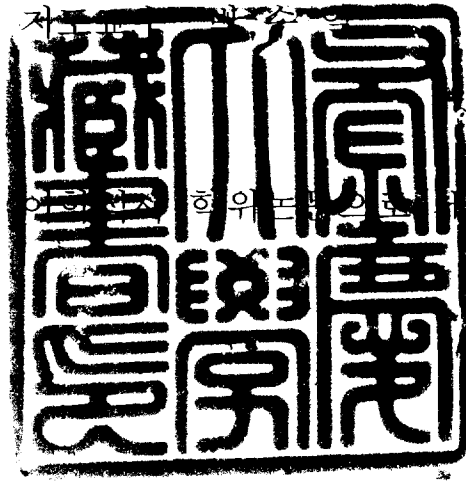


이학석사 학위논문

미성어 양식 넙치, *Paralichthys olivaceus* 에서
분리한 *Vibrio ichthyenteri*의 특성

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함



2005년 8월

부 경 대 학 교 대 학 원

어 병 학 과

이 화

이 화의 이학박사 학위논문을 인준함

2005년 6월 일

주 심 농 학 박 사 허 민 도



위 원 이 학 박 사 정 현 도



위 원 농 학 박 사 박 수 일



목 차

목 차	i
Abstract	iii
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 시험균의 분리와 사용 균주	4
2. 시험 균주의 배양 성상	6
2.1 시험 균주의 배양	6
2.2 염분 농도별 발육 시험	6
2.3 온도별 발육 시험	6
3. 생화학적 성상 검사	6
4. SDS Poly-acrylamide gel electrophoresis (PAGE)	7
5. 시험 균주의 항원성 시험	7
5.1. 항원의 제작	7
5.2. 항혈청 제작	8
5.3. 항원 항체 반응	8
6. 시험균주의 16S-23S rRNA intergenic space (IGS) 분석	9
6.1. 세균의 genomic DNA의 분리	9
6.2. 16S-23S rRNA IGS 증폭을 위한 PCR primer 제작	11
6.3. Polymerase chain reaction (PCR)	11
6.4. PCR products cloning	12
6.5. 재조합된 plasmid DNA의 추출과 inserted DNA 확인	12
6.6. DNA sequencing	12
6.7. 염기 서열의 비교 분석	13
7. 시험 균주의 병원성 시험	13
7.1.넙치 치어의 복강 감염 시험	13
7.2.넙치 치어의 경구 감염 시험	14
8. 시험 균액에 침지한 brine shrimp의 체내 시간별 세균 수	14
9. Pepsin 농도별 정균 효과 시험	14

III. 결 과	15
1. 세균의 분리	15
2. 시험 균주의 생물학적 및 생화학적 성상	16
3. SDS-PAGE에 의한 균체 단백질 분석	21
4. 분리 균주의 항원 항체 반응	23
5. 시험균주의 16S-23S rRNA intergenic space (IGS) 분석	25
5.1. IGS 분석을 위한 PCR 결과	25
5.2. IGS의 염기 서열 분석	28
6. 병원성 시험	32
6.1. 넙치 치어의 복강 감염 시험	32
6.2. 넙치 치어의 경구 감염 시험	33
7. 균액에 침지한 brine shrimp의 체내 시간별 세균 수	35
8. In vitro상에서의 pH 및 pepsin 농도별 정균 효과 시험	37
IV. 고 찰	40
V. 요 약	45
VI. 감사의 글	46
VII. 참고문헌	47

Characteristics of *Vibrio ichthyenteri* isolated from the olive flounder, *Paralichthys olivaceus* of culturing size

Hua Li

*Department of fish pathology, Graduate School,
Pukyong National University*

Abstract

From 2002 to 2004, various vibrios were isolated from the olive flounder, *Paralichthys olivaceus* of culturing size with disease signs. During this survey, it was known that the high proportion of *Vibrio ichthyenteri* was occupied among the isolated vibrios. Generally, *Vibrio ichthyenteri* is well known as the pathogen of bacterial enteritis of olive flounder larvae.

The aim of the present study were the comparison of the characteristics between two isolated groups of *Vibrio ichthyenteri*, (i) culturing sized olive flounder, and (ii) larvae of olive flounder showing the intestinal necrosis. The research was focused on the physiology, biochemistry, antigenicity, genetics, and pathogenicity in the bacterial groups.

The physiological and biochemical characteristics of the tested strains were very similar between these two groups. The most bacterial protein profiles of the tested strains were very similar to reference strain but certain portion (34~45 kDa) of

protein band were different.

In antigenic property, *Vibrio ichthyenteri*, isolated from culturing sized olive flounder, could divide roughly into two groups based on the antigen FKC. In antigen HKC, they widely showed common antigenicity against other vibrios.

The Intergenic Spacer (IGS) Region between the 16S and 23S rRNA genes of 21 isolated strains and 3 reference strains, *V. ichthyenteri*, were investigated by PCR fragment length typing and DNA sequencing. The isolated strains were identified as *V. ichthyenteri*, not only phenotypic characteristics of the isolated and reference strains but also homology of 16S-23S IGS of all isolated strains and reference strains as 99.1~100%. The *V. ichthyenteri* presented 4 specific 16S-23S pattern and contained no-tRNA, tRNA^{Glu(CTC)}, tRNA^{Ile(GAT)} tRNA^{Ala(IGC)} type .

In the challenge test, oral intubation/i.p. injection with *Vibrio ichthyenteri* suspension showed that there were no pathogenicity difference between the two groups of strains. The virulence in two groups of *V. ichthyenteri* was seemed to trivial on the culturing sized olive flounder. But it was suggestive the possibility of oral infection to larvae of olive flounder that the colonization of *V. ichthyenteri* was clarified from the immersed brine shrimp in the bacterial suspension.

I. 서 론

1970년대 후반 종묘 생산 기술이 성공됨에 따라 넙치, *Paralichthys olivaceus* 양식은 우리나라 해수 양식 어종에서 가장 높은 비중을 차지하며 중요한 경제적 어종으로 인정받고 있다. 넙치 양식 규모와 생산량이 늘어나는 동시에 여러 가지 원인으로 인한 질병이 증가하는 추세이며, 폐사율이 높은 자치어기에 유전적, 환경적 또는 영양적 요인에 의한 비감염성 질병의 비율도 상당히 높지만 바이러스성 또는 세균성 질병과 같은 감염성 질병도 계속 증가하고 있는 실정이다 (Nishioka et al., 1997). 뿐만 아니라 넙치 양성 과정에서도 다양한 감염성 질병이 나타나며 특히 병원 세균의 분리 빈도는 현저히 높아지고 있는 실정이다.

본 연구에서는 2002~2004년간 양식 넙치에서 어병 세균을 분리하고 동정하는 과정에서 넙치 자어가 아닌 미성어에서 *V. ichthyocenteri*로 추정되는 균종을 다수 분리 동정하였다. *V. ichthyocenteri*는 넙치의 자어기에만 국한된 감염성 질병의 원인균으로 잘 알려져 있으나, 이 균종이 질병의 증상을 보이는 중간 육성 과정의 어류에서도 순수 분리에 가까운 상태로 분리 검출되었으므로 여러 성장 단계의 어체에 대한 질병과의 연관성을 검토해보고자 하였다.

*V. ichthyocenteri*는 넙치 자어에 발생하는 장관백탁증의 원인 병원체로 잘 알려져 있다. 장관백탁증은 1971년에 일본에서 최초로 보고되었으며 넙치 자어의 장관이 병원 세균의 감염으로 백탁 및 괴사되고 체색 흑화 증상과 함께 대량 폐사를 일으킨다 (Murata, 1987; Muroga, 2001). 이후, Masumura et al. (1989)은 이 질병의 원인균을 형태학적, 생화학적, 생리학적, 병리학적 그리고 혈청학적 시험을 통하여 임시로 vibrio species INFL (intestinal necrosis of flounder larvae)로 명명하였고 vibrio속의 새로운 종일 것으로 추측하였다. Muroga et al. (1990)은 이 분리균을 rotifer, *Brachionus plicatilis*와 brine shrimp, *Artemia salina* nauplii에 침지시킨 후 넙치 자어에 경구 감염

시켜 병원성을 확인하였고, 최종적으로 Ishimaru et al. (1996)은 장관백탁증의 원인균을 *V. ichthyocytophaga*로 명명하게 되었다. 국내에서는 이 등 (1995)이 제주도 남해안 남해군 배양장에서 장관 백탁 증세를 보이는 넙치로부터 분리한 세균에 대해 조사하고, 부화 후 18일 경부터 착저기를 지난 약 30일 경까지 자치어기에 발병시켜 폐사에 이르게 한다고 보고하였다. 장관백탁증은 경구 감염이 유일한 감염 경로이며 약 40일령 이후에는 감수성이 없는 것으로 알려져 있다 (Muroga et al., 1990; Kim et al., 2004).

*Vibrio*균의 동정에는 일반적으로 각종 생화학적 성상 조사, 항체를 이용한 동정, 분자 생물학적 동정법 등이 이용되고 있다. 생화학 성상을 기초로 한 *vibrio*속 세균의 분류에는 많은 혼란이 있었고 항체 동정법도 *vibrio* 종간의 교차 반응으로 정확한 동정에 혼선을 빚고 있다 (Chen et al., 1992). 최근 16S rRNA gene sequence의 비교 분석 연구가 진행됨에 따라 상호 유연 관계를 조사하여 종을 나누려는 분자 분류학적 방법들이 시도되고 있다 (Amann et al., 1995). 그러나 이 부분은 계통 발생학적으로 염기 서열이 유사하게 나타나 근연한 종간에서는 그 유전적 다양성이 부족하여 (Krawiec and Riley, 1990) *vibrio* 세균의 속 (genus)의 동정까지는 가능하지만 종 동정에는 부적합하다고 알려져 있다. 이에 비해 16S-23S rRNA intergenic space (IGS)라 불리는 부분은 16S rRNA에 비해 종 특이적인 염기 서열을 가지고 상대적으로 변이도가 크다 (Barry et al., 1991). 또한, IGS는 염기 서열뿐만 아니라 길이도 종간에 차이가 있어 이 부분을 이용하여 가까운 관계의 종도 동정이 가능하게 되었다 (Gurtler and Stanisich, 1996). *Vibrio*속 세균은 어류나 해수에서 많이 분리되며 종간의 정확한 동정이 필요하다. *Vibrio*속 세균 중 16S-23S IGS의 연구는 *V. cholerae*, *V. mimicus* (Chun et al., 1999), *V. parahaemolyticus* (Maeda et al., 2000), *V. costicola*, *V. diazotrophicus*, *V. fluvialis*, *V. nigripulchritudo*, *V. proteolyticus*, *V. salmonicida*, *V. splendidus*, *V. tubiashii* (Simon et al., 2002) 등의 여러 종에서 보고되었다. 그러나 *V. ichthyocytophaga*에 관한 16S-23S rRNA IGS의 염기 서열은 아직 GenBank에 등재되지 있지 않다. 따라서 미성어 병어 유래와 장

관백탁증 감염 자어에서 분리되는 두 그룹의 *V. ichthyocenteri*에 대한 16S-23S IGS 염기 서열을 비교 분석하는 일이 필요하고 이를 토대로 시험균을 동정하고 균주들의 유전학적 특성을 비교 연구하는 것은 어병학적으로 매우 중요한 일이라 생각된다.

본 연구에서는 넙치 미성어에서 분리한 *V. ichthyocenteri* 그룹과 장관백탁증 넙치 자어의 참조 균주 그룹이 넙치 미성어에 대한 병원성을 비교 분석하여 종묘 생산에 미칠 가능성을 조사하고자 하였다. 이를 위하여 두 그룹 균주들에 대하여 미생물학적 관점에서 각종 배양 성상, 생화학적 성상, 혈청학적 특성 및 유전자형 조사를 통하여 *V. ichthyocenteri*로 확정하고 이들 균주간의 상호 관계를 비교 분석하였다. 또한 이들 분리 균주가 가지는 어병학적 특성을 알기 위하여 넙치에 공격 시험을 실시하여 병원성을 확인하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시험균의 분리와 시험 균주

본 실험에 사용한 시험 균주는 2002년부터 2004년까지 제주도, 동해 및 남해 등 여러 양식장에서 질병의 증상을 보이는 넙치 및 전복에서 분리된 것이다. 시험에 사용한 균주에 대한 정보는 Table 1.1~1.2에 나타내었다. 분리균은 1.5% NaCl 첨가 TSA와 TCBS에 획선 도말한 후 25℃, 24시간 배양하여 우점적으로 자란 세균 집락을 순수 분리 배양법으로 구하였다.

참조 균주는 일본 Hiroshima University에서 제공받은 *Vibrio ichthyocenteri* FH8804와 장관백탁증에 걸린 넙치 자어로부터 분리된 *V. ichthyocenteri* KF-3 (Kim et al., 2004), 그리고 한국미생물보존센터 (Korea culture center of microorganisms, KCCM)에서 분양 받은 *V. ichthyocenteri* ATCC 700023 (KCCM 40870, F-2)이었다.

이외에도 중간 종묘에서 분리된 *V. ichthyocenteri* 대한 병원성 및 미생물학적 특징을 비교하기 위하여 2000년 넙치에서 분리된 *Edwardsiella tarda*를 사용하였다.

Table 1.1. The origin of isolated strains used in this study

Strains		Origin of bacteria		
Isolated strains (n=11)	A26001	Liver, Olive flounder	2003. 08	Wando
	A26002	Kidney, Olive flounder	2003. 07	Ulsan
	A26004	Kidney, Olive flounder	2003. 07	Jeju
	A26005	Kidney, Olive flounder	2003. 07	Jeju
	A26006	Kidney, Olive flounder	2003. 06	Jeju
	A26008	Kidney, Olive flounder	2003. 06	Jeju
	A26009	Internal organs, Abalone	2003. 06	Jeju
	A26010	Mouth, Olive flounder	2003. 06	Jeju
	A26011	Mouth, Olive flounder	2003. 06	Gochang
	A26012	Kidney, Olive flounder	2002. 08	Jeju
	A26013	Kidney, Olive flounder	2002. 08	Wando
Reference strains (n=3)	FH8804	Hirosima University		
	FK-3	Kim et al. (2004)		
	F-2	ATCC 700023 (KCCM 40870)		

Table 1.2. The clinical signs of diseased fish used for bacteria isolation

Strains		Clinical sign
Isolated strains	A26001	gill anaemia, liver and spleen atrophy, intestine hemorrhage
	A26002	liver hyperemia, spleen and kidney atrophy
	A26004	fins corrosion, liver hemorrhage spleen and kidney hypertrophy
	A26005	fins corrosion, abdominal swelling, liver hemorrhage, spleen and kidney hypertrophy
	A26006	skin ulcer, abdominal swelling, liver and kidney hypertrophy
	A26008	skin ulcer, abdominal swelling, kidney hypertrophy
	A26009	no sign
	A26010	mouth ulcer, skin ulcer with scuticociliatosis
	A26011	mouth ulcer, fin ulcer
	A26012	skin ulcer, abdominal swelling, kidney hypertrophy
	A26013	liver hyperemia
Reference strains	FH8804	intestinal necrosis
	FK-3	intestinal necrosis
	F-2	intestinal necrosis

2. 시험 균주의 배양 성장

2.1. 시험 균주의 배양

11개의 시험 균주와 3개의 참조 균주는 1.5% NaCl 첨가 TSA에 획선 도말하여 25℃, 24시간 배양하였으며, 이를 각종 성장 검사의 시험균으로 사용하였다.

2.2. 염분 농도별 발육 시험

시험에 사용한 모든 시험 균주와 참조 균주를 대상으로 염분 농도에 따른 발육 특성을 조사하였다. 배양된 시험균을 1% peptone으로 만든 alkali-peptone 수 배지를 염분 농도 0, 0.5, 1, 3, 6, 8% 되게 준비하고, 각각의 시험 균주를 MacFarland no. 3 농도로 조정된 후 40 μ l 씩 접종하여 25℃, 24시간 배양하고 발육 유무는 육안적으로 관찰되는 혼탁도로써 판정하였으며, 또한 파장 540nm에서 흡광도 값을 측정하였다.

2.3. 온도별 발육 시험

모든 시험 균주와 참조 균주를 대상으로 온도에 따른 발육 유무를 조사하였다. 배양된 시험균을 1.5% NaCl 첨가 alkali-peptone 수 배지에 상기의 농도로 조정된 시험균을 40 μ l 씩 접종하여 4, 10, 15, 25, 35, 40℃에서 24시간 배양하고 발육 유무는 육안적으로 관찰되는 혼탁도로써 판정하였고, 파장 540nm에서 흡광도 값을 측정하였다.

3. 생화학적 성장 검사

모든 시험 균주와 참조 균주를 시험균으로 배양한 다음 생화학적 성장 검사를 실시하였다. 생화학 시험 항목은 Oxidase test (Cytochrome oxidase), Citrate 이용능 (Simmon's citrate agar), Nitrate 환원능, Kovacs's Indole test, Methyl red test, Voges-Proskauer test와 탄수화물 분해 시험으로서 Arabinose, Glucose, Sorbitol, Raffinose, Sucrose, Salicin, Lactose, Inositol, Maltose, Mannose, Mannitol 및

Melibiose 등의 당 분해능을 조사하였다. 그리고 Lysine과 Ornithine에 대한 Decarboxylase 시험과 Arginine에 대한 Dehydrolase 시험을 실시하였으며 Novobiocin 시험과 TCBS에서의 colony 성상을 관찰하였다.

4. SDS Poly-acrylamide gel electrophoresis (PAGE)

모든 시험 균주와 참조 균주의 SDS-PAGE에 의한 whole cell protein 분석은 Andrews (1986)의 방법에 준하여 실시하였다. 간략히 설명하면 1.5% NaCl이 첨가된 5ml의 TSB에 각 시험 균주를 25℃, 24시간 배양하여 집균한 후 멸균 증류수에 2회 세척하였다. 세균의 pellet을 150 μ l의 sample lysis buffer (0.125M Tris-HCl, 4%SDS, 20% glycerol, 5mM 2-mercaptoethanol)에 현탁하여 100℃에서 7분간 가열한 후에 동량의 멸균 증류수를 첨가하여 다시 100℃에서 5분간 가열하여 변성시켰다. 각각의 sample을 1.0mm 두께의 10% SDS-polyacrylamide gel에 15 μ l씩 로딩하고 150V로 약 3시간 동안 전기 영동하였다. 그리고 Molecular weight marker로 low range SDS-PAGE standards (Bio-Rad)를 사용하였다. 전계가 완료된 gel은 Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하고 destain 용액으로 탈색하여 band를 확인하였다.

분리 균주의 protein profiles를 여러 vibrio속 세균의 그것과 비교하기 위하여 *V. alginolyticus*, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus*, *V. campbellii*, *V. pelagius*, *V. damsela* (*Photobacterium damsela* ssp. *damsela*) 및 *V. anguillarum* 균주를 동일한 방법으로 처리하여 사용하였다.

5. 시험 균주의 항원성 시험

5.1. 항원의 제작

시험 균주 A26002, A26004, A26011, FH8804, KF-3의 균체를 항원으로 사용하였다. 위의 각 균주를 1.5% NaCl이 첨가된 TSB에 25℃, 24시간 배양하고 최종 농도가 0.5% 되

도록 포르말린을 첨가하여 실온에서 하루 밤 방치하였다. 그 후 6000 ×g에서 30분간 원심분리하여 집균한 다음 멸균생리식염수에 2회 세척하여 습중량 100~200mg/ml로 조정하고 0.05% 되게 sodium azide를 첨가한 후 냉장고에 보관하면서 항원으로 사용하였다 .

5.2. 항체의 제작

상기의 방법으로 제작한 FKC 및 HKC 항원을 약 1.5kg의 New Zealand white rabbit 에 면역시켰다. 1회 주사는 Freund ' s complete adjuvant와 항원을 1:1로 혼합하여 토끼의 대퇴부 및 피하에 주사하였다. 항원 농도는 200mg/ml이었고 1주일 간격으로 3회에 걸친 주사 양은 각각 0.8ml, 1.0ml, 1.2ml이었다. 2회 접종부터는 Freund ' s incomplete adjuvant로 혼합 주사하였다. 최종 접종 8일 후 귀 정맥에서 채혈하여 항체 생성 여부를 확인한 다음 심장에서 전 채혈하였다. 혈액을 냉장고에서 overnight 하고 4,000g, 30분간 원심 분리하여 항혈청을 얻은 다음 56℃, 30분 가열로 비동화시킨 후 sodium azide를 0.05% 첨가하여 -70℃에서 냉동 보관하였다.

5.3. 항원 항체 반응

항원 항체 반응은 96well microtiter 법으로 실시하였고 항원은 FKC와 HKC를 이용하였다. FKC는 상기의 방법으로 제작하였고 HKC는 100℃에서 1시간 가열하여 제작하였다. 먼저 각 well에 생리식염수를 25 μ l씩 넣은 후 1번 well에 항혈청을 넣고 충분히 혼합한 다음 단계 희석하였다. 이어서 각 well에 시험용 항원을 25 μ l씩 분주하여 잘 섞어준 후 실온에서 2시간 방치하고 4℃에 overnight 하여 결과를 판정하였다.

6. 시험 균주의 16S-23S rRNA intergenic space (IGS) 분석

6.1. 세균의 genomic DNA의 분리

Table 1에 나타난 3개의 참조 균주와 11개의 분리 균주를 1.5% NaCl 첨가 TSB 5mℓ에 접종하고 25℃에서 200rpm으로 진탕 배양한 후 6,000rpm에서 5분간 원심 분리하여 pellet을 취하고 High pure PCR template preparation kit (Roche)를 사용하여 genomic DNA를 분리하였다.

이외에도 2004년도 어병 세균의 분리 동정 과정에서 생화학 성상이 *V. ichthyenteri*와 일치하는 10개의 분리 균주를 대상으로 DNA를 분리하여 이후 실험에 사용하였다 (Table 2).

한편, *V. ichthyenteri*와 각종 vibrio속 세균의 16S-23S IGS patterns을 알아보기 위하여 사용한 참조 균주는 Table 3과 같고 이들 참조 균주의 genomic DNA도 상기의 방법에 따라 분리하였다. 분리한 DNA는 PCR의 template로 사용하였다.

Table 2. The origin of *Vibrio ichthyenteri* isolates from olive flounder, *Paralichthys olivaceus* in 2004 used for 16S-23S IGS pattern analysis

Strains		Origin of bacteria		
		Size	Date	Location
Present isolated strains in 2004 (n=10)	A26015	220 g	June, 2004	Jeju
	A26019	340 g	June, 2004	Jeju
	A26022	10 g	June, 2004	Jeju
	A26029	1350 g	June, 2004	Jeju
	A26037	70 g	June, 2004	Ulsan
	A26040	310 g	July, 2004	Uljin
	A26041	60 dph*	Aug. 2004	Jeju
	A26042	55 g	Aug. 2004	Jeju
	A26044	62 g	Aug. 2004	Haenam
	A26045	186 g	Aug. 2004	Haenam

*, days post hatching.

Table 3. The reference strains used for comparison of 16S-23S IGS patterns

Reference strain		Reference strain	
<i>Vibrio alginolyticus</i>	KCTC 2928	<i>Vibrio mimicus</i>	ATCC 33653
<i>Vibrio anguillarum</i>	ATCC 19264	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 33844
<i>Vibrio carchariae</i>	ATCC 35084	<i>Vibrio penaeicida</i>	KH-IG
<i>Vibrio compbellii</i>	ATCC 25920	<i>Vibrio vulnificus</i>	ATCC 27562
<i>Vibrio diazotrophicus</i>	ATCC 33466	<i>Photobacterium damsela</i> ssp. <i>damsela</i>	ATCC 33539
<i>Vibrio fluvialis</i>	ATCC 33809	<i>Aeromonas salmonicida</i>	MT004
<i>Vibrio logei</i>	ATCC 29985		

6.2. 16S-23S rRNA IGS 증폭을 위한 PCR primer 제작

분리 균주 및 참조 균주들의 IGS를 증폭시키기 위하여 사용한 primer는 Gurtler et al. (1996)이 제안한 primer를 일부 변형한 것으로서 5'-GCG CTG GAT CAC CTC CTT T-3' (*E. coli* 16S rRNA 부분의 1523~1540 bp)과 5'-TGC CAA GGC ATC CAC CGT T-3' (23S rRNA 부분의 21~38 bp)을 주문 제작하여 사용하였다 (Bioneer, Korea).

6.3. Polymerase chain reaction (PCR)

PCR은 PCR premix (Bioneer)를 사용하여 Thermal cycler (Perkin-Elmer)로 수행하였고 PCR 조건은 Table 4에 나타내었다. PCR 증폭산물은 2% agarose gel에서 전기영동하고 UV transilluminator 상에서 확인한 후 Table 2에 나타낸 2004년도 분리 균주와 Table 3에 나타낸 다른 vibrio속 세균들과 PCR patterns를 비교 분석하였다.

Table 4. Condition of reaction steps and PCR cycles

	Temperature(℃)	Reaction Time	Cycle(s)
Pre-denaturation	94	5 min	1
Denaturation	94	30 sec	
Annealing	55	30 sec	30
Extention	72	30 sec	
Post-extention	72	7 min	1

6.4. PCR products cloning

8개의 분리 균주와 3개의 *V. ichthyocenteri* 참조 균주에 대한 각각의 PCR products에 대하여 크기별 band 부분을 절취한 다음 PCR product purification kit (Bioneer)를 사용하여 gel로부터 정제하였다.

PCR products를 cloning하기 위하여 pGEM T easy vector system (Promega)을 이용하였다. 즉, T4 ligase로 PCR products를 vector와 연결시켜 recombinant plasmid DNA를 준비하고 이를 -80℃에 보관된 100 μ l의 competent cell (*E. coli* DH5 α)에 42℃에서 90초간 heat shock으로 transformation 시켰다. 이것에 1ml의 LB medium을 첨가하여 37℃에서 90분간 배양한 후 Ampicillin (50 μ g/ml), IPTG (Isopropylthio- β -D-galactopyranoside, 25mg/ml)와 X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-galactopyranoside, 10 μ g/ml)이 포함된 LB 배지에 배양하여 white colony를 선별하였다.

6.5. 재조합된 plasmid DNA의 추출과 inserted DNA 확인

재조합된 plasmid DNA는 alkaline lysis 법으로 추출하였다. plasmid의 대량 증폭을 위하여 Ampicillin (50mg/ml)이 들어있는 LB broth 2ml에 white colony를 37℃ 조건 하에서 overnight 배양하고 1000rpm 4℃ 30초 원심 분리하여 집균한 후 수확한 세포에 solution I [50mM glucose, 25mM Tris HCl (pH 8.0), 10mM EDTA (pH 8.0)] 100 μ l, solution II [0.2 N NaOH, 1% SDS] 및 Solution III [5M Potassium acetate 60 μ l, Glacial acetic acid 11.5 μ l, 탈이온수 28.5 μ l] 과정을 거치고 얻어진 상정액과 동량의 Phenol:ChCl : IAA (PCI; Ambion)용액을 첨가하여 침전시킨 후 건조하고 RNase (5mg/ml)를 처리하여 실험에 사용하였다.

6.6. DNA sequencing

Plasmid DNA를 추출한 후 automatic sequencer (ABI 377, USA)로 염기 서열을 분석

하였다.

6.7. 염기 서열의 비교 분석

분리 균주 및 참조 균주의 16S-23S IGS 염기 서열은 Clustal W (ver. 1.71) program을 이용하여 multiple alignment하였으며, IGS 유전자의 구성은 tRNA scan-SE program을 사용하여 tRNA gene을 확인하였다.

해독한 염기 서열은 Genetyx program을 사용하여 조합하였으며 National Center for Biotechnology Information (NCBI)에서 제공되는 BLAST program으로 이미 밝혀져 있는 균주들의 16S-23S rRNA intergenic space (IGS)와 비교 분석하였다.

7. 시험 균주의 병원성 시험

병원성 시험을 위한 시험어는 경북의 사설 수산 양식장에서 분양받은 전중 4~5g의 넙치이었으며, 500L 사육 수조에서 2주일간 순치시킨 후 사용하였다. 시험에 사용된 균주는 *V. ichthyocenteri* 3개의 분리 균주와 장관 백탁증 자어에서 분리한 참조 균주 3개 그리고 넙치에 병원성을 나타내는 *E. tarda*이었다. 모든 시험 균주는 1.5% NaCl 첨가 TSA 배지에서 25℃, 24시간 배양된 것을 사용하였다.

7.1. 넙치 치어의 복강 감염 시험

시험어는 균주 당 각각 10마리를 사용하여 실시하였으며 사용된 균주는 *E. tarda*, FK-3, A26002, A26004, A26011이었고, 접종 농도는 약 10^{9-10} cfu/ml 및 10^7 cfu/ml로 조정하여 어체 당 0.1ml씩 복강 주사하였다. 시험 수온은 $20\pm0.5^\circ\text{C}$ 로 유지시켰으며 14일 동안 폐사율을 조사하였다.

7.2. 넙치 치어의 경구 감염 시험

존대를 이용한 강제 경구 투여 시험은 경구 감염 시험과 동일한 균주 (이외 참조 균주 F-2)를 약 10^9 cfu/ml 및 10^7 cfu/ml의 농도가 되게 조정하여 어체 당 0.2 ml씩 투여하였다. 그리고 감염 후 7일에 각 실험구의 넙치 내부 장기를 무균적으로 채취하여 멸균 생리식염수에 갈아서 단계 희석한 다음 세균수를 측정하였다.

8. 시험 균액에 침지한 brine shrimp의 체내 시간별 세균 수

Brine shrimp를 세균 현탁액에 침지하여 시간별 세균 수의 변화를 측정하였다. 시험 균주 F-2, KF-3, A26002 및 A26011를 약 10^{10} cfu/ml 농도로 조정한 시험균액에 침지시킨 후 15, 30, 60분이 경과할 때 마다 brine shrimp를 수확하여 0.1g/ml 농도로 갈아서 단계 희석한 다음 총 세균 수와 *Vibrio* 균수를 측정하였다. 배지는 TCBS, Marine agar 및 0.5% NaCl 첨가 TSA를 사용하였으며, 이들 평판 배지에 접종하여 25℃에서 18시간 배양한 후 세균의 집락 수를 측정하였다.

9. pepsin 농도별 정균 효과 시험

다양한 pH 조건에서 농도별 pepsin의 정균 효과를 보기 위해 다음과 같은 시험을 수행하였다. 약술하면, pH 4, 5, 6, 7로 조정된 1.5% NaCl 첨가 TSB 배지를 이용하여 돼지의 위장에서 분리한 pepsin (pepsin A, 1 : 10,000; Sigma-Aldrich)을 0.1mg/ml, 0.01mg/ml 및 0.001mg/ml 농도로 조정하여 96well microplate에 200 μ l씩 분주하고 각 분리 균주와 참조 균주를 TSB에 동일한 농도 (0.3, A540nm)로 조정하여 40 μ l씩 분주한 다음 7시간째와 14시간째에 흡광도를 측정하여 정균 효과를 조사하였다.

III. 결 과

1. 세균의 분리

본 실험에 사용한 분리 균주는 2002~2004년에 제주도, 남해안 및 동해안 넙치 양식장에서 질병의 증상을 보이는 넙치로부터 분리한 균주 10개와 건강한 전복에서 분리된 1개의 균주로서 총 11개 균주이다. 이들 균주는 1.5% NaCl 첨가 TSA에서 creamy colony를 형성하며 TCBS에서는 대부분 yellow colony를 형성하였으나 균주에 따라서는 green colony를 형성하기도 하였다.

2. 시험 균주의 생리학적 및 생화학적 성상

Table 5에는 3개의 자어 유래 참조 균주와 11개의 미성어 유래의 시험 균주를 대상으로 배양 성상, 즉 염분 농도별, 온도별 발육 시험과 각종 생화학적 성상 시험 결과를 나타내었다.

염분 농도별 발육 시험 결과 3개의 참조 균주와 11개의 분리 균주는 2~3% NaCl 첨가 peptone 수에서 잘 증식하였고 1~6% NaCl 첨가 peptone 수에서 자랐으나 균주 FH-8804는 0.5% NaCl 첨가 peptone 수에서는 증식하지 않는 것으로 조사되었다. 그리고 F-2는 약한 증식을 보였지만, 그 외 균주들은 모두 잘 증식하는 것으로 나타났으며 FK-3, A26002, A26004, A26005, A26009, A26010, A26011 및 A26013 균주는 8% NaCl에서도 약한 증식을 볼 수 있었다.

온도별 발육 시험에서 모든 시험 균주가 25~30℃에서 발육하였지만 10℃이하와 35℃이상에서는 발육하지 못하여 25℃전후가 최적의 조건인 것으로 나타났다. 염분 농도별, 온도별 발육 실험 결과는 Fig. 1과 Fig. 2에 나타내었다.

생화학적 성상 시험에서 3개의 참조 균주와 11개의 분리 균주의 결과는 거의 모든 시험에서 일치하였지만 F-2, A26006, A26008 및 A26009는 sucrose 이용능이 음성으로 나

타났으며 TCBS 배지상에서 green colony를 형성하였고, FH-8804와 A26006은 TCBS 배지에서 잘 자라지 않았다. 여러 가지 가수분해 효소 활성 측정에서는 모든 균주가 활성이 거의 없는 것으로 나타났다. 당 분해 시험에는 Fructose, Glucose, Maltose, Mannose 및 Trehalose는 양성이고 그 외 시험 항목은 모두 음성으로 나타났다.

Table 5. Biochemical and physiological characteristics of the tested strains^a

Tested Items	Isolated strains												Reference strains		
	A26	A26	A26	A26	A26	A26	A26	A26	A26	A26	A26	A26	F	FH-	KF
	001	002	004	005	006	008	009	010	011	012	013	-2	8804	-3	
Gram stain	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Fermentation of glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Gas production of glucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Simmon ´ citrate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Nitrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Methyl red	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Voges-Proskauer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ONPG ^b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Hydrolysis of															
Casein	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Gelatin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Starch	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Decarboxylase production															
Lysine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ornithine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Dehydrolase production															
Arginine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Growth at															
4 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
10 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
25 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
35 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
40 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

(continued)

Tested Items	Isolated strains												Reference strains		
	A26	A26	A26	A26	A26	A26	A26	A26	A26	A26	A26	A26	F-2	FH-8804	KF-3
	001	002	004	005	006	008	009	010	011	012	013				
Acid production from															
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Cellobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
myo-Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Mannitole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sucrose	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Novobiocin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TCBS	Y	Y	Y	Y	N	G	G	Y	Y	Y	Y	Y	G	N	Y

^aAll tests except of the growth test on temperature were performed at 25°C; ^bONPG, o-nitrophenyl-D-galactopyranoside; S, susceptible; Y, yellow colony; G, green colony; N, no growth; W, weak reaction.

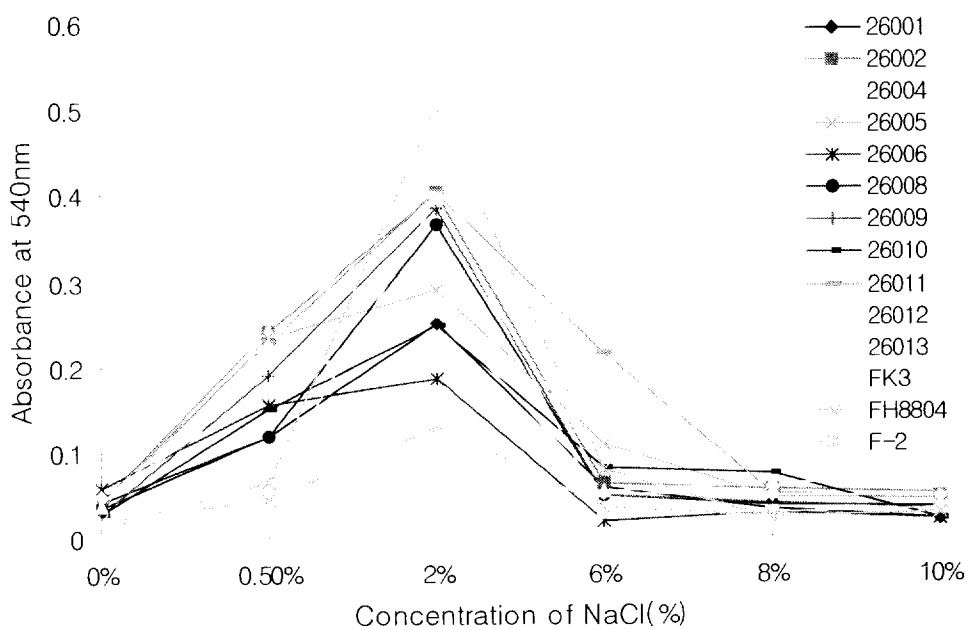


Fig. 1. The effects of NaCl concentration in alkali-peptone media on the growth of the isolated strains and the reference strains at 25°C for 24 h.

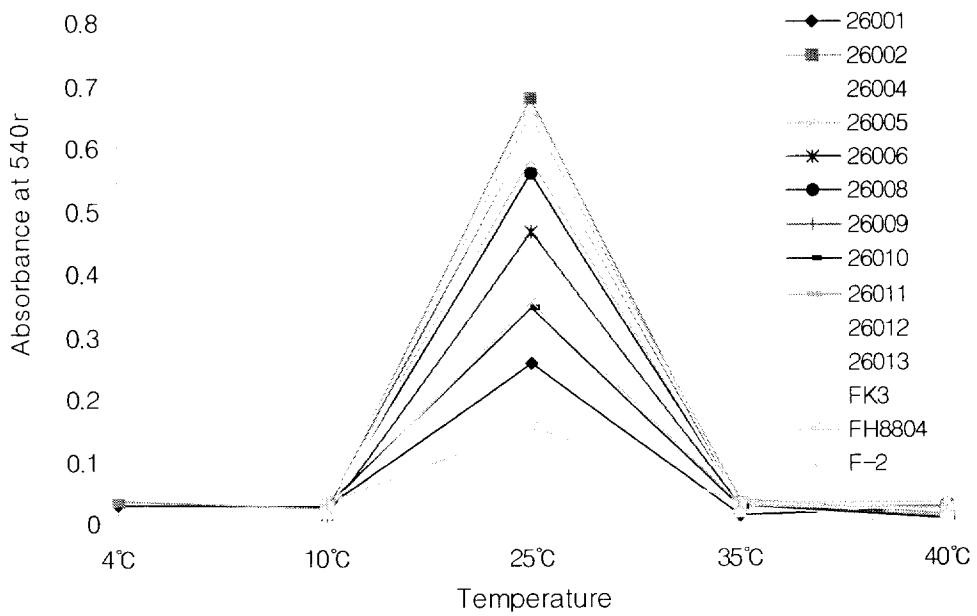


Fig. 2. The effects of temperature on the growth of the isolated strains and the reference strains in alkali-peptone media supplemented with 1.5% NaCl.

3. SDS-PAGE에 의한 균체 단백질 분석

Fig. 3에는 본 실험에 사용된 11개의 분리 균주와 3개 참조 균주 그리고 vibrio속 세균 종과의 비교를 위하여 *V. alginolyticus*, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus*, *V. campbellii*, *V. pelagius*, *V. damsela* (*Photobacterium damsela* ssp. *damsela*) 및 *V. anguillarum*이 가지는 균체 단백질을 poly-acrylamide gel상에 전기 영동하여 확인한 결과를 나타내었다. *V. ichthyocyteri* 균의 참조 균주와 분리 균주의 기본적인 단백질 구성은 유사하였으나 약 34~45kDa 사이의 major band에서 차이를 보였다. A26001, A26002, A26004, A26005, A26011, A26012 및 A26013 균주의 B1 band의 분자량은 참조 균주 F-2과 유사한 것으로 나타났으며, 균주 A26010과 A26009는 참조 균주 F-2에 비해 B1 band 분자량이 좀 더 큰 것으로 나타났고, A26006과 A26008균주는 분자량이 작은 것으로 나타났다. 자어 유래 참조 균주인 FK-3과 FH8804에서는 B1 band가 약하게 보였으며 FH-8804와 FK-3는 일치하지만 F-2는 다소 차이가 있었다.

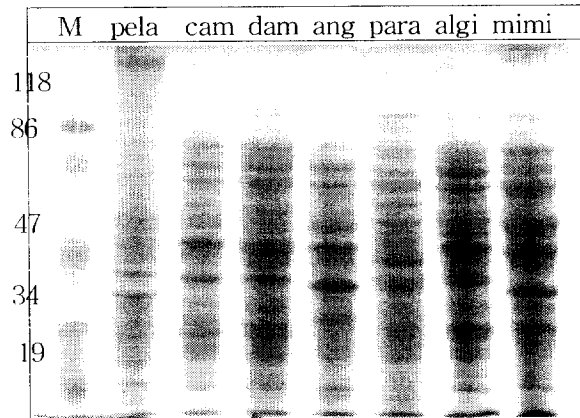
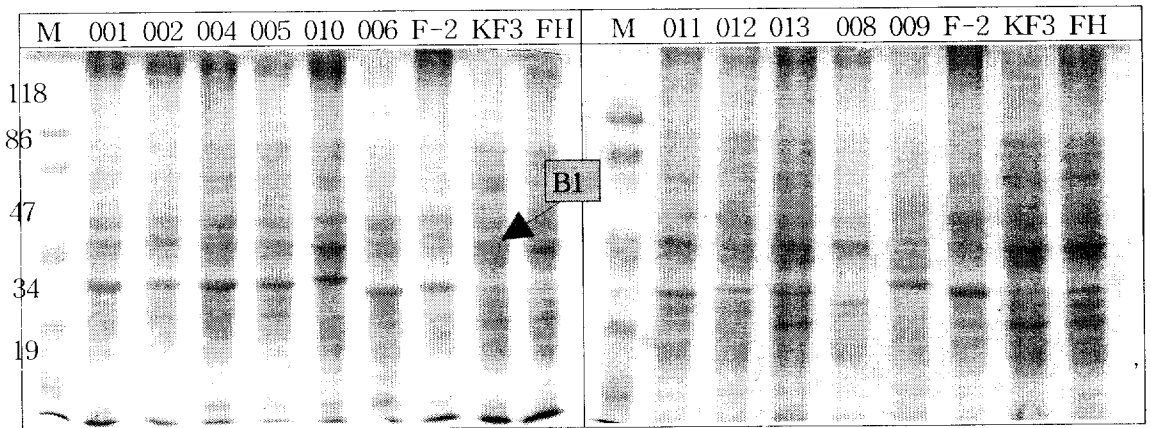


Fig. 3. Electrophoretic protein patterns of the isolated strains (A26001~A26013), reference strains (F-2, FK-3, FH-8804) and other tested strains for comparison (*V. pelagius*, pela; *V. compbellii*, cam; *V. damsela*, dam; *V. anguillarum*, ang; *V. parahaemolyticus*, para; *V. alginolyticus*, algi; and *V. mimicus*, mimi).

4. 시험 균주의 항원 항체 반응

*V. ichthyenteri*의 3개 참조 균주와 11개 분리 균주 그리고 7개 vibrio속 세균의 토끼 항A26004 혈청과 항KF-3 혈청에 대한 응집 항체가를 측정한 결과는 Table 7과 같다.

FH-8804 균주를 제외한 시험 균주들의 항체가는 HKC 항원이 FKC 항원 보다 각각의 시험 항혈청에 대하여 같거나 높은 값을 보였으며, 분리 균주 및 *V. ichthyenteri* 참조 균주 사이의 항체가는 그 외 vibrio 종의 균주들보다 항체가가 특이적으로 높게 나타났다. 그러나 분리 균주들과 *V. ichthyenteri* 참조 균주 내에서도 항원 항체 응집 반응은 다양한 결과를 볼 수 있었다. FKC 처리 항원을 사용한 항체가를 기준으로 균주 A26001, A26002, A26004, A26005 A26006, A26008, A26009, A26010, A26012, KF-3, FH-8804 및 F-2를 A 그룹으로 A26011와 A26013을 B 그룹으로 구분할 수 있을 정도의 응집 항체가에서 차이를 볼 수 있었다. 그러나 FKC 항원으로 사용한 7종의 다른 Vibrio 속 세균에 대해서는 응집항체가가 대부분 $2^2 \sim 2^4$ 수준의 교차 반응을 나타내었고 *V. pelagius*와 *V. damsela*는 $2^4 \sim 2^6$ 수준의 교차 반응을 보였다.

Table 6. Agglutinin titers of rabbit anti-*V. ichthyenteri* sera against antigens of isolated strains, reference strains and other vibrios

Antigen	Antiserum			
	A26004		KF-3	
	HKC*	FKC**	HKC	FKC
A26001	2 ¹¹	2 ¹¹	2 ¹¹	2 ¹¹
A26002	2 ¹¹	2 ¹⁰	2 ¹¹	2 ¹¹
A26004	2 ¹¹	2 ¹⁰	2 ¹⁰	2 ¹¹
A26005	2 ¹¹	2 ¹¹	2 ¹⁰	2 ¹¹
A26006	2 ¹⁰	2 ⁸	2 ⁹	2 ⁸
A26008	2 ¹¹	2 ⁹	2 ⁹	2 ¹¹
A26009	2 ¹⁰	2 ⁸	2 ⁸	2 ⁸
A26010	2 ¹⁰	2 ⁹	2 ⁸	2 ⁹
A26011	2 ¹¹	2 ⁴	2 ⁸	2 ⁴
A26012	2 ⁹	2 ⁷	2 ⁹	2 ⁷
A26013	2 ⁷	2 ⁵	2 ⁶	2 ⁴
F-2	2 ⁹	2 ⁷	2 ⁸	2 ⁸
KF-3	2 ¹¹	2 ⁸	2 ¹¹	2 ¹⁰
FH8804	2 ¹⁰	2 ⁹	2 ⁸	2 ¹⁰
<i>V. parahaemolyticus</i>	2 ⁶	2 ³	2 ⁷	2 ³
<i>V. campellii</i>	2 ¹⁰	2 ²	2 ³	2 ³
<i>V. anguillarum</i>	2 ³	2 ²	2 ⁴	2 ³
<i>V. mimicus</i>	2 ⁹	2 ²	2 ⁷	2 ³
<i>V. damsela</i> ***	2 ⁵	2 ⁵	2 ⁵	2 ⁴
<i>V. alginolyticus</i>	2 ⁹	2 ³	2 ⁷	2 ²
<i>V. pelagius</i>	2 ¹⁰	2 ⁵	2 ⁹	2 ⁶

*, Antigen prepared with heat killed bacterial cells.

**, Antigen prepared with formalin killed cells.

***, *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*.

5. 시험 균주의 16S-23S rRNA intergenic space (IGS) 분석

5.1. IGS 분석을 위한 PCR 결과

21개의 분리 균주와 3개의 *V. ichthyocenteri* 참조 균주 및 13종의 다양한 균종에서 DNA를 분리한 후 16S rRNA 부분과 23S rRNA 부분의 보존적인 염기 서열을 primer로 사용하여 PCR을 한 결과를 Fig. 4 (Table 1의 분리 균주)와 Fig. 5 (Table 2의 분리 균주)에 나타내었다. 3개의 참조 균주와 분리 균주는 모두 4개의 major band (IGS-1, IGS-2, IGS-3, IGS-4)를 형성하였으며 각각의 band size는 Table 7과 같다. 참조 균주와 분리 균주간에는 A26009와 A26010의 IGS-1, IGS-3 band (Lane 8, 9)에서 약간의 차이를 보였으나 이를 제외한 모든 균주들은 동일한 PCR product pattern을 나타내었다. 이에 비해 다른 vibrio속 12종과 1종의 *Aeromonas salmonicida* 균에서 보이는 PCR product pattern은 세균 종 특이성으로 인한 band size 뿐만 아니라 band 개수에서도 큰 차이를 보였다.

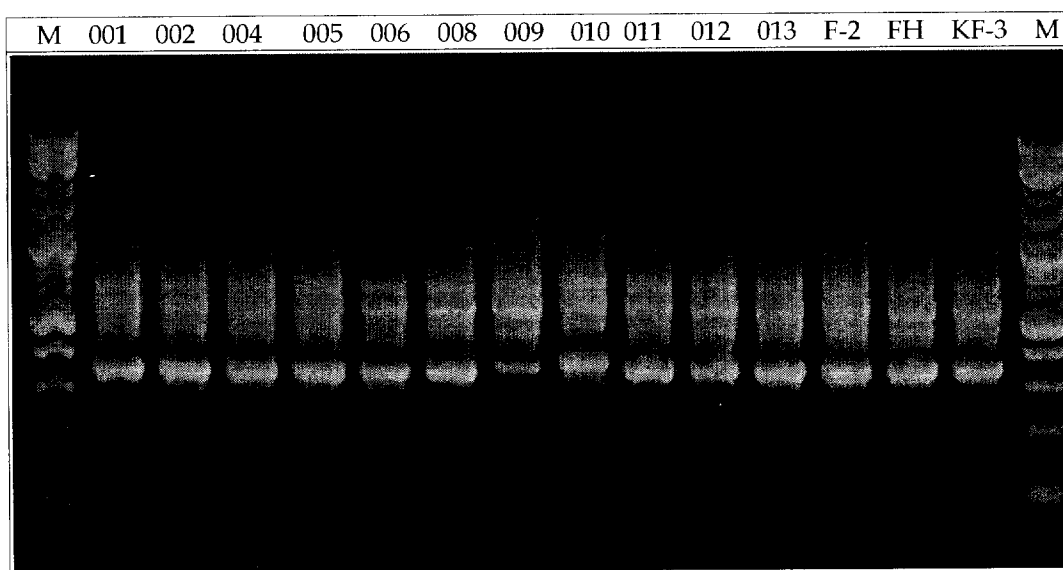


Fig. 4. Amplification of 16S-23S intergenic spacer of the isolated strains (A26001~A26013) and *V. ichthyenteri* reference strains (F-2, FK-3, FH-8804).

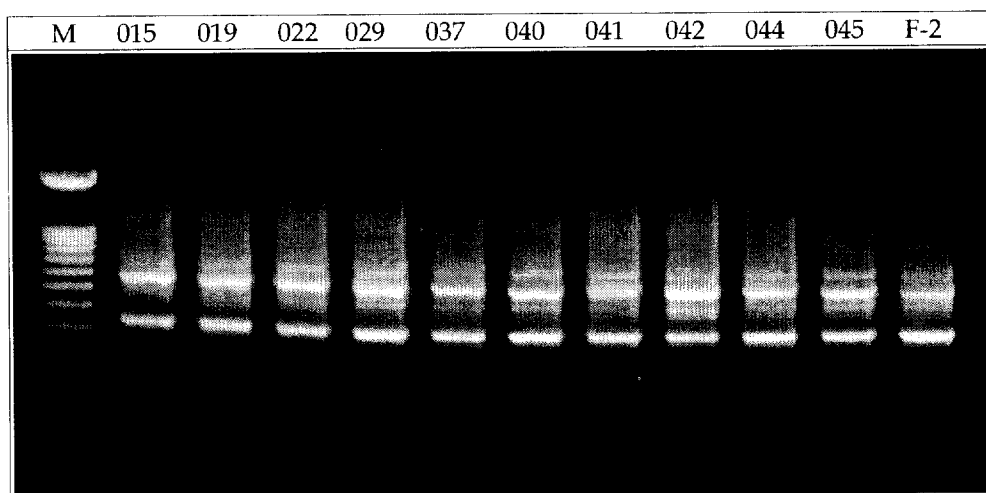


Fig. 5. Amplification of 16S-23S intergenic spacer of the isolated *V. ichthyenteri* in 2004 (A26015~A26045) and reference strains (F-2).

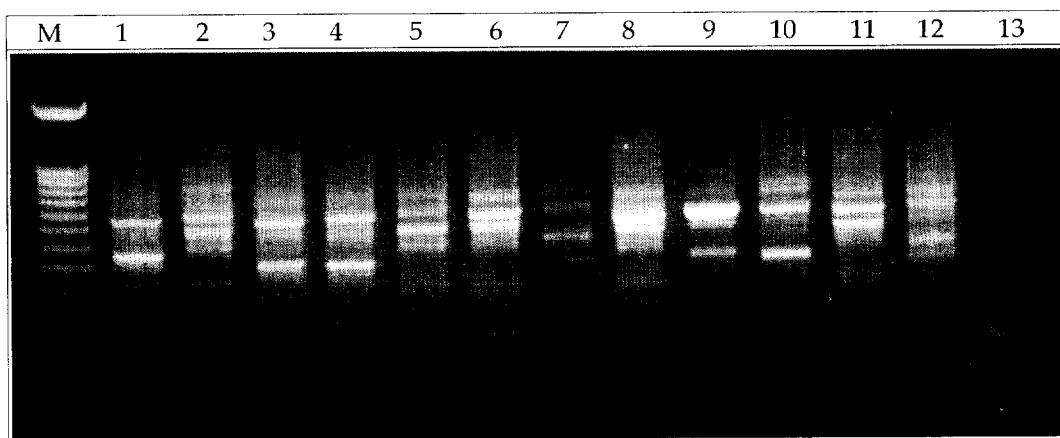


Fig. 6. Amplification of 16S-23S intergenic spacer of other bacteria species. M, 100 bp ladder; 1, *V. alginolyticus*; 2, *V. anguillarum*; 3, *V. carchariae*; 4, *V. compbellii*; 5, *V. diazotrophicus*; 6, *V. fluvialis*; 7, *V. logei*; 8, *V. mimicus*; 9, *V. parahaemolyticus*; 10, *V. penaeicida*; 11, *V. vulnificus*; 12, *Photobacterium damsela* subsp. *damselae*; 13, *Aeromonas salmonicida*.

5.2. IGS의 염기 서열 분석

Table 7에 나타난 4 groups의 band 중 IGS-1, 2 및 3에 해당하는 각 균주의 증폭산물을 절취하여 PCR products를 cloning하고 sequencing한 결과, 분리 균주 및 참조 균주는 3가지 형태의 IGS로 구분할 수 있었다. 즉, Group IGS-1은 tRNA를 가지고 있지 않은 IGS gene, Group IGS-2는 tRNA^{Glu(TTC)}, Group IGS-3은 두 개의 tRNA 즉 tRNA^{Ile(GAT)}와 tRNA^{Ala(IGC)}를 coding하는 IGS gene으로 확인되었다.

A26009와 A26010을 제외한 모든 분리 균주들의 IGS-1, 2 및 3 genes은 *V. ichthyocenteri* 참조 균주인 F-2, FK-3 및 FH-8804와 99.06~100%로 일치하였다 (Fig. 6, 7, 8).

이에 비해 A26010의 IGS-1 gene은 379 bp로서 다른 분리 균주에 비해 25 bp가 더 길며 F-2의 IGS-1과 83.7%의 상동성을 보였다. A26009 strain의 IGS-3 gene은 tRNA^{Ile(GAT)}와 tRNA^{Ala(IGC)}를 가지는 유전자로서 다른 strain의 그것보다 9 bp 더 길었으며 81.7%의 상동성을 나타내어 유전적으로 상이한 strain인 것이 밝혀졌다.

Table 7. Band sizes of IGSs

Strain		Group of band size (bp)			
		IGS-1	IGS-2	IGS-3	IGS-4*
Isolated strains (n=8)	A26004	354	461	613	750
	A26006	354	461	613	750
	A26008	354	461	613	750
	A26011	354	461	613	750
	A26012	354	461	613	750
	A26013	354	461	613	750
	A26009	360	500*	622	750
	A26010	379	461	622	750
Reference strains (n=3)	FK-3	354	461	613	750
	FH-8804	354	461	613	750
	F-2	354	461	613	750

*, approximately.

CGCGTGGATCACCTCCTT : 6S rRNA primer

F-2 ATACGATGATTACTCACGATGAGTGTCCACACAGATTGATGGTTTTGAGGTTTTTAACCT 60
 FK-3 ATACGATGATTACTCACGATGAGTGTCCACACAGATTGATGGTTTTGAGGTTTTTAACCT 60
 FH8804 ATACGATGATTACTCACGATGAGTGTCCACACAGATTGATGGTTTTGAGGTTTTTAACCT 60
 004 ATACGATGATTACTCACGATGAGTGTCCACACAGATTGATGGTTTTGAGGTTTTTAACCT 60
 006 ATACGATGATTACTCACGATGAGTGTCCACACAGATTGATGGTTTTGAGGTTTTTAACCT 60
 008 ATACGATGATTACTCACGATGAGTGTCCACACAGATTGATGGTTTTGAGGTTTTTAACCT 60
 012 ATACGATGATTACTCACGATGAGTGTCCACACAGATTGATGGTTTTGAGGTTTTTAACCT 60
 013 ATACGATGATTACTCACGATGAGTGTCCACACAGATTGATGGTTTTGAGGTTTTTAACCT 60
 011 ATACGATGATTACTCACGATGAGTGTCCACACAGATTGATGGTTTTGAGGTTTTTAACCT 60

F-2 CGAGCTATTATTGCTCTTTAACAATTTGGAAAGCTGACTGATAACAACATTGTTGTTATC 120
 FK-3 CGAGCTATTATTGCTCTTTAACAATTTGGAAAGCTGACTGATAACAACACTGTTGTTATC 120
 FH8804 CGAGCTATTATTGCTCTTTAACAATTTGGAAAGCTGACTGATAACAACATTGTTGTTATC 120
 004 CGAGCTATTATTGCTCTTTAACAATTTGGAAAGCTGACTGATAACAACATTGTTGTTATC 120
 006 CGAGCTATTATTGCTCTTTAACAATTTGGAAAGCTGACTGATAACAACANTGTTGTTATC 120
 008 CGAGCTATTATTGCTCTTTAACAATTTGGAAAGCTGACTGATAACAACATTGTTGTTATC 120
 012 CGAGCTATTATTGCTCTTTAACAATTTGGAAAGCTGACTGATAACAACATTGTTGTTATC 120
 013 CGAGCTATTATTGCTCTTTAACAATTTGGAAAGCTGACTGATAACAACATTGTTGTTATC 120
 011 CGAGCTATTATTGCTCTTTAACAATTTGGAAAGCTGACTGATAACAACACTGTTGTTATC 120

F-2 AAAAAAAGTTCTCAATGTTTATCTTTAAGATAAACACCAAAAAACACATTCAAGTGTCT 180
 FK-3 AAAAAAAGTTCTCAATGTTTATCTTTAAGATAAACACCAAAAAACACATTCAAGTGTCT 180
 FH8804 AAAAAAAGTTCTCAATGTTTATCTTTAAGATAAACACCAAAAAACACATTCAAGTGTCT 180
 004 AAAAAAAGTTCTCAATGTTTATCTTTAAGATAAACACCAAAAAACACATTCAAGTGTCT 180
 006 AAAAAAAGTTCTCAATGTTTACCTTTANGNTAAACACCAAAAAACACATTCAAGTGTCT 180
 008 AAAAAAAGTTCTCAATGTTTACCTTTAAGGTAAACACCAAAAAACACATTCAAGTGTCT 180
 012 AAAAAAAGTTCTCAATGTTTACCTTTAAGGTAAACACCAAAAAACACATTCAAGTGTCT 180
 013 AAAAAAAGTTCTCAATGTTTACCTTTATGGTAAACACCAAAAAACACATTCAAGTGTCT 180
 011 AAAAAAAGTTCTCAATGTTTACCTTTAAGGTAAACACCAAAAAACACATTCAAGTGTCT 180

F-2 TGGCAATATCATCATTTAATGATGATTATTCGAAATTGAGTCCGGCAAAATCGAACGTCT 240
 FK-3 TGGCAATATCATCATTTAATGATGATTATTCGAAATTGAGTCCGGCAAAATCGAACGTCT 240
 FH8804 TGGCAATATCATCATTTAATGATGATTATTCGAAATTGAGTCCGGCAAAATCGAACGTCT 240
 004 TGGCAATATCATCATTTAATGATGATTATTCGAAATTGAGTCCGGCAAAATCGAACGTCT 240
 006 TGGCAATATCATCATTTA-TGATGATTATTCGAAATTGAGTCCGGCAAAATCGAACGTCT 239
 008 TGGCAATATCATCATTTA-TGATGATTATTCGAAATTGAGTCCGGCAAAATCGAACGTCT 239
 012 TGGCAATATCATCATTTA-TGATGATTATTCGAAATTGAGTCCGGCAAAATCGAACGTCT 239
 013 TGGCAATATCATCATTTA-TGATGATTATTCGAAATTGAGTCCGGCAAAATCGAACGTCT 239

```

011      TGGCAATATCATCATTTAATGATGATTATTCGAAATTGAGTCCGGCAAAATCGAACGTCT 240
          *****

F-2      CTCAC TCATAAAATAGAGAGACAAC TTGGTTGTTTAACGAAACTCCTTCGGGTTGTATGG 300
FK-3     CTCAC TCATAAAATAGAGAGACAAC TTGGTTGTTTAACGAAACTCCTTCGGGTTGTATGG 300
FH8804   CTCAC TCATAAAATAGAGAGACAAC TTGGTTGTTTAACGAAACTCCTTCGGGTTGTATGG 300
004      CTCAC TCATAAAATAGAGAGACAAC TTGGTTGTTTAACGAAACTCCTTCGGGTTGTATGG 300
006      CTCAC TCATAAAATAGAGAGACAAC TTGGTTGTTTAACGAAACTCCTTCGGGTTGTATGG 299
008      CTCAC TCATAAAATAGAGAGACAAC TTGGTTGTTTAACGAAACTCCTTCGGGTTGTATGG 299
012      CTCAC TCATAAAATAGAGAGACAAC TTGGTTGTTTAACGAAACTCCTTCGGGTTGTATGG 299
013      CTCAC TCATAAAATAGAGAGACAAC TTGGTTGTTTAACGAAACTCCTTCGGGTTGTATGG 299
011      CTCAC TCATAAAATAGAGAGACAAC TTGGTTGTTTAACGAAACTCCTTCGGGTTGTATGG 300
          *****

F-2      TTAAGTGACTAAGCGTAC 318
FK-3     TTAAGTGACTAAGCGTAC 318
FH8804   TTAAGTGACTAAGCGTAC 318
004      TTAAGTGACTAAGCGTAC 318
006      TTAAGTGACTAAGCGTAC 317
008      TTAAGTGACTAAGCGTAC 317
012      TTAAGTGACTAAGCGTAC 317
013      TTAAGTGACTAAGCGTAC 317
011      TTAAGTGACTAAGTGTAC 318  ←
          *****

          :TGCCAAGGCATCCACCGT : 23S rRNA primer

```

Fig. 6. Alignment of nucleotide sequences of IGS-1 gene. The sequences were derived from the clone and isolates listed in Table 1. The symbols referred to absent base (-) and misreading base (N). Nucleotides conserved in all strains (*).

ATACGATGAT TACTCAGCAT GAGTGTCCAC ACAGATTGAT ATGTTTATAA AGTTAAGAG 60
 TTAAC TAGTG TCCCGTTTCGT CTAGAGGCCT AGGACACCGC CCTTTCACGG CGGTAACAGG 120
 GGTTTCGACTC CCCTACGGGA TACCATCTTT AAGCATTCTT TAGGTAATAA CCTATTTGAG 180
 AGTTTTTAAA AATGGTTAGT TTCTTTTGAA ACAAATTGC TCTTTAACA TTTGGAAAGC 240
 TGACTGATAA CAACATATTG TTATCAAAAA AAGTTCTCAA TGTACCTTA AGGTAAACAC 300
 CAAAAAACA CATTCAAGTG TTCTTGGCAA TCATCATTTA TTGATGATTA TTCAAATTGA 360
 GTCCGGCAAA ATCGAACGTC TCTACTCAT AAAATAGAGA GACAATTGG TTGTTTAACG 420
 AAACTCCTTC GGGTTGTATG GTTAAGTGAC TAAGCGTACA

Fig. 7. Nucleotide sequence of ISR-2 gene (strain A26004). Region encoding tRNA molecules are boxed: tRNA^{Glu(TTC)}.

ATACGATGAT TACTCAGCAT GAGTGTCCAC ACAGATTGAT AAGTTTATAA AGTTTAAGAG 60
 ACGATACTGG GTCTGTAGCT CAGGTGGTTA GAGCGTTCGC CTGATAAGCG AGAGGTCGGT 120
 GGTTTCGAGTC CACTCAGACC CACCAATTCC CTTCCCAAGG AATTGGCACA CAGTATCGAC 180
 ACCTGATGGG GCTATAGCTC AGCTGGGAGA GCGCCTGCCT TGCACGCAGG AGGTCTGCGG 240
 TTCGATCCCG CATAGCTCCA CCATCTTTAA GCGCATTTAC TTTTGAATAG AAAGTTGAGT 300
 GTTTTTTAAA ATGGTTTTCA TCAGAAAATC TAGCTCTTTA ACAATTTGGA AAGCTGACTG 360
 ATAACAACAT TGTTGTTATC AAAAAAAGTT CTCAATGTTT ATCTTTAAGA TAAACACCAA 420
 AAAACACATT CAAGTGTCT TGGCAATATC ATCATTTATG ATGATTATTC GAAATTGAGT 480
 CCGGCAAAAT CGAACGTCTC TACTCATAA AATAGAGAGA CAACTTGGTT GTTTAACGAA 540
 ACTCCTTCGG GTTGTATGGT TAAGTGACTA AGCGTAC

Fig. 8. Nucleotide sequence of ISR-3 gene (strain A26004). Region encoding tRNA molecules are boxed; tRNA^{Ile(CAT)} and tRNA^{Ala(TGC)}.

6. 병원성 시험

6.1. 넙치 치어의 복강 감염 시험

체중 4~5g의 넙치에 시험균액을 복강 주사하고 누적 폐사율을 조사한 결과를 Table 8에 나타내었다. *V. ichthyenteri*의 참조 균주 FK-3과 분리 균주 A26002, A26004 및 A26011를 각각 10^7 cfu/ml 및 10^{10} cfu/ml의 농도로 주사한 시험구에서는 폐사 개체가 나타나지 않았으며 어떠한 외부 증상도 관찰되지 않았다. 그러나 병원성 비교를 위해 사용한 *E. tarda* 시험구에서는 시험어가 6일 이내에 모두 100% 폐사하였다.

Table 8. Cumulative mortality of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* injected intraperitoneally with several isolated strains and reference strains

Strains	Challenge dose (CFU/ml)	Dead number of tested fish days after challenge					Mortality (%)
		3	4	5	6	14	
A26002	0.8×10^7	0	0	0	0	0	0
	0.8×10^9	0	0	0	0	0	0
A26004	0.6×10^7	0	0	0	0	0	0
	0.6×10^{10}	0	0	0	0	0	0
A26011	1.3×10^7	0	0	0	0	0	0
	1.3×10^{10}	0	0	0	0	0	0
FK-3	1.6×10^7	0	0	0	0	0	0
	1.6×10^{10}	0	0	0	0	0	0
<i>E. tarda</i>	1.4×10^7	0	3	5	2		100
	1.4×10^{10}	4	6				100
Control	PS	0	0	0	0	0	0

6.2. 넙치 치어의 경구 감염 시험

체중 4~5g의 넙치에 존대를 이용해 시험 균을 강제 경구 투여한 후 폐사율을 조사한 결과를 Table 9에 나타내었다. *E. tarda* 시험구에서는 시험어가 모두 폐사하였으나 *V. ichthyocenteri*의 시험구에서는 A26011의 5.6×10^9 cfu/ml 농도 시험구에서 1마리가 폐사하였을 뿐 다른 시험구에서는 폐사가 일어나지 않았다.

경구 감염 후 시간별 시험어의 장기 내 세균수를 측정한 결과는 Table 10에 나타낸 것과 같다. 세균 농도 10^9 cfu/ml로 투여한 시험어는 7일째 감염어 내부 장기를 마쇄하여 균수를 조사한 결과 A26002, F-2 및 *E. tarda* 시험구에서 세균이 재분리되었으며, 이때 *E. tarda*는 7.6×10^7 cfu/g의 높은 농도로 분리되었고 실험 개시 후 7일부터 폐사하기 시작하여 14일 사이에 모두 폐사하였다. 그 외 시험구에서는 약 10^3 cfu/g의 농도로 시험 균이 재분리되었지만 폐사체는 관찰 할 수 없었다.

Table 9. Cumulative mortality of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* challenged by oral route with several isolated strains and reference strains

Strains	Challenge dose (CFU/ml)	Dead number of tested fish days after challenge									Mortality (%)
		6	7	8	9	10	11	12	13	14	
A26002	0.8×10^7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	8.9×10^9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A26004	0.6×10^7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4.0×10^9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A26011	1.3×10^7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5.6×10^9	0	0	0	0	1					10
FK-3	1.6×10^7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6.6×10^9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F-2	9×10^9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. tarda</i>	1.4×10^7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2.2×10^9	0	1	2	4	0	1	1	0	1	100
Control	PS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 10. Number of bacteria reisolated from internal organs of the fish challenged with 10^9 cfu/ml of isolated strains and reference strains of *Vibrio ichthyenteri*

	Isolated strains			Reference strains		<i>E. tarda</i>	Control
	A26002	A26004	A26011	KF3	F-2		
Number of bacteria (cfu/g)	5.2×10^3	0	0	0	7.5×10^3	7.6×10^7	0

7. 시험 균액에 침지한 brine shrimp의 체내 시간별 세균 수

세균 현탁액에 침지시킨 brine shrimp 체내 세균 수의 변화를 시간별로 측정한 결과는 Table 11과 같다. Brine shrimp를 각 세균 현탁액에 침지시킨 후 15, 30 및 60분간 침지시킨 후 TCBS에 배양했을 때 형성된 세균 집락의 총수는 거의 증가하지 않은 것으로 나타났지만 TSA와 MA 배지에서는 침지 시간에 따라 세균 수가 증가하는 것을 볼 수 있었다. 그리고 brine shrimp를 균액에 침지 15min과 30min 후의 조사에서는 각 시험구의 세균 수가 거의 같은 양으로 나타났다. 대조구의 brine shrimp 체내 세균 수는 TCBS 배지에서만 측정할 수 있었고 TSA 와 MA 배지에서는 swarming bacteria가 많아 측정할 수 없었다. 그러나 분리 균주 및 참조 균주의 세균 현탁액에 침지한 brine shrimp에서는 대조구에서 관찰되는 swarming bacteria가 거의 사라지고 새로운 우점 세균이 단일 형태의 colony를 형성하였다. 따라서, 침지한 세균이 brine shrimp에서 집락화된 것을 알 수 있었다.

Table 11. Number of bacterial cells in the brine shrimp after immersion with *Vibrio ichthyenteri* suspension

Strains	Media	Number of bacteria in brine shrimp (CFU/g brine shrimp)		
		Time length of immersion		
		15min	30min	60min
A26002	TCBS	1.05×10^7	1.46×10^7	8.66×10^7
	TSA	7.46×10^9	1.16×10^{10}	2.18×10^{10}
	MA	1.1×10^{10}	1.4×10^{10}	1.02×10^{11}
A26011	TCBS	1.7×10^8	1.41×10^8	6.6×10^7
	TSA	3.24×10^{10}	6.0×10^{10}	3.3×10^{11}
	MA	2.76×10^{10}	8.13×10^{10}	3.46×10^{11}
KF-3	TCBS	1.47×10^7	5.3×10^6	2.13×10^7
	TSA	2.97×10^{10}	2.7×10^{10}	8.53×10^{10}
	MA	2.83×10^{10}	3.15×10^{10}	1.21×10^{11}
F-2	TCBS	1.03×10^8	6.66×10^7	2.67×10^7
	TSA	1.56×10^{10}	1.46×10^{10}	2.04×10^{11}
	MA	1.46×10^{10}	2.57×10^{10}	1.8×10^{11}
Control	TCBS	1.18×10^7	3.2×10^6	8.93×10^7
	TSA	swarming bacteria	swarming bacteria	swarming bacteria
	MA	swarming bacteria	swarming bacteria	swarming bacteria

8. *In vitro*상에서의 pH 및 pepsin 농도별 정균 효과 시험

*In vitro*의 다양한 pH 조건하에서 pepsin의 세균 증식 억제 효과에 대한 시험 결과는 Table 12 및 13과 같다. 시험에 사용한 대부분의 균주가 pH 6이하에서는 증식이 억제되었으며, 모든 균주가 pH 5이하에서는 거의 증식하지 못하는 것으로 나타났다. 배양 7시간 후 대부분의 세균은 0.01 g/ml 이상의 pepsin 농도에서 균의 증식이 억제되었으며, 14시간 후에는 pepsin 0.001 g/ml에서도 대부분 세균의 증식이 유의적으로 억제되는 것을 알 수 있다. 두 그룹의 *V. ichthyocenteri*는 *in vitro*상의 pH 및 pepsin 농도별 정균 효과 시험에서 동일한 특성을 나타내었다.

Table 12. Growth rate of bacterial strains measured by optical density after 7 h incubation in various pepsin doses and pH conditions

Pepsin dose	pH	A26 001	A26 002	A26 004	A26 006	A26 008	A26 009	A26 010	A26 011	A26 012	A26 013	KF-3	F-2
Free	4 ^a	2**	1**	1**	1**	1**	1**	1**	2**	1**	1**	2**	2**
	5 ^a	1**	1**	1**	1**	1**	1**	1**	2**	1**	1**	2**	2**
	6 ^a	8*	8**	8**	8**	8	13**	8**	7**	8	11	7	13
	7 ^{ab}	17	20	20	24	15	27	17	16	11	24	13	29
0.001g/ml	4	2**	2**	2**	2**	2**	2**	2**	3**	2**	2**	2**	2**
	5	1**	1**	1**	1**	1**	1**	1**	2**	1**	1**	1**	1**
	6	8	10**	9**	8**	8**	12**	8**	8	9	11**	8**	13**
	7	14	19	21	25	17	20	14	11	6	22	11	28
0.01g/ml	4	1**	1**	1**	1**	1**	1**	1**	2**	1**	1**	2**	1**
	5	1**	1**	1**	8**	2**	1**	1**	2**	1**	1**	1**	1**
	6	7	15	11*	12	17	16**	7	12	10	13	9	16**
	7	10 ⁺⁺	12 ⁺⁺	17	18 ⁺	17	26	10 ⁺	15	8 ⁺⁺	13 ⁺⁺	10 ⁺⁺	25 ⁺
0.1g/ml	4	1**	1**	1**	1**	1**	1**	1**	2**	1**	1**	1**	1**
	5	1**	1**	1**	1**	1**	1**	1**	2**	1**	0**	1**	0**
	6	6**	13**	14**	11	15**	28**	6**	10**	10*	20**	14**	29**
	7	15	25	25	14 ⁺⁺	27	42	15	22	15	28	25	35

^a, Control for the effect of pepsin at each pH level.

^b, Control for the effect of pH level at each pepsin concentration.

**, Significant difference, $P < 0.01$ compared with each value (b) at pH 7 at four different pepsin concentration.* $P < 0.05$

⁺⁺, Significant difference, $P < 0.01$ compared with each value (a) of a pepsin-free at four different pH levels.+ $P < 0.05$.

Table 13. Growth rate of bacterial strains for 14 hrs incubation in various pepsin concentrations and pH conditions measured by optical density

Pepsin dose	pH	A26 001	A26 002	A26 004	A26 006	A26 008	A26 009	A26 010	A26 011	A26 012	A26 013	KF-3	F-2
Free	4	1	1**	1**	1**	1**	2**	1**	2**	1**	1**	2**	1**
	5	1	1**	1**	1**	1**	1**	1**	1**	1**	1**	2**	1**
	6	5	10**	9**	9	9	16	10**	9**	10	13	9	11
	7	-3	12	14	9	10	15	16	15	4	13	6	10
0.001g/ml	4	2	2	2**	2**	2	3**	2**	2	1	2**	2	1**
	5	1	1	1**	1**	2	1**	1**	2	1	1**	1	1**
	6	2	6	5	4	6	12	6	7	7	10	4 ⁺⁺	5 ⁺⁺
	7	-9 ⁺⁺	2 ⁺⁺	5 ⁺⁺	5 ⁺⁺	0 ⁺⁺	9 ⁺⁺	6 ⁺⁺	4 ⁺⁺	1 ⁺⁺	7 ⁺⁺	1	4
0.01g/ml	4	0	1	1**	1	1	1**	1**	2**	1**	1	2	1
	5	0	1	1**	6	1	1**	1**	2**	1**	1	1	1
	6	-4	1 ⁺⁺	5	7	17	13**	2**	5	2**	5**	1	2
	7	-9 ⁺⁺	2	12	7	5	17	12 ⁺	7 ⁺⁺	5	2 ⁺⁺	-2 ⁺⁺	1 ⁺⁺
0.1g/ml	4	0	1	1	1	1	1**	1	2	1	1**	1	0
	5	0	1	1	1	1	1**	1	1	1	0**	1	0
	6	-3	8	9	4	7	29	-1	3	6	8	7	7
	7	-13 ⁺⁺	-1 ⁺⁺	1 ⁺⁺	-7 ⁺⁺	1 ⁺⁺	14	-12 ⁺⁺	-4 ⁺⁺	-8 ⁺⁺	8 ⁺	-1 ⁺⁺	0 ⁺⁺

^a, Control for the effect of pepsin at each pH level.

^b, Control for the effect of pH level at each pepsin concentration.

**, Significant difference, $P < 0.01$ compared with each value (b) at pH 7 at four different pepsin concentration.* $P < 0.05$

⁺⁺, Significant difference, $P < 0.01$ compared with each value (a) of a pepsin-free at four different pH levels.+ $P < 0.05$.

IV. 고 찰

2002부터 2004년까지 우리 나라의 해수 양식 어류에서 어병 세균을 분리 조사한 결과 어종별로는 넙치에서의 세균 분리 빈도가 제일 높았다. 어병 세균 중에서는 특히 *Vibrio*속 세균이 높은 비율을 차지하고 매년 증가하는 추세이며 그 중 넙치 자어기에 장관백탁증을 일으키는 것으로 알려져 있는 *V. ichthyocyentri*가 지역에 따라서는 40%이상의 높은 분리 비율과 출현 빈도를 나타내었다. 특히 자어가 아닌 미성어 넙치에서 *V. ichthyocyentri*가 분리되는 예는 잘 알려져 있지 않으며 이들이 넙치 자어의 장관백탁증이나 미성어에 미치는 영향 등은 어병학적으로 중요한 의미를 가진다.

본 연구에서는 미성어 넙치에서 분리된 *V. ichthyocyentri*와 장관백탁증 넙치 자어에서 분리된 *V. ichthyocyentri*의 어병 미생물학적 특성을 비교하기 위하여 두 균주간의 생화학적 성상, 항원성 및 분자생물학적 성상 등을 시험 분석하였다.

시험 결과, 시험 균주간에는 분리 유래가 달라도 생화학적 성상은 거의 동일하게 나타났으며 특히 시험 균주를 장기간에 걸쳐 연속 계대하면 평판 배지에서 잘 자라지 않는 배양 특성이 있음을 알 수 있었다. 온도와 염분 농도에 따른 발육 성상의 비교는 세균을 분류하는 요소로서 매우 유용하며 특히, *Vibrio* sp.의 분류에서 0% 염분 농도와 4℃에서의 발육 유무는 중요한 지표로 이용된다 (Brant et al., 1986; Alsian and Blanch, 1994). 모든 시험 균주는 NaCl 0%와 4℃에서는 발육하지 않았다. NaCl 0.5% 첨가 pepton 수에서는 장관백탁증 넙치 병어에서 분리한 KF-3 균주를 제외하고 참조 균주 FH8804 와 F-2 두 균주는 증식하지 않거나 약한 증식을 하는 반면 미성어에서 분리된 균주들은 모두 증식하는 것을 볼 수 있었으며 참조 균주인 FK-3를 비롯한 7개의 시험 균주들은 8% NaCl 첨가 pepton 수에서도 약하게나마 발육하여 균주에 따라 발육성상에 차이가 있음을 알 수 있었다. 본 연구에서 미성어로부터 분리한 균주들은 일본 유래 (Masumura et al., 1989) 균주보다 발육 가능한 염분 농도 범위가 넓은 특성을 보였는데 대상인 넙치의 크기나 분리 지역이 다양한 것과도 관련이 있을 것으로 생각된다.

본 실험을 통하여 수온 25℃전후 일 때, 염분 2~3%가 *V. ichthyenteri*의 최적의 배양 조건인 것으로 나타났으며 이러한 특성은 이전의 연구 결과 (Murata, 1987; Masumura et al., 1989; Muroga et al., 1987, 1990; Ishimaru et al., 1996)와 일치하였다.

항원성은 세균의 특성 중 중요한 부분이며 백신과 진단 등에 중요한 의미를 가지므로 많이 연구되고 있다 (Ruben et al., 2004; Grisez et al., 1995; Balebona et al., 1998). 본 실험에서는 균주 A26004와 FK-3의 FKC 항원에 대한 토끼 항혈청으로 참조 균주와 시험 균주 등 vibrio속 세균 총 21 균주의 응집 항체가를 조사한 결과 시험 균주의 항원성이 다양하며 교차 반응성이 큰 것으로 나타났다. 그럼에도 불구하고 시험 균주를 FKC 항원을 기준으로 하였을 때 크게 2그룹으로 나눌 수 있었다. 균주의 항원성은 균체 단백질 구조와 연관성이 있으므로 (Grisez et al., 1995; Ruben et al., 2004), SDS-PAGE를 이용하여 균체 단백질 pattern을 알아본 결과, *V. ichthyenteri* 균주들은 약 34~45KD band에서 차이를 보여서 이들은 항원성의 다양성과 관련성이 있을 것으로 추정하였다. 이러한 연구 결과는 Masumura et al. (1989)이 다양한 지역의 분리 균주들이 혈청학적으로 차이가 있다고 제시한 결과와 유사한 현상으로 생각된다. 본 시험에서 시험 균주의 HKC 항원이 FKC 항원보다 높은 항체가를 나타내어 항원의 제작 방법이 항원의 특성에 큰 영향을 미치는 것으로 생각된다. 그러나 이러한 현상은 Masumura et al. (1989)의 HKC항원이 FKC 항원 보다 응집항체가가 낮게 나타나 본 실험 결과와 차이가 난다. 이런 차이점이 항원의 제작 방법에 기인한 것인지 본 시험 균주가 다양한 어체에서 분리된 것과 관련이 있는지 등에 대해서 검토할 필요가 있을 것으로 생각한다.

넙치에서 자주 분리되는 *V. ichthyenteri* 이외의 vibrio속 각종 시험 균주들의 FKC 및 HKC 항원은 *V. ichthyenteri*의 토끼 항혈청에 다양한 교차 반응을 나타내어 vibrio속 세균들이 공통 항원 (Chen et al., 1992)을 가지고 있는 것을 알 수 있었으며, 이는 vibrio 속 세균의 백신 연구에 중요한 의미가 있다고 생각된다.

*V. ichthyocenteri*는 40일령 이전 넙치 자치어기에만 장관백탁증을 유발한다. 본 실험에서는 미성어에서 분리된 시험균의 병원성을 확인하기 위하여 장관백탁증에 걸린 넙치 자어에서 분리한 *V. ichthyocenteri* 참조 균주로 인위 감염 시험을 실시하였다. 넙치 치어 복강 감염 시험에는 시험 접종 농도에서 모두 병원성이 없었으며, 넙치 치어 경구 감염 시험에서도 두 그룹의 *V. ichthyocenteri*는 폐사가 나타나지 않았다. 이러한 결과는 *V. ichthyocenteri* 균주가 넙치 치어에 병원성이 없으며 본 시험 균과 참조 균주간에도 병원성 차이가 없다는 것을 보여준다. Carman (1998)는 gilt head sea bream의 병어에서 분리된 vibrio 세균이라 하더라도 균주에 따라 병원성이 다양하게 나타난다고 하였다. 한편, Pujalte (2003)도 gilthead sea bream, *Sparus aurata*의 종묘에서부터 성어까지 정상적인 어체 및 병증이 있는 다양한 sample에서 세균을 분리한 결과, *V. ichthyocenteri*-like 균이 임상 증상과 연관성이 밀접하지는 않지만 연중 계속 분리된다고 보고하였다. 본 연구에서 미성어로부터 분리한 *V. ichthyocenteri*는 다양한 임상 증상을 나타내는 넙치 장기에서 분리되었고 분리 빈도가 높은 점을 보아 *V. ichthyocenteri*는 복합 감염일 수도 있으며 자연 조건하에서 숙주의 건강 상태와 환경 요소로 인해 넙치에게 다소 영향을 미칠 수도 있을 것으로 생각한다. 특히 양성 과정인 넙치에서 이 균이 계속 존재하면 넙치 종묘 배양장에도 영향을 미칠 가능성이 있기에 앞으로 친어나 환경수에 대한 균의 분포를 조사하는 것이 필요할 것으로 생각한다.

넙치 자어의 먹이 생물인 brine shrimp를 세균 현탁액에 침지한 후 시간별로 brine shrimp 체내의 세균수를 측정하였을 때, 대조구의 brine shrimp 체내에서는 swarming bacteria가 우점적으로 나타났다. 이러한 결과는 Stephen et al. (2002)의 실험 결과와 일치하였다. 그러나 시험균의 세균 현탁액에 15min, 30min 또는 60min의 단시간 침지한 각 시험구의 brine shrimp에서는 시험균이 brine shrimp 체내에서 집락화된 것을 알 수 있었고 또 침지 시간에 따라 brine shrimp 체내에서 세균이 증식하는 경향을 볼 수 있었다. 따라서 이 세균이 brine shrimp 체내에 부착하고 집락화된다는 사실로부터

경구 감염이 이 질병의 발생과 관련성이 높을 것으로 생각하게 되었다.

*Vibrio*속 세균의 동정은 일반 세균과는 달리 생화학적 성상이 다양하여 (Diggles *et al.*, 2000), 정확한 동정을 위해서는 분자생물학적 동정법이 이용된다 (Osorio and Toranzo, 2002). 그렇지만 *vibrio*속 세균은 16S rRNA 부분이 매우 유사하게 나타나므로 16S rRNA의 염기 서열 분석만으로는 질병의 원인체를 정확하게 동정하는 것이 어렵다(Krawiec and Riley, 1990). 반면 intergenic space (IGS)라 불리는 부분은 종마다 구분되는 특징적인 염기 서열을 가지므로 16S-23S rRNA IGS는 16S rRNA에 비해 종 특이적인 염기 서열을 가진다 (Barry *et al.*, 1991). IGS는 염기 서열뿐만 아니라 길이도 종간에 차이를 보이므로 이 부분을 이용하여 가까운 관계의 종도 동정이 가능하다 (Gurtler and Stanisich, 1996). 따라서 종별 특이성이 높게 나타나는 16S-23S rRNA intergenic space의 염기 서열을 분석하는 방법이 *Vibrio* 종의 동정에 적합할 것으로 생각된다. 본 연구 결과에서 16S-23S IGS의 pattern은 특이적이고 아직까지 *V. ichthyocenteri* 16S-23S IGS의 염기 서열은 GenBank에 등록되어 있지 않지만 3개 차어 유래 참조 균주와 21개 미성어 유래 분리 균주간의 상동성은 99.1~100% (A26009, A26010외)로 일치하고 다른 *vibrio* 종과는 <70%의 낮은 상동성을 나타내었기에 분리 균주를 *V. ichthyocenteri*로 동정할 수 있었다. 그리고 16S-23S IGS pattern의 4개 major band에 포함되어 있는 3개의 tRNA 유전자를 밝혀내었다. Moon *et al.* (2004)은 *V. ichthyocenteri*의 IGS는 tRNA gene 없는 no type만을 보고하였지만, 본 연구에는 no-tRNA, tRNA^{Glu(TTC)} 그리고 tRNA^{Ile(GAT)}와 tRNA^{Ala(TGC)}를 coding하는 3 가지 이상의 tRNA type이 있음을 밝혔다. 이러한 유전학적 특성은 종간의 동정에 이용될 뿐만 아니라 신속 검출법 연구에 특이 primer 기초 자료로 될 수 있을 것으로 생각한다.

본 연구에서는 미성어 유래와 차어 유래의 *V. ichthyocenteri*에 대한 어병학적 특성을 비교한 결과 생화학적 및 생리학적 특성이 매우 유사하였다. 미성어 유래 균주의 FKC 항원은 항원성의 차이를 보여 2가지 그룹이 존재하며, 유전학적 상관 관계에서는 2개의

분리 균주를 제외한 19개 시험 균주가 모두 자어 유래 참조 균주와 동일한 특성을 나타내었다. 그리고 유전학적 특성으로서는 3가지 type tRNA를 포함하는 16S-23S IGS gene을 밝혔다. 본 시험 균주는 미성어 넙치에 병원성은 없지만 brine shrimp에서는 colonization 되는 것으로 나타나 경구 감염의 가능성을 시사하는 것으로 판단되었다.

V. 요 약

2002년에서 2004년에 걸쳐, 우리 나라의 넙치 양식장에서 질병의 증상이 보이는 중간 육성 단계의 넙치를 대상으로 다수의 *Vibrio*속 세균을 분리 동정하였으며 그 중에서 *V. ichthyoenetri*균이 높은 비율을 차지하고 있었다. 일반적으로 *V. ichthyoenetri*는 넙치의 자어기 장관백탁증의 원인균으로 잘 알려져 있으며, 미성어의 병어로부터 분리되었다는 점에서 여러 크기의 넙치 및 종묘 생산에 미치는 영향을 알고자 하였다.

본 연구는 미성어 넙치에서 분리된 11개의 균주와 장관백탁증에 걸린 넙치 자어에서 분리한 *V. ichthyoenetri* 참조 균주 3개를 대상으로 두 그룹간의 생화학적 및 생리학적 성상, 균체 구조 단백질과 항원 항체 반응 및 유전학적 특성을 비교 분석함으로써 분리 균주를 *V. ichthyoenetri*로 동정하고, 이들의 어병학적 특성을 조사하였다.

본 연구에서 시험 균주와 참조 균주간의 생화학적 특성과 생리학적 성상이 거의 동일한 것으로 나타났다. 분리 균주와 참조 균주의 균체 구조 단백질 profile이 전체적으로는 유사하였으나 약 34~45 KD band 부분에서 차이를 보였다. *V. ichthyoenetri*의 항혈청을 이용한 항원성 분석 결과, FKC 항원이 높은 항체가를 나타내는 그룹과 낮은 항체가를 보이는 그룹이 존재하는 것으로 나타났으며, HKC 항원은 다른 *Vibrio*속 세균들과도 높은 교차 반응성을 나타내었다.

본 연구에서 분리 균주와 참조 균주의 16S-23S rRNA intergenic space (IGS) region을 cloning하여 염기 서열을 분석하였다. 3개의 참조 균주와 21개의 분리 균주 가운데 A26009와 A26010을 제외한 모든 균주들은 *V. ichthyoenetri* 참조 균주와 99.1~100% 동일하였으며 *V. ichthyoenetri*는 3개 이상의 PCR products를 보였다. 이들 각각에 대한 tRNA type을 분석한 결과, no-tRNA, tRNA^{Glu(TTC)} type 그리고 tRNA^{Ile(GAT)}와 tRNA^{Ala(TCC)}를 coding하는 3 가지 tRNA type을 밝혔다.

넙치 미성어에서 분리한 시험 균주로 공격 시험을 실시한 결과 넙치 치어기에는 병원성이 없는 것으로 조사되었으나 이들 시험 균주가 bine shrimp 체내에 부착하여 집락화되는 것으로부터 경구 감염의 가능성이 시사되었다.

VI. 감사의 글

2년 전 많은 지식을 배우려고 중국에서 먼 길을 떠나 어병예방연구실의 일원이 되었습니다. 그동안 너무 많은 도움과 관심을 주신 감사한 분들이 있었기에 이 논문을 완성하게 되었다고 생각하며 진심으로 감사의 마음을 전합니다.

저에게 이런 귀한 학습 기회를 마련해 주시고 바다처럼 넓은 마음과 깊은 배려로 배움의 길을 개척해 주셨으며 아낌없이 가르쳐주신 박수일 지도 교수님께 진심으로 감사드립니다. 바쁘신 와중에도 논문 심사를 위해 애쓰시고 따뜻한 충고와 격려로 지도해주신 허민도 교수님, 정현도 교수님께 감사드립니다. 항상 관심과 배려를 주신 정준기 교수님, 강주찬 교수님, 김기홍 교수님 그리고 지금의 부경대와 연분을 맺어주고 다시 배움의 길을 개척해주신 조재운 교수님께도 깊은 감사를 드립니다.

실험 설계, 실험 방법에서부터 실험 결과와 논문 완성까지 도움과 관심을 아끼지 않은 김수미 박사님께 진심으로 감사드리며 실험에서는 물론 생활 중에서도 항상 옆에서 든든한 힘이 되어주신 저의 흑기사 우승호 어병예방학 연구실 실장님께 진심으로 감사드리며 부딪치는 일이 있으면 말없이 해결해 준 이덕찬 박사님, 실험동안 최선을 다하여 도와준 최광진, 문정현, 정영은, 자기 일처럼 열심히 도와준 김은전, 황성돈, 최정현, 김수현, 김승훈, 이준희 후배님들께 진심으로 감사드립니다. 실험어를 기꺼이 해결해준 황미혜 지도사, 박영수, 최성재, 홍주원 님, 피로울 때 항상 따뜻한 관심과 격려를 아끼지 않은 원경미, 권분경님께 감사드립니다. 늘 옆에서 잘 배려해 주는 최현숙 조교, 격려하고 지켜봐주시는 홍미주, 김현정, 이재일, 강민진님께 감사드립니다.

많은 조언과 관심을 아끼지 않고 큰 힘이 되어주신 방종득, 김진우 팀장님, 김이청 연구관님, 최혜승, 조미영, 지보영, 이주석, 박찬일 박사님께 감사드립니다.

유학 생활의 외로움과 힘든 과정을 너무나 잘 이해하고 많은 도움을 준 동생, 시동생 내외분 그리고 학습에 영향을 준다고 모든 일들을 맡아한 형제들, 항상 믿어주고 이해해주신 부모님, 학문과 인생의 길에서 언제나 지지해주고 든든한 버팀목이 되어 주신 남편과 딸에게 머리 숙여 감사드립니다. 더욱 힘찬 모습과 좋은 성과로 여러분들께 보답 하겠습니다.

VII. 참고 문헌

- Amann, R. I., W. Ludwig and K. H. Schleifer (1995). Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol. Rev. 59, 143-169.
- Alsian, M. and R. A. Blanch (1994). A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. Journal of Applied Bacteriology, 76, 79-85.
- Balebona, C. M., I. Zorrilla, M. A. Morinigo and J. J. Borrego (1998). Survey of bacterial pathologies affecting farmed gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.) in southwestern Spain from 1990 to 1996. Aquaculture, 166, 19-35.
- Barry, T., G. Collieran, M. Glennon, L. K. Dunican, and F. Gannon (1991). The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. PCR Methods and Applications. 1, 51-56.
- Brant, T. N., J. V. Lee, P. A. West and R. P. Colwell (1986). Numerical classification of species of *vibrio* and related genera. Journal of Applied Bacteriology, 61, 437-467.
- Chen, D., P. J. Hanna, K. Altmann, A. Smith, P. Moon and L. S. Hammond (1992). Development of monoclonal antibodies that identify *vibrio* species commonly isolated from infections of humans, fish and shellfish. Applied and Environment Microbiology, 58, 3694-3700.
- Chun, J., A. H. and R. R. Colwell (1999). Analysis of 16S/23S rRNA intergenic Spacer Regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. Applied and Environmental Microbiology, 65, 2202-2208.
- Diggles, B. K., J. Carson, P. M. Hine, R. W. Hickman and M. J. Tait (2000). *Vibrio* species associated with mortalities in hatchery-reared turbot (*Colistium mudipinnis*) and brill (*C. guntheri*) in New York, pp. 1-36.
- Gurtler, V. and V. A. Stanisich (1996). New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. Microbiology, 142, 3-6.
- Grisez, L. and F. Ollevier (1995). Comparative serology of the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum*. Applied and Environmental microbiology, 61 (12), 4367-4373.

- Ishimaru, K., M. Akagawa-Matsushita and K. Muroga (1996). *Vibrio ichthyenteri* sp. nov., a pathogen of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) larvae. International Journal of Systematic Bacteriology, 46, 155-159.
- 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* (Temminck & Schlegel). Journal of Fish Diseases, 27, 497-505.
- Krawiec, S. and M. Riley (1990). Organization of the bacterial chromosome. Microbiol. Rev. 54, 502-539.
- Maeda, T., N. Takada, M. Furushita, and T. Shiba (2000). Structural variation in the 16S-23S rRNA intergenic spacers of *Vibrio parahaemolyticus*. FEMS Microbiology Letters, 192, 73-77.
- Maeda, T., Y. Matsuo, M. Furushita and T. Shiba (2003). Seasonal dynamics in a coastal *Vibrio* community examined by a rapid clustering method based on 16S rDNA. Fisheries Science, 69, 385-394.
- Masumura, K., H. Yasunobu, N. Okada and K. Muroga (1989). Isolation of a *Vibrio* sp. the causative bacterium of intestinal necrosis of Japanese flounder larvae. Fish Pathology, 24, 135-141.
- Moon, Y. G., G. T. Park, H. J. Son, S. H. Lee, J. M. Lee and M. S. Heo (2004). Rapid Detection of the Pathogenic of Bacterial White Enteritis of Larval and Juvenile Stages in Olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Journal of Fish Pathology, 17(3), 159~169.
- Murata, O. (1987). Infectious intestinal necrosis in flounder. Fish Pathology, 22, 59-61.
- Muroga, K. (2001). Viral and bacterial diseases of marine fish and shellfish in Japanese hatcheries. Aquaculture, 202, 23-44.
- Muroga, K., M. Higashi and H. Keitoku (1987). The isolation of intestinal microflora of farmed red seabream (*Pagrus major*) and black seabream (*Acanthopagrus schlegelii*) at larval and juvenile stages. Aquaculture, 65: 79-88.
- Muroga, K., H. Yasunobu, N. Okada and K. Masumura (1990). Bacterial enteritis of cultured flounder *Paralichthys olivaceus* larvae. Diseases of Aquatic Organisms, 9, 121-125.
- Nishioka, T., T. Furusawa and Y. Mizuta (1997). Diseases occurring in marine fish

- and shellfish hatcheries in Japan (1989-1994). *Suisan Zoshoku*, 45, 285-290.
- Osorio, C. and A. Toranzo (2002). DNA-based diagnostics in sea farming, p. 253-310. In M. Fingerman and R. Nagahushanam (ed.), *Seafood safety and human health*. Science Publishers, Inc., Enfield, N. H.
- Pujalte, M. J., A. S. Bobadilla, P. A. Pellitero, E. Garay (2003). Carriage of potentially fish-pathogenic bacteria in *Sparus aurata* cultured in Mediterranean fish farms. *Disease of Aquatic organisms*, 54, 119-126.
- Ruben, A. H., M. Batriz, L. R. Sonia, L. R. Jesus, E. T. Alicia (2004). Phenotypic characterization and description of two major O-serotypes in *Tenacibaculum maritimum* strains from marine fishes. *Disease of Aquatic organisms*, 58, 1-8.
- Simon, K. Y., H. Z. Wang, H. W. Sheran, S. S. Rudolf and Y. C. Richard (2002). Analysis of 16s-23s rDNA intergenic spacers (IGSs) of marine vibrios for species-specific signature DNA sequences. *Marine pollution Bulletin*, 44, 412-420.
- Stephen, E. D. and H. S. Jones (2002). Microbiology of summer flounder *Paralichthys dentatus* fingerling production at a marine fish hatchery. *Aquaculture*, 211, 9-28
- 이정백, 노섭, 송춘복 (1995). 넙치 *Paralichthys olivaceus* 자어에서 분리한 장관백탁증의 원인균인 *Vibrio* sp. (INFL group)의 생물학적 및 생화학적 특성. *한국어병학회지*, 8(2), 99-109.