

양식 조피볼락(*Sebastes schlegeli*) 치어의 대량폐사 원인인 비브리오병에 관하여

박 성 우 · 김 영 길 · 최 동 립*

군산대학교 수족병리학과

*국립수산진흥원 서해수산연구소 군산분소

1995년과 1996년 충남의 조피볼락 종묘생산장에서 발생한 대량폐사의 원인을 조사하였다. 병어로부터 분리된 원인균은 생화학적 및 생물학적 특성에 의해 *Vibrio ordalii*로 동정되었다. 당년생과 일년생 조피볼락에 대한 병원성 조사를 위하여 수온 18°C와 25°C에서의 감염실험을 실시한 결과 25°C의 일년생 시험어에 비해 18°C의 당년생 치어가 훨씬 높은 비율로 감염되었다. 이러한 결과는 양어장에서의 질병발생예를 포함한 현장조사 결과와 일치하고 있었다. 병어의 병리조직학적 관찰결과 아가미는 2차새변과 뇌의 모세혈관의 확장, 호흡상피의 박리, 간실질의 위축, 신장의 괴사가 관찰되었고 소화관계는 뚜렷한 병변이 없었다.

Key words : *Sebastes schlegeli*, Massive mortality, *Vibrio ordalii*, Virulence, Histopathology

비브리오병은 담수어와 해산어등 광범위한 숙주 범위를 가지는 질병으로 그 원인균의 대부분은 *Vibrio anguillarum*으로 보고되고 있다. 그러나 *V. anguillarum*과는 생화학적 성상이 다른 *Vibrio*균이 연어과 어류의 병어에서 분리되어져 *Vibrio* sp. RT group(大西와 室賀, 1976)과 *Vibrio* sp. 1669(Harrell et al., 1976)로 보고되어 분류상의 위치가 분명하지 않았으나 Schiewe 등(1977)은 *Vibrio anguillarum* biotype 2로 분류하여 *Vibrio anguillarum* biotype 1과 구분하여야만 한다고 주장하였지만, Schiewe 등(1981)은 이들 균주의 성상을 조사하여 *V. anguillarum*과는 생화학적, 혈청학적 및 유전학적으로 명백한 차이가 있기 때문에 *Vibrio ordalii*라는 새로운 종명을 부여하여야 한다고 제안하였다.

*V. ordalii*는 냉수성 어종인 연어과 어류와 온수성 어류인 은어 뿐만 아니라(室賀 등, 1986), 온수성 해산어인 조피볼락에서도 이 균에 의한 감염증이 보고된 바 있다(室賀 등, 1986; 文谷 등, 1987).

근년에 들어 우리나라에서도 조피볼락의 종묘생산기술이 발달하여 육상종묘생산장 수조에서 치어를 생산하여 일정크기까지 성장시킨 후 가두리로 옮겨 출하기까지 양식하고 있는데, 종묘사육중 또는 가두리로 옮긴 직후에 대량폐사가 일어나고 있지만, 그 원인에 관해서는 현재까지 보고된 바 없다.

저자들은 충남지역의 조피볼락 종묘생산장에서 사육중에 대량폐사를 유발시킨 유행성 감염증의 원인을 조사한 결과 원인균이 *V. ordalii*임을 밝혀 내어, 원인균의 생화학적 및 생물학적 성상과 병리조직상에 대하여 보고한다.

재료 및 방법

원인균의 분리

1995년 5월 충남 태안지역 종묘생산장과 1996년 6월 보령지역 종묘생산장의 육상수조에서 사육중인

평균체장이 각각 1.8 cm(1.5~2.8 cm)와 3.1 cm(2.8~3.4 cm)의 병든 조피볼락 치어의 외부 증상을 관찰한 후 병어의 신장, 비장, 간장, 뇌 및 혈액을 무균적으로 분리하여 일부를 Brain heart infusion agar (BHIA)에 도말한 후 25°C에서 48시간 배양하여 세균을 분리하였다. 또 병어의 뇌를 슬라이드글라스에 도말하여 그람염색을 한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

분리균의 특성

태안지역의 병어에서 분리한 7개 균주, 보령지역에서 분리한 4개 균주와 대조균으로 *V. ordalii* 표준균주 (ATCC 33509) 및 일본양식연구소에서 분양받은 *V. anguillarum* (A-10, 방어유래)를 성장실험에 사용하였다.

분리균의 성장검사는 식염 2% 첨가 BHIA배지에 25°C, 48시간 배양균을 사용하여 상법에 따라 실시하였다. 발육에 미치는 식염농도의 영향을 조사하기 위하여 1% 펩톤수를 기초배지로 하여 식염 농도가 0%, 0.5%, 1.5%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6% 및 7% 되게 첨가한 후, 식염 2% 첨가 BHIA배지에서 전배양한 세균을 각각의 식염 첨가 펩톤수에 접종하였다. 25°C에서 48시간 배양한 후 탁도를 측정하여 세균의 발육 유무를 조사하였다. 또 2% 식염 첨가 BHIA배지로 37°C와 42°C에서 48시간 배양하여 세균의 발육 유무를 조사하였다. 한편 시판배지에서의 발육 유무 조사를 위해 Nutrient agar(NA), Tryptic soy agar(TSA), Heart infusion agar(HIA) 및 BHIA에 식염의 최종농도가 0.5%와 2%가 되도록 첨가한 평판배지와 Thiosulfate-citrate-bile-sucrose agar(TCBS)에 접종한 다음 25°C에 24시간과 48시간 배양한 후 자라난 집락의 직경을 칼리퍼로 측정하였다.

병원성

태안 유래의 95-5균주를 2% 식염 첨가 BHIA

배지에 25°C에서 24시간 배양한 다음 자라난 균체를 멸균생리식염수에 부유시켜 10ℓ의 해수가 들어 있는 유리수조에 첨가하여 균의 농도가 2×10^8 cfu/ml, 2×10^8 cfu/ml, 2×10^7 cfu/ml, 2×10^6 cfu/ml 및 2×10^5 cfu/ml가 되도록 현탁시킨 후 조피볼락을 30분간 침지하였다. 또 같은 농도로 멸균생리식염수에 현탁시킨 균액 0.1ml를 등지느러미 밑의 근육에 주사하였다. 실험에 사용한 조피볼락은 체장 3.0 cm(2.5~3.5 cm)의 당년생과 체장 10.7 cm(9.5~11.2 cm)인 1년생 각각 20마리였으며, 수온은 18°C와 25°C의 두 수온에서 실시하였다. 침지 또는 근육주사한 어류는 직경 1.4 m의 20ℓ FRP수조에 유수식으로 10일간 사육하면서 폐사율을 구하였다.

병리조직학적 검사

병어를 10% 증성 포르말린에 고정한 후 Ransom 등(1984)의 방법에 따라 70% 에탄올에 염산을 3% 되도록 첨가한 탈회액에 48시간 방치한 다음 70% 에탄올로 세정한 후, 상법에 따라 파라핀에 포매한 후 마이크로톰으로 4μm의 조직절편을 만들어 H-E염색과 Giemsa염색을 하여 광학현미경으로 병리조직학적 변화를 관찰하였다.

결과 및 고찰

발병의 개요

질병이 발생된 종묘생산장들은 만조시 수위차를 이용하여 해수를 침전조로 유입시켜 며칠간 방치한 후 부유물을 침전시킨 다음 펌핑하여 사육수조에 공급하는 유수식 육상사육시설로서, 태안지역의 종묘배양장은 *Artemia*유생과 배합사료를, 보령지역의 종묘배양장은 배합사료를 조피볼락 치어의 먹이로 사용하고 있었으며, 수온은 각각 19.2°C와 21°C였다. 병어는 수면 가까이를 힘없이 유평하면서 수류에 떠밀려 수조의 중앙에 위치한 배수구 부근에 모이며,

Plates

1. Gram negative bacteria imprinted from brain of diseased fish. Gram stain, $\times 1000$.
2. The gill shows severe edema and the lamellar epithelium is separated from the basement membrane by bacterial invasion in the lamellar capillaries. Giemsa stain, $\times 200$.
3. Bacteria multiply in the blood vessel of brain. Giemsa stain, $\times 200$.
4. Bacteria extensively multiply causing congestion in the blood vessel under the eyes. Giemsa stain, $\times 200$.
5. Disseminated bacteria forms embolus in the sinusoids of the liver. Giemsa stain, $\times 200$.
6. The parenchymal cells are atrophied accompanied by sinusoidal dilatation. H-E stain, $\times 200$.
7. Bacteria invade in the hematopoietic tissue causing necrosis and hemorrhage. Cloudy swelling occurs in the tubular epithelia. Giemsa stain, $\times 200$.
8. Sheathed artery is necrotized by bacterial invasion and hemorrhage is occurred in the pulp. H-E stain, $\times 100$.

Table 3. Growth of the present isolates, *V. ordalii* (ATCC 33509), and *V. anguillarum* (A-10) on various agar media supplemented with NaCl at 25°C

Medium*	1 day			2 days		
	Present isolates	<i>V. ordalii</i>	<i>V. anguillarum</i>	Present isolates	<i>V. ordalii</i>	<i>V. anguillarum</i>
0.5% NaCl						
NA	-	-	+W	+W	+W	+
TSA	+W	+W	+	+	+	++
HIA	+W	+W	++	++	++	++
BHIA	+	+W	++	++	++	+++
2% NaCl						
NA	+W	+W	+	+	+	++
TSA	+W	+W	++	+	+	++
HIA	+W	+W	++	++	++	+++
BHIA	+W	+W	++	++	++	+++
TCBS	-	-	+	-	-	++

*NA : Nutrient agar, TSA : Tryptic soy agar, HIA : Heart infusion agar, BHIA : Brain heart infusion agar, .Colony size in diameter(mm) : - : No growth, +w : <0.5, + : 0.5~1, ++ : 1~2, +++ : >2

또 시판배지에서의 발육은 Table 3과 같이 분리균과 *V. ordalii* (ATCC 33509)는 NA와 TSA에서의 발육은 미약하였으며, 2% 식염첨가 HIA와 BHIA는 잘 발육하였고, TCBS에서는 48시간 배양 후에도 발육되지 않아 *V. anguillarum*과 발육상태가 차이가 났다.

大西와 室賀 (1976)는 *V. ordalii*인 *Vibrio*. sp. RT군의 성장중에서 *V. anguillarum*과 가장 현저한 차이를 나타내는 것은 보통 시판의 배지에서 발육이 느리며, 알기닌 분해, 인돌 생성 및 mannose의 이용이 음성인 점이라고 하였다. 또 室賀 등 (1986)이 은어와 조피볼락에서 분리한 *V. ordalii*의 성장도 생화학적 성장에서는 무지개송어 유래주와 일치하지만, 당분해능에서 무지개송어 유래주는 galactose를 분해하고 salicin, cellobiose 및 dextrin은 분해하지 못한 반면, 조피볼락 유래주는 galactose, cellobiose 및 dextrin은 분해하지 못하지만, salicin은 분해하며, 은어 유래주는 galactose를 분해하지 못

하는 것은 무지개송어 유래주와 같지만, cellobiose, dextrin 및 salicin을 모두 분해하고 있어 유래 균주에 따라서 약간의 차이를 보이고 있다.

또 식염 의존성은 본 분리균과 大西와 室賀 (1976)와 室賀 등(1986)의 결과와 같이 발육가능 식염 농도는 0.5~5%로 일치하고 있다. 한편 Schiewe 등(1981)은 *V. ordalii*는 당과 같은 기질을 분해할 수 있는 효소가 결여되어 있기 때문에 TSA에 배양했을 때 발육이 매우 느려 4~6일 후에도 집락의 직경이 1~2 mm에 불과하다고 하였으며, 室賀 등 (1986)도 식염 2% 첨가 HIA와 BHIA에서는 잘 자라지만, 0.5% 식염 첨가 NA와 TCBS에서는 2일간 배양후에도 집락이 형성되지 않는다고 하였다. 따라서 분리균은 생화학적 성장, 배지에서의 발육성, 발육가능 온도와 식염에 근거하여 *V. ordalii*로 동정하였다.

당년산 치어의 침지와 주사에 의한 폐사율은 Table 3에 나타낸 것처럼 침지에 의한 경우 수는 18°C에

Table 4. Pathogenicity of the 95-5 strain against no summer rockfish* by immersion or intramuscular injection

Dose (CFU/Tank or Fish)	Mortality(%)			
	Immersion		Injection	
	18°C	25°C	18°C	25°C
2×10 ⁸	65	0	100	100
2×10 ⁷	55	0	100	100
2×10 ⁶	5	0	100	100
2×10 ⁵	0	0	100	85
2×10 ⁴	0	0	35	30
Control	0	0	0	0

*Twenty fish, ranged from 2.5 cm to 3.5 cm in body length, was used in each group. After bacterial treatment fish were held in flow-through tanks and the mortalities were monitored for 10 days.

Table 5. Pathogenicity of the present isolated strain 95-5 against 1-summer rockfish* by immersion or intramuscular injection

Dose (CFU/Tank or Fish)	Mortality(%)			
	Immersion		Injection	
	18°C	25°C	18°C	25°C
2×10 ⁸	45	0	100	45
2×10 ⁷	5	0	100	10
2×10 ⁶	0	0	100	0
2×10 ⁵	0	0	100	0
2×10 ⁴	0	0	35	0
Control	0	0	0	0

*Fish were ranged 9.5 cm to 11.2 cm in body length. Other conditions were the same in Table 4.

서는 2×10⁸cfu/ml과 2×10⁷cfu/ml에서 각각 65%와 45% 폐사하였지만 25°C에서는 전혀 폐사하지 않았다. 복강주사에 의한 경우 수온 18°C에서는 2×10⁸cfu/ml에서 2×10⁶cfu/ml까지 모두가 폐사하였고, 2×10⁴cfu/ml은 35%가 폐사하였다. 수온 25°C에서는 2×10⁸

cfu/ml과 2×10⁷cfu/ml에서는 모두 폐사하였고, 2×10⁶cfu/ml과 2×10⁵cfu/ml에서 85%와 35%가 폐사하였다. 또 종묘생산후 1년간 사육한 조피볼락에 대한 결과는 Table 4에 나타났다. 침지에 의한 경우 수온의 고저에 불분하고 당년산과 비슷한 결과로 나타났으며, 주사에 의한 경우 수온 18°C에서는 폐사율이 당년산과 동일하였다. 그러나 25°C에서는 접종균이 고농도인 2×10⁸cfu/ml과 2×10⁷cfu/ml에서만 각각 45%와 10%가 폐사하여 당년산의 경우에 비해 폐사율이 낮아 수온이 낮을수록 어체크기가 작을수록 본균에 대한 감수성이 높게 나타났다. 이러한 결과는 양어장에서의 질병발생예를 포함한 현장조사결과와 일치하고 있었다(미발표). 이 결과는 본균에 의한 감염증이 주로 치어기에 한정되어 발병하는 점과 발병기의 수온이 18~20°C(室賀 등, 1986)인 것으로 미루어 치어가 어느 정도 성장하게 되면 본균에 대한 감수성이 저하되거나 또는 발병과 밀접한 관계가 있는 외독소(Moustafa *et al.*, 1985)의 생성이 고수온 사육에 따라 독성에 어떠한 영향을 미쳤다고 생각할 수도 있다. 또 1년어는 거의 종묘기에 본병의 감염에 의한 면역획득에 의해 당년산에 비해 폐사율이 낮을 가능성도 있다고 생각되기 때문에 종묘기에 면역처리에 관한 검토가 필요하다고 생각된다. 한편 본균을 계속 계대배양한 다음 고농도의 균액을 근육접종하여도 외부증상만 발현할 뿐 폐사는 일어나지 않았는데 이는 Schiwe 등(1981)이 지적한 바와 같이 본균이 병어에서만 분리되는 숙주의존성이 강한 균으로, 분리후의 생리기능의 감소에 따른 병원성의 저하때문일 가능성도 추정할 수 있으나 계대배양에 의한 병원성변화에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

병리조직학적 관찰결과 병어의 아가미는 2차 세번의 모세혈관내에 세균이 증식하여 모세혈관이 확장되고, 호흡상피는 심한 부종을 일으켜 기저막에서 박리되어 있었다(Plate 2). 세균은 뇌에도 침입하여 모세혈관내에 증식하여 모세혈관이 확장되어 있었으며(Plate 3), 간에는 동양혈관내에 원인균이 증식하여 확장되고 간실질 세포는 위축을 일으켜 괴사가

관찰되었다(Plate 4). 신장은 세노관 상피세포에 세균이 증식되어 혼탁중창을 일으키고 있었으며, 간 질내에도 수많은 세균이 증식함에 따라 출혈을 동반한 피사가 관찰되었다(Plate 5, 6). 비장은 미세포가 약간 감소되어 있었지만 소화관계에는 뚜렷한 병변은 관찰할 수 없었는데 이러한 결과는 文谷 등(1987)이 보고한 조피볼락의 병리상과 일치하고 있다. 따라서 조피볼락의 경우에도 뚜렷한 외부증상이 없이 급성 패혈증을 유발하기 때문에 대량폐사를 유발하는 것으로 추정되어진다.

끝으로 분리균은 tetracycline, norfloxacin 및 ciprofloxacin에 높은 감수성을 나타냄으로 (미발표) 본 병의 치료에는 이들 약제의 투여나 수온을 22°C 이상으로 상승시키면 폐사율을 줄일 수 있었음을 천연한다.

감사의 말씀

이 연구는 1995년도 농림수산부에서 시행한 농림수산특정연구사업의 연구비 지원으로 수행되었습니다.

참 고 문 헌

- 文谷 俊雄, 星台愿 一, 畑井喜司雄 玉井登, 窪田三郎: 크로노이稚魚의 *Vibrio ordalii* 感染による斃死例とその病理. 魚病研究, 22 : 113-114, 1987.
- Harrell, L. W., Novotny, A. J., Schiewe, M. H. and Hodgins, H. O. : Isolation and description of two vibrios pathogenic to pacific salmon in Puget Sound, Washington. Fish. Bull., 74 : 447-449, 1976.
- Moustafa, M., Kodama, H., Mikami, T. and Izawa, H. : Toxic substance in culture infiltrate of *Vibrio* sp. strain N7802, a poor producer of hemolysin and protease. Fish Pathol., 20 : 181-186, 1985.
- 室賀 清邦, 城 泰彦, 増村 和彦: アユおよびクロソイ病魚から分離された *Vibrio ordalii*. 魚病研究, 21 : 239-243, 1986.
- 大西 圭二, 室賀 清邦: 養殖ニジマスのビブリオ病の一原因菌の生化学的 性状. 魚病研究, 11 : 159-165, 1976.
- Ransom, D. R., Lannam, C. N., Rohovec, J. S., and Fryer, J. L. : Comparison of histopathology caused *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii* in the species of pacific salmon. J. Fish Dis., 7 : 107-115, 1984.
- Schiewe, M. H., Crosssa, J. H. and Ordal, E. J. : Deoxyribonucleic acid relationship among marine vibriosis pathogenic to fish. Can. J. Microbiol., 23 : 954-958, 1977.
- Schiewe, M. H., Trust, T. J. and Crosa, J. H. : *Vibrio ordalii* sp. nov. : a causative agent vibriosis in fish. Cur. Microbiol., 6 : 343-348, 1981.

***Vibrio ordalii*, the causative agent of massive mortality in cultured rockfish(*Sebastes schlegeli*) larvae**

Sung-Woo Park, Young-Gill Kim and Dong Lim Choi*

Department of Fish Pathology, Kunsan National University, Kunsan 573-400,

**Kunsan Laboratory, West Sea Fisheries Research Institute, NFRDA,*

Kunsan 573-030, Korea

A specific disease syndrome, which led to massive mortality on larve of rockfish(*Sebastes schlegeli*) in marine hatcheries at Chungnam area during the period 1995~1996 was studied. The causative agent isolated from the diseased or dead larvae was identified as *Vibrio ordalii* on the basis of biochemical and biological characteristics. In the experimental challenges aganist 0 and 1 summer fish conducted at two different temperatures as 18°C and 25°C, *Vibrio ordalii* showed higher virulence to no summer fish at 18°C than 1-summer fish at 25°C. These results were consistent to field data obtained during epizootic outbreaks in the farms. Moribund and died larvae presented telangiectasis of secondary gill lamella and brain, dissecting of respiratory epithelium, atrophy of hepatic cells and necrosis of kidney associated with the presence of the bacteria. But the digestive tissue of these fish showed no significant change.

Key words : *Sebastes schlegeli*, Massive mortality, *Vibrio ordalii*, Virulence, Histopathology