



미꾸라지(*Misgurnus mizolepis*)의 *Shewanella putrefaciens* 감염증

김대현 · 박성우†
(군산대학교)

A *Shewanella putrefaciens* infection in cultured Mud Loach (*Misgurnus mizolepis*)

Dae-Hyun KIM · Sung-Woo PARK†
(Kunsan National University)

Abstract

The mud loach, *Misgurnus mizolepis*, are the important freshwater fish species for culture in Korea. Recently, mass mortality occurred among imported mud loach from China.

Clinical signs of diseased fish showed hemorrhage of operculum and mouth, abrasion of mouth and abnormal swimming. Internally, pale liver with hemorrhage, enlarged kidney and spleen were observed. And some of affected fish showed severe enteritis of the intestine.

Pure bacterial isolates were obtained with round, slightly convex and reddish-brown colonies on TSA medium after 48h incubation at 27°C. And the isolates could produce H₂S on peptone iron agar (PIA, BD). Using the API system, the isolates were identified as *Shewanella putrefaciens* (99.9%, 99.0%). The isolates grew well at 1 to 3% NaCl and its optimum concentration was 3%. Optimal pH range for growth was pH 6~8. And LD₅₀ of SP-2 and L-2 calculated from the pathogenicity test were 1.7 × 10⁷ cfu/fish and 1.2 × 10⁷ cfu/fish, respectively. This is the first report on *S. putrefaciens* infection in freshwater fish in Korea.

Key word : Mud loach, *Misgurnus mizolepis*, *Shewanella putrefaciens*

I. 서론

우리나라의 양식대상 미꾸라지는 2종으로 미꾸리(*Misgurnus aguillicaudatus*)와 미꾸라지(*Misgurnus mizolepis*)로 분류되어진다. 과거에 우리나라에서는 미꾸리를 양식용으로 이용하였다. 그러나 크기가 작고 성장이 느리며 종묘를 확보하는 것에 어려움이 있어 근래에 미꾸라지로 바꾸어 양식하는 추세이다. 이러한 미꾸라지 양식은 자연산 종묘를 포획하여 농경지에서 양식을 시작하였으

나 종묘 및 치어를 확보하는데 어려움이 있어 해외로부터 수입하여 양식하고 있다. 이러한 종묘 및 치어는 국내 양식장에서 자연산과 양식산으로 구분하여 수입되며, 국내에서 3개월간 양식을 하게 되면 국내산으로 인정을 받고 있는 실정이다. 미꾸라지는 단백질과 비타민 A와 D를 포함하는 영양식품일 뿐만 아니라 눈의 질병에 효능이 있는 약재로서 사용되어왔다. 또한 단백질과 비타민이 풍부하여 양계사료로도 사용 되었으며 오늘날에는 낚시미끼, 모기유충 퇴치를 위한 천적생

† Corresponding author : 063-469-1884, psw@kunsan.ac.kr

※ 본 연구는 군산대학교 수산과학연구소의 연구비 지원에 의한 대어민 질병 상담업무의 일환으로 수행되었습니다.

물 등으로 그 이용성이 확대되고 있다. 이처럼 미꾸라지의 다양한 용도로 때문에 수요가 증가하는 추세이며, 이런 수요를 충족시켜주기 위하여 국내에서는 가까운 중국으로부터 치어뿐만 아니라 성어를 수입하고 있다. 수입되는 미꾸라지는 중국으로부터 장시간의 수송과정을 거치면서 국내로 들어와 집하장을 거쳐 국내 양식장으로 배송되어진다. 집하장은 사육을 목적으로 하는 시스템이 아닌 활어의 일시 보관, 검역 등 수산물의 유통·판매·보관을 하며 수산물 처리·가공을 목적으로 갖춰진 시설이다. 따라서 집하장에서는 어류를 고밀도로 일시적으로 보관을 하고 있기에 기존에 질병에 감염된 어류가 있을시 감염되지 않은 어류에 전염이 되는 위험에 쉽게 노출될 수 있다. 또한 집하장의 고밀도 사육환경뿐만 아니라 장시간의 수송과정으로 인하여 스트레스를 받은 어류는 면역체계가 약해져있어 병원체에 감염되기 쉽다.

미꾸라지의 세균성 질병으로는 *Flavobacterium columnare* (Wakabayashi and Egusa, 1966; 1967), *Streptococcus epidermis* (Park et al., 2002), *Aromonas hydrophila* (Kumakawa, 2009), *Aeromonas sobria* (Yu and Park, 2008; Yao et al., 2010) 및 *Vibrio cholerae* (Zhang et al., 2012), *Listonella anguillarum* (Lei et al., 2014) 등이 있다. 최근 중국에서 수입되는 미꾸라지에서 기존의 보고되었던 세균성 질병의 증상인 지느러미 부식 및 체표면 발적, 출혈 증상 이외에 주둥이 부식 및 출혈과 이상 유영 증상 특징적인 증상으로 하는 질병이 확인되었다.

본 연구에서는 주둥이 부식 및 출혈과 이상 유영증상을 지닌 감염 미꾸라지로부터 원인 세균을 분리하여 세균학적으로 동정 및 특성, 병원성 조사 및 항생제 감수성을 통하여 미꾸라지에 감염되는 세균성 질병에 대한 기초자료 및 예방 대책 자료로 사용하고자 한다.

II. 재료 및 방법

중국으로부터 수입된 미꾸라지 (*M. mizolepis*)를 집하장에 수용하는 도중 주둥이 부식 및 출혈, 이상 유영현상이 발견된 미꾸라지 병어를 시료로 2014년 5월에 채집하여 사용하였다. 미꾸라지의 평균 체장은 14.4 ± 2.0 cm, 평균 체중은 22.6 ± 7.6 g 였다.

병어는 2-phenoxyethanol로 마취를 시킨 후 부식 및 출혈이 있는 주둥이 환부와 간, 비장 및 신장 조직 일부분을 trypticase soy agar (TSA, BD)에 접종하여 27°C에서 48시간 배양하였다. 접종 후 발육된 균은 순수 분리하여 주둥이 환부로부터 분리된 분리한 균주는 (SP-2), 간에서 분리한 균주는 (L-2)로 명명한 뒤 API 20E kit (BioMérieux, France) 이용하여 사용 설명서에 따라 생화학적 검사를 실시하였다. 부가적으로 oxidase, catalase, O-F시험, 운동성 시험을 실시하였으며 또한 peptone iron agar (PIA, BD)에 접종하여 27°C에서 48시간 배양하여 H₂S의 생성을 확인하였다. 대조균주로는 표준균주인 *Shewanella putrefaciens* (ATCC 8071, KCTC 12458)를 사용하였다.

분리균인 SP-2와 L-2, 대조균 *S. putrefaciens* (ATCC8071, KCTC12458)의 성장에 미치는 식염 농도와 pH의 영향을 조사하였다. 염분에 따른 성장은 1% peptone water에 NaCl를 첨가하여 0, 1, 2, 3, 4, 5, 그리고 6%로 염분농도를 맞춘 후 멸균 시험관에 각각 3 ml씩 분주 후 고압증기 멸균하였다. 또한 pH에 따른 성장은 1% peptone water에 1N HCl 과 1N NaOH를 사용하여 pH를 5.0~10.0까지 조절 후 3 ml씩 각각 멸균 시험관에 주입하여 마찬가지로 멸균처리 하였다. 각각의 조건별, 염분 농도 구배별과 pH 구배별, 시험관에 0.85% 생리식염수에 현탁시켜 McFarland No. 1의 탁도에 맞춘 균 현탁액을 각각 0.1 ml씩 접종하여, 27°C에서 24시간 배양하였다. 24시간

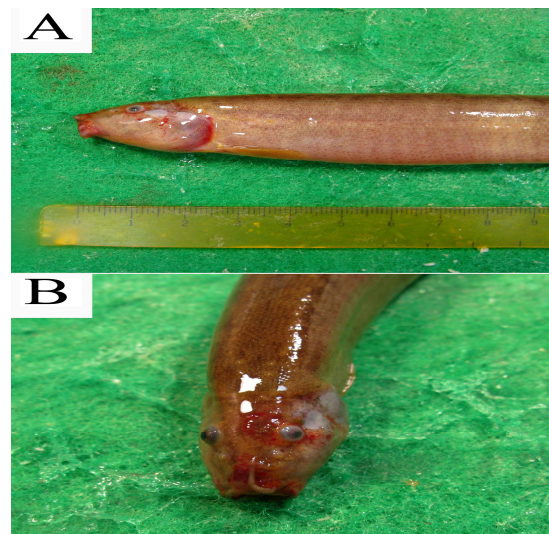
배양한 균은 spectrophotometer를 이용하여 630nm에서 흡광도를 측정하여 균의 발육 정도를 비교하였다.

TSA에서 27°C 48시간 배양한 균 SP-2와 L-2를 각각 0.85% 생리 식염수로 10단계 희석하여 $10^6 \sim 10^{10}$ cfu/ml의 균 현탁액을 제조하였다. 각각 20마리의 미꾸라지(체장: 13.8 ± 1.6 cm, 체중: 20.5 ± 3.6 g) 복강 내에 각 균 현탁액 0.1 ml를 접종하여 사각 플라스틱 수조($50 \times 36 \times 18$ cm³)에 사육수온을 25°C로 조절하여 7일간 사육하면서 폐사율을 조사하였다. 대조군은 멸균 생리식염수를 같은 양 주사하였다. 폐사어 또는 빈사어의 신장과 비장을 TSA에 접종하여 접종 균의 재분리를 시도하였다.

사육수의 염분의 비율에 따른 병원성을 측정을 위하여 사각 플라스틱 수조($50 \times 36 \times 18$ cm³)에 각각 0%, 0.5%, 1.0%의 NaCl을 첨가 후 사육수온을 25°C로 조절하였다. TSA에서 27°C 48시간 배양한 균을 0.85% 생리 식염수로 희석한 균액을 제조하였다. 균액 0.1 ml를 20마리의 미꾸라지(체장: 12.5 ± 1.9 cm, 체중: 19.6 ± 5.2 g) 복강에 접종한 다음 7일간의 폐사율을 관찰하였다. 또한 사육 수온에 따른 병원성을 측정을 위하여 기본 조건인 수조와 사육수의 조건은 위와 동일하게 맞춰주었으며 수온만 각각 20, 30°C로 조절하여 분리 배양균을 기존의 측정된 병원성에 맞춰진 농도로 접종하여 폐사율을 7일간 측정하였다.

TSA에서 27°C 48시간 배양한 균을 0.85% 생리 식염수로 10단계 희석하여 $10^6 \sim 10^9$ cfu/ml의 균 현탁액을 제조하였다. 각각 20마리의 이스라엘 잉어 (*Cyprinus carpio*, 체장: 8.78 ± 0.3 cm, 체중: 22.02 ± 7.6 g)와 금붕어 (*Carassius auratus*, 체장: 6.35 ± 0.3 cm, 체중: 9.4 ± 0.8 g) 복강 내에 각 균액 0.1 ml씩 접종하여 14일간의 폐사율을 조사하였다. 대조군은 멸균 생리식염수를 같은 양 주사하였다. 폐사어 또는 빈사어의 신장과 비장을 TSA에 접종하여 접종 균의 재분리를 시도하여 확인하였다.

항생제 약제 감수성 시험을 위해 McFarland No. 0.5의 탁도에 맞춘 균 현탁액을 제조하여 muller-hinton agar (MHA, BD)에 전체적으로 도말한 후 화학 처리된 항생제 disc를 얹은 후에 27°C에서 배양하였다. 감수성 시험에 사용된 항생제 disc와 농도는 tetracycline (30 µg), doxycycline (30 µg), penicilline G (10 µg), gentamicin (10 µg), trimethoprim (5 µg), erythromycin (15 µg), cephalixin (30 µg), neomycin (30 µg), nalidixic acid (30 µg), spiramycin (100 µg), cefadroxil (30 µg), ampicillin (10 µg), oxolinic acid (2 µg), clindamycin (2 µg), oxytetracycline (30 µg), amoxicillin (10 µg) 이다. 48시간 동안 배양한 후, 각각의 항생제 disc 주변에 억제된 반경의 지름을 측정하여 기록하였다. Disc 주변 억제된 반경의 지름에 대한 기준은 Zhang et al., (2010)의 방법에 따라 13 mm 이하는 R (resistant), 13~19 mm는 I (intermediate), 19 mm 이상은 S (Susceptible)로 표시하였다.

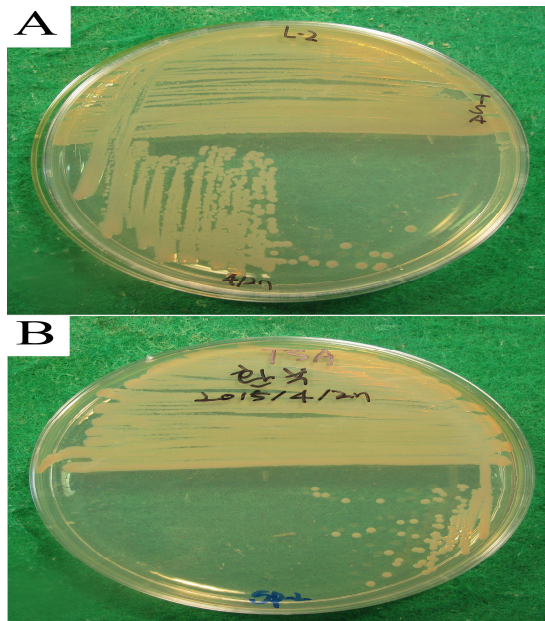


[Fig. 1] External symptoms of diseased loach, *Misgurnus mizolepis*, showing hemorrhage of operculum and mouth, erosion of mouth.

III. 결 과

병어는 [Fig. 1]에 나타난 것과 같이 육안적으로 주된 특징인 두부 환부인 주둥이에서 부식 및 출혈증상을 나타냈으며 아가미뚜껑에서는 출혈, 아가미에서는 빈혈 및 퇴색, 항문 발적, 이상 유영 현상으로 뒤집히거나 서서 머리를 밖으로 꺼내어 유영하는 증상이 나타났다.

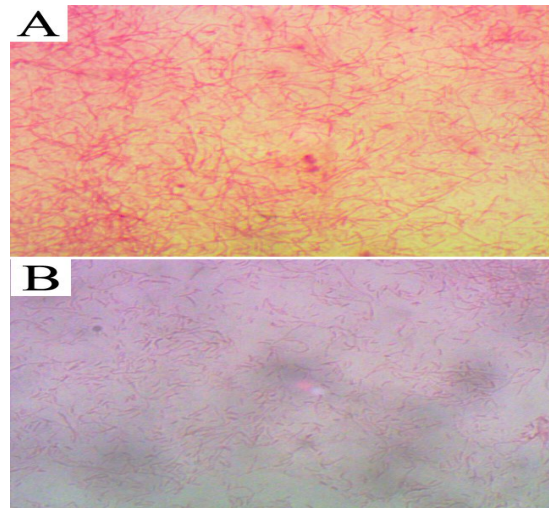
내부 증상으로는 일반적인 간 퇴색, 신장과 비장 종대 현상이 나타났으며, 일부 병어에서는 장염 증상이 나타났다. 심하게 감염된 증상의 어류에서는 *F. columnare*에 의한 꼬리지느러미 및 가슴지느러미, 체표에서 부식 증상이 동반되거나 *A. sobria*에 의한 체표면 점상출혈 증상이 동반되어 나타났다.



[Fig. 2] Morphology of colonies on TSA. Liver(A), lesion on the mouth(B) of diseased loach were streaked on TSA and incubated for 48h at 27°C.

부식 및 출혈이 있는 환부와 간, 비장 및 신장을 TSA에 접종하여 27°C에서 48시간 배양한 결

과 적갈색의 등글며 약간 솟아 오른 집락이 분리되었다. 추가적으로 Gram염색, oxidase시험, catalase시험, O-F시험, 운동성 시험 결과 분리 균은 Gram 음성, oxidase 양성, catalase 음성, O-F 음성의 운동성 간균으로 검출되었다(<Table 1>).



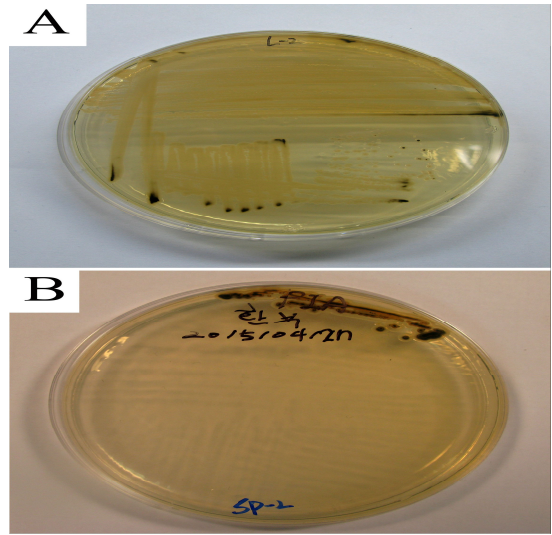
[Fig. 3] *Shewanella putrefaciens*, from Liver(A), lesion on the mouth(B) of diseased loach, *Misgurnus mizolepis*. Gram stain.

분리 균 SP-2, L-2를 API 20E로 분석을 한 결과 SP-2, L-2, ATCC 8071, KCTC 12458의 API profile은 각각 040202451, 040602451, 040000450, 040000451로서 99.0, 99.9, 90.3, 97.8%로서 *S. putrefaciens*로 동정되었다. 또한 대조균주인 ATCC 8071와 KCTC 12458과의 대부분의 생화학적 특징이 일치하였다. PIA에 접종한 *S. putrefaciens*균주들은 모두 검은색의 집락을 형성하여 H₂S를 생산하였다([Fig. 4]).

분리균의 성장에 미치는 NaCl의 농도와 pH의 영향은 [Fig. 5]에 나타내었다. NaCl의 경우 분리균은 1~3%에서 잘 자랐으며 3%에서 최대 발육 성장을 나타내었으나 5~6%에서는 성장이 저하되었다. 분리균의 발육 가능 pH는 6~8이며 SP-2는 pH 6에서 L-2는 pH 7에서 최대의 발육을 나타내었다.

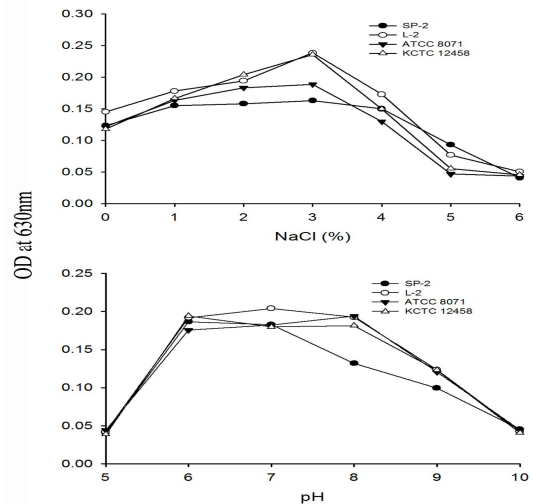
<Table 1> Biochemical characteristics of the present isolates (SP-2, L-2)

Characteristics	Present isolate	
	SP-2	L-2
Gram stain	-	-
Catalase	+	+
Oxidase	+	+
Motility	+	+
Oxidation/fermentation	-/-	-/-
Growth on MacConkey agar	+	+
Hemolysis on blood agar	-	-
Growth on TCBS agar	-	-
Growth on TSI agar	K/NC, H ₂ S, G	K/NC, H ₂ S, G
Growth on PIA agar	+	+
Growth in		
0% NaCl	+	+
2% NaCl	+	+
4% NaCl	+	+
API 20E test result		
β -galactosidase	-	-
Arginine dihydrolase	-	-
Lysine decarboxylase	-	-
Ornithine decarboxylase	-	-
Citrate utilization	-	-
H ₂ S production	+	+
Urease	-	-
Tryptophane deaminase	-	-
Indole production	-	-
Voges proskauer	-	-
Gelatinase	+	+
Glucose	+	+
Mannitol	-	-
Inositol	-	-
Sorbitol	-	-
Rhamnose	-	-
Saccharose	+	+
Melibiose	-	-
Amygdalin	-	-
Arabinose	-	-
NO ₂	+	+
N ₂	-	-

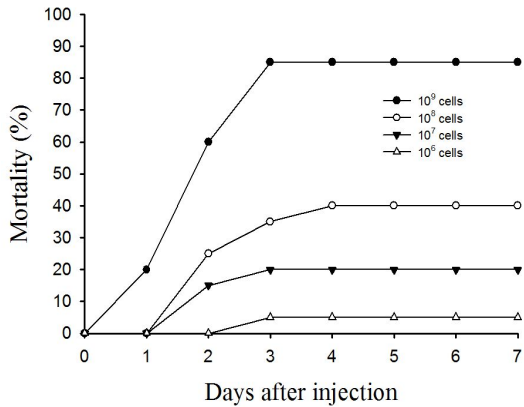


[Fig. 4] Morphology of colonies on PIA. Liver(A) and lesion on the mouth(B) of diseased loach were streaked on PIA.

병원성 실험에서 $1.4 \times 10^9 \sim 10^6$ cfu/fish를 각각 접종을 한 결과 SP-2 분리 균에서는 10^9 cfu/fish에서는 접종 2일 후부터 폐사하기 시작하였으며, 7일간 85%의 폐사율을 나타내었다.

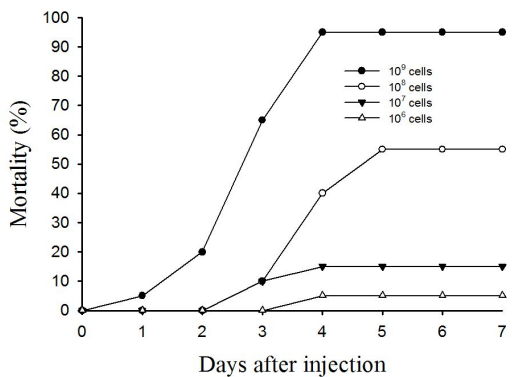


[Fig. 5] Effect of NaCl and pH on the growth of the present isolates, SP-2 and L-2 and the reference strains *Shewanella putrefaciens* (ATCC 8071, KCTC 12458).



[Fig. 6] Mortality of mud loach intraperitoneally injected with different concentrations of the present isolate (SP-2).

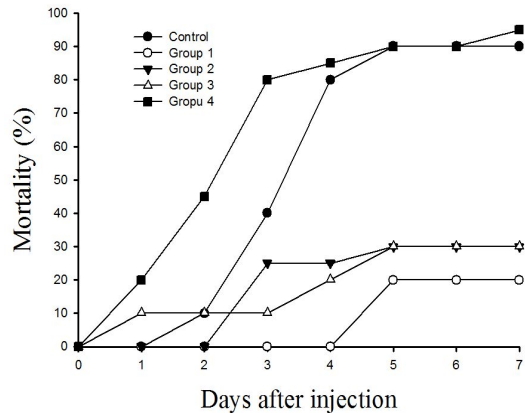
10⁸과 10⁷ cfu/fish에서는 3일 후부터 폐사가 일어나기 시작하여 각각 55%와 20%, 10⁶ cfu/fish에서는 5%의 낮은 폐사율을 보였다 ([Fig. 6]). LD₅₀은 1.7×10⁷ cfu/fish로 산출되었다. 한편 L-2는 복강내 접종 후 10⁹ cfu/fish에서 폐사하기 시작하여 7일간 95%의 폐사율을 나타내었으며, 10⁸ cfu/fish에서는 2일 후부터 폐사하기 시작하여 55%, 10⁷ cfu/fish에서는 접종 3일부터 폐사가 나타나 15%, 10⁶ cfu/fish에서는 SP-2와 마찬가지로 5%의 낮은 폐사율을 나타냈다([Fig. 7]). 본 균의 LD₅₀은 1.2×10⁷ cfu/fish로 산출되었다.



[Fig. 7] Mortality of mud loach intraperitoneally injected with different concentrations of the present isolate (L-2).

또한 고농도로 접종한 미꾸라지에서는 자연 발병의 주된 특징인 주둥이 부식 및 발적, 아가미 뚜껑의 출혈, 항문 발적, 이상 유영 등의 외부 증상이 재현되었으며, 내부증상으로는 간 퇴색이 재현되었다. 그러나 일부 개체에서는 체표의 발적 및 점상 출혈증상이 나타났으며 지느러미 부식도 종종 발현되었다. 폐사어 및 빈사어로부터 접종균인 *S. putrefaciens*가 재분리되었다.

사육수의 사육수온 및 염분농도에 따른 폐사율은 [Fig. 8]에 나타내었다. 대조군인 25℃에서 90%, 30℃에서는 95%, 20℃에서는 대조군인 25℃ 수조에 비해 폐사율이 30%로 낮게 나타났다. 염분농도에 따른 폐사율은 0.5%와 1.0%에서는 각각 20%와 30%로, 0%인 대조군에 비해 낮게 나타났다.



[Fig. 8] Mortality of mud loach intraperitoneally injected with the present isolate, *Shewanella putrefaciens* and different environment conditions.

(Control: 25℃/0% NaCl, Group 1: 25℃/0.5% NaCl, Group 2: 25℃/1.0% NaCl, Group 3: 20℃/0% NaCl, Group 4: 30℃/0% NaCl)

분리균을 10⁹~10⁶ cfu/fish의 균액을 제조하여 잉어(*C. carpio*)와 금붕어(*C. auratus*)에 접종하였을 때 잉어는 10⁹ cfu/fish에서는 접종 당일부터 폐사하는 개체가 나오기 시작하여, 14일동안의

누적 폐사율은 55%였으며, 10^8 cfu/fish에서는 2일 차부터 폐사하기 시작하여 누적폐사율은 50%였다. 그러나 10^7 과 10^6 cfu/fish에서는 폐사가 없었다.

<Table 2> Experimental infection of the isolate against goldfish, *Carassius auratus* and carp, *Cyprinus carpio*

Control/infectious dose (cfu/fish)	Cumulative mortality (%)		Post-infection days	
	Goldfish	Carp	Goldfish	Carp
Group I (10^6)	0	0	14	14
Group II (10^7)	40	50	10	4
Group III (10^8)	50	55	8	3
Group IV (control)	0	0	0	0

금붕어는 10^9 과 10^8 cfu/fish에서는 각각 50%와 40%가 폐사하였지만, 10^7 과 10^6 cfu/fish에서는 폐사가 없었다(<Table 2>).

잉어와 금붕어에 접종한 개체에서는 외관상 뚜렷한 이상 징후는 보이지 않았지만, 폐사어로부터는 *S. putrefaciens*가 재분리되었다.

항생제 약제 감수성 시험을 한 결과를 <Table 3>에 나타내었다. 분리균인 SP-2와 L-2, 대조 균인 ATCC 8071, KCTC 12458는 trimethoprim, cephalixin, nalidixic acid, spiramycin, ampicillin, oxolinic acid, oxytetracycline에서 감수성이 나타났다. 그러나 gentamicin, clindamycin, amoxicillin에서는 내성을 나타내었다. 또한 분리균과 대조균 모두 nalidixic acid에서 가장 높은 감수성을 나타내었다. 대조균은 cefadroxil이 감수성이 나타났지만 분리균은 약한 감수성이 나타난 것이 차이가 있었다.

<Table 3> Antimicrobial susceptibility of the present isolates (L-2, SP-2) and the reference strains, *S. putrefaciens* (ATCC 8071, KCTC 12458).

Chemotherapeutics	Present isolate		<i>S. putrefaciens</i>	
	SP-2	L-2	ATCC 8071	KCTC 12458
Tetracycline	S	I	S	S
Doxycycline	S	I	S	S
Penicilline G	I	I	I	I
Gentamicin	R	R	R	R
Trimethoprim	S	S	S	S
Erythromycin	S	S	S	I
Cephalexin	S	S	S	S
Neomycin	S	I	S	S
Nalidixic acid	S	S	S	S
Spiramycin	S	S	S	S
Cefadroxil	I	I	S	S
Ampicillin	S	S	S	S
Oxolinic acid	S	S	S	S
Clindamycin	R	R	R	R
Oxytetracycline	S	S	S	S
Amoxicillin	R	R	R	R

IV. 고찰

미꾸라지의 세균성 질병에 대한 연구는 *F. columnare* (Wakabayashi and Egusa, 1966, 1967), *S. epidermis* (Park et al., 2002), *A. hydrophila* (Kumakawa, 2009), *A. sobria* (Yu and Park, 2008; Yao et al., 2010) 및 *V. cholerae* (Zhang et al., 2012) 등이 보고되어왔다. 최근 중국에서 양식 미꾸리(*M. anguillicaudatus*)로부터 *Listonella* sp.와 *Shewanella* sp. (Lei et al., 2014)가 혼합감염된 보고가 있을 뿐이다. 본 실험은 중국으로부터 수입되는 미꾸라지(*M. mizolepis*)에서 기존에 보고된 질병의 특징적인 증상이 아닌 주둥이의 출혈 및 부식, 이상 유영증상을 나타낸 미꾸라지로부터 원인균을 분리하였다. 분리한 균을 API 20E와 재래식 성장검사방법을 이용하여 생화학적 동정을 하였다. 그 결과 API 20E에서 API profile 040202451, 040602451로서 99.0%로 *S. putrefaciens*로 동정 되었다.

Shewanella sp.는 주로 해양 환경 및 해산어로부터 분리되어지며, 때로는 인체병원균으로 패혈증을 유발한다고 보고되었다(Brink et al., 1995; Chen et al., 1997). 최근에는 식품으로부터 분리되기도 하며 어류 부패와 관련이 있는 것으로 잘 알려져 있다(Dalgaard, 1995; Feldhusen, 2000).

*S. putrefaciens*는 Saeed et al.(1990)에 의해 처음으로 1985년에 해산어인 감염된 양식 독가시치로부터 처음 분리되었다. 또한 Kozinska and Pekala(2004)에 의해 담수어류인 잉어와 무지개송어로부터 분리되었다. 또한 터키에서는 금붕어(*C. auratus*)에서도 발견되어 분리되었다(Soner et al., 2014). Lei et al.(2014)에 의해 중국에서 양식 미꾸리가 *Shewanella* sp.에 감염된다는 보고를 근거로 하여, 국내로 수입되는 미꾸라지에도 감염이 될 수 있다는 가능성을 있을 것으로 추정하고, 본 실험을 시작하여 *S. putrefaciens*의 감염을 확인하였다.

본 실험에서 분리균의 생화학적 성장 조사 결과는 표준균주인 *S. putrefaciens*(ATCC 8071, KCTC 12458)와 비교하여 생화학적 특성들이 유사함을 나타냈다. *Shewanella* sp.의 특징적인 반응인 PIA와 TSI에 공통적으로 H₂S를 생성하였다. 또한 미꾸라지로부터 분리된 균의 외부 요인 중 하나인 NaCl의 농도, pH의 조절이 성장에 대해 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위하여 실험을 한 결과 일반적인 담수보다 3%의 NaCl에서 더욱 성장이 잘되었다. pH 경우에는 pH 6~8에서 성장이 가장 잘 이루어짐을 알 수 있었다. 이는 *Shewanella* sp.가 해양을 기원으로 하고 있어 담수보다는 해양 환경인 3.4~3.5%인 염분 농도를 갖춰진 조건에서 더욱 발육이 잘 될 수 있다고 판단 할 수 있다.

병원성 검사를 통해 분리 균 SP-2와 L-2의 LD₅₀이 각각 1.7×10⁷ cfu/fish, 1.2×10⁷ cfu/fish로 산출되었는데 두 균의 병원성이 비슷함을 나타내었으며 각각 접종한 실험어에서 자연 발병어와 마찬가지로 같은 증상인 주둥이 출혈과 이상 유영 현상이 나타났으며, 실험어로부터 *S. putrefaciens*를 재분리였다. 이후 추가적인 감염 실험을 통해 일부 실험어에서는 체표와 미병부의 점상 출혈 증상과 지느러미 부식 증상 등 다른 세균에 의한 특이 증상들도 나타났다. 마찬가지로 실험어로부터 병원균을 재분리한 결과 접종한 *S. putrefaciens*가 검출되었지만 일부 폐사어에서 *A. sobria*와 *F. columnare* 세균들도 혼입되어 검출되었다. 이는 추가 감염 실험에 사용된 미꾸라지에 *A. sobria*와 *F. columnare*가 소수 개체에 보균인자로 작용하였다고 판단할 수 있다. 병원성 검사 실험을 통하여 *S. putrefaciens*의 병원성은 Yu and Park (2008)과 Yu et al.(2015)의 미꾸라지 세균성 질병인 *A. sobria*의 연구와 비교하면 마찬가지로 병원성이 낮다고 간주 할 수 있다. 또한 공격 실험을 통한 인위적 감염 시킨 어류와 자연 발생어류와의 동일한 증상이 재현되어, *S. putrefaciens*가 미꾸라지에 있어서 새로운 세균성 질병의 원인균

으로 될 수 있다고 볼 수 있지만, [Fig. 6~8]에 표시한 것처럼 낮은 병원성으로 인하여 폐사에 주 원인균이라 보기 어렵다고 판단된다. 또한 추가 실험을 통한 결과는 단일 병원체로 인한 폐사율 보다는 여러 병원체의 복합 감염을 통하여 미꾸라지 개체들이 폐사가 일어났을 가능성이 크다고 판단된다.

사육수온에 따른 분리균의 병원성을 측정한 결과 정상시의 수온인 25°C보다 30°C에서 폐사율이 약간 높은 폐사율을 나타내었다. 이는 수온이 높은 여름에 *S. putrefaciens*의 활성이 더 활발하여 병원성이 더 높아진 때문이라 추측된다. 사육수의 염분농도의 변화에 따른 폐사율을 조사한 결과 식염의 첨가가 없는 대조군의 폐사율이 식염을 첨가하였을 때에 비해 폐사율이 높았다. 이는 [Fig. 5]에 표시한 것처럼 발육에 미치는 NaCl의 영향의 결과와 약간의 차이를 나타내었다. 이러한 결과는 *S. putrefaciens*의 발병에는 단지 염분 뿐만 아니라 다른 요인들이 관여할 가능성이 있을 것으로 추정된다. Yu et al.(2016)의 연구에 의하면 담수어에 식염을 일정량 첨가하여 사육하면 스트레스 요인이 감소되어 폐사가 줄어든다고 보고하였다. 즉, 삼투압 조절에 필요한 에너지 소모를 줄여 면역에 대한 면역력을 높여 줄 수 있는 요건을 맞춰 주었다고 볼 수 있다.

미꾸라지에 분리한 *S. putrefaciens*를 이용하여 기존의 *S. putrefaciens*에 감염이 된다고 보고된 잉어 (*C. carpio*)와 금붕어 (*C. auratus*)에 동일하게 감염 실험을 하였다. 그 결과 분리균의 병원성이 확인되었으며 최대 누적 폐사율은 각각 50~55% 내외로 나타났다. 이러한 결과는 Kozinska and Pekala(2004)와 Soner et al.(2014)의 보고와 비슷한 결과이다. 즉, 미꾸라지에서 분리한 균이 다른 담수어류에 대하여도 병원성을 나타낸다는 결과와 일치하고 있다.

Kozinska and Pekala(2004)의 보고에 따르면 잉어의 경우 유영이 느려지며 피부가 어두워지고 비장 종대가 나타난다고 제시하였다. 본 연구에

서는 체색의 변화는 보이지 않았지만, 비장이 커지는 등 동일한 증상이 나타났다. 또한 금붕어도 유영증상, 식욕 부진, 복부 팽만, 안구 돌출의 외부 증상과 간 퇴색, 복수, 비장 종대 및 삼출물로 인한 신장 구분이 어려운 내부 증상이 있다고 보고되었다(Soner et al., 2014). 그러나 본 연구에서는 복수에 의한 복부 팽만과 같은 비슷한 증상이 확인되어, 약간의 차이가 났다.

항생제 감수성에서는 *S. putrefaciens*는 일반적으로 aminoglycosides, carbapenems, erythromycin 및 quinolones에 감수성이 있지만, penicillin에 내성이 있다고 보고되었다(Chen et al., 1997; Holt et al., 1997, 2004; Kim et al., 1989; Richard et al., 1985; Vogel et al., 1997). 또한 일부 선행 연구들에서는 *Shewanella*가 penicillin과 cefazolin에서 자연적인 내성을 나타내지만(Liu et al., 2013), 광범위 β -lactam계 항생제에 감수성을 보인다고 보고되었다(Sivolodskii et al., 2012). 담수어류에서 분리된 *S. putrefaciens*는 공통적으로 amoxicillin에 내성을 나타내는 것으로 보고되었다(Lei et al., 2014; Soner et al., 2014; Pekala et al., 2015). 본 실험도 amoxicillin, gentamicin, clindamycin에 내성을 나타내었지만, quinolones인 nalidixic acid, oxolinic acid에서 높은 감수성이 나타난 것으로 보아 *S. putrefaciens*의 선행 연구들의 결과와 거의 일치하였다. 그러나 천연항생물질인 penicillin G에서는 약한 감수성을 보이는 것은 기존의 결과와 약간의 차이가 있었다.

본 연구에서는 기존의 증상과 상이한 증상을 나타내는 미꾸라지에서 *S. putrefaciens*로 동정되는 원인균을 분리하였다. 또한 인위감염실험의 결과 병원성은 낮지만 미꾸라지, 잉어 및 금붕어에 병원성이 확인되었다. 그럼으로 향후의 미꾸라지, 잉어 및 금붕어 양식에 주요 질병으로 대두할 가능성이 있지만, 발병에 관여하는 요인 등에 관해서는 더욱더 조사할 필요가 있다고 판단하였다.

References

- Brink A. J · van Straten A. and van Rensburg A. J. (1995). *Shewanella (Pseudomonas) putrefaciens* bacteremia. Clin. Infect. Dis., 20: 1327~1332.
- Chen, Y. S. · Liu, Y. C. · Yen, M. Y. · Wang, J. H. · Wann, S. R. and Cheng, D. L.(1997). Skin and soft-tissue manifestations of *Shewanella putrefaciens* infection. Clin. Infect. Dis., 25: 225~229.
- Dalgaard, P.(1995). Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish. Int. J. Food Microbiol., 26: 319~333.
- Feldhusen, F.(2000). The role of seafood in bacterial foodborne diseases. Microbes. Infect. 2: 1651~1660.
- Holt, H. M. · Søgaard, P. and Gahrn-Hansen, B. (1997). Ear infections with *Shewanella alga*. A bacteriologic, clinical and epidemiologic study of 67 cases. Clin. Microbiol. Infect., 3: 329~334.
- Holt, H. M. · Gahrn-Hansen, B. and Bruun, B. (2004). *Shewanella* species: infections in Denmark and phenotypic characterisation. Clin. Microbiol. Infect., 10: 348~349.
- Kim, J. H. · Cooper, R. A. · Welty, W. K. · Harrell, L. J. · Zwadyk, P. and Klotman, M. E.(1989). *Pseudomonas putrefaciens* bacteremia. Rev. Infect. Dis., 11: 97~104.
- Kozinska A. and A. Pekala(2004). First isolation of *Shewanella putrefaciens* from freshwater fish - a potential new pathogen of fish. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 24:189.
- Kumakawa, S.(2009). pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* isolated from crucian carp, Japanese tree frog larvae and oriental weather loach in rice fields. Bull. Nagano Pref. Fish. Exp. St., 11: 4~7.
- Lei, Q. · Ming, Z. and Jing, X.(2014). First report of *Shewanella* sp. and *Listonella* sp. infection in freshwater cultured loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. Aquaculture Res., 45: 602~608.
- Liu, P. Y. · Lin, C. F. · Tung, K. C. · Shyu, C. L. · Wu, M. J. · Liu, J. W. · Chang, C. S. · Chan, K. W. · Huang, J. A. and Shi, Z. Y.(2013). Clinical and microbiological features of *Shewanella* bacteremia in patients with hepatobiliary disease. J. Intern. Med., 52: 431~438.
- Park, S. W. · Jung, Y. S. and Kim, Y. G.(2002). *Staphylococcus epidermis* isolated from cultured mud loach (*Misgurnus mizolepis*). J. Fish Pathol., 14: 155~162.
- Pekala, A. · Kozinska, A. · Pazdzior, W. and Glowacka, W.(2015). Phenotypical and genotypical characterization of *Shewanella putrefaciens* strains isolated from diseased freshwater fish. J. fish diseases, 38: 283~293.
- Richard, C. · Kiredjian, M. and Guilvout, I.(1985). Caractères des phenotypes de *Alteromonas putrefaciens*. Etude de 123 souches. Ann. Biol. Clin. Paris. 43: 732 - 738.
- Saeed M.O. · Alamoudi M. M. and Al-Harbi A. H. (1990). Histopathology of *Pseudomonas putrefaciens* associated with disease in cultured rabbitfish, *Siganus rivulatus*. J. Fish Dis., 13: 417~422.
- Sivolodskii, E. P. · Kotiv, B. N. · Kolobova, E. N. · Gorelova, G. V. · Bogoslovskaja, S. P. · Barinov, O. V. and Ivanov, F. V.(2012). Isolation of *Shewanella algae* from pleural exudate of patient with pneumonia. Zh. Mikrobiol. Epidemi. Immunobiol., 74~76.
- Soner. A. · Ayse. G. B. · Muhammed. D. · Musa. O. O. · Suheyla. K. and Emre. T.(2014). Isolation of *Shewanella putrefaciens* from goldfish (*Carassius auratus*). The Israeli J. Aquaculture-Bamidgeh, 66: 1~8.
- Vogel, B. F. · Jorgensen, K. · Christensen, H. · Olsen, J. E. and Gram, L.(1997). Differentiation of *Shewanella putrefaciens* and *Shewanella alga* on the basis of whole-cell protein profiles, ribotyping, phenotypic characterization, and 16S rRNA gene sequence analysis. Appl. Environ. Microbiol., 63: 2189~2199.
- Yao, D. R. · Bing, X. W. · Zhw, M. · Bi, K. R. · Chen, L. and Zhang, X. J.(2010). Molecular identification and drug resistance of pathogenic *Aeromonas sobria* isolated from *Misgurnus anguillicaudatus*. Oceanologia Et Limnologia Sinica, 41: 759~769.
- Yu, J. H. and Park, S. W.(2008). Isolation of *Aeromonas sobria* from cultured mud loach, *Misgurnus mizolepis*. J. Fish Pathol., 21: 21~27.
- Yu, J. · Koo, B. H. · Kim, D. H. · Kim, D. W. and Park, S. W.(2015). *Aeromonas sobria* infection in

- farmed mud loach (*Misgurnus mizolepis*) in Korea, a bacteriological survey. Iranian J. veterinary Res., 16: 194~201.
- Yu, J. H. · Kim, D. H. · Han, J. J. and Park, S. W. (2016). Salt treatment for recovery of the mud loach, *Misgurnus mizolepis* from transport stress. Kor. J. Vet. Res., 56: 215~221.
- Wakabayashi, H. and Egusa, S.(1966). Characteristics of a myxobacterium, *Chondrococcus columnaris*, isolated from diseased loaches. Bull. Jap. Fish. Sci., 32: 1015~1022.
- Wakabayashi, H. and Egusa, S.(1967). Columnaris disease of the Japanese loach. Fish Pathol., 15: 319~325.
- Zhang, F. P. · Peng, Z. · Zhang, J. · Liu, M. H. · Fu, R. B. and Luo, H. Z.(2010). Isolation and identification of the pathogenic strain of *Vibrio harveyi* from *Miichthys miiu*. Acta Microbiol. Sin., 50: 304~309.
- Zhang, X. J. · Yao, D. R. · Yan, B. L. · Bi, K. R. · Liang, L. G. and Qin, G. M.(2012). Identification of *Vibrio cholerae* as a causative bacterium for an ulcer disease of cultured loach *Misgurnus anguillicaudatus* in China. Afr. J. Microbiol. Res., 6: 2060~2070.
-
- Received : 01 May, 2017
 - Revised : 06 July, 2017
 - Accepted : 11 July, 2017