한국어병학회지 제 20 권 제 1 호 (2007)
J. Fish Pathol., 20(1) : 49 ~ 60 (2007)

양식 넙치에서 분리한 *Streptococcus parauberis*의 동정방법에 따른 지역적 비교

조미영† · 오윤경 · 이덕찬 · 김재훈* · 박명애
국립수산과학원 병리연구팀, *국립수산물품질검사원 완도지원

Geographical comparison on different methods for identification of *Streptococcus parauberis* isolated from cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus*

Mi Young Cho†, Yun Kyeong Oh, Deok Chan Lee, Jae Hoon Kim* and Myoung Ae Park

Pathology Team, National Fisheries Research and Development Institute, Busan 619-902, Korea
**Wando Branch, National Fisheries Products Quality Inspection Service, Wando 537-808, Kora*

Non-hemolytic *Streptococcus parauberis* isolated from diseased olive flounder, *Paralichthys olivaceus* in the South coast of Korea were identified by physiological, biochemical and genetic analysis in order to define the different characteristics geographically. First, twelve strains of *S. parauberis* were isolated from catalase-negative gram-positive cocci by multiplex PCR assay. Phenotypic identifications were performed with commercially available kit (API 20 Strep and API ZYM system). Analysis of API profiles of the isolates showed that strains were identified as either of *Lactococcus lactis, S. constellatus* or *S. uberis*. Moreover, *S. parauberis* isolated from olive flounder differed from that of turbot (X89967) to the test of not Voges-Proskauer, arginine, hippurate, alkiline phosphatase and pyrroidonyl arylamidase but β-glucuronidase. All *S. parauberis* isolates were sensitive to florfenicol, ampicillin, ofloxacin and vancomycin but were resistant to oxolinic acid, flumequine, nalidixic acid and sulfisoxazol. However, the 16S rDNA sequences of the isolates showed 99% similarity to *S. parauberis* KCTC 3651 (AY584477) and a great homogenecity among the flounder isolates.

Key words: *Streptococcus parauberis*, Flounder, *Paralichthys olivaceus*, API identification system, PCR, 16S rRNA

제주도의 양식 넙치에서 *Streptococcus* sp.가 분리·보고된 이후 (이와 하, 1991) 다양한 연쇄상 구균이 폐사의 원인균으로 보고되고 있다. *Streptococcus* sp. 이외에도 *Lactococcus garviae* (이 등, 2001), β-hemolytic *Streptococcus* sp. (허 등, 2001), *S. pyogenes* 및 *Enterococcus faecalis* (송 등, 2003), *S. iniae* (김과 김, 2003; 정 등, 2004; 김 등, 2005) 등이 넙치에 대한 병원성과 관련하여 보고되었으며, 이중에서 *S. iniae*가 넙치 연쇄구균증의 주요 원인체로 지목되어 왔다 (허 등, 2001; 김과 김, 2003; 김 등, 2005; 우 등, 2006). 그러나 최근 제주 지역을 중심으로 연쇄구균증에 감염된 넙치에서 *S. parauberis*가 새로운 원인체로 분리되고 있어 (우 등, 2006; Baeck *et al*., 2006), 넙치에 감염하는 *S. parauberis*의 감염병학적 특성에 대한 구명이 요구되고 있다.

†Corresponding Author : Mi Young Cho, Tel : 051-720-2483, Fax : 051-720-2498, E-mail : mycho@nfrda.re.kr

본 연구에서는 최근 제주 지역을 포함하여 우리 나라 전체 남해안 양식장으로 감염 양상이 확산되고 있는 *S. parauberis*의 발병 동태를 파악하기 위하여 국내에서 어류 질병의 진단방법 중 보편적으로 이용되고 있는 API identification system 및 polymerase chain reaction (PCR)을 이용한 분자생물학적인 동정법을 이용하여 *S. parauberis*의 지역적 특성을 비교하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시험 균주

시험균은 체색흑화, 안구돌출 및 백탁, 복수, 장출혈 등의 증상을 나타내는 넙치로부터 분리하였으며, 1.5% NaCl이 첨가된 BHIA (Difco, USA) 배지를 사용하여 병든 어류의 내부 장기 조직을 무균적으로 적출하여 도말한 후 30℃, 24~48시간 배양하여 분리하였다. 순수 분리한 colony 중 그람 양성의 catalase-negative Gram-positive cocci를 구별하고 Mata 등 (2004)의 방법에 따라 multiplex PCR을 실시하여 1차적으로 *S. parauberis*를 선별하였다 (Table 1). 그 결과 2004년부터 2005년 동안 제주, 전남 완도 및 경남 지역의 넙치 양식장에서 분리한 *S. parauberis* 12균주를 선정하고 참조 균주로 *S. parauberis* KCTC 3651, *S. iniae* KCTC 3657을 실험에 사용하였다.

2. 생화학적 동정

생화학적 특성을 분석하기 위하여 각 시험 균주를 BHIA (Difco)에서 30℃, 12~24시간 배양한 후 API 20 Strep kit (Biomerieux, France)를 사용하여 동정하였다. 순수 배양된 colony를 제조 회사의 조작법에 따라 스트립에 접종하고 4시간과 24시간 배양 결과를 APILAB identification System (BioMerieux, France)으로 판정하였다. 또한, API ZYM kit (Biomerieux)를 사용하여 alkaline phophatase 외 18가지 효소의 활성을 검사하였으며, 용혈성 시험은 양혈액한천배지 (아산제약, Korea)에 접종하여 30℃, 48시간 배양 관찰하였다.

3. 배양조건별 발육 시험

시험 균주의 최적 발육 조건을 조사하기 위해 BHI broth (Difco, USA)를 이용하여 NaCl 농도 (3~6.5%), 배양온도 (10~45℃), pH (4~9.6) 및 bile 농도 (10~40%)를 달리하여 균의 증식 유무를 관찰 하였다. 각 시험 균주를 30℃, 12~24시간 배양한 후 멸균생리식염수를 이용하여 현탁하고 분광광도계 (Amersham Bio., USA)로 A_{600} = 1.0으로 조정하고 각 조건별 배지가 들어있는 시험관에 100 ㎕씩 첨가하여 30℃, 2~3일간 배

Table 1. Oligonucleotide primers for multiplex PCR

Primer sets	Oligonucletide sequence (5'-3')	Target gene	Product size (bp)	Primer
Sin-1	CTAGAGTACACATGTACT(AGCT)AAG	16S rRNA	300	*Streptococcus iniae*[1)]
Sin-2	GGATTTTCCACTCCCATTAC			
Spa 2152	TTTCGTCTGAGGCAATGTTG	23S r RNA	718	*S. parauberis*[2)]
Spa 2870	GCTTCATATATCGCTATACT			
pLg-1	CATAACAATGAGAATCGC	16S rRNA	1,100	*Lactococcus garvieae*[2)]
pLg-2	GCACCCTCGCGGGTTG			

[1)], Zlotkin *et al*., 1998.
[2)], Mata *et al*., 2004.

양하여 결과를 판정하였다. Bile은 bile esculin medium (BEM, Difco, USA)에 필요량을 첨가하여 제작하고 동일한 농도의 균을 접종하여 발육을 관찰하였다.

4. 약제 감수성 시험

시험 균주의 약제감수성은 디스크확산법으로 시험하였다. 먼저, 1.5% NaCl을 첨가한 BHIA (Difco, USA) 배지에서 배양한 균을 멸균생리식염수를 이용하여 탁도를 MacFarland No. 0.5로 조절한 다음 1% NaCl을 첨가한 Muller-Hinton Agar (Difco, USA)에 균일하게 도말하여 25℃, 18~24시간 동안 배양하였다. 감수성 여부의 판정은 디스크별 발육 저지대의 직경을 측정하여 National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS)의 기준으로 Resistant (R), Intermediate (I), Susceptible (S)로 구분하여 분석하였다.

5. PCR법을 통한 분자생물학적 동정

Multiplex PCR을 실시하여 *S. parauberis*로 동정된 균주의 16S rRNA 유전자 분석을 실시하였다. Chromosomal DNA는 시판되고 있는 DNA preparation kit (Promega, USA)를 사용하여 정 등 (2004)의 방법에 따라 분리하였으며, 순수 분리된 DNA를 100 ㎕의 TE buffer에 녹여 사용하기 전까지 -20℃에 보관하였다. PCR primer는 universal bacterial primer (Bioneer, Korea)로 P27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')과 P1492r (5'-TACGGCTACCTTGTTACGAC-3')를 사용하였으며, PCR 반응은 Accupower PCR premix (Bioneer, Korea)를 사용하였다. PCR 반응 조건은 predenaturation (94℃, 5분), denaturation (95℃, 30초), annealing (55℃, 30초), extension (72℃, 30초), final extension (72℃, 5분), 30cycles로 실시하였다. 증폭된 PCR 반응 산물은 AccuPrep™ PCR purification kit (Bioneer) 및 AccuPrep™ PCR plasmid extension kit (Bioneer)를 이용하여 plasmid DNA를 분리하고 (주) 솔벤트에 sequencing을 의뢰하여 염기 서열을 결정하였다. 실험 균주 및 GenBank에 등록되어 있는 *Streptococcus* 속 세균의 유전 정보를 Clustal W program을 사용하여 multiple alignment를 실시하고 각 균종간의 상동성을 비교하였다.

결 과

1. 생화학적 특성

연쇄구균증의 증상을 나타내는 넙치에서 분리한 그람 양성의 catalase-negative Gram-positive cocci를 대상으로 multiplex PCR을 실시하여 718bp에서 특이 band를 형성하는 12개의 균주를 *S. parauberis*로 가동정하여 이후의 이화학적 특성 분석에 사용하였다 (Fig. 1).

참조 균주와 분리 균주의 생화학적 성상을 API 20 Strep 및 API ZYM Kit를 사용하여 비교한 결과 (Table 2, 4), multiplex PCR 결과와는 달리

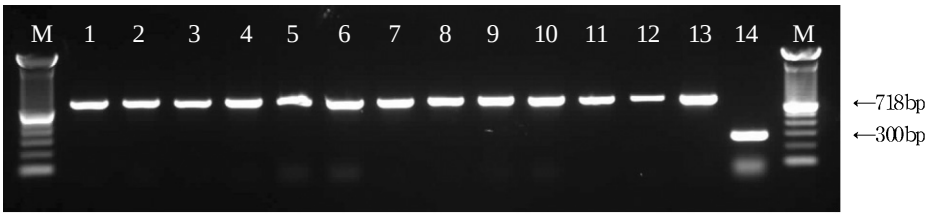

Fig. 1. PCR amplification products using the specific primer designed for multiplex PCR of the reference and the tested strains. M, 100 bp ladder as size marker; 1, *Streptococcus parauberis* KCTC3651; 2, FP4096; 3, FP4097; 4, FP5244; 5, FP5252; 6, FP2132; 7, FP2133; 8, FP2284; 9, FP2285; 10, FP3057, 11, FP3088; 12, FP3089; 13, FP3109; 14, *Streptococcus iniae* KCTC3657.

Table 2. Origin of the strains used in this study

Species		Strains	Host	Location	Year	API code	Identification	% Identity
Isolates	*Streptococcus parauberis* (n=12)	FP2132	Olive flounder, *Paralichthys olivaceus*	Jeju	2004	5163010	*Lactococcus lactis*	49.1
		FP2133	〃	〃	2004	5163730	*S. uberis*	98.8
		FP2284	〃	〃	2005	5173130	*Enterococcus faecium*	84.9
		FP2285	〃	〃	2005	5161010	*S. constellatus*	93.6
		FP4096	〃	Wando	2004	5161110	*L. lactis*	63.9
		FP4097	〃	〃	2004	5163010	*L. lactis*	49.1
		FP5244	〃	〃	2005	5161010	*S. constellatus*	93.6
		FP5252	〃	〃	2005	5163110	*L. lactis*	75.9
		FP3057	〃	Ulsan	2004	5161010	*S. constellatus*	93.6
		FP3088	〃	〃	2005	5161010	*S. constellatus*	93.6
		FP3089	〃	〃	2005	5163110	*L. lactis*	75.9
		FP3109	〃	〃	2005	5163330	*S uberis*	92.7
Reference strains	*S. parauberis*	KCTC3651	mastitis sample milk	Williams & Collins	1990	5373770	*S. uberis*	-
	S. iniae	KCTC3657	Dolphin, *Inia geoffrensis*	San Francisco, USA	1972	4563117	*S. dysgalactiae* ssp. *equisimilis*	99.9

Lactococcus, *Streptococcus* 또는 *Enterococcus* 속의 다양한 군으로 동정되었다. 이 중 *L. lactis*가 41.7%로 가장 높은 비율을 차지하였으며, 그 외 *S. constellatus* (33.0%), *S. uberis* (16.7%), *Enterococcus faecium* (8.3%) 등으로 동정되었다. 분리 균주의 API profile을 참조 균주와 비교한 결과, αGAL, βGUR, βGAL, RAF의 이용 능에 차이가 있는 것으로 나타났으며, 분리 균주 사이에서도 RIB, D-mannitol, D-sorbitol, D-lactose, inulin의 이용능이 다양한 것으로 나타났다. 또한, 효소 활성에서도 esterase lipase. crystine arylamidase, α-chymotrysin, naphtol-AS-BI-phosphotydrolase, β-glucuronidase, α-glucosidase 및 β-glucosidase의 활성이 참조 균주와 차이가 나는 것으로 나타났다.

2. 배양 조건별 발육 특성

참조 균주와 분리 균주의 배양 조건별 성장 유무를 조사한 결과를 Table 3에 나타내었다. 적정 배양 온도는 20~30℃로 나타났으며, 10℃ 및 45℃에서는 모든 균주가 증식하지 않는 것으로 나타났다. 염분 농도별로는 3% 이상의 NaCl을 첨가한 경우 분리 균주 중 2 균주가 증식하지 않았으며, 5% 이상의 NaCl을 첨가한 경우 균의 발육이 관찰되지 않았다. 또한 분리 균주의 경우 pH 4 및 pH 9.6에서도 증식이 관찰되지 않았으며, 10% bile을 첨가한 경우 시험 균주 중 2 균주가 발육하였으며, 40%의 bile을 첨가한 배지에서는 모든 균주가 증식하지 못하는 것으로 나타났다.

3. 약제디스크에 대한 감수성

참조 균주 및 분리 균주의 약제 감수성을 조사한 결과, 모든 균주가 oxolinic acid, flumequine, nalidixic acid 및 sulfisoxazole에 대해 저항성을

Table 3. Physiological characteristics of the reference and the tested strains isolated from cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus* from 2004 to 2005 in the south coast of Korea

Characteristics	*Streptococcus iniae*	*S. parauberis*			
	KCTC3657[1)]	KCTC3651[2)]	Wando (n=4)	Jeju (n=4)	Ulsan (n=4)
10℃	-	-	-	-	-
20℃	+	+	+	+	+
35℃	+	+	+	+	+
45℃	-	-	-	-	-
3% NaCl	+	+	±/(3)[3)]	+	±/(3)
4% NaCl	-	+	±/(1)	-	-
5% NaCl	-	-	-	-	-
6% NaCl	-	-	-	-	-
6.5% NaCl	-	-	-	-	-
pH4	-	-	-	-	-
pH7	+	+	+	+	+
pH9.6	+	-	-	-	-
10% bile	-	-	-	±/(1)	±/(1)
40% bile	-	-	-	-	-

[1)], [2)], Reference strains.
[3)], Interpretation / (Number of positive reaction).

Table 4. Biochemical profiles and enzyme activities of *Streptococcus parauberis* isolated from diseased olive flounder, *Paralichthys olivaceus* from 2004 to 2005 in the south coast of Korea

API20 STREP test	Reference strains		Present isolates			Baeck *et al*. (2006)[1)]	API ZYM test	Reference strains		Present isolates			Baeck *et al*. (2006)
	KCTC3657	KCTC3651	Ulsan (n=4)	Wando (n=4)	Jeju (n=4)	Jeju		KCTC3657	KCTC3651	Ulsan (n=4)	Wando (n=4)	Jeju (n=4)	Jeju
sodium pyruvate	-	+	+	+	+	+	Alkaline phosphate	+	+	+	+	+	+
hippuric acid	-	-	-	-	-	+	Esterase	+	-	-	-	-	-
esculin ferric citrate	+	+	+	+	+	-	Esterase Lipase	+	+	±(2)	+	+	+
pyroglutamic acid β-naphthylamide	+	+	+	+	+	+	Lipase	-	-	-	-	-	-
6-bromo-2-naphthyl-α D-galactopyranoside	-	+	-	-	-	-	Leucine arylamidase	+	+	+	+	+	+
naphthol ASBI-glucuronic acid	+	+	-	-	-	-	Valine arylamidase	+	+	+	+	+	-
2-naphthyl-βD-galactopyranoside	-	+	-	-	-	-	Crystine arylamidase	+	+	±(1)	±(3)	+	-
2-naphthyl phosphate	+	+	+	+	+	+	Trypsin	-	-	-	-	-	-
L-leucine-β-naphthylamide	+	+	+	+	+	+	α-chymotrypsin	+	+	-	±(3)	-	+
L-arginine	+	+	+	+	+	+	Acid phospatase	+	+	+	+	+	+
D-ribose	+	+	±(2)[2)]	±(2)	±(3)	-	Naphtol-AS-BI-phosphotydrolase	+	+	±(3)	±(2)	+	+
L-arabinose	-	-	-	-	-	-							
D-mannitol	+	+	±(2)	±(2)	±(2)	+	α-galactosidase	-	-	-	+	-	-
D-sorbitol	-	+	±(1)	-	±(1)	-	β-glucuronidase	-	-	-	-	±(2)	-
D-lactose	-	+	-	-	±(1)	+	β-glucosidase	+	+	±(1)	-	-	-
D-trehalose	+	+	+	+	+	+	α-glucosidase	+	+	±(3)	+	±(1)	+
inulin	-	+	±(1)	-	±(1)	-	β-glucosidase	-	-	±(2)	-	+	-
D-raffinose	-	+	-	-	-	-	N-acetyl-β-glucosaminidase	-	-	-	-	-	-
starch	+	-	-	-	-	-	α-mannosidase	-	-	-	-	-	-
glycogen	+	-	-	-	-	-	α-fucosidase	-	-	-	-	-	-

[1)], API profiles of *S. parauberis* previously reported by Baeck *et al.* (2006).

[2)], Number of positive reaction.

Table 5. Susceptibility to antibiotics of *Streptococcus parauberis* isolated from diseased olive flounder, *Paralichthys olivaceus* from 2004 to 2005 in the south coast of Korea

Antibiotics	Zone Diameter Interpretive Standards (mm)[1)]			Reference strains		Tested strains (No. of each reaction by [1)])		
	R	I	S	KCTC3657	KCTC3651	Ulsan (n=4)	Jeju (n=4)	Wando (n=4)
Oxytetracyclin (T30)	≤18	19-22	≥23	S	S	R(1) /I(1) /S(2)	R(2) /S(2)	S
Oxolinic acid (OA-2)	≤10	-	≥11	R	R	R	R	R
Flumequine (UB)	≤15	16-20	≥21	R	R	R	R	R(3) /I(1)
Florfenicol (FFC)	≤17	18-20	≥21	S	S	S	S	S
Amphicillin (AM10)	≤11	12-14	≥15	S	S	S	S	S
Erythromycin (E15)	≤15	16-20	≥21	S	S	R(1) /S(3)	R(2) /S(2)	S
Gentamicin (GM10)	≤12	13-14	≥15	I	S	R(2) /I(2)	S	R(2) /I(2)
Ciprofloxacin (CIP5)	≤15	16-20	≥21	S	S	S	S	R(1) /S(3)
Amoxicillin (Amc30)	≤13	14-17	≥18	S	S	S	S	S
Trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT1.25)	≤15	16-18	≥19	S	S	R(2) /S(2)	R(1) /S(3)	R(2) /S(2)
Nalidixic Acide (NA30)	≤13	14-18	≥19	R	R	R	R	R
Clindamycin (CC-2)	≤15	16-18	≥19	S	S	S	R(1) /S(3)	S
Doxycyclin (D30)	≤12	13-15	≥16	S	S	S	R(1) /I(1) /S(2)	S
Ofloxacin (OFX-5)	≤12	13-15	≥16	S	S	S	S	S
Sulfisoxazole (G-.25)	≤12	13-16	≥17	R	R	R	R	R
Norfloxacin (NOR10)	≤12	13-16	≥17	S	S	S	S	R(1)/S(3)
Ceftazidime (CAZ-30)	≤14	15-17	≥18	S	S	I(1) /S(3)	S	S
Vancomycin (Va-30)	-	-	≥17	S	S	S	S	S

[1)] R, resistant; I, intermediate; S, susceptible.

```
FP5244          GTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCTAAGGAAATG 60
FP3109          GTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCTAAGGAAATG 60
KCTC3651        GTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCTAAGGAAATG 60
FP2284          GTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCTAAGGAAATG 60
                ************************************************************

FP5244          GAAGCACGTTAGGAAAAGTCTTATTTAGTTTTGAGAGGTCTTATTAAAGTAATGAGATAG 120
FP3109          GAAGCACGTTAGGAAAAGTCTTATTTAGTTTTGAGAGGTCTTATTAAAGTAATGAGATAG 120
KCTC3651        GAAGCACGTTAGGAAAAGTCTTATTTAGTTTTGAGAGGTCTTATTAAAGTAATGAGATAG 120
FP2284          GAAGCACGTTAGGAAAAGTCTTATTTAGTTTTGAGAGGTCTTATTAAAGTAATGAGATAG 120
                ************************************************************

FP5244          AAACACCACTAATAATGTAACAACCAGTTTATTAGTCGGGGCCTTAGCTCAGCTGGGAGA 180
FP3109          AAACACCACTAATAATGTAACAACCAGTTTATTAGTCGGGGCCTTAGCTCAGCTGGGAGA 180
KCTC3651        AAACACCACTAATAATGTAACAACCAGTTTATTAGTTGGGGCCTTAGCTCAGCTGGGAGA 180
FP2284          AAACACCACTAATAATGTAACAACCAGTTTATTAGTCGGGGCCTTAGCTCAGCTGGGAGA 180
                ************************************ ************************

FP5244          GCGCCTGCTTTGCACGCAGGAGGTCAGCGGTTCGATCCCGCTAGGCTCCATTATCTAGGA 240
FP3109          GCGCCTGCTTTGCACGCAGGAGGTCAGCGGTTCGATCCCGCTAGGCTCCATTATCTAGGA 240
KCTC3651        GCGCCTGCTTTGCACGCAGGAGGTCAGCGGTTCGATCCCGCTAGGCTCCATTATCTAGGA 240
FP2284          GCGCCTGCTTTGCACGCAGGAGGTCAGCGGTTCGATCCCGCTAGGCTCCATTATCTAGGA 240
                ************************************************************

FP5244          TACAAAGAGATGTTCGGCTTGCCGAAATTTCTTAAGAAATTAATCTCGTGTTCAACTAGA 300
FP3109          TACAAAGAGATGTTCGGCTTGCCGAAATTTCTTAAGAAATTAATCTCGTGTTCAACTAGA 300
KCTC3651        TACAAAGAGATGTTCGGCTTGCCGAAATTTCTTAAGAAATTAATCTCGTGTTCAACTAGA 300
FP2284          TACAAAGAGATGTTCGGCTTGCCGAAATTTCTTAAGAAATTAATCTCGTGTTCAACTAGA 300
                ************************************************************

FP5244          TAAGTAGGATAAAAATCCTAACATAGTCCATTGAAAATTGAATATCTATATCAAATTCCA 360
FP3109          TAAGTAGGATAAAAATCCTAACATAGTCCATTGAAAATTGAATTTCTATATCAAATTCCA 360
KCTC3651        TAAGTAGGATAAAAATCCTAACATAGTCCATTGAAAATTGAATATCTATATCAAATTCCA 360
FP2284          TAAGTAGGATAAAAATCCTAACATAGTCCATTGAAAATTGAATATCTATATCAAATTCCA 360
                ******************************************* ****************

FP5244          CAATTAAGAAATTAATTGTAGAGAAAAAGTAACAAGAAATAAACCGAAAAAAAAGATAAA 420
FP3109          CAATTAAGAAATTAATTGTAGAGAAAAAGTAACAAGAAATAAACCGAAAAAAAAGATAAA 420
KCTC3651        CAATTAAGAAATTAATTGTAGAAAAAAAGTAACAAGAAATAAACCGAAAAAAAAGATAAA 420
FP2284          CAATTAAGAAATTAATTGTAGAAAAAAAGTAACAAGAAATAAACCGAAAAAAAAGATAAA 420
                ********************* ****************************************

FP5244          CGCGAACATATTAAAAAAAATTAAAAAGAAGGTCGAAAGACTGGAAATAAGGTTAAGTTA 480
FP3109          CGCGAACATATTAAAAAAAATTTAAAAGAAGGTCGAAAGACTGGAAATAAGGTTAAGTTA 480
KCTC3651        CGCGAACATATTAAAAAAAATTTAAAAGAAGGTCGAAAGACTGGAAATAAGGTTAAGTTA 480
FP2284          CGCGAACATATTAAAAAAAATTTAAAAGAAGGTCGAAAGACTGGAAATAAGGTTAAGTTA 480
                ********************* ****************************************

FP5244          A 481
FP3109          A 481
KCTC3651        A 481
FP2284          A 481
```

Fig. 2. Comparison of 16S rRNA gene sequences of *Streptococcus parauberis* KCTC3651 (AY584477) and isolated strains from olive flounder, *Paralichthys olivaceus* on the each region (FP3109, Ulsan; FP5244, Wando; FP2284, Jeju).

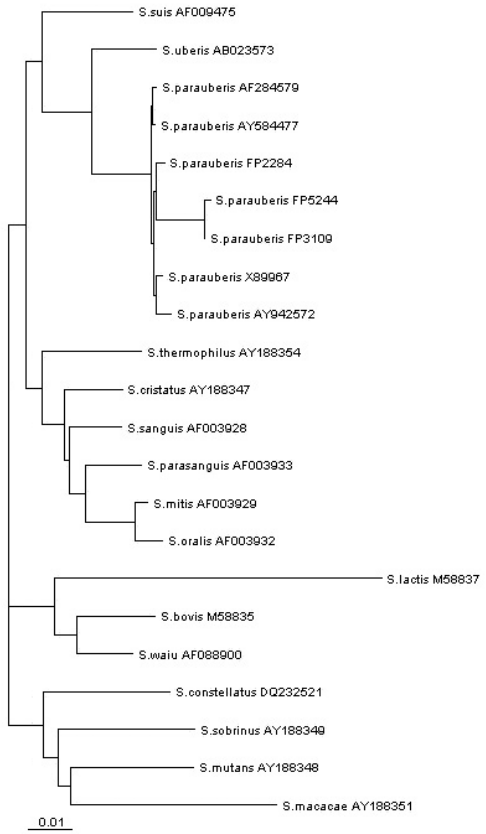

Fig. 3. Phylogenetic tree showing the relationships between the identified 16S rRNA sequences of the isolates and the reference strains. Names and accession numbers are given as cited in the GenBank database.

나타내었다 (Table 5). 또한, Trimethoprim/Sulfamethoxazole (SXT), erythromycin, gentamicin 등에 대해서는 참조 균주에 비해 분리 균주에서 저항성을 나타내는 비율이 증가한 것으로 나타났다.

4. 분자생물학적 동정

분리 균주의 16S rRNA gene에 대한 염기 서열을 분석한 결과, 모두 *S. parauberis*로 동정되었으며, 특히, *S. parauberis* KCTC 3651 (AY584477) 균주와 99%의 상동성을 나타내었다 (Fig. 2). 또한, 각 지역에서 분리한 대표 균주의 16S rRNA를 universal primer로 분석하여 GenBank에 등록되어 있는 *Streptococcus* 속의 유사 균주와 비교한 결과, *S. parauberis* AF 284579, AY584477, X89967 및 AY942572 등과 98% 이상의 상동성을 나타내어 동일그룹으로 판단되었다 (Fig. 3).

고 찰

*S. parauberis*는 소 유선염 (mastitis)의 원인균으로서 어류에서는 양식 터봇에서 처음으로 분리되었다 (Toranzo *et al*., 1995). 이 균은 표현형 및 혈청학적 특성에 의해 *S. uberis* genotype Ⅱ (Williams & Collins, 1990), *Enterococcus seriolici-*

da 등으로 동정되었다가 (Toranzo *et al*., 1994), 이후 16S rDNA 분석 결과 *S. parauberis*에 속하는 것으로 보고된 바 (Domenech *et al*., 1996)에서 알 수 있듯이 균의 동정을 위하여 다양한 동정 시스템이 요구되고 있다. 표현형적 특징에 기초한 분류는 동일 종 내에서도 모든 균주가 동일한 특징을 나타내지 않는다던지, 동일 균주라 할지라도 반복되는 실험에서 다른 결과를 나타낼 수 있으며, 시험 결과가 각자의 해석과 숙련 정도에 따라 달라질 수 있다는 단점을 가지고 있어 명료한 동정 결과를 도출하기가 힘이 든다. 이러한 측면에서 16S rRNA subunit의 gene sequencing 방법이 세균의 동정 방법 및 세균성 질병의 진단법으로서 광범위하게 사용되고 있다 (Bosshard *et al*., 2004).

본 연구에서 API Kit로 조사한 생화학적 성상에서 분리 균주들이 다양한 profile을 나타내었으며, *S. lactis, S. constellatus, S. uberis* 및 *Enterococcus faecium*, 등으로 동정되었다. 특히, *S. constellatus*로 동정된 그룹의 경우 API ID No.가 5161010으로 모두 동일하게 나타난 반면, 가장 높은 비율을 차지했던 *L. lactis*로 동정된 그룹에서는 동정 결과에 대한 신뢰도가 낮게 나타났을 뿐만 아니라 L-arginine, L-ribose, L-arabinose, D-manitol, D-sorbitol, D-lactose의 이용능 차이로 인해 동일 종으로 동정된 그룹 내에서도 API profile이 다양하게 나타나는 것으로 관찰되었다. 지역적으로 많은 균주가 비교되지 못했으나 제주 지역이 가장 다양한 양상을 나타내는 것으로 나타났으며, 완도 지역은 동정율은 다소 낮았으나 대부분 *L. lactis*로 동정되었다. 이와는 달리 Baeck 등 (2006)은 2005년도 제주 지역에서 분리한 연쇄상구균을 API 20 STREP으로 동정한 결과 22 균주 중에서 18 균주를 *S. parauberis*로 동정하여 제주 지역 연쇄구균증의 우점종으로 보고하였으며, API 동정 결과 *L. garviae*와 구별되는 동일한 표현형을 가지는 것으로 보고하였다. 그러나 이 결과에서는 *S. parauberis*의 API 동정 결과 중 hippuric acid가 양성, esculin이 음성으로 나타났으며, D-ribose와 D-lactose의 이용능에서 본 연구 결과와 차이가 있다. 또한, API ZYM 분석 결과에서도 제주 지역에서 분리된 균주 간에 valine arylamidase, crystine, α-chymotrypsin, β-glucosidase의 활성에서 차이가 있는 것으로 나타났다. 표현형에서의 이러한 차이는 다양한 보고에서 찾아볼 수 있는데, 김과 김 (2003)은 남해안의 병든 넙치에서 분리한 연쇄상구균 중 동일한 RAPD pattern을 나타낸 그룹을 대상으로 API 20 Strep test를 실시한 결과 균주 간에 API profile이 다양하게 나타났으며, 이들이 동일한 종에 속하는 결과를 얻지 못하였다고 보고하였다. 그러나, 이 경우 모든 균이 용혈성을 나타낸 것으로 보아 이들 그룹이 *S. iniae*로 추정되어 본 연구 결과와는 다소 차이가 있을 수 있다. 송 등 (2003)도 병든 넙치에서 분리된 연쇄상구균을 API Strep kit로 동정한 결과, 10개 균주 중 4개 균주만이 90% 이상의 동정율을 나타내었으며, 나머지 결과들은 신뢰 수준 이하로 보고하였다. 실험 균주 중 γ-용혈성을 나타낸 4개 균주 중 3개 균주는 *E. avium* (API No. 7140710), *E. faecalis* (API No. 5143710), *L. lactis* (API No. 7042110)으로 동정하여 본 연구 결과와도 많은 차이가 있다. 이와 같이 세균의 생화학적 특성에 의한 분류는 실험자나 실험조건 등에 의해 영향을 받을 수 있으나, Iida 등 (1991)은 실험 횟수에 관계없이 일정한 ID number가 얻어지는 균주들은 동일 group으로 구분할 수 있다는 것을 제시한 바 있다.

분리 균주들을 대상으로 실시한 multiplex PCR에서 *S. parauberis*으로 동정된 균주들의 유전학적인 정보를 분석한 결과, 분리 균주들은 소 유선염 유래 균주와 높은 상동성을 나타내었으며 지역적인 차이와 상관없이 유전학적으로 모두 동일한 그룹에 속하는 것으로 나타났다. 이와 유사한 결과로서 Bosshard 등 (2004)은 aerobic catalase-negative, Gram-positive cocci를 대상으로 API 20 Strep Kit와 16S rDNA sequencing을 실시하여 동정 수준을 비교한 결과 16S rDNA의 경

우 42개 균주 중 32개 균주가 정확한 동정 결과를 나타낸 반면 phenotypic identification은 2개 균주에 대해서만 일치하는 것으로 나타나 16S rDNA sequencing이 그람양성구균의 동정에 효과적임을 시사하였다. 본 연구 결과에서도 API 20 Strep system은 분리 균의 이화학적 특성을 손쉽게 밝히는 데 효과적이나 *S. parauberis*의 최종 동정에는 적합하지 않은 것으로 판단되었으며, 특이 primer를 이용한 PCR법 또는 RAPD analysis 등의 유전학인 진단 방법을 병행하는 것이 효과적일 것으로 사료된다.

다양한 배양 조건에서 균의 발육을 조사한 결과, 지역적인 차이는 나타나지 않았으나, 우 등 (2006)이 제주와 포항 지역에서 분리한 연쇄구균 중에서 *S. parauberis*가 5% NaCl 및 40% bile을 첨가한 배지에서 성장하였다고 보고한 것과는 차이가 났다. 또한 터봇에서 분리된 *S. parauberis*의 경우 4.5% NaCl 첨가 배지에서 발육한 것으로 보고하였으며 본 연구 결과와 효소활성을 비교한 결과, Voges-Proskauer, hydrolysis of arginine, hydrolysis of hippurate, alkiline phosphatase, pyrroidonyl arylamidase의 결과는 동일하였으나, β-glucuronidase 활성은 차이가 있었다 (Doménech *et al*., 1996).

분리 균주의 약제감수성을 비교한 결과 터봇 분리 균주의 경우 penicillin, ampicillin, erythromycin, nitrofurantoin 등에 감수성이 있는 것으로 나타났으며, streptomycin, oxolinic acid, flumequine, enrofloxacine 등에 내성을 가지는 것으로 나타났다 (Doménech *et al*., 1996). 이와는 다소 차이가 있으나 본 연구에도 florfenicol, ampicillin, amoxicillin, ofloxacin, vancomycin에 대해 효과적인 것으로 나타났으며, oxolinic acid, flumequine, nalidixic acid, sulfisoxazol에 대해 내성이 있는 것으로 나타났다. 또한, 약제에 대한 감수성이 지역적으로 차이가 있는 것으로 나타났는데, 제주 지역의 경우 doxycycline, clindamycin, SXT의 경우 감수성 균주의 비율이 우위를 나타내었으나, erythromycin은 감수성 균주와 내성 균주의 비율이 동일하게 나타났다. 완도 지역의 경우 제주 지역에 비해 gentamicin, ciprofloxacin, norfloxacin에 대한 내성이 다소 증가한 것으로 나타났으며, 울산 지역은 gentamicin, ceftazidime에 대한 내성이 다소 증가한 것으로 나타났다. 이와 유사한 결과로서 김 등 (2006)은 제주 지역에서 분리한 연쇄상구균에 대한 약제별 감수성시험 결과 ampicillin에 대해서는 분리 균주의 79% 정도가 0.1 ㎍/㎖ 이하의 농도에서 생장이 억제되는 것으로 나타나 연쇄상구균의 치료제로서 효과적임을 시사하였다. 그러나 doxycycline, erythromycin, OTC의 경우 감수성 균주의 출현 빈도는 높았으나 내성 균주의 수가 각각 39%, 12%, 35%로 나타나 치료 약제를 선택할 경우 감수성시험을 필히 실시하도록 권장하고 있다. 그 외 Heo 등 (2002)도 경남 남해안 지역의 양식 어류에서 분리한 연쇄상구균이 erythromycin에 대하여 50% 이상 내성을 형성하였으나 doxycycline 및 OTC에 대해서는 각각 70% 및 64%의 감수성을 나타내었다고 보고하였다. 또한, 이와 유사하게 Baeck 등 (2006)은 carbenicillin, ampicillin, cefoperazone, centamicin, nitrofurantoin에 효과적이었으나 amikacin, ciprofloxacin, colistin, kanamycin, nalidixic acid, neomycin, polymyxin b에 내성이 있다고 보고하였다.

본 연구 결과를 종합해볼 때 우리나라 남해안 넙치 양식장에서 분리한 *S. parauberis*는 모두 동일한 유전자 그룹에 속하는 것으로 나타났으나 이화학적으로는 다양한 표현형을 가지고 있으며, 지역에 따라 약제에 대한 감수성에 차이가 있는 것으로 나타났다. 분리 균의 동정법으로서는 특이 primer를 이용한 PCR 방법이 효과적으로 적용될 수 있을 것으로 판단되었다. 반면, API identification system을 이용한 *S. parauberis*의 동정 결과에서는 다양한 유사 종으로 동정되었을 뿐만 아니라 동일 종 일지라도 다양한 표현형을 가지고 있는 것으로 나타나 정확한 동정을 위해서는 전통적인 생화학적 분석 및 유전학

적 연구가 병행되어야 할 것으로 판단되었다. 그럼에도 불구하고 이러한 commercial kit의 동정 결과는 동일한 결과를 반복적으로 얻을 수 있다면 이화학적 표현형으로 균을 구분할 수 있는 편리한 동정 방법이 될 수 있으므로 동일 균주 내에서의 다양한 표현형의 분포 및 지역적 특성을 구분하는 데 효과적으로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

우리 나라 남해안의 병든 넙치로부터 분리한 non-hemolytic *Streptococcus parauberis*의 지역적 특성을 구명하고자 균의 생리적, 생화학적 및 분자생물학적 분석을 실시하였다. 먼저, catalase-negative Gram-positive cocci를 대상으로 multiplex PCR을 실시하여 *S. parauberis* 12 균주를 선정하였으며, 표현형적 동정을 위해 시판되고 있는 API 20 Strep 및 API ZYM kit를 사용하였다. 분리 균주의 API porfile을 분석한 결과, *Lactococcus lactis, S. constellatus* 및 *S. uberis* 등으로 동정되었다. 또한, 터봇에서 분리된 *S. parauberis*와 비교해 볼 때 Voges-Proskauer, arginine, hippurate, alkiline phosphatase 및 pyrroidonyl arylamidase의 반응 결과는 동일하였으나, β-glucuronidase 활성은 다양한 것으로 나타났다. 약제 감수성 시험 결과에서는 florfenicol, ampicillin, ofloxacin 및 vancomycin에 대해 감수성이 있는 것으로 나타났으며, oxolinic acid, flumequine, nalidixic acid 및 sulfisoxazol에 대해 내성이 있는 것으로 나타났다. 그러나, 분리 균주의 16S rDNA 염기서열을 분석한 결과, 참조균주인 *S. parauberis* KCTC 3651 (AY584477)과 99%의 상동성을 나타내었으며, 넙치 분리 균주들이 유전적으로 동일한 그룹에 속하는 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 국립수산과학원 (양식어류질병 모니터링 및 역학연구, RP-2007-AQ-003)의 지원에 의해 운영되었습니다.

참 고 문 헌

Baeck, G.W., Kim, J.H., Gomez, D.K. and Park, S.C.: Isolation and characterization of *Streptococcus* sp. from diseased flounder (*Paralichthys olivaceus*) in Jeju island. J. Vet. Sci., 7: 53-58, 2006.

Bosshard, P.P., Abels, S., Altwegg, M., Bottger, E.C. and Zbinden, R.: Comparison of conventional and molecular methods for identification of aerobic catalase-negative Gram-positive cocci in the clinical laboratory. J. clin. Microbiol., 42: 2065-2073, 2004

Domenech, A., Fernandez-Garayzabal, J.F., Pascual, C., Garcia, J.A., Cutuli, M.T., Moreno, M.A., Collins, M.D. and Dominguez, L.: Streptococcosis in cultured turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), associated with *Streptococcus parauberis*. J. Fish Dis., 19: 33-38, 1996.

Heo, J.H., Jung, M.H., Cho, M.H., Kim, G.H., Lee, K.C., Kim, J. H. and Jung, T.S.: The study on fish diseases with reference to bacterial susceptibility to antibiotics in the southern area of Kyongnam. J. Vet. Clin., 19: 19-22, 2002.

Iida, T., Hamasaki, K. and Wakabayashi, H.: Rapid identification for fish pathogenic streptococci by Api 20 strep. Fish Pathol., 26: 93-94, 1991.

Mata, A.I., Gibello, A., Casamayor, A., Blanco, M.M. and Dominguez, L.: Multiplex PCR assay for detection of bacterial pathogens associated with warm-water streptococcosis in fish. Appl. Environ. Microbiol., 68: 5177-5180, 2004.

Toranzo, A.E., Devesa, S., Heinen, P., Riaza, A., Nunez, S. and Barja, J.L.: Streptococcosis in cultured turbot caused by an Enterococcus-like bacterium. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 14: 19-23, 1994.

Williams, A.M. and Collins, M.D.: Molecular taxonomic studies on *Streptococcus uberis* types Ⅰand Ⅱ. Description of *Streptococcus paraubris* sp. nov. J. Applied Bacteriol., 68: 485-490, 1990.

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.

김종훈, 김은희: 넙치 (*Paralichthys olivaceus*) 병어에서 분리된 연쇄상구균의 다양성. 한국수산학회지, 36: 654-660, 2003.

김종훈, 이창훈, 김은희: 제주도 양식넙치 병어에서 분리된 연쇄상구균의 약제내성 전이성 plasmid. 한국어병학회지, 19: 267-276, 2006.

김현정, 우승호, 김진우, 박수일: *Streptococcus iniae*의 형태학적 특성과 병원성. 한국어병학회지, 18: 167-178, 2005.

송진경, 김종훈, 김은희: 연쇄상구균의 표현형적 특성과 RAPD profiles 비교. 한국어병학회지, 16: 51-59, 2003.

이덕찬, 이재일, 박찬일, 박수일: 해산 양식어류로부터 분리된 연쇄구균증의 원인균, *Lactococcus garvieae*에 대한 연구. 한국어병학회지, 14: 71-80, 2001.

이창훈, 하동수: 양식넙치의 연쇄구균증. 한국어병학회지, 4: 71-77, 1991.

우승호, 김현정, 이주석, 김진우, 박수일: 해수 양식어류에서 분리된 연쇄상구균의 종류와 병원성. 한국어병학회지, 19: 17-33, 2006.

정용욱, 강봉조, 박근태, 허문수: 16S-23S rRNA intergenic spacer region을 이용한 어류병원성 *Streptococcus iniae*의 분자생물학적 동정. 한국어병학회지, 17: 91-98, 2004.

허문수, 송춘복, 이제희, 여인규, 전유진, 이정재: 제주산 양식넙치 (*Paralichthys olivaceus*)로부터 분리된 β-용혈성 연쇄구균 (*β-Streptococcus* spp.)의 특성. 한수지, 34: 365-369, 2001.

Manuscript Received : February 20, 2007
Revision Accepted : April 10, 2007
Responsible Editorial Member : Suhee Hong
(Kangnung Univ.)