

## 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Region을 이용한 어류 병원성 *Streptococcus iniae*의 분자생물학적 동정

정용욱 · 강봉조\* · 박근태 · 허문수<sup>†</sup>

제주대학교 해양과학대학 해양과학부, \*제주도해양수산자원연구소

## Use of 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Region for Identification in the Fish Pathogenic *Streptococcus iniae*

Yong-Uk Jung, Bong-Jo Kang\*, Geun-Tae Park and Moon-Soo Heo<sup>†</sup>

<sup>†</sup>Faculty of Marine Science, Cheju National University, Jeju, 690-816

\*Jeju Province Fisheries Resources Research Institute, Jeju 699-814

This study was performed for the identification of *Streptococcus* sp. from cultured flounders (*Paralichthys olivaceus*) showing streptococcosis in the Jeju island. We isolated 10 strains of *Streptococcus iniae* from the cultured olive flounders with streptococcosis. Isolated strains were identified in *S. iniae* since they have formed the expected band through performing PCR assay using specific primers, Sin-1 (5'-CTA-GAGTACACATGTACT(AGCT)AAG-3') and Sin-2 (5'-GGATTTTCCACTCCCATTAC-3'). In addition to 16S-23S rRNA intergenic spacers (ISR), operon structure of isolated strains showed that all strains had three 16S-23S rRNA ISR band patterns. The 16S-23S rRNA ISR sequence of isolated strains showed 96% sequence identity with *S. iniae* (GenBank accession number AF 048773). This paper is the first report that *S. iniae* is associated with streptococcosis of olive flounder in Korea.

**Key words:** Streptococcosis, Olive flounder, Species-specific primer, 16S-23S rRNA intergenic spacers (ISR).

어류에서 발병되는 연쇄구균증은 우리나라를 비롯하여, 전 세계적으로 해수 및 담수산 양식어류의 대량폐사를 일으키는 중요 질병이다. 본 질병의 병원체는 전 세계 25종의 양식어종에서 *Streptococcus difficilis*, *S. agalactiae*, *S. iniae*, *S. parauberis*, *S. equi*, *S. equisimilis*, *S. faecium*, *S. pyogenes*, *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*, *Lactococcus garvieae* 등과 같은 다양한 병원체가 본 질병에 관여하는 것으로 보고되었다 (Austin and Austin, 1999).

*S. iniae*는 주로 고수온기에 발병하여 높은 경제적 손실을 가져오는 대표적인 연쇄구균증 병

원체로 알려져 있으며, 주 증상으로는 뇌수막염과 전안구염(안구돌출)이 관찰되어지고 있다. 또한 틸라피아 (*Oreochromis niloticus*), 송어 (*Oncorhynchus mykiss*), 은어 (*Plecoglossus altivelis*), 잉어 (*Cyprinus carpus*), 넙치(*Paralichthys olivaceus*) 등 다양한 어종에서 본 병원체에 의한 감염이 보고되고 있다 (Bercovier et al., 1997; Eldar et al., 1995; Nguyen et al., 1999).

Nagatsugawa (1983)는 일본산 넙치의 연쇄구균증 병원체로서 *S. iniae*를 최초로 보고하였고, 이후 *S. iniae*에 대한 선택배지 개발 연구 (Nguyen and Kanai, 1999), 감염경로 추적을 위한

<sup>†</sup>Corresponding Author : Moon-Soo Heo, Tel : 064-754-3473,  
Tel : 064-756-3493, E-mail : msheo@cheju.ac.kr

생태학적 연구 (Nguyen *et al.*, 2002) 등 본 병원체를 제어하기 위한 기초적 연구가 진행되고 있다. 반면에 지리적으로 일본의 인접국인면서 동일 종의 양식넙치(*P. olivaceus*)를 생산하고 있는 우리나라의 경우 *S. iniae*에 대한 자세한 보고가 이루어지지 않고 있다.

국내에서 어류의 연쇄구균증과 관련된 병원체 동정 연구는 이 등 (2001)에 의해 연쇄구균증 증세를 보이는 양식넙치를 대상으로 연쇄구균을 분리하여 생화학적 성상, 혈청학적 성상 및 16S ribosomal RNA gene 중 종 특이서열을 기초로 하여 *L. garvieae*를 동정하였다. 그러나 Aoki 등 (2000)은 *L. garvieae*의 16S rRNA 서열이 근연속이나 근연종인 *S. agalactiae*, *S. bovis*, *S. canis*, *S. equi*, *L. lactice*, *L. piscium*, *Lactobacillus. plantarum*의 서열과 90% 이상의 상동성을 보여, 16S rRNA를 이용한 종 특이적 primer에 의한 종 동정은 적절하지 않을 수 있다고 하였다. 따라서 이를 보완하는 한 방법으로서 Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) 기법을 이용한 어류 병원성 세균에 대한 분자유전학적 동정에 관한 연구 결과가 다수 보고되고 있으며, 특히 송 등은 (2003)은 연쇄구균증을 보이는 병어에서 분리한 *Streptococcus* sp.의 생화학적 성상을 기초로 하여 *S. pyogenes*, *E. faecalis*등을 동정하고, 이를 토대로 RAPD profile 연구를 통해 분자생물학적 동정을 시도하였다. 그러나 기존에 보고된 표준균주와 RAPD band pattern이 상이하어 어류 병원성 *Streptococcus* sp.에 대한 많은 RAPD profiling 연구가 필요할 것으로 보고하였다.

미생물 동정의 한 부류인 분자생물학적 동정 방법은 표현형에 근거한 동정 방법이 가진 여러 단점 즉, 미생물의 생리상태, 실험 조건 및 계통 발생학적 다양성에 의한 동정 오류를 보완할 수 있는 방법으로서 유용하게 사용되어지고 있다. 하지만 지금까지 미생물 동정에 있어 보편적으로 사용되어진 16S rRNA gene 서열은 일부 종간 비교에 있어 유사성이 매우 높아 종간 비교에 적합하지 않은 것으로 알려지고 있다.

따라서 보다 정확한 세균 종 동정을 위해 ribosomal RNA operon 중, 16S rRNA gene 서열보다 염기치환률이 빠른 16S-23S rRNA intergenic spacer region (ISR)을 이용하는 방법이 도입되었다. ISR은 종간 및 종내 비교를 위한 적절한 영역으로 인정받고 있으며, 16S-23S ISR 서열과 길이 다양성이 이용되고 있다 (Jensen *et al.*, 1993; Nagpal *et al.*, 1998).

이러한 동정 기법은 다양한 근연종 또는 근연속을 가지는 연쇄구균증 원인 세균의 동정에 효과적으로 사용될 수 있을 것으로 사료된다. 따라서 본 연구에서는 제주도 양식넙치에서 분리된 어류 병원성 연쇄구균을 생화학적 성상, 16S rRNA gene 및 ISR을 이용하여 동정한 결과를 비교 검토하여 ISR에 의한 신속 정확한 종 동정 기법에 대한 방법을 제시하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시험균주의 분리와 참고균주

본 연구에 사용된 균주들은 제주도 육상양식장이 밀집한 동부 해안을 중심으로 6곳을 선정하였고 체색흑화, 안구돌출 및 출혈, 안구백탁, 복벽 출혈, 장 발적 등의 전형적인 연쇄구균증을 나타내는 12 - 52 cm의 양식넙치(*P. olivaceus*)를 실험 재료로 사용하였다. 시험균주의 분리는 신장에서 1.5% NaCl이 첨가된 BHIA (Brain Heart Infusion Agar, Difco Co.)와 혈액배지를 사용하여 28°C, 48시간 배양하여 순수 분리하였다. 분리된 균주의 형태와 운동성을 관찰하기 위해, 1.5% NaCl이 첨가된 BHIB (Brain Heart Infusion Broth, Difco Co.) 배지에서 28°C, 18 - 48시간 배양하였고, Gram 염색 후 광학현미경 (OLYMPUS BX50, × 1000)에서 관찰하여 연쇄상의 형태를 확인하였다. 또한 oxidase와 catalase-test를 수행하여 결과가 모두 음성인 균주를 본 실험에 사용하였다. 참고균주는 *S. pyogenes* KCTC-3096, *S. sp.* KCTC-3098, *S. iniae* KCTC-3657, *L. garvieae* KCTC 3772를 사용하였다 (Table 1).

**Table 1.** Streptococcal strains used in this study

strain		origin			
classification	designation	Host	organ	Region	Year
Reference strains	KCTC*-3096	Human	-	-	-
	KCTC-3098	Human	-	-	-
	KCTC-3657	amazon fresh water dolphin	-	-	-
	KCTC-3772	Human	-	-	-
Tested strains	S-3	Olive flounder	kidney	Taeheung	2003
	S-4	Olive flounder	kidney	Sincheon	2003
	S-5	Olive flounder	kidney	Sincheon	2003
	S-23	Olive flounder	kidney	Wimi	2003
	S-28	Olive flounder	kidney	Taeheung	2003
	S-41	Olive flounder	kidney	Wimi	2003
	S-50	Olive flounder	kidney	Sehwa	2003
	S-58	Olive flounder	kidney	Sehwa	2003
	S-88	Olive flounder	kidney	Wimi	2003
	S-95	Olive flounder	kidney	Sincheon	2003

KCTC\*: KCTC-3096, *S. pyogenes*; KCTC-3098, *Streptococcus* sp.;  
KCTC-3657, *S. iniae*; KCTC-3772, *L. garvieae*.

### 생화학적 동정

API 20 Strep kit (bioMerieux, France)를 이용한 동정방법은 제조회사의 조작법에 따라 균주를 접종하여 4시간과 24시간 후의 성상을 관찰하였고, 5% sheep blood가 첨가된 Blood Agar Plate (KOMED Co.)에 5% CO<sub>2</sub>, 36°C 48시간 배양 후 용혈성 판정 결과를 토대로 하여 APILAB identification system (APILAB PLUS, V 3-3-3, bioMerieux, France)으로 분석하였다.

### Genomic DNA의 분리

Genomic DNA는 Promega DNA preparation kit (Promega Co., USA)를 사용하여 분리하였다. BHIB에서 배양한 균주를 4,000 rpm으로 5분간

원심분리한 후 50 mM EDTA, lysozyme (10 mg/ml)을 첨가하여 37°C, 30분간 정치하였다. cell을 lysis하기 위해 원심분리한 후 상정액을 제거하고 nuclei lysis 용액 600 µl에 현탁시켰고 80°C에서 5분간 정치하였다. 이후 RNase 용액 (4 mg/ml)을 3 µl를 첨가하고 교반하여 37°C에서 30분간 처리하였다. 용출되어진 DNA 수용액을 얻기 위해, protein precipitation 용액 200 µl를 첨가하고 교반하여 0°C에서 5분간 방치하였고, 14,000×g에서 5분간 원심분리후 ethanol 침전법으로 DNA를 침전하여 분리하였고, 1% agarose gel 상에서 전기영동하여 genomic DNA를 확인하였다.

### Primer의 제작 및 반응조건

*S. iniae*의 동정을 위한 primer는 Zlotkin *et al.* (1998)이 16S rRNA region에서 디자인 한 primer를 사용하였으며 (Table 2), 염기서열 분석을 위한 16S-23S rRNA ISR amplification primer는 현재 어류 연쇄구균증을 일으키는 각 병원체들의 16S rRNA gene 영역의 말단서열과 23S rDNA 영역의 선두서열을 GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov)에서 조사하여 각 영역에서 중간 변이 없이 보존된 공통서열을 기초로 하여 디자인하였다 (Fig. 1).

PCR에 의한 유전자 증폭을 위해 template

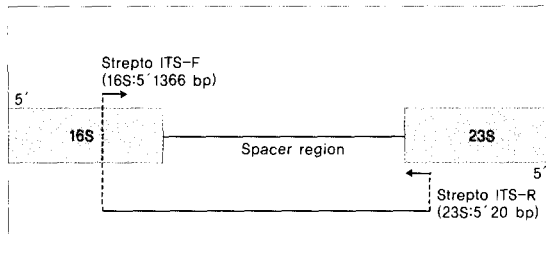


Fig. 1. *Streptococcus* sp. 16S-23S rRNA intergenic spacer region (ISR) PCR primer design scheme.

DNA 100 ng, 각 primer(20 pmol) 0.75  $\mu$ l, 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  $\mu$ g/ml BSA) 2.5  $\mu$ l, 2.5 mM dNTP 2  $\mu$ l, Taq polymerase (0.5 unit) 0.5  $\mu$ l를 각각 넣고 증류수를 첨가하여 최종 volume을 25  $\mu$ l가 되게 하였다.

### 16S-23S rRNA intergenic spacer region (ISR)의 염기서열 분석

16S-23S rRNA ISR 염기서열 분석을 위해 각 PCR 반응산물을 MagExtractor-PCR & Gel clean up kit (TOYOBO Co., Japan)를 사용하여 정제하였다. 즉 1.5% agarose gel상에서 major band를 절취하고 흡착액 400  $\mu$ l를 첨가하여 gel을 용해시켰다. 이후 magnetic bead 30  $\mu$ l를 PCR 반응산물과 반응시키고 세정액과 75% 에탄올을 차례로 넣어 세정 후 증류수를 첨가하여 순수한 PCR 반응산물을 얻었다.

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

Table 2. Oligonucleotide primers and PCR programs for amplification of *S. iniae* specific parts of 16S rRNA gene and amplification of 16S-23S rRNA intergenic spacer region (ISR)

Primer	Gene position	Use	Sequence	PCR program
Sin-1	16S	<i>S. iniae</i> specific PCR	5'-CTAGAGTACACATGT ACT(AGCT)AAG-3'	1 <sup>a</sup>
	rRNA			
Sin-2	16S	<i>S. iniae</i> specific PCR	5'-GGATTTTCCACTCCC ATTAC-3'	1 <sup>a</sup>
	rRNA			
Strepto ISR-F	16S-23S	Nonspecific 16S-23S PCR	5'-TTGTACACACCGCCC GTCA-3'	2 <sup>b</sup>
	ISR			
Strepto ISR-R	16S-23S	Nonspecific 16S-23S PCR	5'-CATCCACCGTGCGCC CTTAT-3'	2 <sup>b</sup>
	ISR			

<sup>a</sup>: (94°C 60 s, 55°C 60 s, 72°C 60 s)  $\times$  30 cycles.

<sup>b</sup>: (94°C 45 s, 57°C 45 s, 72°C 45 s)  $\times$  30 cycles.

## 결과 및 고찰

### 연쇄구균의 분리 및 표현형에 의한 동정

본 연구에서 사용된 시험균주는 모두 전형적인 연쇄구균증을 나타내는 병어에서 분리하였으며, 그람양성의 구균으로 운동성이 없고, catalase, oxidase test에 음성이며,  $\alpha$ -용혈성을 나타내었다.

API strep 20 system을 이용한 생화학적 성상은

시험균주 전부와 참고균주로 사용된 *S. iniae* (KCTC 3657)가 거의 일치하였다. 또한 Colorni *et al.* (2002)이 유럽산 sea bass와 틸라피아 등에서 분리하여 생화학적, 분자생물학적 종 동정 연구를 통해 보고한 병원성 *S. iniae*가 가진 API 20 strep system의 생화학적 성상을 인용하여 비교해 본 결과와도 높은 유사성을 보였다. 그러나 시험균주들과 참고균주 *S. iniae* (KCTC 3657)의 생화학적 성상을 판독해 본 결과 ID No.

**Table 3.** Biochemical profile of KCTC strains and strains isolated from olive flounder with streptococcosis in cheju

API 20 strep system	<i>S. pyogenes</i>	<i>Streptococcus sp.</i>	<i>L. garvieae</i>	<i>S. iniae</i>	<i>S. iniae</i> *	Tested strains
	KCTC 3096	KCTC 3098	KCTC 3772	KCTC 3657		
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	$\beta$	$\beta$	$\gamma$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$

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

(±)\*: weak reaction.

4563113으로 API strep 20 system에 의한 동정이 이루어지지 않았다 (Table 3). 따라서 본 분리균주 및 *S. iniae* (KCTC 3657)의 신속, 정확한 종 동정 방법이 필요하였다.

### 연쇄구균의 계통발생학적 분류

*S. iniae*의 16S rRNA gene 서열에 특이적인 primer에 의한 PCR-assay법 (Zlotkin *et al.*, 1998)을 수행해 본 결과 시험균주와 참고균주 *S. iniae* (KCTC 3657) 모두 동일하게 예상되었던 약 300 bp의 증폭 산물을 나타내었다. 또한 Aoki 등 (2000)이 보고한 16S rRNA gene의 종특이적 primer가 근연속이나 근연종의 16S rRNA gene과 높은 상동성으로 인해 비특이적 PCR 반응 산물을 나타낼 수 있는 현상은 본 연구에서는 관찰되지 않았다 (Fig. 2). 그러나 국내 어류의 연쇄구균증에 관련된 병원체의 종 조성 자체가 명확히 보고된 바가 없기에 시험 균주들에 대한 명확한 동정이 요구되었다.

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

시험균주의 명확한 종 동정을 위하여 16S-23S ISR band pattern을 확인해본 결과 약 700 bp, 520 bp, 340 bp로 3개의 ribosomal RNA operon을 모두 동일하게 가지고 있는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 참고균주 *S. iniae* (KCTC 3657)의 경

우 약 520 bp의 단일 ribosomal RNA operon이 확인되었다 (Fig. 3). Berridge 등(1998)에 의하면 16S-23S ISR 영역에서 *S. iniae* 종 특이 진단 primer 개발을 위해 연쇄구균에 감염된 환자에서 분리한 *S. iniae*의 16S-23S ISR 영역을 분석해 본 결과, 대부분의 strain이 약 550 bp의 단일 ribosomal RNA operon이 확인되었으나 일부 strain의 경우 550 bp, 390 bp로 2개의 ribosomal RNA operon을 나타내었다고 보고하였다.

생화학적 성상 및 16S rRNA gene에 의해 *S. iniae*로 확인된 시험균주 group과 참고균주의 16S-23S ISR band pattern 중 major band의 염기서열을 분석하였다. 525 bp의 염기서열 내에 한 개의 tRNA<sup>Asp</sup> gene을 가지고 있었으며, 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. 4). 상기의 결과를 종합할 때 본 연구에서 분리된 균주들은 *S. iniae*로 동정되었다.

따라서 제주도내의 연쇄구균증 양식넙치(*Paralichthys olivaceus*)에서 분리된 병원성 세균은 *S. iniae*으로 동정되었으며, 생화학적 성상과 분자유전학적 특징이 일치하는 결과를 보여 연쇄구균증의 진단을 위한 기초자료로서 활용이 가능하리라 생각된다.

Fig. 2. 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. 3. 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.

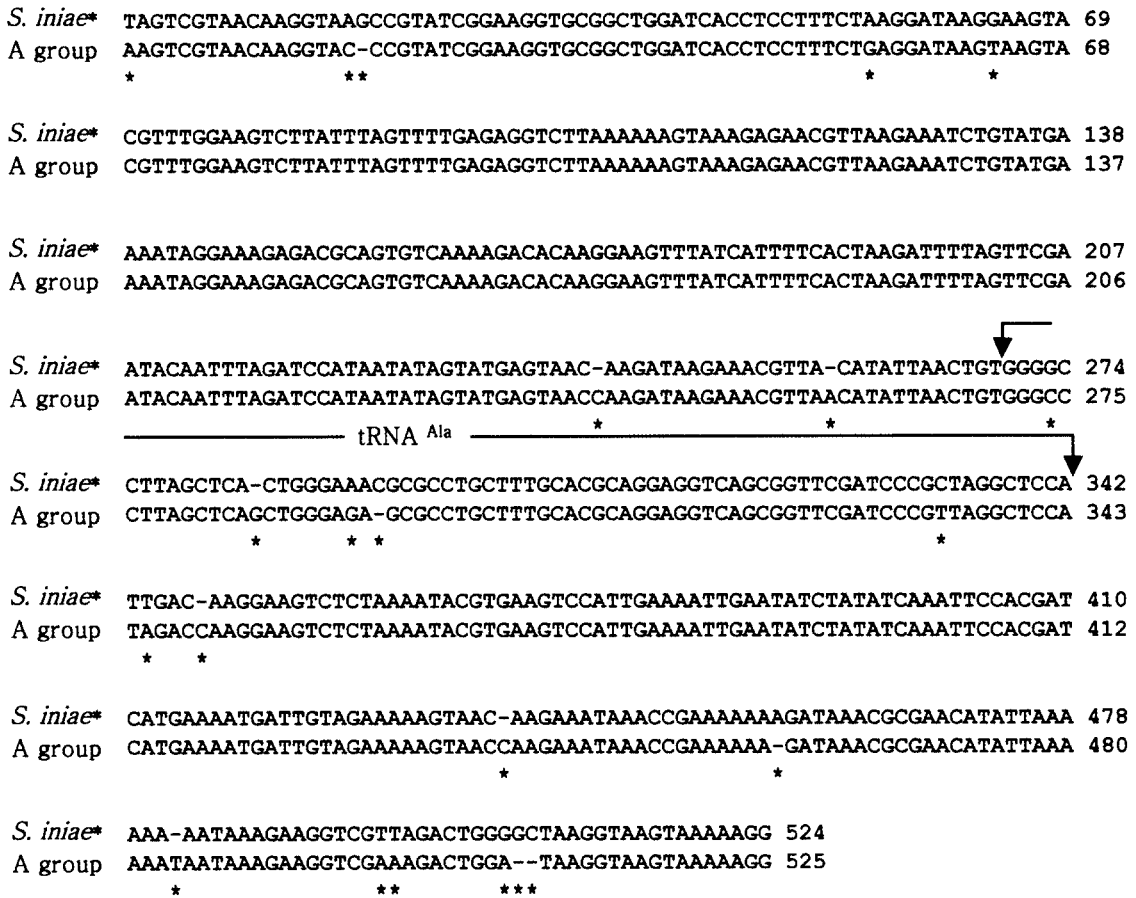


Fig. 4. 16S-23S rRNA ISR nucleotide sequences of *S. iniae* (GenBank accession number AF 048773) and isolated strains which were included *S. iniae* group (A group).

그러나 어류에서 발병하고 있는 연쇄구균증은 이외에도 다수의 원인균이 보고 되고 있어 생태학적 분포 및 온도 등의 생육 환경에 대한 폭넓은 연구를 통해 다양한 병원성 연쇄구균의 분리 및 동정 연구가 필요할 것으로 사료되며 이러한 차후 실험에 본 연구 결과가 유용히 활용될 수 있을 것이다.

### 요 약

본 연구의 목적은 국내 어류 연쇄구균증 병원체 동정에 있어서 *Streptococcus iniae*에 대한 구체적인 국내 연구 보고가 없어, 기존에 수행되고 있는 동정방법을 근간으로 16S-23S intergenic

spacer region (ISR)의 염기서열을 분석하여 보다 명확한 동정을 실시하고자 하였다. API 20 strep system에 의한 생화학적 성상을 분석해본 결과 정확한 종 동정은 이루어지지 않았지만 기존의 연구에서 보고된 API 20 strep system에 의한 *S. iniae*의 생화학적 성상과 높은 유사성을 보이는 10균주를 분리할 수 있었다. *S. iniae* 16S rRNA gene 서열 유래 종 특이적 primer Sin-1 5'-CTA-GAGTACACATGTA(AGCT)AAG-3'와 Sin-2 5'-GGATTTTCCACTCCCATTAC-3'에 의한 PCR-assay 결과 시험균주 10 균주 모두 동일하게 약 300bp의 증폭산물이 관찰되었고, 비 특이적인 반응은 관찰되지 않았다. 시험균주 모두 3개의 16S-23S ISR operon 구조가 관찰되었으나

*S. iniae* 표준균주 (KCTC 3657)의 경우 단일 구조가 관찰되었다. 16S-23S intergenic spacer region (ISR)의 염기서열을 분석해본 결과 기존에 보고된 *S. iniae* (Genbank accession number AF048773)와 96%의 상동성을 보였으며 전체서열에서 상동성을 보이는 근연종이나 근연속은 검색되지 않아 최종적으로 *S. iniae*로 동정하였다.

### 참 고 문 헌

- Aoki, T., Park, C-I., Yamashita, H. and Hirono, I.: Species-specific polymerase chain reaction primers for *Lactococcus garvieae*. J. Fish Disease, 23:1-6, 2000.
- Austin, A. and Austin, D. A. : Bacterial fish pathogens, 3rd ed., Springer. London, 1999.
- Bercovier, H., Ghittino, C. and Eldar, A.: Immunization with bacterial antigens: infections with streptococci and related organisms. Dev. Biol. Stand., 90:153-60, 1997.
- Berridge, B., Fuller, J. D., Azavedo, J., Low, D. E., Bercovier, H. and Frelie, P. F.: Development of specific nested oligonucleotide PCR primers for the *Streptococcus iniae* 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer. J. Clin. Microbiol., 36:2778-2781, 1998.
- Colomi, A., Diamant, A., Eldar, A., Kvitt, A. and Zlotkin, A., : *Streptococcus iniae* infections in Red Sea Cage-cultured and wild fishes. Dis. Aquat. Org., 49:165-170, 2002
- Jensen, M. A., Webster, J. A. 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.
- Lee, D. C., Lee, J. I., Park, C. I. and Park, S. I. : The study on the causal agent of Streptococcosis (*Lactococcus garvieae*), isolated from cultured marine fishes. J. Fish Pathol., 14:71-80, 2001. (in korean)
- 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. Microbiol. Methods, 33:211-219, 1998.
- Nagatsugawa, T.: A streptococcal disease of cultured flounder. Fish Pathol., 17:281-285, 1983.
- Nguyen, H. T. and Kanai K.: Selective agars for the isolation of *Streptococcus iniae* from Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, and its cultural environment. J. Appl. Microbiol., 86:769-776, 1999.
- Nguyen, H. T., Yoshikoshi, K., and Kanai K.: Ecological investigation of *Streptococcus iniae* in cultured Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) using selective isolation procedures. Aquaculture, 205:7-17, 2002.
- Song, J. K., Kim, J. H. and Kim, E. H., : Comparison of RAPD profiles and phenotypical characters of streptococcal strains. J. Fish Pathol., 16:51-59, 2003. (in korean)
- Zlotkin, A., Hershko H and Eldar A., : Possible transmission of *Streptococcus iniae* from wild fish to cultured marine fish. Appl. Environ. Microbiol., 64:4065-4067, 1998.

Manuscript Received : March 16, 2004

Revision Accepted : May 26, 2004

Responsible Editorial Member : Sang-Hun Choi  
(Kunsan Univ.)