

공학박사 학위논문

어류양식장 분리 병원성세균의
항균제 내성 특성

2006년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

식품공학과

손 광 태

공학박사 학위논문

어류양식장 분리 병원성세균의 항균제 내성 특성

지도교수 조 영 제

이 논문을 공학박사 학위논문으로 제출함

2006년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

식 품 공 학 과

손 광 태

손광태의 공학박사 학위논문을 인준함.

2005년 12월 일

주	심	농 학 박 사	양 지 영	인
위	원	이 학 박 사	이 태 식	인
위	원	공 학 박 사	전 병 수	인
위	원	공 학 박 사	김 지 회	인
위	원	수 산 학 박 사	조 영 제	인

목 차

Abstract	vii
서론	1
재료 및 방법	8
1. 재료	8
1.1. 어류양식장 선정	8
1.2. 대상시료	10
2. 실험방법	10
2.1. 시료처리	10
2.1.1. 어류	10
2.1.2. 사육용수	10
2.2. 위생지표세균의 분리 및 동정	12
2.2.1. 분변계대장균	12
2.2.2. <i>Enterococcus</i> spp.	12
2.3. 병원성세균의 분리 및 동정	13
2.3.1. <i>Vibrio</i> spp.	13
2.3.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	13
2.3.3. <i>Salmonella</i> sp.	14
2.3.4. <i>Shigella</i> sp.	14
2.4. 분리균주에 대한 항균제 감수성 시험	15
2.5. Tetracycline 내성유전자 특성 시험	16

2.5.1. Polymerase Chain Reaction(PCR) 반응	16
2.5.1.1. Total DNA 추출	16
2.5.1.2. PCR 반응조건	18
2.5.2. Tetracycline 내성유전자의 cloning	18
2.5.3. Plasmid DNA 분리 및 DNA 염기서열 분석	21
2.5.4. <i>E. coli</i> 의 tetracycline 내성유전자 분포 조사	22
2.5.5. 해양상채세균 및 장내세균의 tetracycline 내성유전자 상동성 조사	22
2.5.6. <i>E. coli</i> 의 integron 분포 조사	23
 결과 및 고찰	 24
 1. 연안해역 어류양식장에서의 위생지표세균 및 병원성세균의 분포	 24
1.1. 어류양식장에 대한 위생지표세균의 분포	24
1.1.1. 시료별 위생지표세균의 분포	24
1.1.2. 지역별 위생지표세균의 분포	28
1.1.3. 시기별 위생지표세균의 분포	28
1.2. 어류양식장에 대한 병원성세균 분포	31
1.2.1. 시료별 병원성세균의 분포	31
1.2.2. 지역별 병원성세균의 분포	34
1.2.3. 시기별 병원성세균의 분포	36
 2. 분리균주에 대한 항균제 내성 특성	 41
2.1. 분리균주의 항균제 내성 특성	41
2.2. 균주 분리원에 따른 항균제 내성 특성 비교	46
2.2.1. 지역별 항균제 내성 특성 비교	46
2.2.2. 균종별 항균제 감수성 특성 비교	47

2.2.2.1. 해양상재세균의 항균제 내성 특성	48
2.2.2.2. <i>E. coli</i> 의 항균제 내성 특성	52
2.2.2.3. <i>Enterococcus</i> spp.의 항균제 내성 특성	55
2.2.2.4. <i>Salmonella</i> sp. 및 <i>S. aureus</i> 의 항균제 내성 특성	60
 3. 분리균주의 tetracycline 내성유전자 특성	64
3.1. 분리균주에 대한 tetracycline 내성유전자의 분포	64
3.1.1. Tetracycline 내성균의 최소발육억제농도	64
3.1.2. <i>tet</i> gene 검출용 primer의 검증	64
3.1.3. PCR을 이용한 <i>tet</i> gene의 분포	66
3.2. 균종간 <i>tet</i> genes 의 상동성 조사	73
3.2.1. 분리균주에서의 <i>tet</i> genes의 분포	73
3.2.2. 균종간 <i>tet</i> genes 상동성 확인	75
3.3. 분리균주의 integron 분포	80
3.3.1. Integron 검출용 primer의 검증	80
3.3.2. Integron의 분포	80
3.3.3. Integron 보유균과 다재내성과의 상관성 검토	83
 요 약	88
 감사의 말씀	91
 참고문헌	92

List of Figures

Fig. 1. Location of sampling stations of pathogenic bacteria monitoring.	9
Fig. 2. Detection rate of fecal coliform and <i>Enterococcus</i> spp. in seawater and farmed fishes.	27
Fig. 3. Detection rate of fecal coliform and <i>Enterococcus</i> spp. in seawater and fishes by sampling area.	29
Fig. 4. Monthly detection rate of fecal coliform and <i>Enterococcus</i> spp..	30
Fig. 5. Comparison of monthly detection rate of pathogenic bacteria in all examined samples.	37
Fig. 6. Monthly comparison of quantitative contents of <i>V. parahaemolyticus</i> in all the samples collected from fish farms.	39
Fig. 7. Number of the bacterial strain isolated from seawater and farmed fishes. ...	42
Fig. 8. Antimicrobial resistance rate of the isolated bacterial strain.	43
Fig. 9. Antimicrobial resistance rate of the isolated bacterial strain by samples.	45
Fig. 10. Antimicrobial resistance rate of the isolated bacterial strain by sampling area.	47
Fig. 11. The antimicrobial resistance patterns of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> and <i>Vibrio alginolyticus</i> isolates.	49
Fig. 12. Antimicrobial resistance pattern of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> isolates according to the number of resistive antimicrobials.	51
Fig. 13. Antimicrobial resistance pattern of <i>Vibrio alginolyticus</i> isolates according to the number of resistive antimicrobials.	53
Fig. 14. The antimicrobial resistance pattern of <i>E. coli</i> isolates.	54
Fig. 15. Antimicrobial resistance pattern of <i>Vibrio alginolyticus</i> isolates according to the number of resistive antimicrobials.	56
Fig. 16. The antimicrobial resistance pattern of <i>Enterococcus faecalis</i> and <i>Enterococcus faecium</i> in all the samples collected from fish farms.	57

Fig. 17. Antimicrobial resistance pattern of <i>Enterococcus faecalis</i> and <i>Enterococcus faecium</i> isolates according to the number of resistive antimicrobials. ..	59
Fig. 18. The antimicrobial resistance pattern of <i>Salmonella</i> sp. and <i>Staphylococcus aureus</i> isolates.	61
Fig. 19. Antimicrobial resistance pattern of <i>Salmonella</i> sp. and <i>Staphylococcus aureus</i> isolates according to the number of resistive antimicrobials.	63
Fig. 20. Minimum inhibitory concentration patterns of the tetracycline resistant <i>E. coli</i> isolates	65
Fig. 21. PCR amplicons to the efflux <i>tet</i> genes in <i>E. coli</i> isolates.	67
Fig. 22. Comparison of DNA nucleotide sequence of <i>tet A</i> in <i>E. coli</i> , <i>Enterococcus</i> spp, <i>V. parahaemolyticus</i> and <i>V. alginolyticus</i> isolate.	76
Fig. 23. Comparison DNA nucleotide sequence of <i>tet B</i> in <i>E. coli</i> , <i>Enterococcus</i> spp, <i>V. parahaemolyticus</i> and <i>V. alginolyticus</i> isolate.	77
Fig. 24. Comparison of DNA nucleotide sequence of <i>tet D</i> in <i>E. coli</i> , <i>Enterococcus</i> spp, <i>V. parahaemolyticus</i> and <i>V. alginolyticus</i> isolate.	79
Fig. 25. PCR amplicons of the class I integron in <i>E. coli</i> isolates.	81
Fig. 26. Integron possession rate of the <i>E. coli</i> examined.	82
Fig. 27. Nucleotide sequences of class I integron in <i>E. coli</i> isolates.	84
Fig. 28. Comparison of the antimicrobial resistance between integron possessive and absent strains	86

List of Tables

Table 1. Number of fish and seawater samples collected at the surveyed fish farms	11
Table 2. Antimicrobial disks used for the susceptibility test of the bacteria strain ..	17
Table 3. Primers and expected sizes of PCR amplicons for various <i>tet</i> genes ...	19
Table 4. Primers and expected sizes of PCR amplicons for integron	20
Table 5. Ranges of fecal coliform in seawater and farmed fishes collected at different geographical fish farms	25
Table 6. Detection rate of <i>Salmonella</i> sp., <i>Shigella</i> sp. and <i>Staphylococcus aureus</i> in seawater and farmed fishes	32
Table 7. Detection rate of pathogenic Vibrios in seawater and farmed fishes	33
Table 8. Detection rate of pathogenic bacteria in seawater and farmed fishes by sampling area	35
Table 9. Homology analysis of the <i>tet A</i> in <i>E. coli</i> isolates	68
Table 10. Homology analysis of the <i>tet B</i> in <i>E. coli</i> isolates	68
Table 11. Homology analysis of the <i>tet D</i> in <i>E. coli</i> isolates	68
Table 12. Distribution of tetracycline resistance genes in the isolated strain ...	70
Table 13. Distribution of tetracycline resistance genes of <i>E. coli</i> isolated from seawater and fishes	72
Table 14. Distribution of tetracycline resistance genes detected in <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. alginolyticus</i> and <i>Enterococcus</i> spp.	74
Table 15. Homology analysis of the class I integron (<i>intI</i>) in <i>E. coli</i> isolates	85

Characteristics of Antimicrobial Resistance of Pathogenic Bacteria Isolated from Fish Farms

Kwang-Tae SON

*Department of Food Science and Technology, Graduate School,
Pukyong National University*

Abstract

The contamination state of sanitary indicative bacteria and pathogenic bacteria was investigated in farmed fishes, olive flounder (*Paralichthys olivaceus*), black rock fish (*Sebastes schlegeli*), red sea bream (*Pagrus major*) and sea bass (*Lateolabrax japonicus*), and seawater samples were collected from 10 aquaculture nurseries located on the southern coastal area of Korea from May to October in 2004. An antimicrobial susceptibility test was performed by the disk diffusion method following the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) to identify the characteristics of antimicrobial resistance of isolated strains from all fish farms. Total 165 *Escherichia coli* isolates resistant to tetracycline were examined for the presence of *tet A*~*tet E* and *tet Y* which code for energy dependent efflux proteins. Characterization of *tet* genes of *Vibrio parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* and *Enterococcus*. spp. were compare with those of *E. coli* possessed tetracycline resistant gene. In addition, the presence of class I or II integron was investigated in *E. coli* isolates resistant to tetracycline.

Detection rates of fecal coliform and *Enterococcus* spp. of sanitary indicative bacteria in all samples were 38.9% and 23.8%, respectively. Detection rate of fecal coliform (41.7%) in seawater samples was remarkably higher than that of *Enterococcus* spp.(13.3%), but there was little differentiation of detection rate between fecal coliform and *Enterococcus* spp. in the same fish samples.

The detection rates of fecal coliform was highest of 58.3% in Busan, Geoje and Wando sampling area, followed by Yeosu (33.3%), Jeju (12.5%), Tongyeong (11.1%). And the detection rate of *Enterococcus* spp. was highest in Wando sampling area as 45.8%, followed by Yeosu (33.3%), Tongyeong (22.2%), Busan (16.7%), Geoje and Jeju (12.5%). Detection rate of fecal coliform was higher than that of *Enterococcus* spp., except for Tongyeong sampling area.

There was no fluctuation in detection rate of fecal coliform from May to October, but the detection rate of *Enterococcus* spp. increased according as the seawater temperature gradually rose.

Among pathogenic bacteria, detection rate of *V. alginolyticus* from all tested samples was highest as 49.2%, followed by *V. parahaemolyticus* (36.5%), *Staphylococcus aureus* (6.3%), *Salmonella* sp. (2.4%). But the number of *V. parahaemolyticus* enumerated by most probable number method in seawater and fishes was <3.0~11.6 MPN/100mL and <30~56.8 MPN/100g, respectively. However, *V. cholerae*, *V. vulnificus* and *Shigella* sp. were not detected in all tested samples.

A total of 784 strains were isolated from the fish farms and were subjected to perform antimicrobial susceptibility test. The isolated 784 strains were compose of 316 *E. coli*, 194 *V. alginolyticus*, 120 *V. parahaemolyticus*, 66 *Enterococcus faecalis*, 37 *E. faecium*, 18 *Salmonella* sp., 15 *S. aureus* and 18

Enterococcus spp.. Among isolates, 750 strains (95.7%) were resistant to one or more antimicrobial agents and 293 strains (37.3%) were multiple antimicrobial resistant bacteria.

Detection rate of antimicrobial resistant bacteria from isolated strains according to sampling area was ranged from 93% to 100% and highest in Jeju (100%). And detection rate of multiple antimicrobial resistant bacteria was highest in Wando (48.6%), followed by Jeju (47.0%), Yeosu (39.2%), Geoje (35.7%), Busan (28.7%), Tongyeong (20.8%).

316 *E. coli* isolates were tested against 19 antimicrobial agents and *E. coli* isolates were highly susceptible to imipenem (99.7%), cefepime (98.1%), cefotaxime (97.2%) and gentamicin (94.0%), but resistant to tetracycline (74.1%), cephalothin (69.6%), doxycycline (66.1%), streptomycin (47.5%) and ampicillin (45.9%). Among tested *E. coli* isolates, 74 isolates (23%) out of seawater samples and 101 isolates (32%) out of fish samples showed the resistance phenotype against at least one antimicrobial agent. 10 isolates (3.2%) from seawater and 60 isolates (18.9%) from fish samples showed multiple antimicrobial resistant to more than 10 antimicrobial agents.

The antimicrobial susceptibility of 194 strains of *V. parahaemolyticus* and 120 strains of *V. alginolyticus* were investigated against 10 antimicrobial agents. Apparently 98.5% of *V. parahaemolyticus* and 100% of *V. alginolyticus* isolates were demonstrated antimicrobial resistance against at least one type of antimicrobial agent. The resistance of *V. parahaemolyticus* isolates to ampicillin (97.9%) was highest, followed by oxolinic acid (26.8%), amikacin (19.1%), tetracycline and amoxicillin/clavulanic acid (6.7%). And *V. alginolyticus* isolates were resistant to ampicillin (100%), sulfamethoxazole/trimethoprim (25%),

amikacin (21.7%), amoxicillin/clavulanic acid (15.8%), ciprofloxacin (13.3%), tetracycline and doxycycline (11.7%). 20.8% of *V. alginolyticus* isolates were multiple antimicrobial resistance, while only 6.7% of *V. parahaemolyticus* isolates were multiple antimicrobial resistance.

37 strains of *E. faecium* and 66 strains of *E. faecalis* were tested against 10 antimicrobial agents. *E. faecium* isolates were resistant to rifampin (86.5%), ciprofloxacin (64.9%), tetracycline (59.5%) and *E. faecalis* isolates were resistant to tetracycline (80.3%), doxycycline (77.3%), erythromycin and chloramphenicol (75.8%).

Total DNA of *E. coli* isolates resistant to tetracycline was amplified by PCR with six different sets of primers targeting tetracycline efflux genes. 165 *E. coli* isolates were screened for the presence of genes *tet* A, B, C, D, E or Y. The *tet* D gene was most abundant (92.7%) followed by *tet* A (88.5%), *tet* A+D (46.7%), *tet* B (40.6%), *tet* A+B+D (34.5%) and *tet* B+D (5.5%). The *tet* C, *tet* E and *tet* Y genes were not detected in any of the isolates.

The nucleotide sequences of *tet* A, B and *tet* D genes from *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* and *Enterococcus*. spp. were very similar to those of *E. coli*.

The presence of class I and class II integrons among *E. coli* isolates resistant to tetracycline were investigated through amplification of the gene with PCR. It was found that 76 isolates of 165 *E. coli* isolates (46.0%) carried class I integrons, but class II integrons were not found in all tested strains. The ratio of multiple antimicrobial resistance strains in the group of *E. coli* with class I integron was higher (82.9%) than that in the group of *E. coli* without class I integron (62.5%).

서론

우리나라에서의 어류 양식업은 1970년대 이전에도 일부 시도된 바 있으나 완전 양식에는 이르지 못하였고, 1980년대 이후 연구기관 및 대학 등에서 종묘생산기술을 확립하면서 산업적 규모로 성장하게 되었다(한, 2001). 양식어류 생산량은 1980년에는 38 M/T에 불과하였으나 1990년에는 2,656 M/T, 2004년에는 64,476 M/T으로 급증하게 되었다. 양식대상 어종 또한 1980년대에는 넙치가 주종을 이루었으나 1990년대 이후 조피볼락, 참돔, 농어, 복어, 숭어 등으로 다양화 되어 왔다(해양수산부, 2005a). 양식어류 생산량이 증가하고, 품종이 다양화된 배경에는 종묘생산 기술의 향상, 고 효율 사료개발 등 어류의 생산성에 직접적으로 관계하는 기술의 발전뿐만 아니라 양식과정에 발생하는 각종 질병에 대한 제어기술 개발도 중요한 역할을 하였다(김, 2001).

그러나 근년 우리나라 연안에서는 어장환경의 악화로 인하여 양식어류에서 질병 발생빈도가 증가하고, 발생하는 질병의 종류도 세균, 바이러스, 기생충 등으로 다양화 되고 있으며, 특히, 세균성 질병은 다양한 어종에서 발생하고 있다(김 등, 2002; Park et al., 2002). 어류양식 과정에서 각종 세균성 질병의 예방이나 치료를 위하여 약 20여종의 수산용 항균제제가 단일 또는 복합제로 사용되고 있다(Heo et al., 2002; Jeong and Chun, 1992).

한편, 동물용 항균제제는 수산산업계에서 뿐만 아니라 농축산업에서도 가축 등의 질병 예방이나 치료에 광범위하게 사용되고 있으며, 심지어는 성장촉진을 목적으로 사료와 혼합하여 사용하는 경우도 있다(吐山, 1998; 堀江・中澤, 1995). 이와 같이 수산산업계나 농축산분야에서의 동물용 항균제의 사용은 생산성 향상이라는 측면에서는 필수불가결 부분이 없지 않지만, 오남용 등 부적절한 사용은 여러 가지의 부작용을 초래할 수 있다(Moreillon and

Entenza, 2001; Perreten et al., 1997; Robredo et al., 2000). 즉 사람이 항균제를 과량 섭취할 경우 백혈구 감소와 같은 혈액장애, 청각장애, 간장 및 신장장애 등과 같은 직접적인 독성을 나타내기도 하며, 사람에 따라서는 알러지 등 과민증을 유발하기도 한다(이, 1987; Rouveix, 2003). 그리고 항생제가 함유된 식품을 장기간 섭취할 경우 인체 장관에 존재하는 각종 세균의 항균제 내성을 유발시키거나 증대시키기도 한다(吐山, 1998; 堀江・中澤, 1995). 뿐만 아니라 어류 양식과정에 항균제를 지속적으로 사용할 경우, 사육용수나 어류에 존재하는 세균의 항균제에 대한 내성이 유발될 수도 있다.

실제로 우리나라에서 산업적 어류 양식이 본격화되기 시작한 1995~1996년에 남해안 어류양식장에서 분리된 *Vibrio*속 세균은 oxolinic acid, oxytetracycline, tetracycline 등에 대하여 대부분 감수성이었으나, 2002년에 분리된 균주에서는 50% 정도가 내성을 나타내는 것으로 보고된 바 있다(Choi and Moon, 1995; 1996; Choi and Kong, 1996; Heo et al., 2002).

또한 외국의 경우 홍콩 연안의 양식 돔에서 분리된 대부분의 *Vibrio* 속 세균은 여러 가지 항균제에 내성을 나타내었으며, 항균제별 내성율은 ampicillin 60.8%, cefuroxime 66.7%, amikacin 55%, kanamycine 58.8% 및 trimethoprim 76.5%이었다고 보고된 바 있다(Li et al., 1999). 이와 같이 특정한 항균제를 지속적으로 사용하는 경우 사용 항균제에 대한 내성균이 출현하게 되는데, 미국에서는 FDA (Food and Drug Administration)에서 양식어류에 대한 oxytetracycline의 사용을 승인한 이후 tetracycline 내성균의 발생율이 급격히 증가하였다는 보고도 있다(De Paola et al., 1988; Miranda et al., 2003; Schmit et al., 2001).

세균이 특정한 항균제에 대하여 내성을 나타내는 것은 여러 가지 측면에서 고려되어야 할 심각한 문제점을 내포하고 있다. 즉 항균제 내성이 유발된 세균이 인체에 직접적인 위해를 미칠 수 있는 병원균일 경우, 인체 치료용으

로 사용하던 여러 가지 항생제의 치료 효율을 저하시키거나 무력화시킬 수 있는 극단적인 상황에도 이를 수 있으며, 이러한 사례는 간헐적으로 임상에서 보고되고 있다(Hiramatsu et al., 1997; Kim et al., 2000). 그리고 내성 유발 세균이 인체 위해세균이 아닌 경우라도 세균에 보유된 항생제 내성유전자는 동종 또는 이종 세균간에 쉽게 전이될 수 있기 때문에 인체 위해세균으로 전파될 가능성이 매우 높다. 뿐만 아니라 항생제 내성균이 양식어류, 가축류 및 가금류 등 경제 동물에 위해를 미치는 경우, 생산성을 극단적으로 저하시킬 수 있으므로 이러한 동물용 항균제제의 적절한 사용은 임상적으로는 물론 산업계의 안정적 경영에 매우 중요한 것으로 인식되고 있다. 항균제가 발견된 이후 임상에서는 장기간에 걸쳐 각종 항균제를 사용함에 따라 항균제 내성 병원세균이 출현하게 되었다(이, 2004). 이중 근년에 보고된 메치실린 내성 포도상구균(methicillin resistant *Staphylococcus aureus*; MRSA), 또는 반코마이신 내성 장구균(vancomycin resistant Enterococci; VRE) 등은 기존의 항생제로는 제어가 곤란한 대표적인 슈퍼박테리아로 보고되고 있다(Kim et al., 2000; Woo and Ryu, 1999). 우리나라 환자에서 분리되는 세균의 항균제 내성율은 다른 나라에 비하여 높은 편에 속하며, 병원에서 분리된 MRSA의 비율은 1988년에는 50% 미만이었으나, 1999년에는 70%를 초과하였고, VRE의 비율은 1990년에는 50% 미만이었으나, 1999년에는 80%를 초과하는 것으로 보고되고 있다(Chong, 2000; Jeong and Lee, 1998). 그리고 전염병 세균인 콜레라균의 경우, 전파 경로에 따라 다양한 항생제 내성율을 나타내는 것으로 보고되고 있다. 즉, 일본에서 보고된 *Vibrio cholerae* O1의 내성균 출현빈도는 1981~1985년에는 1.2%이었으나, 1996~2001년에는 70.8%로 급격히 증가하였고, *V. cholerae* non-O1에서도 1981~1985년에는 9.4%이었으나 1996~2001년 20.7%로 증가하였다(Matsushita et al., 2003).

세균의 항균제에 대한 내성 발현에는 4가지의 기전이 알려져 있다. 즉, 세

균의 세포 외막구조를 변화시킴으로써 항균제의 유입을 저해시키거나, 세균 내로 유입된 항균제를 분해하는 효소를 생성하여 대상 항균제를 분해시키고, 또는 항균제들은 각각의 특이적 작용표적을 가지고 있는데 이를 변화시키거나, 세포질내로 유입된 항균제를 선택적으로 능동 배출시키는 펌프 단백질을 세포막에 발현시켜 항균제의 농도를 낮춤으로써 내성을 발현하게 된다(정, 2001; Cloete, 2003).

임상 혹은 수·축산분야 등에서 여러 가지 기전으로 발생한 항균제 내성균은 이종 혹은 동종 세균 간에 내성유전자가 전이될 수 있으며, 인체 질병 원인세균으로 내성유전자가 전이될 경우 질병 치료가 어려운 상황에 이를 수도 있다(Baticados and Paclibare, 1992; Chandrasekaran et al., 1998; Rhodes et al., 2000; Tendencia and De la Peña, 2001). 유사한 사례로 어류질병 원인세균인 *V. anguillarum*의 내성유전자가 *V. parahaemolyticus*나 *V. cholerae*와 같은 인체 병원균에 전이됨을 실험적으로 입증한 바 있다(Hayashi et al., 1982; Nakajima et al. 1983).

또한, 동일 균속 내에서 이종간의 내성유전자 전이는 1991년 남미에서 발생한 콜레라 유행의 역학조사 결과에서도 입증되고 있다. 즉, 당시 새우 양식장의 근로자에서 분리된 콜레라 원인균은 다제내성균이었는데, 내성유형은 새우 양식장에서 분리된 새우질병 원인 비브리오균의 내성유형과 유사하여 새우질병 원인 비브리오의 내성인자가 *V. cholerae* O1으로 전이된 것으로 추정되고 있다(Weber et al., 1994).

세균에서 항균제 내성유전자는 주로 수평적 전이(horizontal transfer)를 통하여 동종 혹은 이종 세균으로부터 획득하거나 반대의 과정이 발생하는데, 이러한 것을 주관하는 이동성 인자(mobile element)에는 plasmid, transposon, integron 등 세 가지로 알려져 있다.

어류질병세균인 *Aeromonas salmonicida*, *A. hydrophila*, *Pseudomonas*

fluorescens, *V. anguillarum*, *Pasteurella piscicida*, *Edwardsiella tarda* (Aoki, 1988) 그리고 *Yersinia ruckeri* (De Grandis and Stevenson, 1985) 등은 plasmid를 매개체로 하여 내성을 획득하는 것으로 보고되어 있다. 특히, 이동성 R-plasmids를 가지는 *A. salmonicida*는 다양한 항균제에 대하여 내성을 발현하는데, 일본에서는 chloramphenicol, sulphonamide 그리고 streptomycin에 내성을 나타내는 이동성 R-plasmids가 발견된 바 있고, 아일랜드에서는 sulphonamide, streptomycin, spectinomycin, trimethoprim 및 tetracycline에 내성을 나타내는 이동성 R-plasmids가 발견되기도 하였다(Aoki, 1997). 또한 스코틀랜드에서는 분리된 총 40균주의 oxytetracycline 내성균 중 11균주가 이동성 R-plasmids를 보유하고 있었으며, 이들 균주는 oxytetracycline, streptomycin, sulphamethoxine 및 trimethoprim에 대하여 다제내성을 나타내는 것으로 보고되어 있다(Inglis et al., 1993).

한편, integron의 경우 그람음성 세균에서 항균제 내성유전자의 전이에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다(Goldstein, 2001; Hall and Collis, 1995). Integron에는 각각 다른 내성 유전정보가 포함된 cassettes 유전자가 한 개 혹은 그 이상 함유되어 있는데, 이는 다양한 항균제들에 대한 내성을 나타내는 요인이 된다(Fluit et al., 1999). Cassette와 integron에 있는 재결합 부위(recombination site)에 여러 가지 내성정보를 지닌 cassette 유전자가 부위 특이적 재결합(site-specific recombination)을 함으로써 내성 획득이 가능하게 된다(Collis et al., 1993; Collis and Hall, 1992a; 1992b). 현재까지 integron에는 class I 과 class II가 가장 많이 알려져 있고, 그 외에도 class III (Arakawa et al., 1995), 9 (Hochhut et al., 2001) 그리고 분류되지 않은 class (accession no. AJ277063)가 한 경우씩 보고되었다(Correia et al., 2003).

Cassette 유전자의 전이에는 integrase가 관여하는데 *att I* site에 부위 특이적 재결합 방법으로 cassette 유전자를 결합 혹은 분리시킨다. Cassette 유전자

의 전이는 항균제 내성유전자의 전이로 직결되고 현재까지 약 60여종 이상이 보고되고 있는데, 이 중 가장 많이 연구된 class I integron은 병원 내 장내세균과(Enterobacteriaceae) 세균의 다제내성과는 밀접한 관련이 있는 것으로 밝혀져 있다(Hall and Collis, 1998).

임상에서 항균제는 1940년대부터 사용되었으며, 장기간에 걸친 각종 항균제의 사용으로 1970년대에는 MRSA가, 1990년대에는 반코마이신 내성 포도상구균 (vancomycin resistant *S. aureus*; VRSA)와 VRE 등이 출현하기에 이르렀다(이, 2004). 그리고 근년에는 축산분야에서도 질병치료는 물론 성장 촉진을 위하여 사료 등에 항균제 첨가가 일반화되어 있으며, 이에 따른 다제내성균의 출현율이 높은 것으로 보고되고 있다(Yashimura, 2000; Bower, 1999). 그리고 수산분야에서도 1980년대부터 산업적 규모의 어류양식업이 성행하고 있고, 각종 동물용 항균제가 지속적으로 사용됨에 따라 어류질병 세균은 물론 환경에 분포하는 세균에서 항균제 내성균의 출현이 우려되고 있는데, 실제로 어류양식장에서 분리된 어류질병 세균의 특정 항균제 내성율은 상당히 증가한 것으로 보고되었다(Choi and Moon, 1995; 1996). 수산분야에서 발생한 내성균은 물론, 임상 및 축산분야 등 육상에서 발생한 내성균이 강우나 하천을 통하여 해양으로 유입되고 이들 내성균의 내성유전자가 해양상재 병원세균으로 전이될 가능성도 있다.

본 연구는 우리나라 연안 어류양식장에 대한 위생안전평가를 위하여 주요 양식어류와 사육용수 중의 분변계대장균, 장구균 등의 위생지표세균 분포를 조사하고, 병원성 비브리오, 포도상구균, 살모넬라, 이질균 등 인체 병원성세균 존재 유무 등을 조사하였다. 그리고 분리균주에 대한 항균제 감수성 시험을 통하여 각 균종별 항균제 내성율 등 내성 특성을 파악하였다. 또한 사육용수 및 양식어류에서 분리한 *E. coli*에 대하여 tetracycline 내성유전자(*tet* genes)의 분포를 확인하고, 해양상재세균인 *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*

와 장내세균인 *Enterococcus* spp.에서 검출된 *tet* genes의 상동성을 비교 분석하여, 육상유래 세균으로부터 해양상재세균으로의 항균제 내성유전자 전이 가능성에 대한 분자생물학적 해명을 시도하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1.1. 어류양식장 선정

시험에 사용된 해수와 양식어류는 2004년 5월부터 10월까지 우리나라 남해안 연안에서 어류양식업이 성행하고 있는 부산, 거제, 통영, 여수, 완도, 제주 등 6개 지역에서 채취하였다(Fig. 1). 시험대상 어류양식장은 각 지역의 양식사정과 지리적 특성을 고려하여 부산시와 경남 통영시에 각 1개소, 거제시, 전남 여수시, 완도군 그리고 제주도에 각 2개소를 선정하였으며, 넙치 양식장은 모두 육상 수조식이었고 그 외 어종은 해상 가두리식이었다.

각 지역별 시험 양식장의 지리적 특성은 부산시 기장군 동백면 소재 육상 수조식 넙치 양식장의 경우 주변에 어류 양식장이나 마을이 위치하지 않으며 사육해수는 해안선에서 비교적 떨어진 곳에서 취수되고 있었다. 경남 통영시 산양읍 소재 해상의 조피볼락 및 참돔 양식장은 주변에 가두리가 없고 또 육상의 배수유역에는 해역의 수질에 영향을 미칠만한 오염원은 없었다. 거제시 둔덕면 소재 육상 넙치 양식장 및 해상 농어 양식장은 주변 해상에 양식장이 다수 분포하고, 육상의 배수유역에는 밀집된 인가가 분포하는 것으로 확인되었다. 그리고 전남 여수시 돌산읍 소재 해상 농어 및 조피볼락 양식장은 자연 마을의 인근에 위치하고 있으며, 농가에서는 가축의 사육도 다수 확인되고 있어 가축의 분변에 의한 오염도 우려되는 지역이었다. 완도군 완도읍 소재 넙치 양식장은 육상 수조식으로 주변에는 양식장과 자연 마을이 일부 위치하고 있으며, 사육용수 공급을 위한 취수원은 해안선에서는 비교적 떨어져 있으나 수심이 낮은 내만으로 조석에 따라서는 주변 육상 배출수에 영향을 받을 수 있는 지역이었다. 완도군 신지면 소재 해상에 위치한 조피볼락 양식

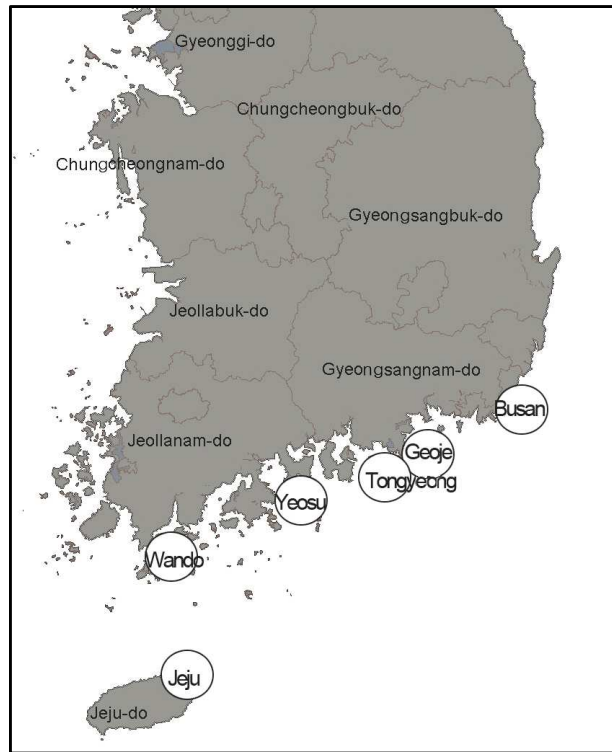


Fig 1. Location of sampling stations of pathogenic bacteria monitoring.

장은 인근해역에 밀집되어 있는 가두리와 배수유역 마을에서 유입되는 생활하수 등의 영향을 직접적으로 받을 우려가 있는 것으로 확인되었다. 제주지역에서는 북제주군 조천읍 소재 넙치양식장 2개소를 대상으로 하였는데, 주변에는 어류 양식장과 자연 마을이 약간 분포하지만 사육해수는 해안선에서 비교적 떨어진 곳에서 취수되고 있었다.

1.2. 대상시료

시험어류는 우리나라 양식어류 생산량의 80%를 차지하는 넙치(*Paralichthys olivaceus*)와 조피볼락(*Sebastes schlegeli*), 그리고 최근 매년 2,000 M/T 이상 생산되는 참돔(*Pagrus major*)과 농어(*Lateolabrax japonicus*) 등 주요 양식어종을 대상으로 하였다(해양수산부, 2005b). 시험에 제공된 시료는 양식어류 66개, 사육용수 60개 등 모두 126개 시료이었으며, 어종별로는 넙치가 30개로 가장 많았고, 다음으로 조피볼락이 18개, 농어가 12개, 그리고 참돔은 6개이었다(Table 1). 넙치가 다른 어종에 비하여 많았던 것은 부산, 거제, 완도, 제주 등지에서 양식이 성행하고 있어 지역별로 동일 어종에서 분리된 균주의 항균제 내성 패턴의 차이를 비교하기 위하여 많은 시료를 분석하였다.

2. 실험방법

2.1. 시료처리

2.1.1. 어류

각 양식장에서는 5~10개체의 활어를 채취하여 폴리에틸렌 주머니에 담아 얼음을 채운 스티로폼 용기에 넣고, 실험실로 운반한 후 아가미와 내장을 무균적으로 채취하여 blender (Waring, USA)로 균질화한 후 분석시료로 하였다.

2.1.2. 사육용수

Table 1. Number of fish and seawater samples collected at the surveyed fish farms

Region \ Samples	Seawater	Oliver flounder	Black rock fish	Sea bass	Red sea bream	Total
Busan	6	6	0	0	0	12
Geoje	12	6	0	6	0	24
Tongyeong	6	0	6	0	6	18
Yeosu	12	0	6	6	0	24
Wando	12	6	6	0	0	24
Jeju	12	12	0	0	0	24
Total	60	30	18	12	6	126

양식장 사육용수는 1 L 용량의 멸균병에 채수하여 어류시료와 같은 방법으로 실험실로 운반하고, pore size 0.8, 0.45 및 0.2 μm 의 멸균 membrane filter (Millipore, Ireland)로 순차적으로 여과한 다음 filter를 모아서 시험에 사용하였다. 해수 시료 채취시 각 어류양식장의 수온은 디지털 온도계(Sato, SK-250WP)를 사용하여 현장에서 직접 측정하였다.

2.2. 위생지표세균의 분리 및 동정

2.2.1. 분변계대장균

양식어류 및 해수에 대한 분변계대장균은 Recommended Procedures for the Examination of Seawater and Shellfish (APHA, 1970)에 준하여 시험하였다. 추정시험에는 Lauryl Tryptose broth (Difco, USA)를, 확정시험에는 EC 배지 (Difco, USA)를 각각 사용하였다. 분변계대장균의 완전시험은 EC 배지에서 gas 양성인 배양액을 Eosin Methylene Blue agar (Difco, USA, EMB) 평판에 도말 배양한 후 전형적인 형태를 나타내는 집락을 분리하여 IMViC test를 실시하여 분변계대장균의 균형을 확인하였다.

2.2.2. *Enterococcus* spp.

Enterococcus. faecalis, *E. faecium* 등 장구균은 Ramotar et al. (2000)의 방법을 일부 변형하여 분리·동정하였다. 즉, 어류의 내장과 아가미 부위를 채취하여 마쇄한 다음 25 g을 6.5% NaCl이 함유된 Azide Dextrose broth (Merck, Germany) 225 mL에 접종하고 35°C에서 24시간 증균배양하였다. 증균배양액 1 mL을 Bromocresol Purple Azide broth (Merck, Germany) 9 mL에 접종하고 35°C에서 48시간 배양한 다음 배양액이 황색으로 변한 것은 Enterococcosel agar (BBL USA)에 도말하고, 35°C에서 24시간 배양하였다. 배양 후 평판에서 표준균주와 유사한 형태를 나타내는 집락을 선택하여 Tryptic Soy agar

(Difco, USA, TSA)에 계대배양하면서 생화학시험 및 API Strep (bioMerieux, France)을 사용하여 동정하였다.

2.3. 병원성세균의 분리 및 동정

2.3.1. *Vibrio* spp.

병원성 비브리오균의 분리 및 동정은 Bacteriological Analytical Manual (Elliot et al., 1992; BAM)에 준하여 실시하였다. 즉, 어류의 경우 전처리된 시료 25 g을 Alkaline Peptone Water (pH 8.5±0.2, 2% NaCl 함유, APW) 225 mL에 접종하였고, 해수는 여과 후 membrane filter를 모아서 APW 100 mL에 접종하여 35℃에서 각각 증균배양하였다. 시료가 접종된 APW는 *V. cholerae*의 경우 6~8시간, *V. parahaemolyticus*와 *V. vulnificus*는 18~24시간 배양한 후 배양액은 Thiosulfate Citrate Bile Sucrose (Merck, Germany, TCBS) 평판에 도말하여 35℃에서 18~24시간 배양하였다. 배양한 TCBS 평판에서 *V. alginolyticus*와 *V. cholerae*의 경우는 황색집락을, *V. parahaemolyticus*와 *V. vulnificus*는 녹색집락을 각각 취하여 Triple Sugar Iron agar (Difco, USA, TSI)에 접종하여 35℃에서 24시간 배양한 후, 전형적인 반응을 나타내는 균주는 내염성 시험, 42℃ 발육시험, ONPG (ortho-nitrophenol β-D-galacto-pyranoside) 시험 등을 거친 후 API 20NE (bioMerieux, France)로 동정하였다.

한편, 해수와 어류에서 계절에 따른 장염비브리오의 균수 변화를 알아보기 위하여 BAM (US FDA, 1992a)에 준하여 각 회석단별로 3개의 시험관을 사용하는 최확수법(Most Probable Number; MPN)으로 정량하는 시험도 병행하였다.

2.3.2. *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus*의 분리 및 동정은 BAM (Bennett and Lancette, 1992)

에 준하여 실시하였다. 어류의 경우 전처리된 시료 25 g에 인산완충희석수 (Phosphate Buffer, pH 7.2) 225 mL를 첨가하여 blender로 균질화한 다음 10% NaCl이 함유된 Tryptic Soy broth (Merck, Germany, TSB)에 접종하고, 해수는 여과 후 membrane filter를 모아서 TSB 100 mL에 접종하여 35℃에서 48시간 배양하였다. 배양액은 Baird-Parker agar (Difco, USA) 평판에 도말하여 35℃에서 48시간 배양한 다음 주위에 투명환이 발생한 집락을 선택하여 coagulase 시험을 실시하고 전형적인 반응을 나타내는 양성균주는 API Staph (bioMerieux, France)로 동정하였다.

2.3.3. *Salmonella* sp.

Salmonella sp.의 분리 및 동정은 BAM (Andrews et al., 1992)에 준하여 실시하였다. 어류의 경우 전처리된 시료 25 g을 Buffered Peptone Water (0.5% NaCl 함유, pH 7.2±0.2, BPW) 225 mL에 접종하고, 해수는 여과 후 membrane filter를 모아서 BPW 100 mL에 접종하여 35℃에서 24시간 증균배양하였다. 증균배양액(1 mL)은 10 mL의 Tetrathionate broth (Merck, Germany)와 Rappaport-Vassiliadis broth (Merck, Germany)에 각각 접종하고 35℃에서 24시간 배양하였다. 각 배양액은 Bismuth Sulfite agar (Difco, USA, BS), Xylose Lysine Desoxycholate agar (Difco, USA, XLD), Hektoen Enteric agar (Difco, USA, HE) 및 Rambach agar (Merck, Germany) 평판에 각각 도말한 다음 35℃에서 24시간 배양하고 전형적인 형태의 집락을 분리하였다. 분리된 균주는 TSI 사면 배지에 접종하여 35℃에서 24시간 배양한 후 표준균주와 같은 반응을 나타내는 *Salmonella* sp. 의심균주는 TSA 사면배지에 배양한 후 API 20E (bioMerieux, France)로 동정하였다.

2.3.4. *Shigella* sp.

Shigella sp.의 분리 및 동정은 BAM (Andrews et al., 1992)에 준하여 실시하였다. 어류의 경우 전처리된 시료 25 g을 BPW 225 mL에 접종하고 35℃에서 24시간 증균 배양하였다. 배양액 1 mL를 *Shigella* broth 9 mL에 접종하여 44.5℃에서 혐기배양 조건으로 24시간 배양한 후 선택배지인 BS agar, XLD agar, HE agar 평판에 도말한 다음, 전형적인 집락을 선택하여 TSI 사면 배지에 접종하여 35℃에서 24시간 배양하였다. TSI 사면배지에서 전형적인 반응을 나타내는 *Shigella* sp. 의심균주는 TSA 사면배지에 증균배양하여 API 20E (bioMerieux, France)로 동정하였다.

2.4. 분리균주에 대한 항균제 감수성 시험

분리·동정된 균주의 항균제 감수성 시험은 Acar and Goldstein (1991)의 디스크 확산법과 미국 National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2004)에 준하여 실시하였다. 즉, 분리된 각 균주는 Müller Hinton broth (Merck, Germany)에서 35℃에서 18~24시간 배양한 다음 배양액의 농도를 McFarland No. 0.5가 되도록 조정하였다. 희석된 균액은 1% NaCl을 첨가하고 두께 4 mm로 굳힌 Müller Hinton agar (Merck, Germany, MHA) 평판에 면봉으로 도말하였다. 균액이 접종된 MHA 평판은 약 5분간 상온에 방치하여 균액을 흡수시킨 후 항균제 디스크(ϕ 8 mm)를 디스펜서(dispensor)를 이용하여 평판에 고착시켰다. 항균제 디스크가 고착된 MHA 평판은 35℃에서 16~18시간 배양한 다음 항균제 디스크 주변에 형성된 생육억제대(inhibition zone)의 크기를 측정하여 항균제 감수성 유무를 판별하였다. 분리균주의 항균제 감수성의 정도는 NCCLS 기준에 따라 내성(R; resistance)과 감수성(S; susceptible)으로 구분하였다.

분리된 위생지표세균 및 병원성세균에 대한 항균제 감수성 측정에 사용된 항균제 디스크는 Sensi-Disc (BBL, USA)를 사용하였으며, 균종별로 시험된 항

균체의 종류와 함량은 Table 2에 나타내었다.

2.5. Tetracycline 내성유전자 특성 시험

2.5.1. Polymerase Chain Reaction(PCR) 반응

2.5.1.1. Total DNA 추출

시험균을 TSB에 접종하여 35℃에서 18시간 배양한 다음 배양액 1 mL를 원심분리(20,000×g, 5분)하여 집균하였다. 집균된 균체는 200 µL의 TEG 완충용액(25 mM Tris · HCl, 10 mM EDTA, 50 mM glucose, pH 8.0)으로 현탁한 다음 원심분리(20,000×g, 5분)하여 상정액을 제거하였다. Lysozyme (Sigma, USA)이 2 mg/mL가 첨가된 200 µL의 TEG 완충용액에 현탁하여 30℃에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응액에 150 µL의 10% sodium dodecyl sulfate (Sigma, USA) 용액을 1% 되도록 첨가하여 70℃에서 완전히 투명하게 될 때까지 처리하고, 300 µL의 3M sodium acetate (pH 4.8)을 첨가한 후 0℃에서 10분간 방치한 다음 원심분리(20,000×g, 20분)하였다. 상정액 500 µL를 취하고 동량(v/v)의 PCI (saturated phenol : chloroform : isoamylalcohol = 25 : 24 : 1, Bioneer) 용액을 첨가하여 현탁시킨 다음 원심분리(20,000×g, 30분)하였다. 상정액 400 µL에 RNase A (Sigma, USA)를 200 µg/mL 되도록 첨가하고 30℃에서 1시간 반응시켰다. 반응 후 proteinase K (Sigma, USA)를 50 µg/mL 첨가하고 50℃에서 1시간 반응시켜 단백질을 제거하였다.

위의 반응액에 동량의 PCI 용액을 첨가하여 잘 혼합한 후 원심분리(20,000×g, 10분)하였다. 상정액 400 µL를 취한 다음 2배량의 냉에탄올(-20℃)을 첨가하고 -70℃에서 1시간 정치시켰다. 반응액은 원심분리(20,000×g, 30분)하여 상정액을 제거하고 침전물(pellet)은 1 mL의 70% 에탄올로 1회 세척한 다음 10분간 공기 중에서 건조시켜 에탄올을 모두 제거하였다. 침전물은 50 µL의 TE 완충용액(10 mM Tris · HCl, 1 mM EDTA, pH 7.4)에 현탁시켜 total

Table 2. Antimicrobial disks used for the susceptibility test of the bacteria strain

Antimicrobial agent	Contents (/disk)	<i>E. coli</i> or <i>Salmonella</i> sp.	<i>S. aureus</i>	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Vibrio</i> spp.
Amikacin (AN)	30 µg	•	•		•
Amoxicillin/clavulanic acid (AmC)	20/10 µg	•		•	•
Ampicillin (AM)	10 µg	•		•	•
Cefazolin (CZ)	30 µg	•			
Cefepime (FEP)	30 µg	•			•
Cefotaxime (CTX)	30 µg	•			•
Cefoxitin (FOX)	30 µg	•			
Cephalothin (CF)	30 µg	•			
Chloramphenicol (C)	30 µg	•		•	
Ciprofloxacin (CIP)	5 µg	•		•	•
Clindamycin (CC)	2 µg		•		
Doxycycline (D)	30 µg	•	•	•	•
Enrofloxacin (ENO)	5 µg	•			
Erythromycin (E)	15 µg		•	•	
Gentamicin (GM)	10 µg	•		•	
Imipenem (IPM)	10 µg	•			
Norfloxacin (NOR)	10 µg	•			
Oxacillin (OX)	1 µg		•		
Oxolinic acid (OA)	2 µg	•			•
Penicillin (P)	2units		•		
Rifamfin (RA)	5 µg			•	
Streptomycin (S)	10 µg	•			
Tetracycline (TE)	5 µg	•	•	•	•
Sulfamethoxazole/ Trimethopenem (SXT)	23.75/ 1.25 µg	•	•		•
Vancomycin (VA)	5 µg		•	•	
Total		19	9	10	10

DNA로 사용하였으며 실험 전까지 -20℃에서 보관하였다.

2.5.1.2. PCR 반응조건

PCR 반응은 PCR Thermal Cycler (Takara, Japan)로 94℃에서 미리 5분간 열변성(denaturation) 시킨 후 94℃ 1분, 62℃ 1분, 72℃ 1분 반응을 1 cycle로 하여 30 cycle 반응시켰으며, 72℃에서 4분간 신장(extension)시켰다.

PCR 후 증폭산물은 0.5 g/μL Ethidium Bromide (EtBr, Sigma)가 첨가된 1% agarose gel 상에서 전기영동하여 확인하였다. 본 연구에 사용된 primer는 tetracycline 내성유전자의 분포조사를 위하여 National Center for Biotechnology Information (NCBI)에서 운영하는 유전자은행(Genebank)으로부터 *E. coli* 유래의 *tet A*, *tet B*, *tet C*, *tet D*, *tet E*, *tet Y*의 유전자를, 그리고 class I integron과 class II integron의 분포조사를 위하여 유전자은행으로부터 *E. coli* 유래의 integrase I (*int I*) 및 integrase II (*int II*)를 검색하여 각각의 염기서열을 근거로 하여 제작하였다(Table 3, 4).

2.5.2. Tetracycline 내성유전자의 cloning

Tetracycline에 내성을 나타내는 균주 중 목적으로 하는 유전자를 cloning하기 위하여 PCR 증폭산물을 정제하는 gel elution 단계와 vector에 삽입(ligation)하여 competent cell (*E. coli* DH5α)에 transformation하는 단계로 나누어 실험하였다.

PCR 증폭산물은 Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System kit (Promega, USA)를 사용하여 agarose gel로부터 분리·정제하였다. PCR 산물 중 목적으로 하는 DNA를 절단하여 microtube에 옮기고 겔(gel) 10mg 당 membrane binding solution 10 μL를 첨가하였다. 65℃에서 10분간 반응시켜 겔을 녹인 후 컬럼(column)에 옮기고 원심분리(16,000×g, 1분)하여 상정액을 제거하였다.

Table 3. Primers and expected sizes of PCR amplicons for various *tet* genes

Primer	<i>tet</i> genes	Oligonucleotide sequence (5'-3')	Expected sizes (bp)	Accession No. or reference
tetAPF	<i>tet A</i>	gCT ACA TCC TgC TTg CCT TC	210	Ng et al, 2001
tetAPR		CAT AgA TCg CCg TgA AgA gg		
tetBOF	<i>tet B</i>	ATg AAT AgT TCg ACA AAg ATC gC	1206	J01830
tetBOR		CTA AgC ACT TgT CTC CTg TTT AC		
tetCOF	<i>tet C</i>	ATg AAA TCT AAC AAT gCg CTC ATC g	1191	J01749
tetCOR		TCA ggT CgA ggT ggC CCg gCT CCA Tg		
tetDOF	<i>tet D</i>	ATg ATA AgC AgT TTC ATA CAA Cg	356	AY528506
tetDOR		TCA gTg CAT TgC CTC CAA TTC		
tetEOF	<i>tet E</i>	ATg AAC CgC ACT gTg ATg ATg gC	1218	L06940
tetEOR		gCC ATC ATC ACA gTg Cgg TTC		
tetYOF	<i>tet Y</i>	ATg TCA AAA TCA CTT ATA ACC gCA C	541	AF070999
tetYOR		TTA AgA TCg CAA TAA ACT ggC Tg		

Table 4. Primers and expected sizes of PCR amplicons for integron

Primer	Integron	Oligonucleotide sequence (5'-3')	Expected sizes (bp)	Accession No.
Eint I –F	class I	TCA gCA CATgCg TgT AAA TCg TCg	951	L06822
Eint I –R		ATg AAA ACCC gCC TCT gCG CCg TTA C		
Eint II –F	class II	TTT ATT gCT ggg ATT Agg CgC gTg g	536	AJ0018146
Eint II –R		TTC TAT ACg CAC ggA TAT gCg AG		

Membrane wash solution 700 μ L를 첨가하여 동일한 방법으로 원심분리하여 불순물을 제거한 다음 실온에서 1분간 건조하였다. DNA 분리는 nuclease-free water 50 μ L를 첨가한 후, 원심분리하고 -20°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

정제한 DNA는 pGEM-T Easy Vector System kit (Promega, USA)를 사용하여 cloning시켰다. 정제된 DNA 3 μ L, rapid ligation buffer ($\times 2$) 5 μ L, pGEM vector 1 μ L, T4 DNA ligase 1 μ L, 증류수 10 μ L를 첨가하여 16°C에서 4시간 동안 반응시켰다. Ligation시킨 반응용액 10 μ L와 competent cell (*E. coli* DH5 α) 100 μ L를 섞어서 얼음 내에서 30분간 반응시키고, 42°C에서 90초간 heat-shock 시킨 후, 다시 빙욕상에서 2분간 반응시켰다.

반응 후 SOC medium (Sigma, USA) 900 μ L를 첨가하고, 37°C에서 60분간 진탕 배양시켰다. 배양액을 X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside, Takara, Japan) 25 μ g/mL과 ampicillin 50 μ g/mL가 첨가된 Luria-Bertani (Difco, USA; LB) 평판배지에 도말하여 37°C에서 24시간 동안 배양시킨 후 흰색집락만을 선택하여 시험하였다.

2.5.3. Plasmid DNA 분리 및 DNA 염기서열 분석

Plasmid DNA는 알칼리용해법(alkali-lysis)으로 분리하였다(Birnboim and Doly, 1979). 항생제가 함유된 LB 액체배지에 균을 접종하여 배양한 다음 원심분리 (20,000 $\times$ g, 5분)하여 균체를 집균하였다. 집균한 균체는 STE 완충용액(0.1 M NaCl, 10 mM Tris $\cdot$ HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 200 μ L을 사용하여 세척한 다음, lysozyme이 5 mg/mL 함유되어 있는 TEG 완충용액에 300 μ L를 첨가하여 현탁시켰다. 0°C, 10분간 반응 후 300 μ L의 1% SDS 용액(0.2 N NaOH 함유)을 첨가하여 0°C에서 5분간 용해시켰다. 반응액에 300 μ L의 3 M sodium acetate 용액(pH 5.2)을 첨가하여 0°C에서 10분간 정치한 다음 원심분리

(20,000×g, 10분)하였다. 상정액을 취하여 동량의 PCI 용액을 첨가하여 원심분리(20,000×g, 10분)하였다. 상정액을 microtube로 옮겨 2배량(v/v)의 냉에탄올을 첨가하여 plasmid DNA를 침전시켰다. 침전물은 원심분리(20,000×g, 10분) 후 상온에서 건조하고 50 µL의 TE 완충용액(10 mM Tris · HCl, 1 mM EDTA, pH 7.4)에 현탁시켜 -20℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

Sequencing용 plasmid의 추출은 miniprep plasmid isolation kit (Qiagen, USA)와 plasmid extraction kit (Bioneer, Korea)를 사용하여 추출하였다.

DNA 염기서열 분석을 위하여 Dye terminator cycle sequencing ready kit (Applied biosystem, Forster City, CA, USA)를 사용하였으며, 각각의 염기서열은 NCBI에서 운영하는 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 및 European Bioinformatics Institute (EBI)에서 운영하는 FASTA33 (<http://www.ebi.ac.uk/fasta33>)의 database를 이용하여 분석하였다.

2.5.4. *E. coli*의 tetracycline 내성유전자 분포 조사

Tetracycline에 내성을 나타내는 *E. coli*를 대상으로 tetracycline 내성유전자(*tet* genes)의 분포조사를 실시하였다. 즉 tetracycline 내성기전 중 efflux 펌프 기능에 의해 tetracycline에 내성을 나타내는 내성유전자인 *tet A*, *tet B*, *tet C*, *tet D*, *tet E* 및 *tet Y*의 분포 조사를 위하여 tetracycline 내성 *E. coli* 165균주로부터 total DNA를 분리하고 PCR법을 이용하여 Table 3에 나타난 각각의 primer로 확인하였다.

2.5.5. 해양상채세균 및 장내세균의 tetracycline 내성유전자 상동성 조사

어류양식장으로부터 분리된 균주 중 tetracycline에 내성을 가지는 해양상채세균 *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*와 장내세균 *Enterococcus* spp.를 대상으로 Table 3에 나타난 primer로 PCR법을 이용하여 *tet* genes의 분포를 조사하였다. 각 균주에서 검출된 *tet* genes은 상기의 방법으로 cloning한 후 염기서

열을 비교 분석하여 *E. coli*, *Enterococcus* spp. 등 육상유래세균으로부터 *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* 등 해양상재세균으로의 항균제 내성유전자의 전이 가능성을 조사하였다.

2.5.6. *E. coli*의 integron 분포 조사

Tetracycline에 내성을 가지는 *E. coli* 165균주를 대상으로 이동성 인자 중 내성 유전정보가 포함된 cassette 유전자가 존재함으로써 다양한 항균제들에 대해 내성을 나타내는 integron 중 class I 과 II 의 분포를 조사하였다. Integron의 유무는 Table 4에 나타난 primer로 PCR법을 이용하여 확인하였으며, integron이 존재함으로써 발현되는 다제내성 정도를 확인하기 위하여 integron이 존재하는 균주와 존재하지 않는 균주 상호간의 다제내성 정도를 비교 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 연안해역 어류양식장에서의 위생지표세균 및 병원성세균의 분포

2004년 5월부터 10월까지 우리나라 남해안 연안에서 어류양식업이 성행하고 있는 부산, 거제, 통영, 여수, 완도, 제주 등 6개 지역에 소재한 어류양식장 10개소를 대상으로 어류양식장의 세균학적 오염정도를 파악하기 위하여 사육용수 및 양식어류에 대한 위생지표세균 및 병원성세균 분포조사를 실시하였다. 위생지표세균은 분변계대장균, 장구균(*Enterococcus* spp.) 등을, 그리고 병원성세균은 병원성비브리오(*Vibrio parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*), 육상유래 *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Staphylococcus aureus* 등을 대상으로 하였다.

1.1. 어류양식장에 대한 위생지표세균의 분포

1.1.1. 시료별 위생지표세균의 분포

우리나라 연안해역 소재 6개 지역의 사육용수 및 양식어류 중의 분변계대장균수를 Table 5에 나타내었다. 부산소재 넙치 양식장의 해수 및 어류 중 분변계대장균수의 범위는 각각 $<1.8 \sim 49$ MPN/100mL, $<18 \sim 20$ MPN/100g으로 비교적 양호한 것으로 평가되었다. 거제소재 농어 양식장의 해수와 어류 중 분변계대장균수의 범위는 각각 $<1.8 \sim 350$ MPN/100mL, $<18 \sim 1,100$ MPN/100g이었으며, 어류양식장의 위치적 여건상 배수유역에서 유입되는 각종 오염원의 영향권에 있기 때문에 사료된다. 그러나 넙치 양식장의 해수 및 어류 중 분변계대장균수의 범위는 각각 $<1.8 \sim 17$ MPN/100mL, $<18 \sim 40$ MPN/100g으로 아주 양호한 상태를 유지하였다.

한편, 통영의 조피볼락 및 참돔 양식장의 경우 분변계대장균수의 범위는 해수에서 $<1.8 \sim 2.0$ MPN/100mL, 조피볼락에서 $<18 \sim <18$ MPN/100g, 참돔에서

Table 5. Ranges of fecal coliform in seawater and farmed fishes collected at different geographical fish farms

Sampling area	Samples	Fecal coliform (MPN/100g or mL)	Number of samples
Busan	Oliver flounder	<18 ~ 20	6
	Seawater	<1.8 ~ 49	6
Geoje	Sea bass	<18 ~ 1,100	6
	Seawater	<1.8 ~ 350	6
	Oliver flounder	<18 ~ 40	6
	Seawater	<1.8 ~ 17	6
Tongyeong	Black rock fish	<18 ~ <18	6
	Red sea bream	<18 ~ 20	6
	Seawater	<1.8 ~ 2.0	6
Yeosu	Sea bass	<18 ~ 460	6
	Seawater	<1.8 ~ 7.8	6
	Black rock fish	<18 ~ 45	6
	Seawater	<1.8 ~ 2.0	6
Wando	Black rock fish	<18 ~ 3,500	6
	Seawater	<1.8 ~ 540	6
	Oliver flounder	<18 ~ 16,000	6
	Seawater	<1.8 ~ 170	6
Jeju	Oliver flounder (A)	<18 ~ 2,400	6
	Seawater	<1.8 ~ <1.8	6
	Oliver flounder (B)	<18 ~ 20	6
	Seawater	<1.8 ~ 1.8	6

<18~20 MPN/100g으로 나타나 조사대상 어류양식장 중 가장 양호한 위생상태로 나타났으며, 양식장 주변에 유의할 만한 오염원이 없는 것으로 확인되었다. 여수의 농어 양식장의 해수 및 어류 중 분변계대장균수의 범위는 각각 <1.8~7.8 MPN/100mL, <18~460 MPN/100g으로 8월에 농어에서 460 MPN/100g이 검출된 것을 제외하면 해수와 어류 모두 양호한 위생상태를 나타내었다. 조피볼락 양식장의 해수 및 어류 중 분변계대장균수의 범위는 각각 <1.8~2.0 MPN/100mL, <18~45 MPN/100g로 비교적 양호한 위생상태를 나타내었다. 완도소재 조피볼락 양식장의 해수 및 어류 중 분변계대장균수의 범위는 각각 <1.8~540 MPN/100mL, <18~3500 MPN/100g이었으며, 넙치양식장의 해수 및 어류 중 분변계대장균수의 범위는 각각 <1.8~170 MPN/100mL, <18~16,000 MPN/100g으로 나타나 다른 지역에 비하여 상대적으로 높은 오염상태를 나타내었다. 제주소재 넙치 양식장 A, B 2개소의 사육용수 중의 분변계대장균수 범위는 각각 <1.8~<1.8 MPN/100mL, <1.8~ 1.8 MPN/100mL이었으며, 두 양식장의 넙치 중 분변계대장균수의 범위는 각각 <18~2,400 MPN/100g, <18~20 MPN/100g으로 해수는 양호한 위생상태를 나타내었으며, 7월에 A양식장의 넙치에서 2,400 MPN/100g이 검출된 것을 제외하면 위생상태는 양호한 것으로 확인되었다.

이상의 결과, 연안해역 10개소 어류양식장의 사육용수의 세균학적 수질은 총 60개 시료 중의 분변계대장균수의 범위가 <18~540 MPN/100mL이었고, 양식어류의 세균학적 수질은 완도소재 조피볼락 및 넙치양식장을 제외하고는 <18~2,400 MPN/100g으로 비교적 양호한 것으로 확인되었다.

한편, 해수 및 양식어류에 대한 분변계대장균 및 장구균의 검출율을 시료별로 구분하여 Fig. 2에 나타내었다. 해수에서의 분변계대장균과 장구균의 검출율은 각각 41.7% 및 13.3%로 장구균보다 분변계대장균의 검출율이 높았다. 그러나 어류의 경우 어종에 따른 검출율의 차이는 있었으나 동일어종에서 장구

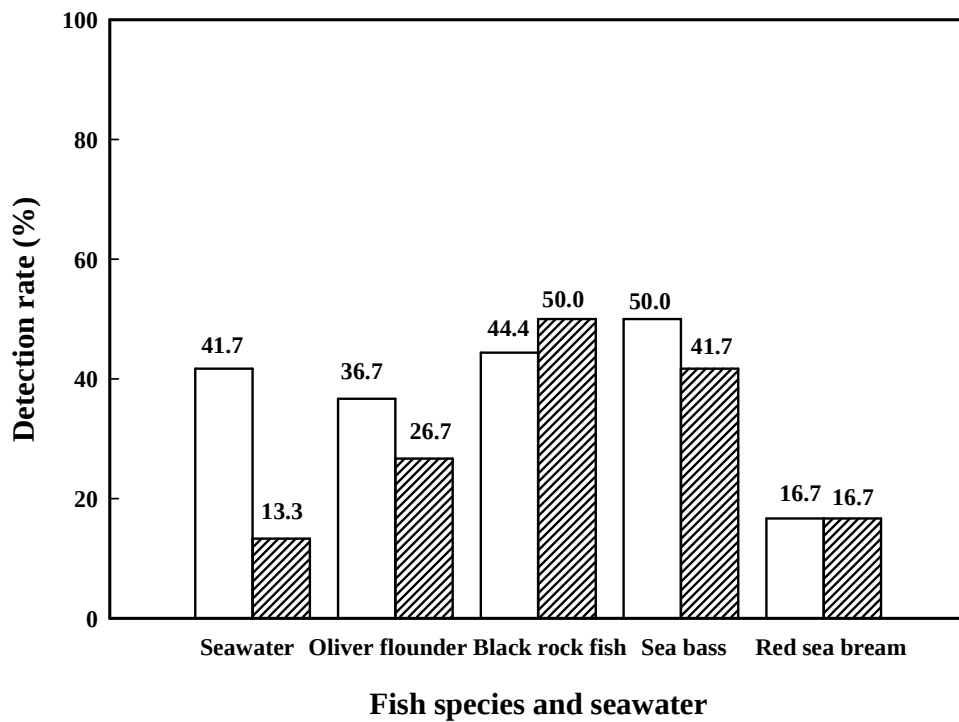


Fig. 2. Detection rate of fecal coliform and *Enterococcus* spp. in seawater and farmed fishes.

□, Fecal coliform; ▨, *Enterococcus* spp..

균과 분변계대장균의 검출율은 큰 차이가 없었다.

분변계대장균과 장구균은 사람이나 동물의 소화관 내에 상재하는 세균으로서, 인축의 분변에 오염되지 않은 환경에서는 검출되지 않으므로 인축분변 오염지표세균으로 활용되고 있다. 또한, *E. coli*가 해수 중에서 0.8일 생존하는데 비하여 장구균은 2.4일 동안 생존할 수 있기 때문에 해수 중의 위생지표세균은 장구균이 분변계대장균보다 더욱 적절하다는 보고도 있다(Hanes and Fragala, 1967). 한편 장구균은 대장균군과는 큰 상관관계를 나타내지 않았으나, *E. coli*와는 밀접한 상관관계를 나타내어 미국 환경보호국(Environmental protection agency: EPA)에서는 해양수질 조사시 위생지표세균으로서 장구균을 추천하기도 하였다(US EPA, 1986).

1.1.2. 지역별 위생지표세균의 분포

해수 및 양식어류 4종에 대한 지역별 분변계대장균과 장구균의 검출결과를 Fig. 3에 나타내었다. 분변계대장균은 부산, 거제 그리고 완도에서 58.3%를 나타내었고, 여수에서 33.3%, 통영과 제주에서 11.1~12.2%를 나타내었다. 그리고 장구균은 완도에서 45.8%로 가장 높은 검출율을 나타내었고, 다음으로 여수에서 33.3%, 통영에서 22.2%, 부산에서 16.7%를 나타내었으며, 제주와 거제에서 12.5%로 가장 낮은 검출율을 나타내었다. 조사지역 중 완도와 여수 지역에서 장구균의 검출율이 다른 지역보다 높은 것은 어류양식장의 위치상 주변의 오염원으로부터 직접적인 영향을 받기 때문이며, 통영이나 제주에서 분변계대장균의 검출율이 낮았던 것은 통영의 경우 주변의 육상의 오염원이 적은 지역에 위치하고 있으며, 제주의 경우에는 취수원이 육상에서 멀리 떨어져 있기 때문으로 사료된다.

1.1.3. 시기별 위생지표세균의 분포

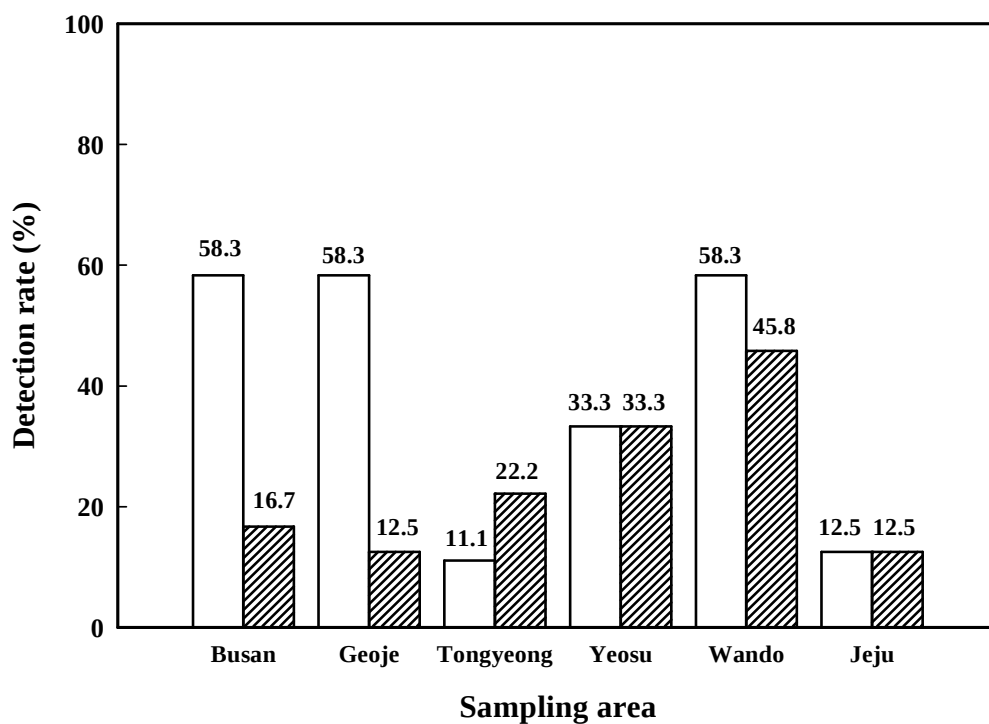


Fig. 3. Detection rate of fecal coliform and *Enterococcus* spp. in seawater and fishes by sampling area.

Detection rate stood for overall detection ratio from seawater and farmed fishes.

□, Fecal coliform; ▨, *Enterococcus* spp..

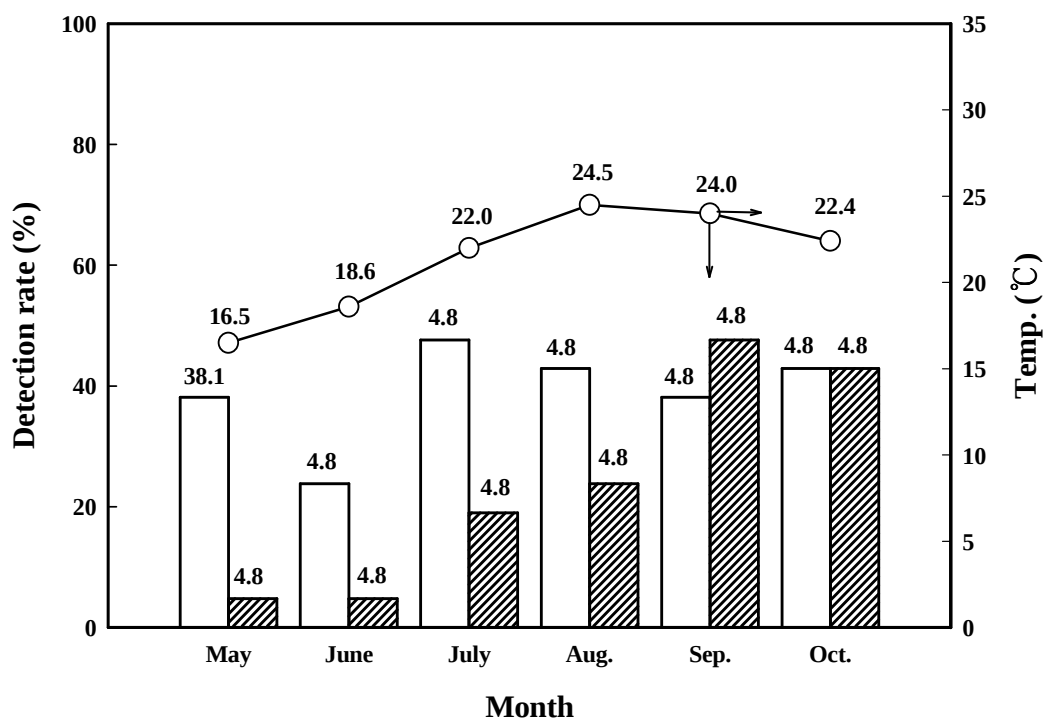


Fig. 4. Monthly detection rate of fecal coliform and *Enterococcus* spp..

Detection rate stood for overall detection ratio from seawater and farmed fishes.

□, Fecal coliform; ▨, *Enterococcus* spp..

각 지역에서 채취한 해수와 양식어류 중 분변계대장균 및 장구균의 월별 검출율을 Fig. 4에 나타내었다. 분변계대장균의 월별 검출율의 범위는 23.8~47.6%로 채취시기에 따라 큰 차이는 없었다. 그러나 장구균의 검출율의 범위는 4.8~47.6%이었으며, 월별 검출율의 차이는 매우 크게 나타났다. 즉, 5월에는 4.8%에 불과하였으나 7월에는 19.0%로 증가하였으며, 8월과 9월에 각각 23.8%, 47.6%로 증가한 후 10월에 42.9%로 다소 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 7월 이후 발생하는 강우에 의하여 배수유역에서 지속적으로 분변물질이 해역으로 유입되기 때문으로 사료된다.

1.2. 어류양식장에 대한 병원성세균의 분포

1.2.1. 시료별 병원성세균의 분포

양식어류 및 해수에 대한 *S. aureus*, *Salmonella* sp. 및 *Shigella* sp.의 모니터링 결과는 Table 6에 나타내었다. 총 126개 시료에서의 *S. aureus*의 검출율은 6.3%이었으며, 어류에서는 농어 1개 시료에서 검출되었으나 해수에서는 7개 시료에서 검출되어 양식어류에서의 *S. aureus*의 오염정도는 낮았다. 그리고 *Salmonella* sp.는 넙치, 참돔, 해수에서 각각 1개 시료에서 검출되어 2.4%의 낮은 검출율을 나타내었다.

한편, 근년 우리나라에서는 세균성 이질환자가 전국적으로 발생함에 따라 어류양식장에서의 이질균 오염의 우려가 있어 양식어류 및 해수에 대한 이질균의 오염실태를 조사한 결과, 세균성 이질의 원인균인 *Shigella* sp.는 모든 시료에서 검출되지 않았다.

양식어류 및 사육용수에 대한 병원성 비브리오 모니터링 결과는 Table 7에 나타내었다. 모니터링 대상 병원성 비브리오 중 제1군 전염병인 콜레라의 원인균인 *V. cholerae*와 제3군 전염병인 비브리오패혈증의 원인균인 *V. vulnificus*는 어류 및 해수 시료에서 검출되지 않았다. 그러나 총 126개 시료 중

Table 6. Detection rate of *Salmonella* sp., *Shigella* sp. and *Staphylococcus aureus* in seawater and farmed fishes

Samples	No. of sample	No. of positive sample(%)		
		<i>Salmonella</i> sp.	<i>Shigella</i> sp.	<i>S. aureus</i>
Fish species				
Oliver flounder	30	1(3.3)	0(0)	0(0.0)
Black rock fish	18	0(0.0)	0(0)	0(0.0)
Sea bass	12	0(0.0)	0(0)	1(8.3)
Red sea bream	6	1(16.7)	0(0)	0(0.0)
Seawater	60	1(1.7)	0(0)	7(11.7)
Total	126	3(2.4)	0(0)	8(6.3)

Table 7. Detection rate of pathogenic Vibrios in seawater and farmed fishes

Samples	No. of sample	No. of positive sample(%)			
		<i>V. cholerae</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>
Fish species					
Oliver flounder	30	0(0)	0(0)	6(20.0)	11(36.7)
Black rock fish	18	0(0)	0(0)	5(27.8)	7(38.9)
Sea bass	12	0(0)	0(0)	3(25.0)	2(16.7)
Red sea bream	6	0(0)	0(0)	0(0.0)	2(33.3)
Seawater	60	0(0)	0(0)	32(53.3)	40(66.7)
Total	126	0(0)	0(0)	46(36.5)	62(49.2)

*V. parahaemolyticus*는 46개 시료(36.5%)에서, *V. alginolyticus*는 62개 시료(49.2%)에서 각각 검출되었다. *V. parahaemolyticus*의 경우 참돔에서는 검출되지 않았으나, 그 외의 어종에서는 20.0~27.8%의 비슷한 검출율을 나타내었고 해수에서의 검출율은 53.3%이었다. 한편, *V. alginolyticus*의 검출율은 해수에서 66.7%, 어류에서 16.7~38.9%로 해수에서의 검출율이 어류보다 약 1.7~4배 높게 나타나 *V. parahaemolyticus*와 유사한 경향을 나타내었다. 어종에 따라서는 조피볼락에서 38.9%로 가장 높았고, 다음으로 넙치, 참돔, 농어의 순으로 나타났다.

*V. parahaemolyticus*는 식중독 원인균으로 잘 알려져 있고, *V. alginolyticus*는 해양이나 기수지역에 흔히 분포하는 균으로(Barbieri et al., 1999), 양식어류에 대하여 질병을 유발하는 것으로도 알려져 있으며(Balebona et al., 1998), 일부 중이염의 원인이 되기도 한다(Dronda et al, 1991).

우리나라 연안의 어패류와 해수에서 병원성 비브리오의 분포는 경남 일부 지역에서의 양식어의 경우 어종별 검출율은 넙치가 48.4%로 가장 높았으며, 다음으로 조피볼락(24.2%), 농어(16.1%), 참돔(6.4%)의 순이었다고 보고된 바 있다(Heo et al., 2002). 그리고 경북 동해안 연안 해수에서의 검출율은 42.9%이었으며, 해수와 어패류 등을 포함한 전 시료에서의 *V. parahaemolyticus* 검출율은 31.9%로 보고되었다(Son et al., 2003). 한편, 부산 및 경기도 연안 해역에서의 *V. parahaemolyticus* 검출율이 각각 59%, 38.9%이었다는 보고된 바 있다(Lee and Jeong, 2004; Lee et al., 1989).

1.2.2. 지역별 병원성세균의 분포

조사지역에 따른 병원성세균의 검출율은 Table 8에 나타내었다. 해수 중 *V. parahaemolyticus*는 부산, 거제, 통영에서 66.7%의 검출율을 나타내었고, 여수와 완도에서 50.0%, 제주에서 33.3%의 검출율을 나타내었다. 그리고 *V. algi-*

Table 8. Detection rate of pathogenic bacteria in seawater and farmed fishes by sampling area

Area	Samples	No. of samples	<i>Salmonella</i> sp.	<i>S. aureus</i>	<i>Vibrio</i> spp.	
					<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>
Busan	Fish	6	0(0) ¹⁾	0(0)	16.7(1)	66.7(4)
	Seawater	6	0(0)	0(0)	66.7(4)	83.3(5)
Geoje	Fish	12	8.3(1)	0(0)	8.3(1)	33.3(4)
	Seawater	12	0(0)	16.7(2)	66.7(8)	75.0(9)
Tongyeong	Fish	12	8.3(1)	0(0)	16.7(2)	41.7(5)
	Seawater	6	16.7(1)	0(0)	66.7(4)	66.7(4)
Yeosu	Fish	12	0(0)	8.3(1)	25.0(3)	25.0(2)
	Seawater	12	0(0)	8.3(1)	50.0(6)	83.3(10)
Wando	Fish	12	0(0)	0(0)	50.0(6)	33.3(4)
	Seawater	12	0(0)	33.3(4)	50.0(6)	58.3(7)
Jeju	Fish	12	0(0)	0(0)	8.3(1)	25.0(3)
	Seawater	12	0(0)	0(0)	33.3(4)	41.7(5)

¹⁾ Number of sample detected.

*lyticus*는 해수에서 높은 검출율을 나타내었는데, 부산과 여수에서 83.3%, 다음으로 거제 75.0%, 통영 66.7%, 완도 58.3%, 제주 41.7%의 순으로 나타났다. 어류에서 *V. parahaemolyticus*는 완도에서 50.0%, 다음으로 여수 25.0%, 부산과 통영 16.7%, 거제와 제주 8.3%의 순으로 나타났다. *V. alginolyticus*는 부산에서 66.7%로 가장 높은 검출율을 나타내었고, 다음으로 통영 41.7%, 거제와 완도 33.3%, 그리고 여수와 제주 25.0%의 순으로 나타났다. *S. aureus*는 완도의 조피볼락양식장의 해수 4개 시료(33.3%), 거제의 농어양식장의 해수 2개 시료(16.7%), 여수의 농어양식장의 농어와 해수에서 각각 1개 시료(8.3%)에서 검출되었다. *Salmonella* sp.는 거제의 넙치, 통영의 참돔과 해수 등 각 1개 시료씩 총 3개 시료에서 검출되었다.

1.2.3. 시기별 병원성세균의 분포

시험 대상지역의 어류양식장에서 검출된 병원성세균의 균종별 월별 검출율은 Fig. 5에 나타내었다. 살모넬라는 8월의 3개 시료에서만 검출(13.0%)되었고, *S. aureus*는 6월과 7월, 그리고 9월과 10월에 매월 2개 시료에서 검출되어 각각 8.7%의 검출율을 나타내었다. 한편, 비브리오는 5월에는 검출율이 낮았으나, 수온이 상승하면서 검출율도 증가하기 시작하여 8월에 *V. alginolyticus* 및 *V. parahaemolyticus*가 각각 73.9%, 52.2%로 가장 높은 검출율을 나타내었는데, 이는 비브리오속 세균에 의한 질환이 집중되는 시기와 일치한다.

우리나라 연안해역에서의 *V. parahaemolyticus*의 출현 및 변동에 관한 많은 연구에서 대체로 5월에서 11월 사이에 주로 검출되는 것으로 확인되고 있다(Chang and Kim, 1977; Park et al., 2003; Park et al., 2001). 특히 부산연안의 해수에서 *V. parahaemolyticus*의 검출율은 9월에 가장 높았으며(Lee and Jeong, 2004), 동해안의 유통 수산물 및 해수에서 비브리오 균이 8월을 변곡점으로 하강한다고 보고된 바 있다(Son et al., 2003).

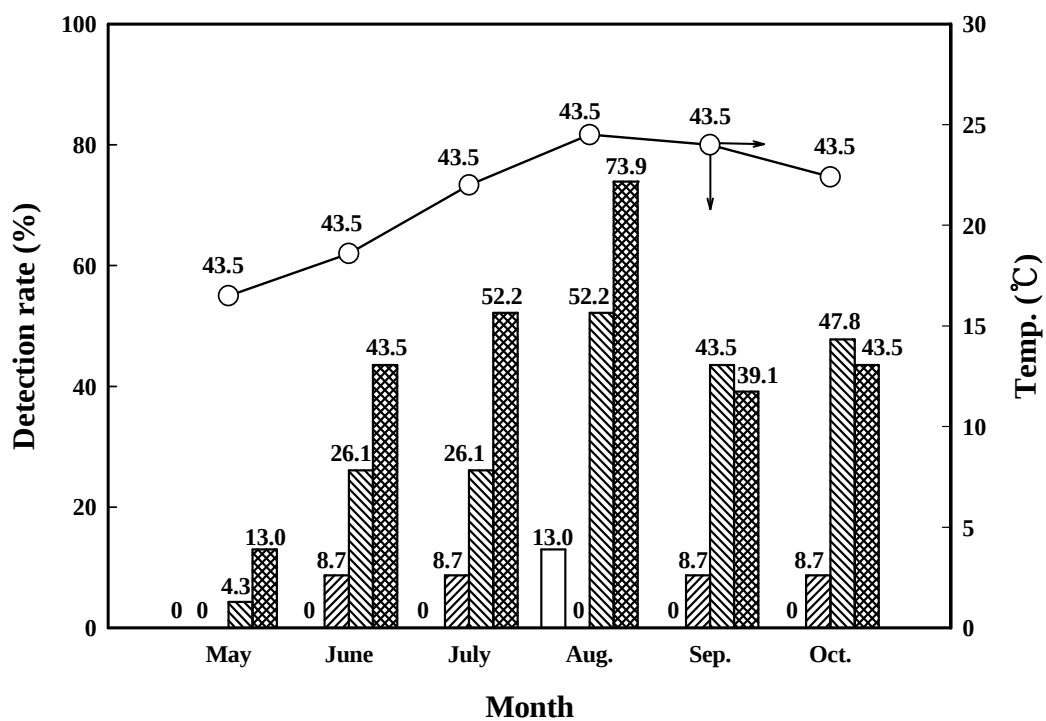


Fig. 5. Comparison of monthly detection rate of pathogenic bacteria in all examined samples.

□, *Salmonella* sp.; ▨, *S. aureus*; ▩, *V. alginolyticus*;
 ▦, *V. parahaemolyticus*.

이상에서 우리나라 연안의 어류양식장에서는 *Shigella* sp., *V. cholerae*, *V. vulnificus* 등 전염병 원인균은 검출되지 않았으나, *Salmonella* sp. 및 *S. aureus* 등의 식중독 원인균은 일부에서 검출되었고, *V. parahaemolyticus*와 *V. alginolyticus*는 여름철에 검출율이 높아 이러한 비브리오균은 양식어류에서 잠재적인 위해인자임을 알 수 있었다.

한편, 수산물 및 그 가공품의 섭취로 인하여 특히 하절기에 집중적으로 발생하는 장염비브리오 식중독의 원인균인 *V. parahaemolyticus*의 해수와 어류에서 균수변화를 최확수법으로 정량하여 Fig. 6에 나타내었다. 어류 및 해수에서의 검출균수는 모두 수온이 상승하는 6월부터 증가하기 시작하여 어류는 8월에, 그리고 해수는 9월에 각각 56.8 MPN/100g 및 11.6 MPN/100mL로 가장 높은 균수를 나타내었다. *V. parahaemolyticus*는 해양상재세균으로 극지방을 제외한 전 세계의 해양에 널리 분포하는 식중독 원인균으로서 이 균에 의해 오염된 식품의 균수가 $10^6/\text{g}$ 을 초과할 경우 식중독을 일으킨다고 알려져 있는데(竹田 등, 1990) 본 연구결과에서 검출된 균수는 이에 비하면 훨씬 낮은 것으로 나타났다. 우리나라의 식품공전(식품의약품안전청, 2004)에는 「더 이상의 가공, 가열조리를 하지 않고 그대로 섭취하는 수산물에서는 장염비브리오가 음성이어야 한다(제5의2.수산물에대한잠정규격).」 라고 규정되어 있어 수산물에서의 장염비브리오균의 검출 그 자체만으로도 법적 규제대상이 되고 있다. 그러나 일본 식품위생법에서 생식용의 신선한 어패류에 대한 장염비브리오의 규정에 의하면 「장염비브리오의 최확수는 검체 1g에 대하여 100이하로 존재하여야 한다(식품·첨가물등의규격기준)」 라고 규정되어 있다. 이에 비하면 본 연구결과에서 검출된 장염비브리오 함량은 일본의 기준함량에 비하여 훨씬 낮은 수준이었다.

따라서 우리나라에서도 수산물 또는 해양환경에서 수산식품 위생관리를 위한 중요한 지표로 사용되고 있는 장염비브리오균을 평가할 때 일본의 식품위

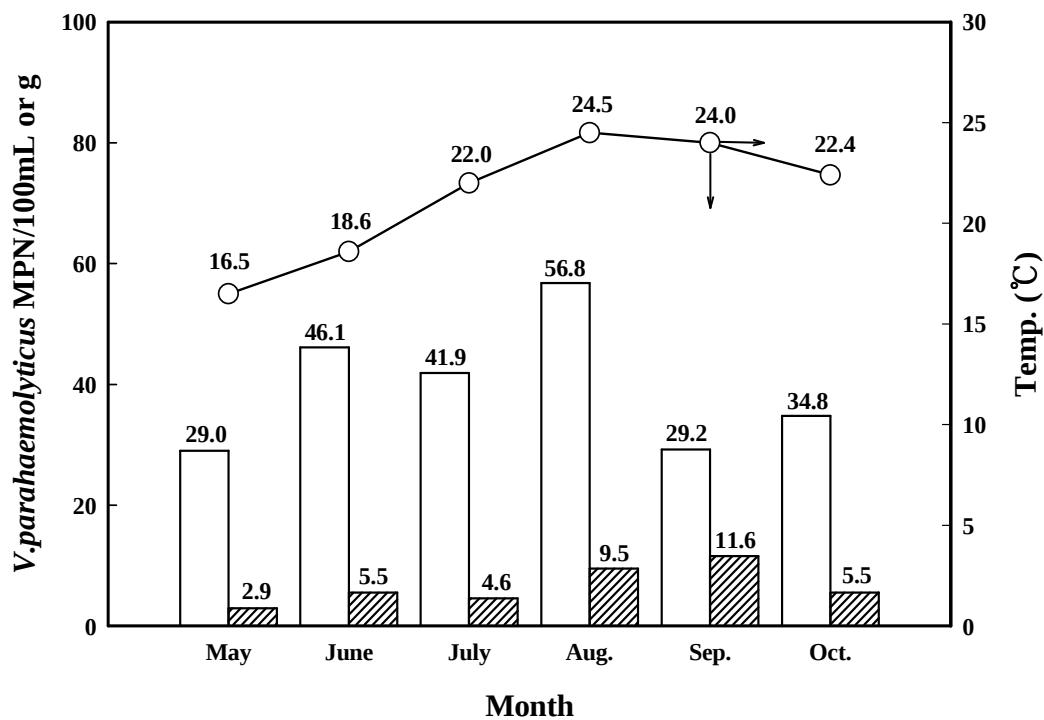


Fig. 6. Monthly comparison of quantitative contents of *V. parahaemolyticus* in all the samples collected from fish farms.

□, Fishes; ▨, Seawater.

생법에서 제시된 바와 같이 최확수법에 의한 장염비브리오균의 법적 기준이 설정되어야 할 것으로 생각된다.

2. 분리균주에 대한 항균제 내성 특성

우리나라 남해안 연안에 소재하는 어류양식업이 성행하고 있는 부산, 거제, 통영, 여수, 완도, 제주 등 6개 지역의 어류양식장에서 양식되고 있는 양식어류 및 해수를 대상으로 양식장의 위생안전을 평가하고 또 양식장에 분포하는 세균의 항균제 내성을 알아보기 위하여 위생지표세균 및 병원성세균을 분리·동정하였다. 항균제 감수성 시험에 사용된 균주수는 총 784균주로 변계대장균인 *E. coli*가 316균주로 가장 많이 분리되었으며, 다음으로 해양상채세균인 *Vibrio* spp. 314균주, *Enterococcus* spp. 121균주, 그 외에 *Salmonella* sp. 18균주, *S. aureus* 15균주 등이 분리되었다(Fig. 7). 해양상채세균 중에서는 대상으로 선정한 *V. vulnificus*와 *V. cholerae*는 모든 시료에서 검출되지 않아 항균제 감수성 시험은 실시하지 못하였으며, *V. parahaemolyticus*와 *V. alginolyticus*만 각각 194균주(24.7%), 120균주(15.3%) 분리되어 이들을 대상으로 항균제 감수성 시험하였다. *Enterococcus* spp. 중에서는 *E. faecalis*가 66균주, *E. faecium*이 37균주 분리되어 대부분을 차지하였고, 이들 외에 일부 시료에서 *E. gallinarum*, *E. avium*, *E. durans* 등이 검출되어 이들에 대한 항균제 감수성 시험도 실시하였다.

2.1. 분리균주의 항균제 내성 특성

분리·동정된 모든 균주에 대하여 각 균종별로 특정한 항균제를 사용하여 감수성을 시험하고, 한 가지 이상의 항균제에 대한 내성을 나타내는 내성균의 비율과 이들 내성균들 중 최소 4개 이상의 항균제에 대해서 내성을 나타내는 다제내성균의 검출비율을 Fig. 8에 나타내었다. 분리된 총 784 균주 중 95.7%에 해당하는 750균주가 한 가지 이상의 항균제에 내성을 나타내는 것으로 확인되었으며, 37.3%에 해당하는 293균주가 다제내성을 나타내었다. 해양상채세균 중 다제내성균의 비율이 *V. parahaemolyticus*에서 2.6%, *V. alginolyticus*에서

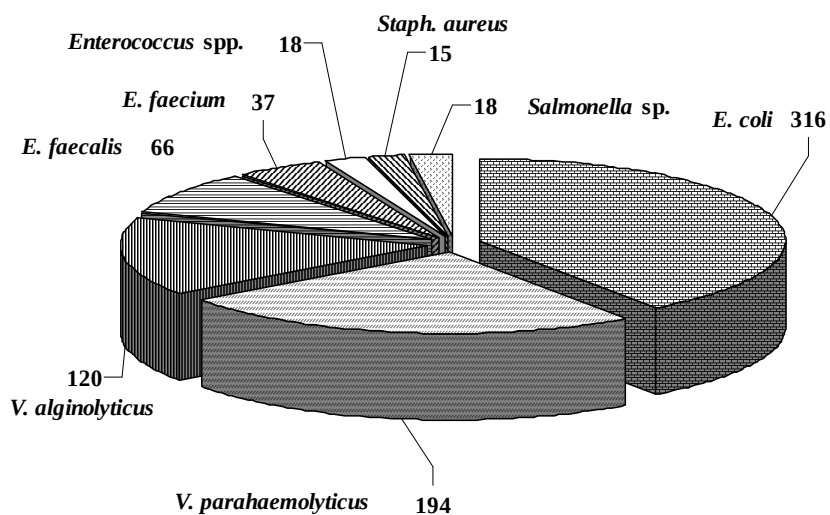


Fig. 7. Number of the bacterial strain isolated from seawater and farmed fishes.

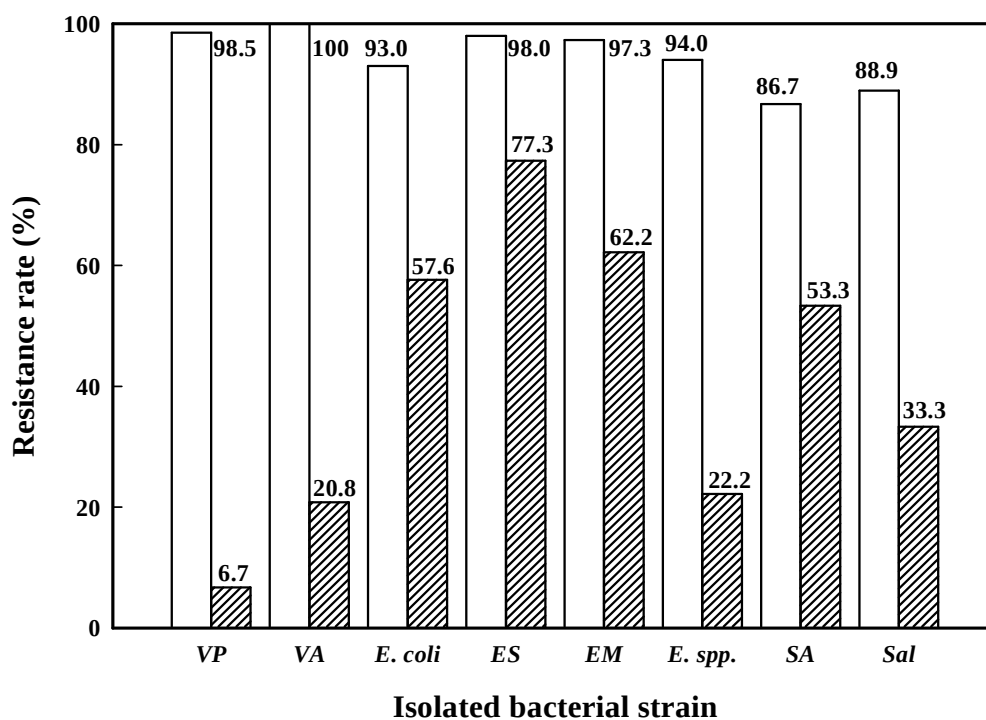


Fig. 8. Antimicrobial resistance rate of the isolated bacterial strain.

VP, *V. parahaemolyticus*; VA, *V. alginolyticus*; ES, *E. faecalis*; EM, *E. faecium*; *E. spp.*, *Enterococcus spp.*; SA, *Staphylococcus aureus*; Sal., *Salmonella sp.* ▨, Antimicrobial resistant bacteria; □, Multiple antimicrobial resistant bacteria..

17.5%로 육상 유래세균의 다제내성율과 비교하였을 때 비교적 낮은 편이었으며, *V. parahaemolyticus*의 경우에는 가장 낮은 다제내성율을 나타내었다. 그러나 육상 온혈동물의 장관계 세균의 다제내성율은 22.2~77.3%로 나타나 균종에 따라서는 매우 높은 다제내성을 나타내었다.

1995~1996년 경남 통영, 거제지역의 어류양식장(Choi and Moon, 1995; 1996)과 전남지역의 어류양식장(Choi and Kong, 1996)에서 분리된 비브리오균은 oxolinic acid, oxytetracycline, tetracycline 등의 항균제에 대하여 80~100%의 감수성을 나타낸 반면, 2002년 경남 남부지역(Heo et al., 2002) 양식어류에서 분리된 비브리오속 62균주는 oxolinic acid, oxytetracycline 및 tetracycline 등에 대한 감수성이 50~60%로 낮아졌다고 보고되었다. 최근 비브리오속에서 항균제 내성이 증가하고 있다는 이러한 보고들을 볼 때 해양상재세균의 내성 정도가 점차 증가하는 추세에 있는 것으로 추정된다.

해수 및 시험어 종류에 따른 항균제 내성균 및 다제내성균의 검출율은 Fig. 9에 나타내었다. 사육용수에서 분리된 391균주 중 96.4%가 한 가지 이상의 항균제에 내성을 나타내었고, 양식어류 중 넙치에서는 분리된 141균주 모두 내성을 나타내어 100%의 내성율을 나타내었으며, 다음으로 내성율이 높은 어종은 농어, 조피볼락, 참돔의 순으로 나타났다. 다제내성균은 사육용수에서 27%로 가장 낮은 검출율을 나타내었으며, 양식어류 중에서는 내성율의 결과와 마찬가지로 넙치에서 가장 높은 다제내성율을 나타내었고, 다음으로, 농어, 참돔, 조피볼락의 순으로 나타났다. 이처럼 넙치에서 내성균 및 다제내성균의 검출율이 특히 높은 것은 넙치의 경우 다른 어종에 비해 육성 기간이 짧아 단기간에 항균제 투여가 이루어짐에 따라 넙치에서 분리된 균주들은 다양한 약제에 집중적으로 노출되는 경향이 있어 다제내성균의 검출율이 높은 것으로 사료된다.

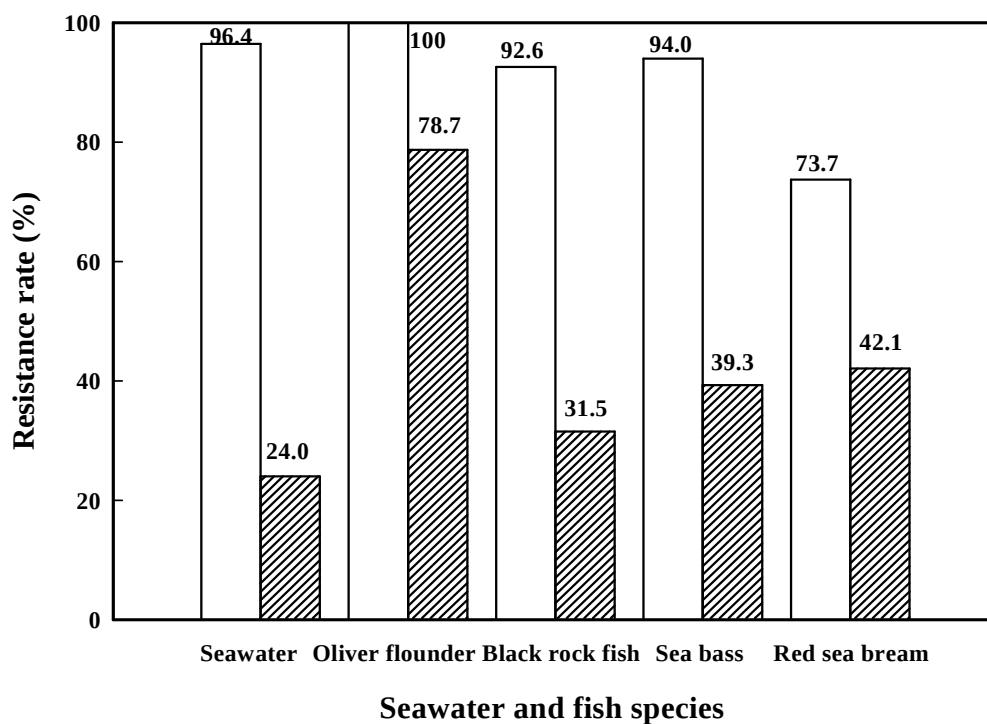


Fig. 9. Antimicrobial resistance rate of the isolated bacterial strain by samples.

▨, Antimicrobial resistance bacteria; □, Multiple antimicrobial resistance bacteria..

2.2. 균주 분리원에 따른 항균제 내성 특성 비교

2.2.1. 지역별 항균제 내성 특성 비교

분리·동정된 모든 균주에 대하여 항균제 감수성 시험을 실시하고, 그 결과를 지역별로 구분하여 Fig. 10에 나타내었다. 6개 지역의 어류양식장에서 분리된 균주 중 한 가지 이상의 항균제에 대하여 내성을 나타내는 비율은 91.7~100%로 지역적인 큰 차이는 나타내지 않았으나, 제주지역에서 분리된 균주는 100%의 내성율을 나타내어 다른 지역보다 약간 높은 경향이였다. 또한 다제내성균의 검출율은 완도와 제주지역에서 45.0~46.8%로 높은 값을 나타내었고, 다음으로 여수, 거제, 부산의 순이었으며, 통영지역이 20.8%로 가장 낮은 다제내성율을 나타내었다.

어류양식장에서 항균제의 사용은 양식어류 및 해수 등 해양환경에 존재하는 세균의 내성 정도를 증가시킬 수 있다는 사실이 많은 연구에서 입증되고 있다. 항균제를 많이 사용한 어류양식장의 침전물에서 분리된 세균의 내성은 항균제를 거의 사용하지 않은 어류양식장의 침전물에서 분리된 세균의 내성에 비하여 매우 높았다고 보고도 있으며(Herwig et al., 1997), 낮은 농도의 항균제라도 계속적으로 사용할 경우 세균에 대한 약제 내성을 증가시킬 뿐 만 아니라 세균이 다제내성균으로 발전될 가능성도 있으며, 내성균에서 병원세균으로 내성이 전이되거나 사람 또는 동물에 대한 약제 처리효과가 감소할 수 있다는 보고도 있다(Tendencia and De la Peña, 2001). 또한, 양식어류와 가축을 동시에 사육하면서 가축의 성장 촉진용으로 항균제가 함유된 사료를 사용하였을 때 2개월 후에 분리한 세균에서 oxytetracycline과 ciprofloxacin에 대한 내성이 초기에 비하여 80~100%나 증가하였다고 보고도 있다(Petersen et al., 2002).

2.2.2. 균종별 항균제 내성 특성 비교

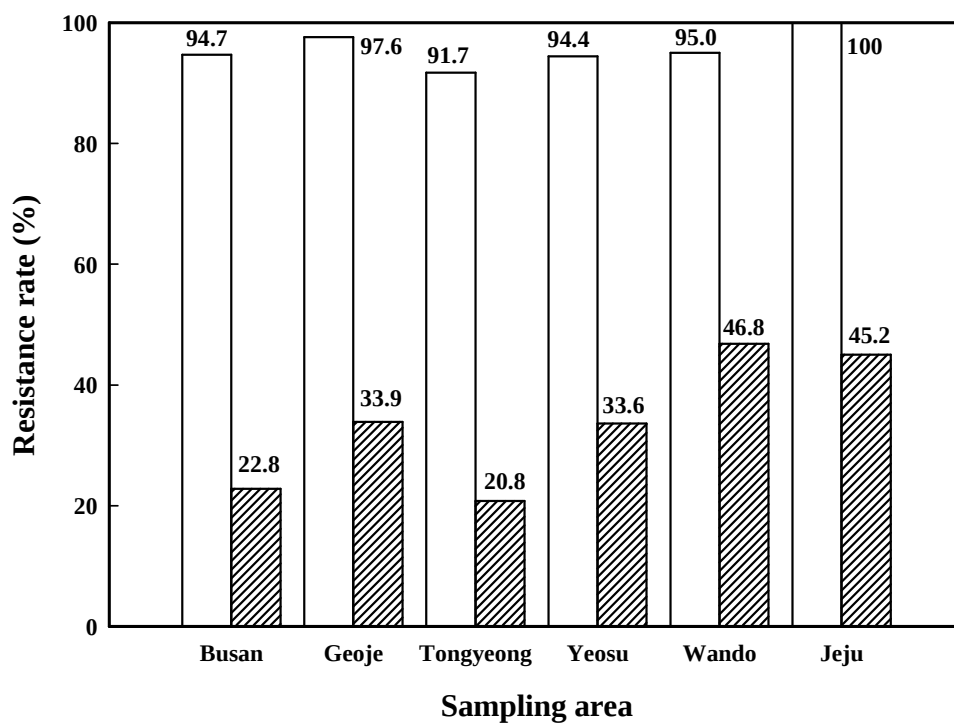


Fig. 10. Antimicrobial resistance rate of the isolated bacterial strain by sampling area.

▨, Antimicrobial resistant bacteria; □, Multiple antimicrobial resistant bacteria.

대상 균종에 따라 내성시험에 사용한 항균제의 종류가 다르기 때문에 포괄적인 비교와 더불어 개별로 그 내성의 유형을 살펴볼 필요가 있다. 그래서 시험균주의 항균제 내성 유형을 균종별로 나누어 고찰하였다.

2.2.2.1. 해양상재세균의 항균제 내성 특성

우리나라 남해안 연안 소재 6개 지역의 어류양식장에서 분리·동정된 해양상재세균 중 *V. parahaemolyticus*가 194균주, *V. alginolyticus*가 120균주가 각각 분리되었는데 이들의 내성율은 각각 98% 및 100%이었으며(Fig. 8), 이들 균주들에 대한 각 항균제별 내성패턴은 Fig. 11에 나타내었다.

분리·동정된 *V. parahaemolyticus*와 *V. alginolyticus*가 항균제 내성율이 높았던 것은 시험에 사용된 여러 가지 항균제들 중 제 1세대 항균제인 ampicillin에 대해 98~100%의 내성율을 나타내었기 때문이었다.

그리고 항균제 종류별 내성율에 있어서는 *V. alginolyticus*가 전반적으로 *V. parahaemolyticus*에 비하여 다양한 패턴을 나타내었고, 항균제 내성율도 다소 높은 것으로 나타났다. *Vibrio* spp.에 대한 항균제 감수성 시험에 사용된 항균제 종류는 모두 10가지였으며, 시험 균주수의 10% 이상의 내성을 나타낸 항균제는 *V. alginolyticus*에서는 ampicillin 외에 sulfamethoxazole/trimethoprenem (SXT), amikacin (AN), amoxillin/clavulanic acid (AmC), ciprofloxacin (CIP), doxycycline (D), tetracycline (TE) 등 7종류인 반면, *V. parahaemolyticus*에서는 ampicillin 외에 oxolinic acid (OA), amikacin (AN) 등 모두 3종류인 것으로 나타났다. *V. parahaemolyticus* 및 *V. alginolyticus*는 항균제 감수성시험에 사용된 다른 항균제에 비하여 ampicillin과 amikacin에 대하여 내성이 높은 것으로 나타났다.

Vibrio spp.의 ampicillin에 대한 내성은 국내외 여러 연구자들에 의해 보고되고 있는데 연구사례별로 살펴보면, 국내의 경북 동해안 연안에서 분리된 *V.*

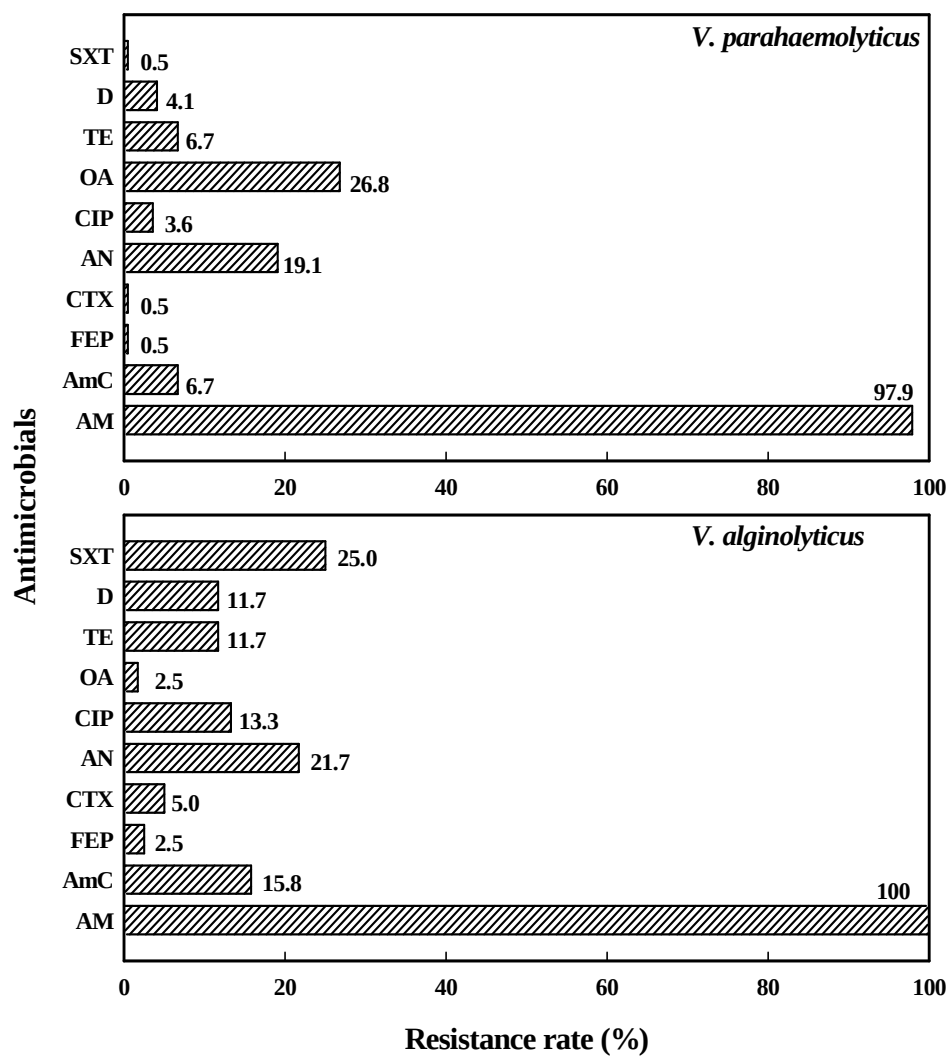


Fig. 11. The antimicrobial resistance patterns of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* isolates.

SXT, Sulfamethoxazole/trimethoprim; D, Doxycycline; TE, Tetracycline; OA, Oxolinic acid; CIP, Ciprofloxacin; AN, Amikacin; CTX, Cefotaxime; FEP, Cefepime; AmC, Amoxicillin/clavulanic acid; AM, Ampicillin.

parahaemolyticus 16균주 중 12균주(75%)가 ampicillin에 대하여 내성을 나타낸 것으로 보고되었으며(Son et al., 2003), 동해안 환경 가검물에서 분리된 *V. parahaemolyticus* 18균주의 ampicillin의 내성율은 72%(13균주)로 나타났다(Lee et al., 2001). 또한, 연안산 패류에서 분리한 *V. parahaemolyticus* 18균주 중 9균주, *V. alginolyticus* 11균주 중 10균주에서 ampicillin에 대한 내성이 각각 50%, 90.9%를 나타내어 환경에서 분리된 비브리오속 세균이 주로 ampicillin에 대한 내성정도가 높은 것으로 보고하였다(Lee et al., 1998).

또한, 임상분야에서도 1980년대 후반에는 환자에서 분리된 *V. parahaemolyticus*에서 ampicillin 내성이 일부 관찰되었으나(Matsuzaki and Tanaka, 1987), 인도네시아의 병원내 설사환자에서 *V. parahaemolyticus*의 ampicillin에 대한 내성은 1995년에 67%에서 2001년에 100%로 증가하였다고 보고되었으며(Tjaniadi et al., 2003), 아시아지역의 유행성 장염 환자에서 분리된 *V. parahaemolyticus*의 ampicillin에 대한 내성도 97.4%이었다고 보고되었다(Wong et al., 2000).

따라서 임상에서 분리된 *V. parahaemolyticus* 뿐만 아니라 환경 분리균주도 ampicillin에 대한 내성은 상당히 높은 것으로 확인되었다.

*V. parahaemolyticus*는 해수에서 145균주, 어류에서 49균주가 각각 분리되었고, 이들 균주 중 해수에서 분리된 3균주만이 모든 항균제 10종에 대하여 감수성을 나타내었으며, 나머지 191균주는 ampicillin을 포함하여 한 가지 이상의 항균제에 대하여 내성을 나타내었다(Fig. 12). 분리균주 중 시험에 사용된 항균제 중 단지 ampicillin에 대해서만 내성을 나타내는 내성균주는 112균주로 전체 분리균주의 67.7%를 차지하였는데, 이 때문에 *V. parahaemolyticus*의 내성율이 높게 나타나는 주요한 원인으로 확인되었다.

환경에서 분리되는 *Vibrio* sp.의 ampicillin 내성은 인도네시아 Jakarta Bay에서 분리된 *V. parahaemolyticus*는 약 97%, *V. alginolyticus*는 약 67%이었다(Moritori et al., 1985). 그리고 이탈리아의 Northern Sardinia 연안에서 분리된

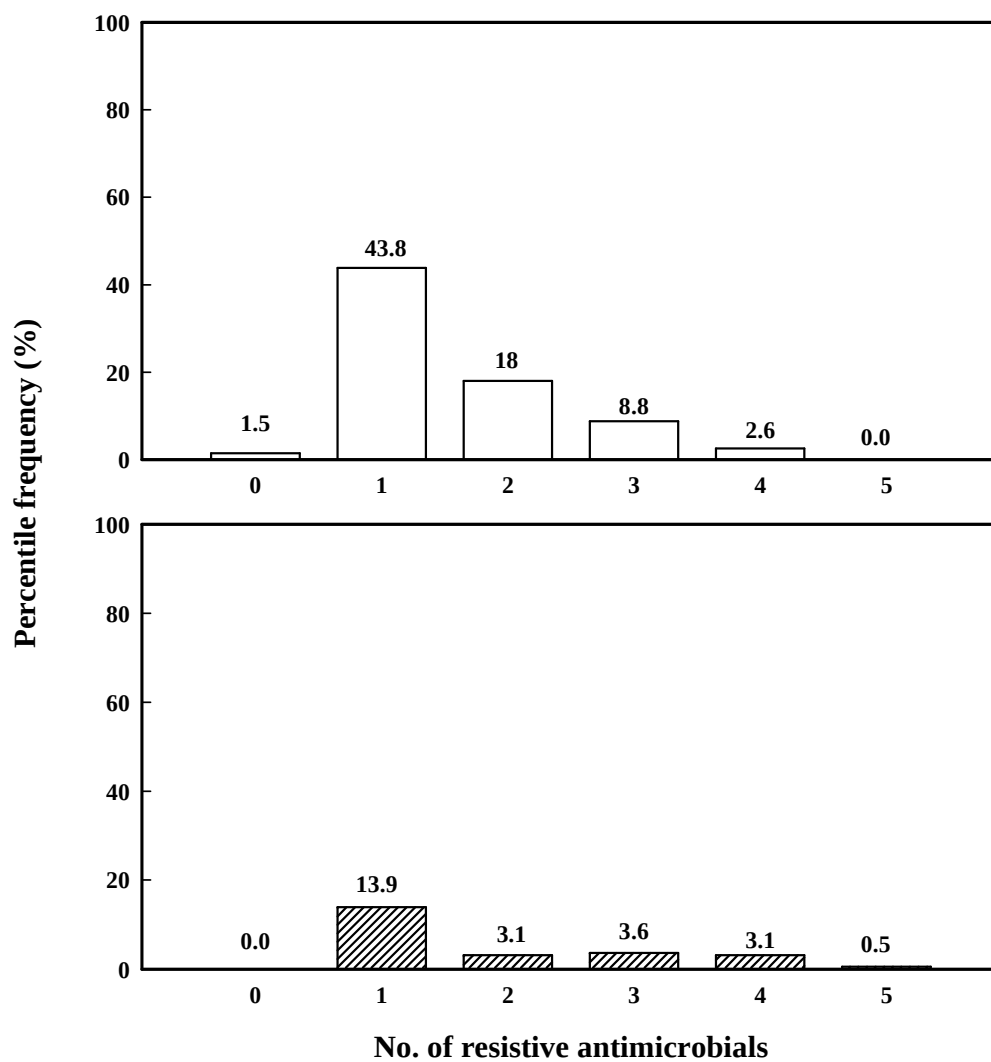


Fig. 12. Antimicrobial resistance pattern of *Vibrio parahaemolyticus* isolates according to the number of resistive antimicrobials.

□, Seawater; ▨, Fishes.

*Vibrio*속 세균의 80% 이상이 ampicillin에 내성을 나타내었다고 보고되어 (Zanetti et al., 2001), 거의 자연내성에 가까운 정도의 내성율을 나타내었다..

그러나 다제내성을 나타내는 *V. parahaemolyticus* 균주는 양식어류에서 7균주(조피볼락에서 3균주, 농어에서 4균주), 해수에서 5균주가 분리되어 전체 분리균주 중 6.8%를 나타내어 매우 낮은 수준이었다.

*V. alginolyticus*는 해수에서 77균주와 어류에서 43균주가 분리되었는데, 이들 균주 중 모든 시험 항균제에 대하여 감수성을 나타낸 균주는 한 균주도 없었다(Fig. 13). 이는 *V. parahaemolyticus*에서와 마찬가지로 분리균주가 ampicillin을 비롯한 한 가지 이상의 항균제에 대해 내성을 나타내기 때문으로 ampicillin에 대해서만 내성을 나타내는 균주는 해수에서 57균주(47.5%), 양식어류에서 19균주(15.8%)가 분리되어 이들이 전체 분리균주 중 차지하는 비율이 69.2%로 대부분을 차지하였다. 다제내성을 나타내는 *V. alginolyticus* 균주는 해수에서 9균주(7.5%), 양식어류에서 16균주(13.3%)가 각각 검출되어 전체 분리균주 중 20.8%로 *V. parahaemolyticus*에 비하면 다소 높은 내성율을 나타내었으나 다른 병원성세균 및 위생지표세균에 비하면 우려할 수준은 아닌 것으로 판단된다.

2.2.2.2. *E. coli*의 항균제 내성 특성

*E. coli*는 6개 지역의 어류양식장에서 총 316균주가 분리되어 분리균주 중 단일 균종으로서는 가장 많은 균주를 시험하였으며, ampicillin 등 19종의 항균제를 사용하여 시험한 내성 특성결과는 Fig. 14에 나타내었다. 시험에 사용된 항균제 중 tetracycline에서 내성율이 74%로 가장 높았고 다음으로 cephalothin 70%, doxycycline 66%, streptomycin 47%, ampicillin 46% 등의 순이었으며, imipenem, cefepime, cefotaxime 그리고 gentamicin 등에 대해서는 내성율이 0.3~6.0%로 나타났다.

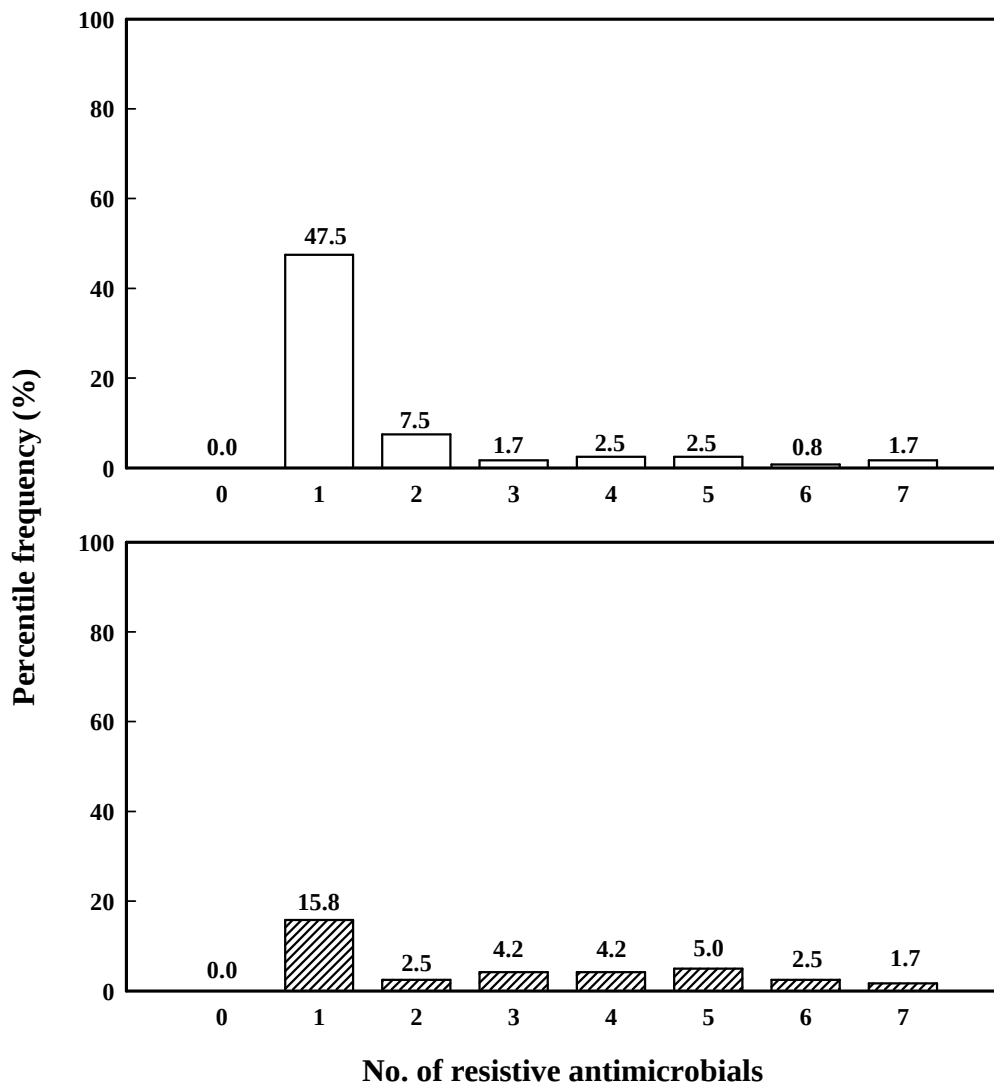


Fig. 13. Antimicrobial resistance pattern of *Vibrio alginolyticus* isolates according to the number of resistive antimicrobials.

□, Seawater; ▨, Fishes.

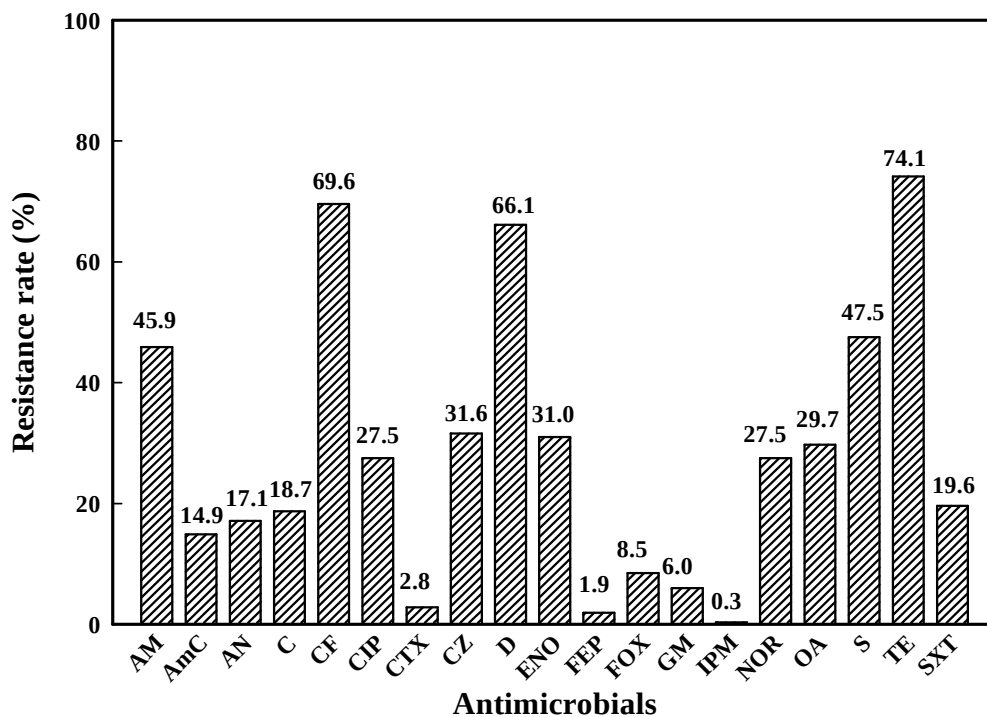


Fig. 14. The antimicrobial resistance pattern of *E. coli* isolates.

AM, Ampicillin; AmC, Amoxillin/clavulanic acid; AN, Amikacin; C, Chloramphenicol; CF, Cephalothin; CIP, Ciprofloxacin; CTX, Cefotaxime; CZ, Cefazolin; D, Doxycycline; ENO, Enrofloxacin; FEP, Cefepime; FOX, Cefoxitin; GM, Gentamicin; IPM, Imipenem; Nor, Norfloxacin; OA, Oxolinic acid; S, Streptomycin; TE, Tetracycline; SXT, Sulfamethoxazole/trimethoprenem.

시험에 제공된 *E. coli*는 해수에서 139균주, 어류에서 177균주가 각각 분리되었는데, 이들 중 24균주(7.6%)만 모든 항균제에 감수성을 나타내었고, 4종 이상의 항균제에 내성을 나타내는 다제내성균은 해수에서 74균주(23%), 어류에서 101균주(32%)로 각각 나타났다(Fig. 15). 특히 *E. coli*에 시험된 항균제 총 19종 중 최소 10종 이상의 항균제에 대하여 내성을 나타낸 균주가 해수에서는 10균주(3.2%)가 분리되었으나, 어류에서는 60균주(18.9%)가 분리되어 어류에서 다소 높은 내성 경향을 나타내었다. 이처럼 온혈동물의 장내세균으로 육상에서 유입되는 *E. coli*에서 다제내성율이 높은 내성경향은 해양 유입 시 수계 상재균으로 내성인자가 전이할 가능성도 있으므로 육상에서의 관리가 필요할 것으로 사료된다.

2.2.2.3. *Enterococcus* spp.의 항균제 내성 특성

해수 및 어류에서 분리된 *Enterococcus* spp. 중에서는 *E. gallinarum*, *E. durans*, *E. avium* 등도 분리되었지만 주로 많이 검출되는 *E. faecalis*, *E. faecium*만 선택하여 내성경향을 확인하여 그 결과는 Fig. 16에 나타내었다. *E. faecalis*와 *E. faecium*에 대하여 10종의 항균제를 사용하여 감수성 시험을 한 결과 121균주 중 118균주에서 내성을 나타내어 97.5%의 높은 내성율을 나타내었다. *E. faecalis*의 주요 항균제에 대한 내성율은 tetracycline에서 80%로 가장 높은 값을 나타내었고, 다음으로 doxycycline 77%, erythromycin과 chloramphenicol 76%, ciprofloxacin 74%의 순으로 내성율이 높게 나타나 대부분의 분리균주가 이 다섯 종류의 항균제에 대하여 내성을 나타내고 있음을 알 수 있었다. 그러나 ampicillin에 대한 내성율은 1.5%로 가장 높은 감수성을 나타내었으며, gentamicin과 amoxicillin/clavulanic acid에서도 각각 12.1%, 13.6%로 비교적 높은 감수성을 나타내었다.

*E. faecium*의 항균제 내성경향은 rifamfin에서 86.5%로 가장 높은 내성율을

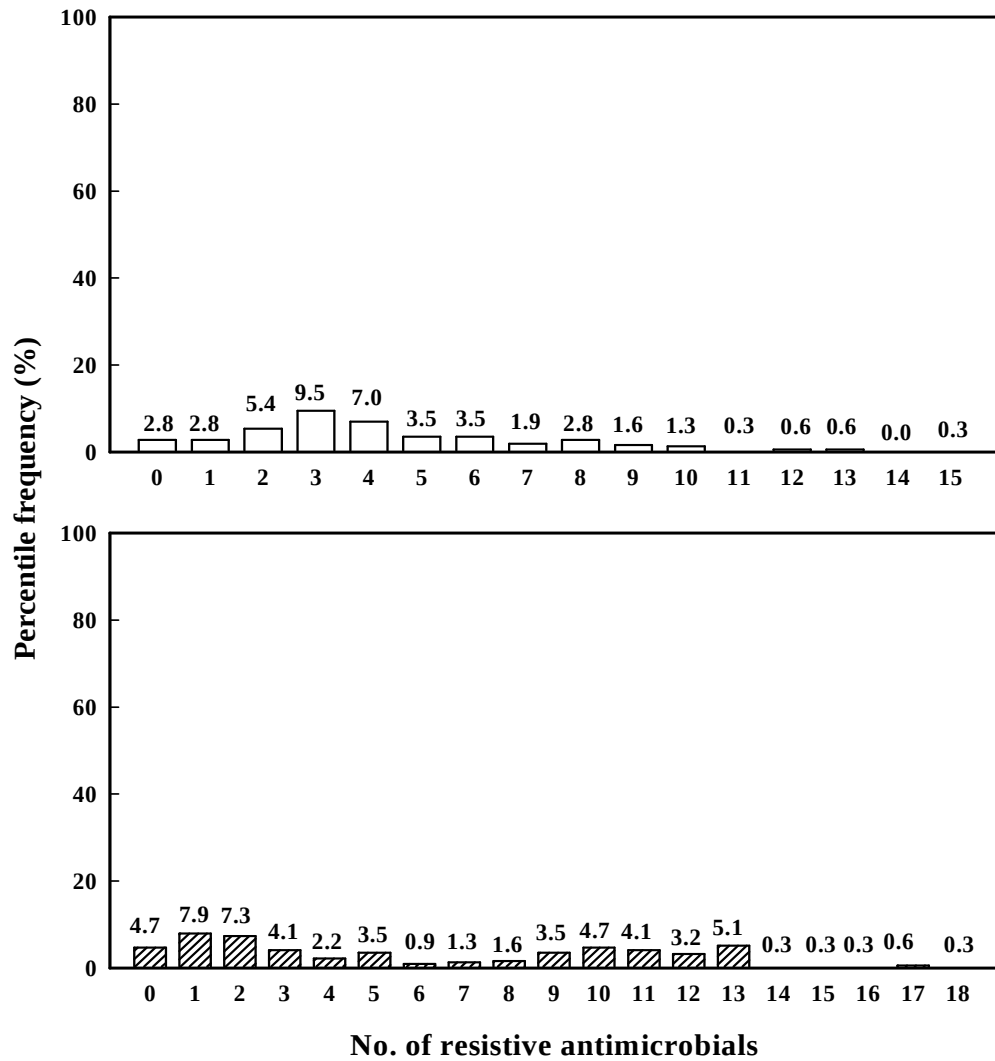


Fig. 15. Antimicrobial resistance pattern of *Vibrio alginolyticus* isolates according to the number of resistive antimicrobials.

□, Seawater; ▨, Fishes.

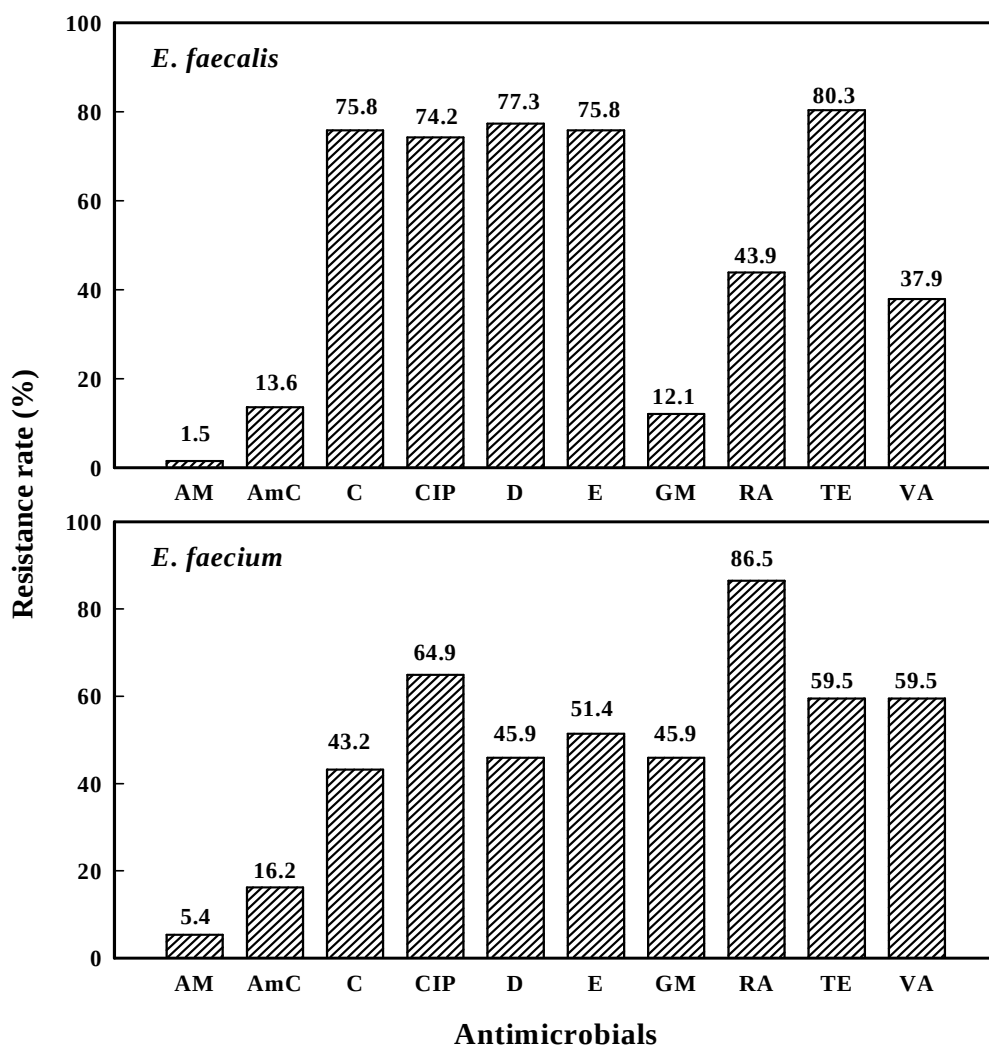


Fig. 16. The antimicrobial resistance pattern of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in all the samples collected from fish farms. AM, Ampicillin; AmC, Amoxillin/clavulanic acid; C, Chloramphenicol, CIP, Ciprofloxacin; D, Doxycycline; E, Erythromycin; GM, gentamicin; RA, Rifamfin; TE, Tetracycline; VA, Vancomycin.

나타내었고, 다음으로 ciprofloxacin 64.9%, vancomycin 및 tetracycline 59.5%, erythromycin 51.4% 등의 순으로 나타났다. Ampicillin과 amoxicillin/clavulanic acid에 대해서는 *E. faecalis*에서와 마찬가지로 내성율이 각각 5.4%, 16.2%로 비교적 낮은 내성율을 나타낸 반면, gentamicin과 vancomycin은 내성율이 각각 46%, 51%로 다소 높은 것으로 나타났다.

분리균주가 내성을 나타내는 항균제 수를 보면 *E. faecalis*와 *E. faecium*은 균종별로 각각 1균주씩 모든 항균제에 대하여 감수성을 나타내었고, 4종 이상의 항균제에 대하여 내성을 나타내는 다제내성율은 *E. faecalis*가 77.3% (51/66), *E. faecium*이 62.2%(23/37)이었다(Fig. 17).

장구균은 사람과 가축의 정상적인 장내세균총이지만 최근 중요한 병원균으로도 인식되고 있다(Tailor et al., 1993). 장구균에 의한 감염증의 치료에는 penicillin과 aminoglycoside 복합제제를 사용하는데, β -lactam계와 aminoglycoside계 항균제에 내성을 가진 균주가 출현하기 시작하면서, vancomycin은 β -lactam계 항균제에 민감한 환자나 β -lactam계 항균제 내성균주에 대하여 사용되어져 왔다(Schwalbe et al., 1987). 그러나 최근 VRE가 발견되기 시작하였으며, 미국 병원감염 감독기관(National Nosocomial Infection Surveillance; NNIS)의 자료에 따르면 미국에서 원내감염으로 인한 VRE의 발생률이 1989년의 0.3%에서 1993년 7.9%로 증가하였다고 한다. 다제 항균제 내성을 가진 VRE에 의한 균혈증(bacteremia)과 관련된 치사율은 거의 70%에 이르고 있고, VRE의 내성유전자가 다른 그람양성 구균으로 전이됨으로써 vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA)의 출현이 우려된다고 한다(Gin and Zhanel, 1996). 또한 Vancomycin의 지속적인 사용과 사용빈도의 증가로 VRSA 출현의 축진이 우려되고 있고, 이러한 균주에 의한 감염증 치료법의 부재가 심각하다(Christensen and Gubbins, 1996). 보통 VRE는 vancomycin에만 내성을 가지는 것이 아니라 여러가지 항균제에 내성을 보이는데, 이 다제 항균제 내성

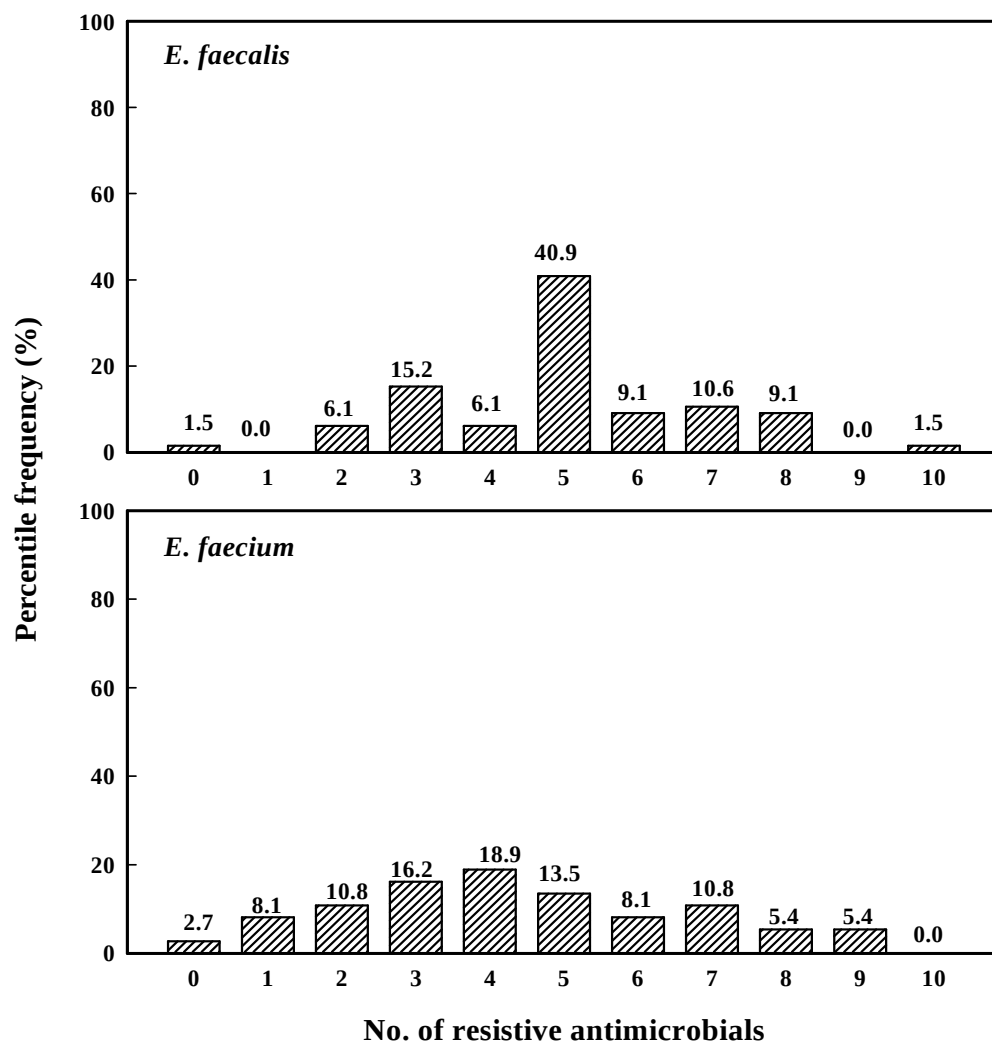


Fig. 17. Antimicrobial resistance pattern of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates according to the number of resistive antimicrobials.

이 VRE 감염에 의한 사망률 증가에 원인을 제공하고 있다(Hagman and Straubach, 1996). 이처럼 장구균은 인체 병원균으로서 중요성이 부각되고 있는 균종이 수계에서 상당량 검출되고 있고, 다제내성균의 검출율도 크게 증가하고 있는 것으로 나타나 수산식품의 위생적 측면 뿐 만 아니라 내성인자 전이의 측면에서도 반드시 관리되어야 될 균종으로 생각된다.

2.2.2.4. *Salmonella* sp. 및 *S. aureus*의 항균제 내성 특성

본 연구에서 분리된 *Salmonella* sp.와 *S. aureus*은 각각 18균주 및 15균주로 이들에 대한 19종의 각 항균제별 내성경향을 Fig. 18에 나타내었다. *Salmonella* sp.는 19종의 항생제 중 7종의 항균제에서만 내성을 나타내었는데, 이들 중 non- β -lactam계 항균제인 tetracycline과 doxycycline에서 각각 66.7%, 55.6%로 높은 내성율을 나타내었으며, 다음으로 β -lactam계 항균제인 cephalothin과 cefazolin 33.3%, ceftiofur 27.8%, ampicillin과 amoxicillin/clavulanic acid 11.1%의 순으로 나타났다. 또한 cefotaxime, cefepime, imipenem 등 3종의 β -lactam계 항균제와 amikacin, chloramphenicol, ciprofloxacin 등 9종의 non- β -lactam계 항균제에 대해서는 100%의 감수성을 나타내었다.

1999년부터 2001년까지 우리나라 서울 시내 설사환자에서 분리된 *Salmonella* sp. 718균주 중 tetracycline에 대한 내성균주가 32.7%로 가장 높았고, streptomycin 28.0%, ampicillin 12.4%, chloramphenicol 7.5%, cephalothin 4.0% 등이었으며, 90% 이상의 감수성을 나타낸 항균제는 amikacin, ceftiofur, gentamicin, amoxicillin/clavulanic acid, cephalothin 등이었다고 보고된 바 있어 (Park et al., 2002) 본 연구결과와 비슷한 경향이였다. 또한, 1993년부터 2001년까지 국내 유통식품에서 분리된 살모넬라는 streptomycin에 대한 내성이 75.6%로 가장 높았으며, ampicillin 65.9%, tetracycline 61.0%, chloramphenicol 9.8% 등으로 나타났으나, amikacin, gentamicin, cephalothin 등의 항균제에 대해

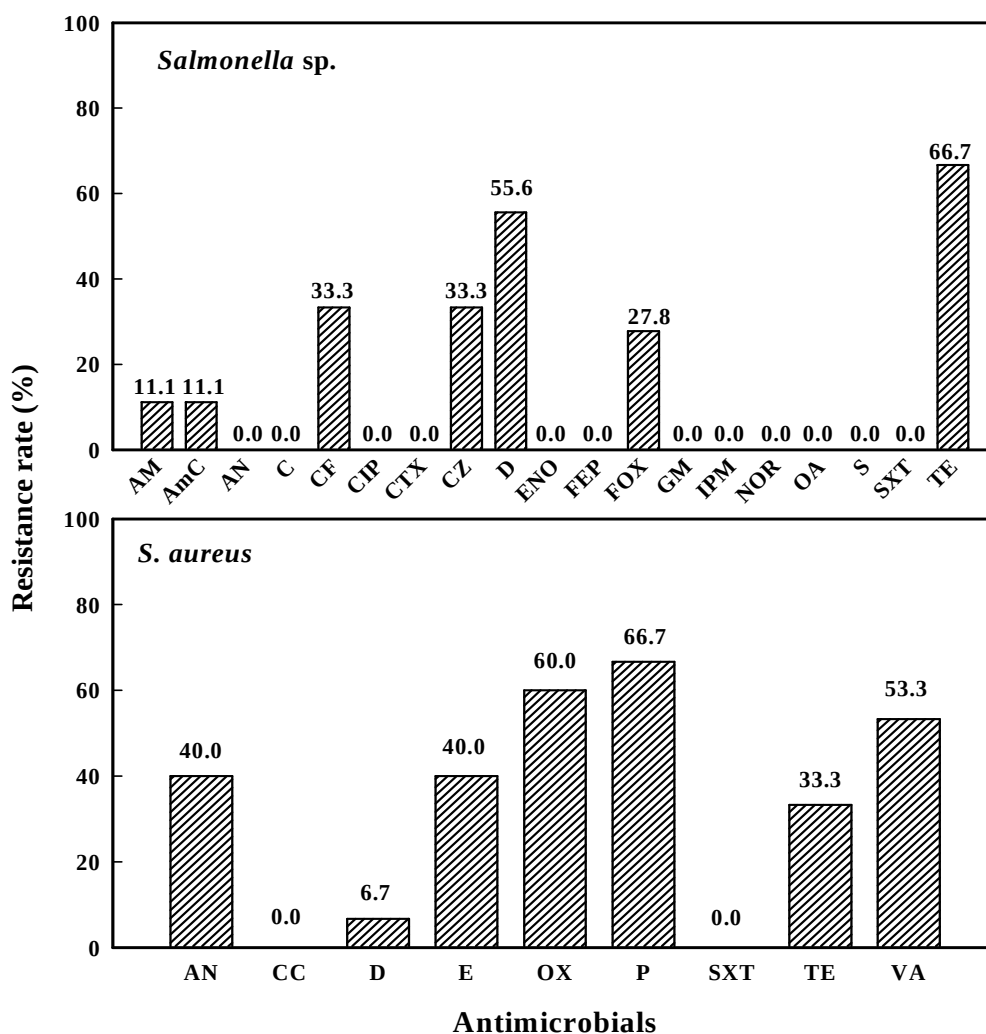


Fig. 18. The antimicrobial resistance pattern of *Salmonella* sp. and *Staphylococcus aureus* isolates.

The antimicrobials performed to *Salmonella* sp. isolates same as those of *E. coli*. AN, Amikacin; CC, Clindamycin; D, Doxycycline; E, Erythromycin; OX, Oxacillin; P, Penicillin; SXT, Sulfamethoxazole/trimethoprenem; TE, Tetracycline; VA, Vancomycin.

서는 감수성을 나타내었다고 보고된 바 있다(Chung et al., 2003). 반면, 본 연구에서는 Park et al. (2002)이 보고한 살모넬라의 내성율과 비교하여 볼 때 tetracycline이 66.7%로 2배 이상의 높은 내성율을 나타내었으며, cephalothin이 33.3%, cefoxitin이 27.8%, amoxicillin/clavulanic acid이 11.1%로 비교적 높은 내성율을 나타내었으나, ampicillin은 비슷한 경향을 나타내었다.

그리고 *Salmonella* sp.가 내성을 나타낸 항균제 수에 있어서 전 항균제에 대하여 감수성을 나타낸 균주는 3균주(17%)이었으며, 한가지의 항균제에 대한 내성을 나타낸 균주가 8균주(44%)로 가장 많은 비율을 나타내었고, 4종 이상의 항균제 내성을 나타내는 다제내성 균주는 모두 5균주(28%)로 비교적 높은 내성율을 나타내었다(Fig. 19). 1999년부터 2001년까지 우리나라 서울 시내 설사환자에서 분리된 *Salmonella* sp. 718균주 중 45%가 내성균이었고, 이들 내성균주 중 24%가 다제내성을 나타내었다고 보고되었는데(Park et al., 2002), 이는 본 연구결과와 유사한 경향이였다.

*S. aureus*는 β -lactam계 항균제에 속하는 penicillin계의 penicillin과 oxacillin에서 각각 66.7% 및 60.0%의 높은 내성율을 나타내었다. 그 외의 항균제는 모두 non- β -lactam계 항균제로서 vancomycin에서도 53.3%로 비교적 높은 내성율을 나타내었고, amikacin과 erythromycin에서 40.0%, tetracycline에서 33.3%를 나타내었으며, clindamycin과 trimethoprim/sulfamethoxazole에 대해서는 100%의 감수성을 나타내었다(Fig. 18). 그리고 내성을 나타내는 항균제의 수에 따른 내성율은 4종의 항균제에 대한 내성을 나타내는 균주가 40.0%(6균주)로 가장 높은 비율을 나타내었으며, 4종의 항균제에 내성을 나타낸 다제내성균주는 8균주(53.3%)이었다(Fig. 19).

본 연구에서 분리된 *S. aureus*는 15균주에 불과하여 시험균종의 항균제 내성 특성을 충분히 파악하기는 어려웠으나, 분리된 균주의 53.3%가 vancomycin 내성을 지니고 있는 것으로 나타나 이러한 균에 의한 해양상재세균의 내성유전자 전이가 우려된다.

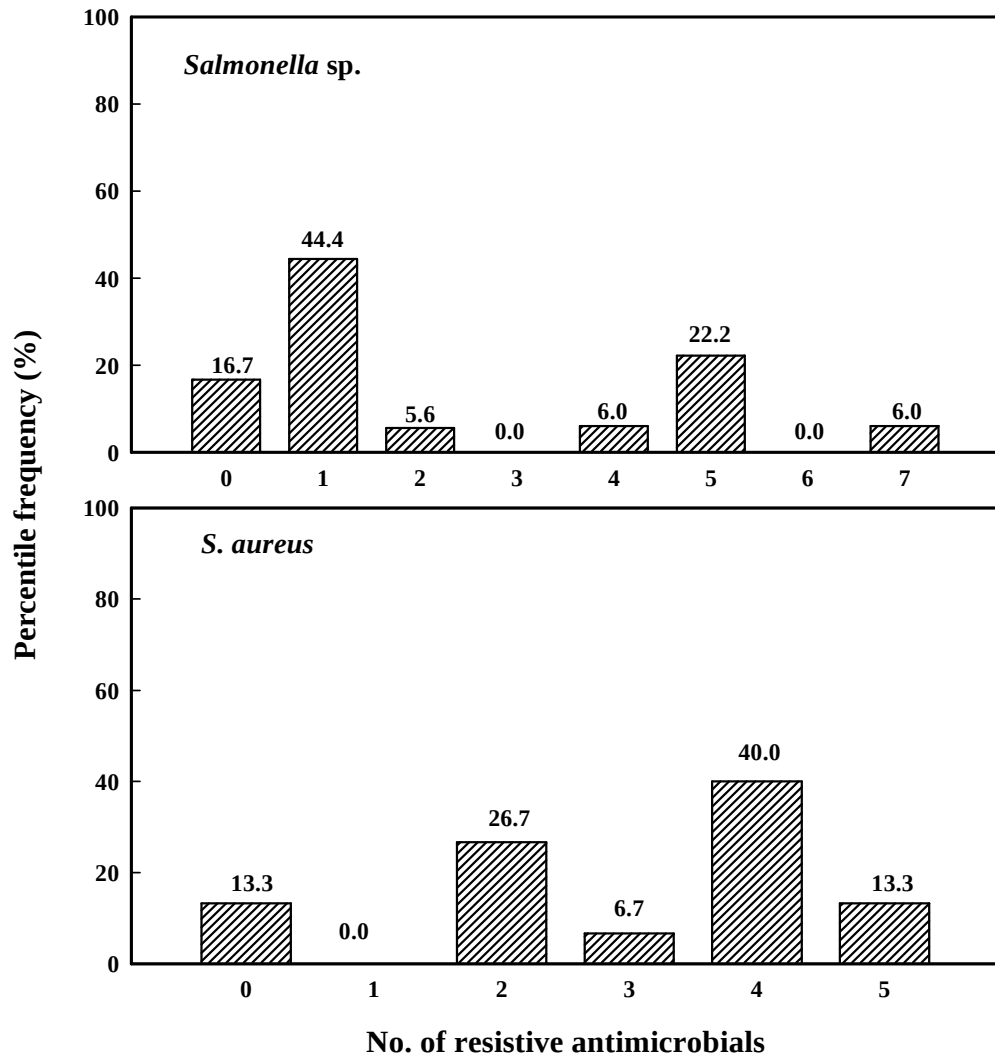


Fig. 19. Antimicrobial resistance pattern of *Salmonella sp.* and *Staphylococcus aureus* isolates according to the number of resistive antimicrobials.

3. 분리균주의 tetracycline 내성유전자 특성

어류양식장에서 광범위하게 사용되고 있는 tetracycline에 내성을 나타내는 *E. coli*를 대상으로 *tet* genes의 분포조사를 실시하였다. 또한 해양상재세균인 *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*와 육상유래세균 *Enterococcus* spp.에서도 *tet* genes의 분포조사를 실시하고, *E. coli* 분리균주에서 검출된 *tet* gene간의 상동성 조사를 통하여 육상유래세균과 해양상재세균 상호간의 항균제 내성 전이 가능성을 확인하고자 하였다. 그리고 내성 유전정보가 포함된 cassettes 유전자가 한개 혹은 그 이상 함유되어 있음으로써 다양한 항균제들에 대해 내성을 나타내는 integron의 분포조사 및 integron이 존재하지 않는 내성균들과의 다제내성 정도를 비교 분석하였다.

3.1. 분리균주에 대한 tetracycline 내성유전자의 분포

3.1.1. Tetracycline 내성균의 최소발육억제농도

어류양식장의 양식어류 및 사육용수로부터 분리된 *E. coli* 중 *tet* genes을 보유한 *E. coli* 165 균주에 대한 최소발육억제농도(Minimum Inhibitory Concentration; MIC)를 측정한 결과, 그 범위는 16~128 µg/mL로 나타났다(Fig. 20). 95% 이상의 분리균주가 tetracycline에 대하여 32~64 µg/mL의 MIC 농도를 나타내어 비교적 낮은 것으로 확인되었다. 그러나 완도의 넙치에서 분리한 두 균주에서의 MIC 농도는 128 µg/mL(1.2%)인 것으로 확인되었다.

3.1.2. *tet* gene 검출용 primer의 검증

Tetracycline에 내성을 나타내는 *E. coli* 165균주의 *tet* genes 분포조사를 위하여 Table 2에 나타난 primer로 PCR을 실시한 결과, *tet* A는 210 bps, *tet* B는 1,206 bps, *tet* D는 356 bps에 해당하는 증폭산물을 확인할 수 있었으며 (Fig. 21), *tet* C, *tet* E, *tet* Y는 본 연구에서 분리된 *E. coli* 165균주에서는 존재

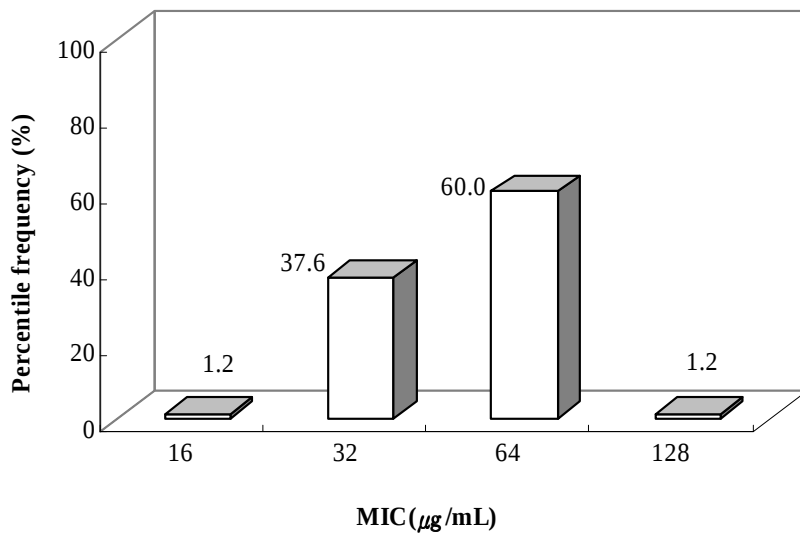


Fig. 20. Minimum inhibitory concentration patterns of the tetracycline resistant *E. coli* isolates.

하지 않는 것으로 나타났다. 검출된 210 bps의 *tet A*, 1,206 bps의 *tet B* 및 356 bps의 *tet D*가 목적으로 한 *tet gene*인지 확인하기 위하여 cloning에 의한 염기서열 분석을 통하여 상동성을 확인한 결과, *E. coli*의 *tet A*는 기존에 보고된 *S. typhimurium* MSPS4, *P. aeruginosa*, *A. punctata*의 *tet A*와, 그리고 *E. coli*의 *tet B*와 *tet D*는 *S. typhimurium*, *S. flexineri* 등의 *tet B*, *tet D*와 일치함을 알 수 있었다(Table 9~Table 11).

3.1.3. PCR을 이용한 *tet genes*의 분포

Tetracycline에 내성을 나타내는 *E. coli* 165균주의 total DNA를 추출하고 이를 대상으로 *tet genes* 중 efflux 기능을 수행하는 유전자인 *tet A*, *tet B*, *tet C*, *tet D*, *tet E*, *tet Y*에 대한 분포를 확인하기 위하여 Table 2에 나타낸 primer로 PCR을 실시하였다.

Tetracycline에 내성을 나타내는 *E. coli* 165균주 중 본 연구에서 시험한 tetracycline 내성 결정인자 6종류 중 *tet A*, *tet B*, *tet D*만 존재하는 것으로 확인되었으며, *tet C*, *tet E*, *tet Y*는 모든 분리균주에서 존재하지 않는 것으로 나타났다(Fig. 21). Tetracycline 내성유전자는 내성 기전에 따라 크게 efflux proteins, ribosomal protection proteins, enzymatic deactivation 등 3가지로 구분되며, 38종류의 *tet genes*이 존재하는 것으로 알려지고 있는데, 이들 중 *tet A*~E 등을 포함한 23개 유전자는 tetracycline을 세포 밖으로 배출하는 efflux protein의 작용에 의해 내성을 가지며, 그람음성 세균에서 가장 일반적으로 발견되는 기전이다(Roberts, 2005).

Tetracycline 내성유전자를 보유한 *E. coli*에서 단일 내성결정인자와 두 개 이상의 복합 내성결정인자들의 유무를 확인하고 지역별 분포를 조사하였다. 모든 *tet genes*의 검출율은 *tet B*를 제외하고는 부산에서 가장 높았으며, *tet D*는 제주(75.0%)를 제외하고 90.3~100%로, *tet A*는 83.9~100%로 지역간 큰 차이

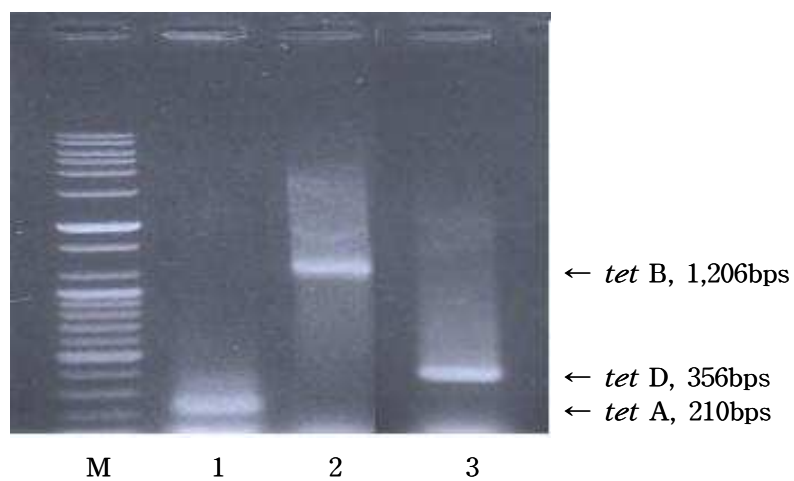


Fig. 21. PCR amplicons to the efflux *tet* genes in *E. coli* isolates.

M, 100bp Plus DNA ladder; Lane 1, *tet* A; lane 2, *tet* B;
lane 3, *tet* D.

Table 9. Homology analysis of the *tet A* in *E. coli* isolates

Strain (plasmid or transposon)	Gene	Identities (%)	Accession No.
<i>Salmonella typhimurium</i> MSPS4	<i>tet A</i>	100	DQ205472
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (plasmid RP4)	<i>tet A</i>	100	X75761
<i>Aeromonas punctata</i> (pFBAOT6)	<i>tet A</i>	100	CR376602
<i>Escherichia coli</i> WYPE531	<i>tet A</i>	100	AY947640

Table 10. Homology analysis of the *tet B* in *E. coli* isolates

Strain (plasmid or transposon)	Gene	Identities (%)	Accession No.
<i>Escherichia coli</i> (Tn10)	<i>tet B</i>	100	J01830
<i>Escherichia coli</i> (pGBG1)	<i>tet B</i>	100	AJ277653
<i>Salmonella typhimurium</i> (plasmid R64)	<i>tet B</i>	100	AP005147
<i>Shigella flexneri</i> (Tn10)	<i>tet B</i>	99	AF005147

Table 11. Homology analysis of the *tet D* in *E. coli* isolates

Strain (plasmid or transposon)	Gene	Identities (%)	Accession No.
<i>Escherichia coli</i> (Tn10)	<i>tet D</i>	100	AY528506
<i>Shigella flexneri</i> (Tn10)	<i>tet D</i>	100	AF162223
<i>Salmonella typhi</i> (plasmid R27)	<i>tet D</i>	100	AF223162
<i>Serratia marcescens</i>	<i>tet D</i>	100	BX664015

를 보이지 않았다(Table 12). *tet A*는 부산과 제주에서 모든 분리균주가 *tet A*를 보유하는 것으로 나타났으며, 다음으로 여수 90.3%, 완도 86.9%, 거제 83.9%의 순이었다. *tet B*는 거제에서 58.1%로 가장 높은 검출을 나타내었고, 다음으로 완도 42.9%, 제주 37.5%, 부산 27.3%, 여수 22.6%의 순이었으며, 단일 내성결정인자로는 가장 낮은 검출을 나타내었다. 복합 내성결정인자 중 *tet A*와 *D*가 동시에 검출된 경우 부산에서 72.7%로 가장 높은 검출을 나타내었으며, 다음으로 여수 64.5%, 완도 46.4%, 제주 37.5%, 거제 22.6%의 순으로 나타났다. 그리고 *tet A*와 *B*, 그리고 *D*가 동시에 검출된 균주는 거제에서 54.8%로 가장 높은 검출을 나타내었으며, 다음으로 제주 37.5%, 완도 34.5%, 여수와 부산에서 각각 19.4%, 18.2%를 나타내었다. 검출된 *tet genes* 중 가장 낮은 검출을 보인 *tet B*와 *D*가 동시에 검출된 균주의 경우 5개 지역 중 제주지역에서만 검출이 되지 않고, 나머지 지역에서는 3.2~9.1%로 검출되었는데 다른 내성결정 인자들에 비하여 비교적 낮은 검출을 나타내었다.

한편 tetracycline에 내성을 나타내는 *E. coli* 165균주 중 검출된 단일 내성결정인자 중에서는 *tet D*가 153균주에서 92.7%로 검출되어 가장 많은 분포를 나타내었으며, 다음으로 *tet A*가 146균주에서 88.5%, *tet B*가 67균주에서 40.6%의 검출율을 나타내었다. 두 가지 이상의 *tet genes*을 보유한 복합 내성결정인자 중에서는 *tet A*와 *D*가 동시에 검출된 균주는 77균주(46.7%)로 가장 많은 분포를 나타내었으며, 다음으로 *tet A*와 *B*, 그리고 *D*가 동시에 검출된 균주는 57균주(34.5%), *tet B*와 *D*가 동시에 검출된 균주는 9균주(5.5%)로 나타났다.

Tetracycline 내성유전자는 세균의 종과 속에 따라 다르게 분포하는 것으로 알려져 있으며(Roberts et al., 1990), 대체로 efflux protein의 작용에 의해 내성을 나타내는 *tet genes* 중 그람음성 세균에는 주로 *tet A*~*E* 이외에 *tet G*가 분포하는 것으로 보고되고 있다(Chopra and Roberts, 2001). 칠레의 연어 양식

Table 12. Distribution of tetracycline resistance genes in the isolated strain

Types of <i>tet</i> gene	No. of isolates detected from sampling area (%)				
	Busan	Geoje	Yeosu	Wando	Jeju
<i>tet</i> A	11 ¹⁾ /11 ²⁾ (100) ³⁾	26/31(83.9)	28/31(90.3)	73/84(86.9)	8/8(100)
<i>tet</i> B	3/11(27.3)	18/31(58.1)	7/31(22.6)	36/84(42.9)	3/8(37.5)
<i>tet</i> D	11/11(100)	28/31(90.3)	29/31(93.5)	79/84(94.0)	6/8(75.0)
<i>tet</i> A+D	8/11(72.7)	7/31(22.6)	20/31(64.5)	39/84(46.4)	3/8(37.5)
<i>tet</i> B+D	1/11(9.1)	1/31(3.2)	1/31(3.2)	7/84(8.3)	0/8(0.0)
<i>tet</i> A+B+D	2/11(18.2)	17/31(54.8)	6/31(19.4)	29/84(34.5)	3/8(37.5)

¹⁾ No. of isolates possess the tetracycline resistance determinant.

²⁾ No. of isolated strain .

³⁾ Percentile (%) of isolates possess each tetracycline resistance determinants.

장에서 분리된 그람음성 세균에서 *tet* genes의 분포는 *tet* A, *tet* B, *tet* E가 44%를 차지하였고(Miranda et al., 2003), 어류양식장에서 분리된 *Vibrio* spp.에서 *tet* B, *Photobacterium* spp.에서 *tet* B와 Y, *Salmonella* spp.과 *Alteromonas* spp. 그리고 *Citrobacter* spp.에서 *tet* D가 분포하는 것으로 보고되어 있다(Furushita et al., 2003).

시료별로는 단일 내성 결정인자들 중에서 조피볼락을 제외하고는 *tet* D가 90.9~100%로 가장 높은 검출율을 나타내었고, 다음으로 *tet* A가 83.0~96.3%, *tet* B가 33.3~63.8%인 것으로 나타났다(Table 13). 그러나 조피볼락에서는 *tet* A의 검출율이 88.0%로 가장 높았으며, 다음으로 *tet* D와 *tet* B가 각각 84.0%, 20.0%의 순으로 나타났다. 두 가지 이상의 복합 내성결정인자들의 검출율은 넙치를 제외하고는 *tet* A와 D가 동시에 검출된 군주에서 50.0~63.0%로 가장 높았으며, 다음으로 *tet* A와 B, 그리고 D가 동시에 검출된 군주에서 16.0~33.3%, *tet* B와 D가 동시에 검출된 군주에서 0~4.5%의 순으로 나타났다. 넙치에서는 *tet* A와 B, 그리고 D가 동시에 검출된 군주에서 51.1%로 가장 높은 검출율을 나타내었고, 다음으로 *tet* A와 D 27.7%, *tet* B와 D 12.8%의 순이었다.

Furushita et al. (2003)은 어류양식장에서 분리한 그람음성 세균에서 *tet* B가 43.9%, *tet* Y와 *tet* D가 각각 6.1% 검출되었다고 보고하였으나, 본 연구에서는 *tet* Y가 한 군주도 검출되지 않았고, *tet* D의 분포 또한 훨씬 낮은 것으로 확인되었다. 그러나 *tet* B의 분포는 본 연구결과와 유사한 것으로 나타났다. 한편, 축산분야에서의 *tet* genes의 분포는 수산분야와는 다소 차이를 나타내었는데, 양돈장에서 23년 동안 분리된 균에서는 *tet* A, *tet* B, *tet* C만 분포하였으며, 검출율은 각각 25%, 80%, 25%인 것으로 나타났다(Christine et al., 2003). 또한 소사육장에서 분리된 tetracycline 내성 *E. coli* 108균주에서는 *tet* A가 6균주(5.6%), *tet* B가 95균주(88%), *tet* D가 1균주(0.9%)에서 각각 검출되었으며,

Table 13. Distribution of tetracycline resistance genes in *E. coli* isolated from seawater and fishes

Origin of <i>E. coli</i> isolates	No. of isolates	Types of <i>tet</i> genes					
		<i>tet</i> A	<i>tet</i> B	<i>tet</i> D	<i>tet</i> A+D	<i>tet</i> B+D	<i>tet</i> A+B+D
Seawater	66	59(89.4)	23(34.8)	60(90.9)	33 ¹⁾ (50) ²⁾	3(4.5)	20(30.3)
Oliver flounder	47	39(83.0)	30(63.8)	45(95.7)	13(27.7)	6(12.8)	24(51.1)
Black rock fish	25	22(88.0)	5(20.0)	21(84.0)	14(56.0)	0(0)	4(16.0)
Sea bass	27	26(96.3)	9(33.3)	27(100)	17(63.0)	0(0)	9(33.3)
Total	165	146 (88.5)	67 (40.6)	153 (92.7)	77 (46.7)	9 (5.5)	57 (34.5)

¹⁾ No. of isolates possess each tetracycline resistance determinant.

²⁾ Percentile (%) of isolates possess each tetracycline resistance determinants among isolates.

*tet A+B*가 6균주 검출되었다고 보고되어(Yuko et al., 2005), 축산분야에서는 대체적으로 *tet B*가 분포율이 높은 것으로 나타났다. 그러나 Beatriz et al. (2003)은 소, 돼지, 가금류 등에서 분리된 *tet genes* 보유 *E. coli*에서 *tet A*가 66%, *tet B*가 42%로 나타났다고 보고하여 *tet genes*의 분포는 지역적 특이성은 없는 것으로 판단된다.

이처럼 *tet genes*은 축산분야는 물론 수산분야에서도 널리 분포함으로써 동종 혹은 이종의 균들 상호간에 내성유전자가 쉽게 전이되고 이로 인하여 인체 병원세균으로 *tet genes*의 전이로 인한 질병의 유발 가능성도 충분히 있다.

어류양식장에서 발생하는 각종 질병원인세균들에 대한 예방 및 치료를 목적으로 항균제 사용이 증가함에 따라 어류양식장에 존재하는 세균들은 점차 내성이 높아지게 될 것이다. 따라서 이들 내성균들에 대한 *tet genes*의 분포 확인은 어류질병의 원인세균간 혹은 다른 세균으로의 내성 전이에 관한 연구에 중요한 기초가 될 수 있다.

3.2. 균종간 *tet genes*의 상동성 조사

3.2.1. 분리균주에서의 *tet genes*의 분포

Tetracycline에 내성을 나타낸 *V. parahaemolyticus* 6균주, *V. alginolyticus* 4균주, *Enterococcus* spp. 28균주를 선정하여 *tet genes*의 분포를 조사하였다(Table 14). *V. parahaemolyticus*와 *V. alginolyticus*는 대상균주 수가 적었던 관계로 경향을 파악하기 어려웠으며, *Enterococcus* spp.는 단일 내성결정인자 중 *tet D*만 7.1%의 검출율을 나타내었다. *Enterococcus* spp.는 *tet D*만 검출된 두 균주 외에는 모두 복합 내성결정인자들이 분포하는 것으로 확인되었는데, 그 중 *tet A*와 *B*, 그리고 *C*가 동시에 검출된 균주가 57.1%로 가장 높게 검출되었고, 다음으로 *tet B*와 *D*가 32.1%로 나타났다. 이는 tetracycline에 내성을 나타내는 *E. coli*에서의 각 각의 검출율 34.5% 및 5.5%에 비하면 다소 높은 검출율

Table 14. Distribution of tetracycline resistance genes detected in *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* and *Enterococcus* spp.

Strain	Types of <i>tet</i> genes						
	<i>tet</i> A	<i>tet</i> B	<i>tet</i> D	<i>tet</i> A+B	<i>tet</i> A+D	<i>tet</i> B+D	<i>tet</i> A+B+D
<i>V. parahaemolyticus</i>	0 ¹ /6 ² (0) ³	0/6(0)	0/6(0)	0/6(0)	0/6(0)	2/6(33.3)	4/6(66.7)
<i>V. alginolyticus</i>	0/4(0)	0/4(0)	0/4(0)	0/4(0)	0/4(0)	3/4(75)	1/4(25)
<i>Enterococcus</i> spp.	0/28(0)	0/28(0)	2/28(7.1)	0/28(0)	1/28(3.6)	9/28(32.1)	16/28(57.1)

¹) No. of isolates possess each tetracycline resistance determinants.

²) No. of strain isolated from each sampling area.

³) Percentile (%) of isolates possess each tetracycline resistance determinants among isolates.

을 나타내었다.

3.2.2. 균종간 *tet* genes의 상동성 확인

V. parahaemolyticus, *V. alginolyticus* 및 *Enterococcus* spp.에서 검출된 *tet* genes과, *E. coli*에서 검출된 *tet* genes간의 상동성을 확인하기 위하여 각 분리 균주로부터 *tet* A, B, D를 cloning하여 상동성을 조사한 결과 *E. coli* 유래의 *tet* A, *tet* B, *tet* D와 매우 높은 상동성을 나타내었다(Fig. 22~Fig. 24). *tet* B 및 *tet* D는 그 기원이 Tn10으로서 *Shigella flexneri*에서 처음 발견되었고, 그 후 *E. coli*, *Klebsiella* sp., *Proteus* sp., *Pseudomonas* sp., *Vibrio* spp., *Salmonella* sp.와 같은 광범위한 장내세균들에서 발견된 바 있으며, 이 Tn10은 plasmid와 관련 있는 인자로서 세균의 접합에 의해서 전이가 이루어진다고 보고되고 있다(Chalmers et al., 2000).

어류양식장에서 분리된 그람음성 세균의 tetracycline 내성결정인자 *tet* A, *tet* B, *tet* D 그리고 *tet* Y와 임상균주의 tetracycline 내성 결정인자의 염기서열을 비교 분석한 결과 *tet* genes에 대한 기원이 동일하였으며, *tet* genes을 보유한 *Vibrio* spp., *Photobacterium* sp., *Alteromonas* sp. 그리고 *Pseudomonas* sp.등으로부터 *E. coli*에 *tet* B, *tet* D 그리고 *tet* Y가 전이된다는 보고도 있다(Furushita et al., 2003). 그리고 영국의 병원 폐수와 어류양식장에서 oxytetracycline내성 *Aeromonads*로부터 추출한 plasmid 중의 tetracycline 내성 결정인자는 두 장소에서 모두 *tet* A만 존재하는 것으로 확인되었으며, restriction fragment length polymorphism (RFLP)과 DNA proving을 통하여 분석한 결과 인접국가인 스코틀랜드와 노르웨이의 어류양식장에서 분리한 *Aeromonads*, 그리고 독일의 병원으로부터 분리한 *E. coli*와 기원이 동일하다는 보고도 있다(Rhodes et al., 2000). 이러한 사실에서 육상유래세균인 *E. coli*와 해양세균인 *Aeromonads*의 이종간 또는 자연 환경세균으로부터 인체병원균으로 tetracycline 내성을 조절

```

1 CATAGATCGCCGTGAAGAGGAGGGGTCCGACGATCGAGGTCAGGCTGGTGAGCGCCGCCA
2 CATAGATCGCCGTGAAGAGGAGGGGTCCGACGATCGAGGTCAGGCTGGTGAGCGCCGCCA
3 CATAGATCGCCGTGAAGAGGAGGGGTCCGACGATCGAGGTCAGGCTGGTGAGCGCCGCCA
4 CATAGATCGCCGTGAAGAGGAGGGGTCCGACGATCGAGGTCAGGCTGGTGAGCGCCGCCA
*****
1 GTGAGCCTTGACAGCTGCCCCTGACGTTCTCATCCACCTGCCTGGACAACATTGCTTGCA
2 GTGAGCCTTGACAGCTGCCCCTGACGTTCTCATCCACCTGCCTGGACAACATTGCTTGCA
3 GTGAGCCTTGACAGCTGCCCCTGACGTTCTCATCCACCTGCCTGGACAACATTGCTTGCA
4 GTGAGCCTTGACAGCTGCCCCTGACGTTCTCATCCACCTGCCTGGACAACATTGCTTGCA
*****
1 GCGCCGGCATTCCGATGCCACCCGAAGCAAGCAGGACCATGATCGGGAACGCCATCCATC
2 GCGCCGGCATTCCGATGCCACCCGAAGCAAGCAGGACCATGATCGGGAACGCCATCCATC
3 GCGCCGGCATTCCGATGCCACCCGAAGCAAGCAGGACCATGATCGGGAACGCCATCCATC
4 GCGCCGGCATTCCGATGCCACCCGAAGCAAGCAGGACCATGATCGGGAACGCCATCCATC
*****
1 CCCGTGTCGCGAAGGCAAGCAGGATGTAGC
2 CCCGTGTCGCGAAGGCAAGCAGGATGTAGC
3 CCCGTGTCGCGAAGGCAAGCAGGATGTAGC
4 CCCGTGTCGCGAAGGCAAGCAGGATGTAGC
*****

```

Fig. 22. Comparison of DNA nucleotide sequence of *tet A* in *E. coli*, *Enterococcus* spp., *V. parahaemolyticus* and *V. alginolyticus* isolates.

1, *E. coli*; 2, *Enterococcus* spp.; 3, *V. parahaemolyticus*; 4, *V. alginolyticus*.

```

1 ATGAATAAGTTTCGACAAAAGATCGCATTTGGTAATTACGTTACTCGATGCCATGGGGATTGGC
2 ATGAATAAGTTTCGACAAAAGATCGCATTTGGTAATTACGTTACTCGATGCCATGGGGATTGGC
3 ATGAATAAGTTTCGACAAAAGATCGCATTTGGTAATTACGTTACTCGATGCCATGGGGATTGGC
4 ATGAATAAGTTTCGACAAAAGATCGCATTTGGTAATTACGTTACTCGATGCCATGGGGATTGGC
*****
1 CTTATCATGCCAGTCTTTGCCAACGTTATTACGTGAATTTATTGCTTCGGAAGATATCGCT
2 CTTATCATGCCAGTCTTTGCCAACGTTATTACGTGAATTTATTGCTTCGGAAGATATCGCT
3 CTTATCATGCCAGTCTTTGCCAACGTTATTACGTGAATTTATTGCTTCGGAAGATATCGCT
4 CTTATCATGCCAGTCTTTGCCAACGTTATTACGTGAATTTATTGCTTCGGAAGATATCGCT
*****
1 AACCACTT GGCCTATTGCTTGCACCTTTATGCGTTAATGCAGGTTATCTTTGCTCCTTGG
2 AACCACTT GGCCTATTGCTTGCACCTTTATGCGTTAATGCAGGTTATCTTTGCTCCTTGG
3 AACCACTT GGCCTATTGCTTGCACCTTTATGCGTTAATGCAGGTTATCTTTGCTCCTTGG
4 AACCACTT GGCCTATTGCTTGCACCTTTATGCGTTAATGCAGGTTATCTTTGCTCCTTGG
*****
1 CTTGGAAAAAATGTCGTGACCGAATTTGGTCGGCGCGCCAGTGCCTGTTGTTGTCATTAATAGGC
2 CTTGGAAAAAATGTCGTGACCGAATTTGGTCGGCGCGCCAGTGCCTGTTGTTGTCATTAATAGGC
3 CTTGGAAAAAATGTCGTGACCGAATTTGGTCGGCGCGCCAGTGCCTGTTGTTGTCATTAATAGGC
4 CTTGGAAAAAATGTCGTGACCGAATTTGGTCGGCGCGCCAGTGCCTGTTGTTGTCATTAATAGGC
*****
1 GCATCGCTGGATTACTTATTGCTGGCTTTTTCAAGTGCCTTTGGATGCTGTATTTAGGC
2 GCATCGCTGGATTACTTATTGCTGGCTTTTTCAAGTGCCTTTGGATGCTGTATTTAGGC
3 GCATCGCTGGATTACTTATTGCTGGCTTTTTCAAGTGCCTTTGGATGCTGTATTTAGGC
4 GCATCGCTGGATTACTTATTGCTGGCTTTTTCAAGTGCCTTTGGATGCTGTATTTAGGC
*****
1 CGTTTTCCTTTACGGGATCACAGGAGCTACTGGGGCTGTGCGCGGCATCGGTCATTGCCGAT
2 CGTTTTCCTTTACGGGATCACAGGAGCTACTGGGGCTGTGCGCGGCATCGGTCATTGCCGAT
3 CGTTTTCCTTTACGGGATCACAGGAGCTACTGGGGCTGTGCGCGGCATCGGTCATTGCCGAT
4 CGTTTTCCTTTACGGGATCACAGGAGCTACTGGGGCTGTGCGCGGCATCGGTCATTGCCGAT
*****
1 AC ACCTCAGCTTCTCAACGCGTGAAGTGGTTTCGGTTGGTTAGGGGCAAGTTTTGGGCTT
2 AC ACCTCAGCTTCTCAACGCGTGAAGTGGTTTCGGTTGGTTAGGGGCAAGTTTTGGGCTT
3 AC ACCTCAGCTTCTCAACGCGTGAAGTGGTTTCGGTTGGTTAGGGGCAAGTTTTGGGCTT
4 AC ACCTCAGCTTCTCAACGCGTGAAGTGGTTTCGGTTGGTTAGGGGCAAGTTTTGGGCTT
*****
1 GGTTTAATAAGCGGGGCTTATTATTGGTGGTTTTTCAGGAGAGATTTACCGCATAGTCCC
2 GGTTTAATAAGCGGGGCTTATTATTGGTGGTTTTTCAGGAGAGATTTACCGCATAGTCCC
3 GGTTTAATAAGCGGGGCTTATTATTGGTGGTTTTTCAGGAGAGATTTACCGCATAGTCCC
4 GGTTTAATAAGCGGGGCTTATTATTGGTGGTTTTTCAGGAGAGATTTACCGCATAGTCCC
*****
1 TTTTTTATCGCTGCGTTGCTAAATATTGTC CTTTCCTTGTGGTTATGTTTTGGTTCCGT
2 TTTTTTATCGCTGCGTTGCTAAATATTGTC CTTTCCTTGTGGTTATGTTTTGGTTCCGT
3 TTTTTTATCGCTGCGTTGCTAAATATTGTC CTTTCCTTGTGGTTATGTTTTGGTTCCGT
4 TTTTTTATCGCTGCGTTGCTAAATATTGTC CTTTCCTTGTGGTTATGTTTTGGTTCCGT
*****
1 GAAAAACAAAAAATACACGTGATAATACAGATAACCGAAGTAGGGGTTGAGACGCAATCGAAT
2 GAAAAACAAAAAATACACGTGATAATACAGATAACCGAAGTAGGGGTTGAGACGCAATCGAAT
3 GAAAAACAAAAAATACACGTGATAATACAGATAACCGAAGTAGGGGTTGAGACGCAATCGAAT
4 GAAAAACAAAAAATACACGTGATAATACAGATAACCGAAGTAGGGGTTGAGACGCAATCGAAT
*****

```

Fig. 23. Comparison of DNA nucleotide sequence of *tet B* in *E. coli*, *Enterococcus* spp., *V. parahaemolyticus* and *V. alginolyticus* isolates.
1, *E. coli*; 2, *Enterococcus* spp.; 3, *V. parahaemolyticus*; 4, *V. alginolyticus*.

```

1 TCGGTATACATCACTTTATTTAAAAACGATGCCCCATTTTGTGTGATTATTTATTTTTTCAGCG
2 TCGGTATACATCACTTTATTTAAAAACGATGCCCCATTTTGTGTGATTATTTATTTTTTCAGCG
3 TCGGTATACATCACTTTATTTAAAAACGATGCCCCATTTTGTGTGATTATTTATTTTTTCAGCG
4 TCGGTATACATCACTTTATTTAAAAACGATGCCCCATTTTGTGTGATTATTTATTTTTTCAGCG
*****
1 CAATTGATAGGCCAAATTTCCCGCAACGGTGTGGGTGCTATTTACCGAAAAATCGTTTTTGGAA
2 CAATTGATAGGCCAAATTTCCCGCAACGGTGTGGGTGCTATTTACCGAAAAATCGTTTTTGGAA
3 CAATTGATAGGCCAAATTTCCCGCAACGGTGTGGGTGCTATTTACCGAAAAATCGTTTTTGGAA
4 CAATTGATAGGCCAAATTTCCCGCAACGGTGTGGGTGCTATTTACCGAAAAATCGTTTTTGGAA
*****
1 TGG ATAGCATGATGGTTGGCTTTTCAATTAGCGGGTCTTGGTCTTTTACACTCAGTATTC
2 TGG ATAGCATGATGGTTGGCTTTTCAATTAGCGGGTCTTGGTCTTTTACACTCAGTATTC
3 TGG ATAGCATGATGGTTGGCTTTTCAATTAGCGGGTCTTGGTCTTTTACACTCAGTATTC
4 TGG ATAGCATGATGGTTGGCTTTTCAATTAGCGGGTCTTGGTCTTTTACACTCAGTATTC
*** *****
1 CAAGCCTTTGTGGCAGGAAGAAATAGCCACTAAATGGGGCGAAAAAACGGCAGTACTGCTC
2 CAAGCCTTTGTGGCAGGAAGAAATAGCCACTAAATGGGGCGAAAAAACGGCAGTACTGCTC
3 CAAGCCTTTGTGGCAGGAAGAAATAGCCACTAAATGGGGCGAAAAAACGGCAGTACTGCTC
4 CAAGCCTTTGTGGCAGGAAGAAATAGCCACTAAATGGGGCGAAAAAACGGCAGTACTGCTC
*****
1 GGA TTATTGCAGATAGTAGTGCAATTTGCCCTTTTACGCTTTATATCTGAAGGTTGGTTA
2 GGA TTATTGCAGATAGTAGTGCAATTTGCCCTTTTACGCTTTATATCTGAAGGTTGGTTA
3 GGA TTATTGCAGATAGTAGTGCAATTTGCCCTTTTACGCTTTATATCTGAAGGTTGGTTA
4 GGA TTATTGCAGATAGTAGTGCAATTTGCCCTTTTACGCTTTATATCTGAAGGTTGGTTA
*** *****
1 GTTTTCCCTGTTTTAAATTTTATTGGCTGGTGGTGGGATCGCTTTACCTGCATTACAGGGA
2 GTTTTCCCTGTTTTAAATTTTATTGGCTGGTGGTGGGATCGCTTTACCTGCATTACAGGGA
3 GTTTTCCCTGTTTTAAATTTTATTGGCTGGTGGTGGGATCGCTTTACCTGCATTACAGGGA
4 GTTTTCCCTGTTTTAAATTTTATTGGCTGGTGGTGGGATCGCTTTACCTGCATTACAGGGA
*****
1 GTGATGTCTATCCAAACAAAGAGTCATCAGCAAGGTGCTTTACAGGGATTATTGGTGAGC
2 GTGATGTCTATCCAAACAAAGAGTCATCAGCAAGGTGCTTTACAGGGATTATTGGTGAGC
3 GTGATGTCTATCCAAACAAAGAGTCATCAGCAAGGTGCTTTACAGGGATTATTGGTGAGC
4 GTGATGTCTATCCAAACAAAGAGTCATCAGCAAGGTGCTTTACAGGGATTATTGGTGAGC
*****
1 CTTA CAATGCAACCGGTGTTATTGGGCCATTACTGTTTGCTGTTATTTATAATCATTTCA
2 CTTA CAATGCAACCGGTGTTATTGGGCCATTACTGTTTGCTGTTATTTATAATCATTTCA
3 CTTA CAATGCAACCGGTGTTATTGGGCCATTACTGTTTGCTGTTATTTATAATCATTTCA
4 CTTA CAATGCAACCGGTGTTATTGGGCCATTACTGTTTGCTGTTATTTATAATCATTTCA
*** *****
1 CTACCAATTTGGGATGGCTGGATTTGGATTATTGGTTTAGCGTTTTACTGTATTATTATC
2 CTACCAATTTGGGATGGCTGGATTTGGATTATTGGTTTAGCGTTTTACTGTATTATTATC
3 CTACCAATTTGGGATGGCTGGATTTGGATTATTGGTTTAGCGTTTTACTGTATTATTATC
4 CTACCAATTTGGGATGGCTGGATTTGGATTATTGGTTTAGCGTTTTACTGTATTATTATC
*****
1 CTGCTATCGATGACCTTCATGTTAAACCCCTCAAGCTCAGGGGAGTAACACAGGAGACAAAGT
2 CTGCTATCGATGACCTTCATGTTAAACCCCTCAAGCTCAGGGGAGTAACACAGGAGACAAAGT
3 CTGCTATCGATGACCTTCATGTTAAACCCCTCAAGCTCAGGGGAGTAACACAGGAGACAAAGT
4 CTGCTATCGATGACCTTCATGTTAAACCCCTCAAGCTCAGGGGAGTAACACAGGAGACAAAGT
*****
1 GCTTAG
2 GCTTAG
3 GCTTAG
4 GCTTAG
*****

```

Fig. 23. (Continued).

```

1 ATGATAAGCAGTTTCATACAACGGTTATCAAAGATGTTCTATTATGGATTGAACATAATT
2 ATGATAAGCAGTTTCATACAACGGTTATCAAAGATGTTCTATTATGGATTGAACATAATT
3 ATGATAAGCAGTTTCATACAACGGTTATCAAAGATGTTCTATTATGGATTGAACATAATT
4 ATGATAAGCAGTTTCATACAACGGTTATCAAAGATGTTCTATTATGGATTGAACATAATT
*****
1 TAGATCAGTCTTTACTGCTTGA GATGTGGCGAATAAAGCGGGTTATACCAAGTGGTATT
2 TAGATCAGTCTTTACTGCTTGA GATGTGGCGAATAAAGCGGGTTATACCAAGTGGTATT
3 TAGATCAGTCTTTACTGCTTGA GATGTGGCGAATAAAGCGGGTTATACCAAGTGGTATT
4 TAGATCAGTCTTTACTGCTTGA GATGTGGCGAATAAAGCGGGTTATACCAAGTGGTATT
*****
1 TTCAGCGGCTGTTCAAAAAAGTAACAGGGGTCACACTGGCTAGCTATA TCGTGCTCGTC
2 TTCAGCGGCTGTTCAAAAAAGTAACAGGGGTCACACTGGCTAGCTATA TCGTGCTCGTC
3 TTCAGCGGCTGTTCAAAAAAGTAACAGGGGTCACACTGGCTAGCTATA TCGTGCTCGTC
4 TTCAGCGGCTGTTCAAAAAAGTAACAGGGGTCACACTGGCTAGCTATA TCGTGCTCGTC
*****
1 GTTTGACGAAAGCGGCTGTTGAGTTG GTTTGACGAAAAAACTATCCTTGAGATCGCAT
2 GTTTGACGAAAGCGGCTGTTGAGTTG GTTTGACGAAAAAACTATCCTTGAGATCGCAT
3 GTTTGACGAAAGCGGCTGTTGAGTTG GTTTGACGAAAAAACTATCCTTGAGATCGCAT
4 GTTTGACGAAAGCGGCTGTTGAGTTG GTTTGACGAAAAAACTATCCTTGAGATCGCAT
*****
1 TAAAATATCAATTTGATTCCCAACAATCTTTTACACGTCGATTAAAGTACATTTTAAAGG
2 TAAAATATCAATTTGATTCCCAACAATCTTTTACACGTCGATTAAAGTACATTTTAAAGG
3 TAAAATATCAATTTGATTCCCAACAATCTTTTACACGTCGATTAAAGTACATTTTAAAGG
4 TAAAATATCAATTTGATTCCCAACAATCTTTTACACGTCGATTAAAGTACATTTTAAAGG
*****
1 TTACACCAA TTATTATCGGCGTAATAAATTATGGGAATTGGAGGCAATGCACTGA
2 TTACACCAA TTATTATCGGCGTAATAAATTATGGGAATTGGAGGCAATGCACTGA
3 TTACACCAA TTATTATCGGCGTAATAAATTATGGGAATTGGAGGCAATGCACTGA
4 TTACACCAA TTATTATCGGCGTAATAAATTATGGGAATTGGAGGCAATGCACTGA
*****

```

Fig. 24. Comparison of DNA nucleotide sequence of *tet D* in *E. coli*, *Enterococcus* spp., *V. parahaemolyticus* and *V. alginolyticus* isolates.

1, *E. coli*; 2, *Enterococcus* spp.; 3, *V. parahaemolyticus*; 4, *V. alginolyticus*.

하는 plasmids의 전이에 의해 tetracycline 내성결정인자가 확산될 수 있다는 것을 알 수 있다.

따라서 본 연구에서 장내세균인 *E. coli*, *Enterococcus* spp.와, 해양상재세균인 *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*에서 *tet A*, *tet B* 그리고 *tet D*가 검출된 것은 육상유래세균 및 해양상재세균에 있어서 동종 혹은 이종간에 접합에 의한 *tet genes*의 수평적 전이에 의한 것으로 생각되어진다.

3.3. 분리균주의 integron 분포

3.3.1. Integron 검출용 primer의 검증

Tetracycline에 내성을 나타내는 *E. coli* 에서 추출한 165균주의 total DNA를 대상으로 Table 3에 나타낸 primer를 이용하여 integrase gene의 검출을 통한 integron의 존재여부와 class I integron 및 class II integron의 분포를 조사하였다. PCR 결과 *E. coli* 내에 class I integron이 존재한 경우 951 bps에 해당하는 PCR 산물을 확인할 수 있었으며, class II integron은 모든 균주에서 존재하지 않아 PCR 산물은 확인되지 않았다(Fig. 25).

3.3.2. Integron의 분포

Tetracycline 내성 *E. coli* 165균주 중에서 76균주(46%)에서만 integron이 존재하는 것을 확인할 수 있었으며(Fig. 26), 확인된 integron은 모두 class I integron인 것으로 판명되었다. Integron은 다양한 분야에서 분리된 항균제 내성균들에서 그 분포가 확인됨으로써 수평적 전이를 통한 항균제 내성유전자의 이동성 인자로서 중요한 역할을 하고 있는 것이 입증되고 있다. class I integron은 다양한 분야에서 존재하는 것으로 보고되고 있는데, 설사를 일으키는 소와 돼지의 분변에서 분리된 *E. coli*에서 각 분리균주의 59%(Du et al., 2005)와 64.2%(Kang et al., 2005)에서 class I integron이 존재하는 것으로 보고되었

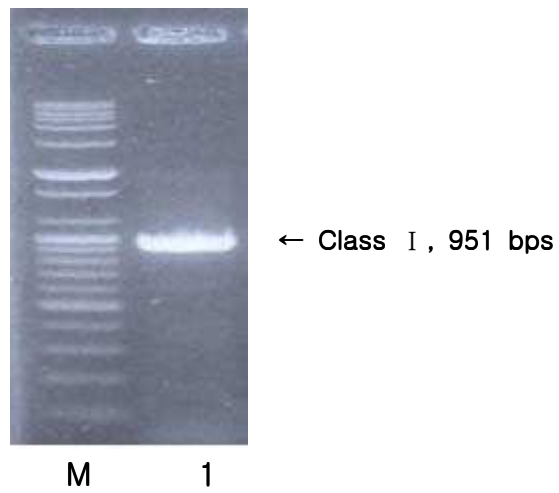


Fig. 25. PCR amplicons of the class I integron in *E. coli* isolates.

M, 100bp Plus DNA ladder; lane 1, class I integron.

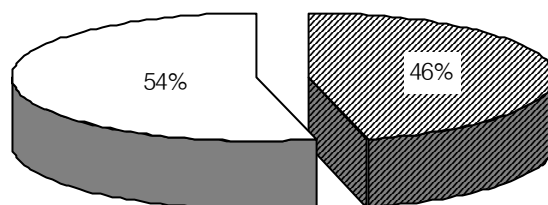


Fig. 26. Integron possession rate of the *E. coli* examined.

□, Integron absence; ▨, Integron possession.

다. 뿐만 아니라 임상분야에서 분리된 그람음성 세균에서 class I integron의 분포는 Taiwan에서 54% (Sallen et al., 1995), France에서 59% (Chang et al. 2000), Australia에서 49% (White et al., 2001)로 보고되어 class I integron이 전세계적으로 광범위하게 확산되어 있는 것으로 밝혀져 있다.

Class I integron이 존재하는 것으로 확인된 PCR 증폭산물은 target gene의 일치성 여부를 확인하기 위하여 염기서열을 분석한 결과 class I integron의 염기서열은 기존에 보고된 *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *S. enterica*, *Acinetobacter baumannii* 등과 일치하다는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 27, Table 15).

3.3.3. Integron 보유균과 다제내성과의 상관성 검토

Tetracycline에 내성을 나타내는 *E. coli* 165균주 중 integron이 존재하는 균주와 존재하지 않는 균주 간 다제내성 정도를 확인하였다. Class I integron이 존재하는 *E. coli* 76균주 중에서 4가지 이상의 항균제에 내성을 나타내는 다제내성 균주는 63균주로 class I integron이 존재하는 균주 중 82.9%를 나타낸 반면 class I integron이 존재하지 않은 *E. coli* 88균주 중에서는 55균주(65.2%)만이 다제내성균으로 나타나 class I integron이 존재하는 *E. coli* 균주가 다제내성율이 훨씬 높다는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 28).

대상균주 165균주 중 각 시료에 대한 class I integron의 검출비율을 살펴보면 넙치에서 52.1%로 가장 비율이 높았으며, 다음으로 해수에서 47.0%, 조피볼락에서 42.3%, 농어에서 36.0%를 나타내었다.

Integron은 일반적으로 균주가 지니고 있는 integrase (*int I*) gene에 따라 4 종류의 integron class로 구분되는데(Recchia and Hall, 1995), class I integron이 임상분야에서 가장 많이 분포하고 있으며, 다제내성과 밀접한 관계를 이루고 있다(Martinez-Freijo et al., 1998). 또한 동종 혹은 이종의 세균 간에 integron의 수평적 내성유전자의 전달은 내성유전자와 다제내성균이 확산되는

```

1  TTTCAGCACA TGGGTGTAAA TCATCGTCGT AGAGACGTCG GAATGGCCGA GCAGATCCTG
61  CACGGTTCGA ATGTCGTAAC CGCTGCCGAG AAGGCCGTC GCGAACGAGT GGC GGAGGGT
121 GTGCGGTGTG GCGGGCTTCG TGATGCCCTGC TTGTTCTACG GCACGTTTGA AGGCGCGCTG
161 AAAGGTCTGG TCATACATGT GATGGCGACG CACGACACCG CTCGTGGAT CGGTCAATG
241 CGTGTGCTGC GCAAAAACCC AGAACCACGG CCAGGAATGC CCGGCGCGCG GATACTTCCG
301 CTCAAGGGCG TCGGGAAGCG CAACGCCGCT GCGGCCCTCG GCCTGGTCCT TCAGCCACCA
361 TGCCCGTGCA CGCGACAGCT GCTCGCGCAG GCTGGGTGCC AAGCTCTCGG GTAACATCAA
421 GGCCCGATCC TTGGAGCCCT TGCCCTCCCG CACGATGATC GTGCCGTGAT CGAAATCCAG
481 ATCCTTGACC CGCAGTTGCA AACCTCACT GATCCGCATG CCCGTTCCAT ACAGAAGCTG
541 GCGGAACAAA CGATGCTCGC CTTCAGAAA ACCGAGGATG CGAACCATT CATCCGGGGT
601 CAGCACCACC GGCAAGCGCC GCGACGGCCG AGGTCTTCCG ATCTCCTGAA GCCAGGGCAG
661 ATCCGTGCAC AGCACCTTGC CGTAGAAGAA CAGCAAGGCC GCCAATGCCT GACGATGCGT
721 GGAGACCGAA ACCTTGCGCT CGTTCGCCAG CCAGGACAGA AATGCCTCGA CTTGCTGCT
781 GCCCAAGGTT GCCGGGTGAC GCACACCGTG GAAACGGATG AAGGCACGAA CCCAGTGGAC
841 ATAAGCCTGT TCGGTTGTA AGCTGTAATG CAAGTAGCGT ATGCGCTCAC GCAACTGGTC
901 CAGAACCTTG ACCGAACGCA GCGGTGGTAA CGGCGCAG G GCGGTTTTCA T

```

Fig. 27. Nucleotide sequences of class I integron in *E. coli* isolates.

Table 15. Homology analysis of the class I integron (*int I*) in *E. coli* isolates

Strain	Gene	Identities (%)	Accession No.
<i>Escherichia coli</i>	<i>int I</i>	99	AY214164
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>int I</i>	99	AJ877225
<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>int I</i>	99	AJ746361
<i>Salmonella enterica</i>	<i>int I</i>	99	AJ628353
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>int I</i>	99	ABA289190

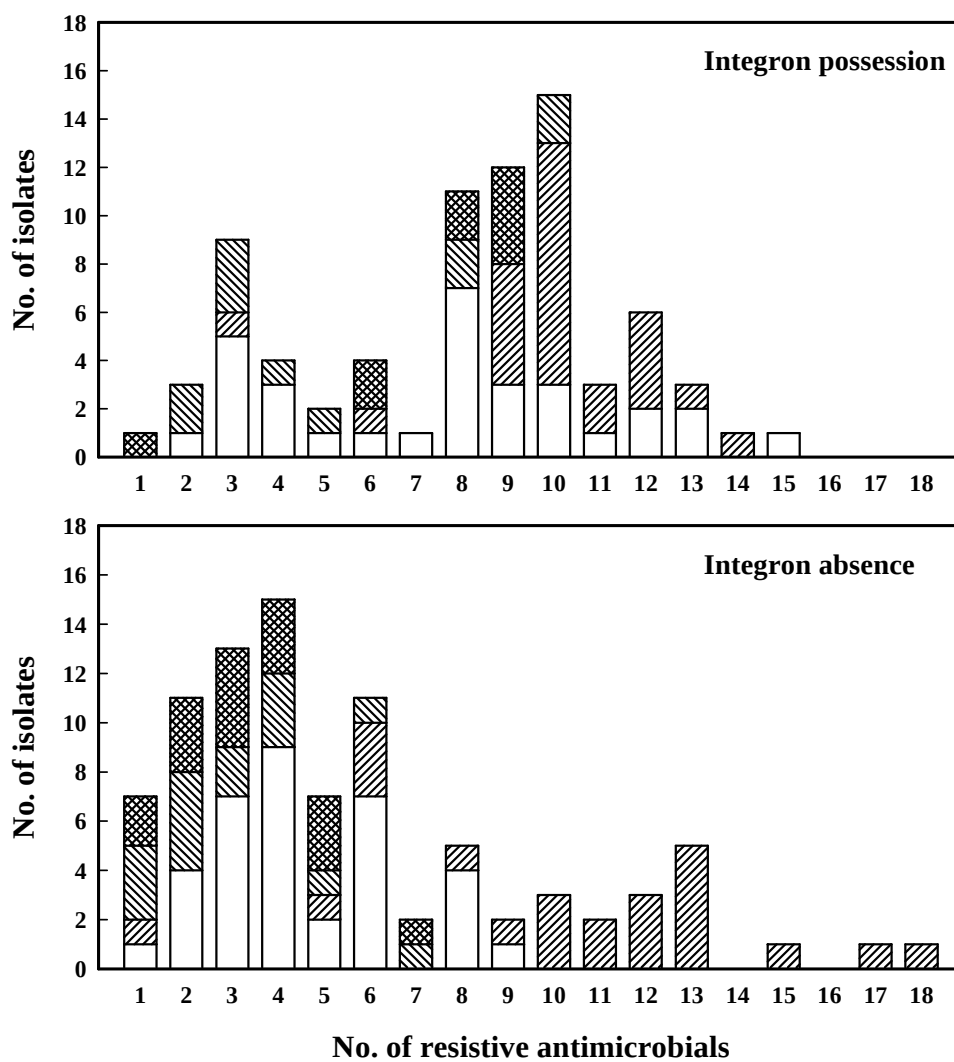


Fig. 28. Comparison of the antimicrobial resistance between integron possessive and absent strains.

□, Seawater; ▨, Oliver flounder; ▩, Black rock fish; ▤, Sea bass.

데 가장 효과적인 수단으로 생각되어지고 있다(Chandler and Claverys, 2001; Rowe-magnus and Mazel, 2001).

요 약

2004년 5월부터 10월까지 우리나라 남해안 연안의 어류양식업이 성행하고 있는 6개 지역(부산, 거제, 통영, 여수, 완도, 제주)의 육상 수조식 및 해상 가두리양식장 10개소의 양식어류 및 사육용수에 대한 위생상태를 파악하기 위하여 위생지표세균(분변계대장균, 장구균) 및 병원성세균(병원성비브리오, 살모넬라, 이질균, 포도상구균) 분포를 조사하였다. 또한 분리된 위생지표세균 및 병원성세균의 항균제 내성 특성을 파악하고, 어류양식장에서 특히 많이 사용되고 있는 항균제 중 tetracycline에 대한 내성을 가진 *Escherichia coli*를 선정하여 tetracycline 내성결정인자 분포조사를 통하여 수산용 항균제 사용의 오·남용 방지를 위한 기초자료로 사용하고자 하였다. 그리고 어류양식장으로부터의 분리된 *E. coli*, *Vibrio parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *Enterococcus* spp. 등에 대한 tetracycline 내성결정인자 분포조사를 통하여 동일 혹은 다른 균종간의 내성유전자의 전이 가능성을 확인하였으며, 내성균 중 다재내성에 관여하는 integron의 유무조사도 실시하였다.

1. 해수에서 분변계대장균과 장구균의 검출율은 각각 41.7% 및 13.3%로 장구균보다 분변계대장균의 검출율이 높았으나, 어류에서는 동일어종 내에서 장구균과 분변계대장균의 균종에 따른 큰 차이는 나타나지 않았다. *V. parahaemolyticus*와 *V. alginolyticus*의 검출율은 각각 36.5%, 49.2%이었다. 식중독 세균인 *Staphylococcus aureus*와 *Salmonella* sp.의 검출율은 각각 6.3% 및 2.4%로 일부 시료에서만 검출되어 비교적 낮은 검출율을 나타내었다. 그러나 *V. vulnificus*, *V. cholerae*, *Shigella* sp.는 모든 시료에서 검출되지 않았다.
2. 양식어류 및 해수에서 *V. parahaemolyticus*의 월별 균수변화는 수온이 상승

하는 6월부터 증가하기 시작하여 어류는 8월에, 그리고 해수는 9월에 각각 56.8 MPN/100g 및 11.6 MPN/100mL로 가장 높은 균수를 나타내었다.

3. 양식어류 및 해수로부터 분리·동정되어 항균제 감수성시험에 사용된 균주는 모두 784균주로 *E. coli*가 316균주, 해양상재세균인 *Vibrio* spp. 314균주, *Salmonella* sp. 18균주, *S. aureus* 15균주이었으며, 항균제 감수성시험 결과 총 784균주 중 750균주(95.7%)가 한 가지 이상의 항균제에 대해 내성을 나타내었고, 4가지 이상의 항균제에 대해 내성을 나타내는 다제내성균은 293균주(37.3%)이었다.
4. 분리된 위생지표세균 및 병원성세균의 균종별 내성율은 83.3~100%로 큰 차이를 나타내지 않았으나, 다제내성율은 육상유래세균인 *E. coli*와 장구균에서는 57.6~77.3%로 매우 높은 반면, 해양상재세균인 *V. parahaemolyticus*와 *V. alginolyticus*에서는 6.7~20.8%로 육상유래세균에 비하면 매우 낮은 것으로 나타났다.
5. *V. parahaemolyticus*의 항균제별 내성율은 ampicillin 97.9%, oxolinic acid 26.8%, amikacin 19.1% 등의 순으로 나타났고 *V. alginolyticus*에서는 ampicillin 100%, sulfamethoxazole/trimethoprim 25.0%, amikacin 21.7%, amoxicillin/clavulanic acid 15.8% 등의 순이었다.
6. Tetracycline에 내성을 나타내는 *E. coli* 165균주 중에서 tetracycline 단일 내성결정인자는 *tet* D가 153균주에서 92.7%로 가장 높은 검출율을 나타내었으며, 다음으로 *tet* A가 146균주에서 88.5%, *tet* B가 67균주에서 40.6%의 순이었으며, *tet* C, *tet* E, *tet* Y는 모든 균주에서 검출되지 않았다. 그리고 복합 내성결정인자에는 *tet* A와 D가 77균주에서 46.7%로 검출율이 높았으며, 다음으로 *tet* A와 B와 D가 57균주에서 34.5%, *tet* B와 D가 9균주에서 5.5%로 검출되었다.

7. Tetracycline에 내성을 나타내는 *E. coli* 165균주 중 76균주(46%)에서 class I integron이 검출되었으며, class II integron은 모든 균주에서 검출되지 않았다. 또한, class I integron이 존재하는 분리균주의 다제내성율은 82.9%로 class I integron이 존재하지 않는 분리균주의 65.2%에 비하여 높았다.
8. 해양상재세균인 *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*와 장내세균인 *Enterococcus* spp.에서 검출된 tetracycline 내성결정인자 중 *tet A*, *tet B* 및 *tet D*에 대한 염기서열은 *E. coli*에서 확인된 각 내성유전자의 염기서열과 99% 이상 일치하는 것으로 나타나 동종 혹은 이종간 접합에 의한 *tet* genes의 수평적 전이 가능성을 확인하였다.

감사의 말씀

1986년 대학 신입생으로 입학하여 본 논문이 완성될 때까지 어언 20년, 변함없는 관심과 격려로 지도해주신 조영제 교수님께 먼저 깊은 감사를 드립니다.

평소 바쁘신 일정 중에서도 심사과정에서 면밀한 검토와 아낌없는 조언을 해주신 양지영 교수님, 전병수 교수님, 논문이 완성되어질 수 있도록 많은 시간을 배려해 주시고 따뜻한 관심과 세심한 지도로 이끌어 주신 이태식 팀장님, 김지회 연구관님 그리고 언제나 따뜻한 애정으로 도와주신 이근태 교수님, 김선봉 교수님, 이양봉 교수님, 안동현 교수님께 감사의 마음을 전합니다.

아낌없는 격려와 힘이 되어주신 이희정 연구관님과 김풍호 연구사님, 논문이 완성될 때까지 질타를 아끼지 않으신 오은경 박사님, 바쁜 일정 속에서도 넉넉한 배려를 아끼지 않으신 목종수 박사님, 유홍식 박사님, 조미라 박사님, 논문실험을 위해 주야로 노력해 주신 심길보 박사, 박큰바위님, 신순범님, 김보미님, 김선경님을 비롯하여 황혜진님, 유혜진님, 장수선님께 깊은 감사를 드립니다. 또한 학위과정 중 번거로운 일들을 마다 않고 도와준 부경대학교 식품공학과 수산가공학실험실 후배님들께도 감사의 말씀을 드립니다.

어려운 생활여건 속에서도 지금 이 자리에 서기까지 항상 사랑과 믿음으로 뒷바라지 해주신 부모님, 자형과 누님, 동생 내외분 그리고 장인어른, 장모님께도 감사드립니다. 또한 주말에도 연구실에 나가 많은 시간을 같이 보내지 못했음에도 불구하고 나의 곁에서 불평 한마디 없이 묵묵히 같이 걸어와 준 사랑하는 아내 이정화와 아빠의 희망 유정이, 귀염둥이 현정이에게도 작은 선물이 되길 바라는 마음으로 이 논문을 바칩니다.

참 고 문 헌

- Acar, J.F. and F.W. Goldstein. 1991. Disk susceptibility test. In : Antibiotics in Laboratory Medicine, Lorian, V. ed. Williams & Wilkins, Baltimore, USA, pp. 17-52.
- Andrews, W.H., F. Satchell and P. Sherrod. 1992d. *Shigella*. In: Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual, 7th ed. AOAC International, Arlington, USA, pp. 71-76.
- Andrews, W.H., V.R. Bruce, G. June, F. Satchell and P. Sherrod. 1992. *Salmonella*. In: Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual, 7th ed., AOAC International, Arlington, USA, pp. 51-70.
- Aoki, T. 1988. Drug resistant plasmids from fish pathogens. Microbiological Sciences, 5, 219-223.
- Aoki, T. 1997. Resistant plasmids and the risks of transfer. In: Furunculosis, Multidisciplinary Fish Disease Research. Bernoth, E.M. ed. Academic Press, San Diego, USA, pp. 433-440.
- A.P.H.A. 1970. Recommended Procedures for the Examination of Sea Water and Shellfish, 4th ed., American Public Health Association, Washington, D.C., USA, pp. 28-47.
- Arakawa, Y., M. Murakami, K. Suzuki, H. Ito, R. Wacharotayakun, S. Ohsuka, N. Kato and M. Ohta. 1995. A novel integron-like element carrying the metallo β -lactamase gene bla_{IMP}. Antimicrob. Agents Chemother., 39, 1612-1615.
- Balebona, M.C., I. Zorrilla, M.A. Morinigo and J.J. Borrego. 1998. Survey of bacterial pathologies affecting farmed gilt-head sea bream in southwestern

- Spain from 1990 to 1996. *Aquaculture*, 166, 19-35.
- Barbieri, E., I. Falzano, C. Fiorentini, A. Pianetti, W. Baffone, A. Fabbri, P. Matarrese and A. Casiere. 1999. Occurrence, diversity, and pathogenicity of *Vibrio* spp. and non-O1 *Vibrio cholerae* from estuarine waters along the Italian Adriatic coast. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 2748-2753.
- Baticados, M.C.L. and J.O. Paclibare. 1992. The use of chemotherapeutic agents in aquaculture in the Philippines. In: *Diseases in Asian Aquaculture*. Subasinghe, R.P. and J.R. Arthur eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, pp. 531-546.
- Beatriz, G., J. Ernst, S. Andreas, M. Burkhard, L. Simone and H. Reiner. 2003. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German *Escherichia coli* isolates from cattle, swine and poultry. *J. Antimicrob. Chem.*, 52, 489-492.
- Benett, R.W. and G.A. Lancette. 1992. *Staphylococcus aureus*. In: *Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual*, 7th ed., AOAC International, Arlington, pp. 161-166.
- Birnboim, H.C. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, 24, 1513-1523.
- Bower, C.K. and M.A. Daeschel. 1999. Resistance responses of microorganisms in food environments. *Int. J. Food Microbiol.*, 50, 33-44.
- Chalmers, R., S. Sewitz, K. Lipkow and P. Crellin. 2000. Complete nucleotide sequence of Tn 10. *J. Bacteriol.*, 182, 2970-2972.
- Chandler, M. and J.P. Claverys. 2001. Genome diversity: sources and forces. *Curr. Opin. Microbiol.*, 4, 547-549.
- Chandrasekaran, S., B. Venkatesh and D. Lalithakumari. 1998. Transfer and

- expression of a multiple antibiotic resistance plasmid in marine bacteria. Curr. Microbiol., 37, 347-351.
- Chang, C.Y., L.L. Chang, Y.H. Chang, T.M. Lee and S.F. Chang. 2000. Characterization of drug resistance gene cassettes associated with class I integrons in clinical isolates of *Escherichia coli* from Taiwan, ROC. J. Med. Microbiol., 49, 1097-1102.
- Chang, D.S. and S.J. Kim. 1977. Distribution and physiological characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* in coastal sea of Korea. Bull. Nat'l. Fish. Res. Dev. Agency, 19, 7-40.
- Choi, H.S. and T.S. Moon. 1995. Studies on the disease of culture organism. The Technical Report of South Sea Fisheries Institute, pp. 220-233.
- Choi, H.S. and T.S. Moon. 1996. Studies on the disease of culture organism in Kyeognam. The Technical Report of South Sea Fisheries Institute, pp. 168-183.
- Choi, S.D. and Y.G. Kong. 1996. Studies on the disease of culture organism in Jeonnam. The Technical Report of South Sea Fisheries Institute, pp. 126-135.
- Chong, Y.S. 2000. Current state of antimicrobial resistance in Korea. J. Korean Soc., Microbiol., 35, 337-339.
- Chopra, I. and M. Roberts. 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, application, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 65, 232-260.
- Christensen, K.J. and P.O. Gubbins. 1996. Treatment of vancomycin resistant Staphylococcal infections. Ann. Pharmacother., 30, 288-290.
- Christine, M., M.F. John, B. Sadjia, S. Francois, C.L. Roger, B. Roland, M. Luke, L. Serge and H. Josee. 2003. Antimicrobial resistance genes in

- enterotoxigenic *Escherichia coli* O149:K91 isolates obtained over a 23-year period from pigs. Antimicrob. Agents Chemother., 47, 3214-3221.
- Chung, Y.H., S.Y. Kim and Y.H. Chang. 2003. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Salmonella* isolated from foods in Korea from 1993 to 2001. J. Food Protect., 66, 1154-1157.
- Cloete, T.E. 2003. Resistance mechanism of bacteria to antimicrobial compounds. International Biodeterior. Biodgrad. 51. 277-282.
- Collis, C.M. and R.M. Hall. 1992a. Gene cassettes from the insert region of integrons are excised as covalently closed circles. Mol. Microbiol., 6, 2875-2885.
- Collis, C.M. and R.M. Hall. 1992b. Site-specific deletion and rearrangement of integron insert genes catalyzed by the integron DNA integrase. J. Bacteriol., 174, 1574-1585.
- Collis, C.M., G. Grammaticopoulos, J. Briton, H.W. Stocks and R.M. Hall. 1993. Site-specific insertion of gene cassettes into integrons. Mol. Microbiol., 9, 41-52.
- Correia, M., F. Boavida, F. Grosso, M.J. Salgado, L.M. Lito, J.M. Cristino, S. Mendo and A. Duarte. 2003. Molecular characterization of a new class 3 integron in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicro. Agents Chemother. 2838-2843.
- De Grandis, S.A. and R.M.W. Stevenson. 1985. Antimicrobial susceptibility patterns and R plasmid mediated resistance in the fish pathogens *Yersinia ruckeri*. Antimicrob. Agents Chemother., 27, 938-942.
- De Paola, A., P.A. Flynn, R.M. McPhearson and S.B. Levy. 1988. Phenotype and genotype characterization of tetracycline and oxytetracycline resistant *Aeromonas hydrophila* from cultured channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and their environments. Appl. Environ. Microbiol., 54, 1861-1863.

- Dronda, F., R. Canton, J.L. Selma, F. Garcia-Ramos and M. Martinez-Ferrer. 1991. *Vibrio alginolyticus* and swimmer's otitis externa. *Enferm Infect. Microbiol. Clin.*, 10, 437-438.
- Du, X., Z. Shen, B. Wu, S. Xia and J. Shen. 2005. Characteristics of class 1 integrons-mediated antibiotic resistance among calf pathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 245, 295-298.
- Elliot, E.L., C.A. Kaysner and M.L. Tamplin. 1992. *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* and other *Vibrio* spp. In: Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual, 7th ed., AOAC International, Arlington, pp. 111-140.
- Fluit, A.C and F.J. Schmitz. 1999. Class 1 integron, gene cassettes, mobility, and epidemiology. *Eur. J. Clin. Microbiol. infect. Dis.*, 18, 761-770.
- Furushita, M., T. Shiba, T. Maeda, M. Yahata, A. Kaneoka, Y. Takahashi, K. Torii, T. Hasegawa and M. Ohta. 2003. Similarity of tetracycline resistance genes isolated from fish farm bacteria to those from clinical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 5336-5342.
- Gin, A.S. and G.G. Zhanel. 1996. Vancomycin-resistant enterococci. *Ann. Pharmacother.*, 30, 615~624.
- Goldstein, C., M.D. Lee, S. Sanchez, C. Hudson, B. Phillips, B. Register, M. Grady, C. Liebert, A.O. Summers, D.G. White and J.J. Maurer. 2001. Incidence of class 1 and 2 integrases in clinical and commensal bacteria from livestock, companion animals, and exotics. *Antibiol. Agent. Chemother.*, 45, 723-726.
- Hagman, H.M. and L.J. Strausbaugh. 1996. Vancomycin-resistant enterococci. *Postgrad. Med.*, 99, 60-71.

- Hall, R.M. and C.M. Collis. 1995. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site specific recombination. *Mol., Microbiol.*, 15, 593-600.
- Hall, R.M. and C.M. Collis. 1998. Antibiotic resistance in gram-negative bacteria: the role of gene cassettes and integrons. *Drug Resist. Updates*, 1, 109-119.
- Hanes, N.B. and C. Fragala. 1967. Effect of seawater concentration on the survival of indicator bacteria. *J. Water Pollut. Control Fed.*, 39, 97.
- Hayashi, F., K. Harada, S. Mitsuhashi and M. Inoue. 1982. Conjugation of drug-resistance plasmids from *Vibrio anguillarum* to *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiol. Immunol.*, 26, 479-485.
- Heo, J.H., M.H. Jung, M.H. Cho, G.H. Kim, K.C. Lee, J.H. Kim and T.S. Jung. 2002. The study on fish disease with reference to bacterial susceptibility to antibiotics in the southern area of Kyeongnam. *J. Vet. Clin.*, 19, 19-22.
- Herwig, R.P., J.P. Gray and D.P. Weston. 1997. Antibacterial resistant bacteria in surficial sediments near salmon net-cage farms in Puget Sound, Washington. *Aquaculture*, 149, 263-283.
- Hochhut, B., Y. Lotfi, D. Mazel, S.M. Faruque, R. Woodgate and M.K. Waldor. 2001. Molecular analysis of antibiotic resistance gene clusters in *Vibrio cholerae* O139 and L1 SXT constins. *Antimicrob. Agent. Chemother.*, 45, 2991-3000.
- Hiramatsu, K., N. Aritaka, H. Hanaki, S. Kawasaki, Y. Hosoda, S. Hori, Y. Fukuchi and I. Kobayashi. 1997. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet*, 350, 1670-1673.
- Inglis, V., E. Yimer, E.J. Bacon and S. Ferguson. 1993. Plasmid-mediated

- antibiotic resistance in *Aeromonas salmonicidia* isolated from Atlantic salmon, *Salmosalar* L. in Scotland. J. Fish Dis., 16, 593-600.
- Jeong, H.D. and S.K. Chun. 2002. The utilization of antibiotics and the treatment of bacterial diseases in fish. J. Fish. Pathol., 5, 37-48.
- Jeong, Y.S. and K.W. Lee. 1998. Antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from Korean patient. The Microorganisms and Industry, 24, 10-19.
- Kang, S.G., D.Y. Lee, S.J. Shin, J.M. Ahn and H.S. Yoo. 2005. Changes in patterns of antimicrobial susceptibility and class I integron carriage among *Escherichia coli* isolates. J. Vet. Sci., 6, 201-205.
- Kim, M.N., C.H. Pai, J.H. Woo, J.S. Ryu and K. Hiramatsu. 2000. Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* in Korea. J. Clin. Microbiol. 38, 3879-3881.
- Lee, H.K., Y.H. Yoon, S.S. Lee and K.H. Ha. 1998. Biochemical characteristics of *Vibrios* isolated from cultured shellfish, *Ruditapes philippinarum*, and some species of wild shellfish. J. Korean Soc. Microbiol., 33, 567-574.
- Lee, I.S., J.B. Lee, Y.B. Park, J.B. Kang and M.J. Lee. 1989. Study on the distribution and growth of *Vibrio parahaemolyticus* by influenced kinds of environmental materials in Gyeongido coastal area. The Report of Gyeongido Institute of Health & Environ., 3, 55-70.
- Lee, J.H. and K.Y. Jeong. 2004. The monitoring of *Vibrio* spp. of Busan coastal area. The Report of Busan Institute of Health & Environ., 14, 188-200.
- Lee, S.J., M.J. Kim, J.K. Jeong and D.Y. Lee. 2001. The study on the molecular biology of *Vibrio* spp. of isolated from Gyeongbukdo area (2000-2001). The Report of Gyeongbukdo Institute of Health & Environ., 14, 9-47.
- Li, J., J. Yie, R.W.T. Foo, J.M.L. Ling, H. Xu and N.Y.S. Woo. 1999. Antibiotic resistance and plasmid profiles of *Vibrio* isolates from cultured

- silver sea bream, *Sparus sarba*. Mar. Pollut. Bull., 39, 245-249.
- Martinez-Freijo, P., A.C. Fluit, F.J. Schmitz, V.S. Grek, J. Verhoef and M.E. Jones. 1998. Class I integrons in gram negative isolates from different European hospitals and association with decreased susceptibility to multiple antibiotic compounds. J. Antimicrob. Chemother., 42, 689-696.
- Matsushita, S., S. Yamada, Y. Kudoh and M. Ohashi. 2003. Drug resistance and transferable R plasmids in *Vibrio cholerae* O-1 and non-O1, *V. fluvialis* and *V. parahaemolyticus* recently isolated from human sources. Kansenshogaku Zasshi, 61, 109-117.
- Matsuzaki, S. and S. Tanaka. 1987. Catabolite repression of extracellular amylase synthesis in *Vibrio parahaemolyticus*. Nippon Saikingaku Zasshi., 42, 837-845.
- Miranda, C.D., C. Kehrenberg, C. Ulep, S. Schwarz and M.C. Roberts. 2003. Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria from Chilean salmon farms. Antimicrob. Agents Chemother., 47, 883-888.
- Moreillon, P. and J.M. Entenza. 2001. Antibiotic resistance: learning animal feeds and animal experimentation. Clin., Microbiol., Infect. 7. 13-18.
- Moritoris, E., S.W. Joseph, M.I. Krichevsky, W. Sindhuhardja and R.R. Colwell. 1985. Characterization and distribution of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* isolated in Indonesia. Appl. Environ. Microbiol., 50, 1388-1394.
- Nakajima, T., M. Suzuki, K. Harada, M. Inoue and S. Mitsuhashi. 1983. Transmission of R plasmids in *Vibrio anguillarum* to *Vibrio cholerae*. Microbiol. Immunol., 27, 195-198.
- NCCLS. 2004. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.

- NCCLS document M100-S14. National Committee for Clinical Laboratory Standards., Wayne, PA.
- Ng, L.K., I. Martin, M. Alfa and M. Mulvey, 2001. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Molecular and Cellular Probes.*, 15, 209-215.
- Park, H.O., C.M. Kim, G.J. Woo, S.H. Park, D.H. Lee, E.J. Chang and K.H. Park. 2001. Monitoring and trends analysis of food poisoning outbreaks occurred in recent years in Korea. *J. Fd Hyg. Safety*, 16, 280-294.
- Park, M.S., B.Y. Jee, S.H. Jeong and J.W. Kim. 2002. State and prospects of fish diseases in Korea. *World Aqua.*, p. 586.
- Park, M.Y., H.J. Kim and D.S. Chang. 2003. Pathogenic *Vibrio* spp. isolated from the Gwangan beach of Busan. *J. Fish. Sci. Tech.*, 6, 105-109.
- Park, S.G., S.K. Park, J.H. Jung and Y.H. Jin. 2002. Antibiotic susceptibility of *Salmonella* spp. isolated from diarrhoea patients in Seoul from 1996 to 2001.
- Perreten, V., F. Schwarz, L. Cresta, M. Boeglin, G. Dasen and M. Teuber. 1997. Antibiotic resistance spread in food. *Nature*, 389, 801-802.
- Petersen, A., J.S. Andersen, T. Kaewmak, T. Somsiri and A. Dalsgaard. 2002. Impact of integrated fish farming on antimicrobial resistance in a pond environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 6036-6042.
- Ramotar, K., W. Woods, L. Larocque and B. Toye. 2000. Comparison of phenotypic methods to identify enterococci intrinsically resistant to vancomycin. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 36, 119-124.
- Recchia, G.D. and R.M. Hall. 1995. Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiology*, 141, 3015-3027.
- Rhodes, G., G. Huys, J. Swings, P. McGann, M. Hiney, P. Smith and R.W.

- Pickup. 2000. Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between aeromonads in hospital and aquaculture environments: implication of Tn1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant *tet A*. Appl. Environ. Microbiol., 66, 3883-3890.
- Roberts, M.C. 1990. Characterization of the *tet M* determinant in urogenital and respiratory bacteria. Antimicrob. Agents Chemother., 34, 476-478.
- Roberts, M.C. 2005. Update on acquired tetracycline resistance genes. FEMS Microbiol. Lett., 245, 195-203.
- Robredo, B., K.V. Singh, F. Baquero, B.E. Murray and C. Torres. 2000. Vancomycin resistant enterococci isolated from animals and food. Int., J. Food Microbiol., 54, 197-204.
- Rouveix, B. 2003. Antibiotic safety assessment. Int., J. Antimicrob., Agents. 21, 215-221.
- Rowe-Magnus, D.A. and D. Mazel. 2001. Integron; natural tools for bacterial genome evolution. Curr. Opin. Microbiol., 4, 565-569.
- Sallen, B., A. Rajoharison, S. Desvarenne and C. Malibat. 1995. Molecular epidemiology of integron-associated antibiotic resistance genes in clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. Microb. Drug Resist., 1, 195-202.
- Schwalbe, R.S., J.T. Stapleton and P.H. Gilligan. 1987. Emergence of vancomycin resistance in coagulase-negative staphylococci. N. Engl. J. Med., 316, 927-931.
- Son, J.C., S.W. Park and K.J. Min. 2003. Environmental and antimicrobial characteristics of *Vibrio* spp. isolated from fish, shellfish, seawater and brackish water samples in Gyongbuk eastern coast. Kor. J. Env. Hlth., 29, 94-102.
- Taylor, S.A.N., E.M. Bailey and M.J. Rybak. 1993. *Enterococcus*, an emerging

- pathogen. *Ann. Pharmacother.*, 27, 1231-1242.
- Tendencia, E.A. and L.D. De la Peña. 2001. Antibiotic resistance of bacteria from shrimp ponds. *Aquaculture*, 195, 193-204.
- Tjaniadi, P., M. Lesmana, D. Subekti, N. Machpud, S. Komalarini, W. Santoso, C.H. Simanjuntak, N. Punjabi, J.R. Campbell, W.K. Alexander, H.J. Beecham III, A.L. Corwin and B.A. Oyofe. 2003. Antimicrobial resistance of bacterial pathogens associated with diarrheal patients in Indonesia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 68, 666-670.
- US EPA(Environmental Protection Agency). 1986. Bacteriological Ambient Water Quality Criteria for Marine and Freshwater Recreational Waters. Springfield, PB86-158-045.
- Weber, J.T., E.D. Mintz, R. Canizares, A. Semiglia, I. Gomez, R. Sempertegui, A. Davilar, K.D. Greene, N.D. Puh, D.N. Cameron, F.C. Tenover, T.J. Barrett, N.H. Bean, C. Ivey, R.V. Tauxe and P.A. Blake. 1994. Epidemic cholera in Ecuador: multidrug-resistance and transmission by water and seafood. *Epidemiol. Infect.*, 112, 1-11.
- White, P.A., C.J. McIver, Y.M. Deng and W.D. Rawlinson. 2000. Characterization of two new gene cassettes, *aadA5* and *dfrA17*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 182, 265-269.
- Wong, H.C., S.H. Liu, T.K. Wang, C.L. Lee, C.S. Chiou, D.P. Liu, M. Nishibuchi and B.K. Lee. 2000. Characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 from Asia. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 3981-3986.
- Woo. J.H. and J.S. Ryu. 1999. Antimicrobial resistance in Korea. *Korean J. Medicine*, 57, 578-586.
- Yoshimura, H., M. Ishimaru, Y.S. Endoh and A. Kojima. 2000. Antimicrobial

- susceptibilities of enterococci isolated from faeces of broiler and layer chickens. FEMS Microbiol. Lett., 31, 427-432.
- Yuko, K., S. Yasuhiko, T. Yoshinori, S. Kensuke, K.B. Rupak, Y. Shinji, K. Koichi and E. Ginji. 2005. Characterization of multidrug-resistance phenotypes and genotypes of *Escherichia coli* strains isolated from swine from an abattoir in Osaka, Japan. Epidemiol. Infect., 133, 59-70.
- Zanetti, S., T. Spanu, A. Deriu, L. Romano, L.A. Sechi and G. Fadda. 2001. In vitro susceptibility of *Vibrio* spp. isolated from the environment. Int. J. Antimicrob. Agents, 17, 407-409.
- 김윤. 2001. 기르는 어업 연구방향과 향후방향. 수산탐구. 2, 4-8.
- 김진우, 이주석, 박미선, 방종득, 손상규, 박명애, 정승희, 최동립, 지보영, 도정완, 심두생, 김이청, 최혜승, 권문경, 이창훈, 송재희, 민은영. 2002. 수산양식생물 질병도감. 국립수산물과학원, pp. 222.
- 식품의약품안전청. 2004. 제5의2.수산물에대한잠정규격. 식품공전. p. 504.
- 이상희. 2004. 치료제가 없는 ‘슈퍼세균’의 출현 및 대책. 미생물과 산업, 1, pp. 1-10.
- 정선식. 2001. 향균제 내성 극복을 위한 연구방향. 보건산업기술동향. 봄. 28-35.
- 한형균. 2001. 어류 종묘생산기술개발. 수산탐구. 2, 9-14.
- 해양수산부. 2005a. 2004 해양수산물 주요통계. pp. 52-53.
- 해양수산부. 2005b. 수산업 동향에 관한 연차보고서. pp. 62-261.
- 이우주. 1987. 이우주의 약리학강의. pp. 61-64.
- 竹田美文, 工藤泰雄, 篠田純男, 本田武司. 1990. 腸炎ビブリオ. pp. 98-104.
- 吐山豊秋. 1998. 動物薬の使用實態と食品残留. 食衛誌, 39(1), J-6-J-11.
- 堀江正一, 中澤裕之. 1995. 動物用醫藥品の法規制の現状と残留分析法. 食衛誌, 36, 329-343.