

碩士學位論文

제주도 양식넙치에서 분리된
연쇄구균의 신속동정과정

항생제 내성



濟州大學校大學院

水產生命醫學科

梁惠英

2008年 2月

제주도 양식넙치에서 분리된
연쇄구균의 신속동정과
항생제 내성

指導教授 許 文 洙

梁 惠 英

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2008年 2月

梁惠英의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 이 제 희 (印)

委 員 여 인 규 (印)

委 員 허 문 수 (印)

濟州大學校 大學院

2008年 2月

Rapid Molecular Identification and Antibiotic
Resistance of *Streptococcus* spp. Isolated from
the Cultured Olive Flounder in Jeju

Hye Young Yang

(Supervised by professor Moon-Soo Heo)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement
for the degree of Master of Science

Department of Aquatic Life Medicine
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

February, 2008

목 차

Abstract	i
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	5
1. 시험균주	5
1.1. 표준균주	5
1.2. 제주도내 양식장에서 분리된 연쇄구균	6
2. 시험균주의 배양	12
2.1. 표준균주의 배양	12
2.2. 제주도 양식장에서 분리된 연쇄구균의 배양 및 간이 동정	12
3. <i>aroA</i> 유전자 염기서열 확보	13
3.1. Total DNA 추출	13
3.2. PCR 증폭	13
3.3. PCR 산물의 cloning	14
3.4. 염기서열 결정 및 자료 분석	16
4. Detection primer 제작	16
5. 제주도 양식장 넙치에서 분리된 연쇄구균의 동정	18
6. 항생제 감수성 시험	19
III. 결과	21
1. <i>aroA</i> 유전자 cloning	21
2. <i>Streptococcus</i> 속 계통분석	22
3. Detection primer 제작	25
4. 제주도 양식넙치에서 분리된 연쇄구균의 detection	31
5. 분리균주별 항생제 감수성 시험 결과	35
IV. 고찰	39

V. 요약	47
VI. 사사	49
VII. 참고문헌	50
감사의 글	57



Abstract

The genus *Streptococcus* comprises about 48 recognized gram-positive species which are widely distributed in estuarine and marine environments. As some *Streptococcus* species have long been known as bacterial pathogens to marine organisms and human beings, many researchers have attempted to develop the method for rapid and accurate identification.

Traditionally, they have been identified based on morphological, serological and biochemical methods. In recent years, rDNA sequences have been adopted for bacterial taxonomy including *Streptococcus* to overcome the shortage of traditional methods. However, there are still some problems in identification of closely related bacterial species due to the conservation of rDNA sequences. Thus, we tried to develop the more rapid and accurate identification method than before by using the DNA sequences of *aroA* gene and multiplex PCR.

The *aroA* gene encodes 5-enolphyluvyshikimate-3-phosphate synthase which is a key enzyme in the aromatic amino acid biosynthetic pathway in microorganism. *Streptococcus* species were isolated from the diseased olive flounders (*Paralichthys olivaceus*) sampled at the hatcheries in Jeju and standard strains of *Streptococcus* were purchased from KCCM and KCTC. *aroA* genes of *Streptococcus* were then cloned and sequenced for detection primer design and phylogenetic analysis.

By using detection primers designed based on multiple alignment and phylogenetic analysis, multiplex PCRs have been performed for the simultaneous detection of major *Streptococcus* spp. isolated from the farmed olive flounder in Jeju. As a result, two major *Streptococcus* species among total number of isolated strains were *Streptococcus parauberis* (81.2%), *Streptococcus iniae* (11.1%), *Listeria* sp. (7.4%), *Enterococcus* sp. (0.3%).

In addition, antimicrobial susceptibility, resistant pattern and combined action

to the 18 antibiotics were tested with the identified *Streptococcus* species in order to treat the streptococcosis effectively and rapidly. The results showed that both *Streptococcus parauberis* and *Streptococcus iniae* had high degree of antimicrobial resistance to clindamycin, and some degree of resistance to flumequine and oxolinic acid as well, whereas these two species were highly sensitive to chloramphenicol, ciprofloxacin, doxycycline and florfenicol. By the way, the degree of antimicrobial susceptibility was various even between strains of the same *Streptococcus* species.



I. 서론

국내 양식 산업은 식량자원의 확보 측면에서 중요성을 인정받아 1980년대 이후 전반적인 산업화와 함께 급속히 발전되어 왔다. 양식업 중에서도 어류양식은 단 백질 공급원 확보 측면에서 매우 중요한 위치를 차지하며 매우 활발하게 발전해 왔다. 또한 총 어업생산량 중에서 양식어업의 비중은 2000년에 20.6%에서 2005년에 34.6%로 높아지고 있으며, 특히 어류 양식은 괄목할만한 생산량의 증가를 보이며 2002년에 48,073톤에서 2006년에 91,123톤으로 증가 하였다. 이 중에서 넙치의 총 생산량이 43,852톤으로 약 50%를 차지하면서 국내어류 양식 산업의 대표 품종의 자리를 고수 하였다. 특히 제주도내 약 260여 개소의 양식장에서 2005년 한해 넙치 총생산량이 약 2만 톤에 이르면서 우리나라 한해 총 넙치 생산량에 절반을 차지하며 우리나라 어류 양식 산업에 크게 기여할 뿐만 아니라 제주도 지역 경제에도 중요한 위치를 차지하고 있다.

어류 양식 산업 중에서 대표 품종인 넙치(*Paralichthys olivaceus*)는 1984년 인공종묘 생산기술을 개발한 이후 매년 생산량이 증가하면서 양식장 수도 늘어났고 사육 기술, 사료제조기술, 치료제의 개발 등으로 대량생산이 가속화 되었다. 그러나 넙치 양식 산업이 양적 생산에 치우친 나머지 고밀도 사육과 MP (moist pellet)사료의 과용, 항생제 남용으로 양식 환경이 악화되었고 이로 인해 각종 질병이 유발하여 연간 경제적 손실을 초래하게 되었다. 실제로 2003년 넙치 생산량은 34,533톤에 생산금액이 367,096,478천원에 달했지만 다음해인 2004년에는 생산량이 32,141톤에 330,937,441천원에 그쳤다(해양수산부 통계연보; 제주도, 2006).

양식어류에 출현하는 질병의 원인은 세균성질병, 기생충성 질병, 바이러스성 질병으로 크게 3가지로 나눌 수 있으며 이들 중 세균성 질병에 의한 피해가 가장 큰 것으로 알려져 있다. 그 밖에 사료에 의한 영양결핍 또는 산패에 의한 영양성 문제에 의해서도 발병한다.

양식 넙치에 주로 발생하는 세균성 질병은 연쇄구균증, 에드워드증, 비브리옴증, 활주세균 등이 알려져 있으며, 2005년부터 2006년 사이 우리나라 양식 넙치에서 분리된 세균성 질병을 조사한 결과 *Vibrio* spp.가 42.1%, *Streptococcus* spp.가

16.9%, *Edwardsiella tarda*가 12.3%의 검출율을 보였다(조 등, 2007). 에드워드와 비브리오, 연쇄구균은 연중 출현하고 고수온기나 나쁜 사육환경에 스트레스를 받아 어체가 약해지면 발병률이 높아진다. 그 중에서도 매년 고수온기인 7~9월이 되면 연쇄구균에 의해 넙치의 폐사율이 급증하는데 더욱이 체장 20 cm 전후부터 성어에 주로 발병이 되고 있어 각 양식장에서는 출하기간을 앞두고 상품이 될 넙치들이 연쇄구균으로 인한 타격을 받는 것으로 드러났다. 특히 연쇄구균은 에드워드나 비브리오와의 복합감염이 확인되는데 연쇄구균은 누적폐사율이 높아 복합감염이 될 경우 피해가 더욱 심한 것으로 알려져 있다. 이와 같은 질병에 의한 대량 폐사를 줄이기 위해서는 밀식을 피하고 사육환경을 적절히 관리해야 하며 변패된 사료의 사용을 금해야 한다. 그리고 무엇보다 발병 초기에 정확한 진단으로 적절한 대책이 시급히 강구되어야 한다.

이번 연구에서는 고수온기에 어류 양식장에 높은 발병률을 보이는 연쇄구균증에 주목하였다. 연쇄구균증의 원인균은 그람양성의 연쇄상 구균으로 우리나라에서 현재까지 분리, 동정된 원인균은 *Streptococcus iniae*, *Streptococcus parauberis*, *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus* sp. 등으로 알려져 있다. 연쇄구균은 담수, 기수, 해수 및 양식장의 저질에 상재하는 세균으로(Kitao, 1979) 수중 원인균이 질병을 유발할 정도로 대량 증식하였을 때 양식 어류의 상처를 통해 감염 되거나 산패된 생사료를 투여할 경우 소화관을 통해서 감염 된다(Rasheed and Plumb, 1984; Minami, 1979; Nagatsugawa, 1983). 넙치의 양성용 사료로 이용되는 냉동 정어리(*Sardinops melanosticta*)와 까나리(*Ammodytes personatus*) 등의 내부 장기에서 원인균이 분리되었고 냉동보관 중인 사료용 어류에서도 6개월 이상 생존하는 것으로 나타났으며(Minami, 1979), *Streptococcus iniae* 인위 감염 실험에서 해수에 침지시키거나 사료에 투여할 경우에도 감염이 일어났다(Nguyen, 2001). 따라서 어류의 방어력을 저하시키는 스트레스 요인 즉, 나쁜 사육 환경과 저조한 영양 상태와 감염된 사료 투여가 연쇄구균증의 발병에 영향을 미치는 것으로 보고 있다.

*Streptococci*는 그람양성균으로 운동성이 없으며 연쇄상의 구균들이 사슬모양의 집락을 형성하는 것이 가장 큰 특징이다. 이 균에 대해 알려진 것은 Lister가 1873년 처음으로 분리하여 *Bacterium lactis*로 보고 한 것이 최초이며 현재는

*Lactococcus lactis*로 분류되었다. 그리고 1874년 Billroth에 의해 동물이나 사람의 화농창에서 분리되어 이 균의 명칭이 시작되면서부터 연쇄구균의 연구가 본격화 되었다(Heo *et al.*, 2001). 이 균은 사람뿐만 아니라 축산 동물이나 양식 어류에 감염되어 심각한 질병을 유발하므로 여러 분야에서 연구가 진행 되고 있다.

연쇄구균에 감염된 어류의 증상은 먹이를 잘 먹지 못하고 완만한 유행을 보이거나 바닥에 흩어져 있으며 몸체를 반대로 뒤집고 머리를 올려 수면 위로 입을 열고 있기도 한다. 외부증상으로 체색 흑화, 안구 돌출, 안구 백탁 및 충혈, 두부와 상·하턱의 발적, 아가미 뚜껑 하부의 출혈, 아가미 뚜껑 내측의 충혈, 포피 궤양, 탈장 그리고 아가미와 체표에 점액이 많이 분비되는 것을 볼 수 있다. 해부학적으로는 간장의 출혈이나 퇴색, 장관의 발적, 복수가 차는 증상이 나타난다. 또한 신장 및 비장의 비대, 아가미의 빈혈과 부분적인 괴사가 나타나는 경우도 있다. 간이나 신장의 병변, 복수가 찬다는 점에서 에드워드증과 유사하지만, 에드워드증에서 나타나는 주요 장기 결절이 연쇄구균증에서는 보이지 않는다.

Streptococci의 동정에는 선택배지가 따로 없고 각종 생화학적 성상, 항체를 이용한 동정, 분자 생물학적 동정법 등이 이용되고 있다. 그러나 생화학적 성상은 종간 혹은 동일 종 내에서도 다양한 결과를 나타내며, 항체 동정법 또한 종간의 교차 반응으로 정확한 동정에 어려움을 주고 있다. 이에 따라 세포질에 존재하는 16S ribosomal RNA (rRNA)를 이용하여 많은 연구가 이루어 졌고 현재도 활발히 수행되고 있으나 16S rRNA는 유전적으로 보존적 부분의 비율이 매우 높아 종간의 유전자 차이가 거의 없어 유전적인 다형성이 낮아서 종 동정에 문제가 있다고 많은 연구자들에 의해 보고되고 있다(Krawiec and Riley, 1990; Kim *et al.*, 2005; Moon *et al.*, 2004). 이에 따라 최근에는 종 동정을 위해 이 유전자를 대신하는 다른 유전자를 찾는 데 많은 연구가 이루어지고 있다.

이제까지 어병세균의 동정에 관한 많은 연구가 이루어져 왔지만 발병 초기에 정확하고 신속히 진단할 수 있는 방법에는 아직 미흡한 면이 있기에 넓치에 나타나는 연쇄구균을 대상으로 분자계통학적 관계성 및 유전학적 다양성을 조사하여 새로운 유전학적 진단방법을 연구하기로 한다.

연쇄구균증을 유발하는 병원체를 동정하기 위해 이번 연구는 *aroA* 유전자를 이용한 DNA 분석법에 목적을 두었다. 이 연구에 사용된 *aroA* 유전자는 미생물이

나 식물에서 aromatic amino acid의 생화학적 과정에 중요한 역할을 하는 효소인, 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate (EPSP) synthase를 암호화하는 유전자로 알려져 있다. *aroA* 유전자는 그람음성 및 그람양성균에 모두 존재하며 세포벽 형성에 관여하고 있어 결핍 되었을 때에는 박테리아의 성장이 저해 되는 특징을 가지고 있다. 이로 인해 attenuated vaccine 연구에 사용 되고 있으며 계속적으로 연구가 증가하는 추세이다. 또한 본 연구와 같은 목적인 계통학적 분류 및 종 동정에 있어 *aroA* 유전자를 이용하여 여러 병원균을 대상으로 연구가 보고되고 있지만(Soriano, 1997; Del Rio *et al.*, 2006) 아직까지 연쇄구균을 대상으로 한 연구는 보고되지 않았다.

이번 연구는 *aroA* 유전자를 이용하여 streptococci의 분자계통분류학적 관계성을 조사하며 이를 바탕으로 하여 제주도의 넙치 양식장에서 발생하는 연쇄구균 증의 원인균을 동정하고 연간 출현하는 연쇄구균에 대해 월별 종류와 비율을 조사하였다. 또한 *aroA* 유전자를 이용한 분자학적 상관성을 조사하여 종 동정 하였고 이러한 연구 결과는 현재 활발히 진행되는 백신 연구에 유용한 자료로 사용 될 것으로 사료 된다. 그리고 어류 질병에 대항하여 차후 양식 어류의 신속한 진단과 치료 및 예방을 통해 폐사량을 감소 시켜 양식 산업에 소득 증대의 효과를 가져 올 것으로 생각 된다.

II. 재료 및 방법

1. 시험균주

1.1. 표준균주

이 실험에 사용된 박테리아의 표준균주는 한국생명공학연구원 유전자은행 Korean Collection for Type Cultures (KCTC)에서 9종, 한국미생물보존센터 한국종균협회 Korean Culture Center of Microorganisms (KCCM)에서 2종으로 총 11종을 분양받았다.

이 실험에서는 해수어에 질병을 일으킨다고 알려진 그람양성구균 중에 *Lactococcus garvieae*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*와 함께 연쇄구균증의 원인균으로 알려진 *Streptococcus parauberis*, *Streptococcus iniae*를 포함하여 그 외, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae* 표준균주를 이용하였다(Table 1).

그리고 표준 균주의 *aroA* 유전자 cloning을 위한 primer 제작에 이용된 *Streptococcus*속의 *aroA* 유전자는 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 GenBank에 등록된 *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus thermophilus*의 *aroA* 유전자 data를 이용하였다. 표준균주 출처와 GenBank의 Strain 정보는 Table 1에 나타내었다.

1.2. 제주도내 양식장에서 분리된 연쇄구균

2005년 11월부터 2007년 10월까지 제주도내 넙치 양식장에서 양식되는 넙치 중 체색 흑화, 안구 돌출 및 충혈, 안구 백탁, 아가미 발적, 지느러미 부식, 표피 궤양, 탈장 등 전형적인 연쇄구균 증상을 나타내는 넙치를 이 실험에 사용 하였고 이들 어체를 사용하여 간, 신장, 비장, 표피, 지느러미 등에서 연쇄구균을 분리하였다. 대표적인 연쇄구균 세균성 질병의 외부적인 증상은 Fig. 1에서 나타내었고 총 분리한 연쇄구균은 377균체로 시료의 채취 현황은 Table 2와 Table 3, Fig. 2에 나타내었다.

월별로 분리된 연쇄구균의 수를 살펴보면 2006년 8월이 57균체로 가장 많이 분리되었으며 2006년 2월과 4월이 각 4 균체로 가장 적게 분리 되었고 2006년 3월에는 분리되지 않았다. 지역별로는 성산 지역의 양식장으로부터 108균체가 분리되었으며, 그 밖의 구좌, 한경, 외도, 대정, 애월, 조천, 한림, 표선, 남원, 서귀포 지역의 양식장에서 각각 36, 1, 2, 42, 20, 14, 13, 50, 24, 60균체의 연쇄구균이 분리되었다(Table 2 and Table 3).



Fig. 1. External and internal streptococcosis symptoms of diseased flounders. Darkness of body color and skin ulcer (A); exophthalmia and haemorrhaging in the eye (B); darkened pigment, rubefaction of below jaw (C); gill cover decay (D); protruded anus (E); haemorrhaging in the liver and hypertrophy of the liver, protruded anus (F).

Table 1. List of strains used in this study

Species name	Strain No.	Culture medium	Culture temperature
<i>Streptococcus parauberis</i>	KCTC3651	Tryptic soy agar	37°C
<i>Streptococcus iniae</i>	KCTC3657	Brain Heart Infusion agar with 0.5% Glucose	37°C
<i>Streptococcus pyogenes</i>	KCTC3984	Tryptic soy agar	37°C
<i>Streptococcus agalactiae</i>	KCCM40417	Tryptic soy agar	37°C
<i>Streptococcus mutans</i>	KCTC3065	Brain Heart Infusion agar	37°C
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	KCTC5412	Tryptic soy agar	37°C
<i>Lactococcus garvieae</i>	KCTC3772	MRS	30°C
<i>Staphylococcus aureus</i>	KCTC1927	Micrococcus, Tryptic soy agar	37°C
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	KCTC3958	CA°, Tryptic soy agar	37°C
<i>Enterococcus faecalis</i>	KCCM11792	IFO804'	37°C
<i>Listeria monocytogenes</i>	KCTC3710	Brain Heart Infusion agar	37°C

CA°: Corynebacterium Agar, IFO804': Medium No.329 indicated KCCM

KCTC: Korean Collection for Type Cultures, KCCM: Korean Culture Center of Microorganisms

Species name	Gene position	Geninfo identifier No.
<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>aroA</i> gene	gi55736088
<i>Streptococcus mutans</i>	<i>aroA</i> gene	gi15458855
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>aroA</i> gene	gi76561771
<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>aroA</i> gene	gi15674250
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>aroA</i> gene	gi24378526
<i>Lactococcus lactis</i>	<i>aroA</i> gene	gi12724755
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>aroA</i> gene	gi49482253
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>aroA</i> gene	gi57636010
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>aroA</i> gene	gi29350190
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>aroA</i> gene	gi85700163

Table 2. The number of *Streptococcus* strains monthly sampled from fish farms located in Jeju in 2005~2006

Locality	Nov.	Dec.	Jan.	Feb.	Apr.	May	Jun.	Jul.	Aug.	Sep.	Oct.	Nov.	Dec.	Total
Gu-jwa	2	2	3			3				4	2		3	19
Seong-san		3			2		24	13	12	15	3		1	73
Han-gyeong										1				1
Dae-jeong			1	2	1	2	3	3	4	7	2	3	3	31
Ae-wol	3		2	1			2	3	3	4			1	19
Jo-cheon											4	5	3	12
Hal-lim	1						1		2			5		9
Pyo-seon							2	5	10		11		2	30
Nam-won									4	4			2	10
Seogwipo							1	11	20	1		1	3	37
Oe-do									2					2
Total	6	5	6	3	3	5	33	35	57	36	22	14	18	243

(Seogwipo contained Wimi, Hahyo, Daepo area)

Table 3. The number of *Streptococcus* strains monthly sampled from fish farms located in Jeju in 2007

Locality	Jan.	Feb.	Mar.	Apr.	May	Jun.	Jul.	Aug.	Sep.	Oct.	Total
Gu-jwa	3	6		5							14
Seong-san	4		6	3	3	7	5	4		3	34
Han-gyeong											
Dae-jeong	2	1						6		3	12
Ae-wol			1								1
Jo-cheon											
Hal-lim	1	1								4	6
Pyo-seon			10	5	4	2	3		2	4	30
Nam-won	3	1				3			3	4	14
Seogwipo	3	2		2		4	4	1	2	4	32
Total	16	11	17	15	7	16	12	11	7	22	134

(Seogwipo contained Wimi, Hahyo, Daepo area)



Fig. 2. A map showing the sampling sites of *Streptococcus* spp. from fish farms located in Jeju. (): number of aqua farms.

2. 시험균주의 배양

2.1. 표준균주 배양

동결건조 상태의 분양받은 표준균주에 0.8% 생리식염수 400 μ l를 첨가하여 멸균된 백금이로 잘 섞은 후 현탁액을 균주의 성장 환경에 가장 적합한 평판 배지에 도말하였다. 도말된 균주는 최적 성장온도에서 24시간동안 배양하였다(Table 1).

평판 배지에서 배양된 균주는 단일의 colony를 선택하여 1.5% NaCl이 첨가된 Brain Heart Infusion (BHI, BBL, USA) broth 혹은 Tryptic Soy (TS, Difco, USA) broth 4 ml에 접종하였다. 각 균주는 최적 성장 온도에서 24시간동안 순수 배양하였다(Table 1).

2.2. 제주도 양식장에서 분리된 연쇄구균의 배양 및 간이 동정

제주도에서 양식된 넙치로부터 분리된 균주는 1~1.5% NaCl이 첨가된 Brain Heart Infusion Agar (BHIA, BBL, USA) 평판 배지에서 28 $^{\circ}$ C, 24~48시간동안 배양하여 그람양성으로 추정되는 균의 colony를 선택하여 순수분리한 후 단일 콜로니의 형태, 크기 및 색을 확인하고 균주의 형태와 운동성을 관찰하기 위해 1~1.5% NaCl이 첨가된 BHI broth 배지에 28 $^{\circ}$ C, 18~48시간동안 배양한다. 그람 염색후 원인균의 연쇄상의 형태를 확인하고 0.3% KOH 테스트를 통해 음성 반응을 보인 균을 실험에 사용하였다. 용혈성을 보기 위해서는 5% sheep blood agar (HANIL Komed Co., Korea)를 이용하여 28~30 $^{\circ}$ C, 24~48시간 배양한 후 관찰하였다.

3. *aroA* 유전자 서열 확보

3.1. Total DNA 추출

액체 배지에서 배양된 균 중 1 ml를 eppendorf. tube에 넣고 13,000 rpm에서 1 분 동안 원심 분리한 후 AccuPrep[®] Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer Co., Korea), QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN Inc. Germany)를 사용하여 total DNA를 분리하였다.

3.2. PCR 증폭

aroA 유전자 증폭을 위한 primer를 제작하기에 앞서 알맞은 primer의 표적 부위를 찾기 위하여 NCBI GenBank에 등록되어 있는 *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*의 *aroA* 유전자를 참고하여 가장 보존성이 높은 서열을 기초로 forward primer와 reverse primer를 디자인 하였다(Table 4).

PCR 반응은 약 0.2~0.5 μg 의 genomic DNA 1 μl , 각각의 10 μM primer (forward primer, reverse primer) 2.5 μl , 10 \times reaction buffer (Takara Bio Inc., Japan) 5 μl , 2.5 mM dNTP (Takara Bio Inc., Japan) 5 μl 와 1 unit의 *Ex Taq* polymerase (Takara Bio Inc., Japan)를 이용하였으며 3차 증류수를 이용하여 total volume이 50 μl 가 되도록 하였다. PCR 반응 시 반응물의 증발을 막기 위해 1~2 방울의 mineral oil을 첨가하였으며 Programmable Thermal Controller (PTC-100, MJ Research Inc., USA)에서 반응시켰다.

이 때 반응 조건은 94 $^{\circ}\text{C}$ 에서 3분간 변성시킨 후 이어 반복주기로 94 $^{\circ}\text{C}$, 45초, primer annealing을 위해 50 $^{\circ}\text{C}$, 1분, primer 확장을 위해 72 $^{\circ}\text{C}$, 1분의 주기로 30회 반복한 후 최종 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 7분간 확장시켰다.

PCR 증폭산물은 1 \times TAE buffer (45 mM Tris-borate, 45 mM boric acid, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ethidium bromide로 염색시킨 1.2% agarose gel에서 전기 영동하여 992 bp 정도의 *aroA* 유전자 증폭산물을 확인하였다.

Table 4. PCR primers used for *aroA* gene amplification and sequencing

Primer name	Gene position	Sequence
Strep_py_mu_F	<i>aroA</i> gene	5'-CCM GGM GAY AAG TCY ATY AGT CA-3'
Strep_py_mu_R	<i>aroA</i> gene	5'-ACT ACY TGA ATA CGA TCT GTY TC-3'
Strep_pn_th_F	<i>aroA</i> gene	5'-CCA GGT GAC AAG TCT ATC AGC CA-3'
Strep_pn_th_R	<i>aroA</i> gene	5'-ACA ACC TGA ATA CGG TCT GTT TC-3'
Strep_aga_F	<i>aroA</i> gene	5'-CCT GGC GAT AAA TCA ATA AGT CA-3'
Strep_aga_R	<i>aroA</i> gene	5'-ACG ACC TGA ATC CGA TCT GTC TC-3'
T3*		5'-AAT TTA CCC TCA CTA AAG GGA A-3'
T7*		5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG G-3'

* primers designed for the pBluescript phagemid vector

3.3. PCR 산물의 cloning

PCR 산물은 0.8% agarose gel에 전기영동하여 UV-lamp 상에서 잘라낸 후 Power Gel Extraction Kit (Bioneer Co., Korea, Korea)를 이용하여 증폭된 DNA를 분리하였다. PCR 산물의 blunting을 위해 분리한 DNA 30 μ l에 1 μ l의 10 \times T4 polymerase buffer와 0.1% BSA, 1 μ l의 2.5 mM dNTP (Takara Bio Inc., Japan)를 넣어 70 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 반응 후 1 unit의 T4 polymerase (Takara Bio

Inc., Japan)를 첨가하여 37°C에서 5분 동안 반응 시킨 다음 강한 vortex를 통해 효소 활성을 억제하였다. 그 후 PCR Purification Kit (Dyne Bio Inc., Korea)를 이용하여 insert DNA를 정제하였다.

PCR 산물의 cloning을 위한 숙주는 대장균의 XL1-blue strain을 사용하였고 벡터는 pBluescript II SK(-) (Stratagene Co., Korea)를 사용하였다. 2.5 μ g의 pBluescript II SK(-) 벡터는 37°C에서 2시간 동안 제한효소 *HincII* (Takara Bio Inc., Japan)를 이용하여 절단하였다. 절단된 벡터는 PCR Purification Kit (Dyne Bio Inc., Korea)를 이용하여 정제하였다.

정제된 벡터는 agarose gel 상에서 그 농도를 측정하였으며, ligation은 *HincII* (Takara Bio Inc., Japan)로 절단된 1 μ l의 pBluescript II SK(-) 벡터, 3 μ l의 insert DNA, 1 μ l의 10 \times ligation buffer와 1 unit의 T4 DNA ligase (Takara Bio Inc., Japan)를 넣고 3차 증류수로 최종 volume 15 μ l가 되도록 한 후에 16°C에서 18시간동안 반응시켰다.

Ligation된 산물을 XL1-blue MRF'과 함께 새로운 1.5 ml eppendorf tube에 넣어서 42°C에서 1분 30초 동안 반응 후, 항온수조에서 37°C, 30분 동안 배양하였다. 형질전환 된 cell은 50 mg/ml ampicillin, 2% X-gal과 1M IPTG가 함유된 LB (Luria-Bertani) plate에 도말하여 37°C에서 16시간 배양하였다. 배지에서 배양된 cell 가운데 white colony로 선택하여 ampicillin이 포함된 LB broth 배지에서 37°C, 항온교반기를 이용하여 16시간 배양한 후 AccuPrep[®] Plasmid Mini Extraction Kit (Bioneer Co., Korea)를 이용하여 plasmid DNA를 분리하였다.

Plasmid DNA를 1.2% agarose gel에 loading하여 cloning과 형질전환이 성공적으로 이루어졌는지를 확인하였으며 제한 효소 *PstI* (Takara Bio Inc., Japan)과 *XhoI* (Takara Bio Inc., Japan)을 사용하여 절단한 후 1.2% agarose gel에 100 bp Plus DNA ladder (Bioneer Co., Korea)를 함께 loading하여 예상 크기의 insert 유무를 확인하였다.

3.4. 염기서열 결정 및 자료 분석

Cloning을 통해 얻은 재조합 plasmid DNA는 (주)마크로젠에 의뢰하여 sequencing을 하였으며 염기서열 결정시 pBluescript II SK(-) vector의 multiple cloning site의 5' 과 3' 말단의 T3와 T7 primer를 사용하였다(Table 4). 이를 통해 얻은 자료는 DNAssist (version 2.2, Patterton and Graves, 2000) 프로그램을 이용하여 다중 정렬 하였다. 정렬된 자료는 MEGA 3.0 (Kumar *et al.*, 2004) 프로그램을 이용하여 distant에 근간을 둔 neighbor-joining 방법으로 계통수 작성 및 염기조성, 유전적 다형성을 조사하였다.

4. Detection primer 제작

연쇄구균 동정을 위한 detection primer를 제작하기 위하여 제주도 양식 넙치에서 분리한 연쇄구균 균주 중 무작위적으로 선택하여 *aroA* 유전자를 cloning하였다. Cloning을 통하여 얻어진 표준균주의 *aroA* 유전자 염기서열과 제주도 양식장에서 분리된 연쇄구균의 *aroA* 유전자 염기서열을 이용하여 계통수를 작성하였다. 계통수 상에서 해수 어류에 질병을 일으킨다고 보고된 *Streptococcus parauberis*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* 6종을 선택하여 primer로 이용될 *aroA* 유전자의 비보존적이고 종특이적인 서열을 다중 정렬하여 종 동정 primer를 제작하였다. 또한 그 외, 다른 속(Genus)으로 *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Listeria*, *Staphylococcus* 5가지 그람양성균에 대한 genus detection primer를 제작하였다. 이들 간 *aroA* 유전자서열이 매우 다양하기 때문에 16S rRNA를 이용하였고 NCBI에 등록된 데이터를 이용하여 primer를 제작하였다(Table 5).

Table 5. Strains information used in this study for phylogenetic analysis based on 16S rRNA and design genus detection primers

Species name	Gene position	Geninfo identifier No.
<i>Streptococcus parauberis</i> KCTC3651*	16S rRNA	gi46409867
<i>Streptococcus parauberis</i> *	16S rRNA	gi61104972
<i>Streptococcus iniae</i> KCTC3657	16S rRNA	gi12642830
<i>Streptococcus iniae</i>	16S rRNA	gi59861312
<i>Streptococcus pyogenes</i> (1)	16S rRNA	gi21905618
<i>Streptococcus pyogenes</i> (2)	16S rRNA	gi19749053
<i>Streptococcus thermophilus</i>	16S rRNA	gi55820103
<i>Streptococcus agalactiae</i>	16S rRNA	gi22536185
<i>Streptococcus mutans</i>	16S rRNA	gi24378532
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	16S rRNA	gi15902044
<i>Enterococcus faecalis</i> *	16S rRNA	gi78499506
<i>Enterococcus faecalis</i> *	16S rRNA	gi84874536
<i>Listeria monocytogenes</i> *	16S rRNA	gi85700163
<i>Listeria monocytogenes</i> *	16S rRNA	gi16411809
<i>Staphylococcus aureus</i> *	16S rRNA	gi1199939
<i>Staphylococcus aureus</i>	16S rRNA	gi88193823
<i>Staphylococcus epidermidis</i> *	16S rRNA	gi1199945
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	16S rRNA	gi82617058
<i>Lactococcus garvieae</i> *	16S rRNA	gi61658335
<i>Lactococcus garvieae</i>	16S rRNA	gi51512138
<i>Lactococcus lactis</i> *	16S rRNA	gi15671982

* Strains used in design genus detection primers

5. 제주도 양식 넙치에서 분리된 연쇄구균의 동정

평판 배지에서 배양된 각 연쇄구균을 BHI broth에 접종한 후 배양하여 1 μ l의 배양액을 위에서 제작한 detection primer를 이용하여 PCR 반응을 한다.

Detection multiplex PCR 반응은 균이 접종된 broth 1 μ l, 10 μ M detection primer 1.0 μ l, 10 \times reaction buffer (Takara Bio Inc., Japan) 2.5 μ l, 2.5 mM dNTP (Takara Bio Inc., Japan) 2 μ l와 1 unit의 *Ex Taq* polymerase (Takara Bio Inc., Japan)를 3차 증류수를 이용하여 최종 volume이 25 μ l가 되도록 한다. 또는 배양액 2 μ l와 mix된 detection primer 2 μ l, Premixs (Solgent Co., Korea) 10 μ l를 증류수와 함께 최종 volume이 20 μ l이 되도록 한 후에 PCR 반응 시 반응물의 증발을 막기 위해 1~2 방울의 mineral oil을 첨가하여, Programmable Thermal Controller (PTC-100, MJ Research Inc., USA)에서 반응시켰다.

이 때 genus detection을 위한 PCR 반응 조건은 94 $^{\circ}$ C에서 3분간 변성시킨 후 94 $^{\circ}$ C, 45초, primer annealing을 위해 45 $^{\circ}$ C, 1분, primer 확장을 위해 72 $^{\circ}$ C, 1분, 다시 반복주기로 94 $^{\circ}$ C, 40초, 55 $^{\circ}$ C, 1분, 72 $^{\circ}$ C, 1분의 주기로 34회 반복한 후 최종 72 $^{\circ}$ C에서 3분간 확장시켰다. 그리고 *Streptococcus* sp.의 종 동정은 genus detection PCR 결과물을 확인한 후 *Streptococcus*로 동정된 것을 detection multiplex PCR 한다. 이때 연쇄구균의 *aroA* 유전자를 증폭하기 위한 반응 조건은 94 $^{\circ}$ C에서 3분간 변성시킨 후 94 $^{\circ}$ C, 45초, primer annealing을 위해 50 $^{\circ}$ C, 1분, primer 확장을 위해 72 $^{\circ}$ C, 1분의 주기로 30회 반복한 후 최종 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 확장시켰다.

증폭산물은 1.2% agarose gel에 전기 영동하여 genus detection multiplex PCR의 결과로 *Staphylococcus* 111 bp, *Streptococcus* 360 bp, *Listeria* 520 bp, *Lactococcus* 650 bp, *Enterococcus* 750 bp를 확인할 수 있으며 *Streptococcus*의 종동정을 위한 multiplex PCR의 경우 *Streptococcus agalactiae* 200 bp, *Streptococcus iniae* 300 bp, *Streptococcus mutans* 400 bp, *Streptococcus parauberis* 500 bp, *Streptococcus pneumoniae* 600 bp, *Streptococcus pyogenes* 700 bp의 DNA 증폭산물을 확인하였다.

6. 항생제 감수성 시험

2005년 11월부터 2007년 10월 사이에 분리된 연쇄구균을 이 연구에서 제작된 detection primer를 이용하여 동정 하였다. 이를 통해 동정된 연쇄구균 균주 가운데 항생제 감수성 시험에 이용된 양식장 분리 균주는 동정 결과 *Streptococcus parauberis*와 *Streptococcus iniae*로 detection 된 균주를 월 별 무작위적으로 선택하여 실시하였다. 항생제 감수성 시험은 Bauer-Kirby Disc 확산법(1966)에 의하여 수행하였다.

병어에서 분리한 균은 1~1.5% NaCl을 첨가한 BHI broth에서 배양하여 1~1.5% NaCl을 첨가한 Muller Hinton Agar (BBL, USA)에 균일하게 도말한 후 disc 확산법으로 시험하였다. 시

시험에 사용된 약제는 amoxycillin (10 μ g), ampicillin (10 μ g), cephalexin (30 μ g), chloramphenicol (30 μ g), ciprofloxacin (5 μ g), clindamycin (2 μ g), doxycycline (30 μ g), enrofloxacin (5 μ g), erythromycin (15 μ g), florfenicol (30 μ g), flumequine (30 μ g), nalidixic acid (30 μ g), neomycin (10 μ g), norfloxacin (10 μ g), ofloxacin (5 μ g), oxolinic acid (2 μ g), oxytetracycline (30 μ g) 및 pefloxacin (5 μ g) 으로 18 disc (Oxoid, England)를 사용하였다. 항생제 감수성 시험에 사용된 항생제 disc에 대한 연쇄구균의 감수성 판단기준은 Table 5에 제시하였다.

Table 6. Criteria for determination of antibiotics sensitivity by inhibition zone based on paper disc method

Antibiotics	Concentrations (μg)	Diameter of inhibition zone (mm)		
		Resistant	Weakly sensitive	Sensitive
Amoxicillin (AML)	10	≤ 13	14~17	≥ 18
Ampicillin (AMP)	10	≤ 13	14~16	≥ 17
Cephalexin (CL)	30	≤ 14	15~17	≥ 18
Chloramphenicol (C)	30	≤ 12	13~17	≥ 18
Ciprofloxacin (CIP)	5	≤ 15	16~20	≥ 21
Clindamycin (DA)	2	≤ 14	15~20	≥ 21
Doxycycline (DO)	30	≤ 12	13~15	≥ 16
Enrofloxacin (ENR)	5	≤ 16	17~19	≥ 20
Erythromycin (E)	15	≤ 13	14~22	≥ 23
Florfenicol (FFC)	30	≤ 13	14~19	≥ 20
Flumequine (UB)	30	≤ 20	21~24	≥ 25
Nalidixic acid (NA)	30	≤ 13	14~18	≥ 19
Neomycin (N)	10	≤ 12	13~16	≥ 17
Norfloxacin (NOR)	10	≤ 12	13~16	≥ 17
Ofloxacin (OFX)	5	≤ 12	13~15	≥ 16
Oxolinic acid (OA)	2	≤ 10	-	≥ 11
Oxytetracycline (OT)	30	≤ 14	15~18	≥ 19
Pefloxacin (PEF)	5	≤ 15	16~21	≥ 22

Ⅲ. 결과

1. *aroA* 유전자 cloning

NCBI에 등록된 *Streptococcus*속의 *aroA* 유전자 데이터를 이용하여 primer를 제작한 후 PCR을 수행하였다. *aroA* 유전자를 확보하기 위해 cloning에 사용된 균주는 *Streptococcus parauberis* (KCTC 3651), *Streptococcus iniae* (KCTC 3657), *Streptococcus pyogenes* (KCTC 3984), *Lactococcus garvieae* (KCTC 3772) 표준균주와 8개의 환경균주이다(Table 7). 결과 대부분의 연쇄구균은 992 bp의 *aroA* 유전자가 sequencing 되었고 4개의 *Streptococcus parauberis*와 4개의 *Streptococcus iniae aroA* 유전자가 sequencing 되었다.

실험에 사용된 *Streptococcus*속의 염기조성은 T (Thymine) 27.4%, C (Cytosine) 18.5%, A (Adenine) 30.8%, G (Guanine) 23.3%,로 C의 함량이 다른 염기 함량에 비해 낮은 값을 보였다. *Streptococcus*속 외 다른 그람양성균과 비교해보면 *Lactococcus*속의 염기 함량은 T (27.0%), C (17.9%), A (31.1%), G (24.0%) 가운데 C의 함량이 다른 염기 함량에 비해 낮은 값을 보였다. 또한 *Staphylococcus*속, *Listeria*속, *Enterococcus*속의 염기조성은 평균적으로 T가 각 29.3%, 26.1%, 28.2%이고 C는 각 17.6%, 17.6%, 18.0%, A는 각 34.9%, 31.9%, 29.7%이며, G는 28.2%, 24.4%, 24.0%로 C염기의 함량이 다른 염기에 비해 낮은 값을 보였다. 그람양성균으로 genus detection primer 제작에 사용된 *Lactococcus*속의 *Lactococcus garvieae*는 표준균주(KCTC3772)로 직접 cloning 하였고 *Lactococcus lactics*와 *Staphylococcus*속의 *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria*속의 *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus*속의 *Enterococcus faecalis*의 *aroA* 유전자는 NCBI에 등록된 데이터를 이용하였다(Table 1).

2. *Streptococcus*속 계통분석

aroA 유전자를 이용한 *Streptococcus*속 균주의 계통수(phylogenetic tree)는 거리(distance)에 근거한 방법으로 작성되었다. Fig. 3은 *Streptococcus* 15종과 참조분류군(Outgroup)으로 *Lactococcus* 2종, *Staphylococcus* 2종, *Enterococcus* 1종, *Listeria* 1종을 포함하였으며 각각의 박테리아로부터 얻어진 *aroA* 유전자의 data를 이용하였다. 또한 분자학적 계통관계를 비교하기 위하여 16S rRNA를 이용한 계통수를 작성하였다(Fig. 4). 계통수 작성은 MEGA 3.0 (Kumar *et al.*, 2004) 프로그램의 neighbor-joining 방법에 의해 수행되었다.

계통학적 분석을 통해 *p*-distance를 확인한 결과 *Streptococcus*속내의 7종 사이는 0.00~0.416%의 차이를 나타내었다. *Streptococcus parauberis* 표준균주와 환경균주 4균체 내의 *p*-distance는 0.000~0.011%이고 *Streptococcus iniae* 표준균주와 환경균주 4종간의 *p*-distance는 0.000~0.004%이다. 또한 *Streptococcus*속 7종간의 *aroA* 유전자 염기 서열 *p*-distance를 비교 한 결과 *Streptococcus iniae*와 *Streptococcus thermophilus* 사이가 0.415%로 가장 많은 차이를 보였고 *Streptococcus mutans*와 *Streptococcus thermophilus* 사이가 0.262%로 가장 적은 차이를 보였다(Table 8).

aroA 유전자를 이용해 작성된 계통수와 *p*-distance에 근거하여 *Streptococcus*속의 진화적 관계를 분석해 보면 계통진화적으로 *Streptococcus iniae*, *Streptococcus parauberis*, *Streptococcus pyogenes*가 가깝게 묶여졌고 *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*가 가깝게 묶였다. 참조분류군으로는 *Lactococcus garvieae*와 *Lactococcus lactis*가 한 그룹으로 묶였고 *Staphylococcus aureus*와 *Staphylococcus epidermidis*가 한 그룹으로 묶였다. *Listeria monocytogenes*와 *Enterococcus faecalis* 또한 잘 분류 되었다. 그러나 연쇄구균종의 원인균 중 하나로 알려진 *Lactococcus* 그룹이 *Streptococcus*속으로 묶여있어 이에 대한 연구가 더욱 필요할 것으로 보인다(Fig. 3). 반면 16S rRNA를 이용한 계통수를 보면 *Streptococcus agalactiae*가 계통진화적으로 *Streptococcus pyogenes*에 가깝게 묶여 *aroA* 유전자를 바탕으로 작성된 계통수와 차이를 보이고 있다(Fig. 4).

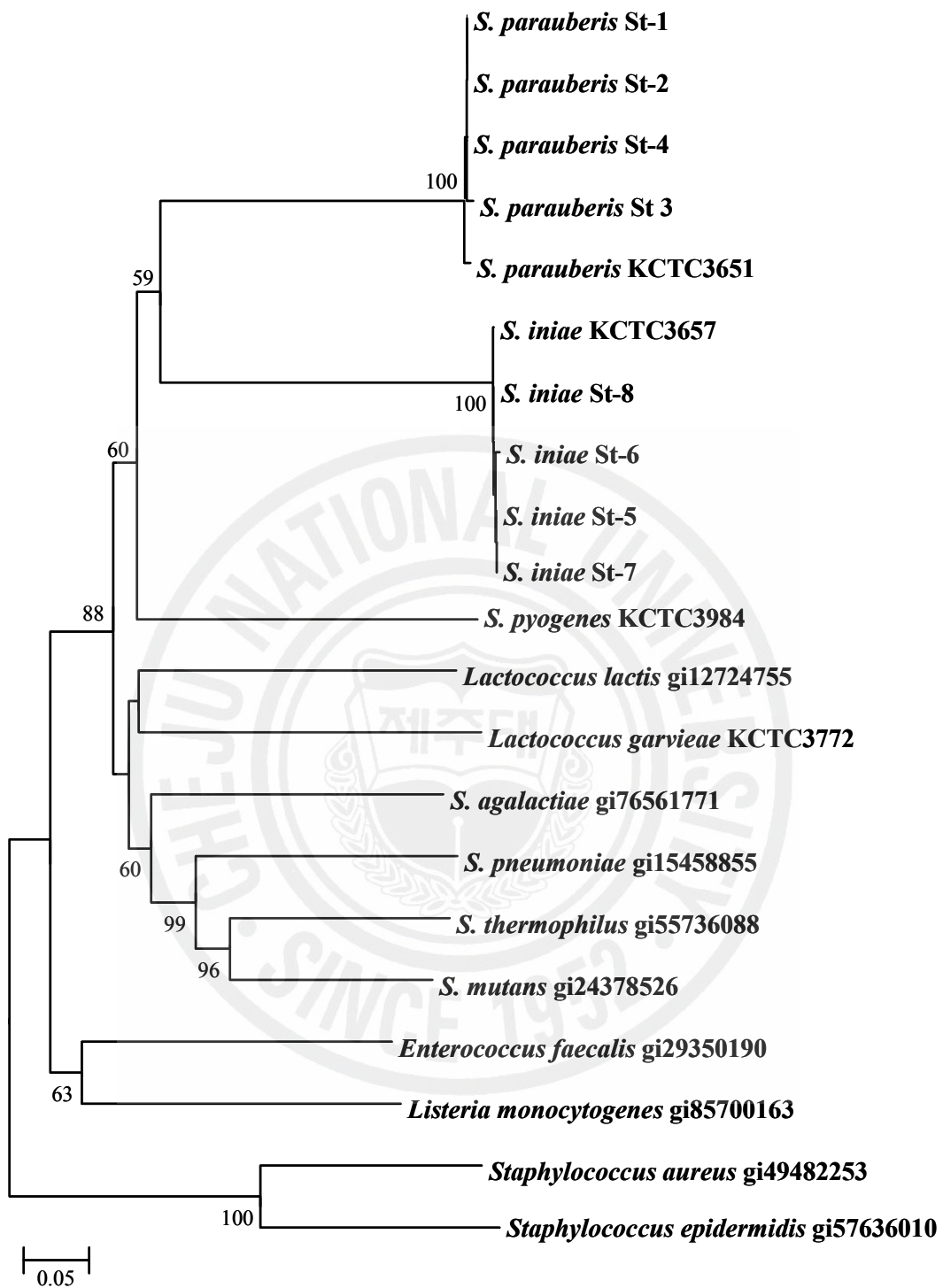


Fig. 3. Neighbor-joining phylogenetic tree based on *aroA* gene (992bp) of *Streptococcus* isolated from diseased flounder and some gram-positive strains listed in Table 1 and 5.

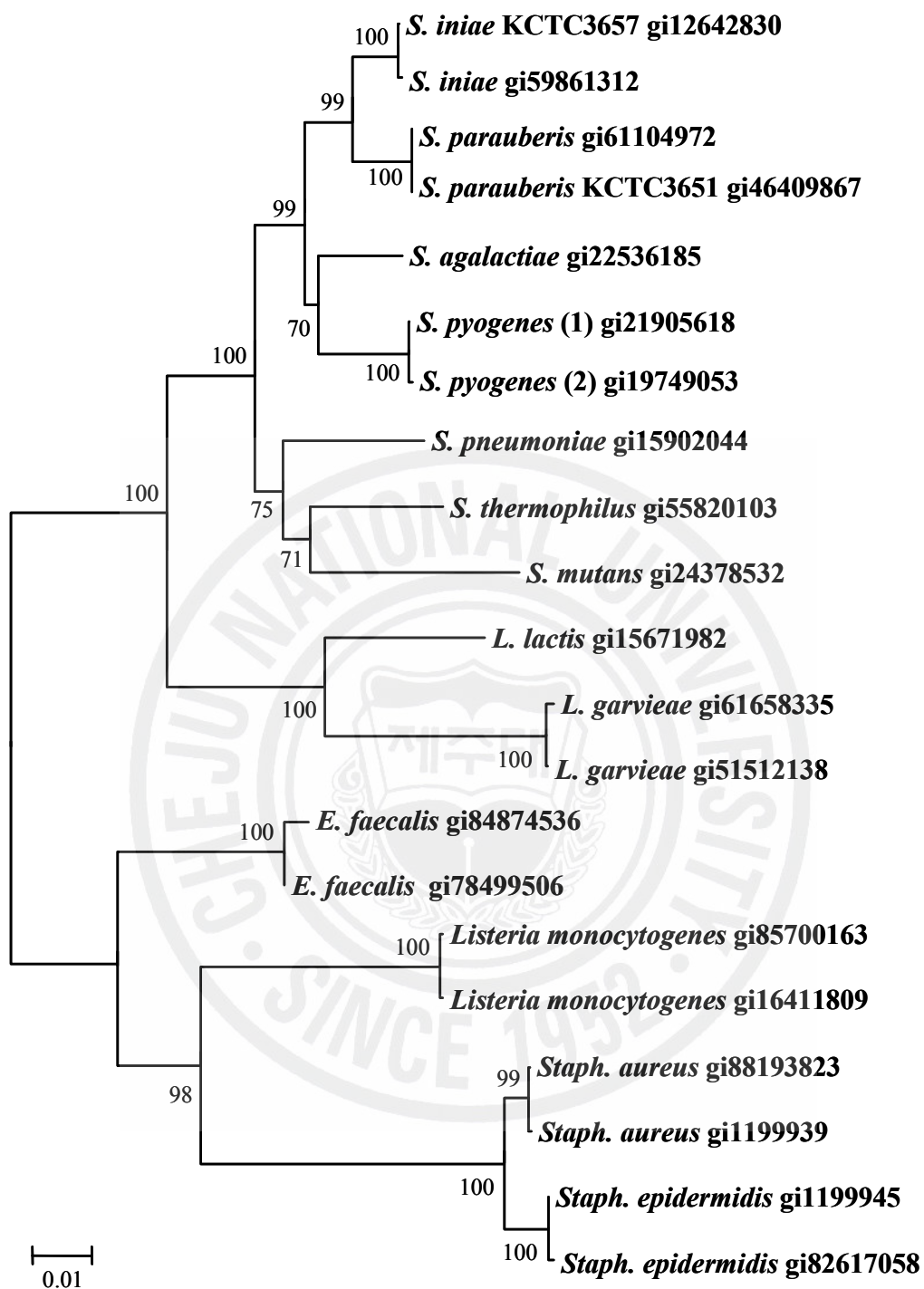


Fig. 4. Neighbor-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene (1335 bp) of *Streptococcus* and some other gram-positive strains sources from GenBank (Table 5).

3. Detection primer의 제작

양식장 분리균주 중 많이 발병하는 원인균을 확인하기 위해 표준균주의 *aroA* 유전자를 cloning 하는 방법으로 양식 넙치에서 분리된 연쇄구균을 지역별로 8개의 균주를 선택하여 이들 박테리아의 *aroA* 유전자를 sequencing하였다. 이들의 *aroA* 유전자의 염기 서열을 가지고 DNAssist (version 2.2) 프로그램을 이용하여 다중 정렬한 후 MEGA 3.0 프로그램의 neighbor-joining 방법을 통해 계통수를 작성하여 제주도 넙치 양식장에서 주로 발병되는 연쇄구균을 분석하였다.

제주도 양식넙치에서 분리되는 *Streptococcus*속 어병세균의 species detection primer 제작을 위해서는 연쇄구균종의 주요 원인균인 *Streptococcus iniae*와 *Streptococcus parauberis*, 그리고 이제까지 양식어류에서 발견된 보고가 있는 *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*를 포함하여 6종을 대상으로 디자인 하였다. Cloning에 사용된 연쇄구균의 정보는 Table 6에 나타내었다.

Streptococcus 의 *aroA* 유전자를 이용하여 작성된 계통수 결과와 염기 서열의 차이를 확인한 결과(Fig. 3, Table 8) species detection primer 제작에 용이함을 결정하여 양식장에서 분리된 균들의 염기 서열을 정렬한 후 서로 중복되지 않는 특이서열을 선택하여 primer를 제작하였다.

*Streptococcus*를 포함한 5개 속의 그람양성균 간의 염기 차이는 *Streptococcus*와 *Lactococcus*간에 372-379개, *Streptococcus*와 *staphylococcus* 사이에 432-441개, *Streptococcus*와 *Listeria* 사이에 420개, *Streptococcus*와 *Enterococcus* 사이에 405개의 염기 차이를 보였다(Table 10). 반면 16S rRNA 염기서열을 비교해보면 102개에서 212개의 차이를 보여 *aroA* 보다 약 반 정도 적은 차이를 나타냈다(Table 11). 이들 *aroA* 유전자 992 bp 염기서열 가운데 평균 408.1개의 염기차이를 보이고 있어 variation이 높기 때문에 5개의 그람양성균을 대상으로 제작할 genus detection primer는 16S rRNA를 이용하여 디자인하였다. Primer 제작에 사용된 16S rRNA의 데이터 정보는 Table 5에 표시하였으며 각 염기서열을 정렬하여 서로 중복되지 않는 특이서열을 선택하여 primer를 제작하였다.

Table 7. Information of *Streptococcus* strains isolated from fish farms located in Jeju used in design of species detection primers

Strain name	Location	Organ	Length(cm)	Sampling date
S-1	Gu-jwa	Spleen	40.0	26 Apr. 2004
S-2	Hal-lim	Spleen	40.0	14 Oct. 2004
S-3	Pyo-seon	Spleen	30.0	12 Oct. 2004
S-4	Gu-jwa	Kidney	37.0	31 Jen. 2005
S-5	Jo-cheon	Eye	36.0	12 Oct. 2004
S-6	Seong-san	Kidney	42.0	16 Nov. 2005
S-7	Ae-wol	Eye	25.0	20 Nov. 2005
S-8	Nam-won	Kidney	30.0	3 Sep. 2005

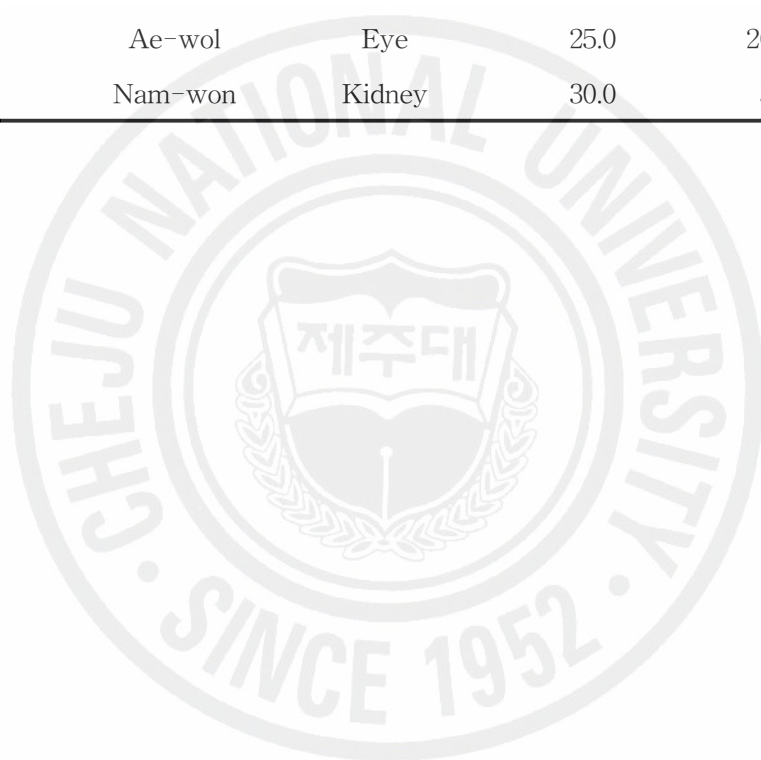


Table 8. *p*-distance estimated based on *aroA* DNA sequences obtained from standard strains and isolated strains of *Streptococcus* spp.

	[1]	S-1	S-2	S-3	S-4	2	S-5	S-6	S-7	S-8	3	4	5	6	7]
[1]															
[S-1]	0.006														
[S-2]	0.006	0.000													
[S-3]	0.011	0.005	0.005												
[S-4]	0.006	0.000	0.000	0.005											
[2]	0.365	0.361	0.361	0.362	0.361										
[S-5]	0.367	0.363	0.363	0.364	0.363	0.003									
[S-6]	0.368	0.364	0.364	0.365	0.364	0.004	0.004								
[S-7]	0.367	0.363	0.363	0.364	0.363	0.003	0.000	0.004							
[S-8]	0.366	0.362	0.362	0.363	0.362	0.001	0.002	0.003	0.002						
[3]	0.384	0.384	0.384	0.387	0.384	0.376	0.377	0.378	0.377	0.375					
[4]	0.388	0.387	0.387	0.387	0.387	0.415	0.415	0.416	0.415	0.414	0.390				
[5]	0.381	0.379	0.379	0.379	0.379	0.410	0.411	0.412	0.411	0.409	0.376	0.299			
[6]	0.380	0.378	0.378	0.382	0.378	0.387	0.386	0.388	0.386	0.386	0.367	0.262	0.303		
[7]	0.355	0.356	0.356	0.360	0.356	0.388	0.389	0.390	0.389	0.388	0.377	0.336	0.341	0.335	

[1]: Standard strain of *Streptococcus parauberis* (KCTC3651), [S-1]~[S-4]: *Streptococcus parauberis* isolated from fish farms and strains information is shown at Table 7. [2]: Standard strain of *Streptococcus iniae* (KCTC3657), [S-5]~[S-8]: *Streptococcus iniae* isolated from fish farms and strains information is shown at Table 7. [3]: Standard strain of *Streptococcus pyogenes* (KCTC3984), [4]: *Streptococcus thermophilus*, [5]: *Streptococcus pneumoniae*, [6]: *Streptococcus mutans*, [7]: *Streptococcus agalactiae*. [3]~[7] is shown at Table 1.

Table 9. *p*-distance estimated based on 16S rRNA sequences obtained from standard strains and isolated strains of *Streptococcus* spp.

	[1]	2	3	4	5	6	7	8	9	10]
[1]										
[2]	0.000									
[3]	0.017	0.017								
[4]	0.018	0.018	0.001							
[5]	0.034	0.034	0.036	0.037						
[6]	0.034	0.034	0.037	0.037	0.001					
[7]	0.054	0.054	0.058	0.058	0.048	0.049				
[8]	0.035	0.035	0.028	0.028	0.029	0.030	0.062			
[9]	0.053	0.053	0.047	0.047	0.052	0.053	0.049	0.050		
[10]	0.074	0.074	0.068	0.068	0.067	0.066	0.055	0.067	0.062	

[1]: Standard strain of *Streptococcus paraubris* (KCTC3651), [2]: *Streptococcus parauberis*, [3]: standard strain of *Streptococcus iniae* (KCTC3651), [4]: *Streptococcus iniae*. [5]: *Streptococcus pyogenes* (1), [6]: *Streptococcus pyogenes* (2), [7]: *Streptococcus thermophilus*, [8]: *Streptococcus agalactiae*, [9]: *Streptococcus mutans*, [10]: *Streptococcus pneumoniae*. Strains information is shown at Table 5.

Table 10. Number of nucleotide differences estimated based on *aroA* DNA sequences

	Strepto	Lacto-1	Lacto-2	Staph-1	Staph-2	Entero	Listeria
Strepto							
Lacto-1	372						
Lacto-2	379	354					
Staph-1	432	455	459				
Staph-2	441	446	468	271			
Entero	405	361	390	433	438		
Listeria	420	376	383	415	420	344	

Strepto: *Streptococcus parauberis*, Lacto-1: *Lactococcus garvieae*, Lacto-2: *Lactococcus lactis*, Staph-1, *Staphylococcus aureus*, Staph-2: *Staphylococcus epidermidis*, Entero: *Enterococcus faecalis*, Listeria: *Listeria monocytogenes*.



Table 11. Number of nucleotide differences estimated based on 16S rRNA sequences

	Strepto -1	Strepto -1	Lacto -1	Lacto -2	Staph -1	Staph -2	Entero -1	Entero -1	Liste -1	Liste -2
Strepto-1										
Strepto-2	0									
Lacto-1	129	129								
Lacto-2	119	119	83							
Staph-1	138	138	171	160						
Staph-2	133	133	166	155	5					
Entero-1	169	169	186	181	106	102				
Entero-2	169	169	186	181	106	102	1			
Liste-1	179	179	208	201	127	122	119	118		
Liste-2	182	182	212	205	132	127	121	120	15	

Strepto-1, 2: *Streptococcus parauberis*, *Streptococcus parauberis* KCTC3651,
 Lacto-1: *Lactococcus garvieae*, Lacto-2: *Lactococcus lactis*, Staph-1, *Staphylococcus aureus*,
 Staph-2: *Staphylococcus epidermidis*, Entero-1, 2: *Enterococcus faecalis*,
 Liste-1, 2: *Listeria monocytogenes*.

4. 제주도 양식장 분리 균주의 detection

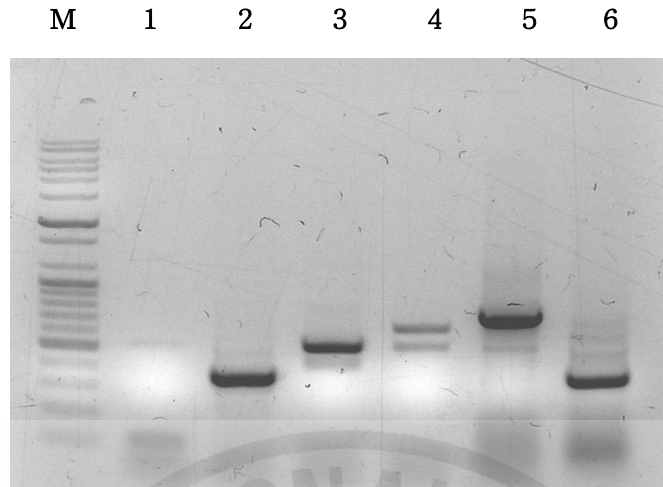
2005년 11월부터 2007년 10월까지 제주도 양식 넙치에서 분리된 연쇄구균은 총 348균체로 *Streptococcus parauberis*, *Streptococcus iniae*를 genus detection primer와 species detection primer를 이용한 multiplex PCR을 통해 동정 하였다.

Genus detection multiplex PCR 결과 *Staphylococcus*는 111 bp, *Streptococcus*는 360 bp, *Listeria*는 520 bp, *Lactococcus*는 650 bp, *Enterococcus*는 750 bp의 PCR 산물을 얻었다(Fig. 5). 또한 species detection multiplex PCR 결과 *Streptococcus agalactiae*가 200 bp, *Streptococcus iniae*가 300 bp, *Streptococcus mutans*가 400 bp, *Streptococcus parauberis*가 500 bp, *Streptococcus pneumoniae*가 600 bp, *Streptococcus pyogenes*가 700 bp로 각각의 PCR 산물을 확인하였다(Fig. 6). 동정된 균주의 용혈성을 보기 위해서 sheep blood agar 평판배지에 도말하여 관찰한 결과 *Streptococcus parauberis*는 α -hemolysis를 보였고 *Streptococcus iniae*는 β -hemolysis를 나타냈다.

제주도 양식장에서 분리된 연쇄구균을 대상으로 스크리닝 결과, *Streptococcus parauberis*가 377균체 중 306균체로 전체의 81.2%로 가장 높은 비율을 차지하였고 *Streptococcus iniae*는 42균체로 11.1%의 검출 비율을 나타냈다. 나머지는 *Listeria* sp.가 28균체(7.4%), *Enterococcus* sp.가 1균체(0.3%) 검출 되었다. *Streptococcus*는 연중 검출되었고 특히 고수온기인 여름철에 특히 많이 분리되고 있음을 확인했다. 2006년 3월에는 양식 넙치에서 연쇄구균을 분리하지 못하였고 2006년 8월이 57균체로 가장 많이 분리 되었다(Table 12).

이 연구에서 제작한 5종의 genus detection primer를 이용하여 세균성 질병에 감염된 양식 넙치에서 분리된 균주를 동정한 결과 *Streptococcus*로 확인 된 것만 species detection을 실시하였다. 그 결과 *Listeria*가 29 균체, *Enterococcus*가 1균체 검출되었으며 나머지는 모두 *Streptococcus*로서 genus detection primer와 species detection primer는 multiplex PCR을 통해 제주도 양식 넙치에서 분리된 연쇄구균에 대해 상당히 높은 동정률을 보였다(Table 12).

(A)

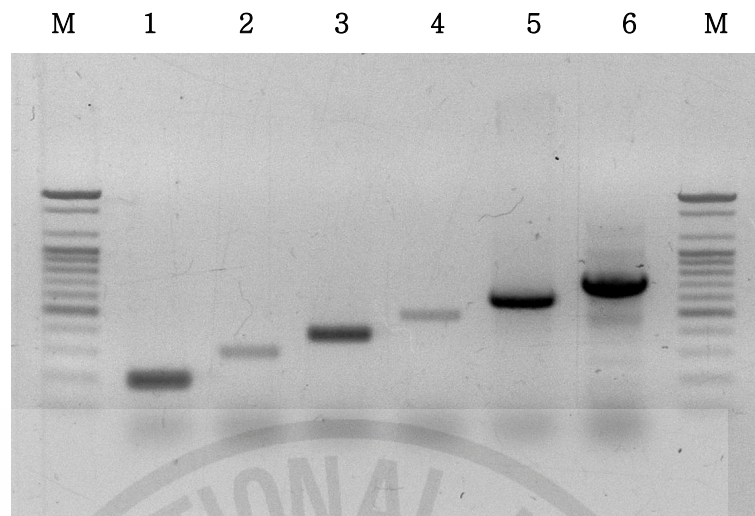


(B)



Fig. 5. Multiplex PCR products of gram-positive pathogens by using genus detection primers. (A) Genus detection multiplex PCR products of five gram-positive pathogens about standard strains. M: 100 bp ladder as size marker, 1: *Staphylococcus aureus*, 2: *Streptococcus parauberis*, 3: *Listeria monocytogenes*, 4: *Lactococcus garvieae*, 5: *Enterococcus faecalis*, 6: detection of *Streptococcus* sp. between five gram-positive strains. (B) Genus detection multiplex PCR products of environment strains isolated from fish farms located in Jeju. M: 100 bp ladder as size marker, 1~12, 14, 15: *Streptococcus* sp., 13: *Listeria* sp..

(A)



(B)

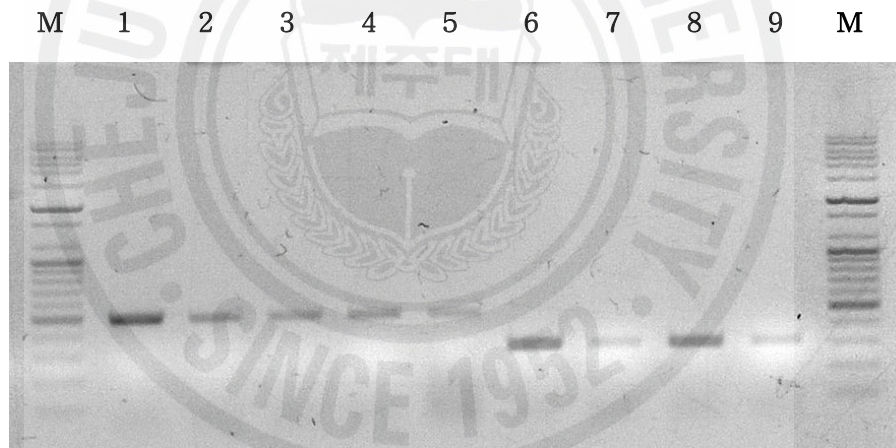


Fig. 6. Multiplex PCR products of major streptococcosis pathogens by using species detection primers. (A) Species detection multiplex PCR products of six *Streptococcus* pathogens about standard strains. M: 100 bp ladder as size marker, 1: *Streptococcus agalactiae*, 2: *Streptococcus iniae*, 3: *Streptococcus mutans*, 4: *Streptococcus parauberis*, 5: *Streptococcus pneumoniae*, 6: *Streptococcus pyogenes*. (B) Species detection multiplex PCR products of environment strains isolated from fish farms located in Jeju. M: 100 bp ladder as size marker, 1~5: *Streptococcus parauberis*, 6~9: *Streptococcus iniae*.

Table 12. Monthly occurrence of *Streptococcus* spp. and *Listeria* sp., *Enterococcus* sp. isolated from fish farms located in Jeju

Sampling date	<i>S. parauberis</i>	<i>S. iniae</i>	<i>Listeria</i>	<i>Enterococcus</i>	Total
Nov., 2005	4	1	1		6
Dec., 2005	4		1		5
Jan., 2006	5		1		6
Feb., 2006	3				3
Mar., 2006					0
Apr., 2006	3				3
May, 2006	4		1		5
Jun., 2006	29	3	1		33
Jul., 2006	30	3	2		35
Aug., 2006	40	13	4		57
Sep., 2006	35	1			36
Oct., 2006	9	11	2		22
Nov., 2006	8	4	2		14
Dec., 2006	12	4	2		18
Jan., 2007	15		1		16
Feb., 2007	9		2		11
Mar., 2007	16		1		17
Apr., 2007	14		1		15
May, 2007	2		5		7
Jun., 2007	16				16
Jul., 2007	12				12
Aug., 2007	10		1		11
Sep., 2007	5	2			7
Oct., 2007	21			1	22
Total	306 (81.2%)	42 (11.1%)	28 (7.4%)	1 (0.3%)	377

(): percentage occurrence of *Streptococcus* isolated from the diseased flounders.

5. 분리 균주별 항생제 감수성 시험 결과

aroA 유전자를 이용하여 제작된 detection primer를 이용한 multiplex PCR을 통해 동정된 연쇄구균 가운데 양식 넙치에서는 *Streptococcus parauberis*가 306 균체로 가장 빈번하게 분리되었고 *Streptococcus iniae*도 42균체가 검출되어 두 종을 대상으로 월별 검사 하였다. 시험에 쓰인 18개의 항생제(Table 6)에 따른 균들의 항생제 감수성 결과는 Table 13과 Table 14, Fig. 7에 제시하였다.

항생제 감수성 시험에 사용된 균주는 총 99개체로 *Streptococcus parauberis*로 분리된 균주 중 74균체를 시험하였다. 이 결과, nalidixic acid, flumequine, oxolinic acid에 대해 각각 64.8%, 63.5%, 58.1%의 내성을, neomycin에 대해 33.7%의 내성을 나타냈다. Amoxycillin, ampicillin에 대해서는 79.8%, 75.8%의 감수성을 보였고 cephalixin에 대해 85.2%의, chloramphenicol, ciprofloxacin에 대해 각 91.9%, 93.3%의 감수성을 나타냈다. 또한 clindamycin에서는 74.4%의 감수성을 보였고 doxycycline과 enrofloxacin, florfenicol 및 ofloxacin에 대해서는 각각 94.7%, 96.7%, 94.6%, 89.2%의 감수성을 보였다. Oxytetracycline에 대해서는 77.1%의 감수성을 보였고 마지막으로 pefloxacin에 대해 52.3%의 약한 감수성을 나타냈다.

*Streptococcus iniae*로 분리된 연쇄구균 중 25균주의 항생제 시험 결과, cephalixin, florfenicol에 대해 100%의 감수성을 보였으며 amoxycillin, ampicillin, clindamycin, chloramphenicol에 대해 각 92.0%, 92.0%, 96.0%, 94.0%의 감수성을 나타냈다. Doxycycline과 ofloxacin, oxytetracycline에 대해서는 각 96.0%, 96.0% 96.0%의 감수성을 보였고 enrofloxacin, erythromycin, neomycin, norfloxacin에 대해서는 각 88.0%, 64.0%, 72.0%, 68.0%로 비교적 낮은 감수성을 보였다. Flumequine, oxolinic acid에 대해서는 각 76.0%, 68.0%의 내성을 보였다.

항생제 감수성 결과를 종합해 보면, *Streptococcus parauberis*와 *Streptococcus iniae*는 상대적으로 flumequine, oxolinic acid에 대해 높은 내성을 보였고, chloramphenicol, ciprofloxacin, doxycycline, florfenicol에 대해서 높은 감수성을 보였다. 감수성 시험 결과 종에 따라 18개의 항생제에 대해 내성정도의 차이를 보였으며, 같은 종간에서도 다소의 내성 차이를 보였다.

Table 13. Antibiotics sensitivity of *Streptococcus* spp. based on paper disc method

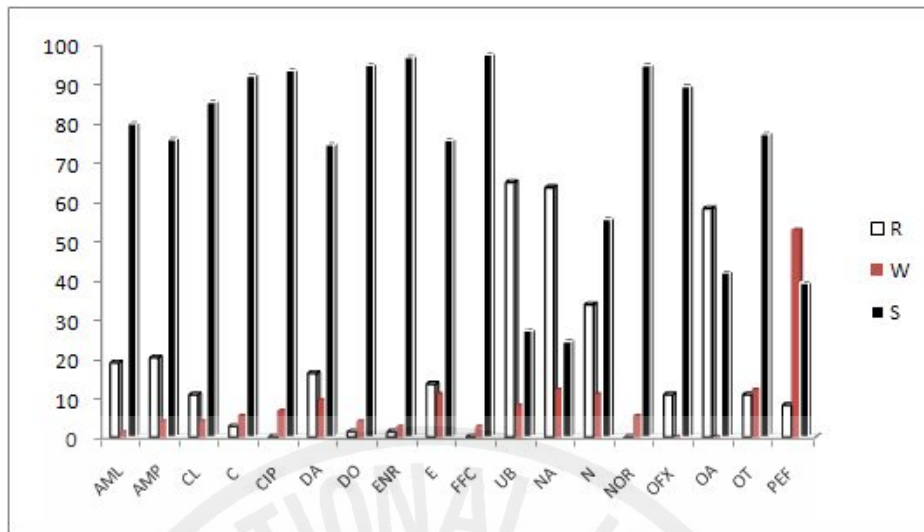
Antibiotics	<i>Streptococcus parauberis</i> (74)			<i>Streptococcus iniae</i> (25)		
	Resistant	Weakly sensitive	Sensitive	Resistant	Weakly sensitive	Sensitive
Amoxicillin (AML)	14	1	59	2	-	23
Ampicillin (AMP)	15	3	56	2	-	23
Cephalexin (CL)	8	3	63	-	-	25
Chloramphenicol (C)	2	4	68	-	1	24
Ciprofloxacin (CIP)	-	5	68	1	3	21
Clindamycin (DA)	12	7	55	11	1	13
Doxycycline (DO)	1	3	70	-	1	24
Enrofloxacin (ENR)	1	2	71	2	1	22
Erythromycin (E)	10	14	50	9	-	16
Florfenicol (FFC)	-	2	75	-	-	25
Flumequine (UB)	48	6	20	19	1	5
Nalidixic acid (NA)	47	9	18	11	2	12
Neomycin (N)	25	14	35	10	6	9
Norfloxacin (NOR)	-	4	70	4	4	17
Ofloxacin (OFX)	8	-	64	1	-	24
Oxolinic acid (OA)	43	-	31	17	-	8
Oxytetracycline (OT)	8	9	9	1	-	24
Pefloxacin (PEF)	6	39	29	8	8	9

Table 14. The percentage rate of antibiotics resistance and sensitivity of 2 *Streptococcus* strains based on paper disc method

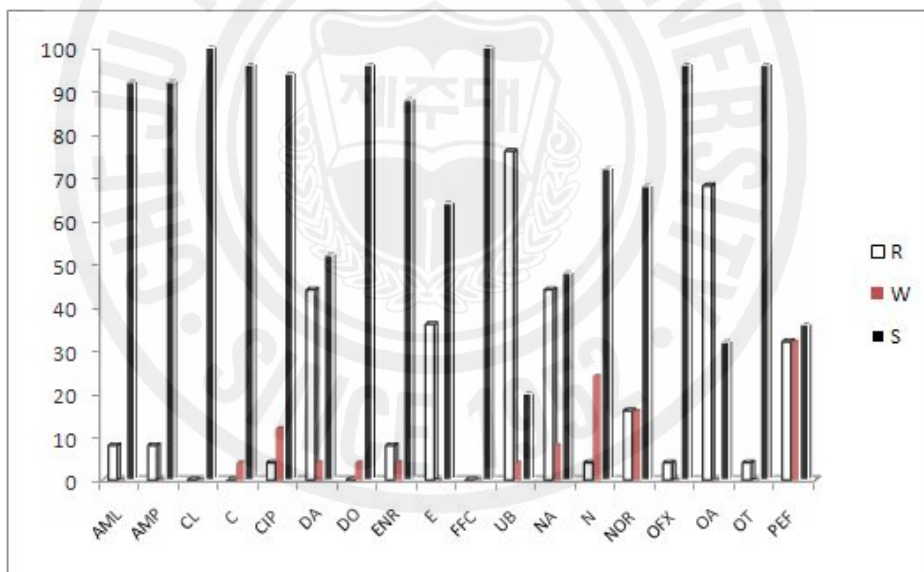
Antibiotics	Percent of antibiotics resistant and sensitive					
	<i>Streptococcus parauberis</i>			<i>Streptococcus iniae</i>		
	R	W	S	R	W	S
Amoxicillin (AML)	18.9	1.3	79.8	8.0	-	92.0
Ampicillin (AMP)	20.2	4.0	75.8	8.0	-	92.0
Cephalexin (CL)	10.8	4.0	85.2	-	-	100
Chloramphenicol (C)	2.7	5.4	91.9	-	4.0	96.0
Ciprofloxacin (CIP)	-	6.7	93.3	4.0	12.0	94.0
Clindamycin (DA)	16.2	9.4	74.4	44.0	4.0	52.0
Doxycycline (DO)	1.3	4.0	94.7	-	4.0	96.0
Enrofloxacin (ENR)	1.3	2.7	96.7	8.0	4.0	88.0
Erythromycin (E)	13.5	10.9	75.6	36.0	-	64.0
Florfenicol (FFC)	-	2.7	97.3	-	-	100
Flumequine (UB)	64.8	8.1	27.1	76.0	4.0	20.0
Nalidixic acid (NA)	63.5	12.1	24.4	44.0	8.0	48.0
Neomycin (N)	33.7	10.9	55.4	4.0	24.0	72.0
Norfloxacin (NOR)	-	5.4	94.6	16.0	16.0	68.0
Ofloxacin (OFX)	10.8	-	89.2	4.0	-	96.0
Oxolinic acid (OA)	58.1	-	41.9	68.0	-	32.0
Oxytetracycline (OT)	10.8	12.1	77.1	4.0	-	96.0
Pefloxacin (PEF)	8.1	52.7	39.2	32.0	32.0	36.0

R: resistant, W: weakly sensitive, S: sensitive

(A)



(B)



R: Resistance, W: weakly sensitive, S: sensitive

Fig. 7. Antibiotic resistant and sensitive pattern of 2 *Streptococcus* strains isolated from fish farms located in Jeju by paper disc method. *Streptococcus iniae* (A); *Streptococcus parauberis* (B). AML: amoxycillin, AMP: ampicillin, CL: cephalexin, C: chloramphenicol, CIP: ciprofloxacin, DA: clindamycin, DO: doxycycline, ENR: enrofloxacin, E: erythromycin, FFC: florfenicol, UB: flumequine, NA: nalidixic acid, N: Neomycin, NOR: norfloxacin, OFX: ofloxacin, OA: oxolinic acid, OT: oxytetracycline, PEF: pefloxacin.

IV. 고찰

제주도 어류 양식 대표 품종인 넙치(*Paralichthys olivaceus*)는 1984년 인공종묘 생산기술을 개발한 이후 매년 생산량이 급증하였고 제주도 1차 산업의 중요한 자리를 차지하였다. 하지만 각종 질병에 의해 폐사량 또한 적지 않은 문제점이 있다. 양식 넙치 질병의 원인에는 고밀도 사육이나 MP 사료의 과용, 항생제 남용에 의한 폐사도 일어나지만 세균성 질병, 기생충성 질병, 바이러스성 질병에 의한 것이 주요인이다. 이들 질병 중 양식 넙치의 주요 세균성 질병은 연쇄구균증, 에드워드증, 비브리오증 등이 알려져 있다(Oh *et al.*, 1998). 이번 연구의 대상인 연쇄구균은 연중 출현하고 고수온기나 나쁜 사육환경에 스트레스를 받아 어체가 약해지면 발병률이 높아진다. 그 중에서도 특히 매년 고수온기인 7~9월이 되면 연쇄구균에 의해 넙치의 폐사율이 급증하는데 주로 체장 20 cm 전후부터 성어에 주로 발병이 되고 있다.

Streptococci의 heterogeneous group 은 인간에게 질병을 일으키는 병원체를 포함하여 전 세계적으로 48종이 보고 되었고 지속적으로 분리, 동정이 이루어지고 있으며 여러 가지 표현 형질과 유전학적 분석을 통하여 다른 속 혹은 다른 종으로 재 동정 되고 있는 실정이다(Facklam *et al.*, 2002; Ruoff *et al.*, 1998). 이 중 양식 어류에 연쇄구균증을 일으키는 병원체는 전 세계 25종의 양식 어류에서 분리 되었으며, 원인균으로는 *Streptococcus agalactae*, *Streptococcus difficilis*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus paraubeirs*, *Streptococcus equi*, *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus faecium*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecuime*, *Lactococcus garvieae* 등이 관여하는 것으로 보고되었다(Austin, 1999). 또한 심(1994)은 양식 넙치로부터 *Staphylococcus epidermidis*를 연쇄구균과 함께 분리 하였다.

양식어에서의 연쇄구균에 의한 패혈증은 1957년 일본 시즈오카현의 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*)에서 처음으로 발견되었다(Hoshina *et al.*, 1958). 그 후 Robinson and Meyer (1966)는 어류에서 *Streptococcus* spp.를 분리하였고 Boomker *et al.* (1979)는 송어의 폐사에서 분리 하였으며 미국, 남아프리카와 싱

가포르의 담수어류양식에서도 이 질병에 의한 보고가 있다(Kitao *et al.*, 1981). 또한 유럽산 범가자미에서 연쇄구균이 분리 되었고(Moreno *et al.*, 1996), 우리나라에서도 양식넙치를 비롯하여 방어, 조피볼락 등에 폐사를 가져와 막대한 손실을 일으키고 있다(Chun, 1989; Lee and Ha, 1991).

넙치 양식 산업에 나타나는 연쇄구균증의 주요 원인균은 *Streptococcus iniae* (syn. *Streptococcus shiloi*), *Streptococcus parauberis*, *Lactococcus garvieae* (syn. *Enterococcus seriolicida*)로 보고되었으며 *Streptococcus iniae*의 경우 안구 돌출, 뇌수막염, 패혈증을 주 증상으로 미국, 이스라엘의 경우 담수어인 틸라피아(*Oreochromis* sp.)와 무지개송어에서 연쇄구균증의 주요 병원체이다. 또한 일본에서는 yellowtail과 넙치에서 분리 되었고 이스라엘의 유럽산 sea bass와 red drum (*Sciaenops ocellatus*), 오스트레일리아의 barramundi (*Lateolabrax* *calcarifer*)에서 보고되었다(Perera *et al.*, 1994; Eldar *et al.*, 1995, 1999b; Eldar and Ghittino, 1999; Nguyen and Kanai, 1999; Bromage *et al.*, 1999). 그리고 이스라엘 남단 Eilat만의 자연산 어류에서도 이 균이 분리되었다고 보고하였다(Colomi *et al.*, 2002).

*Lactococcus garvieae*의 경우 패혈증에 의한 급성 전신 질환을 보이며 해산어인 일본의 yellowtail과 이탈리아, 스페인, 프랑스, 영국 및 오스트레일리아의 무지개송어와 같은 담수어에 감염을 일으킨다(Kusuda *et al.*, 1991; Eldar *et al.*, 1996, 1999a; Bercovier *et al.*, 1997; Eldar and Ghittino, 1999; Bark and McGregor, 2001; Romalde and Toranzo, 2002). 또한 최근 보고에 따르면 *Lactococcus garvieae* 는 홍해의 자연산 wrasse (*Coris aygula*)에서도 분리 되었다(Colomi *et al.*, 2003).

Streptococcus parauberis 경우 *Streptococcus uberis*와 특징이 모호하여 *Streptococcus uberis* type II로 분류되었으나 생화학적 성상, 혈청학적성상의 이형성과 16S rRNA 염기서열 분석을 통해 1990년 *Streptococcus parauberis*로 재동정 되었다. 이 균은 페인의 Galicia 지역에서 저온성(적정수온 15~19℃) 어류인 터봇(*Scophthalmus maximus*)에 연중 발병하며 출혈 및 농양을 동반한 안구 돌출, 복부와 복벽의 점상 출혈 등 병리학적 특징 등이 보고되었다(Toranzo *et al.*, 1994, 1995; Domenech *et al.*, 1996).

이와 같이 각 병원체간의 병원성이 다른 것으로 알려져 있으며, 치사율도 각각 달라 연쇄구균증을 일으키는 각 병원체에 대한 명확한 동정과 분류가 필요할 것으로 사료된다(Domenech *et al.*, 1996; Bercovier *et al.*, 1997; Eldar *et al.*, 1999).

이 세균성 질병에 대해 국내에서도 연구가 진행되었으며, Lee *et al.* (2001)는 *Lactococcus garvieae*가 국내 양식 어류에 발병되는 연쇄구균증의 원인균 가운데 우점종일 것이라고 추정하였으며, 이 외에 *Enterococcus* sp., *Streptococcus* sp.를 보고하였고 Song *et al.* (2003)은 *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*를 동정하여 보고 하였다. 또한 *Streptococcus iniae*는 넙치가 주요 양식 어종인 제주 지역에서 분리되는 연쇄구균증 원인균의 우점종으로 추정 되었다 (Kim *et al.*, 2004). 하지만 최근의 연구 결과에 따르면 제주 양식 넙치에서 1월에서 6월 사이에 분리한 연쇄구균 가운데 43개체 중 33개체가 *Streptococcus parauberis*로 동정 되었고 나머지는 *Streptococcus iniae*로 나타났으며 *Lactococcus garvieae*는 분리 되지 않았다(Jung, 2004). 하지만 현재의 연구 결과만으로 양식 어류의 연쇄구균증과 관련한 원인균이 모두 동정 된 것으로 보기 어려우며 특히 제주의 넙치 양식에 있어 원인균에 대한 구체적인 동정이 이루어 지지 않은 실정이다.

병어에서 분리된 연쇄구균을 동정하기 위해서는 선택배지가 따로 없으므로 영양배지나 혈액한천 배지에 배양하여 집락형성 및 용혈성을 관찰하고 API-32와 같은 kit를 사용하여 신속한 생화학적 특징을 볼 수 있다. 하지만 이러한 방법을 통한 동정은 *Lactococcus garvieae*와 *Streptococcus iniae*를 각각 *Lactococcus lactis*와 *Streptococcus uberis*로 잘못 동정 될 수 있으며(Weinstein *et al.*, 1997; Ravelo *et al.*, 2001), 다른 여러 종에 있어서도 잘못 동정 되어질 수 있다. 또한 연쇄구균의 동정은 항혈청을 이용한 형광항체반응이나 슬라이드 응집반응을 수행하여 혈청학적 특징을 확인 하여야 한다. *Lactococcus garvieae* 의 경우 캡슐의 유무에 따라 두 가지 혈청형 즉, KG(-), KG(+)으로 구분되며(Yoshida *et al.*, 1996), 캡슐이 있는 KG(-)은 교차 응집 반응 시험 결과 항체와의 binding site를 캡슐이 둘러싸고 있어 세포를 이물질로 인식하는데 방해하는 것으로 나타났다 (Alim *et al.*, 1996; Ooyama *et al.*, 1999).

*Streptococcus iniae*의 경우 캡슐의 차이점에 의해 두 가지 혈청형(I and II) 으로 보고되었으나(Bachrach *et al.*, 2001), 최근 우리나라에서 보고된 바에 따르면 *Streptococcus iniae* 또한 질병의 임상 및 병리학적으로 증상이 유사한 *Lactococcus garvieae*와 같이 캡슐의 유무에 따라 두 가지 혈청으로 구성 되었으며 캡슐을 가지고 있는 것이 serum killing에 저항성을 나타내고 식균작용을 회피 할 수 있어 이들의 캡슐이 병원성을 나타내는 주요 요인으로 나타났다 (Kim *et al.*, 2004). Streptococci와 같이 펩티도글리칸층이 두껍게 형성되어있는 그람양성균은 다양한 항원성을 갖고 있으며 그 만큼 혈청형도 다양하게 나타날 수 있어 진단 과정에 있어서 혈청형의 분석은 선행 되어야 한다. 또한 이를 바탕으로 유전학적 분석이 진행 되어야 종 동정 및 질병 대책마련에 효율적일 것으로 보인다.

최근 연구에 따르면 전 세계적으로 잘 알려져 있고 폐렴구균인 *Streptococcus pneumoniae*의 경우 헤파 다당체의 구조에 따라 92개의 혈청형으로 세분 되며 이들은 모두 같은 독성을 갖고 있지 않을 뿐 만 아니라 그에 따라 항생제 내성의 유형도 다른 것으로 나타났다. 이들 감염체 가운데 숙주에 우세한 특정 혈청형을 중심으로 유전학적 상관성을 PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) 양상으로 분석한 결과 혈청형별로 각기 다른 양상을 나타냈다(Chung, 2004). 게다가 *Streptococcus iniae*를 대상으로 실시된 attenuated vaccine 실험에서는 혈청형이 다른 이유로 백신의 방어 효과가 나타나지 않았다(Bachrach *et al.*, 2001).

따라서 종 동정 과정에서는 혈청 분석과 유전학적 분석이 이루어 져야 하며 혈청형에 따른 유전학적 상관성을 세밀하게 정리 한다면 이러한 연구 결과로 유전자를 이용한 방법만으로 종 동정과 혈청형 분류를 동시에 해결 할 수 있을 것으로 보인다. 또한 예전의 종 동정 방법들은 배양 기간을 포함하여 상당히 오랜 시간을 필요로 하기 때문에 이를 대체 할 수 있는 신속하고 효율적인 진단 kit로 사용 될 수 있으며 병원체의 진단뿐만 아니라 이와 관련한 백신 개발에 있어서도 중요한 역할을 수행 할 것이다.

이번 연구는 이들 병원균 가운데 제주도 넓치 양식장에서 분리된 연쇄구균의 동정을 위하여 *aroA* 유전자를 이용한 방법이 수행되었다. 일반적으로 균 동정은 형태학적, 염색학적, 혈청학적, 생화학적, 유전학적 방법을 통해 이루어지고 있으

며 특히 유전학적 방법에서는 16S rRNA의 database가 풍부하여 이를 토대로 종 동정뿐만 아니라 계통분류학적 연구에 이용되고 있다(Thompson *et al.*, 2004). 하지만 16S rRNA는 유전적으로 매우 보존된 부분으로 종간의 유전자 차이가 거의 없어 진화적으로 가까운 종간의 동정에 어려움을 지니고 있다(Krawiec and Riley, 1990; Moon *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005). 이 어려움을 보완하기 위해서 이 연구에서는 aromatic amino acid 생합성 과정에 관여하는 *aroA* 유전자를 이용하여 연쇄구균의 동정 및 계통분류학적 연구를 하였다. 그 결과 *aroA* 유전자를 이용한 분자계통분류와 기존에 연구된 16S rRNA의 분자계통분류는 유전적 다형성 정도와 다소 차이를 보였다. 또한 16S rRNA의 경우 유전적으로 보존성이 높아 가까운 종간의 동정에 어려움을 보였다(Francois *et al.*, 2004; Krawiec and Riley, 1990; Moon *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005).

aroA 유전자를 이용하여 *Streptococcus*속의 계통학적 관계를 살펴보면 *Streptococcus iniae*와 *Streptococcus parauberis*, *Streptococcus pyogenes*가 한 그룹으로 가깝게 묶였으며, *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*가 가깝게 묶였다.

이들 *Streptococcus*속 7종간의 *aroA* 유전자 염기 서열 *p*-distance를 비교 한 결과 *Streptococcus iniae*와 *Streptococcus thermophilus* 사이가 0.415%로 가장 많은 차이를 보였고 *Streptococcus mutans*와 *Streptococcus thermophilus* 사이가 0.262%로 가장 적은 차이를 보였다. 이들 계통수는 *tuf* 유전자를 이용한 Francis *et al.* (2004)의 *Streptococcus*속 계통수의 결과와 유사하였다. 이 계통수에서는 *Streptococcus iniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus parauberis*, *Streptococcus agalactiae*를 *pyogenes* 그룹으로 분류하였고 *Streptococcus mutans*는 *mutans* 그룹으로 분류하였으며 *Streptococcus pneumoniae*는 *mitis* 그룹으로 분류하였다. 또한 16S rRNA를 이용한 계통수에서도 유사한 결과를 나타냈지만 염기의 유사성이 매우 높아 종동정이 어려움을 나타냈다고 보고하였다(Francois *et al.*, 2004).

이번 연구에서 작성한 16S rRNA를 이용한 계통수와 *aroA* 유전자를 이용한 계통수와 비교했을 때 다른 점은 전자의 계통수에서 *Streptococcus agalactiae*가 *Streptococcus pyogenes*와 가까운 그룹으로 묶여있는 반면 *aroA* 유전자를 이용

한 계통분류에서는 *Streptococcus pneumoniae*와 한 그룹으로 묶여있었다..

aroA 유전자를 이용한 계통수 결과 연쇄구균의 종동정이 가능할 것으로 판단되어 species detection primer를 제작하였다. 하지만 5개 속의 그람양성균을 대상으로 각 *aroA* 유전자 염기 서열을 정렬한 결과 992 bp 가운데 344 bp에서 468 bp의 많은 염기차이를 보이기 때문에 16S rRNA 염기서열을 이용하여 genus detection primer를 제작하였다. 디자인된 각 primer를 이용한 multiplex PCR 방법으로 동정한 결과 제주도 양식 넙치에서 분리된 연쇄구균은 총 377균체로 *Streptococcus* spp.가 348개, *Listeria*가 28개, *Enterococcus*가 1개 분리되었다. 그 중 *Streptococcus parauberis*가 306개로 81.2%를 차지하였고 *Streptococcus iniae*가 42개로 11.1%의 검출율을 보였다. 이들 균의 용혈성을 실험한 결과 *Streptococcus iniae*에서만 β -hemolysis를 나타냈고 *Streptococcus parauberis*의 경우 Annett and Collins (1990)는 α -hemolysis 또는 γ -hemolysis 라고 보고하였지만 이 연구에서는 α -hemolysis만 보였다.

이들의 출현양상을 계절적으로 비교 할 경우 연중으로 검출되기는 하나 고수온기에 가장 많이 발생하며 2006년 8월에 57개체로 가장 많이 검출 됐으며 2006년 6월, 7월, 9월에는 각각 33개, 35개, 36개로 높은 검출율을 나타냈다. 반면 2006년 2월과 4월이 각 4 균체로 가장 적게 분리 되었고 2006년 3월은 분리되지 않아 저수온기에는 낮은 검출율을 보였다. 지역별로 비교한 결과 성산 지역의 양식장으로부터 108균체가 분리되었으며, 그 밖의 구좌, 한경, 외도, 대정, 애월, 조천, 한림, 표선, 남원, 서귀포 지역의 양식장에서 각각 36, 1, 2, 42, 20, 14, 13, 50, 24, 60균체의 연쇄구균이 분리되었고 넙치의 육상수조식 양식장이 밀집해 있는 지역에서 많은 균이 분리 되었다.

동정된 연쇄구균 가운데 가장 많이 분리된 *Streptococcus parauberis*는 저온성 어류인 터봇에서 연중 발병했다고 보고하였고(Domenech *et al.*,1996) 배양 특성 실험에서 또한 10°C의 낮은 온도에 성장이 이루어진다고 보고되었다(이 등, 2007). 이러한 생리적 특성으로 저수온기에도 발병하여 연중 병어에서 검출되는 것으로 사료되며 정 등(2006)이 2003년 6월부터 2005년 5월 사이의 제주지역 양식장의 연쇄구균증 발생 동향 조사에서 저수온기의 *Streptococcus parauberis*의 검출율이 *Streptococcus iniae*의 검출율에 비해 상대적으로 높게 나타났다고 보

고한 결과와 10℃의 낮은 온도에서도 성장이 이루어진다는 결과(이 등, 2007)는 연관이 있는 것으로 사료된다. 또한 이 등(2007)이 보고한 병원성의 차이는 *Streptococcus iniae*의 경우 급성 감염 형태를 보이고 외부적으로 탈장 증세가 주로 관찰된 반면 *Streptococcus parauberis*는 만성 감염 형태를 보이고 외부적으로 체색 흑화외의 특이적 증상이 없었다. 이 연구에서는 이들 병원체에 대한 감염실험이 수행되지 않았지만 앞으로는 감염실험을 수행하고 연쇄구균증 증상과 관련해 각 원인균의 병원성 분석과 또한 병원성에 관여하는 분자학적 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다.

이번 연구에서는 연쇄구균에 감염된 양식 넙치로부터 377개 중 306개로 가장 많이 분리된 *Streptococcus parauberis*와 42개 검출된 *Streptococcus iniae*를 대상으로 18개의 항생제에 대한 감수성 시험을 하였다. 항생제 감수성 시험에 사용된 균주는 총 99개체로 *Streptococcus parauberis*로 분리된 균주 중 74균체를 시험하였다. 그 결과, nalidixic acid와 flumequine, oxolinic acid에 대해 각 64.8%, 63.5%, 58.1%의 내성을 보였고 neomycin에 대해 33.7%의 내성을 나타냈다. Amoxycillin, ampicillin에 대해서는 각 79.8%, 75.8%의 감수성을 보였고 cephalexin에 대해 85.2%, chloramphenicol, ciprofloxacin에 대해서는 각 91.9%, 93.3%의 비교적 높은 감수성을 나타냈다.

*Streptococcus iniae*로 분리된 연쇄구균 중 25균주의 항생제 시험 결과, 항생제 cephalexin, florfenicol에 대해 100%의 감수성을 보였으며 amoxycillin, ampicillin, clindamycin, chloramphenicol에 대해 각 92.0%, 92.0%, 96.0%, 94.0%의 감수성을 나타냈다. 또한 doxycycline과 ofloxacin, oxytetracycline에 대해서는 각 96.0%, 96.0%, 96.0%의 감수성을 보였고 enrofloxacin, erythromycin, neomycin, norfloxacin에 대해서는 각 88.0%, 64.0%, 72.0%, 68.0%로 비교적 낮은 감수성을 보였다. 반면 flumequine, oxolinic acid에 대해서는 각 76.0%, 68.0%의 내성을 나타냈다.

결과를 종합해 보면, 검출된 *Streptococcus parauberis*와 *Streptococcus iniae*는 상대적으로 flumequine, oxolinic acid에 대해 높은 내성을 보였고, chloramphenicol, ciprofloxacin, doxycycline, florfenicol에 대해 높은 감수성을 보였다. 18개의 항생제에 대해서 종에 따라 내성 정도의 차이를 보였으며, 같은 종

사이에서도 다소의 차이를 보였다.

이러한 결과를 바탕으로 제주도 양식장에서 출현하는 연쇄구균에 대해 병원성 및 항생제 감수성 테스트 등이 수행되어야 할 것이며 내성 인자를 지닌 plasmid 를 연구하여 내성 균주의 파악이 수행되어야 할 것이다. 또한 어류 병원성 세균이 항생제에 대한 내성 증가 억제 및 양식 어류의 세균성 질병에 효과적으로 대처하기 위해 적절한 약제의 선정이 필요하며 항생제 내성 균주를 파악하기 위해 지속적인 연구가 필요할 것이다.



V. 요약

*Streptococcus*속은 최근까지 전 세계적으로 약 48종이 분리되어 보고되고 있으며 계속적으로 분리 보고되고 있다. *Streptococcus*는 그람양성 구균으로 해수, 기수 담수 지역에 널리 분포하는 상재 세균으로서 어류, 갑각류 및 연체동물에 이르는 다양한 수산 생물에 감염시킨다.

일반적으로 병원균의 동정은 형태학적, 혈청학적 방법 및 생화학적 방법, 유전학적 방법 등을 통해서 진행되고 있다. 이 연구에서는 유전학적 방법 중 *aroA* 유전자를 이용하여 *Streptococcus*속을 동정하였다.

aroA 유전자는 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase를 인코딩하는 유전자로 박테리아의 세포벽 형성에 관여하는 것으로 알려져 있다.

이 연구는 *aroA* 유전자를 이용하여 *Streptococcus*속의 분자계통분류학적 관계성 및 다양성을 조사하였으며 이를 토대로 *Streptococcus*속의 신속한 동정을 위한 방법을 구축하여 제주도의 양식 넙치에서 발생하는 세균성 질병의 원인균인 *Streptococcus*를 동정하였다.

aroA 유전자를 이용한 *Streptococcus*속 표준균주의 계통분석과 질병에 감염된 양식 넙치에서 분리된 연쇄구균의 *aroA* 유전자 cloning을 통해 얻어진 데이터를 이용하여 어병균인 연쇄구균의 특이 서열로 detection primer를 제작하였다.

제작된 detection primer로 multiplex PCR을 통해 제주도 양식 넙치에서 분리된 연쇄구균을 동정하였다. 동정 결과 넙치에서 분리된 연쇄구균의 총 수는 377개이며 그 중 *Streptococcus parauberis*가 82.2%, *Streptococcus iniae*가 11.1%, *Listeria* sp.가 7.4%, *Enterococcus* sp.가 0.3%를 차지하였다.

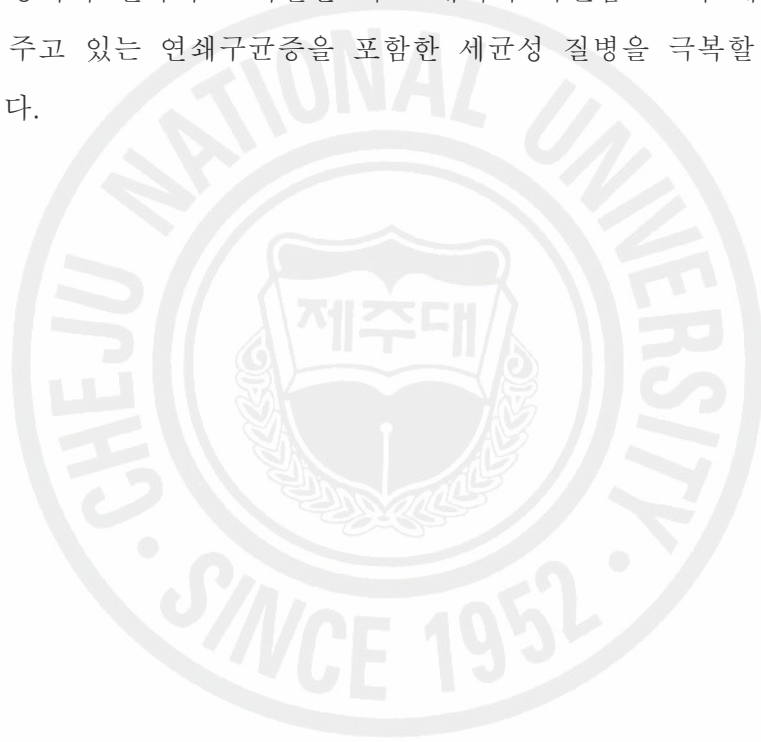
또한 양식 넙치에서 분리된 연쇄구균 가운데 주요 검출균인 *Streptococcus parauberis*와 *Streptococcus iniae*를 월 별 무작위로 선택하여 18 종류의 항생제에 대한 감수성 시험을 수행하였다.

항생제 감수성 시험 결과, *Streptococcus parauberis*는 상대적으로 nalidixic acid, flumequine, oxolinic acid,에 대해 내성을 각각 64.8%, 63.5%, 58.1%의 내성을 보였고 *Streptococcus iniae*는 cephalixin, florfenicol에 대해 100%의 감수성

을 보였으며 flumequine, oxolinic acid에 대해 내성을 나타냈다.

항생제 감수성 시험 결과를 종합해 보면, 검출된 *Streptococcus parauberis*와 *Streptococcus iniae*는 상대적으로 flumequine, oxolinic acid에 대해 높은 내성을 보였고, chloramphenicol, ciprofloxacin, doxycycline, florfenicol에 대해서 많은 균주들이 높은 감수성을 보였다. 감수성 시험 결과 중에 따라 18개의 항생제에 대해 내성정도의 차이를 보였으며, 같은 종 사이에서도 다소의 내성의 차이를 보였다.

따라서, *aroA* 유전자를 이용한 세균성 질병 원인균의 신속 동정과 항생제 감수성 시험을 통하여 신속하고 적절한 치료 대책의 마련함으로써 제주도 양식장에 큰 피해를 주고 있는 연쇄구균증을 포함한 세균성 질병을 극복할 수 있을 것으로 생각 된다.



VI. 사 사

이 논문은 2006년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-2006-511-F00030)



VII. 참고 문헌

- Alim, A.R., K. Kawai and R. Kusuda. 1996. Comparative pathogenicity study on antigenically variant strains of *Enterococcus seriolicida*. J. Fish Dis., 19: 39-46.
- Annette, M.W. and M.D. Collins. 1990. Molecular taxonomic studies on *Streptococcus uberis* type I and II. Description of *Streptococcus parauberis* sp. nov. J. Appl. Bacteriol., 68: 485-490.
- Austin, A. and D.A. Austin. 1999. Bacterial fish pathogens, 3rd ed., Springer. London.
- Bachrach, G., A. Zlotkin, A. Hurvitz, D.L. Evans and A. Eldar. 2001. Recovery of *Streptococcus iniae* from diseased fish previously vaccinated with a *Streptococcus* vaccine. Appl. Environ. Microbiol., 67: 3756-3758.
- Bark, S. and D. McGregor. 2001. The first occurrence of lactococcosis in farmed trout in England. Trout News, 31: 9-11.
- Bercovier, H., C. Ghittino and A. Eldar. 1997. Immunization with bacterial antigens: infections with streptococci and related organisms. In: R. Gudding, A. Lillehaug, P.J. Midtlyng and F. Brown. (Eds.), Fish Vaccinol. Karger, Basel, Switzerland, pp. 153-160.
- Boomker, J., G.D. Imes, C.M. Camerson, T.W. Naude and H.J. Schoonbee. 1979. Trout mortalities as a result of *Streptococcus* infection. J. Vet. Res., 46: 71-78.
- Bromage, E.S., A. Thomas and L. Owens. 1999. *Streptococcus iniae*, a bacterial infection in barramundi *Lates calcarifer*. Dis. Aquat. Org., 36: 177-181.
- Chen, D., P.J. Hanna, K. Altmann, A. Smith, P. Moon and L.S. Hammond. 1992. Development of monoclonal antibodies that identify *Vibrio* species

commonly isolated from infections of humans, fish and shellfish. Appl. Environ. Microbiol., 58: 3694–3700.

Chun, S.K. 1989. A streptococcal disease of freshwater fish. J. Fish. Pathol., 2: 31–36.

Chung, K.S. 2004. The genetic correlations among serotypes and PFGE patterns of *Streptococcus pneumoniae* isolated in Korea. Kor. J. Env. Hlth., 30(1): 15–21.

Colorni, A., A. Diamant, A. Eldar, H. Kvitt and A. Zlotkin. 2002. *Streptococcus iniae* infections in red sea cage-cultured and wild fishes. Dis. Aquat. Org., 49: 165–170.

Colorni, A., C. Ravelo, J.L. Romalde, A.E. Toranzo and A. Diamant. 2003. *Lactococcus garvieae* in wild red sea wrasse *Coris aygula* (Labriidae). Dis. Aquat. Org., 56: 275–278.

Del Rio, M.L., C.B. Gutiérrez-Martin, J. Navas, B. Gutiérrez-Muñiz, J.I. Rodríguez-Barbosa and E.F. Rodríguez Ferri. 2006. *aroA* gene PCR-RFLP diversity patterns in *Haemophilus parasuis* and *Actinobacillus* species. Research in Veterinary Science, 80: 55–61.

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

Eldar, A., P.F. Frelier, L. Assenta, P.W. Varner, S. Lawhon and H. Bercovier. 1995. *Streptococcus shiloi*, the name for an agent causing septicemic infection in fish, is a junior synonym of *Streptococcus iniae*. Int. J. Syst. Bacteriol., 45: 840–842.

Eldar, A., C. Ghittino, L. Asanta, E. Bozzetta, M. Gorla, M. Prearo and H. Bercovier. 1996. *Enterococcus seriolicida* is a junior synonym of *Lactococcus garvieae*, a causative agent of septicemia and

meningoencephalitis in fish. *Curr. Microbiol.*, 32: 85-88.

Eldar, A. and C. Ghittino. 1999. *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: similar, but different diseases. *Dis. Aquat. Org.*, 36: 227-231.

Eldar, A., M. Gorla, C. Ghittino, A. Zlotkin and H. Bercovier. 1999a. Biodiversity of *Lactococcus garvieae* isolated from fish in Europe, Asia, and Australia. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 1005-1008.

Eldar, A., S. Perl, P.F. Frelief and H. Bercovier. 1999b. Red drum *Sciaenops ocellatus* mortalities associated with *Streptococcus iniae* infection. *Dis. Aquat. Org.*, 36: 121-127.

Facklam, R. 2002. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin. Microbiol. Rev.*, 15: 613-630.

Heo, M.S., C.B. Song, J.H. Lee, I.K. Yeo, Y.J. Jeon, J.J. Lee, S.C. Chung, K.W. Lee, R. Rho, K.S. Choi and Y.D. Lee. 2001. Characteristics of β -*Streptococcus* spp. isolated in cultured flounder (*paralichthys olivaceus*) of Jeju Island. *J. Korean Fish. Soc.*, 34(4): 365-369.

Hoshina, T., T. Sanō and R. Morimoto. 1958. A *Streptococcus* pathogenic to fish. *J. Tokyo Uni. Fish.*, 44: 57-68.

Jung, Y.U. 2004. Distribution and identification of *Streptococcus* sp. from cultured flounders, *Paralichthys olivaceus* with streptococcosis in the Jeju Island. M.S. Thesis, Cheju Natl. Univ.

Kim, J.W., H.J. Kim, S.H. Woo and S.I. Park. 2005. Morphological characteristics and pathogenicity of *Streptococcus iniae*. *J. Fish Pathol.*, 18(2): 167-168.

Kim, S.M., K.M. Won, S.H. Woo, H. Li, E.J. Kim, K.J. Choi, M.Y. Cho, M.S. Kim and S.I. Park. 2005. Vibrios isolated from diseased marine culturing fishes in Korea. *J. Fish Pathol.*, 18(2): 133-145.

- Kitao, T., T. Aoki and K. Iwata. 1979. Epidemiologic study on streptococcosis of cultured yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) 1. Distribution of *Streptococcus* sp. in sea water and muds around yellowtail farms. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 45: 567-572.
- Kitao, T., T. Aoki and R. Sakoh. 1981. Epizootic caused by β -haemolytic *Streptococcus* species in cultured freshwater fish. Fish Pathol., 15: 301-307.
- Krawiec, S. and M. Riley. 1990. Organization of the bacterial chromosome. Microbiol. Rev., 54: 502-539.
- Kusuda, R., K. Kawai, F. Salati, C.R. Banner and J.L. Fryer. 1991. *Enterococcus seriolicida* sp. nov., a fish pathogen. Int. J. Syst. Bacteriol., 41: 406-409.
- Kumar, S., K. Tamura and M. Nei. 2004. Intergrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. Briefings in Bioinformatics, 5(2): 150-163.
- Lee D.C., J.I. Lee, C.I. Park and S.I. Park. 2001. The study on the casual agent of streptococcosis (*Lactococcus garvieae*), isolated from cultured marine fishes. J. Fish Pathol., 14: 71-80.
- Minamik T. 1979. *Streptococcus* sp., pathogenic to cultured yellowtail, isolated from fisheries for diets. Fish Pathol., 14: 15-19.
- Moreno, M., D. Clins and L. Dominguez. 1996. *Streptococcus* in cultured turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), associated with *Streptococcus parauberis*. J. Fish. Dis., 19: 33-38.
- Moon, Y.G., G.T. Park, H.J. Son, S.H. Lee, J.M. Lee and M.S. Heo. 2004. Rapid detection of the pathogenic agent of bacterial white enteritis of larval and juvenile stages in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). J. Fish Pathol., 17(3): 157-169.

- Nagatsygawa, T. 1983. A streptococcal disease of cultured yellowtail. *Fish Pathol.*, 17: 281-285.
- Nguyen, H.T. and K. Kanai. 1999. Selective agars for the isolation of *Streptococcus iniae* from Japanese flounder, *Paralichthys olivaceous*, and its cultural environment. *J. Appl. Microbiol.*, 86: 769-776.
- Nguyen, H.T., K. Kanai and K. Yoshikoshi. 2001. Experimental *Streptococcus iniae* infection in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish Pathol.*, 36: 40-41.
- Oh, S.P., D.H. Kim, J.J. Lee and C.H. Lee. 1998. Bacterial diseases in flounder farms of Cheju Island. *J. Fish Pathol.*, 11(1): 23-27.
- Ooyama, T., A. Kera, T. Okada, V. Inglis and T. Yoshida. 1999. The protective immune response of yellowtail *Seriola quinqueradiata* to the bacterial fish pathogen *Lactococcus garvieae*. *Dis. Aquat. Org.*, 37: 121-126.
- Patterton, H.G. and S. Graves. 2000. DNAssist: the integrated editing and analysis of molecular biology sequences in windows. *Bioinformatics*, 16(7): 652-653
- Picard, F.J., D. Ke, D.K. Boudreau, M. Boissinot, A. Huletsky, D. Richard, M. Ouellette, P.H. Roy and M.G. Bergeron. 2004. Use of *tuf* sequences for genus-specific PCR detection and phylogenetic analysis of 28 streptococcal species. *J. Clin. Microbiol.*, 42: 3686-3695.
- Plumb, J.A. 1994. *Streptococcus* and *Enterococcus* septicemia. *In: Health maintenance of cultured fishes. Principal microbial diseases.* CRC Press, Boca Raton, FL, 231-235.
- Rasheed, V. and J. Plumb. 1984. Pathogenicity of a nonhemolytic group B *Streptococcus* sp. in gulf killifish, *Fundulus grandis* (Baird&Girard). *Aquaculture*, 37: 97-105.

- Ravelo, C., B. Magarinqnws, A.E. Toranzo and J.L. Romalde. 2001. Conventional versus miniaturized systems for the phenotypic characterization of *Lactococcus garvieae*. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol., 21: 136-144.
- Robinson, T.A. and F.P. Meyer. 1966. Streptococcal fish pathogen. J. Bacteriol., 92, 512-520.
- Romalde, J.L. and A.E. Toranzo. 2002. Molecular approaches for the study and diagnosis of salmonid streptococcosis. In: C.O. Cunningham (Ed.), Molecular diagnosis of salmonid diseases. Kluwer Academic Publ, Netherlands, pp. 211-223. Chap. 8.
- Ruoff, K.L., R.A. Whiley and D. Beighton. 1998. *Streptococcus*. p. 283-296. In: P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover and R. H. Tenover (ed.), Manual of clinical microbiology, 7th ed. ASM Press, Washington, D.C.
- Song, J.K. and E.H. Kim. 2003. Comparison of RAPD profiles and phenotypical charaters of streptococcal strains. J. Fish Pathol., 16: 51-59,
- Soriano, A.C., S.J. Anguita, C.H. Moral, M.S. Salazar, J.Y. Marcos and G.N. Carrasco. 1997. RFLP-PCR analysis of the *aroA* gene as a taxonomic tool for the genus *Aeromonas*. FEMS Microbiol. Lett., 156: 199-204.
- Thompson, F.L., T. Iida and J. Swings. 2004. Biodiversity of vibrios. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 68(3): 403-431.
- Toranzo, A.E., S. Devesa, P. Heinen, A. Riaza, S. Nuñez and J.L. Barja. 1994. Streptococcosis in cultured turbot caused by an *Enterococcus*-like bacterium. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol., 14: 19-23.
- Toranzo, A.E., J.M. Cutrin, S. Nuñez, J.L. Romalde and J.L. Barja. 1995. Antigenic characterization of *Enterococcus* strains pathogenic for turbot and their relationship with other gram positive bacteria. Dis. Aquat. Org., 21: 187-191.

Weinstein, M.R., M. Litt, D.A. Kertesz, P. Wyper, D. Rose, M. Coulter, A. McGeer, R.R. Facklam, C. Ostach, B.M. Willey, A. Borczyk and D.E. Low. 1997. Invasive infections due to a fish pathogen, *Streptococcus iniae*. N. Engl. J. Med., 337: 589-594.

Yoshida, T., T. Eshima, Y. Wada, Y. Yamada, E. Kakizaki, M. Sakai, T. Kitao and V. Inglis. 1996. Phenotypic variation associated with an antiphagocytic factor in the bacterial fish pathogen *Enterococcus seriolicida*. Dis. Aquat. Org., 25: 81-86.

심두생, 정승희, 박형숙, 전세규. 1994. 양식 넙치에서 분리한 *Staphylococcus epidermidis*의 생물학적 및 생화학적 특성. 한국어병학회지, 7(1): 23-36.

이창훈, 김필연, 고창식, 오덕철, 강봉조. 2007. 제주지역 양식 넙치(*Paralichthys olivaceus*)로부터 분리되는 *Streptococcus iniae*와 *Streptococcus parauberis*의 생물학적 특성. 한국어병학회지, 20(1): 33-40.

정용욱, 강철영, 김민주, 허문수, 오덕철, 강봉조. 2006. 제주지역 양식넙치의 연쇄 구균증 발생동향 및 원인균에 대한 분자적 동정. 한국미생물학회지, 42(3): 199-204.

제주도. 2006. 제주도지. 328-338.

조미영, 김명석, 권문경, 지보영, 최혜승, 최동립, 박경현, 이창훈, 김진도, 이주석, 오윤경, 이덕찬, 박신후, 박명애. 2007. 2005년부터 2006년사이 우리나라 양식 넙치, *Paralichthys olivaceus*의 세균성 질병에 대한 역학조사. 한국어병학회지, 20(1): 61-70.

해양수산부 통계연보. <http://www.momaf.go.kr/>

감사의 글

석사학위 논문이 나올 수 있도록 따뜻한 격려와 조언을 아끼지 않으셨던 존경하는 송춘복 교수님께 고개 숙여 감사드립니다. 또한 저의 지도 교수님으로 1년 동안 지도해주신 허문수 교수님께 정말 감사드립니다. 바쁘신 중에도 저의 논문을 심사해주신 이제희 교수님, 여인규 교수님과 학부과정과 석사과정동안 많은 관심과 충고를 아끼지 않으셨던 이기완 교수님, 전유진 교수님께도 감사를 드립니다.

학부 2학년부터 시작된 어류유전육종실험실 생활에서 기쁨과 어려움을 함께했던 김맹진 선배님, 고범석 선배님, 양윤철 선배님, 오상규 선배님, 친구 미란이에게 감사하며 늘 웃어주며 서로 다독여주던 석사 동기인 김경주 오빠, 김주상 오빠, 이승홍 오빠, 장태원 오빠와 그 외 수산생명의학과 대학원생들에게 고마운 마음을 보냅니다.

항상 저를 믿어주시는 아버지와 사랑해주시는 시부모님, 그 외 가족들에게 감사드리며 언제나 정다운 친구들에게 감사를 드립니다. 마지막으로 사랑하는 실험실 동료이자 평생의 배우자인 한송헌과 저에게 가장 큰 선물, 사랑하는 아들 지혁에게 이 자그마한 결실을 드립니다.