



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

제주 연안에 서식하는
Vibrio alginolyticus 분포

濟州大學校 大學院

海洋生命科學科

崔元瑄

2021 年 8 月

제주 연안에 서식하는
Vibrio alginolyticus 분포

指導教授 許文洙

崔元瑄

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2021 年 8 月

崔元瑄의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 _____ 정준범 _____

委 員 _____ 최학선 _____

委 員 _____ 허문수 _____



濟州大學校 大學院

2021 年 8 月



Distribution of *Vibrio alginolyticus* inhabiting
the Jeju coast

Wonsun Choi

(Supervised by professor Moon-Soo Heo)

A thesis submitted in partial fulfillment
of the requirement for the degree of
Master of Science

Department of Marine life science
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

August, 2021

목 차

목 차	i
List of Tables	iii
List of Figures	V
Abstract	vi
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	3
2.1 시료 채취 및 대상지역	3
2.2 환경인자, 이화학적 특성	4
2.3 <i>V. alginolyticus</i> 분리, 배양 및 보관	4
2.4 <i>V. alginolyticus</i> 의 형태학적, 생화학적 동정 및 배양 성상	6
2.4.1 표준균주	6
2.4.2 TCBS agar	7
2.4.3 Chrom agar	8
2.4.4 그람염색 (Gram staining)	9
2.4.5 Oxidase test	9
2.4.6 Catalase test	9
2.4.7 Sulfide-indole-motility (SIM)	10
2.4.8 Kligler Iron agar (KIA)	11
2.4.9 Metyl-red test	12
2.4.10 Voges-Proskauer test	12
2.4.11 API 20E kit	13
2.5 최적배양조건 (온도, pH, 염도)	15
2.6 항생제 감수성 시험	16

III. 결과 및 고찰	18
3.1 분리 균주의 생화학적 특성	18
3.2 샘플링 지점의 환경인자 측정 결과	22
3.3 항생제 감수성 시험	24
3.4 <i>V. alginolyticus</i> 의 분리 현황	26
3.4.1 지역별, 검체별 <i>V. alginolyticus</i> 분포	27
3.4.2 지역에 따른 월별 <i>V. alginolyticus</i> 분포	27
3.4.3 지역에 따른 월별 <i>V. alginolyticus</i> 분포	27
IV. 요약	28
V. 참고문헌	29
VI. 감사의 글	34

List of Tables

Table 1. Composition of 1% NaCl Alkaline Peptone Water (1% A.P.W)	5
Table 2. Composition of 3% NaCl Alkaline Peptone Water (3% A.P.W)	5
Table 3. Composition of 3% NaCl Brain Heart Infusion Agar (3% BHIA)	5
Table 4. Composition of Thiosulfate Citrate Blie salts Sucrose agar (TCBS agar)	7
Table 5. Composition of Chromogenic medium (CHROM agar)	8
Table 6. Composition of 1% NaCl Sulfide Indole Motility (SIM)	10
Table 7. Composition of 1% NaCl Kligler Iron agar (KIA)	11
Table 8. Composition of Methyl-red VOGES-PROSKUER broth (MR-VP broth)	12
Table 9. Composition of Muller Hinton broth (MHB)	16
Table 10. Composition of Muller Hinton agar (MHA)	16
Table 11. List of antibiotics used of antibiotic test	17
Table 12. Characteristics of biochemical of the isolated <i>V. alginolyticus</i>	20
Table 13. The Morphological and Physiological characteristics of <i>V. alginolyticus</i>	21

Table 14. Monthly environmental factor of the Jeju coast
.....23

Table 15. Antibiotics sensitive test of *V. alginolyticus* strains in 4 area
.....25

Table 16 Isolation frequency of *V. alginolyticus* from samples
.....27

List of Figures

Fig. 1. Sampling location of <i>V. alginolyticus</i>	3
Fig. 2. <i>V. alginolyticus</i> API 20E kit test result	11
Fig 3. Monthly <i>V. alginolyticus</i> detection rate	27

Abstract

Vibrio species are Gram-negative bacteria that are always distributed in seawater, and their appearance tends to increase as the water temperature increases. It is usually infected through contaminated seawater or seafood, and *V. alginolyticus* infection cases in humans are mainly etiologically associated with skin and ear wound infections such as acute otitis media and cellulitis.

Therefore, in this study, the distribution of *V. alginolyticus* along the coast of Jeju Island and the levels of water temperature, salinity, DO, and pH were also investigated, and the antibiotic susceptibility test of the isolated bacteria was also conducted.

In the case of seawater, 13 cases (21.7%) in the Daejeong area showed the highest distribution rate, and 8 cases (13.3%) in the Hallim area showed the lowest distribution rate. In the case of shellfish, the Daejeong area showed the largest distribution rate with 7 cases (23.3%), and the Seongsan area and Hallim area showed the lowest distribution rate with 4 cases (13.3%). The overall detection rate was the highest in Daejeong area with 20 cases (22.2%) and the lowest in Hallim area with 12 cases (13.3%). The detection rate according to changes in the marine environment was highest when the water temperature was highest.

I. 서론

해양 생태계에서 가장 흔한 박테리아 중 하나인 비브리오 종은 그람음성 호염균으로 해수 중에 항상 분포되어 있으며 대표적인 종으로는 *Vibrio cholera*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio alginolyticus* 등 이있다(Craig Baker-austin et al., 2018; Carla pruzzo et al., 2005).

*V. alginolyticus*는 수중에서 기회 감염성 병원체로 과거 *V. parahaemolyticus* 와 유사균으로 발견되었으나 자당 분해 여부의 차이를 가지며(Miguel kourany, 1983) 현재 *V. alginolyticus*로 명명되었다.

기후변화에 관한 정부간 협의체 (IPCC, Intergovernmental Panel on Climate Change) 4차 기후변화보고서(2007)에 따르면 전 지구적으로 지구 온난화에 의한 기후 변화가 일어나고 있으며 이에 따라 기온과 지구 평균 해수면 온도(SST, Sea surface temperature)가 상승하고 있고 더욱 심각한 상승이 이어질 것이라고 예상했으며 한반도의 SST 역시 지난 수십 년간 증가했으며(Luigi Vezzulli et al., 2013) 이로 인해 해양생물을 비롯하여 병원성 비브리오의 생리, 생태, 분포에도 영향을 미칠 수 있다(Young-Il Jeong et al., 2018). 유럽의 경우 비정상적인 온도가 증가에 따라 인간에게 감염되는 비브리오 출현이 증가됐다(Frederique Le Roux et al., 2015). 비브리오 감염은 일반적으로 수온이 상승할 경우(Sonja Oberbeckmann et al., 2012) 발생하며 오염된 물이나 해산물에 노출되거나 덜 익힌 해산물 섭취를 통해 감염되며 인간이나 어류 및 무척추동물(K.-K. Lee et al., 1973)에 걸쳐 다양한 증상을 유발한다. 인간의 경우 보통 해수에 피부가 노출되는 경우 감염이 이루어지며 보통은 귀에 염증을 일으키나 *V. vulnificus*와 같이 패혈증을 일으키기도 하며 창상감염, 만성궤양, 만성 골수염 환자에게서 분리되기도 하였다(Uwe Schmidt et al., 1979; Dong-Young Lee et al., 2008). 어류에 미치는 영향은 아직 불분명하나 감염된 어류에서 높은 비중을 차지하며 분리되며(Su Mi Kim et al., 2005), 특히 소라의 경우 여과섭식 과정에서 병원균이나 바이러스

및 독소를 농축시키므로 해양생물 독소의 매개체이자 주요한 감염원으로 작용할 수 있다(S R Rippey et al., 1994).

제주 지역의 육상수조식 양식장의 규모는 2020년 기준 266개로 전국 육상수조식 양식장의 49.4%에 달하며(KOSIS, 2020) 제주 본도의 자연 해안선 길이는 약 250 km로 평균적으로 적어도 1km마다 1개소 이상의 양식장이 분포하고 있다고 볼 수 있다. 육상양식장 배출수의 오염물질은 양식 어패류들이 섭취하지 못한 사료, 배설물, 소화시키지 못한 영양분 등이 섞여 고형 물질과 암모니아와 같은 용존유기물질을 모두 포함하므로 연안해역의 수질과 수중 생물에 많은 영향을 미칠 수 있다(Man-Chul Kim et al., 2009; Hyuk-joon Koh et al., 2013). 따라서 본 연구에서는 해양 레저활동이 빈번하며 양식장 밀집도가 높은 제주도 연안의 *V. alginolyticus* 의 지역별 분포 및 해양환경 변화와의 상관성을 알아보려고 하였다.

II. 재료 및 방법

2. 1. 시료 채취 및 대상 지역

*V. alginolyticus*는 제주도의 4개 지역 (성산, 표선, 한림, 대정)에서 지역별로 2020년 9월부터 2021년 2월까지 매월 해수는 10개 지점에서 1L씩, 소라는 5마리씩 시료를 채집하였다. 해수는 1L 멸균 채수곽과 채수봉을 이용하여 해수면에서 20~30cm 깊이에서 채수하였으며 소라는 지역 해녀를 통해 채집하여 아이스박스에 담아 -4°C 를 유지시키며 운송시킨 후 실험과정에 들어갔다.

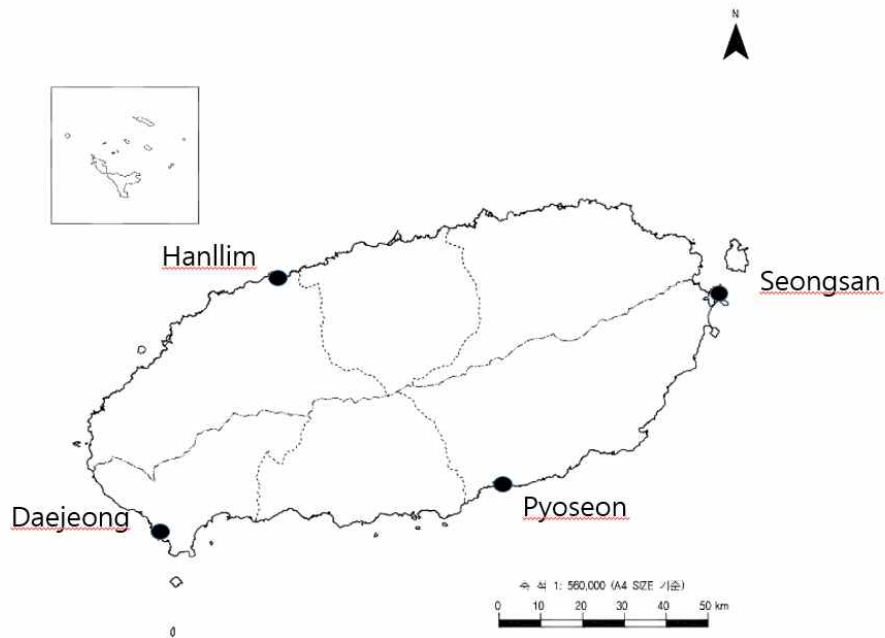


Fig. 1. Sampling location of *V. alginolyticus*

2. 2. 환경인자, 이화학적 특성

샘플 채취 시 *V. alginolyticus* 의 월별, 지역별 출현 빈도와 해양환경의 변화와의 연관성을 조사하기 위해 YSI (YSI Proplus, USA)을 사용하여 인근 해수의 수온, 염분, DO (dissolved oxygen), pH를 측정하였다.

2. 3. *V. alginolyticus* 분리, 배양 및 보관

운반해온 해수 1L를 Vacuum/pressure pump (GAST Manufacturing, USA)를 이용하여 Millipore filter (pore size 0.45mm, Hyundai micro co, KOREA)로 여과한 뒤 Millipore filter를 1% NaCl을 첨가한 Alkaline Peptone Water 100ml (pH 8.4, Difco, USA)에 35°C에서 15~18시간 1차 증균 배양하였고 1차 증균배양액 10ml를 다시 3% NaCl을 첨가한 Alkaline Peptone Water 90ml에 접종해 35°C에서 15~18시간 2차 증균 배양하였다.

소라의 경우 청동술로 표면을 흐르는 물에 깨끗이 세척 후 패각을 제거한 뒤 패육을 믹서에 1분 30초간 분쇄하여 100g을 1% NaCl A.P.W (pH 9.2) 500ml 에서 1차 증균 배양을 한 후 15~18시간 후 10ml을 다시 3% A.P.W 90mL에 접종해 35°C에서 15~ 18시간 2차 증균 배양하였다. 소라는 글리코젠을 함유하여 pH가 저하되므로 pH를 9.2로 조정하여 배양하였다. 2차 증균 후 멸균된 백금이를 사용하여 TCBS (Thiosulfate Citrate Bile salts Sucrose) agar에 2차 증균액 상층부를 도말하고 35°C에서 15~18시간 배양한다. (Min-Kyoung Song et al., 2007), 분리된 균주는 25% (v/v) glycerol에 현탁하여 -80°C에서 보관한 후 실험에 사용하였다.

Table 1. Composition of 1% NaCl Alkaline Peptone Water (1% A.P.W)

Ingredient	Amounts (/L)
Peptone	10.0 g
Sodium Chloride	10.0 g

Table2. Composition of 3% NaCl Alkaline Peptone Water (3% A.P.W)

Ingredient	Amounts (/L)
Peptone	10.0 g
Sodium Chloride	30.0 g

Table 3. Composition of 3% NaCl Brain Heart Infusion Agar (3% BHIA)

Ingredient	Amounts (/L)
Calf Brains, Infusion from 200g	7.7 g
Beef Heart, Infusion from 250g	9.8 g
Proteose Peptone	10.0 g
Dextrose	2.0 g
Sodium Chloride	5.0 g
Disodium Phosphate	2.5 g
Agar	15.0 g

2. 4. *V. alginolyticus*의 형태학적, 생화학적 동정 및 배양 성상

*V. alginolyticus*의 동정은 형태 및 생화학적 성상 및 배양성상에 의해 확정하였다. *V. alginolyticus*는 호염성균이므로 일부 배지에는 3%의 NaCl을 첨가하여 다음과 같은 성상들을 시험하였다.

2.4.1 표준균주

분리한 균주들과 형태 및 생화학적 성상을 비교하기 위해 표준균주 *V. alginolyticus* KCCM40513을 한국미생물보존센터 (Korean Culture Center of Microorganisms, KCCM)에서 분양받아 비교하여 확정하였다.

2.4.2 TCBS agar

*V. alginolyticus*는 TCBS (Thiosulfate Citrate Bile salts Sucrose) agar에서 sucrose를 분해하여 직경 2mm 내외의 yellow color colony를 형성하므로 15~18 시간 배양 후 yellow color colony를 분리하여 3% NaCl을 첨가한 BHIA (Brain Heart Infusion Agar, Difco, USA)에서 배양하여 실험에 사용하였다.

Table 4. Composition of Thiosulfate Citrate Bile salts Sucrose agar (TCBS agar)

Ingredient	Amounts (/L)
Yeast Extract	5.0 g
Proteose Peptone No. 3	10.0 g
Sodium Citrate	10.0 g
Sodium Thiosulfate	10.0 g
Oxgall	8.0 g
Saccharose	20.0 g
Sodium Chloride	10.0 g
Ferric Ammonium Citrate	1.0 g
Bromthymol Blue	0.04 g
Thymol Blue	0.04 g
Agar	15.0 g

2.4.3 CHROM agar

TCBS에서 1차적으로 sucrose를 비분해하는 비브리오 균들을 분리한 후 *Vibrio cholerae* 와 같이 TCBS에서 *V. alginolyticus* 와 같은 성상을 나타내는 균들을 분리해 내기 위해 2차적으로 Chromogenic medium (CHROM agar) 에서 형태학적 동정을 실시하였다. CHROM agar에서 무색의 Creamy한 질감의 colony를 순수분리하여 마찬가지로 3% BHIA에서 배양하여 실험에 사용하였다.

Table 5. Composition of Chromogenic medium (CHROM agar)

Ingredient	Amounts (/L)
Peptone & Yeast extract	8.0 g
Salts	51.4 g
Chromogenic mix	0.3 g
Agar	15.0 g
pH	9.0(±0.2)

2.4.4 그람염색 (Gram staining)

그람염색은 Gram-staining kit (BBL, Difco., USA)를 사용하였으며 Slide glass에 분리된 균을 고정시킨 후 Crystal violet 1분, Iodine 1분, 95% Alcohol 30초, Safranin을 45초간 처리하여 염색 후 그람음성 간균을 분리해냈다. 그람염색을 한 후 일부 그람양성균의 경우 신속히 탈색되어 그람음성균으로 잘못 판정되는 경우가 있으므로 검사의 정확성을 위해 KOH String 검사를 추가로 실시하여 그람음성 간균을 분리해 내었다(T. Gregersen, 1978; John D. Duck, 1982).

2.3.5 Oxidase test

Oxidase test 는 3% NaCl BHIA 에서 배양한 colony에 1~2방울의 Oxidase reagent (Biomerieux, France)를 적하한 후 30초 이내에 보라색으로 변하면 양성으로 판정하였다(Jeffery J. Tarrand et al., 1982). 수 분후에 나타나는 짙은 청색은 양성으로 판정하지 않았다.

2.3.6 Catalase test

Catalase test는 18시간 배양한 colony를 슬라이드 글라스에 올리고 3% H₂O₂를 1~2방울을 떨어뜨려 즉시 기포가 생성되면 양성으로 판정하였다.

2.3.7 Sulfide-indole-motility (SIM)

Sulfide-indole-motility (SIM, Hardy, USA) 배지에 균을 접종하고 35°C에서 24~48시간 배양 후 H₂S 생성 여부와 운동성을 확인한 후 Kovacs 시약을 5방울 정도 떨어트려 배지 상단에 붉은색 고리가 형성되면 인돌 양성으로 판정하였다.

Table 6. Composition of 1% NaCl Sulfide Indole Motility (SIM)

Ingredient	Amounts (/L)
Casein Peptone	20.0 g
Animal Tissue Peptone	6.1 g
Ferrous Ammonium Sulfate	0.2 g
Sodium Thiosulfate	0.2 g
Agar	3.5 g

2.4.8 Kligler Iron agar (KIA)

Kligler Iron agar (KIA, Hardy, USA) 배지에 접종 후 37°C에서 18~24시간 배양하여 glucose/lactose 분해능 및 H₂S, gas생성 여부를 확인하였으며 배지가 노란색으로 변하면 glucose와 lactose를 분해한 것이고 검은색으로 변하면 H₂S 생성을 한 것이며 아무런 변화 없이 붉은색이면 분해를 하지 못한 것으로 *V. alginolyticus*의 경우 배지균열 없이 검은색으로 변한 부분이 없으며 배지의 상단부는 붉은색, 하단부는 노란색으로 변한 것을 양성으로 판정하였다.

Table 7. Composition of 1% NaCl Kligler Iron agar (KIA).

Ingredient	Amounts (/L)
Casein Peptone	10.0 g
Animal Tissue Peptone	10.0 g
Lactose	10.0 g
Sodium Chloride	5.0 g
Dextrose	1.0 g
Sodium Thiosulfate	0.5g
Ferric Ammonium Citrate	0.5 g
Phenol Red	25.0 mg
Agar	15.0 g

2.4.9. Metyl-red (MR) test

Metyl - red (MR) test 는 MR-VP 배지 (Difco, USA)에 접종 후 37℃에서 18~24시간 배양한 뒤 배지에 metyl red 시약을 떨어뜨려 붉은색으로 변하면 양성으로 판정하였다.

2.4.10. Voges-Proskauer (VP) test

Voges - Proskauer (VP) test는 MR- VP 배지에 접종 후 37℃에서 18~24시간 배양한 뒤 6% α -naptol 용액 0.2ml와 40% KOH 0.1ml를 떨어뜨려 1시간이내에 붉은색으로 변하면 양성으로 판정하였다.

Table 8. Composition of Methyl-red VOGES-PROSKUER broth (MR-VP broth)

Ingredient	Amounts (/L)
Peptone from meat	7.0 g
D(+)-Glucose	5.0 g
Phosphate buffer	5.0 g

2.4.11 API 20E kit

분리균주의 동화작용, 발효유무 등 생화학적 특성을 표준균주와 비교하기 위해 API 20E kit (Biomérieux, France)를 사용하였다. 냉장상태의 kit 와 시약들은 실험하기 30분전 실온에 꺼내 두었으며 트레이에 5ml의 멸균 증류수를 뿌려 strip이 건조되지 않게하였다. 상기 실험에서 표준균주와 동일한 반응을 보이는 균만을 선별한 후 프로토콜에 따라 API NaCl 0.85% Medium 5ml에 현탁하여 0.5 McFarland가 되게 조정한 후 현탁액을 스트립의 모든 테스트 튜브에 각각 튜브까지만 접종하였다. CIT, VP, GEL은 현탁액을 큐플까지 모두 채워주었고 ADH, LDC, ODC, H₂S, URE는 혐기적조건을 조성해주기위해 광유(mineral oil)를 큐플에 채워주었다.

호기적 상태로 37°C에서 18~24시간 배양한뒤 glucose가 양성이거나 3개이상의 테스트가 양성인 경우 TDA, IND,VP, GLU에 보조시약을 첨가하였다. nitrate 환원반응과 indole 생성 반응은 gas를 생성함으로써 다른반응들에 간섭을 일으킬 수 있으므로 가장 마지막에 테스트 하였다. TDA 테스트는 TDA시약을 한방울 떨어트려 짙은갈색으로 변할시 양성으로 판정하였다. IND에 JAMES 시약을 한방울 떨어트려 즉시 큐플 전체가 분홍색으로 변할 시 양성을 판정하였다. VP테스트는 VP1과 VP2를 각각 한방울씩 첨가하여 10분 후 붉은색이나 분홍색으로 변하면 양성으로 판정하였으며 10분 이후의 열은 분홍색은 양성으로 판정하지 않았다. GLU 테스트 튜브는 NIT1 과 NIT2 시약을 한 방울씩 떨어트린 후 5분 후 붉은색으로 변하면 양성으로 판정하였으며 노란색은 음성으로 판정하였다. 음성인 경우 nitrogen의 환원에 의한 것 일수 있으며 한번 더 확인하기 위해 Zn을 2~3mg 첨가한 후 여전히 노란색이면 nitrogen (N₂)으로의 환원인것이며 붉은색이나 분홍색으로 변하면 이는 튜브에 남아있던 nitrate (NO₃)가 zinc에 의해 환원 되었음을 의미하므로 양성으로 판정하였다. 실험 후 API 20E kit의 지침에 따라 결과를 판독하여 *V. alginolyticus*를 동정하였다.

2. 5. 최적배양조건 (온도, pH, 염도)

V. alginolyticus 의 최적 배양조건을 알아보기 위해 온도, pH, 염도의 배양조건을 조정하여 실험하였으며 배양온도실험은 3% NaCl을 첨가한 BHI broth (Brain Heart infusion, pH 8.4) 에 접종하여 온도별 (5, 15, 25, 35, 40, 45℃)로 배양한 후 배양액이 혼탁 되면 양성으로 판정하였다. pH는 37℃에서 3% NaCl을 첨가한 BHI broth에 pH를 2부터 12까지 조정 후 배양하고 배양액이 혼탁 되면 양성으로 판정하였으며 염도 실험은 BHI broth (pH 8.4) 접종 후 염 농도를 1%~12%까지 조정하여 접종한 후 배양액을 660nm에서 흡광도를 측정하여 판정하였다.

2. 6. 항생제 감수성 시험

분리된 *V. alginolyticus* 의 항생제 감수성 시험은 Bauer-kirby 방법(1966)에 준하여 시험하였다. 분리된 균주는 Muller Hinton broth (MHB, Difco, USA)에 접종한 후 35℃ 배양기에서 3~4시간 증균 배양하고 배양액의 농도를 McFarland 0.5가 되게 희석조정 하였다. 각 희석된 균액은 멸균된 면봉으로 Muller Hinton agar (MHA, Difco, USA)에 4분 구획 도말하고 5분간 방치시켜 균액을 흡수시킨 뒤 항생제 disc (BD, USA and Oxoid, UK) 를 올리고 35℃ 배양기에서 16~18시간 배양한 후 균의 증식 저해대를 측정하였다. 사용된 항생제는 Florfenicol, Amoxycillin, Oxytetracycline, Oxolinic acid, Flumequine, Doxycycline, Ciprofloxacin, Nalidixic acid이다(James J. Biemer, M.D., 1973).

Table 9. Composition of Muller Hinton broth (MHB)

Ingredient	Amounts (/L)
Beef Extract Powder	2.0 g
Acid Digest of Casein	17.5 g
Starch	1.5 g

Table 10. Composition of Muller Hinton agar (MHA)

Ingredient	Amounts (/L)
Beef Extract Powder	2.0 g
Acid Digest of Casein	17.5 g
Starch	1.5 g
Agar	17.0 g

Table 11. List of antibiotics used of antibiotic test

Antibiotic	Concentration
Amoxicillin	10 μ g
Ciprofloxacin	5 μ g
Doxycycline (30 μ g)	30 μ g
Florfenicol (30 μ g)	30 μ g
Flumequine (30 μ g)	30 μ g
Nalidixic acid (30 μ g)	30 μ g
Oxolinic acid (2 μ g)	2 μ g
Oxytetracycline (30 μ g)	30 μ g

III. 결과 및 고찰

3. 1. 분리 균주의 생화학적 특성

각 지역에서 분리한 균주들은 모두 TCBS agar에서 자당을 분해하여 등근 형태의 진한 yellow color colony를 형성하였으며 그람 염색 결과 그람 음성 단간균임을 확인하였고 Chrom Agar에 배양하여 White colony를 형성하였다. API 20E kit 실험을 실시하여 분리된 균주와 표준 *V. alginolyticus* 를 비교한 결과 ONPG, ADH, LDC 를 포함한 18개 항목이 동일한 반응을 보여 전형적인 *V. alginolyticus*의 특성을 나타내었다. Indole 반응은 모두 표준균주와 같이 양성반응을 보였으며 MR 반응의 경우 표준균주와 대부분의 분리 균주는 양성반응을 보였으며 성산지역과 표선지역의 경우 음성반응을 보이는 지점도 있었다(Table12).

호염성 시험에서 NaCl을 첨가하지 않은 NB와 10%의 NaCl을 첨가한 NB에서는 모두 발육하지 않았으며 1~8%의 식염을 첨가한 NB에서는 일부 발육하였다. 모두 발육한 농도는 2~5%의 NaCl을 첨가한 NB였으며 이를 통해 *V. alginolyticus*는 전형적인 호염균임을 확인하였다. 최적 배양온도시험은 5°C에서는 모두 발육하지 않았으며 15°C~45°C에서 모두 발육하였다. 35°C에서 가장 발육이 좋았으며 이를 통해 최적 발육온도는 35°C이며 *V. alginolyticus*는 중온균임을 알 수 있었다. 최적 pH test 에서는 pH 2~4와 pH 12 에서는 전혀 발육하지 않았으며 pH 5에서는 일부 발육하거나 약하게 혼탁되었다. 나머지 pH 농도의 경우 잘 자랐으며 특히 pH 8~9에서 가장 잘 발육하여 산성 조건보다 약 염기성 조건에서 발육이 좋음을 알 수 있었다. *V. alginolyticus*의 생화학적 특성은 Mr-VP 실험은 variable 하게 나타났으며 이를 제외하고는 샘플링 위치와 관계없이 전 세계적으로 대부분이 동일한 특성을 보였다(R. Siddiqui et al., 2012; E. H. Kampelmacher et al., 1972; Hamza Eid et al., 2015). 호염성 실험의 경우 해수에 노출된 환자의 대변에서 분리한 *V. alginolyticus* 는 11%의 NaCl 에서도 발육하였고(Selena Lam et al., 1981), 마찬가지로 인간의

대변 및 피부에서 분리한 *V. alginolyticus* 는 1~6%의 NaCl에서만 발육하였다(Uwe Schmidt et al., 1979). 그리고 해수 및 소라에서 분리한 본 실험에서는 10%의 NaCl을 첨가하였을때 발육하지 않았다(Table 13). 따라서 *V. alginolyticus*의 호염성은 지역적 혹은 검체 샘플에 따라 결과값에 차이가 있음을 알 수 있었다.

Table 12. Characteristics of biochemical reaction of the isolated *V. alginolyticus*

strains Characteristics	standard strains	Isolated <i>V. alginolyticus</i> strain			
		Seongsan	Pyoseon	Hallim	Daejeong
Indole in SIM	+	+	+	+	+
Metyl red	+	±	+	+	±
Oxidase	+	+	+	+	+
KIA	K/A	K/A	K/A	K/A	K/A
ONPG(ortho-nitro-phyeny l-galactosidase)	-	-	-	-	-
ADH (arginine)	-	-	-	-	-
LDC (lysine)	+	+	+	+	+
ODC (ornithine)	+	+	+	+	+
CIT (sodium citrate)	+	+	+	+	±
H ₂ S	-	-	-	-	-
URE (urea)	-	-	-	-	-
TDA (tryptophane)	-	-	-	-	-
IND (indole)	+	+	+	+	+
VP (Voges-Proskauer)	-	-	-	-	±
GEL (kohn gelatin)	+	+	+	±	±
MAN (mannitol)	+	+	+	+	+
INO (inositol)	-	-	-	-	-
SOR (sorbitol)	-	-	-	-	-
RHA (rhamnose)	-	-	-	-	-
SAC (sucrose)	+	+	+	+	+
MEL (melibiose)	+	+	+	+	+
AMY (amygdalin)	-	-	-	-	±
ARA (arabinose)	-	±	-	-	-
Chrome Agar	W	W	W	W	W

W= White colony

Table 13. The Morphological and Physiological characteristics of *V. alginolyticus*

strains	standard strains	Isolated <i>V. alginolyticus</i> strain			
		Seongsan	Pyoseon	Hallim	Daejeong
Gram staining	-	-	-	-	-
Motility	+	+	+	+	+
Growth in					
0% NaCl	-	-	-	-	-
1% NaCl	+	+	+	+	+
2% NaCl	+	+	+	+	+
4% NaCl	+	+	+	+	+
6% NaCl	+	+	+	+	+
8% NaCl	+	+	+	+	+
10% NaCl	-	-	-	-	-
Growth at					
5°C	-	-	-	-	-
15°C	+	+	+	+	+
25°C	+	+	+	+	+
35°C	+	+	+	+	+
40°C	+	+	+	+	+
45°C	+	+	+	+	+
Growth at					
pH 2	-	-	-	-	-
pH 4	-	-	-	-	-
pH 6	+	+	+	+	+
pH 8	+	+	+	+	+
pH 10	+	+	+	+	+
pH 12	-	-	-	-	-

3. 2. 환경인자, 이화학적 특성

샘플링 지점 인근 해수의 수온, 염분, DO, pH 를 측정한 결과는 Table 14와 같이 나타났으며 평균 수온의 경우 표선지역이 20.13℃로 가장 높게 나타났고 한림지역이 18.23℃로 평균 수온이 가장 낮게 조사되었다. 평균 수온이 가장 높은 표선지역은 월별 평균 수온에서도 다른 지역과 비교하여 항상 높은 수온을 보였으며 성산지역의 경우에는 9월에는 24.25℃로 높은 수온을 보였지만 2월에는 14.72℃까지 낮아져 다른 지역에 비해 많은 수온 변화를 보였다. pH와 염분, DO값은 4지역 모두 평균 수치에서 큰 차이를 보이지 않았다. 따라서 pH와 염분, DO 수치는 *V. alginolyticus* 검출률에 영향을 주는지 확인할 수 없었으며 수온의 경우 지역별, 시기별로 많은 변동성을 보여 *V. alginolyticus* 검출률과 비교하였을 때 연관성이 있음을 확인할 수 있었다. 본 연구결과와 동일하게 전남 다도해에서도 *V. alginolyticus* 검출율은 수온과 비례하게 높아졌으며 특이하게 다른 비브리오속들과 달리 수온이 낮은 시기에 적은 비율이지만 검출이 되었다(Mal Nam Kim et al., 2007). 따라서 *V. alginolyticus* 는 다른 비브리오 속들에 비해 수온에 덜 민감하나 수온과 밀접한 연관성이 있음을 알 수 있었다.

Table 14. Monthly environmental factor of the Jeju coast

Environmental Factor	Areas	9	10	11	12	1	2
Temperature	Seongsan	24.25	22.3	20.88	17.85	15.93	14.72
	Pyoseon	25.05	22.67	21.87	18.84	16.71	15.64
	Hanllim	22.87	22.04	17.94	15.59	15.78	15.19
	Daejeong	22.69	22.07	18.28	17.45	15.89	15.58
pH	Seongsan	8.52	8.84	8.22	8.34	8.35	8.39
	Pyoseon	8.52	9.07	8.25	8.34	8.36	8.4
	Hanllim	8.79	8.7	8.28	8.3	8.37	8.41
	Daejeong	8.96	8.89	8.29	8.33	8.37	8.4
Salinity	Seongsan	31.03	31.87	31.87	31.95	32.73	32.63
	Pyoseon	30.88	32.02	32	31.98	32.75	32.6
	Hanllim	31.74	33.68	31.26	31.23	32.72	32.73
	Daejeong	31.83	33.64	31.68	32.28	32.73	32.79
DO	Seongsan	7.92	8.32	7.53	7.49	5.74	6.62
	Pyoseon	7.37	8.66	7.63	7.52	6.03	6.58
	Hanllim	8.86	8.27	8.29	7.78	6.96	6.81
	Daejeong	8.57	8.31	7.98	7.51	6.86	6.67

3. 3. 항생제 감수성 시험

분리된 *V. alginolyticus* 에 대한 항생제 감수성 시험에 관한 결과는 Table 15와 같이 나타내었고 4개 지역에서 분리된 균들은 공통적으로 Oxytetracycline, Nalidixic acid 모두 감수성을 보였으며, 성산지역과 대정지역에서 분리된 균주는 Doxycycline, Oxolinic acid 에도 감수성을 보였다. 내성을 보인 균주는 Amoxycillin 의 경우 표선지역은 12 균주, 한림지역 8 균주, 성산지역 5 균주, 대정지역 4 균주이고 Florfenicol은 표선지역과 성산지역에서 6 균주, 한림지역에서 3 균주, 대정지역에서 5 균주가 내성을 나타냈으며 Flumequine은 표선지역 7 균주, 성산지역 5 균주, 대정지역 4 균주, 한림지역 2 균주가 내성을 보였다. Ciprofloxacin에는 표선지역 3 균주, 성산지역 1 균주, 한림지역은 2 균주가 내성을 나타내었으며, Oxolinic acid는 한림지역 2 균주, 표선지역 1 균주가 내성을 보였고 Doxycycline은 표선지역 1 균주가 내성을 보였다. 따라서 *V. alginolyticus* 에 감염 시 병원체에 감수성을 보인 항생제를 제1 선택제로 하여 투여함이 바람직하며 모든 균주에 감수성을 보인 Oxytetracycline, Nalidixic acid 외에도 Oxolinic acid, Doxycycline, Ciprofloxacin에도 대부분 감수성을 보여 *V. alginolyticus* 에 효과적인 항생제임을 알 수 있었다. 하지만 Nalidixic acid 와 Tetracycline의 경우 *V. alginolyticus* 에 관해 OM protein 변형 사례가 있으므로 오남용에 주의하여야 한다(Xiao-Peng Xiong et al., 2010).

Table 15. Antibiotics sensitive test of *V. alginolyticus* strains in 4 area

Susceptibility Antibiotics	Disc potency (μ g)	No. of <i>V. alginolyticus</i> strain											
		Seongsan			Pyoseon			Hallim			Daejeong		
		S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
Amoxicillin	10	5	5	5	3	5	12	2	2	8	8	4	4
Ciprofloxacin	5	8	6	1	10	7	3	6	4	2	8	8	-
Doxycycline	30	10	5	-	12	7	1	9	3	-	8	8	-
Florfenicol	30	6	3	6	9	5	6	4	5	3	5	6	5
Flumequine	30	6	4	5	7	6	7	5	5	2	7	5	4
Nalidixic acid	30	15	-	-	18	2	-	12	-	-	16	-	-
Oxolinic acid	2	9	6	-	14	5	1	5	5	2	10	6	-
Oxytetracycline	30	13	2	-	18	2	-	11	1	-	15	1	-

3. 4. 지역에 따른 월별 *V. alginolyticus* 의 분리 현황

2020년 9월부터 2021년 2월까지 4개 지역에서 채취한 해수와 소라의 분리된 *V. alginolyticus* 의 분리 결과는 Table16에 표시하였다. 총 360건의 검체에서 63건(17.5%)의 *V. alginolyticus* 가 분리되었으며 해수의 경우 총 240건의 검체에서 43건(17.9%)이 분리되었다. 지역별로는 표선지역이 13건(21.7%)으로 가장 많은 가장 많은 분포율을 나타냈고 한림지역이 8건(13.3%)으로 가장 낮은 분포율을 나타냈다. 소라의 경우 120건의 검체에서 20건(16.7%)이 분리되었으며 지역별 분포의 경우 표선지역이 7건(23.3%)으로 가장 많은 분포율을 나타냈으며 성산지역과 한림지역이 4건(13.3%)으로 가장 낮은 분포율을 나타냈다. 조사지역 중 표선지역의 *V. alginolyticus* 분포율이 해수와 소라 모두에서 가장 높게 검출되었으며 전체 검출률에서는 총 90건 중에서 20건(22.2%)으로 가장 높았다. 다른 지역은 대정 16건(17.8%), 성산 15건(16.7%), 한림 12건(13.3%)의 분포율을 나타내었고 월별 분포율은 9월이 11건(18.3%)으로 가장 높았으며 2월이 2건(3.3%)으로 가장 낮은 분포율을 보였다.

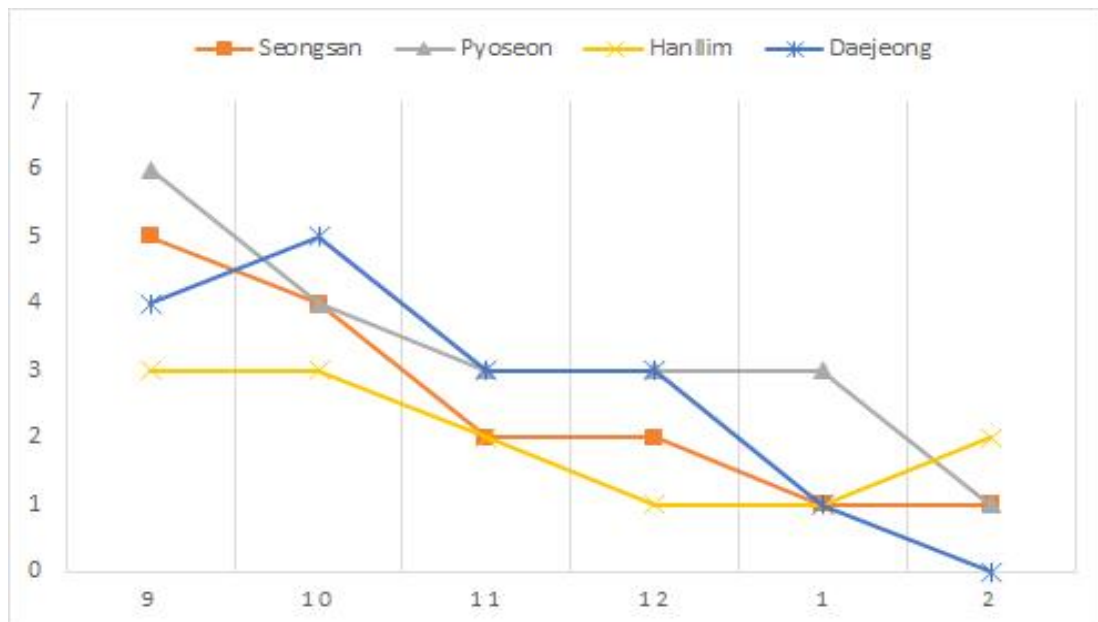
월별 분포를 보았을 때 *V. alginolyticus* 는 9월 및 10월에 높은 검출률을 보이고 1월과 2월에도 검출되었다(Figure 2). 수온이 높을수록 검출 빈도가 증가하였지만, 상대적으로 수온이 낮은 달에도 검출되는 것으로 보아 *V. alginolyticus* 의 검출률은 지역별 평균 수온과 상관관계가 있는 것으로 판단된다.

Table 16. Isolation frequency of *V. alginolyticus* from samples

Sample source	Sea water		Shellfish		Total	
	A	B	A	B	A	B
Seongsan	60	11 (18.30%)	30	4 (13.30%)	90	15 (16.70%)
Pyoseon	60	13 (21.70%)	30	7 (23.30%)	90	20 (22.20%)
Hallim	60	8 (13.30%)	30	4 (13.30%)	90	12 (13.30%)
Daejeong	60	11 (18.30%)	30	5 (16.70%)	90	16 (17.80%)
Total	240	43 (17.90%)	120	20 (16.70%)	360	63 (17.50%)

A, Total number of sample collected; B, Total number of isolation of *V.alginolyticus*
(ratio in %)

Fig 2. Monthly *V. alginolyticus* detection rate



IV. 요약

2020년 9월부터 2021년 2월까지 성산, 표선, 한림, 대정을 중심으로 제주 연안 해수와 소라의 *V. alginolyticus* 분포변화를 조사하였다.

가검물은 총 360건으로 해수 240건, 소라 120건이었으며 분리된 균에 대해 형태 및 생화학적 성상 및 배양성상 등을 이용하여 동정하였으며 동정 후 분리된 *V. alginolyticus* 의 검출률과 인근해안의 이화학적 특성과 비교하여 연관성을 찾고자 하였다. 또한, 최적배양조건과 항생제 감수성 테스트를 실시하였다.

본 연구결과 총 검출률은 전체 가검물 360건중 63건으로 17.5%의 검출률을 보였고 해수인 경우 소라 모두 표선지역에서 가장 검출률이 높았고 한림지역이 가장 낮은 검출률을 보였다. 표선지역에서 13건 (21.7%)으로 가장 많은 분포율을 나타냈으며 한림지역이 8건 (13.3%)으로 가장 낮은 분포율을 나타냈다. 소라의 경우 표선지역이 7건 (23.3%)로 가장 많은 분포율을 나타냈으며 성산지역과 한림지역이 4건(13.3%)으로 가장 낮은 분포율을 보였다. 전체 검출률은 표선지역이 20건(22.2%) 가장 높았으며 한림지역이 12건(13.3%)으로 가장 낮았다. 해양 환경변화에 따른 검출률은 수온이 가장 높은 시기에 가장 높았다. *V. alginolyticus*의 검출률은 인근 해안의 수온 상승률과 비례했으며 수온과 연관성이 높음을 확인할 수 있었다. 항생제 감수성 시험 결과 4개 지역에서 분리된 균들은 공통적으로 Oxytetracycline, Nalidixic acid에 모두 감수성을 보였으며 이외에도 Oxolinic acid, Doxycycline, Ciprofloxacin 에도 대부분이 감수성을 보였다.

V. 참고문헌

- Craig Baker-Austin, James D. Oliver, Munirul Alam, Afsar Ali, Matthew K. Waldor, Firdausi Qadri and Jaime Martinez-Urtaza. 2018. *Vibrio* spp. Infections. *Nat Rev Dis Primers*. 4, 1-19.
- Luigi Vezzulli, Rita R. Colwell and Carla Pruzzo. 2013. Ocean Warming and Spread of Pathogenic Vibrios in the Aquatic Environment. *Microb Ecol*. 65, 817-825.
- T. Gregersen. 1978. Rapid method for distinction of gram-negative from gram-positive bacteria. *European journal of applied microbiology and biotechnology*. 5, 123-127
- Jeffrey J. Tarrand and Dieter H. M. Groschel. 1982. Rapid Modified Oxidase Test for Oxidase-Variable Bacterial Isolates. *J Clin Microbiol*. 16, 772-774
- Min-Kyoung Song, Man-Chul Kim, Moon-soo Heo. 2007. Study on the Distribution of *Vibrio parahaemolyticus* along Cheju Coast. *Korean J. Environ. Biol*. 25, 34-41
- James J. Biemer, M.D. 1973. Antimicrobial Susceptibility Testing by the Kirby-Bauer Disc Diffusion Method. *Ann Clin Lab Sci*. 3, 135-140
- K.-K. Lee, S.-R. Yu, Yang, P.-C. Liu and F.-R. Chen. 1996. Isolation and characterization of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased Kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Lett Appl Microbiology*. 22,

111-114

- S R Rippey. 1994. Infectious diseases associated with molluscan shellfish consumption. Clin Microbiol Rev. 7, 419-425
- Sonja Oberbeckmann, Bernhard M. Fuchs, Mirja Meiners, Antje Wichels, Karen H. Wiltshire and Gunnar Gerds. 2012. Seasonal Dynamics and Modeling of a *Vibrio* Community in Coastal Waters of the North Sea. Environ Microbiol. 63, 543-551
- Man-chul kim, Tae-Won Jang Yong-Jae Han, Ju-Sang Kim, Ramasamy Harikrishnan, Duck-Chul Oh, Ki-young Kim, Moon-soo Heo. 2009. Physico-Chemical Characteristics of Aquacultural Discharging Water in Jeju Island. Saengmyeong Gwahag Hoeji. 7, 943-948
- Hyuk-joon Koh, Sung-Eun Park, Hyung-Kee Cha, Dae-soo Chang, Jun-Ho Koo. 2013. Coastal Eutrophication caused by Effluent from Aquaculture Ponds in Jeju. J Korean Soc. Mar. Environ. Saf. 19, 315-326
- Frederique Le Roux, K. Mathias Wegner, Craig Baker-Austin, Luigi Vezzulli, Carlos R. Osorio, Carmen Amaro, Jennifer M. Ritchie, Tom Defoirdt, Delphine Destoumieux-Garzon, Melanie Blokesch, Didier Mazel, Annick Jacq, Felipe Cava, Lone Gram, Carolin, C. Wendling, Eckhard Strauch, Alexander Kirschner and Stephan Huehn. 2015. The emergence of *Vibrio* pathogens in Europe: ecology, evolution, and pathogenesis (Paris, 11-12th March 2015). Front Microbiol. 6, 830

- John D. Duck. 1982. Nonstaining (KOH) Method for Determination of Gram Reactions of Marine Bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 44, 992-993
- Miguel kourany. 1983. Medium for Isolation and Differentiation of *Vibrio parahemolyticus* and *Vibrio alginolyticus*. *Appl Environ Microbiol.* 45,310-312
- Young-Il Jeong, Go-Eun Myung, Eun-Jin Choi, Sang-Moon Soh, Gi-jun Park and Tae-jong Son. 2018. Distribution of Pathogenic Vibrios in the Aquatic Environment Adjacent to Coastal Areas of South Korea and analysis of the Environmental Factors Affecting Their Occurrence. *J Environ Health Sci.*44, 133-142
- Luigi Vezzulli, Rita R. Colwell and Carla Prozzo. 2013. Ocean Warming and Spread of Pathogenic Vibrios in the Aquatic Environment. *Microb Ecol.* 65,817-825
- Uwe Schmidt, Herman chmel and claude cobbs. 1979. *Vibrio alginolyticus* infections in Humans. *J Clin Microbiol.* 10,666-668
- Carla pruzzo, Anwar Huq, Rita R. Colwell. 2005. Pathogenic Vibrio Species in the Marine and Estuarine Environment. *Oceans and Health: Pathogens in the Marine Enviroment.* 217-252
- Dong-Young Lee, Soo-Youn Moon, Sang-Oh Lee, Hee-Young Yang, Hee-Joo Lee and Mi Suk Lee. 2008. Septic Shock due to *Vibrio alginolyticus* in a Cirrhotic Patient: The First Case in Korea. *Yonsei Med J.* 49, 329-332

- Su Mi Kim, Kyung Mi Won, Sung Ho Woo, Hua Li, Eun Jeon Kim, Kwang Jin Choi, Mi Young Cho, Myung Suk Kim and Soo Il Park. 2005. Vibrios Isolated from Diseased Marine Culturing Fishes in Korea. J. Fish Pathol. 18,133-145
- Mal Nam Kim and Han Woong Lee. 2007. Seasonal Distribution of *Vibrio* spp. in the Jeonnam Archipelago Marine Ranching Ground. J. Fish Pathol. 21,229-235
- Xiao-Peng Xiong, Chao Wang, Ming-Zhi Ye, Tian-Ci Yang, Xuan-Xian Peng, Hui Li. 2010. Differentially Expressed Outer Membrane Proteins of *Vibrio alginolyticus* in Response to Six Types of Antibiotics. Mar Biotechnol. 12,686-695
- R. Siddiqui, M. M. Alam, M. N. Naser, Y. Otomo, M. Yasmin, J. Nessa and C. R. Ahsan. 2012. Prevalence of *Vibrio alginolyticus* in Sediment Samples of River and Coastal Areas of Bangladesh. Banglad J Microbiol. 29,1-6
- E. H. Kampelmacher, Lucretia M. van Noorle Jansen, DAA Mossel, Frieda J. Groen. 1972. A Survey of the Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and *V. alginolyticus* on Mussels and Oysters and in Estuarine Water in the Netherlands. J. appl. Bact. 35,431-438
- Hamza Eid, Zainab Soliman, Al-Shaimaa Hanafy. 2015. Prevalence and Molecular Characterization of *Vibrio* Spp. In Fish Shellfish from Port Said Coastal Area. SCVMJ, XX. 20, 291-302

Selena Lam, Edmund Monteiro. 1981. Unusual Vibrio Species found
in Diarrhoeal Stools. Singapore Med J. 22, 259-261

VI. 감사의 글

먼저 학부시절부터 석사졸업까지 항상 이해심을 가지고 지켜봐주시고 응원해주시며 지도해주신 허문수 교수님께 진심으로 감사의 말씀을 올립니다. 또 논문심사를 위해 애써주시고 조언해주신 정준범 교수님과 최학선 교수님께 감사드립니다. 그리고 학부생부터 지금까지 많은 가르침을 주셨던 송춘복 교수님, 최광식 교수님, 전유진 교수님, 이경준 교수님, 이제희 교수님, 김기영 교수님, 이승현 교수님, 정석근 교수님, 박상울 교수님께도 감사의 말씀을 올립니다. 그리고 실험실 생활에 도움을 주신 동휘오빠, 소현언니, 경미언니, 영수언니, 지현언니, 해리언니에게도 감사합니다. 마지막으로 26년간 항상 부족함 없이 지원을 아끼지 않으시고 밝고 훌륭한 사람으로 성장하게 해주신 우리 가족들에게도 감사의 말을 전합니다.