

碩士學位論文

조피볼락, *Sebastes schlegeli*에서分離한
病原性 *Vibrio* sp.의 特性

濟州大學校 大學院

水産生物學科



1995年 12月

조피볼락, *Sebastes schlegeli*에서分離한
病原性 *Vibrio* sp.의 特性

指導教授 盧 暹

金 鍾 華

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함.

1995年 12月

金鍾華의 理學 碩士學位 論文을 認准함.



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

審査委員長

李 祺 亮



委 員

李 榮 敦



委 員

盧 暹



濟州大學校 大學院

1995年 12月

Characteristics of pathogenic *Vibrio* sp. isolated
from the rockfish, *Sebastes schlegeli*

Jong Hwa Kim
(Supervised by professor Sum Rho)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE

DEPARTMENT OF MARINE BIOLOGY
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

1995. 12.

目 次

Summary	1
I. 緒 論	2
II. 材 料 및 方 法	4
III. 結 果	9
1. 養殖漁場 環境	9
2. 發生狀況과 病魚의 症狀	15
3. 分離菌의 形態學的 및 生物學的 性狀	16
4. 分離菌의 生化學的 性狀	23
5. 藥劑에 對한 感受性	25
6. 病原性 試驗	26
IV. 考 察	28
V. 要 約	32
VI. 參 考 文 獻	33
謝 辭	36

Summary

At the summer time, an infectious bacterial disease occurs and damages the net cage farms of rockfish (*Sebastes schlegelii*) at the western coast of Korea. The symptoms of this disease include darkness of body color, ulceration of skin, anemia of gill-filaments, and congestion of operculum. In order to know the attributes of pathogenicity of this disease, the study is performed with isolated bacteria from the rockfish sampled at the fish farm, located at Taean-gun, Chungcheongnam-do, from June to September in 1994. The pathogenic bacteria can be isolated from dermal lesion, kidney, liver, and spleen of the sick fish, and classified as *Vibrio* sp. based on the morphological, biological, and biochemical examinations. These isolates are proliferated in BTB teepol, TCBS, TSA, NA, BHIA media, not in SS and MacConkey media, and the optimal growth conditions for NaCl concentration, pH, and temperature are 3%, 7 ~ 8, and 25 ~ 30°C, respectively. They turn out to be sensitive to three chemicals such as SXT (sulfamethoxazol + trimethoprim), nalidixic acid, and tetracycline, but resistant to ampicillin and penicillin G. Finally, the virulence of infectious bacteria is appeared at both 20°C and 27°C when isolated pathogenic strains are injected into the muscle of healthy rockfish.

I. 緒 論

우리나라의 해상가두리 양식은 1970年代初 부터 자연산 稚魚 채포에 의한 방어와 참돔 등을 대상으로 일부 남해안에서 시작된 이래 1980년 이후 본격적으로 방어 가두리양식이 개발 되었다. 1990年代에 와서는 收益性이 높고 생산관리가 용이한 넙치·참돔·조피볼락 등의 인공종묘생산 기술과 함께 양식기술의 급진적인 발전으로 넙치의 옥상수조양식은 물론, 이들 어종의 해상가두리 양식업이 남해안에서 성행되고 있고 서해안에서도 1989년도 부터 忠南 泰安, 瑞山, 保寧 관내의 淺水灣에서 조피볼락을 대상으로 가두리양식이 실시되고 있다.

근년에 와서 양식기술의 발달에 따른 가두리시설의 증가와 사육어의 밀식 등으로 양식어장 환경은 악화되고 있으며 吸蟲類 및 纖毛蟲類 등 기생충의 대량 감염, 선별과 망갈이 때 생긴 상처 등으로 인한 질병의 종류도 다양하게 발생되고 있다. 또한 그 발생頻度가 매년 높아져 이로인한 피해가 커지고 있는 실정이므로 질병대책이 양식업의 成敗를 좌우하는 중요한 요건의 하나로 浮刻되었다.

이러한 諸般 문제점들은 해산어류 양식에 중대한 障礙를 일으킬 수 있으므로 양식생물의 질병 실태파악과 병원성세균의 동정 및 약제감수성시험에 따른 질병 예방대책 수립은 해산어류 양식산업의 당면 과제로 되고 있다.

해산어류에 있어 유행하는 세균성 질병으로는 *Vibrio* 病과 連鎖球菌症 및 葡萄狀球菌症이 알려져 있으며, 특히 양식방어에 큰 피해를 입히고 있는 세균성질병의 그 원인균이 *Vibrio anguillarum*과 그 類似種에 의한 것으로 밝혀졌다(江草, 1983).

해산어의 *Vibrio* 病에 대한 연구로는 방어에 대하여 楠田와 赤澤(1963), 木村(1968), Jo 등(1979), Yasunaga 등(1981)의 보고가 있고, 넙치의 경우는 山野井等(1988), 村田(1987) 등의 보고가 있으며 참돔의 경우는 安永와 山元(1977) 등의 비교적 많은 보고가 있다. 그러나 조피볼락의 *Vibrio* 질병에 관한 연구는 국내외적으로 보고된 바 없다.

1994년 6월 忠南 泰安郡 南面 堂岩理의 조피볼락 가두리양식장에서 사육중인 치어와 미성어에 피부潰瘍과 체색의 흑화, 아가미 뚜껍의 充血, 지느러미 腐植, 내

장기관의 充血 및 退色 등의 증상이 발생하여 세균성 질병으로 추정되는 질병이 발생하여 7-8월 고수온기에 대량폐사가 일어났다. 이 연구에서는 이 질병의 원인 균을 밝히기 위하여 病巢와 腎臟, 肝臟, 脾臟 등의 내장기관에서 세균을 분리하였으며, 분리된 균주의 생물학적 및 생화학적 특성을 조사하고 약제감수성과 병원성 확인을 실시하였다.

II. 材料 및 方法

1. 養殖漁場 環境

조사수역은 忠南 泰安郡 南面 堂岩里의 해상 가두리양식장(Fig. 1)으로서 양식장 중심부에서 1994년 3월 24일 부터 11월 17일 사이에 매월 1회 조사하였다.

수온은 棒狀溫度計로 0.1℃ 까지 현장에서 측정하였고, 수질은 수심 5m 수층에서 採水器로 해수 1ℓ를 채수하여 실험실로 운반하여 수소이온농도(pH), 용존산소(DO), 화학적산소요구량(COD), 인산염성 인(PO_4 -P), 용존성무기질소(DIN)를, 저질은 採泥器로 저질 200g을 채취하여 실험실로 운반, 저질의 화학적 산소요구량과 유기물을 분석하였다. 분석방법은 pH의 경우 Corning pH meter 120으로, DO는 Winkler's 개량법으로, COD는 알카리성 과망간산칼륨염산법으로, 인산염성 인(PO_4 -P)과 암모니아성 질소(NH_4 -N), 아질산염 질소(NO_2 -N) 및 질산염 질소(NO_3 -N)는 Strickland와 Parson의 방법으로 분석하여 용존성무기질소(DIN)는 암모니아성 질소, 아질산염 질소 및 질산염 질소량을 합한 값으로 하였고, 저질COD 및 저질유기물은 해양오염 및 적조지침(국립수산진흥원, 1985)에 의거 분석하였다.

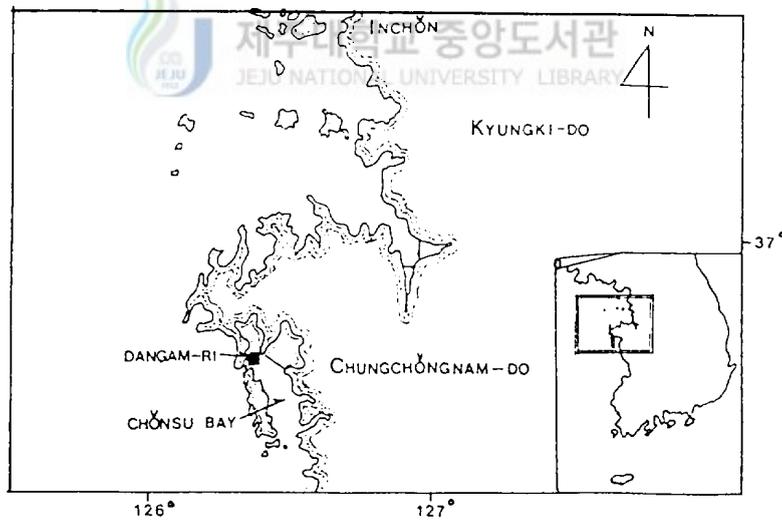


Fig. 1. Location of sampling stations for the survey of pathology.

2. 試料魚 및 細菌分離

매월 시험에 사용한 조피볼락 시료는 1-3년생으로서 외관상 질병징후가 뚜렷한 전장 15.5-28.8 cm(중량 55-720 g)되는 5마리를 채취하여 내·외부의 증상과 기생충 감염여부를 확인하고 腎臟, 肝臟, 脾臟 및 病巢에서 원인균을 분리하였으며, 각 균주의 유래는 Table 1과 같다.

Table 1. Source of pathogenic bacterial strains isolated and reference strains

Strains	Date sampled	T.L.(cm)	Location	Source
RF-1	June 25, '94.	15.5 ~ 26.9	Dangam-ri Taeon	Kidney, Liver
RF-2	July 20, '94.	16.8 ~ 27.3	"	Kidney, Spleen
RF-3	Aug. 22, '94.	26.2 ~ 28.8	"	Spleen, Lesion
RF-4	Sep. 8, '94.	26.5 ~ 28.4	"	Kidney, Lesion
Reference strains				
	<i>Virio</i> sp. YT-85116		NFRDA*	
	<i>Vibrio anguillarum</i> YT-85805		"	

* NFRDA indicates the strain from National Fisheries Research and Development Agency

세균의 분리는 室賀와 高橋(1980) 및 室賀 등(1982)과 Tabata 등(1982)의 방법을 변경한 Fig. 2의 방법에 따라 실시하였다. 즉, 병어의 腎臟, 肝臟, 脾臟 및 病巢의 조직절편을 無菌的으로 절취하여 BTB teepol 한천배지(日水)와 Tryptic Soy Agar(TSA, Difco) 평판배지에 stamp하고 白金耳로 전체면을 고르게 도말하여 25℃에서 48시간 배양한 후, 각 배지상에 우점적으로 발육한 colony 중 *Vibrio* 균으로 추정되는 황색 colony를 선택하여 Brain Heart Infusion Agar(BHIA, Difco) 배지에 순수배양 하였다. 순수분리된 각 균주를 Hugh Leifson's O-F반유동 배지에 접종, 25℃에서 48시간 배양하여 이 배지에서 glucose를 발효적으로 분해하고 산

은 생성하지만 gas가 생성되지 않은 균주를 골라 gram염색성과 catalase, cytochrome oxidase 시험과 Triple Sugar Iron Agar(TSIA, Difco) 배지에 접종하여

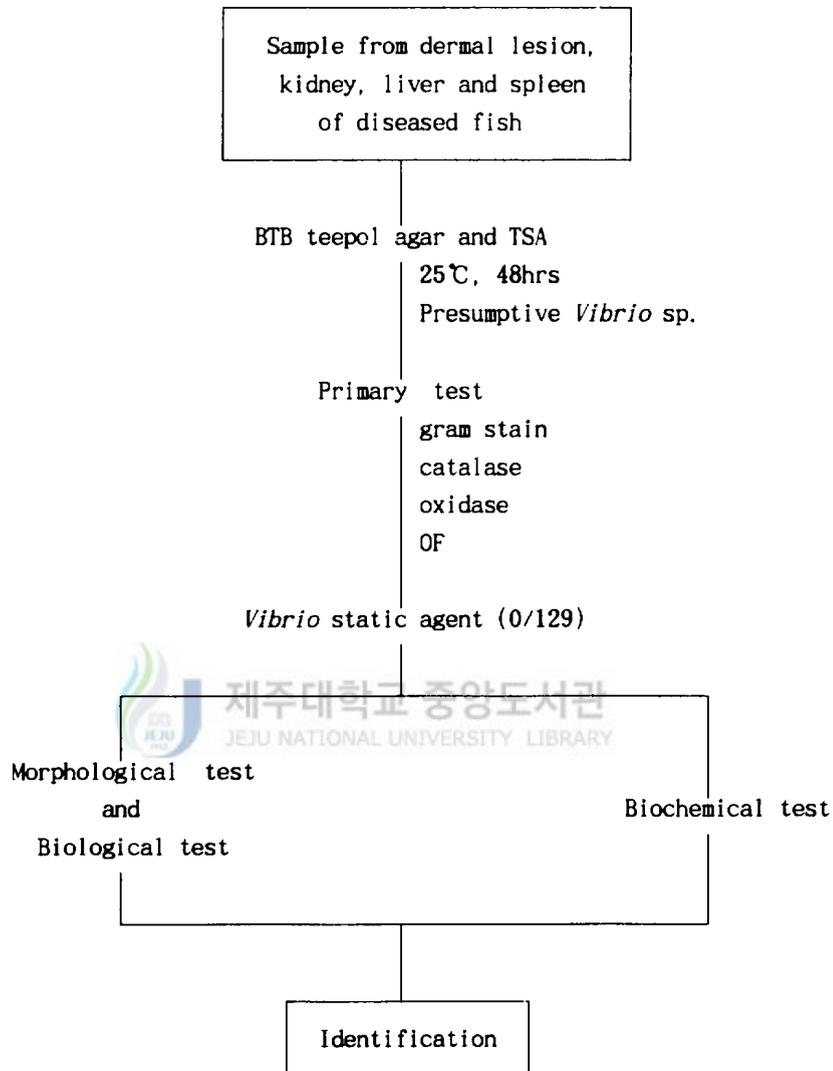


Fig. 2. A scheme for the identification of *Vibrio* sp. isolated from the diseased rockfish, *Sebastes schlegeli*.

Vibrio 屬 세균으로 추정되는 균주에 대해 *Vibrio static agent*(0/129)에 감수성을 표시한 4균주와 국립수산진흥원에서 제공받은 방어 궤양성질병의 원인균인 *Vibrio* sp. YT-85116과 *Vibrio anguillarum* YT-85805를 비교균주로 하여 형태 및 생물학적 성상과 생화학적 성상시험을 실시하였다.

3. 形態學的 및 生物學的 性狀

형태학적 및 생물학적 성상검사는 상법에 따라 실시하였다. 즉, 分離된 各 菌株 들은 2.0%식염 첨가한 BHI Broth 배지에서 增菌한 것을 사용하여 gram 염색성 (Hücker 변법), 운동성, 형태, 크기 및 색소생산 등 형태학적 성상검사를 실시하였으며, 생물학적 성상검사에서는 각종 배지상에서 25℃에 18-24시간 배양하여 발육 여부를 관찰하였다.

발육에 미치는 식염농도, pH 및 온도의 영향실험은 1% peptone水를 기초배지로 사용 하였으며 BHI Agar 배지에서 24시간 배양한 각 균주 1白金耳를 멸균 생리식염수 5 ml에 현탁시킨 균액의 0.1 ml씩을 식염농도 0-7%, pH 4-10, 온도 10-50℃로 조절한 액체배지에 접종하여 25℃에서 24시간 배양 후 발육의 유무와 정도를 조사하였다.

4. 生化學的 性狀



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

모든 생화학적 성상은 상법에 따라 실시하였다.

5. 藥劑에 對한 原因菌의 感受性

분리된 4개의 각 균주 1白金耳를 멸균 생리식염수 3 ml에 현탁시켜 이 균액의 각각을 BHI Agar 배지에서 25℃, 24시간 배양한 배양액의 0.1 ml를 약제감수성 배지인 Müller-Hinton 배지(Difco)에 도말하여 건조시킨 후 그 배지에 Ampicillin 외 8종의 약제감수성 Disk(Difco)를 얹어서 25℃에서 24시간 배양하여 발육 阻止 圓의 직경을 측정하여 감수성 여부를 조사하였다.

6. 病原性 試驗

시험에 사용된 어류는 가두리에서 사육하고 있는 외관상 질병의 증상이 없는 건강한 조피볼락(1년어, 평균전장 16 ± 0.5 cm, 평균중량 85 ± 9 g) 100마리를 사용하였으며, 시험수조 및 관리는 용량 60 x 40 x 25 cm의 플라스틱 수조에 수용하여 2 l/min.의 해수를 주수하면서 산소공급을 하였고, 먹이는 수질악화 방지를 위하여 공급하지 않은 상태에서 7일간 조사하였다. 즉, 병어에서 분리된 각 균주를 BHIA 배지에 25 ℃에서 18시간 배양한 다음 멸균된 생리식염수에 현탁시켰다. 이때의 각 균액의 농도는 $4.4 \times 10^{8-9}$ ~ $5.2 \times 10^{8-9}$ CFU/ml로 하였으며 시험어의 등지느러미 下部 근육에 0.25 ml씩 주사하였고, 대조구는 멸균생리식염수 0.25 ml를 주사하여 수온별(27 ± 0.5 ℃ 및 20 ± 0.5 ℃) 폐사 유무를 관찰하고 폐사 및 증상을 나타내는 개체로부터 접종한 균과 같은 성상을 지닌 균을 재분리 함으로서 병원성 여부를 확인하였다.



III. 結 果

1. 養殖漁場 環境

1994년 3월부터 11월까지 매일 1회 조사한 양식어장의 제반 수질 및 저질 분석 결과는 Table 2 및 Fig. 3 ~ Fig. 6과 같다.

조사기간중 수온은 4.3 ~ 28.5℃, 염분농도는 27.25 ~ 33.28 ‰, DO는 3.48 ~ 7.35 ml/ℓ, pH는 7.31 ~ 8.23의 범위이었고, 영양염류의 경우, PO₄-P은 0.73 ~ 3.47 μg-at./ℓ, DIN은 6.72 ~ 10.84 μg-at./ℓ의 범위이었으며, 저질COD는 6.27 ~ 15.76 mg/g. dry, 저질유화물은 0.01 ~ 0.15 mg/g. dry의 범위이었다. 양식장 수심은 15 m 내외로 저질은 粒度 60 μm 이하가 80%로 주로 泥質로 구성되어 있었다.

Table 2. Environmental factors examined around the culturing netcage from March 10 to November 15, 1994

Item Date	W.T. (℃)	Sal. (‰)	DO (ml/ℓ)	pH	Nutrients(μg-at./ℓ)		Sediment(mg/g. dry)	
					PO ₄ -P	DIN	COD	Sulphide
Mar. 10, '94.	4.3	32.43	7.35	8.11	1.02	6.72	5.45	0.03
Apr. 13, '94.	7.6	33.28	6.28	8.05	1.24	7.05	6.27	0.01
May 17, '94.	13.5	33.07	5.46	7.82	1.53	10.84	10.34	0.05
June 25, '94.	21.1	32.53	5.62	7.75	1.36	7.65	12.51	0.07
July 20, '94.	27.0	29.92	4.47	7.97	0.73	7.23	6.72	0.15
Aug. 22, '94.	28.5	27.25	3.48	7.31	3.47	10.22	8.89	0.11
Sep. 8, '94.	22.3	30.74	4.68	7.62	2.54	9.48	10.42	0.09
Oct. 18, '94.	18.1	32.65	5.36	8.02	1.25	7.56	14.19	0.03
Nov. 15, '94.	13.5	32.78	6.77	8.23	0.86	7.37	15.76	0.01

수온 및 염분농도 수온은 7월 중순부터 8월 하순까지 卞년에 비하여 2 ~ 3℃의 고수온으로 27.0 ~ 28.5℃의 비교적 높은 수온상을 보였으나, 9월 초순부터는 평년수온을 유지하였다. 염분농도는 평년수준(33 ‰내외)을 유지하였으나 7 ~ 9월에는 27.25-30.74 ‰의 비교적 낮은 염분농도를 나타내었다(Fig. 3).

DO 및 pH 비교적 안정된 수준이었으나 8월의 DO값은 3.48 ml/ℓ로서 해역 수질 II등급기준치(3.52 ml/ℓ 이상)보다 약간 낮은 값을 보였다(Fig. 4).

영양염류 PO₄-P은 전반적으로 해역 수질 II등급기준치(0.48 μg-at./ℓ 이하)를 초과하였고, 특히 8-9월에는 3.47 ~ 2.54 μg-at./ℓ로서 비교적 높은 수준이었으며, DIN은 3 ~ 4월을 제외하고 전반적으로 해역 수질 II등급기준치(7.14 μg-at./ℓ 이하)를 초과하였다(Fig. 5).

저질COD 및 저질유화물 저질COD는 6.27 ~ 15.76 mg/g.dry의 범위로 해역 수질 II등급기준치(20 mg/g.dry 이하)내이었으며, 저질유화물도 0.01 ~ 0.15 mg/g.dry의 범위로 해역 수질 II등급기준치(0.2 mg/g.dry 이하)내 이었다(Fig. 6).



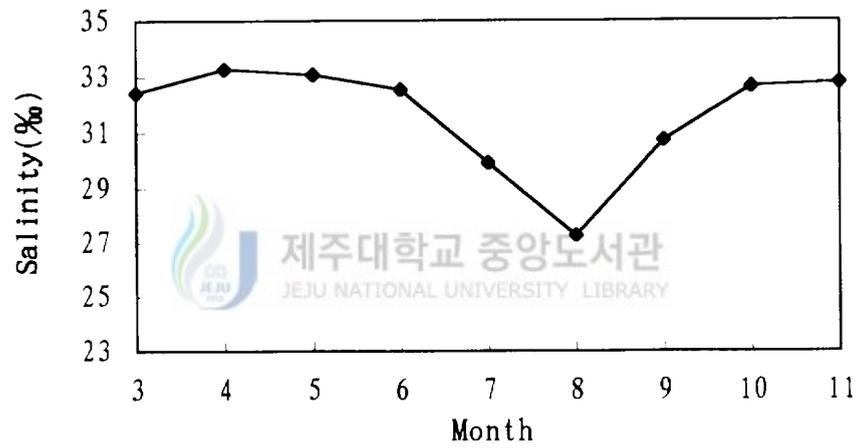
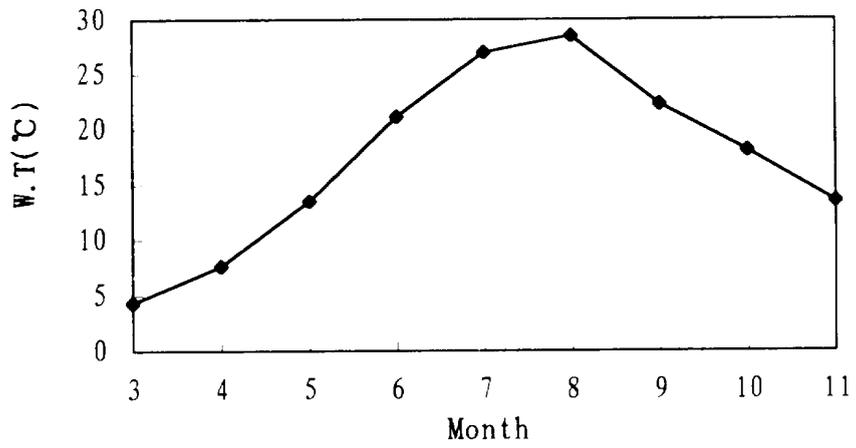


Fig. 3. Monthly variation of water temperature (upper) and salinity (lower) in 1994.

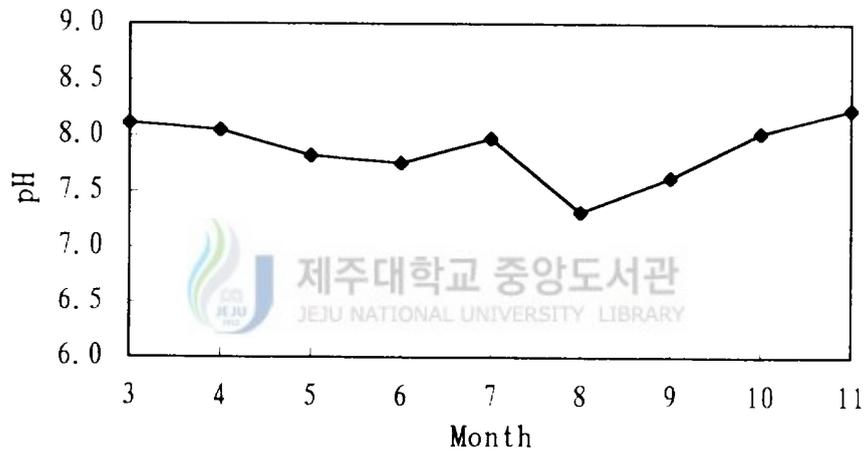
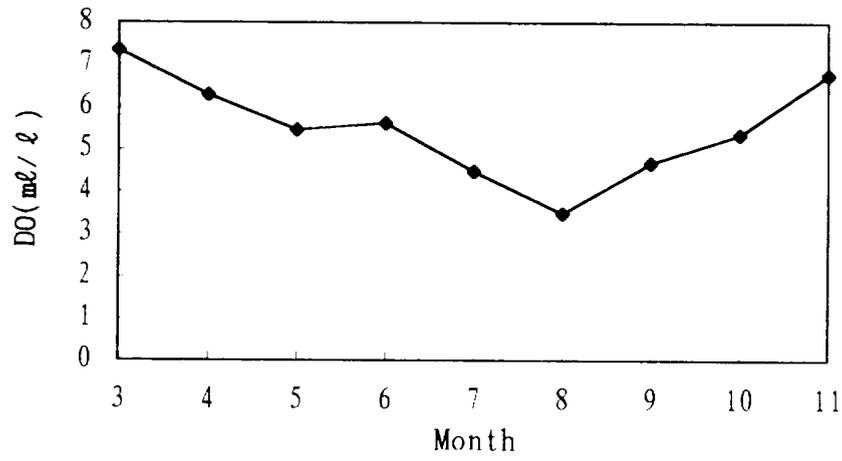


Fig. 4. Monthly variation of dissolved oxygen (upper) and hydrogen ion concentration (lower) in 1994.

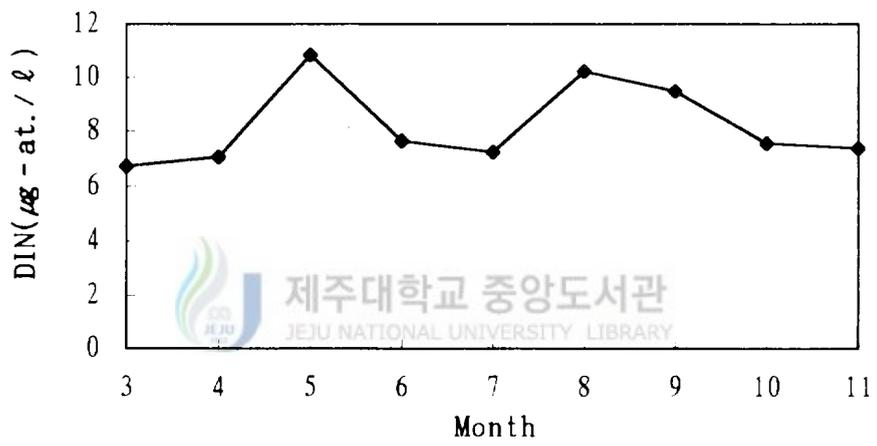
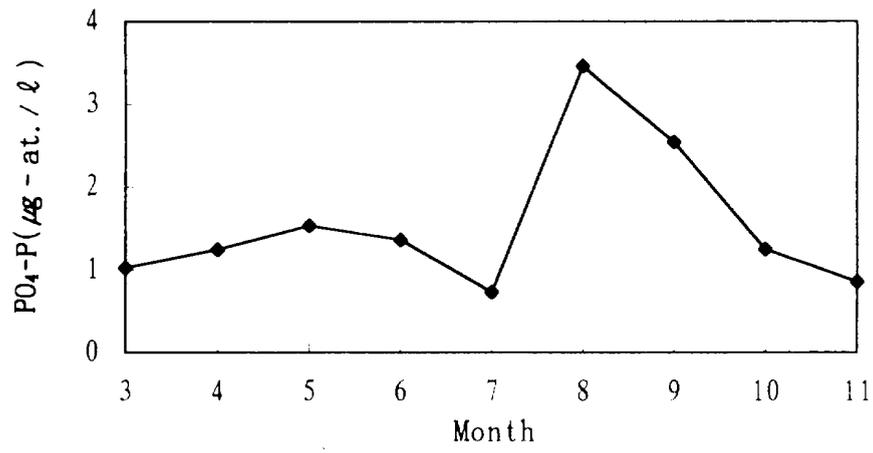


Fig. 5. Monthly variation of phosphate (upper) and inorganic nitrogen (lower) in 1994.

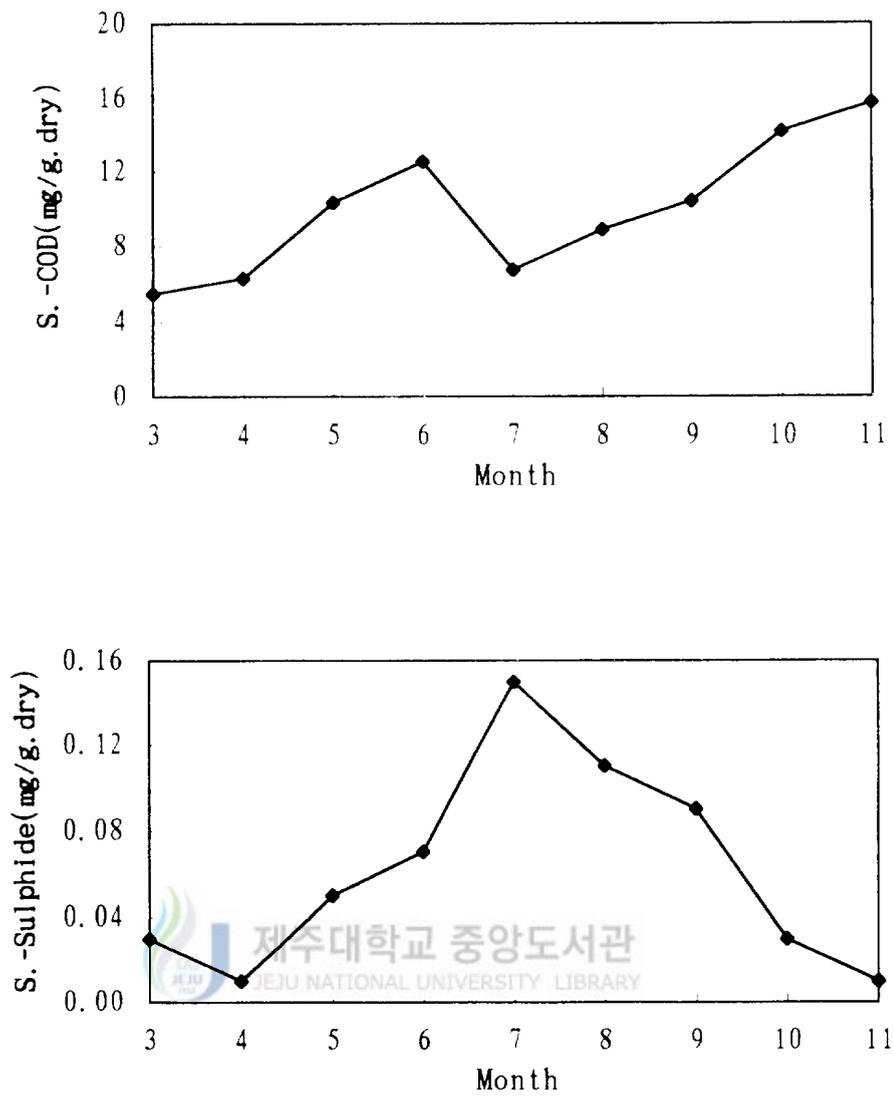


Fig. 6. Monthly variation of chemical oxygen demand (upper) and sulphide in sediment (lower) in 1994.

2. 發生狀況 과 病魚의 症狀

조사기간 중 忠南 泰安郡 南面 堂岩里의 조피볼락 해상가두리 양식장에서 발생된 질병의 症狀事例는 Table 3에서 보는 바와 같다.

Table 3. Symptoms observed from the diseased rockfish, *Sebastes schlegelii*, reared in the netcage located in Tae-an, Chungchongnam-do in 1994

Date	Total length (cm)	Water temperature(℃)	Symptoms
June 25, '94.	15.5 ~ 26.9	21.1	Anemia of gill-filaments, detection of parasites, darkness of body color
July 20, '94.	16.8 ~ 27.3	27.0	Darkness of body color, flare of fin and mouth, ulceration of skin and tail
Aug. 22, '94.	26.2 ~ 28.8	28.5	Darkness of body color, ulceration of skin and tail
Sep. 8, '94.	26.5 ~ 28.4	22.3	Darkness of body color, ulceration of tail, congestion of opercula region

이 질병은 수온 21.1 ~ 28.5℃의 범위에서 전장 15.5 ~ 28.8 cm(중량 55 ~ 720 g) 크기의 만 1년 이상된 미성어에서 발생하였다.

병어의 증상은 6월의 수온이 비교적 낮은 시기에는 아가미 흡충류의 일종인 *Microcotyle sebastisci*가 다량 기생되어 아가미의 빈혈이 뚜렷하였고, 체색이 흑화된 증상을 보였으며, 7 ~ 9월중에는 체색의 흑화 뿐만아니라 지느러미와 입 주변 및 아가미의 발적증상이 있었고 또한 피부와 꼬리자루 부근에 궤양이 형성되어 있었다(Fig. 7). 한편, 병어의 병소와 신장, 간장 및 비장의 조직 일부를 BTB teepol agar, TSA 평판배지에 도말, 배양 검사한 결과, 운동성이 있는 gram음성의 단간균이 관찰되었으며 원인균으로 추정되는 세균이 분리되었다.

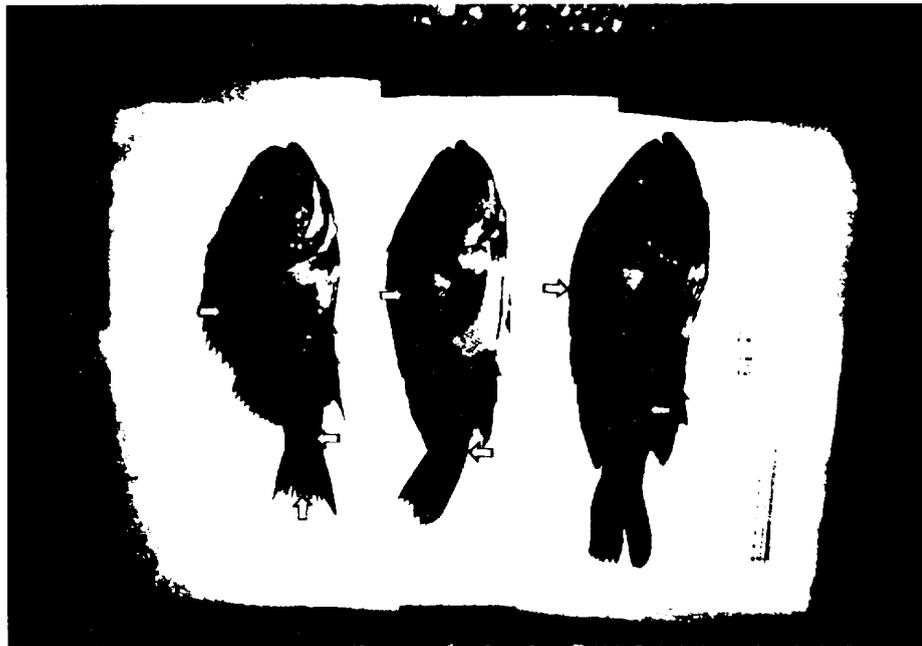


Fig. 7. The diseased rockfish showing *Vibrio* symptoms (darkness of body color, ulceration of skin and tail).

3. 分離菌의 形態學的 및 生物學的 性狀

분리된 균주의 형태학적 및 생물학적 성상은 Table 4에 나타낸 바와 같다.

분리 균주를 gram 염색한 결과, Fig. 8에서와 같이 약간 만곡된 短桿菌으로 1개의 極鞭毛를 가지고 크기는 1.3 ~ 1.5 μm 이었으며, BHIA 평판배지에서의 배양된 집락형태는 직경 1.0 ~ 1.2 mm 정도의 正圓形으로 약간 볼록하고 주변이 원활하였다. 집락의 색깔은 무색으로 투명하고 광택이 있는 중심부가 약간 융기한 집락을 형성하였으며, 색소의 생산과 swarming은 없었다.

전 균주는 gram 음성, 운동성이며 BTB teepol, TCBS, TSA, NA, BHIA 배지에서 잘 발육하였으나 SS 배지 및 MacConkey 배지에서는 발육하지 않았다.

또 0.5 ~ 7% 식염첨가 NA 배지에서는 전 균주가 발육하였으나 식염첨가를 하지 않는 NA 배지에서는 전 균주가 발육하지 않았다.

Table 4. Morphological and biological characteristics of the isolated strains from diseased rockfish and reference strains (*Vibrio* sp. and *Vibrio anguillarum*)

Characteristics	The present isolates				Reference strains	
	RF-1	RF-2	RF-3	RF-4	YT-85116	YT-85805
Gram stain	-	-	-	-	-	-
Motility	+	+	+	+	+	+
Flagella	Single polar flagellum					
Form	Short rod					
Swarming	-	-	-	-	-	-
Growth on :						
BTB teepol	+	+	+	+	+	+
TCBS	+	+	+	+	+	+
TSA	+	+	+	+	+	+
NA	+	+	+	+	+	+
BHIA	+	+	+	+	+	+
SS	-	-	-	-	-	-
MacConkey	-	-	-	-	-	-
0% NaCl NA	-	-	-	-	-	+ ^w
0.5	+	+	+	+	+	+
1	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+
7	+ ^w	+ ^w	+ ^w	+ ^w	+ ^w	-
Growth at:						
10℃	+ ^w	+ ^w	+ ^w	+ ^w	+ ^w	+
20	+	+	+	+	+	+
30	+	+	+	+	+	+
40	+ ^w	+ ^w	+ ^w	+ ^w	+ ^w	-
50	-	-	-	-	-	-

* w : weak reaction.

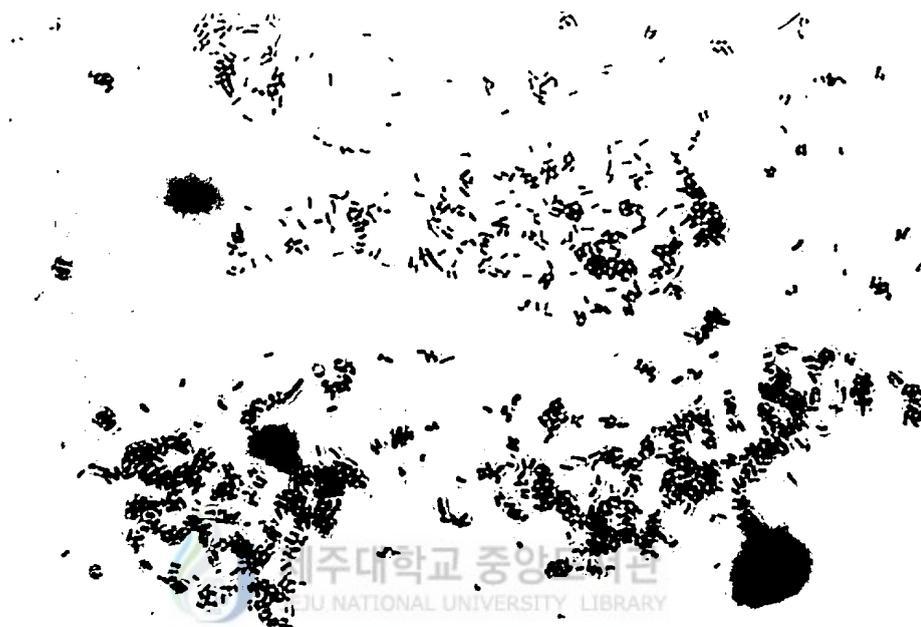


Fig. 8. Morphology of the isolated *Vibrio* sp. cultured in TSA medium at 25°C for 48hrs (Gram stain: × 1,000).

NA 배지에 있어서 전 균주가 20-30℃에서 잘 발육하였으며, 10℃ 및 40℃에서는 발육정도가 미약하였으나 50℃에서는 발육하지 않았다.

각 균주의 발육에 대한 식염농도와 pH 및 온도의 영향은 Fig. 9 ~ Fig. 11에 나타낸 바와 같다. 균주에 따라 발육성에 다소 차이는 있었으나 균주들은 식염농도 2-6%의 범위에서 잘 발육하였으며 최적 식염농도는 3%이었다. pH는 5-10의 범위에서 발육하였고, pH 7-8에서 발육이 가장 좋았다. 한편, 각 균주는 수온 20-30℃에서 잘 자랐고 발육성은 균주간에 큰 차이를 보이지 않았다.



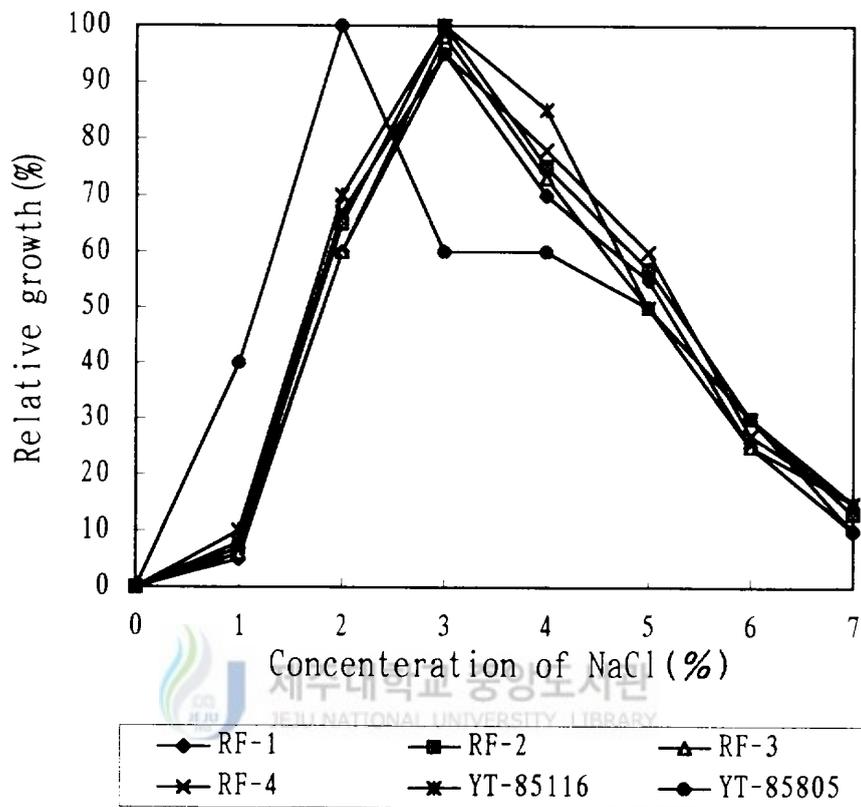


Fig. 9. Effect of NaCl concentration on the growth of *Vibrio* sp. (medium: 1% peptone water, incubation: 24hr stationary culture, temperature: 25°C).

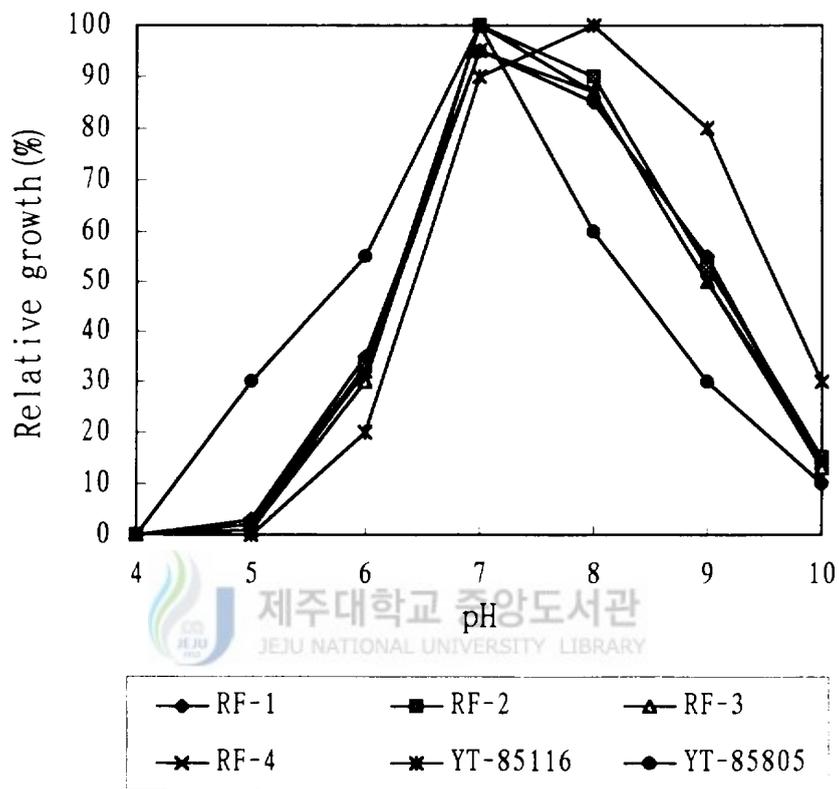


Fig. 10. Effect of pH on the growth of *Vibrio* sp. (medium: 1% peptone water, incubation: 24hr stationary culture, temperature: 25°C).

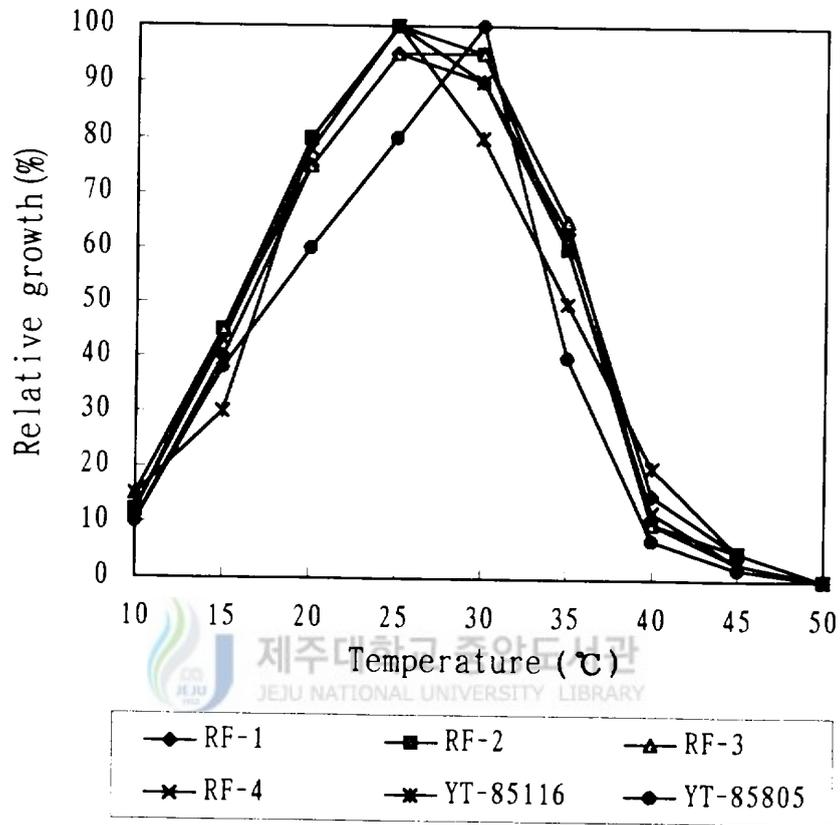


Fig. 11. Effect of temperature on the growth of *Vibrio* sp. (medium: 1% peptone water, pH: 7, incubation: 24hr stationary culture).

4. 分理菌의 生化學的 性狀

분리된 원인균의 생화학적 성상은 Table 5에서와 같다.

Table 5. Biochemical characteristics of the isolates from diseased rockfish and reference strains (*Vibrio* sp. and *Vibrio anguillarum*)

Characteristics	The present isolates				Reference strains	
	RF-1	RF-2	RF-3	RF-4	YT-85116	YT-85805
Catalase	+	+	+	+	+	+
Cytochrome oxidase	+	+	+	+	+	+
OF test	F	F	F	F	F	F
Indole production	+	+	+	+	+	+
Nitrate reduction	+	+	+	+	+	+
Gelatin liquefaction	+	+	+	+	+	+
Gas from glucose	-	-	-	-	-	-
Methyl Red test	+	+	+	+	+	-
V-P test	-	-	-	-	-	+
H ₂ S production	-	-	-	-	-	-
O/129 sensitivity	+	+	+	+	+	+
Starch Hydrolysis	+	+	+	+	+	+
Arginine	-	-	-	-	-	+
Decarboxylation of Lysine	-	-	-	-	-	+
Ornithine	-	-	-	-	-	-

F: Fermentation

전 균주는 catalase, cytochrome oxidase를 생산하며 glucose를 발효적으로 분해하여 산은 생성하지만 gas는 생산하지 않았다. 또 전 균주가 Indole, 질산염의 환원, gelatine 액화, Methly Red(MR) 반응, citrate 이용성 시험은 전균주가 양성이었으며 0/129에 감수성을 나타내었다. 그러나 Voges-Proskauer(V-P)반응, ornithine 반응에서는 전 균주가 음성을 나타내었고 황화수소도 생산되지 않았다. 또한 전 균주는 starch를 가수분해 하였으나 arginine의 가수분해에서는 음성이었고 lysine과 ornithine 脫炭酸시험에서도 음성을 나타내었다. 한편 분리된 균주의 각종 탄수화물 분해성은 Table 6과 같다.

Table 6. Carbohydrate utilization of the isolates from diseased rockfish and reference strains (*Vibrio* sp. and *Vibrio anguillarum*)

Characteristics	The present isolates				Reference strains	
	RF-1	RF-2	RF-3	RF-4	YT-85116	YT-85805
Acid from						
Glucose	A	A	A	A	A	A
Arabinose	-	-	-	-	-	-
Xylose	-	-	-	-	-	-
Mannose	A	A	A	A	A	A
Galactose	A	A	A	A	A	A
Lactose	-	-	-	-	-	-
Sucrose	A	A	A	A	A	A
Trehalose	A	A	A	A	A	-
Mannitol	A	A	A	A	A	A
Salicin	-	-	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	-	-	-
Inulin	-	-	-	-	-	-
Glycogen	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-
Dextrin	A	A	A	A	A	A
Adonitol	-	-	-	-	-	-

A: Acid.

Glucose, Mannose, Galactose, Sucrose, Trehalose, Mannitol, Dextrin 전 균주가 분해하여 산을 생성하였으나 Arabinose 외 8개의 탄수화물로 부터는 균주가 산을 생성하지 않았다.

5. 藥劑에 對한 感受性

항생제 디스크법에 의한 원인균의 각종 약제에 대한 감수성시험 결과는 Table 7 과 같다.

Table 7. Antibiotic sensitivities of the isolated *Vibrio* sp. based on the disc method

Antibiotics	Concentration (μg)	Strains			
		RF-1	RF-2	RF-3	RF-4
Ampicillin	10	-	-	-	-
Doxycycline	30	+	+	-	-
Erythromycin	15	++	+	+	+
Kanamycin	30	+	+	+	++
Nalidixic acid	30	+++	+++	+++	+++
Penicillin G (10U)		-	-	-	-
Streptomycin	10	+	++	++	+
SXT	25	+++	+++	+++	+++
Tetracyclin	30	+++	+++	+++	+++

SXT (25 μg): Sulfamethoxazole(23.75 μg) + Trimethoprim(1.25 μg)

Size of the inhibition: -: Resistant, +: <5-15 mm, ++: 15-20 mm, +++: >20 mm

균주에 따라 다소의 차이는 있으나 전 균주는 Sulfa製劑인 SXT와 Nalidixic acid 및 Tetracyclin에 높은 감수성을 보였고, 그 다음으로는 Streptomycin,

Kanamycin, Erythromycin의 순서로 감수성을 보였다. 또한 전 균주는 Ampicillin 과 Penicilin G에는 耐性を 나타내었다.

6. 病原性試驗

조피볼락(1년어, 평균전장 16 ± 0.5 cm, 평균중량 85 ± 9 g) 100마리를 사용하여 수온별(27 ± 0.5 °C 및 20 ± 0.5 °C)로 병원성 재현시험을 실시한 결과는 Table 8 과 같다.

Table 8. Pathogenicity of the isolated strains inoculated to rockfish intramuscularly at two different temperature

strains	Challenge dose (CFU/100g B. W.)	Experiment I *		Experiment II **	
		Fish number (died/tested)	Mortality in 7 days	Fish number (died/tested)	Mortality in 7 days
RF-1	1.1×10^9	10/10	100%	5/10	50%
RF-2	1.3×10^8	10/10	100	6/10	60
RF-3	1.2×10^8	10/10	100	7/10	70
RF-4	1.3×10^8	10/10	100	6/10	60
Control	-	2/10	20	0/10	0

* (Experiment I): Water temperature of aquarium was kept 27 ± 0.5 °C;

** (Experiment II): Water temperature of aquarium was kept 20 ± 0.5 °C.

27°C 내외의 수온에서는 균주접종 후 2일부터 폐사개체가 나타나기 시작하였고, 시험종료인 7일까지는 각 균주 전 시험구에서 100%의 폐사율을 나타내었으며, 20 °C 내외의 수온에서는 균주접종 후 4일부터 폐사개체가 나타나기 시작하였고, 시

27℃ 내외의 수온에서는 3.5일 이었고, 20℃ 내외의 수온에서는 5일 이었다. 따라서 분리된 각 균주는 저수온인 20℃ 내외보다 고수온인 27℃ 내외에서 강한 독성을 나타냈으며, 또한 폐사어나 시험 종료시 발병어의 腎臟, 肝臟 및 脾臟에서 접종균과 동일 성상의 세균이 재분리 되었다.

이상의 결과에서 이러한 분리균들을 본 질병의 원인균으로 추정하였다.



IV. 考 察

어류의 세균성질병 중 비브리오 질병은 담수어는 물론 방어, 넙치 등 해산어에 있어 그 원인균의 성상에 대하여 오래 전부터 현재에 이르기까지 많은 연구자들에 의해 보고되고 있다 (Saito 등, 1964; Muroga와 Egusa, 1967; Harrel 등, 1976; 村田, 1987; 沈과 鄭, 1991). *Vibrio*屬 세균은 분류학적인 면에서 아직까지 문제가 남아 있으며 대부분이 *Vibrio anguillarum*과 그 유사종으로 동정되고 있다. *Vibrio*屬 세균의 분류학적 위치에 관하여는 "gram음성 短桿菌으로 1개의 極鞭毛를 가지고 있으며, 운동성이 있고 glucose를 발효적으로 분해하지만 gas는 생산하지 않고 catalase는 양성이다." 라고 정의하고 있다(Krieg와 Holt, 1984).

분리균은 *Vibrio*屬 세균 구별에 필요한 조사항목의 하나인 *Vibrio static agent* 0/129에 대하여 감수성을 나타내었으며, *Vibrio* sp.와 *Vibrio anguillarum*를 구별하는 중요한 조사항목인 arginine의 가수분해에서는 음성이었다고 lysine과 ornithine 탈탄산 시험에서도 음성을 나타내어 Bergey's manual 및 대조균주인 YT-85116과 같은 반응결과를 나타내었으나 楠田(1965) 및 Muroga(1975)가 보고한 해산어 궤양병의 원인균인 *Vibrio* sp.의 음성, 양성, 음성과는 lysine에서 차이를 보였다. 또한 Muroga(1975)는 V-P반응이 *Vibrio anguillarum*과 그 유사종을 구별하는 중요한 항목으로 *Vibrio* sp.는 음성이라 하였으나 Bergey's manual에는 V-P반응이 종별로 음성 또는 양성으로 상이하게 보고하고 있다.

분리균의 시판배지에서의 발육과 선택배지로서의 사용 가능성을 검토하면 *Vibrio*균은 질병어에서 분리된 직후는 보통한천 배지에서 발육이 느리지만 계대배양하면 잘 자란다(江草, 1969)고 하였고, *Vibrio anguillarum*은 BTB teepol 한천배지에서 잘 자라지만 3% NaCl을 첨가한 SS 한천배지, MacConkey 한천배지에서는 자라지 않는다(Muroga와 Egusa, 1967)고 하였다. 또한 窪賀 등(1982)은 BTB teepol, TCBS, SS, Endo 한천배지 등 6종류의 배지를 사용한 결과, BTB teepol 배지에서 가장 발육이 좋았다고 하였다. 본 실험에서도 BTB teepol배지에서 발육이 좋은 점을 감안하면 BTB teepol배지가 *Vibrio*屬 세균의 선택배지로 용이할 것으로 생각된다.

Table 9. Comparison in main characteristics between present isolates and *Vibrio* sp. strains previously reported

characteristics	present isolate (1994)	Bergey's Manual V.1(1984)		Yasunaga <i>et al.</i> (1981)
		<i>Vibrio</i> sp.	<i>V. anguillarum</i>	<i>Vibrio</i> sp.
Gram stain	-	-	-	-
Motility	+	+	+	+
polar flagellum	+	+	+	+
Fermentation of glucose	F	F	F	F
Swarming	-	-	-	-
Oxidase	-	-	±	-
Catalase	+	+	+	+
Nitrate reduction	+	+	±	+
Methyl Red test	+	+	-	+
V-P test	-	±	+	-
Gas from glucose	-	-	-	-
Growth on :				
4°C	-	-	-	-
10	+ ^W			
30	+			+
35	+			+
40	+ ^W	±	-	+
0% NaCl NA	-	-	-	-
3	+	+	+	+
5	+	+	+	+ ^W
7	+ ^W	±	-	+ ^W
Acid from Trehalose	+	+	±	+
O/129 sensitivity	+	+	+	+
Starch Hydrolysis	+	+	+	+
Arginine	-	±	+	-
Decarboxylation of Lysine	-	±	-	-
Ornithine	-	±	-	-

* F : Fermentation, W : weak reaction.

江草(1969)는 기수나 해수에서 분리한 균주는 식염을 첨가하지 않으면 발육하지 않으며, 발육가능 상한선은 균주에 따라 다르다고 하였고, Tabata *et al.*(1982)은 염분농도에 따른 발육은 분리시기와 그 때의 환경에 따라 다르다고 하였다. 따라서 이 연구에서 질병어로 부터 분리된 원인균은 0%에서는 자라나지 않고 2~7%의 범위에서 자라는 다소 好鹽性인 균으로 사료된다. 또한 *Vibrio*屬은 높은 pH에서 잘 자란다고 알려져 있지만 江草(1969)는 pH와 *Vibrio*屬 세균의 발육관계는 식염 농도와 배양온도에 따라서 차이가 있다고 보고하였는데, 분리된 균주는 6~10의 다소 높은 pH에서 잘 자라는 균주라고 생각된다.

해산어류 중 방어에서 분리된 *Vibrio*屬으로는 Muroga(1975), Jo *et al.*(1979), Yasunaga *et al.*(1981)이 *Vibrio anguillarum*을, 그리고 Kimura(1964), 楠田(1965), 木村(1968) 및 Yasunaga *et al.*(1981)이 *Vibrio* sp.를 보고한 예가 있지만 조피볼락의 *Vibrio*症의 원인균에 대한 보고는 거의 없으며 특히 우리나라에서는 아직까지 보고된 바가 없다.

이번에 忠南 泰安郡 南面 堂岩里에서 분리한 균주의 각종 성상을 Bergey's manual V.1(Krieg and Holt, 1984) 및 Yasunaga *et al.*(1981)이 보고한 *Vibrio*屬 세균의 성상과 비교하여 Table 9에 정리하였다. 분리균은 생물학적 및 생화학적 성상에 있어서 *Vibrio anguillarum*과 대부분의 항목이 일치하지만 M-R, V-P시험 및 arginine분해와 탄수화물 중 trehalose의 분해에서 차이가 있었으며, 또한 조사한 제반 성상으로 보아 *Vibrio alginolyticus*와 유사한 종이라고 생각되지만, ornithine 탈탄산성과 V-P반응에서 상이한 결과를 나타냈다. 따라서 이제까지 모든 특성이 Yasunaga *et al.*(1981)이 분리한 *Vibrio* sp.의 성상과 일치하고 균주 특성도 동일하므로 서해안의 당암리에서 발생 되었던 또는 발생할 수 있는 조피볼락의 궤양성 질병의 원인균은 *Vibrio* sp. YT-85116과 동일함을 알 수 있었다는 것을 보고하는 바이다.

*Vibrio*屬은 해수중에 상존하면서 어체의 활력이 약해졌을때 체내에 침입하여 질병을 일으키는 조건병원균에 속하는 세균으로 어종에 따라 발병과 증상에 상당한 차이가 나타나며(鹽賀와 江草, 1973), 또 병원성은 수온 등 어장환경 여건과 사육어의 연령, 크기 및 건강도에 따라 다르다고 할 수 있겠다.

이 연구에서 질병에 감염된 사육어는 6월과 9월의 21-22℃ 내외의 수온에서는

큰 피해가 없었으나 7-8월 중 27-28℃ 내외의 고수온 시기에는 상당량의 피해가 있었던 점은 병원성실험 결과에서도 확인 되었듯이 수온이 비교적 낮은 시기에 아가미 吸蟲類의 일종인 *Microcotyle sebastisci*가 다량 기생되어 어체가 약해진 상태에서 고수온 시기에 어장환경의 악화가 가중되어 어체의 활력이 약화된 상황에서 *Vibrio* SP.의 감염이 주요 폐사원인으로 판단된다.

V. 要 約

1994년 7월에서 8월 사이의 고수온기에 忠南 泰安郡 南面 堂岩里의 해상 가두리 양식장에서 사육중이던 조피볼락에 궤양성 질병이 발생하여 대량폐사 현상이 일어났다.

이 연구는 이러한 질병의 원인균 구명을 위하여 형태학적, 생물학적, 생화학적 성상과 약제감수성 및 병원성을 검토하였다.

1. 병어의 궤양부위와 腎臟, 肝臟 및 脾臟으로 부터 분리된 균주는 BTB teepol, TCBS, TSA, NA 및 BHIA 배지에서 잘 발육하였으나 SS 배지와 MacConkey 배지에서는 발육하지 않았다.

2. 분리균이 최적으로 발육할 수 있는 식염농도는 3% 내외 이었고 pH는 7-8이었으며, 최적 온도는 25-30℃이었다.

3. 분리균은 SXT, Nalidixic acid, Tetracycline에 높은 감수성을 보였으나 Ampicillin과 Penicillin G에는 내성을 나타내었다.

4. 분리된 균주의 병원성은 20℃ 내외에서 병원성을 나타냈으며, 27℃ 내외의 고수온에서는 강한 병원성을 나타냈다.

5. 이상의 결과에서 모든성상이 비교균주중 *Vibrio* sp. YT-85116과 일치하고 균주의 특성도 동일함으로 이 병의 원인균을 *Vibrio* sp. 로 동정하였다.

VI. 参 考 文 献

- 江草周三. 1969. 魚病菌 *Vibrio anguillarum* について. 魚病研究, 4(1), 31-44.
- 江草周三. 1983. 魚病学(感染症·寄生蟲病篇). 恒星社 厚生閣, 62-72.
- Harrel, L. W., H. M. Etlinger and H. D. Hodgins. 1976. Humoral factors important in resistance of salmonid fish to bacterial disease. II. Anti-*Vibrio anguillarum* activity in mucus and observations on complement. *Aquaculture*, 7, 363-370.
- 安永統南·山元宜征. 1977. 1977年終期養殖マダイのいわゆるピブリオ病から分離された菌株の性状. 魚病研究, 12(3), 209-214.
- Jo, Y., K. Ohnishi, and K. Muroga. 1979. *Vibrio anguillarum* isolated from cultured yellowtail. *Fish Pathology*, 14(1), 43-47.
- Kimura, M. 1964. Studies on diseases of fish under cultured II. On a bacterial diseases of the yellowtail, *Seriola quinqueradiata* T. et. S. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish, 40(2), 114-121.
- Krieg, N. R. and J. G. Holt. 1984. Bergey's manual of Systematic bacteriology 1. Williams and Wilikins Co., Baltimore, 516-538.
- 木村正雄. 1968. 海産養殖魚とくにブリの疾病に関する基礎的研究. 宮崎大學農学部研究時報, 15(2), 81-175.

- 楠田理一・赤澤一三. 1963. 細菌による海産養魚類の傳染性疾患について. 水産増殖臨時號, 3, 31-64.
- 楠田理一. 1965. 海産魚の潰瘍病に関する研究. 京都府水産試験場業績, 25, 1-116.
- 村田 修. 1987. ヒラメの傳染性腸管白濁症(日本魚病學會ワークショップ). 魚病研究, 22, 59-61.
- Muroga, K. 1975. Studies on *Vibrio anguillarum* and *Vibrio anguillarum* infection. J. Fac. Fish. Anim. Husb. Hiroshima Univ., 14, 101-215.
- Muroga, K. and S. Egusa. 1967. *Vibrio anguillarum* from an endemic disease of Ayu in Lake Hamana. Bull. Jap. Soc., Fish, 33, 636-640.
- 室賀清邦・江草周三. 1973. *Vibrio anguillarum*の性状に関する考察. 魚病研究, 8(1), 10-24.
- 室賀清邦・高橋 誓. 1980. 養殖用魚アユ種苗の*Vibrio anguillarum*の保菌状態に関する研究. 昭和54年度魚病対策技術開發研究報告書, 1-12.
- 室賀清邦・花田博・里井晋一. 1982. 養殖用魚アユ種苗の*Vibrio anguillarum*の保菌状態に関する研究. 昭和54年度 魚病対策技術開發研究報告書, 1-11.
- 國立水産振興院. 1985. 海洋汚染 및 赤潮調査指針. 藝文社, 57-67.
- Saito, Y, H. Otsuru, T. Furukawa, K. kanda and A. Sato. 1964. Studies on an infectious disease of rainbow trouts. Acta Medica et Biologica, 11, 267-295.

沈斗生·鄭丞姬. 1991. 海上 가두리에서 飼育한 養殖넙치의 魚病診斷 및 治療 試驗. 넙치 海上養殖技術開發에 關한 研究. 科技處 特定研究課題報告書, 74-106.

Tabata, K., S. Karata, and Ruiz Sacristan. 1982. Studies on the naturally occurring disease of during the production of ayu(*plecoglossus altivelis*) in sea water-II. Dynamics of *Vibrio anguillarum*. Fish Pathology, 17(3), 205-212.

山野井英夫·桃山和夫·安信秀樹·室賀清邦. 1988. ヒラメ稚魚に發生した *Vibrio anguillarum* 感染症. 魚病研究, 23, 69-70.

Yasunaga, N., S. Ogawa, and K. Hatai. 1981. The causative organisms of vibriosis in cultured young yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. Bull. Nagasaki Pref. inst. Fish, 7, 47-55.



謝 辭

學問의 길로 精進하도록 이끌어 주시고 이 論文이 完成되기 까지 精誠으로 細心하게 指導하여 주신 指導教授 노 섬 교수님께 眞心으로 깊은 感謝를 드립니다.

그리고 바쁘신 중에도 論文을 檢討하여 주시고 많은 助言과 論文體制를 바로잡아 주신 이기완 교수님과 이영돈 교수님께 감사드립니다. 또한 항상 자상한 關心과 忠告를 해주신 이정재 교수님, 정상철 교수님, 변충규 교수님, 백문하 교수님, 송춘복 교수님, 최광식 교수님께도 感謝를 드립니다.

또 공부하는 동안 많은 關心과 配慮를 하여주신 國立水產振興院 西海水產研究所 오희국 소장님, 정영균 과장님과 南海水產研究所 조용철 과장님, 本院 심두생 연구관에게도 깊은 感謝를 드리며, 實驗과 資料整理에 도움을 준 西海水產研究所 김진도, 송재희, 김성태 연구사에게도 고마움을 전합니다. 끝으로 항상 마음속 깊이 精神的인 지주역활을 하여주신 부모님에게 感謝드리며 만수엄마에게도 고마움을 포함합니다.

