



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩 士 學 位 論 文

제주도 양식넙치에서 분리된
비브리오세균의 신속동정과
항생제 내성



濟 州 大 學 校 大 學 院

海 洋 生 物 工 學 科

趙 美 蘭

2006年 12月

제주도 양식넙치에서 분리된
비브리오팀균의 신속동정과
항생제 내성

指導教授 宋 春 福

趙 美 蘭

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2006年 12月

趙美蘭의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 허 문 수 (인)

委 員 전 유 진 (인)

委 員 송 춘 복 (인)

濟州大學校 大學院

2006年 12月

Rapid Molecular Identification and Antibiotic
Resistance of *Vibrio* spp. Isolated from the
Farmed Olive Flounders in Jeju Island, Korea

Mi-Ran Jo

(Supervised by professor Choon Bok Song)

A thesis submitted in partial fulfillment of the degree of
Master of Science

Department of Marine Biotechnology
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

December, 2006

목 차

Abstract	i
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 시험균주	12
2. 시험균주의 배양	12
3. Total DNA 추출	12
4. PCR 증폭	13
5. PCR 산물의 cloning	15
6. 염기서열 결정 및 자료 분석	16
7. detection primer 제작	16
8. 제주도 양식장 넙치에서 분리된 비브리오의 동정	16
9. 항생제 감수성 시험	17
III. 결과	19
1. 표준 균주의 <i>aroA</i> 유전자 cloning	19
2. <i>Vibrio</i> 속 표준균주 계통분석	21
3. detection primer 제작	24
4. 제주도 양식장 분리 비브리오의 detection	32
5. 분리균주별 항생제 감수성 시험 결과	35
IV. 고찰	41
V. 요약	47
VI. 참고문헌	49
감사의 글	55

Abstract

The genus *Vibrio* comprises about 65 recognized gram-negative species which are widely distributed in estuarine and marine environments. As some *Vibrio* species have long been known as bacterial pathogens to marine organisms and human beings, many researchers have attempted to develop the method for rapid and accurate identification. Traditionally, they have been identified based on morphological, serological and biochemical methods. In recent years, rDNA sequences have been adopted for bacterial taxonomy including *Vibrio* to overcome the shortage of traditional methods. However, there are still some problems in identification of closely related bacterial species due to the conservation of rDNA sequences. Thus, we tried to develop the more rapid and accurate identification method than before by using the DNA sequences of *aroA* gene and multiplex PCR. The *aroA* gene encodes 5-enolphyluvyshikimate-3-phosphate synthase which is a key enzyme in the aromatic amino acid biosynthetic pathway in microorganism. *Vibrio* species were isolated from the diseased olive flounders sampled at the hatcheries in Jeju island and standard strains of *Vibrio* were purchased from CECT, KCCM and KCTC. *aroA* genes of *Vibrio* were then cloned and sequenced for detection primer design and phylogenetic analysis. By using detection primers designed based on multiple alignment and phylogenetic analysis, multiplex colony PCRs have been performed for the simultaneous detection of major *Vibrio* spp. isolated from the farmed olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, in Jeju Island. As a result, four major *Vibrio* species among total number of isolated strains were *Vibrio scophthalmi* (45.3%), *Vibrio harveyi* (24.0%), *Vibrio pomeroiyi* (6.4%), *Vibrio pelagius* (3.8%) and *Vibrio anguillarum* (0.9%). Antimicrobial susceptibility, resistant pattern and

combined action to the 18 antibiotics were tested with the identified *Vibrio* species in order to treat the vibriosis effectively and rapidly. High degree of antimicrobial resistance to clindamycin was detected in all four species tested including *Vibrio scophthalmi*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio pelagius* and *Vibrio pomeroyi*, whereas these species were highly sensitive to chloramphenicol, florfenicol, norfloxacin, ofloxacin and oxolinic acid. However, we found that the degree of antimicrobial susceptibility was various even between strains of the identical *Vibrio* sp.



I. 서론

현대 사회에 사는 대부분의 소비자들은 사회·경제적 생활수준의 향상으로 건강에 대한 관심이 높아지고 있다. 이에 따라 건강에 직접적인 영향을 미치는 식품에 대한 관심은 상대적으로 건강식품으로 알려진 수산물에 대한 관심을 증가시켜 수산 양식 산업 발전에 이바지하였다. 특히, 제주 지역의 넙치 양식은 1980년대 후반에 시작되어 지속적으로 성장해왔다. 제주도의 양식 넙치 생산량은 1988년에 14톤에 불과하던 것이 2000년에는 10,010톤, 2003년에는 15,351톤으로 늘어났으며 최근 전체 어류 생산량 중에서 양식넙치가 차지하는 비중이 점점 높아지고 있다. 이에 따라 제주도의 넙치 양식은 어류양식장 261개소 중 253개소가 넙치양식장으로 어류양식의 대부분을 차지하고 있다(제주도, 2006).

그러나 세균 및 기생충 등에 의한 생물학적 요인 뿐 만 아니라 환경적 요인 등에 의한 어류 질병의 증가는 어류의 폐사를 유발시켜 경제적인 피해를 가져오고 있다. 어류 질병에 의한 폐사율은 약 13.5%를 차지하며 연간 그 피해액은 2,500억 원으로 추정되고 있으며 그 중 세균성 질병은 양식 어류의 질병 중 대부분을 차지하고 있다(국립수산과학원, 2002).

양식장에서는 세균성 질병에 의한 어류의 폐사를 감소시키기 위해 질병 예방과 치료의 목적으로 주로 항생제를 사용하고 있으나 적절한 세균학적 검사 없이 항생제를 남용하고 오용하는 문제로 인해 양식 어류에 대한 불신이 높아지고 있다(Oh *et al.*, 1998). 따라서 세균성 질병을 유발시키는 원인균을 신속 동정하여 정확한 원인균의 파악과 그 원인균에 대한 적합한 항생제 처리를 통하여 항생제의 남용과 오용을 억제해야 할 것이다.

현재 양식 넙치의 대량 폐사를 유발시키는 주요 세균성 질병은 연쇄구균증, 에드워드증, 비브리오증이 알려져 있다. 이중에서 비브리오증 원인균을 포함하는 *Vibrio*속은 최근까지 전 세계적으로 약 65종이 분리되어 보고되고 있으며 계속적으로 새로운 종이 보고되어 그 수가 증가하는 추세이다(Thompson *et al.*, 2004). *Vibrio*속은 gram 음성, 호염기성 간균으로 해수, 기수, 담수 지역에 널리 분포하

는 상재 세균으로서 어류, 갑각류 및 연체동물에 이르는 다양한 수산 생물에 감염을 일으킨다(Kim *et al.*, 2005). 기회 감염성 세균으로서 비브리오는 해수 어류의 정상 세균 총을 이루기도 하지만 때로는 질병의 원인체로서 수산 생물의 대량 폐사를 유발시키기도 한다. 또한, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* 및 *Vibrio vulnificus* 등은 인간에게 감염되어 질병을 일으키며 때때로 사망에 이르게 한다(Oh *et al.*, 1999; Thompson *et al.*, 2004).

*Vibrio*속 세균의 검출은 일반적으로 thiosulphate citrate bile salt sucrose (TCBS) 선택 배지를 사용하여 이루어지고 있으며(Simon *et al.*, 2002), 검출된 *Vibrio*속의 동정은 형태학적, 염색학적, 혈청학적 방법 및 생화학적 방법, 유전학적 방법 등을 통해서 진행되고 있다. 그러나 속내의 종 다양성 및 근연종의 존재(Holt *et al.*, 1994; Thompson *et al.*, 2004)와 지속적인 신종의 보고 등으로 인해(Cerda-Cuellar *et al.*, 1997; Gomez-Gill *et al.*, 2003; Thompson *et al.*, 2003) *Vibrio* 세균의 동정에 어려움이 많다. 이 중 많이 사용되어지고 있는 생화학적 방법을 통한 종의 동정은 종간 혹은 동일 종 내에서도 다양한 결과를 나타내어 정확한 동정에 혼선을 빚고 있다(Chen *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 2005). 현재 세균의 종 동정을 위해 유전학적 방법이 많이 이용되고 있다. 보편적으로 세포질에 존재하는 16S rRNA를 이용하여 많은 연구가 이루어졌고 수행되고 있는 실정이다. 그러나 16S rRNA인 경우 유전적으로 매우 보존된 부분으로 진화적으로 가까운 종간의 유전적인 다형성이 낮아 유전자의 차이가 거의 없어 종 동정에 있어서 문제가 있다고 많은 연구자들은 보고하고 있다(Krawiec and Riley, 1990; Moon *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005). 그 후 이러한 문제를 극복하기 위해 16S-23S rRNA intergenic space region (ISR)을 이용한 종 동정이 시도된 바 있다. 그러나 ISR은 16S rRNA에 비해 종 특이적인 염기 서열을 가지고 있지만 tRNA의 종류에 따라 종간의 길이 차이를 보이는 것으로 알려져 있고(Gurtler and Stanisich, 1996), 지금까지 축적되어온 ISR의 database가 충분하지 않아 세균의 동정에 어려움이 따른다. 따라서 신속 동정을 위한 도구로 새로운 유전자를 찾기 위한 연구가 이루어져야 할 것이다.

이 연구에서는 *Vibrio*속 세균의 동정을 위해 *aroA* 유전자를 이용하였다. 이 연구에 사용되는 *aroA* 유전자는 aromatic amino acid의 생화학적 합성 과정에서

중요한 역할을 하는 효소로 skimate-3-phosphate를 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate로 전환하는 EPSP (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate) 합성효소를 암호화하는 유전자로 알려져 있다(Parish *et al.*, 2002). *aroA* 유전자는 gram-negative과 gram-positive 박테리아 모두 존재하며, 세포벽 형성에 관여하여 이 유전자가 결핍 되었을 시 박테리아의 성장이 저해 되는 특징으로 인해 attenuated vaccine 연구에 사용되어지고 있으며 계속적으로 연구가 증가하는 추세이다(Hernanz *et al.*, 1998; Temprano *et al.*, 2005). 또한 *aroA* 유전자를 이용하여 *Vibrio*속을 대상으로 한 연구는 없는 실정이나 *Vibrio*속의 유사 속인 *Aeromonas*속 및 여러 병원균을 대상으로 계통학적 분류 및 동정에 관한 연구는 *aroA* 유전자를 이용한 *Vibrio*속의 종 동정 가능성을 제시하였다(Soriano *et al.*, 1997; del Rio *et al.*, 2006).

따라서 이 연구는 *aroA* 유전자를 이용하여 *Vibrio*속의 분자계통분류학적 관계성 및 다양성을 조사하였으며 이를 토대로 *Vibrio*속의 신속한 동정을 위한 방법을 구축하여 제주도의 양식 넙치에서 발생하는 세균성 질병의 원인균인 *Vibrio*속을 동정하였다. 또한 양식 넙치에 출현하는 비브리오의 종류와 그 출현 빈도를 월별, 지역별로 조사하였으며 양식 넙치에서 분리되는 비브리오 중 동정된 어병 원인 비브리오를 선택하여 수산용 항생제의 적절한 사용과 내성균 관리를 위한 기초 자료를 확립하기 위해 항생제 감수성 시험을 수행하였다. 이러한 결과는 양식 넙치의 비브리오증의 원인균 파악에 기초 자료를 제공하여 차후 양식 넙치 질병의 빠른 치료 및 예방을 통해 폐사량을 감소시켜 소득 증대의 효과를 가져올 것으로 생각되어 진다.

II. 재료 및 방법

1. 시험균주

1) 표준균주

이 실험에 사용된 박테리아의 표준균주는 한국생명공학연구원 유전자은행 KCTC, 한국미생물보존센터 한국종균협회 KCCM, 스페인 표준균주 분양센터인 Coleccion Espanola de Cultivos Tipo (CECT)에서 분양받았다. KCTC에서 19종, KCCM에서 15종, CECT에서 3종으로 총 37종을 분양받았다.

이 실험에서는 38종의 *Vibrio*속과 *Photobacterium*속과 근연종에 있다고 알려진 *Photobacterium*속 중 *Photobacterium profundum*, *Photobacterium damsela*, *Photobacterium damsela* subsp *damsela*, *Photobacterium subsp piscicida* 4종을 이용하였으며 outgroup으로 *Edwardsiella tarda*와 *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*를 이용하였다(Table 1).

그리고 표준 균주의 *aroA* 유전자 cloning을 위한 primer 제작에 이용된 *Vibrio* 속의 *aroA* 유전자는 NCBI의 genbank에 등록된 *Vibrio cholerae*, *Vibrio fischeri*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*의 *aroA* 유전자 data를 이용하였다.

2) 제주도내 양식장에서 분리된 비브리오

2005년 3월부터 2006년 9월까지 제주도내 넙치 양식장에서 양식되는 넙치 중 체색 흑화, 지느러미 부식, 표피 궤양, 탈장 등 전형적인 비브리오 증상을 나타내는 넙치를 이 실험에 사용 하였고 이들 어체를 사용하여 간, 신장, 비장, 표피, 지느러미 등에서 비브리오 균을 분리하였다 대표적인 비브리오 세균성 질병의 외부적인 증상은 Fig. 1 에서 나타내었고 총 분리한 비브리오는 342균체로 시료

의 채취 현황은 Table 2에 나타내었다.

월별로 분리된 비브리오의 수를 살펴보면 2006년 7월이 46균체로 가장 많이 분리되었으며 2006년 3월이 5균체로 가장 적게 분리되었다. 그리고, 2006년 5월에는 비브리오 병원균을 확보하지 못하였다. 지역별로는 구좌지역의 양식장에서부터 154균체가 분리되었으며, 그 밖의 성산, 한경, 대정, 애월, 조천, 한림, 표선, 남원지역의 양식장에서 각각 46, 7, 36, 35, 26, 3, 5, 20균체의 비브리오가 분리되었다(Table 2, Table 3, Fig. 2).



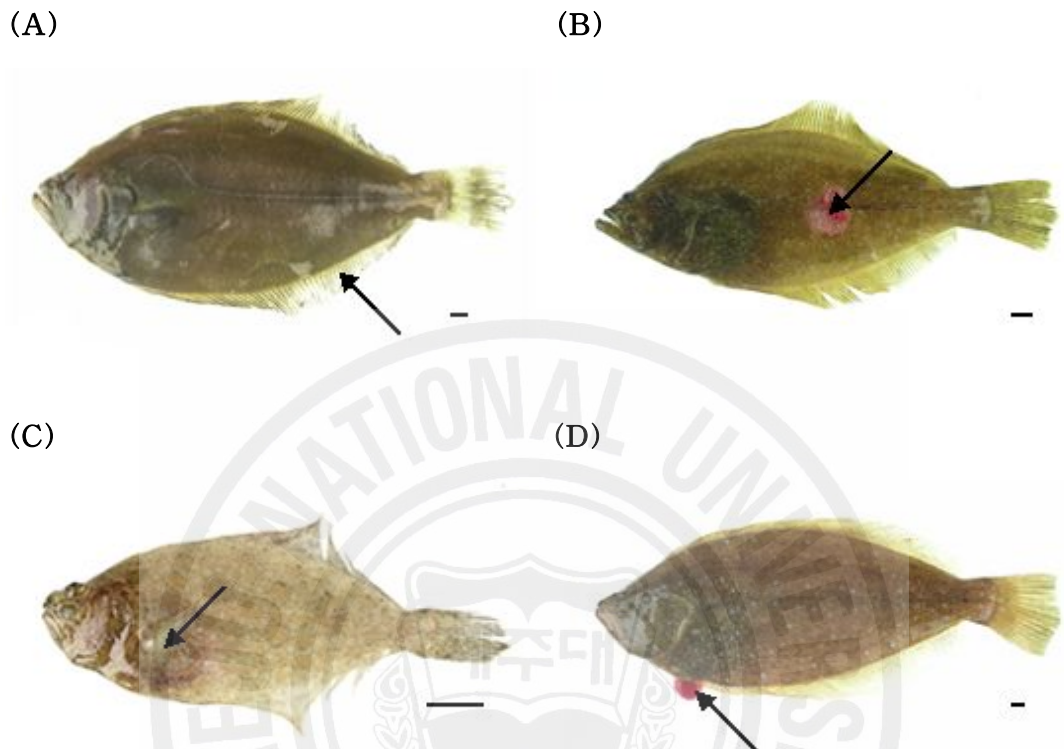


Fig. 1. External vibriosis symptoms of diseased flounders. The bar indicates one centimeter. Darkness of body color and decay of fins (A); skin ulcer (B); bacterial white enteritis-like symptom (C); viscera hernia (D).

Table 1. List of standard strains used in this study

Species name	Strain No.	Culture medium	Grown temperature
<i>Vibrio agarivorans</i>	KCTC12947	Marine agar	26 °C
<i>Vibrio alginolyticus</i>	KCTC2472	Trypticase soy agar with 3% NaCl	37 °C
<i>Vibrio anguillarum</i>	KCTC2711	Marine agar	25 °C
<i>Vibrio cholerae</i>	KCTC2715	Marine agar	25 °C
<i>Vibrio cyclitrophicus</i>	KCTC12925	Marine agar	30 °C
<i>Vibrio fluvialis</i>	KCTC2473	Marine agar	30 °C
<i>Vibrio furnissii</i>	KCTC2731	Marine agar	37 °C
<i>Vibrio gazogenes</i>	KCTC2719	Marine agar	25 °C
<i>Vibrio harveyi</i>	KCTC2717	Marine agar	25 °C
<i>Vibrio littoralis</i>	KCTC12520	Marine agar	25 °C
<i>Vibrio mimicus</i>	KCTC2737	Nutrient agar	37 °C
<i>Vibrio nereis</i>	KCTC12677	Marine agar	25 °C
<i>Vibrio orientalis</i>	KCTC2725	Luminous medium	30 °C
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	KCTC2471	Marine agar	30 °C
<i>Vibrio pelagius</i>	KCTC2732	Marine agar	25 °C
<i>Vibrio rotiferianus</i>	KCTC12125	Marine agar	25 °C
<i>Vibrio salmonicida</i>	KCTC2726	Marine agar	15 °C
<i>Vibrio splendidus</i>	KCTC12679	Marine agar	26 °C
<i>Vibrio tubiashii</i>	KCTC2728	Marine agar	25 °C
<i>Vibrio aestuarianus</i>	KCCM40863	Marine agar	26 °C
<i>Vibrio cambellii</i>	KCCM41986	Marine agar	25 °C
<i>Vibrio cincinnatiensis</i>	KCCM41683	Marine agar	26 °C
<i>Vibrio diazotrophicus</i>	KCCM41666	Trypticase soy agar with 1% NaCl	26 °C
<i>Vibrio fischeri</i>	KCCM41685	Photobacterium broth	20 °C
<i>Vibrio hollisae</i>	KCCM41680	Marine agar	30 °C
<i>Vibrio ichthyenteri</i>	KCCM40807	Marine agar	26 °C

Table 1. Continued.

<i>Vibrio mediterranei</i>	KCCM40867	Marine agar	26 °C
<i>Vibrio metschnikovii</i>	KCCM41681	Trypticase soy agar with 1% NaCl	30 °C
<i>Vibrio natriegens</i>	KCCM40868	Nutrient agar with 1% NaCl	26 °C
<i>Vibrio navarrensis</i>	KCCM41682	Trypticase soy agar with 5% defibrinated sheep blood	26 °C
<i>Vibrio ordalii</i>	KCCM41669	Trypticase soy agar with 5% defibrinated sheep blood	26 °C
<i>Vibrio penaeicida</i>	KCCM40869	Marine agar	26 °C
<i>Vibrio proteolyticus</i>	KCCM11992	Nutrient agar with 3% NaCl	26 °C
<i>Vibrio vulnificus</i>	KCCM41665	Trypticase soy agar with 1% NaCl	30 °C
<i>Vibrio lentus</i>	CECT5110	Marine agar	26 °C
<i>Vibrio scophthalmi</i>	CECT4638	Marine agar	26 °C
<i>Vibrio corallilyticus</i>		Brain Heart Infusion agar	25 °C
<i>Vibrio pomeroyi</i>		Brain Heart Infusion agar	25 °C
<i>Vibrio cholerae</i>	gi 9656248		
<i>Vibrio fischeri</i>	gi 59478708		
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	gi 47118310		
<i>Vibrio vulnificus</i>	gi 37509034		
<i>Photobacterium damsela</i>	KCTC2734	Marine agar	25 °C
<i>Photobacterium damsela</i> subsp <i>damsela</i>	CECT626	Marine agar	26 °C
<i>Photobacterium damsela</i> subsp <i>piscicida</i>	gi 17978912		
<i>Photobacterium profundum</i>	gi 46914013		
<i>Aeromonas hydrophila</i> *	KCTC2944	Nutrient agar	30 °C
<i>Aeromonas salmonicida</i> *	gi 141871		
<i>Escherichia coli</i> *	gi 26107213		
<i>Edwardsiella tarda</i> *			

* Bacteria used for the outgroup in this study

Table 2. The number of *Vibrio* strains monthly sampled from fish farms located in Jeju Island in 2005

Locality	Mar.	Apr.	May	Jun.	Jul.	Aug.	Sep.	Oct.	Nov.	Dec.
Gu-jwa	11	13	6	17	7	8	11	15	24	12
Seong-san	3	2			1					
Han-kyoung	1		1	1	1			1		1
Dae-jeong	2			2		1	2	3		
Ae-wol		1		16			1	3	2	
Jo-cheon			2			3	4	2	2	1
Han-lim				1				1	1	
Pyo-seon					1					
Nam-won										
Total	17	16	9	37	10	12	18	25	29	14

Table 3. The number of *Vibrio* strains monthly sampled from fish farms located in Jeju Island in 2006

Locality	Jan.	Feb.	Mar.	Apr.	May	Jun.	Jul.	Aug.	Sep.
Gu-jwa	5	7	3	4					
Seong-san				1		16	12	16	8
Han-kyoung	1		1						
Dae-jeong	4			2		1	10	6	4
Ae-wol			1	2		2	4	7	1
Jo-cheon	1			1					
Han-lim									
Pyo-seon							5		
Nam-won		1				1	15	7	6
Total	11	8	5	10	0	20	46	36	19

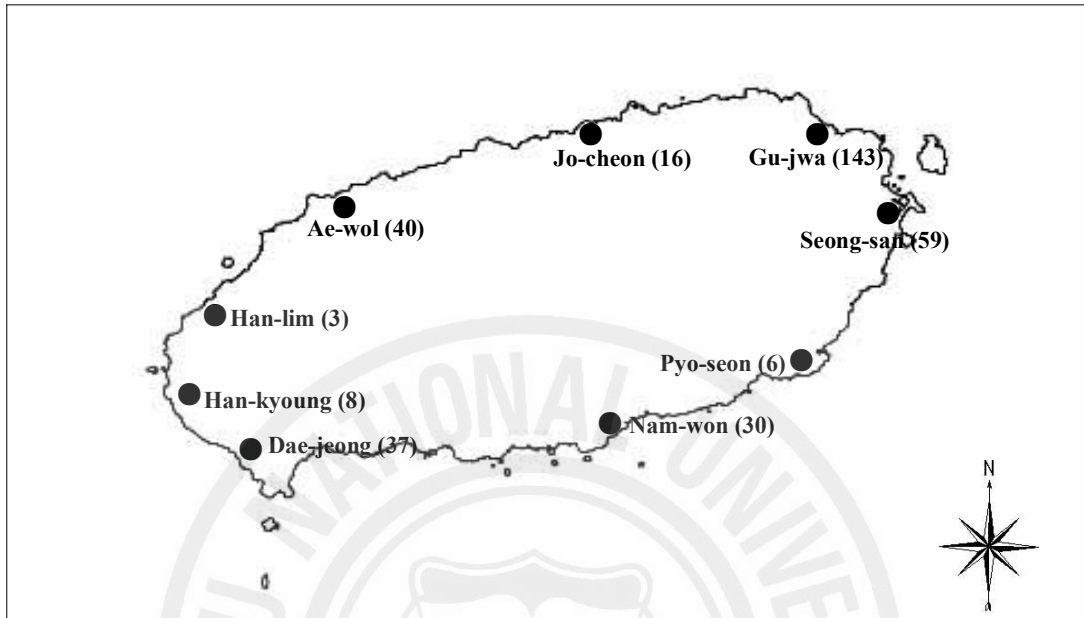


Fig. 2. The sampling sites of *Vibrio* spp. from fish farms located in Jeju Island.

2. 시험균주의 배양

1) 표준균주

동결건조 상태의 분양받은 표준균주에 0.85% 생리식염수 400 μ l를 첨가하여 멸균된 백금으로 잘 섞은 후 현탁액을 균주의 성장 환경에 가장 적합한 평판 배지(주로 Marine agar, TSA, BHIA 배지 등을 이용)에 도말하였다. 도말된 균주는 최적 성장온도에서 24시간 배양하였다(Table 1).

평판 배지에서 배양된 균주는 단일의 colony를 선택하여 1.5% NaCl이 첨가된 BHI broth 4 ml에 접종하였다. 각 균주는 최적 성장 온도에서 24시간 순수 배양하였다(Table 1).

2) 제주도내 양식장에서 분리된 비브리오

제주도에서 양식된 넙치로부터 분리된 균주는 BHIA 평판 배지에서 배양하여 그람 음성으로 추정되는 균의 colony를 선택하여 TCBS 배지에 도말하여 *Vibrio*를 확인하였다. *Vibrio*속으로 확인된 균주는 단일 colony를 선택하여 1.5% NaCl이 첨가된 BHI broth 4 ml에 접종하여 25°C에서 24시간 순수 배양하였다.

3. Total DNA 추출

액체 배지에서 배양된 균 중 1 ml를 E. tube에 넣고 13,000 rpm에서 1분 동안 원심 분리한 후 AccuPrep[®] Genomic DNA Extraction Kit을 사용하여 total DNA를 분리하였다.

4. PCR 증폭

aroA 유전자 증폭을 위한 primer를 제작하기 위한 알맞은 표적 부위를 찾기 위하여 NCBI GenBank에 등록되어 있는 *Vibrio cholera* (GI number 9656248), *Vibrio parahaemolyticus* (GI number 47118310), *Vibrio vulnificus* (GI number 37509034), *Vibrio fischeri* (GI number 59478708) *aroA* 유전자를 참고하여 가장 보존된 서열을 기초로 forward primer aro136F와 reverse primer aro1016R을 디자인하였다(Table 4).

PCR 반응은 약 0.2-0.5 μg 의 genomic DNA 1 μl , 10 μM 의 각각의 primer (forward primer, reverse primer) 2.5 μl , 10 \times reaction buffer (Takara Co.) 5 μl , 2.5 mM dNTP (Takara Co.) 5 μl 와 1-2 unit의 Ex *Taq* polymerase (Takara Co.)를 이용하였으며 증류수를 이용하여 total volume이 50 μl 가 되도록 하였다. PCR 반응 시 PCR 반응물의 증발을 막기 위해 1-2 방울의 mineral oil을 첨가하였으며 Programmable Thermo Controller (RTC-100, MJ Research Inc.)에서 반응시켰다.

이 때 반응 조건은 94 $^{\circ}\text{C}$ 에서 3분간 변성시킨 후 94 $^{\circ}\text{C}$ 45초, 50 $^{\circ}\text{C}$ 1분, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1분의 주기로 30회 반복한 후 최종 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 7분간 확장시켰다.

PCR 증폭산물은 0.8% agarose gel에서 전기 영동하여 겔 상에서 880 bp 정도의 *aroA* 유전자의 증폭산물을 확인하였다.

Table 4. PCR primers used for *aroA* gene amplification in this study.

Primer name	Gene position	Sequence
aro136F	<i>aroA</i> gene	5'-GATAG(A/T)GATGATATCCGTCATATGCT-3'
aro136R	<i>aroA</i> gene	5'-CGCCAGTT(T/G)TAAACGTT(T/G)CGAAT-3'



5. PCR 산물의 cloning

PCR 산물의 cloning을 위한 숙주는 대장균의 XL1-blue strain을 사용하였으며 벡터는 pBluescript II SK(-) (Stratagene Co.)를 사용하였다.

2.5 μg 의 pBluescript II SK(-) 벡터는 37°C에서 2시간 동안 제한효소 *HincII*를 이용하여 절단하였다. 절단된 벡터는 High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Molecular Biochemicals Co.)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 정제하였다.

정제된 벡터는 agarose gel 상에서 그 농도를 측정하였으며, ligation은 *HincII*로 절단된 1 μl 의 pBluescript II SK(-) 벡터, 3 μl 의 insert DNA, 1 μl 의 10 \times ligation buffer와 1 unit의 T4 DNA ligase (Takara Co.)를 넣고 증류수를 사용하여 최종 volume 15 μl 가 되도록 한 후에 16°C에서 18시간 동안 반응시켰다. Ligation된 산물을 XL1-blue competent cell과 함께 새로운 eppendorf tube에 넣어서 42°C에서 1분 30초 동안 heat shock을 가한 후에, 항온수조에서 37°C, 30분 동안 그 혼합물을 배양하였다.

형질전환 한 cell은 50mg/ml ampicillin, 2% X-gal과 1M IPTG가 함유된 LB (Luria-Bertani) plate에 도말하여 37°C에서 16시간 배양하였다. 배지에서 배양된 cell은 확실하게 white colony로 자란 cell을 선택하여 ampicillin이 들어있는 LB broth 배지에서 37°C 항온교반기(shaking incubator)를 이용하여 16시간 배양한 후 Standard Mini Plasmid Isolation Kit (Takara Co.)를 이용하여 plasmid DNA를 분리하였다.

Plasmid DNA를 0.8% agarose gel에 loading하여 cloning과 형질전환이 성공적으로 이루어졌는지를 확인하였으며 제한 효소 *PstI*과 *xhoI*을 사용하여 절단한 후 0.8% agarose gel에 loading하여 예상 크기의 insert 유무를 확인하였다.

6. 염기서열 결정 및 자료 분석

Cloning을 통해 얻은 재조합 plasmid DNA는 (주)마그로젠에 의뢰하여 sequencing을 하였으며 염기서열 결정시 T3와 T7 primer를 사용하였다. 이를 통해 얻은 자료는 DNAssist (version 2.2) 프로그램을 이용하여 다중 정렬하였다.

정렬된 자료는 MEGA 3.0 프로그램을 이용하여 distant에 근간을 둔 neighbor-joining 방법으로 계통수 및 유전적인 다형성을 조사하였다.

7. detection primer 제작

비브리오 검출을 위한 detection primer를 제작하기 위하여 제주도 양식 넙치에서 분리한 비브리오 균주 중 무작위적으로 선택하여 *aroA* 유전자를 cloning하였다. Cloning을 통하여 얻어진 표준균주의 *aroA* 유전자 sequence와 제주도 양식장에서 분리된 비브리오의 *aroA* 유전자 sequence를 이용하여 계통수를 작성하였다. 계통수 상에서 양식장 분리균주의 종을 파악하고 우점종으로 분리되는 *Vibrio scophthalmi*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio pelagius*, *Vibrio poemeroyi*을 다중 정렬하여 primer로 이용될 *aroA* 유전자 특이적 서열을 이용하여 oligonucleotide를 제작하였다.

8. 제주도 양식장 넙치에서 분리된 비브리오의 동정

평판 배지에서 배양된 각 비브리오를 BHI broth에 접종한 후 배양하여 1 μ l를 취하여 위에서 제작한 detection primer를 이용하여 PCR 반응을 한다.

PCR 반응은 약 균이 접종된 broth 1 μ l, 10 μ M로 섞어서 희석한 detection primer 1.0 μ l, 10 \times reaction buffer (Takara Co.) 2.5 μ l, 2.5 mM dNTP (Takara Co.) 2 μ l와 1 unit의 Ex Taq polymerase (Takara Co.)를 증류수를 이용하여 최종 volume이 25 μ l가 되도록 한 후에, PCR 반응시 반응물의 증발을 막기 위해

1-2 방울의 mineral oil을 첨가하여, Programmable Thermo Controller (RTC-100, MJ Research Inc.)에서 반응시켰다. 이 때 반응 조건은 94℃에서 3분간 변성시킨 후 94℃ 45초, 55℃ 1분, 72℃ 1분의 주기로 30회 반복한 후 최종 72℃에서 7분간 확장시켰다.

증폭산물은 1.2% agarose gel에 전기 영동하여 *Vibrio scopthalmi* 720 bp, *Vibrio harveyi* 550 bp, *Vibrio anguillarum* 450 bp, *Vibrio pelagius* 350 bp, *Vibrio pomeroi* 250 bp 정도의 DNA 증폭산물을 확인하였다.

9. 항생제 감수성 시험

2006년 6월부터 9월 사이에 분리된 비브리오를 이 연구에서 제작된 detection primer를 이용하여 detection한다. 이를 통해 detection 된 비브리오 균주 매월 무작위적으로 분리하여 Bauer-Kirby Disc 확산법(1966)에 의한 항생제 감수성 시험을 하였다.

Muller Hinton 한천 배지(BBL 사)와 Oxoid 사의 항생제 disc 중, amoxycillin (10 μ g), ampicillin (10 μ g), cephalothin (30 μ g), chloramphenicol (30 μ g), ciprofloxacin (5 μ g), clindamycin (2 μ g), doxycycline (30 μ g), enrofloxacin (5 μ g), erythromycin (15 μ g), florfenicol (30 μ g), flumequine (30 μ g), nalidixic acid (30 μ g), neomycin (10 μ g), norfloxacin (10 μ g), ofloxacin (5 μ g), oxolinic acid (2 μ g), oxytetracycline (30 μ g), pefloxacin (5 μ g) 18 disc를 사용하였다.

항생제 감수성 test에 이용된 양식장 분리 균주들은 detection 결과 *Vibrio scopthalmi*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio pelagius*, *Vibrio pomeroi*로 동정된 균주를 무작위적으로 선택하여 실시하였다. 항생제 감수성 시험에 사용된 항생제 디스크에 대한 비브리오 감수성 판단기준은 Table 5에 제시하였다.

Table 5. Criteria for determination of antibiotics sensitivity by inhibition zone based on paper disc method

Antibiotics	Concentrations (μg)	Diameter of inhibition zone (mm)		
		Resistant	Weakly sensitive	Sensitive
Amoxicillin (AML)	10	≤ 13	14~17	≥ 18
Ampicillin (AMP)	10	≤ 13	14~16	≥ 17
Cephalothin (KF)	30	≤ 14	15~17	≥ 18
Chloramphenicol (C)	30	≤ 12	13~17	≥ 18
Ciprofloxacin (CIP)	5	≤ 15	16~20	≥ 21
Clindamycin (DA)	2	≤ 14	15~20	≥ 21
Doxycycline (DO)	30	≤ 12	13~15	≥ 16
Enrofloxacin (ENR)	5	≤ 16	17~19	≥ 20
Erythromycin (E)	15	≤ 13	14~22	≥ 23
Florfenicol (FFC)	30	≤ 13	14~19	≥ 20
Flumequine (UB)	30	≤ 20	21~24	≥ 25
Nalidixic acid (NA)	30	≤ 13	14~18	≥ 19
Neomycin (N)	10	≤ 12	13~16	≥ 17
Norfloxacin (NOR)	10	≤ 12	13~16	≥ 17
Ofloxacin (OFX)	5	≤ 12	13~15	≥ 16
Oxolinic acid (OA)	2	≤ 10	-	≥ 11
Oxytetracycline (OT)	30	≤ 14	15~18	≥ 19
Pefloxacin (PEF)	5	≤ 15	16~21	≥ 22

Ⅲ. 결과

1. 표준균주의 *aroA* 유전자 cloning

NCBI에 등록된 *Vibrio*속의 *aroA* 유전자 데이터를 이용하여 primer를 제작한 후 PCR을 수행하였다. Cloning 결과 대부분의 비브리오는 883 bp의 *aroA* 유전자가 sequencing 되었다. 그러나 *Vibrio ichthyoenteri*, *Vibrio scophthalmi*, *Vibrio litoralis*, *Vibrio salmonicida*, *Vibrio gazogenes*는 118 bp-119 bp 사이에 nucleotide가 삽입되었다. *Vibrio ichthyoenteri*는 30 bp의, *Vibrio scophthalmi*, *Vibrio litoralis*는 15 bp의, *Vibrio salmonicida*, *Vibrio gazogenes*는 3 bp의 염기를 가졌다.(Fig. 3).

실험에 사용된 *Vibrio*속의 C (Cytosine), A (Adenine), G (Guanine), T (Thymine)의 염기조성은 C 20.8%, A 26.1%, G 25.9%, T 27.3%로 C의 함량이 다른 염기 함량에 비해 낮은 값을 보였다. *Vibrio*속과 근연종에 있는 *Photobacterium*속의 염기 함량은 C 18.9%, A 27.5%, G 23.9%, T 29.7%로 C의 함량이 다른 염기 함량에 비해 낮은 값을 보였다.

*Vibrio*속과는 달리 outgroup으로 사용된 *Edwardsiella*속(C: 30.8%, A: 16.5%, G: 34.8%, T: 17.9%)과 *Aeromonas*속(C: 30.0%, A: 19.5%, G: 31.1%, T: 19.5%)은 C, G의 염기 함량에 비해 T, A의 염기 함량이 낮게 나타났다.

<i>Vibrio ichthyoenteri</i>	81	GAGTGC	160
<i>Vibrio litoralis</i>	81	GTATGTGAAGTGC	145
<i>Vibrio scophthalmi</i>	81	GTGTGTGAAGTCGATGGCTGGCGGTGCGTTA	145
<i>Vibrio gazogenes</i>	81	ATTTGTGAAGTGGATGGACTGGGTGATGCTTTTC	133
<i>Vibrio salmonicida</i>	81	GTTTGC	133
<i>Vibrio anguillarum</i>	81	GTGTGTGAGATAAAAGGTTGGGTCTGCCTTTTA	130
<i>Vibrio ordalii</i>	81	GTGTGTGAGATAAAAGGCTTGGGTGCGCCTTTTA	130
<i>Vibrio cholerae</i>	81	ACCTGTGAAGTAGAAGGTTGGGCCAAGCCTTTC	130
<i>Vibrio mimicus</i>	81	ACTTGTGAAGTGGAAAGGCTCGGCCAAGCCTTTC	130
<i>Vibrio fluvialis</i>	81	GAAATGTGAAGTGAAGGCTCGGTAAGCCGTTTA	130
<i>Vibrio furnissii</i>	81	GAAATGTGAAGTGAAGGACTGGGTAAAGCCGTTTA	130
<i>Vibrio cincinnatiensis</i>	81	GAAATGTGAAGTGGACGGGTTAGGAAAACCCCTTTG	130
<i>Vibrio metschnikovii</i>	81	CAGTGTGAAGTAGAGGGGTTAGGTCAACCCCTTTG	130
<i>Vibrio fischeri</i>	81	GAAATGC	130
<i>Vibrio cyclitrophicus</i>	81	GTTTGTGAAGTAACTGGTGTGGTGGTGCCTTTT	130
<i>Vibrio lentus</i>	81	GTCTGTGAAGTAAAGGGCGTTGGTGGTGCATTTT	130
<i>Vibrio pomeroyi</i>	81	GTTTGTGAAGTGCAGGGGTGGTGGTGGTGCATTTT	130
<i>Vibrio splendidus</i>	81	GTCTGTGAAGTGCAGGGGTGGTGGTGGTGCATTTT	130
<i>Vibrio pelagius</i>	81	GTTTGTGAAGTGAAGGCTTGGCGGTGCGTTTG	130
<i>Vibrio agarivorans</i>	81	GTGTGTGAAGTAAAGGGCTAGGTGCTCCGTTTG	130
<i>Vibrio orientalis</i>	81	GTCTGTGAAGTGCAGGGCTTAGGTAAGCCATTTG	130
<i>Vibrio tubiashii</i>	81	GTATGTGAAGCCGAAGGCTTAGGAAAGCCATTTG	138
<i>Vibrio alginolyticus</i>	81	GAAATGTCTCGTTGAAGGCTTGGGCGTCCGTTTT	130
<i>Vibrio paraheamolyticus</i>	81	GAAATGTGTGGTTGAAGGCTTGGTGCCTGCTTCT	130
<i>Vibrio campbellii</i>	81	GAAATGTGTCTGATGAAGGCTTGGTGCCTGCTTCT	130
<i>Vibrio rotiferianus</i>	81	GAAATGTGTCTGATGAAGGCTTGGTGCCTGCTTCT	130
<i>Vibrio harveyi</i>	81	GAAATGTGTCTGATGAAGGCTTGGTGCCTGCTTCT	130
<i>Vibrio natriegens</i>	81	GAGTGTGTCTGGAAGGACTTGGCCAAACCTTCT	130
<i>Vibrio navarrensis</i>	81	GTTTGTACTGTGAATGATGGGGCGCCATTTA	130
<i>Vibrio vulnificus</i>	81	GTTTGTGTGTGGAAGGCTTAGGCCGACCGTTTA	130
<i>Vibrio mediterranei</i>	81	GTCTGTGAAGTGGAAAGGCTTGGGCAGAAGTTTA	130
<i>Vibrio aestuarianus</i>	81	GTCTGTGAAGTGGAAAGGCTTAGGTAAGCCATTTA	130
<i>Vibrio penaeicida</i>	81	CAATGCATCCTTAAAGGTTTAGGTAAGCCATTTA	130
<i>Vibrio corallilyticus</i>	81	GTGTGCGAAGTGAAGGATAGGTCGAGCTTTTG	130
<i>Vibrio nereis</i>	81	GTTTGTGAAGTGAAGGCTTAGGTAAGCCGTTTG	130
<i>Vibrio diazotrophicus</i>	81	GCGTGC	130
<i>Vibrio proteolyticus</i>	81	GTCTGTGAAGTGCAGGGACTGGGCCAGCCATTTT	130
<i>Vibrio hollisae</i>	81	GAGTGTGTGGTTGAAGGTTGGGCTCGCCATTTA	130

Fig. 3. 3-30 nucleotide base pair insertion are located between 118th and 119th position of *aroA* gene of *Vibrio* spp.

2. *Vibrio*속 표준균주의 계통분석

계통수(phylogenetic tree)는 거리(distance)에 근거한 방법으로 작성되었다. Fig. 3은 *Vibrio* 38종, *Photobacterium* 4종과 outgroup 4종의 박테리아로부터 얻어진 *aroA* 유전자의 data를 이용하여 Neighbor-Joining 방법에 의해 계통수를 나타내었다(Fig. 4).

aroA 유전자를 이용한 *Vibrio*속 균주의 계통학적 분석을 통해 p-distance를 확인한 결과 outgroup을 제외한 *Vibrio*속과 *Photobacterium*속의 p-distance는 2.7~43.1%의 차이를 나타내었다. *Vibrio cylitrophicus*와 *Vibrio holisae*의 사이가 43.1%로 유전자 차이가 가장 많이 나타났으며 *Vibrio anguillarum*과 *Vibrio ordalii*의 사이가 2.7%로 가장 작은 유전자 차이를 나타내었다(Table 6).

계통수와 p-distance에 근거하여 *Vibrio*속의 진화적 관계를 분석해 보면 계통진화적으로 (1) *Vibrio cyclitrophicus*, *Vibrio lentus*, *Vibrio pomeroyi*, *Vibrio splendidus*; (2) *Vibrio natriegens*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio cambellii*, *Vibrio rotiferianus*; (3) *Vibrio ichthyenteri*, *Vibrio scophthalmi*; (4) *Vibrio orientalis*, *Vibrio tubiashii*; (5) *Vibrio anguillarum*, *Vibrio ordalii*; (6) *Vibrio cincinnatiensis*, *Vibrio metschnikovii*; (7) *Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus*; (8) *Vibrio fluvialis*, *Vibrio furnissii*; (9) *Vibrio fischeri*, *Vibrio salmonicida*, *Photobacterium*속이 가깝게 묶였다.

118 bp와 119 bp 사이에 15 bp와 30 bp크기의 염기가 각각 삽입되어진 *Vibrio scophthalmi*와 *Vibrio ichthyenteri*는 계통학적으로 하나의 그룹을 형성하였다.

*Vibrio fischeri*는 *Photobacterium*속과 같은 group을 형성하였다. 또한 *Photobacterium* group은 *Vibrio* group과 ingroup을 형성하였다. 이런 결과에서 보듯이 *Vibrio*속 세균들과 Vibrionaceae인 *Photobacterium*속이 계통진화적으로 가깝게 묶여 진화학적으로 *Vibrio*속은 paraphyletic group을 형성하였다(Fig. 4).

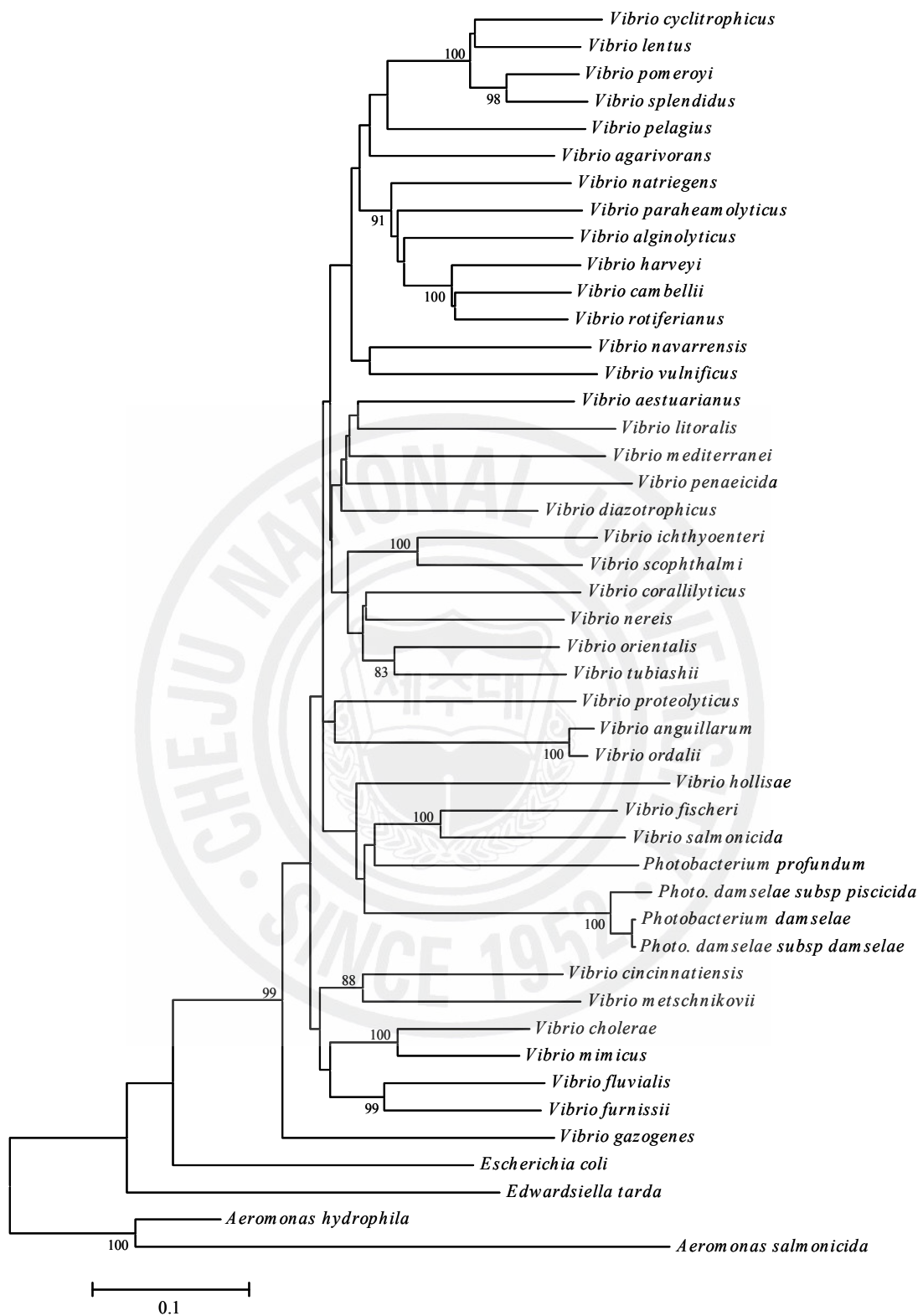


Fig. 4. Neighbor-joining phylogenetic tree of *Vibrio* standard strains based on *aroA* DNA sequences.

3. detection primer의 제작

양식장 분리균주 중 많이 발병하는 원인균을 확인하기 위해 표준균주의 *aroA* 유전자를 cloning 하는 방법으로 양식 넙치에서 분리된 비브리오 균주를 무장위적으로 62개체를 선택하여 이들 박테리아의 *aroA* 유전자를 sequencing하였다.

이들의 *aroA* 유전자의 염기 서열을 가지고 Neighbor-joining 방법을 통해 계통수를 작성하고 제주도 넙치 양식장에서 주로 발병되는 비브리오를 분석하였다.

제주도 양식넙치에서 분리하여 'V-'으로 표현된 47균체와 넙치를 제외한 돌돔, 붉바리 등의 어류나, 먹이 생물인 로티퍼와 알테미어에서 분리하여 '*Vibrio sp.*-'로 표현된 21균체를 cloning하여 얻어진 data를 분석한 결과 *Vibrio scophthalmi*는 15균체, *Vibrio harveyi*가 4균체, *Vibrio anguillarum*이 4균체, *Vibrio pelagius* 5균체, *Vibrio pomeroyi*가 7균체 분리되었다. 그 밖에 *Vibrio fischeri*,가 5균체, *Vibrio rotiferianus*가 5균체, *Vibrio cyclitrophicus*가 4균체, *Vibrio alginolyticus*가 1균체, *Photobacterium damselae*가 1균체 분리되었으며 13균체는 미동정되었다(Fig. 5). 비브리오가 분리된 넙치의 information은 Table 7에 나타내었다.

계통수에서 *Vibrio pelagius*와 *Vibrio corallilyticus*는 각각 4균체와 2균체가 분리되었는데 이는 어류가 아닌 먹이생물인 로티퍼와 알테미어에서 분리된 것을 확인하였다.

이러한 계통수 결과를 보고 *Vibrio scophthalmi*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio pelagius*, *Vibrio pomeroyi*의 detection primer를 제작하였다.

Vibrio scophthalmi group은 0.1~3.8%의 염기차이를 보였으며(Table 8), *Vibrio harveyi* group은 0~0.1%의 염기차이를(Table 9), *Vibrio anguillarum* group은 0.2~2.1%의 염기차이를(Table 10), *Vibrio pelagius* group은 0.1~2.3%의 염기차이를(Table 11), *Vibrio pomeroyi* group은 0~1.3%의 염기차이를 보였다(Table 12). 이들 각 그룹과 표준균주를 정렬하여 각 표준균주와는 중복되지 않고 각 그룹끼리 가장 상동성이 높은 서열을 선택하여 primer를 제작하였다.

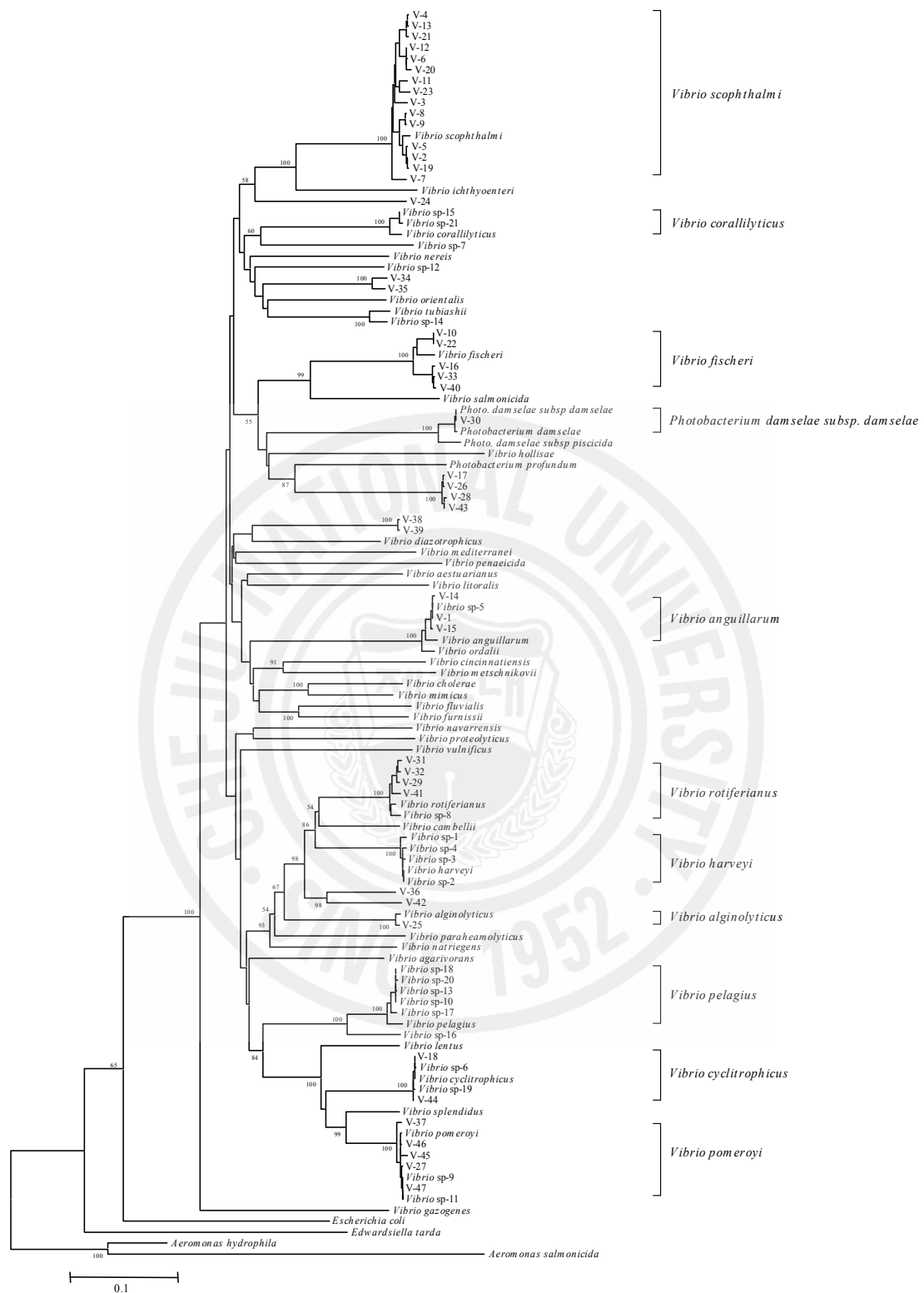


Fig. 5. Neighbor-joining phylogenetic tree with *aroA* DNA sequences of standard strains and isolated *Vibrio* spp. from diseased flounder.

Table 7. Information of *Vibrio* strains isolated from fish farms located in Jeju Island.

Strain name	Location	Organ	Length	Sampling date
V-1	Gu-jwa	spleen	21.0	Mar., 2005
V-2	Gu-jwa	liver	15.0	Mar., 2005
V-3	Gu-jwa	liver	17.0	Mar., 2005
V-4	Gu-jwa	liver	15.5	Mar., 2005
V-5	Gu-jwa	spleen	13.0	Mar., 2005
V-6	Gu-jwa	spleen	15.0	Mar., 2005
V-7	Gu-jwa	spleen	22.0	Mar., 2005
V-8	Gu-jwa	kidney	12.0	Mar., 2005
V-9	Gu-jwa	liver	11.0	Mar., 2005
V-10	Gu-jwa	liver	17.0	Mar., 2005
V-11	Dae-jeong	liver	18.0	Mar., 2005
V-12	Han-kyoung	liver	13.0	Mar., 2005
V-13	Seong-san	liver	19.0	Mar., 2005
V-14	Seong-san	spleen	22.0	Mar., 2005
V-15	Seong-san	liver	40.0	Mar., 2005
V-16	Gu-jwa	spleen	17.0	Apr., 2005
V-17	Gu-jwa	liver	18.0	Apr., 2005
V-18	Seong-san	fin	22.0	Apr., 2005
V-19	Gu-jwa	liver	25.0	May, 2005
V-20	Gu-jwa	liver	15.0	May, 2005
V-21	Gu-jwa	spleen	20.5	May, 2005
V-22	Han-kyoung	liver	25.5	May, 2005
V-23	Jo-cheon	kidney	21.0	May, 2005
V-24	Jo-cheon	liver	22.0	May, 2005
V-25	Gu-jwa	liver	15.0	Jun., 2005
V-26	Gu-jwa	spleen	15.0	Jun., 2005
V-27	Gu-jwa	spleen	45.0	Jun., 2005
V-28	Han-lim	kidney	27.0	Jun., 2005
V-29	Gu-jwa	kidney	22.0	Jul., 2005
V-30	Gu-jwa	spleen	11.0	Jul., 2005
V-31	Gu-jwa	liver	27.0	Aug., 2005
V-32	Jo-cheon	gill	30.0	Aug., 2005
V-33	Gu-jwa	liver	26.0	Sep., 2005
V-34	Gu-jwa	eyes	30.0	Sep., 2005
V-35	Gu-jwa	eyes	32.0	Oct., 2005
V-36	Han-kyoung	liver	33.0	Oct., 2005
V-37	Gu-jwa	all internal organs	7.0	Nov., 2005
V-38	Gu-jwa	all internal organs	4.0	Nov., 2005
V-39	Gu-jwa	all internal organs	5.5	Nov., 2005
V-40	Gu-jwa	ascites	31.0	Nov., 2005
V-41	Gu-jwa	kidney	9.0	Nov., 2005
V-42	Gu-jwa	all internal organs	5.0	Dec., 2005
V-43	Gu-jwa	gill	40.0	Dec., 2005
V-44	Gu-jwa	spleen	18.0	Dec., 2005
V-45	Gu-jwa	all internal organs	4.0	Jan., 2006
V-46	Gu-jwa	all internal organs	6.0	Jan., 2006
V-47	Gu-jwa	all internal organs	5.0	Feb., 2006

Table 8. p-distance estimated based on *aroA* DNA sequences obtained from standard and isolated strains of *Vibrio scophthalmi*

	1	V-2	V-3	V-4	V-5	V-6	V-7	V-8	V-9	V-11	V-12	V-13	V-19	V-20	V-21	V-23
1																
V-2	0.011															
V-3	0.025	0.025														
V-4	0.034	0.034	0.030													
V-5	0.014	0.002	0.027	0.037												
V-6	0.025	0.027	0.027	0.020	0.030											
V-7	0.031	0.033	0.024	0.026	0.033	0.026										
V-8	0.011	0.018	0.023	0.030	0.018	0.020	0.024									
V-9	0.014	0.020	0.024	0.031	0.020	0.023	0.025	0.002								
V-11	0.033	0.033	0.029	0.022	0.036	0.028	0.034	0.029	0.031							
V-12	0.024	0.026	0.026	0.019	0.029	0.001	0.025	0.019	0.022	0.027						
V-13	0.033	0.033	0.029	0.001	0.036	0.019	0.025	0.029	0.030	0.020	0.018					
V-19	0.012	0.001	0.026	0.036	0.003	0.029	0.034	0.019	0.022	0.034	0.027	0.034				
V-20	0.029	0.031	0.031	0.024	0.031	0.006	0.027	0.022	0.024	0.032	0.004	0.023	0.032			
V-21	0.036	0.036	0.031	0.003	0.036	0.022	0.025	0.029	0.030	0.023	0.020	0.002	0.037	0.023		
V-23	0.036	0.036	0.026	0.022	0.038	0.026	0.032	0.031	0.032	0.018	0.025	0.020	0.037	0.030	0.023	

1: Standard strain of *Vibrio scophthalmi*, V- : *Vibrio scophthalmi* isolated from fish farms and strain's information is shown at Table 7.

Table 9. p-distance estimated based on *aroA* DNA sequences obtained from standard and isolated strains of *Vibrio harveyi*

	Standard strain	<i>Vibrio</i> sp-1	<i>Vibrio</i> sp-2	<i>Vibrio</i> sp-3	<i>Vibrio</i> sp-4
Standard strain					
<i>Vibrio</i> sp-1	0.010				
<i>Vibrio</i> sp-2	0	0.010			
<i>Vibrio</i> sp-3	0.002	0.010	0.002		
<i>Vibrio</i> sp-4	0.006	0.009	0.006	0.006	

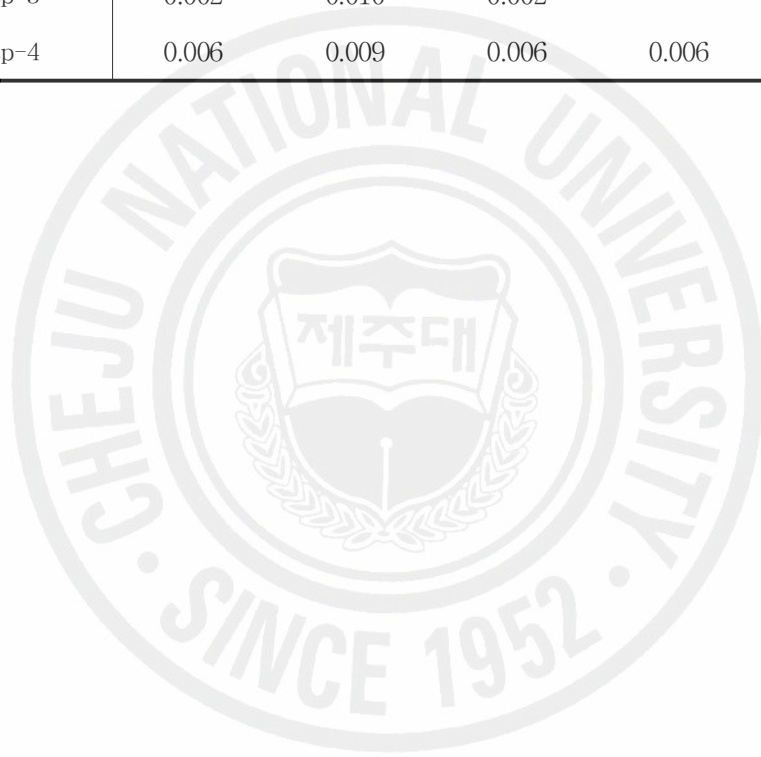


Table 10. p-distance estimated based on *aroA* DNA sequences obtained from standard and isolated strains of *Vibrio anguillarum*

	Standard strain	V-1	V-14	V-15	<i>Vibrio</i> sp-5
Standard strain					
V-1	0.017				
V-14	0.020	0.002			
V-15	0.021	0.003	0.003		
<i>Vibrio</i> sp-5	0.020	0.002	0.002	0.003	

V- : *Vibrio anguillarum* isolated from fish farms and strain's information is shown at Table 7.

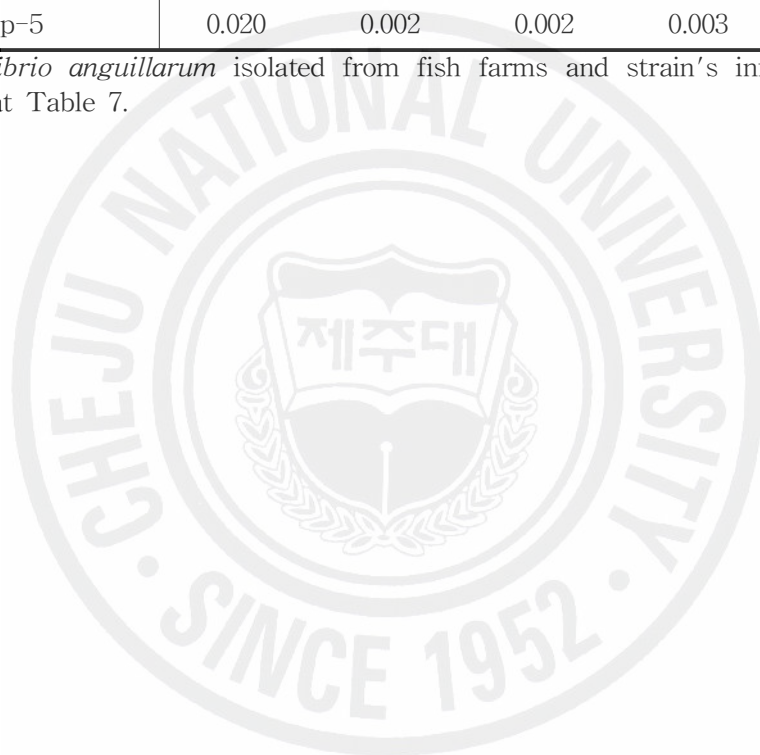


Table 11. p-distance estimated based on *aroA* DNA sequences obtained from standard and isolated strains of *Vibrio pelagius*

	Standard strain	<i>Vibrio</i> sp-10	<i>Vibrio</i> sp-13	<i>Vibrio</i> sp-17	<i>Vibrio</i> sp-18	<i>Vibrio</i> sp-20
Standard strain						
<i>Vibrio</i> sp-10	0.022					
<i>Vibrio</i> sp-13	0.023	0.003				
<i>Vibrio</i> sp-17	0.023	0.010	0.011			
<i>Vibrio</i> sp-18	0.022	0.002	0.001	0.010		
<i>Vibrio</i> sp-20	0.021	0.003	0.005	0.011	0.003	

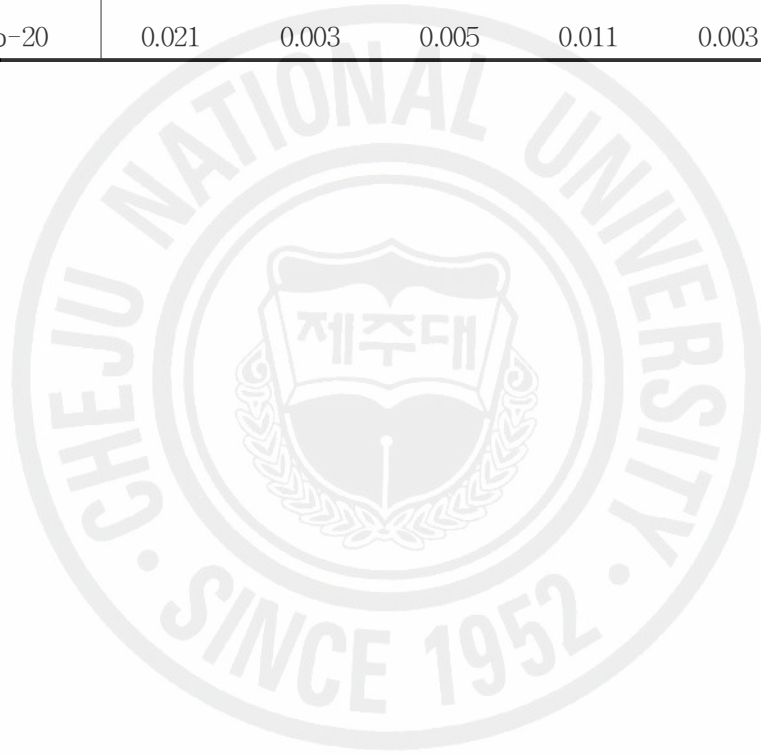


Table 12. p-distance estimated based on *aroA* DNA sequences obtained from standard and isolated strains of *Vibrio pomeroyi*

	Standard strain	V-27	V-37	V-45	V-46	V-47	<i>Vibrio</i> sp-9	<i>Vibrio</i> sp-11
Standard strain								
V-27	0.005							
V-37	0.008	0.010						
V-45	0.007	0.009	0.013					
V-46	0.005	0.009	0.010	0.011				
V-47	0.007	0.002	0.013	0.011	0.009			
<i>Vibrio</i> sp-9	0.006	0.001	0.011	0.010	0.010	0.001		
<i>Vibrio</i> sp-1	0.007	0.002	0.013	0.011	0.009	0	0.001	

V- : *Vibrio pomeroyi* isolated from fish farms and strain's information is shown at Table 7.



4. 제주도 양식장 분리 균주의 detection

2005년 3월부터 2006년 9월까지 제주도 양식 넙치에서 분리된 비브리오는 총 342균체로 *Vibrio scophthalmi*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio pelagius*, *Vibrio pomeroi* detection primer를 이용한 multiplex colony PCR을 통해 스크리닝 하였다.

Multiplex colony PCR 결과 *Vibrio scophthalmi*는 720 bp의, *Vibrio harveyi*는 550 bp의, *Vibrio anguillarum*은 450 bp의, *Vibrio pelagius*는 350 bp의, *Vibrio pomeroi*는 250 bp의 PCR 산물을 얻었다(Fig. 6).

스크리닝 결과, *Vibrio scophthalmi*가 342균체 중 155균체로 전체 45.3%, *Vibrio harveyi*는 342균체 중 82균체로 24.0%, *Vibrio anguillarum*은 342균체 중 3균체로 0.9%, *Vibrio pelagius*가 342균체 중 13균체로 3.8%, *Vibrio pomeroi*가 342균체 중 22균체로 6.4%의 분리 조성을 나타내었다(Table 13).

*Vibrio scophthalmi*는 한여름인 8월에는 거의 분리되지 않았으며 봄철에서 초여름철, 가을철에 분리되는 것을 확인할 수 있었다. 이에 반해 *Vibrio harveyi*는 초여름철인 6월부터 분리되기 시작하여 가을철인 11월까지 분리되었다. 그리고 *Vibrio anguillarum*은 3월에 분리된 3종을 제외하고 본 연구에서는 분리되지 않았다. *Vibrio pelagius*는 계절에 관계없이 분리되었으나 고수온기인 8월에는 분리가 되지 않았으며 *Vibrio pomeroi*는 계절에 관계없이 분리되었다.

이 연구에서 제작한 5종의 detection primer를 이용하여 세균성 질병에 감염된 양식 넙치에서 분리된 342균주 중 54종만이 종 동정이 이루어지지 않았다. 즉, 현재 제작된 5종의 vibrio detection primer는 multiplex colony PCR을 통해 제주도 양식 넙치에서 분리된 342균체의 비브리오 중 275균체가 detection되어 85.0%의 동정률을 보였다.

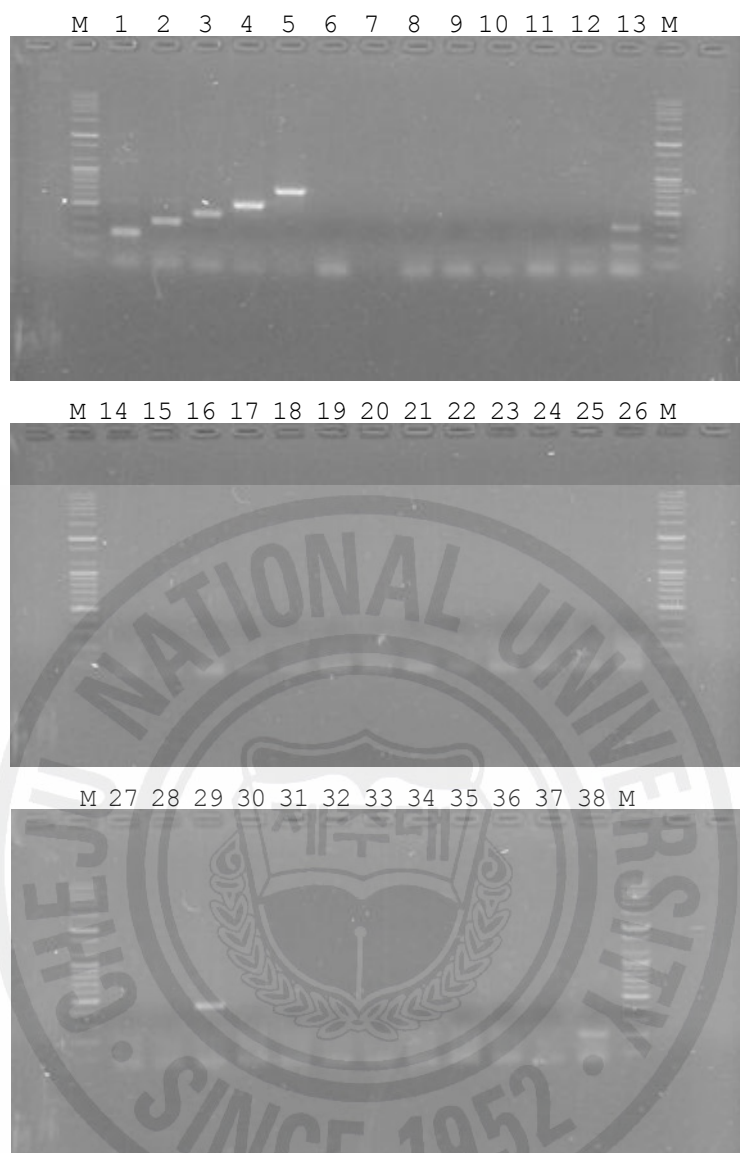


Fig. 6. Multiplex colony PCR products of *Vibrio* spp. causing major vibriosis by using detection primers.

M: 100 bp ladder as size marker, 1: *Vibrio pomeroyi*, 2: *Vibrio pelagius*, 3: *Vibrio anguillarum*, 4: *Vibrio harveyi*, 5: *Vibrio scophthalmi*, 6: *Vibrio aestuarianus*, 7: *Vibrio agarivorans*, 8: *Vibrio alginolyticus*, 9: *Vibrio cambellii*, 10: *Vibrio cholerae*, 11: *Vibrio cincinnatiensis*, 12: *Vibrio corallilyticus*, 13: *Vibrio cyclitrophicus*, 14: *Vibrio diazotrophicus*, 15: *Vibrio fischeri*, 16: *Vibrio fluvialis*, 17: *Vibrio furnissii*, 18: *Vibrio gazogenes*, 19: *Vibrio hollisae*, 20: *Vibrio ichthyoenteri*, 21: *Vibrio lentus*, 22: *Vibrio littoralis*, 23: *Vibrio mediterranei*, 24: *Vibrio metschnikovii*, 25: *Vibrio mimicus*, 26: *Vibrio natriegens*, 27: *Vibrio navarrensis*, 28: *Vibrio nereis*, 29: *Vibrio ordalii*, 30: *Vibrio orientalis*, 31: *paraheamolyticus*, 32: *Vibrio penaeicida*, 33: *Vibrio proteolyticus*, 34: *Vibrio rotiferianus*, 35: *Vibrio salmonicida*, 36: *Vibrio splendidus*, 37: *Vibrio tubiashii* 38: *Vibrio vulnificus*

Table 13. Monthly occurrence of *Vibrio* spp. isolated from fish farms located in Jeju Island

Sampling date	V_sco	V_har	V_pom	V_pel	V_ang	V_fis	V_rot	V_cyc	V_alg	P_dam	V_sp	Total
Mar., 2005	13				3	1						17
Apr., 2005	12			1		1		1			1	16
May, 2005	7					1					1	9
Jun., 2005	24	5	2	2					1		3	37
Jul., 2005	4	4					1			1		10
Aug., 2005		10					2					12
Sep., 2005	6	9		1		1					1	18
Oct., 2005	12	9		1							3	25
Nov., 2005	18	6	1			1	1				2	29
Dec., 2005	10	1						1			2	14
Jan., 2006	8		2	1								11
Feb., 2006	7		1									8
Mar, 2006	4										1	5
Apr., 2006	8										2	10
Jun., 2006	7		4	1							8	20
Jul., 2006	11	5	11	5							14	46
Aug., 2006	3	22	1								10	36
Sep., 2006	1	11		1							6	19
Total	155 (45.3)	82 (24.0)	22 (6.4)	13 (3.8)	3 (0.9)	5 (1.5)	4 (1.2)	2 (0.6)	1 (0.3)	1 (0.3)	54 (15.8)	342

(): percentage occurrence of *Vibrio* isolated from the diseased flounders, V_sco: *Vibrio scophthalmi*, V_har: *Vibrio harveyi*, V_pom: *Vibrio pomeroi*, V_pel: *Vibrio pelagius*, V_ang: *Vibrio anguillarum*, V_fis: *Vibrio fischeri*, V_rot: *Vibrio rotiferianus*, V_cyc: *Vibrio cyclitrophicus*, V_alg: *Vibrio alginolyticus*, P_dam: *Photobacterium damsela*, V_sp: *Vibrio* sp.

5. 분리 균주별 항생제 감수성 시험 결과

aroA 유전자를 이용하여 제작된 detection primer를 이용한 multiplex PCR을 통해 동정된 비브리오 중 양식 넙치에서 빈번하게 분리된 *Vibrio scophthalmi*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio pelagius*, *Vibrio pomeroi*의 항생제 감수성 test를 하였다.

균에 따른 항생제 감수성 정도는 Table 14, Table 15에 제시하였다.

*Vibrio scophthalmi*로 분리된 비브리오 균주 중 34균주를 시험한 결과, amoxycillin, ampicillin에 대해 79.4%의 내성을, clindamycin에 대해 100%의 내성을 나타냈으며, cephalothin에 대해 79.4%의, cholramphemicol, florfenicol 및 pefloxacin에 대해 70.6%의, ciprofloxacin과 nalidic acid에 대해 73.5%의, enrofloxacin에 대해 76.5%의, norflxacin에 대해 91.2%의, ofloxacin에 대해 88.2%의, oxolinic acid에 대해 85.3%의 감수성을 나타냈다.

*Vibrio harveyi*로 분리된 비브리오 균주 중 40균주의 항생제 시험 결과, 항생제 amoxycillin, ampicillin, cephalothin, clindamycin에 대해 100%의 내성을 보였으며 이에 반해 chloramphenicol에 대해 90.0%의, enrofloxacin, norfloxacin, ofloxacin에 대해 92.5%의, florfenicol, nalidixic acid에 대해 95.0%의, oxolinic acid에 대해 97.5%의 감수성을 보였다.

*Vibrio pelagius*로 분리된 비브리오 균주 중 7균주의 항생제 시험에서는 clindamycin에 대해 100%의 내성이 나타났으며, 이에 반해, amoxycillin, ampicillin, cephalothin, chloramphenicol, ofloxacin, oxolinic acid에 대해 100%의 감수성이 나타났다. 그리고 doxycyline, enrofloxacin, florfenicol, norfloxacin에 대해 85.7%의 감수성이 나타났다.

*Vibrio pomeroi*로 분리된 비브리오 균주 중 18균주는 amoxycilline, ampicillin에 대해 83.3%의 내성을 보였고, clindamycin에 대해 94.4%의 내성을, neomycin에 대해 77.8%의 내성을 보였다. 그러나 cephalothin에 대해 모든 균주가 감수성을 보였으며 cholamphenicol, norfloxacin에 대해 94.4%의 균주가, florfenicol에 대해 77.8%의 균주가, nalidixic acid, ofloxacin에 대해 83.3%의 균주가 oxolinic acid에 대해 88.9%의 균주가 감수성을 보였다.

항생제 감수성 시험 결과를 종합해 보면, 검출된 *Vibrio scophthalmi*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio pelagius*, *Vibrio pomeroyi*는 상대적으로 clindamycin에 대해 높은 내성을 보였고, chloramphenicol, florfenicol, norfloxacin, ofloxacin, oxolinic acid에 대해서 많은 균주들이 감수성을 보였다. 그리고 amoxicillin과 ampicillin에 대해 *Vibrio pelagius* 만이 높은 감수성을 나타내었으며 나머지 *Vibrio scophthalmi*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio pomeroyi*는 높은 내성을 보였다.

감수성 시험 결과 중에 따라 18개의 항생제에 대해 내성정도의 차이를 보였으며, 같은 종 사이에서도 다소의 항생제 내성 정도의 차이를 보였다.



Table 14. Antibiotics sensitivity of *Vibrio* spp. based on paper disc method

Antibiotics	<i>Vibrio scophthalmi</i> (34)			<i>Vibrio harveyi</i> (40)		
	Resistant	Weakly sensitive	Sensitive	Resistant	Weakly sensitive	Sensitive
Amoxicillin (AML)	27	2	5	40	0	0
Ampicillin (AMP)	27	1	6	40	0	0
Cephalothin (KF)	3	4	27	40	0	0
Chloramphenicol (C)	5	5	24	3	1	36
Ciprofloxacin (CIP)	3	6	25	4	7	29
Clindamycin (DA)	34	0	0	40	0	0
Doxycycline (DO)	13	0	21	4	1	35
Enrofloxacin (ENR)	8	0	26	1	2	37
Erythromycin (E)	7	24	3	22	15	3
Florfenicol (FFC)	10	0	24	2	0	38
Flumequine (UB)	9	10	15	7	26	7
Nalidixic acid (NA)	9	0	25	1	1	38
Neomycin (N)	19	15	0	18	22	0
Norfloxacin (NOR)	0	3	31	1	2	37
Ofloxacin (OFX)	0	4	30	2	1	37
Oxolinic acid (OA)	5	0	29	1	0	39
Oxytetracycline (OT)	13	3	18	5	5	30
Pefloxacin (PEF)	8	2	24	3	34	3

Table 14. Continued.

Antibiotics	<i>Vibrio pelagius</i> (7)			<i>Vibrio pomeroyi</i> (18)		
	Resistant	Weakly sensitive	Sensitive	Resistant	Weakly sensitive	Sensitive
Amoxicillin (AML)	0	0	7	15	0	3
Ampicillin (AMP)	0	0	7	15	0	3
Cephalothin (KF)	0	0	7	0	0	18
Chloramphenicol (C)	0	0	7	1	0	17
Ciprofloxacin (CIP)	0	2	5	2	5	11
Clindamycin (DA)	7	0	0	17	1	0
Doxycycline (DO)	1	0	6	4	1	13
Enrofloxacin (ENR)	1	0	6	3	3	12
Erythromycin (E)	2	5	0	3	14	1
Florfenicol (FFC)	0	1	6	1	3	14
Flumequine (UB)	1	3	3	3	5	10
Nalidixic acid (NA)	0	2	5	2	1	15
Neomycin (N)	2	4	1	14	4	0
Norfloxacin (NOR)	0	1	6	1	0	17
Ofloxacin (OFX)	0	0	7	2	1	15
Oxolinic acid (OA)	0	0	7	2	0	16
Oxytetracycline (OT)	3	0	4	5	0	13
Pefloxacin (PEF)	1	2	4	4	2	12

Table 15. The percentage rate of antibiotics resistance and sensitivity of 4 *Vibrio* strains based on paper disc method

Antibiotics	Percent of antibiotics resistant and sensitive							
	<i>Vibrio scophthalmi</i>		<i>Vibrio harveyi</i>		<i>Vibrio pelagius</i>		<i>Vibrio pomeroiyi</i>	
	R	S	R	S	R	S	R	S
Amoxicillin (AML)	79.4	14.7	100	0	0	100	83.3	16.7
Ampicillin (AMP)	79.4	17.6	100	0	0	100	83.3	16.7
Cephalothin (KF)	8.8	79.4	100	0	0	100	0	100
Chloramphenicol (C)	14.7	70.6	7.5	90.0	0	100	5.6	94.4
Ciprofloxacin (CIP)	11.8	73.5	10.0	72.5	0	71.4	11.1	61.1
Clindamycin (DA)	100	0	100	0	100	0	94.4	0
Doxycyline (DO)	38.2	61.8	10.0	87.5	14.3	85.7	22.2	72.2
Enrofloxacin (ENR)	23.5	76.5	2.5	92.5	14.3	85.7	16.7	66.7
Erythromycin (E)	20.6	8.8	55.0	7.5	28.6	0	16.7	5.6
Florfenicol (FFC)	2.9	70.6	5.0	95.0	0	85.7	5.6	77.8
Flumequine (UB)	26.5	44.1	17.5	17.5	14.3	42.9	16.7	55.6
Nalidixic acid (NA)	26.5	73.5	2.5	95.0	0	71.4	11.1	83.3
Neomycin (N)	55.9	0	45.0	0	28.6	14.3	77.8	0
Norfloxacin (NOR)	0	91.2	2.5	92.5	0	85.7	5.6	94.4
Ofloxacin (OFX)	0	88.2	5.0	92.5	0	100	11.1	83.3
Oxolinic acid (OA)	14.7	85.3	2.5	97.5	0	100	11.1	88.9
Oxytetracycline (OT)	38.2	52.9	12.5	75.0	42.9	57.1	27.8	72.2
Pefloxacin (PEF)	23.5	70.6	7.5	7.5	14.3	57.1	22.2	66.7

R: resistant, S: sensitive

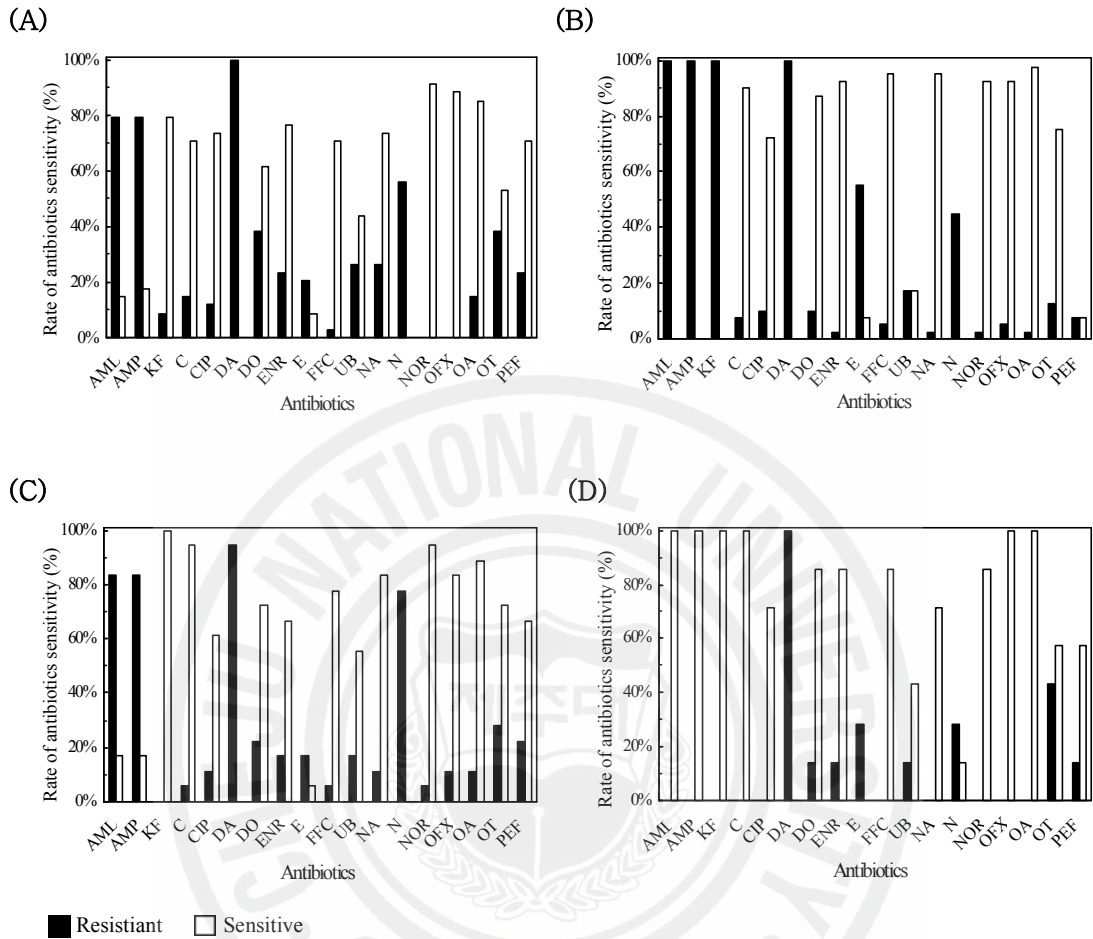


Fig. 7. Antibiotic resistant and sensitive pattern of 4 *Vibrio* strains isolated from fish farms located in Jeju Island by paper disc method. *Vibrio scoophthalmi* (A); *Vibrio harveyi* (B); *Vibrio pelagius* (C); *Vibrio pomeroyi* (D).

AML: amoxicillin, AMP: ampicillin, KF: cephalothin, C: chloramphenicol, CIP: ciprofloxacin, DA: clindamycin, DO: doxycycline, ENR: enrofloxacin, E: erythromycin, FFC: florenicol, UB: flumequine, NA: nalidixic acid, N: Neomycin, NOR: norfloxacin, OFX: ofloxacin, OA: oxolinic acid, OT: oxytetracycline, PEF: pefloxacin.

IV. 고찰

양식 넙치의 질병은 세균성 질병, 기생충성 질병, 바이러스성 질병, 영양성 질병 및 환경성 질병이 있으며 이들 질병 중 양식 넙치의 주요 세균성 질병은 연쇄구균증, 에드워드증, 비브리오증 등이 알려져 있다(Oh *et al.*, 1998). 특히 비브리오증 원인균인 *Vibrio*속은 해수, 기수, 담수 지역에 널리 분포하며 해양에 많이 상재하고 있는 기회 감염성 세균으로 알려져 있다(Kim *et al.*, 2005). *Vibrio*속 세균은 현재 약 65종이 보고되고 있으며 계속적으로 신종이 보고되는 추세이다(Thompson *et al.*, 2004).

*Vibrio*속은 형태학적, 염색학적, 혈청학적, 생화학적, 유전학적 방법을 통해 동정이 이루어지고 있다. 특히, 16S rRNA의 database가 풍부하여 이를 토대로 종 동정 뿐만 아니라 계통분류학적 연구에 이용되고 있다(Thompson *et al.*, 2004). 하지만 16S rRNA는 유전적으로 매우 보존된 부분으로 종간의 유전자 차이가 거의 없어 진화적으로 가까운 종간의 동정에 어려움을 지니고 있다(Krawiec and Riley, 1990; Moon *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005). 이 어려움을 보완하기 위해서 이 연구에서는 aromatic amino acid 생합성 과정에 관여하는 *aroA* 유전자를 이용하여 *Vibrio*속의 동정 및 계통분류학적 연구를 하였다. 그 결과 *aroA* 유전자를 이용한 분자계통분류와 기존에 연구된 16S rRNA의 분자계통분류는 종에 따라 유전적 다형성 정도의 차이를 보일 뿐 대부분 유사한 계통학적 분류 결과를 나타내었다. 그러나 16S rRNA의 경우 유전적으로 보존성이 높아 가까운 종간의 동정에 어려움을 보였다(Krawiec and Riley, 1990; Moon *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005).

aroA 유전자를 이용하여 *Vibrio*속의 계통학적 관계를 살펴보면 *Vibrio anguillarum*과 *Vibrio ordalii*가 유전학적으로 가장 상동성이 높아 진화적으로 가장 가까운 종으로 나타났다. 16S rRNA를 이용한 계통학적 관계도 같은 결과를 나타냈지만 이 경우 두 종간의 상동성이 99% 이상으로 종 구분이 어려웠다. *Vibrio ordalii*는 *Vibrio anguillarum*의 biotype II로 분리된 종으로 생화학적 및

유전학적 차이에 의해 새로운 종으로 보고되었으며(Schiewe and Croas, 1981, Schiewe *et al.*, 1981) 두 종 모두 출혈성 패혈증 원인균으로 알려져 있다(Kwon *et al.*, 2005). 기존에 연구에 따르면 *Vibrio anguillarum*는 *Vibrio*속으로 편입되어 사용하다가 ribosomal RNA분석을 통해 새로운 genus인 *Listonella*속으로 분류되어졌다(MacDonnell and Colwell, 1985). 그러나 현재의 분류 체계는 *Vibrio*속으로 편입되어 사용되고 있으며(Brenner *et al.*, 2005), 본 연구에서도 *Vibrio*속과 계통 분류학적으로 가깝게 묶여서 추후 분류학적 관계에 대한 조사를 통해 분류 체계의 정립이 필요하다고 사료된다.

그리고, *Vibrio harveyi*, *Vibrio cambellii*, *Vibrio rotiferianus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus*가 진화적으로 가까운 종으로 묶여서 16S rRNA를 이용한 계통분석 결과(Thompson *et al.*, 2004)와 비슷하였다. 하지만 16S rRNA 유전자를 이용할 경우 종간의 다형성이 낮아 종 구분이 불가능하였다(Nagpal *et al.*, 1998). 보고에 따르면 이들 5종은 진화적으로 가까운 종으로 16S rRNA는 99% 이상의 상동성을 지녀 종 동정이 불가능하지만 DNA hybridization 방법 및 생화학적, 형태학적 방법을 사용하여 동정을 하고 있다(Gomez-Gil, *et al.*, 2003, Gomez-Gil, *et al.*, 2004). 그러나 *aroA* 유전자를 이용한 본 연구에서는 이들의 종간 차이가 14.6%~24.5%로 16S rRNA 유전자보다 다형성이 높아 분류학적 연구 및 종 동정에 *aroA* 유전자의 사용이 가능할 것으로 사료된다.

*Vibrio cholerae*와 *Vibrio mimicus*가, *Vibrio fluvialis*와 *Vibrio furnissii*가 16S rRNA를 이용한 계통 분석 결과와(Thompson *et al.*, 2004) 같이 진화적으로 가까운 종으로 분리되었다. *Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus*는 16S rRNA의 경우 유전적 상동성이 99% 이상으로 거의 일치하여 계통진화적으로 명확한 구분이 힘들었지만 *aroA*의 경우 상동성이 83.8%로 계통진화적으로 두 종의 구분이 명확하게 나타났다. *Vibrio mimicus*는 Davis *et al.* (1981)에 의해 최초로 보고된 종으로 이전에는 *Vibrio cholerae*와 생태, 생화학적으로 매우 유사하여 동종으로 분류하였지만 TCBS 배지에서 sucrose 분해 능력 차이로 신종 *Vibrio mimicus*로 명명되었다(Chang, 1998). 이들은 전 세계적으로 서식하는 종으로 해산물에 오염되어 장염을 유발하는 것으로 알려져 있다(Ogg *et al.*, 1989; Chang *et al.*, 1995). 그리고 *Vibrio fluvialis*, *Vibrio furnissii* 사이에 16S rRNA의 경우 유전적 상동

성이 99% 이상으로 거의 일치하였지만 *aroA*의 경우 상동성이 79.7%로 본 연구에서는 두 종 사이의 명확한 구분이 가능하였다. 기존 연구에 의하면 *Vibrio fluvialis*와 *Vibrio furnissii*는 매우 가까운 종으로 *Vibrio fluvialis*이 포도당 발효에 있어 가스를 생성하는 aerogenic 균주와 가스를 생성하지 않는 anaerogenic 균주에 따라 생물형 I 과 II로 나뉘어졌으며, DNA 유연관계를 밝혀 생물형 II를 별도의 종이라는 것을 확인하고 *Vibrio furnissii*로 명명하였다(Bonner *et al.*, 1983; Heo, 2001). 이들 비브리오는 하천 및 연안의 갯벌, 플랑크톤, 어패류에 부착하여 생활하는 어패류의 생식을 통한 급성 위장관염을 유발하는 세균으로 감염시 *Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus*와 유사한 설사, 복통, 구토, 심한 탈수 증상 등이 나타난다(Blake *et al.*, 1980; Kolb *et al.*, 1997). 이들은 유사한 발병 특성과 계통분류학적 관계를 통해 진화적으로 가까운 종으로 생각되어진다.

또한, *aroA* 유전자를 이용한 계통 분석 결과 *Vibrio scophthalmi*와 *Vibrio ichthyoenteri*가 진화적으로 가깝게 묶였다. 주로 turbot (*Scophthalmus maximus*)의 장내에 기생하는 비브리오로 알려진 *Vibrio scophthalmi*와 부화 후 25-30일 경의 넙치 치어에 감염되어 단기간 집단폐사를 일으키는 장관백탁증의 원인균으로 알려진 *Vibrio ichthyoenteri*는 16S rRNA 유전자를 이용한 계통분류학적 연구에서도 99% 이상의 상동성을 보여 유전적으로 가까운 종으로 확인되었다(Cerdá-Cuéllar *et al.*, 1997; Cerdá-Cuéllar and Blanch, 2004; Moon *et al.*, 2004; Montes *et al.*, 2006). 그러나 *Vibrio scophthalmi*와 *Vibrio ichthyoenteri*는 16S rRNA의 유전학적 방법으로 종의 구분이 명확하지 않아 Montes *et al.* (2006)는 ribotyping 분석법을 통해서 이들 종을 구분하였다. *aroA* 유전자를 이용한 본 연구에서도 *Vibrio scophthalmi*와 *Vibrio ichthyoenteri*는 유전적으로 가까운 그룹을 형성하였으나 16S rRNA와 달리 22.1%의 유전적 차이를 보여 종 구분이 가능하였다.

*Photobacterium*속은 *Vibrio*속의 *Vibrio fischeri*, *Vibrio salmonicida*와 가깝게 묶여, *Photobacterium*속이 *Vibrio*속에 포함되는 현상을 보였다. 이는 16S rRNA를 이용한 계통학적 분석 결과(Thompson *et al.*, 2004)와 유사하였다. 기존에 연구에 따르면 유사한 속인 *Vibrio*속과 *Photobacterium*속은 분류학적 위치 정립을 위한 기준이 명확하지 않아 그 구분이 모호하여(Smith *et al.*, 1991, Austin and

Austin, 1999, Thompson *et al.*, 2004) 차후 더 많은 연구를 통해 *Vibrio*속에서 *Photobacterium*속으로 분류학적 위치의 명확한 기준을 마련해야 할 것이다.

*Vibrio*속의 *aroA* 유전자를 이용한 계통분류학적 자료를 토대로 제주도 양식 넙치에서 분리된 비브리오를 multiplex colony PCR만으로 신속 동정할 수 있는 detection primer를 제작하였다. 본 연구에서 병원성을 보이는 양식넙치로부터 2005년 3월부터 2006년 9월까지 분리된 비브리오 342균체를 동정하였다. 동정 결과, *Vibrio scophthalmi*가 155균체 45.3%를 차지하였으며 *Vibrio harveyi*가 82균체로 24.0%를, *Vibrio anguillarum*가 3균체로 0.9%를, *Vibrio pelagius*가 13균체로 3.8%를, *Vibrio pomeroi*가 22균체로 6.4%를 차지하였다. 그 밖에 *aroA* 유전자의 cloning을 통해 얻어진 염기서열 자료를 이용하여 작성된 계통수에서 분리된 전체 균주 342균체 중 *Vibrio fischeri*는 5균체로 1.5%를, *Vibrio rotiferianus*는 4균체로 1.2%를, *Vibrio cyclitrophicus*는 2균체로 0.6%를, *Vibrio alginolyticus*는 1균체로 0.3%를, 그리고 *Photobacterium damsela*는 1균체로 0.3%를 나타내었다.

본 연구에서 가장 많이 분리된 *Vibrio scophthalmi*는 1월에서 6월 사이에 상대적으로 많이 분리되었으며 고수온기인 8월에는 상대적인 분리 빈도가 낮았다. *Vibrio scophthalmi*는 넙치의 장내에 주로 발생한 종으로 지리적 위치에 상관없이 저서생활을 하는 넙치류의 장내에 기생하는 종으로 다른 어종에서는 분리되지 않는 것으로 알려져 있다(Sugita *et al.*, 2006). *Vibrio scophthalmi*는 Kang (2004)의 연구에서 261균주 중 69균주가 분리되었으나 Kim *et al.* (2005)의 연구에서는 분리되지 않았다. 이 종은 아직 어류질병에 관한 연구가 미미하여 병원성, 독성 등에 관한 차후의 조사가 필요하다고 생각된다.

*Vibrio harveyi*는 넙치 뿐 만 아니라 여러 해양 동물에 질병을 일으키는 것으로 보고되고 있는(Brenner *et al.*, 2005) 종으로 이 연구에서 고수온기인 여름철에 주로 분리되었다. *Vibrio harveyi*에 감염된 넙치는 탈장, 복부 팽만, 창자의 출혈, 간 출혈 등의 증상을 나타낸다고 알려져 있으며(교육인적자원부, 2003) 이 연구에서는 특히 탈장 증상을 보이는 개체에서 주로 분리되었다.

*Vibrio anguillarum*는 연안 해수에 널리 분포하여 다양한 온수성 및 냉수성 어종에 전형적인 출혈성 패혈증을 유발한다고 알려져 있으며(Austin *et al.*, 1999;

Kim *et al.*, 2005) 넙치 뿐 만 아니라 뱀장어 등의 다른 어류의 질병을 유발시키는 병원균으로 알려져 있다(Lee *et al.*, 1991; Austin and Austin, 1999; Kang, 2003; Kim *et al.*, 2005). 그러나 본 연구에서는 2005년 3월에 3균주만이 분리되었다. 또한 *Vibrio anguillarum*과 유사 종인 *Vibrio ordalii* 또한 넙치 어병 세균으로 알려져 있지만 분리되지 않아 좀 더 다양한 비브리오증의 연구를 통해 넙치 비브리오증의 정확한 원인균 파악이 필요할 것으로 사료된다.

이 연구에서 13균체가 분리된 *Vibrio pelagius*는 넙치의 먹이 생물인 알테미아나 로티퍼에서 주로 분리되었으며 넙치에서 분리된 균주 또한 간이나 신장 등의 내장기관에서도 분리되었으나 주로 아가미나 표피를 통해 분리되었다. 보고에 따르면 turbot의 유생, 치어, 성어의 균총으로부터 분리된 종으로(Toranz *et al.*, 1993) turbot의 치어에 감염 시 폐사를 유발시키지는 않지만 넙치의 움직임을 둔화시키고 먹이 섭취율을 감소시켜 상업적인 어류 양식에 피해를 가져온다고 보고되어 있다(Villamil *et al.*, 2003). 또한 turbot 치어 유행성 질병의 원인균으로도 알려져 있다(Angulo *et al.*, 1992).

*Vibrio pomeroyi*는 1998년 *Nodipecten nodosus*에서 최초로 분리되었으며(Thompson *et al.*, 2003), Kang (2003) 에 의해 넙치에서 분리된다고 보고되었다. *Vibrio pomeroyi*는 현재 해산어에 대한 병원성 보고는 없지만 무지개송어를 대상으로 독성실험 결과 안구돌출, 복수 및 장내 기관의 용해가 일어나는 것으로 보고되었다(Austin *et al.*, 2005). 따라서, 차후 이 균주가 넙치의 질병을 일으키지 병원성에 관한 연구를 수행되어야 할 것이다.

*Vibrio fischeri*는 일반적으로 해수에 상주하는 세균으로(Austin and Austin, 1999) 최근 들어 어병 세균으로 인식되고 있으며(Zorrilla *et al.*, 2003), Kang (2003) 및 Kim *et al.* (2005) 등에 의해 넙치에서 분리된다고 보고되었다. *Vibrio rotiferianus*는 최초 로티퍼(*Brachionus plicatilis*)에서 분리되어 신종으로 보고된 종으로(Gomez-Gil *et al.*, 2003), 어류에서 분리된 기록은 없다. 또한, 해산어 질병의 병원성에 관한 보고는 없지만 무지개송어를 대상으로 독성실험을 실시한 결과 안구돌출 및 장내 기관의 용해가 일어나는 것으로 보고되고 있지만 낮은 치사율을 보인다(Austin *et al.*, 2005). 따라서 자·치어 시기 때 먹이생물인 로티퍼에서 온 것인지 환경수로부터 감염된 것인지 다른 경로로부터 감염된 것인지

차후 연구가 필요하다. *Vibrio cyclitrophicus*는 클레오소트(Creosote)에 의해 오염된 침전물에서 처음 분리된 종으로(Hedlund and Staley, 2001) 현재 어류의 병원균으로 보고된 연구는 없어 차후 이 종에 대한 병원성 연구가 필요하다.

이 외에 *Vibrio fischeri*가 5균체, *Vibrio rotiferianus*가 4균체, *Vibrio cyclitrophicus*가 2균체, *Vibrio alginolyticus*가 1균체, *Photobacterium damsela*가 1균체가 나타났으며 54균체가 동정되지 않았다.

2005년 3월부터 2006년 9월 사이에 제주도 양식 넙치에서 분리된 비브리오는 342균체로 9종의 *Vibrio*속과 1종의 *Photobacterium*속이 분리되었다. 이 연구에서 분리된 균주 중 동정이 되지 않은 종은 *aroA* 유전자를 이용하여 추가적 연구를 통해 detection primer 제작을 수행하고 있는 중이다. 또한 지금까지 양식 넙치에서 분리된 균주 중 *aroA* 유전자의 계통수를 통해 동정되지 않은 종은 추가적 방법을 통한 종 동정을 통해 신종 여부의 파악 및 종 동정이 이루어져야 할 것이다.

본 연구에서는 비브리오에 감염된 넙치로부터 가장 많이 분리된 4종인 *Vibrio scophthalmi*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio pelagius*, *Vibrio pomeroyi*에 대해 항생제 감수성 시험을 하였다. 양식 넙치로부터 분리된 *Vibrio scophthalmi*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio pelagius*, *Vibrio pomeroyi*는 상대적으로 clindamycin에 대해 높은 내성을 보이는 균주가 많았고, chloramphenicol, florfenicol, norfloxacin, ofloxacin, oxolinic acid에 대해서 많은 균주들이 감수성을 보였다. 그리고 amoxycillin과 ampicillin에 대해 *Vibrio pelagius* 만이 높은 감수성을 나타내었으며 나머지 *Vibrio scophthalmi*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio pomeroyi*는 높은 내성을 보였다. 종에 따라 항생제에 대한 내성 정도가 다르게 나타났으며 같은 종이라도 항생제 감수성 정도는 다소 차이를 보였다.

이러한 결과를 통해 제주도 양식장에서 다양한 비브리오의 출현에 따른 병원성 및 항생제 감수성 테스트 등이 수행되어야 할 것이며 내성 인자를 지닌 플라즈미드를 연구하여 내성 균주의 파악이 수행되어야 할 것이다

따라서 어류 병원성 세균이 항생제에 대한 내성 증가 억제 및 양식 어류의 세균성 질병에 효과적으로 대처하기 위해 적절한 약제의 선정이 필요하며 항생제 내성 균주를 파악하기 위해 지속적인 연구가 필요할 것이다.

V. 요약

*Vibrio*속은 최근까지 전 세계적으로 약 65종이 분리되어 보고되고 있으며 계속적으로 증가하는 추세이다. *Vibrio*속 세균은 gram 음성 간균으로 해수, 기수 담수 지역에 널리 분포하는 상재 세균으로서 어류, 갑각류 및 연체동물에 이르는 다양한 수산 생물에 감염시킨다.

*Vibrio*속의 동정은 형태학적, 혈청학적 방법 및 생화학적 방법, 유전학적 방법 등을 통해서 진행되고 있다. 이 연구에서는 유전학적 방법 중 *aroA* 유전자를 이용하여 *Vibrio*속을 동정하였다.

aroA 유전자는 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase를 인코딩하는 유전자로 박테리아의 성장에 관여하는 것으로 알려져 있다.

이 연구는 *aroA* 유전자를 이용하여 *Vibrio*속의 분자계통분류학적 관계성 및 다양성을 조사하였으며 이를 토대로 *Vibrio*속의 신속한 동정을 위한 방법을 구축하여 제주도의 양식 넙치에서 발생하는 세균성 질병의 원인균인 *Vibrio*속 동정하였다.

aroA 유전자를 이용한 *Vibrio*속 표준균주의 계통분석과 질병에 감염된 양식 넙치에서 분리된 비브리오의 *aroA* 유전자 cloning을 통해 얻어진 데이터를 이용하여 어병 원인 비브리오의 특이 서열로 detection primer가 제작되었다.

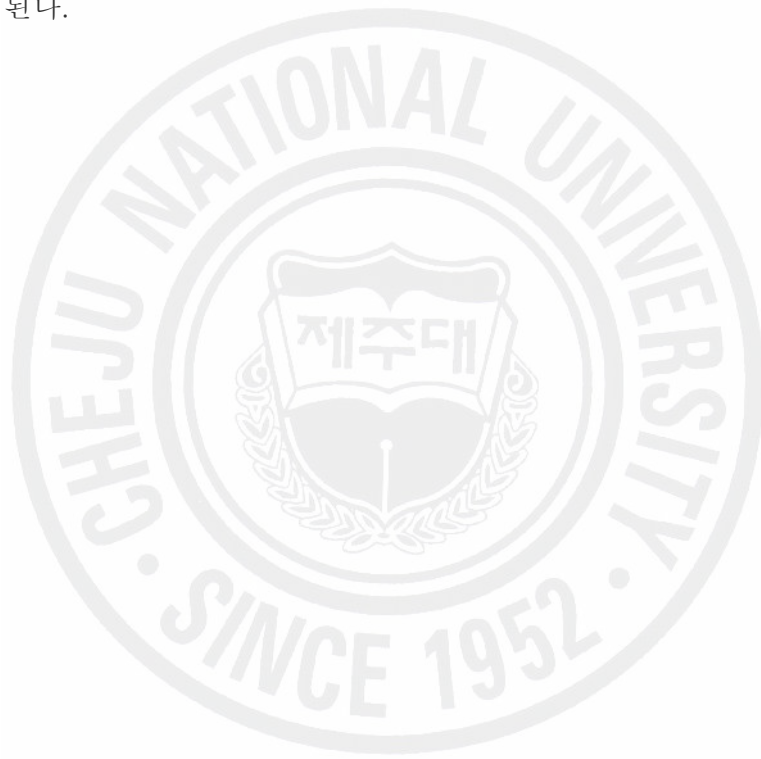
제작된 detection primer로 Multiplex PCR을 통해 넙치에서 분리된 비브리오를 동정하였다. Detection 결과 *Vibrio scophthalmi*가 45.3%, *Vibrio harveyi*가 24.0%, *Vibrio anguillarum*이 0.9%, *Vibrio pelagius*가 3.8%, *Vibrio pomeroiyi*가 6.4%를 나타내었다.

또한 양식 넙치에서 분리되는 비브리오 중 동정된 비브리오 중 주로 분리되는 비브리오를 선택하여 18 종류의 항생제를 이용하여 감수성 시험을 수행하였다.

항생제 감수성 시험 결과, 검출된 *Vibrio scophthalmi*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio pelagius*, *Vibrio pomeroiyi*는 상대적으로 clindamycin에 대해 높은 내성을 보였고, cholramphenicol, florfenicol, norfloxacin, ofloxacin, oxolinic acid에 대해서

많은 균주들이 감수성을 보였다. 그리고 amoxycillin과 ampicillin에 대해 *Vibrio pelagius* 만이 높은 감수성을 나타내었으며 나머지 *Vibrio scophthalmi*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio pomeroyi*는 높은 내성을 보였다. 감수성 시험 결과 종에 따라 18개의 항생제에 대해 내성정도의 차이를 보였으며, 종 사이에서도 다소의 항생제 내성 정도의 차이를 보였다.

따라서, *aroA* 유전자를 이용한 세균성 질병 원인균의 신속 동정과 항생제 감수성 시험을 통하여 신속하고 적절한 치료 대책의 마련함으로써 제주도 양식장에 큰 피해를 주고 있는 비브리오증을 포함한 세균성 질병을 극복할 수 있을 것으로 생각 된다.



VI. 참고 문헌

- Angulo L., J.E. Lopez, C. Lema and J.A. Vicente. 1992. *Vibrio pelagius* associated with mortalities in farmed turbot. *Thalassas*, 10: 129-133.
- Austin, B. and D.A. Austin. 1999. Bacterial fish pathogens: Disease of farmed and wild fish, 3rd edn. Goldaming, UK: Springer-Praxis, p 102-118.
- Austin, B., D.A. Austin, R. Sutherland, F. Thompson and J. Swings. 2005. Pathogenicity of vibrios to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaaum) and *Artemia nauplii*. *Environmental Microbiology*, 7(9): 1488-1495.
- Baucer, A.W., W.M.M. Kirby, J.C. Sherris, and M. Turck. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of clinical Pathology*, 45: 493-496.
- Bonner, J.R, A.S. Coker, C.R. Berryman and H.M. pollock. 1983. Spectrum of *Vibrio* infections in a gulf coast community. *Ann. Intern. Med.*, 99: 464-476.
- Brake, P.A., R.E. Weaver and D.G. Hollis. 1980. Diseases of human (other than cholera) caused by vibrios. *Annu. Rev. Microbiol.*, 34: 341-354.
- Brenner Don J., Noel R. Krieg and James T. Staley. 2005. *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*. Second Edition. springer., Volume 2: p 494-552.
- Cerdá-Cuéllar, M. and A.R. Blanch. 2004. Determination of *Vibrio scophthalmi* and its phenotypic diversity in turbot larvae. *Environmental Microbiology*, 6(3): 209-217.
- Cerdá-Cuéllar M., R.A. Rosselló-Mora, J. Lalucat, J. jorre and A.R. Blanch. 1997. *Vibrio scophthalmi* sp. nov., a new species from turbot (*Scophthalmus maximus*). *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47(1): 58-61.
- Chang, S.H., D.J. Song, S.J. Yang, I.S. Shin and Y.M. Kim. 1995. Ecology of *Vibrio cholerae* non-01 and *Vibrio mimicus* in Estuary of Kum River, Korea. *Bull. Korean Fish. Soc.*, 28(1): 15-22.
- Chang, S.H. 1998. Seasonal distribution of *Vibrio cholerae* non-01 and *Vibrio mimicus*

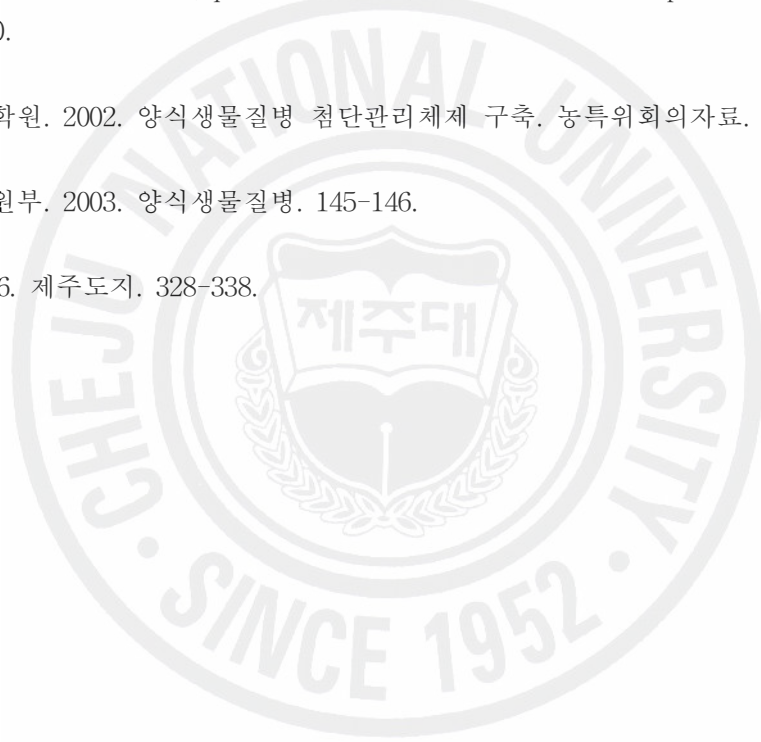
- of Mije Pond, Kunsan. Fish Sci. Research, 14: 1-22.
- Chen, D., P.J. Hanna, K. Altmann, A. Smith, P. Moon and L.S. Hammond. 1992. Development of monoclonal antibodies that identify *vibrio* species commonly isolated from infections of humans, fish and shellfish. Appl. Environ. Microbiol., 58: 3694-3700.
- Davis, B.R., G.R. Fanning, J.M. Madden, A.G. Steigerwalt, H.B. Bradford, Jr., H.L. Smith, Jr. and D.J. Brenner. 1981. Characterization of biochemically atypical *Vibrio cholerae* strains and designation of a new pathogenic species, *Vibrio mimicus*. F. Clin. Microbiol., 14: 631-639.
- Del Rio, M.L., C.B. Gutiérrez Martín, J. Navas, B. Gutiérrez-Muñiz, J.I. Rodríguez-Barbosa and E.F. Rodríguez Ferri. 2006. *aroA* gene PCR-RFLP diversity patterns in *Haemophilus parasuis* and *Actinobacillus* species. Research in Veterinary Science, 80: 55-61.
- Gomez-Gil, B., F.L. Thompson, C.C. Thompson and J. Swings. 2003. *Vibrio rotiferianus* sp. nov., isolated from cultures of the rotifer *Brachionus plicatilis*. Int. J. Syst. Bacteriol., 53: 239-243.
- Gomez-Gil, B., S. Soto-Rodríguez, A. García-Gasca, A. Roque, R. Vázquez-Juárez, F.L. Thompson and J. Swings. 2004. Molecular identification of *Vibrio harveyi*-related isolates associated with diseased aquatic organisms. Microbiology, 150: 1769-1777.
- Gurtler, V. and V.A. Stanisich. 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. Microbiology, 142: 3-6.
- Hedlund, B.P. and T.J. Staley. 2001. *Vibrio cyclotrophicus* sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading marine bacterium. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 51: 61-66.
- Han, S.H., N.R.Y. Woo, S.D. Lee and M.H. Kang. 2006. Antioxidative and antibacterial activities of endemic plants extracts in Korea. Korean J. Medicinal Crop Sci., 14(1): 49-55.
- Heo, M.S. 2001. Purification and characterization of the extracellular hemolysin of *Vibrio furnissii*. J. Korean Fish. Soc., 34(5): 502-508.

- Hernanz, C., E. Flano, P. Lopez, A. Villena, J. Anguita, A. Cascon, M. Sanchez, B. Razquin and G. Naharro. 1998. Molecular characterization of the *Aeromonas hydrophila aroA* gene and potential use of an auxotrophic *aroA* mutant as a live attenuated vaccine. *Infection and Immunity* 66: 1813-1821.
- Hickman, F.W., J.J. Farmer and D.J. Brenner. 1982. Identification of *Vibrio hollisae*, sp. nov. from patient with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.*, 15: 395-401.
- Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley and S.T. Williams. (editors) 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th edn. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Kang, B.J. 2003. A study on the characteristics of bacteria isolated from cultured flounder (*Paralichthys olivaceus*) showing disease symptoms in Jeju area of Korea. Doctor's Thesis. Cheju National University. 112 pp.
- Kim, S.M., K.M. Won, S.H. Woo, H. Li, E.J. Kim, K.J. Choi, M.Y. Cho, M.S. Kim and S.I. Park. 2005. Vibrios isolated from diseased marine culturing fishes in Korea. *J. Fish Pathol.*, 18(2): 133-145.
- Kolb, A.K., S.C. Eppes and J.D. Klein. 1997. *Vibrio fluvialis*: an under recognized enteric pathogen in infants *South. Med. J.*, 90: 544-545.
- Krawiec, S. and M. Riley. 1990. Organization of the bacterial chromosome. *Microbiol. Rev.*, 54: 502-539.
- Kwon, M.G., S.U. Park, J.D. Bang and S.I. Park. 2005. Isolation of pathogenic *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* from olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J. Fish Pathol.*, 18(3): 205-214
- Lee, H.G., H.J. Kim and I. Kim. 1991. Isolation of *Vibrio* species from cultured flounders (*Paralichthys olivaceus*) with ulcers and ascites in the Southern Coast of Korea during the winter season. *Kor. Jour. Microbiol.*, 29(5): 319-328.
- Lee, Simon K.Y., H.Z. Wang, Sheran H.W. Law, Rudolf S.S. Wu and Richard Y.C. Kong. 2002. Analysis of the 16S-23S rDNA intergenic spacers (IGSs) of marine vibrios for species-specific signature DNA sequences. *Marine pollution Bulletin*, 44: 412-420.

- MacDonnell, M.T. and R.R. Colwell. 1985. Phylogeny of the *Vibrionaceae*, and recommendations for two new genera *Listonella* and *Shewanella*. *Systematic Applied Microbiology*, 6: 171-82.
- Montes, M., R. Farto, M.J. Pérez, S.P. Armada and T.P. Nieto. 2006. Genotypic diversity of *Vibrio* isolates associated with turbot (*Scophthalmus maximus*) culture. *Research in Microbiology*, 30: 1-9.
- Moon, Y.G., G.T. Park, H.J. Son, S.H. Lee, J.M. Lee and M.S. Heo. 2004. Rapid detection of the pathogenic agent of bacterial white enteritis of larval and juvenile stages in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *J. Fish Pathol.*, 17(3): 157-169.
- Nagpal, M.L., K.F. Fox and A. Fox. 1998. Utility of 16S-23S rRNA spacer region methodology: how similar are interspace regions within a genome and between strains for closely related organism. *J. Microbiol. Methods*, 33: 211-219.
- Ogg, J.E., R.A. Ryder and H.L. Smith, Jr. 1989. Isolation of *Vibrio cholerae* from aquatic birds in Colorado and Utah. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55: 95-99.
- Oh, S.P., D.H. Kim, J.J. Lee and C.H. Lee. 1998. Bacterial diseases in Flounder farms of Cheju Island. *J. Fish Pathol.*, 11(1): 23-27.
- Oh, Y.H., Y.B. Kim, Y.M. Park, M.J. Kim and M.S. Cha. 1998. Antibiotic sensitivity of the bacterial strains isolated from operating wounds. *Korean J. Life Science*, 8(1): 40-50.
- Parish, T. and N.G. Stoker. 2002. The common aromatic amino acid biosynthesis pathway is essential in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology*, 148: 3069-3077.
- Schiewe, M.H. and J.H. Crosa. 1981. Molecular characterization of *Vibrio anguillarum* biotype II., *Can. J. Microbiol.*, 27: 1011-1018.
- Schiewe, M.H., T. Trust and J.H. Crosa. 1981. *Vibrio ordalii* sp. nov.: A causative agent of vibriosis in fish. *Curr. Microbiol.*, 6: 343-348.
- Smith, S.K., D.C. Sutton, J.A. Fuerst and J.L. Reichelt. 1991. Evaluation of the genus

- Listonella* and reassignment of *Listonella damsela*(Love *et al.*). MacDonella and Colewell to the genus *Photobacterium* as *Photobacterium damsela* comb. nov. with an emended description. *Int. J. System. Bacteriol.*, 41: 529–534.
- Soriano, A.C., S.J. Anguita, C.H. Moral, M.S. Salazar, J.Y. Marcos and G.N. Carrasco. 1997. RFLP-PCR analysis of the *aroA* gene as a taxonomic tool for the genus *Aeromonas*. *FEMS Microbio. Lett.*, 156: 199–204.
- Sugita, H. and Y. Ito. 2006. Identification of intestinal bacteria from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) and their ability to digest chitin. *letters in Applied Microbiology*, 43: 336–342.
- Temprano A., J. Riano, J. yugueros, P. Gonzalez, L. de Castro, A. Villena, J. M. Luengo and G. Naharro. 2005. Potential use of a *Yersinia ruckeri* O1 auxotrophic *aroA* mutant as a live attenuated vaccine. *Journal of Fish Diseases*, 28: 419–427.
- Thompson F.L., B. Hoste, K. Vandemeulebroecke and J. Swings. 2001. Genomic diversity amongst *Vibrio* isolates from different sources determined by fluorescent amplified fragment length polymorphism. *Syst Appl Microbiol.*, 24: 520–538
- Thompson F.L., B. Hoste, K. Vandemeulebroecke and J. Swings. 2003. Reclassification of *Vibrio hollisae* as *Grimontia hollisae* gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 53: 1615–1617.
- Thompson, F.L., C.C. Thompson, Y. Li, B. Gomez-Gill, J. Vandenberghe, B. Hoste and J. Swings. 2003. *Vibrio kanaloae* sp. nov., *Vibrio pomeoyi* sp. nov. and *Vibrio chagasii* sp. nov., from sea water and marine animals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53: 753–759.
- Thompson, F.L., T. Iida. and J. Swings. 2004. Biodiversity of Vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(3): 403–431.
- Toranzo, A.E. and J.L. Barfa. 1990. A review of the taxonomy and seroepizootiology of *Vibrio anguillarum*, with special reference to aquaculture in the northwest of Spain. *Dis. Aquat. Org.* 9: 73–82.
- Toranzo, A.E., B. Novoa, J.L. Romalde, S. Nunez, S. Devesa, E. Marino, R. Silva, E.

- Martinez, A. Figueras and J.L. Barja. 1993. Microflora associated with healthy and diseased turbot(*Scophthalmus maximus*) from three farms in northwest Spain. *Aquaculture*, 114: 189-202.
- Villamil, L., A. Figueras, A.E. Toranzo, M. Planas and B. Novoa. 2003. Isolation of a highly pathogenic *Vibrio pelagius* strain associated with mass mortalities of turbot, *Scophthalmus maxiums*(L.), larvae. *Journal of Fish Diseases*, 26: 293-303.
- Zorrilla, I., M. Chabrillon, S. Arijó, P. Diaz-Rosales, Martínez-Manzanares, M.C.E. Balebona and M.A. Morinigo. 2003. Bacterial recovered from diseased cultured gilthead sea bream (*Sparus autata* L.) in Southwestern Spain. *Aquaculture*, 218: 11-20.
- 국립수산과학원. 2002. 양식생물질병 첨단관리체제 구축. 농특위회의자료.
- 교육인적자원부. 2003. 양식생물질병. 145-146.
- 제주도. 2006. 제주도지. 328-338.



감사의 글

석사학위 과정의 결과물이라고 볼 수 있는 학위 졸업논문을 쓰면서 지난 대학 생활을 돌이켜 보면 끝났다는 후련함보단 더 열심히 할 것이라는 아쉬움이 더 큽니다.

우선 미숙하고 부족함 많은 저에게 많은 격려와 지도를 아끼지 않으신 송춘복 교수님께 감사의 마음을 전합니다. 그리고 바쁘신 가운데서도 논문을 정성껏 심사해주시고 격려를 아끼지 않으셨던 허문수 교수님, 전유진 교수님께 감사의 말씀을 드립니다. 또한 학위과정 중 따뜻하게 저를 보아 주신 이제희 교수님, 여인규 교수님께 감사드립니다.

실험하는 동안 많은 도움을 준 어류유전육종실험실의 맹진오빠, 송헌오빠, 혜영이에게 감사드리며 범석오빠, 윤철오빠, 상규오빠에게도 감사드립니다.

대학 생활 동안 함께한 해양생물공학과 분자유전학실험실원, 해양자원이용공학실험실원, 어류분자생리학 실험실원, 해양미생물학 실험실원 및 해양생물공학과 외국인 유학생들에게도 감사의 마음을 전합니다.

그리고 이 연구를 위해 군주 샘플을 제공해 주신 진창남 과장님, 고봉균 선배님, 태경이에게 감사의 마음 전합니다.

언제나 옆에서 큰 힘이 되 준 나의 친구들에게 감사드립니다.

이제까지 저에게 도움을 주었던 많은 분들에게 감사의 마음을 전합니다.

마지막으로 저를 키워주시고 언제나 믿어주시고 큰 힘이 되어 주시는 사랑하는 아빠, 엄마에게 감사의 마음을 전합니다. 그리고 사랑하는 동생에게도 감사의 마음을 전합니다.