JFMSE, 26(6), pp. 1366~1372, 2014.
수산해양교육연구, 제26권 제6호, 통권72호, 2014.
www.ksfme.or.kr
http://dx.doi.org/10.13000/JFMSE.2014.26.6.1366

Vibrio harveyi 백신의 효능 향상을 위한 배양 배지내 2-2'-dipyridyl 첨가 및 연쇄구균 백신과 혼합 투여의 효과

김명석 · 정승희 · 홍수희†
(국립수산과학원 · †강릉원주대학교)

Effect of 2-2'-dipyridyl in culture media and combined advantage of Streptococcus parauberis *vaccine for preparation of* Vibrio harveyi *vaccine on olive flounder*, Paralichthys olivaceus

Myoung Sug KIM · Sung Hee JUNG · Suhee HONG†
(National Fisheries Research and Development Institute · †Gangneung Wonju National University)

Abstract

This study was conducted to select the media for the formalin killed vaccine (FKC) production of *Vibrio harveyi* and its application for olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. For this, we have investigated the immune effects of *Vibrio harveyi* FKC vaccines grown in 3 different media i.e. Tryptic Soy Broth (TSB), TSB containing 2-2'-dipyridyl (TSB-D), Brain Heart Infusion Broth (BHIB) on the production of agglutinating antibody and protection against *Vibrio harveyi* in olive flounder. Additionally, a dual vaccine was prepared by combining *Streptococcus parauberis* vaccine to *V. harveyi* vaccine and its efficacy was also analyzed with the determination of optimal administration dosage. Consequently, olive flounder immunized with FKC grown in TSB-D showed the same protection with the vaccine grown in BHIB and the optimal dose of the vaccine was 10mg/kg of body weight. Indeed the dual vaccine showed higher agglutination titer and protection than control fish. The optimal dose for dual vaccine was 10mg/kg body weight for each of two vaccines.

Key words : *Vibrio harveyi*, vaccine, *Streptococcus parauberis*, *Paralichthys olivaceus*

Ⅰ. 서 론

우리나라의 어류양식 생산량은 2010년도 80,075톤이었으나 2012년도에 76,308톤, 2013년도에는 73,108톤으로 점차적으로 감소하고 있다. 양식어류 중 넙치류는 2013년도에 36,944톤이 생산되어 전체 양식어류 생산량의 약 50%를 차지하므로 국내에서 가장 주요한 양식어종이라 할 수 있다 (통계청, www.kosis.kr). 그러나 넙치류의 생산량도 2009년의 54,675톤과 비교하면 현재 그 생산량이 매우 감소되어 있는 실정이다.

넙치를 포함한 국내 어류 양식생산량의 감소는 여러 가지 요인이 있으나 그중 질병에 기인한 폐사가 주요한 원인이 될 수 있으며 양식 넙치에서 분리되는 주요 병원체로는 *Tricodina* sp., viral nervous necrosis virus, *Scutica* sp., *Vibrio* spp. 등

† Corresponding author : 033-640-2852, s.hong@gwnu.ac.kr
※ 이 논문은 국립수산과학원 연구비 (RP2014-AQ-117)에 의해 연구되었음.

이 있다 (Cho et al, 2008).

*Vibrio spp.*는 넙치와 주요 해산어종 및 갑각류에서 비브리오증을 일으키는데 *Vibrio harveyi, V. ichthyoenteri, Photobacterium damselae, Listonella anguillarum* 등이 비브리오증을 일으킨 해산어류에서 분리되고 있으며 *V. harveyi*가 대표적 비브리오속 어병세균으로 알려져 있다 (Kim et al., 2004; Won et al., 2006; Sunaryanto et al., 1986).

*V. harveyi*는 그람음성의 운동성 세균으로서 많은 해산어류에서 질병을 일으키는 것으로 알려져 있으며 *V. harveyi* 감염에 의한 주요 증상으로는 피부궤양과 안구병변이며 이로 인하여 어류와 갑각류에서 급성 폐사를 일으키기도 한다 (Austin and Zhang, 2006). 특히 넙치와 새우에서 *V. harveyi*에 의한 폐사가 많이 보고 되었다 (Lavilla-pitogo et al., 1990; Muroga et al., 1990).

비브리오증과 같은 세균성 질병의 치료를 위한 보편적인 치료법은 항균제를 사용하는 것이지만 우리나라 양식 넙치에서 분리된 비브리오속 세균은 tetracycline에 43%, oxolinic acid에 37%의 내성을 나타내어 (Kim et al., 2010) 항균제의 사용에 의한 세균성 질병의 치료가 점점 어려워지고 있다.

특히 *V. harveyi* 감염증은 여름철 양식 넙치에서 흔히 발병하는 질병으로 예방이 매우 중요하지만, 사육환경 및 사육관리의 개선만으로는 질병 발생을 억제하는데 한계가 있다. 따라서 보다 근본적인 예방 대책으로서 백신의 개발이 시급한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 경제적이고 효과적인 *V. harveyi* 백신을 개발하기 위하여 *V. harveyi*의 배양용 배지로서 비교적 저렴한 TSB (Tryptic Soy Broth)배지에 철분 제한 조건을 제공하여 항원성을 증진할 수 있도록 2,2'-dipyridyl를 첨가하여 배양하여 백신 제작 후 그 면역학적 효능을 조사하였고, 적절한 백신 접종량을 확인하였다. 또한 *V. harveyi* 백신과 *Streptococcus parauberis* 백신의 혼합백신의 접종으로 *V. harveyi* 감염에 대한 면역효과를 비교하고자 하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 균의 배양

1%의 NaCl이 첨가된 TSA (Tryptic Soy Agar; BD, USA; sTSA)에 배양된 *V. harveyi*와 *S. parauberis* 단일집락을 각각 1%의 NaCl이 첨가된 TSB (Tryptic Soy Broth; BD, USA; sTSB), 1%(v/v) NaCl이 첨가된 BHIB (Brain Heart Infusion Broth; sBHIB), 2,2'-dipyridyl (Sigma, USA)을 50 μ㏖의 농도로 첨가한 sTSB (sTSB-D)에 접종하여 진탕배양기에서 150 rpm, 25℃로 배양하였다.

2. Formalin Killed Cell의 제작

포르말린 사균화 항원 (Formalin killed cell, FKC) 백신을 제작하기 위하여 위의 방법에 따라 세 종류의 배지 (sTSB, sTSB-D, sBHIB)에 각각 배양된 균액에 37% 포름알데히드 (포르말린, Merck, Germany)를 최종농도가 0.3%가 되도록 첨가하고 25℃에서 1시간 또는 4℃에서 24 시간 동안 반응시켰다.

포르말린을 제거하기 위하여 사균화된 균액을 12,000 g로 원심분리 후 상등액을 제거하고 멸균된 0.01M Phosphate Buffered Saline (PBS, pH 7.4)에 균을 현탁하는 세척과정을 3회 실시하였다. 마지막 원심분리 후 상등액을 제거한 후 균체를 수거하고 최종적으로 습균체 무게를 측정하여 100mg/ml이 되도록 멸균 PBS에 현탁한 후 멸균된 유리병에 분주하여 4℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

배양균의 사균화 여부는 포르말린 처리 후 균액을 sTSA에 접종하여 25℃의 배양기에서 배양한 후 균집락이 생기지 않는 것으로서 최종 확인하였다.

3. 어류

체중 100g 내외의 넙치를 국립수산과학원 주변 양식장으로 부터 구입하여 2주간 순치 후 실험에 사용하였다. 실험기간동안 어류는 수온 25℃인 유수식 수조에서 사육하였으며 하루 두 번 사료를 만복으로 투여하였다. 각 실험구는 35마리의 어류를 사용하였으며 백신투여 3주후에 10마리로부터 혈액을 채취하였으며 나머지 25마리를 공격실험에 이용하였다.

4. 백신투여

가. 배양배지에 따른 백신의 효능조사

배양배지에 따른 백신효능을 조사하기 위하여 각기 다른 배지 (sTSB, sTSB-D, sBHIB)에 배양하여 제작된 FKC 백신을 FIA (Freund's incomplete adjuvant)와 1:1의 비율 혼합하고 어체중 1kg 당 FKC양이 20mg이 되도록 넙치에 복강 주사하였다. 대조구는 멸균 PBS와 FIA를 1:1로 혼합하고 동량씩 복강 주사하였다. 복강에 주사된 총 투여량은 200㎕가 되도록 조정하였다.

나. 투여 농도에 따른 백신 효능조사

sTSB-D에서 배양된 *V. harveyi* FKC 백신을 넙치에 어체중 1kg당 10mg 또는 20mg을 복강주사하고 접종 후 3주째에 항체가 측정과 *V. harveyi*에 대한 상대생존율을 계산하였다. 대조구는 멸균 PBS만을 100㎕ 씩 복강주사하였다. 순수한 농도차에 의한 백신효과를 보기 위하여 FIA 또는 *S. parauberis*를 혼합하지 않은 *V. harveyi* FKC만을 사용하였다.

다. 혼합백신의 투여

sTSB-D에서 배양하여 제작된 *V. harveyi* FKC 백신을 *S. parauberis* FKC와 1:1로 혼합하고 어체중 1kg당 투여량을 각 FKC 10mg 또는 20mg이 되도록 넙치에 복강주사하였다. 즉, 한 실험구에는 *V. harveyi* FKC 백신 10mg과 *S. parauberis* FKC 10mg을 혼합하여 투여하였고 또 다른 실험구에는 *V. harveyi* FKC 백신 20mg과 *S. parauberis* FKC 20mg과 혼합하여 투여하였으며 대조구는 *S. parauberis* FKC 만을 어체중 1kg당 20mg을 투여하였다. *S. parauberis* 백신과의 혼합사용 효능을 알기 위하여 FIA를 사용하지 않았다.

5. 응집항체가분석

각 백신 접종 3주후에 각 실험구당 10마리의 넙치를 채집하였으며 미부정맥으로부터 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후 항체가를 분석하였다. 항혈청을 분리하기 위하여 혈액을 3000 g에서 15분간 원심분리한 후 상등액을 취한 후 사용 전까지 -20℃에서 보관하였다.

응집항체가를 측정하기 위하여 분리된 항혈청을 PBS에 두 배씩 단계희석한 후 V bottomed 96 well plate (SPL)에 50㎕ 씩 첨가 후 0.1mg/ml의 FKC 항원을 50㎕ 씩 투입하여 실온에서 6시간 반응하였다. 음성대조구에는 혈청희석액을 넣지 않고 PBS와 항원만 투입하였다.

응집항체가는 well의 바닥에 응집반응에 의한 button이 생기지 않은 최대희석배수로서 결정하였다.

6. 공격실험

*V. harveyi*를 복강주사법으로 인위감염시켜 누적폐사를 기록 후 상대생존율을 계산하였다. 이를 위하여 *V. harveyi* 단일집락을 sTSB에 접종하여 진탕배양기에서 150 rpm, 25℃로 배양하였다. 균의 농도를 $1x10^9$ Colony Forming Units (CFU)/ml로 조정한 후 어체당 100㎕씩 복강주사하였고 수온 25℃인 유수식 수조에서 28일 동안 폐사를 관찰하여 누적폐사율을 기록하였다. 상대생존율은 아래와 같이 계산하였다.

상대생존율(Relative Survival Rate; RPS)
= (1-실험구 누적폐사율/대조구 누적폐사율) X 100

공격실험에서 발생된 배출수는 차아염소산나트륨($Ca(OCl)_2$)를 1mg/ml이상의 농도로 처리하여 소독 후 방출하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 백신 제작시 사용된 배양 배지에 따른 효능 조사

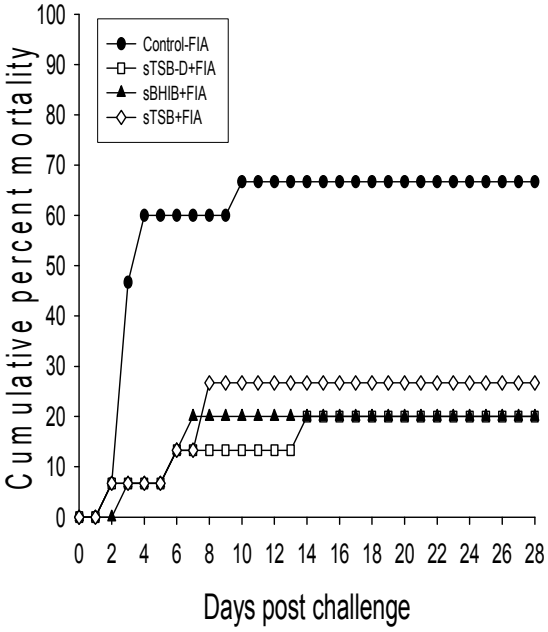
FKC 제작시 사용된 배양 배지 종류에 따른 백신의 효과를 알기 위하여 세 종류의 백신으로 면역된 넙치의 항혈청의 응집항체가 및 공격실험을 실시한 결과, 넙치로부터 분리된 항혈청의 *V. harveyi* FKC 항원에 대한 3주째의 응집항체가는, sBHIB에서 배양된 항원의 투여구에서 $2^{8.7}$, sTSB-D에서 배양된 항원의 투여구에서 $2^{7.1}$, sTSB 에서 배양된 항원의 투여구에서 $2^{7.1}$를 나타내어 3주 만에 높은 수준의 응집항체가 생성됨을 보여주었다 <Table 1>.

한편, 살아있는 *V. harveyi* 를 복강 투여한 공격실험에서 상대생존율이 sTSB 실험구가 60%인 반면에 sBHIB 실험구와 sTSB-D실험구에서는 70%로 나타나 *V. harveyi* 감염에 대한 방어력이 sBHIB 실험구와 sTSB-D 실험구에서 sTSB 실험구 보다 높은 것으로 나타났다(<Table 1>, [Fig. 1]).

2. 백신 투여량에 따른 면역 효능 조사

백신투여량에 따른 백신효능을 조사하기 위하여 실시한 실험에서 *V. harveyi* FKC 백신을 어체중 kg 당 20mg을 투여한 실험구의 항혈청이 $2^{4.0}$의 응집항체가를 가졌으며 어체중 kg 당 10mg을 투여한 실험구의 항혈청은 $2^{3.8}$의 항체가를 나타내어 백신 투여량에 따른 응집항체 형성에는 큰 차이가 없는 것으로 보인다(<Table 1>).

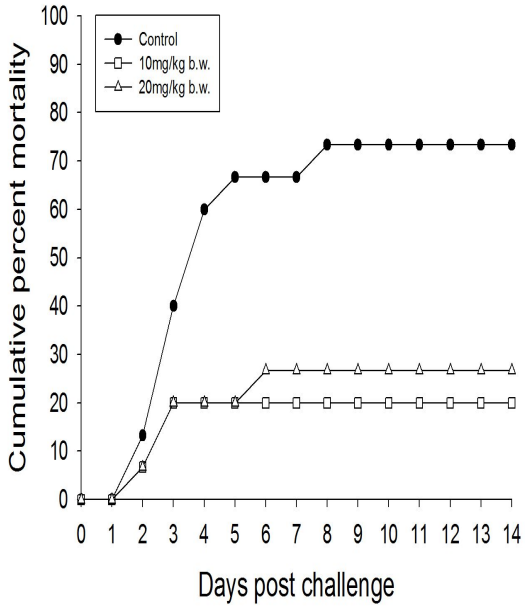
그러나 공격실험에 의한 방어력 조사 결과, 어체중 kg 당 20mg을 투여한 실험구의 상대생존율이 63.6% 이었으며, 어체중 kg 당 10mg을 투여한 실험구의 상대생존율은 그 보다 조금 높은 70%로 나타나 10mg 농도의 백신 접종량으로 백신 투여시 면역효능이 조금 더 우수한 것으로 판단되었다(<Table 1>, [Fig. 2]).



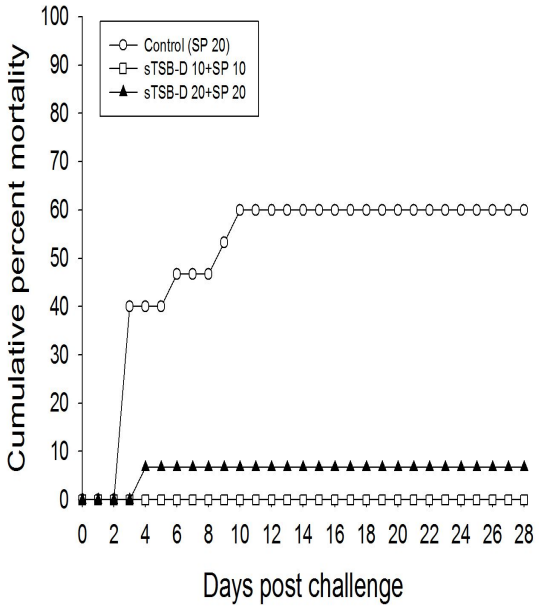
[Fig. 1] Compariosn of cumulative mortality in flounder vaccinated for 3 weeks with formalin killed *V. harveyi* (10mg/kg fish body weight) cultured in TSB with or without supplementation of 2-2'-dipyridyl, or BHIB. Challenge was performed by intraperitoneal injection with 0.1 ml of *V. harveyi* (1x109 CFU/ml)

3. 혼합 백신 효능 조사

S. parauberis 백신을 혼합한 *V. harveyi* 백신 투여실험에서 *V. harveyi* 항원에 대한 3주째의 응집항체가는 각 백신을 20mg+20mg 투여한 실험구에서 $2^{5.7}$, 10mg+10mg 투여한 실험구에서 $2^{5.7}$를 나타내었다. *V. harveyi* 균주에 대한 상대생존율은 20mg+20mg 투여한 실험구가 88.8%와 10mg+10mg 투여한 실험구는 100%를 나타내었다 (<Table 1>, [Fig. 2]).



[Fig. 2] Comparison of cumulative mortality of flounder vaccinated for 3 weeks with formalin killed *V. harveyi* at the administration doses were 10 or 20mg/kg of body weight. *V. harveyi* was cultured in TSB with 2-2'-dipyridyl. Cahllenge was performed by intraperitoneal injection with 0.1 ml of *V. harveyi* (1x109 CFU/ml)



[Fig. 3] Comparison of cumulative mortality of flounder vaccinated for 3 weeks with formalin killed *V. harveyi* cultured in TSB supplemented with 2-2'-dipyridyl under advantage of combination of with *S. parauberis* FKC vaccine. The administration doses were 10 or 20mg/kg of body weight for each vaccine

Ⅳ. 고 찰

본 연구에서는 넙치에서 *V. harveyi* 감염으로 인한 질병을 예방하기 위한 *V. harveyi* FKC 백신 생산에 있어 경제적이면서 효과적인 배양배지를 사용하기 위하여 sTSB, sTSB-D, sBHIB 배지에서 배양된 균으로 FKC 백신을 제작하였으며 이들 백신을 투여 후 응집항체가와 공격실험테스트를 실시한 결과, 응집항체가는 sBHIB에서 키운 균 백신으로 면역시 가장 높게 나타났으나 *V. harveyi* 균에 대한 공격실험에서 방어력이 sBHIB 실험구와 sTSB-D실험구가 같았다.

2,2'-dipyridyl를 첨가한 배지에서 자란 균을 이용하여 제작한 백신의 효능이 첨가하지 않은 배지에서 자란 균으로 제작된 백신보다 면역효능이 높게 나타나는 것은 아마도 배양액에 첨가된 2,2'-dipyridyl이 배양액의 철분 chelator로서 세균 배양시 철분을 제한하기 때문일 것으로 생각된다 (Boss et al., 2002). 이러한 세균 배양시 철분의 제한은 일부 세균의 병원성을 증가시키는 것으로 알려져 있다 (Ratledge & Dover, 2000). *V. harveyi* 의 경우도 siderophore에 의한 철분결합력이 병원성에 영향을 미치는 것으로 보고된 바 있다 (Owens et al., 1996).

경제적인 면에서 보면 세균항원 백신 제작시 사용되는 배지 중 TSB는 그 가격이 BHIB의 40% 수준이며 50 μmol이라는 매우 미량의 2,2'-dipyridyl

첨가에 의해 값비싼 BHIB에서 생산된 백신과 같은 효능을 가지는 백신을 생산할 수 있다면 저렴한 *V. harveyi* 백신의 현장 공급이 가능해질 것이다. 따라서 백신의 효과와 경제성을 고려할 때 sTSB-D 배지를 사용하여 *V. harveyi* 백신을 생산하여 산업화하는 것이 적절할 것으로 판단된다.

본 연구에서는 또한 우리나라의 주요 해산어류에서 빈번하게 발생하는 세균성 질병의 원인체인 *V. harveyi* 백신과 *S. parauberis* 백신을 혼합 투여하였을 때 *V. harveyi* 백신을 단독으로 투여하였을 때 보다 응집항체가와 공격실험에서의 생존율이 모두 상승되었다. 따라서 *V. harveyi* 백신의 효능을 증진시키기 위하여 *S. parauberis* 백신을 혼합하여 dual 백신으로 투여하였을 때 혼합백신 투여시 백신의 효능을 더욱 높일 수 있을 것으로 사료된다.

어병예방을 위한 혼합백신의 효과는 Han et al. (2009)에 의해 보고된 바 있는데 넙치에 *Edwardsiella tarda*와 *S. iniae, S. parauberis*균을 FKC로 제작한 후 혼합투여시 응집항체가의 증가와 공격실험에서 상대생존율의 증가를 보고하였다.

결론적으로 넙치를 위한 *V. harveyi* 백신을 개발할 때 2-2'-dipyridyl 이 첨가된 TSB에 균을 배양하는 것이 백신효능과 경제적인 면을 고려할 때 우수하였다. 또한 적정 백신 투여량은 10mg/kg b.w.이었으며 *S. parauberis* 백신과 혼합투여시 그 효능은 더욱 높아졌다.

Ⅴ. 요 약

본 연구의 목적은 해산어류와 갑각류에 심각한 위해를 끼치고 있는 *V. harveyi*에 대한 백신개발을 위하여 *V. harveyi* 백신생산에 적합한 배양배지를 탐색하고 적정 투여량을 조사하며 또한 *S. parauberis* 백신과 혼합백신의 형태로 투여시 백신효능에 대해 조사하는 것이다. 이를 위하여 2-2'-dipyridyl이 첨가되거나 첨가되지 않은 TSB와 BHIB에 배양 후 FKC 백신을 제작한 후 넙치에 투여하여 응집항체가의 생산변화와 공격실험에서의 상대생존율을 비교분석하였다.

또한 *V. harveyi* 백신의 적정 투여량을 정하기 위하여 어체중 kg 당 10mg 또는 20mg을 투여하여 면역반응을 비교하였으며 *S. parauberis* 백신을 혼합한 백신을 투여한 후 면역반응을 비교하였다. 그 결과 2-2'-dipyridyl이 들어간 TSB와 BHIB에 배양된 *V. harveyi* 백신은 응집항체형성과 방어력에서 차이를 보이지 않았다. 또한 백신 투여량에 따른 응집항체가에 있어서 큰 차이는 없었으나 어체중 kg 당 10mg을 투여한 실험구가 조금 높은 방어력을 나타내었다.

S. parauberis 백신과 혼합한 dual 백신을 투여시 *V. harveyi* 백신만을 단독으로 투여했을 때와 비교해 방어력이 현저히 증가하였으며 특히 어체중 kg당 두가지 백신을 각각 10mg씩 혼합하여 투여한 실험구에서는 28일동안 폐사가 전혀 일어나지 않아 백신효능이 매우 뛰어난 것으로 나타났다.

결론적으로 넙치를 위한 *V. harveyi* 백신을 개발할 때는 2-2'-dipyridyl가 첨가된 TSB에 배양 후 제작된 *V. harveyi* 백신을 어체중 kg당 10mg의 투여량으로서 *S. parauberis* 백신과 혼합투여하는 것이 효능과 경제적인 면에서 바람직하다고 생각된다.

References

Austin, B & Zhang, X(2006) *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates, *Letters in Applied Microbiology* 43, 119~124.

Boss, J. T.・Janson, H.・Sheehan, B. J.・Beddek, A. J.・Rycroft, A. N.・Simon, K & Langford, PR (2002) *Actinobacillus pleuropneumoniae:* pathobiology and pathogenesis of infection, Microbes Infect 4, 225~235.

Cho, M. Y.・Kim, M. S.・Choi, H. S.・Park, G. H.

· Kim, J. W. · Park, M. S. & Park, M. A.(2008) A statistical study on infectious diseases of cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus* in Korea, *J. Fish Pathol.* 21(3), 271~278.

Han, S. · Kang, B. · Lee, C. · Song, D. · Yeom, M. & Kim, J.(2009). Efficacy of *Edwardsiella tarda, Streptococcus iniae and Streptococcus parauberis* Combined Vaccine for Olive flounder (*Paralichthys olivaceus*), Korean, *J. Vet. Res*. 49 (1), 126~127.

Kim, M. S. · Seo, J. S. · Park, M. A. · Cho, J. Y. · Hwang, J. Y. · Kwon, M. G. & Jung, S. H.(2010). Antimicrobial resistance of *Edwardsiella tarda, Vibrio* spp., and *Streptococcus* spp. isolated from olive flounder Paralichthys olivaceus, *J. Fish Pathol.* 23(1), 37~45.

Kim, S. M. · Won, K. M. · Woo, S. H. · Li, H. · Kim, E. J. · Choi, K. J · Cho, M. Y · Kim, M. S. & Park, S. I.(2005) Vibrio isolated from diseased marine culturing fishes in Korea, *J. Fish Pathol*. 18, 133~145.

Lavilla-Pitogo, C. R. · Baticados, MCL · Cruz-Lacierda, E. R. & Pena, L. D.(1990) Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines, *Aquaculture* 91, 1~13.

Muroga, K. · Yasunobu, H. · Okada, N. & Masumura, K.(1990) Bacterial enteritis of cultured flounder *Paralichthys olivaceus* larvae, Dis. Aquat. Org. 9, 121~125.

Owens, L. · Austin, D. A. & Austin, B.(1996) Effect of siderophore production in *Vibrio harveyi* isolates, Dis. Aquat. Org. 27, 157~160.

Ratledge C1. & Dover L. G.(2000) Iron metabolism in pathogenic bacteria, *Annu. Rev. Microbiol*. 54, 881~941.

Sunaryanto, A. & Mariam, A.(1986) Occurrence of pathogenic bacteria causing luminosense in penaeid larvae in Indonesian hatcheries, *Bull Brackishwater Aquaculture* 8, 105~112.

Won, K. M. · Choi, J. H. & Park, S. I.(2006) Characteristics of the extracellular products (ECPs) of Vibrio harveyi grown under various conditions, *J. Kor. Fish Pathol.* 19, 119~126.

● 논문접수일 : 2014년 10월 15일
● 심사완료일 : 1차 - 2014년 10월 20일
2차 - 2014년 10월 27일
● 게재확정일 : 2014년 10월 27일