

639.3758  
L2936  
V.2

제 2차년도  
최종보고서

양식 조피볼락의 비특이적 방어력 증강에 관한 연구

Studies on the Increase of the Non-specific Self  
Defense Mechanism in Cultured Rockfish

군산대학교



농 립 부

## 최 종 보 고 서

1995년도 농림수산 특정연구사업에 의하여 완료한 “양식 조피  
블락의 비특이적 방어력 증강에 관한 연구”의 최종보고서를  
별첨과 같이 제출합니다.

- 첨부: 1. 최종보고서 8부  
2. 자체평가의견서 8부  
3. 최종보고서 디스켓 1매

1997. 12. .

주관 연구 기관: 군산대학교

총괄연구책임자: 박성우(인)

주관연구기관장: 군산대학교 총장

농 립 부 장 관 귀 하

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “ 양식 조피볼락의 비특이적 방어력 증강에 관한 연구”의 최종보고서로 제출합니다.

1997. 12. 10.

주관연구기관명: 군산대학교

총괄연구책임자: 박 성우

연 구 원: 김 영길

“ : 최 동림

# 요 약 문

## I. 제 목

양식 조피볼락의 비특이적 방어력 증강에 관한 연구

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

우리나라 해산어 양식의 선도적 역할을 담당하여 왔던 방어양식은 사료로 사용되는 잡어 가격의 상승, 겨울철 수온의 하강에 따른 월동의 어려움 및 수요의 대일 수출의존성 때문에 퇴조하고 대신 육상수조에서 유수식으로 양성하는 넙치가 해산어 양식의 주어종으로 자리 잡고 있으나 최근 생산과잉으로 어가가 하락하거나 질병이 빈발하고 있어 다른 품종으로의 전환이 요구되고 있다. 이러한 어민의 요구에 부합되는 어종이 조피볼락으로 종묘생산기술과 가두리 또는 육상수조에서의 양성법이 확립되어 새로운 해산 양식어종으로 각광을 받아 서해안과 남해안에서 종묘생산 및 양식이 이루어지고 있다. 그러나 종묘생산후 치어의 사육기간 동안과 양성중에 세균성으로 추정되는 질병에 의해 대량으로 폐사하여 종묘가격의 상승을 부채질하고 있어 양성은 소수의 어민에 한정되어져 있어 양식대상어종의 전환에 어려움을 겪고 있다. 그러므로 이러한 조피볼락의 종묘생산기의 대량폐사를 경감시키는 것이 조피볼락의 양식발전 뿐만아니라 어민의 소득과 직결시킬 수 있는 것이다. 그러나 현재 조피볼락의 질병에 관해서는 거의 연구된 바도 없어 어느 시기에 어떠한 질병이 발생되고 있는지 조사되지 않아 오로지 어민의 경험에 의존함으로써 어가의 비용지출

을 더욱 가중시키고 있다.

본연구에서는 양식 조피볼락의 종묘생산기와 가두리 이송 후의 양성기간 동안 대량폐사의 원인으로 추정되는 세균성질병에 의한 사망율을 줄이기 위한 대책을 수립하고자 종묘생산기에 발생하는 질병의 원인을 구명하고, 질병에 의한 폐사율의 감소책으로 종래에 사용하던 발병후의 약제에 의한 치료보다는 발병전에 어류가 지니고 있는 고유의 방어능력을 활성화 시키는 비특이면역증강제의 투여하는 방법을 확립함이 주 목적으로, 어민이 손쉽게 이용할 수 있는 투여 방법을 확립하게 됨으로서 질병에 의한 폐사를 감소시켜 조피볼락 종묘의 안정적 생산과 양성중의 생산율을 높일 수 있을 뿐만아니라 치료에 소요되는 약제 비용의 절감이 어민의 소득으로 되돌아옴으로 궁극적으로는 양식 경영의 수지 개선에 도움이 된다. 또 어종간에 차이는 있지만 고유의 생체방어 체계를 비특이면역증강제로 자극하여 질병에 대한 저항성을 증강시키는 어류의 양성기술의 신개념이 확산되어 질병의 예방적 측면과 식품의 안전성 확보라는 부수적 활용성도 기대할 수 있다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 양식 조피볼락 종묘생산기의 세균성질병의 원인을 구명하고 세균성 질병에 의한 폐사율을 감소시키기 위하여 비특이면역증강제의 투여법을 확립하는 것 등 2가지로 대별할 수 있다.

조피볼락은 종묘생산기술과 가두리 또는 육상수조에서의 양성법이 확립되어 새로운 해산 양식어종으로 각광을 받아 서해안과 남해안에서 종묘생산 및 양식이 이루어지고 있다. 그러나 종묘생산후 치어

사육기간 동안과 양성중에 세균성으로 추정되는 질병에 의해 대량으로 폐사하여 종묘가격의 상승을 부채질하고 있다. 그러므로 이러한 초기의 대량폐사를 경감시키는 대책의 수립이 절실히 요구되고 있으나 폐사의 원인에 관해서는 전혀 밝혀지지 않고 있다.

종묘생산기의 대량폐사의 원인 구명을 위하여 서해안의 종묘생산장에서 병어를 채집하여 원인균을 분리한 다음 병원성, 생물학적, 생화학적인 특성 및 병리조직학적인 고찰에 의해 병원균의 특성을 밝힌다.

어류 양식중 질병이 발생하는 것은 피할 수 없는 상황으로 현단계에서는 발병후 약제에 의한 치료에 의존하고 있기 때문에 치료약제의 선택과 치료기간등에 따라 치료가 불가능하게 될 경우도 있다. 본 연구에서는 이러한 발병후의 치료보다는 발병을 사전에 예방한다는 측면에 중점을 두고 어류가 지닌 고유의 방어체계를 자극하기 위하여 면역증강제의 투여를 강구하게 되었다.

비특이면역증강제의 투여법을 확립하기 위해서 비특이면역증강제의 투여농도, 투여방법, 투여기간을 설정하기 위하여 비특이면역증강제를 투여한 후, 병원균의 생균을 인위감염시킨 다음, 일정기간 동안의 생산율을 비특이 면역증강제의 투여에 저항성의 증가로 간주하여 판정의 기준으로 한다. 비특이면역증강제의 투여구와 미투여구를 일정시간 수송한 다음 생산율을 비교하고 수송후 방양한 다음 병원균의 생균을 인위감염시켜 생산율을 비교함으로써 비특이 면역증강제의 투여가 수송간 및 수송 후의 생산율에 미치는 영향을 조사하여 조피블락의 수송간 및 수송 후의 폐사량을 줄일 수 있는 가를 검토한다. 따라서 본 연구는 과학적인 영역보다는 현장 애로의 해결에 중점을 두고 있어 어민이 손쉽게 활용할 수 있는 방법을 강구하는데 중점을 두었다.

#### IV. 연구 개발 결과 및 활용에 대한 건의

조피블락의 종묘생산중에 폐사가 발생하는 것은 친어의 양부에서 오는 자어의 먹이붙임 능력의 부족, 먹이의 전환계열의 부적응에 의한 대량폐사가 있었지만 대량폐사의 주원인은 *Vibrio ordalii*의 감염에 의한 세균성 질병으로 조피블락의 종묘생산 과정중에 발생하는 질병중에서 가장 피해가 심각한 질병으로 사망률은 90%이상이었다.

이 병의 발생은 수온과 밀접한 관계가 있으며, 종묘를 사육하는 수온인 18-20℃를 주발생 시기로 하고 있어 그 피해는 더욱 심각한 것으로 나타났다. 이 질병을 비롯하여 주요어병세균인 *Edwardsiella tarda* 및 *Staphylococcus* sp.에 대한 저항성을 비특이면역증강제인  $\beta$ -glucan을 투여효과가 확실히 인정되어지는 주사에 의한 강제 투여 대신에 어민이 손쉽게 이용할 수 있는 먹이에 혼합하여 투여하기 위한 농도, 시간을 설정한 결과  $\beta$ -glucan을 사료건중량의 1%로 배합 사료에 혼합하여 투여하면 투여 20일부터 질병에 대한 저항성이 증가되며, 투여기간이 길수록 질병에 대한 생산율도 높아져 50일간 투여하는 것이 가장 효과적이었다. 또  $\beta$ -glucan을 많이 함유하고 있으면서 값싼 제빵용 효모를 배합사료에 10%첨가 50일간 투여하는 것도 미첨구에 비해 생산율을 높일 수 있는 것으로 나타나 앞으로 제빵용 효모의 어체에 대한 흡수도를 증가시키는 처리법만 확립된다면 값싼  $\beta$ -glucan의 공급원이 될 가능성도 있는 것으로 생각된다.

$\beta$ -glucan을 첨가하여 투여한 종묘는 수송중 또는 수송후의 종묘의 생산율에도 영향을 끼쳐 투여한 종묘가 수송후 종묘의 생산율이 높게 나타났다. 그러나 수송후 병원균에 대한 저항성을 증강시키지는 못하

기 때문에 수송후 종묘를 수용하는 수조의 환경에 세심한 관심을 기울여야 할 것으로 생각된다.

## SUMMARY

To establish a method to decrease the mortality of rockfish fingerling by bacterial infections, the effectiveness of  $\beta$ -glucan administrated by oral and immersion routes as a non-specific immunomodulator against bacterial diseases was evaluated.

As there was no available information on the diseases occurred during the seedling production of rockfish, we scrutinized moribund or dead fish to investigate the cause of mass mortality in some fisheries hatcheries in Chungnam and Chunbuk province.

The causative organisms isolated from the diseased fingerlings was identified as *Vibrio ordalii* on the basis of biochemical and biological characteristics.

Vibriosis by *Vibrio ordalii* infection was an acute disease of rockfish fingerlings during artificial seedling production. The clinical signs include listless swimming with the head up and tail down around the draining hole, petechial hemorrhages in the isthums and the inside of the operculum, but any external symptoms were invisible to the naked eyes in many cases.

In the pathogenesis test against 0- and 1-summer fish at two different temperatures, 18°C and 25°C, *Vibrio ordalii* showed higher virulence to 0-summer fish than 1-summer fish at both temperatures.

Histopathologically there were telangiectasis of the secondary gill lamellae and brain, dissection of the respiratory epithelium, atrophy of the hepatic cells, and necrosis of the kidney associated with the presence of the bacteria. But no significant changes occurred in the alimentary tracts of the diseased fish.

Glucan, a polysaccharide made up of glucose units linked in a

special way, is known to have a stimulating effect on disease resistance in both plants and animals, including fish. We undertook these experiments to establish the optimum dose and duration of feeding with glucan.

After fish were fed the pellets supplemented with 0,5% or 1%  $\beta$ -glucan for 20, 30, and 50 days, *V. ordalii* were intramuscularly challenged with a lethal dosage. And the mortality was monitored for 10 days. The mortalities were lower in all populations fed glucans, with the best effect seen in the fish fed glucans for 50 days, giving an overall reduction in mortality. The lower the bacterial concentration was challenged and the longer the periods was administered, the lower the mortality resulted in.

When *E. tarda* or *Staphylococcus epidermidis* was intraperitoneally injected in the fish fed glucans for 50 days, the mortality by *Staphylococcus epidermidis* greatly decreased but by *E. tarda* did not change.

Further experiments were undertaken to know whether the addition of bakery yeast, reported to contain a lot of glucan in the cell wall, can reduce the mortality. The effect of the additive on disease resistance was not available in comparison with glucan.

The fish fed glucan or bakery yeast for 50 days survived much more than the control-fed fish but the increase in the resistance against an artificial *Staphylococcus epidermidis* injection was not found.

These results indicate that vibriosis by *Vibrio ordalii* is

the most serious disease of rockfish for artificial seedling production, that the addition of 1% glucan as a non-specific immunostimulant to an available commercial pellets for 50 days results in a good survival rate during the artificial seedling production and after transport of the fingerlings.

## CONTENTS

Chapter 1. Introduction	15
Section 1. Introduction	15
Section 2. Diseases occurred during artificial seedlings production	17
Materials and Methods	17
Results and Discussion	18
Chapter 2. Outbreak of Vibriosis resulted in mass mortality of rockfish fingerlings	25
Introduction	25
Materials and Methods	26
Results and Discussion	29
Chapter 3. Increase of non-specific self defense in rockfish by glucan administration	43
Section 1. Introduction	43
Section 2. Establishment of administrating methods	45
Introduction	45
Materials and methods	45
Results	49
Discussion	54
Section 3. Resistance against bacterial disease and survival rate after transport in the fish orally administrated $\beta$ -glucan	59
Materials and methods	59
Results and discussion	63
Summary	78
References	81

## 目 次

제 1 장 서론	15
제 1 절 서언	15
제 2 절 종묘생산시기의 질병	17
1. 재료 및 방법	17
가. 조사지역	17
나. 조사방법	17
2. 결과 및 고찰	18
가. 종묘생산시기	18
나. 종묘생산의 먹이	18
다. 대량폐사의 발생	20
제 2 장 대량폐사의 원인인 비브리오팀	25
1. 서언	25
2. 재료 및 방법	26
가. 원인균의 분리	26
나. 분리균의 특성	26
다. 약제감수성	27
라. 병원성	27
마. 병리조직학적 검사	28
3. 결과 및 고찰	29
가. 발병의 개요	29
제 3 장 비특이적 방어력의 증강	43
제 1 절 서론	43
제 2 절 비특이면역증강제 투여방법의 검토	45
1. 서론	45

2. 재료 및 방법	45
가. 어류	45
나. $\beta$ -glucan의 투여	46
(1) 경구투여	46
(2) 침지	46
(가) $\beta$ -glucan 단독침지	46
(나) 포르말린 사균과 $\beta$ -glucan의 혼합침지	46
다. 병원균의 인위감염	47
(1) 병원균 및 배양	47
(2) 인위감염	47
3. 결과	49
가. 경구투여	49
나. 침지투여	49
(1) 글루칸 단독침지	49
(2) 포르말린 사균과 $\beta$ -glucan의 혼합침지	54
4. 고찰	54
제 3 절 $\beta$ -glucan의 경구투여 효과와 이송후의 생잔율	59
1. 재료 및 방법	59
가. 공시어	59
나. 글루칸과 빵효모의 경구투여	59
다. <i>Vibrio ordalii</i> 의 인위감염에 대한 생잔율	60
라. <i>E. tarda</i> 와 <i>S. epidermidis</i> 의 인위감염에 대한 생잔율	60
마. 수송에 따른 생잔율 비교	61
2. 결과 및 고찰	63
요약	78
참고문헌	81

# 第 1 章 緒 論

## 第 1 節 緒 言

海産魚 養殖의 주어종이었던 방어는 種苗確保의 困難과 越冬의 困難으로 인해 현재 넙치가 해산어 양식의 主魚種으로 되어 있다. 그러나 넙치도 過剩生産과 業體의 亂立등으로 魚價가 不安定하기 때문에 새로운 魚種인 조피볼락, 농어, 승어으로의 轉換이 이루어지고 있다.

이 중 조피볼락은 種苗生産技術이 確立되어 우리나라 南海岸 및 西海岸의 海上가두리 또는 陸上水槽에서 養殖되고 있다. 그러나 養殖의 集團化와 飼育時의 高密度 飼育으로 지금까지 문제시되지 않았던 疾病인 비브리오병, 포도상구균 및 連鎖狀球菌病등의 細菌性疾病과 寄生性疾病이 매년 되풀이되어 發生되고 있으며, 특히 육상의 種苗生産場에서의 종묘사육시 및 種苗를 養成用的 가두리로 移送한 직후인 6월부터 7월에 걸쳐 大量으로 斃死하는 疾病의 原因으로는 細菌性疾病의 感染에 의한 것으로 推定되어져 藥劑의 投藥에 의한 治療를 실시하고 있지만, 再發하는 傾向으로 조피볼락 양식의 큰 障礙要因으로 대두하고 있다.

지금까지 알려진 조피볼락의 細菌性疾病은 日本의 경우 *Vibrio ordalii*에 의한 비브리오병, 연쇄구균증, 滑走細菌症등이 報告되어 있지만, 우리나라에서의 種苗生産期 및 가두리 移送後의 大量斃死의 原因에 관한 調査도 이루어지지 않아, 大量斃死에 관한 解決策은 전무하다. 그러므로 종묘생산기와 양성용가두리에 이송후의 대량폐사로 殘存量의 絶對的 不足으로 種苗價格의 上昇을 부채질하고 있는 實情으로 이러한 初期 대량폐사를 輕減시키는 方策 또는 發病의 豫防策이 絶실히 要求되고 있다.

따라서 本 研究는 조피블락의 種苗生産期와 가두리 수용직후의 大量斃死의 原因으로 추정되어지고 있는 細菌性疾病에 의한 死亡率을 減少시키는 方策을 確立하기 위하여, 우선 종묘생산기에 발병하는 疾病의 原因을 究明하기 위하여 時期別로 疾病의 發生推移를 調査함과 아울러 被害가 심각한 疾病의 原因을 구명하기 위하여 原因菌을 分離 同定하여 原因균의 特性을 明白히 한다. 또 조피블락을 비롯한 모든 魚類의 稚魚는 아직 生體에 防禦能力이 完備되지 못한 狀態에서 새로운 環境의 適應不調에서 비롯된 防禦能力의 低下가 初期減耗의 主原因임으로 종래부터 예방대책을 강구하여 오고 있지만 效能에 制限 要因이 많아 實用化가 되지 않고 있는 백신처리에 의한 特異的 防禦力 增強 대신에 生體의 非特異的 防禦能力을 증강시키는 方法으로 斃死率을 最小化시키고자 한다. 이를 위하여 非特異免疫增強劑의 混合處理가 가장 有效할 것으로 判斷되어 종묘사육기동안의 處理方法, 處理期間, 處理濃度 등을 設定하여 細菌性疾病에 의한 斃死率을 최소화시키고 어민이 손쉽게 사용할 수 있는 方策을 樹立하기 위하여 實施하였다.

## 제 2 절 種苗生産時期의 疾病

조피볼락(*Sebastes schlegeli* Hilgendorf)은 우리나라 全沿岸에 널리 分布하는 卵胎生의 魚類로 低水溫에 강하고 成長이 비교적 빠르기 때문에 넙치 單一種에 偏重되어 있는 海산어 양식의 過剩生産에 의한 魚價 下落의 脫皮 또는 조피볼락에 대한 需要의 增大로 새로운 양식 대상종으로 注目을 받아 왔다. 그러나 人工 種苗生産技術의 未確立으로 조피볼락의 양식은 커다란 發展을 하지 못하고 있었다.

日本의 경우도 비슷하여 1970년頃부터 種苗生産에 대한 基礎的 연구를 실시하여 1981년에 비로소 生殘率 90%以上の 大量生産이 可能하게 되었다(清水·八幡, 1991). 우리나라에서는 1988년부터 國立水産振興院에서 人工種묘생산 技術開發에 착수하여 현재 어느정도의 種苗는 確保하고 있으나 生産이 不安定하여 完全하게 技術이 確立되었다고는 할 수 없는 實情이다. 또 種묘생산중에 發生하는 질병으로서 일본에서 비브리오팀과 連鎖球菌病이 보고되어 있지만(室賀 등, 1986; 酒井 등, 1986; 文谷·星合, 1987), 우리나라에서는 조피볼락의 疾病에 관해서는 전혀 調査된 바가 없다. 그러므로 본 연구에서는 우리나라 種苗生産過程中的 大量斃死의 發生時期와 그 原因을 조사하였다.

### 1. 材料 및 方法

#### 가. 調査地域

1996년 5월부터 8월까지 매월 2회씩 총 8회에 걸쳐 忠南 태안군, 忠南 보령시, 全北 고창군의 種苗生産場(Fig. 1)을 對象으로 실시하였다.

#### 나. 調査方法

飼育中인 조피볼락을 採集하여 體長, 體重을 測定하고 飼育水의 水

溫을 測定하였다. 試料은 現場에서 70%알콜솜으로 魚體表面을 消毒한 다음, 슬라이드 글라스위에 놓고 注射器의 바늘을 이용하여 어체로부터 肝, 腎臟, 脾臟, 腦를 떼어내어 Brain heart infusion寒天培地 (BHIA), Trypticase soy 寒天培地(TSA)에 塗抹 接種한 다음 實驗室로 運搬하여 25℃에서 2-3일간 培養하였다. 또 一部の 어류는 氷藏한 다음 실험실로 옮겨 寄生蟲의 觀察에 사용하였다. 또 사육일수별 飼料의 轉換過程도 아울러 調査하였다.

## 2. 結果 및 考察

### 가. 種苗生産 時期

종묘생산을 시작하는 시기는 地域에 따라 差異가 보이는데 이는 水溫과 密接한 關係가 있어 自然海水의 水溫이 16℃以上되는 時期에 種苗生産을 시작함으로 전북 고창지역이 3월 中旬頃, 충남 보령지역이 4월 初旬, 충남 태안지역이 4월 中旬頃으로 남쪽이 빠르고 북쪽으로 갈수록 늦어지는 傾向으로 全北과 忠南이 약 1개월의 차이가 났다. 그러나 泰安지역의 1개소에서는 自然海水를 加溫하여 18℃를 維持하면서 3월 中旬경부터 種苗生産을 시작하는 곳도 있었다.

仔魚가 産出된 후 대개 60일-70일 정도 飼育하여 養成用 種苗로서 販賣하고 있는데, 종묘생산을 시작하는 것이 빠르면 빠를수록 판매면에서 有利하기 때문에 종묘생산에 着手하는 시기는 점점 빨라질 것으로 생각되지만, 이 때는 加溫이 必要함으로 加溫에 대한 追加 經費負擔이 決定的인 要因으로 作用하고 있었다.

### 나. 種苗生産期の 먹이

종묘생산기의 먹이는 종묘의 成長, 生殘率 및 疾病의 發生과 密接

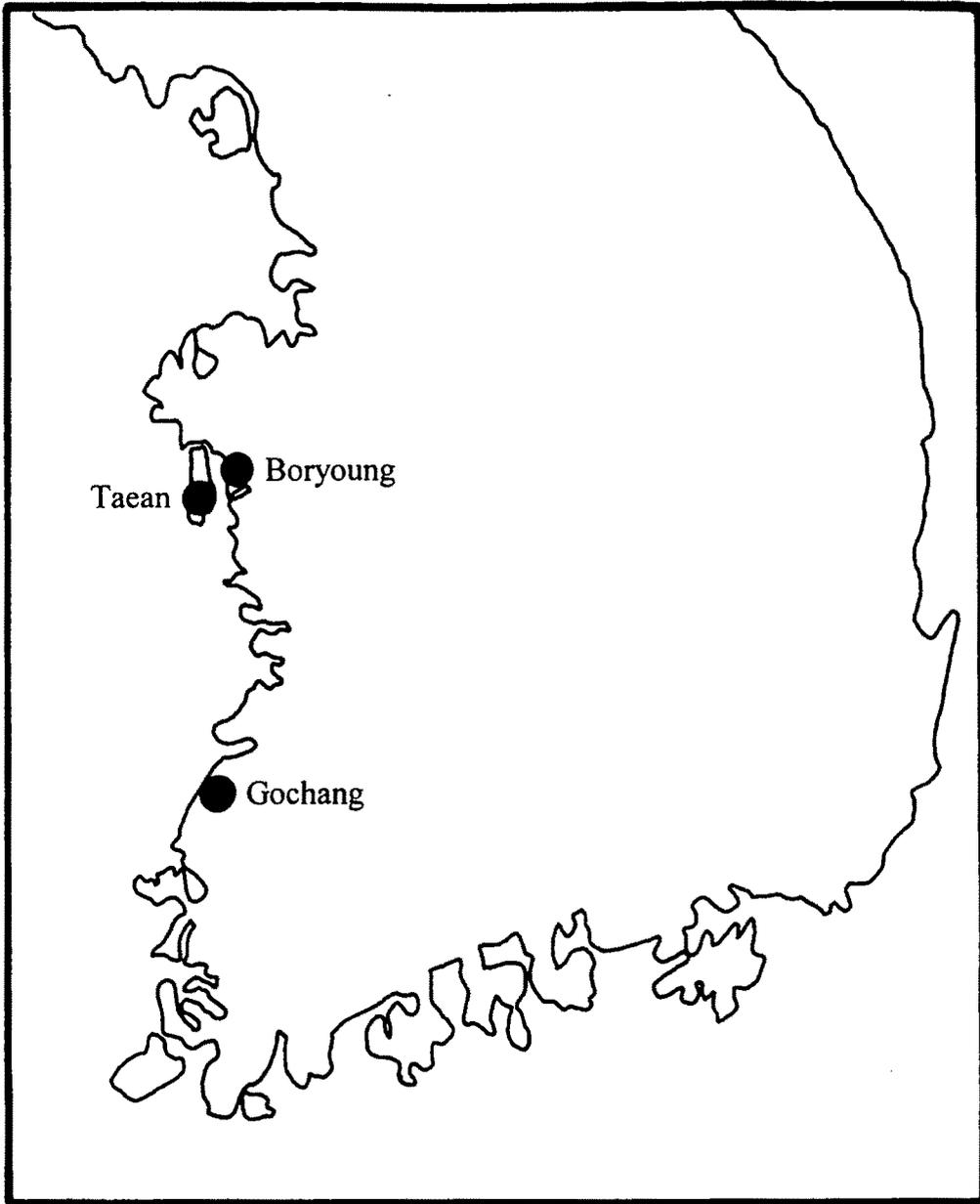


Fig. 1. The sampling stations in this study.

한 關係가 있는데 基本的인 먹이의 投與形態는 다른 海産魚 종묘생산 과정의 먹이 공급 系列인 輪蟲-Artemia 孵化幼生-配合飼料와 一致하고 있었다. 그러나 조피볼락은 다른 魚類와 달리 卵胎生이기 때문에 仔魚의 産出當日 또는 翌日부터 먹이를 投與하는 것이 特徵的으로 Fig. 2에 나타낸 것처럼 먹이공급계열이 地域的으로 약간의 차이가 있었다. 즉 全北 高敞지역에서는 仔魚 産出 翌日부터 輪蟲을 투여하는데 10日齡부터 投與量을 점차 감소시키는 대신에 Artemia부화유생의 양을 增加시켜 12日齡부터는 輪蟲의 供給을 中斷하고 30日齡 까지 Artemia 孵化幼生을 먹이로 사용하며 그 후부터는 완전히 配合飼料만을 投與한다.

충남 보령지역의 種苗生産場에서는 仔魚산출 익일부터 7일령까지 輪蟲을 먹이로 투여하고 7日齡부터는 輪蟲의 양을 줄이는 대신에 Artemia 孵化幼生과 配合飼料를 투여하기 시작하여 15日齡부터는 輪蟲의 공급을 中止하고 Artemia 孵化幼生과 配合飼料를 混合投與하다가 22일령부터는 완전히 配合飼料만으로 飼育하고 있었다.

충남 태안지역에서는 仔魚産出 當日 또는 翌日부터 輪蟲을 투여하기 시작하여 7日齡부터 Artemia 孵化幼生과 配合飼料로 바꾸어서 30日齡까지 사육하고, 30日齡부터는 완전히 配合飼料만으로 사육하고 있었다.

#### 다. 大量斃死의 發生

種苗生産 과정에서 大量斃死가 發生하는 시기는 Fig 2에 表示한 것처럼 種苗生産의 着手時期에 關係없이 仔魚産出후 1일, 7일, 22일의 3번의 大量斃死가 생기는 것으로 나타났다.

仔魚産出 1일후의 斃死魚에서는 原因으로 생각되는 病原體의 발견

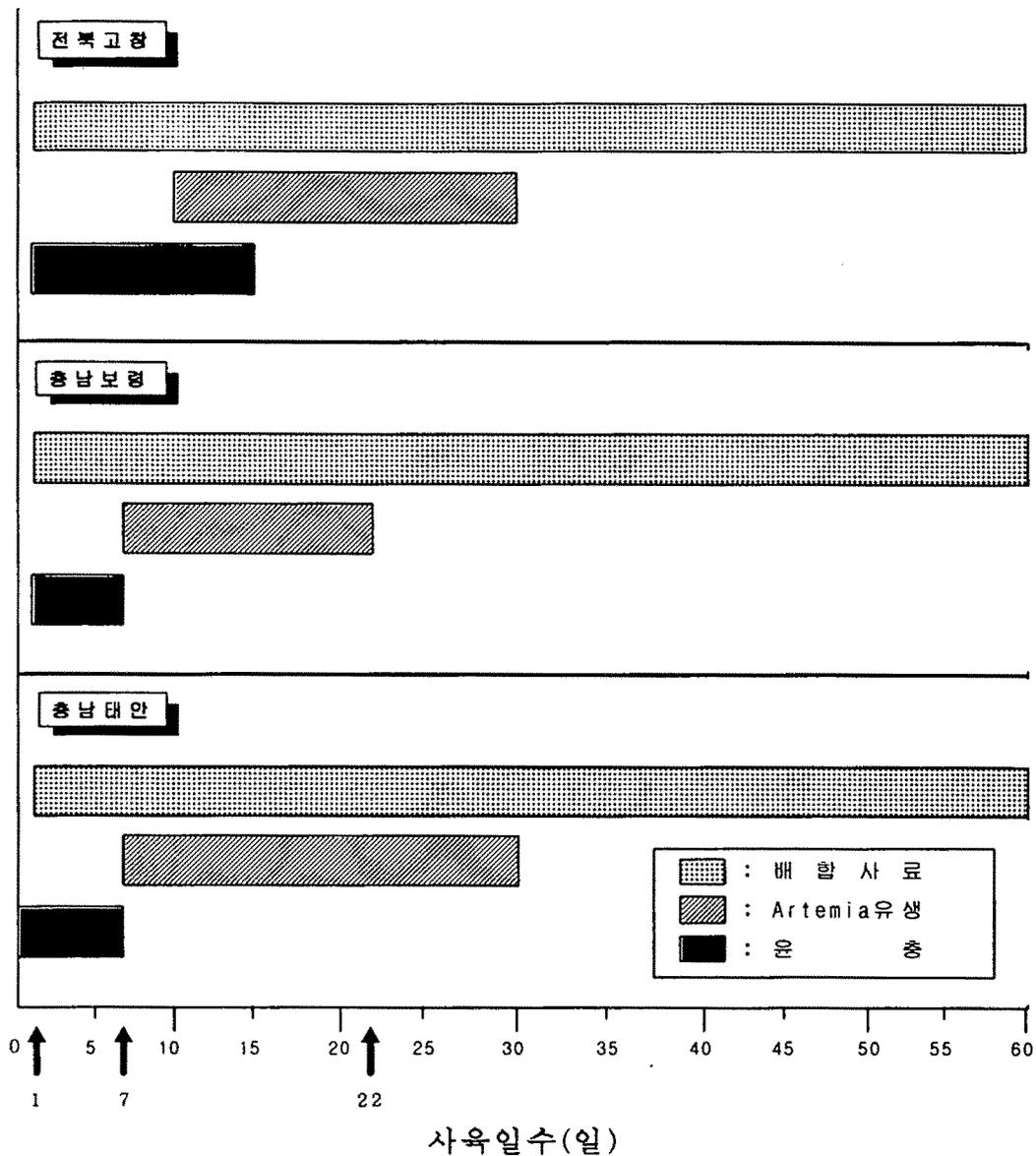


Fig. 2. Comparison of the diets fed rockfish fingerlings in the three different hatcheries during artificial seedling production. ↑ means the day after hatching occurred the mass mortality of fingerlings.

은 없어 産出後 投與되는 먹이불임에 適應하지 못한 것에 기인되는 것으로 생각된다.

자어산출 7일후의 大量斃死는 地域간에 斃死量에 차이가 있으며 또한 原因體로 여겨지는 病原生物이 발견되지 않아 먹이 轉換에 따른 不適應에 의한 것으로 생각된다.

자어 산출후 22일경에 大量斃死가 발생하는데 이 때의 원인은 Vibrio군의 감염에 의한 細菌性 疾病으로 死亡率은 곳에 따라 다르긴 하지만 80%이상으로 種苗의 生殘率에 커다란 影響을 미치는 매우 중대한 疾病임이 밝혀졌다. 이병에 대해서는 다음 章에서 상세히 취급한다. 또 이시기에 모든 種苗生産場에서 發病하는 것은 아니며 같은 時期에 産出한 仔魚를 나누어 收容한 水槽의 一部에서만 發病되며 死亡率이 10-20%前後의 細菌性 疾病도 發病하였다. 이병은 特異한 外部 症狀은 없으면서 遊泳能力이 저하되고 먹이섭취가 不良하며 頭部後方의 體色이 退色되며 肛門에 粘液便을 달고 다니는 것이 特徵으로 水槽의 바닥이나 酸素 供給用 호스에 粘液便이 엉켜 매우 不潔한 狀態였다. 病魚를 채취하여 TSA로 原因菌을 分離 培養한 結果 25℃, 48시간후에 直徑 2mm전후의 黃色粘稠性이 강한 不透明의 정원형, 隆起 集落이 形成되어 배양학적 性상, 형태학적 性상 및 기초적 생물학적 性상을 調査한 결과 *Pseudomonas* sp로 판명되었다(Table 1). -80℃에 保存하였던 原因菌을 TSA에 25℃, 48시간 배양한 다음 濕菌重量으로 10mg/ml의 生菌液을 만들어 0.1ml를 體長 2cm前後의 조피볼락의 腹腔에 注射한 다음 25℃로 飼育하면서 10일간 觀察하였으나 斃死는 일어나지 않아 飼育條件에 따라 發病되는 것으로 推定되며, Oxytetracycline 200ppm에 1時間 藥浴으로 본 병을 治療할 수 있어 문제시되는 질병은 아니며, 다른 養殖魚類의 슈도모나스병과 마찬가지로

Table 1. Biochemical characteristics and drug sensitivities of the *Pseudomonas* sp. isolated from the diseased rockfish fingerlings

	Strains	
	B-1	B-2
Gram	-	-
Flagella	+	+
O-F	0	0
Oxidase	+	+
Catalase	+	+
H <sub>2</sub> S	-	-
Nitrate	-	-
Indole	-	-
Methyl red	-	-
V-P	-	-
Gelatin liquefaction	+	+
Starch hydrolysis	-	-
Sensitivity to		
Nalidixic acid	++	++
Chloramphenicol	+++	+++
Oxolinic acid	++	++
Tetracycline	+++	+++
Ciproxacin	+++	+++

지로 消化不良, 불철저한 바다청소 및 過密飼育에 기인되는 질병으로 飼育環境을 깨끗하게 維持하고 密植과 過食을 防止하면 發病은 없을 것으로 생각된다.

조피블락의 種苗生産에 있어 가장 問題點으로 제기되고 있는 것은 親魚의 確保問題로 대부분의 種苗生産場에서는 定置網으로 逮捕한 어미를 親魚로 사용하고 있기 때문에 어미의 健康狀態에 따라 仔魚의 生存率이 影響을 받고 있음은 잘 알려진 사실이다(황 등, 1992). 또 仔魚가 産出된 다음 飼育中에 生殘率을 低下시키는 要因으로서는 初期의 먹이 공급 系列(황 등, 1992), 먹이 轉換期(소 등, 1992), 飼育 密度(岩田 과 芦立, 1982; 이 와 고, 1992), 配合飼料의 投與時期와 期間(김 과 박, 1992)등과 關聯이 깊다는 것이 밝혀졌지만, 疾病과 관련시켜 生殘率을 檢討한 報告는 없다.

그러므로 조피블락의 種苗生産에 있어 仔魚의 生殘率을 높이기 위해서는 良質의 親魚 確保와 飼育管理에 重點을 두어야 하겠지만, 養殖中에 疾病이 發生하는 것을 防止할 수는 없다. 따라서 特定 魚種에 頻發하고 斃死率이 높은 疾病에 대한 原因究明과 豫防對策은 確立되어야만 하며, 疾病發生시 死亡率을 最小化시킬 수 있는 方策이 講究되어져야만 한다.

## 第 2 章 大量斃死의 原因인 비브리오病

### 1. 緒言

비브리오병은 淡水魚 海産魚를 불문하고 感染되는 疾病으로 그 原因菌의 대부분은 *Vibrio anguillarum*에 의한 것으로 報告되고 있다.

그러나 *V. anguillarum*과는 性狀에서 차이가 나는 *Vibrio*균이 연어 송어류에서 分離되어져 *Vibrio* sp. RT group(大西와 室賀, 1976), *Vibrio* sp 1669(Harrell et al., 1976)로서 보고되어, 分類上의 位置가 애매한 상태로 남아 있기 때문에 Schiewe et al.(1977)은 *Vibrio anguillarum* biotype 2로 *Vibrio anguillarum* biotype 1과 區分하여야만 한다고 主張하였지만, Schiewe et al.(1981)은 이들 菌主의 性狀을 조사하여 *V. anguillarum*과는 生化學的, 血清學的 및 遺傳學的으로 明白한 차이가 있기 때문에 *Vibro ordalii*라는 새로운 種名을 附與하여야만 한다고 提案하였다.

*V. ordalii*는 冷水性魚族인 연어 송어류외에 分類學上 연어과 어류에 가까운 은어에서 發生된 예가 있을 뿐이었으나(室賀 등, 1986), 海産魚인 조피블락에서도 이 균에 의한 感染症이 報告되어지고 있다.(室賀 등 1986; 文谷 등, 1987).

우리나라에서도 조피블락의 種苗生産技術이 확립되어 陸上의 水槽에서 種苗크기까지 成長시킨 다음 가두리로 養殖하고 있는데, 종묘사육중 또는 가두리로 移植시킨 직후에 大量斃死가 일어나고 있지만, 그 原因에 관해서는 不明한 狀態로 남아 있다.

연구자들은 충남과 전북의 조피블락의 種苗生産場에서 종묘사육중에 발생한 大量斃死의 原因을 조사한 결과 *V. ordalii*의 感染症임을

밝혀내고, 原因菌의 性狀과 病理組織像에 대하여 報告한다.

## 2. 材料 및 方法

### 가. 原因菌의 分離

1995년 5월 23일 충남 태안과 1996년 6월 22일 충남 보령의 조피블락 養魚場의 陸上水槽에서 飼育中인 平均體長이 각각 1.8cm(1.5-2.8cm)과 3.1cm(2.8-3.4cm)의 病魚의 腎臟, 脾臟, 肝臟, 腦 및 血液으로 부터 Brain heart infusion agar(BHIA)를 使用하여 25℃에서 48時間 培養하여 原因菌을 分離하였다. 또 病魚의 腦의 스탬프 標本에 대하여 Gram染色을 實施하였다.

### 나. 分離菌의 特性

태안의 病魚에서 分離한 7個 菌株, 보령의 病魚에서 分離한 4菌株와 對照群으로 *V. ordalii*(ATCC 33509) 및 日本養殖研究所에서 분양받은 *V. anguillarum*(A-10, 방어유래)를 使用하였다.

分離菌의 性狀檢査는 食鹽 2%添加 BHIA培地에 25℃, 48시간 培養菌을 使用하여 常法에 따라 實施하였다. 發育에 미치는 食鹽濃度의 影響은 1% 펩톤水를 基礎培地로 하여 食鹽을 0%, 0.5%, 1.5%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%添加하여 각각 서로 다른 食鹽濃度의 펩톤水를 만든 후, 2% 食鹽添加한 BHIA培地에서 24時間 前培養한 菌을 接種하여 25℃에서 48시간 배양한 후, 濁度로서 菌의 發育有無를 判定하였다. 또 2% 食鹽添加한 BHIA培地에 37℃와 42℃에서 48時間 培養하여 菌의 發育有無를 조사하였다. 한편 市販培地에서의 發育有無는 Nutrient agar(NA), Tryptic soy agar(TSA), Heart infusion agar(HIA), BHIA에 食鹽의 最終濃度가 0.5%와 2%가 되도록 添加한

平板培地와 Thiosulfate-citrate-bile-salt-sucrose agar(TCBS)에  
接種한 다음 25℃에 24時間과 48時間 培養한 후 자라난 集落의 直徑  
을 칼리퍼로 測定하였다.

#### 다. 藥劑感受性

泰安 由來의 菌株(95-5)를 2%食鹽添加 BHIA에 接種하여 25℃에서  
48시간 培養한 다음 白金耳로 菌態를 採取하여 滅菌生理食鹽水에 浮  
遊시켜, MacFarland No. 0.5에 浮遊液의 濁度를 調整한 菌液을 만들  
었다. 이 菌液을 綿棒에 적서 Muller-Hinton寒天平板培地에 끌고루  
塗抹한 다음 市販의 藥劑디스크(BBL)를 無菌的으로 얹어 25℃에서 24  
시간 培養하였다. 디스크주위에 形成된 阻止帶의 直徑을 칼리퍼로  
測定하였다. 또 市販되지 않는 norfloxacin과 ciprofloxacin은 본 實  
驗室에서 디스크를 만들어 사용하였다. 즉 大成微生物(株)에서 分與  
받은 norfloxacin粉末(99.8%)藥劑와 신일(주)의 動物用 注射液(力  
價, 50mg/ml)을 滅菌生理食鹽水에 稀釋시킨 다음 直徑 6mm의 濾過紙  
(Adventec)에 20 $\mu$ l씩 吸水시켜 最終濃度가 각각 1 $\mu$ g과 5 $\mu$ g인 디스크  
를 만들어 37℃에서 乾燥시켜 사용하였다.

#### 라. 病原性

泰安 由來의 95-5菌株를 食鹽 2%添加한 BHIA平板培地에 25℃에 24  
시간 培養한 다음 자라난 菌體를 滅菌生理食鹽水에 浮遊시킨 다음,  
10 l의 海水가 들어 있는 유리수조에 添加하여 菌의 濃度가  $2 \times 10^9$ cfu/ml,  
 $2 \times 10^8$ cfu/ml,  $2 \times 10^7$ cfu/ml,  $2 \times 10^6$ cfu/ml,  $2 \times 10^5$ cfu/ml  
가 되도록 調整하여 30분간 通氣하면서 沈漬하였다. 또 같은 濃度로  
滅菌生理食鹽水에 懸탁시킨 菌액 0.1ml를 등지느러미 밑의 筋肉에 注

射하였다. 사용한 조피볼락은 體長 3.0cm(2.5-3.5cm)의 當年生과 체장 10.7cm(9.5-11.2cm)의 1년생 조피볼락 각 20미씩 이었으며, 水溫은 18℃와 25℃의 두 水溫에서 實施하였다. 沈漬 또는 筋肉注射한 어류는 直徑 500 ℓ의 FRP水槽에 流水式으로 10日間 飼育하면서 死亡率을 구하였다.

#### 마. 病理組織學的 檢査

病魚를 10% 中性포르말린에 固定하거나 또는 10% 中性 포르말린에 固定후 Ransom et al.(1984)의 方法에 따라 70% 에탄올에 鹽酸을 3% 되도록 첨가한 脫灰液에 48시간 脫灰한 다음 70%에탄올로 洗滌한 후, 上법에 따라 組織切片을 만들어 Hematoxylin-Eosin(H-E)染色과 Giemsa染色을 한 다음 光學顯微鏡으로 觀察하였다.

### 3. 結果 및 考察

#### 가. 發病의 概要

發病되고 있는 養魚場은 滿潮時 海水를 끌어들여 養魚池밖의 浸澱槽에서 浮遊物을 沈澱시킨 다음, 浸澱槽의 中間部位에서 펌핑하여 飼育水槽에 供給하는 流水式 陸上飼育施設로서, 조피볼락의 먹이로서는 *Artemia*幼生을 投與하고 있었다. 調査時의 水溫은 충남 태안이 19.2℃, 보령이 21℃였다.

病魚는 水面 가까이를 힘없이 遊泳하면서 水流에 떠밀려 水槽의 中央에 位置한 排水口 부근에 모이는 傾向으로 아가미 두껍, 尾柄部의 發赤, 峽部, 頭部の 發赤과 아가미의 貧血 및 간의 退色외는 兵變은 없었지만, 共通的인 症狀으로는 頭部와 峽部の 發赤이었다. 또 충남 보령의 病魚는 지느러미腐蝕病과의 混合感染의 상태로 위의 症狀以外에 꼬리부가 심하게 腐蝕되어 있었다.

病魚의 腎臟, 脾臟, 肝臟, 腦 및 血液으로 부터는 거의 純粹 分離狀態의 原因菌이 分離되어졌으며, 스타프標本의 그람染色에도 無數의 그람 陰性 桿菌이 觀察되었다(Plate 1-1). 分離菌의 生化學的 性狀은 Table 1에 表示한 것처럼 그람음성의 桿菌으로, 1개의 鞭毛를 가지고 활발히 運動하였으며, 포도당을 醱酵的으로 分解하지만 가스는 生成하지 않았다. 또 oxidase와 catalase는 모두 陽性이었으며, 0/129와 novobiocin에는 感受性을 갖고 있었지만, penicillin는 感受性이 없었다.

그 외 중요한 性狀으로는 窒酸鹽의 還元, gelatin液化, 인돌, MR, V-P, 구연산 이용, 黃化水素 生産등의 性狀에 모두 陰性을 나타내었다. 이상의 結果로 分離菌은 *Vibrio*屬으로 分類하였다. 한편 分離菌은 對照로 使用한 *V. anguillarum*과는 窒酸鹽 還元, MR, 구연산이

Table 2. Biochemical and biological characteristics of the present isolates, *Vibrio anguillarum* (A-10) and *V. ordalii* (ATCC 33509)

Strain	95	95	95	95	95	95	95	96	96	96	96	A	33509
Characteristics	-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-1	-2	-3	-4	-10 (ATCC)	(ATCC)
Gram stain	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Flagella	S.P	S.P.											
Hugh-Leifson	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
Gas from glucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cytochrome oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H <sub>2</sub> S production	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sensitivity to													
0/129	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
novobiocin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
penicillin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrate reduction	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Methyl red	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
V-P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Lysine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ornithine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Simmon's citrate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Malonate utilization	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatin liquefaction	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Starch hydrolysis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NaCl													
0%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.5-3%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5%	+w	+	+										
7%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Growth at													
37°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
42°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

용, 아르기닌 分解에서 差異가 나지만, *V. ordalii*(ATCC 33509)와는 젤라틴 液化에서 分離菌이 陰性인 점을 除外하고는 나머지 모든 性狀에서 一致하였다.

한편 炭水化物의 利用能力과 增殖에 미치는 食鹽濃度の 影響은 Table 2에 나타낸 것처럼 fructose, glucose, maltose, scurose는 分解하여 酸을 생성하였지만, 나머지 14개의 糖은 이용하지 못하였다. 또 發育可能 食鹽濃度は 0.5%-5%에서 發育하였지만, 0%와 7%에서는 발육하지 못하였다. 이러한 결과는 *V. anguillarum*은 arabinose, galactose, mannose, sorbitol, xylose등의 분해에서 차이가 나지만, *V. ordalii*와는 性狀이 일치한다. 또 발육가능 食염농도에서는 *V. anguillarum*이 7%에서 發育할 수 있는 데 비해, 分離菌과 *V. ordalii*는 7%에서 발육하지 않는 점이 뚜렷한 差異라 할 수 있다.

또 市販培地에서의 發育을 보면 Table 3에 나타낸 것처럼 分離菌과 *V. ordalii*는 NA와 TSA에서의 發育은 微弱하였지만, 2%食염첨가 HIA와 BHIA는 잘 발육하였고, TCBS는 48시간 배양 후에도 발육하지 않아 *V. anguillarum*에 비해 顯著히 발육이 느렸다.

大西 와 室賀(1976)는 *V. ordalii*인 *Vibrio* sp. RT군의 性狀중 *V. anguillarum*과 가장 현저한 차이를 나타내는 것으로 보통 시판의 배지에서 發育이 느리며, 아르기닌 分解, 인돌 생성 및 mannose의 이용이 陰性인 점이라고 하였다. 또 室賀등(1986)이 은어와 조피볼락에서 분리한 *V. ordalii*의 性狀도 생화학적 性狀은 무지개송어 分離菌과 일치하지만, 糖분해능에서 무지개송어 유래주는 galactose를 분해하고 salicin, cellobiose 및 dextrin은 분해하지 못한 반면, 조피볼락 유래주는 galactose, cellobiose 및 dextrin은 분해하지 못하지만, salicin은 분해하며, 은어 유래주는 galactose를 분해하지 못하는 것

Table 3. Carbohydrate utilization of the present isolates, *Vibrio anguillarum*(A-10) and *V. ordalii* (ATCC 33509)

Strain	95	95	95	95	95	95	95	96	96	96	96	A	33509
Characteristics	-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-1	-2	-3	-4	-10	(ATCC)
Acid from													
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Cellobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inocitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trehalose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

Table 3. Growth of the present isolates, *V. ordalii* (ATCC 33509), and *V. anguillarum* (A-10) on various agar media supplemented with NaCl at 25°C

Medium	1 day			2 days		
	Present isolates	<i>V. ordalii</i>	<i>V. anguillarum</i>	Present isolates	<i>V. ordalii</i>	<i>V. anguillarum</i>
0.5% NaCl						
NA	-	-	+w	+w	+w	+
TSA	+w	+w	+	+	+	++
HIA	+w	+w	++	++	++	++
BHIA	+	+w	++	++	++	+++
2% NaCl						
NA	+w	+w	+	+	+	++
TSA	+w	+w	++	+	+	++
HIA	+w	+w	++	++	++	+++
BHIA	+w	+w	++	++	++	+++
TCBS	-	-	+	-	-	++

\*NA: Nutrient agar, TSA: Tryptic soy agar, HIA: Heart infusion agar, BHIA: Brain heart infusion agar.

Colony size in diameter(mm) : -: No growth, +w: <0.5, +: 0.5~1, ++: 1~2, +++: >2.

은 무지개 송어 유래주와 같지만, cellobiose, dextrin 및 salicin 을 모두 分解하고 있어 菌株의 由來에 따라서 약간의 차이를 보이고 있다.

또 식염 依存性은 본 分離菌과 大西 와 室賀(1976) 와 室賀등 (1986)등의 결과와 같이 발육가능 식염농도는 0.5%-5%로 一致하고 있다. 한편 Schiewe et al.(1981)은 *V. ordalii*는 糖과 같은 基質을 分解할 수 있는 酵素가 缺如되어 있기 때문에 TSA에 배양했을 때 발육이 매우 느려 4-6일 후에도 집락의 직경이 1-2mm에 불과하다고 하였으며, 室賀등(1986)도 식염 2%첨가 HIA와 BHIA에서는 잘 자라지만, 0.5%식염 첨가 NA와 TCBS에서는 2일간 배양 후에도 集落이 形成되지 않는다고 하였다. 따라서 分離菌은 生化學的 性狀, 培地에서의 發育性, 발육가능 온도와 食鹽에 根據하여 *V. ordalii*로 同定하였다.

分離菌의 藥劑에 대한 感受性은 Table 3에 나타난 것 처럼 調査한 모든 藥劑에 感受性을 나타내었지만 특히 클로람페니콜과 테트라사이클린, 노프로삭신, 시프로삭신에 높은 感受性을 나타내었다. 이 病魚의 採取후 테트라사이클린과 노프로삭신에 의한 1-2시간 정도의 藥浴에 治療가 可能하였지만, 또 다른 養魚場은 發病후 시간이 경과된 때문인지 약제에 의한 치료는 不可能하였다. 본병에 대한 現場治療시험의 결과를 조사한 文谷등(1987)에 의하면 大量으로 斃死가 일어나고 있을 때에 염산옥시테트라사이클린을 經口投與 또는 藥浴시켰지만 斃死가 持續되어 옥소린산을 經口投與한 결과 斃死가 감소되었다고 기술하고 있다. 그러나 우리나라 西海岸의 養殖場에서는 주로 魚病의 치료에 옥소린산을 投與하고 있어 效果가 없을 것으로 생각하고, 과거에는 많이 使用하였지만 現在는 治療效果가 없어 使用頻度가 낮은

Table 4. Drug sensitivities of the isolate(95-5 strain)

Drug	Sensitivity
Chloramphenicol(30mcg)	+++
Tetracycline(30mcg)	+++
Amphicilin(30mcg)	+
Vancomycin(30mcg)	+
Kanamycin(30mcg)	++
Neomycin(30mcg)	++
Streptomycin(10mcg)	+
Gentamycin(10mcg)	+
Erythromycin(15mcg)	++
Sulfamethoxazole(23.75mcg)	++
Norfloxacin(1 $\mu$ g)	+++
Cifloxacin(5 $\mu$ g)	+++

+: low sensitivity, ++: intermediate sensitivity, +++: high sensitivity.

테트라사이클린과 새로운 퀴놀론제인 노프로삭신을 투여한 결과 斃死를 終熄시킬 수가 있었던 것으로 생각된다.

當年産 種苗의 浸漬와 注射에 의한 死亡率은 Table 4에 나타난 것처럼 浸漬에 의한 경우 水溫 18℃에서는  $2 \times 10^8$ cfu/ml과  $2 \times 10^7$ cfu/ml에서 각각 65%와 45%死亡하였지만, 25℃에서는 전혀 死亡하지 않았다. 腹腔注射에 의한 경우 水溫 18℃에서는  $2 \times 10^8$ cfu/ml에서  $2 \times 10^5$ cfu/ml까지 모두가 斃死하였고,  $2 \times 10^4$ cfu/ml은 35%가 斃死하였으며, 수온 25℃에서는  $2 \times 10^8$ cfu/ml과  $2 \times 10^6$ cfu/ml에서 모두 폐사하였고,  $2 \times 10^5$ cfu/ml과  $2 \times 10^4$ fu/ml에서 85%와 35%가 폐사하였다. 또 種苗生産후 1년간 飼育한 魚類에 대한 結果는 Table 5에 나타냈다. 浸漬에 의한 경우, 水溫의 高低에 不問하고 當年産과 비슷한 結果로 나타났지만, 注射에 의한 경우 水溫 18℃에서는 死亡率이 35-100%로 接種菌에 대한 感受性이 높았다. 그러나 25℃에서는 接種菌이 高濃度인  $2 \times 10^8$ cfu/ml과  $2 \times 10^7$ cfu/ml에서만 각각 45%와 10%가 폐사하여 當年産의 경우에 비해 死亡率이 낮아, 水溫이 낮을수록, 魚體 크기가 작을수록 본 病에 대한 感受性이 높게 나타났다. 이러한 결과는 본 菌에 의한 感染症이 주로 稚魚期에 限定되어 發病하는 점과 發病期의 水溫이 18-20℃(室賀 등 1986)인 것으로 미루어 種苗가 어느 정도 成長하게 되면 본 菌에 대한 感受性이 低下되거나 또는 發病과 密接한 關係가 있는 外毒素(Moustafa et al., 1985)의 生成에 높은 飼育 水溫이 어떠한 影響을 미쳤다고 推定할 수도 있다. 또 1년생은 거의 種苗期에 본병의 感染에 의한 免疫獲得으로 當年生에 비해 死亡率이 낮을 可能性도 있다고 생각되기 때문에 種苗期에 免疫處理에 관한 檢討가 必要하다고 생각된다. 한편 본 菌은 계속해서 繼代培養한 다

Table 6. Pathogenicity of the 95-5 strain against no summer rockfish\* by immersion or intramuscular injection

Dose (CFU/Tank or Fish)	Mortality(%)			
	Immersion		Injection	
	18°C	25°C	18°C	25°C
$2 \times 10^9$	65	0	100	100
$2 \times 10^7$	55	0	100	100
$2 \times 10^6$	5	0	100	100
$2 \times 10^5$	0	0	100	85
$2 \times 10^4$	0	0	35	30
Control	0	0	0	0

\*Twenty fish, ranged from 2.5cm to 3.5cm in body length, was used in each group. After bacterial treatment fish were held in flow-through tanks and the mortalities were monitored for 10 days.

Table 7. Pathogenicity of the present isolated strain 95-5 against 1-summer rockfish\* by immersion or intramuscular injection

Dose (CFU/Tank or Fish)	Mortality(%)			
	Immersion		Injection	
	18°C	25°C	18°C	25°C
$2 \times 10^8$	45	0	100	45
$2 \times 10^7$	5	0	100	10
$2 \times 10^6$	0	0	100	0
$2 \times 10^5$	0	0	100	0
$2 \times 10^4$	0	0	35	0
Control	0	0	0	0

\*Fish were ranged 9.5cm to 11.2cm in body length. Other conditions were the same in Table 6.

음 高濃度의 菌液을 筋肉接種하여도 外部症狀만 發現할 뿐 斃死는 일어나지 않았는데, 이는 본 菌이 病魚에서만 分離되는 宿主 依存性이 강한 菌으로 分離후의 生理機能의 減少에 따른 病原性의 低下때문일 가능성도 있을 것으로 推定할 수 있으나(Schiewe et al. (1981)), 금 후 繼代培養에 의한 分離菌의 性狀 變化에 대한 연구가 必要할 것으로 생각된다.

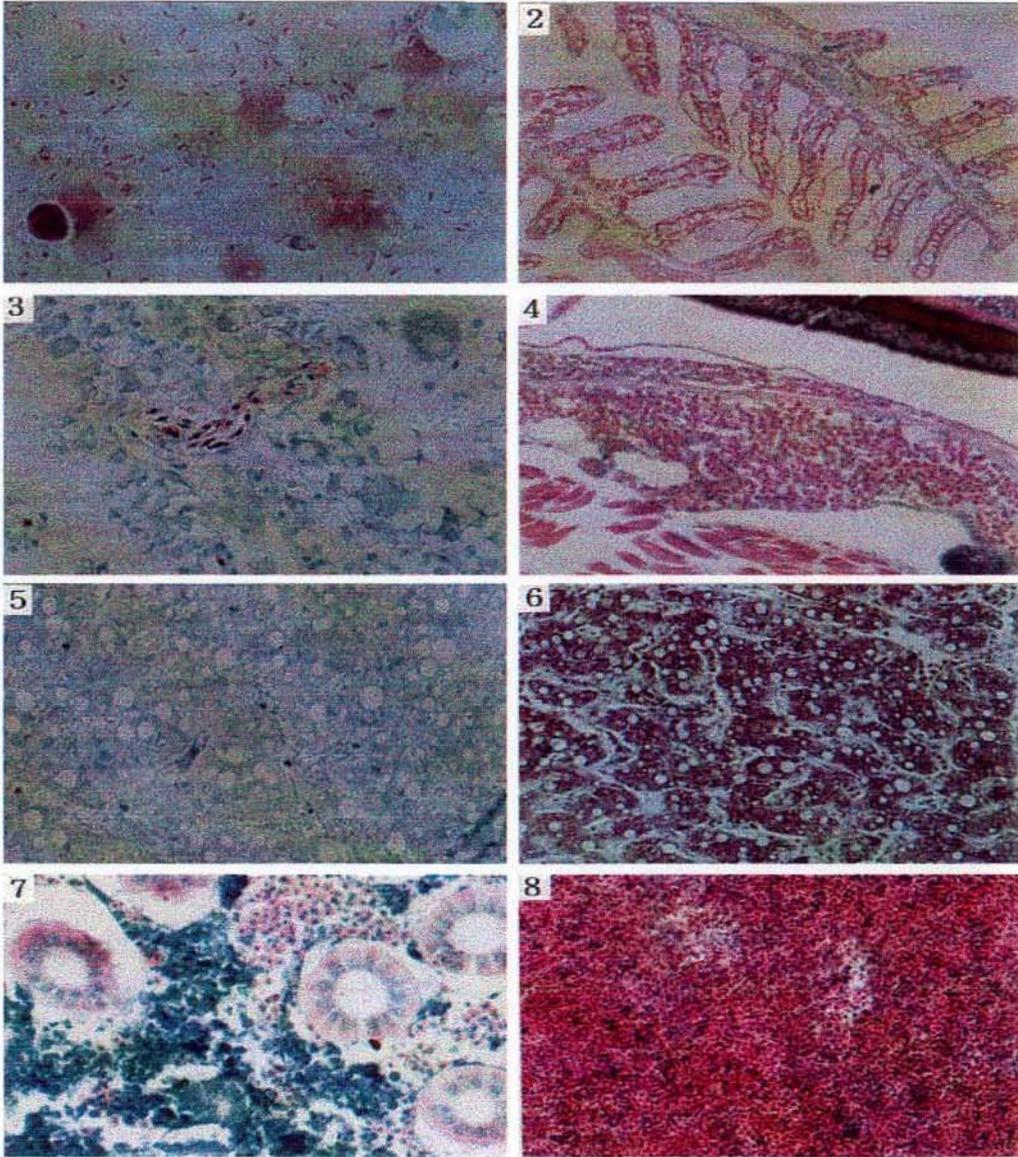
病理組織學的 所見으로서 病魚의 아가미는 2次鰓弁의 毛細血管내에 細菌이 增殖하여 毛細血管이 擴張되어지고, 呼吸上皮는 심한 浮腫을 일으켜 基底膜에서 剝離되어 있었다(Plate 1-2). 原因菌은 腦에도 侵入하여 毛細血管內에 增殖하여 毛細血管이 擴張되어 있었으며(Plate 1-3), 肝의 洞樣血管內에 原因菌이 增殖함으로서 擴張되어져 肝 實質細胞는 萎縮을 일으켜 壞死되어 있었다(Plate 1-4). 腎臟은 細尿管 上皮細胞에 原因菌이 增殖되어 混濁腫脹을 일으키고 있었으며, 造血組織내에도 수 많은 細菌이 增殖함에 따라 出血을 同伴한 壞死가 觀察되어졌다(Plate 1-5, 6). 脾臟은 脾細胞가 약간 減少되어 있었지만 消化管系에는 뚜렷한 病變은 觀察할 수 없었는데 이러한 結果는 文谷등(1987)이 報告한 조피볼락의 病理像과 일치하고 있으며, 腦와 腎臟의 病變에 따라 貧血, 異常遊泳, 浮腫이 隨伴되어졌다고 推定된다. 한편 Ransom et al.(1984)은 *V. anguillarum*와 *V. ordalii*의 3종의 연어(*Oncorhynchus keta*, *O. tshawytscha*, *O. kisutch*)에 대한 病理像이 *V. anguillarum*은 感染初期에 菌血症이 생겨, 血液, 疎性結合組織, 腎臟, 脾臟, 아가미, 腸의 後半部에 組織變化가 顯著的한 반면 *V. ordalii*도 菌血症이 생기지만, 그 時期가 感染의 後半期로서 *V. anguillarum*에 비해 血液中の 細菌數가 현저하게 적은  $10^2$ - $10^3$ 에도 敗血症이 생기며, 주로 病變이 생기는 곳은 骨格

系, 心筋, 腸, 아가미이며, 菌의 분포상도 *V. anguillarum*처럼 組織 내에 골고루 分布하지 않을 뿐만아니라 菌의 集落도 形成하지 않는 것이 뚜렷한 差異点이라고 報告하였다. 그러나 조피볼락의 경우에는 연어류와는 달리, 文谷등(1987)의 考察처럼 血液을 따라 각 臟器에 感染되어 뚜렷한 外部症狀이 없이 急性 敗血症을 誘發하기 때문에 大量斃死를 誘發하는 것으로 推定되어진다.

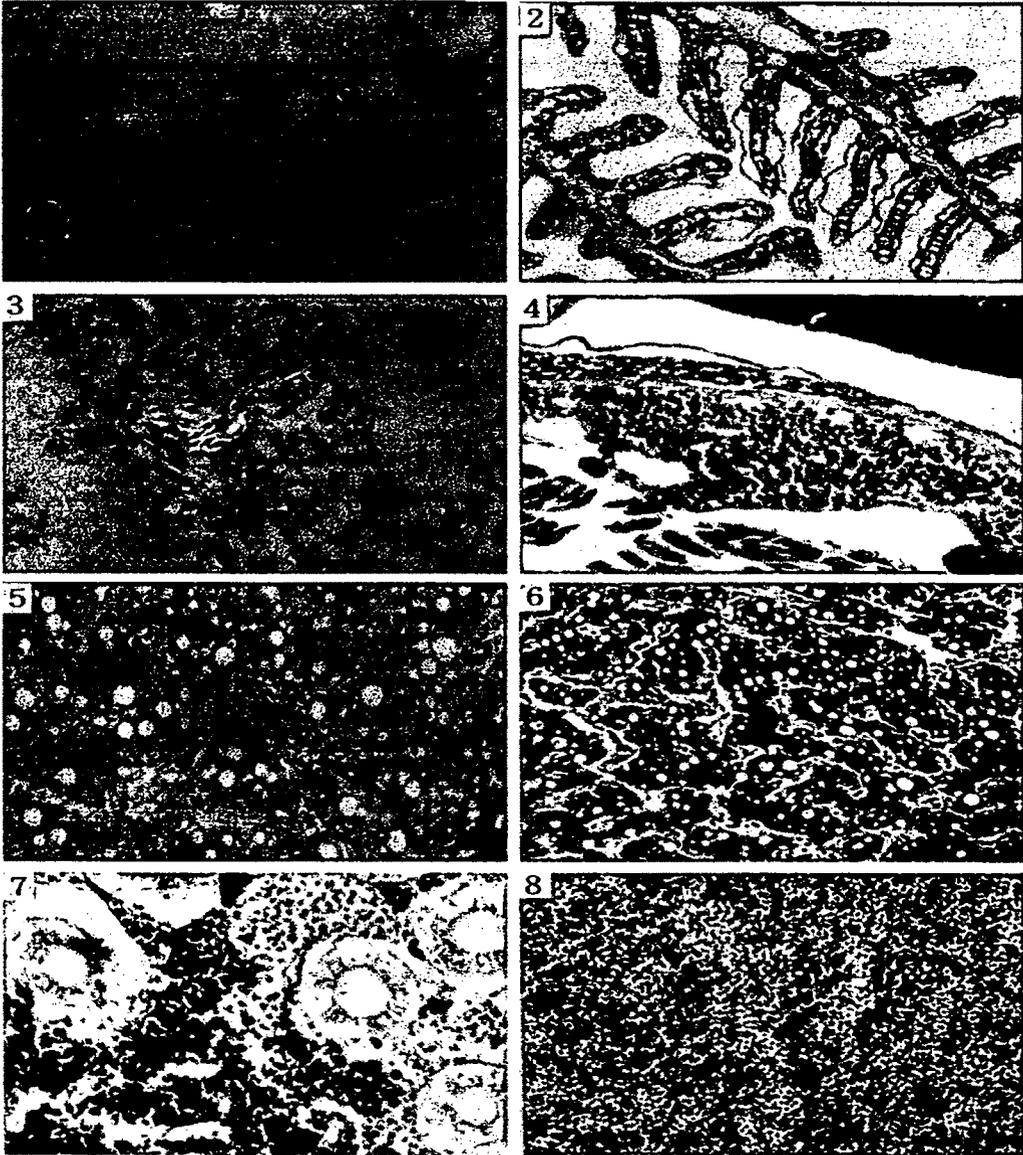
## Explanation of plates

- Plate 1. Gram negative bacteria imprinted from the brain of diseased fish. Gram stain, X1,000.
- Plate 2. The gill shows severe edema and the lamellar epithelium is separated from the basement membrane by bacterial invasion in the lamellar capillaries. Giemsa stain, X200.
- Plate 3. Bacterial multiply in the blood vessel of barin. Giemsa stain, X 200.
- Plate 4. Bacteria extensively multiply causing congestion in the blood vessel under the eyes. Giemsa, X 200
- Plate 5. Disseminated bacteria forms embolus in the sinusoids of the liver. Giemsa stain, H-E stain, X200.
- Plate 6. The parenchymal cells are atrophied accompanied by sinusoidal dilatation. H-E stain, X200.
- Plate 7. Bacteria invade in the hematopoietic tissue causing necrosis and hemorrhage. Cloudy swelling occurs in the tubular epithelia. Giemsa stain, X200.
- Plate 8. Sheathed artery is necrotized by bacterial invasion and hemorrhage is occurred in the pulp. H-E stain, X100.

Plates



Plates



### 第 3 章 非特異的 防禦力의 增強

#### 第 1 節 緒論

魚類飼育中에 頻發하는 細菌性疾病의 治療에는 抗生物質을 비롯하여 몇몇 化學療法劑가 使用되고 있으나, 이들 藥劑의 誤用과 濫用은 藥劑耐性菌의 出現으로 疾病의 治療를 어렵게 할 뿐만 아니라 養殖漁民에 대한 經濟的 負擔을 加重시키고 있다. 따라서 일찍부터 疾病의 治療보다는 豫防에 重點을 둔 Vaccine의 開發에 노력하여 왔지만 (Fryer et al., 1976; Gould et al., 1978; Johnsen and Amend, 1983; Salati and Kusuda, 1985), 그 效用性이 特定魚種, 特定疾病에서만 認定되며 또한 處理時期등에 따라 그 效果가 期待하기 힘든 경우도 있어 어류용 백신의 實用化에 問題點으로 提起되고 있다(Ellis, 1988).

哺乳類를 비롯한 다른 動物의 경우 *Schizophyllum commune*, *Sclerotium gluconicum*, *Lentinus edodes*등 곰팡이의 細胞壁의 多糖體 成分인  $\beta$ -1,3-glucan을 投與한 結果 抗癌效果 뿐만 아니라 非特異的免疫系를 刺戟하는 免疫刺戟劑로서 그 效能이 立證되어져 있다 (Di Luzio, 1985; Seljelid et al., 1987). 한편 魚類에 있어서도 잉어, 무지개송어, chinook salmon, 차넬메기, 대서양연어, 한국산메기 등에  $\beta$ -glucan을 投與함으로써 哺乳類의 경우와 마찬가지로 非特異的 免疫系를 活性化시킨다고 報告되고 있다(Yano et al., 1989, 1991; Robertsen, 1990; Engstad et al., 1992; Chen and Ainsworth, 1992; Nikl et al., 1993; Jorgensen et al., 1993a, 1993b; Jorgensen and Robertson, 1995; 박과 김, 1996; 박등, 1996). 그러나 이러한  $\beta$ -glucan의 投與效果는 모두가 筋肉이나 腹腔注射에 의한

强制投與의 結果로서 現場의 漁民이 實際 使用하기에는 現實性이 없기 때문에 먹이에 添加하거나 浸漬에 의해서 投與하는 簡便한 經路에 의한  $\beta$ -glucan의 投與效果를 立證할 必要가 있다.  $\beta$ -glucan의 경구 투여에 대해서는 대서양연어(Raa et al., 1992), chinook salmon(Nikl et al., 1993)에 經口投與한 結果 細菌性疾病에 대한 防禦能이 增加된다고 하였으며, 浸漬投與에 관해서는 무지개송어의 경우에 末梢血液中的의 食細胞의 機能이 2배 以上 增強되었지만(Jeney and Anderson, 1993), chinook salmon에서는 效果가 없는 것으로 보고(Nikl et al., 1993)되고 있어 아직도 正確한 效果를 立證하기는 困難하다고 할 수 있다. 그러나  $\beta$ -glucan과 비슷한 結合의 고리가 긴 多糖體를 經口投與후 대서양연어의 腸의 後半部에서 吸收되는 것이 立證되고 있으며(Ingebrigtsen et al., 1993; Sveinbjornsson et al., 1995),  $\beta$ -glucan이나 빵효모(*Saccharomyces cerevisiae*)粗抽出物의 經口投與가 非特異的 防禦力을 증강시킬 수 있다고 보고하고 있어(Duncan & Klesius, 1996), 경구투여에 의한 어류의 방어력이 증강됨을 제시하고 있다. 또 浸漬에 의한 效果에 관해서도 서로 相反된 結果를 내고 있지만 백신처리 후에 뚜렷한 抗體價의 上昇效果를 얻고 있어(Nikl et al., 1993; Rorstad et al., 1993), 그 效用性에 대해서는 의심의 여지가 없다.

본 장에서는 非特異免疫增強劑를 實用化시키기 위한 方策으로 養殖 조피볼락에 經口的 또는 浸漬投與하기 위한 濃度와 投與期間을 設定하기 위한 基礎的 試驗으로서 투여후의 人爲的 感染에 대한 生殘率을 基準으로 投與效果를 判定하였다.

## 第 2 節 非特異 免疫增強劑의 投與方法 檢討

### 1. 緒論

藥劑나 免疫增強劑의 投與方法에는 注射에 의한 強制投與, 飼料에 混合하여 投與하는 經口投與 및 液狀의 水槽에 一定時間 浸漬하는 方法이 있다. 이 중 注射에 의한 強制投與는 投與效果가 第 1 節에서 言及한 것처럼 確實하다. 그러나 數 많은 魚類를 모두 注射한다는 것은 不可能하기 때문에 實驗室的인 資料에 그치고 말아 그 效果에도 不拘하고 現實的으로 活用되지 못하고 있다. 그러나 經口投與나 浸漬 投與는 多量의 魚類를 對象으로 實施할 수 있어 簡便한 反面 注射 投與보다는 投與效果를 期待하기가 어려운 것이 普通이다. 본 誌에서는 漁民이 손쉽게 利用할 수 있는 投與方法을 摸索하기 위하여 注射 投與을 止揚하고 經口投與와 浸漬投與의 效果를 調査하기 위하여 實施하였다.

### 2. 材料 및 方法

#### 가. 魚類

全北 高敞의 種苗生産場에서 購入하여 群山大學校 淺海養殖實習場 飼育室에서 2ton의 FRP수조에서 流水式으로 馴致飼育中이던 平均體重 5.6g(3.0-8.5g)의 魚類를 필요한 米수만큼 無作爲로 抽出하여 使用하였다. 순치중 사료는 순치 직후에는 種苗生産場에서 投與하고 있는 輸入産 稚魚用 配合飼料를 투여하였으나 魚體가 커짐에 따라 國內産 넙치用 配合飼料(3號)로 바꾸어 投與하였다. 非特異 免疫增強劑 投與 實驗期間동안의 사료는 넙치용 配合飼料(3호)였으며, 實驗期間의 水溫은 23.0~28.4℃였다

## 나. $\beta$ -glucan의 投與

### (1) 經口 投與

넙치용 配合飼料에  $\beta$ -glucan(Sigma, G6513)을 飼料 乾重量의 0.1%와 1%가 되도록 넣고 飼料重量의 1%의 모래 濾過海水를 添加하여 飼料表面에 吸着시킨 다음, 室溫의 그늘에서 乾燥시켜 비닐봉지에 넣어 冷藏庫에 保管하였다. 一日 飼料投與量은 魚體重의 3%였으며, 하루 2차례 나누어서 30日間 投與하였다.

### (2) 浸漬

#### (가) $\beta$ -glucan 單獨 浸漬

10 l의 모래 濾過海水에  $\beta$ -glucan을 最終濃도가 100mg/l, 200mg/l, 500mg/l가 되도록 浮遊시킨 다음, 通氣하면서 15分과 30分間 浸漬하였다. 이 때 對照區는 모래 濾過海水에 各各 15分과 30分間 浸漬하였다.

#### (나) 포르말린死菌과 $\beta$ -glucan의 混合 浸漬

$\beta$ -glucan의 單獨 浸漬 및 포르말린死菌과의 混合 浸漬를 위하여 어류를 글루칸구, 사균구 및 글루칸과 사균 혼합구 3區로 나누어 실시하였다. 10 l의 모래 濾過海水를 넣은 유리수조에서 30분간 通氣하면서 浸漬시킨 후 사육수조로 옮겼다. 또 2次 浸漬를 위하여는 1次 浸漬 3주 후에 1次 浸漬와 같은 條件의 浸漬를 행하였다.

글루칸액은 모래 濾過海水에 100 $\mu$ g/ml가 되도록 溶解시켰으며, BHIA평판배지에서 25℃에서 24時間 培養시킨 *V. ordalii*(95-5)菌을 生理食鹽水에 浮遊시켜 0.5%의 포르말린을 添加하여 冷藏庫에서 하루 밤 放置하여 死菌化시킨 死菌液을 洗滌하지 않고 濾過海水에 1mg/ml

가 되도록 添加하였다. 글루칸과 사균의 混合區는 글루칸액과 포르말린 死菌液을 각각 2倍 濃度로 添加하여 最終濃度가 單獨區와 같은 濃度로 만들었다.

## 다. 病原菌의 人爲感染

### (1) 病原菌 및 培養

조피볼락에서 분리한 *V. ordalii*(95-5), 國立水産振興院 南海水産 研究所에서 分讓받은 조피볼락 由來의 *Staphylococcus epidermidis*(JS 017), 釜慶大學에서 分讓받은 넙치 由來의 *Edwardsiella tarda*(FSW 81040)을 사용하였다.

*V. ordalii*는 2% 食鹽을 첨가한 BHIA평판배지, *S. epidermidis*는 BHIA평판배지, *E. tarda*는 TSA평판배지를 使用하여 25℃에서 24시간 배양한 菌을 人爲感染用菌으로 使用하였다.

### (2) 人爲感染

經口投與區는 *V. ordalii*를 投與 10일, 20일 및 30일후에 人爲感染 시켰으며, *S. epidermidis*와 *E. tarda*는 投與 20일과 30일후에만 人爲感染시켰다.

글루칸액 單獨浸漬區는 浸漬 3일 후에, 포르말린 사균과 글루칸의 混合浸漬區는 1次 浸漬 3주 후와 2次 침지 1주 후 *V. ordalii*만을 人爲感染시켰다.

25℃, 24시간 培養한 다음 자라난 各各의 菌體를 滅菌 生理食鹽水에 浮遊시켜 *V. ordalii*는  $1.0 \times 10^7$ cfu/ml, *S. epidermidis*는  $1.0 \times 10^{10}$ cfu/ml, *E. tarda*가  $1.0 \times 10^6$ cfu/ml의 生菌 浮遊液을 만들어 各 菌液의 0.1ml를 각 20마리의 魚類에 注射하였는데(글루칸과 사균

의 혼합침지구는 15마리), *V. ordalii*는 등지느러미밑의 筋肉에, 나머지 두 균은 腹腔接種하였다. 이 接種菌의 濃度는 10日間의 각 균의 100%致死濃度이다. 病原菌을 接種한 魚類는 20ℓ의 水槽에 옮겨 먹이의 投與없이 流水式으로 10日 동안의 生存率을 구하여 Fisher의 正確確率檢定法에 의해 比較하였다.

### 3. 結果

#### 가. 經口投與

*V. ordalii*의 人爲感染後의 生存率은 Fig. 3에 나타냈다. 10일동안 경구 투여한 魚類는 菌接種 후 3일 以內에 모두 斃死하였다. 그러나 20일간 경구투여한 어류는 인위감염 후 대조군은 모두 斃死하였으나, 글루칸을 0.1%와 1%첨가 투여한 구는 生殘率이 15-20%로 낮기는 하지만 10일 후까지 生存하였다( $p < 0.05$ ). 또 30일간 경구투여한 어류는 인위감염후 10일까지 0.1%첨가구는 5%, 1%첨가구는 25%가 살아남아 生殘率이 添加量과 投與日數와 有意의 相關關係가 있었다( $p < 0.05$ ).

*E. tarda*를 接種하였을 때의 生存率은 Fig. 4에 表示한 것처럼 投與期間에 關係없이 菌 接種후 4-5일 以內에 모두 斃死하여 글루칸 添加 效果가 없었다.

*S. epidermidis*를 接種하였을 때의 生存率은 Fig. 5에 표시한 것처럼 글루칸 무첨가구는 菌接種후 3일 以內에 全量 斃死하였지만, 20일 투여군과 30일 투여군은 95%의 높은 生殘율을 나타내어( $p < 0.05$ ), 사용한 3種의 菌中에서 生殘率이 크게 向上되어 글루칸의 經口投與가 매우 效果的이었다.

#### 나. 浸漬投與

##### (1) 글루칸 單獨 浸漬

글루칸액에 單獨·浸漬시킨 3일 후에 *V. ordalii*를 接種한 후의 生存率은 Fig. 6과 같다. 無處理區, 200mg/ℓ 와 500mg/ℓ 處理區는 菌 接種 2일-4일 以內에 浸漬時間에 關契없이 全량 斃死하였다. 그러나 100mg/ℓ 처리구는 다른 區에 比해 生殘期間이 길어 30分 處理區에서

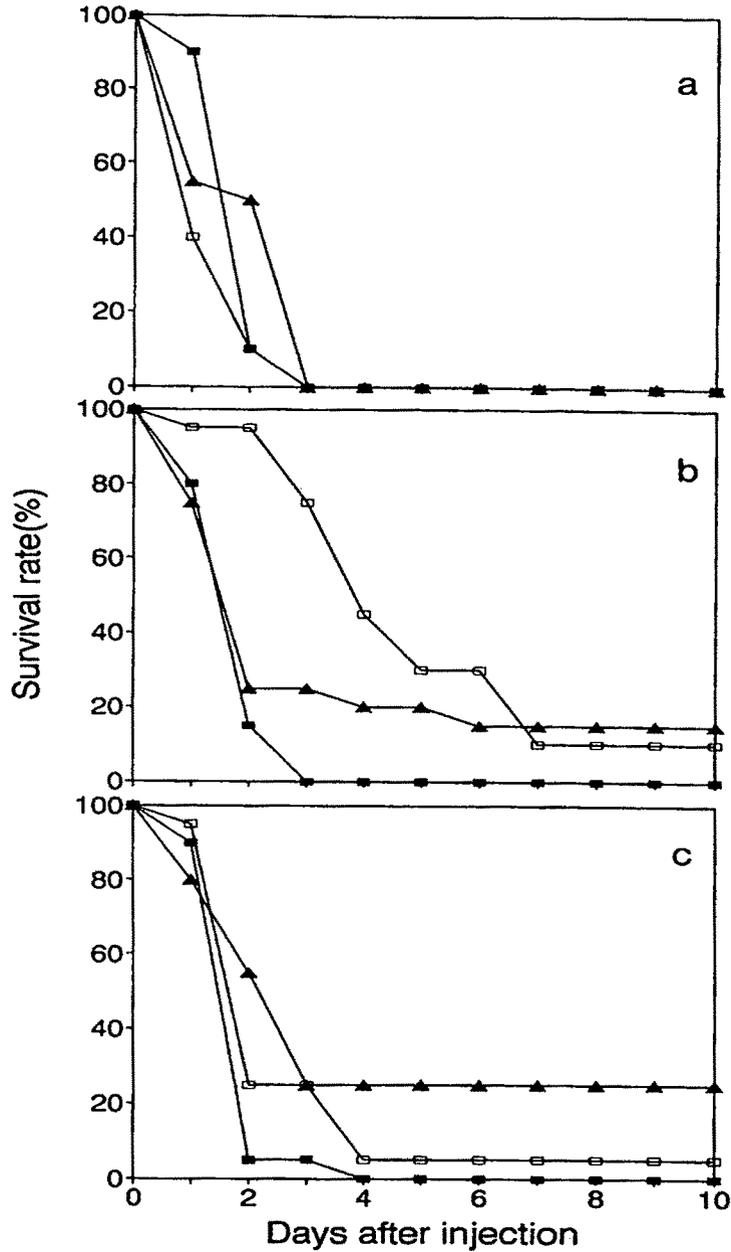


Fig. 3. Effect of  $\beta$ -glucan administration on survival rates of rock fish intramuscularly challenged with *V. ordalii* ( $1.0 \times 10^6$  cfu/fish). The fish were fed the commercial pellet supplemented with 0% (■), 0.1% (□) or 1% (▲)  $\beta$ -glucan for 10(a), 20(b) or 30(c) days prior to the bacterial challenge ( $n=20$  per group).

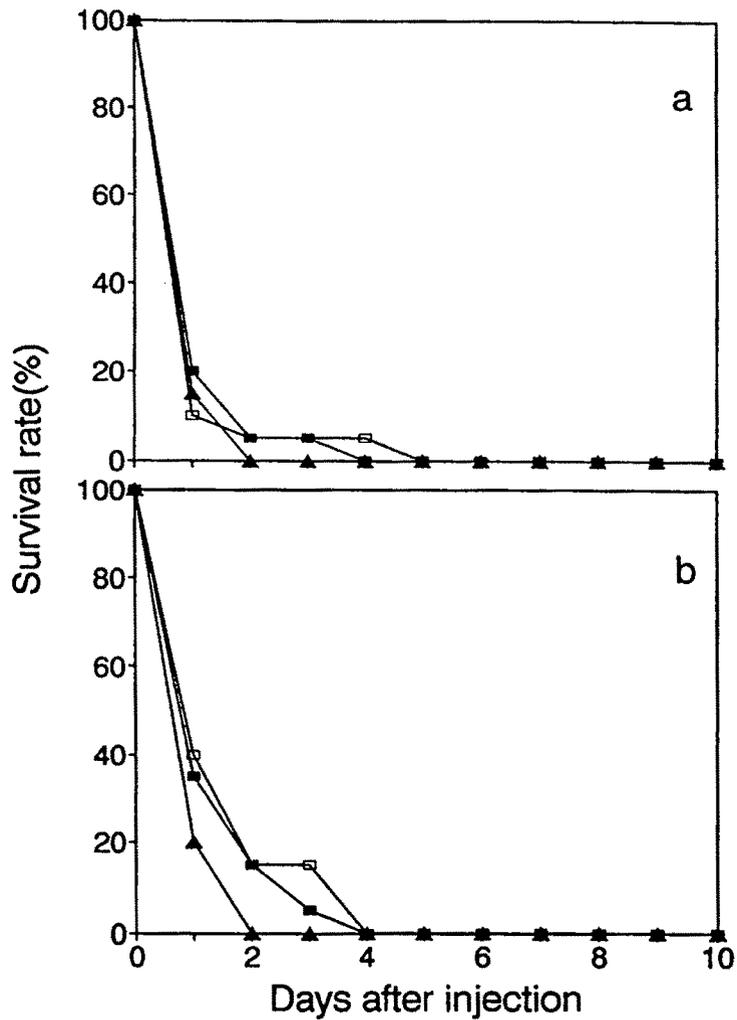


Fig. 4. Effect of  $\beta$ -glucan administration on survival rates of rockfish intraperitoneally challenged with *E. tarda* ( $1.0 \times 10^5$  cfu/fish). The fish were fed the commercial pellet supplemented with 0% (■), 0.1% (□) or 1% (▲)  $\beta$ -glucan for 20(a) or 30(b) days prior to the bacterial challenge (n=20 per group).

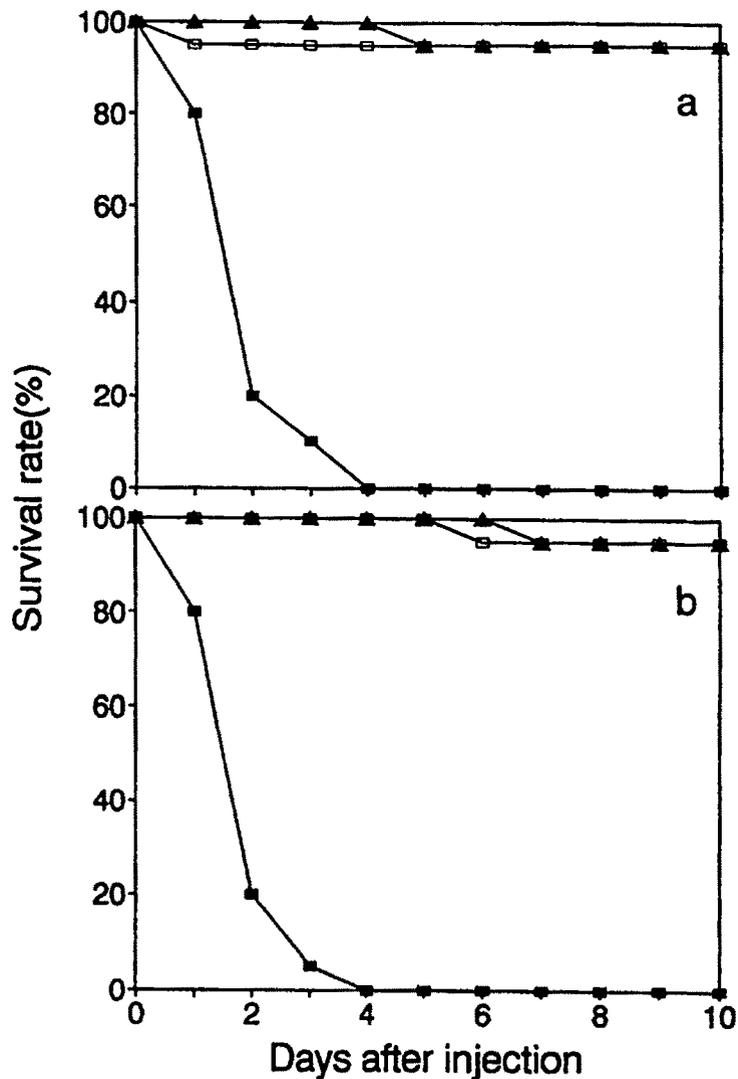


Fig. 5. Effect of  $\beta$ -glucan administration on survival rates of rockfish intraperitoneally challenged with *S. epidermidis*( $1.0 \times 10^9$ cfu/fish). The fish were fed the commercial pellet supplemented with 0%(■), 0.1%(□) or 1%(▲)  $\beta$ -glucan for 20(a) or 30(b) days prior to the bacterial challenge(n=20 per group).

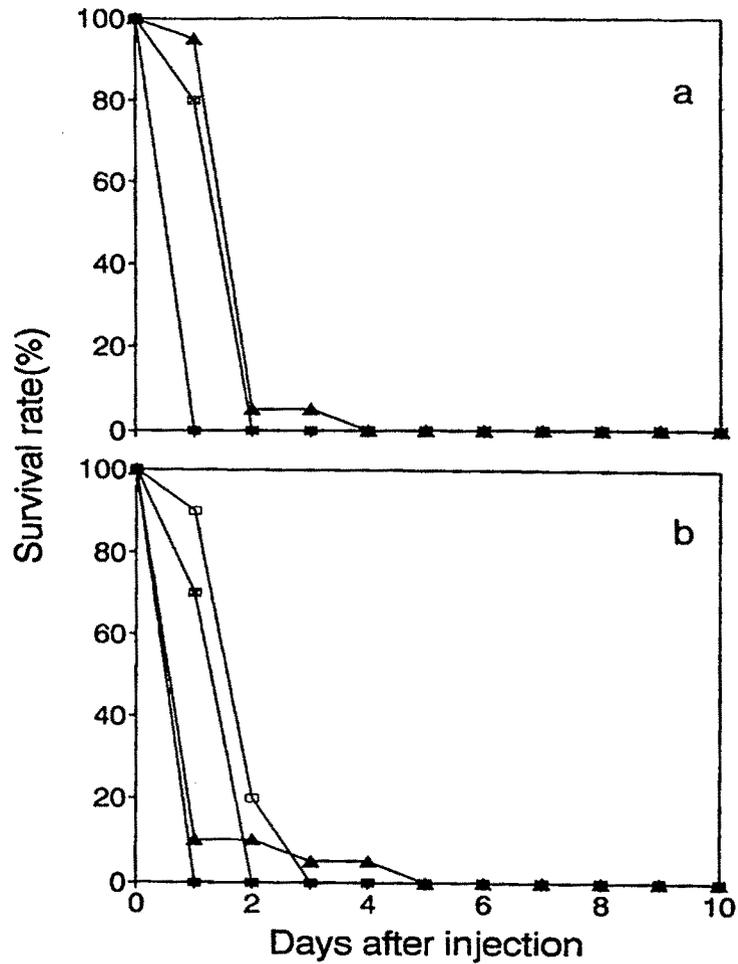


Fig. 6. Effect of bath on survival rates of rockfish intramuscularly challenged with *V. ordalii*( $1.0 \times 10^6$ cfu/fish). Glucan was suspended in filtered seawater with the concentration of 100mg/l (▲), 200mg/l (□), 500mg/l (●) and the fish were placed in the glucan bath for 15(a) or 30min(b) 3days prior to the bacterial challenge. (n=20 per group. Control: ×)

는 5일후 까지 生存하였으나 處理區間의 有意差는 없었다.

#### (2) 포르말린死菌과 $\beta$ -glucan의 混合浸漬

$\beta$ -glucan과 포르말린死菌에 混合浸漬한 후의 生存率은 그림에 나타냈다. 1회 浸漬의 경우  $\beta$ -glucan구와 死菌單獨區 및 對照區는 生菌攻擊 3일 이내에 全量 斃死한 반면 포르말린사균과  $\beta$ -glucan의 混合浸漬區는 接種 6일 후까지 13.3%가 生存하였지만 調查期間인 10일까지는 生存하지 못하였다. 한편 1次 浸漬 3週 후에 같은 條件으로 2次 浸漬시킨 그룹에서는 1次 浸漬의 경우와 마찬가지로  $\beta$ -glucan구와 사균단독구 및 대조구는 菌接種 3일 이내에 모두 斃死하였지만, 포르말린사균과  $\beta$ -glucan의 혼합침지구는 10일후에도 生存率은 낮지만 5%가 生存하여 混合浸漬가 單獨浸漬보다는 生存率이 높았다.

#### 4. 考察

$\beta$ -glucan과 같은 긴 結合고리를 가진 高分子 多糖體는 魚類의 非特異的 防禦力을 增強시킨다는 報告는 많지만(Yano et al, 1989, 1991; Robertsen et al., 1990; Chen and Ainsworth, 1992; Engstad et al., 1992; Jorgensen et al., 1993 a,b; 박 등, 1996), 모두가 注射에 의한 強制 投與로 얻어진 結果로서 投與效果가 分明함에도 불구하고 漁民이 適用하기에는 現實性이 없다.

본 연구에서  $\beta$ -glucan을 조피볼락에 經口投與한 결과 細菌性疾病의 感染에 대한 生殘率을 增加시킬 수 있으며,  $\beta$ -glucan의 投與濃度와 投與期間이 生殘率과 密接한 關係가 있으며 그 效果는 病原菌의

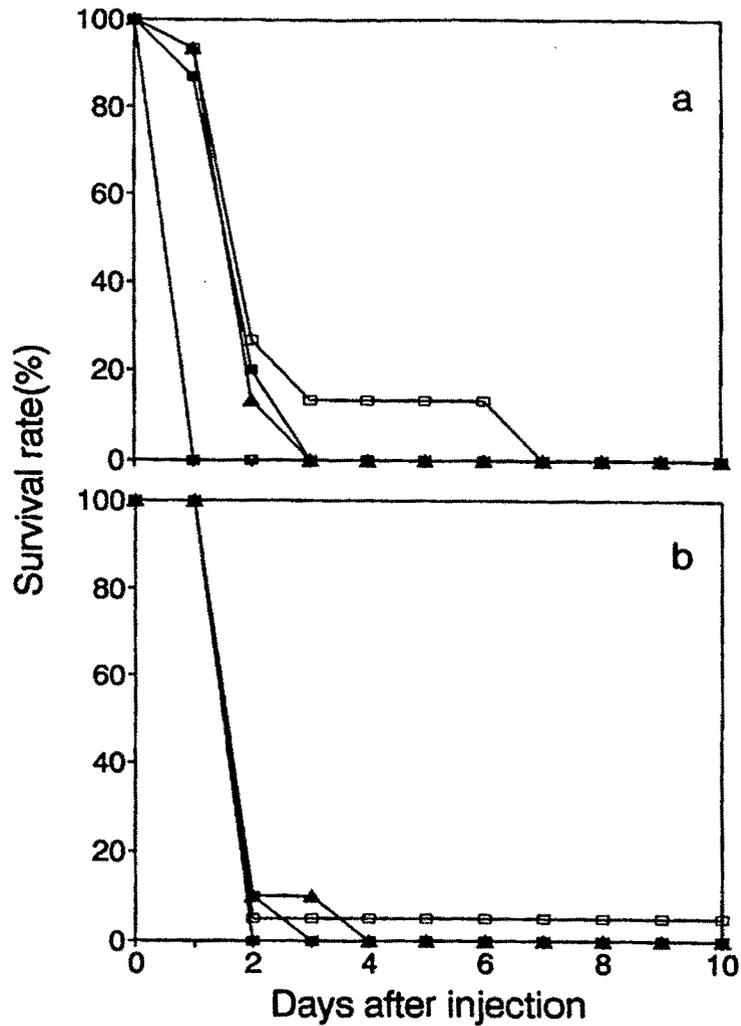


Fig. 7. Effect of glucan bath on the survival rate of rockfish intramuscularly challenged with *V. ordalii* ( $1 \times 10^6$  cfu/fish). The fish were placed in the baths of glucan (■), *V. ordalii* bacterin (▲) or the combined glucan/*V. ordalii* bacterin (□) for 30 min prior to the bacterial challenge. Three weeks after the initial bath (a), the second bath (b) was conducted with the same manner.

種類에 따라 顯著한 差異가 있었다.

$\beta$ -glucan과 같은 免疫增強劑는 魚類養殖에 있어 非特異 免疫增強劑로서 또는 백신 處理時의 adjuvant로서 效能이 높기 때문에  $\beta$ -glucan의 使用은 疾病의 豫防學的인 側面에서 그 效用性이 높게 評價되고 있다. 그러나 免疫增強劑의 投與濃度와 效果는 正의 相關關係가 있는 것이 아니라 高濃度인 경우 오히려 免疫抑制反應을 誘發하는 것으로 報告되고 있으며(Oliver et al., 1985; Yano et al., 1989; Robertson et al., 1990), in vitro에서도 過量의  $\beta$ -glucan은 免疫反應을 抑制하는 것이 밝혀졌다(Figueras et al., 1997). 그러므로 魚種別로 免疫反應이 抑制되지 않는 範圍內에서 免疫增強을 最大로 誘發시킬 수 있는 投與濃度와 期間의 設定이 必要함으로 魚種別로 각 投與濃度와 期間이 달라지게 된다.

Raa et al.(1992)는 대서양연어에 魚體重 kg當 1g의 比率로  $\beta$ -glucan을 5週間 投與한 후에 *Vibrio anguillarum*, *Vibrio salmonicida*에 대한 抵抗性이 높아졌으며, 빵효모의 粗抽出物을 魚體重 Kg당 10g 投與하였을 때도 細菌性疾病에 대한 抵抗性이 높아졌다고 報告하였다. Nikl et al.(1993)도 *Schizophyllum commune*에서 抽出한  $\beta$ -1,3 glucan을 시누크연어사료에 0.1%와 1%를 첨가하여 魚體重的 2%를 1주일간 投與한 후 *Aeromonas salmonicida*를 浸漬 感染한 結果 生殘率이 높아졌다고 하였다. 또 차넬메기에 0.1%  $\beta$ -glucan첨가 사료의 投與는 *Edwardsiella ictaluri*에 대한 抵抗性은 差異가 없었지만, 抗體價는 현저하게 增加하였다고 하였다(Ainthworth et al., 1994). Siwicki et al.(1994)는 무지개송어에  $\beta$ -glucan과 빵효모를 添加한 사료를 투여한 결과 非特異免疫反應이 增強될 뿐만아니라 병에 대한 抵抗性도 증가하였다. 또 Duncan et al.(1996)은  $\beta$ -glucan

과 빵효모를 첨가한 사료를 차넬메기의 末梢血液의 血球數와 *E. ictaluri*에 대한 抵抗性에는 차이가 없었지만 첨가사료 投與魚의 食細胞의 食食能과 遊走能이 증가되었다. 이처럼  $\beta$ -glucan과 빵효모과 같은 物質을 飼料에 添加하여 投與하는 것이 魚類의 非特異的 生體防禦能力을 增強시켜 疾病에 대한 抵抗性을 높인다는 결과는 많지만 多糖體는 魚類에 있어 吸收가 疑問視되어 非特異免疫系를 刺戟하는가 에 관해서는 議論의 餘地가 남아있었다. 그렇지만 Ingebrigtsen et al.(1993)는 多糖體인 AG(aminated  $\beta$  1-3 polyglucose)를 3H로 標識하여 경구투여 후 96시간 동안 經時的으로 投與 多糖體의 器官別 分布를 調査한 결과 血液과 기타 림프기관에서 注射로 強制投與하였을 때보다는 낮지만, 全 실험기간 동안 檢出되는 것을 確認하였는데 특히 經口投與 2일 후에 腸後伴部の 壁에서 상당량 檢出되고 있어 腸壁에 있는 免疫擔當細胞를 刺戟할 可能性이 있다고 考察하고 있다. Sveinbjornsson et al.(1995)도 AG를 FITC로 標識하여 肛門으로 強制 注入한 24-72시간 후 만든 파라핀 組織標本중에 腸上皮의 空胞속에 出現하는 것으로 보아 飲作用(pnocyctocytosis)의해서 腸上皮속으로 들어가 血液을 따라 心臟으로 들어간 다음 尿로 排泄되는 것으로 推定하고 있다. 이렇게 血流中으로 들어온 AG는 分子量이 크기 때문에 血液속에 滯留하는 期間이 길어 非特異 免疫系를 效率的으로 刺戟할 수 있을 것이라 考察하고 있다. 따라서 현단계에 있어 吸收力이 낮은 非特異免疫增強劑의 經口投與 方法으로는 一定濃度를 長期間 投與하는 방법밖에 없기 때문에 본 연구에서는 그 濃度와 投與期間을 設定을 위한 근거를 마련하고자 하였으며 30일간 장기 투여함으로써 生殘率을 높일 수 있다는 것이 判明되었다. 한편 조피블락에 대한 실험적 감염에 대한 病原性이 매우 높아 發病이 충분히 예견되면서도 조

피블락에 發病되고 있지 않는 *E. tarda*에 대해서는 전혀 投與 效果가 없는 것이 特徵的이며, 가두리 養成中에 發病되는 것으로 알려진 *S. epidermis*에 대해서 높은 抵抗性을 나타내어 가두리 移送前에 投與하는 것이 매우 效果的일 것으로 判斷된다. 또 消化率이 精製된 多糖體보다는 낮기는 하지만 보다 값싸고 손쉽게 入手할 수 빵효모 13g에는 글루칸의 粗精製 成分 1g정도가 함유되어 있기 때문에 (Rumsey et al., 1992), 빵효모를 직접 飼料에 混合하여 投與함으로써 細菌性疾病에 대한 生殘率을 높일 수 있을 것으로 생각되고, 글루칸 投與 후의 選別과 輸送에 따른 生殘率에 미치는 影響을 究明할 必要가 있을 것으로 생각된다.

### 第 3 節 $\beta$ -glucan의 經口投與效果와 移送後의 生殘率

제 2절에서는  $\beta$ -glucan을 經口投與하였을 때 投與濃度와 期間에 따라 다르기는 하지만 細菌性疾病의 人爲感染에 대한 生殘率을 높일 수 있다는 것을 立證하였다. 본 절에서는  $\beta$ -glucan의 投與期間의 延長과 高價인  $\beta$ -glucan의 代替原으로서  $\beta$ -glucan을 多量 含有하고 있으면서 漁民이 손쉽게 廉價로 購入할 수 있는 제빵용효모의 效用 價値를 比較 調査하였다. 또  $\beta$ -glucan과 제빵용효모의 競구투여 후 輸送間의 死亡率, 輸送後의 生殘率을 調査하였으며, 輸送後 生殘魚의 *S. epidermidis*의 人爲感染에 대한 抵抗力을 調査하였다.

#### 1. 材料 및 方法

##### 가. 供試魚

忠南 泰安의 A 種苗生産場과 全北 扶安의 B 養殖場에서 購入한 稚魚 10,000尾(平均體長 2.8Cm)를 全北 扶安 所在의 群山大學校 淺海養殖 實習場의 FRP水曹에 收容한 다음 市販의 配合飼料를 投與하면서 2週 間 流水式으로 馴致 飼育하였다. 사육시 水溫은 22-26℃였으며 飼料는 넙치용 配合飼料(3號)를 사용하였다. 移動에 따른 生殘率의 조사 시의 어류의 體重은 飼育期間(50일간)의 成長때문에 平均體長 6.1Cm의 魚類를 使用하였다.

##### 나. 글루칸과 빵효모의 競구투여

供試魚는  $\beta$ -glucan投與區 2개구, 제빵용효모 投與區 2개구 및 對照區의 5개 그룹으로 나누어 直徑 1.2m의 FRP圓形水槽에 收容한 아래와 같이 제조한 各各의 飼料를 투여하면서 流水式으로 飼育하였다.

飼育海水는 모래여과 海水를 使用하였으며, 바닥청소는 每 10日마다 實施하였다.

넙치용 배합사료에 飼料 乾重量의 0.1%와 1%의  $\beta$ -glucan(Sigma, G6513)과 5%와 10%의 제빵용 생효모를 각각 添加한 다음 飼料 重量의 1%의 모래여과해수를 添加하여 골고루 혼합하여  $\beta$ -glucan과 빵효모를 飼料 表面에 吸着시킨 다음, 室溫의 그늘에서 건조시켜 冷藏庫에 保管하였다. 사료제조는 每 10일 分量씩 만들었으며, 이 때마다 빵효모는 새로운 것으로 交換하여 使用하였다. 제조한 사료의 一日 投與量은 魚體重의 3%를 하루 2차례 나누어 20일간, 30일간, 50일간 투여하였으며, 對照區는  $\beta$ -glucan이나 제빵용효모를 첨가하지 않은 시판의 配合飼料를 同量 投與하였다.

#### 다. *Vibrio ordalii*의 人爲感染에 대한 生殘率

2%식염첨가 BHIA에 25℃에 24시간 배양한 *V. ordalii*(95-5)를 滅菌 生理食鹽水에 浮遊시켜 3회 遠心 洗滌한 다음 멸균생리식염수에 最終濃도가  $1.0 \times 10^7$ cfu/ml,  $1.0 \times 10^6$ cfu/ml  $1.0 \times 10^5$ cfu/ml,  $1.0 \times 10^4$ cfu/ml의 濃度로 조정하여 등지느러미밑의 筋肉에 各 시험구 別 20미씩에 各 濃度의 0.1ml를 注射하였다. 接種魚는 수량 0.6ton의 플라스틱용기에 수용하여 25℃에서 10일간 止水式으로 飼育하면서 生殘率을 調查하였다. 이 기간 동안 사료는 투여하지 않았으며 每日 午前 午後 2차례 水量의 1/2를 새로운 海水로 交換하여 水質의 惡變을 防止하였다.

#### 라. *E. tarda*와 *S. epidermidis*의 人爲感染에 대한 生殘率

50日間 公시사료로 飼育한 어류에 *E. tarda*(FSW 81040)와 *S.*

*epidermidis*(JS 017)를 腹腔接種한 다음 10일간의 生殘率로 非特異性을 比較하였다.

*S. epidermidis*는 BHIA평판배지, *E. tarda*는 TSA평판배지를 사용하여 25°C에서 24시간 培養한 균을 人爲感染用菌으로 使用하였다. 25°C, 24시간 배양한 다음 자라난 각각의 菌體를 滅菌生理食鹽水에 浮遊시켜 *S. epidermidis*는  $1.0 \times 10^{10}$ cfu/ml, *E. tarda*가  $1.0 \times 10^6$ cfu/ml의 生菌浮遊液을 만들어 각 菌液의 0.1ml를 각 20마리의 魚類에 腹腔注射하였다. 生菌接種魚는 *V. ordalii*接種魚와 같은 條件으로 飼育하면서 10日間の 生存率을 구하였다.

#### 마. 輸送에 따른 生殘率 比較

直徑 30cm, 길이 60cm의 원통형 비닐봉지에 濾過海水 300 l를 넣은 다음 1%  $\beta$ -glucan과 10% 제빵용효모 添加 飼料로 50日間 飼育한 魚類 각 80미씩을 收容하였다. 비닐봉지속의 空氣를 除去한 다음 液化酸素를 注入시켜고 고무끈으로 密封하였다. 魚類가 들어있는 비닐봉지는 水溫 25°C의 海水로 채워진 直徑 1.5m의 원통형 水槽 위에 띄운 다음 한쪽끝은 復原力을 갖도록 고무 밴드로 連結하여 固定된 支持臺에 固定시키고, 다른 한쪽은 나일론끈으로 連結하여 shaker(Daeil, TM 3, Korea)에 連結시켜 50rpm의 速度로 前後 往復運動을 시켜 種苗 輸送時의 車輛의 흔들림과 類似한 條件을 부여하였다. 비닐봉지속의 어류는 3시간 과 5시간 후 直徑 1.5m의 원통형 수조(수량 5ton)에 收容하여 1시간 관찰하면서 사망어를 計數하여 수송동안의 死亡率로 하였다. 또 放養후 5일간 무급이, 流水式으로 사육하면서 種苗의 生殘率을 구하였다. 또 방양 10일후의 生殘魚 각 20미씩에 대하여 *S. epidermidis*  $1.0 \times 10^9$ cfu/0.1ml를 腹腔에 注射한

다음 다른 人爲感染實驗과 같은 條件으로 飼育하면서 10일간의 生殘  
率을 구하였다. 단 對照群은 무첨가사료로 移動한 魚類의 미수 부족  
으로 馴致飼育中인 같은 크기의 魚類를 使用하였다.

## 2. 結果 및 考察

$\beta$ -glucan과 제빵용 효모를 添加한 사료를 20日間 經口投與한 후 *V. ordalii*를 人爲感染시켰을 때의 生存率은 Fig. 8에 나타냈다.

0.5%  $\beta$ -glucan, 5% 제빵용효모를 첨가하였을 때는 人爲感染後 5일 이내에 全量 斃死하여 添加效果가 없었지만, 1%  $\beta$ -glucan을 投與한 경우는 10%가 살아남았다.

같은 菌量의 *V. ordalii*를 30日間 과 50日間 投與後에 人爲感染시켰을 때의 生存率은 Fig. 9와 Fig. 10에 表示하였다.

30일간 투여하였을 경우 0.5%  $\beta$ -glucan첨가구는 5%, 1%  $\beta$ -glucan첨가구는 15%, 10% 제빵용효모 첨가구는 10%가 生存하였지만, 5% 제빵용 효모첨가구는 6일간 生存하여 20일간 투여구에 비해 生存期間은 다소 길었지만 관찰기간인 10일이내에 全량 斃死하여 첨가효과를 찾을 수 없었다. 한편 50일간 투여구는 0.5%  $\beta$ -glucan첨가구가 15%, 1%  $\beta$ -glucan가 30%가 生殘하였으며, 제빵용 효모첨가구는 5%첨가구가 5%, 10%첨가구가 10%生殘하였다. 20일간, 30일간, 50일간 투여구간의 生殘율을 비교하면  $\beta$ -glucan은 1%첨가구가 0.5%첨가구에 비해 生殘率이 높으며, 投與期間이 길수록 生殘率은 높아진 반면 제빵용 효모첨가구는  $\beta$ -glucan에 비해 生殘率이 낮았다.

한편 1%  $\beta$ -glucan과 10%의 제빵용 효모를 50일간 투여한 어류에 대한 *V. ordalii*의 10일간의 100%致死菌量 以下の 濃度에 대한 生殘率은 Fig. 11에 나타냈다. 1%  $\beta$ -glucan첨가구는  $1.0 \times 10^5$ cfu/fish를 接種한 경우 30%,  $1.0 \times 10^4$ cfu/fish와  $1.0 \times 10^3$ cfu/fish를 接種한 경우는 각각 90%와 100%가 生存하였다. 10% 제빵용 효모를 첨가하여 투여한 구는  $1.0 \times 10^5$ cfu/fish를 接種한 경우 15%,  $1.0 \times 10^4$ cfu/fish와  $1.0 \times 10^3$ cfu/fish를 接種한 경우는 각각 30%와 95%가 生存하여 1%  $\beta$

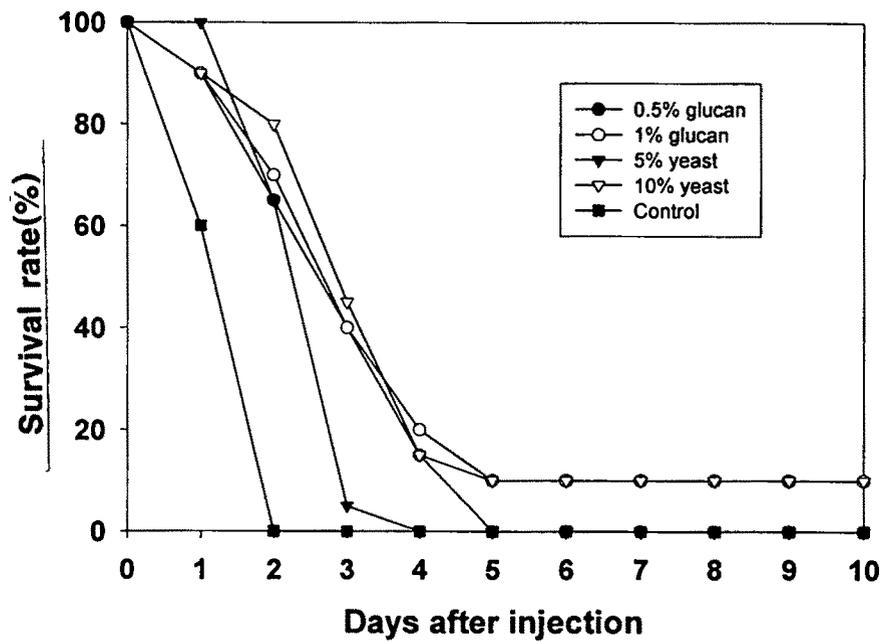


Fig. 8. Effect of  $\beta$ -glucan and bakery yeast on the survival rates of rockfish intramuscularly challenged with *V. ordalii*( $1.0 \times 10^6$ cfu/fish). The fish were fed the commercial pellet supplemented with  $\beta$ -glucan or bakery yeast for 20 days prior to the bacterial challenge(n=20 per group).

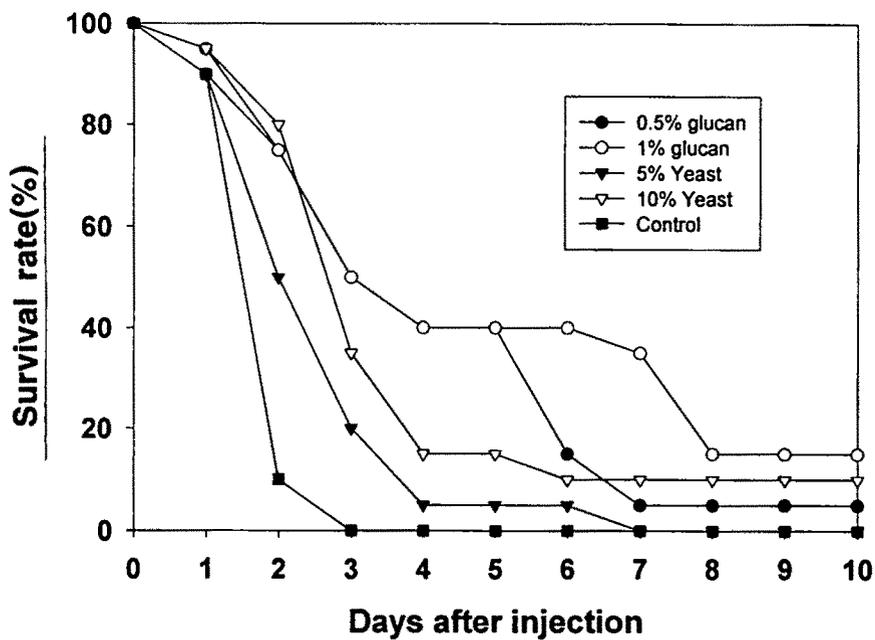


Fig. 9. Effect of  $\beta$ -glucan and bakery yeast on the survival rates of rockfish intramuscularly challenged with *V. ordalii* ( $1.0 \times 10^6$  cfu/fish). The fish were fed the commercial pellet supplemented with  $\beta$ -glucan or bakery yeast for 30 days prior to the bacterial challenge (n=20 per group).

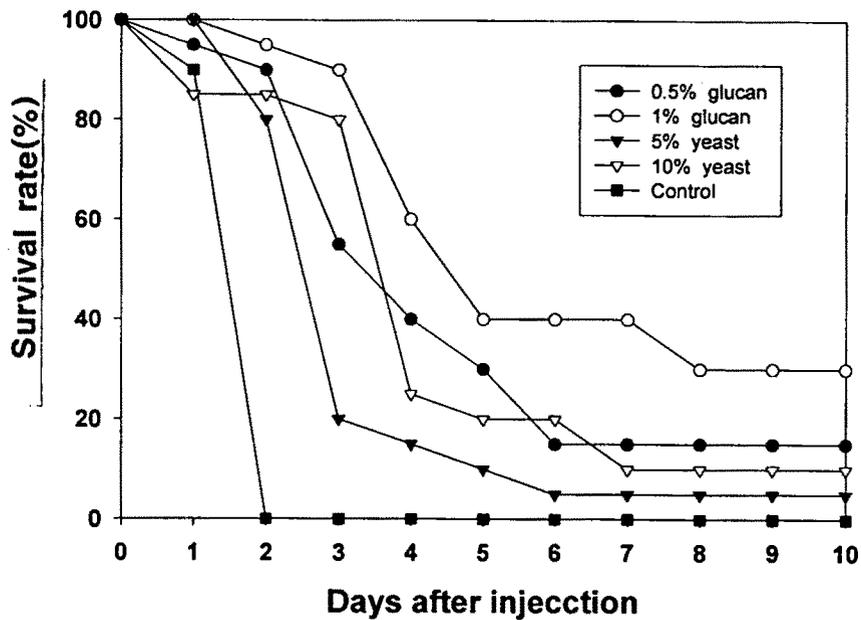


Fig. 10. Effect of  $\beta$ -glucan and bakery yeast on the survival rates of rockfish intramuscularly challenged with *V. ordalii*( $1.0 \times 10^6$ cfu/fish). The fish were fed the commercial pellet supplemented with  $\beta$ -glucan or bakery yeast for 50 days prior to the bacterial challenge(n=20 per group).

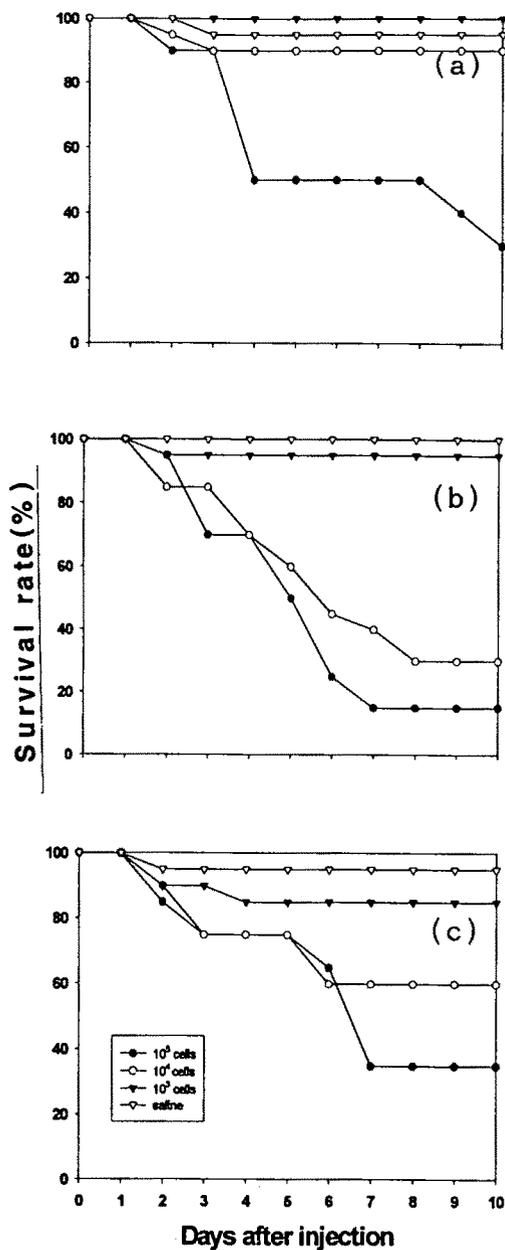


Fig. 11. Effect of  $\beta$ -glucan and bakery yeast on the survival rates of rockfish intramuscularly challenged with different cells of *V. ordalii*. The fish were fed the commercial pellet supplemented with  $\beta$ -glucan(a), bakery yeast(b) or control(c) for 50 days prior to the bacterial challenge(n=20 per group).

-glucan添加區에 비해 生殘率이 낮게 나타났으며, 對照區는  $1.0 \times 10^5$ cfu/fish 접종구가 35%,  $1.0 \times 10^4$ cfu/fish접종구가 60%,  $1.0 \times 10^3$ cfu/fish접종구가 85%生殘하였다. 이러한 結果는 사료에  $\beta$ -glucan을 添加하여 經口投與하는 것은 細菌性疾病에 대한 生存率을 向上시킬 수 있으나, 高濃度의 菌量일수록 添加效果는 낮아지는 반면 菌量이 低濃度일 경우 顯著한 效果가 있음을 말하여 주고 있다. 한편 제빵용 효모는 무첨가구와 별차이가 없었다. 또 1%  $\beta$ -glucan과 제빵용 효모첨가사료를 50일간 투여한 어류의 *E. tarda*와 *S. epidermidis*의 100%致死量에 대한 生殘率은 Fig.12와 Fig. 13과 같다.  $\beta$ -glucan과 제빵용 효모의 첨가는 *E. tarda*에 대한 抵抗性에는 전혀 影響을 미치지 못한 반면, *S. epidermidis*의 인위감염에 대하여는  $\beta$ -glucan첨가구가 85%의 높은 生殘率을 보였으며, 제빵용 효모첨가구도 10%의 生殘率을 나타내어  $\beta$ -glucan구가 제빵용 효모첨가구나 대조구에 비해 높은 生殘率을 나타내어  $\beta$ -glucan의 첨가가 균의 種類에 따라 抵抗의 程度에 차이가 있음을 알 수 있다.

$\beta$ -glucan과 같은 免疫增強劑의 經口投與에 의한 防禦力의 增強에 관한 研究는 소수에 不過하지만, 거의 모두가 防禦力의 增強을 誘發시키는 것으로 報告되고 있다. Siwicki et al.(1994)은 무지개송어에  $\beta$ -glucan또는 제빵용 효모를 經口投與하였을 때 非特異的 免疫反應이 增強될 뿐만아니라 疾病에 대한 抵抗性도 增加되어졌다고 報告하였다. 또 Duncan and Kleisus(1996)이 차넬메기에  $\beta$ -glucan또는 제빵용 효모를 經口投與하였을 때 末梢血液中の 總血球數에는 變動이 없지만,  $\beta$ -glucan또는 제빵용 효모를 經口投與區가 赤血球와 림프구의 비율이 현저히 增加되었다. 특히  $\beta$ -glucan구의 單球와 好中球의 走化性이 현저히 增加되어 異物을 認識하고 移動하는 能力이 向上되

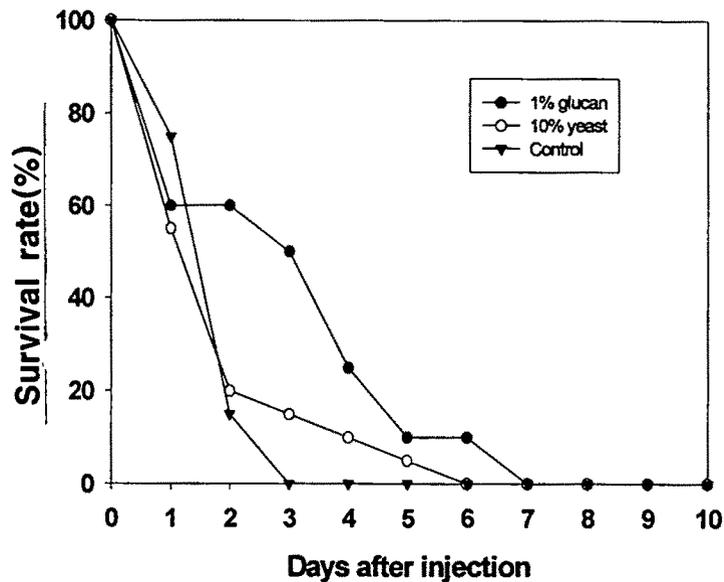


Fig. 12. Effect of  $\beta$ -glucan and bakery yeast on the survival rates of rockfish intraperitoneally challenged with *E. tarda* ( $1.0 \times 10^5$  cfu/fish). The fish were fed the commercial pellet supplemented with  $\beta$ -glucan or bakery yeast for 50 days prior to the bacterial challenge ( $n=20$  per group).

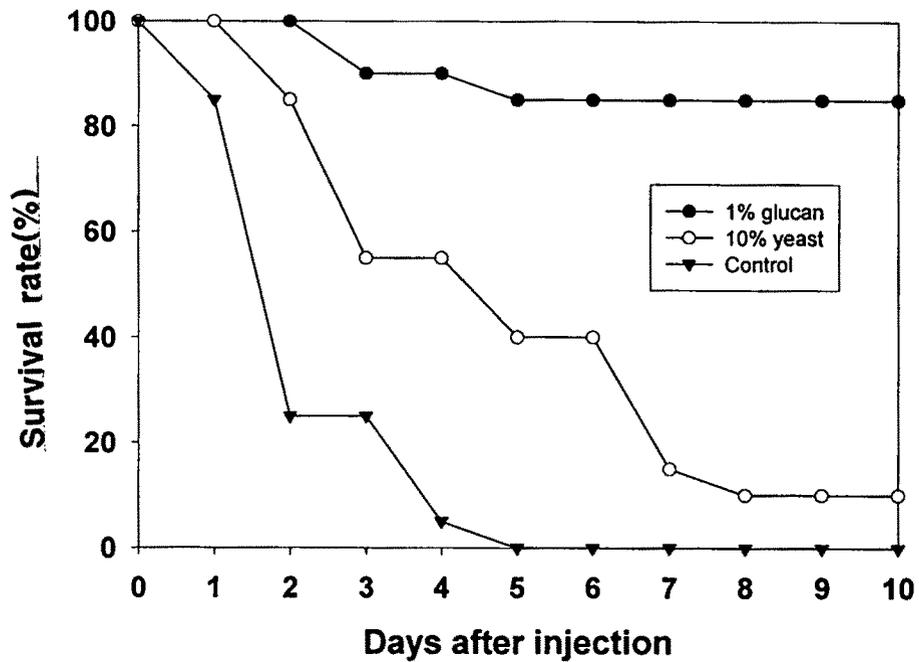


Fig. 13. Effect of  $\beta$ -glucan and bakery yeast on the survival rates of rockfish intraperitoneally challenged with *S. epidermidis*( $1.0 \times 10^9$ cfu/fish). The fish were fed the commercial pellet supplemented with  $\beta$ -glucan or bakery yeast for 50 days prior to the bacterial challenge(n=20 per group).

었지만, 제빵용 효모투여구의 單球數에는 變化가 없었다고 하였다.

그들은 제빵용 효모의 刺戟이 微弱한 理由로 제빵용 효모에 多量의  $\beta$ -glucan이 含有되어 있지만, 精製된  $\beta$ -glucan에 비해 吸收가 되지 않기 때문에 效果가 낮은 것으로 推定하고 있다(Rumsey et al., 1992). 따라서 본 實驗에서의 제빵용 효모의 첨가 후 生殘率의 向上은 있었지만 이는 多量의 添加(10%)에 의한 吸收  $\beta$ -glucan량의 增加에 의한 것인지 아니면 酵母가 가지고 있는 飼料의 unknown factor로서 供給에 의한 것인지 斷定하기는 不可能하지만 低價인 제빵용 효모를 魚類가 쉽게 吸收할 수 있도록 處理한다면 비특이 免疫增強劑로서의 效用性은 더욱 增加될 수 있을 것으로 생각된다.

1%  $\beta$ -glucan 또는 10% 제빵용효모 첨가사료를 50일간 투여후 3시간 및 5시간 輸送 直後와 收容 後 5日間の 生殘率은 Fig.14과 Fig. 15에 나타냈다. 3時間 手術 후 1% $\beta$ -glucan첨가구는 83.8%, 10% 제빵용 효모첨가구는 73.8%가 살아남은 반면 무첨가구는 45%가 生殘하여 1% $\beta$ -glucan과 10%제빵용효모 첨가구의 生殘率이 현저히 높았다. 또 手術후 5일간의 最終的인 生殘率은 1% $\beta$ -glucan첨가구가 68.8%, 10% 제빵용 효모첨가구가 47.5%, 무첨가구가 31.3%로 生殘하여 1% $\beta$ -glucan첨가구의 生殘率이 對照區에 비해 현저히 높았다. 또 5시간동안 輸送한 直後の 生殘率을 보면 1% $\beta$ -glucan첨가구는 33.8%, 10% 제빵용 효모첨가구는 45%살아남은 반면 무첨가구는 6.3%만이 살아남아 1% $\beta$ -glucan첨가구와 10%제빵용효모첨가구의 生殘율이 현저히 높았다. 收容 5일 후의 最終 生殘率은 1% $\beta$ -glucan첨가구가 25.0%, 10%제빵용 효모첨가구가 37.5%生殘한 반면 무첨가구는 生殘율이 1.3%에 불과하였다. 手術 10일 후의 生殘魚에 *S. epidermidis*를 人爲感染시킨 結果는 Fig. 16과 Fig. 17에 나타낸 것처럼 免疫增強劑의 첨

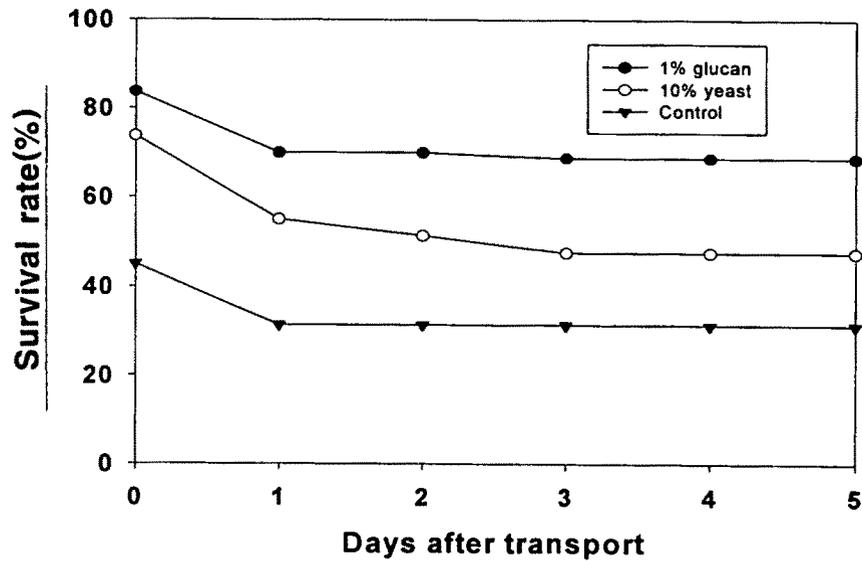


Fig. 14. Survival rate of rockfish orally administrated with  $\beta$ -glucan or bakery yeast for 50days prior to the transport. The fish were transported for 3hr in a 300 L of Vinyle sack with slow agitation. After releasing the fish in stocking aquaria, the survival rates were monitored for 5 days(n=80).

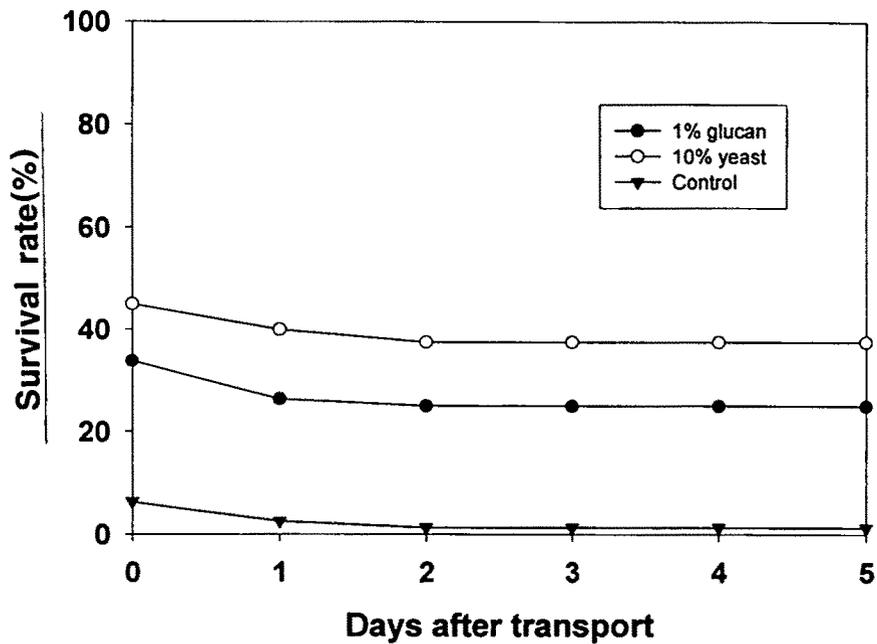


Fig.15. Survival rate of rockfish orally administrated with  $\beta$ -glucan or bakery yeast for 50days prior to the transport. The fish were transported for 5hr in a 300 L of Vinyle sack with slow agitation. After releasing the fish in stocking aquaria, the survival rates were monitored for 5 days(n=80).

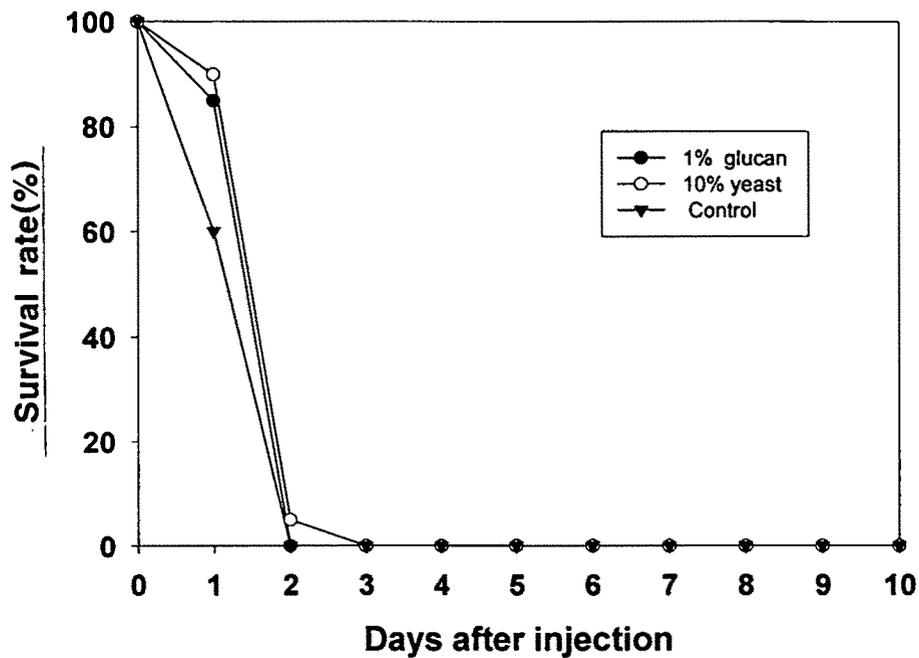


Fig. 16. Survival rate of rockfish injected with *S. epidermidis*. The fish were fed commercial pellets supplemented with  $\beta$ -glucan or bakery yeast for 50 days and transported for 3 hr in Vinyl sacks with slow agitation. The fish were received the bacterial injection 10 days after transport(n=20).

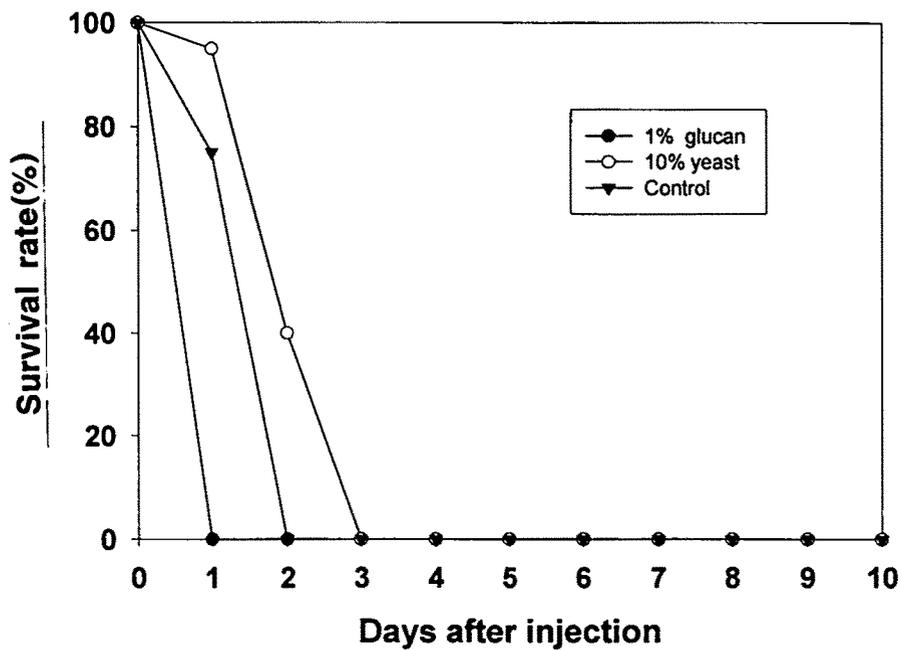


Fig. 17. Survival rate of rock fish injected with *S. epidermidis*. The fish were fed commercial pellets supplemented with  $\beta$ -glucan or bakery yeast for 50 days and transported for 5 hr in Vinyl sacks with slow agitation. The fish were received the bacterial injection 10 days after transport(n=20).

가 또는 輸送時間의 長短에 不問하고 모두 3일 以內에 사망하여 添加效果는 전혀 나타나지 않았다.

이러한 結果는 조피블락의 種苗 輸送前  $\beta$ -glucan을 添加한 사료를 투여함으로써 生殘率을 높일 수 있으며, 제빵용 효모의 첨가도 생산을 향상시킬 수 있지만 輸送時間이 길어지면 添加사료의 投與에도 不拘하고 死亡率은 증가되며, 免疫增強劑의 添加 有無에 關係없이 種苗의 輸送 후에는 疾病에 대한 抵抗性이 減少된다는 것을 의미한다.

어류에 있어  $\beta$ -glucan과 같은 免疫增強劑는 疾病에 대한 抵抗性을 增加시킬 뿐만아니라 스트레스에 의한 免疫抑制反應을 줄이기 위하여 使用되는데(Anderson, 1992), 어류도 스트레스를 받게 되면 glucocorticoids의 分泌가 促進되어 疾病에 대한 感受性이 增加된다(Pickeling et al., 1982). 조피블락도 人工種苗生産 後 養性을 위한 種苗의 輸送 途中 또는 輸送 後에 斃死가 일어나고 있어 種苗價의 上昇과 需給의 不安定으로 조피블락 養殖의 擴大를 阻害하고 있다는 것은 周知의 事實이다. Jeney et al.(1997)은 무지개송어에 여러 가지 濃度의  $\beta$ -glucan을 4주간 경구투여 한 결과 글루칸을 투여한 어류에서는 食細胞作用의 增加와 活性酸素의 放出이 增加되고, 2시간 輸送에 의한 스트레스를 가한 후의 食細胞作用과 血清蛋白質, 리소자임 活性 및 活性酸素의 放出能力이 輸送 前에 비해 顯著히 低下되었지만, 輸送 後에 輸送 前의 狀態로 回復하는 데는  $\beta$ -glucan투여구(0.1%첨가구)가 가장 빠르기 때문에 輸送 前에 一定濃度의  $\beta$ -glucan을 經口投與하는 것이 스트레스에 抵抗性을 增加시킬 수 있는 方法이라고 하였는데, 이러한 結果는 本 研究에서의 1% $\beta$ -glucan첨가투여구가 輸送 途中 또는 輸送 後에 生殘率을 높일 수 있다는 結果와 一致하지만 輸送 후의 人爲感染에 대해서는 전혀 抵抗性에 差異가 없었

다. 이는 輸送時에 오는 스트레스에 의한 生理變動이 疾病에 대한 抵抗性에 影響을 미치고 있기 때문에 正常常態로 回復하기 위한 勞力의 反響이라고 생각되지만 앞으로의 研究課題라 할 수 있다.

## 要 約

### 1. 種苗生産期の 斃死 原因 究明

種苗生産期の 斃死는 仔魚産出 후 1일, 7일, 14일, 30일 전후에서 斃死가 일어나는데 30일경에 *Vibrio ordalii*의 感染에 의해 發生하는 것을 제외하고는 먹이부침에 適應하지 못한 斃死였다. 비브리오병은 水溫 18-21℃에서 發病되며 共通的인 症狀은 頭部와 峽部の 發赤으로 斃死率은 90%以上 이며, 當年産 種苗가 1년어에 비해 높은 感受性을 가지고 있었다. 病魚는 아가미의 毛細血管內에 病原菌이 增殖함으로서 呼吸上皮가 浮腫을 일으켜 剝離되어지며, 肝臟의 類洞과 細尿管 및 뇌의 혈관內에 증식함으로서 急性敗血症을 일으켜 호흡 곤란과 平衡感覺을 喪失하여 사망하게 되는데 消化管系에는 뚜렷한 病變은 없었다.

### 2. 免疫增強劑의 投與法 確立

市販 配合飼料에  $\beta$ -glucan을 0.1%와 1%添加하여 魚體重의 3%로 10일, 20일 30일간 投與한 다음 *Vibrio ordalii*균의 致死量을 筋肉注射한 다음 10일간 飼育하면서 生殘率을 比較한 結果 10일 투여는 전혀 효과가 없었고 20일 투여구와 30일 투여구는 生殘율이 높게 나타났다. 또 20일투여구와 30일 투여구에 대한 *Staphylococcus epidermidis*와 *Edwardsiella tarda*의 致死量을 接種한 結果 *S. epidermidis*에는 높은 抵抗性을 나타내었지만, *E. tarda*에는 전혀 투여 효과가 없었다. 서로 다른 濃度의 글루칸액 단독 또는 *V. ordalii* 사균과의 混合液에 15분 또는 30분 浸漬에도 生殘율에는 차이가 없어 침지법은 實用性이 없는 것으로 나타났다. 投與期間의 設定을 위해

$\beta$ -glucan을 0.5%또는 1%첨가하여 20일, 30일, 50일간 투여한 결과 1%첨가농도가 投與期間이 길수록 生殘率이 높게 났으며, *V. ordalii* 균의 치사농도 以下の 균을 筋肉注射한 후의 生殘率은 치사농도에 가까울수록 生殘率은 낮아지는 반면 低濃度에는 生잔율이 높게 나타나,  $\beta$ -glucan의 經口投與의 질병에 대한 豫防的 효과가 立證되었다. 高價인  $\beta$ -glucan의 代替原으로서 다량의  $\beta$ -glucan이 含有되어 있으면서 飼料 添加劑로서 효과가 있는 제빵용 酵母를 5%와 10%첨가하여 투여하였을 때는 10%에서 투여기간이 길수록 生잔율은 增加하는 경향이 있으나 非特異免疫系의 刺戟에 의한 것으로는 볼 수 없으며 제빵용 효모의 魚類의 消化·吸收를 促進시키기 위해 보다 低分子의 物質로 變形시킨다면 그 效用性은 충분히 있을 것으로 판단된다.

1%  $\beta$ -glucan과 10% 제빵용효모를 50일간 투여한 다음 일반 양식어민이 種묘를 輸送하는 方法대로 비닐봉지에 산소를 注入한 다음 3시간과 5시간 스트레스를 가한 직후와 수송 5일간 生잔율을 比較한 결과  $\beta$ -glucan첨가구와 10% 제빵용효모첨가구의 生殘率이 무첨가구에 비해 높게 나타났고, 수송시간별로는 수송시간이 길수록 生잔미수는 비특이면역중강제의 투여에도 不拘하고 生잔율은 低下되었다. 수송 10일후의 生殘魚에 대하여 *E. tarda*와 *S. epidermidis*를 인위감염시킨 결과 비특이면역중강제의 투여의 有無에 관계없이 全량 斃死하여 수송후에 질병에 대한 抵抗性의 增加는 인정할 수 없었으나 수송간 또는 수송 후의 生殘率에는 커다란 영향을 미치는 것으로 나타났다.

이상의 결과를 요약하면 양식조피불락의 種苗生産期에 大量斃死를 일으키는 疾病은 *V. ordalii*의 감염에 의한 질병으로 병원균이 혈관 내에 증식함으로 急性敗血症을 일으켜 사망하게 된다. 또 種묘생산 과정 또는 種묘사육에  $\beta$ -glucan을 配合飼料에 1%첨가함으로써 조피

블락 종묘의 生殘率 또는 수송후의 生殘率을 增加시킬 수 있는 것으로 나타났으며, 대체원으로서 제빵용효모의 10%첨가도  $\beta$ -glucan보다는 미약하나마 종묘의 生殘率을 提高시킬 수 있는 것으로 나타나 非特異免疫增強劑로서  $\beta$ -glucan은 細菌性 疾病의 禮防 및 疾病感染時의 生殘率 제고를 위한 水産用 飼料 添加劑로서의 效能이 立證되었다.

## 參考文獻

- Anderson, D. P.(1992): Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish.: application to aquaculture. Ann. Rev. Fish Dis., 2, 281-307.
- Chen, D. and Ainsworth, A. J.(1992): Glucan administration potentiates immune defense mechanisms of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. J. Fish Dis., 15:295-304.
- Di Luzio, N.R.(1985): Update on the immunomodulating activities of glucan. Springer Seminars in Immunopathol., 8. 387-400.
- Duncan, P. L.and P.H. Klesius(1996): Dietary immunostimulants enhance nonspecific immune responses in channel catfish but not resistance to *Edwardsiella ictaluri*. J. aquat. Anim. Health, 8, 241-248.
- Ellis, A. E.(1988): Current aspect of fish vaccination. Dis. aquat. Org., 4, 159-164.
- Figueras, A., Santatem, M.M. and Novoa, B.(1977): In vitro immunostimulation of turbot(*Scophthalmus maximus*) leucocytes with  $\beta$ -glucan and/or *Photobacterium damsela* bacterin. Fish Pathol.,32, 153-157.
- Engstad, R. E., Robertsen, B. and Frivold, E.(1992): Yeast glucan induces increase in activity of lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. Fish & Shellfish Immunol., 2: 287-297.
- Fryer, J. L., Rohovec, J. S., Tebbit, G. L., McMichael, J. S.

- and Pilcher, K. S.(1976): Vaccination for control of infectious diseases in Pacific salmon. *Fish Pathol.*, 10, 155-164.
- Gould, R. W., O'Leary, P.J., Garrison, R. L., Rohovec, J. S. and Fryer, J. L.(1978): Spray vaccination: a method for the immunization fo fish. *Fish Pathol.*, 13, 63-68.
- Harrell, L. W., A. J. Novotny, M. H. Schiewe, and H. O. Hodgins(1976): Isolation and description of two vibrios pathogenic to Pacific salmon in Puget Sound, Washington. *Fish. Bull.*, 74, 447-449.
- 황영태, 김봉래, 백국기, 전제천(1992): 조피볼락 종묘양산시험. 수진사업보고 94, 10-15.
- Ingebrigtsen, K., T.E. Horsberg, R. Dalmo and R. Seljelid(1993): Tissue distribution of the immunomodulator aminated  $\beta$ 1-3 polyguucose in Atlantic salmon(*Salmo salar*) after intravenous, intraperitoneal and peroral administration. *Aquaculture*, 116: 315-329.
- 岩田明雄, 芦立昌一(1982): クロソイの種苗量産. 栽培技研, 11(1), 35-44.
- Jeney, G. and Anderson, D. P(1993): Glucan injection or bath exposure given alone or in combination with a bacterin enhance the non-specific defence mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 116: 315-329.
- Jeney, G., M. Galetti, D. Volpatti, Z. Jeney and D. P. Anderson(1997): Prevention of stress in rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different

- doses of glucan. *Aquaculture*, 154, 1-15.
- Johnsen, K. A. and Amend, D. F.(1983): Efficacy of *Vibrio anguillarum* and *Yersinia ruckeri* bacterins applied by oral and intubation of salmonids. *J. Fish. Dis.*, 6, 473-476.
- Jorgensen, J. B., Lunde, H. and Robertsen, B(1993a): Peritoneal and head kidney cell response to intraperitoneally injected yeast glucan in Atlantic salmon, *Salmo salar* L.. *J. Fish Dis.*, 16: 313-325.
- Jorgensen, J. B. and Robertsen, B.(1995): Yeast  $\beta$ -glucan stimulates respiratory burst activities of atlantic salmon(*Salmo salar* L.) macrophages. *Dev. Comp. Immunol.*, 19, 43-57.
- Jorgensen, J. B., Sharp, G. J. E., Secombs, C. J. and Robertsen, B.(1993b): Effect of yeast cell wall glucan on the bacterial activity of rainbow trout macrophages. *Fish & Shellfish Immunol.*, 3: 267-277.
- 김상근, 박 승(1992): 조피볼락 종묘양산시험. 수진사업보고 94, 73-76.
- 이창규, 고태승(1992): 조피볼락 종묘양산시험. 수진연구보고 94, 37-41.
- 文谷 俊雄, 星合愿 一, 畑井喜司雄 玉井登, 窪田三郎(1987): クロソイ稚魚の*Vibrio ordalii* 感染による斃死例とその病理. 魚病研究, 22, 113-114.
- Moustafa, M., H. Kodama, T. Mikami, and H. Izawa(1985): Toxic substance in culture infiltrate of *Vibrio* sp. strain N7802, a

- poor producer of hemolysin and protease. *Fish Pathol.*, 20, 181-186.
- 室賀 清邦, 城 泰彦, 増村 和彦(1986): アユおよびクロソイ病魚から分離された *Vibrio ordalii*. *魚病研究*, 21, 239-243.
- Nikl, L., Evelyn, T. P. T. and Albright, L. J.(1993): Trials with an orally and immersion-administered beta-1,3-glucan as an immunoprophylactic against *Aeromonas salmonicida* in juvenile chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Dis. aquat. Org.*, 17:191-196.
- 大西 圭二, 室賀 清邦(1976): 養殖ニジマスのピブリオ病の一原因菌 生化学的 性状. *魚病研究*, 11, 159-165.
- 박성우, 김영길(1996): 글루칸 투여에 의한 한국산 메기의 *Edwardsiella ictaluri*와 *Aeromonas hydrophila* 감염증에 대한 저항성의 증가. *한국어병학회지*, 9: 79-85.
- 박성우, 김영길, 최동림(1996):  $\beta$ -glucan을 접종한 한국산 메기 (*Silurus asotus*)의 호중구와 리소자임 활성 증강. *한국어병학회지*, 8, 87-93.
- Pickerling, A. D., T. G. Pottinnger and P. Christie(1982): Recovery of the brown trout, *Salmo salar* L. from acute handling stress: A time-course study. *J. Fish Biol.*, 24, 731-740.
- Raa, J., Roerstad, G., Engstad, R. and Raa, J.(1992): The use of immunostimulants to increase resistance of aquatic organisms to microbial infection. *Disease in Asian Aquaculture*.  
I. Proceedings of the first symposium on disease in Asian

- aquaculture. Shariff, M., Subasinghe, R.P., and Arthur, J.R.(Ed.). pp 26-29.
- Ransom, D. R., C. N. Lannam, J. S. Rohovec, and J.L.Flyer(1984): Comparison of histopathology caused *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii* in the species of Pacific salmon. J. Fish Dis., 7, 107-115.
- Robertsen, B., Rorstad, G., Engstad, R. and Raa, J.(1990): Enhancement of non-specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. J. Fish Dis., 13: 391-400.
- Rorstad G., P. Aasjord and Robertsen(1993): Adjuvant effect of a yeast glucan in vaccines against furunculosis in Atlantic salmon(*Salmo salar* L.). Fish and Shellfish Immunol., 3: 179-190.
- Rumsey, G.L., R.A.Winfrey, and S.G. Hughs(1992): Nutritional values of dietary nucleic acids and purine bases to rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 108, 97-110.
- Salati, F. and Kusuda, R.(1985): Vaccine preparation used for immunization of eel, *Anguilla japonica* against *Edwardsiella tarda* infection. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 51, 1233-1237.
- Schiewe, M.H., J.H.Crosby, and E. J. Ordal(1977): Deoxyribonucleic acid relationship among marine vibrios pathogenic to fish. Can. J. Microbiol., 23, 954-958.
- Schiewe, M. H., T. J. Trust, and J. H. Crosby(1981): *Vibrio ordalii* sp. nov.: a causative agent vibriosis in fish. Cur.