한국어병학회지 제33권 제2호 (2020)
J. Fish Pathol., 33(2) : 127~138

www.ksfp.org
pISSN 1226-0819, eISSN 2233-5412
http://dx.doi.org/10.7847/jfp.2020.33.2.127

코끼리조개(*Panopea japonica*)에서 분리되는 비브리오속 세균의 동정

서현준[1] · 남우화[2] · 김정호[1,2†]

[1]강릉원주대학교 동해안생명과학연구원
[2]강릉원주대학교 해양자원육성학과

Identification of Genus *Vibrio* bacteria isolated from geoduck clam (*Panopea japonica*)

Hyun-Joon Seo[1], U-Hwa Nam[2] and Jeong-Ho Kim[1,2†]

[1]The East Coast Research Institute of Life Science, Gangneung-Wonju National University, Gangneung 25457, Korea
[2]Department of Marine Bioscience, Gangneung-Wonju National University, Gangneung 25457, Korea

We attempted to isolate and identify potentially pathogenic bacteria from geoduck clam (*Panopea japonica*) larvae, juvenile and adult, focusing on *Vibrios*. The isolates were identified by molecular approach and biochemical characterization. In particular, we applied MLSA (multilocus sequence analysis) to the isolated *Vibrios* for clear identification and phylogenetic relationships, by combining 16s rDNA and several houskeeping genes (*pyr*H, *rec*A, *rpo*A). We obtained 141 isolates; 10 from healthy adults, 52 from moribund adults with blisters and 79 from larvae. 46 from the moribund adults and 39 from the larvae were identified as *Vibrio* species, while the rest of these samples and all the isolates from healthy adult were identified as marine general bacteria. Among *Vibrio* species, *Vibrio splendidus* was the most frequently identified from the moribund adults and clustered with the known *V. splendidus* in GenBank by MLSA. However, it was still unclear that *V. splendidus* was the cause of blisters because the artificial infection experiment was not conducted and *V. splendidus* was isolated also from the larvae. Further studies are necessary to clarify the etiological agent of the blisters found in geoduck clam in this study.

Key words: *Panopea japonica*, geoduck clam, *Vibrio splendidus*, Multilocus sequence analysis.

서 론

코끼리조개 (Geoduck clam, Genus *Panopea*)는 우럭목 (Order Myoida) 족사부착쇄조개과 (Family Hiatellidae)에 속하는 이매패류로서 9종이 알려져 있으며, 이 중 5종이 북반구에 분포한다 (Leyva-Valencia et al., 2015). 국내에 분포하는 코끼리조개는 Japanese geoduck (*Panopea japonica*)로서 강원도 고성군에서부터 경상북도 울진군의 동해안 연안에 걸쳐 서식하고 있으며, 각장이 13 cm 전후, 체중이 500 g 내외에 달하는 한해성 대형 이매패류

†Corresponding author: Jeong-Ho Kim
Tel: +82-33-640-2851, Fax: +82-33-640-2340
E-mail: jhkim70@gwnu.ac.kr

로서 수심 10~50m 미사질층에 깊게 잠입하여 굵고 긴 입출수관을 표층으로 내어 해수를 빨아들여 동·식물성 플랑크톤을 여과섭식한다 (Lee et al., 1998; Nam et al., 2014). 1980년대 고압분사기가 있는 잠수기 어선을 이용하여 발견된 이후로 지속적으로 채취되어 1996년에 176톤으로 가장 많이 어획되었지만 이후 무분별한 남획으로 인하여 국내 코끼리조개 어획량이 급격하게 감소하여 최근에는 생산량이 거의 없는 실정이며 매년 4월부터 7월까지 자원보존의 목적으로 포획이 금지되어 있다 (Nam et al., 2015).

코끼리조개는 성체의 크기 및 가식부위의 양을 고려했을 때 식용 가치가 높아 양식 대상 종으로 적합하다 (You et al. 1993). 국외에서는 Pacific geoduck (*Panopea generosa*)이 미국, 캐나다에서 상업적으로 양식되고 있으며 (Beattie and Blake, 1999), New zealand geoguck (*Panopea zelandica*)은 뉴질랜드에서 양식이 시도되고 있다 (Gribben and Heasman, 2015). 국내에서는 코끼리조개(*P. japonica*)의 양식기술이 개발되어 있으나 상업적인 대량 생산은 아직까지 시도되지 않았다 (Nam et al., 2014, 2015).

이매패류의 인위적인 대량생산 과정에 있어서 감염성 질병은 유생 및 치패의 성공적인 생산을 저해하는 가장 중요한 요소이며, 특히 *Vibrio* 속 세균은 이매패류의 유생에서 성패에 이르기까지 생활사의 전 단계에서 생존에 영향을 줄 수 있는 중요한 병원체이다 (Dubert at al., 2017). 이매패류의 유생에서는 *Vibrio alginolyticus*, *V. neptunius*, *V. splendidus*, *V. tubiashii*, *V. pectenicida* 등이, 종묘 및 성패에서는 *V. aestuarianus*, *V. chagasii*, *V. splendidus*, *V. tapetis* (Beaz-Hidalgo et al., 2010) 등이 각각 대량 폐사의 원인이 될 수 있는 것으로 알려져 있다.

이매패류는 여과 섭식을 하므로 다양한 세균들과 공생하고 있어 세균 감염에 의한 질병이 발생하였을 때 원인이 되는 세균을 동정하는데 어려움이 있다 (Yoon et al., 2017). 특히 이매패류의 대표적인 병원성 세균인 *Vibrio* 속 세균은 *Photobacterium* 속, *Aliivibrio* 속 등 다른 Vibrio 과 (Family Vibrionaceae) 세균들과 유전형과 표현형이 매우 유사하여 종 수준까지 동정이 쉽지 않다 (Dorsch et al., 1992). Vibrio 과 세균을 종수준까지 분류, 동정하기 위해서 16S rDNA gene의 염기서열만을 비교, 분석하는 방법은 한계가 있으며, 다양한 housekeeping gene (e.g., *gap*A gene, *gyr*B gene, *rpo*A gene, *rec*A gene, *pyr*H gene)의 염기서열을 읽어내어 비교, 분석하는 방법이 널리 사용되고 있다 (Thompson et al., 2005). 특히, MLSA (Multilocus Sequence Analysis)는 16S rDNA gene과 *rpo*A, *rec*A, *gyr*B genes 등 다수의 housekeeping gene을 조합하여 균주의 계통정보를 분석하는 방법으로 Vibrio과 세균을 동정하는데 유용하게 사용되고 있다 (Sawabe et al., 2007; Thompson et al., 2009; Nam et al., 2019). MLSA는 16S rDNA gene 만으로는 한계가 있는 *Vibrio* 속 세균의 근연종간의 유연관계를 명확하게 밝힐 수 있으며, 기존에 기재되었던 종의 재분류 및 신종의 기재에도 유용하게 쓰일 수 있다 (Urbanczyk et al., 2007).

본 연구에서는 코끼리조개 양식과정에 있어서 생존 및 성장에 영향을 미칠 가능성이 있는 병원성 세균들을 분리, 동정을 시도하였다. 특히 *Vibrio* 속 세균들을 대상으로 MLSA (Multilocus Sequence Analysis) 방법을 적용하여 균주를 종 수준까지 명확하게 동정하고, 해당균주들의 생화학적, 생리학적 특징을 조사하였다.

재료 및 방법

코끼리조개 샘플링

2018년 9월부터 2020년 8월에 걸쳐 강원도 강릉시에 소재한 강릉원주대학교 해양생물연구센터에서 사육 중인 코끼리조개를 대상으로 성패의 경우 건강한 개체와 수관부에 수포형태의 병변을 보이는 빈사 개체를 총 8회 (21개체) 샘플링하였고, 유생의 경우 수정란부터 치패까지 유생 단계별로 총 10회 샘플링을 실시하였다 (Fig. 1, Table 1). 코끼리조개는 아이스박스에 해수와 같이 넣어 실험실로 운반한 후 즉시 세균 분리에 사용하였다.

세균 분리

코끼리조개를 샘플링한 직후 실험실로 운반하여 세균분리를 시도하였다. 유생은 40, 80, 100, 200

Table 1. Sampling of geoduck clam, *Panopea japonica*

Date	Stage	Number of individuals	Note
18. 09. 14.	Adult	2	Healthy
18. 09. 28.	Adult	5	Moribund
18. 10. 02.	Adult	2	Moribund
18. 11. 03.	Adult	4	Moribund
18. 11. 12.	Adult	1	Moribund
18. 11. 22.	Adult	1	Moribund
18. 11. 27.	Larva	1,000	D-shaped larva
18. 12. 04.	Adult	3	Moribund
19. 05. 02.	Larva	10,000	Blastula larva
19. 05. 29.	Larva	1,000	Post larva
19. 06. 19.	Larva	1,000	D-shaped larva
19. 08. 08.	Larva	30	Young spat
20. 04. 29.	Egg	10,000	Egg
20. 04. 30.	Larva	10,000	Blastula larva
20. 05. 21.	Larva	1,000	D-shaped larva
20. 05. 29.	Larva	1,000	Moribund D-shaped larva
20. 05. 29.	Adult	3	Moribund
20. 08. 24.	Larva	50	Young spat

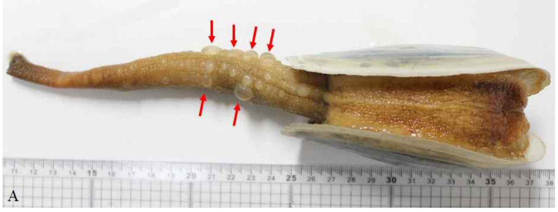

Fig. 1. Geoduck clam (*Panopea japonica*) with blisters.

㎛의 Nylon screen mesh를 사용하여 단계별로 필터링하여 이물질을 제거하고 멸균된 PBS (Phosphate buffered saline)로 수 회 세척한 후, 세척한 시료를 homogenizer를 사용하여 균질화한 후 멸균된 PBS를 사용하여 10배씩 단계별로 희석하였다. 성패는 멸균된 해수로 세척하여 이물질을 제거한 후 패각근을 절개한 뒤 멸균된 백금이로 중장선(midgut gland) 내부를 수 회 휘저었다. 일부 성패 시료는 수관부에 수포 형태의 병변이 발견되어 주사기를 사용하여 수포 내의 체액을 채취하여 세균분리에 사용하였다. 모든 샘플은 증균배지인 MA (Marine agar 2216, Difco, USA)배지와 *Vibrio* 속 세균의 선택배지인 TCBS agar (Thioulphate citrate bile salts sucrose agar, Difco, USA)배지를 사용하여 코끼리조개 사육 수온과 동일한 15℃에서 24~48시간 배양하여 세균분리를 시도하였다. 세균 집락이 형성된 배지는 육안으로 관찰하여 우점하고 있는 균주를 선택하여 2회 이상 계대배양을 통해 순수분리한 후에 MB (Marine broth 2216, Difco, USA)배지에 계대배양하여 15℃에서 24~48시간 배양하였다. 배양된 세균은 80% glycerol과 동량으로 혼합하여 이후 실험까지 -80℃에서 동결보관하였다.

분자생물학적 동정

MA 배지와 TCBS agar 배지에서 배양, 분리한 총 141개의 균주를 MB 배지에 계대배양하였다. 15℃에서 18~24시간 배양한 후 3000 rpm에서 5분간 원심분리하여 pellet 상태로 만든 후에 멸균된 PBS로 수 회 세척한 다음 동일조건으로 다시 원심분리하여 새로운 세균 pellet을 만들었다. 제작한 pellet은 QIAamp DNA kit (QIAGEN, Germany) 매뉴얼에 따라 DNA를 추출하였다. 추출한 DNA는 16S rDNA primer를 사용하여 PCR을 진행하였고, TCBS agar 배지에서 분리한 균주는 Vibrio 과 세균의 house-keeping gene인 *pyr*H, *rec*A, *rpo*A gene primer를 사용하여 추가로 PCR을 수행하였다. 본 실험에 사용

Table 2. Oligonucleotide primers used for PCR identification of isolated bacteria.

Target	Primer	Sequences (5'-3')	Condition	References
16S rDNA	fd2 rp1	AGAGTTTGATCATGGCTCAG GGTTACCTTGTTACGACTT	95℃(30s)-51℃(60s) -72℃(120s), 35cycle	Weisburg et al., 1991
uridylate kinase (*pyr*H)	pyrH-04-F pyrH-02-R	GTRAABGCNGMYARRTCCA GTRAABGCNGMYARRTCCA	95℃(30s)-51℃(60s) -72℃(120s), 30cycle	Thompson et al., 2005
recombinase A (*rec*A)	recA-01-F recA-02-R	TGARAARCARTTYGGTAAAGG TCRCCNTTRTAGCTRTACC	95℃(30s)-50℃(60s) -72℃(60s), 30cycle	
RNA polymerase alpha subunit (*rpo*A)	rpoA-03-F rpoA-03-R	ATGCAGGGTTCTGTDACAG GHGGCCARTTTTCHARRCGC		

한 primer sets의 정보는 Table 2에 나타내었다.

시퀀싱 및 분자계통 분석

증폭된 PCR 산물은 1.5% Agarose gel에서 전기영동 한 후 UV transilluminator를 사용하여 target 밴드를 확인하였다. 생성된 밴드는 절단하여 Accuprep® Gel Purification kit (Bioneer, Korea)를 사용하여 증폭된 산물을 정제, 회수하여 Solgent (Daejeon, Korea)에 sequencing을 의뢰하여 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열은 GenBank에 등록되어 있는 참고 균주들의 유전정보와 함께 MEGA 6 Program (Tamura et al., 2013)의 Kimura two-parameter model (Kimura, 1980)을 사용하여 계통수를 제작하였다. 균주들 간의 염기서열 상동성 조사는 MEGA 6 Program의 Distance estimation을 사용하였다.

Multilocus Sequence Analysis (MLSA)

분리된 *Vibrio* 속 세균의 명확한 동정을 위해 16S rDNA gene을 비롯하여 Vibrio 과 세균의 housekeeping gene으로 알려진 *pyr*H, *rec*A, *rpo*A gene의 염기서열을 조합하여 MLSA (Multilocus sequence analysis)를 진행하였다. *Vibrio* 속에 속하는 참고 균주들의 각각의 유전자 염기서열은 Thompson et al. (2005), Dieguez et al. (2011), Balboa and Romalde (2013), Gabriel et al. (2014), Pérez-Cataluna et al. (2016)이 사용한 *Vibrio* 속 세균의 GenBank Accession number를 참고하였다 (Table 3). MLSA 진행시 발생하는 염기서열간의 gap이나 누락된 서열들은 모두 제거하였다. Neighbor joining tree (Saitou and Nei, 1987)는 MEGA 6 Program (Tamura et al., 2013)의 Kimura two-parameter model (Kimura, 1980)을 사용하여 계산하였으며, Bootstrap values는 1,000번을 기준으로 하였다. 균주들 간의 염기서열 상동성 조사는 MEGA 6 Program의 Distance estimation을 사용하였다.

생화학적, 생리학적 특징 조사

분자생물학적 방법으로 동정한 균주 (This study 1, 2, 5, 6, 7)를 대상으로 그람음성 간균의 동정에 사용되는 API 20E test (BioMeriux, France)와 Oxidase test (Becton Dickinson and company, USA)를 실시하여 생화학적 특징을 확인하였다. TCBS agar 배지에 형성된 집락을 MB 배지에 계대배양하여 15℃에서 24~28시간 배양 후 API 20E kit의 매뉴얼에 따라 진행하였다. 또한 이들 균주를 대상으로 온도조건별, 염분조건별 배양을 진행하였다. TCBS agar 배지에 배양된 균주를 1.5% NaCl이 첨가된 TSB (Trypticase soybean broth, Difco, USA)배지에 계대배양하여 18~24시간 배양한 후 TSB 배지에 100 μl씩 접종하여 배양온도 4, 15, 25, 30, 40℃의 5가지 조건에서 각각 24~48시간 배양하여 각 균주의 성장여부를 관찰하였다. 또한 염분조건은 TSB 배지에 NaCl을 첨가하여 염분농도 0.5, 3, 5, 8, 10%의 TSB 배지를 제작 후 각 100 μl씩 접종하여 15℃에서 24~48시간 배양하여 각 균주의 성장여부를 관찰하였다.

결 과

분자생물학적 동정

Table 3. GenBank accession numbers of bacterial strains used in this study

Species	Strain	*pyr*H	*rec*A	*rpo*A
V. alginolyticus	CECT 521^T	FM202578	AJ842373	AJ842558
V. anguillarum	LMG 4437^T	Taxvibrio*	AJ842375	AJ842561
V. atlanticus	CECT 7223^T	FN582266	EU541589	EU541569
	C 14.7	FN582268	FN582254	FN582259
	Cmj 13.4	FN582270	FN582256	FN582257
	C 2.4	FN582267	FN582253	FN582260
V. campbellii	LMG 11216^T	EF596641	AJ842377	AJ842564
V. celticus	CECT 7224^T	FN582244	EU541590	EU541570
V. cholerae	CECT 514^T	FM202582	AM942078	AM942078
V. crassostreae	LMG 22240^T	EU871948	EU541594	EU541574
V. gigantis	LMG 22741^T	EU871951	EU541593	EU541573
V. harveyi	LMG 4044^T	FM202541	DQ648369	AJ842627
V. lentus	CECT 5110^T	EU871959	AJ842452	AJ842639
V. mediterranei	LMG 11258^T	GU266288	AJ842459	AJ842644
V. orientalis	LMG 7897^T	EU118243	EU130528	AJ842672
V. parahaemolyticus	LMG 2850^T	EU118240	AJ842490	AJ842677
V. splendidus	LMG 19031^T	EU118241	EU130529	AJ842725
	R-14789	Taxvibrio*	AJ842512	AJ842726
V. tapetis	CECT 4600^T	HE795189	HE795219	HE795340
	HH6087^T	HE795208	HE795238	HE795358
	a200	HE795214	HE795244	HE795364
	LP2	HE795218	HE795248	HE795368
	B8.3	HE795200	HE795230	HE795351
	GR0202RD	HE795206	HE795236	HE795357
	C0620701H	HE795212	HE795242	HE795362
V. tasmaniensis	LMG 20012^T	EU871961	AJ842515	AJ842731

*Taxvibrio from online electronic taxonomic scheme vibrios (http://www.taxvibrio.lncc.br)

코끼리조개 성패와 유생으로부터 세균분리를 한 결과 정상개체에서 10개, 빈사개체에서 52개, 유생에서 79개, 총 141개의 균주가 분리되었다. 이들을 대상으로 16s rDNA sequencing을 실시한 결과 정상개체에서 분리된 균주는 *Glaciecola* sp. (20%, 2/10), *Kordia* sp. (20%, 2/10) 등 모두 일반해양세균으로 동정되었으며 빈사개체에서 분리된 균주 중 6개는 *Photobacterium* sp. (50%, 3/6), *Pseudoalteromonas* sp. (50%, 3/6)인 일반해양세균으로, 46개는 *Vibrio* 속 세균으로 동정되었다. 유생에서는 40개의 균주가 *Pseudoalteromonas* sp. (22.5 %, 9/40), Uncultured bacterium (17.5%, 7/40) 등 일반해양세균으로, 39개의 균주가 *Vibrio* 속 세균으로 동정되었다 (Table 4). 빈사개체와 유생에서 분리된 *Vibrio* 속 균주를 대상으로 housekeeping gene을 사용하여 PCR 및 sequencing을 실시한 결과 빈사개체에서 분리된 46개의 *Vibrio* 속 세균은 *V. splendidus* (56.5%, 26/46), *V. atlanticus* (10.8%, 5/46), *V. tapetis* (8.7% 4/46) 등으로 동정되었고, 유생에서 분리된 39개의 *Vibrio* 속 세균은 *V. splendidus* (20.5%, 8/39), *V. atlanticus* (10.2%, 4/39), *V. chagasii* (7.7%, 3/39) 등으로 동정되었다 (Table 5A). 빈사개체 19 개체에서는 *V. splendidus*가 가장 빈번하게 분리되었으며 (73.7%, 14/19), *V. atlanticus* (21.1%, 4/19), *V. tapetis* (15.8%, 3/19), *Vibrio* sp. (15.8%, 3/19) 등의 순서로 분리되었다 (Table 5B). 또한, 19 개체 중 7 개체에서는 2종 이상의 *Vibrio*속 세균이 분리되었으며, 이들 7 개체에서 모

Table 4. Number of bacterial isolates in this study

	Healthy adult	Moribund adult	Healthy larva	Total
Marine general bacteria	10	6	40	56
Vibrio spp.	-	46	39	56
	10	52	79	141

두 *V. splendidus*가 분리되었다 (data not shown).

Multilocus Sequence Analysis (MLSA)

동정된 *Vibrio* 속 세균들 중에서 무척추동물에 병원성이 있는 것으로 알려진 *V. atlanticus* (This study 1~4), *V. tapetis* (This study 5), *V. splendidus* (This study 6~14)를 선택하여 MLSA를 실시한 결과 This study 1과 3은 *V. atlanticus* C 14.7, This study 2와 4는 *V. atlanticus* C 2.4와 동일한 cluster를 형성하였으며, This study 5는 *V. tapetis* a200, This study 6~14는 *V. splendidus* LMG 19031^{T}와 동일한 cluster를 형성하였다 (Fig. 2).

Table 5A. Species and Number of *Vibrios* Isolated in this study

	Moribund adult	Healthy larva	Total
Vibrio spp.	6	14	20
V. alginolyticus	1	1	2
V. atlanticus	5	4	9
V. chagasii	-	3	3
V. cortegadensis	2	-	2
V. crassostreae	1	-	1
V. cyclitrophicus	-	2	2
V. lentus	1	1	2
V. mediterranei	-	3	3
V. pelagius	-	1	1
V. splendidus	26	8	34
V. tapetis	4	-	4
V. tasmaniensis	-	1	1
V. toranzoniae	-	1	1
	46	39	85

Table 5B. Percentage occurrence of each *Vibrio* species isolates from moribund geoduck clam individuals in this study

Species name	% occurrence in moribund geoduck clam individuals (n=19)
V. alginolyticus	5.3%(1/19)
V. atlanticus	21.1%(4/19)
V. cortegadensis	10.5%(2/19)
V. crassostreae	5.3%(1/19)
V. lentus	5.3%(1/19)
V. splendidus	73.7%(14/19)
V. tapetis	15.8%(3/19)
Vibrio spp.	15.8%(3/19)

염기서열 상동성에서는 This study 1과 3은 *V. atlanticus* C 14.7, This study 2와 4는 *V. atlanticus* C 2.4와 상동성이 각각 99.30%, 99.57%이었으며, This study 5는 *V. tapetis* a200과 상동성이 99.79%, This study 6~14는 *V. splendidus* LMG 19031^{T}와 상동성이 99.57~99.95%이었다 (Table 6).

생화학적, 생리학적 특징 조사

분자생물학적 방법으로 동정된 10개의 균주 중에서 중복된 균주를 제외한 5개 균주 *V. atlanticus* (This study 1~2), *V. splendidus* (This study 6~7), *V. tapetis* (This study 5)를 API 20E kit (BioMeriux, France)와 Oxidase test (Becton Dickinson and company, USA)를 통해 생화학적 특징을 조사하였다. 그 결과, Oxidase test에서는 본 연구에 사용된 균주들 모두 *Vibrio* 속 세균과 동일한 양성 반응을 나타내었다. API 20E test에서는 본 연구에 사용된 균주 모두 ONPG (β-galractosidase) test, LDC (Lysine Decarboxylase) test, VP (Voges Proskauer) test, GLU (Glucose) test 등이 기존의 연구 결과와 유사하였다. 그러나, GEL (Gelatinase) test와 AMY (Amygdalin) test는 기존의 연구 보고와 다르게 음성 반응이 나타났다 (Borrego et al., 1996; Buller, 2004; Dieguez et al., 2011; Lee et al., 2018) (Table 7).

온도 조건별 배양 실험에서 본 연구에 사용한 5개의 균주는 4℃에서 25℃까지 모두 성장하였으며 *V. tapetis* (This study 5)를 제외한 나머지 4개의 균주는 30℃에서도 성장하였다. 염분 조건별 배양

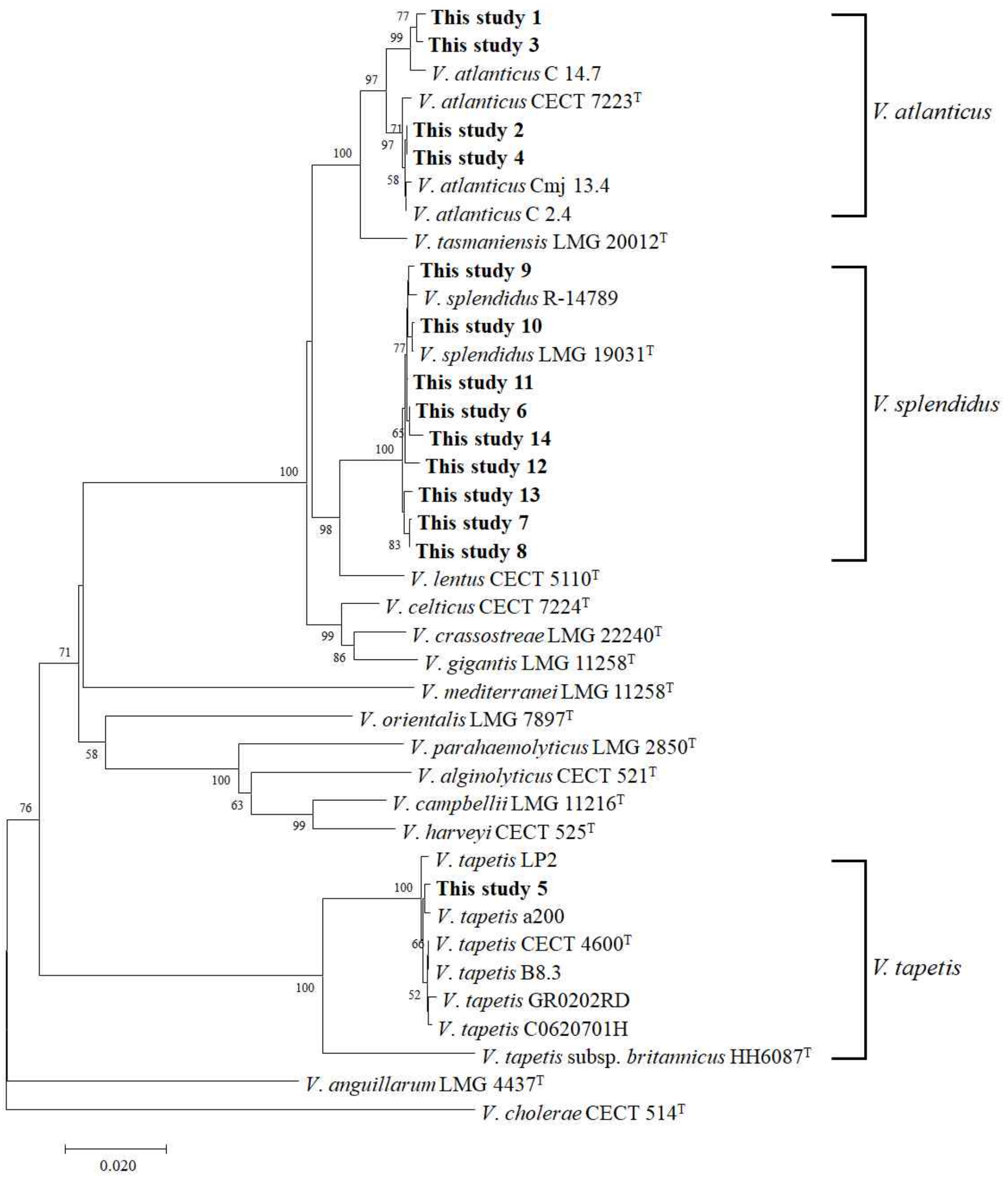

Fig. 2. Phylogenetic reconstructions based on 3 concatenated genes (*pyr*H, *rec*A and *rpo*A). Alignment was conducted with all 3 genes. Gaps and missing parts in the sequence were eliminated to make 1,878 bp in total. The number after bacterial scientific name means strain number registered in the NCBI. The tree was constructed by neighbor-joining method. Numbers at nodes denote the level of bootstrap based on 1,000 replicates.

실험에서는 5개 균주 모두 NaCl이 1.5%에서 5%까지 첨가된 조건에서 성장하였다. 이상의 결과는 Buller (2004), Dieguez et al. (2011)와 유사하였다 (Table 7).

고 찰

코끼리조개 (Japanese geoduck)은 우리나라 동해안, 일본, 중국 북부 연안에 분포하며 상품가치가

Table 6. Estimation of homology among Genus *Vibrio* species, based on the MLSA of 3 concatenated genetic sequences (*pyr*H, *rec*A and *rpo*A genes)

A		1	2	3	4	5	6	7	8			
1	This study 1	-										
2	This study 2	98.55%	-									
3	This study 3	99.73%	98.82%	-								
4	This study 4	98.55%	100.00%	98.82%	-							
5	*V. atlanticus* CECT 7223^T	98.65%	99.68%	98.93%	99.68%	-						
6	*V. atlanticus* Cmj 13.4	98.49%	99.84%	98.76%	99.84%	99.73%	-					
7	*V. atlanticus* C 2.4	98.60%	99.95%	98.87%	99.95%	99.73%	99.89%	-				
8	*V. atlanticus* C 14.7	99.30%	98.76%	99.57%	98.76%	98.87%	98.71%	98.82%	-			
B		1	2	3	4	5	6	7	8			
1	This study 5	-										
2	*V. tapetis* CECT 4600^T	99.73%	-									
3	*V. tapetis* LP2	99.63%	99.79%	-								
4	*V. tapetis* a200	99.79%	99.73%	99.63%	-							
5	*V. tapetis* B8.3	99.73%	100.00%	99.79%	99.73%	-						
6	*V. tapetis* GR0202RD	99.73%	99.79%	99.57%	99.52%	99.79%	-					
7	*V. tapetis* C0620701H	99.73%	99.89%	99.68%	99.63%	99.89%	99.79%	-				
8	*V. tapetis* subsp. *britannicus* HH6087^T	94.91%	94.91%	94.97%	94.91%	94.91%	94.68%	94.80%	-			
C		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	This study 6	-										
2	This study 7	99.68%	-									
3	This study 8	99.73%	99.95%	-								
4	This study 9	99.79%	99.57%	99.63%	-							
5	This study 10	99.79%	99.57%	99.63%	99.79%	-						
6	This study 11	99.95%	99.73%	99.79%	99.84%	99.84%	-					
7	This study 12	99.63%	99.52%	99.47%	99.52%	99.52%	99.68%	-				
8	This study 13	99.68%	99.68%	99.73%	99.68%	99.57%	99.73%	99.41%	-			
9	This study 14	99.73%	99.41%	99.47%	99.52%	99.52%	99.68%	99.36%	99.41%	-		
10	*V. splendidus* LMG 19031^T	99.84%	99.63%	99.68%	99.73%	99.95%	99.89%	99.57%	99.63%	99.57%	-	
11	*V. splendidus* R-14789	99.73%	99.63%	99.68%	99.73%	99.73%	99.79%	99.52%	99.52%	99.47%	99.68%	-

A: *V. atlanticus* strains, B: *V. tapetis* strains, C: *V. splendidus* strains. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There were a total of 1,878 base pairs in the final dataset. Values means similarity of nucleotide sequences.

높아 최근 대량 생산을 목적으로 다양한 방면에서 연구가 진행되고 있으나, 아직 상업적인 대량 생산은 불가능한 실정이다 (Nam et al., 2014, 2015; Huo et al., 2017). 이매패류의 인위적인 대량 생산에 있어서 대규모의 폐사가 종종 발생하며, 수온, 염도, 먹이, 사육 밀도 등 다양한 환경 요인, 감염성 미생물 들이 원인으로 지적되고 있다. 특히, 비브리오 속 세균은 해양 환경에 풍부하게 존재하며, 120 여 종 이상의 다양한 비브리오 속 세균이 해양 환경 내에서 자유생활을 하거나 다양한 해양 생물과 공생하고 있다. 또한, 다양한 비브리오 속 세균이 해양생물에 병원성을 가지고 있는 것으로 보고되어 있다 (Thompson et al., 2004).

Cáceres-Martínez et al. (2015)과 Dorfmeier et al. (2015)은 자연산 Pacific geoduck의 질병에 대해 조사하였으며, 수 종의 기생성 갑각류, 미포자충류 및 리케치아를 보고하였다. 하지만 이들의 감염에 의해 유의할만한 조직병리학적 변화나 폐사는 확인되지 않았다고 언급하였다. 코끼리조개 (Japanese geoduck)의 질병에 관해서는 아직까지 보고된 바

Table 7. Differential phenotypic characteristics of *Vibrio* species isolated in this study and other *Vibrio* species

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Growth at (℃)	4-30	4-30	4-25	4-30	4-30	4-30	4-30	4-22	4-22	4-30
Growth in NaCl (%)	1.5-5	1.5-5	1.5-5	1.5-5	1.5-5	1-7	1-7	1-5	1-5	3-6
β-Galactosidase (ONPG)	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+
Arginine dehydrolase (ADH)	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
Lysine decarboxylase (LDC)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ornithine decarboxylase (ODC)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrate utilization (CIT)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H_2S production (H_2S)	-	-	-	+	+	-	-	-	ND	ND
Urease (URE)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tryptophane deaminase (TDA)	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND
Indole production (IND)	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
Voges Proskauer (VP)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Gelatinase (GEL)	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
D-Glucose (GLU)	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	+
D-Mannitol (MAN)	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Inositol (INO)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Sorbitol (SOR)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Rhamnose (RHA)	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	-
D-Sucrose (SAC)	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
D-Melibiose (MEL)	-	-	-	+	+	-	+	-	ND	-
Amygdalin (AMY)	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
L-Arabinose (ARY)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
Oxdiase (OX)	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	+

1: This study 1, 2: This study 2, 3: This study 5, 4: This study 6, 5: This study 7, 6: *V. splendidus* ATCC 33125, 7: *V. splendidus* NCMB 2251, 8: *V. tapetis* B1090^T, 9: *V. tapetis*, 10: *V. atlanticus* Cmj 13.4. All the other data of reference strains were adopted from Borrego et al. (1996), Buller (2004), Dieguez et al. (2011) and Lee et al. (2018). ND: no data, +: Positive, -: Negative.

없으며, 본 연구에서 코끼리조개의 유생 및 성패를 채집하여 세균분리를 시도한 결과 총 141개의 세균이 분리되었으며 16S rDNA gene sequencing에 의해 56개의 세균은 일반해양세균으로, 85개의 세균은 비브리오 속 세균으로 동정되었다 (Table 4). 비브리오 속 세균은 housekeeping genes 및 MLSA를 통해 *V. splendidus*, *V. atlanticus*, *V. tapetis*, *V. chagasii* 등 다양한 비브리오 속 세균으로 동정되었다 (Table 5A).

*V. splendidus*는 참굴 (*Crassostrea gigas*)을 대량 폐사시키는 대표적인 *Vibrio* 속 세균으로 참굴 이외에도 포목상 바지락 (*Ruditapes decussatus*)과 가리비 (*Patinopecten yessoensis*) 등 다양한 이매패류에서 폐사를 일으킨다고 보고되어 있다 (Lacoste et al., 2001; Gomez-Leon et al., 2005; Rojas et al., 2015). 또한 *V. tapetis*는 바지락에서 Brown ring disease (BRD)의 대표적인 원인세균으로 알려져 있으며 (Paillard et al., 1994; Allam et al., 2000), *V. atlanticus*는 *V. splendidus* Clade에 속하는 균주로 이매패류에 병원성을 보일 가능성이 있을 것으로 생각되며 (Dieguez et al., 2011), 국내에서는 육상양식중인 자주복 (*Takifugu rubripes*)에서 분리되어 보고된 바 있다 (Lee et al., 2018).

또한 Bower and Blackbourn (2003)과 Cáceres-Martínez et al. (2015)은 Pacific geoduck의 입출수관에서 수포성 병변을 보고하였다. 이 수포형 병변은 맑은 액체로 충만되어 있으며, 이 병변과 연관된 감염성 병원체는 발견되지 않았다고 하였다. 본 논문에서 조사한 Japanese geoduck에서도 수포성 병변이 일부 개체에서 관찰되었다 (Fig. 1). 이러한

병변이 발견된 개체는 검사 당시 빈사 상태이거나 결과적으로 폐사하는 것으로 보아 개체의 생존과 관련이 있는 것으로 생각되어 해당 병변에서 채취한 맑은 액체를 사용하여 세균 분리를 시도하였으며, *Vibrio* 속에 속하는 수 종의 세균이 분리되었다.

본 연구에서는 *V. splendidus*가 가장 많이 분리되어 코끼리조개에서 발견된 수포 형태의 병변과 관련이 있는 것으로 의심할 수 있었다. 하지만 이 세균은 유생에서도 분리되었으며, 성패를 대상으로 인위감염실험을 실시하지 않아 본 연구에서 분리된 *Vibrio* 속 세균이 수포 형태의 병변을 일으킨 1차적인 원인인지, 혹은 2차적으로 침입하여 증식한 결과인지는 확인할 수 없었다. 차후 이들 *Vibrio* 속 세균을 사용한 인위감염을 실시하여 수포 형태의 병변과의 연관성을 밝힐 필요가 있으며, 세균 이외의 병원체가 원인일 가능성도 검토해 볼 필요가 있다.

MLSA에 의해 코끼리조개에서 분리된 14개의 균주는 *V. atlanticus* (This study 1~4), *V. tapetis* (This study 5), *V. spledidus* (This study 6~14)로 각각 동정되었다. 16S rDNA 유전자 단편만을 사용하여 염기서열을 분석한 경우에는 분리된 대다수의 *Vibrio* 속 균주들을 종 수준까지 동정하지 못하였다. Housekeeping gene (*pyr*H, *rec*A, *rpo*A genes) 1개만을 사용하여 염기서열을 분석하면 대부분 *Vibrio* 속 세균을 종 수준까지 동정이 가능하였지만 분석하는 housekeeping gene에 따라 다른 균주로 동정된 경우가 있었다 (data not shown). 따라서 이러한 불일치를 줄이고 *Vibrio* 속 세균을 명확하게 동정하기 위해서는 MLSA 방법을 적용할 필요가 있다고 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2020년 해양수산부 재원으로 한국해양과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 연구입니다 (과제명: 코끼리조개 양식산업화 기술개발 (2018-0377)).

요 약

코끼리조개 성패 및 유생으로부터 잠재적 병원성 세균 분리 및 동정을 수행하였다. 분리된 균주는 분자생물학적 기법 및 생화학적 검사를 통해 동정하였으며, 명확한 동정 및 계통수 분석을 위해 16S rDNA와 하우스키핑 유전자 (*pyr*H, *rec*A, *rpo*A)를 결합하여 분석하는 MLSA를 적용하였다. 총 141개의 균주가 분리되었으며, 건강한 성패에서는 10개, 수포 병변을 보이는 빈사 상태의 성패에서 52개, 유생에서 79개가 분리되었다. 이 중 빈사상태의 성패에서 46개, 유생에서 39개의 균주가 *Vibrio* 속 세균으로 동정되었으며, 나머지 균주들은 모두 일반해양세균으로 동정되었다. *Vibrio* 속 세균 중에서는 수포 병변을 보이는 성패에서 *Vibrio splendidus*가 가장 많이 분리되었으며 기존의 *V. splendidus*와 함께 동일한 클러스터를 형성하였다. 하지만, 인위감염실험을 실시하지 않았고 건강한 유생에서도 *V. splendidus*가 분리되어 성패에서 나타난 수포와 *V. splendidus*와의 관계는 확실하지 않으며, 차후 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다.

References

Allam B., Parillard C., Howard A. and Pennec M. L.: Isolation of the pathogen *Vibrio tapetis* and defense parameters in brown ring diseased Manila clams *Ruditapes philippinarum* cultivated in England. Dis. Aquat. Org., 41: 105-113, 2000.

Balboa S. and Romalde J. L.: Multilocus sequence analysis of *Vibrio tapetis*, the causative agent of Brown Ring Disease: Description of *Vibrio tapetis* subsp. *britannicus* subsp. nov. Syst. Appl. Microbiol., 36(3): 183-187, 2013.

Beattie H. and Blake B.: Development of culture methods for the geoduck clam in the USA (Washington State) and Canada (British Columbia). J. World Aquac. Soc., 30(3): 50–53, 1999.

Beaz-Hidalgo R., Balboa S., Romalde J. L. and Figuersa M. J.: Diversity and pathogenecity of *Vibrio* species in cultured bivalve molluscs. Environ. Microbiol. Rep., 2(1): 34-43, 2010.

Borrego J. J., Castro D., Luque A., Paillard C., Maes P., Garcia M. T. and Ventosa A.: *Vibrio tapetis* sp. nov., the causative agent of the Brown Ring Disease affecting cultured clams. Int. J. Syst. Bacteriol., 46(2): 480-484, 1996.

Bower S. M. and Blackbourn J.: Geoduck clam (*Panopea*

generosa): anatomy, histology, development, pathology, parasites and symbionts: lesions of unknown cause on geoduck clams. Available at: https://www.dfo-mpo.gc.ca/science/aah-saa/species-especes/shellfish-coquillages/geopath/warts-eng.html. 2003.

Buller N. B.: Bacteria from fish and other aquatic animals: a practical identification manual. CABI Publishing, Oxfordshire, 171-183, 2004.

Cáceres-Martínez J., Vásquez-Yeomans R. and Cruz-Flores R.: First description of symbionts, parasites, and disease of the Pacific Geoduck *Panopea generosa* from the pacific coast of baja california, Mexico. J. Shellfish Res., 34(3): 751-756, 2015.

Dieguez A. L., Beaz-Hidalgo R., Cleenwerck I., Balboa S., Vos R. D. and Romalde J. L.: *Vibrio atlanticus* sp. nov. and *Vibrio artabrorum* sp. nov., isolated from the clams *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 61(10): 2406–2411, 2011.

Dorfmeier E. M., Vadopalas B., Frelier P. and Friedman C. S.: Temporal and spatial variability of native Geoduck (*Panopea generosa*) endosymbionts in the Pacific northwest. J. Shellfish Res., 34(1): 81–90, 2015.

Dorsch M. D., Lane D. and Stackebrandt E.: Towards a phylogeny of the Genus *Vibrio* based on 16s rRNA sequences. Int. J. Syst. Bacteriol., 42(1): 58-63, 1992.

Dubert J., Barja J. L. and Romalde J. L.: New Insights into pathogenic Vibrios affecting bivalves in hatcheries: present and future prospects. Front. Microbiol., 8: 762, 2017.

Gabriel M. W., Matsui G. Y., Friedman R. and Lovell C. R.: Optimization of multilocus sequence analysis for identification of species in the Genus *Vibrio*. Appl. Enviro. Microbiol., 80(17): 5359-5365, 2014.

Gomez-Leon J., Villamil L., Lemis M. L., Novoa B. and Figueras A.: Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from aquacultured carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) larvae associated with mass mortalities. Appl. Environ. Microbiol., 71(1): 98-104, 2005.

Gribben, P. E., and Heasman, K. G.: Developing fisheries and aquaculture industries for *Panopea zelandica* in New Zealand. J. Shellfish Res., 34(1), 5-10, 2015.

Huo, Z., Guan, H., Rbbani, M. G., Xiao, Y., Zhang, X., Fan, C., Li Z., Li Y., Wu Q., Yang F. and Yan, X.: Effects of environmental factors on growth, survival, and metamorphosis of geoduck clam (*Panopea japonica* A. Adams, 1850) larvae. Aquac. Rep., 8: 31-38, 2017.

Kimura M.: A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol., 16(2): 111-120, 1980.

Lacoste A., Jalabert F., Malham S., Cueff A., Gelebart F., Cordevant C., Lange M. and Poulet S. A.: A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). Dis. Aquat. Org., 46: 139-145, 2001.

Lee C. S., Baik K. K. and Hong K. E.: Ecological studies on the habitat of geoduck clam, *Panope japonica*. J. Aquaculture, 11(1): 105-111, 1998.

Lee N. S., Cho M. Y., Jung S. H. and Won K. M.: The first case report on *Vibrio atlanticus* infection in cultured tiger puffer, *Takifugu rubripes*. J. Fish Pathol., 31(2): 087-092, 2018.

Leyva-Valencia, I., Cruz-Hernández, P., Álvarez-Castañeda, S. T., Rojas-Posadas, D. I., Correa-Ramírez, M. M., Vadopalas, B., & Lluch-Cota, D. B.: Phylogeny and phylogeography of the Geoduck *Panopea* (Bivalvia: Hiatellidae). J. Shellfish Res., 34(1), 11-20, 2015.

Nam M. M., Lee C., Kim M. K., Kim J. W. and Kim Y. D.: Development and growth in fertilized eggs and larvae of the Japanese geoduck, *Panopea japonica* reared in the laboratory. Kor. J. Malacol., 30(4): 303-309, 2014.

Nam M. M., Lee J. Y., Lee C. Kang. H. W., Kim Y. D., Byun S. G. and Yoo H. K.: Effect of water temperature condition on growth and survival of juvenile Geoduck (*Panopea japonica* A. Adams, 1850). Kor. J. Malacol., 31(4): 263-266, 2015.

Nam W. H., Seo H. J., Jang S. R., Kim M. R. and Kim J. H.: Multilocus sequence analysis of the genus *Aliivibrio*: Identification and phylogeny of *Aliivibrio* species isolated from cultured walleye pollock (*Gadus chalcogrammus*) in Korea. J. Fish Pathol., 32(2): 69-80. 2019.

Paillard C. Maes P. and Oubella R.: Brown ring disease in clams. Annu. Rev. Fish Dis., 4: 219-240, 1994.

Pérez-Cataluna A., Lucena T., Tarazona E., Arahal D. R., Macián M. C. and Pujalte M. J.: An MLSA approach for the taxonomic update of the Splendidus clade, a lineage containing several fish and shellfish pathogenic *Vibrio* spp. Syst. Appl. Microbiol., 39(6): 361–369, 2016.

Rojas R., Miranda C. D., Opazo R. and Romero J.: Characterization and pathogenicity of *Vibrio splen-*

didus strains associated with massive mortalities of commercial hatchery-reared larvae of scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). J. Invertebr. Pathol., 124, 61-69, 2015.

Saitou N. and Nei M.: The neighbor-Joining Method-a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol., 4: 406-425, 1987.

Sawabe, T., Kita-Tsukamoto, K. and Thompson, F. L.: Inferring the evolutionary history of vibrios by means of multilocus sequence analysis. J. Bacteriol., 189(21): 7932-7936, 2007.

Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A. and Kumar S.: MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol. Biol. Evol., 30(12): 2725-2729, 2013.

Thompson C. C., Vicente A. C., Souza R. C., Vasconcelos A. T., Vesth T., Alves N., Ussery D. W., Iida T. and Thompson F. L.: Genomic taxonomy of Vibrios. BMC Evol. Biol., 9(1): 258, 2009.

Thompson F. L., Gevers D., Thompsom C. C., Dawyndt P., Naser S., Hoste B., Munn C. B. and Swings J.: Phylogeny and Molecular Identification of Vibrios on the Basis of Multilocus Sequence Analysis. Appl. Environ. Microbiol., 71(9): 5107-5115, 2005.

Thompson F. L., Iida T. and Swings J.: Biodiversity of vibrios. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 68(3): 403-431, 2004.

Urbanczyk H., Ast J. C., Higgins M. J., Carson J. and Dunlap P. V.: Reclassification of *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio wodanis* as *Aliivibrio fischeri* gen. nov., comb. nov., *Allivibrio logei* comb. nov., *Allivibrio salmonicida* comb. nov. and *Aliivibrio wodanis* comb. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 57(12): 2823-2829, 2007.

Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier D. A. and Lane D. J.: 16S Ribosomal DNA amplification of phylogenetic study. J. Bacteriol., 173(2): 697-703, 1991.

Yoon J. S., Park M. S., Kim K. Y., Won N. I. and Won K. M.: Distribution of Vibrionaceae isolated from cultured bay scallop, *Argopecten irradians*. Kor. J. Malacol., 33(4): 285-297, 2017.

You B. J., Jeong I. H., Lee K. H. and Chol H. G.: Quality and storage stability of frozen Geoduck (*Panope japonica* A. Adams). Bull. Kor. Fish. Soc., 26(6): 549-556, 1993.

Manuscript Received : Nov 4, 2020
Revised : Nov 29, 2020
Accepted : Nov 30, 2020