



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

우리나라 담수 관상어에서 분리한
*Aeromonas veronii biovar sobria*의 특성



2008년 2월

부경대학교 대학원

수산생명의학과

손 새 봄

이 학 석 사 학 위 논 문

우리나라 담수 관상어에서 분리한
*Aeromonas veronii biovar sobria*의 특성

지도교수 박 수 일

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함.



2008년 2월

부경대학교 대학원

수산생명의학과

손 새 봄

손새봄의 이학석사 학위논문을 인준함.

2008년 2월 26일



주 심 (인) 이 학 박 사 정 현 도 (인)

위 원 (인) 약 학 박 사 정 준 기 (인)

위 원 (인) 농 학 박 사 박 수 일 (인)

목 차

목차	i
Abstract	ii
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 병원균의 분리와 시험 균주	4
2. 시험어	8
3. 시험 균주의 생화학적 성상 검사	9
4. 세균의 16S ribosomal RNA (16S rRNA) 유전자 배열 분석	10
4.1. 세균의 genomic DNA의 분리	10
4.2. Competent cell의 제작	10
4.3. 16S rRNA의 cloning	10
5. 시험 균주에 대한 병원성 시험	13
5.1. 시험 균주의 반수 치사 농도	13
5.2. 시험어에 대한 병원성 시험	13
6. Extracellular products (ECPs) 의 특성	14
6.1. ECPs의 추출	14
6.2. ECPs의 단백질 정량	14
6.3. Proteolytic activity	14
6.3.1. Caseinase activity	14
6.3.2. Gelatinase activity	15
6.3.3. Phospholipase and lipase activity	15
6.4. Haemolytic activity	15
6.5. <i>In vitro</i> cytotoxic activity	16
III. 결과	17
1. 병원균의 분리	17
2. 시험 균주의 생화학적 특성	20

3. 세균의 16S ribosomal RNA (16S rRNA) 유전자 배열 분석	23
4. 시험 균주의 반수 치사 농도	26
5. 어종별 감염 시험	27
6. Extracellular products (ECPs) 의 특성	28
6.1. Proteolytic activity	28
6.1.1. Caseinase activity	28
6.1.2. Gelatinase activity	28
6.1.3. Phospholipase and lipase activity	28
6.2. Haemolytic activity	30
6.3. <i>In vitro</i> cytotoxic activity	31
IV. 고찰	34
V. 요약	39
VI. 감사의 글	41
VII. 참고 문헌	43

Characteristics of *Aeromonas veronii* biovar *sobria* isolated from in freshwater ornamental fishes in Korea

Sae-Bom Sohn

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

Abstract

The aim of this study was to investigate the distribution of pathogenic bacteria in freshwater ornamental fishes and to identify phenotypic and genotypic characteristics of *Aeromonas veronii* biovar *sobria* strains. A variety of *A. veronii* bv. *sobria* strains isolated from kidney, liver, spleen and skin lesions were identified by the biochemical and the genotypic characteristics. These aeromonads were investigated the enzyme activities of extracellular products (ECPs).

The surveyed fifteen species of freshwater ornamental fishes were obtained from a commercial aquarium and several markets in Busan and Gyeong-Nam, South Korea from October 2006 to July 2007. They were showed various signs of heavy focal skin lesions on the lateral sides, fin rot and skin ulcer on the body. The isolates were characterized biochemically and identified using 16S rRNA sequencing.

A. veronii bv. *sobria* strains were pathogenic to gold fish (*Carassius auratus*), platy (*Xiphophorus maculatus*) and nigro (*Cichlasoma nigrofasciatum*). The ECPs from *A. veronii* bv. *sobria* exhibited various enzymatic activities, such as caseinase, gelatinase, phospholipase and lipase activity, and also

hemolytic activities. All of tested *A. veronii* bv. *sobira* strains showed cytotoxic effects on the EPC cell line and the CHSE-214 cell line within 6h incubation.



I. 서론

최근 우리 나라의 애완 수산 동물 산업이 발달하면서 관상어에 대한 관심이 증가하고 있으며 이와 더불어 아쿠아리움, 대형 할인마트, 수족관 등이 발달하고 있다. 그리고 수입 의존적인 관상어 시장을 발달시키기 위한 정부의 관심으로 해수 관상어의 품종 개량 및 종묘 생산에 대한 연구가 진행되고 있으며, 최근 그 성과가 조금씩 이루어지고 있다.

하지만 국내 담수 관상어 시장에서 유통되는 대부분의 어종들이 수입에 의존하고 있으며, 담수 관상어의 수입과 함께 질병의 유입이 우려된다. 또한 질병에 의한 폐사가 발생했을 경우, 전문적인 연구에 의한 진단이나 대책 마련이 미흡한 실정이다.

현재 *Aeromonas* 속 세균들의 분류는 혼란스럽게 되어있으나 이를 개선하기 위한 새로운 동정 방법들이 계속해서 개발되고 있다. 예를 들면, 생화학적 특징을 이용한 방법 (Valera *et al.*, 2002; Abbott *et al.*, 2003), DNA-DNA hybridization (Esteve *et al.*, 1995; Huy *et al.*, 2001), 16S rRNA gene sequencing을 기반으로 하는 계통발생학적 분석 (Martinez-Murcia *et al.*, 1992), DNA probes와 16S rRNA gene의 restriction fragment length polymorphism (RFLP) (Borrell *et al.*, 1997; Figueras *et al.*, 2000; Ghatak *et al.*, 2007), *gyrB*와 *rpoD*의 유전자 염기서열 분석 (Soler *et al.*, 2004) 등의 방법들이 제시되어있다. 이러한 방법들을 전체적으로 종합하여 *Aeromonas* 속 세균들의 분류가 계속 발전되고 있다 (Saavedra *et al.*, 2006).

Popoff and Véron (1976)에 의해 *Aeromonas sobria*가 처음 보고된 이후 표현형적 특성의 다양성으로 인해 연구에 약간의 혼동이 발생하였다. 이후

DNA-DNA hybridization에 의해 4개의 DNA hybridization group으로 분류되었다 (Farmer *et al.*, 1986). 그 중 DNA hybridization group 10은 ornithine decarboxylase 양성 반응을 나타내는 군으로 *Aeromonas veronii*로 보고하였다 (Hickman-Brenner *et al.*, 1987). 그 후 DNA hybridization group 10에 속하는 세균은 *Aeromonas veronii*와 유전학적으로는 동일하나 표현형적 특성에 차이가 나는 특징이 보고되었으며 *Aeromonas veronii*를 두 개의 biotype으로 구분하였다 (Kuijper *et al.*, 1989).

Aeromonas veronii biovar *sobria*는 인간과 많은 어종에서 모두 질병을 일으키는 그람 음성 세균으로 (Janda *et al.*, 1998), 담수 환경에 편재하고 있다. 어류의 경우, 출혈성 패혈증 (motile aeromonads septicaemia)의 원인체이며 유행성 궤양 증후군 (EUS, epizootic ulcerative syndrome)을 일으키기도 한다 (Rahman *et al.*, 2002). Common carp (*Cyprinus carpio* L.), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) 등 다양한 담수어종에서 피부 궤양, 패혈증 등의 증상을 나타내며 폐사를 일으켜 경제적 손실을 야기한다고 보고되고 있다 (Kozinska, 2007).

Aeromonas 속 세균의 병원성 기작에 관해서는 주로 *Aeromonas hydrophila*와 *Aeromonas salmonicida*를 대상으로 많은 연구가 되고 있으며 (Gudmundsdóttir *et al.*, 1996; González-Rodríguez *et al.*, 2004), 잠재적인 병원성 인자들 중 주로 extracellular products (ECPs)의 독력에 관한 연구가 중심이 되고 있다. 즉, ECPs의 담수 어류에 대한 병원성 시험, ECPs의 활성, 용혈능 및 세포 독성 시험을 통하여 ECPs가 중요한 병원성 인자의 하나임을 증명하였다 (Esteve *et al.*, 1995; Khalil *et al.*, 1997; González-Serrano *et al.*, 2002). ECPs 외의 어류에 대한 다른 주요 병원성 인자로 flagella, pili, O-antigen, S-layer protein 등이 밝혀져 있다 (Santos *et al.*, 1988; Merino *et al.*, 1997; Masada *et al.*, 2002).

현재 국내에서 유통되는 담수 관상어에 대한 질병 연구는 거의 전무한 상태이며, 질병에 의한 폐사 또는 상품 가치 하락 등의 문제가 발생하였을 때 전문적인 연구에 의한 진단 또는 대책 수립이 어려운 상황이다. 특히, *Aeromonas* 속 세균들의 경우 주요 감염 어종과 출현 빈도를 예측하여 대책을 수립하는 것이 매우 중요하다. 이 중 발생 빈도가 높은 *Aeromonas veronii* biovar *sobria*의 경우 인간에게 감염되어 복통, 발열, 구토 등을 일으킬 수 있으므로 (Lin, 2006), 이들의 병원 특성을 밝히는 것이 예방 대책을 수립하는 데 매우 중요할 것이라 생각한다.

본 연구에서는 우리 나라에서 유통되고 있는 여러 담수 관상어에 질병을 유발하는 *Aeromonas* 속 세균들의 종류, 주요 어종에 대한 질병 발생 빈도를 알아보던 중 질병 발생과 관련하여 빈도가 높게 분리된 *Aeromonas veronii* biovar *sobira*를 중심으로 질병 발생과 관련한 ECPs의 특성, 용혈능, 세포 독성, 담수 관상어에 대한 병원성 등을 시험하여 독성 인자의 영향을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 병원균의 분리와 시험 균주

실험에 사용한 *Aeromonas veronii* biovar *sobria* 분리 균주는 2006년 10월부터 2007년 7월까지 부산·경남 지역에 위치한 관상어 도매상, 할인마트, 개인 상점 등에서 판매하고 있는 15 종의 관상어들 중 병적인 증상을 나타내는 개체로부터 분리하였다. 대표적인 외부 증상으로는 비늘 탈락, 지느러미 부식, 아가미 뚜껑 부식, 체표 궤양 등을 나타내었고, 내부 증상으로는 간 충혈, 비장 비대 등을 볼 수 있었다 (Fig. 1).

분리균은 Tryptic Soy Agar (TSA, Difco)에 희석 도말한 후 25 °C, 24 시간 배양하여 우점적으로 자란 세균 집락을 순수 분리 배양법으로 분리하였다. 순수 분리 배양된 균주는 형태학적 관찰과 여러 가지 생화학 시험을 실시한 결과 *Aeromonas veronii* biovar *sobria*로 동정하여 실험에 사용하였다. 시험에 사용한 *Aeromonas veronii* biovar *sobria* 균주와 참조 균주에 대한 정보는 Table 1 ~ 2에 나타내었다.

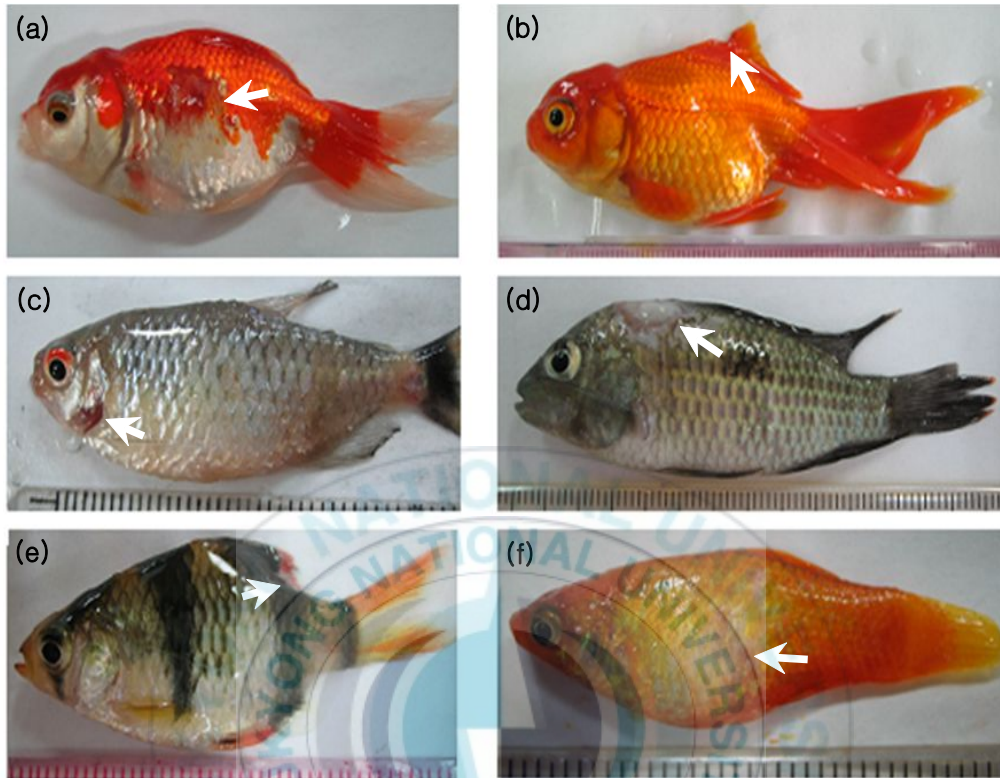


Fig. 1. Gross pathology of disease observed in different freshwater ornamental fishes infected *Aeromonas veronii* biovar *sobria* at commercial aquarium. (a) gold fish (*Carassius auratus*) showing haemorrhages on the skin and loosened scales, (b) gold fish (Oranda, *Carassius auratus*) showing fin rot, (c) head and tail light tetra (*Hemigrammus ocellifer*) showing necrosis of opercular, (d) green tetra (*Aequidens pulcher*) showing skin ulcer on the head, (e) sumatra (*Puntius tetrazona*) showing fin rot, (f) platy (*Xiphophorus maculatus*) showing haemorrhaged and eroded skin.

Table 1. The bacterial strains used in this study

Strains		Origin	Date	
Isolated strains (n=12)	S01	Sumatra (<i>Puntitus tetrazona</i>)	Spleen	2006. 10
	G04	Gold fish (<i>Carassius auratus</i>)	Spleen	2006. 12
	P07	Platy (<i>Xiphophorus maculates</i>)	Kidney	2007. 1
	H09	Head and tail light tetra (<i>Hemigrammus ocellifer</i>)	Liver	2007. 3
	G10	Gold fish (<i>Carassius auratus</i>)	Kidney	2007. 3
	S10	Sumatra (<i>Puntitus tetrazona</i>)	Kidney	2007. 3
	G11a	Green tera (<i>Aequidens pulcher</i>)	Skin	2007. 5
	G11b	Green tera (<i>Aequidens pulcher</i>)	Skin	2007. 5
	P12	Platy (<i>Xiphophorus maculates</i>)	Kidney	2007. 6
	G13	Gold fish (<i>Carassius auratus</i>)	Kidney	2007. 6
	M13	Molly (<i>Poecilia shenops</i>)	Kidney	2007. 6
	B13	Blue gourami (<i>Colisa</i> sp.)	Spleen	2007. 6
Reference strains (n=2)	CECT 4246	Infected frog suffering from red-leg disease		
	CECT 4257	Sputum of drowning victim		

Table 2. Signs of *Aeromonas veronii* biovar *sobria* strains

Strains	Sign	mixed infection ^a
S01	darkening of the skin, darkened in color, exophthalmia	o
G04	ulcer of skin, hemorrhage of operculum	
P07	hemorrhage of skin and fin, hyperemia of liver	o
H09	missing of scale	
G10	alternately float and sink	
S10	decolorization of the skin	
G11a	severe ulcer of skin	
G11b	severe ulcer of skin	
P12	fin and tail rot, the light infection of Trematode	o
G13	the middle infection of Trematode	o
M13	enlarged spleen	
B13	hyperemia of liver	

a, infection of Trematode

2. 시험어

시험어는 세균의 분리 시험과 인위 감염 시험에 사용하였다. 세균의 종류와 빈도를 알기 위해 사용한 시험어는 부산·경남 지역에 위치한 관상어 도매상, 할인마트, 수족관으로부터 구한 총 15 어종의 담수 관상어이며, 그 어종은 플래티 (*Xiphophorus maculatus*), 금붕어 (*Carassius auratus*), 수마트라 (*Puntius tetrazona*), 가이양 (*Pangasius sutchi*), 그린테라 (*Aequidens pulcher*), 칼라그라스 (*Chanda ranga*), 블루 구라미 (*Colisa* sp.), 헤드 앤드 테일 라이트 피시 (*Hemigrammus ocellifer*), 물리 (*Poecilia shenops*), 엔젤 피쉬 (*Pterophyllum scalare*), 백운산 (*Tanichthys albonubes*), 바브 (*Capoeta titteya*), 셀핀 물리 (*Poecilia latipinna*), 블루 다이아몬드 디스커스 (*Symphysodon aequifasciatus haraldi*)와 구피 (*Poecilia reticulata*) 등 이었다.

인위 감염 시험에는 금붕어, 플래티와 니그로를 사용하였다. 금붕어는 평균 체중 3.94 ± 0.85 g, 평균 체장 3.43 ± 2.83 cm, 플래티는 평균 체중 2.14 ± 0.49 g, 평균 체장 3.55 ± 0.6 cm으로 경남 지역의 관상어 도매처에서 구입하여 사용하였고, 니그로는 평균 체중 0.77 ± 0.21 g, 평균 체장 2.85 ± 0.29 cm으로 실험실에서 수 개월간 사육해 온 어미로부터 얻은 수정란을 부화하여 사육한 후 사용하였다. 모든 시험어는 1주일간 부경대학교 수산생명의학과 어병 예방학 실험실에서 순치하여 사용하였다. 인위 감염 시험을 하는 동안 1 톤 사육 수조에서 사육하며 수온은 26 ± 1 °C로 유지하였으며 1 일 1 회 환수하고 시험 기간 동안 먹이는 공급하지 않았다.

3. 시험 균주의 생화학적 성상 검사

모든 시험 균주와 참조 균주를 시험균으로 배양한 다음 생화학적 성상 검사를 실시하였다. 순수 분리 배양된 모든 균주를 TSA에서 27 °C, 24 시간 배양한 다음 생화학적 성상 검사에 이용하였다. 생화학 시험 항목은 Oxidase test (Cytochrome oxidase), Catalase test (3 % H₂O₂), Citrate 이용능 (Simmon's citrate agar), Nitrate 환원능, Kovacs's Indole test, Methyl red test, Voges-Proskauer test, H₂S 생성 확인을 위한 Triple sugar iron agar (TSIA)와 Oxidation-fermentation (OF) test를 하였다. 탄수화물 분해 시험으로서 arabinose, adonitol, cellobiose, dulcitol, fructose, galactose, glucose, inositol, lactose, maltose, mannitol, mannose, melibiose, raffinose, rhamnose, salicin, sorbitol, sucrose, trehalose, xylose의 당 분해능을 조사하였다. 그리고 lysine과 ornithine에 대한 decarboxylase 시험과 arginine에 대한 dehydrolase 시험을 실시하였으며, TCBS와 Rimler-Shoots agar (R-S), Salmonella-Shigella (SS)에서의 colony 성상을 관찰하였다. 모든 시험 배지의 제작은 MacFaddin (2000)의 방법을 따랐다.

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

4.1. 세균의 genomic DNA의 분리

Table 1에 나타낸 2 개의 참조 균주와 12 개의 분리 균주를 각각 5 ml TSB에 접종하고 25 °C에서 200 rpm으로 24 시간 진탕 배양하였다. 그 후 6,000 rpm에서 5 분간 원심 분리 후 상정액을 제거한 다음 Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer)를 사용하여 genomic DNA를 분리하였다.

4.2. Competent cell 제작

Competent cell의 제작을 위해 *Escherichia coli* DH5a를 사용하였다. Luria-Bertani broth 배지 (LB, Difco)에 접종하여 overnight 배양한 균액 100 μ l를 10 ml LB broth에 접종하여 흡광도 값이 600 nm에서 0.4가 되도록 shaking하면서 37 °C, 3~4 시간동안 배양하였다. 얼음 위에서 10 분간 둔 후 원심 분리하여 얻어진 pellet을 100 mM CaCl₂에 현탁하여 얼음 위에서 30 분간 둔 후에 다시 원심 분리하였다. glycerol이 첨가된 100 mM CaCl₂에 재현탁한 후 사용 전까지 -70 °C에서 보관하였다.

4.3. 16S rRNA의 cloning

4.3.1. Primer의 설계

본 실험에 사용된 primer는 기존에 보고된 universal bacterial primer를 사용하였다. 사용된 primer의 염기 배열과 증폭 산물의 크기를 Table 3에 나타내었다.

4.3.2. PCR과 PCR products 추출

PCR은 PCR PreMix (Bioneer)를 사용하였고, Thermal cycler (Perkin-Elmer)로 수행하였으며 조건은 Table 4에 나타내었다. 1 % agarose gel에

0.01 % Etidium Bromide (EtBr: 1 mg/ml)을 혼합하고 60 V에서 30 분간 전기 영동한 후 UV transilluminator 상에서 확인하고 PCR 산물에 해당하는 부분을 칼로 절취하여 gel의 무게를 측정하였다. 그 절취된 gel을 High pure PCR products purification kit (Roche)를 이용하여 PCR products를 정제하였다.

4.3.3. PCR products cloning

Cloning vector로 pGEM T-easy vector (Promega)와 pGEM T vector (Promega)를 사용하여 T4 ligase로 PCR products와 vector를 연결시켜 recombinant plasmid DNA를 준비하였다. 이를 -70 °C에 보관된 100 µl의 competent cell (*Escherichia coli* DH5α)에 recombinant plasmid DNA를 첨가한 후 heat shock 방법으로 transformation 시켰다. 이에 1 ml LB broth를 첨가하여 37 °C에서 1 시간 배양한 후 ampicillin (50 µg/ml), Isopropylthio-β-D-galactopyranoside (IPTG, 25 µg/ml)와 X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-galactopyranoside, 10 µg/ml)이 포함된 LB 배지에 배양하여 white colony를 선별하였다.

4.3.4. 재조합된 plasmid DNA의 추출과 inserted DNA 확인

Ampicillin이 첨가된 LB 배지에서 자란 세균에서 plasmid DNA를 추출하기 위해 plasmid DNA mini-prep. kit (GeneAll)를 사용하였다.

4.3.5. DNA sequencing

Plasmid DNA를 추출한 후 Sanger *et al.* (1997)의 방법에 따라 automatic sequencer (ABI 377, USA)로 염기 서열을 분석하였다.

4.3.6. 염기 서열의 비교 분석

해독한 염기 서열은 Genetyx program을 사용하여 조합하였으며, Nation Center for Biotechnology Information (NCBI)에서 제공되는 BLAST program으로 이미 밝혀져 있는 균주들의 16S rRNA와 비교 분석하였다.

Table 3. PCR primers used to amplify 16S rRNA

	Orient	Sequence (5' to 3')
Primer	27F	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG
	1492R	TACG GYT ACC TTG TTA CGA CTT

Table 4. Condition of reaction step and PCR cycle

	Temperature (°C)	Reaction Time	Cycle(s)
Pre-denaturation	94	5 min	1
Denaturation	94	30 sec	
Annealing	55	30 sec	30
Extension	72	80 sec	
Post-extenstion	72	7 min	1

5. 시험 균주에 대한 병원성 시험

5.1. 시험 균주의 반수 치사 농도

본 연구에서 사용한 2 개의 참조 균주와 12 개의 분리 균주에 대하여 병원성을 확인하기 위해서 반수 치사 농도 (Medium Lethal Dose, LD₅₀)를 측정하였다. 사육 수온은 27 ± 1 °C로 유지하였으며, 시험 기간 동안 사육수는 1 일 1 회 환수하였다. TSA에 배양된 각 균주를 멸균 생리 식염수에 현탁하여 준비했고, 각 실험구 당 시험어 10 마리에 일정량의 시험 균액을 복강 주사하였다. 대조구는 멸균 생리 식염수를 복강 주사하였다. 주사 후 10 일 동안 폐사를 확인하고 누적 폐사율을 계산하였다 (Wardlaw, 1985). 폐사한 어류는 폐사의 원인을 확인하기 위해 R-S 배지와 TSA 배지를 이용하여 원인균의 재분리를 시도하였다. 이후 배양된 균의 특성을 여러 가지 생화학 시험으로 확인하였다.

5.2. 시험어에 대한 병원성 시험

금붕어, 플레티 및 니그로를 대상으로 11 개의 시험 균주와 2 개의 참조 균주에 대한 병원성 시험을 실시하였다. 각 시험균은 TSA에서 27 °C로 24 시간 배양한 후 멸균 생리 식염수에 $2 \times 10^{5-7}$ cfu/fish의 농도 범위로 조정된 다음 복강에 0.1 ml씩 주사하였으며, 대조구는 멸균 생리 식염수를 0.1 ml씩 복강 주사하였다. 각 실험구 당 시험어 10 마리에 사용하였고 수온은 26 ± 1 °C로 유지하고 주사 후 7 일 동안 매일 폐사체를 확인하였다. 폐사한 어류는 폐사의 원인을 밝히기 위하여 즉시 해부한 후 내부 장기를 대상으로 R-S 배지와 TSA 배지에서 원인균의 재분리를 시도하였다. 이후 배양된 균에 대해서 특성을 여러 가지 생화학 시험을 통하여 확인하였다.

6. Extracellular products (ECPs)의 특성

6.1. ECPs의 추출

시험균의 ECPs 추출은 cellophane overlay 방법으로 하였으며, González- Serrano *et al.* (2000)의 방법을 변형하여 사용하였다. 즉, 미리 제작된 TSA 위에 121 °C, 15 분간 멸균한 cellophane membrane을 얹고, TSB에 24 시간 동안 전배양된 균액 400 μ l를 멸균 삼각 유리병으로 고르게 도말하였다. 시험균이 접종된 배지를 28 °C, 24 시간 배양한 후, cellophane membrane을 새로운 petridish에 옮기고 2 ml 0.1 M PBS (pH 7.4)로 세척하여 모았다. 이 현탁액을 4 °C, 14,000 $\times$ g, 30 분간 원심 분리하여 상정액을 분리하였으며, 이를 0.22 μ m pore size의 syringe filter (Corning Inc.)로 여과한 것을 ECPs 액으로 사용하였다. 추출한 ECPs 액은 실험에 사용하기 전까지 -70 °C에 보관하였다.

6.2. ECPs의 단백질 정량

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

6.3. Proteolytic activity

6.3.1. Caseinase activity

Caseinase activity는 Gudmundsdóttir *et al.* (1996)에 따라 azocasein (Sigma)을 기질로 하여 측정하였다. 즉, 0.1 M PBS (pH 7.2)에 녹인 1 % azocasein 용액 450 μ l와 ECPs 50 μ l를 혼합하여 27 °C에서 30 분간 배양한 후, 10 % trichloroacetic acid (TCA, Sigma) 0.5 ml을 넣고 반응을 중지시켰다. 30 분 후, 원심 분리 (4 °C, 14,000 $\times$ g, 5 min)하여 상정액으로

부터 0.5 ml을 취한 다음 1 M sodium hydroxide 0.5 ml과 혼합한 후, A₄₅₀으로 측정하였다 (Pharmaciabiotec Ultrospec 3000). caseine 1 unit는 흡광도 값이 0.001 증가한 것으로 정의하였다.

6.3.2. Gelatinase activity

Gelatinase activity는 Hastings *et al.* (1985)에 따라 1 % (w/v) agarose에 3 % gelatine을 첨가하여 직경 4 mm wells를 만든 후 약 300 µg/ml로 각각의 well에 20 µl씩 분주하고 습윤 상자에서 28 °C, 24 시간 반응시킨 다음 well 주위의 clear zone을 측정하였다.

6.3.3. Phospholipase and lipase activity

Phospholipase와 lipase activity는 Gudmundsdóttir *et al.* (1990)에 따라 1 % (w/v) agarose에 각각 1 % (w/v) egg yolk와 1 % (w/v) Tween 80을 첨가하여 직경 4 mm wells를 만든 후 약 300 µg/ml로 각각의 well에 20 µl씩 분주하고 습윤 상자에서 28 °C, 48 시간 반응시킨 다음 well 주위의 clear zone을 측정하였다.

6.4. Haemolytic activity

양, 틸라피아, 향어의 혈액에 대한 용혈능을 조사하였다. Sheep Red blood cells (RBCs) 시료는 구입하여 사용하였고, 틸라피아와 향어의 Red blood cells (RBCs)는 미부 정맥에서 채혈한 후, PBS로 3 회 세척 (4 °C, 2,000 × g, 10 min)하고 packed cells을 PBS에 1 %로 현탁하여 준비하였다. 96 well plate에 ECPs를 100 µl씩 넣고 PBS로 2배 단계 희석한 후, 동량의 5 % RBCs를 섞어 27 °C, 1 시간 배양하였다. 용혈능의 표시는 50 % 용혈을 일으킨 희석 단계로 표시하였다.

6.5. *In vitro* cytotoxic activity

시험 균주의 ECPs의 세포 독성은 어류 유래의 주화세포 EPC (Epithelioma papillosum cyprini)와 CHSE-214 (Chinook salmon embryo)를 사용하였다. Eagle's minimum essential medium (EMEM, Sigma)에 10 % Fetal bovine serum (FBS, GibcoBRL)과 1 % antibiotic-antimycotic agent (GibcoBRL)가 되도록 첨가하고 24 well plate의 각 well에 접종하여 18 °C에서 24 시간 단층 배양하였다. 배양 후 각 well 내의 배지를 제거하고, 각 시험 균주의 ECPs를 10 % FBS가 첨가된 EMEM으로 단백질 농도가 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 제작하여 각 well에 다시 주입하였다. 각 균의 ECPs가 접종된 24 well plate는 18 °C, 48 시간 동안 배양하여 cell-line의 세포 형태를 관찰하였다. 그리고 PBS를 첨가한 well의 cell-line을 대조구로 하여 세포 변성 효과를 확인하였다.

III. 결과

1. 병원균의 분리

본 실험에 사용한 분리 균주는 2006년 10월 ~ 2007년 7월까지 부산에 위치한 관상어 도매상, 할인마트, 개인 상점들에서 주로 판매하는 15 어종의 관상어들을 대상으로 총 192 건을 조사하여 분리하였다. 비늘 탈락, 체표 꺾양, 지느러미 기부 충혈 및 출혈 등의 외부 증상을 보이는 관상어를 대상으로 세균을 분리한 결과, *Aeromonas* spp.의 빈도가 가장 높게 나타났으며 그 외에도 *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas* sp., *Comomonas* sp., *Enterobacteria* sp., *Klebsilla pneumoniae*, *Shwanella* sp., *Plesiomonas* sp. 그리고 *Aquitalea magnusonii*의 순으로 분리되었다 (Fig. 2).

Aeromonas 균의 경우 12 어종으로부터 분리되었으며 분리균의 종류와 빈도는 Table 4에 나타나있다. 비교적 높은 빈도로 *Aeromonas veronii* biovar *sobria*와 *Aeromonas hydrophila*가 분리되었으며, *Aeromonas jandaei*, *Aeromonas trota*가 분리되었다. 이들 균주는 *Aeromonas* 균 선택 배지로 사용하는 R-S 배지에서 대부분 yellow colony를 형성하였으나 균주에 따라서는 green colony를 형성하기도 하였다.

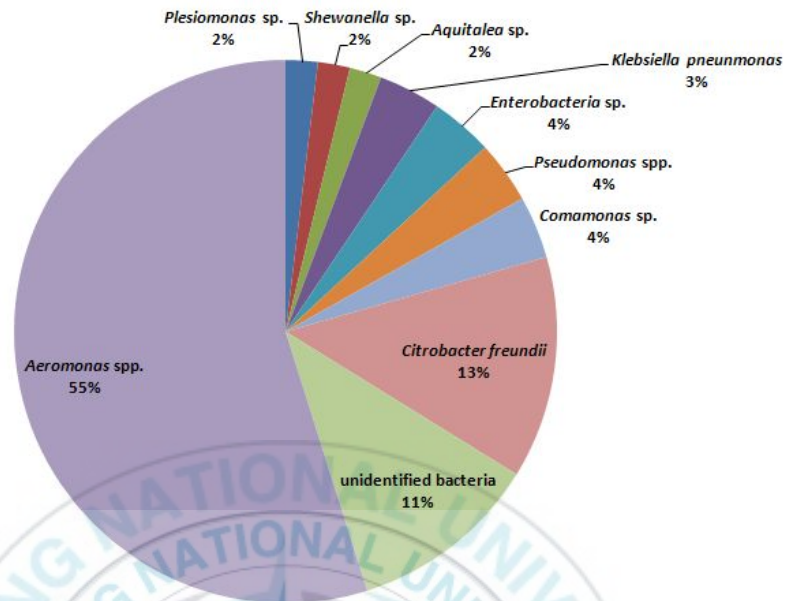


Fig. 2. Distribution of bacteria isolated from in freshwater ornamental fishes.

Table 4. Distribution of Aeromonad recovered in different species of freshwater ornamental fishes

Name of ornamental fish	<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. jandaei</i>	<i>A. trota</i>	Total
Angel fish <i>Pterophyllum scalare</i>		1			1
Blue diamond discus <i>Symphysodon aequifasciatus haraldi</i>		1			1
Blue gourami <i>Colisa sp.</i>	1	1			2
Color glassfish <i>Chanda ranga</i>		3			3
Gold fish <i>Carassius auratus</i>	3				3
Green tera <i>Aequidens pulcher</i>	2				2
Guppy <i>Poecilia reticulata</i>				1	1
Head and tail light tetra <i>Hemigrammus ocellifer</i>	1				1
Molly <i>Poecilia shenops</i>	1				1
Platy <i>Xiphophorus maculatus</i>	2	3	2	2	9
Sumatra <i>Puntius tetrazona</i>	2	2			4
White cloud mountain minnow <i>Tanichthys albonubes</i>			1		1
Total	12 (41.4 %)	11 (37.9 %)	3 (10.3 %)	3 (10.3 %)	29

2. 시험 균주의 생화학적 특성

Table 5에는 여러 어종의 담수 관상어에서 분리한 *Aeromonas* 속 세균들의 생화학적 성상 시험 결과를 나타내었다.

2 개의 참조 균주와 12 개의 시험 균주를 대상으로 한 생화학적 특성을 비교한 결과는 Table 6에 나타내었다. *A. veronii* bv. *sobria*의 시험 균주와 참조 균주는 대부분의 시험 항목에서 공통적인 반응들을 나타내었다. 특히, *A. veronii* bv. *veronii*와 구분할 수 있는 항목인 arginine dihydrolase, lysine decarboxylase 시험에서는 공통적으로 양성 반응을 나타내었고, ornithine decarboxylase 시험에서는 공통적으로 음성 반응을 나타내었다. 그러나 시험 균주와 참조 균주 간에 특징적인 현상으로서 methyl red 시험에서 시험 균주는 양성 반응을, 참조 균주는 음성 반응을 나타내었다.

Table 5. Biochemical properties of Aeromonad from isolated freshwater ornamental fishes

Characteristics	Positive isolates belonging to particular species(%)			
	<i>A. veronii</i> bv. <i>sobira</i> (n=12)	<i>A. hydrophila</i> (n=11)	<i>A. jandaei</i> (n=3)	<i>A. trota</i> (n=3)
Motility	100	100	100	100
Catalase	100	100	100	100
Oxidase	100	100	100	100
Arginine	100	100	100	33
Lysine	63	27	0	100
Ornithine	0	0	0	0
Nitrate	90	100	100	100
Indole	90	81	100	100
Methyl Red	100	90	75	100
Voges-Proskauer	90	90	75	0
Simmon's citrate utilization	54	81	100	100
Acid from				
arabinose	9	100	25	0
adonitol	0	0	0	0
dulcitol	0	0	0	0
cellibiose	27	0	75	66
fructose	100	100	100	100
galactose	100	100	100	100
glucose	100	100	100	100
inostol	0	9	0	0
lactose	0	0	0	0
maltose	100	100	100	100
mannitol	100	100	75	100
mannose	100	100	100	100
melibiose	0	0	50	0
raffinose	0	0	0	0
rhamnose	0	36	0	0
salicin	18	90	0	33
sorbitol	0	0	25	0
sucrose	100	63	50	66
trehalose	100	100	75	100
xylose	20	81	25	0
TCBS	36	45	50	66
R-S	100	90	100	100

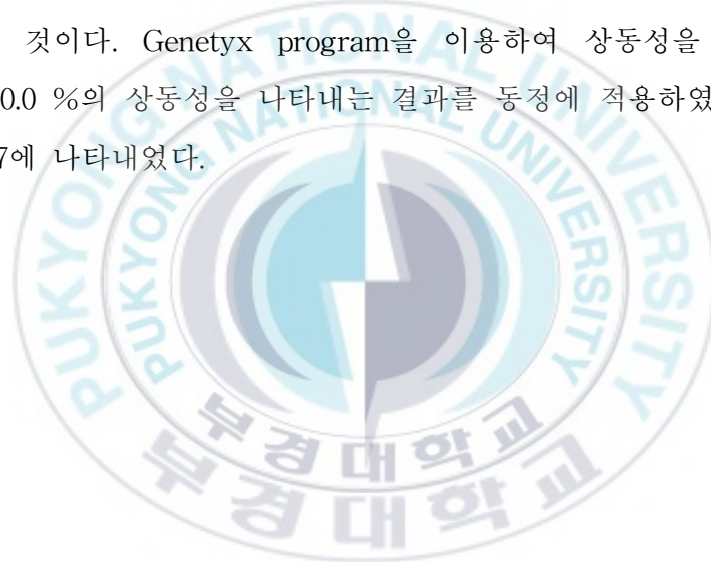
Table 6. Phenotypic characteristics of 12 *Aeromonas veronii* biovar *sobria* isolates from freshwater ornamental fishes

Characteristics	S01	G04	P07	H09	G10	S10	G11a	G11b	P12	G13	M13	B13	<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i> CECT 4246 ^a
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	96
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lysine	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	96
Ornithine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrate	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
Indole	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
Methyl Red	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Voges-Proskauer	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	88
Simmon's citrate utilization	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	
Acid from													
arabinose	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	12
adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
cellibiose	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	20
fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
inostol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12
maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	92
mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	4
raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	4
rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
salicin	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d
xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

a, Data from reference (Abbott *et al.*, 2003).

3. 세균의 16S ribosomal RNA(16S rRNA) 유전자 배열 분석

분리 균주들의 16S rRNA를 분석하기 위하여, universal bacterial primer를 이용하여 얻은 PCR 산물을 정제한 이후, cloning하여 염기 배열을 밝혔으며, 염기 배열 분석에 사용된 균주는 S01, G04, P07, H09, G10, S10, G11a, G11b, P12, G13, M13 그리고 B13이었다. 분석된 염기 배열은 GeneBank에 등록되어 있는 CECT 4246, CECT 4257, ATCC 7966, ATCC 49568 그리고 ATCC 4487의 16S rRNA의 염기 배열과 비교하였다. Fig. 3은 분리 균주의 16S rRNA 염기 배열과 *Aeromonas* 속 세균들과의 계통수를 나타낸 것이다. Genetyx program을 이용하여 상동성을 확인하였고 99.6 ~ 100.0 %의 상동성을 나타내는 결과를 동정에 적용하였다. 그 결과는 Table 7에 나타내었다.



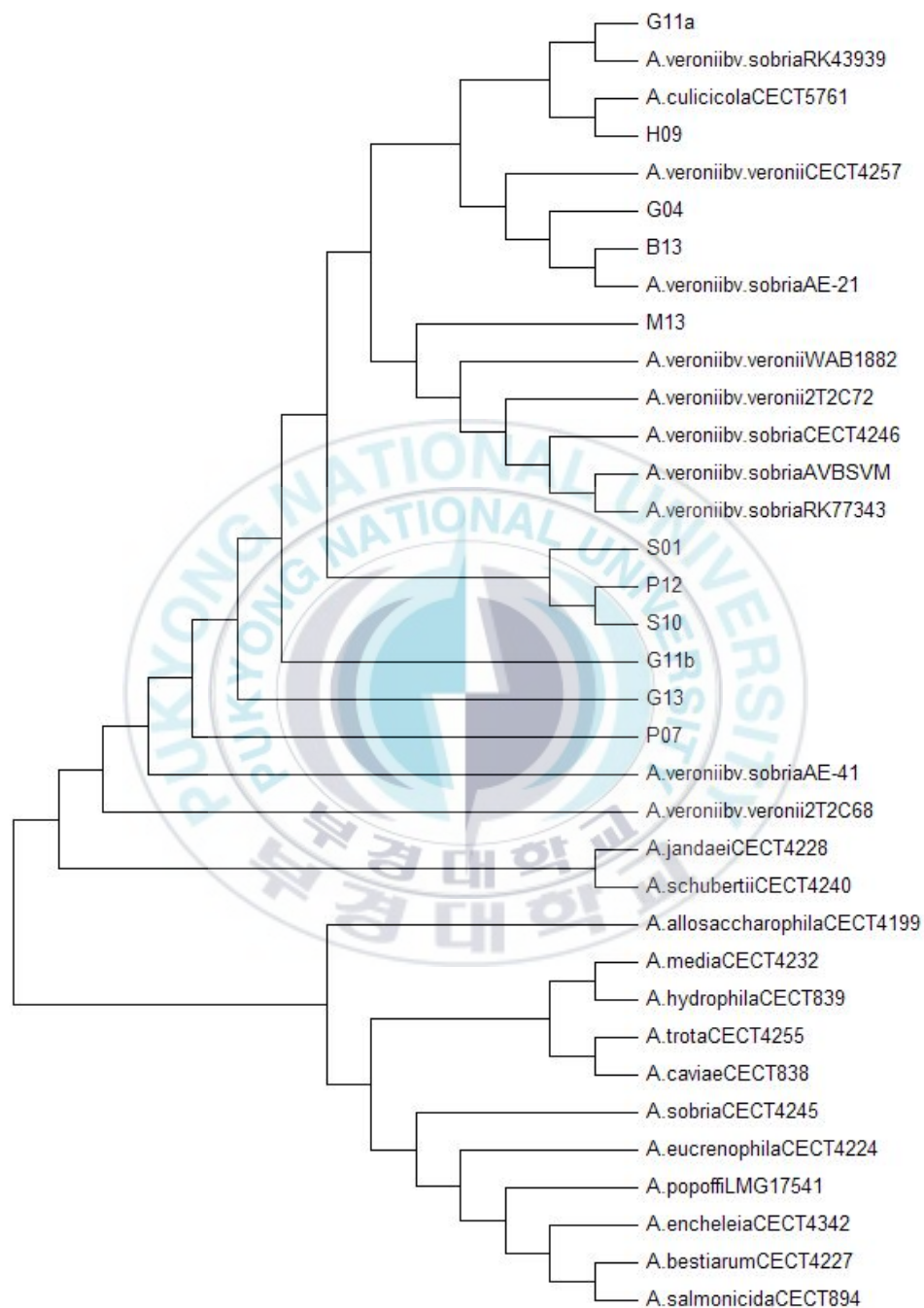


Fig. 3. Phylogenetic tree formed based on 16S rRNA sequences.

Table 7. DNA homology of 12 *Aeromonas veronii* biovar *sobria* strains with reference *Aeromonas* based on nucleotide differences in 16S rRNA gene sequence

Strains	Homology (%)				
	<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i>	<i>A. veronii</i> bv. <i>veronii</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. jandaei</i>	<i>A. trota</i>
	CECT4246	CECT4247	ATCC7966	ATCC49568	ATCC4487
S01	100.00	99.933	98.454	99.395	98.454
G04	100.00	99.931	98.406	99.376	98.406
P07	99.861	99.792	98.545	99.515	98.545
H09	99.933	99.800	98.337	99.268	98.337
G10	99.665	99.667	98.204	99.135	98.204
S10	100.00	99.931	98.404	99.375	98.404
G11a	99.799	99.798	98.589	99.530	98.522
G11b	99.799	99.731	98.522	99.463	98.522
P12	99.664	99.664	98.453	99.395	98.453
G13	100.00	99.933	98.454	99.395	98.454
M13	99.866	99.798	98.589	99.530	98.589
B13	100.00	99.933	98.454	99.395	98.454

4. 시험 균주의 반수 치사 농도

Table 8에는 금붕어를 대상으로 12 개의 분리 균주와 2 개의 참조 균주에 대한 병원성 결과를 나타내었다. 12 개의 분리 균주 중 G04, H09, G11a, G11b가 비교적 낮은 LD₅₀ 값을 나타내며 높은 독력을 보였다. 이에 비해 분리 균주 P07과 B13는 비교적 높은 LD₅₀ 값을 나타내며 낮은 독력을 보였다.

Table 8. The medium lethal dose (LD₅₀) of *Aeromonas veronii* biovar *sobira* on the intraperitoneally infected gold fish, *Carassius auratus* for 10 days

	LD ₅₀ (cfu/fish g ⁻¹)
S01	1.02×10^6
G04	1.02×10^5
P07	$\geq 1.02 \times 10^8$
H09	5.08×10^5
G10	3.44×10^7
S10	1.02×10^6
G11a	9.64×10^5
G11b	2.13×10^5
P12	5.08×10^6
G13	9.64×10^6
M13	6.90×10^6
B13	$\geq 1.02 \times 10^8$
CECT4246	6.09×10^6
CECT4257	$\geq 1.02 \times 10^8$

5. 어종별 감염 시험

Fig. 4에는 금붕어, 플래티와 니그로를 대상으로 12 개의 시험 균주와 2 개의 참조 균주에 대한 인위 감염 시험 결과를 나타내었다. 멸균 생리 식염수를 주사한 대조구는 시험 기간 동안 폐사가 일어나지 않았다. 금붕어에서 가장 강한 독력을 보인 균주는 G04와 G11b이고 다음으로 H09가 뒤따랐으며, 니그로에서는 G04, G11b와 M13가 가장 강한 독력을 보였다.

시험에 사용한 세 어종에 대해 모두 비슷한 결과가 나타났으며 공통적으로 비교적 강한 독력을 보인 균주는 G04와 G11b이고, 비교적 낮은 독력을 보인 균주는 P07과 B13이다. 어종에 따라 뚜렷한 차이는 나타나지 않았다.

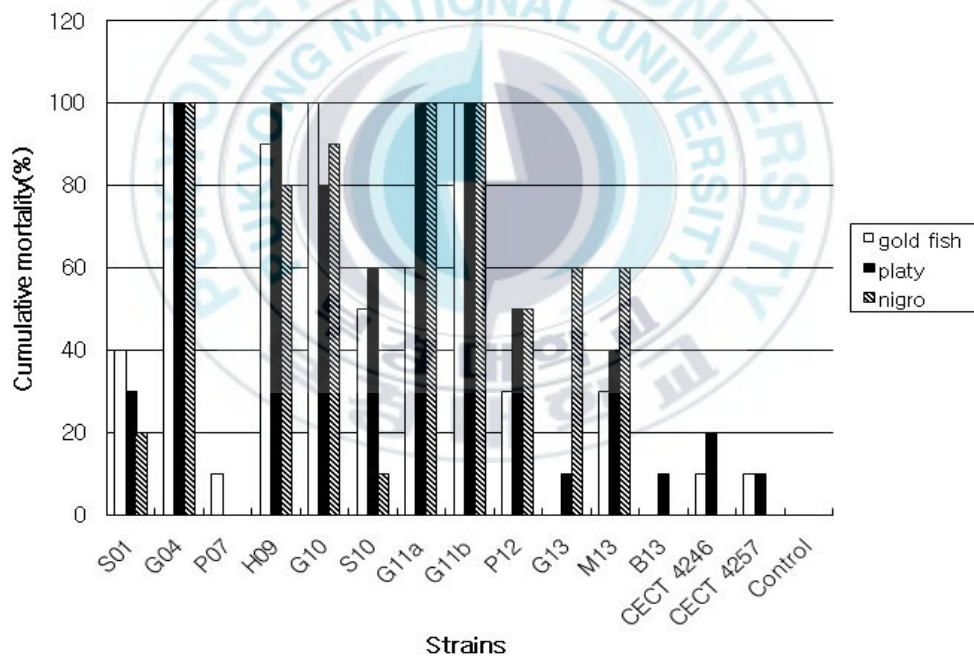


Fig. 4. Cumulative mortality of gold fish (*Carassius auratus*), platy (*Xiphophorus maculatus*) and nigro (*Cichlasoma nigrofasciatum*) infected with 4×10^6 cfu per fish⁻¹ for 7 days.

6. Extracellular products (ECPs)에 대한 효소 활성 시험

6.1. Proteolytic activity

11 개의 분리 균주와 2 개의 참조 균주에서 분리한 *Aeromonas veronii* biovar *sobria* ECPs의 효소 활성을 측정한 것으로 Table 9에 나타내었다. 그 결과, 분리 균주의 경우 G04와 G11a 균주는 비교적 낮은 활성을 나타내었으며 H09와 G11b 균주는 비교적 높은 활성을 나타내었다. 그리고 참조 균주의 경우는 비교적 높은 활성을 나타내었다.

6.1.1. Caseinase activity

11 개의 분리 균주와 2 개의 참조 균주에서 분리한 *Aeromonas veronii* biovar *sobria* ECPs의 효소 활성을 측정한 것으로 Table 9에 나타내었다. 그 결과, 분리 균주의 경우 G04와 G11a 균주는 비교적 낮은 활성을 나타내었으며 H09와 G11b 균주는 비교적 높은 활성을 나타냈다. 그리고 참조 균주의 경우는 비교적 높은 활성을 나타냈다.

6.1.2. Gelatinase activity

11 개의 분리 균주와 2 개의 참조 균주에서 분리한 *Aeromonas veronii* biovar *sobria* ECPs의 효소 활성을 측정한 것으로 Table 9에 나타내었다. 그 결과, 모든 분리 균주와 참조 균주가 활성을 나타내었다 (Table 9).

6.1.3. Phospholipase and lipase activity

Phospholipase activity는 11 개의 분리 균주 중 M13 균주만이 활성을 나타내지 않았고, 나머지 시험 균주는 활성을 나타내었다. 그리고 2 개의 참조 균주는 모두 활성을 나타내지 않았다 (Table 9). 그리고 lipase activity는 11 개의 분리 균주 중 S01과 G11b 균주만이 활성을 나타내지

않았고, 나머지 시험 균주는 활성을 나타내었다. 2 개의 참조 균주는 모두 활성을 나타내었다 (Table 9).

Table 9. Proteolytic activity of the extracellular products from *Aeromonas veronii* biovar *sobria*

Strains	Protein Conc. ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Caseinase (units ml^{-1})	Gelatinase (units ml^{-1})	Phospholipase	Lipase
S01	374.79 $\pm$ 7.69	1366.00 $\pm$ 487.90	+	+	-
G04	371.52 $\pm$ 23.67	2337.50 $\pm$ 716.30	+	+	+
P07	320.00 $\pm$ 38.13	774.00 $\pm$ 415.78	+	+	+
H09	307.17 $\pm$ 93.15	1640.50 $\pm$ 470.23	+	+	+
G10	311.20 $\pm$ 33.67	1480.00 $\pm$ 637.81	+	+	+
S10	332.83 $\pm$ 70.10	1616.00 $\pm$ 642.05	+	+	+
G11a	225.00 $\pm$ 74.71	1242.50 $\pm$ 597.51	+	+	+
G11b	336.20 $\pm$ 128.97	2305.50 $\pm$ 555.08	+	+	-
P12	240.33 $\pm$ 47.81	1068.00 $\pm$ 794.79	+	+	+
G13	323.37 $\pm$ 77.63	1296.00 $\pm$ 793.37	+	+	+
M13	240.44 $\pm$ 37.81	716.00 $\pm$ 438.41	+	-	+
B13	302.72 $\pm$ 1.07	11 $\pm$ 1.1	+	-	+
CECT 4246	332.94 $\pm$ 79.47	1047.50 $\pm$ 65.76	+	-	+
CECT 4257	191.74 $\pm$ 19.98	311.50 $\pm$ 6.36	+	-	+

6.2. Haemolytic activity

다양한 어종의 혈액에 대한 *Aeromonas veronii* biovar *sobira* ECPs의 용혈능을 관찰하여 Table 10에 나타내었다. *Aeromonas veronii* biovar *sobira* ECPs의 용혈능은 양의 적혈구에 비하여 틸라피아, 향어에 대한 용혈능이 비교적 높게 나타났다. 균주 간에 다양한 용혈능을 나타내었으며 참조 균주 CECT 4246 (*Aeromonas veronii* biovar *sobira*)이 가장 높은 용혈능을 나타내었고, CECT 4257 (*Aeromonas veronii* biovar *veronii*)이 가장 낮은 용혈능을 나타내었다.

Table 10. Haemolytic activity of the extracellular products from *Aeromonas veronii* biovar *sobira*

Strains	Sheep	Nile tilapia	Israeli carp
S01	1 : 4	1 : 64	1 : 64
G04	0	1 : 128	1 : 128
P07	0	0	1 : 2
H09	1 : 4	1 : 64	1 : 32
G10	1 : 2	1 : 32	1 : 8
S10	1 : 4	1 : 32	1 : 16
G11a	1 : 1	1 : 8	1 : 4
G11b	0	1 : 2	1 : 2
P12	1 : 8	1 : 32	1 : 32
G13	1 : 2	1 : 32	1 : 16
M13	1 : 4	1 : 32	1 : 8
B13	1 : 4	1 : 8	1 : 32
CECT 4246	0	1 : 2048	1 : 2048
CECT 4257	0	0	1 : 2

Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*; Israeli carp, *Cyprinus carpio nudus*.

6.3. *In vitro* cytotoxic activity

시험 균주의 ECPs를 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 조정하여 처리한 어류 유래의 주화세포 EPC (Epithelioma papillosum cyprini)와 CHSE-214 (Chinook salmon embryo)를 20 $^{\circ}\text{C}$, 24 시간 배양하였을 때 모든 시험구에서 세포 독성을 관찰할 수 있었으며 PBS를 첨가한 대조구에서는 세포 독성을 관찰할 수 없었다 (Fig. 5 ~ 6). 1 시간 후부터 세포 변성 효과가 나타나기 시작하였으며, 6 시간 이내에 모든 균주에서 세포 변성 효과가 나타났다 (Table 11).

Table 11. Cytotoxic activity of the extracellular products from *Aeromonas veronii* biovar *sobria*

	CHSE-214		EPC	
	1h	6h	1h	6h
S01	-	+	-	+
G04	+	++	+	++
P07	+	++	+	++
H09	+	++	+	+
G10	+	++	+	+
S10	+	++	+	++
G11a	+	+	+	++
G11b	+	+	+	++
P12	+	+	-	-
G13	-	-	+	+
M13	-	+	-	-
B13	-	+	-	+
CECT 4246	-	+	-	+
CECT 4257	-	+	+	+

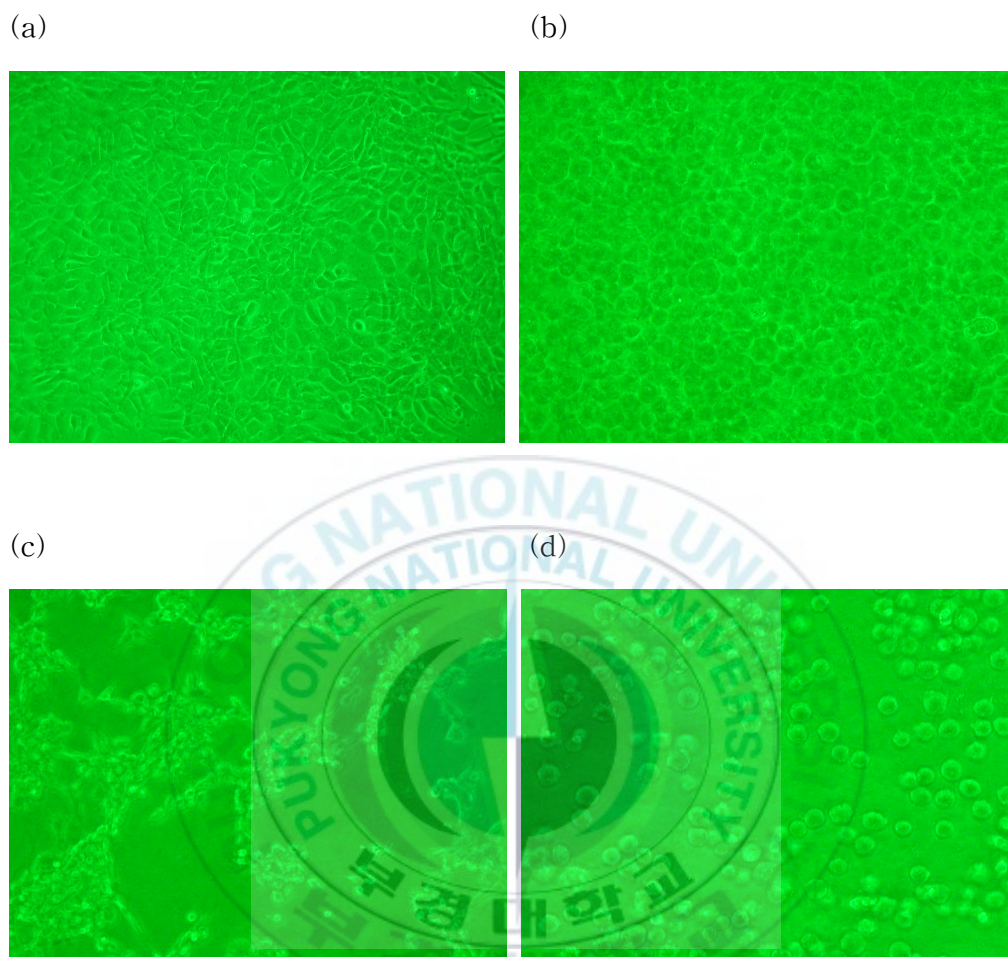


Fig. 5. Effects of cytotoxicity on fish cell line, EPC with ECPs of tested strains, for 6 h incubation. Cytotoxicity activity was determined with microscopic examination. (a) control, (b) after 1 h, (c) after 3 h, (d) after 6 h.

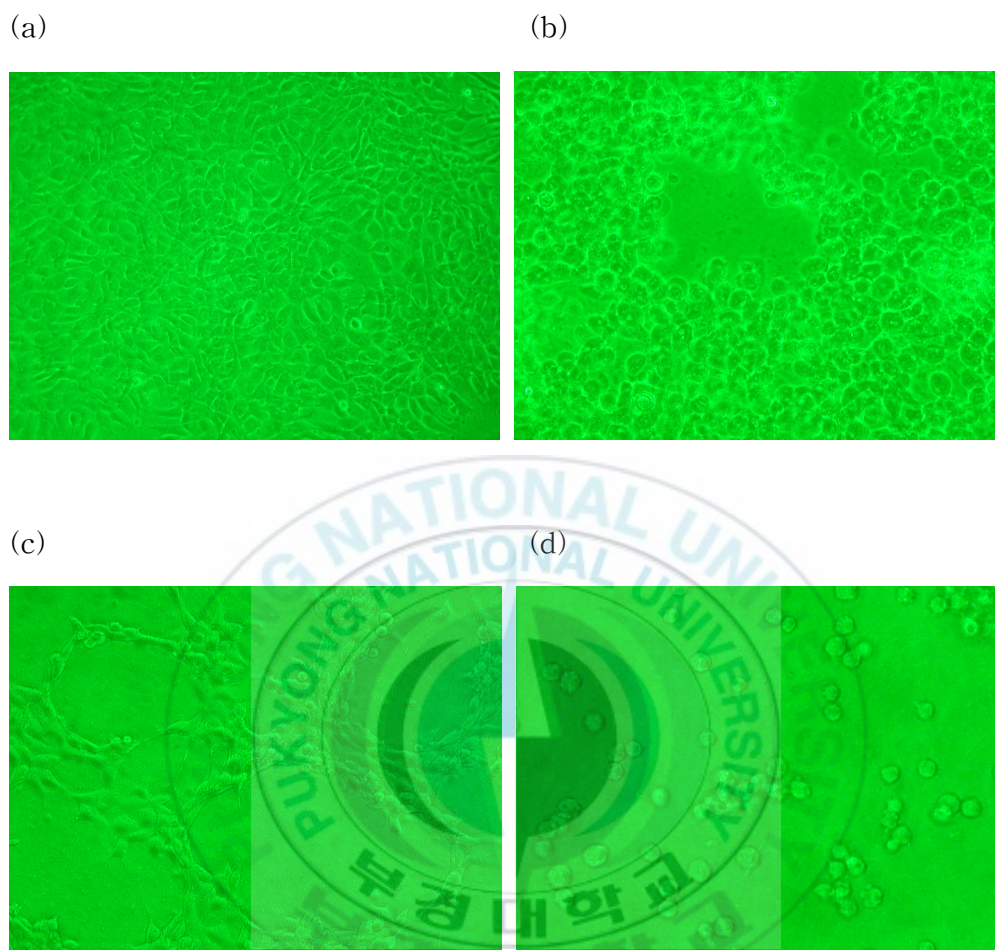


Fig. 6. Effects of cytotoxicity on fish cell line, CHSE-214 with ECPs of tested strains, for 6 h incubation. Cytotoxicity activity was determined with microscopic examination. (a) control, (b) after 1 h, (c) after 3 h, (d) after 6 h.

IV. 고찰

세계 관상어 시장의 규모는 포유류 시장과 비교하여 약 7 배 더 큰 시장을 형성 (유관업체 포함)하고 있을 정도로 초대형 산업으로 성장하고 있다 (한, 1995). 우리 나라의 관상어 시장의 규모도 점점 성장하는 추세이며 애완 산업으로서의 가능성을 높이고 있다. 대부분의 관상어들은 수입에 의해 유통되고 있으나 담수 관상어에 대한 질병 연구가 미흡하여 질병에 의한 폐사나 상품 가치 하락 등의 문제가 생겼을 경우 체계적인 연구에 의한 대책이 이루어지지 않고 있다.

본 연구는 우리 나라에서 유통되는 담수 관상어들에 질병을 유발하는 세균들 종류와 발생 빈도, 어중에 따른 분포 정도를 알고자 부산에 위치한 관상어 도·소매점과 할인마트 등에서 15 종의 관상어를 대상으로 병적인 증상을 관찰하였으며 총 192 건을 조사하였다. 그리고 가장 출현 빈도가 잦은 병원체를 대상으로 병원체의 특성 및 병원성 인자에 대한 연구로 질병 대책의 기초 자료를 얻고자 수행하였다.

담수 관상어에서 분리한 총 53 개의 세균은 생화학적 방법을 통한 동정과 16S rRNA sequence의 분석을 모두 고려하여 동정하였고, 그 결과 *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Comomonas*, *Enterobacteria*, *Klebsiella*, *Shwanella*, *Plesiomonas*, *Aquitalea* 속 세균들이 분리되었다. 그 중 분리 빈도가 비교적 높으며 심각한 외부 증상으로 인해 상품 가치를 하락시키는 원인균으로 생각되는 *Aeromonas veronii* biovar *sobria*를 중심으로 병원체 특성과 병원성에 대하여 연구하였다.

A. veronii bv. *sobria*의 주요 증상으로 비늘 탈락, 지느러미 부식, 아가미 뚜껑 부식, 체표 궤양 등의 외부 증상이 나타났으며, 간 충혈, 비장 비

대 등의 내부 증상이 나타났다. 이는 Lee (1992)에 의해 보고된 양식 가물치 궤양병의 증상과 유사하며, Rahman *et al.* (2002)에 의해 보고된 african catfish, *Clarias gariepinus*, rajputi, *Puntius gonionotus*, rui, *Labeo rohita*, catla, *Catla catla* 그리고 shole, *Channa striatus*의 어체와 꼬리 지느러미 부위에 출혈성 궤양 등을 나타내는 증상과 유사하였다.

총 15 어종 중 가장 많은 종류의 균이 분리된 어종은 플래티였으며, 다음으로는 금붕어에서 많은 종류의 균이 분리되었다. 특히 *Aeromonas veronii* biovar *sobria*가 가장 높은 빈도로 분리된 어종은 금붕어였으며, 이 외에도 플래티, 블루 구라미, 금붕어, 그린 테라, 헤드 엔드 테일 라이트 테트라, 몰리 그리고 수마트라에서 분리되었다.

A. veronii bv. *sobira*의 생화학 시험 결과, 분리 어종에 따른 생화학적 성상의 차이는 거의 없었으나 분리 균주 중에서도 lysine, arabinose, cellibiose, melibiose, raffinose 및 saline 분해능이 다소 차이가 있었다. 그러나 *A. veronii* bv. *sobria* 참조 균주 CECT 4246의 생화학적 시험 결과와는 유사하였다 (Abbott *et al.*, 2003).

Miñana-Galbís *et al.* (2002)와 Valera and Esteve (2002)에 의해 보고된 생화학적 성상들의 특징에 따라 간이 동정법을 고안해내었으며, 그 결과 arginine, lysine, ornithine, Voges-Proskauer, sucrose, arabinose 및 cellibiose 분해능에 따라 간이 동정을 할 수 있음을 확인하였고, 본 실험에서 분리된 균주들의 경우에도 적용할 수 있음을 확인하였다.

또한 분리 균주의 16S rRNA 염기 배열을 분석한 결과 *A. veronii* bv. *sobira* CECT 4246과는 99.6 ~ 100.0 %의 상동성을 보여, *A. veronii* bv. *sobira*인 것으로 나타났으며, 이러한 결과는 16S rRNA 결과를 계통수로 나타내었을 때 더욱 명확히 드러났다. 계통수에서 본 분리 균주와 동일한 것으로 나타난 *A. veronii* bv. *veronii*는 *A. veronii* bv. *sobira*와 유전학적

으로 동일하다고 보고된 바 있다 (Popoff and Véron, 1976). 또한 분리 균주와 동일한 것으로 나타난 *A. culicicola*는 Pidiyar *et al.* (2002)에 의해 처음 보고되었으나, Huys *et al.* (2005)에 의해 1987년 Hickman-Brenner *et al.*에 의해 보고되었던 *A. veronii*와 동일한 균으로 밝혀진 종이다.

A. veronii bv. *sobria*가 다양한 양식 어류에 병원성을 나타낸다는 보고가 있으나 담수 관상어에 대한 병원성 연구는 아직 미흡한 실정이다 (Kang *et al.*, 2000; Rahman *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2005). 최근 Kozińska (2007)은 양식어 common carp와 rainbow trout로부터 Aeromonads 세균을 분리한 결과 *A. veronii* bv. *sobria*가 높은 빈도로 분리되었으며, common carp에 존재하는 세균 중 우점적인 세균임을 확인하였으며 이 병원체에 대한 병원성을 확인하였다.

본 연구에서 금붕어, 플라티와 니그로를 대상으로 분리 균주 12 개와 참조 균주 2 개를 인위 감염 시켜 병원성을 확인하였다. 분리 균주 중 G04, H09, G11a, G11b가 병원성이 강하게 나타났으며 금붕어에 대한 LD₅₀값은 비교적 높게 나타났다. 이에 비해 P07, B13은 금붕어에 대한 LD₅₀값은 비교적 낮게 나타났으며 낮은 병원성을 나타내었다. 또한 참조 균주 CECT 4257의 경우도 매우 낮은 독성을 나타내었다.

A. veronii bv. *sobria*가 분리된 병어의 증상이 심한 경우는 분리 균주의 독력이 비교적 높게 나타났으나, 증상이 가볍게 나타난 병어의 경우는 기생충 또는 다른 종류의 세균에 혼합 감염되어 있으며 분리 균주의 독력이 비교적 낮은 것으로 나타났다.

Aeromonads는 독소와 다양한 효소를 함유하고 있으며 잠재적 병원성 인자로서 여겨지는 extracellular products (ECPs)로부터 haemolysins, cytotoxins 그리고 proteases를 생성한다 (Merino *et al.*, 1999; González-Rodríguez *et al.*, 2004). 생성되는 물질들은 조직 손상을 일으키며 직접

숙주 세포들을 공격하거나 기능을 저하시키며, 숙주 세포, 염증 세포 및 내분비 기관으로부터 많은 염증 매개 물질이나 생체 활성물질, 호르몬 등을 비정상적으로 분비하게 하여 임상 증상을 나타낸다 (Lamas *et al.*, 1994).

본 연구에서도 *A. veronii* bv. *sobria*의 ECPs를 분리하여 protease 활성, phospholipase 및 lipase의 특성을 알아보았다. Caseinase activity는 G04와 G11b가 비교적 높게 나타났으며, P07과 M13은 비교적 낮은 활성을 보였다. 특히 B13은 아주 낮은 활성을 나타내었다. Gelatinase activity는 시험 균주 모두 활성이 나타났다. 또한 phospholipase activity는 분리 균주 중 M13, B13만 활성을 나타내지 않았으며, 2 개의 참조 균주는 모두 활성을 나타내지 않았다. Lipase activity는 분리 균주 S01만 활성을 나타내지 않았다.

Esteve *et al.* (1995)와 Rahman *et al.* (2002)는 ECPs 활성에 protease, phospholipase, haemolysin 또는 cytotoxin이 병원성에 중요한 영향을 미친다고 하였다. 또한 생산되는 효소와 독소의 양과 병원체의 병원성이 관련이 있다고 보고하고 있다 (Hsu *et al.*, 1981; Hsu and Shotts *et al.*, 1983; Kozłńska, 1996). 따라서 이러한 여러 가지 효소 활성이 있는 본 시험 균주들도 다양한 병원성을 나타낼 것으로 예상된다.

본 연구에서도 시험 균주나 시험 어중에 따라서 용혈능이 다양하게 나타났다. 그러나 나일 틸라피아와 이스라엘 잉어의 적혈구에 대한 용혈능에 비해 양의 적혈구에 대한 용혈능은 현저히 낮은 것으로 확인하였다. 또한 인위 감염 시험에서 독력이 강하게 나타난 분리 균주와 독력이 약하게 나타난 분리 균주 간의 뚜렷한 차이가 없었으므로 *A. veronii* bv. *sobria*의 병원성 기작에 용혈능이 미치는 영향은 그다지 크지 않을 것으로 생각된다.

Esteve *et al.* (1995)는 motile *Aeromonas*의 ECPs에 대하여 다양한 세

포의 cytotoxic activity를 실험하였으며 24 시간 관찰 후 결과를 확인하였다. 그 결과 *A. hydrophila*와 *A. jandaei*는 EPC cells에 대해 세포 독성을 나타내었으며 몇 군주에 대해서는 3 시간 후부터 세포 독성을 나타내기 시작하였다. 이에 반해 *A. sobria*, *A. caviae*와 *A. allosaccharophila*는 약한 세포 독성을 나타내거나 세포 독성이 나타나지 않았다. Sarah *et al.* (2003)은 *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*에 대한 EPC cell의 세포 독성을 확인한 결과 접종 5 시간 후부터 세포 독성이 관찰되는 것을 확인하였다.

본 실험의 경우 EPC cell과 CHSE-214 cell에 대해 *A. veronii* bv. *sobria*의 세포 독성을 시험한 결과, 두 주화 세포에 대해 모두 접종 1 시간 후부터 강한 세포 독성을 나타내며 세포의 변형이 관찰되었으며, 약 6 시간 후에는 거의 파괴되었다.

부산·경남 지역에 위치하고 있는 담수 관상어 판매처에 사육 또는 판매되고 있는 담수 관상어들로부터 분리한 세균은 *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Comomonas*, *Enterobacteria*, *Klebsiella*, *Shwanella*, *Plesiomonas* 그리고 *Aquitalea* 속 세균들이었으며, 이 중 *Aeromonads*의 빈도가 가장 높게 나타났다. 그 중 *A. veronii* bv. *sobria*의 분리 빈도가 가장 높았으며 다른 기생충이나 세균과 혼합 감염 되지 않고 순수 분리되었다. *in vivo* 시험에서는 금붕어, 플라티와 니그로에 대한 병원성을 나타내었으나, *in vitro* 시험에서는 ECPs에 대한 효소 활성, 용해능 및 세포 독성과 병원성과의 뚜렷한 상관관계는 나타나지 않았다.

V. 요약

본 연구에서는 우리 나라에서 유통되고 있는 담수 관상어에 대한 세균 감염 빈도와 종류를 파악하고, 그 중 *Aeromonas veronii* biovar *sobira*의 특성을 조사하여 질병 대책의 기초 자료를 얻고자 수행하였다.

2006년 10월부터 2007년 7월까지 부산·경남 지역에 위치한 대형 할인마트, 수족관 등을 대상으로 총 15 종의 담수 관상어들을 조사하였다. 비늘 탈락, 두부 궤양, 지느러미 부식 등의 외부 증상이 관찰되는 어류의 간, 신장, 비장, 체표 병변을 Tryptic Soy Agar (TSA, Difco)와 Rimler-Shotts agar (R-S)에 도말하여 27 °C, 24 ~ 48 시간 배양한 후, 배지에 자란 집락의 특성에 따라 순수분리 배양하였다. 분리된 균은 형태학적 및 생화학적 특성을 검사하고, 16S rRNA sequencing을 시행하여 균을 동정하였다.

그 결과 *Aeromonas* 균 (54.7 %)의 분리 빈도가 가장 높게 나타났으며 그 이외에도 *Citrobacter freundii* (13.2 %), *Comomonas* sp. (3.7 %), *Klebsilla pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (3.7 %), *Pseudomonas* sp. (3.7 %), *Shwanella* sp. (1.9 %), *Aquitalea* sp. (1.9 %), *Plesiomonas* sp. (1.9 %), unidentified bacteria (11.3 %)가 분리되었다.

여러 분리 세균 중 분리 빈도가 가장 높은 *Aeromonas* 균을 형태학적·생화학적·유전학적 특징들을 바탕으로 동정한 결과 *A. veronii* bv. *sobria* (41.4 %), *A. hydrophila* (37.9 %), *A. jandaei* (10.3 %), *A. trota* (10.3 %)로 동정되었으며, 그 중 *A. veronii* bv. *sobria*를 중심으로 균의 특성과 병원성에 대해 조사하였다.

인위 감염 실험 결과 모든 균주에 대한 독력을 확인하였다. 특히, 2 개의 분리 균주 G04와 G11b의 경우는 시험에 사용한 모든 어종인 금붕어, 플레

티 및 니그로에 대해 비교적 강한 독력을 나타내었다. 그리고 분리 균주 P07과 B13은 모든 어종에 대해 비교적 낮은 독력을 나타내었다. 어종에 따른 뚜렷한 독력의 차이는 나타나지 않았다.

그리고 *Aeromonads*의 병원성 인자 중 하나로 잘 알려진 ECPs의 proteolytic activity, 용혈능 및 세포 독성 시험과 인위 감염 시험을 했을 때, 다양한 결과를 나타내어 병원성에 따른 균주 간의 뚜렷한 차이는 보이지 않았다.



VI. 감사의 글

이 논문이 완성될 수 있도록 많은 관심과 변함없는 사랑으로 이끌어 주신 박수일 교수님께 진심 어린 존경과 감사의 말씀 올립니다. 항상 바쁘신 중에도 저의 논문에 지도와 조언을 해주신 정현도 교수님과 정준기 교수님께 감사드립니다. 그리고 항상 관심 가져 주신 허민도 교수님, 김기홍 교수님, 강주찬 교수님께 감사드립니다.

항상 관심 보내시며 격려해 주신 남해 수산 연구소 방종득 소장님, 동해 특성화 연구센터 김이청 센터장님과 국립 수산과학원 김진우 팀장님께 감사드립니다. 그리고 지보영, 최혜승, 조미영, 권문경 연구사님, 동해 수산 연구소 이주석 연구사와 경상대학교 박찬일 교수님께 감사드립니다. 대천 해양 과학 고등학교 김귀옥 선생님, 수산 기술 관리소의 이재일, 황미혜 선배님, 우도 수산 최성재 선배님과 국립 수산물 품질 관리원의 이상윤, 손영찬, 강민진, 성명희, 최광진 선배님께 고마움을 전하고 싶습니다.

논문 계획에서부터 완성까지 많은 지도와 격려를 아끼지 않으신 원경미 선배님께 깊은 감사의 뜻을 전하고 싶습니다. 실험어를 제공해 주신 고석형 선배님과 대가로 관상어 사장님께 깊이 감사드립니다. 그리고 언제나 조언과 격려로 힘이 되어 주신 이덕찬, 김수미, 우승호 선배님과 이화 선생님께 감사드립니다. 실험 기간 동안 많은 지도와 격려를 아끼지 않으신 전남대학교 김도형 교수님, 영해 수산 심재동 선배님, 완도 해양 수산 사무소 최현숙 선배님, 통영 해양 수산사무소 홍미주 선배님 그리고 국립 수산물 품질 관리원 김은진 선배님께 감사드립니다.

항상 고민 상담을 해 주시는 김이경 선배님, 타국에서 공부하시면서도 항상 관심을 가져주신 한현자, 김현정, 이진희 선배님께 감사드립니다. 줄

업 논문을 같이 준비한 하수진 학형님과 항상 함께 해 준 황분옥, 김다영 후배님께도 감사의 인사를 전합니다. 그리고 실험실 생활을 함께하며 많은 추억을 함께했던 최정현 학형님께 감사드리며, 서로 살피며 열심히 자신의 미래를 위해 노력하고 있는 김윤희, 김유정, 정영은, 최수경 학형님께 감사의 인사를 전합니다. 5년 동안의 실험실 생활동안 함께 했던 황성돈, 이준희 선배님, 김수현, 김승훈, 서미영, 박효진, 한상윤, 최민지, 조교회, 엄용환, 김전진, 김민철, 오상현 후배님들께 감사의 인사를 전합니다.

그리고 실험에 많은 도움을 주신 약리학 실험실 김나영 선배님, 제주은 후배님, 진단생화학 실험실 윤소혜, 조혜진 후배님, 병리학 실험실 이한나 후배님께 감사드립니다. 항상 응원해 주는 강미정 언니, 경상대학교 해양생명과학과 김주원 오빠께 감사드립니다.

항상 관심을 가져주시고 걱정해 주시는 친할머니와 외할머니께 감사드리며, 늘 한결같은 사랑으로 스스로 올바른 선택을 할 수 있도록 도와주시는 사랑하는 부모님과 언제나 누나 걱정을 해 주는 기특한 동생 상준이에게 고개 숙여 감사의 인사를 전합니다.

제 인생에 있어 커다란 관문을 통과하는데 수많은 가르침과 관심으로 더 나은 제가 될 수 있게 해 주신 모든 분께 감사드리며, 제가 열심히 살아가는 모습으로 보답하고자 합니다.

VII. 참고 문헌

- Abbott, S.L., Cheung, W.K.W. and Janda, J.M. (2003). The Genus *Aeromonas*: Biochemical Characteristics, Atypical Reactions, and Phenotypic Identification Schemes. J. Clin. Microbiol., 41, 2348-2357.
- Altwegg, M, Steigerwalt, A.G., Altwegg-Bissig, R., Lüthy-Hottenstein, J. and Brenner, D.J. (1990). Biochemical identification of *Aeromonas* genospecies isolated from humans. J. Clin. Microbiol., 28, 258-264.
- Borrell, N., Acinas, S.G., Figueras, M.J. and Martinez-Murcia, A.J. (1997). Identification of *Aeromonas* clinical isolates by restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 16S rRNA genes. J. Clin. Microbiol. 35, 1671-1674.
- 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.
- Esteve, C., Amaro, C., Garay, E., Santos, Y. and Toranzo, A.E. (1995) Pathogenicity of live bacteria and extracellular products of motile *Aeromonas* isolated from eels. J. Appl. Bacteriol., 78, 555-562.
- Farmer III, J.J., Hickman-Brenner, F.W., Fannin, G.R., Arduino, M.J., and Brenner, D.J. (1986). Abstr. Int. Workshop Aeromonas, p. 1-2.
- Figueras, M.J., Soler, L., Chacón, M.R., Guarro, J. and Martínez-Murcia, A.J. (2000). Extended method for discrimination of *Aeromonas* spp. by 16S rDNA RFLP analysis. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 50, 2069-2073.
- Ghatak, S., Agarwal, R.K. and Bhilegaonkar, K.N. (2007). Species

- identification of clinically important *Aeromonas* spp. by restriction fragment length polymorphism of 16S rDNA. Lett. Appl. Microbiol., 44, 550-554.
- González-Rodríguez, M.N., Santos, J.A., Otero, A. and García-López, M.L. (2004). Hemolytic and proteolytic activities of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* biovar *sobria* in broth and salmon extract at different temperatures. J. Food Prot., 67, 278-284.
- González-Serrano, C.J., Santos, J.A., García López, M.L. and Otero, A. (2002). Virulence markers in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* biovar *sobria* isolates from freshwater fish and from a diarrhoea case. J. Appl. Microbiol., 93, 414-419.
- Gudmundsdóttir, B.K. (1996). Comparison of extracellular proteases produced by *Aeromonas salmonicida* strains isolated from various fish species. J. Appl. Bacteriol., 80, 105-113.
- Hänninen, M.L. and Siitonen, A. (1995). Distribution of *Aeromonas* phenospecies and genospecies among strains isolated from water, foods or from human clinical samples. Epidemiol. Infect., 115, 39-50.
- Hickman-Brenner, F.W., MacDonald, K.L., Steigerwalt, A.G., Fanning, G.R., Brenner, D.J. and Farmer III, J.J. (1987). *Aeromonas veronii*, a new ornithine decarboxylase-positive species that may cause diarrhea. J. Clin. Microbiol., 25, 900-906.
- Hsu, T.C., Waltman, W.D. and Shotts, E.B. (1981). Correlation of extracellular enzymatic activity and biochemical characteristics with regards to virulence of *Aeromonas hydrophila*. International Symposium of Fish Biology: Serodiagnostics and Vaccination.

- Leetown, W. Va. USA. Dev. Biol. Stand., 49, 101-111.
- Hsu, T.C., Shotts, E.B. and Waltman, W.D. (1983). Quantitation of biochemical and enzymatic characteristics with pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* complexes in fish. Proceedings of Republic of China-Japan Symposium of Fish Diseases, 47-55.
- Huys, G., Kämpfer, P. and Swings, J. (2001). New DNA-DNA hybridization and phenotypic data on the species *Aeromonas ichthiosmia* and *Aeromonas allosaccharophila*: *A. ichthiosmia* Schubert *et al.* 1990 is a later synonym of *A. veronii* Hickman-Brenner *et al.* 1987. Syst. Appl. Microbiol., 24, 177-182.
- Huys, G., Cnockaert, M. and Swings, J. (2005). *Aeromonas culicicola* Pidiyar *et al.* 2002 is a later subjective synonym of *Aeromonas veronii* Hickman-Brenner *et al.* 1987. Syst. Appl. Microbiol., 28, 604-609.
- Janda, J.M., Abbott, S.L., Khashe, S., Kellogg, G.H. and Shimada, T. (1996). Further studies on biochemical characteristics and serologic properties of the genus *Aeromonas*. J. Clin. Microbiol., 34, 1930-1933.
- Kang, D.L. and Lee, H.K. (2000). Analysis of 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Regions of *Aeromonas veronii* biogroup *sobria* and *Aeromonas caviae*. Kor. Jour. Microbiol. 36, 173-180.
- Kim, J.H., Lim, K.T., Jung, T.S., Shin, N.S., Park, J.H., Heo, G.J. and Park, S.C. (2005). Characterization of *Aeromonas* spp isolated from Neon tetra (*Hyphessobrycon herbertaxelrodi*). J. Vet. Clin., 22, 114-118.
- Kirov, S.M. (1993). The public health significance of *Aeromons* spp. in

- foods, Int. J. Food Microbiol., 20, 179–198
- Kozinska, A. (2007). Dominant pathogenic species of mesophilic aeromonads isolated from diseased and healthy fish cultured in Poland. J. Fish. Dis., 30, 293–301.
- Khalil, A.H., Mansour, E.H. (1997). Toxicity of crude extracellular products of *Aeromonas hydrophila* in tilapia, *Tilapia nilotica*. Lett. Appl. Microbiol., 25, 269–273.
- Kozińska, A., Figueras, M.J., Chacon, M.R., Soler, L. (2002). Phenotypic characteristics and pathogenicity of *Aeromonas* genomospecies isolated from common carp (*Cyprinus carpio* L.). J. Appl. Microbiol., 93, 1034–1041.
- Kuijper, E.J., Steigerwalt, A.G., Schoenmakers, B.S., Peeters, M.F., Zanen, H.C. and Brenner, D.J. (1989). Phenotypic characterization and DNA relatedness in human fecal isolates of *Aeromonas* spp. J. Clin. Microbiol., 27, 132–138.
- Lin, Y.S. (2006). Segmental ascending colitis associated with *Aeromonas veronii* biovar *sobria*. Pediatr. Int., 48, 334–336.
- Lee, H.K. (1992). Pathology of Ulcerous Disease in Cultivated Snakehead, *Channa argus*. Kor. Jour. Microbiol., 30, 164–170.
- MacFaddin, J.F. (2000). Biochemical test for identification of medical bacteria (3rd ed. by Williams, L. and Wilkins), USA.
- Madetoja, J., Pylkkö, P., Pohjanvirta, T., Schildt, L. and Pelkonen, S. (2003). Putative virulence factors of atypical *Aeromonas salmonicida* isolated from Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.), and European grayling, *Thymallus thymallus* (L.). J. Fish Dis., 26, 349–359.

- Masada, C.L., LaPatra, S.E., Morton, A.W. and Strom, M.S. (2002). An *Aeromonas salmonicida* type IV pilin is required for virulence in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Dis. Aquat. Organ., 51, 13-25.
- Merino, S., Rubires, X., Aguilar, A. and Tomás, J.M. (1997). The role of flagella and motility in the adherence and invasion to fish cell lines by *Aeromonas hydrophila* serogroup O:34 strains. FEMS Microbiol. Lett., 151, 213-217.
- Merino, S., Aguilar, A., Nogueras, M.M., Regue, M., Swift, S. and Tomas, J.M. (1999). Cloning, sequencing, and role in virulence of two phospholipases (A1 and C) from mesophilic *Aeromonas* sp. serogroup O:34. Infect. Immun., 67, 4008-4013.
- Miñana-Galbis, D., Farfán, M., Lorén, J.G., and Fusté, M.C. (2002). Biochemical identification and numerical taxonomy of *Aeromonas* spp. isolated from environmental and clinical samples in Spain. J. Appl. Microbiol., 93, 420-430.
- Pidiyar, V., Kaznowski, A., Narayan, N.B., Patole, M. and Shouche, S. (2002). *Aeromonas culicicola* sp. nov., from the midgut of *Culex quinquefasciatus*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 52, 1723-1728.
- Popoff, M and Véron, M. (1976). A taxonomic study of the *Aeromonas hydrophila*-*Aeromonas punctata* group. J. Gen. Microbiol., 94, 11-22.
- Rahman, M., Colque-Navarro, P., Kuhn, I., Huys, G., Swings, J. and Mollby, R. (2002). Identification and Characterization of Pathogenic *Aeromonas veronii* Biovar *Sobria* Associated with Epizootic Ulcerative Syndrome in Fish in Bangladesh. Appl. Environ. Microbiol., 68, 650-655.

- Saavedra, M.J., Figueras, M.J. and Martínez-Murcia, A.J. (2006). Updated phylogeny of the genus *Aeromonas*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 56, 2481-2487.
- Santos, Y., Toranzo, A.E., Barja, J.L, Nieto, T.P. and Villa, T.G. (1988). Virulence properties and enterotoxin production of *Aeromonas* strains isolated from fish. Infect. Immun., 56, 3285-3293.
- Valera, L. and Esteve, C. (2002). Phenotypic study by numerical taxonomy of strains belonging to the genus *Aeromonas*. J. Appl. Microbiol., 93, 77-95.
- Wahli, T., Burr, S.E., Pugovkin, D., Mueller, O. and Frey, J. (2005). *Aeromonas sobria*, a causative agent of disease in farmed perch, *Perca fluviatilis* L. J. Fish Dis., 28, 141-150.
- Wardlaw, A.C. (1985). Practical Statistics for Experimental Biologists. John Wiley and Sons, Chichester, UK, 551-554.
- 한원민 (2003). 관상어는 애완견을 앞지를 수 있을까? 한국양식학회, 5, 78-85.