

양식산 강도다리(*Platichthys stellatus*)에서의 비정형 *Aeromonas salmonicida* 분리

김위식 · 권민수 · 김휘진 · 오명주 · 공경희[†]

전남대학교 수산생명의학과

Isolation of atypical *Aeromonas salmonicida* in cultured starry flounder (*Platichthys stellatus*)

Wi-Sik Kim, Min-Su Kwon, Hwi-Jin Kim, Myung-Joo Oh and Kyoung-Hui Kong[†]

Department of Aqualife Medicine, Chonnam National University, Yeosu 550-749, Korea

About 6.7% mortality was reported in a starry flounder (*Platichthys stellatus*) aquaculture farm in 2022. Most of the diseased fish showed a loss of pectoral fin, hemorrhages on muscle and gills, pale gills, enlarged spleen, and nodules on kidney. Parasites, fungi or viruses (viral hemorrhagic septicemia virus and hirame novirhabdovirus) were not detected from diseased fish. However, numerous bacteria were isolated from liver, spleen and kidney. Nucleotide sequences of the A-protein-encoding virulence array protein gene (*vapA*) of the bacteria showed 99.93% identity with *Aeromonas salmonicida* subsp. *masoucida*. This study is the first report of isolation of atypical *A. salmonicida* in cultured starry flounder in Korea.

Key words: Atypical, *Aeromonas salmonicida*, infection, starry flounder, *Platichthys stellatus*

강도다리(*Platichthys stellatus*)는 경골어강(*Osteichthys*) 가자미목(*Pleuronectiformes*) 가자미과(*Pleuronectidae*)에 속하는 한해성 어종으로 15°C 이하에서 먹이 활동이 활발하며, 고수온기에서는 넙치(*Paralichthys olivaceus*)에 비해 성장이 느리나 수온 28°C에서도 견딜 수 있다(NIFS, 2019). 최근 우리나라에서는 해산어류 양식 생산량의 약 74%를 차지하는 넙치와 조피볼락(*Sebastes schlegeli*)으로 편중되어 있는 양식품종을 다양화하기 위해 강도다리 양식을 동해안과 제주도를 중심으로 시도되어, 2018년에는 약 3,000톤을 생산하였다(NIFS, 2019).

강도다리를 양식하는 과정 중에 발생하는 질병으로는 연쇄구균증과 megalocytivirus 감염증이 보고되어 있으며(Cho *et al.*, 2008; Won *et al.*, 2013), 자연산 강도다리에서는 피부 위종양(skin pseudotumor)이 보고되어 있다(Nagasawa and Nishiuchi, 2012). 또한 질병의 원인 병원체인지는 불명확하나 marine birnavirus (MABV), starry flounder rhabdovirus (SFRV) 및 *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*가 검출되기도 하였다(Mork *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2009; Cho *et al.*, 2013). 이와 같이 양식산 강도다리에서 발생하는 질병은 현재까지 보고된 사례가 적다.

2022년 육상 수조식 양식장에서 사육 중인 강도다리 치어에서 대량 폐사(누적 폐사율: 약 6.7%)가

[†]Corresponding author: Kyoung-Hui Kong
Tel and Fax: +82-10-3064-2239
E-mail: rud570@hanmail.net

발생하였다. 본 연구에서는 폐사 원인을 조사하는 과정에서 비정형 *Aeromonas salmonicida*의 감염이 확인되어 이를 보고하고자 하였다.

검사 시료는 2022년 6월 여수에 위치한 육상 수조식 양식장에서 사육 중인 강도다리 치어(체중: 17.9 ± 5.2 g, 체장: 10.5 ± 0.8 cm)로 빈사 상태의 개체 10마리를 채집하여 사용하였다. 병어로부터 외부 및 내부 증상을 육안적으로 관찰하였고, 체표를 비롯한 각종 장기를 대상으로 광학현미경을 사용하여 기생충 및 진균 검사를 실시하였다. 세균 검사는 간, 비장 및 신장 조직을 무균적으로 채취하여 1.5% NaCl이 첨가된 brain heart infusion agar (BHIA, BD, USA)에 도말한 후, 20°C에서 7일간 배양하여 세균을 분리하였다. 세균이 분리되면 종 동정을 위하여 16S rRNA와 A-protein-encoding virulence array protein gene A (*vapA*)에 대한 염기서열을 분석하였다. 분리된 세균으로부터 genomic DNA를 추출한 후, 16S rRNA 유전자는 Weisburg *et al.*, (1991)의 방법에 준해 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')와 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') primer를 사용하여 polymerase chain reaction (PCR)을 실시하였고, *vapA* 유전자는 Lund *et al.* (2003)의 방법에 준해 F-1 (5'-TCAACGGATGGTTCAACCC-3')과 R-1 (5'-CAGAGTGAAATCTACCAGCGGTGC-3')을 사용하여 PCR을 실시하였다. 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 GenBank의 blast 분석을 실시하여 기존에 보고된 세균 종과 비교하였다. 바이러스 검사는 viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV)와 hirame novirhabdovirus (HIRRV)를 신속히 검사할 수 있는 lateral flow chromatographic assay (LFIA, EnbioGene, Korea)를 사용하여 병어의 심장(타겟 병원체: VHSV, Kong *et al.*, 2021)과 비장 조직(HIRRV)을 sample buffer (EnbioGene, Korea)로 각각 1:10 (0.05 g/500 μ L)과 1:30이 되게 혼합하여 마쇄한 후, 상층액 100 μ L를 키트 시료 투입구에 떨어뜨려 10분 후 반응을 확인하였다. 검사선과 대조선 위치에 2개의 밴

드가 나타나면 양성, 대조선에만 1개의 밴드가 나타나면 음성으로 판정하였다.

분리된 세균의 항균제 감수성을 조사하기 위해, 9종의 항균제인 ampicillin, amoxicillin, enrofloxacin, erythromycin, florfenicol, flumequine, oxolinic acid, oxytetracycline 및 sulfamethoxazole + trimethoprim를 사용하여 디스크 확산법을 실시하였다. 세균을 phosphate buffer saline (PBS: 0.13 M NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na_2HPO_4 , 1.4 mM KH_2PO_4) 완충 용액으로 현탁한 후, Mueller-Hinton agar (BD, USA)에 도말하고 그 위에 항균제 디스크(Oxoid, UK)를 올려 25°C에서 48시간 동안 배양하면서 발육 저지대의 지름을 측정하였다.

2022년 6월 19-21°C에 사육 중인 강도다리 치어에서 약 2주 동안 총 15만 마리 중 1만 마리가 폐사되어, 약 6.7%의 누적 폐사율이 관찰되었다. 대부분의 병어는 외부 증상으로 가슴지느러미의 탈락(8/10마리)과 뒷쪽의 근육 부분이 붉게 보였으며(8/10마리), 내부 증상으로는 아가미 빈혈(9/10마리)과 출혈(8/10마리), 비장 비대(9/10마리) 및 신장에서의 결절(7/10마리)이 관찰되었다 (Fig. 1). 일부 개체에서는 뒷지느러미 탈락(3/10마리), 두부 출혈(3/10마리), 간 출혈(4/10마리) 및 비장 결절(2/10마리)이 관찰되었다. 대부분의 개체에서 가슴과 뒷지느러미 탈락 부위에는 출혈이 관찰되었다.

임상증상이 심한 병어 6마리를 대상으로 병원체 검사를 실시한 결과, 지느러미, 체표, 아가미를 비

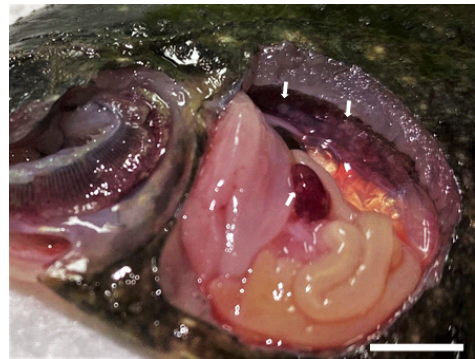


Fig. 1. Diseased starry flounder with pale gills, an enlarged spleen and grayish-white nodules on kidney and spleen (arrow). Scale bar = 5 mm.

로한 내부 장기(결절 부위 포함)에서 기생충과 진균은 검출되지 않았다. VHSV와 HIRRV 검사용 신속 진단키트를 이용하여 근육 출혈을 보인 2마리를 검사한 결과, 2마리 시료 모두 대조선에서만 1개의 밴드가 관찰되어 음성으로 나타났다. 하지만 세균 검사 결과에서는 검사 개체 6마리 모두 간(분리된 colony의 수: 63-120개), 비장(약 280-900개) 및 신장(약 500-2,400개) 조직에서 동일한 형태의 상아색의 colony가 다수 분리되었다. 병어의 비장과 신장으로부터 분리한 2개의 균주와 결절 조직으로부터 얻은 PCR 산물을 사용하여 16S rRNA의 염기서열을 분석한 결과, 3개 균주 모두 100%의 상동성을 보였고, *A. salmonicida* (Genbank no: CP022550), *A. encheleia* (LR134376) 및 *A. bestiaum* (AY987755)과 100% (1,468/1,468 bp) 일치하였다. 16S rRNA 유전자는 일반적으로 세균의 종을 동정하는데 적합한 유전자로 알려져 있으나, *Aeromonas* 속의 세균들의 경우, 염기서열의 차이가 적어 종을 구분하는 데는 한계가 있다(Lane *et al.*, 1985; Martin-Carnahan and Joseph, 2005; Han *et al.*, 2011). 이에 분리된 세균의 종을 동정하기 위해 *vapA* 유전자의 염기서열을 추가로 분석하였다. *vapA*의 염기서열을 분석한 결과에서는 국내에서 조피볼락에서 분리된 *A. salmonicida* subsp. *masoucida* strain BR19001YR (CP060030)과 99.93% (1,432/1,433 bp)로 가장 높은 상동성을 보였다. BR19001YR 균주는 2,435,650번째가 C인데 반해 본 연구에서 분리된 세균은 T로 확인되었다. 분리된 세균은 tryptic soy agar (TSA) 배지에서 갈색 색소를 생성하지 않아(data not shown), 본 연구에서 분리된 세균은 비정형 *A. salmonicida*로 확인되었다. 현재까지 강도다리에서 비정형 *A. salmonicida*가 분리된다고 보고된 바 없어, 본 연구를 통해 강도다리에서 비정형 *A. salmonicida*의 감염을 처음 확인하였다.

비정형 *A. salmonicida*에 대한 항균제의 감수성을 조사한 결과, enrofloxacin, erythromycin, sulfamethoxazole + trimethoprim 및 flumequine에서 inhibition zone이 25-30 mm로 감수성이 높게 나타났다(Table 1). 약제 감수성 결과를 토대로 양식 현장에서 enrofloxacin을 경구 투여한 결과, 폐사율은 1일 10마리 이하로 급격하게 감소하였고, 항균제 투

Table 1. Sensitivity of *Aeromonas salmonicida* to various antimicrobial agents

Antimicrobial agent	Concentration (µg/disc)	Sensitivity*
Enrofloxacin	5	+
Erythromycin	15	+
Sulfamethoxazole/Trimethoprim	25	+
Flumequine	30	+
Oxytetracycline	30	-
Oxolinic acid	2	-
Florfenicol	30	-
Amoxicillin	10	-
Ampicillin	10	-

*+ (25-30 mm), strong inhibition

- (0-11 mm), no or weak inhibition

여 1주일 후에는 폐사가 거의 관찰되지 않았다. 이상의 결과, 강도다리 치어에서 발생하는 질병은 세균에 의해 발생하며, 항균제 투여를 통하여 제어가 가능한 것으로 나타났다.

비정형 *A. salmonicida*는 50 여종이 넘는 자연산 또는 양식산 해산어와 담수어에서 분리되고 있다(Wiklund and Dalsgaard, 1998). 비정형 *A. salmonicida*에 감염된 어류는 주로 체표에 궤양이 형성되나(Wiklund and Dalsgaard, 1998), 강도다리로 속하는 넙치에서는 간 출혈, 신장 비대 및 뇌 부위에 출혈이 관찰되며(Iida *et al.*, 1997), 물가자미(*Eopsetta grigorjewi*)에서는 두부와 체표에 발적이 관찰된다(Nakatsugawa, 1994). 본 연구에서 보인 강도다리의 임상증상은 기존에 보고된 비정형 *A. salmonicida*의 감염 증상들과는 차이를 보였으나 병어로부터 기생충, 진균 및 바이러스(HIRRV 및 VHSV)가 검출되지 않으며, 비정형 *A. salmonicida*가 모든 개체에서 다수 분리되고, 항균제 투여 후 폐사율이 급격히 감소하는 것으로 보아 강도다리의 폐사 원인은 비정형 *A. salmonicida*와 밀접한 연관성이 있을 것으로 사료된다. 향후 질병의 원인을 밝히기 위해서는 분리된 세균을 사용하여 강도다리를 대상으로 한 병원성 실험과 병어를 대상으로 한 병리조직학적 검사가 실시되어야 할 것이다. 또한 병원체들에 의한 혼합감염의 가능성도 남아 있어, 다양한 병원체에 대한 분리도 추가적으로 검토되어야 할

것이다.

감사의 글

이 논문은 전남대학교 연구년교수 연구비 (과제 번호: 2021-3951) 지원에 의하여 연구되었습니다.

References

- Cho, M.Y., Lee, J.I., Kim, M.S., Choi, H.J., Lee, D.C. and Kim, J.W.: Isolation of *Streptococcus paruberis* from starry flounder, *Platichthys stellatus* Pallas. J. Fish Pathol., 21:209-217, 2008.
- Cho, Y.A., Han, H.J., Mun, H.E., Jung, S.H., Park, M.A. and Kim, J.W.: Characterization of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* isolated from cultured starry flounder, *Platichthys stellatus* in Korea. J. Fish Pathol., 26:77-88, 2013.
- Han, H.J., Kim, D.Y., Kim, W.S., Kim, C.S., Jung, S.J., Oh, M.J. and Kim, D.H.: Atypical *Aeromonas salmonicida* infection in the black rockfish, *Sebastes schlegeli* Hilgendorf, in Korea. J. Fish Diseases, 34:47-55, 2011.
- Iida, T., Sakata, C., Kawatsu, H. and Fukuda, Y.: Atypical *Aeromonas salmonicida* infection in cultured marine fish. Fish Pathol., 32:65-66, 1997.
- Kong, K.H., Jeong, H.N., Shyam, K.U., Oh M.J., Kim, C.S., Kim, H.J. and Kim, W.S.: Development and validation of a lateral flow immunochromatographic assay for specific detection of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV, genotype IVa) in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Aquaculture, 537, 2021.
- Lane, D.J., Pace, B., Olsen, G.J., Stahl, D., Sogin, M.L. and Pace, N.R.: Rapid determination of 16S ribosomal sequences for phylogenetic analysis. P. N. A. S., 82:6955-6959, 1985.
- Lund, V. and Mikkelsen, H.: Genetic diversity among A-proteins of atypical strains of *Aeromonas salmonicida*. Dis. Aquat. Org., 61:257-262, 2004.
- Mork, C., Hershberger, P., Kocan, R., Batts, W. and Winton, J.: Isolation and characterization of a rhabdovirus from starry flounder (*Platichthys stellatus*) collected from the northern portion of Puget Sound, Washington, USA. J. Gen. Virol., 85:495-505, 2004.
- Martin-Carnahan, A. and Joseph, S.W.: Genus I: *Aeromonas* Staner 1943, 213^{AL}. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2, pp.557-578, 2nd ed., Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T., Garrity, G.M., Springer, New York, 2005.
- Nakatsugawa, T.: Atypical *Aeromonas salmonicida* isolated from cultured shotted halibut. Fish Pathol., 29:193-198, 1994.
- Nagasawa, K. and Nishiuchi, S.: Prevalence of skin pseudotumors in starry flounder (*Platichthys stellatus*) and pleuronectid hybrids in a brackish-water lake, Hokkaido, Japan. Biosphere Sci., 51:9-14, 2012.
- National institute of fisheries science (NIFS): Technical manual for the starry flounder aquaculture. 2019.
- Park, S.H., Park, M.A. and Cho, M.Y.: Phylogenetic analysis of marine birnavirus (MABV) isolated from cultured starry flounder *Platichthys stellatus* and olive flounder *Paralichthys olivaceus* in Korea. J. Fish Pathol., 22:211-218, 2009.
- Weisburg W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. and Lane, D.J.: 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J. Bacteriol. 173:697-703. 1991.
- Wiklund, T. and Dalsgaard, I.: Occurrence and significance of atypical *Aeromonas salmonicida* in non-salmonid and salmonid fish species: a review. Dis. Aquat. Org., 32:49-69, 1998.
- Won, K.M., Cho, M.Y., Park, M.A., Jee, B.Y., Myeong, J.I. and Kim, J.W.: The first report of a megalocytivirus infection in farmed starry flounder, *Platichthys stellatus*, in Korea. Fish. Aquat. Sci., 16:93-99, 2013.

Manuscript Received : Nov 07, 2022

Revised : Nov 12, 2022

Accepted : Nov 14, 2022