

어류병원성 *Edwardsiella* spp.의 2010년 이전 분리균의 재분류와 특성

김 은 희

전남대학교 수산생명의학과

Reclassification of fish pathogenic *Edwardsiella* spp. isolated before 2010 and their characteristics

Eunheui Kim

Department of Aqualife Medicine, Chonnam National University, Yeosu 59626, Korea

Edwardsiella piscicida previously identified as *E. tarda* is an important pathogen of numerous fish species. In this study, reclassification was conducted on 17 strains isolated from diseased cultured olive flounder or eel and identified as *E. tarda* between 1996 and 2010 in Korea. For this, the detection of a polymerase chain reaction (PCR) amplicon by species-specific primers and phylogenetic analysis based on *gyrB* sequences were performed. And, nucleotide sequences of three amplicons detected in RAPD profile of the isolates originated from eel and the antimicrobial susceptibility were compared. Only 17 isolates formed an amplicon in PCR using *E. piscicida* primer. The *gyrB* of the 17 isolates diverged with those of the *E. piscicida* reference strains in a phylogenetic tree constructed with MEGA11 software. Regions matching the nucleotide sequences of the RAPD amplicons were identified in *Edwardsiella* phage GF-2, *E. piscicida* plasmid pEPMS-18199 and *E. anguillarum* ET080813 plasmid 1. The antimicrobial susceptibility of the isolates originated from flounder showed non-wild type (NWT) for doxycycline, oxytetracycline, and tetracycline, and only isolates derived from eel were NWT for oxolinic acid and flumequine. These results confirmed that all 17 isolates of this study classified as *E. piscicida*, and that the characteristics of the isolates showed differences depending on the isolate's host.

Key words: *gyrB*, *E. piscicida*, Phylogenetic tree, Reclassification

서 론

*Edwardsiella*속 세균은 최근 유전 정보와 계통분류학적 연구 결과에 근거하여 5종, *E. piscicida*, *E. anguillarum*, *E. ictaluri*, *E. tarda*, *E. hoshinae*로 구분

하고 있다(Buján *et al.*, 2018a). 이들 중 *E. piscicida*는 특히 담수와 해수의 주요 양식 어종에서 에드워드병을 일으키는 원인균으로서 많은 경제적 손실을 가져오는 것으로 알려져 있다(Buján *et al.*, 2018c; Leung *et al.*, 2019). 그러나 Abayneh *et al.* (2013)의 보고 이전에는 대부분 양식 어류의 에드워드증 원인 세균을 *E. tarda*로 동정하였으므로 이에 대한 재검토가 필요하게 되었다(Buján *et al.*,

†Corresponding author: Eunheui Kim
Tel: +82-61-659-7171, Fax: +82-61-659-7179
E-mail: ehkim@jnu.ac.kr

2018b). 따라서 우리나라 양식 어류의 에드워드증 원인균도 대부분 *E. piscicida*로 보고되거나 재동정 과정을 거쳐 *E. piscicida*로 분류 되고 있다(Dubey *et al.*, 2019; Jang *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2022).

그동안 원핵생물의 종 구분을 위한 marker gene 으로 사용했던 16S rRNA 유전자는 밀접하게 연관 되어 있는 세균 종을 분명하게 구분하지 못하는 문제가 있었다. Gyrase subunit B 유전자(*gyrB*)는 single-copy gene이며 DNA gyrase의 ATPase 기능을 갖는 부분으로 유전적으로 잘 보존된 영역을 가지고 있어 생물의 종 동정 및 계통 분류학적 연구를 위해 필요한 PCR primers 개발에 많이 이용되었다(Huang, 1996). Reichley *et al.* (2017)은 생화학적 특성이 매우 유사한 *Edwardsiella* 속 세균 5종에 대하여 16S rRNA, *gyrB*, superoxide dismutase 유전자(*sodB*) 염기서열에 근거하여 계통 분류를 실시하였다. 그 결과 16S rRNA는 종내 또는 종간의 유사도가 모두 99% 이상으로 나타나는 반면, *gyrB*와 *sodB*는 종 내에서의 유사도는 99% 이상이나 종간에는 *gyrB*가 84.02%~95.88%, *sodB*는 83.95%~97.16%로 나타나 종간 구분을 위해 16S rRNA 유전자 보다 *gyrB*나 *sodB* 유전자가 더욱 유용함을 보고하였다. 또한 *E. anguillarum*, *E. piscicida*, *E. tarda*를 구분함에 있어서는 *sodB* 보다 *gyrB*가 다소 더 민감하다는 것을 이 결과는 제시하고 있다. 따라서 *gyrB*는 밀접하게 연관된 종들을 더 정확하게 구분하는 것을 가능하게 함으로써 *Edwardsiella*속 세균의 계통분류학적 분석을 위한 gene marker로 유용하게 사용되어 왔다(Reichley *et al.*, 2017; Dubey *et al.*, 2019).

1996년과 2010년 사이에 우리나라 양식 넙치와 뱀장어에서 분리된 본 연구의 시험균들은 형태학적 특성과 생화학적 특성을 근거로 동정하였을 때 *E. tarda*로 분류되었고, Sakai *et al.* (2009)의 *E. tarda*-specific primers를 사용한 PCR에서 motile typical *E. tarda*와 일치하였다. 그러나 이 분리균들에 대한 이전 연구에서 random amplified polymorphic DNA (RAPD) profiles에 근거하여 다양성을 검토한 결과 3 groups으로 구분할 수 있었으며 분리균들은 *E. tarda* type strain (KCTC 12267)과는 다소 다른 RAPD profile을 보인다고 보고하였다(Kim, 2021).

따라서 본 연구에서는 이들 *Edwardsiella* 분리균의 *gyrB* 염기 서열을 분석하여 분류학적 위치를 재검토하고, 항균제 감수성 특성과 RAPD PCR에서 amplicons의 차이를 가져오는 특성에 대하여 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

실험균주와 template DNA 준비

본 연구에 사용된 *Edwardsiella* spp.는 1996년부터 2010년 사이에 양식 넙치 병어에서 분리한 11 균주와 뱀장어 병어에서 분리한 6 균주이다(Kim, 2021). 그리고 생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures, KCTC)로 부터 분양 받은 *E. tarda* (KCTC 12267)와 *E. ictaluri* (KCTC 12264)를 비교 균주로 사용하였다. 유전자 분석을 위한 template DNA를 분리하기 위해 1% NaCl이 첨가된 tryptic soy broth (TSB) (BD, USA)에서 분리균을 30°C로 24시간 배양하였다. 배양 균액은 8000 rpm으로 5분간 원심 분리하여 상층의 배지 성분을 제거하고 멸균증류수를 이용하여 McFarland No.5 (1.5×10^9 CFU/ml)의 농도로 조정 후 AccuPrep Genomic DNA extraction kit (Bioneer, Korea)를 사용하여 DNA를 분리하였다.

Species-specific primers를 이용한 *Edwardsiella* 종 확인

*E. tarda*의 template DNA 1 μ l와 Griffin *et al.* (2014)이 보고한 ET (*E. tarda*), EP (*E. piscicida*), EPL (*E. piscicida*-like)과 ESC (*E. ictaluri*)의 primers 1 μ l를 각각 20 μ l의 PCR premix (BiONEER, Korea)와 반응시켜 thermal cycler (MyGenie96, BiONEER, Korea)로 PCR을 수행하였다(Table 1). 생성된 products는 RedSafe (iNtRon, Korea) 0.5 ppm을 포함하는 2% agarose gel (Bio-Rad, USA)로 1×TAE (tris-acetate-EDTA) buffer에서 전기 영동하여 UV trans-illuminator (WUV-L20, DaiHan, Korea) 상에서 amplicons의 크기를 확인하였다.

PCR로 *gyrB* 부위 검출

Edwardsiella 분리균에서 *gyrB* 부분을 증폭시키

Table 1. Primers used for the detection of species-specific amplicons (Griffin *et al.*, 2014)

Primer		Sequence(5'-3')	Amplicon (bp)
<i>Edwardsiella tarda</i>	ETF	CAGTGATAAAAAGGGGTGGA	114
	ETR	CTACACAGCAACGACAACG	
<i>E. piscicida</i>	EPF	CTTTGATCATGGTTGCGGAA	130
	EPR	CGGCGTTTTCTTTTCTCG	
<i>E. piscicida</i> -like	EPLF	TTTGATCGGGTACGCTGT	128
	EPLR	AATTGCTCTATACGCACGC	
<i>E. ictaluri</i>	ESCF2	ACTTATCGCCCTCGCAAC	129
	ESCR2	GCCTCTGATAAGTGTTCTCG	

PCR conditions : 95°C for 5 min, 35 cycles (95°C for 15 sec, 58°C for 15 sec, 72°C for 15 sec), final extension step (72°C for 5 min)

기 위해 Griffin *et al.* (2014) 이 설계한 primers, GyrB 630F (GGATAACGCGATTGACGAAG)와 GyrB 2540R (GCCGTGARCAAARTCRAA) 조합을 사용하였다. Template DNA 0.5 μ l(약 5 ng)와 각각의 primer 0.5 μ l(10 pmol)를 PCR premix (BiONEER, Korea)에 넣어 반응시킨 후 thermal cycler (MyGenie96)로 PCR을 수행하였다. PCR은 initial denaturation (95°C, 5 min) 실시 후, denaturation (95°C, 15 sec.), annealing (58°C, 15 sec.), extension (72°C, 15 sec.) cycle을 35회 수행하였으며 final extension (72°C, 5 min)을 추가로 실시하였다. 생성된 PCR products는 RedSafe 0.5 ppm을 포함하는 1.5% agarose gel로 1×TAE buffer에서 전기 영동하여 약 1800 bps 위치의 band로 확인하였다.

RAPD PCR의 amplicons 분리

분리균의 RAPD 분석을 보고한 이전 연구 결과에서(Kim, 2021) PCR profiles에 차이가 있었던 बै장어 분리균의 amplicons에 대한 염기 서열을 알아보기 위하여 E97-1과 E09-2에 대하여 RAPD primers 5와 6(Cytiva, USA)으로 이전 연구(Kim, 2021)의 조건과 동일하게 RAPD PCR을 실시하였다. PCR 산물을 각각 20 μ l씩 gel에 loading하여 저전압 (약 30-40 volt)으로 전기영동을 실시하였다. Long wave UV illuminator (365 nm)로 각각의 amplicon이 잘 분리된 것을 확인한 후 band를 gel 조각으로 잘라내어(R1, R2, R3 in reference figure of Table 4) 무게를 측정한 후 정제하였다.

DNA 정제와 염기서열 분석

Gel 조각들과 PCR 산물은 Gel & PCR purification kit (Accuprep™, BioNEER, Korea)를 사용하여 제조사의 설명서에 따라 정제하였다. 정제된 PCR 산물의 염기서열은 Bioneer에 의뢰하여 얻었으며 미국 국립생물정보센터 (NCBI, National Center for Biotechnology Information)의 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)를 이용하여 Genbank database의 염기서열과 비교하였다. 분리균들의 분류학적 위치를 알아보기 위하여 *Edwardsiella* 속 세균들의 gyrB 염기서열들을 내려 받아(Table 2) BioEdit 7.2. (<https://bioedit.software.informer.com/7.2/>)를 사용하여 multiple alignment를 수행하였다. 이렇게 정렬된 DNA 염기서열 매트릭스를 대상으로 MEGA11 (<https://www.megasoftware.net>) program을 이용하여 근린접합법으로(Neighbor joining method) 분류진화학적 분석을 실시하였다. 계통수는 Kimura 2-parameter를 적용하여 작성하였으며 각 분지의 지지도는 1,000회 replication을 적용한 bootstrap 분석으로 구하였다.

항균제 감수성 조사

분리균의 항균제에 대한 감수성 시험 방법과 결과 판단은 수산용항생제 감수성 검사 메뉴얼(NIFS, 2020)의 paper disc method를 따랐다. 시험균을 1% NaCl이 첨가된 tryptic soy agar (BD, USA) 배지로 30°C에서 24시간 배양한 후, 2-3개의 독립된 집락을 분리하여 TSB 배지에 현탁하여 0.5 McFarland

Table 2. Origin of *Edwardsiella* reference strains used for comparisons of *gyrB* sequences and their GenBank accession numbers

Strain	Origin (Host, Country, Isolation year)	Reference	GenBank accession number
<i>E. piscicida</i> ET883 ^T	European eel (<i>Anguilla anguilla</i>), Norway, 1989	Abayneh <i>et al.</i> , 2013	JRGQ10000050.1
<i>E. anguillarum</i> ET080813 ^T	Japanese eel (<i>A. japonica</i>), China, 2008	Shao <i>et al.</i> , 2015	CP006664.1
<i>E. ictaluri</i> ATCC 33202 ^T	Channel catfish (<i>Ictalurus punctatus</i>), USA	Hawke <i>et al.</i> , 1981	AFJ11000008.1
<i>E. tarda</i> ATCC 15947 ^T	Human (<i>Homo sapience</i>), USA	Ewing <i>et al.</i> , 1965	CP084506.1
<i>E. piscicida</i> CK41	Olive flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>), Korea, 2011	Baek <i>et al.</i> , 2020	CP047671.1
<i>E. piscicida</i> KE5	Olive flounder (<i>P. olivaceus</i>), Korea, 1999	Kim <i>et al.</i> , 2022	CP090967.1
<i>E. piscicida</i> LADL97-168	Channel catfish (<i>I. punctatus</i>), USA, 1997		CP084514.1
<i>E. piscicida</i> CZ12001	Catfish (<i>Silurus asotus</i>), Korea, 2012	Kim <i>et al.</i> , 2022	CP090962.1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KAM260	out group		AP023264.1

의 탁도로 조정하였다. 멸균 면봉을 이용하여 Mueller-Hinton agar 배지 전체에 균액을 도말하고 항균제 disc를 올린 후 30°C에 24~28시간 배양하여 디스크 주변에 세균 생장이 억제된 영역의 지름을 측정하였다. 항균제 disc는 본 매뉴얼에 감수성 검사 대상 항생제로 제시되어 있는 것 중, ampicillin (AM), amoxicillin/clavulanic acid (AmC), doxycycline (DO), florfenicol (FF), flumequine (UB), oxolinic acid (OA), tetracycline (TE)과 양식 현장에서 사용 빈도가 높은 oxytetracycline (OT)을 사용하였으며 disc는 모두 BD-BBL사(USA)에서 구입하였다. 항생제 감수성 패턴의 비야생형(Non-wild type, NWT) 여부는 *Edwardsiella*속 어류 병원세균에 대하여 normalized resistance interpretation (NRI) 분석을 실시하여 얻은 wild type cut-off (COwt) 값을 참고하여 결정하였고, COwt 값이 제시되지 않은 TE는 생장억제대가 형성되지 않은 것을 NWT로 결정하였다(Lim *et al.*, 2016; Chun, 2019).

결과 및 고찰

종 특이 primers를 이용한 PCR 결과

Edwardsiella spp.에 대하여 species-specific primers를 이용하여 PCR을 수행한 결과, 17 분리균과

E. tarda, *E. ictaluri* type strain은 각각 다른 amplicon을 형성하였다(Table 3). 이전 연구에서 Sakai *et al.* (2009)이 제안한 정형 *E. tarda* (motile) 특이 primers (EDtT-F, EDtT-R)로 PCR을 수행한 결과, 분리균에서만 약 270 bps의 동일한 크기의 amplicons이 검출되었고 *E. tarda* 표준 균주에서는 amplicon이 형성되지 않았음을 보고한 바 있다(Kim, 2021). Griffin *et al.* (2014)이 보고한 ET, EP, EPL 그리고 ESC primers로 실시한 PCR에서 EP primers로는 17 분리균에서만 amplicons이 형성되었고 ET primers로는 *E. tarda* type strain에서만 amplicons이 형성되었다. 이와 같은 결과는 Griffin *et al.* (2014)이 Sakai *et al.* (2009)의 *E. tarda*-specific primers (ETT=EDtT)로 검출한 균주들이 실제 Abayneh *et al.* (2013)이 *E. piscicida*로 명명한 균주와 일치한다고 한 보고와 같다. 따라서 *E. tarda*로 동정하였던 본 연구의 17 분리균도 모두 *E. piscicida*로 볼 수 있다.

gyrB 염기서열 분석

1996부터 2010년 사이에 분리된 *Edwardsiella*속 17 분리주의 *gyrB* 유전자 영역에 대한 PCR 결과 모든 분리균에서 약 1800 bps의 amplicons이 균일하게 나타났으며 염기 서열을 다중 배열한 결과, 분석된 곳의 서열 상동성은 99.9% 이상으로 나타

Table 3. Results of species-specific PCR

<i>Edwardsiella</i> spp. isolate	Primer*			
	ET	EP	EPL	ESC
F96-1, F96-2	-	+	-	-
F97-2, F97-3	-	+	-	-
F98-1, F98-2	-	+	-	-
F00-1	-	+	-	-
F02-1, F02-2, F02-3, F02-4	-	+	-	-
E97-1, E97-2, E97-3	-	+	-	-
E09-1, E09-2, E09-3	-	+	-	-
<i>E. tarda</i> KCTC 12267(= ATCC 15947 ^T)	+	-	-	-
<i>E. ictaluri</i> KCTC 12264(=ATCC 33202 ^T)	-	-	-	+

*Primer abbreviations: ET, *E. tarda*; EP, *E. piscicida*; EPL, *E. piscicida*-like species; ESC, *E. ictaluri* (Griffin *et al.*, 2014).

나 이들 *gyrB* 유전자 사이의 다양성은 높지 않을 것으로 판단되었다(data not shown). *gyrB* 염기 서열에 근거하여 얻은 phylogenetic tree (Fig. 1)에서, 본 연구의 17 분리군들은 *E. piscicida* type strain인 *E. tarda* ET883과 기타 *E. piscicida* 참고군들과 함께 99%, *E. piscicida* CZ12001 (Table 2)를 포함해서는 100% bootstrapping으로 지지되는 하나의 잘 분리된 계통 분기를 형성하였으며, *E. tarda*, *E. ictaluri*, 그리고 *E. anguillarum*의 type strain들과는 구분되었다. 이로써 본 연구의 17 분리군은 기존에 동정되었던 *E. tarda*와는 완전히 분리되는 clade로 진화하였으며 이들 모두 *E. piscicida*로 분류할 수 있었다. 또한 17 분리군들의 subtree topology에서 넙치 유래군과 뱀장어 유래군이 서로 다른 진화그룹을 형성하고 있었는데 이는 RAPD profile 분석에서 나타난 결과와 일치하였다.

RAPD amplicons의 염기서열 분석

뱀장어 분리군, E09-2에 대하여 primer 5로 실시한 RAPD patterns에서 나타나는 R1 amplicon(약 350 bp)의 염기서열을 분석한 결과(GenBank accession number OQ679871, OQ679872) *Edwardsiella* phage GF-2 DNA 서열(Genebank accession number AP014629.1)에서 100% 일치하는 영역이 발견되었다. 이는 기능이 확인되지 않은 단백질로서 "GF-2_ORF-37"와 "GF-2_ORF-38"의 partial sequences로 확인되었다(Table 4).

Edwardsiella phage GF-2는 integrase와 같은 용원성 관련 유전자를 가지고 있는 용원성 파아지로서, tail fiber 단백질(receptor binding protein, RBP)의 C-terminal 영역이 숙주 특이성을 결정짓는 한 요인으로 보고되었다(Yasuike *et al.*, 2015). 이러한 숙주 특이성을 결정하는 파아지 유전자를 이용하면 host인 *Edwardsiella*의 역학적 모니터링이 가능할 것임을 Yasuike *et al.* (2015)은 제안하고 있다.

오랫동안 어류의 세균성 질병 치료를 위해 다양한 항균제를 사용해 오며 따라 다약제내성균주(multiple drug resistance strain)의 출현과 함께 항생제의 어체 잔류와 같은 공중보건상의 문제가 발생될 수 있어 lytic-bacteriophage를 이용한 phage-therapy에 대한 관심이 높아졌다(Oliveira *et al.*, 2012). *Edwardsiella* phage에 대한 관심 역시 에드워드병 치료를 위해 사용되는 항균제의 대체제 개발 연구로 연결되었다(Nakai and Park, 2002). Matsuoka and Nakai (2004)는 넙치 양식장에서 *E. tarda*와 bacteriophage(=phage)의 계절적 변동을 조사한 연구에서 적어도 질병 발생 한 달보다 훨씬 전부터 사육수에서 *E. tarda* phage가 검출되는데, 이는 사육수에 *E. tarda*가 있다는 것을 의미하므로 양식장 사육수에서 주기적으로 *Edwardsiella* phage를 검출함으로써 에드워드병 발생의 사전 예측이 가능하다고 보고하였다. 이들은 또한 *E. tarda*에 감염되는 많은 phages를 양식장의 해수나 어류 조직으로부터 분리하였다. 이 중 3종류의 *E. tarda*-lytic phages (MSW-

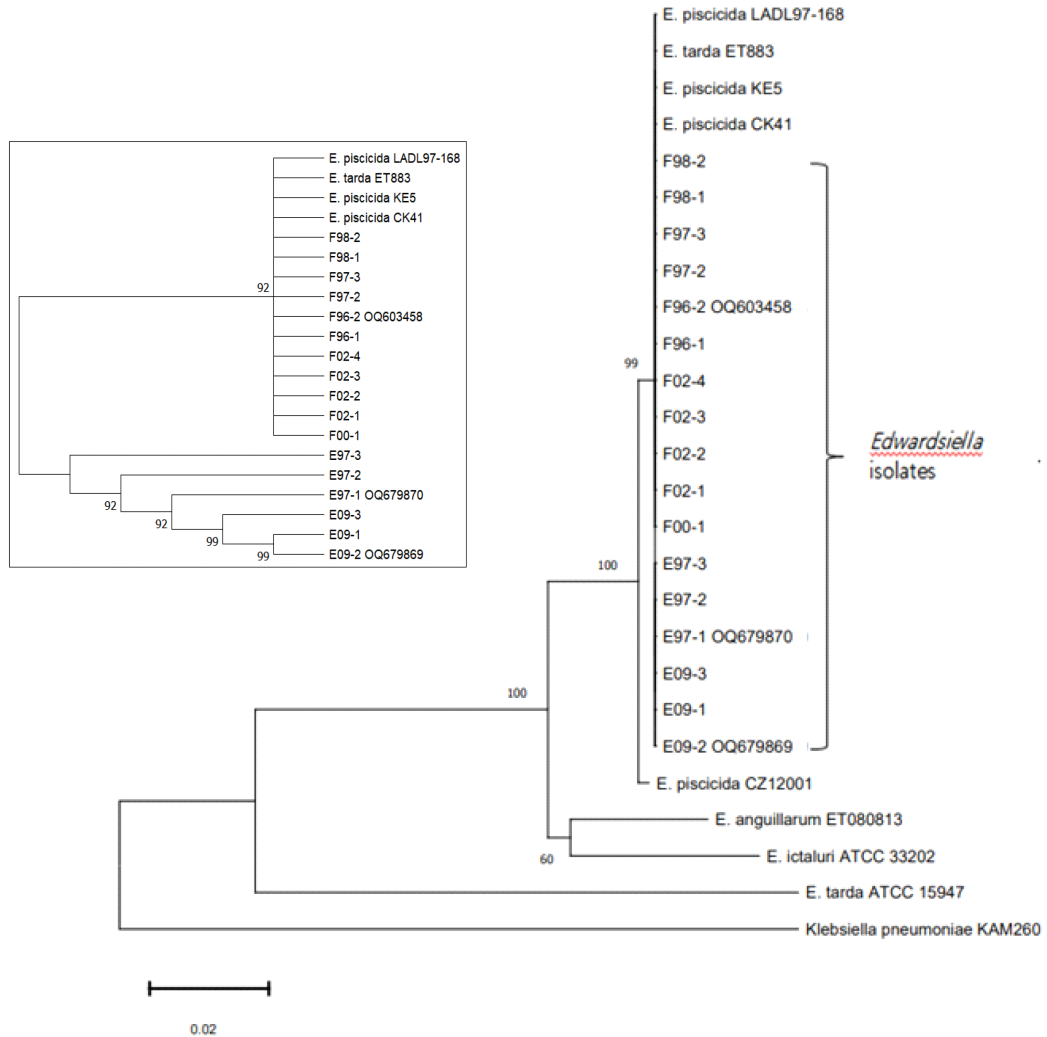


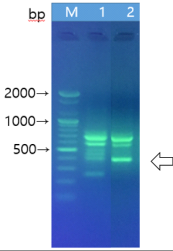
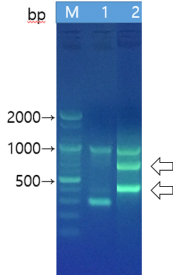
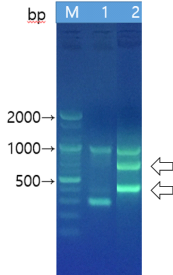
Fig. 1. Phylogenetic tree constructed using the Neighbor-Joining method with DNA gyrase subunit B gene (*gyrB*) sequences of reference strains obtained from GeneBank and those of *Edwardsiella* isolates from *Paralichthys olivaceus* and common eel. *Klebsiella pneumoniae* KAM260 was used as outgroup. The evolutionary distances were computed using the Kimura 2-parameter method. Bootstrap values based on 1,000 replications are shown next to the branches. Evolutionary analysis were conducted in MEGA11 (Tamura *et al.*, 2021). The picture inside the square box is the topology of the subtree.

3, family Myoviridae; KF-1 and IW-1, family Podoviridae)는 에드워드병 치료 및 예방을 위해 사용가능한지 검토하기 위하여 유전체 분석을 통한 특성 파악이 이루어졌다(Yasuike *et al.*, 2013a, b).

에드워드병 예방이나 치료를 위해 phage를 이용하려면 lytic phage와 숙주와의 상호 작용(phage-host interaction)에 대한 이해가 필요하다. MSW-3

은 숙주 범위가 협소하여 비정형 *E. tarda*에 특이적으로 감염되는 반면, KF-1과 IW-1는 넓은 숙주 범위를 가지고 있어 정형과 비정형 *E. tarda*에 모두 감염되는데, 본 연구에서 일부 염기서열이 검출된 GF-2 phage는 형태적으로는 MSW-3와 유사한 소형 Myoviridae이나 MSW-3보다 훨씬 넓은 숙주 범위를 갖는 것으로 밝혀졌다(Yasuike *et al.*, 2015).

Table 4. Reference sequences showing high homology in BLAST searching of RAPD amplicon of R1 in E09-2, and R2 and R3 in E97-1

Amplicon		Reference sequence (Acc. Num.)	Host	E-value	% identity
	R1	NC026611.1	<i>Edwardsiella</i> phage GF-2	1e-170	100
		AP014629.1	<i>Edwardsiella</i> phage GF-2	1e-170	100
		CP084425.1	<i>E. piscicida</i> S07-1019	3e-152	96.7
	R2	CP035669.1	<i>E. piscicida</i> MS-18-199 plasmid pEP-MS-18-199	3e-142	99.3
		CP006665.1	<i>E. anguillarum</i> ET080813 plasmid 1	3e-142	99.3
	R3	CP035669.1	<i>E. piscicida</i> MS-18-199 plasmid pEP-MS-18-199	0	100
		CP006665.1	<i>E. anguillarum</i> ET080813 plasmid 1	0	100

*1 and 2 of the electrophoretic profile is bacterium isolated from olive flounder and eel, respectively.

또한 Yasuike *et al.* (2015)은 전체 유전자 분석을 통해 GF-2에서 *Edwardsiella*-lytic phage에는 없는 용원성 관련 유전자들(lysogeny-related gene; integrase, repressor CI, regulatory protein CII and anti-repressors)을 확인 하였다. 따라서 GF-2는 어류의 에드워드스병 치료를 위한 phage therapy로는 적합하지 않으나, *Edwardsiella*속 세균 내에 공존하면서 증식하므로 병원체 생태학적 연구의 marker가 될 수 있을 것이라 여겨진다.

Wang *et al.* (2000)은 phage λ 의 RBP C-말단 부위가 숙주인 *Escherichia coli*의 세포 표면 수용체에 결합하는 부위임을 밝혔다. Le *et al.* (2013)은 *Pseudomonas aeruginosa* phages PaP1과 JG004의 숙주 특이성 차이에 관한 연구에서 phage의 RBP는 숙주와의 결합 특이성에 관여하며 이 단백질에 변이가 생기면 phage의 숙주범위가 달라진다는 것을 보고 하였다. *P. aeruginosa* phage JG004의 RBP C-말단 부분에서 1개의 아미노산 치환이 발생함으로써 숙주 수용체에 대한 phage의 binding affinity가 감소하였는데, 이러한 차이는 phage의 host 범위가 넓어

진 것과 연관이 있다고 보고하였다. 따라서 *Edwardsiella* myophages의 경우에도 RBP C-말단이 숙주 특이성에 관여할 것으로 보고 유전체 분석을 통해 알아본 결과, GF-2와 MSW-3의 RBP C-말단 부분에서 매우 잘 보존된 아미노산 서열을 발견하였다. 이러한 보존 서열은 *E. tarda*-specific podoviral KF-1과 IW-1에서는 발견되지 않았으며 *E. ictaluri* (PEi21) phages와도 매우 다르다는 것이 밝혀졌다. 또한 GF-2와 MSW-3의 RBP C-말단 부분에서 아미노산 10개가 서로 다른 것이 확인 되었는데 이러한 변화는 GF-2로 하여금 숙주 receptor에 대한 binding affinity를 줄여들게 하였고 이로 인해 숙주 범위가 넓어졌을 것으로 추정하였다.

Primer 6으로 실시한 E97-1의 RAPD patterns에서 나타나는 R2 amplicon(약 400 bps)의 염기서열을 분석한 결과(GenBank accession number OQ679873) *E. piscicida* strain MS-18-199의 plasmid pEPMS-18199의 DNA 서열(CP035669.1)과 *E. anguillarum* ET080813 plasmid 1, pET080813-1의 DNA 염기서열(CP006665.1)에서 100% 일치하는 영역이 발견

되었다. R2는 pEPMS-18199의 type IV secretion system protein “Tra C” gene과 *E. anguillarum* ET 080813의 Inc F plasmid conjugative transfer pilus assembly protein “Tra C” gene의 partial sequences 부분에 해당하였으며 이들 염기서열은 모두 100% 일치하였다. 한편 E97-1의 R3 amplicon (약 700 bps)의 염기서열(GenBank accession number OQ679874) 또한 pEPMS-18199의 기능이 확인되지 않은 단백질 유전자와 pET080813-1의 conjugative transfer protein 123의 유전자에서 동일한 염기서열 영역이 발견되었다. pEPMS-18199는 미국의 hybrid catfish 병어에서 분리된 *E. piscicida* strain MS-18-199에서 발견된 one copy large conjugative plasmid이다 (Abdelhamed *et al.*, 2019). 이 plasmid에는 flofenicol, tetracycline, streptomycin을 포함하는 6개의 항균제 내성 유전자가 있으며 숙주세포에서 매우 안정적으로 유지되고, *Escherichia coli*나 *E. ictaluri*로 전이 가능한 것으로 보고되었다. pEPMS-18199나 pET080813-1, 그리고 본 연구의 E97-1에 동일한

sequence가 나타나고 있는 것으로 보아 이런 구조의 plasmid를 보유한 *Edwardsiella*속 세균이 뱀장어나 차넬메기와 같은 숙주에서 격리된 그룹의 clone으로 존재할 가능성이 있다. 우리나라에서 분리된 어류 *Edwardsiella*속 세균들의 whole-genome sequences 연구에서도(Baek *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2022) 다양한 prophages와 plasmids들의 존재를 보고하고 있다. 따라서 *Edwardsiella*에서 발견되는 prophages나 plasmids들이 종 특이적인 분포를 보이는지에 대한 검토도 필요할 것으로 여겨진다.

이러한 결과들로 부터 뱀장어에서 분리된 *E. piscicida*의 경우 bacteriophage 감염이나 전이성 plasmid 획득이 넓치 분리군과 다른 RAPD pattern을 나타내는 데 일부 기여하고 있음을 알 수 있다. 이와 같이 동종의 병원체라도 숙주에 따라 특성이 다르게 나타나므로 종 특이적인 prophage나 plasmid의 검출은 병원체의 이동을 모니터링 하는데 있어 중요한 marker가 될 수 있다 하겠다.

Table 5. Non-wild type(NWT) profiles determined according to wild type cut-off (COwt) value of inhibition zone in disc diffusion test of various antibacterial agents against *Edwardsiella* isolates

Isolate	Disc COwt	AM ≥12	AmC ≥18	FF ≥29	DO ≥18	OT ≥25	TE *	OA ≥11	UB ≥20
F96-1, F02-4					NWT (0)**	NWT (0)	NWT (0)		
F96-2					NWT (12)	NWT (14)			
F97-3		NWT (0)			NWT (0)	NWT (0)	NWT (0)		
F97-2 & F98-1,2 F00-1, F02-1,2,3									
E97-1,2,3					NWT (0)	NWT (0)	NWT (0)	NWT (0)	NWT (0)
E09-1,2,3								NWT (0)	NWT (0)

Abbreviations : AM, ampicillin (10 µg); AmC, amoxicillin-clavulanic acid (20/10 µg); FF, florfenicol (30 µg); DO, doxycycline (30 µg); OT, oxytetracycline (30 µg); TE, tetracycline (30 µg); OA, oxolinic acid (2 µg); UB, flumequine (30 µg)

*COwt is not suggested for NWT determination

**The size of the inhibition zone for each isolate (mm)

COwt: refers to Lim *et al.*, 2016 and Chun, 2019.

분리균의 항균제 감수성에서 Non wild type 출현

분리균주들의 항균제에 대한 감수성 시험에서 나타난 성장억제대의 크기에 근거하여 비야생형 (NWT) 균주의 출현을 알아본 결과(Table 5) AM에 대해 NWT 형태로 나타난 1균주를 제외한 모든 균주에서 AM, AmC, FF에 대한 NWT는 없었다. 넙치에서 분리된 균들이 NWT로 나타나는 약제는 DO, OT, TE 였으며 OA, UB에 대해서는 뱀장어에서 분리된 균들은 모두 NWT로 나타나는 반면 넙치에서 분리된 균들에서는 NWT가 없었다. 이러한 결과는 *E. piscicida*의 항균제에 대한 감수성은 분리 지역이나 분리 년도 보다 숙주의존적인 경향을 보여주는 것이라 판단되며 이러한 경향은 이전 연구의 RAPD 분석 결과에서도 나타났다(Kim, 2021). 뱀장어에서 분리된 1997년 균에서 다약제에 대한 NWT가 나타난 것은 *E. piscicida* pEPMS-18199와 pET080813-1와 관련이 있는 plasmid에 의한 것으로 생각된다. 넙치에서 분리된 *Edwardsiella* 속 세균에서 transferable R plasmid가 다항균제 내성 전이에 관여하고 있다(Kim, 1999)는 이전 연구 결과로 볼 때, 본 연구의 넙치 분리균에는 pEPMS-18199와 DNA 구조가 다른 DO, OT, TE 내성 관련 conjugative R plasmid가 존재할 가능성이 높은 것으로 여겨진다.

본 연구에서 1996년과 2010년 사이에 우리나라 양식 넙치와 뱀장어 병어에서 분리하여 *E. tarda*로 동정되었던 17 균주의 *gyrB* 염기 서열을 분석한 결과 이들을 모두 *E. piscicida*로 재동정할 수 있었으며, phage나 전이성 plasmid의 존재 여부는 *E. piscicida* 분리주의 숙주의존적인 차이에 기여하고 있는 것으로 판단되었다.

요 약

이전에 *Edwardsiella tarda*로 분류되었던 많은 어류 병원세균들이 다양한 연구에서 *E. piscicida* 또는 *E. anguillarum*으로 재분류되었다. 본 연구에서는 국내에서 1996년부터 2010년까지 양식 넙치와 뱀장어의 감염어에서 분리하여 *E. tarda*로 동정하였던 17균주의 재분류를 실시하였다. 이를 위해 species-specific primers를 이용한 특정 PCR ampli-

con 검출과 *gyrB* 염기서열에 기반한 계통발생학적 분석을 수행하였다. 또한 숙주에 따른 분리주 특성의 차이를 알아보기 위하여 항균제 감수성 패턴과 random amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR의 amplicons에 대한 염기서열을 분석하였다. *E. piscicida* 특이 프라이머를 사용한 PCR 결과 17개의 분리주만 amplicon을 형성하였고, *E. tarda* 프라이머를 사용했을 때는 *E. tarda* type strain (ATCC 15947)에서만 amplicon이 나타났다. 17개 분리주의 *gyrB* 염기 서열에 따른 계통수에서 모든 분리주는 *E. piscicida*의 참조 균주들과 함께 *E. tarda* type strain과는 분리되는 clade를 형성하였으며 넙치와 뱀장어에서 분리된 균들은 각각의 진화 그룹으로 구분되었다. 항균제 감수성 시험 결과 넙치에서 분리된 균들은 doxycycline, oxytetracycline, tetracycline에서 non-wild type (NWT)이 나타났고 oxolinic acid, flumequine에 대해서는 뱀장어에서 분리된 균에서만 NWT이 나타났다. *E. piscicida* 분리주들의 RAPD 패턴에서 차이나는 3개 amplicons의 뉴클레오티드 서열을 분석한 결과 *Edwardsiella* phage GF-2, *E. piscicida* MS-18-199의 플라스미드 pEPMS-18199 및 *E. anguillarum* ET080813의 플라스미드 1에서 일치하는 영역이 확인되었다. 이러한 결과에 근거하여, 본 연구의 17 분리주는 모두 *E. piscicida*로 분류될 수 있으며, 분리주의 특성은 숙주의존적인 차이를 보이는 것으로 판단되었다.

References

- Abayneh, T., Colquhoun, D.J. and Sørum, H.: *Edwardsiella piscicida* sp. nov., a novel species pathogenic to fish. J. Appl. Microbiol., 114: 644-654, 2013.
- Abdelhamed, H., Ramachandran, R., Ozdemir, O., Waldbieser, G. and Lawrence, M.L.: Characterization of a novel conjugative plasmid in *Edwardsiella piscicida* strain MS-18-199. Front. Cell. Infect. Microbiol., 9: 404, 2019.
- Baek, S.W., Hwang, S., Kang, H.Y., Bang, W.Y. and Moon, K.H.: Draft genome sequence of a fish pathogen, *Edwardsiella piscicida* isolate CK41. Microbiol. Resource Announcements, 9: e00061-20, 2020.
- Buján, N., Balboa, S., Romalde, J.L., Toranzo, A.E. and Magariños, B.: Population genetic and evolution analysis of controversial genus *Edwardsiella* by mul-

- tilocus sequence typing. *Mol. Phylog. Evol.*, 127: 513-521, 2018a.
- Buján, N., Mohammed, H., Balboa, S., Romalde, J.L., Toranzo, A.E., Arias, C.R. and Magariños, B.: Genetic studies to re-affiliate *Edwardsiella tarda* fish isolates to *Edwardsiella piscicida* and *Edwardsiella anguillarum* species. *Syst. Appl. Microbiol.*, 41: 30-37, 2018b.
- Buján, N., Toranzo, A.E. and Magariños, B.: *Edwardsiella piscicida* : a significant bacterial pathogen of cultured fish. *Dis. Aquat. Org.*, 131: 59-71, 2018c.
- Chun, W.-k.: Establishment of epidemiological cut-off values for bacterial fish pathogens and effects of antibiotics and probiotics on fish gut microbiome. Master thesis, PKNU :2-15, August 2019.
- Dubey, S., Maiti, B., Kim, S.H., Sivadasan, S.M., Kannimuthu, D., Pandey, P.K., Girisha, S.K., Mutoloki, S., Chen, S.C., Evensen, Ø., Karunasagar, I. and Munang'andu, H.M.: Genotypic and phenotypic characterization of *Edwardsiella* isolates from different fish species and geographical areas in Asia: Implications for vaccine development. *J. of Fish Dis.*, 42: 835-850, 2019.
- Ewing, W.H., McWhorter, A.C., Escobar, M.R. and Lubin, A.H.: *Edwardsiella*, a new genus of Enterobacteriaceae based on a new species, *E. tarda*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 15: 33-38, 1965.
- Griffin, M.J., Ware, C., Quiniou, S.M., Steadman, J.M., Gaunt, P.S., Khoo, L.H. and Soto, E.: *Edwardsiella piscicida* identified in the southeastern USA by *gyrB* sequence, species-specific and repetitive sequence-mediated PCR. *Dis. Aquat. Org.*, 108: 23-35, 2014.
- Hawke, J.P., McWhorter, A.C., Steigerwalt, A.G. and Brenner, D.J.: *Edwardsiella ictaluri* sp. nov., the causative agent of enteric septicemia of catfish. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 31: 396-400, 1981.
- Huang, W.H.: Bacterial diversity based on type II DNA topoisomerase genes. *Ann. Rev. of Genetics*, 30: 79-107, 1996.
- Jang, M.H., Kim, K.Y., Lee, Y.H., Oh, Y.K., Lee, J.H. and Song, J.Y.: Genetic identification and biochemical characteristics of *Edwardsiella* strains isolated from freshwater fishes cultured in Korea. *J. Fish Pathol.*, 33: 111-118, 2020.
- Kim, E.: Transferable R plasmid of *Edwardsiella tarda* isolated from diseased flounders, *Paralichthys olivaceus*. *J. Fish Pathol.*, 12: 115-121, 1999.
- Kim, E.: Characteristics comparisons of *Edwardsiella tarda* isolated from cultured olive flounder and eel. *J. Fish Pathol.*, 34: 31-38, 2021.
- Kim, N., Lee, Y., Tho, H.D., Park, J.Y., Lee, J.Y., Kang, Y.R. and Kim, D.H.: Whole-genome sequences of three *Edwardsiella piscicida* isolates from diseased fish in South Korea. *Microbiol. Resource Announcements*, 11: e00097-22, 2022.
- Le, S., He, X., Tan, Y., Huang, G., Zhang, L., Lux, R., Shi, W. and Hu, F.: Mapping the tail fiber as the receptor binding protein responsible for differential host specificity of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages PaP1 and JG004. *PLoS One*, 8: e68562 2013.
- Leung, K.Y., Wang, Q., Yang, Z. and Siame, B.A.: *Edwardsiella piscicida*: a versatile emerging pathogen of fish. *Virulence*, 10: 555-567, 2019.
- Lim, Y.-J., Kim, D.-H., Roh, H.-J., Park, M.-A., Park, C.-I. and Smith, P.: Epidemiological cut-off values for disc diffusion data generated by standard test protocols from *Edwardsiella tarda* and *Vibrio harveyi*. *Aquacult. Int.*, 24: 1153-1161, 2016.
- Matsuoka, S. and Nakai, T.: Seasonal appearance of *Edwardsiella tarda* and its bacteriophages in the culture farms of Japanese flounder. *Fish Pathol.*, 39: 145-152, 2004.
- Nakai, T. and Park, S.C.: Bacteriophage therapy of infectious diseases in aquaculture. *Res. Microbiol.*, 153: 13-18, 2002.
- NIFS (National Institute of Fisheries Science). Manuals for aquatic antimicrobial susceptibility test: NIFS document, ED-2020-AQ-001, 2020.
- Oliveira, J., Castilho, F., Cunha, A. and Pereira, M.J.: Bacteriophage therapy as a bacterial control strategy in aquaculture. *Aquacul. Internat.*, 20: 879-910, 2012.
- Reichley, S.R., Ware, C., Steadman, J., Gaunt, P.S., Garcia, J.C., Lafrentz, B.R., Thachil, A., Waldbieser, G.C., Stine, C.B., Buján, N., Arias, C.R., Loch, T., Welch, T.J., Cipriano, R.C., Greenway, T.E., Khoo, L.H., Wise, D.J., Lawrence, M.L. and Griffin, M.J.: Comparative phenotypic and genotypic analysis of *Edwardsiella* isolates from different hosts and geographic origins, with emphasis on isolates formerly classified as *E. tarda*, and evaluation of diagnostic methods. *J. Clin. Microbiol.*, 55: 3466-3491, 2017.
- Sakai, T., Yuasa, K., Sano, M. and Ida, T.: Identification of *Edwardsiella ictaluri* and *E. tarda* by species-specific polymerase chain reaction targeted to the upstream region of the fimbrial gene. *J. Aquat. Anim. Health*, 21: 124-132, 2009.
- Shao, S., Lai, Q., Liu, Q., Wu, H., Xiao, J., Shao, Z., Wang, Q. and Zhang, Y.: Phylogenomics characterization of a highly virulent *Edwardsiella* strain

- ET080813^T encoding two distinct T3SS and three T6SS gene clusters: Propose a novel species as *Edwardsiella anguillarum* sp. nov. Syst. Appl. Microbiol., 38: 36-47, 2015.
- Tamura, K., Stecher, G. and Kumar, S.: MEGA 11; Molecular evolutionary genetics analysis Version 11. Mol. Biol. Evol., <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>, 2021.
- Wang, J., Hofnung, M. and Charbit, A.: The C-terminal portion of the tail fiber protein of bacteriophage lambda is responsible for binding to LamB, its receptor at the surface of *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol., 182: 508-512. 2000.
- Yasuike, M., Nishiki, I., Iwasaki, Y., Nakamura, Y., Fujiwara, A., Sugaya, E., Kawato, Y., Nagai, S., Kobayashi, T., Ototake, M. and Nakai, T.: Full-genome sequence of a novel myovirus, GF-2, infecting *Edwardsiella tarda*: comparison with other *Edwardsiella* myoviral genomes. Arch. Virol., 160: 2129-2133. 2015.
- Yasuike, M., Sugaya, E., Nakamura, Y., Shigenobu, Y., Kawato, Y., Kai, W., Fujiwara, A., Sano, M., Kobayashi, T. and Nakai, T.: Complete genome sequences of *Edwardsiella tarda*-lytic bacteriophages KF-1 and IW-1. Genome announcements. 1: e00089-12. 2013a.
- Yasuike, M., Sugaya, E., Nakamura, Y., Shigenobu, Y., Kawato, Y., Kai, W., Nagai, S., Fujiwara, A., Sano, M., Kobayashi, T. and Nakai, T.: Complete genome sequence of a novel myovirus which infects atypical strains of *Edwardsiella tarda*. Genome announcements, 1: e00248-12. 2013b.

Manuscript Received : Mar 29, 2023

Revised : Apr 30, 2023

Accepted : May 03, 2023