

양식넙치에서 분리된 *Edwardsiella tarda*의 생화학적 및 혈청학적 특성에 관한 연구

방종득, 전세규*, 박수일*, 최윤정*

국립수산진흥원 병리과, *부산수산대학교 어병학과

1990년 7월부터 1991년 11월까지 우리나라에서 넙치 양식이 주로 이루어지고 있는 동해 및 남해안과 제주도 연안에 위치하고 있는 여러 넙치 양식장을 대상으로 넙치 에드워드병의 원인균인 *Edwardsiella tarda*를 분리하여, 이들의 생화학적 및 혈청학적 특성을 알아 보았다. 분리된 에드워드균은 131균주로서 이들의 생화학적 특성을 조사한 결과, 균주 모두 H₂S 및 indole를 생성하고, glucose, maltose, mannose, galactose 및 fructose등의 당을 산화시키고 가스를 형성하나 xylose, sucrose, rhamnose등의 당은 분해를 시키지 못하는 등의 특성을 가지고 있었다. 분리된 131균주 중 지역별로 대표가 되는 10개의 균주를 선택하여, 혈청학적 특성을 비교한 결과 일본에서 분류되고 있는 *E. tarda*의 세가지 혈청형을 나타내는 항혈청 E-22(혈청형 a), SU-138(혈청형 b) 및 SU-100(혈청형 c)과 대표균주간에는 항체가 E-22항혈청에 대하여는 2560-5120의 응집을 보인 반면, SU-138 및 SU-100의 항혈청에서는 각각 40-80과 40 이하의 응집을 보여 대표균주는 *E. tarda* serotype a와 유연성이 깊은 것으로 나타났다. 또한 대표균주들을 10% acrylamide gel상에서 전기영동하여 세균단백질을 비교하여 본 결과, 대표균주 모두가 단백질의 종류 및 양에 있어서 거의 동일한 것으로 나타났다.

Key Words : *Edwardsiella tarda*, *Paralichthys olivaceus*, antiserum, SDS-PAGE

*Edwardsiella tarda*가 미국에서는 catfish(Mayer and Bullock, 1973), 일본의 뱀장어, 틸라피아 등 담수어(Wakabayshi and Egusa, 1973: 宮下, 1984)뿐만 아니라 여러가지 어류에 질병을 일으키는 것으로서 잘 알려져 있는 장내세균류의 세균이다. 일본에서는 1980년경 넙치양식이 전국적으로 보급되면서 *E. tarda*를 원인균으로 하는 에드워드병이 발생하여 많은 피해를 나타내었다(安榮 등, 1982: 中律川, 1983). 본질병은 고수온기에 유행하기 쉬우나 단기간에 대량으로 폐사하는 경우는 거의 없으며, 일단 발생하면 장기간 폐사가 지속되는 경우가 많다(金井 등, 1988).

우리나라에서는 1980년대 후반부터 넙치양식이 시

작되면서, 양식 초기에는 별다른 질병증상을 찾아볼 수 없었으나 양식 회수가 거듭되고 사육밀도가 높아지면서 비브리오병, 연쇄구균증 및 에드워드병 등이 발생하여 많은 피해를 입고 있다. 이 중에서도 에드워드병으로 인한 피해가 크다. 양식넙치에 있어 에드워드병은 주로 성어양식장에서 많이 발생하여 피해를 입히고 있지만 최근에 와서는 종묘 생산장에서도 발생하여 피해를 입고 있으며, 감염된 종묘는 약제에 의한 치유가 잘 되지 못하고 성육도중에 지속적인 폐사가 일어나 누적폐사량이 심한 양식장은 70~80%에 이르는 양식장도 있어 이에 대한 대책이 요구되고 있는 실정이다.

본 연구는 에드워드병의 예방학적 측면에서 면역학

적 방법에 의한 대책을 강구하기 위한 기초 연구로서 우리 나라의 양식업체에 분포하고 있는 *E. tarda*의 생화학적 및 혈청학적특성을 구명하였다.

재료 및 방법

분리균의 생화학적 성상

병어의 채집은 1990년 7월부터 1991년 11월까지 동절기를 제외한 봄부터 가을까지 우리나라에서 넓치 양식이 많이 이루어 지고 있는 지역인 경북 영덕군, 영일군, 경남 거제군, 통영군, 남해군, 양산군 및 울산군, 강원도 명주군과 제주도 서귀포 및 남제주군 관내 육상 넓치 양식장을 대상으로 하였다(Fig. 1).

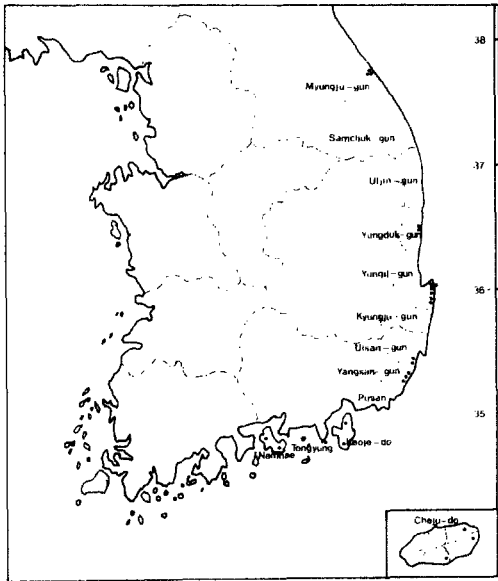


Fig. 1. Location of sampling station.

이들 양식장은 대부분 육상수조식으로서 해수를 양수하여 양식하고 있으나, 통영군관내 1개소는 해상가두리 양식장이며 영일군관내 2개소는 해상축제식 양식장이다. 또한 강원도 명주군소재 양식장은 모두 안인 화력발전소의 온배수를 이용하여 연중 18-20°C로 가온사육을 하고 있는 양식장이다.

시료어로부터 세균분리는 현지에 준비해간 1.5%

NaCl 첨가 TSA 배지(Tryptic soy agar, Difco)에 무균적으로 신장, 비장 및 복수를 취하여 도말 접종한 후 실험실로 운반하여 30°C에서 48시간 배양하였다. 배양후 *Edwardsiella tarda*를 분리하기 위하여 Procedures for the detection and identification of certain fish pathogens(AFS, 1979)에 따라 본균의 배지상 집락의 특징인 회백색이며 소형이고, 반투명한 집락을 순수 분리하여 oxidase음성이고 Triple sugar iron에서 H₂S를 생산하는 균을 대상으로 Manual of method for general bacteriology(ASM, 1981)와 J. F. Macfaddin(1980)에 따라 구체적인 생화학 실험을 실시하여 최종 동정하였다.

혈청형 비교

분리균주의 혈청학적 유연성과 혈청형은 참조 항혈청과 분리균주간의 응집소가를 조사하여 알아 보았다. 응집 실험시 세균들은 *E. tarda*가 분리된 양식장 중 지역별 발생빈도가 높은 10개 양식장에서 대표균주 하나씩을 선택하여 사용 하였으며, 항혈청은 일본에서 분리된 백장어 유래 *E. tarda*중 혈청학적 특성이 서로 다른 3종류의 균주들인 E-22 (혈청형 a), SU-138 (혈청형 b)과 SU-100 (혈청형 c)에 대한 항혈청(박 등, 1983)을 사용하였다. 혈청형 비교는 microtiter법으로 실시하였다. 분리된 세균들을 각각 BHI배지(Brain heart infusion, Difco)에 30°C에서 48시간 배양한 후 배양액에 formalin을 최종 농도가 0.4% 되게 넣고 16시간 동안 불활화 시켰다. 각 세균들을 PBS로 세번 세척한 후, 동 PBS로 습증량 2mg/ml의 빈도가 되도록 균액농도를 조절하고 U자형 96 well plate를 사용하였다. 항혈청은 PBS를 사용하여 2배씩 희석한 후 균액을 떨어뜨려 흔들어서 혼합한 후 Plate를 상온에서 1시간 동안 반응시킨 다음 4°C cold chamber에 넣어 하룻밤 정치한 후 육안으로 응집여부를 관찰 하였다.

세균 단백질의 전기영동

대표균주 10주의 단백질들을 비교 하기 위하여 Laemmli(1970)의 방법에 따라 전기영동을 실시하

였다. BHI배지(Difco)를 사용하여 30°C에서 48시간 배양한 세균들을 3,000g에서 원심분리한 후 침전물을 PBS(pH 7.4)로 재 현탁 하였다. 이와 같은 과정을 두번 더 반복하여 세균들을 세척한 다음 sonicator (Heated system-ultra sonics, Inc.)로 켜 후 3,000 g에서 원심분리하여 상등액을 취하였다. 상등액 20 µl를 동량의 SDS-sample buffer와 섞은 후 2분간 끓였다. 각 시료를 2.5%와 10%의 SDS-discontinuous acrylamide gel에 loading한 후 150 V에서 5시간 동안 running을 하였다. Gel상의 단백질을 Coomassie blue R-250로 4시간 염색한 후 destaining solution(methyl alcohol 7.5%, acetic acid 5%)을 사용하여 탈색 시켰다. Gel상 단백질들의 크기를 비교하기 위하여 molecular weight size marker(Bio-red)를 사용 하였다.

결 과

분리균의 생화학적 성상

각 지역 넙치양식장별 시료어로부터 분리된 *Edwardsiella tarda*는 Table 1과 같이 131주이며, 이들에 대한 생화학적 특성은 Table 2와 같다. 분리균은 모두 gram 음성의 간균으로서 운동성이 있는 것으로 나타났다. oxidase는 음성을 나타냈지만 catalase양성, TSI에서 H₂S를 생산하였다. 또한 indole 및 methyl red는 음성이었으며 citrate이용과 gelatin액화는 음성을 나타냈다. lysine, ornithine 및 arginine의 세가지 아미노산에 대하여 분리균은 lysine과 ornithine에는 아미노산 탈탄산효소를 생성하나 ornithine에서는 음성을 나타냈다. 당 분해시험에서 glucose, maltose, fructose 및 galactose는 모두 분해하여 산과 가스를 생성하였다. dextrin에 대해서는 92균주가 분해하였으나 39균주는 음성을 나타내었으며 sucrose, adonitol등의 당은 이용하지 않는 것으로 나타났다. 이들의 성상을 Bergey's manual of systematic bacteriology(1984)에 기재된 것과, Saka-

Table 1. Source of the present strains isolated from diseased flounder, *Paralichthys olivaceus*

Date	Location	Number of strains isolated	Selected strains
Jul. 1990	Namcheju, Cheju	7	FCI-900736
Aug. 1990	Tongyung, Kyungnam	3	FCM-900815
Sep. 1990	Yungil, Kyungbuk	2	FSD-900921
Sep. 1990	Yungduk, Kyungbuk	2	FCP-900902
Apr. 1991	Keoje, Kyungnam	15	FSW-910410
Apr. 1991	Ulsan, Kyungnam	20	FDS-910604
May 1991	Ulsan, Kyungnam	4	
Jun. 1991	Ulsan, Kyungnam	20	FDS-910604
Jun. 1991	Yangsan, Kyungbuk	14	FCR-910635
Jul. 1991	Yungil, Kyungbuk	7	
Jul. 1991	Yangsan, Kyungnam	4	
Jul. 1991	Ulsan, Kyungnam	7	
Aug. 1991	Yungil, Kyungbuk	13	FDB-910808
Sep. 1991	Namhae, Kyungnam	3	FNH-910930
Sep. 1991	Ulsan, Kyungnam	8	
Oct. 1991	Suguipo, Cheju	6	
Nov. 1991	Myungju, Kangwon	13	FSN-911130

Table 2. Biochemical reactions of strains isolated from diseased flounder, *Paralichthys olivaceus*

Substance	Reaction	Substance	Reaction
Gram stain	-131	acid from :	
Motility	+131	Glucose	+ G 131
Oxidase	-131	Dextrin	+ G 92 -39
Catalase	+131	Xylose	-131
TSI	K/A 131	Maltose	+ G 131
H ₂ S from TSI	+131	Sucrose	-131
Indole production	+131	Rhamnose	-131
Voges-Proskauer	-131	Adonitol	-131
Methyl red	+131	Lactose	-131
Simmon's citrate	-131	Arabinose	-131
O-F glucose	F131	Fructose	+ G 131
Arginine dehydrolase	-131	Inositol	-131
Phenylalanine		Mannitol	-131
deaminase	-131	Sorbitol	-131
Gelatine liquefaction	-131	Galactose	+ G 131
Decarboxylation of		Dulcitol	-131
lysine	+131	Threhalose	-131
arginine	-131	Salicin	-131
ornithine	+131		

K/A : alkaline/acid ; G : gas production + : positive ; - : negative ; F : fermentation.

zaki(1967), Wakabayashi와 Egusa(1973), 楠田理一 등(1976), Amandi 등 (1982), 宮下敏夫(1984), 中律川俊雄(1983) 및 최(1991) 등의 *Edwardsiella tarda*에 대한 특성과 비교한 결과, 분리균은 모두 *E. tarda*로 동정되었다.

혈청형 비교

대표균주(Table 1)와 *Edwardsiella tarda* 참조 항혈청과의 응집소가는 Table 3과 같다. 대표균주 모두가 혈청형 a type인 E-22항혈청에 대하여는 2560-5120의 응집가를 나타내었고, 혈청형 b 및 c인 SU-138과 SU-100의 항혈청에서는 각각 40-80과 40이하의 응집가를 보였다. 또한 킬라피아 유래 항혈청인 CHT-E와는 320-1280의 응집가를 나타내어, 대표균주는 참조항혈청 중 *E. tarda* serotype a에 강한 응집가를 보인 것으로 나타났다.

전기영동상 세균단백 pattern 비교

10개의 대표균주에 대한 protein pattern은 Fig. 2와 같다. 이 결과로부터 실험에 사용한 10개 균주들의 단백질들은 그 종류 및 양에 있어서 거의 동일한 것으로 나타났다. 그러나 45 kda(kilodalton)의 단백질은 균주마다 그 양이 조금씩 차이가 있었는데, FCP 900920(lane 3), FCM 900821(lane 5), FCI 900821(lane 8) 그리고 FSN 911130(lane 10)균주들은 다른 균주들에 비하여 45 kda 단백질의 양이 비교적 적었다.

고찰

양식넙치의 성장단계에서 에드워드병의 초기발생은 종묘생산지에서는 4월부터 전장 10cm 전후의 종묘에서 발생하기 시작하며 조기종묘를 이용한 양성장

Table 3. Agglutination test on selected isolates

Strain	Antiserum				
	E-22 ^a	SU-138 ^b	SU-100 ^c	CHT-E ^d	FCI-900821
FSD-900810	2560	40	20	1280	10240
FDB-910808	2560	40	-	640	10240
FCP-900920	2560	40	20	1280	5120
FSW-910410	2560	80	20	640	10240
FCM-900821	2560	40	-	1280	10240
FCR-910635	2560	40	20	1280	5120
FDS-910604	5120	40	20	1280	10240
FCI-900821	5120	40	-	640	10240
FNH-910930	2560	40	-	640	10240
FSN-911130	2560	80	20	1280	5120

^{a, b} antiserum against *Edwardsiella tarda* isolated from kidney and rectum content of eel in Japan

^c antiserum against *Edwardsiella tarda* isolated from water of eel farm in Japan

^d antiserum against *Edwardsiella tarda* isolated from tilapia in Korea

이상에서는 거의 발병하지 않으나 7월에서 11월까지
는 모든 크기의 넙치에서 발생하는 경향을 보였다.
종묘 크기에서도 병어는 미성어와 같이 에드워드병의
전형적인 증상인 체색이 검어지고 복부가 부어오른상
태이며 심한 경우 탈장증상을 나타내었다. 해부하여
보면 유백색의 복수가 차있고 절개한 부위로 복수가
넘쳐서 흘러 나오며 어떤때는 붉은색의 혼탁된 복수
를 나타낼 경우도 있다. 중증의 경우, 간은 형태를 구
분할 수 없을 정도로 용해 괴사되어 있으며 비장 및
신장은 극도로 팽대되어 있는 것을 관찰할 수 있다.
세균은 1.5% NaCl를 첨가한 TSA 배지에서 분리가
잘 되었으며 중증의 경우에는 장기에서 보다 복수에서
순수 분리가 쉬웠다.

분리된 131주의 성상은 당 분해를 제외한 제반성
상이 기 보고자들과 동일하나 dextrin은 131주중 39
주가 분해하지 못하는 것으로 나타났는데, Amend등
(1982), 申律川(1983), 安榮(1982)은 dextrin을 분
해하여 산과 가스를 생성한다고 하였는데 대하여
Wakabayashi와 Egusa(1973)는 dextrin을 분해시
키지 못한다고 한 것과는 차이를 보였다. TSI에서는
모든균이 H₂S를 생성하였으며 그 중에서 대부분이 H

Fig. 2. SDS-PAGE profiles of bacterial proteins on 10% acrylamide gel.

에서는 4월부터 발생하기도 하나 발생빈도는 낮다.
에드워드병 발생을 월별로 보면 4월에서 6월까지
는 당년생종묘에서 발병율이 높고 이 기간중에는 1년어

2S를 생성한 상태에서 가스를 생성하였다. 분리군의 성상은 지역별 양식장간에는 별 다른 차이를 찾아볼 수는 없었다. 혈청형 비교시험에 사용한 참조항혈청은 뱀장어 및 틸라피아 유래 *E. tarda* 항혈청으로서 특히 뱀장어 유래 항혈청과 높은 항체가를 보여 대표 균주의 혈청형은 *E. tarda* 혈청형 a인 E-22와 가장 유연성이 있는 것으로 나타났는데, 이는 뱀장어 및 틸라피아가 해산어가 아닌 담수어인 점을 고려해 볼 때, 해산어 유래의 *E. tarda*와 담수산어류 유래의 *E. tarda*간에 서로 유연성이 있는 것을 암시 해준다.

생화학적 특성이 거의 동일한 것으로 나타난 대표 균주들의 단백질 성분의 조성은 전기영동상에서 균주간에 거의 동일한 것으로 나타났으나, 다만 저분자인 45 kda에서 균주간에 양적으로 약간의 차이를 보였는데 이 점에 대해서는 더욱 검토가 되어야 할 것이다.

참 고 문 헌

- Amend A., Hiu S. F., Rohovec J. S., and Fryer J. L. : Isolation and characteristics of *Edwardsiella tarda* from fall chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Applied and environmental microbiology* 43(6) : 1380-1384, 1982.
- American society for microbiology : Manual of methods for general bacteriology. *American society for microbiology* 524, 1981.
- Fish health section, American fisheries society : Procedure for the detection and identification of certain fish pathogens. *American fisheries society* 118, 1979.
- Jean F. Macfaddin : Biochemical tests for identification of medical bacteria. Williams and Wilkins, Baltimore pp. 36-319, 1980.
- John P. : A bacterium associated with disease of pond cultured channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *J. Fish. Board Can.* 36 : 1508-1512, 1979.
- Krieg N. R. and Holt J. G. : Bergey's manual of systematic bacteriology, Williams and Wilkins, Co., Baltimore pp. 486-491, 1984.
- Laemli U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227 : 680-685, 1970.
- Mayer F. P. and Bullock G. L. : *Edwardsiella tarda*, a new pathogen of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Applied Microbiology* 25(1) : 155-156, 1973.
- Riichi : Studies on the asakusa group of enterobacteriaceae (*Edwardsiella tarda*). *Japan. J. Med. Sci. Biol.* 20 : 205-212, 1967.
- Wakabayshi, Hisatsugu and Syuzo Egusa : *Edwardsiella tarda* (*Paracolobacterium anguillimortiferum*) associated with pond-cultured eel disease. *Bulletin of the Japanese society of scientific fisheries* 39(9) : 931-936, 1973.
- 宮下敏夫 : ティラゼルの病魚かち分離されん *Pseudomonas fluorescens* および *Edwardsiella tarda*. *魚病研究* 19(1) : 45-50, 1984.
- 金井昞也, 田脇誠, 内田洋祐 : セラナ養殖場における *Edwardsiella tarda*의 分布. *魚病研究* 23(1) : 41-47, 1988.
- 楠田理一, 豊鶴利雄, 岩村善利, 佐古浩 : 高知縣興津灣のボラ病魚かち分離されん *Edwardsiella tarda* について. *Bull. Japan. Soci. Fish.* 42(3) : 271-275, 1976.
- 朴守一, 若林久嗣, 渡邊 佳一郎 : 養鰻地に分布する *Edwardsiella tarda* 血清型と病原性. *魚病研究* 19(2) : 85-89, 1983.
- 中律川雄 : セラナ幼魚かち分離されん *Edwardsiella tarda*. *魚病研究* 18(20) : 99-101, 1983.
- 최혜승 : 양식넙치 (*Paralichthys olivaceus*)에서 분리한 *Edwardsiella tarda*에 대하여. *수진연구보고* 45 : 197-205, 1991.

Studies on the biochemical and serological characteristics of *Edwardsiella tarda* isolated from cultured flounder, *Paralichthys olivaceus*

Jong-Duek Bang, Seh-Kyu Chun*, Soo-Il Park* and Yun-Jung Choi*

*Pathology Division National Fisheries Research and Development Agency Kyong Nam 626-900, Korea and *Department of Fish Pathology, National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea*

This study was carried out in order to identify the biochemical and serological characteristics of *Edwardsiella tarda* isolated from cultured flounder, *Paralichthys olivaceus* in the east and south coast of Korea. During the year of 1990 and 1991, the number of isolated *E. tarda* were 131 strains. To identify the biochemical characteristics of them kinds of tests were conducted. The results represented that all the strains had the same biochemical characteristics, and their biochemical characteristics were no differences among strains. A serological analysis was carried out based on agglutination test with antiserum belonging to *E. tarda* serotype a (E-22), b (SU-138), c (SU-100) classified in japan. The selected 10 isolates showed agglutinin titer of 5120-2560, 40-80 and below 40 against *E. tarda* serotype a, b and c, respectively. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) profiles of cell proteins of selected 10 isolates were showed no differences in kinds and volumes of proteins among strains.