



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학석사 학위논문

넙치, *Paralichthys olivaceus* 병어에서
분리된 *Streptococcus parauberis*의 특성



2007년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

어 병 학 과

황 성 돈

이학석사 학위논문

넙치, *Paralichthys olivaceus* 병어에서
분리된 *Streptococcus parauberis*의 특성

지도교수 박 수 일

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함

2007년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

어 병 학 과

황 성 돈

황성돈의 이학석사 학위논문을 인준함.

2007년 2월



주 심 약 학 박 사 정 준 기 인

위 원 농 학 박 사 허 민 도 인

위 원 농 학 박 사 박 수 일 인

목 차

목차	i
Abstract	iii
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 세균의 분리	4
2. 세균의 형태학적 검사	4
3. 생화학적 특성 검사	6
4. TEM을 이용한 capsule의 유무 관찰	7
5. PCR법을 통한 세균의 동정	8
5-1. DNA 분리	8
5-2. Primers의 준비	8
5-3. Multiplex PCR	8
6. SDS Poly-acrylamide gel electrophoresis (PAGE)	10
6-1. FKC 제작	10
6-2. 시험균의 protein 분석	10
7. 배양 조건별 발육 시험	11
8. <i>Streptococcus parauberis</i> extracellular products(ECPs)의 특성	11
8-1. ECP 추출 및 단백질 정량	11
8-2. API zym kit에서 효소 활성	12
8-3. Proteolytic activity	12
8-4. Gelatinase activity	12
8-5. Phospholipase and lipase activity	13
8-6. 시험균 ECPs의 in vitro cytotoxicity	13
9. 시험 균주의 넘치 혈청에 대한 저항성 시험	14
9-1. 혈청의 준비	14
9-2. 혈청에서의 생존능 시험	14
9-3. 넘치 혈청에 대한 시험균의 반응 시간별 균 수 변화 시험	15
10. 시험 균주의 식균율과 식균 지수의 측정	15
11. 넘치 두신 macrophage에서의 시험 균주별 ROIs 생성능 측정	15

11-1. 넙치 두신 macrophage의 분리	15
11-2. 시험균의 준비 및 시험균의 감작	16
11-3. Chemiluminescence (CL) response	16
11-4. Nitroblue tetrazolium (NBT) response	17
12. 병원성 시험	17
13. 통계학적 분석	18
III. 결과	19
1. 생화학적 특성	19
2. TEM을 이용한 capsule의 유무 관찰	21
3. Mutiplex PCR	21
4. SDS Poly-acrylamide gel electrophoresis (PAGE)	24
5. <i>Streptococcus parauberis</i> 성장 조건	26
6. ECPs 효소 활성	28
6-1. 시험균의 ECPs의 세포독성 시험	28
7. 넙치 혈청에 대한 시험균의 저항성 시험	31
7-1. 혈청에서의 생존능 시험	31
7-2. 혈청에 대한 시험균의 반응 시간별 균 수 변화	33
8. 넙치 혈액에서의 시험 균주의 식균율과 식균 지수의 측정	35
8-1. 넙치 혈액에서의 시험 균주의 식균율	35
8-2. 넙치 혈액에서의 시험 균주의 식균 지수	37
9. 넙치 두신 macrophage에서의 시험 균주별 ROIs 생성능 측정	38
9-1. Chemiluminescence (CL) response	38
9-2. Nitroblue tetrazolium (NBT) response	39
10. 병원성 시험	40
IV. 고찰	42
V. 요약	49
VI. 감사의 글	51
VII. 참고 문헌	53

Characteristics of *Streptococcus parauberis* isolated from infected olive flounder, *Paralichthys olivaceus*

Seong Don Hwang

*Department of fish pathology, Graduate School,
Pukyong National University*

Abstract

Streptococcal diseases are serious problems in fresh water and marine fish culture industry worldwide. In recent years, the importance of infection caused by *Streptococcus parauberis* has increased since severe outbreaks in cultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) were recorded in Korea. The aims of the present study were to investigate phenotypic characteristics of *S. parauberis*, and pathogenic and immunological characteristics between *S. parauberis* and *S. iniae*. In this study, *S. parauberis* isolated from infected olive flounder was identified by biochemical and genotypic characteristics and was investigated the characteristics of morphological, physiological, protein profile and enzyme activity of ECP. Immune responses of the fish to the pathogen was characterized by bactericidal activity in the serum, phagocytic activity and reactive oxygen intermediates (ROIs) production of olive flounder. *S. parauberis* strains used in

this study were overall very similar on the basis of biochemical characteristics. *S. parauberis* appeared α or γ hemolytic activity whereas *S. iniae* showed β hemolytic activity. A multiplex PCR-based method using 4 different primer sets was performed for rapid detection of various Gram-positive cocci fish pathogens, i.e. *Lactococcus garviae*, *S. iniae* and *S. parauberis*. The protein profiles of formalin killed cells of *S. parauberis* presented two major bands around 47 KDa, and overall the profiles were very similar to the reference strain. The optimum temperature and salinity for the growth of strains were 27 °C and 0 % NaCl, and they did not grow at 45 °C and 10 % NaCl, respectively. The capsule of both *S. parauberis* and *S. iniae* seems to be associated with the ability to resist killing by normal sera. Also, capsulated strains could survive in phagocytes and induce low ROIs production.

I. 서 론

우리 나라의 해산 어류 양식 산업은 1980년대부터 급속히 발전하기 시작하여 많은 성장을 가져왔으며, 넙치의 경우 양식 생산량은 40,075 M/T으로 해산 어류 양식 생산량의 약 50 %, 생산 금액으로는 해산 어류 생산 금액의 48.9 %를 차지하는 중요한 어종이다 (해양수산부, 2005). 그러나 양식 산업의 발달과 함께 생산량이 늘어나는 이면에는 과밀양식과 수질 환경 악화 등에 기인한 여러 가지 질병이 빈발하여 생산성이 떨어지는 경향을 보이고 있다.

넙치 양식장에서는 바이러스, 세균 및 기생충 등의 병원체가 단독 또는 혼합 감염되어 많은 폐사가 발생하고 있다. 이 중에서도 세균성 질병의 경우 단독 감염뿐만 아니라 다른 세균과 혼합 감염률도 증가하여 피해를 가중시키고 있다. 또한 약제의 오남용으로 인한 내성균의 출현으로 경제적, 사회적으로 문제가 될 뿐만 아니라 소비자에게 부정적인 영향을 미치게 되는 원인이 되기도 한다. 넙치 양식에서 피해를 주는 세균성 질병으로는 여러 가지가 알려져 있으나 그 중에서도 연쇄구균에 의한 발병 보고가 높은 비율을 차지하고 있다.

현재 넙치의 연쇄구균병의 원인체로 분리되는 균주 중 비중이 증가하고 있는 *Streptococcus parauberis*는 *S. uberis* genotype II로서, 생화학적 성상 및 혈청학적 성상이 거의 유사하여 구별하기 어렵지만, 16s ribosomal RNA 염기서열 분석을 통하여 Williams and Collins (1990)이 *S. parauberis*로 명명하였으며 육상동물의 경우 젖소의 유방염을 일으키는 병원체로 알려져 있다. *S.*

*parauberis*는 1996년 스페인의 Galicia 지역의, 터봇 (*Scophthalmus maximus*)에 연중 발병하며 특히 여름철인 고수온기에 많은 폐사를 유발한다. *S. parauberis* 병어의 증상으로는 체색 흑화, 출혈 및 농양을 동반한 안구 돌출, 비장 및 간 비대, 복부와 복벽의 점상출혈 등이 나타난다 (Domenech *et al.*, 1996). 그리고 *S. parauberis*는 수온이 높은 시기뿐만 아니라 dormant 상태에서도 해수와 퇴적물에 독성을 유지하고 있어 양식장 환경 및 자연 환경은 병원체의 감염원으로서 중요한 역할을 한다 (Curras *et al.*, 2002).

우리 나라에서 분리되는 Streptococci 중 *Lactococcus garvieae*와 *S. iniae*는 많은 연구가 되어 있으며 이들 균주들은 capsule 유무 및 항원성에 따른 병원성 차이가 있다. *L. garvieae*는 capsule 유무에 따라 항원성이 다르며 혈청은 capsule을 가진 균주와 capsule을 가지지 않는 균주와는 약한 교차반응이 일어났으나 capsule을 가지지 않는 균주는 capsule을 가진 균주와는 교차반응이 일어나지 않는다 (Andrew *et al.*, 2002). Kitao (1982)는 KG 7409 균주의 항혈청에 대해 응집하는 KG+ (capsule-)과 KG-(capsule+)의 두 가지 항원성 type으로 구분하고 KG- (capsule+)균주가 높은 병원성을 나타냄을 보고하였다. 이는 capsule을 가진 균주가 응집반응 중 capsule에 의해 key antigen의 억제로 일어나며 (Barnes *et al.*, 2002) KG-의 capsule이 KG+ 응집 항체에 대한 binding site를 cover하고 있음을 시사하고 있다 (Ooyama, 1999). 또한 KG- phenotype cells을 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 첨가 KF *Streptococcus* agar에 수 차례 계대 배양하면 KG+ phenotype cells로 antigenic conversion이 일어난다 (Kitao, 1983; Alim *et al.*, 1996).

*S. iniae*의 경우 arginine dihydrolase 이용능에 따라 AD+, AD-로 구분할

수 있으며 (Zlotkin *et al.*, 1998), *S. iniae* 균주 내에서도 RAPD를 이용하여 유전 변이등을 확인할 수 있으며 Arginine 이용능에 따라 항원성을 분리할 수 있다. AD+를 serotype I (capsule-), AD-를 serotype II (capsule+)이라하며 serotype I에 대한 항혈청은 serotype II와 교차반응이 일어나지 않지만 serotype II에 대한 항혈청은 serotype I과 교차반응이 일어났다. 이는 이스라엘에서 백신의 사용으로 serotype I의 예방이 가능하였으나 새로운 type의 균주인 serotype II가 출현하게 되었다 (Bachrach *et al.*, 2001). 그리고 *S. iniae* 역시 capsule 유무에 따라 병원성에 차이가 있다. 이것은 Strptococcal polysaccharide capsules이 신선 혈청과 면역 혈청에 의해 killing하는 저항성 능력을 가지고 있으며 식작용을 회피하기 때문이다. 면역혈청은 opsonin, 식작용 증진과 polymorphonuclear phagocytes를 통한 killing으로서 작용한다 (Kasper *et al.*, 1990). Opsonophagocytosis에 대한 저항성에서 capsule을 지닌 균주가 높은 독성을 가지는 것은 complement-mediated serum killing에 저항성을 가지며 특이 항체가 존재하기 때문이다 (Yoshida *et al.*, 1997).

최근 우리 나라 양식 넙치의 심각한 세균성 질병을 유발하는 *S. parauberis*는 그 질병의 발생 빈도와 양식장에서의 피해량은 크지만 질병에 대한 연구는 아직 미흡하다.

본 연구에서는 우리 나라의 대표적 해수 양식 대상종인 넙치에서 분리된 *S. parauberis*의 ECP를 분리하여 효소활성 및 세포독성을 알아보았다. 그리고 이들 분리 균주의 넙치 정상 혈청에서 생존능 및 macrophage의 식작용에 대한 저항성을 평가하여 수산 질병 대책에 관한 기초 자료를 얻고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시험 균주

본 연구에 사용된 균주들은 넙치, *Paralichthys olivaceus*에서 연쇄구균병의 증상이 전형적으로 관찰되는 안구 주위의 간장, 비장, 신장 및 심장에서 조직을 무균적으로 적출하여 BHIA 배지에 도말한 후 27 °C에서 24~48 시간 배양하여 분리한 균을 실험에 사용하였다. 비교를 위해 사용된 참조 균주로는 각 Williams *et al.* (1990)의 KCTC 3651, *Streptococcus parauberis*, Pier *et al.* (1976)의 KCTC 3657 및 *Streptococcus iniae* 등을 사용하였다 (Table 1).

2. 세균의 형태학적 검사

BHIA 배지에서 27 °C, 24~48 시간 배양하여 순수 분리한 원인균에 대하여 colony의 특징, 세균의 형태, 크기, Gram 염색 및 운동성 등을 관찰하였다.

Table 1. Present isolated strain and reference strain used in this study

Strains		Orgin of tested bacteria			
<i>S. parauberis</i>	Isolated Strains (n=23)	A12001	Spleen, Olive flounder	2002. July	Je ju
		A12003	Kidney, Olive flounder	2002. July	Je ju
		A12007	Kidney, Olive flounder	2002. July	Yeong deok
		A12008	Kidney, Olive flounder	2002. July	Ul san
		A12017	Kidney, Olive flounder	2004. June	Je ju
		A12020	Kidney, Olive flounder	2004. June	Je ju
		A12021	Kidney, Olive flounder	2004. June	Je ju
		A12022	Kidney, Olive flounder	2004. July	Ul jin
		A12023	Kidney, Olive flounder	2004. July	Ul jin
		A12025	Kidney, Olive flounder	2004. Aug.	Hae nam
		A12027	Spleen, Olive flounder	2004. Aug.	Hae nam
		A12029	Liver, Olive flounder	2004. Aug.	Je ju
		A12036	Liver, Olive flounder	2004. Sept.	Je ju
		2-15	Kidney, Olive flounder	2005. June	Je ju
		2-49	Kidney, Olive flounder	2005. June	Je ju
		2-50	Spleen, Olive flounder	2005. June	Je ju
		4-26	Kidney, Olive flounder	2005. July	Hae nam
		4-27	Spleen, Olive flounder	2005. July	Hae nam
		6-5	Heart, Olive flounder	2005. Aug.	Wan do
		6-13	Spleen, Olive flounder	2005. Aug.	Wan do
		6-17	Heart, Olive flounder	2005. Aug.	Wan do
		6-22	Kidney, Olive flounder	2005. Aug.	Wan do
		6-40	Heart, Olive flounder	2005. Aug.	Wan do
<i>S. iniae</i>	Isolated Strains (n=2)	BS 9	Olive flounder	1998	Tong young
		BS 10	Olive flounder	1998	Je ju
<i>S. parauberis</i>	Reference strains	KCTC 3651	Mastis sample milk	1990	Williams and Colins
<i>S. iniae</i>	(n=2)	KCTC 3657	Brain of Amazon fresh water Dolphin	1972	USA

3. 생화학적 특성 검사

BHIA 배지에서 순수 분리 배양된 균을 이용하여 MacFaddin (2000)의 방법에 따라 생화학적 성상을 검사하였다. 즉 H₂S생성시험은 triple sugar iron agar (TSIA)를 사용하였고, Indole 생성은 Ehrlich's 방법을 따랐다. Methyl red test는 Clark - Lub's medium을 사용하였고, Voges-Proskauer test는 Barritt's 방법에 의하여 시험하였다. Oxidation-fermentation (O-F) test는 Hùgh and Leifson의 방법으로, Catalase test는 3 % H₂O₂를 사용한 slide method로 실시하였다. Citrate test는 Simmon's citrate agar를 사용하여 30 ℃에서 2~4 일간 배양하여 관찰하였다. Oxidase test는 cytochrome oxidase 시험지를 사용했으며, Nitrate reduction 시험은 Nitrate Broth를 사용하였다. 탄수화물 분해 시험은 Phenol red 기초 배지를 사용하여 arabinose, adonitol, dulcitol, cellibose, fructose, galactose, glucose, inositol, lactose, maltose, mannitol, mannose, meliboise, raffinose, rhamnose, salicin, sorbitol, sucrose, trehalose, xylose를 각각의 배지에 1 %, salicin을 0.5 %첨가하여 시험하였고, lysine, ornithine에 대한 decarboxylase 시험과 arginine 에 대한 dehydrolase 시험을 실시하였다. 그리고 Sheep blood agar를 이용하여 용혈능을 조사하였다.

4. TEM을 이용한 capsule의 유무 관찰

Capsule의 유무를 확인하기 위해 TEM을 행하였다. 2-50, 6-40 그리고 참조 균주인 KCTC 3651을 사용하였다. 시료의 준비 과정은 Banes *et al.* (2003)의 방법을 변형하여 행하였다.

각 균주를 BHIB에 접종한 후 27 °C에서 24 시간 배양한 후 3,000×g, 10분간 원심 분리한 다음 phosphate-buffered saline (PBS, 0.2M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.2M Na_2HPO_4)으로 세척하고 Macfarland 2 standard의 탁도가 되도록 현탁액을 제작하였다. 이 현탁액을 각 균주에 대한 불활화 균주 항혈청과 2:8로 희석이 되도록 첨가한 후 4 °C에서 overnight 반응시킨 다음 3,000×g, 10분간 원심 분리하여 집균한 후 PBS로 두 번 세척하였다. pellet은 2.5 % glutaraldehyde (pH 7.2, 4 °C)에 24시간 전고정하고 3번 세척한 다음 PBS에 재현탁하여 polycationic ferritin (Sigma)을 최종 농도가 1 mg ml⁻¹이 되도록 첨가한 후 20 °C에서 30분간 반응시키고 2번 세척하였다. 1 % osmium tetroxide (pH 7.2)로 4 °C에서 2시간 동안 후고정한 다음 Alcohol 탈수 과정을 거쳐 propylene oxide로 치환하고 Epon 혼합물로 열중합처리한 다음 ultrathin section (60~90 nm)하였다. 이러한 과정을 거쳐 제작한 미세 절편을 grid에 부착시켜 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하여 TEM (JEM 1200-II, JEOL)으로 관찰하였다.

5. Multiplex PCR법을 통한 세균의 동정

5-1. DNA 분리

Table1에 나타난 2개의 참조 균주와 23개의 분리 균주를 각각 BHIB 5 ml에 접종하고 25 °C에서 200 rpm으로 진탕 배양한 후 6,000 rpm에서 5 분간 원심 분리 후 lysozyme sol. (10 mg ml⁻¹)을 처리하고 37 °C, 1 시간 동안 배양하였다. 이후 원심 분리하여 상침액을 제거한 다음 Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer)를 사용하여 genomic DNA를 분리하였다.

5-2. Primers의 준비

본 연구에 사용된 특이 primer는 Mata *et al.* (2004)이 제안한 primer로서 *S. parauberis*, *S. iniae*, *L. garvieae*, *S. difficillis*의 특이 primer를 주문하여 (Bioneer) 사용하였으며 염기 배열과 예상 증폭 산물의 크기는 Table 2와 같다.

5-3. PCR

PCR은 PCR PreMix (Bioneer)를 사용하였고 Thermal cycler (Perkin-Elmer)로 행하였으며 조건은 Table 3에 나타내었다. 증폭된 PCR산물은 0.01% EtBr이 첨가된 1% agarose gel에 전기영동한 후 UV transiluminator 상에서 확인하였다.

Table 2. Primer sequences used for PCR amplification and the expected amplicon size

primer pair	Sequences(5' to 3')	Target gene	PCR amplicon(bp)	Pathogen
sdi 61	AGGAAACCTGCCATTTGCG	16S-23S RNA intergenic spacer	192	<i>S. difficillis</i>
sdi 252	CAATCTATTTCTAGATCGTGG			
Spa 2152	TTTCGTCTGAGGCAATGTTG	23S rRNA	718	<i>S. parauberis</i>
spa 2870	GCTTCATATATCGCTATACT			
Lox-1	AAGGGGAAATCGCAAGTGCC	lacO	870	<i>S. iniae</i>
Lox-2	ATATCTGATTGGGCCGTCTAA			
pLG-1	CATAACAATGAGAATCGC	16S rRNA	1,100	<i>L. garvieae</i>
pLg-2	GCACCCTCGCGGGTTG			

Table 3. Condition of reaction step and PCR cycle

	Temperature(℃)	Reaction Time	Cycle(s)
Pre-denaturation	94	2 min	1
Denaturation	92	60 sec	
Annealing	55	60 sec	25
Extension	72	90 sec	
Post-extention	72	5 min	1

6. SDS PAGE

6-1. FKC 제작

시험 균주와 참조 균주를 BHIB에 25 °C, 24 시간 배양하고 최종 농도가 0.5 % 되도록 포르말린을 첨가하여 실온에서 overnight 방치하였다. 그 후 6,000 rpm에서 30분간 원심 분리하여 집균한 다음 멸균 생리 식염수에 3 회 세척하고 sodium azide를 첨가한 후 냉장고에 보관하며 필요 시 사용하였다.

6-2. 시험균의 protein 분석

시험 균주와 참조 균주의 SDS-PAGE에 의한 protein 분석은 Andrews (1996)의 방법에 준하여 실시하였다. FKC를 sonication하고 sample lysis buffer (0.125M Tris-HCl, 4 % SDS, 20 % glycerol, 5 mM 2-mercaptoethanol)에 현탁하여 100 °C, 7 분간 가열하여 변성시켰다. 각각의 sample 1.5 mm 두께의 10 % SDS-polyacrylamide gel에 loading하고 25 mA 로 2 시간 동안 전기 영동하였다. 전개가 완료된 gel은 Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하고 탈색하여 band를 확인하였다.

7. 배양 조건별 발육 시험

참조 균주와 23개의 분리 균주를 대상으로 염분 농도 및 높은 pH에 따른 발육 특성을 조사하였다. BHIA 배지에서 27 °C 24 시간 배양한 후, 멸균 생리 식염수로 OD₅₄₀ 값이 0.6이 되게 조정된 각각의 시험 균주 100 μ l를 1 % peptone이 든 alkali-pepton water 기초 배지에 NaCl을 0, 1, 6, 6.5, 10 % 되게 첨가한 시험 배지 및 pH 9.6으로 조정한 시험배지에 접종한 후 96 시간 후, 배양 정도를 육안적인 혼탁도로 관찰하여 -, +, ++로 나타내었다. 그리고 배양 온도에 따른 발육 특성을 조사하기 위하여 동일한 방법으로 각각의 시험균을 접종하여 4, 10, 27, 37, 45 °C에서 96 시간 배양하고 배양 정도를 육안적인 혼탁도로 관찰하여 -, +, ++로 나타내었다.

8. *S. parauberis* extracellular products (ECPs)의 특성

8-1. ECPs의 추출 및 단백질 정량

시험균의 ECPs 추출은 Zhang and Austin (2000)에 의한 cellophane overlay 방법을 사용하였다. 미리 제작된 BHIA 평판 배지 위에 121 °C, 15 분간 멸균된 cellophane membrane을 깔고, BHIB에 24 시간 동안 전배양된 균액 200 μ l를 멸균 삼각 유리병으로 고르게 도말하였다. 시험균이 접종된 배지를 27 °C, 48 시간 배양한 후, cellophane membrane을 새로운 petridish에 옮기고 0.1M phosphate buffer solution (PBS, pH 7.2) 2 ml로 세척하여 모았다. 이 현탁액을 4 °C, 20,000 $\times$ g, 30 분간 원심 분리하여 상정액을 분리하였으며, 이를 0.22 μ m pore size의 syringe filter (Corning Inc.)로 여과한 것을 ECPs 액으로 사용하였다.

추출된 ECPs의 단백질 농도는 Bovine serum albumin (BSA, Sigma)을 표준으로 하여 Bradford법 (1976)으로 측정하고 -20 °C에서 보관하며 시험에 사용하였다.

8-2. API zym kit에서 효소 활성

분리 균주의 ECPs의 효소 활성은 API zym kit (BioMerieux, Spain)를 사용하여 ECPs를 0.1 M PBS (pH 7.2)로 희석한 다음 20 μ l/ml로 조정한 후 kit 각각의 capsule에 65 μ l씩 분주하고 27 °C에서 overnight한 다음 결과를 판정하였다.

8-3. Proteolytic activity

ECPs의 proteolytic activity는 azocasein (Sigma)을 기질로 사용한 Austin *et al.* (1998)의 방법에 따랐다. 0.1M PBS (pH 7.2)에 녹인 1 % azocasein 용액 450 μ l와 ECPs 50 μ l를 혼합하여 27 °C, 30 분간 배양 후, 10 % trichloroacetic acid (TCA, Sigma) 0.5 ml을 취한 다음 1 M sodium hydroxide 0.5 ml과 혼합한 후, OD₄₅₀으로 측정하였다. casein 1 unit는 흡광도 값이 0.001 증가한 것으로 정의하였다.

8-4. Gelatinase activity

Gelatinase activity는 Zhang and Austin (2000)의 caseinase activity법을 변형하여 측정하였다. 즉, 0.1 M PBS (pH 7.2)에 0.8% (w/v) gelatine (Oxoid) 용액을 제작한 후 gelatine 용액 450 μ l와 ECPs 50 μ l를 잘 혼합하여 27°C,

30분간 반응시켰다. 반응 후 30% (w/v) TCA 1.5 ml을 첨가하여 반응을 정지시켰으며, 1 unit는 OD₂₈₀에서 0.001 증가하는 것으로 하였다.

8-5. Phospholipase and lipase activity

Phospholipase 와 lipase activity는 Liu *et al.* (1996)에 따라 1 % (w/v) agarose에 egg yolk 또는 1 % (v/v) Tween 80을 첨가하여 직경 4 mm well을 만든 후 ECPs를 20 μ l씩 분주하고 습윤상자에서 27 $^{\circ}$ C, 48 시간 반응시킨 다음 well 주위의 clear zone을 측정하였다.

8-6. ECPs의 in vitro cytotoxicity

시험 균주의 ECPs의 세포독성은 어류 유래의 주화세포 EPC(Epithelioma papillosum cyprini)을 사용하였다. Eagle's minimum essential medium (EMEM, Sigma)에 10 % Fetal bovine serum (FBS, GibcoBRL)과 1 % antibiotic-antimycotic agent (GibcoBRL)가 되도록 첨가하고 24 well plate의 각 well에 접종하여 18 $^{\circ}$ C에서 24 시간 단층 배양하였다. 배양 후 각 well 내의 배지를 제거하고, 각 시험 균주의 ECPs를 10 % FBS가 첨가된 EMEM으로 단백질 농도가 200 μ g ml⁻¹가 되도록 제작하여 각 well에 다시 주입하였다. 각 균의 ECPs가 접종된 24 well plate는 18 $^{\circ}$ C, 48 시간 동안 배양하여 cell-line의 세포형태를 관찰하였다. 그리고 PBS를 첨가한 well의 cell-line을 대조구로 하여 세포변성효과를 확인하였다.

9. 시험 균주의 넵치 혈청에 대한 저항성 시험

9-1. 혈청의 준비

시험에 사용한 혈청은 시험어를 아미노산식향산 에틸 50 ppm으로 3~5 분간 마취시킨 후 1 회용 주사기를 사용하여 피부 정맥에서 채혈하여 분리하였다. 채혈된 혈액은 상온에서 1 시간 방치하고, 4 °C에서 3 시간 정치한 후, 8000 rpm에서 5 분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였다. 이렇게 분리한 혈청을 사용 전까지 -20 °C에 보관하였다.

9-2. 혈청에서의 생존능 시험

시험균의 넵치 혈청에 대한 저항성 시험은 Barnes *et al.* (2003)의 방법으로 행하였다. 약술하면, BHIB에 27 °C, overnight 배양한 균을 1,500×g, 20 분간 원심 분리하여 집균한 다음 멸균 PBS로 3회 세척하여 OD₅₄₀ 값이 0.6이 되도록 농도를 조정하였다. OD₅₄₀에서 흡광도 값이 0.6일 때 약 1×10^7 cfu ml⁻¹이 되므로 이렇게 준비한 시험균액을 불활화한 정상 혈청과 1:1로 혼합하여 실온에서 1 시간동안 반응시켰다. 이후, 실험구에는 complement source로서 신선 혈청을 1:4가 되도록 첨가하고 대조구에는 PBS를 첨가하여 실온에서 1 시간 30분간 반응시켰다. 상징액을 PBS로 단계 희석하여 BHIA 평판 배지에 10 µl씩 3 반복 dropping 후 27°C에서 28시간동안 배양하였다. 시험균의 반응 결과는 Miles & Misra (1938)에 따라 배양 후 생성된 colony의 수를 계산하였고 생존율은 대조구의 생존율과 비교하여 나타내었다.

9-3. 넙치 혈청에 대한 시험균의 반응 시간별 균 수 변화 시험

시간별 *S. parauberis* 균주의 혈청에서의 생존능 시험에서는 시험균과 혈청 혼합액을 0, 1, 3, 6, 9, 12 시간 경과할 때마다 단계 희석하여 Miles & Misra (1938)에 따라 배양 후 생성된 colony의 수를 계산하였다.

10. 시험 균주의 식균율과 식균 지수의 측정

식균능의 실험에는 넙치의 whole blood를 사용하였으며 넙치의 미부 정맥 으로부터 heparin (Sigma) 처리된 주사기로 어체당 0.5 ml씩 채혈하였다. 채혈된 혈액은 실리콘 처리한 tube에 넣고, 100 ml^{-1} 로 준비된 각 균액 $30\text{ }\mu\text{l}$ 를 첨가하였다. $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 로 유지된 shaking incubator에서 3 시간 동안 반응시킨 후 시료를 채취하여 slide glass에 도말한 다음 May-Grünwald Giemsa 염색법으로 염색하고 검경하였다. 식세포에 대한 식균율과 식균지수는 아래 식을 이용하여 구하였다.

$$\text{식균율(\%)} = [\text{식균 작용을 한 식세포의 수} / \text{관찰한 식세포의 수}] \times 100$$

$$\text{식균지수} = \text{식균한 식세포의 총 식균수} / \text{식균 작용을 한 식세포의 수}$$

11. 넙치 두신 macrophage에서의 시험 균주별 ROIs 생성능 측정

11-1.넙치 두신 macrophage의 분리

넙치 두신 macrophage는 Secombes (1990)의 방법에 따라 분리하였다. 넙치의 미부 정맥에서 채혈하여 순환 혈액을 가능한 한 모두 제거한 후, 무균적으로 해부하여 두신을 절취하였다. 이를 2 % FBS, 1 % penicillin/streptomycin 및 0.2 % heparin이 함유된 L-15 medium (Sigma)을 소형

disposable petridish에 분주한 뒤 40 μm 의 nylon membrane을 통과시켜 세포 현탁액을 준비하였다. 이 세포 현탁액을 실리콘 처리된 tube에 미리 분주해둔 34 %와 51 % percoll용액 위에 조심스럽게 중층시킨 다음 500 $\times$ g, 30 분간 원심 분리하여 백혈구를 분리하였다. 분리한 백혈구를 0.1 % L-15 medium으로 2 회 세척한 다음 0.1 % trypan blue로 viability를 관찰한 후, 1×10^5 cell ml^{-1} 로 조정하였다.

11-2. 시험균의 준비 및 시험균의 감작

시험균의 준비는 BHIB 5 ml에 25 $^{\circ}\text{C}$, 24 시간 배양한 균을 원심 분리하여 PBS에 3 회 세척한 다음 생균 시험균으로 사용하였다. 세균의 감작은 생균 시험균의 습중량 0.01 g에 넓치 혈청 500 μl 을 첨가하여 25 $^{\circ}\text{C}$, 30 분간 진탕 배양 후에 원심 분리한 다음 PBS로 1 회 세척하여 감작 생균 시험균으로 사용하였다.

11-3. Chemiluminescence (CL) response

1×10^5 cell ml^{-1} 로 조정된 macrophage를 96 well plate에 100 μl 씩 분주한 후 실험에 사용하였으며, luminol은 Scott and Klesius (1981)의 방법에 따라 준비하였다. 100 μl 의 세포액에 100 μl 의 luminol working solution을 넣은 후 10 분간 반응시킨 다음 준비한 생균 시험균과 감작 시험균을 각각 50 μl 씩 첨가하였고, 대조구에는 HBSS 50 μl 를 첨가한 후 lumicount로 측정하였다. 측정 시간은 50 분간이었으며 각 시료에 대한 peak 값을 구하였다.

11-4. Nitroblue tetrazolium (NBT) response

2×10^5 cell ml^{-1} 로 조정된 macrophage를 96 well plate에 $100 \mu\text{l}$ 씩 분주한 후 20°C , 2 시간 부착시킨 다음 상정액을 제거한 후, 3 회 세척하여 시험용 식세포를 준비하였다. 생균 시험균과 감작 시험균을 NBT 용액에 현탁시킨 후 식세포가 부착된 well에 $100 \mu\text{l}$ 씩 첨가하고 20°C 에서 30 분간 반응시킨 다음 100 % methanol로 세포를 고정시켰다. 각 well에 2 M KOH 용액 $120 \mu\text{l}$ 와 dimethyl sulphoxide (DMSO) $140 \mu\text{l}$ 를 첨가한 후 OD_{630} 에서 흡광도를 측정하였다.

12. 병원성 시험

병원성 시험에는 평균 체장 18 cm, 체중 80 g의 건강한 넙치를 실험실의 2 ton 사육 수조에서 1 주일 간 순치 시킨 후 실험에 사용하였다. colony의 형태를 기초로 하여 선정한 4 개의 시험 균주와 2 개의 참조 균주에 대한 병원성의 유무와 그 정도를 조사하고자 연속 3 회에 걸쳐 어체통과 시킨 각각의 균주들을 사용하여 넙치에 대한 공격 시험을 행하였다.

공격에 사용한 균액은 1.5 % NaCl 첨가 BHIA에 24 시간 배양한 후 각각의 균주를 멸균 생리 식염수에 현탁하여 파장 OD_{540} 에서 흡광도가 0.8 (10^8 CFU ml^{-1})이 되도록 조정한 후, 단계 희석하여 10^6 CFU ml^{-1} 으로 넙치 한 마리 당 0.1 ml씩 복강 주사하였다. 시험구별 10 마리씩 사용하였으며 수온 20°C 에서 2 주 동안의 누적 폐사율을 조사하였다. 대조구는 멸균 생리 식염수를 0.1 ml씩 복강 주사하였다. 시험기간 중 먹이는 공급하지 않았으며 3 일마다 50 %정도의 사육수를 환수시켰다. 폐사한 어류는 내부 장기에서 원인균의 분리

를 시도하였으며 또한 시험어와 폐사어에 대해서는 외부 및 내부 증상을 관찰하였다.

13. 통계학적 분석

각 실험구 사이의 통계학적 유의성은 Student's t-test로 비교하여 P값을 측정하였고, $P<0.01$ 와 $P<0.05$ 수준에서 유의성을 평가하였다.



Ⅲ. 결 과

1. 생화학적 특성

시험 균주와 참조 균주의 생화학적 특성을 비교한 결과는 Table 4에 나타내었다. *S. parauberis*의 시험 균주와 참조 균주 그리고 *S. iniae* 참조 균주는 운동성, indole 생성능, oxidase, catalase, Voges-Proskauer, Simmon's citrate 및 nitrate reduction 시험에서 모두 음성 반응을 나타내었고 lysine, ornithine decarboxylase 시험에서 공통적으로 음성 반응으로 나타났다. 특히, *S. parauberis*의 시험 균주와 참조 균주는 탄수화물 분해 시험에서 galactose, glucose, maltose, mannose, salicin, sucrose 및 trehalose에 공통적으로 양성 반응을 나타내었다. 그러나 시험 균주와 참조 균주간에 특징적인 현상으로서 arginine dehydrolase 양성 반응 균주는 lactose 양성 반응을 나타내었으며, arginine dehydrolase 음성 반응 균주는 lactose 음성 반응을 나타내었다. 그리고 blood agar를 이용하여 hemolysin을 측정한 결과 *S. parauberis*의 분리 균주는 α 또는 γ 용혈능, 참조균주는 γ 용혈능 그리고 *S. iniae*의 참조 균주는 β 용혈능을 나타내었다.

Table 4. Biochemical characteristics of tested strains

TEST	<i>S. parauberis</i>		<i>S. iniae</i>
	Tested strains	KCTC 3651	KCTC 3657
Motility	-	-	-
Arginine	+(43%)	+	+
Lysine	-	-	-
Ornithine	-	-	-
Catalase	-	-	-
Oxidase	-	-	-
TSIA	A/A	A/A	A/A
Nitrate	-	-	-
OF	F	F	F
Indole	-	-	-
Methyl red	-	-	-
Voges-Proskauer	-	-	-
Simmon's citrate utilization	-	-	-
Acid from			
Arabinose	-	-	+
Adonitol	-	-	-
Dulcitol	-	-	-
Cellobiose	+	-	-
Fructose	+(82%)	+	+
Galactose	+	+	+
Glucose	+	+	+
Inositol	-	-	-
Lactose	-(61%)	-	-
Maltose	+	+	-
Mannitol	+(60%)	-	+
Mannose	+	+	+
Melibiose	-	+	-
Rafinose	-	-	-
Rhamnose	-	-	-
Salicin	+	+	-
Sorbitol	+(52%)	+	-
Sucrose	+	+	-
Trehalose	+	+	-
Xylose	-	+	+
Hydrolysis of			
Starch	-	-	-
Gelatin	-	-	-
ONPG	+(56%)	-	+
Urea	-	-	-
Hemolysin	α or γ	γ	β

2. TEM을 이용한 capsule의 유무 관찰

세균 표면에 부착되어 있는 capsule을 TEM으로 관찰하였으며 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 넓치에서 분리된 *S. parauberis*의 균주 중 2-50, 6-40의 세균 세포 형태는 구형이었으며, 세균 표면 바깥 쪽에는 polycational ferritin이 결합된 뚜렷한 capsule 층을 확인할 수 있었다. 참조 균주인 *S. parauberis* KCTC 3651의 경우에도 capsule 층을 확인할 수 있었으나 capsule 층의 발현량이 분리 균주에 비하여 적은 것을 알 수 있었다.

3. Multiplex PCR

우리 나라에서 주로 분리되는 균주의 특이 primer를 사용하여 PCR한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. PCR 결과 각 균주는 각 primer에 대하여 특이적으로 증폭하여 예상되는 위치에서 한 개의 밴드를 나타내었다. *S. parauberis* 분리 균주와 참조 균주는 모두 718 bp에서 명확한 band를 형성하였으며 *S. iniae* 참조 균주 KCTC 3657은 870 bp, *L. garvieae* 참조 균주 ATCC 49156은 1,100 bp에서 band를 확인할 수 있었다.

A

B

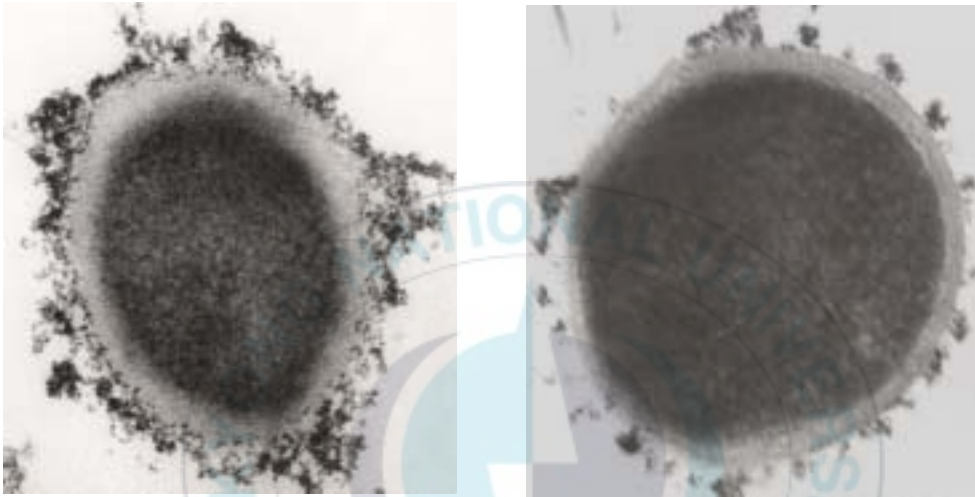


Fig. 1. Electronic micrographs of (A) ferritin-labelled *Streptococcus paruberis* Strain 2-50 and (B) *S. paruberis* KCTC 3651.

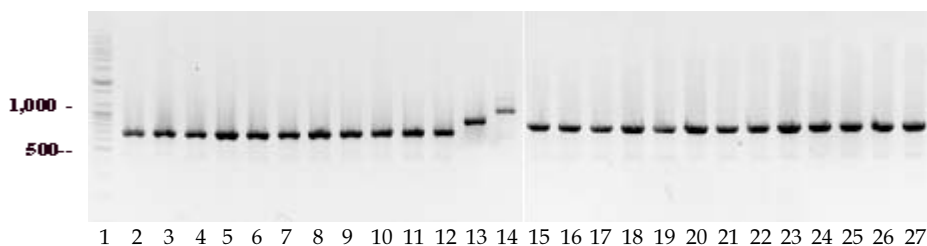


Fig. 2. Amplification products obtained using the multiplex PCR assay.

lane 1, marker; lane2, A12001; lane 3, A12003; lane 4, A12007; lane 5, A12008; lane 6, A12017; lane 7, A12020; lane 8, A12021; lane 9, A12022; lane 10, A12023; lane 11, A12025; lane 12, *S. parauberis* KCTC 3651; lane 13, *S. iniae* KCTC 3657, lane 14, *Lactococcus garvieae* ATCC 49156; lane 15, A12027; lane 16, A12029; lane 17, A12036; lane 18, 2-15; lane 19, 2-49; lane 20, 2-50; lane 21, 4-26; lane 22, 4-27; lane 23, 6-50; lane 24, 6-13; lane 25, 6-17; lane 26, 6-22; lane 27, 6-40.

4. SDS PAGE

S. parauberis 시험 균주의 FKc whole cell을 SDS-PAGE한 결과 47 KDa 부근에서 2개의 major band가 확인되었으며 시험 균주간의 단백질 band pattern의 차이가 나타나지 않았고 참조 균주인 KCTC 3651과 유사한 단백질 band pattern을 나타내었다. 그리고 KCTC 3657과는 단백질 band pattern의 차이가 있었으며 그 결과는 Fig. 3에 나타내었다.



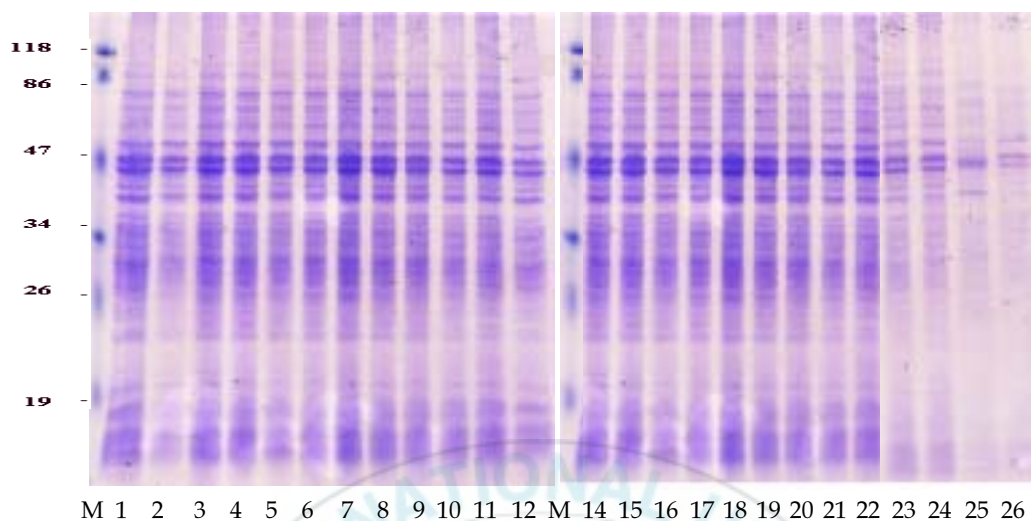


Fig. 3. Electrophoretic protein patterns of *S. parauberis* FK. lane M, Marker; lane 1, A12001; lane 2, A12003; lane 3, A12007; lane 4, A12008; lane 5, A12017; lane 6, A12020; lane 7, A12021; lane 8, A12022; lane 9, A12023; lane 10, A12025; lane 11, A12027; lane 12, A12029; lane 13, A12036; lane 14, 2-15; lane 15, 2-49; lane 16, 2-50; lane 17, 4-26; lane 18, 4-27; lane 19, 6-5; lane 20, 6-13; lane 21, 6-17; lane 22, 6-22; lane 23, 6-40; lane 24, KCTC 3651; lane 25, KCTC 3657 and ; Lane 26, ATCC 49156 (*L. garvieae*).

5. *S. parauberis* 성장 조건

alkali-peptone water를 이용하여 시험 균주와 참조 균주의 성장에 다양한 염분 농도, 온도 그리고 pH조건이 미치는 영향을 조사하였고 그 결과는 Table 5에 나타내었다. 염분 농도에 따른 발육은 0과 1 %에서 가장 성장이 좋았으며 6.5 %까지 성장하였으나 10 %에서는 성장을 관찰하지 못했다. 그 결과는 참조 균주 KCTC 3651과도 일치하였다. 그러나 *L. garvieae* 참조 균주인 ATCC 49156은 10 %의 염분 농도에서도 성장이 가능하였다.

온도별 발육 상태는 4 ~ 37 °C내에서 성장이 가능하였고 *S. parauberis* 성장의 최적 온도는 27 °C로 나타났으며 45 °C에서는 성장하지 못하였다. 그러나 ATCC 49156 균주는 45 °C에서도 성장하였다.

Table 5. The effects of NaCl concentration, temperature and pH in the alkali-peptone water on the growth of *Streptococcus parauberis*

Tested condition	Isolated strains (n=23)	Reference strains		
		KCTC 3651	KCTC 3657	ATCC 49156
0 %	++	++	++	++
1 %	++	++	++	++
6 %	+	+	+	+
6.5 %	+	+	+	+
10 %	-	-	-	+
4 °C	+	+	+	+
10 °C	+	+	+	+
27 °C	+++	+++	+++	+++
37 °C	++	++	++	++
45 °C	-	-	-	+
pH 9.6	+	+	+	+

6. ECPs 효소 활성

각 시험 균주와 참조 균주의 ECPs를 APIzym kit로써 proteolytic activity, gelatinase, phospholipase 그리고 lipase에 대한 조사 결과를 Table 6에 나타내었다. *S. parauberis* 시험 균주 모두 esterase, leucine arylamidase, 그리고 naphthol -AS -BI - phosphohydrolase에서 양성을 나타내었고, 이외의 효소 활성에서는 모두 음성을 나타내었다. 참조 균주 KCTC 3651은 alkaline phosphatase, leucine arylamidase 및 acid phosphatase 양성 반응이 나타났으며 valine arylamidase은 약한 양성반응이 관찰되어 시험 균주와 참조 균주 간에 다소 효소 활성 차이를 나타내었다. *S. iniae* 시험 균주의 경우 esterase lipase, leucine arylamidase, acid phosphatase 및 naphthol-AS-BI-phosphohydrolase에서 양성 반응을 나타내었으나 BS 9 균주만이 alkaline phosphatase에서 약한 양성 반응이 관찰되었으며 참조 균주인 KCTC 3657은 BS 9 균주와 유사하나 esterase lipase에서는 음성을 나타내었다. 그리고 모든 시험 균주와 참조 균주들은 proteolytic 활성을 나타내었다.

6-1. 시험균 ECPs의 세포 독성 시험

시험한 모든 균주의 ECP를 200 μ g ml⁻¹으로 조정하여 처리한 EPC cell-line에서 세포 독성 효과를 관찰할 수 있었으며 PBS를 첨가한 대조구에서는 세포 독성 효과를 관찰할 수 없었다 (Fig. 4).

Table 6. Enzymatic activities of Streptococci ECP

Characteristics	<i>S. parauberis</i>			<i>S. iniae</i>		
	2-50	6-40	KCTC 3651	BS 9	BS 10	KCTC 3657
Alkaline phosphatase	-	-	+	W	-	+
Esterase	+	+	-	-	-	-
Esterase Lipase	-	-	-	+	+	-
Lipase	-	-	-	-	-	-
Leucine arylamidase	+	+	+	+	+	+
Valine arylamidase	-	-	W	-	-	-
Cystine arylamidase	-	-	-	-	-	-
Trypsin	-	-	-	-	-	-
α -chymotrypsin	-	-	-	-	-	-
Acid phosphatase	-	-	+	+	+	+
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	+	+	-	+	+	W
α -galactosidase	-	-	-	-	-	-
β -galactosidase	-	-	-	-	-	-
β -glucuronidase	-	-	-	-	-	-
α -glucosidase	-	-	-	-	-	-
β -glucosidase	-	-	-	-	-	-
N-acetyl- β -glucosaminidase	-	-	-	-	-	-
α -mannosidase	-	-	-	-	-	-
α -fructosidase	-	-	-	-	-	-
Proteolytic	+	+	+	+	+	+
Gelatine	-	-	-	-	-	-
Phospholipase	-	-	-	-	-	-
Lipase	-	-	-	-	-	-

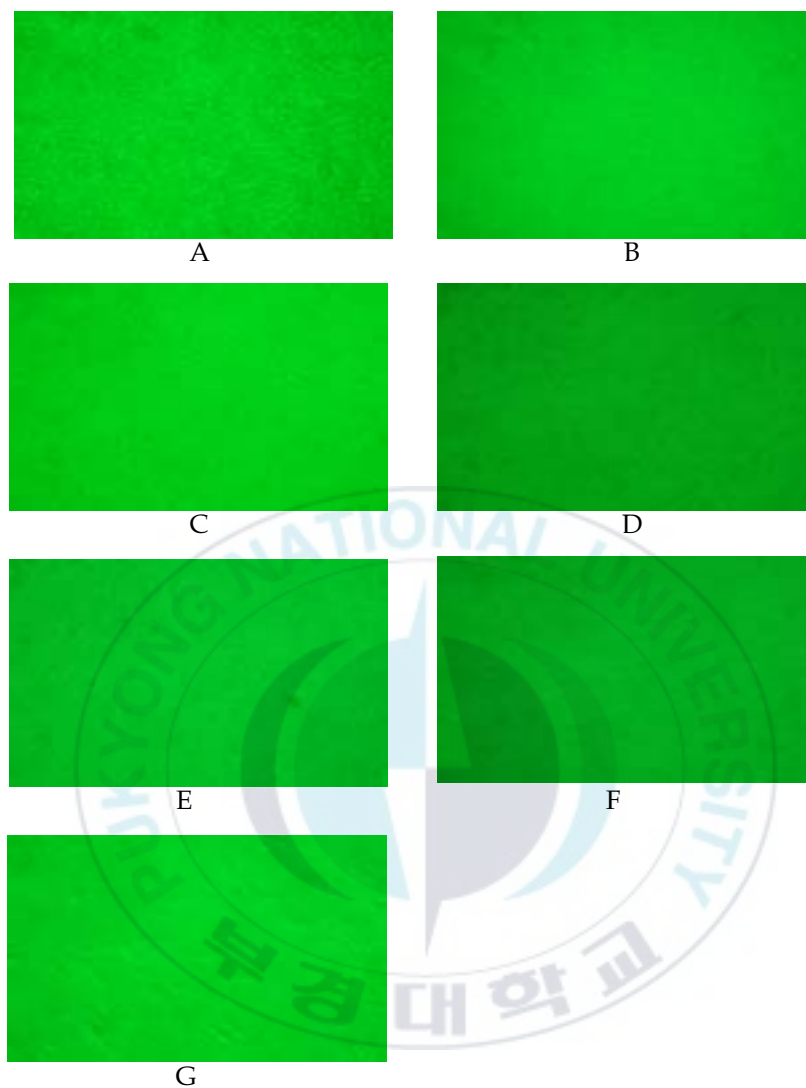


Fig. 4. Effects of cytotoxicity on fish cell line, EPC with ECPs of tested strains, for 48 hour incubation. Cytotoxicity activity was determined with microscopic examination, A: Control, B: 2-50, C: 6-40, D: BS 9, E: BS 10, F: KCTC 3651 and G: KCTC 3657.

7. 녁치 혈청에 대한 시험균의 저항성 시험

7-1. 혈청에서의 생존능 시험

냁치 혈청에 대한 시험 균주별 저항성 시험에서는 *S. iniae*의 capsule이 없는 BS 10 균주, KCTC 3657 균주를 제외한 모든 시험 균주가 녁치 혈청의 살균능에 대해 저항력을 나타내었다. 즉 PBS를 첨가한 대조구와 capsule을 가진 시험균은 그 수가 증가하여 모두 녁치 혈청의 살균능에 대해 저항성을 가지는 것을 확인하였다 (Fig. 5).



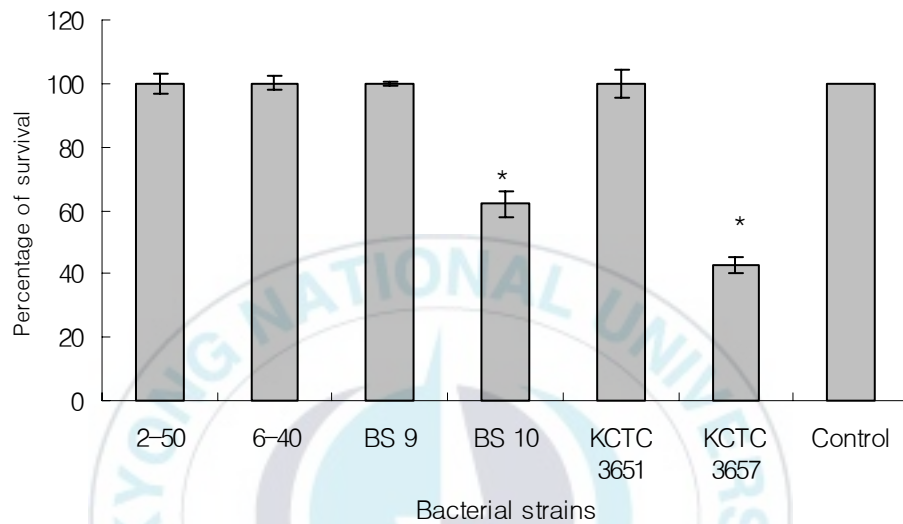


Fig. 5. Bactericidal activity in normal serum of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *, significant difference between references and other strains; $P < 0.05$.

7-2. 혈청에 대한 시험균의 시간별 균 수 변화

혈청 내에 *S. parauberis* 균주와 *S. iniae* 균주의 시간별 균 수 변화 시험 결과를 Fig. 6에 나타내었다. *S. parauberis*의 시험 균주는 시간의 경과에 따라 균 수가 지속적으로 증가하였고 KCTC 3651 균주 또한 시험 균주보다 낮지만 지속적으로 균 수 증가를 확인할 수 있었다. *S. iniae*의 경우 BS 9 균주 역시 균 수가 증가하였지만 BS 10 균주와 KCTC 3657 균주의 경우 넙치 정상 혈청에서 반응 1 시간 이후부터 시간 경과에 따라 균수가 감소하는 현상이 나타났다. 균 수가 증가하는 2-50 균주, 6-40 균주, BS 9균주, KCTC 3651 균주와 균 수가 감소하는 BS 10 균주, KCTC 3657 균주 간에는 유의적인 차이가 있었으며 균 수가 증가하는 그룹 중에서도 2-50 균주, 6-40 균주 및 KCTC 3651 균주 사이에는 유의적인 차이가 있었다.

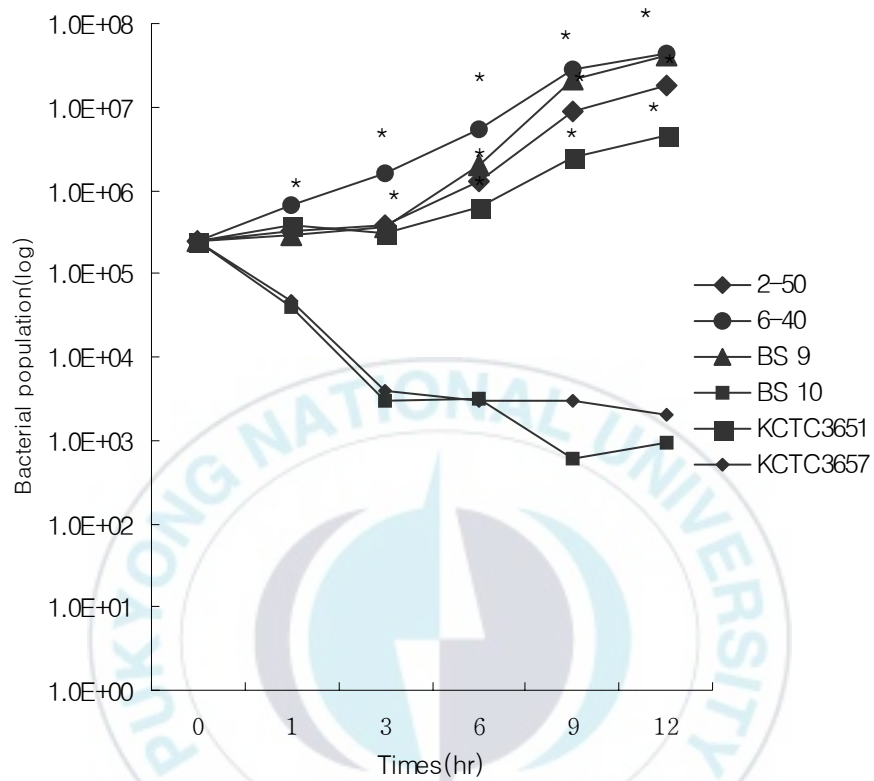


Fig. 6. Survival of various bacterial strains in the normal serum of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*.

*, significant difference between references and other strains; $P < 0.05$.

8. 넙치 혈액 식세포의 식균율과 식균 지수

8-1. 넙치 식세포의 시험 균주에 대한 식균율

넙치 혈액 식세포의 시험 균주에 대한 식균율을 조사한 결과는 Fig. 7에 나타내었다. 식세포의 시험균에 대한 식균율은 *S. parauberis* 시험 균주 2-50과 6-40 및 *S. iniae* 시험 균주 BS 9가 다른 균주에 비해 낮게 나타났으며 *S. iniae* BS 10, *S. parauberis* KCTC 3651 및 *S. iniae* KCTC 3657은 식균율이 높게 관찰되었다. 그리고 식균율이 낮은 *S. parauberis*의 2-50과 6-40 및 *S. iniae* BS 9 균주와 식균율이 높은 *S. iniae* BS 10, *S. parauberis* KCTC 3651 및 *S. iniae* KCTC 3657 균주 간에는 유의적인 차이가 있었다. 즉 capsule을 가지는 균주가 capsule을 가지지 않는 균주에 비하여 macrophage에 의해 식균되는 균수가 많은 것으로 나타났다.

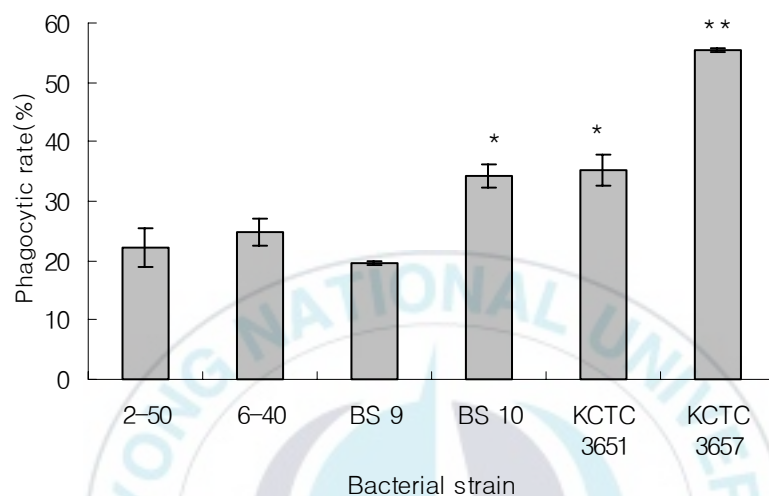


Fig. 7. The Phagocytic rate of leucocyte in peripheral blood of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, to bacterial strains for 3 hr incubation. *, significant difference between other strains; $P < 0.05$.
 **, significant difference between references and other strains; $P < 0.01$.

8-2. 넙치 혈액 식세포의 식균 지수

넙치 혈액 식세포에서의 시험 균주에 대한 식균지수를 조사한 결과는 Fig. 8에 나타내었다. 식균지수는 결과 *S. iniae* KCTC 3657 균주가 가장 높게 나타났다으며 *S. parauberis* 2-50, 6-40 및 *S. iniae* BS 9균주는 *S. iniae* BS 10, *S. parauberis* KCTC 3651, *S. iniae* KCTC 3657 균주보다 낮게 나타났다. 식균지수가 낮은 2-50, 6-40 및 BS 9 균주와 식균지수가 높은 BS 10, KCTC 3651 및 KCTC 3657 균주 간에는 유의적인 차이가 있었으며 식균율 결과와 유사한 경향을 나타내었다. 즉 capsule을 가지는 균주가 capsule을 가지지 않는 균주에 비하여 macrophage에 의해 더 쉽게 식균되는 것으로 나타났다.

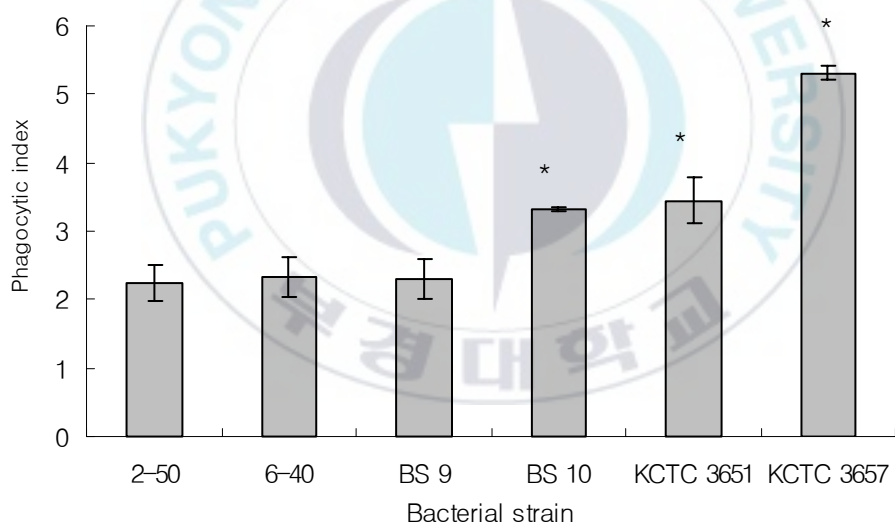


Fig. 8. The Phagocytic index of leucocyte in peripheral blood of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, to bacterial strains for 3hr incubation.

*, significant difference between references and other strains; $P < 0.05$.

9. 넙치 두신 macrophage에서의 시험 균주별 ROIs 생성능 측정

9-1. Chemiluminescence (CL) response

시험 균주에 대한 넙치 두신 macrophage의 CL 반응의 시험 결과를 Fig. 9에 나타내었다. 생균 시험균은 zymosan을 첨가한 대조구에 비하여 유의적으로 활성이 낮은 것으로 나타났으며 생균 시험 균주 사이의 유의적인 차이는 없었다. 그러나 신선 혈청으로 감작시킨 시험 균주는 생균 시험 균주보다 활성이 높아졌으나 capsule을 가지는 *S. parauberis* 2-50, 6-40 및 *S. iniae* BS 9균주와 *S. parauberis* KCTC 3651, capsule을 가지지 않는 *S. iniae* KCTC 3657 균주간에는 유의적인 차이가 있었다. 즉 감작을 시키더라도 capsule을 가지는 균주는 macrophage에 의한 식작용이 낮게 나타나는 것이 관찰되었다.

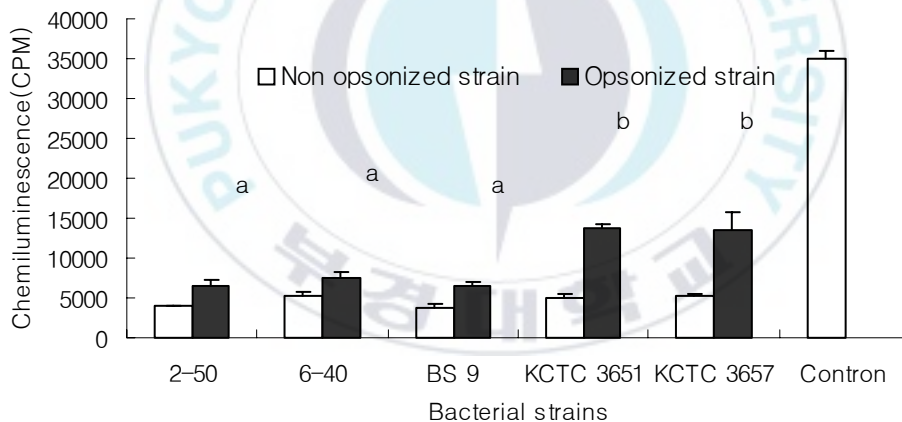


Fig. 9. Peak chemiluminescence of head kidney macrophages olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, to opsonized or nonopsonized bacterial strains for 30 min incubation. a and b; significant different ($P<0.05$).

9-2. Nitroblue tetrazolium (NBT) response

시험 균주가 넘치 두신 macrophage의 respiratory burst 활성을 자극할 수 있는지를 평가하였다. 생균 시험균과 신선 혈청으로 감작시킨 시험균을 사용하여 macrophage가 생성하는 ROIs의 양을 측정한 결과를 Fig. 10에 나타내었다. 생균 시험균은 PBS를 사용한 대조구와 유사한 값을 나타내었고 capsule이 존재하지 않는 *S. iniae* BS 10, KCTC 3657 그리고 *S. parauberis* KCTC 3651균주는 capsule이 존재하는 *S. parauberis* 2-50, 6-40 및 *S. iniae* BS 9균주와 유의적인 차이가 있었으며 감작 시험균은 생균 시험균보다 ROIs 생성이 더 높게 나타났고 대조구와 비교하여 유의적으로 차이가 있었다.

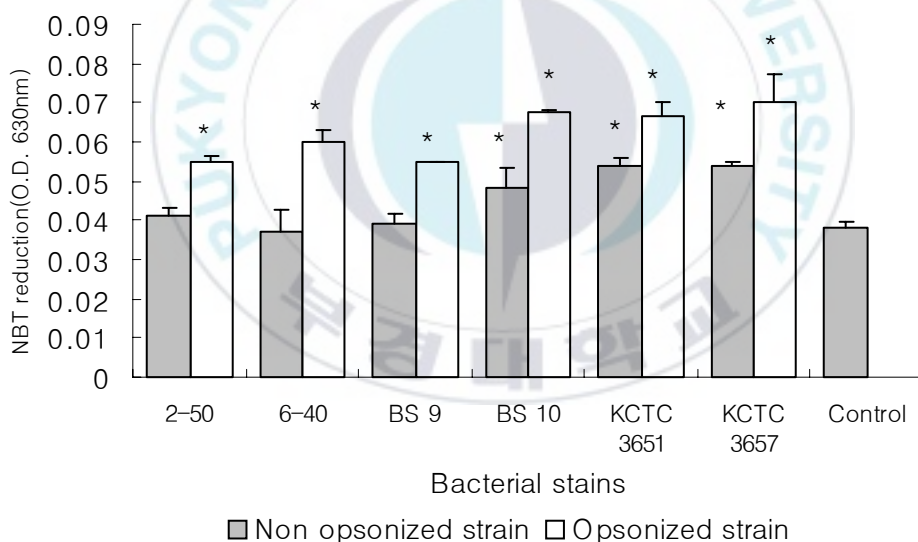
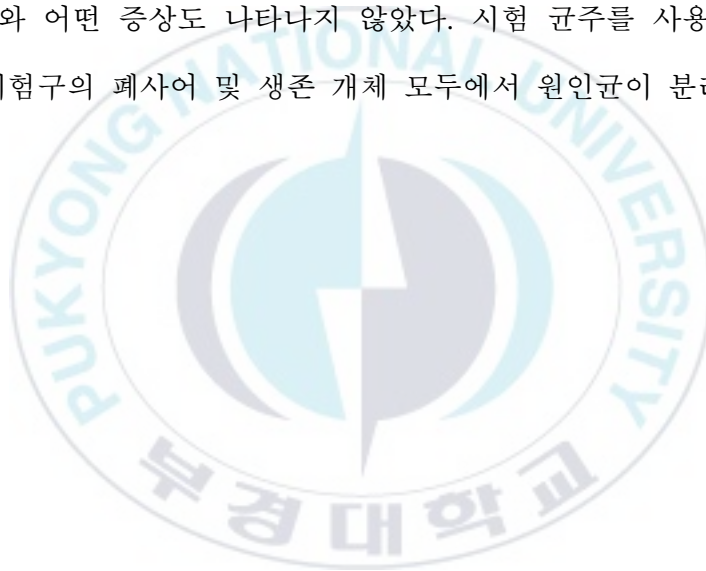


Fig. 10. ROIs production of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* head kidney macrophages after being infected with various opsonized or nonopsonized bacterial strains for 30 min incubation.

*, significant difference between control and other strains; $P < 0.05$.

10. 병원성 시험

Fig. 11에는 4 개의 시험 군주와 2 개의 참조 군주로 넙치에 대한 병원성을 시험한 결과를 나타내었다. 넙치에 대한 공격 균액의 평균 농도는 4×10^6 CFU fish⁻¹로 나타났고 *S. parauberis* 2-50, 6-40 및 *S. iniae* BS 9 군주에서는 주사 후 9일내에 모두 폐사하였으며 *S. iniae* BS 10 군주는 30 %, 참조 군주는 모두 10 %의 폐사율을 나타내었다. 폐사어와 생존개체의 공통적인 병변 으로서는 간울혈이 나타났으며 간혈적으로 안구의 백탁이 나타났다. 대조구에서는 폐사와 어떤 증상도 나타나지 않았다. 시험 군주를 사용한 시험구와 참조 군주 시험구의 폐사어 및 생존 개체 모두에서 원인균이 분리되었다.



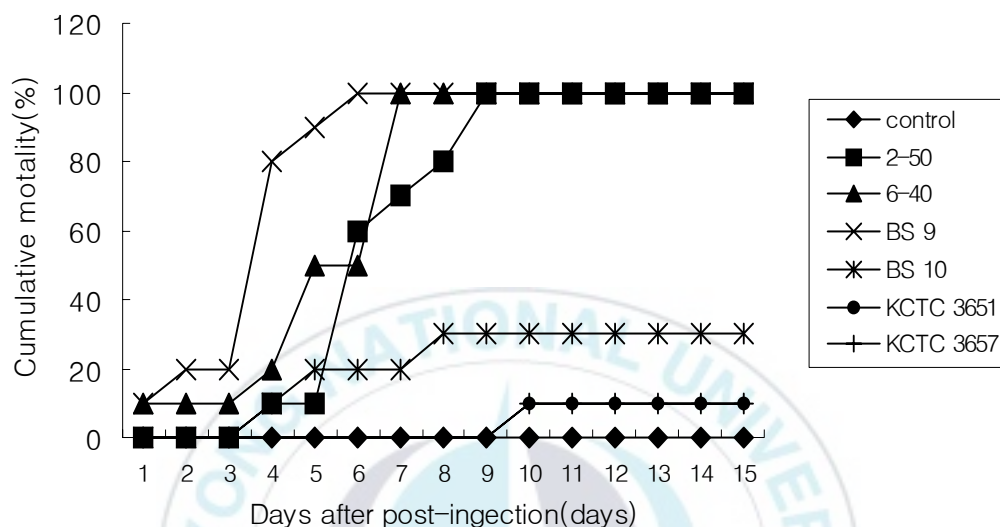


Fig. 11. Cumulative mortality of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, after intraperitoneal injection with the tested strains, *Streptococcus parauberis*, KCTC 3651 and *S. iniae* reference strains, KCTC 3657. The tested groups were challenged with 4×10^6 CFU/fish and control group was injected 0.1ml saline fish⁻¹.

IV. 고 찰

우리 나라에서 양식되는 여러 어종에는 다양한 종류의 연쇄상구균이 혼재하고 있으며, 이 세균에 감염된 어체는 원인균의 종은 달라도 증상이나 질병 진행 유형이 유사하다. 최근 연쇄상구균의 분리 비율이 증가하고 있으며 특히 우리 나라 주요 양식 대상 어종인 넙치에서 분리된 *S. parauberis* 비율이 현저하게 증가함에 따라 본 연구에서는 넙치 병어에서 분리된 *S. parauberis*의 특성을 파악하였다.

*S. parauberis*의 생화학 시험 결과 넙치 병어에서 분리된 균주 중에서도 arginine, fructose, lactose, mannitol 및 sorbitol 분해능이 다소 차이가 있었지만 *S. parauberis* 참조 균주 KCTC 3651과는 유사하였고 *S. iniae* 참조 균주인 KCTC 3657은 당 분해를 거의 하지 않았으며 arabinose, maltose, salicin, sucrose, trehalose 분해능에서 *S. parauberis*와 다소 차이가 있었다. 그리고 *S. parauberis* 분리 균주는 α 또는 γ 용혈능으로 나타났고 참조 균주는 γ 용혈능으로 나타났으나 *S. iniae* 참조 균주는 β 용혈능으로 관찰되었다.

Cell wall 표면의 capsule 유무를 확인하기 위해서 ferritin을 이용하여 TEM으로 관찰한 결과 *S. parauberis*의 시험 균주 및 참조 균주에서 capsule을 확인할 수 있었으나 참조 균주인 KCTC 3651은 시험 균주에 비하여 capsule의 두께가 얇았다. 인간의 streptococcal pathogens은 polysaccharide capsule을 가지고 있는 것이 잘 알려져 있으며 이러한 세균의 cell wall 표면의 capsule

은 일반적으로 polysaccharide로 구성되어 있으며 드물게 amino acid polymers로 구성되어 있는 것이 있다. 본 연구에서 나타난 capsule은 anionic site와 ferritin-labelled antisera가 정전기적으로 결합하고 extracellular fibrous layer가 강하게 염색되어 전자 현미경 상에서 capsule을 관찰할 수 있었고 관찰된 capsule은 독성 메카니즘에서 매우 중요하다 (Wai *et al.*, 1998; Johnson *et al.*, 1992).

일반적인 PCR법으로도 어류 병원체를 검출하고 동정할 수 있지만 single primer sets으로 다수의 sample에 이용한다면 시간과 비용이 많이 소요된다. 그렇지만 한개의 tube에서 다양한 primer를 사용하여 PCR을 증폭하는 방법인 multiplex PCR을 사용하여 여러 질병을 동시에 검출함으로써 신속하고 경제적이다. 그 예로 multiplex PCR를 사용하여 *Aeromonas salmonicida*, *Yersinia ruckeri*와 *Flavobacterium psychrophilum*를 동시에 검출할 수 있으며 (Del Cerro *et al.*, 2002) 우리 나라에서 분리되는 Streptococci 중 주로 분리되는 *S. parauberis*, *S. iniae*, *L. garvieae*에 대한 각 특이 primer를 사용하여 *S. parauberis* 718 bp, *S. iniae* 870 bp 및 *L. garvieae* 1,100 bp에서 특이적인 한 개의 band를 검출함으로써 병원체를 신속하게 검출할 수 있으며 유전학적 동정이 가능하다.

*S. parauberis*의 표준 균주 KCTC 3651과 분리 균주가 가지는 균체 단백질을 polyacrylamide gel 상에 전기 영동하여 확인한 결과 표준 균주와 분리 균주의 protein profile의 차이는 나타나지 않았으며 모든 시험 균주는 47 KDa에서 두 개의 major band를 형성하고 균주의 protein pattern이 유사하게 나타났다. 그렇지만 *S. parauberis* 균주의 protein profile은 *S. iniae* KCTC 3657 및

L. garvieae ATCC 49156 균주의 protein profile과 다소 차이가 나타났다.

*S. parauberis*의 배양 조건에 따른 발육상태를 확인하기 1 % akali-peptone water에 배양 온도, 염분 농도 및 pH에 대한 결과를 얻었다. *S. parauberis* 시험 균주와 참조 균주 모두 27 °C에서 가장 잘 자라는 것으로 확인되었으며 4~37 °C까지 성장이 가능하였으나 45 °C에서는 성장이 되지 않았다. 그리고 염분 농도 0~6.5 %에서 성장이 가능하였고 10 %에서는 발육이 되지 않았으며 0과 1%에서 최적 성장이 가능하여 온도 및 염분 농도에 관한 성장 범위 조사에서는 Domenech *et al.* (1996) 이전의 연구와 일치하였다. *S. parauberis*는 pH가 높은 상태에서는 성장을 하지 않는다는 보고가 있었으나 본 연구에서는 pH가 높은 상태인 pH 9.6에서도 다소 미약하게 성장 가능하였다.

그리고 *S. parauberis*가 주로 분리 되는 지역인 제주와 완도에서 각각 한 균주를 선택하여 어류 병원체로서 독성이 강하고 독성 메카니즘이 잘 알려진 *S. iniae*와 비교하여 독성을 분석하였다. *S. iniae*는 capsule 존재 유무에 따라 독성 및 항원성 차이가 있는 것으로 보고된 capsule이 존재하는 *S. iniae* BS 9와 capsule이 존재하지 않는 *S. iniae* BS 10을 이용하였다 (우, 2002).

어류 병원성 세균의 세포외생성물 (ECPs)은 독소와 다양한 효소를 함유하고 있어 조직 손상을 유발한다. *A. hydrophila*는 cytotoxin과 protease를 함유하고 있어서 염증반응을 유도하는 motile aeromonas septicemia를 나타내며, *L. anguillarum*는 *A. salmonicida*의 주요 glycerophospholipid cholesterol acyltransferase를 함유하고 있으며 Atypical *A. salmonicida*의 ECP에 포함되어 있는 protease와 membrane-damaging toxins (cytolysins, hemolysins and phospholipase) 등은 병원성 기작에 중요한 역할을 한다 (Rockey *et al.*, 1998;

Austin *et al.*, 1998; Ellis, 1997). 그램 양성 세균의 경우, ECP의 독성이 그램 음성 세균보다 강하다는 보고가 많이 있으며 포유동물 혈액이나 조직에 영향을 미치는 대부분의 streptococcal invasions과 protein toxins는 숙주 세포를 죽이고 염증성 반응을 유발한다. 특히 *S. pyogenes* ECPs의 streptolysin S, streptolysin O, hyaluronidase는 많은 연구가 되어있다. Streptolysin S는 oxygen-stable leukocidin이고 streptolysin O는 oxygen-labile leukocidin이며 NADase 또한 leukotoxic이다. Hyaluronidase는 결합조직 hyaluronic acid를 느슨하게 한다. Streptokinases는 fibrin 용해에 관여하며 Streptodornases A-D는 deoxyribonuclease activity를 가진다. Protease activity은 *Staphylococcus aureus*와 유사하며 그것은 조직의 괴사 또는 toxic shock syndrome을 가져다 준다. 본 연구에서 *S. parauberis*와 *S. iniae*의 각 참조 균주와 시험 균주의 ECPs에 대한 enzymatic activity를 측정한 결과, *S. parauberis*와 *S. iniae* 시험 균주는 leucine arylamidase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase와 proteolytic 활성을 나타내었다. *S. parauberis* 분리 균주는 esterase 양성 반응이 나타났으며, *S. iniae* 분리 균주는 esterase lipase 및 acid phosphatase에서 양성 반응이 나타나 *S. parauberis*와 *S. iniae* 분리 균주 간 효소 활성 차이가 있었으며 특히 *S. parauberis*에서 esterase활성을 나타내어 이 효소가 *S. parauberis*의 병원성과 관련이 있을 것으로 추측된다.

넙치 혈청 내의 살균 작용에 대한 *S. parauberis* 균주별 저항성을 시험한 결과 capsule을 가지고 병원성이 강한 것으로 나타난 2-50, 6-40, *S. iniae* BS 9 및 *S. parauberis* KCTC 3651는 넙치 혈청 내에서 생존할 수 있으며 또한 증식할 수 있는 것으로 나타났다. 그러나 capsule이 결핍되어 있고 병원성이

약한 것으로 나타난 *S. iniae* BS 10과 KCTC 3657은 넙치 혈청에서 시간이 지남에 따라 균 수가 감소되는 것으로 나타났다. 혈청 내에서 생존할 수 있는 능력은 병원성 세균과 비병원성 세균을 구별할 수 있는 중요한 indicator가 되며, Leung *et al.* (1994)에 의하면 비병원성의 *Aeromonas hydrophila*가 *tillapia*의 혈청에서 기하 급수적으로 감소하는 반면에 병원성의 *A. hydrophila*는 지속적으로 생존하는 것으로 나타났다. 넙치의 혈청에는 세균 세포벽의 구성 성분인 peptidoglycan을 파괴할 수 있는 lysozyme 및 LPS에 의해 활성화되는 complement가 존재하여 침입한 세균을 용균시킬 수 있다. 그러나 병원성 세균의 경우는 이러한 어류 숙주의 면역 반응을 회피하거나 억제할 수 있는 여러 가지 기작을 가지고 있다. 예를 들어, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, *L. garvieae*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae* 등은 polysaccharide capsule을 가지며, *Aeromonas salmonicida*는 A-layer를 가지고 있어서 어류 혈청 내에서 생존할 수 있다 (Daly *et al.*, 1996; Magarinos *et al.*, 1996; Barnes *et al.*, 2002; Bisno *et al.*, 2003). 본 연구에서는 *S. parauberis*가 polysaccharide capsule을 가지고 있어 넙치 혈청의 살균작용을 회피하고 혈청 내에서 생존함으로써 병원성 측면에서 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다.

병원체가 동물 숙주 내에 감염되면 초기 면역을 담당하는 macrophage는 병원체를 비특이적으로 식작용하여 살해할 수 있고, 면역 반응의 초기에 accessory cell로 작용함으로써 어류의 비특이적 면역 반응에서 중요한 역할을 담당하고 있다 (Secombes, 1990). 이러한 식작용에 대한 저항성을 가지는 capsule은 두 가지 메커니즘이 있다. 첫째로는 capsule이 세균의 세포의 보체 또는 항체와 같은 opsonic factor의 binding을 방해하며 (Horwitz and

Silverstein, 1980) 둘째로는 capsule 표면 아래에 opsonic factor에 침투할 수 있어 capsule은 phagocytic cell의 receptors와 opsonin ligand 사이에서 일어나는 접촉을 하지 못하게 하는 barrier가 존재하여 physical barrier로 작용한다 (King and Wilkinson, 1981). 게다가, capsule은 masking surface antigens, complement consumption 유발, 세균 표면에 binding 할 수 있는 보체 또는 식세포 표면 receptor의 결합을 방해하여 식작용으로부터 세균을 보호할 수 있다. 따라서 세균 capsule의 antiphagocytic 역할 때문에 독성 요소로서 고려되며 이러한 것은 세균 감염에 영향을 미칠 수 있다 (Verbrugh *et al.*, 1979; Densen and Mandell *et al.*, 1980). 예를들어, *P. damsela* subsp. *piscida*의 경우 anti-phagocytic surface components는 polysaccharide capsule에 의해 식세포 결합에 필요한 ligands에 접근하기 어렵고 serum opsonic과의 결합력을 감소시켜 식작용에 저항성을 나타낸다 (Czuprynski, 1988). 그리고 세포의 대사과정에서 생성되는 reactive oxygen intermediaters (ROIs)는 Oxygen이 환원된 superoxide radical (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2)와 hydroxyl radical (OH) 등의 형태로 되어 독성 작용을 나타내어 미생물을 살균한다 (Fridovich, 1995; Keyer *et al.*, 1995). 그러나 병원성 세균의 경우는 SOD와 catalase가 있어 식세포의 respiratory burst 작용을 극복할 수 있다. 예를 들어, *A. salmonicida*, *Staph. aureus*의 경우, 식세포의 respiratory burst 활성을 통하여 생성된 reactive oxygen species를 무독화시킬 수 있는 SOD와 catalase 같은 효소를 가지고 있어 oxygen radical의 살균능을 감소시킴으로써 macrophage의 식작용에 저항성을 나타내는데 중요한 작용을 하는 것으로 나타났다 (Barens *et al.*, 1999; Barens *et al.*, 1996; Mandell, 1975). 본 연구의

넙치 혈액 식세포의 식균율, 식균 지수 및 넙치 두신 macrophage에서의 ROIs 측정 결과 capsule을 가진 *S. parauberis* 분리 균주와 *S. iniae* BS 9 균주를 capsule이 존재하지 않는 BS 10 균주와 비교해보면 식세포에 의한 식균율, 식균지수가 capsule이 존재하는 균주가 capsule이 존재하지 않는 균주에 비해 낮은 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 신선 혈청으로 감작시킨 균주를 사용하더라도 macrophage에서 ROIs 생성이 낮게 나타나는 것을 알 수 있었으며 이는 낮은 식균율과 식균 지수에 의해 발생하는 것으로 생각된다. 이러한 것은 병원체가 체내에 들어왔을 때 세포벽 바깥쪽에 존재하는 capsule이 식작용을 회피하여 병원성을 나타내는 주요한 요인으로 사료된다.

본 연구 결과, *S. parauberis*는 α 또는 γ 용혈능을 가지고 있으나 *S. iniae* 참조 균주는 β 용혈능으로 나타났다. multiplex PCR을 이용하여 어체에서 분리되는 *S. parauberis*를 신속 동정함으로써 질병에 대처하는 데 유용하다고 할 수 있다. 그리고 capsule 존재 유무에 따라 병원성 차이가 나타나는 *S. iniae*와 넙치 병어에서 분리된 *S. parauberis*를 면역학적으로 비교한 결과, capsule이 존재하는 *S. parauberis*와 *S. iniae*는 넙치 혈청에서 세균 살해능에 저항성을 지니며 식작용을 회피하는 기작을 지니고 있었으며 넙치에서 높은 병원성을 나타내는 것으로 사료된다.

V. 요약

연쇄구균증은 우리 나라 양식 넙치에 큰 피해를 주는 세균성 질병의 원인균으로 알려져 있다. 특히, 연쇄구균증 중 *Streptococcus parauberis*가 큰 피해를 내고 있으나 원인균에 대한 구체적인 연구가 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 우리 나라의 주 양식종인 넙치 병어에서 분리된 *S. parauberis*를 생화학적 및 유전학적으로 동정하고 형태학적 특성, 시험균주의 protein profile, ECPs 효소 활성 및 EPC cell line에 대한 세포 독성 효과를 조사하였다. 또한 넙치 혈청에서의 생존능 및 넙치 혈액에서의 식균율과 식균지수를 조사하고 넙치 두신 macrophage의 ROIs 생성능을 측정하였다.

본 연구 결과, 넙치 병어에서 분리한 *S. parauberis*를 우리 나라에서 주로 분리되는 연쇄구균에 대한 각각의 특이 primer를 동시에 넣어서 수행한 multiplex PCR으로 신속하게 유전학적으로 동정하였다. *S. parauberis*의 분리 균주는 α 또는 γ 용혈능을 나타내었지만 *S. iniae*의 경우 β 용혈능을 나타내어 두 균주 사이에 명백한 차이가 있었고 ferritin-labelled antisera를 이용하여 *S. parauberis* 세포벽 바깥쪽의 capsule을 TEM으로 관찰하였다. *S. parauberis* Formalin Killed whole cell protein profiles은 47 KDa 주위에 두개의 major band가 관찰되었으며 *S. parauberis* 시험 균주 및 *S. parauberis* 참조 균주의 protein pattern이 매우 유사하였다. 그리고 최적 성장 적온 및 염분 농도는 27 °C and 0 % NaCl이었으며 45 °C and 10 % NaCl에서는 성장이 관찰되지 않았다. *S. parauberis* 면역학적 특성은 어류 병원체로서 잘 알려진 *S. iniae* 균주 중 병원성이 높으며 capsule이 존재하는

BS 9 균주와 병원성 낮으며 capsule이 존재하지 않는 *S. iniae* BS 10 균주와 비교하였다. capsule이 존재하는 *S. parauberis*와 *S. iniae*는 혈청에 의한 균주 살해능에 저항성을 나타내는 반면, capsule이 존재하지 않는 *S. iniae*는 넙치 혈청에서 시간이 지남에 따라 살균되었다. 또한 capsule이 존재하는 균주는 식작용을 회피하는 기작이 나타났으며 낮은 ROIs 생산을 자극하였다.

이상의 결과에서 넙치 병어에서 분리한 *S. parauberis*를 생화학 및 유전학적으로 동정하고 세균 표면 바깥쪽에 존재하는 capsule이 식작용과 혈청 살해능 등에 저항성을 가지며 높은 폐사율을 나타내었다. 따라서 *S. parauberis*는 우리 나라 대표 양식 어종인 넙치에서 병원성이 강한 균주로 사료된다.



VI. 감사의 글

어병예방학연구실에 발을 들인 지 2년 반이라는 시간이 흘렀습니다. 비록 짧은 시간이지만 저에게는 기쁨과 행복의 순간이었습니다. 먼저 부족한 저에게 항상 인자하신 웃음으로 따뜻한 사랑과 관심을 주신 박수일 교수님께 진심 어린 존경과 감사의 말씀을 올립니다. 항상 바쁘신 중에도 저의 논문에 지도와 조언을 해주신 정준기 교수님과 허민도 교수님께 감사드립니다. 그리고 항상 관심주시고 배움을 일러주신 정현도 교수님, 김기홍 교수님, 강주찬 교수님께 감사드리고 학문적 지도와 삶의 조언을 아끼지 않으신 박찬일 교수님께 감사드립니다.

항상 관심 가져주신 동해수산연구소 방종득 소장님, 울진종묘배양장 김이청 장장님, 수산과학원 김진우 팀장님께 감사드립니다. 수산과학원에서 근무하시면서 어려운 시기에 항상 격려를 해주신 지보영, 최혜승, 조미영, 권문경 선배님 그리고 국립수산물 품질검사원에서 근무하시면서 항상 관심을 가져주신 이상윤, 손영찬, 강민진, 성명희, 최광진 선배님, 김은전 학형님께 감사드립니다. 관심과 격려를 아끼지 않으셨던 지방해양청에 근무하시는 이재일, 황미혜, 최현숙 선배님, 내수면 양식 연구소에 근무하시는 이주석 선배님께 감사드리며 어려운 시기에 실험어를 제공해 주신 최성재 선배님께도 감사드립니다.

논문 계획에서부터 완성시 까지 많은 지도와 격려를 아끼지 않으신 우승호 선배님, 실험중에도 많은 관심을 가져주신 이덕찬 선배님, 김도형 선배님께 감사드립니다. 많은 가르침을 주신 이화 선생님, 김수미, 원경미, 홍미주 선배님 타국에서 공부하시면서도 격려를 아끼지 않으신 한현자, 김현정 선배님께 감사드립니다. 졸업논문을 같이 준비한 최정현 후배님과 항상 웃음을 잃지 않는 이준희, 하수진, 손새봄, 정영은, 김수현, 김승훈, 문정현 후배님께도 감사의 인사를 전합니다. 그리고 실험실 원기를 가득 불어넣는 한상윤, 김지원, 서미영, 박효진, 최민지, 조교희 후배님께 감사드립니다.

석사과정동안 함께 수고하며 서로 힘이 되었던 김민선, 엄지영, 전수진님께 수고하
셨다는 말과 함께 감사의 말을 전하며 약리학 실험실 이상환, 강미정 선배님, 진단생
화학실험실 정준범 선배님, 기생충학실험실 이은혜 선배님께도 감사드립니다. 웃음을
잃지 않게 해주신 경상대학교 해양생명과학과 수산생명의학실험실의 김기혁 선배님
과 김주원 후배님께 감사드립니다.

친구로서 변함없는 우정으로 걱정과 배려를 아끼지 않은 봉수, 성은, 성철, 상현, 인
엽, 정민, 정현, 창배, 화인에게 감사드리며 대학원 생활하는 동안 옆에서 많은 힘이
되어준 석윤, 승준, 승혁, 종현, 지효에게 감사드립니다. 형님으로서 늘 격려해주신
상주대학교 김병오 교수님 내외께도 감사의 인사를 전합니다.

어려운 여건에서도 늘 한없는 사랑을 주시며 올바른 길을 걸을 수 있도록 인생의
등대가 되어주신 부모님과 멀리 떨어져 있으면서도 항상 오빠 걱정을 해준 동생 아
름이에게 고개 숙여 감사의 인사를 전합니다.

제 인생에 있어 커다란 관문을 통과하는데 수많은 가르침과 관심으로 더 나은 제가
될 수 있게 해주신 모든 분께 감사드리며, 제가 살아가는 모습으로 보답하고 싶습니
다. 감사합니다.

VII. 참고 문헌

- Alim, A. R., K. Kawai and R. Kusuda: Comparative pathogenicity study on antigenically variant strains of *Enterococcus seriolicida*. J. Fish Dis., 19: 39-46, 1996.
- Austin, B., D. A. Austin, I. Dalsgaard, B. K. Gudmundsdottir, S. Høie, J. M. Thornton, J. L. Larsen, B. O'Hici and R. Powell: Characterization of atypical *Aeromonas salmonicida* by different methods. Sys. Appl. Microbiol., 21: 50 - 64, 1998.
- Bachrach, G., A. Zlotkin, A. Hurvitz, D. L. Evans and A. Eldar: Recovery of *Streptococcus iniae* from diseased fish previously vaccinated with a *Streptococcus* vaccine. Appl. Environ. Microbiol., 67: 3756 - 3758, 2001.
- Barnes, A. C., F. M. Young, M. T. Horne and A. E. Ellis: *Streptococcus iniae*: serological differences, presence of capsule and resistance to immune serum killing. Dis. Aquat. Org., 53: 241-247, 2003.
- Barnes, A. C., C. Guyot, B. G. Hansen, K. Mackenzie, M. T. Horne and A. E. Ellis: Resistance to serum killing may contribute to differences in the abilities of capsulate and non-capsulated isolates of *Lactococcus garvieae* to cause disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, L.). Fish & Shellfish Immunol., 12: 155 - 168, 2002.
- Barnes, A. C., M. C. Balebona, M. T. Horne and A. E. Ellis: Superoxide

- dismutase and catalase in *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and their roles in resistance to reactive oxygen speices. Microbiol., 145: 483-494, 1999.
- Barenès, A. C., M. T. Horne and A. E. Ellis: Effect of iron on the expression of superoxide dismutase by *Aeromonas salmonicida* and associated resistance to superoxide anion. FEMS Microbiol. Letters, 142: 19-26, 1996.
- Barenès, A. C., M. T. Horne and A. E. Ellis: *Streptococcus iniae* expresses a cell surface non-immune trout immunoglobulin-binding factor when grown in normal trout serum. Fish & Shellfish Immunol., 15: 425-431, 2003.
- Bisno, A. L., M. O. Brito and C. M. Collin: Molecular basis of group A Streptococcal virulence. Lancet Infect. Dis., 3: 191-200, 2003.
- Bonet, R., B. Magarinos, J. L. Romalde, M. D. Simon-Pujol, A. E. Toranzo and F. Congregado: Capsular polysaccharide expressed by *Pasteurella piscicida* grown in vitro. FEMS Microbiol. Letters, 124: 285-289, 1994.
- Bradford, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 72: 248-254, 1976.
- Carr, A., D. D. Sledjeski, A. Podbielski, M. D. Boyle and B. Kreikemeyer: Similarities between complemet-mediated and streptolysin S-mediated hemolysis. J. Biol. Chem., 276: 41790-41796, 2001.

- Currás, M., B. Magariños, A. E. Toranzo and J. L. Romalde: Dormancy as survival strategy of the fish pathogen *Streptococcus parauberis* in the marine environment. *Dis Aquat. Org.*, 52: 129-136, 2002.
- Czuprynski, C. J.: Bacterial invasion of cellular defense mechanisms: an overview. In: *Virulence mechanisms of bacterial pathogens* (ed. by Roth, J. A). 141-160, American Society for Microbiology, Washington, DC, 1988.
- Del Cerro, A., I. Ma´rquez, and J. A. Guijarro: Simultaneous detection of *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum*, and *Yersinia ruckeri*, three major fish pathogens, by multiplex PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 5177 - 5180, 2002.
- Domenech, A., J. F. Fernandez-Garayzabal, C. Pascual, J. A. Garca, M. T. Cutuli, M. A. Moreno, M. D. Collins and L. Dominguez: Streptococcosis in cultured turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), associated with *Streptococcus parauberis*. *J. Fish Dis.*, 19: 33-38, 1996.
- Do Vale, A., A. E. Ellis and M. T. Silva: Electron microscopic evidence that expression of capsular polysaccharide by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* is dependent on iron availability and growth phase. *Dis. Aquat. Organ.*, 44: 237-240, 2001.
- Fridovich, I.: Superoxide radical and superoxide dismutase. *Annu. Rev. Toxicol.*, 64: 97-112, 1995.
- Horwitz, M., and S. C. Silverstein: Influence of the *Escherichia coli* capsule

- on fixation and on phagocytosis and killing by human phagocytes. J. Clin. Invest., 65: 82-94, 1980.
- Johnson, J. A., P. Panigrahi and J. G. Morris, Jr.: Non-O1 *Vibrio cholerae* NRT 36S produces a polysaccharide capsule that determines colony morphology, serum resistance and virulence in mice. Infect. Immun., 60: 864-869, 1992.
- Kasper, D. L., M. R. Wessels and C. Rubens: Role of the capsular polysaccharide of type III group B streptococci in virulence. In: Ayoub, E. M., G. H. Cassell, W. C. Branche and T. J. Henry (eds) Microbial determinants of virulence and host response. American Society for Microbiology Washington, DC, 113 - 121, 1990.
- Keyer, K., A. S. Gort and J. A. Imlay: Superoxide and the production of oxidative DNA damage. J. Bacteriol., 177: 6782-6790.
- King, B. F. and B. J. Wilkinson: Binding of human immunoglobulin to protein A in encapsulated *Staphylococcus aureus*. Infect. Immun., 33: 666-672, 1981.
- Kitao, T.: The methods for detection of *Streptococcus* sp., causative agent of streptococcal disease in cultured yellowtail, *Seriola quinqueradiata*, especially their cultural, biochemical and serological properties. Fish Pathology, 17: 17-26, 1982.
- Kitao, T: Strain variation associated with pathogenesis of *streptococcus* sp., the causative bacteria of streptococcosis in cultured yellowtail, *Seriola*

- quinqueradiata*. Proc. 2nd Natl. Pacific Aquaculture Symposium, Tokyo and Shimizu, Japan, Tokai University, 196-210, 1983.
- Kuo, C. F., J. J. Wu, K. Y. Lin, P. J. Tsai, S. C. Lee, Y. T. Jin, H. Y. Lei and Y. S. Lin: Role of streptococcal pyrogenic extoxin B in the mouse model of group A streptococcal infection. 66: 3931-3935, 1998.
- Leung, K. Y., I. V. Yeap, T. J. Lam and Y. M. Sin: Serum resistance as a good indicator for virulence in *Aeromonas hydrophila* strains isolated from diseased fish in South-East Asia. J. Fish Dis., 18: 511-518, 1994.
- Liu, P. C., K. K. Lee, K. C. Yui, G. H. Kou and S. N. Chen: Isolation of *Vibrio harveyi* from diseased kuruma prawns *Penaeus japonicus*. Curr. Microbiol, 33: 129 - 132, 1996.
- MacFaddin, J. F.: Biochemical test for identification of medical bacteria (3rd ed. by Williams, L. and Wilkins), USA, 2000.
- Mandell, G. L.: Catalase, superoxide dismutase, and virulence of *Staphylococcus aureus*. in vitro and in vivo studies with emphasis on Staphylococcal-leukocyte interaction. J. Clin. Invest., 55: 561-566, 1975.
- Margarinos, B., R. Bonet, J. L. Romalde, M. J. Martinez, F. Congregado and A. E. Toranzo: Influence of the capsular layer on the virulence of *Pasteurella piscicida* for fish. Microbio. Pathol., 21: 289-297, 1996.
- Mata, A. I., A. Gibello, A. Casamayor, M. M. Blanco and L. Dominguez. Multiplex PCR assay for detection of bacterial pathogens associated with warm-water streptococcosis in fish. Appl. Environ. Microbiol., 68:

5177-5180, 2002.

Miles, A. A. and S. S. Misra: The estimate of the bacterial power of the blood. *J. Hygiene*, 38: 873-885, 1938.

Ooyama, T., A. Kera, T. Okada, V. Inglis and T. Yoshida: The protective response of yellowtail *Seriola quinqueradiata* to the bacterial fish pathogen *Lactococcus garvieae*. *Dis. Aquat. Org.*, 37: 121-126, 1999.

Pier, G. B. and S. H. Madin: *Streptococcus iniae* sp. nov., a beta-hemolytic streptococcus isolated from an Amazon freshwater dolphin, *Inia geoffrensis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 26, 545-553, 1976.

Rockey, D. D., J. L. Fryer and J. S. Rohovec: Separation and in vivo analysis two extracellular protease and the T-hemolysin from *Aeromonas salmonicida*. *Dis. Aquat. Org.*, 5: 197-204, 1998.

Secombes, C. J.: The nonspecific immune system: cellular defenses. In: Iwama, G. and T. Nakanishi editor. *The fish immune system: organism, pathogen and environment*. San Diego: Academic Press., 105-157, 1996.

Wai, S. N., Y. Miszunoe, A. Takade, S. I. Kawabata and S. I. Yoshida: *Vibrio cholerae* O1 strain TSI-4 produces the exopolysaccharide materials that determine colony morphology, stress resistance and biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 3648-3655, 1992.

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

Yoshida, T., M. Endo, M. Sakai and V. Inglis: A cell capsule with possible involvement in resistance to opsonophagocytosis in *Enterococcus seriolicida* isolated from yellowtail *Seriola quinqueradiata*. Dis. Aquat. Org., 29: 233-235, 1997.

Zhang, X. H. and B. Austin: Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonids. J. Fish Dis., 23: 93-102, 2002.

Zlotkin, A. H. Hershko and A. Eldar: Possible transmission of *Streptococcus iniae* from wild fish to cultured marine fish. Appl. Environ. Microbiol., 64: 4065 - 4067, 1998.

우승호: 해수 양식 어류에서 분리된 연쇄상구균의 종류와 병원성. 부경대학교, 석사 학위 논문, 2002.

