

해수 사육 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*)의 위팽창증후군

김위식 · 공경희 · 오명주*

전남대학교 수산생명의학과

Stomach Distension Syndrome of Seawater Farmed Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) by Wi-Sik Kim, Kyoung-hui Kong and Myung-Joo Oh* (Department of Aqualife Medicine, Chonnam National University, Yeosu 59626, Republic of Korea)

ABSTRACT About 10% mortality occurred in cultured rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* at a marine farm in Jeju in 2014. Diseased fish showed markedly abdominal distension and distended stomach. Although parasites, bacteria or viruses were not isolated from diseased fish, numerous *Candida* sp. were isolated from distended stomach. In experimental infection with *Candida* sp., mortality was not observed in most fish and clinical sign of distended stomach was not observed in the fish. These results suggest that *Candida* sp. may not be the etiologic agent of stomach distension syndrome. This is the first report of stomach distension syndrome in seawater farmed rainbow trout in Korea.

Key words: Abdominal distension, bloat, *Candida* sp., rainbow trout, stomach

서 론

최근 우리나라에서는 동절기 남해안의 유힬 해사가두리 양식장의 활성화와 넙치(*Paralichthys olivaceus*) 위주의 획일화된 양식산업 구조를 다양화하기 위한 방안으로 해수를 이용한 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*) (해수 송어) 양식이 시도되고 있다(Lee, 2013). 해수에서 사육된 무지개송어는 담수에서 보다 성장이 2~3배 빠르며 육질이 우수하기 때문에 상품성을 향상시킬 수 있는 장점을 가지고 있다(Kim *et al.*, 2003; FAO, 2015). 더욱이 최근에는 송어 정자로부터 추출한 polydeoxyribonucleotide (PDRN)가 상처 치료에 효과가 있음이 확인되어(Altavilla *et al.*, 2009; Chung *et al.*, 2013; Squadrito *et al.*, 2014) 의약품과 화장품의 원료로 사용되고 있다. 따라서 해수에서의 송어 양식은 그 전망이 높은 것으로 생각된다.

해수 사육 연어과 어류에서 발생하는 질병으로는 아메바성 아가미병(amoebic gill disease), 바다물리증(sea lice disease)

등의 기생충에 의한 질병, 세균성신장병(bacterial kidney disease), 피쉬리케차증(piscirickettsiosis) 등의 세균에 의한 질병, 바이러스성출혈성패혈증(viral haemorrhagic septicaemia), 전염성연어빈혈증(infectious salmon anaemia) 등의 바이러스에 의한 질병들이 보고되어 있다(Kent, 1992; Skall *et al.*, 2005; Mitchell and Rodger, 2011; OIE, 2013a, 2013b, 2016). 국내에서는 해수 사육과정 중에 아메바성아가미병이 발생한 적이 있으며(Kim *et al.*, 2016a), 해수 순치과정 중에 비브리오병(vibriosis)과 전염성조혈기괴사증(infectious hematopoietic necrosis)에 의한 폐사가 보고된바 있다(Kim *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2016b).

2014년 제주도에 위치한 양식장에서 해수로 사육 중인 무지개송어에서 만성질병으로 인해 약 10%의 누적폐사가 발생하였다. 병어를 대상으로 질병 검사를 실시한 결과, 기생충, 세균 및 바이러스는 검출되지 않았으나 팽창된 위에서 진균이 분리되었다. 본 연구에서는 해수 사육 무지개송어에 발생되어진 위팽창증후군을 보고하고자 하며, 또한 분리된 진균을 이용한 감염 실험을 통하여 질병과의 연관성을 조사한 결과를 보고하고자 한다.

*Corresponding author: Myung-Joo Oh Tel: 82-61-659-3173, Fax: 82-61-659-3173, E-mail: ohmj@jnu.ac.kr

재료 및 방법

1. 무지개송어

2013년 경상북도에 위치한 양식장에서 사육 중인 담수 무지개송어(체중 300~400 g) 2만마를 지하수가 들어 있는 수조(제주도에 위치한 양식장 수조)에 수용한 후 해수의 유입을 점차적으로 늘리는 방법으로(염분의 농도: 1일에 약 1‰씩 상승시킴) 해수 순치를 실시하였다. 해수 순치 후 무지개송어는 사육 수온 15~18°C, 염분 농도 33‰로 유지하면서 사육하였다.

2. 병어 채집 및 질병 검사

2014년 3월 제주도에 위치한 육상 수조식 양식장에서 해수로 사육 중이던 무지개송어에서 복부가 팽만되어 복부를 위로 한 채 물 위로 떠올라 옆으로 누워 유평하는 증상을 나타낸, 4마리(체중 900~1,400 g, 체장 32~37 cm)를 채집하여 질병 검사를 실시하였다. 채집된 시료는 외부 및 내부 증상을 육안으로 관찰하였고, 아가미, 피부, 위를 비롯한 각종 장기를 대상으로 광학현미경을 사용하여 기생충 및 진균 검사를 실시하였다. 또한 위 내용물을 penicillin과 streptomycin이 첨가된 sabouraud dextrose agar (SDA, Difco, USA) 위에 100 µL씩 도말한 후 15°C에서 7일간 배양하여 진균을 분리하였다. 세균 검사는 간, 비장 및 신장 조직을 무균적으로 채취하여 brain heart infusion agar (BHIA, Difco, USA)에 도말한 후, 15°C에서 7일간 배양하여 세균을 분리하였다. 바이러스 검사는 신장과 비장 조직을 Hanks' balanced salt solution (HBSS; Gibco, USA)으로 1 : 9 (0.5 g/4.5 mL)가 되게 처리하여 마쇄하고, 그 마쇄액을 0.45 µm syringe filter로 여과하여 바이러스 분리용 시료로 사용하였다. 해당 시료는 fathead minnow caudal trunk cell line (FHM)과 Chinook salmon embryo cell line (CHSE-214)에 접종하여 15°C에 배양하면서 세포병성효과 (Cytopathic effect, CPE)를 관찰하였다.

3. 진균 동정

SDA 배지에 자란 진균을 동정하기 위해 형태학적 및 생화학적 특성을 분석하였고, internal transcribed spacer (ITS)-5.8S rDNA-ITS 부위의 염기서열을 분석하였다. 진균의 형태는 광학현미경을 사용하여 관찰하였고, API 20C AUX kit (BioMérieux, France)를 사용하여 상법에 따라 동화시험 (assimilation test)을 실시하였다. 진균의 DNA는 Proteinase K와 phenol-chloroform 용액을 사용하여 분리하였고, ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3')와 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATGATATGC-3') primer를 사용하여 polymerase chain reaction (PCR)을 실시하였다 (White *et al.*, 1990). PCR 반응은 30 mM

KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 1.5 mM MgCl₂, 250 µM의 각 dNTP, 1 U Taq DNA polymerase가 포함되어 있는 혼합물 (PCR premix, Bioneer, Korea)에 20 pmol의 각 primer와 추출된 DNA 1 µL를 첨가하여 실시하였다. 반응조건은 95°C에서 5분간 pre-denature시킨 후, 95°C에서 1분간 denature, 55°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 extension 반응을 30 cycles을 진행시키고, 72°C에서 5분간 post-extension 하였다. PCR 증폭 산물은 1.5% agarose gel을 이용하여 확인하였고, gel purification kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 정제 후 ABI PRISM dye terminator sequencing chemistry (Applied Biosystems, USA)를 사용하여 염기서열을 분석하였다. 분석된 염기서열은 national center for biotechnology information (NCBI) GenBank의 blast 분석을 실시하여 기존에 보고된 진균종과 비교하였다.

4. 감염 실험

무지개송어의 팽창된 위로부터 분리한 진균을 SDA 배지에 3~7일간 배양한 후, 경구 투여 방법으로 감염 실험을 2회 실시하였다. 실험 1에서는 무지개송어(체중 925~1,750 g, 체장 41~49 cm)를 수온 12.5~14°C, 염분 농도 25‰로 유지된 36톤 수조 2개에 각각 23마리씩 수용한 후, 1개의 수조에는 진균을 흡착시킨 사료 500 g (진균수: $10^7 \sim 3 \times 10^7$ colony forming unit (CFU)/g)을 2일 간격으로 무지개송어에 투여하였고(실험구), 다른 1개의 수조에는 진균 미흡착 사료 500 g을 위와 동일한 방법으로 투여하였다(대조구). 실험어는 유수식으로(1일 약 12회전) 42일간 사육하였고, 1일에 1번씩 외부증상을 관찰하여 복부 팽만 유무를 확인하였다. 실험 2에서는 무지개송어(체중 700~1,640 g, 체장 35~48 cm)를 수온 13~16°C, 염분 농도 30~32‰로 유지된 3톤 수조 2개에 각각 20마리씩 수용한 후, 1개의 수조에는 진균을 흡착시킨 사료 200 g ($1.4 \times 10^7 \sim 2 \times 10^7$ CFU/g)을 2일 간격으로 무지개송어에 투여하였고(실험구), 다른 1개의 수조에는 진균 미흡착 사료 200 g을 위와 동일한 방법으로 투여하였다(대조구). 실험어는 유수식으로(1일 약 24회전) 55일간 사육하였고, 1일에 1번씩 외부증상을 관찰하여 복부 팽만 유무를 확인하였다. 실험 완료일에는 실험어를 모두 채집하여 외부 및 내부 증상을 관찰하였고, 위팽창 유무를 조사하였다.

결과 및 고찰

2014년 제주도에 위치한 육상 수조식 양식장에서 해수로 사육 중인 무지개송어에서 1년간 약 10%의 누적 폐사율이 관찰되었다. 병어는 복부가 심하게 팽만되어 힘없이 수면 위로

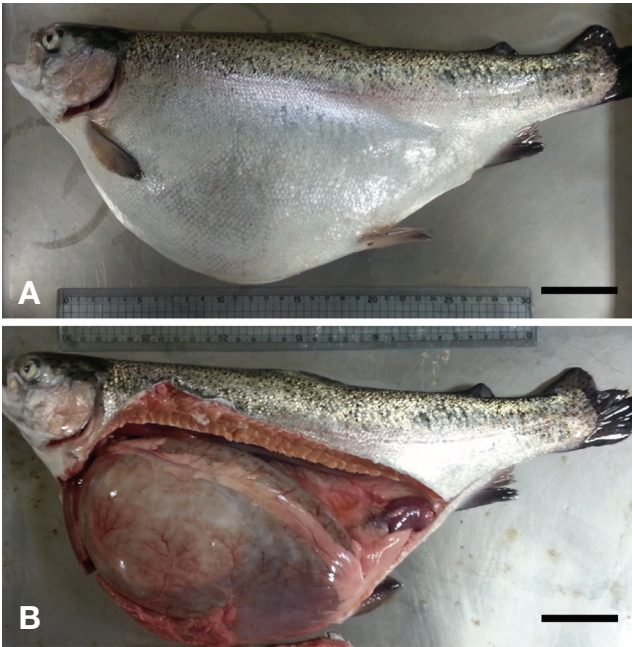


Fig. 1. Diseased rainbow trout showing abdominal distension (A) and distended stomach (B). Scale bar = 5 cm.

떠올라 옆으로 누워 유영하였다. 복부가 팽만된 개체는 급성으로 폐사되지 않았으며, 2주 이상 생존하였다. 무지개송어는 1~4일에 약 1~5마리가 폐사되었고, 폐사는 약 1년간 지속되었다. 병어는 복부 팽만을 제외하고는 외관상 특이한 증상을 보이지 않았다(Fig. 1A). 해부 검사 결과, 모든 개체에서 위가 심하게 팽창되어 있었고 위 내부에는 액성 물질이 가득 차 있었다(Fig. 1B). 간을 포함한 내부 장기는 위 팽창으로 인해 압박되어 있었고 장 출혈이 관찰되었다. 이상의 임상 증상은 기존에 연어과 어류에서 발생하는 위팽창증후군(동일명: 위확장증, 위고창증, bloat, water belly, 본 연구에서는 위팽창증후군으로 질병명을 표기함)의 임상 증상과 유사하였다(Hatai and Egusa, 1975; Staurnes *et al.*, 1990; Meyers *et al.*, 2008). 병어를 대상으로 병원체 검사를 실시한 결과, 기생충, 세균 및 바이러스는 검출되지 않았으나(data not shown) 팽창된 위의 내용물에서 다수의 진균이 분리되었다(1번 개체: 7,840 CFU/mL, 2번 개체: 1,120 CFU/mL, 3번 개체: 7,200 CFU/mL, 4번 개체: 4,000 CFU/mL). 진균은 SDA에서 크림색의 원형 집락을 나타내었다(data not shown). 크림색 원형 집락을 현미경으로 관찰한 결과, 난원형($n = 10$, $5.5 (4.3 \sim 6.7) \mu\text{m} \times 3.6 (2.9 \sim 4.3) \mu\text{m}$) 또는 원형($n = 10$, $2.9 (2.4 \sim 3.1) \mu\text{m} \times 2.9 (2.4 \sim 3.1) \mu\text{m}$)의 효모가 관찰되었다(Fig. 2). 2번과 4번 개체로부터 분리한 진균 집락 중 무작위로 각각 1개씩을 선택한 후(분리주: RF2, RF4) ITS-5.8S rDNA-ITS 부위를 타겟으로 한 PCR을 실시한 결과, 400 bp (RF2)와 700 bp (RF5)의 PCR 산물이 확인되었다(data

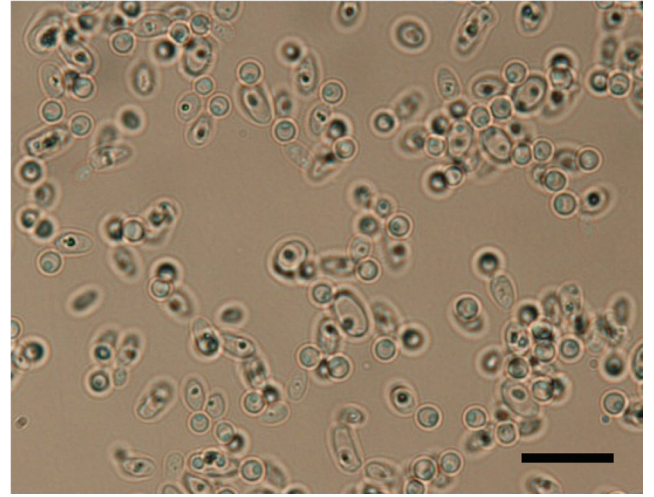


Fig. 2. Morphology of yeast (*Candida* sp.) from distended stomach. Scale bar = 10 μm .

not shown). PCR 산물을 사용하여 염기서열을 분석한 결과, 두 종 모두 *Candida* sp.와 99%의 상동성을 나타내었다(GenBank accession number: KY563722, KY563723). API 20C AUX kit를 사용하여 RF2과 RF4의 동화작용을 검사한 결과, RF2는 D-glucose, methyl- α D-glucopyranoside, D-cellobiose, D-maltose, D-saccharose, D-trehalose, D-melezitose, Adonitol, D-sorbitol, calcium 2-keto-gluconate, N-acetyl-glucosamine에 양성 반응하여 *C. iusitaniae*와 99.8%의 상동성을 나타내었다(Table 1). RF4는 D-glucose, methyl- α D-glucopyranoside, D-cellobiose, D-lactose, D-maltose, D-saccharose, D-trehalose, D-melezitose, D-raffinose, Adonitol, D-sorbitol, N-acetyl-glucosamine에 양성 반응하여 *C. spherica*와 93.9%의 상동성을 나타내었다. 이상의 결과, 병어는 위팽창증후군의 임상 증상을 보였으며, 팽창된 위의 내용물에서 진균인 *Candida* sp.가 분리되는 것을 확인하였다. 연어과 어류의 위팽창증후군은 일본, 노르웨이, 미국 등에서 보고된 바 있다(Hatai and Egusa, 1975; Staurnes *et al.*, 1990; Meyers *et al.*, 2008). 일본에서는 위팽창증후군의 원인이 밝혀져 있지 않으나 위팽창증후군을 보이는 개체의 위 내용물에서 *Candida sake*를 분리하였으며(Hatai and Egusa, 1975), 항진균제인 azalomycin F를 위팽창증후군을 보이는 개체(경증)에 투여하면 치료될 수 있다고 보고되어 있어(Hatai *et al.*, 1974), *Candida sake*는 위팽창증후군과 관련되어 있을 것으로 추정되었다.

본 연구에서는 팽창된 위로부터 분리한 *Candida* sp.가 위팽창증후군과 관련성이 있는지를 조사하기 위해, 해수(염분 농도 25‰와 30~32‰)로 사육 중인 무지개송어에 *Candida* sp.를 경구로 2일 간격으로 사료와 함께 42일 이상 투여한 후 위팽창 유무를 관찰하였다. 25‰의 염분 농도에서는 실험구에서

Table 1. Substrate assimilation by 2 fungi from distended stomach

Substrate	API20C AUX assimilation profile code*	
	Isolate 1	Isolate 2
Pentoses		
L-arabinose	-	-
D-xylose	-	-
Hexoses		
D-glucose	+	+
D-galactose	-	-
methyl- α D-glucopyranoside	+	+
Disaccharides		
D-cellobiose	+	+
D-lactose	-	+
D-maltose	+	+
D-saccharose	+	+
D-trehalose	+	+
Trisaccharides		
D-melezitose	+	+
D-raffinose	-	+
Alcohols		
Glycerol	-	-
Adonitol	+	+
Xylitol	-	-
Inositol	-	-
D-sorbitol	+	+
Organic acids		
calcium 2-keto-gluconate	+	-
Amino acids		
N-acetyl-glucosamine	+	+
Identification	<i>Candida iusitaniae</i>	<i>Candida spherica</i>
Predictive value	99.8%, very good	93.9%, good

*Results for 48 hours are shown.

만 1마리가 폐사되었다(data not shown). 폐사어와 생존어 모두 복부 팽만과 위 팽창 증상은 관찰되지 않았다(data not shown). 30~32%의 염분 농도에서는 실험구와 대조구 모두 폐사되는 개체는 관찰되지 않았으며, 모든 개체에서 복부 팽만과 위 팽창 증상은 관찰되지 않았다(data not shown). *Candida* sp.을 경구로 투여한 후 위내로 *Candida* sp.가 유입되었는지를 확인하기 위해, 사료 투여 후 2시간 후와 1일이 경과된 시점에서 실험어를 채집하여 위 내의 진균수를 측정된 결과, $2.8 \times 10^6 \sim 2.1 \times 10^7$ CFU/g (염분 농도 25%에서 사육한 무지개송어의 위)와 $1.6 \sim 4.9 \times 10^6$ CFU/g (염분 농도 30~32%에서 사육한 무지개송어의 위)의 진균이 분리되었다(data not shown). 이상의 결과, 팽창된 위 내용물에서 분리되는 *Candida* sp.는 무지개송어의 위팽창증후군의 발생과 관련성이 낮을 것으로 사료된다. 현재까지 연어과 어류에서 발생하는 위팽창증후군의 원인은 정확히 밝혀져 있지 않지만 노르웨이와 미국에서는 비감염성 질병에 의해 발생한다는 보고가 있다(Staurnes *et al.*, 1990; Rørvik *et al.*, 2000; Meyers *et al.*, 2008). Rørvik *et al.*(2000)은 삼투조절에 의한 스트레스에 의해 위팽창증후군이 발생한다고 실험적으로 증명하였다. Meyers *et al.*(2008)은 잠재적인 원

인이 삼투조절의 실패, 수온과 스트레스의 증가, 사료의 과잉 투여에 의한 영양 과다로 보고하고 있다. 본 연구에서는 위팽창증후군의 발생 원인을 규명하지 못하였으나, 병어로부터 진균 이외의 특이적인 병원체가 분리되지 않으며, 위 내용물에서 분리된 *Candida* sp.는 감염 실험을 통하여 위팽창증후군과 관련성이 낮은 것으로 확인되어, 무지개송어에서 발생한 위팽창증후군은 환경적 요인 등의 비감염성 원인에 의해 발생한 것으로 사료된다. 본 연구에서는 국내에서 처음으로 해수 사육 무지개송어에서 위팽창증후군이 발생하는 것을 확인하였다.

요 약

본 연구에서는 2014년 제주도에 위치한 양식장에서 해수로 사육 중인 무지개송어에서 만성질환으로 인해 약 10%의 누적 폐사가 발생하였다. 병어는 복부가 팽만되어 있었고 위가 심하게 팽창되어 있었다. 질병 검사 결과, 기생충, 세균, 바이러스는 검출되지 않았으나 팽창된 위에서 다수의 *Candida* sp.가 분리되었다. *Candida* sp.를 사용하여 감염 실험을 실시한 결과, 대부분 개체에서 폐사가 발생하지 않았고 위 팽창 증상이 관찰되지 않아 *Candida* sp.는 본 질병의 원인 병원체가 아닌 것으로 사료되었다. 본 연구에서는 국내에서 처음으로 해수 사육 무지개송어에서 위팽창증후군이 발생하는 것을 확인하였다.

사 사

이 논문은 2016년 해양수산부 재원으로 한국해양과학기술진흥원의 지원을 받아 수행되었습니다(무지개 송어의 해면양식에서 감염성 질병의 발생현황 및 저감 방안 연구).

REFERENCES

- Altavilla, D., A. Bitto, F. Polito, H. Marini, L. Minutoli, V.D. Stefano, N. Irrera, G. Cattarini and F. Squadrito. 2009. Polydeoxyribonucleotide (PDRN): A safe approach to induce therapeutic angiogenesis in peripheral artery occlusive disease and in diabetic foot ulcers. *Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.*, 7: 313-321.
- Chung, K.I., H.K. Kim, W.S. Kim and T.H. Bae. 2013. The effects of polydeoxyribonucleotide on the survival of random pattern skin flaps in rats. *Arch. Plast. Surg.*, 40: 181-186.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2015. Cultured aquatic species information programme *Onchorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). Fisheries and aquaculture department.

- Hatai, H., K. Nakajima and A. Nishide. 1974. Studies on the effective antifungal substance on the overinflation stomach in cultured trout species. *Fish Pathol.*, 8: 171-174.
- Hatai, K. and S. Egusa. 1975. *Candida sake* from gastro-tympanites of Amago, *Oncorhynchus rhodurus*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 41: 993.
- Kent, M.L. 1992. Diseases of seawater netpen-reared salmonid fishes in the Pacific Northwest. *Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci.* 116.
- Kim, B.G., K.D. Jeon, H.G. Kim, S.D. Ju, H.G. Park and Y.K. Choi. 2003. Fish culture (the second volume). Korea textbook, pp. 91-97. (in Korean)
- Kim, S.W., J.O. Kim, W.S. Kim, D.H. Kim and M.J. Oh. 2014. *Vibrio anguillarum* infection in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* during seawater adaption. *J. Fish Pathol.*, 27: 133-137. (in Korean)
- Kim, W.S., J.O. Kim and M.J. Oh. 2016b. Appearance of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, during seawater adaptation. *J. World Aquacult. Soc.*, 47: 352-357.
- Kim, W.S., K.H. Kong, J.O. Kim and M.J. Oh. 2016a. Amoebic gill infection in coho salmon *Oncorhynchus kisutch* farmed in Korea. *Dis. Aquat. Org.*, 121: 75-78.
- Lee, N.S. 2013. The current situation and suggestions of the mariculture of rainbow trout in Korea. *Oceans and Fisheries*, 3: 86-112. (in Korean)
- Meyers, T., T. Burton, C. Bentz and N. Starkey. 2008. Common diseases of wild and cultured fishes in Alaska. The Alaska department of fish and game. Anchorage, pp. 82-83.
- Mitchell, S.O. and H.D. Rodger. 2011. A review of infectious gill disease in marine salmonid fish. *J. Fish Dis.*, 34: 411-432.
- OIE. 2013a. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. Bacterial kidney disease.
- OIE. 2013b. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. Piscirickettsiosis.
- OIE. 2016. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. Infection with infectious salmon anaemia virus.
- Rørvik, K.A., P.O. Skjervold, S.O. Fjæra and S.H. Steien. 2000. Distended, water-filled stomach in seawater farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), provoked experimentally by osmoregulatory stress. *J. Fish Dis.*, 23: 15-18.
- Skall, H.F., N.J. Olesen and S. Møllergaard. 2005. Viral haemorrhagic septicaemia virus in marine fish and its implications for fish farming - a review. *J. Fish Dis.*, 28: 509-529.
- Squadrito, F., A. Bitto, D. Altavilla, V. Arcoraci, G.D. Caridi, M.E.D. Feo, S. Corrao, G. Pallio, C. Sterrantino, L. Minutoli, A. Saitta, M. Vaccaro and D. Cucinotta. 2014. The effect of PDRN, an adenosine receptor A_{2A} agonist, on the healing of chronic diabetic foot ulcers: results of a clinical trial. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 99: E746-E753.
- Staurnes, M., G. Andorsdottir and A. Sundby. 1990. Distended, water-filled stomach in sea-farmed rainbow trout. *Aquaculture*, 90: 333-343.
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White (eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, pp. 315-322.