養殖 능성어, *Epinephelus septemfasciatus* 大量 斃死에 關한 硏究

孫相奎・朴明愛・李生東・田世圭*

國立水產振興院 病理科

* 釜山水產大學校 魚病學科

Studies on the mass mortality of the cultured grouper, *Epinephelus septemfasciatus*

Sang-Gyu SOHN, Myoung-Ae PARK,
Saeng-Dong LEE and Seh-Kyu CHUN*

Pathology Division,
National Fisheries Research and Development Agency,
Kyoungnam 626-900, Korea
*Department of Fish Pathology,
National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737,Korea

In the late summer of 1990 and 1991, mass mortality occured among cage-cultured grouper, *Epinephelus septemfasciatus* in south cost of Korea. The moribund fish didn't feed and became pale or dark chestnut colour and irregularly swimmed due to the loss of equilibrium, finally the diseased fish fell down side away on the bottom or the surface of cage showing the bent of body and died.

The diseased fish showed the extensive hemorrahge in brain, the swelling of spleen and bile duct as the specific syptoms of internal organs.

So the gill, skin and other organs of the diseased fish were examined for the presence of pathogenic parasites and bacteria. The parasitic *Trichodina* sp. were detected only from the gill lamella of the diseased fish, but these parasites seemed to be not a direct causative agents that induced the gross mortality of the cultured grouper, because these parasites were also observed in normal grouper, yellowtail, red seabream and rock bream co-cultured with the diseased grouper in same or near cages.

In the viral examination, although isolation of the causative agent by the use of estabilshed cell lines, RTG-2 and CHSE-214, was not succeed, the normal grouper inoculated intramuscularly with the filtered homogenate of the organs of the diseased fish showed the same external and internal signs with the naturally

infected grouper. They died within a week.

By using the naturally and the artificially infected fishes, electron microscopic observation revealed numerous hexagonal or polygonal particles in the cytoplasm of liver cells.

Based on the these results, we suggest that the mass mortality of the cultured grouper would be occurred by the infection of a viral agent.

緖 論

1990年 및 1991年度에 우리나라 南海岸 일원 해상 가두리 養殖場에서 5月경부터 自然產 種苗를 收集하여 飼育하이던 亞熱帶產 魚種인 능성어, *Epinephelus septemfasciatus*가 7月 初旬부터 가끔 體色이 엷은 밤색이나 짙은 밤색으로 변하면서 먹이를 먹지않고 가두리 바닥이나 수면에서 몸통이 휘어진채 옆으로 누워서 斃死하기 시작하여, 水溫이 上昇함에 따라 日間 斃死量도 급격히 늘어나 斃死가 일어나지 않는 11月 初旬까지 病이 發生한 가두리 養殖場에서는 전체 사육미수중 50-80%가 斃死하였다. 그래서 본 연구에서는 養殖능성어의 大量斃死 原因을 究明하기 위해 病原性 寄生虫, 細菌 및 바이러스 感染 檢査를 실험한 結果를 報告하고자 한다.

材料 및 方法

1. 試料魚

1991年 9月 5日 慶南 統營郡 山陽面 管內 해상가두리 養殖場(Fig.1)에서 發病한 능성어, *Epinephelus septemfasciatus*(체장, 8-19cm) 를 採集하여 각종 실험에 사용하였다.

2. 病原性 寄生蟲 檢査

寄生蟲 檢査는 빙장 상태로 운반한 病魚의 아가미, 지느러미, 체표, 뇌, 간, 비장, 신장 및 소화관을 슬라이드에 압침하여 광학 현미경으로 관찰하였다.

3. 病原性 細菌 檢査

가. 病原菌 分離

병어로 부터 病原菌 分離는 室賀 等(1980)의 方法에 따랐다. 즉, 試料 採集地에서 病魚의 아가미, 간, 비장, 신장, 뇌 및 혈액을 無菌的으로 취하여 1.5% 식염을 첨가한 tryptic soy agar(TSA) 培地에 塗抹하고, 25℃에서 48시간 培養한 후 各 臟器에서 優占的으로 자란 集落을 순수 분리해서 Bergey's manual 제8판(1974)에 의거 genus level에서 菌을 分類하였다.

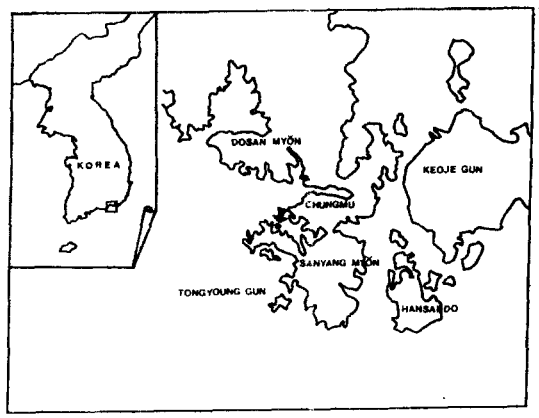


Fig. 1. Sampling site.

나. 病原性 試驗

病魚 肝 組織에서 優占的으로 分離되는 代表菌株를 1개 선택하여 1.5% 식염을 첨가한 BHI broth에서 24시간 培養한 후, 常法에 따라 0.75% 생리식염수로 濕菌量이 1mg/ml로 조정한 다음 능성어(체장, 12-14cm) 10미에 0.2ml씩 背筋肉內 주사하였으며, 對照區는 0.75% 생리 식염수를 0.2ml씩 注射하여 실내 유수식 F.R.P. 원형수조(φ80xH60cm)에 수용하고 넙치 인공 배합사료를 1일 2회 給餌하면서 斃死 有無를 관찰하였다.

4. 바이러스 檢査

가. 바이러스 分離

능성어 病魚로 부터 바이러스 分離는 The American Fisheries Society : Fish Health Section(1975) 方法에

따라서, 病魚 5미의 臟器(뇌, 간,비장, 신장,심장 및 소화관)를 추출해서 저온상태에서 磨碎하고 Dulbecco's modified eagle mediun(D-MEM)으로 9배 稀釋하여 5,000X g에서 15분간(4℃) 원심분리(Sorvall RC5C)한 후, 상층액을 수획해서 10,000X g에서 30분간 다시 원심한 상층액을 0.45μm membrane filter(Gibco)로 濾過한 다음, 10% fetal calf serum(Gibco)을 첨가한 D-MEM으로 培養된 CHSE-214 및 RTG-2 細胞에 接種하고 20℃에서 培養하면서 cytopathic effect(CPE)로서 바이러스 分離를 시도하였다.

나. 病原性 試驗

自然感染된 능성어 5미(체장, 12-13.5cm)의 臟器(4.85g)을 抽出하여 저온상태에서 磨碎하고 D-MEM을 9배량(43.65ml)첨가해서 上記와 같은 방법으로 원심분리시킨 후, 상층액을 0.45μm membrane filter로 여과시켜 製造한 臟器磨碎濾過液(X10)을 건강한 능성어(체장, 12-14cm) 10미의 등근육내 주사하였고, 對照區는 D-MEM을 0.1ml씩 주사하여 실내 유수식 F.R.P. 수조(250ℓ))에 수용하고 病原性을 확인하였다.

다. 電子顯微鏡 觀察

自然感染된 능성어 臟器를 常法에 따라 1mm³정도로 細切하여 2.5% glutaraldehyde로 4℃에서 4시간 固定하고, 1% osmium tetroxide로 실온에서 2시간 後固定한 다음, ethylalchol 계열로 脫水시켜 Epon mixture로 포매하고 60-90nm로 박절하여 1% uranyl acetate로 染色해서 透過電子顯微鏡(Jeol, 1200 EX-2)으로 관찰하였다.

結　果

1. 內外部 症狀

病魚는 외관적으로 체색이 옅은 밤색이나 짙은 밤색으로 변하며 몸이 휘어지고 가끔 眼球突出 증상을 나타내는 경우도 있었다. 感染된 병어를 解剖해 보면 腦出血 증상이 심하였고(plate 1-4), 脾臟과 膽管이 膨大해져 있었는데(plate 1-5), 개체에 따라 肝, 幽門垂 및 消化管 等에 出血 증상을 나타내는 것도 있었다(plate 1-3).

2. 寄生蟲 檢査

病魚의 아가미 새엽에서 纖毛蟲類인 *Trichodina* sp.가 다수 檢出되었고(plate 1-2), 다른 病原性 寄生蟲은 관찰할 수 없었다.

3. 細菌 檢査

가. 病原菌 分離

病魚 臟器 組織을 無菌的으로 도말한 TSA(1.5% 식염첨가) 평판배지를 25℃에서 48시간 배양한 결과, 크기가 2-2.5mm 정도며 中心部가 약간 볼록하고 周邊이 원활한 黃色 集落이 優占的으로 나타났는데, 이들 중 5개 代表菌株를 선택하여 形態學的 및 生化學的 實驗을 한 결과, 모두 gram 陰性桿菌으로, motility(－), O/F test(＋), glucose로 부터 gas생산(＋), catalase(＋), cytochromoxidase(＋), MR/VP(＋/－)의 特性을 나타내어 *Vibrio* 屬 菌으로 分類되었다.

나. 病原性 試驗

病魚 肝 組織에서 分離된 TGL 菌株는 Table 1에서와 같이 실험기간 동안 전혀 病原性을 나타내지 못했다.

4. 바이러스 檢査

가. 바이러스 分離

능성어 病魚 臟器磨碎濾過液을 RTG-2 및 CHSE-214에 接種하여 20℃에서 7日間 培養해도 CPE가 형성되지 않아 blind passage를 2회 실시했지만, 원인 바이러스는 分離되지 않았다.

나. 病原性 試驗

病魚 臟器磨碎濾過液을 背筋肉內 접종한 결과, 人爲感染魚는 接種後 3일째부터 먹이를 거의 먹지않고 수조바닥에 가끔씩 모여드는 개체가 나타나기 시작한 후 5일째부터 斃死가 일어나, 실험기간 동안 80%가 斃死하였지만(Table 2), 對照區에서는 전혀 斃死가 일어나지 않았다. 그리고 人爲感染에 의한 斃死魚는 肉眼的으로 體色이 옅은 밤색이나 짙은 밤색으로 변하고 몸이 휘어져 있었으며, 해부를 했을 때 腦出血과 脾臟 및 膽管이 膨大되어 있었고, 일부 개체에서는 肝과 消化管에 出血 症狀 外에 간혹 眼球가 突出되는 개체도 있었다.

Table 1. Pathogenicity of a strain, TGL isolated from the liver of diseased grouper.

Group	Body length (cm)	Dosage of inoculum (ml/fish)	No. of fish tested	No. of fish died	Mortality (%)
Experiment*	12–14	0.2	10	0	0
Control**	12–14	0.2	10	0	0

* Fish were intramuscularly inoculated with a *Vibrio* strain, TGL and maintained for 20 days at 24± 0.5℃.

** Fish were intramuscularly inoculated with physiological saline solution and maintained for 20 days at 24± 0.5℃.

Table 2. Pathogenicity of the organ hemogenate of diseased grouper.

Group	Body length (cm)	Dosage of inoculum (ml/fish)	No. of fish tested	No. of fish died	Mortality (%)
Experiment*	12–14	0.1	10	8	80
Control**	12–14	0.1	10	0	0

* Fish were intramuscularly inoculated with organ homogenate of diseased grouper and maintained for 20 days at 24± 0.5℃.

** Fish were intramuscularly inoculated with D-MEM and maintained for 20 days at 24± 0.5℃.

5. 바이러스 粒子 觀察

正常魚 臟器 組織에서 전혀 볼 수 없었던 粒子들이 自然感染 및 人爲感染 능성어의 肝細胞 細胞質內 空胞 部位에 무수히 존재해 있었고(plate 2-1), 이들 粒子는 크기가 45-60mm 정도되며 모양은 六角形내지 多角形의 形態를 지니고 있었다(plate 2-2).

考 察

病原性 寄生蟲인 *Trichodina* sp.가 自然感染 능성어 아가미 새엽에서 다수 寄生하고 있었지만, 이 기생충은 大量 斃死가 일어난 가두리나 인근 가두리에서 사육중이던 건강한 능성어,방어,참돔,돌돔에서도 檢出되었으므로서, 斃死의 直接 原因生物은 아닌것으로 생각되며, 또한 능성어 病魚 臟器로부터 優占的으로 分離되는 *Vibrio* 屬菌은 해산어의 病原性 비브리오菌으로 널리 알려져 있는 *Vibrio anguillarum*이나, 방어 등에 潰瘍病을 일으키는 *Vibrio* sp.(楠田 等, 1981), 참돔의 저수온성 비브리오 病原菌인 *Vibrio* sp.(安永 等, 1977; 增村, 1981) 等과는 다른 非病原性 海水常存 *Vibrio* 菌이었다. 그리고 능성어 감염 바이러스가 魚類株化 細胞에서 배양되지 않아 臟器磨碎濾過液내의 바이러스량을 정확히 결정할 수 없었지만, 이 마쇄여과액 0.1 ml를 건강한 능성어에 주사했을 때, 接種魚가 自然感染魚 症狀과 類似하게 體色이 옅은 밤색이나 짙은 밤색으로 변하고 異狀游泳을 하면서 몸이 휘어진채 수조 바닥이나 수면에 힘없이 누워서 急性的으로 斃死되는 것은, Japanse parrotfish(Yoshikoshi et al., 1990), Barramundi(Glazebrook et al., 1990) 및 Red spotted grouper(Mori et al., 1990) 가 Picorna like virus에 의해 소위 viral nervous necrosis(VNN)症에 걸렸을 때 中樞神經系에 障害가 생겨 체색이 검어지며 힘없이 수조 바닥에 누워있다가 갑작스레 돌진하거나 회전운동을 하면서 斃死하는 症狀과 類似한 점이 많으므로, 능성어 감염 바이러스도 신경 계통에 장해가 일어났기 때문이라 생각된다. 그리고 전자현미경상으로 정상적인 능성어 肝 細胞質內에는 관찰되지 않았던 크기가 45-60nm 정도되며 모양이 六角形(hexagonal) 내지 多角形(polygonal)의 粒子들이 自然感染魚 및 人爲感染魚 肝 細胞의 細胞質內 空胞 部位에서 무수히 散在해 있었는데, 이러한 粒子들은 Lounatmaa 等(1978)이 연어 表皮細胞에서 관찰한 바가 있는 크기가 30nm정도되며 多角形의 모양을 한 β-glycogen 입사와 類似한 형태를 하고 있지만, β-glycogen은 細胞質內에만 존재하고 細

胞 밖이나 空胞 部位에는 없기 때문에(De Robertis et al., 1970) 바이러스 입자임에 틀림이 없다. 따라서 이상의 結果를 종합해 볼 때, 1990年 및 1991年 南海岸 一圓 해상가두리 養殖場에서 사육중이던 능성어가 大量 斃死한 것은 病原性 寄生蟲이나 細菌에 의한 것이 아니고 바이러스 感染에 의한 것으로 생각된다.

要 約

1. 自然感染 능성어는 외관적으로 먹이를 먹지 않고 体色이 옅은 밤색이나 짙은 밤색으로 변하며 몸이 휘어져 힘없이 가두리 바닥이나 수면에 누워서 斃死하였는데, 解剖를 해보면 腦出血과 脾臟 및 膽管이 膨大되어 있었다.

2. 自然感染魚 아가미에서 *Trichodina* sp. 寄生蟲이 다수 檢出되지만 大量 斃死의 直接 原因生物은 아니며, 또한 病魚의 臟器에서 優占的으로 分離되는 *Vibrio*屬 細菌은 病原性이 없는 海水常存 *Vibrio* 菌이었다.

3. RTG-2 및 CHSE-214 魚類 株化細胞에서 바이러스는 分離되지 않았지만, 病魚의 臟器磨碎濾過液으로 人爲感染시켰을 때 自然感染魚와 類似한 症狀을 나타내면서 斃死하였다.

4. 自然感染魚 및 人爲感染魚의 肝 細胞質內 空胞 部位에 크기가 45-60nm 정도되며 六角形 내지 多角形 模樣을 한 virion들이 무수히 존재하였다.

5. 따라서 1990年과 1991年 高水溫期에 우리나라 南海岸 일원 해상가두리 양식장에서 사육중이던 능성어가 大量 斃死한 것은 바이러스性 疾病에 의한 것으로 생각된다.

參考文獻

Ahne, W., K. Anders, M. Halder and M. Yoshimizu (1990) : Isolation of picorna like virus particles from the European smelt, *Osmerus eperalanus*(L). Journal of Fish Diseases 13 , 167-168.

American Fisheries Society ; Fish Health Section (1975) : Suggested procedures for the detection and identification of certain infectious disease of fish. U.S. Fish and Wild. Ser.

De Robertis, E.D.P., W. W. Nowinski and F.A.Saez (1970) : Cell Biology, 5th edn. W.B. Saunders, Philadelphia, London and Toronto.

Glazebrook, J.S., M. P. Heasman and S. W. de Beer (1990) : Picorna-like viral particles associated with mass mortalities in larval barramundi, *Lates calcarifer* Bloch. Journal of Fish Diseases 13, 245-249.

增村和彦(1981) : 養殖マダイの低水溫期に發生する細菌感染症に關する 考察. 廣水試研報 11 , 129-134.

楠田理一,赤澤一三(1963) : 細菌による海產蓄養魚類の傳染性疾患について. 水產增殖 臨時號 3 , 31-66.

Lounatmaa, K. and J. Janatuinen(1978) : Electron microscopy of an ulcerative dermal necrosis (UND)-like salmon disease in Filand. Journal of Fish Diseases 1 , 369-375.

Moore, A. R., M.F. Li and M. McMenemy(1988) : Isolation of a picorna-like virus from smelt, *Osmerus mordax*(Mitchell). Journal of Fish Diseases 11 , 179-184.

Mori, K., T. Nakai, M. Nagahara, K. Muroga, T. Mekuchi and T. Kanno(1991) : A Viral Disease in Hatchery reared Larvae and Juveniles of Red-spotted Grouper. Gyobyo Kenkyu 26(4) , 209-210.

室賀清邦・高橋 誓(1980) : 養殖用アユ種苗の*Vibrio anuillarum*の保菌狀態に關する研究. 昭和 54年度 魚病對策技術開發研究報告書, 1-12.

安永統男・山元宣征(1977) : 1977年冬期養殖マダイのいわゆるビブリオ病から分離された菌株の性狀. 魚病研究 12(3) , 209-214.

Yoshikoshi, K. and K. Inoue(1990) : Viral nervous necrosis in hatchery-reared larvae and juveniles of Japanese parrotfish, *Oplegnathus fasciatus*(Temminck and Schlegel). Journal of Fish Diseases 13,69-77.

Explanation of plates

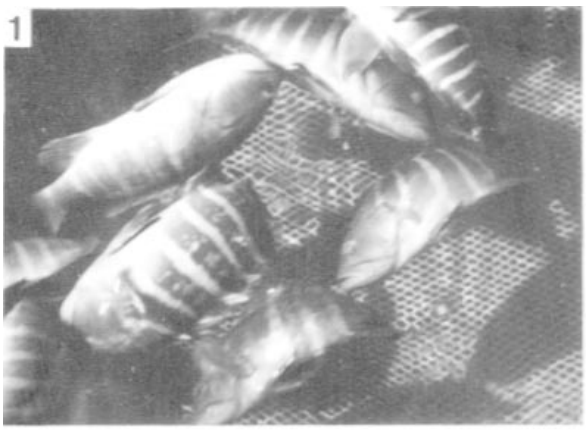
Plate 1

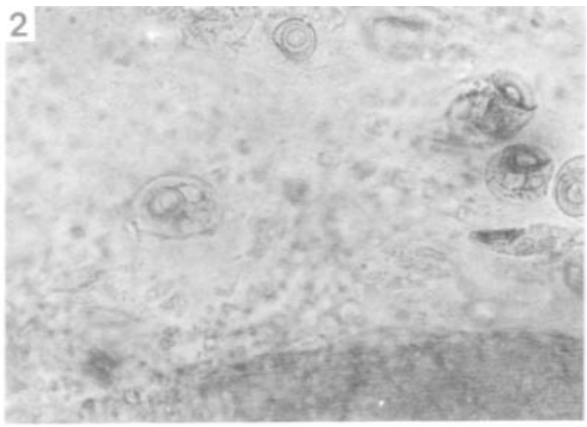
1. External symptoms of the grouper, *Epineplelus septemfasciatus* naturally infected in the cage.
2. *Trichodina* sp. from the gill lamella of tne diseased grouper.
3. Dissected view of the diseased grouper. Fish showed hemorrhage of the liver and the intestine.
4. Hemorrhage in the brain of the diseased grouper.
5. Swelling of the spleen and the bile duct of the diseased grouper.

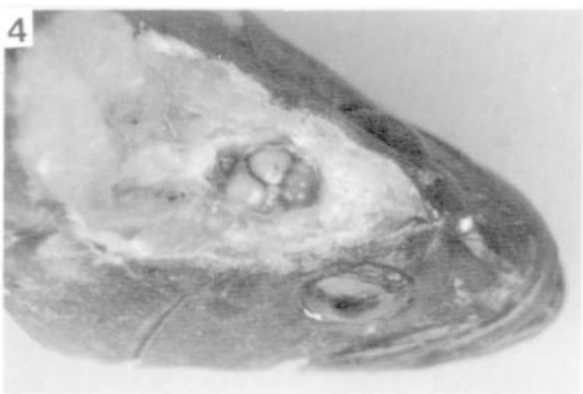
Plate 2

1. Electron micrographs of the liver cells of the diseased grouper. Numerous particles are showed in the vacuoles of the cytoplasm, X 5,000 (bar : 1,000nm).
2. High magnification of the particles in the vacuoles. The particles are about 45-60nm in size and hexagonal or polygonal in morphology, X100,000 (bar : 50nm).

Plate 1







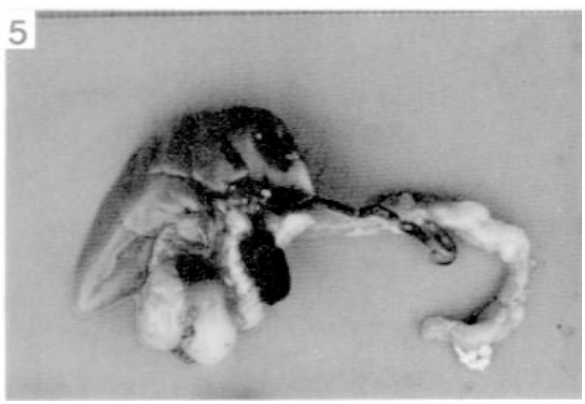
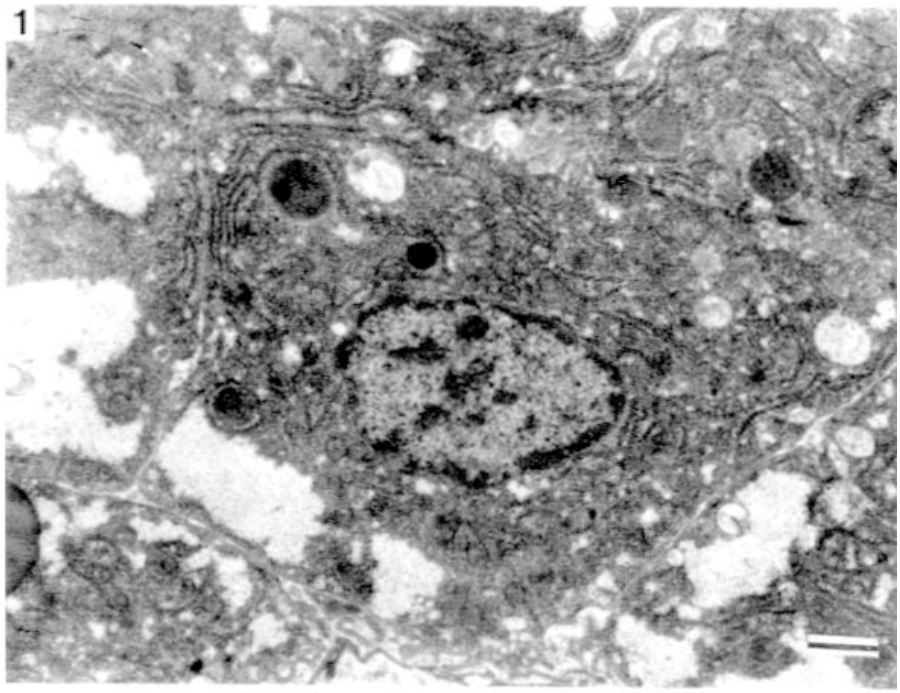
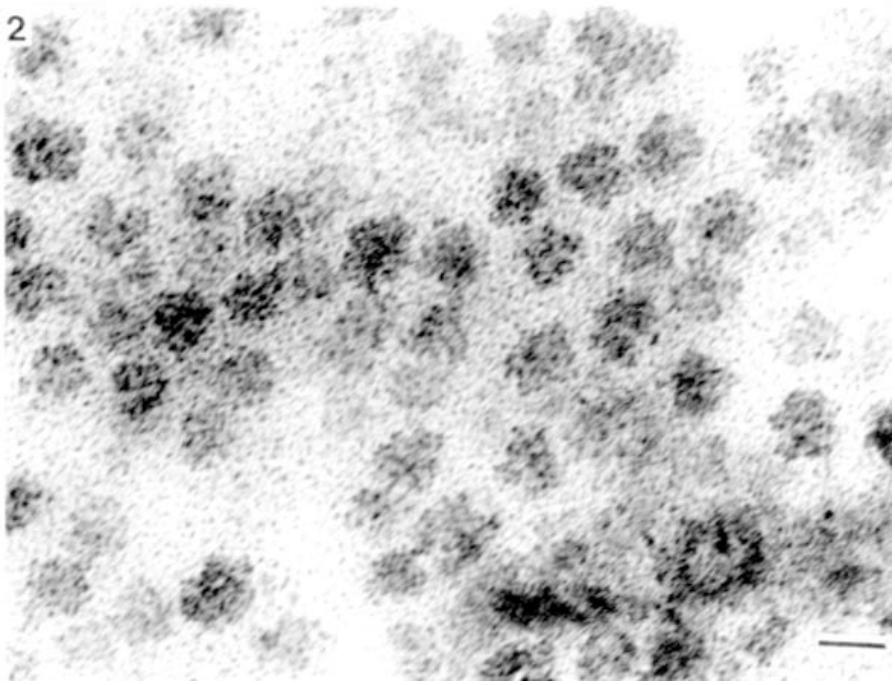



Plate 2