한국어병학회지 제25권 제2호 (2012)
J. Fish Pathol., 25(2): 67~76

www.ksfp.org
http://dx.doi.org/10.7847/jfp.2012.25.2.067

여윔증상 넙치, *Paralichthys olivaceus*로부터 분리된 병원균의 임상적 고찰

최혜승* · 전려진 · 김승민 · 정현도** · 김이경** · 임희영*** · 여인규 · 정준범†

제주대학교 해양의생명과학부, *국립수산과학원 병리연구과, **부경대학교 수산생명의학과, ***괴태대학 의학센터

Clinical features of fish with pathogens isolated from emaciated olive flounder *Paralichthys olivaceus*

Hye Sung Choi*, Lyu Jin Jun, Seoung Min Kim, Hyun Do Jeong**, Yi Kyung Kim**, Heeyoung Lim***, In-Kyu Yeo, and Joon Bum Jeong†

School of Marine Biomedical Sciences, College of Ocean Science & Marine and Environmental Research Institute, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

**Pathology Division, National Fisheries Research and Development Institute (NFRDI), Busan 618-902, Korea*

***Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea*

****Institute for Clinical Pharmacology, Medical Center of Goethe University, Frankfurt, Germany*

Two bacteria strains were isolated from emaciated olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) in aquafarm and were identificated as *Vibrio harveyi* (JV1) and *Edwardsiella tarda* (JE1), respectively. In the challenge experiments, we found 100% cumulative mortalities in all of olive flounder injected with JV1, JE1 or JV1+JE1 within eleven days after the injection. Two bacteria strains were reisolated from dead fish and were analyzed using the PCR method. In the physilogical analysis, the hematocrit, AST, ALT and cholesterol levels in experimental groups were increased significantly compared to those in control group, but the glucose, total protein and triglyceride levels were significantly decreased. Additionally, the lysozyme activity in the blood serum was decreased. The histopathological observations of the intestine showed that all groups had detachment and destruction of epithelial tissues except for the control group.

Key words : Olive flounder, *Vibrio harveyi*, *Edwardsiella tarda*

전형적인 여윔증상을 보이는 양식 넙치로부터 두 종류의 세균을 분리하였고, 분리된 두 균주는 각각 *Vibrio harveyi* (JV1)와 *Edwardsiella tarda* (JE1)로 동정되었다. 인위감염 실험에서 JV1, JE1 및 JV1+JE1으로 각각 공격시킨 넙치는 11일 이내에 모두 100% 폐사하였고, 폐사어로부터 균을 재분리한 후, PCR 방법을 이용하여 동일한 균주임을 확인하였다. 생리학적 분석에서 Hematocrit, AST, ALT 및 Cholesterol은 대조구에 비해 실험구가 유의적인 증가를 보였으나, Glucose, Total protein 및 Triglyceride의 결과는 유의적인 감소를 나타내었다. 또한, 혈청의 lysozyme activity 분석에서는 실험구가 대조구에 비하여 감소하는 결과를 보였다. 장 조직을 조직병리학적으로

†Corresponding author: Joon Bum Jeong
Tel: +82-64-754-3426, Fax: +82-64-756-3493
E-mail: jeongjb@jejunu.ac.kr

관찰한 결과, 대조구를 제외한 모든 실험구에서 상피조직의 박리 및 파괴가 관찰되었다.

넙치는 국내 양식산업의 대표적인 어종으로서 최근에는 우리나라 연간 전체 어류 생산량인 72,449톤 중 40,805톤으로 약 56% 이상을 차지하고 있다. 이 중 제주지역에서 양식넙치의 생산량은 22,823톤으로 전체 생산량의 절반이상을 보이며 국내 양식넙치 산업에서 가장 중요한 비중을 차지하고 있다(통계청, 2011). 그러나, 최근 들어 양식넙치에서의 각종 질병 발생으로 인한 피해가 확산되고 있어 제주도 넙치양식의 경영에 어려움을 겪고 있는 실정이다.

국내산 양식넙치에서 주로 발생하는 세균성 질병은 에드워드병, 비브리오증, 연쇄구균증 등이 보고되고 있으며(강 등, 2007), 그 중 *Edwardsiella tarda*에 감염된 넙치는 체색흑화, 복부팽만, 탈장 등의 일반적인 증상을 나타내고(Kanai, 1993), 비브리오증의 원인체 중 하나인 *Vibrio harveyi*는 새우류에 감염되어 폐사를 일으키는 것뿐만 아니라 양식넙치에도 감염되어 폐사를 나타낸다고 알려져 있다(Alvarze, 1998). 그 외에도 넙치는 바이러스 및 기생충에 의한 감염으로 연중 다양한 발병 양상을 보이고 있다(김 등, 2006).

최근 제주도내 양식장의 약 20 cm 전후 크기의 넙치에서 체표면이 검어지고 여위어가는 원인 불명의 질병이 발생하고 있으며, 여윔증상을 나타내는 넙치의 상당수가 폐사함으로써 양식장에 심각한 손실을 초래하고 있다. 1990년경 일본의 자주복 양식장에서 처음 발견된 여윔증은 최근 해산양식어인 참돔, 돌돔, 넙치에서 발병된다고 보고되었으며(Tin *et al.*, 2000), 감염된 넙치는 복부팽만, 눈의 함몰 및 두개골의 돌출과 같은 전형적인 여윔증상을 보였다(Yasuda *et al.*, 2005). 일본에서는 이러한 여윔증의 원인체가 점액포자충인 *Enteromyxum leei*와 *Leptotheca fugu*라고 보고하였으나(Ogawa and Yokoyama, 2001; Tin *et al.*, 2002), 우리나라의 경우는 다양한 조사가 이루어지고 있음에도 불구하고 그 원인은 불분명한 상황이다.

본 연구에서는 여윔증상을 보이는 제주도내 양식장의 넙치로부터 병원체를 분리하여 동정하였고, 분리된 두 균주의 병원성을 조사하기 위하여 넙치에 인위 감염시켜 폐사율을 관찰하였으며, 실험기간 중 시료를 분석하여 혈액 생리학적 변화를 조사하고 감염조직에서 나타나는 조직학적 변화를 관찰하여 분리된 병원체가 여윔증 발병에 직접적인 영향이 있는지에 대하여 조사하였다.

재료 및 방법

세균의 분리 및 동정

본 연구에서 사용된 균주들은 전형적인 여윔증상을 보이는 제주도내 양식장의 넙치(60±15 g)로부터 분리하였다. 양식장에서 여윔증상 발생 후 약 15일 정도 경과한 넙치를 채집하였고, 비장, 신장 및 간 조직을 무균적으로 적출하여 1% NaCl 첨가 Tryptic soy agar (TSA, Difco)에 직접 도말하였으며, 27℃에서 18~24시간 배양하여 분리한 균을 실험에 사용하였다. 순수 분리된 두 균주는 각각 선택배지인 Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar (TCBS, Difco)에서 노란색 colony, Salmonella-Shigella (SS, Difco)에서 검정색 colony를 나타내는 것으로 확인되었다. 그리고 병원균의 형태, 크기, Gram 염색 및 운동성을 관찰하였으며 API 20E kit (bioMerieux France)를 사용하여 동정하였다.

Total nucleic acid의 분리를 위하여 Genomic DNA prep kit를 사용하였다. 먼저 실험에 사용할 균을 Tryptic soy broth (TSB, Difco)에 접종하여, 균의 적온인 28℃에서 24시간 배양시킨 후, 배양액 1.5 ㎖을 취하여 microtube에 분주하고, 12,000 rpm에서 10분

동안 원심 분리하여 균을 농축하였다. Cell Lysis Solution 300 μl 넣어 pellet을 현탁시킨 후, RNase A (4 ㎎/㎖) 1.5 μl를 첨가하여 37℃에서 15분~1시간 동안 배양하였다. 반응 후 실온에서 식힌 후 Protein Precipitation Solution 100 μl 넣고 강하게 vortex하여 12,000 rpm, 10분 동안 원심분리하였다. 상층액을 새 microtube로 옮기고 100% Isopropanol을 동량으로 넣고 섞은 후 12,000 rpm, 10분 동안 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 80% ethanol을 사용하여 12,000 rpm, 10분간 원심분리하는 세척 과정을 2회 실시하였다. 상등액을 완전히 제거한 후, 10분간 자연 건조시켜, DNA Hydration Solution을 20~100 μl 첨가하고 5초간 vortex 하여 DNA를 현탁시켰으며, 65℃에서 1시간동안 배양한 후 DNA의 농도를 확인하고, 4℃에서 보관하였다. 분리된 각각의 DNA를 사용하여 16S rRNA gene을 사용한 PCR과 염기서열 분석을 통해 균을 동정하였다.

병원성 시험

병원성 시험을 위하여 평균 체장 14~16 ㎝, 체중 50~60 g의 건강한 넙치를 제주도의 양식장에서 분양받아 실험실의 사육 수조에서 1주일간 순치시킨 후 실험에 사용하였다. 동정된 *V. harveyi* (JV1) 균주와 *E. tarda* (JE1) 균주는 1% NaCl 첨가 TSB (Tryptic soy broth, USA)에 18~24시간 배양한 후 각각의 균주를 멸균 생리 식염수에 현탁하여 균수를 1×10^7 CFU/㎖으로 조절하였다. JV1, JE1 및 JV1+JE1의 병원균을 각각 넙치 20마리에 공격시켰고, 한 마리 당 0.1 ㎖씩 복강 주사하고 수온은 23℃를 유지시켰으며, 누적 폐사율을 기록하였다. 대조구의 경우는 동일 조건하에서 멸균 생리 식염수를 0.1 ㎖씩 넙치 20마리에 복강 주사하였다. 폐사어는 해부 후 각 조직으로부터 균을 분리하여 1% NaCl이 첨가된 TSA, TCBS와 SS에 도말하여 원인균을 확인하였다. 분리된 신장과 장으로부터는 DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen Hilden, Germany)를 이용하여 DNA 추출을 실시하였고, 분리된 DNA는 실험 전까지 -20℃에 보관하였다. 공격실험 기간 중 1일과 5일째에 모든 그룹에서 각각 3마리씩 sampling을 하여 조직학적 분석 및 혈액학적 분석을 실시하였다.

Primer **제작 및** PCR

일본에서는 넙치 여윔증의 원인체로서 *Enteromyxum leei*를 제시하였고, 기생충의 small subunit ribosomal DNA gene (SSU rDNA)으로부터 MM18Sf (5'-ctggttgattctgccagtggtc-3') / MM18Sr (5'-cggtactagcgacggggcg-3') primer set를 제작하여 PCR 진단에 사용하였으며(Yasuda *et al*., 2005), 본 연구에서도 동일한 primer set를 제작하여 여윔증상 넙치의 장 조직으로부터 DNA를 분리하여 PCR을 실시하였지만 검출되지 않았다(data not shown).

여윔증상 넙치에서 분리된 두 균주의 동정을 위하여, 이전에 보고되어진 오(2008)와 Castro *et al*. (2010)의 연구결과에서 제작된 primers를 사용하여 *V. harveyi*와 *E. tarda*를 각각 특이적으로 검출할 수 있었으며, primers의 염기서열과 예상 산물의 크기는 아래의 Table 1에서 나타내고 있다. PCR을 위하여, 10X PCR buffer 2 μl, 200 μM의 각각의 dNTP, 1 μM의 sense primer와 1 μM의 antisense primer, Taq DNA polymerase (Taq DNA polymerase, Cosmo, Korea) 및 template 1 μl를 첨가한 후 distilled water로 최종액의 volume이 20 μl가 되도록 하였다. PCR 혼합물은 Gene Pro Thermal Cycler (BIOER, Japan)를 사용하여, 94℃에서 3분간 pre-denaturation 시킨 후, 94℃에서 30초 denaturation, 55℃에서 30초 annealing, 72℃에서 30초 extension의 반응을 30 cycle 수행한 후 72℃에서 7분간

Table 1. PCR primers used in this study

Primer	Oligonucleotide sequences (5' to 3' direction)	Expected size of amplicons	Target gene	Reference
VH-K1	CAAGGCACACTTGACGAGCT	638 bp	*rpoB*	오 (2008)
VH-K2	AAACCGCCTTCTTCAGTTAA			
etfD-F	GGTAACCTGATTTGGCGTTC	445 bp	etfD	Castro *et al*. (2010)
etfD-R	CCTAATTCTGTAATCGCTCC			

post-extension시켰다. PCR 후 증폭 산물은 1×TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA)를 전기영동을 위한 완충액으로 하여, 0.5 ㎍/㎕ EtBr (Ethinium Bromide)이 첨가된 2% agarose gel (SeaKem® LE Agarose, CAMBREX Bio Science Rockland, Inc, USA) 상에서 전기 영동한 후, UV 검출기(Seoulin Scientific Co., Ltd., Korea)를 이용하여, ultraviolet상에서 결과를 확인하였다.

조직학적 분석

어체로부터 간, 신장, 비장, 아가미, 장 등을 적출하여 부완액 (Bouin's solution)에 고정하였다. 전고정하고 24시간 후 각 장기를 세절한 다음 동일 고정액에 후고정하였다. 고정이 끝난 후 에탄올 수용액에 농도 구배로 탈수를 하였다. xylene을 이용하여 투명화한 후 파라핀 친화를 시키고, 파라핀 포매 후 microtome (Richert-Jung 820, Leica)을 사용하여 4~5 ㎛ 두께의 박편을 얻었다. 파라핀 절편은 haematoxylin과 eosin (H&E)으로 염색을 실시하였고, 광학현미경을 사용하여 관찰하였다.

혈액학적 분석

혈액은 미부동맥으로부터 heparin 처리 주사기를 사용하여 마취하지 않고 1분 이내에 채취하였다. 채취한 혈액은 냉장상태를 유지하면서 자동혈액분석기(SEAC H5.m, Italy)로 hematocrit치(Ht)를 측정하였다. 나머지 혈액을 원심분리(6,500 rpm, 5분)하여 얻은 혈장은 분석 전까지 -70℃에 보관하였고, 혈액생화학분석기(Express plus system, Bayer, USA)를 이용하여 혈액생화학적 변화를 측정하였다. 측정항목은 아스파라진산염 아미노전이효소(AST), 알라닌 아미노전이효소(ALT), 중성지방(Triglyceride: TG), 포도당(Glucose: GLU), 총콜레스테롤(Total cholesterol: Tchol), 총단백질(Total protein: TP) 등 총 6항목으로 하였다.

혈청 및 체표 점액 lysozyme 활성 조사

혈청 내 lysozyme의 활성은 Parry *et al*. (1965)의 방법을 바탕으로 분석하였다. 먼저 0.05 M sodium phosphate acid buffer (PBS, pH 6.2)에 동결 건조된 *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma)를 첨가하여 0.2 ㎎/㎖ 농도의 현탁액을 만든 후, 현탁액 200 ㎕를 96-well plates에 분주하고, 어류에서 분리한 혈청 10㎕를 혼합시킨 후, microplate reader (Thermo, USA)를 이용하여 530 nm에서 1분과 5분에 흡광도 값을 측정하였다. Lysozyme의 활성은 units/㎖로 나타내었으며, 1 unit은 흡광도 값이 0.001/min 감소한 양으로 정의하였다. 체표 표면의 lysozyme 활성은 Takahashi *et al*. (1986)의 방법에 따라 *M. lysodeikticus* 현탁액에 대한 흡광도의 감소량을 측정함으로써 평가하였다. 먼저 시료의

2배의 0.1 M PBS (pH 7.2)를 첨가한 다음 점액을 균질화시킨 후, 원심분리(10,000×g, 4℃, 20분)한 다음 상등액을 용균 활성 측정용 시료로 사용하였다.

통계학적 분석

대조구와 시험구 간의 통계학적 유의성은 Student's t-test로 비교하였다($P<0.05$).

결 과

세균의 분리

본 실험에서 분리된 두 균주는 각각의 선택배지인 TCBS와 SS에서 노란색과 집락 중심부에 검은색을 보였고 생화학적 특성을 API 20E로 조사한 결과 *Vibrio*와 *Edwardsiella* 계열인 것으로 나타났다. 정확한 동정을 위하여 16S ribosomal RNA gene을 이용한 분자생물학적인 분석을 실시하였고 그 결과 NCBI에 등록된 중국의 *V. harveyi* 와 99.8%의 유사성이 있는 것으로 분석되었으며, 다른 균주는 *E. tarda*와 100%의 상동성을 나타내었다.

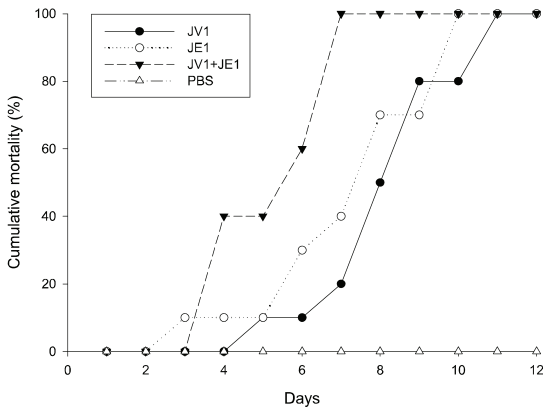

Fig. 1. Cumulative mortality of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, after intraperitoneal injection with *V. harveyi* JV1 (●), *E. tarda* JE1 (○) and JV1+JE1 (▾), respectively. The control group (△) was injected 0.1 ㎖ PBS fish^{-1}.

병원성 시험

분리된 각각의 두 시험 균주와 두 균주의 복합감염시 누적폐사율과 조직학적 변화를 관찰하기 위하여, 대조구를 포함하여 모두 4 그룹으로 나누어 공격실험을 실시하였다. 그 결과, JV1과 JE1을 복합감염시킨 실험구에서는 7일째에 모두 폐사하였고, JV1과 JE1을 단독으로 감염시킨 실험구에서는 각각 11일째와 10일째 100%의 폐사를 보였으며, 대조구에서는 폐사가 나타나지 않았다(Fig. 1). 여윔증상 넙치에서 분리된 균주를 사용한 실험구의 폐사어 모두에서 접종균이 재분리되었고, 각각의 선택배지에서 동일한 성상을 확인할 수 있었다(data not shown). PCR을 이용한 분자생물학적인 분석에서는 positive sample의 유전자 증폭 결과와 동일한 결과를 확인할 수 있었다(Fig. 2). 그러므로, 본 시험에 사용한 두 균주는 각각 넙치에 높은 병원성을 가지는 것으로 확인되었다.

조직학적 변화 비교

감염된 병어에서는 체색흑화, 탈장, 장출혈과 같은

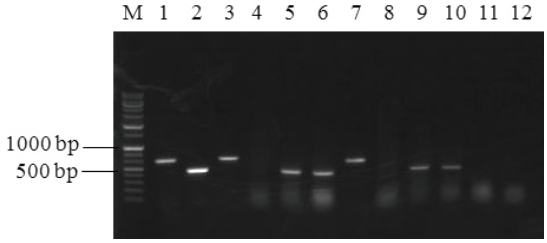

Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of amplicons generated by PCR using the specific primers for the detection of *V. harveyi* (lanes 1, 3, 4, 7, 8 and 11) and *E. tarda* (lanes 2, 5, 6, 9, 10 and 12). Lane 1, Positive of *V. harveyi*; lane 2, Positive of *E. tarda*; lane 3, kidney in JV1 group; lane 4, intestine in JV1 group; lane 5, kidney in JE1 group; lane 6, intestine in JE1 group; lane 7, kidney in JV1+JE1 group (*V. harveyi*); lane 8, intestine in JV1+JE1 group (*V. harveyi*); lane 9, kidney in JV1+JE1 group (*E. tarda*); lane 10, intestine in JV1+JE1 group (*E. tarda*); lane 11, 12, kidney and intestine of control group; M, 100 bp DNA ladder.

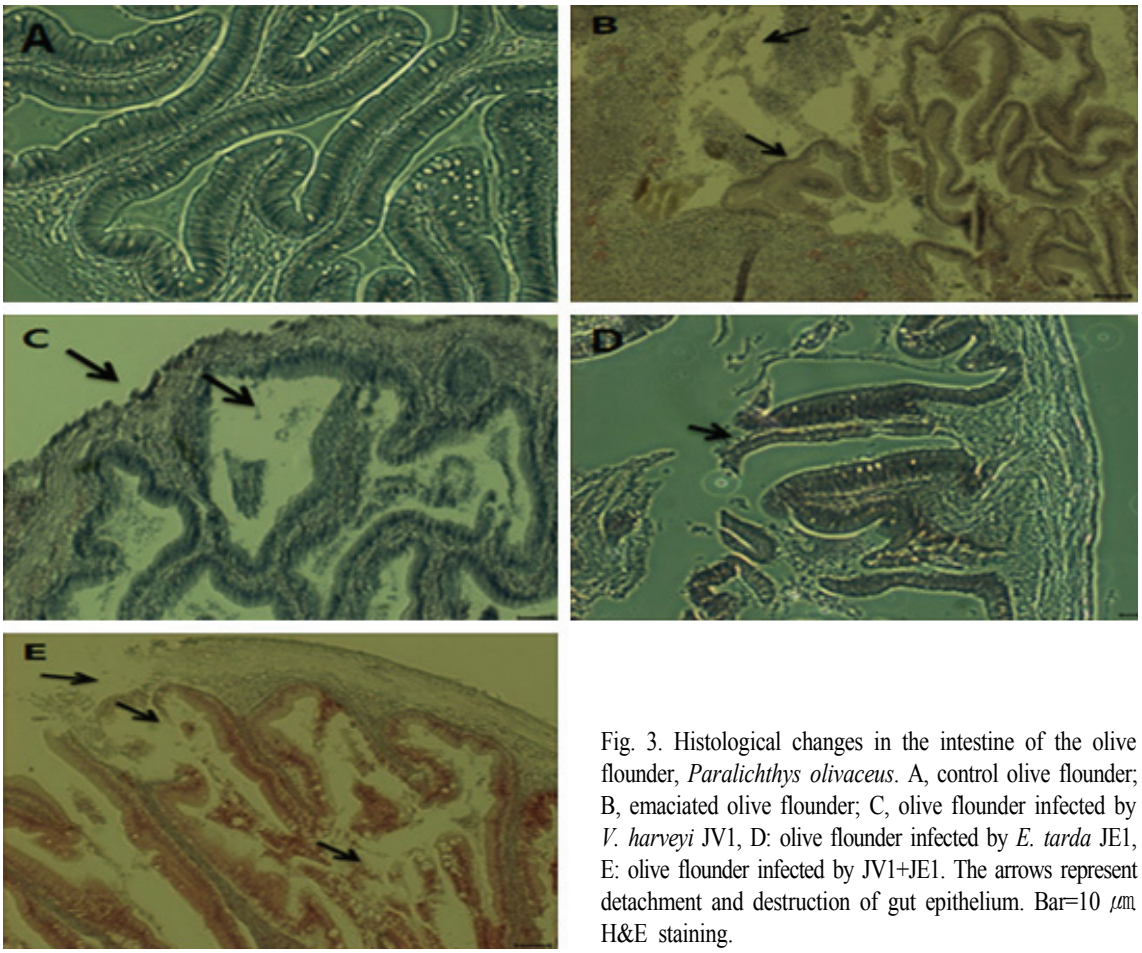

Fig. 3. Histological changes in the intestine of the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. A, control olive flounder; B, emaciated olive flounder; C, olive flounder infected by *V. harveyi* JV1, D: olive flounder infected by *E. tarda* JE1, E: olive flounder infected by JV1+JE1. The arrows represent detachment and destruction of gut epithelium. Bar=10 ㎛ H&E staining.

특징적인 증상이 관찰되었으며, 여윔증의 주요 감염 장기로 추정되는 장의 병리조직학적 변화를 대조구와 비교하여 Fig. 3에 나타내었다. 대조구를 제외한 모든 그룹에서 장의 상피조직 박리 및 파괴가 관찰되었으며, 여윔증상 넙치(Fig. 3B)와 JV1+JE1 (Fig. 3E)에서 장조직 비대 및 출혈을 관찰하였고, 그 밖에 점액세포, 과립층, 치밀증, 윤주근의 파괴가 관찰되었다.

혈액의 생화학적 성분 분석

병원균을 접종한 후 1일과 5일째 sampling을 실시하여 혈액 성분 분석을 한 결과, 1일째 samples는 6가지 항목에 대해 대조구와 유의성을 나타내지 않았다 (Table 2). Ht 치는 대조구와 실험구에서 시간 경과에 따라 증가하는 양상을 보였다. 간 질환의 간접적인 판단근거로 사용되고 있는 AST와 ALT는 대조구 (AST, 8.8±1 U/L; ALT, 17.8±1 U/L)에 비해 복합 감염시킨 실험구(AST, 57±4 U/L; ALT, 42.5±3.7 U/L)에서 특히 유의하게 증가하였으며($P<0.05$), GLU 함량은 JE1을 단독으로 감염시킨 실험구에서만 대조구에 비해 증가하는 양상을 보였다. 간 조직의 손상 여부 지표로 이용되는 총단백질 함량은 단독 감염구 (2.3±0.2 g/dL, 1.8±0.1 g/dL)와 복합 감염구(1.8±0.1 g/dL)를 대조구(1.9±0.2 g/dL)와 비교하였을 때 유의성은 나타나지 않았다.

Table 2. Physical and Hematological changes in olive flounder challenged by *V. harveyi* and *E. tarda*

	Group	Ht (%)	ALT (U/L)	AST (U/L)	TG (g/dL)	GLU (mg/dL)	Tchol (mg/dL)	TP (mg/dL)
	EF[a]	42.3±2.1	21.3±4	19.3±3.5	8.2±0.6	55.5±6.2	438±23	3.4±0.3
1 Day	Control	19.8±4	16.3±1	4.1±1	7.2±0.8	51±7.1	212±19.5	1.8±0.2
	JV1	21.2±3.3	20±2.4	5.6±1	4.8±0.3	45±4.2	228±7.3	2.1±0.1
	JE1	23.5±7.7	28.7±1	17.5±4.3	8.2±0.6	62±3.3	425±19	1.5±0.3
	JV1+JE1	38.4±2.3	35.6±5.5	22.9±4	5.1±0.3	23±2	326±17.3	1.3±0.1
5 Day	Control	23.5±5.5	17.8±1	8.8±1	9±0.8	42±4.2	235±17	1.9±0.2
	JV1	17.6±5.2	34.2±1	37.7±3.3	4.8±0.5	24±5.5	371±22.9	2.3±0.2
	JE1	34.1±2.5	38.1±1.3	18.6±3.5	11.6±0.5	68±3.3	394±34.3	1.8±0.1
	JV1+JE1	42.3±3.8	42.5±3.7	57±4	7.4±0.3	41±2.5	383±17.3	1.8±0.1

[a], Emaciated olive flounder.
Ht, Hematocrit; ALT, SGPT; AST, SGOT; TG, Triglyceride; GLU, Glucose; Tchol, Total cholesterol; TP, Total protein.

Lysozyme **활성의 변화**

병원성 시험을 실시하면서 어류의 비특이적 면역계 중 체액성 면역의 일종인 라이소자임의 활성을 측정하였다. 혈청의 lysozyme 활성 결과, 모든 실험구에서 대조구에 비해 면역 활성이 떨어지는 양상을 나타냈으나, 시간경과에 따라 유의적으로 증가하는 양상을 나타내었다(Fig. 4A). 점액의 lysozyme 활성 결과에서도 혈청과 마찬가지로 JV1, JE1 및 JV1+JE1 실험구 모두에서 대조구보다 낮은 수치를 보였고 실험 기간이 경과한 5일째 조금 증가한 수치를 보였다 (Fig. 4B).

고 찰

최근 제주도의 넙치 양식장에서 체표가 검어지고 여위어가는 질병으로 인한 폐사가 증가하고 있으며 특히 우리나라의 경우는 그 원인이 정확히 밝혀지지 않아 본 연구에서는 여윔증상을 보이는 넙치에서 두 병원체를 분리하였고 인위감염 시켰을 때 나타나는 재현성 확인, 조직학적 분석 및 혈액학적 분석을 실시하여 여윔증과의 연관성을 파악하고자 하였다.

여윔증상을 보이는 넙치에서 분리된 두 균주는 각각 선택배지인 TCBS와 SS에 접종한 결과 노란색 colony와 집락 중심부에 검은색을 보이는 colony를 확인할 수 있었다. 이에 비브리오와 에드워드 계열에 속하는 균주로 추정하였고, 생화학 분석 및 16S rRNA 유전자를 이용한 염기분석 결과 *V. harveyi* 와 *E. tarda* 인 것으로 동정되었다. *V. harveyi*는 새우류 뿐만 아니라 어류에서도 병원성을 나타내어 경제적인 손실을 일으키고 있으며, 우리나라에서 양식넙치에 감염되어 폐사를 일으킨 사례가 있고(원 등, 2006), 감염된 넙치의 증상은 복부팽만, 탈장, 장출혈 등의 증상을 보인다(Soffientino *et al*., 1999). *E. tarda*는 다양한 해수 및 담수 어종에 에드워드병을 유발하는 주요한 어류 병원성 세균으로 알려져 있으며, 특히 넙치에 발병하여 *V. harveyi*와 유사한 증상을 보이기도 한다 (Nakatsugawa, 1983).

여윔증상을 나타내는 넙치로부터 분리된 두 균주

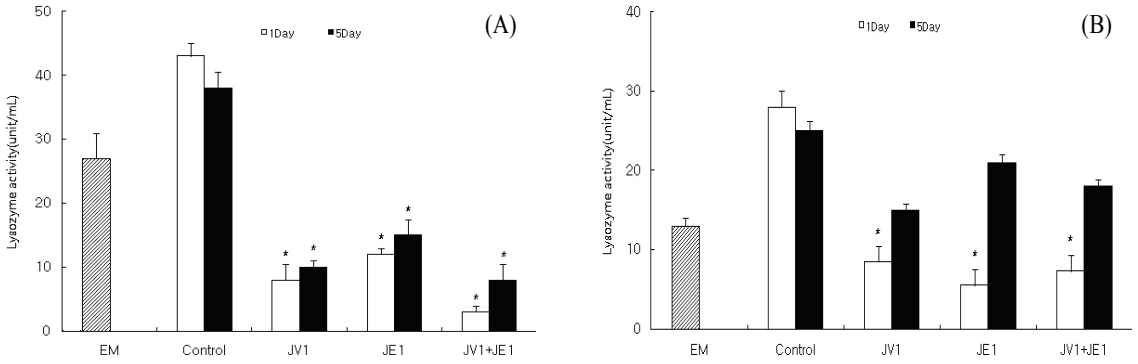

Fig. 4. Changes of lysozyme activity in serum (A) and skin mucus (B) of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, injected intraperitoneally with *V. harveyi* JV1, *E. tarda* JE1 and JV1+JE1, respectively. *, significant difference from control, $P<0.05$. EM: Emaciated olive flounder.

가 여윔증 발병에 직·간접적인 영향을 미치는지에 대해 조사하기 위하여 병원성 시험과 조직학적 검사를 실시하였다. JV1과 JE1을 단독 감염시킨 실험구는 주사 후 11일째와 10일째 각각 100%의 폐사를 보였으나, 복합 감염시킨 실험구에서는 7일째 모두 폐사하였다(Fig. 1). 두 균주가 넙치에 높은 병원성을 가진다는 것을 확인하였으며 단독 투여보다 복합 투여일 경우, 더 높은 병원성을 나타내었다. 조직학적 분석을 위하여 여윔증상의 주요 감염부위로 추정되는 장의 병리조직학적 변화를 비교한 결과(Fig. 3), 여윔증상의 넙치에서 보였던 장 조직 비대 및 출혈이 복합감염 실험구에서 유사하게 관찰되었으며 모든 그룹에서 상피조직 박리 및 파괴를 관찰할 수 있었다. 다른 조직들의 결과에서도 대조구와 비교하여 조직 손상 및 파괴를 관찰할 수 있었으며(data not shown), 단독감염 실험구보다 JV1과 JE1을 복합적으로 투여했을 때 여윔증상 넙치와 더욱 유사한 병리조직학적 증상을 보였다.

최근, 일본에서는 넙치의 여윔증에 대한 원인체로서 *Enteromyxum leei*를 제시하였으며, 여윔증의 일반적인 증상으로 장상피세포의 박리 등 장관조직이 급속하게 붕괴된다고 보고하였다(Yasuda *et al*. 2005). 그러나, 본 연구에서 *Enteromyxum leei*의 감염 진단을 위한 reference primer set (MM18Sf/MM18Sr)를 제작하여 PCR 분석한 결과에서는 검출되지 않았으며, 이로 볼 때, 본 연구에서의 넙치 여윔증의 원인은 일본에서 여윔증의 원인으로 제시되었던 것과는 동일하지 않은 것으로 판단된다.

병원성 균주의 투여가 넙치의 생리에 영향을 미치는지를 조사하기 위하여, Ht 수치를 포함하여 7가지 항목을 측정한 결과, 간의 건강도를 나타내는 AST와 ALT가 대조구에 비해 유의적으로 높은 수치를 보였으며, 총 콜레스테롤 수치에서도 유의적인 증가를 보인 것을 제외하고는 다른 항목에서 그다지 큰 변화를 보이지 않았다(Table 2). 여윔증상을 보이는 넙치의 혈액성분을 비교 분석한 결과, GLU 및 TP에서 여윔증 개체보다 복합감염 실험구에서 낮은 수치를 보였다. 포도당, 총단백질 및 중성지방은 생체내에 영양대사의 중요한 물질로 알려져 있는데 특히 총단백질에 있어서 큰 차이를 보인다는 것은 혈액채취 시기에 다소 차이가 있었다는 것을 고려하더라도 여윔증 개체와 병원성 균주에 감염된 개체가 생리학적 영양대사에 차이를 가지는 것으로 생각된다.

Lysozyme 활성은 살균 및 항 염증성 특성을 가지고 있어 항 기생충 작용, 항바이러스 작용 및 오염물질의

작용 등에 관여함으로써 생체의 방어기작에 다양한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Mohandas *et al*., 1985). 본 연구에서 두 균주를 접종한 후 혈청과 점액에서 lysozyme 활성을 분석한 결과, 대조구에 비해 JV1, JE1 및 JV1+JE1 실험구에서 면역활성이 떨어지는 양상을 나타냈으나 시간이 경과함에 따라 점차 유의적으로 증가하였다(Fig. 4). 이전의 여윔증상을 보이는 넙치의 lysozyme 활성은 대조구에 비해 낮은 수치를 나타냈으나 유의적인 차이를 나타내지 않았으며 혈청에 비해 점액의 lysozyme 활성이 높게 나타났다. 반면 두 균주를 접종한 감염 실험에서는 점액에서보다 혈액에서 더 높은 활성을 보이는 것으로 판단되어, 세균성 질병과 여윔증과는 다소 차이를 가지는 것으로 추정된다.

본 연구에서는 여윔증상을 보이는 넙치로부터 분리된 병원성 균주와 여윔증과의 상관관계를 조사하기 위하여 공격실험 후, 조직학적 및 혈액학적 분석을 실시하였으며, 조직학적으로 여윔증상 넙치와 유사한 결과를 확인하였으나 혈액학적 분석 및 lysozyme 활성에서는 다소 상이한 결과를 나타내었다. 이로 볼 때, 분리된 두 균주가 넙치의 여윔증 발병에 직접적인 영향으로 작용하였다고 볼 수는 없으며, 넙치에 대하여 높은 병원성을 가진 것으로 보아 여윔증 발생 양식장의 넙치에 2차 감염됨으로써 더욱 심각한 피해를 입힌 것으로 여겨진다. 향후 여윔증의 원인 규명을 위한 연구를 위해서는 일본에서 보고되었던 점액포자충을 포함하여 발병 원인에 대한 다양한 접근 방법이 필요할 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 국립수산과학원 연구비 지원(RP-2012-AQ-079)으로 수행되었습니다.

참고문헌

Alvarez, J.J., Austin, B., Alvarze, A.M. and Reyes, H.: Vibrio harveyi: A pathogen of penaeid shirimps and fish in Venezuela. J. Fish Dis., 21: 313-316, 1998.

Kanai, K.: Bacterial diseases of flounder, Paralichthys olivaceus. 한국어병학회지, 6: 197-208, 1993.

Castro, N., Toranzo, A.E., Núñez, S., Osorio, C.R. and Magariños, B.: Evaluation of four polymerase chain reaction primer pairs for the detection of *Edwardsiella tarda* in turbot. Dis. Aquat. Org., 90: 55-61, 2010.

Mohandas, A., Cheng, T.C. and Cheng, J.B.: Mechanism of lysosomal enzyme release from Mercenaria mercenaria granulocyte: a scanning electron microscope study. J. Invertebr. Pathol., 46: 189-197, 1985.

Nakatsugawa, T.: Edwardsiella tarda isolated from cultured young flounder. Fish Pathol., 18: 99-101, 1983.

Ogawa, K. and Yokoyama, H.: Emaciation disease of cultured tiger puffer Takifugu rubripes. Bull. Natl. Res. Inst. Aquacult., Suppl., 5: 65-70, 2001.

Parry, R.M., Chandau, R.C. and Shahani, R.M.: A rapid and sensitive assay of muramidase. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 119: 384-386, 1965.

Soffientino, B., Gwaltney, T., Nelson, D.R., Speck, J.L., Mauel, M. and Go'mez-Chiarri, M.: Infectious necrotizing enteritis and mortality caused by Vibrio carchariae in summer flounder Paralichthys dentatus during intensive culture. Dis. Aquat. Org., 38: 201-210, 1999.

Takahashi, Y., Itami, T. and Konegawa, K.: Enzymatic properties of partially lysozyme from the skin mucus of carp. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 52: 1209-1214, 1986.

Tin, T., Yokoyama, H., Ogawa, K. and Wakabayashi, H.:

Myxosporeans and their hyperparasitic microsporeans in the intestine of emaciated tiger puffer. Fish Pathol., 35: 145-156, 2000.

Tin, T., Ogawa, K. and Wakabayashi, H.: Pathological changes induced by three myxosporeans in the intestine of cultured tiger puffer, Takifugu rubripes (Temminck and Schlegel). J. Fish Dis., 25: 63-72, 2002.

Yasuda, H., Ooyama, T., Nakamura, A., Iwata, K., Palenzuela, O. and Yokoyama, H.: Occurrence of the Myxosporean emaciation disease caused by *Enteromyxum leei* in cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Fish Pathol., 40: 175-180, 2005.

강철영, 강봉조, 문영건, 김기영, 허문수: 제주도 양식넙치(*Paralichthys olivaceus*)로부터 분리한 비용혈성 연쇄구균의 동정. 한국어병학회지, 20: 109-117, 2007.

김진우, 정승희, 박명애, 도정완, 최동림, 지보영, 조미영, 김명석, 최혜승, 김이청, 이주석, 이창훈, 방종득, 박미선, 서정수: 2000년~2006년 하절기 양식어류의 병원체 감염현황. 한국어병학회지, 19: 207-214, 2006.

오윤경: 해산 양식어류에서 분리된 *Vibrio harveyi*의 신속 동정과 항원성에 대한 연구. 부경대학교 석사학위논문 1-53, 2008.

원경미, 최정현, 박수일: 배양 조건에 따른 *Vibrio harveyi* extracellular products (ECP)의 특성. 한국어병학회지, 19: 119-126, 2006.

Manuscript Received : July 31, 2012
Revised : August 09, 2012
Accepted : August 13, 2012