

이학박사 학위논문

해산 양식 어류에서 분리한
non-luminous *Vibrio harveyi*의 특성

지도교수 박 수 일

이 논문을 학위논문으로 제출함



2005년 8월

부경대학교 대학원

어 병 학 과

원 경 미

원경미의 이학박사 학위논문을 인준함.

2005년 8월 31일

주 심 수산학박사

방 종 득



위 원 수산학박사

김 진 우



위 원 약 학 박 사

정 준 기



위 원 이 학 박 사

정 현 도



위 원 농 학 박 사

박 수 일



목 차

Abstract	vii
List of Tables	x
List of Figures	xii
 서론	 1
 제 1장 <i>Vibrio harveyi</i> 의 분리 및 동정	 8
I. 서론	8
II. 재료 및 방법	9
1. 병원균의 분리	9
2. 형태학적 관찰	12
2.1. 편모 염색	12
2.2. 전자 현미경적 형태 관찰	12
3. 생화학적 성상 검사	12
4. 16S ribosomal RNA (16S rRNA) 유전자 배열 분석	13
4.1. 세균의 genomic DNA 분리	13
4.2. 16S rRNA의 cloning	13
4.2.1. Primer의 설계	13
4.2.2. PCR에 사용된 시약과 PCR 수행	14
4.2.3. Gel에서 PCR 산물의 추출	14
4.2.4. PCR 산물의 cloning	15
4.2.5. 재조합된 plasmid DNA의 추출과 inserted DNA 확인	15

4.2.6. DNA sequencing 및 염기 서열의 비교 분석	16
5. PCR 동정법	16
6. 사육 해수 중의 <i>V. harveyi</i> 분포	17
6.1. 시료 채취	17
6.2. 세균수 측정	17
III. 결과	19
1. 병원균의 분리	19
2. 분리 균주의 형태학적 특징	20
3. 분리 균주의 생화학적 성상	21
4. 분리 균주의 16S rRNA 유전자 배열 분석	23
5. <i>V. harveyi</i> 동정법 개발	27
5.1. 생화학적 분류 key	27
5.2. PCR 동정법	28
6. 사육 해수 중의 <i>V. harveyi</i> 분포	29
IV. 고찰	30
V. 요약	35

제 2장 <i>Vibrio harveyi</i>의 미생물학적 특성	36
I. 서론	36
II. 재료 및 방법	38
1. <i>V. harveyi</i> 의 성장 조건	38
1.1. 염분 농도 및 시간별 발육 시험	38
1.2. 배양 온도 및 시간별 발육 시험	38
2. 약제 감수성 시험	38

3. <i>V. harveyi</i> extracellular products (ECPs)의 특성	39
3.1. <i>V. harveyi</i> ECPs 생성의 적정 조건	39
3.1.1. ECPs의 추출 및 단백질 정량	39
3.1.2. Proteolytic activity	39
3.1.3. 실험 조건	40
3.2. 다양한 protease inhibitors에 대한 억제 효과	40
3.3. 열 감수성 시험	41
4. Swarming 운동	41
5. Luminescence 시험	41
5.1. Luminometer에서의 측정	41
5.2. Luciferase gene 검출	42
6. SDS-PAGE	42
III. 결과	43
1. <i>V. harveyi</i> 의 성장 조건	43
1.1. 염분 농도 및 배양 시간	43
1.2. 배양 온도	45
2. 약제 감수성	47
3. <i>V. harveyi</i> ECPs의 특성	48
3.1. <i>V. harveyi</i> ECPs 생성의 적정 조건	48
3.1.1. 염분 농도 및 배양 시간	48
3.1.2. 배양 온도 및 배양 배지	50
3.1.3. pH	52
3.2. 열 감수성	53
3.3. <i>V. harveyi</i> ECPs에 대한 protease inhibitor 검색	54

4. Swarming 운동	56
5. Luminescence	60
6. SDS-PAGE	62
6.1. <i>V. harveyi</i> 균체의 protein pattern	62
6.2. <i>V. harveyi</i> ECPs의 protein pattern	64
IV. 고찰	65
V. 요약	70
 제 3장 <i>Vibrio harveyi</i> 의 병원성 기작	71
I. 서론	71
II. 재료 및 방법	73
1. <i>V. harveyi</i> 인위 감염 실험	73
1.1. 생균의 치사 독성	73
1.2. ECPs의 치사 독성	73
2. 부착능 시험	74
2.1. 세균 세포 표면의 hydrophobicity	74
2.1.1. Microbial adhesion to hydrocarbon (MATH)	74
2.1.2. Salt-aggregation test (SAT)	74
2.2. Biofilm 형성	74
3. <i>V. harveyi</i> 의 어체내 생존능	75
3.1. 어류 점액에서의 생존능	75
3.2. 어류 혈청 내에서의 생존능	75
4. <i>V. harveyi</i> 감염이 넙치의 생리 및 비특이적 면역 기능에 미치는 영향	76
4.1. 인위 감염 시험	76

4.2. <i>V. harveyi</i> 가 넙치의 혈액 성상에 미치는 영향	76
4.2.1. Hematocrit	76
4.2.2. 혈청 내 성분 조사	76
4.3. 점액 lysozyme 활성 측정	77
4.4. 보체의 살균 능력 조사	77
4.5. 어류 두신 식세포의 활성 산소 측정	77
5. <i>V. harveyi</i> ECPs의 활성	78
5.1. Proteolytic activity	78
5.2. 용혈능	79
5.3. <i>In vitro</i> cytotoxicity	79
5.4. Siderophore 생성능	79
6. 통계학적 분석	80
III. 결과	81
1. 인위 감염 시험	81
1.1. 생균의 치사 독성	81
1.2. ECPs의 치사 독성	82
2. 부착능	83
2.1. 세균 세포 표면의 hydrophobicity	83
2.2. Biofilm 형성능	84
3. <i>V. harveyi</i> 의 어체내 생존능	87
3.1. 어류 점액에서의 생존능	87
3.2. 어류 혈청 내에서의 생존능	88
4. <i>V. harveyi</i> 감염이 넙치의 생리 및 비특이적 면역 기능에 미치는 영향	91
4.1. 혈액 성분	91

4.2. 점액 lysozyme 활성능	92
4.3. 보체의 살균능	93
4.4. 어류 두신 식세포의 활성 산소	95
5. ECPs 활성능	96
5.1. Proteolytic activity	96
5.2. APIzym kit에 의한 효소 활성	98
5.3. 용혈능	100
5.4. <i>In vitro</i> cytotoxicity	102
5.5. Siderophore 생성능	105
IV. 고찰	106
V. 요약	112
종합 고찰	113
요약	118
감사의 글	120
참고 문헌	122

Characteristics of non-luminous *Vibrio harveyi* isolated from maricultured fishes in Korea

Kyoung-Mi Won

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

Abstract

An epizootic causing mortality among maricultured fishes suffering by enterocoele, abdominal swelling, and enteritis in 1999 at Kyoungsang province, Korea was found. This causative bacteria was isolated from olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, black rockfish, *Sebastes schlegeli*, turbot, *Scophthalmus maximus*, and the rearing water.

In this study, we described the isolation and identification of bacterial agent and investigated the microbiological properties with the mechanisms of pathogenicity.

Achieved results might be summarized as follows:

1. Isolation and identification of the *Vibrio harveyi*

The agent bacteria was revealed as *Vibrio carchariae*, but we notified that *V.*

carchariae is taxonomically junior synonym of *V. harveyi*. All isolates used were not luminescent, so we called this agent as a non-luminous *Vibrio harveyi*. On the basis of the identification key using the biochemical and PCR methods, we investigated seasonal variation of the *V. harveyi* in aquaculture system, and found the increased *V. harveyi* proportion among *Vibrio* spp. in august and september.

2. Microbiological properties of the *Vibrio harveyi*

V. harveyi was grown well in the 3 % NaCl at 30 °C. ECPs were produced well in 1.5 % NaCl supplemented TSA medium, 25 °C, 24 hours culture. The swarming activity appeared to be an one of the characteristic properties of the *V. harveyi* was the highest in the 1.5 % NaCl supplemented TSA medium. These cells were elongated and had the several lateral flagella which is not waved and short than polar flagella. It was not luminescent in the all isolated strains. Whole cell of the *V. harveyi* had a major protein of 50 kDa and presented various band around of 40 kDa in strains. ECPs of the *V. harveyi* had a major protein of 34 kDa commonly.

3. Pathogenic mechanisms of the *Vibrio harveyi*

V. harveyi was very pathogenic in the olive flounder, *Paralichthys olivaceus* and black rockfish, *Sebastes schlegeli*. The LD₅₀ (1 week) for the olive flounder was $1.24 \times 10^6 \sim 1.36 \times 10^8$ cfu/fish, FR 2 strain was the most virulent. The LD₅₀ (1 week) for the black rockfish were $3.24 \times 10^5 \sim 5.8 \times 10^7$ cfu/fish, FR 2 and FT 1 strain were the most virulent. The ECPs of *V. harveyi* were also virulent for olive flounder, especially ECPs of FR 2 strain [LD₅₀ (1 week) were 39.9~57.3 µg/fish] .

Hydrophobicity, biofilm formation, survival in the fish serum and mucus, and ECPs activities (haemolytic activity, cytotoxic activity and siderophore production) were related with the virulence of *V. harveyi*.

List of Tables

Table 1. Bacterial strains used in this study	10
Table 2. Primers used in this study	14
Table 3. Reference strains used in discrimination PCR	17
Table 4. Characteristics of the isolated and the reference strains	22
Table 5. Percentage of the <i>Vibrio harveyi</i> to <i>Vibrio</i> spp. in supplied and rearing sea water from olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i> culturing farms	29
Table 6. The effects of temperature in the 3 % NaCl added alkali-peptone water on the growth of <i>Vibrio harveyi</i>	45
Table 7. Susceptibility of the isolated and reference strains to antibiotic agents ...	47
Table 8. Sensitivity of <i>Vibrio harveyi</i> ECPs activity on heat-treatment at 60 °C for 30 min	53
Table 9. Effects of various inhibitors on the protease activity of ECPs from isolates and reference strains, <i>Vibrio harveyi</i>	55
Table 10. The Effects of NaCl concentration in the TSA on the swarming of the isolates and the reference strains at 27 °C	57
Table 11. The lethal dose (LD ₅₀) of <i>Vibrio harveyi</i> on the intraperitoneally injected olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i> and black rockfish, <i>Sebastes schlegeli</i> after 7 days	81
Table 12. The LD ₅₀ of <i>Vibrio harveyi</i> ECPs on the intraperitoneally injected olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i> after 14 days	82
Table 13. Cell surface hydrophobicity of the isolates and reference strains	83
Table 14. Growth of <i>Vibrio harveyi</i> in the fish mucus agars	87

Table 15. Hematological changes in the olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i> after injection with 2×10^5 cfu/fish of the <i>Vibrio harveyi</i> strains	91
Table 16. Enzymatic activity of <i>Vibrio harveyi</i> ECPs in APIzym kit	99
Table 17. Haemolytic activity of the <i>Vibrio harveyi</i> ECPs harvested after incubation for 24 h	101
Table 18. Cytotoxic activity of the <i>Vibrio harveyi</i> ECPs	103

List of Figures

Fig. 1. The typical signs of fishes infected with <i>V. harveyi</i>	11
Fig. 2. Morphological properties of the present isolated strain, FF 8.	20
Fig. 3. Multiple alignment of the 16S rRNA nucleotide sequences	25
Fig. 4. Phylogenic tree formed based on 16S rRNA sequences	26
Fig. 5. Rapid identification key for swarming <i>Vibrio</i> sp.	27
Fig. 6. PCR amplification from nucleic acids of isolates and reference strains with <i>Vibrio harveyi</i> specific primer sets Discrimination 1 (a) and Discrimination 2 (b).	30
Fig. 7. The effects of NaCl concentration in the alkali-peptone water on the growth of the <i>Vibrio harveyi</i> ATCC 35084 at 25 °C.	44
Fig. 8. The effects of temperature in the alkali-peptone water on the growth of several bacteria at 72 h.	46
Fig. 9. Effects of NaCl concentration on the production of <i>Vibrio harveyi</i> ECPs. in the tryptic soy agar.	49
Fig. 10. Effects of temperate and media on the production of <i>Vibrio harveyi</i> ECPs. 51	
Fig. 11. Effects of pH on the production of <i>V. harveyi</i> ECPs.	52
Fig. 12. The effects of NaCl concentration in TSA on the swarming of the <i>V.</i> <i>harveyi</i> , FR2.	57
Fig. 13. Morphological change of the <i>V. harveyi</i> , FF 8 on the broth (a and c) and agar plate (b, d and e).	58
Fig. 14. Negative stain of the <i>V. harveyi</i> , FF 8 on the broth medium (a) and agar	

plate medium (b, c and d).	59
Fig. 15. Amplification of luciferase alpha subunit gene of the isolates and the reference strains.	61
Fig. 16. Electrophoretic protein patterns of the <i>Vibrio harveyi</i> whole cells.	63
Fig. 17. Electrophoretic protein patterns of the <i>Vibrio harveyi</i> ECPs.	64
Fig. 18. Kinetics of biofilm formation of various <i>Vibrio</i> spp. and other bacteria.	85
Fig. 19. Kinetics of biofilm formation of <i>Vibrio harveyi</i>	86
Fig. 20. Survival of <i>V. harveyi</i> strains in the fish sera.	90
Fig. 21. Lysozyme activity in the mucus in the olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i> after i.p. injection of the <i>V. harveyi</i> strains as 2×10^5 cfu/fish.	92
Fig. 22. Change of bactericidal reaction of complement in the olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i> serum of i.p. injected with 2×10^5 cfu/fish of the <i>Vibrio harveyi</i> against <i>Escherichia coli</i>	94
Fig. 23. NBT reduction of phagocytes in the head kidney from the olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i> after i.p. injection of the <i>Vibrio harveyi</i> strains as $2 \times$ 10^5 cfu/fish.	95
Fig. 24. Effects of three times bacterial passages through fish on the production of <i>Vibrio harveyi</i> ECPs in the tryptic soy agar.	97
Fig. 25. Effects of cytotoxicity on fish cell line, CHSE-214 with different concentration of ECPs of the <i>Vibrio harveyi</i> , FF 8 for 48 hour.	104
Fig. 26. Siderophore productions of <i>Vibrio harveyi</i> ECPs.	105

서론

양식 어류의 생산량을 증대시키기 위하여 고밀도로 사육하거나 필요 이상의 사료 투여 등으로 양식장의 환경이 점차 악화되어 가고 있는 실정이다. 이러한 환경 조건 하에서 양식 어류는 일시적인 양식 관리의 소홀로도 감염성 질병에 대한 감수성이 급격히 증가될 수 있어 (Barton et al., 1986; Pickering, 1989), 질병에 의한 피해가 늘 어날 뿐만 아니라 새로운 질병의 출현 빈도도 높아지고 있는 실정이다.

1999년 여름철 고수온기에 경북, 경남 및 부산 인근의 몇몇 넙치 양식장에서 세균성 감염증으로 보이는 질병에 의해 넙치의 대량 폐사가 발생하여 그 원인을 조사하게 되었다. 감염어는 복부 팽만, 장 충혈, 장액 삼출 및 간 출혈 등의 특징적 증상을 보이면서 폐사하였고 심하게 감염된 어류는 탈장을 보이기도 하였으며 이들 감염어의 환부 및 내부 장기에서 원인균으로 추정되는 세균을 분리할 수 있었다. 이러한 증상은 에드워드병과 매우 유사하여 각 양어장에서는 단순히 에드워드병으로 판단하고 이에 대한 치료를 시도하고 있었으나, 병어에서는 에드워드균이 분리되지 않았으며 치료 효과도 비교적 낮아서 피해가 증가되고 있는 실정이었다.

이러한 감염어에서 분리된 세균들은 각종 생화학 성상 시험을 통해 *Vibrio carchariae* (*V. carchariae*) 혹은 *Vibrio harveyi* (*V. harveyi*)로 추정 동정할 수 있었다.

*V. harveyi*는 1980년대부터 새우 양식장이 밀집해 있는 인도네시아 (Sunaryanto et al., 1986), 필리핀 (Lavilla-Pitogo et al., 1990), 태국 (Jiravanichpaisal et al., 1994) 및 대만 (Liu et al., 1996) 등에서 새우류의 대량 폐사를 야기하는 병원성 세균으로 잘 알려져 있다. 특히, larvae와 post-larvae에 감염되면 폐사율이 100 %에 달하며 이들은 luminescence 양성 세균으로 중감염된 새우는 발광하는 특징이 있어 luminous vibriosis로 잘 알려져 있다. 그러나, 1990년대 후반에 들어서면서, 새우류 뿐 아니라

여러 해수 어류에도 감염된다는 보고가 늘고 있다 (Alvarez et al., 1998).

*V. carchariae*는 Grimes et al. (1984a)에 의해 sandbar shark, *Carcharhinus plumbeus*에서 처음 보고된 이후 lemon shark, *Negaprion brevirostris* (Colwell and Grimes, 1984) 이외에는 별다른 보고가 없었으나, 1990년대에 접어들면서 grouper, *Epinephelus coioides* (Leong and Wong, 1993; Yii et al., 1997), 넙치류, *Paralichthys dentatus* (Soffientino et al., 1999) 등의 다양한 어종에서 대량 폐사를 유발하는 세균으로 보고되고 있다. 이 세균의 지리적 분포 또한 매우 넓어 미국, 이탈리아, 스페인 및 동남아시아 전역에 걸쳐 발병 사례가 늘고 있으며, 특히 최근에는 우리 나라와 가까운 대만과 중국의 양식 해수 어류와 일본의 양식 전복, *Haliotis tuberculata*에서도 발병 사례가 보고되었다 (Liu et al., 2003; Nishimori et al., 1998).

이와 같이 최근 10년간, 전 세계의 다양한 해양 동물에서 *V. harveyi* 또는 *V. carchariae*의 감염에 대한 보고가 있고 특히 우리 나라 주변국인 일본, 중국, 대만 등에서는 이미 심각한 발병 사례들이 늘어나고 있는 추세이지만 (Liu et al., 2003; Nishimori et al., 1998), 우리 나라에서는 처음으로 발생이 확인되었다. 따라서 본 연구에서는 우리 나라 양식 해수 어류에서 분리된 *V. harveyi*의 정확한 동정을 위해 형태학적 및 생화학적 시험과 16S rRNA 염기 배열 분석을 실시하였으며, 그 결과를 기존의 연구 결과와 비교하였다.

*V. harveyi*와 *V. carchariae*는 원래 서로 다른 종으로 인식되어 왔으나, Pedersen et al. (1998)이 *V. carchariae*를 *V. harveyi*의 junior synonym으로 규정함에 따라 두 종이 *V. harveyi*라는 단일종으로 통합되었다. 그러나 현재에도 분류학상의 혼란이 계속되고 있어, *V. carchariae*로 명명하기도 하고 *V. harveyi*로 명명한 후 구분하여 명시하고자 할 때에는 *V. carchariae* type과 *V. harveyi* type으로 명명하기도 하는 실정이다 (Lee et al., 2002; Zhang and Austin, 2000).

*V. harveyi*의 동정법은 각종 생화학 시험을 통해 표현형으로 동정하는 방법, PCR 법을 통한 분자 생물학적 동정 방법, 그리고 monoclonal antibody를 사용한 면역학적 방법 등이 있다. 생화학 시험은 가장 오래 전부터 행해 오던 고전적인 방법으로 많은 저서와 보고에서 상세히 기술되어 있으며, 이들의 대부분은 병원성을 가지거나 위생학적으로 주목을 끄는 세균에 대한 기술이 많은 반면, 자연 해수에서 일상적으로 분리되는 환경성 *Vibrio*에 대한 기술은 비교적 빈약한 편이다 (Holt et al., 1994). Alsina and Blanch (1994)는 환경성 *Vibrio* species의 생화학적 방법으로 동정할 때, Arginine/Lysine/Ornithine을 큰 분류 기준으로 사용하여 grouping 할 것을 제안하여 유용하게 이용하고 있다. *V. harveyi*의 경우, 그의 분류 기준에 따라 -/+ /+ 그룹에 속하는 것은 쉽게 확인이 되며, citrate, L-arabinose 및 D-glucosamine 시험으로 이 그룹에 속하는 *V. alginolyticus* 및 *V. parahaemolyticus*와의 구별이 가능하다고 하였다. 그러나 Bryant et al. (1986)은 citrate, L-arabinose 및 D-glucosamine 시험이 연구자나 시험 균주에 따라 상이한 결과를 보인다고 하여, 이들 시험을 분류 key로 사용하기에는 한계가 있다고 생각한다. 분자 생물학적 동정에는 16S rRNA를 이용한 PCR 법이 가장 일반적으로, *V. harveyi*의 PCR 신속 동정법이 개발되어 있으나 (Oakey et al., 2003), 이 또한 일부 *V. alginolyticus*에서 검출되어 오판할 여지가 있다. 그러므로 *V. harveyi*의 명확한 동정을 위해서는 새로운 동정법이 개발되어야 할 필요성이 있다고 생각한다. 최근에는 *V. harveyi*를 특이적으로 검출할 수 있는 monoclonal antibody가 개발되었다 (Phianphak et al., 2005). 그러나 아직 폭넓은 적용시험이 필요한 단계이므로 객관적인 평가를 하지 못하고 있다.

이와 같이, 현재까지 가장 확실한 방법은 16S rRNA 염기 서열을 분석하는 것 뿐이어서 신속하고 정확한 동정이 힘든 실정이다. 따라서 본 연구에서는 생화학 시험과 16S rRNA 유전자의 PCR 법을 통해 간편하고 정확한 동정을 위한 key를 제시하고자 하였다.

*V. harveyi*의 가장 큰 특성 중 하나는 swarming 운동을 하는 것이다. 이 세균은 원래 하나의 편모를 가지나, agar 성분이 0.6 % 이상 함유된 고체 배지의 경계면에서 자랄 경우에는 이 극편모와는 별도로 군체의 측면에 여러 개의 측편모 (lateral flagella)가 생겨나 swarming 운동을 하여 배지 상에서 퍼져 나가게 된다. Swarming 형성 과정은 세균이 집락을 이룬 후, 세균 성장 과정에서 분비된 대사 산물로 인해 분열이 지연되어 군체가 길어지고, 그로 인해 수십 개의 lateral flagella가 생성되는 것으로 밝혀져 있다 (McCarter, 2004; Ulitzur and Kessel, 1975). 이러한 swarming의 기능은 운동 기관으로서의 역할 뿐 아니라, 병원성에 관여하는 adhesion, surface colonization, biofilm 형성과 invasion에도 관여하며, 더욱이 virulence factors인 type III secretion pathways와 밀접한 관계가 있다고 알려져 있다 (Kirov, 2003).

*V. harveyi*의 또 다른 주요 특성은 luminescence를 띄는 것으로, 이러한 생물 발광의 가장 큰 역할은 quorum sensing을 조절하는 것이다. Quorum sensing은 가장 잘 연구된 intercellular communication의 하나로 (Bassler, 1999), *V. fischeri*와 *V. harveyi*에서 처음으로 알려졌으며 (Nealson et al., 1970; Nealson and Hastings, 1979), 그 후 세균의 virulence, antibiotic synthesis, conjugation 및 운동성에 관여한다는 사실들이 밝혀졌다 (Fuqua et al., 1996). 생물 발광을 하는 세균으로는 *V. cholerae*, *V. fischeri* 및 *V. harveyi*가 알려져 있으며 (Ramaiah et al., 2000), *V. carchariae* type에서는 보고된 바가 없다.

이 외에, *V. harveyi*의 SDS-PAGE 비교 등이 이루어져 있다 (Pizzutto and Hirst, 1995).

이와 같이, *V. harveyi*의 특성에 관해서는 여러 가지 연구 결과가 있으나 단편적인 경우가 많으므로, 본 연구에서는 우리 나라 양식 해수 어류에서 분리한 *V. harveyi* 군주들에 대한 특성을 일반 성장, extracellular products (ECPs)의 특성 및 단백질 pattern 등을 종합적으로 분석하여, 기 보고된 *V. harveyi* 군주들과 비교 검토하고자

하였다.

세균성 병원체란 숙주에 명백한 손상을 일으키면서 질병을 야기하는 고도로 환경에 적응된 미생물체로, 이들은 숙주 표면이나 숙주 내에서 성공적으로 증식하는 등의 독특한 생존 방법을 가지고 있다. Falkow (1990)의 정의에 따르면 세균성 질병이란, 세균성 감염이 모두 특유의 질병으로 되는 것이 아니라 숙주의 상태와 병원체의 특성 및 환경의 영향에 따라 달라진다고 하였다.

세균성 질병은 보통 매우 복잡하고 다양한 인자들의 연결된 작용에 의해 일어나며, 일반적으로 병원성 기작에는 5가지 요건이 알려져 있다. 첫째 mucus surface로의 부착, 둘째 surface를 통한 숙주 조직으로의 침입, 셋째 *in vivo* 환경에서의 증식, 넷째 숙주 방어 기작의 방해, 마지막으로 숙주에의 손상이다 (Smith, 1988).

Adhesion은 세균이 숙주에서 성공적으로 집락을 형성하는 첫 단계로서 숙주 세포 수용체와의 비가역적 결합에 의해 씻겨 나가거나 탈락되지 않도록 해 준다 (Fuchs, 1998). 이러한 세균의 부착능을 측정하는 경우, ammonium sulfate, hydrocarbon 또는 n-octane 등에 대한 부착능을 측정하여 세균 세포 표면의 소수성의 정도로 adhesion 능력을 판단하는 경우가 많다 (Deziel et al., 2001; Soto-Rodriguez et al., 2003). *In vivo* 환경에서 증식하는 세균은 숙주의 조직이나 혈액에서 생존하여 증식하는 경우도 있고, *Edwardsiella tarda*처럼 macrophage와 같은 식세포 내로 식작용된 후 생존하는 경우도 있는데 (Rao et al., 2001), 숙주 환경에서 생존할 수 있는 능력은 병원성 세균과 비병원성 세균을 구별할 수 있는 중요한 indicator가 된다 (Leung et al., 1994). 숙주의 방어를 회피하는 기작에서 가장 중요한 인자 중의 하나가 혈청의 bactericidal activity에 대한 저항성을 가지는 것이다. 세균의 lipopolysaccharide (LPS)는 보체의 고전 경로와 대체 경로를 활성화하는 물질을 분비하여 보체에 대한 저항성을 획득하기도 하고, O-polysaccharide side chain을 가지고 있어 보체 성분이

insertion 되지 않도록 하기도 한다. Capsule도 중요한 인자로서 보체계의 C3b proteolytic cleavage를 증가시켜 대체 경로 활성을 저해하기도 한다. *Streptococcus pyogenes*는 세포벽 사이에 M-like proteins이 삽입되어 있는데, 이 단백질은 숙주 단백질층으로 세균을 coat하고 있는 것으로 이로 인해 보체계의 영향을 덜 받게 하고, 식세포에 의한 식작용에 저항성을 가지게 해 준다 (Fuchs, 1998). 마지막으로 숙주 세포에 직접적인 손상을 가하는 기작에는 hemolysin, leukotoxin 및 *Clostridium botulinum*의 neurotoxins과 같은 proteolytic toxins 등이 있다.

*V. harveyi*의 병원성 기작에 관해서는 최근 들어 연구가 시작되었으며 주로 extracellular products (ECPs)의 독력에 관한 연구가 중심이 되고 있다. *V. harveyi*의 독성 요소에 관해서는 ECPs를 대상으로 한 연구 결과가 많으며, ECPs의 새우 및 해수 어류에 대한 병원성 시험, ECPs의 활성, 용혈능 및 세포 독성 등의 시험을 통하여 *V. harveyi*의 ECPs가 중요한 병원성 인자의 하나임을 증명하였다 (Liu and Lee, 1999; Zhang and Austin, 2000). 이러한 연구 결과는 gram 양성 세균에 비해 gram 음성 세균의 ECPs 독성이 현저히 낮다는 사실과 다소 상반되므로, *V. harveyi* ECPs가 실제 주요 병원성 인자인지, ECPs 외의 다른 주요 독력 인자는 없는지에 관한 연구가 더 진행되어야 할 것으로 생각된다. ECPs 이외의 *V. harveyi* 병원성 인자로는 bacteriophage와 세균 표면의 소수성 등이 있다 (Munro et al., 2003; Ruangpan et al., 1999; Soto-Rodriguez et al., 2003).

이와 같이 현재까지 밝혀진 *V. harveyi*의 병원성 인자가 본 연구에서 분리된 균주들에서도 동일하게 작용하는지를 확인하고, 밝혀지지 않은 다른 병원성 인자들을 검색하기 위하여 다양한 *in vitro* 및 *in vivo* 실험을 수행하였다.

본 연구에서는 우리 나라 양식 해수어에 질병을 유발하는 *V. harveyi*를 분리·동정하고 *V. harveyi* 감염증의 감염 특성 및 병원체 특성 등을 다각적으로 분석하여 종합

함으로써, 본 질병의 현황을 파악하고 나아가 이 질병에 대한 예방 대책을 수립하는데 필요한 기초 자료를 얻고자 하였다.

이를 위하여 본 연구의 제 1장에서는 우리 나라 양식 해수어에서 *V. harveyi*에 감염된 어체의 특징적인 증상을 관찰하고, 병어로부터 분리된 병원체의 형태학, 생화학 및 분자 생물학적 특성을 분석하여 명확한 동정의 기준을 마련하고자 하였다. 그리고 이를 토대로 진단법을 개선하기 위해 생화학 시험과 PCR 법을 통한 동정 key를 제시하고자 하였다. 제 2장에서는 *V. harveyi*의 어병 세균학적 특성을 분석하기 위하여 *V. harveyi* 균체의 성장과 extracellular products (ECPs) 생성의 적정 조건을 측정하고, swarming과 luminescence 관찰 및 SDS-PAGE 분석을 실시하였다. 제 3장에서는 *V. harveyi*의 병원성 기작을 밝히기 위하여, 생균과 ECPs의 치사 독성을 측정하고 ECPs의 독성 및 감염어의 방어 체계에 미치는 영향을 조사하였다.

제 1장 *Vibrio harveyi*의 분리 및 동정

I. 서론

1999년 여름철 고수온기에 경북 울진군, 경남 통영시 및 부산 기장군의 넙치 양식장에서 세균성 감염증을 보이는 질병에 의해 넙치의 대량 폐사가 발생하여 그 원인을 조사하게 되었다. 감염어는 탈장, 복부 팽만, 장 충혈, 장액 삼출 및 간 출혈 등의 특징적 증상을 보이면서 폐사하였고 감염어의 환부 및 내부 장기에서 원인균으로 추정되는 세균을 분리할 수 있었다. 그리고 같은 시기에 조피볼락과 터벗으로부터도 이와 유사한 병원균이 분리되었다. 감염어 중 조피볼락은 체표 궤양 및 주둥이 부위의 발적이 특징적이었으며 터벗에서는 체표의 전신적 출혈 병소와 장 출혈 등이 나타났다.

이 어류들로부터 분리된 세균들은 분리 어종에 관계없이 1.5 % NaCl 첨가 TSA 배지에서 swarming을 하는 특성을 보였으며, TCBS에서 yellow 혹은 green colony를 형성하는 *Vibrio* 균인 것으로 나타났다.

본 연구에서는 감염어로부터 병원체를 분리하여 형태학, 생화학 및 유전학적 분석을 통해 동정하고 이를 토대로 한 신속 동정표 작성과 넙치 양식장에서 *V. harveyi*의 월별 분포를 파악하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 병원균의 분리

실험에 사용한 균주는 1999년 6월부터 9월 사이에 경상북도 울진군 일대의 넙치, 조피볼락 및 터봇에서 분리한 균주와 경상남도 통영시과 부산광역시 기장군 지역의 넙치와 조피볼락에서 분리된 것이었다. 조사 기간 동안의 수온 범위는 13~25 °C이었으며, 본 실험에 사용한 대부분의 분리 균주는 21 °C 이상의 고수온기에 분리되었다. 병원균의 분리에는 특징적인 증상을 보이는 어체의 간, 신장, 비장, 장액과 복수 등을 시료로 사용하였다. 실험에 사용한 모든 분리균은 1.5 % NaCl 첨가 TSA (Tryptic soy agar, Difco)와 TCBS에 도말한 후, 27 °C, 24 시간 배양하여 swarming activity를 확인하였다.

실험용 참조 균주는 KCCM (Korean Culture Center of Microorganisms)에서 분양받아 사용하였으며, 분리 균주와 참조 균주의 분리 지역과 유래는 Table 1에, 시험균을 분리한 병어의 증상은 Fig. 1에 나타내었다. 넙치의 경우, 탈장, 복부팽만, 복수 저류, 장액 삼출 및 장충혈 등의 증상을 보였으며, 조피볼락은 체표 궤양과 주둥이 부위의 발적이 특징적이었고, 폐사한 터봇에서는 체표와 지느러미 기부의 출혈 및 장출혈 등이 관찰되었다.

Table 1. Bacterial strains used in this study

Strains	Origin of bacteria		Remarks
FT 1	Kidney of turbot	Koungsangbug-Do 1999	
FF 1	Flounder rearing water		
FF 2	Kidney of olive flounder		
FF 3	Flounder rearing water	Koungsangbug-Do	
FF 4	Eye of olive flounder	1999	
FF 5	Kidney of olive flounder		
FF 6	Spleen of olive flounder		
FF 7	Ascitic fluid of olive flounder	Koungsangnam-Do 1999	Isolates (n=16)
FF 8	Ascitic fluid of olive flounder		
FF 9	Intestinal juice of olive flounder		
FF 10	Kidney of olive flounder	Busan	
FF 11	Liver of olive flounder	1999	
FR 1	Kidney of black rockfish	Koungsangbug-Do 1999	
FR 2	Kidney of black rockfish		
FR 3	Surface lesion of black rockfish	Busan	
FR 4	Black rockfish rearing water	1999	
ATCC 35084	Kidney of brown shark	Grimes et al., 1984 <i>V. carchariae</i> type strain	Reference strains
ATCC 14126	Dead, luminescing amphipod	Baumann et al., 1980 <i>V. harveyi</i> type strain	(n=2)

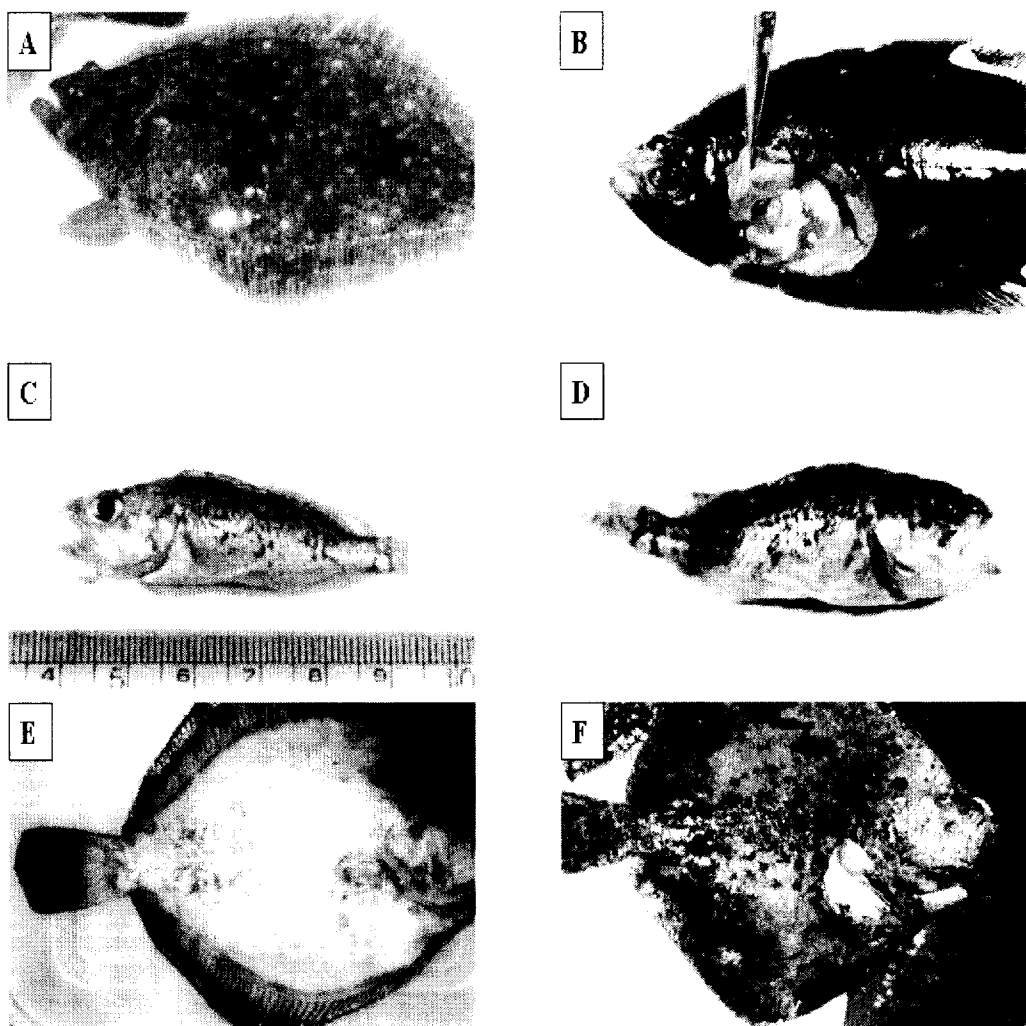


Fig. 1. The typical signs of fishes infected with *Vibrio harveyi*. A and B, infected olive flounder, *Paralichthys olivaceus* with enterocoele and severe enteritis; C and D, infected black rockfish, *Sebastes schlegeli* with skin ulcer and hemorrhage around the mouth; E and F, infected turbot, *Scophthalmus maximus* with hemorrhages on the body surface and the base of fin and enteritis.

2. 형태학적 관찰

2.1. 편모 염색

편모의 유무와 특성을 관찰하기 위한 시험 균주의 염색은 Leifson (1960)의 방법을 사용하였다. 즉, 1.5 % NaCl 첨가 TSB 배지에 균을 접종하고 27 ℃, 2 시간 배양 후, 중성 formalin으로 고정한 다음 3,000 rpm, 10 분간의 원심 분리로 상정액을 제거하여 pellet을 얻었다. 이를 생리 식염수로 2회 세척한 후 현탁하여 슬라이드 글라스에 도말한 다음 자연 건조시키고 편모 염색액 (0.9 % pararosaline acetate salt and 0.3 % pararosaline chloride to ethanol; 3 % tannic acid to water; 1.5 % NaCl to water = 1 : 1 : 1)을 적하하여 20 분간 염색한 후 검경하였다.

2.2. 전자 현미경적 형태 관찰

시험 균주를 1.5 % NaCl 첨가 TSB에 27 ℃, 2 시간 배양한 후 3,000 rpm, 5 분간 원심 분리하여 상정액을 제거하고 얻은 pellet을 2.5 % glutaraldehyde로 고정하여 집균하였다 (3,000 rpm, 5 분). 균 현탁액 10 μ l 위에 grid를 얹어 grid 표면에 균체를 부착시킨 후 건조시키고, 4 % uranyl acetate에 1 분간 negative stain하여 투과형 전자 현미경 (JEM 1200-II, JEOL)으로 관찰하였다.

3. 생화학적 성상 시험

총 16 개의 분리 균주 모두를 검사 대상으로 하였다. 1.5 % NaCl 첨가 TSA (Tryptic Soy Agar, Difco)에서 27 ℃, 24 시간 배양한 균을 이용하여 생화학적 성상 시험을 실시하였다. 생화학 시험 항목은 Oxidase test (Cytochrome oxidase), Citrate 이용능 (Simmon's citrate agar), Nitrate 환원능, Kovac's indole test, Methyl red test 및 Voges-Proskauer test (Clark and Lubs medium)와 탄수화물 분해 시험으로서 Arabinose, Glucose, Sorbitol, Raffinose, Sucrose, Salicin, Lactose, Inositol, maltose,

Mannose, Mannitol, Melibiose 등의 당 분해능을 조사하였다. 그리고 Lysine과 Ornithine에 대한 Decarboxylase 시험과 Arginine에 대한 Dehydrolase 시험을 실시하였으며 Ureas 시험과 TCBS 및 SS 배지에서의 colony 성상을 관찰하였다. 모든 시험 배지의 제작은 MacFaddin (2000)의 방법을 따랐다.

4. 16S ribosomal RNA (16S rRNA) 유전자 배열 분석

4.1. 세균의 genomic DNA 분리

시험 균주의 genomic DNA는 DNAzol (GibcoBRL)을 이용하여 분리하였다. 5 ml의 1.5 % NaCl 첨가 TSB에 각각의 균주를 접종하고 27 °C, 12 시간 배양한 후, 5,000 rpm, 5 분간 원심 분리하여 pellet을 취하고 이를 TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.6)에 2 회 세척하였다. 여기에 1 ml의 DNAzol을 넣고 마쇄한 후 실온에서 10,000 rpm으로 10 분간 원심 분리하여 세포벽 잔여물을 제거하였다. 상정액만을 회수하고 100 % ethanol을 첨가하여 genomic DNA를 침전시킨 후 95 % ethanol로 2회 세척한 다음 진공 건조시켰다. 이것을 TE buffer에 재현탁한 후 흡광도 $A_{260/280nm}$ 로 DNA량을 측정하고 최종 농도가 50 ng/ μ l이 되도록 준비하였다.

4.2. 16S rRNA의 cloning

4.2.1. Primer의 설계

The National Center for Biotechnology Information (NCBI)에서 제공되는 BLAST program으로 이미 밝혀져 있는 *V. carchariae* ATCC 35084와 *V. harveyi* ATCC 14126의 16S rRNA의 공통 부분에서 primer SQ 1을 설계하고, primer SQ 1로 PCR한 후 subcloning을 위해 primer SQ 2를 설계하였으며 이를 합성 주문 제작하여 (Bioneer, Korea) cloning에 사용하였다. 이에 사용된 primer의 염기 배열과 예상 증폭 산물의 크기를 Table 2에 나타내었다.

Table 2. Primers used in this study

Primer sets	Target gene	Orient	Oligo sequence	PCR product size (bp)
SQ 1	16S rRNA	Sense	5'-gtttgatcatggetcagatt-3'	1,350
		Antisense	5'-ttactagegattecgaattc-3'	
SQ 2		Sense	5'-cattatttgacgttagcgac-3'	570
		Antisense	5'-tggagttccacccgaagtg-3'	
Discrimination 1	16S rRNA	Sense	5'-cattatttgacgttagcgac-3'	680
		Antisense	5'-tggagttcccgacattactc-3'	
Discrimination 2		Sense	5'-cattatttgacgttagcgac-3'	680
		Antisense	5'-tggagttccacccgaagtg-3'	
Lux 405	Luciferase	Sense	5'-gatgaaagaaggettcaatg-3'	405
		Antisense	5'-ccttttgtttggtcagagtc-3'	
Lux A		Sense	5'-ctactggatcaaagtgtcaaaaggacg-3'	745
		Antisense	5'-tcagaaccgtttgcttcaaaacc-3'	

4.2.2. PCR에 사용된 시약과 PCR 수행

PCR은 templete DNA 50 ng과 각각의 primer 10 pmol씩을 첨가하여 rTaq (TaKaRa) polymerase로 시행하였으며, PCR 수행은 94 ℃, 30 초 동안 denaturation, 55 ℃, 30 초 동안 annealing 후, 72 ℃, 45 초 동안 extention하는 과정을 30 cycles 반복하여 Thermal cycler (Perkin-Elmer)로 하였다. 0.8 % agarose gel을 0.01 % EtBr (1 mg/ml)로 염색하고 100 V에서 30분간 전기영동한 후 UV transilluminator 상에서 확인하고 PCR 산물에 해당하는 부분만 칼로 절취하여 gel의 무게를 측정하였다.

4.2.3. Gel에서 PCR 산물의 추출

Prep-A-Gene DNA purification system (BM)을 사용하여 agarose gel상에서의 PCR 산물을 정제하였다.

4.2.4. PCR 산물의 cloning

pGEM T-easy vector (Promega)를 cloning vector로 사용하여 T₄ ligase로 PCR products와 vector를 연결시켜 재조합된 plasmid DNA를 준비하였다. 이를 -80 °C에서 보관된 40 µℓ의 competent cell (*Escherichia coli*, JM 109)에 1 µℓ의 재조합된 plasmid DNA를 첨가한 후 heat shock method를 이용하여 transformation시켰다. 여기에 1 ml의 LB broth를 첨가하여 37 °C에서 1 시간 배양한 후 Ampicillin (50 µg/ml), X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside, 20 µg/ml) 및 IPTG (Isopropylthio-β-D-galactopyranoside, 20 µg/ml)가 포함된 LB agar (1 % Bacto tryptone, 0.5 % Bacto yeast extract, 1 % NaCl, 1.5 % Agar) 배지에 배양하여 재조합된 white colony를 선별하였다.

4.2.5. 재조합된 plasmid DNA의 추출과 inserted DNA 확인

Ampicillin이 첨가된 LB에 숙주 세포를 배양하여 alkaline lysis법으로 plasmid DNA를 추출하였다. 즉, 세포를 수확하여 lysis buffer [50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA, 5 mg/ml lysozyme]를 200 µℓ 첨가하고 alkaline lysis 용액 (0.2 N NaOH, 1 % SDS)을 400 µℓ 첨가하여 반응시킨 후 7.5 M ammonium acetate (pH 7.6)를 300 µℓ 첨가한 다음, 실온에서 12,000 rpm으로 10분간 원심 분리하였다. 상층액을 분리하여 isopropanol의 양이 0.5 배가 되게 첨가하여 핵산을 침전시킨 후 4 °C에서 원심 분리 (12,000 rpm, 10 분간)함으로써 DNA pellet을 얻었다. 이를 70 % ethanol로 2 회 세척하고 진공 건조시킨 후 RNase (5 mg/ml)를 처리하여 실험에 사용하였다. 100 ng의 재조합된 plasmid DNA를 1 unit의 EcoR

I 으로 절단한 후 inserted DNA의 크기를 0.8 % agarose gel 상에서 전기 영동하여 확인하였다.

4.2.6. DNA sequencing 및 염기 서열의 비교 분석

Plasmid DNA를 추출한 후 Sanger et al. (1977)의 방법에 따라 automatic sequencer (ABI 377, USA)로 sequencing을 실시하였다.

해독한 염기 배열의 조합과 restriction enzyme site를 찾기 위해서 Genetyx program을 사용하였으며, NCBI에서 제공되는 BLAST program으로 이미 밝혀져 있는 균주들의 16S rRNA와 비교 분석하였다.

5. PCR 동정법

생화학적, 유전적으로 매우 유사하여 쉽게 구별이 되지 않는 *Vibrio* 3 종 (*V. harveyi*, *V. alginolyticus* 및 *V. parahaemolyticus*)을 구별하기 위한 PCR 진단법을 개발하기 위하여, 이미 밝혀져 있는 *V. carchariae* ATCC 35084와 *V. harveyi* ATCC 14126의 16S rRNA 유전자 배열에서 primer sets (discrimination 1 and discrimination 2, Table 2)를 제작하여, 시험 균주와 다양한 참조 균주 *Vibrio* strains에서 분리한 DNA를 templet로 PCR을 수행하였으며, PCR에 사용된 참조 균주는 Table 3에 나타내었다. PCR은 annealing 온도 60 °C, 30 cycles로, Perfect PreMix ver. 2.0 (Takara)를 사용하여 수행하였다. 비교 분석에 사용한 isolate A, B, C, D, 및 E는 본 연구실에서 분리하여, 16S rRNA 염기 서열 분석을 통해 각각 *V. alginolyticus*와 *V. parahaemolyticus*로 확인된 균주들이다 (Table 3).

Table 3. Reference strains used in discrimination PCR

Species	Strain	Origin
<i>V. alginolyticus</i>	ATCC 17749	
	KCTC 2928	
	Isolate A	Shrimp, 2001
	Isolate B	Mullet, 2001
	Isolate C	Red seabream, 2001
<i>V. parahaemolyticus</i>	ATCC 33844	
	ATCC 17802	
	Isolate D	Water, 2001
	Isolate E	-

6. 사육 해수 중의 *V. harveyi* 분포

6.1. 시료 채취

양식장의 유입수 및 사육수 중의 세균 수를 측정하기 위해 2004년 5월부터 9월까지 부산 기장군 소재의 육상 넙치 양식장 2 곳 (A와 B)을 대상으로 월 1 회씩 수온을 측정하고 시료를 채취하였다. 두 양식장의 거리는 700 m 정도로 A 양식장이 B 양식장보다 남쪽에 위치하였다. 무균 채수병에 채취된 시료는 냉장 상태로 실험실로 운반하여 유입수 및 사육수의 총세균수, *Vibrio* 속 균수 그리고 *V. harveyi* 균수를 측정하였다.

6.2. 세균수 측정

총세균수의 측정은 Miles and Misra (1938)의 평판 배양법에 따랐다. 유입수 및 사육수의 적정 단계 희석액을 1.5 % NaCl 첨가 TSA 배지에 25 μ l 씩 3 방울을 떨어뜨

린 후, 27 ℃, 24 시간 배양하여 집락을 계수하였다. 균수의 측정은 TCBS 배지에 형성된 yellow 혹은 green colony를 *Vibrio* 속 세균으로 판단하여 계수하였다. 균수는 2 개의 평판에서 자란 집락 계수의 평균값을 취하였다. *V. harveyi* 균수를 측정하기 위해서는 TCBS의 각기 다른 평판에서 1 drop 씩 선택하여, 이 2 drops에 형성된 모든 집락 (50~100 colonies)을 각각 독립적으로 분리하여 1.5 % NaCl 첨가 TSA에 배양하였다. 이들 배양된 균주는 Gram 염색, 운동성과 Oxidase 시험을 통해 *Vibrio* 속임을 재확인한 후, ALO (Arginine dehydrolase, Lysine and Ornithine decarboxylase test) 시험에서 -/+ / +의 결과를 보이는 균주들을 선별하였다. 이들을 생화학적 성상 시험에 의해 *V. harveyi*로 1 차 동정한 후, *V. harveyi* PCR 동정법에 따라 Distrimination 2 primer set를 이용하여 PCR한 후, 증폭 산물이 확인된 것을 *V. harveyi*로 확정하였다.

III. 결과

1. 병원균의 분리

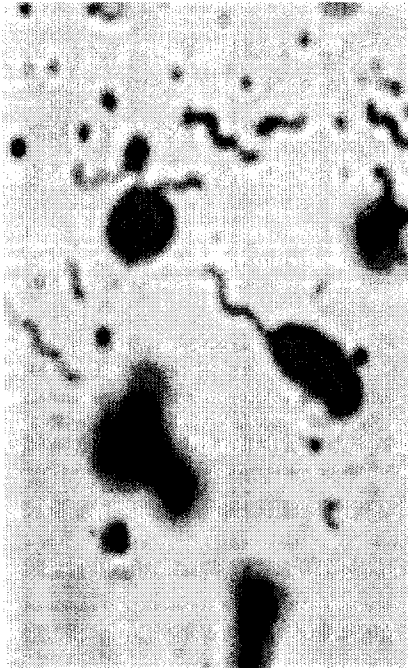
실험에 사용한 분리 균주는 Table 1과 같이 1999년 6월부터 9월까지 경상남북도 및 부산 광역시에 위치한 양식장과 종묘 배양장의 감염어로부터 분리하였다. 모든 분리 균주는 1.5 % NaCl 첨가 TSA에서 swarming하는 특성을 보였으며, 균주에 따라서는 TCBS agar에서 yellow 혹은 green colony를 형성하였다.

2. 분리 균주의 형태학적 특징

실험에 사용한 분리 균주 및 참조 균주는 모두 그람 Gram 음성 간균이었고, 선정된 FF 8, FF 10, FR 1, FR 2 그리고 FT 1을 Gram 염색하여 관찰한 균체의 길이는 각각 $1.46 \pm 0.14 \sim 2.56 \pm 0.9 \mu\text{m}$ 였다.

시험 균주들을 염색하여 광학 현미경과 전자 현미경으로 관찰한 결과, 모두 하나의 편모를 가지고 있었으며, 편모의 길이는 평균 $7.04 \pm 1.43 \mu\text{m}$ 이었다 (Fig. 2).

(a)



(b)



Fig. 2. Morphological properties of the isolates, FF 8. (a) flagella staining ($\times 2,000$); (b) negative staining in TEM.

3. 분리 균주의 생화학적 성상

감염어와 사육수에서 분리한 총 16 균주를 분리 유래와 TCBS 상에서의 특성을 고려하여 5 개의 groups으로 구분하였으며, 이들 각각의 균주에 대한 운동성 시험 및 각종 생화학적 성상 시험 결과를 Table 4에 나타내었다. 분리 균주들은 Gram 음성의 운동성을 가진 균으로, 대부분의 시험에서 균주간의 차이가 없었으나 sorbitol 분해능에서는 차이를 보였다. 조피볼락 유래의 균주들은 참조 균주와 동일하게 음성을 나타내었으나 넙치와 터봇 유래의 균주들은 양성으로 나타났다.

Table 4. Characteristics of the isolated and the reference strains

Item	Isolates					Reference strains	
	Flounder1 (n=7)	Flounder2 (n=4)	Rockfish1 (n=2)	Rockfish2 (n=2)	Turbot (n=1)	ATCC 35084	ATCC 14126
Motility	+	+	+	+	+	+	+
Swarming	+	+	+	+	+	+	+
Luminescence	-	-	-	-	-	-	+
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+
OF	F	F	F	F	F	F	F
TSIA	A/A	K/A	A/A	K/A	Λ/A	A/A	A/A
IMViC	+ / + / - / +	+ / + / - / +	+ / + / - / +	+ / + / - / +	+ / + / - / +	+ / + / - / +	+ / + / - / +
Nitrate	+	+	+	+	+	+	+
ALO	- / + / +	- / + / +	- / + / +	- / + / +	- / + / +	- / + / +	- / + / +
Acid from							
Arabinose	-	-	-	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-
Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-
Fructose	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+
Mannose	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+	+	+	+
Raffinose	-	-	-	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-
Salicin	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+(3)	-	-	+	-	-
Sucrose	+	-	+	-	+	+	+
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+
Xylose	-	-	-	-	-	-	-
ONPG	+	+	+	+	+	+	+
Urea	+	+	+	+	+	+	+
Starch	+	+	+	+	+	+	+
Gelatin	+ ^w	+ ^w	+ ^w	+ ^w	+ ^w	+ ^w	+ ^w
SS/TCBS	+ / Y	+ / G	+ / Y	+ / G	+ / Y	+ / Y	+ / Y

(), responded strain number; ALO, Arginine/Lysine/Ornithine; IMViC, Indole/MR/VP/Simmon’s citrate; (Y), yellow colony; (G), green colony.

4. 분리 균주의 16S rRNA 유전자 배열 분석

분리 균주들의 16S rRNA를 분석하기 위하여, primer SQ 1과 SQ 2를 이용하여 얻은 PCR 산물을 정제한 이후, cloning하여 염기 배열을 밝혔으며 (Fig. 3), 염기 배열 분석에 사용된 분리 균주는 FF 8, FF 10, FR 1, FR 2 그리고 FT 1이었다. 분석된 염기 배열은 GeneBank에 등록되어 있는 ATCC 35084 및 ATCC 14126의 16S rRNA와 비교하였다. 그 결과, 분리 균주들은 참조 균주 ATCC 14126과 99.1 %, ATCC 35084와는 99.9 %의 상동성을 나타내었으며, 특히 1,130 bp 부근의 8 개 염기 배열에서 차이가 나타났다 (Fig. 3, box). Fig. 4는 분리 균주의 16S rRNA 염기 배열과 *Vibrio* 속 세균들과의 계통수를 나타낸 것이다. 분리 균주는 *V. carchariae* 및 *V. trachuri*와 계통 발생학적으로 가장 가까운 것으로 나타났다. *V. trachuri*는 Thompson et al. (2002)에 의해 *V. harveyi*의 junior synonym으로 밝혀진 종이다.

Isolate FF8: 1 primer SQ 1 →
ATCC 35084 : gtttgatcatggctcagattgaacgctggcggcaggccataacacatgcaagtcgagcggg 60
ATCC 14126 : gtttgatcatggctcagattgaacgctggcggcaggccataacacatgcaagtcgagcggg
61 aacgagttatctgaaccttcggggaacgataatggcgtcgagcggcggacgggtgagtaa 120
aacgagttatctgaaccttcggggaacgataacggcgtcgagcggcggacgggtgagtaa
aacgagttatnctgaaccttcggggaacgataacggcgtcgagcggcggacgggtgagtaa
121 tgccctaggaaaatgcccctgatgtgggggataaaccattggaacgatggc taataccgcat 180
tgccctaggaaaatgcccctgatgtgggggataaaccattggaacgatggc taataccgcat
tgccctaggaaaatgcccctgatgtgggggataaaccattggaacgatggc taataccgcat
181 aatacc tacgggtcaaagagggggacccttcgggccctcgcgtcaggatattgcc taggtg 240
aatacc tacgggtcaaagagggggacccttcgggccctcgcgtcaggatattgcc taggtg
aatacc tacgggtcaaagagggggacccttcgggccctcgcgtcaggatattgcc taggtg
241 ggattagctagttggtaggtaattggctcaccaaggcgcagatcccc tagctgggtc tgaga 300
ggattagctagttggtaggtaattggctcaccaaggcgcagatcccc tagctgggtc tgaga
ggattagctagttggtaggtaattggctcaccaaggcgcagatcccc tagctgggtc tgaga
301 ggaatgatcagccacactggaactgagacacggctccagactcc tacgggagggcagcagtg 360
ggaatgatcagccacactggaactgagacacggctccagactcc tacgggagggcagcagtg
ggaatgatcagccacactggaactgagacacggctccagactcc tacgggagggcagcagtg
361 ggaatattgcacaatggcgcaagccctgatgcagccatgccgcgtgtgtgaagaangcc 420
ggaatattgcacaatggcgcaagccctgatgcagccatgccgcgtgtgtgaagaangcc
ggaatattgcacaatggcgcaagccctgatgcagccatgccgcgtgtgtgaagaangcc
421 tcgggttgtaaaacacatttcagtcgtgaggaaggtagtgagttaatagctgcattat 477
tcgggttgtaaaacacatttcagtcgtgaggaaggtagtgagttaatagctgcattat
tcgggttgtaaaacacatttcagtcgtgaggaaggtagtgagttaatagctgcattat
primer SQ 2 →
479 gacgttagcgacagaagaagcaccggcctaacccgtgccagcagccgcggtaatacggag 536
gacgttagcgacagaagaagcaccggcctaacccgtgccagcagccgcggtaatacggag
gacgttagcgacagaagaagcaccggcctaacccgtgccagcagccgcggtaatacggag
537 ggtgcgagcgttaatcggaattactgggcgtaaagcgcatgcaggtgggtttgttaagtca 596
ggtgcgagcgttaatcggaattactgggcgtaaagcgcatgcaggtgggtttgttaagtca
ggtgcgagcgttaatcggaattactgggcgtaaagcgcatgcaggtgggtttgttaagtca
597 gatgtgaaagcccggggc tcaacctcggaatagcatttgaaactggcagactagagtagt 656
gatgtgaaagcccggggc tcaacctcggaatagcatttgaaactggcagactagagtagt
gatgtgaaagcccggggc tcaacctcggaatagcatttgaaactggcagactagagtagt
657 gtagaggggggtagaatttcagggtgtagcgtgaaatgctgtagagatc tgaaggaatacc 716
gtagaggggggtagaatttcagggtgtagcgtgaaatgctgtagagatc tgaaggaatacc
gtagaggggggtagaatttcagggtgtagcgtgaaatgctgtagagatc tgaaggaatacc
717 ggtggcgaagggcagccccctggacagatactgacac tcagatgcgaaagcgtggggagca 776
ggtggcgaagggcagccccctggacagatactgacac tcagatgcgaaagcgtggggagca
ggtggcgaagggcagccccctggacagatactgacac tcagatgcgaaagcgtggggagca
777 aacaggattagataccctggtagtccacgccgtaaacgatgtctacttggaggttgtggc 836
aacaggattagataccctggtagtccacgccgtaaacgatgtctacttggaggttgtggc
aacaggattagataccctggtagtccacgccgtaaacgatgtctacttggaggttgtggc

```

837  cttgagccgtggccttcggagctaaccggttaagtagaccgccctggggagtacggctcgca 896
      cttgagccgtggccttcggagctaaccggttaagtagaccgccctggggagtacggctcgca
      cttgagccgtggccttcggagctaaccggttaagtagaccgccctggggagtacggctcgca

957  agattaaaactcaaatgaattgacgggggcccgcacaaagcggtaggcatgtggtttaat 956
      agattaaaactcaaatgaattgacgggggncgcacaaagcggtaggcatgtggtttaat
      agattaaaactcaaatgaattgacgggggncgcacaaagcggtaggcatgtggtttaat
      *

957  tcgatgcaacgcgaagaaccttacctactcttgacatccagagaaccttccagagatgga 1016
      tcgatgcaacgcgaagaaccttacctactcttgacatccagagaaccttccagagatgga
      tcgatgcaacgcgaagaaccttacctactcttgacatccagagaaccttccagagatgga

1017  ttgggtgccctcgggaactctgagacagggtgctgcatggctgtcgtcagctcgtgttgtga 1076
      ttgggtgccctcgggaactctgagacagggtgctgcatggctgtcgtcagctcgtgttgtga
      ttgggtgcntcgggaactctgagacagggtgctgcatggctgtcgtcagctcgtgttgtga
      *
      primer SQ 2 ←

1077  aatgttgggttaagtcccgcacacgagcgcaacccttatccttgtttgccagcaccttcg-g 1136
      aatgttgggttaagtcccgcacacgagcgcaacccttatccttgtttgccagcaccttcg-g
      aatgttgggttaagtcccgcacacgagcgcaacccttatccttgtttgccagcgagtaatg
      * * * * *

1137  gtgggaactccaggagactgccggtgataaaccggaggaaggtggggacgacgtcaagt 1196
      gtgggaactccaggagactgccggtgataaaccggaggaaggtggggacgacgtcaagt
      tcgggaactccaggagactgccggtgataaaccggaggaaggtggggacgacgtcaagt
      * *

1197  catcatggcccttacgagtagggtacacacgtgctacaatggcgcatacagaggcgcc 1256
      catcatggcccttacgagtagggtacacacgtgctacaatggcgcatacagaggcgcc
      catcatggcccttacgagtagggtacacacgtgctacaatggcgcatacagaggcgcc
      *

1257  caacttgcgagagtgaagcgaatcccaaaaagtgcgtcgtagtcggatcggagctcgcaa 1316
      caacttgcgagagtgaagcgaatcccaaaaagtgcgtcgtagtcggatcggagctcgcaa
      caacttgcgagagtgaagcgaatcccaaaaagtgcgtcgtagtcggatcggagctcgcaa

      primer SQ 1 ←
1317  ctcgactccgtgaagtcggaatcgctagtaa 1349
      ctcgactccgtgaagtcggaatcgctagtaa
      ctcgactccgtgaagtcggaatcgctagtaa

```

Fig. 3. Multiple alignment of the 16S rRNA nucleotide sequences.

*, different nucleotide; shadow region, position of PCR primers; box, particularly different site.



Fig. 4. Phylogenetic tree formed based on 16S rRNA sequences.

FF8, isolated bacterium in this study.

5. *V. harveyi* 동정법

5.1. 생화학적 분류 key

V. harveyi 혹은 *V. carchariae*와 생화학적 특성이 유사하여 구별이 모호한 *V. alginolyticus* 및 *V. parahaemolyticus*를 구별하는 간이 분류 key를 작성하여 Fig. 5에 나타내었다. 이 도표는 본 연구의 결과와 이전 연구 (Qustin and Austin, 1999; Bryant et al., 1986)의 결과를 분석하여, 균주간에 생화학적 성상의 변화가 적은 항목을 대상으로 작성하였으며, 특히 이전의 연구 결과 중에서는 1091 개의 *Vibrio* 균주를 분석하여 균주별 다양성을 비율로 기록한 Bryant et al. (1986)의 보고를 중점적으로 참고하였다.

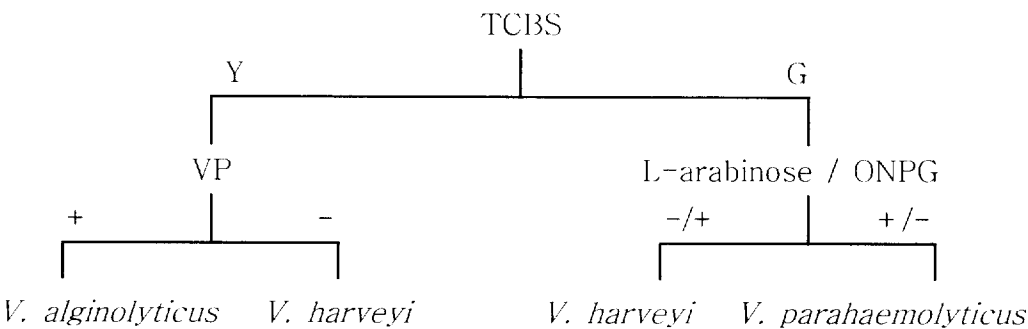


Fig. 5. Rapid identification key for swarming *Vibrio* spp.

ONPG, o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside.

5.2. PCR 동정법

분리 균주들의 동정을 보다 신속하고 정확하게 수행하고자 개발한 PCR 동정법의 결과를 Fig. 6에 나타내었다. Discrimination 1을 primer로 사용한 결과, *V. harveyi* strains를 제외한 모든 균주에서 명확한 band를 형성하였으며 (Fig. 6a), Discrimination 2를 primer로 사용하여 PCR을 수행한 결과, *V. harveyi* strains (Lane 5~11)에서만 band를 형성하였다 (Fig. 6b).

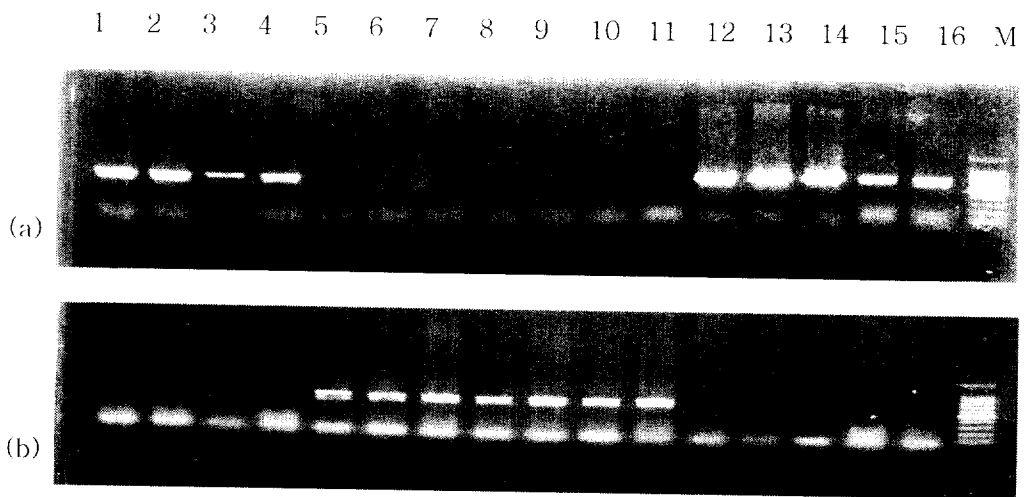


Fig. 6. PCR amplification from nucleic acids of isolates and reference strains with *Vibrio harveyi* specific primer sets Discrimination 1 (a) and Discrimination 2 (b). Lane 1, *V. alginolyticus* ATCC 17749; Lane 2, *V. alginolyticus* KCTC 2928; Lane 3, *V. parahaemolyticus* ATCC 33844; Lane 4, *V. parahaemolyticus* ATCC 17802; Lane 5, *V. harveyi* ATCC 14126; Lane 6, *V. carchariae* ATCC 35084; Lane 7, isolate FF 8; Lane 8, isolate FF 10; Lane 9, isolate FR 1; Lane 10, isolate FR 2; Lane 11, isolate FT 1; Lane 12, isolate A; Lane 13, isolate B; Lane 14, isolate C; Lane 15, isolate D; Lane 16, isolate E; M, 100 bp ladder marker.

6. 사육 해수 중의 *V. harveyi* 분포

부산 광역시 기장군 소재의 양식장 A와 B의 유입수 및 사육수를 채취하여 *Vibrio*에 대한 *V. harveyi*의 출현 비율을 나타내었다 (Table 5). 사육수 중 *V. harveyi*의 분포는 월별로 뚜렷한 경향을 나타내지는 않았으나, 고수온기인 8월과 9월의 사육수 내에서 *V. harveyi*가 차지하는 비율이 A 양식장에서 21.7과 19.6 %, B 양식장에서 24.2와 27.7 %로 현저하게 증가하는 것으로 나타났다.

Table 5. Percentage of the *Vibrio harveyi* to *Vibro* spp. in the supplied and rearing sea water from olive flounder, *Paralichthys olivaceus* culturing farms

Farm	Percentage of <i>V. harveyi</i> to <i>Vibrio</i> spp. (%)					
	May	June	July	Aug	Sept	Oct
A-S	10.7	2.4	16.7	9	3.7	3.5
A-R	10	4.7	9.3	21.7	19.6	9.5
B-S	4.8	10	10	8.3	13	6.5
B-R	3.7	4.3	9.1	24.2	27.7	13.3
Water Temp. (℃)	14.6	20.0	15.6	24.9	22.8	17.6

A, farm A; B, farm B; S, supplied seawate;, R, rearing sea water.

IV. 고찰

V. harveyi 감염의 특징적인 증상은 탈장, 복부 팽만, 장 충혈, 장액 삼출 및 간 출혈 등으로, 이전 연구자들이 *V. carchariae* 감염증에 관해 보고한 것과 유사하였다. Yü et al. (1997)은 grouper, *Epinephelus coioides*의 경우 감염어는 장이 탁하고 노란 액으로 충만된 현상이 특징적인 증상이라고 하였으며, Soffientino et al. (1999)은 summer flounder, *Paralichthys dentatus*에서 감염어의 주 증상이 복부 팽만, 항문 발적, 점액성·출혈성 장액 삼출 등이며 심한 경우에는 탈장 현상이 일어났다고 하였다.

본 실험에서 분리된 균주의 가장 특징적인 성상은 평판 배지 상에서 swarming 운동인데, swarming 운동을 특징으로 하는 *Vibrio* sp.에는 *V. harveyi*, *V. carchariae*, *V. alginolyticus* 및 *V. parahaemolyticus*가 있으나 이들 중 사이에서는 생화학적 성상면에서 일부 당 분해능의 차이를 기준으로 추정 동정이 가능하였다 (Alsina and Blanch, 1994). 그러나, *V. harveyi*와 *V. carchariae*는 생화학적 성상이 같은 group으로 보고되었고 (Grimes et al., 1993), Alsina and Blanch (1994) 역시 2 종을 생화학적으로는 구분하지 못하였다. 또한 이들의 16S rRNA 염기 서열을 밝힌 연구에서 거의 유사한 결과를 보여 이들 종이 매우 밀접한 분류학적 위치에 있음을 밝혔다 (Kita-Tsukamoto et al., 1993; Ruimy et al., 1994). 최근까지, 어류 혹은 새우류에서 일어나는 *Vibrio* sp.에 의한 질병의 원인균을 *V. harveyi* 혹은 *V. carchariae* 중 어느 하나로 나타내고 있었으나, 이들 2 종을 구별하는 명확한 parameter를 찾지 못하였다. 이러한 논란은 Pedersen et al. (1998)이 이들 종의 ribotype을 조사한 결과, 매우 유사함을 밝혀 *V. carchariae*를 *V. harveyi*의 junior synonym으로 규정함에 따라 일단락되었다. 그러나, *V. carchariae*는 주로 어류에서 질병을 일으키고 *V. harveyi*는 새우류를 비롯한 무척추 동물에서 주로 분리되는 것으로 보아, 어병학적 관점에서 이들 2

종간의 관계를 재해석할 필요성이 있는 것으로 생각된다. 뿐만 아니라 luminescence 양성인 *V. harveyi*와 non-luminescence *V. harveyi* (종전의 *V. carchariae*)는 미생물학적 관점에서도 엄격히 다른 유전형과 표현형을 가진다고 판단되었다. 따라서 본 연구에서는 분리된 시험 균주와 서로 다른 성상을 지닌 2 개의 *V. harveyi* 참조 균주 (ATCC 35084 and ATCC 14126)를 분양받아, 그 특성을 비교 검토하였다. 분양받은 균주는 분양 당시까지도 ATCC 35084는 *V. carchariae*로, ATCC 14126은 *V. harveyi*라는 학명을 사용하고 있었으므로 본 실험에서는 후자를 전형적인 *V. harveyi*로 판단하였다.

본 연구에서 분리 균주의 16S rRNA 염기 배열을 분석한 결과, *V. harveyi* ATCC 14126 strain과는 99.1 %, *V. harveyi* ATCC 35084 strain (*V. carchariae* type strain)과는 99.9 %의 상동성을 보여, *V. carchariae* type인 것으로 나타났으며, 이러한 결과는 16S rRNA 결과를 계통수로 나타내었을 때 더욱 명확히 드러났다. 계통수에서 본 분리 균주와 동일한 것으로 나타난 *V. trachuri*는 Thompson et al. (2002)에 의해 *V. harveyi*의 junior synonym으로 밝혀진 종이다.

전형적인 *V. harveyi*는 luminous marine bacteria로서 1936년 Johnson and Shunk에 의해 처음으로 보고될 때에는 *Achromobacter harveyi*로 분류되었고, 1973년에는 *Beneckea harveyi* (Reichelt and Baumann, 1973) 혹은 *Lucibacterium harveyi* (Hendrie et al., 1970)으로 명명되었으며, 1980년 Baumann et al.에 의해 *V. harveyi*로 처음 명명된 후, 1981년에 공식 명칭으로 인정받았다 (Baumann et al., 1981). *V. harveyi*는 온대 해수와 저질에 편재하며 해수 척추 동물 및 무척추 동물의 장내 세균총의 하나로서 (Ruby and Morin, 1979), 일반적으로 어류나 척추 동물에는 병원성이 없으나 shellfish에서는 대량 폐사를 야기하는 것으로 알려져 왔다 (Karunasager et al., 1994; Liu et al., 1996; Pass et al., 1987).

이에 비해 *V. carchariae*는 1982년 폐사한 brown shark, *Carcharhinus plumbeus*에서

분리되어 (Grimes et al., 1984b), 1985년에 정식 학명으로 인정받은 이후 (Grimes et al., 1985), lemon shark, *Negraprion brevirostris* (Colwell and Grimes, 1984) 이외에는 별다른 보고가 없었으나 1990년대에 접어들면서 grouper, *Epinephelus coioides* (Leong and Wong, 1993; Yii et al., 1997), 홍민어, *Sciaenops ocellatus* (Liu et al., 2003), 넙치, *Paralichthys dentatus* (Soffientino et al., 1999) 등의 다양한 어종에서 대량 폐사를 유발하는 세균으로 보고되고 있다. 특히 최근에는 우리 나라와 인접한 대만, 중국 및 일본에서의 발병 사례가 보고되어 (Liu et al., 2003; Nishimori et al., 1998), 우리 나라에서도 *V. harveyi*의 발병 및 분포 현황에 대한 조사가 시급한 실정이다.

*V. harveyi*의 현황 파악을 위해서는 신속·정확한 진단 기법이 전제되어야 하나, *Vibrio* 속 내에서의 동정은 비교적 까다로운 편이어서 간편한 동정법이 없는 실정이다. 다행히 Alsina and Blanch (1994)의 Arginine/Lysine/Ornithine을 이용한 분류 기준을 이용하면, *V. harveyi* group (*V. harveyi*, *V. carchariae*, *V. alginolyticus* 및 *V. parahaemolyticus*)으로의 동정은 비교적 쉽게 이루어지지만, 이들 group에 속하는 세균 간의 구분에 사용된 당 분해능들은 연구자들이나 균주 간의 다양성이 커서 구분이 모호하고 유전학적으로도 매우 유사하여 분자 생물학적 신속 진단 또한 힘든 상황이다. 따라서 본 연구에서는 이들 group 내의 구분이 가능한 시험 항목을 정하기 위해, 이들 세균의 생화학적 분석 자료들 (Austin and Austin, 1999; Bryant et al., 1986)과 본 연구의 결과를 재검토하여, 연구자나 균주에 따른 차이가 거의 없는 VP, L-arabinose 및 ONPG를 분류 key로 제시하였다. *V. harveyi*와 *V. alginolyticus*의 구분에 유용한 VP test는 양성 반응의 비율이 전자는 0 %, 후자는 89 %로 보고 되었으며, *V. harveyi*와 *V. parahaemolyticus*의 구분에 유용한 L-arabinose와 ONPG의 양성 반응 비율이 전자의 경우는 각각 0과 83 %, 후자의 경우는 각각 70과 8 %로 보고 되었다 (Bryant et al., 1986). 이와 같이 본 연구에서 제시한 생화학적 진단 key를 사용할 경우, 일부 다양성이 큰 균주를 제외한 대부분의 균주에서는 정확성이 높은 추

정 동정이 가능할 것으로 판단된다.

Vibrio sp.의 분류에 유전학적 방법을 이용한 연구는 16S rRNA 유전자와 16S-23S rRNA intergenic spacers 유전자의 특이 primer를 이용한 PCR법 (Maeda et al., 2000; Maeda et al., 2003), ribonuclease P RNA의 구조를 분석하여 동정하는 방법 (Maeda et al., 2001) 등 많은 보고가 있다. 그러나, 이런 연구들도 *V. harveyi*, *V. carchariae*, *V. alginolyticus* 및 *V. parahaemolyticus*의 유전학적 상동성이 너무 높아, 구별에 어려움이 많으므로 동일 group에 속하는 것으로 결론지었다. 이에 본 연구에서는 이들 group의 구분을 가능하게 하는 primer를 찾기 위하여 이들 4 종의 16S rRNA 염기 서열을 NCBI에서 제공되는 BLAST program으로 비교 분석하여, 상이한 부분에서 5 개의 primer sets를 제작하였다. 이 중 3 개의 primer sets는 4 종에서 모두 나타난 반면, 본 연구에 사용한 Discrimination 1은 *V. alginolyticus*와 *V. parahaemolyticus*만을 특이적으로, Discrimination 2는 *V. harveyi*와 *V. carchariae*만을 특이적으로 증폭한다는 것을 밝혀, *V. harveyi*의 신속 동정이 가능하다고 판단하였다. Oakey et al. (2003)이 이전에 *V. harveyi*의 신속 동정을 위한 primer를 개발하였으나, 본 연구 결과와 달리, 일부 *V. alginolyticus*와 균주에 대해서도 양성 반응이 나타났다고 하였다. 따라서, 본 연구에서 제안한 생화학 분류 key와 PCR 동정법을 함께 사용할 경우, 신속하고 정확한 동정이 가능할 것으로 생각된다.

본 연구에서, *Vibrio* 균수 중 *V. harveyi*가 차지하는 비율을 조사한 결과, 8, 9월에 급격히 증가하는 것을 관찰하였다. 이러한 현상은 Maeda et al. (2003)이 일본 해안 *Vibrio* spp.의 계절적 변화를 나타낸 보고에서, *V. harveyi* group (*V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. campbellii* 및 *V. natriegens*)이 저수온기 (12~4월)에는 거의 나타나지 않다가 7, 8월에 증가하여 9월에는 *Vibrio* sp. 중 거의 대부분을 점할 정도로 비율이 높아진다고 한 결과와 일치하였다. 본 연구 결과에서 특히 사육수에서 *V. harveyi*의 출현 비율이 급격히 증가하였는데, 이러한 현상은 고수온기에 *V.*

*harveyi*에 의한 발병이 증가하는 1차 원인과 연관성이 깊을 것으로 생각된다.

이상에서, 우리 나라 양식 해수어에 감염되는 *V. harveyi*를 처음으로 분리·동정하고 이들의 신속한 동정을 위한 key를 제안하였다.

V. 요약

1. 최근 몇 년에 걸쳐, 동해 및 남해안 지역의 해수어 양식장에서 탈장, 복부 팽만, 장 출혈, 장액 삼출 등의 주증상을 나타내며 폐사하는 세균성 질병이 빈번히 발생하고 있다.
2. 이러한 질병의 증상을 나타내는 어류에서 분리한 병원체를 생화학, 형태학 및 유전학적으로 분석한 결과, *V. carchariae* type strain과 거의 동일한 *V. harveyi*임을 밝혔다.
3. *V. harveyi*의 간편하고 신속한 동정을 위해, 생화학적 동정 key와 16S rRNA 유전자의 특이 primer를 이용한 동정법을 제시하였다.
4. *V. harveyi*는 우리 나라 넙치 양식장 사육 해수에서 지속적으로 분리되었으며, 고수온기인 8, 9월에 출현 비율이 급증하였다.

제 2장 *Vibrio harveyi*의 미생물학적 특성

I. 서론

*V. harveyi*의 대표적인 특성으로서는 luminescence와 swarming 운동을 들 수 있으며 이 외에도 독특한 미생물학적 성상을 나타내기 때문에 병원 미생물학적 뿐만 아니라, 이 세균에서 볼 수 있는 다양한 연구가 많이 이루어져 있다.

Luminescence는 새우류 유래의 균주 혹은 *V. harveyi* type에서만 알려져 있는 특징이며 심하게 감염된 새우에서 체표 발광을 관찰할 수 있을 정도 (Karunasagar et al., 1994; Liu et al., 1996)로 생물 발광능이 매우 강하다. Swarming 운동을 하는 *Vibrio* 속 세균에는 *V. harveyi* 이외에도 *V. parahaemolyticus*와 *V. alginolyticus* 등이 알려져 있으나, swarming 운동에 관한 연구는 대부분 *V. parahaemolyticus*와 *V. alginolyticus*에 집중되어 있으며 (Ultizur and Kessel, 1975), *V. harveyi*에 대해서는 그다지 연구된 바가 없다. 한편 이와는 달리 swarming 운동을 하지 않는 *V. harveyi*에 관한 연구 결과도 보고되고 있어서 (Abraham and Manley, 1995; Saeed, 1995), 적어도 *V. harveyi*는 균주에 따라 swarming 운동성에 차이가 있을 것으로 예상된다. *V. harveyi*의 물리적인 환경에 대한 적응능을 보면, 염분 농도는 0.5 ~ 8 %, 온도 범위는 40 °C 미만에서 성장할 수 있다 (Ortigosa et al., 1994). 그러나 이들 연구는 특정 조건에서의 성장 유무만을 조사하였을 뿐, 어병 미생물학적으로 중요시되는 구체적인 연구는 부족한 실정이다. 미생물학적 특성의 하나인 세균의 protein patterns에 관한 연구는 미생물의 동정이나 면역학적인 기초 자료로서 필요한 정보를 갖고 있다. 이 세균의 균체 단백질 SDS-PAGE 분석을 통해 52 kDa 그리고 ECPs 단백질은 34 kDa의 major protein을 가지고 있음이 밝혀져 있으며 (Pizzutto and Hirst, 1995; Zhang and Austin, 2000), ECPs의 주요 protease 성분은 cysteine protease와 serine protease로

알려져 있다 (Lee et al., 2002; Liu et al., 1997). 그렇지만 swarming *Vibrio*의 항원성에 관한 연구 결과는 lateral flagella와 polar flagella의 항원성이 다르다는 사실 (Shinoda et al., 1992)이 알려져 있는 데 불과하며, *V. harveyi*의 항원성에 관해서는 균체의 형태가 배양 조건에 따라 다양하게 변하기 때문인지 매우 미미한 실정이다.

이상과 같이, *V. harveyi*의 여러 가지 세균학적 특성에 관한 연구가 지속되고 있으나, 대부분 실험 조건이 다르고 단편적인 연구에 그치고 있어서, *V. harveyi*의 특성에 관한 체계적인 연구가 필요하다.

본 연구에서는 *V. harveyi*의 미생물학적 특성과 균체 배양에 따른 ECPs의 특성 등에 관한 연구를 통하여 어병 세균학적 특성을 알아보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. *V. harveyi*의 성장 조건

1.1. 염분 농도 및 시간별 발육 시험

참조 균주와 선정된 5 개의 분리 균주를 대상으로 염분 농도에 따른 발육 특성을 조사하였다. 1 % pepton이 든 alkali-pepton water 기초 배지에 NaCl을 0, 0.5, 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9 % 되게 첨가한 시험 배지 10 ml씩 준비하고, 1.5 % NaCl 첨가 TSA 배지에서 27 ℃로 24 시간 배양한 후, 멸균 생리 식염수로 OD₆₀₀ = 0.8이 되게 조정된 각각의 시험 균주를 100 µl씩 접종한 후 0, 12, 24, 48, 72, 96 시간째에 600 nm에서 흡광도를 측정하였다.

1.2. 배양 온도 및 시간별 발육 시험

배양 온도 및 시간에 따른 발육 특성을 조사하기 위하여 2 가지 시험을 실시하였다. 먼저, 5 개의 분리 균주와 참조 균주를 조사하기 위해 3 % NaCl이 첨가된 alkali-peptone water에 염분 농도별 발육 시험과 동일한 방법으로 각각의 시험균을 접종하여 72 시간 후, 배양 정도를 육안적인 혼탁도로 관찰하여 -, +, ++로 나타내었다. 또한 *V. harveyi*와 다른 세균들이 배양 온도에 따른 발육 속도의 차이를 조사하기 위하여, *V. harveyi* 균주 중에서는 ATCC 35084와 FR 2를 선정하였고, 비교 균주로 *V. anguillarum* ATCC 19264, *V. alginolyticus* ATCC 17749, *V. parahaemolyticus* ATCC 33844 그리고 *V. fultuvialis* ATCC 33809를 선정하여 염분 농도별 발육 시험과 동일한 방법으로 실험하였다.

2. 약제 감수성 시험

5 개의 분리 균주와 2 개의 참조 균주에 대한 약제 감수성 시험을 디스크 확산법으로 시행하였다. Muller-Hinton agar plate에 27 °C, 24 시간 배양된 균주들을 멸균 생리 식염수에 희석한 다음 이를 멸균 삼각 유리병으로 배지에 균등하게 도말한 후, 약제 디스크 (BBL)를 일정 간격으로 얹었다. 이 배지를 27 °C, 24 시간 배양한 후, 형성된 저지대의 지름을 측정하여 감수성의 정도를 Susceptible, Intermediate 그리고 Resistant로 구별하였다. 실험에 사용된 약제는 Tetracycline, Nalidixic acid, Chloramphenicol, Kanamycin, Erythromycin, Neomycin, Gentamicin, Novobiocin, Ampicillin 및 Trimethoprim/Sulfamethoxazole이었다.

3. *V. harveyi* extracellular products (ECPs)의 특성

3.1. *V. harveyi* ECPs 생성의 최적 조건

3.1.1. ECPs의 추출 및 단백질 정량

시험균의 ECPs 추출은 Zhang and Austin (2000)에 의한 cellophane overlay 방법을 사용하였다. 미리 제작된 1.5 % NaCl 첨가 TSA 위에 121 °C, 15 분간 멸균된 cellophane membrane을 얹고, TSB에 24 시간 동안 전배양된 균액 200 μ l를 멸균 삼각 유리병으로 고르게 도말하였다. 시험균이 접종된 배지를 25 °C, 24 시간 배양한 후, cellophane membrane을 새로운 petridish에 옮기고 0.1 M phosphate buffer solution (PBS, pH 7.4) 2 ml로 세척하여 모았다. 이 현탁액을 4 °C, 20,000 $\times$ g, 30 분간 원심 분리하여 상정액을 분리하였으며, 이를 0.22 μ m pore size의 syringe filter (Corning Inc.)로 여과한 것을 ECPs 액으로 사용하였다.

추출된 ECPs의 단백질 농도는 Bovine serum albumin (BSA, Sigma)을 표준으로 하여 Bradford 법 (1976)으로 측정하고 -20 °C에서 보관하며 실험에 사용하였다.

3.1.2. Proteolytic activity

ECPs의 proteolytic activity는 azocasein (Sigma)을 기질로 사용한 Austin et al. (1998)의 방법에 따랐다. 0.1 M PBS (pH 7.2)에 녹인 1 % azocasein 용액 450 μl 와 ECPs 50 μl 를 혼합하여 27 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30 분간 배양한 후, 10 % trichloroacetic acid (TCA, Sigma) 0.5 ml을 넣고 반응을 중지시켰다. 30 분 후, 원심 분리 ($14,000 \times g$, 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$)하여 상정액으로부터 0.5 ml을 취한 다음 1 M sodium hydroxide 0.5 ml과 혼합한 후, A_{450} 으로 측정하였다 (Pharmacia). casein 1 unit는 흡광도 값이 0.001 증가한 것으로 정의하였다.

3.1.3. 실험 조건

V. harveyi ECPs 생성의 적정 조건을 알아보기 위하여, 염분 농도, 배양 온도, 배양 배지 및 pH의 조건을 변화시키면서 ECPs 활성과 단백질량을 측정하였다. 염분 농도는 TSA 배지에 최종 농도가 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 및 4 % (w/v)가 되도록 NaCl을 첨가하여 25 $^{\circ}\text{C}$ 에서 18, 24, 48, 72 시간 경과 시간별로 조사하였다. 배양 온도에 따른 영향을 관찰하기 위해서는 20, 25 및 30 $^{\circ}\text{C}$ 조건에서, 배양 배지에 따른 영향을 분석하기 위해서는 Marine agar (MA), thiosulfate bile salts sucrose (TCBS), 1.5 % NaCl 첨가 brain heart infusion agar (BHIA), 1.5 % NaCl 첨가 nutrient agar (NA) 및 1.5 % NaCl 첨가 TSA에 접종하여 24 시간 배양 후 측정하였다. pH에 따른 영향은 1.5 % NaCl 첨가 TSA 배지에서 24 시간 배양한 후, pH 4, 5, 6, 7, 8 및 9로 조정된 0.1 M PBS를 사용하여 ECPs를 추출하여 측정하였다.

3.2. Protease inhibitors에 대한 억제 효과

V. harveyi ECPs에 대한 각종 억제제들의 영향을 알아보기 위하여 이미 알려져 있는 aspartic 억제제인 pepstatin (50~100 μM), 비가역적 (irreversible) cysteine 억제제인 trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino) butane (E-64, 5~20 μM), 비가역적

serine 억제제인 phenyl-methanesulfonyl fluoride (PMSF, 1~2 mM) 및 chelating 화합물로 metallo protease 억제제인 1,10-Phenanthroline (1~2 mM)과 ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA, 5~10 μ M)을 각각의 ECPs 시료와 혼합하여 25 °C에서 30 분간 전배양한 후, azocaseine을 이용하여 ECPs 활성의 정도를 측정하였다.

3.3. 열 감수성 시험

V. harveyi ECPs protease의 열에 대한 감수성을 조사하기 위하여, 각각의 ECPs 시료를 60 °C에서 30 분간 가열한 후, azocaseine을 이용하여 ECPs 활성을 측정하였다.

4. Swarming 운동성

*V. harveyi*의 swarming 운동성을 측정하기 위하여, 먼저 NaCl 최종 농도가 0.5, 0.75, 1, 1.25, 2, 3, 5, 7 %가 되도록 조정된 TSA에 각각의 균주를 희석 도말 배양하여 27 °C에서 24 시간 배양하였다. 결과의 판정은 세균의 집락이 배지에 퍼지는 정도에 따라 +, ++, +++ 등으로 표시하였다. 또한 broth 배지 상에서 swarming 운동을 할 때와 plate 배지 상에서 swarming 운동을 할 때의 편모 변화를 관찰하기 위하여, 각각의 균주를 1.5% NaCl 첨가 TSB 배지와 1.5 % NaCl 첨가 TSA 배지에 배양한 후, Gram stain, Flagella stain 및 TEM의 negative stain으로 관찰하였으며, 시료 준비 및 관찰 방법은 1장의 형태학적 관찰에서 기술한 방법과 동일하게 실시하였다.

5. Luminescence 시험

5.1. Luminometer에서의 측정

1.5 % NaCl 첨가 TSB에 27 °C, 24 시간 배양된 시험균 현탁액을 TSB에 2 배 희석한 후 96 well plate에 200 μ l씩 넣고 접종하지 않은 TSB를 blank로 하여 Lumi-counter (Packard)로 발광량을 측정하였다.

5.2. Luciferase gene 검출

세균의 luminescence 반응을 유도하는 luciferase의 존재 유무를 조사하기 위하여 *V. harveyi* ATCC 14126의 luciferase alpha subunit (LuxA) gene에서 제작한 lux 405와 Wimpee et al. (1991)이 제작하여 luminous *Vibrio*의 검출에 사용한 lux A를 primer로 사용하였다 (Table 2). PCR 수행은 모든 시험 균주에서 분리한 genomic DNA를 template로 cloning 할 때와 동일한 조건으로 하였다.

6. SDS-PAGE

V. harveyi 균주의 단백질 pattern을 분석하기 위하여, 각각의 준비된 시료로 SDS-PAGE를 실시하였다 (Laemmli, 1970).

Whole-cell lysates의 SDS-PAGE를 위해, 5 ml의 1.5 % NaCl 첨가 TSB에 각각의 균주를 27 °C, 12 시간 배양하여 이를 집균한 후 멸균 증류수에 1회 세척하였다. 세균의 pellet을 150 µl의 sample lysis buffer (0.12 M Tris-HCl, 4 % SDS, 20 % glycerol, 5 mM 2-mercaptoethanol)에 현탁하여 100 °C에 7 분간 가열한 후 동량의 멸균 증류수를 첨가한 다음, 다시 100 °C에 5 분간 가열하여 변성시켰다. *V. harveyi* ECPs의 SDS-PAGE를 위해, 앞에서 분리된 ECPs를 5 × sample lysis buffer와 1 : 4로 희석하여 상기한 방법과 동일하게 가열 변성시켰다. 각각의 sample을 1.5 mm 두께의 10 % SDS-polyacrylamide gel에 20 µl씩 loading하고 25 mA로 3 시간 동안 전기영동하였다. 전개가 완료된 gel은 Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하고 탈색하여 band를 확인하였다.

III. 결과

1. *V. harveyi*의 성장 조건

1.1. 염분 농도 및 배양 시간

염분 농도를 0~9 %로 조절한 alkali-pepton water에 *V. harveyi* ATCC35084를 배양한 결과를 Fig. 7에 나타내었다. 72 시간 배양 시험 결과, 염분 농도 0, 8 및 9 % 시험구에서는 세균의 성장을 관찰하지 못하였으나 그 외에 모든 염분 농도에서는 성장을 보였으며, 가장 높은 성장률은 염분 농도 3 % 시험구이었다. 배양 시간에 따른 세균의 증식률은 48 시간까지 지속적으로 증가하다가 72 시간째에 급격히 증가한 후, 96 시간째에는 완만히 증가하거나 비슷하게 유지되었다.

이러한 결과는 5 개의 분리 균주와 2 개의 참조 균주 모두에서 유사한 경향을 보였다.

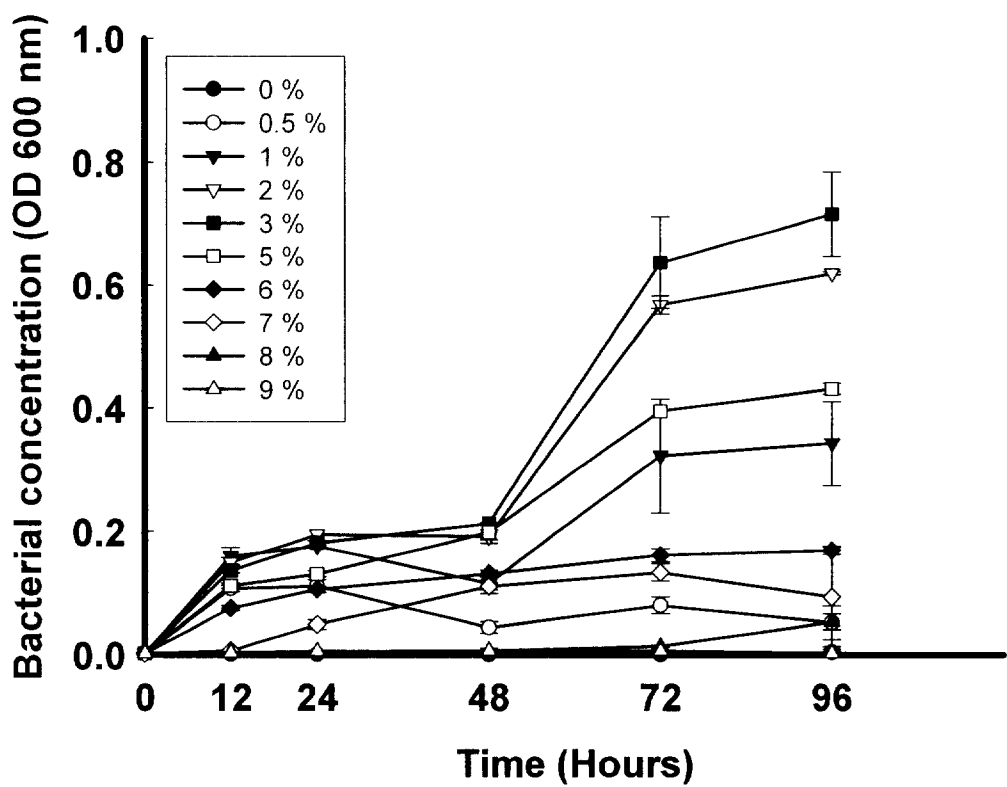


Fig. 7. The effects of NaCl concentration in the alkali-peptone water on the growth of the *Vibrio harveyi* ATCC 35084 at 25 °C.

1.2. 배양 온도

*V. harveyi*의 성장에 배양 온도가 미치는 영향을 조사하기 위하여, 3 % NaCl 첨가 alkali-peptone water에 배양된 각각의 균주를 4, 10, 15, 27, 37 및 40 °C에서 72 시간 배양하였다. *V. harveyi* 성장에 최적인 온도는 27 °C로 나타났으며, 15~37 °C 범위 내에서 성장이 가능한 것으로 나타났다 (Table 6).

*V. harveyi*의 온도별 성장 정도를 다른 세균과 비교한 결과, *V. alginolyticus*가 27과 30 °C에서 급격히 증식하는 것을 제외하고는 유사한 성장률을 보였다 (Fig. 8).

Table 6. The effects of temperature in the 3 % NaCl added alkali-peptone water on the growth of *V. harveyi*

Temperature (°C)	Isolates					Reference strains	
	FF 8	FF 10	FR 1	FR 2	FT 1	ATCC 35084	ATCC 14126
4	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-
15	+	+	+	+	+	+	+
27	++	++	++	++	++	++	++
37	+	+	+	+	+	+	+
40	-	-	-	-	-	-	-

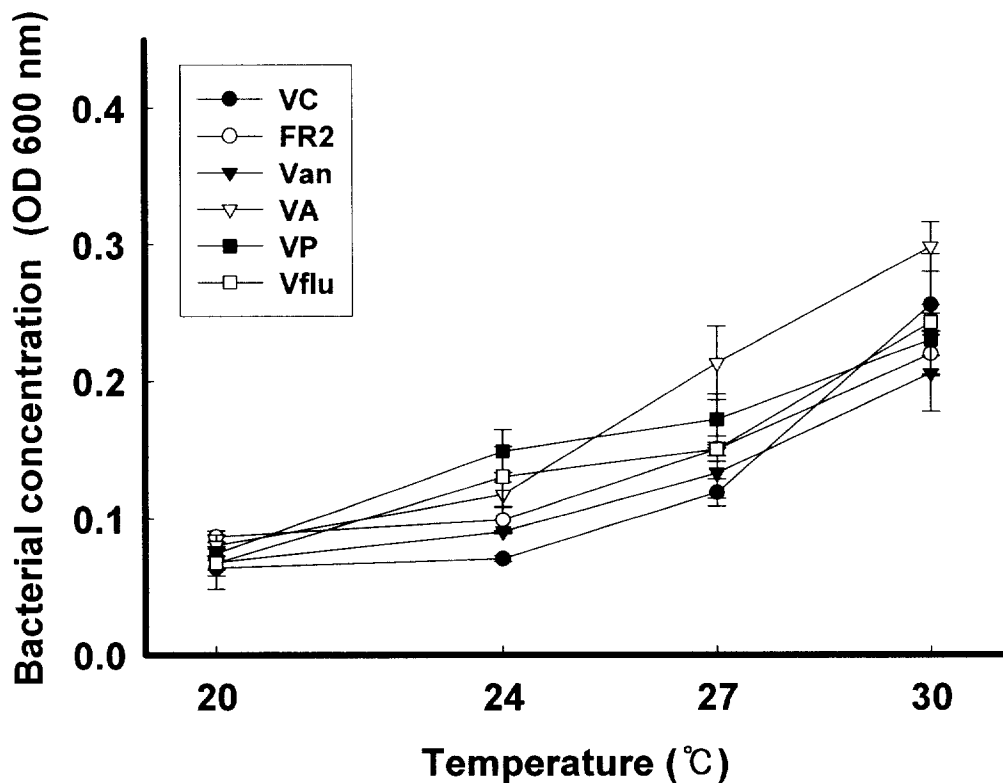


Fig. 8. The effects of temperature in the alkali-peptone water on the growth of several bacteria for 72 h. VC, *V. harveyi* ATCC 35084; FR 2, *V. harveyi* isolate; Van, *V. anguillarum* ATCC 19264; VA, *V. alginolyticus* ATCC 17749; VP, *V. parahaemolyticus* ATCC 33844; Vflu, *V. fluvialis* ATCC 33809.

2. 약제 감수성

Table 7에는 5개의 분리 균주와 2 개의 참조 균주에 대한 약제 감수성 시험 결과를 나타내었다. 모든 시험 균주가 Tetracycline, Nalidixic acid, Chloramphenicol 및 Trimethoprim/Sulfamethoxazole에 대해서는 강한 감수성을 나타내었으며, 기타 약제에 대해서는 시험 균주에 따라 반응성의 차이를 보였다. 그리고 Ampicillin에 대해서는 모든 시험 균주가 저항성을 가지고 있는 것으로 나타났다.

Table 7. Susceptibility of the isolates and the reference strains to antibiotic agents

Antibiotics	Susceptibility of the surveyed strains						ATCC 35084	ATCC 14126
	FF 8	FF 10	FR 1	FR 2	FT 1			
Tetracycline (30 μ g)	S	S	S	S	S	S	S	S
Nalidixic acid (30 μ g)	S	S	S	S	S	S	S	S
Chloramphenicol (30 μ g)	S	S	S	S	S	S	S	S
Kanamycin (30 μ g)	S	I	I	I	I	S	I	I
Erythromycin (15 μ g)	I	I	I	I	I	I	I	I
Neomycin (30 μ g)	S	I	I	S	S	S	S	S
Gentamicin (120 μ g)	S	I	S	S	S	S	S	S
Novobiocin (30 μ g)	I	I	I	I	R	I	R	R
Ampicillin (10 μ g)	R	R	R	R	R	R	R	R
Trimethoprim/ Sulfamethoxazole (12.5/23.75 μ g)	S	S	S	S	S	S	S	S

S, Susceptible; R, Resistant; I, Intermediate.

3. *V. harveyi* ECPs의 특성

3.1. *V. harveyi* ECPs 생성의 적정 조건

3.1.1. 염분 농도 및 배양 시간

V. harveyi ECPs 생성에 염분 농도와 배양 시간이 미치는 영향을 ECPs 활성과 단백질 양을 기준으로 분석한 결과를 Fig. 9에 나타내었다.

ECPs 활성이 가장 높은 조건은 2 % NaCl 농도에서 24 시간 배양한 시험구이었으며, 이 조건에서 멀어질수록 활성이 조금씩 감소하는 경향을 보였다. 이에 비해 단백질 양의 측정 결과에서는 염분 농도에 따른 뚜렷한 변화가 관찰되지 않았으나 배양 시간에 따라 차이가 나타나 48 시간째에 가장 많은 단백질을 생산하였으며, 72 시간째가 뒤를 이었다.

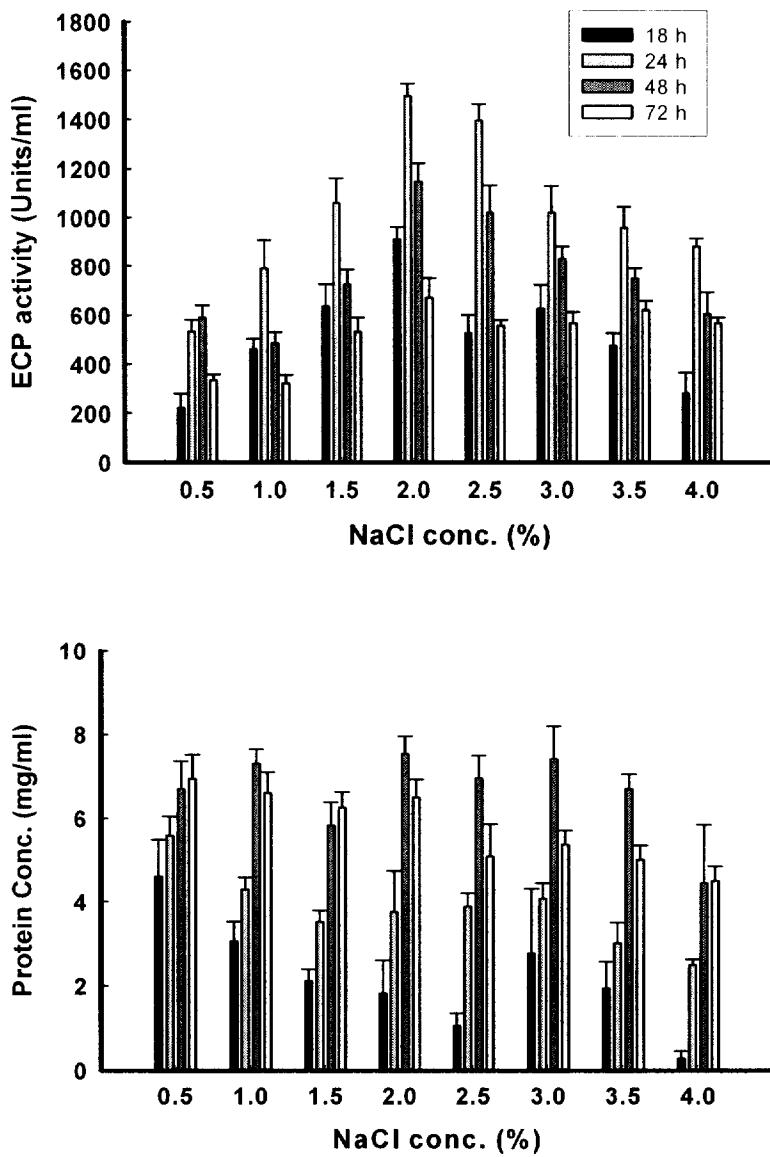


Fig. 9. Effects of NaCl concentration on the production of *Vibrio harveyi* ECPs in the tryptic soy agar. Activity of ECPs was detected by azocaseine method. Protein concentration in the ECPs was measured by Bradford method.

3.1.2. 배양 온도 및 배양 배지

V. harveyi ECPs 생성에 배양 온도와 배양 배지가 미치는 영향을 ECPs 활성과 단백질 양 측정으로 분석하여 그 결과를 Fig. 10에 나타내었다.

V. harveyi ECPs는 1.5 % NaCl 첨가 TSA (ST) 배지에서 25 ℃로 배양할 때 가장 높은 활성을 나타내었다. 그러나 단백질 생성량은 TCBS에서 현저히 높게 나타났으며, 다음으로 ST에서 비교적 높게 나타났다.

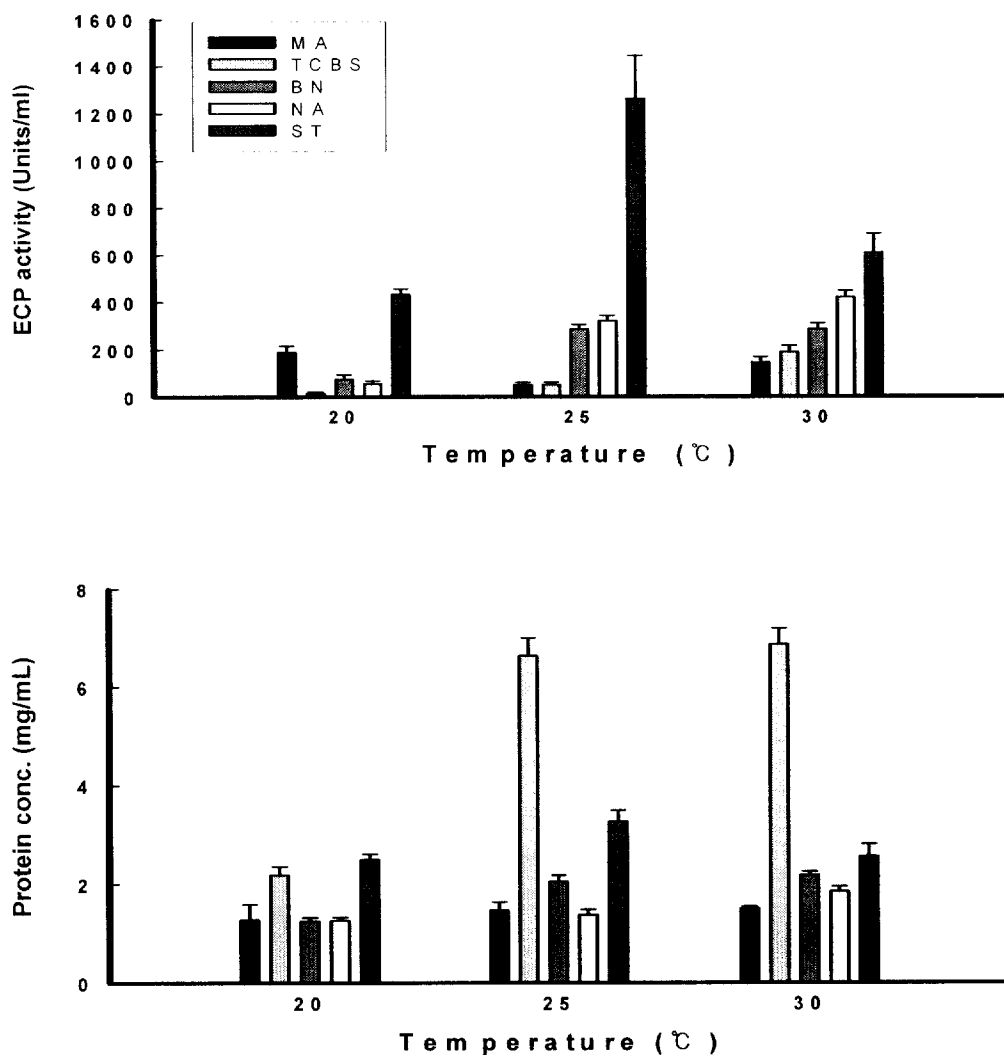


Fig. 10. Effects of temperature and media on the production of *Vibrio harveyi* ECPs. ECPs activity was detected by azocaseine method. Protein concentration was measured by Bradford method. MA, marine agar; BN, 1.5 % NaCl added BHIA; NA, 1.5 % NaCl added nutrient agar; ST, 1.5 % NaCl added TSA.

3.1.3. pH

V. harveyi ECPs 생성에 pH가 미치는 영향의 시험 결과를 Fig. 11에 나타내었다. ECPs 활성은 pH 8에서 최고치를 보였으며, pH 4에서는 활성이 완전히 소실되는 것으로 나타났다.

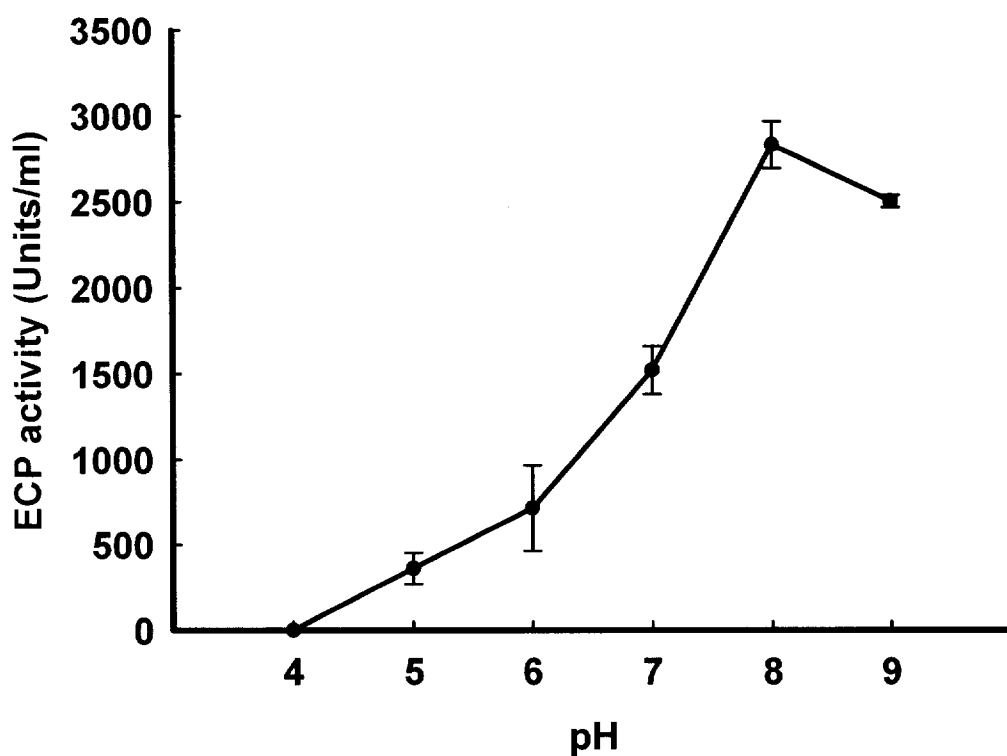


Fig. 11. Effects of pH on the production of *Vibrio harveyi* ECPs. The applied buffer was 0.1 M PBS (pH 4.0 to 9.0). Azocasein was used as substrate.

3.2. 열 감수성

V. harveyi ECPs의 열에 대한 안정성을 조사하기 위하여 60 ℃에서 30 분간 가열한 후, ECPs의 활성을 측정하였다 (Table 8). 모든 시험 균주의 ECPs가 가열 후에 현저히 낮은 활성을 나타냈으며, 특히 5 개의 분리 균주는 0.2~1.1 % 수준까지 활성이 감소되었다.

Table 8. Sensitivity of *Vibrio harveyi* ECPs activity on heat-treatment at 60 ℃ for 30 min

Strains	ECPs activity	
	Control	Heat-treatment (%)
FF 8	19475±787	67±11.5 (0.34)
FF 10	16685±1373	33±11.5 (0.2)
FR 1	16065±687	87±11.5 (0.54)
FR 2	14285±568	153±11.5 (1.07)
FT 1	21265±1331	173±30.6 (0.81)
ATCC 35084	845±44	53±11.5 (6.27)
ATCC 14126	460±71	47±28.1 (10.22)

(), Percentage of the remained ECPs activity.

3.3. *V. harveyi* ECPs에 대한 protease inhibitor 검색

V. harveyi ECPs의 활성을 저해하는 인자를 검색하기 위해, cysteine protease inhibitor인 E-64, metalloprotease inhibitor인 EDTA 및 1,10-PAM, aspartic protease inhibitor인 pepstatin A, 그리고 serine protease inhibitor인 PMSF에 대한 활성 억제 정도를 조사하였으며, 결과는 억제제를 처리하기 전의 활성에 대해 처리 후에 남은 활성의 비율을 백분율 (%)로 표시하였다 (Table 9). 5 개의 분리 균주와 1 개의 참조 균주는 serine protease inhibitor인 PMSF에 의해 강하게 억제된 반면, *V. harveyi* type strain인 ATCC 14126 균주만 cysteine protease inhibitor인 E-64에 의해 억제되었다. 따라서 *V. carchariae* type strain, ATCC 35084 및 5 개의 분리 균주 ECPs의 주요 성분은 serine protease이며 *V. harveyi* type strain, ATCC 14126 ECPs의 주요 성분은 cysteine protease인 것으로 나타났다.

Table 9. Effects of protease inhibitors on proteolytic activities of *V. harveyi* ECPs

Inhibitor class	Inhibitor	Activity remaining (%)						
		FF8	FF10	FR1	FR2	FT1	ATCC 35084	ATCC 14126
Cystein protease	E-64							
	10 μ M	94.96 $\pm$ 3.68	70.47 $\pm$ 10.34	78.01 $\pm$ 6.62	94.51 $\pm$ 3.05	85.19 $\pm$ 11.38	73.33 $\pm$ 9.43	22.54 $\pm$ 5.2
	20 μ M	92.85 $\pm$ 0.24	63.63 $\pm$ 10.59	78.74 $\pm$ 2.92	90.94 $\pm$ 4.96	95.68 $\pm$ 8.03	70.56 $\pm$ 13.36	14.22 $\pm$ 3.9
Metallo protease	EDTA							
	5 mM	82.05 $\pm$ 5.66	70.24 $\pm$ 7.53	83.66 $\pm$ 12.24	95.11 $\pm$ 11.64	80.99 $\pm$ 13.51	78.33 $\pm$ 7.07	82.31 $\pm$ 5.73
	10 mM	81.17 $\pm$ 12.83	88.37 $\pm$ 13.31	76.48 $\pm$ 11.52	89.61 $\pm$ 13.12	83.88 $\pm$ 13.14	72.23 $\pm$ 7.86	82.41 $\pm$ 12.02
	1.10-PAM							
Aspartic protease	1 mM	94.13 $\pm$ 4.85	93.51 $\pm$ 28.04	75.00 $\pm$ 0	91.48 $\pm$ 2.62	90.46 $\pm$ 9.15	85 $\pm$ 2.36	68.98 $\pm$ 5.31
	2 mM	85.99 $\pm$ 16.36	90.53 $\pm$ 3.97	65.07 $\pm$ 2.27	79.39 $\pm$ 7.94	85.99 $\pm$ 6.44	70 $\pm$ 4.71	71.25 $\pm$ 8.52
	PepstatinA							
	50 μ M	89.37 $\pm$ 4.69	78.43 $\pm$ 11.66	56.24 $\pm$ 0.62	85.37 $\pm$ 6.02	87.69 $\pm$ 2.79	76.11 $\pm$ 5.5	64.53 $\pm$ 5.17
Serine protease	100 μ M	67.47 $\pm$ 6.54	84.57 $\pm$ 2.98	63.53 $\pm$ 2.62	92.58 $\pm$ 2.63	76.16 $\pm$ 23.61	70.56 $\pm$ 13.36	64.33 $\pm$ 7.4
	PMSF							
	1 mM	0	0	3.85 $\pm$ 5.48	2.74 $\pm$ 2.62	22.39 $\pm$ 8.75	0	55.41 $\pm$ 7.69
	2 mM	0	0	0	0	0	0	55.54 $\pm$ 1.39

Remaining activity was expressed as a percentage of the control value, mean values $\pm$ S.D. from the triplicate.

4. Swarming 운동

*V. harveyi*의 특징적인 정상인 swarming 운동에 염분 농도가 미치는 영향을 조사하여 rm 결과를 Table 10과 Fig. 12에 나타내었다. 0.5와 7 % NaCl 농도에서는 swarming을 하지 않는 집락을 형성하였으며, 2 % NaCl이 첨가되었을 때에 가장 활발한 swarming 운동을 나타내었다.

Swarming 운동이 일어나는 동안, 세균의 형태학적 변화를 관찰하기 위하여, swimming 운동만 일어나고 swarming 운동은 일어나지 않는 broth 배지에서 배양한 세균과 swarming 운동이 일어나는 agar 배지에서 배양한 세균을 각각 취하여, Gram stain과 Flagella stain을 하여 관찰하였으며 (Fig. 13), negative stain 한 시험균을 TEM으로 관찰하였다 (Fig. 14). Gram 염색의 경우, agar 배지 상에서 배양하였을 때 균체가 길어지는 것을 알 수 있었으며 (Fig. 13b), 편모 염색에서는 길어진 균체 뿐 아니라, 편모의 수가 증가한 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 13d and e). TEM에서는 길어진 균체에 다수의 편모가 형성되어 있으며 (Fig. 14b), swarming 시에 생성된 이들 lateral flagella는 다른 세균과 연결된 경우도 종종 관찰되었다 (Fig. 14c). 또한 swimming 운동에 관여하는 원래의 극편모에 비해 swarming 운동시에 생성된 측편모 (lateral flagella)는 보다 가늘고 짧으며, sheath로 둘러싸여 있지 않는 것으로 관찰되었다 (Fig. 14d).

Table 10. The Effects of NaCl concentration in the TSA on the swarming of the isolates and the reference strains at 27 °C

Concentration of NaCl (%)	Characteristics of swarming on agar medium						ATCC 35084	ATCC 14126
	FF 8	FF 10	FR 1	FR 2	FT 1			
0.5	-	-	-	-	-		-	-
0.75	-	+	-	+	-		-	-
1.0	+	+++	+	+++	-		+	-
1.25	+++	+++	+++	+++	+		+	+
1.5	+++	+++	+++	+++	+		+	+++
2.0	+++	+++	+++	+++	+++		+++	+++
3.0	+	+	+	+	+		+	+
5.0	+	+	-	+	-		-	++
7.0	-	-	-	-	-		-	-

+, ++, +++, swarming activity; -, growth without swarming.

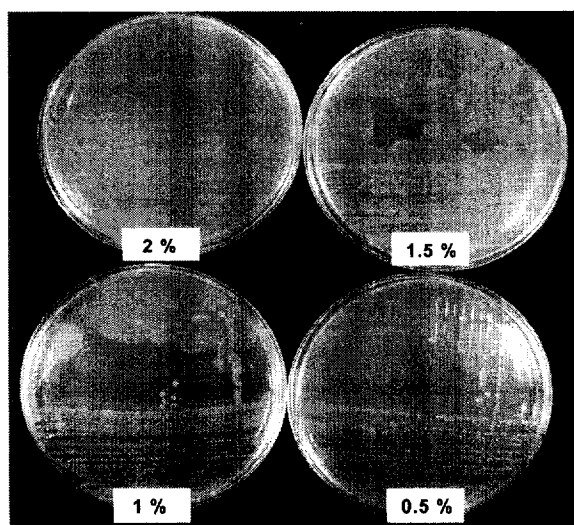


Fig. 12. The effects of NaCl concentration in the TSA on the swarming of the *Vibrio harveyi*, FR2.

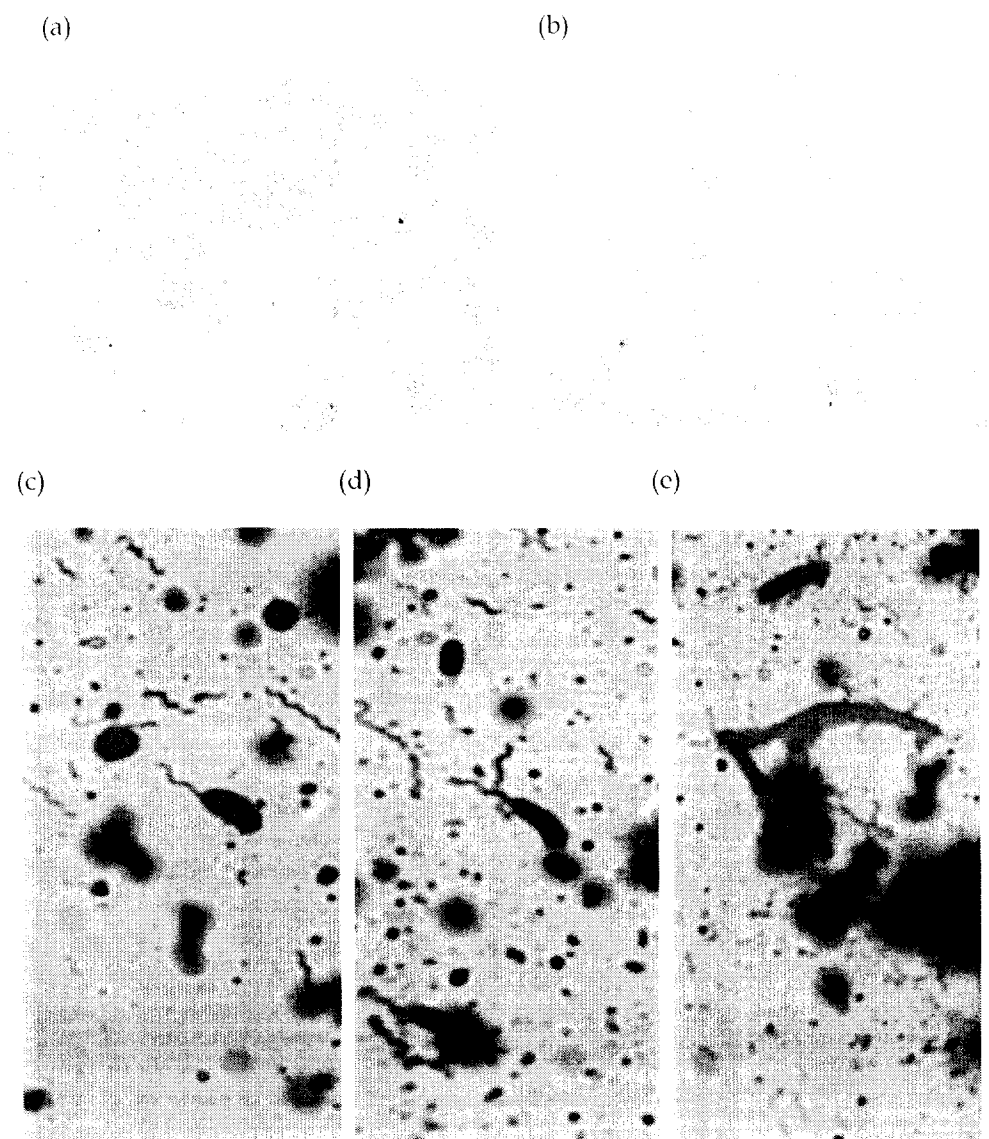


Fig. 13. Morphological change of the *Vibrio harveyi*, FF 8 in the broth (a and c) and agar plate (b, d and e). (a) and (b), gram stained; (c), (d) and (e), flagella stained.

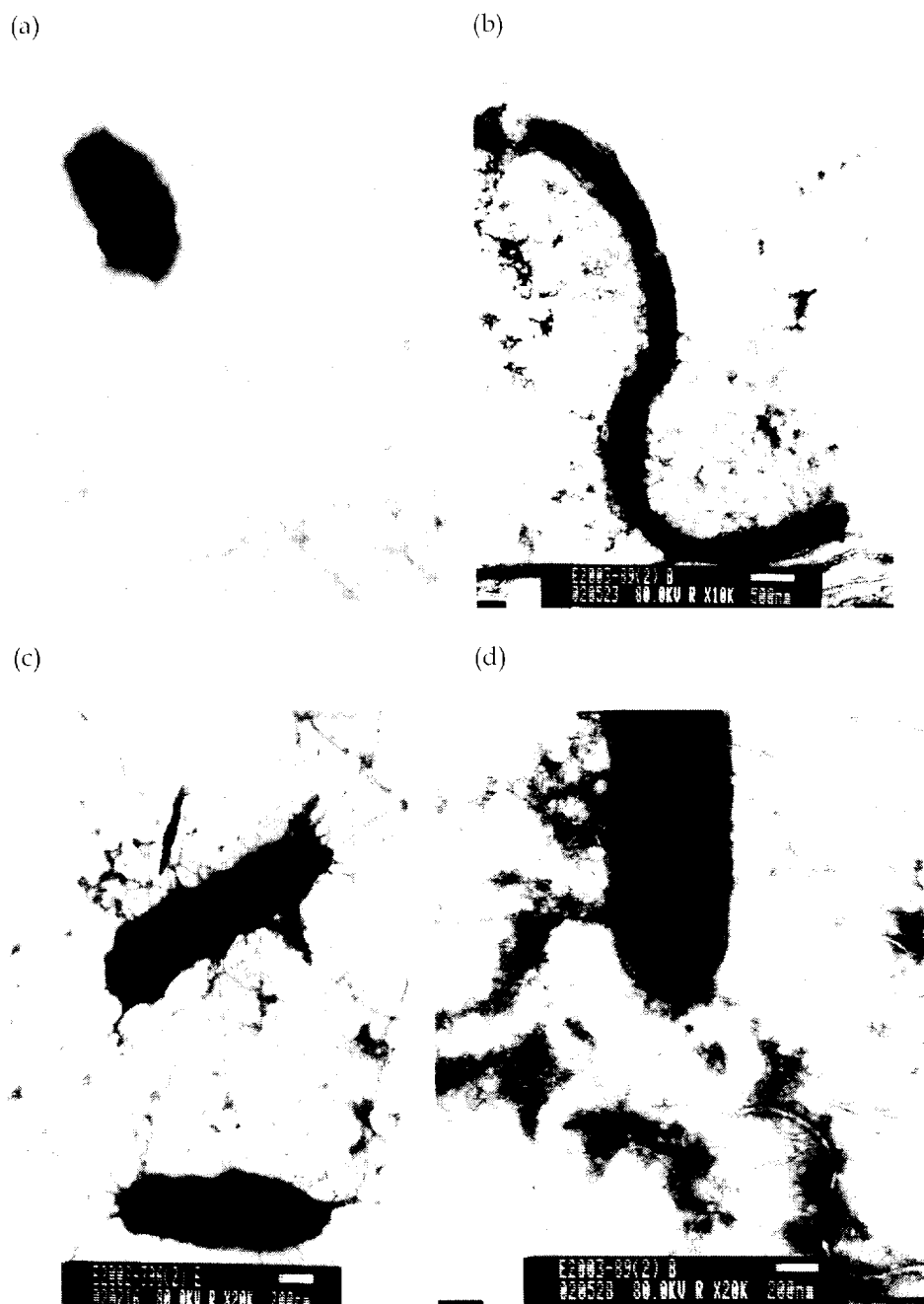


Fig. 14. Negative stain of the *Vibrio harveyi*, FF 8 on the broth medium (a) and agar plate medium (b, c and d).

5. Luminescence

배양된 분리 균주와 참조 균주를 Lumi-count (Pharmacia)로 측정한 결과, ATCC 14126 균주가 20,000 cpm 이상의 높은 발광능을 보인 반면, 나머지 균주들은 200~300 cpm 정도로서 균을 접종하지 않은 TSB 배지와 유사한 값을 나타내어 luminescence 음성으로 판정하였다. 또한 luciferase gene 검출을 위한 PCR 시험에서도 ATCC 14126 균주만 Lux A와 Lux 405 primer에 대해 뚜렷한 증폭 산물을 보인 반면, 나머지 시험 균주에서는 모두 음성으로 나타났다. 따라서 ATCC 14126 균주를 제외한 모든 시험 균주는 발광능이 없는 것으로 판단되었다. Fig. 15는 primer, Lux 405를 사용한 PCR 결과이다.

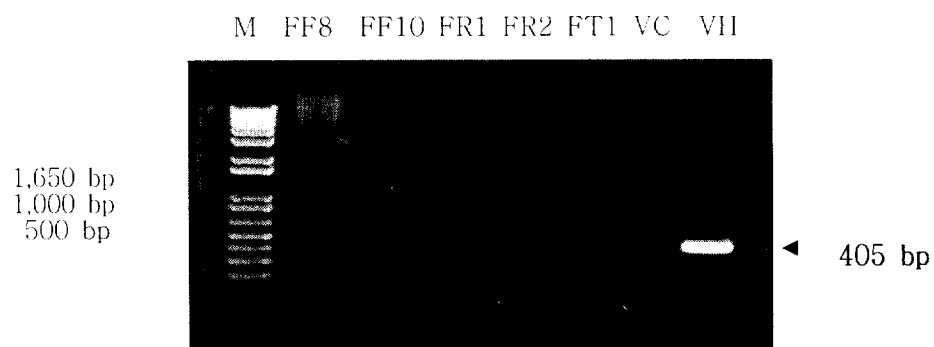


Fig. 15. Amplification of luciferase alpha subunit gene of the isolates and the reference strains. PCR was performed with bacterial genomic DNA using LuxA primer. M: 1 Kb ladder plus marker, FF 8~FT 1: isolates, VC: reference strain ATCC 35084, VH: reference strain ATCC 14126. Arrow indicates the PCR products.

6. SDS-PAGE

6.1. *V. harveyi* 균체의 protein pattern

Fig. 16에 5 개의 분리 균주와 2 개의 참조 균주가 가지는 균체 단백질을 poly-acrylamide gel 상에 전기 영동하여 확인한 결과를 나타내었다. 시험 균주들의 기본적인 protein pattern은 유사하였으나, 36~50 kDa 사이의 bands에서는 다소 차이를 보였다. TCBS 상에서의 특성으로 볼 때, 넙치 유래의 TCBS green colony 형성 균주 FF 10는 조피볼락 유래의 TCBS green colony 형성 균주 FR 2와 완전히 일치하였다. 그리고 터봇 유래의 TCBS yellow colony 형성 균주 FT 1는 조피볼락 유래의 TCBS yellow colony 형성 균주 FR 1와 동일한 protein pattern을 보였다. 그러나, 넙치 유래의 TCBS yellow colony 형성 균주 FF 8는 50 kDa 부근에 있는 B1 band의 분자량이 더 큰 것으로 나타났다. yellow colony 형성 균주와 green colony 형성 균주 사이에는 B1 band의 크기가 약간 다르며, FR 1과 FT 1은 B2 band가 없는 것으로 나타났다. 이에 비해 참조 균주의 protein은 5 개의 시험 균주와 기본적인 protein pattern이 유사하지만 완전히 일치하지는 않는 것으로 나타났다.

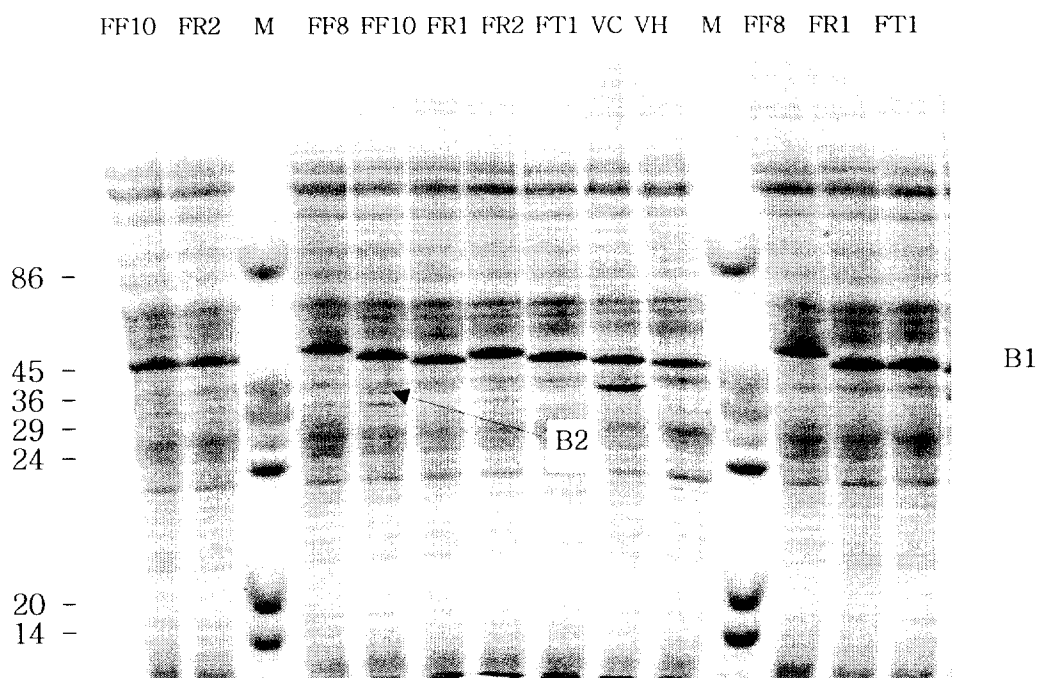


Fig. 16. Electrophoretic protein patterns of the *Vibrio harveyi* whole cells. FF 8~ FT 1, isolates; VC, reference strain ATCC 35084; VH, reference strain ATCC 14126; M, protein molecular marker. Arrow indicates different protein band.

6.2. *V. harveyi* ECPs의 protein pattern

Fig. 17에는 *V. harveyi* ECPs의 SDS-PAGE pattern을 나타내었다. 모든 시험 관주에서 약 34 kDa의 major band가 확인되었으며, 관주 간에 유사한 pattern을 보였다.

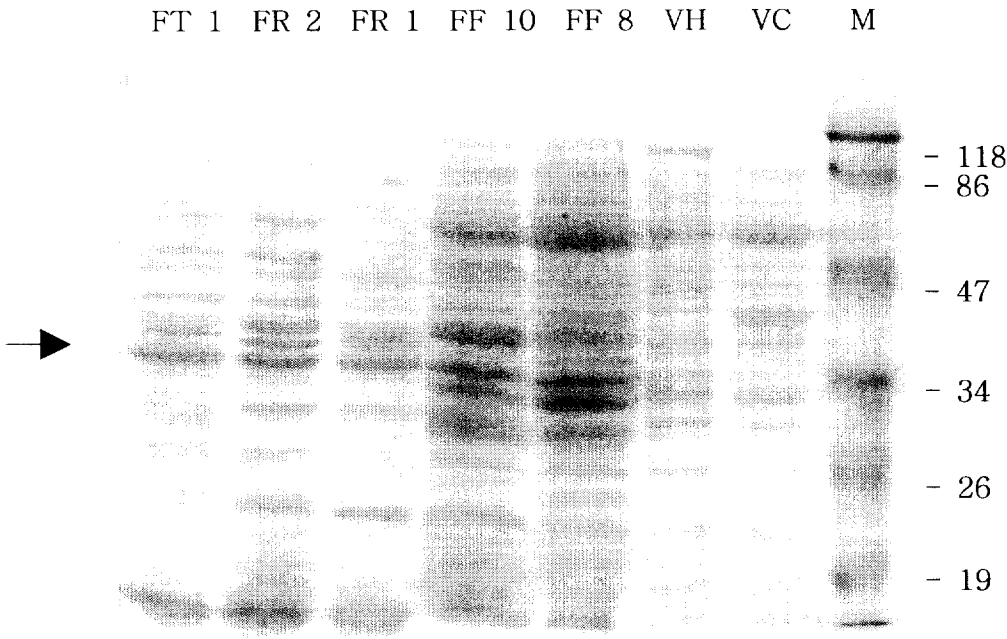


Fig. 17. Electrophoretic protein patterns of the *Vibrio harveyi* ECPs. FF 8~FT 1, isolates; VC, reference strain ATCC 35084; VH, reference strain ATCC 14126; M, protein molecular marker.

Arrow indicates the 34 kDa major protein band.

IV. 고찰

*V. harveyi*는 다른 *Vibrio* sp.와 같이 광염성으로 0.5 ~ 7 %에서 성장 가능하며, 균주에 따라 8 %에서도 성장이 가능하다고 보고되었다 (Ortigosa et al., 1994). 이러한 범위는 본 연구에서도 동일하게 나타났는데, 모든 시험 균주가 7 % 염분 농도에서는 잘 성장하였으나 8 %에서는 성장이 지연되어 96 시간째에 이르러서야 확인되었다. *V. harveyi*와 성장에서 매우 비슷한 *V. alginolyticus*는 보다 광염성으로 12 % 염분 농도에서까지 자랄 수 있는 것으로 알려져 있다 (Ortigosa et al., 1994). 배양 온도에 관한 조사에서 모든 시험 균주는 37 °C에서 성장하였으나 40 °C에서는 성장하지 못하여 이전의 연구와 일치하였다 (Lee et al., 1996; Ortigosa et al., 1994). *V. alginolyticus*는 성장 온도 범위도 더 넓어서 42 °C까지 성장 가능하다. 따라서 *V. harveyi*는 0.5 ~ 7 % 염분 농도와 15 ~ 37 °C의 온도 범위에서 성장 가능하며, 이러한 성장 조건은 *V. alginolyticus*보다 좁은 것으로 나타났다.

세균으로부터 ECPs를 분리하는 방법은 여러 가지가 있으나, 효소의 활성능을 측정해야 하는 경우에는 cellophane plate technique이 가장 보편적으로 사용되고 있다 (Lee et al., 2002; Zhang and Austin, 2000). *V. harveyi* 역시 cellophane overlay 법이 가장 널리 사용되고 있으며, Montero and Austin (1999)이 broth 배양법과 cellophane overlay 법에 따른 ECPs 활성과 단백질 양을 측정한 결과, 단백질 양은 후자가 약간 높은 데 비해 ECPs 효소 활성은 broth 배양법에서는 거의 검출되지 않았다고 보고하여 cellophane overlay 법 선택의 당위성을 제시해주었다. 그러나 cellophane overlay 법으로 추출할 경우에도 대상이 되는 세균이나 연구자에 따라 배양 배지, 온도, 시간 등이 다양하여 (Farto et al., 2002; Lee et al., 2002), 연구 대상이 되는 세균의 적정 ECPs 생성 조건을 조사한 후 구체적인 실험에 사용하는 것이 바람직하다고 생각된다. 본 연구에서 *V. harveyi* ECPs 생성의 적정 조건은 1.5 % NaCl

침가 TSA 배지에 25 ℃로 24 시간 배양했을 때이며, 추출하는 buffer의 적정 pH는 8.0이었다. Zhang and Austin (2000)은 *V. harveyi* ECPs의 분리시, 1 % NaCl 침가 TSA에서 24 시간째에 가장 높은 활성을 보였다고 하여 본 연구의 결과와 일치하였으며 대부분의 *V. harveyi* ECPs 추출 시험에서는 이와 유사한 조건으로 수행하고 있다 (Liu and Lee, 1999). 그러나, Liu and Lee (1999)는 단백질의 농도가 96 시간째까지 꾸준히 증가한다고 보고한 반면, 본 연구의 결과에서는 48 시간째에 최고치를 보인 후 72 시간째부터는 감소하는 것으로 나타났다. Lee et al. (2002)는 *V. carchariae* type strain의 ECPs 분리시 1.5 % NaCl 침가 TSA보다 1.5 % NaCl 침가 nutrient agar에서 단백질 양은 적은 반면, 율등이 높은 효소 활성을 나타낸다고 보고하였다. 이와 같이 연구자에 따라 다른 결과를 보이는 것은 사용된 균주의 차이일 가능성이 크나, 정확한 원인에 대해서는 더 조사해 볼 필요가 있을 것으로 생각한다. 본 연구에 사용된 시험 균주의 ECPs는 열에 불활화되며, 참조 균주인 ATCC 14126을 제외한 균주들은 serine protease가 주요 ECPs 성분인 것으로 밝혀졌다. 현재까지 *V. harveyi* ECPs에 관한 연구는 많이 이루어져 있으나, 대부분 *V. harveyi* type이거나 새우류에서 분리된 균주에 관한 연구들로 이들은 모두 cysteine protease가 주요 성분으로 밝혀졌다 (Liu et al., 1997). 반면, Lee et al. (2002)은 grouper, *Epinephelus coiodes*에서 분리된 *V. harveyi* (*V. carchariae* type)의 주요 ECPs 성분이 serine protease임을 보고하여 본 연구 결과와 일치하였다. 이들 결과로 미루어 볼 때, *V. harveyi* type과 *V. carchariae* type의 주요 ECPs 성분이 다른 것으로 판단되며, 본 분리 균주들은 *V. carchariae* type과 같은 것으로 나타났다.

Swarming 운동은 agar 혹은 점액성 물질의 표면을 따라 움직일 수 있는 능력으로 agar 배지 상에서는 퍼지는 colony를 형성하게 된다. 이러한 특성을 지닌 세균으로는 *Proteus* 속과 *Vibrio* 속의 *V. alginolyticus*와 *V. parahaemolyticus*가 가장 잘 알려져 있다. Swarming 운동은 세균이 성장하는 동안 만들어낸 대사 산물에 의해 세포 분열이

억제되어 elongated cells이 되고 여기에 *Vibrio* 속 세균의 경우, polar flagella와 구조적으로 다른 lateral flagella가 생성된다 (McCarter, 2004; Ulitzur and Kessel, 1975). Henrichsen (1972)은 swarming 운동을 하는 *Vibrio* 속은 세포당 최소 10~20 개 정도의 lateral flagella가 생성된다고 하였으며, 형태적으로는 polar flagellum이 sheath로 둘러싸인 직경 24~30 nm인 반면, lateral flagella는 직경 14~15 nm의 unsheathed이며 (Baumann and Baumann, 1977; Follett and Gordon, 1968), 균체의 길이는 colony center에 위치한 균체보다 spreading zone의 것이 2~6배 더 길다 (Belas and Colwell, 1982). Lateral flagella의 다른 특징은 polar flagella와 같은 wave가 없이 곧은 형태인데, 그 이유는 flagella의 원위부와 근위부 끝이 고정되기 전에, 서로 다른 표면에 부착되어 있기 때문인 것으로 밝혀졌다. 예를 들어, flagella의 한 쪽 끝이 균체에 붙어 있고 다른 한 쪽은 agar matrix나 다른 균체에 부착되어 있다면, 고정 과정은 비교적 안정적인 linkage를 형성하여 다른 표면에 있는 편모의 원위부 끝과 cross-link되기 때문이다 (Belas and Colwell, 1982). 이러한 연구 결과는 주로 *V. alginolyticus*와 *V. parahaemolyticus*에서 밝혀진 사실들로, *V. harveyi*를 대상으로 한 본 연구에서도 유사한 결과를 확인할 수 있었다. 본 연구에서는 broth 또는 agar 배양한 균주를 flagella stain하여 길어진 균체와 증가한 편모 수를 확인하였으며, negative stain을 실시하여 TEM으로 보다 상세히 관찰하였다. 특히 TEM 관찰에서는 Belas and Colwell (1982)의 보고에서와 같이 lateral flagella가 다른 균체와 곧은 형태로 연결되어 있는 것을 확인할 수 있었으며, polar flagella와 lateral flagella가 직경, wave 및 sheath 유무의 측면에서 명확히 다른 구조임을 확인할 수 있었다. 이상과 같이 lateral flagella는 agar 배지에서 swarming 운동을 나타내는 운동 기관으로서의 역할 뿐만 아니라, 병원성에 관여하는 adhesion, surface colonization, biofilm 형성과 invasion에도 관여하며, 더욱이 virulence factor인 type III secretion pathway와도 밀접한 관계가 있는 것으로 보고되고 (Kirov, 2003), 본 연구 결과에서도 다수의 lateral

flagella가 서로 다른 군체와 연결되어 엉겨 있는 것으로 보아, 이러한 기능을 수행하여 병원성에 기여할 것으로 판단되었다.

*V. harveyi*의 luminescence는 세균이 고밀도로 증식했을 때, autoinducer라 불리는 extracellular signalling molecules이 증가하게 되고, 이를 신호로 발광 유전자인 Lux가 발현되어 나타나는 현상이다 (Nealson and Hastings, 1979). 이 현상은 질병 발생과 무관하게 quorum sensing이라 불리는 세포간의 의사 소통 기구로서 주목 받기 시작하여 많은 연구가 이루어져 있으며, 특히 *V. harveyi*를 대상으로 한 보고가 많다 (Freeman and Bassler, 1999; Nealson and Hastings, 1979). 어병학적인 관점에서 연구한 보고로는, Fuqua et al. (1996)이 luminescence가 *V. fischeri*의 virulence, antibiotic synthesis, conjugation 및 운동성에 관여한다는 사실을 밝힌 것과 Song and Lee (1993)가 non-luminous *V. harveyi*는 새우에 질병을 일으키지 않는다고 보고한 것 등이 있다. *V. harveyi*의 경우 새우류에서 분리된 경우에만 발광능이 확인되었으며, 본 연구에서도 참조 균주로 사용한 ATCC 14126 균주에서만 양성 반응을 보였다. 또한 *V. carchariae* type이 어류에서 질병을 일으킬 때는 발광능과 무관하므로, *V. harveyi* type 세균의 병원성 발현 기작과는 차이가 있을 것으로 생각된다.

Pizzutto and Hirst (1995)는 새우, *Penaeus monodon* larvae 유래의 *V. harveyi*의 protein patterns을 연구하고 이들이 모두 52 kDa의 major protein을 뚜렷하게 형성하며 Group I은 42 kDa, Group II는 40 kDa에서 band를 형성하고 기타 group은 이 부근에 band를 형성하지 않는 것을 밝혔다. 본 연구에서 모든 시험 균주는 50 kDa 부근에서 뚜렷한 major protein을 나타냈으나 균주에 따라서 분자량의 차이를 보였으며, 2 개의 참조 균주의 major protein은 FR 1 및 FT 1과 동일한 분자량을 나타내었다. 또한 FR 1과 FT 1을 제외한 모든 시험 균주에서 나타난 40 kDa 근처의 band는 Pizzutto and Hirst (1995)의 연구에서 밝힌 40과 42 kDa band와 일치하는 것으로 생각되며, FR 1과 FT 1은 그의 연구에서 Group I과 Group II 어느 쪽에도

속하지 않는 기타 group에 해당할 것으로 판단된다. 다양한 유래의 *V. harveyi* ECPs에 대한 protein pattern은 Zhang and Austin (2000)의 연구 결과가 있다. 이들은 모든 시험 균주들이 34 kDa의 major protein을 공통적으로 가지며, 균주에 따라 52 kDa의 두꺼운 band와 27 kDa의 band를 나타낸다고 하였다. 본 연구에서도 34 kDa의 공통 band 외, 약 55 kDa 및 27 kDa에서의 band도 확인되어 이들 균주와 ECPs protein pattern이 매우 유사한 것으로 판단되었다. 그러나, Lee et al. (1999)의 연구에서 새우류에서 분리된 *V. harveyi* type strain의 ECPs protein pattern에서 major protein은 38 kDa로 보고되어 본 연구 결과와 차이가 났다. 이러한 현상은 Zhang and Austin (2000)도 연어과 어류에서 분리된 *V. harveyi* ECPs의 major protein이 34 kDa이라고 한 것을 미루어 보아, 어류에 감염되는 종의 major ECPs protein의 분자량이 다소 작은 것으로 생각된다.

V. 요약

1. *V. harveyi*는 염분 농도 3 %, 30 ℃에서 배양했을 때 가장 잘 증식하였다.
2. *V. harveyi* ECPs 생성의 적정 조건은 1.5 % NaCl 첨가 TSA 배지에서 25 ℃, 24 시간 배양하는 것이며, ECPs 분리시의 buffer system은 pH 8.0이었다. 5 개의 분리 균주의 주요 ECPs 성분은 serine protease였다.
3. swarming 운동은 1.5 % NaCl 첨가 TSA에서 가장 활발하였으며, swarming 운동 시 균체는 길어지고, 짧고 곧은 다수의 lateral flagella가 생성된 것을 확인하였다.
4. Luminescence 반응은 luminometer로 직접 검출하는 방법과 luciferase gene을 검출하는 방법으로 시험하였는데, 5 개의 분리 균주가 모두 음성이었다.
5. *V. harveyi*의 균체 단백질은 50 kDa 부근의 major protein을 가지며, 균주에 따라 40 kDa 근처에서 상이한 band pattern을 보였다. *V. harveyi* ECPs 단백질은 34 kDa의 major protein을 가지며 균주간의 차이는 없었다.

제 3장 *Vibrio harveyi*의 병원성 기작

I. 서론

최근 10 년 사이 *V. harveyi*의 병원성 기작에 관한 연구가 이루어지기 시작했다. Zhang and Austin (2000)은 atlantic salmon에 대한 병원성에 *V. harveyi*의 extracellular products (ECPs)와 ECPs의 용혈능이 관여하는 것으로 보고하였으며, Harris and Owens (1999)은 ECPs의 100 kDa 단백질이 독성에 직접적으로 관여하는 것으로 보고하였다. 또한 많은 연구자들이 소량의 ECPs로도 어류에 치사 독성을 일으킨다고 보고하여 (Liu and Lee, 1999; Liu et al., 2003; Zorrilla et al., 2003), *V. harveyi*의 ECPs가 병원성 기작에 미치는 영향은 매우 클 것으로 생각된다. 새우에 대한 연구에서도 유사한 결과가 보고되었는데, post-larval *Penaeus vannamei*에 *V. harveyi* ECPs가 강한 독성을 나타내며, 이때의 ECPs는 proteolytic, haemolytic, cytotoxic activity를 보인다고 하였다 (Montero and Austin, 1999). 또한 Soto-Rodriguez et al. (2001)은 세균 표면의 소수성이 새우류의 병원성에는 관여하지 않으나, 어류의 병원성 기작에는 관여한다고 하였다. 이와 같이 *V. harveyi*의 병원성에 관한 연구가 꾸준히 증가하고 있으나, 대부분이 ECPs의 독력에 관한 연구 중심이 되고 있다. 이러한 연구 결과는 gram 양성 세균에 비해 gram 음성 세균의 ECPs의 독성이 현저히 낮다는 사실에 비추어 볼 때, *V. harveyi* ECPs의 병원성 인자로서의 역할과 ECPs 외의 다른 주요 독력 인자의 관여 여부에 관한 연구는 이 병원체의 병원성을 이해하는 데 중요한 의미를 부여할 것으로 생각된다.

본 장에서는 *V. harveyi*의 병원성 기작을 밝히기 위해 넙치와 조피볼락에 대한 병원성을 확인한 후, 병원체가 숙주에 침입하여 병원성을 발현하는 과정을 5 단계로 나누어 조사하였다. 즉, mucus surface에의 부착능, surface를 통한 숙주 조직으로의 침입

능과 biofilm 형성능을 *in vitro*로 조사하였으며, *in vivo* 환경에서의 증식능은 어류 혈청에 대한 생존능과 어류 점액의 이용능을 지표로 시험하였다. 또한 넙치에 대한 *V. harveyi*의 인위 감염 시험으로 비특이적 면역 반응에 미치는 영향을 조사하고, ECPs activity의 측정으로 숙주 세포에 미치는 손상을 분석하였다.

II. 재료 및 방법

1. *V. harveyi* 인위 감염 시험

1.1. 시험어

*V. harveyi*의 병원성 시험에는 평균 어체중 5 ± 1.2 g의 건강한 넙치, *Paralichthys olivaceus*와 30 ± 1.5 g의 조피볼락, *Sebastes schlegeli*을 경북 포항 소재의 양식장과 경남 통영 소재의 양식장에서 분양받아 부경대학교 수산생명의학과 어병예방학 실험실의 1 톤 사육 수조에서 2 주일간 순치시킨 후 사용하였다.

1.2. 생균의 치사 독성

5 개의 시험 군주와 2 개의 참조 군주에 대한 병원성 유무를 조사하기 위하여 1.5 % NaCl 첨가 TSA에서 27 °C로 24 시간 배양된 각 군주를 멸균 생리 식염수에 10^{6-9} cfu/ml의 농도 범위로 10 배 희석하여 넙치와 조피볼락의 복강에 0.1 ml씩 주사하였으며, 대조구는 멸균 생리 식염수를 0.1 ml씩 복강 주사하였다. 수온은 24 ± 0.5 °C로 유지하였으며, 7 일간의 폐사율을 기록한 후 Profit 법 (醫科學研究所學友會, 1976)에 따라 LD₅₀을 계산하였다. 폐사어는 폐사 즉시 해부하고 신장과 비장 조직을 무균적으로 절취하여 TCBS 배지에 도말한 후 *V. harveyi*를 재분리하였다.

1.3. ECPs의 치사 독성

V. harveyi ECPs의 치사 독성을 조사하기 위하여 각각의 군주로부터 추출한 ECPs를 100, 500 및 1,000 µg/ml로 조정하여 넙치에 0.1 ml씩 복강 주사하였다. 사육 조건과 관찰 및 LD₅₀ 계산은 위에서 기술한 방법과 동일하게 시행하였다.

2. 부착능 시험

2.1. 세균 세포 표면의 hydrophobicity

2.1.1. Microbial adhesion to hydrocarbon (MATH)

세균 세포 표면의 hydrophobicity를 확인하기 위해 Rosenberg et al. (1980)에 따라 hydrocarbon에 대한 부착능을 측정하였다. Overnight 배양된 세균을 25 mM PBS로 2 회 세척 후 OD₆₀₀ = 0.6으로 조정하고 이 균액 1.5 ml를 유리 시험관에 넣어 다양한 volume의 hexadecane과 혼합하여 30 초 동안 강하게 교반하였다. 30 분간 정치시킨 후 OD를 측정하여 hexadecane에 대한 부착 세포의 비율을 아래와 같이 계산하였다.

$$\text{Adhesion (\%)} = \frac{A_{600} \text{ original bacterial suspension} - A_{600} \text{ aqueous phase}}{A_{600} \text{ original bacterial suspension}} \times 100$$

2.1.2. Salt-aggregation test (SAT)

세균 세포 표면의 hydrophobicity를 측정하기 위한 또 다른 시험은 Lee and Yii (1996)에 의해 수정된 Lindhal et al. (1981)의 방법에 따랐다. 하룻밤 동안 배양된 세균을 2.5 % NaCl 멸균 용액에 세척한 후, 0.002 M PBS (pH 6.8)에 현탁하여 OD₄₂₀ = 1.0으로 조절하였다. 이 균액 30 µl를 0.05에서 4.0 M로 조정된 ammonium sulfate (NH₄)₂SO₄ 용액과 96 well plate에 동량으로 혼합하여 실온에서 3 시간 방치 후 관찰하였다. SAT value는 육안적으로 응집을 일으킨 ammonium sulfate의 최소 mol 수로 결정하였다.

2.2. Biofilm 형성

Polystyrene culture tube에서 biofilm 형성 정도를 측정하기 위해 O'Toole and Kolter (1998)의 방법을 따랐다. 1.5 % NaCl 첨가 TSB 배지를 1 ml 넣은 75 mm polystyrene tube에 overnight 배양된 균액을 접종한 후, 27 °C에서 정지 배양하면서 적정 시간 간격마다 3 반복으로 시험관을 선택하였다. 선택된 tube는 tube 속의 배지와 배양된 균액을 제거한 후 멸균 증류수로 완전히 세척하고 1 % crystal violet solution을 첨가하여 tube 벽에 부착된 세포를 염색하였다. 이를 실온에서 10~15 분간 방치한 후 증류수로 세척한 다음, 95 % ethanol 2 ml로 녹여 내어 600 nm에서 OD를 측정하였다.

3. *V. harveyi*의 어체내 생존능

3.1. 어류 점액에서의 생존능

어류 점액을 유일한 영양원으로 성장할 수 있는지를 조사하기 위하여 넙치와 조피볼락의 점액을 사용하였다. 점액은 체표의 수분을 paper towel로 가볍게 흡수시킨 후 채취하였다.

0.2 M PBS로 1 % agarose를 현탁시킨 후 0.2 M PBS에 1 mg/ml의 농도로 조정된 점액 현탁액 2 ml를 첨가하여 배지를 제작하였다. 제작된 배지에 각각의 균주를 도말 배양한 후, 27 °C, 48 시간 배양하였으며, 대조구는 점액 현탁액을 첨가하지 않은 1 % agarose 배지를 사용하였다.

3.2. 어류 혈청 내에서의 생존능

시험 균주의 각종 어류 혈청에 대한 생존능 시험은 Leung et al. (1994)의 방법으로 행하였다. 1.5 % NaCl 첨가 TSB에 27 °C, 24 시간 배양한 각각의 균주를 원심 분리하여 집균하고 PBS (pH 7.4)로 3 회 세척하여 1×10^6 cfu/ml가 되도록 PBS로 조정된 균액을 어류 혈청과 1 : 1로 혼합하여 혈청 시험의 농도가 5×10^5 cfu/ml이 되도록

록 하였다. 이 혼합액을 25 °C에 배양하면서, 0, 1, 3, 6 및 12 시간이 경과할 때마다 단계 희석하여 Miles and Misra (1938)의 방법에 따라 생균수를 측정하였다.

4. *V. harveyi* 감염이 넙치의 생리 및 비특이적 면역 기능에 미치는 영향

4.1. 인위 감염 시험

V. harveyi 감염이 넙치의 생리 및 비특이적 면역 기능에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 평균 어체중 26 ± 5.5 g의 넙치에 독성 균주인 FR 2와 비독성 균주인 ATCC 35084를 각각 2×10^6 cfu/ml로 조정하여 0.1 ml씩 복강 주사하였으며, 대조구는 멸균 생리 식염수를 0.1 ml씩 주사하였다. 각각의 실험은 주사 후, 0, 1, 3, 7 일째에 실시하였으며, 각 실험구에서 8 마리씩 무작위로 꺼내어 2 마리씩 pooling하여 사용하였고 모든 실험은 2 반복으로 수행하였다. 시험 기간 동안의 수온은 24 ± 0.5 °C를 유지하였다.

4.2. *V. harveyi*가 넙치의 혈액 성상에 미치는 영향

4.2.1. Hematocrit

실험어의 hematocrit 치는 Wedemeyer and Nelson (1975)의 방법에 따라 시행하였다. 각 실험구별 실험어의 미부 정맥으로부터 헤파린 처리된 주사기로 채혈한 후, heparinized capillary tube (Chase Instrument Co.)에 삼투시킨 다음, $12,000 \times g$, 5 분간 원심 분리하였다. 실험어의 hematocrit 수치는 전체 혈액량에 대한 적혈구 용적을 percentage (%)로 환산하였다.

4.2.2. 혈청 내 성분 조사

각 실험어의 미부 정맥에서 채혈한 혈액을 실온 2 시간 및 4 °C 2 시간 방치하여 혈병을 수축시킨 후, $8,000 \times g$, 5 분간 원심 분리하여 얻은 혈청을 실험에 사용하였

다. 분석 항목은 효소법을 이용한 glucose, Biuret 법을 이용한 total protein 및 hemoglobin이었다. 모든 시험은 혈액 성분 검사용 kit (Asan Co.)를 사용하였으며, hemoglobin 측정에는 해파린이 처리된 주사기로 채혈한 전혈을 사용하였다.

4.3. 점액 lysozyme 활성 측정

점액 lysozyme은 Takahashi et al. (1986)의 방법에 따라 채표 점액을 채취하여 이 시료에 5 배의 0.005 M PBS (pH 7.4)를 첨가한 다음 균질화한 후, 원심 분리 (4 ℃, 12,000 × g, 20 min)한 상정액을 측정용 시료로 사용하였다. 이 점액 시료 0.5 ml을 0.005 M PBS에 현탁하여 OD₅₃₀ = 0.6으로 조정된 *M. lysodeikoticus* 액 2.5 ml과 혼합하여 25 ℃에서 20 분간 반응시킨 후, 흡광도를 측정하였다.

Lysozyme 활성은 units/ml/min로 나타냈으며, 1 unit는 흡광도 값이 0.001 감소한 값으로 표시하였다.

4.4. 보체의 살균 능력 조사

넙치 혈청 내의 보체 살균 반응은 분리한 혈청과 GVB²⁺ (gelatin 1 g; NaCl 8.5 g; 5,5-diethyl barbitol acid 0.575 g; Na-diethyl barbiturate 0.37 g; MgCl₂ · 6H₂O 0.102 g; CaCl₂ · 2H₂O 0.022 g in distilled water 1 ℓ) 용액을 1 : 4로 희석한 다음, 이를 *Escherichia coli*, ATCC 53323 현탁액 (10³ mg/ml)과 1 : 1로 혼합하여 실시하였다. 생존수의 측정은 세균과 희석된 혈청 혼합액을 27 ℃로 조정된 진탕 배양기로 반응시키면서 0, 1, 3, 6, 12 시간이 경과할 때마다 단계 희석하여 Miles and Misra (1938)의 방법에 따라 균 집락수를 계수하였다.

4.5. 어류 두신 식세포의 활성 산소 측정

넙치의 두신을 무균적으로 적출하여 2 % fetal calf serum (FCS), 1 %

penicillin/streptomycin 및 0.2 % heparin이 함유된 L-15 medium에서 nylon mesh를 통과시켜 세포 현탁액을 준비하였다. 준비된 세포 현탁액을 27%와 45 % 농도의 percoll에 중층시킨 후, $450 \times g$ 에서 30 분간 원심 분리하여 백혈구를 분리하였다. 분리된 백혈구는 0.1 % trypan blue로 viability를 확인한 후 0.1 % FCS 첨가 L-15 medium으로 2×10^6 cells/ml 농도가 되게 조정하여 96 well tissue culture plate에 0.1 ml씩 분주하였다. 이를 18 °C에서 2 시간 부착시킨 다음 상정액을 제거한 후, 3 회 세척하여 시험용 식세포를 준비하였다. FCS로 옴소닌화된 zymosan을 nitroblue tetrazolium (NBT) 용액에 현탁시킨 후 식세포가 부착된 well에 0.1 ml씩 첨가하고 18°C에서 30분간 반응시킨 다음 100 % methanol로 세포를 고정시켰다. 각 well에 2M KOH 용액 120 μ l와 dimethyl sulphoxide (DMSO) 140 μ l를 첨가한 후 630 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 blank는 2M KOH와 DMSO 혼합액을 사용하였다.

5. *V. harveyi* ECPs의 활성

5.1. Proteolytic activity

각각의 균주로부터 분리한 ECPs를 시료로 하여 protease activity를 측정하였다. ECPs 추출 및 protease activity 측정 방법은 1장에서와 동일하게 cellophane overlay 방법에 의해 분리한 후 azocaseine 법으로 활성을 측정하였다. 효소 활성능은 참조 균주 2 개와 분리 균주 5 개에 대해 실시하였으며, 장기간 동결 보존되어 있는 균주와 어체 통과 후 분리된 균주간의 차이를 조사하기 위하여, 각각의 균주를 넘치에 주사한 후 ($2 \times 10^7 \sim 9$ /fish), 폐사어에서 균체를 분리하는 과정을 3 회 실시한 후 어체 통과 균주로 사용하였다.

또한 분리된 ECPs를 APIzym kit에 집중하여 19 가지의 효소에 대한 반응성을 측정하였다.

5.2. 용혈능

V. harveyi ECPs의 다양한 어종의 혈액에 대한 용혈능을 조사하였다. Red blood cells (RBCs) 시료는 토끼의 귀 정맥과 각종 어류의 미부 정맥에서 채혈한 후, PBS로 3 회 세척 (4°C , $2,000 \times g$, 10 min)하고 packed cells을 PBS에 1 %로 현탁하여 준비하였다. 96 well plate에 ECPs를 $100 \mu\text{l}$ 씩 넣고 PBS로 2배 단계 희석한 후, 동량의 1 % RBCs를 섞어 27°C , 1 시간 배양하였다. 용혈능의 표시는 50 % 용혈을 일으킨 희석 단계로 표시하였다.

5.3. In vitro cytotoxicity

V. harveyi ECPs의 세포 독성은 어류 유래의 주화세포, 즉 CHSE-214 (Chinook salmon embryo)와 EPC (Epithelioma papillosum cyprini)를 사용하였다.

Eagle's minimum essential medium (EMEM, Sigma)에 10 % Fetal bovine serum (FBS, GibcoBRL)과 1 % antibiotic-antimycotic agent (GibcoBRL)를 첨가하고 CHSE-214 세포는 $7 \times 10^5 \text{ cells/ml}$, EPC 세포는 $3 \times 10^5 \text{ cells/ml}$ 의 농도가 되도록 조정하여 24 well plate에 1 ml씩 분주하여 18°C , 24 시간 단층 배양하였다. 배양 후 각 well 내의 배지를 제거하고, 10 % FBS가 첨가된 EMEM 0.9 ml에 다양한 농도로 조정된 각각의 ECPs 0.1 ml을 첨가하여 18°C , 72 시간 동안 배양하였다. 배양액 내의 최종 ECPs 농도는 0, 25, 100 및 $250 \mu\text{g}$ 이 되도록 하였다. 배양 기간 동안 도립 현미경 (Olympus, CK-2)으로 관찰하여 세포 변성 효과 (Cytopathic effects)를 확인하였으며, 대조구는 ECPs를 첨가하지 않은 well의 cell-line을 사용하였다.

5.4. Siderophore 생성능

Chrome azurol S (CAS) assay solution을 이용한 siderophore 산생능의 분석은 Schwyn and Neilands (1987)의 방법에 따랐다. CAS assay solution은 6 ml의 10

mM hexadecyltrimethylammonium bromide (HDTMA), 1.5 mL의 10 mM HCl이 첨가된 1 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 7.5 mL의 2 mM 수용성 CAS 용액, piperazine 4.307 g 및 6.25 mL의 12 M HCl을 멸균 증류수 100 mL에 섞어서 제작하였다. siderophore의 측정에는 CAS assay solution 0.5 mL과 동량의 ECPs를 혼합한 후 630 nm에서 흡광도를 측정하였으며, blank는 ECPs 시료 대신 0.1 M PBS를 사용하였다.

6. 통계학적 분석

대조구와 각 시험구 사이의 통계학적 유의성은 Student's t-test로 비교하여 P값이 0.05 미만일 때 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

III. 결과

1. 인위 감염 시험

1.1. 생균의 치사 독성

Table 11에는 넙치와 조피볼락을 대상으로 5 개의 시험 균주와 2 개의 참조 균주에 대한 병원성 시험 결과를 나타내었다. 2 개의 참조 균주는 넙치와 조피볼락 모두에서 높은 LD₅₀을 보인 반면, 5 개의 분리 균주에서는 중간 혹은 낮은 LD₅₀값을 나타내었다. 넙치에 가장 강한 독력을 보인 균주는 FR 2이고 다음으로 FF 8이 뒤따랐으며, 조피볼락에는 FR 2와 FT 1 균주가 강한 병원성을 보였다. 본 실험의 결과, 분리 유래에 따른 숙주 특이성은 나타나지 않았으며, 조피볼락에 대한 병원성이 더 강한 것으로 조사되었다.

Table 11. The lethal dose (LD₅₀) of *Vibrio harveyi* on the intraperitoneally injected olive flounder, *Paralichthys olivaceus* and black rockfish, *Sebastes schlegeli* at 7 days

	FF 8	FF 10	FR 1	FR 2	FT 1	ATCC 35084	ATCC 14126
Olive flounder	4.8×10 ⁷	4.38×10 ⁸	4.38×10 ⁸	1.24×10 ⁶	1.36×10 ⁸	4.38×10 ⁸	> 10 ⁹
Black rockfish	1.62×10 ⁶	1.18×10 ⁶	7.56×10 ⁶	6×10 ⁵	3.24×10 ⁵	5.8×10 ⁷	2×10 ⁸

1.2. ECPs의 치사 독성

V. harveyi ECPs의 치사 독성을 측정한 결과를 Table 12에 나타내었다. 2 개의 참조 균주는 LD₅₀이 100 $\mu\text{g}/\text{fish}$ 이상으로 독력이 약했으며, 가장 강한 독력을 나타낸 균주는 LD₅₀ 값이 39.9 $\mu\text{g}/\text{fish}$ 인 FR 2였다. 다음으로 강한 독력을 보인 균주는 LD₅₀ 값이 45.6 $\mu\text{g}/\text{fish}$ 인 FT 1이었으며, 나머지 3 개의 균주의 LD₅₀ 값은 유사하였다.

Table 12. The LD₅₀ of *Vibrio harveyi* ECPs on the intraperitoneally infected olive flounder, *Paralichthys olivaceus* at 14 days

	FF8	FF10	FR1	FR2	FT1	ATCC 35084	ATCC 14126
LD ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{fish}$)	53	57.2	53	39.9	45.6	> 100	> 100

2. 부착능

2.1. 세균 세포 표면의 hydrophobicity

V. harveyi 세포 표면의 hydrophobicity를 측정하기 위해, hexadecane을 사용한 microbial adhesion to hydrocarbon (MATH)과 ammonium sulfate를 이용한 salt-aggregation test (SAT)를 수행하여 Table 13에 나타내었다. MATH 시험에서는 FF 10과 FT 1 균주가 가장 낮은 부착능, FF 8과 ATCC 35084 균주가 중간 정도의 부착능, 그리고 FR 1, FR 2 및 ATCC 14126이 높은 부착능을 보였다. SAT 시험의 경우, 2 개의 참조 균주와 FR 2 균주가 비교적 낮은 농도의 ammonium sulfate에서도 응집하는 것으로 나타났다. 따라서, MATH법과 SAT법 모두에서 높은 부착능을 보이는 균주는 FR 2와 ATCC 14126 균주였다.

Table 13. Cell surface hydrophobicity of the isolates and reference strains

	MATH (% partition)	SAT (M)
FF 8	21.9±0.64	3.0
FF 10	14.7±0.57	3.0
FR 1	27.4±1.98	4.0
FR 2	28.0±0.85	2.0
FT 1	13.6±0.57	3.0
ATCC 35084	20.1±0.21	2.0
ATCC 14126	29.5±1.34	2.0

2.2. Biofilm 형성능

*V. harveyi*가 polystyrene 재질에서 biofilm을 형성할 수 있는지를 측정한 시험 결과를 다른 여러 세균들과 비교하여 Fig. 18에 나타내었으며, 본 연구의 분리 균주들에 관한 결과는 Fig. 19에 나타내었다. 그 결과, Swarming 특성을 보이는 세균들의 biofilm 형성능이 현저히 높게 나타났으며 (Fig. 18b), 본 연구의 참조 균주인 ATCC 35084와 ATCC 14126은 다른 swarming 세균인 *V. alginolyticus* 및 *V. parahaemolyticus* 보다는 biofilm 형성능이 낮았으나, non-swarming bacteria보다는 높은 수치를 유지하였다 (Fig. 18a). 5 개의 분리 균주들간의 비교에서는 FR 2, FT 1 및 FR 1에서 비교적 높은 수치를 나타내었으며, 특히 24 시간째에 FR 2 균주에서 최고치를 나타내었다 (Fig. 19).

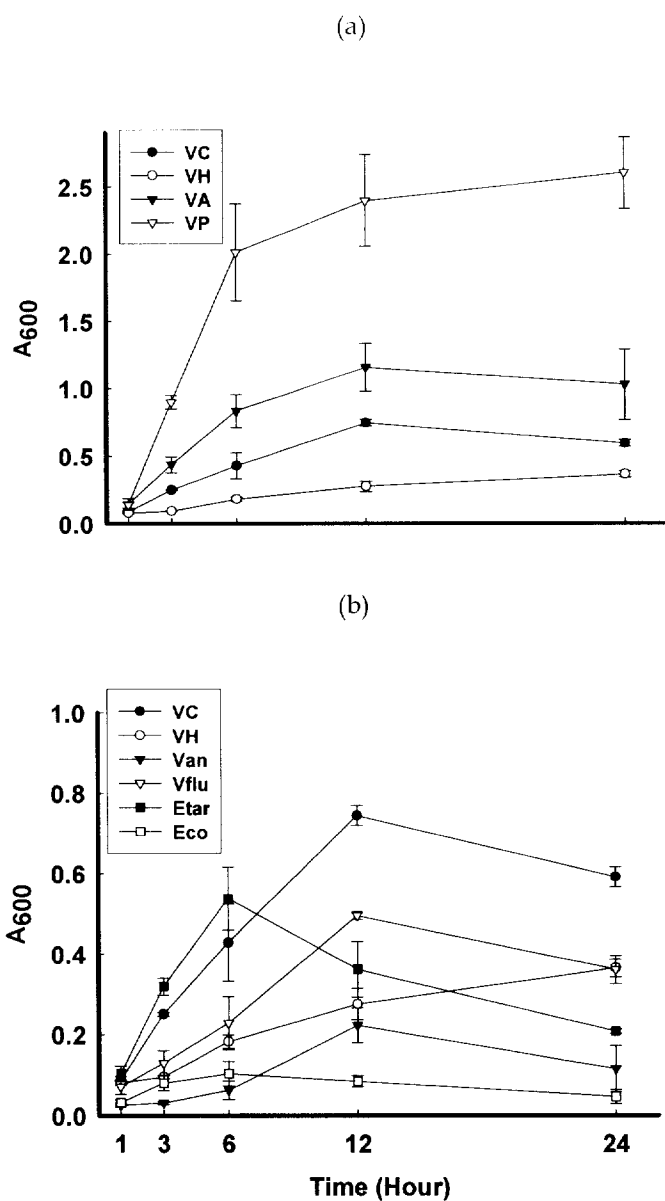


Fig. 18. Kinetics of biofilm formation of various *Vibrio* spp. and other bacteria.

(a), swarming *Vibrio*; (b), non-swarming bacteria; VC, *V. harveyi* ATCC 35084; VH, *V. harveyi* ATCC 14126; Van, *V. anguillarum*; Vflu, *V. fluvialis*; Etar, *Edwardsiella tarda*; Eco, *Escherichia coli*.

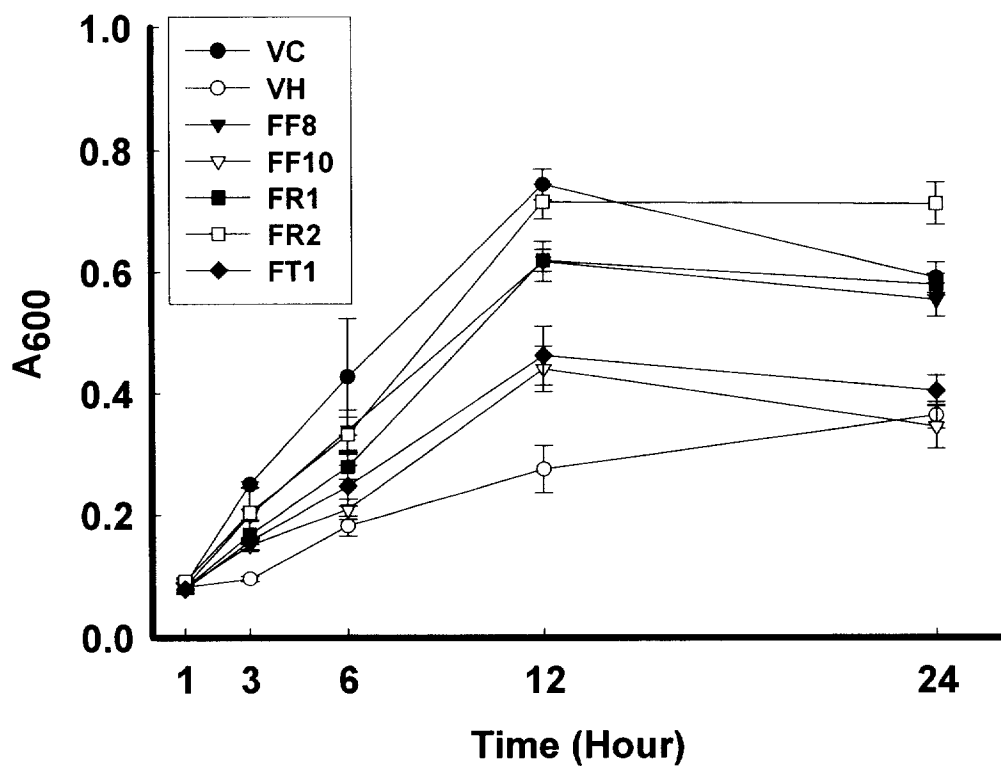


Fig. 19. Kinetics of biofilm formation of *Vibrio harveyi*.

VC, *V. harveyi* ATCC 35084; VH, *V. harveyi* ATCC 14126; FF 8~FT 1, isolated strains.

3. *V. harveyi*의 어체내 생존능

3.1. 어류 점액에서의 생존능

어류 점액을 유일한 영양원으로 성장할 수 있는지를 조사하기 위하여, 넙치와 조피볼락의 점액과 1 % agarose를 첨가하여 제작한 점액 배지에 각각의 균주를 배양한 결과를 Table 14에 나타내었다. 모든 시험 균주가 조피볼락으로 제작된 점액 배지에서는 18 시간 이내에 집락을 형성하였으나, 넙치 점액으로 제작된 배지에서는 FF 8, FR 1, FR 2 및 ATCC 14126 균주에서만 48 시간 배양 후 약하게 자랐다.

Table 14. Growth of *Vibrio harveyi* in the fish mucus agar

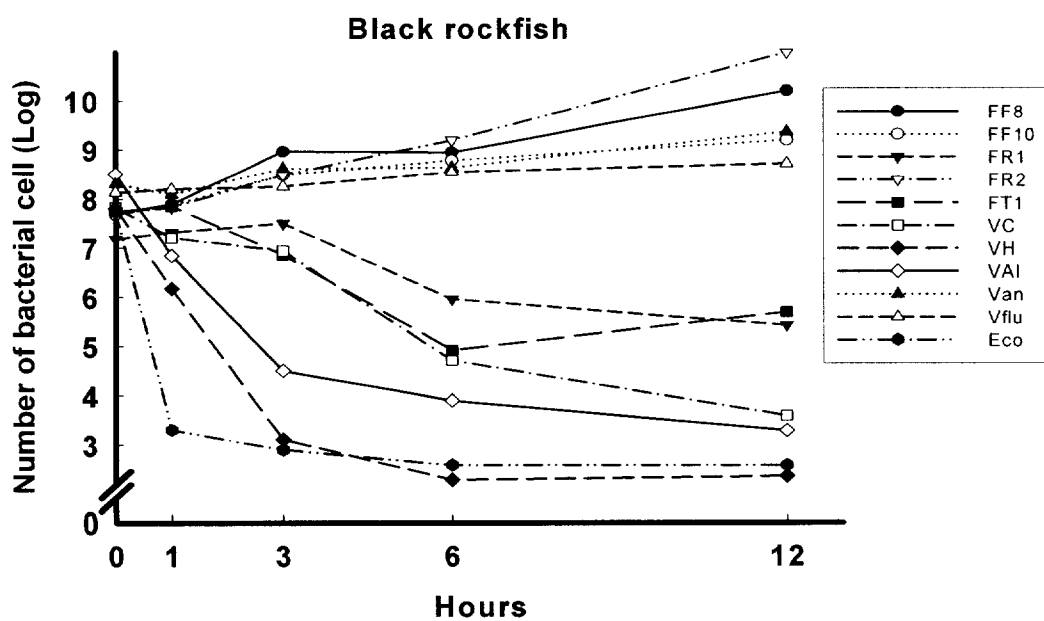
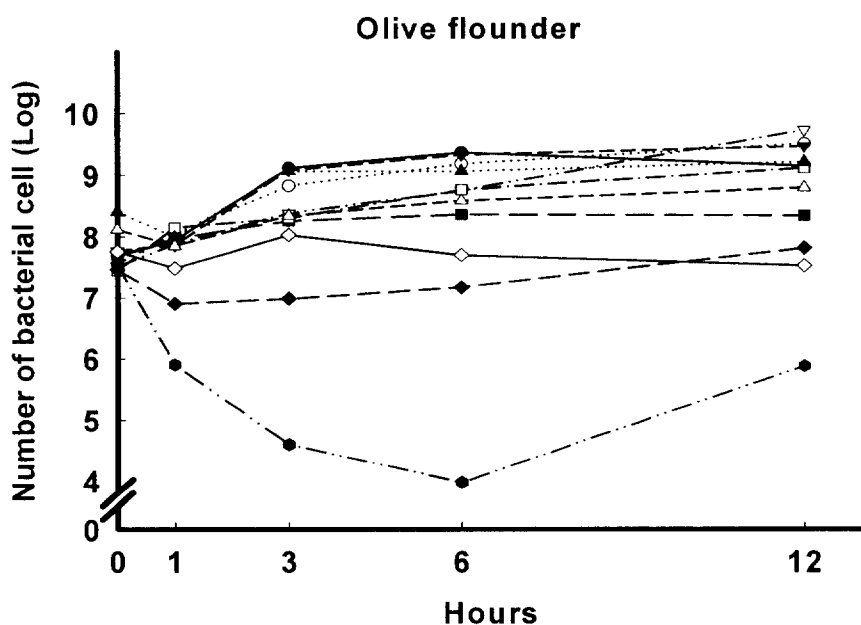
	Olive flounder mucus agar	Black rockfish mucus agar
FF 8	+ ^w	++
FF 10	-	++
FR 1	+ ^w	++
FR 2	+ ^w	++
FT 1	-	++
ATCC 35084	-	++
ATCC 14126	+ ^w	++

++, growth in 18 hours; +^w, weakly growth in 48 hours; -, no growth.

Olive flounder, *Paralichthys olivaceus*; black rockfish, *Sebastes schlegeli*.

3.2. 어류 혈청 내에서의 생존능

Fig. 20은 각종 어류의 혈청에 대한 *V. harveyi*의 생존능을 조사하여, 다른 세균들과 비교한 것이다. 넙치 혈청에서는 *E. coli*를 제외한 모든 세균이 생존하거나 증식할 수 있었으며, 시험 균주 중에서 본 연구의 분리 균주인 FR 2, FF 10, FR 1이 가장 높은 성장률을 보였다. 조피볼락 혈청은 FR 2, FF 8, *V. anguillarum*, FF 10 및 *V. fluvialis*를 제외한 모든 세균을 억제하였다. 참돔 혈청 내에서의 생존능을 조사한 결과, *E. coli*의 성장은 억제되었고 *V. alginolyticus* 및 *V. harveyi* ATCC 14126는 생존할 수 있었으며, 나머지 모든 세균은 증식하였다. 마지막으로 틸라피아 혈청 내에서의 생존능은 본 연구에 사용된 5 개의 분리 균주만이 증식할 수 있었고, 그 이외의 세균은 억제되었다. tilapia 혈청 내에서 증식률이 가장 높은 균주는 FR 2와 FF 8 이었다.



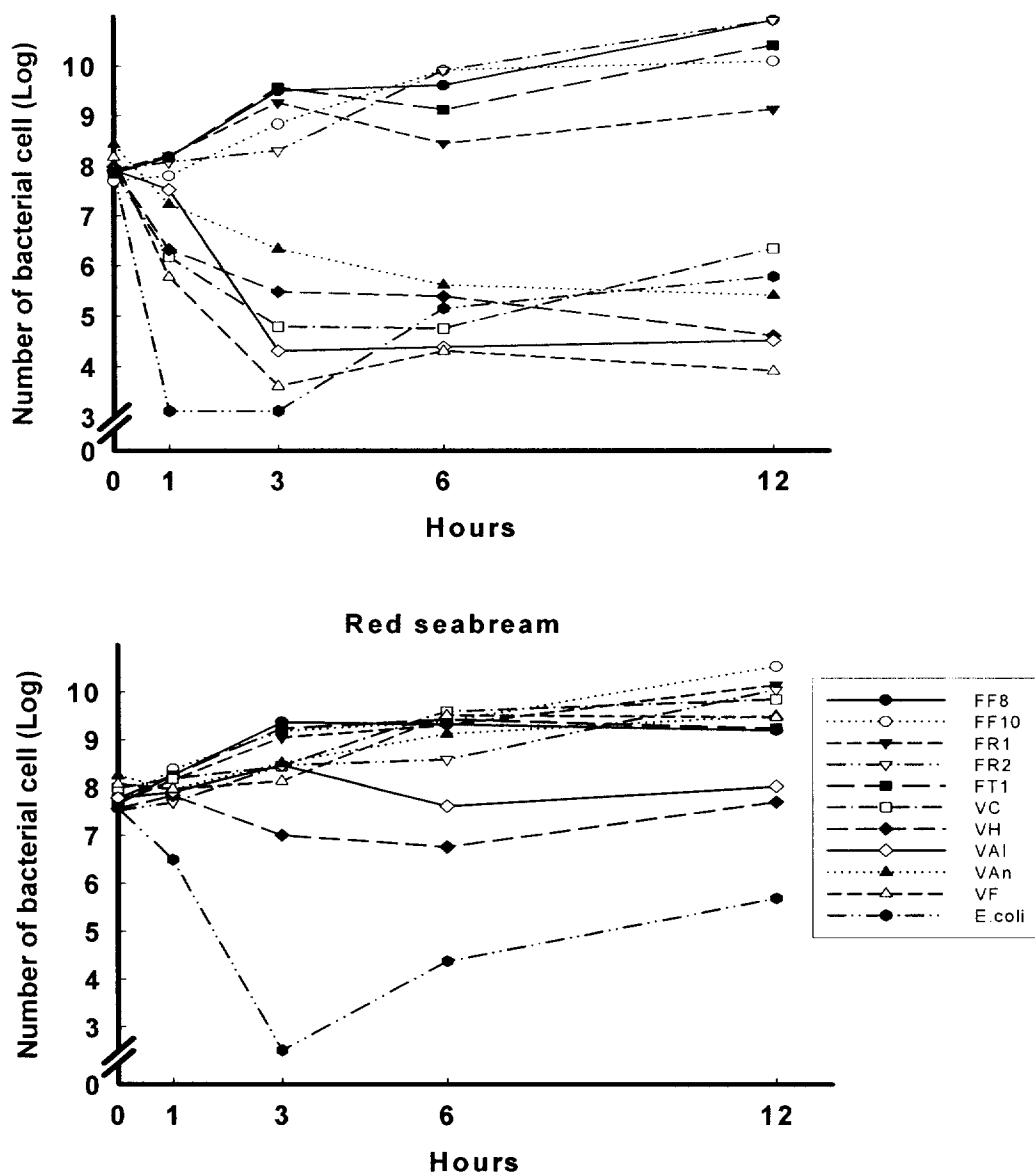


Fig. 20. Survival of isolated strains and reference strains in the fish sera.

Olive flounder, *Paralichthys olivaceus*; Black rockfish, *Sebastes schlegeli*; Red seabream, *Pagrus major*; Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*.

4. *V. harveyi* 감염이 넙치의 생리 및 비특이적 면역 기능에 미치는 영향

4.1. 혈액 성분

Table 15는 *V. harveyi*에 감염된 넙치의 생리적인 변화를 관찰하기 위해 측정된 haematocrits, hemoglobin, glucose 및 total protein의 결과를 나타낸 것이다. 주사 7 일 후 VC 시험구의 glucose 농도가 증가한 것을 제외하면, 실험 기간 내내 독력 균주인 FR 2와 비독력 균주인 VC 시험구에서 유의한 변화를 보이지 않았다 ($p < 0.05$).

Table 15. Hematological changes in the olive flounder, *Paralichthys olivaceus* after injection with 2×10^5 cfu/fish of the *Vibrio harveyi* strains

		Ht (%)	Hb (g/dℓ)	GLU (mg/dℓ)	TP (g/±dℓ)
0 d		27.8±0.76	4.37±0.15	32.3±4.21	4.41±0.30
	Control	26.3±1.15	5.99±0.05	37.8±3.15	5.01±0.30
1 d	VC	25±2.65	6.27±1.75	29.0±2.71	4.76±0.67
	FR 2	25.3±2.08	5.16±0.27	28.1±2.52	4.39±0.16
	Control	24.7±0.58	4.38±1.38	30.7±5.08	5.40±0.61
3 d	VC	26.2±0.76	6.10±1.05	29.3±3.41	5.36±0.86
	FR 2	25±2.18	4.71±0.93	26.4±6.56	4.44±0.37
	Control	31.2±3.55	3.80±0.44	26.6±3.70	4.55±0.38
7 d	VC	27.2±1.04	3.71±0.58	57.8±11.51*	5.40±0.49
	FR 2	31.8±1.53	3.63±0.61	26.57±5.33	4.49±0.13

VC, *V. harveyi* ATCC 35084; FR 2, isolate.

*, significant difference from the control, $p < 0.05$.

4.2. 점액 lysozyme 활성능

*V. harveyi*에 감염된 넙치의 비특이적 액성 면역 기능을 관찰하기 위하여, 독력 균주인 FR 2와 비독력 균주인 VC (ATCC 35084, *V. carchariae* type strain)를 2×10^5 cfu/fish로 복강 주사하여 0, 1, 3, 7 일째에 점액 lysozyme을 측정하였다 (Fig. 21). 그 결과, 독력 균주와 비독력 균주 둘 다 실험 기간 내내 대조구와 유의한 차이를 보이지 않아, *V. harveyi* 감염이 의한 넙치의 보체 살균능에 미치는 영향은 없는 것으로 판단되었다.

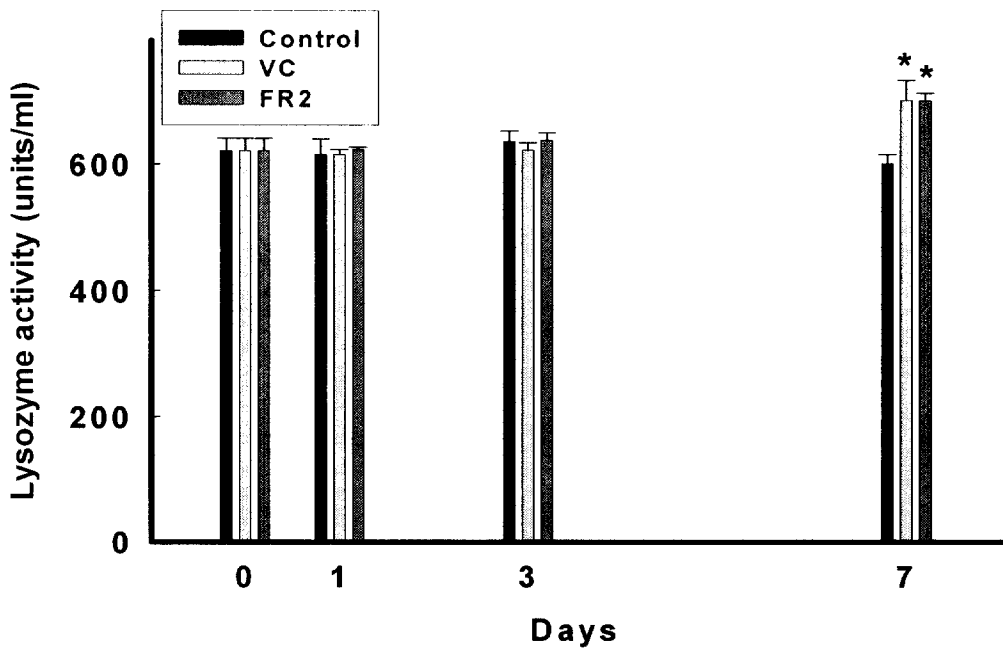


Fig. 21. Lysozyme activity in the mucus in the olive flounder, *Paralichthys olivaceus* after i.p. injection of the *Vibrio harveyi* strains as 2×10^5 cfu/fish.

VC, *V. harveyi* ATCC 35084; FR 2, isolate.

*, significant difference from the control, $p < 0.05$.

4.3. 보체의 살균능

Fig. 22에 *V. harveyi* 감염에 감염된 넙치의 보체의 살균능을 나타내었다. 독력 균주와 비독력 균주 두 시험구에서 실험 기간 내내 대조구와 유의한 차이를 보이지 않아, *V. harveyi* 감염이 넙치의 보체 살균능에 미치는 영향은 없는 것으로 판단되었다.

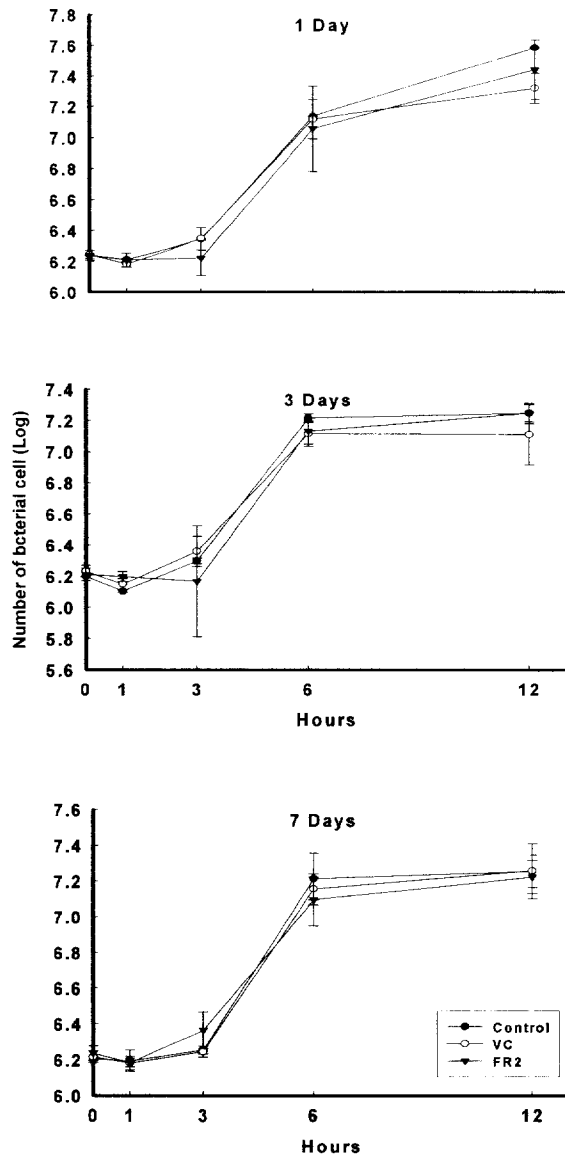


Fig. 22. Change of bactericidal reaction of complement in the olive flounder, *Paralichthys olivaceus* serum of i.p. injected with 2×10^5 cfu/fish of the *Vibrio harveyi* against *Escherichia coli*.

VC, *V. harveyi* ATCC 35084; FR 2, isolate.

4.4. 어류 두신 식세포의 활성 산소

Fig. 23는 *V. harveyi* 감염에 의한 넙치의 NBT 생산능을 측정한 것으로, 실험 기간 내내 독력 균주인 FR 2 주사구에서 높은 활성을 유지하였으며, 비독력 균주인 VC 주사구에서는 주사 1 일과 3 일째에 다소 증가하다가 7 일째에는 대조구와 유사한 수준으로 떨어졌다.

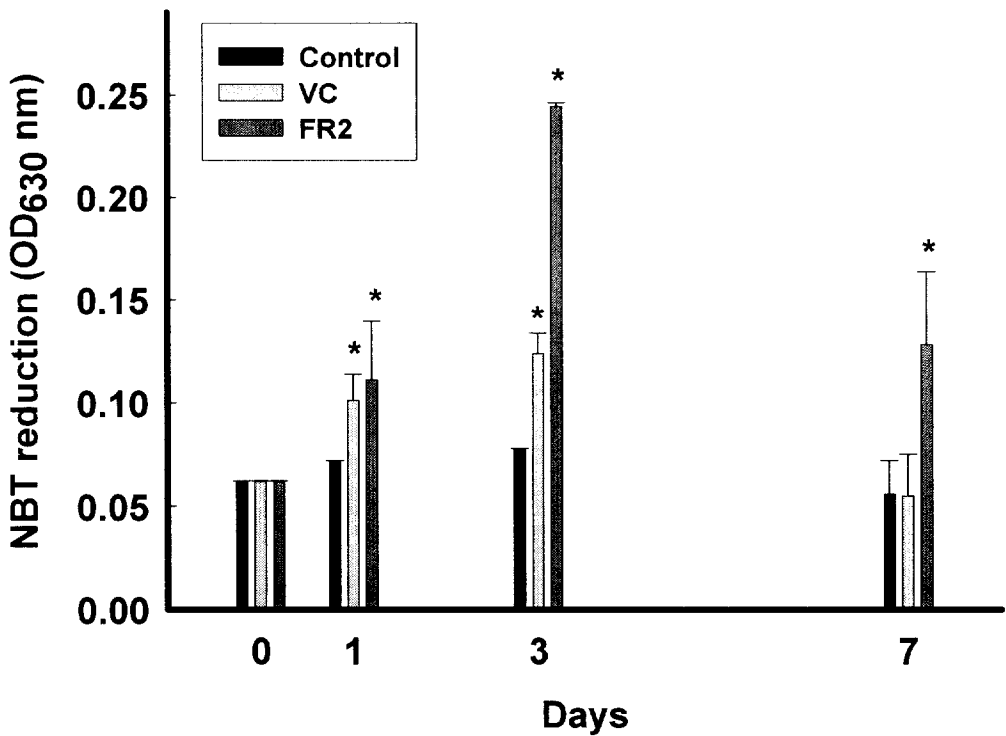


Fig. 23. NBT reduction of phagocytes in the head kidney from the olive flounder, *Paralichthys olivaceus* after i.p. injection of the *Vibrio harveyi* strains as 2×10^5 cfu/fish. VC, *V. harveyi* ATCC 35084; FR 2, isolate.

*, significant difference from the control, $p < 0.05$.

5. ECPs 활성능

5.1. Proteolytic activity

Fig. 24는 5 개의 분리 균주와 2 개의 참조 균주에서 분리한 *V. harveyi* ECPs의 효소 활성을 측정한 것으로, 어체 통과 3 회를 수행한 균주와 -80 ℃에서 장기간 보관된 균주를 구별하여 분석·비교하였다. 그 결과, 2 개의 참조 균주는 1,000 unit 이하의 낮은 활성을 보인 반면, 5 개의 분리 균주들은 20,000 unit 전후의 높은 활성을 나타내었다. 이들 5 개의 균주간에는 그다지 큰 차이를 보이지 않았으며, FR 1과 FR 2 균주를 제외한 모든 균주에서는 어체 통과 균주와 동결 보존 균주의 활성 차이가 나타나지 않았다. 반면, 단백질 양은 VC (ATCC 35084) 균주가 많았으며, 나머지 균주들은 유사하였다.

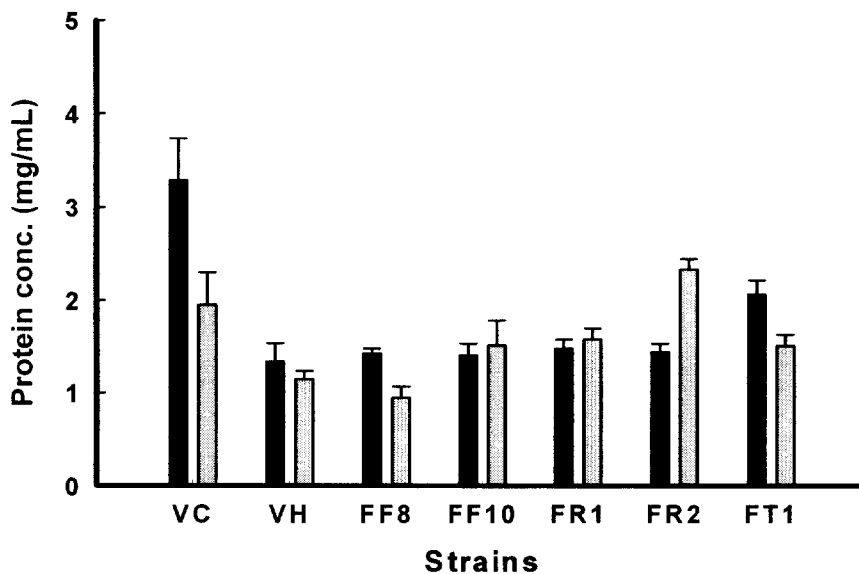
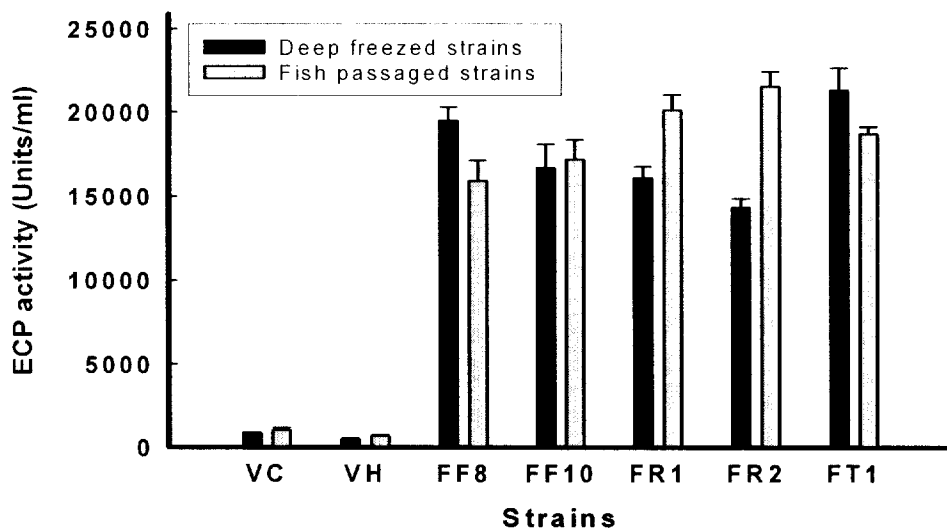


Fig. 24. Effects of three times bacterial passages through fish on the production of *Vibrio harveyi* ECPs in the tryptic soy agar. ECPs activity was detected by azocaseine method. Protein concentration was measured by Bradford method.

5.2. APIzym kit에 의한 효소 활성

Table 16은 5 개의 분리 균주와 2 개의 참조 균주로부터 추출한 ECPs를 APIzym kit에 접종하여 enzymatic activity를 측정한 결과이다. 시험 균주 모두 alkaline phosphatase, acid phosphatase 및 naphthol AS-BI phosphohydrolase에서 양성을 나타내었고 esterase, esterase lipase, trypsin 및 α -chymotrypsin에서는 균주에 따라 다양하게 나타났으며, 그 외의 효소에 대해서는 음성 반응을 보였다.

Table 16. Enzymatic activity of *Vibrio harveyi* ECPs in APIzym kit

	FF8	FF10	FR1	FR2	FT1	ATCC 35084	ATCC 14126
Alkaline phosphatase	–	+	+	+ ^w	+	+	+
Esterase	–	–	–	+ ^w	–	–	+ ^w
Esterase lipase	–	–	+ ^w	+ ^w	–	+ ^w	+ ^w
Lipase	–	–	–	–	–	–	–
Leucine arylamidase	–	–	–	–	–	–	–
Valine arylamidase	–	–	–	–	–	–	–
Crysteine arylamidase	–	–	–	–	–	–	–
Trypsin	–	+	–	+	+	+	+
α -chymotrypsin	–	–	–	+	+	+	+
Acid phosphatase	+	+	+	+	+	+	+
Naphthol AS-BI phosphohydrolase	+	+	+ ^w	+	+ ^w	+ ^w	+
α -galactosidase	–	–	–	–	–	–	–
β -galactosidase	–	–	–	–	–	–	–
β -glucuronidase	+	–	–	–	–	+	–
α -glucosidase	–	–	–	–	–	–	–
β -glucosidase	–	–	–	–	–	–	–
N-acetyl- β - glucosaminidase	–	–	–	–	+ ^w	–	–
α -mannosidase	–	–	–	–	–	–	–
α -fucosidase	–	–	–	–	–	–	–

^w, weak reaction.

5.3. 용혈능

V. harveyi ECPs의 다양한 어종의 혈액에 대한 용혈능을 관찰하여 Table 17에 나타내었다. *V. harveyi* ECPs의 용혈능은 넙치와 게르치 및 토끼 혈액에 대한 용혈능이 비교적 높았으며, 송어와 틸라피아에서는 어떠한 균주에서도 용혈이 전혀 일어나지 않았다. 또한 돔류와 볼락류에 대한 용혈능도 낮은 편에 속하였다. 균주별로 비교하였을 때, 2 개의 참조 균주는 가장 낮은 용혈능을 보였으며, 5 개의 분리 균주에서는 다양하게 나타났다.

Table 17. Haemolytic activity of the *Vibrio harveyi* ECPs harvested after incubation on the blood agar for 24 h

	FF 8	FF 10	FR 1	FR 2	FT 1	ATCC 35084	ATCC 14126
Olive flounder	1:96	1:32	1:96	1:48	1:96	0	1:16
Finespotted flounder	1:24	1:6	1:16	1:6	1:8	1:1	1:4
Black rockfish	1:1	1:0.5	1:0.5	1:1	1:8	1:0.5	0
Rockfish	1:8	1:1	1:8	0	1:4	0	1:1
Red seabream	0	1:8	1:16	1:8	1:32	1:1	1:1
Black seabream	0	0	0	0	1:8	0	0
Rock bream	1:16	1:16	1:8	1:16	1:64	0	1:4
Fat cod	1:48	1:12	1:32	1:32	1:24	0	1:12
Mullet	0	0	0	0	0	0	0
Nile tilapia	0	0	0	0	0	0	0
Rabbit	1:128	1:128	1:128	1:48	1:64	0	1:6

Olive flounder, *Paralichthys olivaceus*; Finespotted flounder, *Pleuronichthys cornutus*; Black rockfish, *Sebastes schlegeli*; Rockfish, *Sebastes inermis*; Red seabream, *Pagrus major*; Black seabream, *Acanthopagrus schlegel*; Rock bream, *Oplegnathus fasciatus*; Fat cod, *Hexagrammos otakii*; Striped mullet, *Mugil cephalus*; Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*; Rabbit, New Zealand white rabbit.

5.4. *In vitro* cytotoxicity

어류 유래의 CHSE-214와 EPC cell line에 대한 *V. harveyi* ECPs의 세포 독성을 측정하여 Table 18에 나타내었다. CHSE-214의 경우, 고농도 (250 μg) 접종 시험구에서는 12 시간째에 FF 8과 FT 1 균주에서 세포 변성이 나타내기 시작하여 24 시간째에는 FR 1과 FR2 균주까지 세포 변성을 일으켰고, 72 시간째에는 100 μg 접종 시험구에서도 FF 8, FR 2 및 FT 1 균주에서 세포 변성 효과를 나타내었다. 2 개의 참조 균주와 FF 10 균주에서는 48 시간째까지 세포 변성을 전혀 일으키지 못하였다. 반면, EPC cell line에 대한 *V. harveyi* ECPs의 세포 독성은 없는 것으로 나타났다.

Fig. 25은 FF 8 균주의 48 시간째 결과로, ECPs의 농도에 따라 대조구 (Fig. 25d)에 비해 명확한 세포 변성 효과를 보였다.

Table 18. Cytotoxic activity of the *Vibrio harveyi* ECPs

Cell line	hour	conc.	ECPs of <i>Vibrio harveyi</i> strains						
			FF 8	FF 10	FR 1	FR 2	FT 1	ATCC 35084	ATCC 14126
CHSE-214		250 μ g	+	-	-	-	+	-	-
	12 h	100 μ g	-	-	-	-	-	-	-
		25 μ g	-	-	-	-	-	-	-
		250 μ g	+	-	+ ^w	+	+	-	-
	24 h	100 μ g	+	-	-	-	-	-	-
		25 μ g	-	-	-	-	-	-	-
		250 μ g	++	-	+ ^w	+	++	-	-
	48 h	100 μ g	+	-	-	-	+	-	-
		25 μ g	-	-	-	-	-	-	-
		250 μ g	++	+	+ ^w	++	++	+	-
EPC	72 h	100 μ g	+	-	-	+	+ ^w	-	-
		25 μ g	-	-	-	-	-	-	-
		250 μ g	-	-	-	-	-	-	-
EPC		250 μ g	-	-	-	-	-	-	-
	72 h	100 μ g	-	-	-	-	-	-	-
		25 μ g	-	-	-	-	-	-	-

(a)



(b)



(c)



(d)

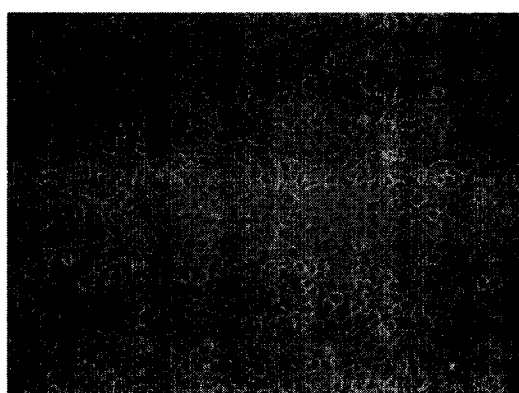


Fig. 25. Effects of cytotoxicity on fish cell line, CHSE-214 with different concentration of ECPs of the *Vibrio harveyi*, FF 8 for 48 hour incubation. Cytotoxicity activity was determined with microscopic examination. (a) 250 μg , (b) 100 μg , (c) 25 μg and (d) control.

5.5. Siderophore 생성능

Fig. 26은 *V. harveyi* ECPs의 siderophore 생성능을 측정한 결과로, 1.5 % NaCl 첨가 배지에서 추출한 ECPs (ST)와 iron chelator인 2,2'-dipyridyl을 100 μ M 첨가한 배지로부터 추출한 ECPs (DP-ST)를 구분하여 나타내었다. 모든 시험 균주에서 2,2'-dipyridyl을 처리한 후, 유의한 증가를 보였다 ($p < 0.05$). FF 10을 제외한 모든 시험 균주가 chelator 처리후 siderophore 생성능이 유의하게 증가하였으며, 특히 FR 1과 FR 2 균주에서 비교적 높은 siderophore 생성능을 확인할 수 있었다. 단, FR 1과 FR 2 균주 사이에 유의적인 차이는 없었다 ($p < 0.05$).

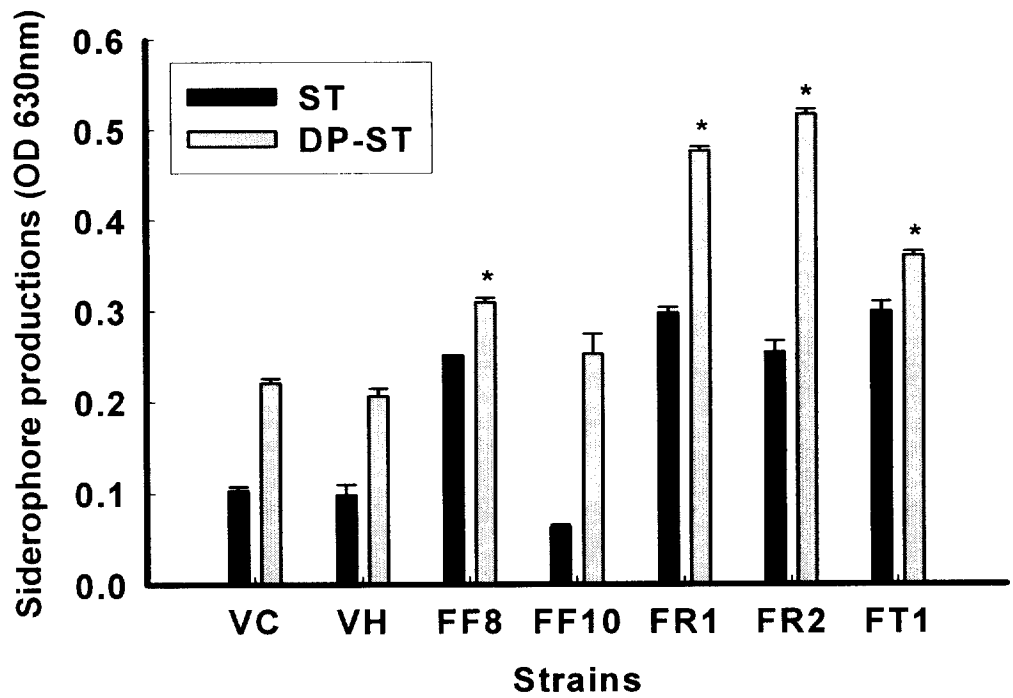


Fig. 26. Siderophore productions of *V. harveyi* ECPs extracted in 1.5 % NaCl supplemented TSA (ST) or 1.5 % NaCl and 100 μ M 2,2'-dipyridyl supplemented TSA (DP-ST) by absorbance at 630 nm. CAS assay solution used.

IV. 고찰

세균성 질병은 보통 다양한 인자들이 복합적으로 작용하여 일어나는데, 일반적으로 알려져 있는 병원성 기작의 5 가지 요건은 다음과 같다. 첫째 mucus surface에의 부착, 둘째 surface를 통해 숙주 조직으로 침입, 셋째 *in vivo* 환경에서의 증식, 넷째 숙주 방어 반응에 대한 저항, 마지막으로 숙주에의 직접적인 손상이다 (Smith, 1988). Mucus surface에의 부착능은 병원성을 일으키는 첫 번째 관문으로 많은 연구가 이루어져 있으나 (Adams et al., 1983), *Vibrio* species에 관한 연구는 *V. anguillarum*, *V. cholerae* 및 *V. parahaemolyticus*등에 한정되어 있다 (Santos et al., 1990, 1991). Surface를 통해 숙주 조직으로 침입해 들어가는 단계에서는 mucus surface에 부착한 세균이 그대로 탈락되거나 사멸되지 않고, 점액질에서 증식하거나 점액을 통과해서 숙주의 더 깊숙한 곳으로 진행해 들어가는 과정이다. 이 과정에는 세균의 biofilm 형성능, 점액을 유일한 영양원으로 증식할 수 있는 능력 등이 관련되며, 특히 biofilm 형성능은 세균에 적대적인 환경 (예, 숙주의 mucus surface)에서 생존하는 데 이상적인 model이 된다 (Fuchs, 1998). 이와 같은 과정을 거쳐, 성공적으로 숙주 조직에 침입한 세균은 생존과 증식을 위해 안식처를 찾아서 자신의 환경으로 차지해야만 하는 불리한 환경에 노출되게 된다. 따라서 충분한 영양분이 있는 서식지에서 집락을 형성하거나, 심지어는 *Mycobacterium*과 같이 숙주 세포내에 침입하여 세포 내부의 구조나 pH를 변화시켜 살아 남는 세균이 병원성을 가질 수 있게 되는 것이다 (Clemens and Horwitz, 1995). *In vivo* 환경에서의 증식은 병원성 세균과 비병원성 세균을 구별할 수 있는 중요한 indicator로 (Leung et al., 1994), 병원성 세균은 혈청 및 조직 내 뿐만 아니라 macrophage와 같은 숙주 세포 내에서 증식하기도 한다. 이렇게 숙주 조직 내에서 생존하기 위해서는 숙주의 방어 기작을 회피하거나 방해하는 능력과도 연관

된다. 마지막은 숙주에 직접적인 손상을 가하는 단계로, 병원성 기작과 관련된 연구의 많은 부분을 차지하는데, *E. coli*의 hemolysin과 *Pasteurella haemolytica*의 leukotoxin 등이 대표적이다 (Binet et al., 1997).

본 연구에서는 넙치와 조피볼락에 *V. harveyi* 균주들을 인위 감염시켜 병원성을 확인하였다. 넙치에 대한 LD₅₀은 $1.24 \times 10^6 \sim 1.36 \times 10^8$ cfu/fish로 FR 2 균주의 병원성이 가장 강하였고, 조피볼락에 대한 LD₅₀은 $3.24 \times 10^5 \sim 5.8 \times 10^7$ cfu/fish로 FT 1과 FR 2 균주의 병원성이 가장 강하였다. Santos et al. (1988)은 *Aeromonas* strain의 독력 시험에서 LD₅₀ 결과를 판별하는 기준을 제시하였는데, $1.7 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ cfu/g은 highly virulent, $1.4 \times 10^6 \sim 1.8 \times 10^7$ cfu/g은 moderately virulent, $> 10^8$ cfu/g은 non-virulent strain으로 간주하였다. 따라서 그의 기준으로 볼 때, FR 2 균주는 독력이 매우 강한 것으로 생각되며, 특히 조피볼락에 대한 감수성이 높은 것을 알 수 있었다. Soffientino et al. (1999)가 *V. harveyi*를 인위 감염시킨 100~200 g의 summer flounder, *Paralichthys dentatus*에서 보고한 LD₅₀이 5×10^5 cfu/fish로 매우 강한 병원성을 보였다. 또한 Zorrilla et al. (2003)이 70 g의 sole, *Solea senegalensis*에서 보고한 *V. harveyi* LG-14.00 strain은 LD₅₀이 2.1×10^5 cfu/fish이고, ECPs의 LD₅₀은 12 µg /fish로 병원성이 매우 높았다. 그러나, 다른 균주들은 병원성이 없거나 매우 낮아, 균주 간의 차이가 매우 큰 것으로 나타났다. 본 연구에서도 균주에 따른 독력의 차이가 매우 큰 것으로 나타났으며, 분리 유래에 따른 종 특이성은 없는 것으로 판단되었다.

병원성 기작의 첫 관문인 adhesion을 측정하는 다양한 방법들이 개발되어 병원성 세균의 독력 인자로서 많은 연구가 되어지고 있다. 특히 *V. harveyi*와 유전형과 표현형이 매우 유사한 *V. alginolyticus*의 경우는 세포 표면의 hydrophobicity가 독소 분비와 밀접한 상관관계가 있음이 밝혀져 있다 (Balebona et al., 1998; Lee, 1995). 그러나, Lee and Yui (1996)는 다양한 방법으로 *Vibrio* 종의 hydrophobicity를 측정한 결과, 측정 방법에 따른 차이가 컸으며 이들 사이의 상관성도 나타나지 않았다고 하였다. 따

라서 이들은 한 가지 방법으로는 소수성의 정도를 정할 수 없으며, 단지 강한 소수성을 띄는 것으로 조사된 strain은 모든 측정 방법에서 공통적으로 높게 나타났으므로 참고할 수 있다고 하였다. 본 연구에서도 MATH 법과 SAT 법에서의 결과가 다소 달랐으나, 병원성이 강한 FR 2 균주 공통적으로 높은 수치를 보여, 강한 소수성을 나타내는 것으로 판단되었다.

Proteus 속의 세균은 swarming 운동으로 병원의 의료 기구 표면에서 biofilm을 형성하거나 이동함으로써 의료 기구를 통한 감염으로 문제시 되고 있으며, 이러한 감염성 질환의 병원성 기작에 swarming 운동이 크게 관여한다고 알려져 있다 (Mobley and Belas, 1995). 본 연구 결과에서도 *V. harveyi*의 biofilm 형성능은 비swarming *Vibrio* 세균들보다 높은 것으로 나타났으며, 특히 병원성이 가장 강한 FR 2 균주에서 가장 높은 수치를 보여 숙주에 대한 부착능이 높은 것으로 판단되었다.

숙주 표면에서의 부착에 성공한 병원체는 숙주 조직에서 생존·증식할 수 있어야 한다. 본 연구 결과, *V. harveyi* 또한 점액을 유일한 영양원으로 증식할 수 있었으며, 다양한 어류의 혈청 내에서도 증식하였다. 넙치와 조피볼락의 점액으로 측정된 증식능에서 모든 시험 균주들은 조피볼락의 점액에서 18 시간 이내에 증식한 반면, 넙치의 점액에서는 48 시간이 지난 후 약한 집락을 형성하여 어종에 따라 증식능의 차이를 볼 수 있었다. 그 원인에 대해서는 밝히지 못하였으나, 본 시험균은 두 어종의 점액에서 집락을 형성할 수 있었으므로 병원균으로서의 가능성을 시사한 것으로 생각된다. *V. harveyi*의 어류 혈청 내 생존능은 다른 세균들에 비해 매우 높은 것으로 조사되었는데, FR 2 균주가 모든 어류 혈청에서 높은 생존능을 보였으며, 특히 조피볼락의 혈청은 다른 어류의 혈청에 비해 세균의 증식을 억제하는 능력이 강하여 2 종의 세균 (FR 2와 FF 8)에서만 증식이 확인되었다. 어류 혈청에서 생존할 수 있는 능력은 병원성 세균과 비병원성 세균을 구별할 수 있는 중요한 indicator가 되며, Leung et al. (1994)에 의하면 비병원성 *Aeromonas hydrophila*가 틸라피아의 혈청에서 기하 급수

적으로 감소하는 반면에 병원성의 *A. hydrophila*는 지속적으로 생존한다고 하였다. 이러한 특성은 rainbow trout에 cold water disease를 유발하는 *Flavobacterium psychrophilum*에서도 동일하게 나타났다 (Wiklund and Dalsgaard, 2002). 따라서 본 시험균과 같이 혈청내 생존능이 강한 균은 어류에 대한 병원성도 강하다는 것을 시사하는 것으로 사료된다.

이러한 숙주 조직 내에서의 생존능에 세균의 면역 회피능이 작용할 수도 있으므로, *V. harveyi*가 인위 감염된 넙치의 비특이적 면역 반응을 조사하였다. 그러나, *V. harveyi* 감염으로 인한 비특이적 체액성 면역의 변화는 없었으며 비특이적 세포성 면역능이 약간 상승하는 것으로 나타나, 특별히 어류의 면역 반응을 방해할 수준은 아닌 것으로 생각되었다.

어류의 조직 내에 침입한 병원체는 어류 조직에 직접적인 손상을 일으키며 최종적으로 병원성을 발휘하게 된다. *V. harveyi*의 병원성 기작에 대한 연구 중, 가장 잘 명되어 있는 것이 ECPs의 독력으로서, 이전 연구자들의 대부분은 *V. harveyi*의 ECPs를 분리하여 새우 및 해수 어류에 주사한 후 유의한 폐사를 확인하고, protease 활성, 용혈능 및 세포 독성 등과 이들 폐사율과의 관련성을 입증하여 병원성의 중요한 인자의 하나임을 증명하였다 (Liu and Lee, 1999; Zhang and Austin, 2000). Montero and Austin (1999)는 감염된 *Penaeus vannamei*에서 분리한 *V. harveyi* ECPs가 rabbit, sheep 및 donkey의 혈액에 대한 용혈능을 가지며, *Nephrops morvegicus*의 cultured haemocytes에 대해 접종 1 시간 후부터 강한 세포 독성을 나타낸다고 하였다. 또한 Zhang and Austin (2000)은 *V. harveyi* 중에서 연어과 어류에 가장 강한 독력을 보인 VIB 645 균주가 Atlantic salmon과 rainbow trout 적혈구에 대한 용혈능이 가장 높았다고 하였다. 본 연구에서도 다양한 어류, 특히 넙치 혈액에 대한 용혈능과 어류 유래 주화 세포인 CHSE-214에서의 세포 독성이 확인되었다. 그러나, 공격 실험에서 감수성이 높은 어종으로 밝혀진 조피볼락의 적혈구에 대한 용혈능은 거의 나타나지 않

았으며, 강한 용혈능을 보인 녀치의 적혈구에 대해서도 참조 균주에 비해서는 높은 용혈능을 보였지만 독력 균주와 비독력 균주와의 뚜렷한 차이가 없었다. 따라서 *V. harveyi*의 병원성 기작에 용혈능이 미치는 영향은 그다지 크지 않을 것으로 생각된다. 그러나, 독력 균주와 비독력 균주 사이의 세포 독성에는 차이가 있어, *V. harveyi*의 세포 독성을 유발하는 인자가 병원성 기작에 관여할 것으로 생각되었다.

철 획득 능력과 병원성과의 연관성에 관한 연구는 species 혹은 strains에 따라 다양하게 나타나나, 일부 어병 세균에서는 병원성 인자로 작용할 것이라는 증거 또한 많이 나오고 있다. Igarashi et al. (2002)는 *Edwardsiella tarda*의 독력 균주와 비독력 균주를 구분하여 siderophore 생성능을 조사한 결과 뚜렷한 유의성을 확인하여 siderophore와 *E. tarda*의 병원성이 상관 관계를 가진다고 보고하였다. Owens et al. (1996)이 *V. harveyi*에서도 유사한 결과를 보고하였는데, 88 개의 조사 균주 중 78.4 %에서 siderophore가 생성되었으며 무척추 동물 유래의 *V. harveyi*는 병원성과 무관하나, 해수와 어류 유래의 *V. harveyi*는 병원성과 유의한 상관 관계를 나타내었다. 본 연구의 결과에서도 철 결핍 조건에서 FF 10 균주를 제외한 모든 분리 균주에서 참조 균주보다 유의하게 높은 siderophore 생성능을 보였으며, 특히 병원성이 가장 높은 것으로 확인된 FR 2 균주가 가장 높은 생성능을 보여, *V. harveyi*도 병원성 발현에 siderophore의 생성능과 관련성이 있을 것으로 생각되었다.

이상에서, *V. harveyi*가 녀치와 조피볼락에 병원성을 나타내는 것을 확인하였고 FR 2 균주에서 특히 높은 독력을 보였다. *V. harveyi*가 이러한 병원성을 일으키는 과정은 다음과 같이 정리할 수 있을 것으로 생각한다. *V. harveyi*는 세포 표면의 소수성을 이용하여 숙주에 부착한 후, 뛰어난 biofilm 형성능을 통해 숙주 세포와 접촉한 후 오랜 시간 동안 부착하고 이 과정에서 어류 점액 세포를 영양원으로 증식하면서 숙주 체내로 침입할 수 있는 것으로 생각된다. 이렇게 침입한 세균은 혈청 내에서 매우 급격히 증식할 수 있어 숙주 체내에서 대량 증식을 하는 것이 병원성 기작에 중요한

역할을 수행하는 것으로 보인다. 이렇게 증식한 균체는 ECPs를 분비하여 숙주로부터 철을 빼앗아 이용하거나 숙주의 여러 단백질을 분해하고 세포 독성을 일으켜 직접적인 손상을 가하는 것으로 추측된다. 이와 같이 *V. harveyi*의 독력 균주는 특정 독력 인자에 의해 병원성이 좌우되는 것이 아니라, 이상의 병원성 기작에 대해 전반적으로 비독력 균주보다 유세한 능력을 가짐으로서, 이들 각 능력들이 복합적으로 병원성을 발휘하는 것으로 판단된다.

V. 요약

1. *V. harveyi* 생균의 넙치에 대한 LD₅₀ (1 주일)은 $1.24 \times 10^6 \sim 1.36 \times 10^8$ cfu/fish로 FR 2 균주의 병원성이 가장 강하였으며, 조피볼락에 대한 LD₅₀ (1 주일)은 $3.24 \times 10^5 \sim 5.8 \times 10^7$ cfu/fish로 FT 1과 FR 2 균주의 병원성이 가장 강하였다. *V. harveyi* ECPs의 LD₅₀ (1 주일)은 넙치에서 39.9~57.3 µg/fish로 나타났으며, FR 2 균주의 ECPs가 가장 강한 독력을 가지는 것으로 조사되었다. 생균과 ECPs 모두 2 개의 참조 균주에서 병원성이 없거나 매우 약한 것으로 조사되었다.
2. *V. harveyi* 세포 표면의 hydrophobicity는 MATH 시험에서 FR 1, FR 2 및 ATCC 14126 균주에서 높게 나타났으며, SAT 시험에서는 FR 2, ATCC 35084 및 ATCC 14126에서 높게 측정되었다.
3. 병원성이 강한 FR 2 균주의 biofilm 형성능이 가장 지속적으로 높은 값을 나타내었다. 또한 *V. harveyi*는 점액을 유일한 영양원으로 이용하여 증식할 수 있으며, 다양한 어류의 혈청 내에서 생존·증식할 수 있었다.
4. 우리 나라 양식 해수어에서 분리된 *V. harveyi*는 참조 균주에 비해 현저히 높은 ECPs의 proteolytic activity를 가지고, 넙치, 게르치, 토끼 등의 혈액에 대한 용혈능을 가지며, 어류 유래의 주화 세포인 CHSE-214에 대한 세포 독성을 보였다. 또한 *V. harveyi*는 siderophore를 생성하는데, 특히 FR 1과 FR 2 균주에서 높게 나타났다.

종합 고찰

1999년 여름철 고수온기에 경북, 경남 및 부산 인근의 몇몇 넙치 양식장에서 세균 감염증으로 보이는 질병에 의해 넙치의 내장 폐사가 발생하여 그 원인을 조사하게 되었다. 감염어는 탈장, 복부 팽만, 장 충혈, 장액 삼출 및 간 출혈 등의 특징적 증상을 보이면서 폐사하였고 감염어의 환부 및 내부 장기에서 원인균으로 추정되는 세균을 분리할 수 있었다. 이 원인체는 여러 가지 생화학 시험과 유전학적 조사를 통해 *V. carchariae*임을 밝혔으나, *V. carchariae*는 분류학적으로 *V. harveyi*의 junior synonym으로 재명명되었고 (Pedersen et al., 1998), 이전의 *V. harveyi* type의 특징인 luminescence를 띄지 않아 non-luminous *V. harveyi*로 구분하였다. 이 두 종은 Pedersen et al. (1998)에 의해 하나의 종으로 재명명되기는 하였으나, *V. harveyi* type은 주로 무척추 동물에, *V. carchariae* type은 어류에서 질병을 일으키며, luminescence 또한 전자에서만 발현되므로 미생물학적·어병학적 관점에서 이 두 종의 관계를 재해석할 필요성이 있을 것으로 생각하게 되었다.

본 연구에서는 형태학적, 생화학적, 유전학적 분석을 통해 정확한 동정을 시도하였으며, 16S rRNA 염기 배열 분석을 통해 *V. harveyi* type보다 *V. carchariae* type에 더 가까운 것을 밝혔다. 나아가 *V. harveyi*만을 신속하게 동정할 수 있는 생화학 분류 key와 16S rRNA PCR법을 제안하였다. *V. harveyi*는 *V. alginolyticus* 및 *V. parahaemolyticus*와 16S rRNA가 매우 유사하여, 이 유전자를 이용한 *Vibrio* species의 신속 진단법에서는 구별이 되지 않았다. 최근 들어, *V. harveyi*의 검출을 위해 몇몇 16S rRNA 유전자 부분에서 제작된 primer가 발표되었으나, 이 또한 일부 *V. alginolyticus*를 분별해내지는 못하였다. 따라서 본 PCR 간이 동정법으로 간편한 동정이 가능할 것으로 보인다.

작성된 생화학 분류 key와 PCR 동정법을 응용하여 넙치 양식장의 *V. harveyi* 분포를 조사한 결과, 여름철 (8월과 9월) 고수온기에 전체 *Vibrio* sp. 중에서 *V. harveyi*가 차지하는 비율이 급격히 증가하는 것을 알 수 있었다. 이 시기의 수온은 각각 22.8과 24.9 °C로서, 수온이 21 °C 이상일 때 *V. carchariae*의 발병이 급증한다는 보고 (Soffientino et al., 1999)와 본 연구의 조사에서 여름철에 검출 빈도 및 발병 비율이 증가한 것과 연관성이 클 것으로 생각된다.

*V. harveyi*는 다른 *Vibrio* sp.와 같이 광염성 세균으로, 5 개의 분리 균주와 2 개의 참조 균주 모두 7 % 염분 농도에서 성장하였으며, 증식 온도는 37 °C에서 성장하였으나 40 °C에서는 성장하지 못하였다. *V. harveyi*의 최적 성장 조건은 3 % NaCl 첨가 배지에서 30 °C로 배양하는 것이었다. 본 연구에서는 고수온기에 집중적으로 분리되는 *V. harveyi*의 특성이 수온 상승에 의한 증식 속도보다는 swarming 운동이나 biofilm과 같이 생존에 영향을 미치는 여러 인자들이 관여했을 것으로 생각한다. *V. harveyi*의 ECPs 분리를 위해서는 1.5 % NaCl 첨가 TSA 배지에서 25 °C, 24 시간 배양한 후 pH 8.0의 buffer를 사용하여 분리하는 것이 가장 적절한 것을 알 수 있었다. ECPs의 주요 성분은 serine protease이며, cysteine protease가 주요 성분인 새우 유래 *V. harveyi* type과는 차이가 났다. 이러한 특성으로 볼 때 본 시험 균주가 *V. carchariae* type인 것을 시사한 것으로 판단된다. 또한 luminescence 시험에서는 5 개의 분리 균주 모두 음성으로 나타나 본 분리 균주들이 *V. carchariae* type strain임을 더욱 뒷받침해 주었다. *V. harveyi*의 가장 큰 특징 중의 하나인 swarming 운동은 1.5 % NaCl 첨가 TSA 배지에서 가장 활발하였으며, 하나의 극편모 (polar flagella)로 액체 환경에서 움직이는 swimming activity 때와는 달리 군체가 길어지고 측면에 여러 개의 lateral flagella가 생성되는 것을 확인하였다. 이러한 관찰은 *V. carchariae* type strain에서는 처음으로 확인되었으며, 더욱이 lateral flagella의 양 끝이 서로 다른 세포에 부착된 것이 관찰되어 다른 swarming bacteria와 동일하게 세포 간

communication에 관여할 가능성도 확인하였다 (Belas and Colwell, 1982). *V. harveyi*의 균체 단백질은 50 kDa 부근의 major protein과 균주에 따라 상이하게 나타나는 40 kDa 부근의 band로 특징지을 수 있었다. 5 개의 분리 균주들은 protein pattern에 따라 FR 1과 FT 1, FR 2와 FF 10, 그리고 FF 8 균주의 3 group으로 나눌 수 있었다. *V. harveyi* ECPs는 34 kDa의 major protein을 가지지만 균주간의 차이는 확인할 수 없었다.

본 연구에서는 *V. harveyi*가 병원성을 발휘하는 과정을 일반적인 병원성 기작의 5 가지 단계에 맞추어 분석하고자 하였다. 병원성 기작에 대한 구명 이전에, 넙치와 조피볼락에 인위 감염시켜 병원성을 확인하였다. 그 결과, 넙치에 대한 LD₅₀ (1 주일)은 $1.24 \times 10^6 \sim 1.36 \times 10^8$ cfu/fish로 FR 2 균주의 LD₅₀ (1 주일)값이 가장 낮았고, 조피볼락에 대한 LD₅₀ (1 주일)은 $3.24 \times 10^5 \sim 5.8 \times 10^7$ cfu/fish로 FT 1과 FR 2 균주의 LD₅₀ (1 주일)값이 가장 낮았다. 특히, FR 2 균주는 독력이 매우 강한 것으로 생각되며, 조피볼락에 대한 감수성이 더 높았다. 그러나, 균주에 따른 종 특이성은 없는 것으로 판단되었다.

*V. harveyi*의 병원성 발현 첫 단계인 adhesion을 측정하기 위해, MATH와 SAT 법을 이용하여 *V. harveyi*의 hydrophobicity를 측정하였다. 두 시험 방법에 따른 결과가 일치하지 않아 *V. harveyi*의 소수성의 정도를 정확히 나열할 수는 없었으나, FR 2 및 ATCC 14126 균주에서는 두 가지 방법 모두에서 높은 수치를 보여 이 두 균주의 소수성은 매우 강할 것으로 추정되었다. 또한 *V. harveyi*의 biofilm 형성능을 polystyrene에 부착하는 능력으로 평가하였을 때, 시험 균주들 중 swarming 균주들은 모두 높은 것으로 나타났으며, 특히 FR 2 균주에서 가장 높은 수치를 보였다.

숙주 표면에 부착하는 것에 성공한 병원체는 숙주 조직에서 생존·증식하게 된다. *V. harveyi*는 점액을 유일한 영양원으로 증식할 수 있었으며, 다양한 어류의 혈청 내에서도 증식하였다. 넙치와 조피볼락의 점액에 대한 증식능 시험에서 모든 시험 균주

들은 조피볼락의 점액에서 18 시간 이내에 증식하였으며, 넙치의 점액에서는 FF 8, FR 1, FR 2 및 ATCC 14126 균주에서만 48 시간이 지난 후 집락을 형성하였다. *V. harveyi*의 어류 혈청 내 생존능은 다른 세균들에 비해 매우 높은 것으로 조사되었는데, FR 2 균주가 모든 어류 혈청에서 높은 생존능을 보였으며 특히 조피볼락의 혈청은 다른 어류의 혈청에 비해 세균의 증식을 억제하는 능력이 강하였지만 병원성이 강한 FR 2와 FF 8 균주는 혈청내에서 증식하는 것이 확인되었다. 이러한 결과는 *V. harveyi*의 병원성 기작에 이들 혈청 내에서의 생존능이 크게 기여할 것으로 판단되었다.

V. harveyi 감염으로 인한 비특이적 체액성 면역 반응의 변화는 없었으며 비특이적 세포성 면역능이 약간 상승하는 것으로 나타났으나 특별히 어류의 면역 반응을 방해할 수준은 아닌 것으로 생각되었다.

*V. harveyi*의 어류 조직에 대한 직접적인 손상 여부를 시험한 결과, 어류 유래 주화 세포인 CHSE-214에서의 세포 독성이 확인되었으며, FR 1과 FR 2 균주에서는 비교적 높은 siderophore 생성 능력이 있는 것으로 나타났다. 따라서 숙주 조직에 침입하여 생존·증식한 *V. harveyi*는 ECPs의 cytotoxic activity 및 siderophore 산생능 등을 통하여 숙주 세포에 직접적인 손상을 가할 것으로 생각된다.

본 연구에서는 양식 해수 어류의 *V. harveyi* 감염증을 처음으로 보고하였으며, 이 질병의 원인체에 대한 생화학 분류 key 및 PCR 간이 동정법을 제안하였다. 또한 *V. harveyi*의 미생물학적 특성을 밝히고 실제 인위 감염 시험에서도 자연 감염과 동일한 증상으로 폐사되는 것을 관찰하였으며, 나아가 이러한 병원성 기작을 해명하고자 하였다. *V. harveyi*가 질병을 일으키는 기작은 뛰어난 biofilm 형성능을 통해 숙주 세포에 오랜 기간 부착한 후 어체 내에 침입하여 혈청 등에서 증식하는 능력이 관여할 것으로 보인다. 어체 내에서 증식한 이들 세균은 cytotoxic activity 및 siderophore 산생능과 같은 ECPs 활성을 통해 숙주 조직에 직접적인 손상을 가하는 것으로 사료된

다.

요 약

본 연구는 최근 몇 년간, 동해 및 남해안 지역의 해수어 양식장에서 복부 팽만, 장 충혈, 장액 삼출 등의 주증상을 나타내며 폐사하는 어류를 대상으로, 정확한 질병 원인을 밝히고자 하였으며 분리된 병원체의 미생물학적·어병학적 특성을 관찰하여 이 질병의 현황 파악과 예방 및 치료에 대한 토대를 마련하고자 하였다.

1. *Vibrio harveyi*의 분리 및 동정

1999년 여름철 이후, 우리 나라 해수어 양식장에서 발생하는 질병의 원인체가 *V. carchariae* 임을 밝혔다. 그러나 분류학적으로 *V. harveyi*의 junior synonym으로 재명명되어, 이전의 *V. harveyi* type strain의 특징인 luminescence를 띄지 않는 특성을 반영하여 non-luminous *Vibrio harveyi*로 구분하였다. 또한 *V. harveyi*의 간편하고 신속한 진단을 위해, 생화학적 진단 key와 16S rRNA 유전자의 특이 primer를 이용한 진단법을 개발하였으며, 이를 바탕으로 넙치 양식장 내에서 *V. harveyi*의 분포를 조사한 결과, 5~10월까지 지속적으로 분리되며, 고수온기인 8, 9월에 전체 *Vibrio* 중 *V. harveyi*의 비율이 급증한다는 사실을 밝혔다.

2. *V. harveyi*의 미생물학적 특성

*V. harveyi*는 염분 농도 3 %, 온도 30 ℃에서 가장 잘 증식하였다. ECPs 생성은 1.5 % NaCl 첨가 TSA 배지에서 25 ℃, 24 시간 배양하는 것이 가장 적절한 것으로 나타났다. 5 개 분리 균주의 주요 ECPs 성분은 serine protease로 밝혀졌다. *V. harveyi*의 특징인 swarming 운동은 1.5 % NaCl 첨가 TSA에서 가장 활발하고 이 때에는 균체가 길어지고 polar flagella와 달리 짧고 곧은 lateral flagella의 수가 증가하였다. *V.*

harveyi type strain의 가장 큰 특징인 luminescence는 나타나지 않았다. *V. harveyi*의 균체 단백질은 50 kDa 부근의 major protein을 가지고, 균주에 따라 40 kDa 근처에서 상이한 band pattern을 보였으며, ECPs 단백질은 34 kDa의 major protein을 나타내었다.

3. *V. harveyi*의 병원성 기작

*V. harveyi*는 넙치와 조피볼락에 병원성을 가지는 것으로 조사되었는데, *V. harveyi* 생균의 넙치에 대한 LD₅₀ (1 주일)은 $1.24 \times 10^6 \sim 1.36 \times 10^8$ cfu/fish로 FR 2 균주의 LD₅₀ (1 주일)값이 가장 낮았으며, 조피볼락에 대한 LD₅₀ (1 주일)은 $3.24 \times 10^5 \sim 5.8 \times 10^7$ cfu/fish로 FT 1과 FR 2 균주의 LD₅₀ (1 주일)값이 가장 낮았다. *V. harveyi* ECPs의 LD₅₀ (1 주일)은 넙치에서 39.9~57.3 $\mu\text{g}/\text{fish}$ 로 나타났으며, FR 2 균주의 ECPs가 가장 낮은 LD₅₀ (1 주일)값을 보였다. 2 개의 참조 균주에서는 생균과 ECPs 모두 병원성이 없거나 매우 약한 것으로 조사되었다. *V. harveyi*는 biofilm 형성능이 뛰어나, 숙주 세포와 접촉한 후 오랜 시간 동안 부착해 있을 수 있으며, 이 과정에서 어류 점액 세포를 영양원으로 증식하여 숙주 체내로 침입한 후 혈청 내에서 증식할 수 있다. 이렇게 증식한 균체는 ECPs를 분비하여 숙주로부터 철을 빼앗아 이용하거나 숙주의 여러 단백질을 분해하고 세포 독성을 일으켜 직접적인 손상을 가하는 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문이 완성될 수 있도록 무한한 가르침을 주신 지도교수 박수일 교수님께 깊이 감사드립니다. 연구실 생활을 처음 시작한 칠었던 학부 시절부터 이제 막 학문의 길에 들어선 부족하기 그지없는 지금의 모습까지, 변함없는 사랑으로 이끌어 주신 교수님께 이 장을 빌어 진심으로 감사의 마음을 전해 올리고 싶습니다. 바쁘신 중에도 부족한 논문을 지도해 주신 정현도 교수님, 정준기 교수님, 국립 수산과학원 김진우 팀장님께 감사드리며, 특히 먼 거리도 마다하지 않으시고 오셔서 부족한 논문을 세심하게 지도해 주신 동해 수산연구소 방종득 팀장님께 깊이 감사드립니다. 또한 박사 과정 동안 늘 관심을 가져주신 허민도, 강주찬, 김기홍 교수님께도 감사히 생각합니다.

늘 변함없는 관심으로 지켜봐 주신 국립수산 과학원의 김이청 연구관님과 최혜승, 이주석, 지보영, 조미영 연구사님, 그리고 학위 논문 준비를 함께 한 동해 수산연구소의 권문경 연구사님께도 감사드립니다. 그리고 수산 기술관리소의 박현식, 이재일 선배님과 국립수산물 품질관리원의 이상윤, 강민진 선배님과 성명희에게도 고마움을 전하고 싶습니다.

언제나 든든한 힘이 되어 준 어병 예방학 연구실의 이덕찬, 황미혜 선배님과 이화 선생님, 그리고 실험에 많은 도움을 준 최현숙, 최광진, 홍미주, 김은전, 황성돈, 김수현, 문정현, 김승훈, 이준희 후배님들에게도 감사의 말을 전하고 싶습니다. 특히 때로는 희열을, 때로는 좌절을 경험하게 해 준 긴 실험 기간 동안 한 번의 쯤그림도 없이 묵묵히 나를 믿고 따라와 준 최정현 후배님께서는 그녀의 노력이 고스란히 배어 있는 이 논문의 한 자락을 빌어 진심으로 고마움을 표하고 싶습니다. 그리고 긴 실험실 생활 동안 다정한 친구로, 때로는 든든한 동료로 그리고 때로는 학문의 선배로서 많은 힘이 되어준 김수미와 온갖 궂은 일들을 마다하지 않고 힘들 때마다 큰 도움이 되어

준 우승호에게는 뭐라 표현할 수 없을 만큼 고맙게 생각합니다. 또한 많은 조언과 도움을 받았던 약리학 실험실의 서정수 동기님과 이상환 후배님, 멀리 일본에서 학문에 매진하고 있는 한현자, 김현정 후배님, 그리고 생각만으로도 든든한 93 동기들에게도 감사한 마음을 전합니다.

실험어의 조달에 도움을 주신 강명석, 배찬민 선배님과 비록 학과 선배는 아니지만 항상 깊은 관심으로 지켜봐 주고 마지막 가장 필요한 순간에 실험어를 구해 주신 해양수산 개발원의 김대영 박사님께 깊이 감사드리며, 이렇게 힘들게 구한 실험어를 좋은 환경에서 실험할 수 있도록 장소를 제공해 주신 수산과학 연구소 소장님께도 감사드립니다. 아울러 강원도립대학의 김병기, 김형배 교수님께도 감사드리며, 이 밖에도 박사 과정동안 아낌없는 조언과 도움을 주신 많은 분들께 감사드립니다.

공부를 계속할 수 있도록 적극 지원해 주신 시아버지, 시어머니와 아주버님 내외께 감사드리며, 항상 나를 위해 기도해 준 오빠의 학문에도 큰 발전이 있기를 기원합니다. 부족하기 그지없는 딸이지만 제 일이라면 뭐든지 믿고 후원해 주시는 어머니, 아버지. 그동안 논문을 쓴다는 핑계로 어리광만 부렸던 제 불효를 다 어찌해야할지 막막하지만, 이 부족한 논문을 빌어 제 마음을 전하고자 합니다. 감사합니다. 그리고 사랑합니다. 마지막으로 이 세상 그 누구보다 소중한 나의 반쪽, 남편에게 고맙고 사랑하는 마음의 아주 일부분이라도 표현하고 싶습니다. 논문을 쓰는 힘든 기간 내내 건강하게 잘 자라준 곧 태어날 하늘이에게 많이 고맙고 미안합니다. 이제 하늘이와 남편에게 이 고마운 마음을 조금이나마 보답하는 마음으로 살려고 합니다.

참고 문헌

- Abraham, T. J. and R. Manley (1995). Luminous and non-luminous *Vibrio harveyi* associated with shell disease in cultured *Penaeus indicus*. J. Aqua. Trop., 10, 273-276.
- Adams, D., H. M. Arkinson and W. H. Woods (1983). The differing effect of proteases on the adhesins of *Aeromonas hydrophila*. FEMS Microbiol. Letters, 20, 197-200.
- Alsina, M and A. R. Blanch (1994). A set of keys for biochemical identification of environmental identification of *Vibrio* species. J. Appl. Bacteriol., 77, 719-721.
- Alvarez, J. J., B. Austin, A. M. Alvarez and H. Reyes (1998). *Vibrio harveyi*: a pathogen of penaeid shrimps and fish in Venezuela. J. Fish Dis., 21, 313-316.
- Austin B. and D. A. Austin (1999). Bacterial fish pathogens. Diseases of farmed and wild fish, 3rd ed., Springer-praxis publishing, Godalming.
- Austin, B., D. A. Austin, I. Dalsgaard, B. K. Gudmundsdottir, S. Hoie, J. M. Thornton, J. L. Larsen, B. O'Hici and R. Powell (1998). Characterization of atypical *Aeromonas salmonicida* by different methods. Syst. Appl. Microbiol. 21, 50-64.
- Balebona, M. C., M. Andreu, M. Bordas, I. Zorrilla, M. A. Morinigo and J. J. Borrego (1998). Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* for cultured gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.). Appl. Environ. Microbiol., 64, 4269-4275.

- Barton, B. A., C. B. Schreck and L. A. Sigismondi (1986). Multiple acute disturbances evoke cumulative physiological stress response in juvenile chinook salmon. *Trans. Am. Fish Soc.*, 115, 245-251.
- Bassler, B. L. (1999). How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2, 582-587.
- Baumann, P. and L. Baumann (1977). Biology of the marine enterobacteria: genera *Beneckea* and *Photobacterium*. *Annu. Rev. Microbiol.*, 31, 39-61.
- Baumann, P., L. Baumann, S. S. Bang and M. J. Woolkalis (1980). Re-evaluation of taxonomy of *Vibrio*, *Beneckea*, and *Photobacterium*: abolition of the genus *Beneckea*. *Curr. Microbiol.*, 4, 127-132.
- Baumann, P., L. Baumann, s. S. Bang and M. J. Woolkalis (1981). Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. List no. 6. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 31, 215-218.
- Belas, M. R. and R. R. Colwell (1982). Scanning electron microscope observation of the swarming phenomenon of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.*, 150, 956-959.
- Binet, R., S. Letoffe, J. M. Ghigo, P. Delepelair and C. Wandersman (1997). Protein secretion by Gram-negative bacterial ABC exporters-a review. *Gene*, 192, 7-11.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. biochem.*, 72, 248-254.
- Bryant, T. N., J. V. Lee, P. A. West and R. R. Colwell (1986). Numerical

- classification of species of *Vibrio* and related genera. J. Appl. Bacteriol., 61, 437-467.
- Clemens, D. L. and M. A. Horwitz (1995). characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. J. Exp. Med., 181, 257-270.
- Colwell, R. R. and D. J. Griems (1984). *Vibrio* disease of marine fish populations. Helgolander Meeresuntersuchung, 37, 265-287.
- Deziel, E., Y. Comeau and R. Villemur (2001). Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities. J. Bacteriol., 183, 1195-1204.
- Farto, R., M. J. Perez, A. Fernandez-Briera and T. P. Nieto (2002). Purification and partial characterisation of a fish lethal extracellular protease from *Vibrio pelagius*. Vet. Microbiol., 89, 181-194.
- Falkow, S. (1990). The "Zen" of bacterial pathogenicity. In: Iglewski, B. H. and V. L. Clark (eds) Molecular basis of bacterial pathogenesis. Academic, San Diego.
- Follett, E. A. C. and J. Gordon (1968). An electron microscope study of *Vibrio* flagella. J. Gen. Microbiol., 32, 235-239.
- Freeman, J. A. and B. L. Bassler (1999). A genetic analysis of the function of LuxO, a two-component response regulator involved in quorum sensing in *Vibrio harveyi*. Mol. Microbiol. 31, 665-677.
- Fuchs, T. M. (1998). Molecular mechanisms of bacterial pathogenicity. Naturwissenschaften, 85, 99-108.

- Fuqua, C., S. C. Winans and E. P. Greenberg (1996). Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.*, 50, 727-751.
- Grimes, D. J., D. Jacobs, D. G. Swartz, P. R. Brayton and R. R. Colwell (1993). Numerical taxonomy of Gram-negative, oxidase-positive rods from carcharinid sharks. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 43, 88-98.
- Grimes, D. J., J. Stemmler, H. Hada, E. B. May, D. Maneval, F. M. Hetrick, R. T. Jones, M. Stoskopf and R. R. Colwell (1984a). *Vibrio* species associated with mortality of sharks held in captivity. *Microb. Ecol.*, 10, 271-282.
- Griems, D. J., J. Stemmler, H. Hada, E. B. May, d. Maneval, F. M. Hetrick, R. T. Jones, M. Stoskopf and R. R. Colwell (1985). Validation of publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. List no. 17. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 35, 223-224.
- Grimes, D. J., S. H. Gruber and E. B. May (1985b). Experimental infection of lemon shark, *Neaprimon brevirostris* (Poey), with *Vibrio* species. *J. Fish Dis.*, 8, 173-180.
- Harris, L. J. and L. Owens (1999). Production of exotoxins by two luminous *Vibrio harveyi* strains known to be primary pathogens of *Penaeus monodon* larvae. *Dis. Aquat. Org.*, 38, 11-22.
- Hendrie, M. S., W. Hodgkiss and J. M. Shewan (1970). The identification, taxonomy and classification of luminous bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 64, 151-169.
- Henrichsen, J. (1972). Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriol. Rev.*, 36, 478-503.

- Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley and S. T. Williams (1994). Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th ed., A waverly company.
- Igarashi, A., T. Lida and J. H. Crosa (2002). Iron-acquisition ability of *Edwardsiella tarda* with involvement in its virulence. Fish Pathol., 37, 53-57.
- Johnson, F. H. and I. V. Shunk (1936). An interesting new species of luminous bacteria. J. Bacteriol., 31, 585-592.
- Karunasagar, I., R. Pai, G. R. Malath and I. Karunasagar (1994). Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. Aquaculture, 128, 203-209.
- Kita-Tsukamoto, K., H. Oyaizu, K. Nanba and U. Simidu (1993). Phylogenetic relationships of marine bacteria, mainly members of the family *Vibrionaceae*, determined on the basis of 16S rRNA sequences. Int. J. Syst. Bacteriol., 43, 8-19.
- Jiravanichpaisal P., T. Miyazaki and C. limsuwan (1994). Histopathology, biochemistry, and pathogenicity of *Vibrio harveyi* infecting black tiger prawn *Penaeus monodon*. J. Aquat. Anim. Health., 6, 27-35.
- Kirov, S. M. (2003). Bacteria that express lateral flagella enable dissection of the multifunctional roles of flagella in pathogenesis. FEMS Microbiol., 224, 151-159.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680-685.
- Lavilla-Pitogo C. R., M. C. L. Baticados, E. R. Cruz-Lacierda and L. D. de la Pena (1990). Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon*

- larvae in the Philippines. *Aquaculture*, 91, 1-13.
- Lee, K. K. (1995). Pathogenesis studies on *Vibrio alginolyticus* in the grouper, *Epinephelus malabaricus*, Bloch et Schneider. *Microb. Pathog.*, 19, 39-48.
- Lee, K. K. and K. C. Yii (1996). A comparison of three methods for assaying hydrophobicity of pathogenic *Vibrios*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 23, 343-346.
- Lee, K. K., P. C. Liu and W. H. Chuang (2002). Pathogenesis of gastroenteritis caused by *Vibrio carchariae* in cultured marine fish. *Mar. Biotechnol.*, 4, 267-277.
- Lee, K. K., P. C. Liu and Y. L. Chen (1999). Electrophoretic characterization of a novel cysteine protease produced by *Vibrio harveyi*. *Electrophoresis*, 20, 3343-3346. .
- Leifson, E. (1960). *Atlas of Bacterial Flagellation*, Academic Press, New York.
- Leong, T. S and S. Y. Wong (1993). Environmental induced mortality of cultured grouper *Epinephelus malabaricus* infected with high density of monogeneans and vibrios. In: Programme and Abstracts of the second symposium on diseases in Asian aquaculture (Phuket). Manila: Health Section of the Asian Fisheries Society, p37.
- Leung, K. Y., I. V. Yeap, T. J. Lam and Y. M. Sin (1994). Serum resistance as a good indicator for virulence in *Aeromonas hydrophila* strains isolated from diseased fish in South-East Asia. *J. Fish Dis.*, 18, 511-518.
- Lindhal, M. A., A. Faris, T. Wadstroom and S. Herten (1981). A new test based on 'salting out' to measure relative surface hydrophobicity of bacterial cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 667, 471-476.
- Liu, P. C. and K. K. Lee (1999). Cysteine protease is a major extoxin of

- pathogenic luminous *Vibrio harveyi* in the tiger prawn, *Penaeus monodon*. Letters Appl. Microbiol., 28, 428-430.
- Liu, P. C., W. H. Chuang and K. K. Lee (2003). Infectious gastroenteritis caused by *Vibrio harveyi* (*V. carchariae*) in cultured red drum, *Sciaenops ocellatus*. J. Appl. Ichthyol., 19, 59-61.
- Liu, P. C., K. K. Lee, C. C. Tu and S. N. Chen (1997). Purification and characterization of a cysteine protease produced by pathogenic luminous *Vibrio harveyi*. Curr. Microbiol., 35, 32-39.
- Liu, P. C., K. K. Lee, K. C. Yü, G. H. Kou and S. N. Chen (1996). Isolation of *Vibrio harveyi* from diseased kuruma prawns *Penaeus japonicus*. curr. Microbiol., 33, 129-132.
- MacFaddin, J. F. (2000). Individual biochemical tests. In: *Biochemical tests for identification of medical bacteria*, 3rd ed., pp. 1-456. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
- Maeda, T., M. Furushita, K. Hamamura and T. Shiba (2001). Structures of ribonuclease P RNAs of *Vibrio* core species. FEMS Microbiol. Letters, 198, 141-146.
- Maeda, T., N. Takada, M. Furushita and T. Shiba (2000). Structural variation in the 16S-23S rRNA intergenic spacers of *Vibrio parahaemolyticus*. FEMS Microbiol. Letters, 192, 73-77.
- Maeda, T., U. 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 Sci., 69, 385-394.
- McCarter, L. L. (2004). Dual flagellar systems enable motility under different

- circumstances. J. Mol. Microbiol. Biotechnol., 7, 18-29.
- Miles, A. A. and S. S. Misra (1938). The estimate of the bacterial power of the blood. J. Hygiene, 38, 873-885.
- Mobley, H. L. T. and R. Belas (1995). Swarming and pathogenicity of *Proteus mirabilis* in the urinary tract. Trends Microbiol., 3, 280-284.
- Montero, A. B. and B. Austin (1999). Characterization of extracellular products from an isolate of *Vibrio harveyi* recovered from diseased post-larval *Penaeus vannamei* (Bonne). J. Fish Dis., 22, 377-386.
- Munro, J., J. Oakey, E. Bromage and L. Owens (2003). Experimental bacteriophage-mediated virulence in strains of *Vibrio harveyi*. Dis. Aquat. Org., 54, 187-194.
- Nealson, K. H. and J. W. Hastings (1979). Bacterial bioluminescence: Its control and ecological significance. Microbiol. Rev., 43, 496-518.
- Nealson, K. H., T. Platt and J. W. Hastings (1970). Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. J. Bacteriol., 104, 313-322.
- Nishimori, E., O. Hasegawa, T. Numata and H. Wakabayashi (1998). *Vibrio carchariae* causes mass mortalities in Japanese abalone, *Sulculus diversicolor supratexta*. Fish Pathol., 33, 495-502.
- Oakey, H. J., N. Levy, D. G. Bourne, B. Cullen and A. Thomas (2003). The use of PCR to aid in the rapid identification of *Vibrio harveyi* isolates. J. Appl. Microbiol., 95, 1293-1303.
- Ortigosa, M., E. Garay and M. J. Pujalte (1994). Numerical taxonomy of *Vibrionaceae* isolated from oysters and seawater along an annual cycle.

- System. Appl. Microbiol., 17, 216-225.
- O'Toole, G. A. and R. Kolter (1998). Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. Mol. Microbiol., 28, 449-461.
- Owens, L., D. A. Austin and b. Austin (1996). Effect of strain origin on siderophore production in *Vibrio harveyi* isolates. Dis. Aquat. Org., 27, 157-160.
- Pass, D. A., R. Dybdahl and M. M. Mannion (1987). Investigations into the causes of mortality of the pearl oyster, *Pinctada maxima* (Jamson) in Western Austrelia. Aquaculture, 65, 149-169.
- Pedersen, K., L. Verdonck, B. Austin, D. A. Austin, A. R. Blanch, P. A. D. Grimont, J. Jofre, S. Koblavi, J. L. Larsen, T. Tiainen, M. Vigneulle and J. Swings (1998). Taxonomic evidence that *Vibrio carchariae* Grimes et al. 1985 is junior synonym of *Vibrio harveyi* (Johnson and Shunk 1936) Baumann et al. 1981. Int. J. Syst. Bacteriol., 48, 749-758.
- Phianphak, W., S. Rengpipat, S. Rukpratanporn, S. Longyant, P. Chaivisuthangkura, W. Sithigorngul and P. Sithigorngul (2005). Production of monoclonal antibodies for detection of *Vibrio harveyi*. Dis. Aquat. Organ., 63, 161-168.
- Pickering, A. D. (1989). Environmental stress and the survival of brown trout, *Salmon trutta*. Freshwater Biol., 21, 47-55.
- Pizzutto, M. and R. G. Hirst (1995). Classification of isolates of *Vibrio harveyi* virulent to *Penaeus monodon* larvae by protein profile analysis and M13 DNA fingerprinting. Dis. Aquat. Org., 21, 61-68.

- Ramaiah, N., J. Chun, J. Ravel, W. L. Staube, R. T. Hill and R. R. Colwell (2000). Detection of luciferase gene sequences in nonluminescent bacteria from the Chesapeake Bay. *TEMS Microbiol. Ecol.*, 33, 27-34.
- Rao, P. S. S., T. M. Lim and K. Y. Leung (2001). Oopsonized virulent *Edwardsiella tarda* strains are able to adhere to and survive and replicate within fish phagocytes but fail to stimulate reactive oxygen intermediates. *Infection and Immunity*, 69, 5689-5697.
- Reichelt, J. L. and P. Baumann (1973). Taxonomy of the marine luminous bacteria. *Arch. Microbiol.*, 94, 283-330.
- Rosenberg, M., D. Gutnick and E. Rosenberg (1980). Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.*, 9, 29-33.
- Ruangpan, L., Y. Danayadol, S. Kirekbusarakom, S. Siurairatana and T. W. Flegel (1999). Lethal toxicity of *Vibrio harveyi* to cultivated *Penaeus monodon* induced by a bacteriophage. *Dis. Aquat. Org.*, 35, 195-201.
- Ruby, E. G. and J. G. Morin (1979). Luminous enteric bacteria of the marine fishes: A study of their distribution, densities, and dispersion. *Appl. Environ. Microbiol.*, 38, 406-411.
- Ruimy, R., V. Breittmayer, P. Elbaze, B. Lafay, O. Boussemart, M. Gauthier and R. Christen (1994). Phylogenetic analysis and assessment of the genera *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas*, and *Plesiomonas* deduced from small-subunit rRNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44, 416-426.
- Saeed, M. O. (1995). Association of *Vibrio harveyi* with mortalities in cultured marine fish in Kuwait. *Aquaculture*, 136, 21-29.

- 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. *Infection and Immunity*, 56, 3285-3293.
- Santos, Y., I. Bandin, T. P. Nieto, E. W. Bruno, A. E. Ellis and A. T. Toranzo (1990). Comparison of the cell surface hydrophobicity of bacterial fish pathogens by different procedures. In *Pathology in Marine Science*. ed. Perkins, F. O. and T. C. Cheng. pp. 101-115. San Diego: Academic Press.
- Santos, Y., I. Bandin, T. P., Nieto, J. L. Barja, A. E. Toranzo and A. E. Ellis (1991). Cell-surface-associated properties of fish pathogenic bacteria. *J. Aquat. Animal Health*, 3, 297-301.
- Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson (1997). DNA sequencing with chain-terminating inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5463-5467.
- Schwyn, B. and J. B. Neilands (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analyt. Biochem.*, 160, 47-56.
- Shinoda, S., I. Yakiyama, S. Yasui, Y. M. Kim, B. Ono and S. Nakagami (1992). Lateral flagella of vibrios: serological classification and genetical similarity. *Microbiol. Immunol.*, 36, 303-309.
- Smith, H. (1988). the state and future of studies on bacterial pathogenicity. In: Rothe, J. A. (ed) *Virulence mechanisms of bacterial pathogens*. ASM, Washington.
- Soffientino, B., T. Gwaltney, D. R. Nelson, J. L. Specker, M. Mauel and M. Gomez-Chiarri (1999). Infectious necrotizing enteritis and mortality caused by *Vibrio carchariae* in summer flounder *Paralichthys dentatus* during intensive culture. *Dis. Aquat. Org.*, 38, 201-210.

- Song, Y. L. and S. P. Lee (1993). Characterization and ecological implication of luminous *Vibrio harveyi* isolated from tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Bull. Inst. Zool. Academia Sinica, 32, 217-220.
- Soto-Rodriguez, S. A., A. Roque, M. L. Lizarranga-Partida, A. L. Guerra-Flores and B. Bomez-Gil (2003). Virulence of luminous vibrios to *Artemia franciscana* nauplii. Dis.Aquat. Org., 53, 231-240.
- Sunaryanto, A. and A. Mariam (1986). Occurrence of a pathogenic bacteria causing luminescence in penaeid larvae in Indonesian hatcheries. Bull. Brackishwater Aquacult. Dev. Cen., 8, 105-112.
- Takahashi, Y., T. Itami and K. Konegawa (1986). Enzymatic properties of partially lysozyme from the skin mucus of carp. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish, 52, 1209-1214.
- Thompson, F. L., B. Hoste, K. vademlebroeck, K. Engelbeen, R. Deneys and J. Swings (2002). *Vibrio trachuri* Iwamoto et al. 1995 is a junior synonym of *Vibrio harveyi* (Johnson and Shunk 1936) Baumann et al. 1981. Int. J. Syst. Evol.Microbiol., 52, 973-976.
- Ulitzur, S. and M. Kessel (1975). Giant flagellar bundles of *Vibrio alginolyticus* (NCMB 1803). Arch. Microbiol., 94, 331-339.
- Wedemeyer, G. A. and N. C. Nelson (1975). Statistical methods for estimating normal blood chemistry ranges and variance in rainbow trout (*Salmo gairdneri*), Shasta strain. J. Fish Res. Board Can., 32, 551-554.
- Wimpee, C. F., T. L. Nadeau and K. H. Nealson (1991). Development of species-specific hybridization probes for marine luminous bacteria by using in vitro DNA amplification. Appl. Environ. Microbiol. 57, 1319-1324.

- Wiklund, T. and I. Dalsgaard (2002). Survival of *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) serum in vitro. Fish Shellfish Immunol., 12, 141-153.
- Yii, K. C., T. I. Yang and K. K. Lee (1997). Isolation and characterization of *Vibrio carchariae*, a causative agent of gastroenteritis in the groupers, *Epinephelus coioides*. Curr. Microbiol., 35, 109-115.
- Zhang, X. H. and B. Austin (2000). Pathogenicity of *V. harveyi* to salmonids. J. Fish Dis., 23, 93-102.
- Zorrilla, I., S. Arijó, M. Chabrillon, P. Diaz, E. Martinez-Manzanares, M. C. Balebona and M. A. Morinigo (2003). *Vibrio* species isolated from diseased farmed sole, *Solea senegalensis* (Kaup), and evaluation of the potential virulence role of their extracellular products. J. Fish Dis., 26, 103-108.
- 醫化學研究所學友會 (1976). 細菌學實習提要. pp566-568. (In Japanese)