Kor. J. Food Hygiene 7 (4), 137-142 (1992)

군산만에서 서식하는 패류의 장염 비브리오에 관한 분포연구

윤한식 · 안병용*
원광보건전문대학, *이리농공전문대학

Study on the Distribution of *Vibrio parahaemolyticus* from Various Kinds of Shells in Kunsan Bay

Han-Sig Yoon and Byung-Yong Ahn*
Wonkwang Public Health Junior College
**IRI Agricultural & Technical Junior College*

ABSTRACT－The distribution of *V. parahaemolyticus* was surveyed from various kinds of shells in Kunsan Bay from July to September, 1987. The morphological, biochemical and serological characteristics of the isolated strains were studied. The results were as follows:

1. 41 strains were isolated from 1,350 specimens of shells (*Crassostrea gigas, Tapes philippinarum, Meretrix lusoria*)
2. The isolation rates of *V. parahaemolyticus* were 3% in July, 3.8% in August, and 2.2% in September, respectively.
3. *V. parahaemolyticus* was more frequently isolated from Kunsan (20 strains) than Bideukgi (12 strains) and Gae Hwa-do (9 strains).
4. *V. parahaemolyticus* was more frequently isolated from *C. gigas* (23 strains) than other shells.
5. Kanagawa hemolysis reactions were all negative.
6. 6 Strains positive to K pooled antiserum included K IV, K V, K VI and K VII type.

Keywords□*V. parahaemolyticus*, Hemolysis reaction, K pooled antiserum

장염비브리오(*Vibrio parahaemolyticus*)는 해산 어패류를 생식함으로써 야기되는 세균성 식중독 원인균으로서[1] 식중독으로 사망한 시체의 부검재료와 정어리에서 그람음성으로 나타내는 단간균을 분리한 것이 최초의 일이었으며, 이 균은 해수와 해저펄 및 각종 해산물에서 서식하는 호염성균으로서 육지로부터 오염이 심한 해역 및 연안의 하천지역에서 많이 분포하며 특히 여름철을 중심으로 증식이 왕성하고 겨울철에는 증식이 저하되어 그 수가 현저히 감소된다. 따라서 증식이 활발한 여름철에 해산 어패류를 생식할 경우 산발적으로 미열과 상복부통을 수반한 식중독증을 야기하는데 특히 이질균과 혼합감염시 이질로 오진되는 경우가 많다.

우리나라에서는 포항근해에서 채집한 해수 및 어패류에서 최초로 본 균을 분류한 이래[2] 남해안 지방의 삼천포, 충주시, 마산시 그리고 진해시에서 수집한 해수 및 해산물과 설사환자의 직장 도찰물에서,[3] 남해안 일대의 해수, 해저펄 및 해산물에서 본 균을 분리 보고한 바 있으며[4] 최근에는 군산만에서 서식하는 패류에서[5] 또한 서해안 일대의 패류와 해저펄에서 본 균의 분포상태를 조사 연구한 바 있다.[6]

본 실험에서는 7월과 8월의 한 여름과 9월의 초가을에 걸쳐 장염비브리오의 역학적 조사를 하기 위하여 전라북도 군산 외항의 내초도와 비득지 그리고 개화도에 서식하는 패류인 굴(*Crassostrea gigas*

Received for publication 11 October, 1992
Reprint request: Dr. H.S. Yoon at the above address

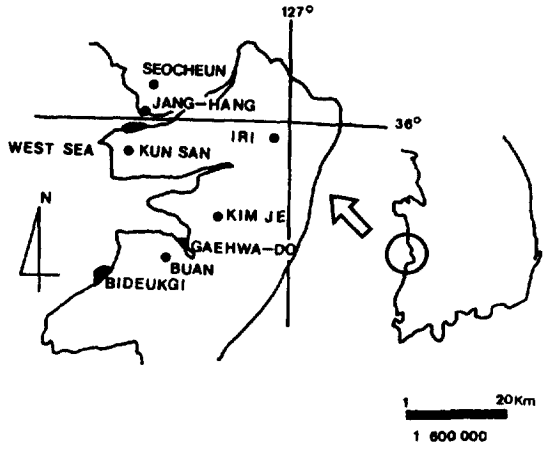

Fig. 1. The site sampled in Kusan Bay.

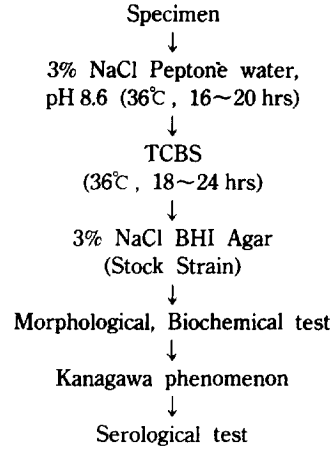

Fig. 2. Overall plan for the isolation and identification of *V. parahaemolyticus*.

Thunberg), 반지락(*Tapes philippinarum Addmset Reeve*) 및 백합(Meretrix lusoria Röding)을 재료로 하여 형태학적, 생화학적 실험을 통해 이들 패류에 대한 장염비브리오의 분포를 조사하였기에 이를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

본 실험에 사용한 시료는 굴, 반지락 및 백합의 각 450 개체씩 총 1,350개체를 1987년 7월, 8월 그리고 9월의 3회의 걸쳐 채취하였으며, 시료의 채취 지점은 군산과 비득지 그리고 개화도로 군산만 일대를 중심으로 하였다(Fig. 1). 또 각 시료의 채취지점에서 해수의 온도를 측정하였다.

시료는 현장에서 3종 패류의 아가미나 소화기를 멸균된 가위와 핀셋으로 세절하여 미리 준비한 3%의 NaCl을 첨가한 peptone 수(pH 8.6)에서 넣어 36℃에서 16~20시간 증균시킨 다음 이것을 TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose) 한천 평판배지에 도말하여 36℃에서 18~24시간 배양시켰다. 그 결과 생성된 농녹색의 독립왜소집락을 선택하여 3%의 NaCl을 첨가한 BHI 한천 배지에 배양이를 보관균주로 하고 형태학적, 생화학적 특성 및 Kanagawa 용혈반응 시험을 실시하였다(Fig. 2).

분리균은 NaCl이 들어 있지않은 배지와 10%의 NaCl을 첨가한 peptone수에서는 생육하지 못하고 6%와 8%의 NaCl을 첨가한 peptone수에서는 생육하며, 그람염색에서는 그람음성의 간균으로 indole 반응과 methyl red 반응은 양성, V-P(Voges-Proskauer) 반응은 음성으로 sucrose 분해 능력이 없을 때 이를 장염비브리오로 추정하여 Table 2에서와 같이 형태학적 및 생화학적 특성을 실험하였다.

생화학적 성태

(1) TCBS 한천 평판배지 : Sucrose를 비분해하는 농녹색의 독립왜소집만을 선택하여 분리하였다.

(2) 호염성 시험 : 0, 6, 8 그리고 10% NaCl을 첨가한 peptone수에서의 생육실험은 먼저 NaCl이 없는 peptone수와 10%의 NaCl을 첨가한 peptone수에서 생육하지 못하고 6%와 8%의 NaCl을 첨가한 peptone수에서는 생육하는 균주만을 분리하였다.

(3) Indole 시험 및 운동성 관찰 : SIM(Sulfide Indole Motility) 반고체 배지에 분리균주를 천자 배양한 후 운동성 여부를 관찰하고, indole 시험은 Kovac 시약을 가하고 흔들어 적색으로 나타나면 양성으로 측정하였다.

(4) MR-VP(Methyl Red, Voges-Proskauer) 시험 : MR시험은 MR-VP배지에 2~3일 배양한 균액에 methyl red 용액 2방울을 적하하여 적색으로 되면 양성으로 판정하였다. VP시험은 MR-VP배지에서 48시간 배양한 배양액 1 ml에 5% α-naphthol의 알콜용액 0.6 ml와 40% KOH 수용액 0.2 ml를 넣고 2~5분간 반응시켜 분홍색이 되면 양성으로 판정하였다.

(5) Oxidase 시험 : 탈 이온수에 1%가 되도록 *p*-

aminodimethylaniline oxalate 용액을 만들고 이를 여과지에 흡수시켜 분리균을 도말한 다음 표면이 분홍색에서 malon색으로 되었다가 최종적으로 흑색으로 변색된 것을 oxidase 양성으로 판정하였다.

(6) Citrate 이용 능력 시험 : Simmon's citrate 배지에 분리균주를 도말한 후 37℃에서 24시간 배양하면 citrate를 이용하여 발육하며, 시험관내에 암모늄을 형성하여 Prussian blue색으로 된 것을 양성으로 판정하였다.

(7) Lactose 이용 능력과 H_2S 및 gas 생성 여부 시험 : KIA(Kliger Iron Agar)반사면 배지에 도말 및 천자 배양한 결과 사면에 알칼리(적색)를, 저변에 산 생성(황색)을 관찰함과 동시에 H_2S와 gas 생성 여부도 주시하였다.

(8) Gelatine 액화 시험 : 0.5%의 gelatine을 첨가한 BHI broth에 분리균주를 접종하고 19~21℃에서 5일간 배양한 후 freezing box에서 30분간 방치한 다음 액화된 것을 양성으로 판정하였다.

(9) Urease 시험 : 여과멸균한 Bacto urea R broth에 분리균을 접종하고 37℃에서 8, 12, 24, 48시간 배양하여 urea를 ammonium carbonate로 가수분해하여 분홍색으로 된 균주를 양성으로 판정하였다.

(10) Decarboxylase 시험 : Moller decarboxylase 시험용 배지에 lysine, arginine 및 ornithine을 각각 1%가 되도록 첨가, 분리균을 접종한 다음 2일간 배양하여 배지의 색이 황색으로 변색된 것을 음성으로, 흔탁된 자색을 나타낸 것을 양성으로 판정하였다.

(11) 각종 당 분해시험 : BCP(Bromcresol purple) 배지에 시험하고자 하는 당류를 각각 1%가 되도록 첨가하여 분리균을 접종배양한 다음 자색에서 황색으로 변색된 것을 양성으로 판정하였다.

Kanagawa 용혈반응 시험방법

사람의 탈 섬유소 적혈구 부유액을 5%가 되도록 첨가한 Wagatsuma 배지에 분리균주를 접종하여 37℃에서 24시간 배양한 후 형성된 집락의 주위가 용혈에 의해 명백한 투명대가 생긴 것을 양성으로, 투명대가 나타나지 않은 것을 음성으로 판정하였다.

K 혈청 응집반응 시험방법

생화학적 동정 결과 *V. parahaemolyticus*로 추정되는 균주에 대해 K 혈청에 대한 응집반응 여부를 Toshiba 제품의 K 혈청을 사용, Krieg와 Holt의 방법[7]에 의하여 초자판법으로 그룹을 확인하였다.

Table 1. The water temperature (℃) at each site sampled from July to September, 1987

Sites \ Month	July	August	September
Kusan	21± 1	23± 1	20± 1
Bideukgi	22± 1	24± 2	21± 2
Gae Hwa-do	22± 0.5	23± 1	20± 0.5

결과 및 고찰

해수 온도는 비브리오균의 발육에 영향을 미치는 중요한 요인이며 각 조사지역의 표층으로부터 1 m 정도의 해수를 월별로 측정한 평균치는 다음과 같다(Table 1).

분리균주의 생화학적 실험 결과

생화학적 실험 결과 분리된 총 41균주는 indol시험, MR시험, oxidase시험, citrate 이용 시험, gelatine 액화 및 lysine과 ornithine 탈 탄산 시험에서는 모두가 양성이고 VP시험, sucrose 이용 시험, H_2S와 gas 생성, urease 시험 및 arginine 탈 수소 시험에서는 모두 음성을 나타냈으며 모든 성상이 Lennette 등의 보고[8]와 유사하게 나타났다(Table 2).

월별 지역별 및 시료별 장염비브리오의 분포

1987년 7월, 8월 그리고 9월의 3개월에 걸쳐 군산, 비득지 및 계화도의 3지점에서 채집한 패류 1,350개체에 대한 장염비브리오의 분포는 다음과 같다(Table 3).

1987년 7월에는 총 450개체 중 14주(3%)가 분리되었으며, 지역별로는 군산에 서식하는 굴에서 4주(8%)가 분리되어 가장 높은 분리 분포를 보였고 계화도의 반지락과 백합에서는 1주도 분리되지 않았다.

8월에는 450개체 중 17주(3.8%)가 분리되었으며, 지역별로는 군산의 굴에서 6주(12%)가 분리되어 가장 높은 분리빈도를 보였다. 9월에는 총 450개체 중 10주(2.2%)의 낮은 분리 빈도를 나타냈으며 군산의 반지락과 비득지와 계화도의 백합에서는 1주도 분리되지 않았다.

Table 2. Morphological and biochemical characteristics resulted from the isolated strains

Properties	Control Strains (1984)	Isolated Strains
Gram strain	−	−
Motility	+	+
Growth in		
0% NaCl	−	−
6% NaCl	+	+
8% NaCl	+	+
10% NaCl	−	−
Indole in SIM	+	+
Methyl red	+	+
Voges-Proskauer	−	−
Sucrose	−	−
Oxidase	+	+
Citrate	+	+
KIA	K/A	K/A
H_2S	−	−
Glucose, gas	−	−
Gelatin	+	+
Urease	−	−
Arginine dehydrolase	−	−
Lysine Decarboxylase	+	+
Ornithine Decarboxylase	+	+
L-Arabinose	+	+
Cellobiose	−	−
Lactose	−	−
Maltose	+	+
D-Mannitol	+	+
Salicin	−	−

Signs: +; 90% or more positive within 1 or 2 days,
−; No reaction (90% or more).

1987년 7월, 8월 그리고 9월에 걸쳐 조사한 총 1,350개체의 패류에 대한 분리빈도는 41주(31%)로 나타났다.

Kanagawa 용혈반응 시험 결과

각 시료에서 분리된 총 41균주에 대한 Kanagawa 용혈반응 시험 결과는 전 균주가 시험 배지에서 용혈현상이 관찰되지 않아 모두 음성으로 판명되었다.

K 혈청 응집반응에 의한 혈별 확인

장염비브리오로 분리된 41균주 중 K 혼합혈청에 대한 응집반응 시험에서 K IV와 VII 인자형이 각각 2주로서 총 6주가 응집이 일어났으며 나머지 35균주에서는 응집이 일어나지 않았다.

본 실험에서 분리된 균은 TCBS 한천 평판배지에서 농녹색의 집락을 형성하고 6%와 8%의, NaCl을 첨가한 peptone수에서 잘 자라는 호염성균으로 indole 시험과 methyl red 시험에서 모두 양성을 나타냈고 VP시험, H_2S와 gas 생성 및 sucrose 시험에서는 모두 음성을 나타내는 모든 성상이 Lennett 등이 보고[8]한 표준균주와 거의 유사하였다.

장염비브리오의 시료별 분포율은 여름철에 해수의 온도가 높은 표층에서 고착생활을 하는 굴에서 56%의 가장 높은 검출율을 보였고 그 다음은 반지락(27%)과 백합(17%)의 순서였다.

지역별로는 군산(49%)이 가장 높은 분리율을 나타낸 바, 이는 Kang의 보고[9]에서 처럼 이 지역은 금강의 하류이고 외항성의 입출항이 잦을 뿐 아니라 도시하수의 유입량이 높기 때문으로 사료된다.

월별 분포율은 7월(34%)과 8월(42%)이 전체의 대부분을 차지한 바, 최근 장염비브리오에 대한 여름철의 분포조사에서 Ju가 보고[4]한 부산의 30.5%, 마산의 30.9%의 분포결과와 또한 Oh가 군산만 일대의 어패류에 대해서 27%의 분포율을 보고[6]한 것과 비교하여 주로 한 여름철에 그 분포율이 높은 것을 알 수 있었고, 해수의 온도가 떨어지는 9월에 접어들면서 감소현상을 나타낸 것은 Lee 등[10]의 결과와 일치하였다.

군산만 일대의 장염비브리오의 총 분리율은 41균주로 3%의 비율을 보였으며 이는 최근 Bae[5]가 7월의 서해안 일대의 패류 및 해저펄에서 분류한 2%의 분리율보다 약간 높게 나타났다. Kanagawa 용혈반응 시험의 결과는 모두가 음성을 나타냈는데 Sakazaki 등[11]이 Kanagawa 반응은 환자로부터 분리된 균주에서는 양성율이 96.5%이나 해산물과 해수로부터 분리된 균주에서는 1%만이 양성율을 나타낸다고 보고한 바에 비하면 자연환경속에서 분리된 *V. parahaemolyticus*의 Kanagawa 반응은 그 양성율이 극히 낮음을 알 수 있었다. K 혈청에 대한 응집반응 시험에서는 K 혼합 혈청의 IV, V, IV 및

Table 3. Status of distribution of *V. parahaemolyticus* from samples at each site samples in Kunsan Bay

Month	Sites	Specimens*	No. of Tested	No. of Positive (%)
July,	Kunsan	C	50	4 (8.0)
		T	50	2 (4.0)
		M	50	1 (2.0)
	Bideukgi	C	50	2 (4.0)
		T	50	2 (4.0)
		M	50	1 (2.0)
	Gae Hwa-do	C	50	2 (4.0)
		T	50	0 (0.0)
		M	50	0 (0.0)
	Sub-total		450	14 (3.0)
August,	Kunsan	C	50	6(12.0)
		T	50	1 (2.0)
		M	50	2 (4.0)
	Bideukgi	C	50	1 (2.0)
		T	50	2 (4.0)
		M	50	1 (2.0)
	Gae Hwa-do	C	50	1 (2.0)
		T	50	2 (4.0)
		M	50	1 (2.0)
	Sub-total		450	17 (3.8)
September,	Kunsan	C	50	3 (6.0)
		T	50	0 (0.0)
		M	50	1 (2.0)
	Bideukgi	C	50	2 (4.0)
		T	50	1 (2.0)
		M	50	0 (200)
	Gae Hwa-do	C	50	2 (4.0)
		T	50	1 (2.0)
		M	50	0 (0.0)
	Sub-total		450	10 (2.2)
	Total		1,350	41 (3.0)

*C: *C. gigas*, T: *philippinarum*, M: *M. lusoria*

VII인 자형에서 응집을 일으켰는데 이는 Oh[6]가 군산만의 어패류에 대한 장염비브리오의 분포에서 확인한 K 혼합혈청의 I, II, VII 및 VIII 인자형과는 다른 양상을 보였다.

국문요약

1987년 7월부터 9월에 걸쳐 군산만에서 서식하는 세 종류의 패류로부터 장염비브리오의 분포를 조사하여 그 분리균주에 대한 형태학적, 생화학적 및 혈청학적 실험으로 얻은 결과는 다음과 같다.

1. 총 1,350 시료의 패류로부터 41균주(3%)의 장염비브리오가 분리되었다.
2. 장염비브리오의 분리율은 각각 7월에 3%, 8월에 3.8% 그리고 9월에 2.2%이었다.
3. 장염비브리오의 비득지(12균주)와 계화도(9균주)보다 군산(20균주)에서 빈도가 높게 분리되었다.
4. 장염비브리오는 다른 패류부터 굴에서 더 높은 빈도로 분리되었다.
5. Kanagawa 용혈반응은 전 균주가 음성이었다.
6. K 다가 항 혈청에 양성을 보인 6균주가 K IV와 VII 인자형이 각각 1주, K V와 VI 인자형이 각각 2주이었다.

참고문헌

1. Fujino, T., Okuno, Y., Nakada, D., Oyanma, A., Fukai, T., Mukai, T. and Ueho, T.: On The Bacteriological Examination of Shirasu-Food Poisoning, *Med. J. Osaka Univ.*, **4**, 299-304 (1953).
2. Chun, D.G., Jeong, J.K., Lee, J.K., Shin, D.H. and Mun, Y.K.: Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* in Korea, *J. Kor. Soc. Microbiol.*, **4**, 105-109 (1967).
3. Lee, C.H., Park, Y.S. and Hwang, K.S.: Halophilic Bacteria Isolated from Southern Distribution of Korea, *The New Med. J.*, **12**, 279-301 (1969).
4. Ju, J.W.: Studies on *V. parahaemolyticus* on the Southern Seas of Korea-On the Isolation of *V. parahaemolyticus* from Sea Water, Sea Mud and Marine Products in Jeju, Keoje, Namhae, Yockji, Busan and Masan, *J. Kor. Soc. Microbiol.*, **18**, 1-7 (1983).
5. Bae, K.U.: Studies on the Distribution of *V. parahaemolyticus* from Various Kinds of Shells and Sea Mud at the Western coast, *Won Kwang Univ. M. S. Paper.*, (1986).
6. Oh, S.H.: Study on Distribution of Pathogenic Vibrio from Kusan Bay's Shell, *Theses Collection of Won Kwang Univ.*, **18**, 71-85 (1984).
7. Krieg, N.R. and Holt, J.G.: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology., **1**, 516-522 (1984).
8. Lennette, E.H., Balow, A., Hausler, W.J. and Jean Shakomy, H.: Manual of Clinical Microbiology, *American Society for Microbiology.*, **4**, 282-290 (1985).
9. Kang, H.H.: Studies on the Distribution of *Vibrio parahaemolyticus* from Various Shell and Sea Mud in Gae Hwa-Do, *Won Kwang Univ. M.S. Paper.*, (1985).
10. Lee, H.T., Lee, C.H. and Kee, R.S.: The Distrubution of Pathogenic Vibrios along the Coastal Districts of Korea, *J. Kor. Soc. Microbiol.*, **5**, 1-2 (1970).
11. Sakazaki, R., Iwanami, S. and Fukumi, H.: Studies on the Enteropathogenic Facultatively Halophilic Bactera. *Vibrio parahaemolyticus*. II. Serological Characteristics, *Jap. J. Med. Sci. Biol.*, **21**, 313-324 (1965).