

넙치, *Paralichthys olivaceus*의 비특이적 방어기작에 대한 *Edwardsiella tarda* 균의 반응

하수진 · 우승호* · 이덕찬** · 박수일†

부경대학교 수산생명의학과, *부경대학교 수산과학연구소, **국립수산과학원 병리연구과

Responses of *Edwardsiella tarda* to innate immunity of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*

Su Jin Ha, Sung Ho Woo*, Deok Chan Lee** and Soo Il Park†

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

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

**Pathology Division, National Fisheries Research and Development Institute (NFRDI), Busan 618-902

This paper aims to compare difference with the in an ability of their resistance and survival against in a non-specific defence mechanism of the olive flounder, between the virulent and the avirulent *E. tarda* strains. The tested *E. tarda* strains, we divided into the virulent and the avirulent strain groups on the basis of a value of 50% lethal dose (LD₅₀) for the olive flounder weighed 10.3 g in average. The strains of LD₅₀ 10^{1.6} ~ 10^{4.2} cfu/fish were grouped as virulent strains, such as KE-1, KE-3, KE-5 and FSW910410. The group of avirulent strains as LD₅₀ exceeded 10^{8.7} cfu/fish were included the strains, SU100 and AL92448. A test was conducted to understand the survival ability of each strain in the mucus of the skin and the intestine of olive flounders. The results showed KE-1, KE-3, KE-5 and FSW910410 were highly to survive between 6 hours and 24 hours in intestine. The survival ability in the bile of olive flounder the number of avirulent strains declined during incubation but the virulent strain showed the number of alive bacteria having sustained or increased. In the test for the survival of bacteria in fresh sera of olive flounder, the virulent strains also had tendency to multiply. Concerning the tested bacteria internalization into the head kidney macrophages and the intracellular replication in the macrophages of olive flounder. The virulent strains exhibited strong internalization, followed high rate replication. According to the results, virulent strains of *E. tarda* revealed more ability to resist and survive in the face of humoral and cellular defence factors than avirulent strains.

Key words: Olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, *Edwardsiella tarda*, Virulence, Humoral defense, Kidney macrophage.

*Edwardsiella tarda*는 edwardsiellosis의 원인균으로 복부팽만과 탈장, 간과 신장의 농양 형성 등 전신적 증상을 나타내며, 많은 담수어와 해산어에 질병을 일으킨다 (Kusuda and Kawai, 1998). 이처럼 폭넓은 어종에 감염되어 질병을

유발하는 *E. tarda*는 피부, 아가미, 경구 등의 손상부위를 통해 감염된다고 알려져 있지만 (Ling et al., 2001), 감염에 있어 virulence factor가 어떻게 작용하는지에 관한 정보가 거의 없으며 병원성 기작과 침입 경로도 분명치 않다.

†Corresponding Author : Soo Il Park, Tel : 051-629-5939
E-mail : parksi@pknu.ac.kr

Ling *et al.* (2001)은 *E. tarda*의 *in vitro* 시험에서 독성 균주 및 비독성 균주 모두 세포 내에 침입할 수 있음을 밝힌 바 있다. Green fluorescent protein (GFP)를 이용하여 *E. tarda*의 독성 균주 및 비독성 균주가 어류의 비늘, 아가미, 장관 등에 침입하는지에 대해 연구한 결과 독성 균주가 비독성 균주에 비해 어류 내에 더 많이 들어가는 것을 확인하였다. 이러한 현상과 연관 지을 수 있는 것은 모든 감염경로의 표면이 점액으로 덮여 있으며, 이 점액은 병원체의 침입을 방지하는 1차 방어선 역할을 하고 있다는 점이다. 이를 위해서 점액에는 라이소자임 같은 효소나 다른 항균성 단백질이 들어있어 생체 방어 작용을 하고 있다 (Oren and Shai, 1996; Cole *et al.*, 1997; Dalmo *et al.*, 1997; Ebran *et al.*, 2000; Patrzykat *et al.*, 2001). 또한 *E. tarda*와 같이 세포내 기생성 세균 (intracellular pathogen)으로 알려져 있는 세균들은 식세포에 식균되더라도 세포내에서 증식하고, 이러한 식세포를 통해 혈액내로 운반되므로 (Díaz-Rosales *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2006) 이를 감염에 이용할 수도 있을 것이다.

본 연구에서는 독성 및 비독성 *E. tarda* 균주의 넘치에 대한 병원성을 확인하고, 이들 균주의 독성 강도가 넘치의 체액성 및 세포성 방어기작에 미치는 영향을 비교해보고자 하였다. 체액성 방어기작 측정을 위하여 체표 및 장 점액, 담즙 및 혈청 등에서의 생존능을 확인하고 세포성 방어기작을 측정하기 위하여 두신 macrophage 내로

의 침입 (internalization) 능력과 세포 내 증식 (intracellular replication) 능력에 대하여 시험하였다.

재료 및 방법

시험 균주

시험 균주 중 *E. tarda* 독성 균주는 국내 여러 지역에서 사육된 넘치와 turbot으로부터 분리된 균을 사용하였으며 비독성 균주인 AL92448은 Singapore National University에서 분양받아 사용하였다 (Table 1).

시험어

병원성 시험에 사용한 넘치는 경북 포항 소재의 양식장에서 사육 중인 건강한 넘치를 분양받아 사용하였으며 평균 체중은 10.5 ± 1.3 g이었다. 혈청, 담즙 및 점액 분리에 사용한 넘치 (평균체중 345 ± 20 g)는 부산 기장 소재 양어장으로부터 분양받은 것을 사용하였다. 시험어는 연구실의 실내 사육조에 옮긴 후 수온 $22 \sim 23^\circ\text{C}$ 에서 반유수식으로 관리하였으며 시험 전 1주일간 순치하여 실험에 사용하였다.

넘치에 대한 시험균의 병원성 비교

사용한 *E. tarda* 균주의 병원성 정도는 반수치 사농도 (LD_{50})로써 평가하였다. 각 시험구 당 10마리의 시험어를 사용하여 2 반복구로 실험하였다. Tryptic Soy Agar (TSA, Difco)에서 27°C , 24시

Table 1. Bacterial strains used in this study

Strains	Source location		Reference
KE-1	Olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i>	Pohang, 2000	Han <i>et al.</i> (2006)
KE-3	Olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i>	Pohang, 1999	Han <i>et al.</i> (2006)
KE-5	Turbot, <i>Scophthalmus maximus</i>	Geoje, 2002	Han <i>et al.</i> (2006)
FSW910410	Olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i>	Geoje, 1991	Han <i>et al.</i> (2006)
SU100	Eel pond water	Shizuoka (Japan), 1980	Park <i>et al.</i> (1983)
AL92448	Unknown	AU*	Ling <i>et al.</i> (2000)

*AU, Department of Fishery, Auburn University.

간 배양한 각 시험균을 멸균 생리식염수에 다양한 농도로 현탁하여 준비하고, 준비 균액 0.1 ml를 실험 넙치의 복강에 주사하였으며, 대조구는 멸균 생리 식염수 0.1 ml을 복강 주사하였다. 시험어의 사육 수온은 22.7±1.0°C로 유지하며 10일간 폐사량을 측정하였다. 폐사어는 폐사 원인을 확인하기 위하여 해부 후 병원균 재분리 시험을 수행하였다.

체표 점액 내에서의 생존능

체표 점액은 Ræder *et al.* (2007)의 방법에 따라 분리하였다. 넙치 체표를 paper towel로 가볍게 눌러 수분을 제거한 후 체표 점액을 슬라이드 글라스로 긁어 모은 다음 이 점액의 2 배에 해당하는 0.1M phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2)를 넣고 균질화하였다. 이를 14,000×g, 15분 동안 4°C에서 원심 분리한 다음 상정액을 0.22 µm pore size의 syringe filter (Corning Inc.)로 여과하여 체표 점액 시료로 사용하였다. 점액 내 생존능은 Kim *et al.* (2006)의 방법으로 시험하였다. 각 시험 균주를 Tryptic Soy Broth (TSB, Difco)에 27°C, 24시간 배양한 후 원심 분리하여 균을 모은 다음 0.1M PBS로 3회 세척하였다. 0.1M PBS로 시험균의 농도를 조절한 다음 시험 균액으로 사용하였으며, 이 시험 균액과 체표 점액 시료를 1 : 4의 비율로 혼합하여 시험균의 최종 농도가 1×10⁵ cfu/ml이 되도록 하였다. 이 혼합액을 25°C에 배양하면서 0, 1, 3, 6, 12 및 24시간 마다 Miles and Misra (1938)의 방법에 따라 생균수를 측정하였다.

장 점액 내에서의 생존능

절취한 넙치의 장을 petridish 내에 놓고 0.1M PBS로 장 안의 내용물을 세척하여 제거하고 장 점액을 해부용 칼로 긁어서 모았다. 모은 장 점액은 측정량의 2배에 해당하는 0.1M PBS를 넣고 균질화하였다. 이 균질화된 액을 10,000×g, 10분간 4°C에서 원심 분리한 다음 상정액을 분

리하고, 이를 다시 15,000×g, 15분간 4°C에서 원심 분리하여 최종 상정액을 0.22µm pore size의 syringe filter (Corning Inc.)로 여과한 후 장 점액 시료로 사용하였다. 장 점액 내에서의 세균 생존능 시험은 체표 점액 내에서의 생존능 시험과 동일한 방법으로 시험하였다.

담즙에서의 생존능

담즙은 넙치의 담낭을 무균적으로 절취한 다음 1회용 주사기로 뽑아내어서 e-tube에 모은 후, -20°C에서 보관하며 1주일 이내에 필요에 따라 해동시켜 시험에 사용하였다. TSB에 27°C, 24시간 배양한 시험균을 원심 분리하여 모은 다음 0.1M PBS로 3회 세척하였다. 0.1M PBS로 조정된 시험 균액을 넙치로부터 분리한 담즙과 1 : 9의 비율로 섞어 최종 균수가 1×10⁶ cfu/ml이 되게 하였다. 이를 25°C에서 배양하면서 0, 1, 3 및 6시간마다 생균수를 측정하였다.

넙치 혈청에서의 생존능

실험 넙치를 마취(아미노산식향산 에틸, 50 ppm)하여 미부 정맥으로부터 채혈하였다. 채혈한 혈액은 상온에서 1시간 방치한 후 이를 4°C에 2시간 정치해 둔 다음 6,000rpm에서 15분간 원심 분리하여 얻은 상정액을 신선혈청 시료로 사용하였다. 넙치 혈청에 대한 *E. tarda* 균의 생존능 시험은 Leung *et al.* (1994)의 방법에 따랐다. 각 시험 균주를 TSB에 27°C, 24시간 배양한 다음 원심 분리하여 균을 모은 후 0.1M PBS로 세척하였다. 0.1M PBS로 조정된 시험 균액과 혈청을 1 : 1 비율로 섞어 최종 균수가 1×10⁶ cfu/ml이 되게 하였으며 이 혼합액을 25°C에 배양하면서 0, 1, 3, 6, 12 및 24시간마다 생균수를 측정하였다.

넙치 두신 macrophage의 분리

넙치 두신 macrophage는 Secombes (1996)의 방법에 따라 분리하였다. 넙치 미부 정맥으로부터 채혈하여 순환 혈액을 제거한 후 무균적으로

넙치 두신을 적출한 다음 2% FBS, 1% penicillin/streptomycin 및 heparin 10 units/ml이 첨가된 L-15 medium (Sigma, pH 7.2) 2 ml씩 분주한 멸균 petridish에서 nylon membrane을 사용하여 적출한 두신을 마쇄하여 세포 현탁액을 준비하였다. 이 세포 현탁액을 실리콘 처리한 시험관에 미리 분주해 둔 34%와 51% percoll 용액 위에 조심스럽게 중층시킨 다음 500×g에서 30분간 원심 분리하여 백혈구를 분리하였다. 분리한 백혈구를 L-15 medium으로 2회 세척한 다음 0.1% trypan blue로 viability를 관찰한 후 1×10^7 cells/ml로 조정된 것을 두신 macrophage 현탁액으로 시험에 사용하였다.

Macrophage 내로의 침입력

시험은 Tang *et al.* (1993)의 방법으로 행하였다. 96-well plate의 각 well에 1×10^7 cell/ml로 조정된 두신 macrophage 현탁액 0.1 ml 씩 넣고 20°C, 2 시간 동안 배양하여 macrophage를 부착시켰다. 비부착 세포를 제거하기 위해 L-15 medium으로 2회 세척하고 1×10^7 cfu/well로 맞춘 시험 균액을 각 well에 0.1 ml 씩 첨가하고 150×g, 5분간 원심 분리하여 시험균이 macrophage monolayer에 부착하도록 하였다. well-plate는 20°C에서 1 시간 및 5 시간 동안 각각 배양한 후 각 well 내의 세포배양액을 제거하였다. macrophage 외부에 존재하는 세균은 gentamicin (최종 농도 100 µg/ml)을 첨가하여 1 시간 동안 반응시킨 후 2회 세척을 통하여 제거하였으며, 0.2% Tween 20을 함유한 멸균 증류수 50 µl를 첨가하여 macrophage를 파괴해서 세포 내에 존재하는 세균을 유출시켰다. 이 용액 내의 세균 수는 상기의 균수 측정 방법에 따랐으며, 평가는 아래의 식에 따랐다.

Internalization rate (%) = (Bacterial cell number after 1 hr or 5 hr incubation/ Bacterial cell number at 0 hr incubation) × 100

Macrophage 내에서의 증식력

시험균의 macrophage 내 증식률은 Leung and Finlay (1991) 방법을 수정하여 실험하였다. 1×10^7 cells/ml로 조정된 macrophage 현탁액을 96-well plate의 각 well에 0.1 ml씩 분주하고 20°C에서 2 시간 동안 배양하여 비부착 세포를 제거한 다음 macrophage monolayer를 만들었다. 최종 농도가 1×10^7 cfu/well이 되도록 시험균액 0.1 ml 씩 첨가하여 150×g에서 5분간 원심 분리한 후 20°C, 1 시간 배양하였다. 배양 후에 상징액과 세균의 제거는 상기의 방법에 따랐으며, 배양액을 넣은 다음 이를 0, 1 및 3 시간째에 0.2% Tween 20을 함유한 멸균 증류수 50 µl를 첨가하여 macrophage를 파괴시키고 이 용액을 단계 희석하여 세균 수를 측정하였다.

통계학적 분석

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

결 과

반수치사농도 (LD₅₀) 비교와 독성 및 비독성 균주 구분

시험균주 중 KE-1과 KE-3의 LD₅₀이 각각 $10^{1.7}$ 과 $10^{1.6}$ cfu/fish로 독성이 높았으며, FSW910410과 KE-5의 LD₅₀은 각각 $10^{4.2}$ 과 $10^{4.1}$ cfu/fish로 독성이 비교적 낮았다 (Table 2). LD₅₀ 값의 결과에 따라 KE-1, KE-3, KE-5 및 FSW910410을 독성 균주 (virulence strains)로 구분하였으며, LD₅₀ 값이 10^6 cfu/fish보다 큰 SU100과 AL92448을 비독성 균주 (avirulence strains)로 구분하였다.

체표 점액 내에서의 생존능

독성 및 비독성 균주 모두 시간이 경과할수록 체표 점액 내에서 균수가 증가하였으며, 특히 3 시간에서 12 시간 사이에는 급격히 증가하였다. 반응 6 시간에서 24 시간 사이에 독성 균주 (KE-1, KE-3, KE-5 및 FSW910410)의 균수는 비독성 균

Table 2. 50% lethal dose (LD₅₀) on the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, intraperitoneally injected with *Edwardsiella tarda* strains

Strains	Virulence				Avirulence	
	KE-1	KE-3	KE-5	FSW910410	SU100	AL92448
LD ₅₀ (cfu/fish)	10 ^{1.7}	10 ^{1.6}	10 ^{4.1}	10 ^{4.2}	>10 ^{9.0}	10 ^{8.7}

Table 3. Survival ability of the virulent and the avirulent *Edwardsiella tarda* in the olive flounder, *Paralichthys olivaceus* skin mucus (P<0.001)

Strains	Survival ability (No. of bacterial cells)				
	0 hr	3 hr	6 hr	12 hr	24 hr
KE-1	2.3 × 10 ⁵ ± 2.0 × 10 ^{4a}	2.7 × 10 ⁵ ± 2.3 × 10 ^{4ab}	8.4 × 10 ⁵ ± 5.5 × 10 ^{4cd}	5.6 × 10 ⁶ ± 6.0 × 10 ^{5fg}	1.7 × 10 ⁷ ± 2.3 × 10 ^{6ghi}
KE-3	2.1 × 10 ⁵ ± 1.7 × 10 ^{4a}	3.1 × 10 ⁵ ± 2.3 × 10 ^{4ab}	1.1 × 10 ⁶ ± 5.8 × 10 ^{4d}	6.1 × 10 ⁶ ± 1.5 × 10 ^{5fg}	2.3 × 10 ⁷ ± 2.3 × 10 ⁶ⁱ
KE-5	2.3 × 10 ⁵ ± 1.0 × 10 ^{4a}	3.0 × 10 ⁵ ± 1.5 × 10 ^{4ab}	3.3 × 10 ⁵ ± 1.5 × 10 ^{4b}	1.6 × 10 ⁶ ± 1.2 × 10 ^{5e}	6.1 × 10 ⁶ ± 2.3 × 10 ^{5g}
FSW910410	2.2 × 10 ⁵ ± 1.5 × 10 ^{4a}	3.0 × 10 ⁵ ± 2.0 × 10 ^{4ab}	6.4 × 10 ⁵ ± 1.0 × 10 ^{4c}	4.0 × 10 ⁶ ± 5.8 × 10 ^{4f}	1.1 × 10 ⁷ ± 4.6 × 10 ^{6ghi}
SU100	2.0 × 10 ⁵ ± 1.5 × 10 ^{4a}	3.5 × 10 ⁵ ± 4.2 × 10 ^{4ab}	5.8 × 10 ⁵ ± 4.5 × 10 ^{4c}	5.9 × 10 ⁶ ± 2.0 × 10 ^{5g}	9.2 × 10 ⁶ ± 4.0 × 10 ^{5h}
AL92448	2.0 × 10 ⁵ ± 2.1 × 10 ^{4a}	2.9 × 10 ⁵ ± 1.2 × 10 ^{4ab}	1.9 × 10 ⁶ ± 1.0 × 10 ^{5e}	6.8 × 10 ⁶ ± 6.1 × 10 ^{5efg}	9.3 × 10 ⁶ ± 2.3 × 10 ^{6ghi}

Table 4. Survival ability of the virulent and the avirulent *Edwardsiella tarda* in the olive flounder, *Paralichthys olivaceus* intestine mucus (P<0.001)

Strains	Survival ability (No. of bacterial cells)				
	0 hr	3 hr	6 hr	12 hr	24 hr
KE-1	2.4 × 10 ⁵ ± 5.8 × 10 ^{3a}	3.3 × 10 ⁵ ± 1.5 × 10 ^{4b}	3.4 × 10 ⁶ ± 6.7 × 10 ^{3d}	4.4 × 10 ¹⁰ ± 3.0 × 10 ^{9ij}	1.5 × 10 ¹¹ ± 1.2 × 10 ^{10k}
KE-3	2.0 × 10 ⁵ ± 2.1 × 10 ^{4a}	3.7 × 10 ⁵ ± 2.0 × 10 ^{4bc}	4.0 × 10 ⁶ ± 2.1 × 10 ^{3d}	2.2 × 10 ¹⁰ ± 3.5 × 10 ^{9g}	1.1 × 10 ¹¹ ± 1.7 × 10 ^{10jk}
KE-5	1.8 × 10 ⁵ ± 1.5 × 10 ^{4a}	3.0 × 10 ⁵ ± 2.0 × 10 ^{4b}	2.0 × 10 ⁶ ± 3.6 × 10 ^{3d}	3.6 × 10 ¹⁰ ± 2.1 × 10 ^{8f}	1.3 × 10 ¹¹ ± 1.0 × 10 ^{10k}
FSW910410	2.3 × 10 ⁵ ± 1.0 × 10 ^{4a}	4.2 × 10 ⁵ ± 5.8 × 10 ^{3c}	3.5 × 10 ⁶ ± 1.2 × 10 ^{3d}	3.2 × 10 ¹⁰ ± 2.0 × 10 ^{9hi}	2.8 × 10 ¹¹ ± 5.8 × 10 ^{9l}
SU100	1.7 × 10 ⁵ ± 1.2 × 10 ^{4a}	3.8 × 10 ⁵ ± 2.0 × 10 ^{4bc}	2.8 × 10 ⁶ ± 6.0 × 10 ^{3d}	1.6 × 10 ¹⁰ ± 5.8 × 10 ^{8g}	4.5 × 10 ¹⁰ ± 2.5 × 10 ^{9j}
AL92448	1.9 × 10 ⁵ ± 2.5 × 10 ^{4a}	3.1 × 10 ⁵ ± 5.8 × 10 ^{3b}	7.7 × 10 ⁶ ± 8.5 × 10 ^{3e}	2.5 × 10 ¹⁰ ± 1.2 × 10 ^{9h}	6.3 × 10 ¹⁰ ± 4.5 × 10 ^{9ij}

주에 비하여 유의적 증가가 확인되었으며, 특히 강한 독성을 가지는 KE-1과 KE-3 균주는 약독성을 나타내는 KE-5와 FSW910410에 비하여 균수의 유의적 증가가 확인되었다 (P<0.001). 비독성 균주인 AL92448과 SU100의 균수는 변화가 거의 없거나 감소되는 경향을 나타내었다 (Table 3).

장 점액에서의 생존능

독성 및 비독성 균주 모두 시간 경과에 따른

균수 변화가 체표 점액에서의 시험 결과와 유사한 경향을 나타내었다. 장 점액과의 반응 6시간 이후부터 균수가 급격히 증가하였으며 독성 균주의 균수 증가가 비독성 균주의 균수 증가에 비하여 유의적 차이를 나타내었다 (P<0.001). 그리고 비독성 균주 (AL92448과 SU100)의 균수 증가가 독성 균주들에 비하여 12시간에서 24시간 사이에 유의적으로 둔화되는 것이 관찰되었다 (Table 4).

담즙에서의 생존능

담즙과의 반응에서 독성 균주와 비독성 균주는 반응 개시 후 곧 비독성 균주의 균수 감소가 나타나기 시작하여 반응 3시간째에 독성 균주와 비독성 균주 사이에 균수의 유의적 차이를 나타내었다 ($P<0.001$). 그러나 독성 균주는 반응 후 1시간과 3시간째에 0시간째와 비교하여 큰 변화가 관찰되지 않다가 배양 6시간 후에 독성 균주인 KE-1, KE-3 및 KE-5의 균수가 증가하는 경향을 나타내었고 특히 강독성 균주인 KE-3의 균수 증가가 두드러졌다. 비독성 균주인 AL92448과 SU100의 균수는 감소하였으며, 특히 SU100의 균수 감소가 두드러지게 나타났다 (Fig. 1).

넙치 혈청에서의 생존능

넙치 혈청과의 반응 후 독성 균주 모두와 비독성 균주인 AL92448의 혈청 내 균수는 3시간째부터 급격히 증가하였다. 다만 독성 균주 중 약독성 균주인 KE-5의 균수 증가는 다른 독성 균주에 비하여 유의적으로 낮았으나 반응 12시간째 이후에는 다른 독성 균주의 증식 특성과 유사한 것으로 관찰되었다 ($P<0.001$). 특히 비독성 균주인 AL92448의 균수는 독성 균주와 유사한 균수 증가 경향을 보이다가 반응 12시간째에

는 독성 균주보다 더 높은 균수를 나타내었다. 또한 SU100은 혈청 내 배양 3시간 이후부터 급격하게 감소되는 경향을 나타내었다 (Fig. 2).

Macrophage 내로의 침입력

다양한 독성을 가진 각 시험균의 넙치 macrophage 내 침입력을 반응 후 1시간 및 5시간째에 측정된 결과, 비독성 균주의 침입력이 1시간째와 5시간째에 각각 $0.1 \pm 0.0 \sim 0.8 \pm 0.0\%$ 과 $0.4 \pm 0.0 \sim 7.5 \pm 0.5\%$ 에 비하여 독성균주의 침입력은 $10.0 \pm 1.1 \sim 80.8 \pm 9.8\%$ 및 $50.0 \pm 7.6 \sim 100.0 \pm 5.4\%$ 로서 유의적으로 높은 것이 확인되었다 ($P<0.05$). 특히 강독성 균주인 KE-1과 KE-3에 비하여 약독성 균주인 KE-5와 FSW910410의 macrophage 내로의 침입력이 유의적으로 높게 나타났다 (Table 5).

Macrophage 내에서의 증식력

*E. tarda*의 각 시험 균주가 넙치 macrophage 내로 침입한 후 증식력을 조사한 결과는 Fig. 3에서와 같다. 강독성 균주인 KE-1과 KE-3는 넙치 macrophage 내에서 0시간 이후부터 급격하게 증가하기 시작하여 시험 종료 시점인 3시간째까지 꾸준히 증식하는 경향을 나타내었다. 이들 강독성 균주의 macrophage 내 증식력은 1시간 및

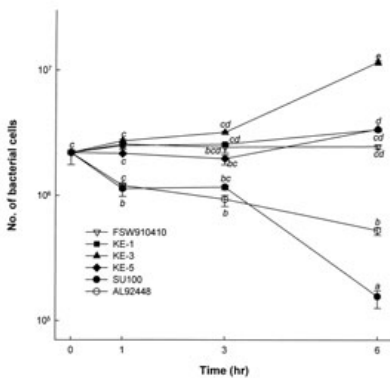


Fig. 1. Bile tolerance of the virulent and the avirulent strains of *Edwardsiella tarda*, $P<0.001$.

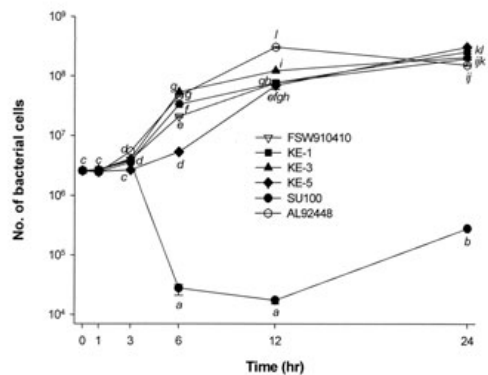


Fig. 2. Survival ability of virulent and avirulent strains of *Edwardsiella tarda* in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* serum ($P<0.001$).

Table 5. Internalization of the virulent and avirulent strains of *Edwardsiella tarda* in the olive flounder, *Paralichthys olivaceus* macrophage

Strains	% internalization	
	1 hr	5 hr
KE-1	11.1 ± 1.4 ^b	64.3 ± 1.0 ^e
KE-3	10.0 ± 1.1 ^b	63.5 ± 2.1 ^c
KE-5	48.0 ± 2.8 ^c	81.6 ± 8.5 ^{cd}
FSW910410	79.0 ± 8.5 ^{cd}	100.0 ± 5.7 ^{cd}
SU100	4.0 ± 4.2 ^b	7.5 ± 0.7 ^b
AL92448	0.0 ± 0.0 ^a	0.0 ± 0.0 ^a

*Internalization is expressed as percentage of input bacteria surviving after gentamicin treatment for 1 hr or 5 hr (P<0.05).

3시간째에 약독성 균주 (KE-5 및 FSW910410)와 비독성 균주 (AL92448 및 SU100)에 비하여 유의적으로 높게 나타났다 (P<0.05).

고 찰

본 연구에서 *E. tarda*의 균주 독성 정도에 따라 넙치의 체액성 및 세포성 면역반응에 대한 균의 병원성과 생존 능력에 대하여 검토하였다. 독성과 비독성으로 알려진 다양한 균주의 독성 능력을 확인하기 위하여 LD₅₀값을 측정하였다. 넙치 유래의 독성 균주인 KE-1, KE-3, KE-5 및 FSW910410은 LD₅₀값이 10^{4.4} cfu/fish보다 낮게 나타났으며, 특히 KE-1과 KE-3는 10^{1.6}~10^{1.7} cfu/fish로서 매우 강한 독성을 나타내었고, KE-5와 FSW910410은 10^{4.1}~10^{4.2} cfu/fish의 독성을 나타내었으나 비독성 균주로 알려진 SU100과 AL92448는 10^{8.4} cfu/fish 보다 커서 시험균 중 약한 독성을 보였다.

넙치 체표 점액에서 생존능을 관찰한 결과, 6종의 시험 균주 모두 24시간째까지 균수가 증가하였다. 그러나 *E. tarda* 독성 균주 중 KE-1, KE-3 및 FSW910410은 각 반응 시간별 균수 측정에서 독성 균주인 KE-5 및 비독성 균주 (SU100 및

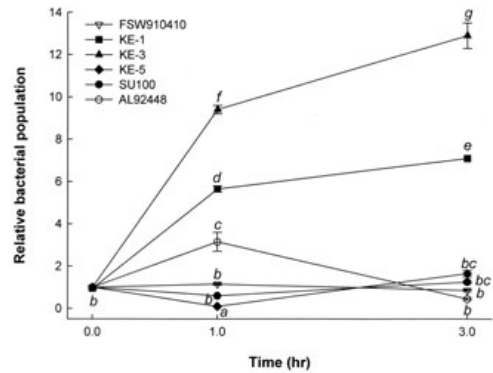


Fig. 3. Intracellular replication of the virulent and the avirulent strains of *Edwardsiella tarda* in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* macrophages. *Significant difference between *Edwardsiella tarda*; P<0.05.

AL92448)에 비하여 유의적 증가가 확인되었다 (P<0.001). 장 점액에서의 생존능 시험에서도 반응 24시간째까지 균수가 지속적으로 증가하였으며, 반응 시간별로 다소 경향의 차이는 있었으나 독성 균주 중 KE-1, KE-3 및 FSW910410의 균수가 비독성 균주 (SU100 및 AL92448)에 비하여 유의적으로 증가하였다 (P<0.001). 넙치의 체표 및 장 점액과 반응시킨 turbot 유래의 KE-5 균주는 다른 독성 균주 (KE-1, KE-3 및 FSW910410)에 비하여 생존 능력이 낮은 것으로 확인되어 분리 유래에 따라 생존능 차이가 있을 것으로 예상되며 보다 면밀한 검토가 필요하다고 생각된다. Ling *et al.* (2001)은 *E. tarda*의 감염 부위가 아가미나 장관, 체표와 같이 외부 환경과 접하고 있어서 이러한 감염 경로로 들어가 증식함에 있어서 *E. tarda* 독성 균주와 비독성 균주가 차이가 있다고 보고하였는데, 이것은 비독성 균주의 경우 다른 entry sites(비늘, 아가미 등)에 비해 장관 쪽에 그 비율이 높으나 독성 균주는 모든 entry sites에 골고루 관찰되므로 독성 균주가 비독성 균주에 비하여 체표 점액뿐만 아니라 장관에서 분비되는 점액에서도 잘 생존한다는 본 연구의 결과와도 유사한 경향을 나타내었다.

담즙에서 *E. tarda* 균주의 생존능을 확인하였을 때 독성 균주인 (KE-1, KE-3, KE-5 및 FSW910410)는 시간이 경과할수록 균수가 증가하지만 비독성 균주의 경우 급격히 감소하는 경향을 나타냈었으며, 특히 반응 3시간 후에 일부 균들의 균수 변화가 심하였다 ($P < 0.001$). Pumbwe *et al.* (2007)은 0.15% bile salt mixture와 0.15% bile salt conjugate 처리한 구간에서 담즙을 처리하지 않은 구간보다 *Bacteroides fragilis*의 성장이 7시간까지 더 낮아 균의 성장이 지연된다고 보고하고 있으며, Hyronimus *et al.* (2006) 역시 lactic acid bacteria인 *Bacillus coagulans*와 *Bacillus racemilacticus*가 담즙을 처리한 구간에서 균의 성장이 지연된다고 보고하고 있다. 본 연구에서 *E. tarda* 균주는 독성 정도에 따라 넘치 담즙에 대하여 반응 정도를 달리하며 독성이 강한 균일수록 담즙에 강한 내성을 보이는 것으로 확인되었다.

넘치 신선혈청 내에서 *E. tarda* 균의 생존능을 조사하였을 때, 독성 균주들 (KE-1, KE-3, KE-5 및 FSW910410)의 균수 변화 경향은 유사하였다. 그러나 신선혈청과의 반응 6시간 및 12시간 째에 강독성 균주 (KE-1와 KE-3)의 균수 증가는 독성이 상대적으로 약한 균주 (KE-5와 FSW910410)에 비하여 균수가 유의적으로 증가하였다 ($P < 0.001$). 그러나 AL92448 균주는 독성 균주들에 비하여 균수가 유의적으로 증가하였으나 SU100은 혈청과의 반응 3시간 후 급격하게 감소하였다. 이러한 결과는 Han *et al.* (2006)의 연구 결과와 유사하며, *E. tarda* 균에 대한 넘치 혈청의 작용이 크지 않거나 균주 유래에 따른 차이를 반영하는 현상으로 사료된다.

넘치 두신으로부터 분리한 macrophage 내로의 침입 시험에서 *E. tarda* 독성 균주의 침입력이 비독성 균주에 비하여 높게 나타났다. 그러나 반응 1시간 및 5시간째에 강독성 균주 (KE-1와 KE-3)의 macrophage 내의 침입력은 약독성 균주 (KE-5와 FSW910410)에 비하여 유의적으로 낮았다 ($P < 0.001$). 이러한 결과는 강독성 균주가

macrophage의 주화반응 (chemotaxis)과 식작용 (phagocytosis)에 대한 회피작용이 강하기 때문으로 판단된다 (Weeks *et al.*, 1988; Han *et al.*, 2006). 넘치 macrophage 내에 들어간 다음 *E. tarda* 독성 균주 (KE-1과 KE-3)는 약독성 균주 (KE-5와 FSW910410)와 비독성 균주에 비하여 유의적으로 빠른 세포내 증식이 관찰되었다 ($P < 0.001$). Srinivasa Rao *et al.* (2001)은 균의 증식 정도가 독성 균주에 비해 비독성 균주가 작으나 독성과 비독성 *E. tarda* 균주 모두 blue gourami의 macrophage 내에서 시간이 갈수록 증가한다고 보고하였으며, Ishibe *et al.* (2008)은 넘치의 복강 macrophage에서 독성이 높은 균주는 살아남을 뿐 아니라 시간이 갈수록 증식하는 반면 독성이 낮은 균주는 이러한 능력을 가지지 못한다고 보고하였다. 강독성 균주가 일단 macrophage의 식작용에 의하여 유입이 되면 세포 내에서 빠르게 증식하는데 이는 phagocyte-mediated killing과 H_2O_2 에 저항성을 가지는데 관여하는 catalase (KatB)가 독성 균주에는 존재하기 때문이며 (Barnes *et al.*, 1999; Srinivasa Rao *et al.*, 2003), 본 연구에서도 *E. tarda* 독성 균주는 macrophage에 대한 회피 작용과 세포 내 증식이 비독성 균주에 비하여 강한 것으로 확인되었는데 이것은 superoxide dismutase (SOD)와 catalase 분비를 통하여 macrophage에 의하여 분비되는 hydrogen peroxide와 다양한 hydroxyl radicals를 불활화하는 것과 관련성이 있을 것으로 판단된다 (Sarinivasa Rao *et al.*, 2001; Díaz-Rosales *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2006).

이상의 결과에서 LD_{50} 값이 낮은 독성 균주들은 비독성 균주들에 비하여 넘치의 체포와 장점액, 담즙 및 혈액으로부터 분리한 혈청 등의 체액성 방어인자에 대한 생존과 증식 능력이 높았으며, 독성 균주 중에서도 강독성 균주가 약독성 균주에 비하여 넘치의 체액성 방어기작에 대한 저항성이 높은 것으로 나타났다. 뿐만 아니라 넘치 신장 macrophage의 식작용에 대한 반응에서 독성 균주가 비독성 균주에 비하여 식세포

내로의 유입 능력과 식세포 내에서의 증식 능력이 강한 것으로 나타났으며, 독성 균주 중에서도 강독성 균주는 식세포의 식작용을 회피하는 능력이 약독성 균주보다 강한 것으로 확인되었다. 이는 *E. tarda* 균의 독성 정도에 따라 넙치 어체 내로의 침입력과 증식력에서 차이가 나며, 병원성의 발현에도 영향을 미치는 것으로 판단된다.

요 약

*Edwardsiella tarda*는 edwardsiellosis를 유발하는 원인 병원체이며, 국내 사육 중인 넙치에 심각한 피해를 나타낸다. 본 연구에서는 독성 및 비독성 *E. tarda* 균주가 넙치의 비특이적 방어기작에 대하여 저항하는 차이를 확인함으로써 병원성 인자의 구명과 효과적인 백신을 제조하기 위한 자료를 얻고자 하였다. 독성 및 비독성 균주의 구분은 평균 체중 10.3g 크기의 넙치에 대한 반수치사농도 (LD₅₀) 값을 기준으로 하였으며, LD₅₀ 값이 10^{1.6}~10^{4.2} cfu/fish의 값을 가지는 균주를 독성 균주 (KE-1, KE-3, KE-5 및 FSW910410)로, >10^{4.2} cfu/fish의 값을 가지는 균주를 비독성 균주 (SU100 및 AL92448)로 구분하였다. 넙치 체표 점액과 장 점액에 대한 각 균주의 생존능 시험 결과, 독성 균주가 반응 6시간에서 24시간 사이에 생존능이 높게 나타나는 경향을 보였다. 담즙에서의 생존능 측정에서 비독성 균주의 균수는 시간의 경과에 따라 감소하지만 독성 균주는 균수가 유지되거나 증가하는 경향을 나타내었다. 넙치 신선혈청 내 생존능의 측정에서도 독성 균주의 균수는 증가하는 경향을 보였다. 세포성 방어기작인 macrophage 내로의 침입력과 세포 내에서의 증식력을 측정한 결과, 독성 균주의 경우 침입력 정도가 높을 뿐만 아니라 침입 후의 증식력도 높은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 독성 *E. tarda* 균주가 비독성 균주에 비하여 넙치의 체액성 방어인자와 세포성 방어인자에 대한 저항과 증식 능력이 높으며, 이러한 일련의 기작들이 질병의 감염과 발병

에 영향을 미치는 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

- Barnes, A.C., Balebona, M.C., Horne, M.T. and Ellis, A.E.: Superoxide dismutase and catalase in *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and their roles in resistance to reactive oxygen species. *Microbiol.*, 145: 483-494, 1999.
- Cole, A.M., Weis, P. and Diamond, G.: Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder. *J. Biol. Chem.*, 272: 12008-12013, 1997.
- Dalmo, R.A., Ingebrigtsen, K. and Bogwald, J.: Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). *J. Fish Dis.*, 20: 241-273, 1997.
- Díaz-Rosales, P., Chabrilón, M., Arijo, S., Martínez-Manzanares, E., Moriñigo, M.A. and Balebona, M.C.: Superoxide dismutase and catalase activities in *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*. *J. Fish Dis.*, 29: 355-364, 2006.
- Ebran, N., Julien, S., Orange, N., Auperin, B. and Molle, G.: Isolation and characterization of novel glycoproteins from fish epidermal mucus: correlation between pore-forming properties and their antibacterial activities. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1467: 271-280, 2000.
- Han, H.J., Kim, D.H., Lee, D.C., Kim, S.M. and Park, S.I.: Pathogenicity of *Edwardsiella tarda* to olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel). *J. Fish Dis.*, 29: 601-609, 2006.
- Hyronimus, B., Le Marrec, C., Hadj Sassi, A., De-

- schamps, A.: Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 61: 193-197, 2006.
- Ishibe, K., Osatomi, K., Hara, K., Kanai, K., Yamaguchi, K. and Oda, T.: Comparison of the responses of peritoneal macrophages from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) against high-virulent and low-virulent strains of *Edwardsiella tarda*. *Fish Shellfish Immunol.*, 24: 243-251, 2008.
- Kim, D.H. Studies on probiotics and microbial diversity in the intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Ph. D. Thesis. Heriot-Watt University, pp. 57-58, 2006.
- Kusuda, R. and Kawai, K. Bacterial diseases of cultured marine fish in Japan. *Fish Pathol.*, 33: 221-227, 1998.
- Leung, K.Y. and Finlay, B.B.: Intracellular replication is essential for the virulence of *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 88: 11470-11474, 1991.
- Leung, K.Y., Yeap, I.V., Lam, T.J. and Sin, Y.M.: Serum resistance as a good indicator for virulence in *Aeromonas hydrophila* strains isolated from diseased fish in South-East Asia. *J. Fish Dis.*, 18: 511-518, 1994.
- Ling, S.H.M., Wang, X.H., Lim, T.M. and Leung, K.Y.: Green fluorescent protein-tagged *Edwardsiella tarda* reveals portal of entry in fish. *FEMS Microbiol. Lett.*, 194: 239-243, 2001.
- Miles, A.A. and Misra, S.S.: The estimate of the bacterial power of the blood. *J. Hygiene*, 38: 873-885, 1938.
- Oren, Z. and Shai, Y.: A class of highly potent antibacterial peptides derived from paradaxin, a pore-forming peptide isolated from Moses sole fish *Pardachirus marmoratus*. *Eur. J. Biochem.*, 237: 303-310, 1996.
- Patrzykat, A., Zhang, L., Mendoza, V., Iwama, G.K. and Hancock, R.E.W.: Synergy of histone-derived peptides of coho salmon with lysozyme and flounder pleurocidin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45: 1337-1342, 2001.
- Pumbwe, L., Skilbeck, C.A., Nakano, V., Avila-Campos, M.J., Piazza, R.M.F. and Wexler, H.M.: Bile salts enhance bacterial co-aggregation, bacterial-intestinal epithelial cell adhesion, biofilm formation and antimicrobial resistance of *Bacteroides fragilis*. *Microb. Pathog.*, 43: 78-87, 2007.
- Rashid, M.M., Mekuchi, T., Nakai, T. and Muroga, K.: A serological study on *Edwardsiella tarda* strains isolated from diseased Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish Pathol.*, 29: 277, 1994.
- Ræder, I.L.U., Paulsen, S.M., Smalås, A.O. and Willassen, N.P.: Effect of fish skin mucus on the soluble proteome of *Vibrio salmonicida* analysed by 2-D gel electrophoresis and tandem mass spectrometry. *Microb. Pathog.*, 42: 36-45, 2007.
- Secombes, C.J.: The nonspecific immune system; cellular defenses. *In* The Fish Immune System; Organism, Pathogen and Environment (Iwama G. and Nakanishi T., eds). pp. 63-103. Academic Press, San Diego, 1996.
- Srinivasa Rao, P.S., Lim, T.M. and Leung, K.Y.: Oposonized virulent *Edwardsiella tarda* strains are able to adhere to and survive and replicate within fish phagocytes but fail to stimulate reactive oxygen intermediates. *Infect. Immun.*, 69: 5689-5697, 2001.
- Srinivasa Rao, P.S., Yamada, Y. and Leung, K.Y.: A major catalase (KatB) that is required for resistance to H₂O₂ and phagocyte-mediated killing in *Edwardsiella tarda*. *Microbiol.*

149: 2635-2644, 2003.

Tang, P., Foubister, V., Pucciarelli, M.G. and Finlay, B.B.: Methods to study bacterial invasion. J. Microbiol. Methods, 18: 227-240, 1993.

Weeks, B.A., Sommer, S.R. and Dalton, H.P.: Chemotactic response of fish macrophages to *Legionella pneumophila*: correlation with

pathogenicity. Dis. Aquat. Org., 5: 35-38, 1988.

Manuscript Received : July 8, 2008

Revision Accepted : October 29, 2008

Responsible Editorial Member : Kang, So Young
(Chonnam National University)