

## 제주도 양식넙치 (*Paralichthys olivaceus*)로부터 분리한 비 용혈성 연쇄구균의 동정

강철영 · 강봉조\* · 문영건 · 김기영 · 허문수†

제주대학교 해양과학부

\*제주도해양수산자원연구소

## Characterization of *Streptococcus parauberis* isolated from cultured Olive flounder, *Paralichthys olivaceus* in the Jeju Island

Chul-Young Kang, Bong-Jo Kang\*, Young-Gun Moon,  
Ki-Young Kim and Moon-Soo Heo†

Faculty of Marine Science, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea

\*Cheju Province Fisheries Resources Institute, Jeju 699-810, Korea

This study was performed to identify non hemolytic *streptococcus* from cultured flounder (*Paralichthys olivaceus*) with Streptococcosis in the Jeju island. The result of BIOLOG™ test was *Streptococcus uberis* that similarity of 0.5 and 98% identified in MicroLog™ system (Release 4.05). Carbohydrate utility pattern was dextrin, N-acetyl-D-glucosamine, arbutin, maltose, maltotriose, D-cellobiose, D-fructose, D-mannose,  $\alpha$ -D-glucose, D-mannitol,  $\beta$ -methyl D-glucoside, salicin, sucrose, D-trehalose, pruvatic acid methyl ester, mono-methyl succinate, glycerol. In addition hemolysis test for *Streptococcus parauberis* and were *Streptococcus iniae* hemolysis in BAP (Blood agar plate). Antibiotic test for *S. parauberis* were Ampicillin, Amoxicillin and Fluoroquinolone sensitivity. Mutiplex PCR assay were detected *S. parauberis* (718 bp), *S. iniae* (870 bp) *Lactococcus garviae* (1,100 bp). Dected *S. parauberis* (718 bp) were result of 16S rRNA sequence identified with *S. parauberis* (Gene bank accession number X89967). All isolated *S. parauberis* that with bouned by one group. The result were *S. parauberis* that  $\gamma$ -hemolytic chain form cocci and negative reaction of catalase, Multiplex PCR assay were 718 bp amplicon size.

*Key words:* *Paralichthys olivaceus*, *Streptococcus parauberis*, Mutiplex PCR

1970년대 후반부터 국내 넙치 (*Paralichthys olivaceus*) 종묘 생산이 시작되었으며 1986년에는 제주도에서 종묘 생산 기술개발을 계기로 육상 수조식 양식이 시작되어 현재 해수 양식 어종에서 가장 높은 비중을 차지하는 중요한 어종으로 자리 잡고 있다. 넙치양식 업체의 수도 최근 급격히 증가하여 2005년 260여개소의 양식업체가

있으며 년 간 매출액이 1,693억원으로 제주도내의 1차 산업의 가장 중요한 부분을 차지하고 있다 (제주도, 2006). 시설 규모도 소규모에서 대규모로 전환되는 경향이며 사육방법도 고밀도 사육이 많아 관리 부주의 등으로 각종 질병이 증가하고 있다 (심 등, 1995).

국내산 양식넙치에 주로 발생하는 세균성 질

†Corresponding Author : Moon-Soo Heo, Tel : 064-754-3473,  
Fax : 064-756-3493, E-mail : msheo@cheju.ac.kr

병은 연쇄구균증, 비브리오팀증, 에드워드증 등이 보고되고 있다 (이 등, 1991; 방 등, 1992; 허 등, 2001).

연쇄구균증에 대한 연구로는 일본에서 무지개송어 (*Oncorhynchus mykiss*)의 연쇄구균성 패혈증에 대한 보고를 시작으로 (Hoshina *et al.* 1958), 은어 (*Plecoglossus altivelis*)와 *Oncorhynchus rhodurus*로부터의  $\beta$ -용혈성 *Streptococcus* 분리 (Ohnishi and Jo, 1981), 뱀장어 (*Anguilla japonica*)의 *Streptococcus* sp. 감염보고 등이 있다 (Kitao, 1982). 어류로부터 분리되는 연쇄구균은 *Streptococcus iniae* (Colomi *et al.*), *Lactococcus garviae* (Zolkin *et al.*)를 제외하고는 대부분의 균주가 정확한 동정이 이루어지지 않았다. Mata 등 (2004)은 방어의 연쇄구균증의 원인균을 PCR기법에 의해 *Lactococcus garviae*라고 추정하였고, Doménech 등 (1996)은 유럽에서 주로 양식되는 터봇 (*Scophthalmus maximus*)의 연쇄구균증의 원인균을 *Streptococcus parauberis*로 동정하였다.

또한 Nakatsugawa (1983)는 일본의 양식넙치 연쇄구균증의 원인균으로 *S. iniae*를 분리 동정하였으며, 국내의 경우는 *L. garviae* 및 *Streptococcus* sp. *S. parauberis*등이 넙치로부터 분리되어 (Chun *et al.*, 1988; Lee *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2007; Cho *et al.*, 2007) 넙치의 연쇄구균증의 원인균은 약 2~3종일 것으로 추정되고 있다. 현재 우리나라에서 보고된 넙치 병원체로 보고된 연

쇄구균은  $\beta$ -용혈성 (Chun *et al.*, 1988; Heo *et al.*, 2001) 균주이다.

본 연구에서는 제주도 육상양식장에서 사육되는 넙치에서 분리되는 연쇄구균의 종류를 확인하고 연쇄구균증 원인균을 분리 동정 및 생화학적 특성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 시료 채취

시료는 제주도내 넙치 육상 양식장 중에서 질병발생이 보고된 양식장의 넙치 집단에 대하여 체색흑화, 피부궤양, 지느러미 출혈, 안구돌출 및 충혈, 안구백탁, 장탈장등 외부소견 상 질병에 걸린 것으로 추정되는 어류를 무작위로 선별하였으며, 채집된 어류를 무균적으로 해부하여 신장 또는 간의 조직을 0.85% 멸균 생리식염수에 희석하여 1.5% NaCl이 첨가된 brain heart infusion agar (BHIA, Difco, USA)에 도말하여 30°C, 16~24시간 배양하였다. 실험에 사용된 어류의 증상 및 크기는 Table 1에 나타냈다.

### *S. parauberis* 분리 및 multiplex PCR을 통한 *S. parauberis*의 확인

배양된 세균은 Gram 염색을 실시하여 형태적으로 연쇄상구균이고 Gram 양성균주를 분리하였으며, Catalase test를 통하여 포도상구균과 구

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

Strain	Origin			Year	Clinical Symptoms
	Body length	Temp. (°C)	Organ		
para1	40 cm	16.5	Brain	2005	Darkened pigment
para2	39 cm	16	Kidney	2005	Darkened pigment, Gill corrosion
para3	36 cm	16	Kidney	2005	Haemorrhaging in the eye
para4	45 cm	18	Kidney	2005	Haemorrhaging abdominal wall
para5	40 cm	13.5	Kidney	2005	Operculum bleeding
para6	42 cm	13	Kidney	2005	Haemorrhaging abdominal wall

분하였다 (Thoesen, 1994). 분리된 연쇄상구균은 1.5% NaCl의 첨가된 700  $\mu$ l brain heart infusion broth (BHIB, Difco, USA)에서 30°C, 24시간 배양한 후 80% glycerol 300  $\mu$ l 첨가하여 -80°C에서 보관하였다.

DNA 분리는 순수 분리된 균주를 1.5% NaCl이 첨가된 BHIB에 접종한 후 30  $\pm$  1°C에서 16~24시간 배양시킨 후 4°C, 10,000  $\times$  g로 10분간 원심 분리하여 균체를 수확한 후 DNeasy tissue kit (QIAGEN, Germany)를 이용하여 제조회사의 방법에 따라 실시하였다.

분리균주에 대한 multiplex PCR을 실시하기에 앞서 국내 해산어 연쇄구균종 원인균과 연관성이 있을 것으로 추정되는 *S. parauberis* KCTC 3651, *S. iniae* KCTC 3096, *L. garvieae* KCTC 3772 등 국내 보유 표준균주에 대한 multiplex PCR 기법을 Mata 등 (2004)의 방법에 따라 실시하였다. PCR 조건은 95°C에서 5분간 변성 후 95°C 1분, 55°C 1분, 72°C 1분의 주기로 33회 반복한 후 최종 72°C에서 10분간 확장하였다. 1% agarose gel에서 전기 영동하여 *S. parauberis*의 특이밴드를 확인하여 이 균주를 실험에 이용하였다. Primer sequences 및 amplicon size는 Table 2에 나타내었다.

생화학적 특성 분석 및 용혈성 시험

분리 균주의 생화학적 특성 분석은 Biolog사 (BBL, USA)의 GP2 Plate를 이용하였으며, 분석은 MicroLog™ system (Release 4.05) program을 이용하였다.

순수 분리된 균주를 Biolog Universal Growth Medium (BUGM, Biolog Inc., USA) 사면배지에 접종하여 30  $\pm$  1°C에서 16-24 시간 배양한 후 현탁 하여 탁도계 (Biolog 21907., USA)를 이용하여 20%가 되도록 조절한 후 GP2 Plate의 각 well에 150  $\mu$ l씩 접종하고 30  $\pm$  1°C에서 24 시간 배양한 후 보라색으로 발색되는 well을 양성으로 판정하였다. 이때 현탁액은 NaCl 150 g, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 51 g, KCl 3.7 g을 증류수 912 ml에 녹인 Marine Cation Solution (Noble, L.D., and Gow, J.A. 1998) stock solution을 10배 희석한 후 멸균하여 사용하였다.

*S. parauberis*의 용혈성시험은 Annett and Collins (1990)의 방법을 응용하였으며, 분리된 세균을 BAP (Blood Agar Plate, Komed, Korea)에 계대배양 (30°C 24시간, 5% CO<sub>2</sub>)한 후 냉장고에 방치하여 용혈성의 변화를 관찰하였다. 대조 시험으로는  $\beta$ -용혈성 연쇄구균이라고 알려진 *S. iniae* KCTC 3657을 사용하였다.

*S. parauberis*의 항생제 감수성 시험

각각의 시료로부터 분리된 세균에 대한 항생

**Table 2.** Primer sequences used for PCR amplification and the expected amplicon size.

Primer	Sequences (5' to 3')	Target gene	PCR amplicon size (bp)	Bacteria
Spa 2152 Spa 2870	TTTCGTCTGAGGCAATGTTG GCTTCATATATCGCTATACT	23S rRNA	718	<i>S. parauberis</i>
LOX-1 LOX-2	AAGGGGAAATCGCAAGTGCC ATATCTGATTGGGCCGTCTAA	<i>lctO</i>	870	<i>S. iniae</i>
pLG-1 pLG-2	CATAACAATGAGAATCGC GCACCCTCGCGGGTTG	16S rRNA	1,100	<i>L. garvieae</i>
27F 1522R	AGAGTTTGATCCTGGCTCA AAGGAGGTGATCCARCCGCA	16S rRNA	1,500	<i>Escherichia coli</i>

제 감수성시험은 Baucer 등 (1966)의 disc 확산법을 이용하여 NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards)의 기준에 따랐다. 먼저 BHIA (Difco, USA) 사면배지에 자란 colony를 0.85% 멸균 생리식염수에 희석하여 McFarland NO. 0.5가 되도록 탁도를 조절하여 1.5% NaCl이 첨가된 Muller Hinton Agar (Difco, USA)에 도말한 후 BBL사 (USA)의 항생제 disc 16종 (Ampicillin (10 µg), Amoxicillin (30 µg), Ciprofloxacin (5 µg), Doxycycline (30 µg), Nalidixic acid (30 µg), Oxolinic acid (2 µg), Norfloxacin (10 µg), Ofloxacin (5 µg), Chloramphenicol (30 µg), Penicillin (10 µg), Enrofloxacin (30 µg), Oxytetracycline (30 µg))을 얹어 30 ± 1 °C에서 24 ± 2 시간 배양한 후 억제환을 측정하였다.

#### *S. parauberis*의 genomic DNA 분리

순수 분리 된 균주를 0.5% NaCl이 첨가된 BHI에 접종한 후 30°C에서 16~24 시간 배양시킨 후 10분간 원심 분리 (10,000×g, 4°C) 후 균체를 수확하여, DNeasy tissue kit (QIAGEN, Germany)를 이용하여 제품의 실험 방법에 따라 genomic DNA를 분리 한 후 흡광도 비 ( $A_{260}/A_{280}$ )가 1.8이상 이 되게 하였다.

#### *S. parauberis*의 동정 및 계통분류학적인 위치 분석

*S. parauberis*의 동정 및 계통분류학적인 위치 분석을 위하여 분리된 균주의 16S rRNA 유전자를 증폭하기 위해 *Taq* DNA polymerase 5unit (TaKaRa, Japan)를 사용하였고, Table 2에 나타난 27F 및 1522R primers (each 20 pmol)과 dNTP mixture 2 µl를 혼합하고 멸균 증류수로 최종 부피를 20 µl로 조정하여 PTC-200 Mini Cycloer (MJ Research, USA)를 이용하여 95°C에서 5분간 변성 후 95°C 1분, 55°C 1분, 72°C 1분의 주기로 33회 반복한 후 최종 72°C에서 10분간 확장하였다. 1% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 약 1.5 Kbp 정도의 DNA 증폭산물을 확인하고 16S rRNA 유전자 절편을 재조합하기 위해 증폭된

PCR 산물을 TOPO TA Cloning kit (Invitrogen, USA)를 이용하여 제조회사의 방법에 따라 클로닝을 실시하였다. 염기 서열 분석은 (주)Maregen (Korea)에 의뢰하였다.

16S rRNA 유전자분석을 통한 분리 균주의 동정은 밝혀진 염기서열을 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 Blast Search 및 DNA Star program을 이용하였다. 염기의 계통학적 관계를 밝히기 위하여 Lasergen의 Megalign program을 이용하였으며 이 때 Clustal method에 의해 수행하였다.

## 결 과

#### multiplex PCR을 통한 *S. parauberis*의 확인

표준균주에 대한 multiplex PCR 기법을 수행한 결과 *S. parauberis* KCTC3651, *S. iniae* KCTC3657, *L. garviae* KCTC3772의 경우 예상되었던, 약 718 bp, 870 bp, 1,100 bp 등의 증폭산물을 확인하였다 (Fig. 1). 각각의 표준균주들에 대한 Multiplex PCR 기법을 수행한 결과 Table 1에 나타난 amplicon size와 일치하였으며, 분리한 균주는 *S. parauberis*와 일치하였다.

#### *S. parauberis*의 생화학적 특성 및 용혈성 시험

GP2 Plate을 이용한 생화학적 특성 조사 결과를 MicroLog™ system (Release 4.05) Program을

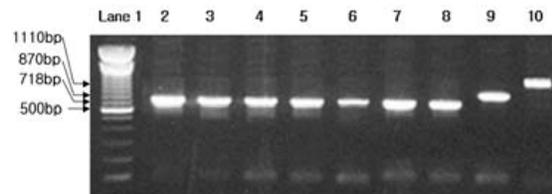


Fig. 1. Multiplex PCR of different *Streptococcus* strains. Lane 1, 100 bp marker; Lane 2, para1; Lane 3, para2; Lane 4, para3; Lane 5, para4; Lane 6, para5; Lane 7, para 6; Lane 8, *S. parauberis* KCTC3651 (718 bp); Lane 9, *S. iniae* KCTC3657 (870 bp); Lane 10, *L. garviae* KCTC3772 (1,100 bp). para 2, 3, 4, 5, 6; isolated strain.

이용하여 동정을 실시하였다. Multiplex PCR을 통하여 *S. parauberis*라고 판단되는 분리 균주는 MicroLog™ system (Release 4.05) Program 에서의 동정 결과는 *S. uberis*였다. 프로그램의 database의 결과와 95%이상을 나타냈으며 similarity 값도 0.5이상을 나타냈다.

GP2 Microplate상에서는 dextrin, N-acetyl-D-glucosamine, arbutin, maltose, maltotriose, D-cellobiose, D-fructose, D-mannose, α-D-glucose, D-mannitol, β-methyl D-glucoside, salicin, sucrose, D-trehalose, pruvatic acid methyl ester, mono-methyl succinate, glycerol을 기질로 한 well에서 양성을 나타냈다 (Table 4).

*S. parauberis*의 용혈성시험 결과는 용혈성이 없는 √용혈성균주로 나타났다. 대조균주인 *S. iniae* KCTC 3657은 β용혈성균주임을 확인하였다.

***S. parauberis*의 항생제 감수성 시험**

*S. parauberis* 높은 감수성을 보인 항생제는 ampicillin (10 μg)과 amoxicillin (30 μg)과 같은 페니실린계의 항생제와 ciprofloxacin (5 μg)과 같은 fluoroquinolone계 항생제에 감수성을 보였다. 그러나 tetracycline (30 μg)과 oxolonic acid (2 μg), nalidixic acid (10 μg), doxycycline (30 μg)의 경우

는 저항성을 나타냈다 (Table 3).

***S. parauberis*의 동정 및 계통분류학적인 위치 분석**

Multiplex PCR을 통해서 *S. parauberis* 로 판단된 분리 균주에 대한 16S rRNA gene에 대한 염

**Table 3.** Antimicrobial susceptibility test of *S. parauberis* isolated from diseased olive flounders.

Antibiotics	<i>S. parauberis</i>
Ampicillin (10 μg)	S
Amoxicillin (30 μg)	S
Ciprofloxacin (5 μg)	S
Doxycycline (30 μg)	R
Erythromycin (15 μg)	S
Nalidixic acid (30 μg)	R
Oxolinic acid (2 μg)	R
Norfloxacin (10 μg)	S
Ofloxacin (5 μg)	S
Chloramphenicol (30 μg)	S
Penicillin (10 μg)	S
Enrofloxacin (30 μg)	S
Oxytetracycline (30 μg)	R

S, sensitivity; R, resistance

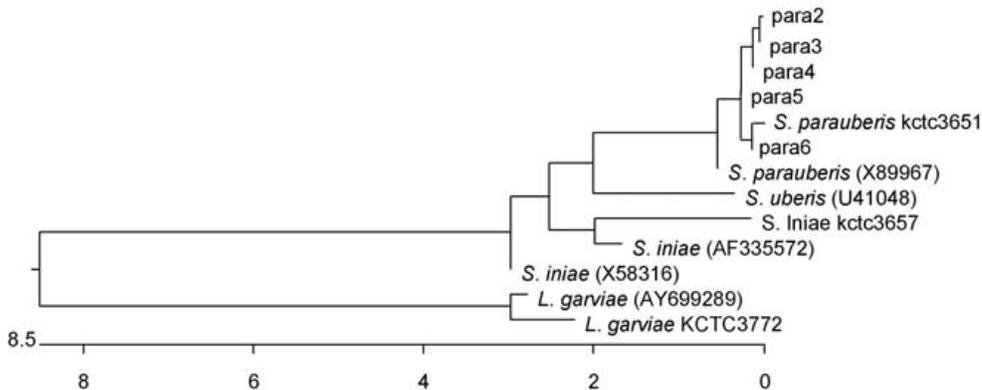


Fig.2. Dendrogram showing the phylogenetic relationship among strains of *Streptococcus* spp. and closely related bacteria isolated (para2, 3, 4, 5, 6) from olive flounders of aquaculture farms. The length of each pair of branches represents the distance between sequence pairs, while the units at the bottom of tree indicate the number of substitution events.

**Table 4.** Biochemical characteristics of isolated strains and type strain tested by BIOLOG™. KCTC3651, *S. parauberis*, KCTC 3657, *S. iniae*

Carbon source	Para 2	Para 3	Para 4	Para 5	Para 6	KCTC 3651	KCTC 3657	Carbon source	Para 2	Para 3	Para 4	Para 5	Para 6	KCTC 3651	KCTC 3657
Water	-	-	-	-	-	-	-	D-Tagatose	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -Cyclodextrin	-	-	-	-	-	-	-	D-Trehalose	+	+	+	+	+	+	+
$\beta$ -Cyclodextrin	-	-	-	-	-	-	-	Turanose	-	-	-	-	-	-	-
Dextrin	+	±	+	+	+	+	-	Xylitol	-	-	-	-	-	-	-
Glycogen	-	-	-	-	-	-	-	D-Xylose	-	-	-	-	-	-	-
Inulin	-	-	-	-	-	-	-	Acetic Acid	-	-	-	-	-	-	-
Mannan	-	-	-	-	-	-	-	$\alpha$ -Hydroxy Butyric Acid	-	-	-	-	-	-	-
Tween 40	-	-	-	-	-	-	-	$\beta$ -Hydroxy Butyric Acid	-	-	-	-	-	-	-
Tween 80	-	-	-	-	-	-	-	$\gamma$ -Hydroxy Butyric Acid	-	-	-	-	-	-	-
N-Acetyl-D Glucosamine	±	+	+	+	+	+	+	p-Hydroxy Phenyl Acetic Acid	-	-	-	-	-	-	-
N-Acetyl-D Mannosamine	-	-	-	-	-	-	-	$\alpha$ -Keto Glutaric Acid	-	-	-	-	-	-	-
Amygdalin	-	-	-	-	-	-	+	$\alpha$ -Keto Valeric Acid	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	Lactamide	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	D-Lactic Acid Methyl Ester	-	-	-	-	-	-	-
Arbutin	+	+	-	-	-	-	+	L-Lactic Acid	-	-	-	-	-	-	-
D-Cellobiose	+	-	-	-	-	-	-	D-Malic Acid	-	-	-	-	-	-	-
D-Fructose	+	+	-	-	-	-	+	L-Malic Acid	-	-	-	-	-	-	-
L-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	Pruvatic Acid	-	-	-	-	-	-	-
D-Galactose	+	-	-	-	-	-	+	Methyl Ester Succinic Acid	+	+	+	+	+	+	-
D-Galacturonic Acid	-	-	-	-	-	-	-	Mono-methyl Ester Methyl Pyruvate	-	-	-	-	-	-	-
Gentiobiose	+	-	+	+	+	+	-	Mono-methyl Succinate	+	+	+	+	+	+	+
D-Gluconic Acid	-	-	-	-	-	-	-	Succinamic Acid	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	Succinic Acid	-	-	-	-	-	-	-
m-Inositol	-	-	-	-	-	-	-	N-Acetyl L-Glutamic Acid	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -D-Lactose	-	-	-	-	-	-	+	L-Alaninamide	-	-	-	-	-	-	-
Lactulose	-	-	-	-	-	-	-	D-Alanine	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	+	-	+	+	+	+	+	L-Alanine	-	-	-	-	-	-	-
Maltotriose	+	+	+	+	+	+	+	L-Alanyl-glycine	-	-	-	-	-	-	-
D-Mannitol	-	+	+	+	+	+	-	L-Asparagine	-	-	-	-	-	-	-
D-Mannose	+	-	+	+	+	+	+	L-Glutamic Acid	-	-	-	-	-	-	-
D-Melezitose	-	-	-	-	-	-	-	Glycyl-L-glutamic Acid	-	-	-	-	-	-	-
D-Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	L-Pyroglutamic Acid	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -Methyl D-Galactoside	-	-	-	-	-	-	-	L-Serine	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -Methyl D-Galactoside	-	-	-	-	-	-	-	Putrescine	-	-	-	-	-	-	-
3-Methyl Glucose	-	-	-	-	-	-	-	2,3-Butanediol	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -Methyl D-Glucoside	-	-	-	-	-	-	-	Glycerol	+	+	+	+	+	+	-
$\beta$ -Methyl D-Glucoside	+	+	+	+	+	+	+	Adenosine	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -Methyl D-Mannoside	-	-	-	-	-	-	-	2'-Deoxy Adenosine	-	-	-	-	-	-	-
Palatinose	-	-	-	-	-	-	-	Inosine	-	-	-	-	-	-	-
D-Psicose	-	-	-	-	-	-	+	Thymidine	-	-	-	-	-	-	-
D-Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	Uridine	-	-	-	-	-	-	-
L-Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	Adenosine-5'-Monophosphate	-	-	-	-	-	-	-
D-Ribose	-	-	-	-	-	-	+	Thymidine-5'-Monophosphate	-	-	-	-	-	-	-
Salicin	+	+	+	+	+	+	-	Uridine-5'-Monophosphate	-	-	-	-	-	-	-
Sedoheptulosan	-	-	-	-	-	-	-	Fructose-6- Phosphate	-	-	-	-	-	-	-
D-Sorbitol	+	-	-	-	-	-	-	Glucose-1- Phosphate	-	-	-	-	-	-	-
Stachyose	-	-	-	-	-	-	-	Glucose-6- Phosphate	-	-	-	-	-	-	-

기서열 분석 결과는 *S. parauberis* (X89967)와 98% 이상의 상동성을 나타내었으며, 분리 균주 모두가 *S. parauberis* KCTC 3651, *S. parauberis* (X89967)와 같은 그룹으로 grouping 되었다 (Fig. 2).

## 고 찰

양식넙치에서 분리되는  $\gamma$  용혈성의 연쇄구균인 *S. parauberis*의 특성을 제시하고자 하였다. *S. parauberis*의 생물학적인 특성에 대한 국내 연구보고는 Lee 등 (2007)이 보고하였으며, 양식터봇의 연쇄구균 병원체로 보고된 바가 있다 (Domenech *et al.*, 1996).

용혈성 시험결과 분리된 *S. parauberis*는  $\gamma$  용혈성 균주였지만 Annett and Collins (1990)는  $\alpha$  또는  $\gamma$  용혈성 균주라고 보고하고 있다.

항생제 감수성 시험 결과에서 보다시피 ampicillin, amoxicillin, chloramphenicol, penicillin에 대해 감수성을 나타내며, oxolonic acid, nalidixic acid, doxycycline은 감수성이 낮은 것 (Kang, 2003; Heo *et al.*, 2001) 과 같다. 분리균주의 탄소원을 기질로 이용하는 특성 (dextrin, N-acetyl-D-glucosamine, arbutin, maltose, maltotriose, D-cellobiose, D-fructose, D-mannose,  $\alpha$ -D-glucose, D-mannitol,  $\beta$ -methyl D-glucoside, salicin, sucrose, D-trehalose, pruvatic acid methyl ester, monomethyl succinate, glycerol)은 Annett and Collins (1990)가 보고한 결과와 유사하였다. 어류병원세균의 약제내성도 여러 종류의 R plasmid에 있는 내성유전자에 의하여 나타나며 (Adams *et al.*, 1998), 이들 R plasmid의 구조 형성에 transposon이 관여하고 있다는 증거가 제시되고 있다 (Kusuda *et al.*, 1976). 그러므로 본 분리 균주에 대한 약제감수성 경향 및 약제내성 전이성 plasmid에 관한 연구는 내성균의 출현을 억제하기 위하여 기본적으로 필요하다고 사료된다. 분리된 균주들을 계통분류학적 분석 결과 Accession number AY584477 하나의 그룹으로 묶였지만 *S.*

*iniae*와는 다른 그룹으로 묶였다 (Fig. 2). 16S rRNA gene에 대한 염기서열 분석 결과는 *S. parauberis* (AY942572)와 98% 이상의 상동성을 나타내어 *S. parauberis* (Williams and Collins, 1990)로 동정하였다. *S. parauberis*는 *S. uberis* type II (Williams and Collins, 1990)로 분류되었으나 Annett and Collins (1990)에 의해서 *S. parauberis*라는 종명이 제시되었다. 이러한 결과로 볼 때 제주도 양식넙치의 연쇄구균증 질병에서 *S. parauberis*는 연쇄구균증 병원체로 판단되었지만 본 연구에서는 감염실험이 수행되지 않아 앞으로 본 병원체에 대한 감염 실험과 병리학적인 연구가 필요하다고 생각된다.

## 요 약

본 연구에서는 국내 연구보고는 아직 없는 실정이나 양식터봇의 연쇄구균 병원체로 보고된 바가 있는 제주 양식넙치에서 분리되는  $\gamma$  용혈성의 연쇄구균인 *Streptococcus parauberis*의 특성을 제시하고자 하였다. *S. parauberis*에 대한 분리균주의 탄소원을 기질로 이용하는 특성은 Annette and Collllins (1990)가 보고한 결과와 유사하였다.

또한 분리된 균주들을 계통분류학적 분석 결과 Accession number AY584477 하나의 그룹으로 묶였지만 *Streptococcus iniae*와는 다른 그룹으로 묶였다. 그러나 Collins가 *S. iniae* (X58306)와 *S. parauberis* (X89967)이 한 그룹으로 묶인다고 발표한 것과는 다른 결과를 나타냈다. 16S rRNA gene에 대한 염기서열 분석 결과는 *S. parauberis* (AY942572)와 98% 이상의 상동성을 나타내어 *S. parauberis*로 동정하였다. *S. parauberis*는 *S. uberis* type II로 분류되었으나 Williams and Collins (1990)에 의해서 *S. parauberis*라는 종명이 제시되었다. 이러한 결과로 볼 때 제주도 양식넙치의 연쇄구균증 병원체로 *S. parauberis*로 판단되나 이번 실험에서 감염실험이 수행되지 않아 앞으로 본 병원체에 대한 감염 실험과 병

리화적인 연구가 필요하다고 사료되어진다.

### 감사의 글

본 연구는 2006년도 제주대학교 해양과학대학 NURI 사업단의 연구비 지원에 의해서 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### 참고 문헌

- Adams, C.A., Austin, B., Meaden, P.G. and McIntosh, D.: Molecular characterization of plasmid mediated oxytetracycline resistance in *Aeromonas salmonicida*. Appl. Envir. Microbiol., 64: 4194-4201, 1998.
- Annette M. Willims and Collins, M.D.: Molecular taxonomic studies on *Streptococcus uberis* type I and II. Description of *Streptococcus parauberis* sp. nov. J. Appl. Bacteriol., 68: 485-490, 1990.
- Baucer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C. and Turck, M.: Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. American Journal of Clinical Pathology., 45: 493-496, 1966.
- Cho, M. Y., Oh, Y. K., Lee, D. C., Kim, J. H. and Park, M. A.: Geographical comparison on different methods for identification of *Streptococcus parauberis* isolated from cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. J. Fish Pathol. 20: 49 - 60, 2007.
- Chun, S.K, Choi, D.L. and Park, S. I.: The Rapid Diagnosis of  $\beta$ -Haemolytic *Streptococcus* sp. by Immunoperoxidase. Method. J. of Fish Pathol., 1: 103-110, 1988.
- Colomi, A., Diamant, A., Eldar, A., Kvitt, A. and Zolkin, A.: *Streptococcus iniae* infection in Red Sea Cage-cultured and wild fish. Dis. Aquat. Org., 49: 165-170, 2002.
- Doménech, A., Fernández-Garayzábal, 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.
- Hoshina, T., Sano, T. and Morimoto, Y.A.: *Streptococcus* pathogenic to fish. J. Tokyo U. Fish., 44: 57-68, 1958.
- Kang, B.J.: A study on the characteristics of bacteria isolated from cultured flounder (*Paralichthys olivaceus*) showing disease symptoms in Jeju area of Korea. Ph. D. Thesis. Cheju National University, pp112, 2003.
- Kim, H.J., Woo, S.H. Kim, J.W. Park, S.I.: Morphological Characteristics and Pathogenicity of *Streptococcus iniae*. J. Fish Pathol., 18: 167-178, 2005.
- 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.
- 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.
- L'Abée-Lund, T.M. and Sorum, H.: Funtional Tn5393-like transposon in R plasmid pRAAS2 from the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* subspecies *salmonicida* isolated in Norway. Appl. Envir. Microbiol., 66: 5533-5535, 2000.
- Lee, C.H. and Ha, D.S.: A streptococcal Disease of Cultured Flounder, *Paralichthys olivaceus*. J. Fish Pathol., 4: 71-77, 1991.

- Lee, C.H., Kim, P.Y., Ko, C.S., Oh, D.C. and Kang, B.J.: Biological characteristics of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus parauberis* isolated from cultured flounder, *Paralichthys olivaceus*, In Jeju. J. Fish Pathol., 20: 33 - 40, 2007
- Lee, D.C., Lee, J.I. Park, C.I. and Park. S.I.: The study on the causal agent of Streptococciosis ( *Lactococcus garvieae* ), isolated from cultured marine fishes. J. Fish Pathol., 14: 71-80, 2001.
- Mata, A.I., Gibello, A. Casamayor, Blanco, M.M., Domínguez, L. and Fernández-Garayzábal, J.F.: Multiplex PCR assay for detection of bacterial pathogens associated with warm-water streptococcosis in fish. Appl. Environ. Microbiol., 70: 3183-3187, 2004.
- Nakatsugawa, T.: A streptococcal disease of cultured flounder. Fish Pathol., 17: 281-285, 1983.
- Noble, L.D., and Gow, J.A.: The effect of suspending solution supplemented with marine cations on the oxidation of Biolog GN MicroPlate™ substrates by Vibrionaceae bacteria. Can. J. Microbiol., 44: 251-258, 1998.
- Ohnishi, K. and Jo, Y.: Studies on streptococcal infection in pond-cultured fish-I. Characteristics of a beta-hemolytic *Streptococcus* isolated from cultured ayu and amago in 1977-1978. Fish pathol., 16: 63-67, 1981.
- Thoesen, J.C.: Suggested procedure for the detection and identification of certain finfish and shellfish pathogens. American Fisheries Society. Bluebook, 1994.
- Zlotkin, A., Eldar, A., Ghittino, C., and Bercovier H.: Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR. J. Clin. Microbiol., 36: 983-985, 1998.
- 방중득, 전세규, 박수일, 최윤정: 양식넙치에서 분리된 *Edwardsiella tarda*의 생화학적 및 혈청학적 특성에 관한 연구. 한국어병학회지, 5: 29-35, 1992.
- 심두생, 이주석, 허문수, 김진우: 양식생물 질병진단 연구(분리균주에 대한 혈청학적 진단 및 최소발육저지농도 조사). 수진사업보고서: 405-423, 1995.
- 이훈구, 김희제, 김일: 동절기 한국 남해안의 궤양증 및 복수증 양식넙치(*Paralichthys olivaceus*)로부터 *Vibrio*종의 분리. 미생물학회지, 29: 319-328, 1991.
- 제주도: 해양수산현황. 2006.
- 허문수, 송춘복, 이제희, 여인규, 전유진, 이정제: 제주산 양식넙치 (*Paralichthys olivaceus*)로부터 분리된  $\beta$ -용혈성 연쇄구균 ( $\beta$ -*Streptococcus* spp.)의 특성. 한국수산학회지, 34: 365-369, 2001.

---

Manuscript Received : June 19, 2007

Revision Accepted : July 10, 2007

Responsible Editorial Member : Sung Hee Jung  
(NFRDI)