

제주산 양식넙치 (*Paralichthys olivaceus*)로부터 분리된 β -용혈성 연쇄구균 (β -*Streptococcus* spp.)의 특성

허문수⁺ · 송춘복 · 이제희 · 여인규 · 전유진 · 이정재
정상철 · 이기완 · 노 섬 · 최광식 · 이영돈*
제주대학교 해양생산과학부, *제주대학교 해양연구소

Characteristics of β -*Streptococcus* spp. Isolated in Cultured Flounder (*Paralichthys olivaceus*) of Jeju Island

Moon-Soo HEO⁺, Choon Bok SONG, Jehee LEE, In-Kyu YEO, You-Jin JEON, Jung-Jae LEE
Sang-Chul CHUNG, Ki-Wan LEE, Sum RHO, Kwang-Sik CHOI and Young Don LEE*

Faculty of Applied Marine Science, Cheju National University, Jeju-do 690-810, Korea

*Marine Research Institute, Cheju National University, Jeju-do 690-810, Korea

Streptococcus spp. of bacterial pathogen of fish were isolated from the cultured flounder (*Paralichthys olivaceus*) in fish farm of Jeju Island. Clinical signs of the infected flounder which are the most commons symptoms are as follows: erratic swimming, darkening of the body colour, unilateral or bilateral exophthalmia, corneal opacity, hemorrhages in the opercular and the bases of the fins, and the ulceration of the body surface. Biochemical characteristics of pathogenic fish *Streptococcus* spp. were gram positive, spherical form, catalase negative, oxidase negative and β -haemolytic, respectively. The viable cells counted from the tissue of the diseased flounder were the largest in the order of the ulcer, the kidney, the blood and the brain. The drugs used were ampicillin, ciprofloxacin, doxycycline, gentamycin, tetracycline, erythromycin, streptomycin and oxytetracycline. *Streptococcus* spp. were found to be sensitive to ampicillin, ciprofloxacin, doxycycline and gentamycin, but were resistant to tetracycline, erythromycin, streptomycin and oxytetracycline. The pathogenicity of *Streptococcus* spp. on the cultured flounder with an abdominal cavity injection was high. The haemolytic activity of the toxin against the sheep red blood cells reached the maximum after 30 min incubation at 37°C or 50°C. The toxin showed highest activity at pH 5.5~6.5.

Key words: *Streptococcus* spp., *Paralichthys olivaceus*, β -haemolytic

서 론

제주도의 넙치양식은 1986년부터 종묘생산기술개발을 계기로 육상양식이 시작되어 1997년 12월 말에는 5,500여톤을 생산하기에 이르렀다. 넙치양식 업체의 수도 최근에 와서 급격히 증가하고 있으며 시설규모도 소규모에서 대규모로 전환하는 경향이다. 또한 사육방법도 고밀도로 사육하는 경우가 많아 사육관리 부주의 등으로 각종 질병이 발생되고 있다 (Lee and Ha, 1991). 연쇄구균은 1873년 Lister에 의하여 처음으로 분리되어 *Bacterium lactis*로 보고된 것이 최초이다. 현재는 *Streptococcus lactis*에 해당하고 이후 1874년 Billroth에 의해 사람이나 동물의 화농창에서 분리되어 본균의 명칭의 시작이었고 이때부터 연쇄구균의 연구가 본격적으로 시작되어 120년 이상이나 되었다. 양식어에서의 연쇄구균에 의한 패혈증은 1957년의 일본의 시즈오카현의 무지개송어 (*Oncorhynchus mykiss*)에서 처음으로 발견되었으며 (Hoshina et al., 1958), 그 후 Robinson and Meyer (1966)는 어류에서 *Streptococcus* spp.를 분리하였고, 계속해서 연쇄구균에 의한 송어의 폐사 (Boomker et al., 1979), 미국, 남아프리카와 싱가포르의 경우 담수어류 양식에서 이 질병에 의한 보고가 있으며 (Kitao et al., 1981), 유럽산

범가자미에서의 연쇄구균의 분리 (Moreno et al., 1996), 우리나라에서도 양식넙치를 비롯하여 방어, 조피볼락 등에 폐사를 가져와 막대한 손실을 일으키고 있다 (Chun, 1989; Lee and Ha, 1991). 양식넙치의 세균성 질병에 있어서는 복합약제 내성균의 의한 감염이 많이 나타나므로 치료 및 예방대책을 세우는데 많은 어려움이 있는 실정이다. 본 연구에서는 제주도의 넙치 양식장에서 분리된 연쇄구균의 특성 및 연쇄구균에 의해 생성된 용혈소의 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 시험어

2000년 8월과 10월의 2회에 걸쳐 제주도 일원 넙치 육상 양식장을 대상으로 연쇄구균에 감염되어 증상을 나타낸 평균 체중 약 200g의 넙치를 연쇄구균의 분리용 시험어로 사용하였고 각 장기에서 균 분리를 시도하였다 (Table 1).

2. 세균검사 및 분리

방어의 환부, 신장, 간, 혈액 및 비장조직을 양식장 현장에서 1.5% NaCl이 첨가된 brain heart infusion agar (BHIA, Difco)에 무균적으로 도말하여 30°C에서 24~28시간 배양하였다. 분리균은 MacFaddin (2000)의 방법에 따라 생물학적, 생화학적 성상 시험을

이 논문은 2000년 두뇌 한국 21사업에 의하여 지원되었음.

⁺ Corresponding author: msheo@cheju.cheju.ac.kr.

Table 1. *Streptococcus* spp. strains isolated from diseased flounder, *Paralichthys olivaceus*

Date of isolation	Source	Organ of isolation	Strains
Aug. 21, 2000	Wimi, Jeju	Brain	MS-1
Aug. 21, 2000	Wimi, Jeju	Liver	MS-2
Oct. 4, 2000	Handong, Jeju	Kidney	MS-3
Oct. 4, 2000	Handong, Jeju	Blood	MS-4
Oct. 4, 2000	Handong, Jeju	Ulcer	MS-5

실시한 후, Bergey's manual of systematic bacteriology (1984)에 준하여 동정하였다.

3. 생균수 측정

병어의 환부, 간, 비장, 혈액 및 신장을 각 부위별로 1g 또는 1 mL씩 채취 및 homogenize하여 멸균해수로 10단계씩 희석시킨 후, 희석액 0.1 mL씩을 BHIA배지에 평판 도말하여 30°C에서 3일간 배양 후 생균수를 구하였다.

4. 약제 감수성 시험

병어에서 분리한 균의 약제 감수성 시험은 1.5% NaCl을 첨가한 BHIA에서 배양한 균을 멸균 생리식염수로 탁도를 MacFarland No. 0.5가 되게 조절하여 멸균 유리병을 이용하여 1.5% NaCl을 첨가한 Muller-Hinton medium (Difco, USA)에 균일하게 도말한 후, disc 확산법으로 실험하였다. 실험에 사용한 약제는 ampicillin (10 µg), ciprofloxacin (5 µg), doxycycline (30 µg), gentamycin (10 µg), tetracycline (30 µg), erythromycin (15 µg), streptomycin (10 µg) 및 oxytetracycline (30 µg)을 사용하였다.

5. 병원성 시험

병어의 환부에서 분리한 연쇄구균을 BHI배지에서 증균시켜 생리식염수로 현탁한 다음 2차례에 걸쳐 건강한 넙치 (전장 17~20 cm) 10마에 각각 1.2×10^9 cells/fish, 1.3×10^7 cells/fish 농도로 복강에 0.1 mL씩 주사하였고 대조구는 생리식염수를 0.1 mL씩 복강에 주사하여 300 L FRP 수조에 수용한 후 증상의 재현 여부를 통한 병원성을 확인하였다. 실험기간중 사료는 투여하지 않고 유수식으로 하였고 사육수온은 22~25°C로 유지하였는데 시험기간중 증상을 보이는 넙치로부터 균의 재분리를 실시하였다.

6. 용혈 활성 측정

배양균주는 pH 7.8로 조정된 5 mL의 Todd-Hewitt Broth (THB, Difco)에 접종하여 25°C에서 48시간 전배양하였고, 전배양액을 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS)을 첨가한 pH 7.0의 100 mL THB에 접종한 후, 25°C에서 20시간 진탕배양하였다. 배양액을 3,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 배양 상층액을 -20°C에 보존하였다. 용혈활성 측정은 다음과 같이 실시하였다. 배양 상층액에서 용혈 반응에 대한 배양 온도와 배양 시간에 대한 효과는 배양 상층액 1 mL와 2%의 양적혈구 부유액 3 mL를 생리식염수에서 혼합하였다. 4°C, 25°C, 37°C 혹은 55°C에서 배양한 후 그 혼합물

을 2,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 양 적혈구를 첨가하지 않은 배양 상층액의 세포 부유액을 대조 상층액으로 하여 용혈반응 현상을 측정하였다.

결 과

1. 감염어의 외부증상 및 발병상태

제주도 각 지역의 넙치 양식장에서 채취한 감염어의 임상적 증상은 감염어 개체마다 약간의 차이를 보이는데 이상 유영을 보이면서 체색 흑화, 안구 돌출, 각막의 백탁, 아가미와 지느러미 기저 부위의 출혈 및 체표에 궤양의 형성을 볼 수 있었다. 본 질병에 감염된 넙치 양식장의 일일 폐사율은 약 5~7% 정도로 나타났다.

2. 병원균의 분리

감염어의 뇌, 신장 등의 감염부위에서 분리한 균의 생화학적 성상 결과는 Table 2와 같다. 분리균의 형태는 연쇄상의 그람 양성 구균이었고 크기는 0.5 µm 내외였다. 운동성은 보이지 않았고, oxidase와 catalase는 음성이고 gelatine은 가수분해가 일어나지 않았으나 arginine은 가수분해가 일어났다. Indole, H₂S의 생성은 없었고, MR-VP시험에서는 MR에 양성을 보였고, VP에는 음성이었다. O-F시험에서는 발효특성을 나타내었고 용혈성 시험에서는 β-용혈성을 나타내었다. 분리된 5균주의 생화학적 특성은 동일하였다.

Table 2. Biochemical characteristics of the *Streptococcus* spp. isolated from diseased flounder, *Paralichthys olivaceus*

Characteristics	MS-1	MS-2	MS-3	MS-4	MS-5
Cell form	Spherical	Spherical	Spherical	Spherical	Spherical
Gram stain	+	+	+	+	+
Motility	-	-	-	-	-
O/F	F	F	F	F	F
Oxidase	-	-	-	-	-
Catalase	-	-	-	-	-
MR	+	+	+	+	+
VP	-	-	-	-	-
Indole	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-
Citrate	-	-	-	-	-
Hemolysis sheep blood	β	β	β	β	β
Gelatine	-	-	-	-	-
Arginine	+	+	+	+	+

3. 감염어의 부위별 생균수

감염어의 환부 및 각 장기별 생균수는 환부에서 1.7×10^7 CFU/g으로 가장 높게 나타났으며, 신장에서는 4.1×10^4 CFU/g, 혈액 3.2×10^3 CFU/g, 뇌 2.7×10^2 CFU/g 순이었다 (Fig. 1).

4. 약제 감수성 시험

8종의 항생제에 대한 감수성 시험결과에서는 ampicillin (10 µg),

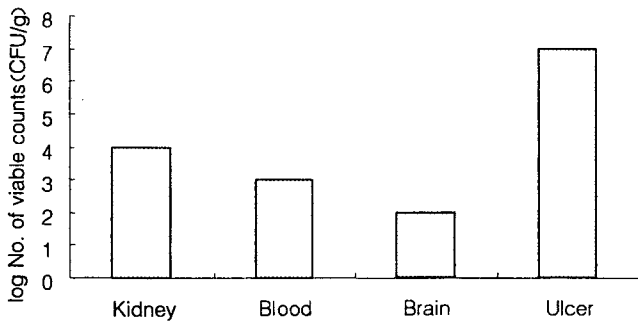


Fig. 1. Viable count of *Streptococcus* spp. in the tissue of diseased flounder, *Paralichthys olivaceus*.

ciprofloxacin (5 μ g), doxycycline (30 μ g), gentamycin (10 μ g) 등에 대해서는 감수성을 보였지만 tetracycline (30 μ g), erythromycin (15 μ g), streptomycin (10 μ g) 및 oxytetracycline (30 μ g)에는 내성을 보이는 것으로 조사되어 약제 내성이 있는 것이 많았다 (Table 3).

Table 3. Susceptibility of *Streptococcus* spp. strains isolated from diseased flounder, *Paralichthys olivaceus* to antibiotics

Antibiotics	Conc. (μ g)	Sensitivity
Ampicillin	10	S ¹⁾
Ciprofloxacin	5	S
Doxycycline	30	S
Gentamycin	10	S
Tetracycline	30	R ²⁾
Erythromycin	15	R
Streptomycin	10	R
Oxytetracycline	30	R

¹⁾ Susceptible, ²⁾ Resistant.

5. 병원성 시험

분리한 균주를 복강에 주사하여 10일간 병원성 시험한 결과에서는 복강내 주사후 시험 I에서는 6일째부터 폐사가 일어나기 시작하여 10일 이내에 전량 폐사되었고 시험 II에서도 3일째부터 폐사가 시작되어 10일 이내에 전량 폐사되었다. 대조구에서는 폐사가 일어나지 않았고, 또한 폐사어에서 본 균을 분리할 수 있었다 (Fig. 2).

6. 용혈소의 특징

용혈반응에 대한 배양온도와 배양시간에 대한 효과는 Fig. 3과 같다. 50 $^{\circ}$ C, 30분 배양 후의 용혈활성은 빠르게 증가되어 최대값에 도달하였다. 50 $^{\circ}$ C, 30분 배양후의 활성은 37 $^{\circ}$ C, 30분 배양후의 최대값의 97.5%이었다. 60분과 90분에서는 활성이 감소되었다. 25 $^{\circ}$ C, 30분간의 배양에서는 활성 최대값이 다른 온도에서 비교하여 25.6, 93.7과 96.7%이었다. 4 $^{\circ}$ C, 30분의 배양후는 14.7%이었고 배양시간이 60분과 90분에서는 활성값이 미약하게 증가됨을 볼 수 있었다. 용혈독소에 대한 온도 안정성에 관한 결과는 Fig. 4와 같다. 독소는 60 $^{\circ}$ C, 10분에서 52%로 급격하게 불활성화가 되었다가 또한 더 많

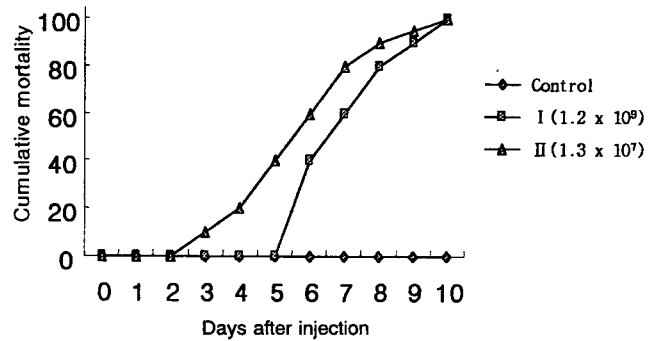


Fig. 2. Pathogenicity of *Streptococcus* spp. on the cultured flounder, *Paralichthys olivaceus*, by abdominal cavity injection.

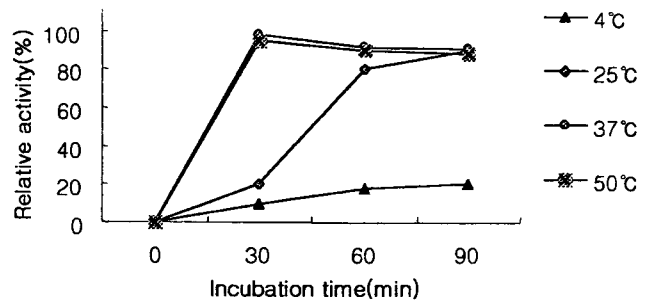


Fig. 3. Effect of incubation temperature on haemolytic reaction. Relative activity was represented in percentages to the value at 37 $^{\circ}$ C for 30 min (maximum).

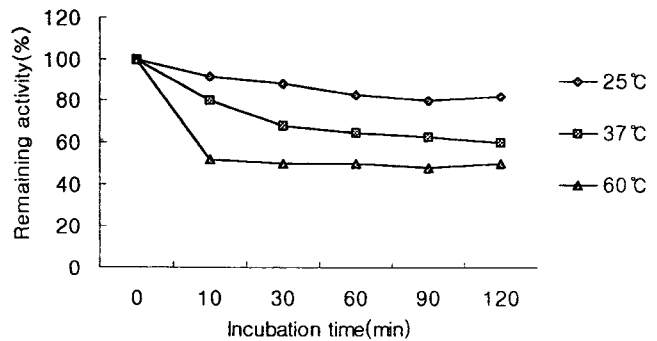


Fig. 4. Thermostability of haemolytic activity of *Streptococcus* spp.

은 시간의 노출에 점진적으로 불활성화가 진행되었고 120분 후에는 40.6%의 활성을 보였다. 용혈활성에 대한 pH의 효과는 Fig. 5와 같다. 활성은 pH 5.5에서 6.5의 범위에서 높았다.

고찰

감염어의 임상적 증상은 이상유증을 보이면서 체색 흑화, 안구 돌출, 각막의 백탁, 아가미와 지느러미 기저부위의 출혈 및 체표의 껍양 등을 볼 수 있었다. 이러한 결과는 Chun (1989)의 보고와 일치하지만, 본 감염어에서는 기저부위의 출혈이 다소 심한 특징

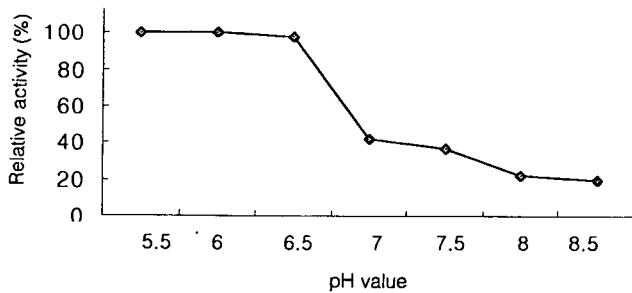


Fig. 5. Effect of pH on haemolytic activity of *Streptococcus* spp. Relative activity was represented in percentages to the value at the pH 5.5.

을 보였다. 감염 넙치에서 분리된 균주의 형태는 연쇄상의 구균이었으며, gram 양성으로 운동성이 없었다. Indole 및 H₂S는 생성되지 않았고 VP시험에서는 음성을 나타내었다. 면양 적혈구의 용혈성 시험에서는 β형을 나타내었다. 분리한 연쇄구균은 특징에 따라 α, β, γ의 3형으로 구분되었다. 병어에서는 α, β형이 많이 분리되며 간혹 γ형도 분리된다. α형은 토끼, 양, 막의 적혈구를 첨가한 평판배지에서 부분용혈을 일으켜 용혈된 부분 중심으로 녹색환을 형성한다. 이에 반하여 β형은 첨가된 적혈구를 완전히 용혈시켜 투명한 부분이 형성되며 용혈성이 강하다. 반면 γ형은 첨가시킨 적혈구를 전혀 용혈시킬 수 없는 비용혈성이다. 위의 생화학적 결과는 Pier and Madin (1976)와 Lee (1991)가 보고한 시험결과와 일치함을 볼 수 있어 *Streptococcus* spp.로 명명하였다. 각 장기에서의 생균수 측정에서는 환부에서 1.7×10⁷ CFU/g으로 가장 높게 나타났고, 신장, 혈액, 뇌순으로 생균수가 검출되었다. 이는 Sohn et al. (1995)이 넙치에서 *Vibrio* sp.에 감염된 각 조직에서 검출된 것과 유사한 결과를 보여주고 있으나 균수에서 차이를 보이고 있고 이는 감염 부위가 어느 곳에서 시작되는가와 감염균의 감염장기에서의 서식조건에 기인한 것으로 여겨진다. 또한 비장에서 본 균이 검출되지 않았는데, 이것은 감염개체수가 적어 분리되지 않은 것으로 유추할 수 있다. 자연 감염된 정어리에서 각 장기와 혈액에서 병원균이 분리되었는데 신장과 비장에서 10⁶~10⁷ CFU/g 연쇄구균이 분리되었고 장관과 혈액에서 10⁵~10⁷ CFU/g, 간장에서 10⁴~10⁵ CFU/g가 검출되어 (田, 2000) 본 연구에서는 상대적으로 적은 양의 연쇄구균의 검출율을 보였다. 이는 감염 어체의 감염 정도와 실험 개체수 및 실험 환경 조건에 기인한 것 같다. 약제 감수성 시험에서는 ampicillin (10 μg), ciprofloxacin (5 μg), doxycycline (30 μg), gentamycin (10 μg)에서 감수성을 보였고 tetracycline (30 μg), erythromycin (15 μg), streptomycin (10 μg) 및 oxytetracycline (30 μg)에는 내성을 보였다. 이는 Lee and Ha (1991)가 erythromycin (15 μg)에 감수성을 보였든 것과 다른 결과를 나타내었는데 이는 아마도 10년간 항생제의 과다투여로 인한 내성에 기인한 것으로 여겨지며 넙치 양식장의 항생제 사용에 세심한 주의가 요구되고 있다. 병원성 시험에서는 시험 I 과 II에서 10일 이내에 전량 폐사되었는데 II 시험에서는 폐사가 빨리 시작되었지만 최종폐사는 거의 같았다. 이는 개체수와 개체의 특성 및 감염균의 병원성과 상관이 있는 것으로 여겨진다. 연쇄구균에

의해 생성된 용혈소는 세균의 중요한 병원성인자로 잘 알려져 왔다 (Eijiro et al., 1991). 대표적인 용혈소인 streptolysin S (SLS)는 혈액용해성 용혈소로 알려져 있는데 이는 Lancefield의 A, C와 G 그룹 연쇄구균에 의해 생성된 것이다 (Weld, 1934). 또 다른 streptolysin O (SLO)는 Lancefield의 A, B, C와 G 그룹에 의해 생성된 것이다 (Todd, 1938). 본 연구에서 분리된 β-용혈성 연쇄구균의 용혈소에 대한 특성은 50°C, 30분 배양후의 용혈활성은 빠르게 증가되었고 최대값에 도달하였다. pH에 대한 용혈소의 활성은 pH 5.5~6.5 사이에서 활성이 높았다. 배양시간과 온도 및 pH에 대한 활성 값은 Kawahara et al. (1991)이 방어에서 분리한 β-haemolytic *Streptococcus* spp.에서 보여준 값과 거의 일치함을 볼 수 있었다.

요 약

2000년도 2회에 걸쳐 제주도 일원 넙치 양식장을 대상으로 감염어에서 분리된 연쇄구균에 대한 특성시험 결과를 요약하면 다음과 같다.

감염어로부터 분리된 연쇄구균은 형태적으로 연쇄상의 gram 양성 구균이었고, catalase와 oxidase에 음성이었으며, 용혈성 시험에서는 β-용혈성을 나타내었다. 감염어에서 각 장기별 생균수에서는 환부, 신장, 혈액 그리고 뇌순으로 연쇄구균이 검출되었다. 약제 감수성에서는 ampicillin, ciprofloxacin 등에 감수성이 있었지만 erythromycin 등에는 감수성이 없었다. 복강에 주사하여 병원성 시험을 한 결과 10일 이내에 전량 폐사하는 강한 병원성을 보였다. 감염균의 용혈성에 대한 특성은 50°C, 30분의 배양에서 용혈활성이 빠르게 증가되어 최대값에 도달되었고 또한 pH 5.5~6.5에서 높은 활성값을 보였다.

참 고 문 헌

- Bergey. 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology. Willams and Willkins. The third edition.
- Boomker, J., G.D. Imes, C.M. Camerson, T.W. Naude and H.J. Schoonbee. 1979. Trout mortalities as a result of *Streptococcus* infection. J. Vet. Res., 46, 71~78.
- Chun, S.K. 1989. A streptococcal disease of freshwater fish. J. Fish. Pathol., 2, 31~36.
- Moreno, M., D. Collins and L. Dominguez. 1996. *Streptococcus* in cultured turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), associated with *Streptococcus parauberis*. J. Fish. Dis., 19, 33~38.
- Eijiro Kawahara., S. Hiroshi, N. Setsuao and K. Riichi. 1991. Properties of hemolysin produced by β-haemolytic *Streptococcus* sp. isolated from yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). Fish Pathol., 26, 177~181.
- Hoshina, T., T. Sano and R. Morimoto. 1958. A *Streptococcus* pathogenic to fish. J. Tokyo Uni. Fish., 44, 57~68.
- Kawahara, E. and R. Kusuda. 1987. Direct fluorescent antibody technique for differentiation between alpha and beta-haemolytic *Streptococcus* spp. Fish Pathol., 22, 77~82.
- Kitao, T., T. Aoki and R. Sakoh. 1981. Epizootic caused by β-

- haemolytic *Streptococcus* species in cultured freshwater fish. *Fish Pathol.*, 15, 301~307.
- Lee, C.H. and D.S. Ha. 1991. A streptococcal disease of cultured flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J. Fish. Pathol.*, 4, 71~77.
- MacFaddin, J.F. 2000. Biochemical test for identification of medical bacteria. Lippincott willams and willkins, Third edition.
- Pier, G.B. and S.H. Madin. 1979. *Streptococcus iniae*, a beta-hemolytic *Streptococcus* isolater from an Amazon freshwater dolphin, *Inia geoffrensis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 26, 545~553.
- Robinson, T.A. and F.P. Meyer. 1966. Streptococcal fish pathogen. *J. Bacteriol.*, 92, 512~520.
- Sohn, S.G., M.A. Park and S.D. Lee. 1995. Study on the ulcer disease of cultured flounder, *Paralichthys olivaceus*. Technical Report National Fisheries Reserch and Development Agency, 122, 63~77.
- Todd, E.W. 1938. The differntiation of two distinct serological varieties of streptolysin O and streptolysin S. *J. Path. Bacteriol.*, 47, 423~445.
- Weld, J.T. 1934. Toxic properties of serum extracts of haemolytic streptococci. *J. Exp. Med.*, 59, 83~95.
- 田世圭. 2000. 海産魚類 疾病. 韓國水産新報社, 71~77.

2001년 4월 11일 접수

2001년 6월 23일 수리