



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



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.

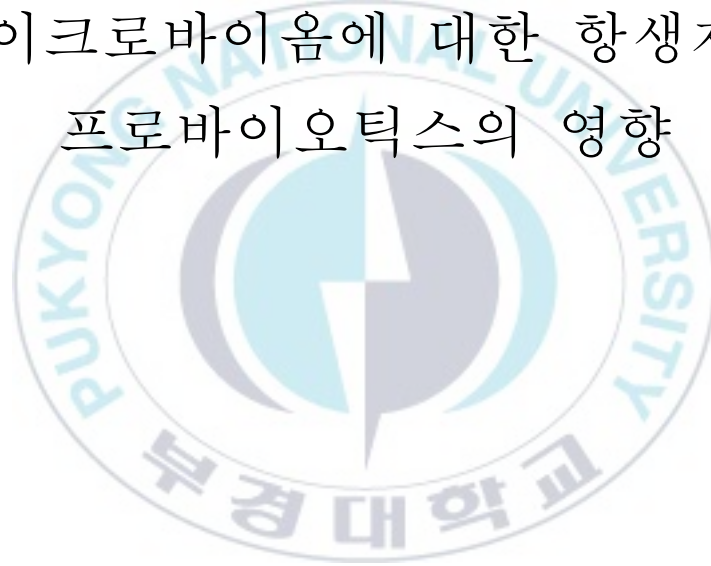
저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이 학 석 사 학 위 논 문

어병세균종에 대한 Epidemiological
cut-off value의 설정과 어류 장관
마이크로바이옴에 대한 항생제와
프로바이오틱스의 영향



2019년 8월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 명 의 학 과

천 원 경

이 학 석 사 학 위 논 문

어병세균종에 대한 Epidemiological
cut-off value의 설정과 어류 장관
마이크로바이옴에 대한 항생제와
프로바이오틱스의 영향

지도교수 김 도 형

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함.

2019년 8월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 명 의 학 과

천 원 경

천원경의 이학석사 학위논문을 인준함.

2019년 8월 23일



위 원 장 이학박사 정 현 도 (인)

위 원 약학박사 정 준 기 (인)

위 원 이학박사 김 도 형 (인)

목 차

목차.....	i
Abstract	iii
Chapter I . 어병세균종에 대한 Wild-type cut-off values 설정과 Non-wild type 분포 분석	1
1. 서론	2
2. 재료 및 방법	6
2.1. 사용된 어병세균 및 배양조건	6
2.2. 항생제 감수성 시험	7
2.3. 어병세균의 Wild-type cut-off values (CO _{WT}) 설정	8
2.4. 어병세균의 Non-wild type 분포 분석	8
3. 결과	9
3.1. 어병세균의 Wild-type cut-off values (CO _{WT}) 결정	9
3.2. 어병세균의 항생제 non-wild type 분포 분석	13
3.2.1. <i>Streptococcus parauberis</i> 의 non-wild type 분포 분석	13
3.2.2. <i>Edwardsiella piscicida</i> 의 non-wild type 분포 분석	16
3.2.3. <i>Aeromonas salmonicida</i> 의 non-wild type 분포분석	19
3.2.4. <i>Vibrio harveyi</i> 의 non-wild type 분포분석	22
3.2.5. <i>Photobacterium damsela</i> 의 non-wild type 분포분석	26
4. 고찰	30
5. 결론	35

Chapter II. 넙치 장관 마이크로바이옴에 대한 항생제와 프로바이오틱스의 영향 36

1. 서론	37
2. 재료 및 방법	40
2.1. 실험어 및 수조탱크	40
2.2. 항생제/프로바이오틱스 투여	40
2.3. 샘플 수집 및 DNA 추출	42
2.4. 넙치 장관 내 미생물 배양	42
2.5. 넙치 장관 내 미생물 동정	43
2.6. 16S rRNA amplicon library 준비 및 sequencing	44
2.7. Metagenomics	45
2.8. 통계 분석	45
3. 결과	46
3.1. 넙치 장관 내 미생물 수 측정	46
3.2. 넙치 장관 내 미생물 동정	49
3.3. 메타지놈 분석	51
3.3.1. 넙치 장관 내 16S 시퀀스 richness and diversity	51
3.3.2. 넙치 장관 내 미생물의 군집 분석	57
4. 고찰	63
5. 결론	68
보충정보	69
국문요약	80
감사의 글	81
참고문헌	82

Establishment of epidemiological cut-off values for bacterial fish pathogens,
and effects of antibiotics and probiotics on fish gut microbiome

Won-kyong Chun

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

Abstract

Use of antimicrobial agents is one of the most commonly used methods to treat bacterial diseases in fish farms. However, abuse of antibiotics could lead to the accumulation of residues as well as the emergence of antibiotic resistant bacteria. Aims of this study were to analyze non-wild type distribution of several bacterial fish pathogens based on epidemiological cut-off (ECOFF) values established in this study. Also, effects of antibiotics and probiotics administration on change in gut microbiota of olive flounder were determined using next generation sequencing. Antibiotic susceptibility testing based on an international protocol was conducted using some tens of strains of *Streptococcus parauberis*, *Edwardsiella piscicida*, *Vibrio harveyi*, *Aeromonas salmonicida*, and *Photobacterium damsela*. Olive flounder were fed with feed supplemented with or without amoxicillin for 21 days. Also, fish orally challenged with a non-wild type of *E. piscicida* were fed with or without a probiotic strain. Changes in gut microbiota were investigated in different timing points. In this study, ECOFF values were established for each fish pathogen against different antibiotics, which can be used as interpretive criteria for antibiotic disc diffusion test. Recent strains of

S. parauberis and *E. piscicida* tend to be non-wild type (NWT) for more kinds of antibiotics. In case of *V. harveyi*, strains originated from farmed fish tend to be NWT for multiple antibiotics compared to wild-fish derived strains. In this study, amoxicillin seem to cause imbalance of fish gut microbiota (dysbiosis). Administration of probiotics could increase microbial diversity, indicating improve microbial balance in fish.



**Chapter I . 어병세균종에 대한 Wild-type cut-off
values 설정과 Non-wild type 분포 분석**



1. 서론

세계 양식산업은 인류의 식량 공급원으로서 중요한 역할을 하고 있으며 경제적·사회적 발전에 기여하고 있다(FAO, 2019). 고밀도 양식은 수산생물의 대량생산을 위해 사용되지만 세균성 질병을 포함한 다양한 질병 발생의 증가 문제를 초래한다(Cabello et al., 2016; Heo et al., 2002; Pokhrel et al., 2018; Santos and Ramos, 2018). 세균성 질병을 예방하기 위한 방법으로 vaccination이 있지만, 항생제 사용은 일반적이며 흔히 사용하는 방법 중 하나이다(Defoirdt et al., 2007; Romero et al., 2012). 그러나 항생제의 무분별한 사용은 잔류물의 축적뿐만 아니라 항생제 내성 세균의 출현을 가속화 시킬 수 있다(Tendencia and de la Peña, 2001; Liu et al., 2017; Jang et al., 2018; Suzuki et al., 2019). 디스크 확산법은 항생제 감수성 검사에서 가장 널리 사용되는 방법 중 하나로 병원성 세균을 시험하는데 적합하며 재현성이 높은 방법으로(Matuschek et al., 2014) 가장 효과적인 항생제를 결정하는데 충분히 활용될 수 있다. 많은 관련 실험실은 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 혹은 European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)에서 제공하는 국제 프로토콜에 따라 항생제 감수성 시험을 수행한다. 그러나 CLSI 가이드라인에 따르면 균주의 감수성과 내성을 구분할 수 있는 해석기준(Interpretive criteria)은 *Aeromonas salmonicida* 한 종에 대해서만 마련되어 있다(CLSI, 2014). Kwon et al. (2016) 은 치료 효과의 의미를 내포하는 “Clinical breakpoint”는 많은 비용과 시간이 소요되므로 Kronvall (2003)이 개발한 Normalized resistance interpretation (NRI) 방법을 이용하여 epidemiological cut-off values(Wild type cut-off values; CO_{WT})을 구함으로써 야생형(Wild type; WT)을 비야생형(Non-wild type; NWT) 집단으로부터 구분할 수 있다고 보고했다. NRI 방법은 항생제에 대한 WT 균주의 억제대

크기를 정규분포화 한 후, 그 크기 분포에 따른 평균과 표준편차를 통해 CO_{WT}를 결정짓는 회귀분석 방법이다(Kronvall, 2003). CO_{WT}으로부터 구분된 WT와 NWT의 비율을 토대로 유효한 항생제를 결정하여 처방할 수 있다(Kwon et al., 2016; Smith, 2012). 최근 NRI 방법을 사용하여 어병세균에 대한 CO_{WT} 설정 연구가 활발하게 이뤄지고 있다; *A. salmonicida* (Smith et al., 2007), *Vibrio anguillarum*(Smith and Christofilogiannis, 2007), *Streptococcus phocae* (Avendaño-Herrera et al., 2011), *Vibrio ichthyenteri* (Lee et al., 2012), *Weissella* sp. (Figueiredo et al., 2012), *Flavobacterium psychrophilum* (Henríquez-Núñez et al., 2012; Miranda et al., 2016; Smith et al., 2016; Van Vliet et al., 2017; Ngo et al., 2018), *Vibrio ordalii* (Poblete-Morales et al., 2013), *Edwardsiella tarda* 및 *Vibrio harveyi* (Lim et al., 2016), *Piscirickettsia salmonis* (Henríquez et al., 2016), *Photobacterium damsela* (Kwon et al., 2016), *Edwardsiella piscicida*(Kim et al., 2018), *Streptococcus agalactiae*, *S. iniae*, and *S. dysgalactiae*(Tavares et al., 2018). 최근 개발된 개선된 NRI 방법은 어병세균의 배양온도와 시간을 고려하여 CO_{WT}를 추정하는 방식을 도입하여 더욱 정확하고 객관적인 분석이 가능해진 것으로 여겨진다(Smith and Kronvall, 2015a; Kronvall and Smith, 2016).

우리나라 수산양식에서 발생하는 주요 세균성 질병으로 연쇄구균병(Choi et al., 2009; Kwon et al., 2014), 에드워드병(Kwon et al., 2014), 비브리오병(Kim et al., 2005; Kim et al., 2010; Kwon et al., 2005), 절창병(Kim et al., 2011; Han et al., 2011) 등 여러 세균감염에 의해 경제적으로 많은 피해를 입고 있는 실정이다(Kim et al., 2012; Jee et al., 2014).

연쇄구균병은 1958년 일본의 무지개 송어 (*Oncorhynchus mykiss*)에서 처음 보고되어 지금까지 많은 어종의 양식 산업에 큰 피해를 주고 있다(Hoshina et al., 1958, Kim et al., 2014). 연쇄상구균병에 의한 증상으로는 체색이상, 안구백탁, 안구돌출, 출혈, 복부팽만, 신장비대 등이 있다(Cho et al., 2008, Kim et al., 2014) 연쇄구균병은 국내 양식 넙치에 가장 큰 피해를 일으키는 세균성 질병으로서 *Lactococcus garviae*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus parauberis* 등에 의하는 것으로 보고되어 왔으나, 2000년대 중반 이후로는 *S. parauberis*가 우점적인 원인으로 보고되고 있다(Baeck et al., 2006; Park et al., 2016).

에드워드병은 어류에서 중요한 세균성 질병 중 하나로 이전에 *Edwardsiella tarda*에 의해 발생한다고 보고되었다(Mohanty, B. R., & Sahoo, P. K., 2007). 2012 년까지 *Edwardsiella* 속은 *E. tarda*, *E. hoshinae* 및 *E. ictaluri*의 3 종으로 구성되어있었으나, 최근의 표현형 및 유전학적 연구 결과에 따라 *E. tarda*는 다른 유전 그룹으로 분류되어 *E. tarda* 내에 여러 독특한 분류군의 존재가 밝혀졌다(Abayneh et al., 2012; Yang et al., 2012). 이전에 *E. tarda*로 확인된 어류 병원성 균주는 *Edwardsiella piscicida*로 재분류되었으며(Abayneh et al., 2013), 최근에는 병든 뱀장어에서 분리된 새로운 종 *Edwardsiella anguillarum*이 보고되었다(Shao et al., 2015).

*Aeromonas salmonicida*는 부스럼병(furunculosis)을 일으키는 병원체로 건강 상태, 어종, 환경, 온도에 따라 다른 형태를 취하는 복잡한 질병이다(Bernoth, 1997). *A. salmonicida*는 일반적으로 tetracycline의 내성의 결정인자인 *tet* gene이 일반적으로 플라스미드에 인코딩되어있다(Adams et al., 1998; Schmidt et al., 2001). 그람음성세균의 퀴놀론 내성은 quinolone-resistance determining regions (QRDRs)의 돌연변이에 주로

기인한다. 그러므로 *A. salmonicida*가 수생환경에서 tetracycline 및 quinolone에 대한 내성 확산에 대한 위험이 있다고 하였다(Kim et al., 2011). *Vibrio harveyi*는 어류, 무척추동물 및 새우에서 심각한 병원체로 알려져 있다(Austin and Zhang, 2006). 숙주의 면역이 손상된 숙주에서 증상이 더 심각하게 나타난다(Grimes et al., 1985). Extracellular Products (ECP), quorum sensing, 숙주세포에 부착된 후 biofilm을 형성하는 능력 등 병원성의 중요한 결정인자로 간주되는데, *V. harveyi*의 병원성 기작은 아직까지 완전히 밝혀지지 않았다(Austin and Zhang, 2006). *Photobacterium damsela*는 어류, 갑각류, 연체동물 및 고래류와 같은 다양한 수산동물에서 보고된 병원성 세균이다(Labella et al., 2011; Rivas et al., 2013). 고수온기에 빈번하게 감염되며 체표에 괴사소를 형성하고 복강 내벽의 근육부에 점상 출혈 등이 나타나며 에드워드병과 유사한 탈장 증상이 특징적으로 나타난다(kwon et al., 2005).

수생 환경은 항생제 잔류 문제 및 항생제 내성 유전자의 보급 또는 전달이라는 측면에서 매우 위협적이다(Jang et al., 2018; Santos et al., 2018). Sørum (2006)은 어병세균과 다른 수생 박테리아가 항생제에 장기간 노출되면 한 가지 이상의 항생제에 대한 내성을 가지는 것으로 보고하였다. 최근 어병세균의 내성이 증가하여 그 위험성이 대두되고 있다. 본 연구에서는 우리나라에서 발생하는 주요 세균성 어류 병원균을 대상으로 NRI방법을 이용하여 항생제에 대한 CO_{WT}를 결정하고, 3 class 이상의 항생제 클래스에 저항성을 보이는 균주에 대한 비율을 계산하여 연도에 따른 NWT 분포의 변화 추이를 파악하고 분리된 어종 또는 지역 간의 비교를 통하여 어병 세균에 대한 항생제별 NWT 분포를 다각적으로 분석하여 보고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 사용된 균종 및 배양조건

본 연구에 사용된 어병세균은 *Streptococcus parauberis* 75 균주, *Edwardsiella piscicida* 54 균주, *Vibrio harveyi* 57 균주, *Photobacterium damsela* 44 균주, *Aeromonas salmonicida* 43 균주를 사용하였다. *E. piscicida* 39균주에 대한 sulfonamides의 데이터(Kim et al., 2018)에서 최근에 분리된 균주들과 여러 항생제를 추가하여 진행되었다. *E. tarda* and *V. harveyi*(Lim et al., 2016)와 *P. damsela*(Gwon et al., 2016)은 이미 구해진 CO_{WT}를 이용하여 균주별 NWT분포를 분석하기 위해 사용되었다. 각 균종의 균주에 대한 정보는 Table (S1-S5)에 나타내었다. 항생제 감수성 시험 수행 전에 1% NaCl을 첨가한 tryptic soy agar(TSA)에 접종하여 28°C에서 18-24시간 배양하여 실험에 사용하였다.

2.2 항생제 감수성 시험

항생제 감수성시험은 수산용 항생제 감수성 시험 표준 프로토콜 CLSI M42-A (2006)에 따라 디스크 확산법(Disk diffusion test)을 실시하였다. 간략히 실험 방법을 서술하면, 균주를 먼저 22°C 또는 28°C에 18-24시간 배양을 한 후 2×10^8 CFU/ml의 농도로 희석시킨 후에 멸균 면봉을 사용하여 Mueller-Hinton agar (MHA) 배지 전체에 도말하고 항생제 디스크를 눌러 붙인 후 28°C에 배양하였다. 가이드라인에 따라 필요시 MHA배지에 1% NaCl(*V. harveyi*, *P. damsela*) 또는 5% sheep blood(*S. parauberis*)를 첨가하여 수행되었다. 이후 CLSI M42-A (2006)에 제시된 배양조건에 따라 항생제 디스크 주변에 세균의 성장이 억제된 투명한 영역의 지름을 측정하여 결과로 사용하였다. Quality control(QC)용 균주는 CLSI M42-A (2006)의 제시된 방법에 따라 *Escherichia coli* ATCC 25922와 *Aeromonas salmonicida* ATCC 33658을 사용하였다. 이번 연구에 사용한 항생제는 OxoidTM에서 구입하였으며 시험에 사용한 항생제는 다음과 같다; AMP, ampicillin(10 μ g); AMX, amoxicillin(10, 25 μ g); AMC, amoxicillin-clavulanic(20 + 10 μ g); TET, Tetracycline(30 μ g); DOX, doxycycline(30 μ g); OTC, oxytetracycline(30 μ g); CEF, cephalothin(30 μ g); LEX, cephalixin(30 μ g); CXM, cefuroxime(30 μ g); CFP, cefoperazone(75 μ g); EFT, ceftiofur(30 μ g); NAL, nalidixic acid(30 μ g); OA, oxolinic acid(2 μ g); CIP, ciprofloxacin(5 μ g); ENR, enrofloxacin(5 μ g); UB, flumequine(30 μ g); GEN, gentamicin(10 μ g); NEO, neomycin(30 μ g); ERY, erythromycin(15 μ g); SMX, Sulfamethoxazole(25 μ g); SD, Sulfadiazine(25 μ g); TMP, trimethoprim(5 μ g); SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole(5 + 25 μ g); CLI, clindamycin(10 μ g); VAN, vancomycin(30 μ g); FFC, Florfenicol(30 μ g); CHL, chloramphenicol(30 μ g).

2.3 어병세균의 Wild-type cut-off values (CO_{WT}) 설정

Kronvall and Smith (2016)의 NRI 방법을 이용하여 epidemiological cut-off value(ECOFF) 또는 wild-type cut-off values (CO_{WT})를 설정하였다. NRI 분석방법은 특허 소유자인 Bioscand AB, TA" BY, Sweden (European Patent No. 1383913, US Patent No. 7,465,559)로부터 허가를 얻어 사용하였다. Wild type의 정규화된(normalized) zone 크기의 평균값과 표준편차는 정규화된 축적 빈도수의 probit을 이용하여 계산되었다. CO_{WT} 은 Kronvall and Smith (2016)의 방법에 따라 평균값에서 표준편차의 2.5 배를 빼 값으로 설정하였다. *V. harveyi*(Lim et al., 2016)와 *P. damsela*(Kwon et al., 2016)의 경우 이전 연구에서 이미 구해져있는 CO_{WT} 를 이용하여 분석되었으며 군주별 NWT 분포 패턴을 이해하기 위해 사용되었다.

2.4 어병세균의 Non-wild type 분포 분석

어병세균 5군종에 대한 항생제별로 구해진 CO_{WT} 를 이용하여 wild type과 non-wild type을 구분한 결과를 통해 R을 이용하여 Heatmap으로 시각화하였으며, 그 non-wild type 분포 데이터를 이용하여 각 군종에 대한 도출된 결과를 이용하여 연도별, 지역별 및 어종별 등 다각적으로 분석을 진행하였다.

3. 결과

3.1 어병세균의 역학적내성기준값(CO_{WT}) 결정

Quility control은 *E. coli* ATCC 25922 와 *A. salmonicida* ATCC 33658을 사용하였으며 CLSI M42-A (2006) 가이드라인에 제시된 억제대의 범위 안에 결과값이 있는 것을 확인하였다. 각 균종별 CO_{WT} 와 NWT 비율(%)은 Table 1에 나타내었다. 각 균종별 NWT의 비율(%)이 50%이상되는 항생제는 *S. parauberis*의 경우 OTC와 ERY에서 NWT 비율이 51%이상 나타났다. 또한 *E. piscicida*는 DOX, OTC, ENR, SMX, SD, SXT, TMP, CLI 및 CHL에서 NWT 비율이 50%이상 나타났고 *A. salmonicida*는 OA, CIP, ENR, UB, SD 및 SXT에서 NWT 비율이 60%이상 나타났다. *V. harveyi*는 sulfadiazine에서 NWT 비율이 95%이상 나타났다. *P. damsela*e는 tetracycline 계열인 TET, DOX 및 OTC에서 NWT 비율이 50%이상 나타났다.

Table 1. Epidemiological cut-off values calculated from NRI analysis of bacterial fish pathogens

Antibiotic class	Antibiotics	<i>Streptococcus parauberis</i> (n=75)			<i>Edwardsiella piscicida</i> (n=54)			<i>Aeromonas salmonicida</i> (n=43)			<i>Vibrio harveyi</i> (n=57)			<i>Photobacterium damsela</i> (n=44)		
		CO _{WT} (mm)	WT*	NWT (%)	CO _{WT} (mm)	WT*	NWT (%)	CO _{WT} (mm)	WT*	NWT (%)	CO _{WT} (mm)	WT*	NWT (%)	CO _{WT} (mm)	WT*	NWT (%)
Penicillins	AMP	≥35	40	47	≥12	30	44	ND	ND	ND	-	-	-	ND	ND	ND
	AMX	≥35	38	49	≥19	30	44	ND	ND	ND	-	-	-	ND	ND	ND
	AMC	≥36	39	48	≥18	47	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tetracyclines	TET	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	≥23	21	52
	DOX	≥25	38	49	≥18	17	69	-	-	-	≥23	55	4	≥21	21	52
	OTC	≥28	37	51	≥25	14	74	≥15	18	58	≥23	54	5	≥27	20	55
Cephalosporins	CEF	-	-	-	≥30	37	31	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	LEX	≥29	41	45	-	-	-	ND	ND	ND	-	-	-	≥13	41	7
	CXM	≥36	41	45	≥20	50	7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	≥11	44	0
	CFP	-	-	-	≥27	46	15	-	-	-	ND	ND	ND	-	-	-
	EFT	≥30	63	16	-	-	-	≥28	38	12	-	-	-	≥15	41	7
Quinolones	NAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	≥18	53	7	-	-	-
	OA	-	-	-	≥11	30	44	≥27	13	70	≥13	51	11	≥20	32	27

Antibiotic class	Antibiotics	<i>Streptococcus parauberis</i> (n=75)			<i>Edwardsiella piscicida</i> (n=54)			<i>Aeromonas salmonicida</i> (n=43)			<i>Vibrio harveyi</i> (n=57)			<i>Photobacterium damsela</i> (n=44)		
		CO _{WT} (mm)	WT* (%)	NWT (%)	CO _{WT} (mm)	WT* (%)	NWT (%)	CO _{WT} (mm)	WT* (%)	NWT (%)	CO _{WT} (mm)	WT* (%)	NWT (%)	CO _{WT} (mm)	WT* (%)	NWT (%)
Fluoroquinolones	CIP	-	-	-	≥25	35	35	≥46	6	86	≥22	30	47	≥30	24	45
	ENR	≥24	65	13	≥19	27	50	≥37	6	86	≥14	56	2	≥22	34	23
	UB	-	-	-	≥20	30	44	≥24	38	12	-	-	-	≥26	33	25
Aminoglycosides	GEN	≥15	68	9	≥17	53	2	-	-	-	ND	ND	ND	≥13	44	0
	NEO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	-	-	-
Macrolides	ERY	≥31	37	51	-	-	-	≥17	40	7	≥8	52	9	≥9	36	18
Sulfonamides	SMX	-	-	-	≥14	25	54	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	-
	SD	-	-	-	≥13	27	50	≥16	16	63	≥21	3	95	-	-	-
	SXT	≥22	62	17	≥26	26	52	≥18	17	60	≥15	51	11	≥23	34	23
Antifolate	TMP	-	-	-	≥36	13	76	-	-	-	≥13	51	11	≥27	25	43
Lincosamides	CLI	≥30	47	37	≥9	7	87	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycopeptide	VAN	≥21	68	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amphenicols	FFC	≥27	67	11	-	-	-	≥29	42	2	≥26	51	11	≥25	37	16

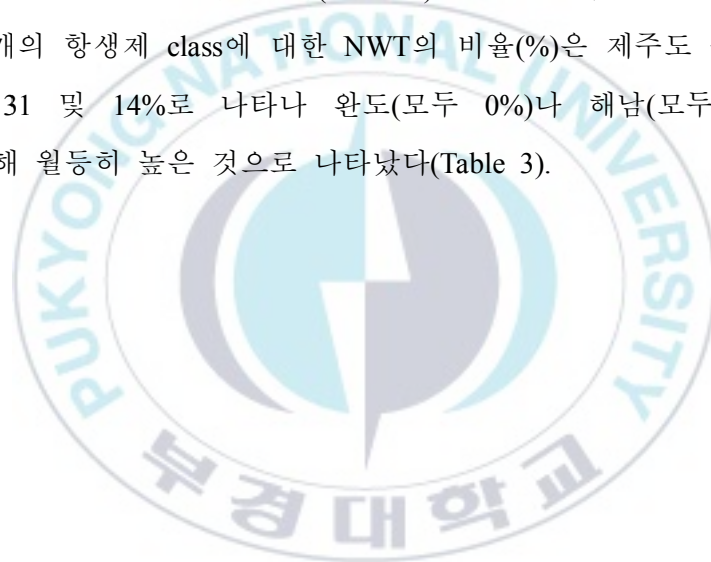
Antibiotic class	Antibiotics	<i>Streptococcus parauberis</i> (n=75)			<i>Edwardsiella piscicida</i> (n=54)			<i>Aeromonas salmonicida</i> (n=43)			<i>Vibrio harveyi</i> (n=57)			<i>Photobacterium damsela</i> (n=44)		
		CO _{WT} (mm)	WT*	NWT (%)	CO _{WT} (mm)	WT*	NWT (%)	CO _{WT} (mm)	WT*	NWT (%)	CO _{WT} (mm)	WT*	NWT (%)	CO _{WT} (mm)	WT*	NWT (%)
Amphenicols	CHL	≥24	75	0	≥31	26	52	≥34	40	7	≥25	49	14	≥25	37	16

Abbreviations for antibiotic agent are as in the materials and methods. *Number of isolates categorized by the application of the relevant CO_{WT} value. AMP, ampicillin; AMX, amoxicillin; AMC, amoxicillin-clavulanic; TET, Tetracycline; DOX, doxycycline; OTC, oxytetracycline; CEF, cephalothin; LEX, cephalexin; CXM, cefuroxime; CFP, cefoperazone; EFT, ceftiofur; NAL, nalidixic acid; OA, oxolinic acid; CIP, ciprofloxacin; ENR, enrofloxacin; UB, flumequine; GEN, gentamicin; NEO, neomycin; ERY, erythromycin; SMX, Sulfamethoxazole; SD, Sulfadiazine; TMP, trimethoprim; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; CLI, clindamycin; VAN, vancomycin; FFC, Florfenicol; CHL, chloramphenicol. ND, not determined

3.2 어병세균의 항생제 Non-wild type 분포 분석

3.2.1 *Streptococcus parauberis* 균주의 Non-wild type 분포 분석

S. parauberis 균주의 항생제별 Non-wild type 분포 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 3, 5 및 6개의 항생제 class에 대한 *S. parauberis*의 NWT 균주 비율(%)은 1999~2007년에 각각 24, 16 및 4% 였으나 2013-2018년의 경우 각각 100, 81 및 65%로 나타났다(Table 2). NWT 지역별 분포 분석에서는 3, 5 및 6개의 항생제 class에 대한 NWT의 비율(%)은 제주도 유래 균주가 각각 57, 31 및 14%로 나타나 완도(모두 0%)나 해남(모두 0%) 유래 균주에 비해 월등히 높은 것으로 나타났다(Table 3).



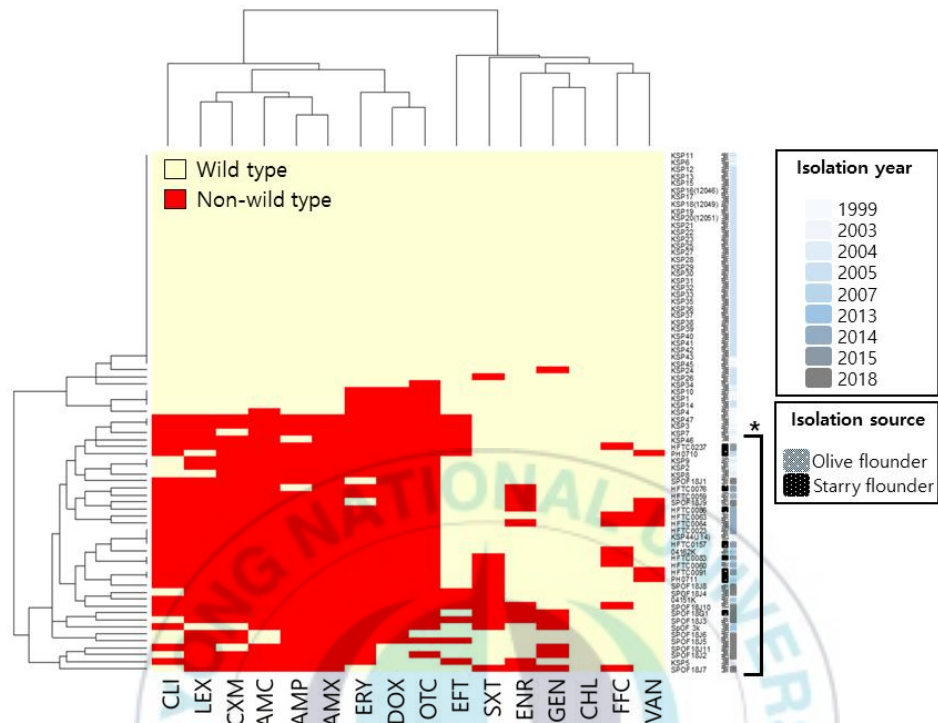


Fig. 1. Heat map shows classification of wild type and non-wild type of 75 strains of *Streptococcus parauberis* strains. Light yellow and red blocks indicate wild type and non-wild type, respectively. *Note that strains recently isolated tend to be NWT for more kinds of antibiotics. Rows and columns represent antibiotics and bacterial strains, respectively; where red blocks indicate non-wild type and lightyellow blocks indicate wild type.

Table 2. NWT for multiple drugs of *S. parauberis* 75 strains by isolation year

Isolation year	Number of strains	Ratio (%) of non-wild type against multiple antibiotic classes					
		3≤	Avg.	5≤	Avg.	6≤	Avg.
1999	4	75%		75%		0%	
2003	4	75%		25%		0%	
2004	6	67%	24%	33%	16%	0%	4%
2005	33	0%		0%		0%	
2007	2	100%		100%		100%	
2013	3	100%		100%		67%	
2014	6	100%		100%		83%	
2015	5	100%	100%	100%	81%	80%	65%
2018	12	100%		58%		50%	

Table 3. NWT for multiple drugs of *S. parauberis* 75 strains by isolation location

Isolation location	Number of strains	Ratio (%) of non-wild type against multiple antibiotic classes		
		3≤	5≤	6≤
Jejudo	35	57%	31%	14%
Gyeongsangbukdo	1	100%	100%	0%
Haenam	2	0%	0%	0%
Wando	20	0%	0%	0%
Pohang	8	100%	100%	75%
Geojedo	3	100%	100%	67%
Yeongduk	3	100%	100%	100%
Uljin	3	100%	100%	100%

3.2.2. *Edwardsiella piscicida* 균주의 Non-wild type 분포 분석

E. piscicida 균주의 항생제별 Non-wild type 분포 결과는 Fig. 2에 나타내었다. *E. piscicida*는 3개의 클러스터로 나누어졌으며 최근 연도에 분리된 균주가 더 많은 항생제에 대한 NWT분포가 나타났다. 또한 Sulfonamide계 항생제에서 넙치 유래 균주의 경우 대부분 NWT로 나타났으나 뱀장어 유래 균주의 경우 대부분 WT로 나타났다. 3, 5 및 6개의 항생제 class에 대한 *E. piscicida*의 NWT 균주 비율은 1999~2004년에는 각각 63, 25 및 13% 였으나, 2011~2018년의 경우 97, 83 및 83%로 나타났다(Table 4). NWT 지역별 분포 분석에서는 3, 5 및 6개의 항생제 class에 대한 NWT의 비율(%)은 제주도 유래 균주가 모두 81%로 나타나 완도(83, 17 및 17%)나 포항(50, 0 및 0%) 유래 균주에 비해 월등히 높은 것으로 나타났다(Table 5).

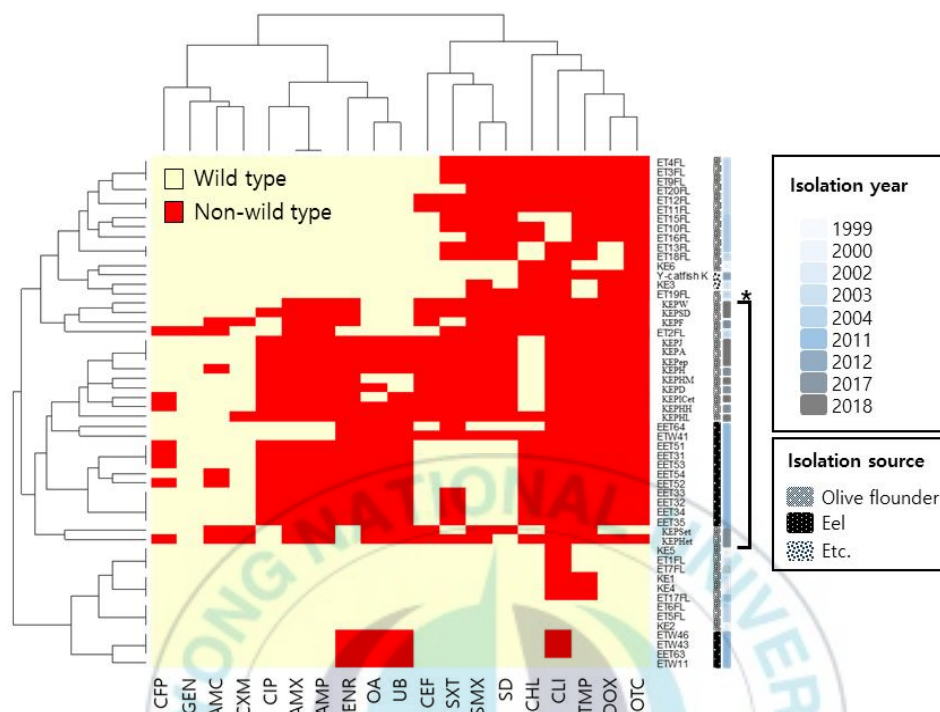


Fig. 2. Heat map shows classification of wild type and non-wild type of 54 strains of *Edwardsiella piscicida* strains. Light yellow and red blocks indicate wild type and non-wild type, respectively. *Note that strains recently isolated tend to be NWT for more kinds of antibiotics. Rows and columns represent antibiotics and bacterial strains, respectively; where red blocks indicate non-wild type and lightyellow blocks indicate wild type.

Table 4. NWT for multiple drugs of *E. piscicida* 54 strains by isolation year analysis

Isolation year	Number of strains	Ratio (%) of non-wild type against multiple antibiotic classes					
		3≤	Avg.	5≤	Avg.	6≤	Avg.
1999	3	33%		0%		0%	
2000	2	0%		0%		0%	
2002	2	50%	63%	0%	25%	0%	13%
2003	12	75%		50%		25%	
2004	5	80%		0%		0%	
2011	15	93%		73%		73%	
2012	1	100%		0%		0%	
2017	6	100%	97%	100%	83%	100%	83%
2018	8	100%		100%		100%	

Table 5. NWT for multiple drugs of *E. piscicida* 54 strains by isolation location

Isolation year	Number of strains	Ratio (%) of non-wild type against multiple antibiotic classes		
		3≤	5≤	6≤
Busan	2	50	50	50
Chungju	1	100	100	100
Geojedo	1	0	0	0
Haenam	1	100	0	0
Haman	9	100	100	100
Jejudo	16	81	81	81
Naju	1	100	100	100
Pohang	4	50	0	0
Wando	6	83	17	17
unknown	13	85	38	15

3.2.3. *Aeromonas salmonicida* 균주의 Non-wild type 분포분석

A. salmonicida 균주의 항생제별 Non-wild type 분포 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 3, 5 및 6 개의 항생제 class에 대한 *A. salmonicida*의 NWT 균주 비율(%)은 2008~2018년에 70, 12 및 2%를 나타내었다(Table 6). NWT 지역별 분포 분석에서는 3, 5 및 6개의 항생제 class에 대한 NWT의 비율(%)은 강원도 유래 균주가 100, 67 및 33%로 나타나 거문도(80, 10 및 0%)나 남해(67, 0 및 0%) 유래 균주에 비해 월등히 높은 것으로 나타났다(Table 7).



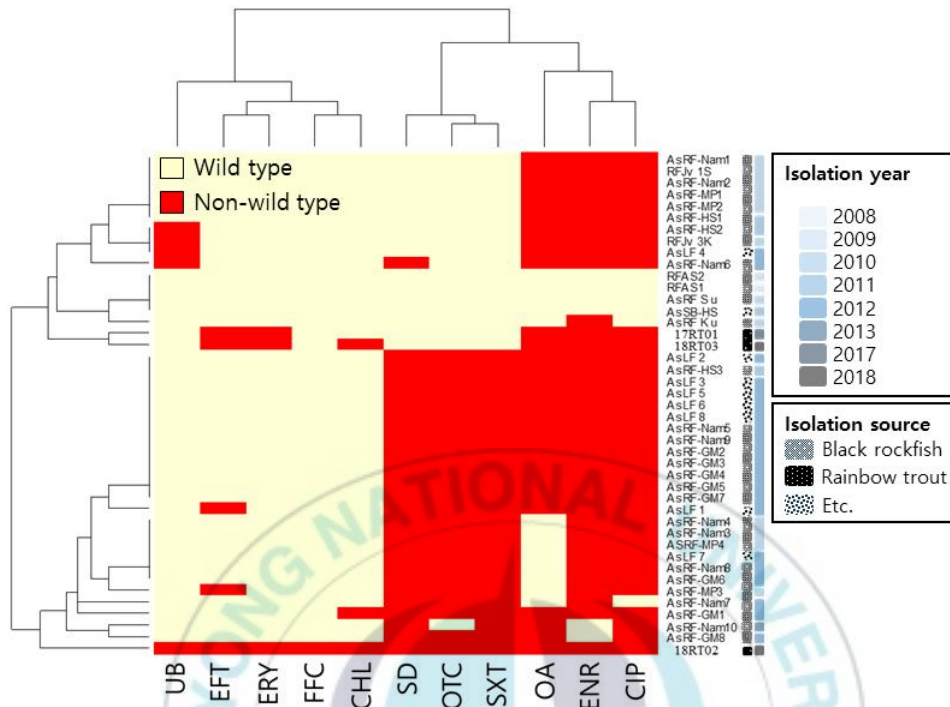


Fig. 3. Heat map shows classification of wild type and non-wild type of 43 strains of *Aeromonas salmonicida* strains. Light yellow and red blocks indicate wild type and non-wild type, respectively. where red blocks indicate non-wild type and lightyellow blocks indicate wild type.

Table 6. NWT for multiple drugs of *A. salmonicida* 43 strains by isolation year

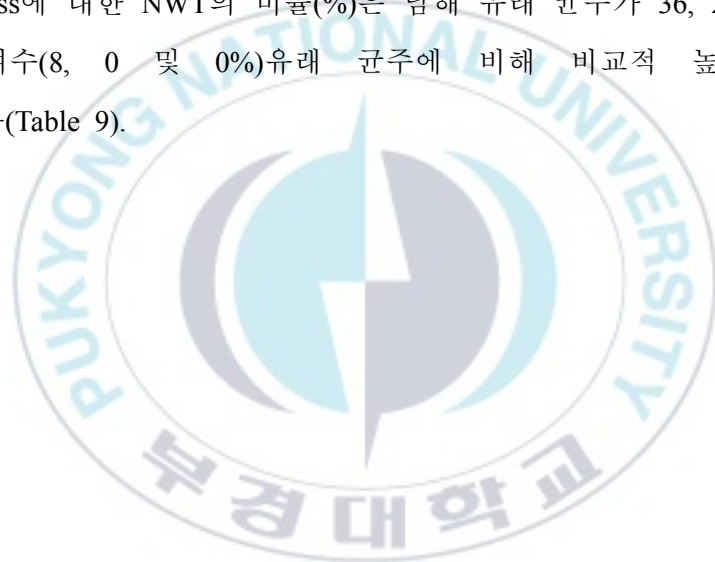
Isolation year	Number of strains	Ratio (%) of non-wild type against multiple antibiotic classes					
		3≤	Avg.	5≤	Avg.	6≤	Avg.
2008	1	0%		0%		0%	
2009	1	0%		0%		0%	
2010	12	33%		8%		0%	
2011	4	50%	70%	0%	12%	0%	2%
2012	21	95%		10%		0%	
2013	1	100%		0%		0%	
2017	1	100%		0%		0%	
2018	2	100%		100%		50%	

Table 7. NWT for multiple drugs of *A. salmonicida* 43 strains by isolation location

Isolation location	Number of strains	Ratio (%) of non-wild type against multiple antibiotic classes		
		3≤	5≤	6≤
Gwangwondo	3	100%	67%	33%
Geomundo	10	80%	10%	0%
Mokpo	4	50%	25%	0%
Namhae	12	67%	0%	0%
Heuksando	4	50%	0%	0%
unknown	10	70%	10%	0%

3.2.4. *Vibrio harveyi* 균주의 Non-wild type 분포분석

V. harveyi 균주의 항생제별 Non-wild type 분포 결과는 Fig. 4에 나타내었다. 자연산에 비해 양식산에서 더 많은 NWT 분포가 나타나는 경향을 보였다. 3, 5 및 6개의 항생제 class에 대한 *V. harveyi*의 NWT 균주 비율(%)은 양식산과 자연산으로 나누어 분석 결과 양식 유래 균주의 경우 41, 11 및 4%로 나타나 야생 유래 균주(7, 3 및 3%)에 비해 월등히 높은 결과가 나타났다(Table 8). NWT 지역별 분석 분석에서는 3, 5 및 6개의 항생제 class에 대한 NWT의 비율(%)은 남해 유래 균주가 36, 27 및 9%로 나타나 여수(8, 0 및 0%)유래 균주에 비해 비교적 높은 분포가 확인되었다(Table 9).



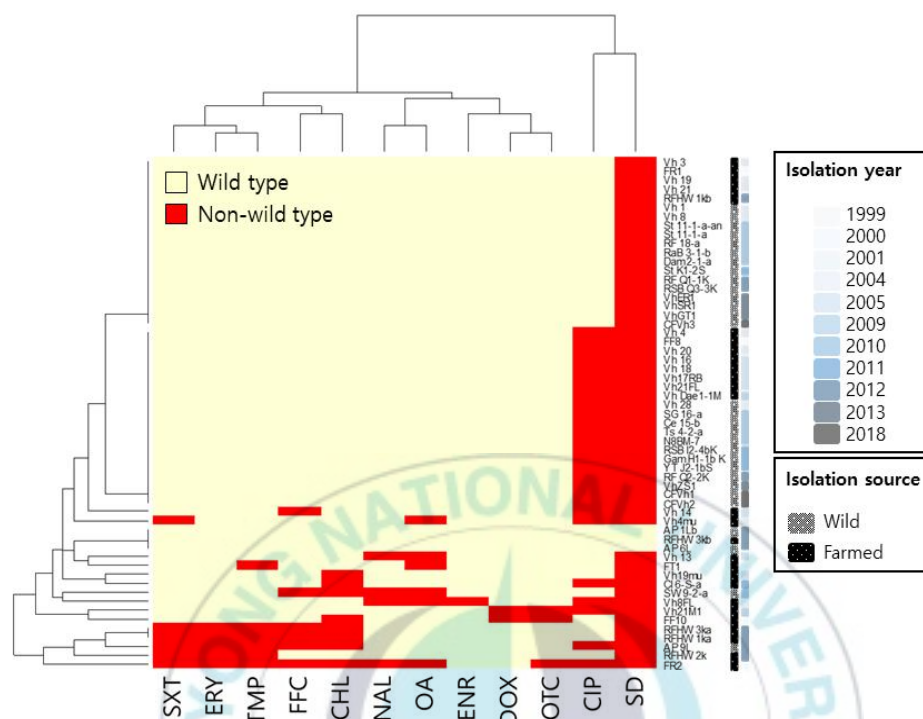


Fig. 4. Heat map shows classification of wild type and non-wild type of 57 strains of *Vibrio harveyi* strains. Light yellow and red blocks indicate wild type and non-wild type, respectively. where red blocks indicate non-wild type and lightyellow blocks indicate wild type.

Table. 8 NWT for multiple drugs of *V. harveyi* 57 strains by isolation year

Isolation year	Number of strains	Ratio (%) of non-wild type against multiple antibiotic classes		
		3≤	5≤	6≤
Farmed	27	41%	11%	4%
1999	5	60%	20%	20%
2000	2	100%	0%	0%
2004	5	0%	0%	0%
2005	7	14%	0%	0%
2009	2	50%	0%	0%
2011	1	100%	0%	0%
2012	5	60%	40%	0%
Wild	30	7%	3%	3%
2001	1	0%	0%	0%
2004	2	0%	0%	0%
2010	10	10%	0%	0%
2011	4	0%	0%	0%
2012	6	17%	17%	17%
2013	4	0%	0%	0%
2018	3	0%	0%	0%

Table 9. NWT for multiple drugs of *V. harveyi* 57 strains by isolation location

Isolation location	Number of strains	Ratio (%) of non-wild type against multiple antibiotic classes		
		3≤	5≤	6≤
Yeosu	13	8%	0%	0%
Namhae	11	36%	27%	9%
Gyeongsangdo	4	50%	0%	0%
Busan	4	25%	25%	25%
Jejudo	3	0%	0%	0%
Wando	3	0%	0%	0%
Southern sea	2	0%	0%	0%
Tongyeong	2	0%	0%	0%
Seocheon	1	100%	0%	0%
Pohang	1	0%	0%	0%
Unknown	13	31%	0%	0%

3.2.5. *Photobacterium damsela* 균주의 Non-wild type 분포분석

P. damsela 균주의 항생제별 Non-wild type 분포 결과는 Fig. 5에 나타내었다. 3, 5 및 6개의 항생제 class에 대한 *P. damsela*의 NWT 균주 비율(%)은 2004~2009년에서 class이상의 NWT(%) 결과에서 42, 42 및 27%로 나타났고 2010~2014년에는 33, 22 및 11%로 나타났다(Table 10). NWT 지역별 분포 분석에서는 3, 5 및 6 개의 항생제 class에 대한 NWT의 비율(%)은 울산 유래 균주가 각각 71, 43 및 29%로 나타나 여수(20, 20 및 0%), 완도(33, 17 및 0%), 통영(0, 0 및 0%) 및 포항(18, 0 및 0%) 유래 균주에 비해 월등히 높은 것으로 나타났다(Table 11).



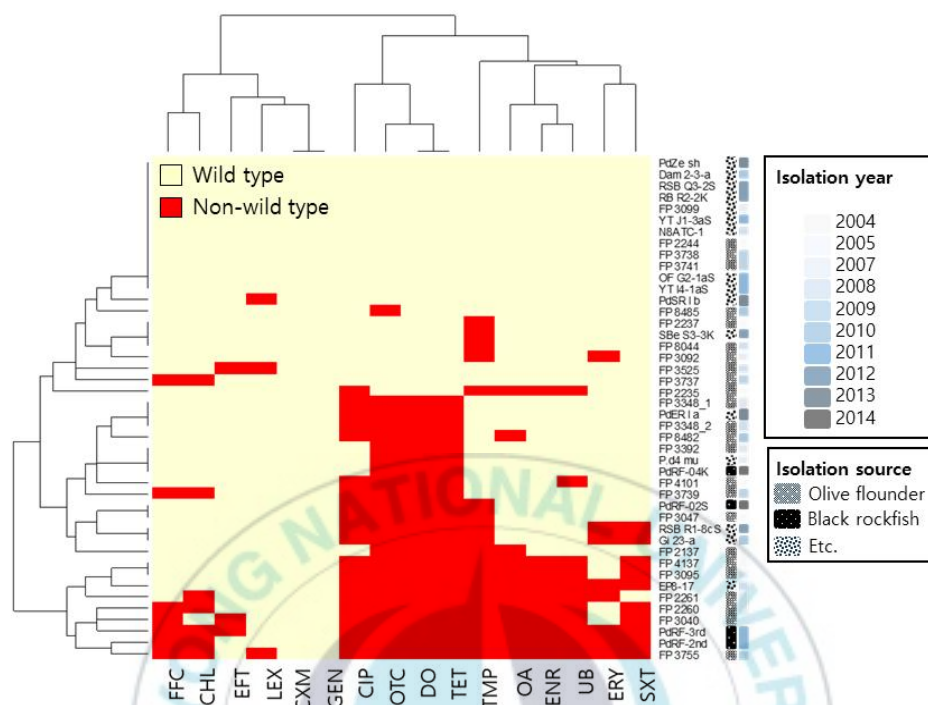


Fig. 5. Heat map shows classification of wild type and non-wild type of 44 strains of *Photobacterium damsela* strains. Light yellow and red blocks indicate wild type and non-wild type, respectively. where red blocks indicate non-wild type and lightyellow blocks indicate wild type.

Table 10. NWT for multiple drugs of *P. damsela*44 strains by isolation year

Isolation year	Number of strains (n=44)	Ratio (%) of non-wild type against multiple antibiotic classes					
		3≤	Avg.	5≤	Avg.	6≤	Avg.
2004	8	63%		25%		13%	
2005	6	50%		50%		33%	
2007	2	0%	42%	0%	42%	0%	27%
2008	5	20%		20%		20%	
2009	5	40%		20%		20%	
2010	4	25%		25%		0%	
2011	5	40%		40%		40%	
2012	4	25%	33%	25%	22%	0%	11%
2013	3	0%		0%		0%	
2014	2	50%		0%		0%	

Table 11. NWT for multiple drugs of *P. damsela* 44 strains by isolation location

Isolation location	Number of strains (n=44)	Ratio (%) of non-wild type against multiple antibiotic classes		
		3≤	5≤	6≤
Yeosu	5	20%	20%	0%
Wando	6	33%	17%	0%
Ulsan	7	71%	43%	29%
Tongyeong	2	0%	0%	0%
Namhae	2	50%	50%	50%
Pohang	11	18%	0%	0%
Jejudo	7	43%	43%	29%
Geomundo	2	100%	100%	100%
Open sea	2	50%	0%	0%

4. 고찰

세균감염의 치료제로서 항생제는 매우 효과적이지만 부적절한 항생제의 선택과 사용은 내성 세균의 발생을 증가시킬 수 있다(Aoki et al., 1990). 그러므로, 분리된 원인체의 항생제 감수성 시험을 통해 치료효과 가능성이 높은 유효한 항생제를 선택하는 것이 매우 중요하다고 할 수 있다. OIE aquatic code에는 항생제 사용 모니터링 및 감시 프로그램을 통해 생성된 감수성 데이터를 해석하기 위해 Epidemiological cut-off (Wild-type cut-off) values를 사용해야 한다고 권고하고 있다. 현재 *S. parauberis*에 대한 감수성 또는 내성을 구분할 수 있는 해석기준이 설정되어 있지 않기 때문에 설령 항생제 감수성 시험 결과가 있다 하더라도 그 구분이 어렵다. 이번 연구에서 제시하고 있는 균종별 항생제별 ECOFF 값은 향후 균주의 WT와 NWT를 구분하는데 매우 유용할 것으로 판단되며, WT로 구분된 항생제 중 하나를 치료제로 사용함으로써 그 유효성을 높이고 항생제의 오용을 줄일 수 있을 것이다. 이번 연구에서 사용된 NRI 방법(Kronvall and Smith, 2016)은 배양 온도에 따라 구분하여 분석할 수 있어 그 정확도가 기존 방법에 비해 좀 더 높아졌다고 판단된다. 수산동물에서 분리된 세균의 epidemiological cut-off value (ECOFF)를 설정할 때 더 많은 균주를 확보할수록 더 정밀한 CO_{WT}를 얻을 수 있으며, 적어도 30개의 WT 관측을 포함하는 것을 목표로 해야 한다고 말하고 있다(Smith et al., 2009; CLSI, 2011; Smith and Kronvall, 2015b). 그런 측면에서 이번 연구에서 사용된 모든 균종의 균주수는 충분하였다고 판단되며, 향후 새로 분리되는 균주의 데이터를 추가하여 지속적인 정보의 업데이트가 필요하다고 판단된다.

이번 연구 결과 *S. parauberis*의 NWT 비율(%)은 ampicillin, oxytetracycline과 erythromycin 항생제에 대해 각각 47, 51, 51%이었는데

이것은 이전 연구결과(Kim et al., 2010)와 유사한 것으로 나타났다. 본 연구와 이전 연구 결과 특히 페니실린계와 테트라사이클린 계열 항생제는 *S. parauberis*에 의한 연쇄구균병의 치료제로는 부적절한 것으로 보인다. *S. parauberis*의 연도별 분석 결과 최근(2013-2018년)에 분리된 균주가 보다 많은 종류의 항생제에 대해 NWT로 분류되는 경향이 뚜렷한 것을 확인하였다. 이번 연구에서 사용된 모든 최근(2013-2018년) 균주는 3개 이상의 항생제 class에 대해 NWT로 구분되었으며 5와 6개의 항생제 class에 대해 각각 81과 65%의 높은 비율로 NWT로 분류되는 것을 확인하였다. *S. parauberis* 균주는 tetracycline과 erythromycin에 대해 NWT로 구분되었는데 이는 이전 연구(Park et al., 2009)에서 *S. parauberis*가 tet(s)과 erm(B) gene을 함께 가지고 있다는 결과와 일치하는 것을 알 수 있다. 우리 결과를 보면 3개 항생제 class 이상의 내성을 보이는 대부분의 균주들에서 페니실린계, 테트라사이클린계 및 마크로라이드계의 항생제로부터 공통적으로 내성이 있는 것을 확인하였다. 현재 국내 양식장에서는 연쇄구균병을 치료하는데 Amoxicillin과 florfenicol을 많이 사용한다고 보고하고 있으나(Jee et al., 2014), 최근 2007년 이후 분리된 *S. parauberis* 28균주에서 amoxicillin 및 florfenicol에 대해 NWT으로 분류된 균주의 비율은 각각 100%, 31%로 항생제 내성 획득이 있는 것으로 생각된다. 이렇게 세균의 항생제 저항성이 증가하게 되면 치료 효율 또한 저하될뿐만 아니라 공중위생학적으로도 상당히 우려가 된다(Park et al., 2009; WHO, 2007). 우리의 결과에서 GEN, FFC, ENR, SXT, EFT, VAN, CHL는 wild type의 비율이 76% 이상으로 나타나 연쇄구균병에 대한 치료가 효과적일 것이라고 판단된다.

*E. piscicida*에서는 연도별 분석결과 이전(1999~2004년)에 분리된 균주의 NWT비율(%)은 oxytetracycline, doxycycline, Oxolinic acid의 결과가 63, 50,

및 0%로 테트라사이클린계에서 높은 NWT 분포 비율을 나타내었는데, Kim et al.(2010)의 결과에 따르면 2004~2005년에 분리된 *E. tarda*에서 tetracycline(84.4%), Oxolinic acid(71.9%)로 oxolinic acid에서도 높은 내성을 보여 우리와는 결과가 다소 다르게 나타났으나 2종류 이상의 내성 비율이 약 84%로 매우 높게 나타나 우리의 결과와 매우 유사한 패턴을 나타내었다. 최근(2011~2018년) 분리된 *E. psidicida* 균주의 경우 GEN을 제외한 모든 항생제에 대해 이전균주에 비해서 NWT 비율이 매우 증가하여 높은 비율을 나타내고 있다. 이 중에서도 2017년~2018년에 분리된 균주에서 모두 6개 항생제 class 이상에 대해 NWT분포가 확인되었다. 경남지역의 해산어류에서 분리된 에드워드균은 penicillin, doxycycline, tetracycline, sulfamethoxazole/trimethoprim, oxolinic acid에서 90~100%의 내성을 나타낸 반면, 우리의 결과에서는 페니실린계열인 AMP, AMX에서 NWT(%)는 각각 44%이며, DOX, OTC, SXT 및 OA의 NWT는 69, 74, 52 및 44%로 나타났다. NWT 유래별 분석 시 넙치(37균주)와 뱀장어(15균주)에서 OA의 NWT(%)은 24, 100%로 나타났고, SMX의 NWT(%)은 76, 7%로 나타났다. 이는 넙치와 뱀장어의 유래 균주에 따라서 치료 효과가 있을 것으로 생각되는 항생제가 달라질 수 있음을 나타낸다. 공통적으로 치료효과가 높은 항생제는 AMC, CXM, CFP, GEN이며 WT가 85% 이상으로 에드워드병에 대한 치료가 효과적일 것으로 생각된다.

A. salmonicida 에서 OTC, OA, CIP 및 ENR의 NWT비율이 각각 58, 70, 86 및 86%를 나타냈는데, 이는 항생제 내성 유전자인 *tetA*, *tetE*를 가지거나 퀴놀론계에 대한 내성 유전자인 *gyrA*의 변이에 의한 내성을 가진 것으로 생각된다(Kim et al., 2011). *A. salmonicida*는 NWT연도별 분석시 2008~2018년에 분리된 43균주에서 3, 5 및 6 개 항생제 class이상의 NWT 분포비율(%)은 각각 70%, 12% 및 2%로 나타내었다. 전체 균주 중

70%가 3개 항생제 class 이상의 NWT 분포를 나타내고 있으며 5개 항생제 class 이상 내성을 보이는 곳은 강원도(67%), 목포(25%) 및 거문도(10%)이며 6 class이상의 non-wild type 분포를 나타낸 균주는 강원도에서만 분리되었다.

*V. harveyi*의 1999~2018년에 분리된 균주들을 이용하여 연도별 분석결과를 수행하였지만 유의미한 결과는 볼 수 없었다. *V. harveyi*의 경우 야생 유래 균주와 양식 유래 균주의 NWT분포 비율이 다르게 나타났는데, 야생 유래 균주에서는 30균주 중 3, 5 및 6 개의 항생제 class 이상의 NWT비율이 7, 3 및 3%로 나타났으나 양식 유래 균주에서는 27균주에서 41, 11 및 4%로 야생 유래 균주보다 높은 NWT분포를 나타내었다. 이전 보고(Kang et al., 2014)에 의하면 한국에서 분리된 *V. harveyi*에서 cephalothin, vancomycin, ampicillin, cefepime, cefotetan 및 streptomycin대한 항생제 내성이 나타나는 다제내성세균이 출현하였다는 보고가 있으며 결과를 종합해볼 때 야생환경에 비해 양식환경에서 항생제의 노출이 많이 되기 때문인 것으로 생각되며 항생제 사용에 주의가 필요할 것으로 생각된다.

*P. damsela*는 2004~2014년에 분리된 44균주 중 17균주(39%)가 3 class 이상의 내성을 가지고 있었다. *P. damsela*는 플라스미드 pAQU1를 가지고 있으며 플라스미드의 접합 전달 시스템이 MOBH 플라스미드 계열의 하위 그룹인 MOBH12에 속하며 *Enterobacteriaceae*와 *Vibrionaceae*에 분포하는 IncA / C 유형의 플라스미드 및 SXT/R391과 밀접한 관련을 가지고 양식환경에 수평 유전자 전달과 보급에 관여하고 있다(Nonaka et al., 2009). 덴마크 무지개송어 수산양식업에서 *P. damsela* subsp. *damsela*의 치료제로 가장 많이 사용되는 항생제는 sulfonamide계이지만 Pedersen et al. (2009)이

시험에 사용한 균주는 대부분 내성을 가지는 경향을 보였다. 우리 균주의 경우 *P. damsela* 44균주의 SXT, TMP의 NWT는 23, 43%로 낮은 비율을 나타내었으며 이전 연구결과를 미루어 볼 때 항생제의 내성을 획득할 수 있음을 시사한다.

본 연구는 어병세균종에 대한 역학적 기준값을 설정하였으며 항생제 선택 시 참고자료로 이용할 수 있을 것으로 생각되며 NWT 분포분석을 통해 다제 내성 패턴 변화에 대한 추이를 파악함으로써 항생제의 적절한 사용을 촉진하고 내성 문제를 극복하기 위해 나아가야 할 방향을 제시한다.



5. 결론

본 연구에서 결정된 CO_{WT} 값은 어류 세균성 질병 치료에 가장 효과적인 항생제를 선택하는 데 도움이 될 수 있다. 지금까지 세균성 어류 병원균에 대한 항균제 감수성 검사 결과와 분리 유래 및 연도별에 따른 경향을 이해하는 것은 매우 어려웠다. 그러나 NRI 방법을 이용하여 세균성 어류 병원균에 대한 WT와 NWT 분포를 분석하면 데이터를 비교하여 균주 정보에 따른 경향성을 파악할 수 있고 항생제 내성 관련 문제에 대한 이해를 높일 수 있다. 이 연구에서 얻은 결과는 수산양식 분야의 항생제 내성 균주의 출현을 크게 감소시키는 데 기여할 수 있다. 이러한 데이터는 새로운 균주가 추가되고 새로운 항생제가 승인되고 치료에 사용될 때 정기적으로 검토되고 업데이트되어야 한다. 이 연구는 항생제 내성 박테리아에 대한 이해를 높이고 향후 연구의 기초 데이터로 사용될 것이다.

**ChapterⅡ. 넓치 장관 마이크로바이옴에 대한
항생제와 프로바이오틱스의 영향**



1. 서론

일반적으로 동물의 장관에는 매우 다양한 미생물총(microbiota)이 존재하며, 이들은 숙주의 영양소 섭취 및 성장과 장관 면역계 발달의 촉진에 도움을 주는 것으로 알려져 있다(Cany et al., 2013; Hoseinifar et al., 2019). 따라서 장내 미생물 균형은 동물의 전반적인 건강을 유지하는데 중요하다(Gómez and Balcázar, 2008). 어류의 장내 미생물은 일반적으로 10^7 - 10^{11} CFU.g⁻¹이 존재하며(Nayak, 2010; Wang et al., 2018), 장내의 정상균총은 병원체의 집락 형성과 침입을 막을 수 있는 효과적인 장벽으로 알려져 있다(Farzanfar, 2006). Peterson and Round (2014)는 유익한 미생물의 감소손실, 병원균 또는 잠재적으로 유해한 미생물의 증가, 미생물 다양성의 상실 등에 의한 장내 미생물의 불균형을 dysbiosis라고 정의하고 있다. 이런 상태는 숙주에게 직간접적으로 부정적인 영향을 일으킬 수 있다고 하였다(Pérez et al., 2010). dysbiosis는 여러 요인에 의해 발생할 수 있는데 여기에는 섭취하는 음식의 종류, 생활 습관, 개인 위생상태, 감염 유무, 항생제 섭취 등이 포함된다.(Nedoluha, P. C., & Westhoff, D., 1997; Peterson and Round, 2014). 특히 항생제는 정상적인 미생물 군집에 상당한 영향을 미칠 수 있으며 경우에 따라 dysbiosis를 일으킬 수 있으며, 중복감염(superinfection)과 같은 의도치 않은 결과를 초래할 수도 있다(Carlson et al., 2017; Walker and Lawely, 2013).

최근 친환경적인 수산양식산업의 중요성이 부각되면서 프로바이오틱스의 사용이 증가하고 그 효과도 주목받고 있다(Balcázar et al., 2006; Kesarcodi-Watson, 2008). 유엔 식량 기구(FAO)와 세계보건기구(WHO)에서는 probiotics를 “적절한 양이 투여될 때 숙주에게 건강상 이익을 주는 살아있는 미생물”로 정의하고 있다(FAO/WHO, 2001).

지금까지 많은 종이 프로바이오틱스로 연구되었으며 특히 유산균(lactic acid bacteria; LAB)이 널리 사용되고 있다. 이 그룹에 속한 많은 세균은 박테리오신을 생산하여 병원균의 증식을 억제하는 능력이 있다(Askarian et al., 2011; Stoffels et al., 1992). 수산양식에서도 프로바이오틱스는 수산동물에 질병 저항성, 건강 상태, 성장 능력, 사료 이용률, 스트레스 등을 개선되었다는 여러 보고가 있다(e.g., Gatesoupe, 2010; Llewellyn et al., 2014; Nguyen et al., 2017; Nguyen et al., 2018; Partridge, 2016; Tellez et al., 2006; Zhou et al., 2010). 또한 장내 미생물은 내장 상피의 성장을 돕고, 필수 영양소를 공급하며 선천적인 면역계를 자극하는 등 어류의 건강에 유익한 영향을 미친다(Nayak, 2010).

Microbiome을 동정하기 위한 기존 방법은 시간과 정확성 면에서 매우 비효율적이고 특수화된 조건을 필요로 하는 절대 혐기성 세균은 배양이 까다로워 종종 장내 미생물 군집의 일부만 검출되는 불확실한 결과를 초래할 수 있다(Kim et al., 2007; Nayak, 2010). 최근 next-generation sequencing (NGS) 기술이 발달함에 따라 샘플에 존재하는 많은 양의 미생물 DNA를 시퀀싱 할 수 있어 복잡한 미생물의 구성을 심층적으로 분석할 수 있게 되었다(Simon and Daniel, 2009; Star et al., 2013). 이 연구에서는 낮은 농도의 미생물 분류군에 대한 의미 있는 분석을 위해 심층적인 시퀀싱이 필요하기 때문에 16S 차세대 시퀀싱 분석을 이용하여 진행되었다. 항생제 사용과 같은 양식업의 관행은 어류의 건강을 저하시킬 뿐만 아니라 항생제 내성을 증가시켜 문제가 되고 있다(Cabello, 2006; Faruk et al., 2008). 또한 양식업에서 어류의 항생제 치료에 의한 장내 미생물의 변화는 심각한 건강 문제 및 질병을 야기할 수 있다. 수산양식업에 항생제의 사용은 보편화 되어 있으며 특정 항생제에 내성을 지닌 균주의 출현은 문제가 되고 있다(Cabello, 2006; Faruk et al., 2008).

최근 연구에 따르면 어류에 항생제 투여시 dysbiosis가 일어날 수 있다고 하였다(Jin et al., 2018; Zhou et al., 2018). 장내 미생물의 구성과 다양성을 회복시키는 방법으로 프로바이오틱스의 사용이 포함될 수 있으나(Gao, X. W. et al., 2010; Kale Pradhan, P. B. et al., 2010; Shi Y. et al., 2018) 현재까지 프로바이오틱스가 장내 미생물에 미치는 영향은 잘 규명되어 있지 않다. 그러므로 본 연구의 목적은 항생제 투여 후 프로바이오틱스의 투여가 장내 미생물 군집에 미치는 영향을 분석하고자 하였다. 이를 통하여 지금까지 불명확하였던 프로바이오틱스의 장내 미생물 군집의 균형과 다양성에 미치는 영향을 이해하고자 하였다.



2. 재료 및 방법

2.1. 실험어 및 수조 탱크

실험에 사용한 어류는 전남 고흥의 한 양식장에서 사전에 질병 및 항생제에 대한 노출이 없는 넙치($15\pm 2\text{cm}$, $40\pm 10\text{g}$)를 구입하여 기장 일광에 위치한 부경대학교 수산과학연구소의 1.5 ton 수조에 4주간 순치하였다. 이후 4개의 0.25 ton 유수식 수조탱크 각각에 40마리씩 옮긴 후 실험을 실시하였다. 수온은 실험 기간 내내 $23\text{--}24^{\circ}\text{C}$ 으로 유지되었다.

2.2. 항생제/프로바이오틱 경구투여

첫 번째 실험(Exp. 1)은 어류 장내 항생제를 경구투여하여 미치는 영향을 알아보고자 진행되었으며 실험에 사용한 항생제는 시중에 판매하고 있는 수산용 아목시실린(대성 아쿠아목스 20산)을 40mg/kg/bw 의 농도를 사료에 섞어 투여하였다. 두 번째 실험(Exp. 2)에서는 프로바이오틱스가 어류 장내 미생물의 불균형을 개선시킬 수 있는지 알아보고자 진행되었다. 실험에 사용된 프로바이오틱스는 효과가 검증된 *Lactococcus lactis lactis* WFLU12(Nguyen et al., 2017; Nguyen et al., 2018)를 10^8CFU.g^{-1} 의 농도로 사료에 섞어서 사용하였다. 대조구를 제외한 실험구에서는 아목시실린에 대한 내성이 있는 *Edwardsiella piscicida* EET52를 10^7CFU.fish^{-1} 로 zonde를 이용하여 하루에 한번씩 이틀간 위에 직접 투여한 후 그 다음날부터 사료 급이를 시작하였다. 일반사료의 경우 생리식염수(0.85% NaCl)를 사료에 섞어 공급하였다. 모든 사료는 autofeeder를 이용하여 매일 어체중 2%로 급이하였고 실험기간동안 이틀간격으로 보충하였다(Fig. 6).

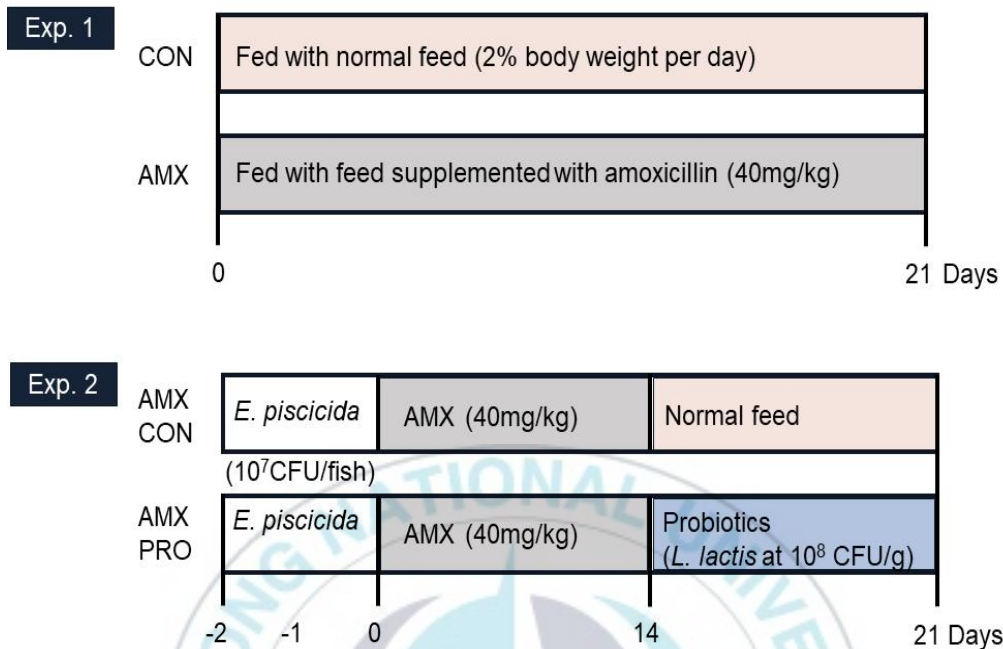


Fig. 6. Schematic plan for oral administration. For Exp. 1, olive flounder were fed with feed supplemented with amoxicillin or sterile saline for 3 weeks. For Exp. 2, olive flounder were orally challenged with *E. piscicida* before they were orally treated with amoxicillin for 2 weeks. Then, fish in AMX-CON and AMX-PRO group were fed with normal feed and feed supplemented with probiotics, respectively, for 7 days.

2.3. 샘플 수집 및 DNA 추출

3주간 급이한 후 다음 날 각 구간마다 무작위로 10마리를 선택하여 장관에서 장점액을 조심스럽게 긁어내어 잘 혼합한 후 한 샘플 당 두 개의 E-tube에 옮긴 후 4°C에 두었다. 그 이후 하나는 장점액의 일부를 털어내어 장점액 내 미생물 수 측정에 이용하였으며 나머지는 DNA 추출을 위해 -80°C에 보관하였다. 그 이후 DNA분리는 PowerSoil® DNA Isolation Kit(MoBio Laboratories Inc., Carlsbad, USA)를 사용하였으며 제조사의 instruction에 따라서 진행하였다.

2.4. 넓치 장관 내 미생물 배양

각 구간 당 10개의 장 점액 샘플을 20mg.ml⁻¹의 농도로 희석한 후 Marine agar(MA)에 spreading하여 28°C에 24-72 h 배양한 후 plating을 하여 미생물의 수를 측정하였다. 이후 각 그룹 내에 존재하는 미생물 동정을 위해 colony의 형태를 확인 후 선택하여 계대 배양하였다.

2.5. 넙치 장관 내 미생물 동정

각 구간마다 선택된 colony를 MA배지에서 28°C 24-72h 배양 후 DNA 추출 및 시퀀싱을 진행하였다. 세균의 genomic DNA는 Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer)를 사용하여 제조자의 지시에 따라 분리하였다. 그리고 각 분리 균주의 16S rRNA gene을 27F(5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG -3')와 1492R(5'- GGT TAC CTT GTT ACG ACT T -3') 세트를 사용하여 증폭하였다. Premix kit(Bioneer-10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 40 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 250 µM dNTPs mix, 1 U Taq polymerase)를 PCR 증폭에 사용하였다. 각 primer 2µL 와 template DNA 1 µL를 premix vials에 넣고 증류수 17 µL를 첨가하여 최종 부피를 20 µL로 만들었다. PCR조건은 94°C에서 5분간 pre-denaturation 처리 후, 94°C 30초간 denaturation, 55°C 30초간 annealing, 72°C 1분 30초간 extension의 조건으로 30 cycle을 진행하고 마지막으로 72°C 7분간 final extension을 진행하였다. 이후 증폭된 DNA는 -20°C에 보관하였다. Dyne staining star(DYNE BIO, Korea)가 포함된 1% Agarose gel에 전기영동을 통해 결과를 확인하였다. 그리고 PCR 정제 후 시퀀싱 분석은 Han et al. (2011)의 방법에 따라 진행하였다. 3'과 5' 말단 부위에 신뢰할 수 없는 서열을 제거한 후, Ribosomal Data Project (RDP) SeqMatch(http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp)를 이용하여 동정하였다.

2.6. 16S rRNA amplicon library 준비 및 sequencing

16S rDNA V3-V4 가변 영역을 target으로 하는 PCR primer 341F/805R와 2x KAPA HiFi HotStart Ready Mix(KAPA Biosystems, Wilmington, MA, USA)와 Agencourt AMPure XP system (Beckman Coulter Genomics, Brea, CA, USA)를 사용하여 다음과 같은 조건으로 PCR을 진행하였다; 95°C에서 3분간, 30cycle에서 95°C 30초, 55°C 30초, 72°C 30초 그리고 72°C 에서 5분간 수행하였다. 초기 PCR은 Illumina index 및 sequencing adapters (forward primer:

5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGC AG-3'; reverse primer :

5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTTTATAGAGACAGGACTACHVGGGT

ATCTAATCC-3')와 호환성을 갖는 영역의 특이적 프라이머를 사용하여 20ng의 주형 DNA로 수행하였다. PCR 산물의 magnetic bead -based 정제 후, 제한된 cycle을 갖는 Nextera XT Index Kit (Illumina)의 프라이머를 사용하여 두 번째 PCR을 수행하였다. 이어서, 정제된 PCR 산물을 겔 전기영동을 사용하여 가시화하고, Qubit 3.0 형광 측정기 상에서 Qubit dsDNA HS 검정 키트 (Thermo Scientific)로 정량화하였다. 수집된 샘플은 시퀀싱에 앞서 품질 분석을 위해 Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent)에서 실행되었다. 라이브러리는 CFX96 실시간 시스템 (Biorad)을 사용하여 qPCR에 의해 정량화되었다. 표준화 후, 준비된 라이브러리의 시퀀싱은 300 bp 쌍 단부 판독을 갖는 Miseq system (Illumina)에서 수행되었다.

2.7. Metagenomics

각 샘플에서 사전 처리된 판독값을 사용하여 Operational taxonomic unit (OTU) (a similarity threshold of 97%)의 수를 계산하였다. OTU의 수는 QIIME 소프트웨어 (v.1.8.0)를 사용하여 결정하였으며 각 표본에 대해 사전 처리된 reads에서 파생된 0.8의 신뢰도 임계값을 사용하여 RDP Classifier v1.1로 taxonomic abundance를 계산하였다. 미생물 조성물에서 taxonomic abundance는 각 샘플에 대한 전처리된 수로 나눈 값을 사용하여 표준화하였다. R의 R 패키지의 Phyloseq v1.8.2는 박테리아의 분류학적 조성의 풍부함을 시각화하는 데 사용되었다.

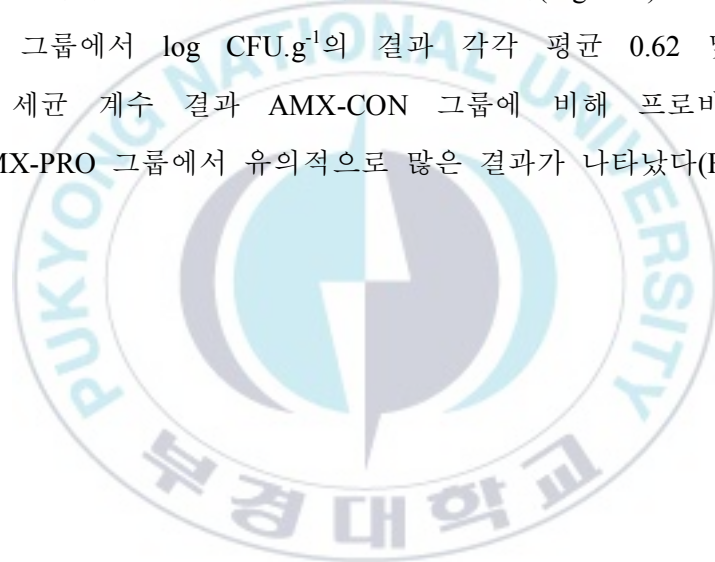
2.8. 통계 분석

각 샘플의 알파 다양성을 측정하기 위해 OTU는 Shannon index (alpha-diversity)를 사용하여 분석되었다. 베타 다양성을 측정하기 위해 Bray-Curtis distance에 따라 유기체 조성의 차이를 측정하고 분류 수준 사이의 거리를 결정하기 위해 principal component analysis (PCA) biplot을 수행하였다. Beta-diversity 및 rarefaction curve는 R을 이용하여 분석되었다.

3. 결과

3.1. 넙치 장관 내 미생물 수 측정

각 구간의 넙치의 장관 내 미생물 수는 MA에서 28°C에 24-72시간 배양한 후 측정하였다. CON과 AMX 그룹에서 log CFU.g⁻¹의 결과 각각 평균 7.16 및 3.01로 나타났다. 세균 계수 결과 CON에 비해 아목시실린을 처리한 AMX 그룹에서 유의적으로 적은 결과가 나타났다(Fig. 7). AMX-CON과 AMX-PRO 그룹에서 log CFU.g⁻¹의 결과 각각 평균 0.62 및 3.56으로 나타났다. 세균 계수 결과 AMX-CON 그룹에 비해 프로바이오틱스를 처리한 AMX-PRO 그룹에서 유의적으로 많은 결과가 나타났다(Fig. 8).



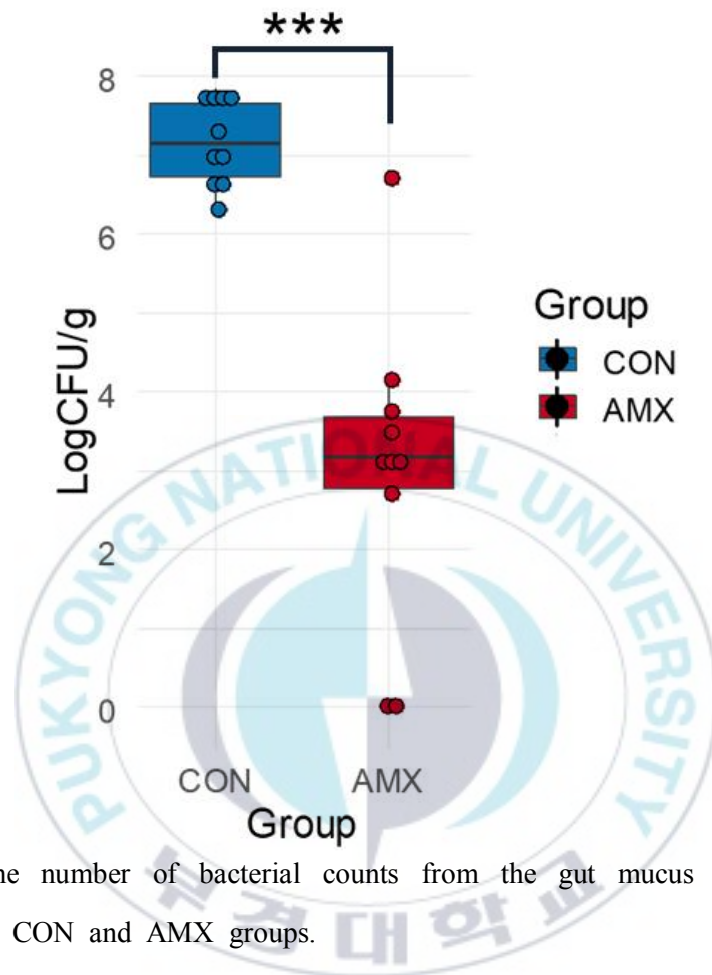


Fig. 7. The number of bacterial counts from the gut mucus of 10 olive flounder in CON and AMX groups.

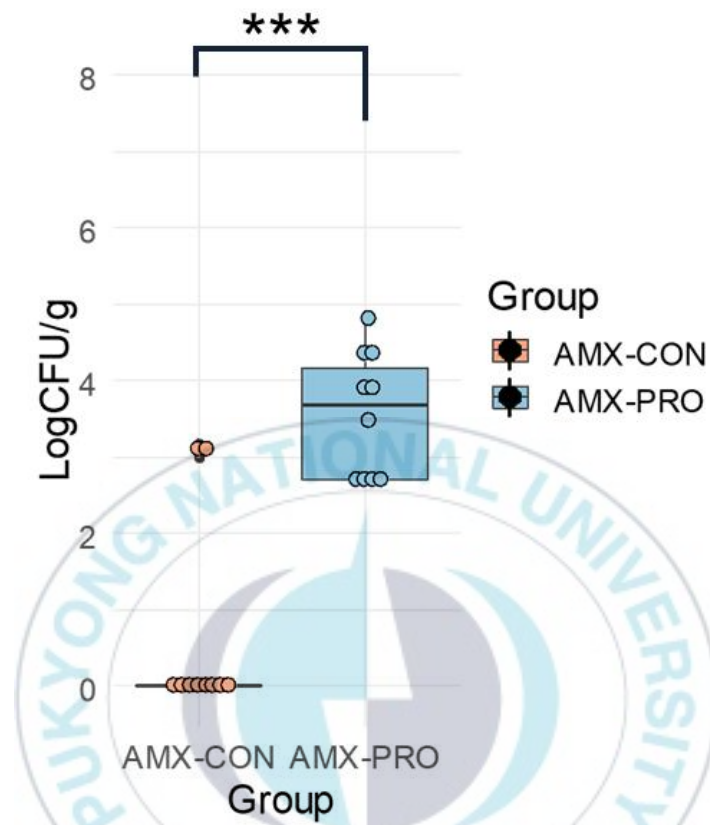


Fig. 8. The number of bacterial counts from the gut mucus of 10 olive flounder in AMX-CON and AMX-PRO.

3.2. 넙치 장점액에서 분리된 미생물의 동정

이번 연구에서 Exp. 1(CON 및 AMX)과 Exp. 2(AMX-CON 및 AMX-PRO)에서 넙치 장점액을 MA에 배양시킨 후 자란 bacteria를 육안으로 colony 성상을 확인 후 분별된 미생물(n=16)에 대하여 16S rRNA sequence를 진행하였다. RDP SEQMATCH 프로그램에 따라 가장 가까운 유형의 균주를 결정하여 Table 12-13에 나타내었다.



Table 12. Identification of gut bacteria isolated from fish in CON and AMX groups

Group	Phylum	Bacteria strain	identity (%)
CON	<i>Proteobacteria</i>	<i>Photobacterium damsela</i>	99.89
		<i>Catenococcus thiocycli</i>	96.35
		<i>Palleronia abyssalis</i>	98.71
		<i>Vibrio alfacensis</i>	99.87
		<i>Vibrio owensii</i>	99.15
AMX	<i>Proteobacteria</i>	<i>Vibrio natriegens</i>	99.16
		<i>Vibrio owensii</i>	99.15
		<i>Vibrio alfacensis</i>	99.88
		<i>Catenococcus thiocycli</i>	98.69
		<i>Vibrio natriegens</i>	98.92
	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus safensis</i>	100

Table 13. Identification of gut bacteria isolated from fish in AMX-CON and AMX-PRO groups

Group	Phylum	Bacteria strain	identity (%)
AMX-CON	<i>Firmicutes</i>	<i>Staphylococcus caprae</i>	100
AMX-PRO	<i>Proteobacteria</i>	<i>Vibrio scophthalmi</i>	98.89
	<i>Firmicutes</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	99.88

3.3. 메타지놈 분석

3.3.1. 넓치 장관 내 16S 시퀀스 richness and diversity

이번 연구에서 메타지놈 분석을 위해 CON(n=3), AMX(n=3), AMX-CON(n=3)과 AMX-PRO(n=3)의 넓치 장관 내 장점액을 사용하였다. 총 881,478개의 quality-filtered sequence reads를 얻었으며 Exp.1에서 CON은 281,434개, AMX는 183,147개이며 Exp.2에서는 AMX-CON은 155,724개, AMX-PRO는 261,173개로 나타났다. QIIME을 사용하여 97% 이상의 서열 유사성을 기준으로 각 그룹 샘플의 OTU를 얻었다(Table 14-15).

종 다양성에 대한 항생제와 프로바이오틱스의 영향을 평가하기 위해 QIIME을 사용하여 알파와 베타 다양성을 계산하였다. rarefaction curve와 같은 alpha-diversity 측정은 시퀀싱이 샘플의 진정한 종 풍부성을 포착하기에 충분한 지 여부를 결정하는 가장 좋은 방법으로 간주된다(Ghanbari et al., 2015). Rarefaction curve는 다양한 분류학적 수준에서 서열의 depth의 함수로서 종 풍부도를 산정하는 정상적인 방법으로 사용되었다(Fig. 9). 박테리아 군집 다양성은 QIIME에서 구현된 shannon index의 결과에서 Exp. 1의 CON과 AMX에서 그룹간 유의적인 차이는 볼 수 없었으며, Exp. 2의 AMX-CON과 AMX-PRO에서 그룹 간 유의적인 차이는 확인할 수 없었다. Exp.1과 Exp.2의 beta-diversity 결과 구성하고 있는 미생물 군집의 유사성에 따라 각 그룹별로 구분되는 것을 확인할 수 있으며, Exp. 1의 총 구성요소는 variation의 92.2%(first component, 67.3%; two component, 24.9%)이며 Exp. 2의 총 구성요소는 variation의 98.4%(first component, 86.5%; two component, 11.9%)로 나타났다(Fig. 10-11). Exp. 1에서 AMX의 경우 항생제의 영향으로 장내

미생물 군집에 영향을 미치고 *Enterobacteriaceae*의 *Citrobacter*가 증가한 것을 확인하였다. Exp. 2에서는 프로바이오틱스를 처리한 AMX-PRO에서 *Enterobacteriaceae*의 비율이 감소하는 경향을 나타내었다.



Table 14. Summary of OTU counts and richness estimate for bacteria in samples of gut mucus from olive flounder in CON and AMX groups.

Sample ID	No. of Reads	OTUs	Alpha diversity (Shannon index)
CON1	81,204	3,105	1.442
CON2	96,147	4,612	1.396
CON3	104,083	6,182	1.526
AMX1	66,930	2,601	1.739
AMX2	77,802	3,232	2.963
AMX3	38,415	1,986	3.830

Table 15. Summary of OTU counts and richness estimate for bacteria in samples of gut mucus from olive flounder in AMX-CON and AMX-PRO groups.

Sample ID	No. of Reads	OTUs	Alpha diversity (Shannon index)
AMX-CON1	41,081	1,757	2.582
AMX-CON2	63,704	2,803	3.377
AMX-CON3	50,939	1,868	3.173
AMX-PRO1	66,512	2,615	3.242
AMX-PRO2	84,974	3,131	2.397
AMX-PRO3	109,687	4,195	4.302

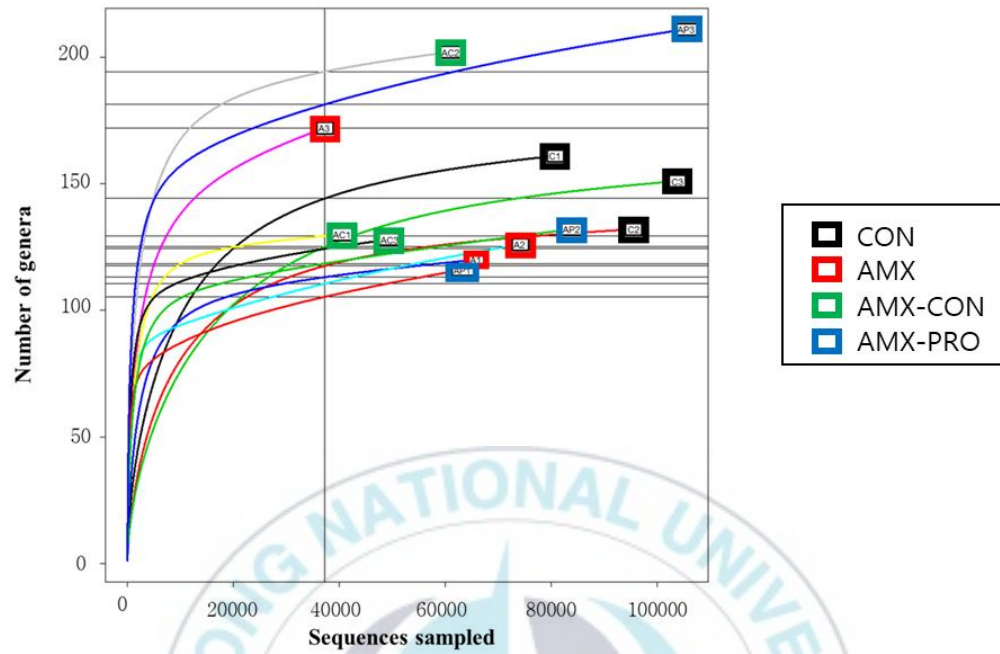


Fig. 9. Genus-level rarefaction curves of gut microbiota. Gut microbiota from each of the groups were sampled according to their 16S rRNA gene sequences.

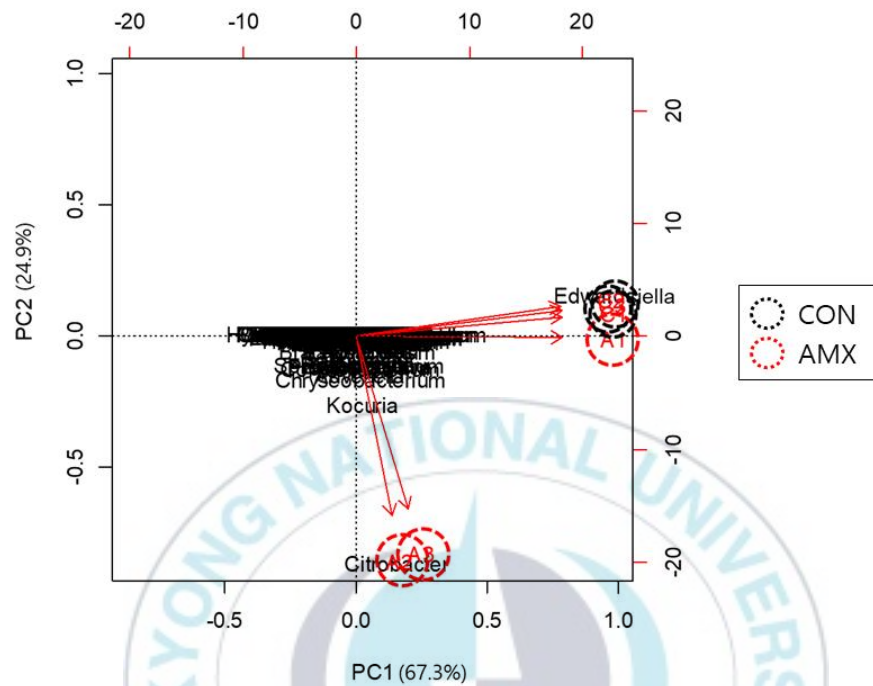


Fig. 10. CON(C1-C3, black dashed circles) and AMX(A1-A3, red dashed circles) comparisons were made the difference in organism composition was measured according to bray-curtis distance and principal component analysis (PCA) was performed using the beta diversities.

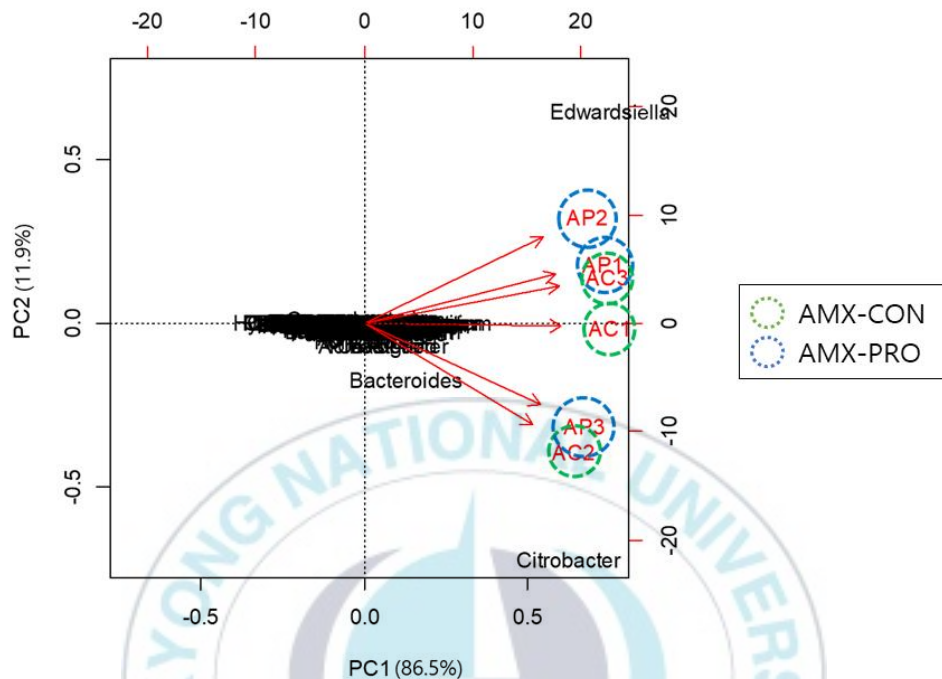


Fig. 11. AMX-CON(AC1-AC3, green dashed circles) and AMX-PRO(AP1-AP3, blue dashed circles) comparisons were made the difference in organism composition was measured according to bray-curtis distance and principal component analysis (PCA) was performed using the beta diversities.

3.3.2. 넙치 장내 미생물의 군집 분석

본 연구에서는 대부분의 OTU가 *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* 및 *Actinobacteria*에 속하는 것이 확인되었다. 어류 장내 미생물에 대한 항생제의 영향을 조사하기 위해 진행된 Exp. 1에서는 CON그룹에 비해 AMX그룹에서 전체적인 abundance가 낮은 값을 나타내었다. 또한 CON그룹에서 *Proteobacteria*가 매우 풍부하였으나 항생제를 처리한 AMX그룹에서는 *Proteobacteria*의 비율이 줄어들고 다른 phyla(*Firmicutes*, *Bacteroidetes*와 *Actinobacteria*)의 비율이 증가하는 경향을 보였다(Fig. 12).

프로바이오틱스가 어류 장내 미생물의 불균형을 개선시킬 수 있는지 알아보기 위해 진행된 Exp. 2에서는 AMX-CON 그룹에 비해 AMX-PRO 그룹에서 전체적으로 abundance가 높은 값을 나타내었다. 또한 AMX-CON 그룹과 비교하여 프로바이오틱스를 투여한 AMX-PRO그룹에서 *Firmicutes*와 *Bacteroidetes*의 비율이 증가하는 경향을 나타내었다(Fig. 13).

각각의 phylum-level에서 주요 10개 과(family)에 대한 abundance 평균값을 나타낸 결과에서 눈에 띄게 나타난 변화는 *Proteobacteria*에서 나타났다. CON에서는 *Proteobacteria*가 약 97.5%로 주로 과(family) *Hafniaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae*, *Moraxellaceae* 및 *Pseudomonadaceae*가 87, 4.2, 3.2, 1.2 및 0.7%로 구성하고 있는 반면 AMX그룹에서는 *Proteobacteria*가 약 67.1%로 감소하였고 주로 과(family) *Enterobacteriaceae*, *Hafniaceae*, *Alcaligenaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Vibrionaceae* 및 *Comamonadaceae*로 구성되었으며 각각 29, 25.9, 2.4, 1.6, 1.2 및 1.1%로 나타났다. 항생제를 처리하였을 때 대체적으로 문(phyla) *Firmicutes*, *Bacteroidetes*와 *Actinobacteria*가 증가하는 경향을 보였지만 큰 차이는 확인할 수 없었다(Fig. 14).

AMX-CON그룹에서는 *Proteobacteria*가 약 77.4%로 *Hafniaceae*와 *Enterobacteriaceae*는 각각 30.5, 34%이며 AMX-PRO 그룹에서는 *Proteobacteria*가 약 68.7%로 각각 37.7, 20.2%로 대조구에 비해 *Enterobacteriaceae*가 낮은 비율을 나타내었다. *Firmicutes*는 주로 과(family) *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Streptococcaceae*, *Oscillospiraceae*, *Eubacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Veillonellaceae*, *Clostridiaceae* 및 *Staphylococcaceae*으로 구성되었으며 AMX-CON그룹은 약 10.1%, AMX-PRO그룹에서는 약 15.7%로 프로바이오틱스를 투여해주었을 때 전체적으로 높은 abundance를 나타냈다. *Bacteroidetes*는 주로 과(family) *Bacteroidaceae*, *Porphyromonadaceae*, *Prevotellaceae*, *Rikenellaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Odoribacteraceae* 및 *Saprospiraceae*로 구성되어있으며 AMX-CON그룹은 약 8.2%, AMX-PRO그룹에서는 약 11.2%로 프로바이오틱스를 처리한 AMX-PRO그룹에서 *Bacteroidaceae*가 6.4%로 대조구(3.4%)에 비해 높은 abundance를 나타내었다. *Actinobacteria*가 주로 과(family) *Propionibacteraceae*, *Mircrococcaceae*, *Corynebacteraceae*, *Bifidobacteriaceae*, *Coriobacteriaceae*, *Nocardiaceae* 및 *Dietziaceae*로 구성되어있으며 AMX-CON그룹에서 약 3.62%, AMX-PRO그룹에서는 약 3.3%이며, 이 중 제일 풍부한 *Propionibacteraceae*에서 각각 2.1, 1.2%로 나타났다(Fig. 15).

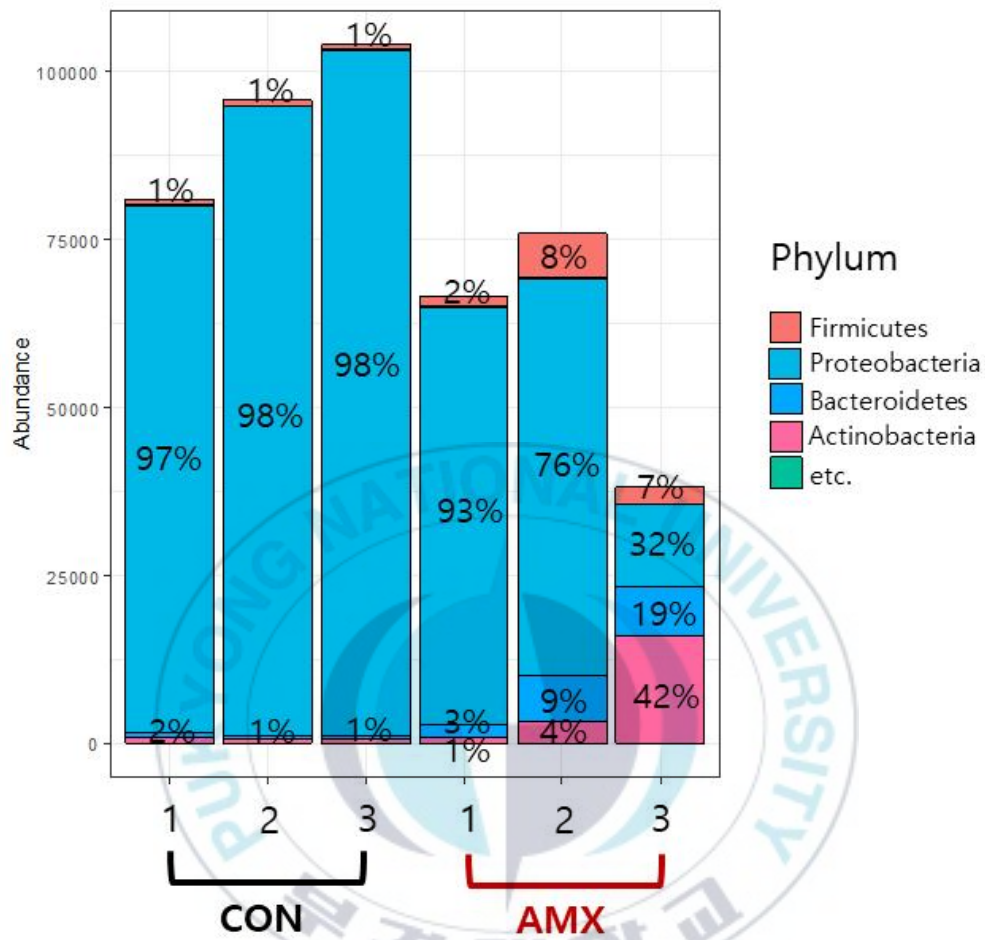


Fig. 12. Bacterial abundance at the phylum level retrieved from the mucus of fish in CON and AMX groups.

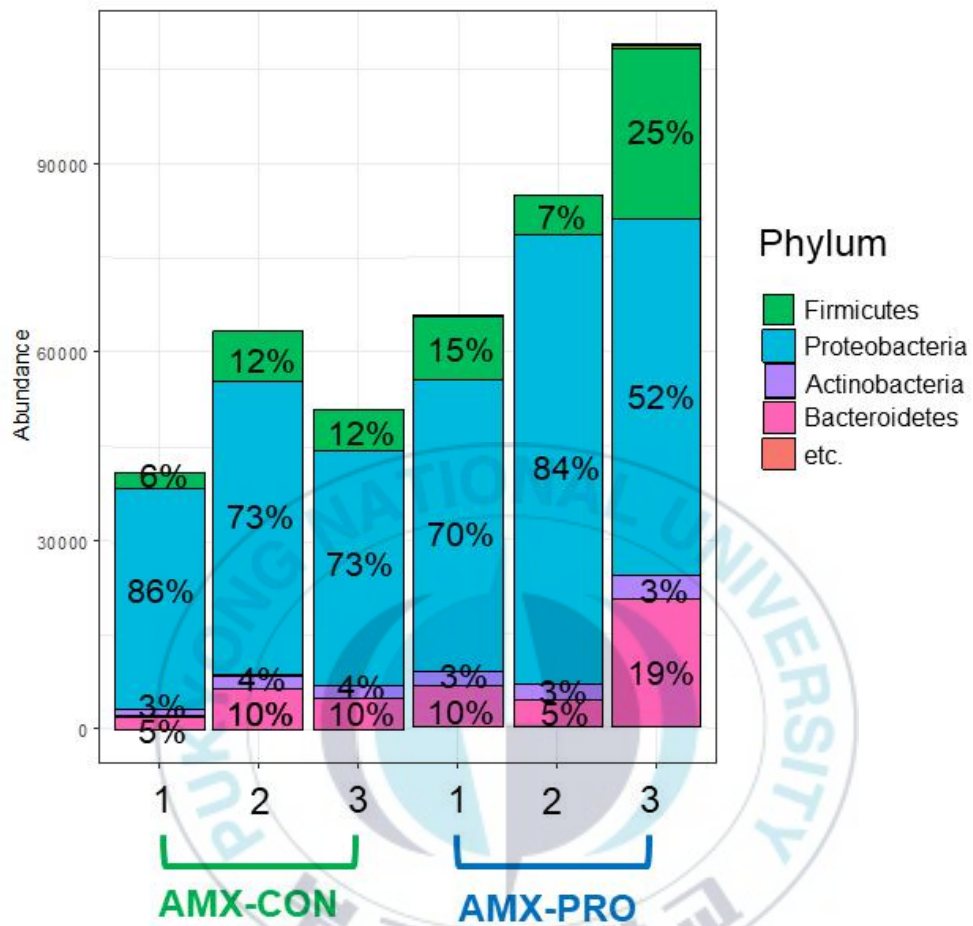


Fig. 13. Bacterial abundance at the phylum level retrieved from the mucus of fish in AMX-PRO and AMX-CON groups.

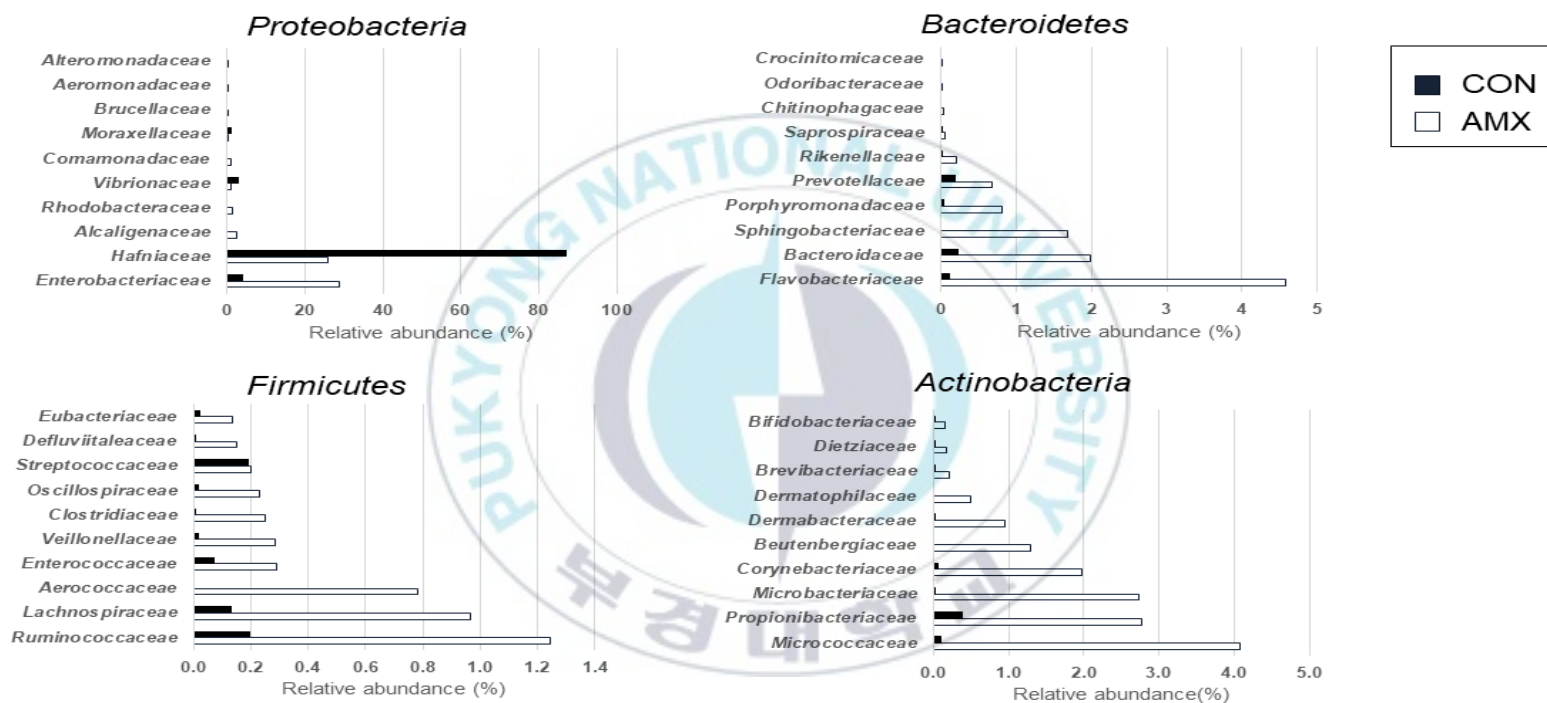


Fig. 14. Taxonomic compositions of bacterial communities. Relative abundance of up to 10 top most family-level of each phyla in the CON and AMX groups was plotted.

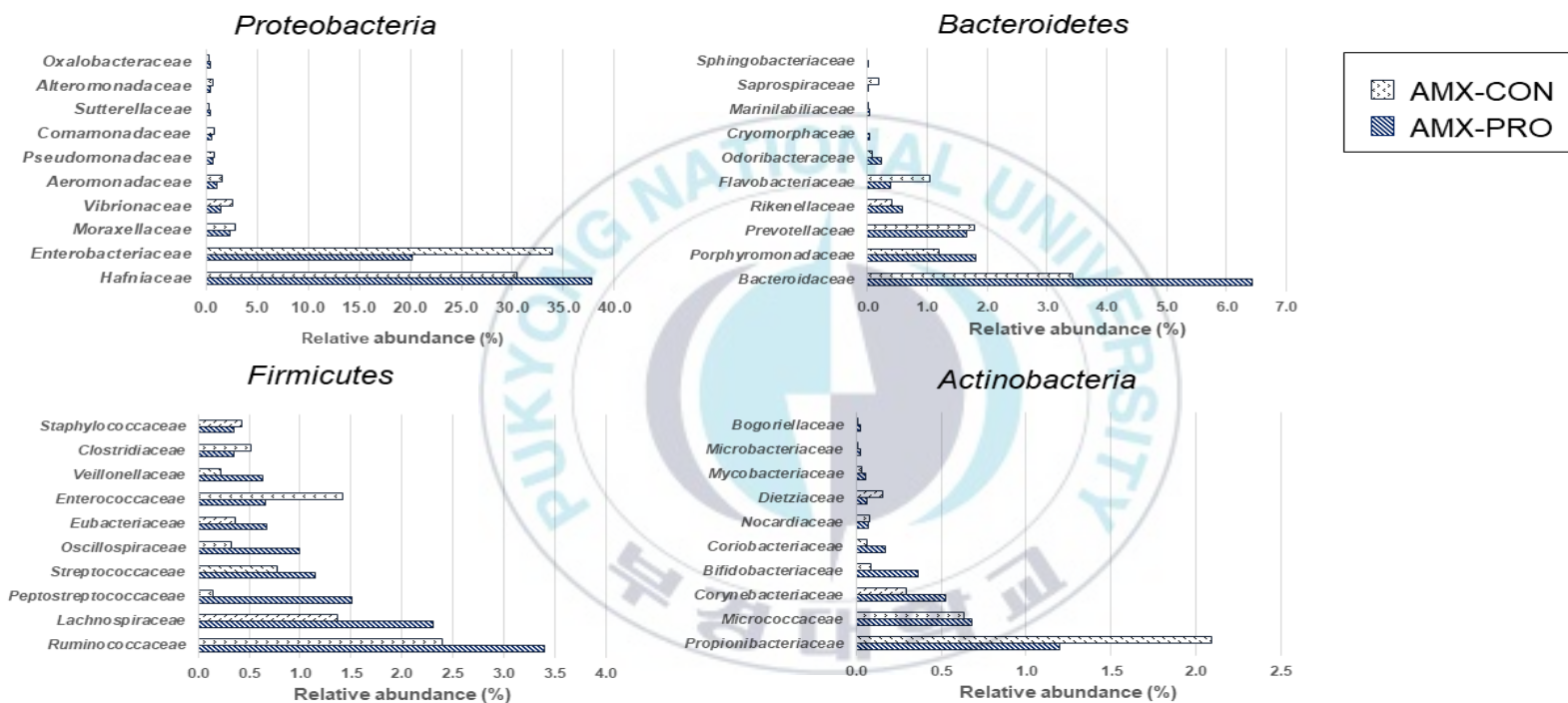


Fig. 15. Taxonomic compositions of bacterial communities. Relative abundance of up to 10 top most family-level of each phyla in the AMX-CON and AMX-PRO groups was plotted.

4. 고찰

이 연구의 목적은 항생제의 투여로 인한 어류 장내 미생물 군집의 변화를 이해하고 프로바이오틱스의 투여가 항생제에 의해 일어난 미생물 군집의 변화에 어떤 영향을 일으키는지를 조사하는 것이었다. *Edwardsiella piscicida*로 재분류된 *E. tarda* (Abayneh et al., 2013)는 어류의 주요 세균성 질병으로 안구 돌출, 지느러미 및 피부의 점상 출혈 등이 나타나며 직장 탈장과 같은 심각한 장 질환을 유발하는 것으로 알려져 있다(Park et al., 2012; Beck et al., 2016). *E. piscicida*는 소화관에 심각한 염증을 유발하며(Beck et al., 2016), 장관이 이 병원체의 입구(portal of entry) 중 하나이기 때문에 경구투여시 장내 미생물 군집에 영향을 줄 수 있으며 dysbiosis 또한 일으킬 수 있다고 판단하여 본 연구에 사용되었다.

Exp. 1에서 아목시실린을 경구 투여하였을 때 녀치의 장내 미생물의 수는 다소 감소하는 경향을 보였다. Exp. 2에서는 항생제 투여 후 프로바이오틱스를 먹인 구간에서 장내 미생물의 수가 대조구에 비해 빨리 회복되는 경향을 나타냈다. 이러한 결과는 프로바이오틱스가 장내 미생물의 환경과 구성에 보다 많은 영향을 일으킬 수 있다는 것을 시사하고 있다. 일반적으로 어류의 장관에 우점적인 미생물은 *Proteobacteria*, *Fimicutes*, *Bacteroidetes* 및 *Actinobacteria* 문(phylum)에 속하는 것으로 알려져 있다(Sullam et al., 2012; Volkoff and Butt, 2019). *Proteobacteria*는 모든 해양 어류에 존재한다. 잡식성 어종의 장내 미생물 군집은 육식성 어종의 장내 미생물 군집 보다 계통발생학적으로 좀 더 다양하다고 알려져 있다(Ghanbari et al., 2015). 이전 연구(Desai et al., 2012)에 의하면 어류의 주요 단백질 공급원인 어분을 무지개송어에 급여하였을 때 *Proteobacteria*가 우점적인 그룹으로 나타났으며 이는 본

연구 결과와 일치하였다. Sugita et al.(2002)는 일본 넙치의 장내에서 *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *coryneforms*, *Enterobacteriaceae*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Vibrio-swarmer* 및 *Vibrio-others*를 포함한 12 종의 family 그룹이 나타났다고 보고하였으며 이러한 결과는 본 연구 결과와 유사하였다.

일반적으로 항생제를 섭취한 어류의 장내 미생물총의 구성은 특정 세균 그룹의 증가 또는 감소 등에 의해 변화가 나타난다고 알려져 있다. 예를 들어, pacu (*Piaractus mesopotamicus*)에 florfenicol을 처리하였을 때 *Klebsiella*, *Plseiomonas* 및 *Citrobacter*와 같은 *Enterobacteriaceae*가 크게 증가하였다(Sáenz et al., 2019). 이번 연구에서는 항생제 투여후 프로바이오틱스를 처리한 구간에서는 대조구에 비해 *Enterobacteriaceae*가 감소되는 경향을 보였다(Fig. 15). 그 외에 아목시실린을 투여한 구간에서 *Proteobacteria* 문(phylum)의 *Hafniaceae* 과(family)의 *Edwardsiella* 속(genus) 세균의 수가 크게 감소하는 반면 *Enterobacteriaceae*의 *Citrobacter* 속의 세균이 크게 증가하는 경향을 보였다. 일반적으로 *Citrobacter*는 베타-락탐계와 테트라사이클린 계열 항생제에 대해 내성을 가진다고 보고되었다(Nawaz et al., 2008; Poirel et al., 2011). 이 속(genus)에 속하는 일부 종, 특히 무지개송어(Duman et al., 2017)와 *Garra rufa obtuse*(Baeck et al., 2009)에 질병을 일으킨다고 보고된 바 있다. 또한, 이 속(genus)에 속한 *C. gillanii*과 *Citrobacter* sp.는 amphenicols 계열 및 테트라사이클린의 항생제를 포함한 다양한 약제에 내성이 있다고 보고되었는데(Askarian et al., 2006), 이는 이들 세균종이 지니는 efflux pump와 *sulI*, *tetA* 및 *tetB* 등에 의한 것으로 알려져 있다(Duman et al., 2017).

Firmicutes 문에 속하는 세균 그룹이 넙치 장내 미생물 중 두 번째로

많이 차지하였으며 항생제 사용 후 프로바이오틱스를 투여하였을 때 더욱 증가하는 경향을 보였다. 프로바이오틱스를 투여한 그룹에서 주요 과(family)인 *Ruminococcaceae*에서 *Faecalibacterium*속과 *Oscillibacter*속이 주요 속(genus)으로 나타났다. *Bacteroidetes*는 아목시실린을 처리하였을 때 과(family) *Flavobacteriaceae*, *Bacteroidaceae*, *Sphingobacteriaceae*, *Porphyromonadaceae*, *Prevotellaceae* 및 *Rikenellaceae*가 증가하였으며 그 중에서도 *Flavobacteriaceae*가 제일 큰 비중을 차지하는 과(family)로 나타났으며 그 중 *Flavobacterium* sp., *Flavobacterium psychrophilum*이 증가하는 경향을 보였다. *Flavobacterium*은 그람음성균으로 다양한 환경에서 발견되며 특히 면역력이 약화되었을 때 기회성 병원체로 작용할 수 있다고 보고된다(Bernardet et al., 1996). KUM, Cavit, et al. (2008)에 의하면 무지개송어에서 분리된 *Flavobacterium psychrophilum*에 대한 amoxicillin - clavulanic acid의 resistant는 90%로 매우 높은 저항성을 나타내었다. Ngo et al. (2018)의 연구에서도 *Flavobacterium psychrophilum*에 대한 amoxicillin의 non-wild type 비율(%)은 32%로 나타났으며 무지개송어 치료제로 사용 시 효과가 미미하다고 보고하였다 이러한 결과들로 미루어 볼 때 본 실험에서 아목시실린을 투여하였을 때 어류의 장관 내에서 아목시실린에 대한 내성을 가진 *Flavobacterium* 속(genus) 세균의 유의미한 증가에 의해 해당 그룹의 비중이 높아진 것으로 생각된다.

본 연구에서 프로바이오틱스를 투여한 그룹에서 *Bacteroidetes* 문(phyla)에 속하는 세균 종이 크게 증가하는 경향을 나타내었다. 특히, *Porphyromonadaceae*, *Prevotellaceae* 및 *Rikenellaceae* 등의 과(family)에 속하는 세균이 증가하였다. *Bacteroidetes*는 동물의 정상 미생물군에서 발견되며 공생균으로 다량류와 단백질의 형태와 같은 복잡한 유기물질을 분해하는 유익한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Church, 2008). 장내

존재하는 *Bacteroidetes*는 일반적으로 향미생물성의 특성이 있는 것으로 여겨지는 butyrate를 생산하며 이는 건강한 장을 유지하는 데 좋은 영향을 주는 것으로 알려져 있다(Thomas et al., 2011). 어류에 대한 butyrate의 영향에 관한 연구는 미비하나 넙치의 장 건강에도 긍정적인 영향을 줄 수 있을 것으로 보인다.

CON 그룹에 비해 AMX 그룹에서 *Actinobacteria*에 속하는 과(family) *Micrococcaceae*, *Propionibacteriaceae*, *Microbacteriaceae*, *Corynebacteriaceae*, *Beutenbergiaceae*, *Dermabacteraceae*, *Dermatophilaceae*, *Brevibacteriaceae*, *Dietziaceae* 및 *Bifidobacteriaceae* 과(family)에 속한 세균이 증가하는 경향을 나타내었다. AMX-CON 그룹과 비교하여 AMX-PRO 그룹에서 *Actinobacteria*에 속하는 과(family) *Micrococcaceae*, *Corynebacteraceae*, *Bifidobacteriaceae* 및 *Coriobacteriaceae*가 크게 증가하였다. 이는 항생제 투여 후 프로바이오틱스를 첨가하였을 때 장내 미생물의 풍부도 및 다양성이 대조구에 비해 더 빨리 증가하였다. AMX-PRO 그룹에서 주요 미생물군인 *Hafniaceae*가 다소 증가하고 *Enterobacteriaceae*가 감소하는 것은 대조군의 미생물군집과 유사한 구성으로서 프로바이오틱스의 투여가 대조군과 유사한 군집 구성으로 복원되는 경향성을 보이는 것으로 생각된다. 그러나 여기에 대한 보다 면밀한 추가 연구가 진행되어야 할 것으로 보인다.

서론에 이미 언급하였듯이 동물의 장내 미생물은 소화기 항상성과 건강에 중요한 역할을 할 것으로 판단된다. 어류의 위장 내 미생물의 집락화, 구성 및 다양성의 형성은 복잡한 과정으로 식이 및 환경 등에 따라 미생물 조성에 반영되며 매우 밀접한 관계가 있다(Sullam et al., 2012). 어류의 장내 점막에 부착하고 있는 미생물은 경쟁적

배재(competitive exclusion)를 통해 질병 발생을 예방하는데 중요한 역할을 한다(Williams and Vickers, 1986; Tinh et al., 2007; Desriac et al., 2010). 그러나 항생제와 같은 물질이 수생동물의 소화관에 들어가면 우점하고 있는 장내 미생물에 영향을 미치고 잠재적인 병원성 미생물에 대한 감수성을 증가시킬 수 있다(He et al., 2017). 건강한 미생물군에서 프로바이오틱스의 첨가는 상주 미생물 개체군에 쉽게 영향을 주지 않지만 dysbiosis를 나타내는 상황에서 프로바이오틱스의 투여는 장내 microbiome 재형성에 상당한 영향을 미칠 수 있다고 하였다(Grazul et al., 2016). 본 연구는 항생제 투여로 인해 손상될 수 있는 미생물 군집의 구성을 재빨리 회복하는데 있어 프로바이오틱스의 영향을 조사하는 것이었으며, 결론적으로 미생물의 수와 군집의 다양성을 빨리 증가시키는데 도움을 주는 것으로 나타났다. 항생제 치료 후 장내 미생물군은 사용된 항생제 종류에 따라 신속하게 회복되거나 장기간동안 회복되지 않고 지속될 수 있으며(Grazul et al., 2016), 숙주의 장내 미생물군의 불균형(dysbiosis)을 일으켜 장건강에 부정적인 결과를 초래할 수 있다. 본 연구에서 아목시실린 항생제를 투여하였을 때 *Enterobacteriaceae*가 가장 크게 증가하여 미생물 군집의 불균형을 나타내는 경향을 보였으며, 프로바이오틱스의 투여시 *Enterobacteriaceae*의 비율이 다소 감소하고 미생물 군집의 다양성과 세균수가 확연히 증가되는 것을 확인하였다. 기존의 프로바이오틱스 관련 연구가 특정 질병에 대한 저항성과 면역반응의 향상에 초점이 맞추어져 있었다면, 본 연구는 프로바이오틱스가 어류의 장건강에 미치는 영향을 이해하므로써 보다 다양한 시각에서 이를 적용할 수 있다는 것을 나타내고 있다. 향후 연구에서는 프로바이오틱스에 의한 보다 면밀한 미생물 군집의 변화를 이해하고 보다 뚜렷한 dysbiosis가 일어나 개체에 나타나는 영향을 조사해야 할 것으로 판단된다.

5. 결론

결론적으로 항생제를 사용하면 dysbiosis를 유도하고 기회감염을 일으킬 확률이 높아져서 어류 건강에 악영향을 미칠 수 있다. 그럼에도 불구하고 항생제의 사용이 불가피한 경우 항균제 투여 후 프로바이오틱스의 사용은 소화관 미생물의 풍부 성과 다양성을 증가시킴으로써 어류의 장 건강을 향상시킬 수 있으므로 좋은 선택이 될 수 있다. 프로바이오틱스는 항생제 치료 후 어류의 장내 미생물 군집에 유익한 영향을 줄 수 있는 중요한 능력을 가지며 어류 장내 미생물의 면역 강화의 방안으로 이용될 수 있을 것으로 생각된다.



보충정보

Table S1. *Streptococcus parauberis* strains used in this study.

Isolate code	Isolation source	Isolation location	Isolation year
KSP44(J14)	olive flounder	Jejudo	1999
KSP45	olive flounder	Jejudo	1999
KSP46	olive flounder	Jejudo	1999
KSP47	olive flounder	Gyeongsangbukdo	1999
KSP1	olive flounder	Jejudo	2003
KSP2	olive flounder	Jejudo	2003
KSP3	olive flounder	Jejudo	2003
KSP4	olive flounder	Jejudo	2003
KSP5	olive flounder	Jejudo	2004
KSP6	olive flounder	Jejudo	2004
KSP7	olive flounder	Jejudo	2004
KSP8	olive flounder	Jejudo	2004
KSP9	olive flounder	Jejudo	2004
KSP10	olive flounder	Jejudo	2004
KSP11	olive flounder	Jejudo	2005
KSP12	olive flounder	Jejudo	2005
KSP13	olive flounder	Jejudo	2005
KSP14	olive flounder	Jejudo	2005
KSP15	olive flounder	Jejudo	2005
KSP16(12046)	olive flounder	Jejudo	2005
KSP17	olive flounder	Jejudo	2005
KSP18(12049)	olive flounder	Jejudo	2005
KSP19	olive flounder	Jejudo	2005
KSP20(12051)	olive flounder	Jejudo	2005
KSP21	olive flounder	Jejudo	2005
KSP22	olive flounder	Haenam	2005
KSP23	olive flounder	Haenam	2005
KSP24	olive flounder	Wando	2005
KSP25	olive flounder	Wando	2005
KSP26	olive flounder	Wando	2005
KSP27	olive flounder	Wando	2005
KSP28	olive flounder	Wando	2005
KSP29	olive flounder	Wando	2005

KSP30	olive flounder	Wando	2005
KSP31	olive flounder	Wando	2005
KSP32	olive flounder	Wando	2005
KSP33	olive flounder	Wando	2005
KSP34	olive flounder	Wando	2005
KSP35	olive flounder	Wando	2005
KSP36	olive flounder	Wando	2005
KSP37	olive flounder	Wando	2005
KSP38	olive flounder	Wando	2005
KSP39	olive flounder	Wando	2005
KSP40	olive flounder	Wando	2005
KSP41	olive flounder	Wando	2005
KSP42	olive flounder	Wando	2005
KSP43	olive flounder	Wando	2005
PH0710	Starry flounder	Pohang	2007
PH0711	Starry flounder	Pohang	2007
SpOF 3k	olive flounder	Geojedo	2013
04151K	Olive flounder	Geojedo	2013
04162K	Olive flounder	Geojedo	2013
HFTC0023	Olive flounder	Pohang	2014
HFTC0059	Olive flounder	Pohang	2014
HFTC0060	Olive flounder	Pohang	2014
HFTC0063	Olive flounder	Pohang	2014
HFTC0064	Olive flounder	Pohang	2014
HFTC0076	Starry flounder	yeongdeok	2014
HFTC0083	Starry flounder	Yeongdeok	2015
HFTC0086	Starry flounder	uljin	2015
HFTC0091	Starry flounder	uljin	2015
HFTC0157	Starry flounder	Pohang	2015
HFTC0237	Starry flounder	yeongdeok	2015
SPOF18J1	Olive flounder	Jejudο	2018
SPOF18J2	Olive flounder	Jejudο	2018
SPOF18J3	Olive flounder	Jejudο	2018
SPOF18J4	Olive flounder	Jejudο	2018
SPOF18J5	Olive flounder	Jejudο	2018
SPOF18J6	Olive flounder	Jejudο	2018
SPOF18J7	Olive flounder	Jejudο	2018

SPOF18J8	Olive flounder	Jejudo	2018
SPOF18J9	Olive flounder	Jejudo	2018
SPOF18J10	Olive flounder	Jejudo	2018
SPOF18J11	Olive flounder	Jejudo	2018
SPOF18G1	Starry flounder	uljin	2018



Table S2. *Edwardsiella piscicida* strains used in this study.

Isolate code	Isolation source	Isolation location	Isolation year
KE2	olive flounder	Pohang	1999
KE5	olive flounder	Geojedo	1999
KE6	olive flounder	Pohang	1999
KE1	olive flounder	Pohang	2000
KE4	olive flounder	Jejudo	2000
KE3	turbot	Pohang	2002
ET1FL	olive flounder	Busan	2002
ET2FL	olive flounder	Unknown	2003
ET3FL	olive flounder	Unknown	2003
ET4FL	olive flounder	Unknown	2003
ET5FL	olive flounder	Jejudo	2003
ET6FL	olive flounder	Jejudo	2003
ET7FL	olive flounder	Unknown	2003
ET9FL	olive flounder	Unknown	2003
ET11FL	olive flounder	Unknown	2003
ET12FL	olive flounder	Wando	2003
ET18FL	olive flounder	Unknown	2003
ET19FL	olive flounder	Unknown	2003
ET20FL	olive flounder	Unknown	2003
ET10FL	olive flounder	Unknown	2004
ET13FL	olive flounder	Wando	2004
ET15FL	olive flounder	Haenam	2004
ET16FL	olive flounder	Unknown	2004
ET17FL	olive flounder	Unknown	2004
ETW11	Eel pond water	Wando	2011
EET31	Japanese eel	Haman	2011
EET32	Japanese eel	Haman	2011
EET33	Japanese eel	Haman	2011
EET34	Japanese eel	Haman	2011
EET35	Japanese eel	Haman	2011
ETW41	Eel pond water	Naju	2011
ETW43	Eel pond water	Wando	2011
ETW46	Eel pond water	Wando	2011
EET51	Japanese eel	Haman	2011
EET52	Japanese eel	Haman	2011
EET53	Japanese eel	Haman	2011
EET54	Japanese eel	Haman	2011
EET63	Japanese eel	Wando	2011
EET64	Japanese eel	Choongju	2011
Y-catfish K	catfish	Unknown	2012
KEPF	olive flounder	Jejudo	2017
KEPH	olive flounder	Jejudo	2017
KEPHH	olive flounder	Jejudo	2017
KEPSet	olive flounder	Jejudo	2017

KEPHet	olive flounder	Jejudo	2017
KEPD	olive flounder	Jejudo	2017
KEPep	olive flounder	Jejudo	2018
KEPICet	olive flounder	Jejudo	2018
KEPSD	olive flounder	Jejudo	2018
KEPHM	olive flounder	Jejudo	2018
KEPA	olive flounder	Jejudo	2018
KEPHL	olive flounder	Jejudo	2018
KEPJ	olive flounder	Jejudo	2018
KEPW	olive flounder	Jejudo	2018



Table S3. *Aeromonas salmonicida* strains used in this study.

Isolate code	Isolation source	Isolation location	Isolation year
RFAS1	Black rockfish	Geomundo	2008
RFAS2	Black rockfish	Geomundo	2009
RFJv 1S	Black rockfish	southern sea	2010
RFJv 3K	Black rockfish	southern sea	2010
AsRF-Nam1	Black rockfish	southern sea	2010
AsRF-Nam2	Black rockfish	southern sea	2010
AsRF-MP1	Black rockfish	Mokpo	2010
AsRF-MP2	Black rockfish	Mokpo	2010
AsRF K u	Black rockfish	Unknown	2010
AsRF S u	Black rockfish	Unknown	2010
AsRF-Nam3	Black rockfish	southern sea	2010
AsRF-Nam4	Black rockfish	southern sea	2010
AsRF-MP3	Black rockfish	Mokpo	2010
ASRF-MP4	Black rockfish	Mokpo	2010
AsRF-HS1	Black rockfish	Heuksando	2011
AsSB-HS	Sea bass	Heuksando	2011
AsRF-HS2	Black rockfish	Heuksando	2011
AsRF-HS3	Black rockfish	Heuksando	2011
AsRF-GM1	Black rockfish	Geomundo	2012
AsRF-GM2	Black rockfish	Geomundo	2012
AsLF 1	gizzard shad	Unknown	2012
AsLF 2	small yellow croaker	Unknown	2012
AsLF 3	small yellow croaker	Unknown	2012
AsRF-Nam5	Black rockfish	southern sea	2012
AsRF-Nam6	Black rockfish	southern sea	2012
AsLF 4	anchovy	Unknown	2012
AsLF 5	small yellow croaker	Unknown	2012
AsRF-GM3	Black rockfish	Geomundo	2012
AsRF-GM4	Black rockfish	Geomundo	2012
AsRF-GM5	Black rockfish	Geomundo	2012
AsRF-GM6	Black rockfish	Geomundo	2012
AsLF 6	unknown	Unknown	2012
AsLF 7	unknown	Unknown	2012
AsLF 8	unknown	Unknown	2012
AsRF-Nam7	Black rockfish	southern sea	2012
AsRF-Nam8	Black rockfish	southern sea	2012
AsRF-GM7	Black rockfish	Geomundo	2012
AsRF-GM8	Black rockfish	Geomundo	2012
AsRF-Nam9	Black rockfish	southern sea	2012
AsRF-Nam10	Black rockfish	southern sea	2013

18RT01	Rainbow trout	Gangwondo	2018
18RT02	Rainbow trout	Gangwondo	2018
18RT03	Rainbow trout	Gangwondo	2018



Table S4. *Vibrio harveyi* strains used in this study.

Isolate code	Isolation source	Isolation location	Isolation year
FR1	Black rockfish	Gyeongsangdo	1999
FR2	Olive flounder	Busan	1999
FT1	Turbot	Gyeongsangdo	1999
FF8	Olive flounder	Gyeongsangdo	1999
FF10	Olive flounder	Gyeongsangdo	1999
Vh8FL	Olive flounder	Seocheon	2000
Vh4mu	Mullet	Unknown	2000
Vh 28	Unknown	Unknown	2001
Vh 1	Unknown	Unknown	2004
Vh 3	Mullet	Unknown	2004
Vh 4	Olive flounder	Jejudo	2004
Vh 8	Unknown	Unknown	2004
Vh 19	Rock bream	Namhae	2004
Vh 20	Black rockfish	Namhae	2004
Vh 21	Mullet	Namhae	2004
Vh 13	Black rockfish	Unknown	2005
Vh 14	Black sea bream	Unknown	2005
Vh 16	Olive flounder	Unknown	2005
Vh 18	Red seabream	Unknown	2005
Vh17RB	Rock bream	Southern sea	2005
Vh21FL	Olive flounder	Pohang	2005
Vh19mu	Mullet	Southern sea	2005
Vh Dae1-1M	Olive flounder	Unknown	2009
Vh21M1	Mullet	Unknown	2009
SG 16-a	Searobin Gurnard	Yeosu	2010
Ce 15-b	Conger eel	Yeosu	2010
St 11-1-a-an	Stripey	Yeosu	2010
St 11-1-a	Stripey	Yeosu	2010
SW 9-2-a	Saddled weever	Yeosu	2010
RF 18-a	black rockfish	Yeosu	2010
RaB 3-1-b	Multicolorfin	Yeosu	2010

	rainbowfish		
Dam 2-1-a	Damselfish	Yeosu	2010
Ts 4-2-a	Thread-sail filefish	Yeosu	2010
N8BM-7	Olive flounder	Unknown	2010
St K1-2S	Stripey	Jejudo	2011
RSB I2-4bK	Red seabream	Jejudo	2011
Gam H1-1b K	G r e a t e r amberjack	Tongyeong	2011
YT J2-1bS	Yellowtail	Tongyeong	2011
Cl 6-S-a	Clownfish	Unknown	2011
RF Q1-1K	Damselfish	Wando	2012
RSB Q3-3K	Red seabream	Wando	2012
RF Q2-2K	Black rockfish	Wando	2012
RFHW 1ka	Black rockfish	Namhae	2012
RFHW 1kb	Black rockfish	Namhae	2012
RFHW 2k	Black rockfish	Namhae	2012
RFHW 3ka	Black rockfish	Namhae	2012
RFHW 3kb	Black rockfish	Namhae	2012
AP 1Lb	northern sand lance	Namhae	2012
AP 6L	northern sand lance	Namhae	2012
AP 9L	northern sand lance	Namhae	2012
VhER1	Eagle ray	Yeosu	2013
VhSR1	Shark ray	Yeosu	2013
VhGT1	Golden travelly	Yeosu	2013
VhZS1	Zebra shark	Yeosu	2013
CFVh1	Clownfish	Busan	2018
CFVh2	Clownfish	Busan	2018
CFVh3	Clownfish	Busan	2018

Table S5. *Photobacterium damsela* strains used in this study

Isolate code	Isolation source	Isolation location	Isolation year
FP2235	olive flounder	Pohang	2004
FP2237	olive flounder	Pohang	2004
FP4137	olive flounder	Jejudo	2004
FP2137	olive flounder	Ulsan	2004
FP2244	olive flounder	Pohang	2004
FP4101	olive flounder	Jejudo	2004
FP3047	olive flounder	Ulsan	2004
FP3040	olive flounder	Ulsan	2004
FP2261	olive flounder	Jejudo	2005
FP2260	olive flounder	Jejudo	2005
FP3092	olive flounder	Ulsan	2005
FP3095	olive flounder	Ulsan	2005
FP3099	olive flounder	Ulsan	2005
P.d4 mu	gray mullet	Tongyeong	2005
FP3348_1	olive flounder	Pohang	2007
FP3392	olive flounder	Pohang	2007
FP8044	olive flounder	Jejudo	2008
FP3348_2	olive flounder	Pohang	2008
FP3525	olive flounder	Pohang	2008
N8ATC-1	olive flounder	southern sea	2008
EP8-17	olive flounder	southern sea	2008
FP3737	olive flounder	Pohang	2009
FP3738	olive flounder	Pohang	2009
FP3739	olive flounder	Pohang	2009
FP3741	olive flounder	Pohang	2009
FP3755	olive flounder	Ulsan	2009
FP8482	olive flounder	Wando	2010
FP8485	olive flounder	Wando	2010
Dam 2-3-a	damselfish	Yeosu	2010
Gi 23-a	gizzard fish	Yeosu	2010
OF G2-1aS	olive flounder	Jejudo	2011

YT I4-1aS	Yellow tail	Jejudo	2011
YT J1-3aS	Yellow tail	Tongyeong	2011
PdRF-2nd	Black rockfish	Geomundo	2011
PdRF-3rd	Black rockfish	Geomundo	2011
RSB Q3-2S	Red sea bream	Wando	2012
RSB R1-8cS	Red sea bream	Wando	2012
RB R2-2K	Rock bream	Wando	2012
SBe S3-3K	S p o t t y b e l l y greenling	Wando	2012
PdSR I b	shark ray	Yeosu	2013
PdER I a	eagle ray	Yeosu	2013
PdZe sh	zebra shark	Yeosu	2013
PdRF-02S	Black rockfish	open sea	2014
PdRF-04K	Black rockfish	open sea	2014



국문 요약

어병세균종에 대한 Epidemiological cut-off value의 설정과 어류 장관
마이크로바이옴에 대한 항생제와 프로바이오틱스의 영향

천 원 경

부 경 대 학 교 대 학 원 수 산 생 명 의 학 과

항생제의 사용은 양식장에서 세균성 질병을 치료하는 가장 보편적인 방법 중 하나이다. 그러나 항생제의 남용은 항생제 내성 박테리아의 출현뿐만 아니라 잔류물의 축적으로 이어질 수 있다. 이 연구의 목표는 이 연구에서 확립된 역학 컷오프(ECOFF) 값에 기초하여 여러 가지 세균성 어류 병원체의 비야생형 분포를 분석하는 것이다. 또한, 넙치의 장내 미생물의 변화에 대한 항생제 및 프로바이오틱스 투여의 효과는 차세대 시퀀싱을 사용하여 결정되었다. *Streptococcus parauberis*, *Edwardsiella piscicida*, *Vibrio harveyi*, *Aeromonas salmonicida* 및 *Photobacterium damsela*의 수십개 균주들을 사용하여 국제 프로토콜을 기반으로 한 항생제 감수성 테스트를 수행하였다. 이 연구에서 항생제 디스크 확산 검사의 해석기준으로 사용할 수 있는 다양한 항생제에 대해 각 어류 병원체에 대해 ECOFF 값을 설정하였다. *S. parauberis*와 *E. piscicida*의 최근 균주는 많은 항생제에 대해서 비야생형(NWT)이 되는 경향이 있다. *V. harveyi*의 경우, 양식 어류에서 유래한 균주는 야생에서 파생된 균주에 비해 여러 항생제에 대한 NWT으로 나타나는 경향이 있다. 또한 넙치에 21일 동안 아목시실린을 투여하거나 투여하지 않은 사료를 급여하였다. 또한 비야생형(NWT)의 *E. piscicida*로 경구투여한 어류에는 프로바이오틱스 균주를 사용하거나 사용하지 않은 사료를 이용하였다. 장내 microbiota의 변화는 다른 시점에서 조사되었다. 이 연구에서 아목시실린은 어류 장관 미생물의 불균형(dysbiosis)을 유발하는 것으로 보인다. 프로바이오틱스의 투여는 미생물 다양성을 증가시킬 수 있으며, 이는 어류의 미생물 균형을 개선함을 나타낸다.

감사의 글

먼저 석사과정을 진행하면서 미숙하고 부족한 저에게 석사학위 논문을 무사히 마칠 수 있도록 성심성의껏 지도해주시고 아낌없는 가르침과 조언과 함께 이끌어 주신 김도형 지도교수님께 깊은 존경과 감사를 드립니다. 바쁘신 가운데에도 학위 논문의 심사위원을 맡아주신 정현도 교수님과 정준기 교수님께도 감사드립니다. 그리고 세심한 지도와 많은 가르침을 주신 김기홍 교수님, 강주찬 교수님, 허민도 교수님께 감사드립니다. 학부과정부터 많은 가르침을 주시고 격려해주신 박찬일 교수님께도 감사드립니다. 처음 저에게 연구에 대해 가르쳐주시고 저를 위해 애정 어린 조언을 해 주신 황성돈 박사님께 큰 감사를 드립니다.

가족과 같은 우리 어병예방학 실험실 식구들에게 감사의 인사를 드립니다. 처음 연구를 시작할 때 도움을 주고 졸업하신 Luan과 임윤진에게 감사드립니다. 실험실 생활에 많은 도움을 준 아란 누나, 남은 누나, 형진이에게 감사드립니다. 그리고 석사학위 과정 동기 윤항이, THO에게 감사의 인사를 전합니다. 석사과정 중인 동빈이, 지연이, 주엽이, 윤재, 유라, 준우, 석사과정을 곧 시작하는 은아에게도 감사드립니다. 실험실 생활하면서 힘든 순간도 있었지만, 실험실 식구들이 있어 덕분에 매 순간 즐겁고 행복했습니다. 너무 고맙고 항상 응원하겠습니다.

저에게 늘 많은 도움을 주시고 따뜻함으로 맞아주신 김보성 형님과 준성이를 비롯한 분질공 식구들, 재영이와 재민이, 통영에 있는 민수와 경상대 식구들에게 감사의 인사를 드립니다. 또한 학위과정 동안 많은 응원을 해준 죽마고우 쌍용편탕과 항상 고마운 영광이형, 태형이형에게 감사의 인사를 전합니다. 그리고 희성형을 비롯한 과학원 식구들에게도 진심으로 감사드립니다.

끝으로 한없이 부족한 저를 위해 모든 것을 믿고 아낌없이 지원해주신 부모님과 소현 누나, 쌍둥이 형 창호, 상우에게도 고마운 마음을 전합니다. 이외에도 여기에 미처 적지 못한 많은 분들께 감사드립니다. 이렇게 많은 분들의 도움과 격려가 있어 저에게 큰 힘이 되었습니다. 다시 한번 깊이 감사드립니다.

천원경 드림

참고문헌

- Abayneh, T., Colquhoun, D. J., & Sørum, H. (2012). Multi-locus sequence analysis (MLSA) of *Edwardsiella tarda* isolates from fish. *Veterinary microbiology*, 158(3-4), 367-375.
- Abayneh, T., Colquhoun, D. J., & Sørum, H. (2013). *Edwardsiella piscicida* sp. nov., a novel species pathogenic to fish. *Journal of applied microbiology*, 114(3), 644-654.
- Adams, C. A., Austin, B., Meaden, P. G., & McIntosh, D. (1998). Molecular characterization of plasmid-mediated oxytetracycline resistance in *Aeromonas salmonicida*. *Applied and environmental microbiology*, 64(11), 4194-4201.
- Akinbowale, O. L., Peng, H., & Barton, M. D. (2006). Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. *Journal of Applied Microbiology*, 100(5), 1103-1113.
- Aoki, T., Takami, K., & Kitao, T. (1990). quinquenaria. Dis. Aquat. Org, 8, 171-177.
- Askarian, F., Kousha, A., Salma, W., & Ringø, E. (2011). The effect of lactic acid bacteria administration on growth, digestive enzyme activity and gut microbiota in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) and beluga (*Huso huso*) fry. *Aquaculture Nutrition*, 17(5), 488-497.
- Austin, B., & Zhang, X. H. (2006). *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Letters in applied microbiology*, 43(2), 119-124.
- Avendaño-Herrera, R., Molina, A., Magariños, B., Toranzo, A. E., & Smith, P. (2011). Estimation of epidemiological cut-off values for disk diffusion susceptibility test data for *Streptococcus phocae*. *Aquaculture*, 314(1-4), 44-48.
- Baeck, G. W., Kim, J. H., Choresca Jr, C., Gomez, D. K., Shin, S. P., Han, J. E., & Park, S. C. (2009). Mass mortality of doctor fish (*Garra rufa* obtusa) caused by *Citrobacter freundii* infection. *한국임상수의학회지*,

26(2), 150-154.

- Baeck, G.W., Kim, J.H., Gomez, D.K., Park, S.C., 2006. Isolation and characterization of *Streptococcus* sp. from diseased flounder (*Paralichthys olivaceus*) in Jeju Island. *J. Vet. Sci.* 7, 53–58.
- Balcázar, J. L., De Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., & Muzquiz, J. L. (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary microbiology*, 114(3-4), 173-186.
- Beck, B. R., Song, J. H., Park, B. S., Kim, D., Kwak, J. H., Do, H. K., ... & Song, S. K. (2016). Distinct immune tones are established by *Lactococcus lactis* BFE920 and *Lactobacillus plantarum* FGL0001 in the gut of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish & shellfish immunology*, 55, 434-443.
- Bernardet, J. F., Segers, P., Vancanneyt, M., Berthe, F., Kersters, K., & Vandamme, P. (1996). Cutting a Gordian knot: emended classification and description of the genus *Flavobacterium*, emended description of the family *Flavobacteriaceae*, and proposal of *Flavobacterium hydatidis* nom. nov.(basonym, *Cytophaga aquatilis* Strohl and Tait 1978). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 46(1), 128-148.
- Bernoth, E. M. (1997). Diagnosis of furunculosis: the tools. In *Furunculosis* (pp. 98-158).
- Buján, N., Mohammed, H., Balboa, S., Romalde, J. L., Toranzo, A. E., Arias, C. R., & Magariños, B. (2018). Genetic studies to re-affiliate *Edwardsiella tarda* fish isolates to *Edwardsiella piscicida* and *Edwardsiella anguillarum* species. *Systematic and applied microbiology*, 41(1), 30-37.
- Cabello, F. C. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental microbiology*, 8(7), 1137-1144.
- Cabello, F. C., Godfrey, H. P., Buschmann, A. H., & Dölz, H. J. (2016). Aquaculture as yet another environmental gateway to the development

- and globalisation of antimicrobial resistance. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(7), e127-e133.
- Cani, P. D., Everard, A., & Duparc, T. (2013). Gut microbiota, enteroendocrine functions and metabolism. Current opinion in pharmacology, 13(6), 935-940.
- Carlson, J. M., Leonard, A. B., Hyde, E. R., Petrosino, J. F., & Primm, T. P. (2017). Microbiome disruption and recovery in the fish *Gambusia affinis* following exposure to broad-spectrum antibiotic. *Infection and drug resistance*, 10, 143.
- Cho, M. Y., Lee, J. I., Kim, M. S., Choi, H. J., Lee, D. C., & Kim, J. W. (2008). Isolation of *Streptococcus parauberis* from starry flounder, *Platichthys stellatus* Pallas. *Journal of fish pathology*, 21(3), 209-217.
- Choi, H. J., Cho, M. Y., Lee, J. I., Kwon, M. G., Choi, D. L., Kim, J. W., ... & Lee, D. C. (2009). The pathogenicity of *Streptococcus parauberis* isolated from cultured olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Journal of fish pathology*, 22(3), 263-273.
- Church, M. J. (2008). Resource control of bacterial dynamics in the sea. *Microbial ecology of the oceans*, 335-382.
- CLSI (2006), Methods for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing of Bacteria Isolated From Aquatic Animals; Approved Guideline. CLSI document M42-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania.
- CLSI (2011). Generation, presentation and application of antimicrobial susceptibility test data for bacteria of animal origin; a report. CLSI document X08-R. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute..
- CLSI (2014). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals; Second informational supplement. CLSI document VET03/VET04-S2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, U.S.A.
- Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W., & Bossier, P. (2007).

- Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example. *Trends in biotechnology*, 25(10), 472-479.
- Desai, A. R., Links, M. G., Collins, S. A., Mansfield, G. S., Drew, M. D., Van Kessel, A. G., & Hill, J. E. (2012). Effects of plant-based diets on the distal gut microbiome of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 350, 134-142.
- Desriac, F., Defer, D., Bourgougnon, N., Brillet, B., Le Chevalier, P., & Fleury, Y. (2010). Bacteriocin as weapons in the marine animal-associated bacteria warfare: inventory and potential applications as an aquaculture probiotic. *Marine drugs*, 8(4), 1153-1177.
- Duman, M., Saticioglu, I. B., Buyukekiz, A. G., Balta, F., & Altun, S. (2017). Molecular characterization and antimicrobial resistance profile of atypical *Citrobacter gillenii* and *Citrobacter* sp. isolated from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of global antimicrobial resistance*, 10, 136-142.
- FAO (Food and Agriculture Organization). FAO Aquaculture Newsletter, August 2019 - No. 60. <http://www.fao.org/3/ca5223en/CA5223EN.pdf>
- Faruk, M. A. R., Ali, M. M., & Patwary, Z. P. (2008). Evaluation of the status of use of chemicals and antibiotics in freshwater aquaculture activities with special emphasis to fish health management. *Journal of the Bangladesh Agricultural University*, 6(2), 381-390.
- Farzanfar, A. (2006). The use of probiotics in shrimp aquaculture. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 48(2), 149-158.
- Figueiredo, H. C. P., Costa, F. A. A., Leal, C. A. G., Carvalho-Castro, G. A., & Leite, R. C. (2012). *Weissella* sp. outbreaks in commercial rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Brazil. *Veterinary microbiology*, 156(3-4), 359-366.
- Gao, X. W., Mubasher, M., Fang, C. Y., Reifer, C., & Miller, L. E. (2010). Dose-response efficacy of a proprietary probiotic formula of *Lactobacillus acidophilus* CL1285 and *Lactobacillus casei* LBC80R for

- antibiotic-associated diarrhea and *Clostridium difficile*-associated diarrhea prophylaxis in adult patients. *The American journal of gastroenterology*, 105(7), 1636.
- Gatesoupe, F. J. (2010). Probiotics and other microbial manipulations in fish feeds: prospective health benefits. In *Bioactive Foods in Promoting Health* (pp. 541-552). Academic Press.
- Ghanbari, M., Kneifel, W., & Domig, K. J. (2015). A new view of the fish gut microbiome: advances from next-generation sequencing. *Aquaculture*, 448, 464-475.
- Gómez, G. D., and Balcázar, J. L. (2008). A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 52, 145–154. doi: 10.1111/j.1574-695X.2007.00343.x
- Grazul, H., Kanda, L. L., & Gondek, D. (2016). Impact of probiotic supplements on microbiome diversity following antibiotic treatment of mice. *Gut Microbes*, 7(2), 101-114.
- Grimes, D. J., Brayton, P., Colwell, R. R., & Gruber, S. H. (1985). Vibrios as autochthonous flora of neritic sharks. *Systematic and Applied Microbiology*, 6(2), 221-226.
- Hagi, T., Tanaka, D., Iwamura, Y., & Hoshino, T. (2004). Diversity and seasonal changes in lactic acid bacteria in the intestinal tract of cultured freshwater fish. *Aquaculture*, 234(1-4), 335-346.
- Han, H. J., Kim, D. Y., Kim, W. S., Kim, C. S., Jung, S. J., Oh, M. J., & Kim, D. H. (2011). Atypical *Aeromonas salmonicida* infection in the black rockfish, *Sebastes schlegeli* Hilgendorf, in Korea. *Journal of fish diseases*, 34(1), 47-55.
- He, S., Wang, Q., Li, S., Ran, C., Guo, X., Zhang, Z., & Zhou, Z. (2017). Antibiotic growth promoter olaquinox increases pathogen susceptibility in fish by inducing gut microbiota dysbiosis. *Science China Life Sciences*, 60(11), 1260-1270.
- Henríquez, P., Kaiser, M., Bohle, H., Bustos, P., & Mancilla, M. (2016). Comprehensive antibiotic susceptibility profiling of Chilean

- Piscirickettsia salmonis* field isolates. *Journal of fish diseases*, 39(4), 441-448.
- Henríquez-Núñez, H., Evrard, O., Kronvall, G., & Avendaño-Herrera, R. (2012). Antimicrobial susceptibility and plasmid profiles of *Flavobacterium psychrophilum* strains isolated in Chile. *Aquaculture*, 354, 38-44.
- Heo, J. H., Jung, M. H., Cho, M. H., Kim, G. H., Lee, K. C., Kim, J. H., & Jung, T. S. (2002). The study on fish diseases with reference to bacterial susceptibility to antibiotics in the southern area of Kyeognam. *JOURNAL OF VETERINARY CLINICS-SEOUL-*, 19(1), 19-22.
- Holmström, K., Gräslund, S., Wahlström, A., Pongshompoo, S., Bengtsson, B. E., & Kautsky, N. (2003). Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. *International journal of food science & technology*, 38(3), 255-266.
- Hoseinifar, S. H., Van Doan, H., Dadar, M., Ringø, E., & Harikrishnan, R. (2019). Feed Additives, Gut Microbiota, and Health in Finfish Aquaculture. In *Microbial Communities in Aquaculture Ecosystems*(pp. 121-142). Springer, Cham.
- Hoshina, T. (1958). A *Streptococcus* pathogenic to fish. *J. Tokyo Univ. Fish.*, 44, 57-68.
- Jang, H. M., Kim, Y. B., Choi, S., Lee, Y., Shin, S. G., Unno, T., & Kim, Y. M. (2018). Prevalence of antibiotic resistance genes from effluent of coastal aquaculture, South Korea. *Environmental Pollution*, 233, 1049-1057.
- Jee, B. Y., Shin, K. W., Lee, D. W., Kim, Y. J., & Lee, M. K. (2014). Monitoring of the mortalities and medications in the inland farms of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, in South Korea. *Journal of fish pathology*, 27(1), 77-83.
- Jin, Y., Xia, J., Pan, Z., Yang, J., Wang, W., & Fu, Z. (2018). Polystyrene microplastics induce microbiota dysbiosis and inflammation in the gut

- of adult zebrafish. *Environmental pollution*, 235, 322-329.
- Kale-Pradhan, P. B., Jassaly, H. K., & Wilhelm, S. M. (2010). Role of *Lactobacillus* in the prevention of antibiotic-associated diarrhea: a meta-analysis. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 30(2), 119-126.
- Kang, C. H., Kim, Y., Oh, S. J., Mok, J. S., Cho, M. H., & So, J. S. (2014). Antibiotic resistance of *Vibrio harveyi* isolated from seawater in Korea. *Marine pollution bulletin*, 86(1-2), 261-265.
- Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M. J., & Gibson, L. (2008). Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, 274(1), 1-14.
- Kim, A., Lim, Y., Kim, N., Luan Nguyen, T., Roh, H. J., Park, C. I., ... & Smith, P. (2018). A comparison of genotypic and phenotypic methods for analyzing the susceptibility to sulfamethoxazole and trimethoprim in *Edwardsiella piscicida*. *Microbial Drug Resistance*, 24(8), 1226-1235.
- Kim, D. H., Brunt, J., & Austin, B. (2007). Microbial diversity of intestinal contents and mucus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of applied microbiology*, 102(6), 1654-1664.
- Kim, J. H., Hwang, S. Y., Son, J. S., Han, J. E., Jun, J. W., Shin, S. P., ... & Park, S. C. (2011). Molecular characterization of tetracycline-and quinolone-resistant *Aeromonas salmonicida* isolated in Korea. *Journal of veterinary science*, 12(1), 41-48.
- Kim, J. W., Lee, H. N., Jee, B. Y., Woo, S. H., Kim, Y. J., & Lee, M. K. (2012). Monitoring of the mortalities in the aquaculture farms of South Korea. *Journal of fish pathology*, 25(3), 271-277.
- Kim, K. H., Kim, A. R., Cho, E. J., Joo, S. J., Park, J. H., Moon, J. Y., ... & Kim, Y. M. (2014). Antibacterial activity of *Rhus javanica* against the Fish Pathogens *Vibrio ichthyenteri* and *Streptococcus iniae*. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 47(1), 18-22.
- Kim, M. S., Seo, J. S., Park, M., Cho, J. Y., Hwang, J. Y., Kwon, M. G., & Jung, S. H. (2010). Antimicrobial resistance of *Edwardsiella tarda*,

- Vibrio* spp., and *Streptococcus* spp. isolated from Olive Flounder *Paralichthys olivaceus*. *Journal of fish pathology*, 23(1), 37-45.
- Kim, S. M., Won, K. M., Woo, S. H., Li, H., Kim, E. J., Choi, K. J., ... & Park, S. I. (2005). Vibrios isolated from diseased marine culturing fishes in Korea. *Journal of fish pathology*, 18(2), 133-146.
- Kronvall G. 2003. Determination of the real standard distribution of susceptible strains in zone histograms. *Internat J Antimic Agent* 22, 7-13.
[http://dx.doi.org/10.1016/s0924-8579\(03\)00107-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0924-8579(03)00107-9).
- Kronvall, G., & Smith, P. (2016). Normalized resistance interpretation, the Nri method: Review of Nri disc test applications and guide to calculations. *Apmis*, 124(12), 1023-1030.
- Kwon, M. G., Hwang, J. Y., & Jung, S. H. (2014). The Efficacy and Safety on Combination Vaccines: *Edwardsiella tarda*, *Streptococcus iniae* and *S. parauberis*, in Olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Journal of Fisheries and Marine Sciences Education*, 26(6), 1193-1200.
- Kwon, M. G., Lim, Y. J., Kim, M. S., Seo, J. S., Kim, D. H. (2016). Epidemiological Cut-off Values Generated for Disc Diffusion Data from *Photobacterium damsela*. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 49(6), 838-844.
- Kwon, M. G., Park, S. U., Bang, J. D., & Park, S. I. (2005). Isolation of pathogenic *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* from olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Journal of fish pathology*, 18(3), 205-214.
- Labella, A., Berbel, C., Manchado, M., Castro, D., & Borrego, J. J. (2011). *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, an emerging pathogen affecting new cultured marine fish species in southern Spain. In *Recent advances in fish farms*. InTech.
- Lee, D. C., Han, H. J., Choi, S. Y., Kronvall, G., Park, C. I., & Kim, D. H. (2012). Antibigrams and the estimation of epidemiological cut off values for *Vibrio ichthyenteri* isolated from larval olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 342, 31-35.

- Lim, Y. J., Kim, D. H., Roh, H. J., Park, M. A., Park, C. I., & Smith, P. (2016). Epidemiological cut-off values for disc diffusion data generated by standard test protocols from *Edwardsiella tarda* and *Vibrio harveyi*. *Aquaculture international*, 24(4), 1153-1161.
- Liu, X., Steele, J. C., & Meng, X. Z. (2017). Usage, residue, and human health risk of antibiotics in Chinese aquaculture: a review. *Environmental pollution*, 223, 161-169.
- Llewellyn, M. S., Boutin, S., Hoseinifar, S. H., & Derome, N. (2014). Teleost microbiomes: the state of the art in their characterization, manipulation and importance in aquaculture and fisheries. *Frontiers in microbiology*, 5, 207.
- Matuschek, E., Brown, D. F., & Kahlmeter, G. (2014). Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(4), O255-O266.
- Miranda, C. D., Smith, P., Rojas, R., Contreras-Lynch, S., & Vega, J. M. (2016). Antimicrobial susceptibility of *Flavobacterium psychrophilum* from Chilean salmon farms and their epidemiological cut-off values using agar dilution and disk diffusion methods. *Frontiers in microbiology*, 7, 1880.
- Mohanty, B. R., & Sahoo, P. K. (2007). Edwardsiellosis in fish: a brief review. *Journal of biosciences*, 32(3), 1331-1344.
- Nawaz, M., Khan, A. A., Khan, S., Sung, K., & Steele, R. (2008). Isolation and characterization of tetracycline-resistant *Citrobacter* spp. from catfish. *Food microbiology*, 25(1), 85-91.
- Nayak, S. K. (2010). Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquaculture Research*, 41(11), 1553-1573.
- Nedoluha, P. C., & Westhoff, D. (1997). Microbiology of striped bass grown in three aquaculture systems. *Food microbiology*, 14(3), 255-264.
- Ngo, T. P., Smith, P., Bartie, K. L., Thompson, K. D., Verner-Jeffreys, D. W., Hoare, R., & Adams, A. (2018). Antimicrobial susceptibility of

- Flavobacterium psychrophilum* isolates from the United Kingdom. *Journal of fish diseases*, 41(2), 309-320.
- Nguyen, T. L., Chun, W. K., Kim, A., Kim, N., Roh, H. J., Lee, Y., ... & Kim, D. H. (2018). Dietary probiotic effect of *Lactococcus lactis* WFLU12 on low-molecular-weight metabolites and growth of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Frontiers in microbiology*, 9, 2059.
- Nguyen, T. L., Park, C. I., & Kim, D. H. (2017). Improved growth rate and disease resistance in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, by probiotic *Lactococcus lactis* WFLU12 isolated from wild marine fish. *Aquaculture*, 471, 113-120.
- Nonaka, L., Maruyama, F., Miyamoto, M., Miyakoshi, M., Kurokawa, K., & Masuda, M. (2009). Novel conjugative transferable multiple drug resistance plasmid pAQU1 from *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* isolated from marine aquaculture environment. *Microbes and environments*, 24(12), 1203-1207.
- Park, S. B., Aoki, T., & Jung, T. S. (2012). Pathogenesis of and strategies for preventing *Edwardsiella tarda* infection in fish. *Veterinary research*, 43(1), 67.
- Park, S. B., Nho, S. W., Jang, H. B., Cha, I. S., Kim, M. S., Lee, W. J., & Jung, T. S. (2016). Development of three-valent vaccine against streptococcal infections in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 461, 25-31.
- Park, Y. K., Nho, S. W., Shin, G. W., Park, S. B., Jang, H. B., Cha, I. S., ... & Jung, T. S. (2009). Antibiotic susceptibility and resistance of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus parauberis* isolated from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Veterinary microbiology*, 136(1-2), 76-81.
- Partridge, G. (2016). Testing the efficacy of probiotics for disease control in aquaculture. *Microbiology Australia*, 37(3), 122-123.
- Pedersen, K., Skall, H. F., Lassen-Nielsen, A. M., Bjerrum, L., & Olesen, N. J. (2009). *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, an emerging

- pathogen in Danish rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), mariculture. *Journal of fish diseases*, 32(5), 465-472.
- Pérez, T., Balcázar, J. L., Ruiz-Zarzuela, I., Halaihel, N., Vendrell, D., De Blas, I., & Múzquiz, J. L. (2010). Host–microbiota interactions within the fish intestinal ecosystem. *Mucosal immunology*, 3(4), 355.
- Petersen, C., & Round, J. L. (2014). Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cellular microbiology*, 16(7), 1024-1033.
- Poblete-Morales, M., Irgang, R., Henríquez-Núñez, H., Toranzo, A. E., Kronvall, G., & Avendaño-Herrera, R. (2013). *Vibrio ordalii* antimicrobial susceptibility testing—Modified culture conditions required and laboratory-specific epidemiological cut-off values. *Veterinary microbiology*, 165(3-4), 434-442.
- Poirel, L., Ros, A., Carricajo, A., Berthelot, P., Pozzetto, B., Bernabeu, S., & Nordmann, P. (2011). Extremely drug-resistant *Citrobacter freundii* isolate producing NDM-1 and other carbapenemases identified in a patient returning from India. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(1), 447-448.
- Pokhrel, H., Baishya, S., Phukan, B., Pillai, D., & Rather, M. A. (2018). Occurrence and Distribution of Multiple Antibiotic Resistance Bacteria of Public Health Significance in Backwaters and Aquaculture Farm. *Journal homepage: <http://www.ijcmas.com>*, 7(02), 2018.
- Rivas, A. J., Lemos, M. L., & Osorio, C. R. (2013). *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, a bacterium pathogenic for marine animals and humans. *Frontiers in microbiology*, 4, 283.
- Romero, J., Feijoó, C. G., & Navarrete, P. (2012). Antibiotics in aquaculture—use, abuse and alternatives. In *Health and environment in aquaculture*. IntechOpen.
- Sáenz, J. S., Marques, T. V., Barone, R. S. C., Cyrino, J. E. P., Kublik, S., Nesme, J., ... & Vestergaard, G. (2019). Oral administration of antibiotics increased the potential mobility of bacterial resistance genes in the gut of the fish *Piaractus mesopotamicus*. *Microbiome*, 7(1), 24.

- Santos, L., & Ramos, F. (2018). Antimicrobial resistance in aquaculture: current knowledge and alternatives to tackle the problem. *International journal of antimicrobial agents*, 52(2), 135-143.
- Schmidt, A. S., Bruun, M. S., Dalsgaard, I., & Larsen, J. L. (2001). Incidence, distribution, and spread of tetracycline resistance determinants and integron-associated antibiotic resistance genes among motile aeromonads from a fish farming environment. *Applied and environmental microbiology*, 67(12), 5675-5682.
- Shao, S., Lai, Q., Liu, Q., Wu, H., Xiao, J., Shao, Z., ... & Zhang, Y. (2015). Phylogenomics characterization of a highly virulent *Edwardsiella* strain ET080813T encoding two distinct T3SS and three T6SS gene clusters: Propose a novel species as *Edwardsiella anguillarum* sp. nov. *Systematic and applied microbiology*, 38(1), 36-47.
- Shi, Y., Zhao, X., Zhao, J., Zhang, H., Zhai, Q., Narbad, A., & Chen, W. (2018). A mixture of *Lactobacillus* species isolated from traditional fermented foods promote recovery from antibiotic-induced intestinal disruption in mice. *Journal of applied microbiology*, 124(3), 842-854.
- Simon, C., & Daniel, R. (2009). Achievements and new knowledge unraveled by metagenomic approaches. *Applied microbiology and biotechnology*, 85(2), 265-276.
- Smith, P. (2012). Antimicrobial resistance: complexities and difficulties of determination. Improving biosecurity through prudent and responsible use of veterinary medicines in aquatic food production, 99.
- Smith, P., & Christofilogiannis, P. (2007). Application of normalised resistance interpretation to the detection of multiple low-level resistance in strains of *Vibrio anguillarum* obtained from Greek fish farms. *Aquaculture*, 272(1-4), 223-230.
- Smith, P., & Kronvall, G. (2015a). Effect of incubation temperature and time on the precision of data generated by antibiotic disc diffusion assays. *Journal of fish diseases*, 38(7), 629-636.

- Smith, P., & Kronvall, G. (2015b). How many strains are required to set an epidemiological cut-off value for MIC values determined for bacteria isolated from aquatic animals?. *Aquaculture International*, 23(2), 465-470.
- Smith, P., Douglas, I., McMurray, J., & Carroll, C. (2009). A rapid method of improving the criteria being used to interpret disc diffusion antimicrobial susceptibility test data for bacteria associated with fish diseases. *Aquaculture*, 290(1-2), 172-178.
- Smith, P., Endris, R., Kronvall, G., Thomas, V., Verner-Jeffreys, D., Wilhelm, C., & Dalsgaard, I. (2016). Epidemiological cut-off values for *F. lavobacterium psychrophilum* MIC data generated by a standard test protocol. *Journal of fish diseases*, 39(2), 143-154.
- Smith, P., Ruane, N. M., Douglas, I., Carroll, C., Kronvall, G., & Fleming, G. T. (2007). Impact of inter-lab variation on the estimation of epidemiological cut-off values for disc diffusion susceptibility test data for *Aeromonas salmonicida*. *Aquaculture*, 272(1-4), 168-179.
- Sørum, H. (2006). Antimicrobial drug resistance in fish pathogens. In *Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin* (pp. 213-238). American Society of Microbiology.
- Star, B., Haverkamp, T. H., Jentoft, S., & Jakobsen, K. S. (2013). Next generation sequencing shows high variation of the intestinal microbial species composition in Atlantic cod caught at a single location. *BMC microbiology*, 13(1), 248.
- Stoffels, G., Nes, I. F., & Guomundsdóttir, A. (1992). Isolation and properties of a bacteriocin-producing *Carnobacterium piscicola* isolated from fish. *Journal of Applied Bacteriology*, 73(4), 309-316.
- Sugimura, Y., Hagi, T., & Hoshino, T. (2011). Correlation between in vitro mucus adhesion and the in vivo colonization ability of lactic acid bacteria: screening of new candidate carp probiotics. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 75(3), 511-515.
- Sugita, H., Okano, R., Suzuki, Y., Iwai, D., Mizukami, M., Akiyama, N., &

- Matsuura, S. (2002). Antibacterial abilities of intestinal bacteria from larval and juvenile Japanese flounder against fish pathogens. *Fisheries Science*, 68(5), 1004-1011.
- Sullam, K. E., Essinger, S. D., Lozupone, C. A., O'CONNOR, M. P., Rosen, G. L., Knight, R. O. B., ... & Russell, J. A. (2012). Environmental and ecological factors that shape the gut bacterial communities of fish: a meta - analysis. *Molecular ecology*, 21(13), 3363-3378.
- Suzuki, S., Nakanishi, S., Tamminen, M., Yokokawa, T., Sato-Takabe, Y., Ohta, K., ... & Virta, M. (2019). Occurrence of sul and tet (M) genes in bacterial community in Japanese marine aquaculture environment throughout the year: Profile comparison with Taiwanese and Finnish aquaculture waters. *Science of The Total Environment*.
- Tavares, G. C., de Queiroz, G. A., Assis, G. B. N., Leibowitz, M. P., Teixeira, J. P., Figueiredo, H. C. P., & Leal, C. A. G. (2018). Disease outbreaks in farmed Amazon catfish (*Leicariius marmoratus* x *Pseudoplatystoma corruscans*) caused by *Streptococcus agalactiae*, *S. iniae*, and *S. dysgalactiae*. *Aquaculture*, 495, 384-392.
- Tellez, G., Higgins, S. E., Donoghue, A. M., & Hargis, B. M. (2006). Digestive physiology and the role of microorganisms. *Journal of Applied Poultry Research*, 15(1), 136-144.
- Tendencia, E. A., & de la Peña, L. D. (2001). Antibiotic resistance of bacteria from shrimp ponds. *Aquaculture*, 195(3-4), 193-204.
- Thomas, F., Hehemann, J. H., Rebuffet, E., Czjzek, M., & Michel, G. (2011). Environmental and gut bacteroidetes: the food connection. *Frontiers in microbiology*, 2, 93.
- Tinh, N. T. N., Linh, N. D., Wood, T. K., Dierckens, K., Sorgeloos, P., & Bossier, P. (2007). Interference with the quorum sensing systems in a *Vibrio harveyi* strain alters the growth rate of gnotobiotically cultured rotifer *Brachionus plicatilis*. *Journal of applied microbiology*, 103(1), 194-203.
- Van Vliet, D., Loch, T. P., Smith, P., & Faisal, M. (2017). Antimicrobial

- susceptibilities of *Flavobacterium psychrophilum* isolates from the Great Lakes Basin, Michigan. *Microbial Drug Resistance*, 23(6), 791-798.
- Volkoff, H., & Butt, R. L. (2019). Gut microbiota and energy homeostasis in fish. *Frontiers in endocrinology*, 10, 9.
- Walker, A. W., & Lawley, T. D. (2013). Therapeutic modulation of intestinal dysbiosis. *Pharmacological Research*, 69(1), 75-86.
- Wang, A. R., Ran, C., Ringø, E., & Zhou, Z. G. (2018). Progress in fish gastrointestinal microbiota research. *Reviews in Aquaculture*, 10(3), 626-640.
- WHO/FAO/OIE (2007) Report of a joint FAO/OIE/WHO Expert Consultation on Antimicrobial Use in Aquaculture and Antimicrobial Resistance, seoul, Republic of korea, 13-16 june 2006. World Health Organization, Geneva,p. 97.
- Williams, S. T., & Vickers, J. C. (1986). The ecology of antibiotic production. *Microbial Ecology*, 12(1), 43-52.
- Yang, M., Lv, Y., Xiao, J., Wu, H., Zheng, H., Liu, Q., ... & Wang, Q. (2012). *Edwardsiella* comparative phylogenomics reveal the new intra/inter-species taxonomic relationships, virulence evolution and niche adaptation mechanisms. *PLoS One*, 7(5), e36987.
- Zhou, L., Limbu, S. M., Qiao, F., Du, Z. Y., & Zhang, M. (2018). Influence of long-term feeding antibiotics on the gut health of zebrafish. *Zebrafish*, 15(4), 340-348.
- Zhou, X., Wang, Y., Yao, J., & Li, W. (2010). Inhibition ability of probiotic, *Lactococcus lactis*, against *A. hydrophila* and study of its immunostimulatory effect in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *International Journal of Engineering, Science and Technology*, 2(7).