

## 배양 조건에 따른 *Vibrio harveyi* extracellular products (ECPs)의 특성

원경미 · 최정현\* · 박수일\*\*

부경대학교 수산과학연구소, \*부경대학교 수산생명의학과

### Characteristics of the extracellular products (ECPs) of *Vibrio harveyi* grown under various conditions

Kyoung-Mi Won, Jeong Hyun Choi\* and Soo-II Park\*\*

Institute of Fisheries Science, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

\*Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

The characteristics of the extracellular products (ECPs) of *Vibrio harveyi* grown under various conditions were studied. The extracellular products (ECPs) of *Vibrio harveyi* is well known as an important pathogenic factor.

The optimal isolation condition of the *V. harveyi* ECPs was incubation with 1.5% NaCl added TSA medium at 25°C for 24 h. The buffer system for ECPs isolation controlled as pH 8.0 displayed optimal condition. The major protein of ECPs isolated from the five *V. harveyi* strains originated from Korea (FF8, FF10, FR1, FR2 and FT1 strain) were revealed to serine protease.

*Key words:* *Vibrio harveyi*, Extracellular products (ECPs), Condition of isolation

1999년 여름철 고수온기에 경북, 경남 및 부산 소재 넙치 양식장 몇 군데에서 세균성 감염증으로 보이는 질병에 의한 폐사체가 다수 발생하였다. 폐사 어체는 복부팽만, 장충혈, 장액삼출 및 간출혈 등의 증상을 보였으며, 때로는 탈장 증상이 관찰되는 경우도 있었다. 이 질병의 원인체를 분리 배양하여 생화학 시험과 16S rRNA 염기배열을 분석한 결과, *Vibrio harveyi* (이전의 *V. carchariae* type)인 것으로 밝혀졌다 (Won, 2005).

*V. harveyi*는 필리핀 (Lavilla-Pitogo *et al.*, 1990), 태국 (Jiravanichpaisal *et al.*, 1994) 및 대만 (Liu *et al.*, 1996) 등지에서 새우류의 대량 폐사를 야기하는 병원성 세균으로 잘 알려져 있다. *V. carchariae*는 1990년대에 접어들면서 grouper, *Epinephelus coioides* (Yii *et al.*, 1997), 넙치류, *Par-*

*alichthys dentatus* (Soffientino *et al.*, 1999) 등 다양한 어종에서 대량 폐사를 유발하는 세균으로 보고되고 있다. 이들 두 종은 Pedersen *et al.* (1998)이 *V. carchariae*를 *V. harveyi*의 junior synonym으로 규정함에 따라 *V. harveyi*라는 단일종으로 통합되었다.

*V. harveyi*의 병원성 기작에 관여하는 인자로는 extracellular products (ECPs) (Zhang and Austin, 2000), bacteriophage (Munro *et al.*, 2003) 및 siderophore (Owens *et al.*, 1996) 등이 있으나 현재까지는 ECPs가 주요 병원성 인자로 알려져 있다 (Liu and Lee, 1999; Zhang and Austin, 2000). 그러나 시험에 사용된 균주나 연구자에 따라 배양 배지의 종류, 배양 온도, 배양 시간 등이 다양하여 (Lee *et al.*, 2002; Zhang and Austin, 2000), *V.*

†Corresponding Author : Soo-II Park, Tel : 051-620-6141,  
Fax : 051-620-6141, E-mail : parksi@pknu.ac.kr

*harveyi*의 병원성 기작에 관한 연구나 균주 간의 특성 비교를 위해서는 이 세균의 적정 ECPs 추출 조건에 대한 조사가 선행되어야 할 것으로 생각되었다.

따라서, 본 연구에서는 Won (2005)이 우리나라에서 처음으로 분리한 *V. harveyi*를 대상으로 하여 이 세균의 ECPs 최적 생산에 필요한 배양 시간, 배양 온도, 배양 배지 및 적정 pH의 범위를 조사하고, 나아가 열감수성 및 inhibitor를 검색하여 그 특성을 밝히고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 시험 균주

본 시험에 사용된 분리 균주와 참조 균주는 Table 1에 나타내었다. 5개의 분리 균주는 모두 *V. carchariae* type의 *V. harveyi*로 동정되었다 (Won, 2005).

#### *Vibrio harveyi* ECPs의 추출 및 단백질 정량

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

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

**Table 1.** Bacterial strains used in this study

Strain	Origin	Remark	
FF 8	Ascitic fluid of olive flounder	Koungsangnam-Do, 1999	
FF 10	Kidney of olive flounder	Busan, 1999	
FR 1	Kidney of black rockfish	Koungsangbug-Do, 1999	Isolates (n=5)
FR 2	Kidney of black rockfish	Busan, 1999	
FT 1	Kidney of turbot	Koungsangbug-Do, 1999	
ATCC 35084	Kidney of brown shark	Grimes <i>et al.</i> , 1984 <i>V. carchariae</i> type strain	Reference strains
ATCC 14126	Dead, luminescing amphipod	Baumann <i>et al.</i> , 1980 <i>V. harveyi</i> type strain	

### Proteolytic activity 측정

ECPs의 proteolytic activity는 azocasein (Sigma)을 기질로 사용한 Austin *et al.* (1998)의 방법에 따랐다. 0.1 M PBS (pH 7.2)에 녹인 1% azocasein 용액 450  $\mu$ l와 ECPs 50  $\mu$ l를 혼합하여 27°C에서 30 분간 배양한 후, 10% trichloroacetic acid (TCA, Sigma) 0.5 ml를 넣고 반응을 중지시켰다. 30 분 후, 원심 분리 (14,000  $\times$  g, 5 min, 4°C)하여 상침액으로부터 0.5 ml를 취한 다음 1 M sodium hydroxide 0.5 ml와 혼합한 후, A<sub>450</sub>으로 측정하였다 (Pharmacia). Casein 1 unit는 흡광도가 0.001 증가한 것으로 정의하였다.

### ECPs의 추출 조건

*V. harveyi* ECPs 생산의 적정 조건을 알아보기 위하여, 염분 농도, 배양 온도, 배양 배지 및 pH 등의 조건을 변화시키면서 ECPs 활성과 단백질량을 측정하였다. 염분 농도는 TSA 배지에 0.5% NaCl이 첨가되어 있는 것을 감안하여, 최종 농도가 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 및 4% (w/v)가 되도록 NaCl을 첨가하여 25°C에서 18, 24, 48, 72 시간 경과별로 각각 조사하였다. 배양 온도의 영향을 관찰하기 위해서는 20, 25 및 30°C 조건에서, 배양 배지에 따른 영향을 분석하기 위해서는 Marine agar (MA), thiosulfate bile salts sucrose (TCBS), 1.5% NaCl 첨가 brain heart infusion agar (BHIA), 1.5% NaCl 첨가 nutrient agar (NA) 및 1.5% NaCl 첨가 TSA에 접종하여 24시간 배양 후 측정하였다. pH에 따른 영향은 1.5% NaCl 첨가 TSA 배지에서 24시간 배양한 후, pH 4, 5, 6, 7, 8 및 9로 조정된 0.1 M PBS를 사용하여 ECPs를 추출하여 측정하였다.

### 열 감수성 시험

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

### Protease inhibitors에 대한 억제 효과

*V. harveyi* ECPs에 대한 각종 억제제들의 영향을 알아보기 위하여 이미 알려져 있는 aspartic 억제제인 pepstatin (50 ~ 100  $\mu$ M), 비가역적 (irreversible) cysteine 억제제인 trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino) butane (E-64, 5 ~ 20  $\mu$ M), 비가역적 serine 억제제인 phenyl-methanesulfonyl fluoride (PMSF, 1 ~ 2 mM) 및 chelating 화합물로 metallo protease 억제제인 1,10-Phenanthroline (1 ~ 2 mM)과 ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA, 5 ~ 10  $\mu$ M)를 각각의 ECPs 시료와 혼합하여 25°C에서 30 분간 전배양한 후, azocasein을 이용하여 ECPs 활성의 정도를 측정하였으며, 그 결과는 억제제 처리하기 전의 활성에 대해 처리 후에 남은 활성의 비율을 백분율 (%)로 표시하였다.

## 결 과

### *V. harveyi* ECPs 생성의 적정 조건

#### 염분 농도 및 배양 시간

*V. harveyi* ECPs 생성에 염분 농도와 배양 시간이 미치는 영향을 ECPs 활성과 단백질 양을 기준으로 분석한 결과, ECPs 활성이 가장 높은 조건은 2% NaCl 농도에서 24시간 배양한 시험구이었으며, 이 조건에서 멀어질수록 활성이 조금씩 감소하는 경향을 보였다. 이에 비해 단백질 양의 측정 결과에서는 염분 농도에 따른 뚜렷한 변화가 관찰되지 않았으나 배양 시간에 따라 차이가 나타나 48 시간째에 가장 많은 단백질을 생산하였다 (Fig. 1).

#### 배양 온도 및 배양 배지

*V. harveyi* ECPs는 1.5% NaCl 첨가 TSA (ST, NaCl final conc. = 2%) 배지에서 25°C로 배양할 때 가장 높은 활성을 나타내었다. 단백질 생성량은 TCBS에서 현저히 높게 나타났으며, 다음으로 ST에서 비교적 높게 나타났다 (Fig. 2).

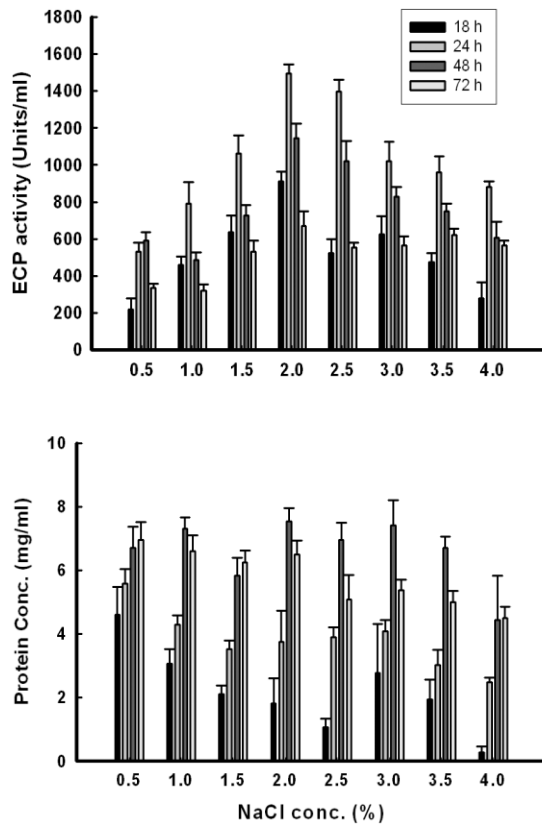


Fig. 1. Effects of NaCl concentration on the production of *Vibrio harveyi* ECPs in the tryptic soy agar. Activity of ECPs was detected by azocasein method. Protein concentration in the ECPs was measured by Bradford method.

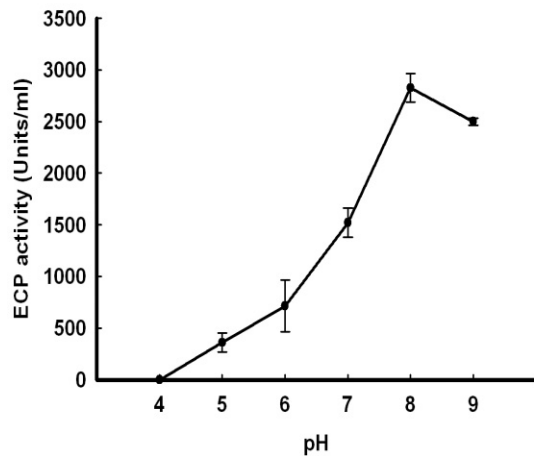


Fig. 3. Effects of pH on the production of *Vibrio harveyi* ECPs. The applied buffer was 0.1 M PBS (pH 4.0 to 9.0). Azocasein was used as substrate.

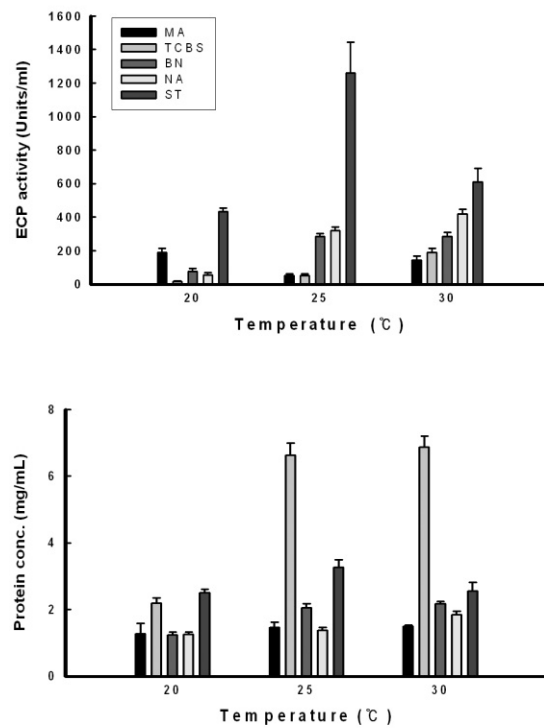


Fig. 2. Effects of temperature and media on the production of *Vibrio harveyi* ECPs. ECPs activity was detected by azocasein method. Protein concentration was measured by Bradford method. MA, marine agar; TCBS, thiosulfate citrate bile sucrose agar; BN, 1.5% NaCl added BHIA; NA, 1.5% NaCl added nutrient agar; ST, 1.5% NaCl added TSA.

### pH

*V. harveyi* ECPs 활성은 pH 8에서 최고치를 보였으며, pH 4에서는 활성이 완전히 소실되는 것으로 나타났다 (Fig. 3).

### 열 감수성 시험

*V. harveyi* ECPs의 열에 대한 안정성을 조사하기 위하여 60°C에서 30분간 가열한 후, ECPs의 활성을 측정된 결과, 모든 시험 균주의 ECPs가 가열 후에 현저히 낮은 활성을 나타냈으며, 특히 5개의 분리 균주는 0.2~1.1% 수준까지 활성이 감소되었다 (Table 2).

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

**Table 2.** Sensitivity of *Vibrio harveyi* ECPs activity on heat-treatment at 60°C for 30 min

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

**Table 3.** Effects of protease inhibitors on the proteolytic activities of *V. harveyi* ECPs

Inhibitor class	Inhibitor	Activity remaining (%)						
		FF8	FF10	FR1	FR2	FT1	ATCC 35084	ATCC 14126
Cystein protease	E-64							
	10 µM	94.96 ± 3.68	70.47 ± 10.34	78.01 ± 6.62	94.51 ± 3.05	85.19 ± 11.38	73.33 ± 9.43	22.54 ± 5.2
	20 µM	92.85 ± 0.24	63.63 ± 10.59	78.74 ± 2.92	90.94 ± 4.96	95.68 ± 8.03	70.56 ± 13.36	14.22 ± 3.9
Metallo protease	EDTA							
	5 mM	82.05 ± 5.66	70.24 ± 7.53	83.66 ± 12.24	95.1 ± 11.64	80.99 ± 13.51	78.33 ± 7.07	82.31 ± 5.73
	10 mM	81.17 ± 12.83	88.37 ± 13.31	76.48 ± 11.52	89.61 ± 13.12	83.88 ± 13.14	72.23 ± 7.86	82.41 ± 12.02
	1,10-PAM							
	1 mM	94.13 ± 4.85	93.51 ± 28.04	75.00 ± 0	91.48 ± 2.62	90.46 ± 9.45	85 ± 2.36	68.98 ± 5.31
	2 mM	85.99 ± 16.36	90.53 ± 3.97	65.07 ± 2.27	79.39 ± 7.94	85.99 ± 6.44	70 ± 4.71	71.25 ± 8.52
Aspartic protease	PepstatinA							
	50 µM	89.37 ± 4.69	78.43 ± 11.66	56.24 ± 0.62	85.37 ± 6.02	87.69 ± 2.79	76.11 ± 5.5	64.53 ± 5.17
	100 µM	67.47 ± 6.54	84.57 ± 2.98	63.53 ± 2.62	92.58 ± 2.63	76.16 ± 23.61	70.56 ± 13.36	64.33 ± 7.4
Serine protease	PMSF							
	1 mM	0	0	3.85 ± 5.48	2.74 ± 2.62	22.39 ± 8.75	0	55.44 ± 7.69
	2 mM	0	0	0	0	0	0	55.54 ± 1.39

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

*V. harveyi* ECPs의 활성을 저해하는 인자를 검색한 결과, 5개의 분리 균주와 *V. carchariae* type strain인 ATCC 35084 균주는 serine protease inhibitor인 PMSF에 의해 강하게 억제된 반면, *V. harveyi* type strain인 ATCC 14126 균주만 cysteine protease inhibitor인 E-64에 의해 억제되었다 (Table 3). 따라서 *V. carchariae* type strain ATCC 35084 및 5개의 분리 균주 ECPs의 주요 성분은 serine protease이며 *V. harveyi* type strain ATCC 14126 ECPs의 주요 성분은 cysteine protease인 것으로 나타났다.

## 고 찰

최근에 와서 *V. harveyi*의 병원성 기작에 관한 여러 가지 연구가 활발히 이루어지고 있다. Zhang and Austin (2000)은 대서양 연어에 대한 *V. harveyi*의 병원성에 ECPs의 용혈능이 관여하는 것으로 보고하였으며, Harris and Owens (1999)은 홍다리얼룩새우, *Penaeus monodon*에서 ECPs의 100 kDa 단백질이 *V. harveyi*의 독성에 직접적으로 관여한다고 보고하였다. 또한 많은 연구자들이 소량의 ECPs로도 어류에 치사 독성을 일으킨다고 보고하여 (Liu and Lee, 1999; Liu et al., 2003; Zorrilla et al., 2003), *V. harveyi*의 ECPs가 병원성 기작에 미치는 영향은 매우 큰 것으로 생각된다.

이들 연구에서 사용된 ECPs의 분리 방법에는 여러 가지가 있으나, 효소의 활성능을 측정해야 하는 경우에는 cellophane plate 법이 가장 보편적으로 사용되고 있다 (Lee et al., 2002; Zhang and Austin, 2000). Montero and Austin (1999)이 broth 배양법과 cellophane overlay 법에 따른 ECPs의 활성과 단백질 양을 측정한 결과, 단백질 양은 후자가 약간 높은 데 비해 ECPs 효소 활성이 broth 배양법에서는 거의 검출되지 않았다고 보고하여 cellophane overlay 법 선택의 당위성을 제시해주었다. 그러나 cellophane overlay 법으로 추출할 경우에도 대상이 되는 세균이나 연구자에

따라 배양 배지, 배양 온도, 배양 시간 등 배양 조건이 다양하여 (Farto et al., 2002; Lee et al., 2002), 연구 대상이 되는 세균의 적정 ECPs 생성 조건에 관한 조사가 선행되어야 할 것으로 생각된다. 본 연구에서 *V. harveyi* ECPs 생성의 적정 조건은 1.5% NaCl 첨가 TSA 배지 (NaCl 최종 농도는 2%)에 25°C로 24 시간 배양했을 때이며, 추출에 사용하는 buffer의 적정 pH는 8.0이었다. Zhang and Austin (2000)은 *V. harveyi* ECPs의 분리 조건을, 1% NaCl 첨가 TSA 배지에서 24 시간으로 하였을 때 가장 높은 활성을 보였다고 하여 본 연구의 결과와 일치하였으며 대부분의 *V. harveyi* ECPs 추출 시험에서는 이와 유사한 조건으로 수행하고 있다 (Liu and Lee, 1999). 그러나, Liu and Lee (1999)는 단백질의 농도가 96 시간째까지 꾸준히 증가한다고 보고한 반면, 본 연구의 결과에서는 48 시간째에 최고치를 보인 후 72 시간째부터는 감소하는 것으로 나타났다. Lee et al. (2002)은 *V. carchariae* type strain의 ECPs 분리시 1.5% NaCl 첨가 TSA 배지보다 1.5% NaCl 첨가 nutrient agar 배지에서 단백질 양은 적지만 효소 활성은 월등히 높게 나타낸다고 보고하였다. 이와 같이 연구자에 따라 다른 결과를 보이는 것은 사용된 균주의 차이일 가능성이 크나, 정확한 원인에 대해서는 더 조사해 볼 필요가 있을 것으로 생각한다. 본 연구에 사용된 시험 균주의 ECPs는 열에 불활화되며, 참조 균주인 ATCC 14126을 제외한 균주들은 serine protease가 주요 ECPs 성분인 것으로 밝혀졌다. 현재까지 *V. harveyi* ECPs에 관한 연구는 많이 이루어져 있으나, 대부분 *V. harveyi* type 이거나 새우류에서 분리된 균주에 관한 연구들로서 이들은 모두 cysteine protease가 주요 성분인 것으로 보고하고 있다 (Liu et al., 1997). 반면, Lee et al. (2002)은 grouper, *Epinephelus coiodes*에서 분리된 *V. harveyi* (*V. carchariae* type)의 주요 ECPs 성분이 serine protease임을 보고하여 본 연구 결과와 일치하였다. 이들 결과로 미루어 볼 때, *V. harveyi* type과 *V. carchariae* type의 주요 ECPs 성분이 다른 것으로

판단되며, 본 분리 균주들은 *V. carchariae* type 과 같은 것으로 나타났다.

### 요 약

본 연구에서는 *Vibrio harveyi*의 주요 병원성 인자로 알려져 있는 ECPs를 분리하는 적정 조건을 제시하고자 하였다. 5개의 분리균주 (FF8, FF10, FR1, FR2 and FT1 strain)와 2개의 참조균주 (ATCC 35084 및 ATCC 14126)의 ECPs를 다양한 조건에서 분리해 본 결과, 1.5% NaCl 첨가 TSA 배지에서 25°C, 24시간 배양하는 것이 가장 좋으며, ECPs 분리시의 buffer system은 pH 8.0이 적절한 것으로 나타났다. 나아가 우리 나라에서 분리한 5개의 분리 균주들의 주요 ECPs 성분이 serine protease인 것으로 조사되었다.

### 참 고 문 헌

- Austin, B., Austin, D.A., Dalsgaard, I., Gudmundsdottir, B.K., Hoie, S., Thornton, J.M., Larsen, J.L., O'Hici, B. and Powell, R.: Characterization of atypical *Aeromonas salmonicida* by different methods. *Syst. Appl. Microbiol.*, 21: 50-64, 1998.
- Bradford, M.M.: 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, 1976.
- Farto, R., Perez, M.J., Fernandez-Briera, A. and Nieto, T.P.: Purification and partial characterization of a fish lethal extracellular protease from *Vibrio pelagius*. *Vet. Microbiol.*, 89: 181-194, 2002.
- Harris, L.J. and Owens, L.: Production of exotoxins by two luminous *Vibrio harveyi* strains known to be primary pathogens of *Penaeus monodon* larvae. *Dis. Aquat. Org.*, 38: 11-22, 1999.
- Jiravanichpaisal P., Miyazaki, T. and Limsuwan, C.: Histopathology, biochemistry, and pathogenicity of *Vibrio harveyi* infecting black tiger prawn *Penaeus monodon*. *J. Aquat. Anim. Health.*, 6: 27-35, 1994.
- Lavilla-Pitogo C.R., Baticados, M.C.L., Cruz-Laciera, E.R. and De la Pena, L.D.: Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. *Aquaculture*, 91: 1-13, 1990.
- Lee, K.K., Liu, P.C. and Chuang, W.H.: Pathogenesis of gastroenteritis caused by *Vibrio carchariae* in cultured marine fish. *Mar. Biotechnol.*, 4: 267-277, 2002.
- Liu, P.C. and Lee, K.K.: Cysteine protease is a major exotoxin of pathogenic luminous *Vibrio harveyi* in the tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Letters Appl. Microbiol.*, 28: 428-430, 1999.
- Liu, P.C., Lee, K.K., Yii, K.C., Kou, G.H. and Chen, S.N.: Isolation of *Vibrio harveyi* from diseased kuruma prawns *Penaeus japonicus*. *Curr. Microbiol.*, 33: 129-132, 1996.
- Liu, P.C., Chuang, W.H. and Lee, K.K.: Infectious gastroenteritis caused by *Vibrio harveyi* (*V. carchariae*) in cultured red drum, *Sciaenops ocellatus*. *J. Appl. Ichthyol.*, 19: 59-61, 2003.
- Liu, P.C., Lee, K.K., Tu, C.C. and Chen, S.N.: Purification and characterization of a cysteine protease produced by pathogenic luminous *Vibrio harveyi*. *Curr. Microbiol.*, 35: 32-39, 1997.
- Montero, A.B. and Austin, B.: Characterization of extracellular products from an isolate of *Vibrio harveyi* recovered from diseased post-larval *Penaeus vannamei* (Bonne). *J. Fish Dis.*, 22: 377-386, 1999.
- Munro, J., Oakey, J., Bromage, E. and Owens, J.:

- Experimental bacteriophage-mediated virulence in strains of *Vibrio harveyi*. Dis. Aquat. Org., 54: 187-194, 2003.
- Owens, L., Austin, D.A. and Austin, B.: Effect of strain origin on siderophore production in *Vibrio harveyi* isolates. Dis. Aquat. Org., 27: 157-160, 1996.
- 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., Vigneulle, M. and Swings, J.: Taxonomic evidence that *Vibrio carchariae* Grimes *et al.* 1985 is junior synonym of *Vibrio harveyi* (Johnson and Shunk 1936) Baumann *et al.* 1981. Int. J. Syst. Bacteriol., 48: 749-758, 1998.
- Soffientino, B., Gwaltney, T., Nelson, D.R., Specker, J.L., Mauel, 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.
- Won K.M.: Characteristics of non-luminous *Vibrio harveyi* isolated from maricultured fishes in Korea. Ph. D. Thesis, Pukyong National University, Korea, 2005. (in Korean)
- Yii, K.C., Yang, T.I. and Lee, K.K.: Isolation and characterization of *Vibrio carchariae*, a causative agent of gastroenteritis in the groupers, *Epinephelus coioides*. Curr. Microbiol., 35: 109-115, 1997.
- Zhang, X.H. and Austin, B.: Pathogenicity of *V. harveyi* to salmonids. J. Fish Dis., 23: 93-102, 2000.
- Zorrilla, I., Arijó, S., Chabrilion, M., Diaz, P., Martinez-Manzanares, E., Balebona, M.C. and Morinigo, M.A.: *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, 2003.

---

Manuscript Received : May 26, 2006

Revision Accepted : June 15, 2006

Responsible Editorial Member : Ju-Chan Kang  
(Pukyong Univ.)