



저작자표시-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



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](#)

이 학 석 사 학 위 논 문

tet 유전자의 정량화에 의한

어류 장내 미생물총의

Tc 내성 수준 분석



2010년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 명 의 학 과

김 영 진



이 학 석 사 학 위 논 문

tet 유전자의 정량화에 의한
어류 장내 미생물 총의
Tc 내성 수준 분석

지도교수 정 현 도

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함

2010년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 명 의 학 과

김 영 진

김영진의 이학석사 학위논문을 인준함.

2010년 2월 25일



주 심 농 학 박 사 허 민 도



위 원 약 학 박 사 정 준 기



위 원 이 학 박 사 정 현 도



목 차

Abstract

I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	6
1. 어류 장내 세균 조사	6
1-1. 어류 채집	6
1-2. 장내 세균 분석	8
1-3. Replica plating method	8
1-4. Tc 내성균의 분리	9
2. 약제 감수성 실험	9
3. Conventional multiplex PCR amplification	10
3-1. Primer	10
3-2. Total Nucleic acid 분리	13
3-3. Multiplex PCR	13
4. Real-time PCR	14
4-1. Primer	14
4-2. Stool DNA 분리	17
4-3. Real-time PCR을 위한 standard DNA 제조	17
4-3-1. Plasmid standard의 제조	17
4-3-2. Amplicon standard의 제조	18
4-3-3. Standard DNA의 정량	18
4-4. Real-time PCR	18
5. 채집 어류의 stool DNA에 대한 real-time PCR의 적용	19

6. Pearson 상관관계 분석	19
7. 어류 장내 microflora number와 16s rDNA gene copy 값과의 관계	20
8. <i>tet</i> gene의 위치와 copy 값과의 관계	21
9. Transformation	23
10. Conjugation	23
III. 결 과	25
1. 어류 장내 세균의 분포	25
2. 어류 장내 세균의 항생제 내성 비율	31
3. Tetracycline 내성의 수준 비교	39
4. Tetracycline 내성 유전자 분포 조사	43
5. 어류 장내 Tc 내성 유전자의 정량	53
6. Tc 내성 비율과 indicator <i>tet</i> gene과의 상관관계	60
7. <i>tet</i> gene의 위치와 copy 값의 차이	62
8. Tc 내성 유전자의 transformation과 conjugation	65
IV. 고 찰	69
V. 요 약	79
VI. 감사의 글	81
VII. 참고문헌	82

Quantification of prevalent *tet* genes, reflecting the level of
Tc resistance in fish microflora

Young Jin Kim

Department of Aquatic Life Medicine, The Graduate school,
Pukyong National University

Abstract

This study investigated the proportion of antibiotic-resistant bacteria using quantitative analysis of tetracycline-resistant genes (*tet* genes) in fish intestines. The proportion of Tc resistant bacteria in marine fishes in Korea (20–50%) appeared to be much lower than that of imported freshwater ornamental fishes (70–95%). Additionally, the proportion of Tc resistant bacteria from domestic freshwater ornamental fishes (40–60%) was also much lower than that of ornamental fishes from other Asian countries. An analysis of the type of *tet* genes present in fish microflora found that *tet*(A) and *tet*(B) were dominant in Tc-resistant bacteria from ornamental and marine fishes, respectively.

To determine whether the *tet* genes were located on plasmids or chromosomes, we performed transformation and conjugation experiments to test the mobility of the *tet* genes. Transformants and transconjugants containing *tet*(A) showed tetracycline resistance. The importance of indicator

tet gene mobility to other bacteria lies in the possibility that the indicator *tet* gene may also be located in mobile plasmids and can be transferred to other bacteria. The copy number of *tet* genes in plasmids was higher than that in chromosomes.

We report here the development, validation, and use of real-time PCR (qPCR) for both the detection and quantification of various efflux *tet* genes: *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(E)*, and *tet(G)*, which are common in the microflora of the aquatic environment due to the high use of tetracycline. The copy number of each indicator *tet* gene was determined using qPCR, with *tet(A)* used for freshwater ornamental fishes and *tet(B)* for domestic marine fishes. We also examined the relationship between the frequency of Tc-resistant colonies on coed ntional agar plates and abundances, analyzed using qPCR. These two assays for *tet* gene load in Tc-resistant bacteria were significantly correlated and evidenceshwaterotential of qPCR for determining the load of Tc-resistant and abundavolving *tet* genes in aquatic microflora. This study demonstrated that qPCR is not only a rapid diagnosis method for detecting the diverse *tet* genes in the ecosystem, but also an accurate and sensitive method for comparing the proportion of Tc-resistant bacteria in normal microflora.

I. 서 론

양식 현장에서 생산성 향상을 위한 밀식, 과다한 사료 투여 등으로 수질악화 및 스트레스 요인의 증가와 함께 세균성 질병의 발생률도 증가함으로써 이러한 질병의 치료를 위하여 우리 나라에서는 많은 양의 항생제가 사용되어지고 있다. 더구나 새로운 병원체에 의한 어류 질병 발생이 증가함에 따라 항생제의 사용 빈도도 점차 증가 추세에 있다. 그 결과 항생제에 대한 내성균의 증가와 다제 내성의 발생과 같은 문제들이 제기되고 있다. 기존에 발표된 보고에 따르면 Bell *et al.* (1988)과 Smith *et al.* (1994)은 양식장에서 사용하는 항생제에 대한 다제 내성균의 출현, Stamm *et al.* (1989)은 항생제에 노출되는 시간이 길수록 각종 질병 원인 균의 Minimum Inhibition Concentration (MIC) 값이 증가한다고 하였다. 더구나 사람에게 병원성이 있는 *Vibrio parahaemolyticus* 등에서도 새로운 내성 유전자의 출현이 보고되고 있으며 (Twiddy *et al.*, 1994), 이는 수산물을 섭취하는 사람에게까지 위협이 되고 있다. 항균성 약제에 의한 질병 예방 및 치료는 일시적인 효과는 있으나 근본적이고 종합적인 질병 방지책으로는 매우 미흡하여, 무분별한 약제의 오용 및 남용은 추후 더욱 강력한 항생제를 필요로 하게 되고 결과적으로는 내성균의 만연으로 인하여 질병의 확산이 발생할 수도 있다.

Tetracycline (Tc)은 정균 작용을 나타내는 광역성 항생물질로서 많은 그람 양성 및 음성 세균, *Rickettsia*, *Mycoplasma* 및 *Chlamydia* 등에 효과적으로 작용하는 항생물질이기 때문에, 어류의 질병 치료를 위한 수산용 항생제로서 매우 중요한 위치를 차지하고 있다. 구조적으로 acetate와 malonate가 환을 형성하여, 4개의 연결된 환을 그 모핵으로 가지고

있으며, 세균의 ribosome의 30s subunit에 결합하여, aminoacyl tRNA가 50s subunit의 acceptor site와 결합하는 것을 방해하는 방법으로 단백질 합성을 억제시키는 작용에 의한 정균 능력을 나타낸다 (Roberts, 1996). 현재 tetracycline, oxytetracycline, chlorotetracycline, doxycycline, minocycline 등 다양한 tetracycline계 항생제가 수산용 치료제로서 널리 이용되고 있으며, Atlantic salmon의 냉수성 비브리오병과 구적병, chinook salmon의 rosette병, Flavobacteria병, furunculosis, 무지개송어의 콜롬나리스병 및 연쇄 구균병 등 많은 어류 질병 치료를 위해 사용되고 있다.

이러한 tetracycline계 약물의 과도한 사용으로 Tc에 대해 내성을 가지는 많은 종류의 내성균이 발생하게 되었다. 이러한 내성균이 가지는 내성 기작의 특성을 보면, 첫째, 내재성 막 단백질에 의해 일어나는 Tc의 energy-dependent efflux, 둘째 용해성 단백질에 의한 ribosomal protection, 마지막으로 효소에 의한 Tc의 불활성화에 의해 일어나는 세 가지로 분류 된다 (Levy, 1992; Taylor&Chau, 1996; Chopra&Roberts, 2001). 내성 기작의 특성에 따라 Tc 내성 유전자도 그 종류를 달리하는데 efflux 내성 기작을 가지는 *tet* gene으로 *tet*(A), (B), (C), (D), (E), (G), (H), (I), (J), (K), (L), (Y), (V), (Z), (30) 그리고 (31) 등이 있으며, 현재 *tet*(33), (35), (38), (39) 등 총 23개의 내성 유전자가 같은 기작을 가진 것으로 밝혀졌다. Ribosomal protection의 경우는 *tet*(M), (O), (S), (W), (Q), (T), (32) 그리고 (36) 등 11 종류가 있고 enzymatic은 *tet*(X)가 있는 것으로 알려져 Unknown *tet* gene 인 *tet*(U)까지 포함하면 총 38가지의 Tc 내성 유전자가 존재하는 것으로 밝혀졌다 (Roberts, 2005). 각종 Tc 저항성 세균의 *tet* gene 종류는 세균에 따라 다소 차이가 있지

만 (Roberts, 1989; Roberts *et al.*, 1990), 대부분의 gram 음성 세균에는 *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(E)* 및 *tet(G)*의 6종이 major type의 내성유전자로 분포한다는 것이 보고된 바 있다 (Chopra & Roberts, 2001). *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 있다. 현재는 polymerase chain reaction (PCR) 기법이 일반적으로 널리 사용되어 유전자 검출이 보다 간편하며 신속하게 되었을 뿐만 아니라 정량적 분석까지 가능한 quantitative real-time PCR (qPCR) 기법이 도입되어 일반화되고 있는 실정이다. qPCR은 실시간으로 PCR 증폭산물의 생성과정을 모니터링하여 target DNA의 양을 분석하는 장비로써 PCR 증폭산물의 확인을 위한 전기영동이 필요 없으며, 증폭이 지수 함수적으로 일어나는 영역에서 증폭 산물량을 비교하여 보다 정확한 정량이 가능한 신속성과 정량성이 뛰어난 방법이며 (Heid *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2001), 현재 환경 속에 내재하는 여러 가지 미생물을 검출하고 정량하는 분자 생물학적 진단 방법으로 사용되고 있다 (Bach *et al.*, 2002; Stubner *et al.*, 2002). qPCR은 bio-sample 간에서 나타날 수 있는 항생제 내성균의 부하(load) 차이를 비교 분석할 수 있고 그 결과 또한 보다 정밀하고 객관적이며 직접 내성 유전자까지 검출할 수 있다. 특히 총 미생물 군 혼합물에서의 양적 분석은 non-culturable bacteria까지 정량할 수 있어 single bacterial colony를 사용한 classical method에 비해 빠르고 정확하다. 동물, 축산물 및 환경유래 항생제 내성 원인균과 인체임상 내성 균주에 관한 qPCR법을 이용한 연구는 많이 보고되어 왔다

(Peak *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2004). 이러한 연구는 내성균에 대한 종류, 빈도, 분포뿐만 아니라 내성 결정 유전자의 유전적인 변화도 함께 분석하여 향후 어떠한 내성균 발생이 나타날 것인지, 새로운 내성균의 유입은 없는지, 그리고 내성균의 진화는 어떻게 이루어지고 있는지에 대한 유전적인 정확한 분석이 이루어지고 있다. 하지만 수산생물에 대한 이러한 연구는 큰 관심을 끌지 못하고, 다만 내성균의 비율 조사에서 그 수치가 높게 나타나므로 수산생물에서 나타나는 내성 유전자의 포괄적이고 가상적인 내재적 위험에 대한 경고만 이루어지고 있다. 특히 무분별한 항생제의 사용에서 예외적인 부분으로 인식되고 있는 관상어에서 어떠한 종류의 내성 유전자가 변화해 가고 어느 정도의 위험성을 가지고 있는지에 대한 분석이 우리나라에서는 미비한 상태이다. 또한 우리나라로 수입되는 관상어에는 어류의 폐사 및 여러 병원성 미생물에 의한 질병을 줄이기 위해 여러 항생제 및 화학요법제를 사용하는데 그로 인해 항생제에 대한 내성균이 발생 할 수 있으며, 나라간 교역으로 항생제 내성균이 다른 환경으로의 이동과 다재 내성균의 출현 및 어류에서 사람에게로의 내성 유전자 전이 등이 나타날 수 있다. 하지만 현재 수산생물질병관리법에서는 수산동물전염병의 병원체에 관하여서만 규정하고 있어 외국으로부터의 수입된 관상어로부터의 항생제 내성균과 그에 따른 내성 유전자 전이와 같은 위험이 야기 될 수 있으며 또한 그 위험성은 곧바로 양식현장의 실질적인 문제점으로 이어질 수 있다.

따라서 본 연구에 있어서는 수입된 담수 관상어와 국내산 담수 관상어 및 해산어 장내 세균에서 존재하는 Tc 항생제에 대한 내성 세균의 비율 및 내성 유전자 분포를 알아보고 각 그룹에서 나타나는 주요 *tet* gene에 대하여 조사하고자 하였다. 또한 내성 비율에 따른 indicator *tet* gene 부

하 량과의 관계에 대해서도 함께 분석하였다. 본 연구에서는 gram 음성 균에서 major type으로 나타나는 *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(E)* 및 *tet(G)*을 대상으로 하여 어류 장내 Tc 내성균이 가지는 내성 유전자의 총량을 qPCR을 이용하여 정량 하고 어종별, 국가별에 따른 *tet* gene 종류의 분포비율과 indicaoter *tet* gene의 종류를 파악하였으며 또한 장 내 Tc 내성균의 특성을 알아보고자 하였다.



II. 재료 및 방법

1. 어류 장내 세균 조사

1-1. 어류 채집

수입산 관상어를 샘플링 하기 위해 2008년 1월에서 2009년 8월에 이르기까지 공항을 통하여 수입된 관상어를 펄 구라미 (*Trichogaster leeri*), 드워프 구라미 (*Colisa lalia*), 골든 구라미 (*Trichogaster trichopterus* var) 종에 대해 총 11차례에 걸쳐 채집하였고, 국내산 관상어는 우리나라 경기도에서 양식하는 블루 구라미 (*Trichogaster trichopterus sumatranus*) 종을 3차례 샘플링 하였다. 해산어의 경우는 국내에서 양식된 해수 양식 어류 Rock bream (*Oplegnathus fasciatus*), Red sea bream (*Pagrus major*), Flounder (*Paralichthys olivaceus*) 그리고 Sea bream (*Acanthopagrus schlegelii*) 을 2008년 1월에서 2009년 8월까지 총 22차례 채집하였다. 그리고 자연산의 경우 부산 근해에서 잡힌 Rock bream (*Oplegnathus fasciatus*)과 일본 근해에서 잡혀 수입된 Rock bream (*Oplegnathus fasciatus*)을 각각 6차례, 4차례씩 채집하여 실험을 실시하였다 (Table 1).

Table 1. Cultured marine fishes, wild marine fishes, and freshwater ornamental fishes used in this experiment.

Country		Names of fishes	Body weight (g)	Sampling frequency
Marine cultured fishes	Korea	Rock bream (<i>Oplegnathus fasciatus</i>)	30±20	9
		Red sea bream (<i>Pagrus major</i>)	10±5	3
		Flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	30±20	9
		Black sea bream (<i>Acanthopagrus schlegelii</i>)	13±5	1
Marine captured fishes	Korea	Rock bream (<i>Oplegnathus fasciatus</i>)	50±40	6
	Japan	Rock bream (<i>Oplegnathus fasciatus</i>)	600±300	4
Freshwater ornamental fishes	Singapore	Pearl gourami (<i>Trichogaster leerii</i>)	5±2	5
		Dwarf gourami (<i>Colisa lalia</i>)		2
		Golden gourami (<i>Trichogaster trichopterus</i> var)		2
	China	Pearl gourami (<i>Trichogaster leerii</i>)		3
	Thailand	Pearl gourami (<i>Trichogaster leerii</i>)		1
	Korea	Blue gourami (<i>Trichogaster trichopterus sumatranus</i>)		3

1-2. 장내 세균 분석

샘플링한 어류의 어체를 해부하여 중장을 분리한 후 무균적으로 장내 stool을 모으고, 그 중 0.1g 을 1X PBS 에 현탁하여 10^{-1} -fold 로 만든 후 10배씩 단계 희석 하여 희석 액을 0.45 μm (pore size) membrane filter (ADVANTEC, Japan) 에 통과시켜 고정하였다. Filter에 걸린 세균을 1% NaCl 첨가 TSA (Tryptic soy agar, Difco, USA) 배지와 다양한 장내 세균의 조사를 위해 각각의 선택배지에 따른 특징적인 집락의 색을 정의하여 균을 분리·동정하였다. Lactoseml 유무에 따라 붉은 색과 상아색의 집락을 나타내는 *Enterobacteriaceae* 선별 배지인 CC (Chromocult agar MERCK, Germany), 각각 노란색과 자주색의 집락을 나타내는 *Aeromonas* spp.와 *Pseudomonas* spp. 선별 배지인 GSP (MERCK, Germany) 그리고 노란색과 초록색 colony를 나타내는 *Vibrio* spp. 선별 배지인 TCBS (Difco, USA) agar 배지에도 부착하였다. 이러한 agar plate를 25℃에서 18~24시간 배양한 후 각각의 plate에서 자란 colony수를 확인하여 strain 분포 비율을 백분율로 계산하였다. 또한 어류 장내 정상 세균총의 동정을 위하여 위의 3가지 선택 배지 외에도 필요에 따라 API 20E test (Biomérieux, France)를 통하여 일부 균을 동정하였다.

1-3. Replica plating method

1% NaCl 첨가 TSA (Tryptic soy agar, Difco, USA) 배지에서 배양된 colony들을 무작위로 선택하여 1% NaCl 첨가 TSA 배지에 80개를 dotting하였다. 25℃에서 18~24시간 배양한 후, 멸균된 벨벳 천을 이용하

여 1% NaCl 첨가 TSA (Tryptic soy agar, Difco, USA) 배지와 tetracycline (Tc 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$), ampicillin (Amp 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$), Erythromycin (Em 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$), Oxolinic acid (OA 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 chloramphenicol (Chp 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 각각 첨가된 TSA 배지에 Replica Method를 실시하였다. 이러한 agar plate를 25℃에서 18~24시간 배양한 후 각각의 plate에서 자란 colony수를 확인하여 내성비율을 백분율로 계산하였다. 또한 다양한 장내 세균에서의 Tc 내성균 조사를 위해서 *Enterobacteriaceae* 선별 배지인 CC (Chromocult agar MERCK, Germany), *Aeromonas* spp.와 *Pseudomonas* spp. 선별 배지인 GSP (MERCK, Germany) 그리고 *Vibrio* spp. 선별 배지인 TCBS (Difco, USA) agar와 각각의 Tc 첨가 배지에도 Replica method를 실시하였다. 이러한 agar plate를 25℃에서 18~24시간 배양한 후 각각의 plate에서 자란 colony수를 확인하여 내성비율을 백분율로 계산하였다.

1-4. Tc 내성균의 분리

1-3에서 실시한 TSA 배지 중 Tc 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 첨가된 배지에서 자란 colony를 무작위로 선택하여 TSB (Tryptic soy broth, Difco, USA)에 접종한 후 25℃에서 18~24시간 배양하였다.

2. 약제 감수성 실험

1-4에서 실시한 배양액을 이용하여 Tc에 대한 내성 정도를 MIC 값으로 나타냈으며, broth dilution method를 사용하여 측정하였다 (Kim,

1997). 먼저 96 wells plate에 멸균된 TSB를 $160\mu\text{l}$, 각 농도로 희석된 항생제를 $20\mu\text{l}$, TSB에 10^7 cell/ml로 현탁시킨 균액을 $20\mu\text{l}$ 넣었고, positive control은 TSB $180\mu\text{l}$ 와 희석시킨 균액 $20\mu\text{l}$ 를 넣고, negative control은 TSB만 $200\mu\text{l}$ 넣었다. 25°C 에서 18시간 배양 후 세균의 증식에 따른 액체 배지의 혼탁도를 관찰하여 세균이 자라지 않는 항생제의 최저 농도를 MIC 값으로 결정하였다.

3. Conventional multiplex PCR amplification

3-1. Primer

tet(A), *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(E)*, *tet(G)*는 전 (2003)의 논문에서 제작된, multiplex PCR (multi PCR) 법에 사용 하였던 primer를 사용하였으며 Fig. 1, Table 2 에 나타냈다. Sense primer 인 TETF primer 는 6개의 *tet* gene sequence를 비교한 후, 가장 많이 conserve되어 있는 148bp~168bp 부위로부터 제작하였다 (degenerated primer).

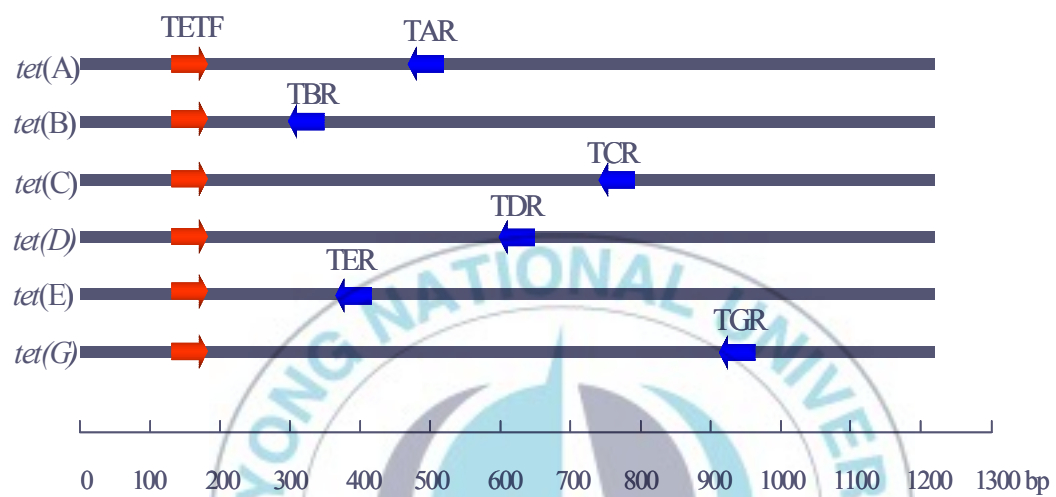


Fig. 1. Positions of primers used in multi-PCR of *tet* genes.

(➡ : sense primer, ⬅ : antisense primers)

Table 2. Expected sizes of various tet genes assayed using multi-PCR

<i>tet</i> genes	Oligomers name	Primer sequence (5' to 3')	Expected size
	TETF	GCGCTINTATGCGTTGATGCA	
<i>tet</i> (A)	TAR	ACAGCCCGTCAGGAAATT	387 bp
<i>tet</i> (B)	TBR	TGAAAGCAAACGGCCTAA	171 bp
<i>tet</i> (C)	TCR	CGTGCAAGATTCCGAATA	631 bp
<i>tet</i> (D)	TDR	CCAGAGGTTTAAGCAGTGT	489 bp
<i>tet</i> (E)	TER	ATGTGICCTGGATTCCT	246 bp
<i>tet</i> (G)	TGR	ATGCCAACACCCCCGGCG	803 bp

3-2. Total nucleic acid 분리

The boiling method (Roberts *et al.*, 1993)을 이용하여 total nucleic acid 를 분리하였다. 1-4에서 배양한 배양액 1ml을 12000rpm에서 10분 동안 원심 분리 한 후 상징액을 버리고 pellet 을 다시 1X PBS 1ml에 현탁, 12000rpm에 다시 10분 원심 분리한 다음 상징액을 완전히 제거하였다. Pellet을 TE 600 μ l에 현탁하여 95~97℃의 물에서 10분간 heating 시킨 후 상징액을 multi PCR을 위한 template로 이용하였다.

3-3. Multiplex PCR

Heating 하여 분리한 DNA를 template로 하여 multi PCR을 실시하였다. 10X PCR buffer 2 μ l, 200 μ M의 각각의 dNTP, 2 μ M의 sense primer 와 1 μ M의 각각의 antisense primer, Taq DNA polymerase (Taq DNA polymerase, Cosmo, Korea) 및 template 1 μ l를 첨가한 후 distilled water로 최종액의 volume이 20 μ l가 되도록 했다. PCR 혼합물은 Perkin-Elmer 2400 thermal cycler (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA)를 사용하여, 94℃에서 3분간 pre-denaturation 시킨 후, 94℃에서 30초 denaturation, 55℃에서 30초 annealing, 72℃에서 30초 extension의 반응을 30 cycle 수행 한 후 72℃에서 7분간 post-extension 시켰다. PCR 후 증폭 산물은 0.5×TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA)를 전기영동을 위한 완충액으로 하여, 0.5 μ g/ μ l EtBr (Ethinium Bromide)이 첨가된 2% agarose gel (SeaKem[®] LE Agarose, CAMBREX Bio Science Rockland, Inc, USA) 상에서 전기 영동한 후, UV 검출기 (Seoulin Scientific Co., Ltd., Korea)를 이용하여, ultraviolet상에서 검출

되는 band의 길이를 관찰하여 *tet* gene의 종류를 확인하였다.

4. Real-time PCR

4-1. Primer

qPCR에 사용된 *tet*(A), *tet*(B), *tet*(C), *tet*(D), *tet*(E), *tet*(G)는 윤 (2008)의 논문에서 제작된, Real-time PCR 법에 사용 하였던 primer를 사용하였으며 Fig. 2, Table 3 에 나타냈다.



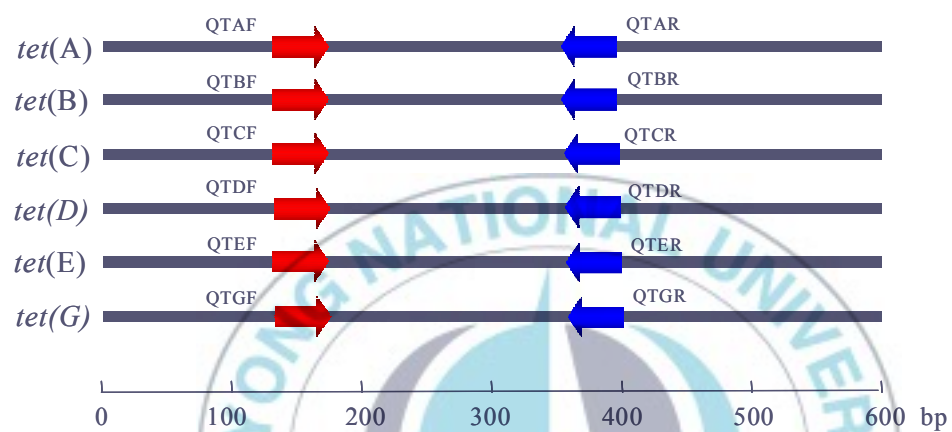


Fig. 2. Illustrated positions of primers used for the qPCR of *tet* genes.
( : sense primer,  : antisense primers)

Fig. 2. Positions of primers used in qPCR of *tet* genes.

Table 3. Oligonucleotide primers used for qPCR assays.

Target genes	Oligomers name	Primer Sequence (5' to 3')	Expected size
<i>tet</i> (A)	QTAF	GCGCTGTATGCGTTGGTGCA	220 bp
	QTAR	GTAGCCGGCGCTTATATTGCCGATATCA	
<i>tet</i> (B)	QTBF	GCACTTTATGCGTTAATGCA	
	QTBR	TGTCGCGGCATCGGTCATTGCCGATACC	
<i>tet</i> (C)	QTCF	GCGCTATATGCGTTGATGCA	
	QTCR	GTTGCTGGCGCCTATATCGCCGACATCA	
<i>tet</i> (D)	QTDF	GCGCTGTATGCGGTGATGCA	
	QTDR	GTTGCGGCTTCGGTAGTGGCGGACAGCA	
<i>tet</i> (E)	QTEF	GCGCTGTATGCAATGATGCA	
	QTER	GTTGCAGCCTCAACAATTGCCGATGTCA	
<i>tet</i> (G)	QTGF	TCGCTCTATGCATTGATGCA	
	QTGR	GTAGCAGCCTCAACCATTGCCGATTCGA	
16s rDNA	16sF	TCCTACGGGAGGCAGCAGT	467bp
	16sR	AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC	

4-2. Stool DNA 분리

qPCR을 위한 template로 사용하기 위해 Table 1.에 나타난 관상어와 해산어의 장내에서 분리한 stool 중 0.1g을 stool DNA kit (AccuPrep[®] Stool DNA extraction kit, Bioneer, Daejeon, Korea) 를 이용하여 DNA를 추출하였다. 20mg/ml의 proteinase K 20 μ l와 lysis buffer 400 μ l를 첨가하여 60 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응 한 후 12000rpm에서 5분 원심 분리 후 상정액을 새 microtube에 옮겼다. 400 μ l의 binding buffer 첨가 후 다시 60 $^{\circ}$ C에서 10분 반응 하고 난 뒤 isopropanol 100 μ l을 넣고 구비된 column tube에 옮겼다. Ethanol을 이용하여 2번 washing 한 후 50 μ l의 EB buffer에 최종적으로 현탁 하였다.

4-3. Real-time PCR을 위한 standard DNA 제조

4-3-1. Plasmid standard의 제조

qPCR을 위한 standard 제조는 윤 (2007)의 논문에서 제작된 primer의 위치가 포함 된 6개 PCR 생성물은 PCR Purification kit (LabopassTM)를 통하여 정제 한 후 새 microtube에 옮긴 후, salt solution 1 μ l, distilled water 4 μ l 그리고 TOPO-TA OPoning[®] vector (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) 1 μ l를 첨가하여 상온에서 30분간 반응시켰다. 다음에 competent cell (E.coli DH5 α -T1^R OR) 50 μ l를 첨가하여 ice 내에서 20분간 반응시키고, 42 $^{\circ}$ C에서 30초간 heat-shock 시켰다. Heat-shock이 끝난 후 바로 ice에 2~3분간 두었다가, SOC 배지를 250 μ l 첨가하여,er

7℃에서 90분간 진탕 배양 시켰다. 배양액은 X-Gal 40 μ g/ml, eAmpicillin 50 μ g/ml이 첨가된 LB agar plate에 도말하여 24시간 배양하였다. White colony를 취하여 Ampicillin 50 μ g/ml이 첨가된 LB broth에 접종한 후 24시간 배양 한 후, Gene-allTM plasmid SV mini kit (General biosystem, Korea)를 이용하여 plasmid를 분리하였다.

4-3-2. Amplicon standard의 제조

3-2에서 분리한 stool DNA를 주형으로 하여 16s rDNA에 대한 specific primer를 이용하여 conventional PCR을 실시 한 후 PCR 증폭 산물을 PCR purification kit (LabopassTM)를 통하여 정제 하였다.

4-3-3. Standard DNA의 정량

위에서 준비된 standard DNA를 Picogreen (Quant-iTTM Picogreen[®] dsDNA Assay kit, Invitrogen, USA)으로 정량하여 copy 값을 결정 한 후 1×10^7 - 1×10 copies/ μ l 값을 가지도록 10-fold 씩 단계 희석하여 qPCR 정량에 필요한 표준 검량 곡선을 작성하는데 사용하였다 (Yu *et al.*, 2005).

4-4. Real-time PCR

윤 (2007) 논문에서 최적화된 조건을 이용하여 qPCR을 실시하였다. 위에서 제작한 Plasmid standard에 3-1에서 준비한 specific primer를 각각의

tet gene에 적용하여 qPCR을 실시하였다. qPCR을 하기 위해 10X buffer $2\mu\text{l}$, $200\mu\text{M}$ 의 각각의 dNTP, $1\mu\text{M}$ 의 각각의 primer, Hot start Taq (HS prime Taq DNA polymerase, Genet Bio, Korea) 및 template 로써 10-fold 씩 희석된 Plasmid DNA를 넣은 후 최종적으로 EvaGreen (Biotium, Korea) $1\mu\text{l}$ 를 첨가 한 후 qPCR (Rotor-Gene 6000 series, Corbett Research, AUS)을 실시하였다. qPCR은 95°C 에서 10분간 pre-denaturation 시킨 후, 95°C 에서 10초 denaturation, 55°C 에서 15초 annealing, 72°C 에서 20초 extension의 반응을 40 cycle 수행하였다. 40 cycle이 끝난 후 $72\sim 95^{\circ}\text{C}$ 에서 $1^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ 의 속도로 T_m (melting point) 값을 측정하였다.

5. 채집 어류의 stool DNA에 대한 real-time PCR의 적용

4-2에서 분리한 stool DNA를 이용하여 qPCR 을 실시하였다. Plasmid standard 와 specific primer를 사용하였으며 4-4의 PCR 조건으로 qPCR 을 수행 한 후 어종별, 국가별 그리고 어류 장내의 Tc 내성 비율에 따른 Tc 내성균의 내성 유전자를 정량 · 비교 분석하였다.

6. Pearson 상관관계 분석

결과의 통계적 처리는 SPSS 통계 프로그램 (SPSS Inc.) 을 이용하여 Pearson 상관관계 분석을 실시하였다. 상관계수 값의 범위는 -1부터 +1 까지이며 계수의 부호는 관계의 방향을 가리키고 절대값이 1에 가까울수록

록 상관관계가 높다.

7. 어류 장내 microflora number와 16s rDNA gene copy 값과의 관계

어류 장내 속 총 microflora의 abundance가 culturable bacteria의 수와 어류 장내 세균의 Tc 내성 비율과 각각 어떠한 상관관계를 알아보고자 하였다.

먼저 *Escherichia coli* HB101 (*E.coli* HB101) 단일 균주를 이용하여 10-fold로 단계 희석하여 TSA 배지에 smear하여 24시간 배양 후 counting 하였다. 같은 양의 세균을 Genomic DNA prep kit for Bacteria (SloGent, Korea)를 이용하여 DNA를 분리 한 후 16s rDNA primer를 사용하여 qPCR을 실시하였다. 이때에 사용된 stadard는 역시 amplicon standard를 제작하여 사용하였다. 각각의 희석 배수에 따른 counting number와 16s rDNA gene의 copy 값을 연관 지어 나타내었다.

또한 채집한 어류의 Stool DNA로부터 16s rDNA의 primer (Zucol *et al.*, 2006)를 이용하여 amplicon standard를 만든 후 picogreen으로 copy 값을 결정, 3-5의 방법으로 qPCR을 실시하였다. 그 다음 어류 장내 세균 filtration 실험을 통해 plate에서 계수된 세균의 수와 qPCR을 통해 정량된 16s rDNA 부분의 copy 값의 상관관계를 분석하였다. 이러한 분석은 qPCR을 통해 결정된 관상어, 해산어류 장내 Tc 내성균의 *tet* gene copy 값을 정량 된 16s rDNA의 copy 값에 비례하여 나타내는데 활용하였다.

8. *tet* gene의 위치와 copy 값과의 관계

tet gene의 위치에 따른 *Escherichia coli* C600 R222, *E. coli* C600 pJA8122, *Aeromonas hydrophila* HA 그리고 qPCR에서 이용하기 위하여 제작하였던 *tet*(B) standard 균주를 이용하여 실험을 실시하였다 (Table. 4).

균의 분리 및 증균용으로는 Tryptic Soy Broth (TSB, Difco)나 Tryptic Soy Agar (TSA, Difco)를 사용하였으며, *E. coli* 균주는 37℃에서 16시간 배양하고 *A. hydrophila*는 25℃에서 16시간 배양한 후 균수를 측정하고, spectrophotometer (UVIKON, KONTRON INSTRUMENTS)를 이용하여 OD₆₀₀값을 구한 후 실험에 사용하였다.

같은 양의 세균을 Genomic DNA prep kit for Bacteria (SloGent, Korea)를 이용하여 DNA를 분리 한 후 16s rDNA primer를 사용하여 qPCR을 실시하였다. 이때에 사용된 stadard는 역시 amplicon standard를 제작하여 사용하였다. 또한 각각의 균주가 갖고 있는 *tet* gene에 맞춰 specific primer를 사용하여 qPCR을 실시한 후 culturabl cell 수, 16s rDNA copy 값과 *tet* gene의 copy 값을 비교하였다.

Table 4. Bacteria used.

Strains	Characteristics	<i>tet</i> genes	Accession No. (GenBank)
<i>Escherichia coli</i> C600 R222	plasmid	<i>tet</i> (B)	J01830
<i>Aeromonas hydrophila</i> HA	chromosome	<i>tet</i> (E)	L06940
<i>Escherichia coli</i> C600 pJA8122	R plasmid	<i>tet</i> (G)	S52437
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	plasmid	<i>tet</i> (B)	J01830

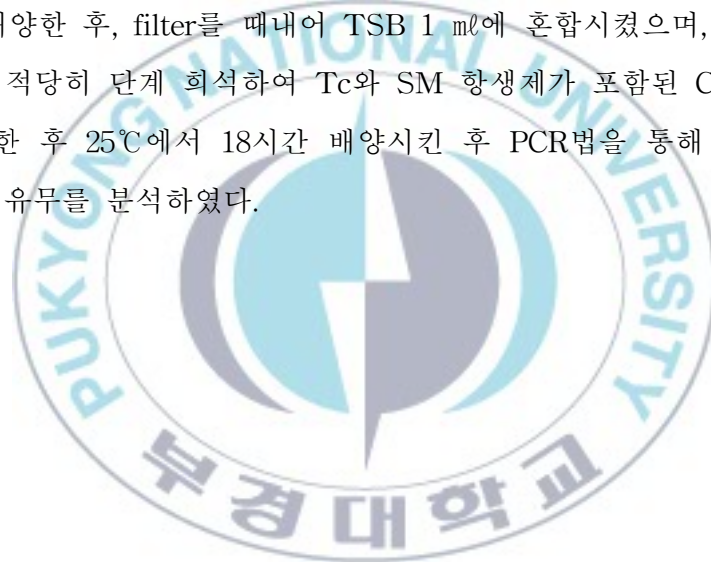
9. Transformation

Calcium chloride법을 이용하여 실시하였다 (Kim, 1993). *E. coli* DH5 α 를 5ml LB배지에 접종하여 24시간 배양한 것을 접종 양이 1% 되도록 5 ml LB에 다시 접종하여 OD₅₅₀에서 0.4가 될 때까지 2~3시간 배양한 다음 얼음에 10분간 냉각시켰다. 1.5 ml 을 위하여 미리 냉각시킨 microtube에 옮긴 후 5,000 rpm, 5분간 원심 분리하여 상청액을 제거하고, 침전물에 50 mM + CaCl₂ + 10mM Tris-Cl (pH 8.0)용액 750 μ l 을 가한 다음 얼음에서 15분간 냉각시켰다. 5,000 rpm, 5분 동안 원심 분리하여 침전물을 얻고, 여기에 다시 50 mM CaCl₂ +10 mM Tris-Cl (pH 8.0) 용액 100 μ l 을 넣은 후 4°C에서 12~24시간 방치하여 competent cell을 제조하였다. Tc 내성 유전자를 가진 채집 내성 균주로부터 plasmid를 분리하여 transformation 실험에 이용하였다. Competent cell에 목적하는 plasmid DNA를 넣고 잘 섞어준 다음 얼음에 30분간 방치한 후 42°C의 water bath로 옮겨 2분 동안 처리하였다. 그 다음 1 ml 의 SOC배지를 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 배양시킨 후 Tc 2 μ g/ml이 들어 있는 LB agar에 200 μ l 도말하여, 12~24시간 배양하여 transformant를 선별하였다.

10. Conjugation

Conjugation은 Aurora *et al.* (1992)의 방법을 수정하여 실시하였다. Tc에 저항성을 가지지 않는 *E. coli* HB101을 recipient 균주로 사용하였으며, 채집균주들을 donor 균주로 사용하였다. *E. coli* HB101은 Tc에 대해

서 저항성을 나타내지 않으며 Streptomycin에 MIC 1024 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 값을 가지며 CC (Chromocult agar MERCK, Germany)에서 파란색의 집락을 형성한다. 본 실험에서는 SM (Streptomycin 256 $\mu\text{g}/\text{ml}$)과 OA (Oxalinic acid 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 첨가한 배지를 이용하여 donor 균주의 배양을 억제하여 Tc에 대한 내성은 없고 SM에 내성을 가지며 CC 배지에서 파란색 집락을 형성하는 것을 trans-conjugant로서 구별하였으며, filter mating법을 이용하였다. 간략히 설명하면 다음과 같다. Donor cell과 recipient cell을 1.0×10^9 cell/ml이 되도록 혼합하여, 0.22 μm (pore size) membrane filter (Millipore Corp., Bedford, Mass)에 통과시켜 고정하였으며, filter에 걸린 세균을 TSA plate의 표면과 부착되도록 하였다. 이 agar plate를 배양한 후, filter를 떼내어 TSB 1 ml에 혼합시켰으며, 혼합 배양된 균주를 적당히 단계 희석하여 Tc와 SM 항생제가 포함된 CC 선택배지에 도말한 후 25°C에서 18시간 배양시킨 후 PCR법을 통해 내성 유전자의 전이 유무를 분석하였다.



Ⅲ. 결 과

1. 어류 장내 세균의 분포

장내 세균의 Tc 내성 비율을 알아보기에 앞서 어류의 장내 세균을 다양한 선택배지를 통해 그 비율을 알아보고자 하였다. 먼저 표준균주를 이용하여 각각의 선택배지에서의 집락 색깔을 확인하였다 (Table 5). 그 결과 균주 종류에 따라서 각각의 선택배지에서 특정 색깔의 집락을 확인하였고 집락의 색깔을 통하여 균주를 분류할 수 있었다. 이러한 결과를 바탕으로 본 연구에서 채집한 어류의 장내 세균의 비율을 확인하였다 (Fig. 4). 그 결과 해산어 중 돌돔에서는 $1.84 \times 10^7 \sim 2.70 \times 10^8$ colony forming units (cfu) 100mg^{-1} stool 정도의 장내 정상 세균 총을 가지고 있었으며 참돔, 감성돔, 넙치 그리고 자연산 한국 돌돔과 일본 돌돔에서는 $5.4 \times 10^5 \sim 3.82 \times 10^7$ cfu 100mg^{-1} stool 정도였다. 그 중에서도 TCBS 배지에서 노란색, 초록색 집락을 형성하는 *Vibrio* spp.의 비중이 50%가 넘고 상대적으로 GSP 배지에서 노란색, 자주색 집락을 형성하는 *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp.와 CC 배지에서 붉은색과 상아색 집락을 형성하는 *Enterobacteriaceae* 등이 낮은 비율로 나타났다. 관상어의 경우 국내산 (2.3×10^7 cfu 100mg^{-1} stool)을 제외한 수입산에서는 $1.04 \sim 4.56 \times 10^8$ cfu 100mg^{-1} stool 정도로 해산어보다 약 10배 정도 높은 세균 수를 가지고 있었다. 또한 균주별 비율로 보았을 때도 *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp. 그리고 *Enterobacteriaceae* 등이 전체 세균 수에서 높은 비중을 차지하고 있었으며 *Vibrio* spp.는 전체의 10% 이하로 낮은 비율을 보였다. 선택배지에서 추출한 몇몇 세균들을

대상으로 API 20E test를 실시한 결과, 선택 배지에서 나타나는 집락의 특징적 색을 이용하여 동정한 결과와 일치하였으며 신뢰성은 대부분 95% 이상 이었다 (Table 6).



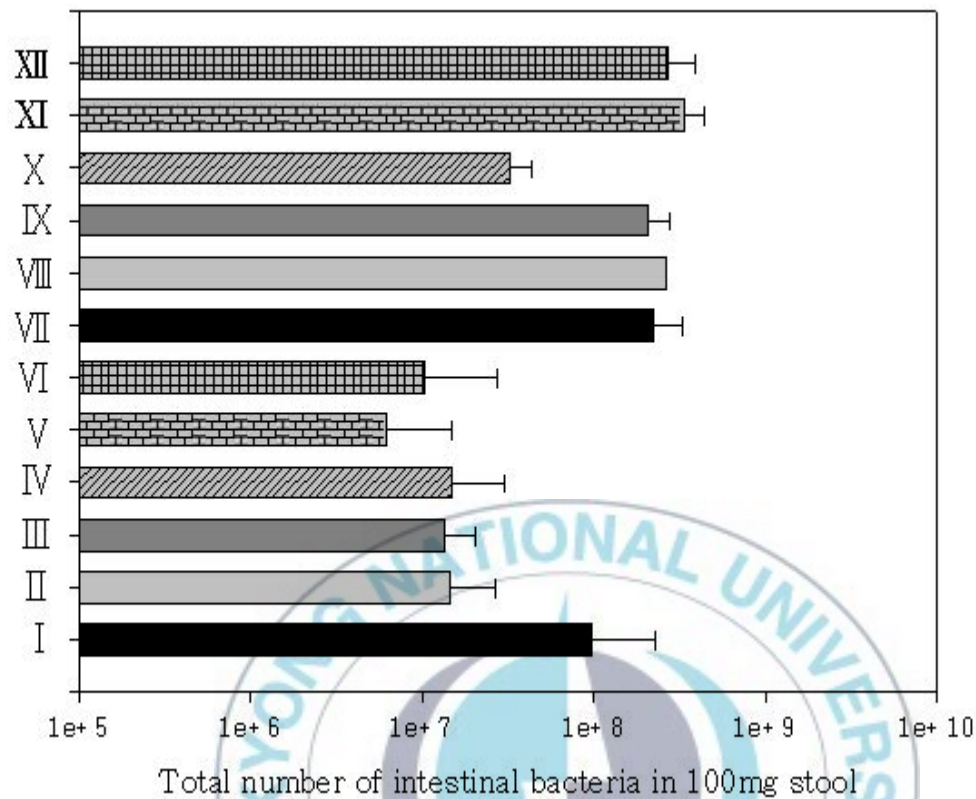


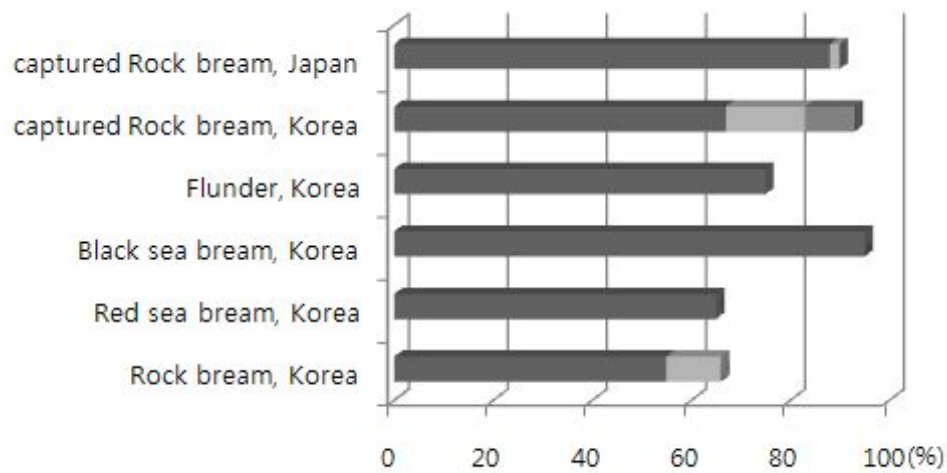
Fig. 3. Numbers of total bacteria in 100-mg stool on TSA medium. Rock bream(I), Red sea bream(II), Black sea bream(III), Flounder (IV) cultured in Korea. Rock bream captured in Korea(V), Rock bream, Japan(VI), Pearl Gourami imported from Singapore(VII), Pearl Gourami, Thailand(VIII), Pearl Gourami, China(IX), Blue Gourami, Korea(X), Dwarf Gourami, Singapore(XI), Golden Gourami, Singapore (XII) were used.

Table 5. Colony of reference bacteria analysed by different selective media.

Strains	TCBS	GSP	CC
<i>Aeromonas hydrophila</i>	N.G*	yellow	light purple
<i>Aeromonas sobria</i>	N.G	yellow	light purple
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	N.G	pink	white
<i>Edwardshiella tarda</i>	N.G	transparent	white
<i>Escherichia coli</i> HB101	N.G	transparent	purple
<i>Escherichia coli</i> DH5a	N.G	transparent	blue
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	green	N.G	N.G
<i>Vibrio anguillarum</i>	yellow	N.G	N.G

* N.G; Not grew

(A)



(B)

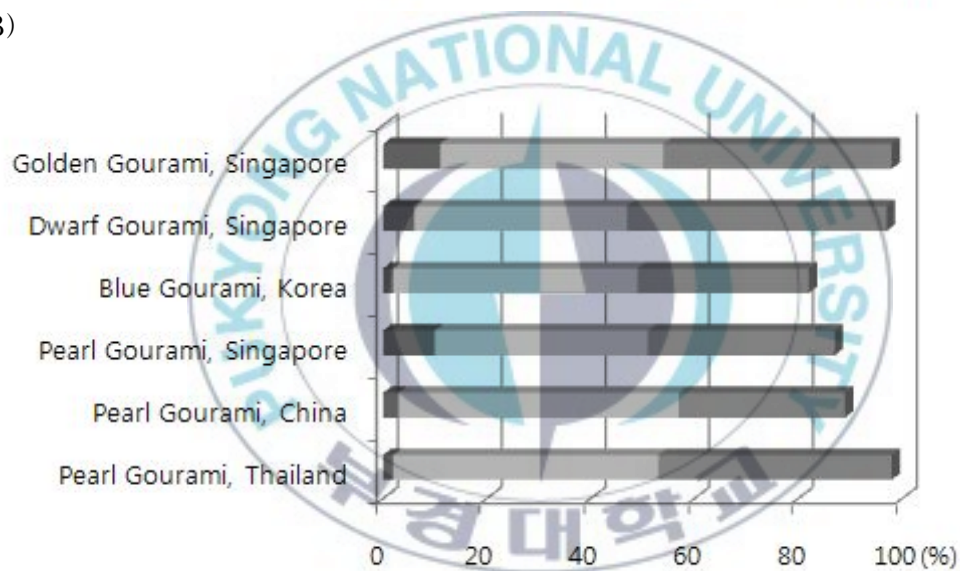


Fig. 4. Proportion of normal microflora in the intestinal tracts of imported and domestic fishes. (A) Marine fish, (B) Freshwater ornamental fish.

(■ : TCBS/TSA, □ : GSP/TSA, ■ : CC/TSA)

Table 6. Identification of intestinal bacteria species, using API 20E kit (bioMerieux, Inc., Hazelwood, MO). (A) captured Rock bream in Korea, (B) freshwater ornamental fish imported Singapore.

(A)

Species	Numbers of bacteria
Vibrio spp.	13/21 ^a (62)
Enterobacter spp.	4/21 (19)
Serratia odorifera	2/21 (10)
Klebsiella pneumoniae	1/21 (5)
unknown	1/21 (5)
total	21/21 (100)

(B)

Species	Numbers of bacteria
Aeromonas spp.	8/18 (44)
Citrobacter freundii	6/18 (33)
Escherichia coli	3/18 (16)
Vibrio cholerae	1/18 (5)
total	18/18 (100)

^a Intestinal bacteria isolates were tested.

2. 어류 장내 세균의 항생제 내성 비율

국내 양식 및 자연산 해산어 그리고 일본에서 수입된 해산어와 싱가포르, 중국 그리고 태국에서 수입된 관상어 및 국내산 관상어의 장내 세균에서 나타나는 항생제 내성 비율 (Tc, Amp, Em, OA, Chp) 은 Fig. 5에 나타냈다. 국내 양식 해산어의 경우 Tc와 EM 내성 비율이 넓치(각각 80~90%, 70~75%)를 제외하고 각각 20~50%, 30~50%를 나타냈다. 또한 OA와 Chp 내성 비율은 0~10%로 낮았고 다른 항생제에 비해 Amp 내성 비율은 60~90%로 높은 수치를 나타냈다.

담수 관상어의 경우 싱가포르, 중국, 태국에서 수입되어진 관상어의 Tc, Amp, Em, OA, Chp 내성 비율이 각각 70~95%, 80~100%, 50~80%, 70~90% 그리고 50~70%로 모든 항생제에서 해산어보다 더 높은 내성 비율을 나타냈다. 국내산 관상어는 다른 아시아 국가의 관상어 장내 세균의 내성 비율에 비해 약 30%씩 낮은 비율을 나타냈지만 해산어보다는 높은 수치를 나타냈다.

균주별 Tc 내성 비율 결과 해산어의 경우 TCBS 배지에서 자라는 *Vibrio spp.*의 Tc 내성 비율이 자연산 돌돔을 제외하고 모두 60%가 넘었다. 그리고 관상어에서도 Tc가 첨가된 GSP배지와 CC배지에서 *Aeromonas spp.*, *Pseudomonas spp.* 그리고 *Enterobacteriaceae*의 내성 비율이 모두 60% 이상의 수치를 나타냈다.

TSA에서 무작위로 추출한 isolates을 대상으로 다제 내성 세균의 비율을 알아보았다 (Table 7.). 그 결과 해산어의 경우 하나의 항생제에 대해서 내성을 가지는 내성균의 비중이 36%로 가장 높았고 2가지, 3가지, 4가지 그리고 5가지의 항생제에 대하여 동시에 내성을 가지는 내성균의

비율은 각각 29%, 13%, 3% 그리고 1%로 나타났다. 관상어의 경우에는 해산어와는 달리 5가지의 항생제에 대하여 내성을 가지는 내성균의 비율이 53%로 가장 높았고 1가지, 2가지, 3가지, 4가지의 항생제에 대하여 내성을 가지는 내성균의 비율이 각각 4%, 6%, 9%, 23%로 나타났다 (Fig. 7.). 이러한 결과는 해산어와 담수 관상어의 장내 미생물 총에 따른 차이에 의한 것으로 추정되며 각각의 균주가 가지는 항생제 내성에 대한 추가 실험이 필요하다고 여겨진다.



(A)

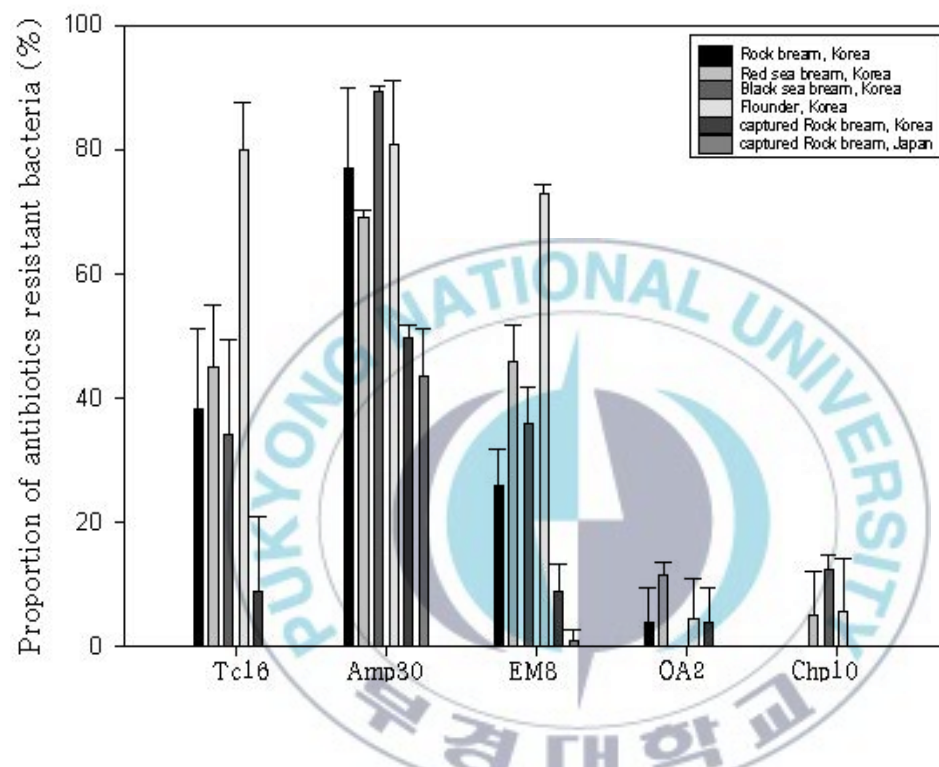


Fig. 5. Continued

(B)

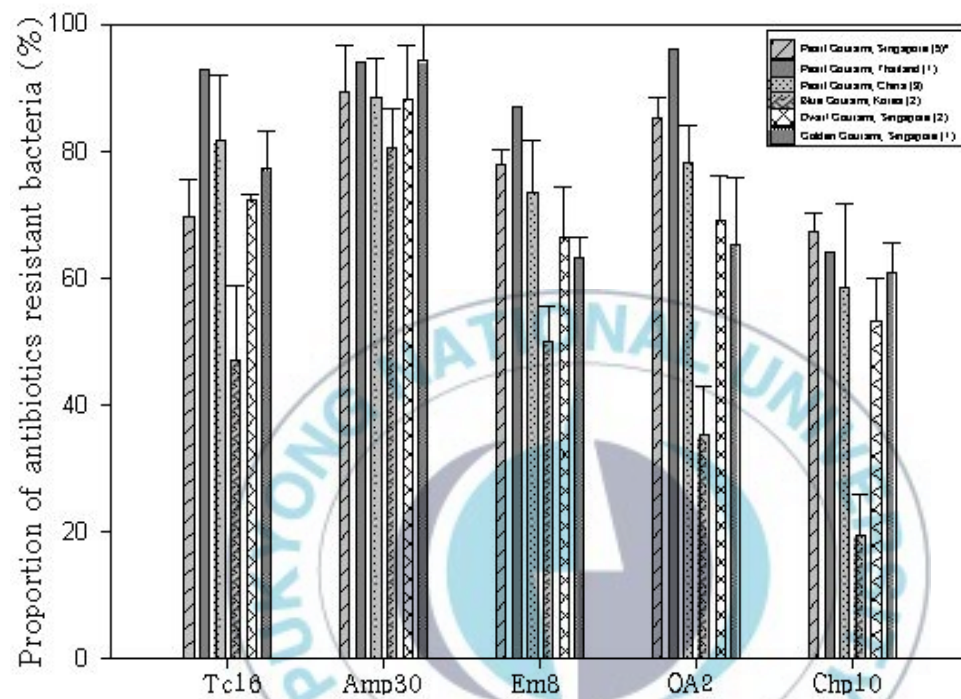


Fig. 5. Proportion of antibiotic-resistant bacteria in intestinal flora on TSA medium (TSA with antibiotics / TSA). (A) Marine fish, (B) Fresh water ornamental fish.

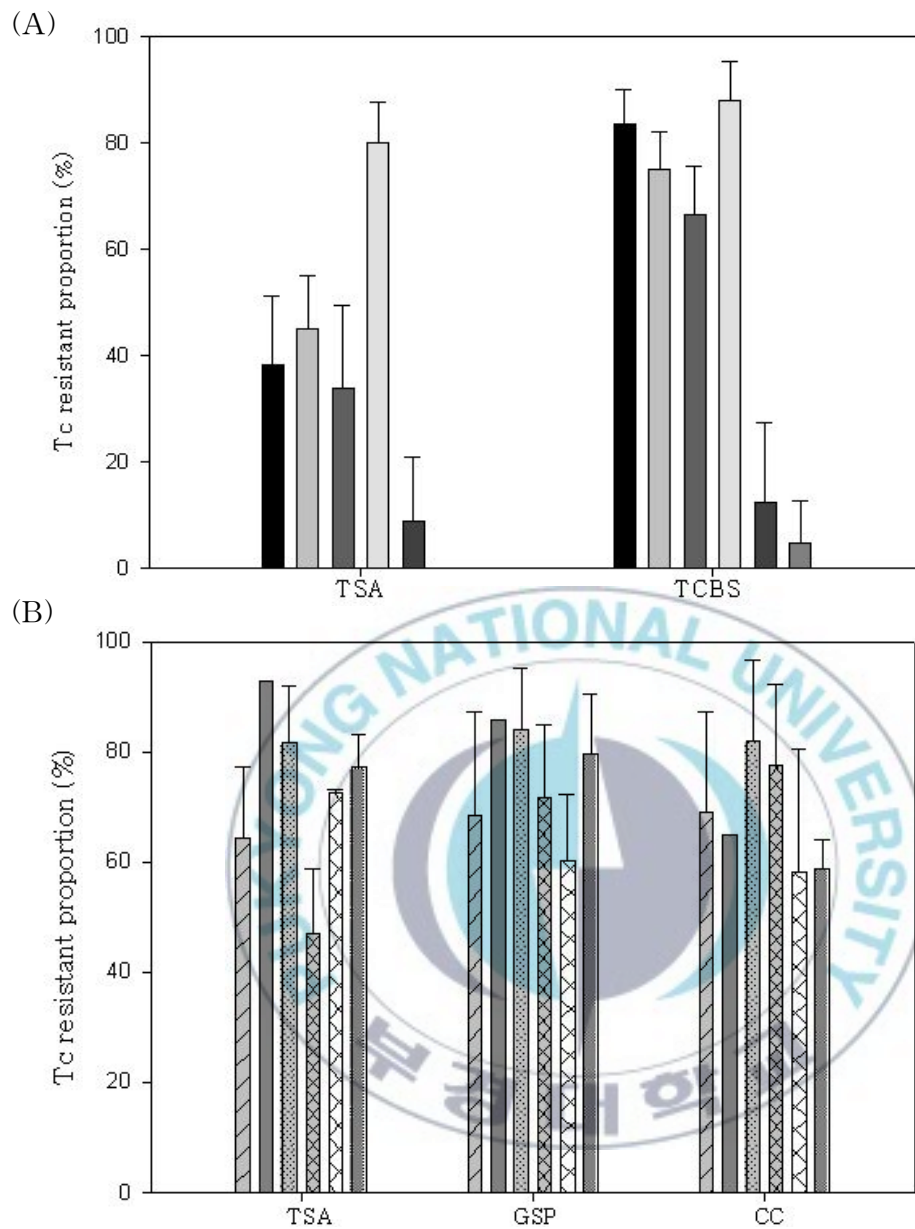


Fig. 6. Proportion of Tc-resistant bacteria in the intestinal flora of fishes on various selective media. (A) Marine fish, (B) Freshwater ornamental fish.

Table 7. Percentage of multiple-antibiotic-resistant bacteria from total culturable microflora in the intestinal tracts of Rock bream and Pearl gourmi. TSA agar plates with different antibiotics (Tc 16 μ g/ml, Amp 30 μ g/ml, Em 8 μ g/ml, OA 2 μ g/ml, Chp10 μ g/ml) were used for the isolation of antibiotic resistant bacteria from the total intestinal bacteria in 100mg stool.

Antimicrobial agent		Rock bream (320) ^a	Pearl gourami (320)
Tc ^R		10	0
Amp ^R		22	1
Em ^R		3	1
OA ^R		1	1
Chp ^R		0	1
Tc ^R	Amp ^R	18	0
Tc ^R	Em ^R	1	1
Tc ^R	OA ^R	2	0
Tc ^R	Chp ^R	0	0
Amp ^R	Em ^R	7	2
Amp ^R	OA ^R	0	1
Amp ^R	Chp ^R	1	1
Em ^R	OA ^R	0	0
Em ^R	Chp ^R	0	0
OA ^R	Chp ^R	0	1

^a Number of tested isolates.

Table 7. Continued.

Antimicrobial agent				Rock bream (320)	Pearl gourami (320)
Tc ^R	Amp ^R	Em ^R		5	1
Tc ^R	Amp ^R	OA ^R		3	3
Tc ^R	Amp ^R	Chp ^R		1	0
Tc ^R	Em ^R	OA ^R		1	0
Tc ^R	Em ^R	Chp ^R		0	0
Tc ^R	OA ^R	Chp ^R		0	0
Amp ^R	Em ^R	OA ^R		1	2
Amp ^R	Em ^R	Chp ^R		2	1
Amp ^R	OA ^R	Chp ^R		0	1
Em ^R	OA ^R	Chp ^R		0	1
Tc ^R	Amp ^R	Em ^R	OA ^R	2	7
Tc ^R	Amp ^R	Em ^R	Chp ^R	1	0
Tc ^R	Amp ^R	OA ^R	Chp ^R	0	2
Tc ^R	Em ^R	OA ^R	Chp ^R	0	0
Amp ^R	Em ^R	OA ^R	Chp ^R	0	14
Tc ^R	Amp ^R	Em ^R	OA ^R Chp ^R	1	53

^a Number of tested isolates.

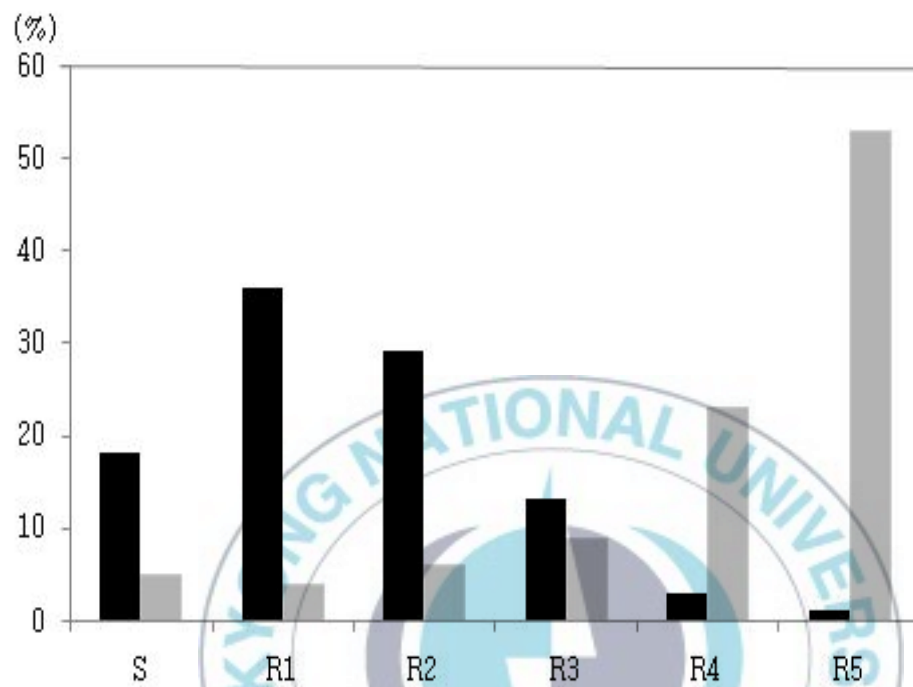


Fig. 7. Prevalence of multi-drug-resistant bacteria in intestinal microflora. R 1~5 shows the proportion of bacteria resistant to 1~5 numbers of different antibiotics respectively.
(■; Rock bream, ■; Pearl gourami)

3. Tetracycline 내성의 수준 비교

broth법을 통하여 Tc에 내성을 나타내는 일부 균을 취하여 Tc에 대한 내성 정도를 MIC 값으로 나타냈다. 그 결과 해산어에서 취한 장내 세균보다 관상어에서 취한 장내 세균의 MIC 값이 높은 수준의 저항성을 가지는 것으로 나타났다 (Table 8). 우리나라에서 양식되어진 해산어에서 취한 Tc^R isolates의 MIC 값은 넙치 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 참돔 512 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 그리고 돌돔과 감성돔 256 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 가장 높은 MIC 값으로 확인되었고 관상어의 경우 국내산은 512 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 싱가포르 1024 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 그리고 태국과 중국은 1024 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 MIC로 해산어보다 높은 수치의 MIC 값을 보였다.

이러한 Tc에 대한 MIC 값의 차이는 군주에 따라 다소 영향을 받을 것이라 추정하고 위에서 분리한 Tc^R isolates 중 *Vibrio*와 *Aeromonas*의 MIC 값을 다시 확인 하였다 (Table 9). 그 결과 *Vibrio* spp.의 경우 32~128 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 MIC 값을 나타내었고 *Aeromonas* spp.에서는 32~256 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 MIC 값을 나타내었다. 이는 Kim *et al.* (2004)의 연구에서 1999년 일본 방어 (*Seriola quinqueradiata*)의 장에서 분리된 34개의 *Vibrio* / *Aeromonas* 군주가 OTC에 대한 MIC 값이 62.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상인 것으로 나타나는 결과와 유사하였다. 또한 *Lactobacillus sakei*에서 서로 다른 내성 기작을 지닌 *tet(L)*, *tet(M)*을 동시에 가지고 있을 경우 두 내성 유전자의 상호작용을 통해 MIC 값이 하나의 내성 유전자를 가지고 있을 때 보다 높게 나타나는 것을 확인하였다(Mohammed Salim Ammor *et al.*, 2007). 이는 본 연구에서도 *Aeromonas* spp.가 2개 이상의 multi-tet gene을 가지는 비율이 *Vibrio* spp.보다 높기 때문에 MIC 값에서도 차이를 가져오는 것이라 추정된다.

Table 8. MIC levels of tetracycline in Tc^R isolates on TSA medium from the intestinal flora of fishes. (A) Marine fish, (B) Freshwater ornamental fish.

(A)

Samples	MIC ($\mu\text{g/ml}$)									
	$\leq$	16	32	64	128	256	512	1024	$\leq$	
Rock bream	39 ^a		30	40	8	23				
Red sea bream	29		66		3	7	24			
Black sea bream	7				29	71				
Flounder	74		72	28						

Table 8. Continued.

(B)

Samples	MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)								
	$\leq$	16	32	64	128	256	512	1024	$\leq$
Singapore	79		18	23	34	23	3	2	
Thailand	26			19	8	46	35		4
China	58			12	14	28	9	28	9
Korea	85		32	19	15	18	16		

^a Number of tested isolates ; Tc resistant isolates were isolated from the imported fresh water ornamental fishes, domestic marine and fresh water ornamental fishes on TSA media with Tc $16\mu\text{g}/\text{ml}$.

Table 9. MIC levels of tetracycline in Tc^R isolates on TSA medium from the intestinal flora of fishes.

Samples		MIC ($\mu\text{g/ml}$)								
		$\leq$	16	32	64	128	256	512	1024	$\leq$
<i>Vibrio</i> spp. ^a	20 ^c			75	15	10				
<i>Aeromonas</i> spp. ^b	30			20	43	27	10			

^a Rock bream, Korea.

^b Pearl gourami, Singapore.

4. Tetracycline 내성 유전자 분포 조사

Table 1.에 설명되어진 채집 어종 대상으로 Tc 내성 유전자 분석을 실시하였다. Gram 음성 세균에서 많이 나타난다는 *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(E)* 그리고 *tet(G)*에 대해서 multi PCR법을 통해 검출하고자 하였고 다양한 크기의 PCR 산물을 전기영동을 통해 확인할 수 있었다 (Fig. 8). 국내산 해산어의 경우 모든 어종에서 *tet(B)*가 50%이상의 비율을 보였고 *tet(A)*, *tet(C)* 그리고 *tet(G)*는 단독으로 확인되지 않았다. *tet(E)*는 감성돔(5%)을 제외한 모든 어종에서 확인되지 않았고 *tet(D)*와 *tet(E)*는 감성돔과 넙치에서만 각각 5%와 1%가 나타났다. 관상어의 경우 싱가포르 산 펄 구라미에서는 *tet(A)*가 38%, *tet(D)*가 4%, *tet(B)*와 *tet(E)*는 1% 였고 *tet(G)*는 단독으로 확인되지 않았다. 태국에서는 *tet(A)*가 60%, *tet(D)* 7%, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(E)*, *tet(G)*는 단독으로 확인되지 않았다. 중국 산 펄 구라미에서는 *tet(A)*가 35%, *tet(B)*와 *tet(D)* 4%와 6%, *tet(E)* 9% 그리고 *tet(C)*와 *tet(G)*는 단독으로 확인되지 않았다. 싱가포르 산 드워프 구라미와 골든 구라미에서는 *tet(A)*가 각각 58%, 70% *tet(B)*가 각각 2%, 5% *tet(D)*가 각각 7%, 10%가 나왔고 *tet(C)*, *tet(E)*, *tet(G)*는 단독으로 확인되지 않았다. 국내산 블루 구라미 역시 *tet(A)*가 65%, *tet(B)*가 3%, *tet(D)* 10%, *tet(E)* 9%, *tet(C)*, *tet(G)*는 단독으로 확인되지 않았으면 이러한 경향은 다른 수입산 관상어와 비슷한 결과를 보였다 (Table 10). 두 가지 이상 내성 유전자를 포함하는 비율은 해산어와 담수 관상어를 포함한 모든 어종 중 싱가포르 산 펄 구라미가 가장 높았고, 그 종류도 다양하게 관찰되었으며 3개 이상의 내성 유전자를 동시에 가지고 있는 multi-*tet* gene의 비율이 11%

로 확인되었다.

중국 산 관상어에서는 2개의 내성 유전자를 가지고 있는 균주의 비율이 37%로 가장 높게 확인되었으나 3개 이상의 내성 유전자를 지닌 균주는 확인되지 않았다. 국내산 관상어의 경우 *tet(A)*와 *tet(B)*를 동시에 가지는 균주는 4%로 모든 어종에서 가장 낮은 비율을 나타냈다. 국내산 해산어의 경우 감성돔과 넙치에서는 3개 이상의 내성 유전자를 지닌 균주는 관찰되지 않았으며 참돔에서 *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(D)*, *tet(G)*를 동시에 지니는 균주가 3% 확인되었다 (Table 11~13).

해산어와 관상어에 있어서 내성 유전자의 분포와 multi-*tet* gene 비율 차이는 세균의 종류에 따라 영향을 받는 것 같다. 그리하여 위에서 분리한 Tc^R isolates 중 *Vibrio*와 *Aeromonas*의 내성 유전자를 다시 확인하였다. 그 결과 *Vibrio* spp.에서는 *tet(B)*가 63% *Aeromonas* spp.에서는 *tet(A)*가 48%로 높게 확인되었다. multi-*tet* gene을 가지는 비율은 각각 20%와 27%로 나타났으며 *Aeromonas* spp.에서 3개의 내성 유전자를 가지는 균주(3%)를 확인하였다 (Table 14~15).

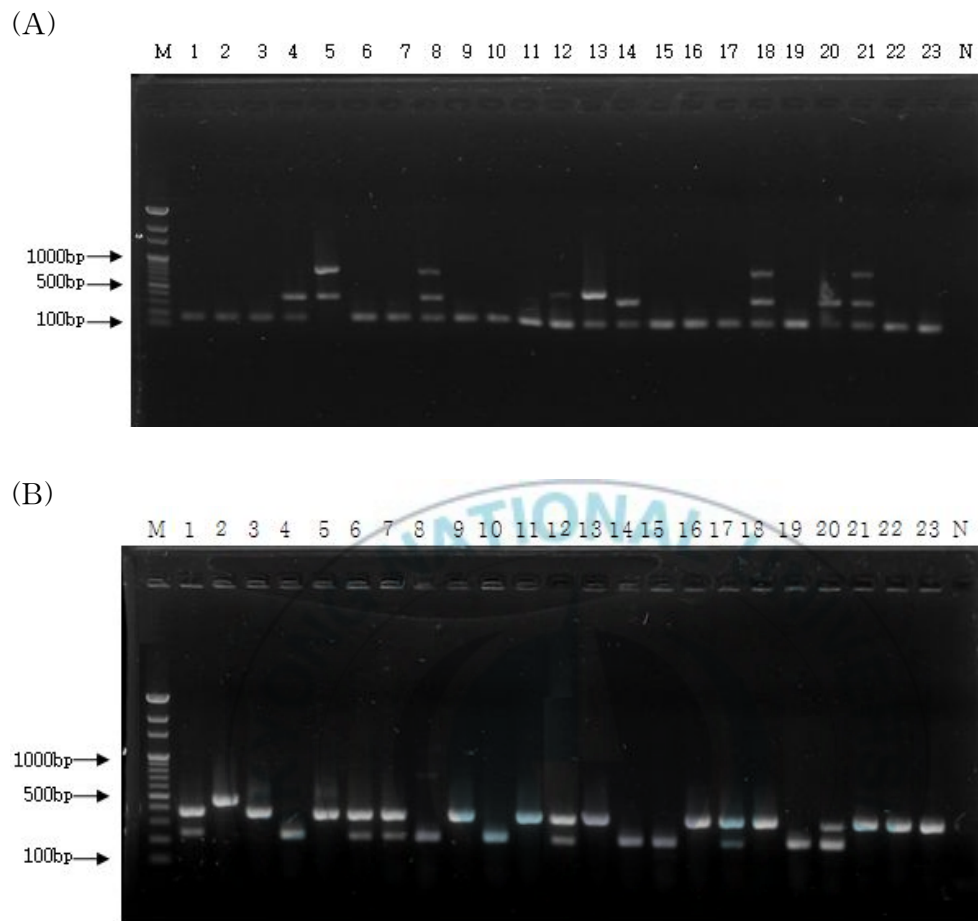


Fig. 8. Agarose gel electrophoresis of amplicons of efflux tet genes generated by multiplex PCR. Lane 1~23 : Tc resistant bacteria isolated TSA containing Tc ($16\mu\text{g}/\text{ml}$) randomly, M : 100bp DNA ladder, N : Negative control. (A) Marine fish, (B) Fresh water ornamental fish.

Table 10. Proportion of Tc-resistant bacterial isolates identified with a single *tet* gene. (A)Marine fish, (B)Fresh water ornamental fish.

(A)

	Rock bream (83) ^a	Red sea bream (30)	Black sea bream (19)	Flounder (93)
<i>tet</i> (A)	0	0	0	0
<i>tet</i> (B)	83	50	68	75
<i>tet</i> (C)	0	0	0	0
<i>tet</i> (D)	0	0	5	1
<i>tet</i> (E)	0	0	5	0
<i>tet</i> (G)	0	0	0	0

Table 10. Continued.

(B)

	Pearl Gourami, Singapore (80)	Pearl Gourami, Thailand (27)	Pearl Gourami, China (47)	Blue Gourami, Korea (68)	Dwarf Gourami, Singapore (55)	Golden Gourami, Singapore (82)
<i>tet</i> (A)	38	68	35	65	58	70
<i>tet</i> (B)	1	0	4	3	2	5
<i>tet</i> (C)	15	0	0	0	0	0
<i>tet</i> (D)	4	15	6	10	7	10
<i>tet</i> (E)	1	0	9	9	0	0
<i>tet</i> (G)	0	0	0	0	0	0

^a Number of tested isolates ; Tc resistant isolates were isolated from the fresh water ornamental fishes, domestic fresh water and marine fishes on TSA media with Tc 16 μ g/ml.

Table 11. Proportion of Tc-resistant bacterial isolates identified with dual *tet* genes. (A)Marine fish, (B)Fresh water ornamental fish.

(A)

	Rock bream (83) ^a	Red sea bream (30)	Black sea bream (19)	Flounder (93)
<i>tet</i> (A), <i>tet</i> (B)	4	16	6	8
<i>tet</i> (A), <i>tet</i> (G)	1	0	5	5
<i>tet</i> (B), <i>tet</i> (D)	1	0	0	0

(B)

	Pearl Gourami, Singapore (80)	Thailand (27)	China (47)	Blue Gourami, Korea (68)	Dwarf Gourami, Singapore (55)	Golden Gourami, Singapore (82)
<i>tet</i> (A), <i>tet</i> (B)	1	7	2	4	4	2
<i>tet</i> (A), <i>tet</i> (C)	4	4	6	0	5	3
<i>tet</i> (A), <i>tet</i> (D)	9	0	4	0	0	0
<i>tet</i> (A), <i>tet</i> (E)	6	0	0	0	11	5
<i>tet</i> (B), <i>tet</i> (D)	0	0	4	0	7	0
<i>tet</i> (B), <i>tet</i> (E)	0	0	2	0	0	0
<i>tet</i> (C), <i>tet</i> (D)	9	0	0	0	0	0
<i>tet</i> (D), <i>tet</i> (E)	1	0	19	0	4	0

^a Number of tested isolates ; Tc resistant isolates were isolated from the fresh water ornamental fishes, domestic fresh water and marine fishes on TSA media with Tc 16 μ g/ml.

Table 12. Proportion of Tc-resistant bacterial isolated with more than three *tet* genes. (A)Marine fish,
(B)Fresh water ornamental fish.

(A)

	Rock bream (83) ^a	Red sea bream (30)	Black sea bream (19)	Flounder (93)
<i>tet</i> (A), <i>tet</i> (B), <i>tet</i> (G)	5	0	0	0
<i>tet</i> (A), <i>tet</i> (B), <i>tet</i> (D), <i>tet</i> (G)	0	3	0	0

(B)

	Pearl Gourami, Singapore (80)	Pearl Gourami, Thailand (27)	Pearl Gourami, China (47)	Blue Gourami, Korea (68)	Dwarf Gourami, Singapore (55)	Golden Gourami, Singapore (82)
<i>tet</i> (A), <i>tet</i> (B), <i>tet</i> (D)	3	0	0	0	0	0
<i>tet</i> (A), <i>tet</i> (C), <i>tet</i> (D)	3	0	0	0	0	0
<i>tet</i> (A), <i>tet</i> (D), <i>tet</i> (E)	3	0	0	0	0	0
<i>tet</i> (B), <i>tet</i> (C), <i>tet</i> (D)	1	0	0	0	0	0
<i>tet</i> (B), <i>tet</i> (C), <i>tet</i> (E)	0	0	0	0	2	0
<i>tet</i> (C), <i>tet</i> (D), <i>tet</i> (E)	0	2	0	0	0	0
<i>tet</i> (A), <i>tet</i> (B), <i>tet</i> (C), <i>tet</i> (D)	1	0	0	0	0	0

Table 13. Comparison of multi-*tet* genes in Tc-resistant bacteria from different fishes (%).

Country	Fish	Number of genes 2, 3, 4			Single genes	Multi genes	N.D
		Two genes	Three genes	Four genes			
Korea	Rock bream (83) ^a	6	5	0	83	11	6
	Red sea bream (30)	16	0	3	50	19	31
	Black sea Bream (19)	11	0	0	78	11	11
	Flounder (93)	13	0	0	76	13	11
	Average	11	1	0	71	13	
Singapore	Pearl Gourami (80)	30	10	1	59	41	0
Thailand	Pearl Gourami (27)	11	2	0	83	13	4
China	Pearl Gourami (47)	37	0	0	54	37	9
Korea	Blue Gourami (80)	4	0	0	87	4	9
Singapore	Dwarf Gourami (62)	10	0	0	85	10	5
Singapore	Golden Gourami (55)	31	2	0	67	33	0
Average		20	2	0	72	23	

^a Number of isolates analyzed.

N.D Not detected.

Table 14. Proportion of Tc-resistant bacterial isolates identified as single or more than two *tet* genes. (*Vibrio* spp. from domestic marine fish, *Aeromonas* spp. from fresh water ornamental fish.)

	<i>Vibrio</i> spp. (30) ^a	<i>Aeromonas</i> spp. (33)
<i>tet</i> (A)	0	48
<i>tet</i> (B)	63	0
<i>tet</i> (C)	0	0
<i>tet</i> (D)	13	3
<i>tet</i> (E)	3	15
<i>tet</i> (G)	0	0
<i>tet</i> (A), <i>tet</i> (B)	3	0
<i>tet</i> (A), <i>tet</i> (E)	0	24
<i>tet</i> (A), <i>tet</i> (G)	0	3
<i>tet</i> (B), <i>tet</i> (D)	17	0
<i>tet</i> (E), <i>tet</i> (G)	0	3
<i>tet</i> (A), <i>tet</i> (D), <i>tet</i> (E)	0	3

^a Number of isolates analyzed.

Table 15. Comparison of multi-*tet* genes in Tc-resistant bacteria from different strains (%).

Fish	Number of genes 2, 3		Single genes	Multi genes	Not detected
	Two genes	Three genes			
<i>Vibrio</i> spp. (30) ^a	20	0	80	20	0
<i>Aeromonas</i> spp. (30)	30	3	67	27	0

^a Number of isolates analyzed.

5. 어류 장내 Tc 내성 유전자의 정량

2008년 1월부터 2009년 8월에 걸쳐 샘플링한 수입산 관상어, 국내산 관상어와 해산어를 대상으로 real-time PCR을 실시하였다. 먼저 절대적인 *tet* gene copy number의 정량에서 돌돔, 참돔, 감성돔과 넙치의 경우 *tet*(B)가 각각 3.41×10^2 copies·100mg stool⁻¹, 8.70×10^3 copies·100mg stool⁻¹, 1.36×10^2 copies·100mg stool⁻¹, 8.44×10^2 copies·100mg stool⁻¹로 각각 결정되었고 이는 다른 종류의 *tet* gene 보다 높은 것으로 확인되었다. 그 중 돌돔에서 *tet*(A)가 1.60×10^2 copies·100mg stool⁻¹로 결정되는 것을 제외하고 해산어의 모든 어종에서 *tet*(A), *tet*(C), *tet*(G)가 8.86×10^2 copies·100mg stool⁻¹ 이하로 결정되었다. 관상어의 경우 *tet*(A)가 모든 어종에서 1.00×10^3 copies·100mg stool⁻¹ 이상으로 확인되었고 싱가포르 산 펄 구라미의 경우 *tet*(B)~(E) 그리고 *tet*(G) 역시 1.00×10^2 copies·100mg stool⁻¹ 이상으로 확인되었다 (Table 16).

본 연구에서는 세균의 16s rDNA gene을 이용하여 Tc 내성 유전자의 양과 상관관계를 알아보고자 하였다. 이전의 보고되어진 Nadkarni *et al* (2002)는 16s rDNA gene을 사용한 총 세균의 abundance가 agar plate를 통해 계수된 세균의 수보다 40배 가량 많다고 하였다. 또한 *Escherichia coli*는 7개, *Pseudomonas* spp.는 4개, *Staphylococce*는 9개 정도의 16s rRNA operon을 한 single chromosome에 가지고 있다고 하였다. 이러한 이전 연구를 참고하여 9에서 단일 균주를 대상으로 culturable intestinal microflora와 16s rDNA gene의 copy 수를 비교한 결과 16s rDNA gene의 copy 수가 culturable intestinal microflora의 수에 비해 10배씩 낮게 나타났다 (Fig. 9.). 또한 해산어와 관상어에서 역

시 모두 16s rDNA gene의 copy 수가 culturable intestinal microflora의 수에 비해 각각 $1/10^2 \sim 1/10^3$ 배씩 적게 나타나는 것을 확인하였는데 (Fig. 10.) 이는 stool DNA 분리와 stool 내의 inhibitor 존재로 인하여 qPCR의 결과에 영향을 끼친 것으로 보인다. 계수된 세균의 수보다 16s rDNA gene의 copy 수가 적게 나타났지만 각각의 DNA를 이용한 16s rDNA gene과 *tet* gene을 정량하는데 있어서 똑같이 영향을 미치리라 추정하고 qPCR을 통해 정량된 *tet*(A)~(E) 그리고 *tet*(G)를 16s rDNA와 상대적인 비율로 나타내었다. 그 결과 역시 6가지의 *tet* gene 중 해산어의 경우 *tet*(B) 관상어에서는 *tet*(A)가 높았다 (Fig. 11).

Table 17은 각 그룹에서의 Tc 내성 균주가 가지는 내성 유전자의 분포 비율과 stool DNA에 존재하는 총 *tet* gene copy 값에서의 각각의 *tet* gene이 차지하고 있는 비율을 나타낸 것이다. 두 결과 모두 해산어에서는 *tet*(B)가 담수 관상어에서는 *tet*(A)가 우세하게 나타나는 것을 확인하였다.



Table 16. Absolute copy numbers of *tet* genes in intestinal microflora of fishes.

Country	Fish	<i>tet</i> gene(copies/100mg stool)						
		<i>tet</i> (A)	<i>tet</i> (B)	<i>tet</i> (C)	<i>tet</i> (D)	<i>tet</i> (E)	<i>tet</i> (G)	Sum
Korea	Rock bream (2) ^a	1.60E + 02 ^b	3.41E + 02	3.16E + 00	1.96E + 02	2.44E - 01	5.47E + 00	7.06E + 02
	Red sea bream (2)	6.96E + 00	8.70E + 03	3.55E + 00	1.49E + 01	4.18E + 01	1.35E + 00	8.77E + 03
	Black sea bream (1)	8.86E + 00	1.36E + 02	3.39E - 01	1.35E + 02	1.71E + 01	1.12E + 00	2.98E + 02
	Flounder (3)	2.83E - 01	8.44E + 02	3.01E + 00	2.54E + 01	6.51E - 02	1.44E + 00	8.74E + 02
Singapore	Pearl gourami (4)	2.07E + 03	1.13E + 02	2.32E + 02	1.78E + 02	6.80E + 02	2.95E + 02	3.57E + 03
	Dwarf gourami (2)	1.01E + 03	1.34E + 01	2.68E + 01	1.09E + 02	8.08E + 02	3.39E + 01	2.00E + 03
	Golden gourami (2)	3.00E + 03	2.48E + 02	5.94E + 00	1.45E + 01	1.36E + 03	3.97E + 00	4.63E + 03
Korea	Blue gourami (3)	3.89E + 03	1.49E + 02	1.00E + 01	5.64E + 01	1.79E + 02	1.49E + 00	7.84E + 02
Thailand	Pearl gourami (1)	1.52E + 03	4.92E + 01	1.50E + 01	3.66E + 00	2.44E + 01	5.10E + 01	1.66E + 03
China	Pearl gourami (3)	4.44E + 03	8.03E + 02	1.67E + 02	2.13E + 02	1.57E + 03	4.35E + 01	7.23E + 03

^a Number of tested sampling times.

^b Mean of *tet* gene copy numbers determined using real-time PCR.

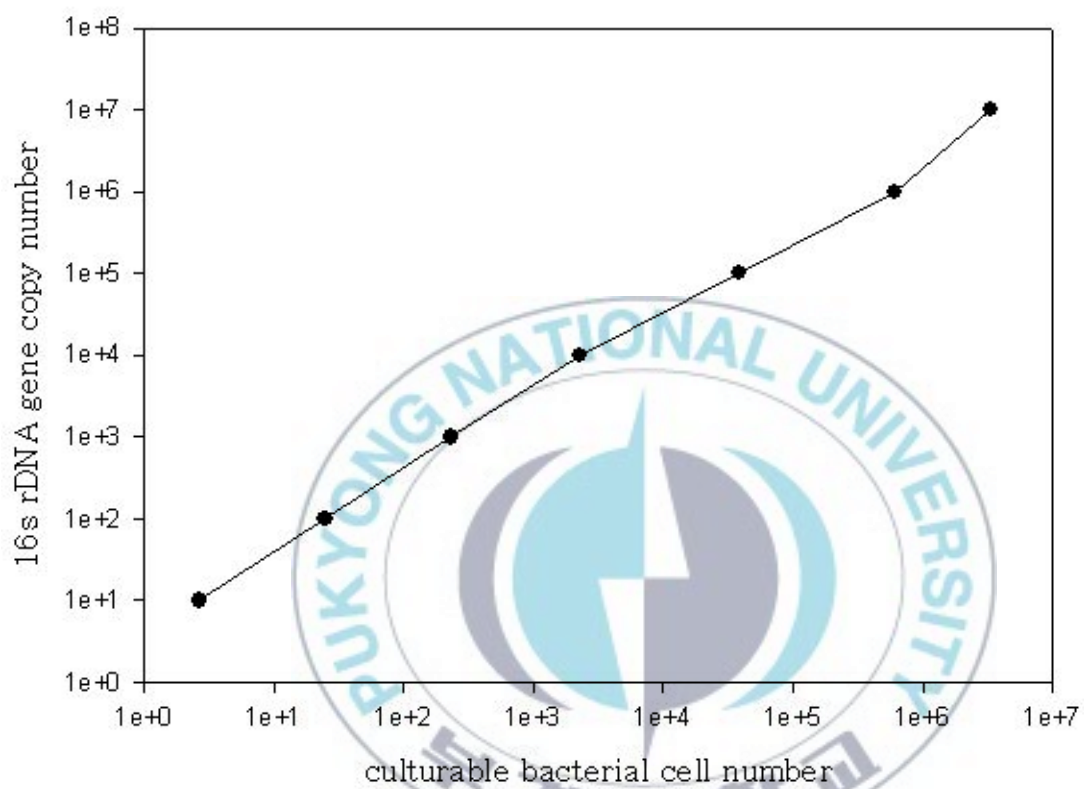


Fig. 9. Correlation between 16s rDNA gene copy number and culturable bacteria number. 16s rDNA gene copy number (x axis) were plotted against the quantification values (y axis) for culturable bacteria number.

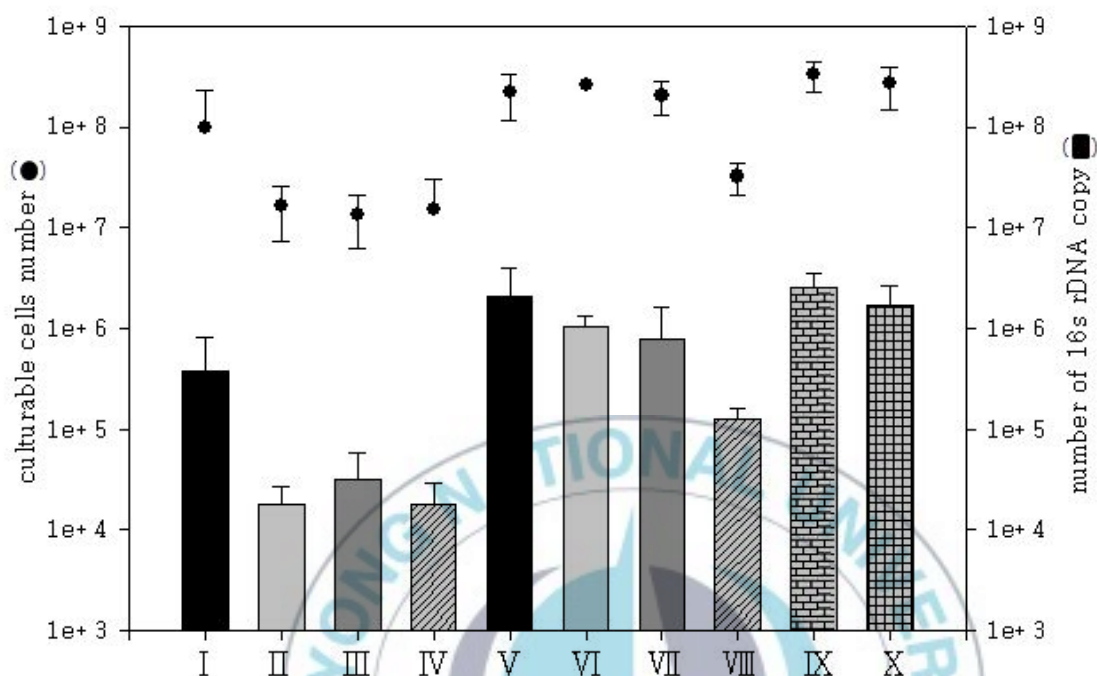
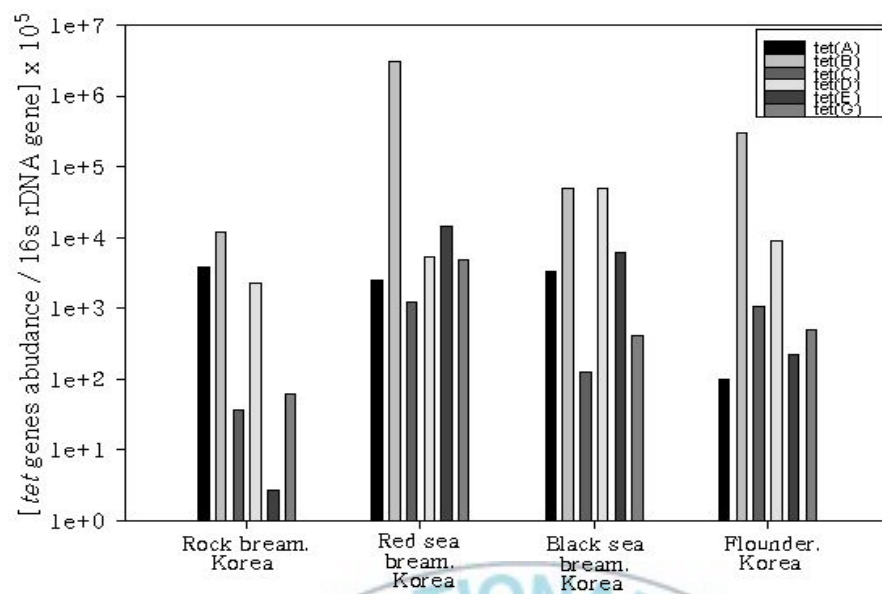


Fig. 10. Correlation between 16s rDNA gene copy number and culturable bacteria number. Copy number of 16s rDNA genes and culturable intestinal microflora (y axis) were plotted against different samples (x axis), Rock bream (I), Red sea bream(II), Black sea bream(III), Flounder(IV) cultured in Korea. Pearl Gourami imported from Singapore(VII), Pearl Gourami, Thailand(VIII), Pearl Gourami, China(IX), Blue Gourami, Korea(X), Dwarf Gourami, Singapore(XI), Golden Gourami, Singapore(XII) were used.

(A)



(B)

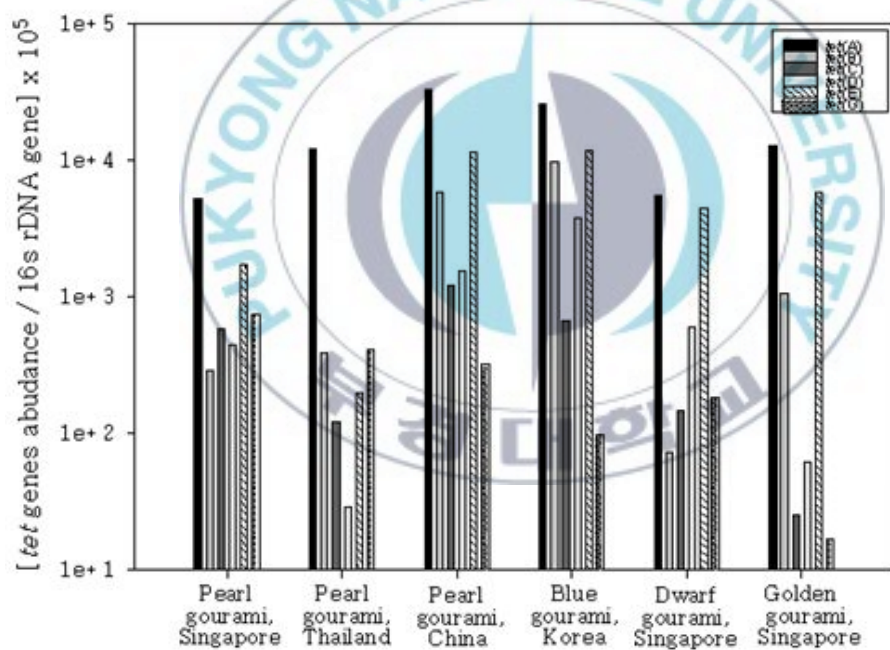


Fig. 11. *tet* gene copy number relative to 16s rDNA using real-time PCR. (A) Marine fish, (B) fresh water ornamental fish.

Table 17. Comparison between the proportion of Tc-resistant genes and copy numbers of *tet* genes in fish microflora.

Country	Fish	<i>tet</i> (A)	<i>tet</i> (B)	<i>tet</i> (C)	<i>tet</i> (D)	<i>tet</i> (E)	<i>tet</i> (G)
Korea	Rock	10 ^a	93	0	1	0	6
	breem	21 ^b	66	0	12	0	0
	Red sea	18	68	0	3	0	3
	breem	0	99	0	0	0	0
	Black sea	11	74	0	6	5	5
	breem	3	46	0	45	6	0
	Flounder	13	83	0	1	0	5
		0	96	0	3	0	0
Singapore	Pearl	68	7	34	34	11	0
	gourami	58	3	7	5	19	8
	Dwarf	78	15	7	18	17	0
	gourami	50	1	1	5	40	2
	Golden	80	7	3	10	5	0
Korea	gourami	65	5	0	0	29	0
	Blue	69	7	0	10	9	0
	gourami	50	19	1	7	23	0
Thailand	Pearl	78	7	6	17	2	0
China	gourami	91	3	1	0	1	3
	Pearl	46	12	6	33	30	0
	gourami	61	11	2	3	22	1

^a Proportion of the Tc resistant bacteria carrying a specific *tet* gene (%).

^b Proportion of copy number of an one specific *tet* gene to sum of the copy numbers of six different *tet* genes determined by real-time PCR.

6. Tc 내성 비율과 indicator *tet* gene과의 상관관계

2008년 1월부터 2009년 8월에 걸쳐 샘플링한 수입산 관상어, 국내산 관상어와 해산어를 통해 조사한 결과 관상어와 해산어 그룹에서의 indicator *tet* gene을 각각 *tet*(A)와 *tet*(B)로 결정하였다. 그리하여 해산어 5 그룹 (Fig. 12. bar 1~5), 관상어 9 그룹 (Fig. 12. bar 6~14) 에서의 Tc 내성 비율과 각 그룹에서의 indicator *tet* gene의 copy를 비교하였다. SPSS 통계 프로그램 (SPSS Inc.) 을 통하여 Pearson 상관관계분석을 실시한 후 그 결과를 상관계수 (r)로 나타내었다. 해산어 5 그룹의 상관계수 r 값은 0.881 담수 관상어 9 그룹에서는 0.752를 보였다. 그 결과 내성 비율에 따라 indicator *tet* gene의 copy 수에 상관관계가 있는 것을 확인하였다.



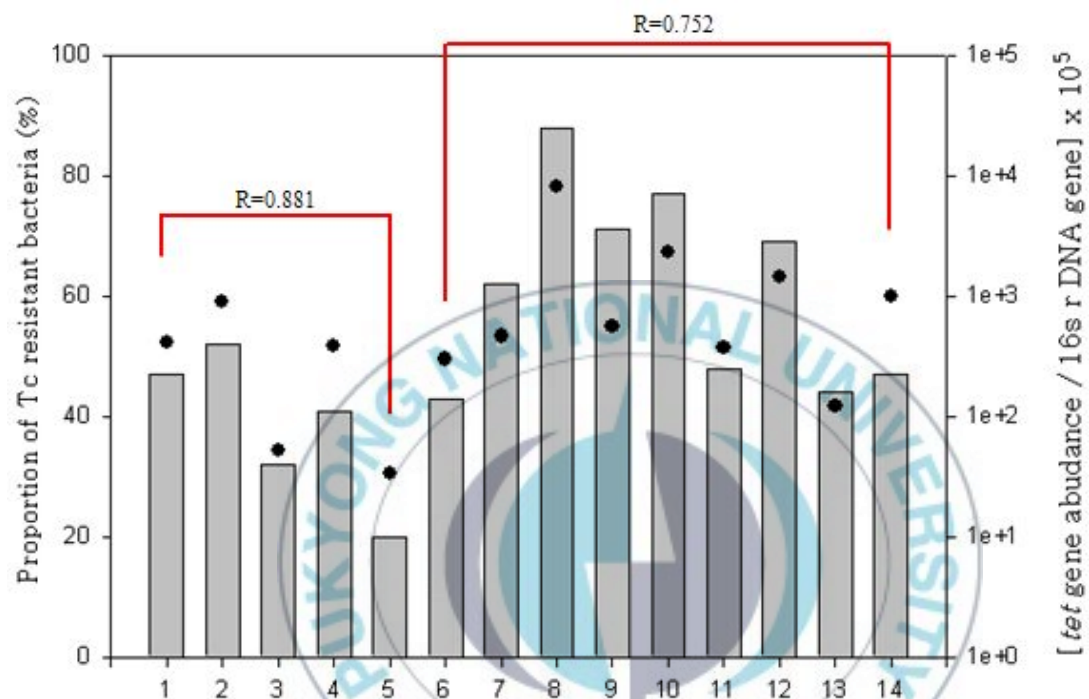


Fig. 12. Correlation between copy numbers of a specific *tet* gene and the proportion of a specific isolates carrying that *tet* gene. Bar 1~5 : individual marine fish, bar 6~14 : individual fresh water ornamental fish.

7. *tet* geen의 위치와 copy 값의 차이

Table 4.에 설명되어진 균주를 이용하여 내성 유전자가 존재하는 위치에 따라 copy 값에 영향을 끼치는지에 대하여 알아보았다. 먼저 4개의 균주가 각각 가지고 있는 세균의 수를 측정한 결과 $2.30 \sim 6.90 \times 10^8$ colony forming units (cfu) 1ml^{-1} 정도였다. 서로 비슷한 양의 세균을 이용하여 DNA분리를 한 후 16s rDNA primer를 이용하여 qPCR 실시한 결과 16s rDNA gene의 copy 값이 $2.60 \sim 3.89 \times 10^8$ copies· μl^{-1} 로 결정되었으며, 이는 앞서 실험한 단일 균주와의 결과와 동일하게 16s rDNA gene이 culturable cells number 보다 약 1/10 정도씩 낮게 나타나는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 13).

다음 *tet* gene의 위치에 따른 copy 값의 차이를 알아보기 위하여 각각의 균주가 가지고 있는 *tet* gene type에 맞는 specific primer를 사용하여 그 값을 정량한 후 각 균주의 16s rDNA gene을 이용하여 상대적인 정량으로 나타내었다 (Fig. 14). 그 결과 *tet*(E)가 세균의 chromosome에 위치해 있는 *A. hydrophila* HA에서 4.00×10^5 copies· μl^{-1} 로 가장 적었고 *tet*(G)가 R-plasmid에 위치해 있는 *E. coli* C600 pJA8122에서 2.71×10^6 copies· μl^{-1} 로 확인되었다. plasmid에 *tet*(B)가 위치해 있는 *E. coli* C600 R222와 *E. coli* DH5a *tet*(B)는 각각 1.63×10^6 copies· μl^{-1} , 9.46×10^6 copies· μl^{-1} 로 확인되어 *A. hydrophila* HA보다 100배, *E. coli* C600 pJA8122보다 10배씩 높게 확인되었다. 이는 plasmid 내에 내성 유전자를 가지고 있는 균주에서 copy 수가 더 높게 나타나는 것을 보여준다.

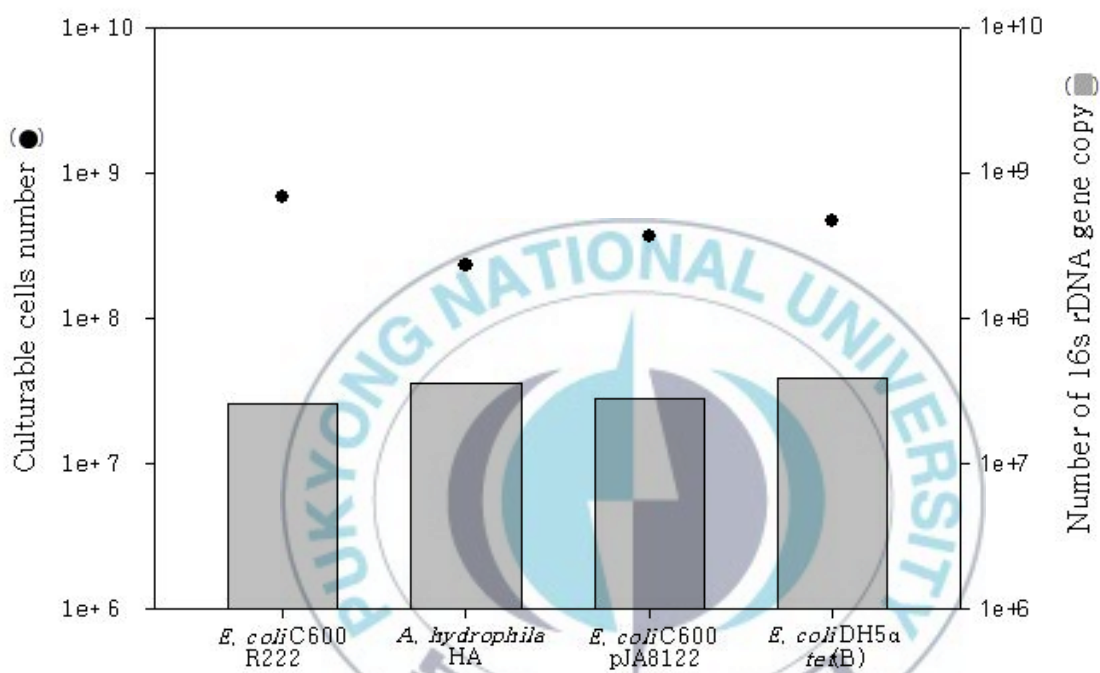


Fig. 13. Correlation between 16S rDNA gene copy number and culturable bacteria number. Copy number of 16S rDNA genes and culturable intestinal microflora (y axis) were plotted against different samples (x axis).

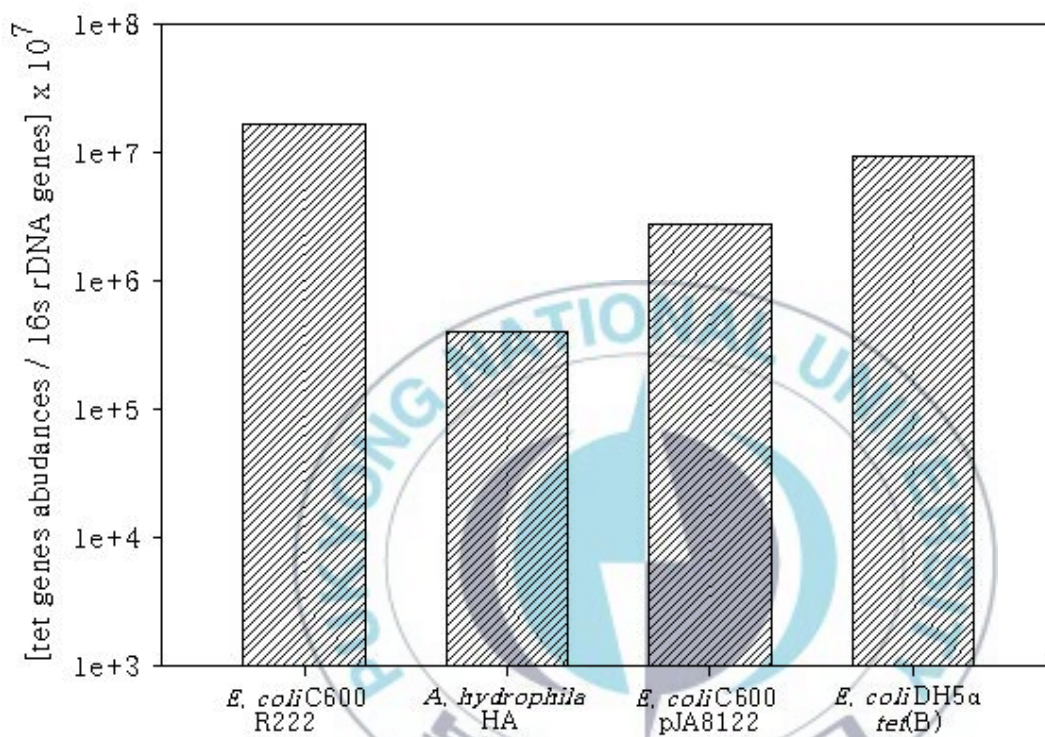


Fig. 14. *tet* gene copy number relative to 16S rDNA using real-time PCR.

8. Tc 내성 유전자의 transformation 과 conjugation

해산어와 담수 관상어에서 분리된 Tc 내성균 중 indicator *tet* gene에 대한 전이 정도를 확인하기 위해서 각각 *Vibrio* spp. 20균주와 *Aeromonas* spp. 20균주를 분리해 내어 transformation 및 conjugation 실험을 실시하였다. 실험에 대한 결과는 Fig. 13과 Table 18 (A)에 나타냈다.

국내산 양식 돌돔 장내 세균 중 *Vibrio* spp. 균주로부터 확인된 *tet*(B)와 싱가포르산 담수 관상어 장내 세균 중 *Aeromonas* spp. 균주로부터 확인된 *tet*(A) 유전자가 transformants와 transconjugants 상에서 PCR법을 통한 작업에서 확인되었다. Fig. 13에서 알 수 있듯이 이 두 가지 내성 유전자는 각각의 균주에서 다른 세균으로 전이가 되었다.

실험에 사용된 *tet*(B)를 가진 *Vibrio* spp. 20균주 중 5균주가 tetracycline 2 μ g/ml이 들어 있는 CC agar에서 transformant를 보였고 *Aeromonas* spp. 20균주 중 *tet*(A)를 가진 13균주 중 7균주, *tet*(A)와 *tet*(E)를 가진 7균주 중 2균주가 transformant를 나타냈다. Transformant로부터 plasmid를 분리한 후 multi PCR 방법을 통해 동일한 *tet* gene을 확인할 수 있었다 (Fig. 13).

Conjugation 실험을 통한 transconjugant의 검출은 recipient 균주 (*E. coli* HB101)가 donor 균주로부터 그 내성을 전달 받았을 경우, 항생제가 첨가된 CC agar에서 진한 보랏빛 집락을 형성하게 된다. 그 결과 *Vibrio* spp.의 경우 20균주 모두에서 transconjugant를 검출할 수 없었고 *Aeromonas* spp. 20 균주에서는 *tet*(A)를 가진 13균주 중 10균주, *tet*(A)와 *tet*(E)를 가진 7균주 중 6균주에서 transconjugant를 검출하였다. *tet*(A), (E)를 가진 6균주에서 5균주는 *tet*(A)와 *tet*(E) 둘 다 넘어갔지만 하나의 균주에서는 *tet*(A)만 전이된 것을 확인하였다.

또한 내성 유전자의 전이에 의하여 copy 값에 어떠한 영향을 끼치는지를 알아보기 위해 내성비율의 차이에 따른 내성 전이 비율을 확인해 보았다. 먼저 담수 관상어

에서 내성비율 평균이 90% 정도 되는 그룹을 high 70% 정도 되는 그룹을 low 그룹으로 정한 뒤 각 그룹에서 분리된 Tc 내성균을 분리하여 transformation 및 conjugation 실험을 실시하였다. 그 결과는 table 18 (B)에 나타났다. high 그룹에서의 transformation과 conjugation의 비율이 각각 75%, 100%였고 low 그룹에서는 각각 73%와 80%로 두 그룹간의 뚜렷한 결과 차이는 보이지 않았다.



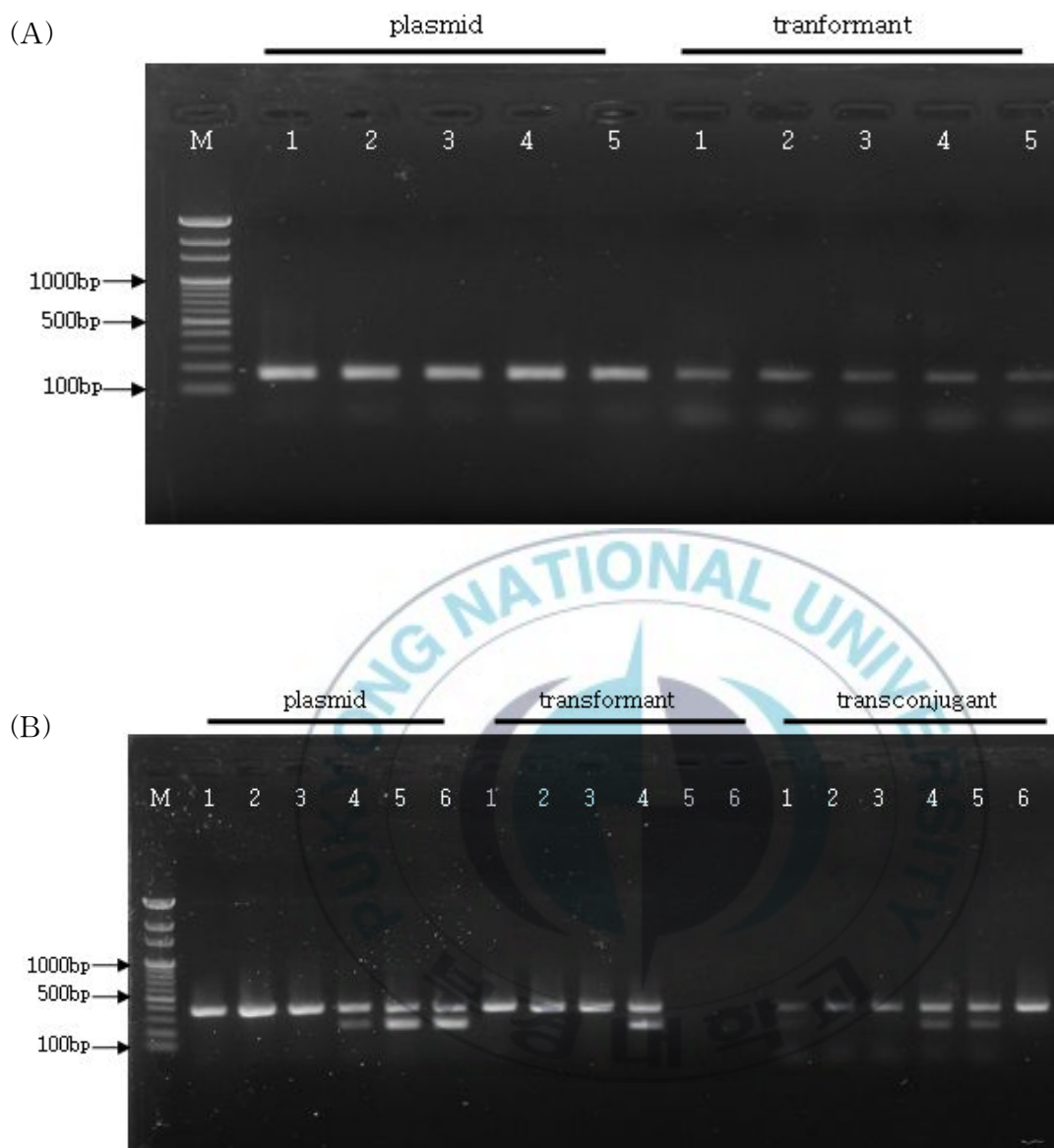


Fig. 13. Agarose gel electrophoresis of PCR amplicons in which a transformant and transconjugant were used as specific primers. (A) *Vibrio* spp. from domestic Rock bream, (B) *Aeromonas* spp. from fresh water ornamental fish in Singapore.

Table 18. Result of transformation and conjugation experiments.

(A)

Donor strain	<i>tet</i> genes	No. of isolates (%)	Transferred gene	Result (%)	
				transformation	conjugation
<i>Vibrio</i> spp. ^a	<i>tet</i> (B)	20 (100)	<i>tet</i> (B)	5/20 (25)	0/20 (0)
<i>Aeromonas</i> spp. ^b	<i>tet</i> (A)	13 (65)	<i>tet</i> (A)	7/13 (53)	10/13 (76)
	<i>tet</i> (A), <i>tet</i> (E)	7 (35)	<i>tet</i> (A), <i>tet</i> (E)	2/5 (40)	5/5 (100)
			<i>tet</i> (A)	0/2 (0)	1/2 (50)
^a <i>Vibrio</i> spp. from domestic marine fish, ^b <i>Aeromonas</i> spp. from fresh water ornamental fish.					

(B)

	Frequency of Tc resistant bacteria (%)	No. of isolates	Results	
			transformation	conjugation
Fresh water	90	12	9 (75)	12 (100)
ornamental fish	70	15	11 (73)	12 (80)

IV. 고 찰

본 연구에서는 아시아에서 수입된 담수 관상어와 국내산 담수 관상어 및 해산어 장내 세균의 여러 항생제 별 내성 비율을 알아보고, Tc 내성 유전자를 정량함으로써 그에 따른 Tc 내성 비율과의 관계에 대해서도 분석하였다.

항생제 내성 비율을 보기에 앞서 선택 배지를 이용하여 장내 정상 세균총의 동정에서 *Aeromonas* spp., *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp. 그리고 *Vibrio* spp. 등의 gram 음성균이 주요한 것으로 밝혀졌다. 특히 해산어에서는 *Vibrio* spp. 관상어에서는 *Aeromonas* spp.의 비중이 높은 것으로 확인되었다. 이는 수입산 담수 관상어와 국내산 해산어에서 각각 18개, 21개의 장내 세균을 무작위로 추출하여 API 20E를 실시한 결과와도 일치하였는데 해산어의 경우 *Vibrio* spp., *Enterobacteriaceae* 그리고 *Serratia odorifera* 등의 순으로 비중을 차지하였고 담수 관상어에서는 *Aeromonas* spp., *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli* 그리고 *Vibrio cholerae* 등의 순으로 나타났다. 담수산 어류인 틸라피아의 경우 역시 *A. hydrophila*, *Corynebacterium urealyticum*, *Escherichia coli* 등의 gram 음성균이 장내 정상 세균 총에 빈번하게 존재한다고 밝혀져 있으며 (Al-Harbi *et al.*, 2004), 미국산 channel catfish의 장내 세균에서도 *Vibrionaceae*, *A. hydrophila*, *C. freundii*가 주요 균주로 조사되었다 (DePaola *et al.*, 1995). 그러나 남극산 Antarctic fish인 *Notothenia neglecta*에는 *Vibrio* spp.가 주요 장내 세균으로 알려져 있다 (Mac Cormack *et al.*, 1990). 또한 기수 지역과 해안 지역의 농어 (*Micropterus* sp.)를 대상으로 장내 세균을 조사한 결과 기수 지역에서는 *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp., *Enterobacteriaceae* 그리고

Vibrio spp. 순으로 나타났지만 해안지역에서는 *Vibrio* spp., *Aeromonas* spp., *Flavobacteria* 그리고 *Enterobacteriaceae* 순으로 장내 세균 비율이 높은 것으로 나타나 어류의 수중 환경에 따른 장내 세균 비율의 차이를 보여주었다 (MacFarlane *et al.*, 1986).

장내 세균의 항생제 내성 비율을 알아본 결과 해산어가 담수 관상어에 비해 전체적으로 낮은 내성 비율을 보였고 담수 관상어 내에서도 수입된 어종에 비해 국내산이 30%씩 낮은 내성 분포를 보였다. Tc의 경우 싱가포르, 태국 그리고 중국산 담수 관상어에 비해 국내산 담수 관상어가 상대적으로 낮은 내성 비율을 보였는데 이는 박 (2006)의 연구에서 보여진 중국, 싱가포르, 태국뿐만 아니라 인도네시아에서 수입된 관상어에서도 장내 세균이 높은 Tc 내성 비율 (48~88%)을 가지고 있고 윤 (2008)의 연구에서 역시 싱가포르, 중국, 태국에서 수입된 관상어 (58~65%)에 비해 국내산 (20~30%)이 낮게 나타난다는 결과와 일치하였다. 이러한 내성 비율의 차이는 항생제 저항성 유전자의 존재 유무와 장내 세균의 종류에 따라서 일정한 영향을 받는다고 하였다 (박, 2006). 프랑스에서 조사된 논문에서는 2005년 3월에 무지개 송어 (*Oncorhynchus mykiss*) 양식장에서 분리된 *Aeromonas* spp.의 OTC 내성이 100%에 이른다고 보고하였다 (Gordon *et al.*, 2006). 본 연구에서도 담수산 관상어종을 대상으로 한 Tc 내성 비율 연구에서 *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp. 그리고 *Enterobacteriaceae*의 Tc 내성 비율이 50% 이상씩 나타났다. 또한 해산어의 경우 TCBS plate에서 자라는 *Vibrio* 군주가 다른 gram 음성 균보다 주요한 장내 세균으로 나타났으며 Tc 내성 비율 또한 다른 선택 배지에 비해 높게 나타났다. 2005년 스페인에서 발표된 논문에 의하면 뱀장어 (*Anguilla japonica*) 장에서 분리된 *Vibrio furnissii* 의 OTC 내성 비율은 33% 였고, TSA plate에서 조사된 전체 Tc 내성 균주의 내성 비율은 18% 정도로 나타났는데 (Alcaide *et al.*, 2005) 이에 비해 본 연

구에서는 내성 비율이 더 높게 나타났다. 특히, 넙치의 경우 Tc 내성 균주의 비율이 80% 이상으로 아주 높게 나타났다. 이는 오스트레일리아의 양식 현장에서 채취한 64개의 *Vibrio* spp. 의 OTC 내성 비율이 6.5%로 나타나는 결과(Akinbowale *et al.*, 2005)와도 큰 차이를 보였다.

Bacterial isolates를 이용한 Tc의 MIC를 확인한 결과 해산어에서 추출한 *Vibrio* spp. MIC 값은 32~128 μ g/ml이었고 관상어에서 추출한 *Aeromonas* spp.의 경우 64~128 μ g/ml 이었다. 이는 Kim *et al.* (2004)의 연구에서 1999년 일본 방어 (*Seriola quinqueradiata*)의 장에서 분리된 34개의 *Vibrio* / *Aeromonas* 균주가 OTC에 대한 MIC 값이 62.5 μ g/ml 이상인 것으로 나타나는 (Kim *et al.*, 2004)결과와도 유사하였다.

multi PCR을 이용하여 어류의 장내에 존재하는 세균들을 대상으로 *tet*(A)-(G)까지 내성 유전자의 분포 비율을 알아보았다. 담수 관상어에서 추출한 장내 세균을 대상으로 한 결과 6가지 내성 유전자가 모두 빈번하게 검출되었으며 그 중에서도 *tet*(A), *tet*(D), *tet*(E)가 주요하게 나타났다. 해산어에서 추출한 장내 세균의 경우 관상어와는 달리 *tet*(B)와 *tet*(D)가 우세하게 확인되었는데 이는 윤 (2008)과의 연구와도 일치하였다. 해산어와 담수 관상어 그룹에서 각각 우세하게 나타나는 *Vibrio* spp. 와 *Aeromonas* spp.를 대상으로 multi PCR을 실시한 결과, *Vibrio* spp.에서는 30개의 내성 균주 중 80%가 *tet*(B)를 가지는 것으로 확인되었고 *Aeromonas* spp.의 경우 *tet*(A)를 가지는 내성 균주가 33개 중 78%를 차지하는 것으로 확인되어 각각의 균주에서 주요 내성 유전자인 것으로 추정된다. 무작위로 추출된 Bacterial isolate 중 싱가포르 산과 중국산 담수 관상어에서 하나의 균주가 2개 이상의 내성 유전자를 가지는 multi-*tet* gene의 비율이 30% 이상으로 나타났다. 대부분의 내성 균주들은 2개의 내성 유전자를 가지는 multi-*tet* gene의 비율이 높았으나 싱가포르 산 펄 구라미의 경우 3개의 이상의 내성 유전자를 가지는 비율이

11%로 가장 높게 확인되었다. 다른 연구에서는 같은 담수어인 메기 (*Silurus asotus*)의 장내 세균에서 분리된 *A. hydrophila* 에는 *tet(A)*와 *tet(E)*가 빈번하게 나타났는데 (Depola *et al.*, 1988) 이는 본 연구에서 실시한 *Aeromonas* spp.를 대상으로 한 multi PCR의 결과와 일치하였다. 그리고 해산어 장내 세균 중 *Vibrio* spp.의 경우 *tet(B)*가 가장 빈번하게 검출되었고 multi-*tet* gene의 경우 *tet(B)*와 *tet(D)*를 가진 균주가 17%로 나타났다. 다른 연구에 의하면 *tet(B)*는 gram 음성균에 많이 존재하는 것으로 알려져 있다 (Roberts *et al.*, 2005). 해수 환경 저질 내 *A. hydrophila*, *P. fluorescens* 등의 균주에서는 *tet(E)*가, lactose fermenting 균주에서는 *tet(B)*가 주요 내성 유전자로 보고되었다 (Andersen and Sandaa, 1994). 특히 노르웨이에서는 *tet(E)* 유전자가 어병 세균인 *Vibrio salmonicida*, *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas salmonicida* 등에서 주로 검출된다고 하였다 (Serum *et al.* 1992). *tet(G)* 또한 *Vibrio* spp., *Pseudomonas* spp. 와 *Salmonella* spp. (31) 등의 병원성 세균에 존재하는 주요 내성 유전자로 알려져 있다 (Furushita *et al.*, 2003; Miranda *et al.*, 2003).

어류 장내 세균의 Tc 내성 비율과 내성 유전자를 조사하기 위해 중장에서 stool을 무균적으로 분리하여 조직 분쇄 과정 없이 qPCR을 위한 template로써 stool DNA를 추출하여 사용하였다. Stool DNA의 사용은 이전 연구 (윤, 2008)에서 제작된 primer를 이용하여 qPCR을 실행하였다. 기존의 conventional PCR법과 EvaGreen 시약을 이용하여 qPCR법으로 어류 장내 세균의 Tc 내성 유전자를 정량하였다. qPCR은 형광 염색 시약을 통하여 형광 분광 광도계를 이용하여 실시간으로 PCR 증폭산물의 생성과정을 모니터링하여 target 유전자를 정량하는 방법으로써, 사용되는 형광 염색 시약에는 DNA에 Primer와 같이 상보적인 염기서열을 이용한 TaqMan, Molecular beacon 등이 있고 DNA의 이중 나선에 비특

이적으로 결합하는 EvaGreen, SYBR Green 등이 있다. Maeda *et al.*(2003)의 연구에서는 동일한 유전자에 대해 이 두 가지 서로 다른 원리의 형광 염색 시약을 모두 사용한 결과 정량된 copy 값에서는 차이가 없음을 밝혔다. 이에 본 연구에서는 경제력 있고 probe 제작의 수고를 덜 수 있는 Evagreen 형광 염색 시약을 사용하였다. 이러한 qPCR 기법을 사용하여 새롭고 신속하게 어류 생체 내 microflora에 존재하고 있는 모든 내성균이 갖고 있는 전체 유전자의 분자 생물학적인 특성과 정량적인 분석까지도 동시에 할 수 있었다. 또한 실험 균주에만 국한 되지 않고 어류 장내 세균 속 잠재적인 Tc 내성 유전자도 정량 할 수 있다. 즉 어류 장내의 모든 microflora에 적용이 가능하다. 더불어 배지를 이용하여 배양 되지 않는 non-culturable bacteria가 가지는 Tc 내성 유전자에 대한 정량이 가능하고 이러한 균주가 가지는 내성 유전자가 전체 내성균의 부하에 어느 정도의 영향을 미치는지 알 수 있다.

16s rDNA gene의 정량을 위한 qPCR 시 필요한 표준 검량 곡선의 결정은 윤 (2008)의 연구 방법을 따라 sample derived standard 인 amplicon standard를 사용하였고 (Yu *et al.*, 2005) 6개의 Tc 내성 유전자의 정량을 위한 표준 검량 곡선의 결정은 plasmid standard를 제작하여 사용하였다. 본 연구에서는 16s rDNA gene과 Tc 내성 유전자 사이의 상관관계를 알아보기 위하여 16s rDNA 부분의 universal primer를 이용하여 stool DNA로부터 amplicon standard를 만들고 이것으로 어류 장내 정상 세균 총을 정량하여 *tet* gene copy 수와의 상대적인 비율을 나타내는 데 사용하였다. 16s rDNA와의 상대적 분석의 장점은 microflora의 분석에서 여러 생사료등이 어류 장내에 있거나 어류 장내 조직으로 인해 total DNA의 양을 기준으로 하는 것이 의미가 없을 때에 적용할 수 있다는 것이다. Nadkarni *et al* (2002)는 16s rDNA gene을 사용한 총 세균의 abundance가 agar plate를 통해 계수된 세균의 수보다

40배 가량 많다고 하였고. 또한 이 논문에 따르면 *Escherichia coli*는 7개, *Pseudomonas* spp.는 4개, *Staphylococce*는 9개 정도의 16s rRNA operon을 한 single chromosome에 가지고 있다고 하였다. 그리고 Joel A. Klappenbach *et al* (2001)에서도 역시 *Escherichia coli*가 가지는 가장 많은 16s r RNA operon이 최대 36개라고 보고하였다. 본 연구는 단일 균주로 *E. coli*를 대상으로 16s rDNA gene의 copy 수와 viable counting의 관계를 확인해 보았는데 이전의 연구 결과와는 달리 2배 정도씩 16s rDNA gene의 copy 수가 낮게 나타나는 것을 확인하였다. 이는 Table 1.에서 설명되어진 해산어와 담수 관상어에서의 16s rDNA gene의 copy 수와 viable counting과의 관계에서 해산어는 1/1000배 관상어는 1/100배 정도 낮게 나타나는 수치이다. 이러한 실험의 결과는 stool에서 DNA를 분리해 나가는 과정에서 stool 내의 inhibitor 제거 과정 미흡으로 인하여 qPCR의 결과에도 영향을 미친 것으로 추정된다. 이는 돼지 faecal sample 내의 단백질, polysaccharide complexes, 먹이의 종류, 장내 세균과 숙주의 건강 상태에 따른 다양한 inhibitor가 존재 (Goncalves *et al.*, 2008) 하기 때문에 DNA extraction 과정에서 이러한 inhibitor 제거를 위한 step이 필요하다고 Roose-Amsaleg *et al.*, (2001)에서 언급한 바 있다. 본 연구에서는 16s rDNA gene의 copy 수가 이전의 연구에 비해 낮게 나타났지만 각각의 stool sample에서 추출한 DNA를 이용하여 16s rDNA gene과 Tc 내성 유전자를 정량하기 때문에 copy 값에는 똑같이 영향을 미치리라 추정하고 실험을 실시하였다. Peak *et al.* (2007)은 Tc 내성 유전자를 정량하는데 16s rDNA gene이나 항생제의 양, 생물 유래 유기물등이 내성 유전자의 양과 비례하는 상관 관계를 가진다고 하였다. 이러한 결과는 본 실험에서도 역시 증명되었다. 담수 관상어의 경우 여전히 높은 Tc 내성 유전자 수를 보였고, 특징적으로 6개의 *tet* gene 중 *tet*(A)가 다른 5개의 *tet* gene에 비해 높았다. 해

산어에서는 *tet(B)*의 abundance가 가장 높았으며 두 그룹 모두 Tc 내성 유전자의 절대적인 정량 값과 Tc resistant bacterial isolates을 이용한 multi PCR의 결과와 모두 일치하였다 (Table 17). S. Koike *et al.* (2007)에서는 lagoon에 존재하고 있는 *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(Q)*, *tet(W)*, *tet(C)*, *tet(H)* 그리고 *tet(Z)* 7개를 대상으로 실험을 실시한 후 target gene / 16s rDNA gene 의 방법으로 16s rDNA gene copy에 대한 *tet* gene의 상대적인 정량을 알아본 결과 *tet(C)*가 우세하게 나타나는 것을 확인하였다.

본 연구에서는 해산어와 담수 관상어 그룹에서의 indicator *tet* gene으로 각각 *tet(B)*와 *tet(A)*로 결정한 후 Tc 내성 비율과 indicator *tet* gene copy 값과의 상관관계를 살펴보았다. 그 결과, Tc 내성 비율이 높을수록 indicator *tet* gene copy 값도 따라 증가하는 경향을 보였지만 70%의 Tc 내성 비율을 나타내는 담수 관상어의 *tet(A)* copy 값이 Tc 내성 비율 85%를 나타내는 담수 관상어의 *tet(A)* copy 값이 10배 정도 더 높게 나타나기도 했다. 이는 담수 관상어의 장내 세균에서 주로 나타나는 *Aeromonas* spp.는 50% 이상이 tetracycline과 ampicillin 관련 내성 유전자가 주로 plasmid 상에 존재한다고 밝혀져 있고 이러한 plasmid는 self-transmissible하며 다른 균주로의 전이 가능성이 높다고 알려져 있다 (Jacobs and Cheina, 2007). 또한 본 연구에서 역시 싱가포르 산 담수 관상어에서 추출한 *tet(A)*를 가진 *Aeromonas* spp.를 이용하여 내성 유전자의 전이에 대한 실험을 한 결과 이전의 보고와 마찬가지로 transformant 45%, transconjugant는 70% 검출되면서 (Table 18 (A)) 동일한 결과를 보여주었다. 이전의 다른 보고들에 의하면 mobile genetic elements의 증가로 인하여 항생제 내성의 범위가 넓어진다고 언급한 바 있다 (Rhodes *et al.*, 2000; schmidt *et al.*, 2001a, b). 이는 본 실험에서 실시한 trnasfer 실험의 결과에서 보이는 것처럼 plasmid 내에 존재하는

*tet(A)*의 전이를 통해 다른 균주에게 Tc에 관한 내성을 전달하는 것과 같은 현상으로 여겨진다. 또한 *Enterobacteriaceae*에서 *tet(A)*, *tet(B)*가 다른 세균 간 수평이동이 나타난다고 보고되었고 (Roberts, 1996) 이와 관련지어 사람이나 포유류의 장내 세균 *Escherichia coli*에는 *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)* 그리고 *tet(D)* 등이 빈번하게 검출된다는 연구로 보아 해산어를 섭취하는 최종 소비자에게로의 내성 유전자 전이의 가능성이 의심 된다 (Bryan *et al.*, 2004). Aoki *et al* (1988)과 Furushita *et al* (2003)은 Tc 내성 유전자의 연구에서 R-plasmid의 전이 위험성에 대하여 언급한 바 있다. *Aeromonas* spp.에 이어 국내산 양식 돌돔에서 추출한 *tet(B)*를 가진 *Vibrio* spp.를 이용한 transfer 결과는 *Aeromonas* spp.와는 달리 transformant 25%이고 transconjugant는 검출되지 않아 내성 유전자의 전이 비율이 낮았다. 이는 *tet(B)*를 가진 *Vibrio* spp.에서 transformation과 conjugation이 잘 이루어지지 않아 내성 유전자가 chromosome에 위치하고 있을 수 있다고 추정되긴 하지만, origin 등의 차이로 *E. coli* HB101에서 replication이 일어나지 않을 수도 있으며, Frech *et al.* (2000)은 *tet* gene의 위치를 확인하기 위해 *tet* probes를 제작하여 hybridization을 시킨 후, plasmid의 유무를 조사하는 것이 선행되어야 한다고 보고하였는데, 본 실험에서는 이 방법을 이용하지 않았기 때문에 더욱 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 사료되어진다.

본 연구에서는 내성 유전자가 chromosome, plasmid와 R-plasmid 중 서로 다른 위치에 내성 유전자가 위치함에 따라 내성 유전자의 copy 값에 영향을 끼치는 지에 대하여 실험을 실시하였다. 그 결과 세균 내의 *tet* gene이 plasmid, R-plasmid, chromosome에 위치해 있는 순으로 *tet* gene copy 값이 높은 것으로 확인되었다. 이는 plasmid나 R-plasmid가 하나의 세균 내에서 4~7개 많게는 10~100개까지 가진다는 보고와 관련

하여 하나의 내성균이 많은 양의 내성 유전자를 가질 수 있음을 보여준다. 그리고 Roberts *et al.* (2005)에서 *tet* gene이 plasmid와 transposon과 관련하고 있다는 보고는 이러한 mobile elements에 의한 내성 유전자의 전이와 함께 copy 값의 영향을 끼치는 중요한 요인 중 하나로 추정된다. 그리고 본 연구에서 실시한 Tc 내성 level에 따른 내성 전이 비율에 있어서도 high와 low 그룹 사이에서 차이가 없음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 본 연구에서 목적으로 하는 indicator *tet* gene과 내성 level의 상관관계를 분석하는 데 있어서 걸림돌이 되지 않는 것을 확인할 수 있다. 하지만 plasmid와 R-plasmid상에 존재하는 내성 유전자에 대한 정확한 copy 값에 대한 세부적인 연구는 계속해서 지속되어야 할 것이다.

예전의 연구에서 가축 양식장 주변의 lagoon 2ml에 *tet*(O), *tet*(W), *tet*(Q)가 약 $4.5 \sim 4.8 \times 10^4$ copies가 존재한다는 연구 (Smith *et al.*, 2004)가 있었다. 이 연구에서는 세 개의 내성 유전자를 single qPCR 한 후 copy 값을 각각 더하였고 이것을 microflora에서 잔류하는 항생제량과 비교 하였다. 그 결과 항생제의 잔류량이 높을수록 *tet* gene copy number가 증가하는 것으로 나타났다. 본 연구에서는 6개 내성 유전자의 총 copy 값을 Tc 내성 비율과 비교하는 대신 각 그룹에서 주로 나타나는 내성 유전자를 indicator *tet* gene으로 결정하여 Tc 내성 비율과 비교하였다. 각 그룹의 indicator *tet* gene이 다른 내성 유전자 copy 값보다 유의적으로 높게 나타나고 이는 6개의 내성 유전자 총 copy 값에 가장 큰 영향 (Table 13)을 미치므로 여러 내성 유전자의 copy 값을 구할 필요 없이 indicator *tet* gene의 copy 값만으로도 각 그룹의 Tc 내성 비율의 차이를 비교할 수 있을 것으로 추정된다.

현재 어류 양식 산업에서는 해산 양식어에 비해 관상어에서 많은 양의 항생제를 사용하고 있다. 이것은 특히 관상어의 국가 간 이동시 질병에

방, 치료의 목적으로 항생제를 과다 사용하는 것과 연관이 있다. 특히 우리나라에는 중국과 일본으로부터의 양식어, 그리고 싱가포르와 인도네시아로부터는 관상어가 대량으로 수입되고 있으므로 이들 나라로부터 수입된 어류의 장내세균에서 나타나는 내성 유전자 종류 및 특성에 대한 분석은 향후의 무역 분쟁 또는 수입 금지책 마련을 위하여서라도 필히 이루어지고 지속적인 monitoring이 있어야 할 것이다.

본 연구에서는 qPCR을 이용한 정량적 분석이 수생 환경뿐만 아니라 생태계에서 존재하는 다양한 Tc 내성 유전자를 검출하여 Tc 내성 비율의 높고 낮음을 추정할 수 있는 신속하고 감도 높은 분자 생물학적 방법이 된다는 것을 증명하였다. 이러한 Tc 내성 유전자의 부하 분석은 chromosome, plasmid 그리고 R-plasmid에 의하여 어느 정도의 차이는 가져올 것이나 일반적으로 서로 다른 다양한 어종의 microflora에 있는 내성균 함유 구성의 평균은 동일할 것이므로 Tc 내성균의 내성 유전자의 부하와 전체 microflora에서의 내성균 비율의 상관관계를 조사하면 수계 환경에서의 resistance indicator를 선정하고 이를 활용 할 수 있는지에 대한 접근이 가능할 것이다. 앞으로 여러 항생제의 광범위한 사용으로 인해 생긴 항생제 내성 유전자들에 대한 다른 세균으로의 수평 전이 또는 다재 내성 유발 등에 대한 보다 깊은 관심과 연구가 필요할 것이며 efflux pump의 내성 기작 외에 ribosomal protection이나 enzymatic 기능을 가지는 다른 *tet* gene에 대한 위와 같은 연구도 진행 되어야 할 것으로 사료된다.

V. 요약

본 연구에서 조사된 바에 의하면 국내산 양식 해산어의 장내 Tc 내성 비율은 20~50% 정도로 담수 관상어에 비해 낮았으며, 담수 관상어 내에서도 싱가포르, 중국, 태국 (70~95%)에서 수입된 관상어종에 비해 국내산 담수 관상어(40~60%)로 상대적으로 낮았다. 이는 관상어종의 국가간 지역간 이동시 많은 양의 Tc 항생제가 쓰이기 때문으로 해석된다. qPCR 정량에 앞서 살펴본 Tc 내성 균주를 이용한 multi PCR에서는 수입산, 국내산 관상어 및 해산어에서 *tet(A)*-(G) 까지 다양한 내성 유전자가 검출 되었으며 multi-*tet* gene을 가지는 Tc 내성 균주도 발견되었는데 특히, 싱가포르 산과 중국 산 담수 관상어에서 30% 이상의 비율로 높게 확인 되었다. 대부분의 어종에서는 2개의 multi-*tet* gene을 가지는 내성 균주의 비율이 높았는데 싱가포르에서 수입된 담수 관상어에서는 약 11% 이상이 3개 이상의 내성 유전자를 모두 가지는 것으로 조사 되었다. Tc resistant bacterial isolates의 multi PCR 결과 해산어에서는 *tet(B)*가 담수 관상어에서는 *tet(A)*가 major *tet* gene으로 확인되었다.

tet gene 정량을 위한 qPCR의 사용에서는 plasmid standard를 이용하였고 16s rDNA gene의 정량에서는 amplicon standard를 사용하였다. 관상어와 해산어의 장내 stool DNA 를 분리하여 single qPCR 방법을 적용하여 *tet* gene abundance를 결정 하였다. 또한 이를 16s rDNA gene 과의 상대적인 비율로 나타내었을 때 절대적인 Tc 내성 유전자의 정량 값과 동일한 결과를 보여 장내 세균 내의 정상 세균총의 수와 Tc 내성 유전자의 수가 비례하는 상관관계를 가지는 것을 확인하였고 또한 이는 Tc resistant bacterial isolates의 multi PCR 결과와도 일치하는 것을 확인하였다.

해산어와 담수 관상어 그룹에서의 indicator *tet* gene으로 각각 *tet*(B)와 *tet*(A)로 결정한 후 Tc 내성 비율과 indicator *tet* gene copy 값과의 상관관계를 살펴본 결과 Tc 내성 비율이 증가함에 따라 indicator *tet* gene의 copy 값도 증가하는 경향을 확인하였다. 내성 유전자의 전이 정도와 위치에 따른 copy 값의 차이는 있으나 서로 다른 다양한 어종의 microflora에 있는 내성균 함유 구성의 평균은 동일할 것으로 보고 indicator *tet* gene의 copy 값으로 Tc 내성 비율의 정도를 추정하는데 있어서 신속하고 감도 높은 분자 생물학적 방법이 된다는 것을 확인하였다.



VI. 감사의 글

학부나 제대로 졸업할 수 있을까 싶었던 제가 어느덧 대학원 2년의 시간을 마무리하고 있다는 것이 믿겨지지 않습니다. 저 스스로 돌이켜보아도 많이 모자라고 부족하였는데 이런 저를 이끌어주시고 잡아주신 정현도 선생님이 새삼 더욱 존경스럽습니다. 항상 모자란 저를 일깨워주시고 이끌어주신 저의 영원한 지도교수님인 정현도 교수님께 항상 감사드리며 부끄럽지 않은 제자가 되도록 노력하겠습니다. 그리고 바쁘신 와중에도 저의 논문에 신경을 써주신 허민도 교수님, 정준기 교수님께 감사드리며 언제나 관심을 가지고 지켜봐주신 박수일 교수님, 김기홍 교수님, 강주찬 교수님께도 감사함을 전합니다.

2005년 11월에 실험실에 들어와 지금까지 오랜 시간 함께 하면서 많은 추억과 경험을 쌓을 수 있게 도와준 진단생화학실험실 선·후배님들께도 감사함을 전하고 싶습니다. 항상 실험실의 중심이 되어주는 준범선배와 려진선배, 편한 친구처럼 대해주는 소혜선배, 혜진선배, 함께 석사 2년을 보내면서 많은 도움을 준 광일선배, 그리고 어떤 형용사로도 표현할 수 없는 동기 기원, 주현, 정희, 진단방의 귀염장이 지웅이 오빠, 윤준이, 진단방 일병 기택이, 막내 여은이에게 고마움을 전하고 싶습니다. 그리고 경현선배, 수희선배, 명석선배, 종영선배, 경엽선배, 우열선배, 신후선배, 순범선배, 호열선배, 재훈선배, 영화선배, 대심선배, 윤경선배, 현정선배, 지효선배에게도 감사드립니다.

평소 축스러워 표현은 못했지만 엄마, 언니 너무 고맙고 미안하고 사랑합니다.

VII. 참고 문헌

- Andersen S. R. and Sandaa R. A. 1994. Distribution of tetracycline resistance determinants among gram-negative bacteria isolated from polluted and unpolluted marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. 60: 908-912.
- Alcaide, E., Blasco, M-D. and Esteve, C. 2005. Occurrence of drug-resistant bacteria in two European eel farms. *Applied and Environmental Microbiology*. 3348-3350.
- Al-Harbi, A. H., Uddin, M. N. 2004. Seasonal variation in the intestinal bacterial flora of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*×*Oreochromis aureus*) cultured in earthen ponds in Saudi Arabia. *Aquaculture*. 229: 37-44.
- Allard, J. D. and K. P. Bertrand. 1993. Sequence of class E tetracycline resistance gene from *Escherichia coli* and comparison of related tetracycline efflux proteins. *Journal of Bacteriology*, 175: 4554-4560.
- Aoki. T. 1988. Chemotherapy and drug resistance in fish farms in Japan. *Diseases in Asian Aquaculture*. 1. 519-529.
- Aurora. F. A., Muela, A., Cisterna, R., Iriberry, J. and Barcina, I. 1992. Biotic and abiotic factors affecting plasmid transfer in *Escherichia coli* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 392-398.
- Bach, H. J., Tomanova, J., Schltoer, M., Munch, J. C. 2002.

- Enumeration of total bacteria and bacteria with genes for proteolytic activity in pure cultures and in environmental samples by quantitative PCR mediated amplification. *Journal of microbiological methods*. 49: 235-245.
- Bell, G. R., Traveler, G. S. and Dworschak, C. 1988. Development in vitro and pathogenicity of an erythromycin-resistant strain of *Renibacterium salmoninarum*, the causative agent of bacterial kidney disease in salmonids. *Disease of Aquatic Organism*, 4: 19-25.
- Bryan, A., Shapir, N., and Sadowsky, M. J. 2004. Frequency and distribution of tetracycline resistance genes in genetically diverse, non-selected, and nonclinical *Escherichia coli* strains isolated from diverse human and animal sources. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 2503-2507.
- Chopra, I. and Roberts, M. C. 2001. Tetracycline Antibiotics: Mode of action, application, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology And Molecular Biology Review*, 65(2): 232-260.
- DePaola, A., Flynn, P. A., McPhearson R. M. and Levy, S. B. 1988. Phenotypic and genotype characterization of tetracycline and oxytetracycline resistance *Aeromonas hydrophila* from cultured channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and their environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 54: 1861-1863.
- DePaola, A., Peeler, J. T. and Rodrick, G. E. 1995. Effect of oxytetracycline-medicated feed on antibiotic resistance of

- gram-negative bacteria in catfish Ponds. *Applied and Environmental Microbiology*, 2335-2540.
- French, G. and Schwarz, S. 2000. Molecular analysis of tetracycline resistance in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars *typhimurium*, *Enteritidis*, *Dublin*, *Choleraesuis*, *Hadar* and *Saintpaul*: construction and application of specific gene probes. *Journal of Applied Microbiology*, 89: 633-641.
- Furushita, M., Shiba, T., Maeda, T., Yahata, M., Kaneoka, A., Takahashi, Y., Torii, Hasegawa, T., and Ohta M. 2003. Similarity of tetracycline resistance genes isolated from fish far bacteria to those from clinical isolates. *Applied and environmental microbiology*, 69: 5336-5342.
- Goncalves, E. M., Araújo, R. S., Orban, M., Matté, M. H., Corbett, C. E., Protocol for DNA extraction of *Cryptosporidium* spp. oocysts in fecal samples. *Rev inst Med Trop Sao Paulo*.
- Gordon, L., Giraud, E., JGanie`re, J-P., Armand, F., Bouju-Albert, A., Cotte, N. de la, Mangion C. and Le Bris, H. 2007. Antimicrobial resistance survey in a river receiving effluents from freshwater fish farms. *Journal of Applied Microbiology*, 1167-1176.
- Heid, C., Stevens, J., Livak, KJ., Williams PM., 1996. Real-time quantitative PCR. *Genome Research*, 6: 986-994.
- Jacobs, L., Cheian, H. Y. 2007. Characterization of integrons and tetracycline resistance determinants in *Aeromonas* spp. isolated from South African aquaculture systems. *International Journal of Food Microbiology*. 114: 295-306.

- Joel A. Klappenbach, Paul R. Saxman, James R. Cole and Thomas M. Schmidt, 2001. rrndb: Ribosomal RNA Operon Copy Number Database. *Nucleic Acids Research*, Vol. 29, No. 1: 181-184
- Kim, D. 2001. Real-time quantitative PCR. *Experimental & Molecular medicine*. 33: 101-109.
- Kim, e. H. and Aoki, T. 1993. the structure of the chloramphenicol resistance gene on transferable R plasmid from the fish pathogen, *Pasteruella piscicida*. *Microbiological Immunology*, 37: 705-712
- Kim, S. R., Nonaka, L., Suzuki S. 2004. Occurrence of tetracycline resistance genes *tet(M)* and *tet(S)* in bacteria from marine aquaculture sites. *FEMS Microbiology Letters*. 237: 147-156.
- Levy, S. B. 1992. Active efflux mechanism for antimicrobial resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 36: 695-703.
- Levy, S. B., McMurry, L. M., Barbosa, T. M., Burdett V., Courvalin, P., Hillen, W., Rovers, M. C., Rood, J. I. and Taylor, D. E. 1999. Nomenclature for new tetracycline resistance determinants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43: 1523-1524.
- MacFarlane, R. D., McLaughlin, J. J. and Bullock, O. L. 1986. Quatitative and qualitative studies of gut flora in striped bass from estuarine and coastal marine environmnets. *Journal of wildlife diseases*, 22(3): 344-348.
- Mac Cormack, W. P. and Fraile, E. R., 1990. Bacterial flora of

- newly caught Antarctic fish *Notothenia neglecta*. *Polar Biology*, 10: 413-417.
- Maeda, H., Fujimoto, C., Haruki, Y., Maeda, T., Koikeguchi, S., Petelin, M., Arai, H., Tanimoto, I., Nishimura, F., Takashiba, S. 2003. Quantitative real-time PCR using TaqMan and SYBR Green for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *tetQ* gene and total bacteria. *FEMS. Immunology and Medical Microbiology*. 39: 81-86.
- Marshall, B. C., C. Tachibana and S. B. Levy. 1983. Frequency of tetracycline resistance determinant classes among lactose-fermenting coliforms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 24: 835-840.
- Miranda, C. D., Kehrenberg, C., Ulep, C., Schwarz, S. and Roberts, M. C. 2003. Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria from Chilean salmon farms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 47: 883-888.
- Mohammed Salim Ammor, Miguel Gueimonde, Morten Danielsen, Monique Zagorec, Angela H. A. M. van Hođa, Clara G. de los Reyes-Gavilan, Baltasar Mayo, and Abelardo Margolles. 2007. Two different tetracycline resistance mechanisms, plasmid-carried *tet(L)* and chromosomally located transposon-associated *tet(M)*, coexist in *Lactobacillus sakei* Rits 9. *Environmental microbiology*. Vol. 74, No. 5: 1394-1401
- Nadkarni, M. A., Martin, F. E., Jacques, N. A., and Hunter, N. 2002. Determination of bacteria load by real-time PCR using a

- broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology*. 148: 257-266.
- NCCLS (2001). Performance Standards for Antimicrobial susceptibility testing, eleventh informational supplement. NCCLS Document M100-S11. *National Committee of Clinical Laboratory Standards*. Wayne, PA, USA. ISBN 1-56238-426-0.
- Peak, N., Knapp, C. W., Yang, R. K., Hanfelt, M. M., Smith, M. S. Aga, D. S., and Graham, D. W. 2007. Abundance of six tetracycline resistance genes in wastewater lagoons at cattle feedlots with different antibiotic use strategies. *Environmental Microbiology*. 9(1): 143-151.
- Rhodes, G., Huys, G., Swings, J., McGann, P., Hiney, M., Smith, P., Pickup, R. W. 2000. Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between aeromonads in hospital and aquaculture environments: Implication of Tn1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant Tet a. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 3883-3890
- Roberts, M. C., Pang, Y., Riley, D. E., Hillier, S. L., Berger, R. C. and Krieger, J. N. 1993. Detection of *tetM* and *tetO* tetracycline resistance genes by polymerase chain reaction. *Molecular and cellular probes*, 7: 387-393.
- Roberts, M. C. 1996. tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Review*. 19: 1-24.
- Roberts, M. C. 2005. Updated on acquired tetracycline resistance

- genes. *FEMS, Microbiology letters*. 245: 195–203.
- Roose-Amsalet C. L., Garnier-Sillam, E., and Harry, M. H. 2001. Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples. *Appl. Soil Ecology*. 18: 47–60.
- Schmidt, A. S., Bruun, M. S., Dalsgaard, I., Larsen, J. L. 2001a. Characterization of class 1 integrons associated with R-plasmids in clinical *Aeromonas salmonicida* isolates from various geographical areas. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*. 47: 735–743.
- Schmidt, A. S., Bruun, M. S., Dalsgaard, I., Larsen, J. L. 2001b. Incidence, distribution, and spread of tetracycline resistance determinants and integron-associated antibiotic resistance genes among motile aeromonads from a fish farming environment. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*. 7: 5675–5682.
- Serum, H., Roberts, M. C. and Crosa, J. H. 1992. Identification and cloning of a tetracycline resistance gene from the fish pathogen *Vibrio salmonicida*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 36:611–61.
- S. Koike, I. G. Krapac, H. D. Oliver, A. C. Yannarell, J. C. Chee-Sanford, R. I. Aminov, and R. I. Mackie. 2007. Monitoring and source tracking of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater adjacent to swine production facilities over a 3-year period. *Environmental microbiology*. Vol. 73, No. 15: 4813–4823
- 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.
- Smith, M. S., Yang, R. K., Knapp, C. W., Niu, Y., Peak, N., Galland, J. C., and Graham, D. W. 2004. Quantification of tetracycline resistance genes in feedlot by real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 7372-7277.
- Stamm, J. M. 1989. In vitro resistance by fish pathogen to aquacultural antibacterial including the quinolones difloxacin(A-56619) and sarafloxacin(A-56620). *Journal of Aquatic Animal Health*, 1: 135-141.
- Stubner, S. 2002. Enumeration of 16S rDNA of *Desulfotomaculum* lineage 1 in rice field soil by real-time PCR with SybrGreen detection. *Journal of microbiological methods*. 50; 155-164
- Taylor, D. E. and A. Chau. 1996. tetracycline resistance mediated by ribosomal protection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40: 1-15.
- 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 Indo Pacific fishery commission working party on fish technology and marketing. *Cochin, India, March, Rome, Italy FAO*, 514: 23-37.
- Yu, Z., Michel F. C., Jr., Hansen G., Wittum T., and Morrison M.. 2005. Development and application of real-time PCR assays for quantification of genes encoding tetracycline resistance. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 6926-6933.

- 박신후. 2006. 수입 관상어 및 해수 양식 어류 장내세균의 항생제 내성 유전자 특성. 부경대학교 대학원 석사 논문.
- 윤소혜. 2008. 어류 장내 세균에서 나타나는 tetracycline 내성 유전자의 정량적 분석. 부경대학교 대학원 석사 논문.
- 전려진. 2003. 우리나라 어병 세균이 갖는 *tet* 유전자의 특성 분석. 부경대학교 대학원 석사 논문.

