韓家衛誌 第18卷 第1號
Korean J. Vet. Serv. (1995), 18(1) : 22~32

뱀장어에서 분리한 不定形 *Aeromonas salmonicida EL-1*의 일부 특성과 병원성에 관한 연구

한규삼·최인열·배정준·신성일·김영진*·김영길**·이근광**
전라북도가축위생시험소 정읍지소,* 전라북도가축위생시험소** 군산대학교 수족병리학과

Studies on partial characterization and pathogenicity of atypical *Aeromonas salmonicida* EL-1 isolated from diseased cultrued Eel

Kyu Sam Han, In Yeol Choi, Joung Joon Bae, Sung Il Shin,
Young Jin Kim*, Keun Kwang Lee**, Young Gill Kim**
Chong Up Branch of Chunbuk Veterinary Service Labortory
**Chunbuk Veterinary Service Laboratory*
***Department of Fish Pathology, Kun San National University, 573-400, Korea*

Abstract

A partial characteristics and pathogenicity of *Aeromonas salmonicida* strain isolated from diseased cultured eel were studied. On the biochemicial characteristics of the isolate strain was classified into atypical *Aeromonas salmonicida* : the characteristics of the isolate strain differed from those of the subspecies of *Achromogenes, masoucida* and *salmonicida*. It strain was named atypical *Aeromonas salmonicida* EL-1 and it grew at optimal pH 7.5 and 1% Nacl.

In the pathogenicity test, at one to two days post infection, the motality of artificially infected eels with 1×10^8 and 1.0×10^7cfu/fish group was 100%, and at three days pos-infection, in the 1.0×10^6cfu/fish infected group, the epizootic haemorrhagic ulcer was developed, and haemorragic red sports were formed around abdomen and fins and its died(40%).

Total cell protein peptide bands of the *A. salmonicida* EL-1 were presented betweeon 11.8~102 Kd in molecular weight by the electrophoretic analysis and appeared 28 bands in all.

Drug sensitivity of atypical *A. salmonicida* EL-1 strain was sensitivity to chlorampenicol, gentamicin, kanamycin, streptomycin and sulfamethoxazole/trimethoprim and intermidiate to ampiclin and neomycin resistant to cephalotin, erythromycin, lincomycin and tetracycline.

Key words : Eel,. Aeromonas salmonicida EL-1.

서 론

최근 산업화에 따라 수반된 수질악화로 인한 환경오염이 심화되면서 이에 비례하여 수산 양식 산업에도 커다란 위험이 따르고 있다. 오늘날 뱀장어의 양식은 고밀도 집약적인 대단위 양식산업으로 환경수 오염에 따른 질병발생이 큰 문제점으로 나타나고 있다. 지금까지 뱀장어 질병에 대한 연구는 많은 연구자들 Wakabayashi 등[1~7]이 연구해왔다. 1970년 Wakabayashi 등[1]은 뱀장어의 사육수 중에서 *A. hydrophila*와 *E. tarda*등의 병원균을 분리동정하였고, Kanai 등[2]은 양식 뱀장어의 장내세균을 조사한 결과 병원균속인 *Aeromonas sp., Vibrio sp., Edward siella sp., Pseudomonas sp.* 등이 높은 비율로 검출된다고 보고하였다. 또한 전[8]은 이환된 뱀장어에서 177주의 병원균주를 분리한 바 *A. hydrophila* 29.94%, *E. tarda* 48.58%, F. *columnnaris* 21.47%였으며, 이들을 다시 시험어에 인공감염시킨 결과 자연에서 발병한 똑같은 증상이 유발되었다고 보고하였다. 반면 *Kitao* 등[9]은 일본 Kagoshima현에서 궤양이 유발된 뱀장어로 부터 원인균을 분리하여 동정한 결과 *A. salmonicida*였으며, 또한 Wiklund 등[10]은 넙치에서 부정형 *A. salmonicida*를 분리하였고, Kitao 등[11] 양식 뱀장어와 금붕어에서 표피궤양의 원인균인 *A. salmonicida*를 분리하여 병원균의 특성을 조사한 바 있다.

따라서 본 연구에서는 양식중 피부에 흰반점이 형성되고 궤양이 유발되어 폐사 직전에 있는 뱀장어로 부터 원인균을 분리하여 그의 병원성 및 일부특성을 분자 생물학적인 측면에서 조사하였다.

재료 및 방법

1. 공 시 어

전라북도 서부지역의 뱀장어 양만장에서 사육중에 있는 병어에서 표피에 백탁반점과 궤양이 형성되었고, 지느러미 부위와 복부에 발적된 병어를 원인균 분리 실험에 사용하였으며, 이때 병어의 내외부 육안적 소견도 함께 조사하였다. 병원성시험에 사용한 뱀장어는 약 10~15g의 것을 사용하였다.

2. 원인균의 분리

원인균 분리를 위하여 병어의 체표면을 70% Alcohol로 소독한 후, 즉시 궤양 부위와 간, 신장에서 원인균을 분리하였으며, 분리균 배지는 Trypticase soy agar 배지(Difco)를 사용하였고, 균의 동정은 MacFaddin[12]과 Cowan and Steel's[13]의 방법에 준하였다.

3. 분리균의 배양 및 성상 조사

분리된 균주는 LB배지(1% tryptone, 5% Yeast extract, 0.85% Nacl, pH 7.0) 5㎖에 1백금이를 접종한 후, 28℃에서 18시간 진탕 배양한 후 균체수를 확인하였으며, pH 및 염분 농도별 발육상태등을 조사하기 위해서는 Nutrient broth 배지를 사용하였다.

4. 병원성시험

병원성 조사를 하기 위해서 건강한 뱀장어(약 10~15g)를 실험실(실온 27±1℃)의 수조(1×0.45×0.40m)에 1주일간 적응시킨 후, 개체당 1.0×10^8, 1.0×10^7, 1.0×10^6dfu/fish를 근육주사하였고, 대조군은 0.65% 멸균생리식염수를 동일한 방법으로 주사하여 감염일로 부터 발병시까지 병증을 계속 관찰하였다.

5. SDS-PAGE 단백질 분석

SDS-PAGE 전기영동은 O'Farrel[14]과 Lae-

mmli[15]의 방법을 절충하여 실시하였으며, 10% Polyacrylamide gel을 사용하였다.

6. 약제 감수성 시험

약제 감수성 시험을 하기 위하여 Macfaland표준탁도 No.5에 맞춘 균주액을 Mueller-Hinton 평판배지에 고르게 도말한 후 각각의 항생제 디스크(BBL)를 일정한 간격으로 올려놓고 37℃에서 18시간 배양하여 형성된 발육억제대의 직경을 측정하여 항생제 감수성 여부를 판단하였으며, 정확도를 기하기 위하여 E. coli ATCC 25922를 대조 균주로 사용하였다.

Table 1. Comparison of biochemical characterictics between the atypical *Aeromonas salmonicida* EL-1 and *Aeromonas salmonicida* subsp. strains

Characteristics *A. salmonicida*	EL-1	*A. salmonicida* subsp.(Austin and Austin, 1987)		
		achromogenes	*masoucida*	*salmonicida*
Gram stain	−	−	−	−
Motility	−	−	+	V
Diffusible brown pigment	+	+	−	−
Indol production	+	−	−	−
H_2S production(SIM)	−	−	+	V
O-F test	*F(G)*	*	*	*
Methyl red	−	−	+	V
V-P reaction	−	−	+	−
Catalase	+	+	+	+
Citrate utilization (Simmon's)	+	−	−	−
Malonate utilization	−	*	*	*
Acid from				
Adonitol	−	−	−	−
Arabinose	−	−	+	+
Cellobiose	−	−	−	−
Dulcitol	−	−	−	−
Esculin	−	*	*	*
Glucose	−	+	+	+
Inocitol	−	*	*	*
Lactose	−	−	−	−
Maltose	−	+	+	+
Mannose	+	*	+	+
Mannitol	−	−	+	+
Raffinose	−	−	−	−
Rhamnose	−	−	−	−
Salicin	−	V	V	+
Solbitol	−	−	−	−
Trehalose	−	+	+	+
Xylose	−	+	+	+

*F : fermentation, V : Variable * : not reported*

결 과

1. 병어의 외부 및 해부학적 소견

병어는 외관상으로 등쪽 피부에 백탁 반점이 산재해 있으며, 궤양이 형성되어 있고, 복부 및 지느러미 부위에는 점상의 발적증상이 있었다. 해부학적 소견으로는 간장이 창백하였으며, 신장과 비장이 종대되었고, 특히 담낭이 2배이상 종대되어 외관상으로도 담낭부위를 구별할 수 있었다.

2. 원인균의 분리 및 동정

병어로 부터 분리한 원인균은 *Aeromonas salmonicida*(표 1 참조)이었으며, 건강한 뱀장어에 인공접종한 결과, 양식장에서 발병된 질병과 동일한 증상을 일으키면서 폐사하였다. 따라서 *A. salmonicida*의 subsp.를 결정하려고 검토해 보았으나 Bergey's manual의 기재와 상이하여 부정형(atypical) *Aeromonas salmonicida*로 분류하고, 이를 *Aeromonas salmonicida* EL-1으로 명명하였다.

A. salmonicida EL-1의 생화학적 성상은 Table 1과 같이 분리균은 gram 음성 간균으로 운동성이 없으며, Indole을 생산하였고, H_2S는 생산하지 않았다. VP, MR시험에서 음성 반응을 나타내었으며, catalase양성 반응을 나타냈다.

당분해 시험에서는 mannose로 부터 산을 생산하였으나, adonitol, arabinose, dulcitol, esculin, inocitol, lactose, maltose, mannitol, raffinose, rhamnose, salichin, trehalose, xylose에서는 반응이 없는 것으로 나타났다.

3. 생물학적 성상

A. salmonicida EL-1의 발육가능 염분농도는 0~3%이지만 최적 염분농도는 1% 이었다.(그림 1) 발육가능 pH는 5.0~8.0이었고, 최적 pH는 7.0이었다.(Fig 2)

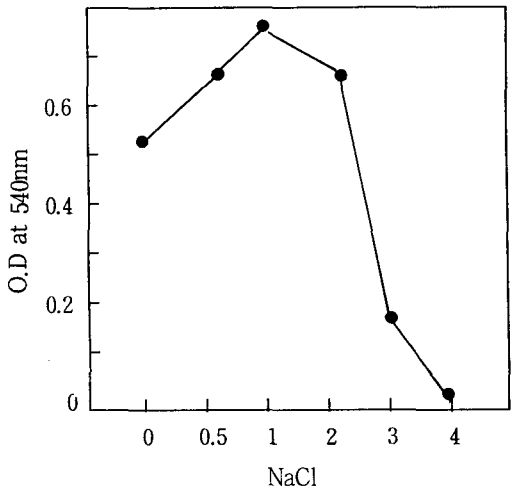

Fig 1. Effet of Nacl concentration on the growth of atypical *A. salmonicida* EL-1. The growth was determined after 24hrs culture.

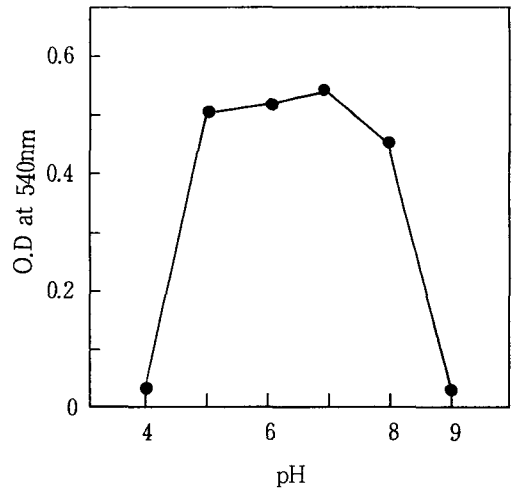

Fig 2. Effet of pH on the growth of atypical *A. salmonicida* EL-1. The growth was determined after 24hrs culture.

O.D at 540nm O.D at 540nm

4. 병 원 성

뱀장어에서 분리한 부정형 *A. salmonicida* EL-1을 건강한 뱀장어에 인공감염시켜 병원성 정도와 폐사량을 조사한 결과는 Table 2에 나타나 있다. 건강한 뱀장어에 개체당 1.0×10^8, 1.0×10^7, 1.0×10^6cfu/fish를 각각 근육주사하여 병증의 진행과정을 관찰한 결과 1.0×10^8와 1.0×10^7cfu/fish를 감염시킨 그룹에서는 감염 24시간이내에 수조 주변을 힘없이 유영하면서 주사한 부위에 궤양이 형성되기 시작하였다. 복부 및 지느러미에는 점상 출혈흔이 나타났고, 과량의 점액이 분비되면서 점섬이 없어지고, 체표가 부분적으로 백탁되면서 1~2일만에 100% 폐사하였다.

그러나 1.0×10^6cfu/fish로 감염시킨 군에서는 병증이 서서히 나타나면서 피부에 궤양이 형성되고, 지느러미가 발적되면서(그림 3. A~F) 감염 3일후에 4마리(40%)가 폐사하였으나 병원성이 약하여 그 이후로는 폐사되지 않았다. 병어의 해부학적 소견은 간이 변색되어 있고, 신장과 비장은 종대되었으며, 장은 탄력이 없고, 담낭에서는 농자색으로 약 2배정도가 팽대되었음을 볼 수 있었다.(그림 3. G)

Table 2. Pathogenicity of atypical *A. salmonicida* EL-1 for eel by intramuscular infection

Strain	Temp. (℃)	Challenge dose (cfu/fish)	Mean body weight(g)	No. of fish tested	No. of deaths				
					Days after infection				
					1	2	3	4	30
A. salmonicida									
EL-1	27±1	saline	10~15	10	0	0	0	0	0
		1.0×10^8	10~15	10	10	0	0	0	0
		1.0×10^7	10~15	10	0	10	0	0	0
		1.0×10^6	10~15	10	0	0	4	0	0

The motality calculated one monty after infection.

5. SDS-PAGE 단백질 분석

부정형 *A. salmonicida* EL-1세포를 SDS-PAGE로 분석한 결과는 (표 3)과 (그림 4)에 나타난 바와 같이 세포를 구성하고 있는 전체 단백질은 대개 분자량이 11.8~102Kd 사이에 존재하고 있으며, 전체 28개의 peptide band로 구성되어 있다.

Table 3. Estimated molecular weights of polyppetides separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of total cell protein of atypical *A. salmonicida* EL-1.

Mol. Wt.(K.dalton)
102
96.4
87.4
74.0
64.0
53.8
46.8
43.8
40.4
38.0
36.1
34.4
33.2
31.8
30.0
28.6
26.8
26.
25.6
23.8
22.8
18.2
17.0
15.8
14.9
14.0
12.7
11.8

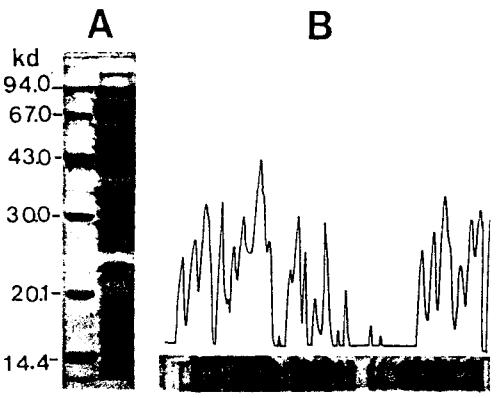

Fig 4. A : Electrophoretic analysis of 10% SDS-PAGE of total cell proteins of the *A. salmonicida* EL-1.
B : Densitogram of electrophorized total cell protein of the *A. salmonicida* EL-1.

6. 약제 감수성

뱀장어에서 분리한 부정형 *A. salmonicida* EL-1의 약제감수성 시험결과는 (표 4)와 같다.

A. salmonicida EL-1균주는 chloramphenicol, gentamicin, Kanamycin, steptomycin, sulfamethoxazole/trimethoprim에 감수성이 있는 반면, ampicillin과 neomycin에는 중정도였으며, cephalthin, erythromycin, lincomycin, tetracyclin1에 내성을 나타내었다.

고 찰

Kltao 등[9]은 뱀장어의 궤양 부위에서 분리한 부정형 *A. salmonicida*를 winnows, *phoxinus phoxinus*(Hastein 등[16], gold fish, *Carassius auratus*(*Shotts* 등[17]., *Trust* 등[18] *Atlantic salmon, Salmo salar*(Paterson 등[19]) Carp, *Cyprinus carpio*(Saba 등[20]) 과 eel, *Anguilla rostrata*(Hay-

Table 4. Antimicrobial resistance of atypical *A. salmonicida* EL-1 Strain

Antibiotics (Concentration)	Resistance types *A. salmonicida* EL-1
Ampicillin(AM 10㎍)	I
Cephalothin(CF 30㎍)	R
Chloramphenicol(C 30㎍)	S
Erythromycin(E 15㎍)	R
Gentamicin(GM 10㎍)	S
Kanamycin(K 30㎍)	S
Lincomycin(L 15㎍)	R
Neomycin(N 30㎍)	I
Streptomycin(S 10㎍)	S
Sulfamethoxazole / Trimethoprim(Sxt 23.75 / 1.245㎍)	S
Tetracycline(TE 30㎍)	R

R : Resistant I : Intermediate S : Sensitivity

asaka and Sullivan[21])로 부터 분리된 부정형 *A. salmonicida*균주와 생화학적 특성을 비교 연구하였으나 여러가지 차이점이 있었으며, 본 연구에서 분리한 부정형 *A. salmonicida* EL-1도 위 연구자들이 분리 보고한 균주의 특성과 비교 검토해 본 결과 대부분의 특성은 비슷하였지만 일부가 상이한 거승로 나타났다.(표 1), 또한 Kltao 등[9]이 분리한 부정형 *A. salmonicida*(KF-8317)는 뱀장어의 머리와 몸통에 심한 궤양을 유발한다고 하였으나 본 연구에서 분리한 부정형 *A. salmonicida* EL-1은 몸통에 궤양 뿐만 아니라 복부 및 지느러미에 출혈반점을 유발하였고, 특히 담낭의 팽대(2배이상)되었다. 병원성 시험에서는 일본산 뱀장어에서 분리한 *A. salmonicida* ET-83205 균주를 수온 20±1℃에서 뱀장어 1.0×10^2cfu/fish를 근육주사한 결과 13일만에 70%의 폐사율을 보였다고 하였으며, 접종량을 높일수록 폐사율은 높아 1.0×10^3cfu/fish를 접종한 그룹의 경우 약 12일만에 100% 폐사율을 보였다. 또한 1.0×10^5cfu/fish를 접종했을 경우는 5일만에 100% 폐사율이 나타났으나 인공감염으로 인한 뱀장어의 폐사율은 수온에 따라 약간의 차이가 있는 것으로 보고하였다.[22~23] 그러나 본 연구에서는 27±1℃에서 1.0×10^8cfu, 1.0×10^7cfu/fish를 접종했을 경우 약 2일만에 100% 폐사하였으나 1.0×10^6cfu/fish를 접종했을 경우는 3일만에 40%가 폐사하고 만성형으로 진행되었다. 이러한 결과는 수온 조건과 실험어의 성장에 따라 차이가 있기 때문인 것으로 생각된다. 또한 현재는 뱀장어의 궤양성 질병 뿐만 아니라 아가미울혈증으로 인해 많은 양만장에서 어려움을 격고 있는 실정이나, 이의 예방과 치료를 위해 계속 연구중에

있고, 세균성 질병으로 인한 질병이 발생했을 경우, 단 시일내에 정확한 약제 감수성시험을 통하여 적절한 항생제를 투여하는 것이 좋으나 무엇보다도 양만장의 수질 및 환경적, 생리적 스트레스를 최소화하는 것이 중요하리라 생각된다.

결 론

전북일원 양만장의 양식 뱀장어의 병어로부터 *A. salmonicida*를 분리하고 그의 일부 북성과 병원성을 조사하였다. 분리균의 생화학적 특성율 *A. salmonicida achrogenes, masomoucida*와 *salmonicida*와 특성을 비교한 결과 일부의 특성이 다른 부정형(atyplcal) *A. salmonicida*로 확인되었다.

분리균은 부정형 *A. salmonicida* EL-1으로 명명하였으며, pH 7.0과 1% Nacl농도에서 가장 잘 발육하였다. 병원성 시험에서 감염후 1~2일만에 1.0×10^8과 1.0×10^7cfu/fish를 감염한 그룹에서 100% 폐사율을 보였으며, 1.0×10^6cfu/fish 그룹에서는 감염후 3일만에 피부궤양이 진행되었고, 출혈성 반점이 복부와 지느러미에 출현되어 40%가 폐사되었다. SDS-PAGE 분석에서 부정형 *A. salmonicida* EL-1은 총 28개의 peptide band로 구성되어 있으며, 분자량은 11.8에서 102Kd이었다. 약제 감수성시험에서 chloramphenicol, gentamicin, kanamycin, stroptomycin과 sulfamethoxazoie, trimethoprim에서는 감수성이 있었고, ampicillin과 neomycin에서는 중등도였고, cephalothin, erythromycin, lincomycin과 letracyciino에 저항성이 있었다.

Fig 3. Externam symptoms of eels experimentally induced by atypical *A. salmonicida* EL-1 infection(A, B, C, D, E, F, G).
Haemorrhagic ulcer was marked by arrows.
24 hrs post infection(A, B, C, D)
72 hrs post infection(E, F, G)

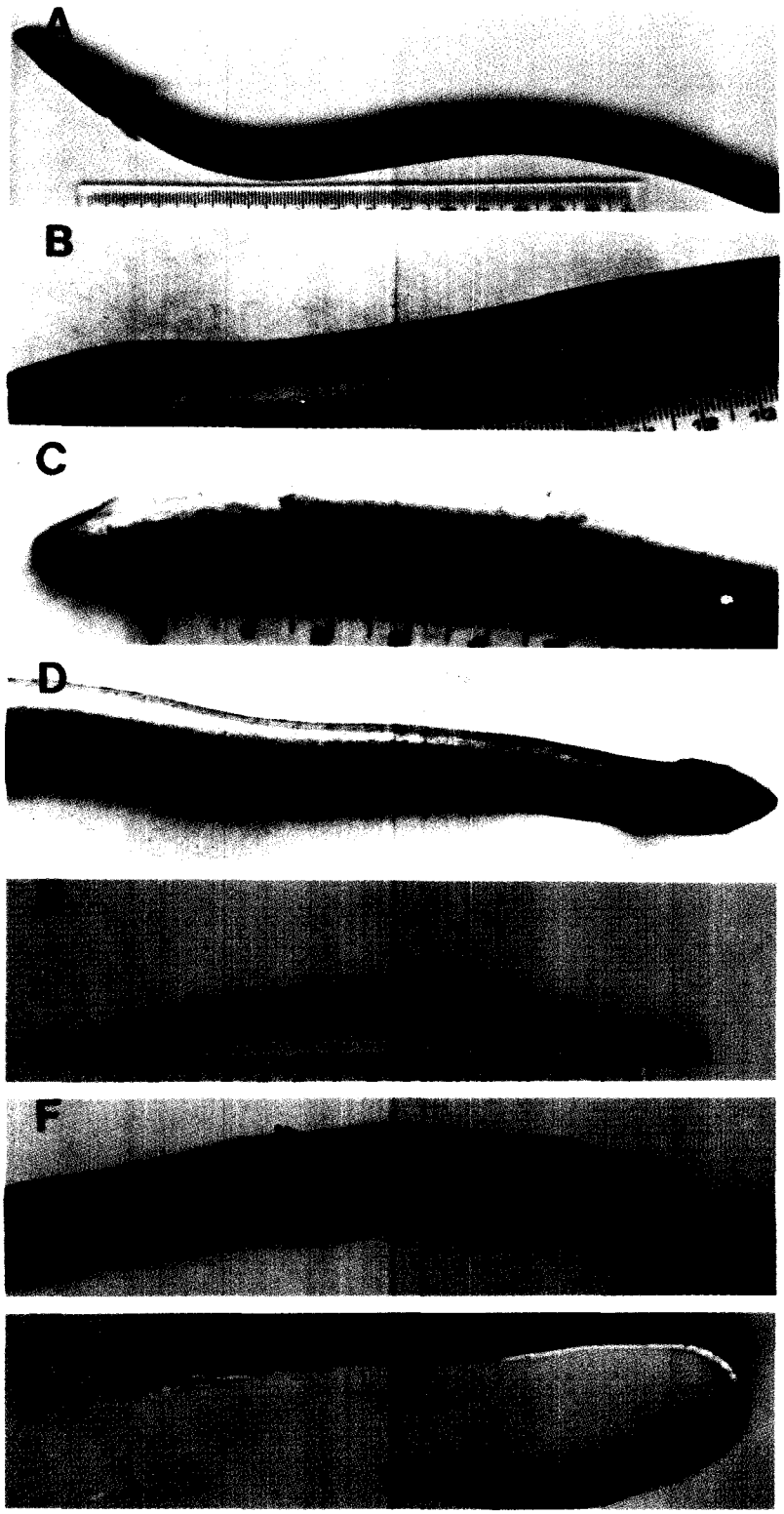

Fig 3. Externam symptoms of eels experimentally induced by atypical

참 고 문 헌

1. Wakabayashi H, Kira K and Egusa S. 1970. Studies on columnaris diseases of pondculture eels-1. characteristics and pathogenicity of *C. colunmar is* isolated from pond cultured eels. Bull, Jap, Soc, Sci, Fish. 36(2):147~155.
2. Kanai K, Wakabayshi H. and Egusa S. 1977. Comparison od intestinal microflora between hwalthy and diseases pound cultur eels. Fish, Pathol. 12(3):199~204.
3. Kusuda R and Ishihara S, 1981. The fate of *EE. tarda* bacteria after intramuscular infection of eels. Bull. Joc, Sci. 47(4):475~479.
4. Miyazaik T and Kubota S. 1981. Histopathological studies on vibriosis of the Japanes eel. Jap, J, Fish Pathol. 16(3):101~109.
5. Minagawa T, Nakai T and Muroga K. 1983. *E. tarda* in eel. culture environment Fish Pathol. 17(4):243~350.
6. Egusa S, Tanaka M, Ogami H and Oka H. 1989. Histopathological observations on an intense congestion of the gills in cultured Japanese eel, *A. japonical.* Jap, J. fish Pathol. 24(1) :51~56.
7. Inouye K, Miwa S, Aoshima H, Oka H and Sorimachi M. 1994. A histopathological studies on the etiology of intense congestion of the gills of Japanese eel, *A. Japanical.* Jap, J, Fish Pathol. 29(1):35~41.
8. S K Chun, 1988. Dection and control of bacterial diseases of cultured fishes in Korea. J, Fish Pathol. 1(1):5~30.
9. Kitao T, Yoshida T, Acki t and Fukudome M. 1984. Atypical *A. salmonicida,* the causative agent of on ulcer disease of eel occured in Kagoshima prefecture, Jap, J, Fish Pathol. 19(2) :113~117.
10. Wiklund T and Bbylund G. 1991. A cytochrome oxidase negative bacterium(presumptively an atypical *A. samonicida)* isolated from ulcerated flounders(*P, flesus*(L,)) in the northern baltic sea. Bull, Eur, Ass, Fish Pathol. 11(2)74~75.
11. Kitao T, Yoshida T, Aoki T and Fukudome M 1985. Characterization of an atypical *A. salmonicida* strain causing epizootic ulcer disease in cultured eel. Jap, J, Fish Pathol. 20(2) :107~114.
12. MacFaddin J F. 1980. Biochemical tests for identification of medical bacteria. Williams and Willikins, Baltimore, London.
13. Cowan and Steel's. 1974. Manual for the identification of medical bacteria. Cambridge, Univ, Press.

14. O' Farrel P H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis protein. J, Biol, Chem. 250:4007~4021.
15. Laemmli U K. 1970. Clavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227:680~685.
16. Hastein T, Satueit S J and Roberts R J. 1978. Mass motality among minnows *Phoxinus phoxinus*(L,) in late Tveitevatn, Norway, due to an aberrant strain of *A, salmonicida*. J. Fish Diseases. 1:241~249.
17. Shotts E B Jr, Talkington F D, Elliot D G and McCarthy D H. 1980. Aetiology of an ulcerative disease in gold fish, *Carassius auratur*(L,) : characterization of the causative agent. J, Fish Disease. 3:181~186.
18. Trust T J, Khouri A G, Austein R A and Ashburner L D. 1980. Fish isolation in Australia of atypical *A, salmonicida*. FEMS Microbiology Letters. 9:39~42.
19. Paterson W D, Douey d and Desautels D. 1980. Isolation and identification of an atypical *A. salmonicida* strain causing epizootic losses among Atlantic salmon(*Salmosalar*) reared in a Nova Scotia hatchery. Can, J, Fish Aquat, Sci. 37:2236~2241.
20. Caba G Y. Kormendy B and Bekesi L. 1981. Observation on the causative agent of carp erythrodermatitis in Hungary. Proccd, Environ, Eur, polyculture. 95~110.
21. Hayasaka S S and Sullivan J. 1981. Furunculosis in cultured American eel. *A. rostrata*(Le Sueur) J, Fish, Bilo. 18:665~669.
22. Whittington R J, Gudkovs N, Carrigan M J, Ashburner L D and Thurstan S L. 1987. Clinical, microbiological and epidemiological findings in recent outbreaks of goldfish ulcer disease due to atypical *A. salmonicida* in south-eastern Australia. J, Fish Dis. 10:353~362.
23. Y G Kim and K K Lee. 1993. Studies on disease of catfish(*Silurus asotus*) in Korea-1. Pathology on vibriosis. J. Fish Pathol. 6(1):1~10.