

*Vibrio harveyi*에서 분리한 extracellular products (ECPs)의 특성과 독성

최정현 · 원경미* · 하수진** · 김이청 · 변순규 · 이백익 · 이종하*** · 허민도** · 박수일**†

국립수산과학원 동해특성화연구센터, *부경대학교 수산과학연구소,
부경대학교 수산생명의학과, *국립수산과학원 동해수산연구소

Characterization and pathogenicity of extracellular products (ECPs) of *Vibrio harveyi*

Jeong Hyun Choi, Kyoung Mi Won*, Su Jin Ha**, Yi Cheong Kim, Soon Gyu Byun,
Bae Ik Lee, Jong Ha Lee***, Min Do Huh** and Soo Il Park**†

East Sea Mariculture Research Center, National Fisheries Research & Development
Institute, Uljin gun, 767 863, Korea

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

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

***East sea Fisheries Research Institute, NFRDI, Gangneung 210 861, Korea

Vibrio harveyi, one of the major causal agent of vibriosis, affects a diverse range of marine vertebrates and invertebrates over a wide geographical area. The aims of this study were to investigate the characteristics of extracellular products (ECPs) of the pathogenic non luminous *V. harveyi* and the luminous *V. harveyi*. And the ECPs of *V. harveyi* were examined the pathogenicity to the black rockfish, *Sebastes schlegeli*, and histopathological changes of internal organs injected by ECPs. Four strains of *V. harveyi* cultures produced ECPs showing various enzymatic activities (caseinase, gelatinase, phospholipase, lipase, haemolysin). These ECPs showed strong cytotoxicity on macrophages of black rockfish, *Sebastes schlegeli* and olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Especially, the virulence of ECPs from the isolate of *V. harveyi* FR 2 was higher than other strains of *V. harveyi* in the intraperitoneally injected black rockfish. Also, the ECPs of *V. harveyi* FR 2 caused the expansion of sinusoids in the liver, the activation of ellipsoid in the spleen and the sloughing of the epidermal cell in the intestine. It was suggested that the ECPs from *V. harveyi* play an important role in the pathogenicity process of the *V. harveyi*.

Key words: *Vibrio harveyi*, Extracellular products, Pathogenicity

*Vibrio harveyi*는 1980년대부터 새우양식장이 밀집해 있는 인도네시아 (Su naryanto and Mariam, 1986), 필리핀 (Lavilla Pitogo *et al.*, 1990), 태국 (Jiravanichpaisal *et al.*, 1994) 및 대만 (Liu *et al.*, 1996a) 등에서 새우류의 대량 폐사를 일으키는 luminous vibriosis의 원인으로 보고되었고,

1990년대 후반에 들어서면서, 여러 해수어류에도 감염된다는 보고가 늘고 있다 (Kraxberger Beatty *et al.*, 1990; Ishimaru and Muroga 1997; Alvarez *et al.*, 1998).

*V. harveyi*의 지리적 분포 또한 매우 넓어 미국, 이탈리아, 스페인 및 동남아시아 전역에 걸

†Corresponding Author : Soo Il Park, Tel : 051-629-5939
Fax : 051-629-5938, E-mail : sipark@pknu.ac.kr

쳐 발병 사례가 늘고 있으며, 특히 최근에는 우리 나라와 가까운 대만과 중국의 양식 해수 어류와 일본의 양식 전복, *Haliotis tuberculata*에서도 발병 사례가 보고되었다 (Nishimori *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2003).

이와 같이 최근 10 여 년간, 전 세계의 다양한 수산 동물에서 *V. harveyi*의 감염에 대한 보고가 있고 특히 우리 나라 주변국인 일본, 중국, 대만 등에서는 이미 심각한 발병 사례들이 늘어나고 있는 추세이다 (Nishimori *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2003). 우리 나라에서는 1999년 여름철에 경북, 경남 및 부산 인근의 몇몇 넙치 양식장에서 세균성 감염증으로 보이는 질병에 의해 넙치의 대량 폐사가 발생하면서 처음으로 확인되었다 (Won *et al.*, 2006).

*V. harveyi*의 병원성 요인으로 extracellular products (Liu *et al.*, 1996b; Liu and Lee, 1999; Lee *et al.*, 2002; Zhang and Austin, 2000; Soto Rodriguez *et al.*, 2003), lipopolysaccharide (Montero and Austin, 1999), bacteriophage (Oakey and Owens, 2000), bacteriocin like substance (Pasharawipas *et al.*, 2005), quorum sensing factors (Henke and Bassler, 2004) 등이 보고되었다. 특히 extracellular products (ECPs)의 독력에 관한 연구가 중심이 되고 있다. 이러한 예로서 Lee *et al.* (2002)은 Grouper, *Epinephelus coioides*와 Red drum, *Sciaenops ocellatus*에 ECPs를 복강 주사하였을 때 주요 증상과 함께 폐사가 보임을 보고하였으며 Zhang and Austin (2000)은 ECPs의 활성, 용혈능, 세포 독성 및 salmon과 trout에 대한 병원성 시험을 통하여 *V. harveyi*의 ECPs가 중요한 병원성 인자의 하나임을 보고하였다. Montero and Austin (1999)은 Lobster, *Nephrops norvegicus*에 ECPs를 주사하고 15 분 후 hemocyte의 수가 감소함을 보고하였다. 이러한 연구 결과로 새우류와 해수 어류 모두에서 *V. harveyi* ECPs가 주요 병원성 요소의 하나임을 알 수 있었다.

따라서 본 연구에서는 *V. harveyi* ECPs의 특성

과 독성을 알아보고자 non luminous *V. harveyi*와 luminous *V. harveyi* 분리 균주에서 ECPs를 분리하여 proteolytic activity, 용혈능 및 세포 독성의 특성을 알아보았다. 또한 조피볼락, *Sebastes schlegeli*에 대한 독성을 인위 감염 시험을 통하여 조사, LD₅₀ 값으로 나타내었으며, ECPs 영향으로 인한 병리조직학적 변화를 관찰하였다.

재료 및 방법

시험균주

Won *et al.* (2006)에 의해 조피볼락에서 분리된 non luminous *Vibrio harveyi* 분리 균주 FR 2와 Zhang and Austin (2000)에 의해 새우에서 분리된 luminous *Vibrio harveyi* VIB 391 균주를 사용하였으며, 후자는 영국 Herriot Watt University에서 분양받아 사용하였다. 또한 시험용 참조 균주는 KCCM (Korean Culture Center of Microorganisms)에서 분양받은 ATCC 35084와 ATCC 14126을 사용하였다. 시험에 사용한 모든 균주는 1.5 % NaCl 첨가 tryptic soy agar (TSA, Difco)와 thiosulfate citrate bile salts sucrose agar (TCBS, Merck)에 도말한 후 27 °C, 24 시간 배양하여 swarming activity 및 luminescence를 확인하였다 (Table 1).

시험어

Haemolytic activity와 cytotoxicity 시험에 사용한 조피볼락, *Sebastes schlegeli* (평균 전장 23 ± 0.5 cm)는 부산 기장 소재의 양식장에서 분양받았으며, 넙치, *Paralichthys olivaceus* (평균 전장 25 ± 0.5 cm)는 경북 울진 소재의 양식장에서 분양받았다.

독성 시험에 사용한 조피볼락 (평균 어체중 15 ± 0.5 g)은 경남 거제 소재의 양식장과 경남 통영 소재의 양식장에서 분양받아 부경대학교 수산과학연구소 수조실의 2 톤 사육 수조에서 수온 23~24 °C로 2 주일간 반유수식으로 순치시

Table 1. Vibrio strains used in this study

Strain	Origin	Remark
FR2 (non-luminous)	Kidney of black rockfish*	Busan, Korea 1999
VIB 391 (luminous)	Unnamed shrimp species	Thailand, 1990
ATCC 35084 (non-luminous)	Kidney of brown shark	Grimes et al., 1984 <i>V. carchariae</i> type strain
ATCC 14126 (luminous)	Dead, luminescing amphipod	Baumann et al., 1980 <i>V. harveyi</i> type strain

* black rockfish, *Sebastes schlegel*

킨 후 사용하였다.

Vibrio harveyi extracellular products (ECPs)의 추출

시험균주의 ECPs 추출은 Zhang and Austin (2000)에 의한 cellophane overlay 방법을 사용하였다. 1.5 % NaCl 첨가 TSA 위에 121 °C, 15 분간 멸균된 cellophane membrane을 얹고, TSB에 24 시간 동안 전배양된 균액 200 µl를 멸균 삼각 유리병으로 고르게 도말하였다. 시험균이 접종된 배지를 25 °C, 24 시간 배양한 후, cellophane membrane을 새로운 petridish에 옮기고 0.1 M PBS (pH 7.4) 2 ml로 세척하여 모았다. 이 현탁액을 4 °C, 20,000 × g, 30 분간 원심 분리하여 상정액을 분리하였으며, 이를 0.22 µm pore size의 syringe filter (Corning Inc.)로 여과한 것을 ECPs 액으로 사용하였다.

Vibrio harveyi extracellular products (ECPs)의 생화학적 특성

단백질 정량

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

Caseinase activity

Caseinase activity는 Zhang and Austin (2000)에

따라 azocasein (Sigma)을 기질로 하여 측정하였다. 즉, 0.1 M PBS (pH 7.2)에 녹인 1 % azocasein 용액 450 µl와 ECPs 50 µl를 혼합하여 27 °C에서 30 분간 배양한 후, 10 % trichloroacetic acid (TCA, Sigma) 0.5 ml을 넣고 반응을 중지시켰다. 30 분 후, 원심 분리 (14,000 × g, 5 min, 4 °C)하여 상정액으로부터 0.5 ml을 취한 다음 1 M sodium hydroxide 0.5 ml과 혼합하여, A450으로 측정하였다 (Pharmaciabiotech Ultrospec 3000). Caseinase 1 unit는 흡광도 값이 0.001 증가한 것으로 정의하였다.

Gelatinase activity

Gelatinase activity는 Zhang and Austin (2000)에 따라 caseinase activity법을 변형하여 측정하였다. 즉, 0.1 M PBS (pH 7.2)에 0.8 % (w/v) gelatine (Oxoid) 용액을 제작한 후 gelatin 용액 450 µl와 ECPs 50 µl를 잘 혼합하여 28 °C, 30분간 반응시켰다. 반응 후 30 % (w/v) TCA 1.5 ml을 첨가하여 반응을 정지시킨 다음 A₂₈₀에서 측정하였다 (Pharmaciabiotech Ultrospec 3000). Gelatinase 1 unit는 흡광도 값이 0.001 증가한 것으로 정의하였다.

Phospholipase and lipase activity

Phospholipase와 lipase activity는 Liu et al. (1996b)에 따라 1 % (w/v) agarose에 egg yolk 또는 1 % (v/v) Tween 80을 첨가하여 직경 4 mm

wells를 만든 후 ECPs 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 각각의 well에 20 μl 씩 분주하고 습윤 상자에서 28 $^{\circ}\text{C}$, 48 시간 반응시킨 다음 well 주위의 clear zone을 측정하였다.

용혈능

Haemolytic activity는 Zhang and Austin (2000)의 방법을 변형하여 실험하였다. 즉, 5%의 조피볼락 및 넙치의 적혈구가 첨가된 Columbia blood agar (Difco)를 각각 제작하여 직경 4 mm wells를 만든 후 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 조정된 ECPs를 100 μl 씩 주입하였다. 접종한 배지는 27 $^{\circ}\text{C}$, 72 시간 동안 배양하고, well 주위의 clear zone이 형성되는 처음 시간과 크기를 측정하였다.

어류에서 분리한 두신 세포에 대한 세포 독성

V. harveyi ECPs의 조피볼락과 넙치 세포에 대한 독성을 알아보기 위하여 신장 macrophage를 분리한 다음 monolayer를 제작하였다. RPMI 1640 배지에 5% (v/v) Fetal bovine serum (FBS, GibcoBRL), 1% antibiotic antimycotic agent (GibcoBRL) 및 heparin 10 units/ml이 되도록 첨가하고 각 cell line을 1×10^7 cells/ml의 농도가 되도록 조정하여 24 well plate (Corning Inc.)의 각 well에 1 ml씩 접종하고 20 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간 단층 배양하였다. 배양 후 각 well 내의 배지를 제거하고, 각 시험 균주의 ECPs를 5% FBS가 첨가된 RPMI 1640 배지로 단백질 농도가 0, 100 및 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 제작하여 각 well에 다시 주입하였다. 각 균의 ECPs가 접종된 24 well plate는 20 $^{\circ}\text{C}$, 24 시간동안 배양하였으며 cell line의

세포 형태를 도립 현미경 (Olympus, CK 2)으로 관찰하였다. 현미경 관찰에서 ECPs를 첨가하지 않은 well의 cell line을 대조구로 하여 세포변성 효과를 확인하였다 (Suprpto *et al.*, 1996).

조피볼락에 대한 *Vibrio harveyi* ECPs의 치사 독성 시험

V. harveyi ECPs의 치사 독성을 조사하기 위하여 각각의 균주로부터 추출한 ECPs 시험액을 100, 500 및 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 조정하여 조피볼락의 복강에 0.1 ml씩 주사하였다. 수온은 24 ± 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 로 유지하였으며, 7 일간의 폐사율을 기록한 후 Profit 법 (醫科學研究所學友會, 1976)에 따라 LD₅₀을 구하였다.

조직 병리학적 영향 시험

ECPs를 복강 주사 한 조피볼락의 전 장기는 Bouin's solution에 전고정하고 24 시간 후에 다시 동종의 고정액에 48 시간 후고정하였다. 고정된 조직을 수세하고 70%에서 100%까지의 순차농도의 알코올로 탈수하고, xylene으로 투명화한 후 파라핀을 친화시켰다. 파라핀으로 침투 및 포매한 후 Rotary형 microtome (Reichert Jung 820, Leica)으로 박절한 다음 통상적인 방법에 의해 H&E 염색하였다.

결 과

Vibrio harveyi extracellular products (ECPs)의 생화학적 특성

Table 2. Characteristics of the extracellular products *Vibrio harveyi*

Strains	Protein Conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Caseinase (units/ml)	Phospholipase (egg yolk)
FR2	158.48 \pm 3.26	9.87 \pm 0.59	-
VIB 391	363.91 \pm 28.80	37.36 \pm 0.39	-
ATCC 35084	585.38 \pm 22.01	0.32 \pm 0.07	+
ATCC 14126	227.50 \pm 10.87	1.68 \pm 0.03	-

단백질 정량

V. harveyi ECPs의 단백질 생성량은 참조 균주인 ATCC 35084가 가장 높았고 분리 균주인 FR 2가 가장 낮게 나타났다 (Table 2).

효소 활성 시험

V. harveyi ECPs의 caseinase activity는 분리 균주 VIB 391에서 가장 높았고 참조 균주인 ATCC 35084에서 가장 낮게 나타났다 (Table 2). Gelatinase activity는 2 개의 분리 균주와 2 개의 참조 균주 모두에서 나타나지 않았으며 phospholipase activity는 참조 균주 ATCC 35084 에서만 나타났고 lipase activity는 모든 시험균주에서 관찰되지 않았다 (Table 2).

용혈능

V. harveyi ECPs의 조피볼락과 넙치 적혈구에 대한 용혈능을 분석한 결과, 조피볼락 적혈구가 첨가된 배지에서는 분리 균주 FR 2와 VIB 391이 참조 균주 ATCC 35084와 ATCC 14126보다 첫 용혈이 관찰된 initial time이 늦고 관찰 시점의 clear zone도 작게 나타났다. 넙치 적혈구가 첨가된 배지에서는 조피볼락 적혈구가 첨가된 배지와 비슷한 결과를 나타내었다. 또한 조피볼락 적혈구 첨가 배지가 넙치 적혈구 첨가 배지보다 모든 시험 균주의 initial time이 빨랐으며 분리 균주 VIB 391은 시험 균주 중에서 가장 약한 용혈능을 나타내었다 (Table 3).

어류에서 분리한 두신 세포에 대한 세포 독성

조피볼락과 넙치의 신장으로부터 분리한 mac

Table 3. Haemolytic activity of the *Vibrio harveyi* extracellular products after incubation of 300 $\mu\text{g ml}^{-1}$ on the blood agar prepared with 5 % of hemocytes from black rockfish (A), *Sebastes schlegeli* and olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (B) for 72h

(A)

Tested strains	Time (Hours)						
	7	9	18	19	24	48	72
FR2	-	-	+ ^w	+ ^w	+	+	+++
VIB 391	-	-	-	+ ^w	+ ^w	+	++
ATCC 35084	+ ^w	+ ^w	+ ^w	+ ^w	+	++	++++
ATCC 14126	-	+ ^w	+ ^w	+ ^w	+	++	++++

(B)

Tested strains	Time (Hours)					
	10	13	23	28	48	72
FR2	-	-	+ ^w	+	+	++
VIB 391	-	-	-	+ ^w	+	++
ATCC 35084	+ ^w	+ ^w	+	+	++	+++
ATCC 14126	-	+ ^w	+	+	++	+++

(-) no zone of clearing; (+^w) diameter of zone of clearing or opalescence of ≤ 10 mm; (+) diameter of zone of clearing or opalescence of ≤ 20 mm; (++) diameter of zone of clearing or opalescence of ≤ 30 mm; (+++) diameter of zone of clearing or opalescence of ≤ 40 mm; (++++) diameter of zone of clearing or opalescence of ≥ 40 mm.

rophage monolayer에 대한 세포 독성을 측정 한 결과, 모든 시험 균주에서 세포변성효과가 나타났다. 또한 분리 균주 FR 2가 다른 균주에 비해 다소 강한 활성을 나타내었으며 특히 조피볼락 신장으로부터 분리한 macrophage monolayer에서 강한 세포 독성을 나타내었다(Table 4, Fig. 1).

조피볼락에 대한 *V. harveyi* ECPs의 치사 독성 시험

V. harveyi ECPs를 조피볼락에 복강 주사한 결과, 분리 균주 FR 2의 LD₅₀ 값이 55 µg/fish로 강한 병원성을 나타내었으며, 분리 균주 VIB 391의 LD₅₀ 값이 79.2 µg/fish, 참조 균주 ATCC 14126은 >100 µg/fish로 약한 병원성을 나타내었다 (Table 5).

조직 병리학적 영향 시험

조피볼락의 조직 병리학적 영향을 조사한 결과, 모든 시험 균주에서 간의 sinusoid 확장이 관찰되었고 (Fig. 2), 비장에서는 ellipsoid의 활성을 관찰할 수 있었으며 이러한 병리 소견은 특히

분리 균주 FR 2에서 강하게 나타났다(Fig. 2). 또한 장 상피 세포의 탈락을 관찰할 수 있었는데 이러한 병리 소견은 분리 균주 FR 2에서만 나타났다 (Fig. 3).

고 찰

어류 병원성 세균의 ECPs는 독소와 다양한 효소를 함유하고 있어 조직 손상을 일으키며, 다양한 세포의 효소로서 amylase, chitinase, chondroitinase, collagenase, DNase, elastase, gelatinase, lipase, mucinase, lecithinase (or phospholipase) 및 protease 등이 알려져 있다 (Yamada and Wakabayashi, 1999). 이러한 독소와 세포의 효소는 직접 숙주 세포들을 공격하거나 기능을 저하시키며, 숙주 세포, 염증 세포 및 내분비 기관으로부터 많은 염증 매개 물질이나 생체 활성 물질, 호르몬 등을 비정상적으로 분비하게 하여 임상 증상이나 병리조직학적 변화를 일으킨다 (Lamas *et al.*, 1994). 본 연구에서도 시험 균주의 ECPs를 분리하여 protease 활성, phospholipase

Table 4. Cytotoxic activity of *Vibrio harveyi* extracellular products

Tested animals			Tested strains			
			FR2	VIB 391	ATCC 35084	ATCC 14126
Cytotoxic effect	Black rockfish	6h	-	-	-	-
		12h	-	-	-	-
		24h	++	+ ^w	+	+ ^w
	Olive flounder	6h	-	-	-	-
		12h	-	-	-	-
		24h	+	+ ^w	+	+ ^w

Table 5. Lethal dose (LD₅₀) of *Vibrio harveyi* extracellular products on the intraperitoneally injected black rockfish, *Sebastes schlegeli* for 7 days

	FR2	VIB 391	ATCC 35084	ATCC 14126
LD ₅₀ (µg/fish)	55	79.2	68.7	>100

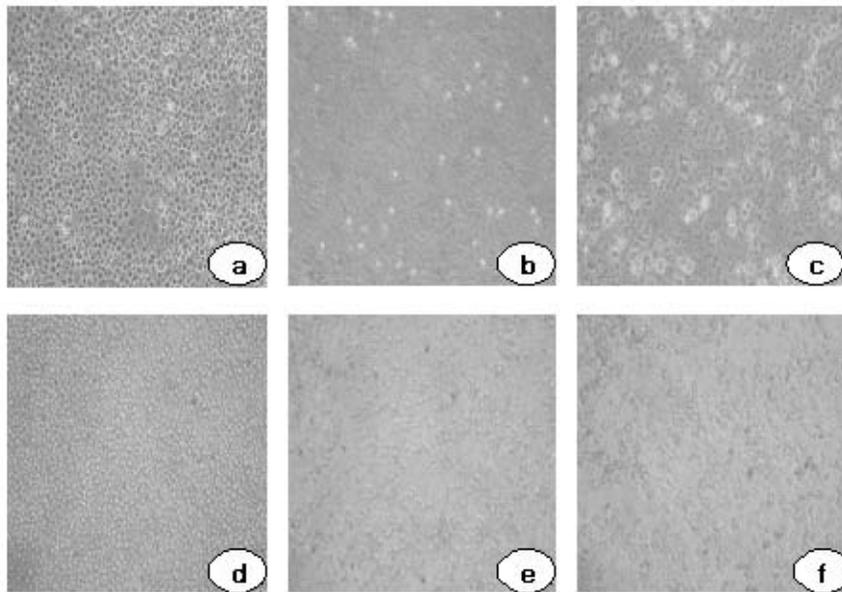


Fig. 1. Cytotoxic effects on the monocyte monolayer from black rockfish, *Sebastes schlegeli* (a, b and c) and olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (d, e and f) administrated with $400 \mu\text{g cell line}^{-1}$ of ECPs of each *Vibrio harveyi* strains. (a and d), control; (b and e), FR2 and (c and f), VIB 391.

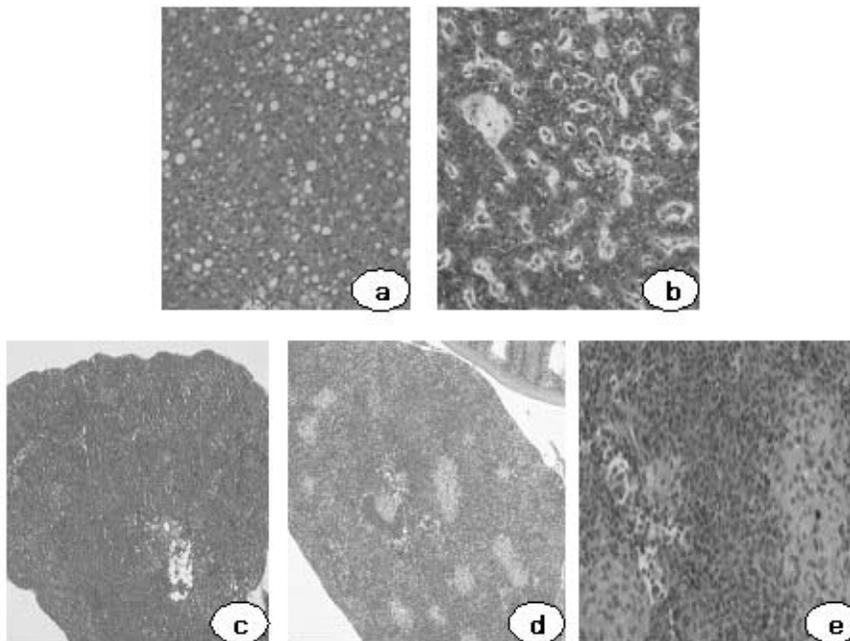


Fig. 2. Liver (a and b) and spleen (c, d and e) of black rockfish, *Sebastes schlegeli* injected with $50 \mu\text{g fish}^{-1}$ of ECPs of *Vibrio harveyi* FR 2 : (a), control (H&E $\times 200$); (b), expansion of sinusoids (H&E $\times 200$); (c), control (H&E $\times 100$); (d), activation of ellipsoid (H&E $\times 100$) and (e), activation of ellipsoid (H&E $\times 400$).

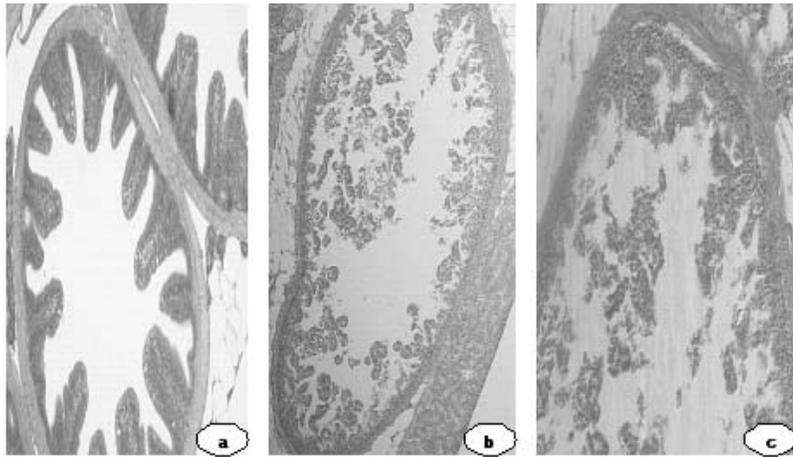


Fig. 3. Intestine of black rockfish, *Sebastes schlegeli* injected with $50 \mu\text{g fish}^{-1}$ of ECPs of *Vibrio harveyi* FR2 : (a), control (H&E $\times 100$); (b), sloughing of the epidermal cells (H&E $\times 100$); (c), sloughing of the epidermal cells (H&E $\times 200$).

및 lipase의 특성을 알아본 결과 caseinase activity는 분리 균주 VIB 391에서 가장 높게 나타났으며 gelatinase activity는 시험 균주 모두 음성으로 나타났다. 또한 phospholipase activity는 참조 균주 ATCC 35084 만이 양성으로 나타났고 lipase activity는 시험 균주 모두 음성으로 나타났다. Liu *et al.* (1996b)은 non luminous *V. harveyi* ECPs의 효소 활성에서 protease, phospholipase, haemolysin 또는 exotoxin이 독성에 중요한 영향을 미친다고 하였다. 그러나 본 시험 균주에서는 다양한 효소 활성을 보여 독성과의 상관관계를 알수 없어 다양한 효소 활성 시험이 필요하다고 생각된다.

Montero and Austin (1999)은 질병의 증상을 나타내는 *Penaeus vannamei*에서 분리한 *V. harveyi*의 ECPs가 rabbit, sheep 및 donkey의 혈액에 대한 용혈능을 보고하였다. 또한 Zhang and Austin (2000)은 *V. harveyi* 중에서 연어과 어류에 60%의 폐사율을 보인 *V. harveyi* VIB 645 균주에서 분리한 ECPs가 Atlantic salmon과 Rainbow trout의 적혈구에 대한 용혈능이 가장 높았으며 *V. harveyi* VIB 648 균주와 VIB 649 균주에서 분리한 ECPs의 용혈능은 *V. harveyi* VIB 648 균주가 더 높았으나 폐사율은 각각 0% 와 40%임을

보고하였다. 또한 Garcia Moreno and Landgraf. (1998)은 *Vibrio vulnificus*의 용혈능은 병원성과 관계없음을 보고하였다. 본 연구에서도 시험 균주나 시험 어종에 따라서 용혈능이 다양하게 나타났으며 인위 감염 시험에서 독성이 강하게 나타난 분리 균주 FR 2의 ECPs와 독성이 약한 균주의 ECPs 간의 용혈능에 뚜렷한 차이가 없었으므로 *V. harveyi* ECPs의 용혈능이 미치는 영향은 그다지 크지 않을 것으로 생각된다.

조피볼락과 넙치의 macrophage monolayer를 이용한 세포 독성 시험에서는 각 시험 균주의 ECPs를 접종한 후 약 24 시간 이내에 세포 변성 효과가 나타났다. 이러한 결과는 *L. anguillarum* ECPs를 EPC에 반응시키면 40 분 후부터 세포의 변형이 일어나서, 약 90 분 후에는 거의 파괴되며 (Wang *et al.*, 1998), *A. salmonicida*의 ECPs가 어류 유래 cell line을 2 시간 이내에 파괴하는 것 (Madetoja *et al.*, 2003)에 비하여 다소 약한 활성을 나타내었다. 또한 독성 시험에서 독성이 강하게 나타난 분리 균주 FR 2의 ECPs가 다른 시험 균주의 ECPs에 비해 다소 강한 활성을 나타내었으며 조피볼락 신장으로부터 분리한 macrophage monolayer에서 강한 세포 독성을 나타내었다.

조피볼락에 시험 균주 *V. harveyi* ECPs를 투여하여 독성을 확인한 결과, 분리 균주 FR 2의 LD50 값은 55 μg fish 1로 독성이 강하게 나타났으나, 분리 균주 VIB 391은 LD50 값이 79.2 μg fish 1, 참조 균주 ATCC 14126은 LD50 값이 100 μg fish 1 이상으로서 매우 낮은 독성을 나타내었다. 이러한 결과는 동일한 시험 균주 *V. harveyi* live cell를 조피볼락에 인위 감염시켰을 때 나타난 결과와 일치하였다 (Choi *et al.*, 2007). 그러나 *V. harveyi* live cell과 ECPs의 작용이 반드시 일치하는 것은 아니며 대상 어종에 따라 달라지는 경우도 알려져 있다. Zhang and Austin (2000)은 rainbow trout에 *V. harveyi* live cell과 ECPs를 인위 투여하였을 때 *V. harveyi* VIB 571, VIB 647과 VIB 661 균주의 live cell에 대해 100% 폐사율을 보이거나 ECPs에 대해서는 0% 폐사율을 보였으며, *V. harveyi* VIB 645 균주의 live cell과 ECPs에 대해 각각 80%와 60% 폐사율을, *V. harveyi* VIB 649 균주는 각각 100%와 40%를 나타내었다고 하였다. 또한 Zorrilla *et al.* (2003)의 보고에 의하면 *V. harveyi*의 sole, *Solea senegalensis*에 대한 독성이 live cell과 ECPs 모두에서 강하게 나타났으나 균주 간의 차이가 컸다고 하였다.

Zhang and Austin (2000)은 Atlantic salmon에 *V. harveyi* VIB 645 ECPs를 독성 시험하여 장을 병리조직학적으로 관찰해본 결과 edema와 장 상피세포의 탈락이 보였으며 간에서는 울혈로 인한 적혈구의 용혈이 관찰되었다. 본 연구에서도 조피볼락에 대해 분리 균주 FR 2의 ECPs에 의한 독성을 관찰하였을 때 비장의 ellipsoid 확장이 나타났으며 간에서는 sinusoid의 확장이 나타났다. 또한 장의 상피 세포 탈락이 관찰되어 위의 결과와 일치하였다.

이들 결과로 미루어 볼 때, 분리 균주 FR 2에서 분리한 ECPs가 live cell을 인위 감염시켰을 때 (Choi *et al.*, 2007)와 동일하게 조피볼락에 대해 강한 독성을 나타내어 ECPs가 *V. harveyi*

의 병원성 요인 중 하나로 작용하는 것을 알 수 있었다.

또한 ECPs 이외의 다른 주요 독력 인자에 관한 연구를 위해서는 본 연구에서 사용한 균주 이외의 다양한 non luminous와 luminous *V. harveyi* 분리 균주를 사용하여 연구가 더 진행되어야 할 것으로 사료되며 본 연구에서 사용한 조피볼락 이외의 다른 숙주에서도 연구가 더 진행되어야 할 것으로 사료 된다.

요 약

본 연구는 조피볼락, *Sebastes schlegeli*에 대한 *Vibrio harveyi* ECPs의 병원성을 알아보기 위하여 non luminous *V. harveyi*와 luminous *V. harveyi* 분리 균주에서 ECPs를 분리하여 조피볼락에 대한 독성 시험을 시행하였다. 시험 균주의 ECPs는 다양한 효소 활성과 용혈능이 나타났다. 또한 조피볼락과 넙치의 macrophage monolayer를 이용한 세포 독성 시험에서는 24시간 이내에 시험 균주의 ECP에 의한 세포 변성 효과가 나타났으며 분리 균주 FR 2의 ECPs가 다른 시험 균주에 비해 강한 활성을 나타내었다. 조피볼락에 인위 주사 시, FR 2의 ECPs가 강한 병원성을 나타내었으며 비장 ellipsoid의 활성, 간 sinusoid의 확장 그리고 장 상피 세포의 탈락 등의 조직병리학적 변화를 보였다. 이상의 결과로부터, 분리 균주 FR 2에서 분리한 ECPs가 live cell을 인위 감염시켰을 때와 동일하게 조피볼락에 대해 강한 병원성을 나타내어 ECPs가 *V. harveyi*의 병원성 기작 중 하나로 작용하는 것을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

- Alvarez, J.J., Austin, B., Alvarez, A.M. and Reyes, H.: *Vibrio harveyi*: a pathogen of penaeid shrimps and fish in Venezuela. J. Fish Dis., 21: 313-316, 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.
- Choi, J.H., Won, K.M., Sohn, S.B., Park, H.J., Byun, S.G., Lee, B.I., Lee, J.H., Kim, Y.C. and Park, S.I.: Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to black rockfish, *Sebastes schlegeli*. *J. Fish Pathol.*, 20: 99-108, 2007.
- Garcia Moreno M.L. and Landgraf, M.: Virulence factors and pathogenicity of *Vibrio vulnificus* strains isolated from seafood. *J. Appl. Microbiol.*, 84: 747-751, 1998
- Henke, J.M. and Bassler, B.L.: Quorum sensing regulates type III secretion in *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.*, 186: 3794-3805, 2004.
- Ishimaru, K. and Muroga, K.: Taxonomical re examination of two pathogenic *Vibrio* species isolated from milkfish and swimming crab. *Fish Pathol.*, 32: 59-64, 1997.
- Jiravanichpaisal P., Miyazaki T. and Iimsuwan C.: Histopathology, biochemistry and pathogenicity of *Vibrio harveyi* infecting black tiger prawn *Penaeus monodon*. *J. Aquat. Anim. Health.*, 6:27-35, 1994.
- Kraxberger Beatty, T., McGarey, D.J., Grier, H.J. and Lim, D.V.: *Vibrio harveyi*, an opportunistic pathogen of common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch), held in captivity. *J. Fish Dis.*, 13: 557-560, 1990.
- Lamas, J., Santos, Y., Bruno, D.W., Toranzo, A.E. and Anadón, R.: Non specific cellular responses of rainbow trout to *Vibrio anguillarum* and its extracellular products (ECPs). *J. Fish Biol.*, 45: 839-854, 1994.
- Lavilla Pitogo, C.R., Baticados, M.C.L., Cruz Lacerda, 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., 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, 1996a.
- Liu, P.C., Lee, K.K. and Chen, S.N.: Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 22: 413-416, 1996b.
- 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., 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.
- Madetoja, J., Pykkö, P., Pohjanviita, T., Schildt, L. and Pelkonen, S.: Putative virulence factors of atypical *Aeromonas salmonicida* isolated from Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.), and European grayling, *Thymallus thymallus* (L.). *J. Fish Dis.*, 26: 349-359, 2003.
- 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.
- Nishimori, E., Hasegawa O., Numata T. and Wakabayashi H.: *Vibrio carchariae* causes mass mortalities in Japanese abalone, *Sulculus diversicolor supratexta*. *Fish Pathol.*, 33: 495-

- 502, 1998.
- Oakey, H.J. and Owens, L.: A new bacteriophage, VHML, isolated from a toxin producing strain of *Vibrio harveyi* in tropical Australia. *J. Appl. Microbiol.*, 89: 702-709, 2000.
- Pasharawipas, T., Thaikua, S., Sriurairatana, S., Ruangpan, L., Direkbusarakum, S., Manopviset charean, J. and Flegel, T.W.: Partial characterization of a novel bacteriophage of *Vibrio harveyi* isolated from shrimp culture ponds in Thailand. *Virus Res.*, 114: 63-69, 2005.
- Soto Rodriguez, S.A., Roque, A., Lizarranga Partida, M.L., Guerra Flores, A.L. and Bomez Gil, B.: Virulence of luminous vibrios to *Artemia franciscana* nauplii. *Dis. Aquat. Org.*, 53: 231-240, 2003.
- Sunaryanto, A. and Mariam, A.: Occurrence of a pathogenic bacteria causing luminescence in penaeid larvae in Indonesian hatcheries. *Bull. Brackishwater Aquacult. Devel. Cen.*, 8: 105-112, 1986.
- Suprpto, H., Hara, T., Nakai, T. and Muroga, K.: Purification of a lethal toxin of *Edwardsiella tarda*. *Fish Pathol.*, 31: 203-207, 1996.
- Wang, X.H., Oon, H.L., Ho, G.W.P., Wong, W.S., Lim, F.T.M. and Leung, K.Y.: Internalization and cytotoxicity are important virulence mechanisms in vibrio fish epithelial cell interactions. *Microbiol.*, 144: 2987-3002, 1998.
- Won, K.M., Kim, S.M. and Park, S.I.: Characterization of *Vibrio harveyi*, the causal agent of vibriosis in cultured marine fishes in Korea. *J. Fish Sci. Technol.*, 9: 123-128, 2006.
- Yamada, Y. and Wakabayashi, H.: Identification of fish pathogenic strains belonging to the genus *Edwardsiella* by sequence analysis of sodB. *Fish Pathol.*, 34: 145-150, 1999.
- Zhang, X.H. and Austin, B.: Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonids. *J. Fish Dis.*, 23: 93-102, 2000.
- Zorrilla, I., Arijo, 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.
- 醫化學研究所學友會: 細菌學實習提要. pp 566-568. (In Japanese), 1976.

Manuscript Received : January 8, 2008

Revision Accepted : May 1, 2008

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