

낙동강 하구에서 분리한 *Aeromonas* spp.의 수리학적 분류 및 특성

전도용·하영철
서울대학교 미생물학과

Characteristics and Numerical Taxonomy of *Aeromonas* spp. Isolated from Nakdong Estuary

Jeon, Do Yong and Yung Chil Hah

Department of Microbiology College of Natural Science, Seoul National University,
Seoul 151-742, Korea.

ABSTRACT: One hundred and sixty one strains of *Aeromonas* were isolated at three sites from August, 1986 to December, 1986 in Nakdong Estuary. Cluster analysis was performed on total of 42 morphological and biochemical characteristics of the isolated strains. At the level of 85% and 84% similarity, three major clusters and two minor clusters had been identified; the first three clusters were different one another from MR reaction and gas production utilizing glucose. The five clusters were classified as two serotypes on the basis of serotyping, which was consistent with the result of cytotoxicity test.

KEY WORDS □ *Aeromonas*, numerical taxonomy, characteristics, Nakdong Estuary

Aeromonas spp.는 19세기 후반에 수생동물의 질병원으로서 처음 분리된 후 1936년에 Kluyster와 van Niel에 의해 *Aeromonas* 라는 속명이 제안되었다(Popoff and Veron, 1976). 1961년에는 Ewing 등에 의하여 *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas shigelloides*의 분류체계가 제안되었으며, 그 후 수생생물의 병원성 세균으로서 점차 보고되기 시작하였다(Shotts and Rimler, 1973). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*(1974)에서는 Schubert의 분류체계에 의거하여 *A. salmonicida*, *A. hydrophila*, *A. punctata*의 3 species로 나누었다. 이에 의하면 *A. salmonicida*는 어류의 병원성 세균으로서, 비운동성, 37°C에서의 성장 불능, indole test 음성, NA배지에서 갈색색소 분비 등의 특성으로 특징지어지는 반면, 운동성인 *A. hydrophila*와 *A. punctata*의 경우는 분류체계가 복잡하여 *A. hyd-*

*rophila*는 3개, *A. punctata*는 2개의 subspecies를 두었다. 그 후 Popoff와 Veron(1976)은 *A. hydrophila*와 *A. punctata*를 L-histidine, L-arabinose, L-arginine 및 salicin의 이용, KCN test, esculin hydrolysis 등의 생리적 특성에 의하여 *A. hydrophila*와 *A. sobria*로 재분류하였으며 *A. hydrophila*에는 elastase 생성, glucose로부터의 acetoin 및 가스생성, cysteine으로부터의 H₂S 생성 등의 생리특성으로 구별되는 2개의 subspecies를 두었다. 1981년, DNA hybridization 연구를 통해 Popoff 등은 *A. hydrophila*내의 2개의 subspecies를 *A. hydrophila*와 *A. caviae*로 다시분류함으로써 *Aeromonas*속의 균주를 *A. salmonicida*, *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria*로 분류하는 분류체계가 확립되었다. *Bergey's Manual for Systematic Bacteriology*(1984)에서는 이 분류체계를 따르고 있으나 아직도 *Aeromonas* spp.의 분류체계에

대해서는 많은 논란이 있음을 지적하고 있다(Bergey's Manual for Systematic Bacteriology, 1984).

*Aeromonas salmonicida*는 자연계에서 주로 어병원으로서 연어와 송어에서만 발견이 되는 반면(Nomura and Saito, 1982), 운동성 *Aeromonas*는 담수성 세균으로서 토양, 폐수, 수돗물 및 인간의 배설물 등에 분포함은 물론(Cavari et al., 1981; Hazen et al., 1978; Rippey and Cabelli, 1980) 온혈 및 변온 척추동물 즉 개구리, 올챙이, 파충류 및 어류에서도 발견되며 심지어 인간에게 설사 등의 질병을 야기시키는 것이 알려지면서 점차 주목받기 시작하여 최근들어 이들의 병리적 및 생태학적 연구들이 많이 보고되고 있다(Hird et al., 1983; Seidler et al., 1980; Rahim et al., 1984; LeChevallier et al., 1982; Allan and Stevenson 1981; Hazen et al., 1978; Kaper et al., 1981).

본 연구에서는 낙동강 하구의 감조수역에서 운동성 *Aeromonas*를 분리하여 수리학적 분류방법에 의하여 분류를 행하였으며 분리된 각 group에 대하여 혈정학적 상관관계 및 병리적 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

시료 채취 및 균주 분리

본 연구는 낙동강 하구의 감조수역 3개소를 설정하여 1986년 8월부터 12월에 걸쳐 매일 1회씩 5회에 걸쳐 시료를 채취하였다(Fig. 1). 시료는 Van Dorn 채수기로 정점 1과 2에서는 수면아래 1m, 정점 3에서는 수면아래 1m와 10m에서 채수하여 멸균된 유리용기에 넣어 냉장상태로 실험실로 운반하여 분석하였다.

Aeromonas 분리를 위해 시료를 R-S 배지(Shotts and Rimler, 1973)에 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후 yellow colony를 분리하였다. R-S 배지에서 분리한 균주는 AH 배지(Kaper et al., 1979)에 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후 acid bottom, alkali surface를 보이며, 운동성과 indole 시험 중 최소한 한 반응은 양성을 나타낸 균주를 *Aeromonas* spp.의 동정 시료로 사용하여 nitrate reduction(+), O/F(F), 0/129 tolerance(+), oxidase(+), catalase(+),의 생리특성을 보이는 균주를 최종적으로 *Aeromonas*로 판정하였다(Kaper et al.,

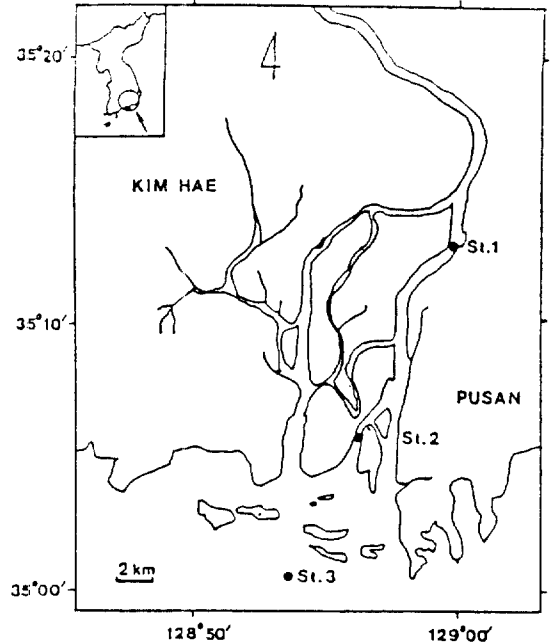


Fig. 1. Sampling sites in Nakdong Estuary.

Table 1. Tests used for the taxonomic study of *Aeromonas* spp. isolated from Nakdong Estuary.

| | |
|--|---|
| Morphological characters: | cell shape, motility |
| Growth characters: | growth at 0%, 3%, 5%, 10% NaCl |
| Biochemical characters: | nitrate iron agar, esculin, gelatin liquefactor, citrate utilization, KCN sensitivity, indole, O/F, casein hydrolysis, gas from glucose, 0/129 sensitivity |
| Production of ornithine decarboxylase, catalase, oxidase, lipase, urease | |
| Acid from 1% carbohydrate: | glucose, inositol, mannitol, fructose, xylose, raffinose, adonitol, sucrose, starch, glycerol, lactose, rhamnose, sorbitol, mannose, galactose, maltose, EtOH, and 0.5% salicin |

1981).

형질 분석

전 정점에서 5회에 걸쳐 161주의 *Aeromonas* spp.를 분리하여 42가지의 형태학적 및 생화학적 실험들을 수행하였다(Table 1). 이 결과로부터 다음과 같은 유사도 index에 의하여 유사도를 구한 뒤 이를 바탕으로 squared Euclidean distance를 계산하여 UPGMA(unweighted pair group method average) 방법으로 cluster 하였

다.

$$\text{similarity} = \frac{Ns}{Ns+Nd}$$

Ns: 두 비교 균주간에 동일한 형질의 수

Nd: 두 비교 균주간에 동일하지 않은 형질의 수

독성 실험

Cluster analysis에 의하여 구분된 5개 cluster의 생화학적 특성과 완전 일치하는 균주들 중에서 임의로 각각 1주씩 5주의 균주를 선택하여 실험하였다. 각 균주를 tryptic soy broth(Difco)배지에 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후 3,000×g에서 10분간 원심분리하여 상등액을 추출하였다. 상등액을 0.8% PBS(phosphate buffered saline, pH=7.4)로 4°C에서 24시간 투석(dialysis)하여 배지성분을 제거한 후 0.2µm pore size membrane으로 여과 멸균하여 EPC 영구 계대 세포를 단일층으로 배양한 96 multiwell plate(Linbro)에 well당 0.1ml씩 접종하였다. 15°C에서 3일간 배양하여 세포가 죽는 것으로 독성판정을 하였다.

형질학적 상관관계

병원성 실험에 사용한 균주를 각각 25°C에서 24시간 배양한 후 formalin을 최종농도가 1%가 되게 첨가하여 1시간 동안 방치하였다. PBS로 세번 세척한 후 540 nm에서의 OD값이 2.0이 되도록 희석하여 토끼에게 2ml씩 피하주사를 하였다. 3주 후에 같은 방법으로 준비한 세균액으로 이차 주사하였다. 이차 주사 1주일 후 토끼로부터 혈청을 얻어 1/2씩 연속 희석한 항혈청으로 교차 응집 실험을 하였다.

결과 및 고찰

5개월에 걸쳐 전 정점에서 161주의 *Aeromonas* spp.를 분리하여 42가지의 실험을 통해 이들을 동정하여 cluster analysis를 실행하였다. *Aeromonas*와 유사한 *Vibrio*속 내의 종(species)을 구분하였을 때 80-89.7%의 유사도가 기준으로 사용된 점을 고려하여(West et al., 1986) *Aeromonas*속 내의 종의 구분은 85%의 유사도를 기준으로 하여 3개의 주 cluster(G1, G2, G3)로 나누고 나머지 1개의 cluster는 다시 84%의 유사도 수준에서 2개의 subcluster(G4, G5)로 나누었다(Fig. 2).

42가지 동정실험 가운데 각 cluster 간에 상위한

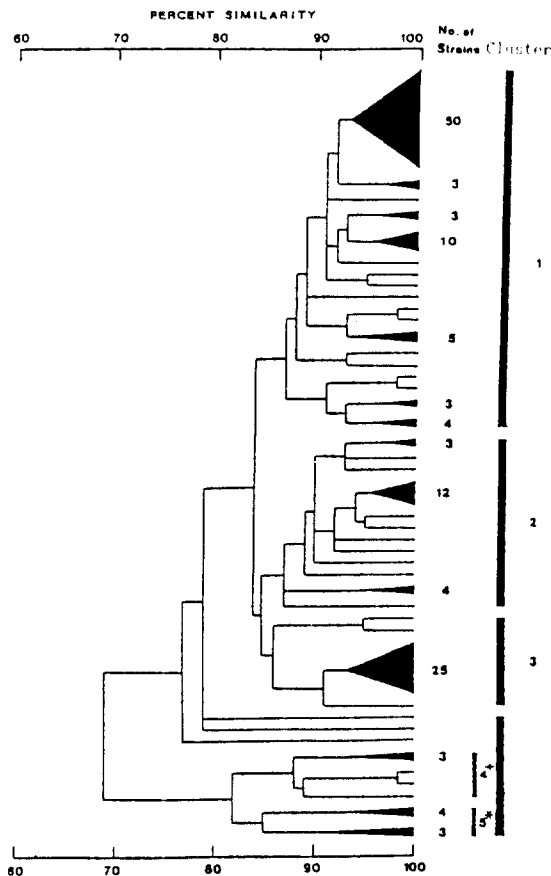


Fig. 2. Dendrogram showing relationships among *Aeromonas* spp. isolated from Noktong Estuary. *Clusters used for cytotoxicity test and serological grouping. See text.

성질을 나타내는 특성들을 Table 2에 나타내었다. 이 결과로 볼때 85%의 유사도에서 나눈 3 cluster는 MR 실험과 glucose로부터의 가스생성 실험에 의해 분류가 가능하였다. 이는 glucose와 glycerol로부터의 가스형성을 분류의 특성으로 제안한 Schubert(1974)의 분류체계와 일부 일치하였다. 그러나 운동성이 중요한 분류특성이 되지 않은 결과는 Veron과 Popoff(1976)의 결과와 일치하였다. Popoff와 Veron은 glucose로부터의 가스생성 여부를 *Aeromonas hydrophila*의 subgroup의 분류특성으로 지적하였다. 현재의 *Aeromonas* 분류체계에 의하면 glucose로부터의 가스생성이 *Aeromonas caviae*의 분류특성인 점을 감안할 때 glucose로부터의 가스생성은 *Aeromonas* 분류에 중요한 분류특성으로 생각된

Table 2. Differentiation among the first five clusters of *Aeromonas* spp. isolated from Noktong Estuary *

| Characteristics | Cluster 1 | Cluster 2 | Cluster 3 | Cluster 4 | Cluster 5 | <i>A. caviae</i> | <i>A. hydrophila</i> |
|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------------|----------------------|
| Motility | d | + | d | d | d | + | + |
| Indole | + | + | + | - | d | + | + |
| Esculin | d | d | + | + | d | + | + |
| KCN sensitivity | d | + | + | + | d | + | + |
| VP | - | d | d | d | - | - | d |
| MR | + | + | - | + | + | + | d |
| Gas from glucose | - | + | - | + | d | - | + |
| Urease | - | - | - | d | - | - | - |
| Growth at 5% NaCl | - | d | d | + | + | | |
| Gelatin hydrolysis | + | + | + | - | d | + | + |
| Lipase | + | + | + | - | d | + | + |
| Acid from glucose | + | + | + | + | + | + | + |
| maltose | + | + | + | + | + | + | + |
| salicin | d | d | + | d | d | + | d |
| sucrose | + | + | + | + | + | + | d |
| mannitol | + | + | + | + | + | + | + |
| inositol | - | - | - | d | - | - | - |
| Cytotoxicity | + | + | - | + | - | | |

*Symbols: +, 90% or more of strains are positive.

- , 90% or more of strains are negative.

d, 11-80% of strains are positive.

다. 한편 낙동강 하구에서의 *Aeromonas*의 분포에 대한 전과 하(1989)에 의하면 오염이 심한 지역일수록 glucose로부터의 가스생성의 특성을 지닌 cluster의 빈도가 높은 것으로 나타나 glucose로부터의 가스생성은 *Aeromonas*의 분포에 있어서도 중요한 생리특성인 것으로 생각된다. 각 cluster의 생리적 특성을 *Bergey's Manual for Systematic Bacteriology*(1984) 및 *The Prokaryotes*(1981)와 대조한 결과 VP 실험과 glucose로부터의 가스생성 유무의 특성에 의해 cluster 1은 *Aeromonas caviae*로 cluster 2는 *Aeromonas hydrophila*로 볼 수 있으나 나머지 cluster들(G3, G4, G5)은 기존의 분류체계의 생리적 특성과는 일치하지 않아 아직도 *Aeromonas*의 분류체계가 확실하지 않음을 알 수 있다(Burke *et al.*, 1984).

생리적 특성에 의하여 구분되어진 5 cluster간의 상호관계를 알아보기 위하여 혈청학적 연구를 시도하였다. 항혈청을 이용한 응집역가로부터 혈청학적 상관관계를 알아보는 연구는 최근들어 많이 시도되고 있다(Leblanc *et al.*, 1981; Riley,

1987). 본 연구에서는 응집역가로부터 계산한 혈청학적 상관계수를 이용하여 상대적 부동성(relative dissimilarity)으로 cluster간의 혈청학적 상관관계를 알아보았다(Table 3, 4, Fig. 3). 항혈청을 사용하여 5개 group의 대표 균주간의 교차응집 실험을 한 결과는 Table 3과 같이 나타났으며 $r = \sqrt{(r_1 \times r_2)}$ 로부터 계산한 혈청학적 관계는 Table 4와 같이 나타났다. Table 3의 결과를 보면 cluster 5를 제외하고는 자신에 대한 항혈청과의 응집역가가 다른 cluster에 대한 항혈청과의 응집역가에 비해 30-70배 정도 높은 결과를 보여 각 cluster들은 주로 자신에 대한 항혈청과 반응하는 것으로 나타났다. 각 cluster간의 혈청학적 상관관계는 혈청학적 상관계수(1/r)로 알 수 있다. cluster간의 1/r 값이 1에 가까울수록 상호간의 혈청학적 상관관계가 밀접함을 의미한다. 본 실험에서는 대부분 cluster간의 1/r 값이 20이 넘어 혈청학적 상관관계가 낮음을 알 수 있었다. 1/r 값을 distance coefficient로 이용하여 cluster analysis를 한 결과 5개의 cluster는 혈청학적 상관관계의 견지에서 크게 2개의 cluster로 나눌 수

Table 3. Cross-agglutination tests among five clusters

| Cluster | Anti-G1 | Anti-G2 | Anti-G3 | Anti-G4 | Anti-G5 |
|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| G1 | 4096 | 16 | 128 | 128 | 64 |
| G2 | 64 | 8192 | 64 | 32 | 128 |
| G3 | 64 | 64 | 4096 | 64 | 256 |
| G4 | 512 | 128 | 256 | 8192 | 256 |
| G5 | 32 | 16 | 32 | 8 | 512 |

Table 4. Antigenic relationship among five clusters based on 1/r*

| Cluster | Anti-G1 | Anti-G2 | Anti-G3 | Anti-G4 | Anti-G5 |
|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| G1 | 1.0 | | | | |
| G2 | 181.0 | 1.0 | | | |
| G3 | 45.3 | 90.5 | 1.0 | | |
| G4 | 22.6 | 128.0 | 45.0 | 1.0 | |
| G5 | 32.0 | 45.3 | 16.0 | 45.3 | 1.0 |

* $r = \sqrt{(r1 \times r2)}$ where r1 and r2 are the titre ratio; heterologous titre divided by homologous titre for the respective antiserum.

가 있었다(Fig. 3). Leblanc 등(1981)은 *Aeromonas* strains 이 혈청학적으로 여러 개의 group 으로 나뉘어지며 *Aeromonas hydrophila* 와 *Aeromonas sobria* 간에도 혈청학적 상관관계가 나타남을 보고하였고, Fliermans 와 Hazen 은(1979) 수계에서 분리한 *Aeromonas hydrophila* 들이 혈청학적으로 서로 다른 group 으로 나눌 수 있음을 지적하였다. 혈청학적 grouping 의 결과는 생리실험에 의한 grouping 과 차이를 보여주었으나, 이러한 결과는 Paterson 등(1980)이 *Aeromonas salmonicida* 로 실험한 결과와 일치하였다.

Burke 등(1984)은 상수원에서 분리한 일부 *Aeromonas* spp. 와 환자로부터 분리한 *Aer-*

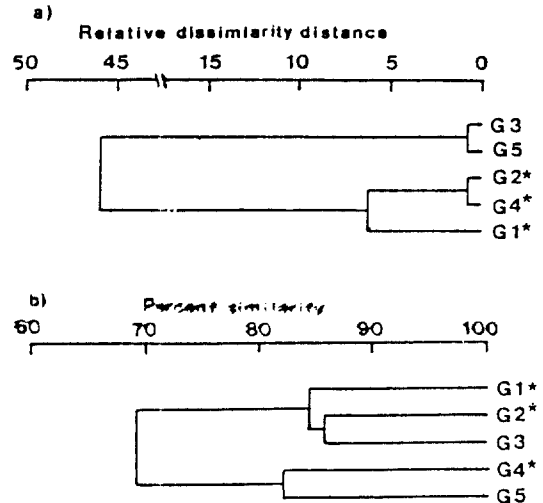


Fig. 3. Dendrogram showing serological relationships (a) and physiological relationship(b) among clusters.

*cytotoxic cluster.

omonas spp. 간에 일부 생리특성에서 차이가 나타나나, 대부분 환자로부터 분리한 *Aeromonas* 와 같은 특성을 보이므로 이들 *Aeromonas* spp. 가 장내병원성 세균일 가능성이 있음을 보고하였다. 본 실험에서도 낙동강 하구에서 분리한 *Aeromonas* spp. 의 병원성여부를 알아보기 위하여 각 cluster 의 extracellular virulence factor 형성여부를 조사한 결과 G1, G2, G4만이 독성을 보여(Table 2)주었으며 이는 혈청학적 grouping 과 일치하였다. 이러한 결과는 독성이 strain 마다 차이가 있음을 보여준 Leblanc 등(1981)의 결과 및 Seidler 등(1980)의 결과와 일치하였다. 그러나 3개 cluster 가 독성을 나타내어 낙동강 하구에서도 *Aeromonas* 에 의한 물고기의 질병이 일어날 가능성이 있음을 예상할 수 있다.

적 요

1986년 8월부터 12월까지 낙동강 하구에서 161주의 운동성 *Aeromonas* 를 분리한 후 42가지의 형태학적, 생화학적 특성을 조사하여 cluster 분석을 한 결과 85% 유사도 수준에서의 3개의 주 cluster 와 84% 유사도 수준에서의 2개의 소수 cluster 의 5 cluster 로 나눌 수 있었다. 각 cluster 는 MR 반응과 glucose 로부터의 가스생성 여부의 생화학적 특성에 의하여 구분이 되었다. 2개의 소수 cluster 를 포함한 5개의 cluster 는 교차응집 실험에 의해 크게 2개의 혈청학적 cluster 로 나뉘어졌으며, 이러한 결과는 독성실험에 의한 grouping 결과와 일치하였다.

REFERENCES

1. 전도용, 하영철, 1989. 낙동강 하구 생태계의 환경요인과 *Aeromonas* spp. 분포와의 관계. *Kor. Jour. Microbiol.* **27**, 365-371.
2. Allan, B.J. and R.M.W. Stevenson, 1981. Extracellular virulence factors of *Aeromonas hydrophila* in fish infections. *Can. J. Microbiol.* **27**, 1114-1122.
3. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed (1974). Edited by R.S. Buchanan and N.S. Buchanan and N.E. Gibbons. Baltimore: Williams and Wilkins.
4. *Bergey's Manual for Systematic Bacteriology* (1984). Edited by N.R. Krieg and J.G. Holt. Baltimore: Williams and Wilkins.
5. Burke, V., J. Robinson, M. Cooper, J. Beaman, K. Partridge, D. Peterson and M. Gracey, 1984. Biotyping and virulence factors in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**, 1146-1149.
6. Cavari, B.Z., D.A. Allen and R.R. Colwell, 1981. Effect of temperature on growth and activity of *Aeromonas* spp. and mixed bacterial populations in the Anacostia River. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**, 1052-1054.
7. Fliermans, C.B. and T.C. Hazen, 1979. Immunofluorescence of *Aeromonas hydrophila* as measured by fluorescence photometric microscopy. *Can. J. Microbiol.* **26**, 161-168.
8. Hazen, T.C., C.B. Fliermans, R.P. Hirsh and G.W. Esch, 1978. Prevalence and distribution of *Aeromonas hydrophila* in the United States. *Appl. Environ. Microbiol.* **36**, 731-738.
9. Hird, D.W., S.L. Diesch, R.G. Mckinnell, E. Gorham, F.B. Martin, C.A. Meadows and M. Gasiorowski, 1983. *Enterobacteriaceae* and *Aeromonas hydrophila* in Minnesota frogs and tadpoles (*Rana pipiens*). *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 1423-1425.
10. Kaper, J., R.R. Seidler, H. Lockman and R.R. Colwell, 1979. Medium for the presumptive identification of *Aeromonas hydrophila* and *Enterobacteriaceae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **38**, 1023-1026.
11. Kaper, J.B., H. Lockman, R.R. Colwell and S.W. Joseph, 1981. *Aeromonas hydrophila*: Ecology and toxigenicity of isolates from an estuary. *J. Appl. Bacteriol.* **50**, 359-377.
12. Leblanc, D., K.R. Mittal, G. Olivier and R. Lallier, 1981. Serogrouping of motile *Aeromonas* species isolated from healthy and moribund fish. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**, 56-60.
13. LeChevallier, M.W., T.M. Evans, R.J. Seidler, O.D. Daily, B.R. Merrell D.M. Rollins and S.W. Joseph, 1982. *Aeromonas sobria* in chlorinated drinking water supplies. *Microb. Ecol.* **8**, 325-333.
14. Nomura, S. and H. Saito, 1982. Production of the extracellular hemolytic toxin by an isolated strain of *Aeromonas salmonicida*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries.* **48**, 1589-1597.
15. Paterson, W.D., D. Douey and D. Desautels, 1980. Relationships between selected strains of typical and atypical *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophila*, *Haemophilus piscium*. *Can J. Microbiol.* **26**, 588-598.
16. Popoff, M. and M. Veron, 1976. A taxonomic study of the *Aeromonas hydrophila*-*Aeromonas punctata* group. *J. Gen. Microbiol.* **94**, 11-22.
17. Rahim, Z., S.C. Sanyal, K.M.S. Aziz, M.I. Huq and A.A. Chowdhury, 1984. Isolation of enterotoxigenic, hemolytic, and antibiotic-resistant *Aeromonas hydrophila* strains from infected fish in Bangladesh. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 865-867.
18. Riley, I.T., 1987. Serological relationships between strains of Coryneform bacteria responsible for annual ryegrass toxicity and other plant-pathogenic corynebacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **35**, 153-159.
19. Rippy, S.R. and V.J. Cabelli, 1980. Occurrence of *Aeromonas hydrophila* in limnetic environments: relationship of the organism to trophic state. *Microb. Ecol.* **6**, 45-54.
20. Schubert, R.H.W., 1974. *Aeromonas*, pp.345-348. in R.E. Buchanan and N.E. Gibbons (ed), *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 8th ed. Williams and Wilkins. Baltimore.
21. Seidler, R.J., D.A. Allen, H. Lockman, R.R. Colwell, S.W. Joseph and O.P. Dailly, 1980. Isolation, enumeration, and characterization of *Aeromonas* from polluted waters encountered in diving operations. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**, 1010-1018.
22. Shotts, E.B. and R. Rimler, 1973. Medium for the isolation of *Aeromonas hydrophila*. *Appl. Microbiol.*, **26** 550-553.
23. The Prokaryotes, Vol.2, 1981. Edited by Starr, M.P, Stolp, H., Truper, H.G., Balows, A., Schlegel, H.G. New York: Springer-Verlag Berlin Hedilberg.
24. West, P.A., P.R. Brayton, T.N. Baryant and R.R. Colwell, 1986. Numerical taxonomy of *Vibrio* isolated from aquatic environments. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **36**, 531-543.

(Received October 25, 1989)