

## 미성어 양식 넙치, *Paralichthys olivaceus* 에서 분리한 *Vibrio ichthyoenteri* 의 표현형 및 유전형적 특성

이 화 · 김수미\* · 박수일 †

부경대학교 수산생명의학과, \*부경대학교 수산과학연구소

### Phenotypic and genetic characteristics of *Vibrio ichthyoenteri* isolated from the olive flounder, *Paralichthys olivaceus* of culturing size

Hua Li, Su Mi Kim\* and Soo Il Park †

Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

\*Institute of Fisheries Science, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

From 2002 to 2004, various vibrios were isolated from the olive flounder, *Paralichthys olivaceus* of culturing size with disease signs. During this survey, it was known that the high proportion of *Vibrio ichthyoenteri* was occupied among the isolated vibrios. Generally, *V. ichthyoenteri* is well known as the pathogen of bacterial enteritis of olive flounder larvae. The aim of the present study was the compare the characteristics of two groups of *V. ichthyoenteri*, culturing sized olive flounder, and larvae of olive flounder showing the intestinal necrosis. The research was focused on the physiology, biochemistry, genetics in the two bacterial groups. The physiological and biochemical characteristics of the tested strains were very similar. The intergenic spacer (IGS) region between the 16S and 23S rRNA genes of 21 isolated strains and 3 reference strains, *V. ichthyoenteri*, were investigated by PCR fragment length typing and DNA sequencing. After the isolated strains were identified as *V. ichthyoenteri*, not only phenotypic characteristics of the isolated and reference strains but also homology of 16S-23S IGS of all isolated strains and reference strains as 99.1~100%. The *V. ichthyoenteri* showed 4 specific 16S-23S patterns and contained no-tRNA, tRNA<sup>Glu(TTC)</sup>, tRNA<sup>Ile(GAT)</sup>, tRNA<sup>Ala(TGC)</sup> type.

*Key words:* *Vibrio ichthyoenteri*, 16S-23S IGS, Olive flounder

1970년대 후반 종묘 생산 기술이 성공됨에 따라 넙치, *Paralichthys olivaceus* 양식은 우리나라 해수 양식 어종에서 가장 높은 비중을 차지하며 중요한 경제적 어종으로 인정받고 있다. 넙치 양식 규모와 생산량이 늘어나는 동시에 자치어기의 유전적, 환경적 또는 영양적 요인에 의한 비감염성 질병의 비율도 상당히 높지만 바이러스성 또는 세균성 질병과 같은 감염성 질병도 계

속 증가하고 있고 (Nishioka *et al.*, 1997), 넙치 양식 과정에서도 다양한 감염성 질병이 나타나며 특히 병원 세균의 분리 빈도는 현저히 높아지고 있는 실정이다 (Kim *et al.*, 2005).

*V. ichthyoenteri*는 넙치 자어에 발생하는 장관 백탁증의 병원체로 1971년에 일본에서 최초로 보고된 (Murata, 1987; Muroga, 2001) 이후, Masumura 등(1989)은 이 원인균의 형태학, 생화

†Corresponding Author : Soo-Il Park, Tel : 051-620-6141,  
Fax : 051-628-7430, E-mail: parksi@pknu.ac.kr

학, 생리학, 병리학 그리고 혈청학적 시험을 통하여 임시로 *Vibrio species* INFL (intestinal necrosis of flounder larvae)로 명명하였다. Muroga 등 (1990)은 이 균을 rotifer, *Brachionus plicatilis*와 brine shrimp, *Artemia salina nauplii*에 침지시켜 경구 감염으로 병원성을 확인하고, 최종적으로 Ishimaru 등 (1996)이 *V. ichthyenteri*로 명명하였다. 국내에서는 이 등 (1995)이 제주도 장관백탁증 낚치 자어에서 분리한 세균에 대해 조사하고, 부화 후 18일 경부터 착저기를 지난 약 30일 까지 폐사를 일으킨다고 보고하였으며, 경구가 유일한 감염 경로이며 약 40일령 이후에는 감수성이 없다고 하였다 (Muroga *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 2004).

*Vibrio*균의 동정에는 각종 생화학적 성상 및 항체를 이용한 동정, 분자생물학적 동정법 등이 이용되고 있다. 그러나 생화학 성상 항체 동정법 등은 *Vibrio*속 세균의 정확한 동정에 혼선을 빚고 있다 (Chen *et al.*, 1992). 최근 16S rRNA gene sequence의 비교 분석으로 상호 유연 관계를 이용하는 분자 분류학적 방법들도 있지만 (Amann *et al.*, 1995). 계통 발생학적으로 염기 서열이 유사함으로 근연한 종간에서는 그 유전적 다양성이 부족하여 (Krawiec and Riley, 1990) 속 (genus) 단위까지의 동정은 가능하지만 종 동정에는 부적합한 것으로 알려져 있다 (Kim *et al.*, 2005). 그러나 16S-23S rRNA intergenic space (IGS)는 종 특이적인 염기 서열을 가졌기에 상대적으로 변이도가 크고 (Barry *et al.*, 1991). 또한, IGS는 염기 서열뿐만 아니라 길이도 종간에 차이가 있어 가까운 관계의 종도 동정이 가능하다고 하였다 (Gurtler and Stanisich, 1996). *Vibrio*속 세균 중 16S-23S IGS의 연구는 *V. cholerae*, *V. mimicus* (Chun *et al.*, 1999), *V. parahaemolyticus* (Maeda *et al.*, 2000), *V. costicola*, *V. diazotrophicus*, *V. fluvialis*, *V. nigripulchritudo*, *V. proteolyticus*, *V. salmonicida*, *V. splendidus*, *V. tubiashii* (Simon *et al.*, 2002) 등의 여러 종에서 보고되었다. 그러나 *V. ichthyenteri*에 관한 16S - 23S rRNA IGS의 염기 서열은 아

직 GenBank에 등재되어 있지 않다.

본 연구에서는 낚치 미성어에서 분리한 *V. ichthyenteri* 그룹과 장관백탁증 낚치 자어의 참조 균주 그룹에 대하여 미생물학적 관점에서 각종 생리학적 성상, 생화학적 성상 및 유전자형을 비교 하였다.

## 재료 및 방법

### 시험 균주

본 실험에 사용한 총 19개의 시험 균주는 2002년부터 2004년까지 제주도, 동해 및 남해 등 여러 양식장에서 질병의 증상을 보이는 낚치에서 분리된 것이며 이에 대한 정보는 Table 1, 2에 나타내었다. 분리균은 1.5% NaCl 첨가 TSA와 TCBS에 희석 도말한 후 25°C, 24시간 배양 하였다.

참조 균주는 일본 Hiroshima University에서 제공받은 *V. ichthyenteri* FH8804와 우리나라에서 장관백탁증에 걸린 낚치 자어로부터 분리된 *V. ichthyenteri* FK-3 (Kim *et al.*, 2004), 그리고 한국미생물보존센터 (Korea culture center of microorganisms, KCCM)에서 분양받은 *V. ichthyenteri* ATCC 700023 (KCCM 40870, F-2)이었다.

### 배양 성상

#### 1) 염분 농도별 발육 시험

1% peptone으로 만든 alkali-peptone 수 배지를 염분 농도 0, 0.5, 1, 3, 6, 8% 되게 준비하고 시험 균주와 참조 균주 각각의 MacFarland No. 3 (OD<sub>540nm</sub> = 1.0) 농도로 조정 한 후 40  $\mu$ l 씩 접종하여 25°C, 24시간 배양하고 발육 유무는 육안적으로 관찰되는 혼탁도로써 판정하였으며, 또한 파장 540 nm에서 흡광도 값을 측정하였다.

#### 2) 온도별 발육 시험

상기의 농도로 조정 한 시험균과 참조 균주를 1.5% NaCl 첨가 alkali-peptone 수 배지에 40  $\mu$ l 씩 접종하여 4, 10, 15, 25, 35, 40°C에서 24시간

**Table 1.** The origin of isolated strains used in this study

Strains		Origin of bacteria		
Isolated strains (n=9)	Vic-CS1	Liver	2003. 08	Wando
	Vic-CS2	Kidney	2003. 07	Ulsan
	Vic-CS3	Kidney	2003. 07	Jeju
	Vic-CS4	Kidney	2003. 07	Jeju
	Vic-CS5	Kidney	2003. 06	Jeju
	Vic-CS6	Kidney	2003. 06	Jeju
	Vic-CS7	Mouth	2003. 06	Gochang
	Vic-CS8	Kidney	2002. 08	Jeju
	Vic-CS9	Kidney	2002. 08	Wando
Reference strains (n=3)	FH8804	Hirosima University		
	FK-3	Kim et al. (2004)		
	F-2	ATCC 700023 (KCCM 40870)		

**Table 2.** The clinical signs of diseased fish used for bacteria isolation

Strains	Clinical sign	
Isolated strains (n=9)	Vic-CS1	Gill anaemia, liver and spleen atrophy, intestine hemorrhage
	Vic-CS2	Liver hyperemia, spleen and kidney atrophy
	Vic-CS3	Fins corrosion, liver hemorrhage spleen and kidney hypertrophy
	Vic-CS4	Fins corrosion, abdominal swelling, liver hemorrhage, spleen and kidney hypertrophy
	Vic-CS5	Skin ulcer, abdominal swelling, liver and kidney hypertrophy
	Vic-CS6	Skin ulcer, abdominal swelling, kidney hypertrophy
	Vic-CS7	Mouth ulcer, skin ulcer with scuticociliatosis
	Vic-CS8	Skin ulcer, abdominal swelling, kidney hypertrophy
	Vic-CS9	Liver hyperemia
Reference strains (n=3)	FH8804	Intestinal necrosis
	FK-3	Intestinal necrosis
	F-2	Intestinal necrosis

배양하고 발육 유무는 상기법으로 측정하여 판정하였다.

#### 생화학적 성상 검사

생화학 시험 항목은 oxidase test (cytochrome

oxidase), citrate 이용능 (Simmon's citrate agar), nitrate 환원능, Kovacs' indole test, methyl red test, Voges-Proskauer test와 탄수화물 분해 시험으로서 arabinose, glucose, sorbitol, raffinose, sucrose, salicin, lactose, inositol, maltose, mannose, manni-

**Table 3.** The origin of *V. ichthyoenteri* strains used for 16S-23S IGS pattern analysis

Strains (n=10)	Origin of bacteria		
	Weight (g)	Month	Location
Vic-CS04'1	220	June	Jeju
Vic-CS04'2	340	June	Jeju
Vic-CS04'3	10	June	Jeju
Vic-CS04'4	1350	June	Jeju
Vic-CS04'5	70	June	Ulsan
Vic-CS04'6	310	July	Uljin
Vic-CS04'7	60 dph*	Aug	Jeju
Vic-CS04'8	55	Aug	Jeju
Vic-CS04'9	62	Aug	Haenam
Vic-CS04'10	186	Aug	Haenam

\*, days post hatching.

tol 및 melibiose 등의 당 분해능을 조사하였다. 그리고 lysine 과 ornithine에 대한 decarboxylase 시험과 arginine에 대한 dehydrolase 시험을 실시하였으며 novobiocin 시험과 TCBS에서의 colony 성상을 관찰하였다.

### 16S-23S rRNA intergenic space (IGS) 분석

#### 1) genomic DNA의 분리

Table 1에 나타낸 참조 균주와 분리 균주는 High pure PCR template preparation kit (Roche)를 사용하여 genomic DNA를 분리하였다.

이외에도 2004년도 분리 균주로서 생화학 성상이 *V. ichthyoenteri*와 일치하는 10개의 분리 균주를 대상으로 DNA를 분리하여 이후 실험에 사용하였다 (Table 3).

한편, *V. ichthyoenteri*와 각종 *Vibrio*속 세균의 16S-23S IGS patterns을 알아보기 위하여 사용한 참조 균주는 Table 4와 같다.

#### 2) 16S-23S rRNA IGS 증폭을 위한 PCR primer

제작

IGS를 증폭시키기 위하여 사용한 primer는

Gurtler 등 (1996)이 제안한 primer를 일부 변형한 것으로서 5'-GCG CTG GAT CAC CTC CTT T-3' (*E. coli* 16S rRNA 부분의 1523~1540 bp)과 5'-TGC CAA GGC ATC CAC CGT T-3' (23S rRNA 부분의 21~38 bp)을 주문 제작 (Bioneer, Korea)하여 사용하였다.

#### 3) PCR amplification

PCR은 PCR premix (Bioneer)를 사용하여 thermal cycler (Perkin-Elmer)로 수행하였다. PCR 증폭산물은 2% agarose gel에서 전기영동하고 PCR 반응 산물은 PCR product purification kit (Bioneer)로 정제하여 pGEM T easy vector system (Promega)을 이용하여 ligation하였다. 재조합된 plasmid DNA는 alkaline lysis 법으로 추출하였다.

#### 4) DNA sequencing

Plasmid DNA를 추출한 후 automatic sequencer (ABI 377, USA)로 염기 서열을 분석하였다.

#### 5) 염기 서열의 비교 분석

16S-23S IGS 염기 서열은 Clustal W (ver. 1.71) program을 이용하여 multiple alignment하였으며,

**Table 4.** The reference strains used for comparison of 16S-23S IGS patterns

	Reference strain	Reference strain	
<i>Vibrio alginolyticus</i>	KCTC 2928	<i>Vibrio mimicus</i>	ATCC 33653
<i>Vibrio anguillarum</i>	ATCC 19264	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 33844
<i>Vibrio carchariae</i>	ATCC 35084	<i>Vibrio penaeicida</i>	KH-IG
<i>Vibrio campbellii</i>	ATCC 25920	<i>Vibrio vulnificus</i>	ATCC 27562
<i>Vibrio diazotrophicus</i>	ATCC 33466	<i>Photobacterium damsela</i> ssp. <i>damsela</i>	ATCC 33539
<i>Vibrio fluvialis</i>	ATCC 33809	<i>Aeromonas salmonicida</i>	MT004
<i>Vibrio logei</i>	ATCC 29985		

IGS 유전자의 구성은 tRNA scan-SE program을 사용하여 tRNA gene을 확인하였다.

해독한 염기 서열은 Genetyx program을 사용하여 조합하였으며 National Center for Biotechnology Information (NCBI)에서 제공되는 BLAST program으로 이미 밝혀져 있는 균주들의 16S-23S rRNA intergenic space (IGS)와 비교 분석하였다.

## 결 과

### 1. 시험 균주의 생리학적 및 생화학적 성상

Table 5에는 자어 유래 참조 균주와 9개의 미성어 유래의 시험 균주를 대상으로 배양 성상, 즉 염분 농도별, 온도별 발육 시험과 각종 생화학적 성상 시험 결과를 나타내었다.

염분 농도별 발육 시험 결과 참조 균주와 9개의 분리 균주는 2 ~ 3% NaCl 첨가 peptone 수에서 잘 증식하였고 1 ~ 6% NaCl 첨가 peptone 수에서 자랐다. 그리고 F-2는 약한 증식을 보였지만, 그 외 균주들은 모두 잘 증식하는 것으로 나타났다. Vic-CS2, Vic-CS3, Vic-CS4, Vic-CS7, Vic-CS9 균주는 8% NaCl에서도 약한 증식을 볼 수 있었다.

온도별 발육 시험에서 모든 시험 균주가 25 ~ 30°C에서 발육하였지만 10°C이하와 35°C이상에서는 발육하지 못하여 25°C전후가 최적의

조건인 것으로 나타났다.

생화학적 성상 시험에서 3개 참조 균주와 9개의 분리 균주의 결과는 거의 모든 시험에서 일치하였지만 F-2, Vic-CS5, Vic-CS6는 sucrose 이용능이 음성으로 나타났으며 TCBS 배지상에서 green colony를 형성하였고 Vic-CS5은 TCBS 배지에서 잘 자라지 않았다. 여러 가지 가수분해 효소 활성 측정에서는 모든 균주가 활성이 거의 없는 것으로 나타났다. 당 분해 시험에는 fructose, glucose, maltose, mannose 및 trehalose는 양성이고 그 외 시험 항목은 모두 음성으로 나타났다.

### 2. 시험 균주의 16S-23S rRNA intergenic space (IGS) 분석

#### 2.1. IGS 분석을 위한 PCR 결과

19개의 분리 균주와 *V. ichthyoenteri* 참조 균주 및 13종의 다양한 균종에서 DNA를 분리한 후 16S rRNA 부분과 23S rRNA 부분의 보존적인 염기 서열을 primer로 사용하여 PCR을 한 결과를 Fig. 1 (Table 1의 분리 균주), Fig. 2 (Table 3의 분리 균주), Fig. 3 (Table 4의 참조 균주)에 나타내었다. 참조 균주와 분리 균주는 모두 4개의 major band (IGS-1, IGS-2, IGS-3, IGS-4)를 형성하였으며 각각의 band size는 Table 6과 같다. 참조 균주와 분리 균주들은 동일한 PCR product

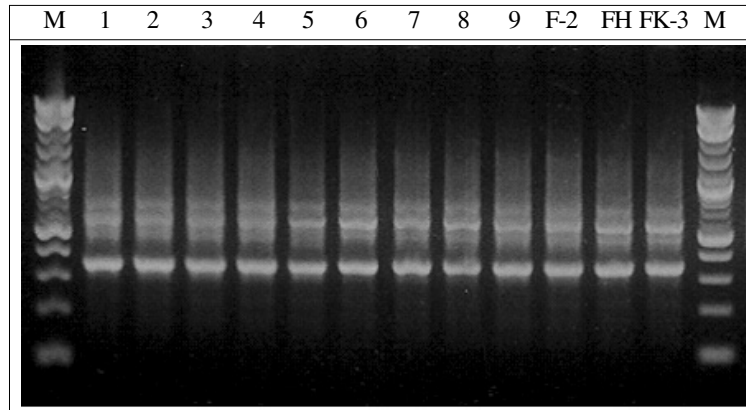


Fig. 1. Amplification of 16S-23S intergenic spacer of the isolated strains (lane 1~9) and reference *V. ichthyenteri* strains (F-2, FK-3, FH-8804). M, size marker; 1, Vic-CS1; 2, Vic-CS2; 3, Vic-CS3; 4, Vic-CS4; 5, Vic-CS5; 6, Vic-CS6; 7, Vic-CS7; 8, Vic-CS8; 9, Vic-CS9.

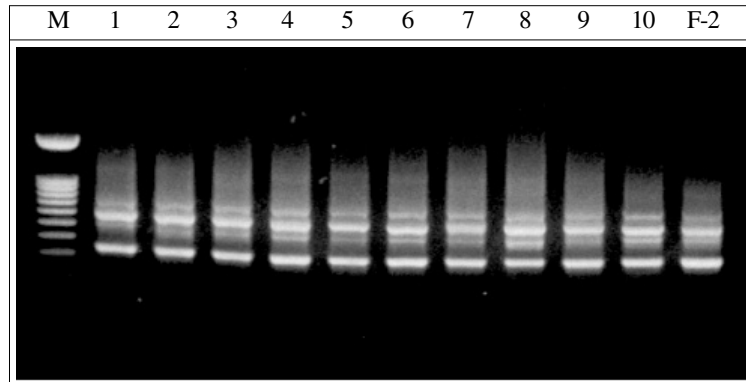


Fig. 2. Amplification of 16S-23S intergenic spacer of *V. ichthyenteri* strains isolated in 2004 and reference strains (F-2). M, size marker; 1, Vic-CS04'1; 2, Vic-CS04'2; 3, Vic-CS04'3; 4, Vic-CS04'4; 5, Vic-CS04'5; 6, Vic-CS04'6; 7, Vic-CS04'7; 8, Vic-CS04'8; 9, Vic-CS04'9; Vic-CS04'10.

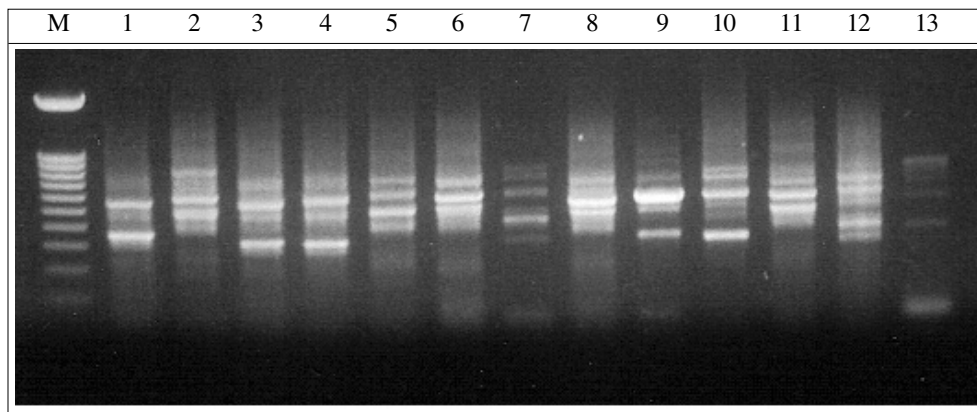


Fig. 3. Amplification of 16S-23S intergenic spacer of other bacteria species. M, 100 bp ladder; 1, *V. alginolyticus*; 2, *V. anguillarum*; 3, *V. carchariae*; 4, *V. compbellii*; 5, *V. diazotrophicus*; 6, *V. fluvialis*; 7, *V. logei*; 8, *V. mimicus*; 9, *V. parahaemolyticus*; 10, *V. penaeicida*; 11, *V. vulnificus*; 12, *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*; 13, *Aeromonas salmonicida*.

**Table 5.** Biochemical and physiological characteristics of the tested strains<sup>a</sup>

Characteristics	Isolated strains									Reference strains		
	Vic- CS1	Vic- CS2	Vic- CS3	Vic- CS4	Vic- CS5	Vic- CS6	Vic- CS7	Vic- CS8	Vic- CS9	F -2	FH-8 804	FK -3
Gram stain	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fermentation of glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gas production of glucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Simmon ' citrate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Methyl red	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Voges-Proskauer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ONPG <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hydrolysis of												
Casein	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Starch	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Decarboxylase production												
Lysine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ornithine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dehydrolase production												
Arginine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at												
4 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
35 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at NaCl (%)												
0 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.5 %	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2 %	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
3 %	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
6 %	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8 %	-	+(w)	+(w)	+(w)	-	-	+(w)	-	+(w)	-	-	-

(continued)

Characteristics	Isolated strains									Reference strains		
	Vic- CS1	Vic- CS2	Vic- CS3	Vic- CS4	Vic- CS5	Vic- CS6	Vic- CS7	Vic- CS8	Vic- CS9	F-2	FH-8 804	FK-3
Acid production from												
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Cellobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
myo-Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Mannitole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sucrose	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Novobiocin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TCBS	Y	Y	Y	Y	N	G	Y	Y	Y	G	N	Y

<sup>a</sup>All tests except the growth test on temperature were performed at 25 °C; <sup>b</sup>ONPG, o-nitrophenyl-D-galactopyranoside; S, susceptible; Y, yellow colony; G, green colony; N, no growth; W, weak reaction.

pattern을 나타내었다. 이에 비해 다른 *Vibrio*속 12종과 1종의 *Aeromonas salmonicida* 균에서 보이는 PCR product pattern은 세균 종 특이성으로 인한 band size 뿐만 아니라 band 개수에서도 큰 차이를 보였다.

### 3.2. IGS의 염기 서열 분석

Table 6에 나타난 4 groups의 band 중 IGS-1, 2

및 3에 해당하는 각 균주의 증폭산물을 절취하여 PCR products를 cloning하고 sequencing한 결과, 분리 균주 및 참조 균주는 3가지 형태의 IGS로 구분할 수 있었다. 즉, Group IGS-1은 tRNA를 가지고 있지 않은 IGS gene, Group IGS-2는 tRNA<sup>Glu(TTC)</sup>, Group IGS-3은 두 개의 tRNA 즉 tRNA<sup>Ile(GAT)</sup>와 tRNA<sup>Ala(TGC)</sup>를 coding하는 IGS gene으로 확인되었다.



**Table 6.** Band sizes of IGSs PCR product

	Strain	Group of band size (bp)			
		IGS-1	IGS-2	IGS-3	IGS-4*
Isolated strains (n=6)	Vic-CS3	354	461	613	750
	Vic-CS5	354	461	613	750
	Vic-CS6	354	461	613	750
	Vic-CS7	354	461	613	750
	Vic-CS8	354	461	613	750
	Vic-CS9	354	461	613	750
Reference strains (n=3)	FK-3	354	461	613	750
	FH-8804	354	461	613	750
	F-2	354	461	613	750

\*, approximately.

```

ATACGATGAT TACTCACGAT GAGTGTCCAC ACAGATTGAT GGTTTTGAGG TTTTAAACCT 60
CGAGCTATTA TTGCTCTTTA ACAATTTGGA AAGCTGACTG ATAACAACAT TGTTGTTATC 120
AAAAAAAGTT CTCAATGTTT ATCTTTAAGA TAAACAACAA AAAACACATT CAAGTGTCT 180
TGGCAATATC ATCATTTAAT GATGATTATT CGAAATTGAG TCCGGCAAAA TCGAACGTCT 240
CTCACTCATA AAATAGAGAG ACAACTTGGT TGTTTAACGA AACTCCTTCG GGTGTATGG 300
TTAAGTGACT AAGCGTAC
    
```

Fig. 4. Nucleotide sequence of ISR-1 gene (strain Vic-CS3). No tRNA encoding gene.

```

ATACGATGAT TACTCACGAT GAGTGTCCAC ACAGATTGAT ATGTTTATAA AGTTTAAGAG 60
TTAACTAGTG TCCCGTTCGT CTAGAGGCCT AGGACACCGC CCTTTCACGG CGGTAACAGG 120
GGTTCGACTC CCCTACGGGA TACCATCTTT AAGCATTCTT TAGGTAATAA CCTATTTGAG 180
AGTTTTTAAA AATGGTTAGT TTCTTTTGAA ACAAACTTGC TCTTTAACAA TTTGAAAGC 240
TGACTGATAA CAACATATTG TTATCAAAAA AAGTTCTCAA TGTTACCTTA AGGTAACAC 300
CAAAAAACA CATTCAAGTG TTCTTGCAA TCATCATTTA TTGATGATTA TTCAAATTGA 360
GTCCGGCAAA ATCGAACGTC TCTCACTCAT AAAATAGAGA GACAACTTGG TTGTTAACG 420
AAACTCTTC GGGTTGTATG GTTAAGTGAC TAAGCGTACA
    
```

Fig. 5. Nucleotide sequence of ISR-2 gene (strain Vic-CS3). Region encoding tRNA molecules are boxed: tRNA<sup>Glu(TTC)</sup>.

ATACGATGAT	TACTCAOGAT	GAGTGTCCAC	ACAGATTGAT	AAGTTTATAA	AGTTTAAAGAG	60
ACGATACTGG	GTCTGTAGCT	CAGGTGGTTA	GAGCGTTCGC	CTGATAAGCG	AGAGGTCGGT	120
GGTTCGAGTC	CACTCAGACC	CACCAATTCC	CTTCCCAAGG	AATTGGCACA	CAGTATCGAC	180
ACCTGATGGG	GCTATAGCTC	AGCTGGGAGA	GCGCCTGCCT	TGCACGCAGG	AGGTCTGCGG	240
TTCGATCCCG	CATAGCTCCA	CCATCTTTAA	GCGCATTTAC	TTTTGAATAG	AAAGTTGAGT	300
GTTTTTAAAA	ATGGTTTTCA	TCAGAAAATC	TAGCTCTTTA	ACAAATTTGA	AAGCTGACTG	360
ATAACAACAT	TGTTGTTATC	AAAAAAGTT	CTCAATGTTT	ATCTTTAAGA	TAAACACCAA	420
AAAACACATT	CAAGTGTCT	TGGCAATATC	ATCATTATG	ATGATTATTC	GAAATTGAGT	480
CCGGCAAAT	CGAACGTCTC	TCACTCATAA	AATAGAGAGA	CAACTTGTT	GTTTAACGAA	540
ACTCCTTCGG	GTTGTATGGT	TAAGTGACTA	AGCGTAC			

Fig. 6. Nucleotide sequence of ISR-3 gene (strain Vic-CS4). Region encoding tRNA molecules are boxed; tRNA<sup>Ile(GAT)</sup> and tRNA<sup>Ala(TGC)</sup>.

모든 분리 균주들의 IGS-1, 2 및 3 genes은 *V. ichthyenteri* 참조 균주인 F-2와 99.06~100%로 일치하였다 (Fig. 4, 5, 6).

## 고 찰

2002부터 2004년까지 우리 나라의 해수 양식 어류에서 어병 세균을 분리 조사한 결과 어종별로는 넙치에서의 세균 분리 빈도가 제일 높았다. 어병 세균 중에서는 특히 vibrio속 세균이 높은 비율을 차지하고 매년 증가하는 추세이며 그 중 넙치 자어기에 장관백탁증을 일으키는 것으로 알려져 있는 *V. ichthyenteri*가 지역에 따라서는 33% 높은 분리 비율과 출현 빈도를 나타내었다. 특히 자어가 아닌 미성어 넙치에서 *V. ichthyenteri*가 분리되는 예는 잘 알려져 있지 않으며 이들이 넙치 자어의 장관백탁증이나 미성어에 미치는 영향 등은 어병학적으로 중요한 의미를 가진다.

본 연구에서는 미성어 넙치에서 분리된 *V. ichthyenteri*와 장관백탁증 넙치 자어에서 분리된 *V. ichthyenteri*의 어병 미생물학적 특성을 비교하기 위하여 두 그룹간의 생화학적 성상 및 분자생물학적 성상 등을 시험 분석하였다.

시험 결과, 시험 균주간에는 분리 유래가 달라 도 생화학적 성상은 거의 동일하게 나타났다. 온도와 염분 농도에 따른 발육 성상의 비교는 세균을 분류하는 요소로서 매우 유용하며 특히, *Vibrio* sp.의 분류에서 0% 염분 농도와 4°C에서의 발육 유무는 중요한 지표로 이용된다 (Brant *et al.*, 1986; Alsian and Blanch, 1994). 모든 시험 균주는 NaCl 0%와 4°C에서는 발육하지 않았다. NaCl 0.5% 첨가 pepton 수에서는 참조 균주 F-2는 약한 증식을 하는 반면 미성어에서 분리된 균주들은 모두 증식하는 것을 볼 수 있었으며 7개의 시험 균주들은 8% NaCl 첨가 pepton 수에서도 약하게나마 발육하여 균주에 따라 발육성상에 차이가 있음을 알 수 있었다. 본 연구에서 미성어로부터 분리한 균주들은 일본 유래 (Masumura *et al.*, 1989) 균주보다 발육 가능한 염분 농도 범위가 넓은 특성을 보였는데 대상인 넙치의 크기나 분리 지역이 다양한 것과도 관련이 있을 것으로 생각된다.

본 실험을 통하여 수온 25°C전후일 때, 염분 2~3%가 *V. ichthyenteri*의 최적의 배양 조건인 것으로 나타났으며 이러한 특성은 이전의 연구 결과 (Murata, 1987; Masumura *et al.*, 1989; Muroga *et al.*, 1987, 1990; Ishimaru *et al.*, 1996)와 일치

하였다.

*Vibrio* 속 세균의 동정은 일반 세균과는 달리 생화학적 성상이 다양하여 (Diggle *et al.*, 2000), 정확한 동정을 위해서는 분자생물학적 동정법이 이용된다 (Osorio and Toranzo, 2002). 그렇지만 *Vibrio* 속 세균은 16S rRNA 부분이 매우 유사하게 나타나므로 16S rRNA의 염기 서열 분석만으로는 질병의 원인체를 정확하게 동정하는 것이 어렵다 (Krawiec and Riley, 1990). 반면 intergenic space (IGS)라 불리는 부분은 종마다 구분되는 특징적인 염기 서열을 가지므로 16S-23S rRNA IGS는 16S rRNA에 비해 종 특이성이 높은 염기 서열을 가진다 (Barry *et al.*, 1991). 또한 IGS는 염기 서열뿐만 아니라 길이도 종간에 차이를 보이므로 이 부분을 이용하여 가까운 관계의 종도 동정이 가능하다고 하였다 (Gurtler and Stanisich, 1996). 따라서 종별 특이성이 높게 나타나는 16S-23S rRNA intergenic space의 염기 서열을 분석하는 방법이 *Vibrio* 종의 동정에 적합할 것으로 생각된다. 본 연구 결과에서 16S-23S IGS의 pattern은 특이적이고 아직까지 *V. ichthyoenteri* 16S-23S IGS의 염기 서열은 GenBank에 등록되어 있지 않지만 3개 자어 유래 참조 균주와 19개 미성어 유래 분리 균주간의 상동성은 99.1~100%로 일치하고 다른 vibrio 종과는 약 70% 이하의 낮은 상동성을 나타내었기에 분리 균주를 *V. ichthyoenteri*로 동정할 수 있었다. 그리고 16S-23S IGS pattern의 4개 major band에 포함되어 있는 3개의 tRNA 유전자를 밝혀내었다. Moon *et al.* (2004)은 *V. ichthyoenteri*의 IGS는 tRNA gene 없는 no type 만을 보고하였지만, 본 연구에는 no-tRNA, tRNA<sup>Glu(TTC)</sup> 그리고 tRNA<sup>Ile(GAT)</sup>와 tRNA<sup>Ala(TGC)</sup>를 coding하는 3 가지 이상의 tRNA type이 있음을 밝혔다. 이러한 유전학적 특성은 종간의 동정에 이용될 뿐만 아니라 신속 검출법 연구에 특이 primer 기초 자료로 될 수 있을 것으로 생각한다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, *V. ichthyoenteri*가 넙치의 전 육성 과정에서 높은 검출율을 나타내

며, 분리 유래와는 무관하게 모두 동일한 특성을 지니는 것을 확인하였다.

## 요 약

2002년에서 2004년에 걸쳐, 우리 나라의 넙치 양식장에서 질병의 증상이 보이는 중간 육성 단계의 넙치를 대상으로 다수의 *Vibrio* 속 세균을 분리 동정하였으며 그 중에서 *V. ichthyoenteri* 균이 높은 비율을 차지하고 있었다. 일반적으로 *V. ichthyoenteri*는 넙치의 자어기 장관백탁증의 원인균으로 잘 알려져 있으며, 미성어의 병어로부터 분리되었다는 점에서 여러 크기의 넙치 및 종묘 생산에 미치는 영향을 알고자 하였다.

본 연구는 미성어 넙치에서 분리된 균주그룹과 장관백탁증에 걸린 넙치 자어에서 분리한 *V. ichthyoenteri* 참조 균주 두 그룹간의 생화학적 및 생리학적 성상, 유전학적 특성을 비교 분석함으로써 분리 균주를 *V. ichthyoenteri*로 동정하고, 이들의 어병학적 특성을 조사하였다.

실험 결과 시험 균주와 참조 균주간의 생화학적 특성과 생리학적 성상이 거의 동일한 것으로 나타났다.

본 연구에서 분리 균주와 참조 균주의 16S-23S rRNA intergenic space (IGS) region을 cloning하여 염기 서열을 분석한결과 3개의 참조 균주와 19개의 분리 균주들은 *V. ichthyoenteri* 참조 균주와 99.1 ~ 100% 동일하였으며 *V. ichthyoenteri*는 3개 이상의 PCR products를 보였다. 이들 각각에 대한 tRNA type을 분석한 결과, no-tRNA, tRNA<sup>Glu(TTC)</sup> type 그리고 tRNA<sup>Ile(GAT)</sup>와 tRNA<sup>Ala(TGC)</sup>를 coding 하는 3 가지 tRNA type을 밝혔다.

## 참 고 문 헌

Alsian, M. and Blanch, A. R.: A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. J. Appl. Bacteriol., 76: 79-85,

- 1994.
- Amann, R. I., Ludwig, W. and Schleifer, K. H.: Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59: 143-169, 1995.
- Barry, T., Colleran, G., Glennon, M., Dunican, L. K. and Gannon, F.: The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. *PCR Methods and Applications*. 1: 51-56, 1991.
- Brant, T. N., Lee, J. V., West, P. A. and Colwell, R. P.: Numerical classification of species of *Vibrio* and related genera. *J. Appl. Bacteriol.*, 61: 437-467, 1986.
- Chen, D., Hanna, P. J., Altmann, K., Smith, A., Moon, P. and Hammond, L. S.: Development of monoclonal antibodies that identify *Vibrio* species commonly isolated from infections of humans, fish and shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 3694 - 3700, 1992.
- Chun, J. A. H. and Colwell, R. R.: Analysis of 16S/23S rRNA intergenic Spacer Regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 2202-2208, 1999.
- Diggles, B. K., Carson, J., Hine, P. M., Hickman, R. W. and Tait, M. J.: *Vibrio* species associated with mortalities in hatchery-reared turbot (*Colistium mudipinns*) and brill (*C. guntheri*) in New York, pp. 1-36, 2000.
- Gurtler, V. and Stanisich, V. A.: New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology*, 142: 3-6, 1996.
- Ishimaru, K., Akagawa-Matsushita, M. and Muroga, K.: *Vibrio ichthyenteri* sp. nov., a pathogen of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) larvae. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46: 155-159, 1996.
- Kim, D. H., Han, H. J., Kim, S. M., Lee, D. C. and Park, S. I.: Bacterial enteritis and the development of the larval digestive tract in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel). *J. Fish Dis.*, 27: 497-505, 2004.
- Kim, S. M., Won, K. M., Woo, S. H., Li, H., Kim, E. J., Choi, K. J., Cho, M. Y., Kim, M. S. and Park, S. I.: *Vibrio* isolated from diseased marine culturing fishes in Korea. *J. Fish pathol.*, 18: 133-145, 2005.
- Krawiec, S. and Riley, M.: Organization of the bacterial chromosome. *Microbiol. Rev.*, 54: 502-539, 1990.
- Maeda, T., Takada, N., Furushita, M. and Shiba T.: Structural variation in the 16S-23S rRNA intergenic spacers of *Vibrio parahaemolyticus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 192: 73-77, 2000.
- Maeda, T., Matsuo, Y., Furushita, M. and Shiba T.: Seasonal dynamics in a coastal *Vibrio* community examined by a rapid clustering method based on 16S rDNA. *Fisheries Sci.*, 69: 385-394, 2003.
- Masumura, K., Yasunobu, H., Okada, N. and Muroga, K.: Isolation of a *Vibrio* sp. the causative bacterium of intestinal necrosis of Japanese flounder larvae. *Fish Pathol.*, 24: 135-141, 1989.
- Moon, Y. G., Park, G. T., Son, H. J., Lee, S. H., Lee, J. M. and Heo, M. S.: Rapid detection of the pathogenic of bacterial white enteritis of larval and juvenile stages in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *J. Fish Pathol.*, 17: 159-169, 2004.
- Murata, O.: Infectious intestinal necrosis in flounder. *Fish Pathol.*, 22: 59-61, 1987.
- Muroga, K.: Viral and bacterial diseases of marine fish and shellfish in Japanese hatcheries.

- Aquaculture, 202: 23-44, 2001.
- Muroga, K., Higashi, M. and Keitoku, H.: The isolation of intestinal microflora of farmed red seabream (*Pagrus major*) and black seabream (*Acanthopagrus schlegeli*) at larval and juvenile stages. Aquaculture, 65: 79-88, 1987.
- Muroga, K., Yasunobu H., Okada, N. and Masumura, K.: Bacterial enteritis of cultured flounder *Paralichthys olivaceus* larvae. Dis. Aquat. Org., 9: 121-125, 1990.
- Nishioka, T., Furusawa, T. and Mizuta, Y.: Diseases occurring in marine fish and shellfish hatcheries in Japan (1989-1994). Suisan Zoshoku, 45: 285-290, 1997.
- Osorio, C. and Toranzo, A.: DNA-based diagnostics in sea farming, p. 253-310. In M. Fingerma and R. Nagahushanam (ed.), Seafood safely and human health. Science Publishers, Inc., Enfield, N. H, 2002.
- Simon, K. Y., Wang, H. Z., Sheran, H. W., Rudolf, S. S. and Richard, Y. C.: Analysis of 16s-23s rDNA intergenic spacers (IGSS) of marine vibrios for species-specific signature DNA sequences. Marine pollution Bulletin, 44: 412-420, 2002.
- 이정백, 노섭, 송춘복: 넙치 *Paralichthys olivaceus* 자어에서 분리한 장관백탁증의 원인균인 *Vibrio* sp. (INFL group) 의 생물학적 및 생화학적 특성. 한국어병학회지, 8: 99-109, 1995.

---

Manuscript Received : June 8, 2006

Revision Accepted : July 25, 2006

Responsible Editorial Member : Jung-Woo Park  
(Ulsan Univ.)