

강원도 양식 연어과 어류에서 분리된 에로모나스 종의 유전학적 동정

임종원* · 구본형** · 김광일*** · 정현도**** · 홍수희*†

*대한민국 강원도 강릉시 죽헌길 7 강릉원주대학교 해양생물공학과

**대한민국 강원도 춘천시 영서로 3074 강원수산질병관리원

***대한민국 강원도 강릉시 해안로 25435 동해수산연구소 양식산업과

****대한민국 부산시 남구 대연동 부경대학교 수산생명의학과

Genetic identification of *Aeromonas* species using a housekeeping gene, *rpoD*, in cultured salmonid fishes in Gangwon-Do

Jongwon Lim*, Bonhyeong Koo**, Kwang Il Kim***,
Hyun Do Jeong**** and Suhee Hong*†

*Department of Marine Biotechnology, Gangneung-Wonju National University, Gangneung 25457, Republic of Korea

**Kangwon Fisheries disease control center, Gangwon-do, 24207, Republic of Korea

***Aquaculture Industry Division, East Sea Fisheries Research Institute, Gangwon-do, 25435, Republic of Korea

****Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University

At the present, fish farms are suffering a lot of economic losses due to infectious diseases caused by various pathogens including aeromonad. Aeromonad is ubiquitous bacteria that causes infectious diseases. At least 26 species in the genus *Aeromonas* have been reported to cause fatal infections not only in salmonid fishes, but also in other freshwater and seawater fishes. Molecular techniques based on nucleic acid sequences of 16S rDNA and housekeeping genes can be used to identify the *Aeromonas* species. In this study, The genus *Aeromonas* was isolated from salmonid fishes of sixteen fish farms in Gangwon-Do, Korea and phylogenetically identified based on the sequences of 16S rDNA and housekeeping genes for Aeromonad, i.e. RNA polymerase sigma factor σ^{70} (*rpoD*) or DNA gyrase subunit B (*gyrB*). Consequently, 96 strains were collected from Atlantic salmon (*Salmo salar*), coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*), masou salmon (*Oncorhynchus masou*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), and 36 isolates were identified as the genus *Aeromonas* by 16S rDNA analysis. Thirty six Aeromonad isolates were further analysed based on *rpoD* or *gyrB* gene sequences and found *Aeromonas salmonicida* (24 isolates), *A. sobria* (10 isolates), *A. media* (1 isolates) and *A. popoffii* (1 isolates), indicating that *A. salmonicida* is a main infectious bacteria in Salmonid fishes in Gangwon-Do. It was also proved that the phylogenetic identification of *Aeromonas* species based on the sequences of housekeeping gene is more precise than the 16S rDNA sequence.

Key words: *Aeromonas*, Salmonid, Identification, *rpoD*, 16S rDNA

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

현재 양식현장에서는 어류의 다양한 병원체에 의한 감염성 질병으로 인하여 많은 경제적 손실이 발생하고 있다. 특히 강원도 지역은 무지개송어 (*Oncorhynchus mykiss*), 대서양연어 (*Salmo salar*) 등을 비롯한 연어과 어류가 주요 양식어종이다. 최근 강원도 각 지자체에서 행해지는 송어축제 등 다방면으로 수요가 급증하고 있어 예전에 비하여 송어의 가격이 매우 상승하였다. 또 동해 STF 등의 산업체에서는 대서양 연어와 은연어 (*Oncorhynchus keta*) 등을 새로운 양식어종으로 담수 및 해수 양식을 시도하고 있다. 해양수산부 발표에 따르면, 연어소비량은 2010년 기준 1 만 2000톤에서 2015년 3 만 4000톤으로 5년 새 3배 이상 늘었다. 또한 국내 생산량도 2012년에는 72톤, 2013년에는 219톤, 2014년에는 356톤으로 3년 사이에 5배 정도 증가하였다. 이처럼 국내의 연어 소비량과 생산량은 꾸준히 증가하고 있는 추세이다. 그러나 다른 양식어류와 마찬가지로 연어과 어류에서도 다양한 질병이 발생하고 있으며 이들 어류의 양식생산성을 하락시키는 주요 요인이 되고 있다.

무지개송어 등에서 주로 발생하는 질병으로는 전염성조혈기괴사증과 전염성채장괴사증과 같은 바이러스성 질병과 절창병과 같은 세균성 질병 및 백점병과 같은 기생충성 질병이 있다 (National Institute of Fisheries Science, 2012). 이중 절창병은 *Aeromonas* 감염에 의해 발생하며 폐사가 적게 일어나도 감염에 의한 절창으로 흉터가 생기면 상품가치가 하락하여 경제적인 손실을 끼치게 된다 (Wiklund and Dalsgaard, 1988). 하지만 최근까지 강원도 지역에서 이러한 *Aeromonas* 종의 정확한 발병현황이 알려져 있지 않고 더욱이 *Aeromonas* 속의 중간에 매우 높은 유사성을 나타내어 정확한 종의 구별이 어렵다.

Aeromonas 속은 다양한 어류 중에서 특히 연어과 어류뿐만 아니라 담수 및 해수어류에도 치명적인 감염을 야기하며 적어도 26종 이상이 보고되고 있고 (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2013b; Vega-Sánchez *et al.*, 2014a), 전염병을 유발하는 유비쿼터스 세균이다 (Dallaire-Dufresne *et al.*, 2014; Thenmozhi *et al.*, 2015). *Aeromonas* 속은 비포자형성 그람음성 간균이며, 통성혐기성균으로 알려져 있다 (Martinez-

Murcia *et al.*, 2011). 또한 운동성, 비운동성 그리고 증온성 및 냉수성 종을 포함하고 있으며 일반적으로 옥시다제, 카탈라아제 그리고 글루코즈에서 양성 반응을 일으킨다 (Martinez-Murcia *et al.*, 2011). 특히, *Aeromonas salmonicida*는 출혈성 및 궤양성 질환을 일으키는 절창병의 주요 원인균이며 송어 및 연어과 어류에 영향을 미친다 (Beaz-Hidalgo and Figueras, 2013a; Dallaire-Dufresne *et al.*, 2014). 또한 높은 사망률과 질병발생률을 특징으로 한다 (Janda and Abbott 2010). 정형 *A. salmonicida*는 티로신 또는 페닐알라닌이 첨가된 배지에서 군주가 갈색색소를 생성하므로 이러한 특징을 이용하여 *A. salmonicida*의 군주를 쉽게 식별할 수 있는 것으로 알려져 있다 (Boone *et al.*, 2001; Dallaire-Dufresne *et al.*, 2014). 그러나 최근의 연구에서는 *A. salmonicida* 아종의 경우 갈색색소 생성능에 의한 정형 및 비정형 군주의 분류에 대해서 의견이 분분하다 (Dallaire-Dufresne *et al.*, 2014). 특히, *Aeromonas* 속의 계통 발생 분류는 끊임없이 진화하기 때문에 분류 체계를 확립하기 어렵다고 알려져 있다 (Beaz-Hidalgo and Figueras, 2013a).

그럼에도 불구하고 *Aeromonas* 속의 종 수준에서의 분류를 위해서 몇 가지 접근법들이 시도되고 있지만, 중간 구분은 여전히 복잡하고 새로 기술된 종의 추가로 인해 지속적으로 변하고 있다. 따라서 분자수준에서의 *Aeromonas* 속의 종 분류가 정립되고 있으며 현재 분자 수준에서 미생물의 계통발생학적 분석은 생태계의 미생물 다양성 연구에 중요한 역할을 하고 있다. 특히, 16S rDNA 분석법을 이용한 *Aeromonas* 속 군주들의 동정 방법이 고려될 수 있다. 16S rDNA 유전자는 세포 기능에 있어서 절대적이기 때문에 보존성을 갖고 있으며 따라서 모든 세균 사이의 연관 관계를 밝힐 수 있는 가능성을 가지고 있다고 알려져 있다 (Ko, 2008).

그러나 *Aeromonas* 속의 높은 유전적 유사성으로 인하여 16S rDNA 분석에 의한 종 분류가 힘든 경우가 많은 것으로 보고되고 있다 (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2009). 이러한 경우에 특정 하우스키퍼유전자의 염기서열 분석을 통해 분류학적 위치를 신속하게 결정할 수 있으며 이미 몇몇의 선행연구에서 입증되어 왔다. 이러한 하우스 키퍼유전자는 항상

제 내성 또는 독성 등의 균주 특이적인 특성과는 달리, 세균의 분류 또는 동정에 안정적으로 이용될 수 있다 (Ko, 2008). 또한, 이전 연구에 의하면 *Aeromonas* 종간 구별을 위하여 RNA polymerase factor σ^{70} (*rpoD*) 및 DNA gyrase subunit B (*gyrB*) 유전자에 대해 특이적인 프라이머를 제작하여 동정이 가능하였다 (Martinez-Murcia *et al.*, 2011). 특히, *A. bestiarum*과 *A. salmonicida*는 유전적으로 밀접하게 관련되어 있음에도 불구하고 하우스키퍼 유전자인 *rpoD* 유전자 염기서열 분석에 의하여 계통발생학적으로 명확한 분리 군집을 보여줬으며, 또 *rpoD* 유전자 분석으로 *Aeromonas* 속의 단일 *Aeromonas piscicola* 종을 밝혀내기도 했다 (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2009).

따라서 본 연구에서는 연어과 어류의 *Aeromonas* 발병 현황을 정확히 분석하기 위하여 한국의 강원도 16개 어류 양식장의 연어과 어류에서 *Aeromonas*를 분리하고 16S rDNA의 서열과 하우스키퍼 유전자인 *rpoD* 혹은 *gyrB* 유전자 서열을 기반으로 종 수준에서 동정하였다.

재료 및 방법

시료 채집

Aeromonas 균주를 얻기 위하여 2017년 1월에서 9월 사이에 강원도에 위치한 총 16개의 양식장으로부터 무지개송어, 대서양연어, 은연어, 산천어 (*Oncorhynchus masou masou*)로부터 세균성 질병 증상을 나타내는 어체를 샘플링한 후 아가미, 간, 비장, 전신, 궤양부분을 채취하여 tryptic soy agar (TSA) 배지 (236950, BD, USA) 에 도말한 뒤, 25°C에서 24 시간 배양하였다. 해수에서 분리된 균주는 1% sodium chloride (Usb, USA)가 첨가된 TSA 배지에 배양하였다. 그리고 단일 균주를 순수분리하기 위해 다시 멸균된 백금이를 이용하여 TSA 배지에 계대 배양하여 최종적으로 순수 분리된 균주를 얻었다. 그리고 콜로니 성장과 색소생성 유무를 면밀히 관찰하여 기록하였다. 모든 균은 tryptic soy broth (TSB) 배지에서 24 시간 배양한 뒤 20% glycerol (GLY001.1, Bioshop, Canada)를 첨가하여 stock을 제조하고 -70°C에 보관하였다.

표현형 테스트

분리 균주의 생리학적 및 생화학적 특성 규명을 위해 Gram-stain (B1, YD, Korea)과 API 20E TEST (BioMe'rieux, France)를 실시하였다. Gram-stain은 TSA 배지에 순수 배양된 단일 콜로니를 백금이를 이용하여 슬라이드위에 올려놓고 제조사의 설명서에 따라 진행되었으며, 현미경 (CH30RF200, Olympus, Japan)으로 관찰하였을 때 청자색이면 그람양성균, 적색이면 그람음성균으로 판정하였다. 또 API 20E TEST는 제조사의 설명서에 따라 25±2°C에서 24~48 시간 배양하여 반응 결과를 확인하였다.

PCR 증폭과 프라이머

중합연쇄반응 (Polymerase chain reaction, PCR) 혼합물은 멸균증류수 7.5 µl와 prime Taq DNA Polymerase 1.25 unit, 2X reaction buffer, 4 mM MgCl₂, enzyme stabilizer, sediment, loading dye, 0.5 mM each of dATP, dCTP, dGTP, dTTP가 포함된 Premix 12.5 µl (Genetbio, Korea)와 forward와 reverse primer (10 pmol)를 각 1 µl 씩 첨가한 혼합액에 single colony를 첨가하였고, 멸균증류수를 첨가하여 최종 볼륨은 25 µl로 조정하고, 혼합한 뒤 thermal cycler (Model 2720, Applied Biosystems, USA)를 이용하여 PCR을 실시하였다. 반응 조건은 94°C에서 10 분간 변성시킨 후, 94°C에서 30 초 변성, 55°C에서 30 초간 결합, 72°C에서 1 분간 신장을 35 회 반복하였다. 그 후, 72°C에서 7 분간 최종 신장 단계를 거쳤다. 프라이머의 조합에 따라 생기는 단편의 길이에 맞춰서 신장 시간을 조정하였다. 증폭된 생성물을 확인하기 위해 ethidium bromide가 0.5 µl / mL 농도로 첨가된 1.5% agarose gel에서 0.5 X TAE Buffer (20 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0)를 완충액으로 하여 100V에서 25~30 분간 전기영동한 후 Gel Logic 100 Image system (Kodak, USA)에서 Molecular Imaging Soft version 4.0 (Kodak, USA)으로 최종 산물을 확인하였다. PCR에 사용된 프라이머는 Table 1에 표시하였다.

DNA 정제와 시퀀싱

UV transilluminator 상에서 특이적인 밴드가 확

Table 1. Primers designed for this study

Primer	Target gene	Sequence (5'-3')	Location*	Reference
EUB-F	16S rDNA	ACGCTGGCGGCAGGCCTAACAC	13 ~ 34	This study
EUB-R		ATTACTAGCGATTCCGTCTTC	1309 ~ 1329	
rpoD-F1	RNA polymerase sigma factor	CGTCAATTCCGCCTGATGCC	769 ~ 788	Martinez-Murcia <i>et al.</i> , 2011
rpoD-F2		GAAGGCGAAATCGACATCGC	340 ~ 359	
rpoD-R1		CTCTGCGTTGAGCAGGCCAA	887 ~ 868	
rpoD-R2		ATCAACCGYCGCATGAGCAT	1100 ~ 1081	
gyrB-F1	DNA gyrase subunit B	GGGGTCTACTGCTTCACCAA	793 ~ 812	
gyrB-F2		CATGTCTACGAGCAGACCTA	415 ~ 434	
gyrB-R1		GACGAGTACAACCCGACAA	1460 ~ 1441	
gyrB-R2		GGCAAGATCCTGAACGTGGAG	1362 ~ 1342	

*Following *E. coli* numbering

인된 샘플을 회수 및 정제하기 위해 Expin™ combo kit (GeneAll, Korea)를 사용하여 Gel purification을 진행하였다. 먼저 1.5% agarose gel에서 전기영동과정을 진행하고 gel에 있는 유전자를 수득하기 위해 UV상에서 목적하는 사이즈의 밴드를 cutting하고 1.5 ml 튜브에 넣어주었다. 이후 gel의 3 배 volume 만큼의 GB buffer를 넣고 vortex를 실시하여 gel을 충분히 녹인 다음 column 튜브에 옮겨 담아 원심 분리 (12000 × g, 2 min)를 해주었다. 다음 NW Buffer 500 µl를 넣고 원심 분리 (12000 × g, 2 min)하여 세척하고 빈 튜브 상태를 한 번 더 원심 분리한다. 마지막으로 EB buffer 20 µl (12000 × g, 2 min)를 넣고 원심 분리하여 순수하고 정제된 DNA 조각을 수득하게 된다. 정제된 DNA는 전문 회사에 보내 염기서열분석을 요청하였는데, Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems, USA)와 DNA Engine Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler (BIO-RAD, USA)를 사용하여 PCR 반응을 진행한 후 반응에 참여하지 않은 dNTP와 반응물을 제거하고 ABI 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, USA)에서 시퀀싱 결과를 얻었다 (Macrogen, Korea).

DNA 염기서열 분석

염기서열분석결과를 BioEdit version 7.2.5를 이용하여 증폭된 염기서열이 정확한 Peak를 형성하는지 확인하였다. MEGA7 프로그램의 CLUSTALW 방법으로 multiple sequence alignment를 진행했고

NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA)에 blast search (Megablast)을 통해 GenBank에 등록되어 있는 균주들의 염기서열과 비교하여 동정을 실시하였다.

결과 및 고찰

표현형 분석

36개의 *Aeromonas* 속의 균주는 그람 염색결과 그람음성간균임을 확인했으며, 25℃에서 24 시간 배양하였을 때 TSA 배지에서 콜로니 형상을 관찰할 수 있었다. 앞서 언급한 것처럼 배지에서 갈색색소는 *A. salmonicida*를 쉽게 판별할 수 있는 방법인데 동일하게 본 연구에서 분리된 24개의 *A. salmonicida* 균주 중 23개는 티로신이 첨가된 배지에서 갈색색소를 형성하였다. 그러나 예외로 1개의 균주에서는 이전 연구와 마찬가지로 비정형 *A. salmonicida* 균주는 갈색 색소를 생성하지 않았다 (Abbott *et al.*, 2003). 또 다른 문헌에 의하면 비정형 *A. salmonicida*는 갈색 색소를 약하거나 느리게 생산한다고 보고된바가 있다 (Altmann *et al.*, 1992). 이외의 10개의 *A. sobria* 균주는 약간의 황토색을 띄거나 하얀색 콜로니를 형성하였다. 그 외 각각 *A. popoffii*, *A. media*는 TSA 배지에서 동그랗고 약간의 황토색을 띄었다. API 20E KIT를 이용하여 관찰된 반응결과는 매우 불규칙적인 결과를 나타냈으며, 이전 보고된 연구결과와 유사했다 (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2009; Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010; Yi

et al., 2015). 그리고 포도당에서 가스를 생성 유무의 따라 정형 및 비정형 균주를 구별하는 데 유용하다고 알려져 있다 (Wiklund and Dalsgaard, 1988).

16S rDNA 염기서열 분석

본 연구에서는 강원도의 16개 어류 양식장의 연어과 어류인 무지개송어, 대서양연어, 은연어, 산천어에서 순수 분리된 균주들의 동정을 위해 16S rDNA 유전자를 기반으로 제작한 프라이머를 이용하여 PCR을 실시한 결과 약 1300 bp의 유전자 단편을 확인하였으며 (Fig. 1) 그 결과 분리된 96 균주 중 36 균주가 *Aeromonas* 속의 균주였으며 그 다음으로 *Pseudomonas* 속이 17 균주로 가장 많이 분리되었다 (Table 2). 그 외 비병원성 유산균인 *Carnobacterium* sp. 이나 연쇄구균종의 원인균인 *Lactococcus garvieae* 가 각각 8균주씩 동정되었다. 또

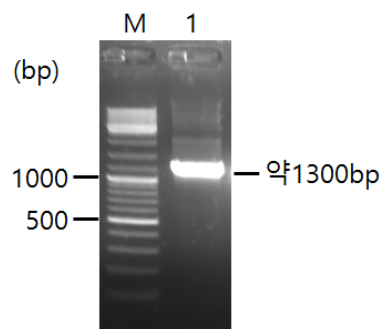


Fig. 1. Electrophoresis results of PCR products amplified using universal primers for 16S rDNA gene. PCR was performed using EUB primer-F (5'- ACGCTGGCGGCA GGCCTAACAC-3') and EUB primer-R (5'- ATTACT AGCGATTCCGTCTTC-3'). Typical PCR product of *A. media* (lane 1) was confirmed with the band size of about 1300 bp. Lane M, DNA marker (GeneRuler, Thermo Scientific, USA).

Table 2. Identification of bacterial strains isolated from salmonid fishes using 16S rDNA sequence analysis

Bacteria	Fish	No. of isolates	Farm*
<i>Aeromonas</i> sp.	Rainbow trout Atlantic salmon Coho salmon	36	A, E, F, H, I, J, N, O
<i>Pseudomonas</i> sp.	Rainbow trout Coho salmon	17	A, C, E, G, N, O
<i>Carnobacterium</i> sp.	Rainbow trout Coho salmon	8	A, N
<i>Lactococcus garvieae</i>	Rainbow trout	8	C
<i>Flavobacterium</i> sp.	Rainbow trout Masou salmon	4	A, N
<i>Acinetobacter</i> sp.	Rainbow trout	4	A, L
<i>Citrobacter</i> sp.	Rainbow trout	4	C, F
<i>Arthrobacter</i> sp.	Rainbow trout	3	A, L
<i>Vibrio</i> sp.	Rainbow trout Coho salmon	3	B
<i>Vibrio anguillarum</i>	Rainbow trout Masou salmon	2	B, D
<i>Bacillus</i> sp.	Rainbow trout Coho salmon	2	G, M
<i>Lactococcus</i> sp.	Rainbow trout	1	N
<i>Acidovorax</i> sp.	Rainbow trout	1	A
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	Rainbow trout	1	K
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	Rainbow trout	1	N
<i>Pantoea</i> sp.	Rainbow trout	1	P

*Bacterial strains were isolated from the 16 farms marked with capital letters

어류에서 아가미부식병을 일으키는 것으로 알려져 있는 *Flavobacterium*속 균주가 분리 되었다. *Vibrio* 속에서 2개의 균주는 *Vibrio anguillarum* 종으로 동정되었지만, 나머지 3개의 균주는 16S rDNA 염기서열 분석으로는 중간 구분이 어려웠다. 다른 문헌에 의하면 몇몇의 변종을 제외하고 *Vibrio anguillarum* 종은 16S rRNA 로 구분이 가능하다고 보고되어 있다 (Wilk *et al.*, 1995). 또 Thompson *et al.*, 2005에 따르면 *Vibrio* 종들의 보다 명확하게 계통발생학적 분석을 위해 *rpoA*, *recA*, *pyrH* 등의 유전자를 고려해야 된다고 보고하고 있다. 그 외 토양 같은 자연환경에 널리 분포하고 있는 *Acinetobacter*속, *Arthrobacter*속 균주가 4개와 3개의 균주로 각각 분리되었고, 장내세균인 *Citrobacter*속 4개 균주가 분리되었다.

rpoD 유전자분석법을 이용한 *Aeromonas* 속의 종 동정

본 연구에서는 16S rDNA 분석에 의해 *Aeromonas* 속으로 판명된 균주의 중간 구분을 위해 *rpoD* 를 기반으로 제작한 프라이머를 이용하여 동정하였으며 *rpoD* 유전자 서열에 의하여 정확한 종의 동정이 안 되는 한 개의 균주에 대해서만 다시 *gyrB* 유전자를 이용하여 종 동정을 실시하였다. 최초 *rpoD* 유전자에 특이적인 프라이머를 이용한 PCR 을 실시한 결과 *rpoD*의 F1과 R1 프라이머 조합의 산물은 약 118 bp로 나타났고, F1과 R2는 약 331 bp, F2와 R1의 프라이머 조합은 약 547 bp으로 나타나 기대했던 크기의 PCR 산물을 확인할 수 있었다 (Fig. 2). 본 연구에서는 *A. salmonicida*와 *A. sobria* 종이 집중적으로 분리되어 이후 실험에서는 집약적으로 나타나는 종의 분리와 PCR 상의 명확하게 단편을 형성하는 F2와 F1 조합의 프라이머를 사용하였다.

rpoD 유전자는 RNA 중합 효소의 특정 개시 부위의 부착을 촉진하고 나서 방출되는 개시 인자이고, *gyrB*는 손상이 적은 상태에서 DNA 토폴로지를 조절하고 염색체를 유지하기 위해 원형 이중가닥 DNA를 슈퍼 코일로 처리하는 타입 II 토포이소머라제로서 항상 발현되는 housekeeping 유전자들이다. 또 multiple sequence alignment를 통해 가장

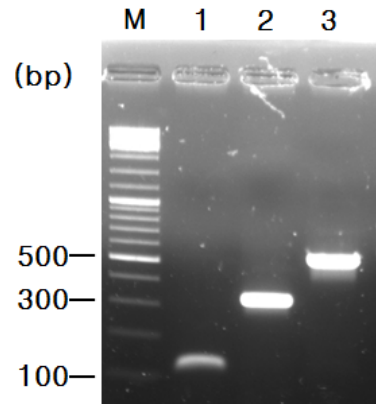


Fig. 2. Electrophoresis results of PCR products amplified using primers for *rpoD* gene of *Aeromonas* species. Lane 1; The combination of *rpoD*-F1 and *rpoD*-R1 is about 118 bp, lane 2; The combination of *rpoD*-F1 and *rpoD*-R2 is about 331 bp, lane 3; The combination of *rpoD*-F2 and *rpoD*-R1 is about 547 bp. Lane M, DNA marker.

conserved 프라이머들을 제작하여 PCR을 실시한 후 염기서열 분석을 통하여 *gyrB*와 *rpoD* 유전자가 계통발생학적관계를 평가하는 우수한 분자 마커임을 입증하였다 (Martinez-Murcia *et al.*, 2005). 이전 연구에 따르면 *Aeromonas* 종의 구별을 위해 이용되는 하우스키퍼의 중간 염기서열 유사성에 있어서 *rpoD* 유전자가 *gyrB* 유전자보다 서열 유사성이 적으므로 *Aeromonas* 속의 중간 분류에 더 적합한 것으로 보고하였다 (Martinez-Murcia *et al.*, 2011). 그러나 *rpoD* 유전자는 *A. allosaccharophila*와 *A. veronii*, *A. lusitana*와 *A. tecta*를 명확히 구별하지 못하는 것으로 나타났다.

본 연구에서는 16S rDNA 분석을 통해 *Aeromonas* 속으로 확인된 36개 균주를 *rpoD* 유전자 염기서열을 분석하여 동정한 결과 *A. salmonicida*가 24 균주로 67%에 달하였으며, 그 뒤로는 *A. sobria*가 10개 균주로서 동정되어 뒤를 이었다 (Table 3). 또 본 연구에서는 1개의 균주는 *rpoD* 유전자를 이용한 종 감별에서 *A. media*와 *A. rivipollensis* 중 정확하게 확정을 할 수 없었는데 이는 이 두 종의 *rpoD* 유전자 염기서열이 매우 유사하기 때문이었다. 따라서 추가적으로 *gyrB* 유전자 염기서열분석을 실시한 결과 *A. media*로 확정되었다 (Table 3). 외국

Table 3. Comparison of 16S rDNA and housekeeping gene analysis for the identification of *Aeromonas* species

16S rDNA	rpoD	gyrB	Fish	No. of isolates	Farm
<i>A.salmonicida</i> <i>A.hydrophila</i> <i>A.bestiarum</i>	<i>A.salmonicida</i>	-	Rainbow trout Atlantic salmon Coho salmon	24	A, H, N
<i>A.sobria</i>	<i>A.sobria</i>	-	Rainbow trout Atlantic salmon	10	A, E, F, H, J, N, O
<i>A.hydrophila</i> <i>A.media</i> <i>A.caviae</i>	<i>A.media</i> , <i>A.rivipollensis</i>	<i>A. media</i>	Rainbow trout	1	A
<i>A.bivalvium</i> <i>A.molluscorum</i> <i>A.enceleia</i> <i>A.salmonicida</i> <i>A.sobria</i> <i>A.veronii</i>	<i>A.popoffii</i>	-	Rainbow trout	1	I

문헌에 의하면 다양한 *Aeromonas* 종들이 보고되고 있으나(Beaz-Hidalgo *et al.*, 2009; Martinez-Murcia *et al.*, 2011; Vega-Sánchez *et al.*, 2014b), 본 연구에서는 제한적인 종의 *Aeromonas* 속의 균주 *A. salmonicida*, *A. sobria*, *A. media*, *A. popoffii*의 단 4종만이 나타났다.

연구결과 *rpoD* 유전자 분석법에 의해 *A. salmonicida*로 최종 판별된 24개의 균주는 16S rDNA 분석에서 *A. salmonicida* 혹은 *A. hydrophila*, *A. bestiarum*인 것으로 나타나 구별할 수 없었으며 이는 이들 종간의 16S rDNA 염기서열의 높은 유사성의 시사한다. 또한 *A. media*와 *A. popoffii*도 16S rDNA 유전자 분석에서 다양한 *Aeromonas* 종과 일치하는 결과를 나타내어 정확한 종을 동정하는 것은 어려웠다. 그러나 *A. sobria*의 경우 16S rDNA 결과와 하우스킵핑유전자를 이용하였을 때 결과가 일치하였고, 이는 Soler 등 (2004)의 보고와도 일치하지만 본 연구에서는 오직 1종에서만 분리하였기 때문에 지속적인 확인이 필요하다. 따라서 연어과 어류에 감염되는 *Aeromonas* 속의 정확한 종 동정은 *rpoD*와 *gyrB* 유전자의 서열을 기반으로 한 *Aeromonas* 종간 구분은 16S rDNA 서열보다 정확한 것으로 나타났다.

계통수 분석

본 연구에서 증폭된 *rpoD*-*gyrB* 유전자 염기서열

을 바탕으로 계통수 분석을 실시한 결과, *A. salmonicida*, *A. sobria*, *A. media* 그리고 *A. popoffii*는 각종 간에 명확한 차이를 나타내고 분리 군집을 형성하였다 (Fig. 3). 또 계통발생학적 관계는 *A. salmonicida*와 *A. popoffii* 과의 중간 유연성이 가장 높았으며, 다음 *A. media* 과 *A. popoffii* 순으로 나타났다. 이러한 결과는 Beaz-Hidalgo 등 (2009)의 이전 연구와 일치한다. 본 연구에서 *gyrB*와 *rpoD* 유전자를 사용하여 확인된 *Aeromonas* 균주는 계통발생학적으로 분리되지 않는 균주는 없었다. 또한 *Aeromonas* 종간 구분을 위해 *dnaJ*, *recA*, *dnaX*, *gyrA* 등의 하우스킵핑유전자가 고려될 수 있으며, 이들 유전자의 종간의 계통발생학적 차이는 각각 다르다고 알려져 있다 (Martinez-Murcia *et al.*, 2011).

요 약

현재 양식장에서는 *Aeromonad*를 비롯한 다양한 병원균에 의한 전염병으로 인해 많은 경제적 손실을 겪고 있다. 연어과 어류뿐만 아니라 담수 및 해수어류에도 치명적인 감염을 야기하는 *Aeromonas* 종은 적어도 26종 이상이 보고되어왔으며, 전염병을 유발하는 유비쿼터스 세균이다. *Aeromonas* 종을 확인하기 위해 16S rDNA 및 하우스 킵핑 유전자의 핵산 서열을 기반으로 한 분자생물학적 기술

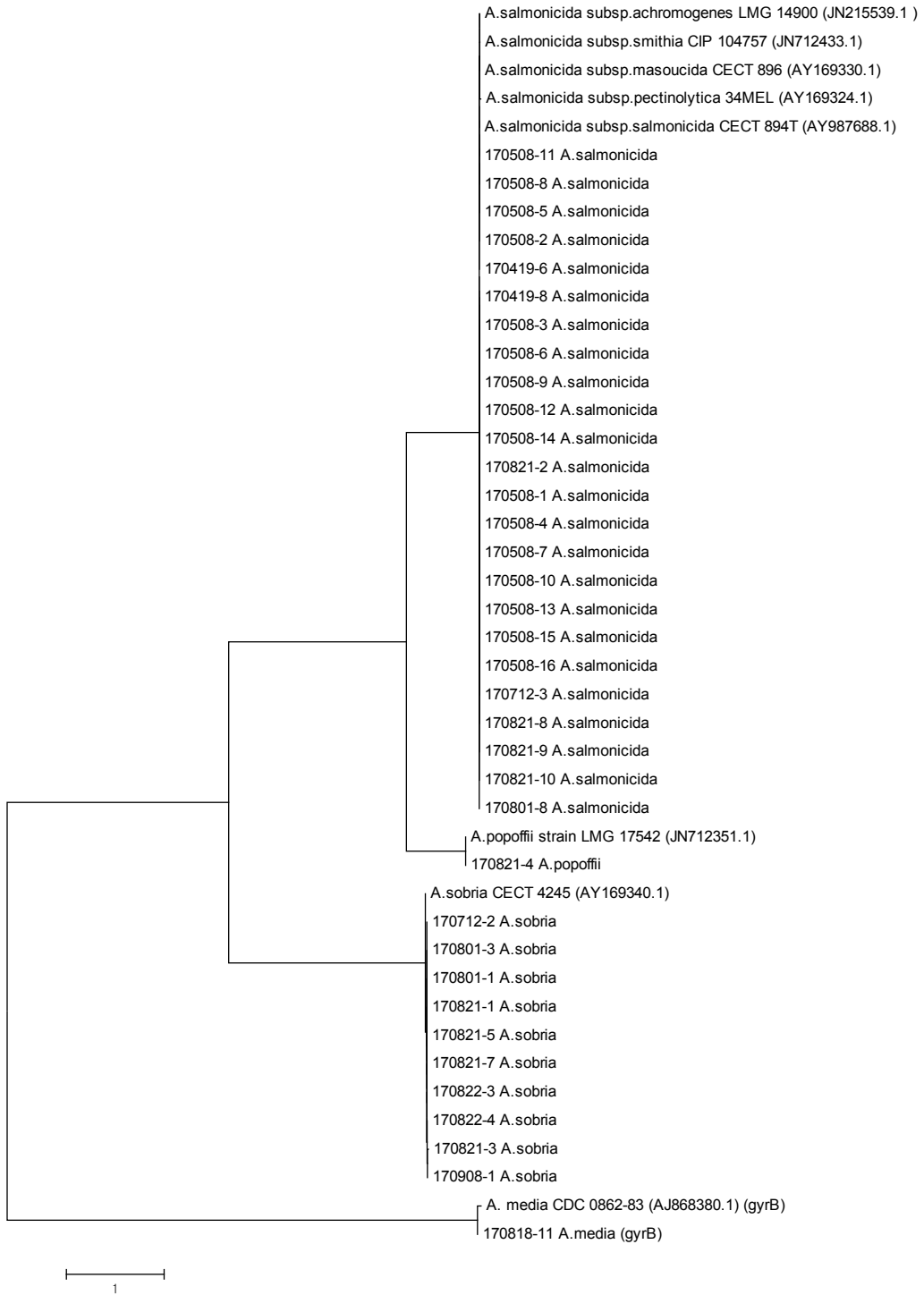


Fig. 3. Phylogenetic analysis of *rpoD* nucleotide sequences (547 bp) performed by the unrooted neighbor joining method using CLUSTAL X software (Verse 1.6). *A. media* was analyzed with the *gyrB* nucleotide sequence (549 bp).

이 사용될 수 있다. 본 연구에서 *Aeromonas* 종은 강원도 16개 양식장의 연어과 어류로부터 분리되었으며 *Aeromonas*의 16S rDNA와 하우스 키팅 유전자의 서열, 즉 RNA polymerase sigma factor $\sigma 70$ (*rpoD*) 또는 DNA gyrase subunit B (*gyrB*)를 기반으로 계통 발생 학적으로 동정했다. 그 결과 대서양 연어 (*Salmo salar*), 은연어 (*Oncorhynchus keta*), 산천어 (*Oncorhynchus masou masou*), 무지개송어 (*Oncorhynchus mykiss*)에서 96 개의 균주가 수집되었으며, 36개의 균주가 16S rDNA 분석에 의해 *Aeromonas* 속으로 확인되었다. 확인된 *Aeromonas* 속 균주는 *rpoD* 또는 *gyrB* 유전자 서열을 기반으로 추가 분석되어 *Aeromonas salmonicida* (24 균주), *A. sobria* (10 균주), *A. media* (1 균주) 및 *A. popoffii* (1 균주)로 검출되었으며, 이 것은 *Aeromonas salmonicida*가 강원도의 연어과 어류에서 주요 감염 균임을 나타낸다. 또 하우스 키팅 유전자의 서열에 기초한 *Aeromonas* 종의 계통발생학적 동정은 16S rDNA 서열보다 더 정확하다는 것이 또한 증명되었다.

감사의 글

본 연구는 해양수산부가 지원하는 강원씨그랜트사업에 의해 이루어진 것이며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Abbott, S., Cheung, L., Wendy, K. W., Michael J. J.: The Genus *Aeromonas*: Biochemical Characteristics, Atypical Reactions, and Phenotypic Identification Schemes, J. Clin. Microbiol. 41(6): 2348-2357, 2003
- Beaz-Hidalgo, R., Alperi, A., Buján, N., Romalde, J. L., Figueras, M. J.: Comparison of phenotypical and genetic identification of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish. Syst. Appl. Microbiol. 33(3): 149-153, 2010.
- Beaz-Hidalgo, R., Alperi, A., Figueras, M. J., Romalde, J. L.: *Aeromonas piscicola* sp. nov., isolated from diseased fish. Syst. Appl. Microbiol. 32(7): 471-479, 2009.
- Beaz-Hidalgo, R., Figueras, M. J.: *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease. J. Fish Dis. 36: 371-388 2013a.
- Beaz-Hidalgo R., Martínez-Murcia A., Figueras M. J.: Reclassification of *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* Huys et al. 2002 and *Aeromonas aquariorum* Martínez-Murcia et al. 2008 as *Aeromonas dhakensis* sp. nov. comb nov. and emendation of the species *Aeromonas hydrophila*. Syst. Appl. Microbiol. 36(3): 171-6, 2013b.
- Boone, D. R., Castenholz, R. W., Garrity, G. M.: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. vol.1 2nd., George M. Garrity, Springer, New York, 2001.
- Dallaire-Dufresne, S., Tanaka, K. H., Trudel, M. V., Lafaille, A., Charette, S. J.: Virulence, genomic features, and plasticity of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, the causative agent of fish furunculosis. Veterinary Microbiology. 169(1-2): 1-7, 2014.
- Janda, J. M., Abbott, S. L.: The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. Clin. Microbiol. 23: 35-73, 2010.
- Altmann, K., Marshall, M., Nicholson, S.E., Hanna, P.J., Gudkovs, N.: Glucose repression of pigment production in atypical isolates of *Aeromonas salmonicida* responsible for goldfish ulcer disease. Microbios. 72: 215-220, 1992.
- Martinez-Murcia, A. J., Soler, L., Saavedra, M. R., Chacon, M. R., Guarro, J., Stackebrandt, E., Figueras, M. J.: Phenotypic, genotypic, and phylogenetic discrepancies to differentiate *Aeromonas salmonicida* from *Aeromonas bestiarum*, International Microbiology. 8: 259-269, 2005.
- Martinez-Murcia, A. J., Monera, A., Saavedra, M. J., Oncina, R., Lopez-Alvarez, M., Lara, E., Figueras, M. J.: Multilocus phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas*. Syst. Appl. Microbiol. 34(3): 189-199, 2011.
- Soler, L., Yáñez, M. A., Chacon, M. R., Aguilera-Arreola, M. G., Catalán, V., Figueras, M. J., Martínez-Murcia, A. J.: Phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas* based on two housekeeping genes. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 1511-519, 2004.
- Thompson, F. L., Gevers, D., Thompson, C. C., Dawyndt, P., Naser, S., Hoste, B., Munn, C. B., wings, J.: Phylogeny and Molecular Identification of *Vibrios* on the Basis of Multilocus Sequence Analysis. Appl. Environ. Microbiol. 71(9): 5107-5115, 2005
- Thenmozhi, S., Vijayalajshmi, P., Moorthy, K., Sureshkumar, B. T.: Virulence and molecular character-

- zation of *Aeromonas* spp. from fish samples using ARDRA technique. Int J Pharm Bio Sci 6(1): 593-603, 2015.
- Vega-Sánchez, V., Acosta-Dibarrat, J., Vega-Castillo, F., Castro-Escarpulli, G., Aguilera-Arreola, M. J. G., Soriano-Vargas, E.: Phenotypical characteristics, genetic identification, and antimicrobial sensitivity of *Aeromonas* species isolated from farmed rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) in Mexico. Acta Tropica 130: 76-79, 2014a.
- Vega-Sánchez, V., Latif-Eugenín, F., Soriano-Vargas, E., Beaz-Hidalgo, R., José Figueras, M., Aguilera-Arreola M. J., Castro-Escarpulli, G.: Re-identification of *Aeromonas* isolates from rainbow trout and incidence of class 1 integron and β -lactamase genes. Veterinary Microbiology 172(3-4): 528-533 2014b.
- Wilk, R., Stackebrandt, E., Valle, O., Daae, F. I., Rddsth, O. M., Andersen, K.: Classification of Fish-Pathogenic Comparative 16S rRNA Vibrios Based on Analysis. Int. J. Syst. Bacteriol. 45(3): 421-428, 1995.
- Wiklund, T., Dalsgaard, I.: Occurrence and significance of atypical *Aeromonas salmonicida* in non-salmonid and salmonid fish species. Dis Aquat Organ. 32: 49-69, 1988.
- Yi W., T., Sissman, M., Liu, D., Poxton, I., Schwartzman, J.: Molecular Medical microbiology. pp. 1099-1109, 2ed., Academic Press, New York, 2015.
- 고관수: 미동정 균주의 염기서열 분석을 이용한 동정.: Infect. Chemother. 40(2), 2008.
- 국립수산물과학원: 어류질병 현장 가이드북. 바이오사이언스출판, 2012.

Manuscript Received : Nov 14, 2017

Revised : Dec 5, 2017

Accepted : Dec 5, 2017