

## 2002-2003년도 복수증 양식산 넙치로부터 동정된 미생물상

이훈구\* · 손병화<sup>1</sup> · 오명주<sup>2</sup>

부경대학교 자연과학대학 미생물학과, <sup>1</sup>부경대학교 자연과학대학 화학과

<sup>2</sup>연수대학교 수산해양대학 수산생명의학과

본 연구는 2002년 6월부터 2003년 11월까지 복수증을 나타내는 양식넙치의 세균상과 virus를 동정한 것이다. 생화학적 성상을 기초로 한 표현형으로, 병어체의 복수, 간, 신장, 내장으로부터 *Vibrio*, *Edwardsiella*, 및 *Listonella* 등 3개 속이 동정되었다. *Vibrio*속은 5종으로 우점이었고 *V. harveyi* (32균주), *V. parahaemolyticus* (23균주), *V. alginolyticus* (10균주), *V. carcariae* (2균주), *V. metschnikovii* (5균주)였다. 그밖에 *Photobacterium damsela* (6균주)와 장내세균인 *Edwardsiella tarda* (15균주)가 동정되었다. 감염어의 내부 장기로부터 해산어 병원성 바이러스로 알려진 marine birnavirus (MABV)가 분리되었다.

**Key words** □ Ascite, Olive flounder (*Paralichthys olivaceus*), *Vibrio*, *Edwardsiella*, *Listonella*, Marine birnavirus (MABV)

우리나라의 수산업은 1970년대 이후 양식업의 중요성을 인식하고 많은 노력을 기울여 현재 수산정책은 잡는 어업에서 기르는 어업으로 전환되고 있다(3). 어류 양식업은 산업화되어졌으며, 양식 대상 생물도 기존의 어류 외에 패류 등 여러 수산생물로 확대되고 있다(1). 현재 우리나라의 대표적인 해산어 양식어류는 연간 생산량이 2001년 말 기준 655,827톤에 달하고 있으며 수출량은 87개국으로 넙치 활어기준 41,063,000 달러에 달하고 있다(1, 3). 그러나 과밀도 양식을 통한 어체의 면역력 약화와 수질오염을 통한 전염병 발생으로 대량폐사와 상품가치의 질 저하로 많은 경제적인 피해를 입고 있다.

복수증과 출혈성 궤양증은 양식넙치를 비롯한 여러 종류의 양식어종 및 자연계의 어류에서 가장 널리 알려진 어류질병으로 *Vibrio*속(7, 14, 16), *Photobacterium damsela*(29), 장내세균인 *Edwardsiella tarda*(15) 등 몇 종의 세균과 일부 바이러스가 환부(22), 또는 병어의 장기로부터 분리되고 있으며, 일부 균들은 인공감염실험에서 유사한 복수증이 재현되기도 하여(9), 병원체로서 중요한 역할을 하는 것으로 생각되기는 하지만 여러 종류의 세균 또는 바이러스가 복합적으로 작용하여 이 질병을 유발할 가능성도 배제하기 어렵다.

우리나라에서도 양식넙치에 있어서 감염성 복수증에 의한 피해가 매우 심각하게 발생되어지고 있다. 이 감염성 복수증은 주로 6월 하순부터 9월 초순 수온이 28°C이상의 고수온이 여러 날 계속된 이후거나, 장마가 끝난 후에 집단적으로 발생되며, 같은 취수원을 사용하는 넓은 지역에서 거의 동시에 발병이 되기 때문에 그 피해가 아주 크다. 따라서 수온을 비롯한 영양염 유입,

적조발생과 같은 환경인자와도 밀접한 관계가 깊을 것으로 생각되며 병원체는 세균 또는 바이러스일 것으로 생각되지만 아직 원인 병원체가 분명하게 밝혀진 것은 없다. 따라서 현재로서는 이 질병의 정확한 발병기전이나, 발병조건, 원인균 및 전파경로 등에 대해서는 잘 알려져 있지 않다.

최근의 복수증의 피해 예로는 2002년 6월부터 9월까지 고수온기에 거제도 일대의 남해안 넙치양식장에서 발생되어 대량폐사를 유발시킴으로서 넙치양식업계에 커다란 피해를 입혔고, 봄과 여름에 걸쳐서 강수량이 많았던 2003년은 부분적인 발병은 있었지만 대량폐사는 없었다. 본 연구자들은 이 복수증 원인 병원체 규명을 위한 기초 자료를 얻기 위하여 병어체로부터 세균과 virus를 분리 동정하였다.

### 재료 및 방법

2002년 6월부터 2003년 11월까지 거제도 넙치양식장에서 사육 중 복수증 증상을 수반하면서 폐사되어지는 양식산 넙치를 대상으로 간, 복수(체강액), 신장, 비장 등으로부터 세균과 바이러스를 분리하였다.

세균 분리방법은 양식장 현장에서 채집된 감염어로부터 적출된 장기 또는 복수액을 vibrio 선택배지인 TCBS agar (thiosulfate-citrate-bile salt-sucrose)와 *Edwardsiella*속의 선택배지인 DSS agar (double Salmonella-Shigella) 배지에 직접 도말하는 방법과, 해당 장기 또는 복수액을 1% 식염이 첨가된 20 ml brain heart infusion broth (BHI)에 접종하여 30°C에서 17시간 증균시켜 균주를 분리하는 2가지 방법을 사용하였다. 증균액은 10배수로 단계희석하여 TCBS agar와 DSS에 도말하였다. *Vibrio* 균주의 분리는 집락이 형성된 TCBS agar에서 노란색 또는 녹색 집락을

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 051) 620-6363, Fax: 051) 628-7432

선택하였고, *Edwardsiella*의 경우, DSS agar에서 집락 중앙에 흑색 색소를 생성하는 것을 선택하였다(2). 동일한 균주의 중복선택을 피하기 위하여 해당 검체로부터 각각 1균주씩 선별하였다. 이후 1.5% 식염과 1.6% agar가 첨가된 BHI agar에서 3회 순수 분리하고 유주(swarming)하는 균주는 4% agar가 첨가된 BHI agar에서 재 순수분리 하였다.

*Vibrio*속과 *Edwardsiella*속의 생화학적 시험은 일반 분리법을 따랐고(3, 4), 특히 해양성 호염세균인 *Vibrio* 분리를 위하여 nutrient broth (NB)에 0, 3, 5, 7, 10 퍼센트 농도로 NaCl을 첨가하여 성장유무를 확인하였다. 균주의 발광유무는 신선한 배양체를 암실에서 관찰하였다. 항균제 감수성 시험, 참조균주, 특별히 언급되지 않은 기본배지의 제조(12, 15) 동정방법 등은 모두 전보를 따랐다(19, 26, 27). *Vibrio* 항균제 검사에 사용된 디스크(Becton Dickinson사 제품)는 6종으로 ampicillin (AM-10 µg), ceftriaxone (CRO-30 µg), doxycycline (D-30 µg), gentamicin (GM-10 µg), kanamycin (K-30 µg), tetracycline (Te-30 µg) 등이었고 *E. tarda*에 대한 검사는 15종으로 위 6종 외에 nalidixic acid (NA-30 µg), cefotetan (CTT-30 µg), ceftazidime (CAZ-30 µg), cefotaxime (CTX-30 µg), cefoxithin (FOX-30 µg), ticacilline/clavulanic acid (TIM-85 75/10 µg), cephalothine (CF-30 µg), colistine (CL-10 µg), imipenem (IPM-10 µg)이 더 추가되었다. 약제시험 기준은 National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (33)과 Becton Dickinson사(8) 지침을 따랐다.

Extended β-lactamase 생성균주 확인을 위한 double disk synergy 시험은 Mueller-Hinton agar에 시험균주를 면봉으로 고르게 도말한 다음 중앙에 Tim-85를 놓고 15 mm 간격을 띄운 다음 3세대 cepha계열 항균제인 CTT, CAZ, CTX를 정삼각형이 되게 배열하여 균을 배양한 다음 항균제 간섭효과를 관찰하였다(25).

대조 균주는 본 연구실에 소장된 참조균주 및 생명공학연구소 등에서 분양받은 *Vibrio* 표준균주로서 *V. parahaemolyticus* ATCC 33844, *V. carchariae* NCIMB 12705, *V. harveyi* KCTC 2720, *P. damsela* KCTC 2734 이었다.

바이러스는 채집된 넙치의 신장, 비장 및 장을 대상으로 일반적인 어류바이러스 분리용 조직액을 제작하여 어류주화세포의 일종인 fathead minnow caudal trunk cell line (FHM)에 접종하여 분리를 행하였다. 주화세포는 100 IU/ml의 penicillin, 100 µg/ml의 streptomycin, 10% FBS (Fetal bovine serum)를 첨가한 MEM (Eagle's minimum essential medium, Gibco)을 사용하여 배양하여 준비하였고, 접종 후 20°C에서 15일간 배양하면서 세포변성효과 (CPE)를 관찰하였다. 분리된 바이러스의 확인을 위하여 MABV 검출용으로 제안되어(34) 사용되고 있는 primer (P1/P2, P3/P4)를 이용하여, RT-PCR을 행하여 확인하였다.

## 결 과

### 병어체

2002년도 하절기 남해안 넙치양식장에서 발생한 감염증의 주증상은 복수증이었으며 일부는 복수와 피부출혈성 궤사가 함께 나

타났다(Fig. 1). 복수가 심한 경우는 탈장이 수반되어 항문으로 장기가 탈출된 상태였고, 부검시 복수액은 투명하고 맑은 액상 혹은 탁한 상태로 특히 간이 노란색으로 변색된 경우가 많았다. 어체는 10 cm 미만의 어린 개체로부터 출하직전의 성체까지 다양하였으며, 특히 성체의 피해가 컸다. 그러나 2003년은 복수증 발생이 거의 없었다.

### 생화학적 결과

TCBS agar상에서 *Vibrio*속으로 추정되는 convex, 또는 flat form의 녹색 또는 노란색의 186균주(2002년 81균주, 2003년 105주)와 *Edwardsiella* 선별배지인 DSS agar 배지에서 투명한 convex형으로 집락 중앙부위에 흑색 색소가 침착되는 15개의 균 집락을 포함한 총 201 균주가 분리되었다. 이중 47 퍼센트인 3속 7종 94균주가 종 수준까지 동정되었다. 우점균은 *Vibrio*속의 세균으로 분리균주는 모두 NaCl이 첨가되지 않은 nutrient broth에서 성장이 불가능하였다. 균종별로 *V. harveyi* (32균주), *V. parahaemolyticus* (23균주), *V. alginolyticus* (10균주), *V. carchariae* (2균주), *V. metschenikovii* (5균주)였다. 그 밖에도 *Photobacterium damsela* (7균주)와 장내세균인 *Edwardsiella tarda* (15균주)가 분리되었고 이들의 종별 생화학적 성상은 Table 1과 같았다.

*V. harveyi*는 암실에서 발광현상이 관찰되었고 오래 배양하거나, 계대배양하면 발광현상이 소실되었다. KIA배지에서 H<sub>2</sub>S가 생성되어 기저부분이 까맣게 변색되었고 indole, methyl-red, lysine decarboxylase 양성반응을 나타내었다. Sucrose, mannitol, maltose, trehalose, cellobiose를 발효시켰고 그 외의 조사된 당들은 발효시키지 못하였다. Voges-Proskauer, arginine dihydrolase는 음성반응을 나타내었고 ornithine decarboxylase는 대부분이 양성이었지만 부분적으로 음성인 경우도 있었다. 항균제 내성검사를 실시한 25균주 중 AM 25균주, TE 4균주, GM 1균주, K 3균주, D 4균주가 내성을 보였고 나머지 약제들에 대해서는 감수성을 나타내었다.

*V. parahaemolyticus*는 TCBS에서 투명한 녹색의 convex형 집락을 형성하였다. 1.6% 한천이 첨가된 BHI에서 유주하지 않았다. 일부 균주들은 Kligler iron agar (KIA) 배지에서 오래 배양되었을 경우, H<sub>2</sub>S를 소량 생산하였다. Indole, methyl red, Simmon's citrate, lysine, ornithine decarboxylase양성이고 D-glucose, mannitol, maltose, trehalose, cellobiose에서 산을 생성하였지만



Fig. 1. Ascitic cultivated flounder with hernia.

**Table 1.** Biochemical results of the genera *Vibrio*, *Listonella* and *Edwardsiella* isolated from ascitic olive flounders

	<i>V. harveyi</i> (32 strains)	<i>V. parahaemolyticus</i> (23 strains)	<i>V. alginolyticus</i> (10 strains)	<i>V. carcariae</i> (2 strains)	<i>V. metschnikovii</i> (5 Strains)	<i>L. damsela</i> (7 strains)	<i>E. tarda</i> (15 strains)
H <sub>2</sub> S <sup>2</sup>	100 <sup>1</sup>	70	0	0	0	0	100
Inodole	100	100	100	100	0	0	100
Methyl-red	100	96	70	100	60	100	100
Voges-Proskauer	0	0	100	0	100	0	0
Simmon's citrate	93	83	100	100	100	0	0
Lysine decarboxylase	100	100	100	100	100	0	100
Arginine dihydrolase	100	0	0	0	0	100	0
Ornithine decarboxylase	70	78	60	0	20	0	100
Motility	100	100	100	100	100	100	100
Glucose-acid	100	100	100	100	100	100	100
Glucose-gas	0	0	0	0	0	100	100
Lactose fermentation	0	0	0	0	0	0	0
Sucrose fermentation	100	0	100	100	100	40	0
D-Mannitol fermentation	100	100	100	100	100	0	0
Dulcitol fermentation	0	0	0	0	0	0	0
Salicine fermentation	0	0	0	0	0	0	0
Adonitol fermentation	0	0	0	0	0	0	0
myo-Inositol fermentation	0	0	0	0	0	0	0
D-Sorbitol fermentation	0	0	0	0	0	0	0
L-arabinose fermentation	0	26	0	0	0	0	0
Raffinose fwementation	0	0	0	0	0	0	0
Rhamnose fermentation	0	0	0	0	0	0	0
D-Xylose fermentation	0	0	0	0	0	0	0
Trehalose fermentation	100	100	100	100	100	100	<sup>3</sup>
Cellobiose fermentation	100	100	100	100	100	100	-
Growth 0% NaCl	0	0	0	0	0	0	100
Growth 3% NaCl	100	100	100	100	100	100	100
Growth 5% NaCl	100	100	100	100	100	100	100
Growth 7% NaCl	100	100	100	100	100	100	100
Growth 10% NaCl	0	0	100	100	0	0	0
Swarming	0	0	100	100	0	0	-

<sup>1</sup>The number gives the percent positive after 48 h of incubation at 30°C.

<sup>2</sup>Some strains of *V. parahaemolyticus* produced H<sub>2</sub>S in KIA after long incubation (>1 week).

<sup>3</sup>Not tested.

L-arabinose에서는 일부 균주가 산을 생성하지 못하였다. Voges-Proskauer, arginine dihydrolase 음성이었다. 분리균들은 7%의 NaCl이 첨가된 배지에서 전 균주가 성장되었지만 10%가 첨가된 배지에서는 성장되지 못하였다.

항균제 시험을 실시한 14균주 중 AM 14균주, TE 1균주, GM 2균주, K 3균주, D 1균주가 내성을 보였고 나머지 약제들에 대해서는 감수성을 나타내었다.

*V. alginolyticus*는 TCBS agar에서 크고 불투명한 점액상의 노란색 집락을 형성하였고 1.6% 한천이 첨가된 BHI agar에서 유주하였다. Indole, Voges-Proskauer, Simmon's citrate, lysine, ornithine decarboxylase 양성 이었고, D-glucose, sucrose, mannitol, trehalose, cellobiose에서 산을 생성하였고 기타 당들에서는 산을 생성하지 못하였다. Methyl red, arginine dihydrolase 음성 이었다. 분리균들은 10% 염이 첨가된 BHI broth배지에서 성장하였고 NaCl이

첨가되지 않은 배지에서는 자라지를 못하였다.

*V. carcariae*는 TCBS agar에서 크고 불투명한 점액상의 노란색 집락을 형성하였고 1.6% 한천이 첨가된 BHI agar에서 유주 하였다. Indole, Simmon's citrate, lysine, ornithine decarboxylase 양성 이었고, D-glucose, sucrose, mannitol, trehalose, cellobiose에서 산을 생성하였고 기타 당들에서는 산을 생성하지 못하였다. Voges-Proskauer, arginine dihydrolase 음성 이었다. 분리균들은 10% 염이 첨가된 BHI broth배지에서 성장하였고 NaCl이 첨가되지 않은 배지에서는 자라지를 못하였다. 집락형태나 그 밖의 생화학적 실험결과가 *V. alginolyticus*와 매우 유사하였다.

*V. metschnikovii*는 TCBS agar상에서 노란색 집락을 형성하였고 1.6% 한천이 첨가된 BHI agar에서 유주를 하지 못하였다. Methyl-red, Voges-Proskauer, Simmon's citrate lysine decarboxylase 양성 이었고, D-glucose, sucrose, mannitol, trehalose, cellobiose에

서 산을 생성하였고 기타 당들에서는 산을 생성하지 못하였다. Indole, arginine dihydrolase는 모두 음성이었고 ornithine decarboxylase는 대부분 음성이었다.

*P. damsela*는 TCBS agar상에서 노란색 집락을 형성하였고 1.6% 한천이 첨가된 BHI agar에서 유주를 하지 못하였다. Methyl-red, Voges-Proskauer, arginine dihydrolase 양성이고, D-glucose에서 durham관에 gas를 생성하였다. Indole, Simmon's citrate, lysine ornithine decarboxylase 등에서 음성반응이었고 trehalose와 cellobiose 당에서 산을 생성하였고 일부 균주가 sucrose 또는 mannitol에서 산을 생성하였다. 기타 당들에서는 산을 생성하지 못하였다.

장내세균인 *E. tarda*는 DSS agar상에서 48시간이 경과된 다음 주변이 투명하고 중앙부위에 흑색이 침착된 작은 집락을 형성하였다. KIA 배지에서 강력한 H<sub>2</sub>S를 생성하였고 indole, methyl-red, lysine, ornithine decarboxylase 양성이고 D-glucose에서 durham관에 gas를 생성하였다. Voges-Proskauer, Simmon's citrate, arginine dihydrolase 음성이었고 당을 거의 이용하지 못하였으며 균주간의 생화학적 변이가 전혀 없이 단일한 시험결과가 나타났다. 10균주에 대하여 항균제 내성 검사 결과, NA 9균주, TE 9균주, CAZ 1균주, CF 1균주, CL 9균주, K 8균주가 내성을 나타내었다. 이들에 대한 extended  $\beta$ -lactamase 생성유무를 관찰한 결과 전 균주가  $\beta$ -lactamase를 생성하지 못하였다.

감염어의 신장, 비장 및 장의 FHM을 이용한 바이러스 분리결과 1종류의 CPE를 특징적으로 나타내는 바이러스가 분리되었으며, 그를 PCR로 확인해본 결과 어류의 병원성 바이러스로 알려져 있는 marine birnavirus (MABV)임을 확인할 수 있었다 (자료 미제시)

## 고 찰

2002-2003년도 복수증 낚치의 각 장기와 복수로부터 분리된 균주들에 대한 고찰은 아래와 같다. 인위적인 균주선별의 실패현상을 방지하기 위하여 한 검체 당 한 균주만을 선별하였다.

표현형을 기초로 한 세균 분류는 인위 분류의 한계성 때문에 많은 어려움이 있고, 이러한 문제점을 극복하기 위하여 16S rRNA나 DNA 서열의 비교와 같은 분자 수준에서의 접근(13, 30, 35)과 수리통계분류방법 등(40)이 모색되고 있지만 아직 만족할 수준에 이르지 못하고 있다.

복수증 낚치의 각 장기로부터 분리되어 종수준까지 동정된 세균속은 *Vibrio*속, *Photobacterium*속, 장내세균 *Edwardsiella* 3개속이었다. 이 중 *Edwardsiella* 속은(4, 10) 대표적으로 알려진 어류 병원성 장내세균으로 *E. tarda*, *E. ictaluri*, *E. hoshinae* 등 3개종이 보고되어 있고(15, 37) 이들은 모두 해수어뿐 아니라 담수어인 뱀장어양식에 큰 피해를 주며, 그중 *E. tarda*가 가장 병독성이 강하다. 국내 가물치 양식장에서도 분리되었으며(3) 이들만 선별할 수 있는 선택성이 아주 강한 DSS agar 배지를 사용하였기 때문에 대부분의 일반 장내세균은 선별과정에서 배제되었을 것이다. 2003년도 복수증낚치로부터 집중적으로 분리되었다.

해양세균 vibrio는 아직까지도 속의 정의가 불안정한 상태로, 여러 차례에 걸쳐 다른 속들과 통합 혹은 분리가 이루어졌고(5, 6, 30, 31), 종수준의 분류는 이보다 훨씬 복잡하여 1980년 세균 이름의 승인된 목록(Approved Lists of Bacterial Names) 이후에도 새로운 조합(new combination)과 신종이 계속 추가되고 있다(37). 이러한 분류학적 혼란을 정리하기 위하여 일본 오사카에서 개최된 비브리오 분류위원회에서(International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of *Vibrionaceae*)는 비브리오과(*Vibrionaceae*)에 속해있던 *Aeromonas* 속을 과(*Aeromonadaceae*)로 독립시켜 비브리오과의 정의를 재정립하였고, *V. alginolyticus*의 이종 문제를 정리하였다(21).

배지조건과, 영양, 환경등 주어진 인위적인 인자들 때문에 자연계에서 서식하고 있는 특정속의 세균을 완벽하게 분리하기는 쉽지 않고 더구나 indole을 비롯한 몇 가지 생화학적 반응들은 실험결과가 분명하지가 않거나 오래 계대배양하면 성상이 변하는 경우가 자주 있기 때문에 특히 해양성 세균분리에 어려운 점이 있다(20).

해수 양식장의 특성상 *Vibrio*속의 세균이 우점으로 분리되었고, 그 중에서도 *V. harveyi*가 우점종이었다. 2002년도 병어체로부터 다수 분리가 이루어졌고 2003년에도 비교적 고르게 병어체로부터 분리되었다. 균주분리는 신선하게 배양된 암실에서 강하게 발광되는 균주를 선별하였다. 검체로부터 초기 분리된 균주는 TCBS, 0.4% agar가 첨가된 BHI 배지에서 매우 강한 형광발색이 있지만 계대배양을 계속하면 발광능이 곧 소실되어졌다. 생화학적 성상의 변이주가 거의 없으며 기준주와 일치되었다. 발광 현상으로 *V. harveyi*는 이미 1936년 Harvey에 의해 *Achromobacter Harveyi*로 알려진 세균이었지만(23) 인체나 어류에 병원균으로 보고된 일이 없었다.

*V. alginolyticus*는 Sakazaki에 의해 1968년 *V. parahaemolyticus* biotype 2를 새로운 종으로 승격시킨 것으로(36), 해안에서 흔히 분리된다고 보고되고 있지만(16, 19, 27), *V. parahaemolyticus* 만큼 짙은 빈도로 분리되지는 않는다. 생화학 동정에서 Voges-Proskauer 양성인 점이 이와 매우 유사한 생화학적 성상을 가진 *V. carcariae*와 구분하는 중요한 시험이다. 기타 동정에서의 문제점 등은 전보에서 상세하게 언급하였다(27).

*V. carcariae*는 Grimes 등(18)이 수족관에서 병으로 죽은 상어로 부터 분리한 균으로 여러 성상 특히 1.6 퍼센트 BHI agar에서 유주하는 성상 등이 *V. alginolyticus*와 매우 유사하고 간혹 인체에 설사와 같은 가벼운 기회감염을 일으키나 인체 병원균으로 크게 중요시되고 있지는 않다(16, 20).

*V. parahaemolyticus*는 사람에게 식중독이나 기회 감염균을 일으키는 병원균이다. *Pasteurella*속, *Pseudomonas*속(31), *Benecke*속(5)을 거쳐 *Benecke*속이 *Vibrio*속으로 통합되면서(6, 7) 오늘에 이르고 있다. 국내에서 분리되는 균주들은 arabinose에서 산을 생성하는 경우가 많이 있고 sucrose를 비롯한 여러 당을 발효시키지 않았다. 생화학적 성상이 Fujino 등(17)의 원기재와 거의 변화가 없이 일치가 되었으며 Fujino 등(17)에서는 KIA상에서 H<sub>2</sub>S를 발생시키지 않는 것으로 보고 되었지만, 일부 균주에서는

KIA에서 일주일 이상 배양시간이 오래 경과되면  $H_2S$ 를 약하게 생성하였다. 국내에서는  $H_2S$ 를 발생하는 균주들이 해산물 등 자연환경과 환자들로부터 자주 분리되고 있다(27). 국내에서, 해산물이나 해수로부터 분리되는 대부분의 균주들은 용혈능을 나타내지 않았지만 임상 가검물로부터 분리된 균주들은 강한  $\beta$ -용혈능을 가지고 있는 것으로 보고 되었다(19, 27).

*V. metschnikovii*는 oxidase 음성인 점이 다른 vibro들과 다른 점이다. Lee 등(28)이 1978년 기재를 개정함으로 오늘에 이르며, *V. cholerae* biovar *proteus*로 알려져 왔던 균이었다. 흔히 바다에서 분리되는 균으로 보고 되었지만 국내에서는 잘 분리되지 않았다. Lee 등(28)의 원기재에서 indole, lysine decarboxylase, arginine dihydrolase 등 여러 생화학적 결과가 균주 간에 서로 다르고, Farmer (16)에서도 lysine의 반응이 서로 달라서 동정에 많은 어려움이 있었지만, 본 연구에서는 Farmer의 기준을 따라 indole 음성반응, lysine decarboxylase 양성반응을 나타내는 균주를 *V. metschnikovii*로 동정하였다.

*Photobacterium damsela*는 균이 기재될 당시는 *Vibrio*속(29)에 속해 있었지만 그 후 현재로 분류학적 위치가 변경된 속(30)으로, 복수중이나 출혈성 궤양을 일으키는 대표적인 어병균 중 하나로 보고되고 있다(14). 그러나 국내에서는 복수중 병어체로부터는 높은 빈도로 분리되지는 않고 있으며, 겨울철 양식넘치의 등 부분에서 자주 발생하는 출혈성 궤양부위에서 집중적으로 분리되어 보고된 바 있다(26).

항균제 감수성 조사를 위한 약제의 선별은 양식장에서 많이 사용하고 있는 tetracycline 계열의 약제(tetracycline, doxycycline)와 ampicillin gentamicin, kanamycin 등과 제 3세대 항균제인 ceftriaxone 1종을 선별하였다. 또한 균주 선별은 통계적인 유의성을 가질 수 있는 *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*에 대한 다약제내성시험을 하였고, 비록 분리된 숫자는 10여 균주에 불과하지만 기존의 양식 어류의 대표적인 병원균으로 알려진 장내세균속 *E. tarda*에 대한 약제 검사는 15종으로 하였고 이들에게 extended  $\beta$ -lactamase 생성균주의 존재유무를 조사할 목적으로 제 3세대 cepha 계열 항균제 내성 검사와 double disk synergy 검사결과를 실시하였으나 양성균주는 한 균주도 나오지 않았다. 그밖에 *Vibrio* 세균들에게는 거의 약효가 없는 AM이 *E. tarda*에게는 아직도 효과가 잘 나타나는 점이 특이 하였다.

감염어의 신장, 비장 및 장으로부터 어류의 병원성 바이러스로 알려져 있는 marine birnavirus (MABV)가 분리되어졌다. MABV는 다양한 어종에 있어서 병원성을 나타내는 것으로 보고되어져 있는데(24, 32, 38) 몇몇 분리주는 넘치의 성어에 대하여서는 낮은 병원성을 가지고 있다는 보고도 있다(22). 특히 이러한 병원성은 주변환경, 즉 양식장 수조에서의 어류의 밀도, 수온, 항원의 농도 그리고 각종 스트레스 인자들에 의해 변화된다고 보고되어 있다(9, 11, 39).

양식산 넘치 성어의 대량 폐사 개체에서 분리되어진 본 바이러스가 폐사에 이르는 정도의 병원성을 가지고 있는지 혹은 본 조사에서 분리되어진 세균류들과 혼합감염 등의 과정을 거치면서 감염증으로 표현되어진 것인지에 대한 앞으로의 추가연구가

필요한 것으로 사료된다.

## Acknowledgement

This study was supported by a grant of the "2002 Korea Sea Grant Program (2002 KSGP)", Ministry of Maritime Affairs and Fisheries (2002).

## 참고문헌

1. 수산연감 2003. 한국수산회. 서울.
2. 이훈구. 1988. 가물치 (*Chana argus*)에서 분리된 *Edwardsiella tarda*의 생 화학 및 항생물질 내성유형에 관한연구. 한국어병학회지 1, 95-101.
3. 해양수산정보총람 2003. 한국산업정보원 부설 해양수산진흥원편. 서울
4. Amandi, A., S.F. Hiu, J.S. Rohovec, and J.L. Fryer. 1982. Isolation and characterization on *Edwardsiella tarda* from fall chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) *Appl. Environ. Microbiol.*, 43, 1380-1384.
5. Baumann, P., L. Baumann, and M. Mandel. 1971. Taxonomy of marine bacteria; the genus *Beneckea*. *J. Bacteriol.* 107, 268-294.
6. Baumann, P., L. Baumann, S.S. Bang, and M.J. Woolkalis. 1980. Reevaluation of the taxonomy of *Vibrio*, *Beneckea* and *Photobacterium*: abolition of the genus *Beneckea*. *Curr. Microbiol.* 4, 127-132.
7. Baumann, P., A.L. Furniss, and J.V. Lee. 1984. Genus I. *Vibrio*, p. 518-538. In N.R. Krieg (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology* Vol. 1. The William & Wilkins Co., Baltimore, Maryland.
8. Becton Dickinson. Becton Dickinson Microbiology System. Becton Dickinson Company Cockeysville, MD 21030 USA.
9. Bowden, T.J., D.A. Smail, and A.E. Ellis. 2002. Development of a reproducible infectious pancreatic necrosis virus challenge model for Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.* 25, 555-563.
10. Bullock, G. L., and R. L. Herman. 1985. *Edwardsiella* infections of fishes. U. S. Fish and Wildlife Service, *Fish Disease Leaflet* 71. Kearneysville, West Virginia.
11. Chou, H.Y., H.J. Li, and C.F. Lo. 1994. Pathogenicity of a birnavirus to hard clam (*Meretrix lusoria*) and effect of temperature stress on its virulence. *Fish Pathol.* 29, 171-175.
12. Difco manual 10th ed. 1985. Detroit, Michigan 482.
13. Dorsch, M., D. Lane, and E. Stackebrandt. 1992. Towards a phylogeny of the genus *Vibrio* based of 16S rRNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41, 290-294.
14. Egidius, E. 1987. Vibriosis: Pathogenicity and pathology. A. Review. *Aquaculture* 67, 15-28.
15. Ewing, W.H. 1986. *Edward's and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae*. 4th ed. Elsevier Science Publishing Co., Inc., N.Y.
16. Farmer, J.J. III and F.W. Hickman-Brenner. 1992. The genera *Vibrio* and *Photobacterium*. p. 2952-3011. In A. Balows (ed), *The Prokaryotes*, 2nd ed. Springer-Verlag, New York, New York.
17. Fujino, T., R. Sakazaki, and K. Tamura. 1974. Designation of the type strains of *Vibrio parahaemolyticus* and description of 200 strains of the species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 24, 447-449.
18. Grimes, D.J., J. Stemmler, H. Hada, E.B. May, D. Maneval, F.M.

- Hetrick, R.T., James, M., Stoskopf, and R.R. Colwell. 1984. *Vibrio* species associated with mortality of sharks held in captivity. *Microb. Ecol.* 10, 271-282.
19. Ha, K.H., and H.K. Lee. 1999. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from diarrheal patients and environmental sources by RAPD-PCR. *J. Korean Soc. Microbiol.* 34, 45-57.
  20. Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, and S.T. Williams. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology* 9th ed., p. 260-289. Williams & Wilkins Co. Baltimore, Maryland, USA.
  21. International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of *Vibrionaceae*: Minute of the meetings, 18 and 20 September 1990, Osaka, Japan. 1992. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42, 199-201.
  22. Isshiki, T., T. Nagano, and S. Suzuki. 2001. Infectivity of aquabirnavirus strains to various marine fish species. *Dis. Aquat. Org.*, 46, 109-114.
  23. Johnson, F.H., and I.V. Shunk. 1936. An interesting new species of luminous bacteria. *J. Bacteriol.* 31, 585-592.
  24. Jung, S.J., S. Suzuki, M.J. Oh, and K. Kawai. 2001. Pathogenicity of Marine Birnavirus against ayu *Plecoglossus altivelis*. *Fish Pathol.* 36, 99-101.
  25. Kim, J., and H.J. Lee. 2000. Rapid discriminatory detection of genes coding for SHV  $\beta$ -lactamases by ligase chain reaction. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 44, 1850-1864.
  26. Lee H.K., H.J. Kim, and I. Kim. 1991. Isolation of vibrio species from cultured flounders (*Paralichthys olivaceus*) with ulcers and ascites in the southern coast of Korea during the winter season. *Kor. J. Microbiol.* 29, 319-328.
  27. Lee, H.K., and S.S. Lee. 1997. Identification of the vibrios isolated from the shrimp (*Crangon affinis*) in estuary of Nakdong River in Korea. *J. Korean Soc. Microbiol.* 32, 529-537.
  28. Lee, J.V., T.J. Donovan, and A.L. Furniss. 1978. Characterization, taxonomy, and emended description of *Vibrio metschenikovii*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 28, 99-111.
  29. Love, M., D.T. Teebken-Fisher, J.E. Hose, J.J. Farmer III, F.W. Hickman, and G.R. Fanning. 1981. *Vibrio damsela*, a marine bacterium, causes skin lesions on the damselfish *Chromis punctipinnis*. *Science* 214, 1139-1140.
  30. MacDonell M.T., and R.R. Colwell. 1985. Phylogeny of the *Vibrionaceae*, and recommendation for two new genera, *Listonella* and *Shewanella*. *System. Appl. Microbiol.* 6, 171-182.
  31. Miyamoto, Y., K. Nakamura, and K. Takizawa. 1961. Pathogenic halophiles, proposals of a new genus "*Oceanomonas*" and of the amended species names. *Jpn. J. Microb.* 5, 477-486.
  32. Nakajima, K., Y. Maeno, M. Arimoto, K. Inouye, and M. Sorimachi. 1993. Viral deformity of yellowtail fingerings. *Gyobyo Kenkyu* 28, 125-129.
  33. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1998. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 4th ed. Pennsylvania: NCCLS; M7-A4. 771 East Lancaster Avenue, Villanova, Pennsylvania 19085, USA.
  34. Oh, M.J., S.J. Jung, and Y.J. Kim. 1999. Detection of birnavirus from cultured marine fish using polymerase chain reaction (PCR). *J. Fish Pathol.* 12, 49-55.
  35. Ruimy, R., V. Breitmayer, P. Elbaze, B. Safay, O. Boussemart, M. Gauthier, and R. Christen. 1994. Phylogenetic analysis and assessment of the genera *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas* and *Plesiomonas* deduced from small-subunit rRNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 416-426.
  36. Sakazaki, R. 1968. Proposal of *Vibrio alginolyticus* for the biotype 2 of *Vibrio parahaemolyticus*. *Jap. J. Med. Sci. Biol.* 21, 359-362.
  37. Skerman, V.B.D., V. MacGowan, and P.H.A. Sneath. 1989. Approved lists of bacterial names. American Society for Microbiology, Washington D.C., U.S.A.
  38. Sorimachi, M., and T. Hara, 1985. Characteristics and pathogenicity of a virus isolated from yellowtail fingerlings showing ascites. *Fish Pathol.* 19, 231-238.
  39. Suzuki, S., N. Hosono, and R. Kusuda. 1997. Detection of aquatic birnavirus gene from marine fish using a combination of reverse transcription and nested PCR. *J. Mar. Biotechnol.* 5, 205-209.
  40. West, P.A., P.R. Brayton, T.N. Bryant, and R.R. Colwell. 1986. Numerical taxonomy of vibrios isolated from aquatic environment. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36, 531-543.

(Received 27 May, 2004/Accepted 18 June, 2004)

**ABSTRACT : Microbial Flora in Ascitic Cultivated Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*) in Koe-je Island in Korea During 2002-2003.**

**Hun-Ku Lee<sup>\*</sup>, Byeng Wha Son<sup>1</sup>, and Myung-Joo OH<sup>2</sup>** (\*Department of Microbiology, Pukyung National University, Pusan 608-737, Korea, <sup>1</sup>Department of Chemistry, Pukyung University, Pusan 608-737, Korea, <sup>2</sup>Department of Aqualife Medicine, Yosu National University, Yosu 550-749, Korea)

A lot of cultured flounders died by ascitic disease blooming during the summer season in 2002, southern parts of Korea. This study was conducted to investigate the microbial flora for the ascitic cultivated olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) which were collected in the Koe-je island in the southern of Korea from July 2002 to October 2003. Three Genera (*Vibrio*, *Photobacterium* and *Edwardsiella*), seven species of bacteria (*V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. carcariae*, *V. metschenikovii*, *P. damsela* and *E. tarda*) and a fish pathogenic birnavirus (marine birnavirus, MABV) were isolated from the liver, dropsy, spleen and identified by biochemical and molecular biological characterization.