



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시, 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리, 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



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

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

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

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

[Disclaimer](#)

이 학 석 사 학 위 논 문

Edwardsiella tarda 독성 균주와 비독성 균주의
넙치(*Paralichthys olivaceus*) 내로의 침입력 비교



2008년 2월

부경대학교 대학원

수산생명의학과

하 수 진

이 학 석 사 학 위 논 문

Edwardsiella tarda 독성 균주와 비독성 균주의
넙치(*Paralichthys olivaceus*) 내로의 침입력 비교

지도교수 박 수 일

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함.



2008년 2월

부경대학교 대학원

수산생명의학과

하 수 진

하수진의 이학석사 학위논문을 인준함.

2008년 2월 26일



주 심 농 학 박 사 허 민 도 인

위 원 이 학 박 사 강 주 찬 인

위 원 농 학 박 사 박 수 일 인

목 차

목차	i
Abstract	iv
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 시험균	4
2. 시험어	4
3. 독성 균주와 비독성 균주 LD ₅₀ 측정	6
4. <i>E. tarda</i> 독성 균주와 비독성 균주의 생화학 성상 비교	6
4.1. 생화학적 특성 비교	6
4.2. 발육 성상 비교	7
4.2.1. 염분 농도에 따른 발육 시험	7
4.2.2. pH에 따른 발육 시험	7
5. 점액과의 상호관계	8
5.1. 체표 점액 내에서의 생존능 비교	8
5.1.1. 체표 점액 분리	8
5.1.2. 체표 점액 내에서의 생존능	8
5.2. 장 점액 내에서의 생존능	8
5.2.1. 장 점액 분리	8
5.2.2. 장 점액 내에서의 생존능 시험	9
6. 위액과 담즙의 영향	9
6.1. Simulated gastric fluid (SGF; 인공위액)에서의 생존능	9
6.2. 위액과 같은 pH의 배지에서의 성장	10

6.3. 담즙에서의 생존능	10
7. 넙치 혈청에서의 생존능	10
7.1. 넙치 혈청 분리	10
7.2. 넙치 혈청에 대한 저항성	11
7.3. 넙치 혈청에서의 생존능	11
8. 시험균의 macrophage에 침입력 및 증식력	12
8.1. 넙치 두신 macrophage 분리	12
8.2. Internalization assay	12
8.3. Intracellular replication assay	13
9. H ₂ O ₂ 감수성 시험	14
10. 어체 내에서의 생존능	14
11. 독성 균주와 비독성 균주의 Outer Membrane Protein (OMP) 비교	14
11.1. Outer Membrane Protein 추출	14
11.2. SDS-PAGE	15
12. OMP 관련 유전자	15
12.1. DNA 분리	15
12.2. PagC 와 OmpS2 gene primer 설계 및 PCR	15
13. 통계학적 분석	17
III. 결과	18
1. 시험균의 반수 치사 농도 비교	18
2. 생화학적 특성	19
3. 염분 농도 및 pH에 따른 발육정도 비교	22
4. 점액 내에서의 생존능 비교	24
4.1. 체표 점액에서의 생존능	24
4.2. 장 점액에서의 생존능	26

5. 위액과 담즙의 영향	28
5.1. 인공위액 및 배지에서의 생존능	28
5.2. 담즙에서의 생존능	31
6. 넙치 혈청에서의 생존능	34
6.1. 넙치 혈청에 대한 저항성	34
6.2. 넙치 혈청에서의 생존능	35
7. 시험균의 macrophage에 침입력 및 증식력	37
7.1. Internalization assay	37
7.2. Intracellular replication assay	38
8. H ₂ O ₂ 감수성 시험	40
9. 어체 내에서의 생존능	42
10. OMP의 SDS-PAGE profile 비교	44
11. OMP gene 비교	46
IV. 고찰	48
V. 요약	53
VI. 감사의 글	54
VII. 참고 문헌	56

Comparison of invasion ability to virulent and avirulent *Edwardsiella tarda* in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)

Su Jin Ha

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

Abstract

Edwardsiella tarda is known to be one of the most serious bacterial diseases in the freshwater and the marine fishes. The aim of this study was the comparison of invasion ability of *E. tarda* with the virulent and the avirulent strains to olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Four among eight tested strains (SU100, AL92448, ATCC15947, ET82015) were divided in avirulent group due to their higher LD₅₀ values of $>10^{8.4}$. The others were grouped as virulent strains with the LD₅₀ of lower than $<10^{4.2}$. The biochemical and the physiological characteristics of both strains were not distinguishable. In the survival experiment of the tested bacteria to the skin mucus of olive flounder, virulent strains showed increased the bacterial cell number after 12~24 h incubation but avirulent strains were not. In the survival experiment of the tested bacteria to the intestine mucus of olive flounder, the virulent strains were increased the bacterial cell number rapidly but avirulent strains were increased slowly. In the SGF (simulated gastric fluid, pH 2.0) tolerance test, the bacterial cell number of the tested strains were decreased. And the bacterial cell number of the tested strains were also decreased in the lowered pH of TSB (pH 2.0) medium. In the olive flounder bile tolerance test, the number of bacterial cells of the avirulent *E. tarda* were decreased after 6 h

incubation. On the other hand the number of bacterial cells of the virulent *E. tarda* were increased after 6 h incubation. In the test of survival ability in the olive flounder fresh serum, the number of bacterial cells of the virulent strains were increased but those of the avirulent strains were decreased after 12~24 h incubation.

The experiment of the tested strains in the internalization and the intracellular replication ability to the olive flounder macrophage, the virulent strains were much higher than the avirulent strains.



I. 서론

*Edwardsiella tarda*는 장내 세균과 (Enterobacteriaceae)에 속하는 Gram-negative bacterium으로 못에서 양식되는 뱀장어에서 처음 분리되었다 (Hoshina, 1962). *E. tarda*는 edwardsiellosis의 원인균으로 복부팽만과 탈장, 간과 신장의 농양 형성 등 전신적 증상을 나타내며 (Kusuda and Kawai, 1998) 많은 담수어와 해산어에 질병을 야기한다. 여기에는 뱀장어, *Anguilla japonica* (Wakabayashi, 1973), 가자미, *Pleuronectes platessa* (Nakatsugawa, 1983), mullet, *Mugil cephalus* (Kusuda *et al.*, 1976) 등과 우리나라의 해수양식에서 가장 많은 비중을 차지하고 있는 넙치, *Paralichthys olivaceus*가 포함된다. Park *et al.* (1983)은 뱀장어와 그 환경 (사육수 등)에서 분리한 *E. tarda*를 O-agglutination analysis에 의해 4개의 serotype (A, B, C and D)으로 분류했으며, 특히 serotype A는 뱀장어나 다른 어류 및 사람에 있어 가장 강한 독성을 나타낸다고 밝혔다.

이같이 폭넓은 어종에 감염되어 질병을 유발하는 *E. tarda*는 피부, 아가미, 경구 등의 손상부위를 통해 감염된다고 알려져 있다 (Ling *et al.*, 2001). 질병의 예방을 위해 이러한 세균의 감염 부위를 아는 것은 중요한 일이다. 하지만 보다 중요한 1차적 정보는 세균의 감염 기작이라고 볼 수 있는데 이는 감염 기작이 세균이 숙주 내에서 질병을 일으키는데 있어 가장 일차적이며 유용한 정보이기 때문이다. 따라서 이러한 감염 기작을 알 필요성이 있는데 *E. tarda*의 경우 감염에 있어 virulence factor가 *E. tarda*의 감염에 어떻게 작용하는지에 관한 정보도 거의 없으며 pathogenic mechanism과 invasion pathway도 분명치 않다. 몇몇 독성 요소로 epithelial cells에 침입력 (Janda *et al.*, 1991; Ling *et al.*, 2000), 식세포의

식작용에 대한 저항성 (Srinivasa, 2001), hemolysins (Chen and Huang, 1996 ; Janda *et al.*, 1993), chondroitinase (Janda *et al.*, 1991)와 같은 효소의 생성 등을 들 수 있으며, ECPs (Extracellular products)와 OMP (Outer Membrane Protein) 등도 중요한 독성 인자로 보고되어 있다. 현재 *E. tarda*와 같은 Gram negative bacteria의 OMP는 중요한 독성 요소로 작용하며 (Zierler and Galan, 1995) 인간과 동물의 병원체에 있어 전염병학적 지표로 사용된다 (Barenkamp *et al.*, 1981). 세균의 세포벽 표면에 위치한 OMP는 병원성과 관련이 있으며 (Suzuki *et al.*, 1994) 세균이 숙주에 부착하여 숙주로부터 영양분을 빼앗거나 숙주의 방어 메카니즘을 제거하는 (Seltman *et al.*, 2002) 등 숙주와 세균의 상호 작용에 중요한 역할을 한다. 대표적인 역할로는 Iron uptake, 항미생물 펩타이드에의 저항성, 혈청 저항성과 여러 약제 및 답즙에 대한 저항성을 들 수 있다 (Jun *et al.*, 2002).

In vitro 상에서, *E. tarda* 균주의 경우 독성 균주와 비독성 균주 모두 cell 내에 침입을 할 수 있다. Ling *et al.* (2001)은 Green fluorescent protein (GFP)를 이용해 *E. tarda*의 독성 균주와 비독성 균주가 숙주인 어류의 비늘, 아가미, 장관 등에 침입하는지에 대한 연구를 통해 독성 균주가 비독성 균주에 비해 어류 내에 더 많이 들어가는 것이 관찰된다고 밝혔다. 하지만 이러한 차이가 나타나는 원인은 확실하지 않다. 그렇지만 한 가지 추정 가능한 것은 이 모든 감염 경로는 점액으로 덮여 있으며, 이러한 점액은 병원체의 침입을 방지하는 1 차적인 방어선이라는 것이다. 이는 점액 내에는 라이소자임과 같은 효소나 다른 항균성 단백질이 들어있어 생체 방어 작용을 하는 것 (Cole *et al.*, 1997; Dalmo *et al.*, 1997; Ebran *et al.*, 2000; Oren and Shai, 1996; Patrzykat *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2000)과 관련이 있을 것으로 생각된다. 또한 *E. tarda*와 같이 세포내 기생성 세균 (intracellular pathogen)이거나 친화성이 강한 세균은 식세포에 식균되더라

도 세포내에서 증식하고, 이러한 식세포를 통해 혈액내로 운반된다. 실제로 세포내 기생체인 *Pasteurella piscicida*에서도 이러한 보고가 있다.

본 연구에서는 *Edwardsiella tarda* 독성 균주와 비독성 균주의 섭취에 대한 병원성 및 섭취 내부로의 침입력을 비교해 *E. tarda* 독성 균주와 비독성 균주 간의 병원 특성에 관여하는 요인을 밝히고자 하였다.

이를 위해 *E. tarda*의 체표 및 장 점액 내 생존능 비교, 경구 침입과 관련 있는 인자인 담즙과 위액에서의 생존능, 혈청에서의 생존능 및 macrophage와의 관계를 알아보하고자 하였다.



II. 재료 및 방법

1. 시험 균주

본 연구에 사용된 시험 균주와 참조 균주는 Table 1에 나타낸 바와 같다. 시험 균주 중 *Edwardsiella tarda* 독성 균주는 포항, 제주 및 거제에서 넙치와 turbot으로부터 분리된 균을 사용하였으며 비독성 균주인 AL92448, ATCC15947 및 ET82015의 경우 싱가포르의 Singapore National University 에서 분양받아 사용하였다.

Macrophage 내에서의 증식력과 침입력 시험에는 *Salmonella choleraesuis* ATCC7001를 참조 균주로 사용했다.

2. 시험어

병원성 시험에 사용한 넙치는 경북 포항 소재의 양식장에서 사육 중인 건강한 넙치를 분양받아 사용하였으며 평균 체중은 10.5 ± 1.3 g, 체장은 11.4 ± 1.12 cm 이었다. 혈청, 담즙 및 점액 분리에 사용한 넙치는 평균 체중 345 ± 20 g, 체장 29 ± 1.5 cm로 국립수산물과학원에서 분양받은 것이었다. 시험어는 연구실의 실내 사육조에 옮긴 후 수온 $22 \sim 23$ °C에서 반유수식으로 관리하였으며 시험 전 1주일간 순치하여 사용하였다.

Table 1. Bacterial strains used in this study

Strain		Source location		Reference
Avirulent <i>Edwardsiella tarda</i>				
Reference strain	SU100	Eel pond water	Shizuoka (Japan), 1980	Park <i>et al.</i> (1983)
	AL92448	Unknown	AU ^b	Ling <i>et al.</i> (2000)
Test strains	ATCC15947	Human (type strain)	ATCC ^a	Ling <i>et al.</i> (2000)
	ET82015	Japanese eel (<i>Anguilla japonica</i>)	Shizuoka (Japan)	Tan <i>et al.</i> (2002)
Virulent <i>Edwardsiella tarda</i>				
Reference strain	FSW910410	Olive flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	Geoje, 1991	Han <i>et al.</i> (2006)
Test strains	KE-1	Olive flounder	Pohang, 2000	Han <i>et al.</i> (2006)
	KE-3	Olive flounder	Pohang, 1999	Han <i>et al.</i> (2006)
	KE-5	Turbot	Geoje, 2002	Han <i>et al.</i> (2006)
The other reference strain		<i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC7001		

^aATCC, American Type Culture Collection; ^bAU, Department of Fishery, Auburn University.

3. 독성 균주와 비독성 균주 LD₅₀ 측정

시험에 사용한 *E. tarda* 독성 균주와 비독성 균주가 넵치에 있어서 어느 정도의 병원성을 가지는지 알아보기 위해 반수 치사 농도 (Medium Lethal Dose ; LD₅₀)를 측정하였다. 시험어는 35 × 25 cm 크기의 플라스틱 통에 넣어 사육 수온은 22.7±0.96 °C로 유지하였으며 시험 기간 동안 사육수는 매일 1회 전량 환수시켰다. Tryptic Soy Agar (TSA)에 27 °C에서 24 시간 동안 배양된 각 시험균을 멸균 생리식염수에 현탁하여 준비하였고 균을 현탁하지 않은 멸균 생리식염수를 대조구로 하였다. 각 시험 구간당 10 마리의 시험어에 다양한 농도의 균 현탁액을 100 µl 씩 복강 주사하고 주사 후 10 일간 폐사정도를 관찰하였다. 폐사어의 폐사원인을 확인하기 위해 시험 기간 중 폐사한 어류를 해부해 병원균을 재분리하여 시험균을 확인하였다.

4. *E. tarda* 독성 균주와 비독성 균주의 생화학 성상 비교

4.1. 생화학적 특성 비교

생화학적 성상은 MacFaddin (2000)의 방법으로 검사하였다.

총 8 균주를 TSA에 24 시간 동안 배양한 균을 이용하여 실시했으며 Oxidase test (Cytochrome oxidase), Catalase test, Nitrate 환원능, Kovac's indole test, Methyl red test 및 Voges-Proskauer test (Clark and Lubs medium), TSIA (Triple Sugar Iron Agar)를 이용한 H₂S와 가스 생성 여부 그리고 Citrate 이용능 (Simmon's citrate agar) 등을 실시하였다. 탄수화물 분해 시험능에는 Arabinose, Adonitol, Dulcitol, Cellibiose, Fructose, Galactose, Glucose, Inositol, Lactose, Maltose, Mannitol, Mannose, Melibiose, Raffinose, Rhamnose, Salicin, Sorbitol, Sucrose, Trehalose, Xylose 등 총 20개의 당을 대상으로 조사하였다. 그리고

Lysine과 Ornithine에 대한 decarboxylase 시험과 Arginine에 대한 dehydrolase 시험을 실시하였다.

4.2. 발육 정상 비교

4.2.1. 염분 농도에 따른 발육 시험

E. tarda 시험 균주 중 2 개의 참조 균주 와 6개의 시험 균주를 대상으로 분리 유래별 염분 농도에 따른 발육 정도를 조사하였다.

각각의 균을 TSA 배지에 27 °C에서 24 시간 배양한 후, 흡광도가 OD₅₄₀에서 0.8이 되게 멸균 증류수로 균 농도를 조정하여 각각의 시험균 100 μ l를 alkali-peptone water 배지에 접종하였다. alkali-peptone water 배지에는 NaCl을 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 및 8 % 가 되게 첨가하여 시험에 사용하였다. 시험균을 접종 후 96시간 배양한 다음 배양 정도를 육안적인 혼탁도로 관찰하였으며, 혼탁도의 정도는 자라지 않은 것은 -, 조금 자란 것은 +, 아주 잘 자란 것은 ++로 나타내었다.

4.2.2. pH에 따른 발육 시험

E. tarda 시험균의 발육에 대한 pH의 영향을 알아보기 위해 각 시험균을 TSA 배지에 27 °C에서 24 시간 배양한 후, 멸균 증류수로 흡광도가 OD₅₄₀에서 0.8이 되게 조정된 것을 시험 균액으로 사용하였다. 각각의 시험균 100 μ l를 alkali-peptone water 배지에 접종하였다. pH는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 및 8로 조정된 alkali-peptone water 배지에 시험 균액 100 μ l를 접종하여 96시간 배양한 다음 배양 정도를 육안적인 혼탁도로 관찰하였으며, 혼탁도의 정도는 자라지 않은 것은 -, 조금 자란 것은 +, 아주 잘 자란 것은 ++로 나타내었다.

5. 넙치 점액과 시험균의 상호작용

5.1. 체표 점액 내에서의 생존능 비교

5.1.1. 체표 점액 분리

Ræder *et al.* (2007)의 방법에 따라 체표 점액을 분리하였다. 넙치 체표를 paper towel로 가볍게 눌러 수분을 제거하고 체표 점액을 슬라이드 글라스로 살살 긁어서 모은 다음 모은 점액에 2 배 정도에 해당하는 0.1 M phosphate buffer saline (PBS, pH 7.2)를 넣고 마쇄하였다. 이를 $14,000 \times g$, 15 분 동안 4 °C에서 원심 분리한 다음 상정액을 0.22 μm pore size의 syringe filter (Corning Inc.)로 여과한 후 체표 점액 시료로 사용하였다.

5.1.2 체표 점액 내에서의 생존능

E. tarda 시험균주의 점액 내 생존능을 Kim *et al.* (2006)의 방법으로 시험하였다. 각 시험 균주를 Tryptic Soy Broth (TSB)에 27 °C, 24 시간 배양한 후 원심 분리하여 균을 모은 다음 0.1 M PBS (pH 7.2)로 3회 세척하였다. 그리고 균수를 5×10^6 cfu/ml 가 되도록 0.1 M PBS로 조정한 다음 이를 시험 균액으로 사용하였다. 이 시험 균액과 어류 점액 시료를 1 : 4로 혼합하여 점액 시험의 시험균 농도가 1×10^6 cfu/ml 이 되도록 하였다. 이 혼합액을 25 °C 에 배양하면서 0, 1, 3, 6, 12 및 24 시간 마다 단계 희석하여 Miles and Misra (1938) 의 방법에 따라 생균수를 측정하였다. 시험은 3 반복 실시하였다.

5.2. 장 점액 내에서의 생존능

5.2.1. 장 점액 분리

장 점액의 경우 장을 무균적으로 절취해 petridish에 놓고 0.1 M PBS (pH 7.2)로 조심해서 세척하여 장 안의 내용물을 제거하고 장 점액을 해부

용 칼등으로 살살 긁어서 모았다. 모은 장 점액을 체표 점액과 마찬가지로 점액의 2배 정도 양의 0.1 M PBS (pH 7.2)를 넣고 마쇄하였다. 이를 $10,000 \times g$, 10 분 동안 4 °C에서 원심 분리한 다음 상정액을 다시 $15,000 \times g$, 15 분 동안 4 °C에서 원심 분리하여 최종 상정액을 0.22 μm pore size의 syringe filter (Corning Inc.)로 여과한 후 장 점액 시료로 사용하였다.

5.2.2 장 점액 내 생존능 시험

E. tarda 시험균의 장 점액 내 생존능은 5.1.2와 동일한 방법으로 시행하였다. 각 시험 균주를 TSB에 27 °C, 24 시간 배양한 다음 원심 분리하여 시험균을 모은 다음 0.1 M PBS (pH 7.2)로 3회 세척하였다. 그리고 균수를 5×10^6 cfu/ml 가 되도록 조정하여 다음 이를 시험 균액으로 사용하였다. 이 시험 균액과 어류 장 점액 시료를 1 : 4로 혼합하여 최종 시험 균수가 1×10^6 cfu/ml이 되도록 하였다. 이 혼합액을 25 °C에 배양하면서 0, 1, 3, 6, 12 및 24 시간마다 단계 희석하여 Miles and Misra (1938)의 방법에 따라 생균수를 측정하였다. 시험은 3 반복 실시하였다.

6. 위액과 담즙의 영향

6.1. Simulated Gastric Fluid (SGF; 인공위액)에서의 생존능

인공 위액 (simulated gastric fluid : SGF)은 Mao *et al.* (2005) 의 방법에 따라 준비하였다. Pepsin을 3 mg/ml의 농도로 멸균 생리식염수에 섞어 준 다음 pH를 2.0으로 맞추고 이를 0.22 μm pore size의 syringe filter (Corning Inc.)로 여과한 후 인공위액 (SGF)으로 사용하였다. TSB에 27 °C, 24 시간 배양한 다음 원심 분리하여 시험균을 모은 다음 0.1 M PBS (pH 7.2)로 3회 세척하였다. 균수를 1×10^7 cfu/ml로 맞춘 시험 균액을

SGF와 1 : 9로 섞어 최종 균수가 1×10^6 cfu/ml 이 되게 하였다. 이 혼합액을 0, 0.5 및 1 시간마다 단계 희석하여 Miles and Misra (1938)의 방법에 따라 생균수를 측정하였다. 시험은 3 반복 실시하였다.

6.2. 위액과 같은 pH의 배지에서의 성장

TSB에 27 °C, 24 시간 배양한 다음 원심 분리하여 시험균을 모은 다음 0.1 M PBS (pH 7.2)로 3회 세척하여 시험 균액을 준비하였다. 인공 위액과의 비교를 위해 TSB를 pH 2.0으로 맞춘 다음 이를 인공 위액 시험과 최종 균수가 동일하게 1×10^6 cfu/ml로 조정하였으며 0, 0.5 및 1 시간마다 단계 희석하여 Miles and Misra (1938)의 방법에 따라 생균수를 측정하였다. 시험은 3 반복 실시하였다.

6.3. 담즙에서의 생존능

TSB에 27 °C, 24 시간 배양한 후 원심 분리하여 시험균을 모은 다음 0.1 M PBS (pH 7.2)로 3회 세척하였다. 시험 균액의 균수를 1×10^7 cfu/ml로 맞춘 다음 넙치에서 분리한 담즙과 1 : 9로 섞어 최종 균수가 1×10^6 cfu/ml 이 되게 하였다. 이를 25 °C에서 배양하면서 0, 1, 3 및 6 시간에 각각 단계 희석 한 다음 TSA 배지에 drop하여 Miles and Misra (1938)의 방법에 따라 생균수를 측정하였다. TSB 배지와 균을 9 : 1로 섞은 혼합액을 대조구로 사용하였다.

7. 넙치 혈청에서의 생존능

7.1. 넙치 혈청 분리

혈청 분리를 위해 시험어를 아미노산식향산 에틸 50 ppm으로 3~5 분간 마취시킨 후 1회용 주사기를 사용하여 피부 정맥에서 채혈하였다. 채취한

혈액은 상온에서 1 시간 방치하고 다시 4 °C에서 2~3 시간 정도 정치해 둔 다음 6,000 rpm에서 15 분간 원심 분리하여 얻은 상정액을 혈청 시료로 사용하였다. 이 혈청 시료는 혈청 분리 후 3일안에 사용하였으며 사용전까지 -80 °C에서 보관하였다.

7.2. 넙치 혈청에 대한 저항성

E. tarda 시험균의 넙치 혈청에 대한 저항성 시험은 Leung and Yeap (1994)의 방법으로 시험하였다. TSB에 27 °C, 24 시간 배양한 후 원심 분리하여 시험균을 모은 다음 0.1 M PBS (pH 7.2)로 3회 세척하였다. 이 시험균을 넙치 혈청과 1 : 1로 섞어 최종 균수가 1×10^6 cfu/ml 이 되게 하였다. 이 혼합액을 혼합 즉시 멸균 생리 식염수에 단계 희석하여 TSA 배지에 drop한 후 이를 0 시간째 반응 시험으로 규정하고 이 혼합액을 25 °C에서 1 시간 배양한 다음 단계 희석하여 생균수를 측정하였다. 혈청에서의 생존능은 1시간 배양 후의 세균 수에 0 시간 배양재의 세균 수로 나누어 계산하였다. 계산된 수치가 1보다 크면 혈청에 저항성을 가지며 (resistance), 1보다 낮으면 혈청에 감수성을 가지는 (sensitivity) 것으로 판정하였다.

7.3. 넙치 혈청에서의 생존능

E. tarda 시험균의 넙치 혈청에 대한 생존능 시험은 Leung *et al.* (1994)의 방법에 따라 시험했다. 각 시험 균주를 TSB에 27 °C, 24 시간 배양한 다음 원심 분리하여 균을 모은 후 0.1 M PBS (pH 7.2)로 세척하여 균수를 2×10^6 cfu/ml 가 되도록 조정한 다음 이를 시험 균액으로 사용하였다. 시험 균액과 혈청을 1 : 1 비율로 섞어 최종 균수가 1×10^6 cfu/ml 이 되게 하였다. 이 혼합액을 25 °C에 배양하면서 0, 1, 3, 6, 12 및 24 시간 마

다 단계 희석하여 Miles and Misra (1938)의 방법에 따라 생균수를 측정하였다. 시험은 3 반복하였다.

8. 시험균의 macrophage에 대한 침입력 및 증식력

8.1. 넵치 두신 macrophage 분리

넵치 두신 macrophage는 Secombes (1990)의 방법에 따라 분리하였다. 넵치의 미부 정맥에서 채혈하여 순환 혈액을 제거한 후 무균적으로 넵치 두신을 적출하였다. 2 % FBS, 1 % penicillin/streptomycin 및 heparin 10 units/ml이 들어간 L-15 medium을 2 ml씩 분주한 멸균 petridish에서 적출한 두신을 nylon membrane으로 마쇄하여 세포 현탁액을 준비하였다. 이 세포 현탁액을 실리콘 처리한 시험관에 미리 분주해 둔 34 %와 51 % percoll 용액 위에 조심스럽게 중층시킨 다음 $500 \times g$ 에서 30 분간 원심 분리하여 백혈구를 분리하였다. 분리한 백혈구를 L-15 medium으로 2회 세척한 다음 0.1 % trypan blue로 viability를 관찰한 후 1×10^7 cell/ml로 조정하였다.

8.2. Internalization assay

시험은 Tang *et al.* (1994)의 방법으로 행하였다. 96-well plate의 각 well에 1×10^7 cell/ml로 조정된 macrophage 현탁액을 100 μ l씩 넣고 20 $^{\circ}$ C에서 2 시간 동안 배양하여 macrophage를 부착시켰다. 비부착 세포를 제거하기 위해 L-15 medium으로 2회 세척하고 1×10^7 cfu/well로 맞춘 시험 균액을 각 well에 100 μ l씩 첨가하고 $150 \times g$ 에서 5분 동안 원심분리해 시험균이 well 전체에 고루 퍼지게 해주었다. 그리고 이를 1 시간 및 5 시간 동안 배양하였다. 배양 후에 상정액을 제거하고 세포 바깥쪽에 존재하는 세균을 없애기 위해 100 μ g/ml의 gentamicin을 첨가하여 1 시간 동안

반응시킨 후 2회 세척하고 0.2 % Tween 20을 함유한 멸균 증류수 50 μl 를 첨가하여 macrophage를 파괴시켰다. 이 반응액을 단계 희석하여 Miles and Misra (1938)의 방법에 따라 생균수를 측정하였다. 시험은 2 반복 실시하였다.

$$\text{Internalization rate (\%)} = \frac{\text{배양 후 세균수 (1 h or 5 h)}}{\text{넣어준 세균수}} \times 100$$

8.3. Intracellular replication assay

macrophage 내에서의 증식률을 알아보기 위해 Leung and Finlay의 방법에 약간의 수정을 가해 시험하였다. 96-well plate에 1×10^7 cell/ml로 조정된 macrophage 현탁액을 100 μl 씩 각 well에 넣고 20 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2 시간 동안 배양하여 macrophage를 부착시켰다. 비부착 세포를 제거하기 위해 L-15 medium으로 2회 세척하고 각 well에 1×10^7 cfu/well로 맞춘 시험균액을 100 μl 씩 첨가하고 150 $\times$ g에서 5분 동안 원심분리를 하여 균이 고루 퍼지게 해 주었다. 그리고 이를 1 시간 동안 배양하였다. 배양 후에 상정액을 제거하고 세포 바깥쪽에 존재하는 세균을 없애기 위해 100 $\mu\text{g/ml}$ gentamicin을 첨가하여 1 시간 동안 반응시킨 후 2회 세척하고 이를 0, 1 및 3 시간 동안 배양하였다. 각 배양시간 후 0.2 % Tween 20을 함유한 멸균 증류수 50 μl 를 첨가하여 macrophage를 파괴시키고 이 액을 단계 희석하여 Miles and Misra (1938)의 방법에 따라 생균수를 측정하였다. 시험은 2 반복하였다. Intracellular replication은 1 시간과 3 시간째의 세균수를 0 시간째 배양 세균수로 나누어 계산하였다.

9. H₂O₂ 감수성 시험

세포가 세균 등을 살균하기 위해 생성하는 활성산소의 하나인 H₂O₂에 대한 각 시험 균주의 감수성을 Ishibe *et al.* (2007)의 방법으로 조사하였다. 각 시험 균주를 TSB에 27 °C, 24 시간 배양한 다음 원심 분리하여 균을 모은 후 0.1 M PBS (pH 7.2)로 세척하여 균수를 1×10^8 cfu/ml 가 되도록 조정된 것을 시험 균액으로 사용하였다. 이 시험 균액 10 μ l를 H₂O₂가 0.01 %가 들어간 1 ml의 PBS와 섞어준 다음 0, 0.5 및 1 시간마다 단계 희석하여 Miles and Misra (1938)의 방법에 따라 생균수를 측정하였다. 시험은 3 반복 실시하였다.

10. 어체 내에서의 생존능

Ling *et al.* (2001)의 방법을 약간 수정해 실시했으며 어체 내에서의 생존능을 보기 위해 침지 방법을 실시했다. 먼저 시험균을 해수에 1×10^6 cfu로 되게 현탁하였다. 그 다음 넙치를 넣어주고 2, 12, 24 및 48 시간마다 2마리씩 샘플 처리해 체표 점액, 장 점액 및 담즙을 각각 모았다. 이 각각의 시료를 0.1 g/ml이 되게 멸균 생리식염수를 넣어준 다음 마쇄하였다. 이를 단계 희석해 Miles and Misra (1938)의 방법에 따라 SS 배지에 drop하여 균수를 측정하였다.

11. 독성 균주와 비독성 균주의 Outer Membrane Protein (OMP) 비교

11.1. OMP 추출

OMP는 Kim *et al.* (2006)의 방법으로 추출하였다. TSB에 시험균을 접종하여 overnight한 배양액을 $15,000 \times g$, 20 분 동안 4°C에서 원심 분리하여 균을 집균하였다. 펠렛을 10 mmol Tris-HCl (pH 8.0)에 재부유시키고 sonication 한 후 $15,000 \times g$, 1 시간 동안 4 °C에서 원심 분리하였다. 최

중 농도가 1.5 % (w/v)이 되게 sarcosyl을 넣은 10 mmol Tris-HCl (pH 8.0) 10 ml에 펠렛을 재부유시킨 다음 실온에서 20 분간 반응 후 15,000 × g, 90 분, 4 °C로 원심 분리해 상정액을 OMP추출액으로 사용하였다. 추출한 OMP는 Bradford 법 (1976)으로 단백질량을 측정하고 -20 °C에서 보관하며 사용하였다.

11.2. SDS-PAGE

SDS-PAGE는 Kim *et al.* (2006)의 방법으로 시험하였다. Sample buffer는 멸균 증류수 2 ml, 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) 1 ml, glycerol 2 ml, 10 % SDS 2.4 ml, 1 % Bromophenol blue 0.15 ml과 β-mercaptoethanol 0.45 ml을 섞어 준비하였고 이 sample buffer 40 μl와 OMP (5 mg/ml)를 섞어 30 μl를 100 °C에서 5 분간 가열하여 시료를 준비하였다. 5 % (v/v) stacking gel과 10 % (v/v) separating gel에 시료를 loading하고 전기영동한 gel은 coomassie brilliant blue R-250으로 염색하고 탈색한 다음 관찰하였다.

12. OMP 관련 유전자

12.1. DNA 분리

Table 1에 나와 있는 4 개의 독성 균주와 4 개의 비독성 균주 각각을 TSA에 24 시간 배양한 다음 5 ml의 TSB에 접종하고 25 °C에서 24 시간 동안 shaking 하면서 배양하였다. 배양된 균을 6000 rpm, 5 분간 원심 분리하였다. 이렇게 얻어진 펠렛을 Genomic DNA Extraction kit (Bioneer)로 genomic DNA를 분리하였다.

12.2. PagC 와 OmpS2 primer 설계 및 PCR

최근 *E. tarda*의 membrane 독성 관련 유전자로 추정되고 있는 PagC

gene에 독성 균주와 비독성 균주가 차이가 있는지를 알아보고 OMP의 protein gene으로 알려진 OmpS2 gene의 primer를 설계하여 PCR을 실시하였다. 사용된 primer와 PCR product band의 예상 size는 Table 2에, PCR의 조건은 Table 3과 4에 나타내었다.

Table 2. PCR primers sequences used to amplify PagC & OmpS2 gene

Primer set	Sequence	Target gene	PCR product size (bp)
PagCF PagCR	5'-ATGAAAAAACAGATCGCTGGACTGG-3' 5'-CTAAAACGGTAGCCGAGACCG-3'	PagC	541bp
OmpS2F OmpS2R	5'-GGCAGTCGTTATTCCTGCTC-3' 5'-AGGCTGGGCATATCTGTACG-3'	OmpS2	1100bp

Table 3. Condition of reaction steps and PCR cycle of PagC gene

	Temperature (°C)	Reaction Time	Cycle
Pre-denaturation	94	1 min	1
Denaturation	94	30 sec	30
Annealing	59	30 sec	
Extension	72	30 sec	
Post-extention	72	7 min	1

Table 4. Condition of reaction steps and PCR cycle of OmpS2 gene

	Temperature (°C)	Reaction Time	Cycle
Pre-denaturation	94	1 min	1
Denaturation	94	30 sec	30
Annealing	55	30 sec	
Extension	72	30 sec	
Post-extention	72	7 min	1

13. 통계학적 분석

각 시험구 사이의 통계학적 유의성은 Student's t-test로 비교하여 P값을 측정하였고, $P < 0.05$ 와 $P < 0.001$ 수준에서 유의성을 평가하였다.

Ⅲ. 결과

1. 시험균의 반수 치사 농도 비교

시험균의 넙치에 대한 병원성 시험 결과는 Table 5에 나타나 있다. 시험 결과 KE-1이 $10^{1.7}$, KE-3이 $10^{1.6}$ 으로 독성이 가장 높았으며 FSW910410과 KE-5는 $10^{4.2}$, $10^{4.1}$ 로비교적 독성이 낮았다. 이러한 시험 결과에 따라 LD₅₀ 값이 낮은 KE-1과 KE-3을 독성 균주로 FSW910410과 KE-5는 중간 정도의 독성 균주로 그리고 LD₅₀값이 10^6 보다 큰 SU100, AL92448, ATCC15947과 ET82015를 비독성 균주로 구분하였다.

Table 5. LD₅₀ on the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, intraperitoneally injected with *Edwardsiella tarda* strains

균주	FSW 910410	KE-1	KE-3	KE-5	SU100	AL 92448	ATCC 15947	ET 82015
LD ₅₀ bacterium cfu	$10^{4.2}$	$10^{1.7}$	$10^{1.6}$	$10^{4.1}$	$>10^{9.0}$	$10^{8.7}$	$10^{8.5}$	$10^{8.3}$

cfu, colony forming unit. LD₅₀ were calculated SPSS 10.0.

2. 생화학적 특성

독성 균주와 비독성 균주의 생화학적 특성을 비교한 결과는 Table 6에 나타나 있다. 독성 균주와 비독성 균주 모두 일반적인 *E. tarda*의 성장과 동일한 결과를 보였다. 독성 균주와 비독성 균주 모두 TSIA에서 H₂S와 가스를 생성했지만 SU100을 제외한 나머지 비독성 균주가 독성 균주에 비해 H₂S의 생성 정도가 높게 나타났다. Nitrate, Indole, Methyl red 모두 positive 반응을 보였으며 Citrate와 Voges-Proskauer test (Clark and Lubs medium)에서는 negative 반응을 보였다. 당의 경우 Fructose, Galactose, Glucose, Maltose, Mannose를 분해하여 positive 반응을 보였으며 Lysine과 Ornithine (decarboxylase)는 positive, Arginine (dehydrolase)은 negative 반응을 보였다.

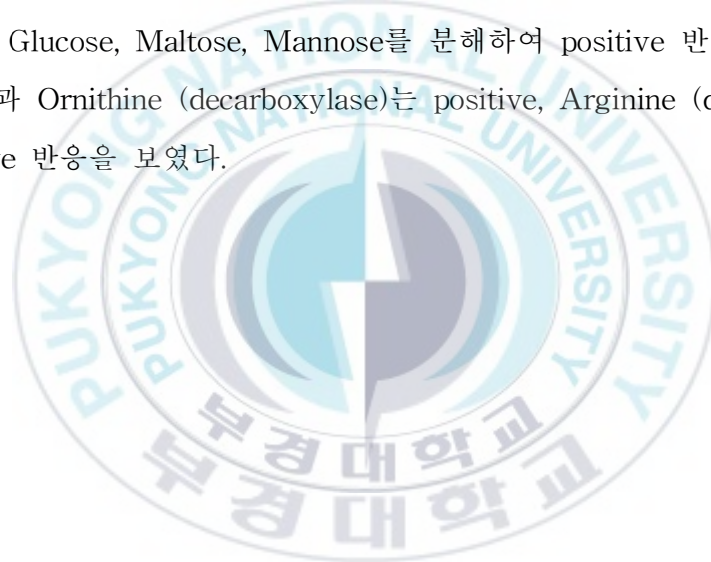


Table 6. Biochemical characteristics of tested strains

	FSW 910410	KE-1	KE-3	KE-5	SU100	AL 92448	ATCC 15947	ET 82015
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase	-	-	-	-	-	-	-	-
TSIA	K/A gas, H ₂ S	K/A gas, H ₂ S	K/A gas, H ₂ S	K/A gas, H ₂ S	K/A gas, H ₂ S	K/A gas, H ₂ S	K/A gas, H ₂ S	K/A gas, H ₂ S
Nitrate OF	+	+	+	+	+	+	+	+
Indole	F	F	F	F	F	F	F	F
Methyl red	+	+	+	+	+	+	+	+
Voges-Proskauer	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrate	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginine	-	-	-	-	-	-	-	-
Lysine	+	+	+	+	+	+	+	+
Ornithine	+	+	+	+	+	+	+	+
Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-
Cellibiose	-	-	-	-	-	-	-	-
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-
Rafinose	-	-	-	-	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicin	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-
Sucrose	-	-	-	-	-	-	-	-
Trehalose	-	-	-	-	-	-	-	-
Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-

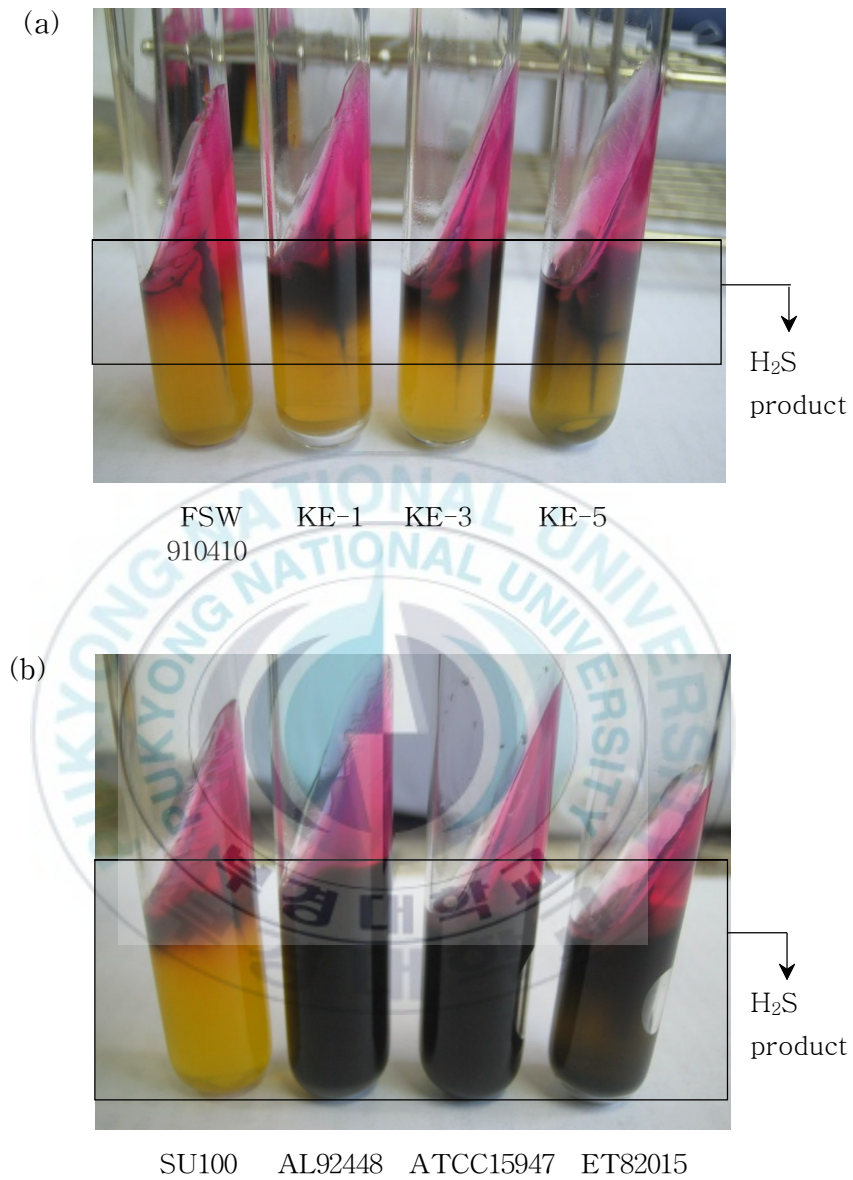


Fig 1. Growth and H₂S production of the virulent (a) and the avirulent *Edwardsiella tarda* (b) in TSIA.

3. 염분 농도 및 pH에 따른 발육정도 비교

염분 농도 및 pH에 따른 발육 정도의 경우도 생화학 시험과 마찬가지로 독성 균주와 비독성 균주 상호간에 특이적인 차이는 나타나지 않았다. 염분 농도의 경우 독성 균주와 비독성 균주 모두 0 %~3 %까지는 매우 잘 성장했으며 4 %~5 %에서도 비교적 잘 성장했다. 반면 6 % 이상의 염분 농도에서는 성장하지 못했다.

pH에 따른 성장의 경우 pH 4.0~9.0 까지 모두 잘 자랐으며 비교적 낮은 pH인 pH 2.0~3.0 에서도 어느 정도의 성장을 보였다.



Table 7. The effects of NaCl concentration in the alkali-peptone water on the growth of *Edwardsiella tarda*

NaCl	Virulent strains				Avirulent strains			
	FSW 910410	KE-1	KE-3	KE-5	SU100	AL 92448	ATCC 15947	ET 82015
0	++	++	++	++	++	++	++	++
0.5	++	++	++	++	++	++	++	++
1	++	++	++	++	++	++	++	++
2	++	++	++	++	++	++	++	++
3	++	++	++	++	++	++	++	++
4	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+
6	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-

Table 8. The effects of NaCl concentration in the alkali-peptone water on the growth of *Edwardsiella tarda*

pH	Virulent strains				Avirulent strains			
	FSW 910410	KE-1	KE-3	KE-5	SU100	AL 92448	ATCC 15947	ET 82015
1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+
4	++	++	++	++	++	++	++	++
5	++	++	++	++	++	++	++	++
6	++	++	++	++	++	++	++	++
7	++	++	++	++	++	++	++	++
8	++	++	++	++	++	++	++	++
9	++	++	++	++	++	++	++	++

4. 점액 내에서의 생존능 비교

4.1. 체표 점액에서의 생존능

시험균의 체표 점액에서의 생존능은 Fig. 2에 나타내었다. 독성 균주와 비독성 균주 모두 시간이 갈수록 그 수가 증가하였으며 특히 3 시간에서 12 시간 사이에는 급격히 증가하였다. 12 시간에서 24 시간 사이에는 비독성 균주는 독성 균주에 비해 성장이 둔화되거나 정지된 경향이 나타난 반면 독성 균주는 급격하게 증가해 생존능에서 약간의 차이를 보였다. 특히 Human type 균인 ATCC15947의 경우는 12 시간에서 24 시간 사이에 그 수가 감소하였다.



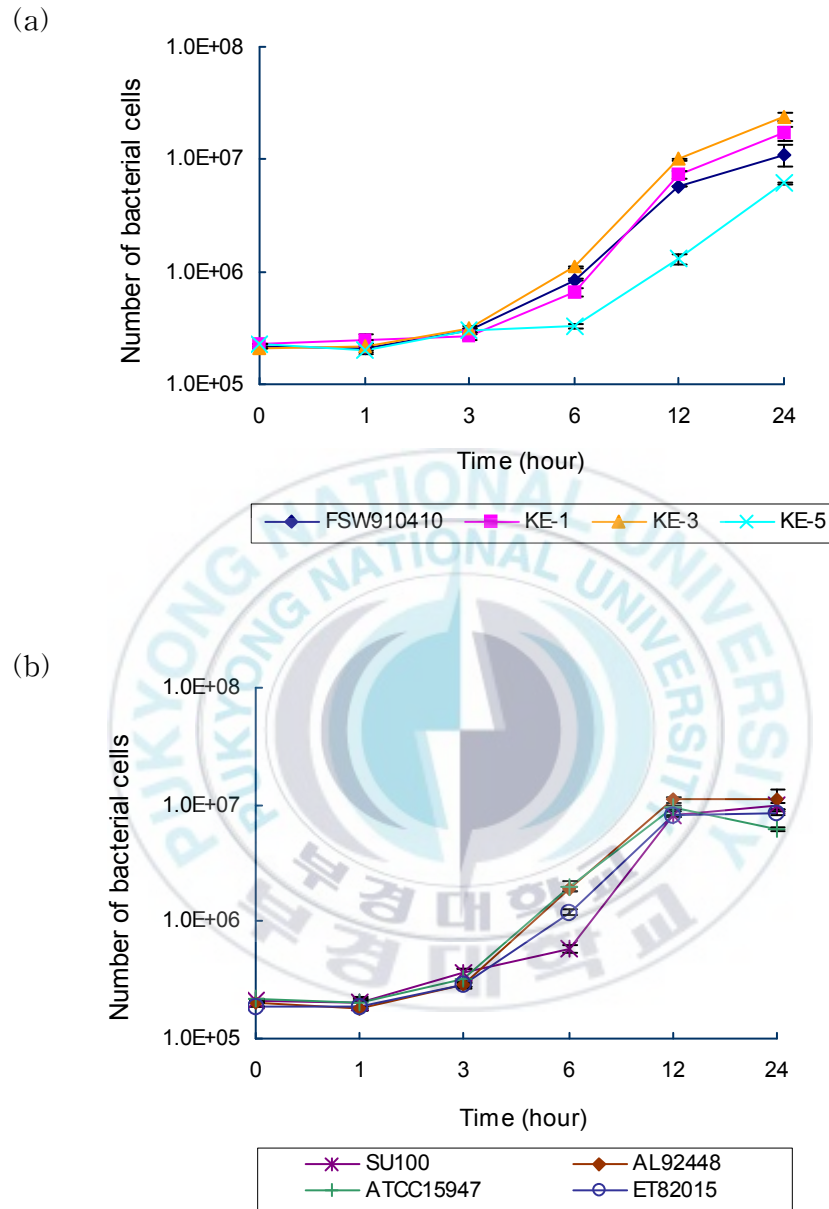


Fig. 2. Survival ability of the virulent (a) and the avirulent *Edwardsiella tarda* (b) in fish skin mucus.

4.2. 장 점액에서의 생존능

시험균의 장 점액에서의 생존능은 체표 점액과는 다른 결과가 나타났다. 하지만 12 시간에서 24 시간 사이에 독성 균주는 균수가 눈에 띄게 증가한 반면 체표 점액에서의 생존능처럼 균수가 감소하거나 증감은 없었지만 비독성 균주의 경우 독성 균주와 비교했을 때는 균수가 크게 증가하지 않아 장 점액에서의 생존능에서도 어느 정도의 차이를 보였다. 하지만 독성 균주와 비독성 균주간에 두드러지는 차이는 나타나지 않았다. 그러나 장 점액내 생존능에 있어 Human type 균인 ATCC15947의 경우는 12 시간에서 24 시간 사이에 그 수가 감소하는 경향이 나타났다.



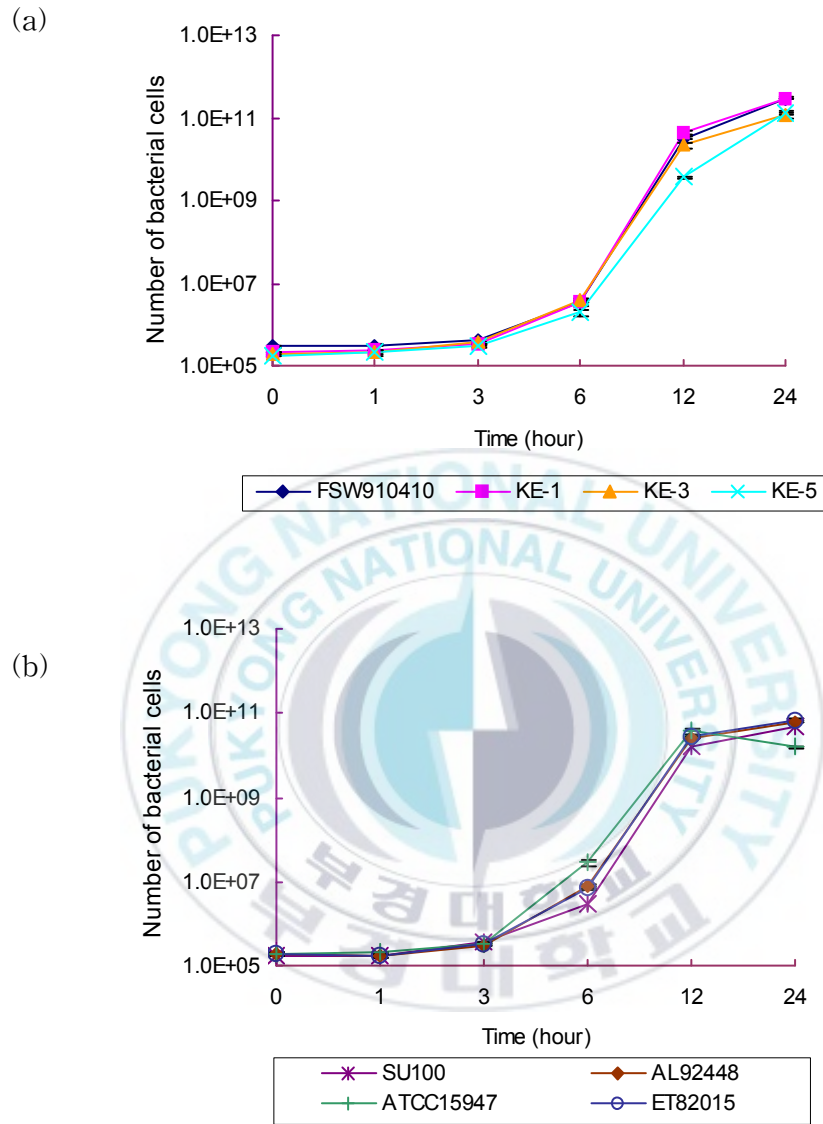


Fig. 3. Survival ability of the virulent (a) and the avirulent *Edwardsiella tarda* (b) in fish intestine mucus.

5. 위액과 담즙의 영향

5.1. 인공위액 및 배지에서의 생존능

시험균의 인공위액에서의 생존능은 Fig. 4에 나타나 있다. 인공위액 (SGF)에서 독성 및 비독성 균주 대부분이 지남에 따라 감소하였으며 TSB를 pH 2.0으로 맞춘 배지에서도 독성 균주와 비독성 균주 모두 시간이 지남에 따라 감소하는 결과가 나타났다.



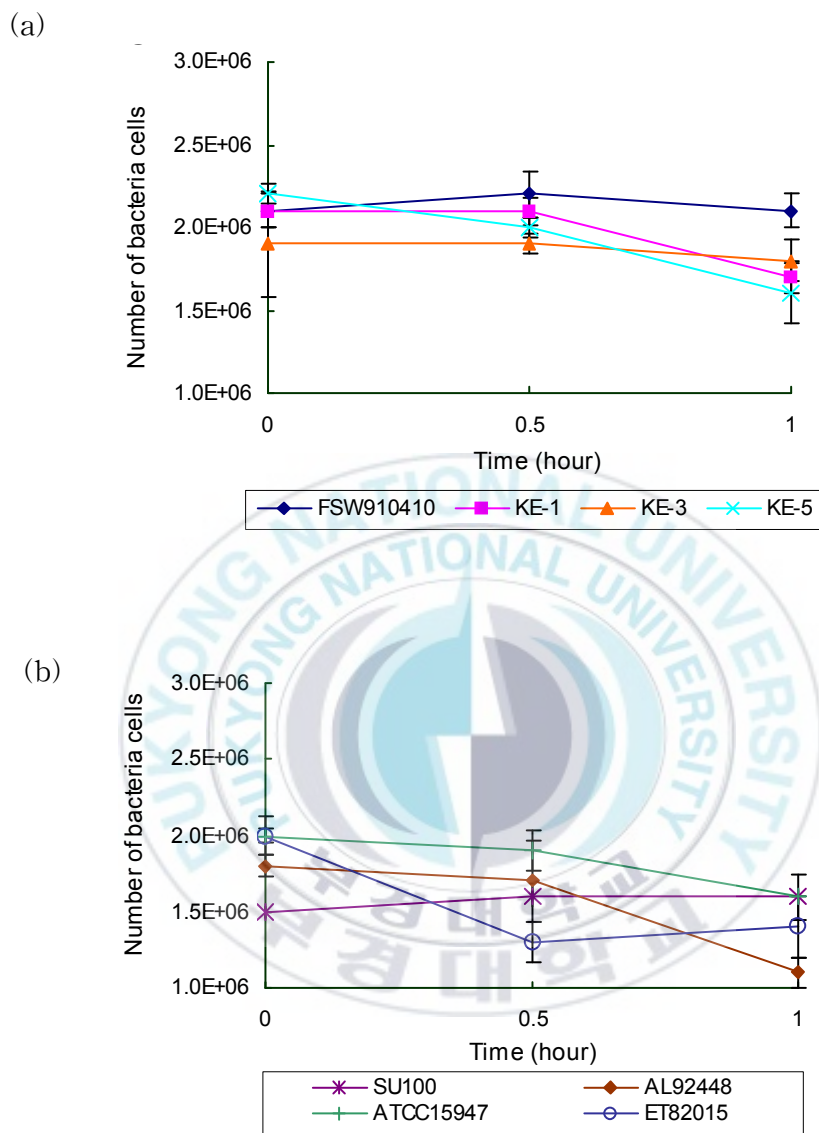


Fig. 4. Survival ability of the virulent (a) and the avirulent *Edwardsiella tarda* (b) in SGF (pH 2.0).

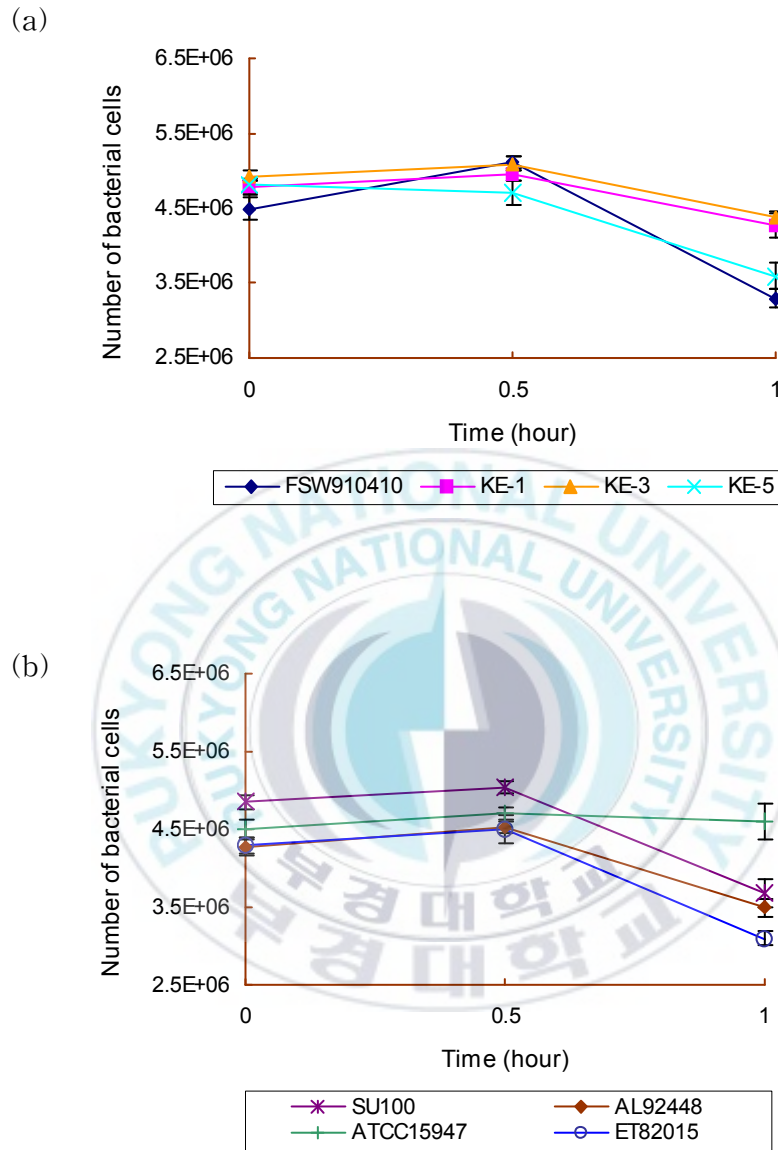


Fig. 5. Survival ability of the virulent (a) and the avirulent *Edwardsiella tarda* (b) in TSB (pH 2.0).

5.2. 담즙에서의 생존능

시험균의 담즙에서의 생존능은 Fig. 6에 나타나 있다. 담즙에서는 독성 균주의 경우 1 시간과 3 시간째에는 0 시간과 비교했을 때 큰 변화가 관찰되지 않았다. 배양 6시간 후에는 독성균주는 0 시간째보다 증가하였으며 비독성의 경우 4 균주 모두 0 시간보다 감소하였다.

배지에 균을 접종한 대조구와 비교했을 때는 독성 균주는 대조구에 비해 담즙 내에서는 성장속도가 더디게 나타났으며 비독성 균주는 대조구에 비해 1 시간 째 이후부터는 균 수가 감소하는 경향이 나타났다.



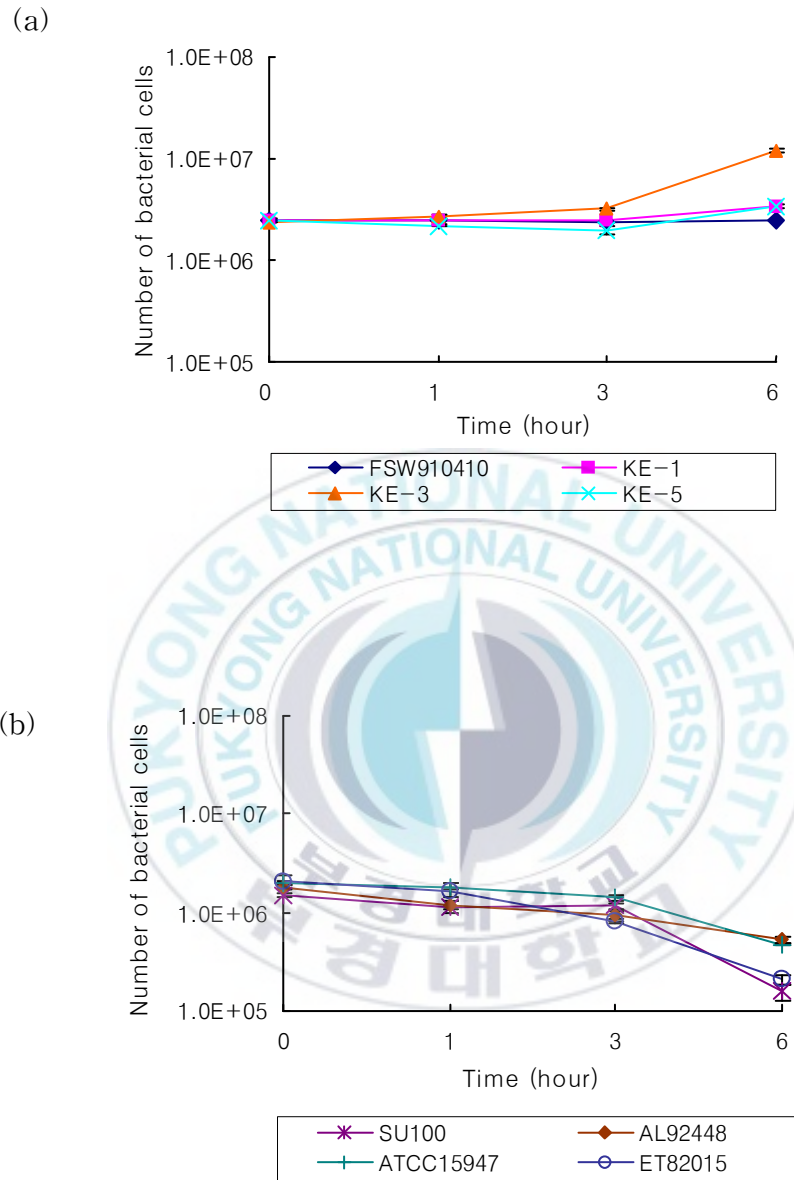


Fig. 6. Bile tolerance of the virulent (a) and the avirulent strains of *Edwardsiella tarda*(b).

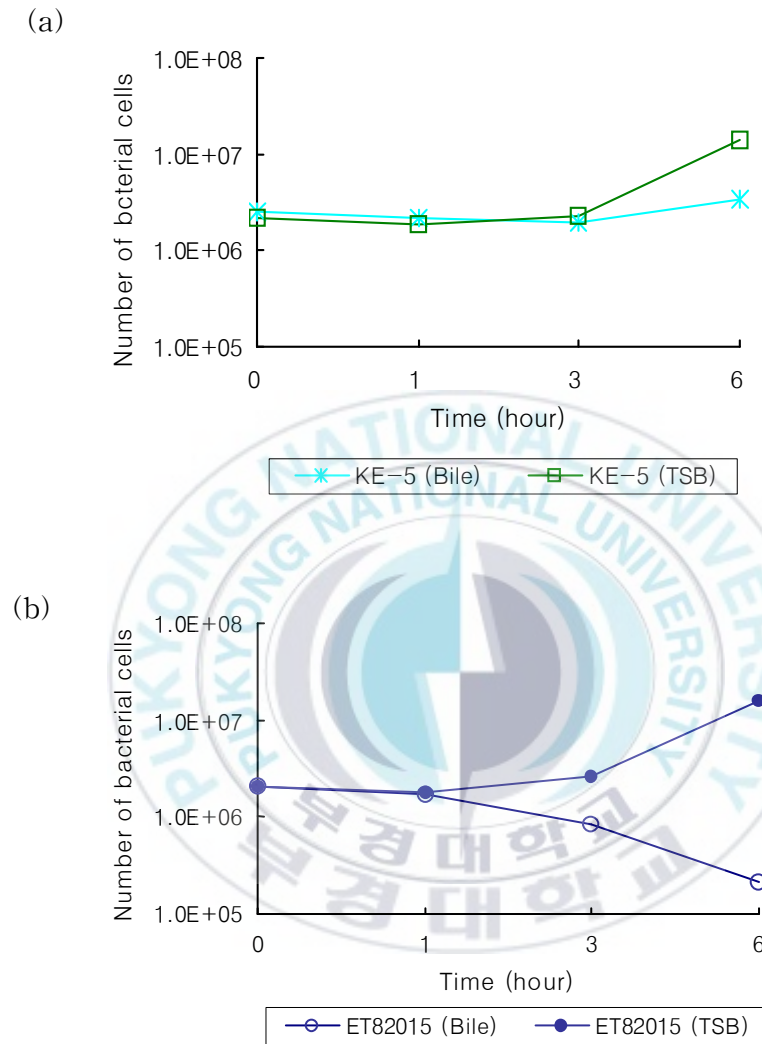


Fig. 7. A comparison between the growth of *Edwardsiella tarda* in Bile and Tryptic Soy Broth (TSB). (a) Growth of the virulent *Edwardsiella tarda* KE-5; (b) Growth of the avirulent *E. tarda* ET82015.

6. 넙치 혈청에서의 생존능

6.1 넙치 혈청에 대한 저항성

넙치 혈청에 대한 *E. tarda* 독성 균주와 비독성 균주의 저항성 시험에서는 SU100과 ET82015 균주를 제외한 나머지 균주는 모두 넙치 혈청에 대해 저항성을 나타내었다.

Table 9. Viability in the serum of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*

Strain	Serum survival ability [*]	Viability
FSW910410	1.23 ± 0.01	R [†]
KE-1	1.04 ± 0.03	R
KE-3	1.13 ± 0.04	R
KE-5	1.09 ± 0.04	R
SU100	0.96 ± 0.06	S [‡]
AL92448	1.04 ± 0.03	R
ATCC15947	1.26 ± 0.07	R
ET82015	0.92 ± 0.07	S

^{*}Serum survival ability was calculated by dividing the number of viable bacterial cells after serum treatment (incubated for 1h) by the initial cells before serum treatment.

[†] R-serum resistance; [‡] S-serum sensitivity.

6.2 넓치 혈청에서의 생존능

시험균의 혈청 내에서의 생존능 시험의 결과는 Fig. 8에 나타나 있다. 혈청에서 독성 균주와 비독성 균주 모두 12 시간까지 균수가 증가하였으나 12 시간에서 24 시간 사이에 독성 균주의 경우 앞서 다른 시험과 마찬가지로 여전히 증가하는 반면 비독성 균주의 경우 ET82015 균주를 제외한 나머지 비독성 균주는 균수가 감소하는 경향이 관찰되었다. 특히 SU100의 경우 다른 비독성 균주와 비교했을 때 3 시간까지는 비슷한 균수의 증가를 보이다가 3 시간째 이후부터 12 시간까지 감소하며 그 이후에는 균수가 증가하는 경향이 나타났다.



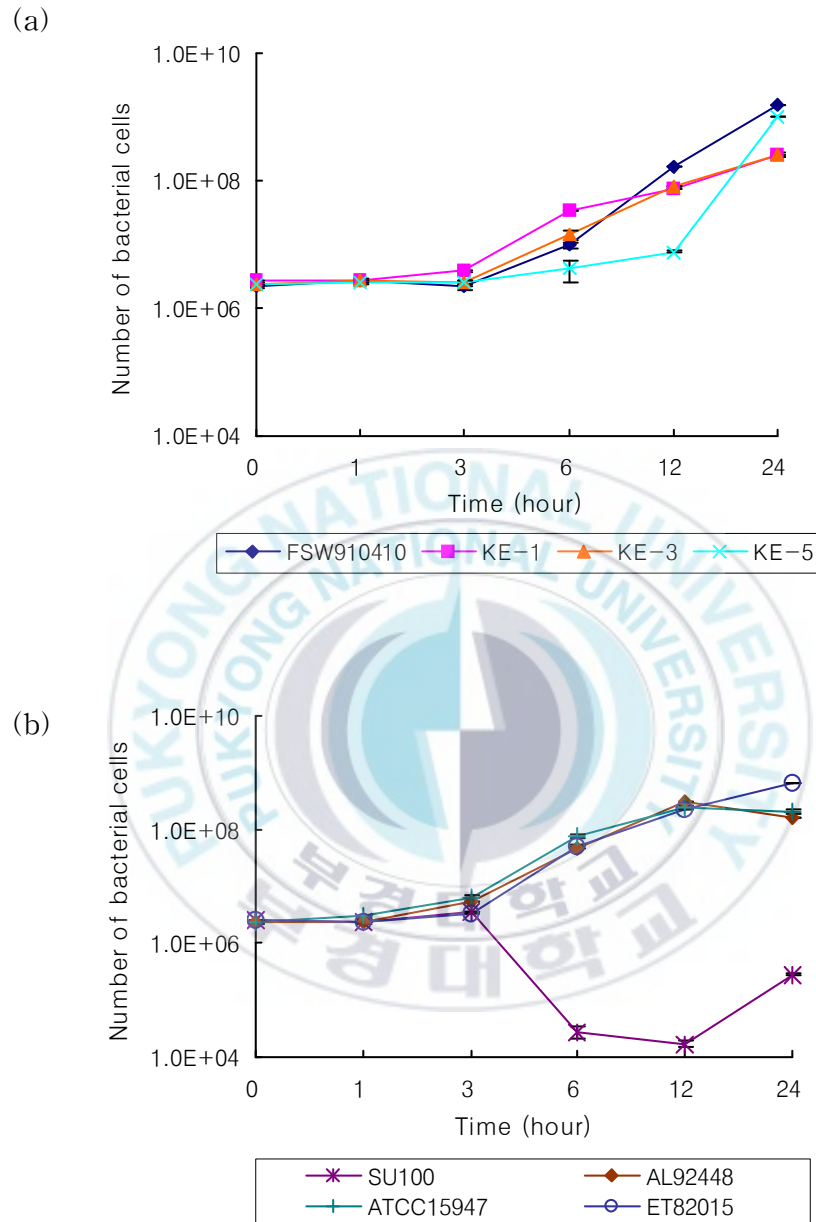


Fig. 8. Survival ability of virulent (a) and avirulent strains (b) of *Edwardsiella tarda* in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, serum.

7. 시험균의 macrophage에 침입력 및 증식력

7.1. Internalization assay

E. tarda 독성 균주와 비독성 균주의 macrophage내로 시간이 갈수록 더 많이 침입할 수 있는지를 비교하였는데 이는 Table 7에 나타나 있다. 1시간 배양했을 때의 균의 침입력과 5 시간 배양후의 침입력을 비교하였는데 ATCC15947 균주를 제외한 모든 독성 균주와 비독성 균주 모두 1 시간 배양 후보다는 5 시간 배양 후에 macrophage 내로 들어간 균수가 증가하였다. 그러나 비독성 균주의 경우 1 시간 배양은 물론 5 시간 배양 후의 균수도 독성 균주에 비해 균수 변화가 아주 미미하였다.

Table 10. Internalization of the virulent and the avirulent strains of *Edwardsiella tarda* in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, macrophage

		1 h [*]	5 h [*]
Virulent	FSW910410	80.8 ± 9.8	100.0 ± 5.4
	KE-1	11.1 ± 1.4	60.7 ± 1.0
	KE-3	10.0 ± 1.1	50.0 ± 7.6
	KE-5	48.0 ± 2.3	81.6 ± 9.1
Avirulent	SU100	0.8 ± 0.0	7.5 ± 0.5
	AL92448	0.1 ± 0.0	0.4 ± 0.0
	ATCC15947	22.6 ± 0.7	16.5 ± 0.8
	ET82015	1.7 ± 0.0	12.0 ± 0.4
	ATCC7001	94.4 ± 0.8	88.9 ± 4.7

*Internalization is expressed as percentage of input bacteria surviving after gentamicin treatment for 1h or 5h.

7.2. Intracellular replication assay

macrophage 내로의 시간에 따른 침입력과 함께 macrophage 내로 침입한 후 각각의 시험균이 증식 할 수 있는지의 여부를 시험하였다. 배양 1시간 후 gentamicin을 처리하여 세포 바깥쪽에 균을 제거한 다음 macrophage 내의 균만을 시간마다 배양하여 그 결과를 Fig. 9에 나타내었다. Macrophages 내의 균의 증식 정도를 보면 앞선 침입력 시험과 마찬가지로 독성균주는 시간이 감에 따라 증식의 정도가 확연히 눈에 띄는 반면 ET82015 균주를 제외한 나머지 비독성 균주의 경우 배양시간이 길어져도 증식하지 못하거나 감소하는 경향이 나타나 독성 균주와 비독성 균주간에 차이가 확연히 나타났다.



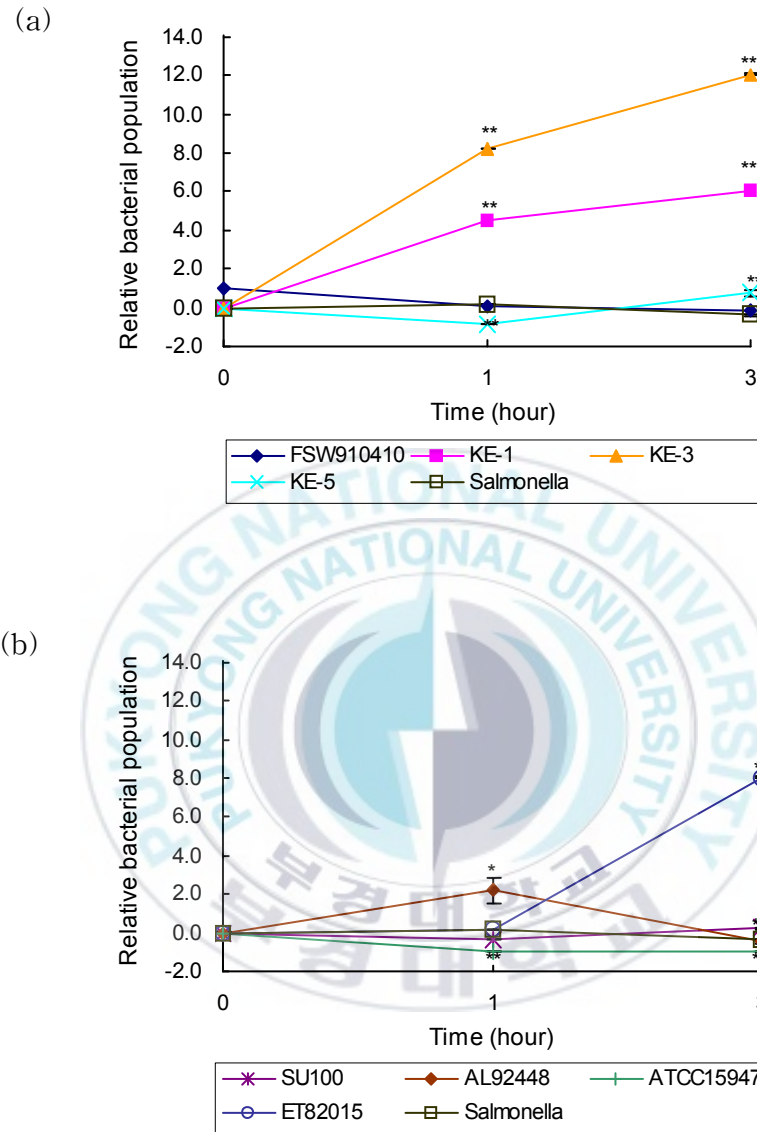


Fig. 9. Intracellular replication of the virulent (a) and the avirulent strains (b) in macrophage. *Significant difference between *Salmonella choleraesuis* and *Edwardsiella tarda*; $P < 0.05$. **Significant difference between *Salmonella choleraesuis* and *E. tarda*; $P < 0.001$. Salmonella, *Salmonella choleraesuis* ATCC7001.

8. H₂O₂ 감수성 시험

H₂O₂의 영향을 알아본 결과 독성 균주와 비독성 균주 모두 H₂O₂의 영향을 받아 시간이 감에 따라 균수가 감소함을 알 수 있었다. 다만 비독성 균주 중 AL92448의 경우 H₂O₂에 가장 민감하게 반응해 시간이 감에 따라 균수가 아주 급격히 감소함이 나타났다.



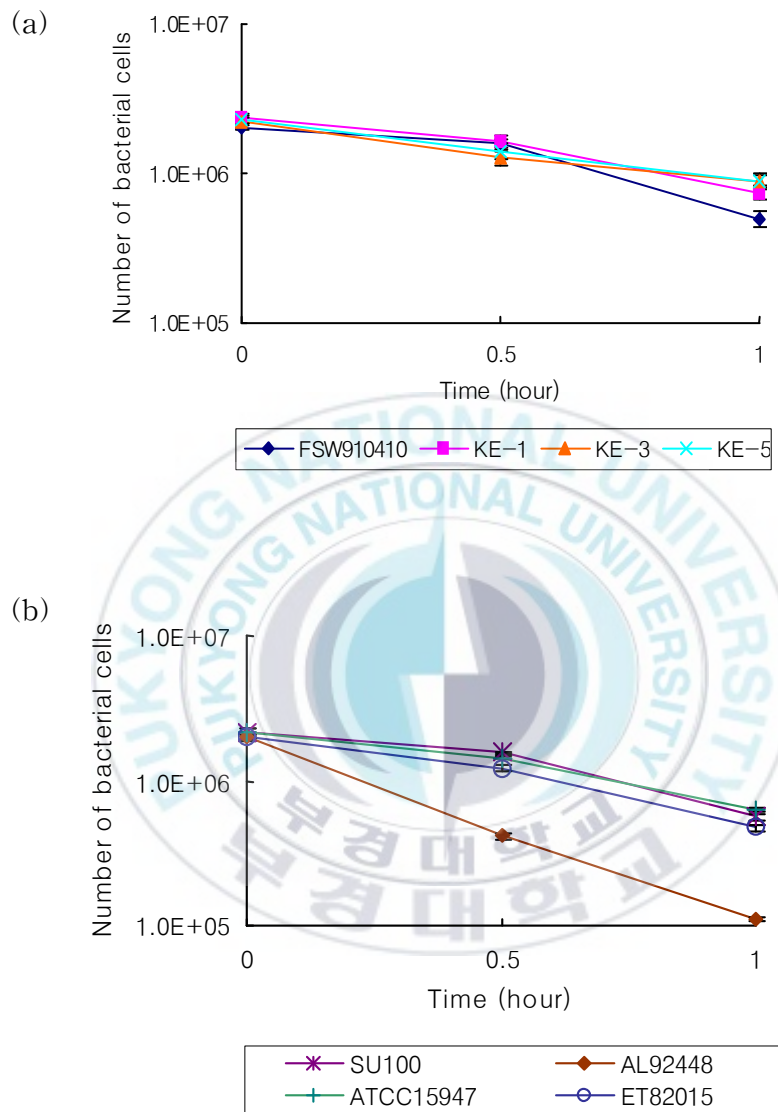


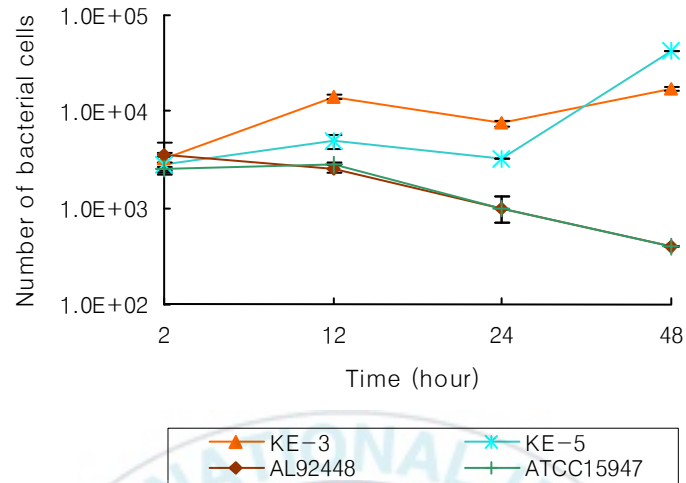
Fig. 10. H_2O_2 susceptibility of the virulent (a) and the avirulent strains (b) of *Edwardsiella tarda*.

9. 어체 내에서의 생존능

E. tarda 각 균주를 침지한 in vivo 시험에서 독성 균주의 경우 시간이 지남에 따라 넙치의 체표와 장 점액에서 균수가 증가하는 반면 비독성 균주의 경우 균수가 감소하는 결과가 나타났다. 이는 in vitro 시험에서 체표 점액의 경우 독성은 균수가 계속적으로 증가하는 반면 비독성은 감소하는 결과와는 일치하지만 장 점액의 경우에는 시간이 갈수록 독성 균주와 비독성 균주 모두 증가한 in vitro 시험과는 반대로 비독성 균주의 경우 시간이 감에 따라 감소하는 결과가 나타났다.



(a)



(b)

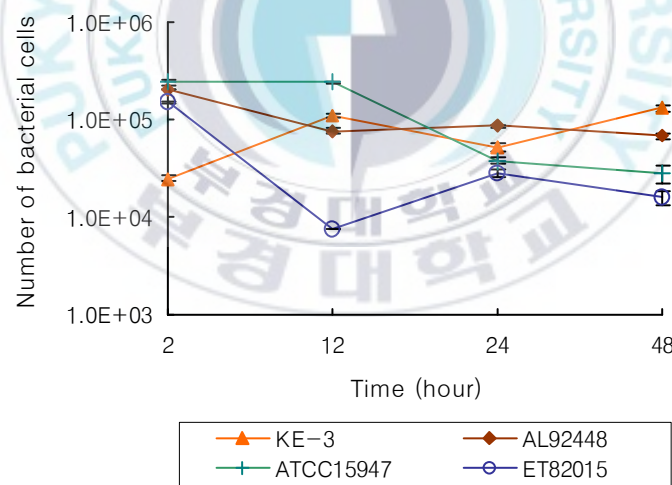


Fig. 11. Viability of the virulent and the avirulent *Edwardsiella tarda* in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. (a) skin mucus of olive flounder; (b) intestine mucus of olive flounder.

9. OMP의 SDS-PAGE profile 비교

SDS-PAGE를 통해 OMP의 profile을 조사한 결과는 Fig. 12와 같다. OMP를 SDS-PAGE 한 결과 전체적으로 비슷한 band가 관찰되었다. 그러나 약 40 kDa 부근의 band에서 독성 균주의 경우 turbot 유래의 KE-5가 다른 독성 균주와는 다른 band 경향을 보였으며 비독성의 경우 AL92448과 ATCC15947은 같은 경향을 보인 반면 ET82015는 비독성 균주가 아닌 다른 세 독성 균주 (FSW910410, KE-1, KE-3)와 유사한 band를 보였다.



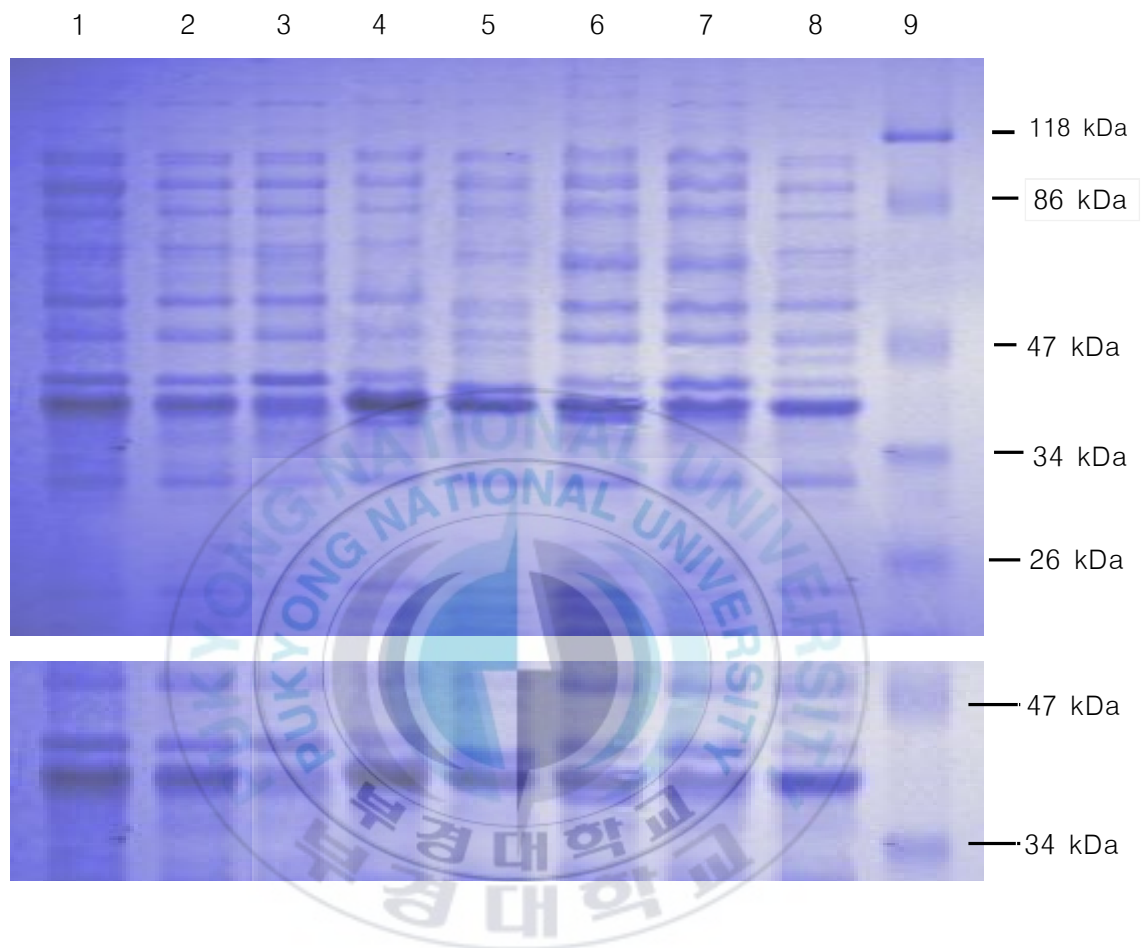


Fig. 12. Comparison between the OMP of the virulent and the avirulent *Edwardsiella tarda*. lane 1, FSW910410; lane 2, KE-1; lane 3, KE-3; lane 4, KE-5; lane 5, SU100; lane 6, AL92448; lane 7, ATCC15947; lane 8, ET82015; lane 9, Marker.

10. OMP gene 비교

OMP protein gene으로 알려진 OmpS2 gene과 *E. tarda*의 독성과 관련 있는 OMP gene으로 알려진 PagC gene을 독성 균주와 비독성 균주에서 확인한 결과는 Fig. 13과 같다. 확인 결과 PagC gene의 경우 독성 균주와는 다른 size의 band를 비독성 균주에서 확인할 수 있었고 ET82015 균주의 경우에는 독성 균주와 같은 size의 band가 확인되었다. OmpS2 gene의 경우도 PagC gene과 유사하게 독성 균주와 ET82015 균주에서는 OmpS2 gene의 band가 확인된 반면 나머지 비독성 균주에서는 band가 나타나지 않았다.





Fig. 13. Comparison between the OMP gene of the virulent and the avirulent *Edwardsiella tarda*. (a) PagC gene, (b) OmpS2 gene.

IV. 고찰

*Edwardsiella tarda*는 감염 숙주 범위가 광범위하며 어류의 경우 담수어 뿐 아니라 해수어에도 감염되는 병원체이다. *E. tarda*에 대한 많은 연구가 현재 수행 중이며 많은 연구 성과도 보고되고 있다. 이러한 *E. tarda*에 감염된 넙치는 복수의 저류로 인한 복부 팽만 및 탈장의 증상을 보이며 괴사와 농양을 형성하는데 이러한 부위의 조직세포와 식세포내에서 많은 수의 *E. tarda* 균이 증식되어 있는 것이 관찰된다 (Rashid *et al.*, 1997).

본 연구에서는 *E. tarda*의 독성 균주와 비독성 균주의 차이가 어디에서 기인하는지를 알아보기 위해 체액성 요소와 세포성 요소에서의 각 균주의 생존능을 비롯한 여러 가지 특성을 비교 • 검토해 보았다. 먼저 독성과 비독성이라고 알려진 균주가 넙치에 있어서도 병원성을 동일하게 가지는지를 알아보기 위해 LD₅₀ 값을 측정하였다. 넙치 (*Paralichthys olivaceus*) 유래의 독성 균주인 FSW910410, KE-1, KE-3, KE-5 모두 LD₅₀ 값이 10^{4.4} 보다 작게 나타났으며 특히 KE-1 (10^{1.7})과 KE-3 (10^{1.6})이 높은 독성을 보였다. 반면 blue gourami (*Trichogaster trichopterus* Pallas)에서 비교적 낮은 독성을 가진 균주인 SU100, AL92448, ATCC15947, ET82015는 LD₅₀ 값이 10^{8.4} 보다 크게 나타났으며 나머지 3 균주에 비해 SU100은 LD₅₀ 값이 10⁹ 보다 커 비독성 균주 중 가장 낮은 독성을 보였다.

넙치에 있어서 나타난 독성의 정도를 기준으로 나눈 *E. tarda* 독성 균주와 비독성 균주에 대한 생화학적 특성과 같은 기본적인 성상 비교에서 독성 균주와 비독성 균주의 생화학적 특성과 pH와 염분농도에 따른 발육 정도를 비교해 보았다. 그 결과 SU100을 제외한 나머지 비독성 균주가 독성 균주에 비해 H₂S 생성 정도가 높다는 차이를 제외하고는 독성 균주와 비

독성 균주 간에 어떠한 차이도 보이지 않았다.

*E. tarda*의 감염 부위는 아가미나 장관, 체표와 같이 외부 환경과 접하고 있는 부위로 알려져 있으며 이러한 감염 경로로 들어가 증식함에 있어서 *E. tarda* 독성 균주와 비독성 균주가 차이가 있다고 보고되고 있다 (Ling *et al.*, 2001). 어류의 경우 상피세포 점액이 아가미, 장관, 체표 표면을 덮고 있으며 이 같이 넓은 범위에 퍼져있는 점액은 외부 환경에 존재하는 병원체로부터 어류를 보호하는 첫 번째 방어선이다 (Aranishi *et al.*, 2000). 이번 연구에서 체표 점액에서의 생존능은 독성 균주의 경우 24 시간까지도 계속 성장하는 반면 비독성 균주의 경우 12~24 시간 사이에 균의 성장이 정체되거나 감소하는 결과가 나타났다. 특히 Human type인 ATCC15947의 경우는 24 시간째에 감소하는 경향을 보였다. 그러나 장 점액에서의 생존능은 체표 점액에 비해 그 경향이 뚜렷하게 나타나지는 않았다. Ling *et al.* (2001)에 따르면 entry sites 중에서 비독성 균주의 경우 다른 entry sites에 비해 장관 쪽에 그 비율이 높은 반면 독성 균주의 경우 모든 entry sites에 골고루 관찰되었다고 하여 본 연구의 장 점액에서 독성 균주와 유사하게 비독성 균주 역시 잘 생존한 것이 일치한다고 볼 수 있다.

인공 위액 (SGF)과 pH를 인공 위액과 같은 2.0으로 맞춘 TSB에서의 생존능에서 시간이 지남에 따라 독성 균주와 비독성 균주 모두 감소했다. 그와 비슷한 예로 낮은 pH에서 *Shigella flexneri*를 비롯한 장내세균이 시간이 지남에 따라 균수가 감소하는 경향이 나타났다는 Jed Gorden *et al.* (1993)의 보고가 있다.

담즙에서의 생존능은 대체적으로 독성 균주가 시간이 갈수록 증가한 반면 비독성 균주의 경우 감소하는 경향을 나타냈다. Lilian *et al.* (2007)은 0.15 % bile salt mixture와 0.15 % bile salt conjugate 처리한 구간에서 담즙을 처리하지 않은 구간에서보다 *Bacteroides fragilis*의 성장이 0 시간 이후부

터 7 시간까지 더 낮아 균의 성장이 지연된다고 보고하고 있으며 Hyronimus *et al.* (2006) 역시 lactic acid bacteria인 *Bacillus coagulans*와 *Bacillus racemilacticus*가 담즙을 처리한 구간에서 균의 성장이 지연된다고 보고하고 있다. 본 연구에서 독성 균주와 비독성 균주의 담즙에서의 생존능을 대조구와 비교하였을 때 독성 균주의 경우 성장이 지연되는 결과가 나타났으나 비독성 균주의 경우 시간이 갈수록 대조구와는 달리 균수가 감소하는 결과가 나타났다. 이는 0.15 % 혹은 5 % 등 담즙 첨가 실험구와는 달리 담즙 원액에 균액을 섞어 시험한 것과 관련이 있는 것으로 생각된다.

넙치 혈청에서의 생존능의 경우 체표 점액과 마찬가지로 독성 균주는 12 ~24 시간 사이에 급격히 그 균수가 증가하는 반면 ET82015를 제외한 나머지 비독성 균주의 경우 균수가 감소하는 경향이 관찰되어 독성 균주와 비독성 균주간에 혈청내에서의 생존능 차이가 나타났다.

특히 앞선 체액성 방어 인자에 대한 독성 균주와 비독성 균주의 생존능 보다는 세포성 방어 인자에 대한 독성과 비독성 균주의 생존능에서 확연한 차이가 나타났다. 넙치에서 분리한 macrophage 내로의 침입 시험에서 배양 1 시간째에 비해 5 시간째에 독성 균주는 그 균수가 눈에 띄게 증가한 반면 비독성 균주의 경우 독성 균주와 비교했을 때 균수의 증가가 미미했고 배양 시간이 지나도 그 증가폭은 크지 않았다. macrophage 내에 들어간 다음 증식에 있어서도 독성 균주는 0 시간째에 비해 3시간째에 그 균수가 증가한 반면 ET82015 균주를 제외한 나머지 비독성 균주는 그 균수가 아주 소폭 증가하거나 (SU100) 감소해 전체적으로 독성과 비독성 균주간에 확연한 차이가 나타났다. H_2O_2 에 대한 감수성의 정도를 비교해 보았을 때는 독성 균주와 비독성 균주 모두 H_2O_2 에 감수성을 보여 시간이 감에 따라 균수가 감소하는 경향이 나타났다. 특히 비독성 균주 중 AL92448 균주의 감소폭이 컸다. 다른 연구에서도 이와 비슷한 결과를 보고되고 있는

데 Sarinivasa *et al.* (2001)는 균의 증식 정도가 독성 균주에 비해 비독성 균주가 작으나 독성과 비독성 *E. tarda* 균주 모두가 blue gourami의 macrophage 내에서 시간이 갈수록 증가한다고 보고하였으며 Ishibe *et al.* (2007)은 Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)의 복강 macrophage에서 독성이 높은 균주는 살아남을 뿐 아니라 시간이 갈수록 증식하는 반면 독성이 낮은 균주는 이러한 능력을 가지지 못한다고 보고하였다. 이는 *E. tarda* 균주가 phagocyte-mediated killing과 H₂O₂에 저항성을 가지는데 관여하는 catalase (KatB)가 독성 균주에는 존재하지만 비독성 균주에는 존재하지 않으며 (Srinivasa *et al.*, 2003) macrophage 내의 ROIs의 생성에 있어 독성 균주에 비해 비독성 균주가 더 많은 양의 ROIs의 생성을 보여 (Sarinivasa *et al.*, 2001) macrophage 내에서 비독성 균주가 더 많이 살균되는 것으로 보인다.

숙주에 대항한 세균성 방어 작용과 부착과 침입 및 숙주 세포의 조절에 작용한다고 알려진 OMP의 SDS-PAGE profile을 조사하고 OMP gene의 primer를 설계해 band를 확인해보았다. OMP의 SDS-PAGE 결과 독성 균주와 비독성 균주 모두 전체적으로 비슷한 band가 관찰되었다. 그러나 약 40 kDa 부근의 band에서 독성 균주의 경우 가자미 유래의 KE-5가 넘치 유래의 다른 독성 균주와는 다른 band 경향을 보였으며 비독성의 경우 AL92448과 ATCC15947은 같은 경향을 보인 반면 ET82015는 비독성 균주가 아닌 다른 세 독성 균주 (FSW910410, KE-1, KE-3)와 유사한 band를 보였다. 비독성 균주 중 AL92448과 ATCC15947의 경우 약 40 kDa 부근의 band가 다른 균주와는 다르게 나타났다. OMP gene의 PCR의 경우 혈청과 macrophage에서 독성 균주와 유사한 경향을 보였던 ET82015 균주만이 독성과 같은 PagC와 OmpS2 gene band가 확인되었으며 나머지 비독성 균주의 경우 band 크기가 다르거나(PagC) band가 나타나지 않았다(OmpS2).

균주별로 살펴보면, Human type인 ATCC15947의 경우에는 다른 독성이거나 비독성 균주와는 다르게 체액성 요소인 넵치의 체표 • 장 점액에서 12~24 시간째에 균수가 감소하였으며 세포성 요소인 macrophage로의 internalization에서도 1 시간째에 비해 5 시간째에 침입하는 균수가 감소하는 경향이 나타나 human 유래의 균주와 어류 유래의 균주간에 숙주 특이성이 존재한다고 추측할 수 있었다. 어류의 경우 넵치의 체액성 및 세포성 요소에서 넵치 유래의 독성 균주인 FSW910410, KE-1, KE-3과 turbot 유래의 독성 균주인 KE-5 균주간에 뚜렷한 차이는 나타나지 않았다. 그리고 blue gourami를 통한 병원성 평가에서 비독성으로 분류된 AL92448과 ET82015 및 뱀장어 사육수에서 분리된 비독성 균주인 SU100 역시 넵치에 있어서는 아주 낮은 병원성을 나타내는 비독성 균주로 분류되었다. 뱀장어에서 분리된 ET82015의 경우 넵치나 담수어(뱀장어, blue gourami 등)에서는 병원성이 아주 낮은 균주로 나타났으나 혈청에서의 생존능이나 macrophage 내에서의 증식력에 있어서는 독성 균주와 유사한 경향을 나타내어, 혈청 내에서의 생존능이나 macrophage 내에서의 생존 능력에 관련한다고 알려진 PagC gene과 porin superfamily의 일반적인 motifs를 포함하는 OMP의 아마노산을 code하는 OmpS2 gene에 대해 조사해 보았다. 그 결과 OmpS2 gene에서 ET82015 균주는 다른 비독성 균주와는 달리 band가 나타났으며 크기도 독성 균주의 band 크기와 일치했다. PagC gene의 경우도 마찬가지로 ET82015만이 다른 비독성 균주와는 다른 band가 나타났으며 이는 독성 균주의 것과 일치했다. 따라서 이러한 유전자들이 혈청이나 macrophage 내에서의 생존 능력에 관련한다는 것을 알 수 있었으며 이러한 유전자가 독성 균주와 마찬가지로 존재함에도 불구하고 ET82015가 어류에 있어 낮은 병원성을 가지는 이유는 차후 더 연구해 볼 필요가 있다고 생각된다.

V. 요약

*Edwardsiella tarda*는 Enterobacteriaceae에 속하는 Gram-negative bacteria 이다. *E. tarda*는 폭넓은 숙주를 가지며 어류의 경우 해산어와 담수어 모두에 Edwardsiellosis를 유발하는 병원체이다. 이번 연구에서는 이러한 *E. tarda* 독성 균주와 비독성 균주가 숙주인 넙치 내부로 침입하는 능력을 비교해 보고자 하였다. 독성 균주와 비독성 균주의 병원성을 확실하게 하기 위해 넙치로 LD₅₀ 값을 측정하였는데 총 8균주 중 4 균주가 LD₅₀값이 10^{4.2}보다 작은 독성균주로, 나머지 4 균주는 LD₅₀ 값이 10^{8.4}보다 큰 비독성 균주로 나타났다. 생화학적 성장이나 염분농도, pH에 따른 차이는 보이지 않았다. 넙치의 체표 점액에서는 12 ~ 24 시간 사이에 독성 균주는 균수가 증가하는 반면 비독성 균주는 감소하거나 성장이 정지되어 독성 균주와 비독성 균주간에 차이를 보였다. 장 점액에서는 12 ~ 24 시간 사이에 독성 균주는 급격히 균수가 증가한 반면 비독성 균주의 경우 균수가 아주 천천히 증가하는 것이 관찰되었다. 담즙에서 생존능에서 배양 6 시간째에 비독성 균주의 경우 0 시간째에 비해 감소하였으며 독성 균주의 경우 증가하는 경향이 관찰되었다. 혈청에서의 생존능의 경우도 체표 점액과 유사하게 독성 균주는 12 ~ 24 시간에 균수가 증가한 반면 ET82015를 제외한 나머지 비독성 균주는 그 균수가 감소하였다. macrophage 내로의 침입력과 증식력에 있어서는 독성 균주의 경우 침입력의 정도도 높을 뿐더러 침입 후의 증식력도 큰 것으로 나타났으나 비독성 균주의 경우 침입력도 미미하였으며 시간이 지나도 침입력에 큰 변화가 나타나지 않았다. 증식력에 있어서도 ET82015 균주를 제외한 나머지 비독성 균주는 시간이 지나도 macrophage 내에서 증식하지 못하고 균수가 감소함을 알 수 있었다.

VI. 감사의 글

이 논문이 완성 될 때까지 부족한 저를 항상 진심으로 격려해주시고 이끌어주신 지도 교수님이신 박수일 교수님께 먼저 감사의 인사를 전해 올리고 싶습니다. 또한 바쁘신 와중에도 저의 논문을 지도해 주시고 논문에 관해 조언해주신 허민도 교수님과 강주찬 교수님께 감사드립니다. 그리고 항상 관심과 격려를 보내주신 김기홍 교수님, 정현도 교수님, 정준기 교수님께 감사드립니다.

늘 실험실원들을 자식처럼 아껴주신 남해 수산연구소의 방종득 소장님과 울진의 동해특성화연구센터의 김이청 센터장님 그리고 국립 수산과학원 김진우 팀장님께 감사드립니다. 그리고 늘 가까이에서 항상 따뜻한 관심을 보내주신 국립 수산과학원에 계신 지보영, 최혜승, 조미영, 권문경 선배님과 동해수산연구소의 이주석 선배님, 대천 해양 과학고등학교에 계신 김귀옥 선생님께 감사드립니다. 몇 번이나 넙치를 구해주시느라 정말 애를 많이 써주셨던 이재일 선배님과 먼 제주도에서 넙치를 보내주시느라 정말 고생 많으셨던 최성재, 남성진 선배님께 감사드립니다. 또한 시험어 뿐 아니라 실험에 있어서 전반적인 조언과 논문의 완성까지 많은 도움을 주신 이덕찬 선배님께 감사드리며 항상 한결같은 마음으로 후배들을 아껴주시는 지방 해양청에 계신 박헌식, 황미혜, 최현숙 선배님과 항상 후배들에게 든든한 힘이 되어 주신 국립 수산물 품질 관리원에 계신 이상윤, 손영찬, 강민진, 성명희, 최혜정, 최광진, 김은전 선배님과 국립 경상대학교 박찬일 교수님과 저의 실험에 기초를 제공해 주시고 많은 것을 가르쳐주신 국립 전남대학교 김도형 교수님께 감사드립니다.

부족한 저를 항상 가르쳐 주시느라 2년 동안 고생이 너무 많으셨던 사수이신 우승호 선배님과 저에게 많은 조언과 함께 여러모로 애써주시고 논문

도 보내주신 멀리 중국에 계시는 이화 선생님께 감사드립니다. 또한 멀리서 항상 지켜봐주시고 신경써주시는 김수미, 이진희, 한현자, 김현정, 황성돈 선배님께 감사드립니다. 졸업논문을 같이 준비하면서 고생이 많았던 만큼 더 친해질 수 있었던 손새봄 학우님과 저의 질문에 상세히 답변해주시고 또 조언해주신 김이경, 원경미 선배님과 지금은 지방 해양수산청 통영사무소에 계신 홍미주 선배님께 감사드립니다. 열심히 공부하면서 자기 길을 가고 있는 이준희 학형님, 김수현, 정영은 후배님과 실험을 도와주느라 애 많이 써준 서미영 후배님을 비롯해 군 카운팅을 하느라 매일 고생한 박효진, 조교회, 최민지, 한상윤 후배님, 항상 다그치기만 해서 미안한 엄용환 학형님 그리고 항상 열심히 실험실 생활을 하고 있는 김승훈, 김지원, 황분옥, 김다영, 김전진, 김민철, 오상현 후배님께 감사드립니다.

학교는 달라도 같이 대학원 생활의 동고동락을 같이한 제 친구 현숙이와 항상 제 든든한 버팀목이 되어준 리향이, 연주, 주영이, 문희, 수영이, 현남이, 은주에게 감사드리며 마지막으로 제가 대학원을 간다고 했을 때도 제게 아무런 나무라는 말씀 없이 묵묵히 성원해주고 지금껏 열심히 저를 뒷바라지 해주시느라 힘드셨을 아빠와 엄마, 그리고 늘 저의 친구 같은, 이제는 두 이쁜 조카의 엄마인 유미 언니와 항상 누나에게 기운을 북돋아준 착한 동생 건우에게 이 논문을 빌어 감사의 말을 전하고 싶습니다.

마지막으로 이 장을 빌어 지금의 제가 있게 도와주시고 격려해주시고 관심을 가져 주신 모든 분께 감사의 인사를 드리며 항상 감사하는 마음으로 더 열심히 노력하는 모습으로 보답하며 살아가겠습니다.

VII. 참고 문헌

- Aranishi, F. and N. Mano. Response of skin cathepsins to infection of *Edwardsiella tarda* in Japanese flounder. Fisheries Science (2000). 66, 169-170.
- Barenkamp, S. J., R. S. Munson, D. M. Granoff, Subtyping isolates of *Haemophilus influenzae* type b by outer membrane protein profiles. Journal of Infection Disease (1981). 143, 668-676.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry (1976). 72, 248-254.
- Chen, J. D., and S. L. Huang. Hemolysin from *Edwardsiella tarda* strain ET16 isolated from eel *Anguilla japonica* identified as a hole-forming toxin. Fisheries Science (1996). 62, 538-542.
- Cole, A. M., P. Weis, G. Diamond. Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder. Journal of Biological Chemistry (1997). 272, 12008-12013.
- Dalmo, R. A., K. Ingebrigtsen, J. Bogwald. Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). Journal of Fish Disease (1997). 20, 241-273.
- Ebran, N., S. Julien, N. Orange, B. Auperin, G. Molle. Isolation and characterization of novel glycoproteins from fish epidermal mucus: correlation between pore-forming properties and their antibacterial

- activities. *Biochimica et Biophysica Acta* (2000). 1467, 271-280.
- Fast, M. D., D. E. Sims, J. F. Burka, A. Mustafa, Ross, N. W. Skin morphology and humoral non-specific defence parameters of mucus and plasma in rainbow trout, coho and Atlantic salmon. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* (2002). 132, 645-657.
- Han H-J, Kim D-H, Lee D-C, Kim S-M and Park S-I. Pathogenicity of *Edwardsiella tarda* to olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck and Schlegel) *Journal of Fish Diseases* (2006). 29, 601 - 609.
- Hoshina T. On a new bacteria, *Paracolobactrum anguillimortiferum* sp. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* (1962). 28, 162-164.
- Hyronimus, B., Le Marrec, C., Hadj Sassi, A., Deschamps, A. Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* (2006). 61, 193-197.
- Inger Lin Uttakleiv Ræder, Steinar M. Paulsen, Arne O. Smalås, Nils Peder Willassen. Effect of fish skin mucus on the soluble proteome of *Vibrio salmonicida* analysed by 2-D gel electrophoresis and tandem mass spectrometry. *Microbial Pathogenesis* (2007). 42, 36-45.
- Ishibe, K., Kiyoshi Osatomi, Kenji Hara, Kinya Kanai, Kenichi Yamaguchi and Tatsuya Oda. Comparison of the responses of peritoneal macrophages from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) against high-virulent and low-virulent strains of

- Edwardsiella tarda*. Fish & Shellfish Immunology (2007).
- Janda, J. M., and S. L. Abbott. Expression of an iron-regulated hemolysin from *Edwardsiella tarda*. FEMS Microbiology Letters (1993). 111, 275-280.
- Janda, J. M., S. L. Abbott and L. S. Oshiro. Penetration and replication of *Edwardsiella* spp. in HEp-2 cells. Infection and Immunity (1991). 59, 154-161.
- Janda, J. M., S. L. Abbott, S. Kroske-Bystrom, W. K. W. Cheung, C. Powers, R. P. Kokka and K. Tamura. Pathogenic properties of *Edwardsiella* species. Journal of Clinical Microbiology (1991). 29, 1997-2001.
- Jed Gorden and P. L. C. Small. Acid Resistance in Enteric Bacteria. Infection and Immunity (1993). 61, 364-367.
- Jun L., Shouxiong H., Qijing Z. Outer membrane proteins: key players for bacterial adaptation in host niches. Microbes and Infection (2002). 4, 325-331.
- Kawai, K., Y. Liu, K. Ohnishi, Syun-ichirou Oshima. A conserved 37 kDa outer membrane protein of *Edwardsiella tarda* is an effective vaccine candidate. Vaccine (2004). 22, 3411-3418.
- Kim, D. H. Studies on probiotics and microbial diversity in the intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Heriot-watt university (2006).
- Kim, S., H. Kim, B. L. Reuhs and L. J. Mauer. Differentiation of outer membrane proteins from *Salmonella enterica* serotypes using Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics. Letters

- in Applied Microbiology (2006). 42, 229-234.
- Kusuda R, Toyoshima T, Iwamura Y, Sako H. *Edwardsiella tarda* from an epizootic of mullets (*Mugil cephalus*) in Okitsu bay. Bull Jap Soc Sci Fish (1976). 42, 271-275.
- Kusuda R, and F. Salati. Major bacterial diseases affecting mariculture in Japan. In Annual Review of Fish Diseases (eds by Faisal, M. and F. M. Hetrick, 1993). pp 69-85, Pergamon Press, England.
- Leung, K. Y. and Finlay, B. B. Intracellular replication is essential for the virulence of *Salmonella typhimurium*. Proceedings of the National Academy of Sciences (1991). 88, 11470-11474.
- Lilian P., Christopher A. Skilbeck, Viviane Nakano, Mario J. Avila-Campos, Roxane M. F. Piazza, Hannah M. Wexler. Bile salts enhance bacterial co-aggregation, bacterial-intestinal epithelial cell adhesion, biofilm formation and antimicrobial resistance of *Bacteroides fragilis*. Microbial Pathogenesis (2007). 43, 78-87.
- Ling, S. H. M., X. H. Wang, L. Xie, T. M. Lim and K. Y. Leung. Use of green fluorescent protein (GFP) to study the invasion pathways of *Edwardsiella tarda* in *in vivo* and *in vitro* fish models. Microbiology (2000). 146, 7-19.
- Ling, S. H. M., X. H. Wang, T. M. Lim, K. Y. Leung. Green fluorescent protein-tagged *Edwardsiella tarda* reveals portal of entry in fish. FEMS Microbiology Letters (2001). 194, 239-243.
- Leung, K. Y., I. V. Yeap, T. J. Lam and Y. M. Sin. Serum resistance as a good indicator for virulence in *Aeromonas hydrophila* strains isolated from diseased fish in South-East Asia. Journal of fish

- Disease (1994). 18, 511–518.
- MacFaddin, J. F. Individual biochemical tests (2000). In: *Biochemical tests for identification of medical bacteria*, 3rd ed., pp. 1–456. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
- Mao, Y., M. P. Doyle and J. Chen. Role of colanic acid exopolysaccharide in the survival of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 in simulated gastrointestinal fluids. *Letters in Applied Microbiology* (2005). 42, 642–647.
- Miles A. A. and S. S. Misra. The estimate of the bacterial power of the blood. *J. Hygiene* (1938). 38, 873–885.
- Nakatsugawa T. *Edwardsiella tarda* isolated from cultured young flounder. *Fish Pathology* (1983). 18, 99–101.
- Nishio, M., N. Okada, T. Miki, T. Haneda and H. Danbara. Identification of the outer-membrane protein PagC required for the serum resistance phenotype in *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis. *Microbiology* (2005). 151, 863–873.
- Oren, Z., Y. Shai. A class of highly potent antibacterial peptides derived from paradaxin, a pore-forming peptide isolated from Moses sole fish *Pardachirus marmoratus*. *European Journal of Biochemistry* (1996). 237, 303–310.
- Patrzykat, A., L. Zhang, V. Mendoza, G. K. Iwama, R. E. W. Hancock. Synergy of histone-derived peptides of coho salmon with lysozyme and flounder pleurocidin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2001). 45, 1337–1342.
- Rashid, M. M., T. Mekuchi, T. Nakai and K. Muroga. A serological

- study on *Edwardsiella tarda* strains isolated from diseased Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Fish Pathology (1994). 29, 277.
- Reed, L. J. and H. Muench. A simple method of estimating fifty percent end points. American Journal of Hygiene (1938). 27, 493-497.
- Roos, S., F. Karner, L. Axelsson and H. Jonsson. *Lactobacillus mucosae* sp. nov., a new species with in vitro mucus-binding activity isolated from pig intestine. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (2000). 50, 251 - 258.
- Secombes C. J. The nonspecific immune system; cellular defenses. In; Iwama G., Nakanishi T, editors. The fish immune system; organism, pathogen and environment. San Diego; Academic Press(1994).
- Seltman G, O. Holst. The bacterial cell wall. Berlin, Heidelberg: Springer; 2002.
- Srinivasa Rao, P. S., T. M. Lim, and K. Y. Leung. Opsonized 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 (2001). 69, 5689-5697.
- Srinivasa Rao, P. S., Y. Yamada and K. Y. Leung. A major catalase (KatB) that is required for resistance to H₂O₂ and phagocyte-mediated killing in *Edwardsiella tarda*. Microbiology (2003). 149, 2635-2644.
- Tang, P., V. Foubister, M. G. Pucciarelli and B. B. Finlay. Methods to study bacterial invasion. Journal of Microbiological Methods (1993). 18, 227-240.

- Tkachenko, A., Y. Waguespack, J. Okoh and E. May. Isolation of intact high-molecular weight glycoconjugates from the skin mucus of *Morone saxatilis* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* (2006). 29, 433-436.
- Suzuki, S., K. Kuroe, R. Kududa. Characteristic of porin like major outer membrane proteins of *Listonella anguillara* serotypes J-O-I, 2 and 3. *Biochemistry and Molecular Biology International* (1994). 32, 605-613.
- Tan, Y. P. Q. Lin, X. H. Wang, S. Joshi, C. L. Hew and K. Y. Leung. Comparative Proteomic Analysis of Extracellular Proteins of *Edwardsiella tarda*. *Infection and Immunity* (2002). 70, 6475-6480.
- Wakabayashi H, S. Egusa. *Edwardsiella tarda* (*Paracolobactrum anguillmortiferum*) associated with pond-cultured eel disease. *Bull Jpn Soc Sci Fish* (1973). 39, 931-936.
- Yamada, Y. & H. Wakabayashi. Identification of fish-pathogenic strains belonging to the genus *Edwardsiella* by sequence analysis of sodB. *Fish Pathology* (1999). 34, 145 - 150.
- Zhang, X. H. and B. Austin. Pathogenicity of *V. harveyi* to salmonids. *Journal of Fish Disease* (2000). 23, 93-102.
- Zierler, M. K., J. E. Galan, Paradigms in bacterial entry into host cells. In: Roth, J. C., Bolin, K., Brogden, F., Chris M., Wannemuehler, M. (eds.), *Virulence mechanism of bacterial pathogens*, 2nd edition. American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp. 21-45.