

넙치 자어, 로티퍼와 알테미아의 세균총에 관한 분석

김명석[†] · 최혜승 · 김나영 · 정승희
(국립수산과학원)

Studies of Bacterial Flora of *Rotifer* sp., *Artemia* sp. and Olive Flounder larvae, *Paralichthys olivaceus*

Myoung Sug KIM[†] · Hye Sung CHOI · Na Young KIM · Sung Hee JUNG
(National Institute of Fisheries Science)

Abstract

The purpose of this research was to investigate the bacterial flora of healthy olive flounder larvae (*Paralichthys olivaceus*) and live feeds (*Rotifer* spp. and *Artemia* spp.). The total bacteria counts were 9.2×10^7 and 1.2×10^{10} cfu/g and *Vibrio* sp.(82.8%) was dominant in rotifers. The total bacteria counts were 3.8×10^6 and 9.2×10^6 cfu/g and *Vibrio* sp.(73.3%) was dominant in artemia. In olive flounder larvae, the total bacteria counts were $1.4 \times 10^6 \sim 8.3 \times 10^7$ cfu/g and *V. harveyi* (38.5%) was dominant. It might be potential marker of disease outbreak in olive flounder larvae.

Key words : Bacterial flora, Artemia, Rotifer, Olive flounder

I. 서론

우리나라의 넙치 종자 생산기술은 1980년대 중반부터 발전되어 왔다. 해산 어류의 종자 생산 과정에서 대량 폐사가 발생하기도 하며(Matsuoka, 1989; Muroga, 1992) 질병도 폐사의 원인 중의 하나이다. 넙치 치어에 발생하는 질병은 바이러스에 의한 상피증생증(Iida et al., 1989), 이리도바이러스 감염증(Kim et al., 2006), 세균에 의한 장관 백탁증(Murata, 1987), 기생충에 의한 스키테카증(Jin et al., 2003) 등이 있다.

넙치 치어기에 발생하는 감염성 질병의 원인 병원체가 종자 배양장으로 유입되는 경로는 명확하지 않으나, 일반적으로 넙치 종자 생산에 초기

먹이 생물로 사용되고 있는 로티퍼와 알테미아를 통해 병원체가 전달될 가능성이 높다. 넙치 먹이 생물의 세균총을 분석하는 것은 넙치 치어의 건강을 위해 필요하지만, 넙치의 치어와 초기 먹이 생물의 세균총에 관한 보고는 거의 없다.

이번 연구에서는 종자 배양장에서 생산되는 넙치의 세균총과 먹이로 공급되는 로티퍼와 알테미아의 세균총을 조사하여 건강한 넙치 종자를 생산하는 기초 자료를 얻고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 조사 지역 및 조사생물

[†] Corresponding author : 051-720-2491, fishdoc@korea.kr

* 이 논문은 국립수산과학원 수산과학연구사업(R2016067)의 지원에 의해 수행되었습니다.

충남 태안(TA)에 위치한 넙치 종자 배양장에서 로티퍼(*Rotifer* sp.), 알테미아(*Artemia* sp.), 부화 14일, 29일, 32일, 42일의 넙치 자어를 채취한 후 실험실로 이송하여 실험에 사용하였다. 이때 로티퍼, 알테미아 및 넙치 자어의 사육수를 함께 채취하여 해수 중 세균 수 변화를 조사하였다. 넙치 치어의 세균 감염을 조사하기 위해 경남 거제(GJa, GJb), 전남 고흥(GHa, GHb), 충남 태안(TA), 충남 보령(BR)에 위치한 6개 종자 배양장의 넙치 치어를 검사하였다.

2. 로티퍼, 알테미아, 넙치 자어의 세균 수 측정

로티퍼, 알테미아와 사육수의 총 세균 수와 비브리�균 수를 viable counting 법으로 측정하였다. 로티퍼와 알테미아는 40 μ m mash filter(BD Falcon, NJ, USA)로 모았고 사육수는 필터를 통과시켜 로티퍼와 알테미아가 제거된 사육수의 세균 수를 측정하였다. 로티퍼, 알테미아와 전장 1cm 이하의 넙치 자어는 멸균 생리식염수로 3회 세척하고 9배의(w/v) PBS 용액에 넣은 후 homogenizer로 마쇄하여 상등액을 분석에 사용하였다.

세균 수 측정을 위해 준비된 시료는 멸균 PBS로 10배 단계희석을 하고 3반복으로 1% NaCl이 추가된 BHIA(Brain heart infusion agar)(sBHIA)와 TCBS agar에 각각 20 μ l를 떨어뜨려 건조시키고 25°C에서 48시간 동안 배양하여 형성된 집락의 수를 조사하였다. 총 세균 수는 sBHIA에서 형성된 세균 집락 수로 계산하였고 비브리�균 수는 TCBS agar에서 형성된 세균 집락 수로 계산하였다.

3. 넙치 치어에서 세균 분리

넙치 치어의 외부를 70% 에탄올로 소독한 후 해부를 하고 신장을 적출하여 sBHIA에 접종하였고 25°C에 48시간 동안 배양하여 세균을 분리하

였다.

4. 세균 동정

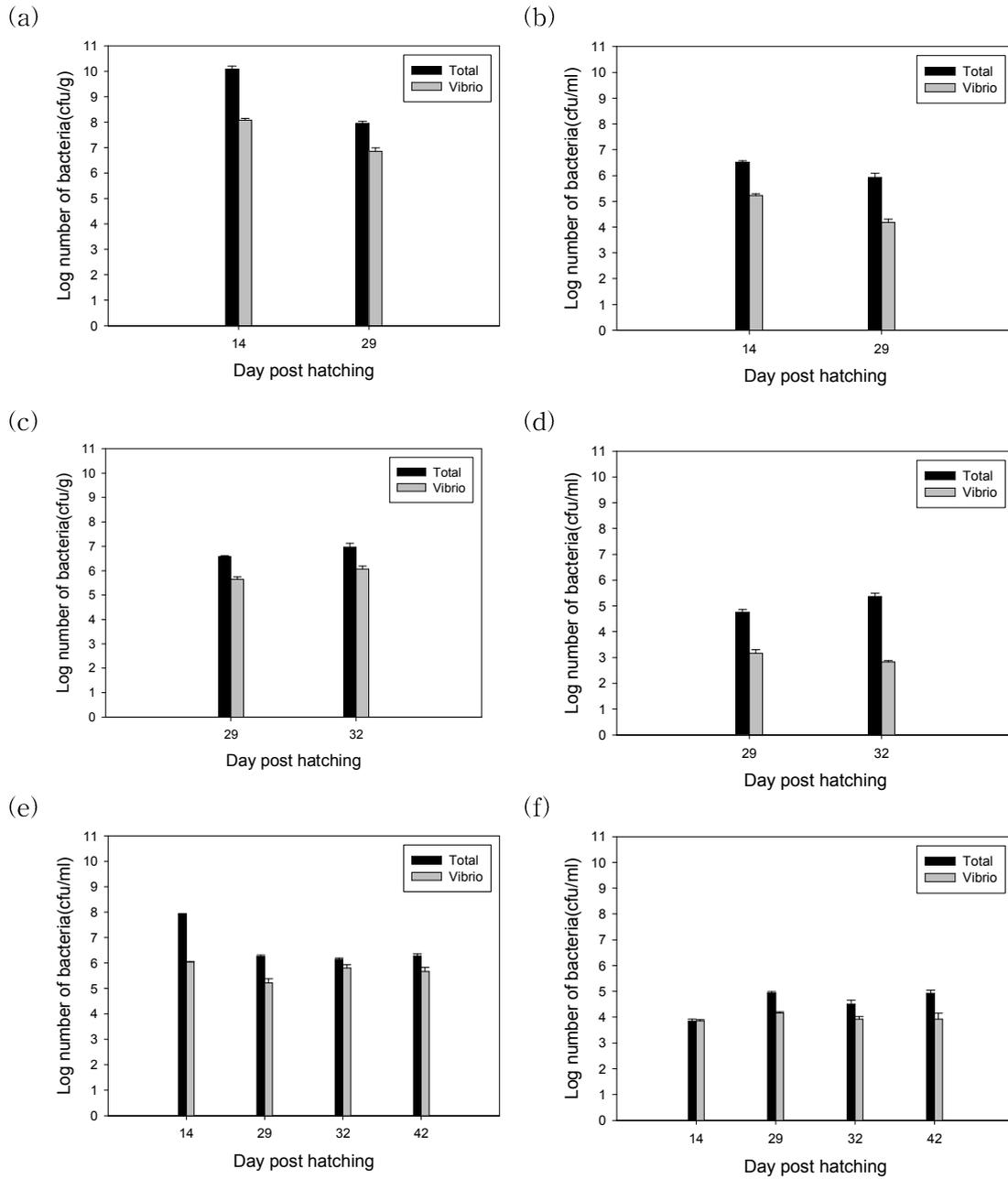
TA 배양장의 부화 후 29일째 넙치 자어와 로티퍼, 알테미아 및 각 사육수에서 분리된 세균을 16S rRNA 염기서열 분석법으로(Wiik et al., 1995) 동정하였다. 각 시험구에서 분리된 26~30개 세균의 DNA는 high pure PCR template preparation kit(Roch, Mannheim, Germany)를 사용하여 분리하였고 PCR 법으로 27f(5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'), 518r primer(5'-GTA TTA CCG CGG CTG CTG G-3')를 사용하여 16S rDNA를 증폭 하였다. PCR 증폭 산물은 Prep-A-Gene DNA Purification System(Bio-Rad Laboratories)으로 정제하고 Big Dye Terminator Cycle DNA Sequencing Kit(ABI PRISM, Applied Biosystems)와 automatic sequencer를 사용하여 염기서열을 분석하였다. 분석된 세균의 염기서열은 GenBank의 Blast 분석을 실시하여 종을 동정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 로티퍼, 알테미아, 넙치 자어 및 사육수의 세균 수

먹이생물, 자어, 사육수의 총 세균 수와 비브리오팀 수를 조사하였다. 로티퍼의 총 세균 수는 $9.2 \times 10^7 \sim 1.2 \times 10^{10}$ cfu/g 이고, 비브리오팀 수는 $7.2 \times 10^6 \sim 1.2 \times 10^8$ cfu/g으로 총 세균수의 1.0 ~ 7.8%이었다([Fig. 1a & 1b]). 로티퍼의 세균 수는 일반적으로 $10^7 \sim 10^{10}$ cfu/g이고 사육수의 세균 수는 $10^4 \sim 10^7$ cfu/ml로 보고 되어 있어 (Miyakawa & Muroga, 1988; Tanasomwang & Muroga, 1990; Nicolas et al, 1989; Skjermo & Vadstein, 1993) 종자 배양장에서 사용하는 로티퍼의 총 세균 수와 유사하였다.

알테미아의 세균 수는 $3.8 \sim 9.2 \times 10^6$ cfu/g이고 배양 해수의 세균 수는 $2.3 \sim 5.6 \times 10^4$ cfu/ml 이었



[Fig. 1] Total bacterial count and total *Vibrio* count of feed, olive flounder larvae and rearing water. Rotifer(a), water in rotifer tank(b), artemia(c), water in artemia tank(d), olive flounder larvae(e), water in larvae tank(f)

다([Fig. 1c & 1d]). 흡으로 된 연못에서 배양된 알테미아의 세균 수는 $4.6 \times 10^7 \sim 3.2 \times 10^8$ cfu/g 로 보고되었고(Al-Harbi & Uddin, 2010) TA 배양장에서 배양된 알테미아의 총 세균 수 보다 많았

는데 이것은 양식장별로 사육관리 방법의 차이 때문이라고 생각된다.

넙치 자어의 세균 수는 $1.4 \times 10^6 \sim 8.3 \times 10^7$ cfu/g 이었고, 비브리오균 수는 $1.6 \times 10^5 \sim 1.1 \times 10^6$ cfu/g 으로 총 세균수의 1.3 ~ 47.1%이었다([Fig. 1e & 1f]).

2. 로티퍼, 알테미아, 넙치 자어의 비브리오 세균 총

TA 배양장의 로티퍼에서 분리된 비브리오균은 3종류로 *Vibrio* sp.가 우점종이었고 사육수에서 분리된 2종류의 비브리오균은 로티퍼에서 분리되지 않았다. 알테미아에서 2종류의 비브리오균이 분리되었고 *Vibrio* sp.가 우점종이다. 넙치 자어에서는 6종류의 세균과 우점종으로 *V. harveyi*가 분리되었다. *Vibrio* sp.는 로티퍼, 알테미아, 넙치 자어와 사육수에서 모두 분리가 되었고 *V. harveyi*는 로티퍼와 넙치 자어에서 분리가 되었다

(<Table 1>). 일본에서 넙치 자어의 장내세균총은 *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *Vibrio* spp., *Pseudomonas*, *Moraxwlla*, *Cytophaga*, *Alcaligenes* 등이 보고 되었으나, 양식장에 따라 차이가 있고 같은 양식장에서도 사육수조에 따라 차이가 있어 (Tanasomwang & Muroga, 1988) 먹이와 사육환경의 영향을 받는 것으로 생각된다.

3. 넙치 세균 감염 조사

6개소의 넙치 종자 배양장에서 생산된 넙치 치어의 신장에서 비브리오속 세균이 분리되었다 (<Table 2>). *V. ichthyoenteri*는 6개 종자 배양장의 넙치 치어에서 분리가 되었고 *V. harveyi*는 2개 종자 배양장에서 분리 되었다. *V. harveyi*와 *V. ichthyoenteri*가 TA 종자 배양장의 자어에서 분리 되었고 로티퍼와 로티퍼를 배양하는 사육수에서도 분리되므로 먹이 생물을 통해 어류로 유입되었을 수 있다.

<Table 1> *Vibrio* bacterial flora isolated from feed, rearing water and flounder

	Rotifer(%)		Artemia(%)		Flounder larvae(%)	
	rearing water	Rotifer	rearing water	Artemia	rearing water	larvae
<i>V. alginolyticus</i>	14.8(4)*					
<i>V. chagasii</i>			19.2(5)		21.4(6)	
<i>V. coralliilyticus</i>						11.5(3)
<i>V. fischeri</i>						11.5(3)
<i>V. fortis</i>			65.4(17)			
<i>V. gigantis</i>					3.6(1)	
<i>V. harveyi</i>	7.4(2)	3.4(1)			35.7(10)	38.5(10)
<i>V. hepatarius</i>	3.7(1)					
<i>V. ichthyoenteri</i>	18.5(5)	13.8(4)				
<i>V. neptunius</i>						3.8(1)
<i>V. parahaemolyticus</i>	7.4(2)			26.7(8)		
<i>Vibrio</i> sp.	48.1(13)	82.8(24)	15.4(4)	73.3(22)	39.3(11)	26.9(7)
<i>Photobacterium damsela</i>						7.7(2)
Total	100(27)	100(29)	100(26)	100(30)	100(28)	100(26)

*, number of isolated bacteria

*V. harveyi*가 넙치에 질병을 일으키는 것으로 보고되어 있고(Won & Park, 2008), *V. ichthyenteri*도 넙치 치어에 질병을 일으키는 것으로 보고되어 있지만(Murata, 1987) 이번 연구에서는 넙치 자어의 폐사가 관찰되지 않았다. Savas et al.(2005)은 감성돔 자치어의 초기먹이로 사용된 로티퍼의 총 세균 수가 8.7×10^6 cfu/g이고, *Pseudomonas*가 60%, *Vibrio*가 20%로 나타났고 로티퍼를 먹은 감성돔 자어의 총 세균수가 9.8×10^3 cfu/fish로 *Pseudomas*(48%), *Vibrio*(28%)가 세균총의 우점종이었다고 보고하여 로티퍼의 세균총이 감성돔 자어의 세균총에 영향을 준 것을 보여 주었다. *V. harveyi*와 *V. ichthyenteri*는 정상적인 넙치의 장내세균총을 구성하고 기회성 병원균으로 작용하는 것으로 알려져 있으므로 넙치 자어에 깨끗한 해수로 세척한 먹이생물을 먹이는 것과 같은 사육관리 방법이 필요하다.

<Table 2> Kind of bacteria isolated from olive flounder juvenile

Aquafarm	Average total length (mm)	Bacteria
GHa	2.7	<i>Vibrio</i> sp., <i>V. ichthyenteri</i> , <i>V. scophthalmi</i>
GHb	5.9	<i>V. ichthyenteri</i>
GJa	6.3	<i>V. ichthyenteri</i>
GJb	3.2	<i>Vibrio</i> sp., <i>V. fischeri</i> , <i>V. ichthyenteri</i>
BR	6.5	<i>V. harveyi</i> , <i>Vibrio</i> sp., <i>Photobacterium damsela</i>
TA	1.5	<i>V. harveyi</i> , <i>V. ichthyenteri</i>

Muroga et al.(1987)은 로티퍼에 *V. alginolyticus*와 기타 세균들이 섭취되며 이러한 세균이 자어의 감염과 관계가 있다고 하였다. 또한 로티퍼 배양수에는 $10^6 \sim 10^8$ cfu/ml의 세균이 존재하며, 로티퍼도 $10^7 \sim 10^8$ cfu/g의 세균을 가지고 있어 로티퍼 배양액 1ml와 로티퍼 1g의 세균은 비슷한

양으로 검출된다고 한다. 이러한 것으로 보아 로티퍼와 알테미아에 포함되어 있는 세균 수의 정도에 따라 자어에 섭취되었을 때 미치는 영향은 다르게 나타났을 것으로 생각된다.

이번 조사 기간에서 넙치 자어의 대량폐사가 관찰되지 않아 조사된 먹이생물의 세균총과 넙치 자어의 세균총은 질병이 발생하지 않은 조건을 보여주는 사례가 될 수 있을 것이다. 앞으로 넙치 자어가 폐사하는 경우에 섭취한 먹이생물을 조사하여 비교하면 넙치의 종자 생산 시기에 질병의 발생 상황을 예측하는 자료로 활용될 수 있을 것이라 생각한다.

References

Al-Harbi, A. H. & Uddin, M. N.(2010). Bacterial flora of artemia cultured in earthen saline ponds, *Journal of Applied Aquaculture* 22, 194~201.

Iida, Y. · Masumura, K. · Nakai, T. · Sorimachi, M. & Matsuda, H.(1989). A viral disease in larvae and juveniles of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*, *Journal of Aquatic Animal Health* 1, 7~12.

Jin, C. N. · Lee, C. H. · Oh, S. P. & Heo M. S.(2003). Infection route of scuticociliates in the juvenile of the cultured flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Journal of Fish Pathology* 16(1), 13~21.

Kim, T. J. · Jang E. J. · Kim, J. S. & Lee, J. I.(2006). Iridovirus infection of cultured juvenile flounder(*Paralichthys olivaceus*) in nursery, *Korean Journal of Veterinary Research* 46(1), 21~25.

Matsuoka, T.(1989). Current state of affairs and problems facing sea-farming with emphasis placed on technical problems of fingerling production, *International Journal of Aquaculture and Fisheries Technology* 1, 324~332.

Miyakawa, M. & Muroga, K.(1988). Bacterial flora of cultured rotifer *Brachionus plicatilis*, *Suisan Zoshoku* 35, 237~243.

Murata, O.(1987). An infectious disease of larval flounder showing opaque intestine, *Fish Pathology* 22, 59~61.

- Muroga, K.(1992). Bacterial and viral diseases of marine fish during seed production, *Aquaculture* 99, 1~15.
- Nicolas J. L. · Robic, E. & Ansguer, D.(1989). Bacterial flora associated with a trophic chain consisting of microalgal rotifers and turbot larvae: Influence of bacteria on larval survival, *Aquaculture* 83, 237~248.
- Savas, S. · Kubilay, A. & Basmaz, N.(2005). Effect of bacterial load in feeds on intestinal microflora of seabream(*Sparus aurata*) larva and juveniles, *The Israeli Journal of Aquaculture* 57(1), 3~9.
- Skjermo, J. & Vadstein, O.(1993). Characterization of the bacterial flora of mass cultivated *Brachionus plicatilis*, *Hydrobiologia* 255/256, 185~191.
- Tanasomwang, V. & Muroga, K.(1988). Intestinal microflora of larval and juvenile stages in japaneas flounder(*Paralichthys olivaceus*), *Fish Pathology* 23(2), 77~83.
- Won, K. M. & Park, S. I.(2008). Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to cultured marine fishes in Korea, *Aquaculture* 285, 8~13.
- Zhang, J. S. · Dong, S. L. · Tian, X. L. · Dong, Y. W. · Liu, X. Y. & Yan, D. C.(2006). Studies on the rotifer(*Brachionus urceus Linnaeus*, 1758) as a vector in white spot syndrome virus(WSSV) transmission, *Aquaculture* 261, 1181~1185.
-
- Received : 21 September, 2016
 - Revised : 05 October, 2016
 - Accepted : 14 October, 2016