

넙치, *Paralichthys olivaceus* 자치어의 장관백탁증, Bacterial white enteritis을 일으키는 *Vibrio ichthyoenteri* 신속진단법 개발

문영건 · 김주상 · 허문수*

*제주대학교 해양과학대학 해양생물공학과

넙치 종묘생산에 있어 특히 자어기에 발생하는 감염성 질병에는 바이러스가 원인인 상피증생증(VEH; viral epidermal hyperlasia)과 세균이 원인인 장관백탁증(Bacterial white enteritis)이 가장 피해가 큰 질병으로 들 수 있다. 특히 장관백탁증의 경우는 자어기에만 주로 감수성이 있는 것으로 알려져 있으며, 부화 후 25~30일령 경의 자어에 발생하고 단기간에 거의 전멸에 가까운 폐해를 주는 질병이다. 본 병은 장의 점막 상피에 세균이 감염되어 점막에 괴사, 박리가 일어나고, 소화관의 백탁 및 위축, 복부의 함몰 등의 주요 증상을 나타낸다. 1989년 Masumura *et al.*은 분리되어진 원인균을 형태학적, 생화학적, 생리학적, 병리학적이고 혈청학적 시험을 통하여 *Vibrio species INFL*(intestinal necrosis of flounder larvae)로 명명하여 보고하였다. 이후 Ishimaru가 *Vibrio ichthyoenteri*로 명명하였다. 일반적으로 *Vibrio ichthyoenteri*는 현재 경구가 유일한 감염경로로 인식되고 있으며 발병되면 대부분 대량 폐사로 이어지는 질병이지만 약 40일령 이후에는 감수성이 없는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 넙치(*Paralichthys olivaceus*) 자어기의 먹이생물 섭취에 의한 장관백탁증 원인 경로를 파악하기 위하여 초기 먹이로 공급되어지는 동물성 플랑크톤인 rotifer에서 넙치 자·치어 장관백탁증을 일으키는 원인균으로 알려진 *Vibrio ichthyoentri*의 분리를 실시하였다. 또한 분리되어진 균주의 최적 성장 조건등과 같은 특성을 조사하여 *Vibrio ichthyoenteri*에 관한 기초 자료를 얻고, 분자생물학적 기법인 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Region(ISR) 분석을 하여 specific detection primer를 개발하여 감염초기에 보다 빠른 병원균의 검출을 하기 위함이다.

재료 및 방법

제주도내 5개소 넙치 종묘 배양장에서 2003년 5월에서 10월 동안 초기먹이로 공급되는 rotifer와 넙치 자어에서 장관백탁증 원인균을 분리하였다.

*V. ichthyoenteri*에 ISR을 증폭하기 위한 primer를 제작하기 위해 GenBank에 등록되어 있는 *Vibrio*의 16S rRNA gene과 23S rRNA gene을 이용하여 mutiple alignment를 수행하여 가장 높게 보존된 서열에서 PCR 반응에 이용하기 위한 primer를 디자인 하고 PCR반응 후 cloning을 하여 분석된 *V. ichthyoenteri* ISR 서

열을 Clustal W program을 사용하여 이미 밝혀진 12종의 *Vibrio* ISR 서열과 Multiple alignment를 실행하여 *V. ichthyenteri* species-specific detection primer를 제작하였고, primer의 특이성을 알아보기 위해 *V. ichthyenteri* KCCM 40870외에 KCTC에서 분양받은 19개의 *Vibrio* strain 및 종묘 배양장에서 분리된 *Vibrio* sp.와 그리고 *V. ichthyenteri*와 가장 유사한 염기서열을 가지고 있다고 보고되어진 *V. scophthalmi*와 PCR 반응을 수행하였다.

결과 및 요약

종묘 배양장에서 분리되어진 세균들 중 *Vibrio* 속으로 판단되는 균주가 71개가 분리되었고, 이들 균주들의 형태학적, 배양적, 생화학적 검사 결과 *V. ichthyenteri* 로 판단되는 균주가 21개가 분리 되었다. 제작된 species-specific detection primer의 특이성을 알아보기 위해 *V. ichthyenteri* KCCM 40870외에 KCTC에서 분양받은 19개의 *Vibrio* strain 과 종묘 배양장에서 분리된 71개의 *Vibrio* sp.와 PCR 반응을 수행한 결과 표준균주와의 PCR 반응에서는 *V. ichthyenteri* 만에 특이적인 band pattern을 나타내고, 분리균주들의 PCR 반응에서는 *V. ichthyenteri* 와 같은 위치에 band가 나타나는 균이 나타나 16S rRNA PCR 분석 결과 *V. ichthyenteri* 와 99%일치 하였다. 또한 가장 유사한 염기서열을 가지고 있는 *V. scophthalmi*와 PCR 반응 결과에서도 *V. ichthyenteri*만의 검출이 되었다. 이러한 결과들을 볼 때 본 실험에서 제작된 primer가 *V. ichthyenteri*의 신속한 검출과 정확한 동정을 할 수 있는 molecular marker로 이용할 수 있음을 확인 하였다.

참고문헌

- Murata, O(1987). Infectious intestinal necrosis in flounder. *Fish Pathol.*, 22:59-61.
- Muroga, K(2001). Viral and bacterial diseases in larval and juvenile marine fish and shellfish : A review. *Fish Pathol.*, 30:71-85.
- Maeda, T., N. Takada, M. Furushita and T. Shiba(2000). Structural variation in the 16S-23S rRNA intergenic spacers of *Vibrio parahaemolyticus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 192: 73-77.
- MacFaddin J.F(2000). Individual biochemical tests. In: *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*, 3rd edn, pp.1-456.

*Corresponding author: danio1977@hanmail.net