

우리나라 양식 강도다리, *Platichthys stellatus*에서 분리된 *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*의 특성

조영아 · 한현자*[†] · 문희은 · 정승희* · 박명애 · 김진우*

국립수산과학원 수산생물방역과, 국립수산과학원 병리연구과*

Characterization of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* isolated from cultured starry flounder, *Platichthys stellatus* in Korea

Young Ah Cho, Hyun-Ja Han*[†], Hee Eun Mun, Sung Hee Jung*, Myoung Ae Park and Jin Woo Kim*

Aquatic life disease control division, National Fisheries Research and Development Institute (NFRDI), 152-1, Busan 619-705, South Korea,

*Pathology Division, NFRDI, 152-1, Busan 619-705, South Korea

Starry flounder, *Platichthys stellatus* (body length 4.4 ± 0.51 cm) that became sick during an outbreak of disease at mariculture facilities at Ulsan, Korea in August of 2012, were examined to identify the cause of the disease. Diseased fish didn't show a unique sign, but the oxidase-positive and gram negative rod was isolated from moribund fish. The bacterium was revealed as *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* by biochemical analysis and sequence analysis of the 16S rRNA and capsular polysaccharide (CPS) genes. The isolates (AD5) was carrying susceptible to ofloxacin and gentamycin and showed high growth value at 18°C and 25°C compared to four other *P. damsela* strains.

Key words : Starry flounder, *Platichthys stellatus*, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, 16S rRNA gene, capsular polysaccharide gene

강도다리, *Platichthys stellatus*는 가자미목 가자미과의 어류로서 일반적으로 몸길이가 30~40 cm 정도 자라며, 북태평양에 넓게 분포하는데 미국 서부 연안과 Bering해로부터 동해에 이르는 지역의 수심 80~350 m 정도의 부드러운 모래질이 분포한 해역에서 많이 잡힌다 (Orcutt, 1950; Kramer *et al.*, 1995; Cho *et al.*, 2008). 우리나라에서 강도다리는 동해 지역의 고부가가치 어종으로 최근 수요가 증가하고 있으나

자연산 채집이 거의 이루어지지 않고 있으며, 동해안의 일부 육상 수조식 넙치 양식장에서 소규모로 사육되고 있어 (Cho *et al.*, 2008), 이러한 강도다리의 자원량만으로는 증가하는 수요를 충족시키지 못하고 있다 (Lim *et al.*, 2007; Hwang *et al.*, 2012). 이를 해결하기 위해 완전 양식 기술 개발과 함께 자원회복 및 증강, 어민 소득 증대를 위해 동해 바다목장 해역에 강도다리 종묘를 방류 관리하고 있다 (Byun *et al.*, 2008; MFAFF, 2010; Hwang *et al.*, 2012). 하지만 현재까지 우리나라에서는 양식 강도다리에 대해 *Streptococcus parauberis* (Cho *et al.*, 2008) 감염증 이

[†]Corresponding author: Hyun-Ja Han,

Tel: 051-720-2483, Fax: 051-720-2498,

E-mail: hjhan77@korea.kr

외에는 세균성 질병에 관한 보고가 전무한 실정이다. 이에 본 연구에서는 2012년 8월, 우리나라 울산 소재의 강도다리 양식장에서 뚜렷한 증상없이 강도다리 폐사가 발생하여 기생충, 세균, 바이러스 검사를 수행하였으며, 내부 장기에서 균이 순수 분리되어 세균을 동정하고 해당 분리 균주의 표현형 및 유전적 특성을 분석하였다.

재료 및 방법

시험어

2012년 8월부터 울산시 울주군 소재의 육상 수조 양식장의 사육되는 강도다리 (평균체장 4.6 ± 0.51 cm)가 뚜렷한 증상 없이 보름동안 폐사를 나타내었다. 총 사육량 15만 마리 중 매일 100~300마리가 폐사하여, 15일간 누적 폐사량이 3%로 확인되었다. 외부증상을 나타내지 않는 빈사상태의 강도다리 29마리를 시험어로 사용하였다.

기생충 검사

강도다리의 아가미, 체표 및 지느러미 점액, 각 내부 장기 (뇌, 신장, 비장)를 생검 시료로 제작한 후 검정하여 기생충 감염 여부를 확인하였다.

바이러스 검사

해산어에서 주로 검출되는 바이러스인 참돔 이리도 바이러스 (Red seabream iridovirus; RSIV), 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스 (Viral hemorrhagic septicaemia virus; VHSV)를 포함하여 바이러스성 신경 괴사증 바이러스 (Viral nervous necrosis virus; VNNV), 히라메 램도 바이러스 (Hirame rhabdovirus; HRV) 및 해산 버나 바이러스 (Marine birnavirus; MBV)를 검사 대상으로 하여 polymerase chain

reaction (PCR) 법으로 검사하였다 (Table 1).

검사용 시료는 감염어를 무균적으로 해부하여 적출한 신장, 비장 및 뇌를 사용하였다. PCR을 위한 DNA는 시판되는 High pure PCR template preparation kit (Roche, Germany)를 사용하여 매뉴얼에 따라 분리하였으며, RNA는 매뉴얼에 따라 TRIZOL[®] Reagent (Invitrogen, USA)로 분리한 후, SuperScript[™] II Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. RSIV의 PCR 분석을 위해 분리된 DNA를 template로 사용하였으며, 그 외 VHSV, VNNV, HRV 및 MBV의 PCR 분석을 위해 분리된 RNA에서 합성한 cDNA를 사용하였다. PCR 분석은 ExTaq[®] (TaKaRa, Japan)을 이용하여 매뉴얼에 따랐으며, 사용된 primer set 및 PCR 조건은 Table 1에 나타내었다. 증폭된 산물은 전기영동으로 확인하였으며, 모든 PCR 분석은 양성 대조 및 음성 대조를 함께 비교하였다.

세균 검사

시험어를 무균적으로 해부하여 신장, 비장, 간 등의 내부 장기 및 체표 환부를 NaCl 1.5% 첨가 BHIA 배지와 TCBS agar 배지에 접종하여 25°C, 24~48시간 배양하여 균의 성상을 확인하였으며 이를 계대 배양하여 이후의 실험에 사용하였다.

(a) 생화학적 분석

분리균의 생화학적 분석에는 1.5% NaCl을 첨가한 BHIA배지에서 25°C, 24시간 배양된 균주를 사용하였다. 먼저 상법에 따라 Gram stain 염색성과 형태를 관찰하고 세균의 운동성을 판정하였다. Oxidase test는 Cytochrome oxidase 시험지법, Catalase test는 3% H₂O₂를 이용한 slide 반응법으로 실시하였다. 그 외의 다양한

Table 1. Oligonucleotide primers used in PCR amplification

Virus		Nucleotide sequence of primer		PCR condition	size (bp)
RSIV*	Forward	5'-CTCAAACACTCTGGCTCATC-3'		94℃(30sec)-58℃(1min)-72℃(1min) [30cycle]	570
	Reverse	5'-GCACCAACACATCTCCTATC-3'			
	Forward	5'-CGGGGGCAATGACGACTACA-3'		94℃(30sec)-58℃(1min)-72℃(1min) [30cycle]	568
	Reverse	5'-CCGCCTGTGCCTTTTCTGGA-3'			
VHSV	Forward	5'-ATGGAAGGAGGAATTCGTGAAGCG-3'		94℃(30sec)-55℃(30sec)-68℃(1min) [35cycle]	505
	Reverse	5'-GCGGTGAAGTGCTGCAGTCCCC-3'			
VNNV	Forward	5'-CGTGTCTAGTCATGTGTCGCT-3'		95℃(40sec)-50℃(40sec)-72℃(40sec) [25cycle]	427
	Reverse	5'-CGAGTCAACACGGGTGAAGA-3'			
HRV	Forward	5'-ACCCTGGGATTCCTTGATTC-3'		94℃(30sec)-55℃(10sec)-72℃(45sec) [30cycle]	600
	Reverse	5'-TCTGGTGGGCACGATAAGTT-3'			
MBV	Forward	5'-GCACCACGAAGGTACGAAAT-3'		94℃(1min)-55℃(1min)-72℃(1min) [30cycle]	430
	Reverse	5'-GTACGTTGCCGTTTCCTGAT-3'			
16S rRNA	27F 1429R	5'-CTGAGCCAGGATCAAACCTCT-3' 5'-CGTTACCTTGTTACGACTT-3'		95℃(30sec)-49℃(30sec)-72℃(90sec) [35cycle]	1,404
CPS	CPSF	5'-AGGGGATCCGATTATTACTG-3'		94℃(30sec)-55℃(30sec)-72℃(1min) [35cycle]	410
	CPSR	5'-TCCCATTTGAGAAGATTTGAT-3'			

RSIV; red seabream iridovirus, VHSV; viral hemorrhagic septicaemia virus, VNNV; viral nervous necrosis virus, HRV; hiram rhabdovirus, MBV; marine birnavirus, CPS; capsular polysaccharide gene of *Photobacterium damsela*

생화학적 시험은 MacFaddin (2000)의 방법에 따라 API 20E kit (bioMerieux sa., France)와 API zym kit (Bio-Merieux, Spain)를 사용하였으며, 모든 시험을 4회 반복하였다. 표준균주 *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* KCTC12268 및 표준균주 *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* KCTC12279, ATCC33539와 국립수산물과학원 병리연구과에서 분양 받은 넙치 유래의 FP3487도 함께 시험 분석하였다. 또 일부 시험을 위해서는 *Vibrio harveyi* AD10 균주를 사용하여 *Vibrio* 속 세균과 비교도 수행하였다.

(b) 16S rRNA 및 CPS 유전자에 대한 염기서열 분석
분리균의 종 동정을 위해 16S rRNA 및 capsular polysaccharide (CPS) 유전자에 대한 염기서열 분석을 실시하였다. 분리균의 genomic DNA 추출과 PCR 분

석은 상기와 동일하게 High pure template preparation kit (Roche, Germany)와 ExTaq® (Takara, Japan)을 사용하였다. 16S rRNA 유전자 및 CPS 유전자 (Rajan *et al.*, 2003)는 Table 1의 조건으로 PCR을 수행하였고, 증폭된 PCR 산물은 전기영동으로 band를 확인한 후, Gel SV kit (GeneAll, Korea)로 정제하고 Topo TA cloning® (Invitrogen, USA)을 이용하여 cloning하여 염기서열을 확인하였다.

염기서열의 분석에는 Genetyx Ver. 8.0 (SDC Software Development, Japan)을 사용하였으며, NCBI에서 제공되는 BLAST program 정보를 이용하여 상동성을 비교하였다.

(c) 항균제 감수성 시험

디스크 확산법으로 ofloxacin, nalidixic acid,

oxolinic acid, gentamycin, clindamycin, clavulanic acid, ampicillin, doxycycline, tetracycline, erythromycin, trimethoprim, sulfisoxazole에 관한 감수성을 시험하였다. 1.5% NaCl이 첨가된 BHIA 배지에서 순수 배양된 세균을 0.85% NaCl이 첨가된 생리식염수에 현탁한 후, 300 μ l를 1.5% NaCl이 첨가된 Muller-Hinton agar (BD, USA)에 도말하고 그 위에 항균제 디스크 (Becton Dickinson, USA)를 접종하여 25°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 나타난 발육저지대의 지름을 측정하여 CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)의 일반적인 Enterobacteriaceae세균에 대한 2012년 기준으로 내성 (resistant), 중간 내성 (intermediate resistant), 감수성 (susceptible)으로 구분하여 분석하였다.

(d) 배양 온도에 따른 발육시험

배양 온도에 따른 발육시험을 위해, 25°C에서 24시간 배양된 분리균액 (OD600=1.0)을 200 μ l를 1.5% NaCl이 첨가된 1% pepton water 20ml에 접종하였다. 접종액은 온도별로 5°C, 18°C, 25°C, 30°C에서 3일간 배양하면서 매일 OD600에서 흡광도를 측정하여 발육정도를 측정하였다.

결 과

감염어의 증상

강도다리는 뚜렷한 증상 없이 폐사하였다. 또한 특징적인 외부 및 내부 증상은 관찰되지 않았다 (data not shown).

기생충 및 바이러스 검사

강도다리의 아가미, 체표 및 내부 장기를 생검하여 검정한 결과, 기생충이 관찰되지 되지 않았으며, RSIV, VHSV, VNNV, HRV 및 MBV에 대한 PCR 분석을 실시한 결과, 검사된 29마리 강도다리 모두에서 어떠한 바이러스도 검출되지 않았다 (data not shown).

세균 검사

모든 빈사의 강도다리의 신장과 비장에서 세균이 분리되었고 형성된 colony의 모양이 동일하였다. 분리균은 1.5% NaCl이 첨가된 BHIA 배지에서 작고 광택있는 유백색의 colony를 형성하였으나 TCBS agar 배지에서는 colony를 형성하지 않았다. 이 균주를 AD5로 명명하고 이후의 분석에 사용하였다. 표준 균주 *P. damsela* subsp. *piscicida* KCTC12268도 AD5

Table 2. Growth of bacterial strains on brain-heart infusion agar (BHIA) and thiosulphate citrate bile salts-sucrose (TCBS) agar plates

Bacterial strains	Growth on BHIA	Growth on TCBS agar
AD5	+	-
<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> KCTC12268	+	-
<i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> KCTC12279	+	+
<i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> FP3487	+	+
<i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> ATCC33539	+	+
<i>V. harveyi</i> AD10	+	+

+, growth, - ; no growth, (G); green colony formation

과 같은 양상을 보였으나 BHIA 배지에서 AD5가 24 시간 후 colony 수가 늘어난데 반해 KCTC12268는 48시간 배양 후 colony 수가 증가하여 늦은 배양 속도를 나타냈다. *P. damsela* subsp. *damsela* KCTC12279, FP3487, ATCC33539는 BHIA 배지에서 AD5보다 크고 탁한 유백색의 colony를 형성하였으며 TCBS agar 배지에서는 초록색의 colony를 형성하였다 (Table 2).

AD5는 Gram 음성 curved rod로, catalase와 oxidase를 생성하였으며 API 20E kit를 이용한 결과, Voges-Proskauer에서는 양성을 보이는 대신 Glucose를 제외한 당 이용능은 음성으로 나타났다. API zym kit를 사용한 효소 활성에서는 alkaline phosphatase, esterase (C4), esterase lipase (C8), leucine arylamidase, acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, N-acetyl- β -glucosaminidase는 양성 반응은 나타내었다 (Table 3).

AD5를 포함한 참조 균주의 16S rRNA 유전자 PCR 결과, 시험한 모든 균주에서 약 1,404bp의 증폭 산물이 형성되어 그 염기 서열을 분석하였다. AD5의 16S rRNA의 염기 서열 분석결과 *P. damsela* subsp. *piscicida* KCTC12268와 100% 일치하였으며, *P. damsela* subsp. *damsela* KCTC12279, FP3487, ATCC33539 균주와는 1개의 염기가 차이를 나타내어 99%의 상동성을 나타내었다 (Fig. 1). CPS 유전자 PCR 결과, 분리균주 AD5와 *P. damsela* subsp. *piscicida* KCTC12268에서만 410bp의 증폭 밴드를 형성하였으며, *P. damsela* subsp. *damsela* KCTC12279, FP3487, ATCC33539 균주 및 *V. harvey* AD10 균주에서는 PCR 밴드를 형성하지 않았다 (Fig. 2). CPS 유전자 증폭산물의 염기서열을 NCBI에서 제공되는 BLAST program 정보를 이용하여 상동성을 비교한 결과 *P. damsela* subsp. *piscicida*의 CPS 유전자 (GenBank accession no: AB074290)와 1bp 차이로 99%

상동성을 나타내었다.

AD5에 대한 약제 감수성 시험 결과는 ofloxacin과 gentamycin에 대해서 감수성, erythromycin에 대해서 중등내성, 그리고 clindamycin, nalidixic acid, clavulanic acid, doxycycline, oxolinic acid, trimethoprim, ampicillin, sulfisoxazole, tetracycline에 대해서 내성을 나타냈다 (Table 4).

AD5에 대한 배양 온도에 따른 발육 시험을 실시 결과, AD5, *P. damsela* subsp. *piscicida* KCTC12268, *P. damsela* subsp. *damsela* KCTC12279, FP3487, ATCC33539는 18°C에서 가장 잘 증식하였으며, 5°C에서 가장 낮은 발육을 보였다. 또한 30°C로 갈수록 증식이 감소하였으나, AD5는 18°C 및 25°C에서 *damsela* subsp. *piscicida* KCTC12268, *P. damsela* subsp. *damsela* KCTC12279, FP3487, ATCC33539에 비해 전체적으로 현저히 높은 발육능을 보였다 ($p < 0.05$) (Fig. 3).

고 찰

*Photobacterium damsela*는 자리돔, *Chromis punctipinnis*에서 처음 보고되었으며 (LOVE *et al.*, 1981), 큰돌고래, *Tursiops truncatus* (Fujioka *et al.*, 1988), 장수거북, *Dermodochelys coriacea* (Obendorf *et al.*, 1987), 방어, *Seriola quinqueradiata* (Sakata *et al.*, 1989), 감성돔 *Sparus aurata* (Vera *et al.*, 1991), baramundi *Lates calcarifer* (Renault *et al.*, 1994), brown shark *Carcharhinus plumbeus* (Colwell and Grimes, 1984; Grimes *et al.*, 1984), 터봇, *Scophthalmus maximus* (Fouz *et al.*, 1991; 1992)에 질병을 일으켰다는 보고가 있다. *Photobacterium damsela*가 우리나라에서는 양식 넙치, *Paralichthys olivaceus* (Kwon *et al.*, 2005)에 질병을 일으켰다는 보고가 있어왔지만, 우리나라

Table 3. Comparison of the phenotypic characteristics of the isolate AD5, *P. damsela* subsp. *piscicida* type strain (KCTC12268), *P. damsela* subsp. *damsela* type strains (KCTC12279, FP3487, ATCC33539)

Tested items	AD5	KCTC12268	KCTC12279	FP3487	ATCC33539
Arginine dihydrolase	+	+	+	+	+
Lysine decarboxylase	-	-	-	-	-
Ornithine decarboxylase	-	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+	+
Indole	-	-	-	-	-
Voges-Proskauer	+	+	+	+	+
Simmon's citrate	-	-	-	-	-
H ₂ S (Hydrogen sulfide)	-	-	-	-	-
Urease	-	-	+	-	-
β-Galactosidase (ONPG)	-	-	-	-	-
Tryptophan	-	-	-	-	-
Kohn's gelatin	-	-	-	-	-
Amygdalin	-	-	-	-	-
Acid production from					
Arabinose	-	-	-	-	-
Glucose	+	+	+	+	+
Inositol	-	-	-	-	-
Mannitol	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-
Sucrose	-	-	-	-	-
Enzyme assayed for					
Alkaline phosphatase	+	+	+	+	+
Esterase (C4)	+	+	+	+	+
Esterase Lipase (C8)	+	+	+	+	+
Lipase	-	-	-	-	-
Leucine arylamidase	+	+	+	+	+
Valine arylamidase	-	-	-	-	-
Cystine arylamidase	-	-	-	-	-
Trypsin	-	-	-	-	-
α-chymotrypsin	-	-	-	-	-
Acid phosphatase	+	+	+	+	+
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	+	+	+	+	(+)
α-galactosidase	-	-	-	-	-
β-galactosidase	-	-	-	-	-
β-glucuronidase	-	-	-	-	-
α-glucosidase	-	-	-	-	(+)
β-glucosidase	-	-	-	-	-
N-acetyl-β-glucosaminidase	+	+	+	+	+
α-mannosidase	-	-	-	-	-
α-fucosidase	-	-	-	-	-

+, positive reaction, - ; negative reaction, (+); weak positive results

	410	420	430	440	450
AD5	AAGGTAGTGT	AGTTAACACC	TGCACTATTT	GACGTTACCT	ACAGAAGAAG
KCTC12268					
KCTC12279			T		
FP3487			T		
ATCC33539			T		

Fig. 1. Variation sites in the partial 425bp segment of the 16S rRNA region. Variable nucleotide position 1 is *P. damsela* subsp. *piscicida* and *P. damsela* subsp. *damsela*. AD5, isolate; *P. damsela* subsp. *piscicida*, KCTC12268; *P. damsela* subsp. *damsela* type strain, KCTC12279; *P. damsela* subsp. *damsela*, FP3487; *P. damsela* subsp. *damsela*, ATCC33539.

Table 4. Sensitivity of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* isolate, AD5, *P. damsela* subsp. *piscicida* type strain (KCTC12268), *P. damsela* subsp. *damsela* type strains (KCTC12279, FP3487, ATCC33539) to various chemotherapeutic agents.

Antibiotic	Chemotherapeutic agents	Disc content (μ g)	Sensitivity*				
			AD 5	KCTC 12268	KCTC 12279	FP 3487	ATCC 33539
Quinolone	Ofloxacin	5	S	S	S	S	S
	Nalidixic acid	30	R	S	S	S	S
	Oxolinic acid	2	R	S	S	S	S
Aminoglycoside	Gentamycin	10	S	S	R	S	I
Lincosamide	Clindamycin	2	R	S	R	R	R
Penicillin	Clavulanic acid	30	R	S	S	R	S
	Ampicillin	10	R	S	R	R	R
Tetracycline	Doxycycline	30	R	S	S	R	S
	Tetracycline	30	R	S	S	S	S
Macrolide	Erythromycin	15	I	S	R	R	R
Trimethoprim	Trimethoprim	1.25	R	S	S	S	S
Sulfonamide	Sulfisoxazole	250	R	R	R	R	R

*, R; resistance, I; intermediate, S; susceptible.

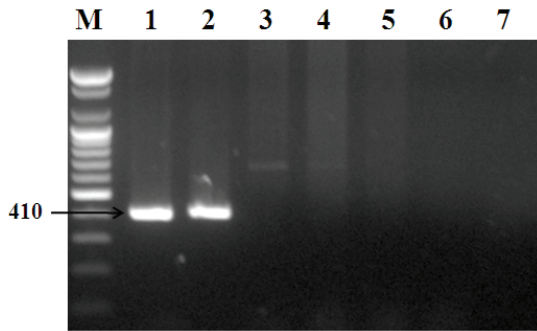


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of PCR amplified product using capsular polysaccharide genes (CPS) primers. Arrow indicates the expected PCR product (410bp). Lane M, 100bp DNA ladder, (1) AD5, isolate, (2) *P. damsela* subsp. *piscicida*, KCTC12268, (3) *P. damsela* subsp. *damsela*, KCTC12279 (4) *P. damsela* subsp. *damsela*, FP3487, (5) *P. damsela* subsp. *damsela*, ATCC33539, (6) *V. harveyi*, AD10, (7) negative control

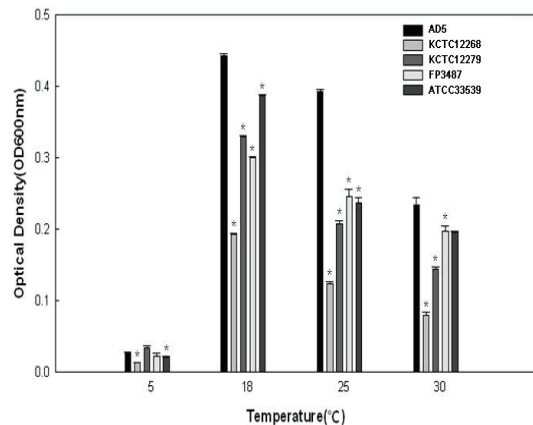


Fig. 3. The results comparing 5 *Photobacterium* strains after 72 hours in 1% pepton water. AD5; starry flounder isolate, *P. damsela* subsp. *piscicida* KCTC12268, *P. damsela* subsp. *damsela* KCTC12279, *P. damsela* subsp. *damsela*, FP3487, *P. damsela* subsp. *damsela* ATCC33539. Significant difference ($p < 0.05$) from the *P. damsela* subsp. *piscicida* AD5 isolate is indicated by an asterisk on top of the bar.

양식 강도다리, *Platichthys stellatus*에 대한 감염 피해의 발생 예는 알려져 있지 않다. 본 연구 결과 빈사 상태의 강도다리에서 *Photobacterium damsela*가 우점적으로 순수 분리되었으며, 다른 어류 병원체가 검출되지 않은 것으로 보아, *Photobacterium damsela*가 강도다리의 병원체일 가능성이 시사되었으며, 차 후 추가적으로 분리균의 병원성 관련 연구가 필요하겠다.

본 연구에서 강도다리에서 분리한 AD5균주 및 *P. damsela* subsp. *piscicida* KCTC12268는 TCBS agar 배지에 증식하지 않았으나, 시험한 모든 *P. damsela* subsp. *damsela* 균주는 TCBS agar 배지에서 초록색 집락을 형성하였다. 이전의 보고에서도 *P. damsela* subsp. *piscicida*는 TCBS agar 배지에서 균이 증식하지 않지만 (Toranzo *et al.*, 1991; Zorrilla *et al.*, 1999), *P. damsela* subsp. *damsela*는 TCBS agar 배지에서 균이 증식하였다 (Love *et al.*, 1981; Thyssen *et al.*,

1998). 이전 보고와 같이 본 연구에서도 TCBS agar 배지에서의 성장이 *P. damsela* subsp. *damsela*과 *P. damsela* subsp. *piscicida*를 구별할 수 있는 좋은 기준이 되는 것을 확인할 수 있었다 (Rajan *et al.*, 2003).

본 연구에서 16S rRNA 유전자 염기분석 결과 분석한 1,404bp 중 단 하나의 염기 차이로 *P. damsela* subsp. *piscicida*와 *P. damsela* subsp. *damsela*가 구분되어졌다. 일반적으로 세균의 분류에 있어 16S rRNA 유전자는 계통발생학적으로 근연한 종간에는 그 유전적 다양성이 부족한 것으로 알려져 있으나 (Krawiec and Riley, 1990), 본 연구에서는 *P. damsela*의 두 아종 간 구분을 위해서 16S rRNA의 활용 가능성이 시사되었다. CPS 유전자에 있어서는 *Photobacterium* subsp. 중에서 *P. damsela* subsp. *piscicida*와 *P. damsela* subsp. *damsela*만을 검출한다 (Rajan *et al.*, 2003)는 보고가 있었으나 본 연구 결과와 차이가 있었다. 본 연구에서 PCR법으로 시험한 결과

P. damsela subsp. *piscicida*는 검출되었으나, *P. damsela* subsp. *damsela*를 비롯한 그 외의 균 검출은 되지 않은 것으로 보아 *P. damsela* subsp. *piscicida*의 염기서열을 바탕으로 제작한 CPS primer 제작하였기에 상이한 결과가 나왔을 것으로 추측하며, 추후 이에 관한 추가실험이 필요할 것으로 생각된다.

API 20E kit와 API zym kit를 이용한 생화학적 성상에서는 *P. damsela* subsp. *piscicida*와 *P. damsela* subsp. *damsela*의 뚜렷한 차이는 나타나지 않았으나, *P. damsela* subsp. *damsela*는 maltose와 mannitol에서 산의 생성능을 나타낸 Kwon *et al.* (2005)의 보고와 Thyssen *et al.* (1998)의 보고에서 알 수 있듯이 *P. damsela*의 표현형의 다양성에 의해 당 이용능에서 상이한 결과가 나타날 수 있다.

비록 각 항생제에 대한 최소 억제 농도 (MIC; Minimum Inhibitory Concentration)를 측정하지는 않았지만 강도다리 분리 균주 AD5는 4개의 참조 균주와 비교하여 비교적 많은 수의 항생제에서 내성을 나타내었다. 참조 균주가 1~6개의 항생제에 관하여 내성을 나타낸 반면, AD5는 9개 항생제에 관하여 내성을 나타내었다. 이는 AD5가 비교적 최근에 병든 어류에서 분리되었으며, 양식장의 약제 사용으로 인한 항생제 내성 획득으로 생각된다. 실제로 1964년 미국의 농어에서 분리된 참조 균주인 *P. damsela* subsp. *piscidia* KCTC12268 균주 (Snieszko *et al.*, 1964)는 sulfisoxazole에만 저항성을 나타내었다. 이러한 항생제에 대한 내성 획득에 관한 추가적인 연구가 더 필요할 것으로 생각된다.

우리나라 동해안 넙치 양식장에서 분리된 *P. damsela* subsp. *damsela*는 특히 8~10월에 높은 감염율이 확인되었으며 (Kown *et al.*, 2005), 본 연구의 강도다리도 8월 초에 폐사된 점을 감안하여, AD5의 균주의 온도별 발육능에 대해 *P. damsela* subsp.

piscicida KCTC12268, *P. damsela* subsp. *damsela* KCTC12279, FP3487, ATCC33539와 비교 실험을 한 결과, 강도다리 유래 분리 균주는 전반적으로 18℃ 및 25℃에서 *damsela* subsp. *piscicida* KCTC12268, *P. damsela* subsp. *damsela* KCTC12279, FP3487, ATCC33539에 비해 유의적으로 높은 생장율을 나타내었다. 본 연구에서는 강도다리 분리 균주의 이러한 생장율의 차이의 정확한 원인을 밝히지는 못하였으나, 균이 분리 당시의 2012년 8월 강원 남부 앞바다의 평균수온이 24.69℃, 10월에는 18.68℃ (<http://egov.nfrdi.re.kr>-종합상황정보)인 점을 감안한다면 생장율 및 질병 발생 시기의 관계는 있을 것을 판단되지만, 이에 대한 차후 추가적인 실험을 통한 특성 규명이 필요할 것으로 생각된다.

P. damsela subsp. *damsela*는 넙치의 체표에 괴사 소를 형성하였으며, 탈장과 복강 내벽의 근육부에 점상출혈이 특징적으로 관찰되었다 (Kown *et al.*, 2005). 하지만 본 연구에서는 *P. damsela* subsp. *piscicida* AD5는 뚜렷한 증상 없이 강도다리에서 관찰되었다는 점에서 특이 사항을 나타낸다.

본 연구의 결과에서는 뚜렷한 증상 없이 보름동안 폐사되어가는 강도다리에서 *P. damsela* subsp. *piscicida*가 분리 동정되었으며, 향후 본 연구에서 분리된 AD5 균주의 강도다리를 이용한 감염시험을 실시, 강도다리에 대한 병원성을 평가할 필요가 있겠다.

요 약

본 연구에서는 2012년 8월, 우리나라 울산 소재의 강도다리 양식장에서 뚜렷한 증상 없이 강도다리 폐사가 발생하여 그 원인을 밝히고자 하였다. 기생충, 세균, 바이러스 검사를 수행하였으며, 내부 장기에서 균이 순수 분리되어 해당 분리균주의 표현형 및 유전

적 특성을 분석하였다. 순수 배양된 균체를 확인하여 계대 배양하여 생화학적 성상과 16S rRNA 유전자와 capsular polysaccharide (CPS) 유전자의 염기서열 분석 결과 *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*으로 동정되었다. *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*와 *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*는 TCBS agar 배지의 균주 배양 유무, 16S rRNA 및 CPS 유전자 분석을 통해 구분할 수 있었다. 실험 균주는 ofloxacin과 gentamycin에 대해서 감수성을 나타냈으며, 배양 온도에 따른 발육시험 시 18℃ 및 25℃에서 시험한 다른 균주에 비해 유의적으로 높은 생장율을 나타내었다.

감사의 말씀

본 연구는 국립수산물과학원 (수산동물전염병방역 및 검역체계구축, RP-2013-AQ-113)의 지원에 의해 운영되었습니다.

참고문헌

- Byun, S.G., Jeong, M.H., Lee, J.H., Lee, B.L., Ku, H.D., Park, S.U., Kim, Y.C. and Chang, Y.J.: Diel rhythm of oxygen consumption of the starry flounder, *Platichthys stellatus* by water temperature. J. Kor. Fish Soc., 41(2):113-118, 2008.
- Cho, M.Y., Lee, J.I., Kim, M.S., Choi, H.J., Lee, D.C. and Kim, J.W.: Isolation of *Streptococcus parauberis* from starry flounder, *Platichthys stellatus* Pallas. J. Fish Pathol., 21:209-217, 2008.
- Colwell, R.R. and Grimes, D.J.: *Vibrio diseases of marine fish populations*. Helgol, Meeresunters, 37:265-287, 1984.
- Fouz, B., Larsen, J.L. Nielsen, B., Barja, J.L. and Toranzo, A.E.: Characterization of *Vibrio damsela* strains isolated from turbot *Scophthalmus maximus* in Spain. Dis. Aquat. Org., 12:155-166, 1992.
- Fouz, B., Larsen, J.L. and Toranzo, A.E.: *Vibrio damsela* as a pathogenic agent causing mortality in cultured turbot (*Scophthalmus maximus*). Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol., 11:81-81, 1991.
- Fujioka, R.S., Greco, S.B., Cates, M.B. and Schroeder, J.P.: *Vibrio damsela* from wounds in bottlenose dolphins *Tursiops truncatus*. Dis. Aquat. Org., 4:1-8, 1998.
- Grimes, D.J., Colwell, R.R., Stemmler, J., Hada, H., Manval, D., Hetrick, F.M., May, E. B., Jones, R. T. and Stoskopf, M.: *Vibrio* species associated with mortality of sharks held in captivity. Microb. Ecol., 10:271-282, 1984.
- Hwang, I.J., Lee, J.B., Choi, S.J., Kim, S.K. Cha, H.K., Oh, T.Y. and Baek, H.J.: Reproductive Capacity in starry flounder *Platichthys stellatus* from Uljin Marine Ranching Area, Korea. Kor. J. Fish Aquat. Sci., 45:253-261, 2012.
- Kramer, D.E., Barss, W.H., Paust, B.C. and Bracken, B.E.: Guide to northeast pacific flatfishes: families Bothidae, Cynoglossidae, and Pleuronectidae. Marine Advisory Bulletin, 47:1-104, 1955.
- Krawiec, S. and Riley, M.: Organization of the bacterial chromosome. Microbiol. Rev., 54:502-539, 1990.
- Kwon, M.G., Park, S.U., Bang, J.D. and Park, S.I.:

- Isolation of pathogenic *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* from olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. J. Fish Pathol., 18:205-214, 2005.
- Lim, H.K., Byun, S.K., Lee, J.H., Park, S.U. and Kim, Y.C.: Sexual maturity and reproductive cycle of starry flounder, *Platichthys stellatus* cultured in indoor tank. J Aquaculture., 20:212-218, 2007.
- Love, M., Fisher, D.T., Hose, J.E., Farmer, J.J., Hickman, F.W. and Fanning, G.R.: *Vibrio damsela*, a marine bacterium, causes skin ulcer on the damselfish *Chromis punctipinnis*, Science, 214:1140-1141, 1981.
- MacFaddin, J.E.: Individual biochemical tests. In: Biochemical tests for identification of medical bacteria. pp.1-456, 3rd ed., Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2000.
- MIFAFF (Ministry of Food, Agriculture, Forestry and Fisheries): Studies on the development of marine ranching program 2009 in the East, West and Jeju coast of Korea. Gwachean, Korea, p.1269, 2010.
- Obendorf, D.L., Carson, J. and McManus, T.J.: *Vibrio damsela* infection in a stranded leatherback turtle (*Dermchelys coriacea*). Wildl. Dis., 23:666-668, 1987.
- Orcutt, H.G.: The life history of the starry flounder *Platichthys stellatus* (Pallas). Calif. Fish Bull., 78:25-32, 1950.
- Rajan, P.R., Lin, J.H.Y., Ho, M.S. and Yang H.L.: Simple and rapid detection of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* by a PCR technique and plating method. J. Appl. Microbiol., 95:1375-1380, 2003.
- Renault, T., Haffner, P., Malfondet, C. and Weppe, M.: *Vibrio damsela* as a pathogenic agent causing mortalities in cultured sea bass (*Lates calcarifer*). Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol., 14:117-119, 1994.
- Sakata, T., Matsuura, M. and Shimokawa, Y.: Characteristics of *Vibrio damsela* isolated from diseased yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). Nippon Suisan Gakkashi, 55:135-141, 1989.
- Snieszko, S.F., Bullock, G.L., Hollis, E., Boone, J.G.: *Pasteurella* sp. from an epizootic of white perch (*Roccus americanus*) in Chesapeake Bay tidewater areas. J. Bacteriol. 88:1814-1845, 1964.
- Thyssen, A., Grisez, L., van Houdt, R. and Ollevier, F.: Phenotypic characterization of the marine pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. International Journal of Systematic Bacteriology, 48:1145-1151, 1998.
- Toranzo, A.E., Barreiro, S., Casal, J.F., Figueras, A., Magarinos, B. and Barja, J.: Pasteurellosis in cultured gilt-head seabream (*Sparus aurata*): first report in Spain. Aquaculture, 99:1-15, 1991.
- Vera, P., Navas, J.L. and Fouz, B.: First isolation of *Vibrio damsela* from seabream (*Sparus aurata*). Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol., 11:112-113, 1991.
- Zorrilla, I., Balebona, M.C., Morinigo, M.A., Sarasquete, C. and Borrego, J.J.: Isolation and characterization of the causative agent of pasteurellosis, *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*, from sole, *Solea senegalensis* (Kaup). J. Fish Dis., 22:167-172, 1999.

국립수산과학원, 2012, 실시간어장정보: 종합상황정보 [온라인] , <http://egov.nfrdi.re.kr-종합상황정보> [인용일자: 2013.3.15]

Manuscript Received : April 10, 2013

Revised : July 09, 2013

Accepted : August 05, 2013