

해수 사육 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*)에서 분리된 *Vibrio anguillarum*의 특성 분석

천혜진 · 김위식¹ · 조미영 · 정승희 · 한현자*

국립수산과학원 병리연구과, ¹전남대학교 수산생명의학과

Characteristics of *Vibrio anguillarum* Isolated from Seawater Cultured Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* in Korea

Hye-Jin Chun, Wi-Sik Kim¹, Mi-Young Cho, Sung-Hee Jung and Hyun-Ja Han*

Pathology Division, National Institute of Fisheries Science, Busan 40683, Korea

¹Department of Aquaculture Medicine, Chonnam National University, Yeosu 61186, Korea

From 2014 to 2017, mortalities of seawater-cultured rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, were observed in the Goheung and Jeju areas of Korea, with *Vibrio anguillarum* (seven strains: RT1, 2, 3, 4, 5, 6, and 7) identified as the etiological agent. The phenotypic (based on API 20NE, API ZYM, and E-test kits), serotypic (slide agglutination tests with O1, O2, O3, O4, and O7 antisera), and genotypic (16S rRNA and *ompU* sequencing) characteristics of the seven RT strains were analyzed and compared to those of seven additional *V. anguillarum* stains (SF, isolated from sweet fish; FM, isolated from flathead mullet; ATCC43305; ATCC43311; ATCC43307; ATCC43308; and KCTC2711). The phenotypes of the RT strains showed variance, while the slide agglutination tests of the RT1-7, SF, and FM strains all showed positive reactions with serotype O1 antiserum. The 16S rRNA and *ompU* sequences of the RT1-7, SF, and FM strains were affiliated with *V. anguillarum* ATCC43305 (Serotype O1), but the *ompU* sequence of the SF strain differed from those of the RT1-7, FM, and ATCC43311 strains, including one amino acid substitution. We thus confirmed that serotype O1 *V. anguillarum*, with multiple phenotypes, continues to infect seawater-cultured rainbow trout in Korea.

Key words: Seawater-cultured, Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, *Vibrio anguillarum*, Serotype O1

서론

무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*)는 연어목(*Salmoniformes*) 연어과(*Salmonidae*)에 속하는 냉수성 어종으로 북미의 멕시코 북부에서부터 알류산 열도에 이르는 동부 태평양 연안과, 캄차카반도 남부에서부터 시베리아에 이르는 서태평양 연안이 주요 서식지이다(Behnke, 1992). 무지개송어는 다른 물고기에 비해 번식력이 강하고 성장이 빨라 주요 양식어종으로 전세계에 널리 번져있다. 우리나라 양식장이나 자연계에서 서식하고 있는 무지개송어는 일생을 담수에서 서식하는 육봉형이지만, 회유성 어종으로 해수에 대한 생리적 적응력을 가지고 있어 일정기간 해수 순치과정을 거치면 해수에서도 사육할 수 있다(Landless, 1976; Gall and Crandell, 1992). 2017년 상반기 기준 내수

면 송어 양식 생산량은 약 1천 7백톤으로 우리나라 내수면 양식 생산의 약 10.7%를 차지하고 있는 주요 양식 품종이다(KOSIS, 2017). 실제로 연어와 송어는 세계에서 가장 많이 소비되는 수산물로 국내에서도 무지개송어는 비린내가 적어, 서구에서 대구류, 다랑어류 및 가자미류와 같은 어류들과 함께 다량 소비되며, 신세대를 포함한 대부분의 소비자들이 선호하고 있어, 지속적으로 증가하는 수입연어, 송어 등에 대한 시장 경쟁력을 확보하기 위해 무지개송어의 시장은 앞으로도 점차 확대되어 갈 것으로 추정된다(Lee, 2013; Kang et al., 2014)

최근 국내 연어류 양식 산업의 문제점을 해결하기 위하여, 민물에서 사육하는 무지개송어를 해수 순치를 통하여 고부가가치의 '바다송어'로 생산하는 해수 양식의 산업화가 시도되고 있다(Lee, 2013). 무지개송어를 해수에서 양식하면 담수에서 보다

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2018.0254>



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Korean J Fish Aquat Sci 51(3) 254-261, June 2018

Received 6 February 2018; Revised 7 March 2018; Accepted 20 April 2018

*Corresponding author: Tel: +82. 51. 720. 2483 Fax: +82. 51. 720. 2498

E-mail address: hjhan77@korea.kr

성장이 빠르고, 육질이 우수하여 상품가치가 향상된다. 국내의 무지개송어 양식 지역으로 연중 수온이 17-18℃로 일정한 제주나 강원도 지역의 청정해수가 무지개송어의 바다양식을 하기에 적격이며, 2008년 전라남도 고흥에서 최초로 남해안 해상어류 양식의 대체어종으로 무지개송어를 시험 양식한 이후 2012년에는 제주, 충남, 경북, 강원도까지 전국적으로 확산되었다(Lee, 2013). 국내 내수면에서 무지개송어 사육 시, 특히 치어기에 전염성 조혈기 괴사증(infectious hematopoietic necrosis virus; IHNV)과 전염성 췌장 괴사증(infectious pancreatic necrosis virus; IPNV)에 감염되게 되면 높은 폐사율을 나타내게 된다(Park et al., 1993, Kim et al., 2015). 그러나 무지개송어는 해수에 순치 혹은 사육과정에서 *Lepeophtheirus salmonis* 감염증, viral hemorrhagic septicaemia (VHS), pancreas disease 등의 다양한 질병에 의해 폐사하는 것으로 알려져 있으며(Nolan et al., 2000; Taksdal et al., 2007; Dale et al., 2009) 국내에서는 무지개송어 순치과정에서 *Vibrio anguillarum* 감염증의 발생이 보고되어 있다(Kim et al., 2014). 담수에서 사육하던 무지개송어를 해수에서 사육할 경우 기존에 담수 및 해수에서 발생하는 질병이 모두 발생할 수 있는 위험성이 있다(Kim et al., 2015).

*V. anguillarum*은 0.5-0.7×1-2 μm 크기의 그람음성의 통성 혐기성 세균으로(Colormi et al., 1981) 무지개송어를 비롯한 다양한 담수어 및 해산어에 있어 비브리오병(vibriosis)을 유발하는 것으로 알려져 있다(Actis et al., 2011). *V. anguillarum*에 감염된 어류는 체표 출혈 및 궤양 등의 증상을 나타내며, 심할 경우 패혈증을 일으켜 높은 폐사를 유발하기도 한다. 비브리오병은 유럽에서는 red pest 혹은 red disease로 알려져 있으며 담수에서 사육되는 뱀장어와 연어과 어류를 비롯하여 방어, 참돔 등

해산어에 널리 발생한다. *V. anguillarum*은 총 23개 이상의 혈청형이 존재한다고 알려져 있으며, 주로 O1, O2 두 가지 혈청형이 어류에 질병을 유발하는 것으로 알려져 있었으나, 최근에는 O3 혈청형도 병원성과 연관이 있다고 보고되어 있다(Stelnum et al., 2016).

본 연구에서는 2014년에서 2017년까지 전라남도 고흥, 제주의 해수에서 사육하고 있던 무지개송어에서 *V. anguillarum*의 감염이 확인되어 원인체를 분리·동정하였으며, 바다송어에서 분리한 *V. anguillarum*의 생화학적, 혈청학적, 유전적 특성을 분석하였다.

재료 및 방법

시험균주

본 연구에서는 2014-2017년까지 전라남도 고흥 및 제주지역 해수에서 사육하던 무지개송어에서 분리한 *V. anguillarum* 7균주 및 참조균주 7균주를 시험에 사용하였으며 이를 Table 1에 나타내었다. 세균의 배양은 1% NaCl을 첨가한 tryptic soy agar (TSA, Becton Dickinson, USA) 또는 brain heart infusion agar (BHIA, Becton Dickinson, USA)배지에 도말한 후, 25℃에서 24시간 배양하여 균의 성장을 확인하고 이를 계대배양하여 이후의 실험에 사용하였다.

생화학적 특성 분석

생화학적 특성을 분석하기 위해 *V. anguillarum* 균주를 1% NaCl이 첨가된 TSA배지에서 25℃, 24시간 배양한 후 API 20NE kit (BIOMERIEUX, France)와 API ZYM (for semi-

Table 1. Bacterial strains used in this study

Strain	Isolated Year	Host/Source	Geographical location
RT1	2014.03	Rainbow trout <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Jeju, South Korea
RT2	2014.03	Rainbow trout <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Jeju, South Korea
RT3	2015.06	Rainbow trout <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Goheung, South Korea
RT4	2015.04	Rainbow trout <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Goheung, South Korea
RT5	2015.05	Rainbow trout <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Goheung, South Korea
RT6	2017.08	Rainbow trout <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Jeju, South Korea
RT7	2017.08	Rainbow trout <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Jeju, South Korea
SF	2004.04	Sweet fish <i>Plecoglossus altivelis</i>	South Korea
FM	2015.04	Flathead mullet <i>Mugil cephalus</i>	Hadong, South Korea
ATCC43305	1986	Rainbow trout <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Denmark
ATCC43311	1986	European eel <i>Anguilla anguilla</i>	Denmark
ATCC43307	1986	Rainbow trout <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Denmark
ATCC43308	1986	Cod <i>Gadus macrocephalus</i>	Denmark
KCTC2711	1986	Cod <i>Gadus macrocephalus</i>	Norway

RT1-7, isolated from rainbow trout; SF, isolated from sweet fish; FM, isolated from flathead mullet; ATCC, American type culture collection; KCTC, Korean collection for type cultures.

quantitation of enzymatic activities) kit (BIOMERIEUX, France)를 사용하였으며, oxidase test를 실시하였다. 실험방법은 순수배양된 균 집락을 제조사의 방법에 따라 스트립에 접종하고, 25°C에서 24시간 동안 배양한 후 결과를 판정하였다. 염분농도가 균의 성장에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 분리균주(RT1, RT3) 및 참조균주(ATCC43305)를 대상으로 NaCl을 농도별로(0.5-7%) 첨가한 tryptic soy broth (TSB, Becton Dickinson, USA)배지에 24-72시간 배양하여 균의 성장유무를 확인하였다.

항생제 최소 억제 농도 측정

8개의 항생제(gentamicin, tetracycline, doxycycline, amoxicillin, erythromycin, ciprofloxacin, chloramphenicol 및 clindamycin)에 대한 최소 억제 농도(minimum inhibitory concentration; MIC)는 E-test (AB Biodisk) disk diffusion 방법으로 측정하였다. 그 결과는 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2005, 2011)의 *Vibrio* spp.의 기준에 따라서 평가하였다

유전적 특성 분석

유전적 특성 분석을 위하여 각 분리 균주를 1% NaCl이 첨가된 TSA배지에서 24시간 배양한 후 13,000 rpm에서 2분간 원심분리, 상층액을 제거하여 세균 pellet을 제작하였다. 세균 pellet은 promega genomic DNA purification kit (Promega, USA)를 사용하여 DNA를 추출하였다. 분리된 모든 균주는 16S rRNA (27F, AGAGTTTGATCMTGGCTCAG; 1,492R, TACGGYTACCTTGTTACGAC) (Kim et al., 2005), *ompU* gene (encoding outer membrane protein, ompU-F, ATGAA-CAAACTCTGATTGCTT; ompU-R, TAGAAGTCGTAAC-GTAGACC) 분석을 위하여 polymerase chain reaction (PCR)을 실시하였다. 16S rRNA는 95°C에서 pre-denaturation을 5분, 95°C (30초)-55°C (30초)-72°C (30초)의 조건으로 30cycles을 반복한 뒤 72°C에서 5분간 post-extension을 실시하였다. *ompU* gene은 95°C에서 pre-denaturation을 5분간, 95°C (30초)-50°C (30초)-72°C (60초)의 조건으로 25cycles을 반복한 뒤 72°C에서 5분간 post-extension을 실시하여 해당 유전자를 증폭하였다. 증폭된 PCR 산물은 EtBr이 포함된 1.5% agarose gel (Bioneer, Korea)을 사용하여 전기영동 한 후 UV transilluminator (Alpha Innotech, USA)이용해 band를 확인하였고, 염기서열을 분석하였다. 유전자 염기서열분석은 MEGA6 program과 GENETYX Ver. 8.0 (SDC Software Development, Japan)를 사용하였으며, 결정된 각 염기서열은 national center for biotechnology institute (NCBI)에서 제공하는 basic local alignment search tool (BLAST)을 이용하여 기준에 보고된 *V. anguillarum*의 유전자와 비교 분석하였다. Blast search의 염기서열 정보를 바탕으로 bioedit Ver.7.2.1를 사용하여 multiple alignments를 실시하였고, MEGA6 program(<http://www.megasoftware.net>; Tamura et al., 2013)을 사용한 근린결합분

석 (NJ, neighbor-joining analysis; 1,000 rounds of bootstrap)을 통하여 각 염기서열간 유전적 거리와 계통도(phylogenetic tree)를 작성하였다.

혈청형 분석

슬라이드 응집반응으로 혈청형을 분석하였으며, 참조균주(*V. anguillarum* ATCC43305, serotype O1; KCTC2711, serotype O2; ATCC43309, serotype O3; ATCC43308, serotype O4 및 ATCC43311, serotype O7)에 대한 토끼항혈청을 제작하여 분석에 사용하였다. 슬라이드글라스에 *V. anguillarum*에 대한 5종류의 토끼 항혈청을 각각 70 µL씩 떨어뜨리고 본 연구에서 시험한 무지개송어, 은어 및 송어 유래 *V. anguillarum* 9 균주(RT1-7, SF, FM)를 McFarland no. 6 standard으로 멸균 생리식염수에 현탁한 균액을 각 10 µL 떨어뜨려 잘 섞어 30초 이내에 응집 형성 유무를 확인하였다. 응집은 어두운 배경에서 슬라이드를 측면에서 관찰하였으며, 대조균은 균을 현탁하지 않은 멸균 생리식염수를 사용하였다.

결과 및 고찰

Kim et al. (2014)은 바다에서 양식하던 무지개송어가 *V. anguillarum*에 감염되면 복부 체표 궤양이 형성되며, 해부해 보면 비장 비대, 간, 유문수 및 장에 출혈 등의 증상이 관찰된다고 보고하였다. 본 연구에서 *V. anguillarum* 감염이 확인된 무지개송어는 체표의 궤양, 간의 울혈 및 출혈, 비장의 출혈 등의 증상이 관찰되었으며, 이러한 증상은 Kim et al. (2014)이 보고했던 바다에서 양식하던 무지개송어의 *V. anguillarum* 감염 증상과 일치하였다. *V. anguillarum* 감염증은 체표의 출혈이나 궤양 형성이 외견상의 특징이지만 이 증상만으로는 다른 세균증과 구별하기 곤란하므로 정확한 진단을 내리기 위해서 감염어의 비장, 신장, 간 또는 혈액을 배지에 접종, 세균을 분리하여 생화학적 성상에 기초하여 균을 동정하는 것이 필요하다(Grisez et al., 1991). 2014-2017년 병든 무지개송어에서 분리된 세균은 1% NaCl이 첨가된 TSA배지에서 투명한 크림색의 colony를 형성하였으며, 본 연구에서 시험한 *V. anguillarum* 14개 균주의 생화학적 특성은 Table 2에 나타내었다. API ZYM kit결과 모든 균주는 alkaline phosphatase, leucine arylamidase의 2항목에서 모두 양성이었다고, lipase (C14), valine arylamidase, cystine arylamidase, trypsin, α -chymotrypsin, α -galactosidase, β -galactosidase, β -glucuronidase, α -glucosidase, β -glucosidase, α -mannosidase 및 α -fucosidase 모두 음성이었다. API 20NE kit 결과 indole 생성능, urease, capric acid, adipic acid 및 phenylacetic acid 모두 음성이었고 나머지 항목에서는 결과가 다양하게 나타났다. *Vibrio*속 세균은 그람 음성 간균으로 glucose 이용능을 갖고, TCBS 배지에서 자라며, oxidase와 catalase에 양성반응을 나타내는 특징이 있다(Pazos et al., 1993). *V. anguillarum*의 경우 oxidase와 catalase에 양성반응을 나타내며 indole을 생

Table 2. Phenotypic characteristics of 7 *Vibrio anguillarum* strains isolated from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in this study

Test	Strains														
	RT1	RT2	RT3	RT4	RT5	RT6	RT7	SF	FM	ATCC 43305	ATCC 43311	ATCC 43307	ATCC 43308	KCTC 2711	
Serotype	O1	O1	O1	O1	O1	O1	O1	O1	O1	O1	O7	O3	O4	O2	
API ZYM	Esterase(C4)	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	
	Esterase Lipase(C8)	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	
	Valine arylamidase	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	
	Acid phosphatase	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	
	Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	
	β-galactosidase	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	
	N-acetyl-β-glucosaminidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
API 20NE	Nitrate reduction	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	
	Glucose fermentation	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	
	Arginine dihydrolase	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
	Esculin hydrolysis	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	
	Gelatinase	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	
	β-galactosidase	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
	Assimilation of :														
	Glucose	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	
	Arabinose	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	
	Mannose	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	
	Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	
	N-Acetyl-glucosamine	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
	Maltose	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	
	Potassium gluconate	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	
	Malate	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	
Trisodium citrate	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-		

RT1-7, isolated from rainbow trout; SF, isolated from sweet fish; FM, isolated from flathead mullet; ATCC, American Type Culture Collection; KCTC, Korean Collection for Type Cultures.

산하는 능력이 없고, arabinose를 분해하여 산을 생산하는 능력이 있는 것으로 알려져 있다(Buller, 2004; Jee et al., 2011). Santos et al. (1996)은 *V. anguillarum* 동종 내에서도 표현형이 다양한 것으로 보고하였으며, 특히 조사한 모든 균주($n=45$)는 nitrate 환원능, glucose 이용능에서 양성을 나타내었다고 보고하였다. 그러나, 본 연구의 무지개 송어에서 분리한 균주 중에

는 nitrate 환원능과 glucose 이용능이 음성인 균주($n=1$)도 확인되었다. 일반적으로 *Vibrio* 속 세균은 그 형태학적, 생리학적, 생화학적 특성이 같은 종 안에서도 다양한 것으로 알려져 있다(Pazos et al., 1993). 염분농도별 *V. anguillarum* RT1, RT3 및 참조균주(ATCC43305)의 성장을 조사한 결과, 시험한 모든 균주는 0.5-5% NaCl 농도에서 24시간 배양 후 균의 성장이 확

인되었으며, 72시간 배양하면 0.5-7%까지 모든 시험균이 성장되는 것을 확인하였다(data not shown). 그러나 본 연구에서는 담수에서 사육되는 무지개송어에서 분리된 균주, 참조균주(ATCC43305)와 해수 유래 *V. anguillarum* 균주의 염분농도에서의 성장률의 차이는 확인할 수 없었다. *V. anguillarum*는 대부분의 해양 *Vibrio* 속 세균과 마찬가지로 NaCl이 없는 상태에서 자라지 않고, 0.5-7%의 염분농도에서 생존할 수 있다고 알려져 있다(Mehrnaz and Davar, 2010). 최적의 염분농도는 1.0-3.0%이며(Eguchi et al., 2000), 최적온도 범위는 15-25°C, pH는 5-9에서 잘 자라는 것으로 알려져 있어(Larsen, 1984), 최적의 염분농도는 본 연구의 결과와 일치하는 것으로 나타났다.

본 연구에서는 8종류의 항생제에 대한 14개의 *V. anguillarum* 균주의 MIC를 측정하였으며, 그 결과를 Table 3에 나타내었다. CLSI의 *Vibrio* spp.에 대한 기준으로 판단하면, gentamicin, tetracycline, doxycycline, chloramphenicol 및 ciprofloxacin에 대해서는 시험한 모든 균주가 감수성이 있었으며, clindamycin, amoxicillin에 대해서는 시험한 모든 균주가 저항성을 나타내었다. 은어에서 분리된 균주(SF)와 참조균주(ATCC43305)는 erythromycin 저항성을 나타내었으며, 그 외 모든 균주는 erythromycin에 대하여 중간 내성을 나타냈다. 터키의 무지개송어에서 분리된 12개의 *Vibrio anguillarum* 균주에 대한 항생제감수성 시험 결과 cloxacillin, ampicillin, sulfamethoxazol-thrimethoprim 및 erythromycin에 대하여 100% 내성을 가지는 것으로 나타났다(Parin et al., 2017). 이러한 연구 결과는 해수에서 사육되는 무지개송어의 *V. anguillarum* 감염증의 치료를 위한 기초자료로 활용가능 할 것이다.

무지개송어에서 분리된 7개의 분리 균주(RT1-7)의 혈청형을 알아보기 위해 제작한 5종류의 토끼 항혈청으로 슬라이드 응집반응을 실시한 결과 7개 균주 모두 O1 type 항혈청과 응집반응이 일어났고, 그 외 항혈청과는 응집반응이 일어나지 않았다(Table 2). Sørensen (1986)과 Larsen (1986)은 585개의 *V. anguillarum* 분리 균주를 사용하여 O항원을 혈청학적으로 검증한 결과, 해수에서 양식하는 무지개송어에서 분리된 균주 중 71%가 O1혈청형에 속하고, 대구 등의 자연산 어류에서 분리된 균주 중 78%가 O2혈청형에 속한다고 보고하였다. 또한 어류에 질병을 유발하는 주요 혈청형은 O1과 O2으로, O1 혈청형 균주가 연어과(*Salmonidae*) 어류에서 질병을 일으키는 혈청형으로 알려져 있다(Tranzo and Barja, 1990; Larsen et al., 1994). Lee et al. (1988)은 우리나라에서 양식하는 해산어류인 방어, 참돔 및 돌돔에서 분리된 26개 *V. anguillarum* 균주의 혈청형을 분석한 결과 모두 serotype C로 보고하였으며, serotype C는 Sørensen과 Larsen (1986)이 보고한 serotype O1과 동일한 혈청형이다. 본 연구에서도 국내의 해수사육 무지개송어에서 분리되는 *V. anguillarum* (RT1-7)의 혈청형이 serotype O1이며, 은어 및 송어에서 분리되는 *V. anguillarum* 균주(SF, FM)의 혈청형도 O1 type임을 확인하였다.

Table 3. The MIC values for the *Vibrio anguillarum* strains and MIC interpretive standards ($\mu\text{g/mL}$) according to CLSI (2005, 2011)

Bacterial Strains	MIC														Breakpoint ($\mu\text{g/mL}$) ⁴		
	Antimicrobial Agent														S ¹	I ²	R ³
	RT1	RT2	RT3	RT4	RT5	RT6	RT7	SF	FM	ATCC 43305	ATCC 43311	ATCC 43307	ATCC 43308	KCTC 2711			
AMINOGLYCOSIDES	Gentamicin	≤ 1.5	≤ 2	≤ 1.5	≤ 2	≤ 3	≤ 1	≤ 3	≤ 4	8	≥ 16						
TETRACYCLINES	Tetracycline	≤ 0.38	≤ 0.38	≤ 0.38	≤ 0.25	≤ 0.19	≤ 0.25	≤ 0.19	≤ 0.38	≤ 0.125	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.38	≤ 4	8	≥ 16
	Doxycycline	≤ 0.38	≤ 0.50	≤ 0.25	≤ 0.38	≤ 0.38	≤ 0.38	≤ 0.125	≤ 0.50	≤ 0.125	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.38	≤ 4	8	≥ 16
BETA-LACTAMS; PENICILLINS	Amoxicillin	≤ 24	≤ 24	≤ 24	≤ 24	≤ 32	≤ 32	> 256	> 256	> 256	> 256	≤ 48	> 256	> 256	≤ 8	16	≥ 32
MACROLIDES	Erythromycin	≤ 3	≤ 8	≤ 3	≤ 12	≤ 3	≤ 4	≤ 4	≤ 6	≤ 0.5	1-4	≥ 8					
QUINOLONES	Ciprofloxacin	≤ 0.008	≤ 0.012	≤ 0.016	≤ 0.023	≤ 0.016	< 0.047	< 0.004	< 0.003	≤ 0.008	≤ 1	2	≥ 4				
OTHER	Chloramphenicol	≤ 50	≤ 0.75	≤ 0.50	≤ 0.50	≤ 0.75	≤ 0.75	≤ 1.0	≤ 0.75	≤ 0.75	≤ 0.75	≤ 1.0	≤ 1.0	≤ 1.0	≤ 8	16	≥ 32
ANTIBIOTICS	Clindamycin	≤ 2	≤ 2	≤ 3	≤ 2	≤ 3	≤ 3	≤ 3	≤ 3	≤ 6	≤ 6	≤ 2	≤ 24	≤ 8	≤ 0.5	1-2	≥ 4

¹Susceptible. ²Intermediate. ³Resistant. ⁴Breakpoints recommended by the clinical laboratory standards institute in M45-A(2011), M45-P(2005), RT1-7, isolated from rainbow trout; SF, isolated from sweet fish; FM, isolated from flathead mullet; ATCC, American Type Culture Collection; KCTC, Korean Collection for Type Cultures.

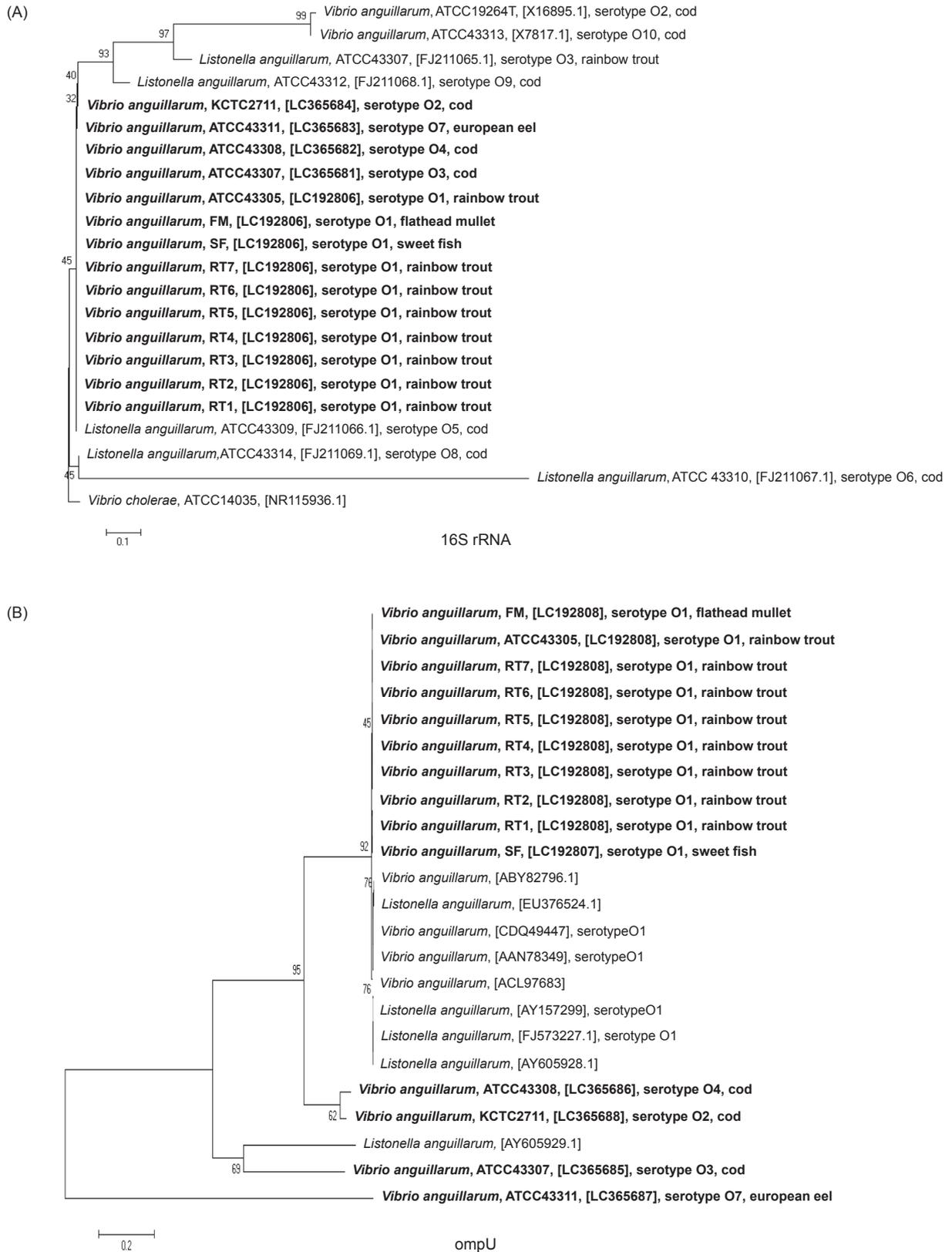


Fig. 1. Phylogenetic trees constructed based on the analyses of the 16S rRNA (a), *ompU* (b) genes using the neighbor-joining method.

무지개송어에서 분리된 7개의 균주(RT1-7)와 은어 및 송어에서 분리된 2개의 균주(SF, FM)의 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석한 결과 참조균주(ATCC43305, serotype O1)와 100% 상동성을 나타내었으며, 다른 참조균주 4종(KCTC2711, serotype O2; ATCC43309, serotype O3; ATCC43308, serotype O4 및 ATCC43311, serotype O7)의 16S rRNA 염기서열과는 99.2-99.8%의 상동성을 나타내었다(data not shown). 16S rRNA 계통수 분석 결과, 무지개송어 유래 분리균주(RT1-7), 송어 및 은어 유래 분리균주(FM, SF)와 참조균주(ATCC43305, serotype O1)는 16S rRNA 유전자 염기서열은 동일한 cluster에 속하였으며, 다른 참조균주와도 계통발생학적으로 큰 차이가 없음을 알 수 있었다(Fig. 1A). 일반적으로 *Vibrio cholerae*를 포함한 몇 가지 병원성 *Vibrio* 종에는 병원성 및 항원성 관련 세포 외막 단백질인 OmpU가 존재하며, *V. anguillarum*에서도 OmpU gene이 없는 mutant 균주는 담즙에 대한 내성 및 병원성이 감소하였으며, 숙주의 면역으로부터 회피할 수 있게 하는 biofilm 생성에 장애가 있는 것으로 알려져 있다(Wang et al., 2003). 또한 *V. anguillarum*의 OmpU 단백질은 백신 항원으로 활용 가능한 것으로 알려져 있다(Sun et al., 2012). 따라서, 본 연구에서 *V. anguillarum*의 이러한 주요 병원성 및 항원성 단백질인 OmpU gene (*ompU*) 분석을 실시하였으며, 그 결과 은어에서 분리된 균주(SF)를 제외하고, 본 연구에서 분리된 해수사육 무지개송어에서 분리된 균주 7개(RT1-7)와 송어에서 분리된 균주(FM)는 참조균주(ATCC43305, serotype O1)와 100% 상동성을 나타내었으며, serotype O1 외의 다른 혈청형의 참조균주 4종(KCTC2711, serotype O2; ATCC43309, serotype O3; ATCC43308, serotype O4 및 ATCC43311, serotype O7)의 *ompU* 유전자 염기서열과는 88.8-95.4%의 상동성을 나타내었다(data not shown). 은어에서 분리된 SF 균주를 제외하고, 동일한 serotype O1 안에서의 *ompU* 유전자 염기서열은 동일한 것으로 확인되었다. SF 균주의 *ompU* 유전자의 염기서열은 해수사육 무지개송어에서 분리된 균주(RT1-7)의 *ompU* 유전자 염기서열과 99.9% 유전적 상동성을 나타내었으며, 총 925 개의 염기 중 1개의 염기서열에 차이가 있는 것으로 확인되었다. *ompU*의 계통수 분석 결과 분석한 무지개송어 유래 분리균주(RT1-7), 송어 및 은어 유래 분리균주(FM, SF)와 참조균주(ATCC43305, serotype O1)는 기존에 보고된 *V. anguillarum* (*Listonella anguillarum*, serotype O1)과 같은 cluster에 속하여 다른 혈청형을 가진 균주와는 유전자 염기서열에 차이가 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 1B). 이전에도 혈청형에 따른 *V. anguillarum*의 유전적 다양성이 보고된 바 있으며(Busschaert et al., 2015), 본 연구 결과도 이와 동일하게 혈청형에 따라 16S rRNA 및 *ompU* 유전자 염기서열에 차이가 있는 것을 확인하였다.

본 연구 결과로부터 2014년부터 2017년까지 전라남도 고흥 및 제주지역의 해수사육 무지개송어에서 분리되었던 *V. an-*

*guillarum*은 모두 serotype O1으로 확인되었으며, 혈청형과 16S rRNA 및 *ompU* 유전형 또한 동일한 *V. anguillarum*에 의해서 지속적으로 질병이 발생하는 것으로 확인되었다. 본 연구 결과는 해수 사육 무지개송어에서 발생하는 *V. anguillarum* 감염증의 치료 및 예방을 위한 기초 자료로 활용 가능 할 것으로 판단된다.

사 사

본 연구는 국립수산과학원(R2018063)의 지원에 의해서 운영되었습니다.

References

- Actis LA, Tolmasky ME and Crosa JH. 2011. Vibriosis. In: Fish diseases and disorders 3(2), Woo PTK and Bruno DW, eds. CABI International, Wallingford, UK, 570-605.
- Behnke RJ. 1992. Native trout of Western North America. American Fisheries Society, Bethesda Maryland, U.S.A., 1-275.
- Buller NB. 2004. Bacteria from fish and aquatic animals: a practical identification manual. Centre for Agriculture and Bioscience International, Wallingford, UK, 1-361.
- Busschaert P, Frans I, Crauwels S, Zhu B, Willems K, Bossier P, Michiels C, Verstrepen K, Lievens B and Rediers H. 2015. Comparative genome sequencing to assess the genetic diversity and virulence attributes of 15 *Vibrio anguillarum* isolates. J Fish Dis 38, 795-807. <http://doi.org/10.1111/jfd.12290>.
- CLSI (Clinical and laboratory standards institute). 2005. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; proposed guideline CLSI document M45-P. CLSI, Wayne, Pennsylvania, U.S.A., 1987-1998.
- CLSI (Clinical and laboratory standards institute). 2011. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; approved guideline-second edition. CLSI document M45-A2, Wayne, Pennsylvania, U.S.A., 36-37.
- Colormi A, Paperna I and Gordin H. 1981. Bacterial infections in gilt-head sea beam *Sparus aurata* cultured at Elat. Aquaculture 23, 257-267. [http://doi.org/10.1016/0044-8486\(81\)90019-3](http://doi.org/10.1016/0044-8486(81)90019-3).
- Dale OB, Ørpetveit I, Lyngstad TM, Kahns S, Skall HF, Olesen NJ and Dannevig BH. 2009. Outbreak of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in seawater-farmed rainbow trout in Norway caused by VHS virus genotype III. Dis Aquat Organ 85, 93-103. <http://doi.org/10.3354/dao02065>.
- Eguchi M, Fujiwara E and Miyamoto N. 2000. Revival of *Vibrio anguillarum* in freshwater environments: adaptation or debilitation?. J Infect Chemother 6, 126-129. <http://doi.org/10.1186/147528756126129>.

- org/10.1007/s101560000027.
- Gall GAE and Crandell PA. 1992. The rainbow trout. *Aquaculture* 100, 1-10.
- Grisez L, Ceusters R and Ollevier F. 1991. The use of API 20E for the identification of *Vibrio anguillarum* and *V. ordalii*. *J Fish Dis* 14, 359-365. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1991.tb00833.x>.
- Jee BY, Bang JD, Cho MY, Kim JW, Won KM and Cho YA. 2011. Characteristics of *Vibrio* isolated from cultured file fish, *Stephanolepis cirrhifer* in Korea. *J Fish Pathol* 24, 103-112. <http://doi.org/10.7847/jfp.2011.24.2.103>.
- Kang SI, Kim KH, Lee JK, Kim YJ, Park SJ, Kim MW, Choi BD, Kim DS and Kim JS. 2014. Comparison of the food quality of freshwater rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* cultured in different regions. *Korean J Fish Aquat Sci* 47, 103-113. <http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2014.0103>.
- Kim SM, Won KM, Woo SH, Li H, Kim EJ, Choi KJ, Cho MY, Kim MS and Park SI. 2005. Vibrios isolated from diseased marine culturing fishes in Korea. *J Fish Pathol* 18, 133-145.
- Kim SW, Kim JO, Kim WS, Kim DH and Oh MJ. 2014. *Vibrio anguillarum* infection in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* during seawater adaption. *J Fish Pathol* 27, 133-137. <http://doi.org/10.7847/jfp.2014.27.2.133>.
- Kim WS, Jang MS, Kim JO, Jeon YH and Oh MJ. 2015. Effect of fish pathogenic viruses on mariculture of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Kor J Ichthyol* 27, 2288-3371. <http://doi.org/10.13140/RG.2.1.1118.6000>.
- KOSIS (Korean statistical information service). 2017. Fishery production survey: Statistics by type of fishery and species. Retrieved from www.kosis.kr on Jan 9, 2018.
- Landless PJ. 1976. Acclimation of rainbow trout to sea water. *Aquaculture* 7, 173-179. [http://doi.org/10.1016/0044-8486\(76\)90006-5](http://doi.org/10.1016/0044-8486(76)90006-5).
- Larsen JL, Pedersen K and Dalsgaard I. 1994. *Vibrio anguillarum* serovars associated with vibriosis in fish. *J Fish Dis* 17, 259-267. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1994.tb00221.x>.
- Larsen JL. 1984. *Vibrio anguillarum*: Influence of temperature, pH, NaCl concentration and incubation time on growth. *J Appl Microbiol* 57, 237-246. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1984.tb01388.x>.
- Lee JY, Chun SK, Pack SI 1988. Serotyping of *Vibrio anguillarum* isolated from cultured marine fishes. *Bull Korean Soc Fish Pathol* 1, 45-50.
- Lee NS. 2013. The current situation and suggestions of the mariculture of rainbow trout in Korea. *Ocean Fish* 3, 86-112.
- Mehrnaz RAD and Davar SHAHSAVANI. 2010. Isolation and characterization of *Vibrio (Listonella) anguillarum* from catfish. *Turk J Vet Anim Sci* 34, 413-415. <http://doi.org/10.3906/vet-0812-5>.
- Nolan DT, Ruane NM., Heijden YVD, Quabius ES, Costelloe J and Bonga SEW. 2000. Juvenile *Lepeophtheirus salmonis* (Krüyer) affect the skin and gills of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) and the host response to handling procedure. *Aquac Res* 31, 823-833. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2000.00515.x>.
- Park MA, Shon SG, Lee SD, Chun SK, Park JW, Fryer JL and Hah YC. 1993. Infectious hematopoietic necrosis virus from salmonids cultured in Korea. *J Fish Dis* 16, 471-478. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1993.tb00880.x>.
- Parin U, Savasan ES, Yuksei HT, Gurpınar S and Kirkan S. 2017. Antimicrobial resistance of *Vibrio (Listonella) anguillarum* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Indian J Ani Res*, B-623. <http://doi.org/10.18805/ijar.v0iOF.7251>.
- Pazos F, Santos Y, Magrinos B, Bandín I, Núñez S and Toranzo AE. 1993. Phenotypic characteristics and virulence of *Vibrio anguillarum*-related organisms. *Appl Environ Microbiol* 59, 2969-2976. [http://doi.org/0099-2240/93/092969-08\\$02.00/0](http://doi.org/0099-2240/93/092969-08$02.00/0).
- Santos Y, Pazos F and Toranzo AE. 1996. Biochemical and serological analysis of *Vibrio anguillarum* related organisms. *Dis Aquat Org* 26, 67-73. <http://doi.org/10.3354/dao026067>.
- Sørensen UB and Larsen JL. 1986. Serotyping of *Vibrio anguillarum*. *American Society for Microbiology, Appl Environ Microbiol* 51, 593-597. [http://doi.org/0099-2240/86/030593-05\\$02.00/0](http://doi.org/0099-2240/86/030593-05$02.00/0).
- Stelnum TM, Karatas S, Martlnussen NT, Melrelles PM, Thompson FL and Colquhoun DJ. 2016. Multilocus sequence analysis of close relatives *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *Am Soc Microbiol* 82, 5496-5504. <http://doi.org/10.1128/AEM.00620-16>.
- Sun Y, Zhang M, Liu CS, Qiu R and Sun L. 2012. A divalent DNA vaccine based on Sia10 and OmpU induce cross protectin against *Streptococcus iniae* and *Vibrio anguillarum* in Japanese flounder. *Fish Shellfish Immunol* 32, 1216-1222. <http://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.03.024>.
- Taksdal T, Olsen AB, Bjekas I, Hiortaaas MJ, Dannevig BH, Graham DA and Mcloughlin MF. 2007. Pancreas disease in farmed atlantic salmon, *Salmo salar* L., and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), in Norway. *J Fish Dis* 30, 545-558. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2007.00845.x>.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A and Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30, 2725-2729. <http://doi.org/10.1093/molbev/mst197>.
- Tranzo AE and Barja JL. 1990. A review of the taxonomy and seroepizootiology of *Vibrio anguillarum*, with special reference to aquaculture in the northwest Spain. *Dis Aquat Org* 9, 73-82. [http://doi.org/0177-5103/90/0009/0073/\\$03.00](http://doi.org/0177-5103/90/0009/0073/$03.00).
- Wang SY, Lauritz J, Jass J and Milton. 2003. Role for the major outer-membrane protein from *Vibrio anguillarum* in bile resistance and biofilm formation. *Micobiol* 149, 1061-1071. <http://doi.org/10.1099/mic.0.26032-0>.