

해산어류에서 분리된 *Vibrio harveyi*의 혈청학적 특성과 항원성

오윤경 · 김명석[†] · 박명애 · 김진우 · 조지영* · 정현도**

국립수산과학원 병리연구과, *순천향대학교 해양생명과학과, **부경대학교 수산생명의학과

Serological characteristics and antigenicities of *Vibrio harveyi* isolated from marine cultured fish

Yun-Kyeong Oh, Myoung Sug Kim[†], Myoung Ae Park, Jin Woo Kim,
Ji Young Cho* and Hyun Do Jeong**

Pathology Division, National Fisheries Research and Development Institute, Busan 619-902, Korea

*Department of Marine biotechnology, Soonchunhyang University, Asan 336-745, Korea

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

Vibrio harveyi was a significant pathogenic agent and cause a high mortality of cultured fish and shrimp in the aquaculture industry. In this study, we have investigated biochemical, physiological, serological and immunological characteristics of *V. harveyi* isolated from marine cultured fish. The phenotypes of *V. harveyi* were differentiated with their own biochemical characteristics and colors of colony on the TCBS agar. *V. harveyi* were classified into more than four serogroups by agglutination test. Most isolates were classified into a group A which is categorized with the same band pattern generated by western blotting. Group A was characterized by a major protein, which is ranged from 26 and 34 kDa in size, and has a virulence to oliver flounder more than reference strain KCCM40866. Oliver flounders vaccinated with FK of *V. harveyi* C05011 were highly resistant to infection by other strains of group A.

Key words: *Vibrio harveyi*, Classification, Antigenic protein, Agglutination, Western blotting

국내에서 양식되는 어류의 주요 세균성 질병은 *Edwardsiella tarda*에 의한 에드워드병, *Lactococcus garviae*, *Streptococcus iniae*, *S. parauberis*에 의한 연쇄구균병 및 *Vibrio harveyi*, *V. ichthyenteri*, *V. ordalii*, *Listonella anguillarum*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* 등에 의한 비브리오증이다 (김 등, 2006).

비브리오증의 원인체 중의 하나인 *V. harveyi*는 무척추 동물인 새우류에 감염되는 luminescence *Vibrio*로 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) 척추동물인 양식 넙치에 감염되어 폐사를 일으킨다고 알려져 있다 (Alvarze et al., 1998; 원 등, 2006).

세균성 질병의 단독 또는 혼합감염은 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 원인 병원체에 대한 정확한 이해와 분류가 필요하다.

Haemolysin 등의 독소를 포함한 ECP, 균체항원, 협막항원, 편모항원 및 기타 항원인자 등의

[†]Corresponding Author : Myoung Sug Kim, Tel : 051-720-2476
Fax : 051-720-2498 E-mail : mskim@nfrdi.go.kr

독성인자들에 대한 연구는 질병예방을 위해 필요하데 (Santos *et al.*, 1995; Balebone *et al.*, 2005), 질병 예방을 위해 어류에 백신을 접종한 어류에서 새로운 혈청형의 세균이 분리되는 경우가 보고되고 있다. 이스라엘에서 *S. iniae*에 의한 연쇄 구균증을 예방하기 위해 백신을 접종한 무지개 송어 (*Oncorhynchus mykiss*)에서 분리된 *S. iniae*는 PCR과 혈청학적 방법에 의해 새로운 혈청형으로 구분되었다 (Bachrach *et al.*, 2001). 스페인에서 *V. vulnificus* serovar E에 대한 백신을 접종한 뱀장어에서 새로운 혈청형인 serovar A의 *V. vulnificus*가 분리되어 (Fouz and Amaro, 2003) 세균의 면역학적인 분류와 특성조사는 효과적인 백신의 제조에 있어 매우 중요한 문제이다.

세균의 혈청학적 분류는 균체항원, 협막항원, 편모항원 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 혈청형은 균체항원과 협막항원의 조합으로 분류되기도 하며 (Gil *et al.*, 2007), *Vibrio*는 고체배지에서 swarming 운

동에 관여하는 lateral flagella에 의하여 혈청형이 구분되기도 한다 (Shinoda *et al.*, 1992).

세균성 질병을 예방하기 위한 백신의 대상 균주를 선정하기 위하여 세균의 혈청학적 검토와 세균 중 내의 공통항원 유무를 확인하는 것이 필요하므로 생화학적, 혈청학적 방법과 세균의 세분에 이용되는 SDS-PAGE (Pizzutto and Hirst, 1995)와 western blotting으로 확인되는 항원성을 갖는 단백질의 비교로 어류에서 분리되는 *V. harveyi*를 분류하고자 하였다.

재료 및 방법

*Vibrio harveyi*의 생화학적 성상 비교

넙치 등 국내 양식 어류에서 분리된 *V. harveyi* (Table 1)와 표준균주 KCCM40866 (=ATCC14126)를 1% NaCl이 첨가된 BHIA (Brain Heart Infusion Agar, Difco) 배지에서 25 °C, 24시간 배양한 후 API 20E kit (bioMerieux, France)를 사용하여 생화학적 성상을 비교하였다. 실험방법은 순수 배양된 집락을 제조사의 방법에 따라 스트립에

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

Strains	Isolated Year	Source	Geographical location	color of colony on TCBS*
E05003	2002	red seabream(<i>Pagrus major</i>)	Tongyeong	green
E05005	2002	red seabream(<i>Pagrus major</i>)	Tongyeong	green
E05006	2002	red seabream(<i>Pagrus major</i>)	Tongyeong	green
E05007	2002	red seabream(<i>Pagrus major</i>)	Tongyeong	green
E05008	2002	black rock fish(<i>Sebastes inermis</i>)	Tongyeong	yellow
E05009	2002	rock fish(<i>Sebastes schlegeli</i>)	Tongyeong	yellow
C05011	2002	flathead mullet(<i>Mugil cephalus</i>)	Tongyeong	yellow
A05022	2003	olive flounder(<i>Paralichthys olivaceus</i>)	Wando	yellow
FP4110	2004	olive flounder(<i>Paralichthys olivaceus</i>)	Jeju	green
FP4138	2004	olive flounder(<i>Paralichthys olivaceus</i>)	Ulsan	yellow
FP5201	2005	rock fish(<i>Sebastes schlegeli</i>)	Tongyeong	yellow

* : Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose agar

접종하고, 25 °C에서 24시간 동안 배양한 후 결과를 판정하였다.

분리균주의 배양 조건에 따른 발육 시험

분리균주의 성장에 미치는 pH, NaCl 농도, 온도의 영향을 조사하였다. pH의 영향을 조사하기 위하여 1N NaOH와 1N HCl을 첨가하여 pH 4, 7, 9로 제작한 BHIB (Brain Heart Infusion Broth, with 1 % NaCl)에 분리균주를 접종하여 25 °C에서 24시간 동안 배양한 후 관찰하였다. 세균의 성장에 미치는 NaCl의 영향을 알아보기 위하여 BHIA에 NaCl을 첨가하여 NaCl 농도가 1.5, 2.5, 3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 7.5, 8.5, 9.5, 10.5 %가 되도록 조절한 후 분리균주를 도말하여 24시간 배양한 후 관찰하였다. 온도의 영향을 확인하기 위하여 1 % NaCl을 첨가한 BHIA에 *V. harveyi*를 도말하여 10, 15, 25, 35, 45 °C에서 24시간 배양 후 집락을 관찰하였다.

FKC (Formalin Killed Cell)과 HKC (Heat Killed Cell) 제작

FKC는 분리균주 FP4138, E05003, C05011와 참조균주 KCCM40866을 3 % NaCl이 첨가된 BHIB에 접종하여, 25 °C에서 24시간 동안 배양한 후 생리식염수에 현탁하고 최종적으로 0.3 %가 되도록 37 % formaldehyde를 첨가하였다. 이것을 4 °C에서 24시간 동안 유지시키고, 7,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 0.02 % sodium azide가 첨가된 생리식염수에 현탁하고 100 mg/ml의 습중량으로 맞춘 후 4 °C에 보관하였다.

HKC는 3 % NaCl이 첨가된 BHIA에 도말하여 25 °C에서 24시간 동안 배양된 *V. harveyi*를 생리식염수에 현탁하여 100 °C에서 15분 동안 가열하고 원심분리하였다 (Abbott *et al.*, 1980). 회수된 균을 0.02 % sodium azide가 첨가된 생리식염수에 현탁하여 농도를 100 mg/ml로 맞춘 후 사용할 때까지 4 °C에서 보관하였으며 1주일 안에 사용하였다.

*V. harveyi*에 대한 토끼의 polyclonal antibody 제작

제작된 4 종류의 FKC를 FCA (Freund's Adjuvant Complete, Sigma)와 1:1로 혼합하여 농도를 50 mg/ml로 맞춘 후 건강한 토끼의 피하에 2ml 씩 주사하였다. 2주 후 동량의 FIA (Freund's Adjuvant Incomplete, Sigma)와 혼합한 FKC를 동일한 방법으로 주사한 다음, 다시 2주 후 동량의 FKC를 멸균된 생리식염수와 1:1로 혼합하여 주사하였다. 마지막 주사 후 2주째에 토끼의 심장에서 채혈하여 실온에서 1시간 유지하고 4 °C에서 overnight 시킨 후 6,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였고 사용할 때까지 -80 °C에서 보관하였다.

Slide agglutination

슬라이드 글라스에 *V. harveyi*에 대한 토끼 항혈청을 25 μ l 떨어뜨리고 *V. harveyi* HKC 또는 FKC를 25 μ l 떨어뜨린 후 잘 섞어 30초 이내에 응집 형성 유무를 확인하였다.

SDS-PAGE

3% NaCl이 첨가된 BHIB와 BHIA에 접종하여 25°C에서 24시간 배양한 *V. harveyi*를 생리식염수에 현탁하여 흡광도 600 nm에서 2.0으로 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 °C에서 10분간 끓여서 준비하였다. 12 % SDS-polyacrylamide gel에 준비된 시료를 15 μ l씩 loading하고 100 V에서 2시간 동안 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 gel은 Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하고 탈색하여 관찰하였다.

Immunoblotting analysis

SDS-PAGE한 gel에 Nitricellulose membrane (NC) paper (Amersham Biosciences, Germany)를 얹어서 100 V에서 1시간 동안 transformation

(BIO-RAD)하였고, 그 후 NC paper를 Tween 20이 포함된 PBS (T-PBS)로 5회 세척한 후 1% BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma)로 1시간 동안 blocking 하였다. T-PBS로 5회 세척한 후 앞서 제작한 4 종류의 토끼 항혈청을 각각 1/100로 희석하여 4 °C에서 overnight 시킨 후 T-PBS로 5회 세척하였다. 2차 항체로는 anti-rabbit IgG (Sigma)를 1/5,000로 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.

면역 후 방어력 조사

평균체중 15 g의 넙치에 FCA와 1:1로 혼합한 *V. harveyi* C05011 FKC를 10 mg/kg body weight로 0.1 ml씩 복강 주사하였다. 2주 후 같은 방법으로 FKC와 FIA를 1:1로 혼합하여 주사하였다. 수온은 25 °C를 유지하고 1일에 1회씩 사료를 주었다. 항원을 주사한 넙치는 2차 주사 후 2주일째 인위감염 실험을 실시하였다. 공격 실험은 4개의 균주 FP4138, E05003, C05011, KCCM40866를 사용하여 실시하였다. 3.5% NaCl이 첨가된 BHIA에 도말하여 25 °C에서 24시간 배양한 *V. harveyi* 균주는 생리식염수에 현탁하여 균수를 1×10^8 CFU/ml로 조절하였으며, 넙치를 MS-222로 마취한 후 세균 현탁액을 0.1 ml씩 10마리에 복강 주사하였고, 수온은 25 °C를 유지하였다. 폐사어는 해부 후 신장과 비장으로부터 균을 분리하여 1% NaCl이 첨가된 BHIA와 TCBS agar에 도말하여 원인균을 확인하였다.

결 과

분리균주의 생화학적 성상

API 20E kit를 사용하여 생화학적 성상을 조사한 결과 11개의 분리균주와 KCCM40866의 생화학 성상이 모두 유사하게 나타났다. 모든 12

균주는 ONPG, ADH, H₂S, URE, TDA, VP, INO, RHA, MEL, ARA의 10개 항목에서 음성이었고 ADH, IND, GLU, MAN, AMY, OX의 6개 항목에서 양성이었다. ODC, CIT, GEL, SOR, SAC의 5개 항목은 균주별로 차이가 있었다 (Table 2).

분리균주의 배양 조건에 따른 발육시험

분리균주의 성장에 영향을 미치는 온도, pH, NaCl 농도에 관하여 조사한 결과 대부분의 균주가 25~35 °C에서 잘 자랐으나 10 °C, 45 °C에서는 자라지 못하였으며 15 °C에서는 집락을 형성하였으나 25~35 °C에 비해 집락의 크기가 작았다. 모든 균주가 pH 9에서는 증식하였으나 pH 4에서는 증식하지 못하였다. 염분농도에 따른 발육시험에서는 대부분의 균주가 7.5%까지 잘 자랐으며 8.5%에서는 E05007과 E05008의 2 균주가 자랐으나 다른 균주들은 자라지 못하였다 (Table 3).

Slide agglutination에 의한 *V. harveyi*의 구분

FP4138, E05003, C05011, KCCM40866 균주에 대한 토끼 항혈청으로 슬라이드 응집반응을 실시한 결과 항원으로 live cell을 사용하였을 경우 FP4138, C05011, KCCM40866에 대한 항혈청은 각각 FP4138, C05011, KCCM40866과 응집반응이 일어났고 다른 균주들과 교차응집이 생기지 않았다. E05003에 대한 항혈청은 FP4110, E05003, E05005, E05006과 응집반응이 일어났다. 항원으로 HKC를 사용하여 응집반응을 실시하였을 때에는 4종류의 항혈청 모두 조사한 *V. harveyi* 균주에서 응집이 일어났다 (Table 4).

SDS-PAGE profile

3종의 분리균주 FP4138, E05003, C05011과 KCCM40866에 대하여 SDS-PAGE로 단백질 패턴을 분석하였을 때 34~48kDa 사이에서 luminosense *V. harveyi*인 KCCM40866에 있는 A3 band를 분리균주는 갖고 있지 않았다. 분리

균주 사이에도 FP4138의 A1 band는 다른 두개의 분리균주에서 보이지 않으며 대신 E05003과 C05011에는 조금 작은 크기의 A2 band가 있었다 (Fig. 1). SDS-PAGE에서 고체배지에서 배양한 것과 액체배지에서 배양한 것의 band pattern은 차이가 있었으나 A1, A2, A3 위치에서는 차이를 구별할 수 없었다 (Fig. 1).

Immunoblotting analysis

3종의 분리균주 FP4138, E05003, C05011와 KCCM40866에 대하여 각 항체별로 western blot을 실시한 결과는 26~34 kDa 사이에서 KC-CM40866과 분리균주 사이에 뚜렷한 차이가 있었다. FP4138, E05003, C05011은 34 kDa 보다

Table 2. Biochemical characteristics of *Vibrio harveyi* isolates and reference strain by API 20E system

Test	Strains											
	FP4110	FP4138	FP5201	E05003	E05005	E05006	E05007	E05008	E05009	C05011	A05022	KCCM 40866
ONPG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ADH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LDC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ODC	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
URE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TDA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IND	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GEL	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-
GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MAN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
INO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SOR	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-
RHA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SAC	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
MEL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AMY	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ARA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OX	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

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.

Table 3. Physiological characteristics of the *Vibrio harveyi* isolates and reference strain

Test	Strains											
	FP4110	FP4138	FP5201	E05003	E05005	E05006	E05007	E05008	E05009	C05011	A05022	KCCM 40866
Temp. (°C)	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	35	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pH	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl (%)	1.5~ 6.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	7.5	+	+	+	+	w*	+	+	+	+	+	+
	8.5	-	-	-	-	-	w	+	-	-	-	-
	9.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*: weak

Table 4. Slide agglutination of *Vibrio harveyi* isolates and reference strain

Live cell				HKC				
Antisera against				Antigen	Antisera against			
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

작은 B2 band가 major protein이었고 KC-CM40866은 약 34 kDa 크기의 B1 band가 major protein이었다 (Fig. 2).

면역 후 방어력

인위감염 후 면역시킨 실험구에서 2주 동안 한 마리의 폐사도 나타나지 않았으나 대조구는 FP4138, E05003, C05011 균주에 대해 70~100% 폐사율을 나타냈으며, KCCM40866 균주에 대해서는 폐사가 전혀 나타나지 않았다. 폐사는 1일째부터 시작하여 3일째까지 지속되었으며 그 이후로는 폐사가 나타나지 않았다 (Fig. 3).

고 찰

*V. harveyi*에 감염된 넙치는 복부팽만, 탈장, 지느러미 갈라짐 등의 외부증상과 출혈성 복수, 간·장출혈, 비장위축 등의 내부증상을 나타낸다고 하였으며 (Soffientino *et al.*, 1999) 우리나라에서 양식넙치에 감염되어 폐사를 일으키기도 하였으나 (원 등, 2006) 분리균주의 특성 연구는 미흡한 실정이다.

V. harveyi 분리균주는 비브리오균의 선택배양에 많이 사용되는 TCBS agar에서 형성되는 집락의 색깔이 동일하지 않고 일부는 녹색 집락을 형성하며 다른 것들은 노란색 집락을 형성하여 (Table 1) TCBS agar에서의 집락의 색깔로 *V. harveyi*를 추정할 수 없었으며 API 20E kit를 이용한 생화학적 실험에서 균주별로 일부 항목에서 차이가 있어 (Table 2) *V. harveyi* 분리균주는 동일한 표현형이 아니었다.

*V. harveyi*는 염분 농도 0.5~8%, 배양온도 40°C 미만에서 성장할 수 있다고 하였는데 (Ortigosa *et al.*, 1994) 이번 연구에서도 2개 균주는 8.5%에서도 성장하였으나 대부분 NaCl 농도 7.5%까지 성장하였고 고염분인 12%까지 자랄 수 있는 *V. alginolyticus* (Ortigosa *et al.*, 1994)와 다르게 9.5% 이상에서는 자라지 못하였다. 이 균주들은

배양온도 15~35°C 사이에서 성장하였고 pH 9에서는 모든 균주가 자랐으며 pH 4에서 모든 균주가 자라지 못하였으나 균주별로 차이가 없어 생리적인 특성에 의해 *V. harveyi* 분리균주들 사이의 차이를 구별할 수는 없었다.

TCBS agar에서의 성장, 분리지역, 분리어종을 비교하여 3개의 분리균주, FP4138, E05003, C05011과 참조균주 KCCM40866를 선정하여 혈청학적인 실험을 실시하였다. 분리균주의 혈청형을 알아보기 위하여 제작된 4종류의 토끼 항혈청으로 슬라이드 응집반응을 실시하였는데 3% NaCl이 첨가된 BHIA에서 배양된 *V. harveyi*와 토끼 항혈청의 슬라이드 응집반응은 FP4138, C05011, KCCM40866에 대한 항혈청은 각각 FP4138, C05011, KCCM40866과 응집반응이 일어났고 다른 균주들과 교차응집이 없었다. E05003에 대한 항혈청은 FP4110, E05003, E05005, E05006과 응집반응이 일어났는데 이 4개의 균주들은 TCBS agar에서 녹색 집락을 형성하는 공통점이 있었고 생화학적 성장도 E05003이 GEL에 양성을 나타내어 다른 3개의 균주들과 차이가 있는 것을 제외하고 모두 일치하여 아주 유사한 균주들이라고 생각된다. *Aeromonas*는 액체배지에서 배양할 때 swimming 운동에 관여하는 polar flagella (M-flagella)와 고체배지에서 swarming 운동에 관여하는 lateral flagella (L-flagella)의 두 형태의 편모가 존재한다고 하였는데 (Kirov *et al.*, 2004) *Vibrio*도 액체배지에서는 M-flagella가 형성되고 고체배지에서는 M-flagella와 L-flagella가 모두 형성이 된다고 하였다 (Shinoda *et al.*, 1985). 이번 연구결과는 액체배지에서 자란 *V. harveyi*를 이용하여 토끼 항혈청을 만들었기 때문에 토끼 항혈청에는 L-flagella에 대한 항체는 없으며 슬라이드 응집반응은 *V. harveyi*의 M-flagella와 토끼 항혈청의 M-flagella에 대한 항체 사이의 응집반응이다. 따라서 *V. harveyi*는 L-flagella에 의하여 3가지의 혈청형으로 구분된다고 알려져 있으나 (Shinoda

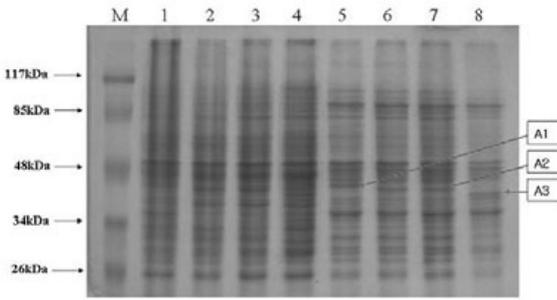


Fig. 1. Comparison by SDS-PAGE of the protein profiles of *Vibrio harveyi* whole cell. Lane M, prestain marker; lane 1, FP4138 cultured on agar media; lane 2, E05003 cultured on agar media; lane 3, C05011 cultured on agar media; lane 4, KCCM40866 cultured on agar media; lane 5, FP4138 cultured in liquid media; lane 6, E05003 cultured in liquid media; lane 7, C05011 cultured in liquid media; lane 8, KCCM40866 cultured in liquid media. A1, A2 and A3 indicate distinguished bands of bacterial protein between 34kDa and 48kDa.

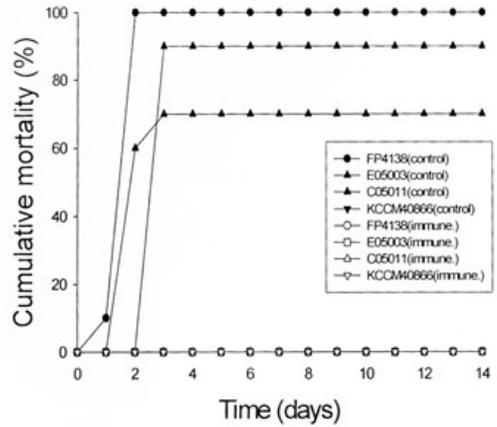


Fig. 3. Cumulative mortality of olive flounder immunized with a formalin killed *Vibrio harveyi* C05011 and non-immunized control challenged with *V. harveyi* FP4138, E05003, C05011 and KCCM40866.

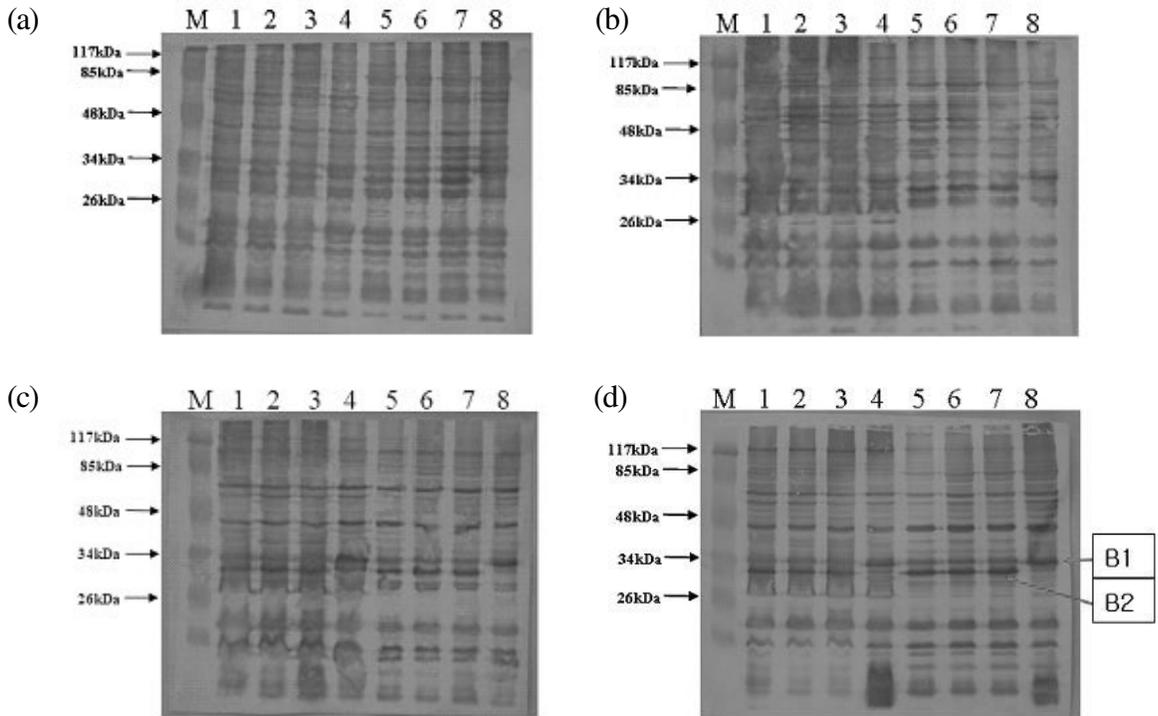


Fig. 2. Western blot analysis of antigenic protein from *Vibrio harveyi*. (a), antiserum against FP4138; (b), antiserum against E05003; (c), antiserum against C05011; (d), antiserum against KCCM40866. Lane M, prestain marker; lane 1, FP4138 cultured on agar media; lane 2, E05003 cultured on agar media; lane 3, C05011 cultured on agar media; lane 4, KCCM40866 cultured on agar media; lane 5, FP4138 cultured in liquid media; lane 6, E05003 cultured in liquid media; lane 7, C05011 cultured in liquid media; lane 8, KCCM40866 cultured in liquid media. B1 indicates the 34 kDa major protein band of KCCM40866 and B2 indicates the 34 kDa major protein band of C05011.

et al., 1992) M-flagella에 의해서도 여러 혈청형으로 구분이 될 수 있을 것이라 생각된다. 세균에 열을 가하여 HKC를 만들게 되면 열에 약한 flagella는 없어지고 열에 안정한 균체항원은 남게 되는데 (Abbott *et al.*, 1980) 11개 분리균주와 KCCM40866의 HKC는 4개의 토끼 항혈청과 반응하여 모두 응집반응이 일어나기 때문에 *V. harveyi*의 균체항원에 균주들 사이의 공통 항원이 존재하는 것을 알 수 있었다.

세균의 혈청형은 많은 종류가 보고되고 있어 대만에서 분리된 3,743개의 *V. parahaemolyticus*는 40개의 혈청형으로 구분되었는데 (Chiou *et al.*, 2000) 이번 연구에서 사용한 4개의 항혈청으로 *V. harveyi*의 혈청형을 명확히 구별할 수는 없었으나 편모항원에 의해 최소 4개의 혈청형이 확인되었고 HKC의 균체항원에 있어서도 항혈청과 강한 응집반응이 일어나는 균주와 약한 응집반응이 일어나는 균주가 있어 여러 혈청형이 있을 가능성이 있다고 생각된다.

균주간의 단백질 성상의 차이를 알아보고자 SDS-PAGE로 단백질 pattern을 분석해본 결과 34~48 kDa 사이의 band에서 균주들 사이에 조금 다른 pattern을 나타냈다. 새우에서 분리된 *V. harveyi*는 42 kDa의 단백질을 갖는 group I, 40 kDa의 단백질을 갖는 group II 그리고 두개의 단백질을 모두 갖지 않는 기타 group으로 구분되었는데 (Pizzutto and Hirst, 1995) KCCM40866에 있는 A3 band를 분리균주는 갖고 있지 않았으며 분리균주 사이에도 FP4138의 A1 band는 다른 두개의 분리균주에서 보이지 않으며 대신 E05003과 C05011에는 조금 작은 크기의 A2 band가 있어 Pizzutto와 Hirst (1995)의 결과와 유사하였다. 4종류의 항혈청을 사용한 western blotting에서 균주들 사이의 항원 단백질 profile의 차이를 명확히 구별할 수 있었다. *V. harveyi*의 항원 단백질은 SDS-PAGE의 결과와 다르게 34~48 kDa 사이에서 균주들 사이의 차이를 확인할 수 없었다. Western blotting 결과는 26~34 kDa 사이에서 KCCM40866과 세 개의 분리균주

사이에 뚜렷한 차이를 보여 주었는데, 즉, 34 kDa 보다 작은 B2 band가 major protein으로 나타난 FP4138, E05003, C05011 (group A)과 34 kDa 크기의 B1 band가 major protein 인 KC-CM40866 (group B)로 2개의 group이 명확히 구분 되었다. FP4138, E05003과 C05011은 유사한 항원성을 갖는 균주로 확인 되었으나 TCBS 배지에서의 집락 색깔 (Table 1)과 생화학적 성상의 차이가 있는 (Table 2) 다른 표현형의 균주들이므로 SDS-PAGE에 의한 단백질 profile의 차이도 표현형의 차이라고 생각된다.

Group A에 속하는 세 개의 균주를 넙치에 인위감염 시켰을 때 폐사가 발생하였으나 KC-CM40866은 넙치의 폐사를 유발하지 않아 병원성에 있어서도 두 group 사이에 차이가 있었다. Group A에 속하는 C05011의 FK로 넙치를 면역시킨 후 *V. harveyi*를 인위감염 시켰을 때 면역을 시킨 실험구에서 한 마리의 폐사도 나타나지 않아 group A 균주들 사이에는 교차방어 효과가 있었다. 이것은 *V. harveyi*는 flagella의 편모항원에 따라 여러 종류의 혈청형으로 구분이 되었지만 분리균주의 균체항원에 일정 부분의 공통항원이 있어 *V. harveyi*에 대한 방어능을 갖게 되는 것으로 생각된다.

발광능이 있는 것으로 알려진 *V. harveyi* KC-CM40866은 발광능을 갖는 luciferase alpha subunit (*luxA*) gene을 증폭시키는 PCR 법 (Wimpee *et al.*, 1991)에 의해 양성 산물이 증폭되었으나 FP4138, E05003, C05011 (group A)은 음성으로 나타났다 (data not shown). *LuxA* gene이 없어 non luminous *V. harveyi*로 추정되는 FP4138, E05003, C05011 균주들은 SDS-PAGE와 western blot의 결과에서 luminous *V. harveyi* KC-CM40866과 차이가 있어 luminous *V. harveyi*와 non luminous *V. harveyi*는 발광능의 차이와 함께 SDS-PAGE에서의 표현형 및 항원 단백질의 차이가 있다고 생각된다.

KCCM40866 이외의 group B에 속하는 균주들을 수집하여 비교하지 못하였으나 최 등 (2007)도

조피볼락에서 luminous *V. harveyi*는 병원성이 낮고 non luminous *V. harveyi*는 병원성이 높다고 하여 이번 연구와 같이 luminous 표현형에 따라 특성의 차이가 있으므로 *V. harveyi*에 대한 항원 단백질의 추가적인 연구가 필요할 것이라 생각된다.

감사의 글

이 연구는 국립수산물과학원 (양식생물 백신 연구, RP-2008-AQ-136)의 지원에 의해 운영되었습니다.

요 약

*V. harveyi*는 양식산업에서 중요한 해산 양식 어류와 새우류에 많은 폐사를 일으키는 병원체로 알려져 있다. 본 연구에서는 해산 양식어류에서 분리된 11개 strain의 *Vibrio harveyi*의 생화학적, 생리학적, 혈청학적, 면역학적 특성을 조사하였다. 생화학적 특성과 TCBS agar에서 집락의 색깔이 달라 표현형의 차이가 있었고 *V. harveyi* 분리균주들은 편모항원에 의해 4개 이상의 혈청형으로 구분되었다. 어류에서 분리된 *V. harveyi*는 western blotting으로 26~34 kDa 사이에 동일한 크기의 major protein을 갖는 group A로 구분되었고 넓치에 대하여 표준균주인 *V. harveyi* KCCM40866 보다 강한 병원성을 갖고 있었다. *V. harveyi* C05011로 면역 유도된 넓치는 다른 group A 균주를 인위감염 시켰을 때 높은 항병력을 나타내었다.

참 고 문 헌

- Abbott, J.D., Dale, B., Eldrige, J., Jones, D.M. and Sutcliffe, E.M.: Serotyping of *Campylobacter jejuni/coli*. J. Clin. Pathol., 33, 762-766, 1980.
- Bachrach, G., Zlotkin, A., Hurvitz, A., Evans, D. and Eldar, A.: Recovery of *Streptococcus iniae* from diseased fish Previously vaccinated with a *Streptococcus* vaccine. Applied and Environmental Microbiology, 67, 3756-3758, 2001.
- Balebone, M.C., Magarinos, B., Toranzo, A.E. and Morinigo, M.A.: Effectiveness of a divalent vaccine for sole, *Solea senegalensis* (Kaup), against *Vibrio harveyi* and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. J. Fish Dis., 28, 33-38, 2005.
- Chiou, C.S., Hsu, S.Y., Chiu, S.I. and Wang, T.K. and Chao, C.S.: *Vibrio parahaemolyticus* serovar O3:K6 as cause of unusually high incidence of food-borne disease outbreaks in Taiwan from 1996 to 1999. J. Clinical Microbiology, 38, 4621-4625, 2000.
- Fouz, B. and Amaro, C.: Isolation of a new serovar of *Vibrio vulnificus* pathogenic for eels cultured in freshwater farms. Aquaculture, 217, 677-682, 2003.
- Gil, A., Miranda, H., Lanata, C., Prada, A., Hall, E., Barreno, C., Nusrin, S., Bhuiyan, N., Sack, D. and Nair, G.: O3:K3 Serotype of *Vibrio parahaemolyticus* identical to the global pandemic clone associated with diarrhea in Peru. Int. J. Infect. Dis. 11, 324-328, 2007.
- Karunasagar, I., Pai, R., Malathi, G.R. and Karunasagar, I.: Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic resistant *Vibrio harveyi* infection. Aquaculture, 128, 203-209, 1994.
- Kerry, J., Hiney, M., Coyne, R., NicGabhain, S., Gilroy, D., Cazabon, D. and Smith, P.: Fish feed as a source of oxytetracycline resistant bacteria in the sediments under fish farm. Aquaculture, 131, 101-113, 1995.
- Kirov, S.M., Castrisios, M. and Shaw, J.G.: *Aeromonas* flagella (polar and lateral) are enterocyte adhesins that contribute to biofilm formation on surfaces. Infect. Im-

- mun., 72, 1939-1945, 2004.
- Lavilla-Pitogo, C. R., Baticados, M. C. L., Cruz-Lacierda, E. R. and Pena, L. D.: Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. *Aquaculture*, 91, 1-13, 1990.
- Obata-Yasuoka, M., Ba-Thein, W. and Tsukamoto, T.: Vaginal *Escherichia coli* share common virulence factor profiles, serotypes and phylogeny with other extraintestinal *E. coli*. *Microbiol.*, 148, 2745-2752, 2002.
- Ortigosa, M., Garay, E. and Pujalte, M.J.: Numerical taxonomy of Vibrionaceae isolated from oysters and seawater along an annual cycle. *System. Appl. Microbiol.*, 17, 216-225, 1994.
- Park, S.I., Wakabayashi, H. and Watanabe, Y.: Serotype and virulence of *Edwardsiella tarda* isolated from eel and their environment. *Fish Pathol.*, 18, 85-89, 1983.
- Pizzutto, M and Hirst, R.G.: Classification of isolates of *Vibrio harveyi* virulent to *Penaeus monodon* larvae by protein profile analysis and M13 DNA fingerprinting. *Dis. Aquat. Org.*, 21, 61-68, 1995.
- Santos, Y., Pazos, F., Bandi' n, I. and Toranzo, A.: 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, 1995.
- Shinoda, S., Nakahara, N., Uchida, E. and Hiraga, M.: Lateral flagellar antigen of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio harveyi*: Existence of serovars common to the two species. *Microbiol. Immunol.*, 29, 173-182, 1985.
- Shinoda, S., Yakiyama, I., Yasui, S., Kim, Y.M., Ono, B.I. and Nakagami, S.: Lateral flagella of vibrios: serological classification and genetical similarity. *Microbiol. Immunol.*, 36, 303-309, 1992.
- Soffientino, B., Gwaltney, T., Nelson, D.R., Speck, J.L., Muel, M. and Go' mez-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.
- Sunaryanto, A. and Mariam, A.: Occurrence of pathogenic bacteria causing luminousness in penaeid larvae in Indonesian hatcheries. *Bull. Brackishwater Aquaculture*, 8, 105-112, 1986.
- Wimpee, C.F., Nadeau, T.L. and Neelson, K.H.: Development of Species-Specific Hybridization Probes for Marine Luminous Bacteria by Using In Vitro DNA Amplification. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 1319-1324, 1991.
- 김진우, 정승희, 박명애, 도정완, 최동립, 지보영, 조미영, 김명석, 최혜승, 김이청, 이주석, 이창훈, 방종득, 박미선, 서정수.: 2000년~2006하절기 양식 어류의 병원체 감염현황. *한국어병학회지*, 19, 207-214, 2006.
- 원경미, 최정현, 박수일.: 배양 조건에 따른 *Vibrio harveyi* extracellular products (ECP)의 특성. *한국어병학회지*, 19, 119-126, 2006.
- 최정현, 원경미, 손새봄, 박효진, 변순규, 이배익, 이종하, 김이청, 박수일.: 조피볼락에 대한 *Vibrio harveyi*의 병원성. *한국어병학회지*, 20, 99-108., 2007.

Manuscript Received : November 14, 2008

Revision Accepted : March 26, 2009

Responsible Editorial Member : Choi, Dong-Rim
(National fisheries Research & Development Institute)