

대서양련어에서 세균성패혈증을 일으키는 병원체의 동정

박 수 찬

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《양어를 발전시키는것은 인민들의 식생활을 윤락하게 하기 위한 중요한 사업의 하나입니다. 양어를 대대적으로 발전시켜야 인민들에게 물고기를 많이 공급할수 있습니다.》
(《김정일선집》 증보판 제19권 158페이지)

대서양련어에서 세균성패혈증을 일으키는 병원체들은 *Aeromonas hydrophila*와 *Flavobacterium columnare*라고 알려져있다.[1]

그러나 최근에 나타난 세균성패혈증의 특징적인 증상은 등지느러미의 근육밑층을 후벼낸것과 같은 피저상으로서 이것은 종전의 증상과는 차이나며 병에 의한 치사률은 60% 이상에 달하였다.[4-7]

우리는 세균학적특성과 16S rRNA배열분석에 기초하여 대서양련어에서 세균성패혈증을 일으키는 병원체의 본태를 밝히기 위한 연구를 하였다.

재료와 방법

대서양련어의 병조부위로부터 세균과 DNA를 선행방법[2, 7]에 따라 분리하였다.

16S rRNA검정용공통프라이머[3]는 다음과 같다.

상류: 5'-TGGCGAACGGGTGAGTAAC-3'

하류: 5'-CAACGCGACAAACCACCTAC-3'

PCR증폭산물의 예상크기는 900bp이다.

염기배열분석자료에 대한 BLAST검색, 상동성 및 계통류연관계분석은 BLAST 2.0, DNA star를 리용하여 진행하였다.

분리동정한 세균의 병원성은 인공감염시험[7-9]으로 확인하였다.

결과 및 논의

1) 분리균주의 특성

분리균주들중에서 우세균주를 확정하기 위하여 균주들의 생리, 생화학적특성들을 조사하였다. 등지느러미, 가슴지느러미, 피부의 병조부위에서 분리한 균주들은 모두 그람음성의 포자가 없는 곧거나 약간 구부러진 막대균으로서 25℃의 LB배지에서 24h만에 성장하였다. 분리균주들은 형광색소양성이었으며 아질산염으로부터 질산염을 형성하지 않았다. 또한 젤라틴을 용해하지 않았으며 만니톨, 이노시톨, 소르비톨, 람노즈, 사카로즈, 아라비노즈, D-만노즈로부터 산을 생성하지 않았다. 이로부터 분리균주들을 *Pseudomonas putida*로 동정하였다.

2) 16S rRNA유전자배열의 PCR증폭

매 균주에서 분리한 게놈DNA와 16S rRNA검정용공통프라이머를 리용하여 PCR를 진행한 결과는 그림 1과 같다.

그림 1에서 보는바와 같이 등지느러미병조부위, 가슴지느러미병조부위, 피부병조부위에서 분리한 세균게놈DNA(이하 각각 미-1, 미-2, 미-3)의 PCR증폭산물들은 예상위치(900bp)에서 단일띠로 관찰되었다.

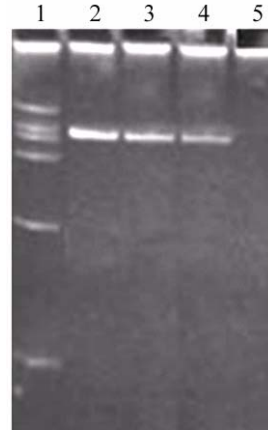


그림 1. 각이한 병조부위에서 분리한 세균게놈DNA의 PCR증폭산물에 대한 8% 폴리아크릴아미드겔전기영동상

1-DL-2000표식자, 2-등지느러미, 3-가슴지느러미, 4-피부, 5-음성대조

3) DNA염기배열분석에 의한 균동정

3개의 PCR증폭단편에 대하여 각각 DNA염기배열을 분석하고(그림 2-4) BLAST검색을 진행한 결과 우세균주는 모두 *Pseudomonas putida*였다.(BLAST검색자료의 그림은 주지 않음.)

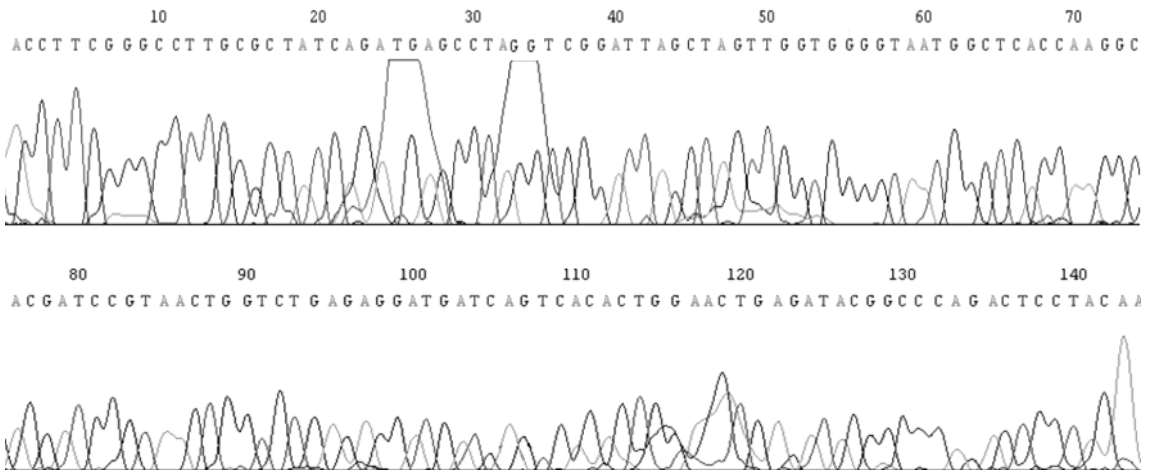


그림 2. 등지느러미병조부위에서 분리한 우세균주의 염기배열분석상

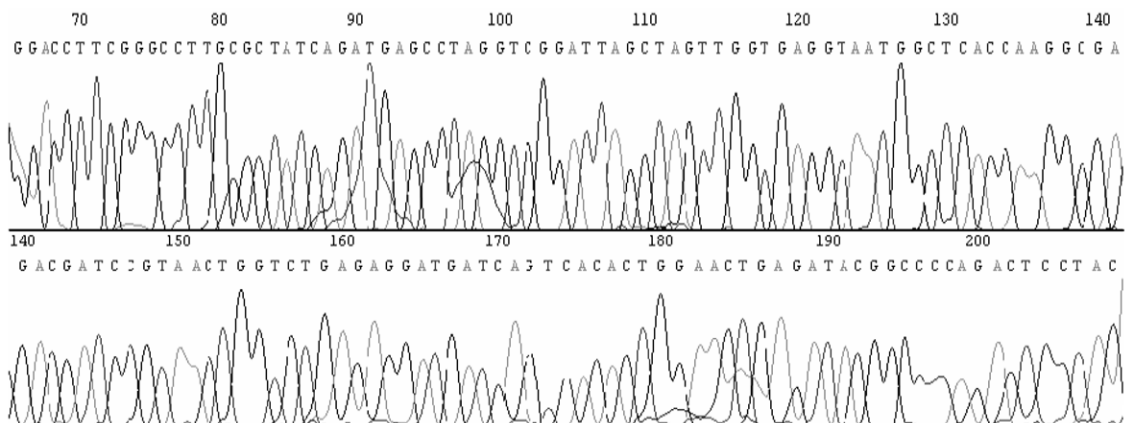


그림 3. 가슴지느러미병조부위에서 분리한 우세균주의 염기배열분석상

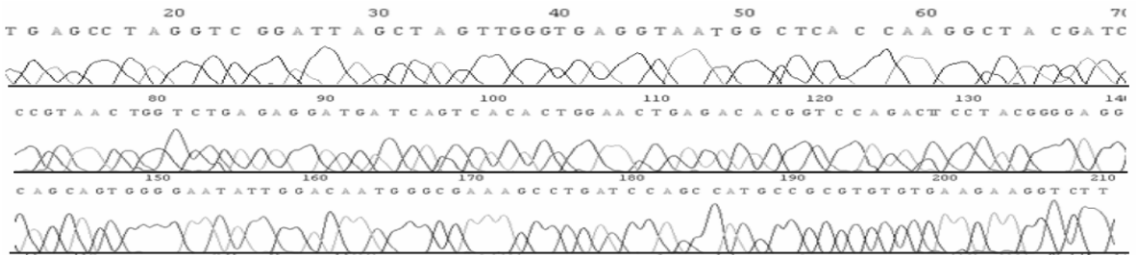


그림 4. 피부병조부위에서 분리한 우세균주의 염기배열분석상

P. putida 16S rRNA 유전자 배열과 상동성 분석을 진행한 결과 염기 일치률은 95.7~99.1%였다.(그림 5)

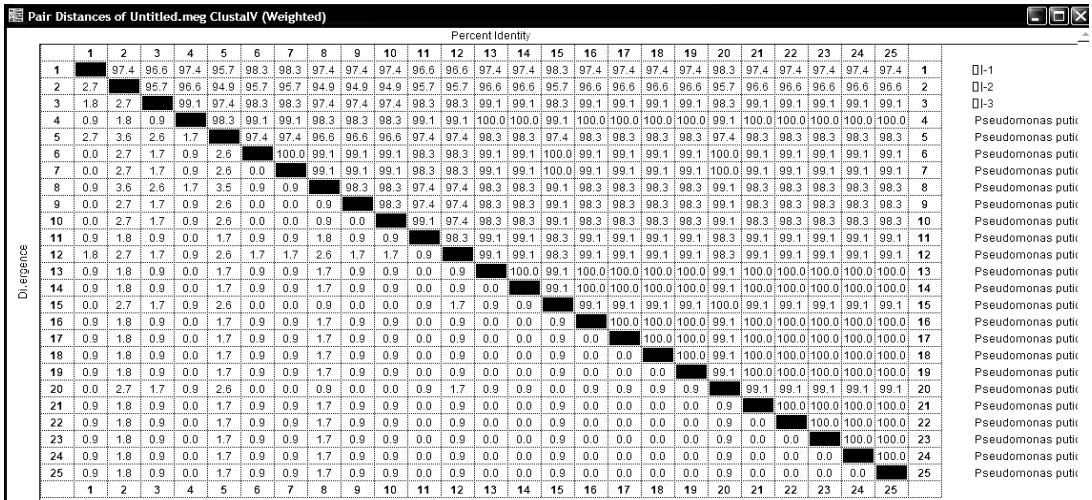


그림 5. 미-1, 미-2, 미-3의 배열들과 *P. putida* 16S rRNA 유전자 배열과의 상동성 분석결과

A. hydrophila, *F. columnare*, *P. putida* 16S rRNA 유전자 부분 배열들과의 계통류연관계를 분석한 결과는 그림 6과 같다.

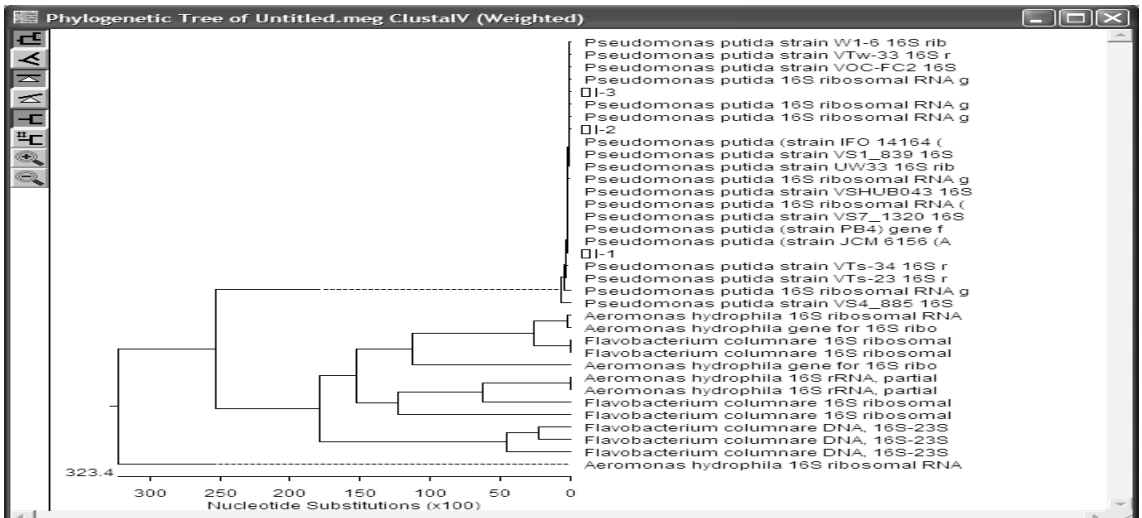


그림 6. 미-1, 미-2, 미-3의 계통류연관계 분석결과

그림 6에서 보는바와 같이 미-1, 미-2, 미-3은 모두 *P. putida*와 연이 가장 가까웠다.

4) 인공감염시험

5g정도되는 30마리의 대서양련어새끼고기를 LB배지에서 24h동안 자래운 *P. putida*(1.0×10^6 CFU/mL)로 인공감염시키고 120h동안 관찰한 결과 24h부터 죽기 시작하여 120h 만에는 치사률이 80%였지만 대조구에서는 등지느러미, 가슴지느러미, 피부에서 주목할만 한 병조가 보이지 않았다.

맺는 말

대서양련어에서 최근에 발생한 세균성패혈증의 원인균은 *P. putida*였다.
*P. putida*감염농도 1.0×10^6 CFU/mL에서 치사률은 80%였다.

참고 문헌

- [1] 손정철; 려어류의 바다양어, 과학기술출판사, 34, 주체103(2014).
- [2] 리근; 생물학, 2, 4, 주체103(2014).
- [3] K. Longnecker et al.; Microbiology, 35, 287, 2001.
- [4] E. Alicia et al.; Aquaculture, 246, 37, 2005.
- [5] Arne Storset et al.; Aquaculture, 272 S 1, 62, 2007.
- [6] Jia-Yi Zheng et al.; Reviews in Fisheries Science, 18, 1, 125, 2010.
- [7] A. Gibello et al.; Journal of Clinical Microbiology, 1, 526, 2005.
- [8] Ilhan Altinokin et al.; Aquaculture, 261, 850, 2006.
- [9] Nour Eissa et al.; American Journal of Bioscience, 2, 5, 175, 2014.

주체107(2018)년 10월 5일 원고접수

Identification of Pathogen Causing Bacterial Septicemia in Atlantic Salmon(*Salmo salar*)

Pak Su Chan

From the biochemical characteristics and result of 16S rRNA gene sequence analysis, we identified the causative bacteria isolated from the diseased fish as *Pseudomonas putida*.

The mortality of fish infected artificially by *Pseudomonas putida* was over 80% in 1.0×10^6 CFU/mL.

Key words: atlantic salmon, *Salmo salar*, *Pseudomonas putida*, bacterial septicemia