

우리 나라 천해양식장 주변의 테트라사이클린 내성균에서 나타나는 *tet* genes의 분포

전려진 · 정준범 · 김재훈* · 이창훈** · 김은희*** · 정현도†
부경대학교 수산생명의학과, *국립수산물품질검사원 완도지원
**국립수산과학원 제주수산연구소
***전남대학교 수산생명의학과

Distribution of *tet* genes in the tetracycline resistant microorganisms isolated from marine-aquatic environments of Korea

Lyu Jin Jun, Joon Bum Jeong, Jae Hoon Kim*, Chang-Hoon Lee**, Eun-Heui Kim***
and Hyun Do Jeong†

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

*Wando Branch, National Fisheries Products Quality Inspection Service, Wando 537-808, Korea

**Jeju Fisheries Research Institute, NFRDI, Jeju 690-190, Korea

***Department of Aqualife Medicine, Chonnam National University, Yosu 550-749, Korea

Expanded potential of multiplex PCR to discriminate six different *tet* genes in a single reaction was confirmed using the cloned plasmids as targets genes, even applicable for the nucleic acid contained six different *tet* genes as a pool. Clearly, six different lengths of amplicons after multiplex PCR using the mixture of cloned-plasmids of six different *tet* genes as templates allowed us to discriminate the specific types of *tet* genes. With this method, we determined the distribution of *tet* genes utilized in the microorganisms present in the environments of the marine-aquatic farms of Korea. The frequency of tetracycline (Tc) resistant bacteria present in the seawater, sediment and net was 6.7%, 24.4% and 30.7%, respectively. Interestingly, it was found that these isolates resistant to tetracycline were utilizing relatively restricted *tet* genes, *tet* (B) and (C), rather than various *tet* genes. It is the first report described the proportion of Tc resistant bacteria with analysis of the specific *tet* genes in the bacteria isolated from the aquatic farms.

Key words: Tetracycline resistant genes, Multiplex PCR, Marine-environment, Korea, Aquatic farms

최근 해산어 및 담수어의 양식산업 현장에서 생산성 향상을 위한 밀식, 과다한 사료 투여 등으로 수질악화 및 스트레스 요인의 증가와 함께 세균성 질병의 발생률도 증가하고 있기 때문에 항생제의 사용은 어류 양식에서 필수적이라고 할 수 있다. 그러나 항생제 사용으로 인한 세균의 내성증가, 어류에서 사람으로 세균의 내성이

전이되는 문제, 다제 내성의 발생문제, 그리고 약물의 유실로 인한 환경오염 등의 문제가 제기 되고 있어 세균성 질병의 치료에 많은 어려움을 겪고 있는 실정이다 (Aoki, 1989; Kim and Aoki, 1993; 최와 김, 1994).

양어장에서 Tetracycline (Tc)계 약물의 무분별한 이용으로 Tc에 대해 내성을 가지는 많은 중

†Corresponding Author : Hyun Do Jeong, Tel : 051-620-6143,
Fax : 051-628-7430, E-mail : jeonghd@pknu.ac.kr

류의 내성균이 발생하게 되었다. 특히 Hekton 등 (1995)은 oxytetracycline (OTC), oxolinic acid (OA) 등의 약품이 180~230일이 지난 후에도 해양 저질에 잔류함을 확인하여 저질내 높은 내성균의 분포 가능성을 제시 하였지만 우리나라의 경우 아직 체계적인 연구가 미흡한 실정이다. 더구나 세계적으로 해양 환경과 해산어에서의 분리되는 세균의 OTC 내성 빈도에 관한 연구보다는 (Ervik *et al.*, 1994; Kerry *et al.*, 1994; Schmit *et al.*, 2000), 오히려 담수어에 대한 것이 비교적 자세하게 이루어지고 있는 실정이다 (McPhearson *et al.*, 1991; Spanggard *et al.*, 1993; Vaughan *et al.*, 1996).

Chopra 등 (2001)은 다양한 종류의 *tet* gene 중 담수어 및 해산어에 발생되어 큰 피해를 주고 있는 그람 음성균에는 energy-dependent efflux 내성 기작에 관련된 *tet* (A), (B), (C), (D), (E) 그리고 (G) 등이 많이 분포한다고 보고하였다. 그러나 이전의 *tet* gene 검출에 관한 여러 연구에서는 *tet* probes를 제작하여 hybridization으로 내성 유전자의 종류를 확인하는 방법이 보고되었지만 (Depaola *et al.*, 1988; Marshall *et al.*, 1983; Lee *et al.*, 1993), 이러한 방법은 실험 과정이 복잡하며 시간이 많이 소비된다는 단점이 있었다. 최근 본 연구실에서는 우리 나라에서 분리된 *Edwardsiella tarda* (*E. tarda*) 에서 나타나는 *tet* gene 이용과 분포에 대해 연구 결과를 보고하였다 (Jun *et al.*, 2004). 그러나 많은 약제 투여의 가능성이 있는 우리나라 양식장 주변에서 발견되는 다양한 종의 Tc 내성 미생물총에서는 어떠한 *tet* gene이 분포하고 있는지에 대한 분석은 아직 이루어지지 않았다.

본 연구에서는 다양한 *tet* gene 에 대한 하나의 공통된 sense primer와 각각의 *tet* gene에 specific primers를 제작한 후 single PCR과 multiplex PCR을 이용하여 그 감도 분석과 실질적인 현장의 내성균 특성을 분석 하고자 하였다. 그 한 단계로서 다양한 *tet* (A), (B), (C), (D), (E) 그리고 (G) 총 6종의 *tet* gene으로부터 각각 유사한 길이

만큼의 부분 DNA를 plasmid에 cloning한 후 이를 templates로 사용하여, multiplex PCR의 정확성과 보다 넓은 응용성을 확인하였다. 또한 우리나라 양식장의 주변 환경 속에 있는 미생물총에서 Tc에 내성을 나타내는 내성균의 비율과 함께, 이미 보고한 primers를 이용하여 이들 내성균이 가지고 있는 내성 유전자 type을 구체적으로 조사하였다.

재료 및 방법

실험 균주

전남 대학교 수산생명의학과 병원 미생물학 연구실과 부경대학교 미생물학과 미생물 유전학 연구실의 협조로 *Escherichia coli* (*E. coli*) C600 R222, *E. coli* HB101 pPT3, *E. coli* C600 pJA8122, 그리고 *E. coli* HB101 pBR322를 분양 받아 실험의 표준 균주로 이용하였으며, *E. tarda* RE1과 *Aeromonas hydrophila* (*A. hydrophila*) HA 균주는 아래에 기술된 방법으로 *tet* gene을 cloning하여 부경대 해양 식량자원 개발 공동 실험관에 유전자의 염기서열에 대한 분석을 의뢰하여, 이전에 보고된 *tet* (A)와 (E) type과 동일한지를 확인한 후 표준균주로 이용하였다.

시료의 채취

해양 환경에서의 내성분포 조사를 위해 2003년 5월 남해안 일대의 해상가두리 양식장 4곳으로부터 양어장 주변의 표층해수, net의 부착물, 바닥 표면으로부터 10 cm 밑의 저질을 각각 취한 후 각 samples를 pool로 하여 시료로 사용하였다. 이때 양식장 4곳 중 2곳은 약 10일전 OTC를 질병 예방을 위하여 투여한 바 있고 또 다른 2곳은 최근 2달간 항생제를 사용한 기록이 없었다. 각 2곳의 양식장에서 체중 50 ± 12 g의 조피볼락 (*Sebastes schlegeli*) 4마리의 장내 물질을 각각 취한 후 각 samples를 pool로 하여 시료로 사용하였다.

내성균 분리

해수, 저질, net의 부착물은 0.15 M phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2) 완충용액으로 10배씩 단계 희석한 후 희석액 10 ml을 0.45 μ m (pore size) membrane filter에 통과시켜, filter에 고정된 세균을 1% NaCl 첨가 TSA배지 (STSA)와 OTC (10 μ g/ml)이 첨가된 STSA배지의 표면과 부착되도록 하였다. 이 agar plate를 25°C에서 24시간 배양한 후 각각의 plate에서 자란 colony수를 확인하여 내성 빈도를 백분율로 계산하였다. 조피 불락은 해부하여 장을 분리한 후 중장 0.5 g을 5 ml의 0.15 M PBS 완충용액에 현탁시켜 분쇄하였다. 내성 빈도에 관한 조사는 위와 동일한 방법으로 이행되었다.

세균의 동정

OTC 10 μ g/ml이 첨가된 배지에서 각기 다른 시료로부터 나타난 colony를 무작위로 취하여 다시 순수 분리한 후 colony의 형태적 특성과 Gram 염색, 그리고 TCBS, CC, GSP 3종의 선택 배지에서의 증식여부를 확인 한 후 API 20E kit와 API 20NE kit (BioMerieux sa, France)로 최종 동정하였다.

Primer 제작과 cloning

각기 다른 *tet* gene을 target으로 하여 PCR 을 실시 하였을 때 Tc 내성 표준균주로부터 모두 유사한 크기의 amplicon이 생성될 수 있도록 각 *tet* gene에 특이적인 primers를 MACAW program (Version 2.0.5, National Center for Biotechnology

Table 1. Primers used in this study

Gene	Origin of the prototype <i>tet</i> gene	Oligo name	Primer sequence (5°C to 3°C)	Primer Position (bp)	Product size (bp)
<i>tet</i> (A)	RE1 from <i>E. tarda</i>	TAF	AATTCTGAGCACTGTCGCG	27~45	
		TAR1	ACAGCCCGTCAGGAAATT	534~517	387
		TAR2	AATGCAGAATGCCAAATG	778~760	752
<i>tet</i> (B)	R222 from <i>E. coli</i>	TBF	GACAAAGATCGCATTGGTA	12~30	
		TBR1	TGAAAGCAAACGGCCTAA	318~301	171
		TBR2	CCATCATGCTATCCATCC	736~718	725
<i>tet</i> (C)	pBR322 from <i>E. coli</i>	TCF	TATCGTCCATTCCGACAGC	102~120	
		TCR1	CGTGCAAGATTCCGAATA	778~761	631
		TCR2	AACGTTTGGTGGCGGGA	820~804	719
<i>tet</i> (D)	pPT3 from <i>E. coli</i>	TDF	ATATCTCCCGGAAGCGGAT	96~114	
		TDR1	CCAGAGGTTTAAGCAGTGT	631~613	484
		TDR2	GACAGTGGCCGGGATCTG	685~667	590
<i>tet</i> (E)	HA from <i>A. hydrophila</i>	TER	CGCACTGTGATGATGGCA	7~24	
		TER1	ATGTGTCCTGGATTCCCT	393~377	246
		TER2	AGCAAGTCCTTGAAACAG	795~778	789
<i>tet</i> (G)	pJA8122 from <i>E. coli</i>	TGF	GCTTGTGCCAGCAGAGCAG	96~114	
		TGR1	ATGCCAACACCCCGGCG	950~933	803
		TGR2	CTTGTTACTGCTGACATT	990~973	895

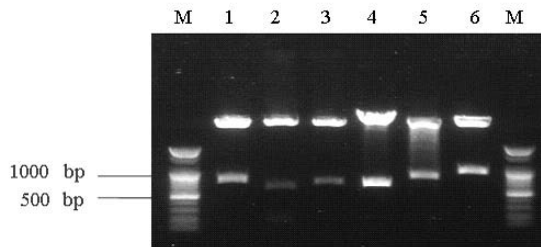


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis the cloned *tet* genes in pUC18 plasmid cut with *EcoR* I. Lane 1, *E. tarda* RE1 *tet* (A); lane 2, *E. coli* C600 *tet* (B); lane 3, *E. coli* HB101 pBR322 *tet* (C); lane 4, *E. coli* HB101 pPT3 *tet* (D); lane 5, *A. hydrophila* HA *tet* (E); lane 6, *E. coli* C600 pJA8122 *tet* (G); M, 100 bp DNA ladder.

Information, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)에서의 *tet* gene alignment로부터 제작하였다. 생성되는 amplicons의 예상 크기와 primers (TAR2, TBR2, TCR2, TDR2, TER2, TGR2)의 각 *tet* gene에서의 위치는 Table 1에 기술하였다. 각 *tet* gene template로부터 생성된 amplicon은 Prep-A-Gene DNA purification kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 사용하여 정제하였으며, 정제한 DNA는 TOPO-TA Cloning Kit (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 pUC18에 cloning 시켰다. Alkaline lysis (Kado and Liu, 1981)법을 사용하여 plasmid 분리한 후 TOPO-TA cloning시 생성되어지는 *EcoR* I site를 이용하여 절단하여 보았을 때 cloning된 amplicon은 기대한 크기의 DNA fragment임을 확인하였고 (Fig. 1), 본 연구에 사용된 *tet* gene은 특이 primers로써 (Table 1) *tet* gene의 type도 확인하였다.

PCR과 Multiplex PCR

6종의 *tet* genes을 cloning한 각 plasmid는 *E. coli* HB101에 transformation을 시킨 후 (김, 1993), alkaline lysis법을 사용하여 분리하였고, Tc 내성 isolates의 total nucleic acid 분리는 Chen과 Kuo (1993) 방법에 따랐다. 분리된 각각의 plasmids는 하나의 pool로 혼합하여 각 *tet* gene

을 함유한 plasmid의 농도가 $0.5\mu\text{g/ml}$ 이 되게 하였다. 준비된 plasmids pool과 total nucleic acid는 일반 PCR 또는 multiplex PCR의 template로 사용하였다. *tet* gene의 확인을 위한 일반 PCR과정은 Yoo 등 (2003)의 방법에 따라 시행하였다. Multiplex PCR에서는 6종의 *tet* gene 각각에 specific한 6개의 antisense primers (TAR1, TBR1, TCR1, TDR1, TER1, TGR1)와 6종의 *tet* gene에서 나타나는 하나의 conserved 부위인 TETF (5'-GCGCTNTATGCGTTGATGCA-3', *tet* (A)의 위치상으로 148~168)을 sense primer를 혼합하여 사용하였으며, amplification cycle은 PCR과 동일하게 하였다. PCR 생성물은 $0.5\mu\text{g/ml}$ EtBr (ethidium bromide)이 첨가된 1% agarose gel 상에서 $0.5\times$ TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA)를 이용하여 전기영동을 실시한 후, UV (ultraviolet)하에서 나타나는 bands를 관찰하여 증폭 여부를 확인하였다.

tet gene type의 분포 조사

OTC가 첨가된 배지에서 자란 colony를 50~100개정도 취하여 TSB에 접종하고 25°C 에서 18~24시간 배양한 후 total nucleic acid를 분리하여 여러 특이적인 primer를 이용해 일반 PCR과 multiplex PCR을 위한 template로 이용하였다. PCR 산물은 $0.5\mu\text{g/ml}$ EtBr이 첨가된 1% agarose gel로 TAE buffer에서 전기영동을 실시한 후 *tet* gene의 종류를 확인하였다.

결 과

Multiplex PCR의 활용

Host cell 내에서 cloning된 *tet* gene를 함유한 각각의 plasmid가 동일한 copy수를 갖게 해주기 위하여 각 *tet* gene template로부터 모두 유사한 크기의 amplicon이 생성될 수 있는 primer (TAR2-TGR2) (Table 1)를 이용하여 PCR을 실시하였고 각각의 생성된 amplicon을 pUC18에

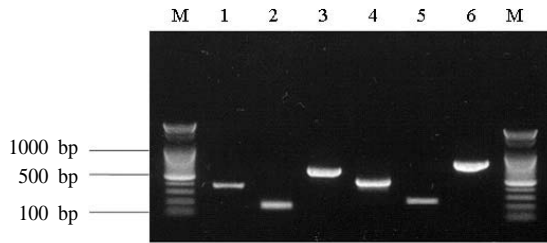


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of the PCR products from cloned *tet* genes in pUC18 plasmid with a single set of *tet* gene primer. Lane 1, *tet* (A); lane 2, *tet* (B); lane 3, *tet* (C); lane 4, *tet* (D); lane 5, *tet* (E); lane 6, *tet* (G); M, 100 bp DNA ladder.

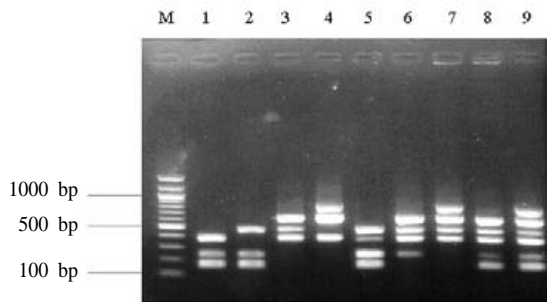


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of amplicons generated by multiplex PCR with mixed primer sets to mixture of each different pUC18 plasmids carrying different *tet* gene. Lane 1, *tet* (B), *tet* (E) and *tet* (A); lane 2, *tet* (B), *tet* (E) and *tet* (D); lane 3, *tet* (A), *tet* (D) and *tet* (C); lane 4, *tet* (A), *tet* (C) and *tet* (G); lane 5, *tet* (B), *tet* (E), *tet* (A) and *tet* (D); lane 6, *tet* (E), *tet* (A), *tet* (D) and *tet* (C); line 7, *tet* (A), *tet* (D), *tet* (C) and *tet* (G); line 8, *tet* (B), *tet* (E), *tet* (A), *tet* (D) and *tet* (C); line 9, *tet* (B), *tet* (E), *tet* (A), *tet* (D), *tet* (C) and *tet* (G); M, 100 bp DNA ladder.

cloning 하였다 (Fig. 1).

제작한 각기 다른 *tet* gene 을 함유한 6종의 plasmid는 transformants로부터 분리 한 후 pool 로 하여 사용 하였다. 그리고 6종의 *tet* gene들이 갖는 conserved region으로부터 제작된 TETF와 각각의 *tet* gene에 특이적인 primers (TAR1, TBR1, TCR1, TDR1, TER1, TGR1)중 하나를 취 하여 한 set의 primer를 이용하여 각 *tet* gene에 특이적인 일반 PCR을 실시한 결과, amplicon의 크기가 *tet* gene의 type에 따라 명확히 구별되는, *tet* (A) (387 bp), *tet* (B) (171 bp), *tet* (C) (631 bp), *tet* (D) (484 bp), *tet* (E) (246 bp) 그리고 *tet* (G) (803 bp)인 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2). 분리 된 plasmid를 template로 하여 multi-template에 대한 multi-primer의 실험, 즉 6종의 template와 6종의 primer를 사용하여 최대의 분별력, 즉 6개의 각기 다른 길이를 가지는 amplicon을 얻고자 하였다. 그 결과 가장 유사한 DNA homology를 갖는 3개의 template를 혼합한 경우부터 6개 전 부의 template를 혼합한 경우까지 모든 경우에서 뚜렷한 특이적 band를 확인할 수 있어 본 multiplex PCR의 정확성과 분별력 그리고 활용성의 가치를 plasmid를 template로 사용하여 보다 명확하게 확인할 수 있었다 (Fig. 3).

양식장 주변 해양 미생물에서의 Tc내성균 비율 분석과 분리균의 동정

Table 2. Proportion of OTC resistant bacteria in marine aquatic environment of Korea

Samples	% of OTC resistant isolates	Numbers of isolates	% of each <i>tet</i> gene	
			<i>tet</i> (B)	<i>tet</i> (C)
Seawater of farm	6.7	50	80	20
Sediment	24.4	25	96	4
Net	30.7	25	100	0
Intestine of rockfish (a)	2.83	25	100	0
Intestine of rockfish (b)	0.25	50	92	8

* Rockfish (a) : OTC treatment before 1 week of sampling

* Rockfish (b) : no antibiotics treatment before 3 months of sampling

양어장 환경에서 채집된 시료를 분석한 결과, 양식장 주변 해수에서는 6.7%, 저질에서는 24.4% 그리고 net의 부착물질에서는 30.7%의 내성균 빈도를 보였다. 그리고 수산생물의 분석에서, 먼저 항생제를 투여하지 않은 양식장의 조피볼락에서 나타나는 장내 세균에서의 내성균 빈도는 0.25%였으나 항생제를 투여한 양식장의 조피볼락에서 나타나는 장내 세균에서의 내성균 빈도는 2.83%로 나타나 항생제의 사용과 어류의 장내 세균에서 나타나는 내성균의 빈도는 밀접한 상관 관계가 있음을 보여주었다 (Table 2).

Tc 내성균이 함유한 *tet* gene type의 분포 조사

각기 다른 시료로부터 분리된 내성균으로부터 total nucleic acid를 분리한 후 이를 template로 이용해 multiplex PCR을 실시함으로써 각 시료로부터 나타난 Tc내성균은 어떠한 type의 *tet* gene을 이용하고 있는지를 분석하였다. 흥미롭게도 모든 시료에서 나타난 Tc내성균 대부분은 tetracycline resistant determinant로 *tet* (B)를 이용하고 있는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 제한된 *tet* gene 이용은 다양한 species의 Tc 내성 해양세균 모두에서 공통적인 것으로 나타났다. 그러므로 양식장 주변의 Tc내성 해양 미생물은 *tet* (B)와 (C), 두 종류의 내성 유전자를 편중되게 이용하고 있음을 알 수 있었다 (Fig. 4).

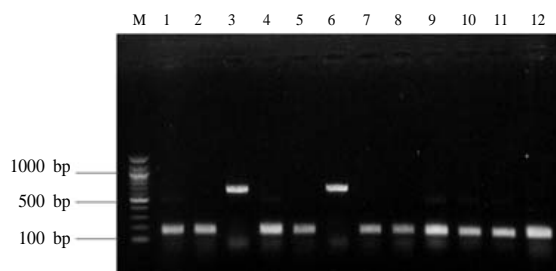


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of amplicons generated by multiplex PCR from the nucleic acids of oxytetracycline resistance bacteria in marine aquatic environment. Lane 1, 2, *tet* (B); lane 3, *tet* (C); lane 4, 5, *tet* (B); lane 6, *tet* (C); lane 7-12, *tet* (B); M, 100 bp DNA ladder.

고 찰

양식 산업에서 *E. tarda*, *Vibrio* sp., *Aeromonas hydrophila*, *Pasteurella piscicida*, *Streptococcus* sp. 등 세균성 질병으로 인한 경제적 손실은 심각하며, 대처 방법은 주로 항생제에 의존하는 것이 현 실정이다. 하지만 항생제의 남용 및 오용으로 인한 약제의 잔류문제, 세균의 내성증가, 다른 세균으로의 내성전이, 다제 내성의 획득으로 질병 치료에 어려움을 겪고 있다.

우리 나라에서는 *E. tarda*의 어류 병원성 세균에서의 약제감수성에 관하여서는 몇몇 보고가 되어 있지만 (최와 김, 1994; 최 등., 1996), 우리나라 양식장의 주변 환경 속에 있는 다양한 종의 미생물에서 나타나는 Tc 내성균의 분포는 어느 정도인지, 그리고 나아가서는 내성균이 갖는 내성 유전자 type은 여러 종류의 *tet* gene type중에서 어떠한 것인지는 분석되어져 있지 않다.

본 연구에서는 각각의 *tet* gene으로부터 유사한 크기의 PCR product를 생성할 수 있는 특이적인 primers를 제작한 후 각 *tet* gene의 표준 균주로부터 분리한 total nucleic acid를 template로 하여 PCR을 실시하고, 생성된 amplicon을 TOPO TA vector에 cloning시켜 *E. coli* HB101 host cell에 transformation을 실시하여 plasmid를 분리하였다. 이렇게 분리된 plasmid들은 각 *tet* gene에 대하여 동일한 *tet* gene의 copy 수와 동일한 host cell 물질의 영향에 있는 template로서의 역할을 할 수 있게 하였다. 그 결과 *tet* (A), (B), (C), (D), (E), 그리고 (G) 6종의 다른 *tet* gene을 함유하고 있는 plasmids를 혼합한 multi templates를 이용한 multiplex PCR에서는 *tet* gene 6개 모두에 대한 PCR 생성물을 얻어, 전기영동 후 6개의 뚜렷한 band가 하나의 lane에서 나타나는 것을 확인하였다 (Fig. 3). 그러므로 본 multiplex PCR은 또 다른 연구 분야에서 보다 광범위한 응용력을 나타낼 수 있을 것이므로 보다 다양한 측면에서 그 잠재력을 분석하는 것도 매

우 중요한 일일 것이다.

그러나 *tet* (A), (B), (C), (D), (E), 그리고 (G)를 가진 각각의 표준 균주로부터 분리한 total nucleic acid를 혼합하여 하나의 pool로 한 후 multiplex PCR의 template로 이용하였을 때, *tet gene*의 type 또는 chromosome/plasmid 등의 location에 따른 내성 유전자의 copy수 차이 때문인지는 명확하지 않지만 동일한 양의 total nucleic acid를 사용한 각각의 *tet gene*에 대해, 증폭된 PCR 생성물이 양적 차이를 보여 3개의 templates를 혼합한 경우까지는 정확한 3종류의 PCR 생성물을 얻을 수 있었으나 4개의 templates를 혼합한 경우부터는 혼합된 *tet gene*의 종류에 따라 차이를 보였다 (data not shown). 물론 Depaola 등 (1993)과 Lee 등 (1993)은 하나의 내성균에서 3개 이상의 *tet gene*이 나타난 경우가 없었다고 보고하였으므로, total nucleic acid를 이용하여 한 종의 세균이 가지는 *tet gene type*을 결정하는데 본 연구에서 개발한 multiplex PCR방법을 실시 하여도 충분한 여력이 있을 것이다. 그리고 이러한 multiplex PCR방법은 여러 번 PCR을 수행하지 않아도 되고 hybridization과 같은 복잡한 과정을 거치지 않아도 되므로 시간적, 경제적 손실을 줄일 수 있는 장점이 있다.

양식장 주변의 해양환경에서 채집된 다양한 시료를 분석한 결과, net의 부착물질 (30.7%)과 저질 (24.4%)에서 가장 높은 TC 내성균의 분포를 보여 주었으며, 해수에서는 그 빈도가 비교적 낮게 나타났다. 그리고 예측할 수 있었지만 항생제를 투여한 조피볼락의 장내 세균에서의 내성균 빈도는 2.83%, 항생제를 투여하지 않은 조피볼락은 0.25%의 내성균 빈도를 보여 항생제를 투여한 어류가 항생제를 투여하지 않은 어류에 비하여 높게 나타났다. Kerry 등 (1995)의 조사에서도 저질에서의 OTC에 대한 내성 비율이 $26 \pm 8.7\%$ 로 나타나 본 실험 결과와 유사함을 확인할 수 있었으며, 해양 환경의 경우 해수에 존재하는 이가 양이온이 항생제와 불활성 복합체를 형성하여 저질 등에 축적된다는 보고와도 일

치함을 확인할 수 있었다 (Pusell *et al.* 1996). 그리고, 저질과 net의 부착물질에서 조사된 내성균의 빈도가 24.4%, 30.7%로 각각 높게 나타났다는 것은 이러한 양식장 주변의 환경이 내성균의 reservoir 역할을 충분히 할 수 있을 것이라 추정되어졌다. 물론 이러한 결과는 환경 속에 있는 세균의 종류에 따라서 차이가 날 수 있으므로 서로 직접적으로 그 비율을 비교하기는 어려울 수도 있다.

이런 측면에서 본 연구에서 분석한 세균의 species를 API20E와 20NE를 사용하여 조사한 결과 그 종류가 *Vibrio sp.*가 60-70% 이상을 차지 하였고 *Enterobacter sp.*와 *Shewanella sp.*가 20-30% 그리고 *A. hydrophila*가 약 4-20%인 것으로 나타났으나 그 동정의 정확도는 매우 제한적이라고 밖에 할 수 없을 것으로 추정된다 (data not shown). 또한 시료간의 뚜렷한 세균종의 경향의 차이는 나타나지 않았다. 그러나 이 Tc 내성 균들이 이용되고 있는 *tet gene*의 type은 *tet* (B)와 *tet* (C) 두개의 유전자만으로 나타나 상당한 의미를 부여할 수는 있으리라고 추정하고 있다. 그것은 아마 *Vibrio sp.*가 *tet* (B) 유전자를 dominant한 type으로 사용되는 것과 연관이 있으리라고 추정 된다 (Kim *et al.*, 2007). 그리고 흥미 있는 것은 해수와 장내세균에서 낮은 비율로 발견 되었지만 *A. hydrophila*균은 모두 *tet* (C)를 이용하고 있는 것을 알 수 있었다. 비록 Andersen 등 (1994)은 해양 저질에서 분리된 내성균 중 그람 음성균에 존재하는 *tet gene*을 조사해본 결과, *tet* (A), (B), (C), (D) 그리고 (E) 등의 다양한 분포를 보였다고 보고하였지만 본 실험에서는 *tet* (B), (C)만을 확인할 수 있어 차이를 보였는데 그것은 오염지역의 부두 저질만을 분석한 결과와 양식장 주변의 시료를 대상으로 한 본 연구와의 차이에서 나타난 것이거나 분리된 균의 species가 제한적이었다는 것에서 유래 하였을 수도 있다.

비록 본 연구에서는 Gram 음성균에서 주로 나타나는 6종의 *tet gene type*에 대한 분석만을

실시하였지만 향후에는 보다 다양한 시기에 다양한 양식장 주위 환경으로부터 분리된 해양 세균에 대한 비교분석까지 이루어져야 할 것이며, 나아가서는 32종 이상으로 알려져 있는 다양한 *tet* gene type 모두에 대한 분석이 이루어져 한 종의 해양 세균에 나타날 수 있는 여러 type의 *tet* gene까지도 분석되어야 할 것이다.

요 약

각각의 6종 *tet* gene을 유사한 크기의 DNA로 cloning한 후 plasmids를 이용하여 multiplex PCR을 실시하여 6개의 template를 혼합한 경우까지 모든 경우에서 뚜렷한 특이적 band를 확인할 수 있어 본 방법의 정확성과 분별력 그리고 활용성의 가치를 보다 명확하게 확인할 수 있었다. 확립된 본 기법을 이용하여 양어장 환경에서 채집된 세균총을 분석한 결과, 양식장 주변 해수에서는 6.7%, 저질에서는 24.4% 그리고 net의 부착물 질에서는 30.7%의 내성균 빈도를 보였으며, 항생제를 투여한 조피볼락의 장내 세균에서의 내성균 빈도는 2.83%, 항생제를 투여하지 않은 조피볼락은 0.25%의 내성균 빈도를 보여 항생제를 투여한 어류가 항생제를 투여하지 않은 어류에 비하여 높게 나타났다. 분리된 내성균에는 *tet* (B), *tet* (C)만을 확인할 수 있어 대부분이 두 종류의 내성 유전자에 편중되게 나타남을 알 수 있었다.

사 사

본 연구는 해양수산부의 수산특정 연구과제 (2005)로서 수행 되었기에 감사 드립니다.

참 고 문 헌

- Andersen, S.R. and Sandaa, R.A.: Distribution of tetracycline resistance determinants among gram-negative bacteria isolated from polluted and unpolluted marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 908-912, 1994.
- Aoki, T., Kitao, T. and Fukudome, M.: Chemotherapy against infection with multiple drug resistant strains of *Edwardsiella tarda* in cultured eel. *Fish pathology*, 34: 161-168, 1989.
- Chen, W. and Kuo, T.: A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Research*, 21: 2260, 1993.
- Chopra, I. and Roberts, M.: Tetracycline antibiotic: mode of action, application, molecular biology and epidemiology of bacterial resistance. *Micriobiology and Molecular Biology*, 65: 232-260, 2001.
- DePaola, A., Flynn, P.A., McPherarson, R.M. and Levy, S.B.: Phenotypic and genotypic characterization of tetracycline and oxytetracycline resistant *Aeromonas hydrophila* from cultured channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and their enviroments. *Applied and Environmental Microbiology*, 54: 1861-1863, 1988.
- Depaola, A., Hill, W.E. and Harrell, F.M.: Oligonucleotide probe determination of tetracycline resistant bacteria isolated from catfish ponds. *Molecular and Celluiar Probes*, 7: 345-348, 1993.
- Ervik, A., Thorsen, B., Eriksen, V., Lunestad, B.T. and Samuelsen, O.B.: Impact of administering antibacterial agent on wild fish and blue mussels *Mytilus edulis* in the vicinity of fish farm. *Diseases Aquatic Organism*, 18: 45-51, 1994.
- Hekton, H., Berge, J.A., Hormazabal, V. and Yndestad, M.: Persistence of antibacterial agents in marine sediment. *Aquaculture*, 133: 175-184, 1995.

- Jun, L.J., Jeong, J.B., Huh, M.D., Chung, J.K., Choi, D.L., Lee, C.H. and Jeong, H.D.: Detection of tetracycline-resistance determinants by multiplex polymerase chain reaction in *Edwardsiella tarda* isolated from fish farms in Korea. *Aquaculture*, 240: 89-100, 2004.
- Kado, C.I. and Liu, S.T.: Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* 145: 1365-1373, 1981.
- Kim, E.H. and Aoki, T.: The structure of the chloramphenicol resistance gene on transferable R plasmid from the fish pathogen, *Pasteurella piscicida*. *Microbiology Immunology*, 37: 705-712, 1993.
- Kim, Y.H., Jun, L.J., Park, S.H., Yoon, S.H., Chung, J.K., Kim, J.C. and Jeong, H.D.: Prevalence of tet(B) and tet(M) genes among tetracycline-resistant *Vibrio* spp. in the aquatic environments of Korea. *Diseases Aquatic Organism*, 75: 209-216, 2007.
- Kerry, J., Hiney, M., Coyne, R., Cazabon, D., Nic-Gahainn, S. and Smith, P.: Frequency and distribution of resistance to oxytetracycline in micro-organisms isolated from marine fish farm sediments following therapeutic use of oxytetracycline. *Aquaculture*, 123: 43-54, 1994.
- Kerry, J., Hiney, M., Coyne, R., Gabhainn, S.N., Gilroy, D., Cazabon, D. and Smith, P.: Fish feed as a source of oxytetracycline resistance bacteria in the sediments under fish farms. *Aquaculture*, 131: 101-113, 1995.
- Lee, C., Langlois, B.E. and Dawson, K.L.: Detection of tetracycline resistance determinants in pig isolates from three herds with different histories of antimicrobial agent exposure. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 1467-1472, 1993.
- Marshall, B.C., Tachibana, C. and Levy, S.B.: Frequency of tetracycline resistance determinant classes among lactose-fermenting coliforms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 24: 835-840, 1983.
- McPhearson, R.M., DePaola, A., Zywno, S.R., Motes Jr., M.L. and Guarino, A.M.: Antibiotic resistance in gram-negative bacteria from cultured catfish and aquaculture ponds. *Aquaculture*, 99: 203-211, 1991.
- Pursell, L., Dineen, T., Kerry, J., Vaughan, S. and Smith, P.: The biological significance of breakpoint concentration of oxytetracycline in media for the examination of marine sediment microflora. *Aquaculture*, 145: 21-30, 1996.
- Schmidt, A.S., Bruun, M.S., Dalsgaard, I., Pedersen, K. and Larsen, J.: Occurrence of antimicrobial resistance in fish-pathogenic and environmental bacterial associated with four Danish rainbow trout farms. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 4908-4915, 2000.
- Spanggard, B., Jorgensen, F., Gram, L. and Huss, H.H.: Antibiotic resistance in bacteria isolated from three freshwater fish farms and unpolluted stream in Denmark. *Aquaculture*, 115: 195-207, 1993.
- Vaughan, S., Coyne, R. and Smith, P.: The critical importance of sample site in the determination of the frequency of oxytetracycline resistance in the effluent microflora of a fresh water fish farm. *Aquaculture*, 139: 47-54, 1996.
- Yoo, M.H., Huh, M.D., Kim, E.H., Lee, H.H. and Jeong, H.D.: Characterization of chloramphenicol acetyltransferase gene by multiplex polymerase chain reaction in multidrug-resistant strains isolated from aquatic environ-

- ments. *Aquaculture*, 217: 11-21, 2003.
- 김종명: 테트라사이클린 내성 황색포도상구균으로부터 테트라사이클린 내성 유전자의 클로닝. 경성대학교 약학과 박사논문, 1993.
- 최민순, 김영길: 양만장 사육조에서 분리한 *Edwardsiella tarda*의 약제 내성과 R plasmid. *한국어병학회지*, 7: 37-46, 1994.
- 최민순, 최상훈, 박관하: 뱀장어 병어로부터 분리한 *Edwardsiella tarda*의 약제 내성. *한국어병학회지*, 9: 195-201, 1996.

Manuscript Received : August 8, 2007

Revision Accepted : August 17, 2007

Responsible Editorial Member : Ki-Hong Kim
(Pukyong Univ.)