한국어병학회지 제34권 제1호 (2021)
J. Fish Pathol., 34(1) : 105~110

www.ksfp.org
pISSN 1226-0819, eISSN 2233-5412
http://dx.doi.org/10.7847/jfp.2021.34.1.105

단 보

볼락(*Sebastes inermis*)에서 분리된 비브리오속 세균의 동정

남우화 · 박재린 · 표지혜 · 김정호†

강릉원주대학교 해양자원육성학과

Identification of *Vibrio* species isolated from dark-banded rockfish (*Sebastes inermis*)

U-Hwa Nam, Jae-Rin Park, Ji-Hye Pyo and Jeong-Ho Kim†

Department of Marine Bioscience, Gangneung-Wonju National University, Gangneung 25457, Korea

We experienced mortality of dark-banded rockfish (*Sebastes inermis*) maintained in the rearing facility located in Gangneung, after transportation. Moribund fish showed various symptoms such as exophthalmia, skin ulcers, tail rots, gill rots, discoloration of liver with petechiae, yellowish fluid in intestines and ascites. Two different colonies were dominantly appeared after spreading the lesions on the agar plates and incubation. One isolate (SI_1) showed swarming movement on TSA, and formed yellow colonies on TCBS agar. The other (SI_2) showed no swarming motility and green colonies on TCBS agar. Both of them were Gram-negative. All of these results are similar with those of Genus *Vibrio*. They were identified as *V. harveyi* and *V. gigantis* by PCR with subsequent sequencing of 3 different genes (16 rDNA, *rec*A, *rpo*A). *V. harveyi* is well-known as a serious pathogen of marine fish and invertebrates, while *V. gigantis* is known to be often isolated from marine invertebrates, but the pathogenicity is still unknown. We suspect *V. harveyi* as the cause of the mortality of dark-banded rockfish, but challenge experiments with these 2 *Vibrio* species are thought to be necessary to make a clear conclusion.

Key words: *Sebastes inermis, Vibrio harveyi, Vibrio gigantis*, dark-banded rockfish

볼락(*Sebastes inermis*)은 쏨뱅이목 (Order Scorpaeniformes) 볼락과 (Family Sebastidae) 볼락속 (Genus *Sebastes*) 에 속하는 난태생 어류이며 일본 북해도 연안에서부터 우리나라의 동해안과 제주도 연안을 포함한 해역에 서식한다 (Masuda et al., 1984). 볼락은 해조가 무성한 연안 암반 해역에서 무리지어 서식하는 연안 정착성 어종으로 우리나라 남해안 연안에서는 연중 채집이 가능하다. 또한, 볼락은 양식 대상 어종으로 경제성이 높으며, 연안 자원조성용 어종으로도 주목받고 있다(Choi et al., 2005; Gwak and Park, 2006).

우리나라에서는 2000년대 초반 볼락의 종묘 생산 기술이 보급되면서 연안해역의 자원 조성을 위해 방류용으로 종묘가 생산되고 있으며, 남해안 연안의 소규모 가두리 양식 시설에서 양식되고 있다 (Oh and Noh, 2006; Kim et al., 2007). 볼락의 종묘 생산 및 양식 과정에서 볼락의 생물학적 특성 및 생리학적 특성 등에 관해서는 연구정보가 비교적 축적되어 있으나 (Gwak and Park, 2006), 양식 과정

†Corresponding author: Jeong-Ho Kim
Tel: +82-33-640-2851 , Fax: +82-33-640-2340
E-mail: jhkim70@gwnu.ac.kr

에서 발생하여 폐사의 원인이 될 수 있는 감염성 질병에 관한 연구는 거의 수행되어 있지 않다. 볼락과 함께 동일한 볼락 속 (Genus *Sebastes*)에 포함되며 우리나라에서 대규모로 양식하고 있는 조피볼락(*Sebastes schlegeli*)의 경우, 연쇄구균증, 비브리오증 등 여러 세균성 질병에 의한 피해가 보고되어 있다 (Choi et al., 2010). 볼락의 경우, 경상남도 양식산 어류의 병원체 모니터링 조사에서 *Vibrio harveyi*, *Vibrio* spp.의 존재가 확인된 바 있다 (Kang and Cha, 2019). 본 연구에서는 양식산 볼락을 사육하는 과정에서 체표의 궤양을 나타내며 지속적으로 폐사하는 개체들이 출현하여 세균 감염을 의심, 세균 분리를 시도하였으며, 분리된 균주를 종 수준까지 명확히 동정하여 볼락의 질병 관리를 위한 자료를 제공하고자 하였다.

2020년 8월 27일 통영에서 양식산 볼락 50마리 (평균 체장 17.6 cm, 평균 체중 89.7 g)를 채집하여, 강릉원주대학교 해양과학교육원의 사육시설로 운반하였다. 채집한 시료는 두 개의 FRP 원형 수조에 각각 25마리씩 분리 수용하였으며 사육 수온은 20 ℃ 내외로 유지되었다. 사육 6일 차 이후 지속적인 폐사가 발생하였으며, 폐사 혹은 빈사 상태의 개체에서 공통적으로 꼬리지느러미의 충혈, 부식, 아가미 및 체표의 부식, 궤양, 안구 돌출 등의 외관 증상이 관찰되었다 (Fig. 1A, B). 또한, 해부 소견으로서 간장의 퇴색, 점상 출혈, 소화관의 황색 점액 및 복수 등이 확인되었다 (Fig. 1C). 이상의 증상을 나타내는 빈사 상태의 볼락을 총 11마리 채집하여 즉시 실험실로 운반, 세균 분리에 사용하였다. 또한, 공시어의 해당 병변은 현미경 관찰을 통해 기생충 감염 여부를 확인하였으며, 세균 분리에 사용한 장기의 일부는 Viral Hemorrhagic Septicemia Virus (VHSV) 및 Marine Birnavirus (MBV) 검출용 PCR 시료로도 사용하였다.

공시어는 과량의 마취제 (2-phenoxyethanol, Sigma, USA)를 투여하여 안락사를 유도한 다음 방혈, 개복하여 비장과 신장을 노출시킨 후, 멸균된 백금이를 깊숙이 찔러 1.5% NaCl을 첨가한 TSA (Trypticase soybean agar, Difco, USA)배지 및 TCBS (Thiosulfate citrate bile salts sucrose, Difco, USA)에 각각 도말하였다. 복수가 형성된 개체는 복수 10 μl를 멸균된 PBS 90 μl에 희석하여 세균 분리에 사용하였다. 도말한 배지는 20℃에서 24~48시간 배양한 다음 배지에 형성된 집락들 중에서 육안으로 관찰하여 가장 우점하고 있는 집락을 선택하여 계대 배양하였다.

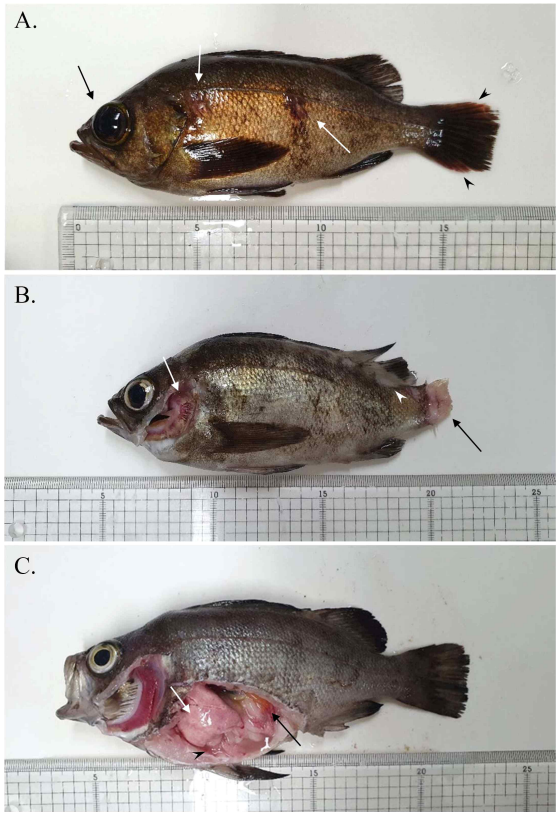

Fig. 1. Moribund dark-banded rockfish showing clinical signs. A. Exophthalmia (black arrow), skin ulcers (white arrows) and tail hyperemia (black arrowheads); B. gill rot (white arrow), excessive mucus (white arrowhead) and tail rot (black arrow); C. discoloration of liver (white arrow), yellowish fluids in intestines (black arrow) and ascites (black arrowhead).

TCBS 배지에 생성된 집락 중 가장 우점하는 두 종류의 집락을 선택하여 생화학적 테스트를 진행하였다. 그람염색을 통해 각각의 집락을 형성한 균주의 형태를 관찰한 후, 장내세균 및 그람음성 간균의 동정에 사용되는 API 20E test (Biomerieux, France) 와 oxidase test를 실시하였다. 또한, TSB (Trypticase soybean broth, Difco, USA) 배지에 균주

를 배양하여 염분 농도별 (0.5, 3, 6, 8, 10% NaCl) 및 온도 조건별 (4, 10, 22, 25, 30℃) 성장 여부를 확인하였으며, 이상의 결과를 이미 알려진 *Vibrio* 속 세균의 특성과 비교하였다.

상기의 2개 균주를 각각 1.5% NaCl이 첨가된 TSB 배지에 20℃, 18시간 배양하였다. TSB 배지에 배양된 균주를 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 제거하고 세균 pellet을 취하였다. 세균 pellet은 microtube에 옮겨 멸균된 PBS로 2-3차례 washing한 후, 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하고 상층액을 제거하여 QIAamp DNA mini kit (QIAGEN, France) 매뉴얼에 따라 핵산을 추출하였다.

세균의 종 동정을 위해 16S rDNA 및 *rec*A (DNA recombination and repair protein) gene과 *rpo*A (RNA polymerase, alpha subunit) gene을 target으로 PCR을 실시하였다. 세균의 종 동정에 사용한 primer set의 정보 및 PCR 조건은 Table 1에 나타내었다. 증폭된 PCR산물은 1.5% agarose gel을 사용해 전기영동을 한 후, UV transilluminator상에서 target band를 확인하였다. 생성된 band는 잘라내어 gel purification kit(bioneer, korea)를 이용하여 정제한 다음, sequencing을 실시하였다. 분리된 균주의 염기서열은 GeneBank에 등재되어 있는 다른 *Vibrio* 속 세균의 염기서열과 함께 MEGA 7.0을 사용하여 계통수 제작 및 균주들간의 상동성을 조사하였다.

빈사 개체의 비장, 신장 및 복수를 TSA배지 (NaCl 1.5% 첨가)에 도말, 배양한 결과, 모든 시료에서 공통적으로 swarming movement를 보이는 집락(SI_1)과 크림색의 원형 집락 (SI_2)이 압도적으로 우점하였다 (Fig. 2A, B). 이들 집락은 TCBS 배지에서 노란색의 단일 집락(SI_1)과 초록색의 단일 집락 (SI_2)을 각각 형성하였다 (Fig. 2C, D). 이들 두 분리균주는 모두 그람 음성이었으며, 해당 병변으로부터 기생충과 VHSV, MBV는 검출되지 않았다.

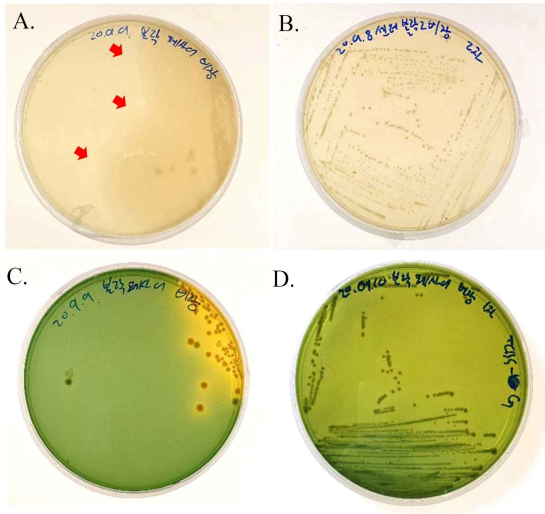

Fig. 2. Culture characteristics of *Vibrio* isolates, SI_1 and SI_2 originating from dark-banded rockfish. A. SI_1 isolate on TSA (1.5% NaCl); B. SI_2 isolate on TSA (1.5% NaCl); C. SI-1 isolate on TCBS medium; D. SI_2 isolate on TCBS. The arrows indicate swarming movements.

분리균주 SI_1은 3~10%의 염분조건 및 20~35℃의 온도 조건에서 성장하였다. 또한, LDC, ODC, CIT, IND, MAN 등의 test에서 양성 반응을 보여 *V. harveyi*나 *V. alginolyticus*와 가장 유사하게 나타났다. 반면, 분리균주 SI_2는 3%와 6%의 염분조건에서 성장하였으며, CIT, IND, MAN 등의 test에서 음성반응을 보여 *V. gigantis*와 가장 유사하였다 (Table 2).

Table 1. Oligonucleotide primers used for PCR identification of isolated bacteria

Target gene	Primer	Sequence(5′-3′)	PCR condition	Size (bp)	References
16S rDNA	20F 1500R	AGAGTTTGATCATGGCTCAG GGTTACCTTGTTACGACTT	95℃(30sec)-51℃(1min) -72℃(2min), 30 cycles	1,481	Weisburg et al., 1991
*rec*A	recA-01F recA-02R	TGARAARCARTTYGGTAAAGG TCRCCNTTRTAGCTRTACC	95℃(30sec)-52℃(1min) -72℃(1min), 35 cycles	819	Thompson et al., 2005
*rpo*A	rpoA-03F rpoA-03R	ATGCAGGGTTCTGTDACAG GHGGCCARTTTTCHARRCGC		951	

Table 2. Differential biochemical and physiological characteristics of *Vibrio* species isolated in this study (SI_1, 2) and other *Vibrio* species. Data of other *Vibrio* species were adopted from Noguerola and Blanch (2008).

1, *V. harveyi*; 2,*V. gigantis*; 3, *V. anguillarum*; 4, *V. alginolyticus*; 5,*V. cholerae*; 6, *V. ichthyoenteri*; 7, *V. ordalii;* 8, *V. salmonicida*; 9,*V. splendidus*; 10, *V. vulnificus.* +, ≥ 75% of strain positive; –, < 25% of strain negative; V, Variable; ND, Not Detected.

	SI_1	SI_2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Growth in NaCl												
0.5%	-	-	-	-	v	-	+	-	-	-	-	-
3%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	v	v	+
6%	+	+	+	+	v	+	-	+	+	-	v	+
8%	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	v	-
10%	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Growth at												
4℃	-	-	+	ND	v	v	-	-	v	+	v	-
20℃	+	+	+	ND	+	+	+	+	+	+	+	+
30℃	+	+	+	ND	+	+	+	+	-	-	+	+
35℃	+	-	+	ND	+	+	+	-	-	-	v	+
40℃	-	-	v	ND	-	+	+	-	-	-	-	+
API 20E												
ONPG	-	-	v	-	+	-	+	-	-	-	+	+
ADH	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
LDC	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+
ODC	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+
CIT	+	-	v	-	+	+	v	-	+	-	v	+
H_2S	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
URE	-	-	v	-	-	-	-	v	-	-	-	-
TDA	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
IND	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
VP	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
GEL	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+
GLU	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MAN	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
INO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SOR	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
RHA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SAC	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-
MEL	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
AMY	+	-	-	+	-	-	-	v	-	ND	-	+
ARA	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
OX	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

ONPG, b-galactosidase; ADH, arginine dihydrolase; LDC, lysine decarboxylase; ODC, ornithine decarboxylase; CIT, citrate utilization; URE, urease; TDA, tryptophane deaminase; IND, indole production; VP, Voges–Proskauer; GEL, gelatinase; GLU, glucose; MAN, mannitol; INO, inositol; SOR, sobitol; RHA, rhamnose; SAC, saccharose; MEL, melibiose; AMY, amygdalin; ARA, arabinose; OX, cytochrome oxidase.

이들 두 균주의 16S rDNA 및 *rec*A, *rpo*A gene을 타겟으로 한 PCR에서 각각 ~1600bp, 819bp, 951bp 위치에 band가 형성되었다 (Fig. 3). 이 band로부터 확보한 염기서열은 계통수를 작성하여 분석한 결과, 16S rDNA 유전자의 경우, SI_1은 *V. harveyi*와 clustering되었으며 SI_2는 *V. gigantis*와 clustering 되었다 (Fig. 4). *rec*A, *rpo*A 유전자도 동일하게 각각 *V. harveyi, V. gigantis*와 clustering되었다 (Data not shown). 각 gene에 대해 SI_1은 *V. harveyi*와 98.4~100%의 상동성을 보였으며, SI_2은 *V. gigantis*와 99.9~100%의 상동성을 보였다 (Data not shown). 따라서, 각각의 균주를 *Vibrio harveyi*와 *Vibrio gigantis*로 동정하였다.

*V. harveyi*는 다양한 해산 어류 및 무척추 동물에 감염하여 안구, 소화관, 체표, 근육, 꼬리 등에 병변을 형성, 폐사를 유발하는 것으로 알려져 있으며, 아시아, 남유럽, 남아메리카 등의 온대 해역에서 발생, 양식 산업에 큰 피해를 주고 있다 (Zhang et al., 2020). 우리나라에서도 넙치, 조피볼락 등에서 *V. harveyi*가 분리, 보고된 바 있으며 (Sohn et al., 2020; Won et al., 2006), 볼락에서도 *V. harveyi*가 분리된 바 있어(Kang and Cha, 2019) 본 연구에서 분리된 *V. harveyi*는 양식 현장에서 볼락에게 이미 감염되어 있는 상태로 운반되었을 가능성이 있다.

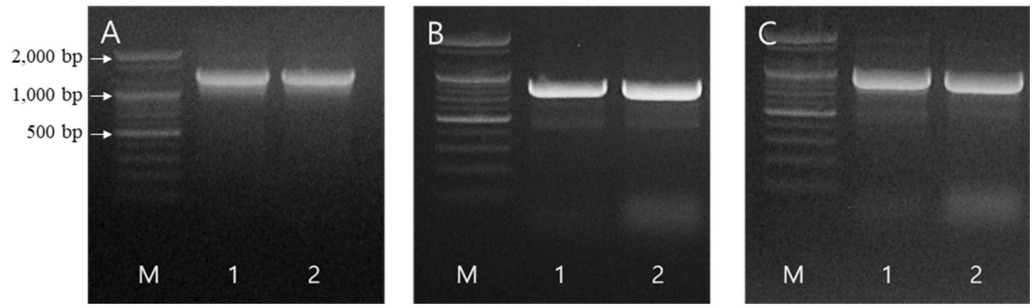

Fig. 3. PCR profiles targeting 16S rDNA gene (A), *rec*A gene (B) and *rpo*A gene (C) (M. 100bp Marker; Lane 1. SI_1 isolate; Lane 2. SI_2 isolate).

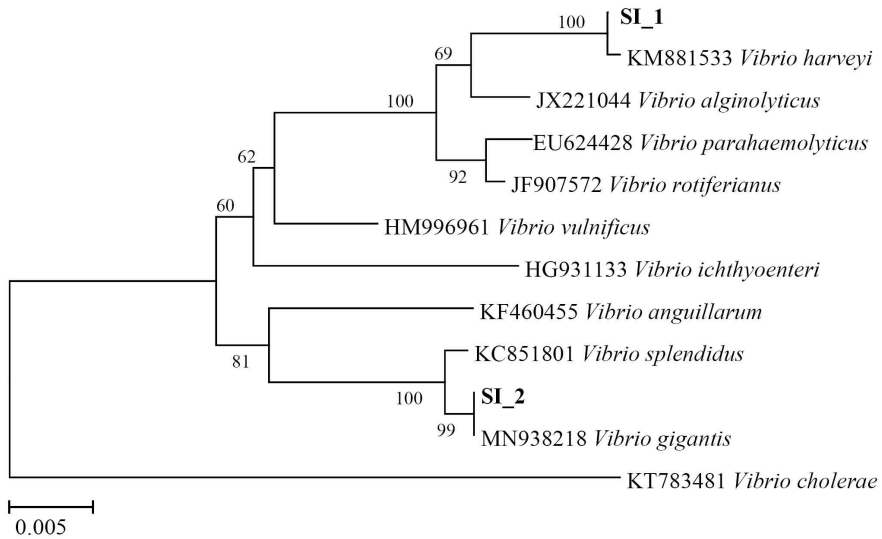

Fig. 4. Molecular phylogenetic tree showing the genetic relationships among *Vibrio* species based on 16S rRNA genes sequences, including the isolates (SI_1, SI_2) in this study. This tree was constructed based on neighbor-joining method. Numbers at nodes denote the level of bootstrap based on 1,000 replicates.

분리된 *V. harveyi*는 TSA 배지에서 한천 배지의 표면을 따라 집락이 넓게 퍼지는 swarming movement 현상을 나타내었으며, 이는 *Proteus* 속 및 *Vibrio* 속 세균 (e.g., *V. alginolyticus, V. parahaemolyticus, V. harveyi*)에서 나타나는 현상으로서 Won et al. (2007)이 *V. harveyi*에서도 이미 보고하였다. 또한, Ortigosa et al. (1994)은 *V. harveyi*는 0.5~7%의 염분 조건에서 성장 가능하며, 균주에 따라 8%에서도 성장이 가능하다고 보고하였다. 본 연구에서 분리된 *V. harveyi*는 10%의 염분 조건에서도 성장하여 다른 *V. harveyi* 분리주에 비해 염분 내성이 상대적으로 강한 것으로 생각된다. 한편, *V. gigantis*는 지중해에서 양식되는 굴에서 처음으로 보고되었으며 (Le Roux et al., 2005), 일반적으로 패류에서 분리되는 것으로 알려져 있다. 최근 Sohn et al. (2020)은 양식산 넙치에서 *V. gigantis*를 분리하였으며, 넙치에 대한 병원성 여부는 알 수 없다고 언급하였다.

본 연구에서도 *V. harveyi*와 *V. gigantis*가 우점적으로 분리되었으며, 볼락에서 관찰된 임상 증상은 *V. harveyi* 감염시 나타나는 증상과 유사하여 *V. harveyi*가 볼락의 폐사 원인일 가능성이 높은 것으로 생각되었다. 하지만 폐사의 원인을 좀더 명확하게 밝히기 위해서는 인위 감염 시험 등 추가 연구가 필요하다고 생각된다.

References

Choi H. J., Hong K. P., Oh S. Y., Noh C. H., Park Y. J., Myoung J. G., Kim J. M., Hur J. W., Zhang C. I. and Park I. S.: Growth characteristics of cultured dark-banded rockfish, *Sebastes inermis* Cuvier. J. Aquaculture, 18: 147-153, 2005.

Choi H. S., Jee B. Y., Cho M. Y. and Park M. A.: Monitoring of pathogens on the cultured Korean rockfish *Sebastes schlegeli* in the marine cages farms of south sea area from 2006 to 2008. J. Fish Pathol., 23: 27-35, 2010.

Gwak W. S. and Park D. W.: Developmental changes in digestive enzymes activity of black rockfish *Sebastes inermis*. J. Aquaculture, 19: 125-132, 2006.

Kang G. H. and Cha S. J.: Monitoring of pathogens detected in cultured fishes of Gyeongnam in 2018. Kor. J. Fish. Aquat., 52: 539-546, 2019.

Kim S. R., Kim J. H., Jung S. J. and Oh M. J.: Bacterial flora and antibiotics resistance of intestinal bacteria in the wild and cultured black rockfish *Sebastes inermis*. J. Fish Pathol., 20: 221-227, 2007.

Le Roux F., Goubet A., Thompson F. L., Faury N., Gay M., Swings J. and Saulnier D.:*Vibrio gigantis* sp. nov., isolated from haemolymph of cultured oysters (*Crassostrea gigas*). Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 55: 2251-2255, 2005.

Masuda, H., Amaoka, K., Araga, C., Uyeno, T. and Yoshino, T. The fishes of the Japanese Archipelago, Vol. 1. Tokai University Press, Tokyo, Japan, 437 p. 1984.

Noguerola I. and Blanch A.R.: Identification of *Vibrio* spp. with a set of dichotomous keys. J. Appl. Microbiol., 105: 175-185, 2008.

Oh S.Y. and Noh S.H.: Changes of water quality during the seed production period of dark-banded rockfish *Sebastes inermis* in large scale tanks. J. aquaculture. 19: 25-32, 2006.

Ortigosa, M., Garay, E and Pujalte, M. J.: Numerical taxonomy of Vibrionaceae isolated from oysters and seawater along an annual cycle. System. Appl. Microbiol., 17: 216-225, 1994.

Sohn H. C., Kim, J. G., Jin, C. N. and Lee J. H.: Identification of *Vibrio* species isolated from cultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus)* in Jeju Island, South Korea. Fish. Aquat. Sci., 22:14, 2020.

Thompson F. L., Gevers D., Thompson C. C., Dawyndt P., Naser S., Hoste B., Munn C. B. and Swings J.: Phylogeny and molecular identification of Vibrios on the basis of multilocus sequence analysis. Appl. Environ. Microbiol. 71: 5107-5115, 2005.

Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A. and Lane D.J.: 16S ribosomal DNA amplification of phylogenetic study. J. Bacteriol., 173: 697-703, 1991.

Won K.M., Choi J.H., Kim Y.C. and Park S.I.: Microbiological characteristics of *Vibrio harveyi.* J. Fish Pathol., 20: 237-247, 2007.

Won K. M., Kim S. M. and Park S. I.: Characterization of *Vibrio harveyi*, the causal agent of vibriosis in cultured marine fishes in Korea. J. Fish. Sci. Technol., 9: 123-138, 2006.

Zhang X. H., He X. X. and Austin, B.: *Vibrio harveyi*: A serious pathogen of fish and invertebrates in mariculture. Mar. Life Sci. Technol., 2: 231-245, 2020.

Manuscript Received : May 15, 2021
Revised : May 25, 2021
Accepted : May 28, 2021