



## 저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 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

전이금속 갈륨을 이용한 양식넙치  
(*Paralichthys olivaceus*)의 세균성  
질병에 대한 Biofilm 형성 억제

濟州大學校 大學院

海洋生命科學科

金東輝

2013年2月

전이금속 갈륨을 이용한 양식넙치  
(*Paralichthys olivaceus*)의 세균성  
질병에 대한 Biofilm 형성 억제

指導教授 許文洙

金東輝

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2013 年 2 月

朴昭炫의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 \_\_\_\_ 김 기 영 \_\_\_\_\_ (인)

委 員 \_\_\_\_ 이 승 현 \_\_\_\_\_ (인)

委 員 \_\_\_\_ 허 문 수 \_\_\_\_\_ (인)

濟州大學校 大學院

2013 年 2 月

Inhibitory effect of Transition Metal Gallium in  
biofilm formation of *Paralichthys olivaceus*  
pathogenic microbes

Dong-Hwi Kim

(Supervised by professor Moon-Soo Heo)

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

Department of Marine life science

GRADUATE SCHOOL

JEJU NATIONAL UNIVERSITY

February, 2013

# 목 차

목 차 .....	i
List of Tables .....	iii
List of Figures .....	iv
Abstract .....	vi
I. 서 론 .....	1
II. 재료 및 방법 .....	2
2.1. 시험균주 확보 .....	4
2.2. 시험균주 분리 · 배양 및 보관 .....	3
2.3. 시험균주의 동정 및 특징 .....	4
2.3.1. 생리학적 특징 .....	4
2.3.2. 형태학적 특징 .....	5
2.3.3. 16S rRNA 염기서열 분석 .....	6
2.4. 항생제 감수성 .....	7
2.5. 시험균주의 성장능 및 바이오필름 형성능 .....	8
2.6. Transition Metal Gallium( $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ )의 바이오필름 저해능 .....	9
2.6.1. 갈륨의 바이오필름 최소억제농도 측정 .....	9
2.6.2. Resazurin assay .....	9
2.6.3. Vitality staining .....	11
2.7. 갈륨처리구와 합성 항생제의 비교 .....	11

III. 결 과 및 고찰 .....	12
3.1. 균주의 동정 및 특징 .....	12
3.1.1. 균주의 배양학 및 형태학적 특성 .....	12
3.1.2. 16S rRNA 염기서열의 계통학적 특성 .....	18
3.1.3. 균주의 생화학적 특성 .....	20
3.2. 항생제 감수성 테스트 .....	24
3.3. 바이오필름 형성능 확인 .....	26
3.4. 갈륨의 항균활성 .....	27
3.5. 균주에 대한 갈륨의 바이오필름 저해능 .....	28
3.6. Resazurin assay .....	30
3.7. Vitality staining .....	32
3.8. 갈륨투여구와 합성항생제의 비교 .....	35
IV. 요 약 .....	37
V. 참고 문헌 .....	39
VI. 감사의 글 .....	42

## List of tables

Table 1. Composition of Brain Heart Infusion Agar (BHIA) .....	3
Table 2. Composition of Brain Heart Infusion Broth (BHIB) .....	4
Table 3. Antibiotic used for antibiotic-resistant strains selection .....	7
Table 4. Genetic isolation and characterization of <i>Streptococcus parauberis</i> .....	13
Table 5. Genetic isolation and characterization of <i>Streptococcus iniae</i> .....	14
Table 6. Genetic isolation and characterization of <i>Edwardsiella tarda</i> .....	14
Table 7. Physiological features of pathogenic microbes .....	19
Table 8. Biochemical characterization through API 20 strep in isolated 25 strains of <i>S. parauberis</i> .....	21
Table 9. Biochemical characterization through API 20 strep in isolated 25 strains of <i>S. iniae</i> .....	22
Table 10. Biochemical characterization through API 20E in isolated 25 strains of <i>E. taeda</i> .....	23
Table 11. Antibiotic resistance of pathogenic microbes .....	24
Table 12. Antibiotic activity of gallium against <i>S. parauberis</i> , <i>S. iniae</i> and <i>E. tarda</i> .....	24

## List of figures

Fig. 1. Sampling sites of <i>Paralichthys olivaceus</i> .....	2
Fig. 2. Field Emission Scanning Electron Microscopic image of <i>Streptococcus parauberis</i> . Cells were grown at 25 °C for 24 hours .....	4
Fig. 3. Field Emission Scanning Electron Microscopic image <i>Streptococcus iniae</i> . Cells were grown at 25 °C for 24 hours .....	5
Fig. 4. Field Emission Scanning Electron Microscopic image <i>Edwardsiella tarda</i> . Cells were grown at 25 °C for 24 hours .....	6
Fig 5. Antibiotic susceptibility pattern of pathogenic microbes .....	25
Fig 6. Biofilm formation and growth of pathogenic microbes .....	26
Fig. 7. Inhibitory activity of gallium on biofilm formation of 3 strains of <i>S. parauberis</i> .....	28
Fig. 8. Inhibitory activity of gallium on biofilm formation of 3 strains of <i>S. iniae</i> .....	27
Fig. 9. Inhibitory activity of gallium on biofilm formation of 3 strains of <i>E. tarda</i> .....	29
Fig. 10. Effect of gallium on viable cell count of <i>S. parauberis</i> .....	30



Fig. 11. Effect of gallium on viable cell count of *S. iniae* ..... 31

Fig. 12. Effect of gallium on viable cell count of *E.tarda* ..... 31

Fig. 13. Confocal Microscopic image of 2 day old *streptococcus parauberis* ..... 32

Fig. 14. Confocal Microscopic image of 2 day old *streptococcus iniae* ..... 33

Fig. 15. Confocal Microscopic image of 2 day old *Edwardsiella tarda* ..... 34

Fig. 16. Growth pattern of pathogenic microbes ..... 35

Fig. 17. Growth pattern of oxyteracycline treated pathogenic microbes ..... 36

Fig. 18. Growth for oxyteracycline and gallium treated pathogenic microbes ..... 36

## Abstract

*Streptococcus parauberis* and *Streptococcus iniae* Edwards *Sieela tarda* have been isolated from 5 locations in and around Jeju Island. In antibiotic susceptibility test, growth experiments, biofilm formation and inhibitory activity were assessed, of which the biofilm forming capability appeared to be in a non-specific pattern. The growth pattern of *S. parauberis* was higher when compared to that of *S. iniae*. In antibiotic susceptibility test, about 32 strains were tested against 14 different antibiotics, in that 4 and 4 were susceptible and resistance respectively. The bacterial culture (24 hrs) was grown along with 3 different concentration of gallium( $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ ) such as 100 mM, 200 mM, and 500 mM, for about 24 to 72 hours to measure the biofilm formation. Most of the assayed pathogenic microbes showed zone of inhibition (ZI) at 200 mM and 500 mM of gallium with the minimum inhibitory concentration (MIC) ranged from 12.5 to 50 mM. Hence, the results indicated that gallium inhibit the growth and induce the biofilm formation in pathogenic microbes.

## I. 서론

우리나라는 예로부터 생활방식 중에 하나인 어업을 통해 생계를 이어 나아왔다. 이러한 어업은 생산량의 증가와 수송방법의 발전 그리고 양식업의 발달에 의해 지속적으로 증가하고 있다. 양식업은 앞으로의 중요한 식량자원 수단으로써 여러 지역에서 시행되어지고 있으며 그 중 제주도는 1980년대부터 양식업이 점차적으로 발전하게 되었다. 제주도는 여러 양식어종 중에서 특히 넙치양식이 발달 하였으며, 이러한 넙치 양식이 발달할 수 있었던 것은 환경적인 요인이 주요하게 작용되고 있다. 제주도는 지역적인 특성상 사계절 내내 수온의 변화가 크게 변하지 않아 넙치 양식에 매우 유리한 점을 이용하여 넙치양식의 증가와 발전을 이루고 있다.

넙치양식이 증가함으로써 제주도의 넙치 생산량은 우리나라의 넙치 생산량의 절반이상을 차지하게 되었다. 하지만 이러한 넙치생산량의 증가는 어류질병세균의 증가를 불러일으켜 막대한 피해를 야기 시키고 있으며, 현재까지 주로 양식 넙치에 발생하는 세균성 질병으로는 연쇄구균증, 에드워드증, 비브리오팀증, 활주세균 등이 알려져 있으며, 연구가 활발히 진행되고 많은 연구결과와 항생제가 개발되었다. (이 등, 2007)

여러 항생제가 개발됨으로써 치료책이 보완되긴 하였지만 문제점도 제시 되었는데, 가장 큰 문제점으로 항생제 오남용을 꼽을 수 있다. 항생제의 오남용이 문제가 되는 이유는 환경적 문제를 일으킬 수 있으며, 어체내의 항생제 잔류로 인해 소비자의 불감증을 증감 시키어 구입 거부감을 줄 수 있으며, 항생제 오남용으로 인한 세균성 질병의 내성을 갖게 하여, 처음엔 치료 가능한 세균성 질병이 점차 많은 항생제를 투여함에 따라, 결국엔 슈퍼 박테리아가 나타나게 된다. 이렇듯 항생제 오남용에 대한 많은 문제점이 대두되어지고 있는 상황에서 항생제가 아닌 다른 물질을 이용하여 세균성 질병을 억제하는 많은 물질 개발되고 있다. (Ehud *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2008; Oh *et al.*, 2009)

이러한 항생제 내성과 관련하여 바이오필름의 사용이 주목받고 있다. 바이오필름은 90% 이상의 세균이 형성을 할 수 있는데, 이렇게 형성된 바이오필름은 항생제, 항체, 대식세포 등에 저항을 하게 된다. 병원체에 있어서 바이오필름의 형성은 필수적이라 알려져 있으며, 그 과정은 부유세균에 의해 감염이 이루어지고 감염을 일으킨 세균은 생체표면에 부착을 한다. 부착을 한 후 퀴럼센싱-신호에 의해 군집을 형성하게 되며 나아가 3차구조의 바이오필름을 형성하게 된다. 이 때문에 병원균은 항생제 내성이 증가하며 옥소닌작용 및 대식세포로부터 방패막 역할을 한다. 이러한 바이오필름 초기 발달시기와 3차 구조의 형성과정에서 세균은 매우 고농도의 철이 필요하다고 알려져 있다. 이러한 점 때문에 철은 전자수용체로써, 세균의 생존에 필수적인 역할을 한다. 이에 따라 미생물의 제어를 위해 철 이온의 농도를 억제하는 접근법이 많이 연구되어 왔으며 그 중 철 이온과 킬레이터의 결합을 통해 철 킬레이션 요법이 개발된 바 있다. 하지만 철 킬레이션 자체가 2차 감염으로 작용하는 사례가 알려져 보완이 필요하고, 철 이온의 수용경로를 차단하는 접근법은 대부분의 병원체가 다양한 철의 수용경로를 가지고 있어 많은 어려움을 겪고 있는 실정이다.

이러한 문제점을 보완하고자 Gallium nitrate를 본 연구에 사용하였다. 갈륨은 철과 같은 3가이온인 동시에 배위수, 전하, 이온 직경, 전자 배열이 비슷한 금속 물질이다. 현재 갈륨은 고칼슘혈증을 치료하는 주사제로 사용되고 있다. (Yukihiro *et al.*, 2007) 과골 세포 활성을 억제하여 뼈가 침식되는 것을 막아줌으로써 혈중 칼슘 농도를 낮추는 역할을 하는 것으로 사료된다. 이러한 갈륨도 독성을 나타낸 보고가 있는데, 갈륨에 장기간 노출되면 피부염을 일으키고 혈액 세포의 생성이 줄어들며, 피부에 장시간 접촉되면 갈색 반점이 생긴다. 이러한 문제점은 갈륨의 농도와 노출시간을 줄인다면 충분히 극복 가능할 것으로 사료된다.

따라서 본 연구에서는 양식 넙치의 어류질병세균의 치료법으로 항생제만 대두되고 있는 상황에서 항생제의 대체 역할을 하는 갈륨을 이용하여 어류질병을 제어하고자 한다. 이러한 갈륨을 이용하여 항생제 내성에 원인이 되는 바이오필름을 직접적으로 억제하여 내성균주가 생기는 것을 미연에 방지하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 2.1. 시험균주 확보

본 연구에서 사용된 시험균주는 제주도내에 존재하는 5개소의 육상수조 양식장에서 2011년 4월부터 11월까지 병중에 발생하는 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)를 채집하여 멸균된 용기에 담아 4 °C에 보관 운송하여 실험실로 운반한 뒤 간, 신장에서 어류질병세균을 분리하여 배양하였다. (Fig. 1) (정 등, 2009; 우 등, 2010)



Fig 1. Sampling sites of *Paralichthys olivaceus*

## 2.2. 시험균주 분리 · 배양 및 보관

채집한 넙치를 절개하여 간, 신장을 이용하여 1.5% NaCl이 첨가된 Brain Heart Infusion Agar (BHIA, Difco, USA)에 도말하여 25 °C에서 각각 48시간 배양하였다. 배양된 균주 중에서 단일 콜로니만을 분리하여 2-3회 계대 배양하여 순수 분리 하였다. 순수 분리 된 균주는 1.5% NaCl이 첨가된 Brain Heart Infusion Broth (BHIB, Difco, USA)에 접종하여 25 °C에서 48시간 배양하였다. 배지의 조성은 Table 1-2와 같다. 분리된 균주는 20% (v/v) 글리세롤에 현탁하여 -80 °C에 보관하였다. (정 등, 2009)

**Table 1.** Composition of Brain Heart Infusion Agar (BHIA)

Ingredient	Amounts
Calf Brains	7.7 g
Beef Heart	9.8 g
Proteose Peptone	10.0 g
Dextrose	2.0 g
Sodium Chloride	5.0 g
Disodium Phosphate	2.5 g
Agar	15.0 g
Distilled Water	1 L

**Table 2.** Composition of Brain Heart Infusion Broth (BHIB)

Ingredient	Amounts
Calf Brains	7.7 g
Beef Heart	9.8 g
Proteose Peptone	10.0 g
Dextrose	2.0 g
Sodium Chloride	5.0 g
Disodium Phosphate	2.5 g
Distilled Water	1 L

## 2.3. 시험균주의 동정 및 특징

### 2.3.1 생리학적 특성

균주들의 생리학적 특성을 알아보기 위해 그람염색법을 이용하여 그람양성균과 그람음성균으로 구분하였다. 슬라이드 글라스 위에 균체를 0.85 % 생리식염수에 섞어 열 고정 시킨다. 크리스탈 바이올렛을 이용하여 1분간 염색 후 수세한 후 요오드용액으로 1분간 고정 후 수세한다. 알코올을 이용하여 15초간 탈색을 시켜 수세한 후 사프라닌을 이용하여 45초간 대비염색 후 수세 후 건조 시켰다. 일련의 염색과정 후 광학현미경 (DE/DM 1000, Leica)을 이용하여 그람양성균과 그람음성균을 관찰하였다. 생화학적 성상은 API 20 strep과 API 20E (Biomerieux, France)을 이용하여 분석법에 따라 시행하였다. (주 등, 1998)

### 2.3.2 형태학적 특성

형태학적 특성을 알아보기 위해 장방출주사전자현미경 (Field Emission Scanning Electron Microscope, JSM-6700F, JEOL Ltd.)을 이용하여 균주의 형태학적 특성을 관찰하였다. 고체배지에 Membrain filter (Adventech)를 올려 그 위에 백금을 이용하여 균주를 도말하였다. 균주의 집락이 형성되기 이전에 전 처리를 시행하였다. 필터를 0.5 x 0.5 cm 되도록 절단 한 뒤, 2.5 % glutaraldehyde 용액에 담아 1시간 고정시켰다. 다음으로 1 M Phosphate buffer 를 이용하여 2회 수세하였다. 수세시킨 후 절단 된 샘플을 각각 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 %의 Ethyl Alcohol로 1시간동안 탈수시켰다. 탈수시킨 샘플을 Isoamyl Acetate와 100 % Ethyl Alcohol을 1:1로 혼합된 용액에 1시간 담근 후, 100% Isoamyl Acetate 용액에 1시간 방치한다. 마지막으로 CO<sub>2</sub> gas를 이용하여 건조시킨 다음 백금을 처리하여 장방출주사전자현미경으로 관찰하였다.



### 2.3.3 16S rRNA 염기서열 분석

16S ribosomal RNA 분석은 (BM *et al.*, 1991; 김 등, 2010) genomic DNA Extraction kit (Bioneer, Korea)를 사용하여 Chromosomal DNA를 분리하였으며 Bacterial 16S rDNA universal primer를 이용하여 16S rDNA를 증폭시켰다. 합성된 oligonucleotides는 각각의 primer가 forward primer (27F) : 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' reverse primer (1492R) : 5'GGTTACCTTGTTACGACTT-3'의 염기서열로 구성되었다. 각각의 0.5  $\mu$ M primer, 200  $\mu$ M deoxynucleoside triphosphate, *Taq* DNA polymerase (Bioneer, Korea) 3  $\mu$ M를 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응조건은 30 cycle 동안 94 °C에서 45초 denaturation, 50 °C에서 45초 annealing, 72 °C에서 45초 extension 하였으며, 증폭된 PCR product는 1 % agarose (Agarose LE, Promega CO) gel을 0.5  $\mu$ g/ml ethidium bromide로 염색하여 확인하였다. 이를 ABI prism™ Bigdye™ terminator cycle sequencing Ready reaction kit V.3.1 (Fluorescent dye terminators methods)와 (Heiner *et al.*, 1999) ABI 3730XL, capillary DNA Sequencer를 사용하여 PCR product의 (AA *et al.*, 2001; Amir *et al.*, 1998; Mishra *et al.*, 2002) 염기서열 분석을 수행하고 염기서열의 homology는 BLAST online program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)를 이용하였다. ClustalW software를 사용하여 염기서열을 배열한 후 MEGA5 program (Ver 5.1)을 이용하여 phylogenetic tree를 작성하였다.

## 2.4 항생제 감수성

항생제의 종류는 Amoxicillin 외 13종을 사용하였고, 세균의 내성 유무를 확인하기 위해 일반적으로 사용되는 항생제에 Bauer-kirby test (Daniel *et al.*, 1975)를 통해 항생제 내성균주와 감수성 균주로 분류 하였다. 세균 배양액을 Muller Hinton Agar (MHA, Difco, USA)배지 위에 접종하고 이 위에 항생제 디스크를 올려놓으면 배지에 항생제 농도 구배가 생기며, 디스크 주위로 생기는 억제환이 항균력을 나타낸다 (George *et al.*, 2004). 억제환은 항생제의 용해도와 세균의 감수성 정도에 따라 크기가 다르게 나타난다. 각 항생제에 대한 감수성은 항생제마다 나타나는 억제환의 크기에 따라 감수성(Sensitive, S), 중간내성(Weakly sensitive, I), 내성(Resistant, R)으로 나누었다.

**Table 3.** Antibiotic used for antibiotic-resistant strains selection

Antibiotics	Concentrations ( $\mu\text{g}$ )	Diameter of inhibition zone (mm)		
		Resistant	Weakly sensitive	Sensitive
Amoxicillin (AML)	10	$\leq 13$	14~17	18 $\geq$
Ampicillin (AMP)	10	$\leq 13$	14~16	17 $\geq$
Ciprofloxacin (CIP)	5	$\leq 15$	16~20	21 $\geq$
Gentamycin (GN)	10	$\leq 12$	13~14	15 $\geq$
Doxycycline (DO)	30	$\leq 12$	13~15	16 $\geq$
Erythromycin (E)	15	$\leq 13$	14~22	23 $\geq$
Florfenicol (FFL)	30	$\leq 12$	13~17	18 $\geq$
Neomycin (N)	10	$\leq 12$	13~16	17 $\geq$
Nalidixic acid (NA)	30	$\leq 13$	14~18	19 $\geq$
Oxolinic acid (OA)	2	$\leq 9$	10~11	12 $\geq$
Oxytetracycline (OTC)	30	$\leq 14$	15~18	19 $\geq$
penicillin G (P)	10	$\leq 19$	20~27	28 $\geq$
Tetracycline (TE)	30	$\leq 14$	15~18	19 $\geq$
Flumequine (UB)	30	$\leq 15$	16~20	21 $\geq$

## 2.5 시험균주의 성장능 및 바이오필름 형성능

시험균주의 성장능을 측정하기 위해 전배양한 균주를 멸균 Phosphate buffered saline (PBS)에  $10^5$  CFU/ml로 희석하여 96 well plate (Thermo Scientific Nunc, USA)에 200  $\mu$ l씩 접종하여 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한, 시험균주의 바이오필름 형성능을 알아보기 위해 96 well plate에 MHB 배지 100  $\mu$ l를 각각 분주한 뒤,  $10^5$  CFU/ml로 희석된 균주들을 분주한 배지에 100  $\mu$ l씩 접종하여 25  $^{\circ}$ C 인큐베이터에서 48h 시간동안 정치배양 시켰다. 배양 후 부착균주는 떨어지지 않게 부유세균이 포함 된 배양액만을 제거 한 후 0.85 % 생리식염수를 이용하여 2회 수세 후 70  $^{\circ}$ C 드라이오븐에 30분간 건조시켰다. 0.1 % crystal violet (CV) 을 이용하여 부착세균에 30분간 염색시킨 후 CV를 제거 하고, 0.85 % 생리식염수를 이용하여 3회 수세 후 염색된 CV를 95 %에탄올에 용해시켜 595 nm에서 흡광도를 측정하였다 (Ehud *et al.*, 2008).

## 2.6 Transition Metal Gallium( $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ )의 바이오필름 저해능

### 2.6.1 갈륨의 바이오필름 최소억제농도(MIC) 측정

최소억제농도(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)는 높은 바이오필름 형성능을 보였던 균주를 대상으로 Microtiter plate assay를 통하여 확인하였다. MIC측정은 전 배양한 균주를 멸균 PBS에  $10^5$  CFU/ml로 희석한 후, MHB에 접종하여 24 h 정지배양 시킨 후, 갈륨을 농도별로 처리하여 각각 24h, 48h, 72h 동안 배양하였다. 이에 660 nm의 흡광도값을 측정하여 MIC 및 억제정도를 가늠하였으며, 각 농도별의 처리구를 플레이트에 접종하여 피검균의 생육유무를 통해 MIC를 확정하였다 (George *et al.*, 2004).

### 2.6.2 Resazurin assay

Resazurin assay는 산화환원전위에 의해 레자주린이 청색에서 분홍색과 무색으로 변하기 때문에 세균분포에 따라 색소환원이 좌우된다. 96 well plate에 MHB를 100  $\mu\text{l}$ 씩 분주를 한 후, 전 배양한 균주를 멸균 PBS에  $10^5$  CFU/ml로 희석한 후, MHB에 50  $\mu\text{l}$ 씩 접종하였다. 접종 후 갈륨을 100 mM, 200 mM, 500 mM의 농도로 각각 50  $\mu\text{l}$ 씩 접종하여, 25  $^\circ\text{C}$  인큐베이터에서 48 h 시간 정지배양 하였다. Resazurin sodium salt(SIGMA, USA)는 차광된 250ml 플라스크에 멸균증류수 1 L와 레자주린 11 mg을 넣어 완전히 용해시킨 후 0.11%의 농도로 사용하였다. 48 h 시간 배양된 균주에 각각 레자주린을 20  $\mu\text{l}$ 씩 접종하여 6 h 동안 반응대기 후 색의 변화를 관찰하였다. 색의 변화는 생균수의 증가에 따라 청색  $\rightarrow$  보라  $\rightarrow$  분홍  $\rightarrow$  연분홍  $\rightarrow$  무색으로 변화를 나타내었다.

### 2.6.3 Vitality staining

갈륨의 시험균주에 대한 저해능을 알아보기 위해 Propidium Iodide(PI, SIGMA, USA)를 이용하여 염색을 하였다. Chamber slide(NUNK, USA)에 MHB를 150  $\mu$ l씩 분주를 한 후, 전 배양한 균주를 멸균 PBS에  $10^5$  CFU/ml로 희석한 후, MHB에 100  $\mu$ l씩 접종하였다. 접종 후 갈륨을 100 mM, 200 mM, 500 mM의 농도로 각각 150  $\mu$ l씩 접종하여, 25  $^{\circ}$ C 인큐베이터에서 48 시간 정치배양 하였다. PI를 2 mg/ml의 농도로 배양된 Chamber slide에 10  $\mu$ l씩 접종하여 25  $^{\circ}$ C에서 30분동안 반응 시켰다. 반응 후 공초점현미경 (Confocal Laser Scanning Microscope, Olympus Optical Co., Japan)을 이용하여 관찰하였다.

### 2.7 갈륨처리구와 합성 항생제의 비교

갈륨 처리구와 비교실험을 하기 위해 양식장에서 주로 사용되고 있는 항생제 Oxytetracycline(OTC, SIGMA, USA)을 사용하였다. 전배양한 시험균주를 멸균 PBS에  $10^5$  CFU/ml로 희석한후, MHB에 50  $\mu$ l씩 접종하여 48 h 동안 정치배양 후 갈륨과 항생제를 농도별로 각각 처리하여 24 h, 48 h, 72 h 시간으로 배양하여 660 nm에서 흡광도를 측정하여 균주의 저해능을 가늠하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### 3.1. 균주의 동정 및 특징

##### 3.1.1. 균주의 배양학 및 형태학적 특성

제주도내 5개소에서 채집한 넙치의 간과 신장을 절제하여 총 32균주를 분리하였다. 분리된 균주들을 BHIA 배지상에서 배양학적 특성을 확인하였다. 분리된 32균주 중에서 *Streptococcus parauberis* (*S. parauberis*)라 의심되는 균주를 25종 분리하였으며, *Streptococcus iniae* (*S. iniae*)라 의심되는 균주를 3종 분리하였으며, *Edwardsiella tarda* (*E. tarda*)라 의심되는 균주를 4종 분리하였다. 분리된 균주 중 *S. parauberis*와 *S. iniae*는 모두 그람양성으로 확인되었다. *E. tarda*는 그람음성균으로 확인되었다. 병원균의 특성 중 하나인 용혈성에 대해 확인한 결과 *S. parauberis*와 *E. tarda* 모두  $\gamma$ -용혈성으로 나타났으며, *S. iniae*는  $\beta$ -용혈성을 보였다. 형태학적 특성은 25 °C에서 BHIA 배지에 배양 후 SEM을 통해 관찰하였다. *S. parauberis*와 *S. iniae*는 모두 연쇄상구균의 형태로 확인되었다. *E. tarda*는 단간균의 형태로 확인되었다.

**Table 4.** Genetic isolation and characterization of *Streptococcus parauberis*

Isolate No.	Species	Temperature	Medium	Gram test	Hemolysis
JK-01	<i>Streptococcus parauberis</i>	25 °C	BHIA 1.5% NaCl	+	γ-hemolytic
JK-02	<i>Streptococcus parauberis</i>	25 °C	BHIA 1.5% NaCl	+	γ-hemolytic
JK-03	<i>Streptococcus parauberis</i>	25 °C	BHIA 1.5% NaCl	+	γ-hemolytic
JK-04	<i>Streptococcus parauberis</i>	25 °C	BHIA 1.5% NaCl	+	γ-hemolytic
JK-05	<i>Streptococcus parauberis</i>	25 °C	BHIA 1.5% NaCl	+	γ-hemolytic
JK-06	<i>Streptococcus parauberis</i>	25 °C	BHIA 1.5% NaCl	+	γ-hemolytic
JK-07	<i>Streptococcus parauberis</i>	25 °C	BHIA 1.5% NaCl	+	γ-hemolytic
JK-08	<i>Streptococcus parauberis</i>	25 °C	BHIA 1.5% NaCl	+	γ-hemolytic
JK-09	<i>Streptococcus parauberis</i>	25 °C	BHIA 1.5% NaCl	+	γ-hemolytic
JK-10	<i>Streptococcus parauberis</i>	25 °C	BHIA 1.5% NaCl	+	γ-hemolytic
JK-11	<i>Streptococcus parauberis</i>	25 °C	BHIA 1.5% NaCl	+	γ-hemolytic
JK-13	<i>Streptococcus parauberis</i>	25 °C	BHIA 1.5% NaCl	+	γ-hemolytic
JK-14	<i>Streptococcus parauberis</i>	25 °C	BHIA 1.5% NaCl	+	γ-hemolytic
JK-15	<i>Streptococcus parauberis</i>	25 °C	BHIA 1.5% NaCl	+	γ-hemolytic
JK-16	<i>Streptococcus parauberis</i>	25 °C	BHIA 1.5% NaCl	+	γ-hemolytic
JK-19	<i>Streptococcus parauberis</i>	25 °C	BHIA 1.5% NaCl	+	γ-hemolytic
JK-20	<i>Streptococcus parauberis</i>	25 °C	BHIA 1.5% NaCl	+	γ-hemolytic
JK-21	<i>Streptococcus parauberis</i>	25 °C	BHIA 1.5% NaCl	+	γ-hemolytic
JK-22	<i>Streptococcus parauberis</i>	25 °C	BHIA 1.5% NaCl	+	γ-hemolytic
JK-23	<i>Streptococcus parauberis</i>	25 °C	BHIA 1.5% NaCl	+	γ-hemolytic
JK-24	<i>Streptococcus parauberis</i>	25 °C	BHIA 1.5% NaCl	+	γ-hemolytic
JK-29	<i>Streptococcus parauberis</i>	25 °C	BHIA 1.5% NaCl	+	γ-hemolytic
JK-30	<i>Streptococcus parauberis</i>	25 °C	BHIA 1.5% NaCl	+	γ-hemolytic
JK-31	<i>Streptococcus parauberis</i>	25 °C	BHIA 1.5% NaCl	+	γ-hemolytic
JK-32	<i>Streptococcus parauberis</i>	25 °C	BHIA 1.5% NaCl	+	γ-hemolytic

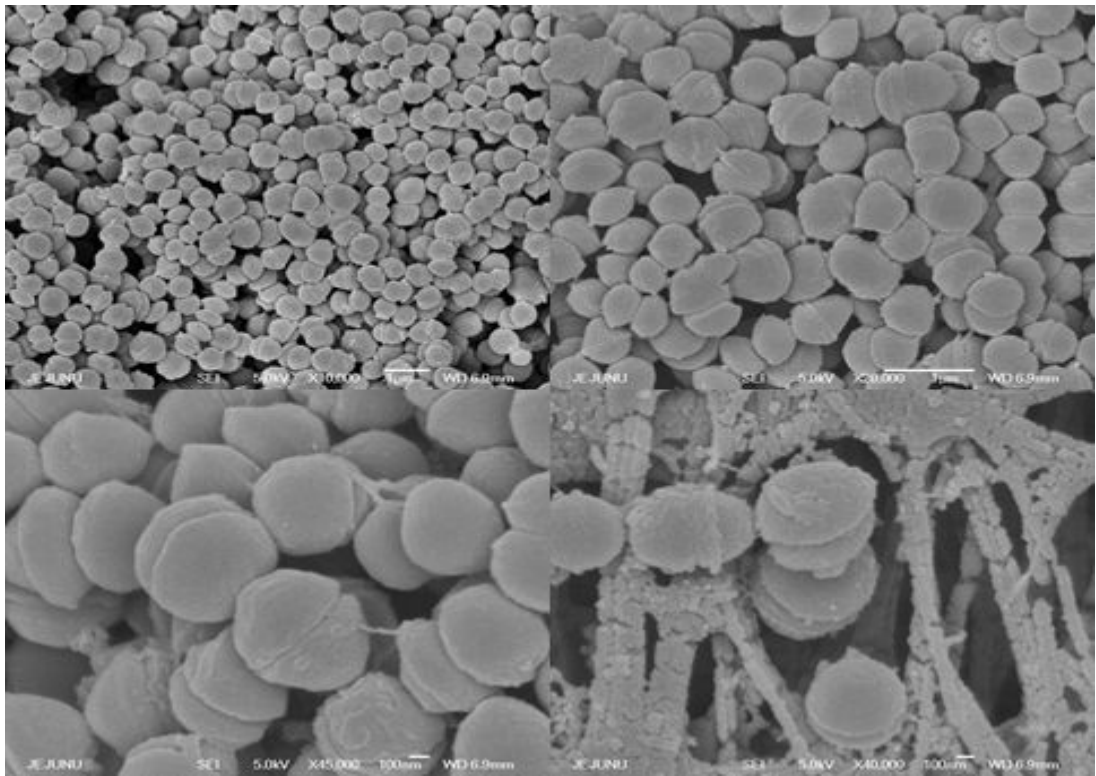
**Table 5.** Genetic isolation and characterization of *Streptococcus iniae*

Isolate No.	Species	Temperature	Medium	Gram test	Hemolysis
JK-25	<i>Streptococcus iniae</i>	25 °C	BHIA 1.5% NaCl	+	$\beta$ -hemolytic
JK-26	<i>Streptococcus iniae</i>	25 °C	BHIA 1.5% NaCl	+	$\beta$ -hemolytic
JK-27	<i>Streptococcus iniae</i>	25 °C	BHIA 1.5% NaCl	+	$\beta$ -hemolytic

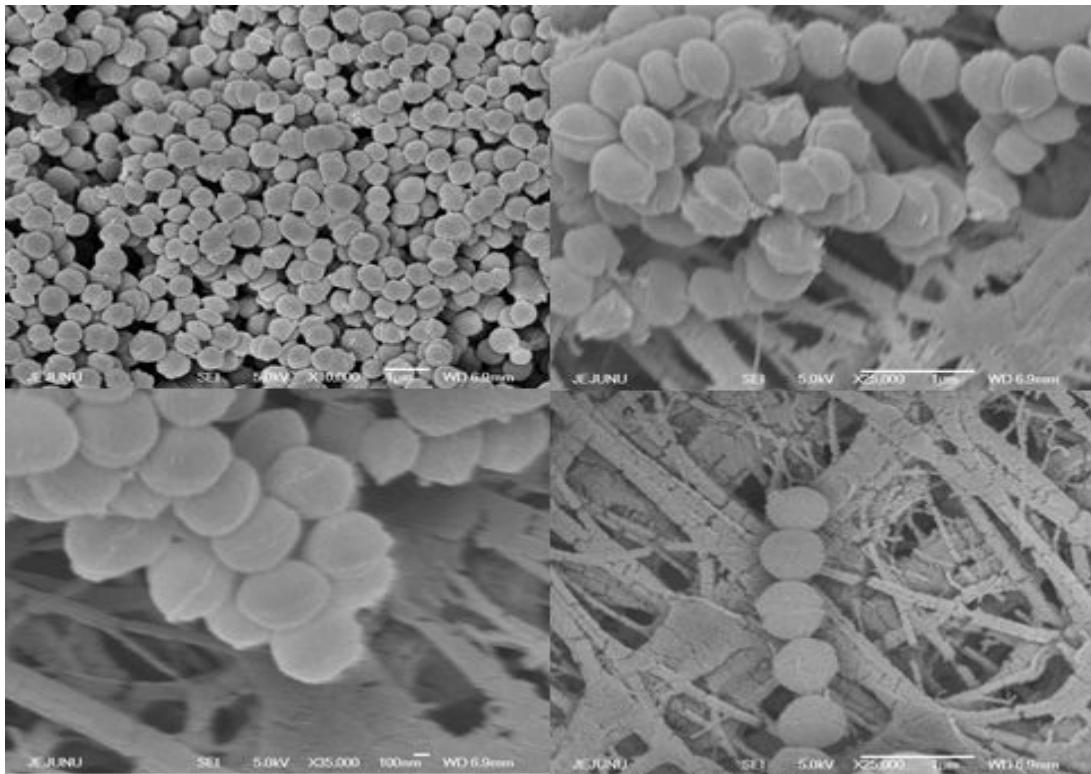
**Table 6.** Genetic isolation and characterization of *Edwardsiella tarda*

Isolate No.	Species	Temperature	Medium	Gram test	Hemolysis
JK-12	<i>Edwardsiella tarda</i>	25 °C	BHIA 1.5% NaCl	-	$\gamma$ -hemolytic
JK-17	<i>Edwardsiella tarda</i>	25 °C	BHIA 1.5% NaCl	-	$\gamma$ -hemolytic
JK-18	<i>Edwardsiella tarda</i>	25 °C	BHIA 1.5% NaCl	-	$\gamma$ -hemolytic
JK-28	<i>Edwardsiella tarda</i>	25 °C	BHIA 1.5% NaCl	-	$\gamma$ -hemolytic





**Fig 2.** Field Emission Scanning Electron Microscopic image of *Streptococcus parauberis*. Cells were grown at 25 °C for 24 hours



**Fig 3.** Field Emission Scanning Electron Microscopic image of *Streptococcus iniae*. Cells were grown at 25 °C for 24 hours

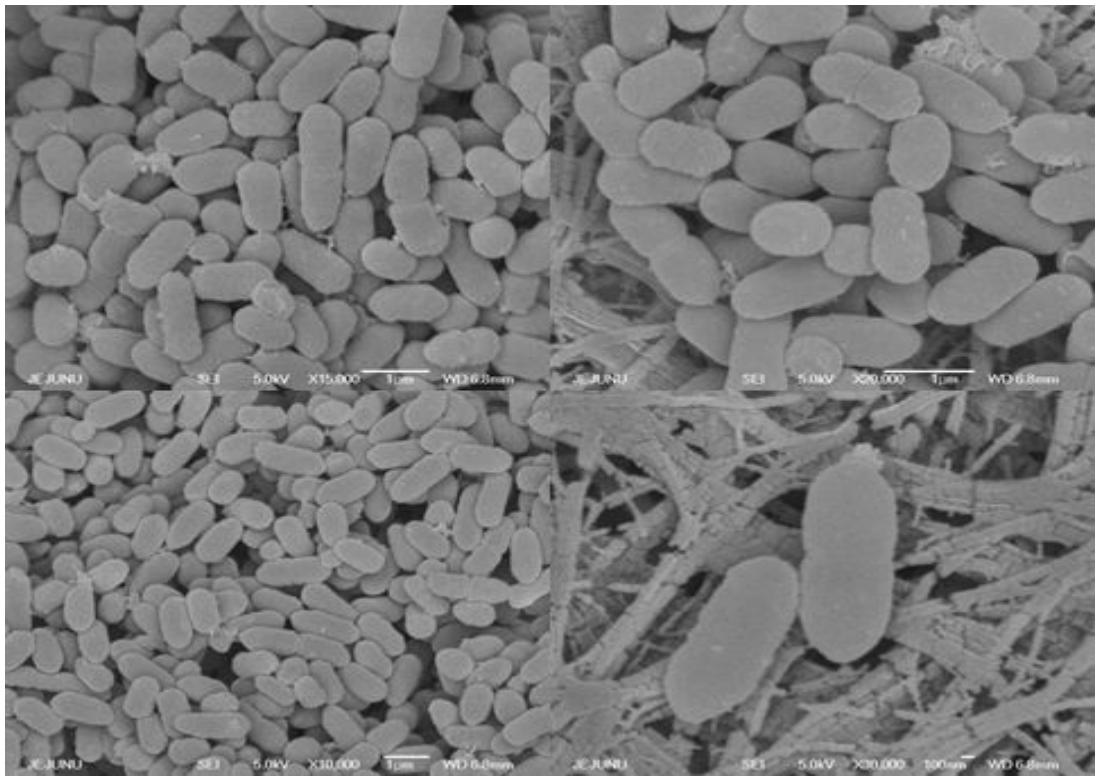


Fig 4. Field Emission Scanning Electron Microscopic image of *Edwardsiella tarda*. Cells were grown at 25 °C for 24 hours

### 3.1.2. 16S rRNA 염기서열의 계통학적 특징

리보솜 RNA(rRNA)는 전 생물에 보편적으로 존재하는 보존성이 높은 핵산분자이며, 미생물의 진화계통의 연구에 가장 유용한 분자마커로 이용되고 있다. 특히 범용성이 높은 분자는 small subunit rRNA(SSU rRNA)로서 분류에 이용되는 16S 및 16S유사(18S) rRNA가 이에 속한다. 현재 미생물의 분류체계는 SSU rRNA의 정보를 근거로 재구축되어 있으며, 이 방법은 미생물 분류학에 필수적인 것으로 인식되기에 이르렀다. 특히 미지의 분리균주의 계통학적 위치를 알기 위한 최초의 실험단계에서 SSU rRNA분석은 필수적이다.

분리된 균주의 분석되어진 16S rRNA 염기서열은 염기서열간의 유사도를 확인하기 위해 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) search program을 이용하여 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 Genbank와 EMBL Nucleotide Sequence Database에서 유사한 염기서열을 비교하였다. Clone의 결정된 염기서열과 database에 얻어진 염기서열은 PHYDIT program (ver 3.2; <http://plaza.snu.ac.kr/~iphydit/phydit>)을 이용하여 Clustal W multiple alignment로 정렬하였으며, 염기서열 분석은 CLUSTAL X software를 이용하여 Neighbor-joining방법에 의해 Bootstrap 분석 시 1000회의 리샘플링을 적용하여 tree topology의 평가기준으로 사용하여 계통수를 작성하였으며, 염기서열간 유전적 거리는 Jukes & Cantor 모델을 이용하여 계산하였다.

분리된 균주들의 상동성을 확인한 결과 *S. parauberis*의 경우 *Streptococcus parauberis* (FJ009631)와, *Streptococcus parauberis* (AY942570)과의 상동성이 99 %이상을 나타내었다. *S. iniae*의 경우 *Streptococcus iniae* (AY581891)과의 상동성이 99 %이상을 나타내었다. *E. tarda*의 경우 *Edwardsiella tarda* (CP002154)와 *Edwardsiella tarda* (EF091710)과의 상동성 결과 각각 100 %와 99 %이상을 나타내었다.

**Table 7.** Physiological features of pathogenic microbes

Isolate No.	Blast results		
	Accession No.	Species	Identities
JK-01	FJ009631.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strain JJI51	661/661 (100%)
JK-02	FJ009631.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strain JJI51	802/802 (100%)
JK-03	FJ009631.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strain JJI51	803/803 (100%)
JK-04	FJ009631.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strain JJI51	819/825(99%)
JK-05	FJ009631.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strain JJI51	656/656 (100%)
JK-06	FJ009631.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strain JJI51	826/828 (99%)
JK-07	FJ009631.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strain JJI51	804/804 (100%)
JK-08	FJ009631.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strain JJI51	869/869 (100%)
JK-09	AY942570.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strain 349	922/922 (100%)
JK-10	FJ009631.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strain JJI51	823/830 (99%)
JK-11	FJ009631.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strain JJI51	905/907 (99%)
JK-13	AY942570.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strain 349	990/993 (99%)
JK-14	AY942570.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strain 349	1001/1003 (99%)
JK-15	AY942570.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strain 349	1007/1008 (99%)
JK-16	AY942570.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strain 349	1000/1003 (99%)
JK-19	AY942570.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strain 349	997/999 (99%)
JK-20	AY942570.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strain 349	1028/1033 (99%)
JK-21	AY942570.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strain 349	1050/1052 (99%)
JK-22	AY942570.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strain 349	987/989 (99%)
JK-23	FJ009631.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strain JJI51	918/918 (100%)
JK-24	FJ009631.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strain JJI51	893/894 (99%)
JK-29	FJ009631.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strain JJI51	778/779 (99%)
JK-30	FJ009631.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strain JJI51	782/783 (99%)
JK-31	FJ009631.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strain JJI51	763/764 (99%)
JK-32	FJ009631.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strain JJI51	763/764 (99%)
JK-25	AY581891.1	<i>Streptococcus iniae</i> strain ATCC 29178	987/989 (99%)
JK-26	AY581891.1	<i>Streptococcus iniae</i> strain ATCC 29178	952/955 (99%)
JK-27	AY581891.1	<i>Streptococcus iniae</i> strain ATCC 29178	803/804 (99%)
JK-12	CP002154.1	<i>Edwardsiella tarda</i> strain FL6-60	1004/1004 (100%)
JK-17	EF091710.1	<i>Edwardsiella tarda</i> strain SMW7	1044/1045 (99%)
JK-18	CP002154.1	<i>Edwardsiella tarda</i> strain FL6-60	1002/1002 (100%)
JK-28	CP002154.1	<i>Edwardsiella tarda</i> strain FL6-60	999/999 (100%)

### 3.1.3. 균주의 생화학적 특징

*S. parauberis*의 경우 API 20 strep을 이용하여 생화학 특성을 확인한 결과, Acetoin production, Hippurate hydrolysis, D-trehalose acidification의 경우 25종 모두 양성으로 확인되었고,  $\alpha$ -GALactosidase,  $\beta$ -GLUcoRonidase, D-raffinose acidification, Glycogen acidification의 경우 역시 모두 음성으로 확인되어 이들 특성의 경우 *S. parauberis*의 주요 생화학 특성으로 사료된다. 그리고 D-mannitol acidification, D-sorbitol acidification, D-lactose acidification의 경우를 제외하고 25균주중 90%이상이 양성 혹은 음성으로 각각의 시험에 같은 결과를 나타내어 균주간의 차이는 있었지만 유전적으로 동정결과와 종합할 때 모두 *Streptococcus parauberis*라고 동정하였다.

*S. iniae*의 경우 API 20 strep을 이용하여 생화학 특성 결과 3균주 모두 PYRrolidonyl arylamidase, lkaline phosphatase, Leucine amino peptidase, Arginine di hydrolase, D-ribose acidification, D-mannitol acidification, D-trehalose acidification, Starch acidification,  $\beta$ Hemolysis의 경우 양성으로 나타났으며,  $\alpha$ -GALactosidase,  $\beta$ -GLUcoRonidase,  $\beta$ -GALactosidase, L-alabinose acidification, Inulin acidification, D-raffinose acidification의 경우 모두 음성으로 나타나는 결과를 보였다. 3균주의 경우 생화학적 특성이 유사한 특성을 가지고 있는 것으로 확인되어 유전학적 동정과 종합하여 볼 때 *Streptococcus iniae*로 동정하였다.

*E. tarda*의 경우 API 20E를 이용하여 생화학 특성 결과 4균주 모두 lysine decarboxylase, ornithine decarboxylase, citrate utilization, H<sub>2</sub>S production, glucose fermentation/oxidation 의 경우 모두 양성으로 나타났으며, beta-galactosidase, arginine dihydrolase, urease, tryptophane deaminase, indole production, acetoin production, gelatinase, inositol fermentation/oxidation, sorbitol fermentation/oxidation, rhamnose fermentation/oxidation, melibiose fermentation/oxidation, amygdalin fermentation/oxidation, arabinose fermentation/oxidation, cytochrome oxidase의 경우 모두 음성으로 나타나 4균주 모두 거의 유사한 생화학적 특성을 보여 유전학적 동정과 종합하여 볼 때



*Edwardsiella tarda*로 동정하였다.

**Table 8.** Biochemical characterization through API 20 strep in isolated 25 strains of *S. parauberis*

Test	<i>S. parauberis</i> KCTC3651	<i>S. parauberis</i> isolates
Acetoinproduction	+	25/25*
Hippurate hydrolysis	+	25/25
Esculin $\beta$ -glucosidase	+	21/25
PYRrolidonylArylamidase	+	19/25
$\alpha$ -GALactosidase	-	0/25
$\beta$ -GLUcoRonidase	-	0/25
$\beta$ -GALactosidase	-	1/25
AlkalinePhosphatase	-	2/25
LeucineAminoPeptidase	+	22/25
ArginineDiHydrolase	+	22/25
D-riboseacidification	-	2/25
L-alabinoseacidification	-	1/25
D-mannitolacidification	-	15/25
D-sorbitolacidification	-	11/25
D-lactoseacidification	-	11/25
D-trehaloseacidification	+	25/25
Inulinacidification	-	1/25
D-raffinoseacidification	-	0/25
Starchacidification	-	1/25
Glycogenacidification	-	0/25
$\beta$ -Hemolysis	-	1/25

\* a/b : a 양성 strain 수, b *S. parauberis* 총 분리 수

**Table 9.** Biochemical characterization through API 20 strep in isolated 25 strains of *S. iniae*

Test	<i>S. iniae</i> JK-25	<i>S. iniae</i> JK-26	<i>S. iniae</i> JK-27	<i>S. iniae</i> KCTC 3657
Acetoinproduction	-	-	+	-
Hippurate hydrolysis	-	-	-	-
Esculin $\beta$ -glucosidase	+	+	+	+
PYRrolidonylArylamidase	+	+	+	+
$\alpha$ -GALactosidase	-	-	-	-
$\beta$ -GLUcoRonidase	-	-	-	-
$\beta$ -GALactosidase	-	-	-	-
AlkalinePhosphatase	+	+	+	+
LeucineAminoPeptidase	+	+	+	+
ArginineDiHydrolase	+	+	+	+
D-riboseacidification	+	+	+	+
L-alabinoseacidification	-	-	-	-
D-mannitolacidification	+	+	+	+
D-sorbitolacidification	+	-	-	-
D-lactoseacidification	-	-	-	-
D-trehaloseacidification	+	+	+	+
Inulinacidification	-	-	-	-
D-raffinoseacidification	-	-	-	-
Starchacidification	+	+	+	+
Glycogenacidification	+	+	+	+
$\beta$ Hemolysis	+	+	+	+



**Table 10.** Biochemical characterization through API 20E in isolated 25 strains of *E. taeda*

Test	<i>E. taeda</i>	<i>E. taeda</i>	<i>E. taeda</i>	<i>E. taeda</i>	<i>E. taeda</i>
	JK-12	JK-17	JK-18	JK-28	KCTC 12267
$\beta$ -galactosidase	-	-	-	-	-
arginine dihydrolase	-	-	-	-	-
lysine decarboxylase	+	+	+	+	+
ornithine decarboxylase	+	+	+	+	+
citrate utilization	+	+	+	+	+
H <sub>2</sub> S production	+	+	+	+	+
urease	-	-	-	-	-
tryptophane deaminase	-	-	-	-	-
indole production	-	-	-	-	-
acetoin production	-	-	-	-	-
gelatinase	-	-	-	-	-
glucose	+	+	+	+	+
fermentation/oxidation					
mannitol	-	+	-	+	-
fermentation/oxidation					
inositol	-	-	-	-	-
fermentation/oxidation					
sorbitol	-	-	-	-	-
fermentation/oxidation					
rhamnose	-	-	-	-	-
fermentation/oxidation					
sucrose	-	+	-	-	-
fermentation/oxidation					
melibiose	-	-	-	-	-
fermentation/oxidation					
amygdalin	-	-	-	-	-
fermentation/oxidation					
arabinose	-	-	-	-	-
fermentation/oxidation					
cytochrome oxidase	-	-	-	-	-

### 3.2. 항생제 감수성 테스트

분리된 32균주에 대하여 항생제 감수성 테스트를 시행한 결과를 나타내었고, 시험한 결과를 백분율로 계산하여 비교해보았다. Amoxycillin, Ampicillin, Ciprofloxacin, Flofenicol에 대해 100 %의 감수성을 나타내었으며, Gentamycin에서 43 % Doxycycline에서 90 % Erythromycin에서 84 % Oxytetracycline에서 75 % Tetracycline에서 84%의 항생제에 대한 감수성을 나타냈다. Neomycin, Nalidixic acid, Oxolinic acid, Flumequine에 대해 100 % 내성을 나타내었으며, Gentamycin 50 %에서 Erythromycin 12 %에서 Oxytetracycline 25 %에서 Tetracycline 15 %의 항생제에 대한 내성을 나타냈다.

**Table 11.** Antibiotic resistance of pathogenic microbes

Antibiotics	Pathogenic microbes(32)		
	Resistant	Weakly sensitive	Sensitive
Amoxycillin (AML)	0	0	32
Ampicillin (AMP)	0	0	32
Ciprofloxacin (CIP)	0	0	32
Gentamycin (GN)	16	2	14
Doxycycline (DO)	0	3	29
Erythromycin (E)	4	1	27
Flofenicol (FFL)	0	0	32
Neomycin (N)	32	0	0
Nalidixic acid (NA)	32	0	0
Oxolinic acid (OA)	32	0	0
Oxytetracycline (OTC)	8	0	24
penicillin G (P)	0	0	32
Tetracycline (TE)	5	0	27
Flumequine (UB)	32	0	0

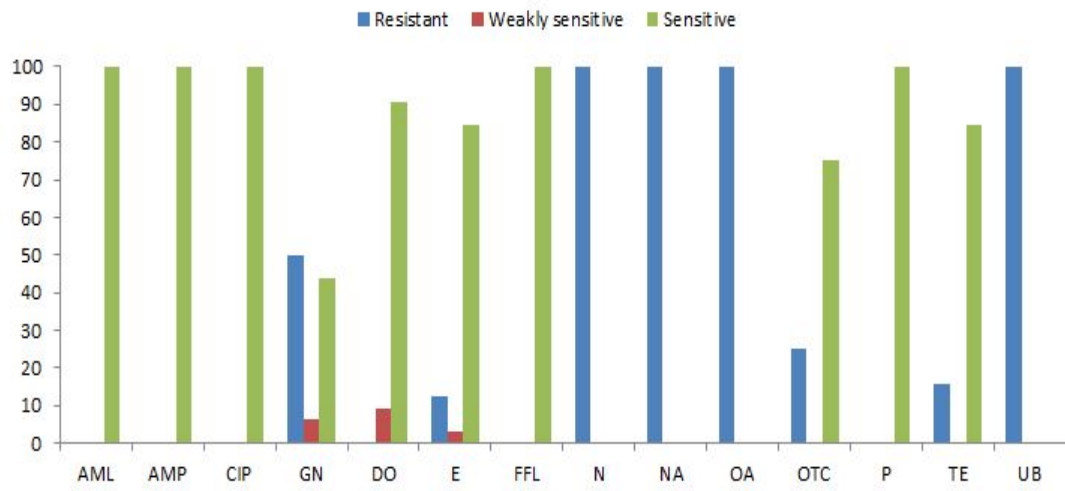


Fig 5. Antibiotic susceptibility pattern of pathogenic microbes

### 3.3. 바이오필름 형성능 확인

분리된 32균주에 대한 바이오필름 형성능과 균의 생육도를 측정하였다. 그 결과 균주별로 성장도와 바이오필름 형성능이 특정한 패턴이 없이 나타났으며, 균의 성장도가 높다 하더라도 꼭 바이오필름을 활발히 형성하지 않음을 알 수 있었다. *S. parauberis*의 경우 *S. iniae*와 *E. tarda*에 비해 몇몇 균주는 매우 높은 바이오필름 형성능을 보였다. 앞에서 확인한 항생제 내성과 바이오필름간의 연관성을 확인하였는데 확연히 유의적인 연관성은 확인할 수 없었다. 이는 몇몇 항생제 내성은 유전적인 변이나 내성유전자의 유무에 의해 결정되기 때문이라 사료된다. 병원균을 저해하는 것을 확인하기 위해 각각의 균주 당 3개의 균주를 선발했다. *S. parauberis*의 경우 JK-01, JK-15, JK-16을 선발하였고, *S. iniae*의 경우 JK-25, JK-26, JK-27을 선발하였고, *E. tarda*의 경우 JK-12, JK-17, JK-28을 선발하였다.

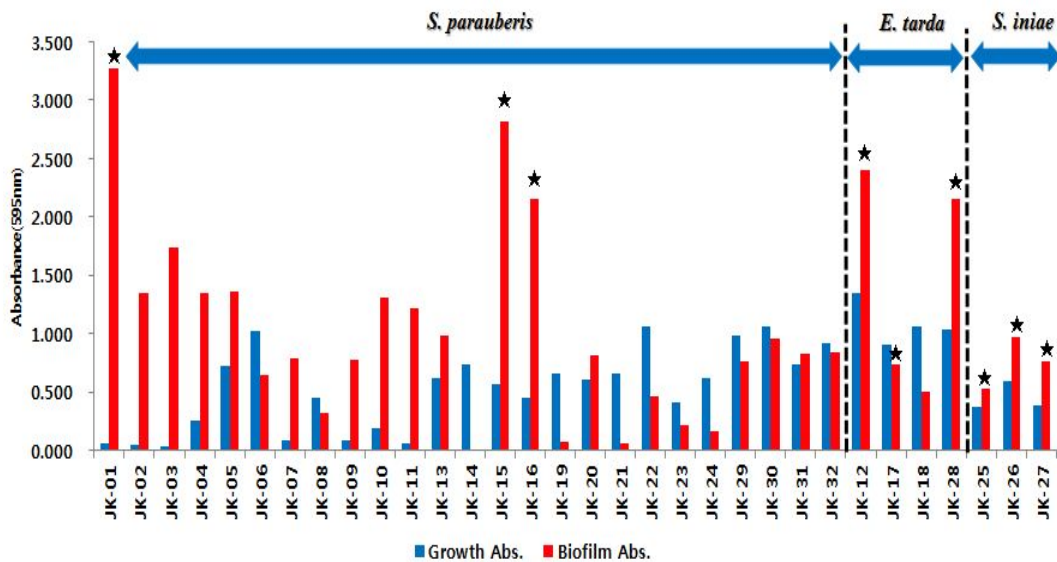


Fig 6. Biofilm formation and growth of pathogenic microbes

### 3.4. 갈륨의 항균활성

갈륨 자체의 항균활성능을 알아보기 위해 항생제 디스크를 이용하여 갈륨을 각각 100 mM, 200 mM, 500 mM의 농도로 100  $\mu$ l 씩 처리하였다. 처리한 결과 9균주에서 낮은 농도인 100 mM에서는 저해환 형성이 비교적 적게 형성되었다. 이에 비해 고농도인 200 mM, 500 mM에서는 비교적 높은 저해환이 형성되었다. MIC 측정결과 12.5 ~ 100 mM의 최소저해농도를 가지는 것을 확인하였다.

**Table 12.** Antibiotic activity of gallium against *S. parauberis*, *S. iniae* and *E. tarda*

Isolate No.	Species	Ga(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>			
		(mm)			MIC (mM)
		100 mM	200 mM	500 mM	
JK-01	<i>Streptococcus parauberis</i>	—	17	26	50
JK-15	<i>Streptococcus parauberis</i>	11	15	20	25
JK-16	<i>Streptococcus parauberis</i>	—	15	27	50
JK-25	<i>Streptococcus iniae</i>	9	13	17	25
JK-26	<i>Streptococcus iniae</i>	11	13	18	12.5
JK-27	<i>Streptococcus iniae</i>	—	8	12	25
JK-12	<i>Edwardsiella tarda</i>	—	12	18	25
JK-17	<i>Edwardsiella tarda</i>	—	17	18	50
JK-28	<i>Edwardsiella tarda</i>	—	—	15	100

### 3.5. 균주에 대한 갈륨의 바이오필름 저해능

선발된 어류질병 병원균 9균주에 대해 갈륨이 바이오필름을 저해하는지 알아보기 위해 각각의 균주를 배양한 후 갈륨 200 mM을 첨가하여 바이오필름을 측정하였다. 그 결과 9균주 모두 갈륨의 첨가 후 바이오필름의 형성이 감소됨을 확인할 수 있었다. 특히 *S. iniae*의 경우 급격한 바이오필름 형성 저해능을 확인할 수 있었으며, *E. tarda*인 JK-17의 경우는 비교적 그 효과가 적었다.

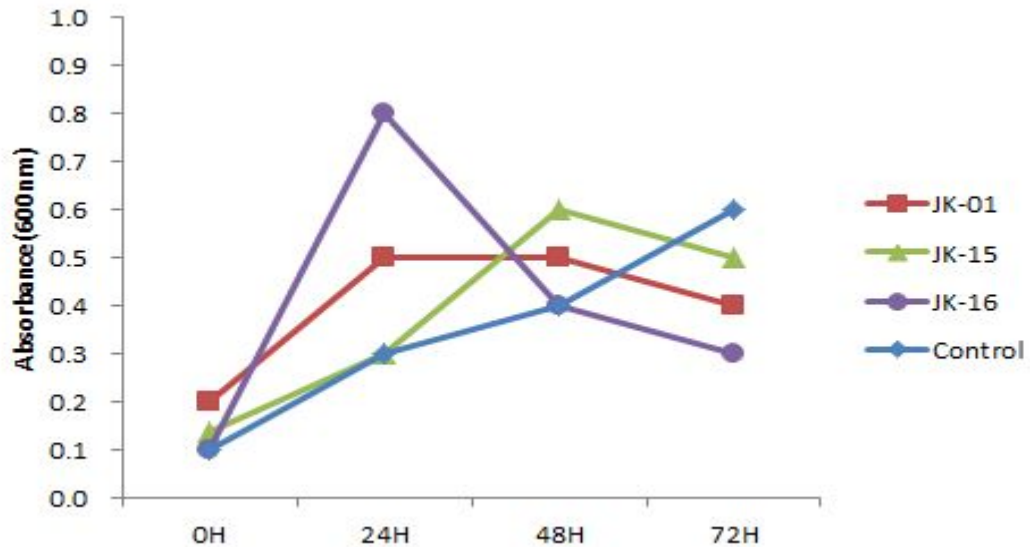


Fig 7. Inhibitory activity of gallium on biofilm formation of 3 strains of *S. parauberis*

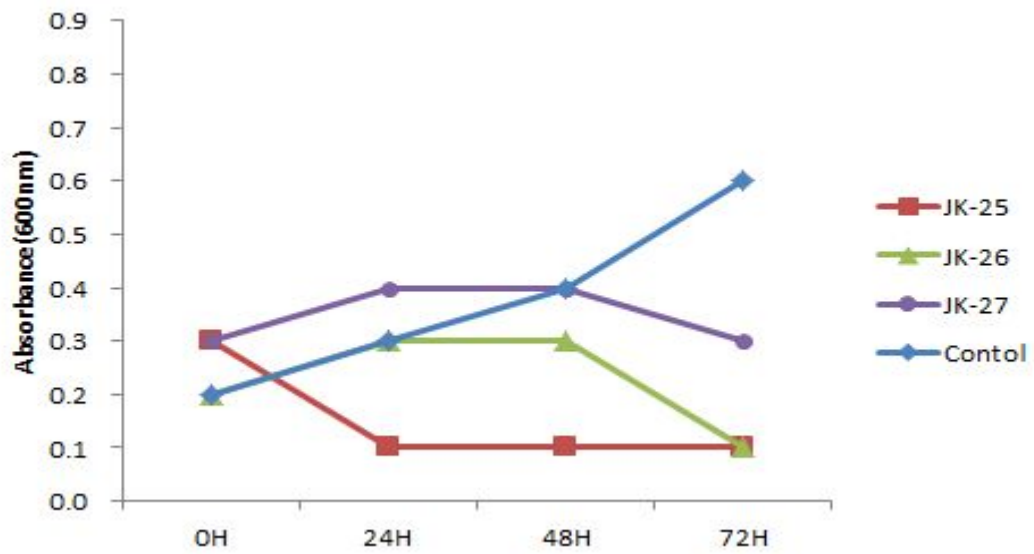


Fig 8. Inhibitory activity of gallium on biofilm formation of 3 strains of *S. iniae*

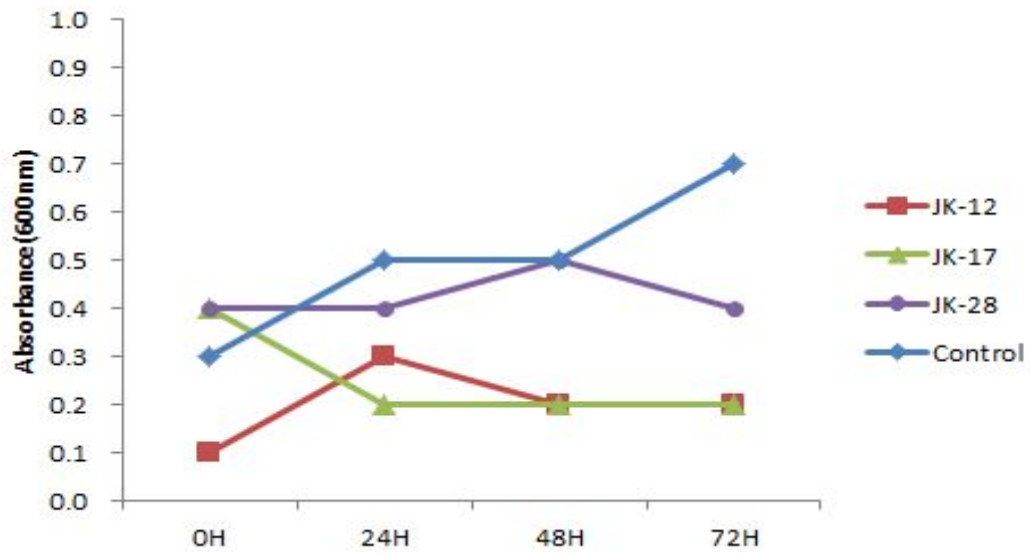


Fig 9. Inhibitory activity of gallium on biofilm formation of 3 strains of *E. tarda*

### 3.6. Resazurin assay

레자주린을 이용하여 확인한 결과, 일반 배지에 레자주린을 처리하였을 시 색의 변화가 청색으로 변하였다. 갈륨을 처리하지 않고 균주만  $10^5$  CFU/ml의 농도로 처리 하였을 때 색의 변화가 진한 분홍색으로 변하였다. 또한 균주를  $10^5$  CFU/ml로 접종하여 갈륨을 100 mM, 200 mM, 500 mM의 농도로 처리한 그룹에서 색의 변화는 진한 노란색으로 변하는 것을 확인 할 수 있었다. 이는 생균수의 증가에 따라 색의 변화가 청색에서 분홍색으로 변하는 것에 따라, 갈륨을 처리하였을 때 생균수가 저해되는 것을 확인 할 수 있었다.

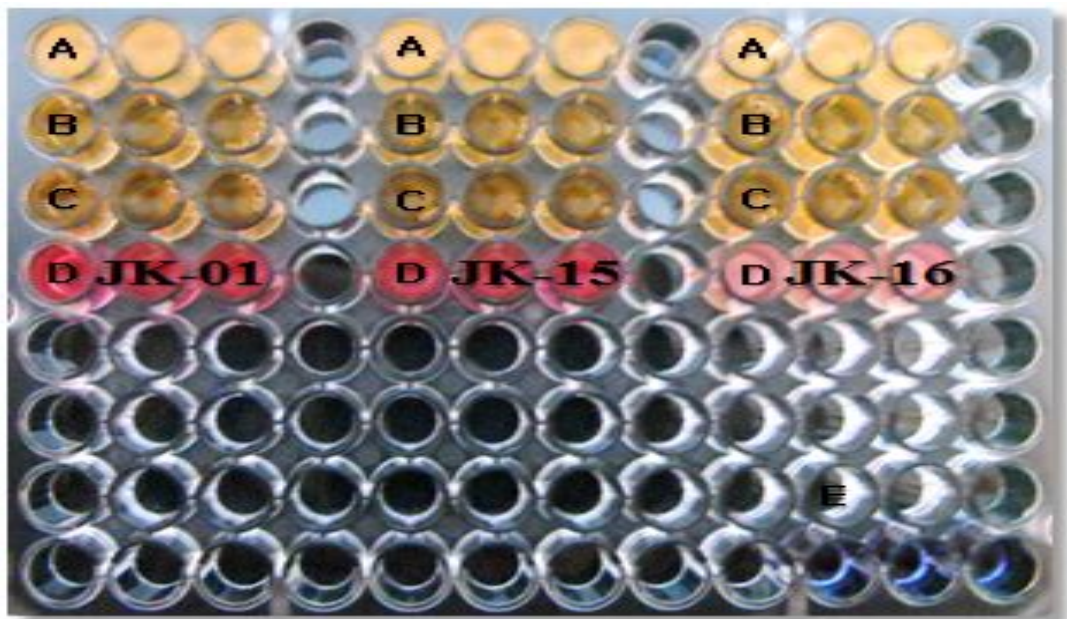


Fig 10. Effect of gallium on viable cell count of *S. parauberis*



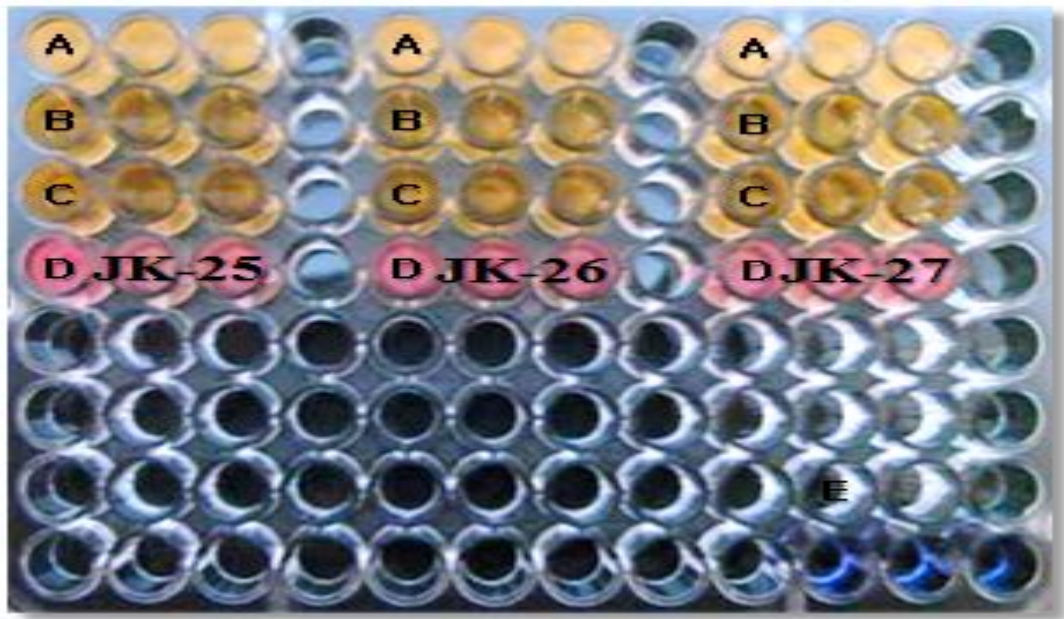


Fig 11. Effect of gallium on viable cell count of *S. iniae*

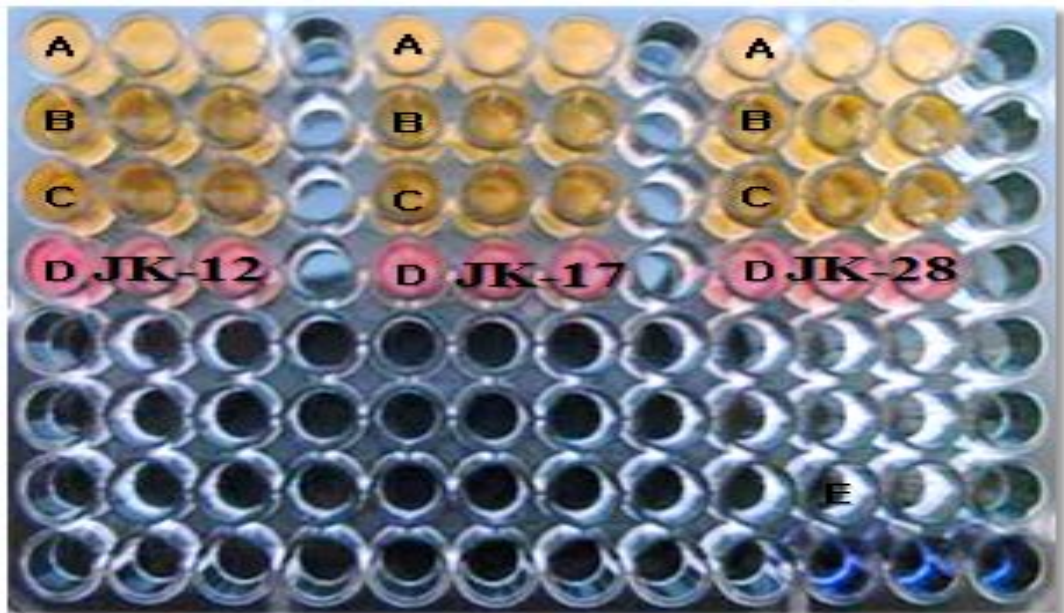
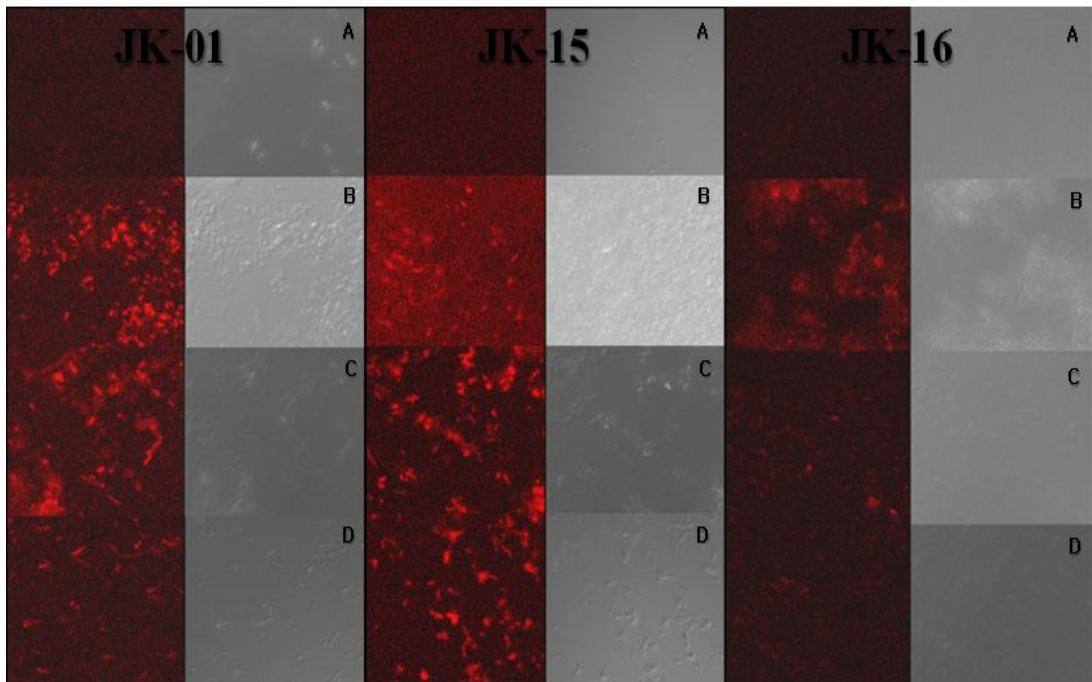


Fig 12. Effect of gallium on viable cell count of *E. tarda*

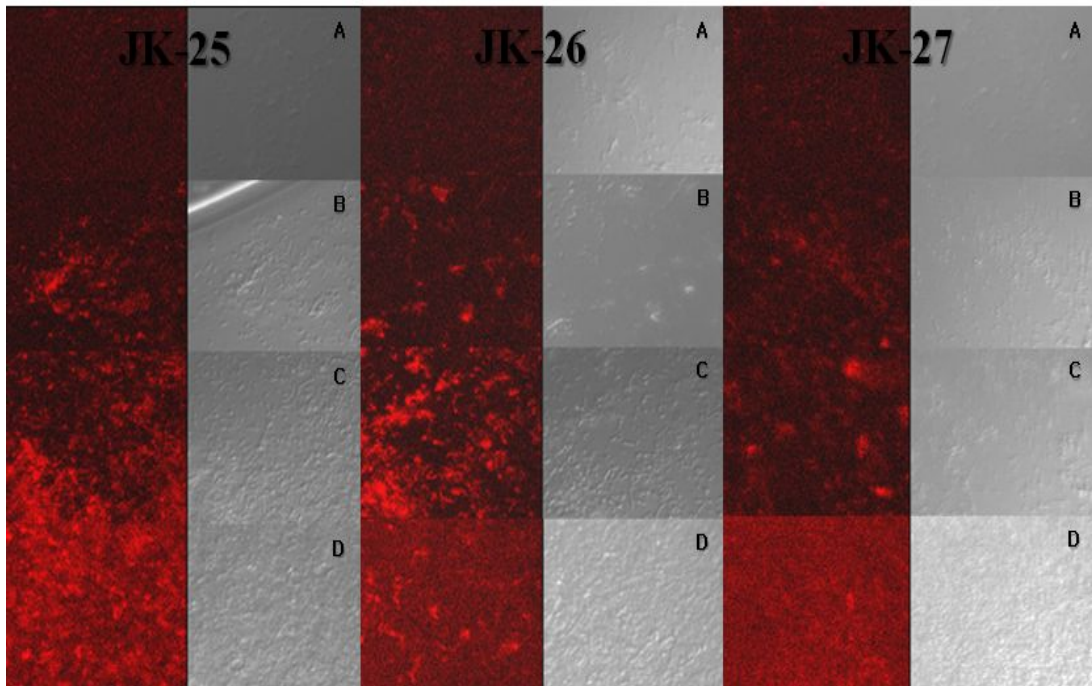
### 3.7. Vitality staining

갈륨이 실제로 병원균을 직접적으로 사멸 시키는지를 확인하기 위해 균주를 배양 후 갈륨을 처리하여 Propidium Iodine (PI, 붉은색)으로 염색을 하여 병원균의 사멸을 확인 하였다. 갈륨을 처리 하지 않은 컨트롤구에 비하여 갈륨을 100 mM, 200 mM, 500 mM의 농도로 처리한 그룹에서 병원균이 사멸되는 것을 확인 할 수 있었다.



**Fig 13.** Confocal Microscopic image of 2 day old *streptococcus parauberis*.

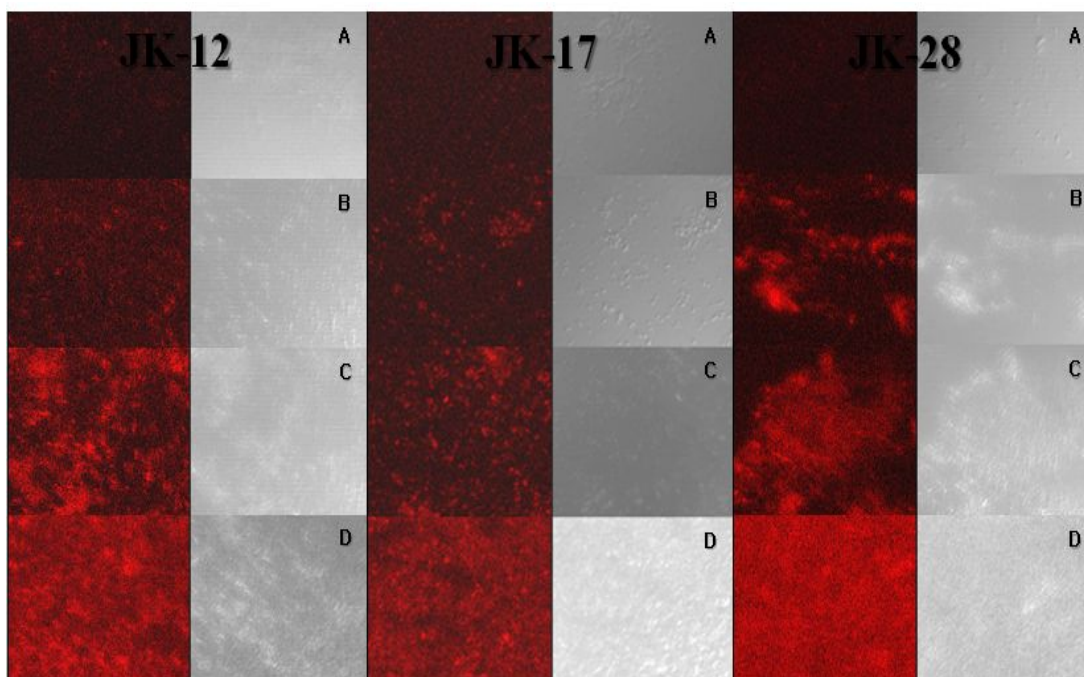
A. growth medium alone, B. with growth medium containing 100mM gallium C. with growth medium containing 200mM gallium, D. with growth medium containing 500mM gallium



**Fig 14.** Confocal Microscopic image of 2 day old *streptococcus iniae*.

A. growth medium alone, B. with growth medium containing 100mM gallium C. with growth medium containing 200mM gallium, D. with growth medium containing 500mM gallium





**Fig 15.** Confocal Microscopic image of 2 day old *Edwardsiella tarda*.  
 A. growth medium alone, B. with growth medium containing 100mM gallium C. with growth medium containing 200mM gallium, D. with growth medium containing 500mM gallium

### 3.8. 갈륨투여구와 합성항생제의 비교

양식장에서 주로 사용되고 있는 항생제인 Oxytetracycline과 갈륨을 접목하기 위해서 병원균의 저해활성을 비교하기 위한 실험을 진행하였다. 대조구와, OTC 단독으로 사용하였을 때, 갈륨과 OTC를 혼합하여 사용하였을 때 병원균의 저해율을 알아보았다. 대조구에 비해 항생제를 사용한 그룹에서 병원균의 저해를 확인할 수 있었고, 항생제와 갈륨을 혼합하여 사용하였을 시 병원균의 저해율이 있긴 하였지만, 그 수치가 작았다. 차후 *In vivo*에 적용하여 보다 정확한 실험결과가 도출될 것으로 사료된다.

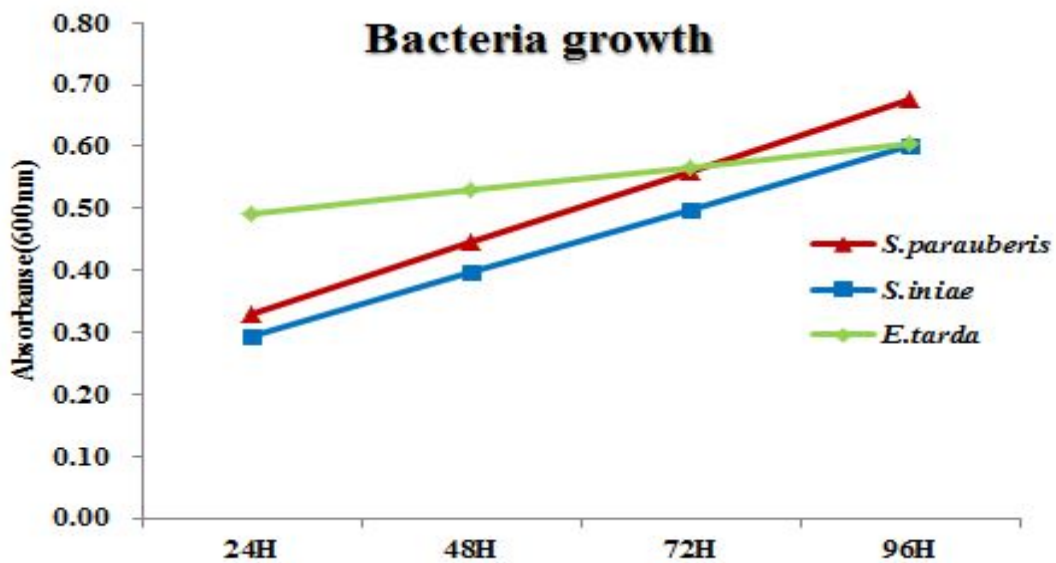


Fig 16. Growth pattern of pathogenic microbes

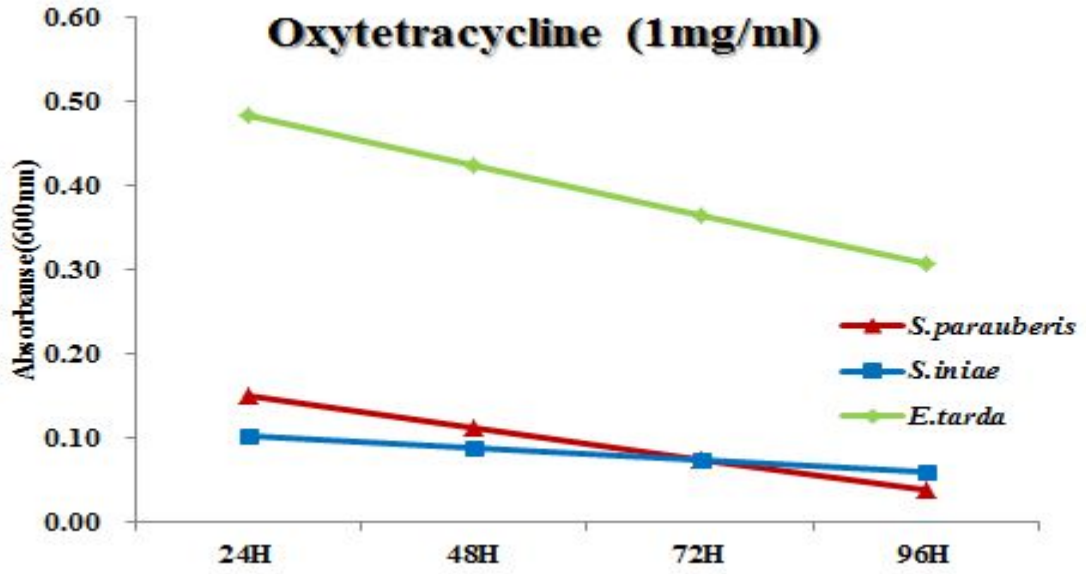


Fig 17. Growth pattern of oxyteracycline treated of pathogenic microbes

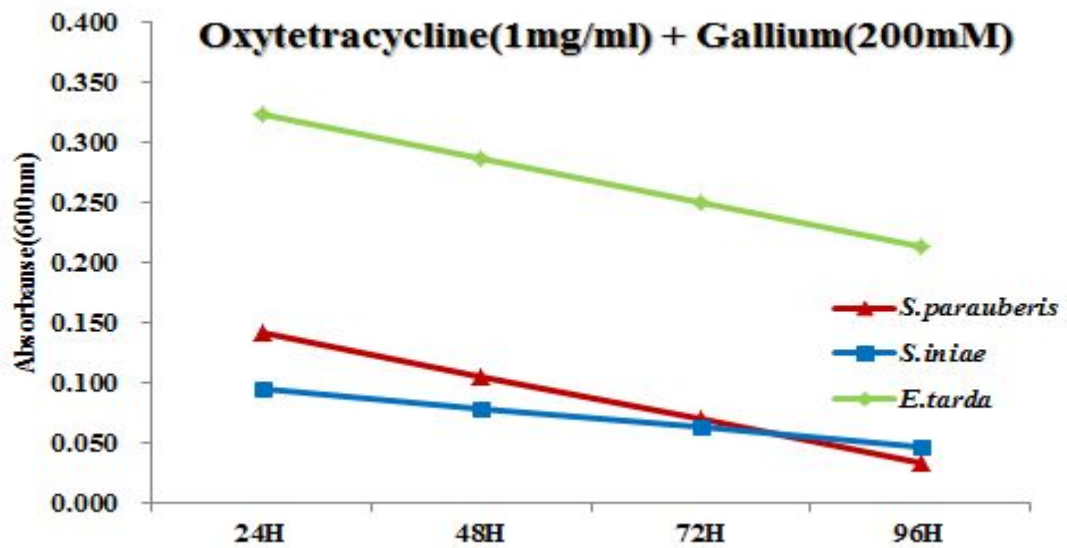


Fig 18. Growth pattern of oxyteracycline and gallium treated of pathogenic microbes

#### IV. 요약

본 논문은 제주 지역의 양식 넙치 사업이 활발히 진행되고 있는 가운데 어류 질병 유발균으로 인한 피해를 줄이고자 연구를 진행하였다. 제주도의 육상양식장 5개소에서 어류질병 유발균 중 동정과정을 거쳐 *Streptococcus parauberis* 25균주, *Streptococcus iniae* 3균주, *Edwardsiella tarda* 4균주를 분리하였으며, 14종의 항생제 실험을 하였다. Amoxycillin의 3종의 항생제에서 모든 균주가 감수성을 보였으며, Neomycin의 3종의 항생제에서 모든 균주가 내성을 보였다. 항생제 내성과 바이오필름간의 연관성을 확인한 결과, 확연히 유의적인 연관성을 확인할 수 없었으며, 이는 몇몇 항생제 내성은 유전적인 변이나 내성유전자의 유무에 의해 결정되기 때문이라고 사료된다. 바이오필름의 형성이 높은 *S. parauberis*, *S. iniae*, *E. tarda* 균당 3균주씩 선발하였다. 선발된 9균주를 이용하여 갈륨 자체의 항균작용 테스트를 시행하였다. 측정 결과 비교적 낮은 농도인 100 mM에선 대부분의 균주에 대해 갈륨의 항균활성이 약하였으며, 농도가 비교적 높은 200 mM, 500 mM에선 대부분의 균주에서 항균활성이 나타났다. 이러한 점을 토대로 갈륨 자체에도 항균작용효과가 있다고 사료된다. 바이오필름 억제실험에선 선발된 균주를 배양 후 갈륨을 100 mM, 200 mM, 500 mM의 농도별로 처리하여 바이오필름 형성을 측정하였을 때, 선발한 9균주 대해서 모두 바이오필름의 형성이 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 토대로 항생제 내성을 가지는 균주와 내성이 약한 균주 모두 유사한 항균활성을 보여 기존의 항생제 내성기작과 관계없이 항균작용을 하는 것을 확인 하였다. 또한 이미 형성된 바이오필름 자체를 파괴하는 효과가 있으며, 바이오필름의 형성능이 높고 낮음에 상관없이 바이오필름을 억제하였기 때문에 매우 긍정적인 결과라 할 수 있다. 또한 갈륨과 합성항생제인 oxytetracycline을 비교 실험한 결과 항생제를 단독으로 사용하였을 때 보다 항생제와 갈륨을 혼합하여 사용하였을 때, 비교적 낮은 생육저해를 확인할 수 있었다. 이는 항생제에만 의존을 하는 양식장에 큰 도움이 될 것으로 사료된다. 이러한 갈륨을 단독으로 사용하기 보다는 항생제의 농도를 낮추고, 이에 갈륨을 첨가하여 사용을 하게 되면 그 효과가 더욱 증가할 것으로 사료

된다. 추후 연구 방향으로 항생제의 최소 농도와 갈륨을 혼합하여, 양식 넙치에 투여하였을 경우, 어류질병균의 저해와 어체내에 항생제 잔여량을 낮추는 방향에 대한 실험을 진행 할 계획이다.



## V. 참고 문헌

- A. A. Hassan, I. U. Khan, A. Abdulmawjood, and C. Lämmle: Evaluation of PCR Methods for Rapid Identification and Differentiation of *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis*. J Clin Microbiol., 39(4): 1618 - 1621. 2001
- A L Barry, M B Coyle, C Thornsberry, E H Gerlach and R W Hawkinson: Methods of measuring zones of inhibition with the Bauer-Kirby disk susceptibility test. J Clin Microbiol., 10(6): 885-889.1979
- Amir Zlotkin, Hannah Hershko, and Avi Elda: Possible Transmission of *Streptococcus iniae* from Wild Fish to Cultured Marine Fish. Appl Environ Microbiol., 64(10): 4065 - 4067., 1998
- B M Jayarao, J J Doré Jr, G A Baumbach, K R Matthews and S P Oliver: Differentiation of *Streptococcus uberis* from *Streptococcus parauberis* by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis of 16S ribosomal DNA. J Clin Microbiol., 29(12): 2774-2778. 1991
- Daniel F. Liberman And Richard G. Robertson: Evaluation of a Rapid Bauer-Kirby Antibiotic Susceptibility Determination. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY., 7(3):250-255, 1975
- Ehud Banin, Alina Lozinski, Keith M. Brady, Eduard Berenshtein, Phillip W. Butterfield, Maya Moshe, Mordechai Chevion, Everett Peter Greenberg, and Eyal Banin: The potential of desferrioxamine-gallium as an anti-*Pseudomonas* therapeutic agent. PNAS., 105(43):16761-16766.,2008.

George Sakoulas, Pamela A. Moise-Broder, Jerome Schentag, Alan Forrest, Robert C. Moellering Jr., and George M. Eliopoulos: Relationship of MIC and Bactericidal Activity to Efficacy of Vancomycin for Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Journal of Clinical Microbiology.*, 42(6):2398-2402. 2004

H. T. Nguyen, K. Kanai: Selective agars for the isolation of *Streptococcus iniae* from Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, and its cultural environment. *Journal of Applied Microbiology.*, 86(5): 769-776. 1999

Heiner, C.R., K.L. Hunkapiller, S.M. Chen, J.I. Glass, and E.Y. Chen: Sequencing multimegabase-template DNA with BigDye terminator chemistry. *Genome Res.*, 8:557-561. 1998

Kim, Jong-Hyun, Cheorl-Ho Kim, Jorg Hacker, Wilma Ziebuhr, Bok Kwon Lee, and Seung-hak Cho: Molecular Characterization of Regulatory Genes Associated with Biofilm Variation in a *Staphylococcus aureus* Strain. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 18(1):28-34. 2008

Kwi-Ok Oh and Kack-Kyun Kim: Prevention of Biofilm Infections. *Journal of Bacteriology and Virology.*,39(4):237-246. 2009

Mishra, R.N., S.L. Singla-Pareek, S. Nair, S.K. Sopory, and M.K. Reddy: Directional genome walking using PCR. *BioTechniques.*, 33:831-834. 2002

Yukihiro Kaneko, Matthew Thoendel, Oyebode Olakanmi, Bradley E. Britigan

and Pradeep K. Singh: The transition metal gallium disrupts *Pseudomonas aeruginosa* iron metabolism and has antimicrobial and antibiofilm activity. JCI, 117(4):877 - 888. 2007

김보배, 조혜연, 현정호: 16S rRNA 유전자 분석방법을 이용한 동해 울릉분지 심해 퇴적물 내 고세균 군집 구조 및 다양성의 수직분포 특성 연구. Ocean and Polar Research, 32(3):309-319. 2010

우승호, 이준희, 김이경, 조미영, 정승희, 김진우, 박수일: 어류 병원성 세균 공격 후 마늘, *Allium sativum* 착즙액의 침지가 넙치, *Paralichthys olivaceus*의 면역반응에 미치는 영향. 한국어병학회지, 23(2):199-209, 2010

이창훈, 김필연, 고창식, 오덕철, 강봉조: 제주지역 양식 넙치(*Paralichthys olivaceus*)로부터 분리되는 *Streptococcus iniae* 와 *Streptococcus parauberis*의 생물학적특성. 한국어병학회지, 20(1):33-40, 2007

정승희, 최동림, 김진우, 조미라, 지보영, 서정수: Oxolinic acid의 경구투여, 주사 및 약욕에 따른 넙치, *paralichthys olivaceus* 체내 약물동태학적 특성. 한국어병학회지, 22(2):125~135, 2009

주진우, 김경숙, 박수정, 윤선옥, 정초록: API 20E Kit를 이용한 1996년의 부산 및 한국 남해안 일대의 *Vibrio vulnificus*의 동정. J. Korean Soc, 33(2):187-194. 1998

## VI 감사의 글

대학원에 들어와 공부한지 2년이라는 세월이 지나고 어느덧 석사학위를 받아 졸업하게 되었습니다. 먼저 이 논문이 완성될 수 있도록 학부생부터 지금까지 많은 관심과 지도편달을 아낌없이 해주신 허문수 교수님께 감사의 말씀을 올립니다. 그리고 여러 분야에서 많은 학문적 가르침을 주신 송춘복 교수님, 최광식 교수님, 전유진 교수님, 이경준 교수님, 이제희 교수님, 김기영 교수님, 정준범 교수님, 이승헌 교수님, 정석근 교수님, 박상률 교수님께도 진심으로 감사의 말씀을 드립니다. 또한 저의 영원한 큰 형님이자 든든한 지원자인 김만철 형님, 대학원 생활의 멘토이자 정신적 지주인 김주상 형님, 세상을 알게해준 장익수 형님, 여러면에서 챙겨준 한용재 형님, 못난 동생 챙기느라 고생한 송창영 형님, 홍준석 형님, 홍정용 형님, 박동민 형님, 유영민 형님께 너무나 감사드립니다. 그리고 실험실 동기라는 이유로 막대하고 잘해준 것 없는 우리 영원한 동기 홍승현, 박소현, 못난 선배 만나 고생한 민선, 경미, 지운, 향실, 다예, 지현이, 민규, 인도에서와 항상 도움을 준 Dr. Dharaneedharan에게 이 글을 진심으로 감사의 인사를 드립니다.

그리고 대학생활 동안 항상 저를 친동생처럼 아껴주신 양병규 형님, 장연환 형님, 강철영 형님, 문영건 형님, 고창식 형님, 양문휴 형님, 한송헌 형님, 오상규 형님, 고석천 형님, 이영득 형님, 강상혁 형님, 강성명 형님, 이원우 형님, 김승민 형님, 강경필 형님, 김창수 형님, 그리고 제 동기인 박아름이, 김은아, 강나래, 오민영에게 감사하고 수고했다는 말 전합니다.

마지막으로 지금의 제가 있기까지 물신양면으로 지원을 아끼지 않고 사랑해주신 가장 소중한 우리 가족 어머니, 아버지, 그리고 하나뿐인 자랑스러운 동생 동성이 에게 감사합니다. 또한 지금은 곁에 안계시지만 이 논문이 나오기까지 헌신적으로 도와주시고, 가장 기뻐해주실 법륜당 태륜스님께 이 논문을 바칩니다.