

## *Vibrio alginolyticus*에 대한 특이 bacteriophage의 생물학적 특성

허용주 · 이찬흔 · 백민석 · 안현미 · 황요셉 · 박권삼<sup>1</sup> · 최상훈<sup>1\*</sup>

군산대학교 수산생명의학과, <sup>1</sup>군산대학교 식품생명공학과

### Biological Characterization of a *Vibrio alginolyticus*- Specific Bacteriophage

Yong Ju Heo, Chan Heun Lee, Min Suk Baek,  
Hyun Mi Ahn, Yo Sep Hwang, Kwon-Sam Park<sup>1</sup> and Sanghoon Choi<sup>1\*</sup>

Department of Aquatic Life Medicine, Kunsan National University, Gunsan 573-701, Korea

<sup>1</sup>Department of Food Science and Biotechnology, Kunsan National University 573-701, Korea

*Vibrio alginolyticus*, a marine fish and shellfish pathogen, has been found at a high frequency around the coastal areas of Korea. *Vibrio alginolyticus* was purified from various diseased fish, and a *V. alginolyticus*-specific bacteriophage was isolated from seawater obtained from fish farms located on the west coast of Korea. In a bacterial lysis experiment using the phage and antibiotics, tetracycline,  $10^3$  cfu/ml of *V. alginolyticus* were completely lysed by both the phage and the antibiotic, suggesting that the purified phage in the study could be utilized as an alternative to antibiotics in the control of fish and shellfish diseases caused by *V. alginolyticus*.

Key words: *Vibrio alginolyticus*, Phage, Tetracycline

## 서 론

*Vibrio* 속에 해당되는 병원체는 다양한 해양동물의 공통적 감염원으로 알려져 있으며 실로 양식산업에 있어서 상당한 경제적 손실을 입히는 것으로 보고되었다(Chen et al., 1992; Lee et al., 2003). 그 중 *Vibrio alginolyticus* (*V. alginolyticus*)와 *Vibrio parahaemolyticus* (*V. parahaemolyticus*)가 고수온이 되는 시점에서 해수에 오염이 되거나 어패류에 가장 빈번히 감염되는 것으로 알려져 있다(Liu et al., 2000; Liu et al., 2001). *V. alginolyticus*는 주로 오염된 해수에 피부가 노출된 사람에서 *Vibrio vulnificus*와 비슷하게 패혈증을 일으킬 수 있으며(Oh et al., 2007) 창상감염, 만성궤양 및 중이염 환자에게서 이 균이 분리되기도 하였다(Schmidt et al., 1979). 이 뿐만 아니라 바다에 서식하는 척추동물(Yan et al., 2007)과 무척추동물(Jayaprakash et al., 2006)에 이르기 까지 다양한 종에 걸쳐 감

염되고 있는 실정이다.

*Vibrio* 속 병원체는 물론 다양한 박테리아성 병원체들을 사멸시키기 위해서 지금까지 항생제를 오남용 해왔지만 그로 인하여 다약제 내성균의 증가와 슈퍼박테리아 등이 나타나고 있으므로(Lee et al., 2007) 우리나라에서는 2011년 7월 양식어의 사료에 항생제를 첨가하는 것이 전면 금지되었다. 그러므로 항생제를 대체할 수 있는 대체제는 물론 병원성 세균의 제어 기술 및 방법에 대한 관심이 고조되고 있다.

박테리오파지(이하 파아지)는 박테리아를 선별적으로 사멸시키는 바이러스의 일종으로 Twort (1915)의 연구를 시작으로 Bruynoghe et al. (1921)에 의해 피부질환을 치료함으로써 시작 되었으나 항생제의 등장으로 인하여 파아지 요법은 사라지게 되었다. 현재는 항생제 대체제로서 그 가능성이 제기되고 있으며 해안에 서식하는 *Vibrio* 속을 비롯한 각종 해양 미생

#### Article history;

Received 3 August 2012; Revised 22 November 2012; Accepted 27 November 2012

\*Corresponding author: Tel: +82. 63. 469. 1886 Fax: +82. 63. 469. 1886

E-mail address: shchoi@kunsan.ac.kr

Kor J Fish Aquat Sci 45(6) 654-658, December 2012

<http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2012.0654>

pISSN:0374-8111, eISSN:2287-8815

© The Korean Society of Fishereis and Aquatic Science. All rights reserved

물이 보고 된 후 Smith et al. (1954)과 Spencer (1955)에 의해 연구가 시작되었다. *Vibrio* 파아지에 대한 우리나라의 연구는 1980년대부터 Ju et al. (1987)에 의해 시도 되었으나 현재는 양식분야 있어서는 미흡한 실정이다.

이에 본 연구에서는 항생제 대체제로서 *V. alginolyticus*에 대한 파아지를 개발하기 위해 서해안 양식장의 해수와 어패류로부터 *V. alginolyticus*와 이에 대한 특이적인 파아지를 분리 동정 하였다. 분리된 *V. alginolyticus*에 대한 파아지의 생물학적인 특성을 조사하여 *Vibrio* 질병에 대한 예방 및 치료 대책의 가능성을 확보하고자 본 연구를 수행 하였다.

## 재료 및 방법

### 해수 샘플링 및 *V. alginolyticus* 표적균주 동정 및 분리

작년 여름 7-8월 경 우리나라의 서해안 및 남해안에 위치한 100여 군데의 양식장으로부터 해수 샘플을 수집하였다. 전복과 넙치의 병어로부터 멸균 면봉을 이용하여 병원성 세균을 채취한 후 alkaline peptone water (APW)에 증균 배양 하였으며 thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar (TCBS)를 선택배지로 하여 자란 균 집락을 API20E kit (BioMerieux, France)와 16S rRNA gene을 이용하여 분석해 본 결과 *V. alginolyticus*로 확인 되었다. DNA sequencing에 사용된 *V. alginolyticus*의 16S rRNA gene에 대한 universal primer로 F, 5'-AGAGTTT-GATCMTGGCTCAG-3', R, 5'-TACGGYTACCTTGT-TACGAC-3'을 각각 사용하였다.

### 물 샘플의 처리 및 사용배지

#### 물 샘플의 여과

다른 미생물들에 오염되었을 가능성이 있는 수집된 물 샘플을 정제하고자 물 샘플 100 ml을 filter paper (Macherey-nagel, Germany)로 1차 여과한 후 8,800 g에서 30분간 원심분리를 하였다. 파아지가 존재 가능한 상청액을 0.2 µm 여과지로 2차 여과를 하였으며 0.2 µm 실린지 필터(Minisart, USA)를 이용해 3차까지 여과 하였다.

#### 파아지 증식용 액체배지

정제된 물 샘플 내에 존재 가능한 *V. alginolyticus* 표적 세균에 특이적인 파아지를 증폭시키기 위해 멸균증류수 100 ml 당 NaCl (sodium chloride) 2 g, Yeast Extract (Bacto™) 0.5 g 및 Peptone (Bacto™) 1.0 g 되도록 제조한 후 pH 7.5로 조정하여 사용했다.

#### 파아지 역가 측정용 고체배지

*V. alginolyticus*에 특이적인 파아지의 역가를 측정하기 위해 2% NaCl이 첨가된 Brain Heart Infusion (이하 2% NaCl-

BHI)에 0.7% 한천을 혼합한 평판 배지를 사용 하였으며 autoclave 한 후 cap tube에 5 mL씩 분주하여 사용하였다.

### 파아지 분리 및 저장

#### 파아지의 분리 및 증폭

정제된 물 샘플 20 mL에 *V. alginolyticus* 2 µL와 2% NaCl-BHI 2 mL을 혼합하여 37 °C에서 배양하였다. 약 12시간 후 대조군에 비해 박테리아가 증식되지 않는 것이 관찰되면 더 많은 양의 파아지를 증폭시키기 위해 박테리아 5 µL를 더 첨가하여 37 °C에 지속적으로 배양하면서 박테리아의 증식여부를 관찰 하였다. 이후 *V. alginolyticus*가 더 이상 자라지 않는 것을 확인한 후 파아지가 있는 것으로 추정되는 배양액을 800 g로 원심 분리하였으며 상청액을 0.2 µm 실린지 필터로 여과하였다. 여과된 파아지 샘플 10 µL를 원균주인 *V. alginolyticus* 500 µl가 균일하게 도말되어 있는 3% NaCl-BHI 배지에 점종하여 나타나는 monolayer spot plaque형태를 관찰하였다.

#### 파아지의 역가 측정

증폭된 파아지의 역가를 알아보기 위하여 정제된 파아지의 원액을 2% NaCl-BHI 액체배지를 사용 하여 5배, 10배, 20배, 25배 및 50배까지 희석하였다. Eppendorf tube에 2% NaCl-BHI 액체배지를 800 µL씩 조성한 다음 각각 희석시킨 파아지 샘플 100 µL와 10<sup>3</sup> colony forming unit (CFU)/mL의 *V. alginolyticus* 100 µL를 첨가하고 37 °C에서 2시간 간격으로 배양하였다. 그 후 주입 평판법으로 생균수를 측정하여 파아지의 역가를 측정 하였다.

#### 파아지의 농축, 정제 및 보관

증폭된 파아지를 농축시키기 위해 20% polyethylene glycol 6000 (PEG 6000)과 3% NaCl을 넣고 4 °C에서 하룻밤 정치한 후 10,000 g에서 30분 원심 분리 하는 PEG 침전법을 사용하였다. 파아지의 정제는 CsCl 밀도구배 원심분리법을 이용하였다. CsCl의 구배를 ρ 1.70/1.50/1.45/1.40/1.30/1.20으로 하고 그 위에 전 처리한 파아지액을 올린 후 70,000 g (Beckman, LE-80K ultracentrifuge, U.S.A), 4 °C에서 2시간 동안 원심 분리한 후 20-gauge 주사기로 ρ 1.45-1.40 사이의 buffy coat 파아지 층을 회수하고 세척하여 정제 하였다. 정제한 파아지는 0.2 µm 실린지 필터로 여과 하였으며 여과된 파아지 샘플에 50% 글리세롤을 1:1로 섞은 후 사용하기 전까지 4°C에 냉장보관 하였다.

### 파아지 및 항생제의 *V. alginolyticus*에 대한 감수성 비교 시험

항생제 중 *Vibrio* 치료제로서 일반적으로 사용되고 있는 tetracycline을 대조군으로 설정하고 분리된 파아지가 *V. alginolyticus*에 대하여 억제 및 사멸능 효과가 있는지 알아보기 위하

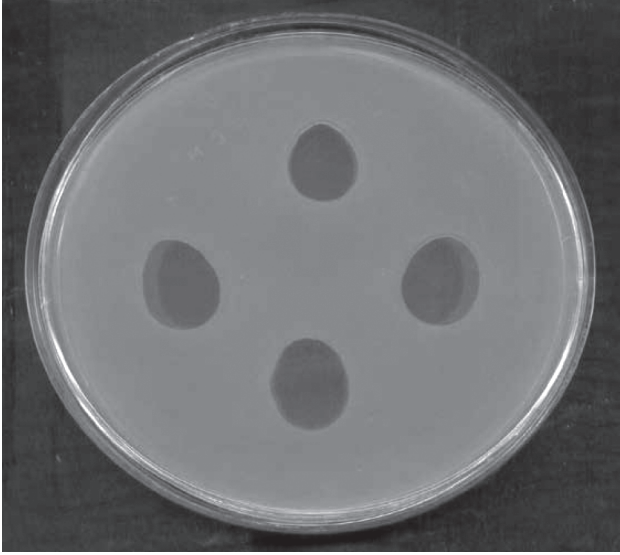


Fig. 1. The plaques by *Vibrio alginolyticus* specific phage isolated from sea water.

여 실험을 진행하였다. Eppendorf tube에 2% NaCl이 첨가된 BHI 액체배지를 800  $\mu$ L씩 조성 한 다음 30  $\mu$ g/mL의 tetracycline 또는 20배 희석된 파아지를 각각 100  $\mu$ L씩 첨가 하였다. 그 후 멸균 해수에 저장해 둔 *V. alginolyticus*  $3 \times 10^3$  CFU/mL 과  $2 \times 10^5$  CFU/mL을 각각 100  $\mu$ L 접종 한 후 37  $^{\circ}$ C에서 2, 4, 6, 8, 10 및 12시간 경과 별로 각각의 샘플을 10진 희석법으로 희석하여 주입 평판법으로 생균수를 측정하였다. 이때 대조군으로는 *V. alginolyticus*만 접종 한 것을 사용 하였다.

## 결과 및 고찰

우리나라의 해상에서 출현되는 *Vibrio* 속 중 *V. alginolyticus* 는 전 연안에 걸쳐 발생 빈도율이 가장 높은 것으로 나타나고 있으며 최근 인간 및 어패류에도 심각한 질병을 유발시키고 있어 문제가 되고 있는 실정이다 (Hwang et al., 2007). *Vibrio* 에 대한 특이백신이 현재 상용화 되어 있지 않은 상태에서 항생제만이 유일한 치료제였지만(Stenholm et al., 2008) 또한 이에 대한 내성이 나타남으로써(Izumi and Aranishi, 2004; LaFrenz et al., 2008) 항생제에 대한 대체제의 개발이 시급히 요구되고 있다. 이에 본 연구에서는 *V. alginolyticus*에 대한 특성을 규명하고 이를 사멸 시킬 수 있는 항생제 대체제로서 파아지를 개발하고자 하였다. 우선 *V. alginolyticus*를 서해안 양식장의 해수와 어패류로부터 분리 동정 하였으며 이에 대한 특이적인 파아지를 분리하여 그에 대한 생물학적 특성을 조사하였다. 이러한 결과들을 바탕으로 *Vibrio* 질병에 대한 예방 및 치료 대책의 가능성이 수월해 질 것으로 생각된다.

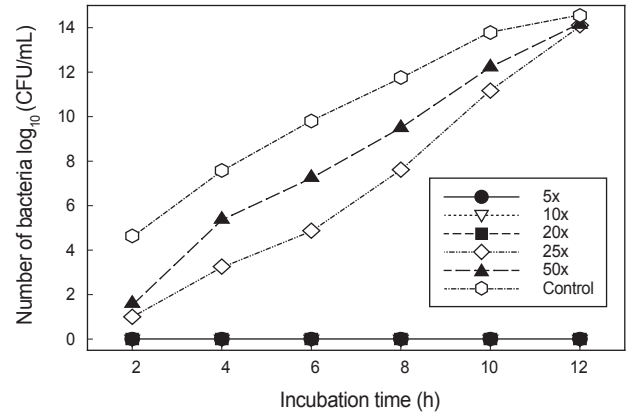


Fig. 2. Titration of *Vibrio alginolyticus* specific phage activity against *V. alginolyticus* target cells. The result is a representative of three different experiments.

본 연구에서는 해수 및 어패류로부터 *V. alginolyticus*라고 추정되는 8개의 균주를 얻었으나 육안적으로 형태 및 크기가 유사하여 동일한 균주로 간주하고 그 중 전복샘플에서 분리한 한 균주를 분리 동정하였다. 선택된 균주는 KCTC에서 분양 받은 표준 균주인 *V. alginolyticus* ATCC 17749와 집락의 색깔이나 형태가 동일하였으며 API20E kit로 실험한 결과 lysine decarboxylase, ornithin decarboxylase, indol, glucose, mannitol, sucrose 및 oxidase에는 Park et al. (2002)이 보고한 결과와 유사하게 두 균 모두 양성 반응을 보였다. 또한 대조군으로 사용한 표준 균주인 *V. alginolyticus* ATCC 17749와 유사한 생화학적 특성을 나타내었으며 16S rRNA 염기서열 분석 결과 Genbank에 등록된 accession number HM771350.1인 *V. alginolyticus*과 99.7% 상동성을 나타내었다 (자료 미 제시). 일백 여 개에 달하는 다양한 해수 샘플을 처리한 결과 *V. alginolyticus*에 대한 특이 파아지 1주가 분리·동정되었으며 이를 VAP11이라 명명하였다. Fig. 1은 *V. alginolyticus*에 특이적인 파아지가 monolayer spot 실험에서 표적균주를 완전히 용혈 시킨 용균반점의 모양을 보여준다. 하지만 37 $^{\circ}$ C 배양 과정에서 24시간 이전에 다시 약간의 용균 반점이 덮이는 현상이 나타났는데 이러한 현상은 기존에 보유하고 있는 양성 균주의 일종인 *Mycobacterium* sp.의 파아지 그리고 음성 균주의 일종인 *Edwardsiella tarda* (*E. tarda*)의 파아지와 비교해 보면 확연한 차이가 남을 알 수 있었다. 그 이유로는 용균성 파아지의 복제과정 중 일부의 박테리아가 살아남아 파아지 감염에 대한 박테리아의 내성이 발생되었을 가능성을 들 수 있다. 이러한 현상에 대한 자세한 기전은 더욱 연구가 진행되어야 하겠지만 *V. alginolyticus*의 특징한 lipopolysaccharide (LPS)와 outer membrane proteins (OMPs)가 파아지의 감염을 저해시키는 인자로 작용 할 수도 있을 것으로 추정된다. 만약 그렇다면 파아지에 대한 내성균주가 어떻게 생성될 수도 있는 지 정확히 메커니즘을 조사하기 위해서는 추가적인 실험이 요구된다.

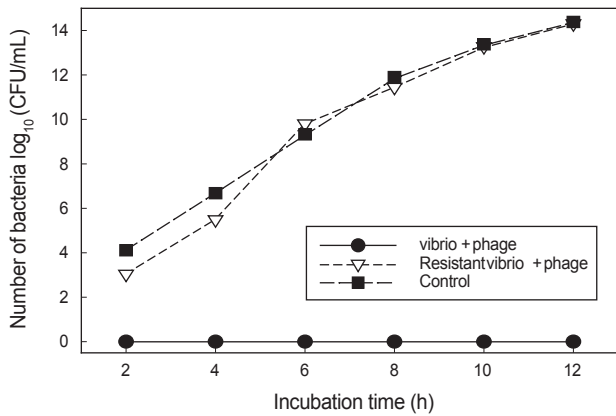


Fig. 3. Growth curves for phage resistant *Vibrio alginolyticus* and wild-type *V. alginolyticus*. The result is a representative of three different experiments.

파아지의 역가를 측정할 결과 5배에서 20배 희석 시까지 파아지가 첨가된 샘플은 숙주 균이 모두 사멸되어 균이 검출되지 않았으며 25 및 50배 샘플의 경우에는 대조군에 비하여 감소는 되는 듯하였으나 2시간 이후부터 균이 모두 증식하여 대조군과 비슷한 결과를 나타내었다(Fig. 2). 이는 앞서 언급하였던 monolayer spot assay 결과와 유사하였다. 증식된 균이 파아지에 대한 내성이 있는지 확인하기 위하여 추가적으로 25배 희석 샘플의 증식 균을 재분리하여 파아지로 재감염을 시도하였다. 그 결과 처음부터 파아지에 내성을 보인 균주는 대조군과 똑같이 증가함을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

항생제의 개발에 의해 각종 박테리아성 질병치료에 항생제가 광범위하게 사용됨으로써 축·수산물의 생산성이 괄목할 수준으로 증대 되어 왔다. 그 중 tetracycline은 국내에서 가장 사용량이 많으며 그람 양성 및 음성 균에 모두 유효한 광범위 항생제이다. 이에 본 연구에서는 분리된 파아지가 *V. alginolyticus*에 대해 tetracycline 항생제와 비교하여 균 사멸에 얼마만큼의 효과가 있는지를 알아보고자 하였다. Fig. 4는 *in vitro* 상에서 파아지 VAP11와 *Vibrio* 치료제로서 사용되어지고 있는 tetracycline을 사용하여 *V. alginolyticus* 10<sup>3</sup>과 10<sup>5</sup> CFU/mL의 농도별에 대한 사멸되는 수준을 비교한 결과로서 *V. alginolyticus* 10<sup>3</sup> CFU/mL의 농도에서는 파아지 VAP11와 tetracycline 모두 대조군 비하여 2시간 만에 균을 사멸시키는 것으로 나타났다. *V. alginolyticus* 10<sup>5</sup> cfu/mL의 농도에서는 2시간까지는 파아지 VAP11이 tetracycline 보다 좋았으나 이후부터는 대조적으로 균이 증가되는 현상을 보였으며 tetracycline의 경우 2시간부터 생균수가 점차 감소되어 8시간 이후 생균수가 모두 사멸되어지는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 앞서 실험된 monolayer spot의 결과와 유사한 현상이라 생각된다. 숙주균과 파아지에 관련된 내성 메커니즘의 연구는 더 진행되어야 할 것으로 생각되며 추후 숙주균을 사멸시킬 수 있는 파아지의 적정농도를 적용한다면 숙주균에 대한 파아지의 최적 사멸 효과를

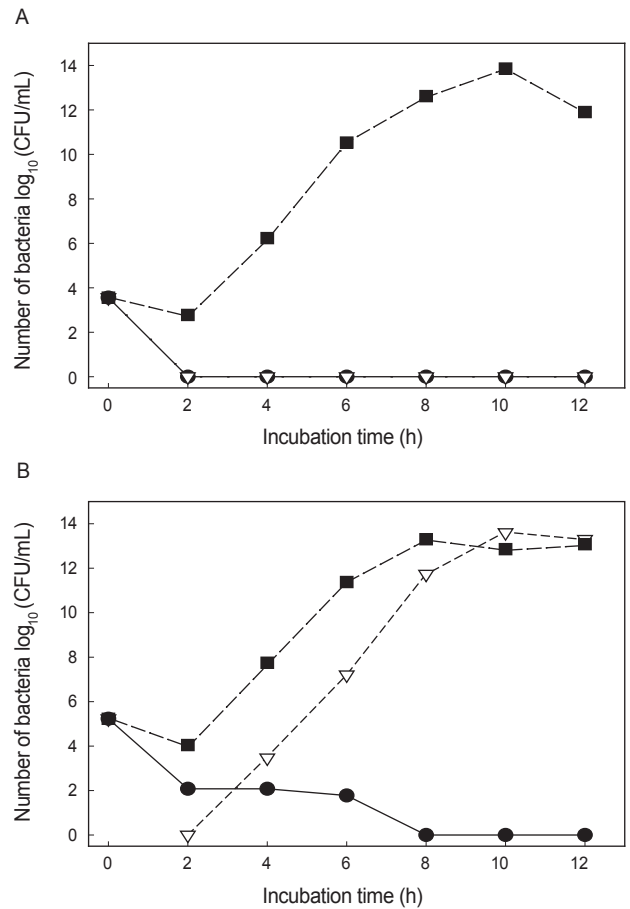


Fig. 4. Effects of phage VAP11 or antibiotics on lethal degree of *V. alginolyticus*. A, 10<sup>3</sup> cfu/mL of *Vibrio alginolyticus*; B, 10<sup>5</sup> cfu/mL of *V. alginolyticus*; ▽, phage VAP11; ●, tetracycline; ■, control. The result is a representatives of four different experiments.

를 볼 수 있을 것으로 기대 한다.

결론적으로 본 연구에서는 *V. alginolyticus*에 특이적인 파아지 VAP11의 기본적인 생물학적 특성을 밝혔으며 이러한 결과들은 각종 박테리아성 질병의 예방 및 치료를 위한 항생제 대체제로서 숙주균 특이 파아지 개발을 위해 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

## 사 사

이 논문은 2012년 군산대학교 수산과학연구소 학술연구비 지원으로 연구되었음

## 참고문헌

Bruynoghe R and Maisin J. 1921. Essais de thérapeutique au moyen du bacteriophage. C R Soc Biol 85, 1120-1121.  
 Chen D Hanna PU, Altmann K, Smith A, Moon P and Hammond LS. 1992. Development of monoclonal antibodies



- that identify *Vibrio* species commonly isolated from infections of humans, fish, and shellfish. *Appl Environ Microbiol* 58, 3694-3700.
- Izumi S and Aranishi F. 2004. Relationship between *gyrA* mutations and quinolone resistance in *Flavobacterium psychrophilum* isolates. *Appl Environ Microbiol* 70, 3968-3972.
- Jayaprakash NS, Pai SS, Philip R and Singh IS. 2006. Isolation of a pathogenic strain of *Vibrio alginolyticus* from necrotic larvae of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *J Fish Dis* 29, 187-191.
- Ju Jw, Rhee GH and Kim I. 1987. Studies on the Phage of *V. parahaemolyticus*. *The J Kor Soc Microbiol* 22, 61-70.
- Hwang KW, Oh BY, Gong YW, Lee JM, Go JM, Kim YH. 2007. Distribution and Antibiotic Resistance of *Vibrio vulnificus* isolated in Incheon coastal area. *J environ Sanit Engineer* 22, 55-63.
- Lafrentz BR, LaPatra, SE, Call DR and Cain KD. 2008. Isolation of rifampicin resistant *Flavobacterium psychrophilum* strains and their potential as live attenuated vaccine candidates. *Vaccine* 26, 5582-5589.
- Lee KK, Liu PC, Huang CY. 2003. *Vibrio parahaemolyticus* infections for both humans and edible mollusk abalone. *Microbes Infect* 5, 481-485.
- Liu PC, Chen YC, Huang CY and Lee KK. 2003. Virulence of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from cultured small abalone, *Haliotis diversicolor supertexta*, with withering syndrome. *Lett Appl Microbiol* 31, 433-437.
- Liu PC, Chen YC and Lee KK. 2001. Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased small abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Microbios* 104, 71-77.
- Oh BY, Kim JH, Gong YW, Jegal S, Kim HY, Lee MY, Hwang KW, Koh YJ, Lee JM, Go JM and Kim YH. 2007. Characteristics of *Vibrio vulnificus* isolated Incheon. *The Kor J Microbiol* 43, 256-263.
- Park, MY, Kim HJ, Choi ST, Oh EG and Chang DS. 2002. Pathogenic Factors of *Vibrio spp.* Isolated from Seawater of Gwangan Beach in Busan. *J Fish Sci*, 5, 178-182.
- Schmidt U, Chmel H and Cobbs C. 1979. *Vibrio alginolyticus* infections in humans. *J Clin Microbiol* 10, 666-668
- Smith S and Krueger AP. 1954. Characteristics of a new *Vibrio* bacteriophage system. *J Gen Physiol* 38, 161-168.
- Spencer R. 1955. A marine bacteriophage. *Nature* 175, 690-691.
- Stenholm AR, Dalsgaard I and Middelboe M 2008. Isolation and characterization of bacteriophage infecting the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Appl Environ Microbiol* 74, 4070-4078.
- Twort FW. 1915. An investigation on the nature of ultra microscopic viruses. *Lancet* 2, 1241-1243.
- Yan Q, Chen Q, Ma S, Zhuang Z and Wang X. 2007. Characteristics of adherence of pathogenic *Vibrio alginolyticus* to the intestinal mucus of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). *Aquaculture* 269, 21-30.