

碩士學位論文

제주도내 양식넙치에서 분리한 활주세균증의
원인균인 *Tenacibaculum maritimum*의
분리 및 특성에 관한 연구



濟州大學校 産業大學院

生命産業工學科

張 榮 桓

2008 年 6 月

제주도내 양식넙치에서 분리한 활주세균증의
원인균인 *Tenacibaculum maritimum*의
분리 및 특성에 관한 연구

指導教授 許文洙

張榮桓

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2008 年 6 月

張榮桓의 理學碩士 學位論文을 認准함

審査委員長 정준범 (印)

委 員 송춘복 (印)

委 員 허문수 (印)

濟州大學校 産業大學院

2008 年 6 月

목 차

목 차	I
Abstract	III
List of Tables	VI
List of Figures	V
I. 서 론	1
1. 제주도 양식현황 및 문제점	1
2. 자생식물추출물의 생리활성 물질 개발의 중요성	4
II 재료 및 방법	6
1. 대상지역 선정 및 조사기간	6
2. 감염증의 원인균의 분리 및 동정	7
2.1 원인균의 분리 및 균주보존	7
2.2 분리균주의 형태학적 관찰	9
2.3 분리균주의 생화학적 성장 검사	9
2.4 16S rRNA 염기서열 분석	10
3. 분리균주의 생물학적 특성	11
3.1 최적 배양조건	11
3.2 항생제 감수성 실험	12
4. 분리균주의 공격 시험	14
4.1 실험어 및 사육조건	14
4.2 인위감염에 의한 침지 공격 시험	14
5. 자생식물 추출물 항균 실험	15
5.1 재료 및 항균활성 측정	15
5.2 MIC 및 MBC 측정	18

Ⅲ. 결과	19
1. 감염증의 원인균 분리 및 동정	19
1.1 병원균의 분리	19
1.2 분리균주의 형태학적 특성	20
1.3 생화학적 성상 검사	21
1.4. 16S rRNA 염기서열 분석	25
2. 병원균의 항생제 감수성 실험	29
3. 분리균주 <i>Tenacibaculum maritimum</i> 의 침지공격 시험	30
4. 자생식물 추출물 항균실험	33
Ⅳ. 고찰	38
Ⅴ. 참고 문헌	41
감사의 글	45

ABSTRACT

Tenacibaculum maritimum (formerly *Flexibacter maritimus*) is the aetiological agent of an ulcerative and necrotic disease commonly called tenacibaculosis in marine fish. Tenacibaculosis is an economically important disease in a great variety species in Jeju Island cultured fish and leading to this pathogen initially affected by skin, mouth, fins, tail causing severe necrotic and ulcerative lesions on the body surface.

The aim of this experiment is to investigate artificially infected in *Paralichthys olivaceus* with *T. maritimum* can cause tenacibaculosis to identify potential processes that may be responsible for mortality. *T. maritimum* is experimentally infected through immersion route in *Paralichthys olivaceus* which the disease outbreaks in land-based fish tanks of Jeju Island. Up to data a number of treatments proposed for the tenacibaculosis outbreaks are based on the immersion administration of drugs in tank. Oxytetracycline is the most widely used disinfectants in fish farms. However, most of fish farms manager and consumers have expressed concern as bioaccumulation in tissue and its environmental. In addition, this antimicrobial compounds is expensive in fish farmers.

The overcome of this problem is desired the application of natural plant derived products. To obtain as 70% EtOH extract antimicrobial compounds against tenacibaculosis from 35 species of Jeju Island native plants were screened for antimicrobial activity against *T. maritimum*. In the present study were identified most of the plant extracts were better antimicrobial activity against *T. maritimum*.

LIST OF TABLES

Table 1. Criteria for determination of antibiotics sensitivity by inhibition zone based on paper disc method	1 3
Table 2. Antimicrobial activity methods of Jeju Island native plants	1 6
Table 3. Phenotypic characteristics that differentiate strain A-7 from the type strains of other <i>Tenacibaculum</i> species	2 2
Table 4. Phenotypic characteristics of strain A-7	2 3
Table 5. Phenotypic characteristics of strain A-7	2 4
Table 6. Antibiotics sensitive of <i>Tenacibaculum maritimum</i> based on paper disc method	2 9
Table 7. Antimicrobial activity of Jeju Island native plant extracts by disc diffusion assay	3 4
Table 8. Minimum inhibitory concentration and Minimum bactericidal concentration of thirteen Jeju Island native plant extracts against <i>T. maritimum</i>	3 7

LIST OF FIGURES

Fig. 1. Sampling area by diagnostic survey of six months in Jeju Island.	6
Fig. 2. External symptom of diseased flounders.	8
Fig. 3. Scanning electron micrograph of the isolate A-7 from eroded mouth. Cells were grown on MA at 30°C for 1days.	2 0
Fig. 4. Alignment of 16S rRNA sequence of the isolated Strain A-7. AB078057 : <i>Tenacibaculum maritimum</i> IFO 15946 ^T D14023 : <i>Flexibacter maritimus</i> NCIMB 2154 ^T	2 7
Fig. 5. Neighbour-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the position of strain A-7 within the radiation of the genus <i>Tenacibaculum</i> . The tree was constructed from evolutionary distance matrix by using neighbour-joining method (Saitou & Neil, 1987). The sequence of <i>Flavobacterium aquatile</i> ATCC 11947T (M62797) was used an outgroup. Bootstrap percentages (from 1000 replications) >50% are shown at branch points. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position.	2 8
Fig. 6. Cumulative mortality of <i>Paralichthys olivaceus</i> , challenged with 1×10 ⁷ CFU/ml Isolated <i>Tenacibaculum maritimum</i> at 2days. Control group was immersed in rearing water.	

(A) *Paralichthys olivaceus* of 12-20 g(10-12 cm) size.

(B) *Paralichthys olivaceus* of 150-200 g(23-25 cm) size.

.....3 1

Fig.7. *Tenacibaculum maritimum* infection after clinical signs.

.....3 2

Fig.8. Inhibitory effections on Jeju Island native plant extracts.

.....3 6



I. 서론

1. 제주도 양식 현황 및 문제점

1990년대 이후 우리나라 양식업은 크게 발전하였고 특히 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)는 해상가두리 양식에서 육상수조식 생산으로 전환되었으며, 2007년에는 43,834톤, 생산금액은 4,588억원에 이르러 생산금액측면에서 우리나라 연근해 어업의 10%를 차지할 정도로 중요한 산업으로 자리잡게 되었다. 이 중 제주도 넙치 육상양식 생산량은 21,487톤으로 전국 생산량의 약 48%를 차지하고 있다.

특히 제주도는 풍부한 지하해수 자원을 가지고 있어서 넙치 육상수조식 양식을 하기에 타 지역보다 유리한 조건을 가지고 있다. 이러한 이유로 완도나 포항 등 기타 지역은 넙치 생산량이 2005년 대비 2006년에는 각각 2.3%, 16.1% 감소하는 반면 제주도는 약 10% 증가하였다 (옥, 2007). 제주도의 경우 육상양식수조식, 가두리식, 축제식 양식이 이루어지고 있으며, 그 중 99%이상은 육상수조식 양식을 하고 있으나 (제주특별자치도, 2007), 생산량은 양식시설면적에 비해 높은 수준이며, 장기간 집약적 양식에 의한 어장의 노화, 고밀도 사육으로 계절에 상관없이 연중 다양한 병원체가 혼합감염 형태로 질병을 일으키고 있다 (Kim *et al.*, 2006). 주로 넙치에 세균성질환을 일으키는 *Vibrio* spp., *Streptococcus* spp., *Edwardsiella tarda*와 기생충성 질병을 일으키는 *Trichodina*, *Ichthyobodo*, *Scutica* 등은 많은 연구가 되어있는 반면 세균성폐양의 원인균에 대한 국내 연구는 전무한 실정이다 (Kim *et al.*, 2006). 그러나 연안 수역의 오염과 과밀양식은 항생제 경구투여와 백신 등의 개발로 치료확률이 높아진 *Vibrio* spp., *Streptococcus* spp., *E. tarda* 보다 넙치의 표피궤양, 표피괴사, 주둥이부식, 지느러미부식, 아가미세엽괴사 증상은 모든 크기의 넙치에 연 중 발병하고 있으며, *scutica* 등과 혼합감염되어 큰 피해를 주고 있다.

외국의 경우 이러한 질병을 salt water columnaris disease, gliding

bacterial disease of sea fish, bacterial stomatitis, eroded mouth syndrome, black patch necrosis 등으로 명명하고 있다 (McVicar & White 1979; Campbell & Buswell 1982; Wakabayashi *et al.*, 1984; Baxa *et al.*, 1986; Devesa *et al.*, 1989; Alsina & Blanch 1993, Chen *et al.*, 1995; Handlinger *et al.*, 1997; Ostland *et al.*, 1999; Cepeds & Santos 2002). 세균성 궤양질환의 원인균인 *Tenacibaculum maritimum* (formerly *Flexibacter maritimus*)은 유럽의 많은 어종에 다양하게 질병을 일으켜 경제적인 많은 손실을 유발하고 있기 때문에 세균성 질병에 있어서 매우 중요하게 여겨지고 있으며, 이 질병의 첫 번째 감염경로는 어류의 주둥이, 지느러미, 꼬리와 표피에 궤양과 괴사를 일으킨다고 보고되어 있다 (Toranzo *et al.*, 2005). 감염어종으로는 참돔 (*Pagrus major*), 감성돔 (*Acanthopagrus schegeli*), 일본넙치 (*Paralichthys olivaceus*) (Baxa *et al.*, 1986; Wakabayashi *et al.*, 1986), 도버서대 (*Solea solea*) (Bernardet *et al.*, 1990), 터봇 (*Scophthalmus maximus*) (Alsina & Blanch 1993), 대서양연어 (*Salmo salar*), 무지개송어 (*Onchorynchus mykiss*), 세줄취청이 (*Latris lineata*), 그린백넙치 (*Rhombosolea tapirina*) (Handlinger *et al.*, 1997) 등 다양한 어종에서 보고되고 있다. 따라서 제주도 및 우리나라 육상수조식 양식의 경우에도 넙치 외에 다양한 어종으로 다변화되는 시점에서 Surface ulcers, Surface necrosis, Eroded mouth, Frayed fins, Tail rots, Gills necrosis에 대한 연구는 필요하다고 사료된다.

그리고 현재 이러한 감염증으로 인한 치료책으로는 항생제 침지법 (약욕)에 의존하고 있으며, 항생제로는 Oxytetracycline (OTC)을 주로 사용하고 있다. 최근 식생활 문화와 소비문화가 변화하면서, 수산식품 및 활어에 대한 소비가 급증하고 있으며 보다 위생적이고 안전한 식품에 대한 요구도 크게 증가하고 있으나 국내산 및 수입산 활어에 있어서 항생제의 검출로 인해 안전성이 위협을 받고 있다. 이러한 사례로 식품의약품안전청에서 보고된 바에 의하면 일본에 수출한 양식넙치의 항생제 잔류로 인한 전량반품, 중국산 활잉어에서 OTC검출로 전량 반송, 제주산 병든 활넙치에서 과량의 OTC검출, 백화점 등에서 판매되는 축·수산 식품 중에서 항생제 내성이 있는 식중독균이 검출되었다. 또한 국내 시판되는 약 30여종의 항생제 중 Tetracycline계 항생제인 OTC가 가장 많이 사용

되고 있다 (국립수의과학검역원, 2005). 이러한 OTC사용은 비브리오팀, 연쇄상구균증에도 사료를 통한 경구투여제로 사용하지만 대부분은 항생제 약용으로 인한 사용으로 추측된다. OTC약육은 넓치의 근육에 잔류 (Kim *et al.*, 2006)되어 항생제의 내성균 유발 (Mcphearson *et al.*, 1991) 및 면역력저해 (Heo *et al.*, 1992)를 일으키며, 약제가 함유된 사육수의 배출은 주변수역을 오염시키는 문제를 일으키고 있다. 따라서 제주도내 육상 수조식 양식장에서 연 중 발생하고 있는 세균성 궤양의 발생원인과 원인균에 대한 동정 및 특성을 확인하여 차후 관련 연구의 기초자료 및 친환경적인 양식기술 개발에 응용하고자 본 연구를 실시하였다.



2. 자생식물추출물의 생리활성 물질 개발의 중요성

최근에 천연 자원을 통한 생리활성물질에 대한 연구가 많이 이루어지면서 자생식물에 대한 관심 또한 높아지고 있다. 자생식물의 항균효능에 대한 연구는 식품, 의약품, 화장품, 양식업, 축산업 등 관련분야에서 적용이 되고 있는데 이는 생리활성 물질을 생산하는 공장이라고 불려질 만큼 다양한 물질을 생산해 내고 특히 자기방어 기작과 관련한 대사 물질의 천연 항균에 잠재력이 있다는 연구에 기초하고 있다 (Moon *et al.*, 2007).

지구상 현화식물 약 250,000종중에 20% 정도가 각 지역의 민속약용식물로서 연구되어지고 있다. 우리나라의 경우 약 4,500여종의 고등식물이 존재하고 있다고 추정되고 있으며, 제주도는 그 중 1870여종의 자생식물이 있다고 보고하고 있다 (Moon *et al.*, 2007). 이러한 자생식물을 이용한 생리활성 효능 중 항균활성에 대한 연구는 일반적으로 그람음성균 (*Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae* NonO1, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus* 등)에 항균활성 (Min *et al.*, 2004)이 알려져 있다.

현재 제주도에서 가장 많이 양식되고 있는 해산어 중 하나인 넙치는 고밀도 양식으로 인한 여러 질병의 발생으로 경제적 손실을 비롯한 많은 어려움을 겪고 있다. 그리고 어류의 질병치료는 대부분 항생제와 같은 약제에 의존하고 있으며, 이러한 항생제의 남용으로 인하여 내성균이 발생할 뿐 아니라 환경을 악화시키며 치료를 더욱 어렵게 만들고 있다. 이러한 문제점을 해결하고자 최근 양식 어류의 건강증진 및 성장촉진을 위해 자생식물 및 천연물 자원을 이용한 생리활성 물질 개발이 이루어지고 있다. 이러한 시도는 친환경적 식품을 요구하는 소비자의 욕구 충족 및 제주도내 양식넙치에 대한 브랜드적 이미지를 확고히 할 수 있으며, 항생제의 오남용으로 인한 가장 큰 문제점인 약제내성균주에 대한 대비책으로서 손색이 없을 것으로 사료된다. 또한 양식어민들의 항생제의 사용에 따른 생산단가를 절감할 수 있는 효과를 기대할 수 있으며, 소비자들에게는 값싸고 질 좋은 품질의 제품을 공급할 수 있는 장점을 가지고 있다.

본 연구에서는 아직까지 확실하게 규명된 연구사례가 없는 제주도내 육

상수조식 양식장에서 연 중 발생하여 피해를 주고 있는 세균성 궤양병을 일으키는 원인균으로 의심되는 *T. maritimum*에 대하여 총 35종류의 자생식물의 유기용매 추출물을 이용하여 항균활성을 검색함으로써, 세균성 궤양병을 일으키는 세균에 대한 방어 효과를 확인하며, 기존의 항생제에 대한 대체물질로서의 이용 가능성을 확인하고자 한다.



II 재료 및 방법

1. 대상지역 선정 및 조사기간

본 연구에서 세균성 궤양병의 원인균을 분리하기 위해 선정된 대상 지역은 서귀포시 지역 5군데 (온평, 태흥, 영락, 위미, 표선)와 제주시 지역 2군데 (구좌, 애월)이며, 육상수조식 양식장의 넙치로부터 원인균주를 분리하였다 (Fig. 1). 2007년 10월부터 2008년 3월까지 총 6개월 동안 채집하였으며, 채집기간 동안의 수온 범위는 14-26℃였다.



Fig. 1. Sampling area by diagnostic survey of six months in Jeju Island.

2. 감염증의 원인균 분리 및 동정

2.1 원인균의 분리 및 균주보존

원인균은 세균성 폐양증상을 보이는 병어의 표피, 주둥이, 지느러미, 꼬리, 아가미 등으로부터 분리하였고, 원인균의 1차적 분리에 앞서 기생충 검사를 통해 스키테카충 및 다른 기생충이 감염되지 않았음을 확인하였다. 양식장 현장에서 해부학적 실험을 통해 marine agar (MA), brain heart infusion (BHIA)agar, thiosulfate citrate bile sucrose (TCBS)agar, salmonella shigella (SS)agar에 도말하였으며, 25℃에서 48시간 동안 배양하였다. 또한 계대배양을 통해 균주를 순수분리하였으며, 분리된 균주의 보관을 위해서 1.5 ml Microtube에 marine broth (MB) 700 µl를 첨가한 후, 균주를 접종하여 25℃에서 48시간 배양하였으며, 배양 후 Microtube에 80% 글리세롤 300 µl 첨가하여 사용전까지 -80℃에 보관하였다.

2.2 분리균주의 형태학적 관찰

시험균주를 MA에 25℃, 48시간 배양 후, 광학현미경으로 균체의 형태적인 관찰 및 Gram 양성 유무를 확인하였다. 또한 시험균주를 MA에 25℃, 48시간 배양 후, Colony가 자란 배지를 0.5cm×0.5cm 크기로 절단하고, 2.5% Glutaraldehyde에 2시간 방치한 후, 1.0 M phosphate buffer solution에 5분씩 washing을 2회 반복하였다.

그리고 2% Osmium tetroxide 용액에 1시간 방치 후 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100% EtOH로 각각 1시간씩 탈수하였으며, isoamyl acetate : 100% EtOH를 0.5:1.5, 1:1, 1.5:0.5, Isoamyl acetate 100%에 1시간 씩 방치하였다.

이후 CO₂를 이용한 건조와 cell 도금하여 scanning electron microscope (SEM)을 촬영하였다.

2.3 분리균주의 생화학적 성장검사

시험균주는 MA를 이용하여 25℃에서 48시간 배양한 후, 생화학적 성장 시험을 하였다. 생화학 시험 항목은 Motility, Oxidase, Catalase, DNase, Gelatin, Starch, Tween 20, Tween 40, Tween 80, API 20E (Biomerieux, France), API 20NE kit (Biomerieux, France), API 20E kit (Biomerieux, France), API 50CH kit (Biomerieux, France), API ZYM kit (Biomerieux, France)를 실시하였으며, colony 성상은 MA에서 관찰하였다.

2.4 16S ribosomal RNA (16S rRNA) 유전자 서열 분석

Genomic DNA Extraction kit (Bioneer, Korea)를 사용하여 Chromosomal DNA를 분리한 후, DNA 양은 흡광도를 측정($A_{260/280}$) 하여 OD값이 1.8이상 되게 하였으며, Bacterial 16S rDNA universal primer를 이용하여 16S rRNA를 증폭시켰다. 합성된 Oligonucleotides의 각각의 primer는 forward primer는(27F) : 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' reverse primer (1492R) : 5'-GGTTA-CCTTGTTACGACTT-3'의 염기서열로 구성되었으며, 각각의 0.5 μ M primer, 200 μ M deoxynucleoside triphosphate, Taq DNA polymerase (Bioneer, Korea) 3 μ l를 사용하여 PCR를 수행하였다.

PCR 반응조건은 94°C에서 5분 predenaturation, 30cycle 동안 94°C에서 45초 denaturation, 50°C에서 45초 annealing, 72°C에서 45초간 extention하였으며, 다시 72°C에서 5분간 extention하였다. 증폭된 PCR product는 ethdium bromide가 첨가된 상태에서 전기영동하여 1% agarose (Agarose LE, Promega CO.) gel에서 확인하였다. 이후, AccuPrep™ PCR Purification Kit (Bioneer, Korea)을 이용하여 PCR product에 남아있는 primers, nucleotides, polymerase, salts를 제거하여 정제하고 30 μ l에 elution buffer (10mM Tris-Cl, pH 8.5)로 DNA를 elution하였다. 이를 ABI prism™ Bigdye™ terminator cycle sequencing Ready reaction kit V.3.1 (Fluorescent dye terminators method)와 ABI 3730XL capillary DNA Sequencer를 사용하여 PCR product의 염기서열을 밝혔고, 밝혀진 염기서열은 NCBI (National Center Biotechnology Information)의 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)을 사용하여 분석하였다.

3. 분리균주의 생물학적 특성

3.1 최적배양조건

분리된 균주의 배양학적 특성을 확인하기 위하여 배양온도에 따른 발육특성 조사하였다. MA에 시험균주를 접종하여 4, 10, 20, 25, 30, 37, 40, 45°C로 배양 후, 발육정도를 육안으로 관찰하였으며, MB에 진배양액을 1% (v/v)로 접종한 후, 각각의 온도별로 배양한 후, Spectrophotometer를 이용하여 600 nm의 흡광도에서 growth curve를 확인하여 최적 배양온도를 측정하였다. 그리고 Wakabayashi *et al.*, (1986), Hansen *et al.*, (1992), Suzuki *et al.*, (2001), Frette *et al.*, (2004)의 방법을 이용하여 염분농도에 따른 균의 생육정도를 조사하기 위해 250 ml 삼각 플라스크에 기초배지로 MB에 NaCl를 0 ~ 14% (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14%)까지 첨가한 후, 전 배양된 2% (v/v) 균액을 접종한 후, 25°C에서 48시간동안 배양하고, 흡광도를 측정하였다. 이외에 같은 방법으로 분리 균주의 pH에 대한 생육정도를 확인하기 위해 배지의 pH를 4-10 (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10)으로 조절하여 배양한 후, 생육정도를 측정하였다. 배양 후 생육정도는 + (Growth), - (No Growth)로 판정하였다.

3.2 항생제 감수성실험

분리된 균주에 대한 항생제 감수성 시험을 하기 위하여 Bauer 방법 (Bauer *et al.*, 1966)에 따른 Paper disc agar diffusion법을 시행하였으며, Muller-Hinton (MH)agar 에서 발육하지 않는 시험균주의 특성으로 MB에서 48시간동안 배양된 균주를 멸균해수를 이용하여 균농도가 1×10^7 CFU/ml가 되도록 희석한 다음 이를 멸균 삼각 유리병으로 MA에 균등하게 도말하였다. 그리고 약제 디스크 (Oxoid, BBL, bioDiscs)를 일정한 간격으로 얹고, 25°C에서 48시간 동안 배양하여 형성된 저지대의 지름을 측정하였고 감수성의 정도를 Susceptible, Intermediate 그리고 Resistant로 나타내었다.

실험에 사용한 약제 디스크는 Amoxicillin, Ampicillin, Erythromycin, Oxolinic acid, Cephalothin, Pefloxacin, Ofloxacin, Lincomycin, Ciprofloxacin, Kanamycin, Gentamicin, Clindamycin, Doxycycline, Oxytetracycline, Norfloxacin, Nalidixic acid, Flumequin, Florfenicol, Neomycin, Chloramphenicol이었다. 분리균주에 대한 약제 감수성 판단기준은 Table 1에 제시하였다.

Table 1. Criteria for determination of antibiotics sensitivity by inhibition zone based on paper disc method

Antibiotics	Concentrations (μg)	Diameter of inhibition zone (mm)		
		Resistant	Intermediate	Susceptible
Amoxicillin (AML30)	30	≤ 13	14~17	≥ 18
Ampicillin (AMP10)	10	≤ 13	14~16	≥ 17
Cephalothin (KF30)	30	≤ 14	15~17	≥ 18
Chloramphenicol (C30)	30	≤ 12	13~17	≥ 18
Ciprofloxacin (CIP5)	5	≤ 15	16~20	≥ 21
Clindamycin (DA2)	2	≤ 14	15~20	≥ 21
Doxycycline (D30)	30	≤ 12	13~15	≥ 16
Erythromycin (E15)	15	≤ 13	14~22	≥ 23
Florfenicol (FFC30)	30	≤ 13	14~19	≥ 20
Flumequin (UB30)	30	≤ 20	21~24	≥ 25
Nalidixic acid (NA30)	30	≤ 13	14~18	≥ 19
Neomycin (N10)	10	≤ 12	13~16	≥ 17
Norfloxacin (NOR10)	10	≤ 12	13~16	≥ 17
Ofloxacin (OFX5)	5	≤ 12	13~15	≥ 16
Oxolinic acid (OA2)	2	≤ 10	-	≥ 11
Oxytetracycline (T30)	30	≤ 14	15~18	≥ 19
Pefloxacin (PEF5)	5	≤ 15	16~21	≥ 22

4. 분리균주의 공격 시험

4.1 실험어 및 사육조건

본 실험에 사용된 실험어는 위미, 구좌 육상 수조식 양식장에서 사육된 넙치를 사용하였고, 외관상 아무런 증세가 없고 사육수조내 사육어 중 평균체중 이상의 건강한 넙치를 사용 하였다. 실험어는 30L 수조에 체중이 12-20 g(체장 10-12 cm)인 넙치를 10마리씩 각각 수용하고, 체중이 150-200 g(체장 23-25 cm)인 넙치를 5마리씩 수용하여 사육수조 내에서 일주일 동안 EP사료를 하루 1번 투여하고, 사육수교환은 하루 1회한 후, 세균성 질병이나 기생충에 의한 감염유무를 확인하여 질병에 감염되지 않은 건강한 넙치를 본 연구의 실험구 및 대조구로 사용하였으며, 실험기간 중 해수 온도는 $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ 를 유지하였다.

4.2 인위감염에 의한 침지 공격시험

실험균주는 남원지역 넙치병어에서 분리한 균주 (A-7)을 사용하였으며, MB에서 25°C , 48시간 동안 배양한 후, 멸균해수를 이용하여 $1\times 10^7\text{CFU/ml}$ 로 되도록 현탁하여 공격 실험용액으로 사용하였다. 세균 공격시험 시 사육수는 실험어를 사육하고 있는 육상수조식 양식장의 해수를 사용하였으며, 2차감염을 막기 위해 해수는 필터를 이용하여 멸균하였다. 공격실험은 1회 실험기간을 1주를 기준으로 3주 동안 총 3반복 실시하였다. 실험에 사용된 실험구는 공격실험을 위해 공격 실험용액을 침지하였으며, 대조구는 공격 실험용액을 침지하지 않았다. 그리고 대조구와 실험구의 폐사율을 1주일 동안 관찰하였다.

5. 자생식물 추출물 항균실험

5.1 재료 및 항균활성측정

본 항균실험에 사용한 시료는 그람음성 세균에 효과 (Min *et al.*, 2004)가 있다고 보고되는 자생식물을 제주하이테크 산업진흥원에서 총 31종류의 식물 시료를 분양받아서 본 실험에 사용하였으며, 그 외에 제주조릿대, 미성숙 온주밀감, 온주밀감 과피, 섬갯장대는 채집하여 본 연구에 실험시료로 사용하였다 (Table 2).

시료 내에 포함되어 있는 불순물을 제거하기 위해 흐르는 물에 2~3번 수세하여 그늘에서 5일간 건조 후, 잘게 시료를 분쇄시키고 시료무게의 10배량의(w/v)의 70% EtOH로 72시간 동안 3회 추출 (Min *et al.*, 2004)하였으며, 유기용매 추출액은 감압농축장치를 이용하여 농축하였다. 최종적으로 농축된 시료를 동결건조 시킨 후, 본 항균실험에 사용하기 위해서 저온에 보관하였다.

항균실험에 이용하기 위해서 dimethylsulfoxide (DMSO)에 녹인 후, Membrane filter (0.45 μm)로 여과시키고 Paper disc (ADVANTEC F0424695, \varnothing 8 mm)에 25 μl (건조 추출물 2.5 mg) 접종하였다. Disc의 제작은 최종 농도가 0.5, 1, 2.5, 5mg/disc가 되게 하였으며, MA에 시험균주를 도말하여 농도별로 제작한 Paper disc를 얹고, 25 $^{\circ}\text{C}$, 48시간 배양시켜 Paper disc의 직경을 포함한 Inhibition zone의 직경을 측정하였다. 그리고 각 농도별 실험은 직경 15mm 이상인 추출물에 대하여 단계별 저농도실험을 하였다.

Table 2. Antimicrobial activity methods of Jeju Island native plant extracts

Korean name	Plant parts	Scientific name
큰달맞이꽃	whole	<i>Oenothera lamarckiana</i>
석류	stems, leaves	<i>Punica granatum</i>
납오미자	whole	<i>Kadsula japonica</i>
왕고들빼기	whole	<i>Lactuca indica var. laciniata</i>
산수국	whole	<i>Hydrangea serrata for. acuminata</i>
진득찰	whole	<i>Siegesbeckia glabrescens</i>
사방오리	whole	<i>Alnus firma</i>
비과	unripened fruits	<i>Eriobotrya japonica</i>
찔레나무	stems, leaves	<i>Rosa multiflora</i>
쑥	whole	<i>Pueraria thunbergiana</i>
말오줌때	whole	<i>Euscaphis japonica</i>
초피나무	stems, leaves	<i>Zanthoxylum piperitum</i>
산초나무	stems, leaves	<i>Zanthoxylum schinifolium</i>
다래	stems, leaves	<i>Actinidia arguta</i>
닥나무	stems, leaves	<i>Broussonetia kazinoki</i>
털여뀌	whole	<i>Persicaria cochinchinensis</i>
때죽나무	stems, leaves,	<i>Styrax japonica</i>

	flowers	
미나리아재비	whole	<i>Ranunculus japonicus</i>
십자고사리	whole	<i>Polysticum tripterum</i>
천문동	whole	<i>Asparagus cochichinensis</i>
사철쭉	stems, leaves	<i>Artemisia capillaris</i>
맥문동	whole	<i>Liriope platyphylla</i>
개면마	whole	<i>Matteuccia orientalis</i>
돈나무	stems, leaves	<i>Pittosporum tobira</i>
복분자	whole	<i>Rubus coreanus</i>
제충국	whole	<i>Chrysanthemum cinerariaefolium</i>
섬갯장대	whole	<i>Arabis stelleri var. japonica</i>
영경귀	whole	<i>Cirsium Japonicum var. ussuriense</i>
제주조릿대	whole	<i>Sasa quelpaertensis</i>
큰천남성	whole	<i>Arisaema ringens</i>
양하	whole	<i>Zingiber mioga</i>
멀구슬나무	stems, leaves	<i>Melia azedarah var. japonica</i>
온주밀감	unripened fruits	<i>Citrus unshiu</i>
온주밀감	peel	<i>Citrus unshiu</i>
신선초	leaves	<i>Angelica keiskei</i>

5.2 MIC 및 MBC 측정

자생식물 추출물들의 궤양성 세균병의 원인균에 대한 최소억제농도 (MIC, Minimum Inhibitory Concentration)의 측정은 Microtitre plate에 MB (Marine Broth, Difco. Co. USA)를 200 μ l를 채운 후, 최소농도가 5 mg/ml가 되도록 추출액 (10 mg/ml)을 접종하고, 이를 2배 희석법으로 희석하여 각 단계 농도를 5 mg/ml, 2.5 mg/ml, 1.25 mg/ml, 0.625 mg/ml, 0.312 mg/ml의 농도구로 실험하였다.

피검균은 48시간 전배양한 것을 멸균해수에 희석하여 1×10^7 CFU/ml 농도로 제조하여 이를 2 μ l씩 접종하였으며, 접종된 Microtitre plate를 25 $^{\circ}$ C 48시간 배양한 후 660 nm의 흡광도 값을 통해 최소억제 농도 (MIC) 및 억제정도를 가늠하였으며, 각 희석단을 MA에 접종하여 균주가 99% 생육되지 않은 최소농도를 MBC (Minimum Bactericidal Concentration)로 정하였다.

Ⅲ. 결과

1.1 병원균의 분리

감염증상을 보이는 넙치의 표피, 주둥이, 지느러미, 아가미세엽 등을 시료로 BHIA, TCBS, SS, MA를 사용하여 병원균을 분리배양 하였으며, 생화학적 성상 검사와 16S ribosomal RNA (16S rRNA) 유전자 서열 분석으로 *Vibrio* sp. 10여종 (*Vibrio splendidus*, *Vibrio gigantis*, *Vibrio tapetis* 등)과 *Mucus bacterium*, *Flavobacterium frigidarium*, *Exiguobacterium oxidotolerans*, *Pseudoalteromonas* sp. *Micrococcus* sp. 등의 여러 종의 균들이 분리되었으나 이 중에서 지금까지 다양한 어종에 세균성 궤양을 일으킨다고 알려져 있는 *T. maritimum* (formerly *F. maritimus*)인 A-7을 분리하였다. 병원균을 분리한 병어의 외부증상은 지느러미, 아가미, 표피, 주둥이에 궤양증상을 나타내었으며, Fig. 2에 나타내었다.

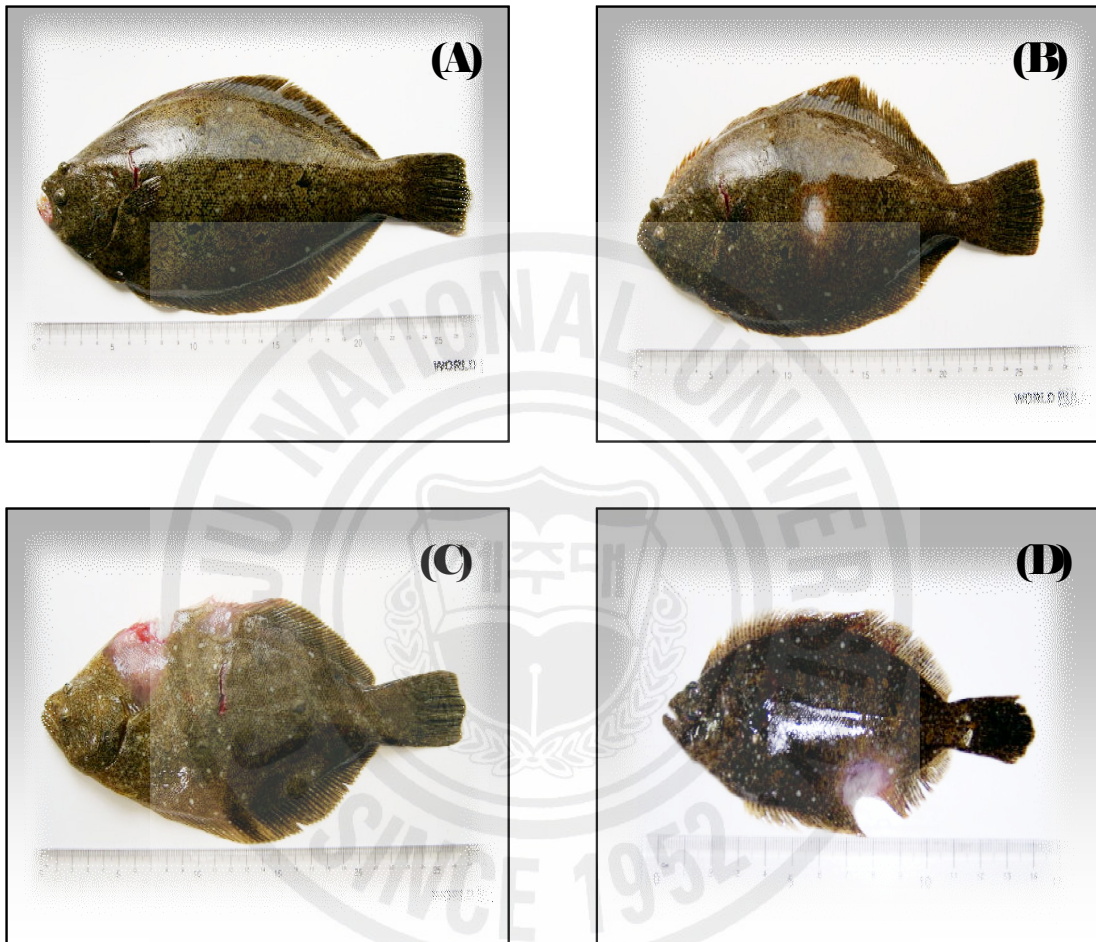


Fig. 2. External symptoms of diseased *Paralichthys olivaceus*.

(A), Eroded mouth; (B), Surface ulcer; (C)(D), Frayed fin

1.2 분리균주의 형태학적 특성

분리균주인 A-7의 형태학적 특성을 확인하기 위해 Gram stain을 통해 그람음성임을 확인 하였고, SEM으로 촬영하여 형태적 특성을 확인하였다 (Fig. 3). 균체의 길이는 대략 5~11 μm 였으며, 외부적인 형태는 장간균의 모양을 하고 있었으며, 균체사이에 점액성분들이 관찰되었다.

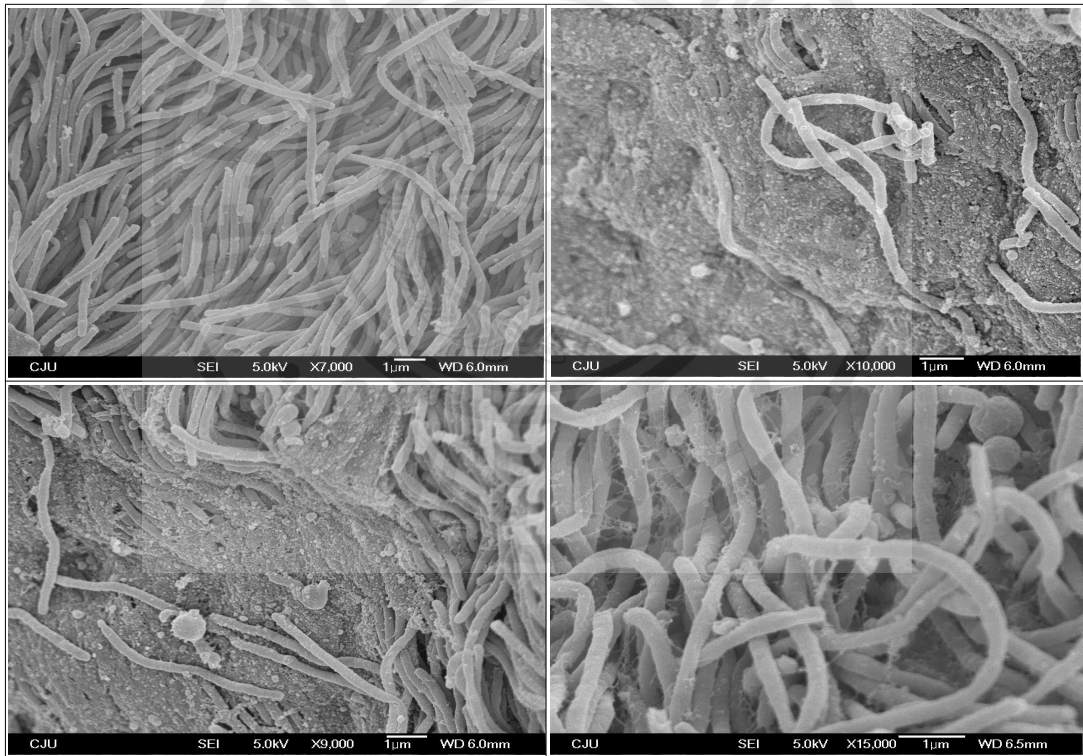


Fig. 3. Scanning electron micrograph of the isolate A-7 from eroded mouth.
Cells were grown on MA at 25°C for 2days.

1.3 생화학적 성상검사

분리균주 A-7의 생화학적 검사를 위해서 균주의 Motility, Oxidase, Catalase, DNase, Gelatin, Starch, Tween 20, Tween 40, Tween 80, API 20E (Biomerieux, France), API 20NE kit (Biomerieux, France), API 20E kit (Biomerieux, France), API 50CH kit (Biomerieux, France), API ZYM kit (Biomerieux, France) 확인 해본 결과 Wakabayashi *et al.*, (1986), Hansen *et al.*, (1992), Suzuki *et al.*, (2001), Frette *et al.*, (2004) 등이 보고한 *T. maritimum*의 생화학적 결과와 비교했을때, Tween 80 음성, Sucrose 양성으로 나타난것을 제외하고는 대부분의 결과가 일치하였다 (Table 3). 그러므로 A-7을 *T. maritimum*으로 동정하였다.

Table 3. Phenotypic characteristics that differentiate strain A-7 from the type strains of other *Tenacibaculum* species

Species: 1, A-7; 2, *T. maritimum*; 3, *T. ovolyticum*; 4, *T. Mesophilum*; 5, *T. amilotyticum*; 6, *T. skagerrskense*. Data were taken from Wakabayashi *et al.*, (1986), Hansen *et al.*, (1992), Suzuki *et al.*, (2001), Frette *et al.*, (2004). +: positive, -: negative; W: weakly positive; V: variable reaction; ND: not determined; -: no growth in the presence of NaCl only. All species are Gram-negative and rod-shaped. All species are positive for catalase, oxidase and degradation of casein. ^a100=full-strength seawater, ^bPercentage of NaCl in the medium

Characteristic	1	2	3	4	5	6
Origin	Diseased <i>Paralichthys olivaceus</i> , Jeju Island	Diseased red sea bream fingerling, Japan	Halibut egg, Norway	Sponge and macroalgae, Japan	macroalgae, Japan	Pelagic, Denmark
Cell size (μm)	10~22 × 0.5	2~30 × 0.5	2~20 × 0.5	1.5~10 × 0.5	2~4 × 0.4	2~15 × 0.5
Colony morphology shape	Uneven edge	Uneven edge	Regular edge	Circular, spreading edge	Circular, spreading edge	Circular, spreading edge
Colour	Pale yellow	Pale yellow	Pale yellow	Yellow	Yellow	Bright yellow
Temperature range (°C)	15~35	15~34	4~25	15~40	20~35	10~40
Optimal temperature (°C)	25~30	30	ND	28~35	27~30	25~37
Salinity range seawater (%) ^a	30~100	30~100	70~100	10~100	50~100	25~150
Salinity range NaCl (%) ^b	-	-	-	1~7	3(W)	-
pH range	6.0~9.0	5.9~8.6	5.9~8.6	5.3~9.0	5.3~8.3	6.0~9.0
Growth on						
Casamino acids	+	+	V	+	+	ND
Sucrose	+	-	-	-	-	+
D-ribose	-	-	-	-	-	ND
DL-aspartate	-	-	-	+	-	+
L-proline	-	-	-	+	+	+
L-glutamate	-	W	-	+	+	+
L-leucine	-	-	-	-	-	W
Degradation of						
Starch	-	-	-	-	+	+
Gelatin	+	+	+	+	+	ND
Tween 80	-	+	+	+	+	-
Nitrate reduction	+	+	+	-	W	+
G + C content (mol%)	31~32	31.3~32.5	30.3~32	31.6~32	30.9	35.2

Table 5. Phenotypic characteristics of strain A-7

	Characteristic	Reaction
API ZYM	Control	-
	Alkaline phosphatase	+
	Esterase (C4)	+
	Esterase Lipase (C8)	+
	Lipase	+
	Leucine arylamidase	+
	Valine arylamidase	+
	Cystine arylamidase	+
	Trypsin	+
	α - chymotrypsin	-
	Acid phosphatase	+
	Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	+
	α - galactosidase	-
	β - galactosidase	-
	β - glucuronidase	-
	α - glucosidase	-
	β - glucosidase	-
	N-acetyl- β glucosaminidase	-
	α - mannosidase	-
	α - fucosidase	-

1.4 16S ribosomal RNA (16S rRNA) 유전자 서열 분석

분리균주인 A-7의 16S ribosomal RNA PCR 증폭을 통해 얻은 1377bp 염기서열들을 NCBI (National Center Biotechnology Information)의 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)을 이용하여 분석한 결과 *Tenacibaculum maritimum* (gene for 16S rRNA, Strain: IFO 15946) 99%, *Tenacibaculum maritimum* small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence 98%, *Flexibacter maritimus* 16S ribosomal RNA 98%의 상동성을 보였으며, *Tenacibaculum maritimum* gene for 16S rRNA, strain:IFO 15946을 alignment 한 결과를 Fig. 4로 나타냈다.

계통수(Phylogenetic tree)는 거리(distance)에 근거한 방법으로 작성하였으며, Neighbor-Joining 방법에 의해 계통수를 나타내었다 (Fig. 5). 계통수 분석결과 *F. maritimus*와 매우 가까운 거리를 나타내어 동일종으로 사료되었고, 최종적으로 현미경적 형태학적 관찰, 생화학적 성상 및 염기서열 분석을 통하여 *F. maritimus* 라고 동정하였다.

Strain A-7 -----GCA-GTCGAGGGGTAACATTGTAGCTTGCTA 30
 AB078057 GATGAACGCTAGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGGGGTAACATTGTAGCTTGCTA 60
 D14023 -----CTA 3

Strain A-7 CAGATGACGACCGCGCACGGGTGCGTAACGCGTATAGAATCTGCCTTCTACAGAGGGAT 90
 AB078057 CAGATGACGACCGCGCACGGGTGCGTAACGCGTATAGAATCTGCCTTCTACAGAGGGAT 120
 D14023 CAGATGACGACCGCGCACGGGTGCGTAACGCGTATAGAATCTGCCTTCTACAGAGGGAT 63

Strain A-7 AGCCTTTAGAAATGAAGATTAATACCTCATAACACTTTGGAATGGCATCGTTTTAAAGTT 150
 AB078057 AGCCTTTAGAAATGAAGATTAATACCTCATAACACTTTGGAATGGCATCGTTTTAAAGTT 180
 D14023 AGCCTTTAGAAATGAAGATTAATACCTCATAACACTTTGGAATGGCATCGTTTTAAAGTT 123

Strain A-7 AAAGATTTATCGGTAGAAGATGACTATGCGTCCTATTAGCTAGATGGTAAGGTAACGGCT 210
 AB078057 AAAGATTTATCGGTAGAAGATGACTATGCGTCCTATTAGCTAGATGGTAAGGTAACGGCT 240
 D14023 AAAGATTTATCGGTAGAAGATGACTATGCGTCCTATTAGCTAGATGGTAAGGTAACGGCT 183

Strain A-7 TACCATGGCAACGATAGGTAGGGTCCTGAGAGGGAGATCCCCCACTGGTACTGAGAC 270
 AB078057 TACCATGGCAACGATAGGTAGGGTCCTGAGAGGGAGATCCCCCACTGGTACTGAGAC 300
 D14023 TACCATGGCAACGATAGGTAGGGTCCTGAGAGGGAGATCCCCCACTGGTACTGAGAC 243

Strain A-7 ACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGGCAATGGAGGCAACTCTG 330
 AB078057 ACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGGCAATGGAGGCAACTCTG 360
 D14023 ACGGACCAGNCTCCTACGGGAGGCAGCANTGAGGAATATTGGGCAATGGAGGCAACTCTN 303

Strain A-7 ACCCAGCCATGCCGCGTGCAGGAAGACTGCCCTATGGGTTGTAAACTGCTTTTATACAGG 390
 AB078057 ACCCAGCCATGCCGCGTGCAGGAAGACTGCCCTATGGGTTGTAAACTGCTTTTATACAGG 420
 D14023 ACCCAGCCATGCCGCGTGCAGGAAGACTGCCCTATGGGTTGTAAACTNCTTTTATACAGG 363

Strain A-7 AAGAAACGTGCCTACGAGTAGGTATTTGACGGTACTGTAAGAATAAGGACCGGCTAACTC 450
 AB078057 AAGAAACGTACCTACGAGTAGGTATTTGACGGTACTGTAAGAATAAGGACCGGCTAACTC 480
 D14023 AAGAAACGTACCTACGAGTAGGTATTTGACGGTACTGTAAGAATAAGGACCGGCTAACTC 423

Strain A-7 CGTGCCAGCAGCCGGTAATACGGAGGGTCCGAGCGTTATCCGGAATCATTGGGTTTAA 510
 AB078057 CGTGCCAGCAGCCGGTAATACGGAGGGTCCGAGCGTTATCCGGAATCATTGGGTTTAA 540
 D14023 CGTGCCAGCANCCNGTNTACGGAGGGTCCNAGCGTTATCCGGAATCATTGGGTTTAA 483

Strain A-7 AGGGTCCGAGCGGTCGATTAAGTCAGAGGTGAAATCCCATAGCTTAACTATGGAAC TG 570
 AB078057 AGGGTCCGAGCGGTCGATTAAGTCAGAGGTGAAATCCCATAGCTTAACTATGGAAC TG 600
 D14023 AGGGTCCGAGCGGTCGATTAAGTCAGAGGTGAAATCCCATAGCTTAACTATGGAAC TG 543

Strain A-7 CCTTTGATACTGGTTGACTTGAGTGATACGGAAGTAGATAGAATATGTAGTGATGCGGGT 630
 AB078057 CCTTTGATACTGGTTGACTTGAGTGATACGGAAGTAGATAGAATATGTAGTGATGCGGGT 660
 D14023 CCTTTGATACTGGTTGACTTGAGTGATACGGAAGTAGATAGAATATGTAGTGATGCGGGT 603

Strain A-7 AAATGCATAGATATTACATAGAATACCGATTGCGAAGGCAGTCTACTACGTATTTACTGA 690
 AB078057 AAATGCATAGATATTACATAGAATACCGATTGCGAAGGCAGTCTACTACGTATTTACTGA 720
 D14023 AAATGCATAGATATTACATAGAATACCGATTGCGAAGGCAGTCTACTACGTATTTACTGA 663

Strain A-7 CGCTCATGGACGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT 750
 AB078057 CGCTCATGGACGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT 780
 D14023 CGCTCATGGACGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT 723

```

Strain A-7      AAACGATGGACACTAGTTGTTGGGAATTATCTCAGTGACTAAGCGAAAAGTGATAAGTGTC 810
AB078057      AAACGATGGACACTAGTTGTTGGGAAATGTCTCAGTGACTAAGCGAAAAGTGATAAGTGTC 840
D14023        AAACGATGGACACTAGTTGTTGGGAAATGTCTCAGTGACTAAGCGAAAAGTGATAAGTGTC 783
***** * *****

Strain A-7      CCACCTGGGGAGTACGATCGCAAGATTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAA 870
AB078057      CCACCTGGGGAGTACGATCGCAAGATTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAA 900
D14023        CCACCTGGGGAGTACGATCGCAAGATTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGNCCCGCACAA 843
***** *****

Strain A-7      GCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGATACGCGAGGAACCTTACCAGGGCTTAAATGT 930
AB078057      GCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGATACGCGAGGAACCTTACCAGGGCTTAAATGT 960
D14023        TCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGATACGCGAGGAACCTTACCAGGGCTTAAATGT 903
*****

Strain A-7      GGAATGACAGGGCTAGAGATAGCTTTTTCTTCGGACATTTACAAGGTGCTGCATGGTTG 990
AB078057      GGAATGACAGGGCTAGAGATAGCTTTTTCTTCGGACATTTACAAGGTGCTGCATGGTTG 1020
D14023        GGAATGACAGGGCTAGAGATAGCNNTTCTTCGGACATTTACAAGGTGCTGCATGGTTG 963
*****

Strain A-7      TCGTCAGCTCGTGCCGTGAGGTGTCAGGTTAAGTCTATAACGAGCGCAACCCCTATTGT 1050
AB078057      TCGTCAGCTCGTGCCGTGAGGTGTCAGGTTAAGTCTATAACGAGCGCAACCCCTATTGT 1080
D14023        TCGTCAGCTCGTGCCGTGAGGTGTTAGGTTAAGTCTATAACGAGCGCAACCCCTATTGT 1023
*****

Strain A-7      TAGTTGCTAGCAGGTAAGCTGAGGACTCTAGCGAGACTGCCGGTGCAAACCGCGAGGAA 1110
AB078057      TAGTTGCTAGCAGGTAAGCTGAGGACTCTAGCGAGACTGCCGGTGCAAACCGTGAGGAA 1140
D14023        TAGTTGCTAGCAGGTAAGCTGAGGACTCTAGCGAGACTGCCGGTGCAAACCGTGAGGAA 1083
*****

Strain A-7      GGTGGGGATGACGTCAAATCATCACGCCCTTACGTCTGGGCTACACAGTGCTACAAT 1170
AB078057      GGTGGGGATGACGTCAAATCATCACGCCCTTACGTCTGGGCTACACAGTGCTACAAT 1200
D14023        GGTGGGGATGACGTCTAATCATCACGCCCTTACGTCTGGGCTACACAGTGCTACAAT 1143
*****

Strain A-7      GGTATGGCAATGAGCAGCCATCTGGCAACAGAGAGCGAATCTACAAACCATATCACAGT 1230
AB078057      GGTATGGCAATGAGCAGCCATCTGGCAACAGAGAGCGAATCTACAAACCATATCACAGT 1260
D14023        GGTATGGCAATGAGCAGCCATCTGGCATCAGAGAGCGAATCTACAAACCATATCACAGT 1203
*****

Strain A-7      TCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGGATATCAG 1290
AB078057      TCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGGATATCAG 1320
D14023        TCGGATCGGAGTCTGCAACTNGACTCCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGGATATCAG 1263
*****

Strain A-7      CCATGATCCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCAAGCCATGGAAGC 1350
AB078057      CCATGATCCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCAAGCCATGGAAGC 1380
D14023        CCATGATCCGGTGAATACGT----- 1283
*****

Strain A-7      TGGGGTGCCTGAAGTCGGTCACCGCA----- 1377
AB078057      TGGGGTGCCTGAAGTCGGTCACCGCAAGGAGCCGCTAGGGTAAAAGTGGTAACTAGGG 1440
D14023        -----

Strain A-7      -----
AB078057      CTAAGTCGTAACAAGTAGCCGTACCGGAAGGTGC 1475
D14023        -----

```

Fig. 4. Alignment of 16S rRNA sequence of the isolated Strain A-7.
AB078057 : *Tenacibaculum maritimum* IFO 15946^T
D14023 : *Flexibacter maritimus* NCIMB 2154^T

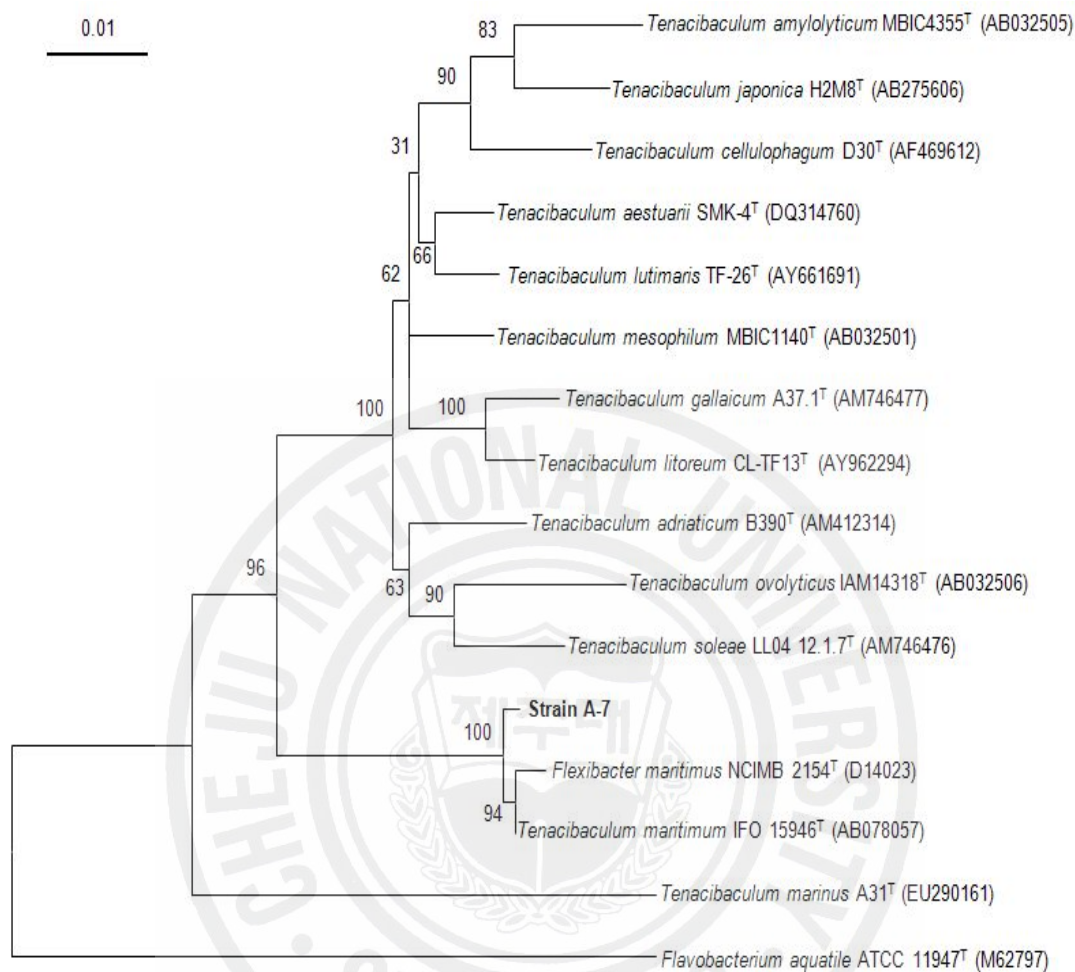


Fig. 5. Neighbour-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the position of strain A-7 within the radiation of the genus *Tenacibaculum*. The tree was constructed from evolutionary distance matrix by using neighbour-joining method (Saitou & Neil, 1987). The sequence of *Flavobacterium aquatile* ATCC 11947^T (M62797) was used an outgroup. Bootstrap percentages (from 1000 replications) >50% are shown at branch points.

Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position.

2.2 항생제 감수성실험

분리균주인 A-7에 대한 약제 감수성 시험 결과를 Table 6에 나타내었다. β -Lactam (Amoxicillin, Ampicillin, Cephalothin) 계열과 Macroride (Erythromycin), Chloramphenicol (Florfenicol, Chloramphenicol), Lincosamide (Clindamycin, Lincomycin) 계열에서는 감수성이 높게 나타났으며, Quinolone 계열인 Ciprofloxacin, Norfloxacin, Ofloxacin, Pefloxacin, Flumequin과 Teracycline 계열인 Doxycycline, Oxytetracycline 에서는 감수성을 나타내었다. 그러나 Quinolone 계열의 Oxolinic acid, Nalidixic acid)와 Aminoglycoside (Neomycin, Kanamycin, Gentamicin) 계열 전체에 대해서는 내성을 가지고 있는 것으로 나타났다.



Table 6. Antibiotics sensitive of *T. maritimum* based on paper disc method

Antibiotics	Inhibition Zone Diameter (mm)
Amoxicillin (30 µg)	37
Ampicillin (10 µg)	32
Cephalothin (30 µg)	33
Ciprofloxacin (5 µg)	24
Chloramphenicol (30 µg)	33
Clindamycin (2 µg)	36
Doxycycline (30 µg),	20
Erythromycin (10 µg)	32
Florfenicol (30 µg)	37
Flumequin (30 µg)	18
Gentamicin (10 µg)	-
Kanamycin (30 µg)	-
Lincomycin (2 µg)	32
Nalidixic acid (30 µg)	8
Neomycin (30 µg)	-
Norfloxacin (10 µg)	20
Ofloxacin (5 µg)	21
Oxolinic acid (2 µg)	-
Oxytetracycline (30 µg)	16
Pefloxacin (5 µg)	14

3. 분리균주 *T. maritimum*의 침지공격 시험

분리균주인 *T. maritimum*의 어체 크기에 대한 침지 감염시켰을 때 감염 정도를 확인하기 위해 체중이 12-20 g(체장 10-12 cm)인 실험구와 체중이 150-200 g(체장 23-25 cm)인 넙치를 사용하여 두 가지 조건으로 침지 공격실험을 실시하였으며, 그 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 체중이 12-20 g(체장 10-12 cm)인 넙치에 침지감염 시킨 실험구인 경우 48시간째에 100% 폐사율을 보였으며 (A), 150-200 g(체장 23-25 cm)인 넙치에 침지감염 시킨 실험구인 경우 *T. maritimum* 접종 후, 72시간 안에 100% 폐사하였다 (B). 이는 어체의 크기에 따라서 숙주의 면역력 및 항원에 대한 저항능력의 차이를 보이기 때문이라고 사료된다.

또한 *T. maritimum*의 침지 공격실험 결과 감염어들은 어체의 크기에 상관 없이 Eroded mouth, Frayed fins, Gills necrosis 및 Hemorrhagic symptom on head와 같은 형태의 공통적인 감염증상을 보였다 (Fig. 7).

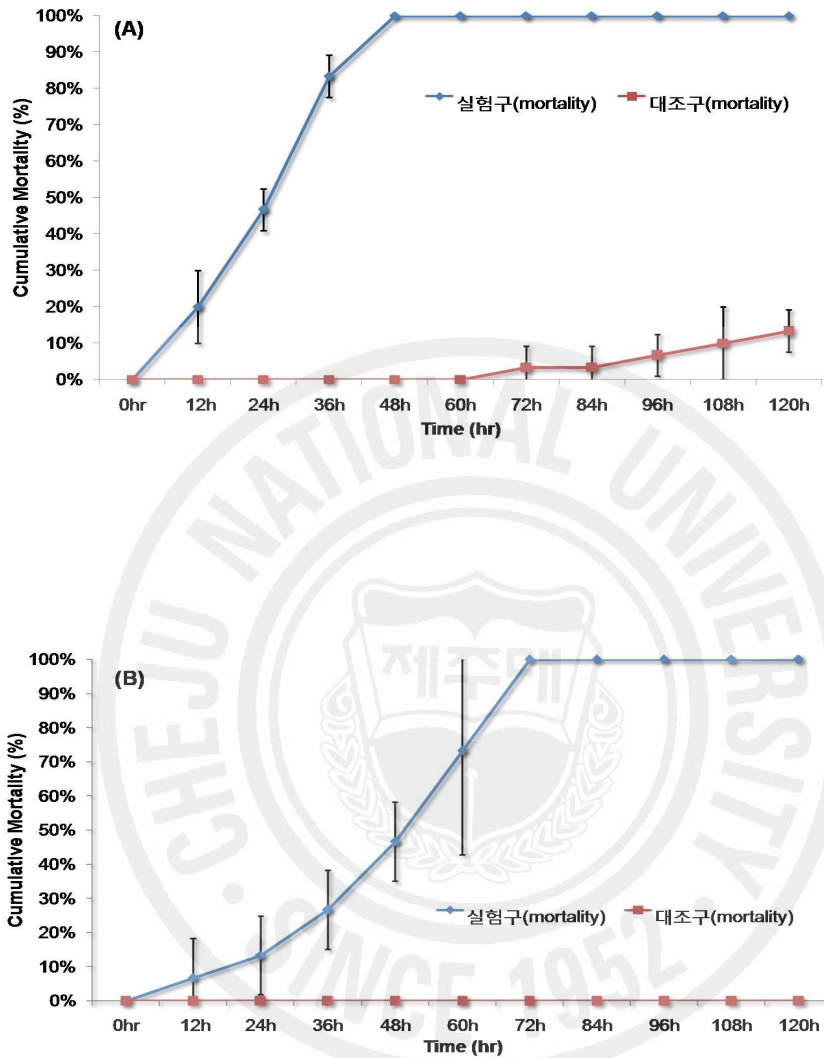


Fig. 6. Cumulative mortality of *Paralichthys olivaceus*, challenged with 1×10^7 CFU/ml Isolated *T. maritimum* at 2 days. Control group was immersed in rearing water.
(A) *Paralichthys olivaceus* of 12-20 g(10-12 cm) size.
(B) *Paralichthys olivaceus* of 150-200 g(23-25 cm) size.

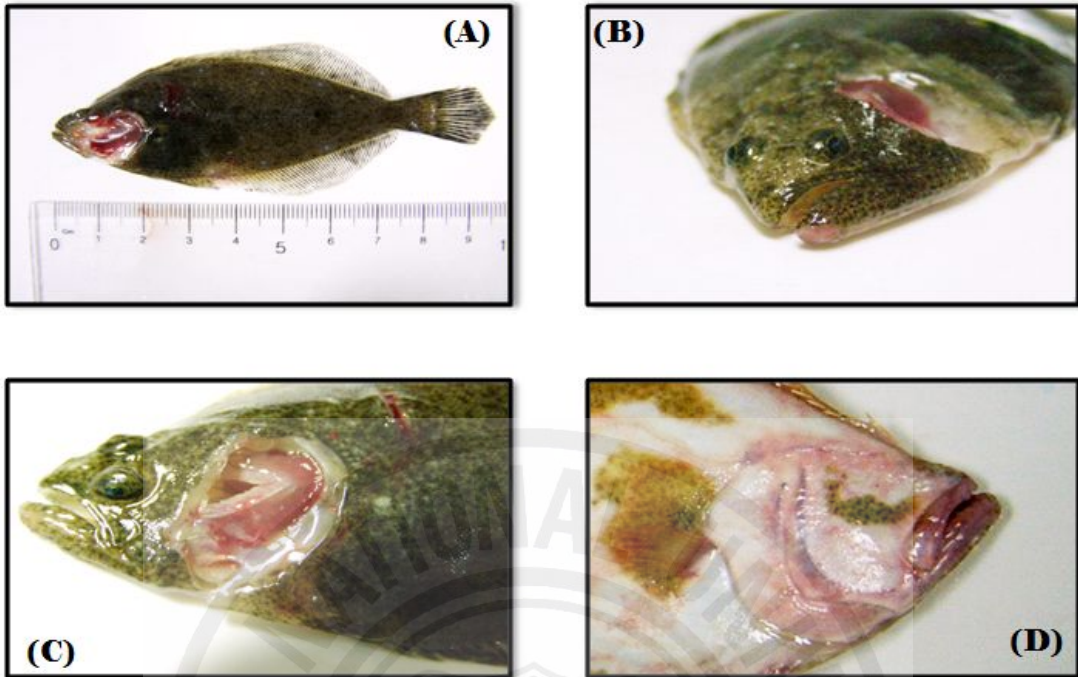


Fig. 7. *T. maritimum* infection after clinical signs.

- (A) Frayed fins, (B) Eroded mouth, (C) Gills necrosis,
- (D) Hemorrhagic symptom on head

4. 자생식물 추출물 항균실험

총 35종의 자생식물의 유기용매 추출물을 이용하여 분리균주 *T. maritimum*의 항균력을 Paper disc agar diffusion으로 측정된 결과는 Table 7, Fig. 8과 같다. 그 중 항균활성 (1 mg/disc)이 좋은 11종과 제주도내에서 쉽게 채집 가능한 제주조릿대, 온주밀감 미성숙과, 합성항균제인 OTC의 MIC 및 MBC를 Table 8에서 비교하였다. 그 결과 디스크 확산법을 이용한 항균활성에서는 석류 (*Punica granatum*), 산초나무 (*Zanthoxylum schinifolium*), 미나리아제비 (*Ranunculus japonicus*), 제충국(*Chrysanthemum cinerariaefolium*)에서 OTC와 비교해보았을 때, 유사한 항균활성을 보였다. 또한 자생식물 추출물의 *T. maritimum*에 대한 MIC와 MBC를 측정해 본 결과 석류 (*Punica granatum*), 초피나무 (*zanthoxylum piperitum*), 산초나무 (*Zanthoxylum schinifolium*), 미나리아제비 (*Ranunculus japonicus*), 제충국 (*Chrysanthemum cinerariaefolium*)에서는 OTC에 비해 2배 가까이 높은 항균 활성을 보였으며, 특히 산초나무인 경우 약 4배 가까이 높은 활성을 보였다.

Table 7. Antimicrobial activity of the Jeju Island native plant extracts by disk diffusion assay

Korean name	Plant parts	Scientific name	Inhibition Zone Diameter (mm)			
			0.5 mg/disc	1 mg/disc	2.5 mg/disc	5 mg/disc
큰달맞이꽃	Whole	<i>Oenothera lamarckiana</i>			14	15
석류	Stems, leaves	<i>Punica granatum</i>	13	16	22	23
남오미자	Whole	<i>Kadsula japonica</i>				9
왕고들빼기	Whole	<i>Lactuca indica var. laciniata</i>			14	15
산수국	Whole	<i>Hydrangea serrata for. acuminata</i>		11	15	18
진득찰	Whole	<i>Siegesbeckia glabrescens</i>			12	16
사방오리	Whole	<i>Alnus firma</i>		12	16	18
비파	Unripened fruits	<i>Eriobotrya japonica</i>				14
찔레나무	Stems, Leaves	<i>Rosa multiflora</i>			13	16
췌	Whole	<i>Pueraria thunbergiana</i>				9
말오줌때	Whole	<i>Euscaphis japonica</i>			14	19
초피나무	Stems, Leaves	<i>Zanthoxylum piperitum</i>		12	15	16
산초나무	Stems, Leaves	<i>Zanthoxylum schinifolium</i>	10	16	21	19
다래	Stems, Leaves	<i>Actinidia arguta</i>		14	15	15
닥나무	Stems, Leaves	<i>Broussonetia kazinoki</i>				10
털여뀌	Whole	<i>Persicaria cochinchinensis</i>			11	15
때죽나무	Stems, Leaves, Flowers	<i>Styrax japonica</i>	12	15	18	18
미나리아재비	Whole	<i>Ranunculus japonicus</i>		14	15	21
십자고사리	Whole	<i>Polysticum tripterum</i>	11	15	18	18
천문동	Whole	<i>Asparagus cochichinensis</i>			12	15
사철쭉	Stems, Leaves	<i>Artemisia capillaris</i>			14	15

Table 7. Continued

Korean name	Plant parts	Scientific name	Inhibition Zone Diameter (mm)			
			0.5 mg/disc	1 mg/disc	2.5 mg/disc	5 mg/disc
복분자	Whole	<i>Rubus coreanus</i>		11	15	15
맥문동	Whole	<i>Liriope platyphylla</i>			14	16
개면마	Whole	<i>Matteuccia orientalis</i>			13	16
돈나무	Stems, Leaves	<i>Pittosporum tobira</i>				9
제충국	Whole	<i>Chrysanthemum cinerariaefolium</i>	14	18	23	20
섬갯장대	Whole	<i>Arabis stelleri var. japonica</i>			13	15
엉겅퀴	Whole	<i>Cirsium Japonicum var. ussuriense</i>				15
제주조릿대	Whole	<i>Sasa quelpaertensis</i>			14	16
큰천남성	Whole	<i>Arisaema ringens</i>				9
양하	Whole	<i>Zingiber mioga</i>				9
멀구슬나무	Stems, Leaves	<i>Melia azedarah var. japonica</i>				10
온주밀감	Unripened Fruits	<i>Citrus unshiu</i>			12	15
온주밀감	Peel	<i>Citrus unshiu</i>				9
신선초	Leaves	<i>Angelica keiskei</i>				9



Fig. 8. Inhibitory effects on Jeju Island native plant extracts.
Sample concentration 1.0 mg/disc.

Table 8. Minimum inhibitory concentration and Minimum bactericidal concentration of thirteen plant extracts against *T. maritimum*

Plant extracts and Reference compounds	Part	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MBC ($\mu\text{g/ml}$)
<i>Punica granatum</i>	stems, leaves	625	625
<i>Hydrangea serrata for. acuminata</i>	whole	1,250	5,000
<i>Alnus firma</i>	whole	1,250	1,250
<i>zanthoxylum piperitum</i>	stems, leaves	625	5,000
<i>Zanthoxylum schinifolium</i>	stems, leaves	312	625
<i>Actinidia arguta</i>	stems, leaves	1,250	1,250
<i>Styrax japonica</i>	stems, leaves, flowers	1,250	5,000
<i>Ranunculus japonicus</i>	whole	625	1,250
<i>Polystichum tripterum</i>	whole	1,250	1,250
<i>Rubus coreanus</i>	whole	2,500	2,500
<i>Chrysanthemum cinerariaefolium</i>	whole	625	625
<i>Sasa quepaertensis</i>	whole	2,500	>5,000
<i>Citrus unshiu</i>	unripened fruits	5,000	5,000
OTC	-	1,250	1,250

IV. 고 찰

육상수조식 양식장의 과밀 사육으로 인한 사육환경 악화 등으로 최근에는 계절, 크기에 상관없이 넙치양식장에서의 Surface ulcers, Surface necrosis, Eroded mouth, Frayed fins, Tail rots, Gills necrosis 증상들이 발생하여 그 원인을 조사하게 되었다. 세균성 궤양증상의 원인균인 경우 양식넙치에 스쿠티카, 트리코디나 등의 기생충과 혼합 감염되어 많은 양이 폐사하거나, 상품성이 떨어져 양식어민들의 경제적인 피해 및 청정 브랜드 이미지를 저하시키고 있는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 제주도내 양식장에서 연 중 발생하고 있는 궤양성 세균증을 유발시키는 원인균을 분리하고 동정하여, 아직까지 보고되어 있지 않은 궤양성 세균증에 대한 원인 및 문제점을 해결하기 위한 목적으로 이 연구를 수행하였다.

현재 제주도내 양식장에서 궤양성 세균증을 나타내는 감염어를 시료로 원인을 분리하였으며, 형태학적, 생화학적, 16S rRNA 염기서열 분석 기법을 이용하여 분리균주 A-7을 *F. maritimus*로 동정하였다. 또한 *F. maritimus*는 분류학적으로 *T. maritimum* (Wakabayashi *et al.*, 1986; Suzuki *et al.*, 2001)으로 재명명되었으나 국내에서는 *T. maritimum*으로 보고되어있지 않다. 따라서 앞으로는 *T. maritimum*으로 명명하는 것이 옳다고 사료된다. 감염어에서 분리된 균주 *T. maritimum*은 배양학적 특성을 조사한 결과 25~30°C, Sea water 및 Sea salt를 첨가한 배지에서 가장 잘 성장하며, NaCl만 첨가한 배지에서는 발육하지 않는 것으로 보아 호염성세균이지만 NaCl 외에 다른 미량원소들이 필요함을 알 수 있었다.

제주도내 육상양식장에서 발병되는 대부분의 세균성 궤양증상어의 경우 궤양부위는 colony가 배양되나 간, 신장, 비장 등을 MA와 BHIA에 접종할 때 세균성 colony가 배양되지 않고 있으며, 이는 세균성 궤양증상을 일으키는 원인균이 조혈조직 및 주요 내부장기에 1차적으로 감염되지 않고 있음을 알 수 있었다. 따라서 세균성 궤양을 일으키는 원인균은 넙치의 선별, 출하, 분조 등으로 인한 상처에 감염되는 기회감염 세균이거나 아가미세염, 표피, 지느러미와 같은 외부에 1차적으로 감염되

어 증상을 나타내는 병원균으로 추정되어 Powell *et al.* (2004)을 참고로 실험실내 간이수조를 이용 *T. maritimum*의 침지 공격실험을 실시하였다. 그 결과 A-7을 분리했던 세균성 궤양증상인 Frayed fins, Eroded mouth, Gills necrosis 증상을 확인했으며, 감염증상 부위와 간, 신장에서 분리한 균을 생화학적 성상검사와 16S ribosomal RNA (16S rRNA) 유전자 서열 분석을 한 결과 *T. maritimum*이 확인되었다. 그리고 감염어의 *T. maritimum*에 대한 부위별 분리양상을 살펴보면, 궤양증상의 경우 (Fig. 7) 우점종으로 나타나며, 간, 신장의 경우 분리빈도가 낮게 나타나 위에서 언급한 내용과 유사한 결과를 얻었다.

또한, 침지공격실험 결과에서 나타나지 않은 Surface ulcers, Surface necrosis 증상과 모든 감염증상어에서 공통적으로 나타난 무안측 발적증상은 침지감염 실험을 위한 원인균 분리과정에서 분리된 *Vibrio* sp. 10여종 (*Vibrio splendidus*, *Vibrio gigantis*, *Vibrio tapetis* 등), *Mucus bacterium*, *Flavobacterium frigidarium*, *Exiguobacterium oxidotolerans*, *Pseudoalteromonas* sp., *Micrococcus* sp. 등을 각각 침지공격실험 하거나, *T. maritimum*과 혼합침지감염실험 또는 *T. maritimum* 침지공격 실험에서 침지공격균의 농도를 달리 해봄으로써 정확한 원인을 밝힐 수 있으리라 사료된다.

본 연구에서는 대부분의 육상 수조식 양식장에서 세균성 궤양증상에 무분별하게 사용되고 있는 OTC는 넙치의 근육에 잔류되어 (Kim *et al.*, 2006) 항생제의 잔류문제를 일으키고 있으며, 항생제 내성균 유발 (Mcphearson *et al.*, 1991) 및 어체의 면역력저하 (Heo *et al.*, 1992)등의 문제를 일으키고 있다. 또한 항생물질이 함유된 사육수의 배출은 제주도내 주변수역을 오염시키는 문제를 유발하고 있기 때문에 이러한 문제를 해결하기 위한 방법으로 제주도내 자생식물을 이용한 천연 항균물질의 개발을 목적으로 자생식물을 이용한 항균성 실험을 실시하였다.

제주하이테크산업진흥원에서 분양받은 제주도내 자생식물 31종 및 직접 채취한 자생식물 4종류, 총 35종의 시료를 70% EtOH로 추출한 후, 감압농축 및 동결건조 과정을 거쳐서 본 연구의 시료로 사용하였다. 그 결과 석류 (*Punica granatum*), 초피나무 (*zanthoxylum piperitum*), 산초나무 (*Zanthoxylum schinifolium*),

제충국 (*Chrysanthemum cinerariaefolium*), 미나리아제비 (*Ranunculus japonicus*)는 OTC 보다 MIC와 MBC 실험에서 더 높은 효과를 보였으며, 항균활성이 가장 뛰어나게 나타난 산초나무 (*Zanthoxylum schinifolium*) 추출물은 OTC보다 약 4 배 이상의 높은 항균활성을 보였다. 따라서 높은 항균활성을 보인 자생식물을 대량채취, 추출, 분획 및 NMR구조 분석 등 추가적인 연구를 수행하여 합성항균제를 대신하여 약육제로 사용함으로써 항생제 잔류 및 내성, 환경오염 등의 문제를 해결하는데 도움이 되리라 사료된다. 차후 활성이 검증된 자생식물 추출물 시료에 대한 세부적인 연구를 통하여 제주도내 양식장내에 현장적응실험을 실시할 계획에 있다.



V. 참고 문헌

- Alsina M, Blanch AR (1993) First isolation of *Flexibacter maritimus* from cultivated turbot (*Scophthalmus maximus*). Bull Eur Assoc Fish Pathol. 13:157-160.
- Bauer, A.W., W.M. Kirby, JC Sherris, M. Turck (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol. 45(4):439-496.
- Baxa DV, Kawai K, Kusuda R (1986) Characteristics of gliding bacteria isolated from diseased cultured flounder, *Paralichthys olivaceous*. Fish Pathol. 21:251-258.
- Bernardet JF, Campbell AC, Buswell JA (1990) *Flexibacter maritimus* is the agent of 'black patch necrosis' in Dover sole in Scotland. Dis. Aquat. Org. 8:233-23.
- Campbell AC, Buswell JA (1982) An investigation into the bacterial aetiology of 'black patch necrosis' in Dover sole, *Solea solea* L. J Fish Dis. 5:495-508.
- Cepeda C, Santos Y (2002) First isolation of *Flexibacter maritimus* from Farmed Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) in Spain. Bull Eur. Assoc. Fish Pathol. 22:388-392.
- Chen MF, Henry-Ford D, Groff JM (1995) Isolation and characterization of

Flexibacter maritimus from marine fishes of California. J Aquat. Anim. Health 7:318–326.

Devesa S, Barja JL, Toranzo AE (1989) Ulcerative skin and fin lesions in reared turbot, *Scophthalmus maximus*(L). J Fish Dis. 12:323–333.

Frette, L., Jorgensen, N.O.G., Irming, H., Kroer, N (2004) "*Tenacibaculum skagerrakense* sp. nov., a marine bacterium isolated from the pelagic zone in Skagerrak, Denmark." Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54, 519–524.

Hansen, G. H., Bergh, O., Michaelsen, J. & Knappskog, D (1992) *Flexibacter ovolyticus* sp. nov., a pathogen of eggs and larvae of Atlantic halibut, *ippoglossus hippoglossus* L. Int. J. Syst. Bacteriol. 42, 451–458.

Handler J, Soltani M, Percival S (1997) The pathology of *Flexibacter maritimus* in aquaculture species in Tasmania, Australia. J. Fish Dis. 20:159–168.

Handler J, Soltani M, Percival S (1997) The pathology of *Flexibacter martimus* in aquaculture species in Tasmania, Australia. J. Fish Dis. 20:159–1.

Heo, G.J, K.S. Shin and M.H. Lee (1992) Diseases of aquaculture animals and prevention of drug residues. Kor. J. Food Hygiene, 7, S7–S19.

Kim, J.W., S.H. Jung, M.A. Park, J.W. Do, D.L. Choi, B.Y. jee, M.Y. Cho, M.S. Kim, J.S. Lee, C.H. Lee, J.D. Bang, M.S. Park and J.S. Seo. (2006) Monitoring of pathogens in Cultured Fish of Korea for the

Summer Period from 2000 to 2006. J. Fish Pathol. 19(3) : 207~214

Kim, S., H.S. Chung, S.J. Kang, J.Y. Ha, W.C. Jung, S.H. Heo, Y.W. Shin, K.W. Kim, D.G. Kim and H.J. Lee. (2006) Tissue Distribution after Dippin Administration of Oxytetracycline and Tetracycline in Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*), Rockfish (*Sebastes schlegeli*), and Red Sea bream (*Pagrus major*). J Fish Pathol. 19(2) : 155~164.

Powell M., Carson J van, Gelderen R (2004) Experimental introduction of gill disease in Atlantic salmon smolts, *Salmo salar*, with *Tenacibaculum maritimum*. Dis. Aquat. Org. 61:179–185.

McPhearson, R.M., A. DePaola, S.R. Zywno, J.M.L. Motes and A.M Guarino. 1991. Antibiotic resistance in gram-negative bacteria from cultured catfish and aquaculture ponds. Aquaculture, 99, 203–211.

McVicar AH, White PG (1979) Fin and skin necrosis of cultivated Dover sole *Soles solea* (L). J. Fish Dis. 2:557–562.

Min, S.K, Y.K. Park, J.H. Park, S.H. Jin and K.W. Kim. 2004. Screening of Antibacterial Activity from Hot Water Extracts of Indigenous Plants. journal of life science 2004, Vol.14, No.6. 951~962.

Moon, Y.G, K.S. Choi, K.J. Lee, K.Y. Kim and M.S. Heo. 2007. Latic acid bacterials growth, Antioxidant Activities and Antimicrobial Activity on Fish Pathogenic Bacteria by Negative Plant Extracts, Jeju Island. *Kor. J. Microbiol. Biotechnology*. Vol.35, No.6. 210~219.

Ostland VE, Latrace C, Morrison D, Ferguson HW (1999) *Flexibacter maritimus* associated with bacterial stomatitis in Atlantic salmon smolts reared in net-pens in British Columbia. J. Aquat. Anim. Health. 11:35-44.

Suzuki, M., Nakagawa, Y., Harayama, S., and Yamamoto, S. (2001). "Phylogenetic analysis and taxonomic study of marine Cytophaga-like bacteria: proposal for *Tenacibaculum* gen. nov. with *Tenacibaculum maritimum* comb. nov. and *Tenacibaculum ovolyticum* comb. nov., and description of *Tenacibaculum mesophilum* sp. nov. and *Tenacibaculum amyolyticum* sp. nov." Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51, 1639-1652.

Toranzo, A.E., Magariños, B., Romalde, J.L., 2005. A review of the main bacterial fish diseases in marineculture system. Aquaculture. 246, 37.61.

Wakabayashi, H., Hikida, M. & Masumura, K. (1986). *Flexibacter maritimus* sp. nov., a pathogen of marine fishes. Int. J. Syst. Bacteriol 36, 396-398.

국립수의과학검역원 (2005) 연도별 (2001~2004년) 항생제판매실적. 125-149.

옥영수. 2007. 넙치양식업의 실태분석과 향후 발전방향. 한국해양수산개발원 Vol. 271 , No.0, page 44~60

감사의 글

산업대학원석사 마지막 과정인 학위논문을 쓰기위해 직장생활과 논문실험을 동시에 하기엔 시간과 노력이 너무나 부족하여 때로는 포기하고 싶다는 생각을 많이 하게 되었습니다. 그때마다 부족한 점들을 충고해주시고 격려해주시어 지금 논문의 마지막장을 채울 수 있게 해 주신 허문수 교수님께 깊은 감사의 마음을 전합니다. 그리고 바쁘신 가운데 미흡한 논문을 늦은 시간까지 지도해주시고, 심사해주신 정준범 교수님, 송춘복 교수님께 감사의 말씀을 드립니다. 또한 학위과정 중 따뜻하게 살피주신 전유진 교수님, 이제희 교수님, 여인규 교수님께 감사드립니다.

실험하는 동안 시작부터 마지막까지 많은 도움을 준 주상, 창영에게 글로나마 감사의 마음을 전하고, 영건, 만철, 윤범, 봉근, 용제, 익수, 동민에게도 감사의 마음을 전합니다. 그리고 부족한 대학생활을 꼼꼼히 챙겨준 철영, 경주, 맹진, 철홍과 더불어 지금은 곁에 없지만 항상 실험실에 웃음이 끊이지 않도록 만들어주었던 현식에게도 깊은 감사드립니다.

직장생활과 학업사이에서 많은 격려와 조언으로 힘을 주신 해양자원연구소 강봉조 박사님, 김필연 연구사님, 하나동물약품 장계환 사장님, 창식, 태원에게도 감사의 마음을 전합니다.

마지막으로 직장생활과 학업을 같이 할 수 있게 한없는 믿음을 주신 어머니, 아버지, 학창시절 본보기가 되어준 큰누나, 작은누나에게 감사드리며, 무엇보다 실험기간 동안 늦은 귀가에도 항상 웃음으로 힘을 주고 다독여준 사랑하는 아내와 일어나면 제일 먼저 아빠를 불러주는 귀여운 딸 하리에게 이 논문을 드립니다.