

병용 항균제의 어류질병 세균에 대한 시험관내 항균활성

정승희[†] · 김진우

국립수산진흥원 병리과

최근 육상의 넓치 양식장에서는 두 가지의 서로 다른 특성을 가지는 세균성질병이 같이 감염되는 혼합감염증이 빈번하게 발생하고 있는데, 혼합감염증은 서로 다른 원인균의 특성 때문에 단일 종류의 약제만으로는 치료효과를 거두기가 어려운 실정이다. 그러므로 본 연구는 약제의 병용 투여에 의해 이들의 상승작용을 이용함으로써 합병증에 대한 치료효과를 높이기 위한 기초자료를 얻고자 실시하였다. 어류 세균성질병의 원인세균인 *Vibrio anguillarum*, *Edwardsiella tarda*, *Streptococcus* sp., *Staphylococcus epidermidis*을 선정하여 병용 항균제의 시험관내 활성을 평가하는 대표적 방법인 Checkerboard법을 적용하여 fractional inhibitory concentration (FIC)지수를 구하여 상승효과를 나타내는 병용 항균제를 찾아내었다. (OTC+LM), (TC+FF), (OTC+FF)의 병용 항균제는 *V. anguillarum*에 대하여, (SNF+FF), (TC+FF), (SNF+OXA), (OTC+FF)의 병용 항균제는 *E. tarda*에 대하여, (CFX+OL), (OTC+OL), (TC+OL), (OTC+LM), (OTC+SPM), (OTC+EM), (DOXY+OL), (TC+SPM)의 병용 항균제는 *Streptococcus* sp.에 대하여, (CFX+EM), (FF+EM), (DOXY+OL), (CFX+OL)의 병용 항균제는 *S. epidermidis*에 대하여 시험관내 상승적 상호작용을 나타내었다.

Key words: Antibacterials, Combination, Minimum inhibitory concentration, Fractional inhibitory concentration, Fish-pathogenic bacteria

임상 약리학에서 항균제의 상호작용에 관한 연구는 오래 전부터 추진되어 두 가지 약제를 동시에 사용할 때 나타나는 항균활성의 작용기전이 어느 정도 밝혀져 있다. 이러한 작용기전 가운데 협동적 및 상승적 상호작용을 나타내는 병용 항균제는 주로 혼합 감염증에서 항균범위를 넓히거나 세균내성의 발생을 지연시키기 위한 질병치료에 직접 사용되고 있다(Holt and Brown, 1989; 이 등, 1990; Eliopoulos and Moellering, 1991; 최, 1995). 그러나 항균제를 병용하는 것이 중복감염 등의 부작용이 나타나는 경우도 있으므로 확실한 효과가 증명되는 경우에만 병용요법이 적용되어야 한다. sulfonamides와 pyrimidine 유도체인 trimethoprim 및 ormetoprim은 어류질병의 치료를 위해 가장 먼저 연구되어 온 상승효과를 나타내는 병용 항균제이다(Kimura *et al.*, 1983; Yoshimizu and Kimura, 1986; Samuelsen *et al.*, 1997). 이러한 효과를 이용하여 실제로 수산용 약제로서 sulfadimethoxin+ormetoprim은 캐나다 및 미국, sulfadiazin+trimethoprim은 유럽, 캐나다 및 한국,

sulfamonomethoxin+ormetoprim은 일본에서 승인되어 시판되고 있다(Schnick, 1991). 그런데 한국의 경우는 드물게 erythromycin+sulfadiazine+trimethoprim(EM+SDZ+TMP), oxytetracycline+neomycin(OTC+NM), spiramycin+tetracycline(SPM+TC), amoxicillin+spiramycin(AMX+SPM) 등의 병용 항균제가 수산용 약품으로 승인되어 시판되고 있다(최 등, 1996). 이들 병용 항균제는 대부분 어류 세균성질병의 광범위 치료제로서 사용되고 있으나, 원인균들에 대하여 어느 정도의 치료효과를 거둘 수 있는지 또는 사용 어류에 대한 안전성 문제에 관해서 현재까지 전 세계적으로 보고된 자료가 전혀 없다.

최근 들어 육상의 넓치 양식장에서는 단일 세균성질병의 발병보다 두 가지 이상의 세균성질병이 함께 발병하는 혼합감염증의 사례가 점차 늘고 있다. 합병증의 예로서는 연쇄구균증+에드워드병, 비브리오병+에드워드병, 비브리오병+연쇄구균증 등이 있다. 이러한 혼합감염증은 서로 다른 특성을 가진 병원세균 때문에 단일 약제만으로는 충분한 치료효과를 거둘 수 없는 실정이다. 따라서 본 연구는 상승효과를 가지는 병용 항균제를 투여함으

[†]Corresponding author

로써 혼합감염증에 대한 치료효과를 높이기 위한 기초자료를 얻고자 실시하였다. 즉, 주요 어류질병의 원인세균을 선정하여 항균제의 단용 및 병용 시 시험관내 minimum inhibitory concentration (MIC)을 조사하고, 이를 근거로 병용 항균제의 항균활성을 대표하는 Checkerboard법으로써 fractional inhibitory concentration(FIC) 지수를 산출하여 상승적 상호작용을 보이는 항균제의 짝을 찾아내고자 하였다.

재료 및 방법

어병 세균

넙치로부터 분리하여 동정된 *Vibrio anguillarum*, *Edwardsiella tarda*, *Streptococcus* sp.와 조피볼락으로부터 분리하여 동정된 *Staphylococcus epidermidis*를 실험에 사용하였다. 시험균은 2% NaCl이 첨가된 Tryptic Soy Agar(TSA, Difco) 평판배지에서 보존하다가 시험 전날에 2% NaCl이 첨가된 Muller Hinton Broth(MHB, Difco)에 접종하여 *V. anguillarum* 및 *E. tarda*는 25°C, *Streptococcus* sp.와 *S. epidermidis*는 30°C에서 24시간 배양한 뒤 McFarland No. 0.5로 조정하여 준비하였다.

항균제

실험에 사용한 약제는 모두 16종류로 ciprofloxacin(CFX)은 제일제당, florfenicol(FF)은 한국동물약품, pefloxacin(PFX)은 팔이합성, sodium nifurstyrenate(SNF)은 대성미생물사로부터 직접 원료를 구입하였고, ampicillin(ABPC), doxycycline HCL(DOXY), erythromycin(EM), spiramycin(SPM), oxytetracycline HCL(OTC), tetracycline HCL(TC), flumequine(FM), oxolinic acid(OXA)는 Sigma사, amoxicillin(AMX), lincomycin(LM), neomycin(NM), oleandomycin(OL)은 INC(Biomedicals)사에서 구입하였다. 약제는 Jung *et al.*(1999)에 따라 각 용해액으로 1000 µg/ml가 되도록 만든 뒤에 증류수로 2배 계열희석을 실시하여 최종농도 0.125 µg/ml까지 준비하였다.

Minimum inhibitory concentration (MIC)

항균제의 희석농도별 MIC는 한천평판희석법

(Japanese Society of Chemotherapy, 1981)에 따라 실시하였다. 2% NaCl이 첨가된 Muller Hinton Agar(MHA, Difco)를 고압증기멸균(121°C, 15분)한 뒤 55°C로 가온 보존해 두었다. 항균제의 희석농도가 100 µg/ml인 약제배지를 만들기 위하여 멸균된 pertridish(85×15 mm, 세원양행) 뚜껑에 항균제 이름과 농도를 기록한 뒤 55°C로 가온 보존해 둔 MHA 18 ml를 분주하고 곧바로 준비해둔 1000 µg/ml의 항균제 2 ml를 분주하여 골고루 잘 섞이도록 하여 균한다. 이와 같은 방법으로 2배 계열 희석된 항균제의 농도로부터 약제배지를 제작하여 이 약제배지 위에 McFarland No. 0.5로 준비해 둔 어병세균 1 loopful(직경 5 mm)을 도말하여 *V. anguillarum* 및 *E. tarda*는 25°C, *Streptococcus* sp.와 *S. epidermidis*는 30°C에서 48시간 배양한 뒤 minimum inhibitory concentration (MIC)을 구하였다.

Fractional inhibitory concentration (FIC) 지수

병용 항균제의 FIC지수는 Checkerboard법(Hamilton-Miller, 1985; Holt and Brown, 1989; Eliopoulos and Moellering, 1991)에 의해 측정하였다. 약제는 먼저 단독으로 어병세균에 대해 MIC를 측정한 뒤 감수성 (MIC≤3.13 µg/ml)을 나타낸 항균제를 대상으로 협동 및 상승효과가 예상되는 짝을 임의로 drug A 및 drug B로 정하였다. Fig. 1과 같이 Y축에 drug B, X축에는 drug A가 배치되고 drug A 및 B의 MIC를 각각 FIC 지수 1

Fig. 1. In the Checkerboard assay, serial dilutions of two drugs are performed using drug concentration proportional to the MICs of the drugs being tested (A/B).

로 산정하고 계속해서 0.8, 0.6, 0.4, 0.2, 0이 되도록 사각형 부분에 표시된 각각의 농도가 조성된 병용 항균제의 평판배지를 MIC와 동일한 방법으로 MHA배지로써 만들었다. 한편 36 plate의 약제 배지 위에 어병세균을 도말하여 MIC 측정과 같은 방법으로 균의 발육유무를 조사하여 FIC 지수를 조사하였다. 만약 설정된 FIC지수의 비율에서 세균이 증식하지 않았을 경우는 보다 세분화해서 농도를 조정하여 배지를 제작하였다.

$$\text{FIC지수} = \frac{\text{A약과 병용사용 할 때 A약의 MIC}}{\text{A약 단독사용 할 때 MIC}} + \frac{\text{A약과 병용사용 할 때 B약의 MIC}}{\text{B약 단독사용 할 때 MIC}}$$

여기서 FIC지수의 값이 낮을수록 항균활성은 높으며 $0.7 \leq \text{FIC지수} < 1.0$ (협동적 상호작용), $\text{FIC지수} < 0.7$ (상승적 상호작용) 효과로 판정하였다.

결 과

Minimum inhibitory concentration (MIC)

주요 어병 원인 세균에 대한 단용 항균제의 MIC를 Table 1에 나타내었다. 본 연구에서는 Palmer *et al.*(1992)의 분류를 기준으로 하여 MIC가 $3.13 \mu\text{g/ml}$ 이하까지를 감수성 항균제로, MIC가 $6.25 \mu\text{g/ml}$ 이상을 내성항균제로 분류하였다. Table 1에 의거하여 감수성으로 분류한 항균제를 대상으로 협동적 및 상승적 상호작용이 예상되는 병용 항균제의 FIC지수를 산출하기 위하여 그들의 MIC를 측정하였다.

단용 및 병용할 때 항균제의 MIC가 어느 정도 다르게 나타났는지 비교하여 Table 2에 나타내었다. 항균제의 MIC 수치도 단용할 때보다 병용할 때 훨씬 낮게 나타나 그만큼 항균활성은 증가하였다. 그리고 약제의 MIC는 최저 2배부터 최고 11배까지 상승한 사실을 관찰하였다. 따라서 병용 시 MIC의 값이 낮아져서 항균활성이 상승한다는 사

Table 1. Minimum inhibitory concentration (MIC) of antibacterials against fish-pathogenic bacteria

Antibacterials		Minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g/ml}$)			
		<i>Vibrio anguillarum</i>	<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>Streptococcus</i> sp.	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
PCs	ABPC	$>100^b$	$>100^b$	$>100^b$	$>100^b$
	AMX	$>100^b$	$>100^b$	$>100^b$	$>100^b$
NFs	SNF	50^b	1.56^a	$>100^b$	25^b
TCs	OTC	0.78^a	0.78^a	1.56^a	100^b
	DOXY	0.78^a	6.25^b	0.78^a	3.13^a
	TC	0.78^a	0.78^a	1.56^a	25^b
AGs	NM	50^b	25^b	50^b	50^b
MLs	EM	50^b	50^b	0.05^a	0.78^a
	OL	100^b	$>100^b$	0.78^a	0.78^a
	SPM	$>100^b$	$>100^b$	0.78^a	25^b
LMs	LM	$>100^b$	$>100^b$	3.13^a	0.39^a
QNs	FM	12.5^b	50^b	$>100^b$	$>100^b$
	FF	0.78^a	0.78^a	6.25^b	1.56^a
	OXA	1.56^a	6.25^b	50^b	3.13^a
	CFX	$>0.0125^a$	0.39^a	0.39^a	0.78^a
	PFX	12.5^b	25^b	25^b	25^b

^aSusceptible: $\text{MIC} \leq 3.13 \mu\text{g/ml}$, ^bresistant: $\text{MIC} \geq 6.25 \mu\text{g/ml}$

Table 2. Enhancement of minimum inhibitory concentration (MIC) when antibacterials were used alone or in mixture

Combinations of antibacterials(A+B)	MIC of drug A		MIC of drug B	
	Alone	Mixture	Alone	Mixture
SNF+FF	1.2	0.3	0.78	0.2
SNF+OXA	1.2	0.6	6.25	0.6
TC+FF	0.78	0.2	0.6	0.2
OTC+SPM	1.56	0.3	0.78	0.12
TC+SPM	1.56	0.5	0.78	0.12
OTC+EM	1.56	0.3	0.05	0.008
OTC+OL	1.56	0.3	0.78	0.07
DOXY+OL	0.78	0.2	0.78	0.07
DOXY+OL	6.25	1.2	1.56	0.3
TC+OL	1.56	0.3	0.78	0.07
OTC+LM	1.56	0.3	3.13	0.3
CFX+EM	1.56	0.2	1.56	0.2
CFX+OL	1.56	0.5	1.56	0.2
FF+EM	3.13	0.3	1.56	0.3

Table 3. Fractional inhibitory concentration (FIC) indices of combination of antibacterials against fish-pathogenic bacteria

Combination of Antibacterials	Fractional inhibitory concentration (FIC) index			
	<i>Vibrio anguillarum</i>	<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>Streptococcus</i> sp.	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
SNF+FF	-	0.51	-	-
SNF+OXA	-	0.6	-	-
OTC+FF	0.67	0.67	-	-
TC+FF	0.59	0.59	-	-
OTC+SPM	-	-	0.35	-
DOXY+SPM	-	-	0.8	-
TC+SPM	-	-	0.48	-
OTC+EM	-	-	0.35	-
OTC+OL	-	-	0.28	-
DOXY+OL	-	-	0.35	0.38
TC+OL	-	-	0.28	-
OTC+LM	0.29	-	0.29	-
CFX+EM	-	-	0.95	0.26
CFX+OL	-	-	0.27	0.45
FF+EM	-	-	-	0.29

실은 그들의 FIC 지수가 협동적 및 상승적 상호작용을 나타낸다는 사실을 잘 증명해 주었다.

Fractional inhibitory concentration (FIC) 지수
주요 어병 원인 세균에 대한 병용 항균제의

FIC지수를 Table 3에 표시하였다. DOXY+SPM과 CFX+EM은 *Streptococcus* sp.에 대하여 FIC지수가 각각 0.8 및 0.95를 나타내어 협동적 상호작용을 보인 것을 제외하면 나머지 병용 약제는 모두 상승작용을 나타내었다. 그리고 DOXY+SPM과 CFX+EM의 병용 항균제는 이들과 같은 계열의 다른 유효성분의 항균제와는 효과판정이 다르게 나타났다. DOXY+OL은 *Streptococcus* sp.에 대해서 FIC지수가 0.35, *S. epidermidis*에 대해서 FIC지수가 0.38로 비슷한 항균활성을 나타내었으며, OTC+LM도 *V. anguillarum*과 *Streptococcus* sp.에 대해서 FIC지수가 각각 0.29로 동일한 값을 나타내었다. 그러나 CFX+EM 및 CFX+OL은 *Streptococcus* sp.에 대해서 FIC지수가 0.95 및 0.27을 나타내었으나, *S. epidermidis*에 대해서는 FIC지수가 0.26 및 0.45로서 같은 병용 항균제이나 어병세균에 따라서 전혀 다른 FIC지수를 나타내었다.

고 찰

임상 약리학에서 살균성 약제+살균성 약제의 병용은 협동적 상호작용, 정균성 약제+정균성 약제의 병용은 상승적 상호작용, 그리고 살균성 약제+정균성 약제의 병용은 길항적 상호작용을 나타낸다고 한다(최, 1995). 따라서 본 연구에서는 이러한 항균효과가 예상되는 계열별로 일차적으로 감수성이 있는 약제를 선정하여 서로 짝을 지어 병용 항균제의 항균활성을 조사하였다.

당초 정균성 약제+정균성 약제의 상승적 상호작용은 예상한 결과를 잘 반영하였다(Table 3). 즉, 정균성 약제+정균성 약제의 계열인 TCs+MLs중에서 DOXY+SPM의 FIC지수가 0.8로 협동적 상호작용을 나타낸 것을 제외하면, 나머지 유효성분의 병용 항균제는 모두 높은 상승작용을 나타내었다. 그런데 살균성 약제+정균성 약제의 계열로 이루어진 짝인 QNs+NFs, QNs+TCs, QNs+MLs는 대부분 상승적 상호작용을 나타내어 일반적인 임상 약리학의 작용기전과 반대 결과를 보였다. 그러나 이러한 작용기전은 반드시 일치하는 것은 아니어서 살균적 약제+살균적 약제는 협동적 상호작용을 나타낸다고 하지만, neomycin+ABPC는 사용하지 않는 것이 바람직하다고 한다(최, 1995). 또한 살균

적 약제+정균적 약제는 길항적 상호작용을 나타낸다고 하지만 ABPC+sulfonamides(최, 1995), gentamycin+clindamycin은 모두 항균력이 증가하는 상승작용을 보인다고 한다(Eliopoulos and Moellering, 1991). 그리고 QNs+NFs인 nalidixic acid+nitrofurantoin은 병용 시 길항적 상호작용을 나타낸다고 하지만(최, 1995; Stockley, 1996), 본 연구에서 비슷한 계열인 QNs+NFs, QNs+MLs는 대부분 상승적 상호작용을 보여 반대의 결과였다.

한편 동일한 계열의 병용 항균제라고 하여도 유효성분에 따라서 병용 항균제의 *in vitro* 항균활성은 반드시 일치하지 않은 것으로 나타났다. 즉, TCs+MLs중에서 DOXY+SPM의 FIC지수는 0.8, QNs+MLs중에서 CFX+EM의 FIC지수는 0.95로 협동적 상호작용을 나타내어 상승적 상호작용을 보인 나머지 유효성분의 항균제와는 상당한 차이가 있었다. TCs+MLs중에서 DOXY+OL은 그람양성균인 *Streptococcus* sp.와 *S. epidermidis*에 대하여 거의 비슷한 FIC지수를 나타내었고, TCs+QNs의 병용 항균제 시험군에서도 그람음성균인 *V. anguillarum* 및 *E. tarda*에 대한 FIC지수가 비슷한 양상을 보였다. 그리고 OTC+LM은 서로 다른 그람음성균(*V. anguillarum*) 및 양성균(*Streptococcus* sp.)에 대하여 동일한 FIC지수를 나타내었다. 그러나 QNs+MLs중에서 CFX+EM은 그람양성균에 대하여 서로 다른 항균활성을 보였다. 이러한 결과가 어떠한 원인 때문인지 본 연구에서는 명확하게 정의를 내릴 수 없었으나, 무엇보다도 선정한 주요 어병세균의 수가 매우 적었으며, 감수성 약제만을 대상으로 하여 병용 항균활성을 조사하였기 때문에 앞으로 보다 면밀하게 검토되어야 할 것이다.

앞서 언급한 것처럼 현재 시판되고 있는 병용 항균제 가운데서 SPM+TC는 정균성 약제+정균성 약제로 상승효과가 예상된 것처럼 본 연구에서도 *Streptococcus* sp.에 대하여 상승효과가 증명되었다. 한편, EM+SDZ+TMP는 정균성 약제+정균성 약제로 상승효과가 예상되지만, 나머지 OTC+NM, SPM+AMX는 정균성 약제+살균성 약제로 길항효과가 예상된다. 그렇지만 이들 병용 항균제를 비롯하여 나머지 병용 항균제들이 어병 원인균에 대해서 동일한 상승작용을 하는 것인지, 금후 내성 항균제를 포함하여 다수의 어병세균을 대상으로 계

열별 FIC지수를 조사한다면 본 연구에서 밝혀지지 못한 의문점을 다소나마 해결할 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

- Eliopoulos, G.M. and Moellering, R.C.: Antimicrobial combinations, In: Antibiotics in laboratory medicine. 3rd ed., V. Lorian (ed.), Williams & Wilkins, Maryland, 432-492, 1991.
- Hamilton-Miller, J.M.T.: Rationalization of terminology and methodology in the study of antibiotic interaction. *J. Antimicrob. Chemoth.*, 15: 655-657, 1985.
- Holt, A. and Brown, D.: Antimicrobial susceptibility testing, In: Medical bacteriology: A practical approach, Chapter 7. Hawkey, P. M. and D. A. Lewis (ed.), Oxford University Press, Oxford, 167-194, 1989.
- Japanese Society of Chemotherapy: Revision of the standard method for MIC determination (established in 1968, previously revised in 1974). *Chemotherapy*, 29: 76-79, 1981 (In Japanese).
- Jung, S.H., Kim, J.W. and Sohn, S.G.: Comparison of detectable levels for screening residual antibacterial agents by bioassay. *J. Korean Fish. Soc.*, 32: 256-260, 1999 (In Korean).
- Kimura, T., Yoshimizu, M. and Wada, M.: 1983. *In vitro* antibacterial activity of the combination of sulphadiazine and trimethoprim on bacterial fish pathogens. *J. Fish Dis.*, 6: 525-532, 1983.
- Palmer, R., Kawai, K. and Kusuda, R.: *In vitro* activity of quinolone antibacterials against selected fish pathogens. *Gyobyo Kenkyu*, 27: 131-142, 1992.
- Samuelsen, O.B., Lunestad, B.T and Jelmert, A.: Pharmacokinetic and efficacy studies on bath-administering potentiated sulphonamides in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L. *J. Fish Dis.*, 20: 287-296, 1997.
- Schnick, R.A.: Chemicals for worldwide aquaculture. In: ADB/NACA (Eds.), Report on a Regional Study and Workshop on Fish Disease and Fish Health Management. ADB Agriculture Department Report Series No. 1. Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific, Bangkok, Thailand. 441-467, 1991.
- Stockley, I.H.: Drug interactions. 3rd ed. Blackwell Science, UK, 932 pp., 1996.
- Yoshmizu, M. and Kimura, T.: *In vitro* antibacterial activity of the combination of sulphamonomethoxin and ormetoprim on bacterial fish pathogens. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, 37: 38-49, 1986 (In Japanese).
- 이우주, 홍사석, 조규철, 김원준, 홍기환, 유경자, 차영남, 김경환, 이향우: 이우주의 약리학 강의. 선일문화사, 서울, 704 pp., 1990.
- 최상덕, 공용근, 이창훈, 최혜승, 백제민, 방인철: 해산양식어 질병과 대책. 국립수산진흥원 남해수산연구소 자료집 제 2호, 삼우사, 185 pp., 1996.
- 최준식: 약물상호작용과 약물동태학의 임상, 신일상사, 814 pp., 1995.

***In vitro* Antimicrobial Activity in Combination of Antibacterials Against Fish-pathogenic Bacteria**

Sung Hee Jung and Jin Woo Kim

Pathology Division, National Fisheries Research and Development Institute

Bacterial diseases with mixed infection have recently occurred at land-based flounder farms in Korea. Thus, single antibacterial is not effective for therapy of mixed bacterial diseases of fish because of their different causative bacteria. The purpose of the present study was to obtain basic data for positive usefulness of a combination of antibacterials used for synergism to mixed bacterial diseases of fish. Synergistic interaction in combination of antibacterials was determined by *in vitro* antimicrobial activity against selected fish-pathogenic bacteria, *Vibrio anguillarum*, *Edwardsiella tarda*, *Streptococcus* sp., *Staphylococcus epidermidis*, on the basis of Checkerboard assay using fractional inhibitory concentration (FIC) indices. Synergistic interactions were observed in combinations of (oxytetracycline HCL+lincomycin), (tetracycline HCL+florfenicol), (oxytetracycline HCL+florfenicol) against *V. anguillarum*, (sodium nifurstyrenate+florfenicol), (tetracycline HCL+florfenicol), (sodium nifurstyrenate+oxolinic acid), (oxytetracycline HCL+florfenicol) against *E. tarda*, (ciprofloxacin+oleandomycin), (oxytetracycline HCL+oleandomycin), (tetracycline HCL+oleandomycin), (oxytetracycline HCL+lincomycin), (oxytetracycline HCL+spiramycin), (oxytetracycline HCL+erythromycin), (doxycycline HCL+oleandomycin), (tetracycline HCL+spiramycin) against *Streptococcus* sp., and (ciprofloxacin+erythromycin), (florfenicol+erythromycin), (doxycycline HCL+oleandomycin), (ciprofloxacin+oleandomycin) against *S. epidermidis*.

Key words : Antibacterials, Combination, Minimum inhibitory concentration, Fractional inhibitory concentration, Fish-pathogenic bacteria