

## 양식 미꾸라지(*Misgurnus mizolepis*)로 부터 *Aeromonas sobria* 검출

유진하 · 박성우<sup>†</sup>

군산대학교 수산생명의학과

### Isolation of *Aeromonas sobria* from Cultured Mud Loach, *Misgurnus mizolepis*

Jin-Ha, Yu and Sung-Woo Park<sup>†</sup>

Department of Aquatic life Medicine, Kunsan National University, Kunsan, 573-701, Korea

Mass mortality occurred in mud loaches, *Misgurnus mizolepis*, cultured in ponds located in Kunsan. External signs of affected fish showed hemorrhage of skin and fins. Internally, pale liver with congestion, enlarged kidney, and spleen and enteritis exhibited.

Causative bacteria isolated from liver, spleen, and kidney of the disease fish. In biochemical tests, the isolates were similar with those of the reference strains, *A. sobria*. The aerolysine gene from the present isolate was amplified PCR with the primer SOBF and SOBB for *A. sobria*. The isolate was identified as *A. sobria* on the basis of those tests. In virulence test, the present isolate resulted in the development of clinical signs identical to those in naturally infected fish. The present results conclude that the present isolate is *A. sobria* and can be a pathogen which causes motile aeromonad septicemia to mud loach.

*Key words:* *Aeromonas sobria*, Mud loach, *Misgurnus mizolepis*

미꾸라지는 예로부터 식용으로 사용되어 온 주 담수 양식어종 중의 하나이다. 특히 비타민 A와 D가 풍부해 강장식품 및 눈병 치료제로 사용해왔고 양계 사료로도 널리 이용되고 있다. 늘어나는 미꾸라지의 수요를 충족시키기 위해 미꾸라지 양식장에서는 고밀도 사육 양식이 성행하였으며, 이로 인하여 각종 질병이 발생하여 많은 경제적 손실이 발생하였다.

*Aeromonas* sp.는 양식어종의 절창병 및 패혈증을 일으키는 세균으로 잘 알려져 있다(Aoki, 1999). Popoff and Veron(1976)은 운동성 예로모나스를 complex adanosin의 분석을 통하여 *A. hydrophila*, *A. caviae* 및 *A. sobria* 3 종류로 구분하였다. *A. sobria*는 인간의 병원균으로 잘 알려

져 있지만, 어류에서는 Wahli *et al.*(2005) 발표한 퍼치고기의 *A. sobria* 감염증뿐이다.

양식 미꾸라지의 세균성질병으로는 Wakabayashi and Egusa(1966, 1967)와 Chowdhury and Wakabayashi(1991)가 보고한 *Flexibacter columnaris* 감염증 및 Park *et al.*(2002)이 보고한 *Stapylococcus epidermdis* 감염증에 대한 보고가 있을 뿐이다.

2006년 5월 전북 군산시에 위치한 지수식 미꾸라지 양식장에서 미꾸라지의 대량 폐사가 발생하였다. 병어는 호흡곤란과 체표의 점상출혈을 동반한 궤양, 아가미의 울혈 및 빈혈이 일어났으며, 간의 퇴색, 비장 및 신장의 종대와 장출혈 증상이 나타났다(Fig. 1).

<sup>†</sup>Corresponding Author : Sung-Woo Park, Tel : 063-469-1884  
E-mail : psw@kunsan.ac.kr

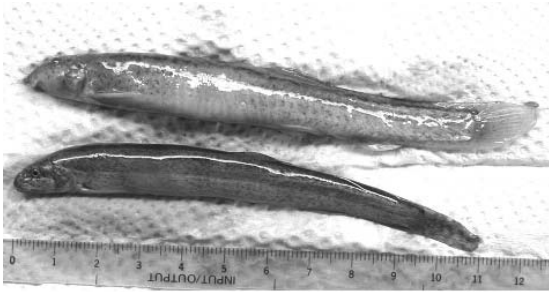


Fig. 1. Diseased mud loaches, *Misgurnus mizolepis*, showing hemorrhage on the abdomen, isthmus, lateral musculature, and at the base of fins.

본 연구는 병어의 간, 비장, 신장에서 병원균을 추출하여 생화학적 시험을 통한 병원균의 특성을 밝힘과 동시에 aerolysin gene의 존재유무 및 병원성을 조사하였다.

### 재료 및 방법

병든 미꾸라지의 체장은  $10.08 \pm 0.74$  cm이었고, 체중은  $3.51 \pm 1.02$  g 이었다. 미꾸라지에서 간, 비장 및 신장의 조직 일부분을 tryptic soy agar (TSA, BD)에 접종하여 20°C에서 24시간 배양하였다. 발육한 균은 순수 분리한 다음 API 50CH kit(biomereux, USA)을 이용하여 사용 설명서에 따라 생화학적 검사를 실시하였다. 부가적으로 oxidase, catalase, O-F시험, 운동성 및 0/129 감수성시험을 실시하였다. 대조균주로는 표준 균주인 *A. sobria*(ATCC 43979), *A. hydrophila*(ATCC 700183)와 이스라엘 잉어에서 분리한 *A. sobria*(DJ-2)를 사용하였다.

염분에 따른 성장은 1% peptone수를 기초배지로 하여 NaCl로 0~6.0%까지의 염분농도를 맞춘 후 멸균 시험관에 각각 3 ml씩 주입하였다. pH에 따른 성장은 1% peptone 수를 1N NaOH 와 1N HCl 을 사용하여 pH를 5.0~10.0까지 조절 후 3 ml씩 각각 시험관에 주입하였으며, 온도별 성장은 1% peptone수가 각각 3 ml씩 첨가된 시험관을 사용하였다. 각 조건별 시험관에 0.9% 생리식염수에 현탁시켜 MacFland No. 1

의 탁도에 맞춘 균현탁액을 0.1ml씩 접종하여, 20°C에서 24시간동안 배양한 다음 630nm에서 흡광도를 측정하여 발육 정도를 비교하였다.

분리균과 대조균의 *A. sobria*의 aerolysine gene유무확인에는 DNA를 High pure PCR template preparation Kit(Roche, USA)를 사용하여 추출하였다.

Aerolysine gene의 primers는 Filler *et al.*(2000)의 SOB(5'-GCA ACC AAC TAC ACC GAC CTG-3')와 SOBB(5'-GGA CTT GTA GAG GGC AAC CCG-3')를 사용하였다. PCR 조건은 initial denaturation 94°C / 5 min, denaturation 94°C / 1 min, annealing 57°C / 1 min, elongation 72°C / 1 min, final elongation 72°C / 5 min로 총 20 cycles 실시하였다. PCR 생성물은 1.5% agarose gel(Bioneer Co, KOR)을 이용한 전기영동(100 V) 후 288 bp에서의 amplicon 유무를 관찰하였다. 음성 대조균으로는 *Vibrio splendidus* II(ATCC 33789)를 사용하였다.

병원균시험은 TSA에서 24시간 배양한 균을 0.9% 생리 식염수로  $3.2 \times 10^6 \sim 10^9$  cfu/ml로 조절하여, 각각 20마리의 미꾸라지(체장:  $9.84 \pm 0.48$  cm, 체중:  $3.31 \pm 0.81$  g) 복강에 0.1 ml씩 주사한 다음 사각 플라스틱 수조(22.0 cm × 19.0 cm × 36.5 cm)에 온도를 20°C로 조절 후 사육하였다. 7일 동안 사육하면서 사망수를 매일 기록하였다.

### 결과 및 고찰

분리균의 생화학적 특성을 API 50E로 조사한 결과 *A. sobria*로 동정되었고, 다른 생화학적 성장도 표준균주인 *A. sobria*(ATCC 43979), 이스라엘 잉어에서 분리한 *A. sobria*(DJ-2)와 비슷한 결과를 나타내었다. 그러나 *A. hydrophila*(ATCC 700183)와는 많은 성장에서 차이가 있었으며, 특히 용혈시험에서 분리균과 *A. sobria*인 ATCC 43979, DJ-2는 30°C에서만 용혈성이 나타내어,

10°C 와 30°C 에서 모두 용혈성을 보이는 *A. hydrophila* ATCC 700183와는 차이가 났다(Table 1). 염분농도에 따른 성장 시험에서는 분리균(DJ-1) 과 ATCC 43979, DJ-2, ATCC 700183은 1.0% 와 2.0% 의 식염농도에서의 발육이 좋았고, 염분 농도가 높아질수록 성장은 감소하는 경향이 있

**Table 1.** Comparison of biochemical and physiological characteristics among the present isolate (DJ-1), and the reference strains, *A. sobria* (DJ-2, ATCC 43979) and *A. hydrophila* (ATCC 700183)

Characteristics	Present isolate	<i>A. sobria</i>		<i>A. hydrophila</i>
	DJ-1	DJ-2	ATCC 43979	(ATCC 700183)
Gram stain	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+
Motility	+	+	+	+
OF test	+	+	+	+
0/129(150 $\mu$ g)	-	-	-	-
$\beta$ -galactosidase	+	+	+	+
Arginine dehydrolase	+	+	+	+
Lysine decarboxylase	+	+	+	+
Ornithine decarboxylase	-	-	-	-
Citrate utilization	-	+	+	-
H <sub>2</sub> S production	-	-	-	-
Urease production	-	-	-	-
Tryptophan deaminase	-	-	+	+
Indole production	+	+	+	+
VP reaction	+	+	+	+
Glycerol	+	+	+	+
Erythritol	-	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	-
L-Arabinose	-	-	-	+
Ribose	+	+	+	+
D-Xylose	-	-	-	-
L-Xylose	-	-	-	-
Salicin	-	-	-	+
Esculin	-	-	-	+
Adonitol	-	-	-	-
$\beta$ -Methyl-xyloside	-	-	-	-
Galactose	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+
D-Mannose	+	+	+	+
D-Glucose	+	+	+	+
L-Sorbose	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-

**Table 1.** - Continued

Characteristics	Present isolate	<i>A. sobria</i>		<i>A. hydrophila</i>
	DJ-1	DJ-2	ATCC 43979	(ATCC 700183)
$\alpha$ -Methyl-D-mannoside	-	-	-	-
$\alpha$ -Methyl-D-glucoside	-	+	+	+
N-Acetylglucosamine	+	+	+	+
Gelatin hydrolysis	+	+	+	+
Gas from glucose	+	+	+	+
Amygdalin	-	-	-	+
Cellobiose	-	-	+	-
Maltose	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-
Trehalose	+	+	+	+
Inulin	-	-	-	-
Melezitose	-	-	-	-
D-Raffinose	-	-	-	-
Amidon (starch)	+	+	+	+
Glycogen	+	+	+	+
Xylitol	-	-	-	-
$\beta$ -Gentobiose	-	-	-	-
D-Turanose	-	-	-	-
D-Lyxose	-	-	-	-
D-Tagatose	-	-	-	-
D-Fucose	-	-	-	-
L-Fucose	-	-	-	-
D-Arabitol	-	-	-	-
L-Arabitol	-	-	-	-
Gluconate	+	+	+	+
2-Ketogluconate	-	-	-	-
5-Ketogluconate	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-
Mannitol	+	+	+	+
Inositol	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	+
Sucrose	+	+	+	+
Melibiose	-	-	-	-
Hemolysis on sheep				
Blood agar at: 10°C	-	-	-	+
30°C	+	+	+	+

었다(Fig. 2). pH에 따른 성장은 pH 5.0에서는 ATCC 700183 의 발육이 좋았으나, 분리균과 ATCC 43979, DJ-2 는 pH 6.0과 7.0에서의 성장이 양호하였다. 온도별 성장은 분리균을 비롯한 ATCC 43979, DJ-2는 15°C에서 양호한 발육을 보였고, 온도가 증가함에 따라 점점 성장이 감

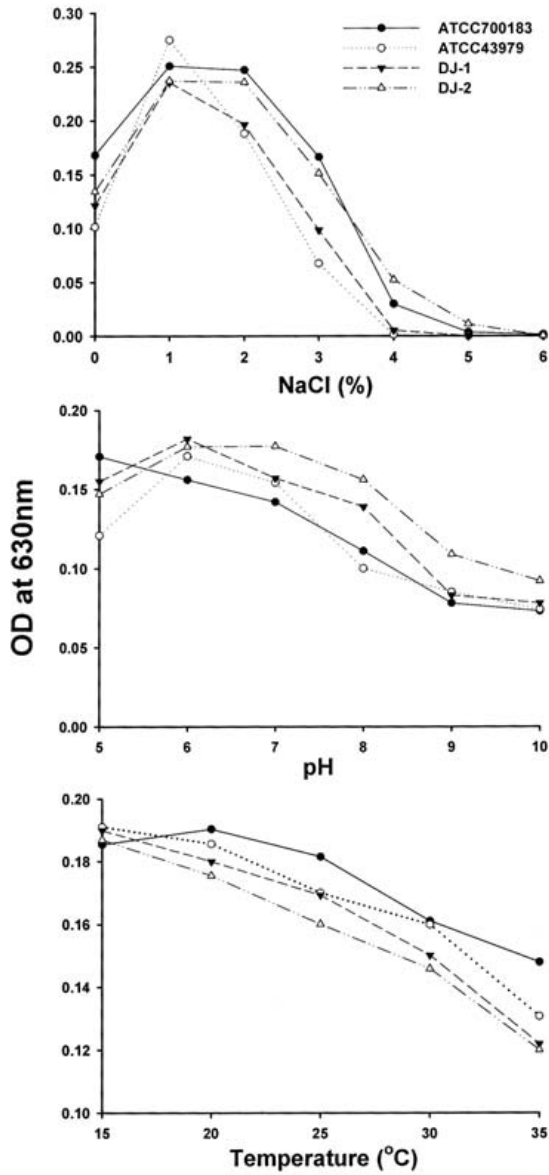


Fig. 2. Effects of NaCl, pH, and temperature on the growth of the present isolate (DJ-1) and the reference strains, *A. sobria* (ATCC 43979, DJ-2 isolated from Israeli carp) and *Aeromonas hydrophila* (ATCC 700183).

소하였다. 그러나 ATCC 700183은 15~30°C까지의 광범위한 온도에서도 발육이 양호하였다.

분리균(DJ-1)에서 DNA를 추출하여 *A. sobria*의 aerolysine gene의 specific primers인 SOBF와 SOBB를 이용하여 PCR반응을 시킨 결과 288 bp에서 amplicon이 생성되었다(Fig. 3). 대조군으로 사용하였던 *A. sobria*인 ATCC 43979과 DJ-2도 amplicon이 생성되었다. 그러나 *A. hydrophila* (ATCC 700183)와 *V. splendidus* II(ATCC 33789)에서는 확인되지 않았다.

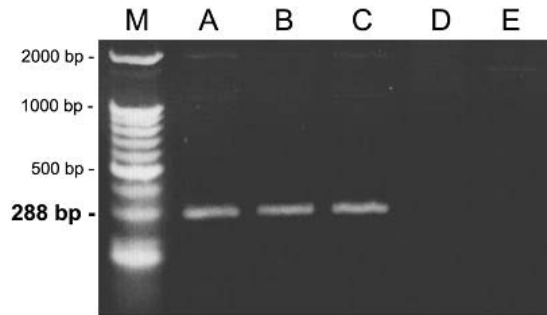


Fig. 3. The amplicon of the aerolysin gene from present isolate by PCR. A: the present isolate, B: *A. sobria* from Israeli carp, C: *A. sobria* (ATCC 43979), D: *Aeromonas hydrophila* (ATCC 700183), E: *Vibrio splendidus* II (ATCC 33789). *A. sobria* produced the amplicons in 288 bp. No amplicons from ATCC 700183 and ATCC 33789. M: marker.

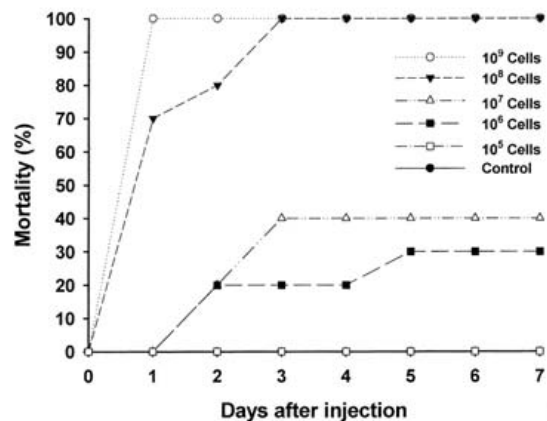


Fig. 4. Mortality of mud loach intraperitoneally injected with different concentrations of the present isolate (DJ-1).

병원성 시험에서  $10^9 \sim 10^8$  cfu/fish에서는 접종 3일 이내에 모두 사망하였고,  $10^7$ 과  $10^6$  cfu/fish에서는 각각 40%와 30%의 사망률을 보였다 (Fig. 4). 반면에  $10^5$  cfu/fish에서는 사망이 일어나지 않았으며,  $LD_{50}$ 은  $5.2 \times 10^8$  cfu/fish로 산출되었다.

미꾸라지의 세균성 질병에 대한 연구는 대단히 미흡한 실정이다. 현재까지 실행된 연구로는 Wakabayashi and Egusa(1966, 1967)와 Chowdhury and Wakabayashi(1991)의 *Flexibacter columnaris* 감염증에 대한 연구와 Park et al.(2002)의 *Staphylococcus epidermidis* 감염증에 대한 보고가 있을 뿐이다. Wahli et al.(2005)은 퍼치고기(농어목)에서 *A. sobria*를 분리하여, 양식어종에 주요한 세균성 질병의 원인균의 하나가 될 수 있다는 가능성을 제시하였다.

본 실험에서 분리균의 성상을 조사한 결과 표준균주 및 이스라엘 잉어에서 분리되었던 *A. sobria*와 아주 유사한 특성을 보였다. 이는 Altwegg et al.(1990)이 기존에 제시했던 결과와 일치하였다. 또한 *A. sobria*가 가지고 있는 aerolysine gene에 대한 특이 primers에도 반응함으로써 Filler et al.(2000)의 결과와 일치하여, 본 분리균을 *A. sobria*로 결론 지을 수 있었다.

병원성 검사의 경우 피부 출혈 및 궤양과 간, 신장, 비장의 장애가 일어난 점은 Wahli et al.(2005)이 제시한 *A. sobria*에 감염된 퍼치고기의 증상과 일치하였다. 병원성 실험에 사용된 실험어도 자연 발생어와 같은 증상이 나타났으며, 접종균을 재분리 할 수 있었기 때문에 *A. sobria*가 미꾸라지에 있어서 새로운 세균성 질병의 원인균이 될 수 있다고 판단되었다.

분리균의 염분, pH, 온도에 대한 성장률을 보면 염분은 0~2% 정도로 저염분에서 발육이 양호하며, pH의 경우 약산에서 중성까지의 범위에서 좋은 발육을 보였고, 온도는  $15 \sim 20^\circ\text{C}$ 로 우리나라의 초봄이나 초가를 날씨의 온도와 일치하고 있어, 양식장 사육수 속에 존재하고 있는

*A. sobria*의 번식에 적합한 환경조건이 된다고 판단된다. 그럼으로 *A. sobria*의 감염을 예방하기 위해서는 국내 노지 양식장의 연중 수온변화로 볼 때  $15 \sim 20^\circ\text{C}$  정도가 되는 환절기에 사육장 수질과 유기물양의 철저한 관리가 중요하다고 판단된다.

## 요 약

2006년 5월 전북 군산시에 위치한 미꾸라지 양식장에서 미꾸라지가 대량으로 폐사하였다. 병어는 궤양을 동반한 체표의 출혈반점과 아가미 빈혈 및 울혈이 있었고 간의 퇴색과 비장, 신장의 종대 및 장의 출혈이 나타났다.

병어의 간, 비장, 신장에서 그람음성의 단간균이 검출되었고 생화학적 시험 결과 분리균은 *Aeromonas sobria*로 판명되었다. 분리균과 *A. sobria*가 소유한 aerolysine 유전자 일치 여부를 분석한 결과 같은 유전자를 가지고 있음이 판명되었다. 분리균을 미꾸라지에 농도별로 복강주사한 결과 자연발생어의 증상과 일치하였다. 그럼으로 *A. sobria*는 양식 미꾸라지의 새로운 세균성 질병의 원인균이 될 가능성이 높다고 판단된다.

## 감사의 글

본 연구는 군산대학교 수산과학연구소의 연구비 지원에 의한 대어민 질병 상담업무의 일환으로 수행되었습니다. 또 질병의 발생 때문에 고초를 겪고 계심에도 불구하고 흔쾌히 시료를 제공하여 주신 H사장님께 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

- Altwegg, M., Steigerwalt, A. G., Altwegg-Bissig, R., Luthy-Hottenstein, J. and Brenner, D. J.: Biochemical identification of *Aeromonas*

- genospecies isolated from humans. J. Clin. Microbiol., 28: 258-264, 1990.
- Aoki, T.: Motile aeromonads (*Aeromonas hydrophila*). In: Fish diseases and disorders, Vol 3. Viral, bacterial and fungal infections. Ed. by Woo, P. T. L. & Bruno, D. W. CABI Publishing, Wallingford, UK. pp 1999.
- Chowdhury, M. B. R. and Wakabayashi, H.: A study on *Flexibater columnaris* infection in loach, *Misgurnus anguillicaudatus* (Bleeker, Gunther). J. Fish Dis., 14: 389-394, 1991.
- Filler, G., Enrich, J. H. H., Stauch, E., and Beutin, L.: Acute renal failure in an infant associated with cytotoxic *Aeromonas sobria* isolated from patient's stool and from aquarium water as suspected source of infection. J. Clin. Microbiol., 38: 469-470, 2000.
- Inglis, V., Roberts, R. J. and Bromage, N. R.: Bacterial diseases of fish. 1<sup>st</sup> ed. The University Press, Cambridge, pp 143-155, 1993.
- Plumbo, S. A, Morgan, D. R., and Buchanan, R. L.: Influence of temperature, NaCl, and pH on the growth of *Aeromonas hydrophila*. J. Food Sci., 50: 1417-1421, 1985.
- Park, S.-W., Jung, Y.-S., and Kim, Y.-G.: *Staphylococcus epidermidis* isolated from cultured mud loach (*Misgurnus mizolepis*). J. Fish Pathol., 14: 155-162, 2002.
- Wahli, T., Burr, S. E., Pugovkin D, Mueller, O. and Frey, J.: *Aeromonas sobria*, a causative agent of disease in farmed perch, *Perca fluviatilis* L. J. Fish Dis., 28: 141-150, 2005.
- Wakabayashi, H. and Egusa, S.: Characteristics of a myxobacterium, *Chondrococcus columnaris*, isolated from diseased loaches. Bull. Jap. Fish. Soc. Sci., 32: 1015-1022, 1966.
- Wakabayashi, H. and Egusa, S.: Columnaris disease of the Japanese loach. Fish Pathol., 1: 20-26, 1967.

---

Manuscript Received : January 24, 2008

Revision Accepted : March 4, 2008

Responsible Editorial Member : Ju-Chan Kang  
(Pukyong Univ.)