

碩 士 學 位 論 文

양식넙치(*Paralichthys olivaceus*)로부터  
분리된 γ용혈성 *Streptococcus sp.*의 특성



海 洋 生 物 工 學 科

康 哲 榮

2005年 12月

양식넙치(*Paralichthys olivaceus*)로부터  
분리된 용혈성 *Streptococcus sp.*의 특성

指導教授 許 文 洙

康 哲 榮

이 論文을 理學碩士學位 論文으로 提出함

2005年 12月

康 哲 榮의 理學 碩士學位 論文을 認准함.

審査委員長 송 춘 복 (인)

委 員 여 인 규 (인)

委 員 허 문 수 (인)

濟州大學校 大學院

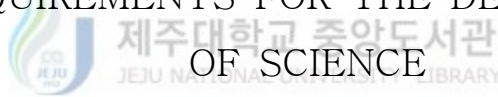
2005年 12月

A Study on the Characteristics of  $\gamma$  hemolytic  
*Streptococcus sp.* Isolated from Culture  
Flouders(*Paralichthys olivaceus*)

Chul-Young Kang

(Supervised by Professor Moon soo Heo)

A DISSERTATION SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF MASTER  
OF SCIENCE



DEPARTMENT OF MARINE BIOTECHNOLOGY  
GRADUATE SCHOOL  
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY  
December, 2005

# 목 차

List of Figure .....	i
List of Table .....	ii
Abstract .....	iii
I. 서 론 .....	1
II. 재료 및 방법.....	3
1.1 시료 채취.....	3
1.2 세균의 분리 동정 및 세균성 질병진단.....	3
1.3 <i>S. parauberis</i> 감염에 의한 병리학적 특이소견의 조사.....	3
1.4 분리세균의 용혈성시험.....	3
1.5 분리세균의 항생제 감수성시험.....	4
1.6 시험균주.....	4
1.7 분리균주의 생화학적 특성 분석.....	4
1.8 분리균주의 분자생물학적인 동정.....	7
III. 결 과.....	11
1. 질병현황.....	11
3. 분리세균의용혈성시험.....	14
4. 분리세균의 항생제 감수성시험.....	16
5. 분리균주의 생화학적 특성 분석.....	19
6. Multiplex PCR을 통한 연쇄구균의 확인.....	25
7. 분리균주의 분자생물학적인 동정.....	27
IV. 고 찰.....	34
V. 요 약.....	36
VI. 참 고 문 헌.....	37
감사의 글.....	42

## List of Figure

Fig. 1. The diseased flounder(*Paralichthys olivaceus*) showing the symptoms of *Streptococcus* sp..

A; Haemorrhaging abdominal wall, B; Haemorrhaging in the eye, C; Ascites undercurrent and liver abscess, D; Haemorrhaging abdominal wall and liver flare and darkened pigment, E; Operculum bleeding

Fig. 2. Comparison of colony morphologies of  $\gamma$  and  $\beta$  hemolytic streptococci. Panels A, C; *S. parauberis*, B, D; *S. iniae*

Fig. 3. Morphological feature of the *Streptococcus* sp. ( $\times 1000$ ).

Fig. 4 Multiplex PCR of different *Streptococcus* strains. Lane 1, 100bp marker; Lane 13, *S. parauberis* KCTC3651; Lane 14, *S. iniae* KCTC3657; Lane 15, *L. garviae* KCTC3772.

Fig. 5. Dendrogram showing the phylogenetic relationship among strains of *Streptococcus* spp. and closely relate bacteria isolated from flounders of aquaculture farms. The length of each pair of branches represents the distance between sequence pairs, while the units at the bottom of tree indicate the number of substitution events. *S. parauberis* KCTC 3651, *S. iniae* KCTC3657, *L. garviae* KCTC 3772, *S. parauberis*(X89967), *S. iniae*(AF3335572, X58316), *L. garviae*(AY699289), *S. uberis*(U41048).

Fig. 6. Mutiple alignment of the partial 16S rDNA sequence of a isolated strain and *Streptococcus parauberis* KCTC 3651 and *Streptococcus iniae* KCTC3657 and *Lactococcus garviae* KCTC 3772. *S. parauberis*(AY942572, AF284579), *S. iniae*(AF3335572), *L. garviae*(AY699289)

## List of Table

Table 1. Parameter of biochemical characteristics by GP2 Micro Plate.

Table 2. PCR primers used for 16S rRNA amplification in this study.

Table 3. Primer sequences used for PCR amplification and the expected amplicon size.

Table 4. Tested strain in this study.

Table 5. Sensitivity to chemotherapeutic agent of *Streptococcus* sp.,  
S, sensitivity; R, resistance

Table 6. Biological characteristic isolation *Streptococcus* spp..

Table 7. Biochemical characteristics of isolated strain and type strain tested by BIOLOG™.



제주대학교 중앙도서관  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

## Abstract

This study performed for the purpose of identification of *Streptococcus parauberis* from culture flounder(*Paralichthys olivaceus*) with Streptococcosis in the Jeju island.

The result of BIOLOG™ test were *Streptococcus uberis* that similitude of 0.5 and 98% identified in MicroLog™ system(Release 4.05). Carbohydrate utility pattern were Dextrin, N-Acetyl-D-Glucosamine, Arbutin, Maltose, Maltotriose, D-Cellobiose, D-Fructose, D-Mannose,  $\alpha$ -D-Glucose, D-Mannitol,  $\beta$ -Methyl D-Glucoside, Salicin, Sucrose, D-Trehalose, Pruvatic Acid Methyl Ester, Mono-methyl Succinate, Glycerol.

In addition hemolysis test for *S. parauberis* were hemolysis and hemolysis test for *S. iniae* hemolysis in BAP(Blood agar plate). Antibiotic test for *S. parauberis* were Ampicillin, Amoxicillin and Fluoroquinolone sensitivity.

Multiplex PCR assay were detected *S. pauberis*(718bp), *S. iniae*(870bp) *L. garviae*(1,100bp). Dected *S. parauberis*(718bp) were result of 16S rRNA sequence identified with *S. parauberis*(Gene bank accession number X89967). All isolated *S. parauberis* that with banded by one group.

The result were *S. pauberis* that  $\gamma$ -hemolytic chain form cocci and negative reaction of catalase, mPCR assay were 718bp amplicon size.



# I. 서 론

양식되고 있는 넙치를 비롯한 다른 어류들도 육상동물과 마찬가지로 각종 질병이 발생하여 경제적인 피해를 주고 있는데, 양식어류에 유행하는 병원미생물의 질병 중 세균에 의한 피해가 가장 크다고 알려져 있다(Jeun, 1988; Kang, 2003). 국내산 양식넙치에 주로 발생하는 세균성 질병은 연쇄구균증, 에드워드증, 비브리오증 등이 보고되고 있다(Bang *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1991; Lee and Ha, 1991; 허 등, 2001).

연쇄구균증에 대한 연구로는 일본에서 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*)의 연쇄구균성 패혈증에 대한 보고를 시작으로 (Hoshina *et al.* 1958), Robinson 과 Meyer(1966)는 golden shiner(*Notemigonus crysoleucas*)에 *Streptococcus* sp.의 감염을 보고하였으며, 방어(*Seriola quinqueradiata*)(Kusuda *et al.*, 1976-a; Kitao, 1982), 은어(*Plecoglossus altivelis*)와 amago(*Oncorhynchus rhodurus*)로 부터의  $\beta$ -용혈성 *Streptococcus* 분리(Ohnishi, *et al.*, 1981), 뱀장어(*Anguilla japonica*)의 *Streptococcus* sp. 감염보고 등이 있다(Kusuda *et al.*, 1978).

그러나 1990년대 이전에는 어류로부터 분리되는 *Streptococcus*는 일부균주를 제외하고는 대부분의 균주가 정확한 동정이 이루어지지 않았었는데, Kusuda *et al.*(1992)은 방어에서 분리한 세균을 *Enterococcus seriolocida*로 동정하였으며, Zlotkin *et al.*(1998)은 방어의 연쇄구균증 원인균을 PCR기법에 의해 *Lactococcus garvieae*라고 동정하였고, Doménech *et al.*(1996)은 유럽에서 주로 양식되는 터봇(*Scophthalmus maximus*)의 연쇄구균증의 원인균을 *Streptococcus parauberis*로 동정하였다.

또한 Nakatsugawa(1983)는 일본의 양식넙치 연쇄구균증의 원인균으로 *Streptococcus iniae*를 분리 동정하였으며, 국내의 경우는 *L. garvieae* 및 *Streptococcus* sp.등이 넙치로부터 분리되어(Lee *et al.*, 2001; Lee and Ha, 1991; Heo *et al.*, 2001), 넙치의 연쇄구균증의 원인종은 약 2~3종일 것으로 추정되고 있다.

현재 우리나라에서 보고된 넙치 병원체로 보고된 연쇄구균은  $\beta$ 용혈성(Jeun *et al.*, 1988; Heo *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2005) 균주이다.



본 연구에서는 제주도 육상양식장에서 사육되는 넙치에서 분리되는  $\gamma$ 용혈성 연쇄구균의 동정 및 생화학적인 특성과 항생제 감수성을 조사하여 양식 넙치에서 분리되는 용혈성이 없는 연쇄상구균의 특성을 제시하고자 하였다.



## II. 재료 및 방법

### 1.1. 시료채취

시료채취는 제주도내 넙치 육상 양식장 중에서 질병발생이 보고된 양식장의 넙치 집단에 대하여 체색흑화, 피부궤양, 지느러미 출혈, 안구돌출 및 충혈, 안구 백탁, 탈장 등 외부소견 상 연쇄구균에 걸린 것으로 추정되는 어류를 무작위로 추출하여 세균분리용 시료로 사용하였으며 대표적인 증상들은 Fig. 1에 나타내었다.

### 1.2. 세균의 분리, 동정 및 세균성 질병 진단

세균의 분리를 위해 채집된 어류를 무균적으로 해부하여 신장 또는 간의 조직액을 1.5% NaCl이 첨가된 Brain Heart Infusion Agar(Difco, USA)와 Blood Agar Plate(BAP, Komed, Korea)에 도말 하여  $30\pm 1^\circ\text{C}$ , 16~24시간 배양하였다.

배양된 세균은 Gram 염색을 실시하여 형태적으로 연쇄상구균이고 Gram 양성균주를 분리하였으며, Catalase test를 통하여 포도상구균과 구분하였다(Thoesen, 1994).

분리된 연쇄상구균은  $700\mu\text{l}$  Brain Heart Infusion Broth(1.5% NaCl)에서  $30^\circ\text{C}$ , 24시간 배양한 후 80% Glycerol  $300\mu\text{l}$  첨가하여  $-80^\circ\text{C}$ 에서 보관하였다.

### 1.3. *Streptococcus* sp.의 감염에 의한 병리학적 특이소견의 조사

연쇄구균증을 보이는 병어에서 세균검사를 통해 연쇄구균이 감염된 것을 확인 후 흑화, 복부팽만, 탈장, 복수저류, 복벽출혈, 안구돌출 및 출혈, 아가미 덮개출혈, 무안축 발적 등의 소견을 관찰하였다.

### 1.4. 분리세균의 용혈성 시험

넙치에서 분리된 세균을 Blood Agar Plate(BAP, Komed, Korea)에 계대배양( $30^\circ\text{C}$  24시간, 5%  $\text{CO}_2$ )한 후 냉장고에 방치하여 용혈성의 변화를 관찰하였다.

## 1.5. 분리세균의 항생제 감수성 시험

각각의 시료로부터 분리된 세균에 대한 항생제 감수성시험은 Baucer *et al.*(1966)의 disc 확산법을 이용하여 NCCLS(National Committee for Clinical Laboratory Standards)의 기준에 따랐다.

먼저 Brain Heart Infusion Agar(BHIA, USA)사면배지에 자란 colony를 0.85% 멸균 생리식염수에 희석하여 McFarland NO. 0.5가 되도록 탁도를 조절하여 1.5% NaCl이 첨가된 Muller Hinton Agar(Difco, USA)에 도말 한 후 BBL사(USA)의 항생제 disc 16종을 얹어  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서  $24\pm 2$ 시간 배양 한 후 억제환을 측정하였다.

## 1.6. 시험균주

제주도내 넙치 육상 양식장에서 질병발생이 보고된 양식장의 넙치 집단에 대한 세균성 질병 발생 동향조사에서 *Streptococcus*속 균으로 간이 동정된 균주를 대상으로 실험을 실시하였다.

## 1.7. 분리균주의 생화학적 특성 분석

분리균주의 생화학적 특성 분석은 Biolog사(Biolog Inc., USA)의 GP2 Plate를 이용하여 Table 1 에 나타난 95가지의 기질이용 특이성을 시험하였으며 분석은 MicroLog™ system(Release 4.05) program을 이용하였다.

순수 분리된 균주를 BUGM(Biolog Inc., USA) 사면배지에 접종하여  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 16~24시간 배양 한 후 현탁하여 탁도계(Biolog 21907, USA)를 이용하여 균주 현탁액이 20%가 되도록 조절한 후 GP2 Micro Plate의 각 well에 150 $\mu\text{L}$ 씩 접종 하고  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간 배양 한 후 보라색으로 발색되는 well을 양성으로 판정하였다. 분리 균주의 BIOLOG™를 이용한 생화학 특성 분석은 3번씩 실시하였다.

이때 현탁액은 NaCl 150g,  $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  51g, KCl 3.7g을 증류수 912mL에 녹인 MCS stock solution(Noble and Gow, 1998)을 증류수로 10배 희석한 후 멸균하여 사용하였다.

분리균주의 Cytochrome Oxidase, Catalase, Voges Proskauer 시험, Arginine, Hippurate, Esculin 가수분해 시험은 Gerhardt *et al.* (1981) 및 MacFaddin (1980)에 준하여 수행하였으며, 온도별 성장시험은 Pepton (Difco, USA) 1%첨가 broth에

서 1주일간 배양하여 관찰하였다.



Table 1. Parameter of biochemical characteristics by GP2 Micro Plate.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Water	$\alpha$ -Cyclodextrin	$\beta$ -Cyclodextrin	Dextrin	Glycogen	Inulin	Mannan	Tween 40	Tween 80	N-Acetyl-DGlucoamine	N-Acetyl-D Mannosamin	Amygdalin
B	L-Arabinose	D-Arabinitol	Arbutin	D-Cellobiose	D-Fructose	L-Fucose	D-Galactose	D-Galacturonic Acid	Gentiobiose	D-Gluconic Acid	$\alpha$ -D-Glucose	m-Inositol
C	$\alpha$ -D-Lactose	Lactulose	Maltose	Maltotriose	D-Mannitol	D-Mannose	D-Melezitose	D-Melibiose	$\alpha$ -Methyl D-Galactosid	$\beta$ -Methyl D-Galactosid	3-Methyl Glucose	$\alpha$ -Methyl D-Glucoside
D	$\beta$ -Methyl D-Glucoside	$\alpha$ -Methyl D-Mannosid	Palatinose	D- Psicose	D-Raffinose	L-Rhamnose	D-Ribose	Salicin	Sedoheptulose	D-Sorbitol	Saccharose	Sucrose
E	D-Tagatose	D-Trehalose	Turanose	Xylitol	D-Xylose	Acetic Acid	$\alpha$ -Hydroxy Butyric Acid	$\beta$ -Hydroxy Butyric Acid	$\gamma$ -Hydroxy Butyric Acid	p-Hydroxy Phenyl Acetic Acid	$\alpha$ -Keto Glutaric Acid	$\alpha$ -Keto Valeric Acid
F	Lactamide	D-Lactic Acid Methyl Ester	L-Lactic Acid	D-Malic Acid	L-Malic Acid	Pruvatic Acid Methyl Ester	Succinic Acid Mono-methyl Ester	Methyl Pyruvate	Mono-methyl Succinamic	Succinic Acid	Succinic Acid	N-Acetyl L-Glutamic Acid
G	L-Alaninamide	D-Alanine	L-Alanine	L-Alanyl-glycine	L-Asparagine	L-Glutamic Acid	Glycyl-L-glutamic Acid	L-Pyruglutamic Acid	L-Serine	Putrescine	2,3-Butanediol	Glycerol
H	Adenosine	2'-Deoxy Adenosine	Inosine	Thymidine	Uridine	Adenosine-5' Monophosphate	Thymidine-5' Monophosphate	Uridine-5' Monophosphate	Fructose-6-P phosphate	Glucose-1-Phosphate	Glucose-6-Phosphate	D-L- $\alpha$ -Glycerol Phosphate

## 1.8. 분리 균주의 분자생물학적 동정

### DNA 분리

순수 분리된 균주를 1.5% NaCl이 첨가된 Brain Heart Infusion Broth (Difco, USA)에 접종한 후  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 16~24시간 배양시킨 후  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $10,000\times g$ 로 10분간 원심분리하여 균체를 수확한 후 DNeasy tissue kit (QIAGEN, Germany)를 이용하여 Protocol에 따라 genomic DNA를 분리한 후 흡광도비( $A_{260}/A_{280}$ )가 1.8이상 되게 하였다.

### PCR 수행

분리된 균주의 16S rRNA 유전자 절편을 증폭하기 위해 *Taq* DNA polymerase (TaKaRa, Japan)를 사용하였고, Table 2에 나타낸 forward primer인 27f 및 reverse primer 1522r universal primers를 이용하여  $95^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 변성 후  $95^{\circ}\text{C}$  1분,  $55^{\circ}\text{C}$  1분,  $72^{\circ}\text{C}$  1분의 주기로 33회 반복한 후 최종  $72^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 확장하였다. 1% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 약 1.5 Kbp 정도의 DNA 증폭 산물을 확인하고 16S rRNA 유전자 절편의 cloning을 실시하였다.

Table 2. PCR primers used for 16S rRNA amplification in this study.

Primer name	Sequence
27f	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCA-3'
1522r	5'-AAGGAGGTGATCCARCCGCA-3'



## Cloning과 sequencing

16S rRNA 유전자 절편을 재조합하기 위해 증폭된 PCR 산물을 TOPO TA Cloning kit(Invitrogen, USA)를 이용하여 제조회사의 방법에 따라 클로닝을 실시하였다.

형질전환은 TOP 10F' *E. coli*를 competent cell로 하여 형질전환을 실시한 다음 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 X-gal과 IPTG 및 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 ampicillin을 포함하고 있는 Luria-Bertani Agar(Difco, USA)를 이용하여 37°C에서 18 시간 동안 배양한 후 흰색 콜로니를 선발하였다.

형질전환된 대장균은 ampicillin이 첨가된 Luria-Bertani broth (Difco, USA)에 접종하여 37°C, 220 rpm에서 18시간 배양한 후, Wizard SV Mini-Prep DNA Purification System (Promega, USA)를 이용하여 제조회사의 방법에 따라 plasmid를 분리하였다.

형질전환을 확인하기 위해 분리된 plasmid에 제한 효소 *EcoR* I 을 처리하여 37°C에서 4시간 반응시킨 후 1.2% agarose gel상에서 전기 영동하여 클로닝 여부를 확인하였다.

분리된 Plasmid는 Macrogen에 의뢰하여 염기서열분석을 실시하였다.

## 분리균주의 분자유전학적 동정

16S rRNA 유전자분석을 통한 분리균주의 동정은 밝혀진 염기서열을 NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 Blast Search 및 DNA Star program을 이용하였다. 염기의 계통학적 관계를 밝히기 위하여 Lasergen의 Megalign program을 이용하였으며 이 때 Clustal method에 의해 수행하였다.

## Multiplex PCR을 통한 연쇄구균의 확인

Multiplex PCR assay는 Mata *et al.* (2004)의 방법을 응용하여 *S. parauberis*, *S. iniae*, *L. garveiae* 3종에 대해 PCR assay를 실시하였고, 1% agarose gel에서 전기 영동하여 종 특이적인 증폭band를 확인하였다. primer sequences 및 amplicon size는 Table 3에 나타내었다.



Table 3. Primer sequences used for PCR amplification and the expected amplicon size.

Primer	Sequences(5' to 3')	Target gene	PCR ampli- con size(bp)	Pathogen
Spa 2152 Spa 2870	TTTCGTCTGAGGCAATGTTG GCTTCATATATCGCTATACT	23S rRNA	718	<i>S. parauberis</i>
LOX-1 LOX-2	AAGGGGAAATCGCAAGTGCC ATATCTGATTGGGCCGTCTAA	<i>lctO</i>	870	<i>S. iniae</i>
pLG-1 pLG-2	CATAACAATGAGAATCGC GCACCCTCGCGGGTTG	16S rRNA	1,100	<i>L. garvieae</i>
Sdi61 Sdi2525	AGGAAACCTGCCATTTGCG CAATCTATTTCTAGATCGTGG	16S-23S RNA intergenic spacer	192	<i>S. difficilis</i>

### Ⅲ. 결과

#### 1. 질병현황

연쇄상구균 감염으로 판정된 양식넙치의 길이는 평균 $40\pm 3\text{cm}$ 였으며, 외부임상소견을 조사해본 결과 흑화, 복부팽만, 탈장, 복수저류, 복벽내측출혈, 아가미 덮개출혈, 무안측 발적 등 육안적으로 특이할만한 증상들이 관찰되는 개체도 있었으나 아무런 임상적 소견을 나타내지 않은 개체도 있었다. 주된 임상적 증상으로는 흑화와 무안측 발적이 대부분이었으며, 아가미부식 또한 관찰되었다(Fig. 1).



Table 4. Tested strain in this study.

Strain	Origin		Organ	Year	Clinical Symptoms
	Host(body length)	Temp.(°C)			
para1	Flounder(40cm)	16.5	Brain	2005	darkened pigment
para2	Flounder(39cm)	16	Kidney	2005	darkened pigment gill corrosion
para3	Flounder(36cm)	16	Kidney	2005	Haemorrhaging in the eye
para4	Flounder(45cm)	18	Kidney	2005	Haemorrhaging abdominal wall
para5	Flounder(40cm)	13.5	Kidney	2005	Operculum bleeding
para6	Flounder(42cm)	13	Kidney	2005	Haemorrhaging abdominal wall



A



B



C



D



E



Fig. 1. The diseased flounder(*Paralichthys olivaceus*) showing the symptoms of *Streptococcus* sp..

A; Haemorrhaging abdominal wall, B; Haemorrhaging in the eye, C; Ascites undercurrent and liver abscess, D; Haemorrhaging abdominal wall and liver flare and darkened pigment, E; Operculum bleeding

## 2. 분리세균의 용혈성시험

혈액배지에 나타나는 용혈성 시험결과 *S. iniae*는 콜로니주위의 적혈구가 완전히 파괴된 완전용혈인  $\beta$ -용혈성을 나타냈으며, 분리균주는 용혈성이 없는  $\gamma$ 용혈성을 나타냈다(Fig. 2).



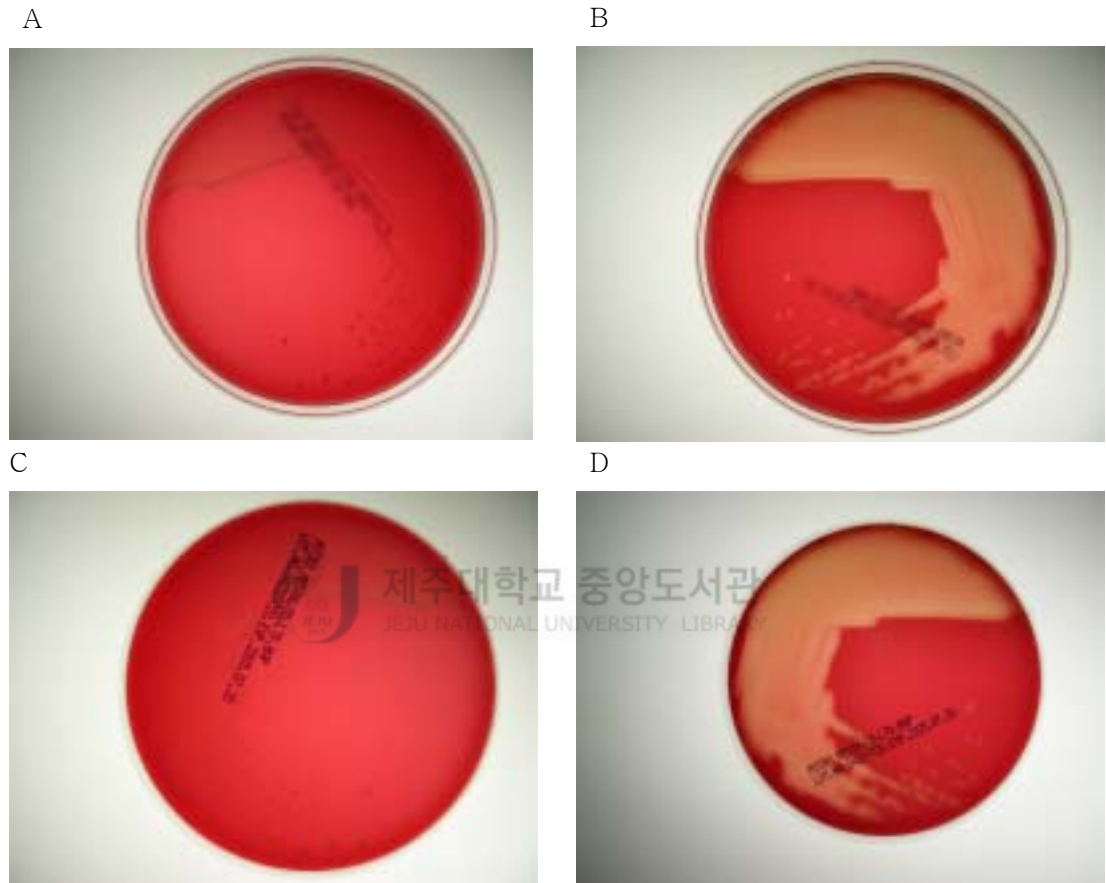


Fig. 2. Comparison of colony morphologies of  $\alpha$  and  $\beta$  hemolytic streptococci. Panels A, C; *Streptococcus* sp., B, D; *S. iniae*

### 3. 분리세균의 항생제 감수성 시험

분리균주에 높은 감수성을 보인 항생제는 ampicillin과 amoxicillin과 같은 페니실린계의 항생제와 ciprofloxacin과 같은 fluoroquinolone계 항생제에 감수성을 보였다. 그러나 teracycline과 oxolonic acid, nalidixic acid, doxycycline의 경우는 저항성을 나타냈다.(Table 6).



Table 5. Sensitivity to chemotherapeutic agent of *Streptococcus* sp..  
 S, sensitivity; R, resistance

Antibiotics	<i>Streptococcus</i> sp.
Ampicillin	S
Amoxicillin	S
Ciprofloxacin	S
Doxycycline	R
Erythromycin	S
Nalidixic acid	R
Oxolinic acid	R
Oxytetracycline	S
Norfloxacin	S
Ofloxacin	S
Chloramphenicol	S
Penicillin	S
Enrofloxacin	S
Oxytetracycline	R





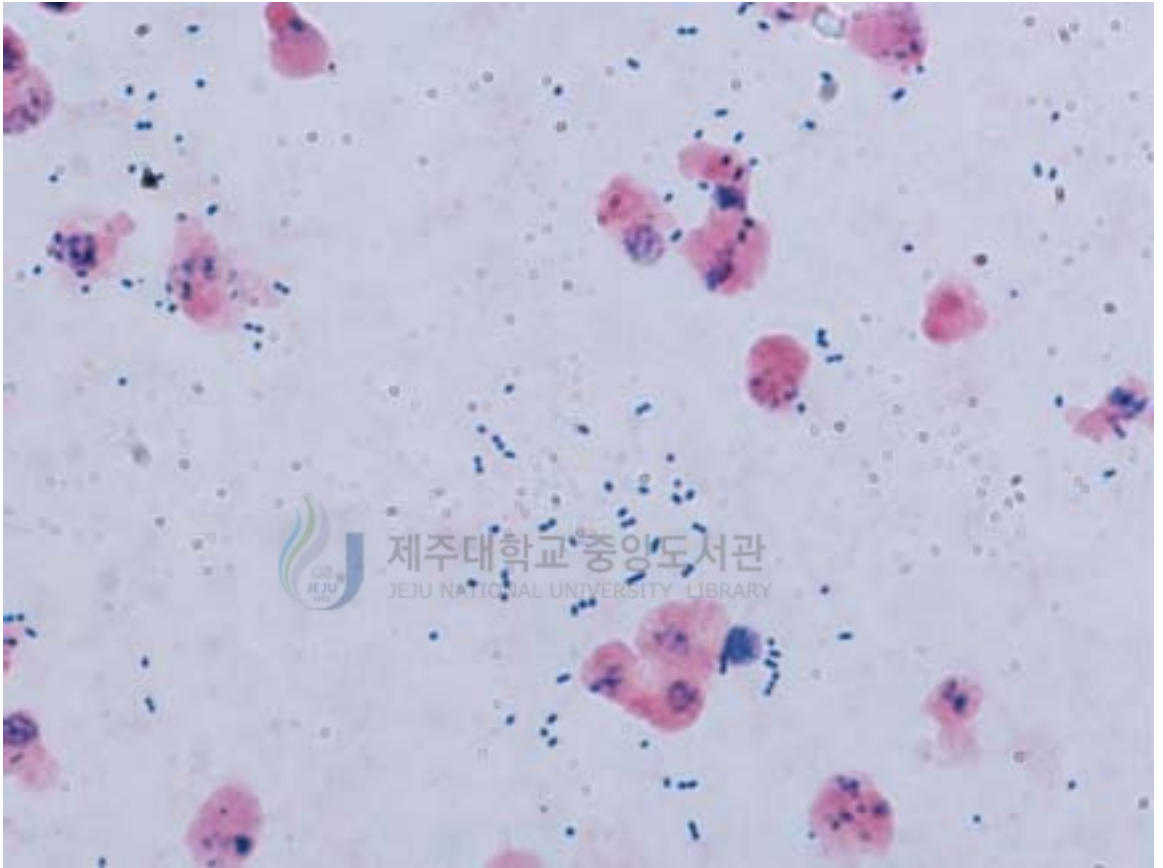


Fig. 3. Morphological feature of the *Streptococcus* sp. ( $\times 1000$ ).

#### 4. 분리균주의 생화학적 특성 분석

GP2 Plate을 이용한 생화학적 특성 조사 결과를 MicroLog™ system(Release 4.05) Program을 이용하여 동정을 실시하였다. 분리 균주의 MicroLog™ system(Release 4.05) Program 에서의 동정결과는 *Streptococcus uberis*였다. 프로그램의 database의 결과와 95%이상을 나타냈으며 similarity 값도 0.5이상을 나타냈다.

Dextrin, N-Acetyl-DGlucosamine, Arbutin, Maltose, Maltotriose, D-Cellobiose, D-Fructose, D-Mannose, α-D-Glucose, D-Mannitol, β-Methyl D-Glucoside, Salicin, D-Trehalose, Pruvatic Acid Methyl Ester, Mono-methyl Succinate, Glycerol을 기질로 한 well에서 양성을 나타냈다 (Table 7).

그리고 5%의 CO<sub>2</sub>가 존재하는 조건에서도 생육이 가능하였으며, Voges Proskauer 양성, Catalase 음성, 6.5% 염분에서도 내성을 나타냈다. Arginine, Hippurate, Esculin을 가수분해 하였다 (Table 6).



Table 6. Biological characteristic isolation *Streptococcus* sp..

Test items	Isolation strains
Growth in air	+
Growth in air plus 5% CO <sub>2</sub>	+
Growth anaerobically	+
Cytochrome oxidase	-
Catalase	-
Voges Proskauer	+
Growth at:	+
10°C	-
45°C	-
pH 9.6	-
Growth with:	
6.5% NaCl	+
40% bile	-
Hydrolysis of:	
Arginine	+
Hippurate	+
Esculin	+

Table 7. Biochemical characteristics of isolation strain and type strain tested by BIOLOG

Carbon source	para1	para2	para3	para4	para5	para6	para7	* KCTC 3651	* KCTC 3657
Water	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -Cyclodextrin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -Cyclodextrin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dextrin	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycogen	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inulin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannan	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tween 40	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tween 80	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-Acetyl-D-Glucosamine	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N-Acetyl-D-Mannosamine	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amygdalin	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Carbon source	para1	para2	para3	para4	para5	para6	para7	* KCTC 3651	* KCTC 3657
L-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arbutin	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Galactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Galacturonic Acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gentiobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Glucosonic Acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
m-Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\* KCTC3651(S. *paraburteri*), KCTC3657(S. *intare*)

Table 7. continue

Carbon source	para1	para2	para3	para4	para5	para6	para7	* KCTC 3651	* KCTC 3657
α-D-Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactulose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltotriose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Melezitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-Methyl D-Galactoside	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β-Methyl D-Galactoside	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3-Methyl Glucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-Methyl D-Glucoside	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Carbon source	para1	para2	para3	para4	para5	para6	para7	* KCTC 3651	* KCTC 3657
β-Methyl D-Glucoside	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α-Methyl D-Mannoside	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Palatinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D- Psicose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Ribose	-	-	+	+	+	+	+	-	+
Salicin	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Scotoheptulosan	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Sorbitol	-	+	+	+	-	-	-	-	-
Stachyose	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+

\* KCTC 3651 (*S. parauberis*), KCTC 3657 (*S. iniae*)

Table 7. continue

Carbon source	para1	para2	para3	para4	para5	para6	para7	* KCTC 3651	* KCTC 3657
D-Tagatose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Turanose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xylitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acetic Acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -Hydroxy Butyric Acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -Hydroxy Butyric Acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\gamma$ -Hydroxy Butyric Acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-
p-Hydroxy Phenyl Acetic Acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -Keto Glutamic Acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -Keto Valeric Acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Carbon source	para1	para2	para3	para4	para5	para6	para7	* KCTC 3651	* KCTC 3657
Lactamide	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Lactic Acid Methyl Ester	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Lactic Acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Malic Acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Malic Acid	+	-	-	-	+	-	-	+	+
Pyruvic Acid Methyl Ester	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Succinic Acid Mono-methyl Ester	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Methyl Pyruvate	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mono-methyl Succinate	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Succinamic Acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Succinic Acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-Acetyl L-Glutamic Acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\* KCTC3651(*S. parvuberis*), KCTC3657(*S. infantis*)

Table 7. continue

Carbon source	para1	para2	para3	para4	para5	para6	para7	* KCTC 3651	* KCTC 3657
L-Alaninamide	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Alanine	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Alanine	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Alanyl-glycine	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Asparagine	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Glutamic Acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycyl- L-glutamic Acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Pyroglutamic Acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Serine	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Putrescine	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,3-Butanediol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Carbon source	para1	para2	para3	para4	para5	para6	para7	* KCTC 3651	* KCTC 3657
Adenosine	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2'-Deoxy Adenosine	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inosine	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Thymidine	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Uridine	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Adenosine-5'- Monophosphate	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Thymidine-5'- Monophosphate	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Uridine-5'- Monophosphate	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fructose-6- Phosphate	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucose-1- Phosphate	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucose-6- Phosphate	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-L- $\alpha$ -Glycerol Phosphate	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\* KCTC3651(*S. parauberis*), KCTC3657(*S. imiae*)

## 5. Multiplex PCR을 통한 연쇄구균의 확인

분리균주에 대한 multiplex PCR assay를 실시하기에 앞서 국내 해산어 연쇄구균증 원인균과 연관성이 있을 것으로 추정되는 *S. parauberis* (KCTC3651), *S. iniae* (KCTC3096), *L. garvieae* (KCTC3772), 등 국내 보유 표준균주에 대한 mPCR 기법을 Mata *et al.*(2004)의 방법에 따라 실시하였다. 표준균주에 대한 mPCR 기법을 수행한 결과 *S. parauberis* KCTC3651, *S. iniae* KCTC3096, *L. garvieae* KCTC3772의 경우 예상되었던, 약 718bp, 870bp, 1,100bp 등의 증폭 산물을 확인하였다. 각각의 표준균주들에 대한 mPCR 기법을 수행한 결과 Table 3. 에 나타낸 amplicon size(817bp)와 일치하였으며, 분리한 균주는 *S. parauberis*와 일치하였다(Fig. 4).





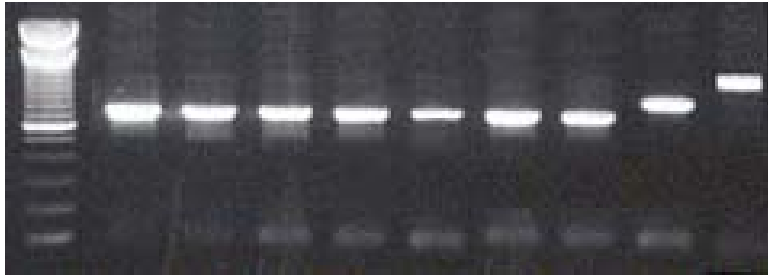


Fig. 4. Multiplex PCR of different Streptococcus strains. Lane 1, 100bp marker; Lane 2, para1; Lane 3, para2; Lane 4, para5; Lane 6, para6; Lane 8, *S. parauberis* KCTC3651(718bp); Lane 9, *S. iniae* KCTC3657(870); Lane 10, *L. garviae* KCTC3772(1,100bp).

## 6. 분리 균주의 분자생물학적 동정

Mutiple PCR을 통해서 *S. parauberis* 로 판정된 분리균주에 대한 16S rRNA gene에 대한 염기서열 분석 결과는 *S. parauberis* (AY942572)와 98%이상의 상동성을 나타내어 *S. parauberis*로 동정하였다.

분리된 균주들을 계통분류학적 분석결과 accession number AY584477 하나의 그룹으로 묶였지만 *S. iniae*와는 다른 그룹으로 묶였다(Fig 5).

분리균주와 표준균주 *S. parauberis* KCTC3651, *S. iniae* KCTC 3657, *L. garviae* KCTC3772, *S. parauberis*(AY942572, AF284579), *S. iniae*(AF335572), *L. garviae*(AY699289)의 align의결과는 Fig. 6에 나타냈다.



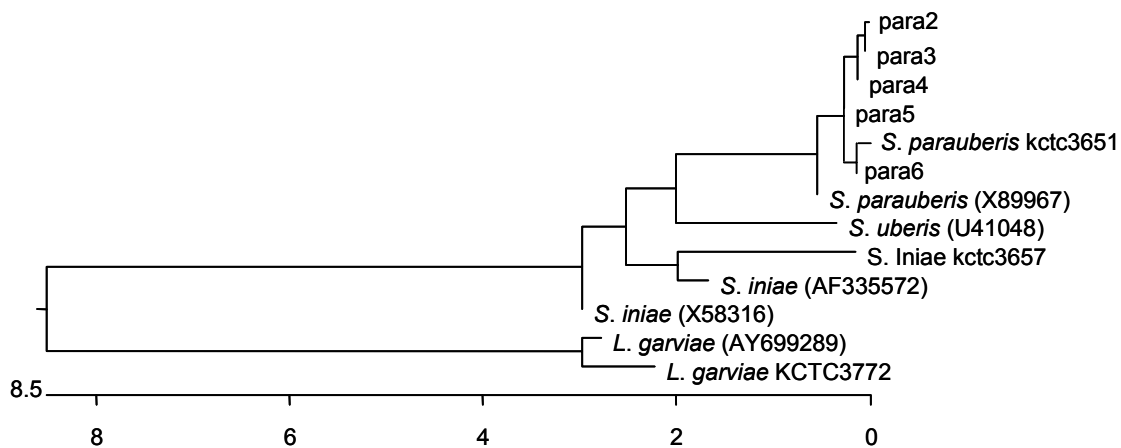


Fig. 5. Dendrogram showing the phylogenetic relationship among strains of *Streptococcus* spp. and closely related bacteria isolated from flounders of aquaculture farms. The length of each pair of branches represents the distance between sequence pairs, while the units at the bottom of tree indicate the number of substitution events.

KCTC3657 GCTGAGGATTGG—TGCTTGC—ACTAATCCAAAGAGTTGAGACGTTGGGAGTAAACGOGTA 91  
 AF335572 GCTGAGGATTGG—TGCTTGC—ACTAATCCAAAGAGTTGCGAACGGGTGAGTAAACGOGTA 117  
 para3 GCTGAAGACTGG—TGCTTGC—ACTAGTCAGATGAGTTGCGAACGGGTGAGTAAACGOGTA 83  
 para4 GCTGAAGACTGGGGTGCCTTGC—ACTAGTCAGATGAGTTGCGAACGGGTGAGTAAACGOGTA 86  
 para2 GCTGAAGACTGG—TGCTTGC—ACTAGTCAGATGAGTTGCGAACGGGTGAGTAAACGOGTA 84  
 KCTC3651 GCTGAAGACTGG—TGCTTGC—ACTAGTCAGATGAGTTGCGAACGGGTGAGTAAACGOGTA 83  
 para5 GCTGAAGACTGG—TGCTTGC—ACTAGTCAGATGAGTTGCGAACGGGTGAGTAAACGOGTA 83  
 para6 GCTGAAGACTGG—TGCTTGC—ACTAGTCAGATGAGTTGCGAACGGGTGAGTAAACGOGTA 84  
 AF264579 GCTGAAGACTGG—TGCTTGC—ACTAGTCAGATGAGTTGCGAACGGGTGAGTAAACGOGTA 117  
 AY942572 GCTGAAGACTGG—TGCTTGC—ACTAGTCAGATGAGTTGCGAACGGGTGAGTAAACGOGTA 102  
 KCTC3772 GATGATTAAGAT—AGCTTGCTATTTTTATGAAGAGCGGCGAACGGGTGAGTAAACGOGTG 95  
 AY699289 GATGATTAAGAT—AGCTTGCTATTTTTATGAAGAGCGGCGAACGGGTGAGTAAACGOGTG 119  
 \* \* \* \* \*

KCTC3657 GGTAACCTAOCCTCATAGCGGGGATAACTATTGSAACGATAGCTAATACCGCATGACAC 151  
 AF335572 GGTAACCTAOCCTCATAGCGGGGATAACTATTGSAACGATAGCTAATACCGCATGACAC 177  
 para3 GGTAACCTAOCCTCATAGCGGGGATAACTATTGSAACGATAGCTAATACCGCATGACAA 143  
 para4 GGTAACCTAOCCTCATAGCGGGGATAACTATTGSAACGATAGCTAATACCGCATGACAA 146  
 para2 GGTAACCTAOCCTCATAGCGGGGATAACTATTGSAACGATAGCTAATACCGCATGACAA 144  
 KCTC3651 GGTAACCTAOCCTCATAGCGGGGATAACTATTGSAACGATAGCTAATACCGCATGACAA 143  
 para5 GGTAACCTAOCCTCATAGCGGGGATAACTATTGSAACGATAGCTAATACCGCATGACAA 143  
 para6 GGTAACCTAOCCTCATAGCGGGGATAACTATTGSAACGATAGCTAATACCGCATGACAA 144  
 AF264579 GGTAACCTAOCCTCATAGCGGGGATAACTATTGSAACGATAGCTAATACCGCATGACAA 177  
 AY942572 GGTAACCTAOCCTCATAGCGGGGATAACTATTGSAACGATAGCTAATACCGCATGACAA 162  
 KCTC3772 GSAATCTGCGGAGTAGCGGGGACAAAGCTTTGSAACGAAAGCTAATACCGCATGACAA 155  
 AY699289 GSAATCTGCGGAGTAGCGGGGACAAAGCTTTGSAACGAAAGCTAATACCGCATGACAA 179  
 \* \* \* \* \*

KCTC3657 TAGAGTACACATGTACTTAATTTAAAAGGAGCAATGCTTCACTATGAGATGGACCTGGG 211  
 AF335572 TAGAGTACACATGTACTTAATTTAAAAGGAGCAATGCTTCACTATGAGATGGACCTGGG 237  
 para3 TTAAGTACTCATGTACTAAATTTAAAAGGAGCAATGCTTCACTATGAGATGGACCTGGG 203  
 para4 TTAAGTACTCATGTACTAAATTTAAAAGGAGCAATGCTTCACTATGAGATGGACCTGGG 206  
 para2 TTAAGTACTCATGTACTAAATTTAAAAGGAGCAATGCTTCACTATGAGATGGACCTGGG 204  
 KCTC3651 TTAAGTACTCATGTACTAAATTTAAAAGGAGCAATGCTTCACTATGAGATGGACCTGGG 203  
 para5 TTAAGTACTCATGTACTAAATTTAAAAGGAGCAATGCTTCACTATGAGATGGACCTGGG 203  
 para6 TTAAGTACTCATGTACTAAATTTAAAAGGAGCAATGCTTCACTATGAGATGGACCTGGG 204  
 AF264579 TTAAGTACTCATGTACTAAATTTAAAAGGAGCAATGCTTCACTATGAGATGGACCTGGG 237  
 AY942572 TTAAGTACTCATGTACTAAATTTAAAAGGAGCAATGCTTCACTATGAGATGGACCTGGG 203  
 KCTC3772 TGAGAAATGCGATGATCTTTATTTAAAAGGAGCAATGCTTCACTACTTGTATGATCCCGGG 215  
 AY699289 TGAGAAATGCGATGATCTTTATTTAAAAGGAGCAATGCTTCACTACTTGTATGATCCCGGG 239  
 \* \* \* \* \*

KCTC3657 TTGATTAGCTAGTTGGTGAAGTAAACGGCTCACCC—AAGGCCAGGATA—CATAGCGG 265  
 AF335572 TTGATTAGCTAGTTGGTGAAGTAAACGGCTCACCC—AAGGCCAGGATA—CATAGCGG 291  
 para3 TTGATTAGCTAGTTGGTGAAGTAAACGGCTCACCC—AAGGCCAGGATA—CATAGCGG 257  
 para4 TTGATTAGCTAGTTGGTGAAGTAAACGGCTCACCC—AAGGCCAGGATA—CATAGCGG 260  
 para2 TTGATTAGCTAGTTGGTGAAGTAAACGGCTCACCC—AAGGCCAGGATA—CATAGCGG 258  
 KCTC3651 TTGATTAGCTAGTTGGTGAAGTAAACGGCTCACCC—AAGGCCAGGATA—CATAGCGG 257  
 para5 TTGATTAGCTAGTTGGTGAAGTAAACGGCTCACCC—AAGGCCAGGATA—CATAGCGG 257  
 para6 TTGATTAGCTAGTTGGTGAAGTAAACGGCTCACCC—AAGGCCAGGATA—CATAGCGG 258  
 AF264579 TTGATTAGCTAGTTGGTGAAGTAAACGGCTCACCC—AAGGCCAGGATA—CATAGCGG 291  
 AY942572 TTGATTAGCTAGTTGGTGAAGTAAACGGCTCACCC—AAGGCCAGGATA—CATAGCGG 276  
 KCTC3772 TTGATTAGCTAGTTGGTGA—TGTAAAGGACTACCCCAAGGGGAGTATATCATAGCGG 274  
 AY699289 TTGATTAGCTAGTTGGTGAAGTAAAGGACTACCC—AAGGCCAGGATA—CATAGCGG 293  
 \* \* \* \* \*

KCTC3657 ACCTGAGAGGGTGTATGCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGC 325  
 AF335572 ACCTGAGAGGGTGTATGCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGC 351  
 para3 ACCTGAGAGGGTGTATGCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGC 317  
 para4 ACCTGAGAGGGTGTATGCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGC 320  
 para2 ACCTGAGAGGGTGTATGCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGC 318  
 KCTC3651 ACCTGAGAGGGTGTATGCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGC 317  
 para5 ACCTGAGAGGGTGTATGCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGC 317  
 para6 ACCTGAGAGGGTGTATGCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGC 318  
 AF264579 ACCTGAGAGGGTGTATGCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGC 351  
 AY942572 ACCTGAGAGGGTGTATGCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGC 336  
 KCTC3772 ACCTGAGAGGGTGTATGCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGC 334  
 AY699289 ACCTGAGAGGGTGTATGCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGC 353  
 \* \* \* \* \*

KCTC3657 A—GCAGTAGGGAATCTTGGCAATGGAACGGAAGTCTGA—CCGAGCAAGCGCGGTGAGTG 383  
 AF335572 A—GCAGTAGGGAATCTTGGCAATGGAACGGAAGTCTGA—CCGAGCAAGCGCGGTGAGTG 409  
 para3 A—GCAGTAGGGAATCTTGGCAATGGAACGGAAGTCTGA—CCGAGCAAGCGCGGTGAGTG 375  
 para4 A—GCAGTAGGGAATCTTGGCAATGGAACGGAAGTCTGA—CCGAGCAAGCGCGGTGAGTG 378  
 para2 A—GCAGTAGGGAATCTTGGCAATGGAACGGAAGTCTGA—CCGAGCAAGCGCGGTGAGTG 376

KCTC3651 AF335572 para5 para6 AF284579 AY942572 KCTC3772 AY699289

A-GCAGTAGGGAATCTTCGGCAATG9999CAACCCTGA-CCGAGCAACGCCGCGTGAAGT 375  
A-GCAGTAGGGAATCTTCGGCAATG9999CAACCCTGA-CCGAGCAACGCCGCGTGAAGT 375  
A-GCAGTAGGGAATCTTCGGCAATG9999CAACCCTGA-CCGAGCAACGCCGCGTGAAGT 376  
A-GCAGTAGGGAATCTTCGGCAATG9999CAACCCTGA-CCGAGCAACGCCGCGTGAAGT 409  
A-GCAGTAGGGAATCTTCGGCAATG9999CAACCCTGA-CCGAGCAACGCCGCGTGAAGT 394  
ACGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATG9999CAACCCTGAGCCGAGCAACGCCGCGTGAAGT 384  
A-GCAGTAGGGAATCTTCGGCAATG9999CAACCCTGA-CCGAGCAACGCCGCGTGAAGT 411  
\*\*\*\*\*

KCTC3657 AF335572 para3 para4 para2 KCTC3651 para5 para6 AF284579 AY942572 KCTC3772 AY699289

AAGAAGGTTTTCCGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGAGAA-GAACGGTAA-TGGGAGTGG 441  
AAGAAGGTTTTCCGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGAGAA-GAACGGTAA-TGGGAGTGG 467  
AAGAAGGTTTTCCGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGAGAA-GAACGGTAA-TGGGAGTGG 433  
AAGAAGGTTTTCCGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGAGAA-GAACGGTAA-TGGGAGTGG 436  
AAGAAGGTTTTCCGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGAGAA-GAACGGTAA-TGGGAGTGG 434  
AAGAAGGTTTTCCGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGAGAA-GAACGGTAA-TGGGAGTGG 433  
AAGAAGGTTTTCCGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGAGAA-GAACGGTAA-TGGGAGTGG 433  
AAGAAGGTTTTCCGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGAGAA-GAACGGTAA-TGGGAGTGG 434  
AAGAAGGTTTTCCGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGAGAA-GAACGGTAA-TGGGAGTGG 467  
AAGAAGGTTTTCCGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGAGAA-GAACGGTAA-TGGGAGTGG 452  
AAGAAGGTTTTCCGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGAGAA-GAACGGTAA-TGGGAGTGG 454  
AAGAAGGTTTTCCGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGAGAA-GAACGGTAA-TGGGAGTGG 489  
\*\*\*\*\*

KCTC3657 AF335572 para3 para4 para2 KCTC3651 para5 para6 AF284579 AY942572 KCTC3772 AY699289

AAATCCATTACGTGACGGTAACCTAACCCAGAAAGGGACGGCTAACCTACGTGCCAGCAGCC 501  
AAATCCATTACGTGACGGTAACCTAACCCAGAAAGGGACGGCTAACCTACGTGCCAGCAGCC 526  
AAATCCATTACGTGACGGTAACCTAACCCAGAAAGGGACGGCTAACCTACGTGCCAGCAGCC 492  
AAATCCATTACGTGACGGTAACCTAACCCAGAAAGGGACGGCTAACCTACGTGCCAGCAGCC 495  
AAATCCATTACGTGACGGTAACCTAACCCAGAAAGGGACGGCTAACCTACGTGCCAGCAGCC 493  
AAATCCATTACGTGACGGTAACCTAACCCAGAAAGGGACGGCTAACCTACGTGCCAGCAGCC 492  
AAATCCATTACGTGACGGTAACCTAACCCAGAAAGGGACGGCTAACCTACGTGCCAGCAGCC 492  
AAATCCATTACGTGACGGTAACCTAACCCAGAAAGGGACGGCTAACCTACGTGCCAGCAGCC 493  
AAATCCATTACGTGACGGTAACCTAACCCAGAAAGGGACGGCTAACCTACGTGCCAGCAGCC 526  
AAATCCATTACGTGACGGTAACCTAACCCAGAAAGGGACGGCTAACCTACGTGCCAGCAGCC 511  
AAATCCATTACGTGACGGTAACCTAACCCAGAAAGGGACGGCTAACCTACGTGCCAGCAGCC 513  
AAATCCATTACGTGACGGTAACCTAACCCAGAAAGGGACGGCTAACCTACGTGCCAGCAGCC 528  
\*\*\*\*\*

KCTC3657 AF335572 para3 para4 para2 KCTC3651 para5 para6 AF284579 AY942572 KCTC3772 AY699289

GC9GTAATACGTAGGCTCGAGCGTTGTC99AATTTATTGG9CGTAAAGCGAGCGCAGG 561  
GC9GTAATACGTAGGCTCGAGCGTTGTC99AATTTATTGG9CGTAAAGCGAGCGCAGG 585  
GC9GTAATACGTAGGCTCGAGCGTTGTC99AATTTATTGG9CGTAAAGCGAGCGCAGG 551  
GC9GTAATACGTAGGCTCGAGCGTTGTC99AATTTATTGG9CGTAAAGCGAGCGCAGG 554  
GC9GTAATACGTAGGCTCGAGCGTTGTC99AATTTATTGG9CGTAAAGCGAGCGCAGG 552  
GC9GTAATACGTAGGCTCGAGCGTTGTC99AATTTATTGG9CGTAAAGCGAGCGCAGG 551  
GC9GTAATACGTAGGCTCGAGCGTTGTC99AATTTATTGG9CGTAAAGCGAGCGCAGG 551  
GC9GTAATACGTAGGCTCGAGCGTTGTC99AATTTATTGG9CGTAAAGCGAGCGCAGG 552  
GC9GTAATACGTAGGCTCGAGCGTTGTC99AATTTATTGG9CGTAAAGCGAGCGCAGG 585  
GC9GTAATACGTAGGCTCGAGCGTTGTC99AATTTATTGG9CGTAAAGCGAGCGCAGG 570  
GC9GTAATACGTAGGCTCGAGCGTTGTC99AATTTATTGG9CGTAAAGCGAGCGCAGG 572  
GC9GTAATACGTAGGCTCGAGCGTTGTC99AATTTATTGG9CGTAAAGCGAGCGCAGG 587  
\*\*\*\*\*

KCTC3657 AF335572 para3 para4 para2 KCTC3651 para5 para6 AF284579 AY942572 KCTC3772 AY699289

CG9GTTCTATAAGTCTGAAGTAAAAGG-CAGTGGCTCAACCATTGTATG-CITTTGGAAA 619  
-CG9GTT-CTATAAGTCTGAAGTAAAAGG-CAGTGGCTCAACCATTGTATG-CITTTGGAAA 641  
-CG9GTT-ATTTAAGTCTGAAGTAAAAGG-CG9TGGCTCAACCATTGTATG-CITTTGGAAA 607  
-CG9GTT-ATTTAAGTCTGAAGTAAAAGG-CG9TGGCTCAACCATTGTATG-CITTTGGAAA 610  
-CG9GTT-ATTTAAGTCTGAAGTAAAAGG-CG9TGGCTCAACCATTGTATG-CITTTGGAAA 608  
-CG9GTT-ATTTAAGTCTGAAGTAAAAGG-CG9TGGCTCAACCATTGTATG-CITTTGGAAA 609  
-CG9GTT-ATTTAAGTCTGAAGTAAAAGG-CG9TGGCTCAACCATTGTATG-CITTTGGAAA 608  
-CG9GTT-ATTTAAGTCTGAAGTAAAAGG-CG9TGGCTCAACCATTGTATG-CITTTGGAAA 608  
-CG9GTT-ATTTAAGTCTGAAGTAAAAGG-CG9TGGCTCAACCATTGTATG-CITTTGGAAA 641  
-CG9GTT-ATTTAAGTCTGAAGTAAAAGG-CG9TGGCTCAACCATTGTATG-CITTTGGAAA 626  
-TG9GTT-TCTTAAGTCTGATGTAAGG-CAGTGGCTCAACCATTGTATG-CITTTGGAAA 628  
-TG9GTT-TCTTAAGTCTGATGTAAGG-CAGTGGCTCAACCATTGTATG-CITTTGGAAA 643  
\*\*\*\*\*

KCTC3657 AF335572 para3 para4 para2 KCTC3651 para5 para6 AF284579 AY942572

CCTGTAGAAGCTTGAAGTGCAGAAAGGGGAGAGTGGAAATCC-ATGTGTAGCGGTGAAATGC 678  
C-TGTAGAAGCTTGAAGTGCAGAAAGGGG-AGAGTGGAAATCC-ATGTGTAGCGGTGAAATGC 698  
C-TGGATAAAGCTTGAAGTGCAGAAAGGGG-AGAGTGGAAATCC-ATGTGTAGCGGTGAAATGC 664  
NCTGGATAAAGCTTGAAGTGCAGAAAGGGG-AGAGTGGAAATCC-ATGTGTAGCGGTGAAATGC 668  
C-TGGATAAAGCTTGAAGTGCAGAAAGGGG-AGAGTGGAAATCC-ATGTGTAGCGGTGAAATGC 665  
-CITGGATAAAGCTTGAAGTGCAGAAAGGGG-AGAGTGGAAATCC-ATGTGTAGCGGTGAAATGC 667  
ACTGGATAAAGCTTGAAGTGCAGAAAGGGG-AGAGTGGAAATCC-ATGTGTAGCGGTGAAATGC 666  
-CITGGATAAAGCTTGAAGTGCAGAAAGGGG-AGAGTGGAAATCC-ATGTGTAGCGGTGAAATGC 665  
-CITGGATAAAGCTTGAAGTGCAGAAAGGGG-AGAGTGGAAATCC-ATGTGTAGCGGTGAAATGC 698  
-CITGGATAAAGCTTGAAGTGCAGAAAGGGG-AGAGTGGAAATCC-ATGTGTAGCGGTGAAATGC 683

```

AF335572      ACATCCCTCTGACCGTCTAGAGATAGGACTTTCCTTGGGACAGAGGACAGGTGGTG 1053
para3        ACATCCCTCTGACCGTCTAGAGATAGGACTTTCCTTGGGACAGAGGTGACAGGTGGTG 1019
para4        ACATCCCTCTGACCGTCTAGAGATAGGACTTTCCTTGGGACAGAGGTGACAGGTGGTG 1024
para5        ACATCCCTCTGACCGTCTAGAGATAGGACTTTCCTTGGGACAGAGGTGACAGGTGGTG 1020
KCTC3651     ACATCCCTCTGACCGTCTAGAGATAGGACTTTCCTTGGGACAGAGGTGACAGGTGGTG 1023
para5        ACATCCCTCTGACCGTCTAGAGATAGGACTTTCCTTGGGACAGAGGTGACAGGTGGTG 1021
para6        ACATCCCTCTGACCGTCTAGAGATAGGACTTTCCTTGGGACAGAGGTGACAGGTGGTG 1020
AF284579     ACATCCCTCTGACCGTCTAGAGATAGGACTTTCCTTGGGACAGAGGTGACAGGTGGTG 1053
AY942572     ACATCCCTCTGACCGTCTAGAGATAGGACTTTCCTTGGGACAGAGGTGACAGGTGGTG 1039
KCTC3772     ACATACCTGCTATCCTTAGAGATAAGGAGTTCCTTGGGACAGGATACAGGTGGTG 1039
AY699289     ACATACTGCTATCCTTAGAGATAAGGAGTTCCTTGGGACAGGATACAGGTGGTG 1054
*****

KCTC3657     CATGGTTGTGTCAGCTCGTGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGGCGCAACC 1095
AF335572     CATGGTTGTGTCAGCTCGTGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGGCGCAACC 1113
para3        CATGGTTGTGTCAGCTCGTGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGGCGCAACC 1079
para4        CATGGTTGTGTCAGCTCGTGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGGCGCAACC 1084
para2        CATGGTTGTGTCAGCTCGTGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGGCGCAACC 1080
KCTC3651     CATGGTTGTGTCAGCTCGTGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGGCGCAACC 1083
para5        CATGGTTGTGTCAGCTCGTGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGGCGCAACC 1081
para6        CATGGTTGTGTCAGCTCGTGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGGCGCAACC 1080
AF284579     CATGGTTGTGTCAGCTCGTGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGGCGCAACC 1113
AY942572     CATGGTTGTGTCAGCTCGTGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGGCGCAACC 1099
KCTC3772     CATGGTTGTGTCAGCTCGTGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGGCGCAACC 1089
AY699289     CATGGTTGTGTCAGCTCGTGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGGCGCAACC 1114
*****

KCTC3657     CCTATTGTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGGCGGTAAATAAAC 1155
AF335572     CCTATT-GTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTG-CGGTAATAAAAC 1171
para3        CCTATT-GTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTG-CGGTAATAAAAC 1137
para4        CCTATT-GTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTG-CGGTAATAAAAC 1142
para2        CCTATT-GTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTG-CGGTAATAAAAC 1138
KCTC3651     CCTATT-GTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTG-CGGTAATAAAAC 1141
para5        CCTATT-GTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTG-CGGTAATAAAAC 1139
para6        CCTATT-GTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTG-CGGTAATAAAAC 1138
AF284579     CCTATT-GTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTG-CGGTAATAAAAC 1171
AY942572     CCTATT-GTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTG-CGGTAATAAAAC 1157
KCTC3772     CTTATT-CTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTG-CGGTGATAAAC 1157
AY699289     CTTATT-CTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTG-CGGTGATAAAC 1172
*****

KCTC3657     CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATG---CCCTTATGA---CCTG99---CTA 1215
AF335572     CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATG---CCCTTATGA---CCTG99---CTA 1224
para3        CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATG---CCCTTATGA---CCTG99---CTA 1190
para4        CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATG---CCCTTATGA---CCTG99---CTA 1195
para2        CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATG---CCCTTATGA---CCTG99---CTA 1191
KCTC3651     CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATG---CCCTTATGA---CCTG99---CTA 1194
para5        CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATG---CCCTTATGA---CCTG99---CTA 1182
para6        CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATG---CCCTTATGA---CCTG99---CTA 1191
AF284579     CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATG---CCCTTATGA---CCTG99---CTA 1224
AY942572     CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATG---CCCTTATGA---CCTG99---CTA 1210
KCTC3772     CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATG---CCCTTATGA---CCTG99---CTA 1210
AY699289     CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATG---CCCTTATGA---CCTG99---CTA 1225
*****

KCTC3657     CAC-ACGTGCCTACAATG9TTGTACAACGAAGTGCAGGCGGTGACAGGCGAGCT 1274
AF335572     CAC-ACGTGC---TACAATG9TTG---GTACAACGA---GTGCAAGCCGGTG---ACGGCAAGCT 1277
para3        CAC-ACGTGC---TACAATG9TTG---GTACAACGA---GTGCAAGCCGGTG---ACGGCAAGCT 1243
para4        CAC-ACGTGC---TACAATG9TTG---GTACAACGA---GTGCAAGCCGGTG---ACGGCAAGCT 1248
para2        CAC-ACGTGC---TACAATG9TTG---GTACAACGA---GTGCAAGCCGGTG---ACGGCAAGCT 1244
KCTC3651     CAC-ACGTGC---TACAATG9TTG---GTACAACGA---GTGCAAGCCGGTG---ACGGCAAGCT 1247
para5        CAC-ACGTGC---TACAATG9TTG---GTACAACGA---GTGCAAGCCGGTG---ACGGCAAGCT 1245
para6        CAC-ACGTGC---TACAATG9TTG---GTACAACGA---GTGCAAGCCGGTG---ACGGCAAGCT 1244
AF284579     CAC-ACGTGC---TACAATG9TTG---GTACAACGA---GTGCAAGCCGGTG---ACGGCAAGCT 1277
AY942572     CAC-ACGTGC---TACAATG9TTG---GTACAACGA---GTGCAAGCCGGTG---ACGGCAAGCT 1263
KCTC3772     CACAGGTGCG---TACAATG9ATG---GTACAACGA---GTGCAAGCCGGTG---ACGGTGC9CT 1264
AY699289     CAC-ACGTGC---TACAATG9ATG---GTACAACGA---GTGCAAGCCGGTG---ACGGTGC9CT 1278
*****

KCTC3657     AATCTCTTAAAGCCAATCTCAGTTG9GATTGTAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGTGG 1334
AF335572     AATCTCTTAAAGCCAATCTCAGTTG9GATTGTAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGTGG 1337
para3        AATCTCTTAAAGCCAATCTCAGTTG9GATTGTAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGTGG 1303
para4        AATCTCTTAAAGCCAATCTCAGTTG9GATTGTAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGTGG 1308
para2        AATCTCTTAAAGCCAATCTCAGTTG9GATTGTAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGTGG 1304
KCTC3651     AATCTCTTAAAGCCAATCTCAGTTG9GATTGTAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGTGG 1307

```

AF335572 ACATCCCTCTGACCGTCTAGAGATAGGATTTTCCTTCCGGACAGAGGAGACAGGTGGTG 1053  
 para3 ACATCCCTCTGACCGTCTAGAGATAGGACTTTTCCTTCCGGACAGAGGAGACAGGTGGTG 1019  
 para4 ACATCCCTCTGACCGTCTAGAGATAGGACTTTTCCTTCCGGACAGAGGAGACAGGTGGTG 1024  
 para2 ACATCCCTCTGACCGTCTAGAGATAGGACTTTTCCTTCCGGACAGAGGAGACAGGTGGTG 1020  
 KCTC3651 ACATCCCTCTGACCGTCTAGAGATAGGACTTTTCCTTCCGGACAGAGGAGACAGGTGGTG 1023  
 para5 ACATCCCTCTGACCGTCTAGAGATAGGACTTTTCCTTCCGGACAGAGGAGACAGGTGGTG 1021  
 para6 ACATCCCTCTGACCGTCTAGAGATAGGACTTTTCCTTCCGGACAGAGGAGACAGGTGGTG 1020  
 AF284579 ACATCCCTCTGACCGTCTAGAGATAGGACTTTTCCTTCCGGACAGAGGAGACAGGTGGTG 1053  
 AY942572 ACATCCCTCTGACCGTCTAGAGATAGGACTTTTCCTTCCGGACAGAGGAGACAGGTGGTG 1039  
 KCTC3772 ACATCCCTCTGACCGTCTAGAGATAGGACTTTTCCTTCCGGACAGAGGAGACAGGTGGTG 1039  
 AY699289 ACATACTCGTCTATCCTTAGAGATAAGGAGTTTCCTTCCGGACAGGAGATACAGGTGGTG 1054

\*\*\*\* \* \*\* \* \*\*\*\*\* \* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\*

KCTC3657 CATGGTTGTCGTAGCTCGTGTGCGTGAAGTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC 1095  
 AF335572 CATGGTTGTCGTAGCTCGTGTGCGTGAAGTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC 1113  
 para3 CATGGTTGTCGTAGCTCGTGTGCGTGAAGTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC 1079  
 para4 CATGGTTGTCGTAGCTCGTGTGCGTGAAGTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC 1084  
 para2 CATGGTTGTCGTAGCTCGTGTGCGTGAAGTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC 1080  
 KCTC3651 CATGGTTGTCGTAGCTCGTGTGCGTGAAGTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC 1083  
 para5 CATGGTTGTCGTAGCTCGTGTGCGTGAAGTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC 1081  
 para6 CATGGTTGTCGTAGCTCGTGTGCGTGAAGTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC 1080  
 AF284579 CATGGTTGTCGTAGCTCGTGTGCGTGAAGTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC 1113  
 AY942572 CATGGTTGTCGTAGCTCGTGTGCGTGAAGTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC 1099  
 KCTC3772 CATGGTTGTCGTAGCTCGTGTGCGTGAAGTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC 1099  
 AY699289 CATGGTTGTCGTAGCTCGTGTGCGTGAAGTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC 1114

\*\*\*\*\*

KCTC3657 CCTATTGTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGGCCGGTAATAAAC 1155  
 AF335572 CCTATT-GTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTG-CGGTAATAAAC 1171  
 para3 CCTATT-GTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTG-CGGTAATAAAC 1137  
 para4 CCTATT-GTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTG-CGGTAATAAAC 1142  
 para2 CCTATT-GTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTG-CGGTAATAAAC 1138  
 KCTC3651 CCTATT-GTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTG-CGGTAATAAAC 1141  
 para5 CCTATT-GTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTG-CGGTAATAAAC 1139  
 para6 CCTATT-GTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTG-CGGTAATAAAC 1138  
 AF284579 CCTATT-GTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTG-CGGTAATAAAC 1171  
 AY942572 CCTATT-GTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTG-CGGTAATAAAC 1157  
 KCTC3772 CTTATT-ACTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAGT&GACTG-CGGTGATAAAC 1157  
 AY699289 CTTATT-ACTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAGT&GACTG-CGGTGATAAAC 1172

\* \*\*\*\* \*\*\*\*\*

KCTC3657 CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATG-COCCTTATGA-CCTGGG-CTA 1215  
 AF335572 CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATG-COCCTTATGA-CCTGGG-CTA 1224  
 para3 CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATG-COCCTTATGA-CCTGGG-CTA 1190  
 para4 CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATG-COCCTTATGA-CCTGGG-CTA 1195  
 para2 CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATG-COCCTTATGA-CCTGGG-CTA 1191  
 KCTC3651 CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATG-COCCTTATGA-CCTGGG-CTA 1194  
 para5 CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATG-COCCTTATGA-CCTGGG-CTA 1192  
 para6 CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATG-COCCTTATGA-CCTGGG-CTA 1191  
 AF284579 CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATG-COCCTTATGA-CCTGGG-CTA 1224  
 AY942572 CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATG-COCCTTATGA-CCTGGG-CTA 1210  
 KCTC3772 CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATG-COCCTTATGA-CCTGGG-CTA 1210  
 AY699289 CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATG-COCCTTATGA-CCTGGG-CTA 1225

\*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*

KCTC3657 CAC-ACGTGC-TACAATGGTTG-GTACAACGA-GTCGCAAGCCGGT-GACGCGCAAGCT 1274  
 AF335572 CAC-ACGTGC-TACAATGGTTG-GTACAACGA-GTCGCAAGCCGGT-GACGCGCAAGCT 1277  
 para3 CAC-ACGTGC-TACAATGGTTG-GTACAACGA-GTCGCAAGCCGGT-GACGCGCAAGCT 1243  
 para4 CAC-ACGTGC-TACAATGGTTG-GTACAACGA-GTCGCAAGCCGGT-GACGCGCAAGCT 1248  
 para2 CAC-ACGTGC-TACAATGGTTG-GTACAACGA-GTCGCAAGCCGGT-GACGCGCAAGCT 1244  
 KCTC3651 CAC-ACGTGC-TACAATGGTTG-GTACAACGA-GTCGCAAGCCGGT-GACGCGCAAGCT 1247  
 para5 CAC-ACGTGC-TACAATGGTTG-GTACAACGA-GTCGCAAGCCGGT-GACGCGCAAGCT 1245  
 para6 CAC-ACGTGC-TACAATGGTTG-GTACAACGA-GTCGCAAGCCGGT-GACGCGCAAGCT 1244  
 AF284579 CAC-ACGTGC-TACAATGGTTG-GTACAACGA-GTCGCAAGCCGGT-GACGCGCAAGCT 1277  
 AY942572 CAC-ACGTGC-TACAATGGTTG-GTACAACGA-GTCGCAAGCCGGT-GACGCGCAAGCT 1283  
 KCTC3772 CAO&AGTGC-TACAATGGATG-GTACAACGA-GTCGCAACCCCGG-AGGGTGGCT 1264  
 AY699289 CAC-ACGTGC-TACAATGGATG-GTACAACGA-GTCGCAACCCCGG-AGGGTGGCT 1276

\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\* \* \*\* \* \*\*

KCTC3657 AATCTCTTAAAGCCAATCTCAGTTGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGG 1334  
 AF335572 AATCTCTTAAAGCCAATCTCAGTTGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGG 1337  
 para3 AATCTCTTAAAGCCAATCTCAGTTGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGG 1303  
 para4 AATCTCTTAAAGCCAATCTCAGTTGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGG 1308  
 para2 AATCTCTTAAAGCCAATCTCAGTTGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGG 1304  
 KCTC3651 AATCTCTTAAAGCCAATCTCAGTTGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGG 1307

```

para5      AATCTCTTAAAGCCAATCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGG 1305
para6      AATCTCTTAAAGCCAATCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGG 1304
AF284579   AATCTCTTAAAGCCAATCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGG 1337
AY942572   AATCTCTTAAAGCCAATCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGG 1323
KCTC3772   AATCTCTTAAAGCCAATCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGG 1324
AY899289   AATCTCTTAAAGCCAATCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGG 1338
*****

KCTC3657   AATGCTAGTAATCGGGATCAGCACGCGCGGTGAATAAGTTCCTCCGGGCTTGTACACA 1394
AF335572   AATGCTAGTAATCGGGATCAGCACGCGCGGTGAATAAGTTCCTCCGGGCTTGTACACA 1397
para3      AATGCTAGTAATCGGGATCAGCACGCGCGGTGAATAAGTTCCTCCGGGCTTGTACACA 1363
para4      AATGCTAGTAATCGGGATCAGCACGCGCGGTGAATAAGTTCCTCCGGGCTTGTACACA 1368
para2      AATGCTAGTAATCGGGATCAGCACGCGCGGTGAATAAGTTCCTCCGGGCTTGTACACA 1364
KCTC3651   AATGCTAGTAATCGGGATCAGCACGCGCGGTGAATAAGTTCCTCCGGGCTTGTACACA 1367
para5      AATGCTAGTAATCGGGATCAGCACGCGCGGTGAATAAGTTCCTCCGGGCTTGTACACA 1365
para6      AATGCTAGTAATCGGGATCAGCACGCGCGGTGAATAAGTTCCTCCGGGCTTGTACACA 1364
AF284579   AATGCTAGTAATCGGGATCAGCACGCGCGGTGAATAAGTTCCTCCGGGCTTGTACACA 1397
AY942572   AATGCTAGTAATCGGGATCAGCACGCGCGGTGAATAAGTTCCTCCGGGCTTGTACACA 1383
KCTC3772   AATGCTAGTAATCGGGATCAGCACGCGCGGTGAATAAGTTCCTCCGGGCTTGTACACA 1384
AY899289   AATGCTAGTAATCGGGATCAGCACGCGCGGTGAATAAGTTCCTCCGGGCTTGTACACA 1398
*****

KCTC3657   CAGCCCGTCACACCAACGAGAGTTTGTAAACACCCGAACCT--TAAAGTAAOCTTTT 1452
AF335572   C-CGCCCGTCACACCAACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGAAGTAAOCTTTT 1456
para3      C-CGCCCGTCACACCAACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGAAGTAAOCTTA 1422
para4      C-CGCCCGTCACACCAACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGAAGTAAOCTA 1427
para2      C-CGCCCGTCACACCAACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGAAGTAAOCT 1423
KCTC3651   C-CGCCCGTCACACCAACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGAAGTAAOCT 1426
para5      C-CGCCCGTCACACCAACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGAAGTAAOCT 1424
para6      C-CGCCCGTCACACCAACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGAAGTAAOCT 1423
AF284579   C-CGCCCGTCACACCAACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGAAGTAAOCT 1456
AY942572   C-CGCCCGTCACACCAACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGAAGTAAOCT 1442
KCTC3772   C-CGCCCGTCACACCAACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGAAGTAAOCT 1443
AY899289   C-CGCCCGTCACACCAACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGAAGTAAOCT 1456
*****

KCTC3657   GCCAGCGCCTAAGGTGGGATAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAGCAATGTGCCCTT 1512
AF335572   GCCAGCGCCTAAGGTGGGATAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAAACAAGGTAGCGT 1518
para3      GCCAGCGCCTAAGGTGGGATAGATGATTGGG-GGAAGTCNAACANNNGCT----- 1472
para4      GCCAGCGCCTAAGGTGGGATAGATGATTGGG-GGAAGTCNAACANNNGCTAGGN----- 1481
para2      GCCAGCGCCTAAGGTGGGATAGATGATTGGG-GGAAGTCNAACANNNGCT----- 1473
KCTC3651   GCCAGCGCCTAAGGTGGGATAGATGATTGGG-GGAAGTCNAACANNNGCT----- 1476
para5      GCCAGCGCCTAAGGTGGGATAGATGATTGGG-GGAAGTCNAACANNNGCT----- 1474
para6      GCCAGCGCCTAAGGTGGGATAGATGAT-GGG-GGAAGTCNAACAAGNGCT----- 1472
AF284579   GCCAGCGCCTAAGGTGGGATAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAAACAAGGTAGCGG 1516
AY942572   GCCAGCGCCTAAGGTGGGATAGATGATTGGG-TGAAGTCGTA----- 1485
KCTC3772   GGGCGCTTCTAAGGTAAAGACCGATGACTGGGGTGAAGTCGTAAACAAGGTAGCG 1500
AY899289   GGGCGCTTCTAAGGTAAAGACCGATGACTGGGGTGAAGTCGTAAACAAGGTAGCG 1516
*****

```

Fig. 6. Multiple alignment of the partial 16S rDNA sequence of an isolated strain and *Streptococcus parauberis* KCTC 3651 and *Streptococcus iniae* KCTC3657 and *Lactococcus garviae* KCTC 3772. *S. parauberis*(AY942572, AF284579), *S. iniae*(AF335572), *L. garviae*(AY699289)



## IV. 고찰

연쇄상구균은 그람양성 catalase음성 세균으로 chain형태를 이루고 있다(Fig. 3). 연쇄상구균은 사람의 구강과 폐의 중요한 미생물환경을 차지하고 있다(Hardie and Marsh, 1978).

어류에서의 연쇄상구균증의 연구로는 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*), golden shiner(*Notemigonus crysoleucas*), 방어(*Seriola quinqueradiata*), 은어(*Plecoglossus altivelis*), amago(*Oncorhynchus rhodurus*), 뱀장어(*Anguilla japonica*)(Hoshina *et al.* 1958, Robinson and Meyer 1966, Kusda *et al.*, 1976-a; Kitao, 1982, Ohnishi, *et al.*, 1981, Kusda *et al.*, 1978), 감염을 보고하였다.

Zlotkin *et al.*(1998)은 방어의 연쇄구균증 원인균을 PCR기법에 의해 *Lactococcus garvieae*라고 동정하였고, Doménech *et al.*(1996)은 유럽에서 주로 양식되는 터봇(*Scophthalmus maximus*)의 연쇄구균증의 원인균을 *Streptococcus parauberis*로 동정하였다.

분리균주의 탄소원을 기질로 이용하는 특성(Dextrin, N-Acetyl-DGlucosamine, Arbutin, Maltose, Maltotriose, D-Cellobiose, D-Fructose, D-Mannose,  $\alpha$ -D-Glucose, D-Mannitol,  $\beta$ -Methyl D-Glucoside, Salicin, Sucrose, D-Trehalose, Pruvatic Acid Methyl Ester, Mono-methyl Succinate, Glycerol)은 Annette and Collllins (1990)가 보고한 결과와 유사하며, 용혈성시험에서도  $\gamma$ 용혈성으로 같은 결과를 나타냈다.

분리균주에 대한 multiplex PCR assay를 실시하여 각각의 표준균주들에 대한 mPCR 기법을 수행한 결과 Table 3 에 나타낸 amplicon size(817bp)와 일치함에 따라 *S. parauberis*로 판단된다.

*S. parauberis*에 대한 국내 연구보고는 아직 없는 실정이나 양식터봇의 연쇄구균 병원체로 보고된바가 있다(Domenech *et al.*, 1996). 이러한 결과로 볼 때 제주도 양식넙치의 연쇄구균증 질병에서 *S. parauberis*는 비중이 높은 연쇄구균증 병원체로 판단되었고 앞으로 본 병원체에 대한 포괄적인 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다.

양식터봇은 저수온성 어종으로 스페인의 경우 연간 양식수온이 12°C-22°C이다. Domenech *et al.* (1996)에 의하면 스페인에서 *S. parauberis*에 의한 감염양상은

연중 발생하며 수온이 오르는 시기에 병원성이 강해지는 것으로 보고하였다.

한편 *S. parauberis*의 외부증상은 체색흑화, 무안축발적이었다(Table 5). *S. iniae*, *S. difficile*의 경우 안구돌출, 뇌수막염, 폐혈증을 주 증상으로 하며 *L. garvieae*의 경우 폐혈증에 의한 급성 전신 질환을 보여 각 병원체간에 병리학적 특성이 다른 것으로 알려져 있고 또한 치사율도 각각 다른 것으로 보고되고 있다 (Domenech *et al.*, 1996; Bercovier *et al.*, 1997; Eldar *et al.*, 1999).

16SrRNA gene대한 염기서열 분석 결과는 *S. parauberis* (AY942572)와 98%이상의 상동성을 나타내어 *S. parauberis*(Williams and Collins 1990) 로 동정하였다. *Streptococcus parauberis*는 *S. uberis* type II(Williams and Collins 1990)로 분류되었으나 Williams and Collins(1990)에 의해서 *Streptococcus parauberis*라는 종명이 제시되었다.

*S. parauberis*항생제 감수성 시험을 실시한 결과 Doxycycline, Oxytetracycline에 대해 낮은 감수성을 보였다(Table 6).

이 결과는 Ampicilin, Amoxicillin, Chloramphenicol, Penicillin에 대해 감수성을 나타냈으며, Oxolonic acid, Nalidixic acid, Doxycycline은 감수성이 낮은 것 (Kang, 2003) 으로 보고한 결과와 허 등(2001)이 보고한 결과와 같다.

어류병원세균의 약제내성도 여러 종류의 R plasmid에 있는 내성유전자에 의하여 나타나며(Adams *et al.*, 1998), 이들 R plasmid의 구조형성에 transposon이 관여하고 있다는 증거가 제시되고 있다(L'Abée-Kund and Sorum, 2000). 그러므로 어류 병원성 세균들의 약제감수성경향 및 약제내성 전이성 plasmid에 관한 연구는 내성균의 출현을 억제하기 위하여 기본적으로 필요하다고 사료된다.

*Streptococcus parauberis*와 *Streptococcus uberis*가 같은 그룹(Fig. 5)으로 묶여서 Bentley (1991)가 보고한 streptococcus의 분자생물학적 계통분석학적인 분석결과와 같은 결과를 나타냈다. 그러나 Collins(2000)가 *Streptococcus iniae*(X58306)와 *Streptococcus parauberis*(X89967)이 한 그룹으로 묶인다고 발표한 것과는 다른 결과를 나타냈다.

## V. 요약

분리균주에 대한 16S rRNA gene에 대한 염기서열 분석 결과는 *S. parauberis*(AY942572)와 98%이상의 상동성을 나타내어 *S. parauberis*로 동정하였다.

MicroLog™ system(Release 4.05) program을 이용한 생화학동정결과는 *S. uberis*와 95%의 상동성을 나타냈으며 similarity 값 또한 0.5이상을 나타냈다. 분리균주의 용혈성은  $\gamma$  용혈성 균주로서 용혈이 없었다. 그리고 항생제 감수성시험결과 Ampicillin, Amoxicillin등과 같은 penicillin계의 항생제에 높은 감수성을 나타냈다. *S. parauberis*의 외부 소견으로는 흑화와 무안축 발적이 주 증상으로 관찰되었다.

생화학적 특성으로는 5%의 CO<sub>2</sub>가 존재하는 조건에서도 생육이 가능하였으며, Voges Proskauer 양성, Catalase 음성, 6.5% 염분에서도 내성을 나타냈다. Arginine, Hippurate, Esculin을 가수분해 하였다.

Dextrin, N-Acetyl-DGlucosamine, Arbutin, Maltose, Maltotriose, D-Cellobiose, D-Fructose, D-Mannose,  $\alpha$ -D-Glucose, D-Mannitol,  $\beta$ -Methyl D-Glucoside, Salicin, Sucrose, D-Trehalose, Pruvatic Acid Methyl Ester, Mono-methyl Succinate, Glycerol을 기질로 한 well에서 양성을 나타내었다.

본 연구에서는 양식넙치에서 분리되는 *S. parauberis*의 특성에 대하여 밝히고 이에 대한 항생제 감수성 양상을 조사하여 연쇄구균의 효과적인 치료 방법을 제시하고자 하였다.

본 연구는 *S. parauberis*의 생화학적 분자생물학적인 동정을 기초로 한 연구였다. 그러므로 *S. parauberis*의 감염경로 및 병리학적인 고찰이 이루어져야 할 것으로 판단된다. 그리고 혈청학적인 연구와 최근 개발된 *S. iniae* 백신의 혼합 투여도 고려되어야 할 것으로 판단된다. 또한 *S. parauberis*의 감염 실험과 백신의 개발이 필요하다고 판단된다.

## VI. 참 고 문 헌

방종득, 전세규, 박수일, 최윤정 1992. 양식넙치에서 분리된 *Edwardsiella tarda*의 생화학적 및 혈청학적인 특성에 관한 연구. *한국어병학회지* 5:29-35.

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

이창훈, 하동수 1991. 養殖 넙치의 連鎖球菌症. *한국어병학회지*. 4:71-77.

전세규 1988. 養殖魚類의 細菌性疾病의 診斷과 對策. *한국어병학회지*. 1: 5-30.

제주도 2003. 해양수산현황.

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

Adams, C. A., Austin, B., Meaden, P. G. and McIntosh, D. 1998. Molecular characterization of plasmid mediated oxytetracycline resistance in *Aeromonas salmonicida*. *Applied Environmental Microbiology*., 64:4194-4201.

Annette M. Willims & M. D. Collins 1990. Molecular taxonomic studies on *Streptococcus uberis* type I and II. Description of *Strteptococcus parauberis* sp. nov.. *Journal of Applied Bacteriology*. 68:485-490.

Austin, B. and Austin, D. A. 1993. *Bacterial fish pathogens*, ed 2. New York, Eliis Horwood. p.384.

Baucer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C. and Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*. 45:493-496.

Baumann, P. and Schubert, R. H. W. 1984. Vibrionaceae. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. ed. Krieg, N. R. and Holt, J. G. Vol.1:516-575. Williams and Wilkins.

Baumann, P. and Schubert, R. H. W. 1984. Genus Streptococcus. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. ed. Krieg, N. R. and Holt, J. G. Vol.2:1043-1070. Williams and Wilkins.

Ballows A., Hans G. Trüper, Matin Dworkin, Wim Harder, Karl-Hrinz Schleifer. 1992. The Genus Streptococcus-Oral. *The Prokaryotes*. Vol.2:1421-1449. Springer Verlag.

Bentley R. W, Leigh J. A, Collins M. D. 1991. Intrageneric structure of Streptococcus based on comparative analysis of small-subunit rRNA sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 41:487-494.

Chun Seh Kyu, D. L. Choi, S. I. Park. 1988. The Rapid Diagnosis of  $\beta$ -Haemolytic *Streptococcus* sp. by Immunoperoxidase Method. *Journal of Fish Pathology*. 1:103-110

Doménech, A., Fernández-Garayzábal, J. F., Pascual, C., Garcia, J. A., Cutuli, M. T., Moreno, M. A., Collins, M. D. and Dominguez, L. 1996. 연쇄구균증 in cultured turbot, *Scophalmus maximus*(L.), associated with *Streptococcus parauberis*. *Journal of Fish disease*. 19:33-38.

Gerhardt, P., Murry, R. G. E., Costilow, R. N., Nester, E. W., Wood, W. A., Kreieg, N. R., Phillip, G. B. 1981. Manual of method for general of

bacteriology: *American Society for Microbiology*, U.S.A. .

**Hardie, J. M., and P. D. Marsh. 1978.** Streptococci and the human oral floral, p.157-206. In: F. A. Skinner and L. B. Quesnel (ed.), *Streptococci*. Academic Press, London.

**Hond, T. 1991.** Pathogenesis, genes, and toxins of genus *Vibrios*. *Medical Immunology*. 21:313-323.

**Hoshina, T., Sano, T. and Morimoto, Y. 1958.** A streptococcus pathogenic to fish. *Journal of Tokyo University of Fisheries*. 44:57-68.

**Jannasch, H. W. and Jones, G. E. 1959.** Bacterial populations in sea water as determined by different methods of enumeration. *American Society of Limnology and Oceanography*. 4:128-139.

**Kang, B. J. 2003.** A study on the characteristics of bacteria isolated from cultured flounder(*Paralichthys olivaceus*) showing disease symptoms in Jeju area of Korea. Ph. D. Thesis. Cheju National University, 112pp.

**Kim, E. H. and Aoki, T. 1993.** Drug resistance and broad geographical distribution of identical R plasmid of *Pasteurella piscicida* isolated from cultured yellowtail in Japan. *Microbiology and Immunology*. 37:103-9.

**Kim, H. J., S. H. Woo, J. W. Kim, S. I. Park 2005.** Morphological Characteristics and Pathogenicity of *Streptococcus iniae*. *Journal of Fish Pathology*. 18:167-178.

**Kitao, T. 1982.** The methods for detection of *Streptococcus* sp., causative

bacteria of streptococcal disease of cultured yellowtail(*Seriola quinqueradiata*). Especially their cultural, biochemical and serological properties. *Fish Pathology*. 17:17-26.

**Kitao, T. 1993.** Streptococcal infections. In Inglis, V., Roberts, R. J., Bromage, N. R. editors: *Bacterial disease of fish*. New york, Halsted Press. 196-210.

**Kusuda, R., Kawai, K., Salati, F., banner, C. R. and Fryer, I. L. 1992.** *Enterococcus seriolicida* sp. nov., a fish pathogen. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 41:406-409.

**Kusuda, R., Kawai, K., Toyoshima, T. and Komatsu, I. 1976-a.** A new pathogenic bacterium belonging to the genus *Streptococcus*, isolated from an epizootic of cultured yellowtail. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. 42:1345-1352.

**Kusuda, R., Komatsu, I. and Kawai K.(1978).** *Streptococcus* sp. isolated from an epizootic of cultured eels. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. 44:295.

**L'Abée-Lund, T. M. and Sorum, H. 2000.** Functional Tn5393-like transposon in R plasmid pRAAS2 from the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* subspecies *salmonicida* isolated in Norway. *Applied Environmental Microbiology*. 66:5533-5535.

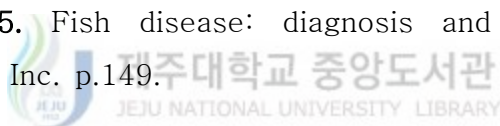
**MacFaddin, J. F.(1980).** Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria: William and Wikins Co., U.S.A.

Mata, A. I., Gibello, A. Casamayor, M. M. Blanco, L. Domínguez, and J. F. Fernández-Garayzábal. 2004. Multiplex PCR assay for detection of bacterial pathogens associated with warm-water streptococcosis in fish. *Applied and Environmental Microbiology*. 70:3183-3187.

Nakatsugawa, T. 1983. A Streptococcal disease of cultured flounder. *Fish Pathology*. 17:281-285.

Noble, L. D., and Gow, J. A. 1998. The effect of suspending solution supplemented with marine cations on the oxidation of Biolog GN MicroPlate™ substrates by *Vibrionaceae* bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*. 44:251-258.

Noga, E. J. 1995. Fish disease: diagnosis and treatment. St. Louis, Mosby-Year Book Inc. p.149.



Ringo, E. and Birkbeck, T. H. 1999. Intestinal microflora of fish larvae and fry. *Aquaculture Research*, 30:73-93.

Robinson, J. A., and Meyer, F. P. 1966. Streptococcal fish pathogen. *Journal of Bacteriology*. 92:512.

Thoesen, J. C. 1994. Bluebook, suggested procedure for the detection and identification of certain finfish and shellfish pathogens. *American Fisheries Society*.

Zlotkin, A., Eldar, A., Ghittno, C., and Bercovier 1998. Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 36:983-985.