

Maroon clownfish, *Premnas biaculeatus* 자어로부터 분리한 *Vibrio ponticus* KJS1의 특성

김종수 · 노섭* · 강봉조†

제주특별자치도 해양수산자원연구소, *제주대학교 해양과학부

Characterization of *Vibrio ponticus* KJS1 Isolated from Larvae of Maroon clownfish, *Premnas biaculeatus*

Jong-Su Kim, Sum Rho* and Bong-Jo Kang†

Jeju Special Self-Governing Province Fisheries Resources Research Institute, Jeju 697-914, Korea

*Faculty of Applied Marine Science, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea

Vibriosis is one of the most important diseases affecting marine fish. In this study, a bacterium belonging to the *Vibrio* were isolated from maroon clownfish (*Premnas biaculeatus*) larvae (3~7 days after hatching). The bacterium was identified as *Vibrio ponticus* KJS1 by 16S rRNA gene sequence analysis. The result of biochemical test using the GN2 microplate (BioLog Inc, USA) showed that it has the ability to use 35 substrates including dextrin and sucrose was detected, could not degrade 52 substrates including α -cyclodextrin, and showed the weak ability to use 7 substrates including glycogen. It was sensitive to oxolinic acid, flumequine, ciprofloxacin, ofloxacin, norfloxacin, nalidixic acid, pefloxacin, and doxycycline hydrochloride.

Key words: Maroon clownfish (*Premnas biaculeatus*), *Vibrio ponticus*, 16S rRNA gene.

흰동가리류 (aneonefish 또는 clownfish)는 damselfish와 함께 자리돔과에 속하는 어종으로 전 세계적으로 약 325종이 알려져 있고 주로 열대와 아열대 해역인 인도-서태평양 연안에 많이 서식하고 있으며 우리나라에는 흰동가리 (*Amphiprion clarkii*) 1종이 제주도 연안에 서식하고 있는 것으로 보고되어있다 (Yu and Lee, 1995).

최근 동남아시아 지역에서 관상어로 수입되는 maroon clownfish (Fig. 1)의 수입 대체 효과 및 국내 관상어류 시장의 다변화를 위해 흰동가리류의 종묘 생산 기술 개발 연구가 이루어지고 있으며, 모든 수산 종묘 생산 기술이 그러하듯이

종묘 생산 시기의 질병 방제는 관상어 양식 기술 개발에 있어서 중요한 요소 중 하나라 할 수 있을 것이다.

흰동가리류에 피해를 입히는 질병 중 외부기 생충성 질병은 *Brooklynella hostilis*가 원인인 brooklynella 병과 *Amyloodinium ocellatum*이 원인인 amyloodinium 병 등이 보고되어 있고, 바이러스성 질병으로는 특히 percular clownfish (*Amphiprion ocellaris*)와 maroon clownfish (*Premnas biaculeatus*)의 VEN (viral erythrocytic necrosis) 등이 보고되어 있다 (Wilkerson, 1998). Clownfish의 질병에 대한 연구로는 tomato clownfish (*Amphiprion frenatus*)에 감염되는 기생

†Corresponding Author : Bong-Jo Kang, Tel : 064-780-6090,
Fax : 064-710-4155, E-mail : kbc1922@jeju.go.kr

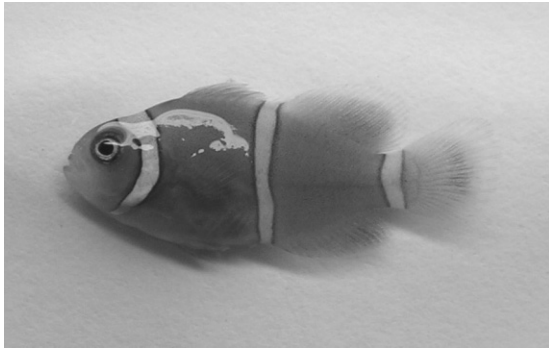


Fig. 1. Juvenile of Maroon clownfish, *Premnas biaculeatus*, 19 days after hatching, 9.34 mm in total length. The three white vertical line completed.

충인 *A. ocellatum*의 면역 반응과 vaccine 개발에 대한 연구가 있고 (Cobb *et al.*, 1998), Silphaduang 등 (2000)은 tomato clownfish (*A. frenatus*)에 감염되는 cladosporiosis에 대해 보고하면서 열대 해산어류의 세균 감염에 관련된 보고는 드물다고 하였다. 그리고 Hoff (1996)는 이 외에 세균성 질병으로 *Vibrio* sp., *Aeromonas* sp. 등이 있다고 하였다.

*Vibrio*속 세균은 기회 감염성 세균으로서 해수 어류의 정상 세균 총을 이루기도 하지만 때로는 질병의 원인체로서 수산 생물의 폐사를 유발하는 것으로 알려져 있으며 (Kang, 2003), 국내와 일본에서 종묘 생산 시 발생하는 세균성 질병에 대한 연구로 넓치 자치어의 장관백탁증 (bacterial white enteritis)에 대한 연구가 수행되었다 (Masumura *et al.*, 1989; Moon and Heo, 2004).

본 연구는 해수 관상어의 1종인 흰동가리의 종묘 생산 기술 개발 과정 중 종묘 생산 초기 대량 감모 발생시기에 분리되는 *Vibrio*속 세균에 대한 동정을 통해 국내 해수 관상어의 질병 연구에 기초 자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

균주의 분리

부화 후 3~7일이 경과한 자어 중 먹이 섭취

를 하지 못하여 힘없이 수영하는 개체를 채집 후 실험에 사용하였다. 이때 부화 자어는 12 L 아크릴 원형수조에 수용하여 사육하였으며, 수온은 $27 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 를 유지하였고 사육수는 매일 1/3 ~ 1/4 정도 교환하였다. 채집된 시료를 70% ethanol로 외부를 소독 한 후 무균적으로 마쇄하여 BHIA (BD, USA), TCBS Agar (BD, USA), 혈액한천배지 (Komed, Korea)에 도말한 후 BHIA 및 TCBS Agar는 $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 에서 20 ± 2 시간 동안 배양하였고 혈액한천배지는 37°C , 5% CO_2 공급 조건에서 20 ± 2 시간동안 배양하였다. 배양 후 각각의 시료로부터 성상이 동일한 균주를 선별 분리하였다.

분리 균주의 생화학적 특성 분석 및 항생제 감수성 시험

분리 균주의 생화학적 특성은 Biolog사 (Biolog Inc., USA)의 GN2 Microplate를 이용하여 실험하였으며 분석은 MicroLog™ system (Release 4.02) program을 이용하였다.

분리 균주의 항생제 감수성은 Miller Hinton II Agar (BD, USA)를 이용하여 disc 확산법으로 측정하였다. 사용된 항생제는 oxoid사 (England)의 oxolinic acid, erythromycin, ampicillin, cephalothin, flumequine, doxycycline hydrochloride, oxacillin, ciprofloxacin, ofloxacin, norfloxacin, nalidixic acid, spiramycin, pefloxacin, oxytetracycline이었다.

분리균주의 분자생물학적 동정

DNA의 분리

순수 분리된 균주를 1.5% NaCl이 첨가된 BHIA (Difco, USA)에 접종한 후 $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 16~24시간 배양시킨 후 4°C , $10,000 \times g$ 로 10분간 원심 분리하여 균체를 수확한 후 Genomic DNA purification kit (TOYOBO, Japan)를 이용하여 제조 회사가 제시한 방법에 따라 genomic DNA를 분리하였다.

PCR 수행 및 염기서열 분석

분리된 균주의 16S rRNA의 증폭은 Bioneer사 (Bioneer, Korea)의 AccuPower PCR preMix를 사용하였으며, 증폭을 위한 primer set은 27f (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC A-3') 및 1522r (5'-AAG GAG GTG ATC CAR CCG CA-3')을 사용하였다.

16S rRNA 유전자 증폭을 위한 반응 조건은 95°C에서 5분간 변성 후 95°C 1분, 55°C 1분, 72°C 1분의 주기로 33회 반복한 후 최종 72°C에서 10분간 확장하였다.

PCR 산물은 1% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 약 1.5 kbp 정도의 DNA 증폭 산물을 확인하고 AccuPrep Gel Purification Kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 증폭 산물을 정제 및 회수하여 direct sequencing을 실시하였다.

분리균주의 분자적 동정

분리 균주의 분자생물학적 동정을 위해 16S rRNA gene에 대한 염기 서열 분석결과를 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 Blast Search 및 Clustal X program을 이용하여 정렬하였다 (Thompson *et al.*, 1997).

염기변이 산출은 PHYLIP program (Felsenstein, 1993)의 transition:transversion을 2:1로 가정하여 two-parameter method (Kimura, 1980)로 작성하였고 그 결과를 토대로 consensus tree를 작성하여 분자 계통학적 유연 관계를 확인하였으며, 이때 계통수의 branch에 대한 신뢰도를 얻기 위해 bootstrap은 100회 실시하였다.

결과 및 고찰

Maroon clownfish, *Premnas biaculeatus*의 종묘 생산 초기의 대량 감모발생 시기에 폐사어 및 빈사어로부터 *Vibrio*를 분리 한 후 생화학적 특성 및 분자 생물학적 동정을 실시하였다. 분리된 균주는 그람음성균으로 TCBS agar에서 황색 colony를 형성하여 전형적인 *Vibrio*속 성장을 보

였으며, GN2 microplate를 이용한 생화학 시험 결과에서는 dextrin 및 sucrose를 포함한 35가지 기질 이용능이 확인되었으며 α -cyclodextrin을 비롯한 52가지 기질은 분해하지 못하였으며, glycogen을 비롯한 7가지 기질은 약한 이용능을 나타내었다 (Table 1).

분리 균주를 14종의 항생제 디스크를 사용하여 감수성 실험을 실시한 결과는 quinolone계 항생제인 oxolinic acid, flumequine, ciprofloxacin, ofloxacin, norfloxacin, nalidixic acid, pefloxacin과 doxycycline hydrochloride에 감수성이 높게 나타났으며 oxacillin, spiramycin에는 내성을 나타내었다 (Table 2).

분리 균주의 16S rRNA 유전자에 대한 염기 서열을 분석한 결과 *Vibrio ponticus* CECT5869과 99.8%의 가장 높은 상동성을 보여 분리균을 *Vibrio ponticus* KJS1으로 동정하였다. *V. fluvialis* ATCC 33809와는 97.2%, *V. fluvialis* NCTC 11327과는 96.8%, 그리고 *V. furnissii* ATCC 35016과는 96.2%의 상동성을 나타내었으며 (Table 3), 이를 토대로 작성된 분자생물학적 계통수를 Fig. 2에 나타내었다.

*Vibrio ponticus*는 Macian 등 (2004)이 gilthead sea bream (*Sparus aurata*)과 해수 등에서 분리하여 신종으로 보고한 종으로 *V. fluvialis* 및 *V. furnissii*와 16S rRNA 유전자의 염기 서열이 각각 97.1%와 97.3% 상동성을 갖는다고 보고하였다.

해산어 종묘 생산 및 양식에 있어서 *Vibrio*속 세균은 성어에 비해 자어 또는 치어에서 분리율이 높은 것으로 보고되고 있는데 (Kang, 2003), 본 연구에서 분리된 *Vibrio ponticus*는 Macian 등 (2004)에 의하여 스페인 지중해 연안의 sea bream, *Sparus aurata*의 질병을 일으키는 원인균으로 밝혀졌으며 국내의 경우 수산양식 질병과 관련해서는 분리 보고가 이루어져 있지 않은 균주로서 추후 인위 감염 실험 등의 추가적인 실험을 통한 해수 관상어의 초기감모 원인규명 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다.

또한 종묘 생산 과정중의 세균성 질병은 사육

Table 1. Biochemical characterization of *V. ponticus* strain KJS1 isolated from diseased Maroon clownfish (*Premnas biaculeatus*) using the MicroLog™ system.

Substrate	Result ^{a)}	Substrate	Result
Water	-	p-Hydroxy Phenylacetic Acid	-
α -Cyclodextrin	-	Itaconic Acid	±
Dextrin	+	α -Keto Butyric Acid	+
Glycogen	±	α -Keto Glutaric Acid	-
Tween 40	±	α -Keto Valeric Acid	-
Tween 80	+	D,L-Lactic Acid	+
N-Acetyl-D Galactosamine	+	Malonic Acid	-
N-Acetyl-D Glucosamine	+	Propionic Acid	+
Adonitol	-	Quinic Acid	-
L-Arabinose	-	D-Saccharic Acid	-
D-Arabitol	-	Sebacic Acid	-
D-Cellobiose	-	Succinic Acid	+
i-Erythritol	-	Bromosuccinic Acid	±
D-Fructose	+	Succinamic Acid	-
L-Fucose	-	Glucuronamide	±
D-Galactose	-	L-Alaninamide	-
Gentiobiose	-	D-Alanine	-
α -D-Glucose	+	L-Alanine	+
m-Inositol	-	L-Alanylglycine	+
α -D-Lactose	-	L-Asparagine	+
Lactulose	-	L-Aspartic Acid	±
Maltose	+	L-Glutamic Acid	+
D-Mannitol	+	Glycyl-L aspartic Acid	+
D-Mannose	+	Glycyl-L glutamic Acid	±
D-Melibiose	-	L-Histidine	-
β -Methyl-D-Glucoside	-	Hydroxy-LProline	-
D-Psicose	+	L-Leucine	-
D-Raffinose	-	L-Ornithine	-
L-Rhamnose	-	LPhenylalanine	-
D-Sorbitol	±	L-Proline	+
Sucrose	+	L-Pyroglutamic Acid	-
D-Trehalose	+	D-Serine	-
Turanose	+	L-Serine	+
Xylitol	-	L-Threonine	+
Pyruvic Acid Methyl Ester	+	D,L-Carnitine	-
Succinic Acid Mono-Methyl-Ester	+	γ -Amino butyric Acid	-
Acetic Acid	+	Urocanic Acid	-
Cis-Aconitic Acid	-	Inosine	+
Citric Acid	-	Uridine	+
Formic Acid	-	Thymidine	+
D-Galactonic Acid Lactone	-	Phenyethylamine	-
D-Galacturonic Acid	-	Putrescine	-
D-Gluconic Acid	-	2-Aminoethanol	-
D-Glucosaminic Acid	-	2,3-Butanediol	-
D-Glucuronic Acid	+	Glycerol	-
α - Hydroxybutyric Acid	+	D,L- α -Glycerol Phosphate	-
β - Hydroxybutyric Acid	+	α -D-Glucose- 1-Phosphate	-
γ -Hydroxybutyric Acid	-	D-Glucose- 6-Phosphate	+

^{a)}+, positive reaction; -, negative reaction; ±, borderline

Table 2. Sensitivity to chemotherapeutic agents of *Vibrio ponticus* KJS1 isolated from diseased Maroon clownfish, *Premnas biaculeatus*.

Chemotherapeutic agent (μg)	Sensitivity ^{a)}
Oxolinic acid (2)	+++
Erythromycin (15)	-
Ampicillin (10)	++
Cephalothin (30)	++
Flumequine (30)	+++
Doxycycline hydrochloride (30)	+++
Oxacillin (1)	-
Ciprofloxacin (5)	+++
Ofloxacin (5)	+++
Norfloxacin (10)	+++
Nalidixic acid (30)	+++
Spiramycin (100)	-
Pefloxacin (5)	+++
Oxytetracycline (30)	++

^{a)} -, Non sensitivity; +, weak sensitivity; ++, sensitivity; +++, good sensitivity.

Table 3. Sequence divergences in the isolated strain (*V. ponticus* KJS1) and type strains. Numbers below the diagonal are divergence values corrected for multiple substitutions using the two parameter model (Kimura, 1980).

	1 ^{a)}	2	3	4	5	6	7	8	9
1	-								
2	0.0022	-							
3	0.0266	0.0250	-						
4	0.0321	0.0305	0.0087	-					
5	0.0282	0.0266	0.0050	0.0036	-				
6	0.0383	0.0366	0.0228	0.0183	0.0221	-			
7	0.0437	0.0420	0.0349	0.0366	0.0372	0.0374	-		
8	0.0415	0.0397	0.0298	0.0284	0.0298	0.0376	0.0222	-	
9	0.0405	0.0389	0.0348	0.0358	0.0371	0.0366	0.0036	0.0236	-

^{a)}1, *V. ponticus* KJS1; 2, *V. ponticus* CECT 5869 (AJ630103); 3, *V. furnissii* ATCC 35016 (X76336); 4, *V. fluvialis* NCTC 11327 (X76335); 5, *V. fluvialis* ATCC 33809 (X74703); 6, *V. vulnificus* ATCC 27562 (X76333); 7, *V. harvey* ATCC 14126 (X74706); 8, *V. nereis* ATCC 25917 (X74716); 9, *V. campbelli* ATCC 25920 (X74692).

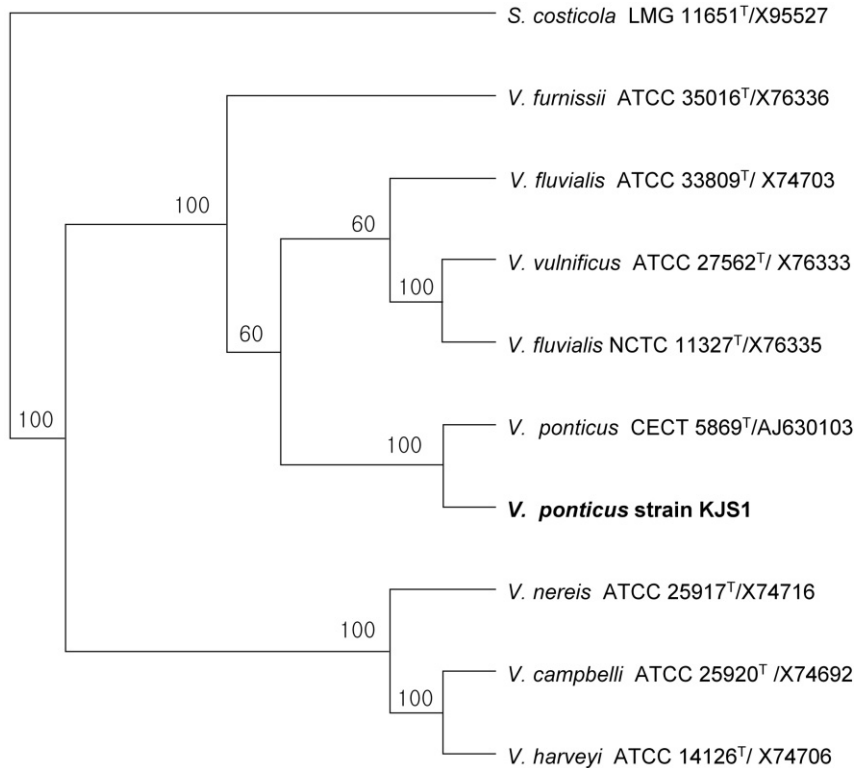


Fig. 2. A strict consensus tree based on 16S rRNA gene sequences comparing isolated strain (*V. ponticus* KJS1) with type strains. Bootstrap values (based on 100 replicates) are shown on the strict consensus tree above the nodes.

수온을 비롯한 환경과 밀접한 관련이 있는 것으로 판단되므로 사육 환경 개선등을 통한 질병 방제 기술 개발은 열대 및 아열대성 해수 관상어 종묘 생산 기술 확보에 있어서 중요한 요소 중 하나로 판단된다.

요 약

비브리오증은 해수어의 중요한 질병중 하나로 알려져 있다. 본 연구에서 maroon clownfish (*Premnas biaculeatus*)를 대상으로 해수 관상어 종묘 생산 기술 개발 과정 중 부화 3~7일령 사이에 섭이를 하지 않고 힘없이 유명하면서 폐사하는 개체들로부터 *Vibrio* 균주를 분리하였다.

분리균주의 16S rRNA gene 염기서열 분석결과 *Vibrio ponticus* CECT5869 와 99.8%의 상동

성을 보여 *Vibrio ponticus* KJS1으로 동정하였다.

GN2 microplate (BioLog, USA)를 이용한 생화학 시험결과에서 dextrin 및 sucrose를 포함한 35가지 기질 이용능이 확인되었고, α -cyclodextrin을 비롯한 52가지 기질은 분해하지 못하였으며, glycogen을 비롯한 7가지 기질은 약한 이용능을 나타내었다.

분리 균주에 대한 항생제 감수성 실험 결과에서는 oxolinic acid, flumequine, ciprofloxacin, ofloxacin, norfloxacin, nalidixic acid, pefloxacin, oxycycline hydrochloride에 높은 감수성을 나타내었다.

참 고 문 헌

Cobb, C., Levy, M. G. and Noga, E. J.: Develop-

- ment of immunity by the tomato clownfish, *Amphiprion frenatus* to the dinoflagellate parasite *Amyloodinium ocellatum*. *Journal of Aquatic Animal Health*, 10: 259-263, 1998.
- Felsenstein, J.: PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5, Computer program distributed by the author. Univ. of Washington, Seattle, WA. USA, 1993.
- Hoff, F. H.: Conditioning, spawning and rearing of fish with emphasis on marine clownfish, pp. 212, *Aquaculture Consultants Inc.*, 1996.
- Kang, B-J.: A Study on the Characteristics of Bacteria Isolated from Cultured Flounders (*Paralichthys olivaceus*) Showing Disease Symptoms in Jeju Area of Korea, pp. 112, Ph. D. thesis, Cheju national university (in Korean), 2003.
- Kimura, M.: A simple method for estimating evolutionary rates of base substitution through comparable studies of nucleotid sequences. *J. Mol. Evol.*, 16: 111-120, 1980.
- Masumura, K., Iida, Y. and Mekuchi, T.: The effects of water temperature and fish age on a herpes virus infection of Japanese flounder larvae, *Paralichthys olivaceus*. *Fish Pathol.*, 24: 111-114, 1989
- Macian, M. C., Garay, E., Grimont, P. A. and Pujalte, M. J.: *Vibrio ponticus* sp. nov., a neighbour of *V. fluvialis*-*V. fumiisii* clade, isolated from gilthead Sea bream, mussels and seawater. *Syst. Appl. Microbol.*, 27: 535-540, 2004.
- Moon, Y-G. and Heo, M-S.: Use of 16S-23S rRNA intergenic spacer region for species-species primer developed of *Vibrio ichthyenteri*. *Kor. J. Microbiol.*, 41: 117-124, 2005.
- Silphaduang, U., Hatai, K., Wada, S. and Noga, E.: Cladosporiosis in a tomato clownfish (*Amphiprion frenatus*). *J. Zoo Wildlife Med.*, 31: 259-261, 2000.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J. and Plewniak, F.: The Clustal-X Windows Interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acids. Res.*, 25: 4876-4882, 1997.
- Wilkerson, J. D.: *Clownfishes*. T. F. H. Publications, Inc., pp. 240, 1998.
- Yu, J. M. and Lee, S. M.: *Marine fishes around Cheju island*. Jeju-do Office of Education, pp. 248, 1995.

Manuscript Received : March 2, 2007

Revision Accepted : March 30, 2007

Responsible Editorial Member : Moon-Soo Heo
(Jeju Univ.)