

넙치, *Paralichthys olivaceus*에서 병원성 *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*의 분리

권문경[†] · 박상언* · 방종득 · 박수일**

국립수산과학원 동해수산연구소, *국립수산과학원 동해수산연구소 어류연구센터,

**부경대학교 수산생명의학과

Isolation of pathogenic *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* from olive flounder, *Paralichthys olivaceus*

Mun-Gyeong Kwon[†], Saung Un Park*, Jong Deuk Bang and Soo-Il Park**

East Sea Fisheries Research Institute, National Fisheries Research & Development

*Finfish research center, East Sea Fisheries Research Institute, National Fisheries Research & Development

**Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University

The isolates, which has caused considerable damage to the olive flounder farm located in the eastern coast of Korea showed 99% sequence homology in the comparison of 16s rRNA gene of *P. damsela* subsp. *damsela* ATCC 33539. The present *P. damsela* was identical to the biotype No. 8 in Pedersen *et al.* (1997) and the same LPS protein pattern as *P. damsela* subsp. *damsela* ATCC 33539. The comparison of infection rates among present *P. damsela* and *Vibrio* spp. showed that isolated *P. damsela* was the highest, followed by *V. anguillarum*, *V. harveyi*, and *V. ordalii*.

Key words : *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, Olive flounder, 16s rRNA, *Vibrio*, Mortality

우리 나라 동해안 넙치 양식장에서 발생 빈도가 높은 *Vibrio* 속 세균을 조사하는 과정에서 thiosulfate citrate bile salts sucrose (TCBS) 배지에서 청색의 집락을 형성하는 균의 빈도가 특히 높은 점에 주목하여 연구한 결과 *Vibrio* 과에 속하는 *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* 로 동정되었다. 이 병원균은 처음 분리될 당시에는 *Vibrio* 속으로 분류된 세균이었으나 (Love *et al.*, 1981), 이후 분자생물학적 분류법에 따라 검토해 본 결과 다른 *Vibrio* 속 세균과 DNA homology 가 낮아 *V. damsela*에서 *Photobacterium* 속으로 재분류되어 지금은 분류 위치가 다른 속에 속해 있다. *Vibrio* 속 어병 세균은 대부분 TCBS 배지

상에서 황색의 집락을 형성하지만, 청색의 집락을 형성하는 종도 다수 존재하므로 질병의 진단에 어려움이 있으며, *P. damsela*의 감염증도 비브리오행균에 포함시키고 있는 실정이다 (Wang and Leung, 2000; Villami *et al.*, 2003).

*P. damsela*는 damselfish, *Chromis punctipinnis*에서 처음으로 보고되었으며 (Love *et al.*, 1981), bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus* (Fujioka *et al.*, 1988), leatherback turtles, *Dermochelys coriacea* (Obendorf *et al.*, 1987), 방어, *Seriola quinqueradiata* (Sakata *et al.*, 1989), 감성돔, *Sparus aurata* (Vera *et al.*, 1991), baramundi, *Lates calcarifer* (Renault *et al.*, 1994), brown shark, *Carcharhi-*

[†]Corresponding Author : Mun-Gyeong Kwon, Tel : 033-661-8504,
Fax : 033-661-8514, E-mail : shellk@hanmail.net

nus plumbeus (Colwell and Grimes, 1984; Grimes *et al.*, 1984) 및 터봇, *Scophthalmus maximus* (Fouz *et al.*, 1991; 1992)에 질병을 일으켰다는 보고가 있지만, 아직 양식 넙치, *Paralichthys olivaceus*에 대한 감염 피해의 발생 예는 알려져 있지 않다.

본 연구에서는 우리 나라 동해안 넙치 양식장에서 *Photobacterium* 감염증을 일으키는 *P. damsela*와 이 질병과 혼용되어 사용되는 비브리오병의 원인균을 분리, 동정하고 각 질병의 감염률을 조사하였다.

재료 및 방법

시료 채취

시료 채취는 2002년 2월부터 2003년 11월까지 매월 1회씩 동해안에 위치한 13개소의 넙치 양식장을 대상으로 시행하였다 (Fig. 1). 이 양식장에서 질병 증상을 나타내는 양식 넙치의 체표, 지느러미 및 아가미 등으로부터 기생충 감염 여부를 조사한 후 세균 배양을 실시하였다. 병원균의 분리는 병어의 환부, 간, 신장, 비장 및 복수액을 무균적으로 채취하여 1.5% NaCl 첨가 tryptic soy agar (TSA, Difco) 평판배지에 도말 접종하였다. 분리 균주는 양식장에서 접종한 TSA 배지를 25°C, 24시간 배양하여 분리한 집락 중

TCBS 배지 상에서 green 색을 나타내는 colony를 택하여 시험에 사용하였다. 그리고 대조 균주는 *P. damsela* ATCC 33539를 사용하였다.

생화학적 성상

분리된 균주 중 TCBS에서 green 색을 나타내는 colony에 대하여 MacFaddin (1980)에 따라 생화학 검사를 실시한 후 *P. damsela*에 대하여 Pedersen *et al.* (1997)의 *P. damsela* biotype과 비교하였다.

16s ribosomal RNA (16s rRNA) 유전자 배열 분석

PCR 수행

시험 균주의 genomic DNA는 DNAzol (Gibco-BRL)을 이용하여 분리한 후 A_{260/280nm}에서 DNA 농도가 50 ng/ μ l가 되도록 준비하였다. PCR은 rTaq (Takara) polymerase와 universal bacterial primer (Bioneer사)로 Sense (5'-agtgtttgatcmtg-gctcag-3')와 antisense (5'-tacggytacctgttacgactt-3')를 사용하였다. PCR은 thermal cycler (Perkin-Elmer)로 수행하였으며, 조건은 initial denaturation (94°C, 5 min), denaturation (94°C, 30 sec), annealing (55°C, 30 sec), extension (72°C, 45 sec), final extension (72°C, 7 min)의 조건으로 30 cycles 반복하였다.

Gel에서 PCR 산물의 추출 및 cloning

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

pGEM T-easy vector (Promega)에 T₄ ligase로 재조합된 plasmid DNA를 준비하였으며, competent cell (*Escherichia coli* JM 109)에 heat shock method로 transformation시켰다. 이에 1 ml의 LB broth를 첨가하여 37°C에서 1시간 배양한 후 ampicillin (50 μ g/ μ l), IPTG (Isopropylthio- β -D-galactopyranoside, 20 μ g/ μ l)와 X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside, 20 μ g/ μ l)이 포함

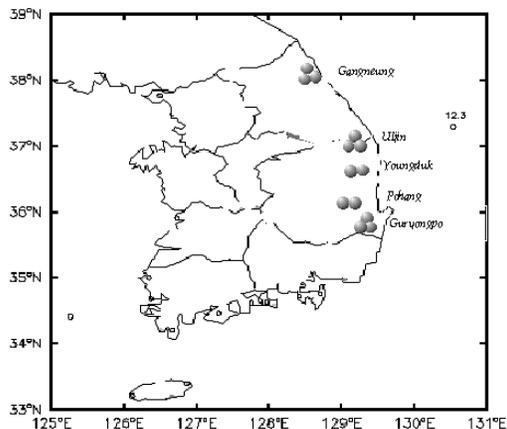


Fig. 1. Sampling sites (●) of diseased olive flounder, *Paralichthys olivaceus* in Gyeongbuk and Gangwon province.

된 LB agar (1% Bacto tryptone, 0.5% Bacto yeast extract, 1% NaCl, 1.5% Agar)에 배양하여 재조합된 white colony를 선별하였다.

DNA sequencing 및 염기 서열 비교 분석

Plasmid DNA를 추출한 후 Sanger *et al.* (1977)의 방법에 따라 automatic sequencer (ABI version 3.2, USA)로 sequencing을 실시하였다.

해독한 염기 배열의 조합과 restriction enzyme site를 찾기 위해서 Genetyx program을 사용하였으며, The National Center for Biotechnology Information (NCBI)에서 제공되는 BLAST program으로 이미 밝혀져 있는 균주들의 16S rRNA gene과 비교 분석하였다.

SDS PAGE

분리 균주 및 참조 균주인 ATCC 33539의 LPS 단백질 profile은 Laemmli (1970)의 방법에 따라 SDS-polyacryl amide gel electrophoresis를 통하여 확인하였다.

Lipopolysaccharide (LPS)는 Schill *et al.* (1985)의 rapid method로 분리하였다. 즉, 배양된 균체는 멸균 PBS로 세척 및 현탁시킨 후 분광광도계를 이용하여 A₅₂₅에서 0.5로 농도를 조정한다. 다음 14,000g에서 3분간 원심분리하여 집균된 균체를 2×SDS-PAGE sample buffer와 동량으로 현탁시켜서 10분간 끓였다. 끓인 sample에 proteinase K (Protease type XI; Sigma, St Louis, MO, USA)가 SDS-PAGE sample buffer에 2.5 mg/μl로 현탁된 용액을 10 μl 첨가하여 60°C water bath에서 1시간 끓인 후 사용할 때 까지 -20°C에 보관하였다.

준비된 LPS는 14% (v/v) resolving gel에 10 μl씩 loading 후 mini-protean II system (BioRad)에서 40mA, 90분간 전기 영동하였다. Marker는 Prestained Protein Molecular Weight Marker (MBI Fermentas)를 사용하였으며, 전기 영동한 gel은 Coomassie brilliant blue R-250 staining solution으로 염색 및 탈색 과정을 거친 후 확인하였다.

지역별 감염율

*P. damsela*와 *Vibrio* 속 어병 세균의 생화학적 성상 결과를 이용하여 월별, 지역별 및 종별 출현 경향을 조사하였다.

결 과

생화학적 성상

분리된 *P. damsela*의 생화학적 성상은 Table 1과 같이 TCBS 배지에서 녹색 집락을 형성하는 그람 음성균이며, 운동성이 있는 nonswarming 간균이다. Catalase, oxidase, methyl red, nitrate에서는 양성 반응을 나타내었으나, indole과 H₂S는 생성하지 않았다. 또한, arginin dihydrolase는 생성하였으나, ornithine과 lysin decarboxylase는 생성하지 못하였다. Urease와 chitinase는 생성하였으나, amylase, caseinase와 alginase는 생성하지 못하였으나, glucose는 혐기적인 조건에서 가스를 생성하면서 분해하였다. 그리고, glucose와 maltose에서 산이 생성되었으나 salicin, arabinose, rhamnose, inositol과 mannitol에서는 산이 생성되지 않았으며, *o*-Nitrophenyl-β-D-galactopyranoside는 분해하지 못하였다. 균주는 Voges-Proskauer test와 lipase, cellobiose에 대해서 양성 반응을 나타내었으며, 항생제인 O/129에 대하여 내성을 나타내었다. 20°C와 37°C에서 증식할 수 있으며, 7% NaCl에서도 증식하였다. 이와 같은 생리·생화학적 특성을 덴마크의 Pedersen *et al.* (1997)이 분리한 *P. damsela*의 biotype과 특성을 비교한 결과 biotype No. 8에 속하는 것으로 동정되었다.

16s rRNA 유전자 배열

생화학 성상에서 *P. damsela*로 동정된 균주의 16s rRNA를 universal primer로 분석하여 Genebank에 등록되어 있는 *P. damsela* subsp. *damsela* ATCC 33539와 비교하여 nucleotide sequence를 나타내었다 (Fig. 2). 그 결과 99%의

Table 1. Biochemical and physiological characteristics of *Photobacterium damsela* reference strains and isolates

Characteristic	Isolates	<i>P. damsela</i> biotype (Pedersen <i>et al.</i> , 1997)								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OF	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
Nitrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Methyl red	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Voges-Proskauer	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Decarboxylase production										
Lysine	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
Ornithine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dehydrolase production										
Arginine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acid from										
Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Cellobiose	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Lipase	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Gelatinase	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Amylase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Caseinase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alginase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>o</i> -Nitrophenyl- β , -D-galactopyranoside	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
gas	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth in 7% NaCl	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
Sensitivity to O/129^(a)	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S

S, Sensitive; R, Resistant.

```

Isolates:      1 ggggaacgttaagggcggcgcgagcggcgggacgggtgagtaatgcctgggaatatgccctg 60
ATCC 33539:    1 ggggaacgttaagggcggcgcgagcggcgggacgggtgagtaatgcctgggaatatgccctg 60

Isolates:      61 gatgtgggggataactatttgaaacgatagctaataccgcataatctcttcggagcaaaag 120
ATCC 33539 :   61 gatgtgggggataactatttgaaacgatagctaataccgcataatctcttcggagcaaaag 120

Isolates:      121 agggggaccttcgggcctctcgcgctcaggnttagccaggtgggattagcttgttggtga 180
ATCC 33539:    121 agggggaccttcgggcctctcgcgctcaggnttagccaggtgggattagcttgttggtga 180

Isolates:      181 ggtaatggctcaccaaggcaacgatccc tagctggcttgagaggatgatcagccacactg 240
ATCC 33539:    181 ggtaatggctcaccaaggcaacgatccc tagctggcttgagaggatgatcagccacactg 240

Isolates:      241 gaactgagacacgggtccagactcc tacgggagggcagcagtggggaatatgacacaaatggg 300
ATCC 33539:    241 gaactgagacacgggtccagactcc tacgggagggcagcagtggggaatatgacacaaatggg 300

Isolates:      301 gaaacccctgatgcagccatgccgcgtgtatgaagaaagcccttcgggttgtaaag 355
ATCC 33539:    301 gaaacccctgatgcagccatgccgcgtgtatgaagaaagcccttcgggttgtaaag 355
    
```

Fig. 2. Comparison of 16s rRNA gene sequence of present isolates with *P. damsela* subsp. *damsela* ATCC 33539.

높은 상동성을 나타내었으며, 다른 *Vibrio* 속 세균과는 다소 낮은 상동성을 나타내었다 (Table 2).

47 kDa와 40 kDa 부근에서 두꺼운 밴드를 형성하여 동일한 패턴을 나타내었다.

SDS PAGE

동해안 넙치 양식장에서 분리된 균주와 공시 균주의 LPS 단백질 패턴을 조사한 결과는 Fig. 3과 같다. 실험에 사용한 *P. damsela*와 참조 균주인 *P. damsela* subsp. *damsela* ATCC 33539는

지역별 감염율

생화학적 성상과 16s rRNA 염기 서열 분석에 기초하여 동정된 *Photobacterium*속 세균과 *vibrio* 균의 감염 경향은 Table 3과 같다. *Vibrio* 균 감염 시에는 균종별에 관계없이 모두 체색 흑화, 체표 출혈과 궤양, 출혈성 복수증이 나타났으며 *P. damsela*에 감염된 어체에서는 에드워드균 감염증과 유사한 탈장 증상이 나타났다.

발생 시기는 수온과 깊은 관련성이 있는 것으로 나타났다. 수온이 높은 강릉 지역에서는 *P. damsela*가 연중 분리되었으며, 특히 고수온기에는 *V. anguillarum*, *V. ordaili* 및 *V. harveyi*가 함께 분리되었다. 강릉을 제외한 다른 지역에서는 주로 고수온기에 *P. damsela*와 *vibrio* 균들이 분리되었으며, 이 중 *P. damsela*와 *V. anguillarum*의 출현율이 높게 나타났다.

2002년 2월에서 2003년 11월까지 분리된 *Vibrio* 속과 *Photobacterium* 속 균주가 차지하는 비율은 Fig. 4와 같다. 전체 분리 균주 중 *P. damsela*가 50%로 가장 많이 분리되었으며, *V. anguil-*

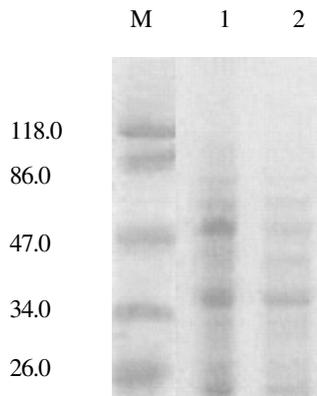


Fig. 3. Protein profiles of lipopolysaccharide (LPS) from present isolate in SDS-PAGE using 14% acrylamide. M, marker; 1, *P. damsela* isolated from olive flounder, *Paralichthys olivaceus*; 2, *P. damsela* subsp. *damsela* ATCC 33539.

Table 2. Homology comparison of 16s rRNA gene sequence in *P. damsela* with several vibrios

Strains	Sequence homology (%)							
	PD ¹	VC ²	VH ³	VS ⁴	VF ⁵	VA ⁶	VI ⁷	VO ⁸
Isolated <i>P. damsela</i>	99	93	92	92	92	91	92	90

¹ *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* (ATCC 33539); ² *Vibrio cholerae* (AY911390); ³ *Vibrio harveyi* (AY928014); ⁴ *Vibrio splendidus*; ⁵ *Vibrio fischeri*; ⁶ *Vibrio alginolyticus* (AY373027); ⁷ *Vibrio ichthyenteri* (AJ437192); ⁸ *Vibrio ordalii* (AY628643).

Table 3. *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* and vibrios isolated from the diseased olive flounder, *Paralichthys olivaceus* at culturing farm of east coast in Korea

Location	Month										
	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	
Gangneung	D ¹⁾	D, H ²⁾	D	D	D	D, C	D, H, A ⁴⁾	D, A, O ⁵⁾	D, A	A	
Uljin	-	-	S ³⁾	D	D	D, H, S	D, A	D, A	D, A	D	
Yeongdeok	-	-	-	-	D	D	D, A	D, A	A	A	
Pohang	-	-	-	S	S	D	D	D, A	O	-	
Guryongpo	-	-	A	-	A	D	A, S	D, A	A, S	-	
Ulsan	-	-	-	-	A	D	D	D	S	-	

* ¹⁾ *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*; ²⁾ *Vibrio harveyi*; ³⁾ *Vibrio splendidus*; ⁴⁾ *Vibrio anguillarum*; ⁵⁾ *Vibrio ordalii*.

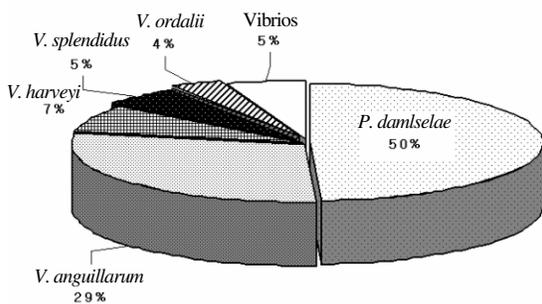


Fig. 4. *P. damsela* and vibrios (% incidence) isolated from the diseased olive flounder, *Paralichthys olivaceus* at culturing farm of east coast in Korea.

*larum*이 29%, *V. harveyi*가 7%, *V. splendidus*가 5%, *V. ordalii*가 4%, 미동정된 *Vibrio* 속 세균이 5%로 나타났다.

고찰

본 연구에서는 넙치에 감염되어 질병을 일으키는 *P. damsela*를 분리하여 Pedersen *et al.* (1997)의 *P. damsela* biotype과 비교한 결과, 무지개송어 (*Oncorhynchus mykiss*)에서 분리된 biotype No. 8과 생화학적 성상이 동일하였다. 본 연구는 94~95년 덴마크에서 평년보다 기온이 5℃나 높은 이상 기온을 나타낸 7~8월에 많은 세균성 질병과 함께 분리되었으며, 숙주 특이성이 약한 병원체로 본 연구에서도 고수온기에 분리율이 높아 같은 경향을 나타내었다. *P. damsela*의 plasmids는 이전부터 확인되어왔으나 (Austin *et al.*, 1997; Fouz *et al.*, 1992), Pedersen *et al.* (1997)은 한 양어장 내에서 분리된 plasmid

profile이 다양하며 일반적으로 virulence plasmid는 아니라고 보고하였다.

16s rRNA를 이용하여 분리된 *P. damsela*의 동정 결과, *P. damsela* subsp. *damsela* ATCC 33539와 99%의 상동성을 나타내어 확정 동정을 할 수 있었으며, 다른 vibrio 속 세균과는 다소 낮은 상동성을 나타내어 세균 속간의 차이를 확인할 수 있었다.

*P. damsela*는 8~10월에 높은 감염율로 체표에 괴사소를 형성하였으며, 탈장과 복강 내벽의 근육부에 점상 출혈이 특징적으로 관찰되었다. 이와 같은 결과는, Love *et al.* (1981)이 8~10월에 damselfish 양식장에서 10~70%의 어류에서 괴사를 형성하고, 근육부의 용해를 관찰한 것과 유사한 결과로 생각되었다.

*P. damsela*와 vibrio 속 세균의 종별 지역별 감염율을 조사한 결과, *P. damsela*, *V. anguillarum*, *V. harveyi*, *V. splendidus* 및 *V. ordalii*의 순으로 감염율이 나타나, 다른 *Vibrio* 속 세균에 비하여 *P. damsela*의 감염율이 높은 것을 알 수 있었으며, 동해안 넙치 양식장에서 주로 분리된 *Vibrio* 속 세균의 특징은 아래와 같다.

*V. anguillarum*은 비브리오병 중 가장 최초로 보고된 종으로 1909년에 스웨덴 연안의 감염된 뱀장어 (*Anguilla anguilla*)에서 수온 상승 시기에 발생하였다고 처음으로 보고되었으며 본 연구에서도 수온이 높은 8~10월에 높은 감염율과 폐사율을 나타내었다. 감염 경로에 대해서는 아직 불확실하지만, Toranzo and Barja (1993)는 세포 표면 성분을 이용하여 숙주에 침입, 부착 후 점액층을 뚫고 들어가 증식하는 것으로 추정하였으며, Chart and Trust (1984)는 어류에 대한 독성은 multiflagellate를 이용한 화학주성과 점액층을 침입할 수 있는 것과 관계가 있다고 하였다. *V. anguillarum*의 serotype은 O1~O10이 확인되었으며 전 세계적으로 폐사를 일으키는 것은 O1, O2와 O3이며, O4~O10은 환경 중에 존재하는 것으로 알려져 있다 (Toranzo *et al.*, 1987; Tajima *et al.*, 1985; Sørensen and Larsen, 1986;

Larsen *et al.*, 1988; Wiik *et al.*, 1989; Toranzo and Barja, 1990).

*V. harveyi*는 새우의 대표적인 병원체로 별개의 종으로 분류되었던 *V. carchariae*와 유사하여 현재 한 종으로 분류되고 있으나 (Pedersen *et al.*, 1998), chitinase 활성은 서로 다르게 나타났다 (Suginta *et al.*, 2000). 어류에서는 Kraxberger-Beatty *et al.* (1990)에 의해 처음 보고되어 Austin과 Austin (1993)에 의해 어류의 병원성 vibrio로 확인되어, 최근에는 grouper (Yi *et al.*, 1997), summer flounder (Soffientino *et al.*, 1999)와 우리나라의 넙치 (원 등, 2003)에서도 폐사가 보고되고 있는 종으로 본 조사 기간 동안 넙치에서는 감염율이 높지 않았다.

*V. splendidus*는 어류를 포함한 많은 해양 동물에서 질병을 일으키는 종으로 넙치류 (Miranda and Rojas, 1996), 터봇과 대구류 (Santos *et al.*, 1997)와 농어류 (Balebona *et al.*, 1998)에서 질병을 일으켰으며, 새우류 (Bacticados *et al.*, 1990)와 패류 (Nicolas *et al.*, 1996)에서도 감염되어 폐사를 발생시키는 종으로 본 연구에서는 감염율이 비교적 낮은 것으로 나타났다.

*V. ordalii*는 *V. anguillarum* biotype II (Schiewe *et al.*, 1981)로 분류되었던 종으로 출혈성 패혈증의 원인균이지만 본 연구에서는 병원성과 분리율이 높지 않았다.

따라서 우리 나라 동해안 넙치 양식장에서 분리된 *P. damsela*는 넙치에서 다른 *Vibrio* 속 세균에 비하여 높은 감염율을 나타내었으며, 특히 고수온기에 감염율이 높았다. Pedersen *et al.* (1997)이 덴마크에서 분리한 균주와 biotype을 비교한 결과 No. 8에 속하는 균주로 ATCC 33539의 16s rRNA와 99% homology를 나타내었다. 본 세균에 의한 질병은 일반적으로 비브리오병으로 분류되고 있으나 (Austin and Austin, 1999; Wang *et al.*, 1998), 유전학적 위치뿐만 아니라 질병 발생시 세균의 감염 방법, 병원성 발현 인자 및 기작 등에서 비브리오병과는 다를 것으로 예상되므로 이에 대한 연구가 지속적으로 이

루어져야 할 것으로 생각된다.

요 약

최근 2년간 동해안 지역 넙치 양식장의 양식 넙치에 피해를 일으키는 *P. damsela* 균을 분리하였으며, 분리된 *P. damsela*의 16s rRNA 염기 서열은 *P. damsela* subsp. *damsela* ATCC 33539와 99%의 상동성을 나타내었다. 분리 균주는 Pedersen *et al.* (1997)의 biotype과 비교한 결과, biotype No. 8과 동일하게 나타났으며, *P. damsela* subsp. *damsela* ATCC 33539의 LPS와 동일한 단백질 패턴을 나타내었다. 넙치의 병어로부터 *P. damsela*와 *Vibrio* 속 세균의 감염 상태를 조사한 결과, *P. damsela*가 가장 높은 감염율을 나타내었고, 그 다음으로 *V. anguillarum*, *V. splendidus*, *V. harveyi*와 *V. ordalii* 순으로 감염율이 나타났다.

감사의 글

본 연구는 국립수산물과학원 (해산어 세균성 질병 특성 연구, RP-2005-AQ-032)의 지원에 의해 운영되었습니다.

참 고 문 헌

- Austin, B. and Austin, D. A.: Bacterial fish pathogens disease in farmed and wild fish. 2nd ed. Ellis Horwood, New York, 1993.
- Austin, B., Austin, D. A., Blanch, A. R., Cerdá, M., Grimont, F., Grimont, P. A. D., Jofers, J., Koblavi, S., Larsen, J. L., Pedersen, K., Tiainen, T., Verdonck, L. and Swings, J.: A comparison of method for typing of fish-pathogenic *Vibrio* spp. Syst. Appl. Microbiol., 20: 89-101, 1997.
- Bacticados, M. C. L., Lavilla-Pitogo, C. R., Cruz-Lacierda, E. R., Pena, L. D. and Sunaz, N. A.: Studies on the chemical control of luminous bacteria *Vibrio harveyi* and *V. splendidus* isolated from diseased *Penaeus monodon* larvae and rearing water. Dis. Aquat. Org., 9: 133-139, 1990.
- Balebona, M. C., Zorilla, I., Morinigo, M. A. and Borrego, J. J.: Survey of bacterial pathologies affecting farmed gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.) in southwestern Spain from 1990 to 1996. Aquaculture, 166: 19-35, 1998.
- Chart, H. and Trust, T. J.: Characterization of the surface antigens of the marine fish pathogens *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. Can. J. Microbiol., 3: 703-710, 1984.
- Colwell, R. R. and Grimes, D. J.: *Vibrio* diseases of marine fish populations. Helgol. Meeresunters., 37: 265-287, 1984.
- Fouz, B., Larsen, J. L. and Toranzo, A. E.: *Vibrio damsela* as a pathogenic agent causing mortality in cultured turbot (*Scophthalmus maximus*). Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol., 11: 80-81, 1991.
- Fouz, B., Larsen, J. L., Nielsen, B., Barja, J. L. and Toranzo, A. E.: Characterization of *Vibrio damsela* strains isolated from turbot *Scophthalmus maximus* in Spain. Dis. Aquat. Org., 12: 155-166, 1992.
- Fujioka, R. S., Greco, S. B., Cates, M. B. and Schroeder, J. P.: *Vibrio damsela* from wounds in bottlenose dolphins *Tursiops truncatus*. Dis. Aquat. Org., 4: 1-8, 1988.
- Grimes, D. J., Colwell, R. R., Stemmler, J., Hada, H., Maneval, D., Hetrick, F. M., May, E. B., Jones, R. T. and Stoskopf, M.: *Vibrio* species associated with mortality of sharks held in captivity. Microb. Ecol., 10: 271-282, 1984.
- Kraxberger-Beatty, T., McGarey, D. J., Grier, H. J. and Lim, D. V.: *Vibrio harveyi* and oppor-

- tunistic pathogen of common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch), held in captivity. *J. Fish Dis.*, 13: 557-560, 1990.
- Laemmli, U. K.: Cleavage of structural protein during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*, 222: 680-685, 1970.
- Larsen, J. L., Rasmussen, H. B. and Dalsgaard, I.: Study of *Vibrio anguillarum* strains from different source with emphasis on ecological and pathobiological properties. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54: 2264-2267, 1988.
- Love, M., Fisher, D. T., Horse, J. E., Farmer, J. J., Hickman, F. W. and Fanning, G. R.: *Vibrio damsela*, as a marine bacterium, causes skin ulcers on the damselfish, *Chromis punctipinnis*. *Science*, 214: 1140-1141, 1981.
- MacFaddin, J. F.: Biochemical tests for identification of medical bacteria. 2nd ed. Willams & Wilkms. pp 527, 1980.
- Miranda, C. and Rojas, R.: Vibriosis en el lenguado, *Paralichthys adspersus* (Steindachner, 1867) en cautiverio. *Revista de Biología Marina*, 31: 1-9, 1996.
- Nicolas, J. L., Corre, S., Gauthier, G., Rober, R. and Ansquer, D.: Bacterial problems associated with scallop, *Pecten maximus* larval culture. *Dis. Aquat. Org.*, 27: 67-76, 1996.
- Obendorf, D. L., Carson, J. and McManus, T. J.: *Vibrio damsela* infection in a stranded leatherback turtle (*Dermochelys coriacea*). *Wildl. Dis.*, 23: 666-668, 1987.
- Pedersen, K., Dalsgaard, I. and Larsen, J. L.: *Vibrio damsela* associated with diseased fish in Denmark. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 3711-3715, 1997.
- Pedersen, K., Verdonck, L., Austin, B., Austin, D. A., Blanch, A. R., Grimont, P. A. D., Jofre, J., Koblavi, S., Larsen, J. L., Tiainen, T., Vignelle, M. and Swings, J.: Taxonomic evidence that *Vibrio carchariae* is a junior synonym of *V. harveyi*. *Int. J. System. Bacteriol.*, 48: 749-758, 1998.
- Renault, T., Haffner, P., Malfondet, C. and Weppe, M.: *Vibrio damsela* as a pathogenic agent causing mortalities in cultured sea bass (*Lates calcarifer*). *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, 14: 117-119, 1994.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 5463-5467, 1977.
- Sakata, T., Matsuura, M. and Shimokawa, Y.: Characteristics of *Vibrio damsela* isolated from diseased yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Nippon Suisan Gakkashi*, 55: 135-141, 1989.
- Santos, Y., Pazos, F., Nunez, S. and Toranzo, A. E.: Antigenic characterization of *Vibrio anguillarum*-related organisms isolated from turbot and cod. *Dis. Aquat. Org.*, 28: 45-50, 1997.
- Schiewe, M. H., Trust, T. and Crosa, J. H.: *Vibrio ordalii* sp. nov.: A causative agent of vibriosis in fish. *Curr. Microbiol.*, 6: 343-348, 1981.
- Schill, W. B., Phelps, S. R., and Pyle, S. W.: Rapid serological analysis of bacterial lipopolysaccharide by electrotransfer to nitrocellulose. *J. Immunol. Methods*, 85: 371-382, 1985.
- Soffientino, B., Gwaltney, T., Nelson, D. R., Specker, J. L., Mael, M. and Gomez-Chiarri, M.: Infectious necrotizing enteritis and mortality caused by *Vibrio carchariae* in summer flounder *Paralichthys dentatus* during intensive culture. *Dis. Aquat. Org.*, 38: 201-210, 1999.
- Sørensen, V. B. S. and Larsen, J. L.: Serotyping of *Vibrio anguillarum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 51: 593-597, 1986.

- Suginta, W., Robertson, P. A. W., Austin, B., Fry, S. C. and Fothergill-Gilmore, L. A.: Chitinases from *Vibrio*: activity screening and purification of *chiA* from *Vibrio carchariae*. *J. Appl. Microbiol.*, 89: 76-84, 2000.
- Tajima, K., Ezura, Y. and Kimura, T.: Studies on the taxonomy and serology of causative organism of fish vibriosis. *Fish Pathol.*, 20: 131-142, 1985.
- Toranzo, A. E., Baya, A. M., Roberson, B. S., Barja, J. L., Grimes, D. J. and Hetrick, F. M.: Specificity of slide agglutination test for detecting bacterial fish pathogens. *Aquaculture*, 61: 81-97, 1987.
- Toranzo, A. E. and Barja, J. L.: Virulence factors of bacteria pathogenic for coldwater fish. *Annu. Rev. Fish Dis.*, 3: 5-36, 1993.
- Toranzo, A. E. and Barja, J. L.: A review of the taxonomy and sero-epizootiology of *Vibrio anguillarum*, with special reference to aquaculture in the northwest of Spain. *Dis. Aquat. Org.*, 9: 73-82, 1990.
- Vera, P., Navas, J. L. and Fouz, B.: First isolation of *Vibrio damsela* from seabream (*Sparus aurata*). *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, 11: 112-113, 1991.
- Villami, V., Figueras, A., Aranguren, R. and Novoa, B.: Non-specific immune response of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), experimentally infected with a pathogenic *Vibrio pelagius*. *J. Fish Dis.*, 26: 321-329, 2003.
- Wang, X. H., Oon, H. L., Ho, G. W. P., Wong, W. S. F., Lim, T. M. and Leung, K. Y.: Internalization and cytotoxicity are important virulence mechanism in vibrio fish epithelial cell interactions. *Microbiol.*, 144: 2987-3002, 1998.
- Wang, X. H. and Leung, K. Y.: Biochemical characterization of different types of adherence of *Vibrio species* to fish epithelial cells. *Microbiol.*, 146: 989-998, 2000.
- Wiik, R., Anderson, K., Daae, F. L. and Hoff, F. A.: Virulence studies based on plasmid profiles of the fish pathogen *Vibrio salmonicida*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55: 819-825, 1989.
- Yii, K. C., Yang, T. I. and Lee, K. K.: Isolation and characterization of *Vibrio carchariae*, a causative agent of gastroenteritis in the grouper, *Epinephelus coioides*. *Curr. Microbiol.*, 35: 109-115, 1997.
- 원경미, 홍미주, 김수미, 박수일: 우리 나라 양식 해산어에서 분리된 *Vibrio harveyi*의 특성. 2003 Joint Meeting of the Korean Societies of Fisheries Science, 320-321, 2003.

Manuscript Received : October 14, 2005

Revision Accepted : December 02, 2005

Responsible Editorial Member : Tae-Sung Jung
(Gyeongsang Univ.)