

틸라피아(*Tilapia* sp.)에서分離한 *Flexibacter columnaris*의 性狀

田世圭·孫相奎

釜山水產大學 養殖學科
(1985년 5월 2일 수리)

Characteristics of *Flexibacter columnaris* Isolated from Tilapia (*Tilapia* sp.)

Seh-Kyu CHUN and Sang-Gyu SOHN

Department of Aquaculture, National Fisheries University of Pusan
Nam-gu, Pusan 608, Korea
(Received May 2, 1985)

The characteristics of a pathogen isolated from infected tilapia, which showed the external symptoms of fin erosion and body decoloration, were examined.

The strain of isolated pathogen was identified as *Flexibacter columnaris*. The normal tilapia dipped into suspensions of the isolated pathogens has developed the infective symptoms.

The strain of *Flexibacter columnaris* was sensitive to kanamycin, tetracycline, and amikacine, but resistant against sulfa drugs.

This strain could not grow in the cytophaga media containing over 2% NaCl or over 50% sea water.

In cytophaga broth containing more than 50% or sea water instead of distilled water, the number of *Flexibacter columnaris* decreased from about 10^6 /ml to 10^4 /ml within one hour after inoculation. On the other hand, in cytophaga broth containing more than 5% of NaCl, the number rapidly reached less than 10^4 /ml from about 10^5 /ml within one hour after inoculation.

緒 論

養殖對象種과 養殖技術이開發됨에 따라 淡水養殖에서는 비닐하우스를 이용한 加溫式高密度 養魚場이 널리 補給되어 溫水性 魚類 및 熱帶性 魚類를 年中 養殖하고 있다. 魚類를 養殖하는데 있어서 큰 問題點은 飼育技術確立과 魚類疾病對策이라고 할 수 있다. 魚類의 細菌性 疾病中에서 *Flexibacter columnaris*에 의한 columnaris 病은 처음 美國에서 Davis(1922)가 報告한 후, Ordal等(1944), Garnjobst(1945), Borg(1948), Calgrove等((1966) 및 Bullock等(1971) 등의 報告가 있다. 이들 報告에 의하면 columnaris 病은 水溫이 上昇하는 봄부터 發生하기 시작하여 高水溫期 여름철에 가장 심하고 水溫이 下降함에 따라 發病도 줄어들었다고 했다. 養殖種에 관한 研究로는 Bootsma(1973), Spangenberg(1975) 및 Boots

ma等(1976)이 잉어를 對象으로 연구한 報告가 있다. 江草(1968)는 매향어의 경우 水中 溶存酸素量과 有機物含量이 많을 때 사육함으로써 columnaris 病發生이 增加하는 傾向이 있다고 했다. 그래서 本實驗에서는 實驗室에서 직접 飼育中이던 틸라피아(*Tilapia* sp.)에서 지느러미 腐蝕症狀을 나타내고 있는 病魚로부터 病原菌을 分離하여 同定하고, 菌에 대한 藥劑感受性和 殺菌力, 食鹽水 및 海水에 있어서의 菌의 成長範圍 및 殺菌力을 조사하여 그 結果를 報告한다.

材料 및 方法

1. 病原菌 分離

實驗室에서 飼育中이던 틸라피아(體長 17 cm)의 腐蝕된 지느러미 組織을 切取하여 顯微鏡으로 관찰

Table 1. The media for isolation and incubation of the strain

Cytophaga agar medium		Cytophaga broth medium	
Tryptone	0.5 g	Tryptone	0.5 g
Yeast extract	0.5 g	Yeast extract	0.5 g
Sodium acetate	0.2 g	Sodium acetate	0.2 g
Beef extract	0.2 g	Beef extract	0.2 g
Agar	10 g		
D. W.	1000 ml	D. W.	1000 ml
pH	7.2~7.4	pH	7.2~7.4

한 후, 백금이로 分離培地(Table 1)에 도달하여 25°C에서 48시간 培養했다.

2. 生化學的 特徵

分離培地에서 자란 集落을 純粹培養하여 Jean and Faddin(1980)의 方法에 準해서 生化學的 實驗을 施行했다.

3. 分離菌의 病原性

2개의 유리수조(40×20×30 cm)에 地下水를 各各 5 l 씩 넣고, 實驗期間 동안 水溫(25±0.5°C)과 水中 溶存酸素量(5~6 ppm)을 一定하게 유지시키면서 各 水槽에 틸라피아(平均體長 17 cm) 5尾를 收用하여 2 日間 馴致시킨 후, 實驗區 水槽에는 病原菌 濃도가 10³/ml 가 되도록 病原菌液을 넣고, 有機物質 含量을 높이기 위해 鰾장어사료를 1 g 첨가했으며, 對照區 水槽에는 鰾장어사료만 1 g 첨가하여 發病 興否를 관찰했다.

4. 分離菌의 藥劑 感受性

增菌用 培地에 培養한 菌液을 Müller-Hinton agar 培地에 도달하여 건조시킨 후, 3段階 및 1 段階 濃度 disc(Eiken社)를 넣고 25°C에서 48시간 培養한 후 形成된 抑制帶를 觀察했다.

5. 試驗管内에서의 藥劑 殺菌力

增菌用 培地에서 24시간 培養한 菌液을 멸균한 生理食鹽水로 10²배 희석한 菌液 1 ml 를 一定한 濃度

의 藥劑를 함유한 增菌用 培地에 接種하여 그 生菌數를 時間別로 測定했다.

6. 試驗管内에서의 食鹽水와 海水의 殺菌力

食鹽 및 海水를 一定한 濃도가 되도록 첨가한 增菌用培地에 菌液을 1 ml 씩 接種하여 25°C에서 2 日間 培養한 후 菌의 發育 興否를 濁度로서 觀察했고 生菌數도 時間別로 測定했다.

結果 및 考察

1. 形態學的 特性

Table 2에서 보는 바와 같이 활주세균 特有的 集落特性을 나타냈고, 培養時間이 길어지며 따라서 細胞形態가 短桿菌으로 變했는데, 이는 Lewin(1969)이 報告한 *Flexibacter columnaris*의 特性과 一致한다.

2. 生化學的 特性

Table 3에서 보는 것처럼 Ordal 等(1944), Wakabayashi(1970) 및 Hatai(1971) 等이 分離한 菌株의 諸生化學的 結果와 거의 一致하고 있었다. 단지 탄수화물中 glucose를 利用하는 것이 一致하지 않으나 Bergey's manual of determinative bacteriology 8th ed.(1974)에 *Flexibacter columnaris*는 모든 탄수화물은 利用하지 못하나 glucose 만은 利用할 수 있다고 기재되어 있으므로 本 實驗에서 分離한 病原菌은 *Flexibacter columnaris*로 同定되었다.

Table 2. Morphological characteristics of the strain isolated from infected tilapia

Colony morphology	1~2 mm in dia., flat, rhizoid, light yellow
Cell morphology	0.5~0.7×4~8 μm in plate culture at 25°C for two days 0.5~0.7×1~2 μm in plate culture at 25°C for five days
Motility	Gliding movement on solid medium
Cell mass	Colum formation in tissue

Table 3. Summary of biochemical characteristics of the strain isolated from infected tilapia

Characteristic	Ordal <i>et al.</i> (1944)	Waka- bayashi (1970)	Hatai (1971)	Present strain
Degradation of				
casein		+	+	+
gelatin	+	+	+	+
starch	-	-	-	-
chitin		-	-	-
cellulose	-	-	-	-
Production of				
H ₂ S	+	+	+	+
indol	-	-	-	-
catalase		+	+	+
ammonium		+	+	+
cytochrome oxidase			d	d
nitrate reduced	-	+	+	+
carbohydrate utilization				
glucose	+	-	-	d
lactose		-	-	-
sucrose	-	-	-	-
galactose		-	-	-
ducitol				-
lebulose				-
xylose				-
inuline				-
melibiose				-
sorbitol				-
raffinose				-
trehalose				-

3. 分離菌의 病原性

實驗區에서는 感染시킨 2日째부터 틸라피아의 各 지느러미는 腐蝕되기 시작하여 점차 體色은 灰色으로 退色되고, 平衡을 잃은 遊泳狀態가 지속되다가 5日째부터 斃死하기 시작하였으며, 斃死된 고기의 아가미는 심하게 腐蝕되어 있었으므로 分離된 菌은 病原性이 확인 되었으나, 對照區에서는 實驗期間 동안 發病되지 않았다.

4. 分離菌의 藥劑感受性

Table 4에서 kanamycin, tetracycline 및 amikacin에 感受性이 높은 반면, chloramphenicol, gentamycin, erythromycin, neomycin sulfate 및 sulfa 系統 抗生劑에서는 전혀 感受性을 나타내지 않았다. 杉本等(1981)도 sulfa 劑에서는 感受性을 나타내지 않는다고 했는데, 이는 sulfa 劑를 濫用한 결과로 생긴 耐性因子形成 때문이라 했다. chloramphenicol에 感受性이 없는 것은 그 동안 columnaris 病을 치료하기 위해 chloramphenicol을 數回 使用했기 때문인 것 같다. 若林等(1966)은 kanamycin에 感受性이 없다고 했으나 本 實驗에서는 感受性을 나타냈다.

5. 試驗管内에서의 藥劑 殺菌力

Fig. 1에서 보는 것처럼 tetracycline HCl의 경우, 6.24 μg/ml에서는 接種시킨 分離菌은 거의 減少되지

Table 4. Antibiotic sensitivity of the strain isolated from infected tilapia

Antibiotic agent	Concentration (μg)			Sensitivity of the strain
	High	Medium	Low	
Kanamycin	30	10	1.5	+++
Tetracycline	30	10	5	+++
Amikacin	30	10	2	+++
Oleandomycin	30	10	2	++
Chloramphenicol	30	10	5	-
Gentamycin	10	5	2	-
Erythromycin	10	2	0.5	-
Neomycin sulfate	-	-	30	-
Sulfisomezole	300	150	50	-
Sulfamethoxazole	-	-	400	-
Sulfisoxazole	300	150	50	-

Sensi-discs (Eiken)

- +++ : All sensitive to the three kinds of antibiotic concentrations tested
- ++ : Sensitive to only high and medium antibiotic concentrations
- +: Sensitive to only high antibiotic concentration
- : Resistant to all antibiotic concentration tested

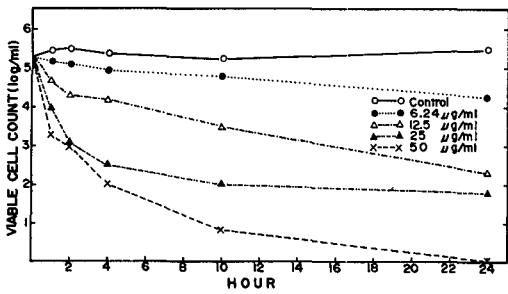


Fig. 1. Bactericidal effect of tetracycline HCl on *F. columnaris* exposed to the concentrations of 6.24, 12.5, 25, and 50 µg/ml (basic medium: cytophaga broth, temperature: 25°C).

않았으나, 12.5 µg/ml 에서는 接種 24時間만에 2×10^2 /ml 로 減少되었고, 25 µg/ml 에서는 接種 10時間까지 급격히 減少하나 그 이후부터는 거의 평형을 유지 하였으며, 50 µg/ml 에서는 24時間만에 生菌은 검출되지 않았다.

Fig. 2에서 나타난 것처럼 oxolinic acid 에서는 50 µg/ml 에 接種시킨 菌은 1時間만에 2×10^5 /ml 에서 10^4 /ml 로 減少하나 4時間이 지나도 완전히 사라지지 는 않았다.

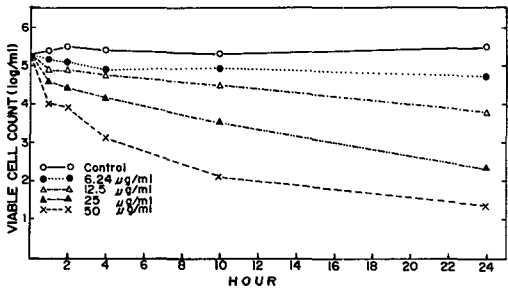


Fig. 2. Bactericidal effect of oxolinic acid on *F. columnaris* exposed to the concentrations of 6.24, 12.5, 25, and 50 µg/ml (basic medium: cytophaga broth, temperature: 25°C).

5. 試驗管内에서의 食鹽水와 海水의 殺菌力

cytophaga broth 에 食鹽이나 海水를 넣었을 때 菌의 發育範圍는 Table 5에서 보는 것처럼 食鹽水에서는 0~1% 까지는 發育하나 2% 에서는 發育하지 못하며, 증류수 대신 海水를 0~40% 까지 넣었을 때는 發育하나 50% 넣었을 경우에서는 發育이 不可能

Table 5. Effects of NaCl and sea water on the growth of the strain isolated from infected tilapia

NaCl concentration (%)					Sea water concentration (%)							
0	0.5	1	2	3	4	0	5	10	20	30	40	50
+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-

-: no growth, +: growth

Incubation: Cultured for 48 hrs in cytophaga broth at each concentration of NaCl and sea water at 25°C.

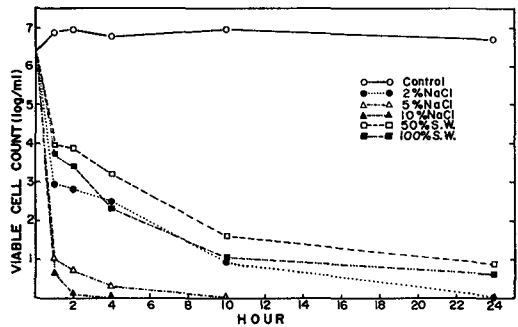


Fig. 3. Bactericidal effect of NaCl and sea water on *F. columnaris* exposed to NaCl of 2%, 5% and 10% and sea water of 50% and 100% (basic medium: cytophaga broth, temperature: 25°C).

하므로 本病原菌은 16% 前後의 鹽分濃度에서는 죽는 것을 알 수 있다. 또 Cytophaga broth 에 食鹽과 海水를 넣었을 때의 菌의 減少 効果는 Fig. 3에서 보는 것처럼 5% 이상의 食鹽水에서는 接種 1時間만에 약 10^6 /ml 에서 10^3 /ml 이하로 되며, 2% 食鹽水에서는 接種 1時間만에 거의 10^3 /ml 로 되어 24時間이 지나야 生菌을 檢出할 수 없다. 또한 50% 이상의 海水에서는 接種 1時間만에 菌數는 급격히 減少하지만 24時間이 지나야 10^4 /ml 로 된다. 그래서 이상의 결과를 고찰해 보면 病原菌數를 減少시키기 위해서는 藥劑나 食鹽水 및 海水에 低濃度로서 長時間 藥浴보다는 高濃度에 短時間 數回 藥浴을 시키는 것이 効果的이라 할 수 있다.

要 約

지느러미 腐蝕과 體色變化를 나타내는 鰻라피아 病魚로부터 分離한 病原菌의 性狀은 다음과 같다.

틸라피아(*Tillapia* sp.)에서分離한 *Flexibacter columnaris*의 性狀

1. 病魚로부터 分離한 病原菌은 *Flexibacter columnaris* 로 同定되었다.
2. 分離한 病原菌液으로 人爲感染시켰을 때 전형적인 *columnaris* 病 症狀을 나타냈다.
3. 病原菌은 kanamycin, tetracycline, amikacin 등에서 높은 感受性を 나타냈으나, sulfa劑에서는 거의 感受性を 나타내지 않았다.
4. 2% 이상 食鹽이나 50% 이상 海水를 含有한 *cytophaga* 培地에서 病原菌은 자라지 못했다.
5. 증류수 대신 50% 이상 海水를 含有한 *Cytophaga* 培地에 病原菌을 接種시킨 후 1時間만에 約 $10^6/ml$ 에서 $10^4/ml$ 로 菌數가 減少했는데 반하여, 5% 이상 食鹽을 含有한 *cytophaga* 培地에서는 接種 후 1時間만에 菌數가 約 $10^5/ml$ 에서 $10/ml$ 이하로 급격히 減少했다.

文 獻

- Bootsma, T. 1973. An outbreak of carp (*Cyprinus carpio* L.) erythrodermatitis caused by myxobacterium. *Aquaculture*. 2, 317—320.
- Bootsma, R. and J.P.M. Clerx. 1976. Columnaris disease of cultured carp (*Cyprinus carpio* L.); Characterization of the causative agent. *Aquaculture* 7, 371—384.
- Borg, A. 1960. Studies on myxobacteria associated with diseases in salmonid fishes. *Wildl. Dis.* 8, 1—85 (2 microcards).
- Buchanon, R.E., and N.E. Gibbon. 1974. Bergy's manual of determinative bacteriology 8th ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- Bullock, G.L., D.A. Conroy and S.F. Snieszko. 1971. Bacterial diseases of fishes. 151 pp. in S.F. Snieszko and H.R. Axelrod (eds.) Diseases of fishes. Book 2A. T.F.H, Publications, Inc., Neptune city.
- Colgrove, D.J. and J.W. Wood. 1966. Occurrence and control of *Chondrococcus columnaris* as related to Fraser river sockeye salmon. *Int. Pacific Salmon Fish Comn., Progress Report*. No. 15, 51 pp.
- Davis, H.S. 1922. A new bacterial disease of fresh-water fishes. *Bull. U.S. Bur. Fish.* 38, 261—280.
- 江草周三. 1938. 養殖ウナギの 鰓病について(續). *魚病研究*. 2, 184—186.
- Garnjobst, L. 1945. *Cytophaga columnaris*(Davis) in pure culture; A myxobacterium pathogenic to fish. *Jour. Bacteriol.* 49, 113—128.
- Jean, F. and M. Faddin. 1980. Biochemical tests for identification of medical bacteria (2nd ed.). The Williams and Wilkins Co., Baltimore. 36—297.
- Lewin, R.A. 1969. A classification of flexibacteria. *J. Gen. Bacteriol.* 58, 189—203.
- 大上皓久. 1977. 新しい養鰻, 養魚タイム社, 東京, pp. 204—208.
- Ordal, E.J., and R.R. Rucker. 1944. Pathogenic myxobacteria. *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.* 56, 15—18.
- Spangenberg, R. 1975. Orientierende untersuchungen uber das vorkommen von myxobacterien bei der kiemennekrose des karpfens. *Zeit. Binnenfisch.* 22, 121—127.
- Sugimoto, N. S. Kashiwagi and T. Matsuda. 1981. Pathogenetic relation between and columnaris disease in cultured eel and the formula feeds. *Bull. Japan. Soc. Fish.* 47(6), 719—725.
- Sugimoto, N. S. Kashiwagi and T. Matsuda. 1971. Cumulative effect of chemotherapeutic agents by medicated bath on the columnaris disease of culture eel. *Bull. Japan Soc. Fish.* 47(9), 1141—1148.
- Wakabayashi, H. and S. Egusa. 1966. Characteristics of myxobacterium, *Chondrococcus columnaris*, isolated from diseased loaches. *Bull. Japan. Soc. Fish.* 32, 1015—1022.
- 若林久嗣・江草周三. 1967. ドジョウのガラムナリス病について. *魚病研究* 1(2), 20—26.
- Wakabayashi, H. K. Kira and S. Egusa. 1970. Characteristics and pathogenicity of *Chondrococcus columnaris* isolated from pond-cultured eel. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 35(2), 147—155.