

## 養殖 넙치의連鎖球菌症

李昌薰 · 河東秀

國立水產振興院 濟州水產研究所

### A streptococcal Disease of Cultured Flounder, *Paralichthys olivaceus*

Chang-Hoon LEE and Dong-Soo HA

National Fisheries Research & Development Agency  
Cheju Regional Fisheries Research Laboratory,  
Cheju, Chju-do, 690-192, Korea

From August to October of 1991, a bacterial disease occurred in cultured flounder, of 0 age *Paralichthys olivaceus*, in Cheju-do.

Typical symptoms of the diseased fish were the hemorrhage of the opercle, discoloration of the body, exophthalmus and hemorrhage of the eyes.

The causative organism isolated from diseased fish was identified as a  $\beta$ -hemolytic *Streptococcus*.

This bacterium was not identical with any known *Streptococcus* species listed in Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 8th edition. However there was a close similarity between this species and *Streptococcus* sp. isolated from flounder and reported by Tashio (1983).

The isolated bacteria *streptococcus* sp. showed very high sensitivity to the SM and EM, however, it resisted to the high concentration of Penicillin.

In the pathogenicity analysis, about  $1.1 \times 10^9$ ,  $1.1 \times 10^7$ ,  $1.1 \times 10^5$ ,  $1.1 \times 10^3$ ,  $1.1 \times 10^1$  cells/100g B.W of isolated bacteria were injected percutaneously. The results showed that this inoculation size  $1.1 \times 10^3$  cells/100g B.W was the threshold for the induction of mortality in pathogenicity analysis.

### 緒 論

近來 濟州道內 海產魚類養殖은 主로 高所得 魚種인 넙치를 養殖하고 있으며, 一部 養殖場에서는 자주복 또는 조피볼락도 養殖되고 있다. 濟州道內 넙치養殖은 1986年 日本에서 受精卵을 導入하여 孵化시켜 種苗를

生産한 以後 1989년부터는 各 養殖場에서 種苗生産과 養殖事業이 이루어졌다. 所得增大를 위하여 飼育方法이 漸次的으로 適正飼育密度를 超過하는 高密度 飼育으로 바뀌어짐에 따라 飼育水槽內의 環境條件이 惡化되어 여러가지 疾病의 原因이 되고 있다. 本 研究는 水產振興院의 '91年 水產研究事業計劃에 依據 濟州道

## 72 A streptococcal disease of cultured flounder

내 넙치양殖場의 魚病實態調査를 한 結果 1991年 8月 부터 10月까지 3個月間 一部넙치양殖場에서 飼育中인 當年生넙치에서 疾病이 發生하였다. 病魚의 症狀은 眼球突出, 充血, 體色黑化, 아가미內測出血症狀 등을 미루어보아 連鎖球菌症으로 推定되었으며 發病한 養殖場에서는 이로 因하여 3~5%가 斃死하였다. 本 研究의 目的은 發病原因菌을 究明하여 이에 따른 適切한 治療對策을 講究할 必要性을 느껴 病原菌의 分離同定試驗, 藥劑感受性試驗 및 病原性試驗을 行한 結果를 報告하고자 한다.

### 材料 및 方法

#### 1. 實驗魚 및 實驗菌株

1991年 8月부터 10月까지 3個月間 濟州道內 一部 넙치양殖場에서 眼球突出, 充血, 體色黑化 및 아가미內測 出血症狀을 나타내는 병어(平均 550g)를 每月 10尾以上 採集하여 當研究所로 옮겨 細菌分離를 行하였다.

#### 2. 分離菌의 性狀試驗

가. 細菌分離試驗: 병어의 腎臟, 腦 등 器官組織을 stamp하여 백담이로 BHIA培地에 塗抹接種한 後 인큐베이터 30C, 48時間 培養하였다. 純粹培養하기 위하여 培地에 形成된 colony를 떼내어 다시 BHIA培地에 塗抹接種하여 純粹分離하였다.

나. 細菌同定試驗: 純粹分離한 菌은 形態學的 및 生化學的 性狀試驗을 거친 後 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology와 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume I 및 II의 정의와 比較 調査한 後 同定하였다.

다. 分離菌株의 特性: 分離菌株의 由來

#### 3. 藥劑 感受性 試驗

純粹 分離한 菌株를 Müller Hinton 培地에 塗抹 接種後 Tetracycline外 6종의 抗生 藥劑 Disc을 사용하여 Disc周圍에 形成된 阻止帶의 有無 및 크기로 測定하였다.

#### 4. 病原性 試驗

分離한 菌을 BHIA배지에 30C, 48時間 培養한 後 集菌하여 滅菌 濾過海水로 一定 菌數가 되게 菌 浮遊液을 만들어 넙치(100g)腹腔內에 菌의濃度가  $1.1 \times 10^8$ ,  $1.1 \times 10^7$ ,  $1.1 \times 10^6$ ,  $1.1 \times 10^5$  cells/100g B.W가 되게 0.1ml씩 注射하였고, 對照區는 滅菌海水 0.1ml만 腹腔內에 接種 하였으며, 使用尾數는 6個 水槽에 各 5尾씩 受容하였다. 實驗 期間은 7日間 이었으며, 水溫은  $20 \pm 0.5^\circ\text{C}$  였다.

### 結果 및 考察

병은 넙치에서 分離한 菌株는 Table 1과 같이 濟州道內 위미(CD-1), 대포(CD-2), 김녕(CD-3), 보목(CD-4) 넙치 養殖場에서 分離하였다. 分離한 菌의 生化學的 性狀 結果는 Table 2와 같다.

分離菌은 形態는 連鎖狀으로 된 球菌이었으며 크기는  $0.5 \sim 1.0 \mu\text{m}$ 였다. Gram 陽性菌으로 運動性은 없었으며 0.1% methylene blue milk, pH 9.6, 6.5% NaCl 에서는 發育하지 않았다.

BHIA, Blood agar에서는 잘 發育되었으나, BTB tee-pol agar 및 SS agar 에서는 發育이 되지않았다.

20~37C에서는 發育되지만 10C 및 45C에서는 發育하지않았다. glucose는 分解하였으나 Indole 및 H<sub>2</sub>S는

Table 1. *Streptococcus* strains used in this study

Date of isolation	Source	Organ of isolation	Strains
Aug. 25. 1991	Wimi, Cheju-do	Kidny	CD-1
Sep. 27. 1991	Daepo, Cheju-do	Liver	CD-2
Sep. 22. 1991	Gimnyeong, Cheju0do	Brain	CD-3
Oct. 24. 1991	Bomok, Cheju-do	Brain	CD-4

Table 2. Characteristics of the isolates

Characteristics	CD-1	CD-2	CD-3	CD-4
Form	ovoid	ovoid	ovoid	ovoid
Size (µm)	0.5~0.8	0.7~1.0	0.5~0.9	0.6~1.0
(average)	(0.6)	(0.8)	(0.8)	(0.8)
Gram stain	+	+	+	+
Motility	-	-	-	-
Growth on :				
BHI agar	+	+	+	+
Blood agar	+	+	+	+
TS agar	+	+	+	+
SS agar	-	-	-	-
BTB teepol agar	-	-	-	-
Growth in :				
0.1% methylene blue milk	-	-	-	-
pH 9.6	-	-	-	-
6.5% NaCl	-	-	-	-
Growth at :				
10°C	-	-	-	-
20°C	+	+	+	+
30°C	+	+	+	+
37°C	+	+	+	+
45°C	-	-	-	-
OF test	F	F	F	F
Indole	-	-	-	-
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-
MR test	+	+	+	+
VP test	-	-	-	-
Citrate	-	-	-	-
Hydrolysis of :				
gelatin	-	-	-	-
starch	-	-	-	-
hippurate	-	-	-	-
esculin	+	+	+	+
arginine	+	+	+	+
Decarboxylation of :				
lysine	-	-	-	-
arginine	Al	Al	Al	Al
ornithine	-	-	-	-
Decomposition of :				
adonitol	-	-	-	-
arabinose	-	-	-	-
cellobiose	+	+	+	+
dextrin	+	+	+	+
dulcitol	-	-	-	-
Hemolysis of sheep blood	β	β	β	β
catalase	-	-	-	-
oxidase	-	-	-	-
inulin	-	-	-	-
lactose	-	-	-	-
maltose	+	+	+	+
manitol	+	+	+	+
mannose	+	+	+	+
raffinose	-	-	-	-
sorbitol	-	-	-	-
sucrose	+	+	+	+
trehalose	+	+	+	+
xylose	-	-	-	-
Gas from carbohydrates				
esculin	+	+	+	+
fructose	+	+	+	+
galactose	+	+	+	+
glucose	+	+	+	+
inuitol	+	+	+	+
inulin	+	+	+	+

Key : F, fermentative ; Al, alkaline.

## 74 A streptococcal disease of cultured flounder

生成되지 않았다. MR試驗에서는 陽性을 나타냈으며 VP試驗에서는 陰性을 나타내었다.

Gelatin과 hippurate 加水分解 試驗에서는 陰性을 나타내었으나 starch, esculin 및 arginine에서는 陽性을 나타내었다. 탄수화물 試驗에서는 arginine은 陽性을 나타내었으나 lysine 및 ornithine에서는 陰性을 나타내었다.

Decomposition 試驗에서는 maltose, mannitol 등은 分解하지만 lactose, raffinose 등은 分解되지 않았으며 면양 血液의 溶血性 試驗에서는  $\beta$ 를 나타내었다.

以上の 結果를 綜合하여 볼때 Bergey's manual of Determinative Bacteriology와 Bergey's manual of Systematic Bacteriology Volume I 및 II와 比較하였을때 *Streptococcus* sp. 로 分類되었다.

分離한 4菌株의 性狀 試驗結果를 Pier *et al*(1976), Ugajin(1981), Kitao *et al*(1981) 및 Tashio(1983)의 報告한 것과 比較하여 Table 3에 나타내었다.

중 分離한 4菌株는 Toshio (1983)의 報告한 것과 一致하고 있지만 Pier *et al*(1976)이 報告한 것과는 10°C의 發育에서 差異가 있으며, Ugajin (1981)의 報告한 것과는 cellobiose의 分解에서 差異를 나타내고 있다.

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 第8版에 記載한 것과 比較해 볼때 本 菌은 *Streptococcus pyogenes* 및 *Streptococcus equisimilis*의 2種과 유사한 性狀을 나타내고 있으나 *Streptococcus pyogenes*와는 maltose의 分解에서, *Streptococcus equisimilis*와는 glucose 와 maltose의 分解에서 差異가 있었다.

그래서 本 菌은 *Streptococcus pyogenes* 및 *Streptococcus equisimilis*의 어느것에도 동정할 수 없었다.

以上の 結果를 미루어볼 때 Tashio (1983)의 報告와 一致함에 따라 現 段階로서는 Tashio(1983)가 밝힌 *Streptococcus* sp.로 나타낼 수 밖에 없었다.

이와 더불어 連鎖球菌의 性狀에 필요한 血清學的 研究가 앞으로 檢討되어야 할 것으로 여겨진다. 分離한 4菌株를 藥劑 感受性 試驗 結果는 Table 4와 같다.

分離한 4菌株 모두 Erythromycin 및 Spiramycin에는 높은 感受性을 나타내었고, Chloramphenicol, Tetracycline 및 Gentamycin에서도 感受性은 있었으나 Penicillin에서는 耐性을 나타내었다. 片江(1982)은 本菌에 對하여 Chloramphenicol 및 Tetracycline에는 感受성이

높지만 投與後 10H程度 지나면 再發하는 傾向이 있어 治療에 어려움이 많지만 Erythromycin은 連續 投與가 可能하고 臟器에서 쉽게 排泄되며 또한 吸收 速度가 빨라 投與後 3時間부터 最小發育抑制濃度(MIC)보다 높은 濃度를 維持하므로 治療하는데 어려움이 없다고 하였다.

北尾等(1987)은 各種 抗生劑에 對한 最小發育抑制濃度(MIC)를 調査한 結果 Erythromycin이 가장 좋은 結果를 나타내었고 50mg(역가)/Kg으로 5日間 投與하면 治療 效果가 좋았다고 報告하였다.

따라서 連鎖球菌症의 治療하는데도 片江(1982)와 北尾(1987)의 報告와 一致하고 있어 Erythromycin 의 投與가 가장 效果가 있을 것으로 여겨진다.

分離한 菌株(CD-3)를 복상에 접종하여 7日間 病原性 試驗한 結果는 Table 5와 같다.  $1.1 \times 10^6$  cells/100g 어 체중의 實驗區에서는 接種 4日 以內에 5尾 全量 斃死하였고  $1.1 \times 10^7$  cells/100g 어 체중의 實驗區에서는 4尾,  $1.1 \times 10^8$  cells/100g 어 체중의 實驗區에서는 3尾가 7日以內에 斃死하였으나  $1.1 \times 10^9$  cells/100g 어 체중 以 下の 實驗區 및 對照區에서는 斃死가 發生하지 않았다. 大西(1986)는 養殖은어에  $10^6$  cells/100g 어 체중만 接 種하여도 10尾중 3尾가 斃死 하였으나 養殖방어에서는  $10^6$  cells/100g 어 체중 接種하여도 斃死 尾數가 나타나지 않았다고 하였다.

本 實驗에서 나타난  $1.1 \times 10^6$  cells/100g 어 체중 以 下에서는 斃死가 없었으나 은어에서는  $10^6$  cells/100g 어 体중만 接種하여도 斃死되며 방어에서는  $10^6$  cells/100g 어 体중 接種하여도 斃死하지 않은 것으로 보아 本 菌은 魚種間에 差異가 많은 것으로 知겨진다.

以上の 結果를 미루어볼때 건강한 넙치에  $1.1 \times 10^3$  cells/fish 이상 接種하였을 때는 아무리 健康한 넙치에 도 폐사가 發生하는 것으로 보이나 그 以上の 濃度에서 是 폐사尾數가 없는 것으로 보인다.

## 要 約

1. 1991年 8月부터 10日까지 濟州道內 넙치양식장 4 個所의 병어에서 연쇄구균을 분리하였다.
2. 分離菌은 10°C, 45°C, 6.5% NaCl, pH 9.6 및 0.1% methylene blue milk 에서는 發育되지 않았고 또한

Table 3. Comparison in characteristics between the isolates and *Streptococcus* strains previously reported

Character	Present isolate				Pier and Madin (1976)	Ugajin (1981)	Kitao <i>et al</i> (1981)	Toshio (1983)
	CD-1	CD-2	CD-3	CD-4				
Hemolysis	β	β	β	β	β	β	β	β
Grwth at :								
10C	-	-	-	-	+	-	-	-
20C	+	+	+	+			+	+
30C	+	+	+	+			+	+
37C	+	+	+	+			+	+
45C	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth in :								
0.1% methylene Blue milk	-	-	-	-	-	-	-	-
pH 9.6	-	-	-	-	-	-	-	-
6.5% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-	-
MR test	+	+	+	+		+	+	+
VP test	-	-	-	-		-	-	-
Citrate	-	-	-	-		-	-	-
Hydrolysis of :								
gelatin	-	-	-	-	-	-	-	-
starch	-	-	-	-	-	-	-	-
hippurate	-	-	-	-	-	-	-	-
esculin	+	+	+	+	+	+	+	+
arginine	+	+	+	+		+	+	+
Decarboxylase of :								
lysine	-	-	-	-		-	-	-
ornithine	-	-	-	-		-	-	-
Decomposition of :								
adonitol	-	-	-	-		-	-	-
arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-
cellobiose	+	+	+	+	+	-		+
dextrin	+	+	+	+		-		-
dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-
esculin	+	+	+	+		+		+
fructose	+	+	+	+	+	+		+
galactose	+	+	+	+	+	+	+	+
glucose	+	+	+	+	+	+		+
inositol	-	-	-	-	-	-	-	-
inulin	-	-	-	-	-	-	-	-
lactose	-	-	-	-	-	-	-	-
maltose	+	+	+	+	+	+	+	+
mannitol	+	+	+	+	+	+	-	+
raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-
sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-
sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+
trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+
xylose	-	-	-	-	-	-	-	-
Gas from carbohydrates	-	-	-	-		-	-	-

76 *A streptococcal disease of cultured flounder*

Table 4. Sensitivity of *Streptococcus* sp. isolated from diseased fish to chemotherapeutical agents

Chemotherapeutical agent	Sensitivity			
	CD-1	CD-2	CD-3	CD-4
Tetracycline	+	+	+	+
Spiramycin	+++	++	+++	+++
Erythromycin	+++	+++	+++	+++
Chloramphenicol	++	+++	++	++
Gentamycin	+	++	+	++
Ampicillin	+	+	+	++
Penicillin	-	-	-	-

+++ : Strongly sensitivity  
 ++ : Mediatly sensitivity  
 + : Weekly sensitivity  
 - : Non sensitivity

Table 5. Pathogenicity of *Streptococcus* sp. CD-3

Group	Inoculated number of viable cells/100g(B.W)	Number of flounder challenged	Number of death after challenge							Total number death	Mortality (%)
			1	2	3	4	5	6	7		
1	$1.1 \times 10^9$	5	4	1					5	100	
2	$1.1 \times 10^7$	5		2	1	1			4	80	
3	$1.1 \times 10^6$	5		1	1	1			3	60	
4	$1.1 \times 10^4$	5				1			1	20	
5	$1.1 \times 10^1$	5							0	0	
6	Non-infected control	5							0	0	

Indole 및 H<sub>2</sub>S도 생성하지 못하였으며 β 용혈성을 나타내었다.

3. 以上の性狀에서 分離菌은 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 및 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology I 및 II에 根據를 두어 檢索한 結果 *Streptococcus pyogenes* 및 *Streptococcus equisimilis*와 유사하지만 약간의 差異가 있으므로 *Streptococcus* sp.로 하였다.
4. 分離菌의 藥劑 感受性 試驗結果 Spiramycin 및 Erythromycin에 높은 感受性を 나타냈으나 Penicillin에는 耐性を 나타냈다.
5. 分離菌의 病原性 試驗結果  $1.1 \times 10^9$  cells/100g 어체 중 以上 接種하였을 때는 斃死 尾數가 發生하였으나 그 以下의 接種 濃度에서는 斃死가 發生하지 않았다.

參考文獻

中津川俊雄(1983) : 養殖ヒラメの連鎖球菌症について, 魚病研究, 17(4) : 281 - 285.  
 北尾忠理, 岩田一夫, 泰田開之(1987) : 水産用エリスロマイシン製劑による養殖ニズマスの連鎖球菌症の治療試験, 魚病研究, 22(1) : 25 - 28.  
 KiTao, T., T. Aoki and R. Sakoh(1981) : Epizootic caused by β-hemolytic *Streptococcus* species in cultured freshwater fish. Fish pathology, 15(3), 301 - 307.  
 大西幸二, 城 泰彦(1986) : 養殖アユから分離された溶血連鎖球菌の生理學的および病原性, 魚病研究, 21(1) : 9 - 13.

片江宏己(1982)：エリスロマイシンのすべて、フリ連鎖球菌症への應用に關する研究. 魚病研究, 17(1)：77-85.

Pier, G. B. and S. H. Madin(1976)： *Streptococcus iniae* sp. nov., a beta-hemolytic *Streptococcus* isolater

from an Amazon freshwater dolphin, *Inia geoffrensis*. Int. J. Syst. Bacteriol., 26(4), 545-553.

宇賀神光夫(1981)：1980年 木万木縣下の養殖アコの流行病の原因である連鎖球菌に關する研究. 魚病研究, 16(3), 119-127.