



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

해산 양식어류에서 분리된
*Vibrio harveyi*의 신속 동정과
항원성에 대한 연구



부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 명 의 학 과

오 윤 경

이 학 석 사 학 위 논 문

해산 양식어류에서 분리된
*Vibrio harveyi*의 신속 동정과
항원성에 대한 연구

지도교수 정 현 도

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함

2008년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 명 의 학 과

오 윤 경

오윤경의 이학석사 학위논문을 인준함

2008년 2월 26일



주 심 농 학 박 사 박 수 일 ㉠

위 원 이 학 박 사 김 기 홍 ㉠

위 원 이 학 박 사 정 현 도 ㉠

목 차

I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 비브리오 분리균주의 동정 및 생화학적 성상비교	4
2. 분리균주의 배양조건에 따른 발육시험	6
3. <i>V. harveyi</i> 의 형태학적 관찰	6
4. 특이 primer 제작 및 PCR	6
4.1. 세균의 genomic DNA 분리	6
4.2. primer 제작	6
4.3. PCR amplification	6
4.4. 특이 primer를 이용한 어병세균 중 <i>V. harveyi</i> 의 비율 조사	7
5. RAPD analysis	7
6. <i>V. harveyi</i> 의 heamolysin gene cloning	8
7. <i>V. harveyi</i> 의 백신 제조	8
7.1. <i>V. harveyi</i> FKC (Formalin Killed Cell) 제작	8
7.2. <i>V. harveyi</i> HKC (Heat Killed Cell) 제작	8
8. <i>V. harveyi</i> 에 대한 polyclonal antibody 제작	9
9. Slide agglutination	9
10. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis	12

11. Immunoblotting analysis	12
12. Vaccination test	13
12.1. FKC injection	13
12.2. Challenge test	13
III. 결 과	14
1. 분리균주의 생화학적 성상	14
2. 분리균주의 배양조건에 따른 발육시험	16
3. <i>V. harveyi</i> 의 형태학적 관찰	18
4. 특이 primer 제작 및 PCR	19
4.1. 특이 primer 제작	19
4.2. PCR 결과	22
4.3. 특이 primer를 이용한 어병세균 중 <i>V. harveyi</i> 의 비율 조사	24
5. RAPD analysis	25
6. <i>V. harveyi</i> 의 heamolysin gene sequence	26
7. Slide agglutination에 의한 <i>V. harveyi</i> 의 구분	29
8. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis	30
9. Immunoblotting analysis	31
10. Vaccination test	33
IV. 고 찰	34
V. 요 약	40
VI. 감사의 글	42
VII. 참고문헌	44

Rapid identification and antigenicity analysis of *Vibrio harveyi* isolated
from mariculture fishes in Korea

Yun-Kyeong Oh

*Department of Fish Pathology, Graduate School,
Pukyong National University*

Abstract

Vibrio harveyi, has been found in a diverse range of marine vertebrates and invertebrates and distributed to wide geographical area. This species are significant pathogenic agents and a cause of high mortality in maricultured fish and shrimp important in the aquaculture industry. For the rapid and specific detection of *V. harveyi*, a pair of specific primer VH-K1, VH-K2 was designed from nucleotide sequence of the RNA polymerase subunit B(*rpoB*) gene. *V. harveyi* isolates were appeared to be calssified into sevrsl serogroup tested by slide agglutination with antisera. Selected thues isolates of *V. harveyi* should different patterns in SDS-PAGE and western blot form that of luminosense *V. harveyi* kccm40866. One isolate C05011 induced antiserum in flounder, showing *V. harveyi* cross-reaction the other *V. harveyi* isolates.

I. 서론

양식 산업에 있어서 어류의 생물학적 원인체, 즉 바이러스, 세균 및 기생충 등에 의한 질병은 하나의 미생물에 의한 감염 보다는 두 가지 이상의 미생물에 의한 복합감염의 경우가 늘고 있는데 (김 등, 2006), 우리나라 해산 양식업에서 큰 비중을 차지하고 있는 넙치의 경우 세균성 질병에 감염된 후 쇠약해진 개체에 2차적으로 기생충이 감염되어 피해가 확산되어 막대한 경제적 손실을 일으키는 경우가 빈번하다 (전, 2005). 세균성 질병과 관련한 단독 또는 혼합감염을 항생제를 사용하여 치료하는 경우가 대부분이나 이것은 항생제 오·남용으로 인한 내성균 발생 (Karunasagar et al., 1994)과 환경오염 (Kerry et al., 1995) 등 2차적인 문제가 발생할 수 있기 때문에 치료보다는 예방이 중요하며 전염병 예방을 위해서는 질병을 일으키는 원인인자에 대한 정확한 이해와 연구가 필요하다.

국내에서 양식되는 넙치의 주요 세균성 질병에는 *Edwardsiella tarda*에 의한 에드워드병, *Lactococcus garviae*, *Streptococcus iniae*, *S. parauberis* 등에 의한 연쇄구균병, 및 *Listonella anguillarum*, *Vibrio harveyi*, *V. ichthyoenteri*, *V. ordalii*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* 등에 의한 비브리오병이 대표적이다 (김 등, 2006). 비브리오병의 원인체 중의 하나인 *Vibrio harveyi*는 무척추 동물인 새우류에 감염되는 luminescence vibrio로 잘 알려져 있으며, larval stage 또는 post larval stage에 감염되어 100% 폐사를 일으키는 심각한 질병의 하나로 알려져 있고 (Sunaryanto and Malium, 1986; Lavilla-Pitogo et al., 1990), 척추

동물인 양식넙치도 감염되어 폐사를 나타낸다고 알려져 있다 (Alvarze et al., 1998; 원 등, 2006).

*V. harveyi*를 동정함에 있어서 좀 더 빠르고 정확한 동정법 개발이 필요하지만, 비브리오병의 원인체는 해수에 상존하는 호염성 세균으로 oxidase test 양성반응, catalase test 양성반응, glucose를 이용하나 가스는 생성하지 않으며 그람음성 간균으로 운동성을 나타내는 생리·생화학적 특성을 가지는데 이러한 특성들은 비브리오병과 관련한 다수의 비브리오 균종들과 유사하거나 유사한 균종 간에도 변화가 심하여 정확한 분류와 동정에 한계를 가진다. 또한, 다른 세균의 동정에 많이 이용되고 있는 16S rRNA 부위 또한 비브리오속 세균 간에 상동성이 매우 높아서 정확한 동정을 위한 분류 인자로는 한계가 있다. 최근에는 비브리오속 세균의 RNA polymerase subunit B (*rpoB*)는 균종간의 차이가 뚜렷하여 일부 비브리오속 세균의 동정에 이용되고 있으나 (Tarr et al., 2007), 비브리오속에 포함되는 다양한 균종에서의 연구는 부족한 실정이다. 세균의 혈청학적 분류는 균체항원 (O항원), 협막항원 (K항원), 편모항원 (H항원) 및 기타 항원에 의해 구분되고, 이런 항원들은 역학조사나 종의 세분화 및 균 동정에 이용된다 (Park et al., 1983; Obata-Yasuoka et al., 2002). *V. parahaemolyticus*의 혈청형처럼 O항원과 K항원의 조합으로 분류되기도 하며 (Gil et al., 2007), *V. harveyi*는 액체배지에서 배양할 때 swimming 운동에 관여하는 polar flagella와 고체배지에서 swarming운동에 관여하는 lartral flagella의 두 가지 다른 flagella의 존재에 의하여 혈청형이 구분되기도 하므로 다른 항원인자들에 의한 다양한 혈청형이 더 존재할 것으로 생각된다 (Kirov et al., 2004; McCarter, 2004; Shinoda et al., 1992).

*V. harveyi*의 병원성에 관해서는 주로 extracellular products (ECP)의 독력에 관한 연구가 (Zhang and Austin, 2000; Zorrilla et al., 2003) 중심이 되고 있는데, protease, phospholipase 및 haemolysin 등이 병원성에 중요한 기작으로 작용하는 것으로 알려져 있다 (Liu et al., 1996b). 특히 haemolysin은 어류의 출혈성 패혈증을 일으키는 중요한 인자로 생각된다 (Zhang et al., 2001). Haemolysin 등의 독소를 포함한 ECP, 균체 항원, 협막항원, 편모항원 및 기타 항원인자 등의 독성인자들에 대한 연구는 효과적인 백신제조를 위하여 매우 중요한데, 새로운 혈청형의 출현은 백신에 의한 효과적인 질병제어를 어렵게 하고 있다 (Santos et al., 1995; Balebone et al., 2005).

본 연구에서는 효과적인 *V. harveyi* 백신의 제작을 위하여 생물형, 유전형 및 혈청형 등에 기초한 정보를 얻고자 하였다. 이를 위하여 국내 양식어류로부터 분리된 균주 중 *V. harveyi*로 간이 동정된 균주를 대상으로 정확하고 신속한 동정을 위하여 비브리오팀 내의 균종 간 차이가 있는 것으로 보고된 *rpoB* 영역비교와 RAPD-PCR에 의하여 분류하였다. *V. harveyi*로 동정된 균주 중 유전적, 면역학적 특성을 조사하여 *V. harveyi*의 백신 대상균주를 선정하고 또 더 나아가서 백신의 효과를 알아보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 비브리오 분리균주의 동정 및 생화학적 성상 비교

넙치 등 국내 양식 어류에서 분리된 비브리오균 (Table 1)을 BHIA (Brain Heart Infusion Agar, Difco) 배지에서 25℃, 24시간 배양한 후 API 20E kit (bioMerieux, France)를 사용하여 동정하였다. 실험방법은 순수 배양된 colony를 제조사의 조작법에 따라 스트립에 접종하고, 배양 온도는 25℃에서 24시간 배양 후 결과를 판정하였다.

2. 분리균주의 배양 조건에 따른 발육 시험

분리균주의 성장에 미치는 pH, NaCl 농도, 온도의 영향을 조사하였다. pH의 영향을 조사하기 위하여 1N NaOH 와 1N HCl을 첨가하여 pH 4, 7, 9로 제작한 BHIB (Brain Heart Infusion Broth, with 1.5 % NaCl)에 분리균주(Table 1)를 접종하여 25℃에서 24시간 배양한 후 관찰하였다. 세균의 성장에 미치는 NaCl의 영향을 알아보기 위하여 1.5, 2.5, 3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 7.5, 8.5, 9.5, 10.5 % NaCl을 첨가한 BHIA 배지에 분리균주를 도말하여 24시간 배양한 후 관찰하였다. 온도의 영향을 확인하기 위하여 1.5 % NaCl을 첨가한 BHIA 배지에 분리균주를 도말하여 10, 25, 35, 45℃에서 24시간 배양 후 관찰하였다.

Table 1. Isolates of *Vibrio* spp. used in this study

Strain	Year	Origin	Location	* TCBS color
E05002	2002	red seabream(<i>Pagrus major</i>)	Tongyeong	Y
E05003	2002	red seabream(<i>Pagrus major</i>)	Tongyeong	G
E05005	2002	red seabream(<i>Pagrus major</i>)	Tongyeong	G
E05006	2002	red seabream(<i>Pagrus major</i>)	Tongyeong	G
E05007	2002	red seabream(<i>Pagrus major</i>)	Tongyeong	G
E05008	2002	black rock fish(<i>Sebastes inermis</i>)	Tongyeong	Y
E05009	2002	rock fish(<i>Sebastes schlegeli</i>)	Tongyeong	Y
C05011	2002	flathead mullet(<i>Mugil cephalus</i>)	Tongyeong	Y
A05021	2003	olive flounder(<i>Paralichthys olivaceus</i>)	Gangleung	G
A05022	2003	olive flounder(<i>Paralichthys olivaceus</i>)	Wando	Y
FP4051	2004	olive flounder(<i>Paralichthys olivaceus</i>)	Uljin	Y
FP4104	2004	olive flounder(<i>Paralichthys olivaceus</i>)	Jeju	G
FP4110	2004	olive flounder(<i>Paralichthys olivaceus</i>)	Jeju	G
FP4126	2004	olive flounder(<i>Paralichthys olivaceus</i>)	Jeju	G
FP4138	2004	olive flounder(<i>Paralichthys olivaceus</i>)	Ulsan	Y
FP5201	2005	rock fish(<i>Sebastes schlegeli</i>)	Tongyeong	Y
FP5088	2005	rock fish(<i>Sebastes schlegeli</i>)	Tongyeong	Y
FP5094	2005	rock fish(<i>Sebastes schlegeli</i>)	Tongyeong	Y
FP5097	2005	rock fish(<i>Sebastes schlegeli</i>)	Tongyeong	Y
FP5100	2005	rock fish(<i>Sebastes schlegeli</i>)	Tongyeong	Y
FP5158	2005	rock fish(<i>Sebastes schlegeli</i>)	Tongyeong	Y
FP5104	2005	flathead mullet(<i>Mugil cephalus</i>)	Tongyeong	Y

* TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose, Difco), Y (Yellow); G (Green).

3. *V. harveyi*의 형태학적 관찰

3.5 % NaCl이 첨가된 BHIA 배지에 *V. harveyi*를 도말하여 25 °C에서 18시간 동안 배양한 후 생리식염수에 현탁하고 10 % 중성 포르말린으로 고정한 후 슬라이드 글라스에 도말하고 자연 건조시킨 후 Leifson (1960) 법으로 염색하여 광학 현미경으로 관찰하였다 (Piccolomini et al., 1999).

4. 특이 primer 제작 및 PCR

4.1. 세균의 genomic DNA 분리

V. harveyi KCCM40866을 포함한 18개의 표준균주 (Table 2)와 분리 균주(Table 1)를 1.5 % NaCl이 첨가된 BHIB 배지를 사용하여 25 °C에서 18시간 동안 배양한 후 High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Germany)를 사용하여 DNA를 분리하였으며 -20 °C에 보관하며 사용하였다.

4.2. primer 제작

*V. harveyi*의 *rpoB* 유전자 (Accession No. EF_064408)와 GenBank에 등록된 비브리오속 세균의 *rpoB* 유전자를 비교하여 비브리오속 세균의 sequence와 차이가 뚜렷한 부위에서 forward primer VH-K1과 reverse primer VH-K2를 제작하였다.

4.3. PCR amplification

PCR amplification은 각각의 10pmol primer를 1 μ l씩, 분리된 DNA

templet 1 μ l, DEPC water 17 μ l를 PCR premix (Bioneer, Korea)에 첨가하여 수행하였다. PCR cycle은 94 $^{\circ}$ C 5분간 predenaturation 시킨 후, 94 $^{\circ}$ C 30초 denaturation, 60 $^{\circ}$ C 30초 annealing, 72 $^{\circ}$ C 30 초간 extention 반응을 1 cycle로 하여 30 cycles을 반응시켰다. 그리고, 30 cycle이 지난 뒤에는 72 $^{\circ}$ C 7분간 final extention time을 주었다. PCR 생성물은 1 % agarose (with 0.5 μ g/ml EtBr)에 넣어 전기용매 1 $\times$ TAE buffer에서 100V로 20분간 전기영동하여 결과를 관찰하였다.

4.4. 특이 primer를 이용한 어병세균 중 *V. harveyi*의 비율 조사

2006년 7월~8월 동안 제주지역의 병어를 포함한 양식넙치의 질병을 검사한 결과 총 50개의 세균이 분리되었고, 분리된 세균은 API 20E kit를 사용하여 동정하였다. 50개의 세균은 TCBS 배지와 SS (Salmonella Shigella, Difco) 배지에 도말하여 색깔을 확인하였고, TCBS 배지에서 yellow 혹은 green 색으로 자라는 colony는 본 연구에서 제작한 특이 primer를 사용하여 PCR 하였다.

5. RAPD analysis

RAPD analysis는 (Alavani et al., 2006) 방법을 변형하여 사용하였다. 10bp random primer 20개 중 *V. harveyi*와 다른 비브리오속에 속하는 균주를 구분할 수 있도록 profile 경향을 보이는 primer인 P3 (5'-AGG GGT CTT G-3')를 선정하여 PCR을 실시하였다. PCR 반응은 17 μ l DEPC water, 2 μ l P3 primer, 1 μ l DNA templet를 PCR premix와 혼

합하고, PCR cycle은 94 °C 5분간 predenaturation 시킨 후, 94 °C 1분 denaturation, 37 °C 1분 annealing, 72 °C 1분간 extention 반응을 1cycle로 하여 45cycles을 반응시켰다. 그리고, cycle이 지난 뒤에는 72 °C 10분간 final extention time을 주었다. PCR 생성물은 1 % agarose (with 0.5 μ g/ml EtBr)에 넣어 전기용매 1×TAE buffer에서 100V로 20분간 전기영동하여 결과를 관찰하였다.

6. *V. harveyi*의 hemolysin gene Cloning

*V. harveyi*의 DNA를 *V. harveyi* hemolysin gene target primer (Table3)를 사용하여 PCR한 후 (Zhang et al., 2001) 1kb 크기의 product를 잘라서 gel illution kit (Gene All, Korea)를 사용하여 정제하였다. 정제된 PCR 산물을 Topo TA Cloning kit를 사용하여 cloning하고 plasmid 분리 kit (Gene All, Korea)를 사용하여 plasmid를 분리하였고 SOLGENT (Korea)에 의뢰하여 sequencing을 실시하였다. 각각의 염기서열들은 MACAW program (version 2.0.5., National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)와 BioEdit program (version 7.0.5.3)을 사용하여 각 균종간의 상동성을 비교하였다.

7. *V. harveyi* 백신 제조

7.1. *V. harveyi* FKC (Formalin Killed Cell) 제작

분리균주 FP4138, E05003, C05011와 reference strain인 KCCM40866

을 3.5 % NaCl이 첨가된 BHIA배지에 접종하여, 25 °C에서 24시간 배양 후 생리식염수에 현탁하고 현탁액 총량의 0.3 %가 되게 37 % formaldehyde을 첨가하였다. 이것을 4 °C에서 24시간 유지 시키고 7,000rpm에서 15분간 원심 분리하여 0.02 % sodium azide가 첨가된 생리식염수에 현탁하여 농도를 100 mg/ml로 맞춘 후 4 °C에서 보관하였다.

7.2. *V. harveyi* HKC (Heat Killed Cell) 제작

3.5 % NaCl이 첨가된 BHIA배지에 도말하여 25 °C에서 24시간 배양한 *V. harveyi* 균주를 생리식염수에 현탁하여 100 °C에서 15분 동안 가열하여 원심 분리하고(Abbott et al.,1980), pellet을 0.02 % sodium azide가 첨가된 생리식염수에 현탁하여 농도를 100 mg/ml로 맞춘 후 사용할 때까지 4 °C에서 보관하였다.

8. *V. harveyi*에 대한 polyclonal antibody 제작

제작된 4종류의 FKC를 FCA (Freund's Adjuvan Complete, Sigma)와 1:1로 혼합하여 농도를 50 mg/ml로 맞춘 후 건강한 토끼의 피하에 2ml씩 주사하였다. 2주 후 동량의 FIA (Freund's Adjuvant Incomplete, Sigma) 혼합 FKC를 동일한 방법으로 주사한 다음, 다시 2주후 동량의 FKC를 멸균 생리식염수와 1:1로 혼합하여 주사하였다. 3차 주사가 끝난 뒤 2주 후 토끼의 심장에서 채혈하여 실온에서 1시간 반응시키고 4 °C에서 overnight 시킨 후 6,000rpm에서 10분간 원심 분리하여 혈청을 분리한 다음 사용할 때 까지 -80 °C에서 보관하였다.

9. Slide agglutination

슬라이드 글라스에 *V. harveyi* 토끼 항혈청을 25 μl 떨어뜨리고 *V. harveyi* HKC를 25 μl 떨어뜨린 후 잘 섞어 30초 이내에 응집이 생기는지를 확인하였다. FKC에 대해서도 같은 방법으로 실시하였다.



Table 2. Bacterial reference strains used in this study

Bacterial Species	Strain Number	
<i>Vibrio harveyi</i>	*KCCM40866	ATCC14126
<i>V. parahaemolyticus</i>	KCCM41664	ATCC27969
<i>V. alginolyticus</i>	KCCM40513	ATCC17749
<i>V. proteolyticus</i>	KCCM11992	ATCC15338
<i>V. mimicus</i>	KCCM40826	ATCC33653
<i>V. fluvialis</i>	KCCM40827	ATCC33809
<i>V. penaeicida</i>	KCCM40869	ATCC51841
<i>V. cholera</i>	KCCM41626	ATCC14035
<i>V. ordalii</i>	KCCM41669	ATCC33509
<i>V. fisheri</i>	KCCM41685	ATCC7744
<i>V. salmonella</i>	KCCM41663	ATCC43839
<i>V. diazotrophicus</i>	KCCM41666	ATCC33466
<i>V. aestuarianus</i>	KCCM40863	ATCC35048
<i>V. furnissi</i>	KCCM41679	ATCC35016
<i>V. campbelli</i>	KCCM41986	ATCC25920
<i>V. carcariae</i>	KCCM40865	ATCC35084
<i>Escherichia coli</i>	KCCM11234	ATCC25922
<i>Staphylococcus aureus</i>	KCCM12214	ATCC25923

*KCCM; Korean Culture Center of Microorganism.

Table 3. Primer of sequences and expected size of amplicon in PCR

Primer	Direction	Sequence(5' → 3')	Target gene	Expected size (bp)
VH1	forward	AAC GAG TTA TCT GAA CCT TC	16S rRNA	413
VH2	reverse	GCA GCT ATT AAC TAC ACT ACC		
VH-K1	forward	CAA GGC ACA CTT GAC GAG CT	<i>rpoB</i>	638
VH-K2	reverse	AAA CCG CCT TCT TCA GTT AA		
VH1F	forward	TCA TGA ATA AAA CTA TTA CG	<i>hemolysin</i>	1250
VH1R	reverse	GAA AGG ATG GTT TGA CAA T		

10. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

3.5 % NaCl이 첨가된 BHIA 배지와 BHIB 배지에 도달하여 25℃에서 24시간 배양한 *V. harveyi* 균주를 생리식염수에 현탁하여 흡광도계로 $A_{600}=2.0$ 으로 조절하여 균수를 일정하게 조절하였다. 30초 간격으로 10분간 sonicate한 다음 2×sample buffer (0.12 M Tris-HCl, 4 % SDS, 20 % glycerol, 5 mM 2-mercaptoethanol)와 1:1로 혼합 후 100 ℃에서 10분간 끓여서 준비하였다. 12 % SDS-polyacrylamide gel에 준비된 시료를 15 μ l씩 loading하고 100V에서 2시간 동안 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 gel은 Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하고 탈색하여 관찰하였다.

11. Immunoblotting analysis

SDS-PAGE한 gel에 Nitricellulose membrane (NC) paper (Amersham Biosciences, Germany)를 얹어서 100V에서 1시간 동안 transformation (BIO-RAD)하였고, 그 후 NC paper를 Tween 20이 포함된 PBS로 5회 세척한 후 1 % BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma)로 1시간 동안 blocking 하였다. T-PBS로 5회 세척한 후 앞서 제작한 토끼 항혈청인 rabbit anti-*V. harveyi* FP41387, E05003, C05011, KCCM40866 각각을 10^{-2} 으로 희석하여 4 ℃에서 overnight 시킨 후 T-PBS로 5회 세척하였다. 2차 항체로는 anti-rabbit IgG (Sigma)를 5×10^{-3} 으로 희석하여 1시간 동안 반응시킨 후 T-PBS로 5회 세척하여 BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate, Sigma)와 NBT (Nitro Blue Tetrazolium, Sigma)를 첨가하여 발색시켜 관찰하였다.

12. Vaccination test

12.1. FKC injection

V. harveyi C05011 FKC를 FCA와 1:1로 혼합하여 15 g의 넙치에 10 mg/kg body weight로 100 μ l씩 복강 주사하였다. 2주 후 같은 방법으로 FKC와 FIA를 1:1로 혼합하여 주사하였다. 백신 주사 후 수온은 25 $^{\circ}$ C를 유지하고 사료는 1일 1회 투여하였다.

12.2. Challenge test

백신을 주사한 넙치를 2차 백신주사 후 2주일째 공격 실험을 실시하였다. 공격 실험은 서로 다른 type 군주에 대해 cross protection이 있는지 알아보려고 4종의 군주 FP4138, E05003, C05011, KCCM40866를 사용하여 실시하였다. 3.5 % NaCl이 첨가된 BHIA 배지에 도말하여 25 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양한 *V. harveyi* 군주는 생리식염수에 현탁하여 군수를 10^8 CFU/ml로 조절하였으며, 건강한 넙치를 MS-222로 마취한 후 세균 현탁액을 100 μ l씩 10마리에 복강 주사하고, 수온은 25 $^{\circ}$ C를 유지하였다. 폐사어는 해부 후 신장과 비장으로부터 균을 분리하여 1.5 % NaCl이 첨가된 BHIA 배지와 TCBS 배지에 도말하여 원인균을 확인하였다.

Ⅲ. 결과

1. 분리균주의 생화학적 성상

API 20E kit를 사용하여 생화학적 성상을 조사한 결과 22개의 균주가 생화학 성상이 모두 유사하게 나타났으나 그 중 FP4110, E05003, E05005, E05006, E05007, E05008, E05009, C05011, A05022 균주는 arginine dihydrolase, lysine decarboxylase, ornithine decarboxylase, citrate utilization, acetoin production 반응에서 -/+ / + / + / - 으로 하나의 그룹을 형성하여, 다른 균주들과 차이를 보였으며, 이 결과는 참조균주 KCCM40866와 동일하였다 (Table 4).

Table 4. ONPG, beta-galactosidase; ADH, arginine dihydrolase; LDC, lysine decarboxylase; ODC, ornithine decarboxylase; CIT, citrate utilization; H₂S, H₂S production; URE, urease; TDA, tryptophane desaminase; IND, indole production; VP, acetoin production; GEL, gelatinase; GLU, glucose fermentation; MAN, mannitol fermentation; INO, inositol fermentation; SOR, sorbitol fermentation; RHA, rhamnose fermentation; SAC, sucrose fermentation; MEL, melibiose fermentation; AMY, amygdalin fermentation; ARA, arabinose fermentation; OX, cytochrome-oxidase. 1, FP4138; 2, FP4104; 3, FP4110; 4, FP4126; 5, FP4138; 6, FP5201; 7, FP5088; 8, FP5094; 9, FP5097; 10, FP5100; 11, FP5158; 12, FP5104; 13, E05002; 14, E05005; 15, E05005; 16, E05007; 17, E05007; 18, E05008; 19, E05009; 20, C05011; 21, A05021; 22, A05022; 23, KCCM40866.

Table 4. Biochemical characteristics of isolates and reference strain

Test	Strain																						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
ONPG	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ADH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LDC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ODC	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
URE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TDA	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IND	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GEL	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MAN	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
INO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SOR	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-
RHA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SAC	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
MEL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AMY	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ARA	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OX	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

2. 분리균주의 배양 조건에 따른 발육시험

분리균주의 성장에 영향을 미치는 온도, pH, NaCl 농도에 관하여 조사한 결과 대부분의 균주가 수온이 25~35 ℃까지는 잘 자랐으나 10 ℃, 45 ℃에서는 자라지 못하였으며, 모든 균주가 pH 9에서는 증식하였으나 pH 4에서는 증식 하지 못하였다. 염분농도에 따른 발육실험에서는 대부분의 균주가 6.5~7.5 %까지 잘 자랐으며, 그 이상의 농도에서는 자라지 못하였다. 그러므로 배양조건에 따른 균주 간의 차이는 알 수 없었다. 하지만 22균주 중 FP5088, FP5094, FP5097, FP5158 균주는 45 ℃에서 자랐으며, 염분농도 10 %에서도 잘 자라서 다른 균주들과는 확연히 구분되었다 (Table 5).



Table 5. 1, FP4138; 2, FP4104; 3, FP4110; 4, FP4126; 5, FP4138; 6, FP5201; 7, FP5088; 8, FP5094; 9, FP5097; 10, FP5100; 11, FP5158; 12, FP5104; 13, E05002; 14, E05005; 15, E05005; 16, E05007; 17, E05007; 18, E05008; 19, E05009; 20, C05011; 21, A05021; 22, A05022; 23, KCCM40866.

Table 5. Physiological characteristics of the isolates and reference strain

Test	Strain																						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Temp. (°C)	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	35	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pH	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl (%)	1.5~ 6.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	7.5	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+
	8.5	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	w	+	-	-	-	-	-
	9.5	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10.5	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

W, weak.

3. *V. harveyi*의 형태학적 관찰

3.5 % NaCl이 첨가된 BHIA 배지에서 18시간 배양하여 균의 형태를 관찰한 결과, 약간 굽은 간균의 전형적인 비브리오균의 형태였으며, 편모를 관찰할 수 있었고, 양극염색성이 강하게 나타났다. FP4138, E05003, KCCM40866 균주에 비해 C05011 균주가 특이적으로 길이가 많이 길어진 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 1).

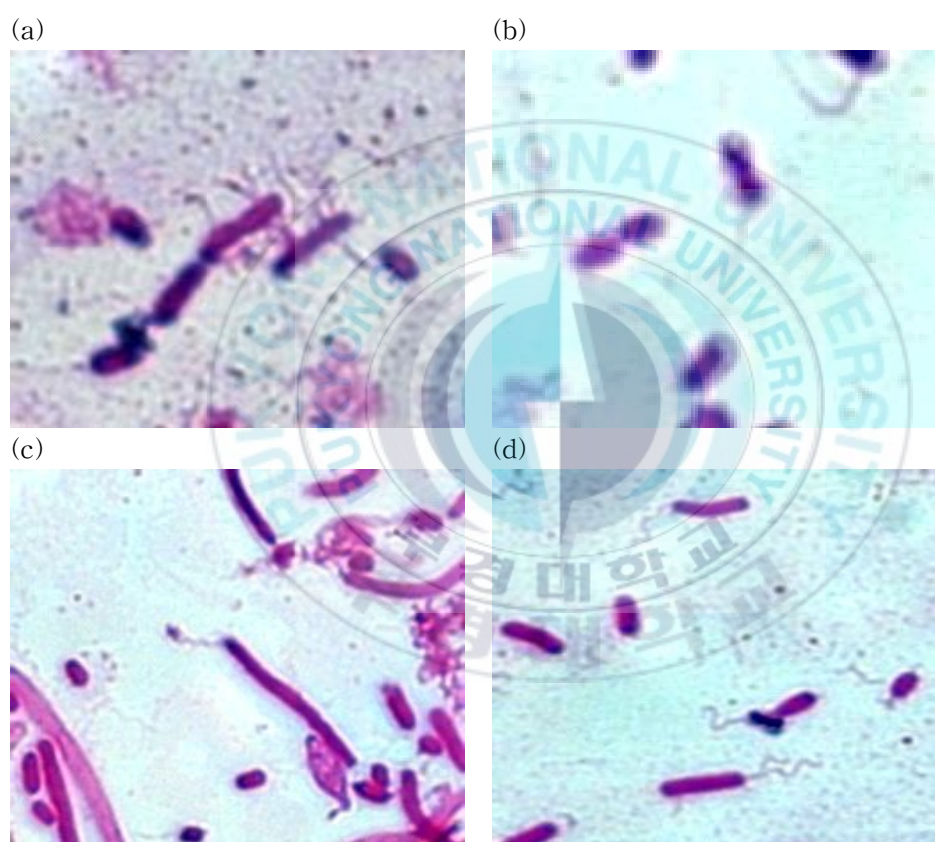


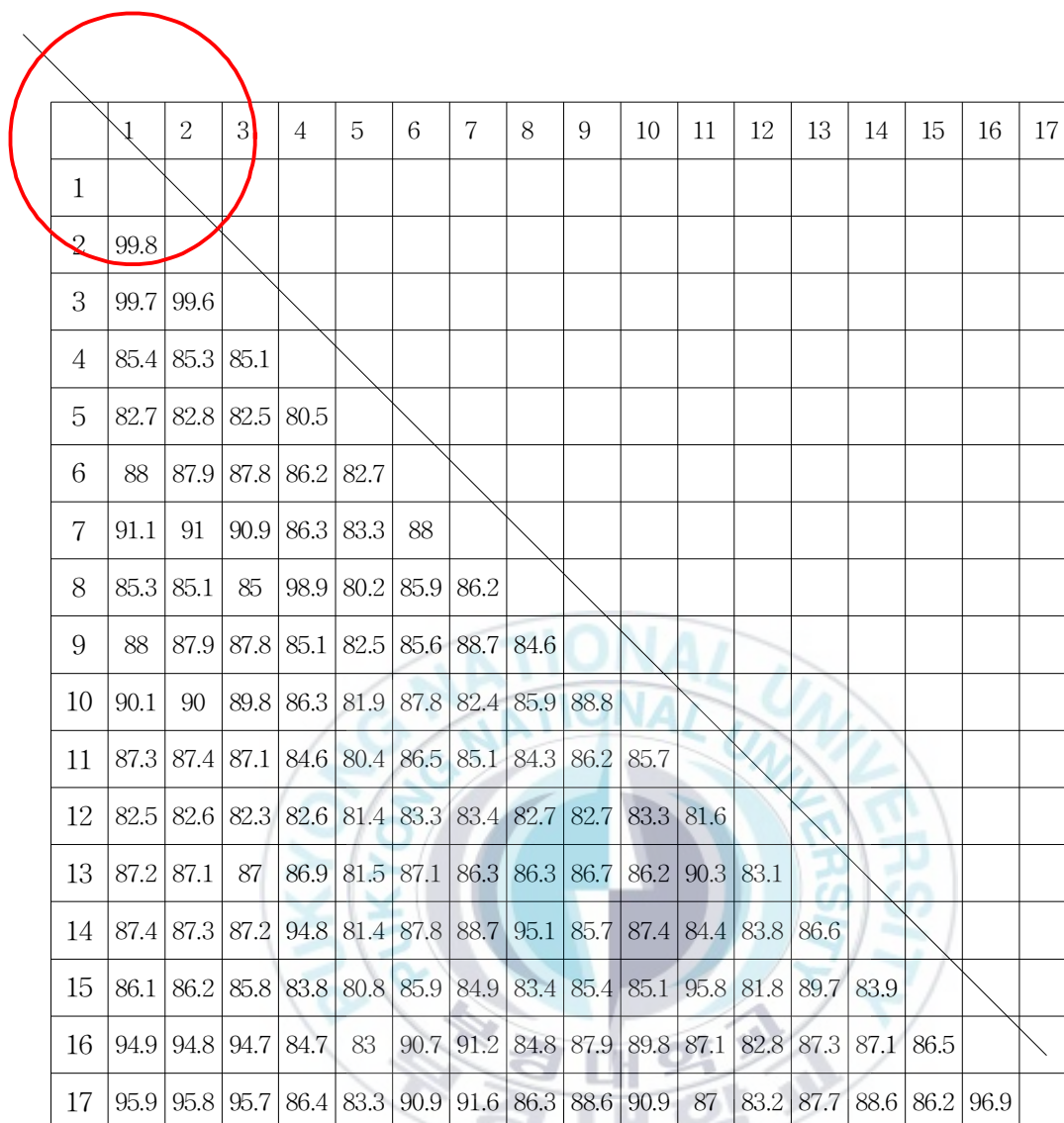
Fig. 1. Morphology of *Vibrio harveyi* isolates and reference strain. (a), FP4138; (b), FP4110; (c), C05011; (d), KCCM40866.

4. 특이 primer 제작 및 PCR

4.1. 특이 primer 제작

비브리오속 균주들의 RNA polymerase subunit B (*rpoB*) 부분을 비교한 결과 *V. harveyi*의 유전자가 다른 비브리오속 세균의 유전자와 차이가 있어다 (Fig. 2). 그래서 비교적 차이가 뚜렷한 103~122 bp 부위로 부터 forward primer VH-K1을 제작하였으며 721~741 bp 부위로 부터 reverse primer VH-K2를 제작하였다 (Fig. 3).





	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1																	
2	99.8																
3	99.7	99.6															
4	85.4	85.3	85.1														
5	82.7	82.8	82.5	80.5													
6	88	87.9	87.8	86.2	82.7												
7	91.1	91	90.9	86.3	83.3	88											
8	85.3	85.1	85	98.9	80.2	85.9	86.2										
9	88	87.9	87.8	85.1	82.5	85.6	88.7	84.6									
10	90.1	90	89.8	86.3	81.9	87.8	82.4	85.9	88.8								
11	87.3	87.4	87.1	84.6	80.4	86.5	85.1	84.3	86.2	85.7							
12	82.5	82.6	82.3	82.6	81.4	83.3	83.4	82.7	82.7	83.3	81.6						
13	87.2	87.1	87	86.9	81.5	87.1	86.3	86.3	86.7	86.2	90.3	83.1					
14	87.4	87.3	87.2	94.8	81.4	87.8	88.7	95.1	85.7	87.4	84.4	83.8	86.6				
15	86.1	86.2	85.8	83.8	80.8	85.9	84.9	83.4	85.4	85.1	95.8	81.8	89.7	83.9			
16	94.9	94.8	94.7	84.7	83	90.7	91.2	84.8	87.9	89.8	87.1	82.8	87.3	87.1	86.5		
17	95.9	95.8	95.7	86.4	83.3	90.9	91.6	86.3	88.6	90.9	87	83.2	87.7	88.6	86.2	96.9	

Fig . 2. Percentage of nucleotide sequence identity of RNA polymerase subunit B gene of *Vibrio* spp. 1, *Vibrio harveyi* EF064443; 2, *V. harveyi* EF064408; 3, *V. harveyi* EF064407; 4, *V. alginolyticus* EF064442; 5, *V. parahaemolyticus* EF064440; 6, *V. cholerae* EF064385; 7, *V. aestuarianus* EF064424; 8, *V. fluvialis* EF064372; 9, *V. huliotoxicoli* EF064427; 10, *V. mimicus* EF064439; 11, *V. nereis* EF064416; 12, *V. nigripulchri* EF064418; 13, *V. ordalii* EF064423; 14, *V. orientalis* EF064417; 15, *V. vulnificus* EF064441; 16, *Photobacterium damsela* EF064429; 17, *Listonella anguillarum* EF064422.

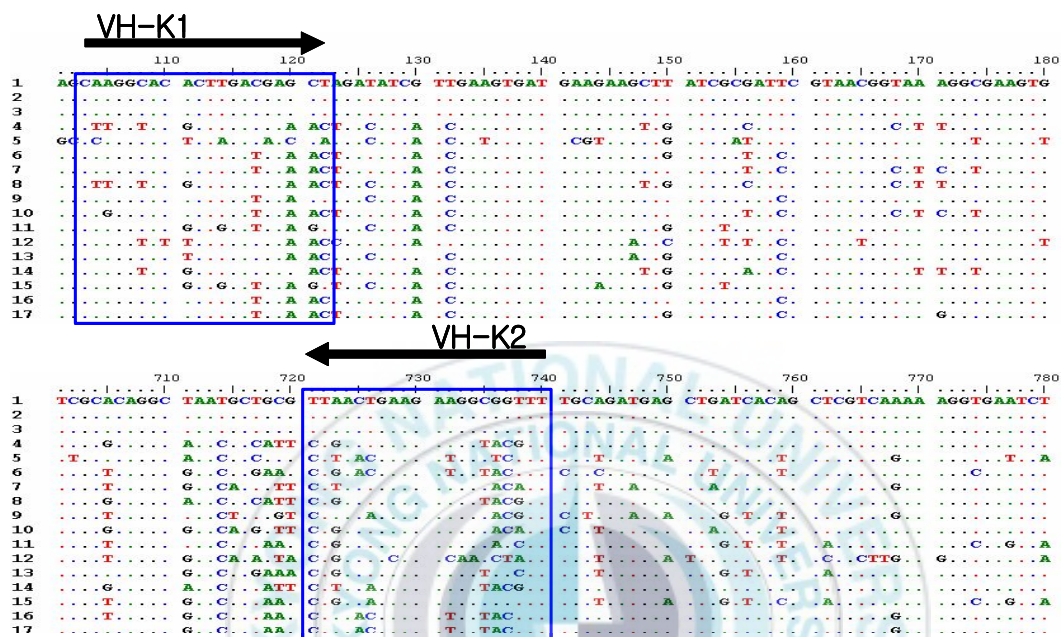


Fig. 3. Genomic region of *Vibrio* strains used for design of primers. 1, *Vibrio harveyi*; 2, *V. harveyi*; 3, *V. harveyi*; 4, *V. alginolyticus*; 5, *V. parahaemolyticus*; 6, *V. cholerae*; 7, *V. aestuarianus*; 8, *V. fluvialis*; 9, *V. hulioticoli*; 10, *V. mimicus*; 11, *V. nereis*; 12, *V. nigripulchri*; 13, *V. ordalii*; 14, *V. orientalis*; 15, *V. vulnificus*; 16, *Photobacterium damsela*; 17, *Listonella anguillarum*.

4.2. PCR 결과

18개의 비브리오속 표준균주와 포도상구균, *Escherichia coli* 표준균주를 대상으로 제작된 primer의 특이성을 조사한 결과 VH-K1과 VH-K2 primer는 *V. harveyi* KCCM40866 균주만을 특이적으로 증폭시켜 638 bp의 산물을 형성하였으며, 다른 표준균주에는 PCR 산물을 형성하지 않았다 (Fig. 4).

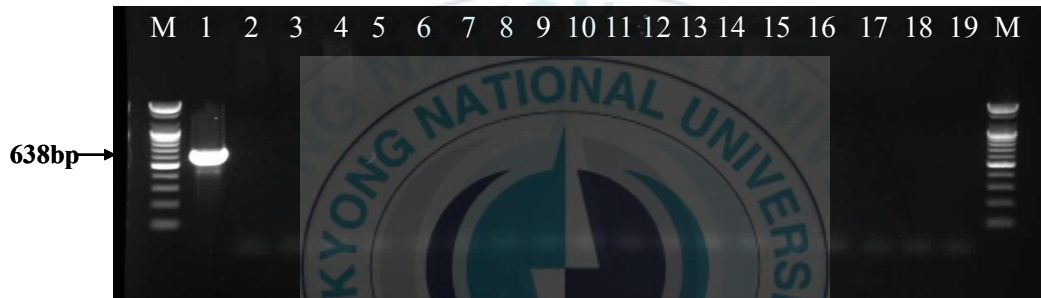


Fig. 4. PCR amplification from nucleic acid of reference strains with *Vibrio harveyi* specific primer VH-K1 and VH-K2. M, 100 bp DNA ladder; lane 1, *V. harveyi* KCCM40866; lane 2, *V. parahaemolyticus* KCCM41664; lane 3, *V. alginolyticus* KCCM40513; lane 4, *V. proteolyticus* KCCM11992; lane 5, *V. mimicus* KCCM42257; lane 6, *V. fluvialis* KCCM40827; lane 7, *V. penaeicida* KCCM40869; lane 8, *V. cholerae* KCCM41626; lane 9, *V. ordalii* KCCM41669; lane 10, *V. fisheri* KCCM41685; lane 11, *V. salmonella* KCCM41663; lane 12, *V. diazotrophicus* KCCM41666; lane 13, *V. aestuarianus* KCCM40863; lane 14, *V. furnissi* KCCM41679; lane 15, *V. campbelii* KCCM41986; lane 16, *V. carchariae* KCCM40865; lane 17, *Escherichia coli* KCCM11234; lane 18, *Staphylococcus aureus* KCCM12214; lane 19, negative control.

또한, 22개의 분리균주에 대해서도 같은 조건으로 PCR한 결과 11개의 균주가 638 bp의 산물을 형성하였다 (Fig. 5).



Fig. 5. PCR amplification from nucleic acid of isolates with *Vibrio harveyi* specific primer VH-K1 and VH-K2. M, 100 bp DNA ladder; lane 1, FP4051; lane 2, FP4104; lane 3, FP4110; lane 4, FP4126; lane 5, FP4138; lane 6, FP5201; lane 7, FP5100; lane 8, FP5158; lane 9, FP5104; lane 10, E05002; lane 11, E05003; lane 12, E05005; lane 13, E05006; lane 14, E05007; lane 15, E05008; lane 16, E05009; lane 17, C05011; lane 18, A05021; lane 19, A05022.

4.3. 특이 primer를 이용한 어병세균 중 *V. harveyi*의 비율 조사

50개의 세균 중 TCBS 배지에서 yellow 혹은 green으로 자란 세균은 19개 균주였으며, 연쇄상구균이 16균주, *Edwardsiella tarda*가 9균주, 미동정 균주가 9균주였다. 19개의 비브리오속 균주를 VH-K1, VH-K2 primer를 이용하여 PCR한 결과 19개의 균주 중 12개의 균주가 638 bp의 PCR 산물을 형성 하였다. 비브리오속 균주 19개의 균주 중 PCR 산물을 형성하지 않은 6개의 균주는 API 20E 결과 정확하게 동정이 되지 않았으므로 *Vibrio* sp.로 분류하였다(Fig. 6).

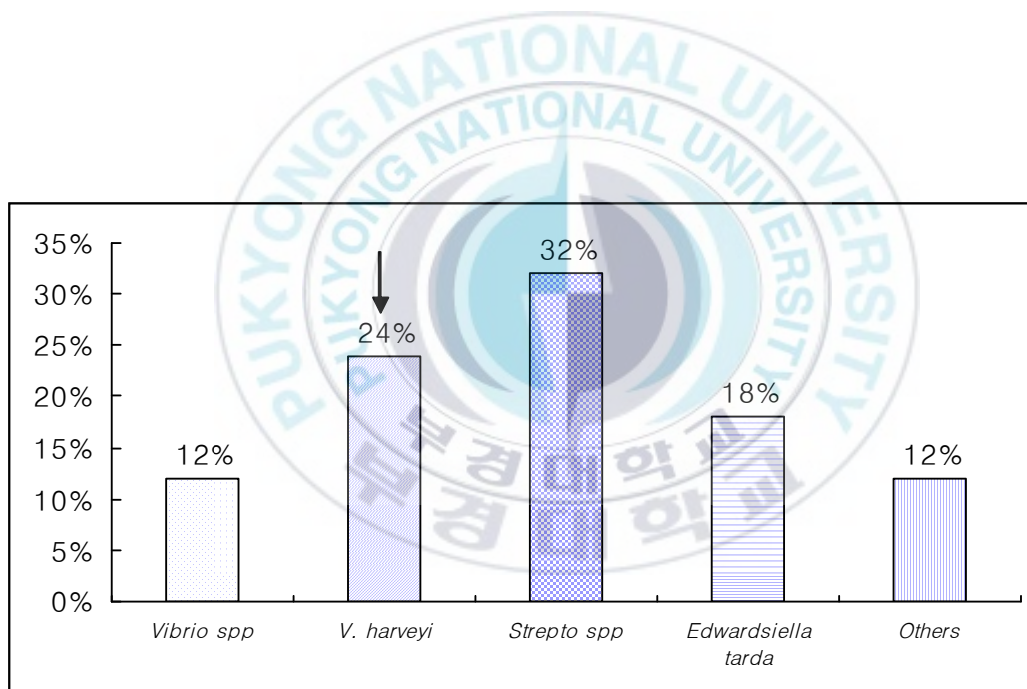


Fig. 6. *Vibrio harveyi* rate (%) of isolated bacterias from cultured olive flounder, *paralichthys olivaceus* in 2006, in Jeju.

5. RAPD analysis

Random primer인 P3 primer를 사용하여 RAPD-PCR을 실시하여 양식어류에서 분리된 *V. harveyi* 간의 차이를 비교해 보고자 하였다. 전체 22개의 분리균주 중 11개의 균주가 RAPD-PCR profile이 유사한 경향을 나타내었고 11개의 균주 모두는 1 kb size와 250 bp size에 main band를 형성 하였으며 FP4138, FP5201, E05003, E05005, E05006, E05007, E05008, E05009, C05011, A05022의 경우 약 500 bp size의 band가 하나 더 형성되었다 (Fig. 7).

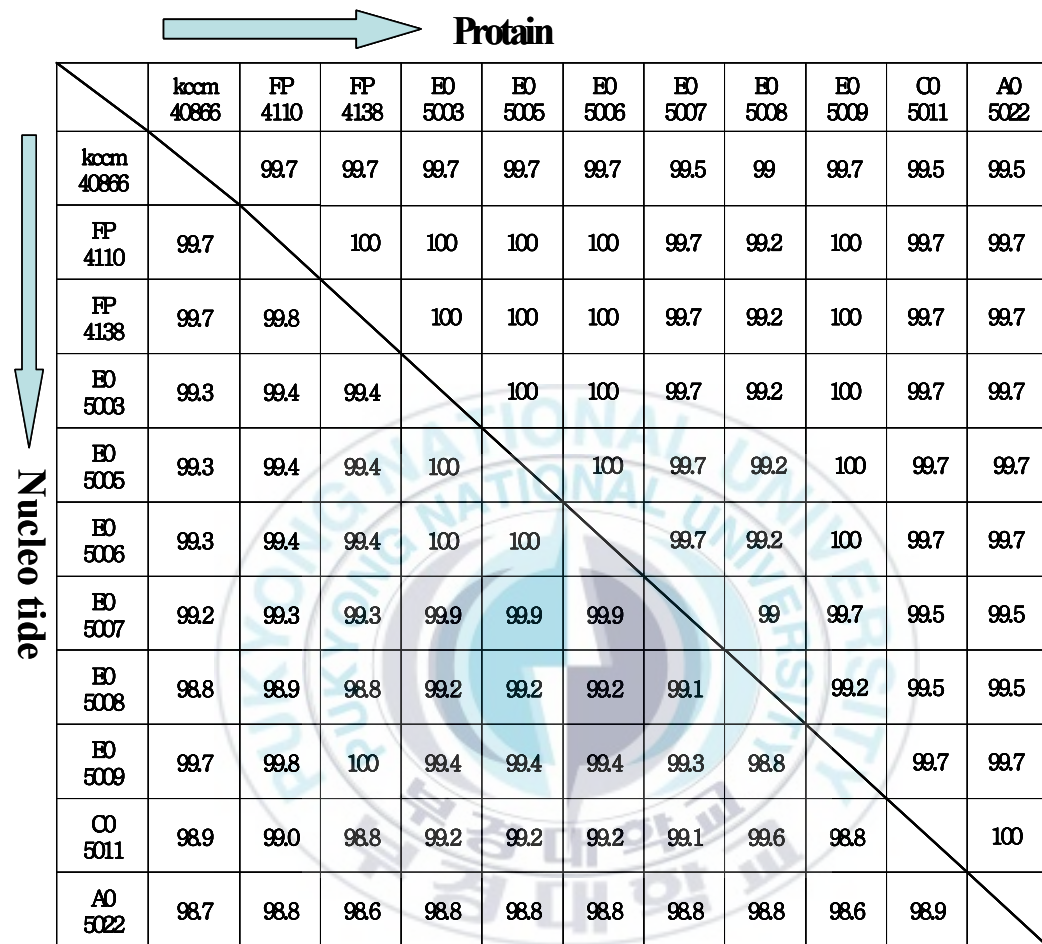


Fig. 7. RAPD-PCR profiles obtained from the nucleic acid of isolates. Lane M, 100bp DNA ladder; lane 1, FP4051; lane 2, FP4104; lane 3, FP4110; lane 4, FP4126; lane 5, FP4138; lane 6, FP5201; lane 7, FP5088; lane 8, FP5094; lane 9, FP5097; lane 10, FP5100; lane 11, FP5158; lane 12, FP5104; lane 13, E05002; lane 14, E05003; lane 15, E05005; lane 16, E05006; lane 17, E05007; lane 18, E05008; lane 19, E05009; lane 20, C05011; lane 21, A05021; lane 22, A05022.

6. *V. harveyi*의 hemolysin gene sequence

VH-K1, VH-K2 primer를 사용한 PCR 결과 22개의 분리균주 중 11균주가 *V. harveyi*로 동정되었고, 이 균주들의 hemolysin gene의 sequencing 결과 11개 균주 간의 일부 차이가 있었지만 서로 간의 상동성이 98~100 %로 매우 유사하게 나타났고 (Fig. 8), 단백질 성상 또한 99 % 이상의 상동성을 나타내어서 균주간의 차이를 확인할 수 없었다. 그러나 GenBank에 등록되어 있는 다른 비브리오속 균주의 hemolysin gene과 비교한 결과 이번 실험에서 사용한 분리균주들과 reference strain인 KCCM40866 균주는 같은 그룹에 속하였고, *V. harveyi*와 상동성이 매우 높은 것으로 알려져 있는 *V. campbelli*와 *V. parahaemolyticus* 등의 다른 비브리오속의 균주들과는 같은 그룹을 형성하지 않고 독립적인 그룹을 형성하였다 (Fig. 9).





	kccm 40866	FP 4110	FP 4138	EO 5008	EO 5005	EO 5006	EO 5007	EO 5008	EO 5009	CO 5011	AO 5022
kccm 40866		99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.5	99	99.7	99.5	99.5
FP 4110	99.7		100	100	100	100	99.7	99.2	100	99.7	99.7
FP 4138	99.7	99.8		100	100	100	99.7	99.2	100	99.7	99.7
EO 5008	99.3	99.4	99.4		100	100	99.7	99.2	100	99.7	99.7
EO 5005	99.3	99.4	99.4	100		100	99.7	99.2	100	99.7	99.7
EO 5006	99.3	99.4	99.4	100	100		99.7	99.2	100	99.7	99.7
EO 5007	99.2	99.3	99.3	99.9	99.9	99.9		99	99.7	99.5	99.5
EO 5008	98.8	98.9	98.8	99.2	99.2	99.2	99.1		99.2	99.5	99.5
EO 5009	99.7	99.8	100	99.4	99.4	99.4	99.3	98.8		99.7	99.7
CO 5011	98.9	99.0	98.8	99.2	99.2	99.2	99.1	99.6	98.8		100
AO 5022	98.7	98.8	98.6	98.8	98.8	98.8	98.8	98.8	98.6	98.9	

Fig. 8. Percentage of nucleotide and amino acid sequence identity of haemolysin gene of *Vibrio harveyi* isolates and reference strain.

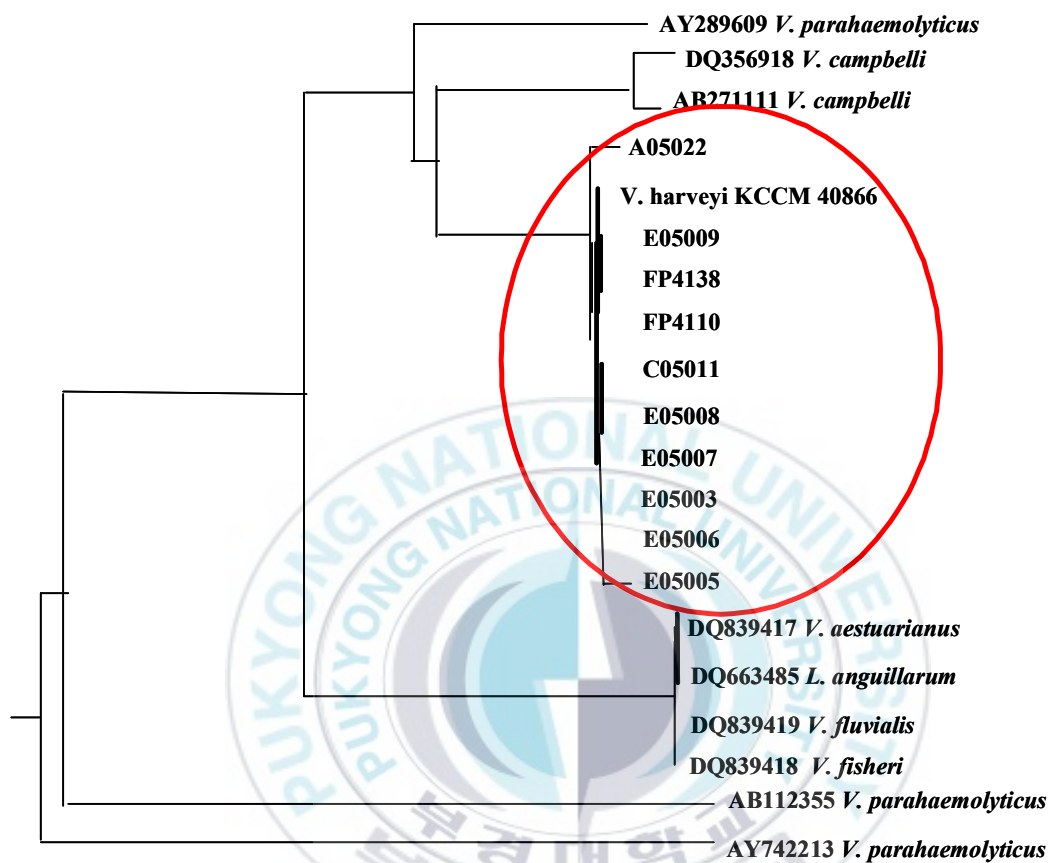


Fig. 9. Phylogenetic tree showing the relationships between the identified hemolysin gene sequences of isolates and reference strain. Name and accession numbers are given as cited in the GenBank database.

7. Slide agglutination에 의한 *V. harveyi*의 구분

FP4138, E05003, C05011, KCCM40866 균주에 대한 토끼 항혈청으로 슬라이드 응집반응을 실시한 결과 항원으로 FKC를 사용하였을 경우 각 항혈청에 대한 특이적인 균주에서만 응집이 일어났다. 그러나 항원으로 HKC를 사용하여 응집반응을 실시한 결과 4종의 항혈청 모두 대부분의 균주에서 응집이 일어났으며, 특히 C05011 항혈청의 경우 모든 균주에서 강한 응집이 일어났다 (Table 6).

Table 6. Slide agglutination test of *Vibrio harveyi* isolates and reference strain

FKC					HKC			
Antisera				Antigen	Antisera			
FP4138	E05003	C05011	KCCM 40866		FP4138	E05003	C05011	KCCM 40866
-	+++	-	-	FP4110	-	+++	+++	+
+++	-	-	-	FP4138	+++	++	+++	++
-	-	-	-	FP5201	++	++	+++	+++
-	+++	-	-	E05003	++	+++	+++	++
-	+++	-	-	E05005	++	+++	+++	++
-	+++	-	-	E05006	+	+++	+++	++
-	-	-	-	E05007	+++	+	+++	++
-	-	-	-	E05008	++	+++	+++	++
-	-	-	-	E05009	++	+++	+++	+++
-	-	+++	-	C05011	+++	+++	+++	+++
-	-	-	-	A05022	+++	+	+++	+++
-	-	-	+++	KCCM 40866	+++	+++	+++	+++

(-) no agglutination; (+) weakly agglutination; (++) middly agglutination; (+++) strong agglutination.

8. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

3종의 분리균주 FP4138, E05003, C05011과 KCCM40866에 대하여 SDS PAGE로 단백질 pattern을 분석한 결과 luminosense *V. harveyi*인 KCCM40866 경우 47~34 kDa 사이의 밴드에서 나머지 3균주와는 조금 다른 pattern을 나타냈지만 FP4138, E05003, C05011 균주 사이에는 뚜렷한 차이가 나타나지 않았다 (Fig. 10).

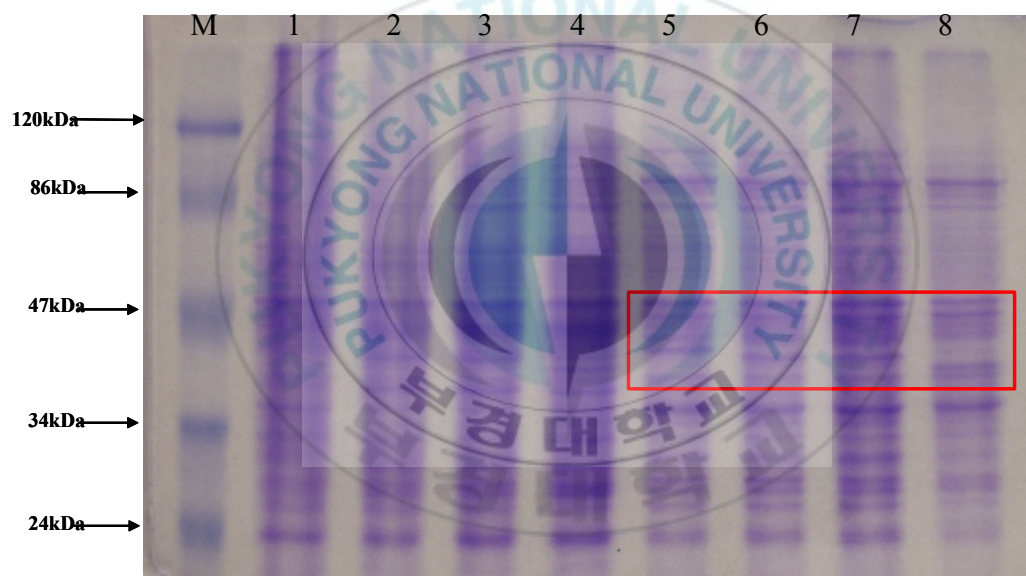


Fig. 10. Electrophoretic protein patterns of *Vibrio harveyi* whole cell. Lane M, prestain marker; lane 1, FP4138 plate culture; lane 2, E05003 plate culture; lane 3, C05011 plate culture; lane 4, KCCM40866 plate culture; lane 5, FP4138 broth culture; lane 6, E05003 broth culture; lane 7, C05011 broth culture; lane 8, KCCM40866 broth culture.

9. Immunoblotting analysis

3종의 분리균주 FP4138, E05003, C05011와 KCCM40866에 대하여 각 항체별로 western blot을 실시한 결과는 (Fig. 11)과 같다. SDS-PAGE 결과와 마찬가지로 luminosense *V. harveyi*인 KCCM40866은 34 kDa의 밴드와 34~26 kDa 사이의 밴드에서 FP4138, E05003, C05011과 비교하여 다른 경향을 보였다. 그러나 분리균주들 사이에서는 뚜렷한 차이는 나타나지 않았다.



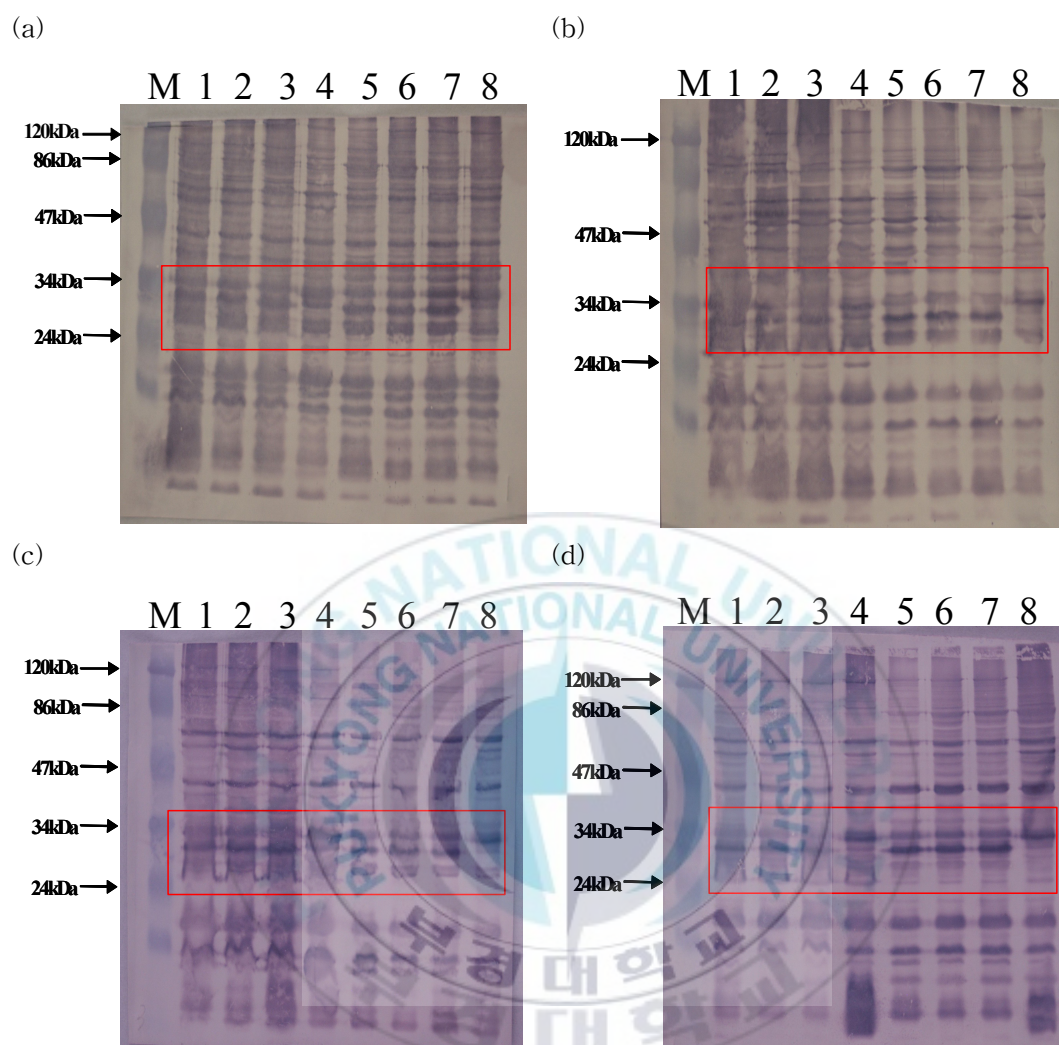


Fig. 11. Immunoblotting analysis. (a), antiserum FP4138; (b), antiserum E05003; (c), antiserum C05011; (d), antiserum KCCM40866. lane M, prestain marker; lane 1, FP4138 plate culture; lane 2, E05003 plate culture; lane 3, C05011 plate culture; lane 4, KCCM40866 plate culture; lane 5, FP4138 broth culture; lane 6, E05003 broth culture; lane 7, C05011 broth culture; lane 8, KCCM40866 broth culture.

10. Vaccination test

백신 주사 후 공격실험을 실시하기 전까지 실험구에서 한 마리의 폐사도 나타나지 않았으며, 공격실험 후에도 실험구에서 2주 동안 한 마리의 폐사도 나타나지 않았다. 그러나 대조구로 백신을 주사하지 않은 어류는 FP4138, E05003, C05011 균주에 대해 70~100 %폐사를 나타냈으며, KCCM40866 균주에 대해서는 폐사가 전혀 나타나지 않았다. 폐사는 2일째부터 시작하여 4일째까지 지속되었으며 그 이후로는 폐사가 나타나지 않았다 (Fig. 12).

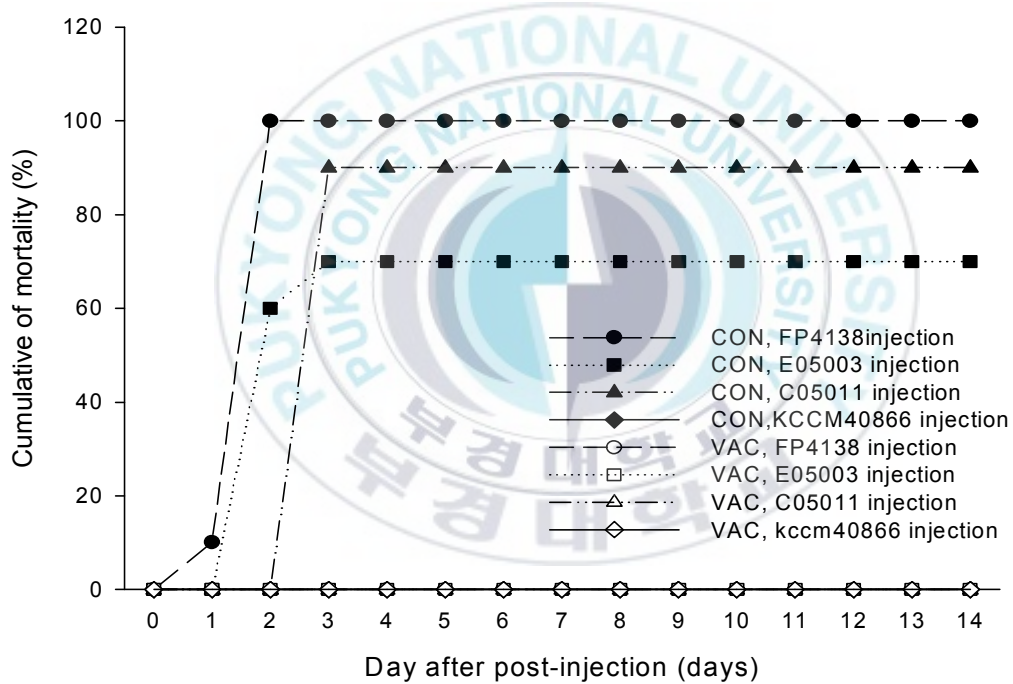


Fig. 12. Effect of formalin killed vaccines administered by intraperitoneal injection on the mortality (%) of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. CON, control; VAC, vaccination.

VI. 고찰

*V. harveyi*는 새우류 뿐만 아니라 어류에서도 많은 감염을 일으켜서 경제적인 피해를 내고 있으며, 우리나라에서 양식넙치에 감염되어 폐사를 일으킨 예가 있으며 (원 등, 2006), 감염된 넙치의 증상은 복부팽만, 탈장, 지느러미 갈라짐 등의 외부증상과 출혈성 복수, 간·장출혈, 비장 위축 등의 내부증상을 나타낸다 (Soffientino et al., 1999). 에드워드병, β -용혈성 연쇄구균증에 감염된 경우에도 복부팽만, 탈장의 증상이 있으므로 감염 증상만으로 질병의 원인을 추정하는 것은 어려우므로 신속하고 정확한 동정법이 필요하다. 비브리오속의 세균들은 그 분리와 동정에 있어서 서로간의 차이점이 크지 않아서 동정이 어렵고 오랜 시간이 소요되므로 균의 신속한 동정은 질병에 대한 빠른 처방을 위한 필수적 요소이며, 균의 정확한 동정은 예방백신제조와 효과 향상을 위하여 매우 중요하다.

본 연구에서는 *V. harveyi* 균의 정확한 동정을 위하여 국내 양식어류에서 분리된 비브리오속 세균 22균주를 선정하여 생화학적인 특성을 규명하고자, API 20E kit를 이용한 생화학적 실험, 온도, pH 및 염분농도가 균의 성장에 미치는 영향 및 형태학적 관찰 등의 실험을 수행하였다. 실험결과 FP4110, E05003, E05005, E05006, E05007, E05008, E05009, C05011, A05022, KCCM40866 균주는 arginine dihydrolase, lysine decarboxylase, ornithine decarboxylase, citrate utilization, acetoin production 반응에서 -/+ / + / + / - 으로 나타나 하나의 그룹을 형성하므로 다른 비브리오 균주들과 구분이 되었으며, 이는 이전연구 결과에서 알려

진 *V. harveyi*의 생화학 성상과 일치하였다. 이상의 생화학실험 결과에서 *V. harveyi* 유사균주 11종을 선택하였으나 다른 비브리오 종과의 확연한 차이는 나타나지 않았다. 온도영향 실험에서 *V. harveyi* 유사균주 11종을 포함한 대부분의 균주가 10 °C 와 45 °C에서는 자라지 못 하였지만 25 °C 와 35 °C에서 잘 자랐으며, 염분농도 1.5~7.5 %에서도 모든 균주가 잘 자라서 균주 간 차이가 뚜렷하지 않았으므로 생리·생화학적 성상만으로는 *V. harveyi*의 정확하고 신속한 동정은 어려운 것으로 확인되었다. 또한 실험결과 세균의 동정에 주로 사용하는 API 20E kit를 사용할 경우, *V. alginolyticus*로 잘못 동정되는 경우가 많았으며, 전통적인 생화학적 검사의 경우도 API 20E kit 보다는 정확하지만 *V. alginolyticus*로 동정되는 경우가 있고, 검사재료의 준비에도 시간이 많이 소요된다. 그러므로 생화학적 시험이나 API kit만을 사용하여 *V. harveyi*를 동정하는 것은 적합하지 않은 것으로 생각된다.

최근 연구에서는 비브리오속 세균을 보다 신속하게 동정하기 위하여 16S rRNA부위나 23S rRNA부위, 16S-23S intergenic spacer, 또는 *gyrB* 부위에 대한 비교연구를 통한 (Chun et al., 1999; Dorsch et al., 1992) 분자생물학적인 방법을 이용하기도 하지만 *V. harveyi*는 *V. alginolyticus*, *V. campbelli*, *V. natrigene*, *V. parahaemolyticus*, *V. rotifer*와 16s rRNA 부위의 상동성이 매우 높기 때문에 정확한 구분이 어려운 것으로 알려져 있다 (Nagpal et al., 1998). 그러므로 본 연구에서는 비교적 균주간의 차이가 뚜렷하다고 알려져 있는 RNA polymerase subunit B (*rpoB*) 부분을 참조하여, NCBI에서 제공하는 비브리오속의 세균들의 polymerase 부위를 비교하였고 (Tarr et al., 2007), RAPD-PCR을 통하여 균주간의 유전학적인 차이를 알아보고자하였다.

또한 *V. harveyi*의 haemolysin gene은 어류의 출혈성 패혈증을 일으키는 중요한 인자로 생각 되어지고 있으며 (Zhang et al., 2001; Zorrilla et al., 2003), 중요한 항원의 기능을 하기 때문에 분리균주의 haemolysin gene의 상동성을 비교하여 항원으로서의 차이를 알아보고자 하였다.

비브리오속 세균들의 polymerase부위를 비교한 결과 *V. harveyi*균주들의 상동성은 99 %이상이었으며, *V. harveyi*와 상동성이 높은 *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* 등과는 85 % 및 82 % 상동성을 나타내어 비교적 차이가 뚜렷하였다. 이러한 결과를 기초로하여 *rpoB* 부위의 특이영역에 대한 primer (VH-K1과 VH-K2)를 제작하였으며, 제작된 primer의 특이성을 검증하기 위하여 18개의 표준균주를 대상으로 PCR을 실시한 결과 VH-K1과 VH-K2 primer를 사용하였을 경우 18개의 표준균주 가운데 *V. harveyi* 만이 특이적으로 검출 되었다. 그러나 VH-K2 primer 대신 735~756 bp 부위를 대상으로 제작된 primer를 VH-K1과 함께 사용하여 PCR을 실시한 경우에는 *V. harveyi* KCCM40866 균주뿐만 아니라 *V. campbellii* KCCM41986도 PCR 산물의 형성이 확인되어서 VH-K1과 VH-K2의 사용에 비하여 특이성이 떨어졌다. 제작된 primer를 이용하여 22개의 분리균주를 대상으로 PCR 한 결과, 11개의 균주만이 양성반응을 나타내었고, 이들 11개의 균주는 *rpoB* 부분을 sequencing한 결과 보고된 *V. harveyi*의 *rpoB* 유전자와 일치하였다. 그러나 16S rRNA 부위를 target으로 한 참조 primer (Oakey et al., 2003)를 사용한 PCR 결과, 22개의 균주 중 19개의 균주가 양성반응을 나타내었고, 이 중 VH-K1과 VH-K2 primer에서 밴드를 형성한 11개의 균주를 제외한 나머지 8개의 균주들은 *rpoB* 유전자를 sequencing 결과, *V. harveyi*가 아닌 것으로 확인되었다. 그러므로 *rpoB*부위에 대한

VH-K1과 VH-K2 primer를 사용할 경우 병어에서 분리되는 *V. harveyi*를 신속하고 정확하게 동정할 수 있을 것으로 생각된다.

Random primer인 P3 primer를 사용하여 RAPD-PCR을 실시한 결과 분리균주 22균주 중 VH-K1과 VH-K2 primer에 의하여 *V. harveyi*로 확인된 11개의 균주에서 RAPD-PCR profile이 유사한 경향을 나타내었고 *V. harveyi*가 아닌 11개의 균주는 RAPD-PCR profile이 다르게 나타났다. 그러므로 RAPD-PCR을 통하여 *V. harveyi*의 유전학적 차이는 알 수 없었지만 다른 비브리오속의 세균과는 구분이 가능하였다.

*V. harveyi*의 haemolysin gene의 상동성을 비교하여 항원으로서의 차이를 알아보자한 실험결과 11개의 *V. harveyi* 균주와 참조균주인 KCCM40866은 균주 간 haemolysin nucleotide sequence는 98~100 % 일치하였고, protein 역시 99~100 % 일치하여 균주 간의 차이는 알 수 없었다. GenBank에 등록되어있는 다른 비브리오속 균주와 *V. harveyi*를 비교한 결과, 상동성이 높은 균주로 알려진 *V. campbelli*, *V. parahaemolyticus* 등과는 다른 그룹에 속하였다 (Gomez-Gil et al., 2003).

이상의 결과를 종합하면, 특이 primer를 이용한 PCR, random primer를 이용한 RAPD-PCR, haemolysin gene의 상동성 비교 등의 분자생물학적 실험결과에서 22개의 분리균주 중 11개의 균주가 *V. harveyi*로 확정 동정되었으며, 이상의 실험결과가 모두 일치하는 것으로 나타나 제작된 primer를 이용한 *V. harveyi*균주의 신속동정 가능성을 입증 할 수 있었다.

제작된 primer를 실제 여름철 양식넙치에서 분리된 세균의 진단에 적용하여 넙치의 세균성 질병에서 *V. harveyi*가 차지하는 비율을 조사하였

다. 2006년 7월에서 8월까지 제주지역의 병어를 포함한 넙치를 질병검사 결과 50개의 세균이 분리되었고, 분리균주를 API 20E kit를 사용하여 동정하였으며, 분리균주 중 TCBS배지에서 yellow 또는 green으로 자라는 균주를 VH-K1과 VH-K2 primer를 이용하여 동정하였다. 그 결과 비브리오속에 속한 세균이 38 % (19균주)로 가장 높았고, 비브리오속 세균 중에서도 제작된 primer를 사용하여 PCR한 결과 63 % (12균주)가 *V. harveyi*로 나타나 어병 세균으로서 중요성을 알 수 있었으며, 이는 *V. harveyi*가 비록 해수 중에 상재하는 세균이지만 여름철 수온이 20 ℃ 이상으로 올라가는 계절에 그 수가 급격히 증가한다는 보고와 관련이 있을 것으로 생각 된다 (Topmson et al., 2004).

본 연구에서는 생화학적인 분석과 분자생물학적인 분석을 통하여 동정된 11개의 *V. harveyi* 균주의 항원특성을 확인하기 위하여 TCBS배지에서의 성장, 분리지역, 분리어종을 비교하여 3가지 균주 FP4138, E05003, C05011를 선택하였고, 선택된 3종의 균주와 참조균주 KCCM40866를 이용하여서 면역학적인 실험을 실시하였다. 분리균주간의 혈청형을 알아보기 위하여 제작된 4종의 토끼 항혈청으로 슬라이드 응집 반응을 실시하였다. 이전 연구자들의 연구에 의하면 *V. harveyi*는 액체 배지에서 배양할 때 swimming 운동에 관여하는 polar flagella와 고체배지에서 swarming 운동에 관여하는 lateral flagella의 두 형태의 편모가 존재하며 (Kirov et al., 2004; McCarter et al., 2004), lateral flagella에 의하여 3가지의 혈청형으로 구분된다고 알려져 있다 (Shinoda et al., 1992). 본 연구에서는 3.5 % NaCl이 첨가된 BHIA 배지에서 배양하여 lateral flagella가 생성되도록 한 FKC와 가열처리하여 flagella를 변형시킨 HKC를 항원으로 사용하여 응집반응 정도를 관찰하였다. 그 결과

FKC를 사용한 경우 응집반응이 해당항체에 대한 항원 위주로만 일어났고, HKC를 사용한 경우는 각각의 항혈청에 대하여 대부분의 균주에서 교차응집이 일어났으며 특히, C05011 항혈청의 경우 모든 균주에서 강하게 응집이 일어났다. 이상의 결과로 보면 이전 연구에서와 마찬가지로 *V. harveyi*는 3가지 이상의 혈청형이 존재하는 것으로 판단되는데, 이는 편모에 의해 구분이 된다는 것을 추정할 수 있었다.

또한 균주간의 단백질 성상의 차이를 알아보고자 SDS-PAGE로 단백질 pattern을 분석해본 결과 KCCM4086은 47~34 kDa 사이의 band에서 분리균주와는 조금 다른 pattern을 나타냈지만 분리균주 사이에는 뚜렷한 차이가 나타나지 않았다. 또한 각 항체별로 western blot을 실시한 결과 SDS-PAGE 결과와 마찬가지로 KCCM40866의 경우 4종의 항체 모두에서 34 kDa의 band와 34~26 kDa 사이의 밴드에서 FP4138, E05003, C05011과는 경향이 다르게 나타났다. 하지만 분리균주 사이에는 뚜렷한 차이가 나타나지 않았다.

이상의 면역학적 실험을 종합해보면 슬라이드 응집반응에서 3.5 % NaCl이 첨가된 BHIA 배지에서 배양한 FKC에 대하여 각 항혈청은 특이적으로 반응하였고 열에 의해 편모 단백질이 파괴된 HKC에 대해서는 특이적이지 않은 것으로 미루어 보아 분리균주들 사이에 일정 부분의 공통항원과 일정부분의 특이 항원이 있을 것으로 생각이 되지만, SDS-PAGE와 western blot을 통한 단백질 분석에서는 분리균주간의 뚜렷한 차이를 입증 할 수 없었다.

본 연구에서는 제작된 4종의 *V. harveyi* 토끼 항혈청을 대상으로 혈청 내에서 *V. harveyi*균의 생존을 실험을 실시하였는데 (자료 수록하지 않음) 4종의 항혈청 중 가장 교차방어 효과가 좋았던 C05011 균주를 선정

하여 vaccination 실험을 실시하였다. 실험결과 실험구에서 2주 동안 한 마리의 폐사도 나타나지 않았으나, 대조구로 백신을 주사하지 않은 어류는 FP4138, E05003, C05011 균주에 대해 70~100 % 폐사를 나타냈다. 이 결과를 바탕으로 *V. harveyi*의 백신 가능성을 알 수 있었고, 또한 여러 type의 균주에 대해 교차방어 효과도 측정할 수 있었다 (Alabi et al., 1999). 이러한 결과로 미루어 면역학적 특성에 의한 균의 분류와 동정은 효과적 백신의 제조에 있어 매우 중요한 문제이며, 대표적인 균주선택에 의한 백신효과 향상은 여러 연구에서 확인되었다 (Santos et al, 1995; Mutharia et al, 1993).

본 연구에서는 여름철 양식어류에 감염되어 질병을 일으키는 *V. harveyi*를 생화학적 실험과 *rpoB* 부위를 target으로한 PCR, RAPD-PCR 및 haemolysin gene영역에 대한 분자생물학적 연구를 추가함으로서 신속하고 정확한 동정이 가능하게 하였고 혈청형 분석에 의하여 백신제조를 위한 중요한 기초자료를 제공할 것으로 사료된다.

V 요약

Vibriosis는 어류의 주요 질병이며, 그 중 *V. harveyi*는 새우류에서 많은 폐사를 일으키는 병원체로 알려져 있다. 최근 다양한 양식산 어류의 질병과 관련하여 그 분리빈도가 높아지고 있으며, 이들 어류에 대하여 대량폐사를 나타내기도 한다. 본 연구에서는 해산양식어류에서 병원성을 나타내는 비브리오속 균종 중 *V. harveyi*에 대한 백신연구의 기초자료를 얻기 위하여 신속하고 정확하게 동정하고, 분류하였으며, 분리된 *V. harveyi* 중 다양한 특성을 고려하여 대표균주를 정하고 항원성 등을 분석하고자하였다.

비브리오속 세균들은 그 분리와 동정에 있어서 생화학 성상이 유사하여 많은 혼돈을 일으키고 있으므로, 정확한 동정인자의 적용이 필요하다. 그러므로 먼저 *V. harveyi* 유사균주 22균주를 선정하여 생화학적 특성을 규명하고자 하였다. API 20E kit를 이용한 생화학적 실험, 온도, pH 및 염분농도가 균의 성장에 미치는 영향 및 형태학적 특성실험을 수행하였다. 실험결과 *V. harveyi* 유사균주 11종을 선택하였으나 다른 비브리오종과의 확연한 차이는 나타나지 않았으므로 생리·생화학적 특성만으로는 *V. harveyi*의 정확하고 신속한 동정이 어려운 것으로 확인되었다. 그러므로 비브리오 균주간의 차이가 뚜렷한 RNA polymerase subunit B (*rpoB*) 유전자를 대상으로 VH-K1, VH-K2 primer를 제작하여 PCR에 의한 특이성을 확인하고자 하였다. 실험결과 비브리오속 내 15종의 비브리오 표준균주와의 비교하였으며, 분리균주들에 대한 적용도 가능한 것으로 확인되었다. 이 결과로 분리균주 중 11개의 균주를 *V. harveyi*라고

확정 동정 하였으며, 동정된 11개의 균주를 대상으로 균주간의 차이를 알아보기 위하여 RAPD-PCR과 haemolysin gene sequencing을 실시하였다. 그 결과 11개의 분리균주 모두 RAPD profile이 유사하게 나타났으며, haemolysin gene 부위도 98~100 %의 매우 높은 상동성을 나타냈다.

분리균주 중 분리지역, 분리어종, 생리·생화학적 특성을 고려하여 3가지 균주(FP4138, E05003, C05011)을 선정하여 면역학적인 실험을 실시하였다. 선정된 3종의 분리균주에 대한 토끼 항혈청을 이용하여 실시한 슬라이드응집반응 실험을 하였을 때 동일균주들 간의 응집이 높게 나타났으며, 분리균주 중 C05011을 선정하여 백신의 효과를 측정해 본 결과 높은 방어 효과를 나타냈으며, 다른 균주에 대해서 교차방어 효과도 확인 할 수 있었다.

이상의 결과를 종합하면, 본 연구에서 제작하여 사용한 VH-K1, VH-K2 primer를 이용한 PCR법을 통하여 *V. harveyi*를 보다 신속하고 정확하게 동정할 수 있는 것으로 확인 되었으며, *V. harveyi* 균주들 사이에는 여러 type의 혈청형이 존재할 것으로 추정되며, 분리균주 중 하나인 C05011 균주에서 높은 백신효과를 증명할 수 있었다.

VI. 감사의 글

입학한지가 엇그제 같은데 벌써 2년이라는 시간이 지났습니다. 2년이라는 시간이 제 인생에서 결코 헛되지 않을 수 있게 도와주신 많은 분들에게 자리를 비로서 감사의 마음을 전하고자 합니다.

여러모로 부족한 저에게 바쁘신 와중에도 관심을 가져주시고 많은 지도와 조언을 해주신 정현도 교수님께 진심으로 감사드립니다. 부족한 저의 논문에 진심어린 충고를 아끼지 않으신 박수일 교수님과 김기홍 교수님께도 감사드립니다. 늘 관심과 격려를 아끼지 않으시는 정준기 교수님과 허민도 교수님, 강주찬 교수님께도 감사드립니다.

대학원 진학을 허락해 주시고 2년 동안 학업을 마칠 수 있게 도와주신 국립수산물품질관리원 김진우 팀장님, 박명애 연구관님, 정승희 연구관님께도 깊이 감사드립니다. 부족한 저를 이끌어주시느라 고생하신 김명석 연구사님과 항상 든든한 지원군이신 조미영 연구사님, 지보영 연구사님, 도정완 연구사님, 서정수 연구사님, 최동림 연구사님과 염혜경 선생님께 감사드립니다.

제가 논문을 쓰는 동안 많은 조언과 격려를 아끼지 않으신 이덕찬 선배님께 진심으로 감사드리며, 언제나 큰언니 같은 남실언니께도 감사드립니다. 제가 국립수산물품질관리원에서 일하는 3년이라는 세월동안 언제나 친동생처럼 아껴주신 승주선배, 희정이 언니, 지연 언니, 신후선배, 은지 언니, 순범선배 에게도 감사의 말을 전합니다. 그리고 제가 늦을 때마다 기다려 주느라 고생하신 호열선배께 진심으로 감사드리며, 혜진이 에게도 감사의 말을 전합니다.

10년을 한결같이 내 곁에 있어준 고마운 친구 정은이 와 재은이, 중국에

서 열심히 공부하고 있을 려영이 에게도 감사의 말을 전합니다.

그리고 힘들때 마다 버팀목이 되어준 고마운 친구 엄 과 현경이, 영아, 현정이, 장미, 정희에게 감사의 말을 전합니다.

2년이라는 시간동안 진단생화학 실험실 식구들이 아니었다면 아마 제가 이 자리에 있지 못했을 것 같습니다. 언제나 실험실의 정신적 지주가 되어주신 준범 선배, 려진언니께 진심으로 감사드리고, 2년 동안 동고동락 하며 고생한 혜진이와 소혜, 지윤언니께 감사드립니다.

언제나 실험실의 분위기를 북돋아 주는 귀여운 후배 정희, 주현이, 광일이, 기원이, 영진이, 윤준이, 영길이, 우섭이 효진이에게도 감사의 말을 전합니다.

마지막으로 부족한 딸을 언제나 믿고 사랑해주시는 사랑하는 엄마, 아빠와 심술쟁이 동생의 든든한 후원자 오빠, 언니, 형부께 이 논문을 받칩니다.



VII. 참고문헌

- Abbott, J. D., Dale, B., Eldrige, J., Jones, D. M. & Sutcliffe, E. M. (1980). Serotyping of *Campylobacter jejuni/coli*. J. Clin. Pathol., 33, 762-766.
- Alabi, A. O., Jones, D. A. & Latchford, J. W. (1999). The efficacy of immersion as opposed to oral vaccination of *Penaeus indicus* larvae against *Vibrio harveyi*. Aquaculture, 178, 1-11.
- Alavandi, S. V., Manoranjita, V., Vijayan, K. K., Kalaimani, N & Santigo, T. C. (2006). Phenotypic and molecular typing of *Vibrio harveyi* isolates and their pathogenicity to tiger shrimp larvae. Lett. Appl. Microbiol., 43, 556-570.
- Alvarez, J. J., Austin, B., Alvarez, A. M. & Reyes, H. (1998). *Vibrio harveyi*: A pathogen of penaeid shrimps and fish in Venezuela. J. Fish Dis., 21, 313-316.
- Balebone, M. C., Magarinos, B., Toranzo, A. E. & Morinigo, M. A. (2005). Effectiveness of a divalent vaccine for sole, *Solea senegalensis* (Kaup), against *Vibrio harveyi* and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. J. Fish Dis., 28, 33-38.

- Chun, J., Huq, A. & Colwell, R. R. (1999). Analysis of 16S-23S rRNA intergenic spacer region of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. Appl. Environ. Microbiol., 65, 2202-2208.
- Coelho. A., Momen. H., Vicente, A. C. P. & Salles, C. A. (1994). An analysis of the V1 and V2 regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus* 16S rRNA. Microbiol., 145, 151-156.
- Gil, A., Miranda, H., Lanata, C., Prada. A., Hall, E., Barreno, C., Nusrin, S., Bhuiyan, N., Sack, D. & Nair, G. (2007). O3:K3 Serotype of *Vibrio parahaemolyticus* identical to the global pandemic clone associated with diarrhea in Peru. Int. J. Infect. Dis. 11, 324-328.
- Gomez-Gil, B., Soto-Rodriguez, S., Garcia-Gasca, A., Roque, A., Vazquez-Juarez, R., Thompson, F. L. & Swings, J. (2004). Molecular identification of *Vibrio harveyi*-related isolates associated with diseased aquatic organism. Microbiol., 150, 1769-1777.
- Gomez-Gil, B., Thompson, F. L., Thompson, C. C. & Swing, J. (2003). *Vibrio rotiferianus* sp. nov., isolated from cultures of the rotifer *Brachionus plicatilis*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol.,

53, 239-243.

Karunasagar, I., Pai, R., Malathi, G. R. & Karunasagar, I. (1994). Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture*, 128, 203-209.

Kerry, J., Hiney, M., Coyne, R., NicGabhaim, S., Gilroy, D., Cazabon, D. & Smith, P. (1995). Fish feed as a source of oxytetracycline resistant bacteria in the sediments under fish farm. *Aquaculture*, 131, 101-113.

Kirov, S. M., Castrisios, M. & Shaw, J. G. (2004). *Aeromonas* flagella (polar and lateral) are enterocyte adhesins that contribute to biofilm formation on surfaces. *Infect. Immun.*, 72, 1939-1945.

Kirov, S. M., Tassell, B. C., Semmler, A. T., O ' Donovan, L. A., Rabaan, A. M. & Shaw, J. G. (2002). Lateral flagella and swarming motility in *Aeromonas* species. *J. Bacteriol.*, 184, 547-555.

Kishishita, M., Matsuoka, N., Kumagai, K., Yamasaki, S., Takeda, Y & Nishibuchi, M. (1992). Sequence variation in the thermostable direct hemolysin-related hemolysin (trh) gene of *Vibrio parahaemolyticus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 2449-2457.

- Lavilla-Pitogo, C. R., Baticados, M. C. L., Cruz-Lacierda, E. R. & Pena, L. D. (1990). Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. *Aquaculture*, 91, 1-13.
- Liu, P. C., Lee, K. K. & Chen, S. N. (1996). Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 22, 413-416.
- McCarter, L. L. (2004). Dual flagella system enable motility under different circumstances. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 7, 18-29.
- Mutharia, L. W., Raymond, B. T., Dekievit, T. R. & Stevenson, R. M. (1993). Antibody specificities of polyclonal rabbit and rainbow trout antisera against *Vibrio ordalii* and serotype O:2 strain of *Vibrio anguillarum*. *J. Microbiol.*, 39, 492-499.
- Nakayama, T., Nomura, N. & Matsumura, M. (2005). Study on the relationship of protease production and luminescence in *Vibrio harveyi*. *J. Appl. Microbiol.*, 101, 200-205.
- Nagpal, M. L., Fox, K. F. & Fox, A. (1998). Utility of 16S-23S rRNA spacer region methodology: how similar are interspace regions within a genome and between strains for closely related

organisms? J. Microbiol. Methods, 33, 211-219.

Oakey, H. J., Levy, N., Bourne, D. G., Cullen, B. & Thomas, A. (2003). The use of PCR to aid in the rapid identification of *Vibrio harveyi* isolates. J. Appl. Microbiol., 95, 1293-1303.

Obata-Yasuoka, M., Ba-Thein, W. & Tsukamoto, T. (2002). Vaginal *Escherichia coli* share common virulence factor profiles, serotypes and phylogeny with other extraintestinal *E. coli*. Microbiol., 148, 2745-2752.

Park, S. -I., Wakabayashi, H. & Watanabe, Y. (1983). Serotype and virulence of *Edwardsiella tarda* isolated from eel and their environment. Fish Pathol., 18, 85-89.

Piccolomini, R., Bonaventura, G. D., Matteoneri, Girolamo, A. D., Catamono, G. & Pizzigallo, E. (1999). Usefulness of Leifson staining method in diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. J. Clin. Microbiol., 37, 199-201.

Santos, Y., Pazos, F., Bandi ' n, I. & Toranzo, A. (1995). Analysis of antigens present in the extracellular products and cell surface of *Vibrio anguillarum* serotypes O1, O2, and O3. Appl. Environ. Microbiol., 61, 2493-2498.

- Shinoda, S., Nakahara, N. & Ono, B. I. (1979). Behavior of a surface antigenic determinant of lateral flagella of *Vibrio parahaemolyticus*. Infect. Immun., 26, 322-327.
- Shinoda, S., Nakahara, N., Uchida, E. & Hiraga, M. (1985). Lateral flagellar antigen of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio harveyi*: Existence of serovars common to the two species. Microbiol. Immunol., 29, 173-182.
- Shinoda, S., Yakiyama, I., Yasui, S., Kim, Y. M., Ono, B. I. & Nakagami, S. (1992). Lateral flagella of vibrios: serological classification and genetical similarity. Microbiol. Immunol., 36, 303-309.
- Soffientino, B., Gwaltney, T., Nelson, D. R., Speck, J. L., Mauel, M. & Go' mez-Chiarri, M. (1999). Infectious necrotizing enteritis and mortality caused by *Vibrio carchariae* in summer flounder *Paralichthys dentatus* during intensive culture. Dis. Aquat. Org. 38, 201-210.
- Sunaryanto, A. & Mariam, A. (1986). Occurrence of pathogenic bacteria causing luminousness in penaeid larvae in Indonesian hatcheries. Bull. Brackishwater Aquaculture, 8, 105-112.

- Tarr, C. L., Patel, J. S., Puhr, N. D., Sowers, E. G., Bopp, C. A. & Strockbine, N. A. (2007). Identification of *Vibrio* isolates by a multiplex PCR assay and *rpoB* sequence determination. J. Clin. Microbiol., 45, 134-140.
- Thaithongnum, S., Ratanama, P., Weeradechapol, K., Sukhoom, A. & Vuddhakul, V. (2006). Detection of *V. harveyi* in shrimp postlarvae and hatchery tank water by the most probable number technique with PCR. Aquaculture, 261, 1-9.
- Thompson, J. R., Randa, M. A., Marcelino, L. A., Tomita-Mitchell, A., Lim, E. & Polz, M. F. (2004). Diversity and dynamics of a north atlantic coastal vibrio community. Appl. Environ. Microbiol., 70, 4103-4110.
- Zhang, X. -H. & Austin, B. (2000). Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonids. J. Fish. Dis., 23, 93-102.
- Zhang, X. -H., Meaden, P. G. & Austin, B. (2001). Duplication of hemolysin gene in a virulent isolate of *Vibrio harveyi*. Appl. Environ. Microbiol., 67, 3161-3167.
- Zorrilla, I., Arijo, S., Chabrillon, M., Diaz, P., Martine-Manzanares, E., Balebona, M. C. & Morinigo, M. A. (2003). *Vibrio* species isolated from diseased farmed sole, *Solea senegalensis* (Kaup), and

evaluation of the potential virulence role of their extracellular products. J. Fish. Dis., 26, 103-108.

김진우, 정승희, 박명애, 도정완, 최동림, 지보영, 조미영, 김명석, 최혜승, 김이청, 이주석, 이창훈, 방종득, 박미선, 서정수 (2006). 2000년~2006하절기 양식 어류의 병원체 감염현황. 한국어병학회지, 19, 207-214.

전세규. (2005). 넙치의 질병과치료. 한국수산신문사.

원경미, 최정현, 박수일 (2006). 배양 조건에 따른 *Vibrio harveyi* extracellular products (ECP)의 특성. 한국어병학회지, 19, 119-126.

