



넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 *Streptococcus parauberis* 감염에 아목시실린과 비타민C 복합제가 미치는 영향

전려진* · 김승민** · 박현경* · 이다원* · 정준범†

*제주대학교(학생) · **주식회사 우진비앤지(과장) · †제주대학교(교수)

Effect of a Combination of Amoxicillin and Vitamin C on the Infection with *Streptococcus parauberis* in Olive flounder, *Paralichthys olivaceus*

Lyu-Jin JUN* · Seung-Min KIM** · Hyun-Kyung PARK* · Da-Won LEE* · Joon-Bum JEONG†

*Jeju National University(student) · **Central Research Institute, Woo Gene(Manager) · †Jeju National
University(professor)

Abstract

We determined the effects of amoxicillin and vitamin C complex (Amox-vitamin C) on olive flounder, *Paralichthys olivaceus* infected by *Streptococcus parauberis*. The minimum inhibitory concentration (MIC) value of Amox-vitamin C and amoxicillin regarding 15 strains of *S. parauberis* were lower than 1.56 μ g/mL. Olive flounder were orally administered Amox-vitamin C (240 mg/kg) (Amox-vitamin C group) or amoxicillin (240 mg/kg) (Amox group) for 5 days after intraperitoneal injection with *S. parauberis* (1×10^5 CFU/fish). The cumulative mortalities of Amox-vitamin C group and Amox group for the one month period were 16% and 20%, respectively. The cumulative mortality of olive flounder intraperitoneally injected with *S. parauberis* as the positive control was 100%. There was no mortality even after 30 days observation in negative control group.

Key words : Amoxicillin, Vitamin C, *Streptococcus parauberis*

I. 서론

양식어류의 연쇄구균병은 넙치를 포함하여 방어, 조피볼락, 무지개송어 등 다양한 어종에서 발병하며, *Lactococcus garvieae*, *L. piscium*, *Streptococcus iniae*, *S. difficilis*, *S. parauberis* 등이 주요 원인체로 알려져 있다(Kusuda and Salati, 1993; Austin and Austin 1999).

최근 국내에서는 *S. parauberis*가 다양한 지역의 양식 넙치로부터 높은 비율로 검출되고 있음

며(Cho et al., 2008), 감염된 넙치는 체색흑화, 피부궤양, 지느러미출혈, 안구돌출과 출혈, 안구백탁 및 탈장 등의 외부증상을 나타낸다(Kang et al., 2007). 항생물질은 사람이나 동물의 질병 발생을 예방하거나 치료를 목적으로 사용되어 왔으며, 일반적으로 어류 세균성 질병에 대한 대처 방법으로 항생제가 사용되고 있다(Tollefson et al., 1997; Gaskins et al., 2002).

아목시실린(amoxicillin; Amox)은 페니실린계열 반합성 항생물질로 그람양성과 그람음성 세균

† Corresponding author : 064-754-3426, jeongjb@jejunu.ac.kr

* 이 논문은 2018학년도 제주대학교 교원성과지원사업에 의하여 연구되었음.

등에 작용하는 광범위한 항생제로 세균의 세포벽 합성에 관여하는 transcarboxylpeptidase와 transpeptidase에 작용하여 세균의 세포벽 합성을 억제함으로써 항균력을 갖게 된다(Brown and Grant, 1992, 1993; Inglis et al., 1992, 1993). 주로 양식어류에 발생하는 유결절증, 비브리오병, 연쇄상구균병 및 에드워드병에 치료제로 사용되고 있다(Lambert and O'Grady, 1992).

비타민 C (Vitamin C)는 콜라겐 형성에 필수적인 영양소로 알려져 있으며, 콜라겐 형성에 중요한 hydroxyl proline과 hydroxylysine 생성을 위한 보조인자로 작용한다(Sandel and Daniel, 1988). 양어사료 내 비타민 C 첨가는 어류의 성장, 면역활성, 질병저항성 및 내성을 향상시키는 것으로 보고되었으며(Eo and Lee, 2008; Zhou et al., 2012), 비타민 C를 안전하게 사용하면 항생제를 적게 사용함으로써 항생제에 대한 부작용을 줄일 수 있다(Farber and Ross, 1950).

본 연구에서는 넙치의 주요 세균성 질병인 *S. parauberis* 균주에 대한 Amox-vitamin C 복합제의 항균활성을 관찰하기 위해 MIC 시험을 실시하였고, *S. parauberis* 균주에 감염된 넙치에 대한 임상효과 및 안전성을 조사함으로써 어류질병 치료 약제로서의 가능성을 확인하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험어

실험어는 제주도내 양식장에서 어류질병에 대한 감염 이력이 없는 넙치를 구입하여, 제주대학교 해양과학연구소로 운송시켜 1주일 간 시판 배합사료를 공급하면서 실험환경에 적응할 수 있도록 순치하였다. 넙치(평균체장 및 무게: 11.8±0.35cm, 11.9±0.42g)는 총 6개의 110 L 원형 플라스틱 수조에 각 수조당 30마리씩 나누어 주었다. 광주기는 형광등을 이용하여 12L:12D 조

건으로 유지되었고, 실험기간 동안의 사육 수온은 25±1℃를 유지시켰다.

2. 시험의약품의 투여 및 성장률

Amox-vitamin C 복합제는 동물용의약품으로 시판되고 있는 Komipharm사 (본 제제: 1kg 중 Amox 100g (역가), Vitamin C 10,000mg (역가); 용법: 어체중 1톤당 최소200g~최대800g)의 수산용 혼합 분제를 구입하여, Jung et al., (2008)의 방법에 따라서 시판되는 배합사료에 Amox-vitamin C를 940 mg/kg (최대 권장량)이 되도록 조제하여 5일간 경구투여 한 후(1일 1회, 만복공급), 30일간 대조구와 동일한 배합사료를 제공하여 5일 간격으로 어체 증체량 및 안전성을 조사하였다.

통계분석은 SPSS (Ver 21) 통계분석 프로그램을 활용하여 *t-test*로 분석하였으며, $p < 0.05$ 에서 유의성을 판단하였다.

3. 사용 균주

본 실험에 사용된 *S. parauberis* 균주는 제주의 넙치 양식장들로부터 분리한 총 15개의 분리주이며(<Table 1>), 분리된 균주는 colony의 형태적 특성, Gram-stain 및 *Streptococcus* sp.의 선택배지의 증식여부를 확인 후, PCR법을 이용하여 *S. parauberis* 균주임을 확인하였다.

4. 최소억제농도 측정

Amox-vitamin C의 항균활성을 관찰하기 위해서 vitamin C가 포함되지 않은 수산용 분제 Amox group (본 제제: Amox 100g (역가), Komipharm)을 추가적으로 설정하여 차이점을 관찰하였고, 각각의 농도는 0.98 ~ 500 µg/mL로 96-well plate와 Muller-Hinton Broth 배지(Difco Co., USA)를 이용한 표준 2배 희석 방법으로 측정하였다(Lee et al., 2003). 25℃에서 18시간 배

양한 후 세균의 증식에 따른 액체 배지의 혼탁도를 관찰하여 세균이 자라지 않는 항생제의 최저 농도를 MIC값으로 결정하였다.

<Table 1> *Streptococcus parauberis* strains used in this study

Strains	Origin
MS 1	Flounder, Jeju, 2004
MS 2	Flounder, Jeju, 2005
MS 3	Flounder, Jeju, 2005
MS 4	Flounder, Jeju, 2005
MS 5	Flounder, Jeju, 2006
MS 6	Flounder, Jeju, 2007
MS 7	Flounder, Jeju, 2007
MS 8	Flounder, Jeju, 2012
MS 9	Flounder, Jeju, 2012
MS 10	Flounder, Jeju, 2012
MS 11	Flounder, Jeju, 2012
MS 12	Flounder, Jeju, 2013
MS 13	Flounder, Jeju, 2013
MS 14	Flounder, Jeju, 2013
MS 15	Flounder, Jeju, 2013

S. parauberis
(n=15)

5. 임상실험

총 4개의 실험구 중 3개에는 *S. parauberis* (1×10^6 CFU/mL)를 0.1mL씩 복강 주사한 후, 다음날에 2개의 실험구에는 수산용 분제 Amox를 240mg (최소권장량)과 수산용 혼합분제 amox-vitamin C (240mg)를 각각 5일간 경구투여한 후, 30일간 일반 배합사료를 공급하였다 (Amox group, Amox-vitamin C group). 또한, 양성 대조구로서 *S. parauberis*를 접종하였고, 음성 대조구로서 PBS를 접종한 후(<Table 2>), 30일간 일반 배합사료를 공급하였다. 모든 그룹은 1일 1회 반복 공급하였고, 수온은 25°C를 유지하였으

며, 30일간 폐사를 관찰하였다.

<Table 2> Challenge experiments were performed by injecting olive flounder, *Paralichthys olivaceus* intraperitoneally with 0.1mL of *Streptococcus parauberis* (1×10^6 CFU/mL).

Group	Way of dealing	Numbers of fish
Negative control	Intraperitoneally injected with phosphate buffered saline (PBS)	30
Positive control	Intraperitoneally injected with <i>S. parauberis</i>	30
Amox group	Orally administered amox (240 mg/kg) for 5 days after intraperitoneal injection with <i>S. parauberis</i>	30
Amox-Vit amin C group	Orally administered amox-vitamin C (240 mg/kg) for 5 days after intraperitoneal injection with <i>S. parauberis</i>	30

III. 결과 및 고찰

본 연구에서는 Amox-vitamin C 복합체가 넙치의 세균성 감염에 미치는 영향과 대상생물에 대한 안전성을 확인하기 위하여 *S. parauberis* 균주를 대상으로 최소억제농도 시험을 실시하였고, 넙치의 안전성 및 임상실험을 수행하였다.

Amox-vitamin C를 940mg 첨가하여 5일간 경구 투여한 후 30일간 대조구와 동일한 배합사료를 제공하여 5일 간격으로 어체중 변화를 조사한 결과, 투여 25일 이후 amox-vitamin C group이 대조구보다 유의적으로 증가하였고(<Table 3>), 실험기간 동안 대조구와 amox-vitamin C groups에서 특이한 증상 및 폐사는 관찰되지 않았다(data not shown).

Amox-vitamin C의 효능을 조사하고자, vitamin C가 포함되지 않은 amox group을 추가하여 최소억제농도를 측정된 결과, amox-vitamin C group에 대한 최소억제농도 값이 amox group보다 효

과가 우수한 것으로 나타났다(<Table 4>).

<Table 3> Growth performance of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets for 5 days, with checks every 5 days. The experiments were accomplished for 30 days.

Group	After commencing dose of drug					
	5 days	10 days	15 days	20 days	25 days	30 days
Control	14.2± 0.8g	14.4± 1.0g	15.7± 1.2g	16.1± 0.9g	16.5± 0.5g	17.1± 1.3g
Amox-vitamin C	15.2± 0.1g	16.3± 1.7g	17.8± 2.7g	18.5± 1g	19.8± 0.7g*	21.2± 0.8g*

*Significant difference between control group and amox-vitamin C group based on the *t*-test ($p < 0.05$)

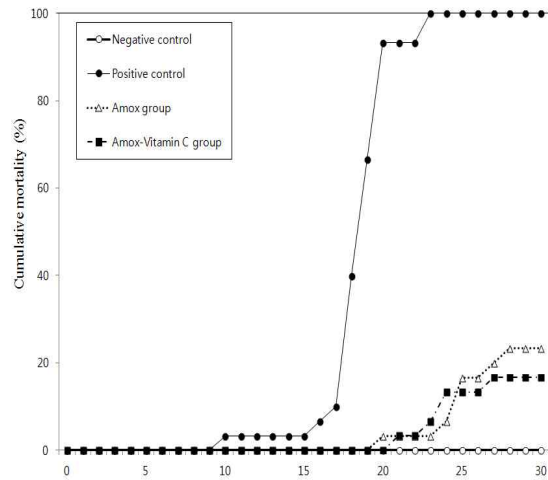
그러나, 두 그룹 모두 *S. parauberis* 15균주에 대한 최소억제농도의 값이 1.56 $\mu\text{g/mL}$ 이하로 CLSI의 민감수준(MIC $\leq 2 \mu\text{g/mL}$)에 유효한 항균제임이 확인되었고, 이는 폐니실린 항생제 중 세균에 대한 항균효과가 우수한 amox와 항생물질의 효과를 증가시키고 보조적인 역할을 하는 vitamin C의 결합으로 인해 단독으로 사용한 amox보다 효과가 우수한 것으로 사료된다.

본 연구에서 사용된 amox-vitamin C의 항균력을 조사하고자 총 4개의 실험구로 나눠 *S. parauberis*에 감염된 넙치에 각각의 항생제(240mg)를 조제하여 5일간 경구 투여 후 30일간 폐사율을 관찰한 결과, Amox group과 Amox-vitamin C group에서는 각각 20%, 16%의 누적 폐사율이 관찰되었다(Fig. 1). 또한, 양성 대조구에서는 10일째부터 폐사를 보이기 시작하여 23일째에 100% 누적 폐사하였고, 음성대조구에서는 실험 기간 동안 폐사가 발생하지 않았다(Fig. 1). Amox-vitamin C는 권장되는 최소 농도에서도 *S. parauberis* 치료에 효과가 있다는 것을 나타내었으며, 양식현장에서는 시험의약품 기준을 준수하여 적절하게 사용되어야 할 것이다.

<Table 4> Minimum inhibitory concentration (MIC) value of Amox-vitamin C and Amox regarding 15 strains of *Streptococcus parauberis*

Group	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)							
	3.12	1.56	0.78	0.39	0.19	0.09	P	N
Amox	0/15	0/15	6/15	13/15	13/15	14/15	15/15	0/15
Amox-Vitamin C	0/15	0/15	0/15	9/15	13/15	14/15	15/15	0/15

*Positive/Total



[Fig. 1] Cumulative mortality of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* intraperitoneally infected with *S. parauberis*.

본 연구에서는 amox-vitamin C 복합제를 사용하였을 때 넙치에 발병하는 *S. parauberis* 균주에 대한 효능을 조사하였으며, amox-vitamin C 복합제가 세균에 대하여 강력한 항균력을 나타낸다는 것을 확인하였고, 향후에는 이러한 복합제에 대한 내성균의 출현을 사전 방지하고 유효성 검증을 위해 어류 내 항생제 잔류량 검사가 필요할 것으로 여겨진다.

References

- Austin B and Dawn AA(1999). Gram positive bacteria the lactic acid bacteria. In *Bacteria Fish Pathogens. Disease in Farmed and Wild Fish*, 3th ed. Springer, UK, 38-49.
- Brown AG and Grant AN(1992). Use of amoxycillin by injection in Atlantic salmon broodstock. *Vet Rec* 131, 237.
- Brown AG and Grant AN(1993). Clinical efficacy of injectable amoxycillin against furunculosis in Atlantic salmon broodstock. *Vet Rec* 133-373.
- Cho MY, Lee JI, Kim MS, Choi HJ, Lee DC and Kim JW(2008). Isolation of *Streptococcus parauberis* from starry flounder, *Platichthys stellatus* Pallas. *J Fish Pathol* 21, 209-217.
- Eo JE and Lee KJ(2008). Effect of dietary ascorbic acid on growth and non-specific immune responses of tiger puffer, *Takifugu rubripes*. *Fish Shellfish Immunol* 25, 611-616.
- Farber JE and Ross J(1950). Antibiotic anaphylaxis a note on the treatment and prevention of severe reactions to penicillin, streptomycin and dihydrostreptomycin. *Med times* 49, 352-353.
- Gaskins HR, Collier CT and Anderson DB (2002). Antibiotics as growth promotants: mode of action. *Anim Biotechnol* 13, 29-42.
- Inglis V, Palmer R, Shatwell JP, Branson EJ and Richards RH(1993). Amoxicillin concentrations in the serum of Atlantic salmon (*Salmosalar L.*) during furunculosis therapy. *Vet Rec* 133, 617-621.
- Inglis V, Soliman MC, Ciapara IH and Richards RH(1992). Amoxicillin in the control of furunculosis in Atlantic salmon parr. *Vet Rec* 131, 45-48.
- Jung SH, Choi DL, Kim JW, Jo MR, Seo JS and Jee BY(2008). Pharmacokinetics of oxytetracycline in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) by dipping and oral administration. *J Fish Pathol* 21, 107-117.
- Kang CY, Kang BJ, Moon YG, Kim KY and Heo MS(2007). Characterization of *Streptococcus parauberis* isolated from cultured Olive flounder, *Paralichthys olivaceus* in the Jeju Island. *J Fish Pathol* 20, 109-117.
- Kusuda R and Salati F(1993). Major bacterial diseases affecting mariculture in Japan. *Annu Fish Dis* 3, 9-85.
- Lambert HP and O'Grady FW(1992). Antibiotics and chemotherapy. In *Veterinary medicine*, 6th ed., Churchill Livingstone. New York. U.S.A. 130-139.
- Lee EW, Chen JC, Huda MN, Kuroda T, Mizushima T and Tsuchiya T(2003). Functional cloning and expression of *emeA*, and characterization of *emeA*, a multidrug efflux pump from *Enterococcus faecalis*. *Biol Pharm Bull* 26, 266-270.
- Sandel LJ and Daniel JC(1988). Effect of ascorbic acid on collagen in RNA levels in short term chondrocyte cultures. *Connect tissue Res* 17, 11-22.
- Tollefson L, Altekruze SF and Potter ME(1997). Therapeutic antibiotics in animal feeds and antibiotic resistance. *Rev Sci Tech* 16, 709-715.
- Zhou Q, Wang L, Wang H, Xie F and Wang T(2012). Effect of dietary vitamin C on the growth performance and innate immunity of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Fish Shellfish Immunol* 32, 969-975.

-
- Received : 17 February, 2018
 - Revised : 20 March, 2018
 - Accepted : 05 October, 2018