



## 저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 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

어류 장내세균에서의 qnr (Quinolone  
resistance gene) 유전자 검출 및 특성  
분석



2015년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 명 의 학 과

정 서 경

이 학 석 사 학 위 논 문

어류 장내세균에서의 qnr (Quinolone  
resistance gene) 유전자 검출 및 특성

분석

지도교수 정 현 도

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함

2015년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 명 의 학 과

정 서 경

# 정서경의 이학석사 학위논문을 인준함.

2015년 2월 27 일



위원장 농학박사 허민도 印

위원 이학박사 강주찬 印

위원 이학박사 정현도 印

# 목 차

## Abstract

|                                           |    |
|-------------------------------------------|----|
| I. 서 론 .....                              | 1  |
| II. 재료 및 방법 .....                         | 5  |
| 1. 어류 장내세균 분리 .....                       | 5  |
| 2. <i>qnr</i> 분포 확인 .....                 | 7  |
| 2-1. Total DNA 분리 .....                   | 7  |
| 2-2. Primer 제작 및 PCR .....                | 8  |
| 3. 약제감수성 실험 .....                         | 10 |
| 4. 클로닝 .....                              | 11 |
| 4-1. Elution .....                        | 11 |
| 4-2. 클로닝 .....                            | 12 |
| 4-3. 플라스미드 분리 및 염기서열 분석 .....             | 13 |
| 5. Transformation .....                   | 14 |
| III. 결 과 .....                            | 15 |
| 1. 분리된 어류 장내세균 .....                      | 15 |
| 2. 어류 장내세균에서의 <i>qnr</i> 분포 .....         | 18 |
| 3. <i>qnr</i> 을 가지는 장내세균의 항생제 내성 특성 ..... | 31 |
| 4. 내성 유전자의 전이 특성 .....                    | 36 |
| IV. 고 찰 .....                             | 42 |
| V. 요 약 .....                              | 50 |

|                 |    |
|-----------------|----|
| VI. 감사의 글 ..... | 52 |
| VII. 참고문헌 ..... | 53 |



Detection and characterization of *qnr* in normal microflora in cultured fish.

Seo Kyung Jeong

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

### Abstract

Quinolones are broad-spectrum antimicrobial agents widely used in both human and veterinary medicine and they are among the most widely used antibiotics in the aquacultures. The extensive use has been associated with worldwide increasing quinolone resistance. Although quinolone resistance commonly results from chromosomal mutation, recent studies indicate that such resistance can also be transferred on plasmids carrying the gene responsible, *qnr*.

Aims of this study was to confirm the prevalence of quinolone resistance genes (*qnr*) in fish intestinal microflora and identified transfer of *qnr*.

To investigate the prevalence of the *qnr* genes in various microflora, we isolated normal microflora of imported ornamental and cultured marine fish on various selective media plate supplemented with ciprofloxacin 0.125 µg/ml. Each isolated were screened for the *qnr* genes (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*) by PCR. Among the 78 isolates indicated in intestinal microflora of dwarf gourami, *qnrA* and *qnrS* were present in 24.4%, 21.8%, respectively. Among the 93 isolates indicated in intestinal microflora of red seabream, *qnrB* and *qnrS* were present in 10.8%, 6.5%, respectively. it is remarkable that dual genes were found in 52.6%, 3.2% in isolates

of dwarf gourami and red seabream, respectively.

Qnr-positive isolates showed higher MIC levels to quinolones, and ampicillin, tetracycline. Through this results, a variety of intestinal microflora has been already multi-drug resistance.

To determine whether the qnr genes were located on plasmids or chromosomes, we were performed transformation to test the mobility of the qnr genes. *Qnr* was transferred from six of the 24 probe-positive isolates selected randomly and confirmed transformants containing *qnrS*. Transformants containing *qnrS* showed 1- to 32-fold increases in quinolone MICs and 128-fold increases in ampicillin MIC of two transformants. In this results, *qnrS* might be located on plasmid and co-transferred ESBL genes.

This study was identified prevalence of qnr genes, MICs of qnr-positive isolates, transfer of qnr gene. We should be made to continuous monitoring and interest of qnr genes and another antibiotic resistance genes in aquaculture.

# I . 서론

어류의 빠른 성장과 대량 생산을 위해 양식현장에서는 사료 과다투입, 밀식 등의 환경에서 양식이 이루어지고 있고 이로 인해 양식장 내 환경의 악화, 스트레스 증가 등이 원인으로 작용해 세균성 질병이 증가하고 있다. 질병의 발생과 더불어 병원체에 대한 항생제의 오남용이 문제시 되고 있고 이를 엄격히 규제하고 있지만 항생제의 지속적인 사용으로 어류 체내에 항생물질이 잔류하게 되었고 그 결과 항생제 내성균 및 다제 내성균의 발생 증가와 같은 문제들이 발생하고 있다.

Quinolone은 1960년대 nalidixic acid의 개발을 시작으로 항균 범위의 항균력을 개선하기 위해 quinolone을 기본구조로 하는 합성물질들이 만들어져 왔고 여러 세대의 항균제가 개발되어왔다. quinolone은 DNA 합성에 필요한 효소인 DNA gyrase (topoisomerase II) 또는 topoisomerase IV의 작용을 억제하여 DNA의 복제를 저해함으로써 항균작용을 나타내 여러 그람양성 세균과 그람음성 세균에 효과가 있다(Gellert *et al.*, 1976). 현재 우리나라 수산업에 사용되는 quinolones는 nalidixic acid, oxolinic acid, enrofloxacin 등이 있으며 세균성 질병의 치료에 이용되고 있다.

Quinolone계 항생제에서 나타나는 염색체 유래의 내성기전은 DNA gyrase와 topoisomerase IV subunit인 *gyrA*, *gyrB*와 *parC*, *parE*에서의 점 변이로 인한 것이 알려져 있고 이 외에도 항균제 유출 펌프의 작동으로 세포 내 항균제의 축적이 줄어들거나 외막의 porin 단백질에서의 변성으로 투과력 감소로 인한 내성이 알려져 있다.

플라스미드를 매개로하는 퀴놀론 내성(Plasmid mediated quinolone resistance, PMQR)에 속하는 퀴놀론 내성 유전자(Quinolone resistance

gene, *Qnr*)는 1990년대 후반 다재내성을 나타내는 *Klebsiella pneumoniae* 균주에서 퀴놀론계 항생제에 대해 높은 MIC값을 나타내는 pMG252를 연구하는 과정에서 처음 발견되었고(Martinez-Martinez *et al.*, 1998), 657bp의 open reading frame을 가지는 것으로 밝혀졌다. *Qnr* 단백질은 pentapeptide-repeat family로 [Ser, Thr, Ala or Val] [Asp or Asn] [Leu or Phe] [Ser, Thr or Arg] [Gly]의 다섯 개 아미노산이 반복되는 구조를 나타낸다. 현재까지 이런 pentapeptide-repeat motifs의 정확한 기전은 알려져 있지 않으나 DNA supercoiling 분석을 통해 *Qnr* 단백질이 DNA gyrase 또는 topoisomerase IV에 결합해 quinolone 약물로부터 세균을 보호해주는 것으로 추정하고 있다(Tran *et al.*, 2005). 처음 발견된 *qnr*은 후에 계속해서 연관된 유전자가 밝혀져 *qnrA*로 명명하였고 이후 발견된 각 유전자에 대해서도 새로운 명명을 하였다. *qnrA*를 시작으로 *qnrB*, *qnrS*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrVC*가 밝혀졌고, 현재까지는 *qnrA1-qnrA7*, *qnrB1-qnrB74*, *qnrS1-qnrS9*, *qnrC*, *qnrD1-qnrD2*, *qnrVC1-qnrVC6*가 알려져 있다(Jacoby *et al.*, 2008). PMQR에는 *qnr* 이외에도 aminoglycoside transferase 유전자인 *AAC(6')-Ib*의 변형체인 *AAC(6')-Ib-cr* (Robicsek *et al.*, 2006), efflux pump에 작용하는 *QepA* (Yamane *et al.*, 2007), *OqxAB* (Hansen *et al.*, 2004) 등이 발견되어 PMQR에 대한 연구영역이 계속해서 확장되고 있다.

plasmid에 위치해 있는 *qnr*은 퀴놀론계 항생제에 대해서는 낮은 저항을 보이며 발견되고 있지만 유전자 이동을 통해 수용체에서의 항생제 내성 증가를 보이고 있을 뿐만 아니라 Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)가 *qnr*과 동일한 플라스미드 상에 위치해 있다는 연구들이 일부 알려지면서 퀴놀론계 항생제뿐만 아니라  $\beta$ -lactam계 항생물질에 대한

내성도 나타내어 다재내성의 위험성이 대두되고 있다(Lautenbach *et al.*, 2001; Paterson *et al.*, 2000).

또한 *qnr*은 plasmid에 위치해 있을 뿐만 아니라 그람 음성균 및 그람 양성균에서 염색체상에 위치해 있다는 연구들이 알려지고 있다. *qnr*의 보유 숙주를 확인하기 위해 48개의 그람 음성균에 대한 실험에서 *Shewanella algae*의 염색체에서 발견된 *qnrA*가 *qnrA3*의 G+C 비율이 동일한 것을 확인하였다(Poirel *et al.*, 2005). *Vibrio splendidus*에서는 플라스미드에서 발견된 *qnrS1*, *qnrS2*와 84%, 88%의 아미노산 상동성을 보이는 것으로 확인되었다(Cattoir *et al.*, 2007). 그람 양성균의 염색체에서도 *qnr*-like peptapetide repeat protein(PRP)이 확인되었고, *qnrA1*, *qnrB1*, *qnrS1*과의 17~22%의 낮은 아미노산 상동성을 나타냈으나 항생제 내성 실험에서 *qnrA1*, *qnrB1*, *qnrS1*과 비슷한 내성정도를 보여 *qnr* 보유 숙주일 것이라고 말하고 있다(Rodríguez-Martínez *et al.* 2008).

현재 PMQR에 대한 많은 연구들에서 적게는 1%미만에서 많게는 50% 이상의 비율로 확인이 되고 있어 이미 내성 유전자가 널리 확산되어 있는 것을 알 수 있다. 대부분의 연구는 사람에서 분리한 *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter* spp. 등 Enterobacteriaceae에 대해 주로 이루어지고 있다(Rodríguez-Martínez *et al.*, 2011). 어류에서는 주로 *Aeromonas* spp., *Escherichia coli* 등에서 *qnr*에 대한 연구가 알려져 있고(Alcaide *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2012), QRDR에서의 변이를 통한 quinolone의 내성에 대한 연구 이외에 *qnr*에 대해 보고가 적을뿐더러 장내세균에서 다양한 종류의 *qnr*분포에 관한 보고가 잘 이루어지지 않고 있다.

따라서 본 연구에서는 담수어와 해산어의 다양한 장내세균에 존재하는

다양한 종류의 *qnr* 분포를 확인하고 분리된 장내세균의 항생제 내성 정도를 비교하였다. 또한 플라스미드에 위치해 있는 *qnr*의 전이 실험을 통해 유전자의 이동과 그에 따른 항생제 내성 변화를 알아보고자 하였다.



## II. 재료 및 방법

### 1. 어류 장내세균 분리

본 실험에서는 싱가포르에서 수입된 담수어인 드워프 구라미(*Colisa lalia*) 4마리를 채집하였고, 해산어의 경우에는 국내에서 양식된 Rock bream(*Oplegnathus fasciatus*), Rock fish(*Sebastes schlegeli*), Red seabream(*Pagrus major*)을 6마리씩 채집하였다. 장내세균 분리를 위해 샘플링한 어류의 어체를 해부하여 중장을 분리한 후 장내 stool을 모아 BHI(Brain Heart Infusion, Difco) Broth 에 접종하여 25℃에서 24~48시간 배양하였다. 배양균은 특징적인 집락의 색을 나타내는 다양한 선택배지에서 분리해내고자 하였다. Enterobacteriaceae 선별 배지인 CC(Chromocult-coliform agar MERCK, Germany), *Aeromonas* spp.와 *Pseudomonas* spp. 선별 배지인 GSP(MERCK, Germany), *Vibrio* spp. 선별배지인 TCBS(Difco, USA), *Salmonella* spp.와 *Shigella* spp. 선별 배지인 SS(Salmonella Shigella agar MERCK, Germany)까지 총 4개의 배지를 사용하였다. *qnr*은 많은 연구에서 quinolone계 항생제에 대해 낮은 저항성을 나타낸다고 알려져 있기 때문에(Rodríguez-Martínez et al., 2011) 각 배지에는 Hordijk et al. (2011)의 방법과 같이 ciprofloxacin을 0.125µg/ml의 농도로 첨가하여 균을 배양하였다. BHIB에서 자란 균은 각 선택배지에 접종한 후 GSP, TCBS, SS는 25℃, CC는 37℃에서 24~48시간 배양하였다. 각 plate에서 자란 집락은 5개씩 무작위로 선택하여 BHIB에 다시 접종하여 25℃, 37℃에서 24~48시간 배양하였다. 배양액은 보존을 위해 20% glycerol (Sigma, USA)을 첨가한 후, -70℃에서

사용 전까지 보관하였다.



## 2. *qnr* 분포 확인

### 2-1. Total DNA 분리

Total nucleic acid의 분리는 The boiling method (Roberts et al., 1993)를 이용하였다. 먼저 실험에 사용할 균을 BHIB에 접종하여, 균의 성장적온에 배양시킨 후 배양액 1ml을 취하여 12,000rpm에서 10분간 원심 분리 한 후 상등액을 제거하고 pellet은 1×PBS 500 $\mu$ l로 현탁하고 다시 12,000rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 이 후 상등액을 완전히 제거한 후 pellet은 TE buffer 100 $\mu$ l에 현탁하여 95~97℃의 물에서 10분간 heating한 후 12,000rpm에서 다시 한 번 원심분리한 후 상등액을 새로운 tube로 분리해 냈고 분리된 Total DNA는 PCR에서 template로 이용하였다.

## 2-2. Primer제작 및 PCR

qnr gene을 확인하기 위해 *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*에 대해 보고된 primer를 이용해 유전자의 존재 유무를 확인하였다(Cattoir *et al.*, 2007, Table 1). 또한 *Vibrio cholerae*에서 처음 발견된 *qnrVC*에 대해서도 확인하기 위하여 Genbank(NCBI)로부터 알려진 *qnrVC1*~*qnrVC6*의 염기 서열을 얻은 후 MACAW program(Version 2.0.5., National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, Bethesda, ND, USA)을 이용하여 비교해 degenerated primer를 제작하였다(Table 1).

PCR은 10X PCR buffer 2 $\mu$ l, 200 $\mu$ M의 각각의 dNTP, 1 $\mu$ M의 sense primer와 antisense primer, Taq DNA polymerase (Taq DNA polymerase, RBC, Korea) 및 template 1 $\mu$ l를 첨가한 후 distilled water로 최종액의 volume이 20 $\mu$ l가 되도록 했다. PCR 혼합물은 Perkin-Elmer 2400 thermal cycler (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA)를 사용하여, 95 $^{\circ}$ C에서 3분간 pre-denaturation 시킨 후, 95 $^{\circ}$ C에서 30초 denaturation, 55 $^{\circ}$ C에서 30초 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 30초 extension의 반응을 35 cycle 수행 한 후 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 post-extension 시켰다. PCR 후 증폭 산물은 0.5 $\times$ TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA)를 전기영동을 위한 완충액으로 하여, 0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l EtBr (Ethidium Bromide)이 첨가된 2% agarose gel (SeaKem<sup>®</sup> LE Agarose, CAMBREX Bio Science Rockland, Inc, USA) 상에서 전기 영동한 후, UV 검출기 (Seoulin Scientific Co., Ltd., Korea)를 이용하여, ultraviolet상에서 검출되는 band의 길이를 관찰하여 qnr gene의 존재 유무를 확인하였다.

Table 1. Primers used in PCR for detection of qnr genes.

| Primer  | Oligonucleotide sequence<br>(5'→3') | Target<br>gene | Expected<br>size | Reference                    |
|---------|-------------------------------------|----------------|------------------|------------------------------|
| QnrAm-F | AGAGGATTTCTCACGCCAGG                | <i>QnrA</i>    | 580bp            | Cattoir <i>et al.</i> (2007) |
| QnrAm-R | TGCCAGGCACAGATCTTGAC                |                |                  |                              |
| QnrBm-F | GGMATHGAAATTCGCCACTG                | <i>QnrB</i>    | 264bp            | Cattoir <i>et al.</i> (2007) |
| QnrBm-R | TTTGCYGYTCGCCAGTCGAA                |                |                  |                              |
| QnrSm-F | GCAAGTTCATTGAACAGGGT                | <i>QnrS</i>    | 428bp            | Cattoir <i>et al.</i> (2007) |
| QnrSm-R | TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG               |                |                  |                              |
| QnrVC-F | CGMKCRAACCTYCGMGATACAC              | <i>QnrVC</i>   | 525bp            | This study                   |
| QnrVC-R | YTGyTCYTGYTGCCACGARCA               |                |                  |                              |

### 3. 약제 감수성 실험

본 실험에서는 항생제로 Ciprofloxacin(Cip), Enrofloxacin(Enr), Oxolinic acid(OA), Nalidixic acid(NA), Ofloxacin(OF), Norfloxacin(Nor), Tetracycline(Tc), Ampicillin(Amp) (Sigma, USA)을 사용하였다. 각 항생제에 대한 MIC 값의 결정은 broth dilution method를 사용하였다 (Kim, 1997). 먼저 96 wells plate에 멸균된 MH(Mueller Hinton Broth, Difco)를  $160\mu\text{l}$ , 각 농도로 희석된 항생제를  $20\mu\text{l}$ , MH에  $10^7$  cell/ml로 현탁시킨 균액을  $20\mu\text{l}$  넣었고, positive control에는 MH  $180\mu\text{l}$ 와 희석시킨 균액  $20\mu\text{l}$ 를 넣고, negative control은 MH만  $200\mu\text{l}$ 를 넣었다.  $25^{\circ}\text{C}$ ,  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 18시간 배양 후 세균의 증식에 따른 액체 배지의 혼탁도를 관찰하여 세균이 자라지 않는 항생제의 최저 농도를 MIC 값으로 결정하였다.

## 4. 클로닝

### 4-1. Gel elution

*qnr* 분포를 확인한 후 일부 PCR 생성물을 Gene-all™ GEL SV elution kit를 사용하여 agarose gel로부터 분리, 정제하였다. 먼저, 전기영동으로 확인하여 원하는 길이의 band가 위치한 부분의 gel을 잘라 microtube에 옮긴다. GB buffer를 잘라낸 gel 무게의 3배 volume으로 첨가한다. 50℃에서 10분간 반응시킨 후 gel이 모두 녹으면 2-propanol 100 $\mu$ l 첨가해 섞어준 다음 반응액을 spin column으로 옮기고 12,000 rpm에서 1분간 원심분리 시킨다. 통과시킨 액은 버리고 GB buffer 500 $\mu$ l를 첨가한 후, 다시 12,000 rpm에서 1분간 원심분리 시킨다. NW buffer 700 $\mu$ l를 첨가하고 이전의 방법과 동일하게 원심분리하여 세척과정을 거친다. 추가로 1~2회 더 원심분리한 다음, 새로운 microtube로 column을 옮긴다. EB buffer를 50 $\mu$ l 첨가하고 1분 동안 그대로 두면서 녹인 다음, 12,000 rpm에서 1분간 원심분리 시킨다. 완성된 samples는 4℃에서 보관한다.

## 4-2. 클로닝

Elution된 samples는 pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector System I (Promega, USA)를 사용하여 클로닝 시켰다. Elution을 통해서 정제된 PCR 산물 4  $\mu$ l를 새로운 microtube로 옮긴 후, 5 $\mu$ l 2X Rapid Ligation Buffer, 1 $\mu$ l T4 DNA Ligase, 1 $\mu$ l pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector를 첨가하였다. 이 혼합물은 원심분리한 후, ligation을 위해서 12°C에서 18시간 반응시키고 형질 전환 과정을 실시하였다.

Competent cell (E. coli DH5 $\alpha$ -T1) 100 $\mu$ l를 반응시킨 혼합물에 첨가하고 얼음에서 30분간 반응한 후, 42°C에서 30초간 heat-shock시켰다. 바로 얼음에 2~3분간 두었다가, SOC배지를 250 $\mu$ l 첨가하고, 37°C에서 90분간 진탕 배양시켰다. 배양 후 배양액은 X-gal 40 $\mu$ g/ml과 Amp 50 $\mu$ g/ml이 첨가된 LB 평판 배지에 도말하여, 37°C에서 24시간 동안 배양시킨 후, 파란색과 흰색의 집락이 증식하는 것을 확인하고 흰색으로 나타나는 집락을 선택하였다.

#### 4-3. 플라스미드 분리 및 염기서열 분석

클로닝 과정에서 plate에 자란 colony 중, white colony를 취하여, Amp 50 $\mu$ g/ml이 첨가된 LB 액체배지에 접종한 후 24시간 배양하였다. 배양액 1.5ml을 microtube에 옮기고 4℃에서 12,000rpm, 10분간 원심분리하여 균을 침전시킨 후, 상정의 배지성분을 제거하였다. 이후에 Gene-all<sup>TM</sup> plasmid SV mini kit (General biosystem, Korea)에서 제시한 방법을 이용하여 플라스미드를 분리하였다. 염기 서열 분석은 Big Dye Terminator Cycle DNA Sequencing Kit(ABI PRISM PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여 분리된 플라스미드 내에 삽입된 염기 서열을 밝힌 후, 각각의 염기 서열은 MACAW program(Version 2.0.5., National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)을 사용하여 비교하였다.

## 5. Transformation

Calcium chloride법을 이용하여 실시하였다(Kim, 1993). E. coli DH5a를 5ml LB 액체배지에 접종하여 24시간 배양한 것을 접종량이 1%가 되도록 5ml LB 액체배지에 다시 접종하여 OD<sub>550</sub>에서 흡광도가 0.4~0.6이 될 때까지 2~3시간 배양한 다음 ice에서 10분간 냉각시켰다. 1.5ml을 취하여 미리 냉각시킨 microtube에 옮긴 후 5,000rpm, 5분 동안 원심분리 하여 상등액을 제거하고, 침전물에 50mM CaCl<sub>2</sub> +10mM Tris-Cl(pH8.0)용액 750μl를 가한 다음 ice에서 15분간 냉각시켰다. 5000rpm, 5분 동안 다시 한 번 원심분리 하여 침전물을 얻고, 여기에 다시 50mM CaCl<sub>2</sub> +10mM Tris-Cl(pH8.0)용액 100μl넣은 후 4℃에서 12~24시간 방치하여 competent cell을 제조하였다.

Competent cell에 목적하는 plasmid DNA를 넣고 잘 섞어준 다음 ice에 30분간 방치한 후 42℃의 water bath로 옮겨 2분 동안 처리하였다. 그 다음 1ml의 SOC배지를 첨가하여 37℃에서 1시간 동안 배양시킨 후 ciprofloxacin 0.0625μg/ml이 들어 있는 CC agar에 100μl 도말하였다. 37℃에서 12~24시간 배양 후 transformant를 선별하였다.

### Ⅲ. 결 과

#### 1. 분리된 어류 장내 세균

*qnr*을 확인하기에 앞서 어류 장내세균을 다양한 선택배지를 통해 분리하고자 하였다.

각각의 isolates는 선택배지 상에서 균별로 나타나는 특징적인 집락의 색을 기준으로 분리하였고(Table 2), 드워프 구라미와 참돔에서 각각 78개, 93개의 장내세균을 얻을 수 있었다. 드워프 구라미에서는 전체 분리균 중 GSP에서 자주색 집락을 나타내는 *Pseudomonas* spp., CC배지에서 보라색의 집락을 나타내는 Enterobacteriaceae에서 가장 많이 확인되었고, TCBS에서 노란색, 초록색 집락을 나타내는 *Vibrio* spp.는 분리되지 않았다. SS에서 *Proteus* spp. *Salmonella* spp.를 나타내는 중앙부에 검은색 집락을 동반하는 균과 *Aeromonas* spp.로 추정되는 GSP에서의 노란색 집락에서 19.2%, 15.4%의 비율로 균이 나타났다. 참돔에서는 *Pseudomonas* spp., Enterobacteriaceae로 추정되는 집락과 SS에서 자주색 집락을 나타내는 *Enterobacter* spp.에서 20%로 전체 균 중 가장 높은 비율로 분리되었다. 또한 *Vibrio* spp.의 집락이 자라는 TCBS, GSP에서 노란색 집락을 나타내는 *Aeromonas* spp.에서도 각각 16.1%, 10.8%로 나타났다. 또 다른 해산어인 조피볼락의 경우 선택배지에서 균 분리를 할 수 없었는데 이는 각 선택배지에 첨가해준 ciprofloxacin의 영향으로 균이 자라지 않은 것으로 생각된다(Table 3).

Table 2. Colony color and representative bacteria indicated in different selective media.

| Selective media | Appearance of colonies          | Representative in selective media                                        |
|-----------------|---------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| GSP             | Yellow                          | <i>Aeromonas</i> spp.                                                    |
|                 | Pink                            | <i>Pseudomonas</i> spp.                                                  |
| CC              | violet-salmon to red            | Enterobacteriaceae                                                       |
| SS              | Translucent with a black center | <i>Proteus</i> and most <i>Salmonella</i> species                        |
|                 | pink, translucent               | <i>Enterobacter</i> , <i>Shigella</i> and some <i>Salmonella</i> species |
| TCBS            | Yellow, Green                   | <i>Vibrio</i> spp.                                                       |

Table 3. Number of intestinal microflora isolated in different selective media.

| Selective media | Appearance of colonies          | Number of isolates |              |
|-----------------|---------------------------------|--------------------|--------------|
|                 |                                 | Dwarf gourami      | Red seabream |
| GSP             | Yellow                          | 12(15.4)*          | 10(10.8)     |
|                 | Pink                            | 20(25.6)           | 20(21.5)     |
| CC              | violet                          | 20(25.6)           | 20(21.5)     |
| SS              | Trunslucent with a black center | 15(19.2)           | 8(8.6)       |
|                 | pink, translucent               | 11(14.1)           | 20(21.5)     |
| TCBS            | Yellow, Green                   | 0(0)               | 15(16.1)     |
| Total           |                                 | 78(100)            | 93(100)      |

\* Percentage to total number of isolates.

## 2. 어류 장내 세균에서의 *qnr* 분포

각 선택배지에서 균을 분리하기 전 BHIB에 stool을 접종 후 배양한 균액을 이용해 stool에 있는 전체 미생물 총 내에 존재하는 *qnr*을 먼저 확인하고자 하였다. 드워프 구라미 전체 미생물 총에서는 모두 *qnrB*와 *qnrS*가 확인되었다(Figure. 1.). 돌돔에서는 *qnr* gene이 확인되지 않았고, 조피볼락에서는 *qnrS*만이 존재하였다. 참돔에서는 총 6마리 중 5마리에서 *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*가 모두 확인되었고, 나머지 한 마리의 참돔에서는 *qnrA*와 *qnrS*가 있는 것을 알 수 있었다(Figure. 2.).

이후 선택배지를 사용하여 대표적 균의 동정이 이루어진 장내세균을 대상으로 *qnr*의 분포를 확인하였다. 드워프 구라미에서는 분리해낸 총 78개의 isolates 중 77개의 isolates에서 *qnr* 유전자를 나타내는 것을 확인할 수 있었고, *qnrA*는 34.6%, *qnrB*는 42.3%, *qnrS*는 74.4%로 나타났다. 참돔의 장내세균에서는 드워프 구라미에서 보다 낮은 34.5%로 *qnr* 유전자가 확인되었고, *qnrB*와 *qnrS*는 각각 14%, 9.7%의 비율로 검출되었으며 *qnrA*는 확인되지 않았다(Table 4). 또한 하나의 *qnr* gene을 가진 isolates뿐만 아니라 두 개의 *qnr* gene을 동시에 가지는 isolates도 확인되었다. 우선 드워프 구라미의 장내세균에서는 *qnrA*, *qnrS*가 각각 24.4%, 21.8%로 나타났고 *qnrB*만 단독으로 가지는 isolates는 확인할 수 없었다. 참돔의 장내세균에서는 *qnrB*, *qnrS*가 각각 10.8%, 6.5%로 나타났고 *qnrA*는 검출되지 않았다. 두 가지 유전자를 동시에 가지는 isolates는 드워프 구라미에서는 *qnrA*와 *qnrS*, *qnrB*와 *qnrS*를 동시에 가지는 isolates가 각각 10.3%, 42.3%를 차지했고, *qnrA*와 *qnrB*를 가진 isolates는 확인되지 않았다. 참돔에서는 *qnrB*와 *qnrS*를 동시에 가지는

isolates만이 3.2%로 나타났다(Table 5). 세 가지 유전자를 동시에 가지는 isolates는 드워프 구라미와 참돔 모두에서 확인되지 않았다. 장내세균별로의 *qnr* 분포를 보면 드워프 구라미와 참돔 모두 다양한 균에서 *qnr*이 확인된 것을 알 수 있었다. 먼저 드워프 구라미에서는 GSP, CC, SS배지에서 분리해낸 균에서 *qnrA*, *qnrS* 및 두 가지 유전자를 동시에 가지는(*qnrA*와 *qnrS*, *qnrB*와 *qnrS*) isolates도 다양한 균에서 확인하였다. 특히 GSP에서 자주색 집락을 나타내는 균과 CC에서 보라색 집락을 나타내는 균에서 *qnrB*와 *qnrS*를 동시에 나타내는 isolates가 각각 90%, 75%로 확인되었다. 참돔에서는 GSP에서 자주색 집락을 나타내는 isolates와 노란색 집락을 나타내는 isolates에서 각각 25%의 *qnrB*, 40%의 *qnrS*를 확인할 수 있었고, CC에서 보라색 집락을 보이는 isolates에서는 25%의 *qnrB*, 10%의 *qnrS*가 나타났다. SS에서 중앙에 검은 집락을 동반한 isolates에서 *qnrB*와 *qnrS*가 37.5%로 동시에 확인되었다(Table 6). *qnrVC*는 드워프 구라미에서는 검출되지 않았고, 참돔의 장내세균 중 *Vibrio* spp.가 자라는 TCBS배지에서 분리된 isolates (33.3%)와 GSP배지에서 자주색 집락을 나타내는 isolates (25%)에서 확인되었다(Fig. 3.). *qnrVC*는 보고되어 있는 *qnrVC1*~*qnrVC6*사이의 variation이 확인되었고 6개의 *qnrVC*를 모두 검출하기 위해 degenerated primer를 제작하여 사용하였고 PCR을 통해 *qnrVC*로 확인된 isolates는 염기서열 분석을 실시하였다. 그 결과 본 연구에서 확인된 *qnrVC*는 GSP배지에서 분리된 isolates는 *qnrVC1*, TCBS에서 분리된 isolates는 *qnrVC6*인 것으로 확인되었다(Fig. 4.).

또한 부산 소재의 위생병원에서 2005년 7월부터 2006년 12월까지 사람에서 분리한 50개의 그람 양성균인 *Staphylococcus aureus* 균주(이 등,

2007) 중 quinolone계 약물인 norfloxacin에 대해 내성을 보이는 15개 균주에서도 *qnr*확인을 하였으나 검출되지 않았다(data not shown).





Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of amplicons in PCR for *qnr* genes in ornamental fish. Lane 1~4 : Dwarf goruami, M : 100bp DNA ladder, N : Negative control.



Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of amplicons in PCR for *qnr* genes in marine fish. Lane 1 : Rock bream, Lane 2 : Rock fish, Lane 3~8 : Red seabream, M : 100bp DNA ladder, N : Negative control.

Table 4. Number of isolates contained *qnr* genes.

|                                    | <i>QnrA</i>           | <i>QnrB</i> | <i>QnrS</i> | <i>QnrVC</i> | ND <sup>c</sup> |
|------------------------------------|-----------------------|-------------|-------------|--------------|-----------------|
| Dwarf gourami<br>(78) <sup>a</sup> | 27(34.6) <sup>b</sup> | 33(42.3)    | 58(74.4)    | 0(0.0)       | 1(1.3)          |
| Red seabream<br>(93)               | 0(0.0)                | 13(14.0)    | 9(9.7)      | 10(10.8)     | 64(68.8)        |

<sup>a</sup>Number of tested isolates.

<sup>b</sup>Percentage to total number of tested isolates.

<sup>c</sup>Not detected.

Table 5. Distribution of isolates contained single or dual qnr genes.

|                  | Proportion of <i>qnr</i> (%)       |                      |
|------------------|------------------------------------|----------------------|
|                  | Dwarf gourami<br>(78) <sup>a</sup> | Red seabream<br>(93) |
| N.D              | 1.3                                | 68.8                 |
| Sub total        | 1.3                                | 68.8                 |
| <i>qnrA</i>      | 24.4                               | 0.0                  |
| <i>qnrB</i>      | 0.0                                | 10.8                 |
| <i>qnrS</i>      | 21.8                               | 6.5                  |
| <i>qnrVC</i>     | 0.0                                | 10.8                 |
| Sub total        | 46.2                               | 28.1                 |
| <i>qnrA,qnrB</i> | 0.0                                | 0.0                  |
| <i>qnrA,qnrS</i> | 10.3                               | 0.0                  |
| <i>qnrB,qnrS</i> | 42.3                               | 3.8                  |
| Sub total        | 52.6                               | 3.8                  |
| Total            | 100                                | 100                  |

<sup>a</sup> Number of isolates analysed.

Table 6. Distribution of *qnr* gene in intestinal microflora grown in each different selective media. (A) Isolates from microflora in dwarf gourami, (B) Isolates from microflora in red seabream.

(A)

| Selective media | Colonies in selective media     | Single gene                           |             |              |              | Dual genes        |                   |                   |
|-----------------|---------------------------------|---------------------------------------|-------------|--------------|--------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                 |                                 | <i>qnrA</i>                           | <i>qnrB</i> | <i>qnrS</i>  | <i>qnrVC</i> | <i>qnrA, qnrB</i> | <i>qnrA, qnrS</i> | <i>qnrB, qnrS</i> |
| GSP             | Yellow                          | 7/12 <sup>a</sup> (58.3) <sup>b</sup> | 0/12(0.0)   | 0/12(0.0)    | 0/12(0.0)    | 0/12(0.0)         | 4/12(33.3)        | 0/12(0.0)         |
|                 | Pink                            | 0/20(0.0)                             | 0/20(0.0)   | 2/20(10.0)   | 0/20(0.0)    | 0/20(0.0)         | 0/20(0.0)         | 18/20(90.0)       |
| CC              | Violet                          | 5/20(25)                              | 0/20(0.0)   | 0/20(0.0)    | 0/20(0.0)    | 0/20(0.0)         | 0/20(0.0)         | 15/20(75.0)       |
| SS              | Trunslucent with a black center | 0/15(0.0)                             | 0/15(0.0)   | 15/15(100.0) | 0/15(0.0)    | 0/15(0.0)         | 0/15(0.0)         | 0/15(0.0)         |
|                 | Pink, translucent               | 7/11(63.6)                            | 0/11(0.0)   | 0/11(0.0)    | 0/11(0.0)    | 0/11(0.0)         | 4/11(36.4)        | 0/11(0.0)         |
| TCBS            | Yellow, Green                   | 0/0(0.0)                              | 0/0(0.0)    | 0/0(0.0)     | 0/0(0.0)     | 0/0(0.0)          | 0/0(0.0)          | 0/0(0.0)          |
| Total           |                                 | 19/78(24.4)                           | 0/78(0.0)   | 17/78(21.8)  | 0/78(0.0)    | 0/78(0.0)         | 8/78(10.3)        | 33/78(42.3)       |

<sup>a</sup>Positive isolates/tested isolates

<sup>b</sup>Percentage to total number of isolates.

Table 6. Continued.

(B)

| Selective media | Colonies in selective media     | Single gene |             |             |              | Dual genes        |                   |                   |
|-----------------|---------------------------------|-------------|-------------|-------------|--------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                 |                                 | <i>qnrA</i> | <i>qnrB</i> | <i>qnrS</i> | <i>qnrVC</i> | <i>qnrA, qnrB</i> | <i>qnrA, qnrS</i> | <i>qnrB, qnrS</i> |
| GSP             | Yellow                          | 0/10(0.0)   | 0/10(0.0)   | 4/10(40.0)  | 0/10(0.0)    | 0/10(0.0)         | 0/10(0.0)         | 0/10(0.0)         |
|                 | Pink                            | 0/20(0.0)   | 5/20(25.0)  | 0/20(0)     | 5/20(25.0)   | 0/20(0.0)         | 0/20(0.0)         | 0/20(0.0)         |
| CC              | Violet                          | 0/20(0.0)   | 5/20(25.0)  | 2/20(10.0)  | 0/20(0.0)    | 0/20(0.0)         | 0/20(0.0)         | 0/20(0.0)         |
| SS              | Trunslucent with a black center | 0/8(0.0)    | 0/8(0.0)    | 0/8(0.0)    | 0/8(0.0)     | 0/8(0.0)          | 0/8(0.0)          | 3/8(37.5)         |
|                 | Pink, translucent               | 0/20(0.0)   | 0/20(0.0)   | 0/20(0.0)   | 0/20(0.0)    | 0/20(0.0)         | 0/20(0.0)         | 0/20(0.0)         |
| TCBS            | Yellow, Green                   | 0/15(0.0)   | 0/15(0.0)   | 0/15(0.0)   | 5/15(33.3)   | 0/15(0.0)         | 0/15(0.0)         | 0/15(0.0)         |
| Total           |                                 | 0/93(0.0)   | 10/93(10.8) | 6/93(6.5)   | 10/93(10.8)  | 0/93(0.0)         | 0/93(0.0)         | 3/93(3.2)         |

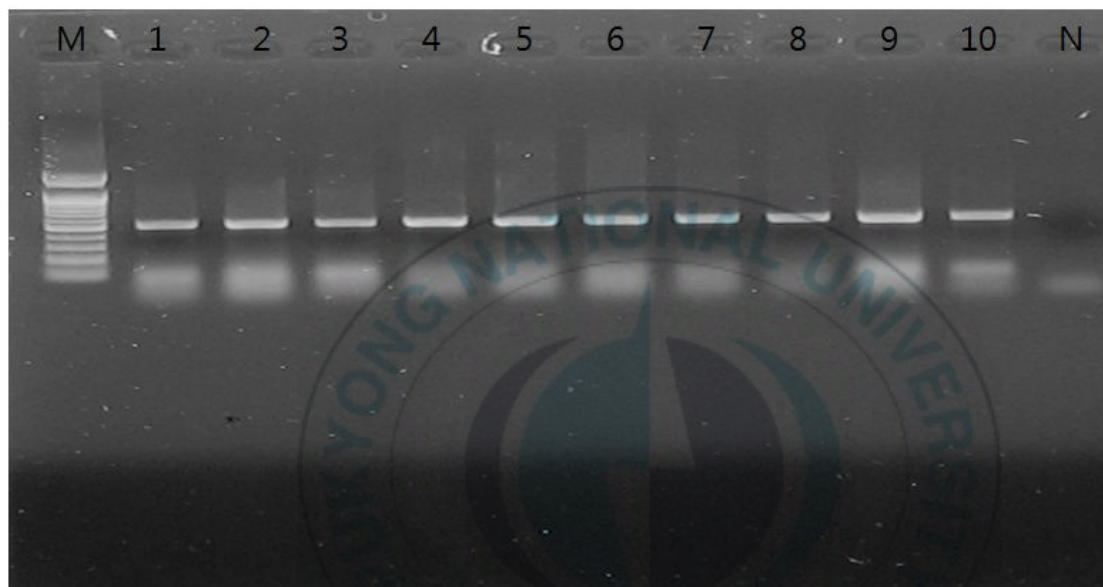


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of amplicons in PCR for *qnrVC*. Lane 1~5 : Isolates of pink colony on GSP from intestinal microflora of red seabream, Lane 6~10 : Isolates of yellow colony on TCBS from intestinal microflora of red seabream, M : 100bp DNA ladder, N : Negative control.

|          |                                                                                 |     |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------|-----|
| qnrVC1   | AAG GGT GCG ATT TTT CTT ATG CTG ATC TTC GAG ATG CTT CAT TTA AAA ACT GTC AGC TTT | 60  |
| qnrVC3   | ...                                                                             | 60  |
| qnrVC4   | .G. ... .T. ... .CT .G. ... .A ... .A. .T. ... .CA GT. ...                      | 60  |
| qnrVC5   | .G. ... .T. ... .CT .G. ... .A ... .A. .T. ... .CA GT. ...                      | 60  |
| qnrVC6   | ... ..G .T. ...                                                                 | 60  |
| RSTYG3-1 | ... ..C. ... ..G .T. ...                                                        | 60  |
| RSTYG3-2 | ... ..C. ... ..G .T. ...                                                        | 60  |
| RSTYG3-3 | ... ..C. ... ..G .T. ...                                                        | 60  |
| RSGP5-1  | ...                                                                             | 60  |
| RSGP5-2  | ...                                                                             | 60  |
| RSGP5-3  | ...                                                                             | 60  |
| qnrVC1   | CAA TGT CCC ATT TTA AGG GGG CAA ATT GCT TTG GTA TTG AAC TGA GAG ATT GTG ATC TTA | 120 |
| qnrVC3   | ...                                                                             | 120 |
| qnrVC4   | ... ..GT ... .C. .A. .T. ... .T. ... .C. .GT .C. ... .A. .C. .T .A.             | 120 |
| qnrVC5   | ... ..GT ... .C. .A. .T. ... .T. ... .C. .GT .C. ... .A. .C. .T .A.             | 120 |
| qnrVC6   | ...                                                                             | 120 |
| RSTYG3-1 | ...                                                                             | 120 |
| RSTYG3-2 | ...                                                                             | 120 |
| RSTYG3-3 | ...                                                                             | 120 |
| RSGP5-1  | ...                                                                             | 120 |
| RSGP5-2  | ...                                                                             | 120 |
| RSGP5-3  | ...                                                                             | 120 |
| qnrVC1   | AAG GAG CAA ATT TTA GTC AAG TTA GTT TTG TAA ATC AGG TTT CGA ATA AAA TGT ACT TTT | 180 |
| qnrVC3   | ... ..C. ...                                                                    | 180 |
| qnrVC4   | .G. .T. .C. ... .G C. ... C. .C. .CA .G. ... .A. ... .C. G. ... .T. ...         | 180 |
| qnrVC5   | .G. .T. .C. ... .T C. ... C. .C. .CA .G. ... .A. ... .C. G. ... .T. ...         | 180 |
| qnrVC6   | ... .G. ... .C. ...                                                             | 180 |
| RSTYG3-1 | ... .G. ... .C. ...                                                             | 180 |
| RSTYG3-2 | ... .G. ... .C. ...                                                             | 180 |
| RSTYG3-3 | ... .G. ... .C. ...                                                             | 180 |
| RSGP5-1  | ... ..G. ...                                                                    | 180 |
| RSGP5-2  | ... ..G. ...                                                                    | 180 |
| RSGP5-3  | ... ..G. ...                                                                    | 180 |

Fig. 4. Comparison analysis of the DNA nucleotide sequence of qnrVC between isolates from red seabream and reference from GenBank(NCBI).

|          |                                                                                 |     |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------|-----|
| qnrVC1   | GTT CTG CAT ACA TAA CAG GTT GTA ACT TAT CCT ATG CCA ATT TTG AGC AGC AGC TTA TTG | 240 |
| qnrVC3   | ...                                                                             | 240 |
| qnrVC4   | ... .A. .T. .T. ... .TC .T. .A. .C. ... .C. ... .AA G.. .T G.. .C.              | 240 |
| qnrVC5   | ... .A. .T. .T. ... .TC .T. .A. .C. ... .C. ... .AA G.. .T G.. .C.              | 240 |
| qnrVC6   | .C. ...                                                                         | 240 |
| RSTYG3-1 | .C. ...                                                                         | 240 |
| RSTYG3-2 | .C. ...                                                                         | 240 |
| RSTYG3-3 | .C. ...                                                                         | 240 |
| RSGP5-1  | ...                                                                             | 240 |
| RSGP5-2  | ...                                                                             | 240 |
| RSGP5-3  | ...                                                                             | 240 |
| qnrVC1   | AAA AAT GTG ACC TGT TCG AAA ATA GAT GGA TTG GTG CAA ATC TTC GAG GCG CTT CAT TTA | 300 |
| qnrVC3   | ...                                                                             | 300 |
| qnrVC4   | ... .G. ... .TT ... .T. .G. ... .C. ... .GA .T. .T. .A. ...                     | 300 |
| qnrVC5   | ... .G. ... .TT ... .T. .G. ... .C. ... .GA .T. .T. .A. ...                     | 300 |
| qnrVC6   | ...                                                                             | 300 |
| RSTYG3-1 | ... .G. ... .T. ...                                                             | 300 |
| RSTYG3-2 | ... .G. ... .T. ...                                                             | 300 |
| RSTYG3-3 | ... .G. ... .T. ...                                                             | 300 |
| RSGP5-1  | ...                                                                             | 300 |
| RSGP5-2  | ...                                                                             | 300 |
| RSGP5-3  | ...                                                                             | 300 |
| qnrVC1   | AAG AAT CAG ATT TAA GCC GTG GTG TTT TTT CGG AAG ACT GCT GGG AAC AGT TTA GAG TAC | 360 |
| qnrVC3   | C.. ... .T ... .A. ...                                                          | 360 |
| qnrVC4   | ... .G. .T. ... .T. .G. .A. .A. ... .T. ... GG. .T. .A GC. ... G.. .GT .G.      | 360 |
| qnrVC5   | ... .G. .T. ... .T. .G. .A. .A. ... .T. ... GG. .T. .A GC. ... G.. .GT .G.      | 360 |
| qnrVC6   | ... ... .T. ... .C. ... .A. ...                                                 | 360 |
| RSTYG3-1 | ... ... .T. ... .C. ... .C. ...                                                 | 360 |
| RSTYG3-2 | ... ... .T. ... .C. ... .C. ...                                                 | 360 |
| RSTYG3-3 | ... ... .T. ... .C. ... .C. ...                                                 | 360 |
| RSGP5-1  | ...                                                                             | 360 |
| RSGP5-2  | ...                                                                             | 360 |
| RSGP5-3  | ...                                                                             | 360 |

Fig. 4. Continued.

|          |                                                                                 |     |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------|-----|
| qnrVC1   | AAG GCT GTG ATT TAA GCC ATT CAG AGC TTT ATG GTT TAG ATC CTC GAA AGA TTG ATC TTA | 420 |
| qnrVC3   | ...                                                                             | 420 |
| qnrVC4   | ... .T. ... .G. ... .C. .G. .T .G. ... .C. ... .G. .AG ... .C. ...              | 420 |
| qnrVC5   | ... .T. ... .G. ... .C. .G. .T .G. ... .C. ... .G. .AG ... .C. ...              | 420 |
| qnrVC6   | ... ..T. ....                                                                   | 420 |
| RSTYG3-1 | ... ..T. ... .A. .A. ....                                                       | 420 |
| RSTYG3-2 | ... ..T. ... .A. .A. ....                                                       | 420 |
| RSTYG3-3 | ... ..T. ... .A. .A. ....                                                       | 420 |
| RSGP5-1  | ...                                                                             | 420 |
| RSGP5-2  | ...                                                                             | 420 |
| RSGP5-3  | ...                                                                             | 420 |
|          |                                                                                 |     |
| qnrVC1   | CGG GTG TAA AAA TAT GCT CGT GGC AAC AGG AAC AGT TA                              | 458 |
| qnrVC3   | ...                                                                             | 458 |
| qnrVC4   | .A. ... .C. .T. ... .G. .A. ... .AC .T                                          | 458 |
| qnrVC5   | .A. ... .C. .T. ... .G. .A. ... .AC .T                                          | 458 |
| qnrVC6   | .A. ... ..G. ...                                                                | 458 |
| RSTYG3-1 | .A. ... .AG C.A. ... .A CAC A.                                                  | 458 |
| RSTYG3-2 | .A. ... .CA ... .AA AC                                                          | 458 |
| RSTYG3-3 | .A. ... .AA CCA -... .A .AC AG                                                  | 458 |
| RSGP5-1  | ... ..G AC. ... A GAA ... A .AA A.                                              | 458 |
| RSGP5-2  | ... ..CA .A. ... .A A-                                                          | 458 |
| RSGP5-3  | ... ..C. T... CAG A.                                                            | 458 |

Fig. 4. Continued.

### 3. *qnr*을 가지는 장내세균의 항생제 내성 특성

드워프 구라미와 참돔 장내세균 중에서 *qnr*에 대해 양성반응을 나타낸 isolates를 선별하여 항생제 내성비율을 알고자 하였다. 여러 선택배지에서 분리된 각 isolates는 Table 7.에 나타난 것과 같이 그룹이름을 명명하였다. 드워프 구라미와 참돔의 장내세균에서 각각 24개, 20개의 isolates를 무작위로 선별하여 사용하였다. 드워프 구라미와 참돔 장내세균에서 다양한 quinolone계 항생제에 대해 내성을 나타냈고 quinolone 계열 이외의 ampicillin과 tetracycline에서도 높은 농도의 MIC를 나타내는 것을 확인하였다(Table 8). quinolone계 항생제 내성 범위는 수생 미생물에 대해 명확하게 나뉘져 있지 않고 있기 때문에 EUCAST, CLSI의 임상세균을 이용한 항생제 내성 범위를 기준으로 ciprofloxacin 1 $\mu$ g/ml, nalidixic acid는 16 $\mu$ g/ml을 최소억제농도로 하여 이보다 높게 나타나는 것을 내성을 가지는 것으로 판단하였다(EUCAST 2014.; Kim *et al.*, 2011). ciprofloxacin, nalidixic acid, ampicillin, tetracycline에 대한 내성 isolates는 드워프 구라미에서 각각 70.8%, 100%, 100%, 87.5%로, 참돔에서는 95%, 100%, 85%, 45%의 비율로 확인되었다(Fig. 5.).

Table 7. Grouping of isolates grown in different selective media.

| Selective media | Appearance of colonies          | Name          |             |
|-----------------|---------------------------------|---------------|-------------|
|                 |                                 | Dwarf gourami | Redseabream |
| GSP             | Yellow                          | DGGY          | RSGY        |
|                 | Pink                            | DGGP          | RSGP        |
| CC              | Violet-salmon to red            | DGCV          | RSCV        |
| SS              | Translucent with a black center | DGSB          | RSSB        |
|                 | Pink, translucent               | DGSP          | RSSP        |
| TCBS            | Yellow, Green                   | DGTYG         | RSTYG       |

Table 8. Susceptibility of *qnr* positive isolates selected randomly. (A) Dwarf gourami, (B) Red seabream.

(A)

| Dwarf gourami<br>isolates (24) <sup>a</sup> | MIC( $\mu$ g/ml) |      |     |     |     |     |      |      | <i>qnr</i> gene           |
|---------------------------------------------|------------------|------|-----|-----|-----|-----|------|------|---------------------------|
|                                             | Cip              | NA   | Nor | OF  | Enr | OA  | Amp  | Tc   |                           |
| DGGY1-1                                     | 8                | 256  | 16  | 8   | 8   | 8   | >256 | 16   | <i>qnrA</i> , <i>qnrS</i> |
| DGGY1-3                                     | 0.5              | 256  | 2   | 0.5 | 0.5 | 4   | >512 | 8    | <i>qnrA</i>               |
| DGGY1-5                                     | 4                | 256  | 16  | 8   | 8   | 16  | >256 | 16   | <i>qnrA</i> , <i>qnrS</i> |
| DGGY2-1                                     | 4                | 256  | 16  | 8   | 16  | 16  | >256 | 32   | <i>qnrA</i> , <i>qnrS</i> |
| DGGP1-1                                     | 64               | >512 | >16 | >16 | >16 | >64 | >256 | >64  | <i>qnrB</i> , <i>qnrS</i> |
| DGGP2-1                                     | 64               | >512 | >16 | >16 | >16 | >64 | >256 | >64  | <i>qnrB</i> , <i>qnrS</i> |
| DGGP4-4                                     | 2                | 128  | 8   | 4   | 2   | 16  | >256 | 8    | <i>qnrS</i>               |
| DGCV1-1                                     | 16               | >512 | 32  | 8   | 8   | 64  | 512  | 64   | <i>qnrB</i> , <i>qnrS</i> |
| DGCV1-2                                     | 0.25             | 256  | 1   | 1   | 0.5 | 8   | >512 | 16   | <i>qnrA</i>               |
| DGCV1-3                                     | 0.5              | 512  | 1   | 1   | 1   | 8   | >512 | 16   | <i>qnrA</i>               |
| DGCV1-4                                     | 8                | >512 | 32  | 16  | 16  | >64 | >512 | >128 | <i>qnrB</i> , <i>qnrS</i> |
| DGCV2-2                                     | 8                | >512 | 32  | 16  | 16  | >64 | >512 | >128 | <i>qnrB</i> , <i>qnrS</i> |
| DGCV2-3                                     | 16               | >512 | 32  | 16  | 16  | >64 | >512 | >128 | <i>qnrB</i> , <i>qnrS</i> |
| DGCV4-1                                     | 16               | >512 | 32  | 16  | 8   | 64  | >512 | 32   | <i>qnrB</i> , <i>qnrS</i> |
| DGCV4-3                                     | 0.5              | 256  | 1   | 1   | 1   | 8   | >512 | 8    | <i>qnrA</i>               |
| DGCV4-4                                     | 0.5              | 512  | 1   | 1   | 0.5 | 8   | >512 | 64   | <i>qnrA</i>               |
| DGCV4-5                                     | 0.5              | 256  | 1   | 1   | 0.5 | 16  | >512 | 16   | <i>qnrA</i>               |
| DGCV5-3                                     | 8                | >512 | 32  | 16  | 16  | >64 | >512 | >128 | <i>qnrB</i> , <i>qnrS</i> |
| DGSP1-3                                     | 1                | 256  | 4   | 1   | 1   | 4   | >256 | 16   | <i>qnrA</i>               |
| DGSP1-4                                     | 0.25             | 256  | 0.5 | 1   | 0.5 | 4   | >256 | 64   | <i>qnrA</i>               |
| DGSP1-5                                     | 4                | 512  | 16  | 16  | 8   | 16  | >256 | 16   | <i>qnrA</i> , <i>qnrS</i> |
| DGSP4-2                                     | 1                | 256  | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 4   | >256 | 16   | <i>qnrA</i>               |
| DGSB2-1                                     | 4                | >512 | 8   | >16 | >16 | 32  | >256 | 32   | <i>qnrS</i>               |
| DGSB4-1                                     | 4                | >512 | 8   | >16 | >16 | 32  | >256 | 32   | <i>qnrS</i>               |

<sup>a</sup>Number of tested isolates.

Table 8. Continued.

(B)

| Redseabream<br>isolates (20) | MIC( $\mu$ g/ml) |      |     |    |     |    |      |       | qnr gene                  |
|------------------------------|------------------|------|-----|----|-----|----|------|-------|---------------------------|
|                              | Cip              | NA   | Nor | OF | Enr | OA | Amp  | TC    |                           |
| RSGY2-1                      | 8                | 64   | 16  | 16 | 8   | 32 | >512 | <0.25 | <i>qnrS</i>               |
| RSGY3-1                      | 8                | 128  | 32  | 16 | 8   | 32 | >512 | <0.25 | <i>qnrS</i>               |
| RSGY3-2                      | 4                | 64   | 16  | 8  | 8   | 32 | >512 | <0.25 | <i>qnrS</i>               |
| RSGP2-1                      | 0.5              | >512 | 1   | 2  | 1   | 8  | >512 | 64    | <i>qnrB</i>               |
| RSGP2-2                      | 1                | >512 | 1   | 2  | 1   | 8  | >512 | 64    | <i>qnrB</i>               |
| RSGP2-3                      | 1                | >512 | 2   | 8  | 1   | 7  | >512 | 32    | <i>qnrB</i>               |
| RSGP5-1                      | 32               | 128  | >32 | 16 | 16  | 32 | 128  | 1     | <i>qnrVC</i>              |
| RSGP5-3                      | 16               | 128  | >32 | 16 | 16  | 16 | 128  | 1     | <i>qnrVC</i>              |
| RSGP5-4                      | 32               | 128  | >32 | 16 | 16  | 32 | 128  | 1     | <i>qnrVC</i>              |
| RSCV1-1                      | 4                | >512 | 16  | 8  | 4   | 16 | >512 | 32    | <i>qnrS</i>               |
| RSCV1-5                      | 8                | 128  | 32  | 16 | 16  | 16 | 256  | <0.25 | <i>qnrS</i>               |
| RSCV2-1                      | 1                | >512 | 2   | 4  | 4   | 32 | >512 | 64    | <i>qnrB</i>               |
| RSCV2-3                      | 1                | >512 | 4   | 2  | 1   | 16 | >512 | 2     | <i>qnrB</i>               |
| RSCV2-4                      | 1                | 512  | 2   | 2  | 1   | 16 | >512 | 64    | <i>qnrB</i>               |
| RSSB2-1                      | 1                | >512 | 2   | 4  | 4   | 4  | >512 | 64    | <i>qnrB</i> , <i>qnrS</i> |
| RSSB2-2                      | 2                | >512 | 2   | 4  | 4   | 8  | >512 | 64    | <i>qnrB</i> , <i>qnrS</i> |
| RSSB2-3                      | 2                | >512 | 4   | 8  | 8   | 16 | >512 | 32    | <i>qnrB</i> , <i>qnrS</i> |
| RSTYG3-1                     | 4                | 128  | 8   | 8  | 2   | 2  | 4    | <0.25 | <i>qnrVC</i>              |
| RSTYG3-3                     | 4                | 128  | 8   | 8  | 2   | 2  | 4    | 0.5   | <i>qnrVC</i>              |
| RSTYG3-5                     | 4                | 128  | 16  | 8  | 2   | 2  | 4    | <0.25 | <i>qnrVC</i>              |

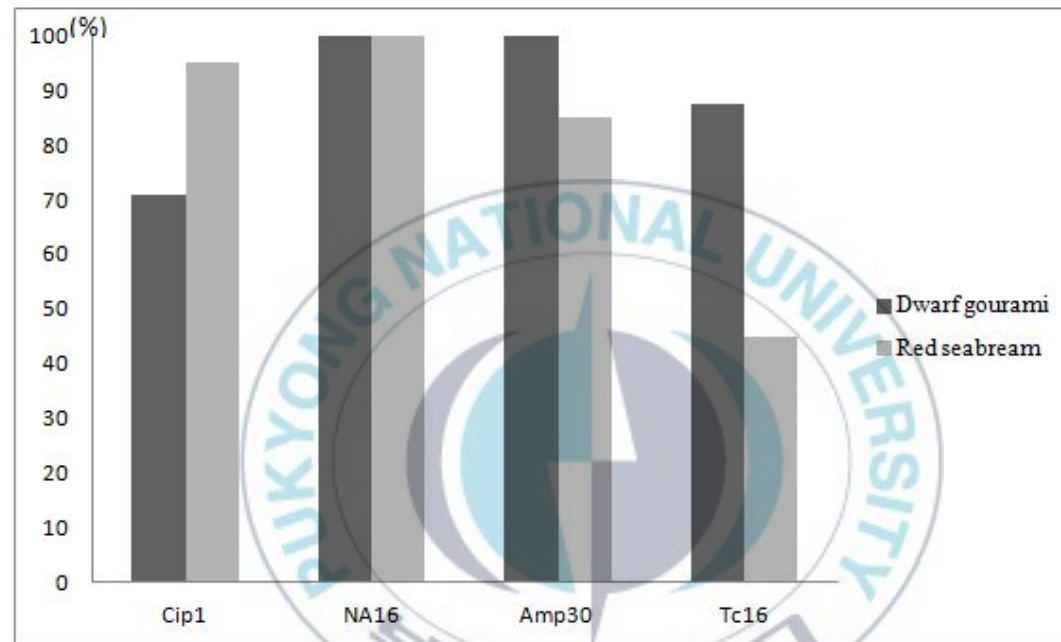


Fig. 5. Proportion of antibiotic-resistant bacteria in intestinal microflora identified with qnr gene.

#### 4. 내성 유전자의 전이 특성

드워프 구라미와 참돔에서 분리된 장내세균 중 *qnr*에 양성반응을 보인 isolates가 나타내는 유전자 전이를 확인하기 위해 transformation 실험을 실시하였다. 먼저 stool을 BHIB에 접종한 후 자란 총 균액에서 분리한 DNA를 이용해 *qnr*의 이동성을 분석한 결과 드워프 구라미에서 분리해낸 균액에서 분리한 DNA만 전이가 일어난 것을 확인하였다. 총 4개의 균액의 DNA중 3개의 DNA가 수용체로 전이된 것을 확인하였고 홍미롭게도 총 분리한 DNA에는 *qnrB*와 *qnrS*를 동시에 가지고 있었으나 수용체로 전달이 된 것은 *qnrS*뿐이라는 것을 알 수 있었다(Fig. 6.). 또한 transformants는 8개의 항생제(Cip, NA, Nor, OF, Enr, OA, Amp, Tc)에서 대부분 MIC가 증가하였다. Cip에서는 8~32, NA는  $\geq 2$ , Nor 4~16, OF 4~16, Enr 1~8, OA 4~8, Amp 2~>32, Tc 1~4배의 증가 값을 보였다(Table 9). 이를 통해 본 실험에서 분리해낸 장내세균에서의 *qnr* 유전자의 전이성을 먼저 확인하였고, 이 후 Table 8.에서 나타낸 isolates의 plasmid DNA를 이용해 서로 다른 균에서의 유전자 이동성을 확인하였다. 참돔에서 분리해낸 isolates에서는 *qnr* gene의 이동성을 확인할 수 없었고, 드워프 구라미에서 분리해낸 장내세균에서는 총 24개 중 6개의 isolates에서 transformation이 된 것을 확인하였다. 두 가지 유전자를 동시에 가진 donor도 50%가 있었으나 transformants에서는 *qnrS*만이 이동한 것을 확인할 수 있었다(Table 10). 또한 transformants는 수용체인 *E. coli* DH5a에서 나타낸 MIC와 비교해 보았을 때 모든 quinolone계 항생물질에 대해서 MIC가 증가하였고, 특히 DGGP4-4와 DGCV1-1의 transformant (DGGP4-4-T, DGCV1-1-T)에서는 ampicillin에서 donor의

MIC 값이 그대로 전달되었다. 각 항생제에 대한 transformant의 MIC 증가 값은 Fig. 7에 나타내고 있다.



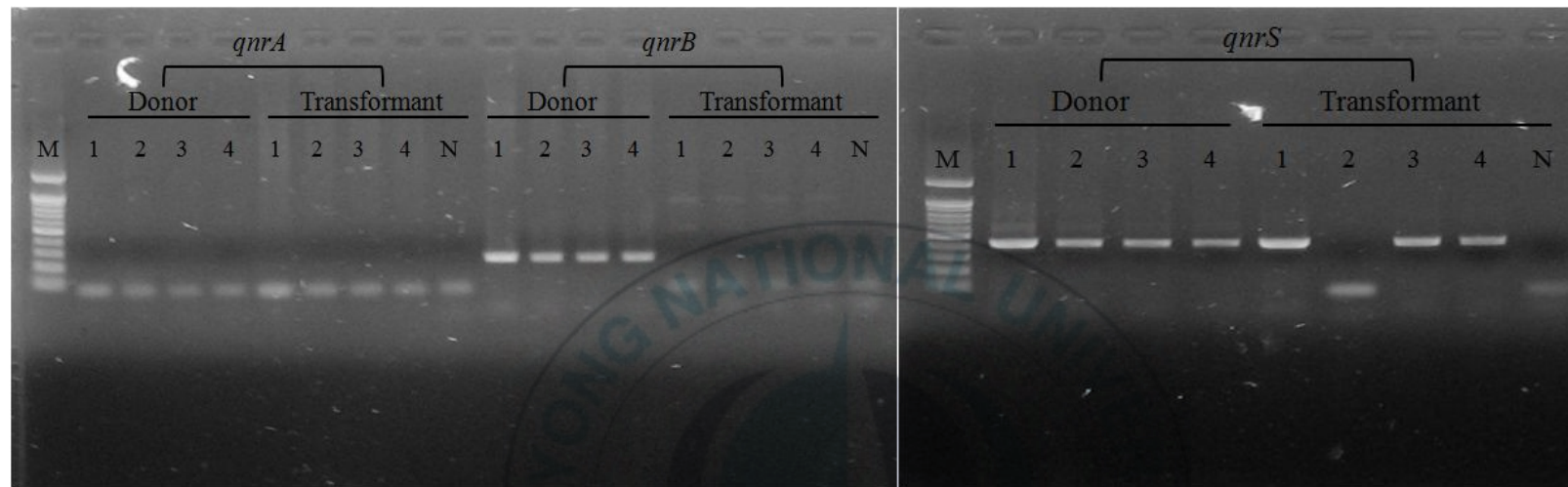


Fig. 6. Agarose gel electrophoresis of amplicons in PCR for *qnr* genes in dwarf normal microflora (donor) and transformants. M : 100bp DNA ladder, N : Negative control.

Table 9. Results of transformation using DNA isolated in Dwarf gourami.

| DNA source                     | qnr gene          | MIC( $\mu$ g/ml) of transformants |     |        |        |        |    |      |     | transferred gene |
|--------------------------------|-------------------|-----------------------------------|-----|--------|--------|--------|----|------|-----|------------------|
|                                |                   | Cip                               | NA  | Nor    | OF     | Enr    | OA | Amp  | Tc  |                  |
| DG1-1                          | <i>qnrB, qnrS</i> | 0.5                               | >64 | 1      | 2      | 1      | 8  | >128 | 0.5 | <i>qnrS</i>      |
| DG1-2                          | <i>qnrB, qnrS</i> | 0.5                               | >64 | 1      | 2      | 1      | 8  | >128 | 0.5 | <i>qnrS</i>      |
| DG1-3                          | <i>qnrB, qnrS</i> | 0.125                             | >64 | 0.5    | 0.5    | 0.25   | 8  | >128 | 1   | <i>qnrS</i>      |
| DG1-4                          | <i>qnrB, qnrS</i> | 0.25                              | 64  | 0.5    | 1      | 0.25   | 4  | 8    | 0.5 | <i>qnrS</i>      |
| DG3-1                          | <i>qnrB, qnrS</i> | 0.25                              | >64 | 2      | 1      | 0.5    | 8  | >128 | 1   | <i>qnrS</i>      |
| DG3-2                          | <i>qnrB, qnrS</i> | 0.125                             | >64 | 0.5    | 0.5    | <0.125 | 8  | 32   | 2   | <i>qnrS</i>      |
| DG3-3                          | <i>qnrB, qnrS</i> | 0.25                              | >64 | 1      | 1      | 0.5    | 8  | 8    | 0.5 | <i>qnrS</i>      |
| DG4-1                          | <i>qnrB, qnrS</i> | 0.25                              | 64  | 0.5    | 1      | 0.5    | 4  | 8    | 0.5 | <i>qnrS</i>      |
| DG4-2                          | <i>qnrB, qnrS</i> | 0.25                              | 64  | 1      | 2      | 0.5    | 4  | >128 | 1   | <i>qnrS</i>      |
| DG4-3                          | <i>qnrB, qnrS</i> | 0.5                               | >64 | 1      | 2      | 1      | 4  | >128 | 1   | <i>qnrS</i>      |
| DG4-4                          | <i>qnrB, qnrS</i> | 0.25                              | 64  | 0.5    | 1      | 0.25   | 4  | 8    | 0.5 | <i>qnrS</i>      |
| Recipient - <i>E.coli DH5a</i> |                   | 0.015625                          | 32  | <0.125 | <0.125 | <0.125 | 1  | 4    | 0.5 |                  |

Table 10. Qnr genes and MICs of antimicrobial agents for 6 donor and transformants.

| Isolates                       | MIC( $\mu$ g/ml) |      |        |        |        |    |      |     | qnr gene(s)               |
|--------------------------------|------------------|------|--------|--------|--------|----|------|-----|---------------------------|
|                                | Cip              | NA   | Nor    | OF     | Enr    | OA | Amp  | TC  |                           |
| DGGY1-1                        | 8                | 256  | 16     | 8      | 8      | 8  | >256 | 16  | <i>qnrA</i> , <i>qnrS</i> |
| DGGY1-1-T*                     | 0.25             | 32   | 2      | 1      | 0.25   | 4  | 4    | 1   | <i>qnrS</i>               |
| DGGY1-5                        | 4                | 256  | 16     | 8      | 8      | 16 | >256 | 16  | <i>qnrA</i> , <i>qnrS</i> |
| DGGY1-5-T                      | 0.25             | 64   | 1      | 1      | 0.5    | 4  | 4    | 1   | <i>qnrS</i>               |
| DGGY2-1                        | 4                | 256  | 16     | 8      | 16     | 16 | >256 | 32  | <i>qnrA</i> , <i>qnrS</i> |
| DGGY2-1-T                      | 0.5              | 64   | 2      | 2      | 0.5    | 8  | 4    | 1   | <i>qnrS</i>               |
| DGGP4-4                        | 2                | 128  | 8      | 4      | 2      | 16 | >256 | 8   | <i>qnrS</i>               |
| DGGP4-4-T                      | 0.25             | 128  | 1      | 2      | 1      | 4  | >512 | 1   | <i>qnrS</i>               |
| DGCV1-1                        | 16               | >512 | 32     | 8      | 8      | 64 | 512  | 64  | <i>qnrB</i> , <i>qnrS</i> |
| DGCV1-1-T                      | 0.5              | 128  | 2      | 4      | 2      | 8  | >512 | 1   | <i>qnrS</i>               |
| DGSP1-5                        | 4                | 512  | 16     | 16     | 8      | 16 | >256 | 16  | <i>qnrA</i> , <i>qnrS</i> |
| DGSP1-5-T                      | 0.25             | 128  | 2      | 2      | 0.5    | 8  | 4    | 1   | <i>qnrS</i>               |
| Recipient - <i>E.coli DH5a</i> | 0.015625         | 32   | <0.125 | <0.125 | <0.125 | 1  | 4    | 0.5 |                           |

\*Transformant.

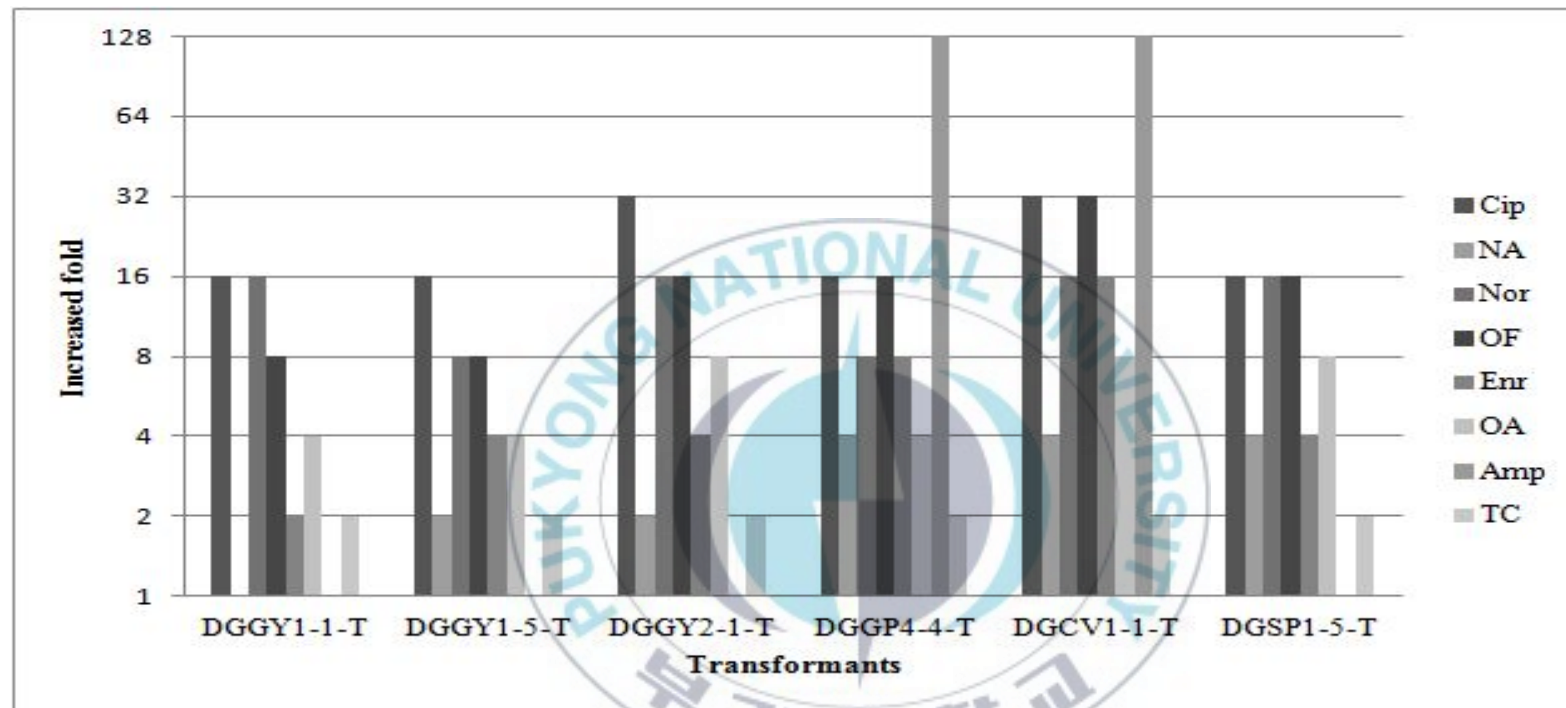


Fig. 7. Increased fold of MIC in transformants.

## IV. 고찰

본 연구에서는 어류의 장내세균을 분리하여 장내세균에서의 *qnr* 분포 및 *qnr*에 양성반응을 나타내는 isolates에 대해 여러 가지 항생제에 대한 내성 정도를 분석 하였다. 또한 플라스미드를 매개로 하는 *qnr*의 이동성을 확인하기 위해 *qnr* gene을 가지는 sample을 대상으로 어류 장내세균에서의 *qnr* 전이 특성에 대해 알아보고자 하였다.

장내세균을 분리하기에 앞서 채집한 어류 sample에 *qnr*이 존재하는지 확인하고자 하였다. stool을 곧바로 BHIB상으로 옮겨 배양시킨 배양액에서 total DNA를 추출해내 우선 *qnr*의 여부를 확인하였다. 이후 *qnr*이 확인된 sample을 대상으로 장내세균을 분리하였다. 장내세균의 분리는 사전 확인 과정에서 *qnr*을 가지고 있는 것이 어떠한 균인지 알 수가 없었고, 분리 균의 범위를 줄이면서 균 마다 특징적인 집락의 색을 나타내어 균종의 추정이 가능한 여러 가지 선택배지를 이용하였다. 이전연구에서(김, 2010) 선택배지에서 분리된 균의 동정에 있어서 95%이상의 신뢰성을 나타냈다. 이를 토대로 다양한 선택배지에서 특정 집락 색을 나타내는 균의 특성을 기준으로 장내 세균 총을 선별하였고 드워프 구라미와 참돔에서 다양한 균을 분리할 수 있었고 분리되는 균의 분포는 다른 양상을 나타냈다. 어류 장내세균은 담수어, 해산어에서 여러 세균의 분포를 나타내고 있는데 담수어인 Cyprininae에서는 *Aeromonas hydrophila*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas* spp. 등 다양한 그람 음성균이 장내 세균 총에 존재한다고 말하고 있다(Apun et al., 1999). 해산어인 Dover sole의 장내 세균에서는 *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Photobacterium*, *Vibrio* 등이 분리되는 것으로 조사되었다(MacDonald et al., 2002). 해수

에서 자란 red hybrid tilapia에서는 *Vibrio* spp. *Flavobacterium* spp. *Pseudomonas* spp.등이 확인되었다. 또한 striped bass (*Morone saxatilis*)를 이용하여 기수 지역과 해수 지역에서의 장내세균 비교 실험을 통해 기수 지역에서는 *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp., *Enterobacter* 순으로, 해수 지역에서는 *Vibrio* spp., *Aeromonas* spp., *Flavobacterium* 순으로 장내세균이 분리를 통해 어류의 서식환경에 따른 장내세균 비율의 차이를 나타내었다(MacFarlane et al., 1986). 본 연구에서 분리한 균은 담수어인 드워프 구라미에서는 GSP에서 분홍색 집락을 보이며 자라는 *Pseudomonas* spp., CC배지에서 Enterobacteriaceae로 추정되는 집락이 25.6%로 가장 많이 분리되었다. 해산어인 참돔에서도 마찬가지로 *Pseudomonas* spp., Enterobacteriaceae로 추정되는 균과 SS에서 *Enterobacter* spp., *Shigella* spp., *Salmonella* spp.로 확인되는 집락이 21.5%로 가장 많이 분리되었다. GSP에서 노란색 집락을 나타내며 자라는 *Aeromonas* spp.는 해산어인 참돔에서(10.8%) 보다 담수어인 드워프 구라미에서(15.4%) 다소 높게 분리되었고. 드워프 구라미에서는 분리되지 않은 *Vibrio* spp.가 참돔에서는 16.1%로 분리되어 해산어에서 *Vibrio* spp.가 분리되는 것을 확인할 수 있었다. 앞선 연구들과 비슷한 장내세균이 나타나는 것을 확인되었고 본 연구에서 보인 담수어와 해산어에서의 장내세균은 어종, 어류의 서식 환경 혹은 배지상의 환경 등의 차이로 다양한 균이 분리된 것으로 생각된다.

분리된 균을 대상으로 어류 장내세균에서의 *qnr* 분포를 알아보았고 여러 가지 *qnr* 유형 중 가장 많이 알려져 있고 주된 유형인 *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*와 *Vibrio cholerae*에서 처음 발견되어 *Vibrio* spp.에 대해 주로 확인되어지는 *qnrVC*도 함께 알고자 하였다. 각각의 isolates 분리 전에 채

집한 어류의 stool에 있는 전체 미생물 총 내에 *qnr*이 존재하는지 알 수 없었기 때문에 *qnr* 여부 실험을 먼저 실시하였다. 사전 실험에서는 드워프 구라미에서 *qnrA*가 확인되지 않았으나 각각의 isolates에서는 *qnrA*가 검출되었다. 이는 액체배지에서 많은 균의 성장으로 *qnrA*를 가진 균이 억제되었다가 선택배지에서 활발한 성장으로 isolates에서는 검출된 것으로 생각되어진다. 참돔에서는 사전 확인 실험에서 1마리를 제외한 모두에서 *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*가 확인되었지만 선택배지에서 분리된 isolates에서는 *qnrA*가 검출되지 않았다. 이는 *qnrA*를 갖고 있던 isolates가 선택배지마다 첨가해준 ciprofloxacin에 감수성을 나타내어 분리되지 않은 것으로 추정된다. 여러 종류의 관상어와 담수를 이용한 다른 실험에서 *Aeromonas* spp.의 *qnrS*가 37%로 나타내고 있고 (Verner-Jeffreys et al., 2009) 담수어의 *E. coli*에서는 *qnrB*와 *qnrS*에 대해 각각 37.5%, 20%로 검출되고 있다(Jiang et al., 2012). 본 연구에서는 드워프 구라미에서는 *qnrS*가 74.4%의 높은 분포를 나타냈고 isolates 별로 봤을 때에도 *Aeromonas* spp.보다 Enterobacteriaceae에서 더 높게 검출되어 이전 연구와는 다른 양상을 보이고 있다. *qnrB*는 42.3%, *qnrA*는 34.6%로 전체비율은 Jiang et al. (2012)에서보다 다소 높은 양상을 보였다. 참돔에서는 *qnrB*가 14%로 가장 높게 나타났고 *qnrS*가 9.7%로 확인되었다. *qnrVC*는 드워프 구라미의 장내세균에서는 확인되지 않았고 참돔의 장내세균 중 TCBS에서의 *Vibrio* spp. 집락에서 33.3%, GSP에서 자주색 집락을 나타내는 *Pseudomonas* spp.에서 25%로 검출이 되었다. *qnrVC*는 *Vibrio cholerae*에서 첫 발견 이후 *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp.에서도 발견되고 있고 다양한 나라에서 검출이 되고 있다(Erica et al., 2013). 본 연구에서도 *qnrVC1*과 *qnrVC6*로 확인

되는 isolates가 분리되었고, 주된 *qnr*유형인 *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*뿐만 아니라 *Vibrionaceae* family에서 주로 나타나는 *qnrVC*에 대해서도 많은 확산이 이루어진 것으로 생각되어져 앞으로 지속적인 관심이 필요할 것으로 생각되어진다. 뿐만 아니라 두 개 이상의 *qnr*을 가지는 isolates도 높은 비율로 검출되었는데 본 연구에서는 드워프 구라미에서 *qnrA*와 *qnrS* 10.3%, *qnrB*와 *qnrS* 42.3%, 참돔에서 *qnrB*와 *qnrS*를 동시에 가지는 isolates는 3.2%로 나타나고 있다. 다른 연구에서는 *qnr* 외의 PMQR에 대해서도 함께 연구를 진행하여 퀴놀론계 항생제에 작용하는 유전자에 대한 동시 발견은 많이 확인되었다(Rodríguez-Martínez et al., 2011). 하지만 *qnr* genes만을 동시에 가지는 예는 많지 않다. 한 연구에서 사람으로부터 분리해낸 *Enterobacteriaceae*에서 *qnrA*와 *qnrB* 6.7%, *qnrB*와 *qnrS* 1.8~2.9%로 두 가지 유전자를 동시에 가지는 isolates를 확인하였다(Yang et al., 2008). 본 연구에서 분리한 드워프 장내세균에서 *qnrA*와 *qnrS* 10.3%, *qnrB*와 *qnrS* 42.3%, 참돔의 경우 *qnrB*와 *qnrS* 3.2%로 앞선 연구와 다소 다른 유형의 유전자 검출 및 더 높은 비율로 나타났다. 또한 드워프 구라미에서 dual *qnr* genes가 52.3%로 나타나 해산어인 참돔에 비해 *qnr* 유전자의 이동이 빠르게 이루어져 항생제 내성의 위험성이 큰 것을 확인하였다. 따라서 관장어에서의 항생제 사용 빈도 및 농도에 있어서 적절한 규제가 필요할 것으로 사료된다. 또한 본 연구에서는 사람에서 분리한 그람 양성균인 *Staphylococcus aureus*에서도 *qnr*을 확인하였으나 검출되지 않았다. 그람 양성균에서는 현재까지 chromosomal *qnr*-like gene에 대해서만 알려져 있고 아직까진 plasmid에 위치한 *qnr* 및 이동성에 대한 연구는 알려진 바가 없으나 환경에서 chromosomal *qnr* gene을 가진 그람 양성균이 보유숙주로 작용하여 quinolone계 항생

제에 내성을 나타낼 수 있다(Rodríguez-Martínez *et al.* 2008). 이런 요인들이 *qnr*의 확산과 더 높은 항생제 내성을 나타낼 수도 있기 때문에 앞으로 이에 대한 지속적인 연구는 더 필요할 것으로 보인다. 본 연구에서는 분리 균의 정확한 동정이 이루어 지지 않았고 어류 장내세균에서의 *qnr*에 대한 연구가 부족하여 다른 문헌과의 비교에 있어 다소 무리가 있는 것으로 생각된다. 하지만 본 연구를 통해 현재까지 알려진 균 이외에도 다양한 어류 장내세균에서 다른 연구에서 제시하고 있는 *qnr*의 비율보다 훨씬 다양하고 높은 비율의 *qnr*이 분포하고 있을 것을 추측해 볼 수 있었고, 앞으로 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

*qnr*에 양성반응을 나타내는 isolates를 대상으로 한 항생제 감수성 실험에서는 다양한 quinolone계 항생제에서 대해 내성을 나타내는 것을 확인하였다. ciprofloxacin은 드워프 구라미에서보다 참돔의 장내세균 isolates에서 높은 비율로 내성을 나타냈고, nalidixic acid는 모두 100%의 내성을 나타냈다. 이는 nalidixic acid의 오랜 기간 사용으로 인해 ciprofloxacin에 비해 내성의 정도가 높게 나타나는 것으로 보여 진다. 드워프 구라미의 장내세균에서는 quinolone계 항생제에 대해 높은 저항성을 보이고 있고 더불어 ampicillin에서 100%, tetracycline에 대해서는 87.5%의 내성균을 나타내어 참돔에서보다 높은 다재내성균의 분포를 나타냈다. 이를 통해 담수어가 여러 가지 항생제에 고농도로 노출이 되어 다재내성을 나타내는 균이 이미 많이 확산되어 있는 것으로 생각되어진다. 또한 *qnr*은 ciprofloxacin에 대해 0.125~0.25 $\mu$ g/ml의 낮은 감수성을 보이는데(Martinez-Martinez *et al.*, 1998; Cavaco *et al.*, 2009) 본 연구에서 분리된 isolates에서는 quinolone 항생물질에 대해 높은 저항성을 보였다. 이는 균 분리과정에서 선택배지에 첨가해준 ciprofloxacin의 영향

으로 높은 감수성을 나타내는 isolates의 성장 억제와 quinolone계 항생 물질에 대해 주된 내성 기전으로 작용하여 높은 MIC 값을 유도하는 *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*에서의 점 변이가 일어난 isolates의 분리 혹은 다른 내성 유전자와의 복합적인 작용으로 인해 항생물질에 대해 높은 저항성을 나타낸 것으로 추정되어진다. 그러므로 본 연구에서 분리된 *qnr* 양성 균에서 나타난 Topoisomerase 유전자의 분석도 함께 이루어져야 보다 정확한 quinolone계 항생제에 대한 어류 장내세균의 특성 분석이 이루어질 것이다. quinolone계 항생물질 이외의 ampicillin 및 tetracycline에서도 내성을 나타내는 isolates가 확인되었는데 참돔보다 드워프 구라미의 장내세균에서 더 많은 비율을 보여 수입되어 이동하는 과정에 항생제의 지속적인 사용으로 드워프 구라미에서 더 많은 저항 isolates가 나타나는 것으로 사료된다.

플라스미드에 위치해 있는 유전자들은 위치 특성상 이동이 가능하고 내성 유전자를 가지고 있지 않은 세균으로의 유전자 전달을 통해 항생제에 내성의 농도를 증가시켜 내성균의 확산을 돕는다. *qnr*도 마찬가지로 플라스미드를 매개로 하여 이동하는 특성이 있고, 이를 확인해 보고자 transformation을 실시하였다. 사전 실험 과정에서 검출한 total DNA를 이용해 이동성을 확인한 것에서는 *qnrS*만 넘어갔다. 이후 선택배지에서 분리해낸 각각의 isolates를 대상으로 한 실험에서도 마찬가지로 *qnrS*만이 25%로 transformant에서 확인되었고 이들은 모두 드워프 구라미 장내세균의 isolates에서 일어난 것으로, 참돔의 장내세균에서는 유전자의 이동을 확인할 수 없었다. 두 가지 유전자를 동시에 가지는(*qnrA*와 *qnrS*, *qnrB*와 *qnrS*) isolates에 대해서도 유전자 이동 실험을 하였으나 *qnrS*만이 이동한 결과를 통해 본 연구에서 분리해낸 isolates에서 동시

에 발견된 *qnrA*와 *qnrS*, *qnrB*와 *qnrS*는 같은 plasmid에 위치해 있지 않음을 추정할 수 있었다. *qnr* 전이를 확인한 다른 연구에서는 conjugation을 통해 *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*의 유전자 이동을 확인하였고 (Briales *et al*, 2012; Yang *et al*, 2008) 또한 *qnrB*와 *qnrS*가 동시에 이동하였고 두 유전자가 다른 플라스미드에 위치해 있는 것으로 확인되었다(Hu FP *et al.*, 2008). 본 연구에서는 conjugation실험이 진행되지 않아 전이되지 않은 유전자의 정확한 유전자 이동 기작을 알 수 없었으나 transformation이 되지 않은 유전자는 염색체에 위치해 있어 이동이 되지 않았거나 수용체가 수용하기에 plasmid의 크기가 너무 커서 유전자의 전이가 일어나지 않은 것으로 추측되어진다.

*qnrA1*을 가진 플라스미드는 유전자 전이를 확인하고 유전자 전달을 통해 transformants에서의 항생제 내성이 수용체에서 보다 ciprofloxacin은 125~250배, nalidixic acid는 4배 증가하는 것을 확인할 수 있었고 (Rodriguez-Martinez *et al.*, 2007), Briales *et al.* (2012)에서는 *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*에서 *qnrA1*, *qnrB1*, *qnrB6*, *qnrS1*를 가지는 transformants의 Cip, NA에 대해 각각 30배 이상, 4배 이상의 MIC 증가 값을 보였다. 본 연구에서도 ciprofloxacin에서 DGGY1-2-T, DGGY1-5-T, DGGP4-4-T, DGSP1-5-T가 16배, DGGY2-1-T, DGCP1-1-T에서 32배로 MIC의 증가를 보였고, nalidixic acid에 대해서는 DGGY1-5-T, DGGY2-1-T에서 2배, DGGP4-4-T, DGCP1-1-T, DGSP 1-5-T가 4배의 MIC 증가 값을 나타내는 것을 확인하였다. ESBL과 *qnr*의 관계는 여러 연구들에서도 많이 언급되어지는데 이 두 유전자는 같은 플라스미드에 위치해 있어서 이동을 함께 하여 수용체에서도 Extended-spectrum  $\beta$ -lactam계 항생물질에 대해 높은 MIC값을

나타내어 다재내성균의 발생에 대한 위험성이 대두되고 있고 *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*에서 CTX-M-14, VEB-1, CTX-M-15, SHV-12, TEM-1 등 다양한 ESBL 유전자가 함께 확인되고 있다(Cheung et al., 2005; Hata et al., 2005; Mammeri et al., 2005; Jacoby et al., 2006). 본 연구에서도 2개의 transformant(DGGP4-4, DGCP1-1)에서 quinolone뿐만 아니라 ampicillin에 대해서도 donor isolates와 같이  $>256\mu\text{g/ml}$ 의 높은 MIC값을 나타낸 것으로 보아 ESBL gene이 함께 이동한 것으로 추정된다. 또한 6개 중 2개의 transformant에서만 ampicillin에 내성을 나타내는 것으로 보아 donor에서의 모든 ESBL이 *qnr*과 함께 이동하는 것은 아닌 것으로 확인되어진다. 이런 다재내성균의 이동으로 인해 수계생태에서 뿐만 아니라 더 나아가 사람에게 까지 영향을 미칠수도 있다. 또한 새롭게 변형된 형태나 또 다른 플라스미드의 등장의 위험성이 발생할 수도 있기 때문에 항생제 내성 유전자에 대한 지속적인 모니터링이 필요할 것으로 생각된다.

## V. 요약

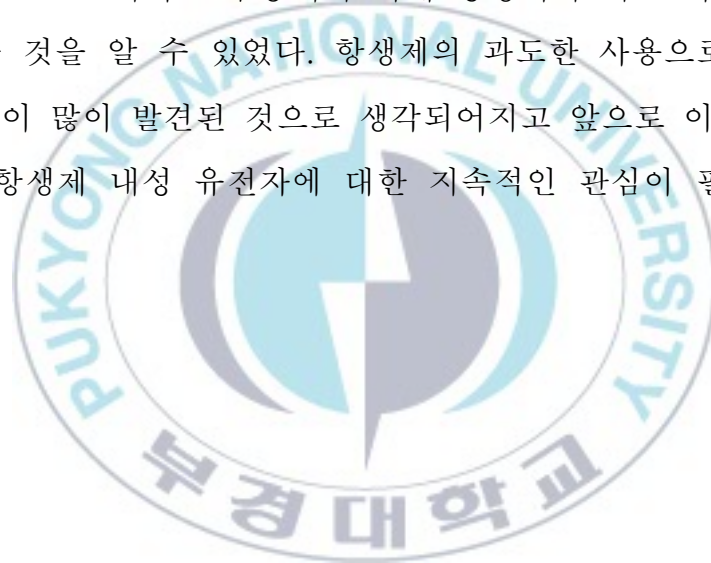
본 연구에서는 어류 장내세균을 분리하여 quinolone계 항생제에 대해 내성을 나타내는 *qnr* gene을 확인하였다. *qnr*은 *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*에 대해 확인하였고, 검출된 *qnr* gene은 참돔(*qnrA* 0.0%, *qnrB* 14.0%, *qnrS* 9.7%)에서 보다 드워프 구라미(*qnrA* 34.6%, *qnrB* 42.3%, *qnrS* 74.4%)의 장내세균에서 더 높은 비율로 검출되었다. 또한 두 가지 유전자를 동시에 가지는 isolates도 확인되었으며 이 또한 드워프 구라미의 장내세균에서 더 높은 빈도를 나타냈다(52.6%). *qnrVC*는 참돔의 장내세균에서만 10.8%로 확인되었으며 이들은 염기서열 분석을 통해 *qnrVC1*, *qnrVC6*임을 확인하였다. 정확한 균 동정이 이루어지지 않아 균의 종류는 알 수 없었으나 본 연구를 통해 다른 연구에서 제시하고 있는 *qnr*의 비율보다 훨씬 다양하고 높은 비율의 *qnr*이 분포하고 있을 것을 추측해 볼 수 있었고, 앞으로의 *qnr*에 대한 다양한 연구가 계속 되어야 할 것으로 생각되어진다.

*qnr*이 확인된 isolates는 quinolone계 항생제에 대해 내성을 나타냈고 quinolone 계열 이외의 ampicillin과 tetracycline에서도 높은 농도의 MIC를 나타내는 것을 확인하였고, 이를 통해 어류의 장내세균이 이미 항생제에 노출이 되어 다재내성을 나타내는 것을 알 수 있었다.

본 연구에서 분리해낸 다양한 *qnr* 유전자를 보유하고 있는 isolates에 대한 유전자 전이 실험에서는 드워프 구라미에서 분리해낸 장내세균에서는 총 24개 중 6개의 isolates에서 transformation이 된 것을 확인하였다. 참돔에서 분리해낸 장내세균에서는 유전자 전이를 확인할 수 있었고, 유

전자의 전이는 모두 *qnrS*만 일어났다. 또한 transformants는 모든 quinolone계 항생물질에 대해서 MIC가 증가하였고, 특히 DGGP4-4와 DGCP1-1의 transformant (DGGP4-4-T, DGCP1-1-T)에서는 ampicillin에서 donor의 MIC 값이 그대로 전달되어 *qnr*과  $\beta$ -lactamase gene이 함께 이동한 것으로 추측하고 있다.

본 연구를 통해 어류 장내세균에서 *qnr*이 다양하고, 보고된 연구에 비해 높은 비율로 확인되었고, 분리 균들은 대부분 항생제에 대해 높은 MIC값을 보였다. 유전자 전이 실험에서는 *qnrS*만 이동하는 것으로 나타났다. transformants에서는 수용체에 비해 항생제의 최소 억제 농도가 높게 증가하는 것을 알 수 있었다. 항생제의 과도한 사용으로 다재내성을 나타내는 균이 많이 발견된 것으로 생각되어지고 앞으로 이에 따른 적절한 규제와 항생제 내성 유전자에 대한 지속적인 관심이 필요할 것으로 사료된다.



## VI. 감사의 글

본 논문이 완성되기까지 대학원 생활 동안 연구에 매진할 수 있도록 아낌없는 격려와 열정적인 가르침으로 이끌어주신 존경하는 정현도 지도교수님께 깊은 감사의 마음을 드립니다. 그리고 저의 논문이 발전할 수 있도록 바쁘신 와중에도 기꺼이 소중한 조언을 아끼지 않으신 허민도 교수님, 강주찬 교수님께 깊이 감사드립니다. 학부 과정부터 석사과정에 이르기까지 끊임없이 격려해주시고 조언해주신 박수일 교수님, 정준기 교수님, 김기홍 교수님, 김도형 교수님께도 감사드립니다.

실험실에 들어와 지금까지 오랜 시간 함께 하면서 많은 추억과 경험을 쌓을 수 있게 도와준 진단생화학실험실 선, 후배님들께도 감사함을 전하고 싶습니다. 그리고 서로 힘들 때마다 보듬어주고 힘이 되어준 우주선배, 이슬, 지희, 민지에게도 고마움을 전하고 싶습니다. 그리고 실험실에 처음 들어와 모르는 게 너무 많았던 저에게 많은 도움을 주신 영철선배, 마지막까지 즐거운 실험실 생활을 하도록 도와준 재찬선배, 준규, 해성이, 형율이, 보경이, 민경이에게도 고맙다고 말하고 싶습니다.

18년간 옆에서 서로 힘이 되어주고 웃게 해준 정소현, 최유정 늘 고맙다. 만나면 항상 엇그제 만난 것처럼 즐거운 덕팸 친구들 모두 고마워. 대학 동기로 만나 아직까지 한 달에 한번은 늘 만나는 술쟁이 주니어 멤버들도 너무 고마워.

마지막으로 늘 저를 위해 기도해주고 걱정해주신 부모님에게 감사의 마음을 표합니다. 표현은 안하지만 늘 걱정해주는 오빠도 너무 고마워. 정말 감사하고 사랑합니다.

## VII. 참고 문헌

- Alcaide E, Blasco MD, Esteve C. 2010. Mechanisms of quinolone resistance in *Aeromonas* species isolated from human, water and eels. Research in microbiology, 161.1, 40-45.
- Apun K, Yusof A.M, Jugang K. 1999. Distribution of bacteria in tropical freshwater fish and ponds. International Journal of Environmental Health Research, 9.4, 285-292.
- Briales A, Rodríguez-Martínez J.M, Velasco C, Díaz de Alba P, Rodríguez-Baño J, Martínez-Martínez L, Pascual A. 2012. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants qnr and *aac(6')-Ib-cr* in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Spain. Int. J. Antimicrob. Agents, 39, 431-434.
- Cattoir V, Poirel L, Rotimi V, Soussy CJ, Nordmann P. 2007. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 60, 394-397.
- Cattoir V, Weill FX, Poirel L, Fabre L, Soussy CJ, Nordmann P.

2007. Prevalence of qnr genes in *Salmonella* in France. *J Antimicrobial Chemother*, 59, 751–754.
- Cattoir V, Poirel L, Mazel D, Soussy CJ, Nordmann P. 2007. *Vibrio splendidus* as the source of plasmid-mediated QnrS-like quinolone resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother*, 51, 2650–2651.
- Cavaco LM, Hasman H, Xia S, Aarestrup FM. 2009. qnrD, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin. *Antimicrob Agents Chemother*, 53, 603–608.
- Cheung TK, Chu YW, Chu MY, Ma CH, Yung RW, Kam KM. 2005. Plasmid-mediated resistance to ciprofloxacin and cefotaxime in clinical isolates of the *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in Hong Kong. *J Antimicrob Chemother*, 56, 586–589.
- Drlica K, Zhao X. 1997. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 61, 377–392.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters.

Version 4.0, January 2014.

Fonseca EL, Vicente ACP, 2013. Epidemiology of qnrVC alleles and emergence out of the Vibrionaceae family. Journal of medical microbiology 62, 10, 1628–1630.

Gellert M., Mizuuchi K., O'Dea MH., Nash HA. 1976. DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 3872–3876.

Hansen LH, Johannesen E, Burmolle M, Sorensen AH, Sorensen SJ. 2004. Plasmid-encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquinox in *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother, 48, 3332–3337.

Hata M, Suzuki M, Matsumoto M, Takahashi M, Sato K, Ibe S, Sakae K. 2005. Cloning of a novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in *Shigella flexneri* 2b. Antimicrob Agents Chemother, 49, 801–803.

Hordijk J, Bosman AB, van Essen-Zandbergen A, Veldman K, Dierikx C, Wagenaar JA, Mevius D. 2011. qnrB19 gene bracketed by IS26 on a 40-kilobase IncR plasmid from an *Escherichia coli* isolate from a veal calf. Antimicrobial agents

and chemotherapy, 55.1, 45-454.

Hu FP, Xu XG, Zhu DM, Wang MG. 2008. Coexistence of *qnrB4* and *qnrS1* in a clinical strain of *Klebsiella pneumoniae*. Acta Pharnacol Sin, 29, 320-324.

Jacoby G, Cattoir V, Hooper D, Martínez-Martínez L, Nordmann P, Pascual A, Poirel L, Wang M. 2008. *qnr* gene nomenclature. Antimicrob. Agents Chemother, 52, 2297-2299.

Jacoby GA, Walsh KE, Mills DM, Walker VJ, Oh H, Robicsek A, Hooper DC. 2006. *qnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. Antimicrob Agents Chemother, 50, 1178-1182.

Jiang HX, Tang D, Liu YH, Zhang XH, Zeng ZL, Xu L, Hawkey PM. 2012. Prevalence and characteristics of  $\beta$ -lactamase and plasmid mediated quinolone resistance genes in *Escherichia coli* isolated from farmed fish in China. J. Antimicrob. Chemother, 67, 2350-2353.

Kim KY, Park JH, Kwak HS, Woo GJ. 2011. Characterization of the quinolone resistance mechanism in foodborne *Salmonella* isoaltes with high nalidixic acid resistance. Internationa journal of food

microbiology, 146, 52-56.

Lautenbach E, Strom BL, Bilker WB, Patel JB, Edelstein PH, Fishman NO. 2001. Epidemiological investigation of fluoroquinolone resistance in infections due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. Clin Infect Dis, 30, 473-478.

LeaMaster B.R, Walsh W.A, Brock J.A, Fujioka R.S. 1997. Cold stress-induced changes in the aerobic heterotrophic gastrointestinal tract bacterial flora of red hybrid tilapia.. J. Fish Biol, 50, 770-778.

MacDonald N.L, Stark J.R, Austin B. 1986. Bacterial microflora in the gastro-intestinal tract of Dover sole (*Solea solea* L.), with emphasis on the possible role of bacteria in the nutrition of the host. FEMS Microbiol. Lett, 35, 107-111.

MacFarlane R.D, McLaughlin J.J Bullock O.L. 1986. Quantitative and qualitative studies of gut flora in striped bass from estuarine and coastal marine environments. *Journal of wildlife diseases*, 22(3), 344-348.

Mammeri H, Van De LM, Poirel L, Martinez-Martinez L, Nordmann

- P. 2005. Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* in Europe. *Antimicrob Agents Chemother*, 49, 71–76.
- Martinez-Martinez L, Pascual A, Jacoby GA. 1998. Quinolone resistance from transferable plasmid. *Lancet*, 351, 797–799.
- Paterson DL, Mulazimoglu L, Casellas JM, Ko WC, Goossens H, Von GA, Mohapatra S, Trenholme GM, Klugman KP, McCormack JG, Yu VI. 2000. Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum beta-lactamase production in *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteremia. *Clin. Infect. Dis*, 30, 473–478.
- Poirel L, Rodriguez-Martinez JM, Mammeri H, Liard A, Nordmann P. 2005. Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrA. *Antimicrob Agents Chemother*, 49, 3523–3525.
- Poirel L, Cattoir V, Nordmann P. 2012. Plasmid-mediated quinolone resistance: interactions between human, animal and environmental ecologies. *Frontiers in Microbiology*, 3, 24.
- Roberts, M. C., Pang, Y., Riley, D. E., Hillier, S. L., Berger, R. C., Krieger, J. N. 1993. Detection of tetM and tetO tetracycline

resistance genes by polymerase chain reaction. Molecular and cellular probes, 7, 387–393.

Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Park CH, Bush K, Hooper DC. 2006. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. Nature Medicine, 12, 83–88.

Rodríguez-Martínez J.M, Velasco C, Garcia I, Cano M.E, Martínez-Martínez L, Pascual A. 2007. Characterisation of integrons containing the plasmid-mediated quinolone resistance gene *qnrA1* in *Klebsiella pneumoniae*. Int J. Antimicrob Agents, 29, 705–709.

Rodríguez-Martínez JH, Cano ME, Velasco C, Martínez-Martínez L, Pascual Á. 2011. Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. J infect Chemother, 17, 149–152.

Rodríguez-Martínez JM, Velasco C, Briales A, García I, Conejo C, Pascual A. 2008. Qnr-like pentapeptide repeat proteins in gram-positive bacteria. Journal of antimicrobial chemotherapy, 61.6, 1240–1243.

Tran JH, Jacoby GA, Hooper DC. 2005. Interaction of the plasmid

encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. Antimicrob Agents Chemother, 49, 118-125.

Tran JH., Jacoby GA, 2002. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. Proc Natl Acad Sci USA. 99, 5638-42.

Verner-Jeffreys DW, Welch TJ, Schwarz T, Pond MJ, Woodwarf MJ, Haig SJ, Rimmer GSE, Roberts E, Morrison V, Baker-Austin C. 2009. High prevalence of multidrug-tolerant bacteria and associated antimicrobial resistance genes isolated from ornamental fish and their carriage water. PLoS One, 4, e8388.

Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Kimura K, Shibata N, Kato H, Shibayama K, Konda T, Arakawa Y. 2007. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. Antimicrob Agents Chemother, 51, 3354-3360.

Yang H, Chen H, Yang Q, Chen M, Wang H. 2008. High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance genes *qnr* and *aac(6')-Ib-cr* in clinical isolates of Enterobacteriaceae from Nine Teaching Hospitals in China. Antimicrob Agents Chemother, 52, 4268-4273.

김영진. 2010. tet유전자의 정량화에 의한 어류 장내 미생물총의 Tc내성 수준 분석. 부경대학교 수산생명의학과 석사학위논문.

이재윤, 박정희, 문경호. 2007. 부산에서 분리된 황색포도상구균의 항생제 내성 양상. 약학회지. 제51권, 제3호, 164-168.

