해수 양식 어류에서 분리된 연쇄상구균의 종류와 병원성

우승호 · 김현정 * · 이주석 ** · 김진우*** · 박수일 *****

부경대학교 수산과학연구소, *동경해양대학교 게놈과학강좌, **국립수산과학원 내수면양식연구소, ***국립수산과학원 병리연구팀, ****부경대학교 수산생명의학과

Pathogenicity and classification of streptococci isolated from cultured marine fishes

Sung Ho Woo, Hyun Jeong Kim*, Joo Seok Lee**, Jin Woo Kim*** and Soo II Park****

Institute of Fisheries Science, Pukyong National University, Busan, 608-737, Korea *Laboratory of Genome Science, Graduate School of Marine Science and Technology, Tokyo University of Marine Science and Technology, Tokyo, Japan. **Inland Aquaculture Research Institute, NFRDI, 645-806, Korea ***Pathology Team, NFRDI, 619-900, Korea ****Department of Aquatic Life Medicine, College of Fisheries Science, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

Thirty-five streptococcci were isolated from the diseased streptoccoccicosis in oliver flounder (*Paralichthys olivaceus*), black rockfish (*Sebastes schlegeli*) and yellowtail (*Seriola quinqueradiata*).

The isolates were identified into 3 kinds of streptococccal species, *Streptococcus parauberis, Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* by PCR assay with specific primers, pSP-1, pSP-2, pLG-1, pLG-2, pSI-1, pSI-2. Several characteristics were investigated on the morphological, biochemical, physiological and serological tests. The isolates were constituted as 5 strains of *S. parauberis*, 11 strains of *L. garvieae* and 19 strains of *S. iniae, L. garvieae* and *S. parauberis* strains appeared non-hemolytic whereas *S. iniae* showed β -hemolysis.

In the serological investigation, *S. parauberis* antigen of formalin killed cells (FKCs) exhibited specificity against all the tested antisera. The antisera of *L. garvieae* (KG- phenotype) and the *S. iniae* showed cross-reaction against to the FKCs of *L. garvieae* (KG+ phenotype). Five out of 11 strains of *L. garvieae* were identified as KG- phenotype with serological test and by TEM observation, although *S. iniae* could not be observed the capsule structure.

In the pathogenicity test with *L. garvieae* and *S. iniae* to the oliver flounder and the black rockfish, *S. iniae* induced acute or chronic mortality in both fishes, whereas *L. garvieae* caused hemorrhage at the base of fins of tested fishes without any mortality.

Key words : streptococci, pathogenicity, identification Streptococcus parauberis, Lactococcus garvieae, Streptococcus iniae

양식 어류에서의 연쇄구균병은 1957년 일본 Shizuoka 현의 무지개송어, Oncorhynchus mykiss 양식장에서 최초로 발견되었으며 (Hoshina et al., 1958), 그 후 연쇄구균병은 송어 (Boomker et al., 1979), 뱀징어, Anguilla japonica (Kusuda et al., 1978), 나일틸라피아, Oreochromis nilotica, 은어, Plecoglossus altivelis (Kitao et al., 1981) 및 차넬 메기, Ictalurus punctatus (Chang et al., 1996) 등의

^{*}Corresponding Author : Soo II Park, Tel : 051-620-6141, Fax : 051-628-7430, E-mail : parksi@pknu.ac.kr

담수어와 방어, Seriola quinqueradiata (Kusuda et al., 1976; Minami et al., 1979), 넙치, Paralichthys olivaceus (Nagatsugawa, 1983), turbot, Scophthalmus maximus (Domenech et al., 1996), gilthead sea bream, Sparus aurata와 European sea bass, Dicentrarchus labrax (Zlotkin et al., 1998a) 등의 해수 어류에 일어났다. 특히 일본의 양식 방어, 넙치, 참돔, Pagrus major에 Streptococcus sp. 가 감염되 어 심각한 경제적 손실을 가져왔다 (Kusuda et al., 1976; Kitao et al., 1979).

연쇄구균은 담수, 기수, 해수 및 양식장의 저질 에 상재하는 세균으로서 (Kitao, 1979), 넙치 양 성용 사료로 이용되는 냉동 정어리, Sardinops melanosticta와 까나리, Ammodytes personatus 등 의 내부 장기에서도 분리되었고 냉동 보관중인 사료용 어류에서도 원인규이 6개월 이상 생존하 는 것으로 나타났다 (Minami, 1979). 그리고 해 수 중의 원인균이 질병을 유발할 정도로 대량 증식하였을 때 양식 어류의 상처를 통해서 또는 산패된 생사료를 투여할 경우 소화관을 통해서 감염되고 (Rasheed and Plumb, 1984; Minami, 1979; Nagatsugawa, 1983), S. iniae 인위 감염 실 험에서 해수에 침지시키거나 사료에 섞어서 투 여할 경우에 감염이 일어난다 (Nguyen, 2001). Plumb (1994)은 어류의 방어력을 저하시키는 스 트레스 요인 즉, 나쁜 사육 환경과 저조한 영양 상태가 연쇄구균병의 발병에 주요한 영향을 미 치는 것으로 보고하고 있다.

따라서 본 연구에서는 연쇄구균병에 감염된 우리 나라의 대표적 해수 양식 대상종인 넙치, 방어 및 조피볼락으로부터 분리된 원인균을 분 석하기 위해 먼저 이미 확립되어 있는 PCR법을 통해 종을 동정하여 분류하고 그 분포를 확인하 고자 하였다. 또한 동정된 각각의 종에 따른 생 화학적 성상, 생리학적 특성 및 혈청학적 구성을 조사, 비교하여 신속 진단 방법을 수립하고자 하 였으며, 원인균의 표현형적 특징과 병원성과의 연관성을 검토하기 위하여 넙치와 조피볼락에 대한 병원성 시험을 하였다.

재료 및 방법

1. 세균의 분리

본 연구에 사용된 시험 균주들은 40~800 g의 넙치, 200 g전후의 조피볼락 및 방어에서 연쇄구 균병의 증상이 전형적으로 관찰되는 어류로부 터 분리한 것이다. 시험균은 병소가 잘 나타난 안구 주위의 농양, 복수, 뇌, 간, 비장, 신장 및 심 장 등에서 시료를 무균적으로 적출하여 1.5% NaCl 첨가 TSA, BHIA 배지에 직접 도말하였으 며, 28°C에서 24~48시간 배양하여 분리하였다. 이외에도 필요에 따라서 국립수산과학원 병리 연구팀에서 시험균을 분양받아 실험에 사용하 였다. 비교를 위해 표준 균주로 Streptococcus parauberis (KCTC3651), Lactococcus garvieae (ATCC49156) 및 Streptococcus iniae (KCTC3657) 등을 사용하였다.

2. 세균의 형태학적 검사

1.5% NaCl첨가 BHIA 배지에서 28°C, 18~48 시간 배양으로 순수 분리된 원인균에 대하여 colony와 병원균의 형태, 크기, Gram염색 및 운 동성을 관찰하였다.

3. PCR법을 통한 세균의 동정

3-1. Chromosomal DNA 분리 및 확인

시험 균주들의 염색체 DNA의 분리는 Ausubel (1987)의 방법에 따랐다. DNA를 진공 건조시키고 100 µl의 TE buffer에 재현탁한 후 흡광도 A2607280nm 으로 DNA 량을 측정하였다.

3-2. Primers의 준비

본 연구에 사용된 특이 primers는 국립수산과 학원 병리연구팀의 수산특정연구과제인 해산어 연쇄구균증 방제 기술 개발의 연구 결과에서 보 고된 primers로서 GenBank상에 등록되어 있는 연쇄상구균의 16S-23S rRNA internal spacer region (ISR) 부분에서 universal primer를 제작하

3-3. PCR법에 의한 **16S-23S rRNA ISR**의 유전 자 증폭

PCR 반응물은 PCR premix tube (Bioneer, Korea)를 사용하였고, Thermal cycler (Perkin-Elmer)로 PCR을 수행하였으며, 1%의 agarose gel상에서 100V에서 30분간 전기영동한 후 UV transilluminator로 확인하였다.

4. 배양 조건별 발육 시험

Table 1과 같다.

MacConkey agar, SS agar 및 *Streptococcus faecalis* broth에서의 발육 상태를 조사하였으며, 10%, 40% bile이 첨가된 bile esculin medium (BEM), 0.01% TTC 첨가 BHIA, BHI broth를 이 용하여 4%, 5%, 6%, 6.5% NaCl, 10°C, 20°C, 37°C, 45°C, pH 9.6 등의 조건하에서 배양 상태를 관찰 하였다.

5. 생회학적 특성 검사

1.5% NaCl 첨가 BHIA 배지에서 순수 배양된 균을 이용하여 MacFaddin (2000)의 방법에 따라 생화학적 성상 검사를 하였다. 즉 H_S 생성능 시 험은 TSIA를 사용하였고, Indole 생성은 Ehrlich's 방법에 따랐다. MR test는 Clark-Lub's medium을 사용하였고, VP test는 Barritt's 방법에 의하여 시 험하였다. OF test는 Hugh and Leifson의 방법으 로, Catalase test는 3% H2O2로, Citrate test는 Simmon's citrate agar를 사용하여 30°C에서 2~4일 배양하였다. Oxidase test는 Cytochrome oxidase 시험지를 사용했으며, Nitrate reduction 시험은 Nitrate broth를 시용하였다. 탄수화물 분해 시험 은 Phenol red 기초 배지에 당을 1%, salicin을 0.5% 첨가하여 시험하였고, lysine과 ornithine의 decarboxylase 시험 및 arginine의 dehydrolase 시 험을 실시하였다. 용혈성 시험은 5% sheep blood agar에 30°C, 24~48시간 배양 관찰하였으며, 가 수 분해 효소 시험은 starch hydrolysis agar, esculin은 bile esculin medium을 사용하였고, hippurate 는 Facklam's 방법을 따랐으며 urease production은 Christensen 's urea agar에서 시험을 실 시하였다.

Primer sets		Oligo sequence	Product size (bp)	PCR program
Streptococcus	pSP-1	5'-TCCAGTCTTTCGACCTTCTT-3'	220	1 a
primers	pSP-2	5'-CAAAGAGATGTTCGGCTTG-3'	220	1
Lactococcus	pLG-1	5'-AAGCAGTCTTTTGATGCAAG-3'	207	1a
specific primers	pLG-2	5'-ACTGTGCGCCCTTATTAACT-3'	507	1
Streptococcus iniae	pSI-1	5'-AAGAGACGCAGTGTCAAAAG-3'	107	Dp
specific primers	pSI-2	5'-CGTTTCTTATCTTGTTACTC-3'	107	2

Table 1. Primers used in this study for PCR

a, $(94^{\circ}C 30s, 58^{\circ}C 30s, 72^{\circ}C 30s) \times 30$ cycles.

b, (94 °C 30s, 55 °C 30s, 72 °C 30s) \times 30 cycles.

6. 혈청학적 성상 검사

6-1. 각각의 균주에 대한 토끼 항혈청의 제작

PCR법에 의해 S. parauberis 로 동정된 J14 균 주, S. iniae 로 동정된 BS10 균주 및 L. garvieae 표준 균주인 ATCC49156로 토끼 항혈청을 제작 하였다. 각각의 균주를 BHI broth에 30℃, 24 시 간 배양한 후 formalin을 0.5% 첨가하여 실온에 서 24시간 정치시켜 불활화하였다. formalin 불활 화 균액 (formalin killed cells, FKC)은 4°C에서 10,000 g로 30분간 원심 분리하여 집균한 후 PBS로 3회 세척한 후 습중량 2g/l PBS의 농도 로 현탁하여 냉장 보관하였다. 준비된 FKC 현탁 액과 Freund's complete adjuvant (FCA)를 동량 혼합한 면역원 1 ml를 1.0 kg 수컷 토끼의 귀정 맥과 대퇴부 및 견갑골의 피하에 3일간 연속 주 사하였고, 2주 후 다시 1 ml를 3일 연속 주사하 였다. 최종 주사일로부터 10일 후 귀정맥에서 채 혈하여 면역 항원과 응집반응으로 항체 생성 여 부를 확인하고 심장에서 전채혈하였다. 채혈된 혈액은 상온에서 1시간 방치하고, 10,000 g에서 20분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였다. 분리 된 혈청은 56°C에서 30분간 처리하여 비동화시 킨 후 0.1% sodium azide를 첨가하고 -70°C에 냉 동 보관하였다.

또한 KG + phenotype cells로 알려진 ATCC 49156 표준 균주의 토끼 항혈청과 PCR법에 의 해 *L. garvieae* 로 동정된 균주와 응집 반응을 시 킨 결과 KG - phenotype으로 확인된 J55 균주 를 사용하여 동일한 방법으로 토끼 항혈청을 제 작하였다.

6-2. 항혈청을 이용한 응집 및 교차 응집 반응 실험

각각의 균주 S. parauberis (J14), L. garvieae 표 준 균주인 ATCC49156 (KG + phenotype), S. iniae (BS10), S. parauberis 표준 균주인 KCTC3651 및 L. garvieae (J55; KG - phenotype) 의 토끼 항혈청을 PBS (0.08% NaCl, 0.002% KCl, 0.029% NaHPO4 · 2H₂O, 0.002% KH₂PO4)로 15배 및 2배 희석하였다. 이 항혈청 15 µℓ와 미 리 1.5% NaCl 첨가 BHIA 배지에 배양해 놓은 시 험 균주를 백금이로 취하여 현탁한 균액 15 µℓ 를 slide glass에 적하하여 혼합한 후 실온에서 5 분간 방치한 다음 각각의 균주별로 시험 항혈청 에 대한 응집 및 교차 응집 여부를 판정하였다. 또한 microtiter method로 응집 항체가 및 교차 응집 항체가를 측정하였다.

7. Capsule의 유무 관찰

그람양성 세균의 병원성에 영향을 미치는 것 으로 보고 (Williams, 1988)되어 있는 세균의 구 조물인 capsule (fimbrae-like material)의 유무를 관찰하기 위해서 *L. garvieae* 와 표준 균주, *S. iniae* 의 시험 균주와 표준 균주에 대하여 Cowan and Steel (1993)의 방법으로 capsule 염색한 후 위상차현미경 (magnification × 1000)으로 관찰 하였다.

또한 Capsule 의 유무를 정확하게 판별하기 위 해서 TEM을 행하였다. 먼저 혈청학적 특징과 capsule stain의 시험 결과로부터 구조적 차이가 예상되는 3개의 *L. garvieae* 균주, J55, ST28 및 표준 균주인 ATCC49156을 시험 균주로 선정하 였고, 또한 colony 형태의 차이를 토대로 3개의 *S. iniae* 균주, BS5, BS9 및 J35를 시험 균주로 선 정하였다. 시료의 준비 과정은 Yoshida *et al.* (1997)의 방법에 따랐으며, *L. garvieae*는 J55 균 주의 항혈청을, *S. iniae*는 BS10 균주의 항혈청을 각각 1:8, 1:512의 titer로 안정화에 사용하였다.

8. 병원성 시험

병원성 시험에는 평균 체장 10.5~11.5 cm, 체 중 9~10 g의 넙치, *P. olivaceus*와 체장 10~11 cm, 체중 16~18 g의 조피볼락, *S. schlegeli*을 1 주일간 순치 시킨 후 실험에 사용하였다. colony 의 형태를 기초로 하여 선정한 14개의 시험 균 주와 2개의 표준 균주에 대한 병원성의 유무와 그 정도를 조사하기 위하여 연속 2회에 걸쳐 어 체 통과시킨 후 넙치에 대한 공격 실험을 행하 였다. 동시에 6개의 시험 균주와 1개의 표준 균 주로 조피볼락에 대한 공격 실험을 행하였다.

공격에 사용한 균액은 1.5% NaCl 첨가 BHIA 에 24시간 배양한 후 각각의 균주를 멸균 생리 식염수에 현탁하여 파장 540 nm에서 흡광도가 0.8이 되도록 조정한 후, 넙치와 조피 볼락 한 미리 당 0.1 ml씩 복강 주사하였다. 시험 수온은 22 ± 0.5°C로 유지시켰으며, 시험구별 10마리씩 사용하여 2주 동안의 누적 폐사율을 기록하였 다. 대조구에는 동일 조건하에서 멸균 생리 식염 수를 0.1 ml씩 복강 주사하였다. 또한 마리당 주 사한 cell 수를 BHIA plate dilution method로 CFU를 구한 값과 슬라이드 글라스에 도말한 균 을 Gram 염색한 후 100 chain을 계수하여 평균 한 값을 곱하는 방법을 이용하여 구하였다. < Cell injected per fish = CFU × average of cells / 100chain >

실험 기간 중 먹이는 공급하지 않았으며 3일 마다 50% 정도의 시육수를 환수시켰다. 폐사한 어류는 내부 장기에서 균의 분리를 시도하였으 며 배양된 균에 대해서는 항혈청을 이용한 슬라 이드 응집반응과 PCR 법을 통하여 원인균을 확 인하였다. 또한 시험어와 폐사어에 대해서는 외 부 및 내부 증상을 관찰하였다.

결 과

1. 시험 균주의 분리

본 실험에 사용된 시험 균주를 Table 2에 나타 내었다. 표준 균주 3균주와 병어에서 분리된 분 리 균주 35균주이다. 실험에 사용된 시험 균주는

Table 2. Isolated strains and reference strains used in this study

	Strains		Origin		
	L. garvieae		kidney of yellowtail, Seriola quinqueradiata; Kochi,		
reference			Japan in 1974		
strains (n=3)	S. parauberis	KCTC3651	mastis sample milk; Williams and Collins, in 1990		
	S. iniae	KCTC3657	brain of Amazon freshwater dolphin, Inia geoffrensis		
		J14	olive flounder, Paralichthys olivaceus; Jeju in 1999		
		J15	olive flounder, Paralichthys olivaceus; Jeju in 1999		
S. parau	beris (n=5)	J43	olive flounder, Paralichthys olivaceus; Jeju in 1999		
		J66	olive flounder, Paralichthys olivaceus; Pohang in 1999		
			olive flounder, Paralichthys olivaceus; Pohang in 1998		
		J21	yellowtail, Seriola quinqueradiata; Tongyoung in 1999		
		J55	olive flounder, Paralichthys olivaceus; Busan in 1999		
		J56	yellowtail, Seriola quinqueradiata; Guje in 1999		
		BS17	olive flounder, Paralichthys olivaceus; 1998		
		BS20	olive flounder, Paralichthys olivaceus; Kyungnam in 1998		
L. garvi	eae (n=11)	ST2	olive flounder, Paralichthys olivaceus; Pohang in 1994		
		ST28	olive flounder, Paralichthys olivaceus; Tongyoung in 1994		
		ST34	olive flounder, Paralichthys olivaceus; Jeju in 1994		
		ST72	black rockfish, Sebastes schlegeli : Jeju in 1988		
		ST80	yellowtail, Seriola quinqueradiata; Tongyoung in 1988		
		L16	yellowtail, Seriola quinqueradiata; Guje in 1998		

Table 2. Isolated strains used in this	study	
---	-------	--

Strains		Origin			
	BS5	olive flounder, Paralichthys olivaceus; Tongyoung in 1998			
	BS9	olive flounder, Paralichthys olivaceus; Tongyoung in 1998			
	BS8	olive flounder, Paralichthys olivaceus; Jeju in 1998			
	BS6	olive flounder, Paralichthys olivaceus; Jeju in 1998			
	BS10	olive flounder, Paralichthys olivaceus; Jeju in 1998			
	BS12	olive flounder, Paralichthys olivaceus; Jeju in 1998			
	BS13	olive flounder, Paralichthys olivaceus; Jeju in 1998			
	BS14	olive flounder, Paralichthys olivaceus; Jeju in 1998			
	BS15	olive flounder, Paralichthys olivaceus; Jeju in 1998			
<i>S. iniae</i> (n=19)	J24	olive flounder, Paralichthys olivaceus; Jeju in 1999			
	J28	olive flounder, Paralichthys olivaceus; Jeju in 1999			
	J33	olive flounder, Paralichthys olivaceus; Jeju in 1999			
	J34	olive flounder, Paralichthys olivaceus; Jeju in 1999			
	J35	olive flounder, Paralichthys olivaceus; Jeju in 1999			
	J37	olive flounder, Paralichthys olivaceus; Jeju in 1999			
	J39	olive flounder, Paralichthys olivaceus; Jeju in 1999			
	J40	olive flounder, Paralichthys olivaceus; Jeju in 1999			
	J44	black rockfish, Sebastes schlegeli; Jeju in 1999			
	J64	black rockfish, Sebastes schlegeli; Jeju in 1999			

제주, 통영, 거제, 부산, 경남 등의 해수 어류 양식 장에서 분리, 배양된 것으로서 안구 백탁, 아가 미 뚜껑의 출혈과 농양, 안구 돌출, 근육 농양 및 복부 팽만 등의 증상을 나타내며 폐사되는 병어 들로부터 분리되었다. 어종별로는 넙치로부터 28 균주, 방어로부터 4 균주 그리고 조피볼락으로 부터 3 균주를 분리하였으며, 분리 시기는 8월부 터 12월 사이이었다.

2.시험 균주의 형태학적 성상

병어에서 분리된 시험 균주는 1.5% NaCl 첨가 TSA 및 BHIA 배지에서 colony 크기가 1~3 mm 이며 그램 양성인 연쇄구균으로 관찰되었다. 또 한 colony의 형태는 Fig. 1과 같이 homogeneity, polymorphism, mucoid-like colony의 3가지로 구 분되었고, 분포 정도는 Table 3와 같이 나타났다.

3. PCR법에 의한 16S - 23S rRNA ISR의 유전자 특성

시험에 사용한 35 시험 균주 중 종별 특이 primers를 이용한 16S - 23S rRNA ISR의 유전자 증폭 시험 결과 S. parauberis가 5 균주, L. garvieae가 11 균주, S. iniae가 19 균주로 나타났고 표준 균주도 각각의 종으로 확인되었다.

98년과 99년 제주와 포항 지역의 넙치에서 분 리된 5균주가 S. parauberis 16S - 23S rRNA ISR 의 유전자 증폭 결과를 나타내었으며 표준 균주 도 S. parauberis 로 확인되었다 (Fig. 2).

94~99년 제주, 통영, 포항, 부산, 경남 지역의



Fig. 1. Photograph of colony type from tested strains in this study. A, homogeneity; B, polymorphism; C, mucoid-like colony.

 Table 3. Diversity of colony forms in tested strains

S. parauberis (6 strains)		L. garvieae (12 strains)			S. iniae (20 strains)			
Н	Р	М	Н	Р	М	Н	Р	М
4	2	-	3	9	-	9	8	3

H, Homogeneity; P, Polymorphism; M, Mucoid-like colony.



Fig. 2. PCR products with the specific primers (pSP-1, pSP-2) from *Streptococcus parauberis*. lane 1, marker; lane 2, KCTC3651; lane 3, J14; lane 4, J15; lane 5, J43; lane 6, J66; lane 7, BS18. Arrow indicates the amplified products.

넙치, 방어, 볼락에서 분리된 11 균주는 *L.* garvieae 16S - 23S rRNA ISR의 유전자 증폭 결 과를 나타내었으며 표준 균주도 *L. garvieae*로 확인되었다(Fig. 3).

94~99년 제주, 통영 지역의 넙치, 조피볼락에 서 분리된 19균주가 S. iniae 16S - 23S rRNA ISR



Fig. 3. PCR products with the specific primers (pLG-1, pLG-2) from *Lactococcus garvieae*. lane 1, marker; lane 2, ATCC49156; lane 3, J21; lane 4, J55; lane 5, J56; lane 6, BS17; lane 7, BS20; lane 8, ST2; lane 9, ST28; lane 10, ST34; lane 11, ST72; lane 12, ST80; lane 13, L16. Arrow indicates the amplified products.

의 유전자가 증폭된 결과를 나타내었으며 표준 균주도 S. iniae 로 확인되었다(Fig. 4).

4. 배양 조건별 발육 특성

시험 균주와 표준 균주에 대한 배양 조건별 발육 시험 결과를 Table 4에 나타내었다. 온도별



Fig. 4. PCR products using the specific primers (pSI-1, pSI-2) from *Streptococcus iniae*. lane 1, marker; lane 2, KCTC3657; lane 3, BS5; lane 4, BS6; lane 5, BS8; lane 6, BS9; lane 7, BS10; lane 8, BS12; lane 9, BS13; lane 10, BS14; lane 11, BS15; lane 12, marker; lane 13, J24; lane 14, J28; lane 15, J33; lane 16, J34; lane, 17 J35; lane 18, J37; lane 19, J39; lane 20, J40; lane 21, J44; lane 22, ST64. Arrow indicates the amplified products.

	Tested strains						
Characteristics	KCTC	Streptococcus	ATCC	Lactococcus	KCTC	Streptococcus	
	3651	parauberis (n=5)	49156	garvieae (n=11)	3657	iniae (n=19)	
			Growth at:				
10°C	-	-	+	-(91%)	-	\mathbf{V}^{1}	
20°C	+	+	+	+	+	+	
37°C	+	+	+	+	+	+	
45°C	-	-(80%)	+	+(82%)	-	-(95%)	
4% NaCl	+	+	+	+	+	+	
5% NaCl	+	+	+	+	-	+(68%)	
6% NaCl	-	-	+	+	-	-(84%)	
6.5% NaCl	-	-	+	+(82%)	-	-	
pH 9.6	-	-	+	+(82%)	-	-(63%)	
0.01% TTC	+	+	+	+	+	+(79%)	
10% bile	+	+(80%)	+	+	-	-(58%)	
40% bile	+	+(60%)	+	+(91%)	-	-	
			Growth on:				
<i>St. faecalis</i> ² broth	-	-	-	+(36%)	-	-	
MacConkey agar	-	-	-	-	-	-	
SS agar	-	-	-	-	-	-	

Table 4. Physiological characteristics of tested strains

¹, Variable reaction.

², Streptococcus faecalis.

	Streptococcus		Lactococcus		Streptococcus			
Test	parat	uberis	garvieae		iniae			
Test	КСТС	Tested	ATCC	Tested	КСТС	Tested		
	3651	strains	49156	strains	3657	strains		
Motility	-	-	-	-	-	-		
Oxidase	-	-	-	-	-	-		
Catalase	-	-	-	-	-	-		
Oxidation-Fermentation test	F	F	F	F	F	F		
H ₂ S production	-	-	-	-	-	-		
Indole production	-	-	-	-	-	-		
Methyl red	-	+(60%)	+	+	-	-(95%)		
Voges-Proskauer	-	-	-	-	-	-		
Simmon's citrate utilization	-	-	-	-	-	-		
Nitrate reduction	-	-	-	-	-	-		
	1	Acid fro	m	1				
arabinose	-	-	-	-	+	-		
lactose	-	+(80%)	-	-	-	-		
maltose	+	+(60%)	+	+(91%)	-	-		
mannose	+	+	+	+	-	-(74%)		
raffinose	-	-	-	-	-	-		
salicin	+	+(60%)	+	+	-	-		
sorbitol	+	-	-	-(91%)	-	-		
sucrose	+	+	-	-(82%)	-	-(84%)		
tagatose	-	-	-	-	-	-		
trehalose	+	+	+	+	-	-(79%)		
xylose	+	-	-	-	+	-		
Arginine dihydrolase	+	+	+	+	-	+(81%)		
	1	Decarboxyla	se of:					
lysine	-	-	-	-	-	-		
ornithine	-	-	-	-	-	-		
Hydrolysis of:								
esculin	-	-(80%)	-	-(18%)	+	+(37%)		
starch	-	-(60%)	+	+(36%)	+	+(84%)		
hippurate	+	+	-	-	-	-		
Urease	-	+(80%)	-	-(55%)	-	-(95%)		
Hemolysis	γ	γ	γ	γ	β	β		

 Table 5. Biochemical characteristics of tested strains

	Rabbit antisera					
Strain of Ag	Streptococcus parauberis J14	Lactococcus garvieae ATCC49156 (KG+ phenotype)	Lactococcus garvieae J55 (KG- phenotype)	Streptococcus iniae BS10		
Streptococcus						
parauberis	1024	-	-	-		
J14						
Lactococcus						
garvieae	_1	2048	512	64		
ATCC49156						
Lactococcus						
garvieae	-	-	8	-		
J55						
Streptococcus						
iniae	-	-	-	512		
BS10						

Table 6. Agglutination titers among the tested strains in this study

¹, Titers lower than 2.

발육 시험 결과 45°C에서는 S. parauberis와 S. iniae가 각각 1개의 시험 균주를 제외하고는 증 식하지 않았다. 반면에, L. garvieae 의 균주는 1개 의 시험 균주를 제외하고 모두 증식하는 결과를 나타내었다. 염분 농도별 발육 시험에서 L. garvieae는 6%에서 모든 균주가 증식하였고, 6.5%에서도 2개의 시험 균주를 제외한 10균주 에서 증식을 나타내었다. 선택배지인 Mac-Conkey agar 와 SS agar에서는 시험 균주와 표준 균주 모두가 자라지 않는 것으로 나타났으나 S. faecalis broth에서는 36%의 L. garvieae 균주가 자라는 것으로 관찰되었다.

5. 생화학적 특성

시험 균주와 표준 균주의 생화학적 특성을 비 교한 결과는 Table 5에 나타내었다. 3 종으로 분 류된 균주는 운동성 음성, indole 생성능, oxidase 시험, catalase 시험, H₂S 생성 시험, VP 시험, Simmon's citrate 시험 및 nitrate reduction 시험에서 음성 반응, lysine, ornithine decarboxylase 시험에 서 공통적으로 음성 반응을 나타내었고, 탄수화 물 분해 시험 결과 raffinose와 tagatose에서도 모 두 음성 반응으로 나타났다.

6. 혈청학적 성상

각각의 균주를 이용하여 제작한 토끼 항혈청 을 이용한 슬라이드 응집 반응과 microtiteration 의 결과를 Table 6에 나타내었다. 각 항원 균주 에 대한 토끼 항혈청으로 응집 항체가를 조사한 결과 *S. parauberis* (J14)가 1024, *L. garvieae* (ATCC49156)가 2048 및 *S. iniae* (BS10)가 512의 응집 항체가를 나타내었으며 *L. garvieae* (J55)에 서는 8 이하로 낮게 나타났다. 그러나 다른 시험 균주들과는 달리 *L. garvieae* (ATCC49156; KG+ phenotype)는 *S. iniae* (BS10)과 *L. garvieae* (J55; KG - phenotype)의 항혈청에 대해서 높은 교차 반응성을 나타내었다.

7. 시험 균주의 Capsule

시험 균주의 capsule 유무를 광학현미경으로

있는 것으로 나타났으나, L. garvieae의 표준 균 주인 ATCC49156을 포함한 KG+ phenotype인 L. garvieae의 시험 균주와 S. iniae의 표준 균주

관찰한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 시험에 사용 된 균주 중 KG - phenotype 인 *L. garvieae*는 균 주에 따라서 다양한 두께의 capsule을 가지고





Fig. 5. Observation of the stained capsule of tested isolates by the phase-contrast microscope. A, *Lactococcus garvieae* J55; B, ATCC 49156; C, *Lactococcus garvieae* ST28; D, KCTC3657; E, *Streptococcus iniae* BS10. Arrows indicates capsular structure.



Fig. 6. Transmission electron micrograph of *Lacto-coccus garvieae* (KG- and KG+ phenotype) and *Streptococcus iniae*.

A, Cell incubated with antiserum (KG- phenotype) and stained with ruthenium red demonstrating and electron faint layer adjacent to the cell wall (A; arrow head).

B, Cell incubated with antiserum (KG- phenotype) and stained with ruthenium red demonstrating and fimbriae-like appendages adjacent to the cell wall (B; arrow head).

C, KG+ phenotype cell showing no layer on the cell (C; arrow head).

D, *Streptococcus iniae* cell (BS5, BS9, J35) showing no layer on the cell (D; arrow head). Bar indicates 100 nm.

인 KCTC3657을 포함한 S. iniae의 모든 시험 균 주는 capsule을 가지지 않는 것으로 나타났다.

TEM으로 시험 균주의 capsule 유무를 확인한 결과는 Fig. 6에 나타내었다. 세균 세포의 형태는 구형 또는 타원형으로 관찰되었다. 항혈청으로 안정화시키고 ruthenium red로 염색한 세균 세포 의 초박절편을 검경한 결과 *L. garvieae* 의 두 혈 청형 중 KG- phenotype 세균 세포의 표면에 희 미한 층 또는 fimbrae-like appendages가 관찰되 었다. 그러나 KG+ phenotype 세균 세포의 특성 을 지닌 *L. garvieae* 세균 세포의 표면에는 어떠 한 층이나 물질도 관찰되지 않았다. 또한 colony 의 형태가 다른 *S. iniae*의 세 시험 균주 (BS5, BS9, J35) cells의 표면에서 capsule-like material 은 관찰되지 않았다.

8. 병원성 시험

 Table 7에 4개의 시험 균주와 2개의 표준 균주

 에 대한 공격 균액의 농도 (CFU/fish)와 한 마리

 당 주사한 세균 세포의 수 (cells/fish)를 나타내

 었다. 넙치에 대한 S. iniae의 공격 균액의 평균

 농도는 2.54 × 10⁷ CFU/fish, 평균 세균 세포의

 수는 6.73 × 10⁷ cell/fish로 나타났고, L. garvieae

 의 공격 균액의 평균 농도는 1.88 × 10⁷ CFU/



Fig. 7 Cumulative mortality of olive flounder, *Paralichthys* olivaceus, after intraperitoneal injection with the tested strains, *Streptococcus iniae*, and reference strain, *Streptococcus iniae*. The tested groups were challenged with 0.1 ml of bacteria suspension for 0.8 optical density at 540 nm and the control group was injected 0.1 ml saline fish⁻¹.

fish, 평균 cell의 수는 4.71 × 10⁷ cell/fish로 나타 났으며, 조피볼락에 대한 *S. iniae* 의 공격 균액의 평균 농도는 1.38 × 10⁷ CFU/fish, 평균 세균 세 포의 수는 4.12 × 10⁷ cell/fish로 나타났고, *L. garvieae* 의 주사 균액의 평균 농도는 2.1 × 10⁷ CFU/fish, 평균 세균 세포의 수는 5.00 × 10⁷ cell/fish로 나타났다.

Fig. 7 에는 S. iniae 시험 균주의 넙치에 대한 병원성을 시험한 결과를 나타내었다. colony의 형태가 Homogeneity한 균주인 J39 와 J40에서 주사 후 6일째에 모두 폐사하였으며, 2주째까지 의 누적 폐사율은 BS10 균주의 70%를 제외한 모든 시험 균주에서는 colony의 형태에 관계없 이 10~40%로 상대적으로 낮은 폐사율을 나타 내었다. 폐사어와 생존 개체의 공통적인 병변으 로서는 안구의 백탁과 간 울혈이 나타났다. 그러 나 표준 균주 시험구와 대조구에서는 폐사나 어 떤 이상도 나타나지 않았다. 각 시험구의 폐사어 및 생존 개체에서 원인균이 재분리되었다.

L. garvieae의 시험 균주 및 표준 균주로 넙치 에 병원성을 시험한 결과 폐사 개체는 없었으 나, 약 50%의 생존 개체에서 지느러미 기저부의 발적을 볼 수 있었으며, 이들로부터 원인균을 재 분리할 수 있었다.



Fig. 8. Cumulative mortality of Korean rockfish, *Sebastes schlegeli*, after intraperitoneal injection with the tested strains, *Streptococcus iniae* and *Lactococcus garvieae*, and reference strains, *Lactococcus garvieae* (ATCC49156). The tested groups were challenged 0.1 ml of bacteria suspension for 0.8 optical density at 540 nm and the control group was injected 0.1 ml saline fish⁻¹.

					Inization des-		
	Bacterial		Morphology	Injection dose			
Strains	species	Fish	of colony	CFU ¹ per fish	Cells ² per	Cells ³ per	
	SPecies		or colony	er e per non	chain	fish	
KCTC3657		F^4	H^6	3.5×10^{7}	2.48	8.68×10^{7}	
BS8		F	\mathbf{P}^7	1.8×10^{7}	2.72	4.90×10^{7}	
BS9		F	M^8	1.2×10^{7}	3.41	4.10×10^{7}	
BS10		F	Р	8.6×10^{6}	2.92	2.51×10^{7}	
BS12	Streptococcus	F	Р	7.4×10^{7}	2.38	1.67×10^{8}	
BS14	iniae	F	Р	3.5×10^{7}	2.39	8.37×10^{7}	
J39		F	Н	9.2×10^{6}	3.41	3.14×10^{7}	
J40		F	Н	3.4×10^{7}	2.37	8.06×10^{7}	
J44		F	Р	1.5×10^{7}	3.68	5.52×10^{7}	
ST64		F	М	1.3×10^{7}	4.09	5.32×10^{7}	
ATCC49156		F	Р	2.0×10^{7}	2.64	5.28×10^{7}	
J55		F	Н	2.2×10^{7}	2.14	4.71×10^{7}	
BS20	Lactococcus	F	Р	1.0×10^{7}	2.38	2.38×10^{7}	
ST28	garvieae	F	Р	2.1×10^{7}	2.24	4.70×10^{7}	
ST34		F	Р	3.0×10^{7}	2.69	8.07×10^{7}	
ST80		F	Р	1.0×10^{7}	3.14	3.14×10^{7}	
BS9		R ⁵	М	1.0×10^{7}	3.32	3.32×10^{7}	
BS10	Streptococcus	R	Р	1.9×10^{7}	2.99	5.68×10^{7}	
J39	iniae	R	Н	5.0×10^{6}	3.20	1.60×10^{7}	
J40	iniae	R	Н	2.2×10^{7}	2.26	4.97×10^{7}	
ST64		R	М	1.3×10^{7}	4.09	5.32×10^{7}	
ATCC49156	Lactococcus	R	Р	2.0×10^{7}	2.64	5.28×10^{7}	
J55	garvieae	R	Н	2.2×10^{7}	2.14	4.71×10^{7}	

 Table 7. Characteristics of the tested strains and reference strains used in the pathogenicity test

¹, Each fish received 0.1ml of diluted bacterial suspension by intraperitoneal injection; CFU was determined by BHI agar plate dilution method.

², The mean number of cells which composed one bacterial chain was determined by microscopic observation of smear preparation of the bacterial suspension on slide glasses.

³, Calculated from CFU fish⁻¹ × cells chain⁻¹; ⁴, Oliver flounder; ⁵, Korean rockfish; ⁶, Homogeneity; ⁷, Polymorphism; ⁸, Mucoid-like colony.

Fig. 8은 넙치에 대해 병원성을 나타낸 5개의 S. iniae 시험 균주와 넙치에 병원성을 나타내지 않은 L. garvieae J55와 표준 균주 ATCC49156으 로 조피볼락에 대해 공격 시험한 결과로서 S. iniae 균주로 공격한 시험구에서는 6일째에 모두 폐사를 나타내었다. 그러나 L. garvieae 시험 균 주와 표준 균주에서는 폐사가 일어나지 않았다. 폐사어에서는 새개의 내측과 아가미 협부의 발 적 및 간의 울혈이 전형적인 증상으로 나타났으 며 원인균이 재분리되었다. 병원성 시험에 대한 넙치와 조피볼락의 대조구에서는 폐사가 일어 나지 않았다.

고 찰

시험 균주를 대상으로 특이적인 primers를 이 용하여 PCR 한 결과 220 bp의 예상 증폭 산물을 나타내는 5개의 *S. parauberis 균*주, 304 bp의 예 상 증폭 산물이 생산된 11개의 *L. garvieae 균*주 및 107 bp의 예상 증폭 산물을 나타내는 19개의 *S. iniae*를 확인할 수 있었으며 이들 중 *S. iniae* 가 우점종으로 밝혀졌다.

우리 나라에서 분리된 S. parauberis, L. garvieae 및 S. iniae 의 협청형에 대한 조사 결과 를 보면 Table 6와 같이 S. parauberis와 S. iniae 는 특이성이 강하고 다른 균주의 항혈청에 대한 교차 반응성을 나타내지 않았으며 L. garvieae의 KG- phenotype인 J55도 같은 범주에 속하는 것으로 생각된다. 이에 비해 L. garvieae 의 KG+ phenotype인 ATCC49156의 항원은 L. garvieae 의 KG- phenotype 인 J55의 항혈청뿐만 아니라 S. iniae의 항혈청에 대해서도 비교적 높은 응집 가를 보이는 등 강한 교차 반응성이 확인되었 다. 그 중에서도 ATCC49156의 항원이 J55에 대 하여 높은 응집항체가를 보이는 것은 특이한 현 상이며, 이는 KG - phenotype 균주가 KG + phenotype의 항원성을 지니고 있을 가능성을 시사 하는 것으로 생각되지만 이를 확인하기 위해서 는 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각한다.또 한 L. garvieae J55 의 경우 항체 제작 항원에 대 한 항체가가 극히 낮은데, 그 이유에 대해서도 보다 심도 있는 분석이 뒤따라야 할 것으로 생 각한다. 추가 연구가 아 종간의 구별을 용이하게 할 수 있을 것으로 생각된다.

표현형 특징을 기초로 하여 균 종간을 비교 시에는 *S. parauberis* 및 *L. garvieae* 의 KG+와 KG-의 두 phenotype은 모든 시험 균주에서 non-hemolytic 인 것으로 나타났고 S. iniae 시험 균주는 모두 β-hemolytic인 것으로 나타났다. S. parauberis의 시험 규주와 표준 규주가 모두 hippurate 가수분해 시험에서 양성이었으나, 다른 두 종은 모두 음성이었으며, 또한 L. garvieae는 salicin 양성이었으나 S. iniae 균주는 모두 음성으 로 나타나 종간의 차이를 보였다. 그 외에도 maltose 분해능 시험 및 Bile 40% 첨가 BEM에 서의 발육 시험에서 두 phenotype의 L. garvieae 시험 균주 중 91%가 양성을 나타내었고,45℃에 서의 발육 시험과 염분 농도 6.5%에서의 발육 시험에서 82%가 증식을 나타내었으나 S. iniae 균주는 모두 음성으로 나타났다. 그러나 10°C의 저온에서 S. iniae의 91%가 증식하는 것으로 나 타났으므로 겨울철에 분리되는 연쇄상구균은 S. iniae 일 가능성이 높은 것으로 사료된다. Eldar et al. (1999)은 분리 지역 (국가)에 따라 tagatose 와 sucrose의 이용능이 다른 경향을 나타낸 점에 착안하여 biotype을 Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ으로 구별하였지만 본 연구에서는 그러한 차이를 확인할 수 없었는 데 이러한 차이점은 본 연구의 시험 균주가 분 리 지역간의 거리가 짧고 기후적인 차이가 거의 없는 것과도 관련성이 있을 것으로 사료된다.

시험 균주의 capsule 유무를 확인하고자, 먼저 항혈청 응집 반응 시험으로 구분한 L. garvieae 의 두 phenotype 인 KG+와 KG- phenotype 균주 와 colony의 형태에 따라 선정한 S. iniae 균주에 대하여 capsule 염색 (Cowan and Steel, 1993)과 TEM으로 capsule 의 유무를 조사한 결과 이 두 방법에서 capsule의 유무가 확인되었으며 그 결 과는 항혈청을 이용한 L. garvieae의 두 phenotype 결과와 일치하였으며 capsule의 두께가 다 양하게 관찰되었다. S. iniae 균주에서는 capsulelike material도 관찰되지 않았다. Yoshida et al. (1997)은 capsule stain으로 capsule의 유무를 확 인할 수 없었다고 하였으나 본 연구에서는 cell wall의 표면에 존재하는 capsule을 염색하여 위 상차 현미경으로 쉽게 관찰할 수 있었다. 또한 무지개송어에서 분리된 capsulated β-hemolytic

Streptococcus spp. (Yoshida et al., 1996b)와 colony 의 형태가 유사하고 β용혈성이라는 공통점을 가 지는 점에 주목하여 capsule의 유무를 밝히고자 하였으나 non-capsulated cell로 확인되었다.

본 연구에서 나타난 *L. garvieae* KG- phenotype cell의 capsule은 opsonophagocytosis에 대한 저항성 (Yoshida *et al.*, 1996a), immunogenicity (Ooyama *et al.*, 1999) 및 보체의 opsonization (Yoshida *et al.*, 1997)과도 관계가 알려져 있다. 또 한 Kitao (1983)와 Alim *et al.* (1996)은 KG - phenotype cells이 공격 시험에서 KG+ phenotype cells보다 더 독성이 강한 것으로 보고하고 있으 며, 이 결과는 KG- phenotype factor (capsular materials)가 *L. garvieae* 의 virulence factor 와 관 런성 있음을 시사하고 있다.

본 연구에서 연쇄구균병의 우점종과 차점종으 로 분리된 S. iniae 와 L. garvieae 에 대한 넙치와 조피 볼락의 병원성 시험을 행하였다. Colony의 형태와 L. garvieae 의 KG+와 KG- phenotype에 따른 병원성의 차이를 분석한 결과 넙치에 대해 서는 S. iniae 균주 중 homogeneity 한 형태의 colony에서 급성적인 폐사가 나타났다. 그러나 표준 균주는 같은 형태의 colony이었지만 넙치 에 대한 병원성을 확인할 수 없었다. 이에 비해 polymorphism 및 mucoid-like colony의 균주는 만성적인 폐사를 유발하는 것으로 밝혀졌으며, L. garvieae 의 균주는 phenotype 이나 colony의 형태와 관계없이 넙치에 병원성을 나타내지 않 있다.

조피볼락에 대한 병원성 시험에서 *S. iniae*는 모든 시험 균주가 강한 병원성을 나타내었으나, *L. garvieae*는 두 가지 phenotype 모두 폐사를 일 으키지 않았다. 그러나 지느러미 발적과 같은 증 상을 나타내는 개체가 많아서 만성적인 폐사가 예상되었다. 이러한 현상은 *L. garvieae* 가 γ형 용 혈성이나 KG- phenotype의 capsule 생성능 유무 와도 관련이 있을 것으로 사료된다.

본 연구에서 우리 나라의 해수 양식 어류로부 터 분리한 연쇄구균을 PCR법으로 종 수준으로

동정하고 표현형적, 혈청학적 특성을 분석하였 다. 분리균은 S. iniae가 우점적이었으며 L. garvieae 와 S. parauberis가 혼재하는 것으로 나 타났다. 그리고 S. iniae는 넙치와 조피볼락에 병 원성이 있는 것으로 확인되었다.

요 약

우리 나라의 해수 양식 어류에서 연쇄구균병 의 증상을 나타내는 병어로부터 분리한 원인균 의 종 분포를 조사하고 그 특성을 연구하고자 Streptococcus parauberis, Lactococcus garvieae 및 Streptococcus iniae에 대한 PCR법 종 동정 결과 를 토대로 각 종의 미생물학적 특성을 비교 분 석하였다. 혈청학적 특성에서는 S. parauberis가 강한 종 특이성을 나타내었다. L. garvieae 는 capsule 염색과 TEM을 통한 형태학적 연구를 통해 서 KG+와 KG- phenotype cell의 구별이 가능 하였으며, S. iniae 대표 균주들은 capsule-like material의 존재를 확인할 수 없었다. 본 실험에 사용된 시험 균주 중 S. parauberis 와 L. garvieae 는 모두 non-hemolytic 이었지만, S. iniae는 모두 β-hemolytic 한 특징을 나타내었다. 시험균의 넙 치와 조피볼락에 대한 병원성 시험 결과, S. iniae 가 넙치와 조피볼락에 대하여 급성 또는 만성적 으로 병원성을 나타내었다. L. garvieae의 두 phenotype이 모두 넙치와 조피볼락에 대해 2주 째까지 지느러미 발적 등의 증상을 나타내었으 나 폐사 개체는 관찰되지 않았다.

감사의 글

본 연구의 일부는 국립수산과학원의 연구 지 원 사업에 의해 수행된 연구 결과임을 밝힙니다.

참고문헌

Alim, A. R., Kawai, K. and Kusuda, R.: Comparative pathogenicity study on antigenically variant strains of *Enterococcus seriolicida*. J. Fish Dis., 19: 39-46, 1996.

- Boomker, J., Imes, G. D., Cameron, C. M., Naude, T. W. and Schoonbee, H. J.: Trout mortalities as a result of *Streptococcus* infection. Onderstepoort J. Vet. Res., 46: 71-78, 1979.
- Chang, P. H. and Plump, 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.
- Cowan, S. T. and Steel, K. J.: Manual for the identification of medical bacteria. Cambridge University Press, Combridge, 1993.
- Eldar, A., Goria, M., Ghittino, C., Zlotkin, A. and Bercovier, H.: Biodiversity of *Lactococcus* garvieae strains isolated from fish in Europe, Asia, and Australia. Appl. Environ. Microbiol., 65: 1005-8, 1999.
- Hoshina, T., Sano, T. and Morimoto, Y.: A *Streptococcus* pathogenic to fish. J. of Tokyo University of Fisheries, 16: 201-206, 1958.
- Kitao, T., Aoki, T. and Iwata, K.: Epidemiologic study on streptococcicosis of cultured yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) 1. Distribution of *Streptococcus* sp. in sea water and muds around yellowtail farms. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 45: 567-572, 1979.
- Kitao T., Aoki, T. and Sakoh, R.: Epizootic caused by β-hemolytic *Streptococcus* species in cultuerd freshwater fish. Fish Pathol., 15: 301-307, 1981.
- Kitao, T.: Strain variation associated with pathogenesis of *Streptococcus* sp., the causative bacteria of streptococcicosis in cultured yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. Proc. 2nd Natl. Pacific Aquaculture Symposium, Tokyo and Shimizu, Japan, Tokai University, 196-210,

1983.

- 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.
- Kusuda, R. and Komatsu, I.: A comparative study of fish pathologenic *Streptococcus* isolated from saltwater and freshwater fisheries. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 44: 1073-1078, 1978.
- MacFaddin, J. F.: Biochemical test for identification of medical bacteria. Lippincott Willams and Wilkins, Third edition, 2000.
- Minami, T.: *Streptococcus* sp., pathogenic to cultured yellowtail, isolated from fisheries for diets. Fish Pathol., 14: 15-19, 1979.
- Nagatsugawa, T.: A streptococcal disease of cultured yellowtail. Fish Pathol., 17: 281-285, 1983.
- Nguyen, H. T., Kanai, K. and Yoshikoshi, K.: Experimental *Streptococcus iniae* infection in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Fish Pathol., 36: 40-41, 2001.
- Ooyama, T., Kera, A., Okada, T., Inglis, V. and Yoshida, T.: The protective immune response of yellowtail *Seriola quinqueradiata* to the bacterial fish pathogen *Lactococcus garvieae*. Dis. Aquat. Org., 37: 121-126, 1999.
- Pier, G. B., and Madin, S. H.: Streptococcus iniae sp. nov., a β-hemolytic Streptococcus isolated from an Amazon freshwater dolphin, *Inia* geoffrensis. International Journal of Systematic Bacteriology, 26: 543-553, 1976.
- Plumb, J. A.: Streptococcus and Enterococcus septicemia. In: Health maintenance of cultured fishes. Principal microbial diseases. CRC Press, Boca Raton, FL, 231-235, 1994.

- Rasheed, V. and Plumb, J.: Pathogenicity of a nonhemolytic group B *Streptococcus* sp. in gulf killifish, *Fundulus grandis* (Baird & Girard). Aquaculture 37: 97-105, 1984.
- Williams, P.: Role of the cell envelope in bacterial adaptation to growth in vivo in infections. Biochemie., 70: 987-1011, 1998.
- Yoshida, T., Eshima, T., Yamada, Y., Kakizaki, E., Sakai, M., Kitao, T. and Inglis, V.: Phenotypic variation associated with an anti-phagocytic factor in the bacterial fish pathogen *Enterococus seriolicida*. Dis. Aquat. Org., 25: 81-86, 1996a.
- Yoshida, T., Yamada, Y. and Sakai, M.: Associated of the cell capsule with anti-opsonophagocytosis in β -hemolytic *Streptococcus* spp. isolated from rainbow trout. Jouranl of Aquatic

Animal Health, 8: 223-228, 1996b.

- Yoshida, T., Endo, M., Sakai, M. and Inglis, V.: A cell capsule with possible involvement in resistance to opsonophagocytosis in *Enterococcus seriolicida* from yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. Dis. Aquat. Org., 29: 233-235, 1997.
- Zlotkin, A., Hershko, H. and Eldar, A.: Possible transmission of *Streptococcus iniae* from wild fish to cultured marine fish. Appl. Environ. Microbiol., 64: 4065-4067, 1998.
- 室賀淸邦・江草周三: 魚病學概論 p. 60, 恒星社 厚生閣, 東京, 日本國, 1998.

Manuscript Received : November 28, 2005 Revision Accepted : December 30, 2005 Responsible Editorial Member : Tae-Sung Jung (Gyeongsang Univ.)