

양식넙치와 뱀장어에서 분리된 *Edwardsiella tarda*의 특성 비교

김 은 희[†]

전남대학교 수산생명의학과

Characteristics Comparisons of *Edwardsiella tarda* Isolated from Cultured Olive Flounder and Eel

Eunheui Kim[†]

Department of Aqualife Medicine, Chonnam National University, Yeosu 59626, Korea

The objective of this study was to determine comparative biochemical characteristics and RAPD (random amplified polymorphic DNA) profiles of 18 strains of *Edwardsiella tarda* isolated from cultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) and eel (*Anguilla* spp) that showed diseases between 1996 and 2010 in Korea. In terms of biochemical properties, they showed four patterns with differences in citrate degradation and production of H₂S and indole. All strains were identified as *E. tarda*. Characteristics of isolates were not classified according to their host. As a result of PCR with *E. tarda*-specific primer, EDfT, the same band of about 270 bp was detected in all 18 isolates. However, no specific band was detected in type strains of *E. tarda* or *Edwardsiella ictaluri*. As a result of RAPD PCR performed with primer No. 5 and No. 6 of a Ready-To-Go-RAPD kit, the band profile showed clear differences among isolates of olive flounder, isolates of eel, and *E. tarda* and *E. ictaluri* type strains. It was possible to organize their characteristics according to the origin of host with possibility to develop tools for pathogen monitoring.

Key words: RAPD analysis, *Edwardsiella tarda*, Biochemical Characteristics, 1996~2010

*Edwardsiella tarda*는 어류 뿐 아니라 물을 매개로 함께 하는 다양한 생물들의 질병에도 관여하고 있으며 생태계 내에서 공통 감염성 병원체로 인식되고 있다(Davies *et al.*, 2018). *Edwardsiella* 속 세균은 1980년대까지 *E. tarda* 단일 종이였으나, 그 후 다양한 생물종으로부터 유사한 균들이 분리되면서 동일 속에 속하는 새로운 종으로 *Edwardsiella hoshinae*, *Edwardsiella ictaluri*, *Edwardsiella piscicida* 그리고 *Edwardsiella anguillarum*이 보고되었다

(Mohanty and Sahoo, 2007; Abayneh *et al.*, 2013; Shao *et al.*, 2015; Buján *et al.*, 2018). 특히 Abayneh *et al.* (2013)과 Shao *et al.* (2015)은 터보이나 유럽산 뱀장어에서 분리되어 *E. tarda*로 보고되었던 많은 균주들을 분자생물학적 기법으로 재분류하여 *E. piscicida*와 *E. anguillarum*의 새로운 종으로 명명하였다. 이후, *E. tarda*로 명명되었던 많은 균들이 *E. piscicida*에 속한다는 보고가 이어져, 대부분의 어류 에드워드증은 *E. tarda* 보다 *E. piscicida*에 의하여 발생함을 시사하였다(Reichley *et al.*, 2017). 우리나라의 메기에서 분리되어 *E. tarda*로 보고되었던 3 균주도 이들에 의해 *E. piscicida*로 재분류되

[†]Corresponding author: Eunheui Kim
Tel: +82-62-659-7171, Fax: +82-62-659-7179
E-mail: ehkim@jnu.ac.kr

었다(Yu *et al.*, 2009; Abayneh *et al.*, 2012, 2013; Shao *et al.*, 2015; Buján *et al.*, 2018). 최근 Jang *et al.* (2020)은 우리나라 내수면 양식 어류로부터 *Edwardsiella*속 세균 7 균주를 분리하여 *E. ictaluri*를 포함하여 극동산 뱀장어에서(*Anguilla japonica*)에서 *E. piscicida*와 *E. anguillarum*을, 동남아산 뱀장어(*Anguilla bicolor*)에서 *E. tarda*를 보고하였다. 이는 우리 나라에도 다양한 *Edwardsiella*속 세균들이 양식 생물의 질병에 관여하고 있음을 시사한다.

이와 같이 병원성 세균을 정확히 동정하고 그 다양성을 아는 것은 학문적 발전에 더하여, 지구 환경의 급속한 변화로 질병의 발생과 병원체의 지역 간 이동이 급격히 빨라지고 있는 요즘, 병원체의 이동을 모니터링 하는데 매우 중요하다(Farzadnia and Naemipour, 2020). 그러나 세균 동정을 위한 분자생물학적 방법들은 많은 비용과 시간 그리고 노력이 드는 과정이므로 다량의 표본을 대상으로 병원체의 이동을 모니터링 하는 것과 같은 역학적 연구를 위해서는 보다 신속하고 간단한 방법이 요구된다. 세균의 종 간 또는 종 내의 유전적 다양성을 알아보기 위하여 사용되는 random amplified polymorphic DNA (RAPD) 분석은 소량의 genomic DNA로 다양한 유전자 부위의 polymorphism을 짧은 시간에 알아볼 수 있다는 장점이 있다(Williams *et al.*, 1990). 이는 병원체 분석에 사용되는 표현형 및 유전적 특성 분석의 단점을 보완할 수 있는 효과적인 역학 연구 tool로 여겨졌다(Nucci *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2017).

본 연구는 2010년 이전에 우리나라 양식넙치와

뱀장어의 병어에서 분리하여 *E. tarda*로 동정하였던 18 균주의 생화학적 특성과 RAPD profile을 비교해봄으로서 이들의 생물학적 다양성을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

실험균주

본 연구에 사용된 *Edwardsiella* 속 세균은 양식 넙치 유래 12주, 뱀장어 유래 6주 그리고 생물자원 센터(Korean Collection for Type Cultures, KCTC)로부터 분양 받은 *E. tarda*와 *E. ictaluri* 각 1균주이다 (Table 1). 분리 주는 1996년부터 2010년 사이에 분리하여 -70°C의 냉동고에 보관하였던 것을 소생시킨 것이며, E09-2(충북)를 제외한 나머지는 모두 전라도에 위치한 양식장에서 채집한 병어로부터 분리하였다.

생화학적 특성 분석

Edwardsiella spp.의 생화학적 특성을 알아보기 위해 3% KOH 용액으로 그람 염색성을 간접 확인하였고, Salmonella-Shigella (SS) agar와 MacConkey agar (BD, Becton, Dickinson and Company, USA) 배지, 그리고 5% sheep blood가 포함된 ready-made BAP agar (BANDIO, Korea) 배지에 균을 접종하여 30°C에서 24시간 배양한 후에 집락의 특성을 관찰하였다. Oxidation/fermentation test는 OF medium base (BD, USA)에 glucose가 1% 함유되도록 제작한 반 유동 배지로 실시하였다. Oxidase와 catalase

Table 1. Origins of 18 isolates formerly classified as *Edwardsiella tarda* and their strain names in this study

Strain Name	Origin	
	Year	Host
F96-1, F96-2	1996	Olive flounder
F97-1, F97-2, F97-3	1997	"
F98-1, F98-2	1998	"
F00-1	2000	"
F02-1, F02-2, F02-3, F02-4	2002	"
E97-1, E97-2, E97-3	1997	Eel
E09-1, E09-2, E09-3	2009	"
Type-ET (<i>E. tarda</i>)	KCTC 12267	Human
Type-EI (<i>E. ictaluri</i>)	KCTC 12264	Cat fish

생산 확인은 일반적인 세균학 실험법에 따랐으며, H₂S와 indole 생산 그리고 세균의 운동성은 SIM 배지(BD, USA)에 균을 배양하여 확인하였다. 그의 특성들은 API 20E (BIOMÉRIEUX, France) test를 제조사의 protocol에 따라 실시한 후, website (<https://apiweb.biomerieux.com>)에서 결과를 확인하였다.

Template DNA 준비

PCR에 사용될 DNA는 편리성을 위해 boiling 방법으로 준비하였다. 1% NaCl이 첨가된 tryptic soy broth (BD, USA)에 균을 접종하여 30°C에서 24시간 배양한 균액 5 ml를 8000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 침전물을 얻었고 이 침전물은 재부유 방식으로 멸균증류수로 2회 세척하였다. 최종적으로 균액을 McFarland No.5 (1.5×10⁹ CFU/ml)의 농도로 조정 후, 부유액 1 ml를 취하여 12000 rpm에서 5분간 원심 분리하였다. 상층액을 제거하고 침전물에 증류수 50 ul를 넣어 재부유한 후 100°C에서 5분간 boiling 하였으며, 동일 조건으로 다시 원심 분리하여 상층액만 취하여 PCR의 template DNA로 사용하였다.

E. tarda 특이 primer를 이용하여 PCR 밴드 검출

*E. tarda*의 template DNA 1 µl, Sakai *et al.* (2009)이 보고한 *E. tarda* 특이 primer (EDtT-F, TTCCGCA ACCATGATCAAAG; EDtT-R, AGGGCATATATC CACTCACTG) 각 1 µl를 PCR premix (Bioneer, Korea)와 반응시켜 thermal cycler (MyGenie96, Bioneer, Korea)로 PCR을 수행하였다. 95°C에서 5분 pre-denature한 후, denature (95°C, 30 sec), annealing (55°C, 30 sec), extension (72°C, 30 sec)을 30 cycle 수행한 후 72°C에서 5분 final extension하였다. 생성된 products는 RedSafe (iNtRon, Korea) 0.5 ppm을 포함하는 2% agarose gel (Bio-Rad, USA)에서 전기 영동하여 UV transilluminator (WUV-L20, DaiHan, Korea) 상에서 약 270 bp 위치의 band로 확인하였다.

RAPD analysis

RAPD는 Ready-To-Go-RAPD kit (Cytiva, USA)로 실시하였다. 제조사의 protocol에 따라 template

DNA 3 ul (5-50 ng), primer 5번 또는 6번을 5 ul (25 pmol), 증류수 17 ul를 kit와 혼합한 후 PCR을 실시하였다(Pre-denature, 95°C-5 min; denature 95°C -1 min, annealing 36°C-1 min, extension 72°C-2 min을 45 cycle). PCR 산물은 RedSafe 0.5 ppm을 포함하는 2% agarose gel로 전기 영동하여 UV transilluminator 상에 나타나는 DNA band pattern으로 비교하였다. DNA size marker는 100 bp ladder (Bioneer, Korea)를 사용하였으며, 균주별 RAPD profile의 유사도는 밴드 유무를 코딩하여 SPSS (Sigma, USA)에서 Euclidian 거리에 근거하여 dendrogram으로 도식화하였다.

결과 및 고찰

*E. tarda*의 생화학적 특성

실험에 사용된 *Edwardsiella spp.*는 모두 그람 음성균으로 oxidase 음성과 catalase 양성이었다. 용혈 반응은 초기에 모두 비용혈성이었으나 배양 시간이 경과하면서 α용혈 특성을 보였다. MacConkey agar 배지와 SS배지에서 모두 집락을 형성하였으나, SS 배지에서는 넙치에서 분리한 균과 *E. tarda* KCTC 12267 만 검은색 집락으로 나타났(data not shown). 분리균의 API test 결과는 4가지 type으로 구분되었으나(Table 2), citrate 분해(CIT), H₂S 그리고 indole 생산 결과에 차이를 보였고 다른 특성들은 동일하였다. 넙치 유래균은 12균주 중 10균주 (약 91%)가 ID code 4544000으로 우점적이었고, 두 균주는 4744000의 code를 보였는데 이는 사람에서 유래된 *E. tarda* KCTC 12267 균주와 일치하였다 (Tables 2 and 3). 뱀장어 유래 균에서는 6균주 중 5균주가 ID number 4144000으로 우점적이었다. Park *et al.* (2017)은 연구에 사용한 넙치 분리균들은 모두 균일한 특성을 보였으며 citrate 분해 특성의 차이를 제외하면 일본에서 보고된 *E. tarda*와 동일하다고 보고하였다. 그러나 본 연구에서는 10균주 중 2개의 균주가 API test에서 CIT 양성으로 나타나 Part *et al.* (2017)과는 다른 결과를 보였다. 이들은 또한 생화학적 특성의 차이에 근거하여 *E. tarda*를 2 group으로 나누는 것을 제안하였던 Joh *et al.* (2011)과 같이 인돌과 H₂S를 생산하는 넙치

Table 2. Biochemical characteristics of isolates formerly identified as *Edwardsiella tarda* showing four patterns in API 20E tests

Characteristic	Olive flounder		Eel	
	10 isolate	F97-2 and F00-1	E97-1	5 isolate
ONPG	-	-	-	-
ADH	-	-	-	-
LDC	+	+	+	+
ODC	+	+	+	+
CIT	-	+	-	-
H ₂ S	+	+	-	-
URE	-	-	-	-
TDA	-	-	-	-
IND	+	+	-	+
VP	-	-	-	-
GEL	-	-	-	-
GLU	+	+	+	+
MAN	-	-	-	-
INO	-	-	-	-
SOR	-	-	-	-
RHA	-	-	-	-
SAC	-	-	-	-
MEL	-	-	-	-
AMY	-	-	-	-
ARA	-	-	-	-
OX	-	-	-	-
ID code	4544000	4744000	4104000	4144000
Identification	<i>E. tarda</i>	<i>E. tarda</i>	<i>E. tarda</i>	<i>E. tarda</i>
% ID	99.9	99.4	99.2	99.9

ONPG, β -galactosidase; ADH, arginin dihydrolase; LDC, lysine decarboxylase; ODC, ornithine decarboxylase; CIT, citrate utilization; H₂S, H₂S production; URE, urease; TDA, tryptophane deaminase; IND, indole production; VP, acetoin production; GEL, gelatinase; GLU, glucose; MAN, mannitol; INO, inositol; SOR, sorbitol; RHA, rhamnose; SAC, saccharose; MEL, melibiose; AMY, amygdalin; ARA, arabinose; OX, cytochrome oxidase. +, positive reaction; -, negative reaction.

분리균을 wild type으로, H₂S를 생산하지 않는 밴장어 분리균을 biogroup 1으로 구분하였다. 그러나 분리균의 생화학적 특성 차이로 host origin을 특정 지을 수는 없다는 결론은 본 연구와 일치하였다. 한편 type strain인 *E. ictaluri* KCTC 12264 균주는 본 실험의 API 20E test에서 4004000의 code로 나타나 동정이 되지 않았으며, 추가 실험에 따른 9자리 코드 4004000(57)를 사용하였을 때도 *E. tarda* (53%)로 검색되어 정확한 동정이 이루어지지 않았다(Table 3). *E. ictaluri* KCTC 12264는 lysine decarboxylase, ornithine decarboxylase, acetoin production (VP) 및 mannitol 분해 특성 등에서 *E. icta-*

*luri*를 동정한 다른 연구 결과(Buján *et al.*, 2018; Jang *et al.*, 2020)와 차이를 보였다. Shao *et al.* (2015)은 새롭게 명명된 *E. anguillarum* sp. nov.의 특성을 그람음성간균, 주모성 편모에 의한 운동, catalase, indole, H₂S 생산 양성, oxidase, β -galactosidase, arginine dihydrolase, tryptophan deaminase (TDA), gelatinase, urease 음성의 특성으로 규정하였는데, 본 연구에서는 이와 일치하는 균주가 없었다.

E. tarda 특이 primer를 이용한 PCR 결과

Sakai *et al.* (2009)은 fimbrial gene cluster의 upstream sequence를 기본으로 하는 3 세트의 PCR

Table 3. Comparison of biochemical characteristics between type strains of *Edwardsiella tarda* and *E. ictaluri*, and three isolates with different RAPD profiles

Characteristic	<i>E. tarda</i> KCTC 12267	<i>E. ictaluri</i> KCTC 12264	Isolate		
			F02-1	E97-1	E09-1
ODC	+	-	+	+	
CIT	+	-	-	-	+
H ₂ S	+	-	+	-	-
IND	+	-	+	-	+
NO ₂	+	+	+	+	+
N ₂	-	-	-	-	-
MOB	+	+	+	+	+
McC	+	+	+	+	+
OF-O	O	O	O	O	O
OF-F	F	F	F	F	F
ID number	4744000 (57)	4004000 (57)	4544000 (57)	4104000 (57)	4144000 (57)

ODC, ornithine decarboxylase; CIT, citrate utilization; H₂S, H₂S production; IND, indole production; NO₂, NO₂ production; N₂, reduction to N₂; MOB, motility; McC, growth in MacConkey agar; O, oxidation; F, Fermentation;+, positive reaction; -, negative reaction.

primer (EDi, EDtT, EDtA)를 제작하였으며 이들 primer는 각각 *E. ictaluri*, 정형 *E. tarda* (motile) 그리고 비정형 *E. tarda* (non-motile)에서 균주 특이적인 DNA band (470 bp, 268 bp, 230 bp respectively)를 형성한다고 보고하였다. EDtT primer로 본 연구의 균들에 대하여 PCR한 결과 18 분리균 모두에서 약 270 bp의 동일한 band가 검출되었으며 그 일부

를 Fig. 1에 제시하였다. 그러나 *E. tarda*와 *E. ictaluri*의 type strain에서는 특이 band가 나타나지 않았다. 이러한 결과는 어류에서 분리되어 *E. tarda*로 동정된 균들이 *E. tarda* type 균주와 다르다는 것을 잘 뒷받침 하고 있다. 분리균들의 병원성 측면에서도 Abayneh *et al.* (2013)은 zebra fish에 대하여 어류에서 분리된 균들과 *E. tarda* type strain의 병원성을 비교한 실험에서 *E. tarda* type strain은 어류에 병원성이 매우 약하므로 어류분리균을 *E. tarda*와 다른 새로운 종으로 분류하여야 한다고 주장하였다. 한편 Park *et al.* (2017)은 우리나라의 넙치와 뱀장어에서 분리하여 *E. tarda*로 동정된 균들이 생화학적 및 유전학적 특성에서 서로 다른 그룹으로 나누어지며, 뱀장어 분리균은 넙치에 병원성을 나타내지 않는다고 보고한 바 있다. Griffin *et al.* (2014)은 Sakai *et al.* (2009)이 고안한 species-specific primer (EDTT)로 PCR한 결과가 *E. piscicida* 특이 primer (EP)로 실시한 PCR 결과와 일치함을 보여주고 있어, 본 연구의 분리 균들은 모두 *E. piscicida*로 볼 수 있으나 생화학적 특성이나 RAPD 비교 결과 등에서 나타나는 차이에 대해서는 추가 검토가 필요하다.

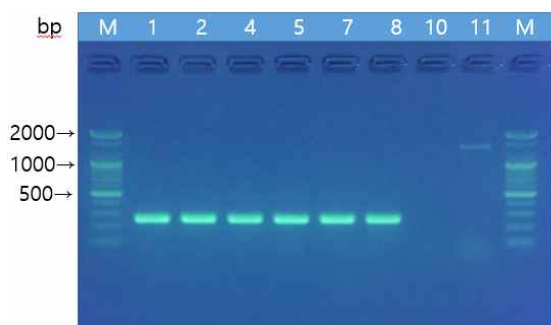


Fig. 1. Agarose gel showing a PCR amplicon of about 270 bp produced using typical *Edwardsiella tarda*-specific primer, EDtT (Sakai *et al.*, 2009). Lanes: 1, F96-1; 2, F00-1; 4, E97-1; 5, E97-2; 7, E09-1; 8, E09-2; 10, *E. tarda* KCTC 12267; 11, *E. ictaluri* KCTC 12264; M, 100 bp DNA ladder.

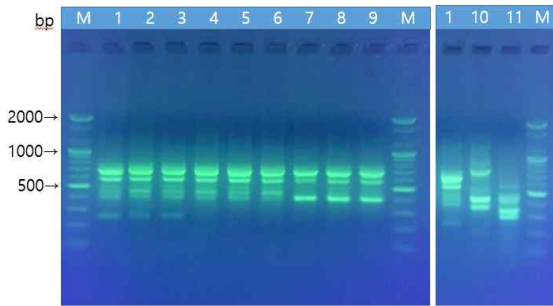


Fig. 2. RAPD profiles obtained using primer No 5 of a Ready-To-Go-RAPD kit. For lanes, refer to Table 4 of this text.

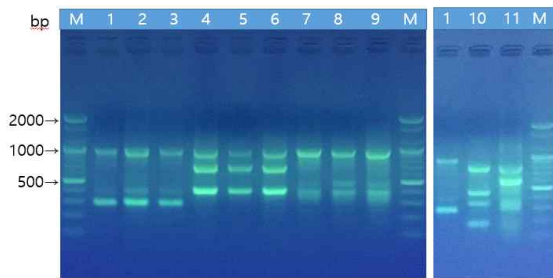


Fig. 3. RAPD profile obtained using primer No 6 of a Ready-To-Go-RAPD kit. For lanes, refer to Table 4 of this text.

RAPD 분석으로 본 *Edwardsiella* 속 균들의 다양성

RAPD primer 5번과 6번으로 PCR을 실시한 결과 (Figs. 2 and 3), 균주 간의 차이를 뚜렷하게 보여주는 DNA 밴드는 2-3개였으며 이들 DNA band에 근

거하여 볼 때, 넙치 유래의 분리 주들이 하나의 그룹을 형성하고(1, 2 and 3 in Figs. 2 and 3) 뱀장어 유래의 분리 주들이 2개의 그룹을 형성하였다. 넙치 유래 균들은 서로 뚜렷한 차이를 보이지 않는 반면, 뱀장어 분리 주들은 1997년 분리 주(4, 5 and 6 in Figs. 2 and 3)와 2009년 분리 주(7, 8 and 9 in Figs. 2 and 3)가 년도에 따른 차이를 보였다. 뱀장어의 경우 host에 따른 차이일 수도 있다고 여겨지나 host의 종을 특정 지을 수 없어 추가 해석의 여지가 있다. DNA band의 차이를 비교적 잘 보여주는 primer 6번의 RAPD 결과를 바탕으로 균주 간 유사도를 나타낸 dendrogram에서도(Fig. 4) 넙치 유래 균주들과 뱀장어 유래 균주들은 서로 분리된 그룹이며, 사람에서 분리된 *E. tarda*와 매우 다른 계통을 형성하고 있음을 알 수 있다. 이와 같은 결과는 넙치 유래 균주들을 1 cluster, 뱀장어 유래 균주들을 3 cluster로 구분하여 균주들의 RAPD analysis로 host origin을 구분하는 것이 가능하다고 했던 Park *et al.* (2017)의 결과와 일치하였다. 2009년 뱀장어에서 분리된 균은 1997년 뱀장어 분리균보다 넙치 유래의 균과 가깝게 위치하는 것으로 나타났는데 이는 유전자 돌연변이에 의한 진화 가능성을 추정케 한다.

Nucci *et al.* (2002)은 RAPD 분석법을 짧은 시간에 균주의 유전적 polymorphism을 알아볼 수 있는 효과적인 tool로 여겨, 이를 이용하여 분리균들의 host origin을 구분할 수 있음을 주장하였다. 또한

Table 4. Strains used for comparing RAPD profiles and their identification based on results of API 20E test

Number in fig 5 and 6	Name	API 20E test result		Origin
		Identifications	ID code	
1	F96-1	<i>E. tarda</i> 99.9%	4544000	Olive flounder
2	F00-1	<i>E. tarda</i> 99.4%	4744000	
3	F02-1	<i>E. tarda</i> 99.9%	4544000	
4	E97-1	<i>E. tarda</i> 99.2%	4104000	Eel
5	E97-2	<i>E. tarda</i> 99.9%	4144000	
6	E97-3	<i>E. tarda</i> 99.9%	4144000	
7	E09-1	<i>E. tarda</i> 99.9%	4144000	
8	E09-2	<i>E. tarda</i> 99.9%	4144000	
9	E09-3	<i>E. tarda</i> 99.9%	4144000	
10	<i>E. tarda</i>	<i>E. tarda</i> 99.4%	4744000	KCTC 12267
11	<i>E. ictaluri</i>	<i>E. tarda</i> 55.2%	4004000 (57)	KCTC 12264

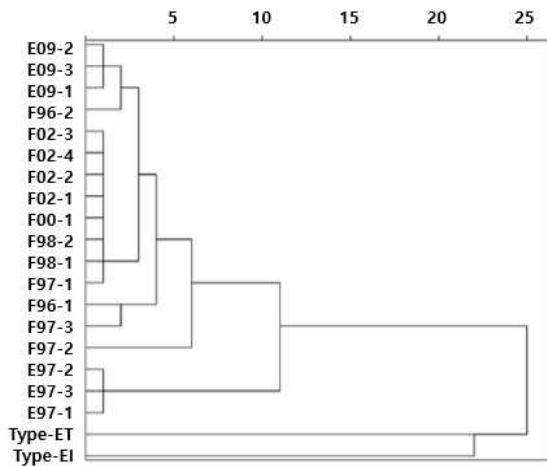


Fig. 4. A dendrogram generated based on the analysis of RAPD profiles produced with 18 isolates, *E. tarda* KCTC 12267, and *E. ictaluri* KCTC 12264 using primer No. 6 of a Ready-To-Go-RAPD kit (Cytiva, USA).

RAPD 그룹핑에서 사람 유래균과 어류 유래균은 각각 다른 그룹으로 구분되었지만 사람 유래균의 일부는 어류 유래 그룹으로, 어류 유래균의 일부는 사람 유래 그룹으로 이동하고 있음을 보여 주었다. 이는 병원체의 이동을 모니터링 하는데 RAPD 분석법이 유용하다는 것을 입증한다 하겠다. 그러나 Nadriah *et al.* (2012)은 Asian seabass에서 분리된 *E. tarda*의 연구에서 origin이 같은 균주들 간에 나타나는 유전적인 다양성을 보고하고 있으므로 병원체의 origin과 RAPD profile과의 연관성에 대한 보다 세밀한 연구의 필요성이 제기된다.

본 연구에서 1996년과 2010년 사이에 우리나라 양식 넙치와 뱀장어에서 분리하여 *E. tarda*로 동정하였던 18 균주에 대한 다양성을 검토한 결과, 3 또는 4개의 그룹으로 구분되었으며, RAPD profile은 생화학적 특성에 의한 그룹화 보다 숙주 의존적 분리가 더욱 명확하였다. 이는 *Edwardsiella*속 어류병원체의 이동을 모니터링 함에 있어서 RAPD profile 분석은 유용한 tool이 될 수 있음을 시사한다.

최근 *Edwardsiella* 속 세균 분류에 대한 폭발적인 연구 결과들은 과거 어류병원성 *Edwardsiella* 속 세균들이 잘못 동정되었음을 보여주고 있다. 그러나 다양한 분류 방법에서도 최초 어류 유래의 type strain은 *E. tarda*로 동정되고 있고 대부분을

차지하지는 않지만 *E. tarda*가 어류의 질병에 관여하고 있다는 결과들이 제시되고 있으므로 (Reichley *et al.*, 2017) 과거에 분리된 어류 유래 균들에 대한 정확한 재동정 과정이 필요하다 하겠다.

요 약

본 연구는 1996년부터 2010년 사이에 우리나라 양식넙치와 뱀장어에서 분리하여 *Edwardsiella tarda*로 동정하였던 18 균주에 대하여 생화학적 특성과 RAPD profile을 비교해봄으로써 이전 양식생물의 질병에 관여되었던 *Edwardsiella*속 세균의 다양성을 알아보려고 하였다. 생화학적 특성으로 볼 때 이들은 citrate 분해, H₂S 그리고 indole 생산 결과에 차이를 보여 4가지 패턴으로 구분되었으나 모두 *E. tarda*로 동정되었고 숙주에 따른 분리균의 특성으로 구분되지는 않았다. *E. tarda* 특이 primer인 EDiT로 PCR을 실시한 결과 18 분리균에서는 모두 약 270 bp의 동일한 band가 검출되었으나 비교 균주로 사용된 *E. tarda*와 *E. ictaluri*의 type strain에서는 특이 밴드가 검출되지 않았다. 또한 Ready-To-Go-RAPD kit의 primer 5번과 6번으로 실시한 RAPD PCR 결과, 넙치 분리균, 뱀장어 분리균, 그리고 *E. tarda*와 *E. ictaluri* type strain에서 band profile이 뚜렷한 차이를 보여 origin에 따른 특징으로 정리될 수 있었으며 병원체 모니터링을 위한 tool의 하나로 개발될 가능성을 보였다.

References

- Abayneh, T., Colquhoun, D.J. and Sørum, H.: Multi-locus sequence analysis (MLSA) of *Edwardsiella tarda* isolates from fish. *Vet. Microbiol.*, 158:367-375, 2012.
- Abayneh, T., Colquhoun, D.J. and Sørum, H.: *Edwardsiella piscicida* sp. nov., a novel species pathogenic to fish. *J. Appl. Microbiol.*, 11:644-654, 2013.. (Corrigendum : *J. Appl. Microbiol.*, 115: 634-635, 2013)
- Buján, N., Toranzo, A.E. and Magariños, B.: *Edwardsiella piscicida* : a significant bacterial pathogen of cultured fish. *Dis. Aquat. Org.*, 131:59-71, 2018.
- Davies, Y.M., de Oliveira, M.G.X., Cunha, M.P.V.,

- Franco, L.S., Santos, S.L.P., Moreno, L.Z., Gomes, V.T. de Moura, Sato, M. I.Z., Nardi, M.S., Moreno, A.M., Saidenberg, A.B. and de Sá, L.R.M. and Knöbi, T.: *Edwardsiella tarda* outbreak affecting fishes and aquatic birds in Brazil. *Vet. Quart.*, 38: 99-105. 2018.
- Farzadnia, A. and Naeemipour, M.: Molecular techniques for the detection of bacterial zoonotic pathogens in fish and humans. *Aqua. Int.*, 28: 309-320, 2020.
- Griffin, M.J., Ware, C., Quiniou, S.M., Steadman, J.M., Gaunt, P.S., Khoo, L.H. and Soto, E.: *Edwardsiella piscicida* identified in the southeastern USA by *gyrB* sequence, species-specific and repetitive sequence-mediated PCR. *Dis. Aqua. Org.*, 108:23-35, 2014.
- Jang, M.H., Kim, K.Y., Lee, Y.H., Oh, Y.K., Lee, J.H. and Song, J.Y.: Genetic identification and biochemical characteristics of *Edwardsiella* strains isolated from freshwater fishes cultured in Korea. *J. Fish Pathol.*, 33:111-118, 2020.
- Joh, S-J., Kim, M-J., Kwon, H-M., Ahn, E-H., Jang, H. and Kwon, J-H.: Characterization of *Edwardsiella tarda* isolated from farm-cultured eel, *Anguilla japonica*, in the Republic of Korea. *J. Vet. Med. Sci.*, 73:7-11, 2011.
- Mohanty, B.R. and Sahoo, P.K. : Edwardsiellosis in fish: a brief review. *J. Biosci.*, 32:1331-1344, 2007.
- Nadirah, M, Najjah, M. and Teng, S.Y.: Characterization of *Edwardsiella tarda* isolated from Asian seabass, *Lates calcarifer*. *Int. Food Res. J.*, 19: 1247-1252. 2012.
- Nucci, C., da Silveira, W.D., da Silva Corrêa, S., Nakazato, G., Bando, S.Y., Ribeiro, M.A. and Pestana de Castro, A.F.: Microbiological comparative study of isolates of *Edwardsiella tarda* isolated in different countries from fish and humans. *Vet. Microbiol.*, 89:29-39, 2002.
- Park, B.P., Nho, S.W., Jang, H.B., Cha, I.S., Lee, J-H., Aoki, T. and Jung, T.S. : Phenotypic and genotypic analysis of *Edwardsiella tarda* isolated from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) and Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Aquaculture*, 473:449-455, 2017.
- Reichley, S.R., Ware, C., Steadman, J., Gaunt, P.S., Garcia, J.C., Lafrentz, B.R., Thachil, A., Waldbieser, G. C., Stine, C.B., Arias, C.R., Loch, T., Welch, T.J., Cipriano, R.C., Greenway, T.E., Khoo, L/H., Wise, D.J., Lawrence, M.L. and Griffin, M.J.: Comparative phenotypic and genotypic analysis of *Edwardsiella* isolates from different hosts and geographic origins, with emphasis on isolates formerly classified as *E. tarda*, and evaluation of diagnostic methods. *J. Clin. Microbiol.*, 55:3466-3491, 2017.
- Sakai, T., Yuasa, K., Sano, M. and Ida, T. : Identification of *Edwardsiella ictaluri* and *E. tarda* by species specific polymerase chain reaction targeted to the upstream region of the fimbrial gene. *J. Aquat. Anim. Health*, 21:124-132, 2009.
- Shao, S., Lai, Q., LIU, Q., Wu, H., Xiao, J., Shao, Z., Wang, Q. and Zhang, Y.: Phylogenomics characterization of a highly virulent *Edwardsiella* strain ET080813^T encoding two distinct T3SS and three T6SS gene clusters: Propose a novel species as *Edwardsiella anguillarum* sp. nov. *Sys. Appl. Microbiol.*, 38:36- 47, 2015.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V.: DNA Polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.*, 18 : 6531-6535. 1990.
- Yu, J.H., Han, J.J., Park, K.S., Park, K.H. and Park, S.W.: *Edwardsiella tarda* infection in Korean catfish, *Silurus asotus*, in a Korean fish farm. *Aquac. Res.*, 41:19-26, 2009.

Manuscript Received : May 31, 2021

Revised : Jun 07, 2021

Accepted : Jun 10, 2021