

## *Edwardsiella tarda*에 의해 유발된 가물치 복수증에 관한 연구

이훈구 · 성희경\* · 박이현\* · 조극래\*\* · 김영지\*\*\*

부산수산대학교 수산해양대학 미생물학과 · \*부산백병원

\*\*인제대학교 중앙의학 연구소 · \*\*\*목포 전문대학 임상병리과

## The Study on the Experimental Ascite by *Edwardsiella tarda* in Snakehead (*Channa argus*)

Hun-Ku LEE · Hee-Kyung SEONG\* · Lee-Heon PARK · Keug-Rae JO\*\* and Young-Ja KIM\*\*\*

Department of Microbiology, National Fisheries University of Pusan,  
Pusan 608-737, Korea

\*Pusan Paik Hospital, Pusan, Korea

\*\*Central Institute of Medicine, Inje University, Pusan, Korea

\*\*\*Department of Clinical Pathology, Mokpo Junier College, Mokpo, Korea

The bacterium *Edwardsiella tarda* was injected into healthy snakeheads (*Channa argus*) in order to prove the causative agent of ascite. The bacterium dominantly isolated from 2 cultured ascite snakeheads was injected into fish by the dose of  $5 \times 10^6$  CFU/ 0.25ml, but the same dose of 0.65% physiological saline was injected into the each control. The injected fish was divided into 4 groups such as intraperitoneal, intramuscle, control intraperitoneal and control intramuscle according to their injection points. Each was composed of 10 healthy snakeheads respectively. Ascites and haemorrhagic ulcers became distinct 5 days after injection, but controls did not show any abnormal symptoms during the experimental period. *Edwardsiella tarda* was reisolated out of the injected fish's ascite, liver, kidney, spleen and haemorrhagic ulcer on the skin. Regardless of the injecting methods, liver was necrotized more severely than any other internal organ, but both the glomeruli of kidney and spleen were considerably damaged. Necrosis of muscle and a number of leucocytes were observed at the ulcerous region of the intramuscular injected fish. It is concluded that judging from the above results the *Edwardsiella tarda* is a causative agent to cause ascite in snakehead.

### 서 론

1970년 한국에서 뱀장어 양식이 처음 소개된 이후 내수면 양식업은 크게 발전되었다. 양식어종도 다양화되어 송어, 잉어류 및 가물치 등이 전국 곳곳에 산재된 호소와 댐 강 유역에서 집단으로 양

식되고 있다(전국 내수면 양식업자 명단 1989).

현재 가물치(*Channa argus*) 양식은 부산을 중심으로 낙동강 유역에서 많이 이루어지고 있다.

그러나 밀집사육의 결과 환경의 변화와 어체의 내병력 약화로 질병이 만연되어 적지 않은 피해를 입고 있다. 어류의 질병은 환경 수질등 외부적인

요인에 의하여 발생되기 때문에 그 원인을 밝히기는 쉽지 않다(Burton *et al.*, 1987; Ishihara and Kusuda, 1982; Kanai *et al.*, 1988; Minagawa *et al.*, 1983).

그러나 *Edwardsiella*(Amandi *et al.*, 1982)나 *Aeromonas*(Brenden and Huizinga, 1986), *Vibrio*(Egidius, 1987), *Flexibacter*(Farkas and Oláh, 1986) 등 몇 종류의 세균은 어류에 질병을 일으키는 원인균으로 밝혀져 있다.

이중 *Edwardsiella* 속은 Sakazaki(1962)에 의해 뱀으로부터 처음 분리되었다. 분류학적으로는 장내 세균에 속하고 있으며 *E. tarda*, *E. hoshinae*, *E. ictaluri* 등 3종으로 구성되어 있다(Farmer 1984; Hawke *et al.*, 1981; Waltman *et al.*, 1986).

이 균에 의해서 질병이 유발되는 어종은 뱀장어(Minagawa *et al.*, 1983; Wakabayashi and Egusa, 1973), 연어류(Amandi *et al.*, 1982) 등의 담수어종과 여러 종류의 해산어종이다(Bullock and Herman, 1985).

국내 보고로는 케양증을 가진 양식 가물치(李, 1989)와 자연산 개구리(李, 1989) 등에서 분리된 것들이 있다.

필자들은 가물치의 케양증과 복수증의 원인을 규명하기 위하여 세균학적 조사를 계속하던 중 복수증이 있는 2마리 어체로부터 *E. tarda*를 우점종으로 분리하였다.

그리고 이 세균이 가물치에 복수증을 유발시키는 원인균인지를 확인하기 위하여 분리된 균주 *E. tarda* p-99를 선택하여 건강한 양식 가물치에 피하와 복강에 각각 주사했다.

그 결과 인공 복수증과 출혈성 케양이 실험어체로부터 유발되었고 여기에 따른 병소부위의 조직학적 조사가 이루어졌기에 이를 보고한다.

## 재료 및 방법

### 어체

병어체는 1989년 10월 부산근교 명지지역 가물치 양식장에서 케양증이 있는 어체 두마리를 구하였다. 병의 진행과정을 관찰하기 위하여 病魚를 30×40×50cm 플라스틱 여과수조에 넣고 특별한 공기주입 장치없이 20℃에서 4개월간 사육하였다. 수조에 옮긴 후 일주일이 경과한 다음 복수에 의한 상복부 팽만이 관찰되었다.

인공감염 실험에 이용된 가물치는 본 실험실에서 사육된 것으로 연령은 1년생이며 무게는 30~50

g으로, 사용된 개체수는 총 40마리였다.

### 病魚로부터 균분리

균분리를 위하여 사용된 배지의 제조 방법은 Difco Manual(1985)을 따랐고 조직 또는 복수로부터의 균체 분리는 李(1988, 1989), 동정은 Ewing(1986)을 따랐다.

### 인공감염

病魚에서 우점종으로 분리된 *E. tarda*를 Brain Heart Infusion(BHI) 액체배지 5ml에 1백금이를 접종한 다음 37℃ 항온기에서 24시간 배양하였다. 이 배양액에서 1ml를 취하여 BHI 액체배지가 50ml 담긴 100ml 삼각 플라스크에 넣고 같은 조건으로 배양하였다. 배양된 균체는 0.65% 생리식염수로 원심분리(10,000 rpm 10 min 3회) 하여 최종적으로 집균된 균을 0.65% 생리식염수에 5×10<sup>6</sup>CFU/0.25ml 되도록 조절하였다.

### 인공접종

실험실에서 사육된 건강한 가물치에 복강주사(10마리)와 근육주사(10마리)를 하였으며 주사바늘은 25G를 사용하였고 균체수는 Kaige(1986), Brenden and Huizinga(1986) 등의 방법을 변형하여 개체당 5×10<sup>6</sup>CFU/0.25ml이었다.

대조군은 복강과 근육에 각각 10마리씩 0.65% 생리식염수 0.25ml을 주사하였다. 어체의 마취는 Lidocaine(홍성약품 주식회사 제품) 200ppm을 지하수에 녹여 사용하였다.

인공감염후 15일동안 어체를 관찰하였다. Koch의 원칙을 증명하기 위하여 개체에서 *E. tarda*의 재분리는 앞의 균분리 방법에 준하였고 조사된 부위는 피부, 아가미, 간, 신장, 비장, 장 등이었다.

### 조직 검사

인공접종후 복수증과 케양증을 일으킨 어체 중 피하주사된 1개체와 복강주사된 1개체를 택하여 각 부위별로 조직학적 조사를 실시하였다. 건강한 가물치 2마리로부터 해당 장기를 같은 방법으로 조사하여 비교하였다.

표본 제작 방법은 朴(1984), 李(1986), 田(1985), Post(1983) 등을 따랐고 Harris Hematoxylin Eosin 법으로 염색하여 광학 현미경으로 표본을 검경하였다.

### 참조 균주

균분리시 참조로 사용된 표준균주는 *E. tarda*

ATCC 15947, 15469였다.

## 결 과

양식장으로부터 가져온 병든 가물치의 복수와 병소 부위로부터 모두 166균주가 분리되었고 이중 152균주가 동정되었으며 *E. tarda*(94주)가 우점종으로 나타났다. 그외 *Citrobacter freundii*(36주), *Morganella morganii*(19주), *Aeromonas hydrophila*(3주), 나머지 14균주가 미동정되었다(Table 1).

피하주사된 가물치는 4일째에 행동이 부자연스러워지기 시작하여 5일째 4마리, 7일째 1마리, 10일째 1마리가 죽었다. 특히 7일후 죽은 개체의 주사부위에서 출혈을 수반한 조직괴사가 일어났고, 그밖에 눈, 아가미, 가슴부위에 출혈이 나타났다. 나머지 사체는 외부와 장기에 이상이 없었다.

복강에 균체가 주사된 가물치는 7~15일 동안 5마리가 죽었다. 7일후 죽은 개체는 항문 주위에 출혈이 수반된 궤양이 있었고, 11일과 14일후 죽은 개체에서는 복수증이 관찰되었다(Fig. 1).

복강과 피하에 각각 0.65% 생리식염수가 0.25 ml씩 주사된 대조군에서는 실험기간중 이상이 없었다. 인공감염 결과 죽은 가물치의 복수와 궤양 조직에서 재분리된 균주는 모두 *E. tarda*였고, 내장과 신장 조직에서 분리된 균주는 90% 정도가 *E. tarda*로 동정되어 Koch의 원칙이 증명되었다.

인공감염후 복수증과 궤양 증세를 나타낸 어체에 대하여 조직검사를 한 결과는 다음과 같다.

피하주사와 근육주사된 모든 개체의 간세포에서는 심한 세포 분해 현상이 나타났고, 비장에서도

피하주사의 경우 심한 세포 분해 현상이 나타났다. 신장의 사구체와 세뇨관의 손상은 복강주사가 피하주사보다 더욱 심했으며 위와 장의 점막층 괴사는 양쪽 모두 심하였다. 아가미는 빗살무늬 부분에 피하주사와 근육주사로 인하여 약간의 퇴화현상이 관찰되었다.

대조군으로 관찰한 가물치의 해당 장기는 모두 정상으로 나타났다.(Fig. 2).

## 고 찰

가물치에 *E. tarda*를 인공감염시켜 복수증을 유발시킨 보고는 본 연구가 처음이다.

양식 가물치의 주요 질병은 궤양증과 복수증이다. 그러나 피해가 특히 심한 궤양병에 대하여 명확한 원인 규명은 아직 이루어져 있지 않으나 Boonyaratpalin *et al.*(1985) 등이 양식 가물치에서 이 질병을 보고하였고, Llobrera(1987)가 가물치 일종인 *Ophiocephalus striatus* 궤양 부위에서 *A. hydrophila* 균주를 분리하여 보고한 경우가 있다. 국내에서는李(1988)에 의해서 궤양증 가물치에서 *E. tarda*가 분리되었을 뿐이다.

육상 동물도 환경에 의한 영향등으로 질병의 원인과 원인균을 밝히기는 쉽지 않다. 어류는 이들보다 환경조건(수질, 염류, 유기인, 중금속, 이온 등)에 훨씬 민감한 영향을 받기 때문에 세균이나 바이러스 등 생물학적 요인만이 질병을 유발시킨다고 말하기 어렵다(Toor *et al.*, 1983; Chowdhury and Wakabayashi, 1989; Chen *et al.*, 1982; Castric and de Kinkelin, 1984; Liu and Wang, 1986; Mushiaki *et al.*, 1984).

그러나 본 실험의 결과를 고찰할 때 필자들이 양식장에서 관찰한 복수증과 본 실험실에서 유발된 증세가 매우 비슷했다. 또 이들 병든 개체로부터 분리한 우점종 균인 *E. tarda*를 건강한 어체에 복강주사와 피하주사를 했을때 역시 똑같은 증세가 실험군에서 재현되었다.

주사방법에 관계없이, 복강주사와 피하주사를 놓았던 개체 모두에서 조직검사결과, 신장, 세뇨관, 간이 크게 손상되었다. 그 이유는 첫째 *E. tarda*가 직접 해당장기에 침윤되어 기계적인 손상을 일으킬 수 있을 가능성과 둘째, 균이 분비한 독소등의 영향일 수 있다. 그러나 본 실험에서 현미경 관찰 소견으로는 두 장기 조직내에서 균체가 직접 관찰되지도 않았으며 세균에 의한 침윤현상도 발견할 수 없었다. 따라서 세균이 분비한 몇 종류의 대사

Table 1. Microflora isolated from ascitic *Channa argus*

Species	Strains	Isolated Organ	Percentage(%)
<i>Edwardsiella tarda</i>	94	Intestine(37) <sup>a</sup>	61
		Liver(26)	
		Ascites(22)	
		Caudal fin(9)	
<i>Citrobacter freundii</i>	36	Intestine(7)	24
		Liver(10)	
		Ascites(9)	
<i>Morganella morganii</i>	19	Caudal fin(10)	13
		Intestine(4)	
		Liver(6)	
<i>Aeromonas hydrophila</i>	3	Ascites(9)	2
		Liver(2)	
		Ascites(1)	

a: strains

물질에 의해서 이루어졌다고 생각되나 자세한 원인은 추후 보완되어야 되리라 생각된다. 기타 조직이 손상된 경우, 장기 조직의 손상은 복강주사쪽이, 근육조직의 손상은 피하주사쪽이 심하였다. 이는 주사부위와 예상되는 조직손상의 결과가 일치되는 것을 의미한다. 본 실험에서 나타난 신장, 비장, 간 등의 손상은 Sae-Oui *et al.*(1984) 등이 비단잉어로부터 얻은 인공감염 실험결과와도 일치되며 Ishihara and Kusuda(1981) 등이 실시한 실험의 결과와도 잘 일치된다.

더구나 항문 주위의 출혈성 괴사조직의 형성은 Huang and Liu(1986), Kaige *et al.*(1986)과 완전히 일치되었지만 본 실험에서는 간과 비장에서 병적인 이상돌기 출현이 관찰되지 않았다.

어체당 접종된  $5 \times 10^6$  CFU/0.25ml 생균수의 적정수는 이미 보고된 뱀장어나 기타 몇 종의 어종을 대상으로한 인공실험들의 결과를 참조하였으나 *E. tarda*가 가물치 장과 조직에 손상을 일으킬 수 있는 ID<sub>50</sub>의 수치등은 차후 실험을 통해서 조사될 문제라고 생각한다.

이상의 본 실험에서 얻은 인공감염 실험과 그 조직의 병변등의 관찰 결과들을 종합해 볼 때, 장내세균 *E. tarda*는 양식 가물치에 대하여 케양증의 직접 원인균인지에 관해서는 좀 더 연구가 필요하지만, 적어도 복수증 원인의 한 세균이라는 것은 분명하다는 결론을 얻게 되었다.

## 감사의 글

본 실험을 위하여 많은 가물치를 제공해 주신 이영석 · 이 동근 형제분께 충심으로 감사드리며, 또한 故 권 병갑씨께 안식이 깃들기를 기원합니다.

## 참 고 문 헌

박인환. 1984. 조직병리 검사법 pp. 91~99. 대학서림, 서울.  
 이종달. 1986. 진단세포학 pp. 43~69. 대학서림, 서울.  
 전국 내수면 양식업자 명단. 1989. 사단법인 한국 내수면 어업협회.  
 전세규. 1985. 어병학 pp. 98~120. 제일문화사, 부산.  
 Amandi, A., S. F. Hiu, J. S. Rohovec and J. L. Fryer. 1982. Isolation and Characterization of *Ed-*

*wardsiella tarda* from fall chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). Appl. Environ. Microbiol., 43, 1380~1384.  
 Boonyaratpalin, M., E. W. McCoy and T. Chittapalpong. 1985. Snakehead culture and its socio-economics in Thailand. Network of Aquaculture Centers in Asia Bangkok, Thailand.  
 Brenden, R. A. and H. W. Huizinga. 1986. Pathophysiology of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in goldfish, *Carassius auratus* (L.). J. Fish Dis., 9, 163~167.  
 Bullock, G. L. and R. L. Herman. 1985. *Edwardsiella* infections of fishes. U. S. Fish and Wildlife Service, Fish Dis. Leaflet 71, Kearneysville, West Virginia.  
 Burton, Jr. G. A., D. Gunnison and G. R. Lanza. 1987. Survival pathogenic bacteria in various freshwater sediments. Appl. Environ. Microbiol., 53, 633~638.  
 Castric, J. and P. de Kinkelin. 1984. Experimental study of the susceptibility of two marine fish species, sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and turbot (*Scophthalmus maximus*), to viral haemorrhagic septicaemia. Aquaculture, 41, 203~212.  
 Chen, C. R. L., H. Y. Chung and G. H. Kuo. 1982. Studies on the pathogenicity of *Flexibacter columnaris* - I. Effect of dissolved oxygen and ammonia on the pathogenicity of *Flexibacter columnaris* to eel (*Anguilla japonica*). CAPD Fish. Ser., 8, 57~61.  
 Chowdhury, B. R. and H. Wakabayashi. 1989. Effect of competitive bacteria on survival and infectivity of *Flexibacter columnaris*. Fish Pathol., 24, 9~15.  
 Difco Manual 10th ed. 1985. Detroit, Michigan 482-32 USA.  
 Egidius, E. 1987. Vibriosis: Pathogenicity and Pathology. A Review. Aquaculture., 67, 15~28.  
 Ewing, W. H. 1986. Edwards and Ewing's Identification of *Enterobacteriaceae*. 4th ed. Elsevier Science Publishing Co., Inc., N. Y.  
 Farkas, J. and J. Oláh. 1986. Gill necrosis a complex disease of carp. Aquaculture. 58, 17~26.  
 Farmer, III. J. J. 1984. Genus X. *Edwardsiella* In Bergey's manual of Systematic bacteriology Vol. 1. R. G. E. Murray ed. Williams & Wilkins.

- Baltimore U. S. A., pp. 486~491.
- Hawke, J. P., A. C. McWhorter, A. G. Steigerwalt and D. J. Brenner. 1981. *Edwardsiella ictaluri* sp. nov., the causative agent of enteric septicemia of catfish. Int. J. Syst. Bacteriol. 31, 396~400.
- Huang, S. T. and C. I. Liu. 1986. Experimental studies on the pathogenicity of *Edwardsiella tarda* and *Aeromonas hydrophila*, in eel *Anguilla japonica*. COA Fish. Ser. 8: 40~55.
- Ishihara, S. and R. Kusuda. 1981. Experimental infection of elvers and anguillettes with *Edwardsiella tarda* bacteria. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 47: 999~1002.
- Ishihara, S. and R. Kusuda. 1982. Growth and Survival of *Edwardsiella tarda* bacteria in environmental water. Bull. Jpn. Soc. Fish., 48, 483~488.
- Kaige, N., T. Miyazaki and S. S. Kubota. 1986. A histopathological study of edwardsiellosis in tilapia-experimental infection. Fish pathol., 21: 95~99.
- Kanai, K., S. Tawaki and Y. Uchida. 1988. An ecological study of *Edwardsiella tarda* in flounder farm. Fish Pathol., 23, 41~47.
- Lee, H. K. 1988. Isolation and antimicrobial susceptibility testing of *Edwardsiella tarda* from *Channa argus* in Korea. J. Fish pathol., 1: 95~101.
- Lee, H. K. 1989. Antimicrobial susceptibility testing of *Edwardsiella tarda* from forgs. J. Korean Soc. Microbiol., 24: 481~486.
- Liu, C. K. and J. H. Wang. 1986. Drug resistance of fish-pathogenic bacteria—II. Resistance of *Edwardsiella tarda* in aquaculture environment. COA Fish. Ser., 8, 56~67.
- Llobrera, A. T. and R. Q. Gautan. 1987. *Aeromonas hydrophila* associated ulcerative disease epizootic in Laguna de Bay, Philippines. Aquaculture. 67, 273~278.
- Minagawa, T., T. Nakai and K. Muroga. 1983. *Edwardsiella tarda* in eel culture environment. Fish Pathol., 17, 243~250.
- Mushiake, K., K. Muroga and T. Nakai. 1984. Increased susceptibility of Japanese eel *Anguilla japonica* to *Edwardsiella tarda* and *Pseudomonas anguilliseptica* following exposure to copper. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 50, 1797~1801.
- Post, G. W. 1983. Textbook of fish health. pp. 113~122, pp. 28~72. T. F. H. Publications Inc. USA.
- Sae-Oui, D., K. Muroga and T. Nakai. 1984. A case of *Edwardsiella tarda* infection in cultured coloured carp *Cyprinus carpio*. Fish Pathol., 19: 197~199.
- Toor, H. S., H. S. Sehgal and R. S. Sehdev. 1983. A case study of acute fish diseases in tanks loaded with high levels of organic manures. Aquaculture, 35, 277~282.
- Wakabayashi, H. and S. Egusa. 1973. *Edwardsiella tarda* (*Paracolobacterium anguillimortiferum*) associated with pond-cultured eel disease. Bull. Jpn. Soc. Fish., 39, 931~936.
- Waltman, W. D., E. B. Shotts and T. C. Hsu. 1986. Biochemical characteristics of *Edwardsiella ictaluri*. Appl. Environ. Microbiol., 51, 101~104.

1990년 10월 7일 접수  
1990년 11월 10일 수리





Fig. 1. Edwardsiellosis of snakehead(*Channa argus*). A; Naturally infected *C. argus*. It showed ascite with severely damaged tail fin by ulcer. B; Intramuscular injection in *C. argus* a) injected region b) haemorrhagic ulcer on the chest. C; Intraperitoneal injection in *C. argus* a) haemorrhage in eyes b) ascite. D; Intraperitoneal injection in *C. argus* a) severe ascites with haemorrhagic ulcer on the upper abdomen.

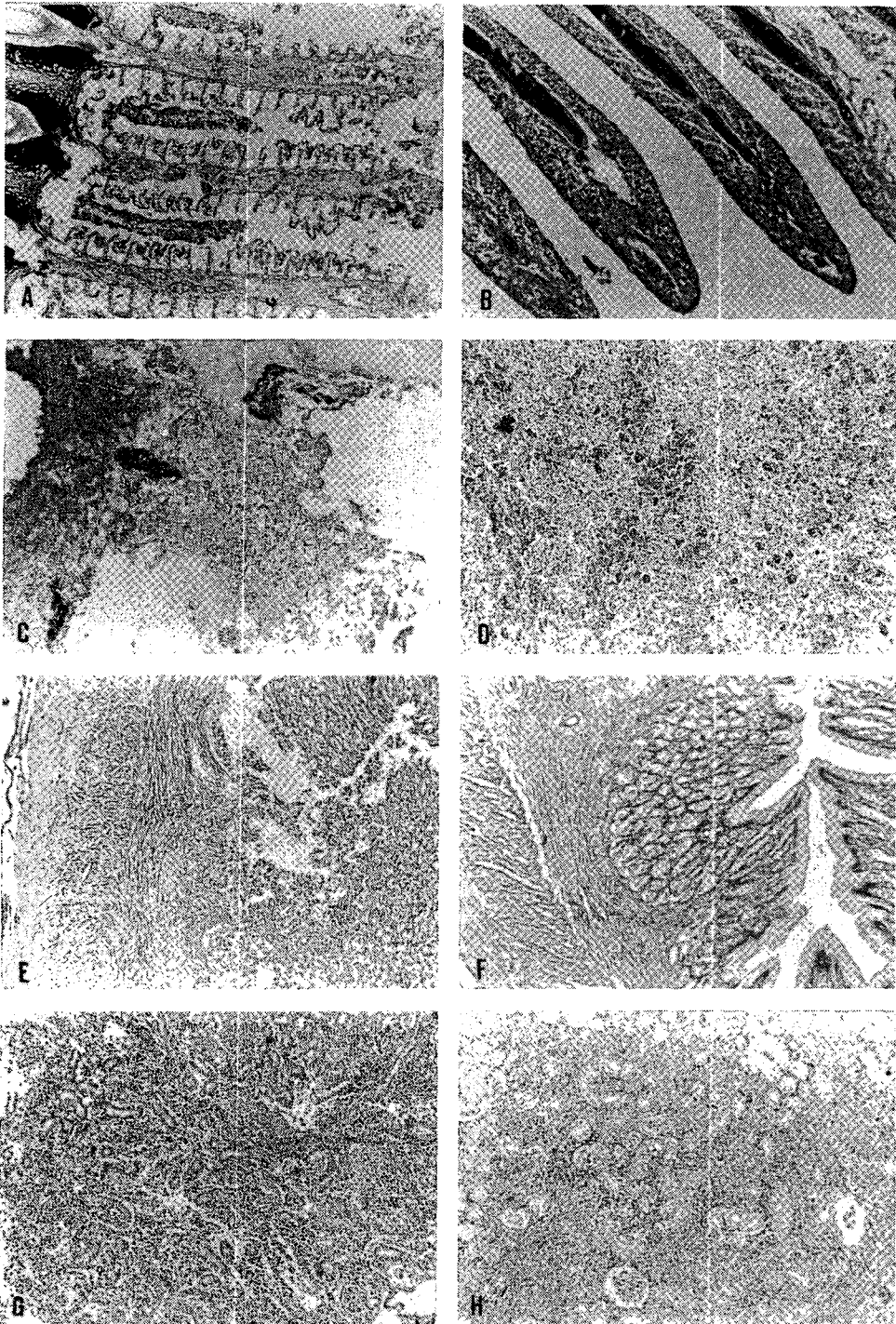


Fig. 2. All experimental specimens were observed 6 days post injection with  $5 \times 10^6$  CFU/0.25ml of *E. tarda* and the normal tissues were collected after injected 0.65% saline/0.25ml. Tissue staining was performed with H and E. A; Gill of intramuscular injected fish. The lamella was slightly degenerated and hyperplasia. B; Normal gill. C; Liver of intramuscular injected fish. The hepatocytes showed severely cytolitic necrosis. D; Normal liver. E; Stomach of intramuscular injected fish. The mucosa cells and lines were observed severe necrosis. F; Normal stomach. G; Kidney of intramuscular injected fish. Glomeruli and tubuli noted necrosis. H; Normal kidney.