



2016년도 제주지역 양식 넙치(*Paralichthys olivaceus*)에서 분리된 어병세균의 tetracycline 내성유전자 분포

이다원 · 전려진 · 정준범[†]
(제주대학교)

Distribution of Tetracycline Resistance Genes in Pathogenic Bacteria Isolated from Cultured Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*) in Jeju in 2016

Da-Won LEE · Lyu-Jin JUN · Joon-Bum JEONG[†]
(Jeju National University)

Abstract

Aquaculture practices to ensure greater production, such as high density breeding and excessive feeding, are become stressors that raise the prevalence of diseases. Accordingly, increasingly large volumes of antibiotics are used more frequently each year. Long term use antibiotics can generate resistant bacteria, which interrupt treatments and cause a potential transfer to human bodies. Thus, antibiotic resistance is of importance in public health. Tetracycline (Tc) is one of the typical medicines used in the aquaculture drugs, which has a wide range of application including gram-positive and gram-negative bacteria. In the examination of 153 strains isolated from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) farms located in Jeju in 2016, it turned out that a total of 84 strains were resistant to Tc or oxytetracycline (OTC). The extent to which the strains are resistant to Tc and OTC was confirmed through MIC test, mostly within the range of 25 to 100 $\mu\text{g/ml}$. Twelve different types of *tet* genes were detected using single and multiplex PCR in the 84 Tc-resistant strains. The PCR was used to find *tet*(K), *tet*(M), *tet*(O), and *tet*(S), which are known to exist primarily in gram-positive strains. According to the results, *tet*(S) is the most dominant gene in 49 strains of *Streptococcus parauberis*, accounting for 63.2%. And there were two strains that have two different types of resistant genes. The multiplex PCR was used to detect *tet*(A), *tet*(B), *tet*(C), *tet*(D), *tet*(E), and *tet*(G), which are commonly found in gram-negative strains. Each of *tet*(B), *tet*(D), and *tet*(B)&(M) was found in a strain presumed to be *Vibrio* sp., and only *tet*(D) was found in 10 *Edwardsiella tarda* strains.

Key words : Olive flounder, Resistance, Tetracycline, Oxytetracycline, *Streptococcus parauberis*

I. 서론

우리나라의 어류 양식 산업은 1980년대부터 시작하여 지속적으로 성장해왔으며, 제주도 내 넙

치 양식은 2015년 27,142톤으로 우리나라 넙치 생산량의 절반 이상을 차지하고 있는 대표적 양식 대상어종이다(KOSIS, 2016). 지속적인 양식 산업의 성장으로 인해 수산생물의 생산량이 증가하

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

* 이 논문은 2016학년도 제주대학교 교원성과지원사업에 의하여 연구되었음.

면서 고밀도 사육 등의 이유로 수산생물의 질병 발생률도 함께 증가하고 있으며, 양식현장에서 생산성 향상과 감염증 치료 등의 목적으로 수산용의약품의 사용량 및 사용빈도는 매년 증가하고 있다(Kim et al., 2014). 이러한 항생제의 사용은 항생제 내성균 발생, 다제 내성균의 출현, 약물 잔류에 의한 안전성 및 약물의 유실로 인한 환경 오염 등의 문제를 야기할 수 있다. 수년간 항생제의 오남용으로 인해 발생한 내성균으로 감염증 치료의 어려움이 있어 최근에는 예방대책으로 백신의 개발 및 천연물질을 사용하여 어체 내 생리활성 증가시키는 등의 방법이 나오고 있으나, 아직까지 많은 양식현장에서 항생제가 사용되고 있다(Kim et al., 2009; Jee et al., 2014).

테트라사이클린(Tc)은 대표적인 수산용의약품 중 하나로, 호기성 그람양성 및 그람음성균, *Richettsia*, *Mycoplasma*, *Chlamydia*, 말라리아 등 여러 감염증에 작용하는 광범위 항생제로 알려져 있다. 테트라사이클린, 옥시테트라사이클린, 클로르테트라사이클린 등은 구조적으로 유사하고 약리작용 및 독성이 거의 동일하여 테트라사이클린계 항생제로 통합하여 평가 및 관리되며, 테트라사이클린계 항생제의 세포벽 합성 억제 작용기작은 세균 ribosome의 30S subunit에 결합하여, acceptor 부위에 aminoacyl tRNA가 mRNA와 결합하는 것을 방해하는 방법으로 단백질 합성을 억제시켜 정균작용을 나타낸다. 테트라사이클린에 대해 내성을 갖는 세균은 1950년대 처음으로 확인된 이후 현재 다양한 세균에서 내성이 증가하여 감염증 치료에 사용하기 어려운 경우가 많아졌다. 테트라사이클린계 항생제의 내성 발생 기작은 3가지로 구분할 수 있으며, (1) 세포 내로 침투한 tetracycline을 에너지 의존성 유출(efflux)을 통해 세포 외로 배출하여 ribosome에 축적되지 않게 하는 기작(efflux pump), (2) 단백질 합성을 위해 ribosome에 결합하는 것을 돕는 보호 단백질을 생산하는 기작(ribosomal protection), (3) 대사효소를 활성화시켜 tetracycline을 불활성화

시키는 기작(enzymatic activation)으로 *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(E)*, *tet(G)*, *tet(H)*, *tet(I)*, *tet(J)*, *tet(K)*, *tet(L)* 및 *tet(Z)*는 efflux pump에 관여하며, *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(S)*, *tet(T)* 및 *tet(W)*는 ribosomal protection, *tet(X)*는 효소적 기능에 관여하는 것으로 알려져 있다(Chopra and Roberts, 2001; Levy et al., 1999).

항생제 내성균의 증가는 질병 치료의 어려움뿐 아니라 축산물이나 수산물을 통해 항생제 내성균이 사람으로 전달될 위험이 높은 것으로 알려져 항생제 내성문제는 공중보건학적으로 중요하게 대두되고 있으며, 항생제 사용 및 세균의 항생제 내성 현황 조사는 치료용 항생제의 선택과 내성균의 증가를 막기 위한 대책수립의 기초 자료로 필요하나 최근 국내의 항생제 내성경향 및 내성유전자 조사는 축산 위주로 이루어지고 있다(Kim et al., 2013; Lee et al., 2009). 어류의 항생제 내성경향과 내성 유전자의 분포에 대한 최근의 연구는 이루어지지 않고 있는 실정이며, 특히 우리나라 넙치 생산량의 대부분을 차지하고 있는 제주지역에 대한 항생제 내성경향 및 내성 유전자 연구 역시 부족한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 제주도 양식 넙치에서 분리한 세균들을 대상으로 항생제 내성 현황과 테트라사이클린의 내성 정도 및 PCR을 통한 Tc 내성 유전자의 분포 및 종류를 살펴보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 균 분리 및 동정

2016년 제주도 내 넙치 양식장에서 질병에 감염된 것으로 추정되는 넙치로부터 균을 분리하여, 실험균주로 사용하였다. 분리균은 tryptic soy agar (TSA, Difco, USA) 또는 brain heart infusion agar (BHIA, Difco, USA) 배지상에서 증식되었으며, 균의 동정을 위해 선택배지인 thiosulfate citrate bile salts sucrose (TCBS) agar (Difco, USA),

Salmonella Shigella (SS) agar (MB cell, Korea), glutamate starch phenol-red agar (GSP, Sigma-Aldrich, Korea), Blood agar 배지에 시료의 내부 장기를 도말하고, 27°C에서 18~24시간 배양하였다. *Vibrio* sp. 균주의 구분을 위해 비브리오 선택배지인 TCBS 평판배지 상에서 초록색 또는 노란색 집락의 집락을 형성한 것으로 규정하였으며, *Edwardsiella tarda* 균은 선택배지인 SS 배지에서 검은색 집락을 형성하는 것으로 규정하였다. 또한, 균주의 세부적인 종 동정은 PCR 방법을 사용하여 확인하였다. 종 동정에 사용한 PCR primer sets는 <Table 1>에 나타내었다. 순수분리된 균주는 20% glycerol (Sigma, USA)을 첨가한 후 실험에 사용하기 전까지 -80°C에서 보관하였다.

2. 항생제 감수성 시험

분리된 균주는 증균을 위해 tryptic soy broth (TSB, Difco, USA)를 사용하였으며, 27°C에서 18~24시간동안 배양하여 실험에 사용하였다. 배양액은 멸균한 면봉을 이용하여 mueller hinton agar (MHA, Difco, USA) 평판에 도말한 후 항생제디스크를 평판에 고착시켰다. 실험에 사용된 항생제디스크는 amoxicillin, ampicillin,

amoxicillin/clavulanic acid, ciprofloxacin, doxycycline, norfloxacin, ofloxacin, gentamycin, minocycline, nalidixic acid, oxolinic acid, oxytetracycline, tetracycline, chloramphenicol, erythromycin, kanamycin, neomycin, penicilline, streptomycin으로 총 19종을 대상으로 실험을 실시하였으며, 모두 Liofilchem®로부터 구입하여 사용하였다. 디스크를 고착시킨 MHA는 27°C에서 18~24시간 배양 후 균의 증식 억제대를 확인하였다.

3. MIC (Minimum inhibitory concentration)

균주들의 tetracycline과 oxytetracycline에 대한 내성 정도는 broth dilution 방법을 적용하여 MIC값으로 나타냈다. MIC값 측정을 위하여, 96 well plate에 mueller hinton broth (MHB, Difco, USA) 160 µl, 단계별로 희석한 항생제 20 µl, 10⁵~10⁶으로 희석시킨 균 배양액 20 µl를 넣고, positive control에는 MHB 180 µl과 균 배양액 20 µl를 넣었으며, negative control에는 MHB 200 µl만 넣었다. Plate를 27°C에서 18~24시간 배양한 후, 균의 증식여부에 따른 액체배지의 혼탁도를 육안으로 확인하여 균이 자라지 않은 최소농도를 MIC값으로 결정하였다.

<Table 1> Primers used for the detection of bacteria in this study

Primer	Oligonucleotide Sequences (5' to 3')	Amplicon size (bp)	Pathogen	Reference
pSP-1	5'-TCCAGTCTTTTCGACCTTCTT-3'	220 bp	<i>Streptococcus parauberis</i>	Woo et al., 2006
pSP-2	5'-CAAAGAGATGTTTCGGCTTG-3'			
pSI-1	5'-AAGAGACGCAGTGTCAAAAAG-3'	107 bp	<i>Streptococcus iniae</i>	
pSI-2	5'-CGTTTCTTATCTTGTTACTC-3'			
pLG-1	5'-AAGCAGTCTTTTGATGCAAG-3'	307 bp	<i>Lactococcus garvieae</i>	
pLG-2	5'-ACTGTGCGCCCTTATTAAGT-3'			
E-1	5'-CGGTAAAGTTGAGTTTACGGGTG-3'	415 bp	<i>Edwardsiella tarda</i>	Sakai et al., 2007
E-2	5'-TGTAACCGTGTGGCGTAAG-3'			

4. DNA 추출

PCR을 위한 template DNA는 Higene™ Genomic DNA prep kit (BIOFACT, Korea)를 사용하였다. 먼저 DNA의 추출을 위하여, 균을 TSB에 접종하고 27°C에서 18~24시간 배양한 후 배양액 1.5 ml를 1.5 ml microtube에 넣고, 10,000 rpm에서 1분간 원심분리하여 pellet을 수집하였다. Cell Re-Suspension Solution 300 µl를 넣어 pellet을 현탁시킨 후, lysozyme 2 µl를 첨가하여 37°C에서 1시간 반응시켰다. 반응 후 13,000 rpm에서 1분간 원심분리하고, Cell Lysis Solution 300 µl를 넣어 pellet을 현탁시키고, RNase A 1.5 µl를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 실온에서 식힌 후 Protein Precipitation Solution 100 µl를 넣고, 강하게 vortex하여

13,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상층액을 100% Isopropanol 300 µl가 들어있는 새 microtube에 넣고 50회 inverting하여 13,000 rpm에서 1분간 원심분리하였다. 상층액을 제거한 후 80% ethanol로 2번 세척하고, 15분간 상온에서 건조시킨 후, DNA Hydration Solution 50 µl를 넣고 5초간 vortex하여 DNA를 추출하였다. 분리된 DNA는 실험에 사용하기 전까지 -20°C에서 보관하였다.

5. PCR 및 Multiplex PCR

본 연구에서는 12종류의 Tc 내성 유전자에 대하여 PCR 방법으로 분석하였으며, 사용된 primer sets는 <Table 2>에 나타내었다.

<Table 2> Primers and expected sizes of PCR amplicons of various *tet* genes

Gene	Primer	Oligonucleotide Sequences (5' to 3')	Amplicon size (bp)	Reference
<i>tet</i> (A) to <i>tet</i> (G)	TETF	GCGCTNTATGCGTTGATGCA		Jun, 2003
<i>tet</i> (A)	TAR2	ACAGCCCGTCAGGAAATT	387 bp	
<i>tet</i> (B)	TBR	TGAAAGCAAACGGCCTAA	171 bp	
<i>tet</i> (C)	TCR3	CGTGCAAGATTCCGAATA	631 bp	
<i>tet</i> (D)	TDR3	CCAGAGGTTTAAAGCAGTGT	489 bp	
<i>tet</i> (E)	TER	ATGTGTCCTGGATTCCT	246 bp	
<i>tet</i> (G)	TGR3	ATGCCAACACCCCGGCG	803 bp	
<i>tet</i> (K)	TKF	GTAATGGTACCTGGTAAATC	329 bp	Kim, 2004
	TKR	CTATTACCTATTGTCGCTAC		
<i>tet</i> (L)	TLF	GATCGATAGTAGCCATGG	480 bp	
	TLR	CTTCTATCAACAAGTATC		
<i>tet</i> (M)	TMF	GAATCTGAACAATGGGAT	1,099 bp	Jun, 2010
	TMR	CTAACAAATTCTGTCCAGC		
<i>tet</i> (O)	TOF	AGACGGAGCAGTATTAG	200 bp	
	TOR	CTGCCAACCTTTTGCTTCAC		
<i>tet</i> (Q)	TQF	GACTCTATGGATATAGAG	835 bp	
	TQR	CCATATCCTCTACAATCG		
<i>tet</i> (S)	TSF	CATAGACAAGCCGTTGACC	667 bp	
	TSR	ATGTTTTTGGAACGCCAGAG		

이전의 연구에서 efflux 기능을 수행하는 *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(E)*, *tet(G)*를 검출하기 위해 제작된 1개의 forward primer와 각 *tet* gene에 따른 여섯 개의 reverse primers (Jun, 2003), *tet(K)*, *tet(L)*을 검출하기 위한 primer sets (Kim, 2004), 그리고 ribosomal protection의 기능을 수행하는 *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(Q)* 및 *tet(S)*를 검출하기 위한 primer sets (Jun, 2010)를 사용하였다<Table 2>.

Multiplex PCR 분석을 위하여, 0.2 ml microtube에 1 µM의 각 primer, 2.5 µM의 각 dNTP, 10x G-Taq Buffer, 2.5 U G-Taq DNA polymerase (Gene Pro Thermal Cycler Cosmo, Korea) 및 세균의 template DNA를 첨가한 후, distilled water로 최종 volume이 20 µl가 되도록 하였고, 이전에 보고된 각각의 Tc 내성 유전자에 대해 특이적으로 반응하는 단일 forward primer와 6개의 reverse primers를 넣어 실시하였다.

PCR 분석을 위하여, 0.2 ml microtube에 1 µM의 각 primer, 2.5 µM의 각 dNTP, 10x G-Taq Buffer, 2.5 U G-Taq DNA polymerase (Gene Pro Thermal Cycler Cosmo, Korea) 및 template DNA를 첨가한 후 distilled water로 PCR 혼합물의 최종 volume이 20 µl가 되도록 하였다.

PCR 조건은 94°C에서 3분간 pre-denaturation시킨 후, 94°C에서 30초 denaturation, 55°C에서 30초 annealing, 72°C에서 30초 extension의 반응을 1 cycle로 하여, 30 cycles를 반응시켰다. 그리고 72°C에서 7분간 post-extension시켰다.

증폭산물은 1x TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA)를 전기영동을 위한 완충액으로 하여, 0.5 µg/ml ethidium bromide가 첨가된 1% agarose gel 상에서 전기영동 후, UV 검출기에서 band의 크기를 확인하여 Tc 내성 유전자의 종류를 확인하였다.

III. 결과

1. 균 분리 및 동정

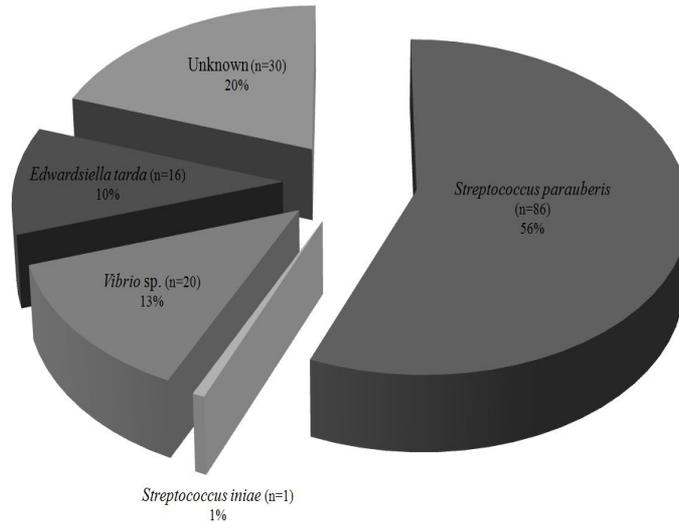
2016년 제주지역 넙치 양식장에서 질병에 감염된 것으로 추정되는 넙치로부터 총 153 균주를 분리하여 실험에 사용하였다. 분리균은 TSA와 BHIA 배지상에서 증식되었으며, 선택배지인 TCBS, SS, GSP, Blood agar를 사용하여 분류하였다. *Vibrionaceae*는 TCBS 배지상에서 초록색 혹은 노란색 집락을 형성하는 것으로 규정하였으며, *E. tarda* 균주는 SS 배지에서 검은색 집락을 형성하는 것으로 규정하였다. 또한, *Streptococcus* sp.에 대한 세부적인 동정을 위하여, 특이적인 primer sets를 사용하여 PCR을 실시하였다<Table 1>.

Streptococcus sp. 균주의 동정 결과, *S. parauberis* 86 균주, *S. iniae* 1균주가 분리되었으며, *Lactococcus garvieae*는 검출되지 않았다. 그리고 *Vibrio* sp.로 추정되는 20 균주, *E. tarda* 16 균주, 미 동정된 30 균주를 분리하여 실험에 사용하였다[Fig. 1 & 2].

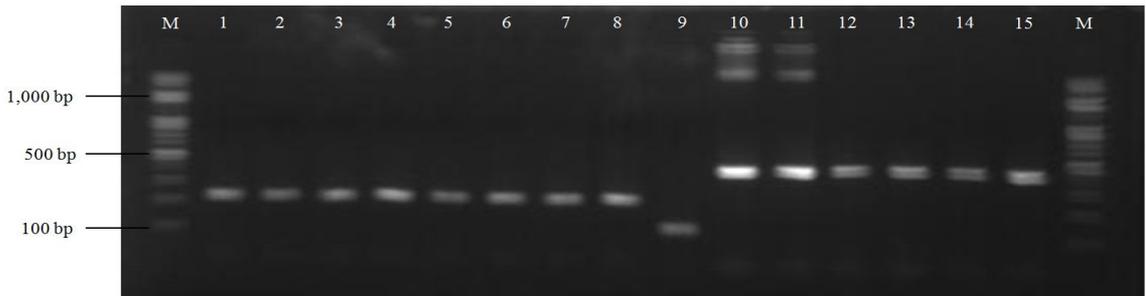
2. 항생제 감수성

제주도 내 넙치 양식장에서 분리한 *S. parauberis* 86 균주, *S. iniae* 1 균주, *Vibrio* sp. 20 균주, *E. tarda* 16 균주 및 동정되지 않은 30 균주[Fig. 1]에 대한 항생제 내성경향을 알아보기 위한 약제감수성 결과는 [Fig. 3]에 나타내었다. *S. parauberis* 86 균주는 nalidixic acid에 88.4%, oxolinic acid에 82.6%, tetracycline과 oxytetracycline에 각각 55.8%로 퀴놀론계 항생제와 테트라사이클린계 항생제에 대해 높은 내성률을 보였으며, erythromycin, streptomycin에는 30.2%와 44.2%의 내성률을 나타내었다. amoxicillin, ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid, ciprofloxacin, norfloxacin, ofloxacin, minocycline, chloramphenicol, kanamycin 등의 항생제에 대해서는 10% 이하의 낮은 내성률을 보였으며, 86 균주의 95.3%에 해당하는 82균주가 2종류 이상

2016년도 제주지역 양식 넙치(*Paralichthys olivaceus*)에서 분리된 어병세균의 tetracycline 내성유전자 분포



[Fig. 1] Number of bacterial isolates from cultured fish in Jeju



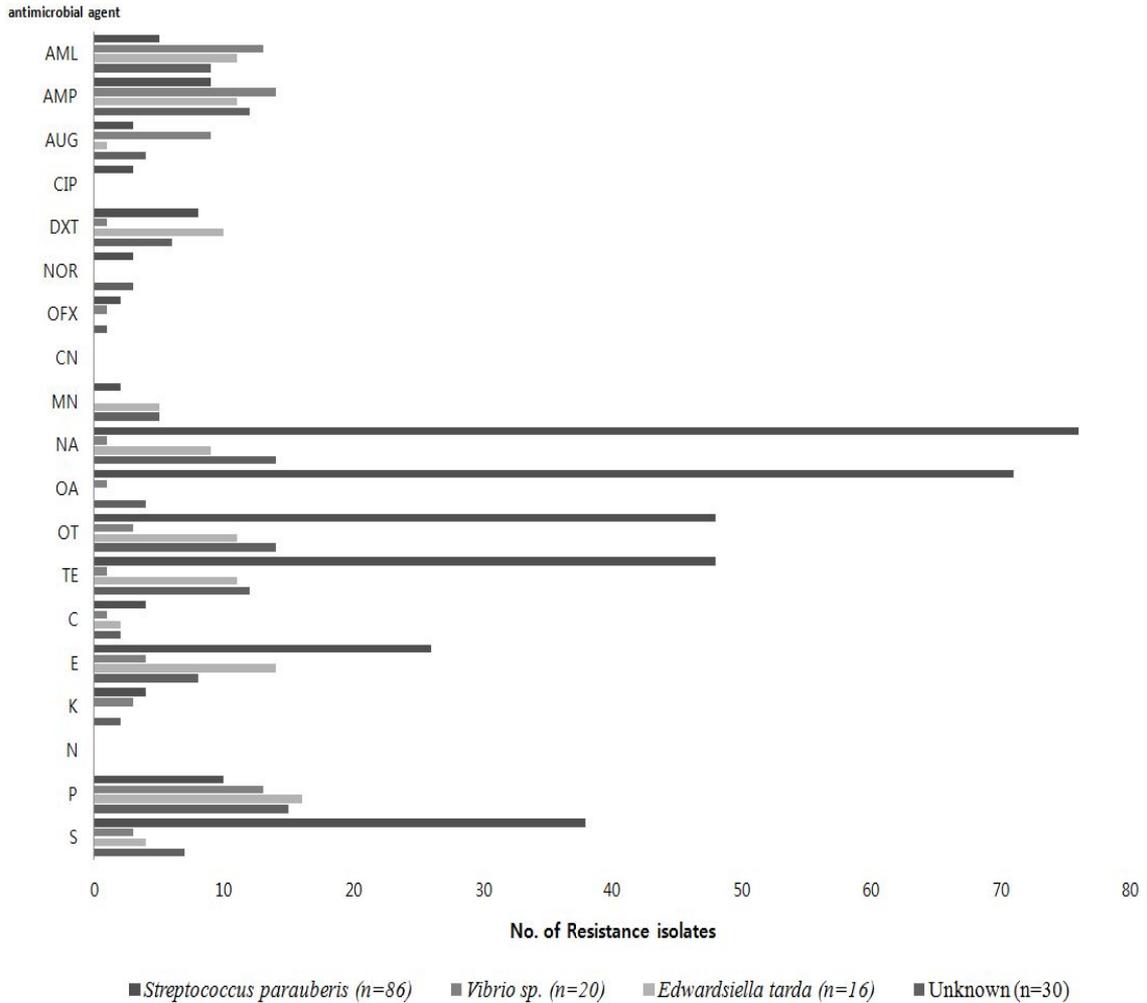
[Fig. 2] Amplification of bacterial DNA by PCR with pSP-1/pSP-2 primer set for *Streptococcus parauberis* (Lane 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8), pSI-1/pSI-2 primer set for *S. iniae* (Lane 9) and E-1/E-2 primer set for *Edwardsiella tarda* (Lane 10, 11, 12, 13, 14 and 15), respectively. M, 100 bp DNA ladder.

의 항생제에 대해 내성을 가지는 다제 내성균임을 확인하였다.

*Vibrio sp.*로 추정되는 20 균주에서의 내성률은 amoxicillin 65%, ampicillin 70%, penicillin 65%로 페니실린계 항생제에 대해 50% 이상의 내성률을 나타내었고, 다른 계열 항생제에 대한 내성률은 5~20%였으며, ciprofloxacin, norfloxacin, minocycline, gentamycin, neomycin의 항생제에는 감수성이 있

었다. 또한, 20 균주 중 90%가 페니실린계 항생제를 포함해 다른 항생제에 대해 내성을 가지는 다제 내성균이었다.

E. tarda 16 균주에 대한 내성 비율은 *Vibrio sp.*와 유사하게 penicillin, amoxicillin, ampicillin 등 페니실린계 항생제에서 68.8~100%였으며, erythromycin, tetracycline, oxytetracycline에 대해서도 50% 이상의 높은 내성 비율을 확인할 수



[Fig. 3] Antimicrobial resistance pattern of bacteria isolated from cultured fish in Jeju.

*AML, amoxicillin; AMP, ampicillin; AUG, amoxicillin/clavulanic acid; CIP, ciprofloxacin; DXT, doxycycline; NOR, norfloxacin; OFX, ofloxacin; CN, gentamycin; MN, minocycline; NA, nalidixic acid; OA, oxolinic acid; OT, oxytetracycline; TE, tetracycline; C, chloramphenicol; E, erythromycin; K, kanamycin; N, neomycin; P, penicillin; S, streptomycin

있었다. 실험에 사용된 *E. tarda* 16 균주 모두 2 종류 이상의 항생제에 내성을 나타내는 다제 내성균이었고, 실험에 사용된 모든 균주들은 gentamycin과 neomycin에 대해 감수성이 있었다.

3. MIC

약제감수성 결과에서 tetracycline이나 oxytetracycline에 대해 내성이 관찰된 균주는 *S.*

parauberis 57 균주, *Vibrio sp.* 3 균주, *E. tarda* 11 균주, 미 동정 13 균주로, Tc 내성 균주들과 감수성 있는 균주들의 내성수준은 MIC값으로 확인하였다. 그 결과, tetracycline과 oxytetracycline에 대해 감수성 있는 실험균주들의 MIC값은 0.78~1.56 µg/ml의 범위의 값을 나타내었으며(data not shown), 내성을 보이는 *S. parauberis* 57 균주 중 7 균주가 tetracycline에 대해 100 µg/ml 이상,

29 균주가 50 µg/ml, 20균주는 25 µg/ml 그리고 1 균주가 6.25 µg/ml의 MIC값을 나타내었으며, oxytetracycline에 대해서는 6 균주가 100 µg/ml 이상, 29 균주는 50 µg/ml, 18 균주에서 25 µg/ml, 4 균주가 12.5 µg/ml의 MIC값을 나타내었고, 두 항생제에 대한 *S. parauberis* 균주의 MIC값은 대부분 25~100 µg/ml의 범위에 속하였다<Table 3>. *Vibrio* sp. 3 균주 중 1 균주는 tetracycline과 oxytetracycline에 대해 100 µg/ml 이상의 MIC값을 나타내었고, 2 균주는 각각의 항생제에 대해 25 µg/ml, 50 µg/ml의 값을 나타내었다.

E. tarda 10 균주는 tetracycline과 oxytetracycline에 대하여 100 µg/ml 이상의 MIC값을 나타내었고, 1 균주는 tetracycline에 대해 25 µg/ml, oxytetracycline에 대해서는 50 µg/ml의 값을 가졌으며, 대부분의 *E. tarda* 균주는 100 µg/ml 이상의 높은 내성수준을 지니고 있었다.

또한, 미 동정된 13 균주에서는 tetracycline에 대해 10 균주가 25~100 µg/ml의 MIC값을 나타내었으며, 나머지 균주는 3.125~12.5 µg/ml의 범위에 속하였다. oxytetracycline에 대해서는 13 균주 모두 25~100 µg/ml의 MIC값을 나타내었으며, tetracycline보다 좁은 범위의 내성수준을 확인할 수 있었다.

4. Tetracycline 내성 유전자

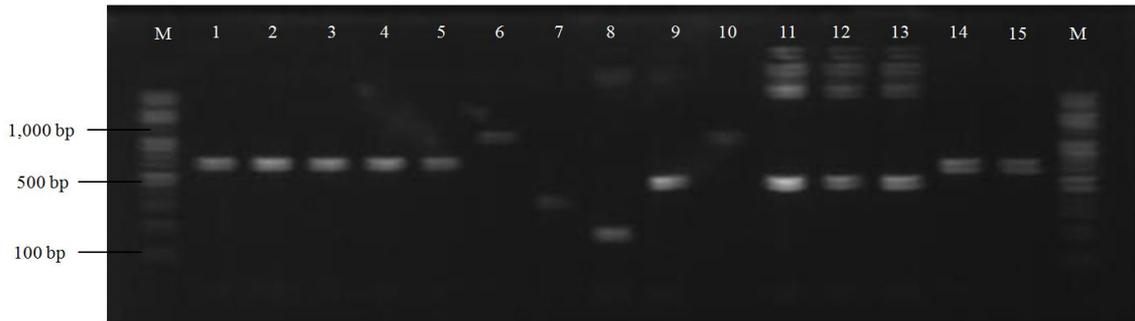
<Table 3> Minimum inhibitory concentrations (MICs) of tetracycline and oxytetracycline against bacteria isolated from cultured fish in Jeju (µg/ml)

Isolates	Concentration of Tc / OTC							
	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78
<i>S. parauberis</i> (n=57)	7 / 6	29 / 29	20 / 18	0 / 4	1 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0
<i>Vibrio</i> sp. (n=3)	1 / 1	0 / 2	2 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0
<i>E. tarda</i> (n=11)	10 / 10	0 / 1	1 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0
Unknown (n=13)	7 / 10	1 / 2	2 / 1	1 / 0	1 / 0	1 / 0	0 / 0	0 / 0

2016년 제주지역 양식장의 병어로부터 분리된 총 153균주에서 tetracycline과 oxytetracycline에 대해 내성을 보이는 총 84균주의 total nucleic acid를 사용하여 Tc 내성 유전자의 유무와 그 종류 및 분포를 조사하였다. 대부분 그람음성세균에서 나타난다고 보고된 *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(E)* 및 *tet(G)* 6종류의 *tet* gene을 검출하기 위한 multiplex PCR 결과, *E. tarda* 10균주에서 500 bp에 근접한 band를 확인할 수 있었다[Fig. 4]. 즉, 6종류의 *tet* gene 중 *tet(D)*가 많이 존재하였으며, *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(E)*, *tet(G)*는 검출되지 않았다<Table 4>. *Vibrio* sp.로 추정되는 균주에서는 *tet(B)*, *tet(D)*, *tet(B)&(M)*이 각각 1균주씩 검출되었으며, 각각의 *tet* gene에 대해서는 multiplex PCR뿐만 아니라 단독으로 PCR을 실시하였을 때에도 동일한 결과를 얻을 수 있었다.

그람양성균에서 주로 존재한다고 알려져 있는 *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(Q)*, *tet(S)*를 검출하기 위한 PCR 결과, *S. parauberis*에서는 *tet(S)*가 63.2%로 가장 많이 존재하였고, *tet(M)&(S)*, *tet(K)&(S)* 같이 2종류의 내성 유전자를 가지는 균주는 각각 1균주였으며, 나머지 *tet(L)*, *tet(O)*, *tet(Q)*는 검출되지 않았다.

미 동정 균주에서는 *tet(S)*가 21.4%로 나타났으며, 나머지 균주들은 본 연구에서 사용한 primer sets로는 확인할 수 없었다.



[Fig. 4] DNA amplification of *tet* genes in tetracycline resistant isolates from cultured fish in Jeju. Lane 1, 2, 3, 4 and 5, *tet*(S) in *Streptococcus parauberis*; Lane 6, *tet*(M) in *S. parauberis*; Lane 7, *tet*(K) in *S. parauberis*; Lane 8, *tet*(B) in *Vibrio* sp.; Lane 9, *tet*(D) in *Vibrio* sp.; Lane 10, *tet*(M) in *Vibrio* sp.; Lane 11, 12 and 13, *tet*(D) in *Edwardsiella tarda*; Lane 14 and 15, *tet*(S) in unidentified bacteria; M, 100 bp DNA ladder.

<Table 4> Detection of various *tet* genes in tetracycline resistant isolates from cultured fish in Jeju

Isolates	No. of isolates	<i>tet</i> genes
<i>S. parauberis</i> (n=57)	49	<i>tet</i> (S)
	1	<i>tet</i> (M)&(S)
	1	<i>tet</i> (K)&(S)
<i>Vibrio</i> sp. (n=3)	1	<i>tet</i> (B)
	1	<i>tet</i> (D)
	1	<i>tet</i> (B)&(M)
<i>E. tarda</i> (n=11)	10	<i>tet</i> (D)
Unknown (n=13)	3	<i>tet</i> (S)
total	67	

IV. 고찰

항생제는 양식현장에서 생산성 증가와 감염증 치료의 목적으로 사용되어지고 있으며, 항생제의 사용은 최근 내성균의 발생과 축산물이나 수산물을 통해 사람으로 내성이 전이되는 등의 문제가 제기되고 있어 공중보건학적 측면에서 중요하게 대두되고 있다.

2016년 제주지역 넙치 양식장의 병어로부터 *S.*

parauberis 86 균주, *S. iniae* 1 균주, *Vibrio* sp. 20 균주, *E. tarda* 16 균주, 미 동정 30 균주 총 153 균주를 분리하였다. 연쇄구균병의 원인체는 *S. parauberis*, *S. iniae*, *Lactococcus garvieae* 등으로 알려져 있으나, 최근에는 주로 *S. parauberis*의 검출빈도가 뚜렷하게 증가하는 추세이다.

분리된 균주들의 ampicillin, amoxicillin, ciprofloxacin, gentamycin, nalidixic acid, oxolinic acid, tetracycline, oxytetracycline, chloramphenicol,

erythromycin, kanamycin, streptomycin, penicillin 등을 포함한 19종의 항생제에 대한 약제감수성 결과, *S. parauberis*는 nalidixic acid, tetracycline 등의 항생제에 대해 내성률이 높았으며, 이는 *S. parauberis* 균주 중 67%가 oxolinic acid에 내성이 있었고, tetracycline에 대해서는 46.4%의 내성을 보였다는 보고(Kim et al., 2014; Kim et al., 2010)와 유사한 결과를 나타내었다. *S. parauberis* 균주는 minocycline과 doxycycline에 대해 tetracycline보다 낮은 내성률을 보였는데, 이는 minocycline이나 doxycycline이 tetracycline에 비해 사용된 시기가 짧고, 누적 사용량이 적어 낮은 내성 비율이 나타난 것으로 생각된다. *Vibrionaceae*는 종이 다양하여 TCBS 배지에서 초록색 또는 노란색 colony를 형성하는 것을 분리해 *Vibrio* sp.로 분류하였다. 이들은 ampicillin, amoxicillin 등의 페니실린계 항생제에 대해 높은 내성을 보였고, 페니실린계 이외의 항생제에 대해서는 대체적으로 낮은 내성률을 보였다. 이전 Son et al.(2005)과 Kim et al.(2010)이 다양한 *Vibrio* sp.가 ampicillin에 대해 90%가 넘는 높은 내성률을 보였다는 보고와 일치하였으며, tetracycline에 대한 내성 비율은 종마다 차이가 있는 것으로 보고되어 이후 세부적인 종 동정과 함께 조사가 더 필요할 것으로 여겨진다.

*E. tarda*에서는 penicillin, ampicillin, erythromycin, tetracycline 등 다양한 계열의 항생제에 높은 내성률을 나타내었고, ampicillin에 38.8%, tetracycline에 84.4%의 내성을 나타내었다는 이전의 보고(Kim et al., 2010; Kim et al., 2012)보다 본 연구에서의 ampicillin과 tetracycline에 대한 내성률이 높게 확인된 것은 항생제의 사용량이 감소하였을 때 내성률 또한 감소하는 양상을 보였다는 이전의 연구(Song et al., 2009)로 미뤄보았을 때, 양식현장에서 항생제의 사용량이 줄어들지 않고 여전히 지속적으로 사용되어짐을 시사하고 있다.

그리고 실험에 사용된 모든 균주들은

chloramphenicol, ciprofloxacin, norfloxacin, ofloxacin 등의 항생제에 대해 감수성이 있거나 매우 낮은 내성률을 보였는데, 이와 같은 결과는 chloramphenicol, fluoroquinolone 계열의 항생제가 동물에 투여되는 것이 금지되면서 항생제의 사용량이 감소하여 균주들의 내성빈도 역시 낮아진 것으로 보인다. 또한, 모든 균주들이 gentamycin과 neomycin에 대해 감수성이 있었는데, 이는 대부분의 세균에서 neomycin의 내성 비율이 높이나 나타난 이전의 보고(Heo et al., 2002)와 차이가 있었다.

실험에 사용된 153 균주 중 대부분의 균주들이 2종류 이상의 항생제에 대해 내성을 가지는 다제 내성균이었다. *S. parauberis*와 *E. tarda* 균주에 대해 이전의 보고들은(Kim et al., 2006; Kim et al., 2010) 다제 내성균의 비율이 90% 이상이었으며, 본 연구에서도 그와 유사한 결과를 확인할 수 있었다. Kim et al.(2010)은 *Vibrio* sp.의 다제 내성률이 57.9%라 보고하였으나, 본 연구에서는 70%로 다제 내성균의 비율이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. Tetracycline계, penicillin계, quinolone계 항생제에 대한 높은 내성률은 이전의 연구들에서 보고된 바가 있으나 제주지역의 항생제 내성 현황 연구는 제대로 이루어지지 않았었으며, 따라서 본 연구가 제주도 내 항생제 내성경향에 대한 기초자료로 활용될 것으로 사료된다.

양식현장에서 장기간 tetracycline계 항생제의 사용으로 내성균이 출현하였으며, 그로 인한 감염증 치료의 어려움 및 적절한 약제 선택의 부재 등의 문제가 발생하였다. 제주도 내 양식장에서 분리한 153 균주 중 tetracycline 내성 균주는 84 균주였으며, MIC test를 통해 내성수준과 균주들이 지니고 있는 내성 유전자의 분포 및 종류를 PCR 및 multiplex PCR을 통해 살펴보았다.

Chopra and Roberts(2001), Roberts(2005)는 *tet(M)*이 가장 일반적이며, 다양한 그람 양성세균과 음성세균뿐만 아니라 *mycoplasma*에서도 발견된다고 보고하였고, 이전 Park et al.(2009)의 보고

는 *S. parauberis* 내 *tet* gene의 분포를 살펴보았으며, 그 결과 *tet*(M)을 가지는 균주는 42 균주, *tet*(S)를 가지는 균주는 15 균주로, *tet*(S)보다 *tet*(M)의 검출빈도가 더 높은 것을 확인하였다. 그러나 본 연구에서는 *tet*(S)가 가장 dominant한 gene이었으며, *tet*(M)은 2종류의 내성 유전자를 가지는 2 균주에서만 검출되어 이전의 보고와 다소 차이가 있었다. 본 연구에서 *tet*(M)을 가지는 내성균의 비율이 낮은 이유는 제주도에서 분리된 균주의 지역적 특성으로 분류할 지는 더 지속적인 연구가 필요할 것으로 여겨진다. *S. parauberis* 내 *tet* gene을 지니는 균주들의 tetracycline이나 oxytetracycline에 대한 MIC값은 대부분 25~100 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 범위에 속하였으며, *tet* gene이 확인되지 않은 균주들은 본 연구에서의 primers가 적용되지 않는 다른 내성 유전자를 지닐 가능성이 있는 것으로 추정하였다.

Vibrio sp.에서 확인된 내성 유전자는 각각 *tet*(B), *tet*(D), 그리고 *tet*(B)&(M)으로, *Vibrio* sp.에서 모두 *tet*(B)가 검출되었다는 보고(Jun, 2003) 및 *tet*(B)&(M)이 검출되었다는 이전의 보고(Kim, 2004)와 일치하였으나, *tet*(D)의 검출은 이전과 다른 내성 유전자의 분포를 확인할 수 있었다. 하지만, 실험에 사용된 *Vibrio* sp. 균주의 수가 이전의 연구에서 사용된 수보다 부족하기 때문에 향후 보다 많은 균주를 채집하여 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다. *Vibrio* sp. 내 *tet* gene을 지니는 균주들의 tetracycline과 oxytetracycline에 대한 내성 정도를 확인한 결과, 2종류의 내성 유전자를 지니는 균주에서의 MIC값은 100 $\mu\text{g/ml}$ 이상이었으며, *tet*(B)와 *tet*(D)를 지니는 균주들의 MIC값은 25~50 $\mu\text{g/ml}$ 이었다.

이전 Roberts(1996)는 *E. tarda* 균주에서는 *tet*(A)와 *tet*(D)가 발견된다고 보고하였으며, 본 연구에서 분리한 *E. tarda* 10 균주 모두 *tet*(D)를 지니고 있는 것을 확인하여 이전에 보고된 결과와 일치하였다. *tet* gene을 가지는 *E. tarda* 균주들의 MIC값을 확인해보았더니, 100 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 MIC

값을 가진 *E. tarda* 10 균주는 *tet*(D)를 가지고 있었으나 tetracycline과 oxytetracycline에 대해 각각 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 MIC값을 가진 1 균주에서는 *tet* gene을 확인할 수 없었다. *E. tarda*의 tetracycline에 대한 MIC값이 25 $\mu\text{g/ml}$ 이상이었을 때 *tet* gene이 확인되었다는 이전의 보고(Jun, 2003)와 상이한 결과를 보였다.

한편, *S. parauberis* 6 균주, *E. tarda* 1 균주, 미동정 10 균주는 tetracycline이나 oxytetracycline에 대해 내성이 있었으나 본 연구에서 사용한 primer sets로는 내성 유전자를 확인할 수 없었으며, 이러한 결과는 본 연구에서 사용하지 않은 *tet*(I), *tet*(T) 및 *tet*(W) 같이 다른 종류의 내성 유전자이거나, 새로운 *tet* gene의 출현에 의한 결과로 해석할 수 있다. 따라서 이후에는 본 연구에서 사용되지 않은 primer sets를 통해 확인을 하는 등의 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

References

- Chopra, I. and Roberts, M. C.(2001). Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65(2), 232~260.
- Heo, J. H. · Jung, M. H. · Cho, M. H. · Kim, G. H. · Lee, K. C. · Kim, J. H. and Jung, T. S.(2002). The study on fish diseases with reference to bacterial susceptibility to antibiotics in the southern area of Kyeognam. *Journal of Veterinary Clinics* 19(1), 19~22
- Jee, B. Y. · Shin, K. W. · Lee, D. W. · Kim, Y. J. and Lee, M. K.(2014). Monitoring of the mortalities and medications in the inland farms of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, in South Korea. *Journal of Fish Pathology* 27(1), 77~83.
- Jun, L. J.(2003). Characterization of tet genes in fish pathogenic bacteria from Korea. *Master's Thesis*, Department of Fish Pathology, Pukyong National University, Busan, South Korea.

- Jun, L. J.(2010). Characterization of antibiotic resistant genes carried by fish pathogens in Korea. *Ph.D. Thesis*, Department of Fish Pathology, Pukyong National University, Busan, South Korea.
- Kim, J. H. · Kim, S. G. · Kim, S. S. · Kim, J. H. · Park, S. H. · Nam, K. H. · Kim, H. B.(2013). Analysis of the antibiotic resistance gene in *Salmonella* Typhimurium isolates from diseased pigs in Gyeongbuk province. *Korean Journal of Veterinary Service* 36(2), 73~78.
- Kim, J. H. · Lee, C. H. and Kim, E. H.(2006). Transferable R plasmid of Streptococci isolated from diseased olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) in Jeju. *Journal of Fish Pathology* 19(3), 267~276.
- Kim, J. W. · Cho, M. Y. · Jee, B. Y. · Park, M. A. and Kim, N. Y.(2014). Administration and use of aquaculture drugs in Korea. *Journal of Fish Pathology* 27(1), 67~75.
- Kim, M. S. · Cho, J. Y. · Seo, J. S. · Jung, S. H. · Choi, H. S. and Park, M. A.(2012). Distribution of MIC value of antibiotics against *Edwardsiella tarda* isolated from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Journal of Fish Pathology* 25(3), 181~188.
- Kim, M. S. · Seo, J. S. · Park, M. A. · Cho, J. Y. · Hwang, J. Y. · Kwon, M. G. and Jung, S. H.(2010). Antimicrobial resistance of *Edwardsiella tarda*, *Vibrio* spp., and *Streptococcus* spp. isolated from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Journal of Fish Pathology* 23(1), 37~45.
- Kim, S. S. · Jang, J. W. · Song, J. W. · Lim, S. J. · Jeong, J. B. · Lee, S. M. · Kim, K. W. · Son, M. H. and Lee, K. J.(2009). Effects of dietary supplementation of alga mixtures (*Hizikia fusiformis* and *Ecklonia cava*) on innate immunity and disease resistance against *Edwardsiella tarda* in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Science* 42(6), 614~620.
- Kim, S. Y. · Kim, Y. C. · Jeong, S. K. · Jun, L. J. · Jin, J. W. and Jeong, H. D.(2014). Increased resistance to Quinolones in *Streptococcus parauberis* and development of a rapid assay for detecting mutations in topoisomerase genes. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Science* 47(3), 247~254.
- Kim, Y. H.(2004). Characterization of tetracycline resistance genes in *Vibrio* spp. isolated from marine fishes. *Master's Thesis*, Department of Fish Pathology, Pukyong National University, Busan, South Korea.
- KOSIS.(2016). Korean Statistical Information Service.
- Lee, H. W. · Lim, S. K. and Kim, M. N.(2009). Characteristics of Ampicillin-Resistant *Vibrio* spp. isolated from a west coastal area of Korean peninsula. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Science* 42(1), 20~25.
- Levy, S. B. · MuMurry L. M. · Barbosa, T. M. · Burdett, V. · Courvalin, P. · Hillen, W. · Roberts, M. C. · Rood, J. I. & Taylor, D. E.(1999). Nomenclature for new tetracycline resistance determinants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43(6), 1523~1524.
- Park, Y. K. · Nho, S. W. · Shin, G. W. · Park, S. B. · Jang, H. B. · Cha, I. S. · Ha, M. A. · Kim, Y. R. · Dalvi, R. S. · Kang, B. J. · Jung, T. S.(2009). Antibiotic susceptibility and resistance of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus parauberis* isolated from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Veterinary Microbiology* 136, 76~81.
- Roberts, M. C.(2005). Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiology Letters* 245, 195~203.
- Roberts, M. C.(1996). Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiology Reviews* 19, 1~24.
- Sakai, T. · Iida, T. · Osatomi, K. and Kanai, K.(2007). Detection of Type 1 Fimbrial genes in fish pathogenic and non-pathogenic *Edwardsiella tarda* strains by PCR. *Fish Pathology* 42(2), 115~117.
- Son, K. T. · Oh, E. G. · Lee, T. S. · Lee, H. J. · Kim, P. H. and Kim J. H.(2005). Antimicrobial susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* from fish farms on the southern coast of Korea. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Science* 38(6), 365~371.
- Song, J. H.(2009). Current status and future strategies of antimicrobial resistance in Korea. *Korean Journal of Medicine* 77(2), 143~151.

Woo, S. H. · Kim, H. J. · Lee, J. S. · Kim, J. W.
and Park, S. I.(2006). Pathogenicity and
classification of streptococci isolated from cultured
marine fishes. *Journal of Fish Pathology* 19(1),
17~33.

-
- Received : 24 March, 2017
 - Revised : 26 April, 2017
 - Accepted : 12 April, 2017