

국내 양식 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*)에서 분리된 *Photobacterium* sp. YW2207의 특성

김현우* · 이은섭* · 이승준* · 김한을* · 한소라*** · 오태진**,*
김명석*** · 김수진*** · 권세련*,***†

*선문대학교 수산생명의학과, **선문대학교 제약생명공학과
유전체 기반 바이오IT 융합연구소, *국립수산과학원 병리연구과

Characterization of *Photobacterium* sp. YW2207 isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) raised in a fresh water farm in South Korea

Hyunwoo Kim*, Eunsup Lee*, Sung Jun Lee*, Haneul Kim*, So-Ra Han***,
Tae-Jin Oh**,* , Myoung Sug Kim****, Soo-Jin Kim**** and Se Ryun Kwon*,***†

*Department of Aquatic Life Medical Sciences, Sunmoon University, Asan 31460, Korea
**Department of Pharmaceutical Engineering and Biotechnology, Sunmoon University, Asan 31460, Korea
***Genome-based BioIT Convergence Institute, Asan 31460, Korea
****Pathology Research Division, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Korea

Photobacterium sp. YW2207 was isolated from rainbow trout raised in a fish farm located in Yeongwol-gun, Gangwon Province, South Korea. Based on 16S rRNA sequence analysis and phylogenetic analysis, it was confirmed that *Photobacterium* sp. YW2207 showed 100% similarity with *Photobacterium piscicola* and *Photobacterium phosphoreum*, and 94.6% similarity with *P. damsela* subsp. *damsela*. Biochemical analysis revealed that *Photobacterium* sp. YW2207 is a Gram-negative, motile bacterium with a cell size of 1.5~3×3~5 μm. The bacteria were cultured on nutrient agar, brain heart infusion agar, Muller-Hinton agar, tryptic soy agar, and thiosulfate citrate bile sucrose agar with NaCl concentrations ranging from 0 to 2.5%. The API50CHE and API20E tests indicated lower utilization capabilities compared to the *P. damsela* strains provided in the API database. Furthermore, unlike most *Photobacterium* species, *Photobacterium* sp. YW2207 presented negative for catalase test. Results from the flow cytometric measurement indicated that *Photobacterium* sp. YW2207 exhibited a more diverse distribution of cell sizes and had larger cell sizes compared with *P. damsela* subsp. *damsela*. Minimum inhibitory concentration tests showed that *Photobacterium* sp. YW2207 had low susceptibility to β-Lactam and aminoglycoside antibiotics, while having high susceptibility to tetracycline, doxycycline, and quinolone antibiotics. Pathogenicity on rainbow trout revealed that an immersion of 1×10⁵ CFU/ml did not cause mortality or clinical symptoms.

Key words: *Photobacterium* sp. YW2207, Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, Characterization

†Corresponding author: Se Ryun Kwon
Tel: +82-41-530-2289, Fax: +82-41-530-2917
E-mail: srkwon@sunmoon.ac.kr

서 론

무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*)는 국내의 내수면 양식 어종 중 백장어에 이어 두 번째로 생산량이 많은 어종이다. 2021년도 무지개송어 양식은 전년 대비 2.7%가 증가하여 2,479톤이 생산되었으며, 시장에서는 연어류의 대체 품목으로 관심이 높다(국립수산과학원, 2023). 무지개송어 양식은 유수식 사육법과 반순환 여과 사육법을 이용하고 있으며(국립수산과학원, 2017), 서식 가능한 수온은 0°C~25°C이며 산소요구량이 높기 때문에 수차 등의 방법을 이용하여 용존산소량을 높이는 방식을 사용하고 있다.

본 연구의 실험대상인 *Photobacterium* 속 세균은 비브리오과 그람 음성의 통성혐기성 간균이다. 해양세균이기 때문에 배양을 위해서는 나트륨 첨가 배지가 필요하다고 알려져 있다(Betts, 2006). 또한 *Photobacterium* 속의 세균들은 생물발광(Bioluminescence)을 하면서 해양 생물에서 공생을 하거나 해양 생물에 질병을 일으키는 경우도 보고되었다. 가장 대표적인 병원체는 *Photobacterium damsela*이며 두 가지의 아종으로 나뉘어진다. 먼저 *P. damsela* subsp. *damsela*는 해수 사육 무지개송어(*O. mykiss*), 터뷰트(*Scophthalmus maximus*), gilthead bream (*Sparus aurata*), 농어(*Lateolabrax japonicus*), 밀새우(*Exopalaemon carinicauda*) 등에서 질병을 일으키는 병원체로 알려졌다(Terceti et al., 2018). 또 다른 아종인 *P. damsela* subsp. *piscicida* 은 gilthead seabream, 적돔, 참돔, european seabass 등의 어류에서 pasteurellosis를 일으키는 병원체로 알려져 있다(CIHEAM, 2020).

우리 연구팀은 국내 양식 무지개송어에서 분리되는 세균종에 대한 연구를 수행하기 위해 2022년에 충청북도, 강원도, 경기도 소재의 양어장에서 채집한 무지개송어를 대상으로 간, 비장, 신장 및 장 점액에서 세균을 분리하고 동정하였다. 동정하는 과정에서 강원도 영월군 소재의 양어장에서 *Photobacterium* 속의 세균이 높은 빈도로 분리되는 것에 주목하였다. *Photobacterium* 속 세균은 강원도 영월군 소재 이외의 다른 무지개송어 양어장에서는 분리되지 않았으며 주로 해수에서 발견되는

세균종으로 알려져 있었기에 특성 규명이 필요하다고 판단되었다. 이에 따라 본 연구에서는 국내 담수 무지개송어에서 분리된 *Photobacterium* sp.의 특성을 파악하고자 16S rRNA 유전자, 배양 특성, 생화학적 특성 및 무지개송어에 대한 병원성 여부를 확인하였다.

재료 및 방법

실험어

무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*)는 말안란부터 성어까지 키우는 강원도 소재의 양어장에서 채집하였다. 이 양식장은 용천수를 이용하여 유수식으로 무지개송어를 양식하고 있었으며 연 평균 수온을 13.8°C로 유지하고 있었다. 2022년 7월에 무지개송어 30마리(평균 전장 29.4±3.2 cm, 평균 체중 332.0±94.0 g)를 채집한 즉시 실험에 사용하였다. 채집된 개체 모두에서 육안적으로 확인되는 임상 증상은 없었다.

세균 분리 및 배양

무지개송어에서 세균을 분리하기 위해 각 개체의 비장 및 간을 무균적으로 채취하여 BHIA (BD, USA)에 접종하였으며 장 점액은 장을 절취하여 멸균된 메스로 끊어모은 후 멸균 생리식염수로 희석 후 BHIA에 도말하였다. 세균 배양은 18°C에서 3일간 수행되었다. 배양된 세균은 동일한 성장별로 분류한 후 순수분리 배양을 실시하였다.

무지개송어 분리 균주의 배양 특성을 비교하기 위해 Korean Collection for Type Cultures (KCTC)에서 *P. damsela* subsp. *damsela* KCTC 12279 균주를 분양받고 KCTC의 지침서대로 Marine Agar 2216 (BD, USA)에서 배양하였다. 차후에 무지개송어 분리 균주와의 특성을 비교하는 실험에서는 BHIA가 사용되었다.

16S rRNA 유전자 서열을 통한 세균 동정

순수 분리 배양된 세균은 BHIA에 배양한 후 microbial identification service (Cosmogenetech, Korea)를 통해 16S rRNA universal primers (27F : 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3', 1492R : 5'-GGTTAC

CTTGTTACGACTTC-3)를 사용한 중 염기서열 분석을 실시하였다. 확보된 염기서열을 토대로 Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) X 소프트웨어를 이용하여 alignment 후에 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)를 통해 종 동정을 실시하였고 계통수 분석을 수행하였다.

형태적 특성 분석

무지개송어에서 분리된 *Photobacterium* sp. YW2207의 특성을 검사하기 위해 슬라이드 글라스에 균체를 도말하여 그람염색을 하였으며, 운동성 여부를 관찰하였다. 그람염색은 Gram stain kit (BD, USA)를 사용하여 수행한 후 균의 염색상과 균체 크기, 균체 모양 등을 관찰하였다. 운동성은 wet mount 방법으로 관찰하였다. 형태적 특성은 *P. damsela* subsp. *damsela* KCTC 12279와 비교하였다.

생화학적 특성 분석

1) 염도 및 배지별 발육시험

염도별 생장을 확인하기 위해 *Photobacterium* sp. YW2207과 *P. damsela* subsp. *damsela* KCTC 12279를 NaCl이 0~6%로 첨가된 BHIA에 접종한 후 18°C에서 3일간 배양한 후 발육 여부를 확인하였다.

다양한 배지에서의 발육 여부를 확인하기 위해 TSA (BD, USA), LB (BioShop, Canada), TCBS (BD, USA), Muller-Hinton (BD, USA)에 접종하여 배양되는지 확인하였다. 접종한 세균은 18°C에서 3일간 배양한 후 발육 여부를 확인하였다.

2) API test

API 20E와 API50CHE는 BioMérieux (France)의 kit를 사용하여 실험하였다. API20E 테스트를 위해서 *Photobacterium* sp. YW2207을 McFarland's standard 0.5와 동일한 탁도가 되게끔 Suspension Medium (BioMérieux, France)을 사용하여 현탁하였고 API50CHE 테스트를 위해서는 API50CHE Medium (BioMérieux, France)을 이용하여 McFarland's standard 2와 동일하게 탁도를 맞추었다. 세균 현탁액의 탁도 조정은 Nephelometer (Thermo Fisher, USA)를

이용하였으며, 현탁한 세균은 API20E와 API50CHE의 각 튜브에 접종한 후 18°C에서 3일간 배양했다. *Photobacterium* sp. YW2207의 생화학적 특성은 BioMérieux에서 제공하는 api manual version의 데이터베이스에 제시된 *P. damsela*와 *Vibrio parahaemolyticus*의 생화학적 특성과 비교하였다.

3) Catalase test 및 Oxidase test

Catalase test에는 3% hydrogen peroxide (Daejung, Korea)를 사용하였으며 집락과 반응시켜 기포가 형성되는 경우 양성으로 판독하였다. Oxidase test에는 Oxidase Reagent (BioMérieux, France)를 사용하였으며, 집락 위에 oxidase reagent를 반응시켜 짙은 보라색으로 보이는 경우 양성으로 판독하였다.

항생제 감수성 시험

항생제 감수성 시험은 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI; www.clsi.org) Guidelines VET04, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST; www.eucast.org) 및 국립수산물과학원에서 발간한 수산용 항생제 감수성 검사 매뉴얼에 제시된 broth microdilution법으로 진행되었다(CLSI, 2018; EUCAST, 2022; 국립수산물과학원, 2022).

실험에 사용된 Sensititre KRAQ3, KRAQ4 panel (ThermoFisher, USA)은 국립수산물과학원에서 디자인된 것으로(국립수산물과학원, 2022) β-lactam 계열의 ampicillin, amoxicillin, amoxicillin/clavulanic acid와 cephalosporin 계열의 cephalexin, ceftiofur과 tetracycline 계열의 tetracycline, oxytetracycline, doxycycline과 quinolone 계열의 nalidixic acid, enrofloxacin, oxolinic acid, ciprofloxacin, flumequine과 aminoglycoside 계열의 neomycin, gentamycin과 lincosamide 계열의 clindamycin과 macrolide 계열의 erythromycin과 phenicol 계열의 florfenicol과 folate-pathway inhibitor와 관련된 trimethoprim/sulfadiazine의 19개의 항생제가 단계회석되어 있어 각 well에 세균 현탁액을 접종하였다.

BHIA에 배양된 세균 집락을 demineralized water에 현탁하고 Nephelometer (ThermoFisher, USA)를 사용하여 McFarland standard 0.5로 조정된 후 최종

농도 5×10^5 CFU/ml이 되도록 cation-adjusted mueller-hinton broth containing TES buffer (CAMHBT) 5 ml에 접종하여 현탁하였다. 세균 현탁액을 각 well 당 100 μ l씩 접종하고 24시간 배양 후 세균이 자라지 않은 최소 농도를 MIC (minimum inhibitory concentration) 값으로 판독하였다. 배양은 18°C에서 3일간 진행하였다.

유세포분석

Photobacterium sp. YW2207과 *P. damsela* subsp. *damsela* KCTC12279의 세포 크기 및 세포 내부 구조의 복잡성 비교를 위해 각 세균을 배양한 후 새로 자란 세균을 멸균 3차 증류수에 현탁 하여 CytoFLEX Flow cytometer (Beckman Coulter, USA)를 이용하여 FSC-A(Forward Scatter Area), SSC-A(Side Scatter Area)분석을 수행하였다.

병원성 시험

Photobacterium sp. YW2207가 검출되지 않았던 경기도 소재의 양어장에서 무지개송어 치어를 구입하여 병원성 시험에 사용하였다. 실험에 사용된 무지개송어의 평균 체장은 12.4 ± 2.2 cm이었다. 무지개송어는 200 L 수조에 15마리씩 사육하였다. 실험구에는 BHI broth에서 배양한 *Photobacterium* sp. YW2207을 1×10^5 CFU/ml 농도가 되도록 사육수에 현탁하고 7일간 폐사를 관찰하였다. 대조구에는 아무 처리를 하지 않았다.

결과 및 고찰

세균 분리 및 동정

무지개송어의 장 점액 및 장기에서 17종의 75가지 균주가 분리되었다. 분리된 균주를 집락의 특성이 유사한 것 끼리 sorting하여 그룹화를 하였으며 각 그룹의 세균 두 개를 16S rRNA를 이용해 동정한 결과 42개의 유사한 균주로 분류하였다. 이 중 4개를 선택하여 16S rRNA sequence를 비교하였을 때 이들 세균이 서로 동일한 세균이라고 판단되었다. 그 중 한개의 세균을 골라 다른 세균과 비교 분석을 한 결과 염기서열은 *Photobacterium piscicola* NCCB100141, *Photobacterium piscicola* NCCB

100105, *Photobacterium piscicola* 215GM34-11 및 *Photobacterium phosphoreum* F3과 100% 일치하였다. 한편 *P. damsela* subsp. *damsela* 04Ya311과 94.66%, *P. damsela* subsp. *piscicida* K-1과는 94.65% 일치하였다. 분리 세균 중 하나를 골라 다른 세균종과 계통 분석을 실시한 결과 가장 가까운 종은 *P. piscicola*, *P. phosphoreum*임을 확인하였고(Fig. 1) 이를 *Photobacterium* sp. YW2207으로 명명하였다. *Photobacterium* sp. YW2207의 16S rRNA gene sequence는 GenBank에 등재하였다(accession no. OR789560).

*P. phosphoreum*은 부패와 관련된 반응을 하며 생물발광을 한다고 알려져 있으나 병원성은 알려져 있지 않다(Bao *et al.*, 2023; Flodgaard, 2005). *P. piscicola*는 lysine decarboxylase, glucose oxidation, nitrate reduction에 양성이라는 보고가 있으나(Marian *et al.*, 2014) 병원성에 대한 보고는 없다.

일반적으로 알려진 *Photobacterium* 속 세균은 해양 세균인데 반해 본 연구에서 획득한 *Photobacterium* sp. YW2207은 담수 무지개송어에서 분리된 세균이라는 점에서 차이가 난다. 해양 세균이 담수어에서 다량으로 발견된 점에 대해서는 추후에 역학조사가 필요하다고 판단된다.

운동성 및 현미경 관찰 특성

Photobacterium sp. YW2207는 현미경 관찰 상 운동성이 보였다. 일반적으로 극성 편모를 가진 *Photobacterium* 속 세균의 이동 특성과 일치하였으나 본 연구에서는 편모 염색을 따로 실시하지 않아 편모 유무는 확인하지 못했다. Gram stain 후 관찰 결과 *Photobacterium* sp. YW2207는 그람 음성균으로 확인되었다(Betts, 2006). *Photobacterium* sp. YW2207의 균체 크기는 약 $1.5 \sim 3 \times 3 \sim 5$ μ m로 확인되었다(Fig. 2). 일반적인 *Photobacterium* 속 세균은 $0.8 \sim 1.3 \times 1.8 \sim 2.4$ μ m이며(Betts, 2006) *P. damsela* subsp. *piscicida*는 0.5×1.5 μ m (CIHEAM, 2020), *P. damsela* subsp. *damsela*는 $0.35 \sim 0.5 \times 0.9 \sim 2.0$ μ m (Fouz *et al.*, 1998), *P. phosphoreum*은 최대 0.53.5 μ m 크기(Dunstan *et al.*, 2018)인 것을 감안하면 본 연구에서의 *Photobacterium* sp. YW2207은 크기가 큰 편에 속하였다.

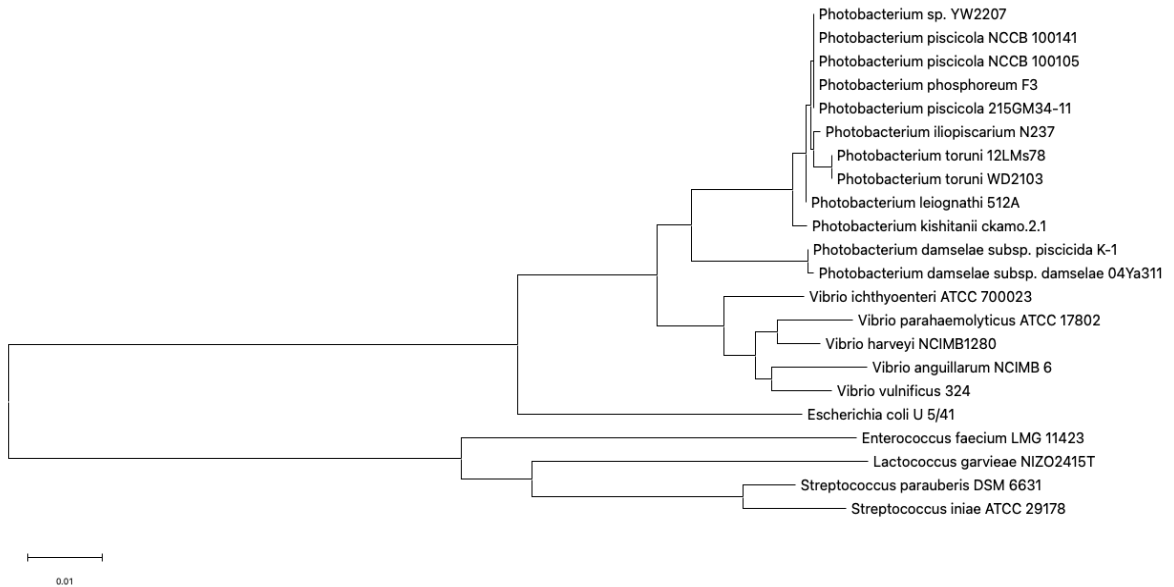


Fig. 1. Phylogenetic tree of *Photobacterium* sp. YW2207 based on 16S rRNA gene sequence alignment. Phylogenetic tree was generated by 1000 replications with neighbor joining tree method and bootstrap (MEGA X). Bar means nucleotide substitution rate units.

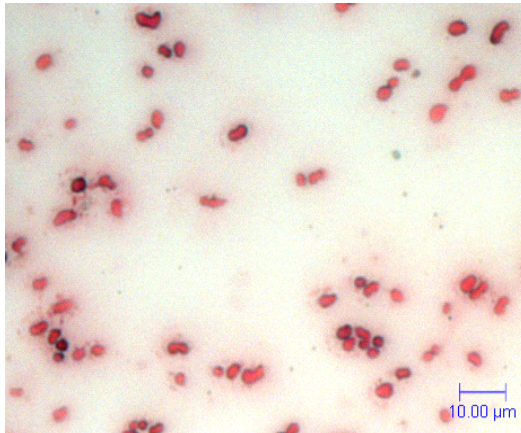


Fig. 2. Microscopic observation of Gram stained *Photobacterium* sp. YW2207.

염도 및 배지별 배양 특성

Photobacterium sp. YW2207를 0.5~6.5% 농도의 NaCl을 첨가한 BHIA에 배양한 결과 염분 농도 5.5%에서 약한 발육을 보였고 염분 농도 6.5%에서는 배양되지 않았다. *Photobacterium* sp. YW2207는 NaCl을 첨가하지 않은 Muller-Hinton agar, NaCl을

0.5% 첨가한 TSA, NaCl을 1% 첨가한 LB 및 TCBS에서 배양되었다. 결과적으로 *Photobacterium* sp. YW2207는 0~2.5%의 염분 농도에서 배양이 적절하였다(Table 1). 모든 배지에서 3일간 배양했을 때 세균은 지름이 1~2 mm 정도의 상아색 집락을 형성하였다. 그 외의 같은 속의 해양 세균인 *Photobacterium panuliri*는 0.5~7%의 염분 농도에서 배양 가능하며 2~4% 염분 농도가 최적 배양 조건이라는 연구 결과가 있으며(Deep *et al.*, 2014) *P. damselae* subsp. *damselae*는 1~6%의 염분 농도에서 자라며 *P. damselae* subsp. *piscicida*는 0.5~3%의 염분 농도에서 자란다(Austin and Austin, 2012). *P. phosphoreum*의 경우 염도가 1% 이하일 경우 성장은 0.9~3.2% 까지 가능하였으나 1% 미만의 염분 농도에서는 발광이 일어나지 않는다는 결과가 존재하며(Waters and Lloyd, 1985), 발광 미생물인 *P. phosphoreum*의 성장이 증가하면 발광도 증가한다는 연구 결과(이 등, 1998)에 따라 염분 농도 1% 미만은 최적 배양 조건이 아니라고 판단된다. *Photobacterium* sp. YW2207는 담수어에서 분리된 세균이므로 낮은 염분 농도에서도 증식된다고 사료된다.

Table 1. Biochemical characterization of *Photobacterium* sp.YW2207

Test	세균명		
	<i>Photobacterium</i> sp. YW2207	<i>Photobacterium</i> <i>damselae</i> (database of BioMérieux)	<i>Vibrio</i> <i>parahaemolyticus</i> (database of BioMérieux)
Control	-	-	-
Glycerol	-	-	W
Erythritol	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-
L-Arabinose	+	-	W
Ribose	-	-	W
D-Xylose	-	-	-
L-Xylose	-	-	-
Adonitol	-	-	-
Methyl-B-D-Xylopyranside	-	-	-
Galactose	-	+	+
Glucose	-	+	+
Fructose	-	+	+
Mannose	-	+	+
Sorbose	-	-	-
Rhamnose	-	-	-
Dulcitol	-	-	-
Inositol	-	-	-
Mannitol	-	-	W
Sorbitol	-	-	W
Methyl-a D-Mannopyranoside	-	-	-
Methyl-a D-Glucopyranoside	-	-	-
N-Acetylglucosamine	-	+	+
Amygdalin	-	-	-
Arbutin	-	-	-
Esculin ferric citrate	-	-	-
Salcin	-	-	-
D-Cellobiose	-	-	W
D-Maltose	+	+	+
D-Lactose	-	-	-
D-Melibiose	-	-	-
D-Saccharose	-	-	-
D-Trehalose	-	W	+
Inulin	-	-	-
D-Melezitose	-	-	-
D-Raffinose	-	-	-
Amidon	-	-	+
Glycogen	-	-	+
Xylitol	-	-	-
Gentiobiose	-	-	-
D-Turanose	-	-	-
D-Lyxose	-	-	-
D-Tagatose	+	-	-
D-Fucose	-	-	-
L-Fucose	-	-	-
D-Arabitol	-	-	-

Table 1. Continued

Test	세균명		
	<i>Photobacterium</i> sp. YW2207	<i>Photobacterium</i> <i>damselae</i> (database of BioMérieux)	<i>Vibrio</i> <i>parahaemolyticus</i> (database of BioMérieux)
L-Arabitol	-	-	-
Potassium Gluconate	-	-	+
Potassium 2-Ketogluconate	-	-	-
Potassium 5-Ketogluconate	+	-	-
API20E	b-galactosidase	-	-
	Arginine dihydrolase	-	+
	Lysine decarboxylase	-	W
	Ornithine decarboxylase	-	-
	Citrate utilization	+	-
	H ₂ S production	-	-
	Urease	-	+
	Tryptophane deaminase	-	-
	Indole production	-	-
	Acetoin production	-	+
	Gelatinase	-	-
	Catalase	-	+
	Oxidase	-	+
	Growth on media	TCBS (1% NaCl)	+
LB (1% NaCl)		+	ND
TSA (0.5% NaCl)		+	ND
Muller-Hinton (0% NaCl)		+	ND
Salinity (BHIA)	0.5%	+	ND
	1.5%	+	ND
	2.5%	+	ND
	3.5%	+	ND
	4.5%	+	ND
	5.5%	W	ND
6.5%	-	ND	

+, positive; -, negative; W, weakly positive; ND, non determined

a, *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* KCTC 12279

생화학적 특성

Photobacterium sp. YW2207의 API50CHE, API20E 분석 결과는 Table 1에 제시하였다. BioMérieux에서 제공하는 api manual version에 데이터베이스로 존재하는 *P. damsela* 균주의 생화학적 특성과 비교하였을 때, L-arabinose, D-tagatose 그리고 potassium 5-ketogluconase에서 *P. damsela*는 음성이고 *Photobacterium* sp. YW2207는 양성이었다. 또한 galactose, glucose, fructose, mannose, N-acetylglucosamine, D-trehalose에서도 *P. damsela*는 양성인

반면 *Photobacterium* sp. YW2207는 음성이어서, *Photobacterium* sp. YW2207의 당 이용 능력이 *P. damsela*보다 낮은 것으로 나타났다. 또한 oxidase test에서 *P. damsela* subsp. *damsela*를 포함한 대부분의 *Photobacterium* 속 세균이 양성(Betts, 2006; 권 등, 2005)인 것에 반해 *Photobacterium* sp. YW2207는 음성이었다. 또한 catalase 반응 또한 *P. damsela* subsp. *damsela*를 포함한 여러 *Photobacterium* 속 세균이 양성(Paul et al., 2021; 권 등, 2005)인 것에 반해 *Photobacterium* sp. YW2207는

음성이었다.

항생제 감수성 테스트

항생제 감수성 테스트에 대한 결과는 Table 2에 제시하였다. 항생제 감수성 테스트 결과 oxytetracycline과 doxycycline의 MIC가 0.12, ciprofloxacin이 0.015, nalidixic acid가 0.5, flumequine이 0.12, oxolinic acid가 0.5, enrofloxacin이 0.03, cephalixin이 0.03, trimethoprim/sulfadiazine이 0.12/2.38으로 해당 항생제에 대해 감수성이 있음을 알 수 있었다. 그에 반해 β -Lactam 계열의 항생제와 aminoglycoside계의 neomycin, gentamycin에 대해서는 감수성이 없었다.

유세포분석

Photobacterium sp. YW2207와 *P. damsela* subsp.

damsela KCTC12279 균주와의 비교를 위해 각각 10만 개의 세균수로 유세포분석을 진행한 결과, *P. damsela* subsp. *damsela* KCTC12279 균주의 FSC-A의 산술평균은 9930이었고, *Photobacterium* sp. YW2207 균주의 FSC-A의 산술평균은 22646으로 확인되어 세포 크기에 비례하는 FSC-A 특성상 *Photobacterium* sp. YW2207가 평균적으로 더 사이즈가 크다고 확인되었다(Fig. 3). 이는 위의 그람염색을 한 후 육안적으로 사이즈 비교를 하였을 때의 결과와 일치하는 부분이다. SSC-A 분석 결과 *P. damsela* subsp. *damsela* KCTC12279 균주의 SSC-A의 산술평균은 7455인데 반하여 *Photobacterium* sp. YW2207의 SSC-A의 산술평균은 17185이었다. 세포 내부 구조의 과립의 양이 많거나 내부 구조가 조밀하면 SSC-A값이 높아지는 것이므로 이 결과로 보아 *Photobacterium* sp. YW2207은 *P. damsela*

Table 2. Antibiotic susceptibility analysis of *Photobacterium* sp. YW2207 and *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* KCTC 12279 using Minimum Inhibitory Concentration(MIC) test

Antibiotics group	Antibiotics	Range	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	
			<i>Photobacterium</i> sp. YW2207	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i> KCTC 12279
β -Lactam	Ampicillin	0.25~128	4	4
	Amoxicillin	0.06~16	4	8
	Amoxicillin / Clavulanic acid	0.06/0.03~8/4	4/2	1/0.5
Tetracycline	Tetracycline	0.06~64	0.25	0.12
	Oxytetracycline	0.12~256	0.12	0.12
	Doxycycline	0.12~128	0.12	0.12
Cephalosporin	Cephalixin	0.25~64	0.5	2
	Ceftiofur	0.03~32	0.03	0.03
Quinolone	Nalidixic acid	0.5~64	0.5	0.5
	Enrofloxacin	0.03~32	0.03	0.03
	Oxolinic acid	0.5~32	0.5	0.5
	Ciprofloxacin	0.015~64	0.015	0.015
	Flumequine	0.12~128	0.12	0.12
Aminoglycoside	Neomycin	0.5~64	2	2
	Gentamycin	0.12~32	2	1
Chloramphenicol	Florfenicol	0.06~64	0.5	0.2
Macrolide	Erythromycin	0.03~64	1	0.03
Lincomycin	Clindamycin	0.015~16	4	8
Folate-pathway inhibitor	Trimethoprim / Sulfadiazine	0.12/2.38~16/304	0.12/2.38	0.12/2.38

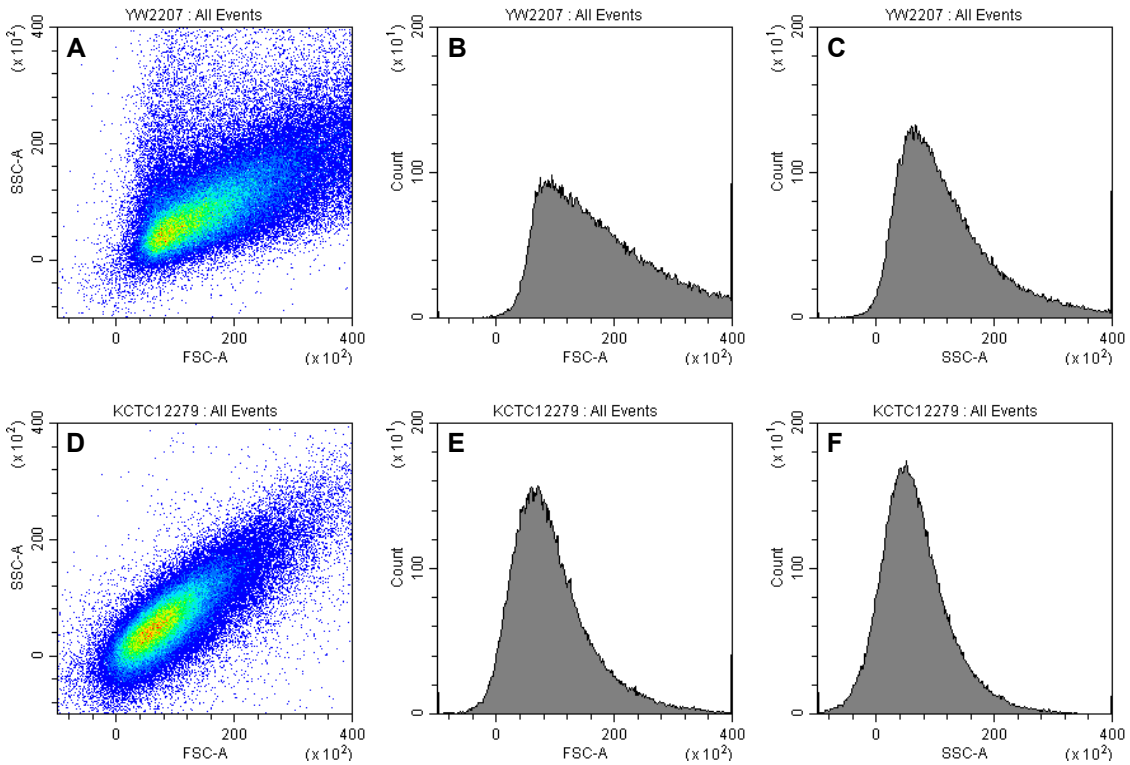


Fig. 3. Flow cytometric measurements of *Photobacterium* sp. YW2207 and *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* KCTC 12279. (A) The density plot of *Photobacterium* sp. YW2207 illustrates a comprehensive view of FSC-A (Forward Scatter Area) and SSC-A (Side Scatter Area). (B) FSC-A Histogram of *Photobacterium* sp. YW2207. (C) SSC-A Histogram of *Photobacterium* sp. YW2207. (D) The density plot of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* KCTC 12279 illustrates a comprehensive view of FSC-A and SSC-A. (E) FSC-A Histogram of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* KCTC 12279. (F) SSC-A Histogram of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* KCTC 12279.

subsp. *damsela* KCTC12279 균주보다 내부 구조가 조밀하다고 보여진다. 또한 FSC-A의 변동계수를 통해 세균의 크기 분포를 미루어 볼 때, *Photobacterium* sp. YW2207의 FSC-A의 변동계수는 367.52%이고 *P. damsela* subsp. *damsela* KCTC12279 균주의 변동계수는 317.26%로서 50% 이상 차이가 나는 것을 알 수 있었다(Table 3). 이 결과를 바탕으로 *Photobacterium* sp. YW2207가 다양한 세균 크기의 분포를 보인다고 판단할 수 있다.

병원성 시험

Photobacterium sp. YW2207의 무지개송어에 대한 병원성을 확인한 결과 1×10^5 CFU/ml의 침지 공격에 의해서는 무지개송어에 대해 폐사는 물론 임

Table 3. The statistical moments of flow cytometric analysis compare between *Photobacterium* sp. YW2207 and *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* KCTC 12279. Event means detected cell numbers

Statistical Moments	<i>Photobacterium</i> sp. YW2207	<i>P. damsela</i> KCTC12279
Events	105461	108511
Mean FSC-A	22646.3	9930.4
SD FSC-A	83230.7	31505.4
CV FSC-A	367.52%	317.26%
Mean SSC-A	17185.1	7455.2
SD SSC-A	242123.8	130971.4
CV SSC-A	1408.92%	1756.77%
Skewness of FSC-A	0.02	0.03
Skewness of SSC-A	0.0003	0.0002

SD, Standard deviation; CV, Coefficient of variation.

상증상을 유발하지 않았다(data not shown). 본 연구에서 공격실험에 사용된 무지개송어가 복강주사를 할 정도의 크기가 아니라고 판단되어 침지 공격실험을 실시했으나 차후에는 복강주사로 공격실험을 실시할 필요가 있다고 생각된다. 본 연구에서는 무지개송어 외 다른 어종에 대한 병원성은 확인하지 않았다. 그러나 *Photobacterium* sp. YW 2207가 담수 사육 무지개송어에서 분리된 것이고 무지개송어의 사육방식이 유수식이므로 *Photobacterium* sp. YW2207가 담수 수계로 노출될 것을 대비하여 다양한 담수어에 대한 병원성 평가를 실시할 필요가 있겠다.

감사의 글

이 연구는 국립수산과학원 (R2023058, 수산분야 항생제 통합감시 및 내성균 연구)의 지원에 의해 진행되었습니다.

References

- Austin, B. and Austin, D. A.: Bacterial Fish Pathogens, pp.327-339, 5th ed., Springer, Dordrecht, 2012.
- Bao, X. C., Tang, H. Z., Li, X. G., Li, A. Q., Qi, X. Q., Li, D. H., Liu, S. S., Wu, L. F. and Zhang, W. J.: Bioluminescence Contributes to the Adaptation of Deep-Sea Bacterium *Photobacterium phosphoreum* ANT-2200 to High Hydrostatic Pressure. *Microorganisms*, 11(6):1362, 2023. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061362>
- Betts, G.: 23 - Other spoilage bacteria. *Food Spoilage Microorganisms*, pp668-693, Woodhead Publishing Series in Food Science, Oxford, UK, 2006. <https://doi.org/10.1533/9781845691417.5.668>
- CIHEAM: Diagnostic Manual for the main pathogens in European seabass and Gilthead seabream aquaculture. CIHEAM, pp83-96, Zrncic S. ed, CIHEAM, 2020.
- Clinical and Laboratory Standards Institute.: M45 Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria. 2018.
- Deep, K., Poddar, A. and Das, S.K.: *Photobacterium panuliri* sp. nov., an Alkalitolerant Marine Bacterium Isolated from Eggs of Spiny Lobster, *Panulirus penicillatus* from Andaman Sea. *Current Microbiology*, 69(5):660-668, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00284-014-0638-0>
- Dunstan, J., Lee, K., Hwang, Y., Park, S. and Goldstein, R.: Evaporation-driven convective flows in suspensions of non-motile bacteria. *Physical Review Fluids*. 3(12):123102, 2018. <https://doi.org/10.1103/PhysRevFluids.3.123102>
- European Committee On Antimicrobial Susceptibility Testing: Broth microdilution – EUCAST reading guide v 4.0, EUCAST, 2022.
- Flodgaard, L. R., Dalgaard, P., Andersen, J. B., Nielsen, K. F., Givskov, M. and Gram, L.: Nonbioluminescent strains of *Photobacterium phosphoreum* produce the cell-to-cell communication signal N-(3-Hydroxyoctanoyl)homoserine lactone. *Applied and environmental microbiology*, 71(4):2113-2120, 2005. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.4.2113-2120.2005>
- Fouz, F., Toranzo, A. E., Marco-Noales, E. and Amaro, C.: Survival of fish-virulent strains of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* in seawater under starvation conditions. *FEMS Microbiology Letters*, 168(2):181-186, 1998. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb13271.x>
- Marian, J. F., Figge, I. C., Astrid, V. U., Paul, D. V., Geert, H. and Lesley, R.: *Photobacterium piscicola* sp. nov., isolated from marine fish and spoiled packed cod. *Systematic and Applied Microbiology*, 37(5):329-335, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2014.05.003>
- Terceti, M. S., Vences, A., Matanza, X. M., Dalsgaard, I., Pedersen, K. and Osorio, C. R.: Molecular epidemiology of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* outbreaks in marine rainbow trout farms reveals extensive horizontal gene transfer and high genetic diversity. *Frontiers in microbiology*, 9:2155, 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02155>
- Paul, S. I., Rahman, M. M., Salam, M. A., Khan, A. R. and Islam, T.: Identification of marine sponge-associated bacteria of the Saint Martin's island of the Bay of Bengal emphasizing on the prevention of motile *Aeromonas* septicemia in *Labeo rohita*. *Aquaculture*, 545:737156, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737156>
- Waters, P. and Lloyd, D.: Salt, pH and temperature dependencies of growth and bioluminescence of three species of luminous bacteria analysis on gradient plates. *Journal of General Microbiology*, 131:2865-2869, 1985. <https://doi.org/10.1099/00221287-131-11-2865>
- 국립수산과학원: 2022 수산용의약품 제품 요약 해설

집. 해양수산부 국립수산물과학원, 2022.
국립수산물과학원: 무지개송어 양식 표준 매뉴얼. 해양
수산부 국립수산물과학원, 2017.
국립수산물과학원: 수과원, 무지개송어 합동이동병원
운영. 국립수산물과학원 보도자료, 2023.
권문경, 박상언, 방종득, 박수일.: 넙치, *Paralichthys*

*olivaceus*에서 병원성 *Photobacterium damsela*
subsp. *damsela*의 분리. 한국어병학회지, 18(3):205-
214, 2005.
이은수, 이홍주, 전억한.: 독성 물질 측정을 위한
*Photobacterium phosphoreum*의 고정화에 관한 연
구. 식량자원개발연구소 논문집, 19:48-56, 1998.

Manuscript Received : Nov 16 2023

Revised : Dec 06 2023

Accepted : Dec 07 2023