

새로운 conjugation 방법을 응용한 R plasmid 함유 어병세균의 분리와 양식장 내성균의 현황 분석

유민호 · 정준범 · 김은희* · 이형호** · 정현도⁺
 부경대학교 수산생명의학과, *여수대학교 수산생명의학과
 **부경대학교 생물공학과

Application of a New Conjugation Method to Fish Pathogenic Bacteria Containing R Plasmid for the Analysis of Drug-Resistant Status in Aquaculture

Min Ho YOO, Joon Beom JEONG, Eun-Heui KIM*, Hyoung-Ho LEE** and Hyun Do JEONG⁺

Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

*Department of Aqualife-medicine, Yosu National University, Cheonnam 550-749, Korea

**Department of Biotechnology and Bioengineering, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

To develop a new method of conjugation and to determine the distribution of R plasmids, we isolated multi-drug resistant strains from fish pathogenic bacteria in the farms of south and east seacoasts of Korea. Out of the 134 isolates examined, 10 showed resistance to chloramphenicol, tetracycline, streptomycin, ampicillin, colistin, nalidixic acid, oxolinic acid and kanamycin. One out of 10 multi-drug resistance bacteria, *Vibrio damsela* JE1 (*V. damsela* JE1), contained transferable R plasmid of chloramphenicol-tetracycline resistance genes and other nucleic acids encoding ampicillin and kanamycin resistance. The presence of the R plasmid was confirmed by conjugation using the chromocult medium (CC) as a selective and differential medium for transconjugants with identification based on the growth or colors of the colonies. The frequency of R plasmid transfer with filter mating method was come out much higher than that of broth mating method and appeared to be dependent upon the mating time and temperature. The optimum conditions for filter mating method were found to be 30°C and 24 hrs as mating temperature and period, respectively. Moreover, donor cells with R plasmid, both isolate and standard bacteria, were shown to have an ability to transfer the plasmid against *Escherichia coli* K-12 HB101 (*E. coli* HB101) and *Edwardsiella tarda* (*E. tarda*) RE14 at fairly high frequencies. Finally, we isolated 3 isolates of *Sphingomonas* sp., carrying R plasmid from 12 multi-drug resistant bacteria in normal microflora of the flounder (*Paralichthys olivaceus*) group used for the isolation of *V. damsela* JE1 four months before. The same size and gene transfer characteristics of R plasmids with those of *V. damsela* JE1 confirmed that normal microflora have the reservoir activity for R plasmid in natural aquatic environment.

Key words: Conjugation, R plasmid, Chromocult medium, Resistance, *Edwardsiella tarda*, *Vibrio damsela*

서 론

한국에서의 항균제사용은 가축에 대하여서는 지금까지 많은 연구가 이루어져 질병치료 효과뿐만 아니라 성장 촉진 효과까지 입증되어 널리 사용되고 있는 반면, 어류를 대상으로 한 연구는 아직도 미비한 상태이다. 하지만 새로운 병원체에 의한 어류질병 발생이 급증하고 있으며, 이에 따라 항균제 사용 빈도도 점차 증가 추세에 있어 항균제에 대한 내성균의 출현은 양식 현장에서 문제점으로 대두되고 있다. Bell et al. (1988)과 Smith (1994)은 양식장에서 사용하는 여러 항균제에 대한 내성균의 출현을 보고하였으며, Stamm et al. (1989)는 항균제에 노출되는 시간이 길수록 각종 질병 원인균의 MIC (minimum inhibitory concentration) 값이 증가하는 것을 확인하였다. 또한 사람에게 병원성이 있는 *Vibrio parahaemolyticus* 등에서도 새로운 내성균의 출현이 보고되었고 (Twiddy and Reilly, 1994), Takashima et al. (1985)은 R plasmid에 의하여 환경 세균의 내성이 어류 질병세균으로 전달된다고

하여 양식산업에서의 약제 내성 심각성을 경고하였다. 이러한 R plasmid에 의한 내성전달은 현재 *Aeromonas salmonicida* (Aoki et al., 1972), *Aeromonas hydrophila* (Akashi and Aoki, 1986), *Edwardsiella tarda* (Aoki and Kitao, 1981), *Pasteurella piscicida* 및 *Vibrio anguillarum* (Aoki et al., 1974) 등의 여러 어류 질병 병원체에서 진행되고 있음을 쉽게 알 수 있다. 그런데 내성전달 분석을 위한 conjugation 실험에서 여러 항균제에 대한 내성 유전자를 함유한 R plasmid의 특성 때문에 donor 세균이 가지고 있지않는 특수한 내성을 나타내는 recipient를 사용하여야만 transconjugant를 분리할 수 있는 불편함이 많이 발생할 수 있다. 그런데 이러한 것을 해결하기 위하여 MacConkey 배지 등을 사용하기도 (Aurora et al., 1992) 하였으나 그 분별능력과 적용 범위는 매우 제한적이었다. 그런데 최근에는 새롭게 개발된 인공배지들이 환경오염에서 발생하는 장내세균들의 선별적 증식과 β-D-galactosidase와 β-D-glucuronidase 등의 효소활성을 이용하여 균주식별에 많이 응용되어 지고 있다. 특히 장내세균 등의 선별 및 식별 (Turner et al., 2000; Byamukama et al., 2000; Ogden et al., 1998)에 매우 효과적이라는 것이 증명되어져 있는 chromocult (CC) 배지

⁺Corresponding author: Jeonghd@pknu.ac.kr

(Merck, Germany)를 conjugation 분석에서 recipient, donor 그리고 transconjugant cell의 구별에 활용하여 어류 질병관련 세균의 내성전달에 대한 보다 구체적인 정보를 확보할 수 있다면 이는 매우 의미 있는 기술적 진전이 될 수 있을 것이다.

그러므로 본 연구에서는 CC 선별배지를 이용한 transconjugant의 분리법 개발로 양식현장의 병어로부터 분리한 다제내성균 중 R plasmid를 함유한 균주를 확인하고 이들이 갖는 내성전달의 특성분석과 최적화에 대한 연구를 실시하였으며, 동시에 양식현장에서 어류의 장내세균이 나타내는 R plasmid reservoir로서의 역할에 대한 분석을 실시하였다.

재료 및 방법

1. 실험 균주

R plasmid (약 200 kb)를 함유한 표준 균주는 *Escherichia coli* pJAPE8232를 실험에 이용하였으며 (Table 1) 분리균주는 1993년부터 1999년까지 한국의 남해안과 동해안 양식장의 병어로부터 균주를 분리하여 실험에 사용하였다 (Table 3). 균의 분리 및 증균용으로는 tryptic soy broth (TSB, Difco)나 tryptic soy agar (TSA, Difco)를 사용하였다. *E. coli* 균주는 37°C에서 16시간, 병어로부터 분리된 채집 균주는 25°C에서 16시간 배양한 후 spectrophotometer (Kontron instruments, USA)를 이용하여 OD₆₀₀값을 구하여 균수를 확인하고 실험에 사용하였다. 또한 실험균은 보존을 위해 배양액에 25% glycerol (Sigma)을 첨가한 후 -70°C에 보존하면서 필요시 꺼내어 사용하였다.

Table 1. Bacteria used in this study

| Bacterial strain | Resistance marker | Remarks |
|------------------------------------|--|---------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> K-12 HB101 | Sm ^r | recipient cell |
| <i>Edwardsiella tarda</i> RE14 | - | recipient cell |
| <i>Escherichia coli</i> pJAPE8232 | Tc ^r Cm ^r Km ^r Sa ^r Sm ^r | transferable R plasmid |

Abbreviation: Sm, streptomycin; Tc, tetracycline; Cm, chloramphenicol; Km, kanamycin; Sa, sulfonamide.

2. 약제 감수성 시험

채집 균주의 항균제에 대한 내성 정도는 broth 희석법을 사용하여 측정하였으며 minimum inhibitory concentration (MIC)값으로 나타내었다 (Kim and Aoki, 1993). 항균제는 ampicillin (Am), chloramphenicol (Cm), tetracycline (Tc), kanamycin (Km), colistin (Cl), nalidixic acid (Na), oxolinic acid (Oa), norfloxacin (Nf)을 Sigma사 (USA)로부터 구입하여 사용하였다. 먼저 96 wells plate에 멸균된 TSB를 160 µL, 각 농도로 희석된 항균제를 20 µL, TSB에 10⁷ cell/mL로 현탁시킨 균액을 20 µL 넣었고, 양성대조군은 TSB 180 µL와 희석시킨 균액 20 µL를 넣고, 음성대조군은 TSB만 200 µL 넣었다. 25°C에서 18시간 배양 후 세균의 증식에 따른 액체 배지의 혼탁도를 관찰하여 세균이 자라지 않는 항균제의 최저 농도를 MIC 값으로 결정하였다.

3. Conjugation

Conjugation을 통한 R plasmid의 확인은 Aurora et al. (1992)과 Bale et al. (1988)의 방법을 수정하여 실시하였다. Recipient로는 *E. coli* HB101과 남해안의 넙치 병어로부터 분리한 *E. tarda* RE14를 사용하였으며 균의 증식을 위한 온도는 각각 37°C와 25°C를 사용하였다.

1) Broth mating

Donor와 recipient 균주를 하룻밤 배양한 후, 2 mL TSB 배지에 donor 균주 (2.0×10⁷ cell/mL)와 recipient 균주 (2.0×10⁸ cell/mL)를 혼합하여, 25, 30, 37°C에서 2, 6, 24시간 동안 배양하였다. 그 후 온도별, 시간별로 혼합 배양된 균주를 단계 희석하여 Cm (10 µg/mL)이 함유된 CC agar plate (Merck, Germany)에 도말하고, 다음날 transconjugant를 확인하였다. 전달빈도는 초기 donor cell수에 대한 transconjugant의 수로써 계산하였다.

2) Filter mating

Donor cell과 recipient cell을 각각 1.0×10⁹ cell/mL이 되도록 혼합하여, 0.22 µm 공극의 membrane filter (Millipore Corp, Bedford, Mass)에 통과시켜 고정하였으며 filter에 고정된 세균을 TSA plate의 표면과 부착되도록 하였다. 이 agar plate를 시간별·온도별로 배양한 후, filter를 분리하여 TSB 5 mL에 현탁한 후 단계 희석하여 Cm (10 µg/mL)이 함유된 CC plate에 도말하였다.

4. R plasmid의 추출

R plasmid 추출은 Kado et al. (1981)의 방법을 수정하여 사용하였다. 시험 균주를 25 mL tryptic soy broth (TSB)에 접종하여 18시간 100 rpm으로 진탕 배양한 후, 6,000 rpm으로 7분간 원심 분리하여 균체를 모으고, 1 mL의 TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 2 mM sodium EDTA, acetic acid, pH 7.9) (Sigma, USA)를 넣고 재 현탁시킨 후, 용출용액 (3% SDS, 50 mM Tris, pH 12.6) 2 mL를 첨가하여 55°C water bath에서 1시간 반응시켰다. 그 후 phenol/chloroform (Sigma, USA) 용액으로 두 번 반복하여 단백질을 추출하고, 그 상등액을 취하였다. 보관시 NaOH에 의한 불활화를 방지하기 위해 1/10 volume의 TE buffer (10배 농도, 40 mM Tris-acetate, 2 mM sodium EDTA, pH 8.0)를 첨가하였다. Plasmid의 확인을 위한 전기 영동은 0.7% SEKEM gold agarose (FMC Bio product) gel에 0.25% bromophenol blue와 40% sucrose가 첨가된 염색액 (pH 8.0) 5 µL와 분리한 상등액 20 µL를 혼합하여 실시하였다. 80 volt에서 2시간 동안 전개시켜서 ethidium bromide (EtBr) 용액 (0.5 µg/mL)으로 30분간 염색하여 단파장 transilluminator (SL-20 Seolin Scientific, Korea)에서 확인하였다.

결 과

1. 내성균주의 분리

1993년부터 1999년까지 한국의 동해안과 남해안 양식장에서 134개의 균주를 병어로부터 얻어 이들 균주의 내성 분포를 조사하였

다. 세균의 내성 문제에 있어 심각성을 더 하는 것은 R plasmid를 매개로 발생하는 다제 내성균의 발생이므로, 134개의 균주에 대해 먼저 최소 2가지 항균제에 대해 그 내성 수준을 구하였다. 2가지 항균제의 선택에 있어 본 연구에서는 예전부터 유전자의 연구가 많이 되어왔고, quinolone계 등의 항균제와는 달리 R plasmid에 의해 내성 전달이 많이 일어나는 것으로 알려져있는 Cm (10 µg/mL)과 Tc (30 µg/mL)에 대해 선별을 실시하였다.

약제 감수성 실험결과 총 134개 균주 중에서 10개의 균주가 Cm과 Tc에 대해서 내성을 나타냄을 알 수 있었으며 각 연도별로 나타난 내성균의 비율이 비슷하게 나타나 본 분석기간 동안 뚜렷한 내성균의 증가나 감소는 없었음을 알 수 있었다 (Table 2). 또한 Cm과 Tc에 대해 내성을 갖는 10균주의 지역별 분포를 보면 남해안에서는 분리균 65균주 중 4균주가, 동해안에서는 분리균 69균주 중 6균주가 발견되어 지역에 따른 내성균 발현 빈도에서는 차이를 발견할 수 없었다. 그리고 분리된 균을 API 20E kit를 사용하여 동정한 결과 10균주 중 5균주는 *E. tarda*, 3균주는 *Vibrio* sp. 그리고 각각 한 균주씩의 *A. hydrophila*, *Shewanella* sp.의 균주로 동정되어 대체로 *E. tarda*와 *Vibrio* 계열의 균주들이 많았으므로 분석 대상이 된 대부분의 병어는 *E. tarda*와 *Vibrio*에 감염되었던 것으로 추정할 수 있었다 (Table 3). MIC 분석을 통하여 Cm과 Tc 이외에 이들 10균주가 갖는 또다른 내성 marker를 조사해 본 결과 kanamycin (Km), colistin (Cl), nalidixic acid (Na), norfloxacin (Nf), ampicillin (Am), oxolinic acid (Oa)에 대해서도 내성을 나타내어 본 실험에서 분리한 모든 균이 다제 내성균임을 확인할 수 있었다 (Table 3).

Table 2. Frequencies of multi-drug resistant isolates among bacteria isolated from diseased fish from 1993 to 1999 in Korea

| Area | Frequency of multi-drug resistant isolates | | | Total |
|-----------|--|------|------|--------|
| | 1993~1995 | 1997 | 1999 | |
| South sea | *2/30 ^b | 1/1 | 1/34 | 3/65 |
| East sea | | 1/9 | 6/60 | 7/69 |
| Total | 2/30 | 1/10 | 7/94 | 10/134 |

*Number of resistant strains against Cm and Tc.

^bTotal number of isolates analyzed.

2. Transconjugant의 검출

다제 내성의 특성이 R plasmid에 의한 것인지 확인하기 위해 conjugation 실험을 실시하였으며, 이를 위하여 장내세균의 선별을 위하여 최근 사용되고 있는 CC plate를 이용하여 transconjugant의 집락을 육안적으로 선별해 내는 방법을 적용하고자 하였다. 이 방법은 donor 세포가 많은 항균제의 내성인자를 가지고 있어, 이와 구별되는 내성 인자를 가지고 있는 recipient 균주의 확보가 어려워 transconjugant의 선별이 불가능할 때 사용할 수 있는 대안이 될 수 있다. Table 4에서 보는 바와 같이 recipient 균주 (*E. coli* HB 101)가 donor 균주로부터 그 내성을 전달받았을 경우, 항균제 (donor의 내성 marker)가 첨가된 CC 배지에서 transconjugant, *E. coli* HB101 (pVD)는 진한 보라빛 집락을 형성하게 되며, donor

Table 3. Drug resistance patterns of multi-drug resistant bacteria isolated from diseased fishes

| Organism | Source | Resistance | Area | Year |
|--------------------------------|----------|-------------------------|-----------|------|
| <i>Edwardsiella tarda</i> RE1 | eel | Cm Tc Km Cl Na Nf | Kwangju | 1995 |
| <i>Edwardsiella tarda</i> RE23 | flounder | Cm Tc Km Cl Na Nf | Namhae | 1994 |
| <i>Edwardsiella tarda</i> JH10 | flounder | Cm Tc Am Km Cl | Yosu | 1997 |
| <i>Edwardsiella tarda</i> KS1 | flounder | Cm Tc Km Cl | Kuryongpo | 1998 |
| <i>Edwardsiella tarda</i> KS2 | flounder | Cm Tc Am Km Cl Na | Kuryongpo | 1998 |
| <i>Vibrio damsela</i> | flounder | Cm Tc Am Km | Kuryongpo | 1998 |
| <i>Vibrio</i> sp. JE5 | flounder | Cm Tc Am Cl | Kuryongpo | 1998 |
| <i>Vibrio</i> sp. KS6 | flounder | Cm Tc Am | Kuryongpo | 1998 |
| <i>Aeromonas hydrophila</i> | catfish | Cm Tc Am Km Cl Oa Na | Uljin | 1998 |
| <i>Shewanella</i> sp. | mullet | Cm Tc Am Km Cl | Namhae | 1998 |

Abbreviation: Cm, chloramphenicol; Tc, tetracycline; Km, kanamycin; Am, ampicillin; Cl, colistin; Na, nalidixic acid; Nf, norfloxacin; Oa, oxolinic acid.

Table 4. Characteristics of different strains of bacteria on CC agar plate

| Bacteria | Colony colors on CC plate |
|------------------------------------|---------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> K-12 HB101 | dark-blue to violet |
| <i>Escherichia coli</i> pJAPE8232 | light-blue |
| <i>Edwardsiella tarda</i> | colourless |
| <i>Vibrio</i> sp. | no growth |
| <i>Aeromonas</i> sp. | purple |
| <i>Sphingomonas</i> sp. | no growth |

균주들은 이 배지에서 보라빛 외의 색깔을 나타내므로, 이 방법은 conjugation 실험에서 형성된 transconjugant를 확인하기 위한 효율적인 방법이었다 (Table 4). 본 방법으로 분리된 10개의 균주에 적용하였을 때 *Vibrio damsela* JE1 (*V. damsela* JE1)균주가 conjugation에 의하여 그 내성을 전달하는 것을 확인하였다.

3. R plasmid의 검출

채집 균주 *V. damsela* JE1에는 *E. coli* pJAPE8232가 함유하고 있는 R plasmid (약 200 kb) (Aoki et al., 1985) 보다 큰 크기의 R plasmid가 존재함을 알 수 있었다 (Fig. 1). 또한 transconjugant인 *E. coli* HB101 (pVD)에서도 donor 균주에서 분리된 것과 같은 크기의 R plasmid가 분리되어 내성전이가 확인되었다.

R plasmid의 전이에 의한 전달내성의 특성비교를 위하여 Cm · Tc · Am · Km에 대한 내성분석을 실시하였을 때 donor 균주로 사용한 *V. damsela* JE1은 Cm · Tc · Am · Km 모두에 대해 내성을 나타내었지만 *E. coli* HB101 (pVD)는 Cm과 Tc에 대해서만 내성을 나타내었으므로, R plasmid에는 Cm, Tc 등에 대한 내성

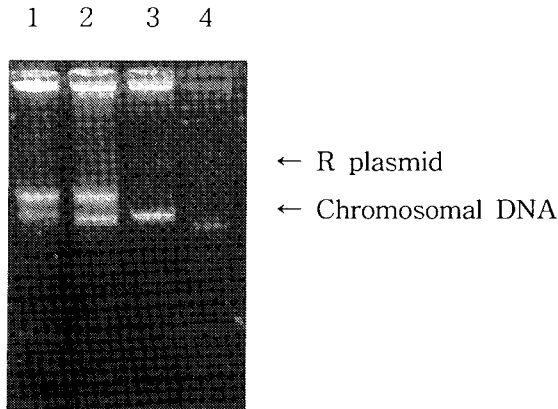


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of R plasmids.
Lane 1, *V. damsela* JE1; lane 2, *E. coli* HB101 (pVD); lane 3, *E. coli* pJAPE 8232; lane 4, *E. coli* HB101.

gene이 존재하고 Am과 Km에 대한 내성 유전자는 chromosome 또는 기능이 밝혀지지 않은 cryptic plasmid (Fig. 1)에 존재하고 있음을 알 수 있었다 (Table 5).

4. Conjugation의 최적화

R plasmid를 가지고 있는 *V. damsela* JE1을 donor로 하고 *E. coli* HB101을 recipient로 사용하여, 서로 다른 두 가지의 mating 방법과 그 mating 시간 그리고 온도에 대해 최적의 조건을 확립하고자 하였다. Table 6의 결과와 같이 filter mating법이 전달 빈도에 있어 broth법보다 10²~10⁴배 정도 높게 나타났고, 가장 높은 전달 빈도를 나타낸 경우는 filter mating시 25°C에서 24시간 배양

Table 5. MIC of antibacterials for *V. damsela* JE1 and its transconjugant

| Bacteria | Minimum inhibitory concentration (µg/mL) | | | | | | |
|---|--|------|-------|------|------|------|------|
| | Cm | Tc | Oa | Na | Am | Cl | Km |
| <i>E. coli</i> HB101 | 12.5 | 1.56 | 0.312 | 6.25 | 6.25 | 0.39 | 6.25 |
| <i>V. damsela</i> JE1 | >100 | >100 | 1.25 | 12.5 | >100 | 12.5 | >100 |
| ^a <i>E. coli</i> HB101 (pVD) | >100 | >100 | 0.312 | 6.25 | 12.5 | 1.56 | 6.25 |

^a*E. coli* HB101 was used as a recipient cell of R plasmid from *V. damsela* JE1.

Table 6. Frequencies of transfer of R plasmid with filter and broth mating methods

| Donor cell | Temp. | Recipient cell (<i>E. coli</i> HB101) | | | | | |
|---------------------------|-------|--|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | | Broth mating | | | Filter mating | | |
| | | 2 hrs ^a | 6 hrs | 24 hrs | 2 hrs | 6 hrs | 24 hrs |
| <i>Vibrio damsela</i> JE1 | 25°C | 1.0×10 ⁻⁶ | 1.0×10 ⁻⁶ | 2.0×10 ⁻⁵ | 4.0×10 ⁻⁴ | 2.0×10 ⁻² | 1.0×10 ⁻¹ |
| | 30°C | 2.0×10 ⁻⁶ | 5.0×10 ⁻⁶ | 2.0×10 ⁻⁴ | 9.0×10 ⁻⁴ | 2.0×10 ⁻² | 8.0×10 ⁻² |
| | 37°C | 1.0×10 ⁻⁵ | 7.0×10 ⁻⁶ | 3.0×10 ⁻⁴ | 1.0×10 ⁻³ | 5.0×10 ⁻² | 6.0×10 ⁻² |

Frequencies are expressed as the number of transconjugants per initial number of recipient cells.

^aMating time.

시켰을 때였다. 그러나 filter mating법에서 온도에 따른 뚜렷한 전달빈도의 변화는 발견되지 않았고, mating 시간은 2시간을 주었을 때는 매우 낮은 전달빈도를 보여 주었으나 6시간 이상에서는 뚜렷한 차이를 발견할 수 없었다. 이에 비하여 broth mating법에서는 온도는 25°C, mating 시간은 6시간 이하에서는 매우 낮은 전달빈도를 보여 주어 mating 방법과 조건에 따라 *V. damsela* JE1의 R plasmid 전달빈도는 매우 다르게 나타남을 확인할 수 있었다. 그리고 *E. coli* pJAPE8232를 donor로 사용하고 *E. tarda* RE14 분리 균주와 *E. coli* HB101을 recipient로 하여 사용균주 및 filter mating법에 의한 conjugation의 조건에 따른 전달빈도도 비교하였다 (Table 7). Donor로 *E. coli* pJAPE8232를 사용하면 37°C에서 25°C와 30°C에 비하여 약 10²배 높은 전달 빈도를 보이고 6시간 이상의 mating 시간이 최적의 전달빈도를 보이는데 필요한 것으로 나타났지만 사용한 recipient의 종류에 따른 뚜렷한 차이는 발견되지 않았다. 그러나 donor로서 *V. damsela* JE1을 그리고 recipient로 *E. tarda* RE14 분리 균주를 사용하면 여러조건 모두에서 전달 빈도는 약 10⁻¹배 정도 낮은 것으로 분석되어져 R plasmid의 특성 또는 donor cell의 유전적 특성에 따라 recipient에로의 전달 빈도는 다르게 나타난다는 것을 확인하였다.

Table 7. Frequencies of transfer of R plasmid against different recipient cells with filter mating method

| Donor cell | Temp. | Recipient cell | | | | | |
|---------------------------|-------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | | <i>E. coli</i> HB101 | | | <i>E. tarda</i> RE14 | | |
| | | 2 hrs ^a | 6 hrs | 24 hrs | 2 hrs | 6 hrs | 24 hrs |
| <i>E. coli</i> pJAPE 8232 | 25°C | 1.0×10 ⁻⁵ | 5.0×10 ⁻⁴ | 2.0×10 ⁻³ | 2.0×10 ⁻⁵ | 6.0×10 ⁻⁴ | 6.0×10 ⁻³ |
| | 30°C | 5.0×10 ⁻⁵ | 6.0×10 ⁻² | 8.0×10 ⁻³ | 4.0×10 ⁻⁵ | 4.0×10 ⁻³ | 4.0×10 ⁻³ |
| | 37°C | 5.0×10 ⁻⁴ | 6.0×10 ⁻² | 4.0×10 ⁻² | 1.0×10 ⁻³ | 1.0×10 ⁻¹ | 6.0×10 ⁻¹ |
| <i>V. damsela</i> JE1 | 25°C | 4.0×10 ⁻⁴ | 2.0×10 ⁻² | 1.0×10 ⁻¹ | 2.0×10 ⁻⁴ | 2.0×10 ⁻³ | 4.0×10 ⁻³ |
| | 30°C | 9.0×10 ⁻⁴ | 2.0×10 ⁻² | 8.0×10 ⁻² | 5.0×10 ⁻⁴ | 6.0×10 ⁻³ | 5.0×10 ⁻³ |
| | 37°C | 1.0×10 ⁻³ | 5.0×10 ⁻² | 6.0×10 ⁻² | 9.0×10 ⁻⁴ | 9.0×10 ⁻³ | 6.0×10 ⁻³ |

Frequencies are expressed as the number of transconjugants per initial number of recipient cells.

^aMating time.

5. 정상 장내세균총이 갖는 내성 특성 분석

항균제내성의 근원과 분포를 분석하기 위하여 R plasmid를 가진 *V. damsela* JE1이 분리된 양어장의 넙치내 장내 세균총은 R plasmid에 의한 내성이 어느 정도인지에 대해 역학 조사를 하였다. 그 결과 장내 세균총 중 약 3%의 균주가 Cm과 Tc에 대해 내성을 나타냈으며, 이 중 12균주를 분리해냈다. 12균주 중 3균주가 *E. coli* HB101으로 그 내성이 전달되었으며, transconjugant에서 R plasmid를 분리한 결과 본 연구에 사용한 *V. damsela* JE1에서 분리된 R plasmid와 유사한 (>200 kb) 크기임을 확인하였고 (Fig. 2) Cm과 Tc에 대한 내성만을 전달하는 것을 확인하였다 (data not shown). 장내 세균총에서 분리되고 R plasmid를 함유하고 있다고 확인된 3 균주는 API 20E를 사용하여 동정 한 결과 모두 *Sphingomonas* 계열의 균으로 확인되었다.

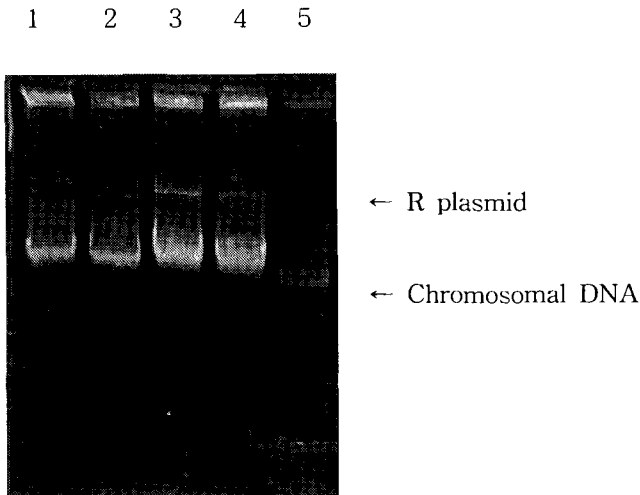


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of R plasmid isolated from *Sphingomonas* sp. present in the intestinal microflora of flounder. Lane 1, *V. damsela* JE 1; lane 2, *E. coli* HB101 (pVD); lane 3, *Sphingomonas* sp. HS10; lane 4, *Sphingomonas* sp. HS11; lane 5, *E. coli* HB101.

고찰

내성균의 분포와 그 원인에 관한 많은 연구가 1970년대 초부터 Aoki et al. (1972)에 의해 일본에서는 이루어져 왔다. 하지만 한국에서는 그 중요성을 인식하면서도 아직까지 다제 내성균에 관한 연구가 충분히 이루어지고 있지 않은 실정이다 (Choi et al., 1996). 그러므로 본 연구에서는 한국 양식 현장의 병어로부터 다제 내성균을 분리하고 이러한 다제 내성균이 갖는 R plasmid의 특성을 새로운 conjugation의 기법들을 응용하여 분석하고자 하였다. 먼저 Tc에 대한 내성균을 분리하고 이들 중 다시 Cm에 내성을 나타내는 어병 세균을 분리하여 이들을 다제 내성균으로 분류한 후 다시 다른 항균제에 대한 내성을 분석하는 방법을 적용하였다. 이러한 방법은 대상 어병 세균중의 모든 다제 내성균을 분리하는 것은 되지 않으나 비교적 높은 비율의 다제 내성균을 빠르게 얻을 수 있기 때문이다.

Table 2, 3의 결과에서 보듯이 1993년부터 1998년까지 한국 양식장에서 나타난 어병 세균중 항균제에 대하여 다제 내성을 나타내는 세균은 약 7~8%를 유지하는 것으로 나타나 그 비율은 크게 변화하지 않았음을 나타내고 있다. Aoki (1988)에 따르면 1973년부터 1983년까지 조사된 어어 양식장의 병어에서 분리된 *V. anguillarum*의 다제 내성 비율은 90% 이상에 달한다고 보고하고 있지만 Cm과 Tc에 대한 내성만으로 그 특성을 좁혀서 분석해 본다면 일본에서도 70년대와 80년대는 차이가 있음을 알 수 있었다. 즉 1973년부터 1977년까지 Cm과 Tc에 대한 저항성은 90% 이상을 보였지만, 1978년에서 1983년까지 분리된 균주에서는 5% 미만이 Tc에 내성을, 50% 정도가 Cm에 내성을 나타내어 내성균 분리에 사용된 항균제의 종류에 따라 그 발생 비율의 변화가 있을 수 있

음을 알 수 있다. 지역별로 본다면 한국의 동해안과 남해안 양식장에서 다제내성을 나타내는 세균의 비율은 뚜렷한 차이가 없었으므로 다제 내성균 발현 빈도는 지역에 상관 없이 비슷함을 알 수 있었다.

다제 내성의 특성을 나타내는 유전자는 chromosome, plasmid 그리고 R plasmid 등에 존재하고 있는 것으로 알려져 있다 (Aoki, 1988). 본 연구에서는 분리된 어병 세균의 다제내성 특성이 R plasmid에 의한 것인지 확인하기 위해 새로운 R plasmid 전달 확인법을 응용한 conjugation 실험을 실시하여 그 특성을 분석하였다. 즉 transconjugant를 얻기 위하여 보편적으로 많이 사용되고 있는 recipient 균주인 *E. coli* HB101와 1932 등은 각각 streptomycin과 nalidixic acid에 대하여 내성을 갖고 있어 donor와 구별되는 marker로서 이용하거나 (Wooley et al., 1986, Muela et al., 1994), 또는 MacConkey Agar 등과 같은 선택배지에 이러한 항균제를 첨가하여 사용하였다 (Aurora et al., 1992). 그러나 이러한 방법들의 문제점은 donor 균주가 이들 항균제에 대한 내성정보를 R plasmid에 가지고 있거나 MacConkey 등의 선택배지에 자랄 경우 transconjugant를 donor와 구별하여 얻기는 불가능하다. 그 한 예로서 recipient인 *E. coli* HB101은 streptomycin에 대한 내성인자를 가지고 있으나 본 연구에서 사용한 대부분의 donor 세포도 동일한 내성 인자를 가지고 있으므로 transconjugant의 선별을 위한 내성 인자로서는 사용할 수 없다. 그러나 본 연구에서는 항균제 내성특성과 함께 장내세균의 선택배지 (Byamukama et al., 2000, Turner et al., 2000)이면서 종에 따라 다양한 집락 색깔을 이루게 하여 주는 CC plate의 특성을 해양환경의 세균들의 conjugation 분석에 적용하여 효율적인 donor, recipient 그리고 transconjugant의 선별법을 확립하였다 (Table 4). 이러한 방법은 앞으로 conjugation 또는 유사한 유전자정보전달 실험에서 폭 넓게 응용 할 수 있을 것이다.

병어로부터 분리한 10개의 다제 내성균에 CC 배지를 이용한 본 방법으로 conjugation 분석을 실시한 결과, *V. damsela* JE1 균주만이 약 200 kb 이상의 R plasmid를 함유한 다제 내성균임을 확인하였다 (Fig. 1). 그리고 transconjugant, *E. coli* HB101 (pVD)의 내성 특성은 Cm과 Tc에 대해서는 내성을 나타내고 donor인 *V. damsela* JE1이 나타내던 Am과 Km에 대해서는 내성을 나타내지 않아 *V. damsela* JE1이 함유한 R plasmid에 존재하는 내성 유전자는 Cm과 Tc 두 항균제에 대한 유전자임을 추정 가능케 하였다 (Table 5). R plasmid의 크기가 크므로 모든 내성 유전자가 transconjugant로 옮겨지지 않고 resistance transfer factor (RTF)에 가까이 있었던 Cm과 Tc에 대한 내성 유전자만 전달되었을 가능성도 있으나 transconjugant의 R plasmid도 donor 세포의 것과 동일한 크기로 나타났으므로 Cm과 Tc를 제외한 다른 항균제 내성 유전자는 chromosome 또는 기능이 밝혀지지 않은 cryptic plasmid (Fig. 1) 등의 부위에 있는 것으로 추정된다.

V. damsela JE1이 나타내는 conjugation 최적 조건을 비교한 결과 filter mating법이 전달 빈도에 있어 일반적으로 많이 사용하는 broth법보다 10²~10⁴배 정도 높게 나타났고, 25°C에서 24시간 배양시켰을 때 최대전달빈도를 보여 주었다. Filter mating 법에서

사용한 mating 온도는 donor cell이 *E. coli*일 경우는 37°C일 때 전달 빈도가 가장 높았지만, *V. damsela*의 경우는 온도변화가 전달 빈도에 대해 영향을 주지는 않았다 (Table 6). 이 결과에서 특정 균의 증식최적온도와 R plasmid의 전달 빈도는 상관관계가 있음을 알 수 있다. 즉 *E. coli*의 증식최적 온도는 37°C인 반면, *Vibrio*의 증식온도는 낮기 때문에 mating의 최적 조건도 낮게 나타난 것으로 추정되어 Singleton et al. (1981)의 보고와 일치하였다. 또한 mating 시간적 측면에서, donor cell이 *Acinetobacter*이면 5시간 배양 후 최대 frequency를 나타내었고 (Rochelle et al., 1988) *Pseudomonas*이면 24시간 후에 최대 전달 빈도를 얻었다고 (Graves et al., 1980) 보고하여 균의 종류에 따라서 적정 mating 시간이 달라지는 점을 알 수 있다. 본 실험에서도 donor cell이 *E. coli*일 경우는 24시간째, *V. damsela*의 경우에는 6시간 이후에 가장 높은 전달 빈도를 나타내어 다른 연구와의 유사성을 보여주었다 (Table 7).

Aoki (1988)에 따르면 일본 방어 양식장에서 화학 요법제의 사용이 초기에는 그 효과가 효율적이었으나, 한 방어 양식장에 출현한 R plasmid를 가진 *P. piscicida* 내성균은 Cm, Tc를 비롯한 여러 항균제에 저항성을 나타내었고, 이후 이러한 내성은 일본 여러 지역의 해산어 양식장에서 발생한 여러 어류질병 세균에 폭넓게 분포하는 것을 확인하였다. 그리고 Oliver (1993)은 *E. coli*에서 conjugation은 48일 까지 지속된다고 하였으며, Garcia et al. (1992)은 3개월 동안 conjugation 능력을 가진다고 하였다. 그러므로 이러한 것은 서로 다른 plasmid와 균종에 따라 차이는 있지만 conjugation은 장내 또는 수중 환경에서 오랫동안 지속되면서 다른 세균으로 전달된다고 생각되므로 어병 세균으로부터 R plasmid가 분리된 양어장에는 R plasmid에 기인한 내성 전달이 어병 세균간 또는 정상 미생물총 간에 오랜 기간에 걸쳐 발생할 수 있을 것이라고 생각된다. 그러므로 본 연구에서는 어병세균에서 나타난 R plasmid가 질병 발생 후 건강한 어류의 정상 세균총에서 상존하고 있는지를 분석하기 위하여 R plasmid를 가진 *V. damsela*가 분리된 동해안의 양식장 사육조에 있었던 동일 그룹의 넙치를 4개월 후 다시 채집하여 정상 장내 세균들이 갖는 내성 정도를 조사해보았다. 그 결과 동일한 양식장의 건강한 넙치의 장내 세균총에서 분리된 12종의 다제 내성균중에서 3균주가 *V. damsela* JE1이 함유한 R plasmid와 동일한 크기와 내성 전달 특성을 나타내는 것을 확인하였다 (Fig. 2). 이들 3균주 모두는 동물의 장, 식물표면, 토양, 수중 등 다양한 환경에 상존하는 *Sphingomonas* sp. (Yamazaki et al., 1996) 임이 확인되어 포유류의 경우와 같이 어류에서도 장내세균총에서 R plasmid의 보존이 상당기간 지속적으로 이루어지고 있는 것을 추정할 수 있었다 (Fig. 2). 또한 내성유전자 및 유전자 전 후의 염기배열순서 등과 같은 R plasmid에 대한 분자생물학적인 특성 비교가 향후 충분히 이루어진다면 이러한 R plasmid의 근원과 분포에 대하여 보다 정확한 접근이 이루어질 수 있을 것이다.

요 약

R plasmid의 분포와 새로운 conjugation 방법 개발을 위하여,

한국의 남해안과 동해안의 양식현장의 어류질병관련 세균으로부터 항균제 다제 내성균을 분리하였다. 분리균 134종에서 10균주가 chloramphenicol, tetracycline, streptomycin, ampicillin, colistin, nalidixic acid, oxolinic acid, kanamycin 등에 대한 다제내성의 특성을 가지고 있었으며 이중 *V. damsela* JE1 한 균주는 chloramphenicol과 tetracycline에 대한 내성전달 특성을 갖는 R plasmid와 ampicillin과 kanamycin에 대한 유전자를 chromosome 등에 함유하고 있었다. 분리된 어병세균의 다제내성 특성이 R plasmid에 기인하는 것인지를 확인은 다양한 장내세균의 선택배지로 최근 개발된 CC 배지에서 각기 다른 균주들이 나타내는 증식여부 또는 집락 색깔의 차이를 이용하여 donor, recipient 그리고 transconjugant를 구별할 수 있는 방법을 적용하였다. Conjugation의 최적화를 위해 여러 가지 조건을 비교한 결과, *V. damsela* JE1의 R plasmid의 전달은 filter mating법을 사용 하는 것이 broth mating법보다 약 100배 이상의 높은 성공률을 보여 주었으며 이때 사용온도는 30°C 이상, mating 시간은 24시간에서 가장 높은 전달 빈도를 나타내었다. R plasmid를 함유한 *V. damsela* JE1이 분리된 4개월 후, 동일 양식장의 동일 그룹의 넙치 장내세균에서 분리한 다제 내성균 *Sphingomonas* sp. 3균주는 *V. damsela* JE1에서 분리된 것과 같은 크기의 R plasmid를 함유하고 있었으며, 그 특성 또한 *V. damsela* JE1의 R plasmid와 마찬가지로 다제 내성 중 Cm과 Tc에 대한 유전자만이 recipient로 전달되어 장내 세균총이 R plasmid의 reservoir로서의 역할을 하고 있음을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구 (과제번호: R02-2000-00227) 지원으로 수행되었음.

참 고 문 헌

- Akashi, A. and T. Aoki. 1986. Characterization of transferable R plasmids from *Aeromonas hydrophila*. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 54, 649~655.
- Aoki, T. 1988. Drug-resistant plasmids from fish pathogens. Microbiol. Sci., 5, 219~223.
- Aoki, T., S. Egusa and T. Arai. 1974. Detection of R factors in natural occurring *Vibrio anguillarum* strains. Atimicrob. Agnets Chemother., 6, 534~538.
- Aoki, T., S. Egusa, C. Yada and T. Watanabe. 1972. Studies of drug resistance and R factors in bacteria from pond cultured salmonids. Jap. J. Microbiol., 16, 233~238.
- Aoki, T., T. Kanazawa and T. Kitao. 1985. Epidemiological surveillance of drug resistant *Vibrio anguillarum* strains. Fish Pathol., 20, 199~208.
- Aoki, T. and T. Kitao. 1981. Drug resistance and transferable R plasmids in *Edwardsiella tarda* from fish culture ponds. Fish Pathol., 15, 277~281.
- Aurora, F.A., A. Muela, R. Cisterna, J. Iriberry and I. Barcina. 1992. Biotic and abiotic factors affecting plasmid transfer in

- Escherichia coli* strains. Appl. Environ. Microbiol., 58, 392~398.
- Bale, M.J., J.C. Fry and M.J. Day. 1988. Transfer and occurrence of large mercury resistance plasmids in river epilithon. Appl. Environ. Microbiol., 54, 972~978.
- Bell, G.R., G.S. Traveler and C. Dworschak. 1988. Development *in vitro* and pathogenicity of an erythromycin-resistant strain of *Renibacterium salmoninarum*, the causative agent of bacterial kidney disease in salmonids. Dis. Aquat. Org., 4, 19~25.
- Byamukama, D., F. Kansiime, R.L. Mach and A.H. Farnleitner. 2000. Determination of *Escherichia coli* contamination with chromocult coliform agar showed a high level of discrimination efficiency for differing fecal pollution levels in tropical waters of Kampala, Uganda. Appl. Environ. Microbiol., 66, 864~868.
- Choi, M.S., K.H. Park, S.H. Choi, S. Jung, C.Y. Yoon, J.G. Cho and H.J. Song. 1996. Survey of drug resistance in *Edwardsiella tarda* isolated from diseased eels (*Anguilla japonica*). J. Fish Pathol., 9(2), 195~201.
- Garcia, L.J., J.C. Fry and M.J. Day. 1992. Program Abstr. Sixth Int. Symp. Microb. Ecol., abstr., C2-3-9.
- Graves, J.F. and H.G. Riggs. 1980. Anaerobic transfer of antibiotic resistance from *Pseudomonas aeruginosa*. Appl. Environ. Microbiol., 40, 1~6.
- Kado, C.I. and S.T. Liu. 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. J. Bacteriol., 145, 1365~1373.
- Kim, E.H. and T. Aoki. 1993. The structure of the chloramphenicol resistance gene on transferable R plasmid from the fish pathogen, *Pasteurella piscicida*. Microbiol. Immunol., 37, 705~712.
- Muela, A., M. Pocino, I. Arana, J.I. Justo, J. Iriberry and I. Barcina. 1994. Effect of growth phase and parental cell survival in river water on plasmid transfer between *Escherichia coli* strains. Appl. Environ. Microbiol., 60, 4273~4278.
- Ogden, I.D., G.C. Brown, S. Gallacher, P.H. Garthwaite, M. Gennari, M.P. Gonzalez, L.B. Jorgensen, B.T. Lunestad, M. MacRae, M.C. Nunes, A.C. Petersen, J.T. Rosnes and J. Vliegthart. 1998. An inter laboratory study to find an alternative to the MPN technique for enumerating *Escherichia coli* in shellfish. Int. J. Food Microbiol., 40, 57~64.
- Oliver, J.D. 1993. Formation of viable but nonculturable cells. Plenum Press, New York.
- Rochelle, P.A., M.J. Day and J.C. Fry. 1988. Occurrence, transfer and mobilization in epilithic strains of *Acinetobacter* of mercury-resistance plasmids capable of transformation. J. Gen. Microbiol., 134, 2933~2941.
- Singleton, P. and A.E. Anson. 1981. Conjugal transfer of R plasmid R1 drd-19 in *Escherichia coli* below 22°C. Appl. Environ. Microbiol., 42, 789~791.
- Smith, P., J. Donlon, R. Coyne and D.J. Cazabon. 1994. Fate of oxytetracycline in a fresh water fish farm: influence of effluent treatment systems. Aquaculture, 120, 319~325.
- Stamm, J.M. 1989. *In vitro* resistance by fish pathogen to aquacultural antibacterials, including the quinolones difloxacin (A-56619) and sarafloxacin (A-56620). J. Aquat. Anim. Health, 1, 135~141.
- Takashima, N., T. Aoki and T. Kitao. 1985. Epidemiological surveillance of drug resistant strains of *Pasteurella piscicida*. Fish Pathol., 20, 209~217.
- Turner, K.M., L. Restaino, E.W. Frampton. 2000. Efficacy of chromocult coliform agar for coliform and *Escherichia coli* detection in foods. J. Food Prot., 63, 539~541.
- Twiddy, D.R. and P.J.A. Reilly. 1994. Occurrence of antibiotic-resistant human pathogens in integrated fish farm. Research contributions presented at the ninth session of India Pacific Fishery Commission working party on fish technology and marketing. Cochinchina, India, March, Rome, Italy FAO, 514, 23~37.
- Wooley, R.E., H.W. Dickerson, K.W. Simmons, E.B. Shotts, and J. Brown. 1986. Effect of EDTA-tris on an *Escherichia coli* isolate containing R plasmids. Vet. Microbiol., 12, 65~75.
- Yamazaki, M., L. Thorne, M. Mikolajczak, R.W. Armentrout, and T.J. Pollock. 1996. Linkage of genes essential for synthesis of a polysaccharide capsule in *Sphingomonas strain* S88. J. Bacteriol., 178, 2676~2687.

2001년 12월 4일 접수

2002년 3월 2일 수리