



저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 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](#)

이 학 석 사 학 위 논 문

양식 넙치, *Paralichthys olivaceus*에서
분리한 *Vibrio scophthalmi*의
감염특성

2013년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수산생명의학과

김 수 현

이 학 석 사 학 위 논 문

양식 넙치, *Paralichthys olivaceus*에서
분리한 *Vibrio scophthalmi*의

감염특성

지도교수 박 수 일

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함

2013년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 명 의 학 과

김 수 현

김수현의 이학석사 학위논문을 인준함

2013년 2월 22일



주	심	농 학 박 사	허 민 도 (인)
위	원	이 학 박 사	정 현 도 (인)
위	원	농 학 박 사	박 수 일 (인)

목 차

목차	i
Abstract	iii
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	3
1. 병원균의 분리	3
2. 시험 균주의 생화학적 성상 검사	6
3. 시험 균주의 유전자 배열 분석	6
3.1. 세균의 genomic DNA의 분리	6
3.2. Competent cell 제작	6
3.3. DNA cloning	7
3.3.1. 16s ribosomal RNA의 primer 준비	7
3.3.2. <i>dnaJ</i> gene의 primer 준비	7
3.3.3. PCR과 PCR products 추출	7
3.3.4. PCR products cloning	8
3.3.5. 재조합된 plasmid DNA의 추출과 inserted DNA 확인	8
3.3.6. DNA sequencing 및 염기 서열의 비교 분석	9
4. 분리 균주의 인위 감염 시험	9
4.1. 시험어	9
4.2. 병원성 확인	9
5. 조직 병리학적 검사	10
5.1. 자연 감염어의 조직 병리학적 검사	10
5.2. 인위 감염어의 조직 병리학적 검사	10
6. SDS-PAGE	10

7. 약제 감수성 검사	11
8. 배양 실험	11
8.1. Coculture	11
8.2. Nurseculture	12
III. 결과	13
1. 병원균의 분리	13
2. 생화학적 성상 검사	14
3. 시험 균주의 염기 서열 분석	16
4. 시험 균주의 병원성 확인	19
5. 조직 병리학적 병변	21
6. SDS-PAGE	26
7. 약제 감수성 검사	27
8. 배양 실험	28
8.1. Coculture	28
8.2. Nurseculture	30
8.2.1. <i>Vibrio scophthalmi</i> 의 base culture 시험	30
8.2.2. <i>Vibrio scophthalmi</i> 의 nurse inoculation 시험	32
IV. 고찰	34
V. 요약	41
VI. 감사의 글	42
VII. 참고문헌	43

The infection characteristics of *Vibrio scophthalmi* isolated
from olive flounder, *Paralichthys olivaceus*

Su Hyun Kim

Department of Aquatic Life Medicine, The Graduate School,
Pukyong National University

Abstract

Recently high mortality of cultured olive flounder occurred frequently at the fish farms in Ulsan, Korea. The diseased fish showed skinny body and swimming behavior on the water surface with liver atrophy and white enteritis as internal signs. The isolated bacteria was identified to *V. scophthalmi* by biochemical test, nucleotide analysis of 16s rRNA and *dnaJ* gene sequencing.

The pathogen of this study showed strong pathogenicity as 75% mortality to olive flounder by infection of 1×10^6 CFU/fish. The pathological sign of diseased fish was not different between the naturally diseased and the artificially infected fish. Histopathological change was shown to liver atrophy, desquamation of the intestinal mucosa and hyaline droplet like as other previous studies. *V. scophthalmi* showed some positive effects on the other bacteria growing during coculture and nurse culture test. It will be contributed to a cofactor as the mixed infection to olive flounder.

I. 서론

양식 산업의 발달과 함께 생산량이 증대되는 이면에 과밀 양식, 수질 악화 등으로 나빠진 환경조건에 의해 피해가 증가하고 있다. 뿐만 아니라 새로운 질병의 출현 빈도가 높아지고 있으며, 바이러스, 세균 및 기생충 등의 혼합 감염에 의한 피해도 늘어나고 있다.

2012년 5월부터 울산시 울주군 소재 양식장에서 특징적인 외부 증상 없이 대량 폐사가 발생하여 그 원인을 조사하였다. 감염어는 여윌, 입올림, 수면 위로 유평하는 등의 외부 증상과 간위축, 장관백탁 등 특징적인 내부 증상을 보이면서 폐사하였다. 감염어의 내부 장기로부터 원인균을 분리한 후, 생화학 성상 시험, 16s rRNA 및 *DnaJ* gene을 이용한 염기 서열을 분석하여 *Vibrio scophthalmi*로 동정하였다.

*V. scophthalmi*는 스페인의 건강한 터봇의 장관 내에서 최초 분리된 세균으로 봄, 여름, 가을의 해수에서 검출되었으며, 정상적인 넙치의 장관 및 질병에 걸린 넙치에서도 봄, 초여름, 가을철에 분리된 바 있다 (Cerdeira-Cuellar *et al.*, 1997; Montes *et al.*, 2006; 조, 2006; Sugita and Ito, 2006).

강 (2003)은 2001년 6월부터 2002년 5월까지 질병 동향 조사를 위해 제주도 내 넙치 양식장의 병어로부터 균을 분리하고, 검출된 *Vibrio* sp.를 분자생물학적으로 동정하였다. 그 결과 검출된 전체 *Vibrio* sp. 중 *V. scophthalmi*가 26.4%를 차지하였으며, *V. harveyi* (32%)에 이어 두 번째로 많이 검출되었다. 또 2005년 3월부터 2006년 9월까지 같은 지역의 넙치 병어를 조사한 결과 분리된 비브리오 균 중 *V. scophthalmi*가 45.3%로 가장 많이 검출되었다 (조, 2006). 2005년 부산, 포항, 제주도의 넙치 양식장에서 *V. scophthalmi*에 의해서 매일 40~50마리씩 지속적인 폐사가 발생하였고, 그 원인균으로 인위감염 실험을 했을 때 복부팽만, 근육 출혈, 비장,

신장 비대 등의 임상증상을 보였다 (Qiao, 2011).

하지만 이전 연구의 감염 증상은 본 연구에서 나타난 것과는 다소 차이가 나며, *V. scophthalmi*의 자연 감염 특성에 대한 연구가 없어 질병 진단에 혼란을 줄 것으로 사료된다.

혼합감염은 빈번히 나타나는 현상으로 그에 대한 여러 보고가 있었다. 양식장에서 사육되고 있는 넙치를 무작위로 채집하여 질병 모니터링을 실시한 결과, 병원체가 분리된 1,528마리 중에서 한 종의 병원체가 분리된 경우는 33.6%, 2종 이상의 병원체가 분리된 경우는 34.6%로 더 높았다 (김 등, 2010).

질병증상을 보이는 넙치로부터 세균을 분리하여 주요 세균성 병원체인 *Streptococcus* sp., *Edwardsiella* sp., *Vibrio* sp. 등으로 간이동정한 결과 17.1%가 2종 이상의 혼합감염을 보였다. 그러나 혼합감염 비율이 계절적으로 차이를 나타내었고, 특히 8월의 경우는 *Vibrio* sp.가 전체 *Vibrio* 검출률 중 56.5%, *Edwardsiella* sp.가 전체 *Edwardsiella* sp. 검출률 중 50%의 혼합감염을 보였다 (강, 2003). Qiao (2012)는 인위감염 실험에서 단독감염 시 10^6 CFU/fish에서 12.5%의 폐사율을 보이는 반면, *Streptococcus parauberis*와의 혼합감염시 87.5%의 폐사율을 보였음을 보고하였다. 본 연구에서도 8, 10월 경 양식장에서 사육 중이던 넙치에서 *Streptococcus* sp.와 *V. scophthalmi*가 혼합감염된 사례가 있었으며, 내부 증상으로 장 혼탁, 위 연화, 간 위축, 비장 비대가 나타났다.

본 연구의 목적은 질병 진단을 위한 기초자료를 확보하고자 단독 감염체로서 *V. scophthalmi*의 감염특성을 비롯하여 여러 분리 균주에 대한 병원성, 병리 조직학적 변화 및 약제감수성 시험 등을 실시하였다. 또, *Vibrio scophthalmi*의 혼합감염체로서의 역할을 알아보기 위하여 Coculture 및 Nurseculture 시 *Edwardsiella tarda*와 *Streptococcus parauberis* 등 다른 어병세균과의 상관관계를 조사하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 병원균의 분리

실험에 사용한 균주는 2012년 5월 울산광역시 울주군 지역 양식장과 연구소의 넙치에서 분리된 것이었다. 분리된 시기의 수온은 16.5~18℃ 이었으며, 병어의 전장은 18cm~25cm 이었다. 병원균의 분리에는 특징적인 증상을 보이는 어체의 간, 신장, 비장, 장 등을 시료로 사용하였다. 시험균의 배양 조건은 1.5% NaCl 첨가 Tryptic Soy Agar (TSA)와 Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose (TCBS) 배지, Salmonella Shigella (SS) 배지에 도말한 후, 27℃, 24시간 배양으로 시행하였다.

시험용 참조 균주와 분리균주의 분리 지역과 유래는 Table 1에, 시험균을 분리한 병어의 증상은 Fig.1에 나타내었다. 병어의 외부 증상으로는 여윌과 입올림, 체색흑화가 있었고, 내부 증상으로는 간위축과 장관 백탁이 특징적이었다.

Table 1. Bacterial isolates and reference strains used in this study

	Strains	Origin	Date
Reference strains (n=2)	<i>V. scophthalmi</i> CECT4638	Intestinal track, healthy turbot (<i>Scophthalmus maximus</i>)	1997, Spain
	<i>V. scophthalmi</i> CAIM1797	Common dentex (<i>Dentex dentex</i> L.)	2005, Spain
Tested isolates (n=7)	A28003	Intestinal track, Diseased olive flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	2012, Ulsan, Korea
	A28004	Kidney, Diseased olive flounder	2012, Ulsan, Korea
	<i>V. scophthalmi</i> A19006	Kidney, Diseased olive flounder	2005, Jeju, Korea
	<i>V. scophthalmi</i> A19008	Kidney, Diseased olive flounder	2005, Jeju, Korea
	<i>V. scophthalmi</i> A19010	Spleen, Diseased olive flounder	2005, Jeju, Korea
	<i>S. parauberis</i> PH0710	Kidney, Diseased starry flounder (<i>Platichthys stellatus</i>)	2007, Pohang, Korea
	<i>E. tarda</i> KE-1	olive flounder	2000, Pohang, Korea

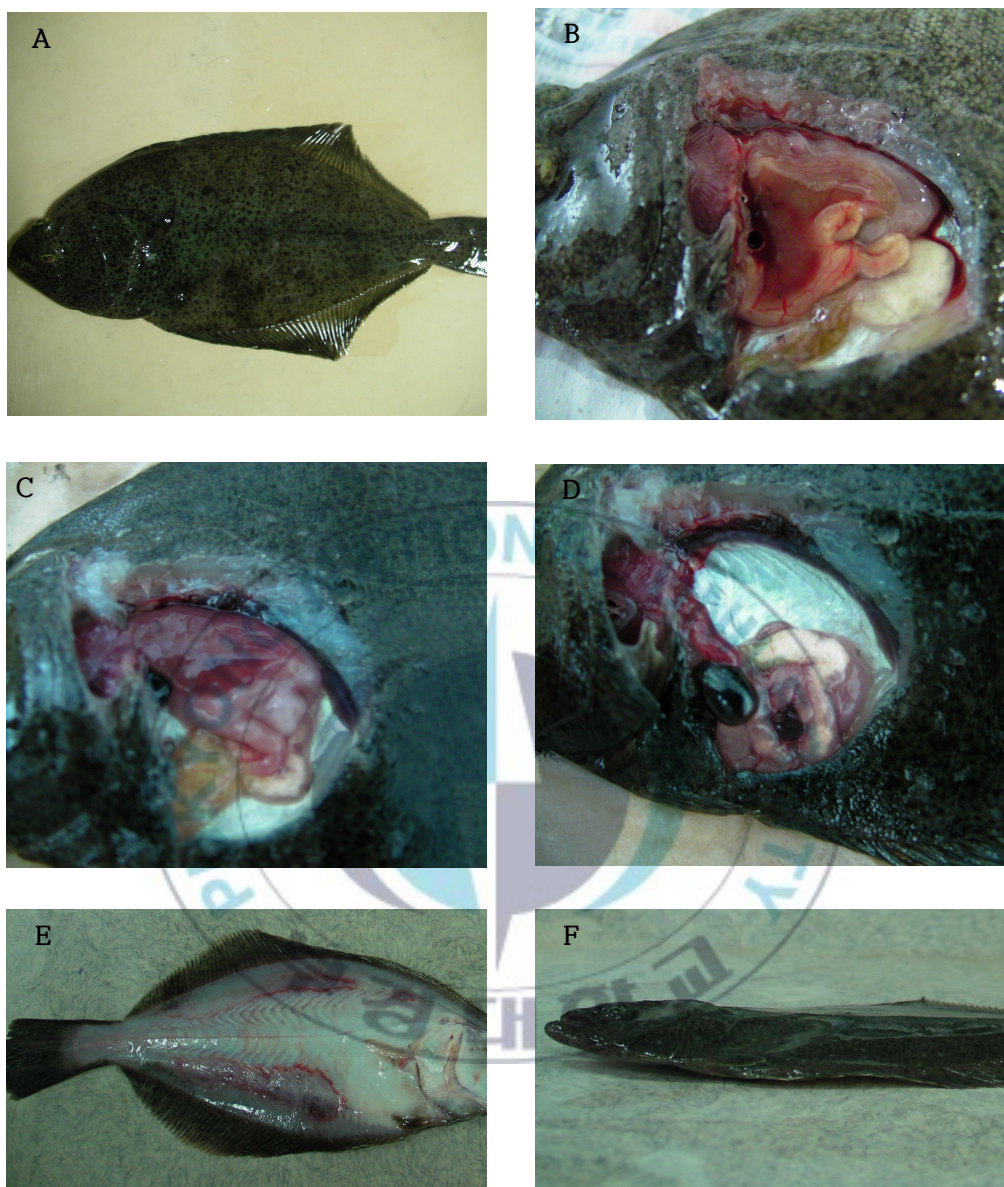


Fig. 1. The typical signs of naturally diseased olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, infected with *Vibrio scophthalmi*. A. F. skinny body; B.C, atrophy of liver, white enteritis; D. white enteritis; E. hemorrhage of muscle.

2. 시험 균주의 생화학적 성상 검사

Table 1의 시험균주에 대한 생화학적 성상 검사를 위하여 1.5% NaCl 첨가 TSA에서 27°C, 24시간 전배양한 것을 사용하였다. Macfaddin (2000)에 따라 Oxidase test (Cytochrome oxidase), Catalase test (3% H₂O₂), Citrate 이용능 (Simmon's citrate agar), Nitrate 환원능, Kovac's Indole test, Methyl red test, Voges-Proskauer test, H₂S 생성 확인을 위한 Triple Sugar Iron Agar (TSIA)와 Oxidation-Fermentation (OF) test를 하였다. 탄수화물 분해 시험으로서 arabinose, adonitol, cellibiose, dulcitol, fructose, galactose, glucose, inositol, lactose, maltose, mannitol, mannose, melibiose, raffinose, rhamnose, salicin, sorbitol, sucrose, trehalose, xylose의 당 분해능을 조사하였다. 그리고 lysine과 ornithine에 대한 decarboxylase 시험과 arginine에 대한 dehydrolase 시험을 실시하였으며, TCBS와 SS 배지에서의 colony 성상을 관찰하였다. 모든 시험 배지 제작은 Macfaddin (2000)의 방법을 따랐다.

3. 시험 균주의 유전자 배열 분석

3.1. 세균의 genomic DNA의 분리

본 연구에서 분리한 균주 A28003, A28004의 genomic DNA는 각각 5ml의 1.5% NaCl 첨가 TSB에 접종하여 27°C에서 24시간 진탕 배양하였다. 그 후 6000rpm에서 5분간 원심 분리로 상징액을 제거한 다음 Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer)를 사용하여 Genomic DNA를 분리하였다.

3.2. Competent cell 제작

Competent cell의 제작을 위해 *Escherichia coli* DH5 α 를 사용하였다. Luria-Bertani broth 배지 (LB, Difco)에 접종하여 overnight 배양한 균액

1ml을 LB broth 50ml에 접종하여 흡광도 값이 600nm에서 0.4가 되도록 37°C, 3~4시간 shaking 배양했다. 얼음 위에서 10분간 정치시킨 후 원심 분리하여 얻어진 pellet을 100mM CaCl₂ 25ml에 현탁하여 얼음 위에서 30분간 배양한 후 다시 원심 분리하였다. 15% glycerol이 첨가된 100mM CaCl₂ 12.5ml에 재현탁한 후 사용하기 전까지 -70°C에서 보관하였다.

3.3. DNA cloning

3.3.1. 16s ribosomal RNA (16s rRNA)의 primer 준비

본 실험에 사용된 universal bacterial primer는 Eubac 27F와 Eubac 1492R을 사용하였다 (Weisburg *et al.*, 1991). 사용된 primer의 염기 배열과 증폭 산물의 크기는 Table 2에 나타내었다.

3.3.2. *dnaJ* gene의 primer 준비

Heat shock protein 40을 encoding한 *dnaJ* gene primer는 805-VibrioMF2와 806-VibrioMR을 사용하였다 (Nhung *et al.*, 2007c). 사용된 primer의 염기 배열과 증폭 산물의 크기는 Table 2에 나타내었다.

3.3.3. PCR과 PCR products 추출

PCR은 PCR Premix (Bioneer)를 사용하였고, Thermal cycler (Perkin-Elmer)로 수행하였으며, 조건은 Table 3에 나타내었다. 1% agarose gel에 0.01% Etidium Bromide (EtBr, 1mg/ml)을 혼합하고 85V에서 30분간 전기 영동한 후 UV transilluminator 상에서 확인한 다음, PCR 산물에 해당하는 부분을 칼로 절취하여 gel의 무게를 측정하였다. 그 절취된 gel을 High pure PCR products purification kit (Roche)로 PCR products를 정제하였다.

Table 2. PCR primer used in this study for 16s rRNA, *dnaJ* gene

Primer	16s rRNA		<i>dnaJ</i> gene	
	Sequence	Product size	Sequence	Product size
Forward	5'-agtgtttgatcmtggctcag-3'	1500b	5'-ttttaygaagtdytdggygt-3'	558bp
Reverse	5'-tacggytacctgttacgactt-3'	P	5'-gacavgtwggacaggytgytg-3'	

Table 3. Conditions of reaction steps and PCR cycles

	16s rRNA			<i>dnaJ</i> gene		
	Temperature	Reaction time	Cycle(s)	Temperature	Reaction time	Cycle(s)
Pre-denaturation	94	3min	1	94	3min	1
Denaturation	94	30sec		94	30sec	
Annealing	56	30sec	30	50	30sec	40
Extension	72	90sec		72	60sec	
Post extension	72	7min	1	72	7min	1

3.3.4. PCR products cloning

Cloning vector로 pGEM T-easy vector (Promega)를 사용하고, T4 ligase로 PCR products와 vector를 연결시켜 재조합된 plasmic DNA를 준비하였다. 이에 -70°C에서 보관된 100μl의 competent cell을 첨가한 후 heat shock 방법으로 transformation 시켰다. 이에 1ml의 LB broth를 첨가하여 37°C에서 1시간 30분 배양한 후 Ampicillin (50μg/ml), X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-D-galactopyranoside, 10μg/ml), IPTG (Isopropylthio-β-D-galactopyranoside, 25μg/ml)이 포함된 LB agar 배지에 배양하여 재조합된 white colony를 선별하였다.

3.3.5. 재조합된 plasmid DNA의 추출과 inserted DNA 확인

Ampicillin이 첨가된 LB broth에 숙주 세포를 배양하여 plasmid DNA를

추출하였다. 이를 위해 plasmid DNA mini-preparation kit (GeneAll)을 사용하였다.

3.3.6. DNA sequencing 및 염기 서열의 비교 분석

Plasmid DNA를 추출한 후, Sanger *et al.* (1977)의 방법에 따라 model ABI 377 automatic sequencer로 sequencing을 실시하였다. 해독한 염기 배열의 조합을 찾기 위해서 Bioedit를 사용하였으며, NCBI에서 제공되는 BLAST program으로 이미 밝혀져 있는 균주들의 nucleotide와 비교 분석하기 위하여 MEGA 4.0을 사용하여 계통수를 그렸다.

4. 분리 균주의 인위 감염 시험

4.1. 시험어

경상북도 울진군 소재의 종묘장에서 사육 중인 건강한 넙치를 분양받아 사용하였으며 평균 전장은 $14.5 \pm 0.8\text{cm}$, 체중은 $25.4 \pm 5.4\text{g}$ 이었다. 연구실의 사육수조에 옮긴 후 수온 $22 \sim 23^\circ\text{C}$ 에서 유수식으로 관리하였으며, 실험 전 1주일간 순치하여 사용하였다.

4.2. 공격 실험

현 분리 균주 A28003, A28004와 이전 분리 균주 A19008의 넙치에 대한 병원성 차이를 알기 위해, 인위공격 실험을 통한 누적폐사율을 조사하였다. 시험어는 1.5% NaCl을 첨가한 TSA에 27°C 에서 24시간 배양된 각 시험균을 멸균 생리식염수에 현탁하여 준비하였고 균을 현탁하지 않은 멸균 생리식염수 (physical saline (P.S.))를 대조구로 하였다. 다양한 농도의 균 현탁액을 어체당 $100\mu\text{l}$ 씩 복강 주사하고 주사 후 14일간 폐사 정도를 관찰하였다. 실험어는 50L 크기의 아크릴 수조에 넣어 $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 로 사육 수온을 유

지하였으며, 매일 1회 전량 환수시켰다. 폐사어의 폐사 원인을 확인하기 위해 시험 기간 중 폐사한 어류의 내부 장기로부터 병원균을 재분리하여 시험균을 확인하였다.

5. 조직 병리학적 검사

5.1. 자연 감염어의 조직 병리학적 검사

병증을 보이는 자연 감염어 3마리의 전 장기를 Bouin's solution에 전 고정하고 24시간 후에 다시 동종의 고정액에 48시간 후 고정하였다. 고정 후 조직을 수세하고 70%에서 100%까지의 순차 농도의 알코올로 탈수한 다음 Xylene으로 투명화한 후 파라핀을 친화시켰다. 파라핀으로 침투 및 포매한 후, Rotary 형 microtome (Reichert-Jung 820, Leica)으로 박절한 4~8 μ m의 절편을 통상적인 방법에 의해 H&E 염색을 시행하여 병리 조직 표본을 제작하였다.

5.2. 인위 감염어의 조직 병리학적 검사

인위 감염에 의해서 빈사상태 혹은 죽은 직후의 실험어의 간, 신장, 비장, 위 및 장을 Bouin's solution에 24시간 동안 전 고정한 후, 48시간 동안 후 고정하였다. 고정 후 조직을 수세하고 상기와 같은 방법에 따라 H&E 염색하여 병리 조직 표본을 제작하였다.

6. SDS-PAGE

시험 균주의 whole protein profile을 비교하기 위해 Laemmli (1970)의 방법으로 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 하였다. 1.5% NaCl을 포함한 BHIB 5ml에 균주를 접종하여 27°C, 24시간 배양한 후, 17,000 $\times$ g, 10분, 4°C에서 원심 분리하여 집균하였다. Pellet은 PBS (0.1M,

pH7.2)에 3번 세척한 후, 250mg/ml로 5×sample buffer에 재현탁했다. 이 현탁액을 100°C, 7분간 열처리한 후, 최종 농도가 50mg/ml 되도록 PBS (0.1M, pH7.2)를 더한 다음 100°C, 5분간 열처리했다. 열처리가 끝난 샘플은 얼음에 10분간 배양한 후, 50μl씩 분주하여 -20°C에 보관하여 사용했다. 5% stacking gel과 12% separating gel상에 각 well 당 샘플 20μl씩을 넣고, sample running은 mini-protein II system (BioRad)으로 30mA에서 90분간 시행하였다. 전기영동한 gel에서 whole cell은 Coomassie brilliant blue로 3시간동안 염색한 후 destaining solution에 overnight로 탈색한 다음 확인하였다.

7. 약제 감수성 검사

각종 시험 균주에 대한 약제 감수성 시험을 디스크 확산법으로 시행하였다. 1.5% NaCl 첨가 Brain Heart Infusion Agar (BHIA)배지에 24시간 전 배양한 균을 Muller-Hinton agar plate에 27°C, 48시간 배양한 후, 형성된 저지대의 지름을 측정하여 감수성의 정도를 Susceptible, Intermediate와 Resistant로 구별하였다. 실험에 사용된 약제는 Tetracycline, Oxytetracycline, Doxytetracycline, Nalidic acid, Clindamycin, Gentamycin, Amoxicillin, Ampicillin, Kanamycin, Sulfisoxazol, Erythromycin이었다.

8. 배양 실험

8.1. Coculture

Vaseeharan *et al.* (2003)의 방법에 따라 coculture 실험을 실시하였다. Table 1에 표시된 A28003, KE-1, PH0710을 1.5% NaCl 첨가 TSA에 27°C, 24시간 전배양한 후, 이 균을 멸균 생리식염수에 희석하여 1.5% NaCl

을 첨가한 TSB 2ml에 1×10^4 CFU/ml가 되도록 접종하였다. A28003과 KE-1 (V+E), KE-1과 PH0710 (E+S), A28003과 PH0710 (V+S)를 동시접종하여 혼합배양하였고, 대조구로 각 균주를 단독배양하였다. 배양 후 24, 48, 72시간 째에 Miles and Misra (1938)의 방법에 따라 배양액을 단계 희석한 다음 A28003은 TCBS 배지, KE-1은 SS 배지, PH0710는 1.5% NaCl 첨가 BHIA에 배양하여 형성된 세균 집락수를 계수하였다.

8.2. Nurseculture

질병 감염 과정에서 *V. scophthalmi*의 1차 혹은 2차감염체로서의 역할을 알아보기 위해서 nurseculture를 실시하였다. 먼저 base culture 제작을 위해 A28003, KE-1, PH0710를 1.5% NaCl 첨가 TSA에 27°C, 24시간 전 배양한 후, 이 균을 멸균 생리식염수에 희석하여 1×10^4 CFU/ml가 되도록 1.5% NaCl 첨가 TSB 2ml에 접종하여 24시간, 27°C에서 배양하였다. 그 후, base culture한 균액에 앞과 동일한 방법으로 균을 nurse inoculation 하였다. Base culture와 nurse inoculation한 균의 종류와 순서는 Table 3에 기재하였다. 배양 후 0, 24, 48, 72시간 째에 Miles and Misra (1938)의 방법에 따라 배양액을 단계 희석한 다음 A28003은 TCBS 배지, KE-1은 SS 배지, PH0710는 1.5% NaCl 첨가 BHIA에 배양하여 형성된 세균 집락수를 계수하였다.

Table 3. Bacterial isolates used in nurseculture test

	Base culture (A)	Nurse inoculation (B)
V + E	<i>V. scophthalmi</i> (A28003)	<i>E. tarda</i> (KE-1)
V + S	<i>V. scophthalmi</i> (A28003)	<i>S. parauberis</i> (PH0710)
E + V	<i>E. tarda</i> (KE-1)	<i>V. scophthalmi</i> (A28003)
S + V	<i>S. parauberis</i> (PH0710)	<i>V. scophthalmi</i> (A28003)

Ⅲ. 결과

1. 병원균의 분리

실험에 사용한 분리 균주는 Table 1과 같이 2012년 5월 울산광역시에 위치한 양식장과 연구소의 감염어로부터 분리하였다. 모든 분리 균주는 최초 분리 시 1.5% NaCl 첨가 TSA에서 둥근 콜로니를 보이며, 균주에 따라서, TCBS 배지에서 yellow 혹은 green colony를 형성했다. 또 SS 배지에서도 투명한 콜로니를 형성하며, 이를 순수 분리한 후 1.5% 첨가 BHIA에 배양시켜 얻은 단일 콜로니를 SS 배지에 접종할 시에는 자라지 않았다.



2. 생화학적 성상 검사

V. scophthalmi 7개의 분리균주와 2개의 참조 균주의 생화학적 성상 시험 결과를 Table 4에 나타내었다. 분리 균주들은 Gram 음성의 운동성을 가진 간균으로, Indole 생성능, Citrate 이용능, Voges-Proskauer test는 negative 반응을 보였고, Methyl red 시험, nitrate 환원능은 positive 반응을 보이며 모든 균주가 일치한 결과를 얻었다. 당의 경우 glucose, maltose, trehalose, sucrose를 분해하여 positive 반응을 보였다. 그러나 cellibiose, mannitol, salicin, sobritol, sucrose, raffinose, galactose 이용능에서 균주간의 차이를 보였다.



Table 4. Biochemical characteristics of the isolates from diseased olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)

	Isolates					References	
	A2800	A2800	A1900	A1900	A1901	CAIM17	CECT17
	3	4	6	8	0	97	97
Gram-stain	-	-	-	-	-	-	-
Motility	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+
TSI	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A
Nitrate	+	+	+	+	+	+	+
OF	F	F	F	F	F	F	F
Indole	-	-	-	-	-	-	-
Methyl red	+	+	+	+	+	+	+
Voges-Proskauer	-	-	-	-	-	-	-
Citrate	-	-	-	-	-	-	-
Arginine	+	+	+	+	+	+	+
Lysine	-	-	-	-	-	-	-
Ornithine	-	-	-	-	-	-	-
Arabinose	-	-	-	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-
Cellibiose	+ ^w	+ ^w	-	-	-	+ ^w	-
Fructose	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	-	+	-	+ ^w	-	+ ^w	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	-	-	-	+	-	+	+
Mannose	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-
Raffinose	+	+	-	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-
Salicin	+ ^w	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	+ ^w	-
Sucrose	+	+	+	+ ^w	+	+	+
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+
Xylose	-	-	-	-	-	-	-

3. 시험 균주의 염기 서열 분석

분리 균주들을 16s rRNA와 *dnaJ* gene으로 분석하여 이전 균주 A19008과 Genbank에 등록되어 있는 여러 균주의 sequence를 비교하여 계통수로 나타내었다. 현 분리 균주와 이전 분리 균주 모두 *V. ichthyenteri*와 가장 유사한 염기서열을 가지고 있으며, 99.2~99.8%의 상동성을 보였다. 다음으로 *V. scophthalmi*에 대해 높은 유사성을 보이며, 99.4~99.6%의 상동성을 나타내었다 (Fig. 2). 또 *dnaJ* gene으로 heat shock protein 40을 분석하여 분리 균주를 분석하였을 때 *V. scophthalmi*와 가장 유사하며 98.1~99.3%의 상동성을 나타내었고, 다음으로 *V. ichthyenteri*가 91~92%의 상동성을 보였다 (Fig. 3).



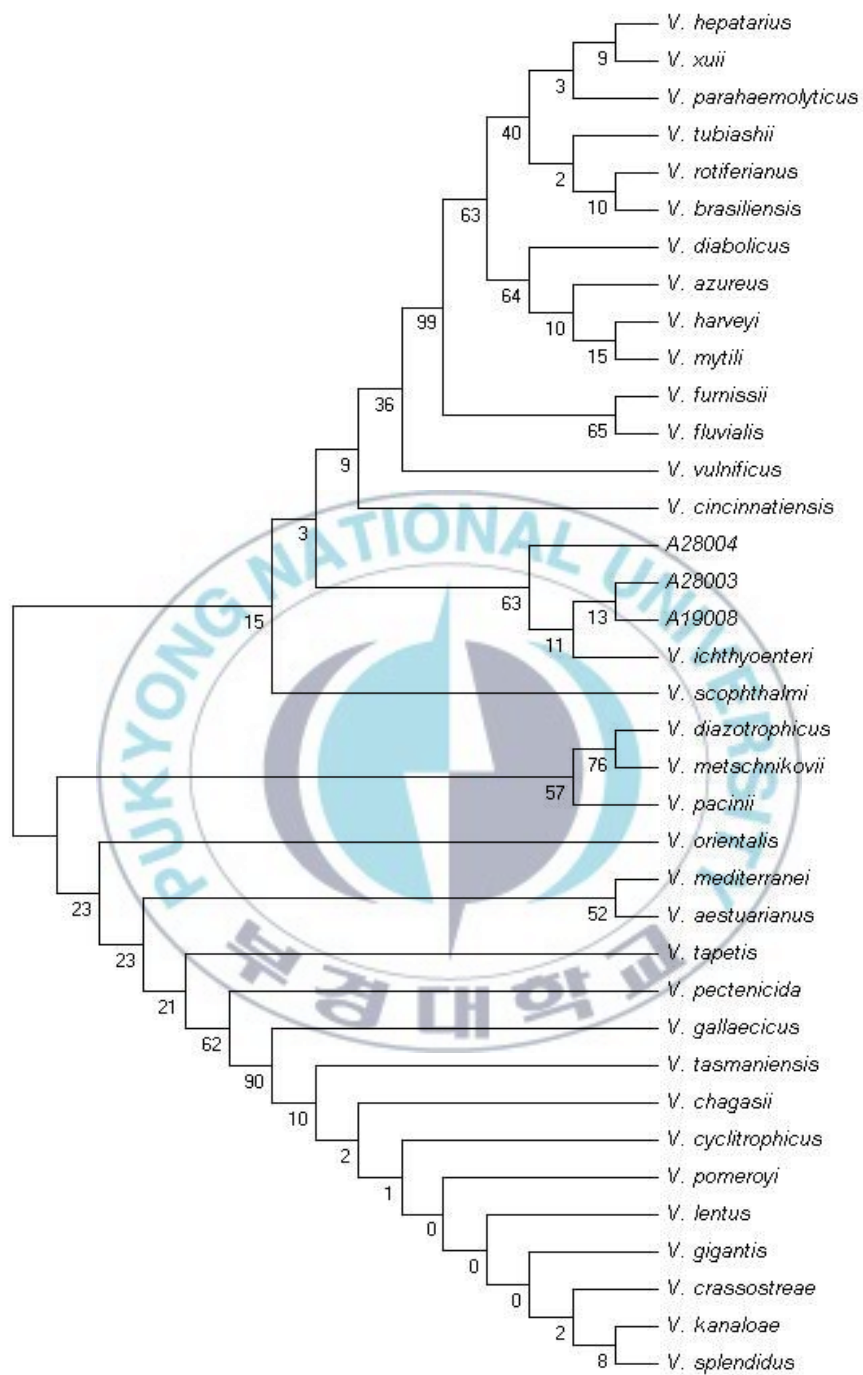


Fig. 2. Phylogenetic tree of three isolates based on partial 16S rRNA gene sequences.

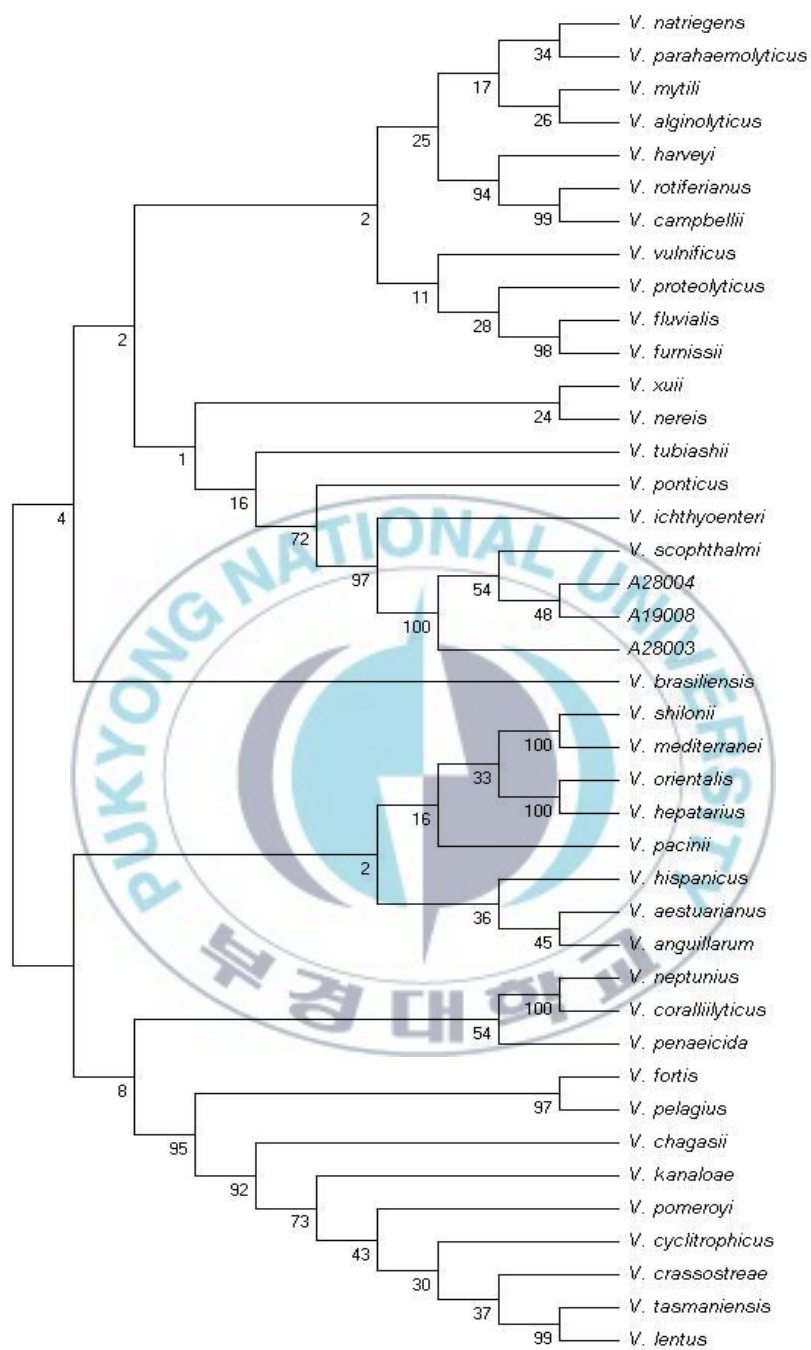
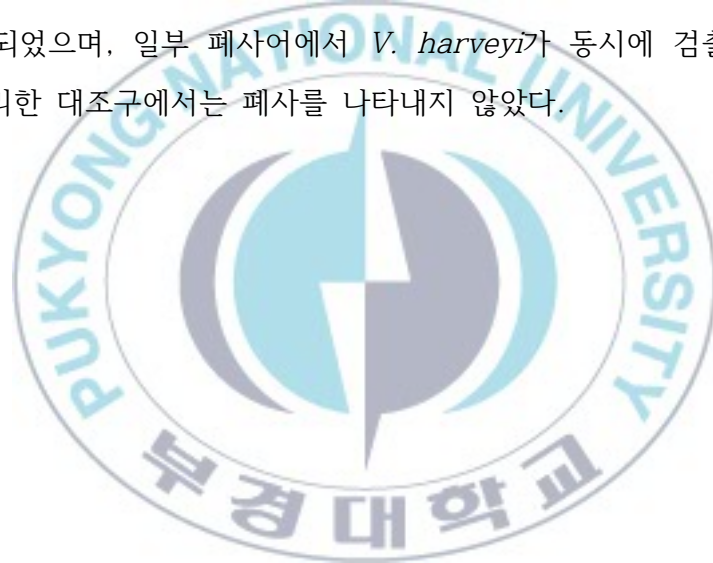


Fig. 3. Phylogenetic tree of three isolates based on partial *dnaJ* gene sequences.

4. 시험 균주의 병원성 확인

시험균의 넙치에 대한 병원성 시험 결과는 Fig. 4에 나타나 있다. 현 분리 균주는 이전 분리 균주보다 강한 병원성을 나타내었다. 1×10^8 CFU/fish의 고농도 감염 시험구에서 A28003, A28004는 100%의 누적 폐사율을, A19008은 60%의 누적폐사율을 보였다. 1×10^6 CFU/fish의 저농도 시험구의 A28003, A28004는 75%, A19008은 25%의 누적 폐사율을 보였다. A28003과 A28004 시험구의 폐사어는 간위축, 체색흑화 및 장관백탁이 관찰되었다. A19008 시험구도 앞의 균주와 같은 증상을 보였으나, 일부 폐사어에서 복부 팽만의 증세를 보였다. 폐사어의 장기에서 공격시험에 사용한 균주가 분리되었으며, 일부 폐사어에서 *V. harveyi*가 동시에 검출되었다. 또 P.S.로 처리한 대조구에서는 폐사를 나타내지 않았다.



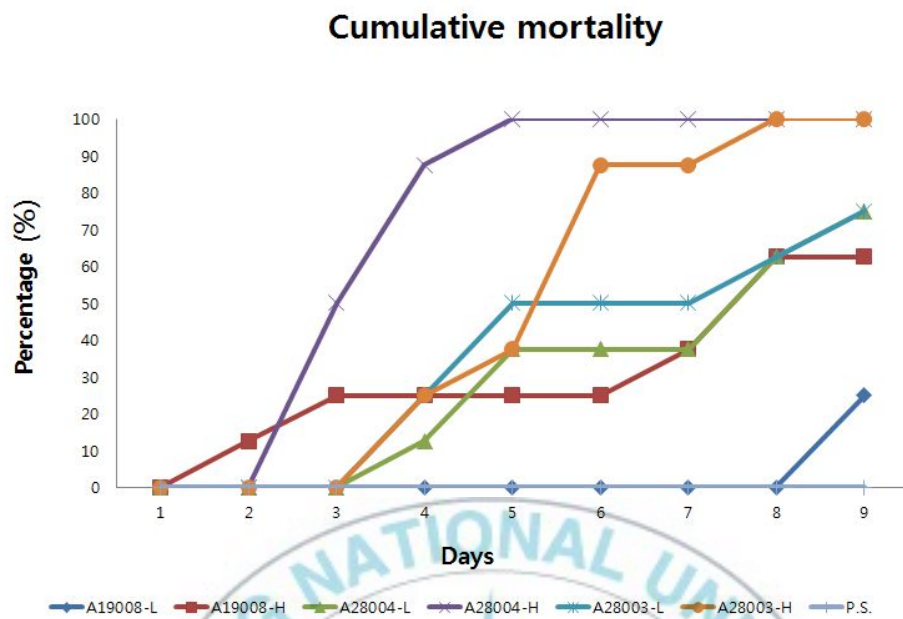


Fig. 4. Cumulative mortality of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, challenged A19008, A28003, and A28004 intraperitoneally with 1×10^6 and 1×10^8 CFU/ml respectively.

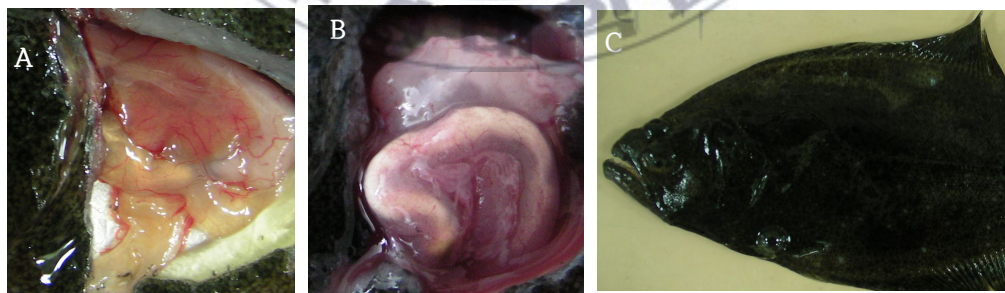


Fig. 5. Clinical signs of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, challenged by A28003 through intraperitoneal injection. A. liver atrophy with white enteritis; B. white enteritis; C. skin darkening.

5. 조직 병리학적 병변

*V. scophthalmi*에 감염된 자연감염어와 인위감염어의 병리 조직학적 병변에 대하여 조사한 결과를 Fig. 6 ~ 12에 나타내었다. 자연 감염어의 조직 병리적 영향으로 심한 간 위축 (Fig. 6), 장 상피 박리, 장내 세포물질 유출 (Fig. 7, 8)이 관찰되었다. 인위 감염어에서는 간 위축 (Fig. 9)이 나타났으며, 비장에서 마크로파지 침윤 (Fig. 10), ellipsoid 비후 (Fig. 11) 등이 관찰되었다. 그리고 신장에서는 hyaline droplet 변성, 조혈기관 활성이 관찰되었다 (Fig. 12). 기 분리 균주와 현 분리 균주 간의 병리 조직학적 차이는 없었다.



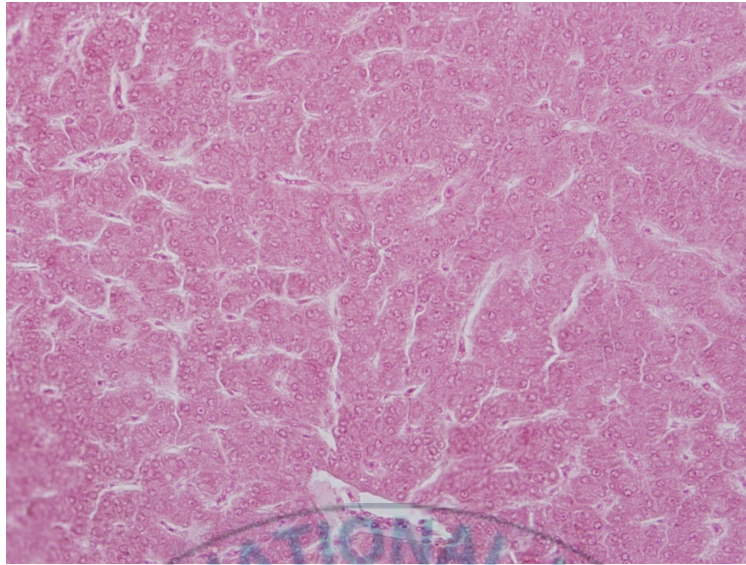


Fig. 6. Atrophied liver of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* naturally infected by *V. scophthalmi*.

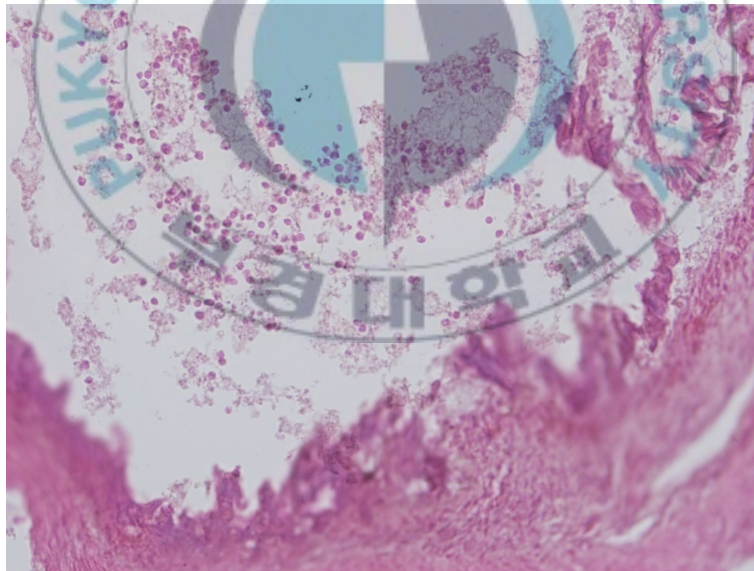


Fig. 7. Enteritis of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* naturally infected by *V. scophthalmi*.

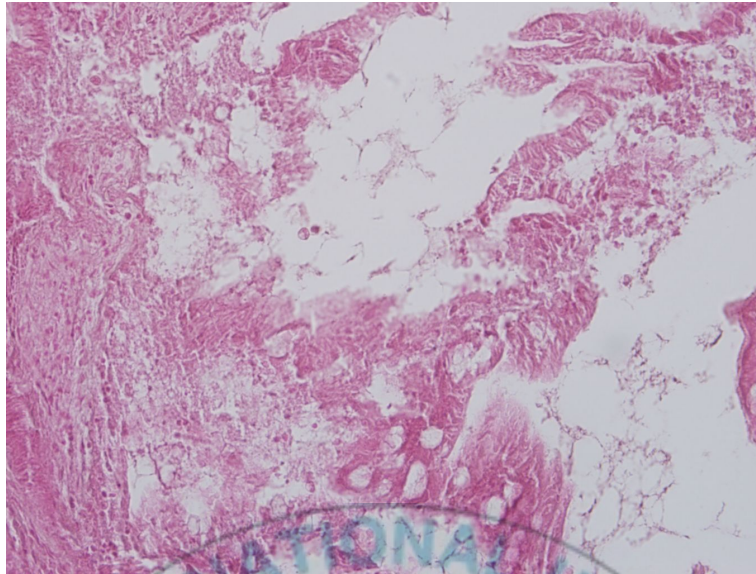


Fig. 8. Enteritis of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* naturally infected by *V. scophthalmi*.



Fig. 9. Atrophied liver of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* challenged with *V. scophthalmi* of A28003.

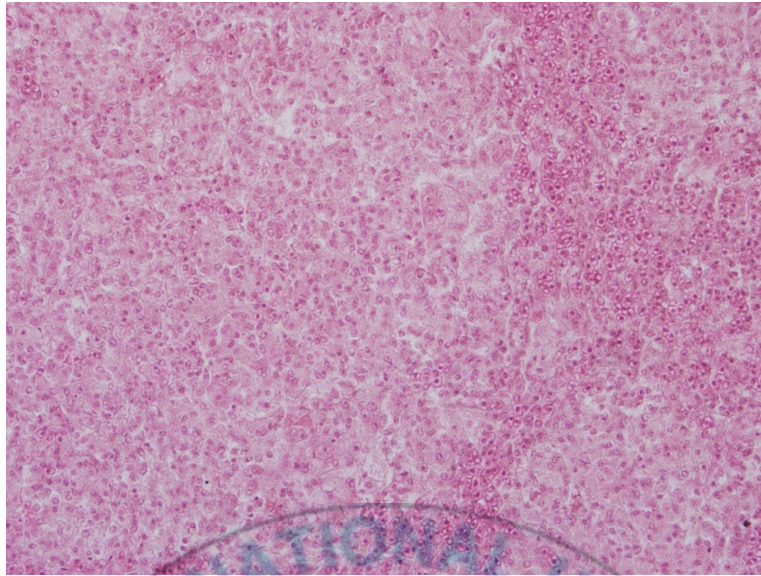


Fig. 10. Macrophage infiltration in the spleen of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* challenged with *V. scophthalmi* of A28003.

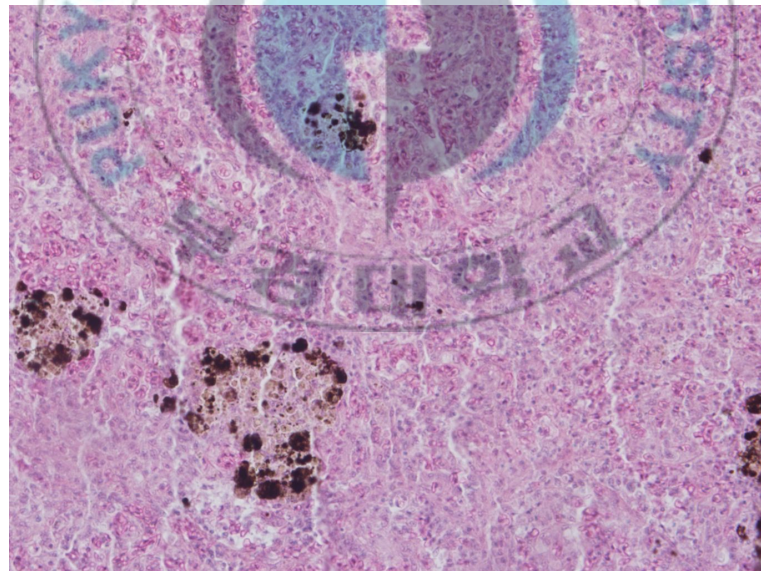


Fig. 11. Ellipsoid hyperplasia in the spleen of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* challenged with *V. scophthalmi* of A28003.

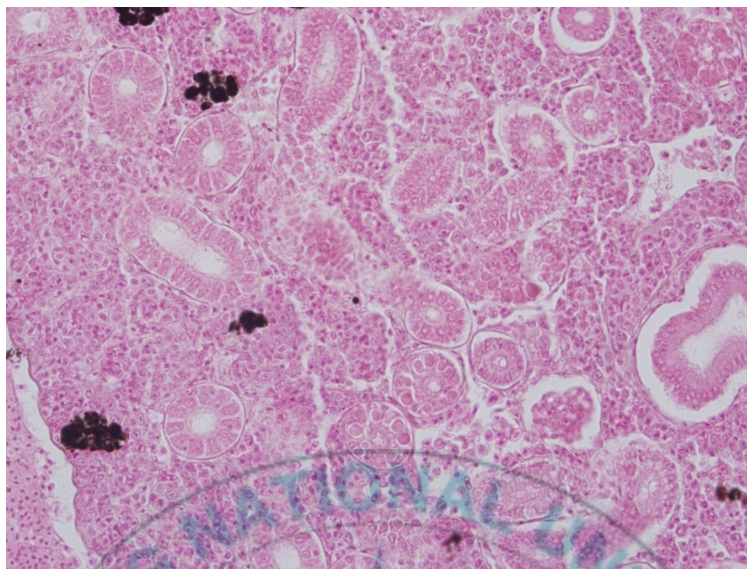


Fig. 12. Hyaline droplet degeneration in the kidney of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* challenged with *V. scophthalmi* of A28003.

6. SDS-PAGE

균주간의 단백질 조성의 차이를 알아보기 위해서, SDS-PAGE를 이용한 whole cell protein을 분석하였다. 시험 균주 모두 전체적으로 비슷한 band가 관찰되었다. 그러나 30kDa 부근의 밴드에서 현 분리균주가 다른 균주와 다른 band 경향을 보였다.



Fig. 13. Whole cell protein pattern of *Vibrio scopthalmi* by SDS-PAGE.

7. 약제 감수성 검사

여러 유래의 시험균주에 대한 약제 감수성 시험을 실시하였다. 모든 시험균주가 Tetracycline, Oxytetracycline, Doxytetracycline에 강한 감수성을 나타내었으며, 기타 약제에 대해서는 시험 균주에 따라 반응의 차이를 보였다. 그리고 Clindamycin에 대해서는 모든 시험 균주가 저항성을 가지고 있는 것으로 나타났다.

Table 6. Susceptibility of the isolates and the reference strains to antibiotic agents

Antibiotics	A1900 6	A1900 8	A1901 0	A2800 3	A2800 4	CECT46 38	CAIM17 97
Tetracycline (30 μ g)	S (23)	S (19)	S (19)	S (25.8)	S (26.5)	S (27.25)	S (22.25)
Oxytetracycline (30 μ g)	S (22.5)	S (21)	S (21)	S (24.3)	S (28.5)	S (24.5)	S (21)
Doxytetracycline (30 μ g)	S (22.5)	S (22.5)	S (22.5)	S (24.3)	S (28.75)	S (24)	S (21)
Nalidic acid (30 μ g)	S (27.5)	R (0)	R (0)	R (10)	R (9.5)	R (9)	R (0)
Clindamycin (2 μ g)	R (0)	R (9)	R (9)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)
Gentamycin (10 μ g)	R (12)	I (13)	I (13)	I (14.2)	S (18.5)	S (17)	S (15.25)
Amoxicillin (30 μ g)	R (0)	S (18.8)	S (18.8)	R (9.8)	S (26)	S (20.5)	I (15)
Ampicillin (10 μ g)	R (0)	R (18.3)	R (18.3)	R (0)	I (24.5)	R (20.8)	R (13.8)
Kanamycin (30 μ g)	R (12.3)	R (12)	R (12)	R (13.2)	S (18.5)	I (16.8)	I (14.3)
Sulfisoxazol (25 μ g)	R (0)	R (0)	R (0)	S (21)	S (31)	S (32)	R (0)
Erythromycin (15 μ g)	R (13.3)	I (14)	I (14)	I (17.5)	I (14.5)	I (17.5)	S (20)

S, Susceptible; R, Resistant; I, Intermediate; (), Diameter of inhibiting ring (mm).

8. 배양실험

8.1. Coculture

V. scophthalmi, *E. tarda* 및 *S. parauberis*를 혼합 배양하였을 때 각 미생물의 성장에 미치는 상관관계를 알아보기 위해서 coculture를 실시하였을 때 *V. scophthalmi*와 *E. tarda*의 coculture 시험구 (V+E)에서는 접종 후 2일 째에 *V. scophthalmi*의 수가 대조구에 비하여 증가하였다 (Fig. 14). *E. tarda*는 모든 시험구에서 대조구에 비하여 성장이 억제되는 것으로 나타났으며, 이는 *S. parauberis*도 마찬가지이었다. *E. tarda*와 *V. scophthalmi*의 coculture 시험구 (V+E)에서 *E. tarda*는 10^9 CFU/ml 정도의 세균 수를 보였으나, *S. parauberis*와 *V. scophthalmi*의 coculture 시험구 (S+E)에서 *S. parauberis*는 10^6 CFU/ml 정도의 세균수를 보였다 (Fig. 15, 16).

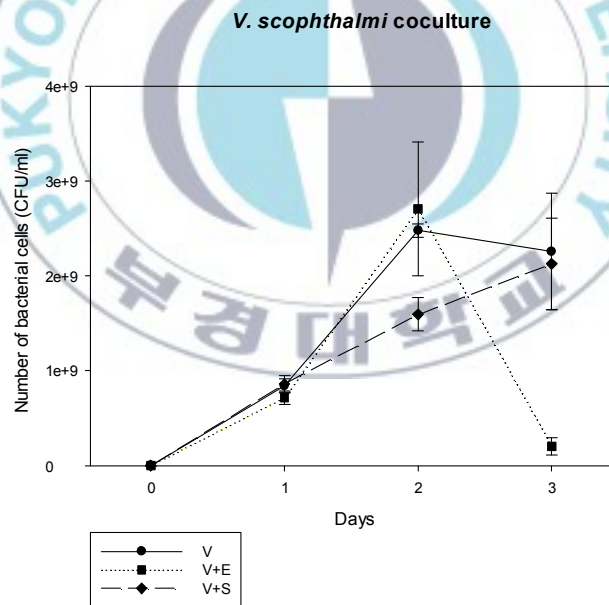


Fig. 14. Growth pattern of *V. scophthalmi* in single culture or coculture. S, *Streptococcus parauberis*; V, *Vibrio scophthalmi*; E, *Edwardsiella tarda*.

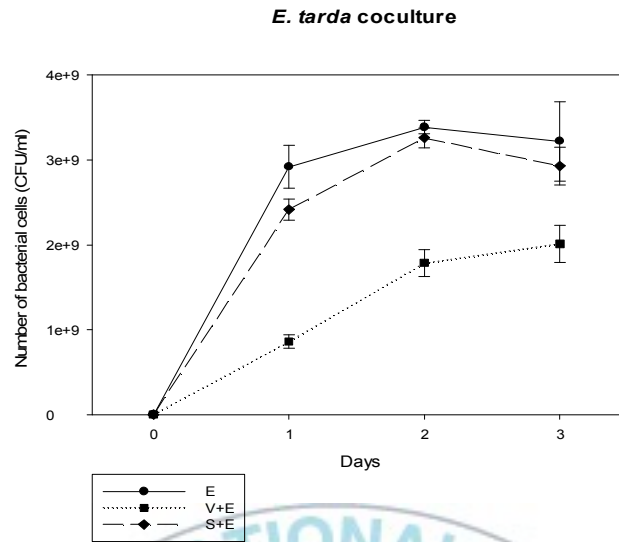


Fig. 15. Growth pattern of *E. tarda* in single culture or coculture. S, *Streptococcus parauberis*; V, *Vibrio scophthalmi*; E, *Edwardsiella tarda*.

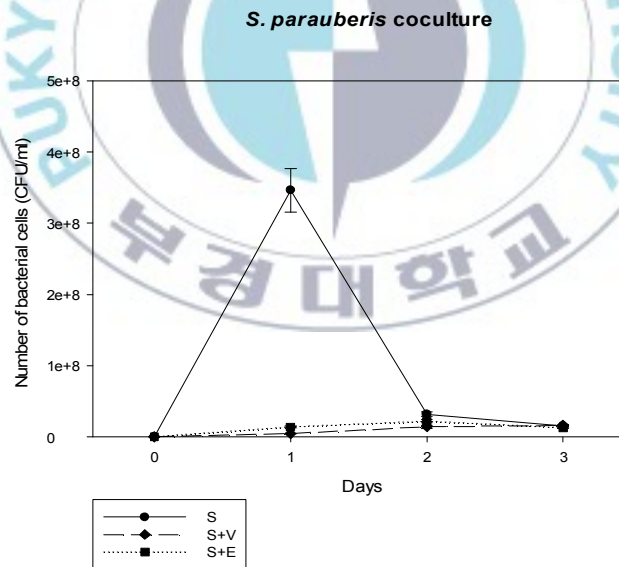


Fig. 16. Growth pattern of *S. parauberis* in single culture or coculture. S, *Streptococcus parauberis*; V, *Vibrio scophthalmi*; E, *Edwardsiella tarda*.

8.2. Nurse Culture

8.2.1. *Vibrio scophthalmi*의 base culture 시험

1차 감염체로서 *V. scophthalmi*의 역할을 알아보기 위하여 base culture 로 *V. scophthalmi*를, nurse inoculation으로 *S. parauberis*와 *E. tarda*를 각각 접종했다. *V. scophthalmi*의 성장 패턴을 살펴보면, 모든 시험구가 대조구에 비하여 1, 2, 3일차에서 빠른 성장을 보였으며, 특히 V+E 시험구의 2일차 세균수는 대조구에 비해 2.37배 많은 세균수를 보였다. *E. tarda*의 경우, 10^9 CFU/ml의 세균수를 보이며 nurse culture에 의해서 성장이 억제되는 것을 알 수 있었다. *S. parauberis*는 1일째에는 균수가 검출되지 않았으나, 2, 3일째에는 대조구와 비슷한 수치를 보였다.

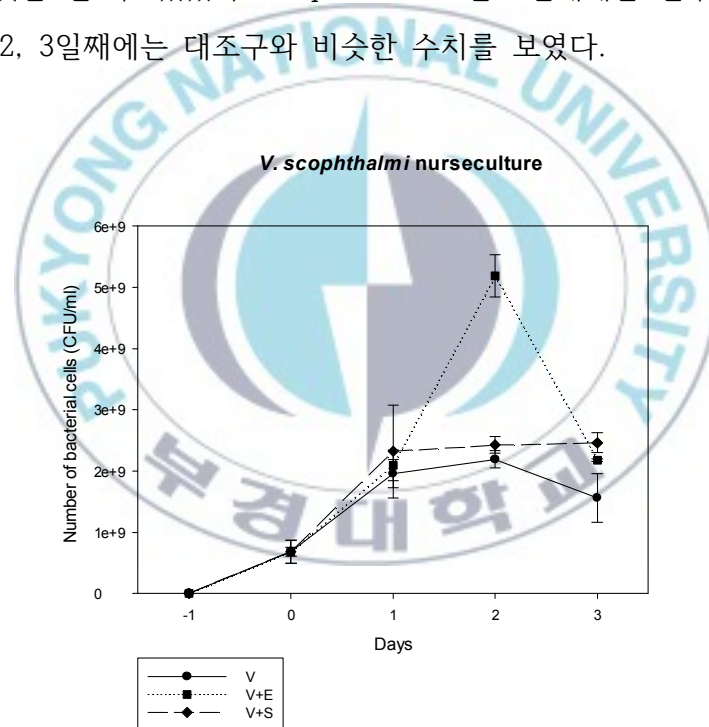


Fig. 17. Growth pattern of *V. scophthalmi* when *Vibrio scophthalmi* was pre-inoculated in nurse culture. S, *Streptococcus parauberis*; V, *Vibrio scophthalmi*; E, *Edwardsiella tarda*.

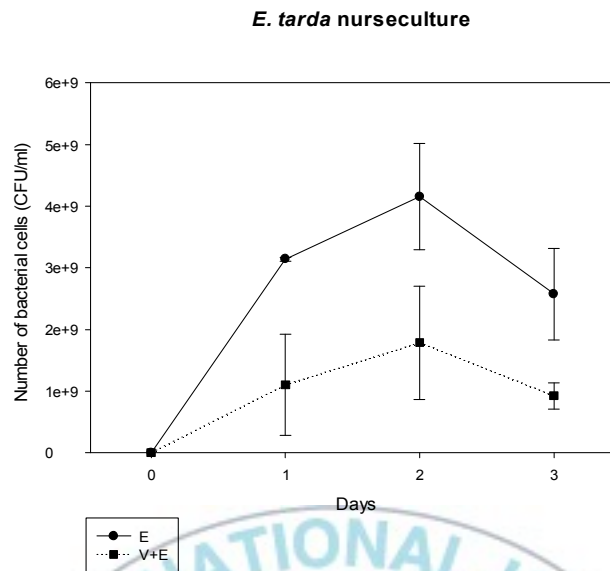


Fig. 18. Growth pattern of *E. tarda* when *Vibrio scopthalmi* was pre-inoculated in nurseculture. V, *Vibrio scopthalmi*; E, *Edwardsiella tarda*.

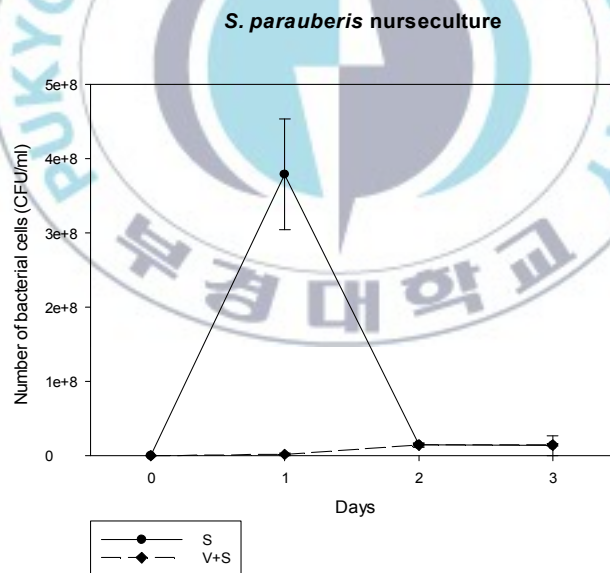


Fig. 19. Growth pattern of *S. parauberis* when *Vibrio scopthalmi* was pre-inoculated in nurseculture. S, *Streptococcus parauberis*; V, *Vibrio scopthalmi*.

8.2.2. *Vibrio scopthalmi*의 nurse inoculation 시험

2차 감염체로서 *V. scopthalmi*의 역할에 대해서 알아보기 위해서 *V. scopthalmi*를 nurse inoculation 하여 성장 패턴을 관찰하였다. *V. scopthalmi*와 *S. parauberis*의 시험구는 nurse culture에 의해 성장이 억제되었다. *E. tarda*의 성장 패턴을 살펴보면, E+V 시험구에서는 1일째 대조구와 1.2배 높은 상태로 나타났다.

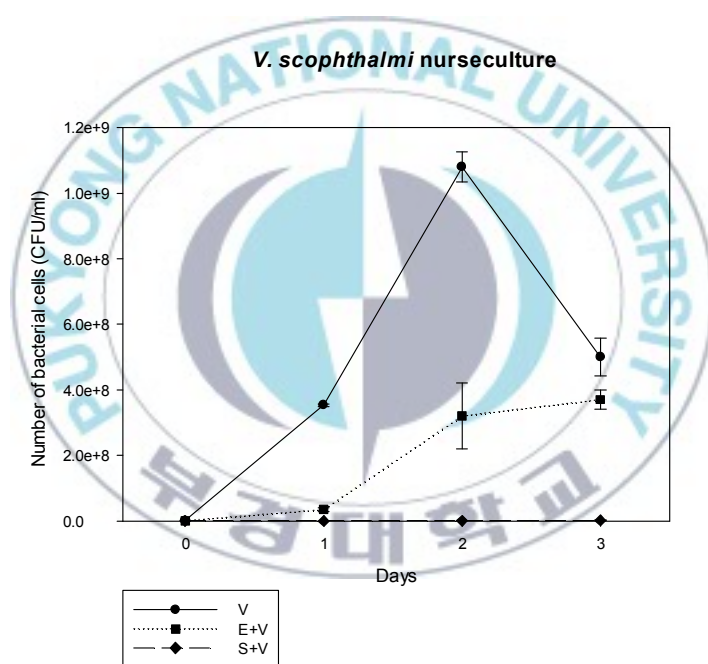


Fig. 20. Growth pattern of *V. scopthalmi* when *Vibrio scopthalmi* was inoculated lately in nurse culture. S, *Streptococcus parauberis*; V, *Vibrio scopthalmi*; E, *Edwardsiella tarda*.

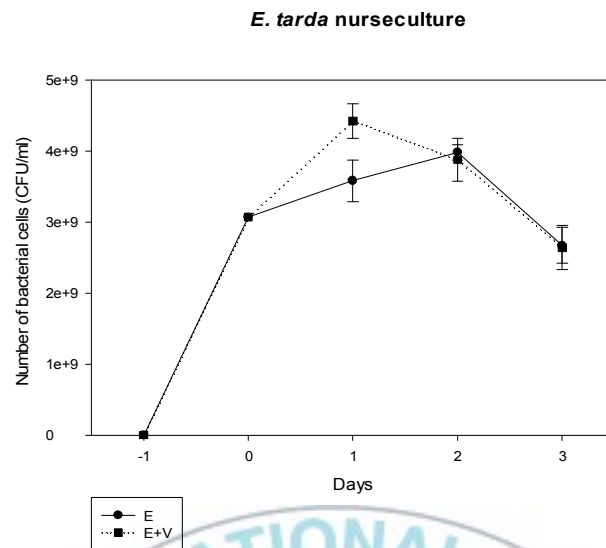


Fig. 21. Growth pattern of *E. tarda* when *Vibrio scophthalmi* was inoculated lately in nurseculture. V, *Vibrio scophthalmi*; E, *Edwardsiella tarda*.

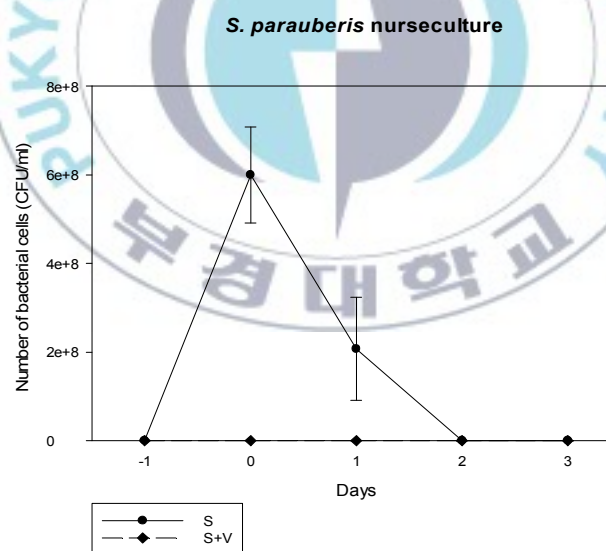


Fig. 22. Growth pattern of *S. parauberis* when *Vibrio scophthalmi* was inoculated lately in nurseculture. S, *Streptococcus parauberis*; V, *Vibrio scophthalmi*.

IV. 고찰

본 연구에서 나타난 자연 감염어는 외부 증상으로서 수면 위로 유영, 여임, 그리고 체색흑화 등의 일반적인 병변을 보였으나, 내부 증상으로 장관백탁, 간위축 등의 특징적인 병변을 나타내었다. 병어로부터 분리한 균의 인위감염어 증상은 자연감염어와 일치하여 본 연구에서 시험한 분리균이 그 원인이라 판단되며, 그 균을 *V. scophthalmi*로 동정하였다.

여임증이 처음 나타난 것은 일본의 양식 자주복이며, 이외에도 참돔, 돌돔, 넙치에서 발병되었다는 보고가 있다 (Tin *et al.*, 2000). 최근 제주도내 양식장의 20cm 전후 크기의 넙치에서 체표면이 검어지고 여위어가는 질병에 의해 상당수의 폐사가 발생하였고, 병어의 특징적인 증상으로 체색흑화, 탈장 및 장출혈 등이 있다 (최, 2012). 병어로부터 *V. harveyi*와 *E. tarda*가 분리되었으나, 직접적인 병원체로서의 역할에 대해서는 연구의 여지가 남아 있다. 본 연구의 병어 또한 여임증을 보여 현재 제주도에서 발생하고 있는 여임증과 동일하게 생각할 수 있으나, 탈장 등 일부 증상이 일치하지 않으며, 분리된 병원체 또한 일치하지 않았으므로 같은 병원체로 인한 질병으로 여겨지지 않는다.

본 시험 균주 A28003, A28004와 이전 분리 균주 및 참조균주의 생화학적 성상을 비교하였을 때 대체로 일치하는 결과를 보였으나 cellibiose, galactose, mannitol, raffinose, sorbitol, salicin, sucrose에 대하여 균주에 따라 차이가 있었다. Cerda-Cuellar and Blanch (2002)에 의하면 터봇 유생기에 분리한 136개의 *V. scophthalmi*를 생화학 동정하였을 때 28개의 생화학적 표현형을 가졌다고 보고하였다. 따라서 당 분해능의 차이를 보이는 것이 *V. scophthalmi*의 특성으로 볼 때, 본 시험 균주를 *V. scophthalmi*로 추정 동정할 수 있다.

16s rRNA는 원핵생물 리보솜의 30s 소단위체를 구성하고 있는 rRNA로,

이 RNA 서열은 대부분 상당히 보존되어 있는 반면 일부 구간에서 높은 염기 서열 다양성을 나타낸다. 특히 동종간에 다양성이 거의 없는 반면 타종간에는 다양성이 나타나 생물 동정에 많이 사용된다. 16s rRNA를 이용한 분리균주의 염기서열을 NCBI에 등록된 sequence와 비교 분석한 결과, 본 시험 균주와 이전 분리 균주 모두 *V. ichthyenterii*와 가장 유사한 염기서열을 가지고 있으며, 99.2~99.8%의 상동성을 보였다. 다음으로 *V. scopthalmi*에 대해 높은 유사성을 보이며, 99.4~99.6%의 상동성을 나타내었다. 그러나 *V. ichthyenterii*의 경우 자어기의 넙치에 대하여 병원성이 있으며, 위장이 완전히 발달한 성어에선 병원성이 없다고 알려져 있다 (김, 2002). 또, *V. scopthalmi*와 *V. ichthyenterii*의 16s rRNA 염기 서열이 매우 유사하기 때문이며, 이를 이용하여 두 균을 구별하는 것은 매우 어려운 일이다 (Thompson *et al.*, 2005). 따라서 좀더 정확한 동정을 위하여 *dnaJ* gene을 이용한 동정을 실시하였다. *dnaJ* gene은 heat shock protein 40을 인코딩하는 house keeping gene으로서, *Mycobacterium* (Takewaki *et al.*, 1994; Yamada *et al.*, 2007), *Legionella* (Liu *et al.*, 2003), *Streptococcus* (Itoh *et al.*, 2006), *Staphylococcus* (Shah *et al.*, 2007), *Aeromonas* (Nhung *et al.*, 2007c), *Vibrio* (Nhung *et al.*, 2007a) 및 Enterobacteriaceae Family (Nhung *et al.*, 2007c)를 성공적으로 동정하고 분류하는데 이용된다. Nhung *et al.* (2007b)은 57 종류의 *Vibrio* 균주를 *DnaJ* gene을 이용하여 성공적으로 분류하였으며, *Vibrio* 균주 동정에 대한 16s rRNA와 *gyrB* gene, *recA* gene 등의 한계를 해결할 대안이라고 주장하였다. 본 연구의 분리 균주를 *dnaJ* gene로 동정하였을 때 *V. scopthalmi*에 대하여 98.1%, 99.3%로 가장 높은 상동성을 나타냈으며, *V. ichthyenterii*에 대해서 91~92%의 상동성을 보였다. 앞의 16s rRNA에 대한 염기서열 상동성과는 달리 *V. ichthyenterii*에 대하여 본 균주가 낮은 상동성을 나타내는 것을 알 수 있었다.

따라서 본 분리 균주에 대하여 시행한 생화학적 시험과 염기서열을 분석한

분자생물학적 분석 결과를 종합하였을 때, A28003과 A28004는 *V. scophthalmi*로 동정되었다. 또 자어기의 넙치에게 장관백탁증을 일으키는 *V. ichthyenteri*와의 유전적 상동성과 본 연구의 병어에서 나타난 장관백탁증상으로 미루어보아, *V. scophthalmi*를 성장 단계의 넙치에게 장관백탁증을 일으키는 병원체로 여겨질 수 있다.

*V. scophthalmi*는 건강한 터봇 유생의 장관에서 최초로 분리되었으며 (Blanch *et al.*, 1997; Cerda-Cuellar and Blanch, 2002), 해수뿐만 아니라 넙치 병어의 장관에서 분리되었다 (Sugita and Ito, 2006; 강, 2003; 조, 2006). 최근까지 *V. scophthalmi*는 summer flounder를 대상으로 인위감염 실험을 시행한 결과 0%의 폐사율을 나타내는 등 병원성이 없는 상주세균으로 여겨져왔다 (Gauger *et al.*, 2006).

그러나 2001년부터 2002년까지 제주도의 넙치 병어를 대상으로 질병 검사를 시행한 결과, *V. harveyi* (32%) 다음으로 *V. scophthalmi* (26%)가 많이 검출되었으며 (강, 2003), 2005년부터 2006년까지의 제주도 넙치 병어의 질병 검사에서 *V. scophthalmi* (45.3%)가 *V. harveyi* (24%)보다 더 많이 검출되었다 (조, 2006). 또 Quio (2010)는 넙치를 대상으로 인위감염 실험을 시행하여 *V. scophthalmi*가 넙치에 대하여 비교적 약한 병원성을 가지는 것으로 보고하였다.

본 연구의 병원성 실험 결과 1×10^6 CFU/fish로 넙치에 인위감염 실험을 실시하였을 때 본 시험 군주가 75%를 보인 반면, 이전 분리 군주는 25%의 누적 폐사율을 나타내어, 본 시험 군주가 이전에 비해 훨씬 강한 병원성을 가지는 것으로 밝혀졌다. 따라서 *V. scophthalmi*는 어종과 군주에 따라 다양한 병원성을 나타내는 것으로 사료된다.

넙치에게 단독 병원체로서 잘 알려진 *Vibrio* 균인 *V. anguillarum*, *V. harveyi*, *P. damsela damsela* 등이 인위감염에서 $10^5 \sim 10^6$ CFU/fish의 LD₅₀값을 보였으며, 본 연구의 분리 군주 또한 10^6 CFU/Fish의 공격 실험에서 75%의 폐사율을 보이는 것으로 미루어보아 매우 강한 병원성을 가지

고 있다고 사료된다. 넙치에 대한 *V. harveyi*의 LD₅₀값으로 $2.48 \times 10^5 \sim 8.76 \times 10^7$ CFU g/fish (원, 2008), $10^{6.1}$ CFU/fish (Sun *et al.*, 2007)가 보고된 바 있다. 또 권 (2005)의 연구에서 1.2×10^6 CFU/fish로 균을 복강주사 하였을 때, *P. damsela damsela*는 80%, *V. anguillarum*은 60%의 누적 폐사율을 나타냈다.

연구에서 자연 감염어와 인위 감염어에 대한 조직병리학적 병변에 대해 조사하였을 때 자연 감염어의 경우, 간 위축과 장 상피 탈락, 장내 세포 물질 유출을 보였고, 인위 감염어는 간 위축, ellipsoid 비후, 마크로파지 침윤, hyaline droplet 변성 등이 발견되었다. 여기서 나타난 조직병리적 변화에 대한 결과는 이전 연구자의 것 (Quio, 2010)과 일치하며, 본 연구에서도 이전 균주와 현 분리 균주의 조직병리학적 변화의 차이는 없었다. 무지개송어에 *V. anguillarum*을 복강주사하여 병리조직학적으로 관찰하였을 때 간 위축, 신세뇨관의 hyaline droplet 변성, 장 점막 박리를 보였다 (Lamas *et al.*, 1994; Kumaran, 2010; AVCI, 2012). 그러나 이 균은 장관 백탁에 이르지 않고 장 점막만 박리를 일으키는 병원체로 알려져 있다. 관찰된 조직병리적 변화 중 장 상피 탈락은 병어의 장내 세포 물질을 유출시키고, 그들이 응집되어 장관백탁증상을 보이는 것으로 추정된다.

병어의 치료에 적합한 약제를 알아보기 위해서 기존 분리 균주와 현 분리 균주, 참조 균주의 약제 감수성 시험을 실시하였다. 모든 균주가 Tetracycline계열의 약제에 감수성이 있었으나, Clindamycin에는 저항성이 있었고, 시험된 나머지 약제에 대해서 균주마다의 차이가 있었다. *V. scophthalmi*의 감염어가 발견된 넙치 양식장에서 약제감수성의 결과에 따라 Oxytetracycline (OTC)을 7일간 경구 투여한 후 폐사가 멈추었다. 따라서 *V. scophthalmi*의 치료 대책으로 현장에서의 Tetracycline 계열의 약제가 효과적임을 알 수 있다.

양식 환경에서 나타나는 질병 패턴을 살펴보기 위해 양식장의 자연 감염 넙치를 대상으로 시행한 질병 검사 결과 2종 이상의 병원체가 분리된 경우

(34.6%)가 한 종의 병원체가 분리된 경우 (33.6%)보다 더 많았고 (김, 2010), 2종 이상의 세균 혼합감염도 많이 나타나고 있는 실정이다 (강, 2003). 특히 8월의 경우는 전체 *Vibrio* 검출률 중 56.5%, 전체 *Edwardsiella* sp. 검출률 중 50%가 혼합감염을 보였다 (강, 2003). *V. scopthalmi*를 후접종체로 superinfection을 시행했을 때 단독감염시 12.5%의 폐사율을 나타낸 농도로 *Streptococcus parauberis*와의 혼합감염 시켰을 때 87.5%로 폐사율이 증가하였다 (Qiao, 2011). 본 연구에서도 8, 10월경 *V. scopthalmi*와 *Streptococcus* sp.가 혼합 감염 상태인 병어를 발견한 바 있다. 이처럼 혼합감염은 양식환경에서 빈번하게 일어나고 있는 현상이며, 본 병원체의 혼합감염 사례를 미루어보아 *V. scopthalmi*의 혼합감염체로서 가능성을 검토할 필요성이 있다고 사료되어 coculture와 nurseculture를 시행하여 *V. scopthalmi*가 다른 균과 가지는 미생물학적 상관관계에 대하여 알아보았다.

본 연구에서 시행한 coculture 실험 결과 V+E 시험구에서 *V. scopthalmi*의 초기 성장이 촉진되는 것을 관찰하였으나, coculture 시험구에서 *E. tarda*와 *S. parauberis*는 성장이 억제되었다. 이를 총 세균수적 측면에서 보면 V+E 시험구의 세균수가 V와 E 대조구의 세균수를 합친 것과 유사한 수치를 나타냈다. 이는 V+E 시험구에서 *E. tarda*의 성장이 대조구에 비해서는 억제되지만 *V. scopthalmi*와 공존하고 있다고 여겨진다. 한편, V+S와 E+S 시험구의 총 세균수가 V, S 대조구의 세균수보다 적은 것으로 미루어 보아 *S. parauberis*가 다른 균주와의 상충작용을 일으킨다는 것을 알 수 있다.

Nurseculture 시험 결과 일부 시험구에서 base culture로 사용된 균의 성장 촉진이 나타났으며, 그 예로 V+E 시험구의 *V. scopthalmi*, V+S 시험구의 *V. scopthalmi*, E+V 시험구의 *E. tarda*의 세균수가 대조구보다 많았다. 나머지 시험구의 시험 균주는 정도의 차이를 가지며 성장이 억제되었다. 각 시험구의 총 세균수적 측면에서 살펴보면, V+E 시험구의 세균수가 E

와 V 대조구의 세균수보다 더 많이 나타났으며, 이를 미루어보아 nurse culture에 의해서 *V. scopthalmi*의 성장이 촉진되더라도, *E. tarda*가 공존한다는 것을 알 수 있다. 또, V+S 시험구와 E+V 시험구 또한 각각의 대조구보다 많은 세균수를 나타내어 base culture한 균의 성장이 촉진될지라도, nurse inoculation한 균이 공존한다는 것을 알 수 있었다. S+V 시험구의 경우 V 대조구의 총 세균수보다는 적고, S 대조구의 세균수와는 비슷하게 나타났고, 성장 패턴에서 또한 두 균 모두 대조구에 비해 성장이 억제되었던 것으로 미루어보아 *S. parauberis*와 *V. scopthalmi* 모두 서로에 의해서 상충작용을 하는 것으로 나타났다.

위 결과를 다시 종합하여 보면, *V. scopthalmi*와 *E. tarda*의 모든 시험구에서 두 균은 공존하거나 혹은 성장이 촉진되는 것을 볼 수 있었다. 즉, *V. scopthalmi*가 *E. tarda*의 혼합감염에서 어떤 역할이 있음을 시사한다. *V. scopthalmi*와 *S. parauberis*의 경우, *V. scopthalmi*가 1차 병원체로서 *S. parauberis*와의 혼합감염에서 조력자로서 역할을 하는 것으로 보인다.

이러한 병원체 간의 상호관계는 다른 균에 의해서 성장이 촉진되고, 이는 서로 다른 영양소를 사용하는 미생물이 다른 미생물의 성장 경쟁에 의하여 자극을 받았거나 성장에 필요한 미지의 물질을 다른 미생물이 분비하여 도움을 받거나 다른 미생물과의 경쟁이라는 환경 변화에 대한 적응을 위해 세균 자신이 성장을 촉진하는 특정 물질을 분비하는 것 등을 생각할 수 있다.

이 때 환경 변화에 대한 적응을 위해 신호 물질을 분비하는 것을 퀴럼센싱이라 하며, 각각의 세균 개체들이 저분자 신호 물질들을 세포 외에 축적하여 상호 개체군의 밀도를 최소한도로 유지하거나 또는 활발한 증식을 유발하게 하여 정족수를 이루게 하는 일련의 현상을 지칭한다. 세균은 환경의 변화에 반응하여 특정한 분자를 합성하여 세포외로 방출하고 또 그것을 흡수하는 방법을 사용하여 서로 상호작용을 위해 신호를 만들고, 즉 이 퀴럼센싱을 통해 함께 특정한 활동을 수행하게 된다. 이런 환경 변화의 예로는 영양소의

부족, 같은 영양소를 사용하는 미생물과의 경쟁, 주변의 toxic한 물질의 증가 등이 있다 (Bassler *et al.*, 1993). 또 신호 전달 과정에 대한 결과로 공생, 발병력, 경쟁, 접합, 항생제 생산, 이동능, 포자 생성, 바이오필름 형성 등에 관여한다. 특히, 바이오 필름은 세포의 정교한 구조를 만들며, 영양 흡수를 촉진시키는 등 세균이 생존하도록 도우며 증식을 촉진시킨다. 이때, 퀴럼센싱의 HSL autoinducer signalling을 통해 바이오필름 형성을 촉진시키며, 세균 성장을 촉진시킨다. 또 저분자의 신호물질을 통한 그람 음성균의 퀴럼센싱 신호 전달 경로로는 acylhomoserine lactone(AHL)-based system과 LuxS system이 존재하며, *E. tarda*와 *V. scophthalmi*에서 두 경로에 이용되는 신호전달 물질이 발견되었고 이들 균도 퀴럼센싱을 한다는 것이 알려져 있다 (Garcia-aljaro, 2008; Morohoshi, 2004; Zhang, 2009). 따라서 한 종류의 균이 다른 종류의 균 존재에 의해 자극을 받게 되고, 그에 대한 적응으로 정족수를 이루기 위해서 신호 전달 물질을 만들어 성장을 촉진하게 된 것이라 추정한다.

두 균의 상호작용에서의 성장 촉진의 직접적인 원인을 밝히기 위해 퀴럼센싱 등의 관점으로 추후 더 많은 연구가 진행되어야 할 것이며, 본 연구에 대한 *in vitro* 실험 결과를 토대로 *in vivo* 실험이 수행되어야 할 필요가 있다.

본 연구에서 발견한 병어는 외관상의 특징적인 증상이 없으며, 내부 소견으로서 장관백탁과 간 위축이 주증상이었다. 그 원인체로 밝혀진 *V. scophthalmi*는 균주에 따라 다양한 병원성을 가지며, 본 연구의 분리균주는 매우 강한 병원성을 나타내어 대량 폐사의 주원인으로 진단되었다. 그리고 *V. scophthalmi*는 특정한 조건에서 다른 균과의 상호 작용을 통해 자신의 성장 혹은 다른 균의 성장을 촉진시켜 혼합 병원체로 역할이 예상된다.

V. 요약

최근 울산광역시 울주군 소재의 양식장에서 체색 흑화, 간 위축, 장관 백탁을 보이며 넙치의 대량 폐사가 빈번히 발생하여, 병원체를 분리하고 감염 특성에 관하여 연구하고자 하였다. 2012년 5월 병어로부터 분리한 원인균은 생화학 시험과 16s rRNA, *dnaJ* gene을 이용한 염기서열 분석을 통해 *V. scophthalmi*로 동정하였다.

병원성 시험 결과, 본 시험 균주의 경우 10^6 CFU/fish 에서 75%의 누적 폐사율을 보여 강한 병원성이 인정되었다.

V. scophthalmi 감염어는 조직병리학적 병변으로서 간 위축, 장 상피 탈락, 장내 세포 물질 유출 및 장관백탁증이 확인되었다.

coculture와 nurseculture 시험 결과 *V. scophthalmi*는 특정한 조건에서 다른 균과의 상호 작용을 통해 자신의 성장 혹은 다른 균의 성장을 촉진시키는 것으로 나타났다. 이로써 *V. scophthalmi*가 *S. parauberis*와 *E. tarda*의 혼합감염에서 기여하는 병원체 역할이 있을 것으로 사료된다.

VI. 감사의 글

뒤늦게 시작한 대학원 생활이 이 논문과 함께 작은 결실을 맺을 수 있도록 부족함이 많은 저를 인내와 인애로 이끌어주신 박수일 지도교수님께 깊은 존경과 감사를 드립니다. 또한 바쁘신 와중에도 부족한 제 논문에 세심한 지도를 해주신 허민도 교수님과 정현도 교수님께 감사드리며 많은 지도와 조언을 해주신 정준기 교수님, 김기홍 교수님, 강주찬 교수님께도 감사드립니다.

늘 한결같은 믿음으로 지도해주시고 관심과 배려로 이끌어주신 방종득 박사님, 항상 후배들을 사랑하는 큰 마음을 보여주시는 유병화 선배님, 만날 때마다 좋은 말씀 아끼지 않으신 최혜승 연구관님, 지보영 박사님, 김수미 박사님, 조미영 박사님, 권문경 박사님, 최현숙 선배님, 김현정 박사님, 홍미주 선배님, 황성돈 박사님, 최정현 박사님, 손새봄 선배님께 감사드리며 힘들 때마다 진심어린 가르침과 격려를 해주신 이덕찬 박사님, 김이경 박사님, 김도형 교수님, 박찬일 교수님, 원경미 박사님, 한현자 박사님께 진심으로 감사드립니다.

실험실에 대한 관심과 지원을 아끼지 않으신 이재일 박사님과 오현석 선배님, 실험어를 자애로 공급해주신 심재동 선배님, 정종아 선배님, 거성수산 노영하 사장님, 김전진 선배님, 한상윤 선배님께 감사드리며, 현장에 대한 공부를 걸음마부터 세심하게 하나하나 가르쳐 주신 문재석 선배님께 정말 감사드립니다. 후배들에게 늘 좋은 수산물을 제공해주시는 국립 수산 품질검사원의 이상윤 선배님, 손영찬 선배님, 강민진 선배님, 성명희 선배님, 최광진 선배님께 감사드립니다. 또 실험의 사육의 편의를 위해 애써주신 부경대

학교 수산과학연구원에 깊이 감사드립니다. 부족한 점이 있을 때마다 내 일처럼 챙겨주신 김민선 박사님, 최승혁 박사님, 이동규 선배님, 조기택 학형님, 김보성 학제님, 이수연 학제님께 감사드리며, 여러모로 많이 도움을 준 학생회장 박준형 학제님께도 진심으로 감사드립니다. 모두 항상 승승장구 하시기를 기원합니다.

실험실에서의 2년여의 시간 동안 전반적인 부분에 대해 조언을 아끼지 않으셨던 우승호 박사님께 진심으로 감사드리며, 언제나 웃는 얼굴로 다독여주신 Qiao Guo 박사님, 언제나 저를 믿어주신 박효진 선배님, 엄용환 선배님, 황분옥 학형님, 곽진영 학제님, 이재연 학제님께 감사드립니다. 항상 마음이 쓰이는 김남은, 믿음직한 김아란, 유쾌한 김민경 학제님 덕분에 즐거운 실험실 생활을 할 수 있었습니다. 마음이 따뜻한 소정이 덕분에 많은 걸 배웠고, 외롭지 않게 이 시간들을 보낼 수 있었습니다. 여러분 덕분에 즐거운 실험실 생활을 할 수 있어서 정말 감사드리며, 앞으로도 서로에게 힘이 되어 주는 사람이 되었으면 합니다.

언제라도 제 이야기에 귀 기울여 들어주고 흔들림 없이 정진할 수 있도록 도와준 엄지영 선배님, 김선영 학제님께 감사드리며, 항상 내 편인 다혜, 현영이, 예지, 윤주, 지윤이에게도 많이 고맙다는 말을 전하고 싶습니다.

바른 길로 오기까지 오랜 시간 믿고 기다려 주시고 저의 결정에 무한한 지지를 해주신 부모님께 감사드리며, 철없는 저를 도와주느라 항상 고생하는 내 동생들, 정현이와 연성이에게도 사랑한다는 말을 전하고 싶습니다.

마지막으로 논문이라는 작은 결실을 맺기까지 만나야했던 고비들을 잘 넘기고 이 자리에 올 수 있게 해주신 모든 분들께 이 장을 빌어 감사의 말씀을 드리며 앞으로 더욱 발전하는 모습으로 그 은혜에 보답하고자 합니다.

VII. 참고 문헌

- 강봉조 (2003). 제주지역 양식장의 질병증상 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)로부터 분리되는 세균의 특성에 관한 연구. 제주대학교.
- 권문경 (2005). 넙치, *Paralichthys olivaceus*에서 분리된 *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*의 어병학적 특성. 부경대학교.
- 김진우, 조미영, 박경현, 원경미, 최혜승, 김명석, 박명애 (2010). 2005년부터 2007년 사이 양식 넙치, *Paralichthys olivaceus* 질병에 대한 통계 자료. 한국어병학회지, 23, 369-377.
- 조미란 (2006). 제주도 양식넙치에서 분리된 비브리오세균의 신속동정과 항생제 내성. 제주대학교
- 최혜승, 전려진, 김승민, 정현도, 김이경, 임희영, 여인규, 정준범 (2012). 여윌 증상 넙치, *Paralichthys olivaceus*로부터 분리된 병원균의 임상적 고찰. 한국어병학회지, 25, 67-76.
- Avci, H., S. Birincio Lu and H. Cagiran (2012). Pathological and immunohistochemical investigations in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) experimentally infected with *Vibrio anguillarum*. Reveu Med. Vet., 163, 31-39.
- Bassler, B. L., M. Wright, R. E. Showalter and M. R. Silverman (1993). Intercellular signaling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence. Mol. Microbiol., 9, 773-786.
- Blanch, A. R., M. Alsina, M. Simon and J. Jofre (1997). Determination of bacteria associated with reared turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae. Appl. Microbiol., 82, 729-734.

- Cerda-Cuellar, M., R. A. Rossello-Mora, J. Lalucat, J. Jofre and A. Blanch (1997). *Vibrio scopthalmi* sp. nov., a new species from turbot (*Scophthalmus maximus*). Syst. Bacteriol., 47, 58-61.
- Cerda-Cuellar, M. and Blanch, A. R. (2002). Detection and identification of *Vibrio scopthalmi* in the intestinal microbiota of fish and evaluation of host specificity. J. Appl. Microbiol., 93, 261-268.
- Garcia-aljaro, C., L. Eberl, K. Riedel and A. R Blanch (2008). Detection of quorum-sensing-related molecules in *Vibrio scopthalmi*. BMC Microbiol., 138, 1471-2180.
- Gauger, E., R. Smolowitz, K. Uhlinger, J. Casey and M. Gomez-Chiarri (2006). *Vibrio harveyi* and other bacterial pathogens in cultured summer flounder, *Paralichthys dentatus*. Aquaculture, 206, 10-20.
- Itoh, Y., Y. Kawamura, H. Kasai, M. M. Shah, P. H. Nhung, M. Yamada, X. S. Sun, T. Koyana, M. Hayashi, K. Ohkusu and T. Ezak (2006). *DnaJ* and *gyr B* gene sequence relationship among species and strains of genus *Streptococcus*. Syst. Appl. Microbiol., 29, 368-374.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680-685.
- Lamas, J, Y. Santos, D. Bruno, AE. Toranzo, R. Anadon (1994). A comparison of pathological changes caused by *Vibrio anguillarum* and its extracellular products in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Pathol., 29, 79-89.

- Liu, H., Y. Li, X. Huang, Y. Kawamura and T. Ezaki (2003). Use of the *dnaJ* gene for the detection and identification of all *Legionella pneumophila* serogroups and description of the primers used to detect 16s rRNA gene sequences of major members of the genus *Legionella*. Microbiol. Immunol., 47, 859-869.
- Kim, D. H., H. J. Han, S. M. Kim, D. C. Lee and S. I. Park (2004). Bacterial enteritis and the development of the larval digestive tract in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. J. Fish Dis., 27, 497-505.
- Kumaran. S., B. Deivasigamani, K. M. Alagappan and M. Sakthivel (2010). Infection and immunization trials of Asian seabass (*Lates calcarifer*) against fish pathogen *Vibrio anguillarum*. J. Environ. Biology., 31, 539-541.
- MacFaddin, J. F. (2000). Biochemical test for identification of medical bacteria (3rd ed. by Williams, L, and Wilkins). USA.
- McDougald, D., S. A. Rice and S. Kjelleberg (2006). Bacterial quorum sensing and interference by naturally occurring biomimics. Anal Bioanal Chem., 387, 445-453.
- Miles, A. A. and S. S. Misra (1938). The estimate of the bacterial power of the blood. J. Hyg., 38, 873-885.
- Montes, M., R. Farto, M. J. Perez, S. P. Armadaa and T. P. Nieto (2006). Genotypic diversity of *Vibrio* isolates associated with turbot (*Scophthalmus maximus*) culture. Research in Microbiol., 157, 487-495.

- Morohoshi, T., T. Inaba, N. Kato, K. Kani and T. Ikeda (2004). Identification of quorum-sensing signal molecules and the LuxRI homologs in fish pathogen *Edwardsiella tarda*. J. Biosci. Bioeng., 98, 274-281.
- Nhung, P. H., H. Hata, K. Ohkusu, M. Noda, M. M. Shah, K. Goto and T. Ezaki (2007a). Novel phylogenetic marker *dnaJ* and DNA-DNA hybridization for clarifying interrelationships among the genus *Aeromonas*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 57, 1232-1237.
- Nhung, P. H., K. Ohkusu, N. Mishima, M. Noda, M. M. Shah, X. S. Sun, M. Hayashi, T. Masaki, J. Miyasaka and K. Ezaki (2007b). Phylogeny and species identification of the family Enterobacteriaceae based on *dnaJ* sequences. Diag. Microbiol. and Infect. Dis., 58, 153-161.
- Nhung, P. H., M. M. Shah, K. Ohkusu, M. Noda, H. Hata, X. S. Sun, H. Iihara, K. Goto, T. Masaki, J. Miyasaka and K. Ezaki (2007c). The *dnaj* gene as a novel phylogenetic marker for identification of *Vibrio* species. Syst. Appl. Microbiol., 30, 309-315.
- Quio, G., D. C. Lee, S. H. Woo, H. Li, D. Xu and S. I. Park (2012). Microbiological characteristics of *Vibrio scophthalmi* isolates from diseased olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Fish Sci., 78, 853-863.
- Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibition. Proc. Natl.

- Acad. Sci. USA, 74, 5461-5467.
- Santos, Y., A. E. Toranzo, J. L. Barja, T. P. Nieto and T. G. Villa (1988). Virulence properties and enterotoxin production of *Aeromonas* strains isolated from fish. Infect. Immun., 56, 3285-3293.
- Soffientinol, B., T. Gwaltney, D. R. Nelson, J. L. Specker, M. Mael and M. Gomez-Chiarri (1999). Infectious necrotizing enteritis and mortality caused by *Vibrio carchariae* in summer flounder *Paralichthys dentatus* during intensive culture. Dis. Aqua. Organ., 38, 201-210.
- Sugita, H. and Y. Ito (2006). Identification of intestinal bacteria from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) and their ability to digest chitin. Lett. Appl. Microbiol., 43, 336-342.
- Sun, K., W. Zhang, J. Hou and L. Sun (2009). Immunoprotective analysis of Vhhp2, a *Vibrio harveyi* vaccine candidate. Vaccine, 27, 2733-2740.
- Takewaki, S., K. Okuzumi, I. Manabe, M. Tanimura, K. Miyamura, K. Nakahara, Y. Yazaki, A. Ohkubo and R. Nagai (1994). Nucleotide sequence comparison of mycobacterial *dnaJ* gene and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of mycobacterial species. Int. J. Syst. Bacteriol., 44.
- Thompson, F. L., D. Gevers, C. C. Thompson, P. Dawyndt, S. Naser, B. Hoste, C. B. Munn and J. Swings (2005). Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of

- multilocus sequence analysis. Appl. Environ. Microbiol., 71, 5107-5115.
- Tin, T., H. Yokoyama, K. Ogawa and H. Wakabayashi (2000). Myxosporeans and their hyperparasitic microsporeans in the intestine of emaciated tiger puffer. Fish Pathol., 35: 145-156.
- Vaseeharan, B., P. Ramasamy (2003). Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus ubtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Lett. Appl. Microbiol., 36, 83-87.
- Weisburg W. G., S. M. Barns , D. A. Pelletier and D. J. Lane (1991). 16S ribosomal DNA amplication for phylogenetic study. J. Bacteriol., 173, 697-703.
- Won, K. M. and S. I. Park (2008). Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to cultured marine fishes in Korea. Aquaculture, 285, 8-13.
- Yamada-Noda, M., K. Ohkusua, H. Hatac, M. M. Shaha, P. H. Nhunga, X. S. Song, M. Hayashia and M. Ezakia (2007) *Mycobacterium* species identification-A new approach via *dnaJ* gene sequencing. Syst. Appl. Microbiol., 30, 453-462.
- Zhang, M., X. Jiao, Y. Hu and L. Sun (2009). Attenuation of *Edwardsiella tarda* virulence by small peptides that interfere with LuxS/Autoinducer Type 2 Quorum Sensing. Appl. Environ. Microbiol., 75, 3882-3890.