養殖보리새우에 發生한 *Vibrio*病

金 鎭 浩・田 世 圭*

斗山産業(株)

*釜山水産大學校 魚病學科

A Vibriosis Occurring in Cultured Kuruma prawn *Penaeus japonicus*

Jin-Ho KIM・Seh-Kyu CHUN*

Dusan Ind. Co., Seoul 105, Korea

*National Fisheries University of Pusan

Pusan, 608－737, Korea

The present study was carried out to reveal the characteristics of organism responsible for so called vibriosis prevailing in warm water season among cultured kuruma prawn *Penaeus japonicus*.

A bacterium was isolated from the heart, lymphoid organ and muscle of the diseased kuruma prawn.

Six strains obtained from diseased kuruma prawn in some culture farms in Namhae and Anhung from august to october in 1989 were submitted to the morphological, biochemical and physiological characterization.

All the strains were gram-negative, nonsporning short rods with one polar flagellum.

Glucose was fermented with no gas production by these strains. Some distinguishing features of the organisms were negative to lysine, arginine, ornithine decarboxilization test.

In general, the temperature 20~27℃, the NaCl concentration of 2~3% and pH of 6~8 were optimal for the growth in peptone water.

The organisms were sensitive to the vibrio static agent 0/129. The isolated should be identified as *Vibrio* sp..

No essential differences in histopathological finding were noted between the naturally and the experimentally infected prawns.

Most characteristic pathological changes were extensive necrosis caused by severe bacteria invasion and multiple formation of meranized nodules in the lymphoid organ.

緖 論

1989年 8月에서 10月에 걸쳐 南海 새우양식장과 安興 새우양식에서 飼育中이던 보리새우(*Penaeus japonicus*)가 斃死 되었다. 두 양식장에서 사육중인 보리새우의 後部腹節筋肉이 白濁되고 아가미에 赤褐色 斑點

이 나타나면서 斃死되었다.

이들 病든 새우의 細菌學的 檢査, 分離菌에 의한 再現確認試驗 및 病理組織學的 檢査를 通하여 病變을 觀察하였으며 分離菌이 *Vibrio* sp.로 同定 되었다.

材料 및 方法

自然感染：南海養殖場에서는 1989年 8月과 9月 26日에 採集하였고 安興양식장에서는 9월 30일에 採集하여 檢査하였다. 이때의 平均體重은 15~24kg되는 보리새우였다(Table 1).

細菌分離：病든 새우를 70% alcohol로 體表面을 消毒하고 心臟과 Lymph器官 및 筋肉을 白金耳로 찔러서 BTB teepol寒天培地, 2% NaCl을 寒加한 BHI寒天培地와 SS寒天培地에다 塗抹하여 25℃에서 24~72時間 培養하였다. 純粹分離된 colony에서 6菌株를 택하여 細菌學的 性狀檢査를 하였다.

細菌學的 性狀檢査：分離菌의 各種 性狀은 食鹽 2%를 加한 BHI寒天培地에서 25%, 24~72時間 培養한 菌을 使用하였다. 常法에 따라 形態學的 檢査와 生物學的 檢査를 하였다(Fig. 1).

分類學的檢査：檢査한 各項目의 性狀檢査를 Bergey's manual of systematic Bacteriology Vol. 1, 坂崎(1967) 및 木村등의 記載와 比較하여 同定하였다.

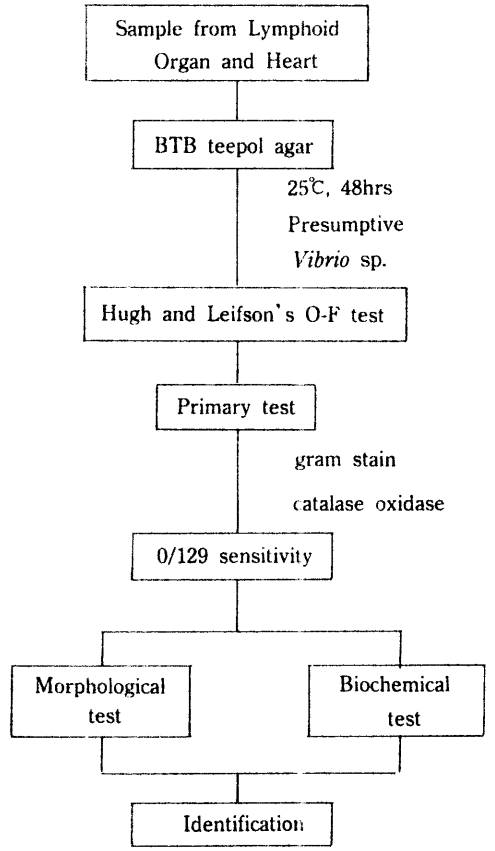


Fig. 1. Scheme for detection of *Vibrio* sp. from *Penaeus japonicus*.

Table 1. Source of 6 strains of *Vibrio* sp. isolated from cultured kuruma prawn (*Penaeus japonicus*) with Vibriosis.

Strain	Locaiton	Date	Temp. of seawater	Media for isolation	Organ
N-1*					
N-2	NAMHAE	89. 9. 12	22~24℃	BTB teepol	Lymphoid
N-3					Organ
A-4**					
A-5	ANHUNG	89. 10. 11	19~21℃	BIB teepol	Lymphoid
A-6					Organ

* N-1, N-2, N-3 strains were isolated from cultured Kuruma prawn in Namhae farm.

** A-4, A-5, A-6 strains were isolated from cultured Kuruma prawn in Anhung farm.

分離한 菌株를 N－1, N－2, N－3와 A－4, A－5, A－6으로 記名하였다. N는 南海養殖場에서 分離한 菌株이고, A는 安興養殖場에서 分離한 菌株로 하였다.

再現確認試驗：純粹培養한 6菌株를 새우肉質汁培地에서 25℃, 24時間 培養한 것을 滅菌된 生理的 食鹽水에 懸濁시켜 平均體重 2. 4g되는 보리새우의 第4 腹節筋肉內에 接種하였다. 接種菌數는 보리새우 體重 1g當, 2.5×10^{7} CFU/g, 2.5×10^{6} CFU/g, 2.5×10^{6} CFU/g, 2.5×10^{5} CFU/g, 2.5×10^{4} CFU/g 2.5×10^{3} CFU/g의 5段階로 各 群마다 6마리씩 接種하였다. 接種한 후 10일간 보리새우의 生死與否와 죽은 직후 病理組織學的 檢査를 하였다.

病理組織學的 檢査：病든 새우의 아가미, 心臟, 림프器官 및 腹節筋肉을 Davidson液에 넣고, 每日 1回씩 交換하면서 4일간 固定하였다. 그후 70% 에칠알코올에 옮긴후 常法에 따라 5μm paraffin切片을 製作하여 觀察하였다(Plate 2,3).

結　果

分離菌의 性狀：分離菌은 모두 그람 陰性이며 胞子가 없고, 한쪽에 한개의 鞭毛를 가지며 活潑히 運動한다. 크기는 0.6～1.0×1.0～3.4μm이며 短桿菌이었다.

食鹽을 2% 加한 BHI寒天平板培地上에서 25℃, 24시간 만에 直徑 0.5mm의 Colony를 形成한다. colony는 正圓形이며 가장자리가 약간 隆起되기 濕潤性으로 光

Table 2. Biological characteristics of isolated strains

Characteristics	N1	N2	N3	A1	A2	A3
Growth on inhibitory						
Media :						
SS Agar	−	−	−	−	−	−
2% NaCl BHI Agar	+	+	+	+	+	+
BTB Teepol Agar	+	+	+	+	+	+
Brilliant Agar	−	−	−	−	−	−
Temperature for growth						
at 5℃	−	−	−	−	−	−
10℃	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
25℃	+	+	+	+	+	+
30℃	+	+	+	+	+	+
37℃	−	−	−	−	−	−
NaCl tolerance :						
0%	−	−	−	−	−	−
1.0%	+	+	+	+	+	+
2.0%	+	+	+	+	+	+
3.0%	+	+	+	+	+	+
0.5%	−	−	−	−	−	−
Sensitivity to 0/129	+	+	+	+	+	+

Note (+) : weak or delayed positive.

澤이 있었다.

分離菌株 및 對照菌株의 生物學的 性狀檢査 結果는 Table 2과 같다. 培養菌株는 25℃, 食鹽 2%를 加한 條件下에서 SS寒天培地나 Brilliant 寒天培地에서는 發育하지 않으나, BTB Teepol 한천배지나 2% NaCl을 첨가한 BHI한천배지에서는 잘 자랐다. 보통 한천배지에서는 20~25℃에서 잘 자랐으며, 10℃에서는 잘 자라지 않았고, 5℃와 37℃에서도 자라지 않았다.

Vibrio static agent 0/129에서 感受性을 나타내었다.

分離菌의 生化學的 性狀

分離菌 및 對照菌의 生化學的 性狀은 Table 3과 같다.

分離菌은 Oxidase, Catalase를 生産하고, OF test에서는 醱酵的으로 分解하지만 gas는 생산하지 않는다. Indole 陽性, MR 陽性, VP 陽性, Citrate 陽性이다. H_2S는 生産하지 않으며 窒酸鹽을 還元한다.

單一炭素源으로서의 有機化合物의 利用을 보면 Table 4와 같다. 分離菌은 lactate, succinate, malate, gluconate, glucose, fructose, sorbitol를 이용하지만 formate oxalate, tartrate, alginate, tryptophan, alanine, arabinose는 利用하지 않는다.

分離菌과의 比較

南海養魚場에서 分離한 N-1, N-2, N-3菌株와

Tabel 3. Biochemical characteristics of isolated strains

Characteristics	N1	N2	N3	A1	A2	A3
Oxidase	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+
O-F test	F	F	F	F	F	F
Indole	+	+	+	+	+	+
MR test	+	+	+	+	+	+
VP test	−	−	−	−	−	−
Simmon's citrate	+	+	+	+	+	+
Hydrogen sulfide	−	−	−	−	−	−
Nitrate reduction	+	+	+	+	+	+
MB reduction	+	+	+	+	+	+
Urease	−	−	−	−	−	−
β-galactosidase	+	+	+	+	+	+
Arginine hydrolysis	−	−	−	−	−	−
Starch hydrolysis	+	+	+	+	+	+
Gelatin liquefaction	+	+	+	+	+	+
Casein digetion	+	+	+	+	+	+
Tributyrin digestion	+	+	+	+	+	+
Xantine disolution	+	+	+	+	+	+
Chitin decomposition	−	−	−	−	−	−
Lysine decarboxylase	−	−	−	−	−	−
Argine decarboxylase	−	−	−	−	−	−

Note F : fermentated reaction

Table 4. Utilization of organic compound of isolated strains

Characteristics	Utilization	Charactetistics	Utilizaton
Formate	−	Acetate	(+)
Lactate	+	Oxalate	−
Succinate	+	Malate	+
Malonate	−	Pyruvate	+
Tartate	−	Alginate	−
Tryptophan	−	Phenol	−
Benzoate	−	Gluconate	−
Alanine	−	Glucose	+
Arabinose	−	Rhamnose	−
Fructose	+	Mannose	+
Sucrose	+	Lactose	+
Cellobiose	+	Glycerol	+
Mannitol	+	Sorbitol	+

安興養魚場에서 分離한 A−4, A−5, A−6菌株를 Takahashi(1985)가 各種魚類에서 分離한 *Vibrio* sp., Hatai (1975)가 방어에서 分離한 *Vibrio* sp., Kusuda(1979)가 各種 魚類에서 分離한 *Vibrio* sp., Yasunaga(1977)가 참돔에서 分離한 *Vibrio* sp., Ueki(1988)가 담수새우인 *Plaemon paucidence*에서 分離한 *Vibrio* sp.와 比較하였다(Table 5).

主要한 生化學的 特性이 Takahashi가 分離한 *Vibrio* sp.와 같았으며, 담수새우에서 Ueki(1988)가 分離한 *Vibrio* sp.와 類似하였다. 방어나 넙치, 참돔에서 分離한 Hatai(1975), Kusuda(1979), 朴(1986), Yasunaga(1977)의 *Vibrio* sp.와는 Table 5에서 보는 바와같이 약간의 차이가 있었다. Mannitol, salicin의 利用度와 鹽分濃度 및 發育溫度에서도 差異를 나타냈다.

分離菌에 의한 再現試驗

分離菌에 의한 病原性實驗 結果는 Table 6에 나타내었다. 보리새우 1g當 2.5×10^7 CFU/g接種한 1군은 接種한지 2日부터 4日 사이에 모두 죽었다. 2군인 2.5×10^6 CFU/g接種한 것도 3~4일 만에 모두 죽었다. 2.5×10^5CFU/g接種한 6마리중 10日까지 1마리가 살아남았다. 반면, 2.5×10^4과 2.5×10^3CFU/g接種한 것은 66.6%의 斃死率을 나타내었다. 또한, 이들 實驗 새우의 心臟이나 lymphoid organ에서 接種한 *Vibrio* sp.가 再分離 되었다.

病든 보리새우의 病理組織

Vibrio症으로 죽은 보리새우의 아가미는 姣褐色으로 변하였다(Plate 1).

Lymphoid organ : 보리새우나 대하의 胸節筋肉의 中腸腺 앞에, 胃의 下端에 있는 1쌍의 少卵形 器官을 Lympoid organ(Oka 1969, Egusa 1988)이라 부르고 있다. *Vibrio* sp.에 감염된 보리새우는 이 기관이 壞死되고 melanine 沈着이 中央部에 일어나는 小集合體(nodule)가 많이 觀察된다. Lymphoid organ의 構造는 血管(central artery)을 지닌 굽어진 모양인데 이것의 대부분이 sheath 주머니에 싸여져 있다. 이 構造의 細胞나 組織이 壞死되고 多數의 濃縮核이 여기저기 남아 있었다. 이 주머니도 崩壞되어 中心 血管이 擴張되어 있다.

黑色結節 形成 : 黑色結節의 크기는 작은 것이 10 μm이고 큰 것은 120μm나 된다. 圓形이며 중앙에 黑色

Talbe 5. Main characteristics of the isolates and *Vibrio* sp. reported by several workers.

Characteristics \ Strain No.	N−1	N−2	N−3	A−4	A−5	A−6	*Vibrio* sp. 1985 (YASUNAGA)	*Vibrio* sp. (HATAI 1975)	*Vibrio* sp. 1975 (Takahashi 1979)	*Vibrio* sp. (KUSUDA 1977)	*Vibrio* sp. (UEKI 1988)
Single polar flagellum	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Indole	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Citrate utilization	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0/129 sensitivity	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	+
Novobiocin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gelatin liquefaction	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Starch hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−
Hydrogen sulfide	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−
Acid from arabinose	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
monnose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−
mannitol	−	−	−	−	−	−	−	+	+	+	+
inositol	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
salicin	−	−	−	−	−	−	−	+	+	−	−
0% NaCl	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−	+
1%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−
7%	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−
Growth at 5℃	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
25℃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37℃	−	−	−	−	−	−	−	+	+	+	+
42℃	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−
Inhibitory media											
SS agar	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
BTB teepol agar	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MacConkey agar	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Brilliant agar	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−

部位가 있고, 細胞集合體(nodule)가 壞死된 組織內에 散在하고 있다. 그 基本的인 構造는 거의 一定하다. 이 中心部에는 細胞의 集落이 있고, 이것을 黑色 melanine이 沈着되어 層을 形成하고 있다(Plate 4).

다른 組織 : 아가미, 心臟, 中腸腺, 胃, 腸, 生殖器, 造血器, 神經節과 腹節筋肉에는 明白한 壞死病巢가 觀察되지 않았다. 黑褐色結節은 아가미 lamella에 잘 나타났다(Plate 5, 6).

분리된 Vibrio균을 접종하였을때 Lymphoid organ이 심한 細菌 侵害를 받아 이 器官의 壞死가 일어났고, 細菌集落을 中心으로 血球가 集結하고 melanine色素가 沈着되어 黑褐色結節이 많이생긴다. 이와같은 黑褐色

Table 6. Pathogenicity of the isolated to Kuruma Prawn *Penaeus japonicus*

Group	Mean body weight of prawn tested (g)	Inoculated number of viable cells/g (b.w.)(A-4 strains)	Number of prawn challenged	Number of death	Mortality (%)
1	2.3	2.5×10^{7}	6	6	100
2	2.4	2.5×10^{6}	6	6	100
3	2.3	2.5×10^{5}	6	5	83.3
4	2.5	2.5×10^{4}	6	4	66.6
5	2.4	2.5×10^{3}	6	4	66.6
Control	2.4	non-infected	6	0	0

結節이 Lymphoid organ에서도 觀察되었다.

考 察

養殖 보리새우에 疾病이 發生하여 病들어 죽은 새우에서 分離된 細菌은 모두 같은 性狀과 形態를 지닌 *Vibrio* sp.인것을 알게 되었다.

이 菌은 健康한 보리새우에 대하여 强한 病原性을 가지는 것을 알 수 있었다. 따라서 南海 및 安興 양식장에서 斃死된 보리새우는 이 *Vibrio* sp.에 의하여 폐사된 것으로 推定된다.

分離菌의 形態學的, 生物學的 및 生化學的 성상을 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 1, Begey's Manual of Determinative Bacteriology 8th 및 坂崎, 木村의 기재등을 비교한 결과 분류상의 위치로서 Vibrio속으로 동정되었다. 분리균은 그람 양성, 아포를 形成하지 않는 桿菌으로서 端在性 單鞭毛를 지니며, 운동성을 지닌다. Glucose를 醱酵的으로 分解하나 gas는 生産하지 않는다. 單一炭素原으로서 glucose와, fructose를 利用하고, Vibrio static agent 0/129에 感受性을 나타내며, Bergey's manual과 坂崎의 Vibrio屬 細菌의 定義에 一致하였다.

分離細菌중 檢査한 6菌株는 同一種으로서 그 形態, 0/129 감수성, glucose를 醱酵的으로 分解, 鹽分耐性 등의 모든 性狀으로보아 Vibrio屬으로 分類되었다. 이 菌의 성상을 Bergey's Manual에 記載된 Vibrio속 세균과, 다른 *Vibrio* sp.등의 예와 比較하였으나 이들과는 모두 一致하지는 않는다. 1985년 Takahashi등이 보리새우에서 分離한 *Vibrio* sp.와 특히, 1988년 Ueki등이 줄새우에서 분리한 *Vibrio* sp.균주와 比較하면 대부분의 特徵이 같았으나, 分離한 균주는 37℃에서도 자라났다. 食鹽添加에 있어서 0%와 0.5%에서도 發育되었다. 또한 糖利用度에 있어서도 sucrose를 이용하여 酸을 生産하지 못하였다.

要 約

새우 養殖場에서 Vibrio病으로 여겨지는 보리새우에서 分離한 6菌株를 檢討한 結果 *Vibrio* sp.로 同定되었다.

分離菌株는 모두 같은 特徵을 나타내었으며 같은 群으로 推定되었다.

分離菌으로 보리새우에 再感染시킨 結果 養殖場의 病든 새우와 같은 病理學的 變化를 나타내었다.

參 考 文 獻

Egusa S., Y. Takahashi, T. Itami and K. Momoyama (1988) : Histopathology of Vibriosis in the Kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. Fish pathology 23(1), 59~63.

畑井喜雄, 岩橋義人, 江草周三(1975) : 養殖ハマチ病魚よりビブリオについて. 魚病研究, 10(1), 31~37.

Krieg, N. R. and J. G. Holt(1984) : Bergy's manual of systematic bacteriology, Williams & Willkins

Bolitmore, U.S.A. Vol. 1, 964～969.

Kusuda R., H. Sako and K. Kawa(1979) : Classification of Vibrio isolated from diseased fish 1. Fish Pathology, 13(3), 123～137.

Oka M.(1968) : Studies on *Paeneous orientalis* Kishinouyz structure of the Newly Found Lymphoid organ. Bul. Japan. Soc. Fish. 35(3), 196～199.

朴性佑, 田世圭(1986) : 養殖방어에서 分離한 病原性 비브리오菌의 特性에 대하여. 韓水誌 19(2), 147～154.

坂崎利一(1967) : 腸炎ビブリオとその類似細菌. 納券書店, 東京, pp. 83～115.

Takahashi Y., Y. Shimoyama and K. Momoyama(1985) : Pathogenicity and Characteristics of *Vibrio* sp. isolated from cultured Kuruma prawn. Bull. Jap.. Soc. Fish., 51(5), 721～730.

Ukei N., T. Sugiyama and K. Muroga(1988) : Vibrio infection in the freshwater shrimp(*Palaemon paucidence*) predisposed by a parasitic Isopod (*Tachea chinensis*) infestation. Fish Pathology, 23(3) 175～178.

Yasunagan and N. Yamamoto(1977) : Characteristics of bacterial strains isolated from so-called Vibriosis of cultured red sea bream in the winter of 1977. Fish pathology, 12(3), 209～214.

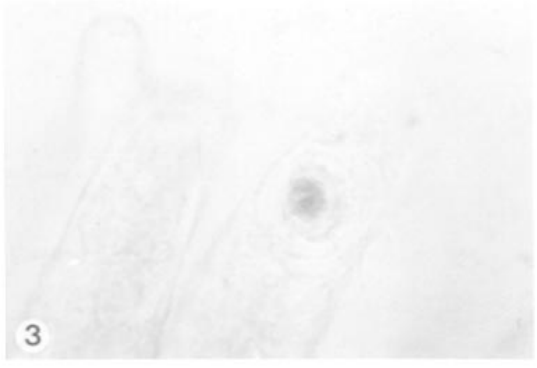
Zzura Y., K. Tajima, M. Yoshimizu and T. Kimura (1980) : Studies on the taxonomy and Serology of causative organisms of fish Vibriosis. Fish pathology 14(4), 167～179.

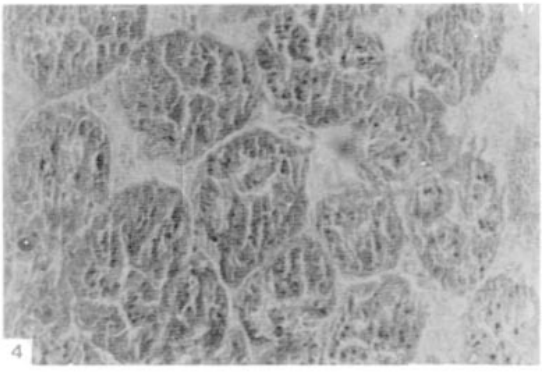
Explanation of Plate

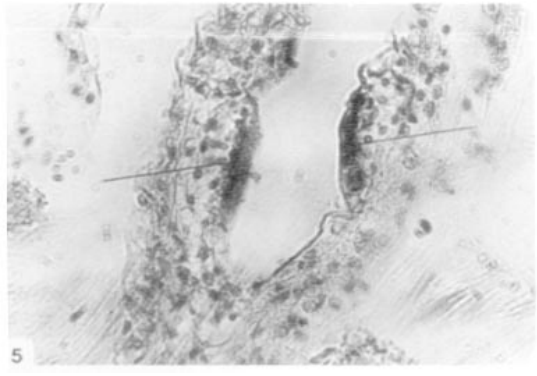
1. Normal gill coloration(above), in contrast to red-brown gill discoloration(below).
2. *Penaeus japonicus* showing structure of the cephalothorax area, lymphoid tissue is exposed.
3. The typical symptom of the diseased Kuruma prawn(*Penaeus japonicus*), showing the brown spot of gill.
4. Large and small bacterial colonies without cellular in an necrosed and disintegrated sheath of the lymphoid organ.
5. Nodules showing bacterial colony in the gill lamella(arrow).
6. Myocardial necrosis, haemocyte infiltration and myophagia in a prawn.

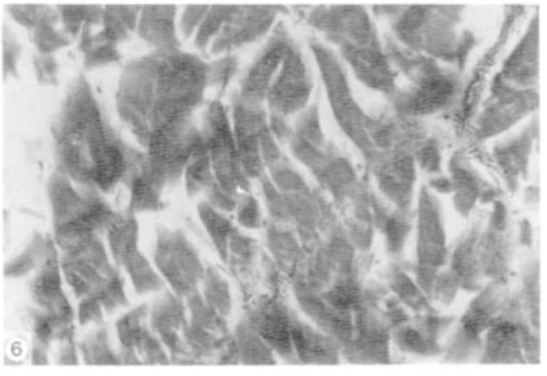
1

2


3


4


5


6