In vivo에서 Photobacterium damselae subsp. damselae 와 Vibrio 속 세균의 병원성 비교

권문경 † · 조병열 * · 박수일 **

국립수산과학원 병리연구과, *울산광역시 보건환경연구원, **부경대학교 수산생명의학과

Comparative study of *Photobacterium damselae* subsp. damselae and Vibrios on pathogenicity in vivo

Mun-Gyeong Kwon[†], Byoung Youl Cho^{*} and Soo-Il Park^{**}

Pathology division, National Fisheries Research and Development Institute, Busan 619-902, Korea
*Ulsan institute of health and environment, Ulsan 680-845, Korea
**Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

Photobacterium damselae subsp. damselae and 4 Vibrio spp, V. anguillarum, V. splendidus, V. harveyi and V. ordalii, were isolated from the diseased olive flounders, Paralichthys olivaceus. The pathogenicity of the isolates were compared to mortality, blood biochemical contents, such as alanine aminotransferase(ALT), aspatate aminotransferase(AST), and cortisol level, and non-specific immune responses, nitroblue tetrazolium (NBT) reduction of macrophages and lysozyme activities of serum.

The mortalities and levels of ALT, AST and cortisol of fishes infected with *P. damselae* were higher than those of others but significantly low in non-specific immune responses, NBT and lysozyme activities.

These results suggest that *P. damsela* might produce damselysin having high hemolytic and phospholipase activities, correlated with the pathogenicity. *P. damsela* could also make an obstruction of internal organs, following increasing in the level of ALT and AST, and depression in host immunity caused by induced high levels of cortisol.

Key words: Photobacterium damselae subsp. damselae, Vibrio, Pathogenicity, Flounder

념치 양식에 피해를 주는 세균성 질병으로 여러 가지가 보고되고 있으며, 그 중 *Vibrio* 속 세균의 감염에 의한 피해도 증가하고 있다.

비브리오병을 일으키는 원인균으로는 V. anguillarum(Ransom et al., 1984), V. alginolyticus(Akazawa, 1968), V. parahaemolyticus, V. ordalii (Schiewe et al., 1981), V. vulnificus(Tison et al., 1982), V. damsela(Love et al., 1981), V. harveyi(Grimes et al., 1984), V. salmonicida(Egidius et al., 1986), V. splendidus, V. pelagius(Lupiani et al., 1989) 및 V. tubiashi(Lodieros et al., 1987) 등이 보고되었다. 이 중

†Corresponding Author: Mun-Gyeong Kwon, Tel: 051-720-2476
Fax: 051-720-2498, E-mail: mgkwon@nfrdi.go.kr

V. damsela는 Photobacterium damselae subsp. damselae로 재분류되었으나(Trüper and De'Clari, 1997), 일반적으로 P. damselae subsp. damselae의 감염에 의한 질병도 비브리오병으로 분류되고 있다(Austin and Austin, 1999).

Photobacterium damselae subsp. damselae(이하 P. damselae)는 damselfish, Chromis punctipinnis 에서 처음으로 보고되었으며(Love et al., 1981), 청백돌고래, Tursiops truncatus(Fujioka et al., 1988), 방어, Seriola quinqueradiata(Sakata et al., 1989), 감성돔, Sparus aurata(Vera et al., 1991) 및

터봇, Scophthalmus maximus(Fouz et al., 1992)에서 질병을 일으켰다는 보고가 있지만, 아직 양식 넙치, Paralichthys olivaceus에 대한 감염 피해는 알려져 있지 않다.

P. damselae에 감염된 병어의 외부 증상은 damselfish에서 직경 2 cm 정도의 궤양이 가슴지느러미와 꼬리지느러미 부근에서 관찰되었으며 (Love et al., 1981), brown shark, Carcharinhus plumbeus에서는 무기력, 식욕부진 및 방향 감각 상실 등의 증상을 보여(Grimes et al., 1984), 감염 어종에 따라 증상 및 행동 유영에 차이가 있으나 넙치에 감염 시 증상에 대해서는 아직 보고되지 않았다.

우리나라 동해안 넙치 양식장의 질병 발생 현황을 조사한 결과, P. damselae에 감염된 넙치가 빈번히 출현하여 많은 피해를 일으키고 있었으나, 본 병원체가 넙치에 미치는 영향에 대한 연구는 미흡한 실정이었다. 따라서 본 연구는 넙치에 대한 P. damselae의 질병인자로서의 인과관계를 밝히고, 유사 증상의 넙치에서 자주 검출되는 어류 병원체인 Vibrio 속 세균과의 차이를 알아보고자 P. damselae와 Vibrio 속 어병 세균의 인위 감염을 통하여 넙치의 어병학적 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

실험어

경상북도 소재 사설 양어장에서 분양받은 넙치(전장 18.5±1.04 cm, 체중 61.1±8.99 g)를 0.5ton 용량의 유수식 사육조에 2주간 순치시킨후 실험에 사용하였다. 실험 기간 동안 수온은 22±1°C 유지하면서, 시판되는 넙치용 부상사료를 1일 3회 투여하였다.

인위 감염 실험

-70°C에 보존된 시험용 균주는 1.5% NaCl 첨가 TSB 배지에서 전배양한 후 1.5% NaCl 첨가 TSA 배지에서 25°C, 24시간 배양하였다. 배양된 균은 멸균생리식염수에 1.2×10°cfu/ml로 현탁하

여 넙치에 0.1 ml 씩 복강 주사한 후 폐사율, 혈액 성상 및 면역학적 활성을 조사하였다.

폐사율

인위 감염 후 매일 누적 폐사율을 조사하고, 폐사어 발생 시 질병 검사를 실시하여 폐사 원 인을 확인하였다.

혈액 성상

호중구 수 변화

인위 감염 3일째 혈액 도말 표본을 제작하여 Hemacolor(Merck)로 염색한 후 적혈구 5,000 cell당 호중구 수를 조사하고 호중구는 형태를 기준으로 하여 식작용한 것과 파괴된 것으로 구분하였다.

Haematocrit

시험어의 haematocrit 치는 Wedemeyer and Nelson(1975)의 방법에 따라 heparinized capillary tube(Chase Instrument Co.)에 삼투시킨 후 12,000×g, 5분간 원심 분리하였다. 시험어 haematocrit 치는 전체 혈액량에 대한 적혈구의 백부율로 나타내었다.

혈액 생화학적 성상 및 cortisol 농도

인위 감염 후 일정 시간 별로 채혈한 혈액을 이용하여 혈액 생화학적 성상 및 cortisol 농도를 측정하였다. Aspatate aminotransferase(AST, GOT) 및 alanine aminotransferase(ALT, GPT) 농도는 혈액자동분석기(Boehringer Mannhein, Germany)를 사용하여 분석하였으며, cortisol 농도는 Lou et al.(1984)의 방법에 따라 Rabbit anti-Cortisol-3 -CMO -BSA 항체(Cosmo-Bio Co. Ltd., Tokyo, Japan), standard cortisol(Steraloids Inc., Wilton, NH, USA) 및 방사선 표지[1,2,6,7-3H]-Cortisol(Amersham Life Science, England)를 사용하여 측정하였다.

혈액 및 조직 중의 세균수

혈액 및 조직 중의 세균 수 변화는 Spang-

gaard *et al.*(2000)에 따라 관찰하였다. 즉, 혈액 중의 균수는 채혈한 혈액의 100 씨를 멸균 phosphate buffered saline(PBS: 130mM NaCl, 10mM NaH₂PO₄, pH 7.2)에 10⁴까지 단계 희석하였다. 조직 중의 균수는 간과 신장의 조직을 1cm 정도되게 무균적으로 채취한 후 각 시료의 10배 (v/w)의 멸균 PBS로 균질화한 다음 10⁴까지 단계 희석하였다. 희석된 혈액 및 장기는 1.5% NaCl 첨가 TSA(Difco)에 접종하여 25°C, 24시간 배양 후 균수를 조사하였다.

면역학적 활성

식세포 활성

념치의 두신을 무균적으로 분리하여 2% fetal calf serum, 1% penicillin과 streptomycin, 및 0.2% heparin이 함유된 L-15 medium에서 40 μm nylon membrane을 통과시킨 세포 현탁액을 27%와 45% percoll에 중층시킨 후 3,000rpm에서 25분간 원심 분리하여 백혈구를 분리하였다. 분리된백혈구는 0.1% tryphan blue에서 viability를 관찰한 후 2×10 cells/mℓ의 농도로 조정하여 microculture well에 분주한 다음 20℃에서 2시간 부착시켰다. 옵소닌화된 zymosan을 nitroblue tetrazolium (NBT) 용액에 현탁시킨 후 식세포가 부착된 microculture well에 NBT 용액을 100 μℓ 씩첨가하여 20℃, 30분 동안 반응시킨 다음 100%

methanol로 고정시켰다. 각 well에 2M KOH 용액 120 μ 와 dimethyl sulphoxide(DMSO) 140 μ 시를 첨가한 후 630nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 blank는 2M KOH와 DMSO의 혼합 용액을 사용하였다.

혈청의 라이소자임 활성

라이소자임 활성은 Parry et al.(1965)의 turbidimetric method를 이용하여 측정하였다. 즉, Micrococcus lysodeikticus 0.2 mg/ml 현탁액(pH 6.2) 950 씨와 혈청 50 씨를 혼합하여 25°C, 30초 및 4분 30초간 반응시킨 후 530nm에서 흡광도를 측정하였다. 라이소자임 활성은 units/ml로 나타내었으며, 1unit는 흡광도 값이 0.001/min 감소한 양을 나타낸다.

통계 처리

시험 결과의 통계 처리는 ANOVA-test를 실시 하여 Duncan's multiple range test (Duncan, 1955) 로 평균간의 유의성을 SPSS Version 10 (SPSS, Michigan Avenue, Chicago, IL, USA, 1997) program을 사용하여 95%수준에서 검정하였다.

결 과

폐사율

시험 균주인 P. damselae와 vibrio 균의 병원성

Table 1. Cumulative mortality of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* infected with *Photobacterium damselae* subsp. damselae and vibrios (1.2×10^6 cfu/fish) by intraperitoneal injection

	Nivershow of		1	Mortality (y (Number of died fish) ay after injection Cumulative	Compulativa			
Strain	Number of tested fish		mortality(%)						
		1	2	3	4	5	6	7	mortanty(%)
P. damselae	20	1	5	9	1	0	0	0	80
V. anguillarum	20	0	4	6	2	0	0	0	60
V. splendidus	20	0	0	2	2	0	0	0	20
V. harveyi	20	0	0	0	2	2	0	0	20
V. ordalii	20	0	1	1	6	1	0	0	45
Control	20	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 2. The state differentiations of neutrophils in the peripheral blood of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* infected with *Photobacterium damselae* subsp. *damselae* and vibrios $(1.2 \times 10^{\circ} \text{cfu/fish})$ by intraperitoneal injection after 3days

G. :	Number of neutrophils in 5,000 RBCs						
Strains	Total	Phagocytized	Broken				
P. damselae	59.6±1.52°	15.6±2.73°	33.5 ± 2.89°				
V. anguillarum	58.3 ± 8.38^{a}	27.9 ± 6.34^{a}	$8.5 \pm 5.40^{\circ}$				
V. splendidus	56.3 ± 2.51^{a}	$38.5 \pm 1.89^{\circ}$	$3.5 \pm 1.47^{\text{b}}$				
V. harveyi	58.3 ± 3.05^{a}	$36.5 \pm 2.56^{\circ}$	$4.9 \pm 1.50^{\circ}$				
V. ordalii	55.3 ± 3.21^a	$30.4 \pm 5.79^{\circ}$	3.3 ± 2.31 ^b				
Control	$38.6 \pm 2.08^{\text{b}}$	0	0				

Alphabetic superscripts indicate statistic significance among tested groups (P < 0.05).

을 알아보기 위하여, 시험 균주를 1.2×10⁶ cfu/fish로 복강 주사한 후 일주일간 폐사율을 관찰하였다.

인위 감염 후 폐사율을 조사한 결과는 Table 1 과 같다. *P. damselae* 감염구는 폐사율이 80%로 가장 높았으며, *V. anguillarum*은 60%, *V. splendidus*와 *V. harveyi*는 20%의 낮은 폐사율을 나타내었다.

혈액 성상

호중구 수 변화

시험 균의 감염이 어류의 혈액 성상에 미치는 영향을 조사하였다.

호중구수의 변화는 인위 감염 후 혈액 도말 표본을 제작하여 관찰하였다(Table 2). Vibrio 균과 P. damselae 시험구의 총 호중구 수는 55.3±3.21~59.6±1.52로 대조구 38.6±2.08에 비하여높은 수치를 나타내었으나 균종에 따른 차이는보이지 않았다. 그러나 호중구 중 식작용을 한호중구수는 폐사율이 높았던 P. damselae와 V. anguillarum에서 낮았으며, 파괴된 호중구는 폐사율이 높았던 P. damselae와 가장 높은 수치를 나타내었다.

혈액 생화학적 성상 및 cortisol 농도

Haematocrit 치의 변화를 조사한 결과는 Fig. 1 과 같다. 감염 후 *P. damselae*와 *V. anguillarum* 시험구에서 haematocrit 치가 떨어지기 시작하여 6일째까지 지속되었으나 대조구와 유의적인 차이는 보이지 않았다. 두 시험 균종을 제외한 Vibrio균 시험구에서는 1일째 다소 떨어졌으나이후 회복되는 경향을 나타내었다

Aspatate aminotransferase(AST)와 Alanine aminotransferase(ALT)활성의 변화를 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. *P. damselae*와 *V. anguillarum* 시험구에서는 대조구에 비하여 유의적으로 높게 나타났으며(*P*<0.05), *V. ordalii* 시험구에서는 감염 3일째 대조구에 비하여 유의적으로 높은 값을 나타낸 후 점차 감소하였다(*P*>0.05).

P. damselae 와 vibrio 균을 인위 감염 후 혈중 cortisol 농도를 조사한 결과는 Fig. 3과 같다. P. damselae와 V. anguillarum 시험구는 감염 12시간째부터 대조구에 비하여 유의적으로 높은 값을 나타내기 시작하여 감염 3일째까지 지속되었다(P<0.05). V. ordalii 감염구는 감염 12시간째부터 증가하여 주사 3일째 가장 높은 값을 나타낸후 6일째 감소하였다.

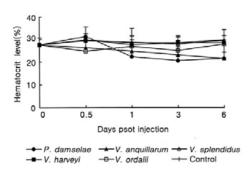


Fig. 1. Hematocrit levels in the blood of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* infected with $1.2 \times 10^{\circ}$ cfu/fish of *P. damselae* subsp. *damselae* and vibrios by intraperitoeneal injection.

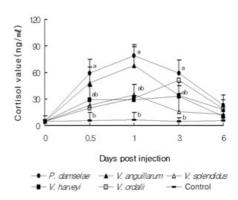
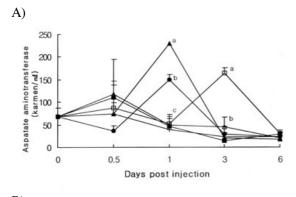
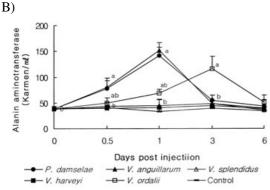
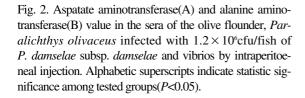
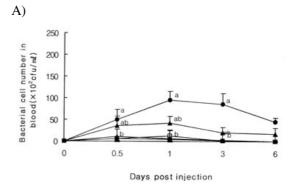


Fig. 3. Blood cortisol values in the olive flounder, *Paralichthys olivaceus* infected with 1.2×10^6 cfu/fish of *P. damselae* subsp. *damselae* and vibrios by intraperitoeneal injection. Alphabetic superscripts indicate statistic significance among tested groups(P < 0.05).









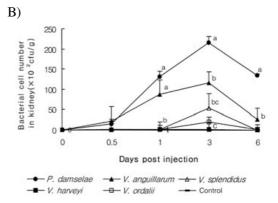


Fig. 4. Bacterial counts in blood (A) and kidney (B) of the olive flounder, *Paralichthys olivaceus* infected with $1.2 \times 10^{\circ}$ cfu/fish of *P. damselae* subsp. *damselae* and vibrios by intraperitoeneal injection. Alphabetic superscripts indicate statistic significance among treatments(P<0.05).

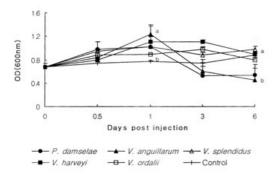


Fig. 5. Nitroblue tetrazolium reduction of head kidney macrophage in the olive flounder, *Paralichthys olivaceus* infected with $1.2 \times 10^{\circ}$ cfu/fish of *P. damselae* subsp. *damselae* and vibrios by intraperitoeneal injection. Alphabetic superscripts indicate statistic significance among tested groups(P < 0.05).

혈액 및 조직 중의 세균수

법치에 P. damselae와 Vibrio 균을 복강 주사한 후 혈액 및 조직 중의 균수를 조사하였다. 혈액 및 신장 중의 균수를 조사한 결과는 Fig. 4와 같다. P. damselae 시험구의 혈액 중의 균수는 주사12시간째부터 증가하여 24시간째 약 1.0×10년년에에로 가장 높은 수치를 나타낸 후 서서히 감소하였으며, 대조구에 비하여 유의적으로 높은 수치를 나타내었다(P<0.05). P. damselae 균주를 제외한 다른 시험구에서는 투여 12시간째 가장 높은 수치를 나타낸 후 24시간째 감소하는 경향을 나타내었으나 대조구와 유의적인 차이는 나타내지 않았다(P>0.05).

P. damselae시험구의 신장 중의 균수는 주사 24시간째 급격히 증가하여 3일째 가장 높은 수치를 나타낸 후 6일째 감소하였으며, 대조구에비하여 유의적으로 높은 수치를 나타내었다 (P<0.05). V. anguillarum과 V. splendidus 주사구에서는 주사 3일째 가장 높은 수치를 나타낸 후 6일째 급격히 감소하는 경향을 나타내었다 (P<0.05).

면역학적 활성

식세포 활성

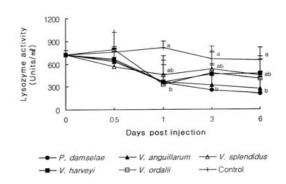


Fig. 6. Lysozyme activities in the sera of the olive flounder, *Paralichthys olivaceus* infected with 1.2×10^{6} cfu/fish of *P. damselae* subsp. *damselae* and vibrios by intraperitoeneal injection. Alphabetic superscripts indicate statistic significance among tested groups(P < 0.05).

법치에 세균을 복강 주사한 후 두신 식세포의 활성을 NBT 방법으로 조사한 결과는 Fig. 5와 같다. 모든 시험구에서 주사 12시간째부터 24시간까지는 대조구에 비하여 높은 활성을 나타내었다. P. damselae 시험구에서는 주사 3일째부터 대조구에 비하여 낮은 활성을 나타내어 6일째는 대조구에 비하여 유의적으로 낮게 나타났으며 (P<0.05), 그 외의 균주는 대조구와 비슷한 수준의 활성을 나타내었다.

혈청의 라이소자임 활성

법치에 세균을 복강 주사 후 혈청 중의 라이소자임 활성을 조사한 결과는 Fig. 6과 같다. 감염구는 감염 12시간째부터 대조구에 비하여 활성이 낮아졌으며, 24시간째는 V. anguillarum, V. ordalii 및 P. damselae의 시험구에서 대조구에비하여 유의적으로 낮은 활성을 나타내었다. 또한 P. damselae와 V. anguillarum 시험구에서는 주사 6일째까지 대조구에비하여 유의적으로 낮은 활성을 나타내었다(P<0.05).

고 찰

비브리오병이 어류 질병으로 알려진 초기에는 주로 담수어류에서 *V. anguillarum*의 감염에 의 한 질병을 지칭하였으나, 최근에는 넙치를 비롯한 해수어와 담수어가 *Vibrio* 속 세균에 감염되어 패혈증을 일으키는 질병에 대한 포괄적인 개념으로 사용되고 있다.

본 연구에서 넙치의 *P. damselae*와 *Vibrio*균의 감염에 대한 어병학적 특성을 밝히고자 각각의 시험균을 넙치에 인위 감염시킨 후 폐사율, 혈액 성상 및 면역 반응 등을 조사하였다.

생체 방어 반응의 하나로서 인위 감염시킨 넙 치의 적혈구 5,000cells 중에 출현하는 호중구 수 를 관찰한 결과, 모든 시험구에서 대조구에 비하 여 유의적으로 높은 수치가 나타나 정상적인 생 체방어 반응 현상을 볼 수 있었다. 그렇지만 식균 식세포수에서는 시험균 종별로 뚜렷한 차이를 볼 수 있었다. 특히 P. damselae 시험구에서는 다 른 시험구의 50% 수준에 불과하였으며, V. anguillarum 균 시험구는 그 중간 정도의 수준에 머물 고 있음을 알 수 있다. 한편 파괴된 호중구수는 폐사율이 높았던 P. damselae 에서 가장 높게 나 타났다. 이러한 현상은 P. damselae 균이 다른 시 험균종과 유사한 수준으로 호중구에 식균된 후 살균되지 않고 호중구를 파괴하기 때문에 일어 난 것으로 사료된다. 다만 이 시험 결과가 시험균 주의 복강 주사 후 3일째에 관찰한 것이므로 시 험 시간 간격을 줄여서 이러한 변화 과정을 보다 면밀하게 확인할 필요가 있을 것으로 생각된다. P. damselae는 Vibrio균과 달리 phospholipase-D (dly) gene이 coding하는 damselysin이라는 세포외 독소를 분비하여 phospholipase 및 haemolytic activity를 갖고 있는 것으로 알려져 있으며, Fouz et al. (1993)은 본 외독소와 어류에 대한 병원성이 깊은 관계가 있다고 하였다. 본 연구에서 P. damselae로 인위 감염 후 호중구를 관찰한 결과, 식작용 과정 중 손상된 호중구 비율이 Vibrio 감 염구에 비하여 높게 관찰되었으며, 인위 감염 후 혈액과 신장에서 Vibrio 감염구에 비하여 세균 수 치가 높게 나타난 것과 관계가 있을 것으로 생각 된다. 또한 이러한 활성은 높은 용혈능, caseinase, gelatinase, phospholipase 및 lipase의 활성에 의한 것으로 판단되며(권 등, 2007), 이와 같은 효소 활성과 용혈능이 병원성 발현에 주요 인자로 작용하였을 것으로 사료된다.

혈액 생화학적 검사는 육상동물뿐만 아니라 해양동물에서도 중요한 요소에 해당하며, 동물의 생리적인 상태를 판단할 수 있는 것으로 알려져 있다(Chen et al., 2004). 본 연구에서 P. damselae 감염 시험구는 hematocrit, AST 및 ALT에서 대조구와 유의적인 차이가 나타났다. 무지개송어에 Aeromonas salmonicida가 감염되면 ALT와 AST는 증가하지만, hematocrit 치는 감소하는 현상이 나타난다(Barham et al., 1980). Chenet al.(2004)은 틸라피아에서 모든 급성 손상과간에 괴사성 병소 형성 시 ALT와 AST가 증가하며, 간장뿐만 아니라 장 및 체신의 병리조직학적 병변이 심해짐에 따라 ALT와 AST가 증가한다고 하여, 본 연구에서도 AST의 증가는 내부장기의 손상과 관련이 있을 것으로 생각된다.

감염성 질병이 어류의 cortisol 농도에 미치는 영향에 대하여 여러 가지 질병에서 보고되고 있 다. Bilodeau et al.(2003) channel catfish, Ictalurus punctauts에 Edwardsiella ictaluri가 감염되면 병원성이 강한 균주가 약한 균주에 비하여 혈중 cortisol 농도를 높인다고 하여 본 연구에 P. damselae 시험구에서 높게 나타난 것과 유사한 결과를 나타내었다. 또한, cortisol 농도 증가 시 brown trout(Salmo trutta)는 곰팡이성 질병(Pickering and Duston, 1983)과 세균성 질병(Pickering and Pottinger, 1989)에 대하여, 무지개송어에서는 기생충성 질병에 대한 감수성이 높아질 뿐만 아 니라(Woo et al., 1987), 림프구의 기능을 저해한 다고 하였다(Tripp et al., 1987; Espelid et al., 1996). 본 연구에서는 P. damselae의 감염이 glucose와 cortisol 농도를 증가시켜 면역 억제가 유 도되어 폐사율이 높아지는 것으로 생각된다.

인위 감염 후 혈액 및 장기에서 세균 수를 관찰한 결과, *P. damselae* 감염 시험구에서 더 많은 수가 관찰되었다. Saeed(1995)은 *V. harveyi*를 brown-spotted grouper에 복강과 근육에 주사하

였을 때 복강 주사구에서는 복강의 세균이 직접 또는 macrophage를 통해서 비장과 간장으로 이 동하여 장기 내에 세균 수가 많아지는 것을 추 정하였으며, 본 연구에서도 같은 현상이 일어났 을 것으로 예상된다.

Lysozyme의 활성 시험에서 *P. damselae* 감염 시험구의 활성이 다른 시험구에 비하여 현저하게 저하되어 있는 것으로 나타났다. 이러한 현상은 neutrophil이 lysozyme 분비와 직접적인 연관성이 있는 점 (Seifert *et al.*, 1990)에서 볼 때, 본시험균이 지닌 특징적인 독성 작용의 하나로 사료된다.

따라서, *P. damselae*의 높은 용혈능과 phospholipase 활성이 병원성에 관여하였을 것으로 생각되며, 감염 시 내부 장기의 손상에 의한 ALT와 AST의 상승, cortisol 농도 증가로 인한 면역 기능저하가 높은 폐사율을 나타낸 것으로 생각된다.

요 약

법치 병어에서 *Photobacterium damselae* subsp. *damselae*와 *Vibrio* spp.(*V. anguillarum*, *V. splendidus*, *V. harveyi* and *V. ordalii*)를 분리한 후 *in vivo*에서 병원성을 비교하였다.

분리균을 인위감염 한 결과, 폐사율, 혈청의 ALT, AST, cortisol 농도가 vibrio 감염구에 비하여 *P. damselae* 감염구에서 높게 나타났다. 또한, *P. damselae* 감염구에서 비특이적 면역반응인 식세 포의 nitroblue tetrazolium(NBT) 반응과 혈청의라이소자임 활성이 유의적으로 낮게 나타났다.

따라서, P. damselae는 특이적 효소인 damselysin의 분비로 높은 용혈능과 phospholipase 활성, 감염 시 내부 장기의 손상에 의한 ALT와 AST 상승, cortisol 농도의 증가로 인한 면역기능저하가 높은 병원성을 나타낸 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 국립수산과학원 (수산생물 질병 모

니터링 및 진단연구, RP-2009-AQ-044)의 지원에 의해 운영되었습니다.

참고문헌

- Akazawa, H.: Bacterial diseases of marine fishes. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 34:271-272, 1968.
- Austin, B. and Austin, D.A.: Bacterial fish pathogen, Diseases of farmed and wild fish, 3rd, ed. Springer-Praxia, Godaliming, 1999.
- Barham, W.T., Smit, G.L. and Schoonbee, H.J.: The hematological assessment of bacterial infection in rainbow trout *Salmo gairdneri*. J. Fish Biol., 17:275-281, 1980.
- Bilodeau, A.L., Small, B.C. and Wolters, W.R.: Pathogens loads, clearance and plasma cortisol response in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), following challenge with *Edwardsiella ictaluri*. J. Fish Dis., 26:433-437, 2003.
- Chen, C.-Y., Gregory, A.W. and Paul, R.B.: Comparative blood chemistry and histopathology of tilapia infected with *Vibrio vulnificus* or *Streptococcus iniae* or exposed to carbon tetrachloride, gentamicin, or copper sulfate. Aquaculture, 239:421-443, 2004.
- Duncan, D.B.: Multiple-range and multiple F tests. Biometrics, 11:1-42, 1955.
- Egidius, E., Wiik, R., Andersen, K., Hoff, K.A. and Hjeltnes, B.: *Vibrio salmonicida* sp. nov., a new fish pathogen. Int. J. Syst. Bacteriol., 36:518-520, 1986.
- Espelid, S., Lokken, G.B., Steiro, K. and Bogwald, J.: Effects of cortisol and stress on the immune system in Atlantic salmon(*Salmo salar* L.). Fish Shellfish Immunol., 6:95-110, 1996.
- 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.
- Fouz, B., Barja, J.L., Rivas, C., Amaro, C. and Toranzo, A.E.: Toxicity of the extracellular products of *Vibrio damsela* isolates from diseased fish. Current Microbiol., 27:341-347, 1993.
- 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.
- Lodieros, C., Bolinches, J., Dopazo, C.P. and Toranzo, A.E.: Bacillary necrosis in hacheries of *Ostrea edulis* in Spain. Aquaculture, 65:15-29, 1987.
- Lou, S.W., Aida, K., Hanyu, I., Sakai, K., Nomura, M.M., Tanaka, M. and Tazaki, S.: Endocrine profiles in the females of a twice-annually spawning strain of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Gen. Comp. Endocrinol., 64, 212-219, 1984.
- 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.
- Lupiani, B., Dopazo, C.D., Ledo, A., Fouz, B., Barja, J.L., Hetrick, F.M. and Toranzo, A.E.: A new syndrome of mixed bacterial and viral etiology in cultured turbot, *Scophthalmus maximus*. J. Aquat. Animal Health, 1:197-204, 1989.

- Parry, R.M., Chandau, R.C. and Shahani, R.M.: A rapid and sensitive assay of muramidase. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 119:384-386, 1965.
- Pickering, A.D. and Duston, J.: Administration of cortisol to brown trout, *Salmo trutta* L. and its effects on the susceptibility to *Saprolegnia* infection and furunculosis. J. Fish Biol., 21:163-175, 1983.
- Pickering, A.D. and Pottinger, T.G.: Stress responses and diseases resistance in salmonid fish: effects of chronic elevation of plasma cortisol. Fish Physiol. Biochem., 7:253-258, 1989.
- Ransom, D.P., Lannan, C.N., Rohovec, J.S. and Fryer, J.L.: Comparison of histopathology caused by *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii* in 3 species of Pacific salmon. J. Fish Dis., 7:107-116, 1984.
- Saeed, M.O.: Association of *Vibrio harveyi* with mortalities in cultured marine fish in Kuwait. Aquaculture, 136:21-29, 1995.
- Sakata, T., Matsuura, M. and Shimokawa, Y.: Characteristics of Vibrio damsela isolated from diseased yellowtail(*Seriola quinqueradiata*).

 Nippon Suisan Gakkashi, 55:135-141, 1989.
- 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.
- Seifert, R., Schultx, G., Richter-Freund, M., Metzger, J., Wiesmuller, K.-H., Jung, G., Bessler, W.G. and Hauschildt, S.: Activation of superoxide formation and lysozyme release in human neutrophils by the synthetic lipopeptide Pam₃Cys-Ser-(Lys)₄. Biochem. J., 267:795-802., 1990.
- Spanggaard, B., Huber, I., Nielsen, J., Nielsen, T. and Gram, L.: Proliferation and location of

- Vibrio anguillarum during infection of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. J. Fish Dis., 23:423-427, 2000.
- Tison, D.L., Nishibuchi, M., Greenwood, J.D. and Seidler, R.J.: *Vibrio vulnificus* biogroup 2: A new biogroup pathogenic for eels. Appl. Environ. Microbiol., 44:640-646, 1982.
- Tripp, R.A., Maule, A.G., Schreck, C.B. and Kaattari, S.L.: Cortisol mediated suppression of salmonid lymphocytes *in vitro*. Dev. Comp. Immunol., 11:565-576, 1987.
- Trüper, H.G. and De'Clari, L.: Taxonomic note: necessary correction of specific epithets formed as substantives (nouns) 'in apposition', Int. J. System. Bacteriol., 41:529-534, 1997.
- 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.

- Wedemeyer, G.A. and Nelson, N.C.: Statistical methods for estimating normal blood chemistry ranges and variance in rainbow trout (*Salmo gairdneri*), Shasta strain. J. Fish. Res. Board Can., 32, 551-554, 1975.
- Woo, P.T.K., Leatherland, J.F., and Lee, M.S.: *Cryptobia salmostica*: cortisol increase the susceptibility of *Salmo gairdneri* Richardson to experimental cryptobiosis. J. Fish Dis., 10:75-83, 1987.
- 권문경, 김명석, 조병열, 김진우, 박수일: *In vitro*에서 *Photobacterium damselae* subsp. *damselae*와 *Vibrio*속 세균의 병원성 비교. 한국어병학회지, 20:71-81, 2007.

Manuscript Received : April 16, 2009 Revised : August 5, 2009

Accepted: August 18, 2009