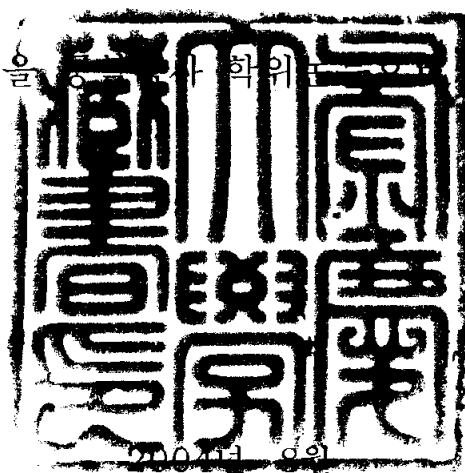


공학박사 학위논문

해양 환경에서 분리된 병원성 비브리오팀의 병독인자 특성

지도교수 장 동 석

이 논문을 공학박사 학위논문으로 제출함.



부경대학교 대학원

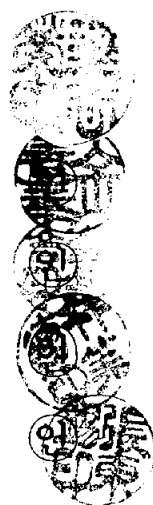
식품공학과

권 칠 성

권철성의 공학박사 학위논문을 인준함.

2004년 8월 31일

주	심	농학박사	양	지	영
부	심	농학박사	김	선	봉
위	원	공학박사	김	지	회
위	원	공학박사	박	미	연
위	원	이학박사	장	동	석



<목 차>

Abstract	1
서론	5
재료 및 방법	10
I. 실험재료	10
1. 배지 및 시약	10
2. 사용균주 및 실험동물	10
3. 독소 유전자 검출을 위한 primer	11
II. 실험 방법	11
1. 균의 분리 및 동정	11
2. 표현형 병독인자 (phenotypic virulence factor)의 검색 및 활성 측정	13
2·1 Hemolysin 활성	13
2·2 Protease 활성	16
2·3 Urease 활성	16
3. 유전형 병독인자 (genotypic virulence factor)의 검색	18
3·1 주형 DNA (template DNA)의 조제	18
3·2 Polymerase chain reaction (PCR)에 의한 유전자의 검출	18
4. Hemolysin 분획물의 제조	20
5. Protease 분획물의 제조	20
6. Urease 분획물의 제조	22

7. Protease가 hemolysin에 미치는 영향 측정	22
8. 양이온이 hemolysin, protease 및 urease에 미치는 영향	22
9. 분리 비브리오균주의 <i>in vivo</i> 병원성 측정	23

결과 및 고찰24

I. 병원성 비브리오균주의 검출	24
II. 분리 비브리오균주의 hemolysin 및 protease 활성 특성	31
1. 분리 균주의 hemolysin 및 protease 생산 양상	31
2. 분리 균주의 protease가 hemolysin에 미치는 영향	37
III. 분리 <i>V. parahaemolyticus</i> 균주의 새로운 병독인자	43
1. Urease 양성 <i>V. parahaemolyticus</i> 의 분리	43
2. <i>V. parahaemolyticus</i> 가 생산하는 urease의 특성	46
IV. 분리 비브리오균주의 병독 유전자 신속검출	51
1. Cholera toxin 유전자의 검출	51
2. Hemolysin 유전자의 검출	54
2·1 <i>V. vulnificus</i> 의 hemolysin 유전자 검출	54
2·2 Urease 양성 <i>V. parahaemolyticus</i> 의 <i>tdh/trh</i> 검출	57
3. 주형 DNA (template DNA)가 PCR 반응에 미치는 영향	58
V. 분리 비브리오균주의 병독에 미치는 양이온의 영향	58
1. Protease의 활성에 미치는 영향	58
2. Hemolysin의 활성에 미치는 영향	62
3. Urease의 활성에 미치는 영향	64

VI. 실험동물에 대한 분리 비브리오팀주의 <i>in vivo</i> 독성 해석	64
1. Hemolysin, protease 및 urease의 치사독성	64
2. <i>In vivo</i> 독성에 미치는 iron-dextran의 영향	67
3. Hemolysin에 의한 피하조직 모세혈관 손상	68
요약	75
감사의 글	79
참고문헌	80

List of Tables

Table 1.	Isolated <i>Vibrio</i> species from seawater of the Gwangan Beach, Busan, Korea, 2001	25
Table 2.	Isolated <i>Vibrio</i> species from seawater of the Gwangan Beach, Busan, Korea, 2002	26
Table 3.	Isolated <i>Vibrio</i> species from seawater of Gwangan Beach, Busan, Korea, 2003	27
Table 4.	Isolation results of <i>Vibrio</i> species from seawater of Gwangan Beach, Busan, Korea	29
Table 5.	Biochemical characteristics of isolated <i>Vibrio</i> species	30
Table 6.	Confirmation results of the pathogenic factors of the <i>Vibrio</i> spp. isolated from seawater of the Gwangan Beach in Korea, 2001	32
Table 7.	Confirmation results of the pathogenic factors of the <i>Vibrio</i> spp. isolated from seawater of the Gwangan Beach in Korea, 2002	34
Table 8.	Confirmation results of the pathogenic factors of the <i>Vibrio</i> spp. isolated from seawater of the Gwangan Beach in Korea, 2003	36
Table 9.	Summary of experimental results of pathogenic <i>Vibrio</i> strains isolated from the Gwangan Beach in Busan	38
Table 10.	Urease-positive <i>V. parahaemolyticus</i> isolated from the Kamak Bay of Yeosu, Korea, in 2002 and 2003	45
Table 11.	Biochemical characteristics of urease-positive <i>V. parahaemolyticus</i> isolated from the	

environments	47
Table 12. Effect of urea concentration on the urease production by the <i>V. parahaemolyticus</i> S25	50
Table 13. Detection results of hemolysis factors of <i>V. vulnificus</i>	56
Table 14. Effect of cations on the protease activity of <i>V. cholerae</i> non-O1	61
Table 15. Effect of cations on the hemolysin activity	63
Table 16. Effect of cations on the urease activity of <i>V. parahaemolyticus</i>	65
Table 17. Comparison of the virulence differences of the isolated vibrios by their pathogenic factors	66
Table 18. Effect of ferrous iron on the virulence of hemolysin	69

List of Figures

Fig. 1. Schematic diagram of pathogenic vibrios	12
Fig. 2. Confirmation of hemolysin, protease and urease	14
Fig. 3. Procedures for hemolysin activity assay	15
Fig. 4. Procedures for protease activity assay	17
Fig. 5. Procedures for urease activity assay	19
Fig. 6. Preparation of crude toxin fraction containing hemolysin, protease or urease produced by the isolated vibrios	21
Fig. 7. Changes of hemolysin and protease activity in the culture supernatant of <i>V. cholerae</i> non-O1 FM62	40
Fig. 8. Changes of hemolysin and protease activity in the culture supernatant of <i>V. cholerae</i> non-O1 FM49	41
Fig. 9. Changes of hemolysin and protease activity in the culture supernatant of <i>V. cholerae</i> non-O1 FM38	42
Fig. 10. Effect of protease on the hemolysin	44
Fig. 11. Changes of urease activity during the growth of the isolated <i>V. parahaemolyticus</i>	48
Fig. 12. Detection of ctx with culture supernatant from different <i>Vibrio</i> species	53
Fig. 13. Detection of hemolysin gene from the isolated <i>V. vulnificus</i>	55
Fig. 14. Detection of hemolysin gene with different concentration of template DNA of <i>V. vulnificus</i> S50	59
Fig. 15. Intestinal view of mice infected with hemolysin- positive <i>V. vulnificus</i> FM29	70

Fig. 16. The photograph (X40) of hypodermic blood capillary of mice injected with urease-positive (A) and protease-positive (B) vibrios	72
Fig. 17. The photograph (X40) of hypodermic blood capillary of mice injected with hemolysin-positive vibrios	73
Fig. 18. Effect of iron-dextran on the virulence of hemolysin.	74

Characteristics of the Virulence Factors of Pathogenic Vibrios Isolated from the Environment

Chil-Seung Kwon

*Department of Food Science and Technology, Graduate School,
Pukyong National University*

Abstract

Pathogenic vibrios were isolated from Gwangan Beach in Busan and Kamak Bay in Yesou located on the southern coast of Korea from June, 2001 to September, 2003. A total of 174 pathogenic *Vibrio* strains were isolated from Gwangan Beach. The isolated vibrios were composed of 7 different species: *V. parahaemolyticus* (64/174), *V. cholerae* non-O1 (35/174), *V. alginolyticus* (31/174), *V. vulnificus* (22/174), *V. fluvialis* (17/174), *V. hollisae* (3/174), and *V. mimicus* (2/174) on order of large magnitude. Among the 174 *Vibrio* isolates, 107 strains (61%) had hemolysin, protease or urease activity. According to the experimental results, the major phenotypic virulence factors were different in the *Vibrio* species, such as protease in *V. parahaemolyticus*, hemolysin in *V. vulnificus*, and both in *V. cholerae* non-O1. However, no urease-positive *Vibrio* strains were isolated in 2001 and 2002, and only one strain (*V.*

parahaemolyticus S25) was isolated in 2003 from the seawater of Gwangsan Beach. From Kamak Bay in 2002 and 2003, a total of 92 *V. parahaemolyticus* strains were isolated. Among them, 12 strains were protease-positive and 5 strains were urease-positive. *V. parahaemolyticus* YKB4 and YKB14 were isolated from seawater, YFB20 from black rockfish (*Sebastes schlegelii*), and YFO 21 and YFO22 from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Therefore, a total of 6 urease-positive *V. parahaemolyticus* strains were isolated from the environments of Busan and Yeosu in 2001 and 2003.

The six urease-positive strains (*V. parahaemolyticus* YKB4, YKB14, S25, YFB20, YFO21, and YFO22) did not show hemolysin and protease activity, but showed the identical biochemical characteristics as a reference strain, *V. parahaemolyticus* KCTC2471 (urease-negative), except in urease production. To examine the presence of *trh*/*tdh* in the 6 urease-positive *V. parahaemolyticus* strains, PCR was conducted with VPD (specific for *tdh* detection) and VPR (specific for *trh* detection) primers. No strains, however, showed the amplified DNA band corresponding to *tdh* or *trh*.

They showed different urease activities in their culture supernatant during the growth phase. The urease activity of S25 increased sharply at the exponential phase, and was highest at the initial stationary phase, it was kept until the late stationary phase. The other 5 strains, except *V. parahaemolyticus* S25, showed urease activities at the mid stationary phase and increased steadily until the late stationary phase, when the urease activity was at its maximum. The addition of urea to the Luria-Bertani broth medium significantly affected the initial production of urease in *V. parahaemolyticus* isolates.

The hemolysin activity in the culture supernatant of *V. cholerae*

non-O1 FM 38, FM49, and FM62 decreased with an increase in protease activity. The crude protease fraction directly affected the activity of the crude hemolysin. We thus concluded that the hemolysin produced by *V. cholerae* non-O1 was digested by its protease.

Hemolysin activities of *V. vulnificus* (FM29) and *V. cholerae* (FM62 and FM49) appeared 2-3 times higher in the presence of ferrous iron (Fe^{2+}) in the reaction mixture, although K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} and Zn^{2+} did not affect the hemolysin activity compared to the control. To study the effect of ferrous iron (Fe^{2+}) *in vivo*, hemolysin-positive strains were injected intraperitoneally into groups of 10 each of ICR mice (7- to 10-week old males) treated with iron-dextran (ferric hydroxide dextran complex). The mortality rate of the iron-dextran treated group was over twice that of the non-treated group. And also, the results of hypodermic injection of hemolysin, protease or urease-positive strains in iron-dextran treated mice showed that ferrous iron (Fe^{2+}) influenced significantly hemorrhagic action by hemolysin in the hypodermic capillary vessel.

From rapid detection of pathogenic vibrios by a polymerase chain reaction (PCR), VF1/VR1 (synthesized primers for *V. vulnificus* hemolysin gene) and VCT1/VCT2 (commercial primer for *V. cholerae* ctx) could detect effectively the hemolysin gene and cholera toxin gene, respectively. The 14 strains of *V. vulnificus* (H6, H19, H34, H40, H41, H42, H60, H64, FM29, FM33, FM35, FM54, S50, and S52) showed an amplified 361 bp band corresponding to hemolysin gene from PCR using VF1/VR1. Among them, *V. vulnificus* S50 and S52 did not show Kanagawa phenomena, a zone of beta-hemolysis around the colony on a tryptic soy agar (5% sheep erythrocytes) plate. Then, any strain of *V. cholerae* non-O1 isolated from the

present study did not show specific DNA bands, while *V. cholera* El Tor and *V. cholerae* O139 showed amplified 307 bp bands corresponding to *ctx* (cholera toxin gene).

In order to compare the degree of virulence of *Vibrio* isolates with various pathogenic factors, hemolysin, protease, or urease-positive strains were injected into groups of 10 each of ICR mice (7- to 10-week-old males). The mortality rates by urease-positive *V. parahaemolyticus* YKB4, YKB14, and S25, were significantly high, at 60–80%. Protease-positive *V. parahaemolyticus* FM39 and FM50 showed a 40% and 60% mortality rate, respectively. However, hemolysin-positive *V. parahaemolyticus* (S34 and S72), had no mortality, like the non-pathogenic *V. parahaemolyticus* KCTC2471, while *V. vulnificus* (FM29) resulted in a 40% mortality rate. Mortality of urease-positive *V. parahaemolyticus* strain in infected mice occurred within 12 hours of infection, and the vibrio strains could be isolated from the viscera of the injected mice.

서 론

비브리오속 (*Vibrio* spp.)의 세균은 담수에서 해수에 이르기까지 다양한 수역에서 분포하여, 현재까지 전 세계적으로 40여종이 알려져 있으며, 최근에 미생물의 분리·동정기술이 발달함에 따라 새로운 종이 계속해서 발견되고 있다. 현재까지 알려져 있는 40여종의 비브리오 중에서 인체의 건강과 밀접한 관계가 있는 것은 *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. cholerae* non-O1, *V. cholerae*, *V. fluvialis*, *V. metschnikovii*, *V. cincinnatiensis*, *V. hollisae*, *V. damsela*, *V. furnissii*, *V. carchariae*, *V. mimicus* 등 12종으로 보고되고 있으며 (Cary et al., 2000), 복어독이나 마비성 패류독을 생산하는 비브리오균도 보고되고 있다 (장 등, 1993).

이러한 비브리오균은 아시아, 유럽, 아프리카, 아메리카 등 극지방을 제외한 전 세계의 연안에 분포하고 있으며, 특히 생선어패류를 즐겨먹는 우리나라에서는 매년 여름철이면 병원성 비브리오 균으로 인하여 시민보건의 크게 위협을 받고 있다 (박 등, 1994). 임해지역의 공업발달과 인구의 도시집중으로 인하여 해수의 유기물질 농도가 증가함에 따라 연안해수에서의 세균증식 조건이 유리해지고 있다.

우리나라에서 가장 문제가 되는 병원성 비브리오균은 *V. parahaemolyticus* (장염비브리오), *V. vulnificus* (패혈증 비브리오), *V. cholerae* (콜레라균) 등이며, 이들 병원성 비브리오균에 의한 감염증, 생리·생태적 특성 및 용혈독소에 관한 연구가 많이 진행되어 왔다 (장과 김, 1977; 김과 장, 1977; 김과 장, 1978; 김 등, 1986; 장 등, 1986; 장, 1998).

1979년 여름철에 전남지역에서 간장질환 환자가 *V. vulnificus*에 감염되어 급성 피부괴저가 동반되어 사망한 예가 있었으며, 당시에는 원인이 규명되지 않아 새로운 괴질이 발생하였다고 사회적으로 크게 문제시된 이래, 1983년 *V. vulnificus*라는 이름으로 분리되었다. 지난 1997년부터 2003년까지 총 297명의 환자가 발생하였고, 그 중 151명이 사망한

것으로 공식 보고되어 치명율은 50.8%로 대단히 높으며, 최근에는 환자수와 사망자가 증가하는 추세이다 (박, 2000; 질병관리본부, 2004). 보건당국에서는 비브리오 패혈증이 높은 치사율을 나타냄으로써 2000년 8월부터 제3군 법정 전염병으로 분류하고 있으며, 매년 연안의 수산물과 해수에 대한 조사를 실시하여 이 환경에서 이균이 검출되면 주의보를 발령하고 있다 (국립보건원 방역과, 2000; Division of Bacterial Respiratory Infection, KNIH, KCDC, 2004).

콜레라균 (*V. cholerae*)은 현재 우리나라 법정전염병 1군에 분류되어 있으며 (국립보건원 방역과, 2000), 장내 감염증을 유발하는 병원성 비브리오균이다 (三好, 1989). 콜레라는 흔히 O1 혈청형의 *V. cholerae*가 원인이 되는 유행성 질환으로, 근년 우리나라에서의 콜레라 발생현황을 보면 1995년 68명, 2001년 162명이라는 비교적 많은 환자가 각각 발생하였고, 1996년, 1997년, 1999년 및 2002년도에도 매년 10명 이하의 환자가 발생한 바 있다 (질병관리본부, 2004). 이와 같이 우리나라에서 근년 대 유행이 아니더라도 해마다 산발적으로 환자가 발생하고 있으며, 이는 국외 여행 자유화와 함께 외국여행지에서 감염된 보건자가 입국하여 발생하는 것으로 추정된다. 실제 보건당국에서는 국제선 기내 화장실에서 콜레라 원인균이 분리되는 사례가 ‘질병관리본부’에서 발간하는 ‘감염병 발생정보’에서 종종 보고되고 있다.

콜레라는 이전부터 세계적인 유행이 몇 차례 기록되어 있으며, 1961년 인도네시아에서 *V. cholerae* O1 biotype El Tor가 원인이 되어 시작된 제 7차 대유행이 아프리카, 동남아시아, 서남아시아 등지에서 진행되고 있다. 이 유행은 1991년부터 1994년에 걸쳐서는 지금까지 콜레라가 발생하지 않았던 중남미 대륙에서도 유행하였다. 그리고 1992년에는 인도 벵갈지역에서는 새로운 혈청형 즉, O139에 의한 콜레라가 발생하여 방글라데시와 인도에서 유행을 일으켰으며, 그 후 거의 동남아시아 전 지역에서 보고되었다. *V. cholerae*는 약 200가지 형태의 O (somatic) 항원이 알려져 있으나 혈청형 O1과 O139만이 콜레라 대유행과 관련이 있는 것으로 보고되어 있다 (Kaper et al., 1995; Reidl and Klose, 2002).

한편, 형태학적 및 생화학적 성상은 *V. cholerae*와 일치하지만 O1 항혈청에 응집하지 않는 균을 *V. cholerae*와 구별하여 *V. cholerae* non-O1 (이전까지는 non-O1이라 하였으나 O139에 의한 콜레라 유행이 알려지면서 현재는 O1 혹은 O139 항혈청에 응집하지 않는 균을 *V. cholerae* non-O1/non-O139로 나타내고 있음) 또는 Non-agglutinable (NAG) *Vibrio*라 칭하는데 (Kaper et al., 1995; Nandi et al., 2000; Stine et al., 2000; Singh et al., 2001; Reidl and Klose, 2002), *V. cholerae* non-O1은 콜레라 유행과는 관련이 없는 것으로 알려져 있어 외국에서는 지금까지 위생적으로 크게 문제가 되지 않는 균으로 생각되어 왔으나 이 균의 병원성에 관한 보고도 일부 있다(Chaudhuri et al., 1992; Pal et al., 1992; Saha et al., 1996; 성, 1997; Barbieri et al., 1999; Nandi et al., 2000).

그리고 *V. parahaemolyticus*는 우리나라에서 전염병으로 지정되어 있는 *V. cholerae* O1과 *V. vulnificus*와는 달리 식중독균으로 분류되고 있다. *V. parahaemolyticus*에 의한 설사증 환자는 산발적이나 지속적으로 보고되고 있고, 우리나라에서는 살모넬라와 포도상구균과 더불어 3대 식중독 원인균의 하나로 알려져 있다(홍과 이, 1990; 윤과 안, 1992; 주 등, 2000; Wong et al., 2000; 김, 2001; 박 등, 2001; 함 등, 2002).

비브리오속에 속하는 세균이 이러한 질병을 유발하는 원인물질로서 hemolysin (Miyamoto et al., 1969; Honda et al., 1985; Ichinose et al., 1987), protease (Kosary and Kreger, 1985), phospholipase (Edward et al., 1984), cytolysin (Gray and Kreger, 1985), siderophore (Simpson and Oliver, 1983; Payne and Finkelstein, 1978), cholerae toxin (Kaper et al., 1979; Iwanaga and Kuyyakanond, 1987; Herrington et al., 1988), urease (Oberhofer and Podgore, 1982; Honda et al., 1992; Kaysner et al., 1994; Suthienkul et al., 1995) 등 다양한 균체의 독소가 관여하는 것으로 알려져 있다. 그 중에서도 병원성 비브리오균의 분리시에 가장 보편적으로 이용되는 대표적인 인자로서는 혈액 한천평판 상에서 혈액을 용해하여 투명한 용혈환을 형성하는 Kanagawa 현상

(Kanagawa phenomenon, KP)의 유무가 기준이 되어왔다 (Joseph et al., 1982; Takeda, 1983). 그러나 최근에는 KP 음성인 *V. parahaemolyticus*가 장염 환자로부터 분리되었으며, 특이하게 이들 균은 urease-positive인 것으로 보고되었다 (Abbott et al., 1989; Eko, 1992; Honda et al., 1992; Huq et al., 1979; Jegathesan and Paramasivam, 1985; Kaysner et al., 1994; Kelly and Stroh, 1989; Lam and Yeo, 1980; Magalhaes et al., 1991, 1992; Oberhofer and Podgore, 1982; Suthienkul et al., 1995; Osawa et al., 1996; Okuda et al., 1997). 한편, 최근에는 *V. cholerae* non-O1중에서도 콜레라독소 유전자를 가지고 있는 경우가 일부 보고되고 있어 식품위생관리상 야기될 수 있는 큰 문제점을 안고 있다 (성, 1997; Park et al., 2003).

지금까지 우리나라 연안에서 병원성 비브리오에 관한 연구로 장과 김 (1977)은 전 연안의 해수와 수산물에서 *V. parahaemolyticus*의 분포와 현청형에 대해서 보고하였고, 김 등(1987)은 *V. vulnificus*의 분포에 대해서 보고하였다. 이러한 연구 결과를 보면 *V. parahaemolyticus*는 여름철에 전 연안의 해수 및 수산물에서 검출되고 있고, *V. vulnificus*도 비록 검출빈도는 *V. parahaemolyticus*보다 낮기는 하지만 여름철에 거의 전 연안에서 검출되며, 특히 서해안의 군산 지역에서 높은 것으로 보고되었다. 성 (1997)은 연안 해수에 대하여 병원성 비브리오를 조사하였으며, *V. cholerae* O1은 검출되지 않았으나 *V. cholerae* non-O1, *V. parahaemolyticus* 및 *V. vulnificus*는 검출되었고, 특히 *V. parahaemolyticus*가 가장 검출율이 높았다고 보고하였다.

이상과 같이, 우리나라 연안에서 병원성 비브리오균 중 *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* 및 *V. cholerae* non-O1의 분포에 대해서는 비교적 많은 연구가 진행되었고, 그 현황도 비교적 잘 알려져 있다. 그러나 병원성 비브리오균 중에는 기존에 알려진 종 외에 새로운 종이 계속적으로 출현하고 있고, 또 종래에는 알려지지 않았던 새로운 변이주가 등장하고 있는 것이 추세이지만 최근 국내에서는 새로운 병원성 비브리오균의 분포나 독소에 관한 연구는 미미한 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 수산물 섭취로 인하여 발생하는 식중독 등의 예방을 위한 자료를 제공하기 위하여, 2001년부터 2003년까지 해안을 따라 횡집이 밀집하여 있어 안전성이 요구되는 부산 광안리 연안해수와 양식장 밀집지역인 전남 여수시 가막만의 해수 및 어류에서 병원성 비브리오균을 분리하여 그들이 생산하는 병독인자를 조사하였다. 특히 분리된 균주를 대상으로 hemolysin, protease 및 urease 생산 pattern을 조사하고, hemolysin과 protease의 상관관계, hemolysin에 대한 양이온의 영향, 병독인자의 신속검출법을 검토하고, 아울러 비병원성 비브리오균으로 분류되던 *V. parahaemolyticus* 중에서 hemolysin과 protease 음성이면서 강력한 병원성을 나타내는 urease 양성 *V. parahaemolyticus*의 생화학적 특성과 실험동물에 대한 치사독성을 시험한 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

I. 실험재료

1. 배지 및 시약

병원성 비브리오균을 분리동정하기 위하여 사용된 배지는 Difco Co. (USA)제품으로, 증균용으로는 펩톤배지 (1% peptone, 0.5% NaCl), 선택배지로는 thiosulfate-citrate-bile-sucrose (TCBS) agar, 배양용 배지로는 heart infusion (HI) broth와 Luria-Bertani broth를 사용하였다.

비브리오균의 hemolysin 생산여부를 확인하기 위하여 tryptic soy agar (TSA, 5% sheep erythrocytes) (Micromedia Co. Korea), protease 생산여부를 확인하기 위해서 skim milk agar (Difco Co. USA), 그리고 urease 생산여부를 확인하기 위해서 urea broth (Difco Co., USA)를 사용하였다.

Iron-dextran (ferric hydroxide dextran complex)을 비롯한 각 양이온 등의 시약은 Sigma Co. (USA)제품을 사용하였으며, polymerase chain reaction (PCR)용 반응 buffer 인 *Perfect Premix*는 Takara Co. (Otsu, Japan)로부터 구입하여 사용하였다.

2. 사용균주 및 실험동물

Urease 음성 표준균주 *V. parahaemolyticus* KCTC2471와 urease 양성 표준균주 *Proteus vulgaris* ATCC6380은 한국생명공학연구원 생물자원센터 (Daejeon, Korea)에서 구입하였으며, cholera toxin 유전자 검출 대조균주로는 부경대학교 식품공학과 식품미생물 연구실에 보존 중인 *V. cholerae* non-O1 El Tor, *V. cholerae* O139균주 및 *V. cholerae* non-O1 CT (Park et al., 2003)를 사용하였다.

In vivo 독성 평가에 사용된 ICR 마우스 (7-10 week-old males)는 동양과학상사 (Busan, Korea)에서 구입하여 사용하였다.

3. 독소 유전자 검출을 위한 primer

*V. vulnificus*의 hemolysin 유전자 검출을 위한 primers는 Yamamoto et al. (1990)의 논문을 토대로 forward primer VF1 (5'-GCC GCA CTT AGA TTG GTC CA-3')와 reverse primer VR1 (5'-TAG CAT CCA AGC TCT TGG CG-3')을 합성 (MicroNet Co., Daejeon, Korea)하여 사용하였으며, *V. parahaemolyticus*의 hemolysin 유전자 *tdh* 검출용 primer인 VPD-1/VPD-2, *trh*를 검출용 primer인 VPR-1/VPR-2 그리고 Cholera toxin 유전자 (*ctx*) 검출용 VCT-1/VCT-2 등은 Takara Co. (Otsu, Japan)로부터 구입하여 사용하였다.

II. 실험방법

1. 균의 분리 및 동정

2001년 6월부터 2003년 9월 까지 3년간 여름철을 중심으로 부산의 광안리 해수와 여수 가막만 해수 및 어류 (넙치 및 조피뿔락) 시료를 채취하고 병원성 비브리오균의 분리·동정을 실시하였다 (Fig. 1) (FDA, 1992; Holt et al., 1994). 채취한 해수는 membrane filter (pore size 0.45 μ m) (Millipore Co., Bedford, MA, USA)로 진공 하에서 여과하여 집균하였다. 한편, 넙치와 조피뿔락 등의 어육 30g을 phosphate buffered saline (PBS) 270 mL로 마쇄하여 fish homogenate를 제조하였다. 여과된 membrane filter 및 fish homogenate를 펩톤배지 (1% peptone, 0.5% NaCl)에 접종하여 37°C에서 하룻밤 증균시킨 다음, 증균액을 선택배지인 TCBS 한천평판에 도말하여 37°C에서 24시간 배양하고, 평판 상에 형성된 녹색과 황색의 독립 콜로니를 선택하여 생화학적 동정을 하였다. 즉 선택된 각 독립 콜로니를 다시 heart infusion (HI) broth (Difco Co., Sparks, MD, USA)에 접종하여 증균시킨 다음, 그 증균액을 0.5 McFarland suspension (bioMérieux Co., Marcy l'Etoile, France)과 동일한 탁도로 조정하여 API 20E 또는 API 20NE

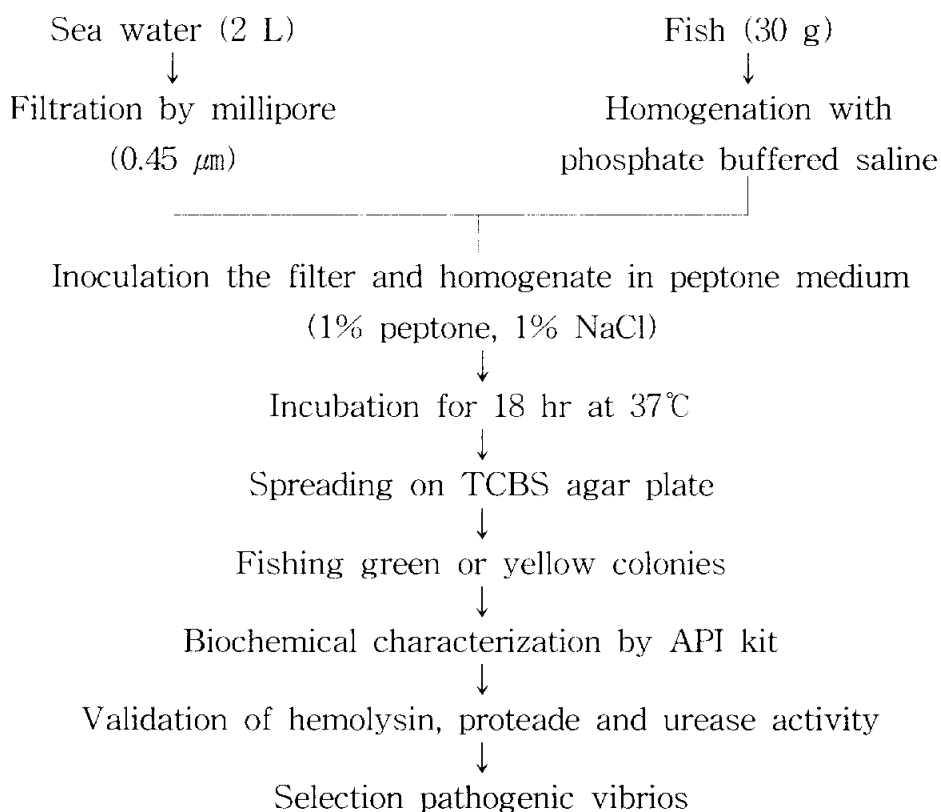


Fig. 1. Schematic diagram of pathogenic vibrios.

(bioMérieux Co., Marcy l'Etoile, France)에 접종하고 37°C에서 18-24 시간 배양한 후 API LAB Plus (bioMérieux Co., Marcy l'Etoile, France) 소프트웨어로 판독하였다.

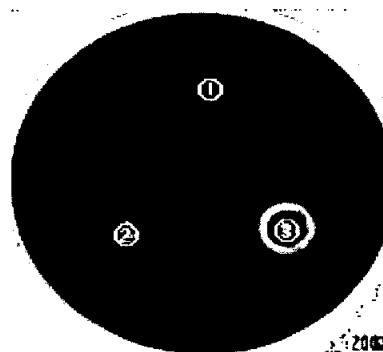
2. 표현형 병독인자 (phenotypic virulence factor)의 검색 및

활성 측정

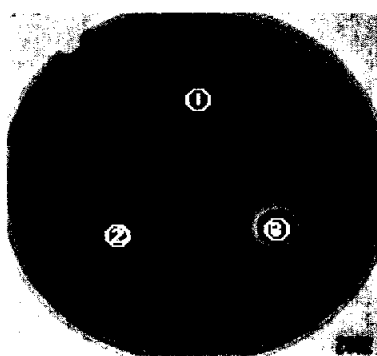
2 · 1 Hemolysin 활성

Hemoysin의 정성시험으로는 TSA (5% sheep erythrocytes)에 paper disk (Toyo, 8 mm, Tokyo, Japan)을 얹고, 균 배양 상청액을 40 μ L 흡입시켜 37°C에서 24시간 반응시킨 후에, disk 주변에 혈액을 분해한 환이 형성된 것을 hemolysin 양성균주로 판명하였다. 투명하고 깨끗한 환을 형성한 것을 β 용혈활성으로, 녹색의 불투명한 환을 형성한 것을 α 용혈활성으로 판별하였다 (Osawa et al, 1996) (Fig. 2의 A).

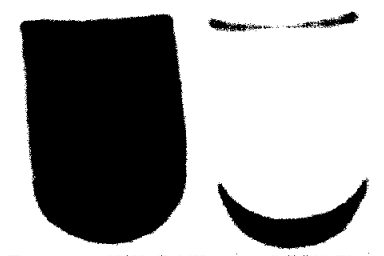
Hemolysin활성의 정량 측정은 Tang et al. (1994)의 방법을 변형하여 사용하였다. 활성측정용액 (10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0), 140 mM NaCl, 0.04% NaN₃, 0.01% bovine serum albumin)으로 단계별로 희석한 조독소액 (hemolysin 분획물)과 1% 면양 적혈구를 동량 혼합하여 37°C에서 1 시간 반응시킨 후 원심분리 (3,000 $\times$ g, 5분)하여, 상청액의 혈색소를 540 nm에서의 흡광도로 측정하고 상대활성을 조사하였다 (Fig. 3). 완전용혈 대조구로서는 1% 면양 적혈구를 증류수와 1:1로 반응시킨 것, 비용혈 대조구로서는 1% 면양 적혈구와 활성측정용액을 1:1로 반응시킨 것을 사용하였다.



(A)



(B)



(C)

Fig. 2. Confirmation of hemolysin, protease and urease.

(A) hemolysin on TSA (5% sheep erythrocytes) plate

(B) Proteolytic activity on a skim milk agar plate

(C) Urease activity in urea broth

1. D.W.; 2. culture supernatant (40 μ L); 3. crude toxin fraction (40 μ L) prepared with 60% ammonium sulfate.

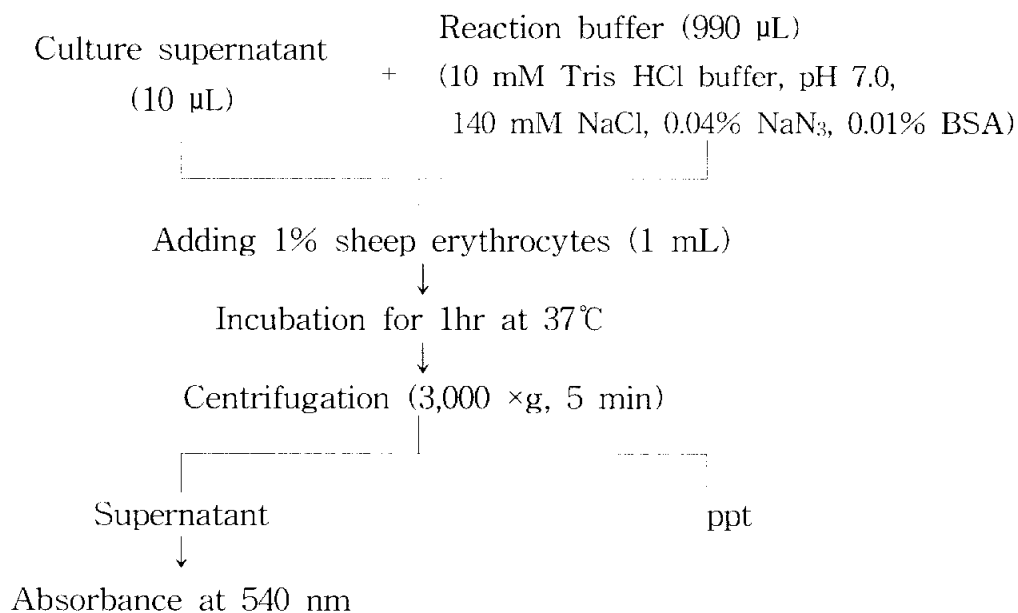


Fig. 3. Procedures for hemolysin activity assay.

2 · 2 Protase 활성

Protease의 정성시험으로는 skim milk 한천 평판 (10% skim milk) 상에 paper disk (Toyo, 8 mm, Tokyo, Japan)을 얹고, 균 배양 상청액을 40 μ L 흡입시켜 37°C에서 24시간 반응시킨 후에, disk 주변에 투명환을 형성하는 것을 protease 양성 균주로 판별하였다 (Norqvist et al., 1990) (Fig. 2의 B).

Protease활성의 정량 측정은 Denkin and Nelson (1999)의 방법에 준하였다. 위 2.1의 활성측정용액 (1 mL)에 azocasein (1%)과 희석한 조독소액 (protease 분획물) 50 μ L를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 10% trichloroacetic acid 1 mL를 첨가하여 반응을 중지시키고 원심분리 (3,500 $\times$ g, 30 min)한 후, 상청액 1.6 mL에 1.8 N NaOH를 0.4 mL 가하여 분리된 peptide의 양을 420 nm에서의 흡광도로 측정하였다 (Fig. 4).

2 · 3 Urease 활성

Urease의 정성시험은 urea broth (Difco Co., Sparks, MD, USA)에 분리 균을 접종하여 37°C에서 24시간 배양 한 후, 배지의 색깔이 분홍 빛으로 변색한 것을 urease 양성균주로 판별하였다. 즉, urease는 urea를 분해하여 암모니아를 생성함으로써 배지의 pH가 상승한 결과, 배지의 색이 황색에서 분홍색으로 변하게 된다 (김, 1999). Urease의 양성 대조구로서는 *Proteus vulgaris* ATCC 6380를, 그리고 음성 대조구로서는 *V. parahaemolyticus* KCTC2471을 사용하여 비교하였다 (Fig. 2의 C).

Urease활성의 정량 측정은 Weatherburn (1967)의 방법에 준하여 실시하였다. 활성측정용액 UHEP buffer (20 mM HEPES buffer, pH 7.5, 30 mM urea, 1 mM EDTA, 1 mM 2-mercaptoethanol) 200 μ L에 배양 상청액 (50 μ L)를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후, 1 mL의 nitroprusside 와 2 mL의 hypochlorite를 동시에 첨가하고 37°C에서 30분간 반응 시켜 625 nm에서의 흡광도를 측정하였다

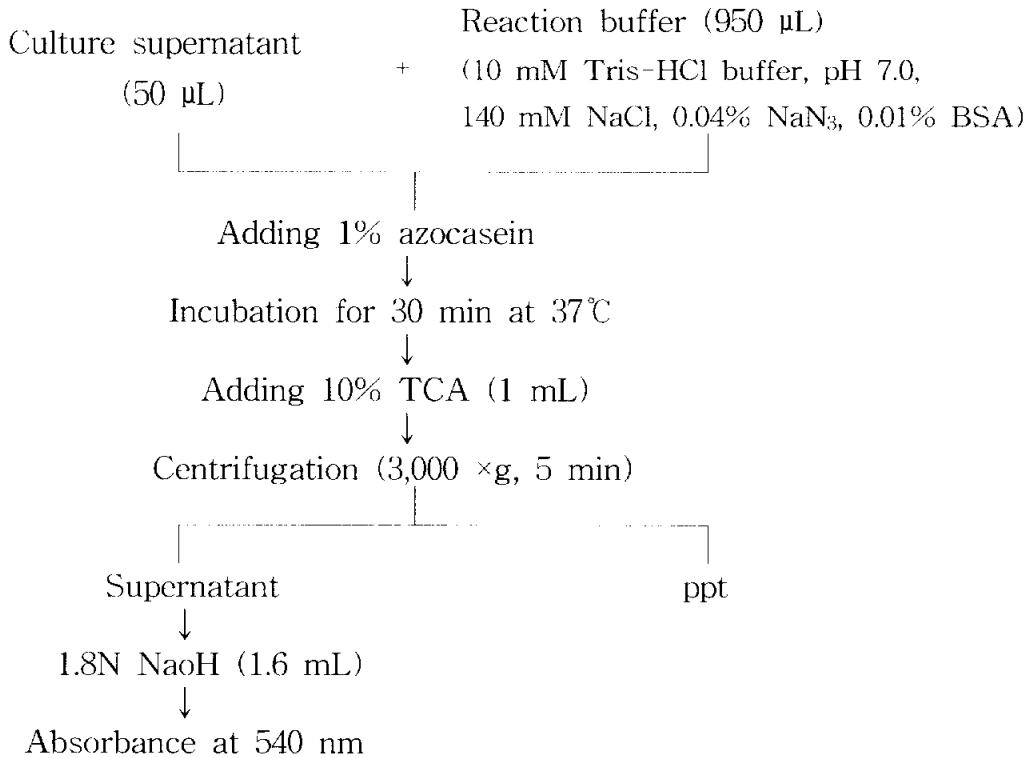


Fig. 4. Procedures for protease activity assay.

(Fig. 5). 한편, urease의 생산에 미치는 urea의 영향을 알아보기 위하여 Lurian-Bertani broth 배지에 urea를 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.5%, 및 1.0% 첨가하여 배양시간별로 배양 상청액 중의 urease 활성을 측정하였다.

3. 유전형 병독인자 (genotypic virulence factor)의 검색

병원성 비브리오균의 병원인자를 생산하는 유전자를 PCR로써 신속하게 검출하는 방법을 Saiki et al. (1988)의 방법에 준하여 모색하였다.

3·1 주형 DNA (template DNA)의 조제

주형 DNA는 균체 내용물을 열수 추출한 상청액을 사용하였다 (조, 1998). 즉, 균을 5 mL의 BHI broth에 접종하고 37℃에서 하룻밤 배양한 후, 9,000 ×g에서 5분간 원심분리 (HERMILE Z 320, National Labnet Co., Woodbridge, NJ, USA)하여 모은 균체를 증류수 1 mL에 현탁시켜 95℃에서 10분간 가열한 다음 다시 원심분리하여, 그 상청액을 주형 DNA로 사용하였다.

3·2 Polymerase chain reaction (PCR)에 의한 유전자의 검출

PCR 반응액은 *Perfect Premix* (Takara, Otsu, Japan) 제품을 사용하였다. *Perfect premix* (×2)에 주형 DNA 4μL와 forward primer와 reverse primer 각각 20 pmol을 첨가하였다. 이 반응용액을 Gene Cyclyer™ (Bio-Rad Co., Richmond, CA, USA)를 사용하여 94℃에서 5분간 1차 변성시킨 후, 94℃에서 1분, 55℃에서 1분,

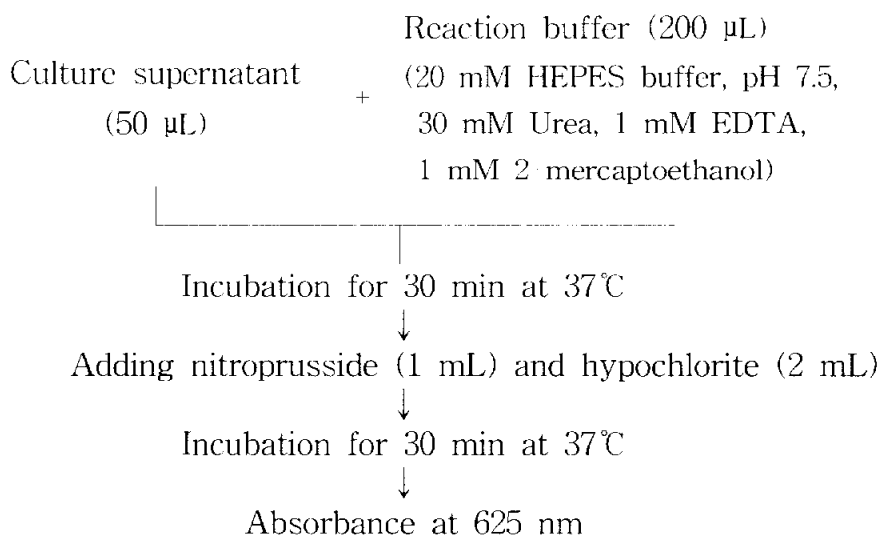


Fig. 5. Procedures for urease activity assay.

72℃에서 1분간 반응을 25회 반응을 진행하였다. 증폭된 각 유전자 의
검출은 agarose gel 전기영동 (40 mA, 100V)한 후, ethidium bromide
로 염색하고 U.V. transilluminator (VILBER LOURMAT TFX-20M,
Sigma Co., St. Louis, MO, USA)로 증폭된 DNA 밴드를 확인한 후,
photo-documentation camera (FB-PDC-34, Fisher Scientific,
Pittsburgh, PA, UK) 또는 EGA system (Panasonic CCTV camera
WV-BL734, Matsushita Co., Yokohama, Japan)을 통하여 GelScpoe1.5
(Imageline Inc. Gardena CA, USA)로 분석하였다.

4. Hemolysin 분획물 제조

Hemolysin 분획물은 Oh et al. (1993)의 방법을 변형하여 제조하였다.
HI broth에 균을 접종하고 37℃에서 교반 배양하면서 시간별로 배양액을
원심분리 (7,000 ×g, 20분)하여 그 상청액의 hemolysin 활성을 측정하여 각
효소의 최대 활성 시기를 조사하였다. 배양 상청액 중의 hemolysin 활성이
최대일 때 배양액 (2 L)을 원심분리하고 (7,000 ×g, 20분), 그 상청액에
60% 포화되도록 ammonium sulfate를 첨가하고 4℃에서 6시간 독소 단백
질을 석출시켜 원심분리 (12,000 ×g, 30분)한 후, 침전물을 10 mM
Tris-HCl buffer (pH 7.0) 30 mL에 녹여 -20℃에 보관하면서 조독소액
(hemolysin 분획물)으로 사용하였다 (Fig. 6).

5. Protease 분획물 제조

Protease 분획물은 위에서 언급한 hemolysin 분획물 제조 방법에 준
하여 제조하였다. 즉, HI broth에 균을 접종하고 37℃에서 교반배양하면서
매 시간마다 배양 상청액 (7,000 ×g, 20분)의 protease 활성을 측정하여 최
대 활성 시기를 조사한 후, protease 활성이 최대일 때의 배양액 (2 L)을
원심분리하고 (7,000 ×g, 20분), 그 상청액을 60%

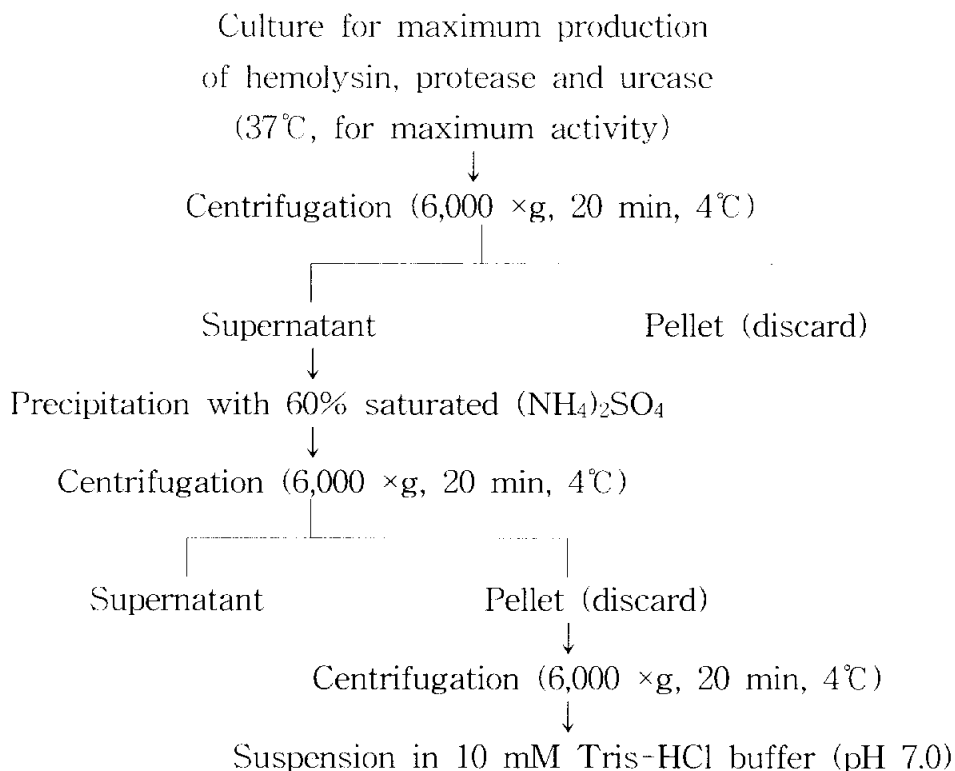


Fig. 6. Preparation of crude toxin fraction containing hemolysin, protease or urease produced by the isolated vibrios.

Bacterial culture was incubated for maximum activity of hemolysin, protease, and urease, respectively.

ammonium sulfate로 포화시켜 4℃에서 6시간 단백질을 석출 후, 원심분리 (12,000 ×g, 30분)한 침전물을 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) 30 mL에 녹여 20℃에 보관하면서 조독소액 (protease 분획물)으로 사용하였다 (Fig. 6) (Secades et al., 1999; Mel et al., 2000).

6. Urease 분획물 제조

Urease 분획물은 위에서 언급한 hemolysin 또는 protease 분획물 제조와 동일한 방법으로 제조하였다. 즉, 배양 상청액 중의 urease 활성이 최대일 때 배양액 (2 L)을 원심분리하고 (7,000 ×g, 20분), 그 상청액을 60% ammonium sulfate로 포화시키고 4℃에서 6시간 단백질을 석출시켜 원심분리 (12,000 ×g, 30분)한 침전물을 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) 30 mL에 녹여 -20℃에 보관하면서 조독소액 (urease 분획물)으로 사용하였다 (Fig. 6).

7. Protease가 hemolysin에 미치는 영향 측정

Hemolysin 분획물과 protease분획물을 이용하여 protease가 hemolysin의 활성화에 미치는 영향을 측정하였다. 즉, hemolysin 분획물 (1 µL)을 protease 분획물 (0 µL, 0.5 µL, 5 µL)과 직접 혼합하여 37℃에서 10분간 반응시킨 다음, 잔존하는 hemolysin의 활성을 상대 활성으로 표시하였다. 상대 활성은 protease 분획물을 첨가하지 않은 실험구의 hemolysin 활성을 100으로 하였을 때의 백분율로 나타내었다.

8. 양이온이 hemolysin, protease 및 urease에 미치는 영향 측정

Zn^{2+} (0.1 mM)을 제외한 K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} 등의 양이온을 활성측정 용액에 2 mM 되도록 첨가하고 각각의 양이온이 hemolysin, protease 및 urease의 활성화에 미치는 영향을 조사하였다. (Shao and Hor, 2000). 상대활성은 양이온 무첨가구의 활성을 100으로 하였을 때의 백분율로 나타내었다.

9. 분리 비브리오균주들의 *in vivo* 병원성 측정

Hemolysin, protease 및 urease 등 각기 다른 병독 인자를 생산하는 분리 비브리오균을 37℃에서 18시간 배양하여 원심분리 (6,000 ×g, 30min) 한 후, phosphate buffered saline (PBS, pH 7.0)으로 2-3회 수세한다. 수세된 균체를 10^7 - 10^8 cfu/mL 되도록 PBS에 현탁시키고, 균 현탁액 0.5 mL를 수컷 ICR 마우스 각 10마리씩에 복강 주사하여 독성을 비교 조사하였다 (Starks et al., 2000). 한편, 철이온이 hemolysin의 *in vivo* 독성에 영향을 미치는지 알아보기 위하여, iron-dextran을 마우스 체중 g 당 200 µg 되도록 복강주사 한 30분 후에, 분리 비브리오균 현탁액 (10^7 - 10^8 cfu/mL of PBS) 0.5 mL를 복강 또는 피하조직에 주사하여 대조구 (iron-dextran 무 처리구)와 비교 조사하였다 (Starks et al., 2000).

결과 및 고찰

I. 병원성 비브리오균의 검출

부산의 광안리 해수욕장 해수에서 2001년부터 2003년까지 3년간에 걸쳐 여름철에 분리한 병원성 비브리오균의 균종별, 월별 분리균주의 수를 연도별로 구분하여 Table 1, Table 2 및 Table 3에 각각 나타내었다.

2001년에는 6종, 68균주의 병원성 비브리오균을 분리하였으며, 균종별로는 *V. alginolyticus* 19균주 (28%), *V. vulnificus* 15균주 (22%), *V. parahaemolyticus* 15균주 (22%), *V. cholerae* non-O1 11균주 (16%), *V. fluvialis* 7균주 (11%), 그리고 *V. hollisae* 1균주 (1%)이었다 (Table 1). *V. alginolyticus*는 6월과 7월에 빈번하게 분리되었고, *V. vulnificus*와 *V. parahaemolyticus*는 6월부터 10월까지 지속적으로 분리되는 경향을 나타내었다. 특히, 우리나라에서는 드물게 검출된다고 보고되고 있는 *V. cholerae* non-O1도 11균주 (16%)가 분리되었다.

2002년 여름철에는 모두 7종, 54균주를 분리하였으며, 균종별로는 *V. parahaemolyticus* 25균주 (46%), *V. cholerae* non-O1 12균주 (22%), *V. alginolyticus* 9균주 (17%), *V. vulnificus* 4균주 (7%), *V. hollisae* 2균주 (4%), *V. fluvialis* 1균주 (2%), *V. mimicus* 1균주 (2%)이었다 (Table 2). 2001년도와 비교하여 새로운 종인 *V. mimicus* 한 균주가 새롭게 분리되었고 *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* 및 *V. fluvialis*는 2001년에 비하여 상대적으로 낮은 검출율을 나타내었다. *V. parahaemolyticus*는 2001년도와 마찬가지로 5월부터 10월까지 지속적으로 분리되었고 가장 높은 검출율을 나타내었으며, *V. cholerae* non-O1도 총 12균주가 분리되어 2001년도와 유사한 검출율을 나타내었다.

2003년의 경우에는 총 6종 52균주를 분리하였으며, *V. parahaemolyticus* 24균주 (46%), *V. cholerae* non-O1 12균주 (23%),

Table 1. Isolated *Vibrio* species from seawater of the Gwangan Beach, Busan, Korea, 2001

Strains	Isolated month					Number of isolated <i>Vibrio</i> spp. (%)
	Jun.	Jul.	Aug.	Sept.	Oct.	
<i>V. alginolyticus</i>	7	8	3	1	ND	19 (28)
<i>V. vulnificus</i>	3	4	3	4	2	15 (22)
<i>V. parahaemolyticus</i>	1	2	3	5	4	15 (22)
<i>V. cholerae</i> non-O1	ND	ND	4	5	2	11 (16)
<i>V. fluvialis</i>	ND	ND	2	2	3	7 (11)
<i>V. holllisae</i>	ND	ND	1	ND	ND	1 (1)
Total	11	14	15	17	11	68 (100)

ND, not detected.

Table 2. Isolated *Vibrio* species from seawater of the Gwangan Beach, Busan, Korea, 2002

Strains	Isolated months						Number of isolated <i>Vibrio</i> spp. (%)
	May	Jun.	Jul.	Aug.	Sept.	Oct.	
<i>V. parahaemolyticus</i>	2	8	1	1	9	4	25 (46)
<i>V. cholerae</i> non-O1	ND	1	3	5	3	ND	12 (22)
<i>V. alginolyticus</i>	1	1	4	1	2	ND	9 (17)
<i>V. vulnificus</i>	ND	ND	ND	3	ND	1	4 (7)
<i>V. hollisae</i>	ND	1	1	ND	ND	ND	2 (4)
<i>V. fluvialis</i>	ND	ND	1	ND	ND	ND	1 (2)
<i>V. mimicus</i>	1	ND	ND	ND	ND	ND	1 (2)
Total	4	11	10	10	14	5	54 (100)

ND, not detected.

Table 3. Isolated *Vibrio* species from seawater of Gwangsan Beach, Busan, Korea, 2003

Strains	Isolated months					Number of isolated <i>Vibrio</i> spp. (%)
	May	Jun.	Jul.	Aug.	Sept.	
<i>V. parahaemolyticus</i>	8	4	2	4	6	24 (46)
<i>V. cholerae</i> non-O1	2	ND	5	2	3	12 (23)
<i>V. fluvialis</i>	ND	2	1	3	3	9 (17)
<i>V. alginolyticus</i>	1	1	ND	1	ND	3 (6)
<i>V. vulnificus</i>	ND	ND	ND	3	ND	3 (6)
<i>V. mimicus</i>	ND	ND	ND	ND	1	1 (2)
Total	11	7	8	13	13	52 (100)

ND, not detected.

V. fluvialis 9균주 (17%), *V. vulnificus* 3균주 (6%), *V. alginolyticus* 3균주 (6%), *V. mimicus* 1균주 (2%)이었다 (Table 3). 전체적인 분리양상은 2001년과는 상이하였으나, 2002년도의 분리양상과 유사한 경향을 나타내었다. 즉, 2002년의 경우 *V. parahaemolyticus*가 46% (25/54)로 가장 높은 검출율을 나타내었고 *V. cholerae* non-O1이 22% (12/54) 이었는데, 2003년도에도 *V. parahaemolyticus*의 검출율이 46% (24/52)로 가장 높았으며 *V. cholerae* non-O1이 23% (12/52)로 2002년도와 유사한 검출율을 나타내었다. 그러나 *V. alginolyticus*의 검출율은 6%로 2001년의 28%, 2002년의 17%에 비하여 매우 낮게 나타났으며, 반대로 2001년과 2002년에는 각각 1균주씩 밖에 검출되지 않았던 *V. fluvialis*가 2003년에는 17% (9/52)의 높은 검출율을 나타내었다.

이상에서, 2001년부터 2003년까지 3년간 부산 광안리 해수에서의 병원성 비브리오 분리결과를 종합하여 Table 4에 나타내었다. 3년간 분리된 병원성 비브리오는 총 7종의 174균주였으며, 균종별 점유율을 보면 *V. parahaemolyticus* 37% (64/174), *V. cholerae* non-O1 20% (35/174), *V. alginolyticus* 18% (31/174), *V. vulnificus* 13% (22/174), *V. fluvialis* 9.8% (17/174), *V. hollisae* 1.7% (3/174), *V. mimicus* 1.1% (2/174)의 순이었다. 특히, 최근 우리나라에서 주목을 받고 있는 *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* non-O1 및 *V. vulnificus*의 월별 검출율을 보면 *V. parahaemolyticus*와 *V. cholerae* non-O1은 연도에 따라 차이는 있으나, 5월-10월에 걸쳐 지속적으로 검출되었다. 그러나 *V. vulnificus*의 경우, 2001년도에는 6월-10월에 계속 검출되었으나 2002 및 2003년도에는 8월에 만 검출되어 연도에 따른 차이가 특히 심하였다. 분리된 병원성 비브리오 균들의 생화학적 성질은 표준균주와 동일하였다 (Table 5).

우리나라 연안의 병원성 비브리오의 분포에 대해서는 다수 보고된 바 있다. 백 등 (1996)은 전북 해안의 해수 및 어류에서 총 224균주의 병원성 비브리오균을 분리하였으며, 이 중 *V. parahaemolyticus*가 138

Table 4. Isolation results of *Vibrio* species from seawater of the Gwangsan Beach, Busan, Korea

Strains	Year			Number of isolated strains (%)
	2001	2002	2003	
<i>V. parahaemolyticus</i>	15	25	24	64 (37)
<i>V. cholerae</i> non-O1	11	12	12	35 (20)
<i>V. alginolyticus</i>	19	9	3	31 (18)
<i>V. vulnificus</i>	15	4	3	22 (13)
<i>V. fluvialis</i>	7	1	9	17 (9.8)
<i>V. hollisae</i>	1	2	ND	3 (1.7)
<i>V. mimicus</i>	ND	1	1	2 (1.1)
Number of isolated strains	68	54	52	174

ND : not detected.

Table 5. Biochemical characteristics of identified *Vibrio* species

Tests*	Strains						
	<i>V.parahaemolyticus</i>	<i>V.cholerae non-O1</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. hollisae</i>	<i>V. mimicus</i>
β-galactosidase	-	+	-	+	+	-	+
Arginine dihydrolase	-	-	-	-	+	-	-
Lysine decarboxylase	+	+	+	+	-	-	+
Ornithine decarboxylase	+	+	+	+	-	-	+
Cytochrome-oxidase	+	+	+	+	+	+	+
Gelatinase	+	+	+	+	+	-	+
Urease	-	-	-	-	-	-	-
Tryptophane deaminase	-	-	-	-	-	-	-
Citrate utilization	-	+	+	-	-	-	+
Indole production	+	+	+	+	+	+	+
Acetoin production	-	+	-	-	-	-	-
H ₂ S production	-	-	-	-	-	-	-
Glucose hydrolysis	+	+	+	+	+	-	+
Mannitol hydrolysis	+	+	+	+	+	-	+
Inositol hydrolysis	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol hydrolysis	-	-	-	-	-	-	-
Rhamnose hydrolysis	-	-	-	-	-	-	-
Sucrose hydrolysis	-	+	+	-	+	-	-
Melibiose hydrolysis	-	-	-	-	-	-	-
Amygdalin hydrolysis	-	-	-	+	-	-	-
Arabinose hydrolysis	+	-	-	-	+	-	-

*, Tests were performed by API 20E system. +, positive reaction; -, negative reaction.

균주로 가장 많이 검출되었고, 그 외 *V. alginolyticus*와 *V. vulnificus*의 순으로 검출되었다고 보고하였는데 본 연구의 결과와 일치한다. 그러나 백 등 (1996)은 *V. cholerae* non-O1의 검출율이 1.3% (3/224)에 불과하였다고 보고하였으나, 본 연구에서는 분리된 총 174균 주 중 35균주로 20%의 검출율을 나타내어 큰 차이를 보였다. 한편, 성 (2003)은 1996년 여름철 한국 연안에 대한 *V. cholerae* non-O1 분포조사에서 평균 검출율이 10% (21/206)였는데, 지역에 따라 차이가 있어 군산에서 16%, 통영에서 6%, 포항에서 10%, 부산에서 8%의 검출율을 나타내었다고 보고하였다. 본 연구에서 부산 광안리해수로부터 *V. cholerae* non-O1의 검출율은 20%로서 성 (2003)의 결과보다 2.5배나 높은 검출율을 나타내고 있다. 이상, 백 등 (1996), 성 (2003) 및 본 연구의 결과로부터 볼 때, 한국 연안에서 *V. cholerae* non-O1의 검출율이 증가하고 있다는 사실과, 지역에 따라 큰 차이가 있다는 사실을 알 수 있었다.

II. 분리 비브리오균주의 hemolysin 및 protease 활성 특성

1. 분리 균주의 hemolysin 및 protease 생산 양상

2001년부터 2003년까지 3년간에 걸쳐 부산시 광안리 해수에서 분리한 병원성 비브리오균의 균주별 hemolysin, protease 및 urease 활성 측정 결과를 연도별로 구분하여 Table 6, Table 7 및 Table 8에 각각 나타내었다.

2001년도에 분리된 68균주 중 46균주 (*V. alginolyticus* 2균주, *V. vulnificus* 12균주, *V. parahaemolyticus* 14균주, *V. cholerae* non-O1 11균주 및 *V. fluvialis* 7균주)가 (Table. 6), 2002년도에 분리된 54균주 중 39균주 (*V. alginolyticus* 5균주, *V. vulnificus* 4균주, *V. parahaemolyticus* 14균주, *V. cholerae* non-O1 12균주, *V. fluvialis* 1균주, *V. mimicus* 1균주, 및 *V. hollisae* 2균주)가 (Table 7), 2003년도에 분리된 52균주 중 22균주 (*V. alginolyticus* 1균주, *V. parahaemolyticus* 6균주, *V. cholerae* non-O1 10균주 및 *V. mimicus* 5균주)가 각각 hemolysin 및 protease 활성

Table 6. Confirmation results of the pathogenic factors of the *Vibrio* spp. isolated from seawater of the Gwangan Beach in Korea, 2001

Strains (a/b) ¹⁾		Hemolysin		Protease activity	Urease activity
		On sheep blood agar plates	Activity assay (%) ²⁾		
<i>V. alginolyticus</i> (2/19)	Code No.				
	H 5	α	<3.0	+	-
	H 14	-	79	-	-
<i>V. vulnificus</i> (12/15)	H 6	-	85	+	-
	H 12	α	77	-	-
	H 13	α	<3.0	-	-
	H 19	α	79	-	-
	H 20	α	39	-	-
	II 34	α	80	-	-
	H 40	α	95	-	-
	H 41	α	100	-	-
	II 42	α	63	-	-
	II 45	α	<3.0	-	-
	H 60	α	65	-	-
	H 64	-	57	-	-
<i>V. parahaemolyticus</i> (14/15)	H 1	-	<3.0	+	-
	H 23	-	<3.0	+	-
	II 26	-	<3.0	+	-
	H 27	α	<3.0	-	-
	H 39	-	<3.0	+	-
	II 43	-	<3.0	+	-
	H 47	-	<3.0	+	-
	H 50	-	<3.0	+	-
	II 51	-	<3.0	+	-
	H 56	-	<3.0	+	-
	II 63	-	<3.0	+	-
	H 65	-	<3.0	+	-
	II 67	-	<3.0	+	-
	H 68	α	<3.0	+	-

Table 6. (continued)

Strains (a/b) ¹⁾	Code No.	Hemolysin activity		Protease activity	Urease activity
		On sheep blood agar plates	Culture supernatant (%) ²⁾		
<i>V. cholerae</i> non-O1 (11/11)	H 31	β	50	+	-
	H 32	β	<3.0	+	-
	H 37	β	97	+	-
	H 38	β	71	+	-
	H 48	β	96	+	-
	H 49	β	96	+	-
	H 52	β	65	+	-
	H 53	β	82	+	-
	H 57	β	70	+	-
	H 61	β	<3.0	+	-
	H 62	β	<3.0	+	-
	H 28	α	<3.0	+	-
<i>V. fluvialis</i> (7/7)	H 35	α	<3.0	-	-
	H 54	α	<3.0	+	-
	H 55	α	<3.0	+	-
	H 58	α	<3.0	+	-
	H 59	α	<3.0	+	-
	H 66	α	<3.0	+	-

1), number of pathogenic strains (a) and isolated strains (b),

2), Relative hemolysin activity is the percentages of hemolysis by cultural supernatant (10 μ L) to perfect hemolysis

α, α type hemolysis; β, β type hemolysis; +, detected, -, not detected.

Table 7. Confirmation results of the pathogenic factors of the *Vibrio* spp. isolated from seawater of the Gwangan Beach in Korea, 2002

Strains (a/b) ¹⁾	Code No.	Hemolysin activity		Protease activity	Urease activity
		On sheep blood agar plates	Culture supernatant (%) ²⁾		
<i>V. alginolyticus</i> (5/9)	FM 13	α	<3.0	-	-
	FM 16	α	<3.0	-	-
	FM 17	α	<3.0	-	-
	FM 18	α	<3.0	-	-
	FM 19	α	<3.0	-	-
<i>V. vulnificus</i> (4/4)	FM 29	α	91	-	-
	FM 33	α	12	-	-
	FM 35	α	100	-	-
	FM 54	α	95	-	-
	FM 9	-	<3.0	+	-
<i>V. parahaemolyticus</i> (14/25)	FM 10	-	<3.0	+	-
	FM 11	-	<3.0	+	-
	FM 36	-	<3.0	+	-
	FM 37	-	<3.0	+	-
	FM 39	-	<3.0	+	-
	FM 40	-	<3.0	+	-
	FM 45	-	13	+	-
	FM 46	-	<3.0	+	-
	FM 47	-	7	+	-
	FM 48	-	10	+	-
	FM 50	-	<3.0	+	-
	FM 51	-	<3.0	+	-
	FM 52	-	<3.0	+	-

Table 7. (continued)

Strains (a/b) ¹⁾	Code No.	Hemolysin activity		Protease activity	Urease activity
		On sheep blood agar plates	Culture supernatant (%) ²⁾		
<i>V. cholerae</i> non-O1 (12/12)	FM 14	β	<3.0	+	-
	FM 23	β	<3.0	-	-
	FM 24	β	<3.0	+	-
	FM 25	β	<3.0	+	-
	FM 26	β	<3.0	-	-
	FM 27	β	<3.0	-	-
	FM 28	β	<3.0	+	-
	FM 30	β	<3.0	+	-
	FM 32	β	<3.0	+	-
	FM 42	β	100	+	-
	FM 43	β	<3.0	+	-
	FM 44	β	<3.0	+	-
<i>V. fluvialis</i> (1/1)	FM 21	α	<3.0	+	-
<i>V. mimicus</i> (1/1)	FM 4	β	<3.0	+	-
<i>V. hollisae</i> (2/2)	FM 15	β	<3.0	-	-
	FM 22	β	<3.0	-	-

1), numbers of pathogenic strains (a) and isolated strains (b),

2), Relative hemolysin activity is the percentages of hemolysis by cultural supernatant (10 μ l.) to perfect hemolysis

α, α type hemolysis; β, β type hemolysis; +, detected, -, not detected.

Table 8. Confirmation results of the pathogenic factors of the *Vibrio* spp. isolated from seawater of the Gwangsan Beach in Korea, 2003

Strains (a/b) ¹⁾	Code No.	Hemolysin activity		Protease activity	Urease activity
		On sheep blood agar plates	Culture supernatant (%) ²⁾		
<i>V. alginolyticus</i> (1/3)	S5	-	<3	-	-
	S27	-	<3	-	-
	S42	-	23	-	-
<i>V. vulnificus</i> (0/3)	S49	-	<3	-	-
	S50	-	<3	-	-
	S52	-	<3	-	-
<i>V. parahaemolyticus</i> (6/24)	S8	-	<3	+	-
	S9	-	<3	+	-
	S19	-	<3	+	-
	S25	-	<3	-	+
	S34	β	<3	-	-
<i>V. cholerae</i> non-O1 (10/12)	S72	β	<3	-	-
	S7	β	<3	+	-
	S10	β	<3	+	-
	S31	β	12	+	-
	S35	β	<3	+	-
	S37	β	<3	+	-
	S38	-	<3	+	-
	S39	β	32	+	-
	S48	-	<3	+	-
	S68	-	<3	+	-
<i>Vibrio fluvialis</i> (5/9)	S70	-	<3	+	-
	S28	α	<3	+	-
	S32	α	<3	+	-
	S45	α	<3	-	-
	S51	α	<3	-	-
<i>Vibrio mimicus</i> (0/1)	S75	α	<3	-	-
	S66	-	<3	-	-

1), numbers of pathogenic strains (a) and isolated strains (b); 2), Relative hemolysin activity is the percentages of hemolysis by cultural supernatant (10μL) to perfect hemolysis; α, α type hemolysis; β, β type hemolysis; +, detected, -, not detected.

을 나타내었다 (Table 8). 특이한 점은, 광안리 해수에서 2001년과 2002년에 urease 활성을 가진 *V. parahaemolyticus*가 전혀 검출되지 않았으나, 2003년에는 한 균주 (*V. parahaemolyticus* S25)가 분리되었다.

이상, 부산 광안리 해수에서 분리된 총 174균주들의 표현형 병독인자를 조사한 결과를 Table 9에 나타내었다. 분리된 174균주 중에서 hemolysin, protease 및 urease 중 1개 이상의 병독 인자를 나타내는 균주의 비율은 61% (107/174)로 높았으며, 균종별로 나타내는 병독인자의 양상이 차이가 있었다.

즉, *V. parahaemolyticus*는 분리된 64균주 중 29균주 (45%)가 protease 양성이었고, *V. cholerae* non-O1은 분리된 35균주 중 26균주 (74%)가 hemolysin 양성인 동시에 protease 양성이었으며, *V. vulnificus*는 분리된 22균주 중 15균주 (68%)가 hemolysin 양성, 그리고 *V. fluvialis*는 분리된 22균주 중 9균주가 hemolysin 양성인 동시에 protease 양성을 나타내었다. 그러나 *V. alginolyticus*는 31균주가 분리되어 전체 분리비율로는 3위를 차지하였으나, 분리된 31균주 중 병독인자를 나타내는 것은 8균주 (26%)로 비교적 적은 편이었고, 이 중 7균주가 hemolysin 양성균주였다.

2. 분리 균주의 protease가 hemolysin에 미치는 영향

분리된 병원성 비브리오균들의 표현형 병독인자 (phenotypic virulence factor)인 hemolysin의 혈액 한천평판 상의 결과와 18시간 배양한 배양 상청액 중의 hemolysin 활성이 일치하지 않는 경우가 다수 발견되었다 (Table 6, Table 7 및 Table 8). 즉, 다수의 분리균이 혈액 한천 평판 상에서는 α 또는 β 용혈현상을 나타내었으나, 18시간 배양한 상청액 중에는 hemolysin 활성이 없는 균주가 발견되었는데, 이 균주들은 모두 skim milk 한천 평판상에서 protease 활성을 나

Table 9. Summary of experimental results of pathogenic *Vibrio* strains isolated from the Gwangan Beach in Busan

Strains	No. of total isolates	No. of virulent strains	Virulence factors			
			Hemolysin	Protease	Hemolysin +Protease	Urease
<i>V. parahaemolyticus</i>	64	34	3	29	1	1
<i>V. cholerae</i> non-O1	35	33	3	4	26	–
<i>V. alginolyticus</i>	31	8	7	–	1	–
<i>V. vulnificus</i>	22	16	15	–	1	–
<i>V. fluvialis</i>	17	13	4	–	9	–
<i>V. hollise</i>	3	2	2	–	–	–
<i>V. mimicus</i>	2	1	–	–	1	–
Total	174	107	34	33	39	1

타내는 균주들이었다.

따라서 hemolysin과 protease를 모두 생산하는 *V. cholerae* non-O1 FM38, FM49 및 FM62균주를 사용하여 hemolysin과 protease의 상관관계를 조사하였다. *V. cholerae* non-O1 FM62균주는 혈액 한천 평판 상에서는 β 용혈환을 형성하였지만 배양 상청액 중에는 hemolysin 활성을 나타내지 않는 균주였으며, *V. cholerae* non-O1 FM49와 FM38균주는 혈액 한천 평판상의 hemolysin 활성과 배양 상청액 중의 hemolysin 활성이 일치하는 균주였다 (Table 6). 이들 균주를 HI broth에 배양하면서, 배양 시간별로 배양 상청액 중의 hemolysin 활성과 protease 활성의 변화를 동시에 조사한 결과를 Fig. 7, Fig. 8 및 Fig. 9에 나타내었다.

V. cholerae non-O1 FM62균주는 대수증식기 중기에 hemolysin 활성이 급격히 증가하여 대수증식기 말기에 최대 활성을 나타내었다. 그러나 protease 활성은 대수증식기 중기에는 나타나지 않았으며 대수증식기 말기에 나타나기 시작하면서 배양 상청액 중의 hemolysin 활성은 급격히 감소하였다. 그리고 protease의 활성이 최대를 나타내는 정지기 중기에는 hemolysin 활성은 완전히 소실되었다 (Fig. 7). 즉, hemolysin 활성은 protease가 생산되면서 그 활성이 급격히 감소하였는데, 이는 protease가 단백독소인 hemolysin을 분해하였기 때문인 것으로 생각할 수 있다.

V. cholerae non-O1 FM62균주와는 달리 *V. cholerae* non-O1 FM49균주는 대수증식기 초기부터 나타난 hemolysin 활성이 정지기 초기까지 지속적으로 유지되어 다른 경향을 나타내었다. 그러나 protease 활성이 대수증식기 말기부터 서서히 나타나기 시작하자 hemolysin 활성은 급격히 저하하여 protease의 활성이 최대인 정지기 말에는 hemolysin 활성이 완전히 소실되었다 (Fig. 8).

한편, *V. cholerae* non-O1 FM38균주는 대수증식기 말기에 hemolysin의 활성이 최대를 나타내었고 안정기 말기까지 30시간 정도 지속적으로 유지되는 양상을 나타내었다. 반대로 protease 활성은 대단히 늦게

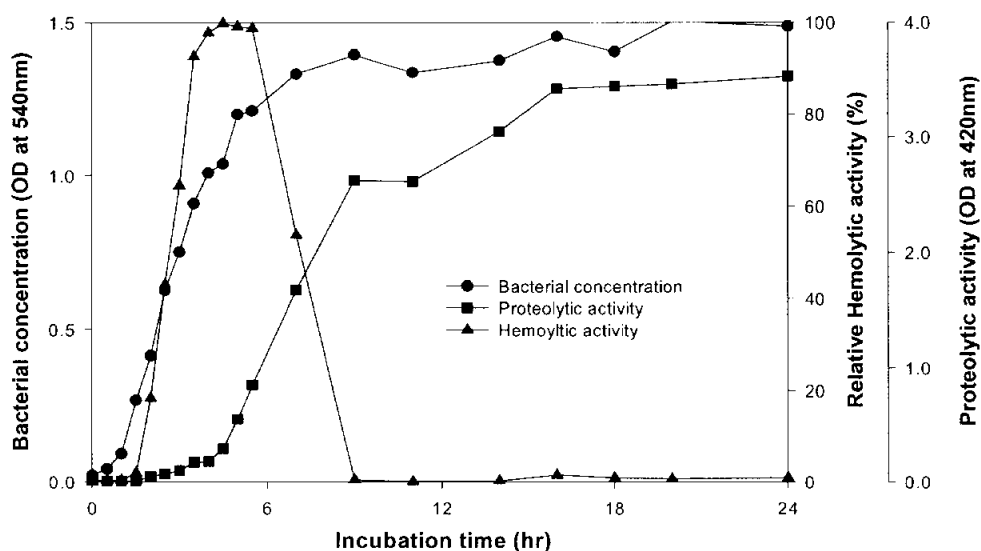


Fig. 7. Changes of hemolysin and protease activity in the culture supernatant of *V. cholerae* non-O1 FM62.

This data were derived from Kim(2003).

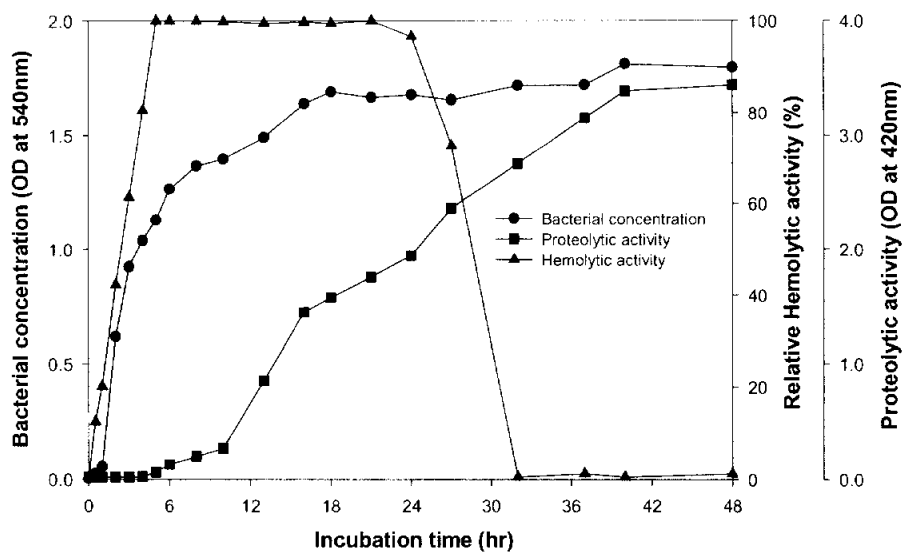


Fig. 8. Changes of hemolysin and protease activity in the culture supernatant of *V. cholerae* non-O1 FM49.

This data were derived from Kim(2003).

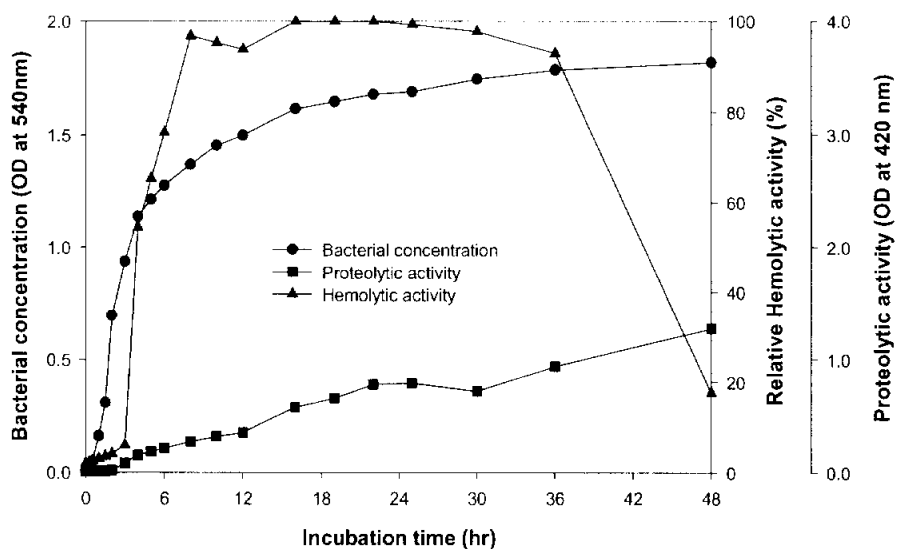


Fig. 9. Changes of hemolysin and protease activity in the culture supernatant of *V. cholerae* non-O1 FM38.

This data were derived from Kim(2003).

생성되었으며 그 활성도 미약하였다 (Fig. 9). 즉, *V. cholerae* non-O1 FM38이 생산하는 hemolysin이 정지기 까지 그 활성을 유지할 수 있었던 것은 protease의 생산 시기가 늦고 또한 활성이 매우 약하기 때문이라 할 수 있다.

이상의 결과로부터, 배양 상청액 중의 hemolysin 활성은 후에 생산되는 protease의 활성에 의해 실행되는 것으로 추정하고, *V. cholerae* non-O1 FM62균주의 배양 상청액 중의 hemolysin 활성과 protease 활성이 각각 최고치를 나타내는 시점의 배양액을 염석하여 얻은 조독소액(hemolysin 분획물 또는 protease 분획물)으로 hemolysin의 활성에 protease가 미치는 영향을 알아보았다. 즉, hemolysin 분획물 (1 μ L)을 protease 분획물 (0.5 μ L, 5 μ L)과 직접 혼합하여 10분간 반응시킨 후 잔존하는 hemolysin 활성을 측정한 결과, protease 분획물을 5 μ L 첨가한 실험구의 hemolysin활성은 무첨가구에 비해 약 50% 정도 감소하였다 (Fig. 10).

이와 같은 결과는 *V. vulnificus*가 생산하는 protease가 hemolysin의 활성 저하에 직접적인 영향을 미친다는 Shao and Hor (2000; 2001)와 Kreger and Lockwood (1981)의 보고와 잘 일치한다.

III. 분리 *V. parahaemolyticus* 균주의 새로운 병독인자

1. Urease 양성 *V. parahaemolyticus*의 분리

2001년부터 2003년까지 광안리 해수에서 병원성 비브리오균을 분리하는 동안, 2001년부터 2002년의 2년 동안 urease 양성인 *V. parahaemolyticus*를 한 균주도 분리하지 못하였으며, 2003년에 *V. parahaemolyticus* S25 한 균주만을 분리할 수 있었다 (Table 8). 그래서, 지역적인 차이를 비교하기 위하여 전라남도 여수시 가막만에 대해서 urease양성인 *V. parahaemolyticus*의 분리를 시도하였다.

가막만의 해수와 어류에서 *V. parahaemolyticus*의 분리를 시도한 결과를 Table 10에 나타내었다. 2002년과 2003년 가막만 해수와 어류에서

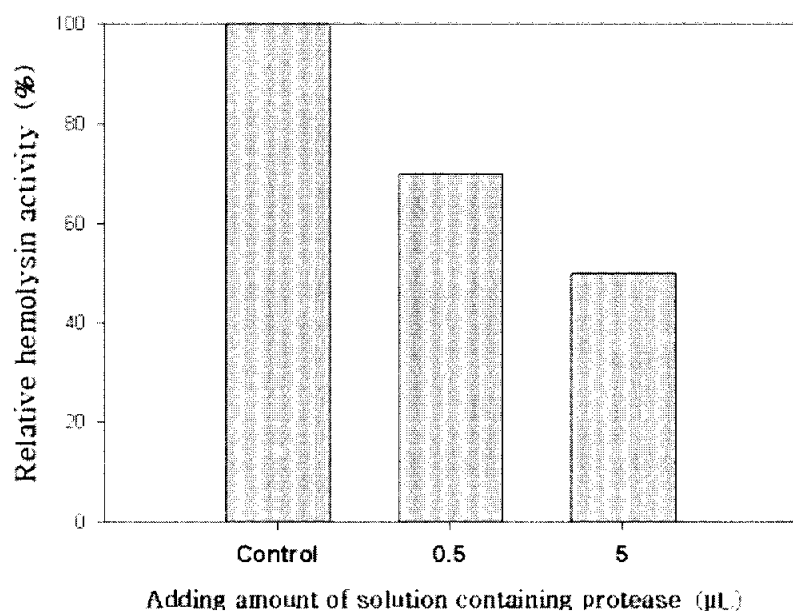


Fig. 10. Effect of protease on the hemolysin.

This data were derived from Kim(2003).

Table 10. Urease-positive *V. parahaemolyticus* isolated from the Kamak Bay of Yeosu, Korea, in 2002 and 2003

Source (number of isolated strains)	Code No.	Hemolytic activity	Protease activity	Urease activity
Seawater in 2002 (22)	YKB 2	-	+	-
	YKB 3	-	+	-
	YKB 4	-	-	+
	YKB 6	-	+	-
	YKB 8	-	+	-
	YKB 10	-	+	-
	YKB 14	-	-	+
	YKB 15	-	+	-
	YKB 17	-	+	-
	YKB 18	-	+	-
	YKB 19	-	+	-
	YKB 20	-	+	-
	YKB 21	-	+	-
	YKB 22	-	+	-
Seawater in 2003 (36)		-	-	-
Fish in 2003 (34)	YFB20 (black rockfish)	-	-	+
	YFO21 (olive flounder)	-	-	+
	YFO22 (olive flounder)	-	-	+
		-	-	+

총 92균주의 *V. parahaemolyticus*가 분리되었으며, 모든 균주는 hemolysin 활성을 나타내지 않았으나 protease 및 urease 활성을 가지는 17균주 (30%) 였다. 그 중 12균주가 protease 활성을, 그리고 5균주 (*V. parahaemolyticus* YKB4, YKB14, YFB20, YFO21, 및 YFO22)가 urease 활성을 나타내었다. 즉, *V. parahaemolyticus* YKB4와 YKB14는 해수에서 분리되었으며, *V. parahaemolyticus* YFB20는 조피뽕락 (black rockfish)에서, 그리고 *V. parahaemolyticus* YFO21과 YFO22는 넙치 (olive flounder)에서 분리되었다. 광안리 해수에서 분리된 64균주의 *V. parahaemolyticus* 중 1균주만이 urease 양성이었다는 결과에 비해, 가막만에서 분리된 92균주 중 urease 양성 균주가 5균주로 상대적으로 높은 검출율을 보여주었다.

이상, 본 연구수행 기간 동안 광안리와 여수에서 모두 6균주의 urease양성 *V. parahaemolyticus*가 분리되었으며, 이들 균주의 생화학적 특징은 urea 분해능을 제외하고는 표준균주 *V. parahaemolyticus* KCTC2471과 일치하였다 (Table 11).

2. *V. parahaemolyticus*가 생산하는 urease의 특성

분리된 urease 양성 *V. parahaemolyticus*의 urease 생산양상을 조사하기 위하여 Luria-Bertani broth에 균을 배양하면서, 배양 시간별로 상청액 중의 urease활성을 측정한 결과를 Fig. 11에 나타내었다. Urease 음성 표준균주인 *V. parahaemolyticus* KCTC2471은 urease 활성을 전혀 나타내지 않았다. *V. parahaemolyticus* YKB4, YKB14, YFO21, YFO22 및 S25 등의 5균주의 배양 상청액 중의 urease 활성 변화를 조사한 결과, S25를 제외한 분리균의 urease는정지기 초기에 서서히 나타나기 시작하여 정지기 중기인 배양 72 시간 쯤에 최고의 활성을 나타내었다. 이와 같은 결과는 urea분해독소 생성 양성 대조균주로 사용한 *Proteus vulgaris* ATCC6380의 경우와 유사하였으나, 분리균의 urease 최대 활성은 *P. vulgaris* 보다 2배 이상 높게 나타났다. *V. parahaemolyticus* S25는 대수증식 말기 (배양 12시간 이후)부터 urease

Table 11. Biochemical characteristics of urease-positive *V. parahaemolyticus* isolated from the environments

Tests*	KCTC2471	urease-positive isolates
β -galactosidase	-	-
Arginine dihydrolase	-	-
Lysine decarboxylase	+	+
Ornithine decarboxylase	+	+
Cytochrome-oxidase	+	+
Gelatinase	+	+
Urease	-	+
Tryptophane deaminase	-	-
Citrate utilization	-	-
Indole production	+	+
Acetoin production	-	-
H ₂ S production	-	-
Glucose hydrolysis	+	+
Mannitol hydrolysis	+	+
Inositol hydrolysis	-	-
Sorbitol hydrolysis	-	-
Rhamnose hydrolysis	-	-
Sucrose hydrolysis	-	-
Melibiose hydrolysis	-	-
Amygdalin hydrolysis	-	-
Arabinose hydrolysis	+	+

*, Tests were performed by API 20E system.

+, positive reaction; -, negative reaction.

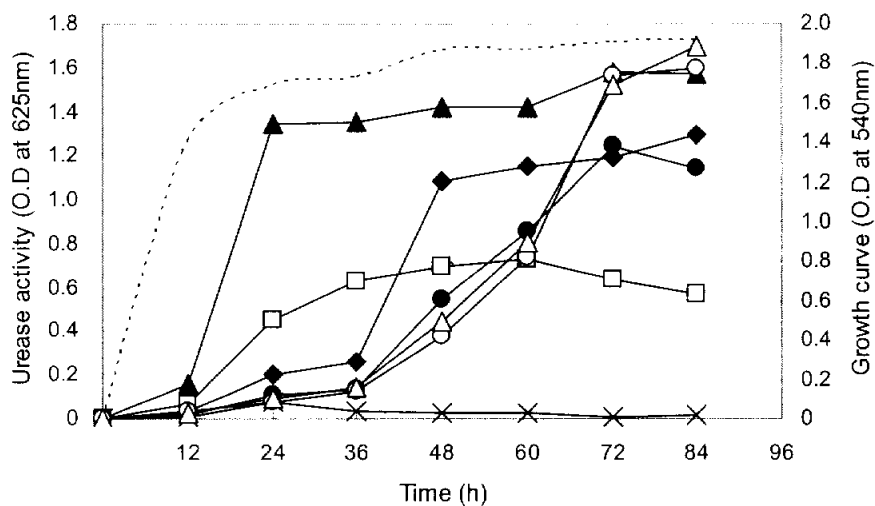


Fig. 11. Changes of urease activity during the growth of the isolated *V. parahaemolyticus*.

Every strain was incubated in Luria-Bertani broth at 37°C. Each culture supernatant was assayed for urease activity.; ----, bacterial growth; X, *V. parahaemolyticus* KCTC2471 (a urease-negative reference strain); □, *P. vulgaris* ATCC 6380 (a urease-positive reference strain); ○, *V. parahaemolyticus* YKB4; △, *V. parahaemolyticus* YKB14; ◆, *V. parahaemolyticus* YFO21; ●, *V. parahaemolyticus* YFO22; ▲, *V. parahaemolyticus* S25.

활성을 나타내기 시작하여 정지기 초기 (배양 24간 켜)에 최고 활성에 달하였으며, 이후에도 72시간 까지 urease 활성은 안정적으로 유지되어 다른 균주들과는 다른 양상을 나타내었다.

이와 같은 결과는, 환경으로부터 분리된 *V. parahaemolyticus* KH410의 urease 활성이 대수증식기 말기에 가장 높았으며, 이후에 정지기 초기에 이르기까지 급격히 감소하는 것으로 보고한 김(1999)의 결과와는 다소 차이를 보였다.

기존의 보고들에 의하며 *Bacillus pasteurii*, *Sporosarcina ureae*, *Morganella morganii* 등의 urease는 구성효소이며, *Proteus mirabilis*, plasmid-encoded ureases 양성균 (*Salmonella cubana*, *Providencia stuartii* and some *E. coli* strains)에서는 urea의 첨가에 의해 유도되어 지는 것으로 알려져 있다 (Mobley et al., 1995). 분리균에 의하여 생성되는 urease가 균체내 독소인지 균체외 독소인지 확인하기 위하여, 대수증식기 (18시간 배양)까지 배양한 균 배양액을 초음파 파쇄기 (Sonics & Materials Inc., Danbury, USA)로 파쇄 (30min on ice with an amplitude 10)한 시료의 urease 활성을 조사한 결과, 초음파 파쇄 처리구와 무처리구에서의 urease 활성은 유사한 값이었다. 따라서 분리균의 urease는 균체외 독소인 것으로 추정하였다.

한편, urea에 의해 urease의 생산이 유도되는지 알아보기 위하여 Luria-Bertani broth에 urea를 농도별로 첨가한 배지에 *V. parahaemolyticus* S25를 배양하면서 배양 48시간과 60시간 켜의 urease 활성을 조사한 결과를 Table 12에 나타내었다. 이미 Fig. 12에서도 나타난 바와 같이 분리균들의 urease 활성은 urea를 첨가하지 않은 배지에서도 높게 나타났다. Urea를 각각 0.1%와 0.2% 첨가한 배지에서는 48시간 켜에 urea를 첨가하지 않은 경우에 비해 각각 1.2배와 1.4배, 그리고 60시간 켜에는 각각 1.3배와 1.6배 높은 활성을 나타내었다. 그러나 urea를 0.3% 이상 첨가한 배지에서는 균의 생육이 억제될 뿐만 아니라, 배양 48시간과 60시간 켜에 대조구에 비해 상대적으로 50% 정도 낮은 활성을 나타내어 urease 생산도 저해되는 것으로 나타났다.

Table 12. Effect of urea concentration on the urease production by the *V. parahaemolyticus* S25

Urea concentration (%)	Cell growth O.D value		Relative urease activity (%)	
	48 hr	60 hr	48 hr	60 hr
0.0	0.713	0.667	100	100
0.1	0.859	0.877	120	131
0.2	1.010	1.079	142	162
0.3	0.364	0.371	51	56
0.5	0.371	0.345	52	49
1.0	0.245	0.236	54	53

한편, 김 (1999)은 환경에서 분리한 *V. parahaemolyticus* KH410의 urease가 urea 첨가하지 않은 배지에서는 거의 생산되지 않으나 urea를 0.2% 첨가하면 약 30배 이상 urease 활성이 높아지는 것으로 보고하였으며, 초음파 파쇄에 의하여 urease 활성이 높아지는 것으로 보아 유도효소이면서 균체 내 효소인 것으로 보고하고 있어 본 연구의 결과와 상이하였다. 이상의 결과로부터, *V. parahaemolyticus* S25가 생산하는 urease는 구성효소로서 균체의 독소인 것으로 최종 판단하였다.

IV. 분리 비브리오균주의 병독 유전자 신속검출

병원성 세균의 병독인자를 신속하게 검출하는 것은 예방차원에서나 치료의 목적에서 대단히 중요한 일이므로, 최근에는 병독 유전자를 PCR로써 검출하는 여러 가지 연구들이 진행되고 있다 (Saiki et al., 1988). 따라서 본 연구에서는 병원성 비브리오균의 표현형 병독인자를 생산하는 유전자를 PCR로써 신속하게 검출하는 방법을 모색하였다.

1. Cholera toxin 유전자의 검출

과거에는 *V. cholerae* non-O1은 위생적으로 크게 문제가 되지 않는 것으로 취급되어 왔으나, 최근 *V. cholerae* non-O1 균주의 병원성에 관한 많은 연구들이 보고 되고 있다 (Chaudhuri et al., 1992; Kiiyukia et al., 1992; Pal et al., 1992; Russel et al., 1992; Rivera et al., 1995; Saha et al., 1996; Kim et al., 1997; Caldini et al., 1997; Barbieri et al., 1999; Nandi et al., 2000; Chow et al., 2001). 또한, Park et al. (2003)은 환경에서 분리한 *V. cholerae* non-O1 CT균주가 cholera toxin 유전자를 가지지만 cholera toxin은 생산하지 않는 균주로 보고하였다.

본 연구에서 분리된 *V. cholerae* non-O1 35균주에 대하여 cholera toxin 유전자의 존재유무를 확인하기 위하여 commercial primers VCT-1/VCT-2 (Takara Co., Japan)를 사용하여 유전자의 검출을 시도

한 결과를 Fig. 12에 나타내었다. VCT 1/VCT-2 primers에 의해 증폭 가능한 DNA의 크기는 307 bp이며, *V. cholerae* O139 (lane 3)와 *V. cholerae* El Tor (lane 4)와 마찬가지로 환경 분리균주 *V. cholerae* non-O1 CT (lane 2) (Park et al., 2003) 에서도 동일한 307 bp의 단일 밴드가 관찰되어 cholera toxin 유전자를 확인하였다. 그러나 본 연구에서 분리된 *V. cholerae* non-O1 35균주 모두에서 DNA band는 검출되지 않아 cholera toxin 유전자를 보유하지 않은 것으로 확인되었다. 본 연구에서 3년간 분리된 총 35균주 중 33균주 (94%)가 hemolysin 또는 protease 활성을 나타내었으며, 그 중 26균주가 hemolysin과 protease 활성을 동시에 나타내는 균주로 밝혀졌다 (Table 9). 이 결과는 인도의 캘커타에서 분리된 *V. cholerae* non-O1이 hemolysin 양성이지만 cholera toxin 유전자는 보유하지 않는 것으로 보고한 Pal et al. (1992)의 결과와 일치한다. 한편, Saha et al. (1996)은 *V. cholerae* non-O1 임상균주로부터 균체 외 cytotoxin을 정제하여 독성을 밝혔으며, Kiiyukia et al. (1992)은 ayu fish로부터 분리된 hemolysin 양성 *V. cholerae* non-O1균주의 배양상청액을 경구투여한 결과 suckling mice에 fluid accumulation을 유도하였다고 보고하였다. Russel et al. (1992)은 *V. cholerae* non-O1의 장관독성에 대하여 보고하였다. 현재, *V. cholerae* non-O1은 일본에서 식중독 세균으로 지정되어있다. 최근에 와서 임상 환자로부터 *V. cholerae* non-O1의 분리 비율이 전세계적으로 증가하고 있는 추세이며, 본 연구에서도 부산 연안 해수에서 분리된 총 174균주 중 *V. cholerae* non-O1이 35균주로 검출율로는 2위이며, 분리균의 대부분 (33/35)이 표현형 병독인자를 생산한다는 점으로 미루어 볼 때, 앞으로 이 균의 병원성에 관한 많은 연구와 환경 중에서의 이 균의 동태를 모니터링하여야 할 것으로 사료된다.

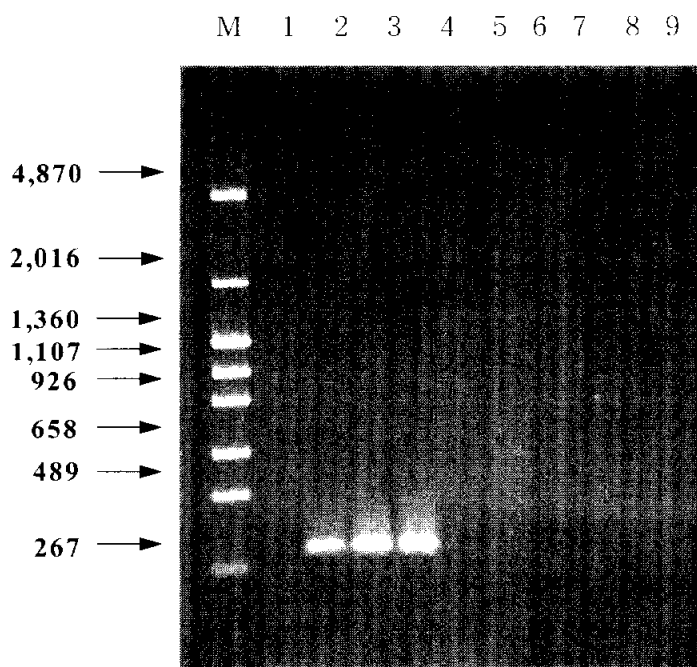


Fig. 12. Detection of *ctx* with culture supernatant from different *Vibrio* species.

PCR was done with VCT primers (Takara Co.) for *ctx* detection. Amplified products were analyzed by electrophoresis on a 1% agarose gel and treated with Ethidium Bromide.

M, pHY marker (Takara Co); Lane1, *V. cholerae* non-O1 ATCC 25872; Lane2, *V. cholerae* non-O1 (isolated in this study); Lane3, *V. cholerae* O1 El Tor; Lane4, *V. cholerae* O 139; Lane5, *V. vulnificus* KCTC 29307; Lane6, *V. parahaemolyticus* ATCC 17802; Lane7, *V. vulnificus* isolated; Lane 8,9, *V. cholerae* non-O1 isolated.

2. Hemolysin 유전자의 검출

2·1 *V. vulnificus*의 hemolysin 유전자 검출

*V. vulnificus*의 hemolysin 유전자를 검출하기 위하여 합성된 primer VF1/ VR1을 사용하여 PCR을 행한 결과를 Fig. 13에 나타내었다. 분리된 *V. vulnificus* 14균주 (*V. vulnificus* H6, H19, H34, H40, H41, H42, H60, H64, FM29, FM33, FM35, FM54, S50, S52)에 대하여 PCR을 행한 결과, 모든 균주에서 hemolysin 유전자의 증폭된 DNA (361 bp)의 단일밴드가 확인되었다.

Hemolysin 유전자가 검출된 *V. vulnificus* 14균주가 혈액 한천평판상에서 hemolysin 활성을 나타내는지 조사한 결과를 Table 13에 나타내었다. *V. vulnificus* S50과 S52를 제외한 10균주들은 혈액 한천평판 상에서 hemolysin 활성을 나타내었으나, *V. vulnificus* S50과 S52는 혈액 한천평판 상에서 hemolysin 활성을 나타내지 않았다. 따라서, *V. vulnificus* S50과 S52는 hemolysin 유전자는 보유하고 있으나 hemolysin 독소 단백질을 생산하지 않는 비 발현 균주로 생각된다. Hemolysin 유전자를 보유하고 있음에도 불구하고 발현되지 않는 이와 같은 결과는 환경에서 분리한 *V. cholerae* non-O1 CT 균주가 cholera toxin 유전자를 보유하고 있지만 cholera toxin은 생산하지 않는다는 Park et al. (2003)의 결과와도 일맥 상통한다.

이상의 결과로부터, 병독 유전자를 보유하고 있음에도 불구하고 병독 단백질을 생산하지 않는 균주가 확인됨에 따라서 병원성 유무의 검토에 있어서는 PCR을 이용한 유전자 검출도 유용하지만, 병독인자를 생산하는지를 판단하는 표현형 검출도 반드시 병행하여야 할 것으로 생각되며, 병독 유전자를 보유한 균주가 어떤 환경에서 병독 단백질을 발현할 수 있는지에 대한 보다 많은 연구가 필요하다고 생각된다.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

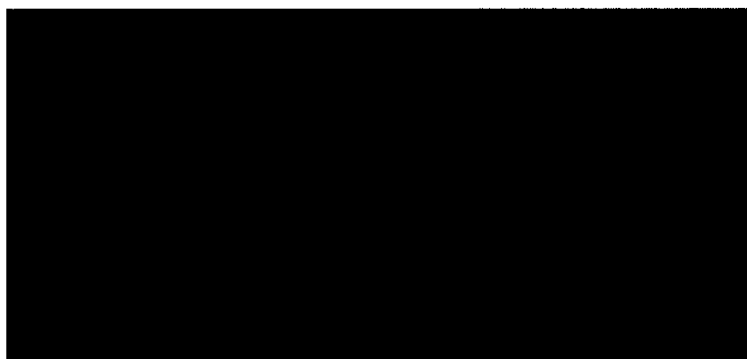


Fig. 13. Detection of hemolysin gene from the isolated *V. vulnificus*

PCR was done with synthesized VF1/VR1 primers and Perfect premix (Takara Co.). Amplified production were analyzed by electrophoresis on a 2% agarose gel and treated with ethidium bromide.

Lane1, *V. vulnificus* H6; Lane2, *V. vulnificus* H19; Lane3, *V. vulnificus* H34; Lane4, *V. vulnificus* H40; Lane5, *V. vulnificus* H41; Lane6, *V. vulnificus* H42; Lane7, *V. vulnificus* H60; Lane8, *V. vulnificus* H64; Lane9, *V. vulnificus* FM29; Lane10, *V. vulnificus* FM33; Lane11, *V. vulnificus* FM35; Lane12, *V. vulnificus* FM54; Lane13, *V. vulnificus* S50; Lane14, *V. vulnificus* S52

Table 13. Detection results of hemolysis factors of *V. vulnificus*

	Genotype	Phenotype
	Hemolysin gene	Kanagawa
	from PCR	phenomenon
H 6	+	+
H 19	+	+
H 34	+	+
H 40	+	+
H 41	+	+
H 42	+	+
H 60	+	+
H 64	+	+
FM 29	+	+
FM 33	+	+
FM 35	+	+
FM 54	+	+
S 50	+	-
S 52	+	-

Phenotypic detection of hemolysin was confirmed on TSA (5% sheep erythrocyte) plate. Genotypic detection was conducted by PCR with VF1/VR1 primers and Perfect premix (Takara Co.).

2·2 Urease 양성 *V. parahaemolyticus*의 *tdh/trh* 검출

Urease 양성인 *V. parahaemolyticus*의 경우에 hemolysin 유전자 (*tdh/trh*)와 밀접한 관련이 있다는 보고가 있다 (Osawa et al., 1996; Iida et al., 1997, 1998; Okitsu et al., 1997; Okuda et al., 1997; Park et al., 2000). 본 연구에서 분리된 urease 양성 *V. parahaemolyticus* 균주들이 내열성 hemolysin 유전자 *tdh* 또는 유사독소 유전자 *trh*를 보유하고 있는지 확인하기 위하여 *tdh* 검출용 primers VPD-1/VPD-2와 *trh* 검출용 primers VPR-1/VPR-2 (Takara Co.)를 사용하여 PCR을 행한 결과, 분리된 urease 양성 *V. parahaemolyticus* 6균주 (YKB4, YKB14, YFB20, YFO21, YFO22 및 S25)에서는 증폭 DNA가 검출되지 않아 이들 균주들은 *tdh/trh*를 보유하지 않은 것으로 확인되었다. 이와 같은 결과는 urease가 hemolysin 유전자와 밀접한 관련이 있는 것으로 보고하고 있는 Osawa et al. (1996), Iida et al. (1997, 1998), Okitsu et al. (1997), Okuda et al. (1997), Park et al. (2000) 등의 결과와는 상이하였다. Osawa et al. (1996)은 환자와 가검물로부터 분리된 urease 양성 *V. parahaemolyticus* 중에서 *tdh*를 보유한 106균주 중 urease 활성을 나타낸 것은 6% 이하였고 *trh*를 보유한 모든 균주는 urease 활성을 나타내었다고 보고하여 *trh*가 urease 생성 유부의 marker가 될 수 있다고 보고하였다. Okitsu et al. (1997)은 환자와 가검물로부터 분리된 urease 양성 *V. parahaemolyticus* 9균주가 모두 *trh*를 보유하며, *trh*와 *tdh*를 동시에 보유하고 있는 균주에 있어서는 TDH의 발현이 저해되는 결과로부터 *trh*가 *tdh*의 발현을 억제한다고 보고하였다. 이들의 결과는 분리된 모든 urease 양성 균주들이 *tdh*와 *trh*를 모두 보유하지 않은 것으로 확인된 본 연구의 결과와는 다소 차이가 있었다. 그러나, Park et al. (2000)은 *trh*를 결손한 urease 양성 *V. parahaemolyticus* TH3996 균주가 hemolysin 활성은 완전히 소실되지만 urease 활성은 wild type과 같은 결과로부터 *trh*가 urease생산에 결정적인 요소는 아니라는 결과를 보고하였다.

이상, Osawa et al. (1996), Okitsu et al. (1997), Park et al. (2000),

그리고 본 연구의 결과 등을 모두 종합해 보면, urease 양성 균주의 *tdh* 또는 *trh*의 보유율이 높기는 하지만 이들의 보유 여부가 urease의 생성유무에 직접적인 영향을 미치는 인자는 아닌 것으로 생각된다.

3. 주형 DNA가 PCR 반응에 미치는 영향

주형 DNA의 양이 PCR반응에 미치는 영향을 검토하였다. *V. vulnificus* S50을 HI broth에 24시간 배양하고, 그 배양액을 열수 추출한 주형 DNA를 0.5 μ L, 1 μ L, 2 μ L, 3 μ L, 4 μ L까지 다양한 농도로 조절하여 PCR반응을 수행한 결과, Fig. 14에서 알 수 있듯이 0.5 μ L를 사용하여도 DNA 증폭이 효과적으로 수행되었다. 비브리오균을 HI broth 배지에 24시간 배양할 경우, 배양된 균체는 10^7 - 10^8 cfu/mL에 해당하며 그것을 0.5 μ L 사용하였으므로 실제 균량은 10^3 - 10^4 cfu에 해당한다. 이론적으로 계산하자면 병원성 세균이 1 cell 만 존재하더라도 2-3시간 증균으로 충분히 검출 가능하다는 결론이다. 종래의 생화학적 방법으로 균을 동정하자면 적어도 7주일에서 10일 정도가 소요되지만, PCR은 신속성과 정확성면에서 아주 효율적인 방법이라고 할 수 있다. 다만, 앞의 결과에서 유전형 병독인자를 보유한다고 해서 모두 발현되는 것은 아니므로, PCR을 이용하여 유전형 병독인자를 확인한 균주에 대하여 표현형 병독인자의 생성 유무를 검사하는 방식으로 병원성 세균의 동정을 하면 효율적일 것으로 생각된다.

V. 분리 비브리오균주의 병독에 미치는 양이온의 영향

효소나 독소의 활성화에 cofactor로 작용한다고 알려져 있는 1가 또는 2가 양이온 (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+})이 hemolysin, protease 및 urease의 활성화에 미치는 영향을 조사하였다.

1. Protease의 활성화에 미치는 영향

V. cholerae non-O1 FM49와 *V. cholerae* non-O1 FM62의 protease

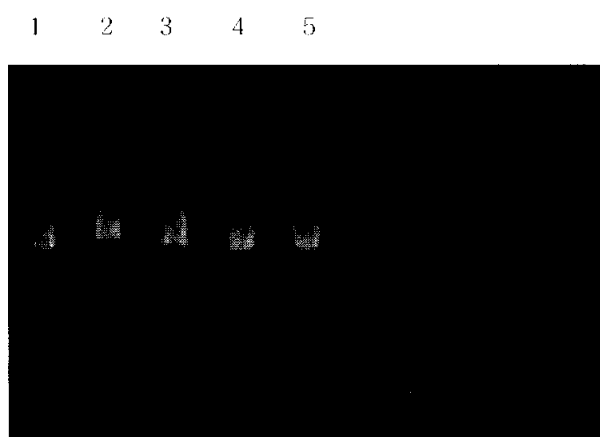


Fig. 14. Detection of hemolysin gene with different concentration of template DNA of *V. vulnificus* S50

PCR was done with synthesized VF1/VR1 primers and Perfect premix (Takara Co.). Amplified production were analyzed by electrophoresis on a 2% agarose gel and treated with ethidium bromide.

Lane1, 0.5 μ L; Lane2, 1 μ L; Lane3, 2 μ L; Lane4, 3 μ L; Lane5, 4 μ L.

활성에 미치는 양이온의 양향을 조사한 결과를 Table 14에 나타내었다. 활성추정용액에 1가 또는 2가 양이온과 protease 분획물을 첨가하여 protease 활성을 측정한 결과, K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} 등의 이온은 protease의 활성에 거의 영향을 미치지 않았으나, Fe^{2+} 첨가구에서는 protease의 활성이 약 50% 정도 감소되었다. 따라서 *V. cholerae* non-O1 FM49와 FM62가 생산하는 protease는 K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} 등을 cofactor로 하지 않는 것으로 확인되었다. 이 결과는 *V. vulnificus*가 생산하는 protease가 Zn^{2+} 을 cofactor로 요구하는 zinc metalloprotease라는 Miyoshi et al. (1987, 1997a, 1998)의 보고 및 *V. anguillarum*의 metalloprotease에 관하여 보고한 Norqvist et al. (1990), Farrell and Crosa (1991) 및 Denkin and Nelson (1999) 등의 결과와는 상이하였다. Miyoshi et al. (1987)에 의하면 *V. vulnificus*의 protease는 metalloprotease inhibitor 첨가에 의하여 완전히 억제되었으며, Zn^{2+} 또는 Fe^{2+} 첨가에 의해서 protease의 활성이 회복되는 결과로부터 Zn^{2+} 또는 Fe^{2+} 가 protease의 활성에 필수요소라고 보고하였다. 한편, Denkin and Nelson (1999)는 Mg^{2+} 을 cofactor로 요구하는 *V. anguillarum*의 protease를 보고한 바 있으며, Farrell and Crosa (1991)는 *V. anguillarum*의 protease 반응 시에 EDTA로 metal ion 을 치환한 상태에서 Ca^{2+} 이나 Zn^{2+} 단독 첨가만으로는 protease의 활성이 회복되지 않았으나, Ca^{2+} 과 Zn^{2+} 를 동시에 첨가하면 protease의 활성이 회복되는 실험결과로부터 Ca^{2+} 과 Zn^{2+} 를 동시에 cofactors로 요구하는 protease라고 보고하였다. 이상, 여러 연구보고들에 의하면 *Vibrio*속의 protease는 metalloprotease인 것으로 추정되나, 본 연구에서 분리된 *V. cholerae* non-O1의 protease는 위에서 언급한 metal ions에 의해 활성의 변화가 없었으며, Fe^{2+} 첨가 시에는 오히려 활성이 50%나 감소되는 경향을 보이므로 metalloprotease가 아닌 것으로 확인되었다.

Table 14. Effect of cations on the protease activity of *V. cholerae* non-O1

Cations	Relative protease activity (%)	
	FM62	FM49
Control	100	100
K ⁺	97	106
Na ⁺	93	105
Ca ²⁺	95	90
Mg ²⁺	99	84
Fe ²⁺	51	56
Zn ²⁺	90	108

All cations were sulfate salts except for calcium ion (CaCl₂).

The final concentration of each cation was 2mM (0.1mM for Zn²⁺) in the reaction buffer.

2. Hemolysin의 활성화에 미치는 영향

V. vulnificus FM29, *V. cholerae* non-O1 FM49와 FM62의 hemolysin 활성화에 미치는 양이온의 양향을 조사한 결과를 Table 15에 나타내었다. K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} 등은 hemolysin의 활성화에 크게 영향을 미치지 않았으나, *V. vulnificus* FM29와 *V. cholerae* non-O1 FM62의 경우, Fe^{2+} 첨가구에서는 대조구와 비교하여 약 2.6-2.7배 높은 활성을 나타내었으며, *V. cholerae* non-O1 FM49의 경우에도 약 2배 정도 높은 활성을 나타내었다. 이상, hemolysin은 Fe^{2+} 이 존재할 때 그 활성이 현저히 증가하였으며 이는 Fe^{2+} 이 용혈독소의 활성화에 cofactor로 작용하기 때문으로 추정할 수 있었다. 이와 같은 결과는, K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} 등이 *V. vulnificus*의 hemolysin 활성화에 거의 영향을 미치지 않았다고 보고한 Lee and Park (1997)의 결과와 일치하고 있다. 그러나 Miyake et al. (1989), Park et al. (1994), Shinoda et al. (1985), Zitzer et al.(1995), Miyoshi et al. (1997b), Raimondi et al.(2000) 등은 *V. metschnikovii*, *V. vulnificus*, *V. cholerae* non-O1, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus* 등이 생산한 hemolysin이 Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} 등의 양이온에 의해 활성이 억제되는 것으로 보고하고 있어 본 연구의 결과와는 차이가 있었다. Park et al. (1994)은 *V. vulnificus*의 hemolysin에 의해 적혈구에 형성된 transmembrane pore로 Ca^{2+} 이 침투할 수 없기 때문에 적혈구의 외부에서 삼투압 보호물질 (osmotic protectant)로 작용하며, 따라서 적혈구세포 외부로 부터의 용매유입을 차단하므로써 세포내부의 삼투압 증가를 막아주므로 hemolysin의 활성을 억제한다고 보고하였다. 최근, Miyoshi et al. (1997b)과 Raimondi et al. (2000)은 hemolysin 활성화에 대한 양이온의 효과는 ion channel과 관계가 있다고 보고하였다. Miyoshi et al. (1997b)에 의하면, Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} 등의 양이온은 hemolysin 활성을 완전히 억제하며, 이 때 K^+ 이 적혈구 세포외부로 유출되는 연구결과를 발표하였으며, 이러한 양이온에 의한 hemolysin 활성화의 차이는 ion channel과 관계가 있으나, Mg^{2+} 과 Ca^{2+} 의 경우에는 hemolysin의 활성을 억제하기는 하지만, 위의 이온들과는

Table 15. Effect of cations on the hemolysin activity

Cations	Relative hemolysin activity (%)		
	<i>V. cholerae</i> non-O1	<i>V. cholerae</i> non-O1	<i>V. vulnificus</i>
	FM62	FM49	FM29
Control	100	100	100
K ⁺	97	84	124
Na ⁺	98	85	103
Ca ²⁺	84	90	84
Mg ²⁺	99	88	78
Fe ²⁺	270	196	260
Zn ²⁺	94	52	86

All cations were sulfate salts except for calcium ion (CaCl₂).

The final concentration of each cation was 2mM (0.1mM for Zn²⁺) in the reaction buffer.

달리 ion channel과는 무관한 것으로 보고하고 있다.

3. Urease의 활성화에 미치는 영향

V. parahaemolyticus KB4, KB14, YFO21, YFO22 및 S25의 urease 활성화에 미치는 양이온의 영향을 조사한 결과를 Table 16에 나타내었다. K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} 등의 이온은 urease의 활성화에 거의 영향을 미치지 않았으며, Fe^{2+} 첨가구에서는 urease의 활성화가 다소 감소되는 경향을 나타내었으나 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

VI. 실험동물에 대한 분리 비브리오균주의 *in vivo* 독성 해석

1. Hemolysin, protease 및 urease의 치사독성

병원성 비브리오균이 생산하는 hemolysin, protease 및 urease의 독성 정도를 평가하기 위하여 각종 병독인자를 생산하는 분리 균을 ICR종 마우스 각 10마리에 복강주사하고 치사독성을 비교 조사한 결과를 Table 17에 나타내었다. 대조구로서는 생리식염수를 주사한 그룹과 비병원성 표준균주 *V. parahaemolyticus* KCTC2471을 주사한 그룹을 사용하였다. 이들 대조구 그룹과 hemolysin 양성 *V. parahaemolyticus* S34와 S72를 주사한 그룹에서는 치사독성이 나타나지 않았다. 그러나, hemolysin 양성 *V. vulnificus* FM29를 주사한 그룹의 치사율은 40%, protease 양성 *V. parahaemolyticus* FM39와 FM50을 주사한 그룹의 치사율은 각각 40%와 60%였다. 한편, urease 양성 *V. parahaemolyticus* YKB4, YKB14와 S25 등을 주사한 그룹의 치사율은 60-80%였다. 세균의 urease는 요로결석증, 암모니아 뇌병증, 신우신염, 간성 뇌병증 등의 병원성에 있어서 주된 원인으로 알려져 있다 (Mobley et al., 1995). 몇몇 연구자들은 *Proteus mirabilis*의 urease가 마우스나 레트의 신우신염의 원인이 될 수 있다고 보고하고 있다 (Aronson et al., 1974; Braude and Sieminski, 1960; Johnson et al., 1993; Jones et al., 1990; MacLaren, 1968, 1969, 1974; Musher et al.,

Table 16. Effect of cations on the urease activity of *V. parahaemolyticus*

Cations	Relative urease activity (%)				
	KB4	KB14	YFO21	YFO22	S25
Control	100	100	100	100	100
K ⁺	105	107	101	101	113
Na ⁺	105	103	105	97	109
Ca ²⁺	106	109	106	113	110
Mg ²⁺	111	114	114	107	121
Fe ²⁺	78	77	82	86	76
Zn ²⁺	103	106	101	110	111

All cations were sulfate salts except for calcium ion (CaCl₂).

The final concentration of each cation was 2mM (0.1mM for Zn²⁺) in the reaction buffer.

Table 17. Comparison of the virulence differences of the isolated vibrios by their pathogenic factors

Phenotypic pathogenic factor	Strains	Lethal time (hr)	Lethal rate (%)
Buffered saline	Control	-	0
None	<i>V. parahaemolyticus</i> KCTC2471	-	0
Urease	<i>V. parahaemolyticus</i> YKB4	4.5~11.0	60
	<i>V. parahaemolyticus</i> YKB14	9.0~12.0	60
	<i>V. parahaemolyticus</i> S25	6.0~24.0	80
Protease	<i>V. parahaemolyticus</i> FM39	4.0~13	40
	<i>V. parahaemolyticus</i> FM50	5.0~8.0	60
Hemolysin	<i>V. parahaemolyticus</i> S34	-	0
	<i>V. parahaemolyticus</i> S72	-	0
	<i>V. vulnificus</i> FM29	8.0~16.0	40

Each bacterial suspension (0.5 mL of 10^7 - 10^8 cfu/mL) was inoculated intraperitoneally into groups of 10 each of ICR mice (7- to 10-week-old male). Each test was done duplicate. Mortality indicates the ratio of dead to total 10 mice inoculated.

1975). *Staphylococcus saprophyticus*는 젊은 가임 여성에 있어서 흔히 요도염의 원인인 것으로 보고되고 있다 (Osterberg et al., 1990). *Helicobacter pylori*에 의한 장염의 원인도 urease와 관련이 있다 (Cover and Blaser, 1995; Fujino et al., 1974; Hawtin et al., 1990).

본 연구 결과에서, urease 양성 *V. parahaemolyticus* 균주에 감염된 마우스는 24시간 이내에 사망하였으며, 치사율도 60-80%로 hemolysin 양성균 또는 protease 양성균 보다 높은 치사독성을 나타내었다. 또한, 감염된 마우스의 장기로부터는 인위적으로 감염 시킨 urease 양성 *V. parahaemolyticus*가 검출되었다. 일반적으로 병원성 비브리오균의 대표적인 병독인자로 알려져 있는 hemolysin 또는 protease 생산균주보다 urease 생산균주에 의한 치사율이 더욱 높은 것은 주목할 만한 결과이다. 따라서 향후, 병원성 비브리오균의 분리 동정시에 urease를 marker로 고려하여야 할 것으로 사료된다.

2. *In vivo* 독성에 미치는 iron-dextran의 영향

앞서 *in vitro* 상의 실험에서 양이온 중 철 이온 (Fe^{2+})이 hemolysin의 활성을 2배 이상 촉진시키는 결과를 얻었으므로 (Table 15), 실제로 *in vivo* 상에서도 hemolysin의 활성을 촉진시키는지 조사하기 위하여, iron-dextran을 마우스 체중 g 당 200 μ g 되도록 복강 주사한 30분 후에, hemolysin 양성 비브리오균을 주사하여 치사독성을 비교한 결과를 Table 18에 나타내었다. 즉, iron-dextran 처리구와 무처리구 (대조구)의 ICR 마우스 그룹에 hemolysin 양성균주 (*V. parahaemolyticus* H27, *V. vulnificus* FM29, *V. alginolyticus* S42), urease 양성균주 (*V. parahaemolyticus* YKB4) 및 protease 양성균주 (*V. parahaemolyticus* FM39)를 각각 복강주사하고 치사독성의 변화를 비교 검토하였다.

Urease와 protease 양성 균주를 주사한 그룹에서는 iron-dextran 처리구와 대조구에서의 치사율에 차이가 나타나지 않았다. 즉, protease 양성 *V. parahaemolyticus* FM39와 urease 양성 *V. parahaemolyticus* YKB4에 의한 치사율은 각각 40%와 70%였으며 이와 같은 결과는

iron-dextran 처리구와 대조구에서 동일하였다. 그러나 hemolysin 양성 균주를 주사한 그룹에서는 iron-dextran 처리구와 대조구의 치사율이 큰 차이를 보였다. 즉, hemolysin 양성 *V. parahaemolyticus* H27은 대조구에서는 20%의 치사율을 나타내었으나 iron-dextran 처리구에서는 100%로 5배 높은 치사율을 나타내었다. Hemolysin 양성 *V. vulnificus* FM29는 대조구에서는 치사율이 40%였으나 iron-dextran 처리구에서는 90%로 2.5배, hemolysin 양성 *V. alginolyticus* S42는 대조구에서 치사율이 50%였던 것이 iron-dextran 처리구에서는 100%로 2배 높게 나타났다. 이상, iron-dextran 처리구에서는 대조구에 비해 hemolysin 양성 균에 의한 치사율이 2-5배 이상 높게 나타났다 (Table 18). 한편, hemolysin 양성균주를 복강 주사한 마우스의 사망 직후의 내장 모습을 관찰해 보면, 대조구에 비해 전체적으로 장기가 부풀어 있었으며, 적색 또는 적자색의 빛이 강하게 나타나는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 15). 이와 같은 결과는 iron-dextran을 투여한 쥐가 투여하지 않은 대조구에 비해 *V. vulnificus*에 감염될 확률이 높았다는 Starks et al.(2000)의 결과 및 Fe^{2+} 의 존재시 hemolysin의 활성이 현저하게 증가하는 본 실험의 *in vitro* 결과와 일치한다. 또한 *V. vulnificus* 외의 *V. parahaemolyticus*와 *V. vulnificus* 등의 hemolysin 생산균주에서도 같은 결과를 얻을 수 있었으므로, 결론적으로 철이온 (Fe^{2+})의 존재는 hemolysin의 *in vitro/in vivo* 독성을 크게 촉진한다는 것을 알 수 있다.

3. Hemolysin에 의한 피하조직 모세혈관 손상

Hemolysin은 병원성 비브리오균의 대표적인 표현형 병독인자로서 균의 분리 시에 가장 흔히 사용되어왔으며 (Gray and Kreger, 1985; Kreger and Lockwood, 1981; Cherwonogrodzky and Clark, 1982; Honda et al., 1988; Kaper et al., 1984; Raimondi et al., 2000), 이 hemolysin은 적혈구를 파괴하여 철이온 (Fe^{2+})을 제공함으로써 비브리오균의 증식을 촉진하는 것으로 알려져 있다 (Simpson and Oliver,

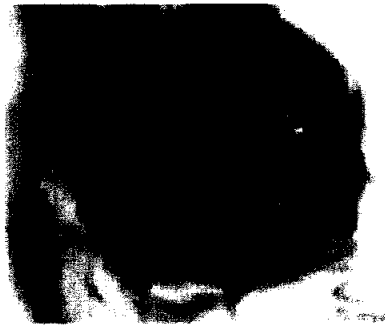
Table 18. Effect of ferrous iron on the virulence of hemolysin

Strains	Pathogenic factor	Lethal rate (%)	
		Not treated	Iron-dextran treated
<i>V. parahaemolyticus</i> H27	hemolysin	20	100
<i>V. vulnificus</i> FM29	hemolysin	40	90
<i>V. alginolyticus</i> S42	hemolysin	50	100
<i>V. parahaemolyticus</i> KB4	urease	70	70
<i>V. parahaemolyticus</i> FM39	protease	40	40

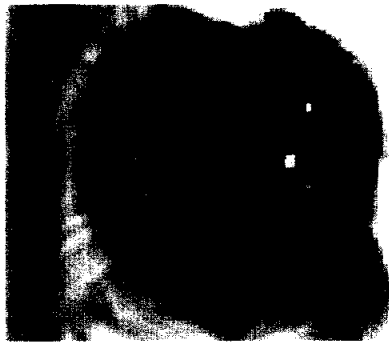
Each bacterial suspension (0.5 mL of 10^7 - 10^8 cfu/mL) was inoculated intraperitoneally into groups of 10 each of ICR mice (7- to 10-week-old male). Each test was done duplicate. Mortality indicates the ratio of dead to total 10 mice inoculated.



Control



A



B

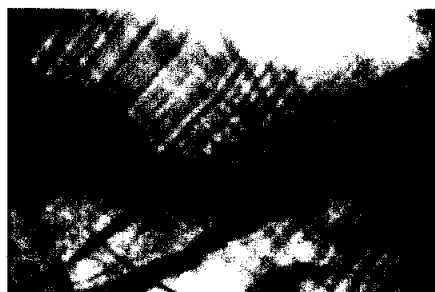
Fig. 15. Intestinal view of mice infected with hemolysin-positive *V. vulnificus* FM29.

A, not-treated with iron-dextran; B, treated with iron-dextran

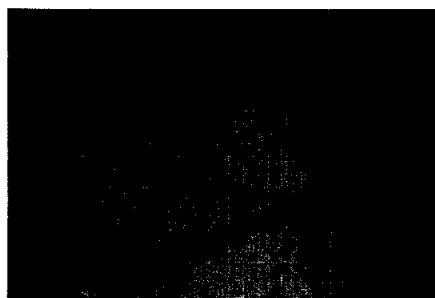
The bacterial suspension (0.5 ml of 10^7 - 10^8 cfu/mL) was inoculated intraperitoneally into ICR mice (7- to 10-week-old males). Control is the mouse injected with 0.85% NaCl sol'n. A and B is the mice injected with *V. vulnificus* FM29

1983; Litwin et al.,1996; Britigan et al., 2000). 본 연구에서 *in vitro/in vivo* 상에서 철이온 (Fe^{2+})이 존재하면 치사독성이 촉진되는 결과를 얻었다 (Table 18, Fig. 15). 따라서, hemolysin이 모세혈관에 특이적으로 손상을 주는지 관찰하기 위하여, hemolysin 양성 균주 (*V. vulnificus* FM29), protease 양성균주 (*V. parahaemolyticus* FM39), urease 양성균주 (*V. parahaemolyticus* S25) 및 hemolysin과 protease 양성균주 (*V. cholerae* non-O1 FM44)를 iron-dextran 처리구 (200 $\mu\text{g/g}$ of mouse)와 무처리구의 ICR 마우스에 피하 주사한 1시간 후에 ICR 마우스의 등 피하조직의 모세혈관을 관찰한 결과를 Fig. 16, Fig. 17 및 Fig. 18에 각각 나타내었다. 대조구로는 생리식염수를 주사한 마우스를 사용하여 비교 관찰하였다. Protease 양성균 및 urease 양성균을 피하조직에 주사한 경우, 모세혈관은 대조구와 큰 차이가 없는 정상적인 모습을 보여주었다. 그러나 hemolysin 양성균을 주사한 경우에는 피하조직의 모세혈관이 손상된 모습을 관찰할 수 있었다 (Fig. 17). 마우스의 복강에 iron-dextran을 처리한 30분 후에 hemolysin 양성 균을 피하 주사한 경우 (B)는 무처리구의 마우스 (A)에 비하여 모세혈관의 손상정도가 더욱 심하게 나타난 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 18).

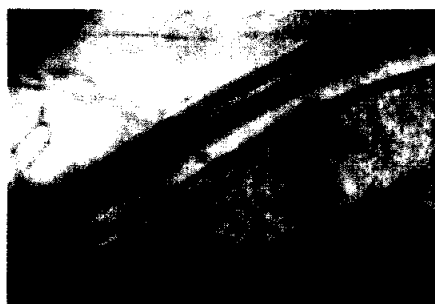
이상의 결과로부터, 병원성 비브리오균의 hemolysin은 모세혈관에 특이적으로 손상을 주는 독소로서, 특히 철이온 (Fe^{2+}) 존재 하에서는 *in vitro/in vivo* 독성이 더욱 강하게 나타남을 확인할 수 있었다.



Control



A



B

Fig. 16. The photograph (X40) of hypodermic blood capillary of mice injected with urease-positive (A) and protease-positive (B) vibrios.

Bacterial suspension (0.5 mL of 10^7 - 10^8 cfu/mL) was injected hypodermically into ICR mice. Each test was done duplicate. Control is the mouse injected with 0.85% NaCl sol'n.

A. *V. parahaemolyticus* S25 (urease-positive); B, *V. parahaemolyticus* FM39 (protease-positive)



Control



A

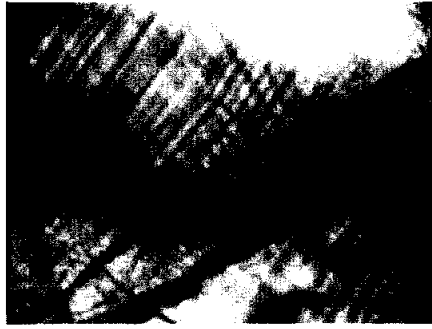


B

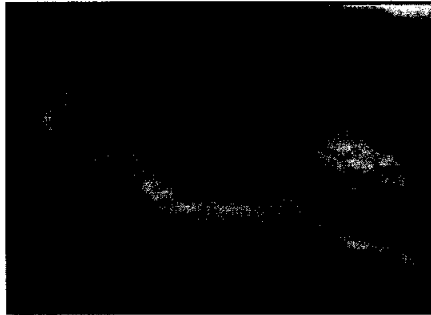
Fig. 17. The photograph (X40) of hypodermic blood capillary of mice injected with hemolysin-positive vibrios.

Bacterial suspension (0.5 mL of 10^7 - 10^8 cfu/mL) was injected hypodermically into ICR mice. Control is the mouse injected with 0.85% NaCl sol'n.

A, *V. vulnificus* FM29 (hemolysin-positive); B, *V. cholerae* non-O1 FM44 (hemolysin and protease-positive)



Control



A



B

Fig. 18. Effect of iron-dextran on the virulence of hemolysin.

The bacterial suspension (0.5 mL of 10^7 - 10^8 cu/mL) of *V. vulnificus* FM29 (hemolysin-positive) was injected hypodermically into ICR mice. Each test was done duplicate.

A, not treated; B, iron-dextran treated

요 약

2001년부터 2003년까지 부산의 광안리 연안해수와 양식장 밀집지역인 전남 여수시 가막만의 해수 및 어류에서 병원성 비브리오균을 분리하여, 그들이 생산하는 hemolysin, protease 및 urease 생산 pattern을 조사하였다. 즉, hemolysin과 protease의 상관관계, hemolysin에 대한 양이온의 영향, 병독인자의 신속검출법을 검토하였으며, 아울러 비병원성 비브리오균으로 분류되던 hemolysin과 protease 음성 *V. parahaemolyticus* 중에서 강력한 병원성을 나타내는 urease 양성균주의 생화학적 특성과 실험동물에 대한 치사독성을 조사한 결과를 요약하면 아래와 같다.

1. 부산 광안리 해수에서 분리된 비브리오는 총 7종, 174균주였으며, 균종별 검출빈도는 *V. parahaemolyticus* 37% (64/174), *V. cholerae* non-O1 20% (35/174), *V. alginolyticus* 18% (31/174), *V. vulnificus* 13% (22/174), *V. fluvialis* 9.8% (17/174), *V. hollisae* 1.7% (3/174), *V. mimicus* 1.1% (2/174)의 순이었다.
2. 광안리에서 분리된 비브리오 174균주 중 병독인자 (hemolysin, protease 및 urease) 생성균주의 비율은 61% (107/174)이었다.
3. 균종별로는 광안리에서 분리된 *V. cholerae* non-O1의 92% (33/36), *V. parahaemolyticus*의 53% (34/64), *V. fluvialis*의 76% (13/17), *V. vulnificus*의 73% (16/22), *V. alginolyticus*의 6% (8/31) 가 hemolysin, protease 또는 urease를 생성하였다.
4. 비브리오균의 주된 병독인자는 hemolysin으로 알려져 왔으나, 본 연구에서 분리된 *V. parahaemolyticus*는 protease (80%, 41/51)를, *V. cholerae* non-O1은 hemolysin과 protease 모두 (79%, 26/33)를, 그리고

*V. vulnificus*은 hemolysin (94%, 15/16)를 주로 생산하였다.

5. 분리된 *V. parahaemolyticus* 총 156균주 중 urease 양성균주는 3.8% (6/156)이었는데, 해수에서 3균주 (*V. parahaemolyticus* S25, YKB4 및 YKB14), 그리고 어류에서 3균주 (*V. parahaemolyticus* YFB20, YFO21, 및 YFO22) 분리되었다.

6. Urease 양성 *V. parahaemolyticus* 6균주는 hemolysin과 protease 활성을 나타내지 않았으나, ICR 마우스에 대한 치사독성은 hemolysin 생산균주나 protease 생산균주에 비해 높았다.

7. *V. parahaemolyticus* YKB4, YKB14, YFB20, YFO21 및 YFO22의 urease 활성은 안정기 중기에 나타나기 시작하여 안정기 말기 까지 서서히 증가하는 경향을 나타낸 반면, *V. parahaemolyticus* S25는 대수증식기 초기에 급속하게 증가하여 안정기 초기에 최대 활성을 나타내고 안정기 말기까지 지속되는 경향을 나타내어, urease 활성은 균주에 따라 다른 양상을 나타내었다.

8. *V. parahaemolyticus*의 urease 활성은 urea를 첨가하지 않은 Luria-Bertani broth 배지에서도 강하게 나타났으며 urea를 0.1% 또는 0.2% 첨가할 때 다소 촉진되었으나, 그 이상의 농도에서는 균의 증식과 urease활성 모두 감소하였다.

9. *V. cholerae* non-O1 35균주 모두에서 콜레라독소유전자가 검출되지 않았다.

10. *V. vulnificus* 14균주 (H6, H19, H34, H40, H41, H42, H60, H64, FM29, FM33, FM35, FM54, S50, S52)에서 hemolysin 유전자가 검출되었으나, 그 중 S50과 S52는 hemolysin활성을 나타내지 않는 비발현 균

주이었다.

11. *V. cholerae* non-O1이 생산하는 hemolysin과 protease의 상관관계를 조사한 결과, 대수증식기 초기 또는 중기에 주로 생산되는 hemolysin은 대수증식기 후기에 생산되는 protease의 직접적인 분해작용을 받는 것으로 확인되었다.

12. K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} 등의 양이온은 protease 및 urease의 활성화에 큰 영향을 미치지 않았으나, Fe^{2+} 존재 하에서 hemolysin의 활성화는 2~3배 증가하였다.

13. *In vivo* 상에서 hemolysin의 독성에 미치는 Fe^{2+} 의 영향을 조사하기 위하여, iron-dextran 처리한 ICR 마우스에 hemolysin 생산균주 (*V. parahaemolyticus* H27, *V. vulnificus* FM29 그리고 *V. alginolyticus* S42)를 복강 주사한 결과, iron-dextran을 처리하지 않은 대조구에 비해 치사율이 2배 이상 높게 나타났다.

14. Hemolysin 생산균주를 ICR 마우스의 등 피하조직에 주사한 결과, 모세혈관 손상이 관찰되었으며 iron-dextran을 처리한 마우스에서는 손상정도가 더욱 심하게 나타났다.

15. 각 병독인자의 독성을 비교하기 위하여 urease 양성균주 (*V. parahaemolyticus* YKB4, YKB14 그리고 S25), protease 양성균주 (*V. parahaemolyticus* FM39와 FM50), 그리고 hemolysin 양성균주 (*V. parahaemolyticus* S34와 S72)를 각각 ICR 마우스에 복강주사하고 치사독성을 비교 조사한 결과, hemolysin 양성균주는 치사독성을 나타내지 않았으나, protease 양성균주 40~60%의 치사율을, 그리고 urease 양성균주는 60~80%의 높은 치사율을 나타내었다.

실론적으로, 비브리오균의 병독인자인 hemolysin, protease 및 urease 는 균종별로 일정한 양상을 나타내었으며, 특히 urease 양성 *V. parahaemolyticus*의 ICR 마우스에 대한 치사독성이 hemolysin 생산균 주나 protease 생산균주에 비해 매우 높게 나타났다. 따라서 향후 *V. parahaemolyticus*의 분리 동정시에 urease를 marker로 고려하여야 할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 글을 쓰려고 펜을 들고 보니, 잊은 듯한 세월들이 가로등 불빛처럼 하나하나 다가옵니다. 지금 생각해 보면 힘들고 어려운 것들 모두가 하나의 결실을 맺기 위한 생의 디딤돌이었다는 것에 가슴 흥건히 젖습니다.

그동안 너무나 부족한 저에게 학문적 가르침뿐만 아니라 정신적 상담자가 되어 인생의 가르침을 주신 장동석 교수님, 부족한 시간을 내어가며 일일이 지도와 격려를 하여 주신 박미연 박사님, 미약한 저의 논문을 심사해 주신 양지영 교수님, 김선봉 교수님, 김지희 박사님께 고개 숙여 깊은 감사를 드립니다. 그리고 식품공학과와 모든 교수님들께도 감사드립니다. 이 논문이 나오기까지 말없이 항상 웃음으로 도와주신 박찬웅님, 김성준님, 미생물실험실의 후배님들께도 진심으로 감사 드립니다. 또한 항상 든든한 후원자로 학업에 전념할 수 있도록 배려와 격려를 아끼지 않으신 예병욱 교장 선생님, 언제나 튼튼한 울타리가 되어주신 식품가공과 선생님들, 저를 도와주신 모든 분들께도 감사를 드립니다.

오늘이 있기까지 끝없는 사랑으로 저를 키워주시고 항상 따뜻한 마음으로 감싸주신 아버님, 어머님께 머리 숙여 감사를 드리며 앞으로도 오래 오래 건강하시길 빕니다. 그리고 항상 저의 마음속에 그리움으로 남아 있는 외할아버지, 장인, 장모님, 지금은 고인이 되신 한봉호 교수님의 영전에 이 조그마한 결실을 바칩니다.

끝으로 지금까지 항상 제일 가까운 곳에서 수많은 역경을 참고 인내와 사랑과 믿음으로 가슴앓이 하면서 내조를 해준 아내, 항상 잘해주지 못하고 늘 미안한 마음을 가슴속에 품고 사는 사랑하는 아들 형준, 진석이와 함께 이 조그마한 결실의 기쁨을 나누고자 합니다.

참고문헌

- Abbott, S.L., C. Powers, C.A. Kaysner, Y. Takeda, M. Ishibashi, S.W. Joseph and J.M. Janda. 1989. Emergence of a restricted bioserovar of *Vibrio parahaemolyticus* as the predominant cause of Vibrio-associated gastroenteritis on the West Coast of the United States and Mexico. J. Clin. Microbiol., 27, 2891-2893.
- Aronson, M., O. Medalia and B. Griffel. 1974. Prevention of ascending pyelonephritis in mice by urease inhibitors. Nephron., 12, 94-104.
- Barbieri, E., L. Falzano, C. Fiorentini, A. Pianetti, W. Baffone, A. Fabbri, P. Matarrese, A. Casiere, M. Katouli, I. Kühn, R. Möllby, F. Bruscolini and G. Donelli. 1999. Occurrence, diversity, and pathogenicity of halophilic *Vibrio* spp. and non-O1 *Vibrio cholerae* from estuarine waters along the Italian Adriatic Coast. Appl. Environ. Microbiol., 65, 2748-2753.
- Braude, A. and J. Siemieniowski. 1960. Role of bacterial urease in experimental pyelonephritis. J. Bacteriol., 80, 171-179.
- Britigan, B.E., G.T. Ramussen, O. Olakanmi and C.D. Cox. 2000. 철이온 acquisition from *Pseudomonas aeruginosa* siderophores by human phagocytes: an additional mechanism of host defense through iron sequestration? Infect. Immun., 68, 1271-1275.

- Caldini, G., A. Neri, S. Cresti, V. Boddi, G.M. Rossolini and E. Lanciotti. 1997. High prevalence of *Vibrio cholerae* non-O1 carrying heat-stable-enterotoxin-encoding genes among *Vibrio* isolates from a temperature-climate river Basin of central Italy. Appl. Environ. Microbiol., 63, 2934-2939.
- Cary, J.W., J.F. Linz and D. Bhatnagar. 2000. Microbial foodborne diseases. Technomic Pub., pp. 157-190.
- Chaudhuri, K., R.K. Bhadra and J. Das. 1992. Cell surface characteristics of environmental and clinical isolates of *Vibrio cholerae* non-O1. Appl. Environ. Microbiol., 58, 3567-3573.
- Cherwonogrodzky, J.W. and A.G. Clark. 1982. The purification of the Kanagawa haemolysin from *Vibrio parahaemolyticus*. FEMS Microbiol. Lett., 15, 175-179.
- Chow, K.H., T.K. Ng, K.Y. Yuen and W.C. Yam. 2001. Detection of RTX toxin gene in *Vibrio cholerae* by PCR. J. Clin. Microbiol., 39, 2594-2597
- Cover, T.L. and M.J. Blaser. 1995. *Helicobacter pylori*: a bacterial cause of gastritis, peptic ulcer disease, and gastric cancer. ASM News, 60, 21-26.
- Denkin, S.M. and D.R. Nelson. 1999. Induction of protease activity in *Vibrio anguillarum* by gastrointestinal mucus. Appl. Environ. Microbiol., 65, 3555-3560.
- Division of Bacterial Respiratory Infections, KNIH, KCDC. 2004.

Analysis on the epidemiological and Biochemical characteristics of *Vibrio vulnificus* infections in 2003. Communicable Diseases Monthly Report, 15, 93-94.

Edward, P.D., J.M. Janda, I.A. Frederic and J.B. Edward, 1984. Comparative studies and laboratory diagnosis of *Vibrio vulnificus*, an invasive *Vibrio* sp. J. Clin. Microbiol., 19, 122-125.

Eko, F.O. 1992. Urease production in *Vibrio parahaemolyticus*: a potential marker for virulence. Eur. J. Epidemiol., 8, 627-628.

Farrell, D.H. and J.H. Crosa. 1991. Purification and characterization of a secreted protease from the pathogenic marine bacterium *Vibrio anguillarum*. Biochem., 30, 3432-3436.

Food and Drug Administration. 1992. Bacteriological Analytical Manual 7th ed., AOAC, Arlington, VA. U.S.A.

Fujino, T., R. Sakazakim and K. Tamura. 1974. Designation of types strain of *Vibrio parahaemolyticus* and description of 200 strains of the species. Int. J. Syst. Bacteriol., 24, 447-449.

Gray, L.D. and A.S. Kreger. 1985. Purification and characterization of an extracellular cytolysin produced by *Vibrio vulnificus*. Infect. Immun., 48, 62-72.

Hawtin, P.R., A.R. Stacey, and D.G. Newell. 1990. Investigation of the structure and localization of the urease of *Helicobacter pylori* using monoclonal antibodies. J. Gen. Microbiol., 136, 1995-2000.

- Herrington, D.A., R.H. Hall, G.A. Losonsky, J.J. Mekalanos, R.K. Taylor and M.M. Levine. 1988. Toxin, toxin-coregulated pili, and *toxR* regulon are essential for *Vibrio cholerae* pathogenesis in humans. J. Exp. Med., 168, 1487-1492.
- Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley and S.T. Williams. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology 9th ed. Williams & Wilkins, U.S.A. pp. 273-274.
- Honda, S., S. Matsumoto, T. Miwatani and T. Honda. 1992. A survey of urease-positive *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from traveller's diarrhea, seawater and imported frozen seafoods. Eur. J. Epidemiol., 8, 861-864.
- Honda, T., M. Arita, T. Takeda, M. Yoh and T. Miwatani. 1985. Non-O1 *Vibrio cholerae* produces two newly identified of toxins related to *Vibrio parahaemolyticus* hemolysin and *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. Lancet., II, 163-164.
- Honda, T., Y. Ni and T. Miwatani. 1988. Purification and characterization of a hemolysin produced by a clinical isolate of Kanagawa phenomenon-negative *Vibrio parahaemolyticus* and related to the thermostable direct hemolysin. Infect. Immun., 56, 961-965.
- Huq, M.I., D. Huber and G. Kibria. 1979. Isolation of urease producing *Vibrio parahaemolyticus* strains from cases of gastroenteritis. Indian J. Med. Res., 70, 549-553.

- Ichinose, Y., K. Yamamoto, N. Nakasone, M.J. Tanabe, T. Takeda, T. Miwatani and M. Iwanaga. 1987. Enterotoxigenicity of El Tor like hemolysin of *Vibrio cholerae* non-O1. Infect. Immun., 55, 1090-1093.
- Iida, T., K.S. Park, O. Suthienkul, J. Kozawa, Y. Yamaichi, K. Yamamoto and T. Honda. 1998. Close proximity of the *tdh*, *trh* and *ure* genes on the chromosome of *Vibrio parahaemolyticus*. Microbiol., 144, 2517-2523.
- Iida, T., O. Suthienkul, K.S. Park, G.Q. Tang, R.K. Yamamoto, M. Ishibashi, K. Yamamoto and T. Honda. 1997. Evidence for genetic linkage between the *ure* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus*. J. Med. Microbiol., 46, 639-645.
- Iwanaga, M. and T. Kuyyakanond. 1987. Large production of cholera toxin by *Vibrio cholerae* O1 in yeast extract peptone water. J. Clin. Microbiol., 22, 405-408.
- Jegathesan, M. and T. Paramasivam. 1985. A strain of urease-producing *Vibrio parahaemolyticus* isolated in Malaysia. J. Diarrhoeal Dis. Res., 3, 162.
- Johnson, D.E., R.G. Russell, C.V. Lockatell, J.W. Warren and H.L.T. Mobley. 1993. Contribution of *Proteus mirabilis* urease to persistence, urolithiasis, and acute pyelonephritis in a mouse model of ascending urinary tract infection. Infect. Immun., 61, 2748-2754.

- Jones, B.D., C.V. Lockatell, D.E. Johnson, J.W. Warren, and H.L.T. Mobley. 1990. Construction of a urease-negative mutant of *Proteus mirabilis*: analysis of virulence in a mouse model of ascending urinary tract infection. *Infect. Immun.*, 58, 1120-1123.
- Joseph, S.W., R.R. Colwell and J.B. Kaper. 1982. *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic vibrios. *Crit. Rev. Microbiol.*, 10, 77-124.
- Kaper, J.B., H. Lockman, R.R. Colwell and S.W. Joseph. 1979. Ecology, serology, and enterotoxin production of *Vibrio cholerae* in Chesapeake Bay. *Appl. Environ. Microbiol.*, 37, 91-103.
- Kaper, J.B., J.G. Morris Jr. and M.M. Levine. 1995. Cholera. *Clin. Microbiol. Rev.*, 8, 48-86.
- Kaper, J.B., R.K. Campen, R.J. Seidler, M.M. Baldini and S. Falkow. 1984. Cloning of the thermostable direct or Kanagawa phenomenon-associated hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect. Immun.*, 45, 290-292.
- Kaysner, C.A., C. Aberta, P.A. Trost, W.E. Hill and M.M. Wekell. 1994. Urea hydrolysis can predict the potential pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated in the Pacific Northwest. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 3020-3022.
- Kelly, M. and E.M.D. Stroh. 1989. Urease-positive, Kanagawa negative *Vibrio parahaemolyticus* from patients and the

- environment in the Pacific Northwest. J. Clin. Microbiol., 27, 2820-2822.
- Kiiyukia, C., A. Nakajima, T. Nakai, K. Muroga, H. Lawakami and H. Hashimoto. 1992. *Vibrio cholerae* non-O1 isolated from ayu fish in Japan. Appl. Environ. Microbiol., 58, 3078-3082.
- Kim, S.H., M.Y. Park, Y.E. Lee, M.H. Cho and D.S. Chang. 1997. Characteristics of hemolysin produced by *Vibrio cholerae* non-O1 FM-3 isolated from seawater. J. Korean Fish. Soc., 30, 556-561.
- Kosary, M.K. and A.S. Kreger. 1985. Production and partial characterization of an elastolytic protease of *Vibrio vulnificus*. Infect. Immun., 50, 534-540.
- Kreger, A. and D. Lockwood. 1981. Detection of extracellular toxin(s) produced by *Vibrio vulnificus*. Infect. Immun., 33, 583-590.
- Lam, S. and M. Yeo. 1980. Urease-positive *Vibrio parahaemolyticus* strain. J. Clin. Microbiol., 12, 57-59.
- Lee, B.H. and H.J. Park. 1997. Study on the hemolysin from marine *V. vulnificus*. J. Kor. Environ. Sci., 6, 225-229.
- Litwin, C.M., T.W., Rayback and J. Skinner. 1996. Role of catechol siderophore synthesis in *Vibrio vulnificus* virulence. Infect. Immun., 64, 2834-2838.

- MacLaren, D.M. 1968. The significance of urease in *Proteus pyelonephritis*: a bacteriological study. J. Pathol. Bacteriol., 96, 45-56.
- MacLaren, D.M. 1969. The significance of urease in *Proteus pyelonephritis*: a histologica and biochemical study. J. Pathol. Bacteriol., 97, 43-49.
- MacLaren, D.M. 1974. The influence of acetohydroxamic acid on experimental *Proteus pyelonephritis*. Invest. Urol., 12, 146-149.
- Magalhaes, M., V. Magalhaes, M.G. Antas and S. Tateno. 1991. Isolation of urease-positive *Vibrio parahaemolyticus* from diarrheal patients in northeast Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo., 33, 263-265.
- Magalhacs, M., Y. Takeda, V. Magalhaes and S. Tateno. 1992. Brazillian urease-positive strains of *Vibrio parahaemolyticus* carry genetic potential to produce the TDH-related hemolysin. Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio de J., 87, 167-168.
- Mel, S.F., K.J. Fullner, S.M. Mackin, W.I. Lencer and J.J. Mekalanos. 2000. Association of protease activity in *Vibrio cholerae* vaccine strains with decreases in transcellular epithelial resistance of polarized T84 intestinal epithelial cells. Infect. Immun., 68, 6487-6492.
- Miyake, M., T. Honda and T. Miwatani. 1989. Effects of divalent cations and saccharides on *Vibrio metschnikovii* cytolysin-induced

- hemolysis of rabbit erythrocytes. Infect. Immun., 57, 158-163.
- Miyamoto, Y., T. Kato, Y. Obara, S. Akiyama, K. Takizawa and S. Yamai. 1969. *In vitro* hemolytic characteristics of *Vibrio parahaemolyticus*: its close correlation with human pathogenicity. J. Bacteriol., 100, 1147-1149.
- Miyoshi, N. C. Shimizu, S. Miyoshi and S. Shinoda. 1987. Purification and characterization of *Vibrio vulnificus* protease. Microbiol. Immunol., 31, 13-25.
- Miyoshi, S.I., H. Wakae, K.I. Tomochika and S. Shinoda. 1997a. Functional domains of a zinc metalloprotease from *Vibrio vulnificus*. J. Bacteriol., 179, 7606-7609.
- Miyoshi, S.I., K. Sasahara, S. Akamatsu, M. Monzur Rahman, T. Katsu, K.I. Tomochika and S. Shinoda. 1997b. Purification and characterization of a hemolysin produced by *Vibrio mimicus*. Infect. Immun., 65, 1830-1835.
- Miyoshi, S.I., H. Nakazawa, K. Kawata, K.I. Tomochika, K. Tobe and S. Shinoda. 1998. Characterization of the hemorrhagic reaction caused by *Vibrio vulnificus* metalloprotease, a member of the thermolysin family. Infect. Immun., 66, 4851-4855.
- Mobley, H.L.T., M.D. Island and R.P. Hausinger. 1995. Molecular biology of microbial ureases. Microbiol. Rev., 59, 451-480.

- Musher, D.M., D.P. Griffith, D. Yawn and R.D. Rossen. 1975. Role of urease in pyelonephritis resulting from urinary tract infection with *Proteus*. J. Infect. Dis., 131, 177-181.
- Nandi, B., R.K. Nandy, A.C.P. Vicente and A.C. Ghose. 2000. Molecular characterization of a new variant of toxin-coregulated pilus protein (TcpA) in a toxigenic non-O1/non-O139 strain of *Vibrio cholerae*. Infect. Immun., 68, 948-952.
- Norqvist, A., B. Norrman and H.W. Watz. 1990. Identification and characterization of a zinc metalloprotease associated with invasion by the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. Infect. Immun., 58, 3731-373
- Oberhofer, T.R. and J.K. Podgore. 1982. Urea-hydrolyzing *Vibrio parahaemolyticus* associated with acute gastroenteritis. J. Clin. Microbiol., 16, 581-583.
- Oh, E.K., Y. Tamanoi, A. Toyoda, K. Usui, S. Miyoshi, D.S. Chang and S. Shinoda. 1993. Simple purification method for a *Vibrio vulnificus* hemolysin by a hydrophobic column chromatography in the presence of a detergent. Microbiol. Immunol., 37, 975-978.
- Okitsu, T., R. Osawa, S. Pornruangwong and S. Yamai. 1997. Urea hydrolysis and suppressed production of thermostable direct hemolysin (TDH) by *Vibrio parahaemolyticus* associated with presence of TDH-related hemolysin genes. Current Microbiology,

34, 314-317.

- Okuda J, M. Ishibashi, S.L. Abbott, J.M. Janda and M. Nishibuchi. 1997. Analysis of the thermostable direct hemolysin (*tdh*) gene and the *tdh*-related hemolysin (*trh*) genes in urease-positive strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated on the west coast of the United States. J. Clin. Microbiol., 35, 1965-1971.
- Osawa R, T. Okistum, H. Morozumi and S. Yamai. 1996. Occurrence of urease-positive *Vibrio parahaemolyticus* in Kanagawa, Japan, with specific reference to presence of thermostable direct hemolysin (TDH) and the TDH-related hemolysin genes. Appl. Environ. Microbiol., 62, 725-727.
- Osterberg, E., H.O. Hallander, A. Kallner, A. Lundin, S.B. Svenssoon and H. Aberg. 1990. Female urinary tract infection in primary health care: bacteriological and clinical characteristics. Scand. J. Infect. Dis., 22, 477-484.
- Pal, A., T. Ramamurthy, R.K. Bhadra, T. Takeda, T. Shimada, Y. Takeda, G.B. Nair, S.C. Pal and S. Chakrabarti. 1992. Reassessment of the prevalence of heat-stable enterotoxin (NAG-ST) among environmental *Vibrio cholerae* non-O1 strains isolated from Calcutta, India, by using a NAG-ST DNA probe. Appl. Environ. Microbiol., 58, 2485-2489.
- Park, J.W., T.A. Jahng, H.W. Rho, B.H. Park, N.H. Kim and H.R. Kim. 1994. Inhibitory mechanism of Ca^{2+} on the hemolysis caused by *Vibrio vulnificus* cytolysin. Biochem. Biophys. Acta.,

1194, 166-170.

- Park, K.S., T. Iida, Y. Yamaichi, T. Oyagi, K. Yamamoto and T. Honda. 2000. Genetic characterization of DNA region containing the *trh* and *ure* genes of *Vibrio parahaemolyticus*. Infect. Immun., 68, 5742-5748.
- Park, M.Y., E.W. Lee, H.K. Seong, I.S. Shin and D.S. Chang. 2003. Purification of hemolysin produced by *Vibrio cholerae* non-O1 isolated from seawater. Food Sci. Biotechnol., 12, 228-232.
- Payne, S.M. and R.A. Finkelstein. 1978. Siderophore production by *Vibrio cholerae*. Infect. Immun., 20, 310-311.
- Raimondi, F. J.P.Y. Kao, C. Fiorentini, A. Fabbri, G. Donelli, N. Gasparini, A. Rubino and A. Fasano. 2000. Enterotoxicity and cytotoxicity of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin *in vitro* system. Infect. Immun., 68, 3180-3185.
- Reidl, J. and K.E. Klose. 2002. *Vibrio cholerae* and cholera: out of the water and into the host. FEMS Microbiol. Rev., 741, 1-15.
- Rivera, I.G., M.A. Chowdhury, A. Huq, D. Jacobs, M.T. Martins and R.R. Colwell. 1995. Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences and the PCR to generate fingerprints of genomic DNAs from *Vibrio cholerae* O1, O139, and non-O1 strains. Appl. Environ. Microbiol., 61, 2898-2904.
- Russel, R.G., B.D. Tall and J.G. Morris. 1992. Non-O1 *Vibrio*

- cholerae* intestinal pathology and invasion in the removable intestinal tie adult rabbit diarrhea model. Infect. Immun., 60, 435-442.
- Saha, P.K., H. Koley and G.B. Nair. 1996. Purification and characterization of an extracellular secretogenic non-membrane-damaging cytotoxin produced by clinical strains of *Vibrio cholerae* non-O1. Infect. Immun., 64, 3101-3108.
- Saiki, R.K., D.H. Golfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Hifuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis and H.A. Erlich. 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, 239, 487-491.
- Secades, P. and J.A. Guijarro. 1999. Purification and characterization of an extracellular protease from the fish pathogen *Yersinia ruckeri* and effect of culture conditions on production. Appl. Environ. Microbiol., 65, 3969-3975.
- Shao, C.P. and L.I. Hor. 2000. Metalloprotease is not essential for *Vibrio vulnificus* virulence in mice. Infect. Immun., 68, 3569-3573.
- Shao, C.P. and L.I. Hor. 2001. Regulation of metalloprotease gene expression in *Vibrio vulnificus* by a *Vibrio harveyi* LuxR homologue. J. Bacteriol., 183, 1369-1375.
- Shinoda, S., S. Miyoshi, H. Yamanaka and N. Miyoshi-Nakahara. 1985. Some properties of *Vibrio vulnificus* hemolysin. Microbiol. Immunol., 29, 583-590.

- Simpson, L.M. and J.D. Oliver. 1983. Siderophore production by *Vibrio vulnificus*. Infect. Immun., 41, 644-649.
- Singh, D.V., M.H. Matte, G.R. Matte, S. Jiang, F. Sabeena, B.N. Shukla, S.C. Sanyal, A. Huq and R.R. Colwell. 2001. Molecular analysis of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1 and non-O139 strains: clonal relationships between clinical and environmental isolates. Appl. Environ. Microbiol., 67, 910-921.
- Starks, A.M., T.R. Schoeb, M.L. Tamplin, S. Parveen, T.J. Doyle, P.E. Bomeisl, G.M. Escudero and P.A. Gulig. 2000. Pathogenesis of infection by clinical and environmental strains of *Vibrio vulnificus* in iron-dextran-treated mice. Infect. Immun., 68, 5785-5793.
- Stine, O.C., S. Sozhamannan, Q. Gou, S. Zheng, J.G. Morris, Jr. and J.A. Johnson. 2000. Phylogeny of *Vibrio cholerae* based on *recA* sequence. Infect. Immun., 68, 7180-7185.
- Suthienkul, O., M. Ishibashi, T. Iida, N. Nettip, S. Supave J.B. Eampokalap, M. Makino and T. Honda. 1995. Urease production correlates with possession of the *trh* gene in *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated in Thailand. J. Infect. Dis., 172, 1405-1408.
- Takeda, Y. 1983. Thermostable direct hemolysin of *Vibrio*

parahaemolyticus. Pharmacol. Ther., 19, 123-146.

Tang, G.Q., T. Iida, K. Yamamoto and T. Honda. 1994. A mutant toxin of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin which has lost hemolytic activity but retains ability to bind to erythrocytes. Infect. Immun., 62, 3299-3304.

Weatherburn, M.W. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia, Anal. Chem., 39, 971-974.

Wong, H.C., S.H. Liu, T.K. Wang, C.L. Lee, C.S. Chiou, D.P. Liu, M. Nishibuchi and B.K. Lee. 2000. Characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 from Asia. Appl. Environ. Microbiol., 66, 3981-3986.

Yamamoto, K., A.C. Wright, J.B. Kaper and J.G. Morris. 1990. The cytolysin gene of *Vibrio vulnificus*: Sequence and relationship to the *Vibrio cholerae* El Tor hemolysin gene. Infect. Immun., 58, 2706-2709.

Zitzer, A., I. Walev, M. Palmer and S. Bhakdi. 1995. Characterization of *Vibrio cholerae* El Tor cytolysin as an oligomerizing pore-forming toxin. Med. Microbiol. Immunol., 184, 37-44.

국립보건원 방역과 · 대한감염학회. 2000. 법정전염병의 신고범위 및 진단기준.

김영만, 이명숙, 장동석. 1986. 생선회에 오염된 장염비브리오균에 미치는 저장온도의 영향. 한국수산학회지, 19, 136-140.

김영만, 신일식, 장동석. 1987. 韓國沿岸의 *Vibrio vulnificus*의 分布에 관한 研究. 한국수산학회지, 20, 591-600.

김영만, 장동석. 1977. 부산연안의 *Vibrio parahaemolyticus* 분포에 관한 연구. 부산수산대학연구보고(자연과학), 17(1,2), 45-54.

김영만, 장동석. 1978. 측정방법에 따른 장염비브리오균의 검출율의 비교. 한국수산학회지, 11, 19-24.

김영부. 2001. 설사 환자 및 해수에서 분리한 장염비브리오의 병원 인자와 유전자 형별. 대한미생물학회지, 31, 229-238.

김종숙. 1999. *Vibrio parahaemolyticus*가 생산하는 urea분해효소의 특성. 동의대학교 박사학위논문.

김현진. 2003. 부산 연안 해수 중의 비브리오균의 분포조사 및 NAG 비브리오의 병원성 인자. 부경대학교 석사학위논문.

박영호, 장동석, 김선봉. 1994. 수산가공이용학. 형설출판사. pp. 1073-1078.

박유환. 2000. 비브리오 패혈증. http://hosp.chosun.ac.kr/mede_info/비브리오.html.

백병걸, 이준화, 김천현, 김병수. 1996. 전북 해안의 해수, 해토 및 해 산어류에 있어서의 *Vibrio* 속의 분포. 한국수의공중보건학회지, 20,

65-73.

박희옥, 김창민, 우건조, 박선희, 이동하, 장은정, 박기환. 2001. 최근 한국에서 발생한 식중독 모니터링 및 추이분석. 한국식품위생안전성학회지, 16, 205~212.

성희경. 1997. 한국에서 분리된 *Vibrio cholerae* non-O1의 분류학적 특성과 독성인자. 부경대학교 박사학위 논문.

성희경. 2003. 한국에서 분리된 *Vibrio cholerae* non-O1의 혈청형의 분포. 한국미생물생명공학회지, 31, 13-17.

윤한식, 안병용. 1992. 군산만에서 서식하는 패류의 장염 비브리오에 관한 분포연구. 한국식품위생안전성학회지, 7, 137-142.

장동석. 1998. 용혈독소를 생산하는 기수성 비브리오균의 생리·생태적 특성과 수산식품의 위생대책. 한국과학재단 연구보고서.

장동석, 김성준. 1977. 장염비브리오균의 분포 및 생리적 특성에 관한 연구. 수산진흥원 연구보고, 19, 7-52.

장동석, 김영만, 박옥연, 성희경, 유홍식, 김신명, 김영목. 1993. 어류에 대한 비브리오균 오염실태에 관한 연구. 수협중앙회 연구용역 보고서(대외비). pp.1-61.

장동석, 신일식, 최승태, 김영만. 1986. *Vibrio vulnificus* 균의 분포 및 세균학적 특성. 한국수산학회지, 19, 118-126.

조묘현. 1998. 병원감염세균의 특성 및 그에 관한 신속동정과 대책.

부경대학교 박사학위논문.

주진우, 박민정, 허분수, 정초록. 2000. 부산과 대전 해안에서 *Vibrio vulnificus*와 *Vibrio parahaemolyticus*의 분리 및 동정. 대한미생물학회지, 35, 390-316.

질병관리본부. 2004. 전염병통계. <http://dis.mohw.go.kr/statistics/statistics.asp>.

함희진, 진영희, 정운태. 2002. 시판 수산물 중 장염 비브리오균의 분포와 분리균주의 혈청학적 특성. 한국식품위생안전성학회지, 17, 152-156.

홍종해, 이용욱. 1990. 우리나라에서 報告된 集團 食中毒의 發生 特徵에 關한 研究(1981-1989). 한국식품위생안전성학회지, 5, 205-212.

三好 伸一. 1989. ビブリオ感染症, 非消化器感染症を中心に. J. Antibact. Antifung. Agents, 17, 279-285.