

## 서해안 양식장에서 분리한 *Edwardsiella tarda*의 특이 bacteriophage 특성

이찬흔 · 허용주 · 백민석 · 이정은 · 강지영 · 한미정 · 경서봉 · 최상훈<sup>†</sup>

군산대학교 해양과학대학 수산생명의학과

### Characterization of *Edwardsiella tarda* specific phage isolated from fish farms on west coast of Korea

Chan Heun Lee, Yong Ju Heo, Min Suk Baek, Jung Uen Lee, Ja Young Kang, Mi Jung Han, Se Bong Kyoung and Sang Hoon Choi<sup>†</sup>

Department of Aquatic Life Medicine, Kunsan National University, Jeonbuk 573-400, Korea

*Edwardsiella tarda* is a broadly infectious agent against freshwater and seawater fishes. In the present study, *E. tarda* specific phage was isolated from fish farms on the west coast of Korea, and the effect of environmental factors such as pH and water temperature on the phage activity was investigated. As a fish model, Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) was used and the interaction between *E. tarda* and phage was investigated. The phage activity, in pH test, appeared even higher in seawater than freshwater and was evenly constant up to 50°C. The phage and *E. tarda* were inoculated in tilapia and the phage activity and *E. tarda* viability were checked on the time intervals. As a result, the number of *E. tarda* in the group of *E. tarda* plus phage was constantly reduced to 24 hr post-inoculation compared to the control group without phage, whereas the phage activity was slightly increased in the experiment group. The results suggest that it might be possible to use phage to control the fish disease caused by *E. tarda*.

**Key words** : *Edwardsiella tarda*, Phage, Plaque assay, Tilapia

*E. tarda*는 다양한 해수 및 담수 어종에서 에드워드드 감염증(Edwardsiellosis)을 유발하는 주요한 어류 병원성 세균이며 특히 넙치 등 우리나라 주요양식 어종에서 발생하는 심각한 질병의 원인 균이기도 하다 (Thune *et al.*, 1993). *E. tarda*는 해산어류인 대서양 연어, 넙치, 농어, 송어, 방어, 참돔 및 감성돔 등과 담수어인 잉어, 금붕어, 무지개송어, 틸라피아, 메기, 뱀장어 등에서 검출되었다(Bullock *et al.*, 1985). *E. tarda*가 감염된 넙치의 에드워드드감염증은 복부팽만,

탈장 등의 증상을 나타내고(Kanai, 1993) 간장이나 신장 등에 농창이 형성되어 있으며 때로는 등지느러미 쪽의 근육 내 농이 관찰되기도 한다. *E. tarda*는 식세포에 대한 저항력이 강하므로 백혈구인 호중구 내에서도 증식해 쉽게 치유되지 않으므로 우리나라 넙치양식 산업에 상당한 피해를 입히고 있는 실정이다. *E. tarda*의 발병 기전에 대해서는 아직까지 확실히 밝혀지지 않았으며 정확한 기전을 위한 추가적 연구가 수행되어야 할 것이다(전, 2005).

Twort (1915)의 bacteriophage(이하 파아지)에 대한 연구를 시작으로 d'herelle (1917)가 세균을 용균시키

<sup>†</sup>Corresponding Author: Sang Hoon Choi

Tel : +81-63-469-1886 Fax : +81-63-469-1886

E-mail : shchoi@kunsan.ac.kr

는 파아지 작용을 보고한 이래 다양한 병원균에 대한 파아지가 지속적으로 발견되었다(Adams *et al.*, 1959). 파아지가 박테리아를 죽인다는 성질을 이용한 파아지 요법은 농업적으로 주요한 식물과 동물은 물론 인간에게도 많이 발생하는 박테리아 질병 치료를 위해 최근까지 많은 연구가 진행되어 왔다(Verma *et al.*, 2009; Monk *et al.*, 2010; Rivas *et al.*, 2010). 또한 실질적 항생제 대체제로서의 파아지 요법은 최근 어패류 병원성 세균 등을 대상으로 연구가 진행되고 있으며 어류 생존율을 높이는 데 파아지가 긍정적인 역할을 한다고 보고되고 있다(Park *et al.*, 2010).

본 연구에서는 *E. tarda*에 특이적인 파아지를 자연 생태계에서 순수 분리하여 다양한 물리적 변화에 따른 특성 변화 및 *Tilapia* 체내에서 일어나는 *E. tarda*에 대한 파아지 감수성과 파아지의 증식 특성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. *E. tarda* 동정 및 해수 샘플링

지난해 7~8월 사이에 우리나라의 서해안 및 남해안에 위치한 100여 군데의 양식장에서 물 샘플을 확보하였다. *E. tarda*는 에드워드 감염증을 앓고 있는 병어의 샘플로부터 동정하였다. API20E kit (BioMerieux, France)와 16S rRNA gene을 이용하여 *E. tarda*임을 증명하였다. 16S rRNA gene의 PCR에 사용된 universal primer로서 F, 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3', R, 5'-TACGGYTACCTGTTACGAC-3'을 각각 사용하였다.

### 2. 물 샘플의 여과 및 사용배지

#### 1) 물 샘플의 여과

물 샘플 100 ml을 filter paper (Macherey-nagel,

Germany)를 통해 1차 여과한 후 800 × g에서 30분간 원심분리를 하였다. 원심 분리된 상청액을 0.2 μm 여과지로 2차 여과를 하였으며 0.2 μm 실린지 필터 (Minisart, USA)를 이용해 3차 여과를 실시하였다.

#### 2) 파아지 증식용 액체배지

물 샘플 내의 파아지를 *E. tarda* 표적 세포를 이용하여 증폭시키기 위해 멸균증류수 100 ml당 NaCl (sodium chloride) 1 g, Yeast Extract (Bacto™) 0.5 g 및 Peptone (Bacto™) 1.0 g 되도록 제조한 후 pH 7.5로 조정하여 사용했다.

#### 3) Plaque 형성배지

파아지가 *E. tarda*를 통해 증식되는 역기를 plaque으로 확인하기 위해 멸균증류수 100 ml당 Tryptic Soy Broth(이하 TSB) 3.0 g 및 agar 0.6 g을 넣고 autoclave한 후 cap tube에 5 ml씩 분주하여 사용하였다.

### 3. 파아지 분리 및 저장

물 샘플 20 ml을 기준으로 *E. tarda* 2 μl와 Brain Heart Infusion(이하 BHI) 2 ml을 첨가하여 32 °C에서 배양하였다. 약 12시간 후 박테리아가 증식되지 않는 것이 관찰되면 더 많은 양의 파아지를 증폭시키기 위해 박테리아 5 μl을 더 첨가하여 32 °C에 배양하였다. 이후 *E. tarda*가 더 이상 자라지 않는 것을 확인한 후 파아지가 있는 것으로 추정되는 배양액을 800 × g으로 원심 분리하였으며 상청액을 0.2 μm 실린지 필터로 여과하였다. 여과된 파아지 샘플을 원균주인 *E. tarda* 500 μl가 도달되어 있는 BHI 배지에 접종하여 나타나는 monolayer spot plaque을 관찰하였다. 파아지를 순수 정제하기 위해 autoclave된 Top agar를 *E. tarda*와 파아지가 손상을 받지 않도록 45~50°C의 적정온도를 유지한 상태에서 10<sup>7</sup> colony forming unit (cfu)/ml

의 *E. tarda* 500  $\mu$ l을 첨가하고 100  $\mu$ l의 *E. tarda* 파아지 샘플을 첨가하여 중층배지를 만들었다. Plaque assay를 통해  $10^{14}$  plaque forming unit (pfu)/ml 정도까지 증폭된 파아지를 확인한 후 0.2  $\mu$ m 실린지 필터로 여과하였다. 파아지 샘플과 50% 글리세롤을 1:1로 섞은 후 사용하기 전까지 4°C에 냉장보관 하였다.

#### 4. 음성 염색법에 의한 파아지 형태관찰

구리 grid (200 mesh)에 collodin 지지막을 입히고 진공 증착기로 탄소를 증착한 후 파아지 정제액을 묻혀 10분간 건조시켰으며 2% uranyl acetate-용액으로 10분간 염색하여 건조한 후 전자현미경(HITACHI, USA)으로 파아지의 형태를 촬영을 하였다(Smith *et al.*, 1954; Valentine *et al.*, 1966; Mahy., 1985).

#### 5. 온도 안정성

파아지 샘플 100  $\mu$ l를 기준으로  $10^1$  부터  $10^8$ 까지 희석한 후 4°C, 16°C, 20°C, 36°C 및 50°C의 다양한 온도에서 24시간 배양하였다. *E. tarda* 500  $\mu$ l을 평판 배지에 분주하고 완전히 흡수된 다음 각 배양온도에서 적용된 희석 파아지 샘플을 10  $\mu$ l씩 접종하여 나타나는 spot plaque을 희석배율( $10^n$ ) 대비 파아지의 생존율(%)로 나타내었다.

#### 6. pH 안정성

해수와 담수 및 pH 변화에 따른 파아지의 감수성을 알아보기 위해 pH 2부터 10까지 맞추어 놓은 멸균 담수 및 해수를 이용하여 파아지 샘플 ( $10^{11}$  cfu/ml)을  $10^1 \sim 10^8$  까지 희석한 후 상온에서 24시간 배양하였다. *E. tarda* 500  $\mu$ l를 BHI 배지에 분주하고 완전히 흡수된 다음 다양한 pH조건의 담수 및 해수에서 배양된 파아지 샘플을 10  $\mu$ l씩 접종하여 파아지 샘플의 희석배수( $10^n$ )에서 나타나는 각각의 spot plaque을 비

교 조사하였다.

#### 7. 시간에 따른 파아지의 방출 효과

시간에 따른 파아지의 방출효과를 알아보기 위해 *E. tarda* ( $10^3$  pfu/ml) 1 ml과 파아지 ( $10^{12}$  cfu/ml) 5 ml을 혼합하여 배양하면서 8시간까지 매시간 증폭 양을 중층배지법을 이용한 plaque assay로 측정하였다.

#### 8. 어체 내 *E. tarda*에 대한 파아지의 감수성 조사

*In vitro*에서 *E. tarda*에 대한 파아지의 감수성이 확인되었으나 *In vivo* 상에서 감염된 *E. tarda*를 대상으로 접종된 파아지가 특이적으로 *E. tarda*를 용균시키며 증식하는지 알아보기 위해 실험군 *E. tarda* ( $10^8$  cfu/ml)와 파아지 ( $10^{14}$  pfu/ml)를 각각 동시에 100  $\mu$ l씩 tilapia의 복강에 주사하였다. 대조군으로서는 *E. tarda* ( $10^8$  cfu/ml)와 BHI 배지를 각각 100  $\mu$ l씩 복강 주사하였다. 주사 후 0, 4, 8, 12, 16, 20 및 24시간째 모든 장기를 추출하여 *E. tarda*의 감염도와 파아지의 증폭 양을 조사하였다. 각 그룹당 사용된 tilapia 수는 3미씩이었으며 총 21미가 사용되었다. 추출된 tilapia의 모든 장기에 멸균증류수 2 ml을 혼합하여 균질화 시켰으며  $1000 \times g$ 에서 30분간 원심 분리하였다. 파아지의 역가를 확인하기 위하여 실험군의 상청액을 수거하여 chroloform 500  $\mu$ l을 첨가하고 vortexing한 후  $1000 \times g$ 에 원심분리를 하였다. 상청액을 수거해서 상온에 하루 보관 후 plaque assay를 이용하여 파아지의 역가를 확인하였다. *E. tarda*의 감소량 및 증가량을 확인하기 위하여 실험군과 대조군의 고형물에 2 ml의 멸균증류수를 혼합하고 멸균된 천으로 걸러내었다. 추출된 용액 속의 *E. tarda* 역가는 Salmonella Shigella agar(이하 SS)에 배양시켜 확인하였다.

## 9. 통계 분석

유의성 점검은 PRIMER (Mc Graw-Hill, Inc., ver. 1.5)의 one way analysis of varince를 이용하여 평균과 표준편차(mean±S.D.)를 측정하였다.  $P < 0.05$ 일 경우 유의성이 있는 것으로 간주하였으며 Student-Newman-Keuls test로 각 군사이의 유의성을 검정하였다.

## 결과 및 고찰

안구돌출과 복부팽만 등의 전형적인 에드워드 감염 증세를 보인 서해안 양식 넙치 샘플에서 *E. tarda*를 분리하였으며 SS배지에서 집락 중심부에 검은색을 보였고 API20E 검사 결과 *E. tarda*로 동정되었다. 또한 DNA 염기서열을 분석한 결과 NCBI에 등록된 *E. tarda* (FL6-60)와 99.8% 유사성이 있는 것으로 확인되었다.

Fig. 1은 *E. tarda* 파아지에 대한 사진으로서 파아지의 두부는 둥근 마름모 모양을 하고 있으며 짧은 미부형태는 것으로 관찰되었다. 두부와 미부는 각각 80 nm와 20 nm로 관찰이 되었으며 파아지 형태상 podoviridae 과에 속하는 바이러스로 추측된다.

Fig. 2A은 해수에서 분리한 *E. tarda*에 특이적인 파아지 샘플 10  $\mu$ l를 monolayer spot으로 파아지에 의해 *E. tarda*가 용균되어 나타나는 맑고 투명한 둥근 원형의 plaque을 보여주고 있다. Fig. 2B는 분리된 파아지와 *E. tarda*를 혼합하고 12시간 증폭시킨 다음 파아지를  $10^3$ 까지 희석하여 monolayer spot으로 관찰한 plaque이다. 그람 음성균주인 *E. tarda*에 특이적인 파아지의 감염특성은 양성 균주에 대한 용원성 파아지의 특성과는 다르게 plaque에 박테리아의 잔여물이 미량 남아있는 것으로 관찰되었다. 또한 BHI 액체 배지에 자란 *E. tarda*에 파아지를 감염시킨 결과 약 1주일 후에도 균주가 남아 있는 것으로 확인이 되었다

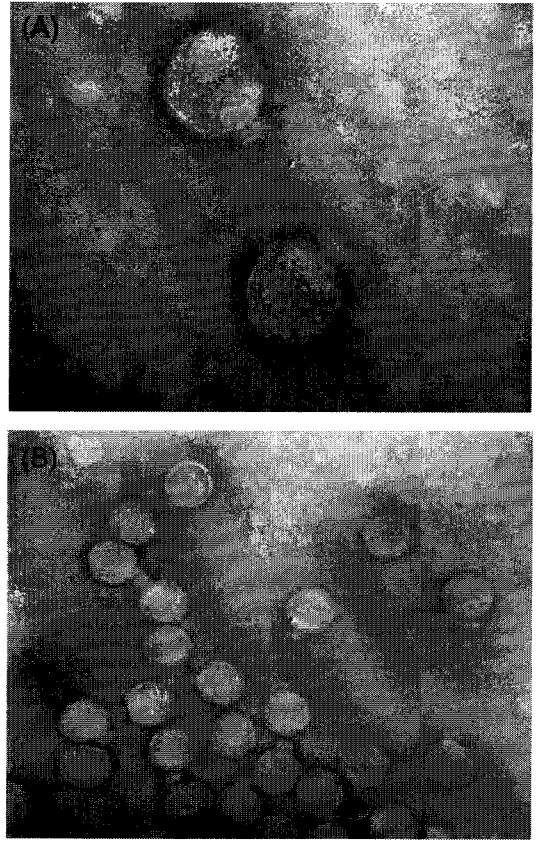


Fig. 1. Transmission electron micrographs of *E. tarda* phage. Scale represents 50 nm (A) and 100 nm(B)

(data not shown). 이러한 결과는 예상 외였으며 본 실험실에서 기존에 동정된 양성균주의 일종인 *Mycobacterium sp.*에 대한 파아지와는 확연한 차이를 보였다. 그 이유로는 *E. tarda*가 표현하는 특유의 Lipopolysaccharide (LPS)와 outer membrane proteins (OMPs)가 파아지의 감염을 저해하는 인자들로 작용될 수 있을 것으로 추측되며(Kumar *et al.*, 2007) 한편으로 파아지 resistant mutant로서의 가능성을 고려해 볼 수 있다(Park *et al.*, 2000). *E. tarda*의 파아지 resistant mutant로의 형질전환 가능성 및 생체 내에서 파아지에 의해서든 그렇지 않은 변형된 *E. tarda*의 감염성 유무 등에 대해 더욱 연구되어야 할 필요성이 있다.

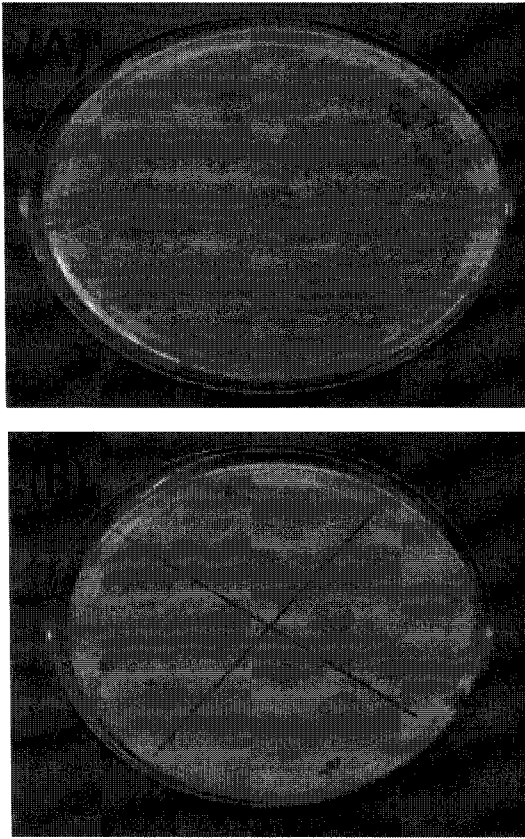


Fig. 2. The plaques by *E. tarda* specific phage isolated from sea water (A) and plaques by phage amplified for 12 hr (B).

*E. tarda*에 감염되는 파아지가 한 종류로만 존재하는지 알아보기 위해 서로 다른 크기와 형태의 plaque를 각각 분리하여 plaque assay를 수차례 반복해 본 결과 단일 종으로 확인되었다. 순수 분리된 파아지는 4°C에 저장하면서 필요한 실험에 사용하였다.

Fig. 3는 *E. tarda* 특이적 파아지가 담수와 해수 그리고 pH 조건에 따른 안정성에 대한 결과를 보여준다. 담수에서는 파아지의 활성이 pH 7, pH 8 및 pH 10에서 높은 안정성을 보였으나 해수에서는 pH 4~pH 10까지 넓은 범위에서도 높은 활성을 나타냄을 알 수 있었다. 그러나 같은 pH의 범위임에도 불구하고 파아지의 활성은 담수보다 해수에서 최고 2배 정

도 차이가 남을 관찰 할 수 있었다. 또한 해수에서는 비록 pH 2의 낮은 조건에서도 파아지의 활성이 관찰 되었지만 담수에서는 pH 3에서도 전혀 나타나지 않았다. 이러한 결과는 *E. tarda* 특이적 파아지가 적정 pH 범위(pH 4~pH 10)에서 담수보다 해수에서 훨씬 높은 활성을 나타낸다는 사실을 알려준다. 이러한 결과를 토대로 *E. tarda*에 감염되는 해수어를 대상으로 파아지의 높은 활성을 적용시키면 해수어에 대한 *E. tarda*감염의 예방 및 치료에 상당한 효과가 있을 것으로 생각된다.

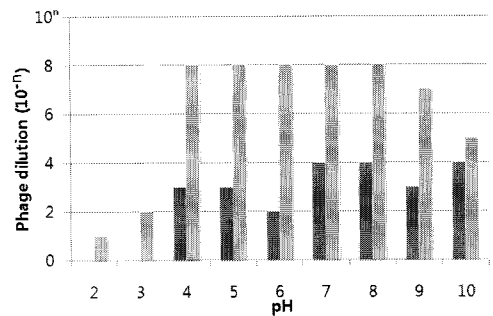


Fig. 3. The effect of fresh and sea water based on various pH values on *E. tarda* specific phage activity. ■, fresh water; □, sea water

주 등(1996)과 같이 파아지의 방출량을 확인하고자 한 대부분의 연구에서는 클로로포름을 사용하였지만 본 연구에서는 클로로포름을 사용하지 않고 자연적으로 *E. tarda*로 부터 방출되는 파아지를 확인하고자 매시간 방출량을 관찰하였다. 처음 접촉한 파아지의 양 (10<sup>3</sup> pfu/ml)은 매시간마다 증가하였으며 특히 7시간째에서 1.2 × 10<sup>7</sup> pfu/ml로 최대 방출량을 보였다(data not shown). Fig. 4는 다양한 배양온도에서의 변화하는 파아지 (10<sup>7</sup> pfu/ml)의 생존율(%)을 보여주고 있으며 50°C에서도 파아지의 활성이 그대로 유지되고 있음을 알 수 있었다. 그러나 60°C에서는

파아지의 활성이 전혀 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 본 연구에서 수확한 *E. tarda* 파아지가 *E. tarda*가 정상적으로 생활할 수 있는 어떠한 범위 내의 온도에서도 감염활성을 잃어버리지 않는다는 사실을 암시해준다. Fig. 3과 4에서의 실험 결과는 *E. tarda* 감염의 예방 및 치료에 있어서 *E. tarda* 특이 파아지를 다양한 환경조건에서도 적용시킬 수 있다는 가능성을 제시해 준다.

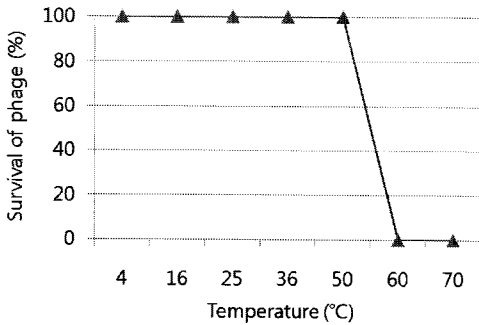


Fig. 4. The effect of various temperatures on the activity of phage specific to *E. tarda*.

파아지를 이용한 병원성 질병의 치료효과를 알아보기 위해 다양한 연구가 시도 되어왔다(Toshihiro *et al.*, 2002; Mzia and Revaz, 2010; Stanford *et al.*, 2010). 어류에 있어서는 Park 등(2000)이 *Pseudomonas plecoglossicida* (*P. plecoglossicida*)가 감염된 ayu (*plecoglossus altivelis*)을 대상으로 *P. plecoglossicida* 특이 파아지를 경구투여 해 본 결과 파아지에 의한 생존율이 향상됨을 보고하였다. 본 연구에서는 *E. tarda*를 감염시킨 후 특이 파아지를 주사요법으로 처리함으로써 시간대별로 tilapia 장기 추출물에 나타나는 *E. tarda*와 파아지의 상관관계를 알아보고자 하였다. Fig. 5는 tilapia 생체 내에 감염시킨 *E. tarda*에 대한 파아지의 감수성에 대한 결과이다. 비록 8시간 외에는 통계적인 유의적 차이를 보이지는 않았지만

반복적인 실험결과 24시간 동안 대조군에 비해 *E. tarda*의 수가 전체적으로 감소됨을 알 수 있었다. Fig. 5에서 보듯이 파아지가 처리된 실험군의 *E. tarda*는 대조군에 비해 4시간째부터 감소되는 것이 확인되었고 8시간째 가장 많은 감소량이 관찰되었다. 그 후 16시간째까지 *E. tarda*의 수가 증가하다 20시간째부터 다시 감소하는 것으로 나타났다. 그러나 24시간 이후 *E. tarda*의 수가 어떻게 변화되는지는 현재 조사 중에 있다.

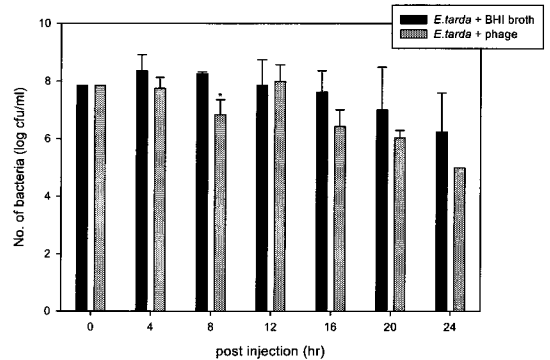


Fig. 5. Interaction of *E. tarda* and *E. tarda* specific phage in tilapia. *E. tarda* and phage were coinoculated into tilapia and the number of *E. tarda* was counted on the time intervals (n=3). Values are mean±S.E., (Asterisk represents statistically significant difference, P < 0.05). 5

Fig. 6는 Fig. 5에서 나타난 *E. tarda* 수의 변화에 따른 파아지 증폭 양을 보여주고 있다. 비록 실험군에서 파아지의 양 (cfu/ml)이 많아 오차범위 내의 유의적 차이를 볼 수 없었지만 파아지만 단독으로 처리했을 시 24시간째까지 파아지의 수는 지속적으로 감소되는 반면에 *E. tarda*를 감염시킨 실험군에서는 파아지의 활성이 약간 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 *E. tarda*에 파아지가 감염되어 증폭된 것으로 이해할 수 있다. *E. tarda*를 감염시킨 실험군에서 처음 접종했던 파아지의 수보다 시간이 지날수록 파아

지의 수가 높은 수준으로 증폭되지 않은 것처럼 보이는 것은 이미 많은 양의 파아지가 tilapia의 비 특이적 면역반응에 의해 이미 사멸되었기 때문일 수도 있다. 한편으로 Fig. 3에서 나타난 바와 같이 *E. tarda* 특이 파아지의 활성은 담수보다는 해수에서 훨씬 높았기 때문에 담수어인 tilapia를 대상으로 얻어진 본 연구의 결과를 해산어를 대상으로 적용시킨다면 보다 나은 긍정적 결과가 도출될 것으로 확신한다.

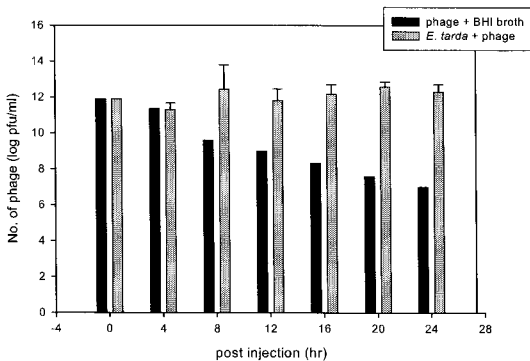


Fig. 6. Interaction of *E. tarda* and *E. tarda* specific phage in tilapia. *E. tarda* and phage were coinoculated into tilapia and the phage activity was investigated on the time intervals (n=3).

결론적으로 본 연구에서 얻어진 결과들을 토대로 *E. tarda*에 감염된 담수어 및 해산어의 질병을 제어할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 감염되기 전 수중이나 어체 내에 잔존하는 *E. tarda*를 사멸시킴으로써 *E. tarda*에 의한 질병발생을 예방할 수 있다. 그러나 파아지를 이용한 각종 병원균에 대한 예방 및 치료제를 개발하기 위해서는 더욱더 많은 연구가 수행되어야 할 것이다.

### 요 약

*Edwardsiella tarda* (*E. tarda*)는 담수 및 해수어에

광범위하게 감염을 일으키는 그람 음성 박테리아이다. 본 연구에서는 서해안 넙치 양식장에서 분리한 *E. tarda*에 대해 특이 용균을 보이는 파아지를 분리하여 파아지의 활성에 미치는 환경적 요인인 pH와 배양 온도의 영향 등을 조사하였다. 또한 어류모델로서는 담수어종인 Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)를 이용하였으며 *E. tarda*와 파아지와의 상호작용을 알아 보았다. pH 안정성 실험에서는 담수보다 해수에서 높은 활성을 보였으며 온도 안정성 실험 결과 50°C까지 일정한 활성을 보였다. Tilapia 감염 실험에서는 파아지와 *E. tarda*를 접종하였다. 그 결과 실험군은 대조군에 비해 24시간째까지 *E. tarda*수가 일정하게 감소하는 것을 확인하였으며 파아지는 처음 접종 양보다 약간 증폭됨을 알 수 있었다. 본 연구의 결과는 *E. tarda*에 의해 발생하는 질병을 특이 파아지를 이용하여 제어할 수 있음을 암시해준다.

### 참고문헌

Adams, and Mark, H.: bacteriophages, Interscience Pub. Inc., New york, 1959.

Bullock, G.L. and Roser, L.H.: *Edwardsiella* infections of fishes. U.S Fish and wildlife service, Fish Disease Leaflet 71, Kearneysville, West Virginia, 1985.

Gokhlesh, K., Gaurav, R., Sengupta, U., Singh, V., Kapoor, D. and Lakra, W.S.: Isolation and characterization of outer membrane proteins of *Edwardsiella tarda* and its application in immunoassays. *Aquaculture*, 272: 98-104, 2007.

Imbeault, S., Parent, S., Agace, M., Uhland, C.F. and Bkalis, J.F.: Using Bacteriophages to Prevent Furunculosis Caused by *Aeromonas salmonicida* in Farmed Brook Trout. *Aquatic Animal Health*, Volume 18,

- Issue 3: 203-214, 2006.
- Kanai, K.: Bacterial diseases of flounder, *Paralichthys olivaceus*. 한국어병학회지, 6(2): 197-208, 1993.
- Kim, J.H., Gomez, D.K., Toshihiro N. and Park, S.C.: Isolation and identification of bacteriophages infecting ayu *plecoglossus altivelis altivelis* specific *Flavobacterium psychrophilum*. Veterinary Microbiology, 140: 109-115, 2010.
- Lan, J., Zhang, X.H., Wang, Y., Chen and Han. Y.: Isolation of an unusual strain of *Edwardsiella tarda* from turbot and establish a PCR detection technique with the *gvrB* gene. Applied Microbiology, 1364-5072, 2007.
- Mahy B.W.J.: Virology, A practical approach., IRLpress, 1985.
- Monk, A.B., Rees, C.D., Barrow, P., Hagens, S. and Harper, D.R.: Bacteriophage applications: where are we now?. Applied Microbiology, 51: 336-369, 2010.
- Muramatsu, K. and Matsumoto, H.: Two generalised transducing phages in *V. parahaemolyticus* and *V. alginolyticus*. Microbiol Immunol., 35(12): 1073-1084, 1991.
- Mzia, K. and Revaz A.: Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. Trends in Biotechnology, Vol.28 No. 12, 2010.
- Nakai, T., Sugimoto, R., Park, K.H., Matsuoka, S., Mori, K., Nishioka, K. and Maruyama, K.: Protective effects of bacteriophage on experimental *Lactococcus garvieae* infection in yellowtail. Diseases of aquatic organism, 37: 33-41, 1999.
- Park, S.C., Ichiro, S., Minoru, F., Koh-Ichiro, M. and Toshihiro, N.: Isolation of phage Specific to a Fish Pathogen, *Pseudomonas plecoglossicida*, as a Candidate for Disease Control. Applied and Environmental Microbiology: 1416-1422, 2000.
- Rivas, L., Coffey, B., McAuliffe, O., McDonnell, M.J., Burgess, C.M., Coffey, A., Ross, R.P. and Duffy, G.: *In vivo* and *ex vivo* evaluations of bacteriophages e11/2 and e4/1c for use in the control of *Escherichia coli* O157:H7. Appl Environ Microbiol., 76(21): 7210-6, 2010.
- Sanders M.E. and Klaenhammer, T.R.: Restriction and modification in group N Streptococci; Effect of heat on development of modified lytic phage. Appl Environ Microbiol., 40(3): 500-506, 1980.
- Skalarow, S.S., Colwell, R.R., Chapman, G.B. and Zane S.F.: Characteristics of *V. parahaemolyticus* phage isolated from Atlantic coast sediment. Can J Microbiol., 19: 1519, 1973.
- Smith, L.S. and Krueger, A.P.: Characteristics of a new vibrio bacteriophage system. J Gen Physiol., Nov 20, 38(2): 161-8, 1954.
- Stanford, K., McAllister T.A., Niu Y.D., Stephens T.P., Mazzocco, A., Waddell T.E. and Johnson, R.P.: Oral delivery systems for encapsulated bacteriophages targeted at *Escherichia coli* O157:H7 in feedlot cattle. J food Prot., 73(7): 1304-12, 2010.
- Toshihiro, N. and Park, S.C.: Phage therapy of infectious diseases in aquaculture. Research in Microbiology, 153: 13-18, 2002.
- Thune, R.L., Stanley, L.A. and Cooper, R.K.: Pathogenesis of gram negative bacterial infections in warm water fish. Annu. Rev. Fish., 3: 37-68, 1993.
- Valentine A.F., Chen P.K., Colwell R.R. and Chapman G.B.: Structure of a marine bacteriophage as revealed by the negative-staining technique. J Bacteriol.



- Feb., 91(2): 819-22, 1966.
- Verma, K., Harjai, K. and Chhibber, S.: Characterization of a T7-like lytic bacteriophage of *Klebsiella pneumoniae* B5055: a potential therapeutic agent. *Curr Microbiol.*, 59(3): 274-81, 2009.
- Vinod, M.G., Shivu, M.M., Umesha, K.R., Rajeeva, B.C., Krohne, G., Karunasagar, I. and Karunasagar, I.: Isolation of *Vibrio harveyi* bacteriophage with a potential for biocontrol of luminous vibriosis in hatchery environments. *Aquaculture*, 255: 117-124, 2006.
- 윤선옥, 주성아, 허문수, 정초록, 주진우: 해양에서 분리한 *Vibrio alginolyticus* 피아지의 특성. *한국미생물학회지*, Vol. 34 No. 5, 1999.
- 전세규: 넙치의 질병과 치료, 수산신문사, 서울, pp. 92-104, 2005.
- 주진우, 박은주, 김영자: *V. mimicus* phage의 분리와 특성. *부산대학교 자연과학대학 논문집*, 54: 97-109, 1992.
- 주진우, 김일: 해양에서 분리한 *Vibrio* phage의 형태학적 분류. *대한미생물학회지*, 24(6): 609-617, 1989.
- 주진우, 이기희, 김일: *V. parahaemolyticus*의 phage에 관한 연구. *대한미생물학회지*, 22(1): 61-70, 1987.

---

Manuscript Received : April 13, 2011

Revised : August 12, 2011

Accepted : August 13, 2011