

석사학위논문

제주도 양식넙치(*Paralichthys olivaceus*)에서  
분리한 연쇄구균증 원인균의  
분포 및 동정



제주대학교 대학원

해양생물공학과

정 용 욱

2003년 12월

제주도 양식넙치(*Paralichthys olivaceus*)에서  
분리한 연쇄구균증 원인균의  
분포 및 동정

지도교수 허 문 수

정 용 욱

이 논문을 이학석사학위 논문으로 제출함



2003년 12월

제주대학교 중앙도서관  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

정용욱의 이학석사학위 논문을 인준함

심사위원장 송 춘 복 ( 인 )

위 원 이 제 희 ( 인 )

위 원 박 근 태 ( 인 )

제주대학교 대학원

2003년 12월

Distribution and Identification of *Streptococcus*  
sp. from Cultured Flounders, *Paralichthys*  
*olivaceus* with Streptococcosis  
in the Jeju Island

Yong-Uk Jung

(Supervised by professor Moon-Soo Heo)



A thesis submitted in partial fulfillment of the  
requirement for the degree of  
Master of Science

DEPARTMENT OF MARINE BIOTECHNOLOGY  
GRADUATE SCHOOL  
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

2003. 12

# 목 차

<b>Abstract</b> .....	i
<b>I. 서 론</b> .....	1
<b>II. 재료 및 방법</b> .....	4
1. 시험 균주의 분리와 참고균주 .....	4
2. API 20 strep system에 의한 생화학적 성상 .....	10
3. BiOLOG system에 의한 생화학적 성상 .....	10
4. Genomic DNA의 분리 .....	10
5. PCR primer의 제작 및 반응조건 .....	11
6. 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Region (ISR) 염기서열 분석 .....	13
<b>III. 결 과</b> .....	14
1. API 20 strep system에 의한 생화학적 성상 .....	14
2. PCR 기법을 이용한 연쇄구균의 계통분류학적 동정 .....	14
3. BiOLOG system에 의한 생화학적 성상 .....	18
4. 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Region (ISR) 염기서열 분석 .....	27

IV. 고찰 .....	32
V. 요약 .....	36
VI. 참고문헌 .....	38

## ABSTRACT

This study performed for the purpose of identification of *Streptococcus* sp. from cultured flounders (*Paralichthys olivaceus*) with Streptococcosis in the Jeju island. We isolated 43 strains of genus *Streptococcus* from cultured flounder with Streptococcosis. The result of API 20 strep system-test showed that the strains should be divided into unidentified group I (10 strains), *S. uberis* (23 strains), *E. faecalis* (4 strains) *S. porcinus* (4 strains) and unidentified group II (2 strains). Unidentified group I (10 strains) were identified in *S. iniae* since they have formed the expected band through performing PCR assay using specific primers, Sin-1 (5'-CTAGAGTACACATGTACT(AGCT)AAG-3') and Sin-2 (5'-GGATTTTCCACTCCCATTAC-3'). Other strains were identified in *S. parauberis* since they were formed the expected band through performing PCR assay using specific primers, Strepto ISR-1(5'-AAATGGAAGCACGTTAGGAAA-3') and Strepto ISR-2 (5'-GGATTTTCCACTCCCATTAC-3').

In addition to carbohydrate utility analyzed pattern (microLog™) showed that all strains can be divided into two groups which were *S. iniae* group and *S. parauberis* group. And then may be divided into two types by the molecular structure of 16S-23S rRNA internal transcribed spaces (ISR). The 16S-23S rRNA ISR sequence of *S. iniae* group identified with 96 % sequence of *S. iniae* (Genbank accession number AF 048773) and 16S-23S rRNA ISR sequence of *S. parauberis*

group identified with 97 % sequence of *S. parauberis* (Genbank accession number AF 255656). This paper reports the first ever recorded occurrence of *S. parauberis* associated with Streptococcosis in the flounder.



## I. 서론

어류에서 발병되는 연쇄구균증은 전 세계적으로 해수 및 담수산 양식 어류의 대량폐사를 일으키는 중요 어류질병으로 본 질병은 우리나라에서도 주요 양식어류인 넙치를 비롯하여 방어, 조피볼락 등에 지속적인 폐사를 가져와 많은 경제적 손실을 가져오고 있다 (진, 1989; Muzquiz *et al.*, 1999).

어류의 연쇄구균증 원인균에 대한 보고는 1974년 일본의 방어에서 최초로 보고되었고 이에 대한 생화학적 정상분석 결과 *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus faecium*의 중간적인 성상을 나타내어 분류학적으로 모호한 점이 있어 최근까지 통상적으로 *Streptococcus* sp.로 불리었다 (Hashimoto *et al.*, 1982; Iida *et al.*, 1986). 그러나 미생물에 대한 동정 기법이 발달함에 따라 지금까지 어류의 연쇄구균증은 여러 속이 포함된 다양한 병원체가 관여하고 있는 것으로 보고되고 있으며, 전 세계 25종의 양식어종에서 *Streptococcus difficilis*, *Streptococcus agalactae*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus parauberis*, *Streptococcus equi*, *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus faecium*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis* subsp, *Lactococcus garviae* 등이 본 질병에 관여하는 것으로 보고되었다 (Austin and Austin, 1999).

이러한 연쇄구균증 병원체들 중 *S. iniae*, *S. difficile*의 경우 안구돌출, 뇌수막염, 패혈증을 주 증상으로 하며 *S. parauberis*의 경우 패혈증이 관찰되어지고 *L. garviae*의 경우 패혈증에 의한 급성 전신 질환을 보여 각 병원체간에 병원성이 다른 것으로 알려져 있으며, 치사율도 각각 달라 연쇄구균증을 일으키는 각 병원체에 대한 명확한 동정과 분류가 필요할 것으로 사료된다 (Domenech *et al.*, 1996; Bercovier *et al.*, 1997; Eldar *et al.*,



1999).

한편 국내에서도 본 질병에 대한 병원체 동정 연구가 진행되고 있으며, Lee *et al.*, (2001)에 의해 생화학적 성상, 혈청학적 성상 및 16S ribosomal RNA gene을 기초로 한 동정 연구 결과 *L. garvieae*를 동정하였으며, 이외에 종 동정이 이루어지지 않은 *Enterococcus* sp. 5 균주, *Streptococcus* sp. 9 균주를 보고하였다. Song *et al.*, (2003)은 양식넙치에서 분리한 *Streptococcus* sp.의 생화학적 성상과 RAPD profile 연구를 통해 *S. pyogenes*, *E. faecalis*로 동정하였고 미동정 균주 3균주를 분리하였다. 따라서 국내 양식어류의 연쇄구균증에 관여하는 병원체 역시 여러 종이 관여할 것이라 여겨지며, 아직 동정되지 않은 병원체가 존재할 것으로 추정되어진다.

미생물 동정의 한 부류인 분자생물학적 동정방법은 표현형에 근거한 동정 방법이 가진 여러 단점 즉, 미생물의 생리상태, 실험 조건 및 계통발생학적 다양성에 의한 동정 오류를 보완할 수 있는 방법으로서 유용하게 사용되어지고 있다. 지금까지 미생물 동정에 있어 보편적으로 사용되어진 16S rRNA gene 서열은 일부 종간 비교에 있어 유사성이 매우 높아 종간 비교에 적합하지 않은 실정이다. 최근에는 보다 명확한 미생물의 동정, 종간 및 종내 비교를 위해 ribosomal RNA operon 중, 16S rRNA gene 서열보다 염기 치환률이 빠른 16S-23S rRNA intergenic spacer region (ISR)의 서열과 길이 다양성을 이용하고 있는 추세이다 (Jensen *et al.*, 1993; Nagpal *et al.*, 1998; Garcia-Martinez *et al.*, 1999). 이러한 동정 기법은 아직 동정체계가 명확하지 않은 어류 연쇄구균증 병원체 동정에 효과적으로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

따라서 본 연구는 어류 질병 제어 차원에서 국내 어류 연쇄구균증 원인균에 대한 동정연구를 보다 면밀히 수행하고자 하였으며, 특히 일반 연안역과 구분이 되는 지리적 특성을 가진 제주도의 경우 구체적인 보고가 없는 실정임으로 중요한 기초 자료로서 가치가 있을 것으로 기대되어, 제주

도 양식넙치 중 연쇄구균증 증상을 보이는 넙치를 대상으로 연쇄구균증 원 인체를 분리 동정하여 이들의 특성을 규명하고자 하였다.



## II. 재료 및 방법

### 1. 시험균주의 분리와 참고균주

본 연구에 사용된 균주들의 시료채취는 제주도 육상양식장이 밀집한 도 동부 해안을 주 대상으로 12곳을 선정하여 2003년 1월부터 6월까지 주로 Fig. 1과 같이 체색흑화, 안구돌출 및 출혈, 안구백탁, 복벽 출혈, 장발적 등의 전형적인 연쇄구균증을 나타내는 12 - 52 cm의 양식넙치 (*Paralichthys olivaceus*)를 실험 대상으로 하였다 (Fig 1, 2).

신장과 뇌에서 1.5% NaCl 첨가 BHIA (Brain Heart Infusion Agar, Difco co.)와 혈액배지를 사용하여 28°C, 24 - 48시간 배양하여 순수 분리하였다. 분리된 균주의 형태와 운동성을 관찰하기 위해, 1.5% NaCl 첨가 BHIB (Brain Heart Infusion Broth, Difco co.) 배지에서 28°C, 18 - 48시간 배양하여 Gram 염색 후 광학현미경 (OLYMPUS BX50, × 1000)에서 관찰하여 연쇄상의 형태를 확인하였고 (Fig. 3), Oxidase, Catalase-test를 수행하여 결과가 음성인 균주를 본 실험에 사용하였다

참고균주는 *Streptococcus pyogenes* KCTC-3096, *Streptococcus* sp. KCTC-3098, *Streptococcus iniae* KCTC-3657, *Lactococcus garvieae* KCTC-3772를 사용하였다 (Table 1).

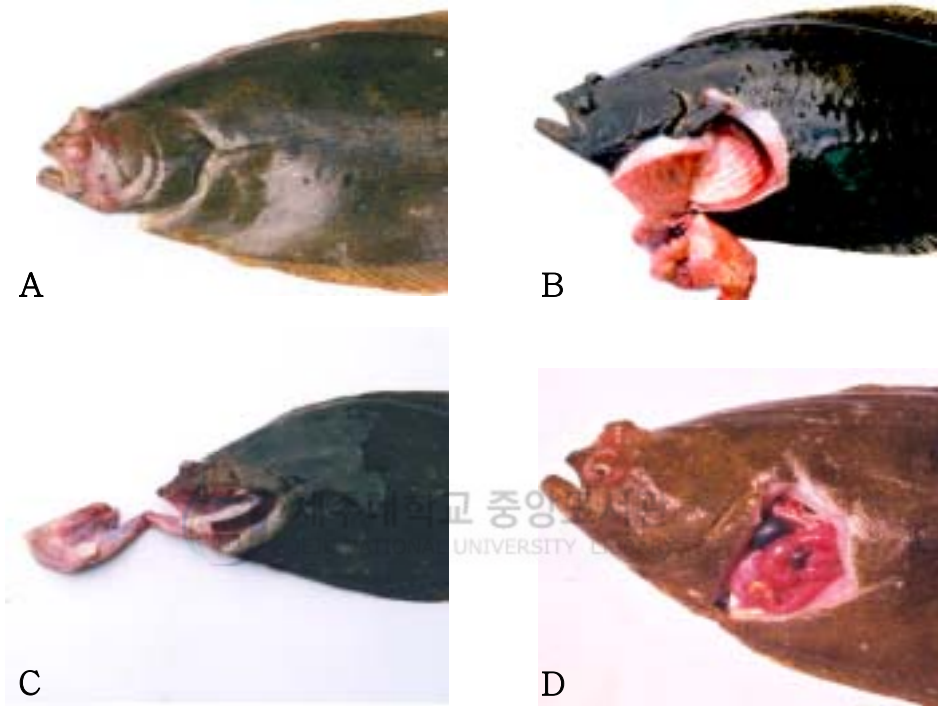


Fig. 1. The diseased flounder (*Paralichthys olivaceuse*) showing the symptoms of streptococcosis. A; Exophthalmus with haemorrhage and pus in the head, B; Petechiae on the abdomen and darkness of body color C; Haemorrhage on the operculum, D; Haemorrhage on the intestine.



Fig. 2. A map showing the sampling site along coast of Jeju island.

Table 1 Tested stains in the study

Strains		Origin			
Classification	Designation	Host	Organ	Region & Temp.*(°C)	Year
Reference strains	<i>S. pyogenes</i> KCTC 3096	Human	-	-	-
	<i>Streptococcus sp.</i> KCTC 3098	Human	-	-	-
	<i>S. iniae</i> KCTC 3657	Fresh water dolphin	-	-	-
	<i>L. garvieae</i> KCTC 3772	Human	-	-	-
Tested strains	S-1	Olive flounder	kidney	Tacheung, 16	2003
	S-2	Olive flounder	kidney	Sehwa, 17	2003
	S-3	Olive flounder	kidney	Tacheung, 16	2003
	S-4	Olive flounder	kidney	Sincheon, 15	2003
	S-5	Olive flounder	kidney	Sincheon, 15.5	2003
	S-8	Olive flounder	kidney	Pyoseon, 18	2003
	S-11	Olive flounder	kidney	Onpyeong, 15.5	2003
	S-12	Olive flounder	kidney	Sincheon, 15.5	2003
	S-13	Olive flounder	kidney	Bomok, 16	2003
	S-17	Olive flounder	kidney	Sincheon, 16	2003
	S-18	Olive flounder	kidney	Pyoseon, 17	2003
	S-20	Olive flounder	kidney	Pyoseon, 18.2	2003
	S-21	Olive flounder	kidney	Pyoseon, 16.5	2003
	S-23	Olive flounder	kidney	Wimi, 17	2003
	S-26	Olive flounder	kidney	Bomok, 17	2003
	S-28	Olive flounder	kidney	Tacheung, 16	2003
	S-29	Olive flounder	kidney	Pyoseon, 17	2003
S-31	Olive flounder	kidney	Bomok, 15	2003	
S-35	Olive flounder	brain	Bomok, 16	2003	

Temp.\* : Water temperature.

Table 1 (continued)

Strains		Origin			
Classification	Designation	Fish	Organ	Region & Temp.*(°C)	Year
Tested strains	S-41	Olive flounder	kidney	Wimi, 15.5	2003
	S-50	Olive flounder	kidney	Sehwa, 16	2003
	S-53	Olive flounder	kidney	Ojo, 15	2003
	S-54	Olive flounder	kidney	Taeheung, 13.5	2003
	S-55	Olive flounder	kidney	WeolPyeong, 13.5	2003
	S-57	Olive flounder	kidney	Bomok, 16	2003
	S-58	Olive flounder	kidney	Sehwa, 14	2003
	S-62	Olive flounder	kidney	Bukchon, 18	2003
	S-66	Olive flounder	kidney	Pyoseon, 16	2003
	S-69	Olive flounder	kidney	Dongbok, 14.6	2003
	S-71	Olive flounder	kidney	Sincheon, 15	2003
	S-72	Olive flounder	kidney	Taeheung, 16	2003
	S-78	Olive flounder	kidney	Taeheung, 16.5	2003
	S-80	Olive flounder	kidney	Pyoseon, 16.6	2003
	S-84	Olive flounder	kidney	Pyoseon, 17	2003
	S-85	Olive flounder	kidney	Pyoseon, 16.8	2003
	S-86	Olive flounder	kidney	Sincheon, 17.9	2003
	S-87	Olive flounder	kidney	Sehwa, 17	2003
	S-88	Olive flounder	kidney	Wimi, 21	2003
	S-89	Olive flounder	kidney	Gama, 17.5	2003
	S-90	Olive flounder	kidney	Pyoseon, 16.5	2003
	S-91	Olive flounder	kidney	Sehwa, 19	2003
	S-92	Olive flounder	kidney	Sehwa, 18.9	2003
	S-95	Olive flounder	kidney	Sincheon, 19	2003

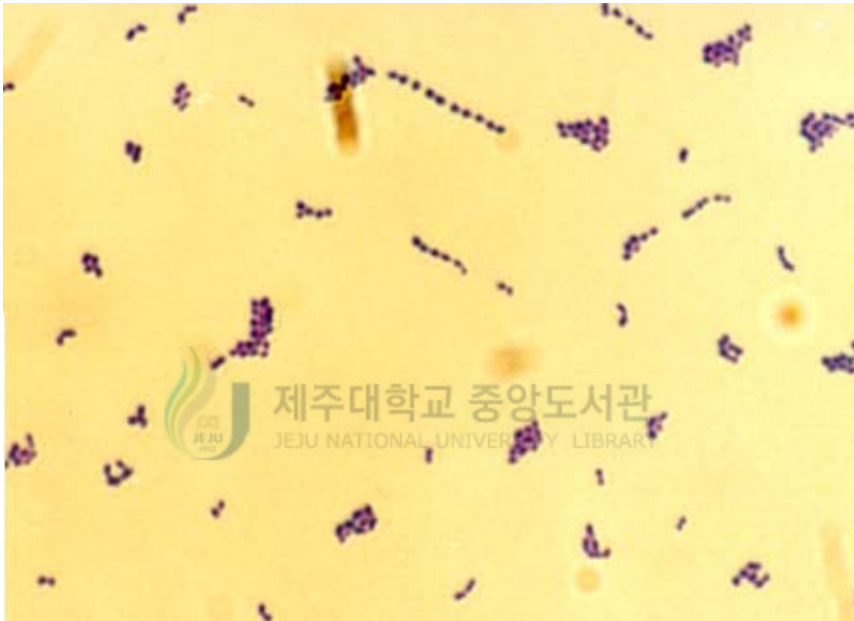


Fig. 3. Morphology of isolated *Streptococcus* sp. cultured in BHIB at 28°C for 24hrs (Gram stain; × 1,000).



## 2. API 20 Strep system에 의한 생화학적 성상

API 20 Strep kit (bioMerieux, France)를 이용한 동정방법은 제조회사의 Manual에 따라 접종하여 4, 24시간대의 성상과 함께, 5% Sheep blood가 첨가된 Blood Agar Plate (KOMED co.)에 5% CO<sub>2</sub>, 36°C 24 - 48시간 배양하여 용혈성을 판정한 결과를 첨가하여 APILAB identification system (APILAB PLUS, V 3-3-3, bioMerieux, France)으로 분석하였다.

## 3. BiOLOG system에 의한 생화학적 성상

MicroLog™system (Release 4.0, Biolog Inc., USA)으로 다음과 같이 실시하였다. BUG (Biolog Inc., USA) 평판배지에 36 ± 1°C에서 24시간씩 2회 배양하여 계대 배양한 후 36 ± 1°C에서 16시간 배양시킨 균체를 GN/GP inoculating fluid (0.85% NaCl, pH 7.0)에 현탁하여 탁도계 (21907, Biolog Inc., USA)를 이용하여 탁도가 20%가 되도록 조절한 후 95종의 탄소원 및 질소원 기질로 구성되어 있는 Microplate에 150 μl씩 접종하였고 36 ± 1°C에서 배양하여 12-16시간대의 성상을 총 2회 실시하여 판독하였다.

## 4. Genomic DNA의 분리

Genomic DNA를 분리하기 위해 Promega DNA preparation kit (Promega co., USA)로 다음과 같이 실시하였다. BHIB에서 배양한 균주를 4,000 rpm 5분간 원심분리 후 50 mM EDTA, lysozyme sol. (10 mg/ml)을 처리하고 37°C, 30분간 incubation 하였다. 이후 원심 분리하여 상정액을 제거한 다음 nuclei lysis sol.을 600 μl를 첨가 후 80°C incubation 하여 cell을 lysis 하였고 RNase sol. (4 mg/ml) 3 μl, 37°C 30분간 처리하였다.

이후 protein precipitation sol. 200  $\mu$ l 첨가하고 얼음 상에서 5분간 incubation하였다. 상정액을 얻기 위해 14,000 g에서 5분간 원심 분리하고 ethanol 침전법으로 DNA를 침전하여 분리 후 1% agarose gel 상에서 전기영동하여 확인하였다.

## 5. PCR (Polymerase Chain Reaction) primer의 제작 및 반응조건

*S. iniae*, *L. garvieae*의 동정을 위한 primer는 Zlotkin *et al.*, (1998)이 16S rRNA region에서 디자인 한 primer를 사용하였으며, *S. parauberis*의 동정을 위해서 Hassan *et al.*, (2001)이 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Region (ISR)에서 디자인 한 primer를 사용하였다.

염기서열 분석을 위한 16S-23S ISR amplification primer는 현재 어류 연쇄구균증을 일으키는 각 병원체들의 16S rRNA gene 영역의 말단서열과 23S rRNA 영역의 선두서열을 gene bank(www. ncbi.nlm.nih.gov)에서 조사하였고 각 영역에서 중간 변이 없이 보존된 공통서열을 기초로 하여 디자인하였다 (Table 2).

PCR에 의한 유전자 증폭을 위해 염색체 DNA 100 ng, 각 primer 20 pmol (0.75  $\mu$ l)씩 첨가 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) 2.5  $\mu$ l를 넣고 2.5 mM dNTP 4  $\mu$ l를 첨가하였다. 여기에 0.5  $\mu$ l (0.5 unit) Taq polymerase를 넣고 증류수를 첨가하여 최종 volume을 25  $\mu$ l가 되게 하였다.

*L. garvieae*와 *S. iniae*의 동정을 위한 PCR 증폭 조건은 모두 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 denature과정을 거친 후 94 $^{\circ}$ C 1분, 55 $^{\circ}$ C 1분 72 $^{\circ}$ C 1분간 총 30 cycle 증폭하여 최종 cycle의 extension은 72 $^{\circ}$ C 10분간 수행하였다.

Table 2 Primers used for species detection PCR and 16S-23S intergenic spacer region PCR amplification

Primer name	Gene position	Sequence
pLG-1 <sup>a</sup>	16S ribosomal RNA	5'-CATAACAATGAGAATCGC-3'
pLG-2 <sup>a</sup>	16S ribosomal RNA	5'-GCACCCTCGCGGGTTG-3'
Sin-1 <sup>b</sup>	16S ribosomal RNA	5'-CTAGAGTACACATGTACT (AGCT)AAG-3'
Sin-2 <sup>b</sup>	16S ribosomal RNA	5'-GGATTTTCCACTCCCATTAC-3'
Paraub 16S-23S-1 <sup>c</sup>	16S-23S intergenic spacer	5'-AAATGGAAGCACGTTAGGAAA-3'
Paraub 16S-23S-2 <sup>c</sup>	16S-23S intergenic spacer	5'-GCAAGCCGAACATCTCTTTG-3'
Strepto ISR-1 <sup>d</sup>	16S-23S intergenic spacer	5' -AAATGGAAGCACGTTAG GAAA-3'
Strepto ISR-2 <sup>d</sup>	16S-23S intergenic spacer	5' -GCAAGCCGAACATCTCTTTG-3'

a : *L. garvieae* species-specific primer

b : *S. iniae* species-specific primer

c : *S. parauberis* species-specific primer

d : 16S-23S rRNA ISR amplification primer

*S. parauberis*의 동정을 위한 PCR 증폭 조건은 5분간 denature과정을 거친 후 94°C 10초, 55°C 10초, 72°C 10초간 총 30 cycle 증폭하여 최종 cycle의 extension은 72°C 10분간 수행하였으며, 16S-23S rRNA ISR영역의 PCR 증폭 조건은 5분간 denature과정을 거친 후 94°C 45초, 57°C 45초, 72°C 45초간, 총 30 cycle 증폭하여 최종 cycle의 extension은 72°C 10분간 수행하였다.

## 6. 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Region (ISR)의 염기서열 분석

16S-23S rRNA Intergenic Spacer Region (ISR) 염기서열 분석을 위해 각 PCR 반응산물을 MagExtractor-PCR & Gel clean up kit (TOYOBO co., Japan)를 사용하여 정제하였으며, 정제과정은 다음과 같다. 1.5% agarose gel상에서 major band를 mess를 이용하여 절취하고 흡착액 400  $\mu$ l를 첨가하여 gel을 용해시켰다. 이후 magnetic bead 30  $\mu$ l를 PCR 반응산물과 반응시키고 세정액과 75% 에탄올을 차례로 넣어 세정하고 난 후 증류수를 첨가하여 순수한 PCR 반응산물을 얻었다.

16S-23S rRNA ISR 염기서열 분석은 다카라코리아 바이오메디칼(주) 유전자해석센터에 direct sequencing 방식으로 의뢰하여 수행하였다.

### Ⅲ. 결과

#### 1. API 20 strep system에 의한 생화학적 성상

API 20 strep system에 의한 생화학적 성상을 판독해 본 결과 5개의 주요그룹으로 A group (Unidentified group I, 10 균주), B group (*S. uberis* 23 균주, 확률 99.9 %에서 80.9 %), C group (*E. faecalis* 4 균주, 확률 89.3 %에서 89.1 %), D group (*S. porcinus* 4 균주, 98.4 %에서 87.8 %), E group (Unidentified group II, 2균주)로 나뉘었다 (Table 3, 4).

A group의 경우 API strep 20 system에 의한 동정은 이루어지지 않았으나 각 형질에 대해 그룹 내 일치성은 매우 높았으며, 참고균주 *S. iniae* (KCTC-3657)와도 매우 높은 유사성을 보였다 또한 기존에 어류의 연쇄구균증 병원체로 보고된 *S. iniae*와도 매우 높은 유사성을 보였다 (Table 3).

#### 2. PCR 기법을 이용한 연쇄구균의 계통분류학적 동정

*S. iniae*에 특이적인 detection primer에 의한 PCR-assay 결과 총 43 균주 중 10 균주(S-3, S-4, S-5, S-23, S-28, S-41, S-50, S-57, S-88, S-95)와 표준균주 *S. iniae* (KCTC-3657)만이 약 330 bp의 증폭 산물을 나타내었다 (Fig. 4). 이것은 API 20 strep system에 의해 A group으로 나뉘어진 균주들과도 일치하였다. 따라서 S-3, S-4, S-5, S-23, S-28, S-41, S-50, S-57, S-88, S-95를 *S. iniae*로 동정하였고 *S. iniae* group으로 나타내었다. 반면 분리균주에 대해 *L. garvieae* 중 특이적인 detection primer에 대한 PCR 반응은 표준균주 중 *L. garvieae* (KCTC-3772)만이 약 1,100 bp의 증폭 산물을 나타냈고 API 20 strep system에 의한 생화학적 성상이 표준균주 *L. garvieae* (KCTC-3772)와 유사하거나 일치하는 균주가 없어

Table 3 Biochemical profile of KCTC strains and test strains isolated from streptococcosis flounder in the Jeju

API 20 strepsystem	<i>S. pyogenes</i> KCTC 3096	<i>Streptococcus</i> sp. KCTC 3098	<i>L. garvieae</i> KCTC 3772	<i>S. iniae</i> KCTC 3657	<i>S. iniae</i> <sup>*</sup>
Pyruvate	-	-	+	-	-
Hippurate	-	-	-	-	-
Esculin	+	-	-	+	+
Pyrrolidonyl 2-naphthylamide	-	+	±	+	+
6-Bromo-2-naphthyl $\alpha$ -D-galactopyranoside	-	-	-	-	-
Naphthol AS-BI - $\beta$ -D-glucuronate	+	-	-	+	+
2-naphthyl- $\beta$ -D-galactopyranoside	-	-	-	-	-
2-naphthyl phosphate	+	+	-	+	+
L-leucine-2-naphthylamide	+	+	+	+	+
Arginine	+	+	+	+	±
Ribose	+	+	+	+	+
L-Arabinose	-	-	-	-	-
Mannitol	-	-	-	+	+
Sorbitol	-	-	-	-	-
Lactose	+	+	-	-	-
Trehalose	+	+	+	+	+
Inulin	-	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	-	-
Starch	+	-	-	+	+
Glycogen	-	-	-	+	+
Hemolysis	$\beta$	$\beta$	$\gamma$	$\alpha$	$\alpha$

*S. iniae*<sup>\*</sup> : Biochemical profile of isolated strains from streptococcosis fish in the red sea (Colomi *et al.*, 2002).

Table 3 (continued)

API 20 strepsystem	A group (%)	B group (%)	C group (%)	D group (%)	E group (%)
Pyruvate	0	100	100	100	50(50)*
Hippurate	(10)*	100	100	100	100
Esculin	100	100	100	100	100
Pyrrolidonyl 2-naphthylamide	100	17(26)*	50(50)*	0	50
6-Bromo-2-naphthyl $\alpha$ -D-galactopyranoside	0	0	0	0	0
Naphthol AS-BI - $\beta$ -D-glucuronate	100	0	0	0	0
2-naphthyl- $\beta$ -D-galactopyranoside	0	0	0	0	0
2-naphthyl phosphate	100	4(26)*	0	(100)*	(50)*
L-leucine-2-naphthylamide	100	95	100	100	100
Arginine	100	100	100	100	50
Ribose	100	100	100	100	50
L-Arabinose	0	0	0	0	0
Mannitol	100	100	100	100	50
Sorbitol	0	100	100	100	0
Lactose	0	74	100	100	0
Trehalose	100	95	100	100	100
Inulin	0	87(4)*	0	(25)*	0
Raffinose	0	0	0	0	0
Starch	100	0	0	0	0
Glycogen	100	4	0	0	0
Hemolysis	$\alpha$ : 100	$\alpha$ : 4, $\beta$ : 35, $\gamma$ : 61	$\beta$ : 25, $\gamma$ : 75	$\beta$ : 75, $\gamma$ : 25	$\alpha$ : 100

(\*) : Weak reaction

Table 4 API 20 strep system groups

	Strains
<b>A group</b>	
<b>Unidentified group I</b> (10 strains)	S-3, S-4, S-5, S-23, S-28, S-41, S-50, S-58, S-88, S-95,
<b>B group</b>	
<b><i>S. uberis</i> 99-80.9 %</b> (23 strains)	S-20, S-12, S-18, S-1, S-26, S-13, S-92, S-29, S-53, S-31, S-17, S-89, S-21, S-69, S-8, S-85, S-57, S-2S-90, S-71, S-80, S-72, S-86
<b>C group</b>	
<b><i>Enterococcus faecalis</i></b> 89.3-89.1 % (4 strains)	S-84, S-55, S-78, S-91
<b>D group</b>	
<b><i>S. Porcinus</i> 98.4-87.8 %</b> (4 strains)	S-35, S-62, S-54, S-66
<b>E group</b>	
<b>Unidentified group II</b> (2 strains)	S-87, S-11



전체 분리균주 중 *L. garvieae*는 존재하지 않는 것으로 판단되었다 (Fig. 5).

*S. parauberis* 16-23S ISR 서열에 특이적인 PCR-assay법 (Hassan *et al.*, 2001)을 수행해본 결과 API 20 strep system에 의한 B group, C group, D group E group, 총 33 균주 모두 동일하게 약 201 bp의 band pattern을 보였다 (Fig. 6). 따라서 API 20 strep system에 의한 동정 결과 미동정 균주, *S. uberis*, *E. faecalis*, *S. porcinus* 등으로 동정되었으나 종 특이적 PCR-assay법을 수행해본 결과를 바탕으로 하여 본 연구에 사용되어진 균주를 *S. iniae* group과 *S. parauberis* group으로 나누었다.

### 3. BiOLOG system에 의한 생화학적 성상

종 특이적 PCR-assay법에 의한 동정 결과로 분류한 *S. iniae* group과 *S. parauberis* group의 96가지 당류에 대한 이용성을 비교한 결과 *S. iniae* group은 *S. parauberis* group과 비교해 볼 때  $\alpha$ -Cyclodextrin (100%),  $\beta$ -Cyclodextrin (100%), Dextrin (100%), Glycogen (70%),  $\alpha$ -D-Glucose (100%), Mannitol (100%) D- Psicose (90%), L-Lactic acid (90%), Pyruvic acid (90%), Adenosine (60%) D-L- $\alpha$ -Glycerol phosphate (90%)을 특이적으로 분해하였다. 반면에 *S. parauberis* group은 N-acetyl-D-Manosamine (91%), Gentiobiose (79%),  $\beta$ -methyl D Glucoside (97%)를 특이적으로 분해하는 특성을 보였다 (Table 5).

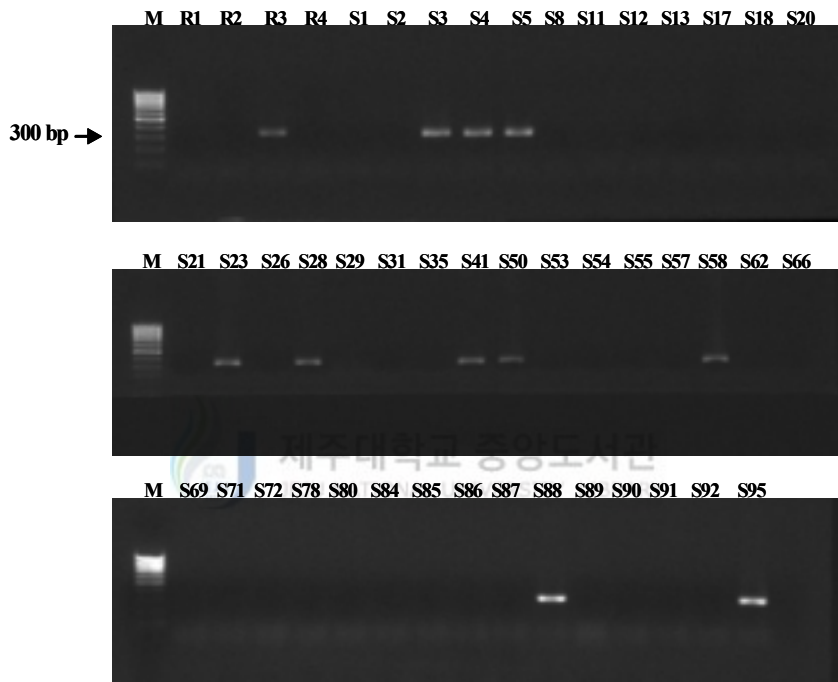


Fig. 4. PCR product using the *Streptococcus iniae* specific primers (sin-1, sin-2) from reference strains and tested strains. M; 100bp ladder as size maker; R1, *Streptococcus pyogenes* KCTC 3096; R2, *Streptococcus* sp. KCTC 3098; R3, *Streptococcus iniae* KCTC 3657; R4, *Lactococcus garvieae* KCTC 3772.

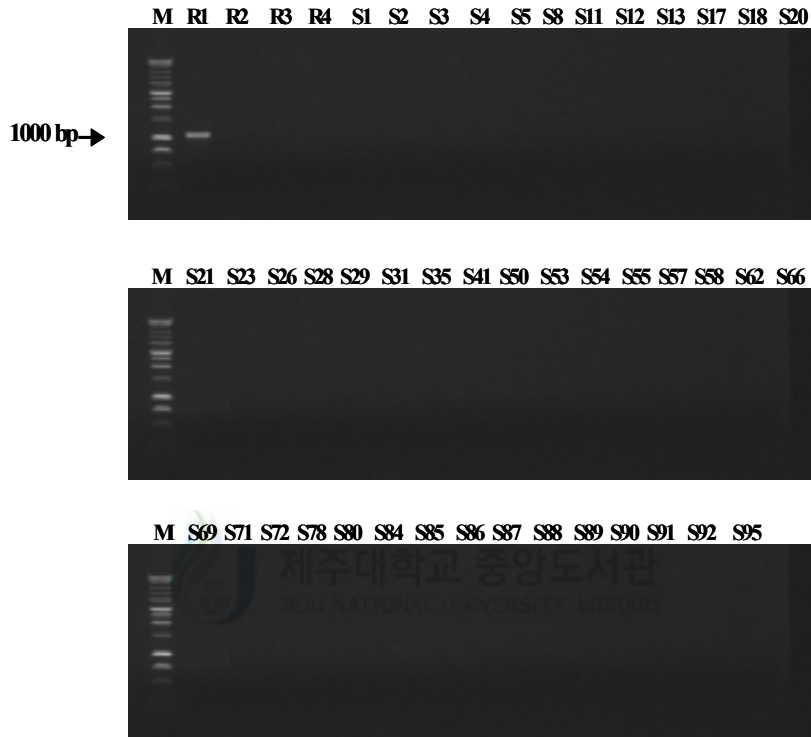


Fig. 5. PCR product using the *Lactococcus garvieae* specific primers (pLG-1, pLG-2) from reference strains and tested strains. M; 100 bp ladder as size marker; R1, *Streptococcus pyogenes* KCTC 3096; R2, *Streptococcus* sp. KCTC 3098; R3, *Streptococcus iniae* KCTC 3657; R4, *Lactococcus garvieae* KCTC 3772.

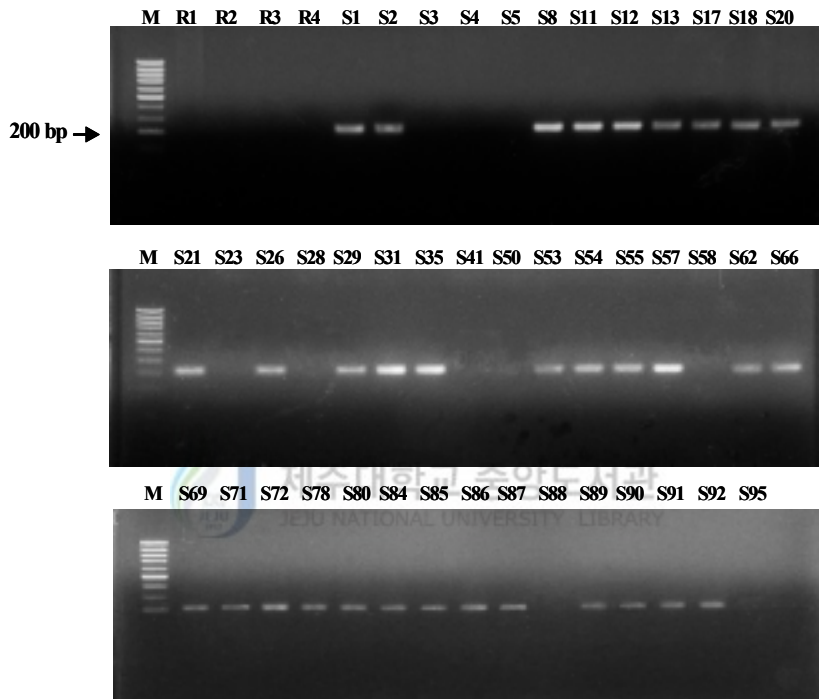


Fig. 6. PCR product using the *S. prauberis* specific primers (Paraub 16S-23S-1, Paraub 16S-23S-2) from reference strains and present tested strains. M; 100 bp ladder as size marker; R1, *S. Pyogenes* KCTC 3096; R2, *Streptococcus sp.* KCTC 3098; R3, *S. iniae* KCTC 3657; R4, *L. garvieae* KCTC 3772.

Table 5 Biochemical profiles of *S. iniae* group and *S. parauberis* group isolated from Streptococcosis flounder in the Jeju

BiOLOG system	<i>S. pyogenes</i> KCTC 3096	<i>Streptococcus</i> sp. KCTC 3098	<i>S. iniae</i> KCTC 3657	<i>L. garvieae</i> KCTC 3772	<i>S. iniae</i> group (%)	<i>S. parauberis</i> group (%)
Water					0	0
$\alpha$ -Cyclodextrin					100	0
$\beta$ -Cyclodextrin					100	0
Dextrin	+	+	±	±	100	58(30)*
Glycogen					70	0
Inulin					10	12
Mannan					0	0
Tween 40		±	±		0	0
Tween 80		±	±		0	0
N-acetyl-D-Glucosamine		+	+	+	100	97(3)*
N-acetyl-D-Mannosamine		+	+		50(40)*	91(6)*
Amygdalin					0	55(33)*
L-Arabinose					0	0
D-Arabitol					0	0
Arbutin		+	±		100	100
Cellobiose		+	±		100	94(3)*
D-Fructose	+	+	+	+	100	100
L-Fucose					0	0
D-Galactose					(20)*	33

0\* : Week reaction

Table 5 (continued)

BiOLOG system	<i>S. pyogenes</i> KCTC 3096	<i>Streptococcus</i> sp. KCTC 3098	<i>S. iniae</i> KCTC 3657	<i>L. garvieae</i> KCTC 3772	<i>S. iniae</i> group (%)	<i>S. parauberis</i> group (%)
D-Galacturonic acid					0	0
Gentiobiose			±		0	79(21)*
D-Gluconic Acid					0	0
α-D-Glucose	+	+	+	+	100	0
M-Inositol					0	0
α-D-Lactose					0	6
Lactulose					0	0
Maltose	+	+		+	100	100
Maltotriose	+			+	100	94(3)*
Manitol			+	+	100	79(3)*
Mannose	+	+	+	+	100	100
Melezitose					10	0
Melibiose					0	0
α-methyl D-Galactoside					0	0
β-methyl D-Galactoside					0	0
3-methyl Glucose					0	0
α-methyl D-Glucoside					(40)*	0
β-methyl D-Glucoside		+			0	97(3)*
α-methyl D-Mannoside					0	0

0\* : Week reaction

Table 5 (continued)

BiOLOG system	<i>S. pyogenes</i> KCTC 3096	<i>Streptococcus</i> sp. KCTC 3098	<i>S. iniae</i> KCTC 3657	<i>L. garvieae</i> KCTC 3772	<i>S. iniae</i> group (%)	<i>S. parauberis</i> group (%)
Palatinose					0	0
D-Psicose	±	+	+	+	90(10)*	(9)*
D-Raffinose					0	0
L-Rhamnose					0	0
D-Ribose					0	0
Salicin		+	±	+	100	100
Sedoheptulosan					0	0
D-Sorbitol					0	(3)*
Stachyose					0	0
Sucrose	+	+		+	100	100
D-Tagatose					0	0
D-Trehalose	+	+	+	+	90	100
Turanose					0	0
Xylitol					0	0
Xylose					0	0
Acetic acid					0	0
α-Hydroxy butyric acid					0	0
β-Hydroxy butyric acid					0	0
γ-Hydroxy butyric acid					0	0

0\* : Week reaction

Table 5 (continued)

BiOLOG system	<i>S. pyogenes</i> KCTC 3096	<i>Streptococcus</i> sp. KCTC 3098	<i>S. iniae</i> KCTC 3657	<i>L. garvieae</i> KCTC 3772	<i>S. iniae</i> group (%)	<i>S. parauberis</i> group (%)
$\rho$ -Hydroxy butyric acid					0	0
$\alpha$ -keto Glutanic acid					0	0
$\alpha$ -keto Valeric acid					0	0
Lactamide					0	0
D-Lactic acid methylester					0	0
L-Lactic acid		+	±	+	90(10)*	0
D-Malic acid					0	0
L-Malic acid					0	18(15)*
Methyl pyruvate	±		±	±	90(10)*	97(3)*
Mono-methyl Succinate					0	0
Propionic acid					0	0
Pyruvic acid	+	+	+	+	90	27(24)*
Succinamic acid					0	0
Succinic acid					0	0
N-aetyl L-Glutamic acid					0	0
Alaninamide					0	0
D-Alanine					(10)*	0
L-Alanine					0	0
L-Alanyl-glycine			±		0	0

0\* : Week reaction



Table 5 (continued)

BiOLOG system	<i>S. pyogenes</i> KCTC 3096	<i>Streptococcus</i> sp. KCTC 3098	<i>S. iniae</i> KCTC 3657	<i>L. garvieae</i> KCTC 3772	<i>S. iniae</i> group (%)	<i>S. parauberis</i> group (%)
L-Asparagine					0	0
L-Glutamic acid					0	0
Glycyl-L-Glutamic acid					0	0
L-Pyroglytamic acid					0	0
L-Serine					0	0
Putrescine					0	0
2,3-Butanediol					0	0
Glycerol	+	+	+	+	100	100
Adenosine	+	+	+	+	60(40)*	0
2-Deoxyadenosine			±		0	0
Inosine	+	+	+	±	0	0
Thymidine	+		+		(10)*	0
Uridine	±	+	+	±	20(50)*	(6)*
Adenosine-5'-monophosphate		+			0	0
Thymidine-5'-monophosphate					0	0
Uridine-5'-monophosphate	+	+	+	±	(10)*	0
Fructose-6-phosphate	+	+			30(40)*	0
Glucose-1-phosphate					0	0
Glucose-6-phosphate	+	+			30(20)*	0
D-L- $\alpha$ -Glycerol phosphate		±			90(10)*	0

0\* : Weak reaction

#### 4. 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Region(ISR) 서열 분석

*S. iniae* group의 16S-23S ISR band pattern을 확인해본 결과 3 개의 ribosomal RNA operon을 가지고 있는 것을 관찰 할 수 있었으며, *S. iniae* group 내 모든 균주에서 동일한 ribosomal RNA operon 구조를 확인하였다 (Fig. 7).

*S. iniae* group의 16S-23S ISR band pattern 중 major band의 염기서열을 분석해 본 결과 총 525 bp의 염기서열 내에 한 개의 tRNA<sup>Ala</sup> gene을 가지고 있었다. Genbank의 염기서열을 기초로 하여 상동성을 비교해 본 결과 *S. iniae* (genbank accession number AF048773)와 96%의 상동성을 보였고, *S. iniae* strain 이외의 16S-23S ISR 전체 서열에서 상동성을 보이는 근연속이나 근연종은 검색되지 않았다 (Fig. 8). 이를 근거로 하여 최종적으로 *S. iniae*로 동정하였다.

API 20 strep system에 의해 B group, C group, D group, E group으로 다양한 생화학적 성상을 나타내었으며, *S. parauberis* 중 특이적인 PCR-assay를 통해 *S. parauberis*로 동정된 총 33 균주의 ISR band pattern은 각각의 그룹 모두 1 개의 ribosomal RNA operon을 가지고 있고, 약 600 bp로 서로 동일하였다 (Fig. 7). 또한 각 그룹의 16S-23S ISR의 염기서열을 분석해본 결과 458-462 bp였으며, 한 개의 tRNA<sup>Ala</sup> gene을 가지고 있었다. Genbank의 염기서열을 기초로 하여 상동성을 비교해 본 결과 *S. parauberis* (genbank accession number AF255656)와 약 98-97%의 상동성을 보였으며, 16S-23S ISR 전체 서열에서 상동성을 보이는 근연속이나 근연종은 역시 검색되지 않았다 (Fig. 9). 이를 근거로 하여 API 20 strep system에서 다양한 생화학적 성상을 보였던 B group, C group, D group, E group 모두를 최종적으로 *S. parauberis*로 동정하였다.

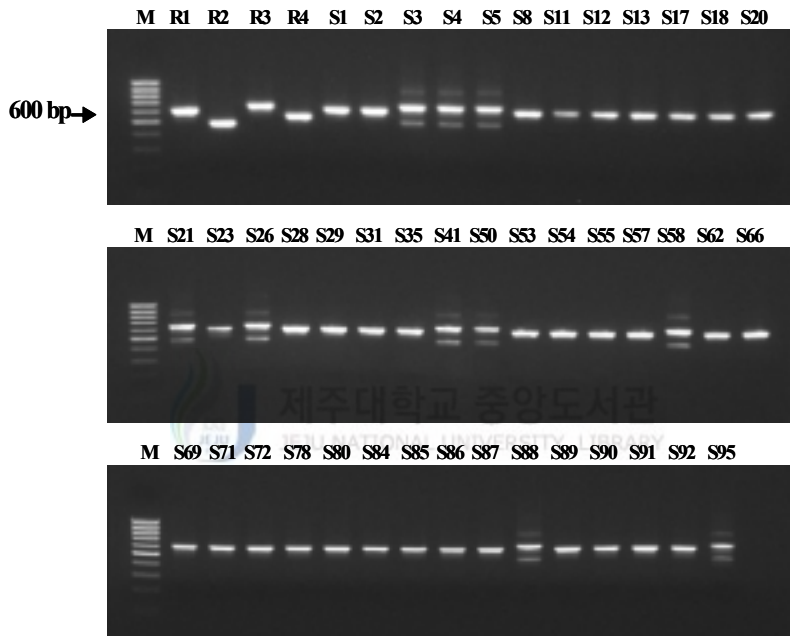


Fig. 7. PCR-amplified 16S-23S rRNA intergenic spacer region band patterns from reference strains and tested strains. M; 100bp ladder as size marker; R1, *Streptococcus pyogenes* KCTC 3096; R2, *Streptococcus* sp. KCTC 3098; R3, *Streptococcus iniae* KCTC 3657; R4, *Lactococcus garvieae* KCTC 3772.

*S. iniae* TAGTGGTAAACAGGTAAGCGTATCGGAGGIGGGCIGGATCACCTCCTTCTCAGGNTAAGGAGTA 69  
 A group AAGTGGTAAACAGGTAACCGTATCGGAGGIGGGCIGGATCACCTCCTTCTCAGGNTAAGGAGTA 68  
 \* \*\* \* \*

*S. iniae* CGTTTGGAGICTTATTTAGTTTTCAGGGICTTAAAAAGTAAAGCAACGTTAAGAAATCIGTAIGA 138  
 A group CGTTTGGAGICTTATTTAGTTTTCAGGGICTTAAAAAGTAAAGCAACGTTAAGAAATCIGTAIGA 137

*S. iniae* AAATAGGAAAGCAGCGGAGIGICAAAAGCAACAGGAGTTTATCATTTCCTAAGATTTTATGTTGA 207  
 A group AAATAGGAAAGCAGCGGAGIGICAAAAGCAACAGGAGTTTATCATTTCCTAAGATTTTATGTTGA 206

*S. iniae* ATACAAATTAGATCCATATATATGATATGGTAAACAGATTAAGAAACGTTA-CATATTAACIGIGGGCC 274  
 A group ATACAAATTAGATCCATATATATGATATGGTAAACAGATTAAGAAACGTTA-CATATTAACIGIGGGCC 275  
 tRNA<sup>Ala</sup> \* \* \*

*S. iniae* CTTAGCTCA-CIGGAAACGGGCTGCCTTTGACCGAGGAGGICAGGGTTCGATCCCGCTAGGCTTCA 342  
 A group CTTAGCTCAGCIGGAGA-CGGCTGCCTTTGACCGAGGAGGICAGGGTTCGATCCCGCTAGGCTTCA 343  
 \* \*\* \*

*S. iniae* TTGC-AGGAGAGICTTAAATACGIGAGGICNTTCAAAATGAAATATCATTATCAAAATTCACGAT 410  
 A group TTGC-AGGAGAGICTTAAATACGIGAGGICNTTCAAAATGAAATATCATTATCAAAATTCACGAT 412  
 \* \*

*S. iniae* CTTCAAAATGNTTGTACAAAAGTAAACAGAAATTAACCTCAAAAAAGTAAACGGTAACTATTATAA 478  
 A group CTTCAAAATGNTTGTACAAAAGTAAACAGAAATTAACCTCAAAAAAGTAAACGGTAACTATTATAA 480  
 \* \*

*S. iniae* AAA-ANTAAAGAGGTCGTAGCCTGGGGCTAAGGTAAAGTAAAAAGG 524  
 A group AAA-ANTAAAGAGGTCGAAAGCTGGA-TAAGGTAAAGTAAAAAGG 525  
 \* \*\* \*\*\*

Fig. 8. 16S-23S rRNA ISR nucleotide sequences of *S. iniae*.  
*S. iniae* was a reference strain (Genbank accession number AF 048773) and A group was included *S. iniae* group. The 16S-23S rRNA ISR sequence of this group identified with 96 % sequence of *S. iniae* AF048773.

*S. parauberis* C10C1T1TCTAAGGAAATGGAAGCACGTTAGGAAAAGICTTATTTAGITTTIGAGAG 55  
 B group C10C1T1TCTAAGGAAATGGAAGCACGTTAGGAAAAGICTTATTTAGITTTIGAGAG 55  
 C group C10C1T1TCTAAGGAAATGGAAGCACGTTAGGAAAAGICTTATTTAGITTTIGAGAG 55  
 D group C10C1T1TCTAAGGAAATGGAAGCACGTTAGGAAAAGICTTATTTAGITTTIGAGAG 55  
 S - 87 C10C1T1TCTAAGGAAATGGAAGCACGTTAGGAAAAGICTTATTTAGITTTIGAGAG 55  
 S - 11 C10C1T1TCTAAGGAAATGGAAGCACGTTAGGAAAAGICTTATTTAGITTTIGAGAG 55

*S. parauberis* G1C1TATTAAGTAATGAGATAGAAACACCCTAATAATGTAACAACCCAGITTTAT 110  
 B group G1C1TATTAAGTAATGAGATAGAAACACCCTAATAATGTAACAACCCAGITTTAT 110  
 C group G1C1TATTAAGTAATGAGATAGAAACACCCTAATAATGTAACAACCCAGITTTAT 110  
 D group G1C1TATTAAGTAATGAGATAGAAACACCCTAATAATGTAACAACCCAGITTTAT 110  
 S - 87 G1C1TATTAAGTAATGAGATAGAAACACCCTAATAATGTAACAACCCAGITTTAT 110  
 S - 11 G1C1TATTAAGTAATGAGATAGAAACACCCTAATAATGTAACAACCCAGITTTAT 110

tRNA<sup>Ala</sup> —

*S. parauberis* TAGT10GGGGCCTTAGCTCAGCTGGGAGAGCGCC1GCTTTGCAACGAGGAGGTCAG 165  
 B group TAGT10GGGGCCTTAGCTCAGCTGGGAGAGCGCC1GCTTTGCAACGAGGAGGTCAG 165  
 C group TAGT10GGGGCCTTAGCTCAGCTGGGAGAGCGCC1GCTTTGCAACGAGGAGGTCAG 165  
 D group TAGT10GGGGCCTTAGCTCAGCTGGGAGAGCGCC1GCTTTGCAACGAGGAGGTCAG 165  
 S - 87 TAGT10GGGGCCTTAGCTCAGCTGGGAGAGCGCC1GCTTTGCAACGAGGAGGTCAG 165  
 S - 11 TAGT10GGGGCCTTAGCTCAGCTGGGAGAGCGCC1GCTTTGCAACGAGGAGGTCAG 165

\*

*S. parauberis* CGG1TCGATCCCGCTAGGCTCCATTATCTAGGATACAAGAGATGTTGGCCTTGC 220  
 B group CGG1TCGATCCCGCTAGGCTCCATTATCTAGGATACAAGAGATGTTGGCCTTGC 220  
 C group CGG1TCGATCCCGCTAGGCTCCATTATCTAGGATACAAGAGATGTTGGCCTTGC 220  
 D group CGG1TCGATCCCGCTAGGCTCCATTATCTAGGATACAAGAGATGTTGGCCTTGC 220  
 S - 87 CGG1TCGATCCCGCTAGGCTCCATTATCTAGGATACAAGAGATGTTGGCCTTGC 220  
 S - 11 CGG1TCGATCCCGCTAGGCTCCATTATCTAGGATACAAGAGATGTTGGCCTTGC 220

*S. parauberis* CGAAAT1TCTTAAGAAATTAATCTCGIGITCAAC-TAGATAAGTAGGATAAAAAAT 274  
 B group CGAAAT1TCTTAAGAAATTAATCTCGIGITCAAC-TAGATAAGTAGGATAAAAAAT 274  
 C group CGAAAT1TCTTAAGAAATTAATCTCGIGITCAACGTTAGATAAGTAGGATAAAAAAT 275  
 D group CGAAAT1TCTTAAGAAATTAATCTCGIGITCAAC-TAGATAAGTAGGATAAAAAAT 274  
 S - 87 CGAAAT1TCTTAAGAAATTAATCTCGIGITCAAC-TAGATAAGTAGGATAAAAAAT 274  
 S - 11 CGAAAT1TCTTAAGAAATTAATCTCGIGITCAACGTTAGATAAGTAGGATAAAAAAT 275

\*

Fig. 9. (continued)

*S. parauberis* CCTAACATAGTCCATTGAAAATTCGAATATCTATATCAAATTCACAATTAAGAAA 329  
 B group CCTAACATAGTCCATTGAAAATTCGAATATCTATATCAAATTCACAATTAAGAAA 329  
 C group CCTAACATA-TCCATTGAAAATTCGAATATCTATATCAAATTCACAATTAAGAAA 329  
 D group CCTAACATAGTCCATTGAAAATTCGAATATCTATATCAAATTCACAATTAAGAAA 329  
 S - 87 CCTAACATAGTCCATTGAAAATTCGAATATCTATATCAAATTCACAATTAAGAAA 329  
 S - 11 CCTAACATA-TCCATTGAAAATTCGAATATCTATATCAAATTCACAATTAAGAAA 329  
 \*

*S. parauberis* TTAATTGTAGAAAAAAGTAACA-GAAATAA-CCGAAAAAAAAAGATAAACCGCGAA 382  
 B group TTAATTGTAGAAAA--AGTAACAAGAAATAAACCGAAAAAAAAAGATAAACCGCGAA 382  
 C group TTAATTGTAGAAAA--AGTAACAAGAAATAAACCGAAAAAAAAAGATAAACCGCGAA 382  
 D group TTAATTGTAGAAAA--AGTAACAAGAAATAAACCGAAAAAAAAAGATAAACCGCGAA 382  
 S - 87 TTAATTGTAGAAAA--AGTAACAAGAAATAAACCGAAAAAAAAAGATAAACCGCGAA 382  
 S - 11 TTAATTGTAGAAAA--AGTAACAAGAAATAAACCGAAAAAAAAAGATAAACCGCGAA 382  
 \*\* \* \*

*S. parauberis* CATATTTAAAAAATTTANAAGAAGGTCGAAAGACTCGAAATAAGGTTNAGTTAA 437  
 B group CATATTTAAAAAATTT-AAAAGAAGGTCGAAAGACTCGAAATAAGGI-TAATTAA 435  
 C group CATATTTAAAAAATTT-AAAAGAAGGTCGAAAGACTCGAAATAAGGI-TAATTAA 435  
 D group CATATTTAAAAAATTTTAAAAGAAGGTCGAAAGACTCG--ATAAGG--TAGTTAA 433  
 S - 87 CATATTTAAAAAATTT-AAAAGAAGGTCGAAAGACTG--ATAAG--TAGTTAA 431  
 S - 11 CATATTTAAAAAATTTTAAAAGAAGGTCGAAAGACTCG--ATAAG--TAGTTAA 433  
 \* \*\* \*\*\* \*\*\*\* \*

*S. parauberis* AAAGACTGGAATAAGGTTAAGTTAAT 464  
 B group AAAGACTGGAATAAGGTTAAGTTAAT 462  
 C group AAAGACTGGAATAAGGTTAAGTTAAT 462  
 D group AAAGACTGGAATAAGGTTAAGTTAAT 460  
 S - 87 AAAGACTGGAATAAGGTTAAGTTAAT 458  
 S - 11 AAAGACTGGAATAAGGTTAAGTTAAT 460

Fig. 9. 16S-23S rRNA ISR nucleotide sequences of *S. parauberis*. *S. parauberis* was a reference strain (Genbank accession number AF255656). Each other groups were included *S. parauberis* group. The 16S-23S rRNA ISR sequence of these group identified with 97 % sequence of *S. parauberis* AF255656.

## IV. 고찰

*Streptococcus*속은 인간을 포함한 동물 및 식물에서 광범위하게 분리되고 있으며 또한 인간을 비롯한 가축의 병원체로서 산업적 피해가 큰 미생물로 알려져 있으며 양식어류 또한 이에 포함되어 있다.

지금까지 어류의 연쇄구균증을 유발하는 병원체는 *Streptococcus* sp.로 통칭하여 불려져왔으나 점차 종 동정을 위한 생화학적 연구와 분자생물학적 연구들을 통해 본 질병에 관계된 병원체들을 *Streptococcus* sp. (Kusuda *et al.*, 1978), *S. iniae* (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) 등으로 동정하여 본 질병에 관련된 종들을 점차적으로 동정해 내고 있는 추세이다.

한편 본 질병에 대해 국내에서도 연구가 진행되었으며, Lee *et al.*, (2001)에 의해 *L. garvieae*가 국내 양식어류의 연쇄구균증의 원인종으로서 우점종일 것이라고 추정하였으며, 이외에 *Enterococcus* sp., *Streptococcus* sp.를 보고하였고, Song *et al.*, (2003)은 *S. pyogenes*, *E. faecalis*를 동정하여 보고하였다. 하지만 현재의 연구결과만으로 연구가 국내 양식어류 연쇄구균증과 관련된 병원체를 모두 동정된 것으로 판단되지는 않는다. 또한 독특한 지리적 특성을 가진 제주도의 경우 Lee *et al.*, (2001)에 의해 분리된 2 개체가 *L. garvieae*로 동정된 것 이외에 구체적인 보고가 없는 실정이다.

*S. iniae*는 은어 (*Plecoglossus altivelis*), 틸라피아 (*Oreochromis niloticus*), 넙치 (*Paralichthys olivaceus*), 송어 (*Oncorhynchus mykiss*) 등 여러 양식산 어종에 대해 패혈증과 뇌수막염을 주 증상으로 연쇄구균증을

일으키는 병원체로 알려져 왔으며, 특히 일본의 양식넙치 (*Paralichthys olivaceus*)의 연쇄구균증 병원체로서 중요하게 다루어지고 있는 병원체이다 (Nguyen *et al.*, 2002; Elder *et al.*, 1999).

본 연구에서 *S. iniae*로 동정된 S-3, S-4, S-5, S-23, S-28, S-41, S-50, S-57, S-88, S-95는 API 20 strep system에 의한 동정을 할 수 없었으나 각 균주간의 생화학적 성상이 매우 유사한 특성을 보였으며, Colorni *et al.*, (2002)이 보고한 어류 병원성 *S. iniae*의 생화학적 성상과도 매우 유사한 특성을 보였다. 또한 어류 병원성 *S. iniae*의 16S ribosomal RNA gene에 종 특이적인 PCR-assay법 (Zlokin *et al.*, 1998)을 수행해본 결과 참고 균주 *S. iniae* (KCTC-3657)를 포함한 10 균주 모두 동일하게 예상되었던, 330 bp의 band pattern을 보였다. 또한 16S-23S ISR의 염기서열 분석하여 상동성을 비교해 본 결과 *S. iniae* (genbank accession number AF048773)와 96%의 상동성을 보였고, *S. iniae* strain 이외의 16S-23S ISR 전체 서열에서 상동성을 보이는 근연속이나 근연종은 검색되지 않았다. 이를 근거로 하여 최종적으로 *S. iniae*로 동정하였다. 또한 이들의 지역적 분포는 보목, 위미, 태흥, 신천 등으로 주로 제주도의 육상 양식시설이 밀집한 지역에서 관찰되었다.

국내 양식어류의 연쇄구균증 병원체로서 *S. iniae*에 대한 보고는 아직 없는 실정이다. 하지만 *S. iniae*가 지리적으로 인접국인 일본의 양식넙치 (*Paralichthys olivaceus*)의 중요 연쇄구균증 병원체로서의 보고가 있으며, 제주도를 포함한 한국과 일본 모두 동일한 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)를 사육하고 있다는 점, Lee *et al.*, (2001)가 남해권 양식장을 주 대상으로 연구한 연쇄구균 균주 중 일부가 생화학적 성상이 *S. iniae*와 유사하다는 보고를 볼 때, 제주도뿐만 아니라 한국산 양식어류의 연쇄구균증 병원체로서 *S. iniae*가 존재할 가능성도 있는 것으로 판단된다. 따라서 이에 대하여 좀 더 체계적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

한편 *L. garvieae*의 생화학적 성상과 일치되는 균주는 존재하지 않았으



며, 어류 병원성 *L. garvieae*에 대해 분자생물학적 종 동정연구 (Zlokin *et al.*, 1998)에 따른 PCR-assay법을 수행해본 결과 참고균주 *L. garvieae* (KCTC-3772) 이외의 균주 모두 음성 반응을 보여 최종적으로 본 연구에서는 *L. garvieae*는 검출되지 않음을 확정하였다. 하지만 Lee *et al.*, (2001)에 의해 *L. garvieae*가 제주도를 포함한 국내 양식어류의 연쇄구균증의 원인종으로서 우점종일 것이라고 추정된 바가 있어, 제주도 양식넙치를 대상으로 좀 더 폭 넓은 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다.

본 연구에서 *S. parauberis*로 동정된 균주들은 API strep 20 system에 의한 동정결과 B group (*S. uberis* 23 균주, 확률 99.9 %에서 80.9 %), C group (*E. faecalis* 4 균주, 확률 89.3 %에서 89.1 %), D group (*S. porcinus* 4 균주, 98.4 %에서 87.8 %), E group (미동정 균주 2균주)로 다양하게 나뉘었다 (Table 3). 하지만 *S. parauberis* 16-23S ISR 서열에 특이적인 PCR-assay법 (Hassan *et al.*, 2001)을 수행해본 결과 33 균주 모두 동일하게 예상되었던, 약 201 bp의 band pattern을 보였다. 또한 16S-23S ISR을 증폭한 결과 band pattern은 각각 1 개의 ribosomal RNA operon을 가지고 있었고, 약 600 bp로 서로 동일하였다. 또한 염기서열 분석하여 상동성을 비교해 본 결과 *S. parauberis* (genbank accession number AF255656)와 98-97%의 상동성을 보였고, *S. parauberis* strain 이외의 16S-23S ISR 전체 서열에서 상동성을 보이는 근연속이나 근연종은 검색되지 않았다. 이를 근거로 하여 최종적으로 *S. parauberis*로 동정하였다.

*S. parauberis*는 최근까지 *S. uberis* type II로 분류되었으나, 생화학적 성상, 혈청학적 성상의 이형성과 16S ribosomal RNA 염기서열 분석을 통해 최종적으로 1990년 Williams와 Collins에 의해 *S. parauberis*로 제안된 종으로서 육상동물의 경우 젖소의 유방염을 일으키는 병원체로 알려져 있다. 양식어류의 연쇄구균증 병원체로서의 보고는 스페인의 Galicia 지역에서, 적정성장 수온이 15~19℃로 저온성 어종인 터붓 (*Scophthalmus maximus*)에 연중 발병하여 출혈 및 농양을 동반한 안구돌출, 복부와 복벽

의 점상출혈 등의 병리학적 특징을 보고한 바가 있다 (Domenech *et al.*, 1996).

한편 *S. parauberis*가 터봇 이외의 다른 양식어종의 연쇄구균증 병원체로서 보고된 예는 없으며, 본 연구에서 넙치의 연쇄구균증 병원체로서 병원성 연구를 아직 수행하지는 않은 실정이다. 따라서 *S. parauberis*가 넙치의 연쇄구균증을 유발한다는 명확한 결론을 얻을 수는 없으나, 본 연구에서 채색흑화, 안구돌출 및 출혈, 안구백탁, 복벽 출혈 등과 같이 전형적인 연쇄구균증을 보이는 넙치 병어 43개체 중 33개체가 *S. parauberis*로 동정되었다는 점, 또한 이들을 분리한 지역적 특성이 제주도 육상양식장이 주로 분포하고 있는 동부지역에서 선정된 12곳 모두 공통적으로 분리되었다는 점, 이와 함께 *S. parauberis*를 분리한 기간과 수온은 1월에서 6월까지 약 15 - 21℃로 터봇의 연쇄구균증 발병온도와 유사한 특성을 보였다. 이러한 사실들로 미루어볼 때, *S. parauberis*가 제주도 양식넙치의 연쇄구균증 병원체로서 존재할 가능성이 있는 것으로 판단되며, 이에 대해 병원성 연구를 비롯한 좀 더 폭넓은 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다.

## V. 요약

본 연구의 목적은 아직 국내 어류 연쇄구균증 병원체 동정이 명확히 이루어지지 않은 시점에서 제주도라는 지역적 특수성이 있는 지역의 양식넙치 중 연쇄구균증에 감염된 병어로부터 연쇄구균을 분리하고 동정하고자 하여 수행하였다.

연쇄구균증 증상을 보이는 양식 넙치의 신장과 뇌에서 연쇄구균을 분리하였고, API 20 strep system에 의한 동정 결과 각 개체간에 생화학적 성상이 매우 유사한 Unidentified group I 10균주, *S. uberis* 23 균주, *E. faecalis* 4 균주, *S. porcinus* 4 균주, Unidentified group II 2 균주를 동정하였다.

Unidentified group I은 API 20 strep system에 의한 동정을 할 수 없었으나 각 균주간의 생화학적 성상이 매우 유사한 특성을 보였으며, Colorni *et al.*, (2002)이 보고한 어류 병원성 *S. iniae*의 생화학적 성상과도 매우 유사한 특성을 보였다. 또한 *S. iniae*에 특이적인 PCR-assay법을 수행해본 결과 모두 동일하게 예상되었던 약 330 bp의 band pattern을 보였고, 16S-23S ISR의 염기서열을 분석하여 상동성을 비교해 본 결과 *S. iniae* (genbank accession number AF048773)와 96%의 상동성을 보여 *S. iniae*로 동정하였다. 국내에서 *S. iniae*에 의한 어류 연쇄구균증 보고는 아직 보고된 예가 없다. 또한 이들의 지역적 분포는 보목, 위미, 태흥, 신천 등으로 주로 제주도의 육상 양식시설이 밀집한 지역에서 관찰되었다.

한편 국내 연구에서 어류의 연쇄구균증 병원체로 보고된 *L. garvieae*는 생화학적 성상, 종 특이적 PCR-assay를 수행한 결과 본 연구에서는 검출할 수 없었다.

나머지 그룹들은 각각 생화학적 성상이 다양한 양상을 나타냈으나, *S. parauberis* 특이적인 PCR-assay법을 수행해본 결과 33 균주 모두 동일하

게 예상되었던, 약 201 bp의 band pattern을 보였다. 또한 16S-23S ISR의 염기서열을 분석하여 상동성을 비교해 본 결과 *S. parauberis* (genbank accession number AF255656)와 98-97%의 상동성을 보여 최종적으로 *S. parauberis*로 동정하였다. 이들의 지역적 분포는 제주도의 모든 채집지에서 관찰되었다. 또한 본 균주에 의한 넙치의 연쇄구균증 보고는 아직 알려진 예가 없다.



## VI. 참고문헌

- 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.
- Austin, A. and Austin, D. A. : Bacterial fish pathogens, 3rd ed., Springer. London, 1999.
- Boomker, J., Imes, G. D. Jr., Cameron, C.M., Naude, T. W. and Schoobee, H. J. : Trout mortalities as result of *Streptococcus* infection. Onderstepoort *J. of Veterinary Research*, 46:71-80, 1979.
- Colorni, A., Diamant, A., Eldar, A., Kvitt, A., Zlotkin, A., : *Streptococcus iniae* infections in Red Sea Cage-cultured and wild fishes. *Dis Aquat Org.*, 49:165-170, 2002
- Domenech, A., Fernandez-Garayzabal, J. F., pascual, C., Garcia, J. A., Cutuli, M. T., Moreno, M. A., Collins, M. D. and Dminguez, L. : Streptococcosis in cultured turbot, *Scophthalmus maximus*(L.), associated with *Streptococcus parauberis*. *J. Fish Dis.*, 19:33-38, 1996.
- Elder, A. and Ghittino, C. : *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: similar but different disease. *Dis. Aquat. Org.*, 36:227-231, 1999.
- Hassan, A. A., Khan, I. U., Abdulmawjoob, A. : Evaluation of PCR method for rapid identification and differentiation of *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis*. *J. Clin. Microbiol.*, 39: 1618-1621, 2001.

- Jensen, M. A., J. A. Webster and Straus, N., : Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:945-952, 1993.
- Kaige, N., Miyazaki, T. and Kusuda, S. : The pathogenic and the histopathology of vertebral deformity in cultured yellowtail. *Fish Pathol.*, 19:173-179, 1984.
- Kusuda, R., Kawai, K., Salati, F., Banner, C. R. and Fryer, I. L. : *Enterococcus seriolicida* sp. nov., a fish pathogene. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 41:406-409, 1995.
- Lee, D. C., Lee, J. I., Park, C. I. and Park, S. I. : The study on the casual agent of streptococcosis(*Lactococcus garvieae*), isolated from cultured marine fishes. *J. Fish Pathol.*, 14:71-80, 2001.
- Minami, T., Nakamura, M., Ikeda, Y. and Ozaki, H. : A beta-hemolytic *Streptococcus* isolated from cultured yellowtail. *Fish Pathol.*, 14: 33-38, 1979.
- Nagpal, M. L., Fox, K. F., and Fox, A. : Utility of 16S-23S rRNA spacer region methodology: how similar are intergenic spacer regions within a genome and between strains for closely related organisms?. *J. Micro. Metho.*, 33:211-219, 1998.
- Song, J. K., Kim, J. H., Kim, E. H., : Comparison of RAPD profiles and Phenotypical characters of streptococcal strains. *J. Fish Pathol.*, 16: 51-59, 2003.
- Williams and Collins : Molecular taxonomic studies on *Streptococcus uberis* types I and II description of *Streptococcus parauberis* sp. nov. *J. Appl. bacteriol.*, 68:485-490, 1990
- Zoltkin, A., Eldar, A., Ghittino, C. and Bercovier, H. : Identification of

*Lactococcus garvieae* by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 36:983-985, 1998.

Zolkin, A., Hershko H, Eldar A., : Possible transmission of *Streptococcus iniae* from wild fish to cultured marine fish. *Appl Environ Microbiol.*, 64:4065-4067, 1998.



## 감사의 글

지난 2년이라는 세월동안 참 많은 것을 몸으로 느끼고 배웠던 것 같습니다. 시행착오도 많았었지만 시작부터 끝까지가 한 걸음씩 한 걸음씩이었기에 제게는 소중한 추억인 것 같습니다.

먼저 이런 기회를 주셨고 늘 한결같은 마음으로 가르침을 주셨던 허문수 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 그리고 보잘 것 없는 저에게 조언과 관심으로 대해 주셨던 송춘복 교수님께도 감사를 드리며, 변함 없는 격려와 도움을 주셨고 아낌없는 질문을 통해 가르침을 주셨던 이제희 교수님, 여인규 교수님, 전유진 교수님께도 감사를 드립니다. 또한 논문 심사에 성의를 다해주신 박근태 선생님에게도 감사를 드립니다.

제가 이 논문을 완성하기까지 많은 배려와 도움을 주신 제주도해양수산자원연구소의 이종만 소장님, 홍성삼 과장님, 김문관 과장님 그리고 강봉조 연구사님과 병리실의 식구들에게도 감사를 드립니다.

실험실의 선배님으로서 늘 웃는 얼굴과 관심으로서 대해준 진창남 계장님 그리고 밖에 있어서 늘 미안한 마음이 들었던 영건이와 실험실 식구들 그리고 같이 있어 힘이 되었던 김재환 학우, 송지훈 학우, 진영준 학우, 오철홍 학우, 운영석 학우님들에게 이 자리를 빌어 감사를 드립니다.

끝으로 사랑으로 키워주신 부모님 그리고 동생들에게 이 논문을 드립니다.