

박사학위논문

제주지역 양식장의 질병증상
넙치(*Paralichthys olivaceus*)로부터
분리되는 세균의 특성에 관한 연구



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

제주대학교 대학원
생물학과

강 봉 조

2003년 12월

제주지역 양식장의 질병증상
넙치(*Paralichthys olivaceus*)로부터
분리되는 세균의 특성에 관한 연구

지도교수 오 덕 철

강 봉 조

이 논문을 이학박사학위 논문으로 제출함

2003년 12월



강 봉 조의 이학 박사학위 논문을 인준함.

심사위원장 _____ (인)

위 원 _____ (인)

위 원 _____ (인)

위 원 _____ (인)

위 원 _____ (인)

제주대학교 대학원

2003년 12월

**A Study on the Characteristics of Bacteria
Isolated from Cultured Flouders(*Paralichthys
olivaceus*) Showing Disease Symptoms in
Jeju Area of Korea**

Bong-Jo Kang

(Supervised by Professor Duck-Chul Oh)

**A DISSERTATION SUBMITTED IN PARTIAL
FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS FOR THE
DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY**

**DEPARTMENT OF BIOLOGY
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY**

December, 2003

Abstract

This study was performed for molecular identification and characterization of bacteria including *Vibrio* sp. isolated from 780 flounders being raised in 4 aquaculture farms in Jeju from June 2001 through May 2002, as well as for investigating occurrence frequency of streptococcosis, edwardsiellosis, and vibriosis which are known as fish diseases.

Physical analyses for inflowing water into 4 aquaculture farms revealed that average temperature ranged from 15.1°C to 20.5°C for groundwater, and 13.8°C to 27.1°C for seawater. Salinity test demonstrated lower concentration in groundwater than in seawater except for 1 aquaculture farm.

Tests for the number of bacteria and *Vibrio* sp. in groundwater showed that a total number of bacteria and *Vibrio* sp. were 2,580 CFU/100mL and 295 CFU/100mL, respectively. While in the test for seawater, a total number of bacteria and *Vibrio* sp. were 24,950 CFU/100mL and 5,093 CFU/100mL, respectively.

Examination for bacterial diseases occurred in flounder being raised in aquaculture farms in Jeju demonstrated that the ratio of disease occurrence was highest in July, while lowest in May. The ratio of bacterial isolation for the number of sampling fish was 98.1% in October which was highest while 52.5% in June.

Bacteria such as *Vibrio* sp., *Edwardsiella* sp., *Streptococcus* sp. were detected in 579 ones of 780 fish samples tested. Particularly in 180 ones (23% of total samples) only *Vibrio* sp. was found. The fish samples that only *Edwardsiella* sp. was isolated from was 152 (19.5%), and the ones that only *Streptococcus* sp. was found in 148.

In 51 samples mixed bacteria consisting of *Vibrio* sp. and *Edwardsiella* sp. were isolated, the number of samples in which both *Edwardsiella* sp. and *Streptococcus* sp. were found was 20 (2.5%). Only in two fish samples, three kinds of bacterial genera were detected.

Vibriosis was mainly found in fingerling during the period, October through next March when fish hatcheries was transferred to aquaculture farms, edwardsiellosis in young fish next June and July most of which were in middle growth phase, and streptococcosis in next September and October.

Fish length-based analysis of the isolated bacteria showed that approx 85% vibriosis was found below 20cm, edwardsiellosis was dominant symptom in fish between 20 ~ 30 cm in size, and in adult fish above 30cm in size the most dominant disease was streptococcosis. These findings suggested that major disease occurred in fingerling was vibriosis, and disease patterns might be affected and different according to growth phases of fish and seasonal change.

Antibiotic test using 15 antibiotic agents for bacteria including 196 strains of *Streptococcus* sp., 225 strains of *Edwardsiella* sp., and 261 strains of *Vibrio* sp. revealed that approx 80% of *Streptococcus* sp. were sensitive to antibiotics, ampicillin, amoxicillin, chloramphenicol, and penicillin while the number of strains of *Streptococcus* sp. having susceptibility to nalidixic acid, oxolinic acid, and streptomycin was a very few. For *Edwardsiella* sp. approx 80% were sensitive to antibiotics, ampicillin, amoxicillin, chloramphenicol, ciprofloxacin, and norfloxacin, approx 2% showed susceptibility to kanamycin, nobobiocin, penicillin, and streptomycin. Approx 70% of *Vibrio* sp. were susceptible to chloramphenicol, ciprofloxacin, gentamycin,

nalidixic acid, oxolinic acid, a few strains of *Vibrio* sp. was relatively susceptible to ampicillin, penicillin, and streptomycin.

Total genomic DNA was purified from two hundred and sixty one bacterial strains that were assumed *Vibrio* spp. by physiological characterization. Sequence analysis for 16S rRNA clones constructed through PCR and cloning process revealed 225 strains of 261 clones examined were placed into twelve species of *Vibrio* such as *V. trachuri* (*V. carchariae*, 85 strains), *V. scopthalmi* (69 strains), *V. parahaemolyticus* (23 strains), *V. pomeroyi* (15 strains), *V. campbellii* (16 strains), *V. fischeri* (3 strains), *V. lentus* (3 strains), *V. furnissii* (3 strains), *V. corallilyticus* (3 strains), *V. fortis* (2strains), *V. probioticus* (2 strains), and *V. tubiashii* (1 strain) with over 95% sequence similarity. Other bacteria identified were *Photobacterium damsela* sub. *damsela*, *Listonella anguillarum* (the former *Vibrio anguillarum*), *Photobacterium damsela* sub. *pscicida* etc. The dominant species were *V. trachuri* (32%), *V. scopthalmi* (26%), and *V. parahaemolyticus* (8%). It is noticeable that *Vibrio trachuri* was evenly found both in young and adult flounders diseased while other species of *Vibrio* were mainly in young fishes, suggesting it might be a potential putative pathogenic bacterium causing vibriosis in flounder.

Key words : Aquaculture, *Edwardsiella* sp., Edwardsiellosis, Fish diseases, Flounder, *Streptococcus* sp., Streptococcosis, *Vibrio* sp., Vibriosis.

목 차

Abstract	i
목차	iv
List of Tables	vii
List of Figures	ix
약어	xi
1. 서 론	1
1.1. 연구배경	1
1.2. 연구목적	5
2. 제주도 넙치양식장 유입수의 세균학적 특성	6
2.1. 서 론	6
2.2. 재료 및 방법	8
2.2.1. 시료채취	8
2.2.2. 세균학적 특성분석	8
2.3. 결과 및 고찰	10
2.3.1. 월별 수온 변화	10
2.3.2. 월별 염분농도의 변화	12
2.3.3. 총세균수 및 <i>Vibrio</i> 속 세균수의 월별변화	12
2.4. 요약	19
3. 제주산 양식넙치로부터 어류병원성세균의 분리 및 규명	21
3.1. 서 론	21
3.2. 재료 및 방법	22

3.2.1. 시료채취	22
3.2.2. 세균의 분리, 동정 및 세균성 질병 진단	22
3.2.3. 분리세균의 항생제 감수성 시험	27
3.3. 결과 및 고찰	28
3.3.1. 세균성 질병의 단독 및 혼합발생 현황	28
3.3.2. 월별 및 성장에 따른 세균성질병 발생상황	31
3.3.3. 시료채취지역별 질병발생동향	33
3.3.4. 분리 균주에 대한 항생제감수성 시험결과	36
3.4. 요약	40
4. 제주산 양식넙치로부터 분리되는 <i>Vibrio</i> 속 세균의 계통분류학적 연구	42
4.1. 서론	42
4.2. 재료 및 방법	45
4.2.1. 시험균주	45
4.2.2. 분리 균주의 생화학적 특성 분석	45
4.2.3. 분리 균주의 분자생물학적 동정	45
4.2.4. 분리 균주의 항생제 감수성 시험	48
4.3. 결과 및 고찰	49
4.3.1. 분리균주의 생화학적 특성분석	49
4.3.2. 분리된 <i>Vibrio</i> 속 균주의 분자생물학적 동정	50
4.3.3. 분리·동정된 <i>Vibrio</i> 속 균주의 계통학적 분석	56
4.3.4. 넙치 성장기별 <i>Vibrio</i> 속 균주의 분리현황	57
4.3.5. 지역에 따른 <i>Vibrio</i> 속 균주의 분리현황	57
4.3.6. 생화학적 동정과 분자생물학적 동정 결과 비교	61

4.3.7. 분리 균주별 항생제 감수성 시험결과	61
4.4. 요약	67
5. 종합고찰	69
Appendices	75
Appendix I	76
Appendix II	77
Appendix III	87
참고문헌	94
적 요	109



List of Tables

Table 2-1. The number of bacteria of groundwater supplied to aquaculture farms for flounder raising in Jeju.	15
Table 2-2. The number of bacteria of seawater supplied to aquaculture farms for flounder raising in Jeju.	16
Table 3-1. Individual number of flounders showing external disease symptom monthly based on body length.	24
Table 3-2. Number of flounders collected from each sampling site ·	25
Table 3-3. The occurrence frequency of a single or mixed bacteria from flounders showing external disease symptom in Jeju from June 2001 through May 2002.	29
Table 3-4. The occurrence frequency of bacterial fish diseases found in flounders based on disease symptoms and sampling sites from June 2001 through May 2002	35
Table 4-1. PCR primers used for 16S rRNA amplification in this study	47
Table 4-2. Classification of bacteria isolated from the flounders by 16S rRNA sequence-based identification	52
Table 4-3. Classification of <i>Vibrio</i> sp. and phylogenetically closely related bacteria isolated from the flounders based on fish	

sizes	58
Table 4-4. Comparison of bacterial identification resulted from Biolog test and 16S rRNA sequence analysis	62
Table 4-5. Antibiotic susceptibility of the bacteria isolated from flounders showing external disease symptom	66



List of Figures

- Fig. 2-1. The site map for collecting water sample of aquaculture farm in Jeju, Korea. 9
- Fig. 2-2. Monthly variation of water temperature of aquaculture farms in Jeju, Korea. 11
- Fig. 2-3. Monthly variation of water salinity of aquaculture farm in Jeju, Korea. 13
- Fig. 3-1. The representative pictures for flounders showing external disease symptoms. 23
- Fig. 3-2. The map of sampling area and number of farms sample were collected. 26
- Fig. 3-3. Monthly occurrence frequency of bacterial diseases found in flounders of aquaculture farms from June 2001 through May 2002. 32
- Fig. 3-4. Occurrence frequency of bacterial diseases found in flounders based on fish sizes(body length). 34
- Fig. 3-5. Antibiotics susceptibility of strains of *Streptococcus* sp., *Edwardsiella* sp. and *Vibrio* sp. isolated from diseased flounder. 37

Fig. 4-1. Reactions of haemolysis of *Vibrio* sp. isolated from diseased flounders on blood agar. 51

Fig. 4-2. Dendrogram showing the phylogenetic relationship among strains of *Vibrio* sp. and closely related bacteria isolated from diseased flounders of aquaculture farms. 53

Fig. 4-3. Number of *Vibrio* sp. and phylogenetically related bacteria from different sampling sites. 59



약 어

BHIA	brain heart infusion agar
BHIB	brain heart infusion broth
CFU	colony forming unit
DNA	deoxyribonucleic acid
ELBAMAP	clamped homogeneous electric field gel eletrophoresis
EtBr	ethidium bromide
IPTG	isopropylthio- β -D-galactoside
Kbp	kilo base pair
LB	Luria-Bertani
MCS	marine cation solution
NCBI	national center for biotechnology information
NCCLS	national committee for clinical laboratory standards
PCR	polymerase chain reaction
rpm	revolution per minute
rRNA	ribosomal ribonucleic acid
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -galactoside

1. 서 론

1.1. 연구배경

1980년대 중반부터 시작된 제주지역의 넙치양식은 2002년 현재 247개의 양식장에 수면적이 88 ha로 연간 생산량이 11,983톤에 달하며, 연간 수입이 약 1,200억원으로 제주도의 1차 산업중 중요한 부분을 차지하고 있다(제주도, 2003).

이렇게 양식되고 있는 넙치를 비롯한 어류들도 다른 육상동물과 마찬가지로 각종 질병이 발생하여 경제적인 피해를 주고 있는데, 양식어류에 유행하는 질병 중 병원성 세균에 의한 피해가 가장 크다고 알려져 있다(전, 1988). 국내산 양식넙치에 주로 발생하는 세균성 질병은 streptococcosis, edwardsiellosis, vibriosis등이 보고되고 있다(방 등, 1992; 이 등, 1991; 이 와 하, 1991; 허 등, 2001).

어류의 streptococcosis, edwardsiellosis 그리고 vibriosis에 대한 연구 중 먼저 streptococcosis에 대한 연구로는 일본에서 무지개송어 (*Oncorhynchus mykiss*)의 연쇄구균성 패혈증에 대한 보고를 시작으로 (Hoshina *et al.* 1958), Robinson 과 Meyer(1966)는 golden shiner(*Notemigonus crysoleucas*)에 *Streptococcus* sp.의 감염을 보고하였다.

그 외에도 *Streptococcus*에 의한 방어(*Seriola quinqueradiata*)의 감염보고(Kusuda *et al.*, 1976-a; Kitao, 1982), 은어(*Plecoglossus altivelis*)와 amago(*Oncorhynchus rhodurus*)로 부터의 β -용혈성 *Streptococcus* 분리(Ohnishi, *et al.*, 1981), 뱀장어(*Anguilla japonica*)의 *Streptococcus* sp. 감염보고 등이 있다(Kusuda *et al.*, 1978).

그러나 1990년대 이전에는 어류로부터 분리되는 *Streptococcus*는 일부군주를 제외하고는 대부분의 군주가 정확한 동정이 이루어지지 않았었는데, Kusuda *et al.*(1992)은 방어에서 분리한 세균을 *Enterococcus seriolocida*로 동정하였으며, Zlotkin *et al.*(1998)은 방어의 streptococcosis 원인균을

PCR기법에 의해 *Lactococcus garvieae*라고 동정하였고, Doménech *et al.*(1996)은 유럽에서 주로 양식되는 터봇(*Scophthalmus maximus*)의 streptococcosis의 원인균을 *Streptococcus parauberis*로 동정하였다.

또한 Nakatsugawa(1983-a)는 일본의 양식넙치 streptococcosis의 원인균으로 *Streptococcus iniae*를 분리 동정하였으며, 국내의 경우는 *L. garvieae* 및 *Streptococcus* sp.등이 넙치로부터 분리되어(이 등, 2001; 이와 하, 1991; 허 등, 2001), 넙치의 streptococcosis의 원인종은 약 2-3종일 것으로 추정되고 있다.

어류의 edwardsiellosis의 원인 병원균은 *Edwardsiella ictaluri* 와 *Edwardsiella tarda*로 보고되고 있는데, 찬벨메기(*Ictalus punctatus*)에서는 *E. ictaluri* 와 *E. tarda* 2종이 보고되고 있으며(Meyer and Bullock, 1973), brown bullhead(*Ictalurus punctatus*), danio(*Danio devario*), walking catfish(*Clarias batrachus*), white catfish(*Ictalurus catus*)의 edwardsiellosis 원인균은 *E. ictaluri*로 알려져 있다(Kasornchandra *et al.*, 1987; Plumb and Sanchez, 1983; Waltman *et al.*, 1985).

반면에 넙치(*Paralichthys olivaceus*)를 포함한 chinook salmon(*Oncorhynchus tshawytscha*), common carp(*Cyprinus carpio*), crimson seabream(*Evynnis japonicus*), 뱀장어(*Anguilla japonica*), largemouth bass(*Micropterus salmonides*), mullet(*Mugil cephalus*), red seabream(*Chrysophrys major*), striped bass(*Morone saxatilis*), 틸라피아(*Tilapia nilotica*), 방어(*Seriola quinqueradiata*)의 edwardsiellosis 원인균은 *E. tarda*로 보고되고 있다(Amandi *et al.*, 1982; Egusa, 1976; Herman and Bullock, 1986; Kusuda *et al.*, 1976-b; Kusuda *et al.*, 1977; Miyashito, 1984; Nakatsugawa, 1983-b; Sae-Oui *et al.*, 1984; White *et al.*, 1973; Yasunaga *et al.*, 1982)

국내산 양식넙치의 edwardsiellosis 원인균은 방 등(1992)의 보고에 의해 *E. tarda*로 알려져 있다.

한편 어류 vibriosis는 많은 종류의 *Vibrio*속 세균의 감염에 의하며 해수 어 및 담수어등 다양한 어류들에 발생하며, 특히 고밀도 양식, 고염분과 유기

물 오염이 높은 경우에 그 발생빈도가 높은 것으로 알려져있고, 기생충감염이나 선별등의 물리적 스트레스가 가해졌을 때에도 본 병의 발생이 높다고 알려져있다(Noga 1996).

또한 치어의 경우가 성어보다 그 피해가 큰 것으로 알려져 있고, 그 중 가장 공통적인 vibriosis의 원인균은 *Vibrio anguillarum*으로 보고되어있는데 (Hjeltnes and Roberts, 1993), 이 균은 MacDonnell and Colwell(1985)에 의해 새로운 속인 *Listonella*에 포함시킬 것이 제안되어 현재 *Listonella anguillarum*으로 명명되고 있다.

저수온기 vibriosis 원인균으로 알려져 있는 *Vibrio salmonicida*의 경우는 유럽과 캐나다, 미국 등지에서 대서양 연어에 감염을 일으킴으로써 심각한 피해가 발생했다는 보고가 있다(Hjeltnes and Robert, 1993; O'Hallorn *et al.*, 1992).

일본과 미국에서는 *Vibrio ordalli*가 어류의 세균성 출혈성 패혈증원인균으로 보고되었고(Schiew *et al.*, 1981), *Vibrio damsela* 또한 blacksmith damselfish, 방어, 터봇, gilthead seabream, brown shark 등 많은 종류의 어류에서 피부궤양등을 일으키는 것으로 보고되었는데(Fouz *et al.*, 1992), 이종은 현재 *Photobacterium*으로 속명이 바뀌었다(Austin and Austin, 1993).

*Vibrio carchariae*는 상어에 전신질환을 일으키는 것으로 보고되었으며, 이 병원체는 피부궤양 및 장과 뇌에 염증을 일으킨다는 보고도 있다(Colwell and Grimes, 1984).

그 외에 일본과 유럽에서 뱀장어의 세균성 패혈증 원인균으로 *Vibrio vulnificus*가 보고되었고(Austin and Austin, 1993), 일본산 은어의 vibriosis의 원인균으로 *Vibrio cholerae* non O1의 분리(Muroga *et al.*, 1979), 터봇의 *Vibrio fischeri* 감염(Lamas *et al.*, 1990), 미국 Florida에서 common snook의 *Vibrio harveyi* 감염(Kraxberger-Beatty *et al.*, 1990), Atlantic salmon, 터봇, European sea bass의 *Vibrio splendidus* 감염(Austin and Austin, 1993)등 어류의 vibriosis는 그 원인균종 및 감염어종이 매우 다양하게 알려져 있다.

이렇듯 다양한 *Vibrio* 속 세균은 많은 양식어류에 감염을 일으켜 경제적 손실을 주는 것으로 보고되어 있다(Austin and Austin, 1993; Hjeltnes and Robert, 1993).

넙치의 vibriosis에 대한 연구로서 이 등(1991)은 한국 남해안에서 궤양증 및 복수증 양식넙치로부터 *Vibrio tubiashii*, *V. damsela*, *V. anguillarum*, *Vibrio campbellii* 등 9종 206균주를 분리동정하였으며, 154균주를 미동정 균주를 보고하였고, Ishimaru *et al.*(1996)은 넙치자어의 병원체로서 *Vibrio ichthyenteri*를 분리 보고하였는데, 아직 국내외적으로 양식넙치의 vibriosis 원인균 규명에 대한 연구는 미미한 실정이다.



1.2. 연구목적

국내에서 양식어류의 세균성 질병에 대한 연구는 전 등(1988)의 연구를 시작으로 이루어지기 시작하였는데, 어류의 세균성 질병발생에 대한 연구를 위해서는 질병 발생 상황조사 및 원인균에 대한 정확한 동정과 그에 따른 신속 진단법 개발 등이 필요하다고 볼 수 있으며, 양식어류의 사육환경에 대한 관리가 필요하다고 판단된다.

본 연구는 제주도의 주요 양식어종인 넙치 양식장의 수질에 대한 세균학적 특성조사를 통해 제주도내 양식장의 위생학적 수준을 파악하고자 하였으며, 양식 넙치의 주요세균성 질병으로 알려져 있는 streptococcosis, edwardsiellosis 그리고 vibriosis의 발생동향조사를 통한 월별 세균성 질병 발생상황 분석 및 질병원인으로 추정되는 분리 균주들에 대한 항생제 감수성 실태 등을 파악하여 양식넙치의 질병발생에 대한 기초자료를 제공하고자 하였다.

또한 가장 광범위한 세균성 질병 원인균으로 알려진 *Vibrio*속 균은 속내의 종 다양성 및 근연종의 존재(Holt *et al.*, 1994; Thompson *et al.*, 2002) 와 계속적인 신종의 보고 등으로 인하여(Ben-Haim *et al.*, 2003; Cerdà-Cuéllar *et al.*, 1997; Gomez-Gill *et al.*, 2003; Macian *et al.*, 2001-a, b; Thompson *et al.*, 2003-a, b, c) 동정에 어려움이 많은 실정이다.

따라서 본 연구에서는 질병에 감염된 것으로 판단되는 제주산 양식넙치 시료로부터 분리되는 다양한 *Vibrio*속 세균을 16S rRNA 유전자 염기서열분석법을 이용하여 동정함으로써 양식넙치의 vibriosis 원인균 규명에 대한 기초자료를 제공하고자 하였다.

2. 제주도 넙치양식장 유입수의 세균학적 특성

2.1. 서 론

일반적으로 양식어의 질병에는 생물학적 요인, 유전적 요인, 환경적 요인, 영양학적인 요인 등을 들 수 있는데, 그 중 생물학적인 요인이 가장 많다고 볼 수 있으며 생물학적인 요인 중에서는 다시 세균을 포함하는 미생물감염에 의한 질병이 많다.

또한 어류의 질병은 육상동물과 달리 물을 매개로 하는 질병감염기회가 더욱 높다고 할 수 있다.

어류병원균을 포함하는 세균들은 일반적으로 수중의 유기물분포나 수온, 염분, 용존산소 등의 환경변화에 따라 군집의 변화를 가져오며, 어류의 장내 세균총은 알, 먹이생물, 수중환경으로부터 유래된다고 알려져 있고(Ringo, 1999), *Vibrio*속 세균의 경우에는 해수에 상존 하는 세균으로서 해수 및 해양동물의 세균군집에서 중요한 위치를 차지하고 있으며(Ortigosa, 1994), 그 중 일부는 사람의 질병원인균으로 작용하기도한다(Colwell, 1984; Hond, 1991).

Vibrio 속 세균의 경우는 어류에 있어서도 1차 및 2차적 질병 원인균으로 작용할 뿐만 아니라 정상적인 미생물 총의 한 부류로 분리되며(Austin and Austin, 1993), 또한, 사육환경이 악화됐을 때 어체에 침입하여 생체방어능력을 저하시켜 질병을 일으킨다고 알려져 있다(Hjeltnes and Robert, 1993).

고수온기인 여름철에는 해수로부터 병원성 *Vibrio* 균 검출비율이 높다고 알려져 있어서(Shin *et al.*, 1976) 양식장 사육수내의 세균 상 및 *Vibrio*속 세균의 분포는 양식중인 어류의 세균성 질병발생과도 연관성이 높을 것 판단 된다.

최 등(2000)은 군산 내만의 해양수의 세균분포연구에서 *Vibrio* spp.가 전체 분리 균주의 35.7%로 가장 우점한다고 보고하였고, 그 중 해산 양식어의 vibriosis와 관련된 종이 38 균주가 분리되어 해양수내의 세균분포가 어류의

세균성 질병발생과 관련설을 보고하였으며, 윤 등(1996)은 국내 연안해수로부터 다양한 *Vibrio*속 세균의 분리를 보고하였다.

또한, 신 과 정(1996)은 여수연안 및 동중국해의 세균상 분포연구에서 *Vibrio* 속 세균의 경우 *Vibrio alginolyticus*와 *Vibrio parahaemolyticus*가 우점하게 분리되었다고 보고하였고, 김 과 오(1982)는 제주항의 *Vibrio parahaemolyticus*분포를 조사하였는데, 해수 중의 *Vibrio* 분포를 포함해서 세균분포를 파악하는 것이 양식어류의 질병관리차원에서 매우 중요한 것으로 생각된다.

따라서 본 연구는 제주도내 육상 양식장의 유입수에 대한 총 세균수 및 *Vibrio* 속 세균의 월별 변화 양상을 파악함으로써 제주도내 양식장의 수질 환경 및 위생관리에 대한 기초자료를 제공하고자 실시하였다.



2.2. 재료 및 방법

2.2.1. 시료채취

양식장 사육수의 세균학적 수질특성분석을 위해 2001년 6월부터 2002년 5월까지 제주의 동부지역 2개소(표선, 성산)와 서부지역 2개소(애월, 한림)의 육상 넙치 양식장을 대상으로 사육수조로 유입되는 해수 및 지하수에 대해 월 1회씩 시료를 채취하였다(Fig. 2-1.).

무균 채수병에 채취된 시료는 냉장상태로 실험실로 운반하여 유입수의 총 세균수 및 *Vibrio* 속 균수를 측정하였다.

2.2.2. 세균학적 특성 분석

총 세균수 및 *Vibrio* 속 세균수의 측정에는 Jannasch and Jones(1959)의 membrane filter법을 응용하여 생균수를 측정하였다. 즉 멸균된 pore size 0.45 μm membrane filter(GN-6 Metrice[®] Grid 47mm, Pall Corporation, USA)를 이용하여 적당량의 시료를 여과한 후 membran filter를 Marine agar 2216(Difco, USA) 및 TCBS agar(Difco, USA) 평판에 얹은 후 $30\pm 1^\circ\text{C}$ 에서 배양하였다.

Marine agar 2216 평판배지에서 48 ± 2 시간 배양 후 형성된 집락을 총 세균수로 측정하였고, TCBS agar 평판배지에서 24 ± 2 시간 배양 후 형성된 황색 및 녹색 집락을 *Vibrio*속 균으로 판단하여 측정하였다. 균수는 집락 계수가 가능한 3개의 평판을 취하여 평균으로 처리하였다.

현장의 수온 및 염분은 salinometer(YSI 30, USA)를 이용하여 측정하였다.



Fig. 2-1. The site map for collecting water sample of aquaculture farm in Jeju, Korea.

2.3. 결과 및 고찰

2.3.1. 월별 수온 변화

조사대상 양식장 별 유입수의 월별수온 변화를 Fig. 2-2에 나타내었다. 지하수의 수온 분포는 A(표선 지역) 양식장의 경우 17.5℃(1월) ~18.6℃(7월), B(성산 지역) 양식장의 경우는 15.7℃(2월)~20.5℃(7월), C(한림 지역) 양식장의 경우는 15.4℃(12월)~18.2℃(7월), 그리고 D(애월 지역)양식장의 경우는 16.5℃(1월)~18.8℃(7월)였다.

시료채취 양식장 별 지하수의 월별 수온 편차는 A 양식장의 경우가 1.1℃로 수온 편차가 가장 적었고 년 중 약 18℃ 전후의 수온분포를 보였다. B 양식장의 경우는 4.8℃의 수온 편차를 보였고, C 와 D 양식장은 각각 2.8℃, 2.3℃의 편차를 보였다.

조사대상 양식장의 지하수의 수온편차는 전체적으로 약 1.1~4.8℃로 년 중 큰 편차가 없는 것으로 판단되었으나 년 중 가장 높은 수온분포를 보인 달은 7월이었다.

해수의 수온 분포는 A 양식장의 경우 14.2℃(1월)~25.9℃(8월), B 양식장의 경우 13.8℃(1월)~27.1℃(8월), C 와 D 양식장은 각각 14.5℃(2월과 3월)~26.8℃(8월) 와 14.4℃(3월)~25.5℃(8월)이었다.

조사대상 양식장 전체적으로 8월에 가장 높은 수온 분포를 보이는 것으로 조사되었으며, 1월~3월 사이가 1년 중 가장 낮은 수온분포를 보였다.

지하수 및 해수의 수온 분포를 비교하여 볼 때 일반적으로 11월과 5월은 지하수 및 해수의 수온분포가 비슷한 경향을 보였으며, 1월~4월까지 지하수가 높은 수온분포를 보였고, 6월~10월은 해수가 지하수에 비해 높은 수온분포를 나타내었다.

현재 제주도의 육상 양식장은 대부분 지하해수 개발이 가능한 지역위주로 시설되어 있는데, 수중의 세균수 분포가 수온과 직접적인 영향이 높다고 판단할 때 지하 해수층의 존재는 사육수의 수온조절을 통한 양식어의 건강관리 측면만이 아니라 기회감염에 의한 세균성 질병예방 차원에서 중요한 요인으로 판단된다.

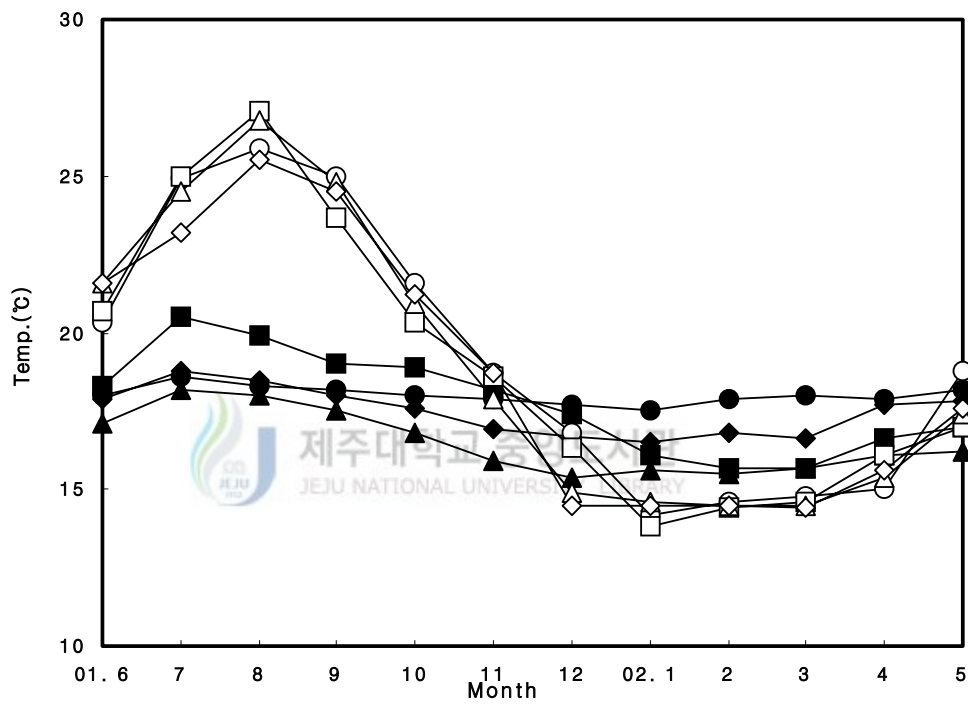


Fig. 2-2. Monthly variation of water temperature of aquaculture farms in Jeju, Korea. Symbols; Groundwater(●) and seawater(○) of Farm A, Groundwater(■) and seawater(□) of Farm B, Groundwater (▲) and seawater(△) of Farm C, Groundwater(◆) and seawater(◇) of farm D.

2.3.2. 월별 염분농도의 변화

조사대상 양식장별 유입수의 염분농도의 변화는 Fig. 2-3에 나타내었는데 A양식장의 지하수의 염분농도는 30‰(11월)~32.2‰(7월)로 조사되어 일반해역과 비슷한 수준을 보였으며, B양식장의 지하수는 18.9‰(8월)~26.5‰(2월)의 범위로 조사되어 일반해역보다 낮은 염분농도를 보였고, C 와 D 양식장의 지하수의 염분농도는 각각 3.7‰(7월)~5.1‰(6월)와 25.1‰(1월)~30.8‰(6월)의 범위를 보였다.

B 양식장의 지하수의 경우는 월별 염분농도 변화 폭이 조사대상 양식장에서 가장 큰 것으로 조사되었는데, Fig 2-2에 나타난 수온분포 조사에서도 변화폭이 다른 양식장의 지하수에 비해 큰 것으로 확인되었는데, 이는 B 양식장 지하수의 수질이 안정되지 않은 것에 기인하는 것으로 사료되며 본 연구에서는 조사되지 않았지만 다른 물리 화학적 성분들의 월별 변화폭도 클 것으로 판단된다.

C 양식장은 조사대상 양식장 중 지하수의 염분 농도가 가장 낮은 것으로 확인되었으나 월 별 변화 폭은 크지 않은 것으로 조사되어 해수와의 적절하게 혼합해서 이용 할 때 수온 관리차원에서 효과적일 것으로 사료된다.

넙치는 일반적으로 광염성 어종으로 알려져 있어 사육수의 염분농도 변화에 민감하게 반응하지는 않을 것으로 사료되나 사육수의 잦은 환경변화는 어떠한 형태로든 어류의 1차 적인 스트레스요인으로 작용할 가능성이 있다고 여겨진다. 또한, 대부분의 어류 질병원인 세균들이 기회 감염 균주로서 1차적인 스트레스에 의한 면역력약화 개체 위주로 발병율이 높다고 볼 때 사육수의 안정적인 관리가 중요하다고 판단된다.

해수의 염분농도 분포는 A, B, C, D 양식장이 각각 30.5‰(8월)~33.2‰(9월), 30.4‰(8월)~32.5‰(6월), 29.9‰(8월)~33.1‰(9월), 30.1‰(8월)~33.1‰(9월)로 조사되었으며, 모든 양식장이 수온이 가장 높았던 8월에 가장 낮은 염분농도를 보였으나 년 중 변화 폭은 크지 않은 것으로 판단되었다.

2.3.3. 총세균수 및 *Vibrio* 속 세균수의 월별변화

조사대상 양식장의 지하수에 대한 총 세균수 및 *Vibrio* 속 세균수 측정

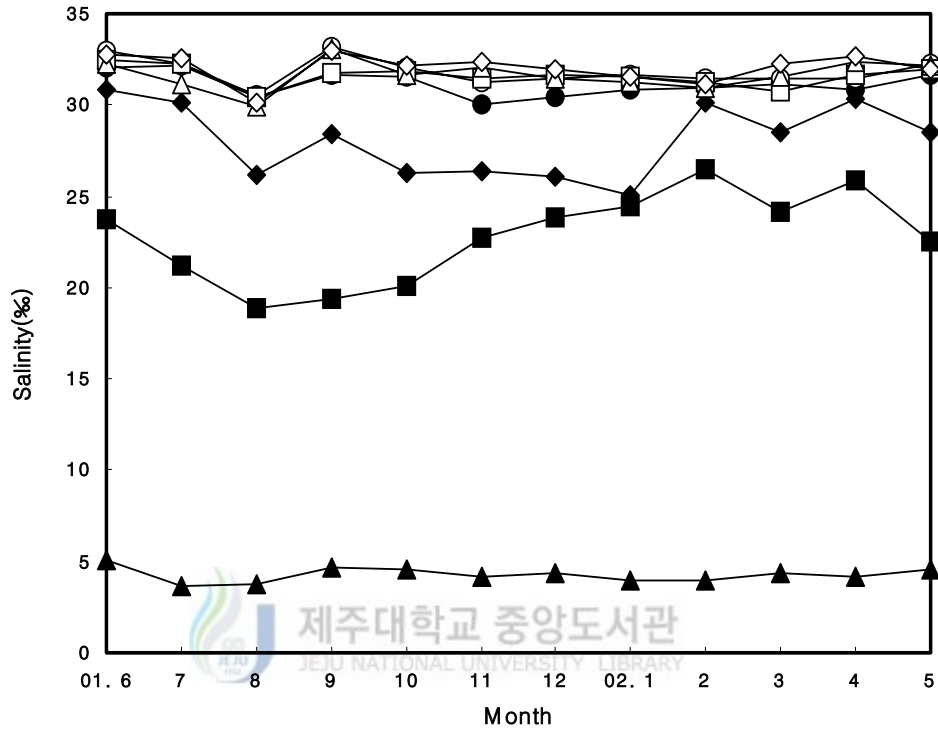


Fig. 2-3. Monthly variation of water salinity of aquaculture farm in Jeju, Korea. Symbols; Groundwater(●) and seawater(○) of Farm A, Groundwater(■) and seawater(□) of Farm B, Groundwater(▲) and seawater(△) of Farm C, Groundwater(◆) and seawater(◇) of farm D.

결과를 Table 2-1에 나타내었다.

월별 지하수의 총 세균수에 대한 측정 결과는 A 양식장의 경우 87~603 CFU/100 mL이었고, B 양식장은 2,233~10,033 CFU/100mL의 범위로 조사되었고, C 와 D 양식장은 각각 1,700~8,667 CFU/100mL 와 220~1,310 CFU/mL였다.

지하수의 *Vibrio* 속 세균수는 A, B, C, D 양식장에서 각각 3~40, 290~3,900, 13~157, 2~44 CFU/100mL의 범위를 나타내었다.

조사대상 양식장 지하수의 총세균수에 대한 조사결과 A양식장은 12월에 가장 높은 세균수를 나타냈으며, B 양식장은 1월, C 와 D 양식장은 5월에 가장 높은 세균수를 나타내는 것으로 조사되었으며, 가장 적은 세균수를 보인 달은 A, B, C, D 양식장이 각각 2월, 3월, 12월, 1월이었다.

각 양식장의 세균수에 대한 년 평균 비교를 보면 B 양식장이 가장 높은 5,345 CFU/100mL였으며, 가장 적은 세균수를 보인 곳은 A 양식장으로 321 CFU/mL이었다.

지하수의 *Vibrio*속 세균수에 대한 조사에서는 A, B, C, D 양식장에서 각각 1월, 7월, 1월, 5월에 가장 높은 세균수를 보였으며, 가장 적은 *Vibrio*속 균수를 보인달은 A 양식장은 2월과 3월, B 양식장은 3월, C 양식장은 7월, D 양식장은 11월이었다.

Table 2-2에 나타낸 해수에 대한 세균수 측정 결과에서 총 세균수는 A, B, C, D 양식장 해수에서 각각 10,367~61,400, 5,467~52,370 9,167~76,470, 9,300~40,000 CFU/100mL이었다.

조사대상 양식장의 해수에 대한 *Vibrio* 속 세균수의 측정결과에서는 A 양식장은 1,447~14,630 CFU/100mL, B양식장의 경우는 1,133~7,967 CFU/100mL이었고, C 와 D 양식장은 각각 3,233~7,933 CFU/100mL 와 2,000~12,050 CFU/100mL로 측정되었다.

해수의 총 세균수 측정에서 A 양식장에서는 8월에, B, C, D 양식장에서는 9월, 8월, 6월에 각각 가장 높은 세균수를 나타내는 것으로 조사되었으며, 가장 낮은 세균수를 보인 달은 A 양식장은 12월에 나머지 3군데 양식장에서는 3월이었다.

Table 2-1. The number of bacteria of groundwater supplied to aquaculture farms for flounder raising in Jeju

Unit: CFU/100mL

Bacteria Farms	01.6	7	8	9	10	11	12	01.1	2	3	4	5	Mean
A	383	360	630	390	467	1187	603	411	87	137	213	267	321
B	3,533	7,630	9,600	5,917	3,340	3,360	4,633	10,033	5,567	2,233	3,367	4,513	5,345
C	2,400	4,400	5,267	3,720	4,667	2,500	1,700	2,000	2,260	2,367	6,000	8,667	3,964
D	1,910	1,209	660	447	970	487	970	220	280	633	467	747	712
Mean	1,931	3,400	3,967	2,586	2,333	1,770	1,951	3,366	2,050	1,342	2,706	3,546	2,580
<hr/>													
A	29	33	6	6	17	23	20	40	3	3	4	10	16
B	416	8,900	1,207	1,470	663	743	667	1,043	667	230	710	1,368	1,068
C	36	13	142	73	167	97	76	31	47	53	63	40	67
D	6	17	9	5	3	2	3	4	4	10	5	44	9
Mean	121	960	341	388	207	216	188	279	172	84	196	369	235

Table 2-2. The number of bacteria of seawater supplied to aquaculture farms for flounder raising in Jeju

Bacteria Farms	Unit: CFU/100mL														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	Mean
Total bacteria															
A	37,300	46,370	61,400	52,330	37,400	10,200	10,367	14,233	13,133	15,833	33,467	43,833	30,368		
B	52,370	34,770	50,100	39,500	11,030	10,070	9,067	19,067	8,467	5,467	20,067	20,333	23,552		
C	22,200	32,230	75,470	24,030	19,030	12,000	15,467	13,467	14,500	8,167	33,800	25,167	24,852		
D	40,000	35,030	37,700	15,440	12,090	13,030	12,500	14,200	15,367	9,300	25,033	20,633	20,868		
Mean	37,967	37,100	56,417	27,850	20,087	13,000	11,950	15,441	12,866	9,941	29,291	27,891	24,950		
Vibrio															
A	3,730	5,400	14,630	8,767	4,833	4,767	1,467	1,447	2,017	2,433	2,633	4,347	4,305		
B	2,633	2,267	7,467	7,967	6,868	1,133	1,200	1,617	1,930	2,433	6,523	3,167	3,817		
C	4,967	7,353	7,827	5,667	7,933	7,867	5,900	6,667	3,233	3,367	4,268	4,967	5,833		
D	4,100	9,833	12,050	10,120	8,933	4,520	2,767	4,100	2,233	2,900	4,667	5,700	5,918		
Mean	5,865	6,563	10,493	8,130	7,145	4,571	2,853	3,457	2,353	2,574	4,572	4,545	5,363		

해수에 대한 월별 *Vibrio* 속 세균수 조사에서는 A, B, C, D 양식장에서 각각 8월, 9월, 10월, 9월에 가장 높은 것으로 조사되었고, 1월, 11월, 2월, 3월에 각각 가장 낮은 세균수를 나타내었다.

정 과 신(1996)은 한국 여수연안의 일반세균수가 여름철에 $1.0 \times 10^2 \sim 3.0 \times 10^4$ /mL로 보고하였으며, 동중국해의 경우는 $0.4 \times 10^2 \sim 2.0 \times 10^3$ /mL로 보고하여 연안에서 멀어질수록 세균수가 감소한다고 보고하였고, 강 과 오 (1999)의 제주지역 항포구의 세균수 조사에서는 $0.9 \times 10^2 \sim 135.33 \times 10^2$ /mL로 보고하였으며 주로 여름철에 높게 나타난다고 하였다.

본 연구에서 계절적인 세균 분포양상은 정 과 신(1996) 및 강 과 오 (1999)의 결과와 비슷하였으나 분포 세균수 조사에서는 본 연구에서 조사대상 양식장 전체에 대한 지하수 및 해수의 총 세균수의 평균은 1,342~3,997 CFU/100mL 와 9,941~56,417 CFU/100mL로 정 과 신(1996) 및 강 과 오 (1999)의 조사 보다 낮게 나타났는데, 이는 양식장 유입수가 저층 해수 및 지하수인 점에 기인하는 것으로 사료된다.

또한, Shin *et al.*(1976)은 연안수의 *V. parahaemolyticus*에 대한 계절적 변동을 조사한 결과 여름철에는 $10 \sim 10^4$ CFU/100mL 까지 검출되었다고 하였으나, 겨울철에는 검출되지 않아 계절적으로 큰 차이를 보인다고 하였고, 김 과 오(1982)는 제주항에 대한 *V. parahaemolyticus* 분포조사에서 8,9월이 높은 분포를 보인다고 하였는데, 본 조사에서도 해수의 경우에 주로 8, 9월인 여름철에 *Vibrio* 속 균수가 높고 겨울철에 낮게 나타나는 것으로 조사되어 비슷한 결과로 사료된다.

그리고 Croci *et al.*(2001)은 해수로부터 분리된 세균의 46.9%가 *Vibrio* 속으로 동정하였는데 본 연구에서는 지하수의 경우는 총 세균수에 대한 *Vibrio* 속 세균수가 차지하는 비율은 약 11% 정도로 나타났고, 해수의 경우는 평균 약 20% 정도로 조사되어 지하수보다는 해수의 경우가 총 세균수에 대한 *Vibrio* 속 세균수 비율이 높게 나타났다.

또한, 지하수와 해수의 세균수 분포를 비교해 보면 총 세균수의 경우 약 9.5배, *Vibrio* 속 세균수는 약 17 배정도가 지하수 보다 해수에서 높게 검출되었다.

본 연구의 결과(3. 제주산 양식넙치로부터 어류병원성 세균의 분리 및 규명)에 의하면 7월과 8월 등 주로 여름철에 세균성 질병 및 기타 질병 발생이 높은 것으로 나타나고 있는데(Table 3-3), 양식장 유입 해수의 총 세균수 및 *Vibrio* 속 세균수 역시 수온이 높은 8월 과 9월에 높게 조사되고 있어 여름철 세균성 질병발생이 수온상승 및 사육수내의 세균수 분포와도 상관성이 높은 것으로 판단된다.

그러나 지하수의 경우는 년 중 수온편차가 크지 않은 것으로 조사되었고, 세균수 분포에서도 계절적 상관성이 크지 않은 것으로 판단되며, 또한 세균분포수가 해수에 비해 낮은 것으로 조사되어 지하수의 적절한 활용은 여름철 수온관리 및 세균성 질병 관리 차원에서 매우 유용 할 것으로 사료된다.



2.4. 요약

제주도내 양식장의 수질 환경 및 위생관리에 대한 기초자료를 제공하고자 육상양식장 4군데를 대상으로 양식장 유입수로 사용되는 해수 및 지하수의 총 세균수, *Vibrio* 속 세균의 월별 분포 양상 및 수중의 세균 분포에 밀접한 영향을 미칠것으로 판단되는 물리적 환경요인인 수온과 염분농도의 월별 변화를 파악하였다.

조사기간 중 수온 분포는 지하수의 경우 15.1℃~20.5℃로 편차는 크지 않았으나 7월 수온이 가장 높게 조사되었고, 해수인 경우 13.8℃~27.1℃로 조사되었는데 모든 양식장에서 8월이 가장 높은 수온분포를 나타냈다. 각 양식장의 월간 수온편차는 해수의 경우에는 전체적으로 10℃이상의 월간 수온 편차를 보였으나, 지하수의 경우는 약 1.1~4.8℃정도로 조사되어 지하수의 경우는 계절적 수온변동이 크지 않았다.

염분농도의 경우 대부분 양식장에서 지하수가 해수에 비해 염분농도가 낮게 조사되었으며, 해수보다는 지하수가 월간 편차가 큰 것으로 나타났으며, 해수의 경우에는 주로 8월이 다른 달에 비해 낮은 염분농도를 보였다.

총 세균수 및 *Vibrio* 속 세균수에 대한 조사에서 지하수의 월평균 총 세균수는 1,342(3월)~ 3,997(8월) CFU/100mL, 년 평균 총 세균수는 2,580 CFU/100mL이었다. 또한 지하수의 월 평균 *Vibrio* 속 세균수는 84(3월)~ 990(7월) CFU/100mL이었으며, 년 평균 *Vibrio* 속 세균수는 295 CFU/100mL이었다.

해수의 월 평균 세균수에 대한 조사에서는 총 세균수는 9,941(3월)~ 56,417(8월) CFU/100mL, *Vibrio* 속 세균수는 2,353(2월)~10,493(8월) CFU/100mL로 측정되었고, 평균 세균수는 총 세균수가 24,950 CFU/100mL, *Vibrio* 속 세균수가 5,093 CFU/100mL로 나타났다.

지하수와 해수의 세균수 분포를 비교해 보면 총 세균수의 경우 약 9.5배, *Vibrio* 속 세균수는 약 17 배정도가 지하수 보다 해수에서 높게 검출되었으며, 또한 총 세균수 및 *Vibrio* 속 세균수의 월별 편차가 지하수 보다 해수에서 높게 나타났다.

또한 총 세균수에 대한 *Vibrio* 속 세균수의 분포비율은 해수는 약 20%, 지하수에서는 약 11% 정도로 조사되어 해수가 지하수 보다 *Vibrio* 속 세균이 차지하는 비율이 높게 나타났다.

본 연구에서 지하수에 비해 상대적으로 해수에 분포하는 세균수가 높게 조사되었고 세균수의 계절적 편차가 큰 것으로 나타났으며, 또한 총세균수 및 *Vibrio* 속 세균수에서 모두 수온이 높은 여름철에 세균수가 높게 검출되었다는 것은 여름철에 세균성 질병을 포함한 어류 질병 발생율이 높은 것에도 연관성이 높은 것으로 사료된다.

따라서 여름철 사육수의 위생관리가 양식어류의 질병과 관련하여 중요한 요인으로 판단될 뿐만 아니라, 수온 및 수중의 세균분포를 고려해 볼 때 지하수의 적절한 활용은 고수온기 양식어의 건강관리에 매우 긍정적인 측면으로 사료된다.



3. 제주산 양식넙치로부터 어류병원성 세균의 분리 및 규명

3.1. 서 론

어류의 질병 중에는 세균성 질병이 가장 많은 것으로 알려져 있으며, 국내 양식넙치의 세균성 질병에 대한 연구는 방 등(1992)의 *Edwardsiella tarda*에 대한 연구, 허 등(2000)의 양식넙치로부터 분리된 β -용혈성 *Streptococcus* sp.에 대한 연구와 이 등(1991)의 *Vibrio* sp.에 대한 연구 등이 보고되고 있다.

최근에는 질병원인세균이 두 종류 이상의 복합감염으로 나타나서 치료 및 예방대책을 세우는데 어려움이 많은 실정이다. 이러한 어류 세균성 질병에 대한 피해를 최소화하기 위해서는 그 원인균의 분포현황을 파악하고 이에 대한 사전예방 및 적절한 치료대책을 강구하는 것이 필요하다고 할 수 있다.

현재까지 어류의 세균성질병에 대한 치료는 화학요법에 의존하고 있는데, 일본의 경우 오래 전부터 주요 어류질병세균에 대한 약제내성경향을 파악하여 대 어민지도자료로 활용하고 있으나(Kim and Akoi, 1993; Kusda *et al.*, 1990), 약제내성균주의 출현 등으로 그 치료가 더욱 어려운 실정이다(Kusda *et al.*, 1990).

양식어류의 질병에 대한 대책을 수립하기 위해서는 양식장의 질병발생동향파악, 원인균 동정, 복합감염여부, 약제내성균주의 파악 등이 무엇보다 필요하다고 할 수 있으며, 일시적인 감염현황조사보다는 월별조사 및 치어 부터 성어에 이르기까지 성장단계에 따른 질병동향 등 광범위한 조사가 이루어져야 할 것으로 판단된다.

본 연구는 제주산 양식넙치에 대해 양식어류의 주요 세균성 질병으로 보고되는 vibriosis, edwardsiellosis, streptococcosis에 대한 발생현황을 조사하여 월별 발생상황, 발생 비율 등을 분석함과 동시에 감염시료로부터 분리되는 세균들에 대한 항생제 감수성 시험을 실시하여 제주도 양식넙치의 세균성 질병발생 대책 수립에 기초자료를 제공하고자 한다.

3.2. 재료 및 방법

3.2.1. 시료채취

시료채취는 2001년 6월부터 2002년 5월까지 제주도내 넙치 육상 양식장에서 질병발생이 보고된 양식장의 넙치 집단에 대하여 체색흑화, 피부궤양, 지느러미 출혈, 안구돌출 및 충혈, 안구백탁, 장탈장등 외부조건 상 질병에 걸린 것으로 추정되는 어류를 무작위로 추출하여 세균분리용 시료로 사용하였으며 대표적인 증상들은 Fig. 3-1에 나타내었다.

시료 채취 현황은 Table 3-1과 3-2에 나타내었는데, 전체적으로 780회에 걸쳐 시료를 채취했으며, 월별로는 7월이 132 시료로 가장 많았으며 5월이 가장 낮은 34 시료가 실험에 이용되었다.

넙치의 성장단계를 판단할 수 있는 어체 크기별 채취현황은 20cm 이하의 치어가 286 개체였으며, 중간어로 판단 할 수 있는 20~30cm 크기 시료는 228 개체, 성어로 판단되는 30cm 이상 크기는 266 개체가 채취되었다.

지역별로는 표선 지역이 78개 양식장에서 502 시료, 성산 지역이 20개 양식장에서 108 시료, 남원 지역이 14 개 양식장에서 96 시료로 전체의 90.5%인 706 시료가 표선, 성산, 남원지역의 양식장으로 부터 채집되었다(Fig. 3-2).

3.2.2. 세균의 분리, 동정 및 세균성 질병 진단

세균의 분리를 위해 채집된 어류를 무균적으로 해부하여 신장 또는 간의 조직액을 1.5% NaCl이 첨가된 BHIA(Difco, USA), 1.5% NaCl-TCBS agar(Difco, USA) 그리고 1.5% NaCl-SS agar(Difco, USA)에 도말 하여 $30\pm 1^{\circ}\text{C}$, 16-24시간 배양하였다.

배양된 세균은 속 수준에서 *Streptococcus* sp., *Edwardsiella* sp., 그리고 *Vibrio* sp.로 간이 동정 한 후(Thoesen, 1994), 각각 streptococcosis, edwardsiellosis, vibriosis로 진단하였다.

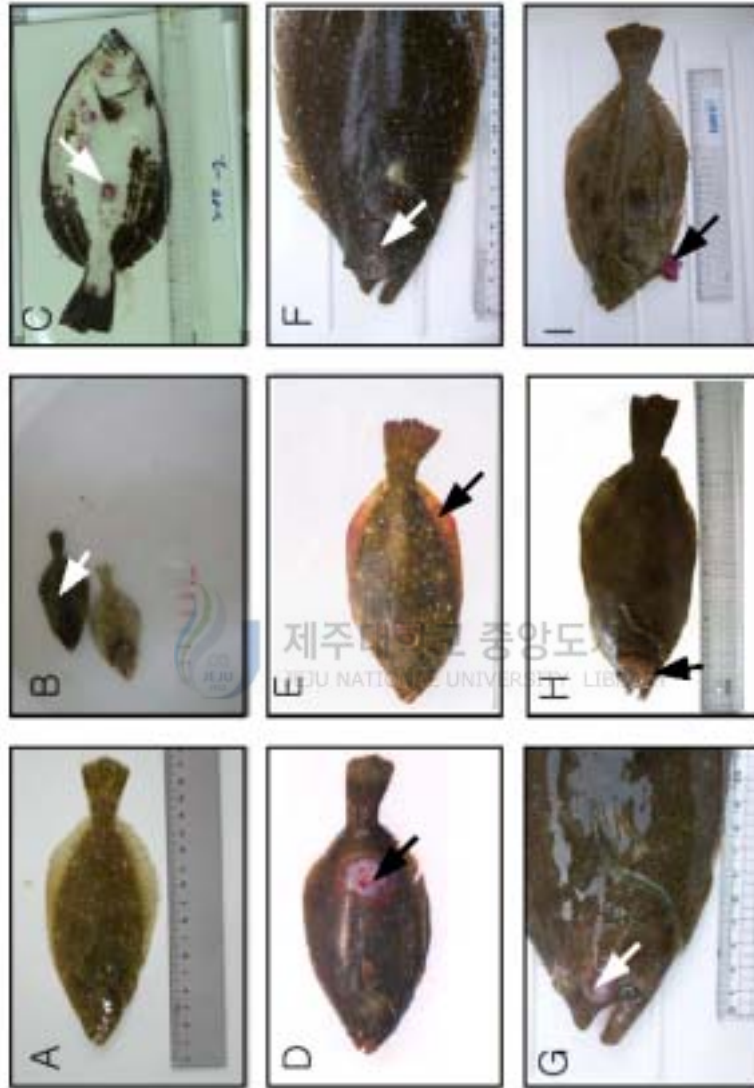


Fig. 3-1. The representative pictures for flounders showing external disease symptoms. A; normal fish, B;darkened pigment(up), C-D; haemorrhaging in the fin, E;exophthalmia and haemorrhaging in the eye, G; whitening and haemorrhaging in the eye H; abscess in eye, I;distended abdomen and protruded anus.

Table 3-1. Individual number of flounders showing external disease symptom monthly based on body length

Month	Body length of flounder(cm)					Total No.
	≤10	10<-≤20	20<-≤30	30<-≤40	40<-≤50	
01. 6	16	24	39	14	4	97
7	11	18	64	32	7	132
8	2	26	28	23	10	89
9	3	7	19	19	1	49
10	2	17	10	22	1	52
11	7	19	7	14	4	51
12	7	26	6	24	9	72
02. 1	5	31	11	13	5	65
2	2	20	9	7	4	42
3	4	17	6	10	12	49
4	3	11	16	7	11	48
5	6	2	13	4	9	34
Total No.	68	218	228	189	77	780

Table 3-2. Number of flounders collected from each sampling site

Month	Sampling site								Total No.
	Namwon	Pyoseon	Seongsan	Gujwa	Jocheon	Hallim	Daejeong	Seogwipo	
'01. 06	23	54	16	0	0	0	0	4	97
07	17	92	10	0	1	6	0	6	132
08	19	57	9	0	0	1	0	3	89
09	3	32	8	0	0	0	4	2	49
10	6	37	4	1	0	0	1	3	52
11	1	30	14	4	0	0	0	2	51
12	8	45	9	1	0	0	0	9	72
'02. 01	3	43	9	8	0	0	2	0	65
02	0	33	5	3	0	0	1	0	42
03	4	34	6	0	0	0	2	3	49
04	6	28	9	2	0	0	0	3	48
05	6	17	9	0	0	0	0	2	34
Total No.	96	502	108	19	1	7	10	37	780

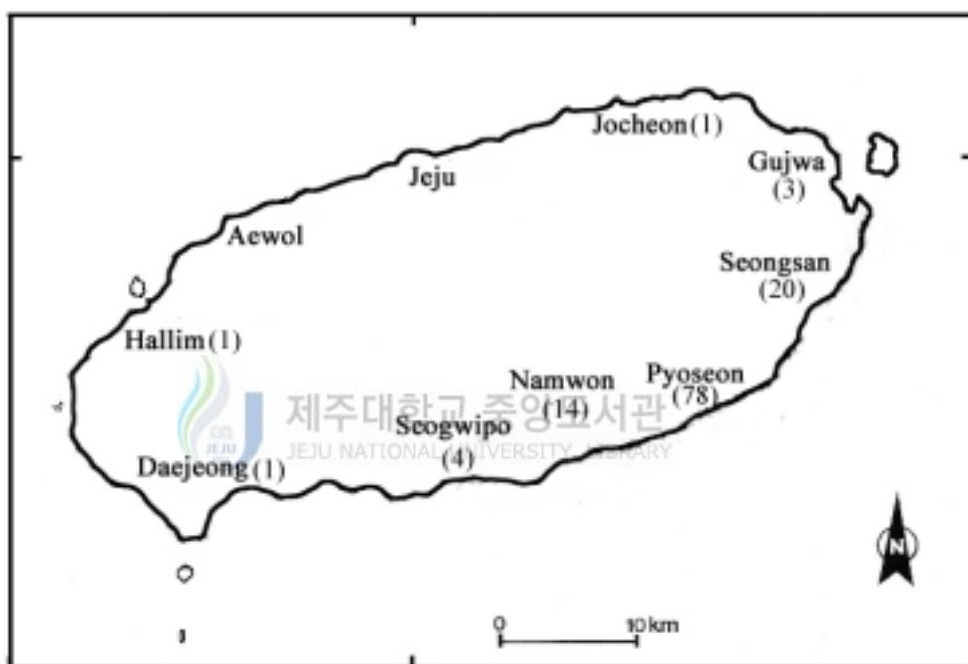


Fig. 3-2. The map of sampling area and number of farms sample were collected.

3.2.3. 분리세균의 항생제 감수성 시험

각각의 시료로부터 분리된 세균에 대한 항생제 감수성시험은 Baucer *et al.*(1966)의 disc 확산법을 이용하여 NCCLS의 기준에 따랐다.

먼저 BHIA 사면배지에 자란 colony를 0.85% 멸균 생리식염수에 희석하여 McFarland NO. 0.5가 되도록 탁도를 조절하여 1.5% NaCl이 첨가된 Muller Hinton Agar(Difco,USA)에 도말 한 후 BBL사(USA)의 항생제 disc 15종을 얹어 $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 24 ± 2 시간 배양 한 후 억제환을 측정하였다.



3.3. 결과 및 고찰

3.3.1. 세균성 질병의 단독 및 혼합발생 현황

외부조건 상 질병증상이 있는 것으로 추정되는 넙치로부터 분리한 세균을 간이동정한 결과로 추정진단한 질병발생 현황을 Table 3-3에 나타내었다. 시료 채취 현황을 기준으로 제주도내 양식넙치의 질병 발생동향을 추정해 볼 때 조사기간 중 질병발생이 가장 많은 달은 7월로 나타났으며, 질병발생이 가장 적은 달은 5월이었다.

채취된 시료로부터 *Streptococcus* sp. *Edwardsiella* sp. *Vibrio* sp. 등으로 간이 동정되는 결과를 바탕으로 세균성 질병 발생건수가 많다고 판단되는 달은 시료채취수가 많았던 7월과 8월이었으며, 2~5월에는 질병이 발생한 것으로 추정되는 넙치 집단의 수도 적었으며, 세균검출시료도 적어 계절적으로는 여름철이 세균성 질병발생이 높은 것으로 판단되고, 또한 10월~1월에도 상대적으로 높은 세균성질병발생을 보였다.

반면에 채취시료에 대한 세균 분리율은 10월이 98.1%로 가장 높은 비율을 보여 다른 원인보다 세균성질병에 의한 피해가 높을 것으로 판단되며, 6월에는 시료채취가 97개 집단에서 이루어져 7월 다음으로 질병발생이 많은 것으로 판단되었으나 채취 시료 중 세균 분리율은 52.5%로 조사되어 어류의 체내 세균감염에 의한 피해와 더불어 다른원인에 의한 질병발생도 높은 것으로 사료된다.

6월부터 8월 사이에 세균성 질병을 포함한 질병발생비율이 높은 것은 Fig 2-2에서 알 수 있듯이 수온 상승등에 의한 수조 내 세균증식 등과도 관련이 있을 것으로 사료되며, 수온이 낮은 10월부터 1월 사이에도 세균성질병을 포함해서 질병발생이 높게 조사된 것은 제주도내 많은 양식장에서 주로 10월부터 치어입식이 이루어져 초기 사육과정에서 면역력이 약한 치어에 세균 감염을 비롯한 기타 병원생물의 감염에 기인하는 것으로 추정된다.

조사대상 질병에 대한 단독발생 또는 혼합발생 상황을 보면 세균이 검출된 579 시료 중에서 480 시료에서는 vibriosis, edwardsiellosis, streptococcosis 등이

Tale 3-3. The occurrence frequency of a single or mixed bacteria from flounders showing external disease symptom in Jeju from June 2001 through May 2002

Month	Occurrence of bacterial diseases								Total No.	
	V ¹	Ed ²	St ³	V+Ed	V+St	Ed+St	V+Ed+St	Total		
'01. 6	12	27	6	3	3	0	0	51(52.6)	46	97
7	28	41	19	9	1	1	0	99(75)	33	132
8	10	17	18	9	4	6	2	66(74.2)	23	89
9	7	9	21	4	2	3	0	46(93.9)	3	49
10	17	8	19	2	2	3	0	51(98.1)	1	52
11	19	11	8	3	5	2	0	48(94.1)	3	51
12	18	10	9	8	4	2	0	51(70.8)	21	72
'02. 1	28	9	8	7	0	1	0	53(81.5)	12	65
2	16	4	5	4	0	0	0	29(69)	13	42
3	13	6	12	2	2	0	0	35(71.4)	14	49
4	7	6	13	0	3	0	0	29(60.4)	19	48
5	5	4	10	0	0	2	0	21(61.8)	13	34
Total No.	180	152	148	51	26	20	2	579(74.2)	201	780

() ; percent of bacterial isolation.

¹ Vibriosis, ² Edwardsiellosis, ³ Streptococcosis, ⁴ Not detected.

단독으로 발생한 것으로 조사되었고, 나머지 99 시료에서는 2종의 세균, 또는 3종의 세균이 혼합 감염된 것으로 나타났다. 단독 질병발생의 경우는 vibriosis가 가장 많은 180 시료로 전체 시료의 23%이었고, 다음은 edwardsiellosis 152 시료(19.5%), streptococcosis가 148 시료(19%)였다. 혼합 세균성 질병 발생은 vibriosis 와 edwardsiellosis 혼합발생의 경우가 51 시료(6.5%), vibriosis 와 streptococcosis가 혼합으로 발생한 경우가 26 시료(3.3%), edwardsiellosis 와 streptococcosis 혼합발생은 20시료(2.5%)였으며, 2 시료에서는 3종의 질병이 혼합으로 발생하였다.

단독발생과 혼합발생을 포함한 각 질병의 전체적인 발생상황을 비교 해 보면 vibriosis는 180 시료에서는 단독으로 질병이 발생하였고, 51 시료에서는 edwardsiellosis와 혼합발생 양상을 보였으며, streptococcosis와 혼합발생한 경우는 26시료로 조사되는 등 총 259 시료가 vibriosis로 간이진단 되었다. 대부분의 달에 단독 발생비율이 높게 조사되었으나 8월의 경우에는 vibriosis로 판단되는 25 시료 중 15마리의 시료가 edwardsiellosis 또는 streptococcosis와 혼합발생 한 것으로 나타났다.

Edwardsiellosis는 단독발생과 혼합 발생을 포함 총 225 시료에서 본 질병으로 간이진단 되었는데, 4월에 채취된 6 시료를 제외하고는 모든 달에 혼합발생이 조사되었는데 vibriosis와의 혼합 발생율이 streptococcosis와의 혼합 발생율을 보다 약 2배 이상 높은 51 시료였으며 8월과 12월은 각각 혼합 발생율과 단독 발생율이 같게 나타났다.

Streptococcosis는 단독 및 혼합발생을 합하여 196 시료가 진단되었는데 8월이 가장 높은 발생을 보이는 것으로 나타났다. 조사기간 동안 전체적으로는 vibriosis와 혼합발생한 경우가 26 시료, edwardsiellosis와 혼합발생한 경우가 20 시료였다. 8월, 9월, 10월에는 edwardsiellosis와의 혼합감염율이 vibriosis와의 혼합발생율을 보다 높게 나타났다.

조사대상 질병의 전체 발생건수에 대한 단독 질병 발생비율을 보면 streptococcosis가 전체 streptococcosis 발생 시료 196 시료 중 75%인 148 시료로 다른 질병에 비해 단독발생비율이 높게 나타났으며, vibriosis 와 edwardsiellosis의 단독발생비율은 각각 69%(180/259) 와 67%(152/225)로

확인되었다.

3.3.2. 월별 및 성장에 따른 세균성질병 발생상황

각각의 시료로부터 분리된 단독검출 및 혼합검출을 포함하여 해당 질병으로 간이진단된 결과를 근거로 한 제주산 양식넙치의 월별 세균성 질병발생상황을 Fig. 3-3에 나타내었다.

세균성 질병의 월별 발생유형 보면 6~8월에는 다른 질병에 비해 edwardsiellosis가 높은 발생비율을 보였으며, 9월과 10월, 그리고 4월과 5월에는 streptococcosis, 11~3월 사이에는 vibriosis가 다른 질병보다 높은 비율로 발생하였다.

6~8월 사이에 다른 세균성 질병에 비해 높게 조사된 edwardsiellosis의 경우는 발생이 가장 높게 조사된 7월을 기점으로 10월까지 감소추세를 보이다가 그 이후부터 12월까지 다시 약간 증가하는 경향을 보였다. 그러다가 이후 5월까지 계속하여 감소추세로 조사되었으며, 6월부터 급격히 증가하는 경향을 나타내었다.

월별 vibriosis의 발생상황은 9월을 기점으로 증가하기 시작하여 2월까지 지속적인 증가 추세를 보이다가 5월까지 감소하는 경향으로 조사되었는데 가장 높은 발생을 보인 달은 7월이었다.

Streptococcosis의 경우는 8월이 가장 높은 발생을 보였으며, 9월 이후에 2월까지 계속하여 감소하는 경향을 보이다가 3월에 증가하여 6월까지 비슷한 발생경향을 보였으며 7월 이후 증가하는 것으로 나타났다.

조사기간 동안 세균성 질병발생동향은 양식장의 치어 입식시기 및 성장과정과도 상당히 연관성이 높은 것으로 판단된다.

즉, Table 3-1의 질병발생이 보고되어 채집된 시료의 크기별 구분을 보면 4월부터 9월까지의 주로 20~30cm크기의 시료가 높은 비율로 채취되었으며, 10월의 경우에는 30~40cm 크기의 시료가 가장 많이 채집되었으며, 11월부터 이듬해 3월까지의 20cm 이하의 치어 중심으로 시료가 채집되었는데, 이러한 질병발생보고 및 시료채취는 대부분의 양식장에서 10~12월경에 치어를 입식 한 후 약 1년의 양성과정을 거치는 일련의 과정과도 관련이 있을 것으로

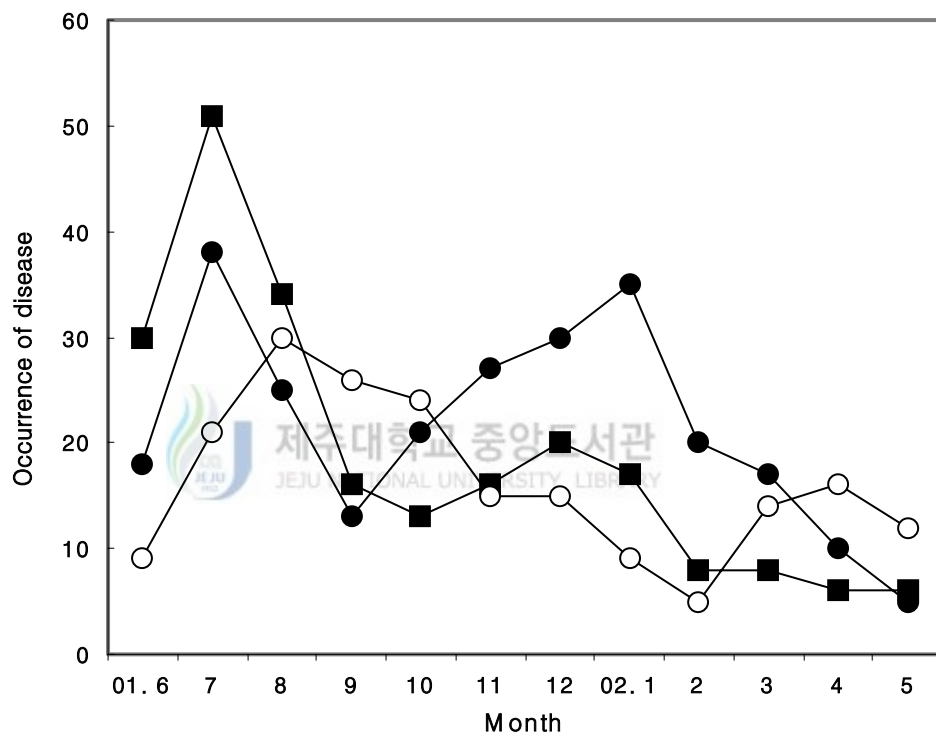


Fig. 3-3. Monthly occurrence frequency of bacterial diseases found in flounders of aquaculture farms from June 2001 through May 2002. Symbols: ●, vibriosis; ■, edwardsiellosis; ○, streptococcosis.

사료되며 이러한 과정이 세균성 질병 발생동향과도 연관이 깊은 것으로 사료된다.

이와 관련하여 시료로 채취된 어류의 크기별 세균분리현황을 Fig. 3-4에 나타내었다.

세균의 분리된 어류를 대상으로 볼 때 20cm이하의 크기의 치어에서는 vibriosis가 가장 많은 약 85%를 차지했으며, 20~30cm 크기의 시료에서는 edwardsiellosis가 약 52%로 가장 많은 비율로 조사되었고 30cm이상의 성어에서는 streptococcosis가 가장 높은 비율로 발생하였다. Fig. 3-4에서 볼 때 vibriosis는 주로 치어기인 20cm 까지 주로 발생하다가 점차 감소하는 경향을 보였으며, edwardsiellosis의 경우는 치어기 때 보다는 20cm이상의 시료에서 보다 높은 발병비율로 조사되었으나 중간성장단계로 볼 수 있는 20~30cm 크기에서 가장 높은 비율로 발생하였다. Streptococcosis는 20cm 정도 때부터 발병비율이 증가하기 시작하였으며 40cm 이상의 시료에서는 세균성 질병의 약 70%정도를 차지하였다.

성장기별 또는 어체 크기별 질병발생현황에 대한 원인규명을 위해서는 급이 사료종류별 세균감염현황조사 및 성장기별 어류의 장내세균 상 분석 등의 좀 더 구체적인 연구가 추가적으로 이루어져야 될 것으로 사료된다.

3.3.3. 시료채취지역에 따른 질병발생동향

시료채취 지역별 질병발생동향을 Table 3-4에 나타내었다. 주로 시료채취가 이루어진 남원, 표선, 성산지역 시료에 대한 결과를 위주로 볼 때, 남원지역의 시료에서는 단독으로 질병이 발생한 경우는 streptococcosis가 22 시료로 가장 높게 나타났으며, 단독발생 및 혼합발생을 포함한 경우에는 vibriosis가 전체의 34.3%인 33 시료였다.

시료수가 가장 많았던 표선지역의 시료에서는 502 시료 중 vibriosis로 간이진단된 경우가 단독발생 123 시료, 혼합발생 42 시료로 전체의 33%로 나타났으며, 다음으로는 edwardsiellosis가 29.7%, vibriosis가 22.3%였다.

성산지역 시료에서는 단독 질병발생의 경우에는 streptococcosis가 29 시료, vibriosis가 19 시료, edwardsiellosis가 17 시료로 조사되었으며, 혼합

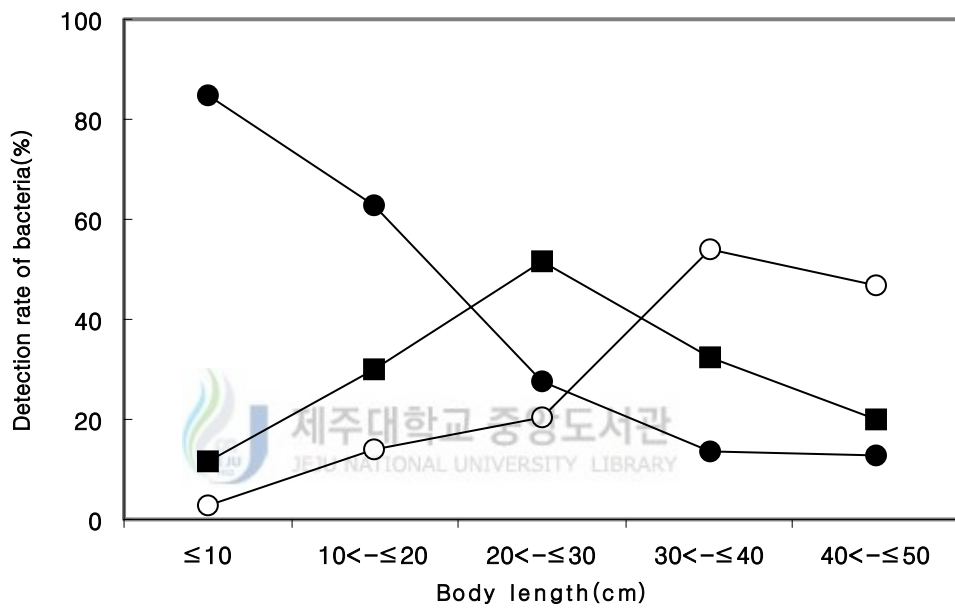


Fig. 3-4. Occurrence frequency of bacterial diseases found in flounders based on fish sizes(body length). Symbols: ●, vibriosis; ■, edwardsiellosis; ○, streptococcosis.

Table 3-4. The occurrence frequency of bacterial fish diseases found in flounders based on disease symptoms and sampling sites from June 2001 through May 2002

Bacterial diseases	Sampling site								Total
	Namwon	Pyoseon	Seongsan	Gujwa	Jocheon	Hallim	Daejeong	Seogwipo	
V ¹	14	123	19	12	1	1	6	4	180
Ed ²	17	105	17	1	0	4	0	8	152
St ³	22	84	29	0	0	2	0	11	148
V+Ed	13	29	6	2	0	0	0	1	51
V+St	6	13	6	0	0	0	0	1	26
Ed+St	2	14	1	0	0	0	0	3	20
V+Ed+St	0	1	1	0	0	0	0	0	2
ND ⁴	22	133	29	4	0	0	4	9	201
Total	96	502	108	19	1	7	10	37	780

¹ Vibriosis, ² Edwardsiellosis, ³ Streptococcosis, ⁴ Not detected.

발생을 포함한 전체적인 세균성 질병발생도 streptococcosis, vibriosis, edwardsiellosis가 각각 34%, 29.6%, 23.1% 순으로 나타났다.

3.3.4. 분리 균주에 대한 항생제감수성 시험결과

채취된 시료 중 vibriosis로 간이 진단된 259 시료에서 261균주의 *Vibrio* sp.가 분리되었으며, edwardsiellosis로 간이진단된 225시료로부터 *Edwardsiella* sp. 225균주, streptococcosis 진단 시료에서 *Streptococcus* sp. 196균주가 분리되었는데, 분리균주를 대상으로 15종의 항생제에 대한 감수성 시험결과를 Fig. 3-5에 나타내었다.

Ampicillin에 대한 항생제 감수성 시험에서는 *Streptococcus* sp.의 84.2%, *Edwardsiella* sp.의 85.8%가 감수성을 나타내었으나 *Vibrio* sp.는 시험균주의 17.6%만이 감수성을 나타내었다. Amoxicillin은 *Streptococcus* sp. 와 *Edwardsiella* sp.에 대해서는 각각 92.3%와 90.2%의 높은 감수성을 보였으나, *Vibrio* sp.의 경우에는 34.9%만이 감수성을 나타내었으며, Chloramphenicol의 경우에는 70%이상의 균주가 감수성을 보였다.

Ciprofloxacin는 *Streptococcus* sp.의 37.2%가 감수성을 보였으며, *Edwardsiella* sp. 와 *Vibrio* sp.균주는 각각 83.1%와 71.6%가 감수성을 보였다.

Doxycyclin에 대한 감수성시험에서는 *Streptococcus* sp., *Edwardsiella* sp., *Vibrio* sp. 균주 각각에 대해서 57.6%, 56%, 46.7%의 감수성을 나타내었으며, gentamycin은 *Streptococcus* sp., *Edwardsiella* sp.에 대해서는 14.7%와 26.2%의 낮은 감수성을 나타냈으나 *Vibrio* sp.에 대해서는 75%의 감수성을 보였다.

Kanamycin은 *Streptococcus* sp., *Edwardsiella* sp., *Vibrio* sp. 균주 각각에 대해서 3%, 2.2%, 31.4%의 감수성을 나타내어 전체적으로 매우 낮은 감수성을 보였으며, Nalidixic acid와 neomycin은 *Vibrio* sp.에 대해서는 각각 72%와 62%의 감수성을 나타내었으나 다른 균주에 대해서는 상대적으로 낮은 감수성을 보였다.

Norfloxacin은 조사대상 균주 전체에 대해서 50%이상의 감수성을 보였으며

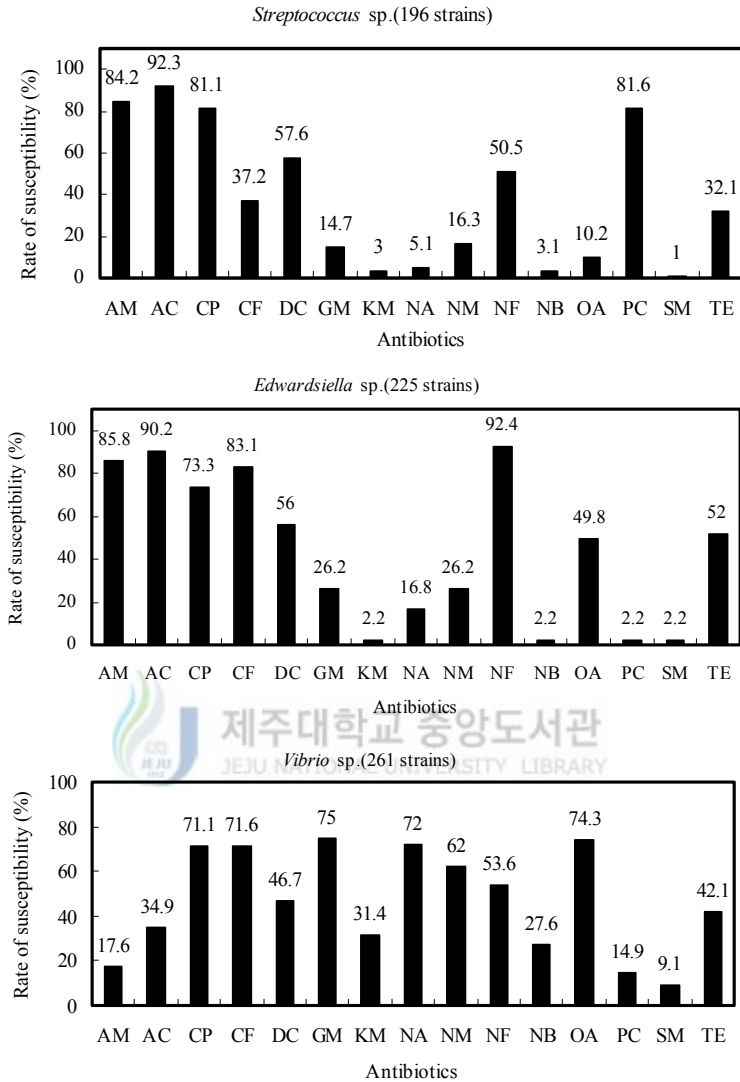


Fig. 3-5. Antibiotics susceptibility of strains of *Streptococcus* sp., *Edwardsiella* sp. and *Vibrio* sp. isolated from diseased flounder. AM, ampicillin; AC, amoxiillin; CP, chloramphenicol; CF, ciprofloxacin; DC, doxycycline; GM, gentamicin; KM, kanamycin; NA, nalidixic acid; NM, neomycin; NF, norfloxacin; NB, novobiocin; OA, oxolinic acid; PC, Penicillin; SM, streptomycin; TC, tetracyclin.

특히 *Edwardsiella* sp.에 대해서는 92.4%의 균주가 감수성을 보이는 것으로 나타났다.

Novobiocin은 *Streptococcus* sp., *Edwardsiella* sp., *Vibrio* sp.에 대해 각각 3.1%, 2.2%, 27.6%의 균주만이 감수성을 나타내었으며, oxolinic acid는 10.2%, 49.8%, 74.3%의 감수성을 보였다.

Penicillin은 *Streptococcus* sp.에 대해서는 81.6%의 균주에 대해서 감수성을 보였으나, *Edwardsiella* sp. 및 *Vibrio* sp.에 대해서는 2.2%와 14.9% 균주만의 감수성을 나타내었다.

Streptomycin은 전체 시험대상 균주에 대해서 10%미만의 균주가 감수성을 보여 15종의 조사대상 항생제 중 가장 낮은 감수성을 나타내었다.

양식장에서 보편적으로 사용되는 것으로 알려진 tetracyclin은 *Streptococcus* sp., *Edwardsiella* sp., *Vibrio* sp. 균주 각각에 대해 32.1%, 52%, 42.1%의 감수성을 나타내었다.

균주별로는 *Streptococcus* sp.가 ampicillin, amoxicillin, chloramphenicol, penicillin에 대해서는 80%이상의 균주가 감수성을 나타냈으며, nalidixic acid, oxolinic acid, streptomycin에 대해서는 매우 낮은 감수성을 보이는 것으로 나타났는데, 허 등(2001)은 2000년에 분리된 넙치유래 *Streptococcus* sp.에 대해 ampicillin, ciprofloxacin, doxycycline, gentamycin, tetracyclin, erythromycin, streptomycin, oxytetracyclin등에 대한 항생제 감수성 조사에서 결과 ampicillin, ciprofloxacin, doxycycline, gentamycin에 대해서는 감수성을 나타낸다고 하였고, tetracyclin, erythromycin, streptomycin, oxytetracyclin에 대해서는 내성을 보인다고 하였다.

Edwardsiella sp.는 ampicillin, amoxicillin, chloramphenicol, ciprofloxacin, norfloxacin, 에 대해서 약 80%이상의 균주에서 감수성을 나타내었으며, kanamycin, novobiocin, penicillin, streptomycin등의 항생제에 대해서는 약 2%정도의 균주만의 감수성을 나타내었다. 김(1999)은 국내산 넙치에서 분리된 *Edwardsiella tarda* 에 대한 약제내성 전달연구에서 ciprofloxacin, florfenicol, gentamicin, nifurstylenic acid, norfloxacin의 경우에는 치료 약제로서의 효과가 인정된다고 하였으나, sulfonamide, erythromycin,

novobicin의 경우에는 치료효과가 없을 것으로 예측하였는데, 본 연구에서도 ciprofloxacin, norfloxacin, novobicin에 대한 시험결과는 유사하였으나 gentamicin의 경우에는 본 연구에서는 분리균주의 약 26.2%의 균주가 감수성을 나타내어 상이한 결과를 보였다.

Vibrio sp.는 chloramphenicol, ciprofloxacin, gentamycin, nalidixic acid, oxolinic acid등 5종의 항생제에 대해서 70%이상의 균주가 감수성을 보였으며, ampicillin, penicillin, streptomycin등에 대해서는 상대적으로 낮은 감수성을 보였다. 이 등(1991)의 보고에서는 한국 남해안 넙치로부터 분리된 *Vibrio* 종에 대한 항생제 감수성시험결과 cephalothin, chloramphenicol, colistin, tetracycline등의 항생제에 대해서는 강한 감수성을 보였으나, carbenicillin, kanamycin, penicillin, streptomycin등의 항생제에는 내성을 나타내는 것으로 보고하였는데, 본 연구에서도 이 등(1991)의 보고에서와 동일한 항생제인 chloramphenicol, penicillin, streptomycin, kanamycin등에 대해서는 유상한 결과를 보였으나 본 연구에서는 tetracyclin의 경우에는 42%의 *Vibrio* 종만이 감수성을 나타내는 것으로 조사되어 상이한 결과를 보였다.

어류병원성 세균이 항생제에 대한 내성증가 억제 및 양식어류의 세균성 질병에 효과적으로 대처하기 위해서는 양식현장에서 수산용 약제의 사용 시 전문기관의 진단을 통한 적절한 약제의 선정뿐만 아니라 모니터링을 통한 항생제 내성균주 파악 등의 연구가 계속적으로 이루어져야 될 것으로 사료된다.

3.4. 요약

제주산 양식넙치의 세균성 질병발생동향 조사를 위해 2001년 6월부터 2002년 5월까지 질병에 걸린 것으로 추정되는 넙치집단에서 채집된 780 시료에 대해 streptococcosis, edwardsiellosis, vibriosis 등의 세균성 질병 발생현황 조사 및 시료로부터 분리된 세균에 대한 항생제 감수성 시험을 실시하였다.

질병에 걸린 것으로 추정되는 시료의 채취현황을 근거로 한 질병발생조사에서는 7월에 질병 발생율이 가장 높은 것으로 판단되며, 질병발생이 가장 적은 달은 5월이었다.

반면에 채취시료에 대한 세균 분리율은 10월이 98.1%로 가장 높은 비율을 보여 다른 원인보다 세균성질병에 의한 피해가 높을 것으로 판단되며, 6월에는 채취된 97 시료 중 52.5%의 낮은 세균 분리율을 나타내어 세균성질병에 의한 피해가 상대적으로 낮은 것으로 판단된다.

조사대상 세균성 질병 원인균의 단독감염 또는 혼합감염에 대한 분석 결과를 보면 세균이 검출된 579 시료에 대한 세균검출 결과 480 시료에서는 *Vibrio* sp., *Edwardsiella* sp., *Streptococcus* sp.가 단독으로 검출되었으며, 나머지 99 시료에서는 2종의 세균, 또는 3종의 세균이 혼합으로 검출되었다.

조사대상 시료 중 vibriosis 단독발생으로 간이진단 된 경우는 180 시료로서 전체 시료의 23%이었고, edwardsiellosis 단독 발생은 152 시료(19.5%), streptococcosis 단독발생은 148 시료(19%)로 나타났다.

조사대상 세균성 질병의 혼합발생은 vibriosis와 edwardsiellosis의 혼합발생으로 확인된 경우가 51시료(6.5%), vibriosis와 streptococcosis 혼합발생 26시료(3.3%), edwardsiellosis와 streptococcosis 혼합발생 20시료(2.5%), 그리고 3종의 질병의 혼합으로 발생한 경우가 2 시료이었다.

세균성 질병발생유형은 대부분의 양식장에서 치어입식이 이루어지는 10월부터 이듬해 2월 및 3월까지의 면역력이 약한 치어에 vibriosis가 주로 발생하고, 중간성장단계인 6, 7월경에는 edwardsiellosis가, 9월과 10월인 성장이 막바지 단계에서는 주로 streptococcosis의 발병비율이 높게 나타났다.

어제 크기별 세균성 질병발생현황을 조사한 결과에서는 20cm이하 크기의 치어에서는 vibriosis가 약 85%로 가장 많이 나타났으며, 20~30cm 크기의 시료에서는 edwardsiellosis가 약 52%로 가장 많은 비율로 조사되었고 30cm이상의 성어에서는 streptococcosis가 가장 높은 비율로 발생하였다.

이상에서 볼 때 양식넙치의 세균성 질병 중 가장 많은 질병은 vibriosis로 판단되며, 세균성 질병발생 양상은 어류의 성장단계 및 계절에 따라서도 매우 높은 영향을 받는 것으로 사료된다.

세균성질병에 걸린 것으로 판단되는 넙치 시료로부터 분리된 *Streptococcus* sp. 196균주, *Edwardsiella* sp. 225균주, *Vibrio* sp. 261균주를 대상으로 15종의 항생제에 대한 감수성시험을 한 결과 *Streptococcus* sp.는 ampicillin, amoxicillin, chloramphenicol, penicillin에 대해서는 80%이상의 균주가 감수성을 나타냈으며, nalidixic acid, oxolinic acid, streptomycin에 대해서는 매우 낮은 감수성을 보이는 것으로 나타났으며, *Edwardsiella* sp.는 ampicillin, amoxicillin, chloramphenicol, ciprofloxacin, norfloxacin에 대해서 약 80%이상의 균주가 감수성을 나타내었으며, kanamycin, nobobiocin, penicillin, streptomycin등의 항생제에 대해서는 약 2%정도의 균주만이 감수성을 나타내었다.

Vibrio sp.는 chloramphenicol, ciprofloxacin, gentamycin, nalidixic acid, oxolinic acid등 5종의 항생제에 대해서 70%이상의 균주가 감수성을 보였으며, ampicillin, penicillin, streptomycin등에 대해서는 상대적으로 낮은 감수성을 보였다.

본 연구 결과는 세균성 질병에 국한된 조사로서 앞으로 기생충성 질병 및 기타 질병 발생 및 그와의 혼합발생에 대한 조사가 필요하다고 인정되며, 더불어 세균성 질병에 대해 효과적인 대처를 하기 위해서는 항생제 내성 균주의 변화 양상과약 등을 포함 한 보다 장기적이고 폭넓은 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

4. 제주산 양식넙치로부터 분리되는 *Vibrio* 속 세균의 계통분류학적 연구

4.1. 서 론

*Vibrio*는 그람음성 간균의 중속영양세균으로 몇종을 제외한 대부분은 oxidase positive, catalase positive 균으로 성장에 sodium ion을 필요로 하는 호염성세균으로 식중독균을 포함하는 인체병원균, 어류 및 동물로부터 분리된 종, 해수 및 환경으로부터 분리되고있으며 Bergey's manual에 20종이 보고되어있으며(Baumann *et al.*, 1984), Holt *et al.*(1994)에 의해 37종이 보고되었다.

최근에 양식중인 대합류에서 brown ring disease의 원인균인 *Vibrio tapetis* sp. nov. 분리와(Borrego *et al.*, 1996) 넙치자어의 질병원인균인 *Vibrio ichthyoenteri* sp. nov.의 분리 보고(Ishimaru *et al.*, 1996)를 비롯해서 해수 및 해양동물로부터 *Vibrio scophthalmi*(Cerdà-Cuellar *et al.*, 1997), *Vibrio rotiferianus*(Gomez-Gill *et al.*, 2003), *Vibrio coralliilyticus*(Ben-Haim *et al.*, 2003), *Vibrio kanaloae*, *Vibrio pomeroyi*, *Vibrio chagasii*(Thompson *et al.*, 2003-a), *Vibrio fortis* 와 *Vibrio hepatarius*(Thompson *et al.*, 2003-b), *Vibrio neptunius*, *Vibrio brasiliensis*, 그리고 *Vibrio xuii*(Thompson *et al.*, 2003-c), *Vibrio agarivorans*(Macian *et al.*, 2001-a), *Vibrio lentus*(Macian *et al.*, 2001-b)등 계속적인 신종보고로 현재는 약 45종 이상이 알려져 있다.

*Vibrio anguillarum*과 *Vibrio pelagius*등 몇종은 MacDonell 과 Colwell(1985)등에 의해 *Listonella* 속이 제안되면서 *Listonella*속으로 바뀌었으며, *Vibrio carchariae*는 DNA hybridization에 의해 *Vibrio harveyi*의 junior synonym으로 보고되어있으며(Holt *et al.*, 1994), Thompson *et al.*(2002)은 *Vibrio trachuri* 또한 *V. harveyi*의 junior synonym으로 보고하여 *Vibrio*종간에 근연종에 대한 연구들이 보고되었다.

또한 *Vibrio* 속 세균의 다양성에 대한 연구도 계속보고 되고 있는데, *V. anguillarum*의 다양한 serotype에 대한 연구(Skov Sørensen and Larsen, 1986)와 ELBAMAP분석에 의한 *Vibrio vulnificus* 균주간의 다양성 보고(Pedersen *et al.*, 1999) 및 양식환경으로부터 분리되는 *Vibrio*속 균주들의 phenotype의 다양성 보고(Vandenbergh *et al.*, 2003)를 비롯해 16S rRNA sequence 분석에 의한 *Vibrionaceae*의 계통관계 연구(Kita-Tsukamoto *et al.*, 1993)등이 있으며, Montes *et al.*(2003)은 phenotype 및 ribotyping과 16S rRNA gene 분석을 통한 *Vibrio* 속균의 다양성 연구등 *Vibrionaceae* 내에 다양한 종조성이 존재함이 보고되어있다.

다양한 *Vibrio* 속균의 동정에는 과거에는 생화학적 분석법등을 이용하였으나, *Vibrio* 속내의 종다양성 때문에 어려움이 많다고 알려져 있다. 임상으로부터 분리되는 *Vibrio*종 동정에는 표준화된 생화학적 동정법 및 kit가 시판되고 있으나 환경 및 해양동물등 기타 시료로부터 분리되는 *Vibrio* 종인 경우에는 생화학적 특성의 다양성으로 인해 생화학적 동정에는 어려움이 많은 실정이다(Alsina and Blanch, 1994).

최근에는 생화학적 동정의 어려움을 극복하고, 신속한 동정을 위해 PCR 기법등의 분자생물학적 분석을 이용한 *Vibrio* 속 균의 검출기법등의 연구가 이루어지고 있다(Harris *et al.*, 1996; Hiney and Smith, 1998; Kim and Jeong, 2001; Nealson *et al.*, 1993; Valle *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2000; Yii *et al.*, 1997).

국내의 경우 넙치의 vibriosis의 원인균과 관련한 연구로는 이 등(1991)이 동절기의 남해안의 양식넙치로부터의 *Vibrio* 종의 분리에 대해보고 한 바 있다. 이는 생화학적 방법에 의해 균 동정이 이루어졌으며, 그 중 많은 균주가 미동정 균주로 보고되었으며 넙치 양식의 초창기에 이루어진 연구로 사료되는 바 최근에 알려진 분자생물학적 기법 등을 이용하여 세균성 질병 중 많은 비중을 차지하는 vibriosis의 원인균 동정을 위한 연구가 필요하다고 인정된다.

따라서 본 연구는 양식넙치로부터 분리되는 다양한 *Vibrionaceae*의 균주들의 16S rRNA 유전자 분석을 통해 종 동정을 실시함으로써 넙치로부터 분

리되는 *Vibrio* 및 관련 세균들의 다양성 조사 및 계통학적 특성을 파악하고 나아가 양식넙치의 vibriosis의 원인균 파악에 대한 기초 자료를 제공하고자 하였다.



4.2. 재료 및 방법

4.2.1. 시험균주

2001년 6월부터 2002년 5월까지 제주도내 넙치 육상 양식장에서 질병발생이 보고된 양식장의 넙치 집단에 대한 세균성 질병 발생 동향조사에서 *Vibrio* 속 균으로 간이 동정된 261균주를 대상으로 실험을 실시하였다.

4.2.2. 분리균주의 생화학적 특성 분석

분리균주의 생화학적 특성 분석은 Biolog사(Biolog Inc., USA)의 GN2 Plate를 이용하여 Appendix I에 나타낸 95가지의 기질이용 특이성을 시험하였으며 분석은 MicroLog™ system(Release 4.0) program을 이용하였다.

순수 분리된 균주를 BUGM(Biolog Inc., USA) 사면배지에 접종하여 $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 16-24시간 배양 한 후 현탁하여 탁도계(Biolog 21907., USA)를 이용하여 52-59%가 되도록 조절한 후 GN2 Plate의 각 well에 150 μL 씩 접종 하고 $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간 배양 한 후 보라색으로 발색되는 well을 양성으로 판정하였다.

이때 현탁액은 NaCl 150g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 51g, KCl 3.7g을 증류수 912mL에 녹인 MCS stock solution(Noble and Gow, 1998)을 10배 희석한 후 멸균하여 사용하였다.

또한 분리된 261균주 중 무작위로 선택한 12균주에 대해 용혈성시험을 실시하였다.

4.2.3. 분리 균주의 분자생물학적 동정

DNA 분리

순수 분리된 균주를 1.5% NaCl이 첨가된 BHIB(Difco, USA)에 접종한 후 $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 16~24시간 배양시킨 후 4°C , $10,000\times\text{g}$ 로 10분간 원심분리하여 균체를 수확한 후 DNeasy tissue kit(QIAGEN, Germany)를 이용하

여 제조회사의 방법에 따라 genomic DNA를 분리한 후 흡광도비(A_{260}/A_{280})가 1.8이상 되게 하였다.

PCR 수행

분리된 균주의 16S rRNA 유전자 절편을 증폭하기 위해 *Taq* DNA polymerase(TaKaRa, Japan)를 사용하였고, Table 4-1에 나타난 27f 및 1522r primers를 이용하여 95℃에서 5분간 변성 후 95℃ 1분, 55℃ 1분, 72℃ 1분의 주기로 33회 반복한 후 최종 72℃에서 10분간 확장하였다. 1% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 약 1.5 Kbp 정도의 DNA 증폭산물을 확인하고 16S rRNA 유전자 절편의 cloning을 실시하였다.

Cloning과 sequencing

16S rRNA 유전자 절편을 재조합하기 위해 증폭된 PCR 산물을 TOPO TA Cloning kit(Invitrogen, USA)를 이용하여 제조회사의 방법에 따라 클로닝을 실시하였다.

형질전환은 TOP10F' *E. coli*를 competent cell로 하여 형질전환을 실시한 다음 40 µg/mL의 X-gal과 IPTG 및 50 µg/mL의 ampicillin을 포함하고 있는 고체 LB배지를 이용하여 37℃에서 18 시간 동안 배양한 후 흰색 콜로니를 선별하였다.

형질전환된 대장균은 ampicillin이 첨가된 LB broth(Difco, USA)에 접종하여 37℃, 220 rpm에서 18시간 배양한 후, Wizard SV Mini-Prep DNA Purification System(Promega, USA)를 이용하여 제조회사의 방법에 따라 plasmid를 분리하였다.

형질전환을 확인하기 위해 분리된 plasmid에 제한 효소 *EcoR* I 을 처리하여 37℃에서 4시간 반응시킨 후 1.2% agarose gel상에서 전기영동하여 클로닝 여부를 확인하였다.

염기서열분석은 ABI 3700 automatic sequencer(ABI, USA)를 사용하였는데, Cy5로 표지된 inner primer인 M13-40 primer와 M13 reverse primer를 포함하고있는 Cy5-AutoCycle Sequencing kit(Pharmacia, USA)를

Table 4-1. PCR primers used for 16S rRNA amplification in this study

Primer name	Sequence
27f	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCA-3'
1522r	5'-AAGGAGGTGATCCARCCGCA-3'



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

이용하여 제작사의 매뉴얼에 따라 수행하였다. 본 연구에 사용한 PCR 산물은 약 1.5 Kbp로서 산물의 중간서열에 대한 염기서열분석은 inner primer(5'-GCTAACTCCGTGCCAGCAGC-3')를 디자인하여 분석에 이용하였다.

분리균주의 분자유전학적 동정

16S rRNA 유전자분석을 통한 분리균주의 동정은 밝혀진 염기서열을 NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 Blast Search 및 DNA Star program을 이용하였다. 염기의 계통학적 관계를 밝히기 위하여 Lasergen의 Megalign program을 이용하였으며 이 때 Clustal method에 의해 수행하였다.

4.2.4. 분리 균주의 항생제 감수성 시험

분리동정된 균주의 항생제 감수성시험은 Baucer *et al.*(1966)의 disc 확산법을 이용하여 NCCLS(National Committee for Clinical Laboratory Standards)의 기준에 따랐다.

먼저 BHIA 사면배지에 자란 colony를 0.85%생리식염수에 희석하여 McFarland NO. 0.5가 되도록 탁도를 조절하여 1.5% NaCl이 첨가된 Muller Hinton Agar에 도말한 후 BBL사의 항생제 disc 16종을 얹어 30±1 °C에서 24±2시간 배양 한 후 억제환을 측정하였다.

4.3. 결과 및 고찰

4.3.1. 분리균주의 생화학적 특성분석

GN2 Plate을 이용한 생화학적 특성 조사결과를 MicroLog™ system(Release 4.0) program을 이용하여 생화학 동정을 실시하였다. 해당 프로그램은 similarity 값이 0.5이상에서 정확한 동정이 이루어지는 것으로 지정해 놓고 있으나 본 조사에서는 전체균주를 대상으로 생화학적 grouping을 하기 위해 similarity값에 상관없이 그 값이 0.5이하가 되더라도 그 중 가장 높은 similarity값에 해당되는 균주로 생화학적 grouping을 실시하였으며, 그 결과 총 28개의 생화학 group으로 나누어졌다(Appendix II).

그 중 *V. carchariae* group이 51균주로 가장 많았고, 다음으로는 *V. harveyi* group이 37균주, *Aeromonas sorbia* DNA group7로 grouping되는 균주가 30균주, *V. splendidus* group이 22균주, *Vibrio aestuarinus* group이 16균주, *Vibrio furnissii*와 *Vibrio alginolyticus* group 14균주, *Photobacterium logei* group이 13균주, *Vibrio proteolyticus* group 11균주, *Photobacterium angustum* group 10균주, *Aeromonas veronii/sorbia* DNA group8로 grouping 되는 균주가 6균주, *Aeromonas hydrophila* DNA group 1로 grouping 된 균주가 5균주, *Vibrio fluvialis* group, *Photobacterium damsela* group, *Vibrio campbellii* group이 각 4균주, *Aeromonas tructi* DNA group 13으로 grouping 되는 균주와 *Aeromonas enteropelogenes* group이 각 3균주, *Aeromonas eucrenophila* DNA group6으로 동정된 group과, *Pseudomonas creosotensis*, *V. anguillarum* group은 각 2균주였으며, 그외 *Aeromonas allosaccharophilla*, *Photobacterium fisheri*, *Achromobacter cholinophagum*, *Iodobacter fluvialis*, *Pasteurella canis stomatis*, *Aeromonas natrigens*, *Aeromonas mediterranei*, *Bukholderia cocovenenans*가 각 1균주였다.

GN2 Plate 및 MicroLog™ system(Release 4.0) program을 이용하여 구분한 생화학 group중 주요 group으로 판단되는 *V. carchariae*, *V.*

harveyi, *A. sorbia* DNA group7, *V. splendidus*, *V. aestuarinus* group의 기질 이용성을 보면 *V. carchariae* group은 경우에는 전체 95개의 기질 중에서 36종의 기질에 대해서 해당 균주의 90%이상의 positive 반응을 보였으며, *V. harveyi* group에 포함되는 균주들은 8종의 기질에 대해서 90%이상의 positive 반응을 보였고, *A. sorbia* DNA group7에 포함되는 균주들은 40종의 기질에 대해서 positive 반응을 보여 다른 group의 균주들에 비해 기질 이용성이 높은 것으로 나타났다.

V. splendidus group에 포함되는 균주들은 15종의 기질에 대해서는 positive 반응을 보였고, *V. aestuarinus* group의 균주들은 11종의 기질에 대해서는 positive 반응을 나타내었다(Appendix II).

또한 분리균주의 병원성 여부를 짐작 할 수 있는 용혈성 시험을 실시하였는데. 분리된 261균주 중 무작위 추출된 12균주의 용혈성시험결과를 Fig. 4-1에 나타내었다.

12균주 중 3개 균주는 α-용혈을 나타냈으며, 나머지 9개 균주는 β-용혈성을 보이는 것으로 확인되었다.

4.3.2. 분리된 *Vibrio* 속 균주의 분자생물학적 동정

분리된 261균주의 DNA를 사용하여 16S rRNA 유전자에 대한 염기서열 분석결과 *Vibrio*속 12종, *Photobacterium* 속 2종, *Listonella* 속 1종, *Aeromonas*속 1종, *Acinetobacter* 속 2종, *Citrobacter*속 1종과 미동정 균주가 8종 총 27종으로 동정되었다(Table 4-2, Fig. 4-2.).

12종의 *Vibrio*속에는 *V. trachuri*가 85균주로 가장 많은 부분을 차지하였으며, 다음으로는 *V. scophthalmi* 69균주로 동정되었고, *V. parahaemolyticus* 23균주, 다음으로는 *V. campbellii*가 16균주, *V. pomeroyi* 가 15균주 *V. fischeri* 와 *V. lentus*, *V. corallilyticus*, *V. furnissii*,가 각 3균주, *V. fortis*, *Vibrio probioticus*가 각 2균주로 동정되었으며, *Vibrio tubiashii* 1균주가 동정되었다.

*Photobacterium*속의 경우는 *P. damsela* subsp. *damsela* 11균주, *P. damsela* subsp. *piscicida* 6균주가 분리 동정되었고, *Listonella*속 균주로는

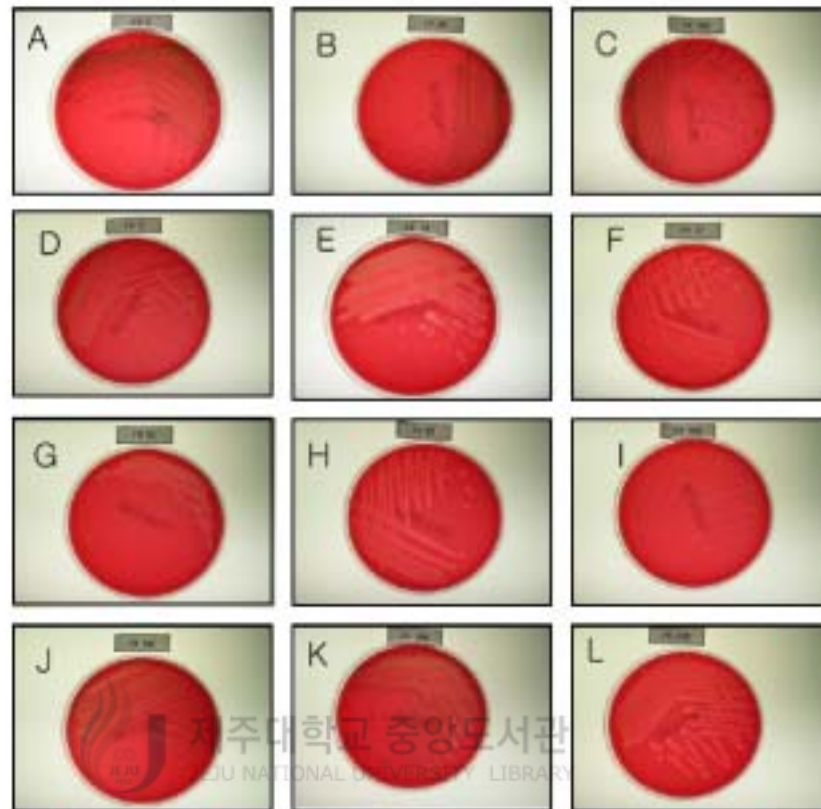


Fig. 4-1. Reactions of haemolysis of *Vibrio* sp. isolated from diseased flounders on blood agar.
A-C, α -haemolysis; D-L, β -haemolysis.

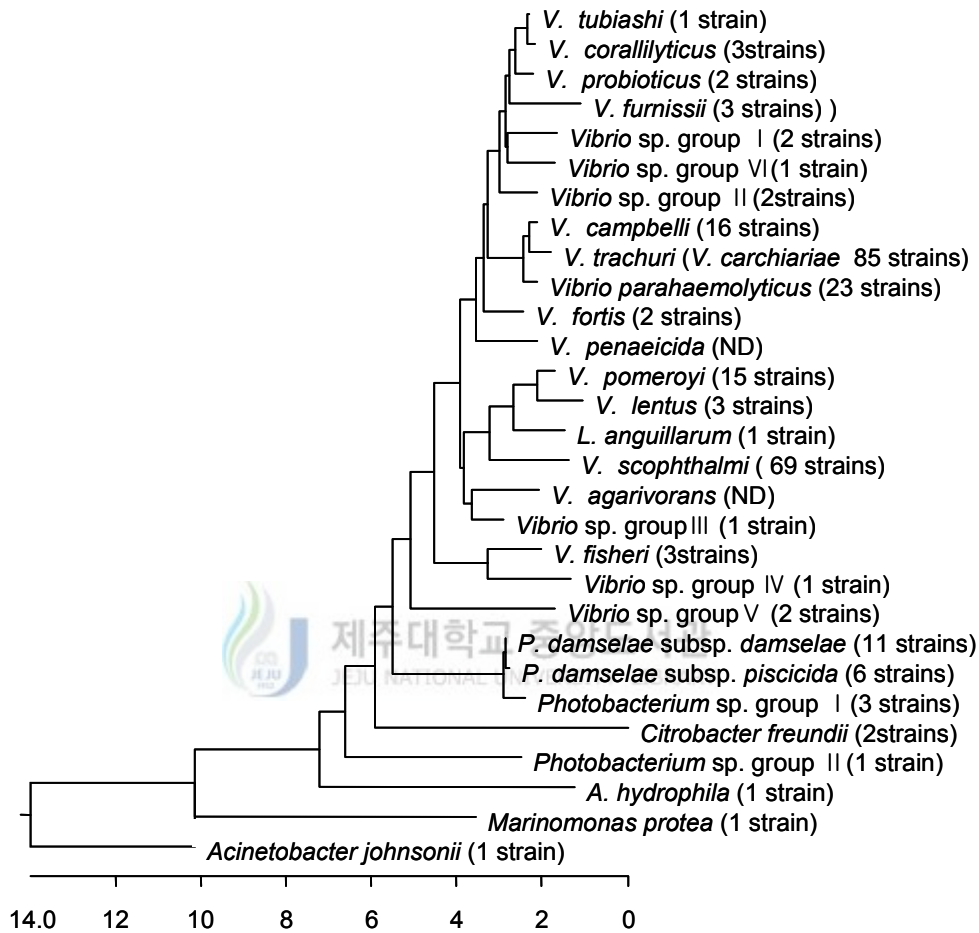


Fig. 4-2. Dendrogram showing the phylogenetic relationship among strains of *Vibrio* sp. and closely related bacteria isolated from diseased flounders of aquaculture farms. The length of each pair of branches represents the distance between sequence pairs, while the units at the bottom of the tree indicate the number of substitution events.

Listonella anguillarum 1균주가 동정되었으며, 그 외에 *A. hydrophilla* 1균주, *Acinetobacter johnsonii* 1균주, *Citrobacter freundii* 2균주로 동정되었고, 그 외 미동정 균주가 8 group이었다.

국내의 경우 이 등(1991)은 생화학적 동정방법에 의해 한국 동절기에 양식 넙치로부터 *V. tubiashii*, *V. damsela*, *V. anguillarum*, *V. compbellii*, *V. fluvialis*, *Vibrio costicola*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio gazogenes*, *Vibrio marinus* 등 9종의 *Vibrio*를 분리 동정하였고, 3 group의 미동정 group를 보고하였는데, 본 연구에서는 *V. fluvialis*, *V. costicola*, *V. alginolyticus*, *V. gazogenes*, *V. marinus*는 분리되지 않았다.

이러한 차이는 실제적인 종 분포의 차이일 수도 있으나 이 등(1991)의 보고가 동절기인 한 계절에 국한한 조사라는 점과 본 연구가 16S rRNA 유전자 분석에 의한 동정이라는 것과 최근에 신종 *Vibrio*의 보고 의해 *V. lentus*(Macian *et al.*, 2001-b), *V. scopthalmi*(Cerdá-Cuéllar *et al.*, 1997), *V. pomeroyi*(Thompson *et al.*, 2003-a), *V. corallilyticus*(Ben-Haim *et al.*, 2003), *V. fortis* 와 *V. probioticus*(Thompson *et al.*, 2003-b)가 새롭게 보고된 종이 라는 것 과도 상관성이 높을 것으로 판단된다.

Alcaide(2003)는 잭방어(*Seliola dumerili*)와 사육수로부터 그람음성 종속 영양 통성혐기성 세균 148균주를 분리하여 형태학적, 생화학적 특성시험을 통해 *P. damsela* subsp. *damsela*, *Vibrio orientalis*, *V. fischeri*, *V. harveyi*(*Vibrio carchariae*), *Vibrio mediterranei*, *Vibrio alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. furissii*, *V. splendidus*로 동정하였고, 미동정 균주도 16 균주가 분리되었는데, 미동정 균주에 대해 분자생물학적인 동정이 필요하다고 하였다.

*V. trachuri*는 본 연구에서 가장 많이 분리가 이루어졌는데 5월과 12월 사이에 주로 분리되었다. *V. trachuri*는 16S rDNA gen 비교에서 *V. harveyi*와 약 98.8%의 상동성을 나타내는 것으로 보고되었으며(Thompson *et al.*, 2002), Alsina와 Blanch(1994)는 *V. harveyi* 와 *V. carchariae*를 생화학적 특성에 근거한 동정에서 두 종이 같은 cluster로 보고하였고,

Perdersen *et al.*(1998)은 사실상 동종으로 판단하여, 본 연구에서는 *V. trachuri*, *V. carchariae*와 *V. harveyi*를 동종으로 간주하였다.

*V. carchariae*는 sandbar shark 와 lemon shark등 상어의 피부궤양증 및 홍민어(*Sciaenops ocellatus*)의 장염유발 원인균으로 보고되고 있는데 (Colwell and Grimes, 1984; Liu *et al.*, 2003), 감염된 어류는 피하에 괴사성 cyst를 형성하고 장염 및 뇌에 염증을 형성한다고 보고되었었다(Grimes *et al.*, 1985).

두 번째로 많이 분리된 *V. scophthalmi*는 본 연구에서 11월과 5월 사이에 주로 분리되었는데 Cerdá-Cuellar *et al.*(1997)이 터북에서 처음 분리하여 신종으로 보고하였으며 본 연구에서 약 26%의 분리율을 나타내었다.

*V. parahaemolyticus*는 2월과 4월을 제외하고 매월마다 분리되었으며, 국내의 경우 군산 내만의 서식 패류로부터 본 균의 분리가 보고된 예가 있다 (윤 과 안, 1992).

*V. pomeroiyi*는 Thompson *et al.*(2003-a)에 의해 최근에 새로운 *Vibrio*로 보고된 종으로 본 연구에서는 11월부터 5월 사이에 15균주가 분리되었다.

3 균주가 분리된 *V. fischeri*는 스페인에서 터북에 체표 유두종과 장에 종양을 형성하는 원인체로 보고되어 있다(Lamas *et al.*, 1990).

P. damsela subsp. *damsela*는 이전에는 *V. damsela*로 명명되어 *Vibrio*속으로 간주되다가 지금은 *Photobacterium* 속에 포함시키고 있는 종으로(Austin and Austin, 1993), blacksmith damselfish, 방어, 터북, 돛류, 상어등 광범위한 어종에 피부체표궤양등을 일으키는 원인종으로 알려져 있다 (Fouz *et al.*, 1992).

P. damsela subsp. *piscida*는 처음에 *Pasteurella piscicida*로 명명되다가 rRNA 염기분석 및 DNA-DNA hybridization과 생화학적 특성분석등을 통하여 *P. damsela* subsp. *piscicida*로 재 동정되었는데(Gauthier *et al.*, 1995), striped bass(*Morone saxatilis*)와 white perch(*Morone americanus*)에서 처음 분리되었으며(Snieszko *et al.*, 1964), Osorio *et al.*(1999)은 nested PCR 방법에 의한 신속진단법을 보고하였다.

*Vibrio lentus*는 Macian *et al.*(2001-b)에 의해 지중해의 굴에서 처음 분

리되었으며, Montes *et al.*(2003)은 터벗에서 본 균의 분리를 보고하였으며, Farto *et al.*(2003)은 문어의 질병원인균으로 보고하였다.

*V. campbelli*는 16주가 분리되었는데 이 등(1991)의 보고에서도 국내산 양식 넙치로부터 본 종의 분리를 보고하였다.

*L. anguillarn*은 가장 공통적인 어류 병원체로 알려져 있는 균주로서 1985년 이전까지는 *V. anguillarn*으로 동정되다가 ribosomal RNA 분석을 통해 새로운 genus인 *Listonella* 속으로 분리토록 제안된 균주로서 (MacDonnell *et al.*, 1985) 본 연구에서는 5월에 1균주가 분리되었다.

본 연구에서 분리되어 분자생물학적 방법에 의해 *Vibrio* 및 관련 세균으로 동정된 261균주의 월별 분포현황은 6월(20strains - 6 species), 7월(38strains-6species), 8월(25strains-5species), 9월(13strains-5species), 10월(21strains-5species), 11월(27strains-9species), 12월(28strains-11species), 1월(37strains- 12species), 2월(20strains-5species), 3월(17strains-6species), 4월(10strains-4species), 5월(5strains-5species)이 분리되어 1월이 가장 종 다양하게 분포하는 것으로 나타났다.

4.3.3. 분리·동정된 *Vibrio* 속 균주의 계통학적 분석

Fig 4-2에 나타낸 분리된 261균주들에 대한 계통학적 분석결과에서는 *V. tubiashi*, *V. corallilyticus*, *V. probioticus*는 상당히 유연관계가 깊은 것으로 분석되었으며, *V. campbellii*, *V. trachuri*, *V. parahaemolyticus*도 상당히 유연관계가 깊은 것으로 나타났다. 또한 같은 종내에서 아종으로 구분된 *Photobacterium* 속의 *P. damsela* subsp. *damsela*와 *P. damsela* subsp. *piscida* 역시 상당히 깊은 유연관계가 있는 것으로 분석되었다.

16S rRNA 유전자 분석을 통해 동정된 29종 중 주로 많이 분리된 *V. trachuri*, *V. scophthalmi*, *V. parahaemolyticus*, *V. campbelli*, *V. pomeroyi*, *P. damsela* subsp. *damsela*, *P. damsela* subsp. *piscida*간의 분자생물학적 계통관계를 분석하였다(Appendix III).

*V. campbellii*로 동정된 16균주는 크게 8개의 group으로 분류되었고, 가장

많이 분리된 *V. trachuri*의 경우에도 크게 8개의 group으로 분석되었으며, 전체 23균주가 분리된 *V. parahaemolyticus*의 경우에는 5개의 group, 15균주가 분리된 *V. pomeroyi*는 8개의 작은 group으로 구분할 수 있었으며, 두 번째로 많이 분리된 *V. scophthalmi*의 경우에는 12개의 group으로 구분할 수 있었다.

Photobacterium 속의 *P. damsela* subsp. *damsela*와 *P. damsela* subsp. *piscida*는 각각 7개의 작은 group과 2개의 작은 group으로 나누어졌다.

4.3.4. 넙치 성장기별 *Vibrio* 속 균주의 분리현황

넙치의 성장단계와 분리 동정된 *Vibrio* 속 균주와의 연관성을 Table 4-3에 나타내었다.

균주가 분리된 시료의 크기별 구분을 볼 때 10~20cm의 시료에서 가장 많은 129균주가 분리되었으며, 다음으로는 10cm 이하의 시료에서 55균주가 분리되어 20cm이하의 시료에서 주로 분리되었음을 알 수 있었다.

그 중 *V. scophthalmi*가 분리된 시료는 총 69개 시료였는데, 그 중 64개 시료가 20cm 이하로 나타나 본 균은 대부분이 치어에서 분리가 이루어졌음을 알 수 있었다.

*V. trachuri*는 85균주 중 35균주가 20cm 이하의 시료에서 분리되었으며, 나머지 50균주는 20cm 이상의 크기의 시료에서 분리가 이루어졌다.

4.3.5. 지역에 따른 *Vibrio* 속 균주의 분리현황

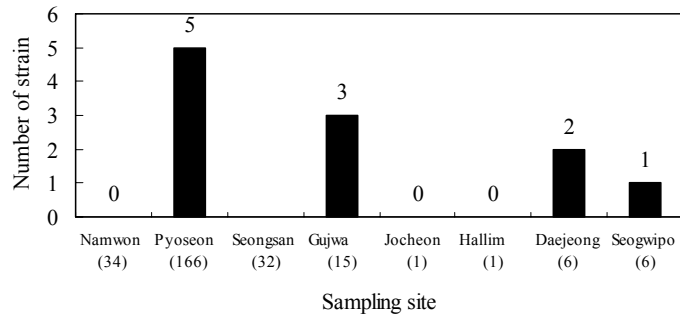
분리 동정된 27종의 균주 중에서 주로 분리된 *V. trachuri*, *V. scophthalmi*, *V. parahaemolyticus*, *V. campbellii*, *V. pomeroyi*, *P. damsela* subsp. *damsela*에 대해 지역별 분리현황을 Fig 4-3에 나타내었다.

시료채취가 주로 이루어진 표선, 성산, 남원지역 시료로부터 분리된 균주의 현황을 보면 표선 지역에서 가장 많은 166균주가 분리되었는데, 그 중 58균주가 *V. trachuri*였고, 남원지역의 경우에도 34균주 중 16균주가 *V. trachuri*로 동정되었으나, 성산 지역의 시료에서는 오히려 *V. scophthalmi*가 *V. trachuri*

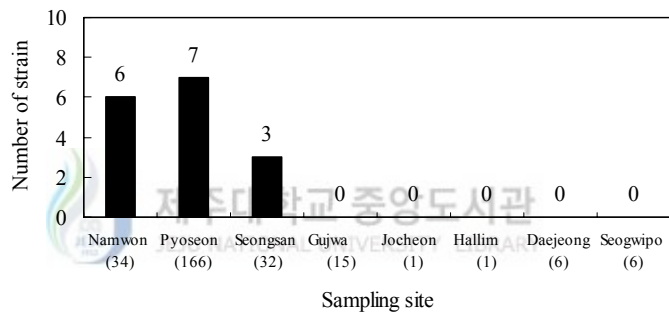
Table 4-3. Classification of *Vibrio* sp. and phylogenetically closely related bacteria isolated from the flounders based on fish sizes

Species	Length of flounder(cm)				
	0~≤ 10	10<~ ≤20	20<~≤ 30	30<~≤40	40<~≤ 50
<i>Vibrio campbellii</i> (16)	1	9	2	3	1
<i>Vibrio corallilyticus</i> (3)	1	2			
<i>Vibrio fisheri</i> (3)		2	1		
<i>Vibrio fortis</i> (2)		2			
<i>Vibrio furnissii</i> (3)	3				
<i>Vibrio lentus</i> (3)	1	2			
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (23)	11	10	2		
<i>Vibrio pomeroiyi</i> (15)	4	4	5	1	1
<i>Vibrio probioticus</i> (2)		2			
<i>Vibrio scophthalmi</i> (69)	13	51	3	1	1
<i>Vibrio trachuri</i> (<i>V. carchariae</i> , 85)	7	28	28	18	4
<i>Vibrio tubiashii</i> (1)					
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i> (11)	3	6	1		1
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> (6)	4	2			
<i>Listonella anguillarum</i> (1)	1				
<i>Vibrio</i> sp. group I (2)	2				
<i>Vibrio</i> sp. group II (2)	2				
<i>Vibrio</i> sp. group III (1)		1			
<i>Vibrio</i> sp. group IV (1)	1				
<i>Vibrio</i> sp. group V (2)		1	1		
<i>Vibrio</i> sp. group VI (1)					1
<i>Photobacterium</i> sp. group I (3)		1	2		
<i>Photobacterium</i> sp. group II (1)		1			
<i>Aeromonas hydrophila</i> (1)		1			
<i>Acinetobacter johnsonii</i> (1)	1				
<i>Citrobacter freundii</i> (2)		2			
<i>Marinomonas protea</i> (1)		1			
Total No.	55	129	45	23	9

P. damsela subsp. *damsela* (11)



V. campbellii (16)



V. parahaemolyticus (23)

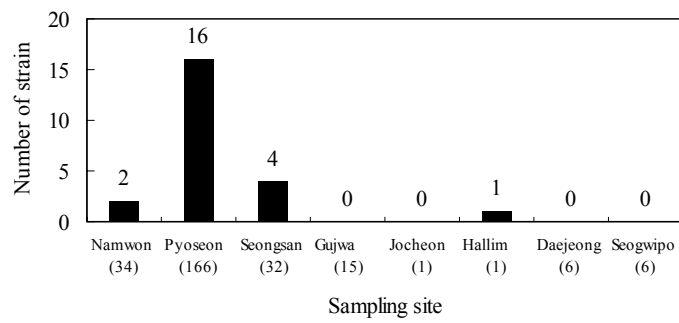
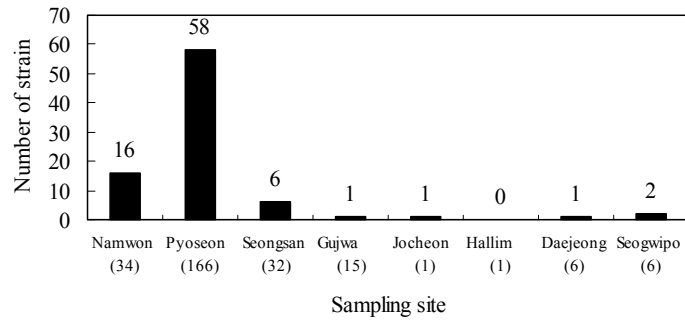


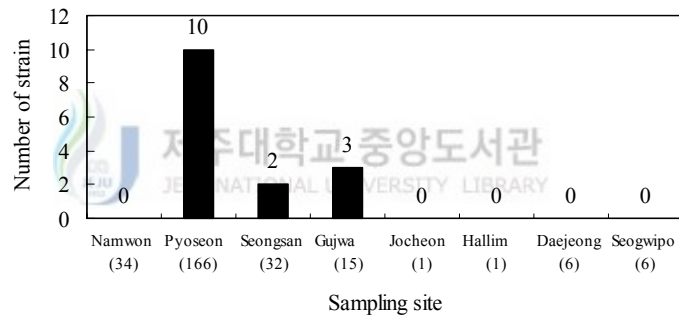
Fig. 4-3. Number of *Vibrio* sp. and phylogenetically related bacteria from different sampling sites.

Fig. 4-3. continued

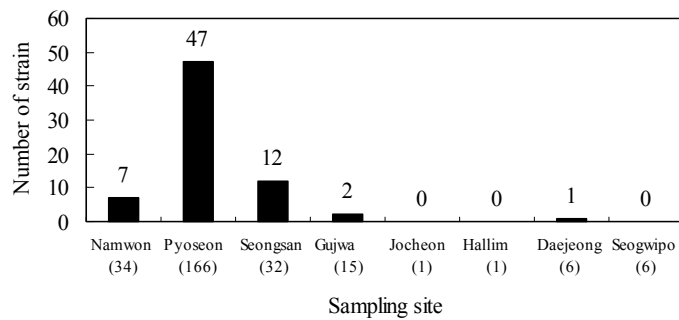
V. trachuri(*V. carchariae*) (85)



V. pomeroyi (15)



V. scopthalmi (69)



보다 2배 이상 많이 분리되었다.

4.3.6. 생화학적 동정과 분자생물학적 동정간의 비교

분리된 261균주에 대해 MicroLog™ system(Release 4.0)을 이용하여 생화학적 특성을 시험한 결과를 바탕으로 구분된 BioLog group과 16S rRNA 유전자 분석을 통한 균주의 동정결과 비교하였다(Table 4-4).

생화학적 특성분석에 의한 BioLog group중 가장 많은 부분을 차지하는 *V. carchariae* group의 51균주와 *P. damsela* group의 4균주의 경우에는 16S rRNA 유전자 분석에 의한 동정에서 각각 *V. trachuri*(*Vibrio carchariae*) 34균주와 *P. damsela* 3균주로 동정되어 동정이 일치하는 경우도 있었으나, *Aeromonas sorbia* DNA group7에 속하는 30균주 중에는 16S rRNA 동정결과 26균주가 *V. trachuri*(*Vibrio carchariae*)로 동정되는 등 일반적으로 생화학적 group과 16S rRNA 유전자 분석에 의한 동정간에 차이가 있는 것으로 나타났다.

이러한 결과는 MicroLog™ system(Release 4.0)에 의한 동정이 해당 프로그램에서 규정하는 similarity 보다 낮더라도 가장 높은 similarity 수치를 기준으로 하여 이루어졌다는 점, 균주 분리가 임상 시료가 아닌 어류로부터 분리되어 생화학적 다양성이 높음으로 인해 해당 프로그램 내에 균주에 대한 database의 부족, 그리고 16S rRNA 유전자 분석에 의한 동정에서 최근에 신종으로 보고된 *Vibrio*가 많은 비중을 차지한 점등에 기인하는 것으로 사료된다.

이렇듯 생화학적 특성분석에 의한 동정결과 및 분자생물학적 동정결과에 대한 오차를 줄이기 위해서는 환경시료로부터 분리되는 다양하고 새로운 *Vibrio* 종에 대한 database 확보와 생화학적 및 분자생물학적 특성 분석에 의한 근연종 연구등이 더욱 더 진행되어야 할 것으로 사료된다.

4.3.7. 분리 균주별 항생제 감수성 시험결과

16S rRNA 유전자 분석에 의해 동정된 261균주에 대한 항생제 감수성 시험결과에서 주로 우점하게 분리된 *V. campbellii* (16 strains), *V. parahaemolyticus* (23 strains),

Table 4-4. Comparison of bacterial identification resulted from Biolog test and 16S rRNA sequence analysis

Biolog group	16S rRNA identification result
<i>Photobacterium damsela</i> (4)	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i> (2) <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> (1) <i>Vibrio scophtalmi</i> (1)
<i>Aeromonas allosaccorophila</i> (1)	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (1)
<i>Photobacterium fisheri</i> (1)	<i>Vibrio scophtalmi</i> (1)
<i>Aeromonas eucrenophila</i> DNA group 6 (2)	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (2)
<i>Aeromonas sobria</i> DNA group 7 (30)	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (4) <i>Virio trachuri</i> (26) <i>Virio trachuri</i> (1) <i>Vibrio furnissii</i> (2) <i>Vibrio scophtalmi</i> (24) <i>Vibrio pomeroyi</i> (3) <i>Vibrio fisheri</i> (2) <i>Vibrio probioticus</i> (1) <i>Virio corallilyticus</i> (1) <i>Vibrio campbelli</i> (1)
<i>Vibrio harveyi</i> (37)	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> (1) <i>Vibrio</i> sp. I (1) <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (2)
<i>Pseudomonas creosotensis</i> (2)	<i>Vibrio fortis</i> (1)
<i>Vibrio furnissii</i> (14)	<i>Vibrio scophtalmi</i> (8) <i>Vibrio</i> sp. V (1) <i>Vibrio</i> sp. VI (1) <i>Vibrio pomeroyi</i> (1) <i>Acinetobacter johnsonii</i> (1) <i>Citrobacter freundii</i> (1)
<i>Vibrio carchariae</i> (51)	<i>Vibrio campbelli</i> (9) <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (5) <i>Virio trachuri</i> (<i>V. carchariae</i> , 34) <i>Vibrio scophtalmi</i> (1) <i>Vibrio lentus</i> (1) <i>Vibrio pomeroyi</i> (1) <i>Virio trachuri</i> (4) <i>Virio corallilyticus</i> (2)
<i>Aeromonas veronii/sobria</i> DNA group 8 (6)	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (2) <i>Vibrio campbelli</i> (5) <i>Vibrio</i> sp. II (1) <i>Vibrio scophtalmi</i> (1)
<i>Vibrio proteolyticus</i> (11)	<i>Virio trachuri</i> (1) <i>Listonella anguillarum</i> (1)

Table 4-4. continued

<i>Vibrio alginolyticus</i> (14)	<i>Vibrio pomeroyi</i> (5) <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (2) <i>Vibrio fortis</i> (1) <i>Vibrio scophtalmi</i> (2) <i>Vibrio trachuri</i> (4)
<i>Aeromonas tructi</i> DNA group 13(3)	<i>Photobacterium</i> sp. I (1) <i>Vibrio pomeroyi</i> (1) <i>Vibrio trachuri</i> (1)
<i>Photobacterium angustum</i> (10)	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i> (2) <i>Vibrio scophtalmi</i> (5) <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> (2) <i>Photobacterium</i> sp. II (1) <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i> (5) <i>Photobacterium</i> sp. I (2) <i>Vibrio trachuri</i> (2) <i>Vibrio scophtalmi</i> (5) <i>Vibrio campbelli</i> (1) <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (1)
<i>Vibrio aesturrius</i> (16)	<i>Vibrio scophtalmi</i> (12) <i>Vibrio lentus</i> (2) <i>Vibrio pomeroyi</i> (4) <i>Vibrio tubiashi</i> (1) <i>Vibrio</i> sp. II (1) <i>Vibrio</i> sp. III (1) <i>Vibrio furnissii</i> (1) <i>Vibrio trachuri</i> (10) <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (2) <i>Citrobacter freundii</i> (1) <i>Marinomonas protea</i> (1) <i>Vibrio scophtalmi</i> (2) <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i> (1) <i>Vibrio scophtalmi</i> (3) <i>Vibrio</i> sp. I (1) <i>Vibrio fisheri</i> (1) <i>Vibrio probioticus</i> (1) <i>Vibrio</i> sp. V (1) <i>Vibrio</i> sp. IV (1) <i>Vibrio trachuri</i> (2) <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (2) <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i> (1) <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> (2) <i>Vibrio scophtalmi</i> (4) <i>Aeromonas hydrophila</i> (1)
<i>Vibrio splendidus</i> (22)	
<i>Photobacterium logei</i> (13)	
<i>Achromobacter chlinophogum</i> (1)	
<i>Vibrio anguillarum</i> (2)	
<i>Iodobacter fluvialtilis</i> (1)	
<i>Vibrio campbelli</i> (4)	
<i>Pasteurella canis stomatis</i> (1)	
<i>Vibrio natriegens</i> (1)	
<i>Vibrio mediterranei</i> (1)	
<i>Bukholderium coccovenenans</i> (1)	
<i>Vibrio fluvialis</i> (4)	
<i>Aeromonas enteropelogens</i> (3)	
<i>Aeromonas hydrophila</i> DNA group I (5)	

() ; Number of strain

V. pomeroyi (15 strains), *V. scopthalmi* (69 strains), *V. trachuri*(*Vibrio carchariae*, 85 strains), *P. damsela* subsp. *damsela* (11 strains), *P. damsela* subsp. *piscicida* (6 strains)에 대한 결과를 보면 *V. campbellii*는 ampicillin, kanamycin, penicillin, streptomycin 등의 항생제에 대해서는 감수성을 나타내지 않았으나, amoxicillin, chloramphenicol, doxycyclin, gentamycin, nalidixic acid, norfloxacin, oxolinic acid, tetracyclin에 대해서는 전체균주가 감수성을 나타내었다.

V. parahaemolyticus(23 strains)는 nalidixic acid, oxolinic acid에는 약 80%이상의 균주가 감수성을 보였으나, ampicillin, kanamycin, novobiocin, penicillin, streptomycin에 대해서는 감수성정도가 낮게 나타났다.

V. pomeroyi (15 strains)는 gentamycin에는 분리 균주 전부가 감수성을 보였고, norfloxacin, oxolinic acid에도 강한 감수성을 보였으나, kanamycin, neomycin, penicillin, streptomycin에는 감수성 정도가 미약하게 나타났다.

전체 261균주 중 두 번째로 우점하게 분리된 *V. scopthalmi* (69 strains)는 gentamycin과 norfloxacin에 대해서 각각 대상 균주의 79.7%와 69.6%가 감수성을 보였으며, kanamycin, novobiocin, streptomycin, tetracyclin 등의 항생제에는 감수성 정도가 미약한 것으로 나타났다.

V. trachuri(*Vibrio carchariae*, 85 strains)는 ampicillin과 streptomycin에 대해서는 분리 균주 전체가 감수성을 보이지 않았으며, amoxicillin, norfloxacin, penicillin에 대해서는 낮은 감수성을 보였고, chloramphenicol, ciprofloxacin, nalidixic acid, oxolinic acid 등의 항생제에 대해서는 높은 감수성을 나타내었다.

P. damsela subsp. *damsela* (11 strains)의 경우는 chloramphenicol, doxycyclin, tetracyclin에 대해서는 낮은 감수성을 보였으나, gentamycin, neomycin, penicillin에 대해서는 높은 감수성을 나타내었다.

P. damsela subsp. *piscicida* (6 strains)는 ampicillin, amoxicillin, chloramphenicol, doxycyclin, novobiocin, penicillin, tetracyclin에 대해서는

감수성을 보이지 않았으며 neomycin, norfloxacin, oxolinic acid에 대해서는 66.7%의 균주가 감수성을 보이는 것으로 나타났다(Table 4-5).



Table 4-5. Antibiotic susceptibility of the bacteria isolated from flourders showing external disease symptom

Strains	Rate of antibiotic susceptibility(%)															
	AM ¹	AC ¹	CP ¹	CF ¹	DC ¹	GM ¹	KM ¹	NA ¹	NM ¹	NF ¹	NB ¹	OA ¹	PC ¹	SM ¹	TC ¹	
<i>Vibrio anguillarum</i> (1)	0	100	100	81.2	100	100	0	100	12.5	100	6.3	100	C	0	100	
<i>Vibrio anguillarum</i> (3)	33.3	33.3	100	100	33.3	100	0	100	0	C	0	100	33.3	33.3	33.3	
<i>Vibrio fischeri</i> (1)	33.3	100	66.7	100	33.3	100	0	100	100	100	66.7	100	C	0	33.3	
<i>Vibrio fischeri</i> (2)	100	100	50	50	C	100	0	100	100	100	50	100	50	0	0	
<i>Vibrio fischeri</i> (3)	0	0	100	100	33.3	100	100	100	100	66.7	33.3	100	C	0	0	
<i>Vibrio lentus</i> (1)	66.7	66.7	33.3	33.3	33.3	66.7	0	66.7	33.3	66.7	66.7	66.7	33.3	0	0	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (2)	8.7	47.8	65.3	65.2	78.3	66.6	13	33.6	66.6	66.6	4.3	37	3.7	0	65.2	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (1)	25.7	65.7	65.7	66.7	66.7	100	13.3	13.3	20	51.3	45.7	55.3	20	20	66.7	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (2)	100	100	100	100	100	50	50	100	50	100	100	100	100	50	100	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (3)	33.3	33.3	48.2	39.1	44.5	79.7	21.7	42	65.2	66.6	24.6	44.9	10.4	12.9	21.7	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (4)	0	3.6	95.3	97.6	92.6	67.6	78.6	89.4	71.8	9.4	28.1	89.4	1.2	0	78.6	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (5)	0	0	100	100	C	100	0	100	100	C	0	100	C	0	0	
<i>Photobacterium damela</i> ssp. <i>damela</i> (1)	36.4	45.5	35.2	54.5	16.2	100	35.4	16.4	81.9	63.6	27.3	35.4	51	21.3	9.1	
<i>Photobacterium damela</i> ssp. <i>damela</i> (2)	0	0	0	50	C	50	16.7	0	66.7	66.7	0	66.7	C	33.3	0	
<i>Listonella anguillarum</i> (1)	0	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	C	0	100	
<i>Vibrio</i> sp. group I (2)	0	100	100	100	50	100	100	100	100	100	100	100	50	0	50	
<i>Vibrio</i> sp. group I (2)	0	50	100	100	60	100	60	60	50	100	60	100	50	60	50	
<i>Vibrio</i> sp. group II (1)	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	C	0	0	
<i>Vibrio</i> sp. group IV (1)	0	0	100	100	C	100	100	100	100	100	0	0	100	100	0	
<i>Vibrio</i> sp. group V (2)	50	50	0	50	100	100	0	100	100	100	100	100	C	0	0	
<i>Vibrio</i> sp. group VI (1)	100	100	100	100	100	100	0	100	0	100	100	100	100	0	100	
<i>Photobacterium</i> sp. group I (3)	0	100	100	100	C	100	100	100	100	100	100	100	100	0	66.7	
<i>Photobacterium</i> sp. group I (1)	0	100	100	100	C	0	100	100	0	100	100	100	C	0	0	
<i>Aeromonas hydrophila</i> (1)	0	0	0	100	C	100	100	C	0	100	0	0	C	0	0	
<i>Aerobacter johnsonii</i> (1)	0	0	0	0	100	0	0	C	100	100	100	0	C	0	100	
<i>Citrobacter freundii</i> (2)	100	100	100	50	100	100	60	C	100	100	0	0	C	0	100	
<i>Moraxella</i> sp. group I(1)	100	100	0	100	100	100	100	100	0	C	100	0	100	100	0	

(C) Number of strains isolated.

¹ampicillin, ²amoxicillin, ³chloramphenicol, ⁴ciprofloxacin, ⁵doxycycline, ⁶gentamicin, ⁷kanamycin, ⁸nalidixic acid, ⁹neomycin, ¹⁰netilmicin, ¹¹novobiocin, ¹²teicoplanin, ¹³penicillin, ¹⁴streptomycin, ¹⁵tetracycline

4.4. 요약

GN2 Plate를 이용한 생화학적 성상을 MicroLog™ system(Release 4.0)에 의해 동정한 결과 *V. carchariae* group 51균주, *V. harveyi* group이 37균주, *A. sorbia* DNA group7로 grouping되는 균주가 30균주, *V. splendidus* group이 22균주, *V. aestuarinus* group이 16균주, *V. furnissii*와 *V. alginolyticus* group 14균주, *P. logei* group이 13균주, *V. proteolyticus* group 11균주, *P. angustum* group 10균주, *A. veronii/sorbia* DNA group8로 grouping 되는 균주 6균주를 포함하여 총 28개의 생화학 group으로 나누어졌다.

분리된 261균주의 16S rRNA 유전자에 대한 염기서열 분석에 따른 종 동정결과에서는 *Vibrio*속 12종, *Photobacterium* 속 2종, *Listonella* 속 1종, *Aeromonas*속 1종, *Acinetobacter* 속 2종, *Citrobacter*속 1종과 미동정 균주가 8종 등 총 27종으로 동정되었다.

12종의 *Vibrio*속에는 *V. trachuri*가 85균주로 가장 많은 부분을 차지하였으며, 다음으로는 *V. scophthalmi* 69균주로 동정되었으며, *V. parahaemolyticus* 23균주, *V. campbellii*가 16균주, *V. pomeroyi*가 15균주, *V. fischeri*와 *V. lentus*, *V. corallilyticus*, *V. furnissii*가 각 3균주, *V. fortis*, *V. probioticus*가 각 2균주, *V. tubiashii*가 1균주로 동정되었다.

*Photobacterium*속의 경우는 *P. damsela* subsp. *damsela* 11균주, *P. damsela* subsp. *piscida* 6균주가 동정되어 17균주의 *P. damsela*가 분리되었다.

*Listonella*속의 *L. anguillarum*이 1균주가 동정되었으며, *Aeromonas hydrophilla* 1균주, *Acinetobacter johnsonii* 1균주, *Citrobacter freundii* 2균주로 동정되었고, 그 외에 미동정 균주가 8 group(13 strains)이었다.

넙치의 성장단계와 분리 동정된 *Vibrio* 속 균주와의 연관성을 살펴보면 10~20cm의 시료에서 129균주가 분리되어 가장 많은 균주가 분리되었으며, 다음으로는 10cm 이하의 시료에서 55균주가 분리되어 20cm이하의 시료에서

균 분리가 주로 이루어졌다.

그 중 *V. scophthalmi*가 분리된 시료는 총 69 시료였는데, 그 중 64 시료가 20cm 이하로 나타나 본 균은 대부분이 치어에서 분리가 이루어졌음을 알 수 있었다.

*V. trachuri*는 85균주 중 35균주가 20cm 이하의 시료에서 분리되었으며, 나머지 50균주는 20cm 이상의 크기의 시료에서 분리가 이루어졌다.

본 연구에서 분리된 261균주에 대해 GN2 Plate를 이용한 생화학적 동정 결과와 16S rRNA 유전자 분석에 의한 동정결과 비교에서 차이가 있는 것으로 나타났는데, 이러한 결과는 MicroLog™ system(Release 4.0)에 의한 동정이 해당 프로그램에서 규정하는 similarity 보다 낮더라도 가장 높은 similarity 수치를 기준으로 하여 이루어졌다는 점, 균주 분리가 임상 시료가 아닌 어류로부터 분리되어 생화학적 다양성이 높음으로 인해 해당 프로그램 내에 균주에 대한 database의 부족, 그리고 16S rRNA 유전자 분석에 의한 동정에서 최근에 신종으로 보고된 *Vibrio*가 많은 비중을 차지한 점등에 기인하는 것으로 사료된다.

5. 종합고찰

제주도의 육상양식업은 1980년대 중반부터 넙치양식 위주로 발전하기 시작하여 현재는 제주도 1차 산업에서 중요한 위치를 차지하고 있다. 이러한 넙치양식에 있어서 질병관리는 성공적인 양식을 위해 무엇보다 중요한 과제라 할 수 있다.

이러한 질병관리를 위해서는 양식생물질병 전파가 물을 매개로 하여 이루어지는 경우가 많기 때문에 양식장 유입수의 위생적인 관리가 기본적으로 필요하다고 판단된다.

그리고 넙치의 성장에 따른 월별 질병발생조사 및 질병원인생물에 대한 연구 등의 기초자료 축적이 필요하다고 인정된다.

본 연구에서는 제주도 양식넙치의 세균성질병 대책에 대한 연구의 일환으로 2001년 6월부터 2002년 5월까지 제주도내 4군데 양식장을 대상으로 유입수로 이용되는 해수 및 지하수에 대한 세균학적 수질조사 및 같은 기간에 질병발생이 보고된 제주도내 양식장을 대상으로 양식넙치의 주요세균성 질병 중 체내감염증으로 보고되어 있는 streptococcosis, edwardsiellosis, vibriosis등(방 등, 1992; 이 등, 1991; 이 와 하, 1991)의 세균성 질병발생동향조사와 질병감염 양식넙치로부터 분리되는 다양한 종의 *Vibrio* 속 균의 동정을 통해 양식넙치의 vibriosis의 원인균 동정에 대한 기초자료를 제공하고 자 하였다.

양식장 유입수의 세균학적 특성조사에서는 조사기간 중 수온 분포는 지하수의 경우 15.1℃~20.5℃로 편차는 크지 않았으나 7월 수온이 가장 높게 조사되었고, 해수인 경우 13.8℃~27.1℃로 조사되었는데 모든 양식장에서 8월이 가장 높은 수온분포를 나타냈다. 각 양식장의 월간 수온편차는 해수의 경우에는 전체적으로 10℃ 이상의 월간 수온 편차를 보였으나, 지하수의 경우는 약 1.1~4.8℃정도로 조사되어 지하수의 경우는 계절적 수온변동이 크지 않은 것으로 나타났다.

염분농도의 경우 대부분 양식장에서 지하수가 해수에 비해 염분농도가 낮

게 조사되었으며, 해수보다는 지하수가 월간 편차가 큰 것으로 나타났으며, 해수의 경우에는 주로 8월이 다른 달에 비해 낮은 염분농도를 보였다.

총 세균수 및 *Vibrio* 속 세균수에 대한 조사에서 지하수의 경우는 총 세균수의 월 평균은 1,342~3,997 CFU/100mL로 년 평균 2,580 CFU/100mL의 총 세균수를 나타내었다.

지하수에 대한 월 평균 *Vibrio* 속 세균수는 84~990 CFU/100mL로 조사되었으며, 년 평균 295 CFU/100mL의 *Vibrio* 속 세균수를 보였다.

해수의 월 평균 세균수에 대한 조사에서는 총 세균수는 9,941~56,417 CFU/100mL, *Vibrio* 속 세균수는 2,353~10,493 CFU/100mL로 나타났으며, 해수의 년 평균 세균수는 총 세균수가 24,950 CFU/100mL, *Vibrio* 속 세균수가 5,093 CFU/100mL이었다.

지하수와 해수의 세균수 분포를 비교해 보면 총 세균수의 경우 약 9.5배, *Vibrio* 속 세균수는 약 17 배정도가 지하수에 비해 해수에서 높게 검출되었다. 또한 총 세균수에 대한 *Vibrio* 속 세균수의 분포비율을 보면 해수는 약 20%, 지하수에서는 약 11% 정도로 조사되어 해수가 지하수에 비해 매우 높은 *Vibrio* 속 세균의 분포비율을 나타내었다.

본 연구에서 지하수가 해수에 비해 *Vibrio* 속 균을 포함하여 세균수가 낮게 검출되었다는 점과 년 간 약 4°C 이하의 수온 편차를 보이며 17°C 전후의 수온 분포를 나타내는 것은 지하수의 효율적인 사용이 여름철의 수온상승에 의한 양식어의 스트레스 방지 등의 목적뿐만 아니라 질병관리 차원에서 중요한 요인으로 작용 할 것으로 생각된다.

예로 *Vibrio* 속 세균의 경우에는 해수에 상존하는 세균으로 환경수로부터 다양한 종이 분리가 보고되고있는데, 이들 중 일부는 어류의 질병 원인균과 상관성이 높은 것으로 알려져 있을 뿐만 아니라, 수온이 높은 여름철에 분리 비율이 높은 것으로 보고되고 있고, 또한, 어류의 장내 세균총은 해수내의 세균상과 연관이 있는 것으로 알려져 있다(Alcaide, 2003; Croci *et al.*, 2001; O'Neill *et al.*, 1992; Ringo and Birkbeck, 1999; Shin *et al.*, 1976).

따라서 지하수와 해수에 대한 월별 세균수 측정결과를 놓고 볼 때 지하수의 활용이 면역력이 약한 치어기 때의 사육수 등 환경으로부터의 세균감염

증 예방 및 고수온기의 세균성 질병대처 등에 효과적으로 이용될 수 있다고 생각된다.

월별 세균성질병발생동향 조사 결과에서는 질병에 감염된 것으로 판단되는 시료의 채취현황을 근거로 한 질병발생조사에서는 7월에 질병 발생율이 가장 높은 것으로 판단되며, 질병발생이 가장 적은 달은 5월이었다.

반면에 채취시료에 대한 세균 분리율은 10월이 98.1%로 가장 높은 비율을 보여 다른 원인보다 세균성질병에 의한 피해가 높을 것으로 판단되며, 6월에는 시료채취가 97개 집단에서 이루어져 7월 다음으로 질병발생이 많은 것으로 판단되었으나 채취 시료 중 세균 분리율은 52.5%로 조사되어 어류의 체내 세균감염에 의한 피해와 더불어 질병에 의한 피해도 높은 것으로 사료된다.

6월부터 8월 사이에 세균성 질병을 포함한 질병발생비율이 높은 것은 수온 상승 등에 의한 수조 내 세균증식 등과도 관련이 있을 것으로 사료되며, 수온이 낮은 10월부터 1월 사이에도 세균성질병을 포함해서 질병발생이 높게 조사된 것은 제주도내 많은 양식장에서 주로 10월부터 치어입식이 이루어져 초기 사육과정에서 면역력이 약한 치어에 세균 감염을 비롯한 기타 병원생물의 감염에 기인하는 것으로 추정된다.

조사대상 질병의 월별 발생유형은 대부분의 양식장에서 치어입식이 이루어지는 10월부터 이듬해 2월 및 3월까지의 면역력이 약한 치어에 vibriosis가 주로 발생하고, 중간성장단계인 6월과 7월경에는 edwardsiellosis가, 9월과 10월인 주 출하시기에는 주로 streptococcosis가 발생하는 것으로 판단되었다.

또한, 채취된 시료의 크기와 각 시료별 분리 균주의 간이동정에 의한 세균성 질병과의 상관관계를 보면 20cm이하의 크기의 치어에서는 vibriosis가 가장 많은 약 85%를 차지했으며, 20~30cm 크기의 시료에서는 edwardsiellosis가 약 52%로 가장 많은 비율로 조사되었고, 30cm이상의 성어에서는 streptococcosis가 가장 높은 비율로 발생하였다.

조사대상 세균성 질병 중 가장 많은 질병은 vibriosis로 조사되었으며, 세균성 질병발생 양상은 어류의 성장단계 및 계절에 따라서도 영향을 받는 것

으로 사료된다.

세균성질병에 감염된 것으로 판단되는 넙치 시료로부터 분리된 *Streptococcus* sp. 196균주, *Edwardsiella* sp. 225균주, *Vibrio* sp. 261균주를 대상으로 15종의 항생제에 대한 감수성시험을 한 결과 *Streptococcus* sp.는 ampicillin, amoxicillin, chloramphenicol, penicillin에 대해서는 80% 이상의 균주가 감수성을 나타냈으며, nalidixic acid, oxolinic acid, streptomycin에 대해서는 매우 낮은 감수성을 보이는 것으로 나타났다.

Edwardsiella sp.는 ampicillin, amoxicillin, chloramphenicol, ciprofloxacin, norfloxacin에 대해서 약 80%이상의 균주에서 감수성을 나타내었으며, kanamycin, nobobiocin, penicillin, streptomycin등의 항생제에 대해서는 약 2%정도의 균주 만의 감수성을 나타내었다.

Vibrio sp.는 chloramphenicol, ciprofloxacin, gentamycin, nalidixic acid, oxolinic acid등 5종의 항생제에 대해서 70%이상의 균주가 감수성을 보였으며, ampicillin, penicillin, streptomycin등에 대해서는 상대적으로 낮은 감수성을 보였는데, 분리 균주에 대한 항생제 감수성 시험은 단기적인 결과보다는 장기적인 연구를 통해 항생제 내성 균주의 파악 및 그 변화패턴을 분석하는 것이 세균성 질병에 대해 효과적으로 대처 할 수 있는 방법의 일환이라 사료된다.

*Vibrio*속 균은 *V. tapetis*, *V. ichthyoenteri*, *V. scopthalmi*, *V. rotiferianus*, *V. coralliilyticus*, *V. kanaloae*, *V. pomeroyi*, *V. chagasii*, *V. fortis*, *V. hepatarius*, *V. neptunius*, *V. brasiliensis*, *V. xuii*, *V. agarivorans*등의 지속적인 신종보고(Ben-Haim *et al.*, 2003; Borrego *et al.*, 1996; Cerdà-Cuéllar *et al.*, 1997; Gomez-Gill *et al.*, 2003; Ishimaru *et al.*, 1996; Macian *et al.*, 2001-a, b; Thompson *et al.*, 2003-a, b, c)와 종 다양성등에 의해 생화학적 동정에 어려움이 많은 것으로 알려져 있으며, 특히 환경으로부터 분리되는 *Vibrio*속 균의 경우에는 더욱 그렇다고 알려져 있는데(Alsina and Blanch., 1994), 본 연구에서는 16S rRNA 유전자 분석에 의해 질병감염 양식넙치로부터 12종의 *Vibrio*속, 2종의 *Photobacterium*, 1종의 *Listonella*속과 미동정 group을 포함하여 *Vibrionaceae* 및 그 관련

종으로 판단되는 27종(261 strains)의 세균을 분리 동정하였다.

그 중 *V. trachuri*가 85균주로 가장 많은 부분을 차지하였으며, 다음으로 *V. scophthalmi* 69균주로 동정되었으며, *V. parahaemolyticus* 23균주, *V. campbellii*가 16균주, *V. pomeroyi*가 15균주 *V. fischeri*와 *V. lentus*, *V. corallilyticus*, *V. furnissii*가 각 3균주, *V. fortis*, *V. probioticus*가 각 2균주로 동정되었으며, *V. tubiashii* 1균주로 동정되었다.

*Photobacterium*속의 경우는 *P. damsela* subsp. *damsela* 11균주, *P. damsela* subsp. *piscida* 6균주가 동정되어 17균주의 *P. damsela*가 분리되었다.

Listonella 속 균주로는 *L. anguillarum* 1균주가 동정되었으며, 그 외에 *A. hydrophilla* 1균주, *Ac. johnsonii* 1균주, *C. freundii* 2균주로 동정되었으며, 미동정 균주가 8 group(13 strains)으로 나타났다.

GN2Plate을 이용한 생화학적 특성 조사결과를 MicroLog™ system(Release 4.0) program을 이용하여 생화학 동정을 실시한 결과 *V. carchariae* group 51균주, *V. harveyi* group이 37균주, *A. sorbia* DNA group7로 grouping 되는 균주가 30균주, *V. splendidus* group이 22균주, *V. aestuarinus* group이 16균주, *V. furnissii*와 *V. alginolyticus* group 14균주, *P. logei* group이 13균주, *V. proteolyticus* group 11균주, *P. angustum* group 10균주, *Aeromonas veronii/sorbia* DNA group8로 grouping 되는 균주 6균주 등을 포함하여 총 28개의 생화학 group으로 나누어졌는데, 16S rRNA 유전자 분석에 의한 동정결과와 비교 해 볼 때 동정결과에 큰 차이가 있었다.

생화학적 동정결과와 분자생물학적 동정결과의 차이는 MicroLog™ system(Release 4.0)에 의한 생화학적 동정의 경우는 해당 프로그램상에 similarity 값이 0.5이상에서 정확한 동정이 이루어지는 것으로 지정해 놓고 있으나 본 연구에서는 전체 균주를 대상으로 생화학적 grouping을 하기 위해 similarity값에 상관없이 그 값이 0.5이하가 되더라도 그 중 가장 높은 similarity값에 해당되는 균주로 동정을 실시하였다는 점이 가장 큰 이유로 생각된다.

그 외에 균주 분리가 임상 시료가 아닌 어류로부터 분리되어 생화학적 다

양성이 높음으로 인해 해당 프로그램 내에 균주에 대한 database의 부족, 그리고 16S rRNA 유전자 분석에 의한 동정에서 최근에 신종으로 보고된 *Vibrio*가 많은 비중을 차지한 점등에 기인하는 것으로 사료된다.

따라서 생화학적 특성분석에 의한 동정결과 및 분자생물학적 동정결과에 대한 오차를 줄이기 위해서는 환경시료로부터 분리되는 다양하고 새로운 *Vibrio* 종에 대한 database 확보와 근연종에 대한 연구등이 더욱 더 진행되어야 할 것으로 사료되며, 또한 분자생물학적 방법에 의한 신속진단법외에 생화학적 특성에 의해 신속하게 *Vibrio* 종을 구분하기 위한 연구등도 이루어져야 될 것으로 판단된다.

또한 본 연구에서 vibriosis 감염증으로 추정되는 넙치에서 분리동정된 *Vibrio* 종 중 *V. trachuri*, *V. scophthalmi*, *V. parahaemolyticus*, *V. campbellii*, *V. pomeroi*등 우점하게 분리된 동정 결과를 바탕으로 분리균주의 감염실험실시 및 제주산에 국한된 시료채취가 아닌 좀 더 광범위하고 좀 더 장기적인 균주의 분리 동정 등을 통하여 양식넙치의 vibriosis의 원인균 확인에 대한 연구가 좀 더 이루어져야 될 것으로 사료된다.

Appendices



Appendix 1 : Parameter of biochemical characteristics by GN2 MicroPlate

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	water	D-xylose	D-glucose	D-fructose	D-glucose	D-fructose	D-glucose	D-fructose	D-glucose	D-fructose	D-glucose	D-fructose
B	D-xylose	D-fructose	D-glucose	D-fructose	D-glucose	D-fructose	D-glucose	D-fructose	D-glucose	D-fructose	D-glucose	D-fructose
C	D-fructose	D-glucose	D-fructose	D-glucose	D-fructose	D-glucose	D-fructose	D-glucose	D-fructose	D-glucose	D-fructose	D-glucose
D	acetic acid	citric acid	malic acid	formic acid	D-glucosonic acid	D-glucosonic acid	D-glucosonic acid	D-glucosonic acid	D-glucosonic acid	D-glucosonic acid	D-glucosonic acid	D-glucosonic acid
E	3-hydroxybutyric acid	lactic acid	pyruvic acid	glutaric acid	valeric acid	acetic acid	malic acid	pyruvic acid	glutaric acid	valeric acid	acetic acid	malic acid
F	lactic acid	pyruvic acid	glutaric acid	valeric acid	acetic acid	malic acid	pyruvic acid	glutaric acid	valeric acid	acetic acid	malic acid	pyruvic acid
G	D-xylose	D-fructose	D-glucose	D-fructose	D-glucose	D-fructose	D-glucose	D-fructose	D-glucose	D-fructose	D-glucose	D-fructose
H	lactic acid	pyruvic acid	glutaric acid	valeric acid	acetic acid	malic acid	pyruvic acid	glutaric acid	valeric acid	acetic acid	malic acid	pyruvic acid

Appendix II

Result of biochemical test by using GN2Plate and MicroLog™ system(Release 4.0) program

<i>Aeromonas sobria</i> DNA group 7 (30)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	d	+	+	+	+	d	-	-	-	d	+
B	-	+	d	+	d	+	d	d	-	+	+	+
C	-	d	d	-	-	d	d	+	-	-	+	d
D	+	d	+	-	d	-	+	-	+	d	-	-
E	-	-	-	+	-	+	-	d	-	-	-	+
F	+	-	d	d	+	+	+	+	+	+	-	+
G	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-
H	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+

<i>Vibrio carchariae</i> (51)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	+	+	+	+	+	d	+	-	-	-	+
B	-	+	-	+	d	+	-	-	-	+	+	+
C	-	d	d	-	d	d	d	+	-	d	d	d
D	d	d	d	-	d	d	+	-	+	d	d	-
E	-	d	-	+	-	+	-	d	-	-	-	+
F	+	-	d	d	d	+	+	+	+	+	+	d
G	-	d	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-
H	d	+	+	+	-	-	-	-	+	+	d	+

<i>Vibrio harveyi</i> (37)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	-	d	d	d	d	d	+	-	-	-	d
B	-	+	-	d	d	+	-	-	-	+	d	+
C	d	d	d	-	-	-	d	d	d	-	d	d
D	d	-	-	-	-	-	d	-	d	-	d	-
E	-	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	d
F	d	-	d	-	d	d	d	d	d	-	d	d
G	-	-	-	-	-	d	-	d	d	d	-	-
H	-	+	+	+	-	-	-	-	d	-	-	d

Appendix II . Continued

Pseudomonas creosotensis (2)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	d
B	-	+	-	d	-	+	-	-	-	+	+	d
C	-	-	+	-	-	d	+	+	-	-	+	+
D	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
E	-	-	d	+	-	+	-	+	-	-	-	+
F	+	-	-	d	+	+	+	+	+	+	+	+
G	+	d	d	d	-	+	-	-	+	+	-	-
H	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+

Vibrio proteolyticus (11)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	d
B	-	+	-	d	d	+	-	-	-	d	+	d
C	-	d	d	-	-	d	d	+	-	-	+	d
D	+	d	d	d	-	-	+	-	-	d	-	-
E	-	-	d	+	+	+	+	d	-	-	-	+
F	+	-	-	d	+	+	+	+	+	+	+	d
G	d	d	d	d	-	+	-	d	+	+	-	-
H	-	+	+	+	-	d	d	-	d	+	+	+

Vibrio alginolyticus (14)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	d	d	d	d	d	d	+	-	-	-	d
B	-	+	-	d	d	+	-	d	-	+	-	+
C	-	-	d	-	-	d	d	+	-	-	d	d
D	d	-	d	-	-	-	+	-	d	d	-	-
E	-	-	-	d	-	+	-	d	-	-	-	d
F	d	-	d	d	d	+	+	+	d	+	d	d
G	d	d	-	d	-	d	-	d	d	d	-	-
H	-	+	+	+	-	d	-	-	d	d	d	d

Appendix II . Continued

Aeromonas tructi DNA group 13 (3)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	d	+	d	d	d	d	+	-	-	-	d
B	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	d	+
C	-	-	d	-	-	-	-	+	-	d	d	d
D	d	d	d	-	-	-	-	+	-	-	d	d
E	-	-	-	d	-	+	d	-	-	-	-	d
F	d	-	d	-	d	+	d	d	d	d	d	d
G	-	d	-	-	-	d	-	d	d	d	-	-
H	d	+	+	d	-	-	-	-	d	d	+	+

Photobacterium angustum (10)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	-	d	-	d	d	-	+	-	-	-	d
B	-	+	-	d	-	+	-	-	-	-	-	+
C	-	-	d	-	-	-	d	d	-	-	d	d
D	-	-	-	-	-	-	d	-	d	-	d	-
E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d
F	-	-	-	-	-	d	d	d	d	+	+	d
G	-	-	-	-	-	d	-	-	d	d	-	-
H	-	+	+	+	-	-	-	-	d	d	d	d

Vibrio aestuarinus (16)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	d	d	d	d	d	d	+	-	-	-	d
B	-	+	-	d	d	+	-	-	-	+	d	+
C	-	-	d	-	-	-	d	d	d	-	d	d
D	d	-	-	-	-	-	d	-	d	d	d	-
E	-	-	-	d	-	+	-	-	-	-	-	d
F	d	-	d	-	d	d	d	+	d	+	d	d
G	-	-	-	-	-	d	-	d	d	d	-	-
H	-	+	+	+	-	-	-	-	d	d	d	d

Appendix II . Continued

<i>Vibrio splendidus</i> (22)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	-	d	d	d	d	d	+	-	-	-	d
B	-	+	-	d	d	+	-	-	-	+	d	+
C	-	-	d	-	-	-	d	+	d	d	d	-
D	-	d	-	-	-	-	+	-	d	-	d	-
E	-	-	-	d	-	+	-	-	-	-	-	d
F	-	-	d	-	d	d	+	+	d	+	+	d
G	-	-	-	-	-	d	-	-	d	d	-	-
H	-	+	+	+	-	-	-	-	d	-	-	d

<i>Photobacterium logei</i> (13)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	+	+	+	+	+	d	+	-	d	d	+
B	-	+	d	+	d	+	d	d	d	+	+	+
C	-	d	d	d	d	+	+	+	d	d	+	+
D	+	d	+	-	-	-	+	d	+	d	d	-
E	-	d	d	+	+	+	d	d	+	d	-	+
F	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G	d	+	d	d	-	+	-	+	+	+	-	-
H	d	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+

<i>Vibrio furnissii</i> (14)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	-	d	-	d	d	d	+	-	-	-	-
B	-	d	-	d	-	+	-	-	-	+	-	d
C	-	d	-	-	-	-	d	d	d	-	d	d
D	d	-	-	-	-	d	d	-	d	-	d	-
E	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	d
F	d	-	-	-	d	d	d	+	d	+	+	d
G	-	-	-	-	-	d	-	-	d	d	-	-
H	-	+	+	d	-	-	-	-	d	-	-	-

Appendix II . Continued

Vibrio natriegens (1)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+
B	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+
C	+	+	-	±	-	-	+	+	-	-	+	+
D	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
E	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+
F	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-
H	-	+	+	+	-	+	-	-	+	±	±	+

Vibrio mediterranei (1)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	-	+	+	±	+	+	+	-	-	-	+
B	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+
C	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
D	-	-	-	-	+	-	±	-	-	-	-	-
E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
F	+	-	-	-	-	+	+	±	+	+	+	-
G	±	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
H	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+

Photobacterium leiognahi (1)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	-	-	-	-	-	±	+	-	-	-	-
B	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	±
C	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
D	-	-	-	-	-	-	+	-	±	-	-	-
E	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
F	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H	-	+	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-

Appendix II . Continued

Bukholderia cocovenenans (1)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
B	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
C	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
D	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
E	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
F	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
G	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Vibrio fluvialis (4)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	+	+	+	+	+	d	+	-	d	d	+
B	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
C	-	d	+	-	-	-	d	+	-	-	+	d
D	+	d	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
E	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
F	+	-	d	-	+	+	+	+	+	+	+	+
G	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	d
H	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+

Aeromonas enteropelogenes (3)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	d
B	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+
C	-	-	-	-	-	d	-	+	-	-	-	-
D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	-
E	-	-	-	d	-	+	-	-	-	-	-	d
F	-	-	-	d	-	+	+	d	d	d	d	-
G	-	-	-	-	-	d	-	-	d	-	-	-
H	-	+	+	d	-	-	-	-	-	+	+	+

Appendix II . Continued

<i>Aeromonas hydrophila</i> DNA group 1 (5)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	-	d	d	d	d	d	+	-	d	-	d
B	-	+	-	d	-	+	-	-	-	d	d	d
C	-	d	d	-	-	d	d	d	-	-	d	-
D	-	-	-	d	-	-	+	-	-	-	-	-
E	-	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-
F	-	-	-	-	-	d	d	d	d	d	d	d
G	-	-	-	-	-	d	-	d	d	-	-	-
H	-	+	+	+	-	-	-	-	d	d	-	-

<i>Aeromonas veronii /sobria</i> DNA group 8 (6)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	d	d	+	+	+	d	d	-	-	-	d
B	-	+	-	d	-	d	-	-	-	+	d	+
C	-	d	d	-	-	d	+	+	-	-	d	d
D	d	d	d	-	-	d	+	+	-	-	-	-
E	-	-	-	+	+	+	+	d	-	-	-	+
F	+	-	d	d	+	+	+	+	+	+	+	+
G	d	d	-	d	-	+	-	d	d	d	-	-
H	d	+	+	+	-	-	-	-	d	d	+	+

<i>Achromobacter cholinophagum</i> (1)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
B	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	±
C	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
D	-	-	+	-	-	-	±	-	-	-	-	-
E	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
F	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-
G	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Appendix II . Continued

<i>Vibrio anguillarum</i> (2)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	-	+	-	-	-	d	+	-	-	-	-
B	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	d	+
C	-	-	d	-	-	-	+	d	+	-	-	-
D	-	-	-	-	-	-	+	-	d	-	+	-
E	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	d
F	-	-	-	-	-	-	-	d	d	+	+	-
G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	d

<i>Iodobacter fluviatilis</i> (1)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
B	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+
C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
D	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
F	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
G	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-
H	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+

<i>Vibrio campbellii</i> (4)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	-	d	d	-	-	d	+	-	-	-	-
B	-	+	-	-	d	+	-	-	-	+	d	+
C	-	d	d	-	-	-	d	+	d	+	-	-
D	-	-	-	-	-	-	d	-	d	-	d	-
E	-	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-
F	-	-	d	-	-	+	+	+	d	+	+	d
G	-	-	-	-	-	-	-	-	d	d	-	-
H	-	+	d	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Appendix II . Continued

<i>Pasteurella canis stomatis</i> (1)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+
B	-	+	-	±	+	+	-	-	-	+	-	+
C	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-
G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+

<i>Photobacterium damsela</i> (4)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	-	+	-	d	d	d	+	-	-	-	d
B	-	+	-	d	-	+	-	-	-	+	-	+
C	-	-	d	-	-	-	-	+	-	+	d	-
D	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	-	-	-	d	-	d	-	-	-	-	-	d
F	d	-	-	-	-	-	-	d	d	d	d	d
G	-	-	-	-	-	d	-	-	d	d	-	-
H	-	+	d	d	-	-	-	-	d	d	d	+

<i>Aeromonas allosaccharophila</i> (1)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+
B	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
C	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+
D	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-
E	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+
F	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
G	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-
H	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+

Appendix II . Continued

<i>Photobacterium fisheri</i> (1)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
B	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
C	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
D	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
E	-	-	±	-	-	±	±	+	+	+	+	-
F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

<i>Aeromonas eucrenophila</i> DNA group 6 (2)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	+	+	+	+	+	-	+	-	d	-	+
B	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
C	-	+	+	-	-	d	+	+	-	-	+	+
D	+	-	-	-	-	-	+	-	+	d	-	-
E	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+
F	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G	-	+	-	d	-	d	-	+	+	+	-	-
H	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+

+; 90% or more of the strains are positive.

-; 90% or more of the strains are negative.

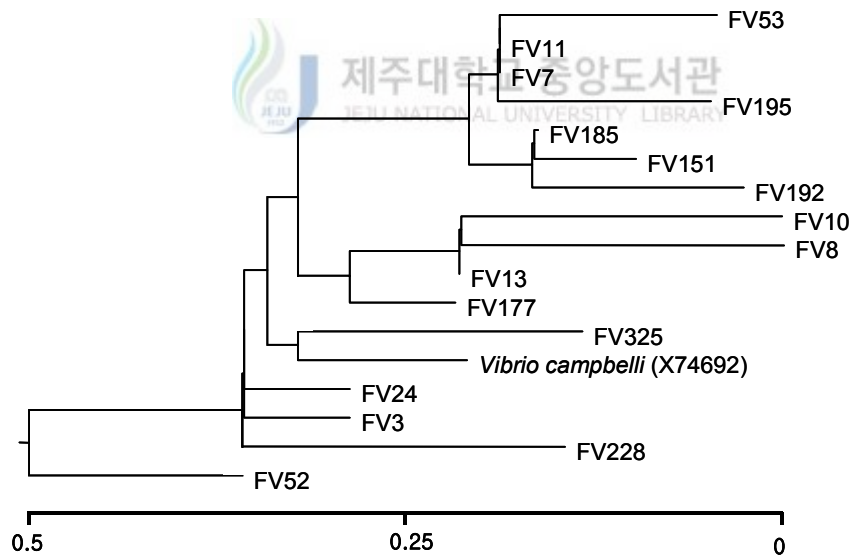
±; weak reaction.

d; 11-89% of the strains are positive.

Appendix III

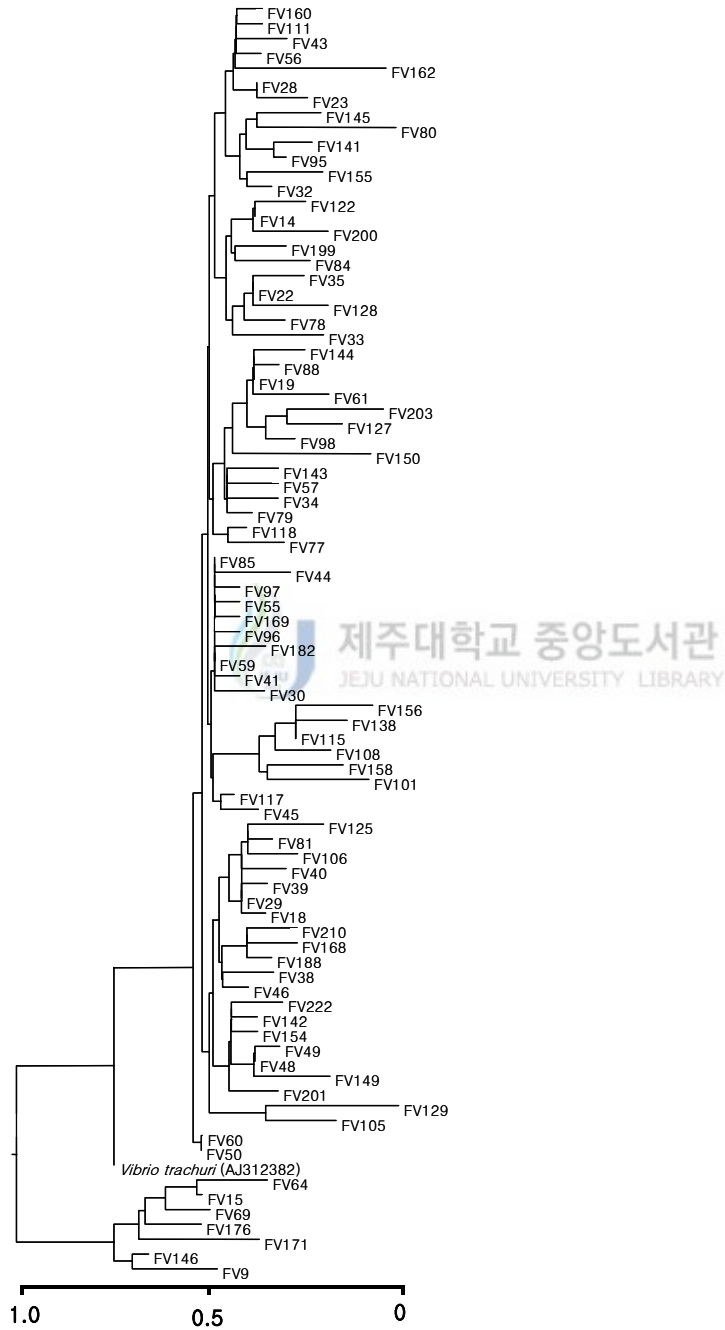
Dendrogram showing the divergence of *Vibrio campbellii*(A), *Vibrio trachuri*(B), *Vibrio parahaemolyticus*(C), *Vibrio pomeroiyi*(D), *Vibrio scophthalmi*(E), *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*(F), *Photobacterium damsela* subsp. *piscida*(G) isolated from cultured flounder in Jeju. The length of each pair of branches represents the distance between sequence pairs, while the units at the bottom of the tree indicate the number of substitution events.

(A): *Vibrio campbellii*



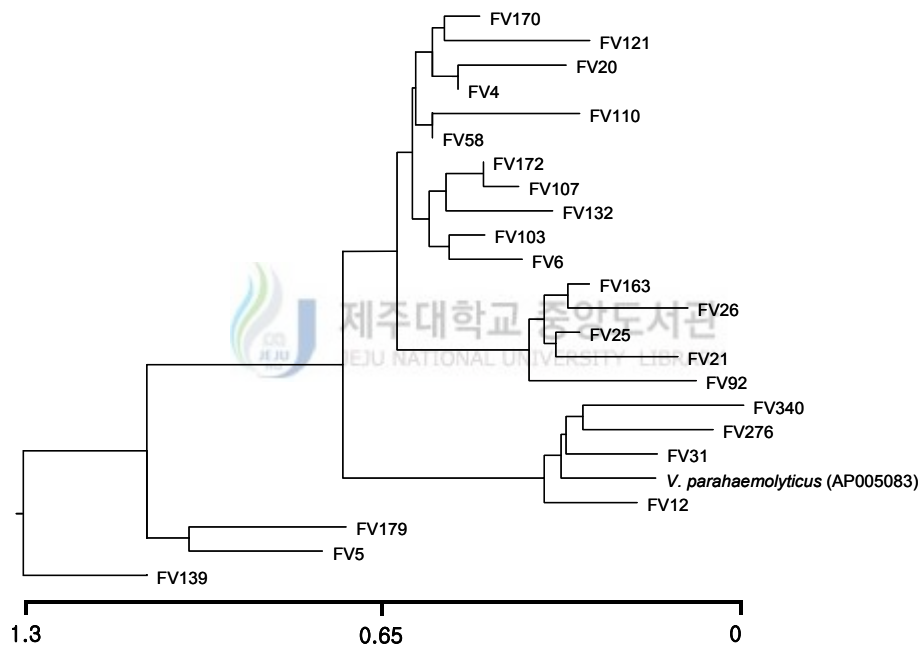
Appendix III. Continued

(B): *Vibrio trachuri*



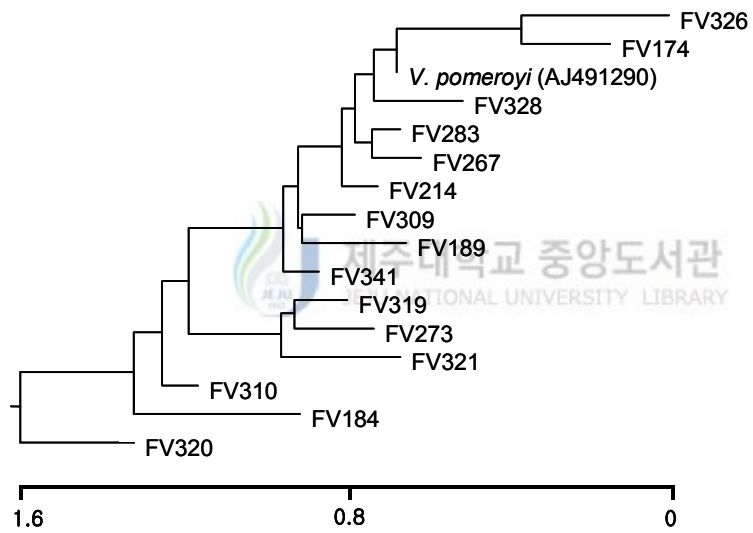
Appendix III. Continued

(C): *Vibrio parahaemolyticus*



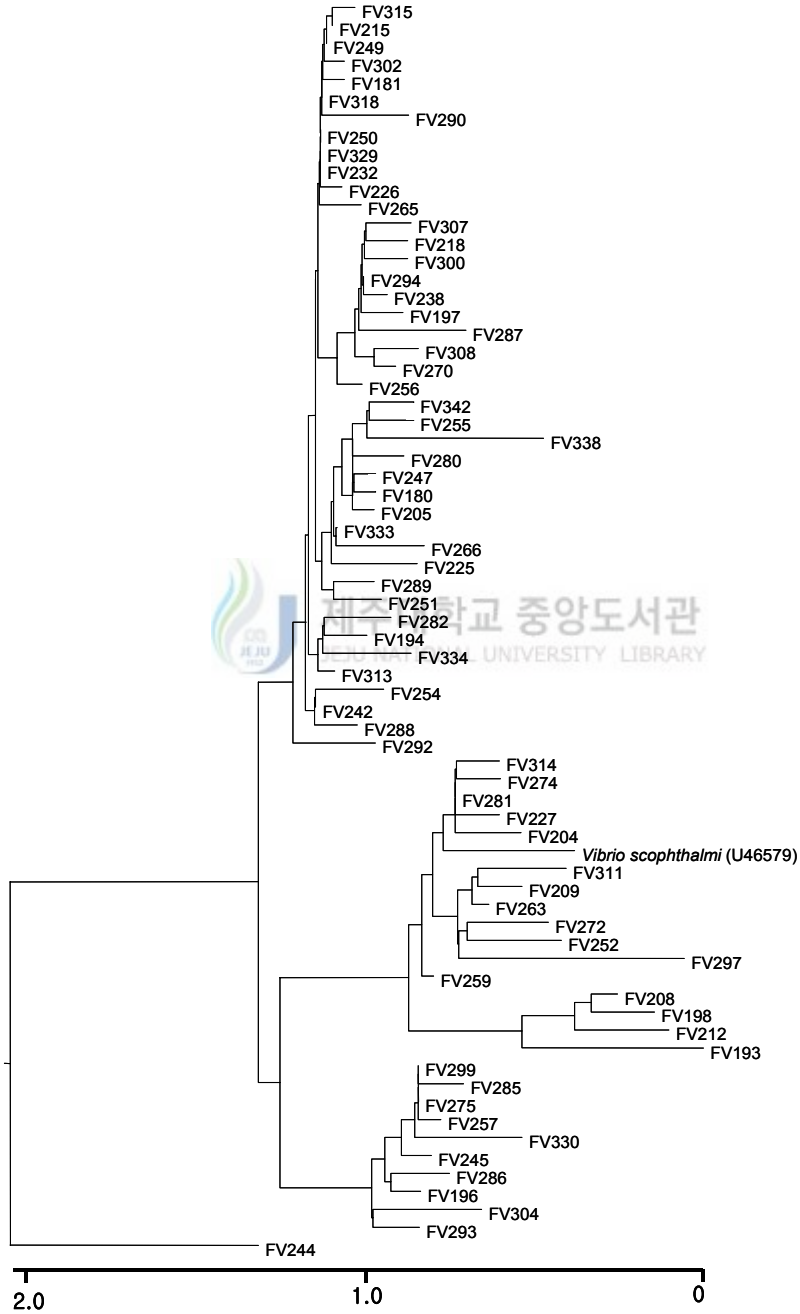
Appendix III. Continued

(D): *Vibrio pomeroi*



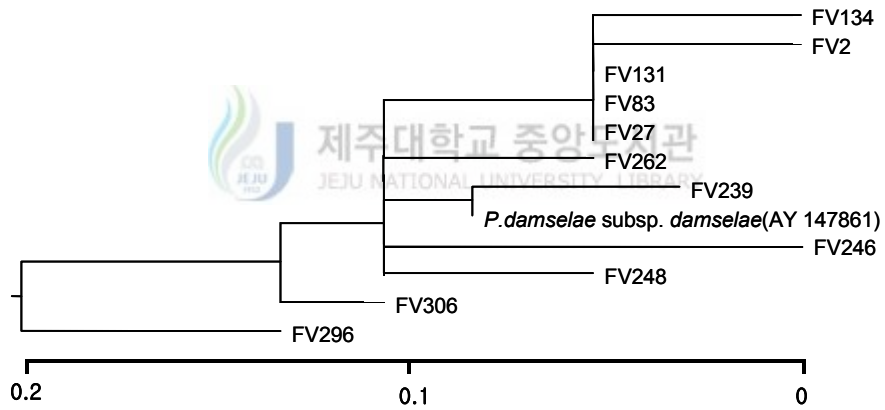
Appendix III. Continued

(E): *Vibrio scophthalmi*



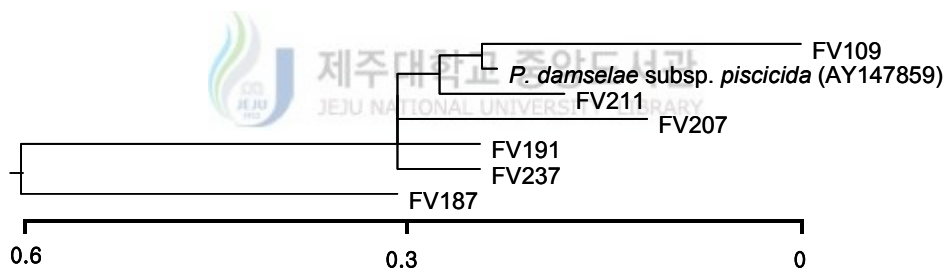
Appendix III. Continued

(F): *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*



Appendix III. Continued

(G): *Photobacterium damsela* subsp. *piscida*



참고문헌

- 강봉조, 오덕철(1999). 제주지역 항·포구 해수의 세균학적 및 화학적 수질분석. *제주대학교 해양연구소 연구논문집*. 23:39-50.
- 김은희(1999). 넙치에서 분리된 *Edwardsiella tarda*의 약제내성 전달성 R plasmid. *한국어병학회지*. 12: 115-121.
- 김재하, 오덕철(1982). 제주항의 *Vibrio parahaemolyticus* 분포에 관한 연구. *제주대해양자원연구소 연구보고*. 6:27-32.
- 방종득, 전세규, 박수일, 최윤정(1992). 양식넙치에서 분리된 *Edwardsiella tarda*의 생화학적 및 혈청학적 특성에 관한 연구. *한국어병학회지*. 5:29-35.
- 신석우, 정규진(1996). 여수연안 및 동중국해의 세균상. 2. 분리균의 수평분포. *한국수산학회지*. 29:17-25.
- 윤영준, 김정완, 고용구, 고영환(1996). 연안해수 근원의 *Vibrio*속 세균의 다양성. *미생물과 산업*. 22:193-204.
- 윤한식, 안병용(1992). 군산만에서 서식하는 패류의 장염비브리오에 관한 분포연구. *한국식품위생학회지*. 7:137-142.
- 이덕찬, 이재일, 박찬일, 박수일(2001). 해산양식어로부터 분리된 연쇄구균증의 원인균, *Lactococcus garvieae*에 대한 연구. *한국어병학회지*. 14:71-80.
- 이창훈, 하동수(1991). 養殖 넙치의 連鎖球菌症. *한국어병학회지*. 4:71-77.

이훈구, 김희제, 김일(1991). 동절기 한국 남해안의 궤양증 및 복수증 양식
넙치(*Paralichthys olivaceus*)로부터 *Vibrio* 종의 분리. *미생물학회지*. 29:
319-28.

전세규(1988). 養殖魚類의 細菌性疾病의 診斷과 對策. *한국어병학회지*. 1:
5-30.

정규진, 신석우(1996). 여수연안 및 동중국해의 세균상. 1. 일반세균, *Vibrio*
spp., 대장균군수에 따른 수평분포. *한국수산학회지*. 29:9-16.

제주도(2003). 해양수산현황.

최민순, 심현빈, 정경민(2000). 군산내만의 해양수에서 분리되는 세균의 분
포. *한국어병학회지*. 13:67-73.

허문수, 송춘복, 이제희, 여인규, 전유진, 이정재(2001). 제주산 양식넙치
(*Paralichthys olivaceus*)로부터 분리된 β -용혈성 연쇄구균(β -
Streptococcus spp.)의 특성. *한국수산학회지*. 34:365-369.

Alcaide E.(2003). Numerical taxonomy of *Vibrionaceae* isolated from
cultured amberjack(*Seriola dumerili*) and surrounding water. *Current*
Microbiology. 46:184-189.

Alsina, M. and Blanch A.(1994). A set of keys for biochemical
identification of environmental *Vibrio* species. *Journal of Applied*
Bacteriology. 76:79-85.

Amandi, A., Hiu, S. F., Rohovec, J. S. and Fryer, J. L.(1982).
Isolation and characterization of *Edwardsiella tarda* from fall chinook

salmon(*Oncorhynchus tsawytscha*). *Applied and Environmental Microbiology*. 43:1380-1384.

Austin, B. and Austin, D. A.(1993). *Bacterial fish pathogens*, ed 2. New York, Eliis Horwood. p.384.

Baucer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C. and Turck, M.(1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*. 45:493-496.

Baumann, P. and Schubert, R. H. W.(1984). Vibrionaceae. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. ed. Krieg, N. R. and Holt, J. G. Vol.1:516-575. Williams and Wilkins.

Ben-Haim, Y., Thompson, F. L., Thompson, C. C., Cnockaert, M. C., Hoste, B., Swings, J. and Rosenberg, E.(2003). *Vibrio coralliilyticus* sp. nov., a temperature dependent pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53:309-315.

Borrego, J. J., Castro, D., Lique, A., Paillard, C., Maes, P., Garcia, M. T. and Ventosa, A.(1996). *Vibrio tapetis* sp. nov., the Causative Aegesz, nt of the Brown Ring Disease Affecting Cultured Clams. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 46:480-484.

Cerdà-Cuéllar, M., Rosselló-Mora, R. A., Lalucat, J., Jofre, J. and Blanch, A.(1997). *Vibrio scophthalmi* sp. nov., a New Species from turbot(*Scophthalmus maximus*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 47:58-61.

Colwell, R. R. and Grims, D. J.(1984). *Vibrio* diseases of marine fish populations. *Helgolander Meeressuntersuchungen*. 37:265-287.

Colwell, R. R.(1984). *Vibrios in the environment*. New York: John Wiley & Sons.

Croci, L., Serratore, P., Cozzi, L., Stacchini, A., Milandri, S., Suffredini, E. and suffredini, L.(2001). Detection of Vibrionaceae in mussels and in their seawater growing area. *Letters in Applied Microbiology*. 32:57-61.

Doménech, A., Fernández-Garayzábal, J. F., Pascual, C., Garcia, J. A., Cutuli, M. T., Moreno, M. A., Collins, M. D. and Dominguez, L.(1996). Streptococcosis in cultured turbot, *Scophthalmus maximus*(L.), associated with *Streptococcus parauberis*. *Journal of Fish disease*. 19:33-38.

Egusa, S.(1976). Some bacterial disease of freshwater fishes in Japan. *Fish Pathology*. 10:103-114.

Farto, R., Armada, S. P., Montes, M., Guisande, J. A., Perez, M. J. and Nieto, T. P.(2003). *Vibrio lentus* associated with diseased wild octopus (*Octopus vulgaris*). *Journal of Invertebrate Pathology*. 83:149-156.

Fouz, B. I. et al. (1992). Characterzation of *Vibrio damsela* strains isolated from turbot, *Scophthalmus maximus* in Spain. *Disease of Aquatic Organism*. 12:155-166.

Gauthier, G., Lafay, B., Ruimy, R., Breittmayer, V., Nicolas, J. L., Gauthier, M. and Christen, R.(1995). Small-subunit rRNA sequences and whole DNA relatedness concur for the reassignment of *Pasteurella piscicida*(Sineszko et al.), Janssen and Surgalla to the genus *Photobacterium* as *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 45:139-144.

Gomez-Gill, B., Thompson, F. L., Thompson C. C. and Swing, I. (2003). *Vibrio rotiferianus* sp. nov., isolated from cultures of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53:239-243.

Grimes, D. J., Gruber, S. H. and May, E. B.(1985) Experimental infection of Lemon Sharks, *Negaprion brevirostris* (Poey), with *Vibrio* species. *Journal of Fish Diseases*. 8:173-180.

Harris, L., Owens, L. and Smith. S.(1996). A selective and differential medium for *Vibrio harveyi*. *Applied and Environmental Microbiolog.* 62:3548-3550.

Herman, R. L. and Bullock, G. L.(1986). *Edwardsiella tarda* as a cause of mortality in strip bass. *Transaction of the American Fisheries Society*. 115:232-235.

Hiney, M. P. and Smith, P. R.(1998). Validation of polymerase chain reaction-based techniques for proxy detection of bacterial fish pathogen: framework, problems and possible solutions for environmental applications. *Aquaculture*. 162:41-68.

Hjeltnes, B. and Roberts, R. J.(1993). Vibriosis. In Inglis V., Roberts, R. J., Bromage, N. R. editors: *Bacterial disease of fish*. New York, Halsted Press. pp.109-121.

Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T. and Willams, S. T.(1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. ninth edition. pp. 175-289. Williams and Wilkins.

Hond, T.(1991). Pathogenesis, genes, and toxins of genus *Vibrios*. *Medical Immunology*. 21:313-323.

Hoshina, T., Sano, T. and Morimoto, Y.(1958). A streptococcus pathogenic to fish. *Journal of Tokyo University of Fisheries*. 44:57-68.



Ishimaru, K., Akagawa-Matsushita, M. and Muroga, K.(1996). *Vibrio ichthyenteri* sp. nov., a pathogen of Japanese flounder(*Paralichthys olivaceus*) larvae. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 46:155-159.

Jannasch, H. W. and Jones, G. E.(1959). Bacterial populations in sea water as determined by different methods of enumeration. *American Society of Limnology and Oceanography*. 4:128-139.

Kasornchandara, J., Rogers, W. A. and Plumb, J. A. (1987). *Edwardsiella ictaluri* from walking catfish, *Clarias batrachus* L., in Thailand. *Journal of fish Diseases*. 10:137-138.

Kim, E. H. and Aoki, T.(1993). Drug resistance and broad

geographical distribution of identical R plasmid of *Pasteurella piscicida* isolated from cultured yellowtail in Japan. *Microbiology and Immunology*. 37:103-9.

Kim, M. S. and Jeong, H. D.(2001). Development of 16S rRNA targeted PCR methods for the detection and differentiation of *Vibrio vulnificus* in marine environments. *Aquaculture*. 193:199-211.

Kitao, T.(1982). The methods for detection of *Streptococcus* sp., causative bacteria of streptococcal disease of cultured yellowtail(*Seriola quinqueradiata*). Especially their cultural, biochemical and serological properties. *Fish Pathology*. 17:17-26.

Kitao, T.(1993). Streptococcal infections. In Inglis, V., Roberts, R. J., Bromage, N. R. editors: *Bacterial disease of fish*. New York, Halsted Press. 196-210.

Kita-Tsukamoto K., Oyaizu H., Nanba, K. and Simidu U.(1993). Phylogenetic relationships of marine bacteria, mainly members of the family *Vibrionaceae*, determined on the basis of 16S rRNA sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 43:8-19.

Kraxberger-Beatty T, McGarey D. J., Grier, H. J. and Lim, D. V.(1990). *Vibrio harveyi* an opportunistic pathogen of common snook, *Centropomus undecimalis* (Block), held in captivity. *Journal of Fish Diseases*. 13:557-560.

Kusda, R., Itami, T., Mumekiyo, M. and Nakajima, H.(1977). Characteristics of an *Edwardsiella* sp. from an epizootic of cultured

crimson sea breams. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. 43:129-134.

Kusuda, R., Kawai, K., Salati, F., banner, C. R. and Fryer, I. L.(1992). *Enterococcus seriolicida* sp. nov., a fish pathogen. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 41:406-409.

Kusuda, R., Kawai, K., Toyoshima, T. and Komatsu, I.(1976-a). A new pathogenic bacterium belonging to the genus *Streptococcus*, isolated from an epizootic of cultured yellowtail. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. 42:1345-1352.

Kusuda, R., Komatsu, I. and Kawai K.(1978). *Streptococcus* sp. isolated from an epizootic of cultured eels. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. 44:295.

Kusuda, R., Toyoshima, T., Iwamura, Y. and Saka, H.(1976-b). *Edwardsiella tarda* from an epizootic of mullets (*Mugil caphalus*) in Okitsu Bay. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. 43:129-134.

Kusuda. R., Sugiura, H. and Kawai, K. (1990). Drug sensitivity of *Pasteurella piscicida* isolated from cultured yellowtail from 1986 to 1988. *Nippon Susian Gakkaishi*. 56:239-242. (In Japanese)

Lamas, J., Anadon, R., Devesa. S., Toranzo, A. E.(1990). Visceral neoplasia and epidermal papillomas in cultured turbot *Scophthalmus maximus*. *Disease of Aquatic Organism*. 8:179-87.

Liu, P. C., Chuang, W. H., Lee, K. K.(2003). Infectious gastroenteritis caused by *Vibrio harveyi* (*V. carchariae*) in cultured red drum, *Sciaenops ocellatus*. *Journal of Applied Ichthyology*. 19: 59-61.

MacDonnell, M. T. and Colwell, R. R.(1985). Phylogeny of the *Vibrionaceae* and recommendations for two new genera. *Listonella* and *Shewanella*. *Systematic Applied Microbiology*. 6:171-82.

Macian, M. C., Ludwig, W., Schleifer, K. H., Pujalte, M. J. and Garay, E.(2001). *Vibrio agarivorans* sp. nov., a novel agarolytic marine bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51:2031-2036.

Macian, M. C., Ludwig, W., Azanar, R., Grimont, P. A. D., Schleifer, K. H. and Pujalte, M. J.(2001). *Vibrio lentus* sp. nov., isolated from Mediterranean oyster. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51:1449-1456.

Mayer, F. P. and Bullock, G. L.(1973). *Edwardsiella tarda*, a new pathogen of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Applied Microbiology*. 25: 135-156.

Miyashito, T.(1984). *Pseudomonas fluorescens* and *Edwardsiella tarda* isolated from diseased tilapia. *Fish Pathology*. 19:45-50.

Montes, M., Farto, R., Pérez, M. J., Nieto, T. P., Larsen, J. L. and Christensen, H.(2003). Characterization of *Vibrio* strains isolated from turbot (*Scophthalmus maximus*) culture by phenotypic

analysis, ribotyping and 16S rRNA gene sequence comparison. *Journal of Applied Microbiology*. 95:693-703.

Muroga, K., Takahashi, S. and Yamanoe, H.(1979). Non-cholera *Vibrio* isolated from diseased ayu. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. 50:591-596.

Nakatsugawa, T.(1983-a). A streptococcal disease of cultured flounder. *Fish Pathology*. 17:281-285.

Nakatsugawa, T.(1983-b). *Edwardsiella tarda* isolated from cultured young flounders. *Fish Pathology*. 18:99-101.

Nealson, K. H., Wimpee, B. and Wimpee, C.(1993). Identification of *Vibrio splendidus* as a member of the planktonic luminous bacteria from the Persian gulf and Kuwait region with *luxA* probes. *Applied and Environmental Microbiology*. 59:2684-2689.

Noble, L. D., and Gow, J. A.(1998). The effect of suspending solution supplemented with marine cations on the oxidation of Biolog GN MicroPlate™ substrates by *Vibrionaceae* bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*. 44:251-258.

Noga, E. J.(1995). Fish disease: diagnosis and treatment. St. Louis, Mosby-Year Book Inc. p.149.

O'Halloran, J., Cornick, J., Zwicker, B., Griffiths, S.(1992). Cross-Canada disease report: Atlantic Canada. *Canadian Veterinary Journal*. 33:406-407.

O'Neill, K., Jones, S. H. and Grimes, D. J.(1992). Seasonal incidence of *Vibrio vulnificus* in the Great bay estuary of new hampshire and maine. *Applied and Environmental Microbiology*. 58:3257-3262.

Ohnishi, K. and Jo. Y.(1981). Studies on streptococcal infection in pond-cultured fishes- I. Characteristics of a beta-hemolytic *Streptococcus* isolated from cultured ayu and amago in 1977-1978. *Fish pathology*. 16:63-67.

Ortigosa, M., Garay, E., Pujalte, M. J.(1994). Numerical taxanomy of Vibrionaceae isolated from oysters and seawater along an annual cycle. *Systematic Applied Microbiology*. 17:216-225.

Osorio, C., Collins, M. D., Toranzo, A. E., Barja, J. L., and Romalde, J. L.(1999). 16S rRNA gene sequence analysis of *Photobacterium damsela* and nested PCR method for rapid detection of the causative agent of fish pasteurellosis. *Applied and Environmental Microbiology*. 65:2942-2946.

Pedersen, K., Grisez, L., van Houdt, R., Tiainen, T., Ollevier, F. and Larsen, J. L.(1999). Extended serotyping scheme for *Vibrio anguillarum* with the definition and characterization of seven provisional O-serogroups. *Current Microbiology*. 38: 183-189.

Perdersen, K., Verdonck, L., Austin, B., Austin, D., Blanch, A. R., Grimont, P. A. D., Jofre, J., Koblavi, S., Larsen, J. L., Tiainen, T., Vigneulle, M. and Swings, J.(1998). Taxonomic evidence that *Vibrio carchariae* Grimes et al. 1985 is a junior

synonym of *Vibrio harveyi*(Johnson and Shunk 1936) Baumann et al. 1981. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 48:749-758.

Plumb, J. A. and Sanchez, D. J.(1983). Susceptibility of five species of fish to *Edwardsiella ictaruri*. *Journal of Fish Disease*. 6: 261-266.

Ringo, E. and Birkbeck, T. H.(1999). Intestinal microflora of fish larvae and fry. *Aquaculture Research*, 30:73-93.

Robinson, J. A., and Meyer, F. P.(1966). Streptococcal fish pathogen. *Journal of Bacteriology*. 92:512.

Sae-Oui, D., Muroga, K. and Nakai, T.(1984). A case of *Edwardsiella tarda* infection in cultured colored carp *Cyprinus carpio*. *Fish Pathology*. 19:197-199.

Schiewe M. H., Trust T. J., Cross J. H.(1981). *Vibrio ordalii* sp. nov.: a causative agent of vibriosis in fish. *Current Microbiology*. 6: 343-348.

Shin, S. U., Horie, S., Okuzumi, M., and Kobayashi, Y.(1976). Seasonal variation of the bacterial flora in coastal sea-water in relation to the occurrence of *Vibrio parahaemolyticus*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. 42:1041-1053.(In japanes).

Skov Sørensen, U. B. and Larsen, J. L.(1986). Serotyping of *Vibrio anguillarum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 51: 593-597.

Snieszko, S. F., Bullock, G. L., Hollis, E., and Boone, J. G.(1964). *Pasteurella* sp. from an epizootic of whit perch(*Roccus americanus*) in Chesapeake Bay tide water areas. *Journal of Bacteriology*. 88:1814-1815.

Thoesen, J. C.(1994). Bluebook, suggested procedure for the detection and identification of certain finfish and shellfish pathogens. *American Fisheries Society*.

Thompson F. L., Hoste, B., Vandemeulebroecke, K., Engelbeen, K., Deneys, R. and Swings, J.(2002). *Vibrio trachuri* Iwamoto *et al.* 1995 is a junior synonym of *Vibrio harveyi* (Johnson and Shunk 1936) Baumann *et al.* 1981. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52: 973-976.

Thompson F. L., Li, Y., Gomez-Gill, B., Thompson, C. C., Hoste, B., Vandemeulebroecke, K., Rupp, G. S., Pereira, A., De Bem, M. M., Sorgeloos, P. and Swings, J.(2003-c). *Vibrio neptunius* sp. nov., *Vibrio brasiliensis* sp. nov. and *Vibrio xuii* sp. nov., isolated from the marine aquaculture environment (bivalves, fish, rotifers and shrimps). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53:245-252.

Thompson, F. L., Thompson, C. C., Hoste, B., Vandemeulebroecke, K., Gullian, M. and Swings, J.(2003-b). *Vibrio fortis* sp. nov. and *Vibrio hepatarius* sp. nov., isolated from aquatic animals and the marine environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53:1495-1501.

Thompson, F. L., Thompson, C. C., Li, Y., Gomez-Gill, B., Vandenberghe, J., Hoste, B. and Swings, J.(2003-a). *Vibrio kanaloae* sp. nov., *Vibrio pomeoyi* sp. nov. and *Vibrio chagasii* sp. nov., from sea water and marine animals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53: 753-759.

Valle, L. D., Zanella, L., Belvedere, P. and Colombo, L.(2002). Use of random amplication to develop a PCR detection method for the causative agent of fish pasteurellosis, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*(Vibrionaceae). *Auaqulture*. 207:187-202.

Vandenberghe, J., Thompson, F. L., Gomez-Gil, B., and Swings, J.(2003). Phenoypic diversity amongst *Vibrio* isolates from marine aquaculture systems. *Aquaculture*. 219:9-20.

Waltman, W. D., Shotts, E. B., and Blazer, V. S.(1985). Recovery of *Edwardsiella ictaluri* from Danio(*Danio devario*). *Aquaculture*. 46:63-66.

Wang X. H. and K. Y. Leung.(2000). Biochemical charaterization of different types of adherence of *Vibrio* species to fish epithelial cells. *Microbiology*. 146:989-998.

White, F. H., Simpson, C. F. & Williams, L. E. Jr.(1973). Isolation of *Edwardsiella tarda* from aquatic animal species and surface waters in Florida. *Journal of Wildlife Disease*. 9:204-208.

Yasunaga, N., Ogawa, S. & Hatai, K.(1982). Characteristic of the fish pathogen *Edwardsiella* isolated from several species of cultured

marine fishes. *Bullentin of the Nagasaki Prefecture Institute of Fisheries*. 8:57-65.

Yii Kah-Ching, Tun-I Yang, Kuo-Kau Lee.(1997). Isolation and Characterization of *Vibrio carchariae*, causative agent of gastroenteritis in the Grouper, *Epinephalus coioides*. *Current Microbiology*. 35:109-115.

Zlotkin, A., Eldar, A., Ghittno, C., and Bercovier (1998). Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 36:983-985.



적 요

제주도내 양식업치의 세균성질병에 대한 대책의 일환으로 2001년 6월부터 2002년 5월까지 4군데 육상양식장의 월별 세균학적 특성분석과 제주도내 육상 양식장 중 질병발생이 보고된 양식장의 넙치집단으로부터 채집된 780시료를 대상으로 한 streptococcosis, edwardsiellosis, vibriosis의 발생동향조사 그리고 질병감염시료로부터 분리되는 *Vibrio*속 및 관련속 세균에 대한 생화학적 동정 및 분자생물학적 동정을 실시하였다.

제주도 육상양식장 유입수의 세균학적 특성조사에서 조사기간동안 4군데 양식장의 수온 분포는 지하수의 경우 $15.1^{\circ}\text{C}\sim 20.5^{\circ}\text{C}$ 로 조사되었으며 해수인 경우 $13.8^{\circ}\text{C}\sim 27.1^{\circ}\text{C}$ 로 조사되어 지하수의 경우는 해수에 비해 계절적 변동이 크지 않았다.

염분농도의 경우 1군데 양식장을 제외한 대부분의 양식장의 지하수는 해수에 비해 염분농도가 낮았다.

양식장 유입수의 총 세균수 및 *Vibrio* 속 세균수에 대한 조사에서 지하수의 총 세균수는 월 평균 $1,342\sim 3,997$ CFU/100mL로 년 평균 2,580 CFU/100mL의 총 세균수를 나타내었다. 지하수에 대한 월 평균 *Vibrio* 속 세균수는 $84\sim 990$ CFU/100mL로 조사되었으며, 년 평균 295 CFU/100mL의 *Vibrio* 속 세균수를 보였다.

해수의 월 평균 세균수에 대한 조사에서는 총 세균수는 $9,941\sim 56,417$ CFU/100mL, *Vibrio* 속 세균수는 $2,353\sim 10,493$ CFU/100mL로 조사되었고, 해수에 대한 년 평균 세균수는 총 세균수가 24,950 CFU/100mL, *Vibrio* 속 세균수가 5,093 CFU/100mL로 나타났다.

지하수와 해수의 세균수 분포를 비교해 보면 해수가 지하수에 비해 총 세균수의 경우 약 9.5배, *Vibrio* 속 세균수는 약 17배 정도 높은 세균수 분포를 나타내었다.

제주도내 육상양식장의 세균성질병발생동향조사에서는 질병에 감염된 것으로 판단되는 시료의 채취현황을 근거로 한 질병발생조사에서는 7월에 질병발생율이 가장 높은 것으로 판단되며, 질병발생이 가장 적은 달은 5월이었다.

반면에 채취시료에 대한 세균 분리율은 10월이 98.1%로 가장 높은 비율을 보여 다른 원인보다 세균성질병에 의한 피해가 높은 것으로 판단되며, 6월에는 다른 달에 비해 상대적으로 질병발생보고는 많았으나 세균성 질병에 대한 조사에서는 채취된 시료의 52.5%가 조사대상 세균에 감염된 것으로 나타났다.

총 780시료 중 579시료에서 세균이 분리되어 각각 *Vibrio* sp., *Edwardsiella* sp., *Streptococcus* sp.로 간이동정 되었는데, 180 시료에서 vibriosis가 단독 발생한 것으로 조사되어 전체 시료의 23%로 가장 높은 비율을 보였으며, edwardsiellosis는 152 시료(19.5%), streptococcosis는 148 시료(19%)에서 각각 단독발생으로 나타났다.

조사대상 세균성 질병의 혼합발생은 vibriosis와 edwardsiellosis의 혼합발생으로 확인된 경우가 51시료(6.5%), vibriosis와 streptococcosis 혼합발생 26시료(3.3%), edwardsiellosis와 streptococcosis 혼합발생 20시료(2.5%), 그리고 3종의 질병의 혼합으로 발생한 경우가 2 시료이었다.

시기별 세균성 질병발생유형은 대부분의 양식장에서 일반적으로 치어입식이 이루어지기 시작하는 10월부터 이듬해 2월 및 3월까지의 면역력이 약한 치어에 vibriosis가 주로 발생하고, 중간성장단계인 6, 7월경에는 edwardsiellosis가, 출하가 주로 이루어지는 시기인 9월과 10월에는 주로 streptococcosis가 높은 비율로 발생하였다.

어체 크기별 세균성 질병 발생현황을 조사해 본 결과는 20cm이하의 크기의 치어에서는 vibriosis가 가장 많은 약 85%를 차지했으며, 20~30cm 크기의 시료에서는 edwardsiellosis가 약 52%로 가장 많은 비율로 조사되었고 30cm이상의 성어에서는 streptococcosis가 가장 높은 비율로 발생하였다.

이상에서 볼 때 양식넙치의 세균성 질병 중 가장 많은 질병은 vibriosis로 판단되며, 세균성 질병발생 양상은 어류의 성장단계 및 계절에 따라서도 영향을 받는 것으로 사료된다.

세균성질병에 감염된 것으로 판단되는 넙치 시료로부터 분리된 *Streptococcus* sp. 196균주, *Edwardsiella* sp. 225균주, *Vibrio* sp. 261균주를 대상으로 15종의 항생제에 대한 감수성시험을 한 결과 *Streptococcus*

sp.는 ampicillin, amoxicillin, chloramphenicol, penicillin에 대해서는 80% 이상의 균주에서 감수성을 나타냈으며, nalidixic acid, oxolinic acid, streptomycin에 대해서는 매우 낮은 감수성을 보이는 것으로 나타났으며, *Edwardsiella* sp.는 ampicillin, amoxicillin, chloramphenicol, ciprofloxacin, norfloxacin, 에 대해서 약 80%이상의 균주에서 감수성을 나타내었으며, kanamycin, nobobiocin, penicillin, streptomycin등의 항생제에 대해서는 약 2%정도의 균주만의 감수성을 나타내었다.

Vibrio sp.는 chloramphenicol, ciprofloxacin, gentamycin, nalidixic acid, oxolinic acid등 5종의 항생제에 대해서 70%이상의 균주가 감수성을 보였으며, ampicillin, penicillin, streptomycin등에 대해서는 상대적으로 낮은 감수성을 보였다.

Vibrio sp.로 간이동정된 261균주에 대해 GN2 Plate를 이용한 생화학적 성상을 MicroLog™ system(Release 4.0)에 의해 동정한 결과 *V. carchariae* group 51균주, *V. harveyi* group이 37균주, *Aeromonas sorbia* DNA group7로 grouping되는 균주가 30균주, *V. splendidus* group이 22균주, *V. aestuarinus* group이 16균주, *V. furnissii*와 *V. alginolyticus* group 14균주, *P. logei* group이 13균주, *V. proteolyticus* group 11균주, *P. angustum* group 10균주, *Aeromonas veronii/sorbia* DNA group8로 grouping 되는 균주 6균주를 포함하여 총 28개의 생화학 group으로 나누어졌다.

또한, 16S rRNA 유전자에 대한 염기서열 분석에 따른 *Vibrio* sp. 동정결과에서는 *Vibrio*속 12종, *Photobacterium* 속 2종, *Listonella* 속 1종, *Aeromonas*속 1종, *Acinetobacter* 속 2종, *Citrobacter*속 1종과 미동정 균주가 8종 등 총 27종으로 동정되었다.

12종의 *Vibrio*속에는 *V. trachuri*가 85균주로 가장 많은 부분을 차지하였으며, 다음으로는 *V. scophthalmi* 69균주로 동정되었으며, *V. parahaemolyticus* 23균주, *V. campbelli*가 16균주, *V. pomeroyi* 가 15균주 *V. fischeri* 와 *V. lentus*, *V. corallilyticus*, *V. furnissii*,가 각 3균주, *V. fortis*, *V. probioticus*가 각 2균주, *V. tubiashi*가 1균주로 동정되었다.

*Photobacterium*속의 경우는 *P. damsela* subsp. *damsela* 11균주, *P. damsela* subsp. *piscida* 6균주가 동정되어 17균주의 *P. damsela*가 분리되었다.

*Listonella*속의 *L. anguillarum*이 1균주가 동정되었으며, *Aeromonas hydrophilla* 1균주, *Acinetobacter johnsonii* 1균주, *Citrobacter freundii* 2균주로 동정되었고, 그 외에 13종의 미동정 균주가 분리되었다.

본 결과로 제주산 양식넙치의 Vibriosis의 원인균은 *Vibrio trachuri*, *Vibrio scophthalmi*등 본 연구에서 우점하게 분리되는 종과 관련이 있을 것으로 사료된다.

