

## 해산 양식어류로부터 분리된 연쇄구균종의 원인균, *Lactococcus garvieae* 에 대한 연구

이덕찬 · 이재일\* · 박찬일\*\* · 박수일†

부경대학교 수산생명의학과 · \*포항지방해양수산청 · \*\*동경수대 자원육성과

## The study on the causal agent of Streptococciosis (*Lactococcus garvieae*), isolated from cultured marine fishes

Deok-Chan Lee, Jae-II Lee\*, Chan-II Park\*\* and Soo-II Park†

Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

\* Pohang Regional Maritime Affairs & Fisheries Office

\*\* Department of Aquatic Biosciences, Tokyo University of Fisheries, Konan 4-5-7,  
Minato, Tokyo 108, Japan

The purpose of this study was to investigate the microbiological characteristics and the distributions of the bacteria causing streptococciosis occurred in marine fish farm, Korea. Many kinds of cultured fishes suffered from the disease accompanied with typical symptoms, including darkening of the skin, exophthalmia, petechiae inside of the opercula and distended abdomen. The isolates from the diseased fishes were compared with *Lactococcus garvieae* by biochemical, biophysical and serological methods and polymerase chain reaction(PCR) assay. We isolated 35 strains of the genus *Streptococcus* from the diseased olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, yellow tail, *Seriola quinqueradiata* and Korean rockfish, *Sebastes schlegeli*. 15 strains out of the isolates were identified to *L. garvieae* and the others were not because of their different biochemical and biophysical characteristics. Seven strains of the isolates were agglutinated by rabbit serum raised against *L. garvieae* KG<sup>+</sup> phenotypic cells(ATCC49156) as a reference strain.

Twenty-one strains of the isolates identified to *L. garvieae* since they were formed the expected band through performing PCR assay using specific primers, pLG-1(5'-CATAACAATGAGATCGC-3') and pLG-2(5'-GCACCCCGCGGTTG-3'). In the present study, it showed that *L. garvieae* was a dominant strain causing streptococciosis in the tested area due to occurrence of 21 strains as *L. garvieae* out of all the isolates, 9 strains as *Streptococcus* sp. and 5 strains as *Enterococcus* sp.

**Key words** : Streptococciosis, *Lactococcus garvieae*, *Enterococcus* sp., *Streptococcus* sp., polymerase chain reaction(PCR)

연쇄구균증은 1957년 일본 Shizuoka현의 양식 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*) 양식장에서 최초로 보고된 이래(Hoshina *et al.*, 1958), 각종 담수어(Kitao *et al.*, 1981; Tung *et al.*, 1985; Chang and Plumb, 1996), 해산어(Kusuda *et al.*, 1976; Nagatsugawa, 1983; Rasheed and Plumb, 1984; Foo *et al.*, 1985; Nieto *et al.*, 1995; Domenech *et al.*, 1996), 양서류(Chung and Kow, 1985), 갑각류(Pappalardo and Boemare, 1982) 등에서 보고되고 있다. 이 질병은 주로 고수온기에 많이 발생하며 일본 뿐만 아니라, 우리 나라의 주

요 해산 양식어류인 넙치를 포함한 방어, 조피볼락 등에 폐사를 일으켜 막대한 경제적 손실의 원인이 되고 있다(Kusuda *et al.*, 1976, Chun *et al.*, 1988; Kusuda and Salati, 1993).

어류에 연쇄구균증이 나타났던 초기에는 원인균의 분류학적 위치가 정립되지 못하여 *Streptococcus* sp.로 명명하여 왔다(Kusuda *et al.*, 1976). 이 세균은 혈청학적으로 KG<sup>+</sup>형과 KG<sup>-</sup>형으로 구분하고 있으며, 이는 병원성과 연관이 있다고 알려져 왔다(Kusuda *et al.*, 1976; Kitao, 1983; Yoshida *et al.*, 1996). 연쇄구

†Corresponding Author

균종의 원인균에 대해 Kusuda *et al.*(1992)은 1974년 방어에서 분리한 *Streptococcus* sp.의 생화학적 성상 및 DNA-DNA hybridization을 조사하여 *Enterococcus seriolicida*로 명명하였다. 그러나, Domenech *et al.*(1996)은 이 세균의 16S ribosomal RNA의 염기 배열을 조사한 결과 *Lactococcus garvieae*와 상당히 유사하여 *Lactococcus*에 포함시킬 것을 주장하였고, Eldar *et al.*(1996)은 이 세균의 생화학적 성상 및 DNA-DNA hybridization 결과를 토대로 *E. seriolicida*는 *L. garvieae*의 아종이라고 하였다. 특히, Zlotkin *et al.*(1998)은 일본의 방어에서 분리된 두 개의 균주를 polymerase chain reaction(PCR) 방법에 의해 *L. garvieae*로 동정하였다. 이와 같이 연쇄구균종의 원인균에 대한 분류는 최근 여러 연구자들에 의해 *L. garvieae*로 분류되고 있는 경향이 있으나, 연쇄구균종에 감염된 넙치에서 분리되는 병원체의 분류학적 위치는 아직 분명하지 않은 상태로서 *L. garvieae*보다는 *S. iniae*일 것으로 보고하고 있다(室賀 · 江草, 1998).

본 연구에서는 우리나라의 대표적 해산 양식어 종인 넙치, 조피볼락 및 방어 등의 연쇄구균종 감염어에서 분리되는 원인균에 대한 종 조성을 생화학적 성상과 혈청학적 특성으로 밝히고, *L. garvieae*에 대한 특이 PCR primer를 이용하여 유전학적 연관성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 시험균주의 분리와 참조균주

본 연구에 사용된 균주들은 전형적인 연쇄구균종을 보이는 양식 중인 40~600 g의 넙치(*Paralichthys olivaceus*), 500~800 g의 방어(*Seriola quinqueradiata*) 및 400 g 전후의 조피볼락(*Sebastes schlegeli*)의 안구 주위, 농양액, 복수액, 뇌, 간장, 비장, 신장 및 심장 등에서 분리하였다. 비교를 위해 사용된 참조균주는 *L. garvieae* ATCC49156(Kusuda *et al.*, 1976)과 ATCC43921(Schlefer *et al.*, 1985)을 사용하였다(Table 1).

### 세균의 형태학적 검사

1.5% NaCl이 첨가된 BHI 배지에서 28°C, 18~48 시간 배양하여 순수 분리하였으며, 분리된 병원균에 대해서는 Gram 염색한 다음 균의 형태와 크기

를 조사하고, 아울러 현미경하에서 운동성 유무를 관찰하였다.

### 배양 조건별 발육 시험

MacConkey agar, SS agar, *S. faecalis* broth 및 KF Streptococcal broth에서의 발육 상태를 조사하였으며, 0.01% tetrazolium이 첨가된 BHIA와 BHI broth를 이용하여 6.5% NaCl, 10°C, 45°C, pH 9.6 등의 각 조건하에서 성장유무를 조사하였다(Table 3).

### 생화학적 성상 검사

본 실험에서 분리된 시험균을 이용하여 Table 2에 나타난 여러 가지 항목의 생화학적 성상 검사를 하였다.

그리고 용혈성 시험은 5% sheep blood agar에 30°C, 24~48 시간 배양한 후 결과를 판정하였다.

### 토끼 항혈청 제작과 응집시험

ATCC49156(KG<sup>+</sup>) 균주를 BHI broth에 30°C, 24시간 배양한 후 formalin을 0.5% 첨가하여 실온에서 24시간 정치시켜 불활화하였다. Formalin 불활화 균액(formalin killed cells, FKC)은 4°C에서 10,000×g로 30분간 원심 분리하여 집균하고, PBS로 3회 세척한 후 습중량 2 g/l PBS의 농도로 현탁하여 냉장 보관하였다. 준비된 FKC 현탁액과 Freund's complete adjuvant(FCA)를 동량 혼합한 면역원 1 ml를 1.5 kg 수컷 토끼의 귀정맥과 대퇴부 및 견갑골의 피하에 3일간 연속 주사하였고, 2주 후 다시 1 ml를 3일 연속 주사하였다. 최종 주사일로부터 10일 후 심장에서 전채혈한 다음 56°C에서 30분간 가열하여 비동화시킨 것을 시험용 항혈청으로서 실험에 사용하였다.

시험균주에 대한 응집시험은 PBS로 적절히 희석한 시험용 항혈청을 사용하여 슬라이드 응집시험 방법으로 실시하였다.

### PCR을 통한 세균의 동정

Chromosomal DNA 분리 및 확인은 Ausubel *et al.*(1989)의 방법에 따랐다. 즉, 각 시험균주는 BHI Broth 배지를 이용하여 27°C에서 24시간 배양하여 5,000 rpm에서 3분간 원심분리하고, pellet은 egg lysozyme(10 mg/ml)이 함유된 TE(10 mM Tris-HCl,

**Table 1.** Tested strains used in this study

strains		origin				
classification	designation	fish	oragn	region	year	
reference strains	ATCC43921	-	-	-	1985	Schleifer <i>et al.</i> Kusuda <i>et al.</i>
	ATCC49156	yellowtail	Kidney	Kochi, Japan	1976	
tested strains	KS 1	olive flounder	-	Tongyoung	1992	
	KS 2	olive flounder	-	Tongyoung	1992	
	KS 3	yellowtail	-	Góje	1994	
	KS 4	rockfish	-	Yochun	1994	
	KS 5	olive flounder	-	Tongyoung	1994	
	KS 6	olive flounder	-	Jeju	1994	
	KS 7	olive flounder	-	Tongyoung	1995	
	KS 8	olive flounder	spleen	Pohang	1996	
	KS 9	olive flounder	-	Tongyoung	1996	
	KS 10	olive flounder	spleen	Jeju	1998	
	KS 11	olive flounder	kidney	Pohang	1998	
	KS 12	olive flounder	liver	Pohang	1998	
	KS 13	olive flounder	kidney	Pohang	1998	
	KS 14	yellowtail	-	Tongyoung	1998	
	KS 15	olive flounder	liver	Pohang	1998	
	KS 16	olive flounder	heart	Pohang	1998	
	KS 17	olive flounder	spleen	Pohang	1998	
	KS 18	olive flounder	kidney	Pohang	1998	
	KS 19	olive flounder	liver	Pohang	1998	
	KS 20	olive flounder	operculum	Pohang	1998	
	KS 21	olive flounder	kidney	Pohang	1998	
	KS 22	olive flounder	kidney	Pohang	1998	
	KS 23	olive flounder	kidney	Pohang	1998	
	KS 24	olive flounder	spleen	Uljin	1999	
	KS 25	olive flounder	spleen	Uljin	1999	
	KS 26	olive flounder	operculum	Uljin	1999	
	KS 27	olive flounder	spleen	Uljin	1999	
	KS 28	olive flounder	liver	Uljin	1999	
	KS 29	olive flounder	brain	Pohang	1999	
	KS 30	olive flounder	brain	Pohang	1999	
	KS 31	olive flounder	brain	Pohang	1999	
	KS 32	olive flounder	opercula	Pohang	1999	
	KS 33	olive flounder	spleen	Pohang	1999	
	KS 34	olive flounder	operculum	Pohang	1999	
	KS 35	olive flounder	brain	Pohang	1999	

**Table 2.** General characteristics of tested strains

Characteristics	reference strains		tested strains (n=35), %
	ATCC43921	ATCC49156	
Gram stain	+, cocci	+, cocci	+, cocci
Motility	-	-	-
Oxidase test	-	-	-
Indole production	-	-	-
H <sub>2</sub> S production	-	-	-
Oxidation-Fermentation test	F	F	F
Methyl red	+	+	+
Voges-Proskauer	-	-	-
Catalase	-	-	-
Simmon' s citrate utilization	-	-	-
Nitrate reduction	-	-	-
Growth at			
MacConkey agar	-	-	-
SS agar	-	-	-
Acid from			
arabinose	-	-	-
glycerol	-	-	-
inulin	-	-	-
lactose	-	-	-(85)*
maltose	+	+	+
mannitol	+	+	+(91)
melibiose	-	-	-
raffinose	-	-	-
ribose	+	+	+
sorbitol	-	-	-(91)
sucrose	-	-	-
trehalose	+	+	+

\*, percentage of reaction in tested strains.

**Table 3.** Differential characteristics of tested strains

Strains	Characteristics											
	Growth at						<i>S. faecalis</i> broth	KF broth	hydrolysis of Hippurate	hemo-lysis	Agglu-tination	PCR results
	10° C	45° C	6.5% NaCl	pH9.6	40% bile esculin	0.01% TTC						
ATCC 43921	+	+	+	+	+	+	-	+	-	$\alpha$	+	+
ATCC 49156	+	+	+	+	+	+	+	+	-	$\alpha$	+	+
KS 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	$\alpha$	-	+
KS 2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	$\alpha$	+	+
KS 3	+	+	+	+	+	+	+	+	-	$\alpha$	-	+
KS 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	$\alpha$	-	+
KS 5	+	+	+	+	+	+	-	+	-	$\alpha$	-	+
KS 6	+	+	+	+	+	+	+	+	-	$\alpha$	+	+
KS 7	+	+	+	+	+	+	+	+	-	$\alpha$	-	-
KS 8	+	+	+	+	+	+	-	+	-	$\alpha$	-	+
KS 9	+	+	-	+	+	+	-	+	-	$\alpha$	+	+
KS 10	+	+	+	+	-	+	-	-	-	$\beta$	+	+
KS 11	+	+	-	+	-	+	-	-	-	$\beta$	-	+
KS 12	+	+	+	+	+	+	-	-	+	$\alpha$	-	+
KS 13	+	+	+	+	+	+	+	+	-	$\beta$	+	+
KS 14	+	+	-	+	+	-	+	+	-	$\alpha$	-	+
KS 15	+	-	-	-	-	+	-	-	-	$\alpha$	-	-
KS 16	+	+	+	+	+	+	+	+	-	$\alpha$	-	+
KS 17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	$\alpha$	-	-
KS 18	+	-	+	-	+	+	-	-	+	$\alpha$	-	+
KS 19	+	+	-	+	+	+	-	+	+	$\alpha$	-	+
KS 20	+	+	-	+	+	+	+	+	-	$\alpha$	-	+
KS 21	+	+	+	+	+	-	+	+	-	$\alpha$	-	-
KS 22	+	-	-	+	-	+	-	-	-	$\beta$	-	+
KS 23	+	+	+	+	+	+	+	+	-	$\alpha$	-	+
KS 24	+	-	-	+	-	+	-	-	-	$\beta$	+	+
KS 25	-	-	-	-	-	+	-	+	-	$\beta$	-	-
KS 26	-	-	-	-	-	+	-	+	-	$\beta$	-	-
KS 27	-	-	-	-	-	+	-	+	-	$\beta$	-	-
KS 28	-	-	-	-	-	+	-	-	-	$\beta$	-	-
KS 29	+	-	-	+	-	+	-	+	-	$\beta$	-	-
KS 30	-	-	-	+	-	+	-	+	-	$\beta$	-	-
KS 31	+	-	-	+	-	+	-	+	-	$\beta$	-	-
KS 32	+	+	+	+	+	+	-	+	-	$\beta$	-	-
KS 33	+	+	+	+	+	+	-	+	-	$\beta$	-	-
KS 34	+	-	-	-	-	+	-	+	-	$\beta$	-	-
KS 35	+	-	-	+	-	+	-	+	-	$\beta$	+	+

**Table 4.** Differential reaction on some genera of present tested strains

Characteristics	groups of tested strains (n=35)		
	A(n=9)	B(n=5)	C(n=21)
Growth at 10° C	V	+	+
Growth at 45° C	-	+	-
Growth at 6.5%NaCl	-	+	V
Bile esculin reaction	-	V	V
<i>S. faecalis</i> broth	V	V	V
KF broth	+	V	V
ATCC49156 antiserum	-	-	+(n=7)
PCR result	-	-	+

n, number of strain; A, *Streptococcus*; B, *Enterococcus*; C, *Lactococcus*; V, variable reaction.

pH 8.0, 1 mM EDTA)에 현탁시키고 실온에 10분간 방치하였다. 여기에 10% SDS 30  $\mu$ l와 20 mg/ml의 proteinase K 3  $\mu$ l를 첨가하여 37°C에서 6시간 반응시켜 세포벽을 제거한 후, 5 M NaCl 100  $\mu$ l를 넣고 혼합한 다음 cTAB/NaCl용액(10% cetyltrimethylammonium bromide, 0.7M NaCl)을 80  $\mu$ l첨가하여 65°C, 10분간 반응시켰다. 반응 후 동량의 chloroform/isoamylalcohol(24:1)을 첨가하여 조심스럽게 혼합하고 실온에서 13,500 rpm으로 7분간 원심 분리하였다. 상층을 새로운 tube(1.5 ml)에 옮기고, 동량의 phenol/chloroform/isoamylalcohol(25:24:1)을 첨가하여 혼합한 다음 실온에서 13,500 rpm으로 7분간 원심 분리하였으며, 상층을 새로운 tube에 옮기고 0.6 배 양의 isopropanol을 첨가하여 흰 실 모양의 DNA가 나타날 때까지 혼합하였다. 시료는 -20°C에 보존 중인 75% ethanol로 세척·건조시키고 100  $\mu$ l의 TE에 용해시켜 흡광도로 측정하였다.

Zlotkin *et al.*(1998)이 디자인 한 *L. garvieae*의 특이 primers인 pLG-1(5'-CATAA CAATGA-GAATCGC-3')과 pLG-2(5'-GCACC-CTCGCGGGTTG-3')를 주문 제작(Bioneer, Korea)하여 사용하였다.

PCR에 의한 *L. garvieae* 16S rRNA 유전자 증폭을 위하여 분리된 염색체 DNA 100 ng, pLG-1 및 pLG-2를 각각 100 pmole(1 $\mu$ l)씩 섞은 후 10 $\times$ Taq polymerase reaction buffer(100 mM Tris pH 8.3, 400 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 500  $\mu$ l/ml BSA) 5  $\mu$ l를 넣고 2.5 mM dNTP 4  $\mu$ l를 첨가하였다. 여기에 1  $\mu$ l(1 unit) Taq polymerase를 넣고, 이것에

H<sub>2</sub>O 35  $\mu$ l를 가하여 최종 volume을 50  $\mu$ l되게 맞춘 후, 이들 sample을 94°C에서 10분간 반응시킨 다음 94°C에서 1분간 denaturalization, 55°C에서 1분간 annealing, 72°C 1분간 extension하여 35 cycle로 수행하였으며 마지막 cycle의 extension 반응은 72°C에서 5분간 수행하였다. 증폭된 산물은 1.0% agarose gel상에서 전기영동하여 확인하였으며, DNA molecular weight marker는 1 Kb plus DNA LadderTM(GibcoBRL)를 사용하였다.

## 결 과

### 세균의 분리

본 실험에 사용된 시험균주는 Table 1과 같이 참조균주 2 균주와 병어에서 분리된 분리균주 35 균주이다.

시험균주는 울진, 포항, 통영, 거제, 제주, 여천 등의 해산 어류 양식장에서 분리, 배양된 것으로서 안구 백탁, 아가미 뚜껑 출혈과 농양, 안구 돌출, 근육 농양 및 복부 팽만 등의 증상을 나타내며 폐사되는 병어들로부터 분리되었다. 어종별로는 넙치 유래 32 균주, 방어 유래 2 균주, 조피볼락 유래 1 균주이며, 분리 시기는 6월부터 11월 사이 이었다.

### 세균학적 특성 비교

#### 1) 분리 균주의 일반적 특성

본 실험에서 시험균주와 참조균주의 일반적 특성을 비교한 결과는 Table 2에 나타내었다. 병어에서 분

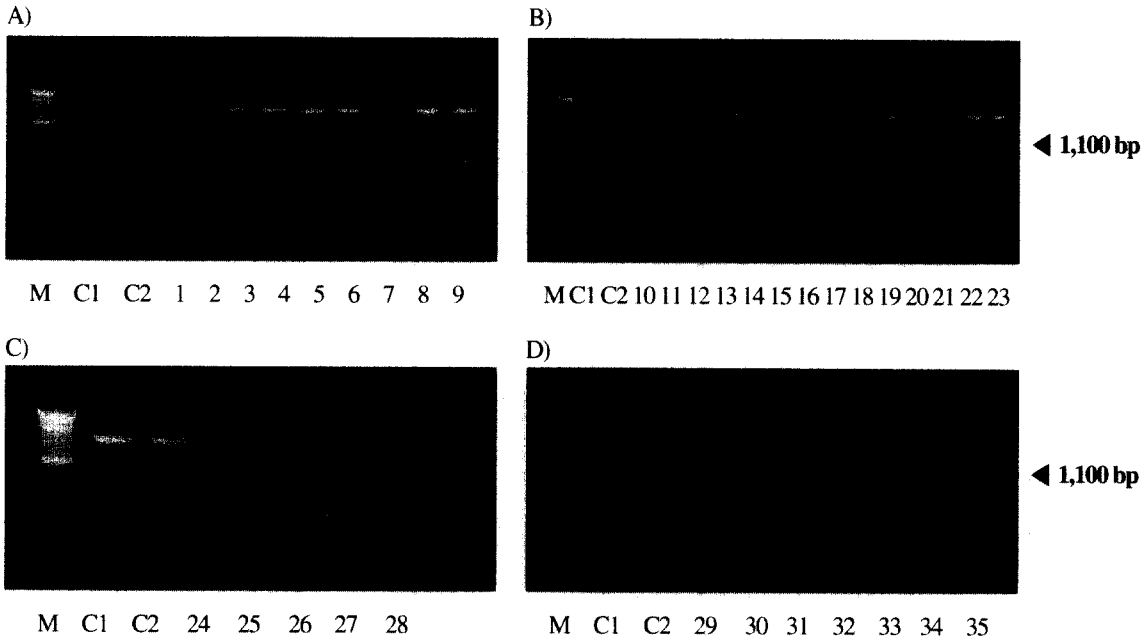


Fig. 1 PCR products using the *L. garvieae* specific primers(pLG-1, pLG-2) from reference stains and present tested strains. A), isolated strains before 1996; B), isolated strains in 1998; C), isolated strains at Uljin in 1999; D), isolated strains at Pohang in 1999. M, marker; C1, ATCC43921; C2, ATCC49156; each number, designated strains.

리된 모든 균주는 TSA, BHIA 배지상에서 colony의 형태는 circular, convex, entire, translucent한 상태로 관찰되었으며, colony의 크기는 1~2 mm이었다. Gram 염색에서는 양성으로 chain을 형성한 구균이 관찰되었다. 또한, 운동성 음성, indole 생성능, oxidase 시험 및 catalase 시험에서 음성, nitrate reduction 시험도 음성반응을 나타내었다. 당 이용능에서는 lactose 85%, mannitol 91% 및 sorbitol 91%와 같이 균주에 따라 다소 차이를 나타내었으며, arabinase, glycerol, inulin, maltose, melibiose, raffinose, ribose, sucrose, trehalose 에서는 실험 결과가 참조균주와 일치하였다.

## 2) 분리균의 분류학적 특성 시험 결과

각 시험균주와 참조균주에 대한 중요한 생리, 생화학적 특성 시험 결과는 Table 3과 4에 나타내었다. 실험에 사용된 모든 균주는 *Streptococcus*, *Enterococcus* 또는 *Lactococcus*속 균으로 나누었으며, 이는 Table 4에 나타내었다. 특히, 참조균주와 유사한 특성을 보이는 균주는 KS1, KS2, KS3, KS4, KS5, KS6, KS7, KS8, KS9, KS12, KS13, KS14, KS16, KS17, KS19, KS20, KS23, KS32 및 KS33 균주로 판

단되었다. 그리고 그 외의 균주들은 다양한 생리, 생화학적 특성을 보였다.

혈청형 KG<sup>+</sup>의 참조균주인 ATCC49156의 토기항혈청에 대한 응집시험에서는 KS2, KS6, KS9, KS10, KS13, KS24 및 KS35의 균주가 응집반응 양성을 나타내었으나, 나머지 28 균주는 응집반응 음성을 나타내었다.

## PCR에 의한 *Lactococcus garvieae* 16S rRNA 유전자 증폭

특히 *Lactococcus garvieae* primer를 이용하여 실험에 사용한 35 시험균주 중 *L. garvieae* 16S rRNA 유전자가 증폭된 균주는 21 균주이었으며, 그 결과는 Fig. 1에 나타내었다.

Fig. 1의 A)는 96년도 이전에 분리된 균주로서 9 균주 중 8 균주의 *L. garvieae* 16S rRNA 유전자가 증폭된 결과를 보였다. KS1 균주는 6.5% NaCl 항목과 Hippurate에서 참조균주와 상이점이 관찰되었으나, KS2, KS3, KS4, KS5, KS6 및 KS8 균주는 생리, 생화학적 특성이 일치하였다. 그러나, KS7 균주는 생리, 생화학적 특성에서는 일치하였으나 PCR 산물에 의한 band의 형성에서 차이가 났다. Fig. 1의 B)는 98년도에 포함 지역의 넙치에서 분리된 12 균

주와 통영 지역의 방어에서 분리된 1균주, 제주 지역의 넙치에서 분리된 1 균주를 대상으로 실험한 결과서 KS10, KS11, KS12, KS13, KS14, KS16, KS18, KS19, KS20, KS22 및 KS23 균주가 PCR 반응에서 예상 band를 보였다. 그러나, 생리·생화학 적 특성 시험 결과에서는 45°C 및 6.5% NaCl에서의 성장과 40% Bile esculin반응에서 상이점이 관찰되었다. KS15 균주는 *Streptococcus* sp.의 특성을 보였으며, KS17 균주 및 KS21 균주는 *Enterococcus* sp.와 유사하였다.

Fig. 1의 C)는 99년도 울진 지역에서 분리된 균주 5종을 대상으로 한 실험 결과이며 KS24 균주에서 만 band 형성이 확인되었다. KS25, KS26, KS27, KS28 균주는 Table 2, 3에 나타난 결과로 볼 때 *Streptococcus* sp.와 유사성을 보였다. Fig. 1의 D)는 99년도 경북 포항 지역 소제 2곳의 넙치 양식장에서 분리된 7 균주의 실험 결과로 KS35 균주에 band가 형성되었다. KS29, KS30, KS31 및 KS34 균주는 *Streptococcus* sp.와 유사성을 보였고, KS32, KS33 균주는 *Enterococcus* sp.와 유사하였다.

## 고 찰

연쇄구균증의 원인균이 형태학적으로는 공통적인 연쇄상구균이지만 분류학적으로는 다양한 종이 관여하고 있음이 밝혀지고 있다. 연쇄구균증의 원인균으로 알려진 병원체로서는 *Streptococcus* sp.(Boonker *et al.*, 1979; Kitao, 1982; Nagatsugawa, 1983; Kusuda *et al.*, 1978; Barham *et al.*, 1979), *S. iniae*(Pier and Madin, 1976; Kaige *et al.*, 1984), *S. equisimilis*(Minami *et al.*, 1979), *S. parauberis*(Domenech *et al.*, 1996), *L. garvieae*(Kusuda *et al.*, 1976) 및 *Enterococcus* sp.(Alicia *et al.*, 1995; Nieto *et al.*, 1995) 등이 있다. 이러한 다양한 원인균이 이 질병의 발생에 관여하고 있으므로 우리 나라의 해산 양식 어류를 대상으로 하여 그 원인을 밝히는 것은 어병학적인 의의 뿐 만 아니라, 양식 산업에서도 매우 중요한 일이라 생각된다.

본 연구에서는 하절기에 주로 발생되어 대량폐사를 유발하는 연쇄구균증에 걸린 여러 가지 해산 어류로부터 분리된 균주들에 대해 생화학적인 성장과 혈청학적 특성을 조사하고, PCR 방법을 통해 *L.*

*garvieae*와의 연관성을 분석하고자 하였다. 이에 따른 분석 결과로 넙치에서 분리한 32 균주 중 KS1, KS2, KS5, KS6, KS8, KS9, KS12, KS13, KS16, KS20, KS23 균주는 그 표현형적 특성과, PCR Assay에서의 분석 결과가 참조균주인 *L. garvieae*와 유사한 특성이 조사되었다. 그러나, KS10, KS11, KS18, KS19, KS22, KS24, KS35 균주는 10°C, 45°C, 6.5% NaCl, pH 9.6에서의 성장 유무 등에서 다양한 결과를 보였으나, PCR 방법에 의한 유전자 증폭 결과는 예상 band를 형성하여 *L. garvieae*로 동정하였다. 이들 균주들에 대한 표현형과 유전형에서 분류적 특성의 차이는 다소 논란의 여지가 있으나, 최근 PCR 방법과 같은 유전학적 연구에 따른 *L. garvieae*의 동정이 보고됨(Zlotkin *et al.*, 1998)에 따라 본 연구에서도 같은 결과로 인정하였다. 이후, *L. garvieae*의 동정을 위한 표현형의 특성 연구에서는 40°C, 4.0% NaCl에서의 성장능, pyrrolidonylarylamidase reaction, arginine hydrolysis 등과 같은 항목의 시험으로 좀더 명확한 결과가 도출되리라 생각된다.

한편, 넙치에서 분리된 나머지 14 균주는 Table 4에 나타난 특성에 따라 *Streptococcus* group 9 균주, *Enterococcus* group 5 균주로 구분하였다. 특히, KS15, KS29, KS31, KS34 균주는 Pier and Madin (1976)이 보고한 *Streptococcus* sp.와 유사한 특성을 보였으며, KS25, KS26, KS27, KS28, KS30 균주는 방어(Kaige *et al.*, 1984)와 넙치(Sako, 1993)에서 분리되어 기 보고된 *S. iniae*와 유사하였다.

결과적으로 넙치에서 분리된 연쇄구균증의 원인균은 *L. garvieae*가 우점을 차지하는 것으로 조사되었다. 그러므로, 우리 나라에서 연쇄구균증에 감염된 넙치에서 분리되는 병원체의 분류학적 위치가 *L. garvieae* 보다는 *S. iniae*일 것이라는 일본에서의 보고(室賀·江草, 1998)와는 차이가 있었으며, 이는 이 감염증의 원인균이 *L. garvieae*를 우점으로 하지만, 일부 다른 병원체도 이 질병의 발생에 관여하고 있음을 알 수 있었다.

양식 방어에서 분리된 KS3과 KS14 균주는 생리, 생화학적인 특성 시험 결과와 PCR assay에서 PCR 산물에 의한 예상 band를 확인할 수 있어 *L. garvieae*로 동정하였다. 이것은 Kusuda *et al.*(1976)이 방어에서 분리한 *L. garvieae*와 그 특성이 유사하였다. 이러한 점으로 미루어 볼 때 연쇄구균증에 걸린 양식 방어



의 원인균은 *L. garvieae*로 분류하는 것이 타당할 것으로 생각된다. 조피볼락에서 분리된 KS4 균주 역시 생리, 생화학적 특성과 PCR Assay 결과로 볼 때 참조균주와 동일한 *L. garvieae*로 분류하였으나, 이 어종에서 연쇄구균종의 원인균에 관해 보고된 예가 없어 앞으로 이에 대한 체계적 연구가 요구된다.

본 연구에서 KG<sup>+</sup> 항혈청을 이용하여 응집시험한 결과, 시험 균주 35균주 중 7 균주 만이 양성반응을 나타내었다. KG<sup>+</sup> 항혈청에 대한 응집시험을 실시하지 않았기 때문에 음성반응 균주에 대한 항혈청을 판단할 수는 없었으나, *Streptococcus* 속 세균이 모두 이 group에 속한다는 점에서 *Lactococcus* 속 세균과 이들 group 간에는 항원성에 차이가 있는 것으로 사료된다.

연쇄구균의 중요 특성 중의 하나인 용혈능에 관한 시험 결과, 분리 유래나 분류종에 따른 특징적인 현상은 구분할 수 없었다. 그러나 분리 연도를 기준으로 하여 볼 때, 1996년 이전의 시험균주에서는 모두  $\alpha$ 용혈능을 나타내었고, 1998년도 분리균주는  $\alpha$ 와  $\beta$ 용혈형이 혼재되었으나 1999년도 분리균주는 모두  $\beta$ 용혈능을 보였다. 그 이유는 본 실험에서는 아직 밝히지 못하였으나 연쇄상구균종의 원인균이 가지는 용혈능이  $\alpha$ 형에서  $\beta$ 형으로 강화되고 있다는 점은 앞으로의 병원성 기구를 해명하는데 중요한 자료가 될 것으로 생각되어 이에 관한 계속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

해산 양식 어류의 대량 피해를 내는 연쇄상구균종의 원인균에는 분류학적으로 다양한 연쇄상구균이 관련되어 있음을 알 수 있었다.

## 요 약

본 연구는 우리 나라의 해산 양식어류 양식장에서 발생하는 연쇄구균종 원인균의 종 조성과 미생물학적 특성을 밝히고자 하였다. 안구 백탁, 안구 출혈, 아가미뚜껑 출혈 및 복부 팽만 등의 증상이 관찰되는 해산 양식어류에서 분리된 연쇄상구균의 여러 균주들을 *Lactococcus garvieae*와 생리학적, 생화학적, 혈청학적 특성을 비교하였다. 또한 polymerase chain reaction(PCR) assay로 분리 균주들과 *L. garvieae*의 연관성을 조사하였으며 연쇄구균종 원

인균들의 분포 특성을 조사하였다.

연쇄구균종을 나타내는 3종의 해산 양식어류로부터 연쇄상구균 35균주를 분리하였으며, 이 균주들의 생리, 생화학적 특성을 *L. garvieae*와 비교해 본 결과 15 균주가 *L. garvieae*에 속하는 것을 알 수 있었다.

분리균주를 참조균주인 ATCC49156 토끼 항혈청으로 슬라이드 응집 시험한 결과 *L. garvieae* KG<sup>+</sup> type과 응집하는 균주가 7 균주로 관찰되었다.

또한, *L. garvieae*의 특이 primers, pLG-1 (5'-CATAACAATGAGATCGC-3')와 pLG-2 (5'-GCAC-CCTCGCGGGTTG-3')를 사용한 16S rRNA의 PCR 시험 결과 분리균주 중 21 균주가 예상 band를 형성하여 *L. garvieae*로 판단하였다.

이상의 결과에 따르면 35종의 분리균주 중 *L. garvieae*가 21 균주, *Enterococcus* sp.가 5 균주, *Streptococcus* sp.가 9종으로 조사된 지역에서 연쇄구균에 의한 질병 발생은 *L. garvieae*가 우점을 차지함을 알 수 있었다.

## 참고 문헌

- Alicia, E. T., Juan, M. C., Soledad, N., Jesus, L. R. and Juan, L. B. : Antigenic characterization of *Enterococcus* strains pathogenic for turbot and their relationship with other Gram-positive bacteria. *Dis. Aquat. Org.*, 21: 187-191, 1995.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, G. G., Smith J. A. and Struhl, K. : *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, New York, 1989.
- Boomker, J., Imes, G. D. Jr., Cameron, C. M., Naude, T. W. and Schoonbee, H. J. : Trout mortalities as a result of *Streptococcus* infection. *Onderstepoort J. of Veterinary Research*, 46: 71-8, 1979.
- Chang, P. H. and Plumb, J. A. : Histopathology of experimental *Streptococcus* sp. infection in tilapia, *Oreochromis niloticus*(L.), and channel catfish, *Ictalurus punctatus*(Rafinesque). *J. Fish Dis.*, 19: 235-241, 1996.
- Chung, H. Y. and Kow, G. H. : Characteristics of non-hemolytic *Streptococcus* isolated Captive Bullfrog(*Rana Catesbeiana*). *COA Fisheries Series No. 4, Fish Disease Research (VII)*, 9-21, 1985.
- Chun, S. K., Choi, D. L. and Park, S. I. : The rapid diagnosis of  $\beta$ -hemolytic *Streptococcus* sp. by immunoperoxidase method. *Fish Pathol.*, 1: 103-110, 1988.
- Domenech, A., Fernandez-Garayzabal, J. F., Pascual, C.,

- Garcia, J. A., Cutuli, M. T., Moreno, M. A., Collins, M. D. and Dominguez, L. : Streptococcosis in cultured turbot, *Scophthalmus maximus*(L.), associated with *Streptococcus parauberis*. J. Fish Dis., 19: 33-38, 1996.
- Eldar, A., Gorla, M., Ghittino, C., Zlotkin, A. and Bercovier, H. : Biodiversity of *Lactococcus garvieae* strain isolated from fish in Europe, Asia and Australia. Appl. Environ. Microbiol., 65: 1005-1008, 1999.
- Foo, J. T. W., Ho, B. and Lam, T. J. : Mass mortality in *Siganus canaliculatus* due to streptococcal infection. Aquaculture, 49: 185-195, 1985.
- Hoshina, T., Sano, T. and Morimoto, Y. : A *Streptococcus* pathogenic to fish. Journal of Tokyo University of Fisheries, 16: 201-206, 1958.
- Kaige, N., Miyazaki, T. and Kusuda, S. : The pathogen and the histopathology of vertebral deformity in cultured yellowtail. Fish Pathol., 19: 173-179, 1984.
- Kitao, T., Aoki, T. and Sakoh, R. : Epizootic caused by  $\beta$ -hemolytic *Streptococcus* species in cultured freshwater fish. Fish Pathol., 15: 301-307, 1981.
- Kitao, T. : The methods for detection of *Streptococcus* sp. causative bacteria of streptococcal disease of cultured yellowtail(*Seriola quinqueradiata*) especially, their cultural, biochemical and serological properties. Fish Pathol., 17: 17-26, 1982.
- Kitao, T. : Strain variation associated with pathogenesis of *Streptococcus* sp., the causative agent of streptococcosis in cultured yellowtail(*Seriola quinqueradiata*). Proceedings of the Second North Pacific Aquaculture Symposium, 231-242, 1983.
- Kusuda, R., Kawai, K., Salati, F., Banner, C. R. and Fryer, I. L. : *Enterococcus seriolicida* sp. nov., a fish pathogen. Int. J. Syst. Bacteriol., 41: 406-409, 1995.
- Kusuda, R. and Salati, F. : Major bacterial diseases affecting mariculture in Japan. Annual Rev. Fish Dis., 3: 69-72, 1993.
- Kusuda, R., Kawai, K., Toyoshima, T. and Komatsu, I. : A new pathogenic bacterium belonging to the genus *Streptococcus* isolated from an epizootic of cultured yellowtail. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 42: 1345-1352, 1976.
- Minami, T., Nakamura, M., Ikeda, Y. and Ozaki, H. : A beta-hemolytic *Streptococcus* isolated from cultured yellowtail. Fish Pathol., 14: 33-38, 1979.
- Nagatsugawa, T. : A streptococcal disease of cultured flounder. Fish Pathol., 17: 281-285, 1983.
- Nieto, J. M., Devesa, S., Quiroga, I. and Toranzo, A. E. : Histopathology of *Enterococcus* sp. infection in farmed turbot, *Scophthalmus maximus* L.. J. Fish Dis., 18: 21-30, 1995.
- Pappalardo, R. and Boemare, N. : An intracellular *Streptococcus*, causative agent of a slowly developing disease in Mediterranean Crab, *Carcinus mediterraneus*. Aquaculture, 28: 283-292, 1982.
- Pier, G. B. and Madin, S. H. : *Streptococcus iniae* sp. nov., a beta-hemolytic *Streptococcus* isolated from an Amazon freshwater dolphin, *Inia geoffrensis*. Int. J. Syst. Bacteriol., 26: 545-53, 1976.
- Rasheed, V. and Plumb, J. A. : Pathogenicity of a non-haemolytic group B *Streptococcus* sp. in Gulf Killifish(*Fundulus grandis* Baird and Girard). Aquaculture, 37: 97-105, 1984.
- Sako, H. : A comparative study on the properties and pathogenicity of  $\beta$ -hemolytic *Streptococcus* sp. isolated from marine and freshwater fishes. Suisanzoshoku (Aquaculture), 41: 387-395, 1993.
- Schleifer, K. H., Klaus, J., Dvarak, C., Kilpper-Balz, R., Collins, M. D. and Fischer, W. : Transfer of *Streptococcus lactis* and related Streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. Syst. Appl. Microbiol., 6: 183-195, 1985.
- Tung, M. C., Chen, S. C. and Tsai, S. S. : General septicemia of streptococcal infection in cage-cultured tilapia, *Tilapia mossambica*, in Southern Taiwan. COA Fisheries Series No. 4, Fish Disease Research (VII), 95-105, 1985.
- Yoshihisa, Y., Yuichi, T., Yoshio, N., Yukie, S. and Toshiko, K. : Molecular and genetic analysis of multiple changes in the levels of production of virulence factors in a subcultured variation of *Streptococcus mutans*. FEMS Microbiol. Lett., 144: 81-87, 1996.
- Zlotkin, A., Eldar, A., Ghittino, C. and Bercovier, H. : Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR. J. Clin. Microbiol., 36: 983-985, 1998.
- 전세규 : 해산 양식 어류 질병, 22-28, 1992.
- 室賀清邦 · 江草周三 : 魚病學概論. 177, 1998. 恒星社厚生閣. 東京. 日本.