넙치, *Paralichthys olivaceus*에서 *Edwardsiella tarda*와 *Streptococcus iniae* 단독 또는 혼합감염의 병원성 비교 연구

권문경[†] · 정승희

(국립수산과학원)

Comparative Study of Pathogenicity Following Single or Coinfection with *Edwardsiella tarda* and *Streptococcus iniae* in Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus*

Mun-Gyeong KWON[†] · Sung-Hee JUNG

(National Fisheries Research and Development Institute)

Abstract

Olive flounders, *Paralichthys olivaceus*, were intraperitoneally challenged with *Edwardsiella tarda* or *Streptococcus iniae* or both bacteria simultaneously. The pathogenicity was respectively compared with blood chemical using alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), glucose and total protein, lysozyme activity, bacterial number of kidney and spleen, histopathological change, and cumulative mortality. The tested group of coinfection showed increased cumulative mortality, bacterial number of kidney and spleen, AST and histopathological change, but not in lysozyme activity compared with others. This study provides support for the conclusion that simultaneous infection with *Edwardsiella tarda* and *Streptococcus iniae* in a susceptible host results in higher pathogenicity, leading to the increment of bacterial number and the destruction of the internal organs.

Key words : Olive flounder, Bacterial infection, *Edwardsiella tarda*, *Streptococcus iniae*, Pathogenicity

I. 서론

국내 대표적 양식 품종인 넙치는 양식 초기에는 고수온기에 병원체의 단독감염이 주를 이루었으나 최근에는 수온과 상관없이 연중 다양한 병원체가 혼합감염의 형태로 질병을 일으키고 있다 (김 등, 2006). 양식 넙치에 감염되는 주요 병원

성 세균으로는 *Vibrio* 속, *Streptococcus* 속, *Edwardsiella tarda*, *Photobacterium damsela*, *Pseudomonas* 속 세균이 있으며, 전체 세균감염율의 81.9%의 높은 비율을 차지하였다 (조 등, 2007). 또한, *Streptococcus* 속 세균은 다른 세균들과 혼합감염율이 높았으며, 특히 *E. tarda*와는 혼합감염율이 18.9%로 가장 높게 나타났다(조 등, 2007).

[†] Corresponding author: 051-720-2491, mgkwon@nfrdi.go.kr

* 본 연구는 국립수산과학원 (RP-2012-AQ-031)의 지원에 의해 운영되었습니다.

Streptococcus 속 세균에 의한 연쇄구균증은 *Streptococcus iniae*와 *Streptococcus parauberis* 감염에 의해 주로 발병하고 있으나, 이 중 *S. iniae*는 고수온기에 감염율이 높아 연쇄구균병의 주요 원인균으로 지목되고 있다 (정 등, 2006; 김 등, 2005). *S. iniae*는 다양한 담수어 및 해산어에 감염되어 막대한 경제적 손실을 일으키는 병원체로 capsule의 유무에 따라 병원성의 차이가 있으며, capsule이 존재하는 균체는 혈청 살균능 및 macrophage의 식작용에 대한 저항능력이 있어 병원성이 높다고 보고하였다 (김 등, 2005).

*E. tarda*는 edwardsiellosis의 원인균으로 감염 시 복부팽만, 탈장, 간과 신장에 농양 형성 등 전신적 증상을 나타내며, 많은 담수어와 해산어에 질병을 일으킨다 (Kusuda and Kawai, 1998). *E. tarda* 내에는 두 종류 이상의 transferable R plasmid가 존재하며(김, 1999), dermatotoxin (Ullah and Arni, 1983), phagocytic killing (Ainsworth and Chen, 1990), hemolysins (Hirono et al., 1997)과 같은 다양한 병원성 factor가 있어 감염 시 높은 폐사율을 나타내는 질병 중의 하나로 알려져 있다.

본 연구에서는 매년 혼합감염에 의한 피해가 증가하고 있으나, 혼합감염이 어류에 미치는 영향에 대한 연구는 거의 이루어지지 않아, 병원체 중 혼합감염율이 높은 *E. tarda*와 *S. iniae*를 넙치에 단독감염 또는 혼합감염 후 넙치에서의 병원성 및 면역반응을 비교하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시험어 및 사육환경

울산 소재 넙치 양어장에서 구입한 넙치 (체중 14.98 ± 2.68 g, 전장 12.52 ± 1.28 cm)를 1 ton 용량의 유수식 사육조에 2주간 순치시킨 후 300L 수조에서 수행하였으며, 수온은 $21.0 \pm 0.89^\circ\text{C}$ 를 유지하였다.

2. 시험 균주

E. tarda FP5060은 제주도 넙치 양식장의 넙치 병어, *S. iniae* FP5228은 완도 넙치 양식장의 넙치 병어에서 분리하여 국립수산물학원 균주은행실에서 -80°C 에 보관 중인 균주를 사용하였다. 보존된 균주는 1% NaCl이 첨가된 TSA (Tryptic Soy Agar) 배지에서 25°C , 24시간 배양 후 멸균 PBS로 *E. tarda*는 1.7×10^6 cfu/ml, *S. iniae*는 1.9×10^6 cfu/ml가 되도록 현탁하였다.

3. 인위 감염 실험

단독감염구는 준비된 세균현탁액을 어체당 *E. tarda* 1.7×10^5 cfu, *S. iniae* 1.9×10^5 cfu가 되도록 0.1ml씩 복강주사 하였으며, 혼합감염구는 두배로 농축된 현탁액을 이용하여 0.1ml 안에 단독감염구와 동일한 수의 *E. tarda*와 *S. iniae*가 접종되게 하였다(표 1). 인위감염 후 혈액생화학적 성상, 라이소자임 활성, 조직병리학적 관찰 및 조직 중의 세균수를 조사하였다.

<Table 1> Experimental design of artificial infections

Group	Experimental infection
Single(E)	<i>Edwardsiella tarda</i> 1.7×10^5 cfu/fish
Single(S)	<i>Streptococcus iniae</i> 1.9×10^5 cfu/fish
Mix(E+S)	<i>Edwardsiella tarda</i> 1.7×10^5 cfu + <i>Streptococcus iniae</i> 1.9×10^5 cfu/fish
Control	PBS

4. 혈액생화학적 성상

인위 감염 후 일정 시간 별로 실험 넙치를 마취(아미노안식향산 에틸, 50 ppm)하여 미부정맥에서 채혈하였다. 채혈한 혈액은 상온에서 1시간 방치한 후 4°C 에 2시간 정치해 둔 다음 8,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 혈청을 분리하였으며, 채혈한 넙치는 별도로 수용하여 재사용되지 않았다. 분리된 혈청으로 AST (aspartate aminotransferase),

ALT (alanine aminotransferase), glucose 및 total protein 농도를 혈액자동분석기 (Fuji DriChem 3500i, Fuji Film, Japan)를 사용하여 측정하였다.

5. 라이소자임 활성

라이소자임 활성은 Parry et al. (1965)의 turbidimetric method를 이용하여 측정하였다. 즉, *Micrococcus lysodeikticus* (0.2 mg/ml) 현탁액 (pH 6.2) 950 μ l와 혈청 50 μ l를 혼합하여 25°C에 30초 및 4분 30초 반응시킨 후 530 nm에서 흡광도를 측정하였다. 라이소자임 활성은 units/ml로 나타내었으며, 1 unit는 흡광도 값이 0.001/min 감소한 값으로 표시했다.

6. 조직 중의 생균수 조사

조직 중의 세균 수는 Spanggaard et al.(2000)에 따라 관찰하였다. 즉, 신장과 비장의 조직을 1 cm³ 정도 되게 무균적으로 채취한 후 각 시료의 10배 (v/w)의 멸균 PBS로 균질화 한 다음 10⁴까지 단계 희석하였다. 희석된 장기는 1.5 % NaCl 첨가 TSA (Difco)에 접종하여 25 °C, 24시간 배양 후 균수를 조사하였다.

7. 병리조직학적 검사

각 시험구에서 시간 경과별로 시험어의 내부 장기를 상법에 따라 5~6 μ m 두께의 파라핀 박편을 제작한 후 HE염색을 실시하여 광학현미경으로 관찰하였다.

8. 누적 폐사율

상기의 인위감염 시험과 같은 방법으로 시험구당 20마리씩 접종 후 2주일간 누적폐사율을 관찰하였다.

9. 통계 처리

결과의 통계 처리는 ANOVA-test를 실시하여

Duncan's multiple range test (Duncan, 1955)로 평균간의 유의성을 SPSS Version 10 (SPSS, Michigan Avenue, Chicago, IL, USA, 1997) program을 사용하여 95%수준에서 검정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 혈액생화학적 성상

*E. tarda*와 *S. iniae*를 단독 또는 혼합감염 후 혈청 중의 glucose, AST, ALT 및 total protein 농도를 조사하였다 (Table 2). 혈액 생화학적 검사는 육상동물뿐만 아니라 해양동물에서도 중요한 요소에 해당하며, 동물의 생리적인 상태를 판단할 수 있는 것으로 알려져 있다 (Chen et al., 2004; 김 등, 2010). 본 연구에서 glucose 농도는 감염 12시간 째 대조구에 비하여 *E. tarda* 감염구와 *E. tarda*와 *S. iniae* 혼합감염구에서 유의적으로 높게 나타났으나 ($p<0.05$), 1일째부터는 모든 실험구에서 유의적인 차이가 보이지 않았다 ($p>0.05$). 어류가 스트레스에 노출 시 1차, 2차, 3차 반응으로 구분할 수 있으며 (Wedemeyer and McLeay, 1981), 혈액 중의 glucose는 1차 반응의 내분비계 활성의 증가로 분비된 catecholamine과 glucocorticoid에 의해 나타나는 스트레스 2차 반응의 가장 대표적인 지표 (Wedemeyer et al., 1990)로서 증가 시 3차 스트레스 반응인 면역능 저하를 유도한다. 본 연구에서는 혼합감염구에서 감염 12시간 째 glucose 농도가 대조구에 비하여 유의적으로 높게 나타나 혼합감염은 넙치에 스트레스를 주어 glucose 농도를 일시적으로 증가시킨 것으로 판단된다. 그러나 본 연구 결과와는 다르게 Das et al. (2011)은 잉어과 어류인 olive barb, *Puntius sarana*에 *Aeromonas hydrophila*를 인위감염 시 감염 초기에는 glucose 농도가 감소하였으나 감염 10일째 회복되었으며, Barhama et al. (1980)은 무지개송어에 *Aeromonas*와 *Streptococcus*을 혼합감염하였을 때 glucose 농도가 현저하게

<Table 2> Blood chemical values in the sera of the olive flounder, *Paralichthys olivaceus* infected with *Edwardsiella tarda* (Single, E) or *Streptococcus iniae* (Single, S) alone, and coinfectd with *E. tarda* and *S. iniae* (Mix, E+S) by intraperitoneal injection

Factor	Group	Days post infection						
		0	3h	12h	1D	3D	5D	7D
Gluc* (mg/dl)	Single(E)	16.5±4.8	17±3.6	15.3±7.5 ^{ab}	13.7±7.1	10.3±1.5	12.3±2.6	18±2.6
	Single(S)		26.3±5.9	11±2.6 ^a	13.4±4.4	16.7±2.1	16.3±5.5	15.7±0.6
	Miix(E+S)		14±2.8	23.3±5.1 ^b	10±5.6	15.3±4.7	17.5±3.5	15±1.0
	Control		15.7±5.3	13.5±2.1 ^a	12±2.6	13.7±1.6	14.3±1.2	15.5±3.5
AST (U/L)	Single(E)	18±5.7	111.7±16.2 ^b	128.0±23.8 ^b	133.0±14.6 ^b	75±15.4 ^b	56±11.9 ^b	30±3.5 ^a
	Single(S)		71.0±14.8 ^b	56.3±34.2 ^a	36±21.5 ^a	29.3±8.1 ^a	28±5.8 ^a	31.3±4.7 ^a
	Miix(E+S)		121.5±13.5 ^b	128.7±16.6 ^b	120.3±21.2 ^b	112.3±21.5 ^b	89.6±19.8 ^b	55±10.4 ^b
	Control		19.7±5.1 ^a	27.5±6.1 ^a	15±2.4 ^a	20.7±4.2 ^a	17.3±6.4 ^a	19±11.3 ^a
ALT (U/L)	Single(E)	2±0	6.7±1.5	5.3±1.9	3.3±1.5	2±1	5±1.5	3±1.2
	Single(S)		5.3±1.4	4.3±1.2	2.7±0.6	2.3±0.6	4.5±1.5	3±0.9
	Miix(E+S)		3±1.4	3.0±1.0	3.3±1.2	2.3±0.6	4±0.9	3±1.1
	Control		2.7±1.5	6.5±2.9	3±0.5	3±1	3±1	1.5±0.7
TP (g/dL)	Single(E)	2±0.7	2±0.4	2.3±0.3	2.1±0.1	2.1±0.4	2.0±0.3	1.7±0
	Single(S)		2.6±0.5	1.6±0.3	2.1±0.5	1.7±0.4	1.1±0.3	2.4±0.4
	Miix(E+S)		2.8±0.6	2.1±0.3	1.9±0.4	1.6±0.3	1.1±0.5	2.7±0
	Control		2±0.3	2±0.1	2±0	2.0±0.3	2.2±0.2	2.1±0.1

* Gluc, Glucose; AST, Aspartate aminotransferase; ALT, Alanine aminotransferase; TP, Total protein. Mean±SD with the same letters are not significantly different based on ANOVA followed by Duncan's multiple range tests ($p<0.05$).

낮아진다고 보고하였으며, glucose 농도의 감소는 감염 초기에 간 기능의 장애로 glucosynthesis에 영향을 받은 것으로 추측하였다.

혈청 중의 AST 활성은 인위감염 3시간째부터 대조구에 비하여 모든 감염구가 유의적으로 높게 나타났으며, *E. tarda*와 *S. iniae* 혼합감염구는 감염 7일째까지 대조구에 비하여 유의적으로 높게 나타났(p<0.05). AST 활성은 인위감염 후 모든 감염구에서 감염 초기인 감염 3시간째부터 급격하게 증가하여 *E. tarda* 단독감염구에서는 감염 3일째, *E. tarda*와 *S. iniae* 혼합감염구에서는 감염 5일째부터 감소하는 경향을 나타내었다. 감염구 중에는 *E. tarda*와 *S. iniae* 혼합감염구와 *E. tarda* 단독감염구가 *S. iniae* 단독감염구에 비하여 높게 나타났다. Grizzle and Kiryu (1993)은 channel catfish에 *Aeromonas hydrophila* 감염 시 AST 활

성이 증가되어 본 연구 결과와 유사한 경향을 나타내었다. 혈청 중의 AST 활성은 근육, 간, 신장 또는 심장 조직에 손상이 있을 때 손상 조직으로부터 AST가 유출되어 높아지는 것으로 (Canfield et al., 1985), 본 연구에서는 두 세균의 혼합감염 시 손상이 가장 크며, 특히 감염 초기에 간세포의 손상이 컸던 것으로 판단된다.

혈청 중의 ALT 활성은 *E. tarda* 단독감염구에서 2±1~6.7±1.5 U/L, *S. iniae* 단독감염구는 2.3±0.6~5.3±1.4 U/L, *E. tarda*와 *S. iniae* 혼합감염구는 2.3±0.6~4±0.9 U/L, 대조구는 1.5±0.7~6.5±2.9 U/L로 감염구 사이에 유의적인 차이가 나타나지 않아 ALT 활성은 세균 감염에 영향을 받지 않는 것으로 나타났다.

혈청 중의 total protein 농도는 *E. tarda* 감염구, *S. iniae* 감염구, *E. tarda*와 *S. iniae* 혼합감염

구 및 대조구 모두 실험기간 동안 $1.1 \pm 0.3 \sim 2.8 \pm 0.6$ g/dL로 실험구간에 유의적인 차이는 나타나지 않았으며, 다소 농도가 낮은 경향을 나타내었다.

2. 라이소자임 활성

혈청 중의 라이소자임 활성은 감염 3시간째는 감염구에서 대조구에 비하여 유의적인 차이는 없었으나 높은 경향을 나타내어 인위감염이 라이소자임 활성을 자극하여 활성이 일시적으로 높아진 것으로 판단된다. 라이소자임은 어류의 비특이적 면역활성 중 하나로 성별, 연령, 계절, 수온, pH,

독성 물질 노출, 감염, 스트레스 정도 등에 따라 활성이 다양하게 나타날 수 있다 (Saurabh and Sahoo, 2008). 본 연구 결과와 유사하게 잉어에 *Aeromonas punctata* 감염 (Siwicki and Studnicka, 1987), 잉어에 원충류인 *Eimeria subepithelialis* 감염 (Studnicka et al., 1986), 대서양연어에 *A. salmonicida* 감염 (Moyner et al., 1993) 시 라이소자임 활성 증가가 나타났으며, 넙치에 *E. tarda*를 인위감염 시 신장, 비장, 장, 심장과 혈구 중의 c-type과 g-type lysozyme mRNA level이 증가되었다 (Hikima et al., 2001).

<Table 3> Blood lysozyme activity of the olive flounder, *Paralichthys olivaceus* infected with *Edwardsiella tarda* (Single, E) or *Streptococcus iniae* (Single, S) alone, and coinfectd with *E. tarda* and *S. iniae* (Mix, E+S) by intraperitoneal injection

group	Days post infection						
	0	3h	12h	1D	3D	5D	7D
<i>E. tarda</i>	58.6±16.3	74.6±22.0	95.3±23.6	64.4±19.8	43.3±13.9	41.0±9.8	50.6±12.2
<i>S. iniae</i>		82.2±16.9	84.3±22.8	54.6±14.6	49.3±18.8	45.6±17.7	49.4±14.6
<i>E.tarda</i> + <i>S.iniae</i>		80.3±18.6	54.6±15.1	40.4±14.3	35.3±19.7	35.6±10.4	38.9±18.6
Control		60.8±13.1	62.8±17.7	72.2±13.0	69.5±18.1	60.7±11.1	63.6±14.9

3. 조직 중의 세균수 변화

넙치에 단독 또는 혼합감염 후 신장 및 비장 중의 세균 수를 조사하였다(그림 1, 2). 신장과 비장 모두 감염 1일째에는 감염구 사이에 차이가 보이지 않았으나, 3일째부터 혼합감염구에서 *E. tarda* 및 *S. iniae*의 균수가 단독감염구에 비하여 현저하게 증가하여 실험 종료 시기인 7일째에는 *E. tarda* 균수가 급격하게 증가하였다. 단독감염구 중에서는 *S. iniae* 단독감염구가 *E. tarda* 단독감염구에 비하여 균수가 적게 나타났으며, 이것은 혼합감염구에서도 *E. tarda* 균수에 비하여 *S. iniae*의 균수가 적게 나타난 것과 같은 경향을 보였다. Saeed (1995)는 *Vibrio harveyi*를 brown-spotted grouper에 복강에 인위감염 시 세균이 직접 또는 macrophage를 통해서 비장과 간장의

로 이동하여 장기 내에 세균 수가 많아지는 것을 추정하였으며, 본 연구에서도 같은 현상이 일어났을 것으로 예상된다.

4. 병리조직학적 검사

넙치에 *E. tarda*와 *S. iniae*를 단독 또는 혼합감염 후 대조구와 병리조직학적으로 관찰한 결과, *E. tarda*와 *S. iniae* 혼합감염구, *E. tarda* 단독감염구, *S. iniae* 단독감염구 순으로 조직변화가 빠르게 나타났다.

*E. tarda*와 *S. iniae* 혼합감염구에서는 감염 3시간째 비장 조직 내 협조직벽을 구성하는 대식세포의 비후가 나타났으며, 12시간째에는 비장의 협조직 비후, 임파구 및 염증성 세포 침윤, 1일째 비장의 협조직 비후, 임파구 및 염증성 세포 침윤이

[Fig. 1] Bacterial counts in spleen of the olive flounder, *Paralichthys olivaceus* infected with *Edwardsiella tarda* or *Streptococcus iniae* alone, and coinfectd with *E. tarda* and *S. iniae* by intraperitoneal injection. Single (E), *E. tara* counts of flounder infected with *E. tarda* alone; Single (S), *S. iniae* counts of flounder infected with *S. iniae* alone; Mix (E), *E. tara* counts of flounder coinfectd with *E. tarda* and *S. iniae*; Mix (S), *S. iniae* counts of flounder coinfectd with *E. tarda* and *S. iniae*

[Fig. 2] Bacterial counts in kidney of the olive flounder, *Paralichthys olivaceus* infected with *Edwardsiella tarda* or *Streptococcus iniae* alone, and coinfectd with *E. tarda* and *S. iniae* by intraperitoneal injection. Single (E), *E. tara* counts of flounder infected with *E. tarda* alone; Single (S), *S. iniae* counts of flounder infected with *S. iniae* alone; Mix (E), *E. tara* counts of flounder coinfectd with *E. tarda* and *S. iniae*; Mix (S), *S. iniae* counts of flounder coinfectd with *E. tarda* and *S. iniae*

[Fig. 3] Histopathological section showing the olive flounder, *Paralichthys olivaceus* response infected with *Edwardsiella tarda* (Single, E) or *Streptococcus iniae* (Single, S) alone and coinfecting with *E. tarda* and *S. iniae* (Mix, E+S) on 3 days post-injection. H&E stain. A~D, Coinfection with *S. iniae* and *E. tarda*; E~F, Infection with *E. tarda*; G~J, Infection with *S. iniae*

- A) Histological structure in spleen of olive flounder. Ellipsoids (circles) are markedly enlarged.
- B) Histological structure in kidney of olive flounder. Bright areas (circles) in lymphoid tissue are also recognized due to the increase in number of macrophages. Hyaline droplet degeneration (arrows) of epithelial cells of renal tubule.
- C) Histological structure in intestine of olive flounder. Intestine filled with necrotic epithelial cells and cellular debris. M; muscularis, S; serous membrane.
- D) Histological structure in intestine of olive flounder. Bacteria (arrows) seen in Figure. C at a higher magnification.
- E) Histological structure in spleen of olive flounder. Note the accumulation of bacterial cells (circles) and associated necrosis of the splenic parenchyma, with little evidence of inflammatory cell infiltration.
- F) Histological structure in kidney of olive flounder. Note the focal coagulative necrosis of the lymphoid tissue and collapse of glomeruli (arrowheads) with edema in Bowman's capsules (arrows).
- G) Histological structure in kidney of olive flounder. Necrosis and numerous bacteria (circles) within the lymphoid tissue and glomeruli.
- H) Histological structure in kidney of olive flounder. Bacteria (arrows) seen in Figure. G at a higher magnification.
- I) Histological structure in kidney of olive flounder. Inflammation appeared at the epicardium (*) of ventricle (V) and atrium (A).
- J) Histological structure in intestine of olive flounder. Focal necrosis and sloughing of the intestinal mucosa occurred.

관찰되었다. 감염 3일째에는 비장 혈조직벽의 대식세포 세포질에는 변성 적혈구와 핵농축 소견을 보이는 괴사세포가 혼재하였으며, 조혈부에는

임파구 및 염증성 세포 침윤이 관찰되었다 (그림 3-A). 신장에서는 조혈부 임파구 및 대식세포 침윤, 세뇨관 상피세포 내 초자변성 (hyaline

droplet degeneration)이 관찰되었으며 (그림 3-B), 장에서는 세균의 증식으로 인하여 점막상피의 괴사와 박리 및 노출된 점막고유층의 괴사, 모세혈관 확장 및 출혈이 관찰되었다 (그림 3-C, D).

E. tarda 단독감염구에서는 감염 3시간과 12시간째에는 조직학적 변화가 관찰되지 않았으나, 1일째에는 비장의 협조직 비후가 관찰되기 시작하면서, 3일째에는 비장에서 협조직 괴사, 조혈부 세균집락, 임파구 및 염증성 세포 침윤이 관찰되었다 (그림 3-E). 또한 신장에서도 조혈부 괴사 및 임파구 침윤, 세노관 위축 및 변성과 사구체의 괴사 및 위축이 관찰되었다 (그림 3-F).

S. iniae 단독감염구에서는 3시간, 12시간과 1일째에는 조직학적 변화가 관찰되지 않았으나, 3일째에는 비장에서 임파구 및 염증성 세포 침윤, 실질세포의 괴사, 신장에서는 사구체 및 조혈부에 세균이 증식하여 괴사 및 대식세포 침윤이 관찰되었다 (그림 3-G, H). 심장에서는 동맥구 주위에 외막염 (그림 3-I), 장 점막 괴사, 상피세포 괴사붕괴, 점막고유층의 모세혈관 확장 및 출혈이 관찰되었다 (그림 3-J).

Chen et al. (2004)은 틸라피아에서 급성 손상으로 간에 괴사성 병소 형성 시 ALT와 AST가 증가하며, 간장뿐만 아니라 장 및 체신의 병리조직학적 병변이 심해짐에 따라 ALT와 AST가 지속적으로 증가한다고 하였다. 본 연구에서는 내부 장기의 손상이 심하게 나타났던 혼합감염구에서 대조구 및 다른 감염구에 비하여 AST 활성이 유의적으로 높게 나타났다. AST 활성은 간세포 손상의 지표 지수로 감염 초기에 AST 활성이 감염 초기에 높게 나타나 감염 초기에는 간세포의 손상이 컸던 것으로 판단되며 이후에 신장과 비장에서 세균수가 증가하여 폐사를 유도한 것으로 판단된다.

5. 누적폐사율

*E. tarda*와 *S. iniae*를 단독 또는 혼합감염 후 7

일간 넙치의 누적폐사율을 조사하였다. *E. tarda* 단독감염구의 폐사율은 70%, *S. iniae* 단독감염구의 폐사율은 30%였으며, *E. tarda*와 *S. iniae* 혼합 감염구의 폐사율은 90%로 가장 높게 나타났다 (그림 4).

하 등 (2008)은 *E. tarda*는 넙치에 감염 시 체액성 및 세포성 방어인자에 대하여 저항 능력이 있어 넙치에 대하여 병원성이 높다고 보고하였으며, 본 연구에서도 *E. tarda*가 넙치의 면역인자에 대한 저항 능력이 있어 *E. tarda* 단독감염 및 혼합감염 모두 감염 3일째부터 40%의 높은 폐사율을 나타낸 것으로 판단된다. 이에 비해 *S. iniae*는 감염 4일째부터 폐사가 발생하여 실험 종료일인 감염 7일째까지 누적폐사율이 35%로 *E. tarda* 감염구에 비하여 낮은 폐사율을 나타내었다. *S. iniae*의 경우 capsule 유무에 따라 숙주의 macrophage 식작용 및 살균작용 저항능력에 차이가 있으나 (김 등, 2005), *E. tarda*에 비해 어체 내에서 병원성을 발현하기까지 잠복기간이 긴 것으로 판단된다. Oh et al. (2006)은 넙치에 marine birnavirus (MABV)와 *E. tarda* 또는 *V. harveyi*를 단독 또는 혼합감염 시 MABV 단독감염구의 폐사율은 20%, *E. tarda* 단독감염구의 폐사율은 70%였으나, MABV와 *E. tarda*와 혼합감염구는 100%의 폐사가 발생하였으며, *V. harveyi* 혼합감염구에서도 유사한 경향을 나타낸다고 보고하였다.

양식넙치에서 혼합감염은 본 연구에서 조사한 세균-세균의 혼합감염 뿐만 아니라 세균-기생충, 세균-바이러스, 기생충-바이러스, 바이러스-바이러스, 세균-기생충, 바이러스 등 다양한 형태가 나타나고 있으며, 혼합감염에 의한 피해는 매년 증가하고 있는 실정이다. 본 연구에서 단독감염과 같은 농도의 혼합감염구(현재 혼합감염구의 1/2 농도)의 실험이 수행되지 않아 혼합감염에 따른 병원체 별 병원성 발현의 정확한 메커니즘을 밝히지는 못하였으나 심각한 영향을 나타내는 것은 확인하였다. 연구 결과 혼합감염구가 단독감염구에 비하여 비장, 신장 조직에서 세균 수의 급격한 증가, 심각한 내부 장기의 손상, 혈액중의

AST 농도 증가, 유의적인 차이는 보이지 않았으나 라이소자임 활성의 저하 등이 병원성 발현에 중요한 요소로 작용하여 폐사율을 높인 것으로 생각된다. 이와 같이 양식어류에서 병원체의 혼합감염은 대량 폐사를 유발할 수 있으므로, 질병에 의한 피해를 최소화하기 위해서는 병어 진단 시 다각적인 분석을 통한 정확한 원인 파악이 요구되며, 또한 정확한 진단 결과를 토대로 한 적절한 처방이 필요하다고 생각된다.

[Fig. 4] Cumulative mortality of the olive flounder infected with *Edwardsiella tarda* (Single, E) or *Streptococcus iniae* (Single, S) alone and coinfectd with *E. tarda* and *S. iniae* (Mix, E+S) by intraperitoneal injection. Data expressed as cumulative percentage mortality against the post challenge time

IV. 요약

양식 넙치에 *Edwardsiella tarda* 또는 *Streptococcus iniae*를 단독 또는 혼합감염하여 넙치에서 병원성을 비교하였다. 넙치에 단독 또는 혼합감염 후 혈액생화학적 성상으로 alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), glucose 농도, total protein 농도를 조사하였으며, 라이소자임 활성, 신장과 비장 조직 중의 세균수, 조직 병리학적 변화와 누적폐사율을 조사하였다.

혼합감염구는 다른 시험구에 비하여 누적폐사율, 신장과 비장 조직 중의 세균수, AST활성과 병리조직학적 변화가 크게 나타났으나, 라이소자임 활성에서는 유의적인 차이가 보이지 않았다.

따라서 *E. tarda*와 *S. iniae*의 혼합감염은 신장과 비장 조직 중의 세균수 증가와 내부 장기의 손상으로 숙주에 높은 병원성을 나타낸 것으로 판단된다.

참고 문헌

- 김강웅·권문경·김경덕·김신권·박명애·손맹현 (2010). 배합사료가 양식장 넙치의 성장 및 건강도 향상에 미치는 영향, 수산해양교육연구 22, 529~536.
- 김은희(1999). 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)에서 분리된 *Edwardsiella tarda*의 약제내성 전달성 R plasmid, 한국어병학회지 12, 115~121.
- 김진우·정승희·박명애·도정완·최동림·지보영·조미영·김명석·최혜승·김이청·이주석·이창훈·방종득·박미선·서정수(2006). 2000년~2006년 하절기 양식어류의 병원체 감염현황. 한국어병학회지 19, 207~214.
- 김진우·조미영·박경현·원경미·최혜승·김명석·박명애(2010). 2005년부터 2007년 사이 양식 넙치, *Paralichthys olivaceus* 질병에 대한 통계 자료, 한국어병학회지 23, 369~377.
- 김현정·우승호·김진우·박수일(2005). *Streptococcus iniae*의 형태학적 특성과 병원성, 한국어병학회지, 18(2), 167~178.
- 정용욱·강철영·김민주·허문수·오덕철·강봉조 (2006). 제주지역 양식넙치의 연쇄구균증 발생 동향 및 원인균에 대한 분자적 동정, 한국미생물학회지 42, 199~204.
- 조미영·김명석·권문경·지보영·최혜승·최동림·박경현·이창훈·김진도·이주석·오윤경·이덕찬·박신후·박명애(2007). 2005년부터 2006년 사이 우리나라 양식 넙치, *Paralichthys olivaceus*의 세균성 질병에 대한 역학조사, 한국어병학회지 20,

- 51~60.
- 조미영·김명석·최혜승·박경현·김진우·박미선·박명애(2008). 양식 넙치(*Paralichthys olivaceus*) 질병에 대한 통계적 관찰, 한국어병학회지 21, 271~278.
- 하수진·우승호·이덕찬·박수일(2008). 넙치, *Paralichthys olivaceus*의 비특이적 방어기작에 대한 *Edwardsiella tarda*균의 반응, 한국어병학회지 21, 189~199.
- Ainsworth, A.J., and Chen, D.X.(1990). Differences in the phagocytosis of four bacteria by channel catfish neutrophils, Dev. Comp. Immunol., 14, 201~209.
- Barham, W.T., Smit, G.L. and Schoonbee, H.J.(1980). The hematological assessment of bacterial infection in rainbow trout *Salmo gairdneri*, J. Fish Biol., 17, 275~281.
- Canfield, P.J., Church, D.B. and Gallagher, C.H.(1985). Veterinary clinical enzymology: Laboratory aids for diagnosis and evaluation of disease, University of Sydney, Sydney, Australia.
- Chen, C.-Y., Gregory, A.W. and Paul, R.B.(2004). Comparative blood chemistry and histopathology of tilapia infected with *Vibrio vulnificus* or *Streptococcus iniae* or exposed to carbon tetrachloride, gentamicin, or copper sulfate, Aquaculture, 239, 421~443.
- Das, A., Sahoo, P.K., Mohanty, B.R. and Jena, J.K.(2011). Pathophysiology of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in *Puntius sarana*. Early changes in blood and aspects of the innate immune-related gene expression in survivors, 142, 207~218.
- Duncan, D.B.(1955). Multiple-range and multiple F tests, Biometrics, 11, 1~42.
- Grizzle, J.M. and Kiryu, Y.(1993). Histopathology of gill, liver and pancreas and serum enzyme levels of channel catfish infected with *Aeromonas hydrophila* complex, J. Aquat. Anim. Health., 5, 36~50.
- Hikima, J., Minagawa, S., Hirono, I. and Aoki, T.(2001). Molecular cloning, expression and evolution of the Japanese flounder goose-type lysozyme gene, and the lytic activity of its recombinant protein, Biochemical et Biophysica Acta, 1520, 35~44.
- Hirono, L., Tange, N. and Aoki, T.(1997). Iron regulated hemolysin gene from *Edwardsiella tarda*, Mol. Microbiol., 2, 851~856.
- Kusuda, T. and Kawai, K.(1998). Bacterial diseases of cultured marine fish in Japan, Fish Pathol., 33, 221~227.
- Moyner, K., Ored, K.H., Sevatdal, S. and Heum, M.(1993). Changes in nonspecific immune parameters in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., induced by *Aeromonas salmonicida* infection, Fish and Shellfish Immunol., 3, 253~256.
- Oh, M.-J., Kim, W.-S., Kitamura, S.-I., Lee, H.-K., Son, B.W., Jung, T.-S. and Jung, S.-J.(2006). Change of pathogenicity in olive flounder *Paralichthys olivaceus* by co-infection of *Vibrio harveyi*, *Edwardsiella tarda* and marine birnavirus, Aquaculture, 257, 156~160.
- Parry, R.M., Chandau, R.C. and Shahani, R.M.(1965). A rapid and sensitive assay of muramidase, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 119, 384~386.
- Saeed, M.O.(1995). Association of *Vibrio harveyi* with mortalities in cultured marine fish in Kuwait, Aquaculture, 136, 21~29.
- Saurabh, S. and Sahoo, P.K.(2007). Ich (white spot) disease in carps, Aqua International, 14, 27~19.
- Siwicki, A. and Studnicka, M.(1987). The phagocytic ability of neutrophils and lysozyme activity in experimentally infected carp, *Cyprinus carpio* L. Journal of Fish Biology, 31A, 57~60.
- Spanggaard, B., Huber, I., Nielsen, J., Nielsen, T. and Gram, L.(2000). Proliferation and location of *Vibrio anguillarum* during infection of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. J. Fish Dis., 23, 423~427.
- SPSS Inc.(1997). SPSS Base 7.5 for Window, SPSS Inc., 444N. Michigan Avenue, Chicago, IL, 60611.
- Ullah, M.A. and Arni, T.(1983). Pathological activities of the naturally occurring strains of *Edwardsiella tarda*, Fish Pathol., 3, 65~70.

- Wedemeyer, G. and McLeay, D.J.(1981). Methods of determine the tolerance of fishes to environmental stressors, In Stress in Fish, 247~275, Pickering, A.D., Academic Press, London.
- Wedemeyer, G.A., Barton, B.A. and McLeay, D.J.(1990). Stress and acclimation, In Methods for Fish Biology, 451~489.

-
- 논문접수일 : 2012년 07월 20일
 - 심사완료일 : 1차 - 2012년 08월 06일
 - 게재확정일 : 2012년 08월 08일