한국어병학회지 제36권 제2호 (2023)
J. Fish Pathol., 36(2) : 277~286

www.ksfp.org
pISSN 1226-0819, eISSN 2233-5412
http://dx.doi.org/10.7847/jfp.2023.36.2.277

국내 조피볼락(*Sebastes sclegelii*) 양식장에서 분리한 *Streptococcus iniae*의 표현형 및 유전형 특성

김태호 · 한현자 · 김명석 · 조미영 · 김수진†

국립수산과학원 병리연구과

Pheno- and genotyping of *Streptococcus iniae* isolated from cultured rockfish, *Sebastes schlegelii* at Korean coastal sites

Tae-Ho Kim, Hyun-Ja Han, Myoung Sug Kim, Miyoung Cho and Soo-Jin Kim†

Pathology Division, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Republic of Korea

Korean rockfish, *Sebastes schlegelii*, is a representative bony fish that belongs to the family Scorpaenidae and the order Scorpaeniformes. It has high ecological and economic value and is widely cultivated in many East Asian countries, including South Korea, Japan and China. One of streptococci, *Streptococcus iniae*, is Gram-positive cocci with a negative reaction for catalase and oxidase. The Korean rockfish shows clinical signs when infected with *S. iniae*, such as body darkening, bleeding, enlarged kidneys, blurred eyes, abdominal distension, etc., ultimately leading to death. The Korean rockfish causes significant economic losses every year in South Korea due to streptococcosis. In this study, we identified bacteria from the fish using polymerase chain reaction and conducted analyses of hemolytic activity and biochemical tests using API 20 STREP and API ZYM systems. Results of confirming the hemolytic activity (n=4) observed in alpha-type hemolysis (25%), beta-type hemolysis (50%), and gamma-type hemolysis (25%) of isolates. The biochemical test results exhibited significant variation among *S. iniae*. Additionally, we performed intraperitoneal injection with *S. iniae* in the fish and analyzed the phylogenetic tree using housekeeping genes of *S. iniae*, including *cpsD*, *arcC*, *glnA*, *groEL*, *gyrB*, *mutS*, *pheT*, *prkC*, *rpoB*, and *tkt*, via multilocus sequence typing (MLST). The lethal dose (LD_{50}) showed strong pathogenicity, such as 3.34×10 colony-forming unit (CFU)/ml for 23FBStr0601 strain and 7.16×10 CFU/ml for 23FBStr0602 strain. 23FBStr0603 strain showed relatively low pathogenicity at 1.73×10^5 CFU/ml. The strains 23FBStr0601 and 23FBStr0602, which showed strong pathogenicity, clustered into one monophyletic group. The 23FBStr0603 strain showed weak pathogenicity and formed a monophyletic group with KCTC 3657.

Key words: *Sebastes sclegelii*, *Streptococcus iniae*, Phynotype, Housekeeping gene, Multilocus sequence typing, Phylogenetic tree

†Corresponding author: Soo-Jin Kim
Tel: +82-51-720-2492, Fax: +82-51-720-2498
E-mail: sjkim1984@korea.kr

서 론

조피볼락(*Sebastes sclegelii*)은 쏨뱅이목(*Scorpaeniformes*), 양볼락과(*Scorpaenidae*)에 속하며, 주로 연안의 암초 지역에 서식한다. 조피볼락은 대표적인 태생 경골어류로 감염성 질병 및 저수온에 대한 저항성이 강하고 먹이 섭이가 활발하며, 성장이 빨라 한국, 일본, 중국 등 동아시아 국가에서 주로 양식된다(Jang et al., 2019). 1990년대 이후 국내 해상가두리 양식 기술이 발달함에 따라 생산량이 크게 증가하였고, 현재는 국내 주요 양식 어종 중 하나가 되었다(Lee 2001; Han et al. 2020). 국내 조피볼락 양식 생산량은 급증하였으나 양식 과정이 고밀도로 이루어지고 있어 *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio* spp., *Streptococcus* spp.의 세균성 질병에 의한 감염 및 폐사가 보고되었다(Han et al. 2011; Jung et al. 2012).

국내 주요 양식 품종인 넙치(*Paralichthys olivaceus*)와 조피볼락에서 연쇄구균병(streptococcosis)에 따른 경제적 손실이 지속적으로 보고된다(Han et al. 2020; Eldar et al. 1994). 이러한 연쇄구균병을 일으키는 세균 중 하나인 *Streptococcus iniae*는 그람양성구균으로 조피볼락에 감염되면 주로 체색흑화, 출혈, 신장비대, 안구백탁, 복부팽만 등의 증상이 나타나며, 심한 경우 폐사에 이르게 된다(Kim and Heo 2018). *S. iniae*는 1976년 아마존강돌고래(*Inia geoffrensis*) 피하조직의 농양에서 최초로 분리되었고, 양식장에서 *S. iniae* 감염으로 연쇄구균병이 발생하면 감염된 개체 중 약 30~50%가 폐사한다고 보고된다(Weinstein et al. 1997). 1976년 이후로 27종의 어류에서 감염이 보고되며, 병원체에 감염된 보균어(carrier fish)를 섭이하거나 대변-구강 경로를 통한 감염, 복강 내 주사 등 다양한 감염경로를 통해 전파, 확산된다. 또한, 어종에 따라 다양한 병원성을 보이며, 무지개송어(Oncorhynchus mykiss), 큰입선농어(*Lates calcarifer*), 틸라피아(*Oreochromis mossambicus*)에서 3×10^4 colony forming unit (CFU)/fish－10^8 CFU/fish 사이의 반수치사농도(lethal dose, LD_{50})가 보고된다 (Eldar and Ghittino 1999, Agnew and Barnes 2007).

원핵생물의 분류학적 다양성을 분석하는데 있어 유전형 분석 방법(genotypic methods)은 매우 중요한 기술이다. 이러한 분석 방법은 1998년 microbial typing method로 하우스키핑 유전자(housekeeping genes)를 사용하여 유전자 수준에서의 변이(variation)를 분석하는 방법인 Multilocus sequence typing(MLST)이 처음 소개되었고, 2005년에는 MLST를 기반으로 몇 가지 단백질 조각들을 코딩하고 있는 유전자 절편들(internal fragments)을 같은 속(genus) 내 종(species) 간의 다양성을 계통수(phylogenetic tree)로 분석하는 Multilocus sequence analysis(MLSA)가 개발되었다. 본 연구에서 사용한 MLST 분석 방법은 하우스키핑 유전자의 DNA 염기 서열을 비교함으로써 같은 종 내 계통의 분화를 알아보고자 본 기술을 활용하였다 (Glaeser and Kampfer, 2015).

본 연구의 목적은 국내 조피볼락 양식장의 연쇄구균 감염어로부터 분리한 세균을 유전자 증폭 기술 중 하나인 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)으로 16S rRNA sequencing 분석을 통해 동정하였고, 표현형(phynotype) 및 유전형(MLST) 특성 분석, 병원성 시험(LD_{50})으로 조피볼락에서 발생하는 *S. iniae*의 질병 특성을 연구하는데 기초적인 자료를 확보하고자 하였다.

재료 및 방법

시험균주의 배양 조건

본 연구에 사용한 세균은 1.5% sodium chloride 및 1.5% agar가 포함된 brain heart infusion(BHI) (Difco Laboratories, USA) 평판배지에서 25℃ 조건으로 36시간 배양하였다. 평판배지에서 순수 분리된 균을 1.5% sodium chloride를 포함하는 BHI 액상배지에 접종하였고, shaking incubator에서 25℃, 160 rpm 조건에서 36시간 배양하였다. 배양이 끝난 균액을 4,000 rpm에서 30분간 원심분리해서 상등액을 제거하고 펠렛을 phosphate buffer saline (PBS)로 세척하는 과정을 2번 반복한 후 사용하였다. 배양한 *S. iniae*는 실험 전까지 -80℃에 보관하였다.

세균의 동정

한국수산미생물자원은행 (Korean Culture Col-

Table 1. Information on *Streptococcus iniae* isolates used in this study

Isolates ID	Strain	Year	Source
23FBStr0601	Streptococcus iniae	2017	통영
23FBStr0602	Streptococcus iniae	2021	기장
23FBStr0603	Streptococcus iniae	2021	여수
KCTC 3657	Streptococcus iniae	1972	미국

lection of Aquatic Microorganisms, KoCAM)에 보관 중이던 3개 균주 (23FBStr0601, 23FBStr0602, 23FBStr 0603)와 표준균주 KCTC 3657를 선정하여 16S rRNA sequencing 으로 동정하였다(Table 1). 본 연구에서 사용한 3개 균주는 여름철 고수온기 국내 조피볼락 양식장의 연쇄구균 감염어의 신장에서 분리하였다. 선정한 4개 균주는 high pure PCR template preparation kit (Roche Diagnostics, Germany)를 사용하여 핵산(genomic DNA)을 추출하였고, 1 μL의 genomic DNA (50 ng/μL)와 25 μL의 EmeraldAmp PCR mixture (Takara, Japan), 1 μL의 forward primer (0.2 μM/μL), 1 μL의 reverse primer (0.2 μM/μL)를 eppendorf tube에 분주한 후, 충분히 혼합하여 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)으로 유전자 증폭을 실시하였다. PCR 조건은 95℃ for 5 min, 35 cycles of 95℃ for 30 s, 48℃ for 30 s, 72℃ for 1 min, final extension at 72℃ for 5 min, 유전자 증폭에 사용한 프라이머는 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 1492R (5'-GGTTACC TTGTTACGACTT-3')를 사용하였다.

실험어

본 연구에 사용한 실험어는 충청남도 태안군 소재의 종묘생산장에서 평균전장 7.43 cm, 평균체중 12.04 g의 조피볼락(*Sebastes schlegelii*)을 부산 기장군 소재 국립수산과학원으로 이동 후 28일간 순치하였다. 본 연구에 사용한 실험어의 세균성 질병 감염 여부를 확인하기 위해, 무작위로 조피볼락 10마리를 선정하였다. 선정한 조피볼락의 신장과 비장 일부를 무균적으로 적출하여 1.5% sodium chloride 및 1.5% agar 포함된 BHI 평판배지에 streaking 배양법으로 도말하였다. 도말이 끝난 평판배지를 25℃에서 48시간동안 배양을 실시하였으며, 배지에 세균은 자라지 않는 것을 확인한 후 본 실험을 진행하였다. 무작위로 선정한 260마리의 조피볼락을 13개의 개별 수조(300 L)에 각각 20마리씩 분배하였고, 수온 20℃에서 사육한 후 공격실험을 위해 사육수온을 매일 1℃씩 3일간 가온한 후 23±2℃의 조건에서 실험을 진행하였다. 실험기간 동안 어체중의 2.0%의 사료를 1일 1회 공급하였다.

미생물 효소활성 및 용혈능

동정이 끝난 시험균주를 1.5% sodium chloride 및 1.5% agar가 포함된 BHI 평판배지에 각각 도말하였고, 25℃에서 36시간 배양한 후 해당 균주의 미생물 효소활성을 분석하였다. 효소활성 분석은 API®20 STREP kit(BioMerieux, France)와 API® ZYM kit(BioMerieux, France)를 사용하였고 제조사의 매뉴얼대로 실험을 진행하였다. 시험균주의 용혈능은 혈액배지(Blood Agar Base) (KisanBio, Republic of Korea)에 도말하였으며, 25℃에서 24시간 배양한 후 용혈 부위 (hemolysis zone)를 확인하였다.

시험균주의 하우스키핑 유전자 분석

조피볼락에서 분리한 시험균주의 유전자 분석은 *Streptococcus iniae*의 하우스키핑 유전자(housekeeping genes)를 코딩하는 부위를 multilocus sequence typing (MLST)로 유전자 염기서열의 변이를 확인하였다. *S. iniae*의 하우스키핑 유전자인 Capsular polysaccharide D (*cpsD*), DNA mismatch repair protein (*mutS*), RNA polymerase B (*rpoB*), Glutamine synthetase (*glnA*), Gyrase B (*gyrB*), Serine/threonine-protein kinase (*prkC*), Transketolase (*tkt*), Phenylalanine-tRNA ligase subunit beta (*pheT*), Carbamate kinase (*arcC*), Chaperonin (*groEL*)를 선정하여 해당 유전자에 특이적인 프라이머를 제작하였으며, 각 프라이머에 대한 정보는 Table 2에 나타내었다(Kim et al. 2014; Heckman et al. 2020). 모든 시험균주는 앞서 언급한 방법대로 각각 BHI 액상배지에 배양해서 genomic DNA를 추출하였고, PCR법으로 증폭해서 Bionics사에 유전자 염기서열 분석을 의뢰하였다. 유전자 분석은 BioEdit 프로그램과 MEGA X v10.2.2 프로그램을 사용하여

Table 2. Primers for multilocus sequence typing (MLST) analysis that were used in this study

Target genes	Primers	Sequences (5'-3')	Size (bp)	PCR conditions
Capsular polysaccharide D (*cpsD*)	cpsD-F cpsD-R	5'-ATGTCACAATTAAATTTAGTAAGTAC-3' 5'-TCACTTTCTGGAATGTTTTTTAC-3'	720	94℃ for 5 min, 30 cycles of 94℃ for 30 s, 48℃ for 30 s, 72℃ for 1min, final extension at 72℃ for 10 min
DNA mismatch repair protein (*mutS*)	mutS-F mutS-R	5'-WAAAAATTCTGARCGYTATGG-3' 5'-AAGGTTGATTGCCCAGAAAT-3'	440	
RNA polymerase B (*rpoB*)	rpoB-F rpoB-R	5'-TGTTGGTACTGGTATGGA-3' 5'-AAACGTTGTCCACCAAAT-3'	692	
Glutamine synthetase (*glnA*)	glnA-F glnA-R	5'-MAAATGGGYTTTGAAGTDGAAGC-3' 5'-RTCAATTTCCCATTGWGAMAY-3'	712	94℃ for 5 min, 30 cycles of 94℃ for 30 s, 52℃ for 30 s, 72℃ for 1 min, final extension at 72℃ for 10 min
Gyrase B (*gyrB*)	gyrB-F gyrB-R	5'-GGWGARGATGTTCGTGAAGG-3' 5'-TCCATTGTTGTTTCCCAAAG-3'	732	
Serine/threonine-protein kinase (*prkC*)	prkC-F prkC-R	5'-TATTTGCTGGTCGTTATCGS-3' 5'-YCCCATSGCATAAATATCAC-3'	498	
Transketolase (*tkt*)	tkt-F tkt-R	5'-CAGAAGATGTKAAAGGACGTT-3' 5'-GCCATKGCAAATTCACGWAC-3'	503	
Phenylalanine-tRNA ligase subunit beta (*pheT*)	pheT-F pheT-R	5'-GGTCAACCWATGCATGCTTT-3' 5'-WCATYGGCCACATVAGTTC-3'	716	94℃ for 5 min, 30 cycles of 94℃ for 30 s, 54℃ for 30 s, 72℃ for 1min, final extension at 72℃ for 10 min
Carbamate kinase (*arcC*)	arcC-F arcC-R	5'-GCWAAAGCACAACAAGAAGC-3' 5'-CGCCADCCACGRCCWGCATC-3'	340	
Chaperonin (*groEL*)	groEL-F groEL-R	5'-TAAATTTTCAGCAGATGCSCGY-3' 5'-ACTTCAAGYTCTGTYTCCATACC-3'	459	

clustal W 방법으로 정렬하였고, Maximum Likelihood 방법과 Bootstrap 방법, Tamura- Nei model을 참고해서 계통수(Phylogenetic tree)를 제작해서 계통발생학적으로 비교 및 분석을 진행하였다(Tamura 1994).

병원성 시험

본 실험에 들어가기 앞서 *S. iniae* 3개 균주(23FBStr 0601, 23FBStr0602, 23FBStr0603)의 병원성을 확인하기 위해, 20 L 사각수조(n=12)에 조피볼락을 5마리씩 무작위로 배치하였다. 각 균주별 접종 농도는 접종할 균을 PBS에 현탁해서 $10^3 \sim 10^6$ CFU/ml농도로 제조하였다. 이를 조피볼락의 복강에 100 μl씩 주사하였고 23℃에서 7일 동안의 폐사를 관찰하는 예비실험을 실시하였다(Data not shown). 예비실험 결과를 바탕으로 본 실험의 인위 감염 실험 농도를 설정하였다.

균주에 따른 인위감염 농도는 10-fold 단계희석법으로 조정하였고, 100 μl의 PBS에 시험균주를 각각 현탁하여 조피볼락의 복강에 주사(Intraperitoneal injection) (23FBStr0601_10 ~ 10^3 CFU/ml; 23FBStr0602_10 ~ 10^4 colony-forming unit (CFU)/ml; 23FBStr0603_10^4 ~ 10^6 CFU/ml) 하였다. 이와 비교하기 위한 음성 대조구는 균주별로 하나씩 설정하였고, 동일한 방법으로 조피볼락의 복강에 멸균 PBS를 주사하였다. 실험어인 조피볼락은 인위감염 후 23±2℃에서 14일 동안 폐사를 관찰하였다. 병원성 시험에 사용한 실제 접종한 균의 농도 확인을 위해, 생균수(colony-forming unit, CFU)는 plate dilution 방법으로 측정하였다(Jett et al., 1997). 모든 실험구(n=13)는 개별 수조에 20마리씩 분배한 후 사육 및 폐사를 관찰하였으며, 실험 기간 동안 폐사한 실험어의 신장 및 비장 조직을 분리하여 BHI agar 배지에 도말한 후 25℃에서 2일 동안 배양하여 인위감염에 따른 폐사 여부를 확인하였다. 각 *S. iniae* 균주의 반수치사농도(LD_{50})는 SPSS

23.0 software를 사용해서 probit analysis로 분석하였다.

결과 및 고찰

연쇄구균의 동정 및 용혈성

2017년과 2021년에 양식 조피볼락에서 분리한 균주(23FBStr0601, 23FBStr0602, 23FBStr0603)와 표준균주 KCTC 3657는 *Streptococcus iniae*로 동정되었다(Table 1). PCR을 이용하지 않고 연쇄구균속(genus)의 균들을 구분할 수 있는 방법은 대표적으로 혈청학적 및 생화학적 방법, 용혈성 확인 등이 알려져 있다. 이 중에서 연쇄구균의 용혈능은 혈액한천배지에서 연쇄구균이 자라면서 일으키는 용혈 패턴에 따라 세 가지 유형으로 나눌 수 있으며, 일반적으로 *S. iniae*를 혐기성 조건에서 배양하면 β형 용혈을 일으킨다고 알려져 있다(Barnes et al., 2003, Goh et al., 1998). α형 용혈은 연쇄구균의 일부 colony만 용혈시켜 녹색의 colony 형태로 자라고, β형 용혈은 혈액배지의 적혈구를 완전히 용혈시켜 colony 주변이 투명해진다. γ형 용혈은 연쇄구균이 적혈구를 용해시키지 못한다(Lancefield 1933). 본 연구에서 *S. iniae* 3개 균주의 용혈능을 확인한 결과 23FBStr0602은 α형 용혈성으로 확인되었고, 23FBStr0601과 23FBStr0603은 β형 용혈, KCTC 3657은 γ형 용혈성임을 확인하였다. 넙치에서 분리한 65개의 *S. iniae* 균주가 β형 용혈을 일으켰다는 Nho et al. (2009)의 보고와는 다르게 2개 균주 (50%)만 β형 용혈을 일으켰다. Chou et al. (2014)는 지역 및 어종에 따라 *S. iniae* 균주가 다양한 용혈을 일으켰다고 보고한 것처럼 서로 다른 지역의 조피볼락 양식장에서 분리한 *S. iniae*가 다양한 형태의 용혈을 일으키는 것으로 사료된다.

생화학적 특성

API 20 STREP system을 활용한 미생물 효소활성 분석 결과, 시험에 사용된 모든 균주 사이에서 20개 항목 중 13개 항목의 효소 이용능이 일치하였고, 7개 항목의 효소 이용능에서 차이를 확인하였다. 효소 이용능이 일치한 시험 항목 중에서 esculin (ESC), pyrrolidonyl arylamidase (PYRA), alkaline phosphatase (PAL), leucine aminopeptidase (LAP)는 양성 반응을 일으키면서 해당 효소들을 이용할 수 있었고, Voges-Proskauer (VP), hipuric acid (HIP), α-galactosidase (αGAL), β-galactosidase (βGAL), arabinose (ARA), sorbitol (SOR), lactose (LAC), inulin (INU), raffinose (RAF)에서는 음성 반응을 확인하였다(Table 3). 효소 이용능에 차이를 보인 시험은 β-glucuronidase (βGUR), arginine dihydrolase (ADH), ribose (RIB), mannitol (MAN), trehalose (TRE), amidon (AMD), glycogen (GLYG)에서 차이를 보였다. 넙치에서 분리한 *S. iniae* 균주의 생화학적 특성 분석 결과와 비교해보면, ESC, PYRA, PAL, LAP 시험 항목에서 모두 양성 반응을 나타냈다는 Shin et al. (2006)의 보고와 일치하였다. 또한, Nho et al. (2009)의 연구와 비교 시 PYRA, PAL, LAP 시험 항목이 일치하였으나, ESC 효소에서 모두 음성 반응이 관찰된 결과와는 차이를 나타내었다. 본 연구에서 시험한 *S. iniae* 3개 균주와 표준균

Table 3. Comparison of the biochemical characteristics of the isolates based on API 20 STREP system

Enzymes	23FBStr0601	23FBStr0602	23FBStr0603	KCTC 3657
Voges-Proskauer	-	-	-	-
hipuric acid	-	-	-	-
esculin	+	+	+	+
pyrrolidonyl arylamidase	+	+	+	+
α-galactosidase	-	-	-	-
β-glucuronidase	+	-	+	+
β-galactosidase	-	-	-	-
alkaline phosphatase	+	+	+	+
leucine aminopeptidase	+	+	+	+
arginine dihydrolase	+	-	+	-
ribose	+	-	+	-
arabinose	-	-	-	-
mannitol	-	-	+	-
sorbitol	-	-	-	-
lactose	-	-	-	-
trehalose	+	-	+	-
inulin	-	-	-	-
rafinose	-	-	-	-
amidon	+	-	-	-
glycogen	+	-	-	-

주로 사용한 KCTC 3657 사이에서도 효소 이용능의 차이가 확인되었다. KCTC 3657 균주와 다른 분리 균주와의 차이를 비교해보면, 23FBStr0601 균주는 5개의 효소(ADH, RIB, TRE, AMD, GLYG), 23FBStr0602 균주는 βGUR 효소, 23FBStr0603 균주는 4개의 효소(ADH, RIB, MAN, TRE)에서 양성 반응이 나타났지만, KCTC 3657 균주에서만 음성 반응을 확인했다. 균주별로 차이를 보이지만 조피볼락에서 분리된 *S. iniae*가 표준 균주인 KCTC 3657에 비해 더 많은 항목의 효소를 이용할 수 있는 것으로 확인된다. API 20 STREP system을 활용한 생화학적 특성 분석 결과, 23FBStr0602 균주와 표준균주 KCTC 3657가 가장 유사하였다(βGUR 제외). API® ZYM system으로 미생물 효소 활성을 분석한 결과, 모든 시료의 음성 대조구에서 반응이 일어나지 않았고, 음성 대조구를 제외한 14개의 시험 항목이 일치하였다. 시험 항목이 일치한 효소 중 3개의 효소(alkaline phosphatase, leucine arylamidase, acid phosphatase)는 양성 반응을 보이면서 시험한 모든 균주가 해당 효소들을 이용할 수 있었고, 11개 효소는 이용할 수 없는 것으로 확인되었다. 본 연구에서 시험한 *S. iniae* 3개 균주와 KCTC 3657의 효소 활성 분석 결과, valine arylamidase와 naphtol-AS-BI-phosphohydrolase는 표준균주인 KCTC 3657이 양성 반응을 나타내었고, β-glucuronidase와 α-glucosidase는 23FBStr0601 균주만 효소를 이용할 수 있었다. α-chymotrypsin는 23FBStr0602 균주만 이용할 수 없었다. 또한, 23FBS0603 균주는 valine arylamidase와 naphtol-AS-BI-phosphohydrolase 효소에 대해서는 음성 반응을 보이면서 KCTC 3657 균주와 차이가 있었다(Table 4).

Table 4. Comparison of the biochemical characteristics of the isolates based on API ZYM system

Enzymes	23FBS tr0601	23FBS tr0602	23FBS tr0603	KCTC 3657
control	-	-	-	-
alkaline phosphatase	+	+	+	+
esterase (C4)	-	-	-	-
esterase lipase (C8)	-	-	-	-
lipase (C14)	-	-	-	-
leucine arylamidase	+	+	+	+
valine arylamidase	-	-	-	+
crystine arylamidase	-	-	-	-
trypsin	-	-	-	-
α-chymotrypsin	+	-	+	+
acid phospatase	+	+	+	+
naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	-	-	-	+
α-galactosidase	-	-	-	-
β-galactosidase	-	-	-	-
β-glucuronidase	+	-	-	-
α-glucosidase	+	-	-	-
β-glucosidase	-	-	-	-
N-acetyl-β-glucosaminidase	-	-	-	-
α-mannosidase	-	-	-	-
α-fucosidase	-	-	-	-

+, positive; -, negative

본 연구에서 분석한 *S. iniae*는 그람양성구균으로 일반적으로 연쇄상구균은 catalase 음성, LAP 양성 반응을 보이며, vancomycin에 대한 저항성이 약하다고 보고된다(Goh 1988). API 20 STREP system과 API ZYM system을 활용한 분석 결과, 조피볼락에서 분리한 4개 균주는 LAP에서 양성 반응을 보이면서 대표적인 연쇄상구균의 특징을 보였다(Table 3, 4). *S. iniae*는 PYRA, ESC, arginin을 가수분해 시킬 수 있어서 양성 반응을 나타내며, VP, urease, HIP에서는 음성 반응을 보인다고 한다(Goh et al., 1988; Lau et al., 2003). 본 연구에서 분석한 *S. iniae* 4개 균주도 PYRA와 ESC에서 양성 반응을 나타냈고, VP와 HIP에서는 음성 반응을 보이며 *S. iniae*의 대표적인 특징을 보였다(Table 3). 하지만, 23FBStr0601 균주와 23FBStr0603 균주만 ADH를 이용해서 가수분해 시킬 수 있었기 때문에, 기존에 보고된 *S. iniae*의 특징과 차이가 있었다. 또한, 발효능 시험에서 *S. iniae*는 일반적으로 glucose, salicin, sucrose, starch를 이용 할 수 있어서 양성 반응을 나타내며, ARA, INU, LAC, melibiose, RAF, SOR에서는 음성 반응이 나타난다고 보고된다(Goh et al., 1988). 본 연구에서 시험한 4개 균주는 발효 효소 이용능을 분석한 결과에서 ARA, INU, LAC, RAF, SOR 시험 항목에서 음성 반응을 나타내었고, 이는 *S. iniae*의 대표적인 특징으로 볼 수 있다(Table 3). 또한, mannitol을 이용한 발효 이용능은 *S. iniae*에서 variable한 결과를 보인다고 보고되며(Goh et al.,

1988), 본 연구 결과에서도 3개 균주(23FBStr0601, 23FBStr0602, KCTC 3657)는 양성 반응, 23FBStr 0603 균주는 음성 반응을 보이며 균주 간에 효소 이용능에 차이를 보였다. 생화학적 특성 분석 결과, 3개 시험균주(23FBStr0601, 23FBStr0602, 23FBStr 0603)의 용혈능 및 효소 이용능 사이의 연관성을 찾을 수 없었다. 또한, Nho et al. (2009)와 shin et al. (2006)의 보고처럼 조피볼락에서 분리한 *S. iniae* 균주 (n=4)의 효소 이용능에도 많은 차이를 보였다. 이는 조피볼락에서 분리한 세균의 표현형 특성이 동일한 종 내에서도 다형성(polymorphic)을 보이는 것은 해당 지역의 환경적 요인 (온도, 염분)에 큰 영향을 받는 것으로 사료된다(Nho et al. 2009; Jang et al. 2020).

병원성 시험

본 연구에서 선정한 *S. iniae* 3개 균주의 병원성을 시험하기 위해 복강주사법으로 인위감염을 실시하였다. 실험 기간 동안 각 균주별 음성 대조구 (n=20)에서 폐사가 관찰되지 않았으며, 폐사한 조피볼락의 비장 및 신장 조직에서 순수 분리된 형태의 연쇄구균을 확인하였다. 폐사체의 체표 및 내부 임상 증상을 확인한 결과, 대부분의 조피볼락에서 입 주변 가장자리 및 아래턱, 꼬리 지느러미 부위의 출혈 및 복부팽만 등의 증상이 나타났고, 내부 장기를 부검한 결과 특이적인 감염 증상은 나타나지 않았다. (Fig. 1). Kim and Heo (2018)의 보고에 따르면, 연쇄구균에 감염된 조피볼락에서 신장이 비대해지는 감염 증상은 본 연구에서 나타나지 않았으나, 감염된 일부 개체에서 안구 백탁과 돌출, 이상유영 증상이 동일하게 관찰되었다. 따라서 다른 병원체에 의한 폐사가 아닌 인위감염에 의한 폐사가 발생한 것으로 확인된다.

실험에 사용된 *S. iniae* 3개 균주의 병원성 시험 결과, 23FBStr0601 균주의 누적폐사율은 2.83 × 10 CFU/ml, 2.83 × 10^2 CFU/ml, 2.83 × 10^3 CFU/ml 농도에서 각각 70%, 100% 및 95%의 누적폐사가 발생하였고 (Fig. 2A), 23FBStr0602은 1.17 × 10 CFU/ml, 1.17 × 10^2 CFU/ml, 1.17 × 10^3 CFU/ml, 1.17 × 10^4 CFU/ml 농도에서 각각 10%, 60%, 100%, 100%의 누적폐사를 일으켰다 (Fig. 2B). 23FBStr0603 균주는 5.04 × 10^3 CFU/ml, 5.04 × 10^4 CFU/ml, 5.04 × 10^5 CFU/ml 농도에서 각각 65%, 65%, 40%의 폐사율이 관찰되었다(Fig. 2C). 세균은 어류에서 감염성 질병과 폐사를 일으키는 주요한 원인 중 하나이다. 수산 분야에서 세균성 병원체의 진화, 숙주의 면역시스템과 병원체와의 상호작용, 숙주의 감염성 질병에 대한 적응 전략, 환경적인 요인 등은 현재 정확히 밝혀지지 않았다(Sudheesh et al., 2012). 하지만, 현재에도 감염된 숙주와 병원체는 서로의 생존을 위해 끊임없이 싸우는 중이라는 것은 명확하다고 판단된다. 본 연구의 23FBStr0601 균주가 2.83 × 10^3 CFU/ml 농도에서 2.83 × 10^2 CFU/ml 보다 낮은 폐사율을 보였으며, 23FBStr0603 균주도 5.04 × 10^5 CFU/ml 농도에서 5.04 × 10^3 CFU/ml과 5.04 × 10^4 CFU/ml 농도보다 낮은 폐사율을 보인 것은, 실험 개체간 차이 혹은 일부 개체가 면역시스템의 작용으로 생존한 것으로 사료된다. 본 연구의 조피

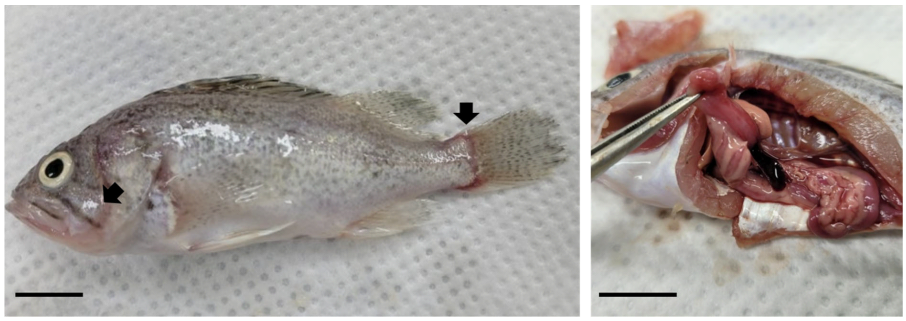
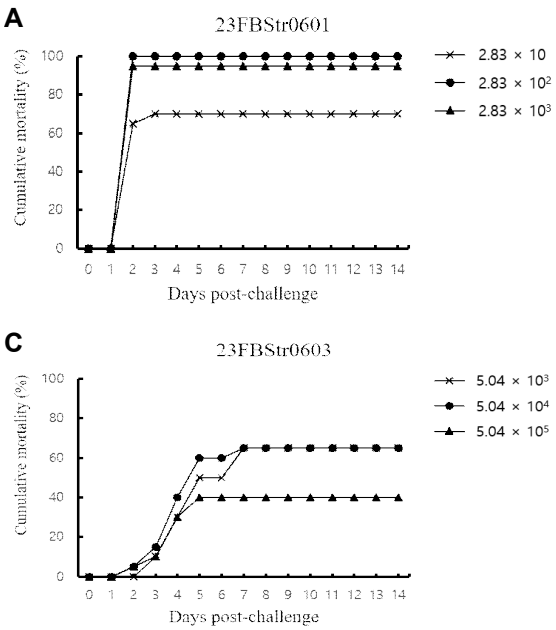


Fig. 1. Fish shown in the picture challenged with *Streptococcus iniae* 23FBStr0601. Arrows indicate symptomatic areas following *S. iniae* infection. Black bars indicates 1 cm.



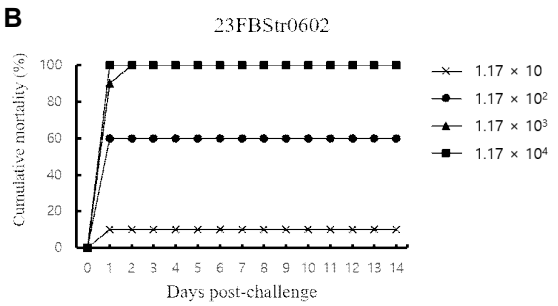


Fig. 2. Cumulative mortality of Korean rockfish was monitored for 14 days after being challenged with *Streptococcus iniae*. (A) 23FBStr0601, (B) 23FBStr0602, (C) 23FBStr0603.

볼락에 대한 *S. iniae*의 LD_{50}을 측정한 결과, 23FBStr 0601과 23FBStr0602 균주에서 강한 병원성이 확인되었고, 23FBStr0603 균주는 상대적으로 약한 병원성을 보였다(Table 5).

MLST를 활용한 유전형 분석

하우스키핑 유전자를 활용한 계통수 분석은 감염성 질병의 역학조사에서 중요한 역할을 한다. 본 연구에서 *S. iniae*의 하우스키핑 유전자를 분석해서 계통수를 그린 결과, 조피볼락에 대해 강한 병원성을 보인 23FBStr0601과 23FBStr0602 균주는 유전적 근연관계가 가깝게 나타나면서 하나의 단일계통군(monophyly)을 형성하였고, 상대적으로 병원성이 약했던 23FBStr0603 균주는 표준균주인 KCTC 3657 균주와 유전적 근연관계가 가까웠고 하나의 단일계통군을 형성하였다(Fig. 3).

본 연구는 국내 조피볼락 양식장에서 연쇄구균

Table 5. Determination of lethal lethal dose (LD_{50}) for each *Streptococcus iniae* strain

Isolates ID	Strain	LD_{50}
23FBStr0601	Streptococcus iniae	3.34×10 CFU/ml
23FBStr0602	Streptococcus iniae	7.16×10 CFU/ml
23FBStr0603	Streptococcus iniae	1.73×10^{5}CFU/ml

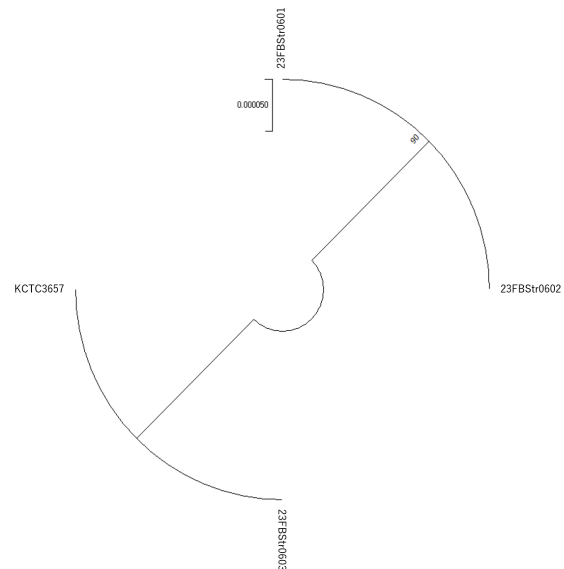


Fig. 3. Phylogenetic relationships of housekeeping genes between three strains (23FBStr0601, 23FBStr0602, 23FBStr0603) isolated from Korean rockfish and standard strain (KCTC 3657).

감염증상을 보인 개체의 신장과 비장에서 분리한 세균을 16S rRNA sequencing을 활용하여 동정하였고, 세균의 용혈능 및 효소 이용능, *S. iniae*의 하우스키핑 유전자를 MLST로 분석을 실시하고 *S. iniae*의 병원성, 표현형 및 유전형 특성을 비교하였다. 본 연구의 계통수 분석에서 23FBStr0601, 23FBStr0602 균주와 23FBStr0603, KCTC 3657 균주가 서로 다른 단일계통군을 형성하는 것은 *S. iniae*의 병원성과 하우스키핑 유전자 사이에 연관성이 있는 것으로 판단된다. Kim et al. (2005)은 넙치(*Paralichthys olivaceus*)에 *S. iniae*를 1×10^6 CFU/ml의 농도로 인위 감염 시켰을 때, KS1, KS2, KS3 균주는 인위 감염 후 10일째에 100%의 누적 폐사율을 보였으나, KCTC 3657은 20%의 낮은 누적폐사율을 보였다. 이는 본 연구에서 활용한 KCTC 3657균주가 조피볼락에 대해서도 낮은 병원성을 보일 것으로 사료된다. 하지만, 하나의 단일계통군을 형성하면서 낮은 병원성을 보인 KCTC 3657과 23FBStr0603 균주가 용혈능과 효소 이용능에 가장 큰 차이를 보인 점에 대해서는 추가적인 연구가 필요하다고 여겨진다. 또한, 분석한 세균의 수가 제한적 (n=4)이기 때문에 본 연구 결과만으로 *S. iniae*의 특성을 일반화시키는 것은 어렵고, 지역별로 분리한 *S. iniae*를 추가적으로 확보해서 균주의 특성을 비교하는 연구가 필요하다고 판단된다.

사 사

이 연구는 국립수산과학원 (R2023052, 고효율 어류백신 및 어종별(넙치) 접종 프로그램 개발)의 지원에 의해 진행되었습니다.

References

Agnew, W., and Barnes, A. C.: *Streptococcus iniae*: an aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination. Vet. Microbiol., 122: 1-15, 2007. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.03.002.

Barnes, A. C., Young, F. M., Horne, M. T., and Ellis, A. E.: *Streptococcus iniae*: serological differences, presence of capsule and resistance to immune serum killing. Dis. Aquat. Org., 53: 241-247, 2003. http://doi.org/10.3354/dao053241.

Chou, L., Griffin, M. J., Fraites, T., Ware, C., Ferguson, H., Keirstead, N., Brake, J., Wiles, J., Hawke, J. P., Kearney, M. T., Getchell, R. G., Gaunt, P., and Soto, E.: Phenotypic and genotypic heterogeneity among *Streptococcus iniae* isolates recovered from cultured and wild fish in North America, Central America and the Caribbean islands. J. Aquat. Anim. Health, 26: 263-271, 2014. https://doi.org/10.1080/08997659.2014.945048.

Eldar, A., Bejerano, Y., and Bercovier, H.: *Streptococcus shiloi* and *Streptococcus difficile*: two new streptococcal species causing a meningoencephalitis in fish. Curr. Microbiol., 28: 139-143, 1994. https://doi.org/10.1007/BF01571054.

Eldar, A., and Ghittino, C.: *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: similar, but different diseases. Dis. Aquat. Org., 36: 227-231, 1999. http://doi.org/10.3354/dao036227.

Goh, S. H., Driedger, D., Gillett, S., Low, D. E., Hemmingsen, S. M., Amos, M., Chan, D., Lovgren, M., Willey, B. M., Shaw, C., and Smith, J. A.: *Streptococcus iniae*, a human and animal pathogen: specific identification by the chaperonin 60 gene identification method. J. Clin. Microbiol., 36: 2164-2166, 1998. https://doi.org/10.1128/jcm.36.7.2164-2166.1998.

Glaeser, S. P., and Kämpfer, P.: Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. Syst. Appl. Microbiol., 38: 237-245, 2015. https://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.03.007.

Han, H. J., Kim, D. Y., Kim, W. S., Kim, C. S., Jung, S. J., Oh, M. J., and Kim, D. H.: Atypical *Aeromonas salmonicida* infection in the black rockfish, *Sebastes schlegeli Hilgendorf*, in Korea. J. Fish Dis., 34: 47-55, 2011. https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2010.01217.x.

Han, H. J., Song, J. Y., Cho, M. Y., Choi, H. S., Jung, S. H., and Seo, H. G.: Monitoring of diseases including nematode *Clavinema mariae* infections in the cultured Korean rockfish *Sebastes schlegeli* during 2013-2016. Korean J Fish Aquat Sci., 53: 432-442, 2020. https://doi.org/10.5657/KFAS.2020.0432.

Heckman, T. I., Griffin, M. J., Camus, A. C., LaFrentz, B. R., Morick, D., Smirnov, R., Ofeck, T., and Soto, E.: Multilocus sequence analysis of diverse *Streptococcus iniae* isolates indicates an underlying genetic basis for phenotypic heterogeneity. Dis. Aquat. Org., 141: 53-69, 2020. https://doi.org/10.3354/dao03521.

Jett, B. D., Hatter, K. L., Huycke, M. M., and Gilmore, M. S.: Simplified agar plate method for quantifying viable bacteria. BioTechniques., 23: 648–650, 1997. https://doi.org/10.2144/97234bm22.

Jung, S. H., Choi, H. S., Do, J. W., Kim, M. S., Kwon, M. G., Seo, J. S., Hwang, J. Y., Kim, S. R., Cho, Y. R., Kim, J. D., Park, M. A., Jee, B. Y., Cho, M. Y., and Kim, J. W.: Monitoring of bacteria and parasites in cultured olive flounder, black rockfish, red sea bream and shrimp during summer period in Korea from 2007 to 2011. J. Fish Pathol., 25: 231-241, 2012. https://doi.org/10.7847/jfp.2012.25.3.231.

Jang, M. H., Kim, K. Y., Lee, Y. H., Oh, Y. K., Lee, J. H., and Song, J. Y.: Genetic Identification and biochemical characteristics of *Edwardsiella* strains isolated from freshwater fishes cultured in Korea. J. Fish Pathol., 33: 111-118, 2020. https://doi.org/10.7847/jfp.2020.33.2.111.

Kim, H. J., Woo, S. H., Kim, J. W., and Park, S. I.: Morphological characteristics and pathogenicity of *Streptococcus iniae*. J. Fish Pathol., 18: 167-178, 2005.

Kim, M. S., Jin, J. W., Han, H. J., Choi, H. S., Hong, S., and Cho, J. Y.: Genotype and virulence of *Streptococcus iniae* isolated from diseased olive flounder *Paralichthys olivaceus* in Korea. Fish Sci., 80: 1277-1284, 2014. https://doi.org/10.1007/s12562-014-0804-0.

Kim, D. H., and Heo, M. S.: Characteristics and diagnostic methods of Streptococcosis causing disease in aquaculture. Life Sci., 28: 1118-1126, 2018. https://doi.org/10.5352/JLS.2018.28.9.1118.

Lancefield, R. C.: A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. J. Exp. Med., 57: 571-595, 1933. https://doi.org/10.1084/jem.57.4.571.

Lee, S. M.: Review of the lipid and essential fatty acid requirements of rockfish (*Sebastes schlegeli*). Aquac. Res., 32: 8-17, 2001. https://doi.org/10.1046/j.1355-557x.2001.00047.x.

Lau, S. K., Woo, P. C., Tse, H., Leung, K. W., Wong, S. S., and Yuen, K. Y.: Invasive *Streptococcus iniae* infections outside north America. J. Clin. Microbiol., 41: 1004-1009, 2003. https://doi.org/10.1128/jcm.41.3.1004-1009.2003.

Nho, S. W., Shin, G. W., Park, S. B., Jang, H. B., Cha, I. S., Ha, M. A., Kim, Y. R., Park, Y. K., Dalvi, R. S., Kang, B. J., Joh, S. J., and Jung, T. S.: Phenotypic characteristics of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus parauberis* isolated from olive flounder *Paralichthys olivaceus*. FEMS Microbiol. Lett., 293: 20-27, 2009. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01491.x.

Shin, G. W., Palaksha, K. J., Yang, H. H., Shin, Y. S., Kim, Y. R., Lee, E. Y., Kim, H. Y., Kim, Y. J., Oh, M. J., Yoshida, T., and Jung, T. S.: Discrimination of streptococcosis agents in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol., 26: 68, 2006.

Sudheesh, P. S., Al-Ghabshi, A., Al-Mazrooei, N., and Al-Habsi, S.: Comparative pathogenomics of bacteria causing infectious diseases in fish. J. Evol. Biol., 1-16, 2012. https://doi.org/10.1155/2012/457264.

Tamura, K.: Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+ C-content biases. Mol. Biol. Evol., 9: 678-687, 1992.

Weinstein, M. R., Litt, M., Kertesz, D. A., Wyper, P., Rose, D., Coulter, M., Mcgeer, A., Facklam, R., Ostach, C., Willey, B. M., Borczyk, A., and Low, D. E.: Invasive infections due to a fish pathogen, *Streptococcus iniae*. N. Engl. J. Med., 337: 589-594, 1997. http://10.1056/NEJM199708283370902.

Zhang, Z., Yu, Y. X., Wang, K., Wang, Y. G., Jiang, Y., Liao, M. J., and Rong, X. J.: First report of skin ulceration caused by *Photobacterium damselae* subsp. *damselae* in net-cage cultured black rockfish (*Sebastes schlegeli*). Aquaculture., 503: 1-7, 2019. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.12.088.

Manuscript Received : Nov 24 2023
Revised : Dec 06 2023
Accepted : Dec 07 2023