

# 해수에 순치된 첩연어(*Oncorhynchus keta*)에서 분리된 정형 에로모나스 살모니시다(*Aeromonas salmonicida*)에 대한 특성 분석

임종원 · 고성재 · 박영준 · 안도일 · 홍수희<sup>†</sup>

강릉원주대학교 생명과학대학 수산생명의학과

## Characterization of typical *Aeromonas salmonicida* isolated from Sea-Chum Salmon (*Oncorhynchus keta*)

Jongwon Lim, Sungjae Ko, Youngjun Park, Do-il Ahn and Suhee Hong<sup>†</sup>

Department of Aquatic Life Medicine, Gangneung-Wonju National University, Gangneung 25457, Korea

Chum salmon (*Oncorhynchus keta*) is a species which returns to Korea for spawning and was produced as seed production at the Fisheries Resources Agency located in Uljin-gun, Gyeongsangbuk-do to preserve the species. However, farmed chum salmon showed symptoms of bacterial infection. Therefore, in this study, bacteria were isolated to identify the causative agent from chum salmon in October 2021. The isolated bacteria were identified based on the sequences of 16S rDNA, rpoD (RNA polymerase sigma factor  $\sigma^{70}$ ), and vapA (A-layer) genes. Also, salinity-growth curve, biochemical characterization, antibiotic susceptibility test, and pathogenicity analysis were performed in four strains. As a result, four isolated strains were identified as *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. Additionally, the bacterial strains showed a decrease in growth as the salt concentration increased in the medium. All of the isolated strains exhibited  $\gamma$ -hemolysis, and the same biochemical properties. In the antimicrobial susceptibility test, all strains showed an inhibition zone of 40 to 44 mm for oxolinic acid, flumequine, and florfenicol. Pathogenic factors were assessed by RT-PCR at the mRNA level, and found that the four strains express the outer membrane ring of T3SS (ascV), inner membrane ring of T3SS (ascC), vapA, enterotoxin (act), and lipase (lip) genes which are well known to significantly contribute to the pathogenicity of *A. salmonicida*. The results of this study can be used as basic data to prevent *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* occurring in sea-chum salmon in the future.

**Key words:** Chum salmon, *Aeromonas salmonicida*, vapA, Identification, Pathogenicity, Characterization

## 서 론

첩연어 (*Oncorhynchus keta*)는 연어목 연어과 연

어속에 속하며, 주로 북태평양 연안국에 위치한 하천으로 회귀한다. 한국에서는 동해 북부의 일부 하천에 회귀한다고 알려져 있다 (명정구 등, 2010). 또한, 연어는 강원도 연안과 하천에 가장 많이 분포하고, 주로 10~12월 사이에 산란을 위해 하천으로 돌아온다. 최근 급격한 기후의 변화는 자연산 어류

<sup>†</sup>Corresponding author: Suhee Hong  
Tel: +82-33-640-2852, Fax: +82-33-640-2955  
E-mail: s.hong@gwnu.ac.kr

의 분포, 이동, 생리, 대사 그리고 성장 등에 영향을 미칠 뿐만 아니라 감염성 질병의 발병률을 증가시킬 수 있는 원인이 될 수 있다 (Maulu *et al.*, 2021). 연어과 어류에서 주로 발생하는 바이러스성 질병의 경우 전염성 조혈기 괴사증, 전염성 횡장 괴사증, 바이러스성 출혈성 패혈증이 있으며, 세균성 질병에는 절창병, 비브리오팀, 아가미부식병 그리고 백점병과 같은 기생충성 질병이 있다 (Sommer *et al.*, 2005; Shivam *et al.*, 2021; Irshath *et al.*, 2023). 그 중 *Aeromonas salmonicida*는 연어과 어류에서 높은 폐사율과 이환율로 인해 중요한 병원체로 알려져 있다 (Dallaire-Dufresne *et al.*, 2014). *A. salmonicida*는 subsp. *salmonicida*, subsp. *masoucida*, subsp. *pectinolytica*, subsp. *smithia*, 그리고 subsp. *achromogenes*로 다섯 가지의 아종으로 분류된다 (Dallaire-Dufresne *et al.*, 2014). 그 중 정형 (typical)으로 알려진 *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*는 연어과 어류의 절창병을 일으키며 (Dallaire-Dufresne *et al.*, 2014), 나머지 네 가지의 아종은 비정형 (atypical)으로 연어과 및 비연어과 어류에 감염을 일으킨다 (Wiklund and Dalsgaard, 1998). 국내에서는 무지개송어, 대서양연어 그리고 침연어에서 *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*에 대한 감염된 보고가 있었다 (Lim *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2011). 또한, 해수에서 사육된 조피볼락에서 분리된 비정형 *A. salmonicida* 균주가 확인되었다 (Kim *et al.*, 2013).

*Aeromonas* 속의 높은 유전적 유사성으로 인해 이들 간의 유전학적 동정이 쉽지 않지만, 하우스키핑 유전자 중 RNA polymerase factor  $\sigma^{70}$  (rpoD) 유전자가 *Aeromonas* 종간 구분을 가능하게 한다 (Martinez-Murcia *et al.*, 2011). 또한, *A. salmonicida* 아종은 ssp. *pectinolytica*를 제외하고 vapA typing으로 정형 및 비정형 균주 구별할 수 있다 (Gulla *et al.*, 2016).

*Aeromonas* 속의 잘 알려진 생화학적 특성은 cytochrome oxidase와 nitrate reductase의 존재, D-glucose와 trehalose의 발효, mucate 이용 부족, D-arabitol, dulcitol, erythritol 및 xylose로부터 산 생성 불가능이 있다 (Abbott *et al.*, 2003).

*Aeromonas*가 숙주에 손상을 유도하는 독성인자로 편모, 지질다당류, 생물막, 이온 조절 외막단백

질, 접착, A-layer (vapA), 정족수 감지, 세포 독소, 장독소, 에어로리신, 해모리신, 리파아제, 프로테아제 그리고 기타 세포외 생성물 등이 있다 (Dallaire-Dufresne *et al.*, 2014). 독성인자 중 A-layer은 세포 표면의 지질다당류와 결합된 단백질 구조이며, 세균을 숙주 단백질에 부착하여 세균 집락을 촉진하는 것으로 알려져 있다 (Dallaire-Dufresne *et al.*, 2014). 또한, A-layer은 쉽게 돌연 변이되고 특정 어종의 질병과 연관성이 있음을 보여주었다 (Gulla *et al.*, 2016).

침연어는 동해안 연어 자원 증강 및 어업인의 소득 증대 등 미래 연어 자원을 확보를 위해 중요하다. 이러한 이유로 수산자원공단에서는 1984년부터 연어 자원조성 및 자원 관리 목적으로 침연어를 키워 방류하고 있다. 그러나, 2021년 10월 사이에 경상북도 울진군 수산자원공단에서 종묘 생산하던 침연어 치어가 세균성 질병에 감염된 증상을 보이며 지속적으로 폐사가 발생하였다. 이뿐만 아니라, 침연어의 질병에 관한 연구는 미미한 실정이다. 따라서, 본 연구는 해수에서 순치된 침연어에서 세균을 분리하여 원인체를 16S rDNA, rpoD 및 vapA 유전자의 염기서열 분석을 통해 유전학적으로 동정하였다. 또한, 분리된 균주들은 염분 농도에 따른 성장, 생화학적 특성 분석, 항생제 감수성 분석 및 병원성 인자를 추가로 분석하여 균주를 특성화하였다.

## 재료 및 방법

### 세균 분리

경상북도 울진군에 있는 수산자원공단에서 침연어를 자연 해수 (16.7~19.5°C)를 공급하거나 냉각기로 수온이 조절된 사육수 (9.8~11.9°C)를 공급하는 수조에 각각 개체 크기별 (약 15g 및 약 50g)로 구분하여 사육하였다. 총 4개의 사육 수조에서 다수 폐사된 침연어는 2021년 10월 8일, 14일, 20일 그리고 21일에 탱크별로 3마리씩 선별하여 비장과 신장을 분리하였다. 비장과 전신은 멸균 백금이를 이용하여 tryptic soy agar (TSA) (236950, BD, USA) 배지에 도말한 후, 25°C에서 24~48시간 배양하였다. 이후 배양된 균은 계대배양을 통해 순수 배양

하였으며, 콜로니의 성장과 색소의 생성 유무를 기록하였다. 순수 배양된 균들은 TSB 배지에서 24시간 배양한 뒤 20%의 글리세롤을 첨가하여 stock을 제작하고 -70°C에 보관하였다. 분리된 균주는 같은 성장과 갈색 색소를 모두 띄었기 때문에 각 시기에 1개의 균주를 선정하여 L121020, L51008, L111021, 그리고 L61014로 명명하고 분석에 사용되었다.

**A. salmonicida subsp. salmonicida의 염분에 따른 성장 확인**

염분에 따른 성장을 확인하기 위해 단일 콜로니를 TSB배지에 계대 배양한 후 흡광도 600nm 값이 0.3이 되도록 계대 배양하였다. 이후 *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* 균주는 NaCl의 농도가 0.5%, 1.5%, 2.5% 그리고 3.5%의 농도로 조정된 TSB배지에서 20°C, 180rpm으로 48시간 동안 배양하면서 일정 시간 간격으로 흡광도와 세균수를 측정하였다.

**생화학적 테스트**

생화학적인 특성은 API 20NE 및 API 20E kit (BioMérieux, France)를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 분석하였다. 간략하게, 생화학적인 특성을 분석하기 위해 TSA 배지에 배양된 단일 콜로니를 수득 후, 멸균 증류수에 현탁 하여 스트립에 접종하였다. 이후, 스트립에 접종된 균은 25°C에서 48시간 배양하여 양성 및 음성 반응을 기록하고, 보조 시약을 첨가하여 제조업체의 판독표에 따라 생화학적 반응을 판정하였다. 또한, 용혈성은 blood agar (Synergy Innovation, Korea)에 균을 도말하여 25°C에서 48시간 배양하여 확인하였다.

**항생제 감수성 테스트**

항생제 감수성 테스트는 Lim and Hong, 2020의 방식을 수정하여 디스크 확산법으로 분석하였다. 간략하게, 침연어에서 분리된 4개의 *A. salmonicida* 균주에 대한 단일 콜로니를 각각 5 ml의 TSB 배지에 현탁 후 20°C에서 18시간 동안 배양하였다. 접종액은 1×10<sup>8</sup>CFU으로 조정하였으며, TSA 배지에 100 µl을 도말한 후에 항생제 디스크를 올려 25°C에서 24시간 동안 배양하여 억제대를 측정하였다. 연구에는 Liofilchem에서 구입한 oxolinic acid (2 mg), flumequine (30 mg), neomycin (30 mg), florfenicol (30 mg), erythromycin (15 mg), oxytetracycline (30 mg)의 항생제가 사용하였다. 음성대조균은 항생제 디스크에 세균을 접종하지 않았고, 양성대조균은 각각의 균에 항생제를 첨가하지 않았다.

**16S rDNA 유전자를 이용한 세균 속 동정**

침연어에서 분리된 세균의 속 동정을 위해 16S rDNA 유전자에 대한 특이프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다 (Table 1). PCR은 2×Prime Taq Premix (1.25 units of Prime Taq DNA polymerase; 2× reaction buffer; 4 mM MgCl<sub>2</sub>; enzyme stabilizer; loading dye; each of 0.5 mM dATP, dCTP, dGTP and dTTP [Genet Bio]) 10 µl, 정방향 프라이머 (10 µM)와 역방향 프라이머 (10 µM)를 각각 1.0 µl, 멸균 증류수 7 µl, 균액 1 µl를 혼합하여 수행하였다. 16S rDNA를 증폭하기 위한 PCR 조건은 95°C에서 10분; 95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 1분 동안 35 사이클; 72°C에서 7분 동안 최종 연장하였다.

PCR 증폭 산물은 1.5% 아가로오스 겔에서 0.5

Table 1. The primer for identification used in this study

Purpose	Primer	Nucleotide sequence (5' - 3')	Size(bp)	Target gene	Reference
16S rDNA PCR	16S_F	ACGCTGGCGGCAGGCCTAACAC	약 1300	16S rDNA	Lim <i>et al.</i> , 2017
	16S_R	ATTACTAGCGATTCCGTCTTC			
rpoD PCR	rpoD_F rpoD_R	TCGTTACTACCTCCCTCGCA CACCCAAGACAGCTGTAGCA	547	rpoD	Gulla <i>et al.</i> , 2016
vapA PCR	vapA_F vapA_R	CTGGACTTCTCCACTGCTCA ACGTTGGTAATCGCGAAATC	626	A-layer (highly variable vapA region)	

× TAE Buffer (20mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0)를 완충액으로 하여 100V에서 30분간 전기영동하였다. 이후 브로민화 에티듐으로 염색 후 증류수로 탈색하여 gel logic 100 image system (Kodak, USA)에서 밴드를 확인하였다.

#### rpoD 및 vapA 유전자를 이용한 *A. salmonicida* 아종의 동정

*Aeromonas*속 균주의 정확한 종으로 동정하기 위해 rpoD 유전자에 대한 특이프라이머와, *A. salmonicida* 종의 아종을 동정하기 위해 vapA 유전자에 대한 특이프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다 (Table 1). PCR은 2×Prime Taq Premix (1.25 units of Prime Taq DNA polymerase; 2×reaction buffer; 4 mM MgCl<sub>2</sub>; enzyme stabilizer; loading dye; each of 0.5 mM dATP, dCTP, dGTP and dTTP [Genet Bio]) 10 μl, 정방향 프라이머 (10 μM) 와 역방향 프라이머 (10 μM)를 각각 1.0 μl, 멸균 증류수 7 μl, 균액 1 μl 혼합하여 수행하였다. rpoD 유전자를 증폭하기 위한 PCR 조건은 95°C에서 10분; 95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 1분 동안 35 사이클; 72°C에서 7분 동안 최종 연장하였다. vapA 유전자를 증폭하기 위한 PCR 조건은 95°C에서 10분; 95°C에서 1분, 53°C에서 1분, 68°C에서 1분 동안 30 사이클; 68°C에서 4분 동안 최종 연장하였다. PCR 증폭 산물은 상기 언급된 방법으로 밴드를 확인하였다.

#### DNA 염기서열 분석

증폭이 확인된 시료들은 DNA gel extraction S&V kit (Bionics, Korea)를 이용하여 정제 후 macrogen (Korea) 사에 의뢰하여 시퀀싱 하였다. 수득된 염기서열은 BioEdit version 7.2.5를 이용하여 증폭된 염기서열이 정확한 peak를 형성하는지 확인하였다. 이후, MEGA X 프로그램의 clustal W를 이용하여 alignment를 진행하였고, NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA)에 blast 검색 (Megablast)을 통해 GenBank에 등록된 균주들의 염기서열과 비교하여 동정하였다.

#### 계통수 분석

분리된 균주의 유전학적 관계를 확인하기 위해 NCBI GenBank에서 여러 국가 및 숙주에서 보고된 *A. salmonicida* 균주의 vapA 염기서열을 수집하여 분석하였다. 계통수는 vapA의 염기서열의 multiple alignment (Clustal W) 후에 maximum likelihood method로 bootstrap 10,000번으로 결정하였다.

#### 병원성 유전자를 검출하기 위한 RT-PCR

분리한 4개의 균주는 mRNA 수준에서 병원성 유전자의 유무를 분석하기 위해 TSB 배지에서 20°C, 48시간 배양하였다. 이후, total RNA 분리는 RNAiso plus (Takara, Japan)를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 추출하였다. RNA 순도 및 농도는 나노드랍 기기 (BioSpectrometer Eppendorf, Germany)를 이용하여 측정하였다. 분리된 RNA는 ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO, Japan)를 사용하여 cDNA를 합성하였고, 실험 전까지 -70°C에 보관하였다.

*A. salmonicida*의 병원성 유전자는 cDNA를 주형으로 사용하여 PCR로 증폭하였다. PCR은 2×Prime Taq Premix (1.25 units of Prime Taq DNA polymerase; 2×reaction buffer; 4 mM MgCl<sub>2</sub>; enzyme stabilizer; loading dye; each of 0.5 mM dATP, dCTP, dGTP and dTTP [Genet Bio]) 10 μl, 정방향 프라이머 (10 μM)와 역방향 프라이머 (10 μM)를 각각 1.0 μl, 멸균 증류수 7 μl, cDNA 1 μl를 혼합하여 수행하였다. PCR 조건은 95°C에서 5분; 95°C에서 30초, 58°C에서 30초, 72°C에서 60초 동안 35 사이클; 72°C에서 7분 동안 최종 연장하였다. 16s rDNA는 내부 대조군으로 사용하였고, 상기 PCR 방법에서 증폭 cycle을 20회 수행하여 검증하였다. 모든 증폭 산물은 상기 언급된 DNA 염기서열 분석에 따라 확인하였다. 기존 연구에서 설계된 프라이머를 사용하여 8개의 병원성 유전자인 ascV (outer membrane ring of T3SS), ascC (inner membrane ring of T3SS), T3SS의 전사 조절 단백질인 exsA (T3SS transcriptional regulator), act (cytotoxic enterotoxin), lip (lipase), ela (elastase), hlyA (haemolysin), aerA (aerolysin), vapA 유전자를 증폭하였다 (Table 2).

Table 2. The primer for detection of virulence factors

Primer	Nucleotide sequence (5' – 3')	Size (bp)	Target gene	Reference
ascV_F ascV_R	ATGGACGGCGCCATGAAGTT TATTCGCCTTCACCCATCCC	710	Outer membrane ring of T3SS	Chacón <i>et al.</i> , 2004
ascC_F ascC_R	GCATTGGAGCAACAGTCCCA CCTTCAATCCCCTTGCGAT	476	Inner membrane ring of T3SS	Lim <i>et al.</i> , 2020
exsA_F exsA_R	TACCACAGAGAAGGGCGATA GCGAGCAGAAACAGCAACT	435	T3SS transcriptional regulator	Lim <i>et al.</i> , 2020
act_F act_R	AGAAGGTGACCACCAAGAACA AACTGACATCGGCCTTGAACTC	232	Cytotoxic enterotoxin	Kingombe <i>et al.</i> , 1999
lip_F lip_R	ATCTTCTCCGACTGGTTCGG CCGTGCCAGGACTGGGTCTT	382	Lipase	Sen <i>et al.</i> , 2004
ela_F ela_R	ACACGGTCAAGGAGATCAAC CGCTGGTGTGGCCAGCAGG	513	Elastase	Sen <i>et al.</i> , 2004
hlyA_F hlyA_R	GGCCGGTGGCCGAAGATACGGG GGCGGCGCCGACGAGACGGG	597	Haemolysin	Wong <i>et al.</i> , 1998
aerA_F aerA_R	GCWGARCCRTCTATCCWG TTTCTCCGGTAACAGGATTG	252	Aerolysin	Santos <i>et al.</i> , 1999
vapA_F vapA_R	TCGTTACTACCTCCCTCGCA CACCCAAGACAGCTGTAGCA	822	A-layer	Lim <i>et al.</i> , 2020

## 결과 및 고찰

### 세균 분리

해수 순치된 침연어에서 순수 분리된 4개의 균주는 TSA 배지에서 25°C, 24시간 동안 배양 시에 갈색 콜로니가 관찰되었다 (Fig. 1). 정형 *A. salmonicida* 균주는 티로신 또는 페닐알라닌이 첨가된 배지에서 균주가 갈색 색소를 생성하는 것으로 알려져 있다 (Dallaire-Dufresne *et al.*, 2014).

### *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*의 염분에 따른 성장 확인

해수에서 분리된 정형 *A. salmonicida*을 20°C에서 염분별 (0.5%, 1.5%, 2.5%, 3.5%) 배지에 배양하여 일정 간격으로 세균수를 측정하여 성장을 확인하였다 (Fig. 2). 그 결과, NaCl의 농도가 증가할수록 균의 성장이 감소하였다. 이전 연구에 따르면, *A. salmonicida*는 60.0%의 높은 염도에 내성이 있다고 보고하였다 (Wang *et al.*, 2005). 이 연구에서는 3.5%의 NaCl이 첨가된 배지에서 균이 배양되지 않았지만, 배지의 종류, pH, 배양 온도 등에 영향을

받았을 수 있음을 고려해야 한다.

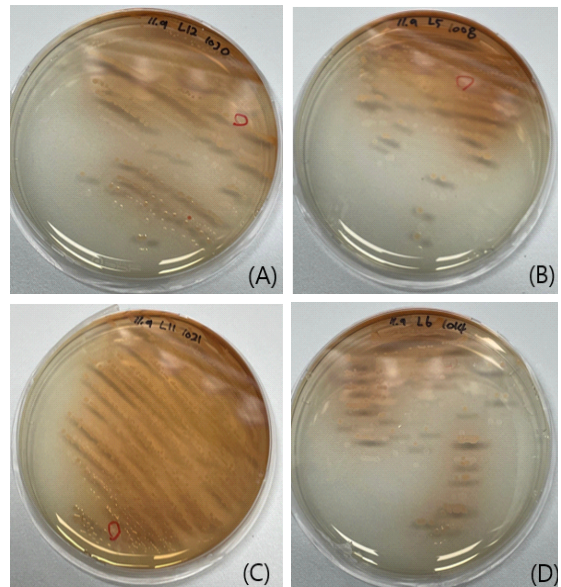


Fig. 1. Cultured appearance of the four strains isolated from chum salmon on TSA at 25°C for 48 hours. (A) L121020; (B) L51008; (C) L111021; L61014.

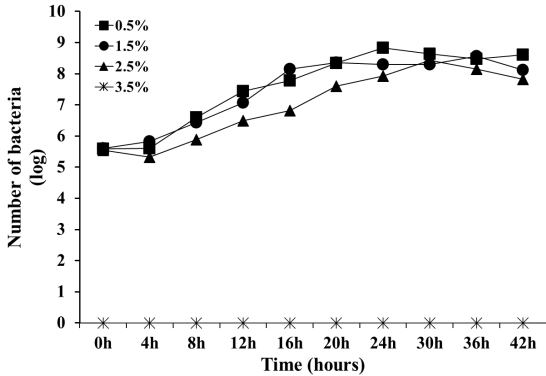


Fig. 2. Growth curve of *A. salmonicida* L51008 cultured in TSB supplemented with 0.5%, 1.5%, 2.5%, and 3.5% NaCl at 20°C, 48 hours.

**표현형 분석**

이 연구에서 분석된 4개의 균주는 모두 갈색 색소를 띄며, 감마 용혈을 나타냈다. 또한, API 20E와 API 20NE kit를 이용하여 생화학적 분석한 결과, 4개의 균주는 모두 esulin, gelatine, glucose, D-mannitol, inositol, D-sorbitol, L-rhamnose, D-sucrose, amygdalin, N-acetyl-glucosamine, D-maltose, potassium gluconate에서 양성 반응을 나타냈으며, indole, ONPG, citrate utilization, sodium pyruvat, ornithine decarboxylase, arginine dihydrolase, H<sub>2</sub>S production, urease, tryptophan deaminase, D-melibiose, L-arabinose, D-mannose, capric acid, adipic acid, malic acid, phenylacetic acid에서는 음성 반응을 나타냈다 (Table 3).

이 연구에서 분석된 4개의 균주는 이전에 보고된 정형 *A. salmonicida*와 일부 다른 생화학적인 반응이 나타났다. 특히, sodium pyruvat, esculin, tryptophan deaminase, D-mannitol, inositol, D-sorbitol 그리고 amygdalin에서 나타난 반응은 2006~2011년 사이에 침연어에서 분리된 정형 *A. salmonicida*와 반응이 달랐다 (Kim *et al.*, 2011). 반면에 4개의 균주는 indole, OPNG, citrate utilization, lysine decarboxylase, H<sub>2</sub>S production, urease, 그리고 D-melibiose에서 음성 반응을 나타냈고, 이는 이전에 국내 대서양연어, 무지개송어 그리고 침연어에서 분리된 정형 *A. salmonicida*과 일치하는 반응이었다 (Lim and Hong., 2020; Kim *et al.*, 2011). 미생물은 환경 변화에 빠르게 적응하여 다양한 표현형을 만들어

Table 3. Analysis of biochemical properties of *A. salmonicida*

strain	<i>A. salmonicida</i>
Brown pigment	+
Haemolysis	γ
Indole	-
ONPG	-
Citrate utilization	-
Nitrate reduction	+
Sodium pyruvat	-
Lysine decarboxylase	-
Ornithine decarboxylase	-
Arginine dihydrolase	-
H <sub>2</sub> S production	-
Urease	-
Esculin	+
Tryptophan deaminase	-
Gelatine	+
Glucose	+
D-Mannitol	+
Inositol	+
D-Sorbitol	+
L-Rhamnose	+
D-Sucrose	+
D-Melibiose	-
Amygdalin	+
L-Arabinose	-
D-Mannose	-
N-Acetyl-glucosamine	+
D-Maltose	+
Potassium Gluconate	+
Capric acid	-
Adipic acid	-
Malic acid	-
Phenylacetic acid	-

낼 수 있다 (Wee *et al.*, 2022).

**항생제 감수성 테스트 결과**

항생제 감수성 분석 결과에서 분석된 4개의 균주는 oxolinic acid, flumequine 그리고 florfenicol의 항생제에서 40~44 mm의 억제대를 형성하였다 (Table 4). 또한, oxytetracycline에 대해서는 32~40 mm의 억제대를 형성하였으며, neomycin과 erythromycin에 대해서는 26~30 mm의 억제대를 형성하였다.

이 연구에서는 CLSI 및 국립수산물과학원에서 발

Table 4. Antimicrobial susceptibility of 4 *A. salmonicida*

Antibiotics	Test range (mg)	L121020	L51008	L111021	L61014
		Inhibition zone (mm)			
Oxolinic acid	2	40	40	40	40
Flumequine	30	42	42	40	44
Neomycin	30	30	26	26	30
Florfenicol	30	42	42	40	44
Erythromycin	15	28	30	30	26
Oxytetracycline	30	32	32	40	34

간한 메뉴얼 및 표준균주가 포함되지 않았기 때문에 정확한 감수성의 판정은 어렵다. 그러나, 이 연구와 동일한 항생제 감수성 방법으로 분석된 이전 연구에 비교하면, 국내 양식 무지개송어 및 대서양 연어에서 분리된 정형 *A. salmonicida*는 oxytetracycline에 대하여 내성이 있었지만, 이 연구에서 분리된 4개 균주는 모두 32~40 mm의 억제대를 형성하였다 (Lim and Hong *et al.*, 2020).

*A. salmonicida*의 oxytetracycline 내성은 tetA 및 tetE 유전자의 존재 여부와 관련이 있는 것으로 알려져 있다 (Kim *et al.*, 2011). tetracycline에 대한 내성은 tet 유전자가 암호화하고 있는 유출 펌프, 리보솜 보호 또는 효소 불활성화의 세 가지 저항 메커니즘으로 인해 발생한다 (Chopra and Roberts, 2001).

*A. salmonicida*의 항생제 내성 유전자들과 같은 유동적 유전 요소는 원핵 생물간 이동이 가능하다고 알려져 있다 (Piotrowska and Popowska, 2015). 또한, 항생제 내성 유전자들은 다른 그람음성 박테리아로 이동할 수 있으며, 이러한 특성은 박테리아의 방어 메커니즘으로 작용한다 (Reith *et al.*, 2008).

**해수에서 순치된 침연어에서 분리된 세균의 유전학적 동정**

침연어에서 분리된 4개 균주의 속 동정을 위해 16S rDNA에 대한 특이프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과, 16S rDNA에 대해서 약 1,300bp의 유전자 단편을 확인하였으며 *Aeromonas* 속의 균주로 확인되었다 (데이터를 나타내지 않음). 16S 염기서열 분석법은 16S rDNA 유전자의 가변적인 부분과 영구적인 염기서열 부분으로 구

성된 영역을 이용하여 세균 동정에 보편적으로 사용된다 (Amann *et al.*, 1995). 그러나, 세균의 정확한 종 분류는 높은 유전적 유사성을 가진 세균의 존재와 새로 기술된 종의 추가로 인해 어려워지고 있다.

이 연구에서는 분리된 *Aeromonas* 속의 정확한 종 판정을 위해 해수 순치된 침연어에서 분리된 4개의 균주는 모두 rpoD에 대한 특이프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과, 약 550bp의 산물을 얻었으며, 염기서열 분석 결과에서는 *A. salmonicida* 균주로 확인되었다. (데이터를 나타내지 않음). rpoD는 하우스키핑 유전자로 *Aeromonas* 종간 구별을 가능하게 하며 *Aeromonas* 종 동정에 오랫동안 사용되어왔다 (Lim *et al.*, 2007, Martinez-Murcia *et al.*, 2011).

*A. salmonicida* 균주는 초가변영역의 vapA 염기서열 분석을 통해 *A. salmonicida*에 대한 아종을 쉽게 구분할 수 있다 (Gulla *et al.*, 2016). 이 연구에서 침연어에서 분리된 *A. salmonicida* 균주들의 아종을 구분하기 위해 vapA 유전자에 대한 특이프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. vapA 유전자에 대해서는 약 600bp의 단편이 확인되었다 (데이터를 나타내지 않음). 또한, 수득된 증폭 산물은 시퀀싱하여 최종적으로 *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*로 확인하였다. *A. salmonicida*의 정형 및 비정형 균주 구분할 수 있는 MIY 프라이머 (Miyata *et al.*, 1996)와 tapA 유전자를 차단하는 insertion sequence인 ISAsa4 프라이머 (Nilsson *et al.*, 2006)를 이용한 PCR도 본 연구에서 수행되었으며, *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* 균주로 확인되었다 (데이터를 나타내지 않음). 추가로 증폭된 vapA 유전자 염기

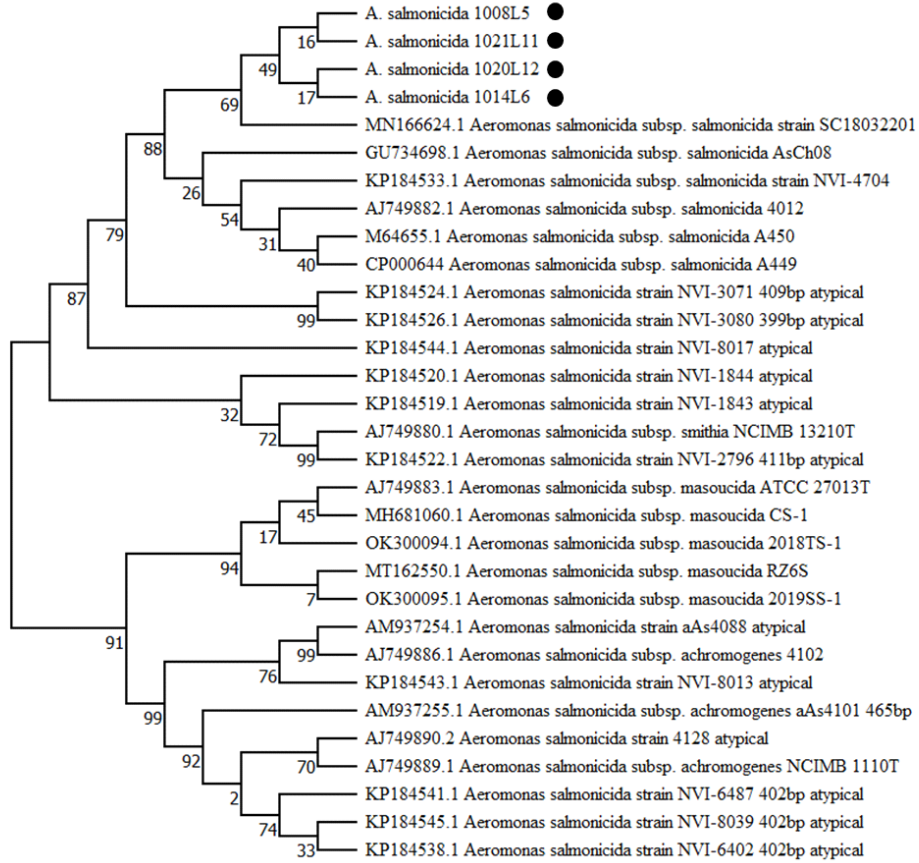


Fig. 3. Phylogenetic analysis of vapA nucleotide sequences was performed by the maximum likelihood method (Bootstrap, n=10,000) using Mega software. ● indicates the strains used this study.

서열을 바탕으로 계통수를 분석한 결과, 4개 균주 모두가 이전에 보고된 *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* 균주들과 함께 분리 군집되었다 (Fig 3).

2006~2011년 사이에 자연산 침연어와 인공 부화 침연어의 치어에서 vapA typing으로 총 880개 시료 중 34.5%의 시료가 정형 *A. salmonicida*에 감염되었다 (Kim et al., 2011). 또한, 정형 *A. salmonicida*는 강원도에 위치한 양식 연어과 어류에서 빈번하게 검출되었을 뿐만 아니라 무지개송어 (*Oncorhynchus mykiss*)와 은연어 (*Oncorhynchus kisutch*)에서 높은 병원성을 나타냈다 (Lim et al., 2017; Lim and Hong et al., 2020). 따라서, *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*는 국내 연어과 어류에서 지속적으로 피해를 주는 주요한 병원체임을 나타낸다.

**병원성 유전자 발현 분석 결과**

본 연구에서 분리한 4개 균주는 잘 알려진 9개의

Table 5. Detection of PCR products using virulence gene primer with cDNA of 4 *A. salmonicida* strains

Factors	Strains			
	L121020	L51008	L111021	L61014
ascV	+	+	+	+
ascC	+	+	+	+
vapA	+	+	+	+
act	+	+	+	+
lip	+	+	+	+
ela	-	-	-	-
hlyA	-	-	-	-
aerA	-	-	-	-
exsA	+	+	+	-



병원성 유전자의 존재를 RT-PCR을 통해 mRNA 수준에서 확인되었다 (Table 5). 그 결과, 4개의 균주는 ascV, ascC, vapA, act 및 lip 유전자가 검출되었다. 그러나, ela, hlyA, 그리고 aerA에 대해서는 유전자가 검출되지 않았다. A-layer은 *Aeromonas*에서 잘 알려진 외막단백질 중에 하나로 숙주 세포에 부착하는 데 필수적인 역할을 한다 (Beaz-Hidalgo and Figueras, 2013). 세포 외 분비 물질인 프로테아제, 리파아제와 같은 다양한 효소, 장내 독소, 바이오필름 같은 것들이 숙주의 병원성에 크게 기여한다고 알려져 있다 (Beaz-Hidalgo and Figueras,

2013). aerA과 hlyA은 용혈성과 관련된 유전자로 *Aeromonas* 균에 널리 퍼져 있다 (Dallaire-Dufresne et al., 2014). 그러나, ela, hly 및 aerA은 이전 국내에서 분리된 정형 *A. salmonicida*에서 확인된 것과 달리 본 연구에서 분석된 4개의 균주는 모두 검출되지 않았다 (Lim and Hong, 2020). 병원성 박테리아의 독성 유전자 발현은 환경 매개변수에 의해 쉽게 조절될 수 있다 (Guijarro et al., 2015). 일부 세균의 경우 온도에 따라 독성 유전자의 발현 유도를 제어하는 시스템은 다양하다고 알려져 있다 (Guijarro et al., 2015).

Supplemental table: Individual details for *A. salmonicida* used in phylogenetic tree analysis

Bacteria	NCBI Accession number	Isolation source/host	Country	Sub species	Date
<i>A. salmonicida</i> 1008L5	In the study	Chum salmon	Korea	salmonicida	2023.10.08
<i>A. salmonicida</i> 1014L6	In the study	Chum salmon	Korea	salmonicida	2023.10.14
<i>A. salmonicida</i> 1020L12	In the study	Chum salmon	Korea	salmonicida	2023.10.20
<i>A. salmonicida</i> 1021L11	In the study	Chum salmon	Korea	salmonicida	2023.10.21
<i>A. salmonicida</i> 4012	AJ749882.1	Atlantic salmon	Scotland	salmonicida	Uncertain
<i>A. salmonicida</i> AsCh08	GU734698.1	Chum salmon	Korea	salmonicida	Uncertain
<i>A. salmonicida</i> SC18032201	MN166624.1	Perch	China	salmonicida	2018.04
<i>A. salmonicida</i> NVI-4704	KP184533.1	Turbot	Norway	salmonicida	2003
<i>A. salmonicida</i> A450	M64655.1	Brown trout	France	salmonicida	1978
<i>A. salmonicida</i> A449	CP000644	Brown trout	France	salmonicida	1975
<i>A. salmonicida</i> NVI-1844	KP184520.1	Turbot	Norway	atypical	1990
<i>A. salmonicida</i> NVI-8017	KP184544.1	Ballan wrasse	Norway	atypical	2011
<i>A. salmonicida</i> NVI-1843	KP184519.1	Arctic char	Norway	atypical	1990
<i>A. salmonicida</i> NVI-8013	KP184543.1	Ballan wrasse	Norway	atypical	2011
<i>A. salmonicida</i> 4128	AJ749890.2	Spotted wolffish	Iceland	atypical	2001
<i>A. salmonicida</i> aAs4088	AM937254.1	Spotted wolffish	Norway	atypical	Uncertain
<i>A. salmonicida</i> RZ6S	MT162550.1	Turbot	China	masoucida	2016.12
<i>A. salmonicida</i> ATCC 29013T	MT162550.1	Masou salmon	Japan	masoucida	Uncertain
<i>A. salmonicida</i> 2019SS-1	OK300095.1	Salmon salar	Norway	masoucida	1992
<i>A. salmonicida</i> 2018TS-1	OK300094.1	Salmon salar	Norway	masoucida	1992
<i>A. salmonicida</i> CS-1	MH681060.1	Tongue sole	China	masoucida	Uncertain
<i>A. salmonicida</i> NCIMB 1110T	AJ749889.1	Brook trout	UK	achromogenes	Uncertain
<i>A. salmonicida</i> 4102	AJ749886.1	Atlantic cod	Canada	achromogenes	1981
<i>A. salmonicida</i> aAs4101	AM937255.1	Atlantic cod	Iceland	achromogenes	Uncertain
<i>A. salmonicida</i> NVI-8039	KP184545.1	Atlantic cod	Norway	atypical	2011
<i>A. salmonicida</i> NVI-6487	KP184541.1	Atlantic cod	Norway	atypical	2008
<i>A. salmonicida</i> NVI-6402	KP184538.1	Atlantic salmon	Norway	atypical	2008
<i>A. salmonicida</i> NCIMB 13210T	AJ749880.1	Roach	UK	atypical	Uncertain
<i>A. salmonicida</i> NVI-3071	KP184524.1	Atlantic salmon	Canada	atypical	1896
<i>A. salmonicida</i> NVI-2796	KP184522.1	Atlantic salmon	Norway	atypical	1988
<i>A. salmonicida</i> NVI-3080	KP184526.1	Atlantic salmon	Canada	atypical	1987

*A. salmonicida*의 3형 분비 시스템 (T3SS)은 주요 독성 시스템이며, 숙주 세포와 직접 접촉하는 전좌 장치, 다양한 단백질과 독소를 주입하는 바늘, 병원체의 세포막에 위치하는 분비 장치로 구성된다 (Frey and Origgi, 2016). *ascV* 및 *ascC*는 이 시스템에서 구조적으로 관련 있는 인자이나 환경에 의한 돌연변이와 유전적 재배열로 인해 결실이 발생할 수 있다 (Stuber *et al.*, 2003; Daher *et al.*, 2011). 이전 연구에 따르면, T3SS 장치 유전자의 결핍으로 인해 RTG-2세포를 사멸시키는 병원성이 낮다는 것이 밝혀졌고 (Stuber *et al.*, 2003), 나아가 *A. salmonicida*의 T3SS 유전자는 스트레스가 많은 환경에서 배양될 때 소실되었다고 보고하였다 (Daher *et al.*, 2011). T3SS의 전사 조절 단백질인 *exsA*의 유전자는 T3SS 프로모터 활동을 유도하여 T3SS의 전사를 활성화한다 (Frey and Origgi, 2016). 그러나, 본 연구에서는 *exsA* (456bp) 유전자가 *A. salmonicida* L61014 균주에서만 검출되지 않았다.

이 연구에서는 *A. salmonicida*에서 잘 알려진 병원성 인자들에 대하여 mRNA수준에서 확인하였으며, 분석된 균주 간의 병원성 인자가 차별적으로 확인되었다. 병원체의 모든 항원성 인자가 모두 면역원성을 일으키지는 않지만, 보편적인 백신을 개발하기 위해서는 온전한 항원성을 보유하거나 발현하는 균주가 필요할 수 있다. 이전 연구에서는 고병원성 균주를 이용한 포르말린 불활화 백신은 무지개송어에서 보호 효과가 최소 16주 동안 지속됨을 입증하였다 (Lim and Hong, 2020).

## 요 약

침연어는 한국에서 동해 북부의 일부 하천에 회귀하는 어종으로 동해안 연어 자원 증강 및 어업인의 소득 증대 등 자원 확보를 위해 중요하다. 이러한 이유로 경상북도 울진군에 위치한 수산자원공단에서 해수 순치하며 침연어 치어를 생산하였다. 그러나, 침연어 치어에서 세균성 질병에 감염된 증상을 보이며 지속적으로 폐사가 발생하였다. 따라서, 본 연구에서는 폐사된 침연어에서 세균을 분리하고 16s rDNA, *rpoD* 및 *vapA*의 염기서열을 분석하여 동정하였다. 또한, 분리된 균주들은 염분 농

도에 따른 성장, 생화학적 특성 분석, 항생제 감수성 분석 및 병원성 인자를 추가로 분석하였다. 그 결과, 분리된 4개의 균주는 모두 *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* 아종으로 동정하였다. 또한, 분리된 균주는 염분의 농도가 증가할수록 배지에서 성장이 감소하였다. 생화학적 특성 분석에서 4개 균주는 이전에 국내 연어과 어류에서 보고된 정형 *A. salmonicida*와 비교하여 indole, OPNG, citrate utilization, lysine decarboxylase, H<sub>2</sub>S production, urease, 그리고 D-melibiose에서 음성 반응인 점이 일치하였다. 그러나, sodium pyruvate, esculin, tryptophan deaminase, D-mannitol, inositol, D-sorbitol 그리고 amygdalin에서 나타난 반응은 달랐다. 항생제 감수성 결과에서 분리된 4개의 균주는 oxolinic acid, flumequine, florfenicol, oxytetracycline, neomycin 그리고 erythromycin에 대한 항생제에서 26-44 mm의 억제대를 형성하였다. 병원성 인자의 발현 분석에서 4개 균주는 mRNA 수준에서 RT-PCR로 분석되었으며, 모두 *A. salmonicida*의 병원성에 중요한 역할을 하는 *ascV*, *ascC*, *vapA*, *act* 및 *lip* 유전자가 검출되었다. 이 연구에서 분리된 *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*의 염분에 따른 성장, 항생제 감수성, 생화학적 특성 그리고 병원성 유전자의 발현 분석은 침연어에서 발생하는 질병을 예방하기 위한 기초자료로 활용될 수 있을 것이라 기대한다.

## 초 록

침연어(*Oncorhynchus keta*)는 한국에서 회귀하는 연어로 종 보존을 위해 경상북도 울진군에 위치한 수산자원공단에서 해수 순치하며 종묘 생산하였다. 그러나, 사육 중이던 침연어 치어에서 세균성 질병에 감염된 증상을 보이며 폐사하였다. 따라서, 본 연구에서는 2021년 10월경에 사육환경에 따라 구분된 침연어로부터 원인체를 규명하고자 세균을 분리하였다. 분리된 세균은 16S rDNA, *rpoD* (RNA polymerase sigma factor  $\sigma^{70}$ ) 및 *vapA* (A-layer)의 염기서열을 기반으로 유전학적으로 동정하고, 추가로 염분에 따른 성장, 생화학적 특성 분석, 항생제 감수성 및 병원성 인자를 분석하여 균주를

특성화하였다. 그 결과, 분리된 4개의 균주는 모두 *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* 아종으로 동정하였다. 또한, 분리된 균주는 염분의 농도가 증가할수록 배지에서 성장이 감소하였다. 생화학적 특성 분석에서 분리된 4개 균주는 용혈성이 확인되지 않았고, 모두 같은 생화학적인 성상을 나타냈다. 항생제 감수성 분석에서는 oxolinic acid, flumequine 그리고 florfenicol에 대한 항생제에서 40~44 mm 억제대를 형성하였다. 병원성 인자의 발현 분석은 mRNA 수준에서 RT-PCR로 확인되었으며, 4개 균주는 모두 *A. salmonicida*의 병원성에 크게 기여한다고 잘 알려진 outer membrane ring of T3SS (ascV), inner membrane ring of T3SS (ascC), vapA, enterotoxin (act) 및 lipase (lip) 유전자가 발현되었다. 이 연구에서 분리된 *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*의 특성 분석은 해수에 순치된 침연어에서 발병하는 절창병을 예방하기 위한 기초자료로 활용될 수 있을 것이다.

### 감사의 글

이 논문은 2022학년도 강릉원주대학교 학술연구 조성비 지원으로 수행되었습니다.

### References

Abbott, S. L., Cheung, W. K., and Janda, J. M.: The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. *Journal of clinical microbiology*, 41(6): 2348-2357, 2003. DOI: 10.1128/JCM.41.6.2348-2357.2003

Amann, R. I., Ludwig, W., & Schleifer, K. H.: Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews*, 59(1), 143-169. 1995. DOI: 10.1128/mr.59.1.143-169.1995

Beaz-Hidalgo, R., and Figueras, M. J.: *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease. *Journal of fish diseases*, 36(4), 371-388. 2013. <https://doi.org/10.1111/jfd.12025>.

Chacón, M. R., Soler, L., Groisman, E. A., Guarro, J., and Figueras, M. J.: Type III secretion system genes in clinical *Aeromonas* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 1285-1287, 2004. DOI: 10.1128/

jcm.42.3.1285-1287.2004.

Chopra, I., and Roberts, M.: Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and molecular biology reviews*, 65(2), 232-260, 2001. DOI: 10.1128/mmb.65.2.232-260.2001.

Dallaire-Dufresne, S., Tanaka, K. H., Trudel, M. V., Lafaille, A., and Charette, S. J.: Virulence, genomic features, and plasticity of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, the causative agent of fish furunculosis. *Veterinary microbiology*, 169(1-2):1-7, 2014. DOI: 10.1016/j.vetmic.2013.06.025.

Daher, R. K., Filion, G., Tan, S. G. E., Dallaire-Dufresne, S., Paquet, V. E., and Charette, S. J.: Alteration of virulence factors and rearrangement of pAsa5 plasmid caused by the growth of *Aeromonas salmonicida* in stressful conditions. *Veterinary Microbiology*, 152(3-4), 353-360, 2011. DOI: 10.1016/j.vetmic.2011.04.034.

Frey, J., and Origi, F. C.: Type III secretion system of *Aeromonas salmonicida* undermining the Host's immune response. *Frontiers in Marine Science*, 3, 130, 2016. DOI: 10.3389/fmars.2016.00130.

Gulla S, Lund V, Kristoffersen A. B, Sørum H, Colquhoun D. J. vapA (A-layer) typing differentiates *Aeromonas salmonicida* subspecies and identifies a number of previously undescribed subtypes. *Journal of Fish Disease*, 39(3): 329-42, 2016. DOI: 10.1111/jfd.12367.

Guijarro, J. A., Cascales, D., García-Torrico, A. I., García-Domínguez, M., and Méndez, J.: Temperature-dependent expression of virulence genes in fish-pathogenic bacteria. *Frontiers in microbiology*, 6, 700, 2015. DOI: 10.1128/iai.43.1.195-201.1984

Irshath, A. A., Rajan, A. P., Vimal, S., Prabhakaran, V. S., and Ganesan, R.: Bacterial pathogenesis in various fish diseases: Recent advances and specific challenges in vaccine development. *Vaccines*, 11(2), 470, 2003. DOI: 10.3390/vaccines11020470.

Kingombe, C. I. B., Huys, G., Tonolla, M., Albert, M. J., Swings, J., Peduzzi, R., and Jemmi, T.: PCR detection, characterization, and distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp. *Applied and Environment Microbiology*, 65, 5293-5302, 1999. DOI: 10.1128/AEM.65.12.5293-5302.1999.

Kim, D. H., Choi, S. Y., Kim, C. S., Oh, M. J., and Jeong, H. D.: Low-value fish used as feed in aquaculture were a source of furunculosis caused by atypical *Aeromonas salmonicida*. *Aquaculture*, 408:113-117,

2013. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2013.05.014.
- Kim, J. H., Hwang, S. Y., Son, J. S., Han, J. E., Jun, J. W., Shin, S. P., ... & Park, S. C. (2011). Molecular characterization of tetracycline-and quinolone-resistant *Aeromonas salmonicida* isolated in Korea. *Journal of Veterinary Science*, 12(1), 41-48, 2011. DOI: 10.4142/jvs.2011.12.1.41.
- Kim, Y. S., Yoon, J. W., Han, H. J., Suebsing, R., and Kim, J. H.: Prevalence and characterization of typical *Aeromonas salmonicida* chum salmon isolates in Korea. *Fisheries and aquatic sciences*, 14(4):347-354, 2011. DOI: 10.5657/FAS.2011.0347.
- Lim, J., and Hong, S.: Characterization of *Aeromonas salmonicida* and *A. sobria* isolated from cultured salmonid fish in Korea and development of a vaccine against furunculosis. *Journal of fish diseases*, 43(5):609-620, 2020. DOI: 10.1111/jfd.13158.
- Lim, J., Koo, B., Kim, K. I., Jeong, H. D., and Hong, S.: Genetic identification of *Aeromonas* species using a housekeeping gene, rpoD, in cultured salmonid fishes in Gangwon-Do. *Journal of Fish Pathology*, 30, 79-88, 2017. DOI: 10.7847/jfp.2017.30.2.079.
- Maulu, S., Hasimuna, O. J., Haambiya, L. H., Monde, C., Musuka, C. G., Makorwa, T. H., ... & Nsekana-bo, J. D.: Climate change effects on aquaculture production: sustainability implications, mitigation, and adaptations. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 609097, 2021. DOI: 10.3389/fsufs.2021.609097
- Martinez-Murcia, A. J., Monera, A., Saavedra, M. J., Oncina, R., Lopez-Alvarez, M., Lara, E., and Figueras, M. J.: Multilocus phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas*. *Systematic and applied microbiology*, 34(3), 189-199, 2011. DOI: 10.1016/j.syapm.2010.11.014.
- Miyata M, Inglis V, Aoki T.: Rapid identification of *Aeromonas salmonicida* subspecies *salmonicida* by the polymerase chain reaction. *Aquaculture* 141:13-24, 1996. DOI: 10.1016/0044-8486(95)01221-4.
- Nilsson, W. B., Gudkovs, N., and Strom, M. S.: Atypical strains of *Aeromonas salmonicida* contain multiple copies of insertion element *ISAsa4*, useful as a genetic marker and a target for PCR assay. *Diseases of aquatic organisms*, 70(3), 209-217, 2006. DOI: 10.3354/dao070209.
- Piotrowska, M., and Popowska, M.: Insight into the mobilome of *Aeromonas* strains. *Frontiers in microbiology*, 6, 494, 2015. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00494.
- Reith M. E, Singh R. K, Curtis B, Boyd J. M, Bouevitch A, Kimball J, Munholland J, Murphy C, Sarty D, Williams J, Nash J. H, Johnson S. C, Brown L. L.: The genome of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* A449: insights into the evolution of a fish pathogen. *BMC Genomics*. Sep 18;9:427, 2008. DOI: 10.1186/1471-2164-9-427.
- Santos, J. A., González, C. J., Otero, A., and García-López, M. L.: Hemolytic activity and siderophore production in different *Aeromonas* species isolated from fish. *Applied and Environment Microbiology*, 65, 5612-5614, 1999. DOI: 10.1128/AEM.65.12.5612-5614.1999.
- Sen, K., and Rodgers, M.: Distribution of six virulence factors in *Aeromonas* species isolated from US drinking water utilities: A PCR identification. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 1077-1086, 2004. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2004.02398.x.
- Sommerset, I., Krossøy, B., Biering, E., and Frost, P.: Vaccines for fish in aquaculture. *Expert review of vaccines*, 4(1), 89-101, 2005. DOI: 10.1586/14760584.4.1.89.
- Shivam, S., El-Matbouli, M., and Kumar, G.: Development of fish parasite vaccines in the OMICs era: Progress and opportunities. *Vaccines*, 9(2), 179, 2021. DOI: 10.3390/vaccines9020179.
- Stuber, K., Burr, S. E., Braun, M., Wahli, T., and Frey, J.: Type III secretion genes in *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* are located on a large thermolabile virulence plasmid. *Journal of clinical microbiology*, 41(8), 3854-3856, 2003. DOI: 10.1128/jcm.41.8.3854-3856.2003.
- Wiklund T and Dalsgaard I: Occurrence and significance of atypical *Aeromonas salmonicida* in non-salmonid and salmonid fish species: a review, 32: 49-69, 1998. DOI: 10.3354/dao032049.
- Wang, Y., and Gu, J.: Influence of temperature, salinity and pH on the growth of environmental *Aeromonas* and *Vibrio* species isolated from Mai Po and the Inner Deep Bay Nature Reserve Ramsar Site of Hong Kong. *Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms*, 45(1), 83-93, 2005. DOI: 10.1002/jobm.200410446.
- Wee, G. N., Lyou, E. S., Hong, J. K., No, J. H., Kim, S. B., & Lee, T. K.: Phenotypic convergence of bacterial adaptation to sub-lethal antibiotic treatment. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 913415, 2022. DOI: 10.3389/fcimb.2022.913415.
- Wong, C. Y., Heuzenroeder, M. W., and Flower, R. L.:

Inactivation of two haemolytic toxin genes in *Aeromonas hydrophila* attenuates virulence in a suckling mouse model. *Microbiology*, 144, 291-298, 1998.  
DOI: 10.1099/00221287-144-2-291.

명정구, 김병일, 이선병, 전길봉: 우리바다 어류도감, pp. 287, 예조원, 2010.

---

Manuscript Received : Nov 15 2023

Revised : Dec 02 2023

Accepted : Dec 14 2023