

碩士學位論文

제주도 양식 돌돔, *Oplegnathus fasciatus*에서
발생하는 저수온기 질병 원인 세균의 분리 및 특성



濟州大學校 産業大學院

生命産業工學科
海洋生物工學專攻

高 大 希

2004. 6

碩士學位論文

제주도 양식 돌돔, *Oplegnathus fasciatus*에서
발생하는 저수온기 질병 원인 세균의 분리 및 특성

指導教授 許文洙



濟州大學校 産業大學院

生命産業工學科
海洋生物工學專攻

高 大 希

2004. 6

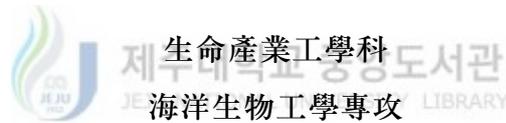
제주도 양식 돌돔, *Oplegnathus fasciatus*에서
발생하는 저수온기 질병 원인 세균의 분리 및 특성

指導教授 許文洙

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함.

2004年 6月 日

濟州大學校 産業大學院



高 大 希

高大希의 理學 碩士學位 論文을 認准함.

2004年 6月 日

委員長 여인규 印

委 員 전유진 印

委 員 박근태 印

목 차

ABSTRACT	vi
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	3
1. 병어의 채집 및 관찰	3
2. 원인세균의 분리	3
3. 분리세균의 동정	3
4. 분리세균의 생육 특성	4
5. 병원성 시험	5
6. 약제감수성 시험	6
7. 발병현황 및 피해상황	6
8. 치료시험	7
9. 병리조직학적 관찰	7
III. 결 과	8
1. 병어의 임상 증상	8
2. 분리균주의 동정	10
3. 분리균의 생육 특성	13
4. 발병현황 및 피해상황	13
5. 병원성 시험	15
6. 약제 감수성	17
7. 치료 시험	17
8. 병리조직학적 관찰	17

IV. 고찰	25
V. 요약	27
VI. 참고문헌	28



표 목 차

Table 1. Biochemical characteristics of a isolated strain	11
Table 2. Effect of temperature, pH and NaCl concentration on the growth of a bacterium isolated from rock sea bream, <i>Oplegnathus fasciatus</i> in Jeju	14
Table 3. Sensitivity to chemotherapeutic agents of <i>Pseudomonas anguilliseptica</i> isolated from diseased rock sea bream, <i>Oplegnathus fasciatus</i>	18



Abstract

The outbreak of haemorrhagic septicemia and lesions in dermis, frequently associated with keratitis have occurred on rock sea bream (*Oplegnathus fasciatus*) reared in Jeju island. A bacterium isolated from the diseased fish identified as *Pseudomonas* sp. by morphologic, cultural, and biochemical tests. The bacterium was identified *Pseudomonas anguilliseptica* according to 16S rDNA sequence analysis. The highest growth rate of this strain was obtained at 20 to 25°C although the disease occurred mostly below 16°C. The challenge test by ip injection revealed that this bacterium was pathogenic to rock sea bream. All experimental fish in challenged by ip injection died within 21 days but there was no death in control group. The bacterium was sensitive to Doxycycline, Chloramphenicol, Ciprofloxacin, Erythromycin, Flumequine, Nalidixic acid, Norfloxacin, and Ofloxacin.

그림 목차

- Fig. 1. Map showing the sites
(● : A land-based pond, ■ : Mari-floating netcage) 7
- Fig 2. External feature at the early stages (A) and the last stage (B) of the rock sea bream, *Oplegnathus fasciatus* infected with bacteria. 8
- Fig 3. Discoloration of the cornea (A) and swelling around the anus (B) of the rock sea bream (arrow), *Oplegnathus fasciatus* infected with bacteria 9
- Fig. 4. Internal feature at the early stages of intestine bleeding (A) and spleen swelling (B) in the rock sea bream (arrow), *Oplegnathus fasciatus* infected with bacteria. 9
- Fig. 5. Morphological feature of the isolates. Scale bar = 10 μ m. 10
- Fig. 6. Alignment of the partial 16S rDNA sequence of a isolated bacterium and *Pseudomonas anguilliseptica*. 12
- Fig. 7. Pathogenicity for *Pseudomonas auguilliseptica* in rock sea bream, *Oplegnathus fasciatus*. 15
- Fig. 8. External feature of artificial infected fish with *Pseudomonas anguilliseptica*. 16

Fig. 9. Therapeutic effect of flumequine on survival rate in rock sea bream, *Oplegnathus fasciatus*. ■, The period of administration of the drug. 19

Fig. 10. Microscopic pathological changes observed in the muscle tissue of the early stage (A) and last stage (B) in diseased rock sea bream (arrow), *Oplegnathus fasciatus*. Scale bar = 25 μm 20

Fig. 11. Longitudinal view of caudal fin. Tissue of healthy fish (A) and tissue of infected fish (B). Scale bar = 25 μm 21

Fig. 12. Longitudinal view of the scales just-before falling off (A) and gill filament (B). Scale bar = 25 μm 22

Fig. 13. Microscopic pathological changes observed in the kidney (arrows) of healthy fish(A) and infected fish (B). Scale bar = 25 μm 23

Fig. 14. Microscopic pathological changes (arrows) observed in the spleen (A) and liver (B). Scale bar = 25 μm 24

I. 서 론

돌돔 (*Oplegnathus fasciatus*)은 태평양과 인도양 등지에 광범위하게 분포하며 우리나라에서는 주로 남부이남 해역에 분포하고 있다(정, 1988). 특히 제주도 연안 암초지대에 많이 서식하고 있고 제주도 방언으로 갯돔으로 불리며 횡감 재료로 인기가 높은 고급 어종이다. 돌돔 양식은 일본과 국내에서 지속적인 인공종묘생산 기술개발(Fukusho, 1979; Kumai, 1984; 이 등, 1992; 황 등, 1996)이 진행되었고 종묘의 대량생산이 가능해져 남해안과 제주지역에서 양식이 이루어지고 있다. 특히 제주도 연안은 겨울철 저수온기에도 평균수온이 12℃ 이상으로 돌돔양식에 적합한 조건을 갖추고 있어 육상 수조 및 가두리 양식장에서 활발히 양식되고 있다. 또 남해안에서 양식하는 돌돔을 겨울철 저수온기를 피하기 위해 제주연안에서 월동을 시키는 경우도 있다.

양식 돌돔의 질병은 이리도 바이러스 등에 의한 바이러스성 질병, 연쇄구균 등에 의한 세균성 질병 및 백점충 등에 의한 기생충 질병 등 다양하게 발병되나 대부분 여름철을 포함한 고수온기에 집중적으로 발생된다. 그러나 오래전부터 제주도 지역 양식 돌돔이 겨울철 저수온기에 체표 출혈성 패혈증과 진무름, 안구 백탁이 수반되며 내부 장기는 비장, 신장의 증대 등 다양한 증상을 보이며 폐사하는 사례가 지속적으로 나타나 많은 피해를 입혀왔다. 이러한 발병 증상은 기존에 알려진 저수온기 *Vibrio*병이나 *Flexibacter psychrophylus* (*Flavobacterium psychrophylum*)에 의한 cold water disease와는 증상의 차이가 있고 또한 병어에서 이들 원인 세균이 분리되지 않았다 (Ingels et al, 1993).

본 연구에서는 겨울철 저수온기에 제주도 양식 돌돔의 체표 출혈성 패혈증 및 진무름, 안구 백탁 등의 발병 증상을 나타내며 지속적인 폐사를 가져오는 병어에서 질병의 원인균을 분리 동정하고, 병원성을 확인하기 위한 시험감염과 원인균 확인, 생육 특성 및 항생제 감수성을 조사하였으며 선택된 항생제를 이용하여 치료 효과를 확인하였다. 또한 병어의 각종 장기에서 병리 조직학적 특성을 검토하여 병인 기전에 대한 추후 연구에 대한 기초자료를 제공하고자 하였다.



II. 재료 및 방법

1. 병어의 채집 및 관찰

2003년 11월 하순 제주도 북제주군 소재 육상 수조식 양식장 및 제주시 소재 가두리양식장에 사육중인 돌돔 중 체표에 출혈성 패혈증과 짓무름 증상을 보이는 병어를 각각 10 마리와 18 마리를 채집하였다. 돌돔 병어와 폐사어의 외부 증상을 관찰하고 병어를 해부한 후 각 장기별로 내부 증상을 관찰하였다.

2. 원인 세균의 분리

병어의 체표, 궤양부위, 아가미, 아가미뚜껑 안쪽, 근육, 지느러미 등 외부 기관조직과 간장, 신장, 비장, 장, 복강, 담낭, 심장, 안구, 뇌 등 내부조직을 일부 절취하여 증균용 BHI agar 배지에 도말하여 25℃에서 배양하였다. 배양한 균주들은 TCBS, SS배지, Hue-shoot배지, 0.025 g 옥소린산을 첨가한 BHI agar 등 선택배지를 사용하여 원인균을 순수 분리하였다.

3. 분리 세균의 동정

순수 분리된 균주의 분류학적 위치를 검토하기 위하여 형태학적, 배양적, 생화학적 특성과 계통분류학적인 특성을 조사하였다. 세포의 형태학적 특성은 Gerhardt et al. (1981)에 준하여 세포의 형태 및 크기, 그람염색상, 운동

성 등을 관찰하였고 BHI 평판배지에 배양하면서 집락의 형태, 표면의 특징, 색, 투명도 등의 배양적 특성을 관찰하였다. 분리균주의 Gelatin 액화능 실험, 탄수화물 발효능 및 생화학적 특성은 Gerhardt et al. (1981) 및 MacFaddin (1980)에 준하여 실시하였다.

분리균주의 계통발생학적인 분류위치를 검토하기 위하여 16S rDNA의 partial sequencing을 행하였다. Genomic DNA의 분리를 위하여 배양액 3 ml를 원심분리한 후 수거된 균체를 Bioneer사의 DNA Kit를 사용하여 genomic DNA를 분리하였다. 분리된 genomic DNA로부터 16S rDNA를 증폭시키기 위해 20 μ l PCR premix (Bioneer Co., Korea)를 사용하여 PCR을 수행하였다. 주형 DNA 1 μ l, forward primer (20 pM) 1 μ l, reverse primer (20 pM) 1 μ l, 3차증류수 17 μ l를 넣어 혼합하였다. 반응조건은 96°C에서 30초간 denaturation, 52°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 1분간 extention를 30회 반복하였다. primer는 27f (5'-AGAGTTTGAATCM TGGCTCAG-3')와 15222r (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')을 사용하였다.

PCR 산물은 agarose gel 전기영동 후 나타난 밴드를 잘라내 Bioneer사의 Gel Extraction Kit로 정제하였다. 정제된 PCR 산물은 (주) 마크로젠에 의뢰하였으며 ABI 377 Auto-sequencer를 사용하여 Dye terminator sequencing법으로 염기서열을 결정하였다. 염기서열 분석은 Blast search program을 이용, 인터넷상의 database인 gene-bank, EMBL, DDBJ, PDB를 통하여 실시하였다.

4. 분리 세균의 생육 특성

분리균주의 생육특성을 검토하기 위하여 온도, 염분농도, pH를 각각 달리

하여 분리균주의 생육도를 조사하였다. 온도별 생육도는 BHI 평판배지에 분리균주를 도말 후 5℃, 10℃, 15℃, 20℃, 25℃, 30℃에서 배양하면서 집락의 형성 유무로 판단하였다. 염분농도에 따른 생육도는 BHI broth에 NaCl을 단계별로 각각 0%, 0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0%, 2.5%, 3.0%, 3.5% (w/v)를 첨가한 후 25℃에 20일간 배양하면서 발육상태를 관찰하였다. pH에 의한 분리균주의 생육도는 BHI broth를 1 N NaOH와 1 N HCl로 pH 5, 6, 7, 8, 9, 10이 되도록 단계별로 조절한 후 25℃에 20일간 배양하면서 발육상태를 관찰하였다.

5. 병원성 시험

본 실험에 사용된 실험어는 북제주군 조천읍 소재 육상 수조 양식장에서 사육 중인 질병에 감염되지 않은 전장 10 cm 내외의 건강한 돌돔 40마리를 각각 20마리의 실험구와 20마리의 대조구로 구분하고 21일간의 병원성 시험을 통하여 발병 유무 및 폐사 여부를 관찰하였다. 실험어는 실험수조로 옮긴 다음 3일간 순치시킨 후 실험을 시작하였으며 실험기간 중 사료는 투여하지 않았다.

실험에 사용한 수조는 각각 직경 100 cm × 60 cm 원형수조이며, 수량 150 ℓ, 환수량은 자연해수를 1일 30회전이 되도록 주수하였다. 시험 기간중의 수온은 13.0~14.1℃의 범위로 평균 13.5℃였다.

실험구에는 BHI agar 평판배지에서 배양된 균 4 μg을 멸균 생리식염수 10 ml에 현탁시킨 후 현탁액을 실험어 복강에 마리당 0.1 ml씩 주사하여 접종하였으며, 대조구에는 멸균 생리식염수를 0.1 ml씩 복강에 같은 방법으로 접종하였다. 접종균의 감염과 병원성 여부는 접종 후 폐사된 실험어의 주요

장기와 피부 등에서 조직 일부를 절취한 다음 평판 BHI agar 배지에 stamp 한 후 백금으로 도말하여 균을 재 분리 확인하였다.

6. 약제감수성 시험

분리균주에 대한 약제 감수성 시험은 Miller Hinton II agar 배지를 이용하여, Flumequine 등 16종의 항생제에 대해 Disk법에 의하여 실시하였다. 감수성시험에 사용한 항생제는 ampicillin, doxycycline, tetracycline, oxacilline, chloramphenicol, florfenicol, ciprofloxacin, erythromycin, nalidic acid, norfloxacin, ofloxacin, clindamycin은 BBL사 제품을, amoxicillin, flumequine, oxolinic acid, pefloxacin은 Oxoid사 제품을 각각 사용하였다.

7. 발병현황 및 피해상황

제주도 제주시 삼양동 연안과 남제주군 성산포 연안에 시설된 가두리 양식장 2 개소와 북제주군 애월읍 애월리, 한림읍 귀덕리, 조천읍 신흥리와 북촌리의 육상수조식 양식장 4 개소 등 총 6개 양식장에서 사육중인 돌돔을 대상으로 처음 발병증상이 나타난 2002년 11월 하순부터 증상이 나타나지 않는 2003년 4월 말까지 발병상황을 조사하였다 (Fig. 1).

조사방법은 사육중인 돌돔 양식장에서 정상어, 병세가 나타난 병어, 폐사어 등을 검사하여 균의 감염여부를 확인하였다. 종식시기는 동일한 증상이 더 이상 나타나지 않고 폐사어에서 균이 검출되지 않은 시기를 종식되는 시기로 판단하였다. 피해상황은 가두리 A어장에서 발병기간인 2002년 11월에서 2003년 4월까지 총 폐사량을 집계분석 하였다.

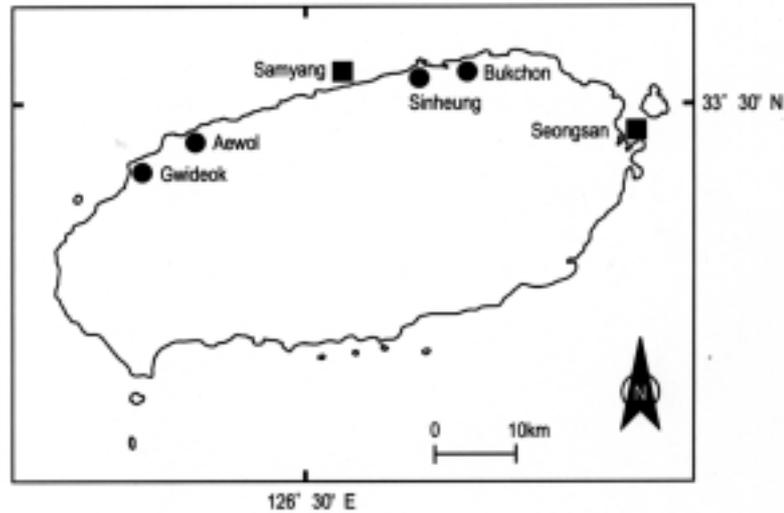


Fig. 1. Map showing the sites
 (● : A land-based pond, ■ : Mari-floating netcage)

8. 치료시험

본 군에 감염된 가두리 양식장에서 발병 후 폐사량이 증가하는 시기인 2003년 1월 9일부터 발병중인 병어를 대상으로 치료실험을 실시하였다. 실험에 사용한 약제는 감수성시험을 통하여 감수성이 가장 높은 Flumequine을 택하여 5일간 경구투여하였다. 투여방법은 어체중 kg당 1일 15 mg의 비율로 Moist pellet에 약제를 혼합하여 1일 1회 경구투여하였다.

9. 병리조직학적 관찰

병어의 환부, 지느러미, 간장, 신장, 비장, 심장, 뇌, 아가미 등 주요 조직을 Bouin's 용액에 고정처리 한 후 탈수과정을 거쳐 파라핀 포매를 하였다. 파라핀 포매 후 Microtome으로 5 μ m 두께로 절편 한 다음 파라핀을 제거하고 Haematoxylin-Eosin으로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 병어의 임상 증상

병어의 초기 발병 증상은 피부와 지느러미에 염증이 발생하며 표피 출혈이 전신부위에 나타났다. 증상이 악화되면서 피부와 지느러미의 괴사가 수반되며 폐사하였고, 항문 백탁이나, 항문 확장과 항문 주위에 발적 및 염증이 나타나는 경우도 있었다. 병어의 내부 장기를 관찰하기 위하여 병어와 폐사어를 멸균된 해부용 기구를 이용하여 해부한 후 정밀하게 관찰한 결과 간과 장, 아가미뚜껑 및 근육에서 염증을 보였으며 아가미 괴사 및 비장이 팽대 되었다 (Fig. 2~4).

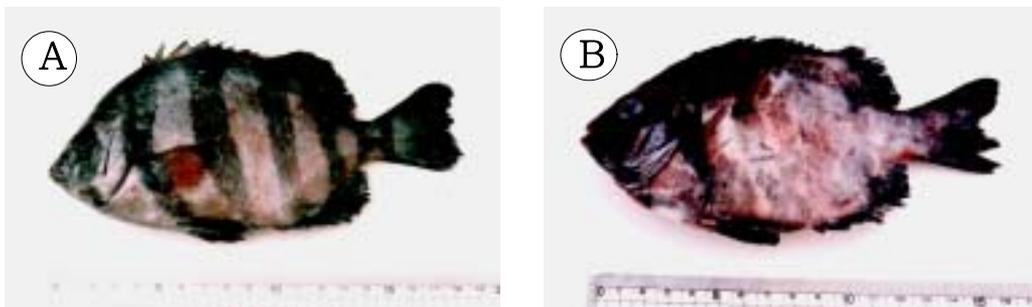


Fig 2. External feature at the early stages (A) and the last stage (B) of the rock sea bream, *Oplegnathus fasciatus* infected with bacteria.

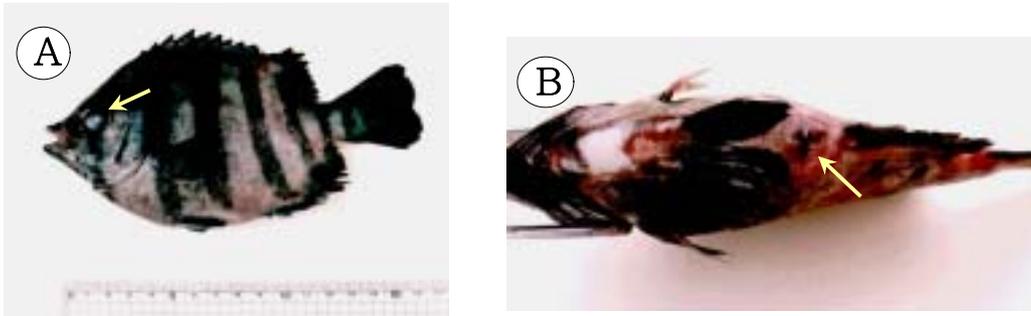


Fig 3. Discoloration of the cornea (A) and swelling around the anus (B) of the rock sea bream (arrow), *Oplegnathus fasciatus* infected with bacteria

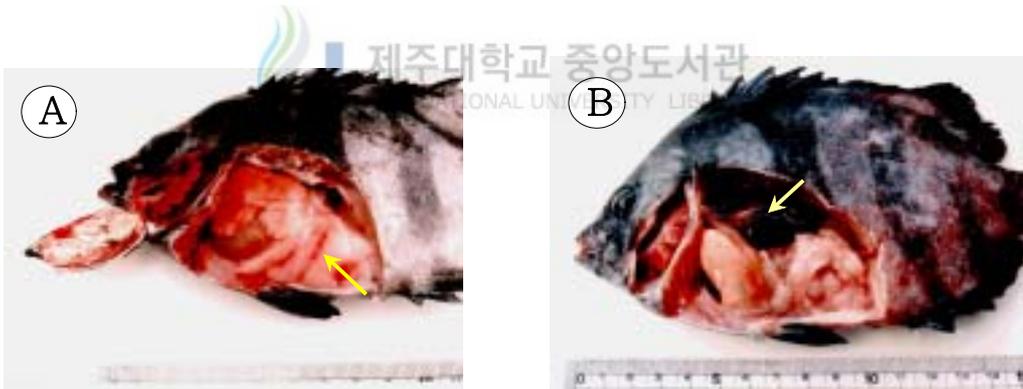


Fig. 4. Internal feature at the early stages of intestine bleeding (A) and spleen swelling (B) in the rock sea bream (arrow), *Oplegnathus fasciatus* infected with bacteria.

2. 분리균주의 동정

그람음성의 간균으로 포자를 형성하지 않았고 운동성을 가졌다 (Fig. 5). 형성된 집락은 원형에 가까웠고 표면은 가장자리가 부정형이고, convex형이었으며, 표면은 smooth하였다. 본 균주는 호기성 세균으로 catalase, cytochrome oxidase, gelatin liquefaction, citrate utilization에서 양성을 나타내었으며, ornithine decarboxylase, nitrate reduction, VP-MR test에서는 음성을 나타내었다 (Table 1).

16S rDNA 염기서열 분석 결과, *Pseudomonas anguilliseptica*의 16S ribosomal DNA sequence와 99% 상동성을 나타내었다 (Fig. 6). 따라서 상기의 형태학적, 배양적, 생화학적 특성과 16S rRNA sequencing 결과를 종합하여 “Bergey’s manual of systematic bacteriology Vol. I (Buchanan and Gibbson, 1984)과 “Bergey’s manual of determinative bacteriology 제 9판 (Holt et al., 1998)을 비교 검토한 결과, 본 균주는 *Pseudomonas anguilliseptica*로 동정되었다.



Fig. 5. Morphological feature of the isolates. Scale bar = 10 μm .

Table 1. Biochemical characteristics of a isolated strain

Contents	Characteristics
Cytochrome oxidase	+
Catalase	+
Oxidation/Fermentation	-
Coagulase	-
β -hemolysis	-
β -Galactosidase	-
Arginine dehydrolase	-
Lysine decarboxylase	-
Ornithine decarboxylase	-
Citrate utilization	+
H ₂ S production	-
Urease	-
Tryptophan deaminase	-
Indole production	-
Methyl red test	-
Voges-Proskauer test	-
Gelatin liquefaction	+
Nitrate reduction	-
6% NaCl	-



```

P. anguilliseptica -----CTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGAGAGAAGCTTGCT
Isolated strain AGTATTTATTTTCGAGGCGGAGCTACCATGC---AGTCGAGCGGTAGAGAGAAGCTTGCT
*** ** *****
P. anguilliseptica TCTCTTGAGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTAGTGGTGGGGGTA
Isolated strain TCTCTTGAGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTAGTGGTGGGGGTA
*****
P. anguilliseptica ACGTTTCGAAACGGACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCGGGGATCTTCG
Isolated strain ACGTTTCGAAACGGACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCGGGGATCTTCG
*****
P. anguilliseptica GACCTCGGCCATTAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAATGGCTCAC
Isolated strain GACCTCGGCCATTAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAATGGCTCAC
*****
P. anguilliseptica CAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGACACG
Isolated strain CAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGACACG
*****
P. anguilliseptica GTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGCGAAAGCCTGATC
Isolated strain GTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGCGAAAGCCTGATC
*****
P. anguilliseptica CAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGA
Isolated strain CAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGA
*****
P. anguilliseptica AGGGCAGTAACCTAATACGTTATTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAAC
Isolated strain AGGGCAGTAACCTAATACGTTATTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAAC
*****
P. anguilliseptica TTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGT
Isolated strain TTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGT
*****
P. anguilliseptica AAAGCGCGGTAGGTGGTTCAGTAAGTTGGAAGTGAAATCCCGGGCTCAACCTGGGAAC
Isolated strain AAAGCGCGGTAGGTGGTTCAGTAAGTTGGAAGTGAAATCCCGGGCTCAACCTGGGAAC
*****
P. anguilliseptica TGCTTTCAAACCTGCTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCCCTGTGAGCGG
Isolated strain TGCTTTCAAACCTGCTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCCCTGTGAGCGG
*****
P. anguilliseptica TGAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCGTGGCGAAGGCGACCACTGGACTGATACT
Isolated strain TGAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCGTGGCGAAGGCGACCACTGGACTGATACT
*****
P. anguilliseptica GACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCC
Isolated strain GACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCC
*****
P. anguilliseptica GTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATT
Isolated strain GTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATT
*****
P. anguilliseptica AAGTTGACCGCCTGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCC
Isolated strain AAGTTGACCGCCTGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCC
**** *****
P. anguilliseptica CGCACAAAGCGGTGGAGCA
Isolated strain CGCACAA-TCG-TGGAGCA
***** ** *****

```

Fig. 6. Alignment of the partial 16S rDNA sequence of a isolated bacterium and *Pseudomonas anguilliseptica*.

3. 분리균의 생육 특성

분리균주의 온도, pH, 염분농도에 의한 생육특성은 Table 2와 같았다. 생육온도는 10~25℃의 저온 범위에서 양호하였으며 특히 20~25℃에서 최대의 생육도를 나타내었다. 그러나 실제 저수온기 질병이 발병하는 온도는 16℃ 이하로 최적 생육온도와는 상이하였다. 분리균주의 pH에 의한 생육도는 pH 7과 8에서 생육이 양호하였다. 그러나 pH 6 이하와 pH 9 이상의 범위에서는 생육이 이루어지 않았다. 염분농도는 1% 이하의 낮은 농도에서 활발한 생육이 이루어졌으며 3.0%까지 생육이 가능하였다.

4. 발병현황 및 피해상황

가두리 양식장 2개소(성산, 삼양)와 육상 수조식 양식장 2개소(북촌, 애월)에서 발병이 확인 되었으나 신흥과 귀덕 육상양식장에서는 발병이 되지 않았다. 발병 어장은 전조사어장 대비 66.7%의 높은 발병률을 나타내었다.

발병시기는 가두리 양식장인 경우 2002년 11월 하순(평균수온 15.9℃)부터 2003년 4월 하순 (평균수온 15.6℃)까지 5개월 정도 지속되어 수온이 16℃ 이하로 하강하는 시기부터 발병되어 16℃ 이상으로 상승하면 종식되었다. 육상수조식 양식장인 경우 12월 말에 처음 발병되어 3월경에 종식되어 3개월 정도 지속되었다.

폐사량은 A 가두리 양식장인 경우 발병시 유효약제를 투여하여 치료를 해준 결과 입식량 31,800 마리 중 11월부터 익년 4월까지 총 3,110 마리가 폐사하여 9.8%의 폐사율을 보였다. 그러나 치료시기를 놓친 B 가두리 양식장인 경우 50% 이상의 높은 폐사율을 보였다.

Table 2. Effect of temperature, pH and NaCl concentration on the growth of a bacterium isolated from rock sea bream, *Oplegnathus fasciatus* in Jeju

Temperature (°C)	
5	-
10	+
15	+
20	++
25	++
30	-
Added NaCl concentration (%)	
0.0	++
0.5	++
1.0	++
1.5	++
2.0	++
2.5	+
3.0	+
3.5	-
pH	
5.0	-
6.0	-
7.0	++
8.0	++
9.0	-
10.0	-

-, No growth; +, growth; ++, Good growth.

5. 병원성 시험

분리균을 실험어의 복강에 인위 감염후 4일 째 처음으로 실험구에서 폐사되기 시작했으며 21일만에 감염어 20마리가 전량 폐사하였으나 대조구에서는 폐사체가 없었다 (Fig. 7). 폐사된 인위 감염어에서는 간, 신장, 비장, 심장, 장, 복강, 피부 등 주요 장기에서 동일 균을 분리하였으나 대조구의 실험어에서는 분리되지 않았다. 실험구의 인위감염 실험어는 양식장에서 발병된 자연 감염어와 유사한 체표 출혈 및 짓무름 증상을 나타내었다 (Fig. 8).

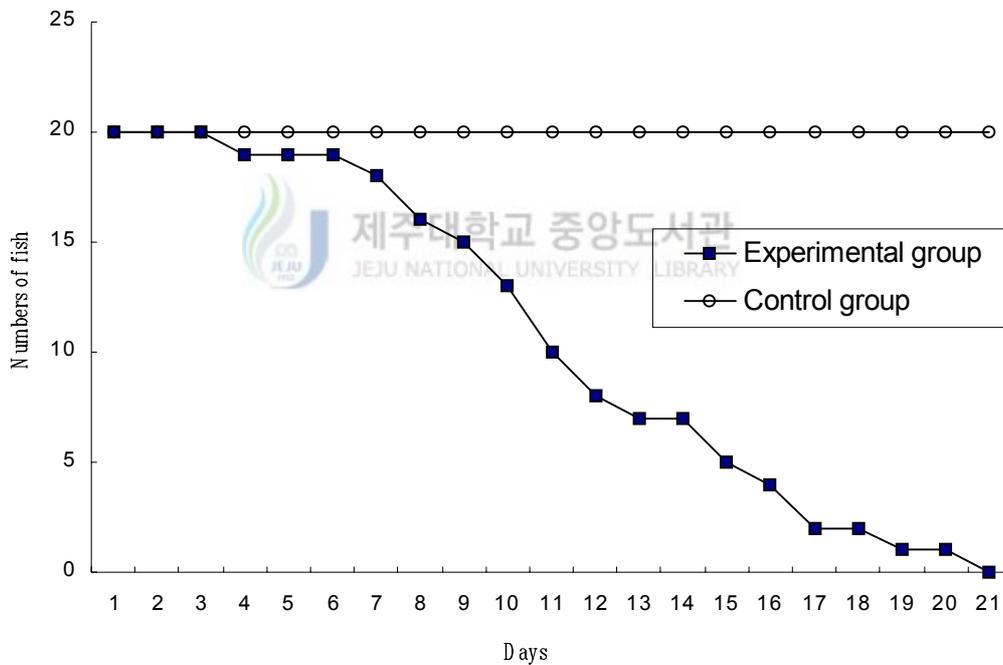


Fig. 7. Pathogenicity for *Pseudomonas auguilliseptica* in rock sea bream, *Oplegnathus fasciatus*.



Fig. 8. External feature of artificial infected fish with *Pseudomonas anguilliseptica*.

6. 약제감수성

16종류의 항생제 디스크를 이용하여 약제감수성 시험을 실시한 결과 doxycycline, chloramphenicol, ciprofloxacin, erythromycin, flumequine, nalidixic acid, norfloxacin, ofloxacin에 감수성이 높게 나타났으나 페니실린계의 항생제에는 높은 내성을 나타내었다 (Table 3).

7. 치료 시험

약제투여 전에는 31,000 마리의 양성어중 1일 최고 28 마리까지 폐사하였으나 Flumequine을 6일간 경구투여한 후에는 뚜렷한 치료효과를 보였다 (Fig. 9). 그러나 치료 후 약 1개월이 경과하면 다시 재발하는 경향을 보였다.



8. 병리조직학적 관찰

병어의 일반 근육조직은 감염초기에 표피 근처 근육부위에 일부 병변조직이 확인되었으나 감염 후기에는 근육의 병변조직이 상당히 확장되어 근육의 심부 조직까지 괴사가 진행되었다 (Fig. 10). 꼬리지느러미의 연조 조직은 건강어와 비교시 초기 감염어에서 이미 다량의 조직 괴사를 관찰할 수 있었다 (Fig. 11). 또한 중증 감염어에서는 피부가 괴사되면서 비늘이 탈락되었으며, 아가미에 감염된 경우에는 필라멘트가 붕괴되었다 (Fig. 12). 신장 조직은 세뇨관 조직 파괴 및 공포화가 이루어졌으며 비장에서는 육아종 및 공포를 형성하였고 간에서도 공포가 관찰되었다 (Fig. 13~14).

Table 3. Sensitivity to chemotherapeutic agents of *Pseudomonas anguilliseptica* isolated from diseased rock sea bream, *Oplegnathus fasciatus*

Agent (μg)	Sensitivity
Amoxicillin (10)	-
Ampicillin (10)	-
Oxacillin (1)	-
OTC (30)	-
Doxycycline (30)	+++
Chloramphenicol (30)	+++
Florfenicol (30)	-
Ciprofloxacin (5)	+++
Erythromycin (15)	+++
Flumequine (30)	+++
Nalidixic acid (30)	+++
Norfloxacin (10)	+++
Ofloxacin (5)	+++
Oxolinic acid (2)	-
Pefloxacin (5)	+
Clindamycin (2)	-

-, No sensitivity; +, weak sensitivity; ++, sensitivity; +++, good sensitivity.

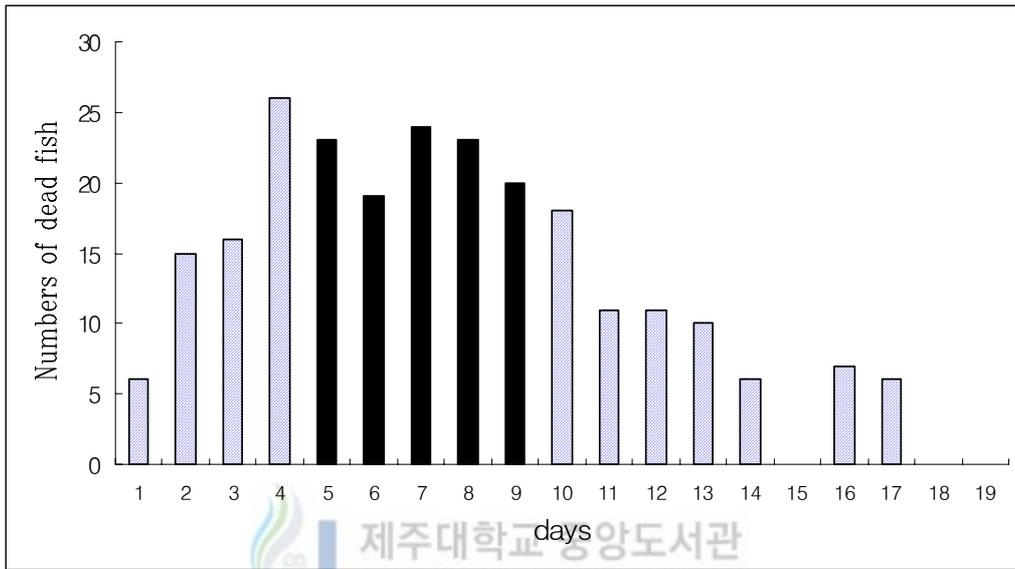


Fig. 9. Therapeutic effect of flumeguine on survival rate in rock sea bream, *Oplegnathus fasciatus*. ■, The period of administration of the drug.

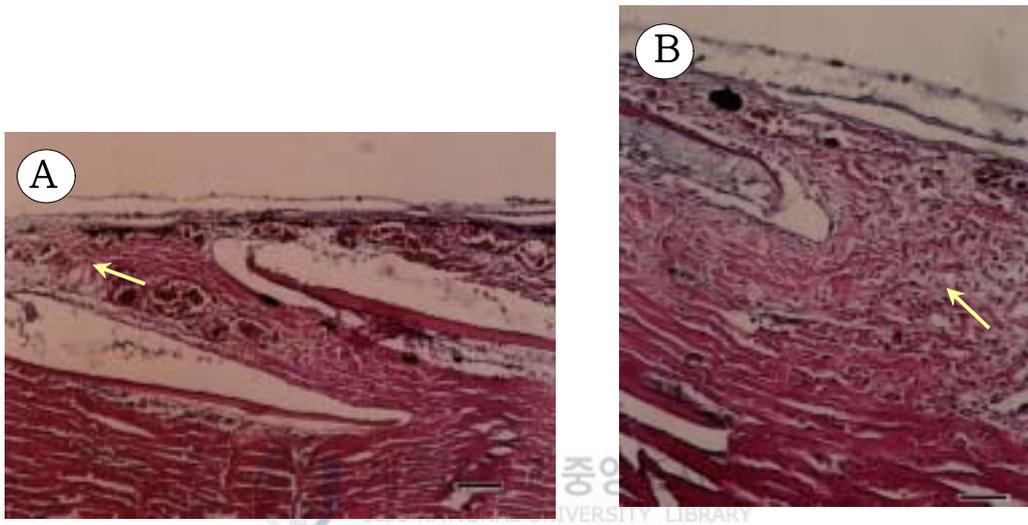


Fig. 10. Microscopic pathological changes observed in the muscle tissue of the early stage (A) and last stage (B) in diseased rock sea bream (arrow), *Oplegnathus fasciatus*. Scale bar = 25 μm .

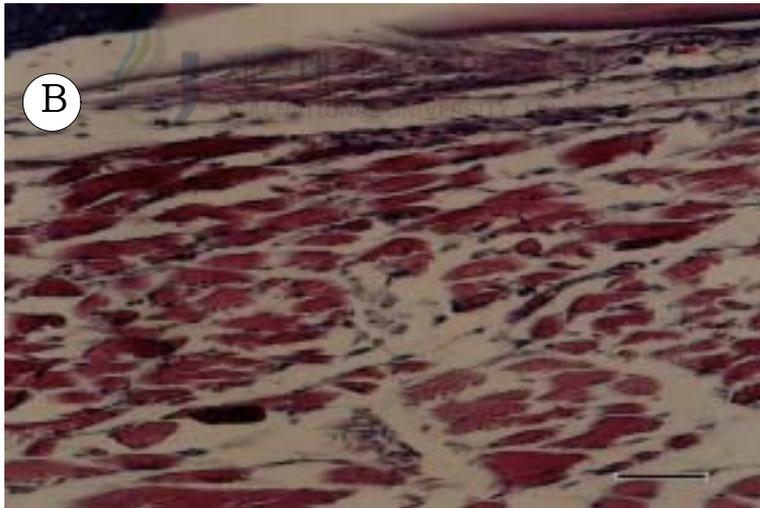
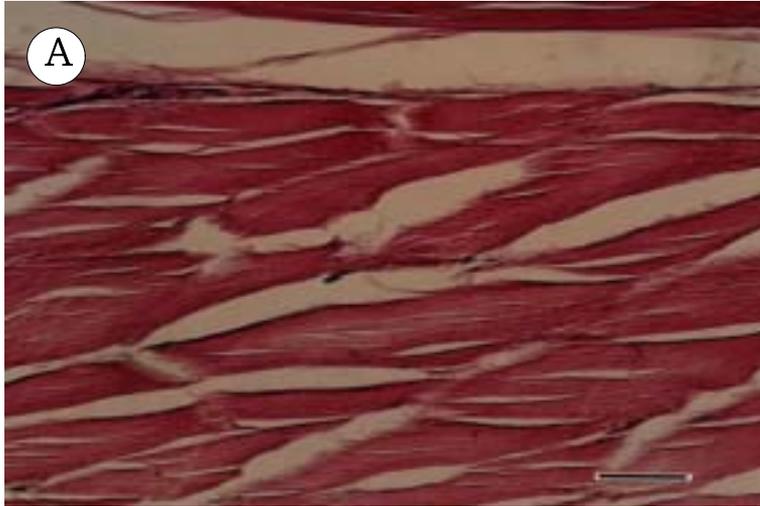


Fig. 11. Longitudinal view of caudal fin. Tissue of healthy fish (A) and tissue of infected fish (B). Scale bar = 25 μm .

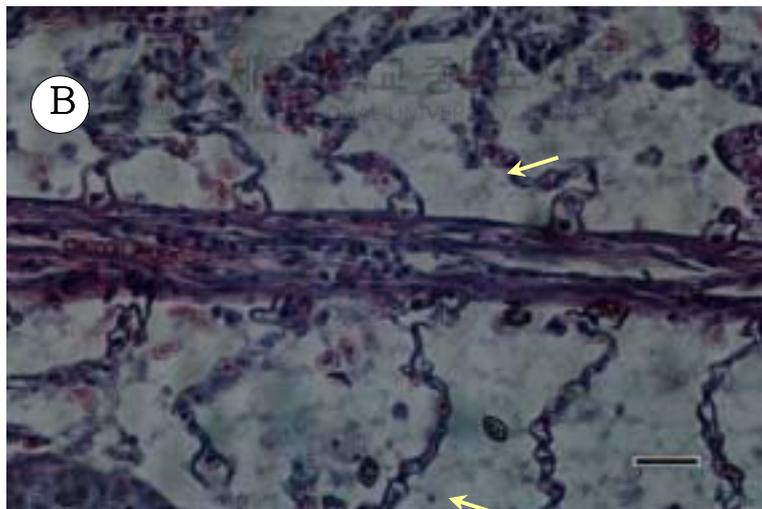


Fig. 12. Longisectional view of the scales just-before falling off (A) and gill filament (B). Scale bar = 25 μm .

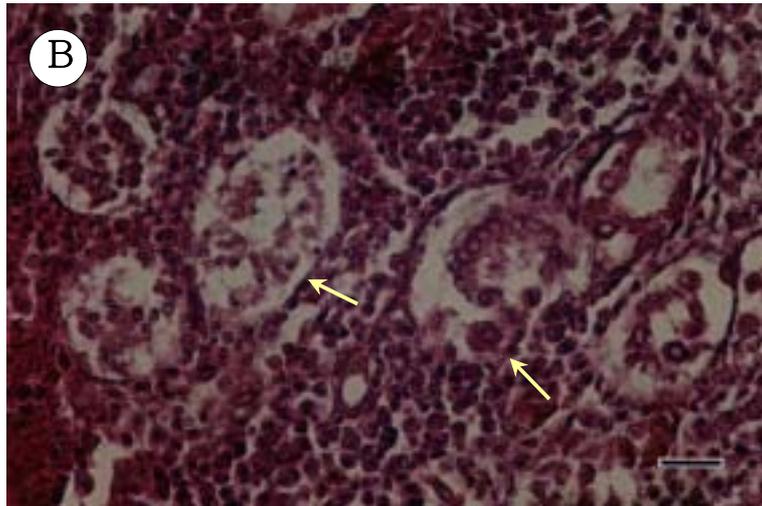
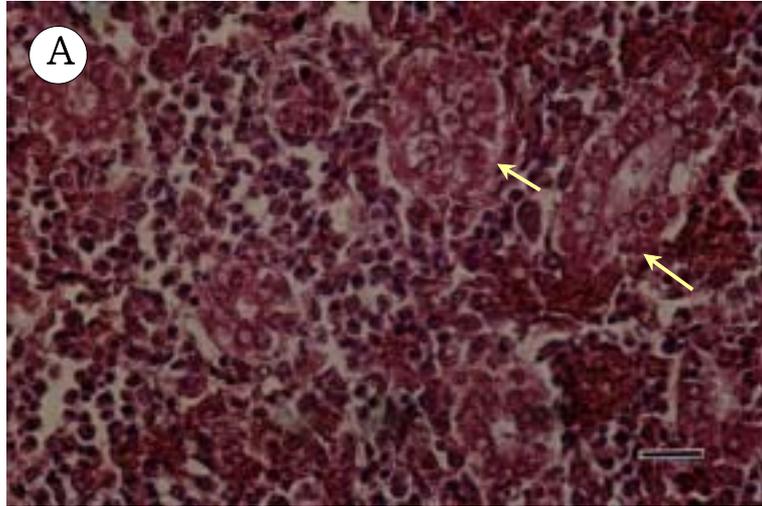


Fig. 13. Microscopic pathological changes observed in the kidney (arrows) of healthy fish(A) and infected fish (B). Scale bar = 25 μ m.

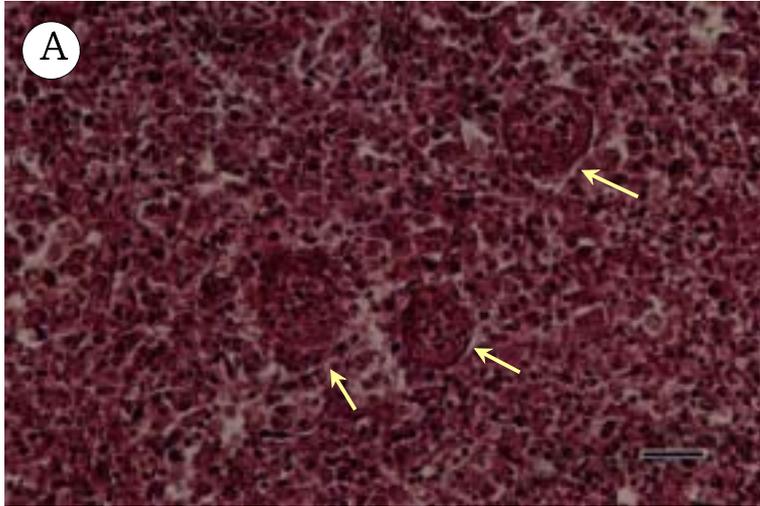


Fig. 14. Microscopic pathological changes (arrows) observed in the spleen (A) and liver (B). Scale bar = 25 μm .

IV. 고 찰

저수온기 제주지역에서 양식되는 돌돔의 체표 출혈성 패혈증과 진무름 현상 및 안구 백탁에 의한 폐사는 오래전부터 발견이 되었으나 단시간에 대량 폐사가 일어나지 않고 지속적으로 증상과 폐사가 이루어졌다. 본 연구에서도 총 조사어장 6개소 중 4개소에서 발병이 확인되어 66%의 높은 발병률을 보였으나 조사된 돌돔 양식장이 많지 않기 때문에 발병률이 유의성을 가진다고는 볼 수 없다. 그러나 오래 전부터 겨울철에 이와 같은 증상을 보이며 폐사하는 개체가 많았던 점 등을 고려하면 돌돔 양식에서 겨울철의 저수온기에 주요 질병인 것은 분명하다. 이러한 발병 증상은 기존에 알려진 저수온기 *Vibrio*병이나 *Flexibacter psychrophylus*에 의한 cold water disease와는 증상의 차이가 있고 또한 병어에서 이들 원인 세균이 분리되지 않았다 (Inges, et al., 1993). 따라서 이것은 지중해 유역의 양식장에서 저수온기에 참돔 (*Sparus aurata*)에 발병하는 winter syndrome과 유사하며, 이 질병은 아직까지 명확한 병원균이 구명되지는 않았으나 면역 체계가 약화될 때 *Pseudomonas anguilliseptica*가 감염되어 발병하는 것으로 알려져 있다 (Tort et al., 1998). 다른 보고에 따르면 유럽의 이베리아 반도에 있는 몇 어장들의 1월에서 4월까지 폐사율은 평균 10~15%였으며 일부 어장에서는 30%의 폐사율을 기록해 심각한 경제적 손실을 야기하기도 하였다 (Domenech et al., 1997).

본 연구에서 돌돔의 발병은 대략 수온 16℃를 기준하여 그 이하로 하강하는 시기로 전형적인 저수온성 질병으로 보인다. 육상 수조식 양식장이 가두리 양식장에 비해 늦게 발병되고 빨리 종식되었는데, 이는 육상 수조식 양식장에서는 사육수를 17℃ 내외의 지하 해수를 자연 해수와 혼합 이용함으

로써 가두리 양식장에 비해 높은 수온을 유지한데 따른 것으로 보인다.

병어에서 분리된 본 균주는 그람음성의 호기성 간균으로 운동성이 있었으며 배양적, 형태학적, 생화학적 제 특성이 *Pseudomonas*속과 유사하였고 16S rDNA partial sequencing 결과 뱀장어 적점병의 원인세균인 *Pseudomonas anguilliseptica*와 99%의 유사도를 나타내었다. 따라서 본 균주는 *Pseudomonas anguilliseptica*로 동정되었고, 본 균주와 같은 종이 프랑스의 지중해 및 대서양 연안의 양식장에서 참돔, 터봇 등 어종에 상관없이 1990년 이래로 발견되고 있는 것으로 보고되고 있다 (Berthe et al, 1995). 아직까지 국내에서는 본 균주에 대한 발병 내용이 뱀장어를 제외하고는 소개된 적이 없으나 저수온에 의해 발육에 영향을 받게 되는 대부분의 어종에 영향을 줄 것으로 사료된다.

본 실험에서 분리균주는 16°C 이하의 저수온에서 발병하나 생육적온은 20~25°C였는데, 이는 본 균주가 저온에 의한 기회성 감염 균주인 것을 확연히 보여주고 있다. 게다가 같은 어장에서 참돔과 같이 양식했을 경우에 특히 고온성 어종인 돌돔에 발병이 쉽게 되는 점으로 미루어 저수온기 어체의 저항력 약화가 주 원인인 것으로 추정된다.

분리균의 인위 감염시험이 실시된지 2일 후 표피 출혈성 패혈증의 전형적인 감염 증상을 보이며 21일 만에 감염어를 전량 폐사시키는 높은 병원성을 보여 저수온기에 본 균의 감염에 의해 많은 피해를 입을 수 있음을 시사하고 있다. 약제내성 검사에서는 doxycycline, chloramphenicol, ciprofloxacin, erythromycin, flumequine, nalidixic acid, norfloxacin, ofloxacin에 감수성이 높게 나타났으나 페니실린계의 항생제에 높은 내성을 나타내었다.

V. 요약

제주도에서 양식되는 돌돔에서 저수온기에 체표에 출혈성 패혈증 혹은 짓무름 및 안구백탁이 수반되며 폐사하는 증상이 지속적으로 발견되었다. 이러한 증상의 원인균으로 추정되는 세균을 병어의 체표 및 장기에서 순수분리하였고, 형태학적·배양적·생화학적 조사 및 16S rDNA sequencing 분석 결과 *Pseudomonas anguilliseptica*로 동정되었다. 본 균주의 병원성 유무를 확인하기 위하여 인위 감염시험을 실시한 결과 시험구에서 21일 만에 실험어 20 마리 모두가 자연 감염된 병어와 동일한 증상으로 폐사하여 병원성이 확인되었다. 분리균주의 생육 최적 온도는 20~25℃였고 생육 최적 pH는 7~8사이로 좁은 범위를 보였다. 염분농도는 저농도에서 생육능이 우수하였으나 3%까지 생육이 가능하였다. 약제내성 검사에서는 doxycycline, chloramphenicol, ciprofloxacin, erythromycin, flumequine, nalidixic acid, norfloxacin, ofloxacin에 감수성이 높게 나타났으나 페니실린계의 항생제에는 높은 내성을 나타내었다.

VI. 참고 문헌

- Berthe, F.C.J., Michel, C., and Bernardet, J.F. : Identification of *Pseudomonas anguilliseptica* isolated from several fish species in France, Dis. of Aqu. Org., 21: 151-155, 1995.
- Buchanan, R.E. and Gibbson, N.E. : Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 4, William and Wilkins Co., U.S.A, 1984.
- Domenech, A. Fernandez-Garayzabal, J.F., Lawson, P., Garcia, J.A., Cutuli T., Blanco M., Gibello A., Moreno, M.A., Collins, M.D., Dominguez, L. : Winter disease outbreak in sea-bream (*Sparus aurata*) asociated with *Pseudomonas anguilliseptica* infection, Aquaculture, 156 : 317-326, 1997.
- Fukusho, K.: Studies on fry production of Japanese striped knife jaw *Oplegnatus fasciatus*, with special reference to feeding ecology and mass culture of food organisms, Spec. Rep. Nagasaki. Pre. Ins. Fish., 430(6), 173 pp, 1979.
- Gerhardt, P., Murry, R.G.E., Costilow, R.N. Nester, E.W. Wood, W.A. Krieg, N.R. Phillips, G.B. : Manual of method for general bacteriology, *American Society for Microbiology*, U.S.A, 1981.
- Holt, J.G., Krieg, N.R. Sneath, P.H., Staley, J.T., Williams S.T. : Bergey's Manual of determinative bacteriology, 9th ed., William and Wilkins Co., U.S.A., 1998.
- Inges, V., Roberts, R.J., Bromage N.R. : Bacterial disease of Fish,

- Blackwell Science Ltd., UK, 1993.
- Kumai. H., Biological studies on culture of the Japanese parrot fish
Oplegnathus fasciatus (Temminck et Schlegel). Bull. Fish. Lab.
Kinki Univ., No. 2, 127 pp, 1984.
- MacFaddin, J.F. : Biochemical Tests for Identification of Medical
Bacteria, William and Wilkins Co., U.S.A., 1980.
- Tort, L., Padros F., Rotulliant and Crespo S. : Winter syndrome in the
gilthead sea bream *Sparus aurata*. Immunological and
histopathological features, Fish & Shellfish Immuno., 8: 37-47, 1998.
- 鄭文基 : 韓國魚圖譜, 一志社, 372~373, 1988.
- 이정의, 김재우, 김경민 : 돌돔종묘 양산시험, 수진사업보고, 97 : 005-209,
1992.
- 황형규, 강용진, 이종하, 양상근 : 돌돔종묘 양산시험, 남해수연사업보고,
406-409, 1996.



감사의 글

먼저 이 논문이 완성되기까지 부족한 저를 지도해 주시고 어려움을 이겨 낼 수 있도록 격려해 주신 허문수 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 아울러 미흡한 논문의 완성을 위해 헌신적 지도와 세심한 심사를 해주신 여인규 교수님, 전유진 교수님, 박근태 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 또한 부족한 제가 학업을 마치고 이 논문을 완성할 수 있도록 지도해 주시고 배려해 주신 송춘복 교수님과 이제희 교수님께 감사를 드립니다.

바쁜 업무에도 이 논문이 완성될 수 있도록 많은 도움을 주신 제주지방해양수산청 진창남 계장님, 이정호 지도사님을 비롯한 수산관리과 직원여러분과 수산과학원 이창훈 박사님께도 깊은 감사를 드립니다. 또한 실험기간 중 어려움을 같이 해준 미생물 실험실의 장영환, 송민경, 양병규, 정용욱, 강철영, 문영건, 김만철, 김민주 학우께도 감사를 드립니다.

그리고 이 작은 결실을 맺을 수 있도록 많은 배려와 격려를 주신 국립수산물품질검사원 제주지원 강병상 지원장님과 김수훈, 한지용, 고영봉, 강영임, 이정선 후배님, 시료를 제공해 주신 양식장 사장님들과 항상 어려울 때마다 용기를 준 친구 근수에게 감사의 말씀을 드립니다.

오늘 이 시간이 있도록 무언의 격려를 보내주신 장인, 장모님과 형님, 누님, 동생에게 감사를 드리며, 어려운 여건 속에서도 묵묵히 뒷바라지를 해준 사랑하는 아내 재영(소피아)과 믿음직스런 아들 슬기(요한), 귀한(베드로)과 기쁨을 함께하고자 합니다.

끝으로 하늘나라에서 이 아들을 보살펴주시는 어머니와 아버지께 머리 숙여 감사드리며, 부모님 영전에 이 논문을 바칩니다.

2004년 6월