

네온테트라 (*Hyphessobrycon herbertaxelrodi*)로부터 분리한 *Aeromonas* 속 균의 특성

김지형* · 임경택* · 정태성** · 신남식 · 박재학 · 허강준*** · 박세창¹

서울대학교 수의과대학 및 중점연구소, *서울대학교 수의과대학

경상대학교 수의과대학, *충북대학교 수의과대학 및 동물의학연구소

Characterization of *Aeromonas* spp Isolated from Neon tetra (*Hyphessobrycon herbertaxelrodi*)

Ji-hyung Kim*, Kyung-taek Lim*, Tae-sung Jung**, Nam-shik Shin, Jae-hak Park, Gang-joon, Heo*** and Se-chang Park¹

College of Veterinary Medicine and Priority Research Institute, Seoul National University

*College of Veterinary Medicine, Seoul National University

**College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University

***College of Veterinary Medicine and Research Institute of Veterinary Medicine, Chungbuk National University

Abstract : Bacterial disease caused by *Aeromonas* are among the most common and troublesome diseases of fish raised in aquaculture systems. In this study, some strains identified as belonging to the *Aeromonas* were isolated from neon tetra (*Hyphessobrycon herbertaxelrodi*) skin and fin, as well as from water samples. VITEK system and API ZYM examination of the isolated strains were undertaken, and it seemed to correlate with the *Aeromonas*, proved to be *Aeromonas veronii*. The antibiotic susceptibility test of isolated strains to different groups of antibiotics was evaluated using the disc diffusion method. Cefixime was the most sensitive antibiotic.

Key words : Neon tetra (*Hyphessobrycon herbertaxelrodi*), *Aeromonas veronii*, antibiotic susceptibility test. cefixime.

서 론

네온테트라(*Hyphessobrycon herbertaxelrodi*)는 카라신(chracine)과의 대표종으로 동남아시아에서 대량 사육되어지고 있으며 세계 제일의 유통량을 확보하고 있다. 카라신과의 열대어는 몸의 형태는 잉어과와 유사하나, 구강에 이를 가지고 있고 잉어과의 어류는 인후에 인두이를 지닌다는 점에서 외관적 차이를 보인다. 카라신과는 다른 어류와 달리 기름지느러미를 지닌다. 네온테트라는 비교적 소형의 개체가 많고 색상과 발색이 뛰어나 관상가치가 높으며 활발하여 사육이 비교적 용이할 뿐 아니라 가격이 저렴해 일반 관상가들 사이에서 인기가 높다. 주로 다른 어류와 혼합 사육되는 경우가 많으며 네온테트라에서는 *Ichthyophthirius multifiliis*에 의한 기생충성 감염과 *Aeromonas* 속 균 감염이 가장 큰 문제가 된다¹⁹.

Aeromonas 균은 온도, 밀집사육, 수중의 유기물 등의 여러 가지 환경적 요인에 의한 스트레스와 상처, 기생충 감염 및 다른 병원체에 의하여 영향을 받은 부위에 2차적으로 감염하여 전신성 급성 출혈성 패혈증을 일으킨다^{17,18,19}. 무지개송

어 등의 어린 연어류에서는 높은 수온시 *A. hydrophila*에 감염되면 많은 폐사를 보인다¹⁷. Hazen 등은 큰입농어에서 전신에 출혈성 괴사소견을 보이는 red sore disease를⁸, Elliot와 Shotts은 금붕어에서 이차적으로 피부에 감염하여 절창병(furunculosis) 소견을 보인다고 보고하였다⁵. 온수성 양식어인 잉어, 뱀장어, 찬넬메기, 틸라피아 및 은어에서는 *A. hydrophila* 감염에 의한 높은 폐사율로 인하여 심각한 경제적 손실을 일으킨다고 알려져 있다².

1987년 Hickman-Brenner등에 의해보고 된 비교적 새로 알려진 *Aeromonas* 속 세균인 *A. veronii*는 Ornithine decarboxylase 양성반응을 나타내는 점이 기존의 *Aeromonas* 속의 세균들과 큰 차이점이다⁷. 이 세균은 과거에 enteric group 77로 불렸으며, *Vibrio cholerae*와 *V. mimicus*와도 매우 유사한 세균이다. *A. veronii*는 잉어에서 분리되었다고 보고된 바 있으며 임상적 증상은 *A. hydrophila* 감염과 유사한 양상을 나타내고 있다^{10,12}.

이번 실험을 통하여 네온테트라에서 집단폐사를 야기한 *Aeromonas*속 원인체를 분리 동정하며, 항생제감수성검사를 통하여 본 질병에 대한 유효한 항생제를 알아보도록 하겠다.

¹Corresponding author.
E-mail : parksec@snu.ac.kr

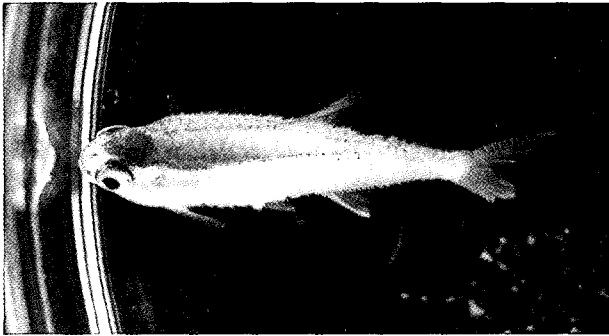


Fig 1. A Neon tetra (*H. herbertaxelrodi*) infected by *Aeromonas veronii*.

재료 및 방법

공시 동물

2005년 2월 네온테트라의 대량 폐사로 질병피해가 보고된 서울의 열대어전문 수족관에서 샘플을 채집하여 미생물학적 검사와 병리학적 검사를 행하였다. 병어는 120 L 용량의 수조에서 사육이 되었으며 체장은 2.5~3 cm, 사육수온은 25~27°C였다. 병어의 외부적인 소견은 비늘의 기립, 안구돌출, 지느러미 부식이 관찰되었다 (Fig 1).

균의 분리 및 생화학적 동정

세균의 분리에는 Tryptic soy agar (TSA, Difco, USA) 배지를 사용하였으며 수조수와 채표, 아가미, 신장, 비장, 장의 일부에서 세균을 채취한 후 25°C에서 24시간 배양하여 순수 분리를 하였다. 또한 oxidase와 catalase 시험을 수행하여 결과가 모두 음성인 균주를 본 실험에 사용하였다. 참고균주는 *A. hydrophilla* Heo를 사용하였다 (Table 1).

VITEK system (bioMerieux, France)의 gram-negative identification (GNI) card 동정방법은 제조회사의 조작법에 따라 균주를 접종 후 VITEK result data analysis에 의해 분류하였다^{14,15}. 효소활성을 측정을 위해 API ZYM kit (bioMerieux, France)를 이용하였다. 또한 *A. hydrophilla* 진양호-2균주의 토끼 항혈청을 이용 슬라이드 항원항체응집반응 시험을 하였다.

항생제 감수성검사

분리균주에 대한 항생제감수성검사는 Muller Hinton agar (Difco, USA)를 이용하여 총 19개 Antibiotics disc를 사용하였다. 감수성 검사에 이용된 항생제는 amikacin (30 µg), ampicillin (10 µg), carbenicillin (100 µg), cefixime (5 µg), cefoperazone (75 µg), ciprofloxacin (5 µg), colistin (10 µg), gentamicin (10 µg), kanamycin (30 µg), nalidixic acid (30 µg), neomycin (30 µg), nitrofurantoin (300 µg), norfloxacin (10 µg), ofloxacin (5 µg), polymyxin B 300 (IU/IE/UI), tetracycline (30 µg), tobramycin (10 µg), trimethoprim (5 µg), sulfamethoxazole (23.75 µg)+trimethoprim (1.25 µg)으로 모두 BBL (USA)사의 제품을 이용하였다.

Table 1. Bacterial strains and its biochemical test

Contents	strain		
	AAM-0501	AAM-0502	A. hydrophilla Heo
Classification	tested strain	tested strain	reference strain
Host	neon tetra	neon tetra	carp
Origin	skin	cultured water	skin
VITEK system			
DP-300	+	+	+
Glucose	+	+	+
Growth control	+	+	+
Acetamide	-	-	-
Esculin	-	-	+
Plant Indican	-	-	+
Urea	-	-	-
Citrate	-	-	-
Malonate	-	-	-
Tryptophan	-	-	-
polymyxin B	-	-	-
Lactose	-	-	-
Maltose	+	+	+
Mannitol	+	+	+
Xylose	-	-	-
Raffinose	-	-	-
Sorbitol	-	-	-
Sucrose	+	+	+
Inositol	-	-	-
Adonitol	-	-	-
p-Coumaric	+	+	+
H ₂ S	-	-	-
O-Nitrophenyl-beta-D-galacto-pyranoside	-	-	+
Rhamnose	-	-	-
L-Arabinose	-	-	+
Glucose(fermentative)	+	+	+
Arginine	+	+	+
Lysine	-	-	-
Ornithine	-	-	-
(OXI)	+	+	+

결 과

육안 및 해부학적 소견

폐사된 네온테트라의 외부소견으로는 운동성예로모나스증과 유사한 솔방울증상 (비늘의 기립)을 나타내었으며 (Fig

1), 동일 수조에 있는 네온테트라라는 운동성의 저하를 보이며 배수구 쪽에 몰려 있었다. 안구돌출, 아가미 충혈, 점액의 과다분비 소견을 보였고 비늘 및 지느러미에서는 소수의 암자 적색의 점상출혈반이 관찰되었다. 일부의 검체에서는 비늘이 탈락되거나 피부조직의 결손부위도 관찰되었다. 내부적인 소견으로서는 복강 내 실질장기의 충혈과 출혈이 관찰되었다.

생화학적 동정

VITEK system을 통한 균의 동정결과 *A. veronii*로 동정되었으며 참고균주로 사용된 *A. hydrophilla* Heo와는 다른 결과를 나타내었다. 분리균주 AAM-0501와 AAM-0502는 DP-300, Glucose, Maltose, Mannitol, Sucrose, p-Coumaric, Glucose (fermentative), Arginine에 양성을, Acetamide, Esculin, Plant Indican, Urea, Citrate, Malonate, Tryptophan, polymyxin B, Lactose, Xylose, Raffinose, Sorbitol, Inositol, Adonitol, H₂S, O-Nitrophenyl-beta-D-galacto-pyranoside, Rhamnose, L-Arabinose, Lysine, Ornithine에 음성을 나타내었다(Table 1).

API ZYM kit에서는 alkaline phosphatase, esterase (C4), esterase lipase (C8), lipase (C14), leucine arylamidase, acid

phosphatase, β -glucuronidase, β -glucosidase, N-acetyl- β -glucosaminidase가 양성으로 나타났으며, valine arylamidase, cystine arylamidase, trypsin, α -chymotrypsin, Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase, α -galactosidase, β -glucosidase, α -glucosidase, α -mannosidase, α -fucosidase는 음성의 결과를 나타내었다(Table 2). *A. hydrophilla* 진양호-2 균주의 토끼 항혈청에 대한 항원항체반응 검사결과는 음성을 나타내었다.

항생제 감수성검사

총 19개의 Antibiotics를 사용하여 약제감수성검사를 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다(Table 3). 분리균주 AAM-0501와 AAM-0502는 amikacin, cefixime, ciprofloxacin, neomycin, ofloxacin이 감수성이 높게 나타났으며 *A. hydrophilla* Heo는 amikacin, cefixime, cefoperazone, ciprofloxacin, gentamicin, kanamycin, nalidixic acid, neomycin, nitrofurantoin, norfloxacin, ofloxacin, tobramycin, trimethoprim, sulfamethoxajole + trimethoprim에 감수성이 높았다.

Table 2. Enzymatic profiles of the isolated strains determined by API ZYM kit

Enzyme	strain		
	AAM-0501	AAM-0502	<i>A. hydrophilla</i> HEO
Alkaline phosphatase	+	+	+
Esterase(C4)	+	+	+
Esterase lipase(C8)	+	+	+
Lipase(C14)	+	+	+
Leucine arylamidase	+	+	+
Valine arylamidase	-	-	-
Crystine arylamidase	-	-	-
Trypsin	-	-	-
α -chymotrypsin	-	-	-
Acid phosphatase	+	+	+
Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	-	-	-
α -galactosidase	-	-	-
β -glucuronidase	+	+	+
β -glucosidase	-	-	-
α -glucosidase	-	-	-
β -glucosidase	+	+	-
N-acetyl- β -glucosaminidase	+	+	+
α -mannosidase	-	-	-
α -fucosidase	-	-	-

Table 3. Antibiotics susceptibility test

Antibiotics (ug)	strain		
	AAM-0501	AAM-0502	<i>A. hydrophilla</i> Heo
Amikacin (30)	+++	+++	+++
Ampicillin (10)	-	-	-
Carbenicillin (100)	-	-	-
Cefixime (5)	+++	+++	+++
Cefoperazone (75)	+	+	+++
Ciprofloxacin (5)	+++	+++	+++
Colistin (20)	++	++	++
Gentamicin (10)	-	-	+++
Kanamycin (30)	++	++	+++
Nalidixic acid (30)	-	-	+++
Neomycin (30)	+++	+++	+++
Nitrofurantoin (300)	++	++	+++
Norfloxacin (10)	++	++	+++
Ofloxacin (5)	+++	+++	+++
Polymyxin B (300IU)	++	++	++
Tetracycline (30)	++	++	++
Tobramycin (10)	++	++	+++
Trimethoprim (5)	-	-	+++
Sulfamethoxajole (23.75) + Trimethoprim (1.25)	-	-	+++

- (0mm), + (1~10mm), ++ (10~20mm), +++ (20mm<).

고 찰

본 연구는 *Aeromonas* 속균에 감염된 것으로 사료되는 네온테트라에서 세균을 분리, 동정한 후 항생제감수성검사를 통하여 어떠한 항생제가 가장 효과적인지 알아보았다. 수서 환경에서 흔히 분리되는 *Aeromonas* 속균은 인체의 설사와 기타 여러 합병증을 일으키는 주요 질병원인 뿐 아니라, 담수와 해수의 여러 어종에서 대량 폐사를 야기하는 원인균 중 하나이다. *Aeromonas* 속균은 크게 비운동성과 운동성으로 나눌 수 있는데, *A. salmonicida*는 비운동성 속균으로 연어과 어류에서 피부에 감염하여 농을 형성하는 질창병을 일으키고, *A. hydrophila*는 대표적인 운동성 속균으로 담수성 어류, 양서류, 파충류 및 사람에서 경구 및 경피를 통해서 급성, 만성 및 잠복감염을 일으킨다고 알려져 있다^{18,19}.

단순 운동성애어로모나스증과 유사한 증상을 보이는 폐사된 네온 테트라는 *A. hydrophila*가 병원체일 것으로 예상되었다. 운동성애어로모나스증은 비늘이 일어서 솔방울처럼 보이는 것이 특징으로, 비늘주머니 내에 점액과 울혈이 축적되어 비늘이 솟아오르는 것이다⁴. 병어의 비늘을 누르면 비늘주머니가 터지면서 점액이 흘러나오며, 비늘주머니 외 피하, 복강에도 울혈 축적이 발견된다^{4,6}. 이와같은 증상의 원인균은 일반적으로 *A. hydrophila*이며 이로 인하여 운동성애어로모나스증이라 명명되었다^{16,20}.

VITEK 동정과 API ZYM 실험의 결과를 통해 네온 테트라의 집단 폐사를 불러일으킨 병원체가 *A. hydrophila*가 아닌 *A. veronii*인 것으로 밝혀졌다. 항생제 감수성 검사를 통하여 분리균주 AAM-0501와 AAM-0502는 amikacin, cefixime, ciprofloxacin, neomycin, ofloxacin이 감수성이 높게 나타났으며 그 중 cefixime의 감수성억제대가 가장 크게 나타났다 (Table 3). *A. veronii*는 주로 설사환자의 직장채변, 피부상처, 호흡기관 등에서 분리되는 인체 병원성 세균으로^{1,3,9,13} 이러한 세균에 오염된 어류는 인간에게 피해를 입힐 가능성이 있다¹¹. 특히 네온 테트라는 일반 가정에서 관상용으로 많이 사육되는 열대어 중 하나이기에 이와 같은 병원체에 의한 감염은 관상어를 사용하는 가정의 사용자나 그 주변인들에게 설사를 불러일으킬 수 있다는 점에서 그 문제점이 심각하다고 할 수 있다. 따라서 본 연구는 일반적인 운동성애어로모나스증으로 생각되기 쉬운 *A. veronii*에 의한 감염에 있어 본 실험에 사용된 19개의 항생제 감수성 검사를 통하여 cefixime이 가장 효과적이라는 것을 알았으며 어류에 있어서 안정성이나 관리 측면에 있어서 좀더 효과적인 방안을 제시하는 것에 의미를 둘 수 있다. 또한 관상어에서 직접적이나 간접적으로 인간에게 피해를 입힐 수 있는 이러한 병원체가 분리되었다는 점에서, *A. veronii*에 대한 연구가 좀더 필요한 실정이다.

결 론

폐사된 네온테트라로부터 분리한 분리균주는 생화학적, 혈

청학적 검사 통해 *A. veronii*임을 확인할 수 있었으며, 솔방울증상, 안구돌출, 비늘탈락, 피부조직의 결손 및 충혈 등의 임상증상을 확인할 수 있었다.

*A. veronii*는 주로 설사환자의 직장채변, 피부상처, 호흡기관 등에서 분리되는 인체 병원성 세균으로 이러한 세균에 오염된 어류는 인간에게 피해를 입힐 가능성이 제기된다. 항생제감수성검사를 통하여 검사에 사용된 19개의 항생제중 cefixime이 가장 효과적이라는 것을 알 수 있었으며, 이러한 감수성 검사는 어류에 있어 안정성이나 관리 측면에 있어서 좀더 효과적인 방안을 제시할 것이라 생각되는 바이다.

감사의 글

이 논문은 2004년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음. (KRF-2004-005-E00076)

참 고 문 헌

- Abbott SL, Seli LS, Catino M Jr, Hartley MA, Janda JM. Misidentification of unusual *Aeromonas* species as members of the genus *Vibrio*: a continuing problem. *J. Clin. Microbiology* 1998; 36: 1103-1104.
- Amon NE, Abdallah IS, Elallawy T, Ahmed SM. Motile *Aeromonas* septicemia among *Tilapia nilotica* (*Sarotherodon nilotica*) in Upper Egypt, *Fish Pathol* 1985; 20: 93-97.
- Davis WA, Kane JG, Garagusi VF. Human aeromonas infections: a review of the literature and a case report of endocarditis. *Medicine* 1978; 57: 267-277.
- Dryden M, Munro R. *Aeromonas* septicemia: relationship of species and clinical features. *Pathology* 1989; 21: 111-114.
- Elliot D, Shotts E. Aetiology of an ulcerative disease in goldfish *Carassius auratus* L.: Experimental induction of the disease. *J Fish Dis* 1980; 3: 687-693.
- Furuki H, Mizutari K, Maekawa Y, Nogami R. A case of necrotizing fasciitis caused by *Aeromonas sobria* (in Japanese). *Jpn J. Dermatol* 1992; 102: 847-850.
- Hickman-Brenner FW, MacDonald KL, Steigerwalt AG, Fanning GR, Brenner DJ, Farmer JJ III. *Aeromonas veronii*, a new ornithine decarboxylase-positive species that may cause diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 1987; 25: 900-906.
- Huizinga HW, Esch GW, Hazen TC. Histopathology of red-sore disease (*Aeromonas hydrophila*) in naturally and experimentally infected largemouth bass, *Micropterus salmoides*. *J. Fish Dis* 1979; 2: 263-277.
- Janda JM, Brenden R. Importance of *Aeromonas sobria* in *Aeromonas* bacteremia. *J Infect Dis* 1987; 155: 589-591.
- Kozinska A, Flgueras MJ, Chacon MR, Soler L. Phenotypic characteristics and pathogenicity of *Aeromonas* genomospecies isolated from common carp. *J. Appl. Microbiology* 2002; 93: 1034-1041.
- Mencacci A, Cenci E, Mazzolla R, Farinelli S, D'Alo F, Vitali M, Bistoni F. *Aeromonas veronii* biovar *veronii* septicemia and acute suppurative cholangitis in a patient with hepatitis B. *J Med Microbiology* 2003; 52: 727-730.
- Radu S, Ahmad N, Ling FH, Reezal A. Prevalence and resistance to antibiotics for *Aeromonas* species from retail fish

- in Malaysia. I. J. Food Microbiology 2003; 81: 261-266.
13. Song T, Toma C, Nakasone N, Iwanaga M. Aerolysin is activated by metalloprotease in *Aeromonas veronii* biovar sobria. J Med Microbiology 2004; 53: 477-482.
 14. BioMerieux Vitek Reference Manual. Hazelwood, MO: BioMerieux. 1994.
 15. BioMerieux Vitek Inc. Gram-negative Identification (GNI) Technical Bulletin 00716713 Rev 0498. Hazelwood, MO: BioMerieux Vitek Inc. 1998.
 16. Edward J. Noga. Fish Disease. Iowa State University Press. 1996: 141-142.
 17. Ellis AE. Fish vaccination. London: Academic Press. 1988: 112-123.
 18. Post G. Textbook of fish health. Neptune: T.F.H Publications. 1987: 30-40.
 19. Robert RJ. Fish pathology. London: Bailliere Tindall. 1978: 183-204.
 20. Valerie Inglis. Bacterial Diseases of Fish. London: Blackwell scientific publication. 1993: 143-155.