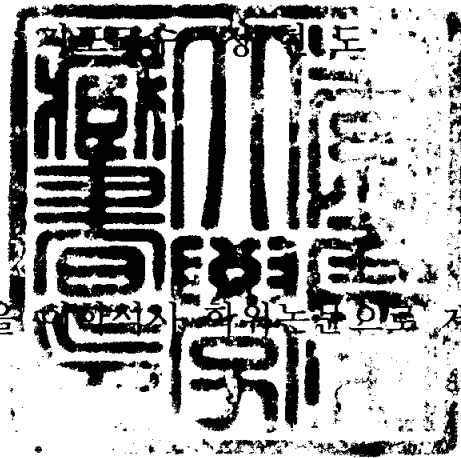


이학석사 학위논문

우리나라 어병 세균이 갖는
tet 유전자의 특성 분석

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함



2003년 2월

부경대학교 대학원

어 병 학 과

전 려 진

전려진의 이학석사 학위논문을 인준함

2002년 12월 26일

주 심 이학박사 김 기 홍



위 원 약학박사 정 준 기



위 원 이학박사 정 현 도



목 차

I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 실험 균주	4
2. 약제 감수성 실험	4
3. PCR amplification	7
3-1. Primer 제작	7
3-2. Total nucleic acid 분리	7
3-3. PCR and multiplex PCR	10
4. pUC18에 <i>tet</i> gene cloning	11
4-1. PCR	11
4-2. Gel elution	11
4-3. Cloning	13
4-4. Plasmid 분리	13
5. Transformation	14
6. Conjugation	14
7. 해양 환경에서의 내성분포 조사	15
7-1. 내성균 분리	15
7-2. PCR 방법을 통한 <i>tet</i> gene의 분포	15
8. 항생제 투여에 따른 내성 변화	16
8-1. 항생제 투여	16
8-2. 내성 변화 관찰	16
III. 결 과	17
1. 내성균주의 분리	17

2. PCR	24
2-1. Primer specificity	24
2-2. Cloning된 <i>tet</i> gene의 확인	24
3. Multiplex PCR	28
3-1. Cloning된 <i>tet</i> gene을 template로 이용	28
3-2. Total nucleic acid를 template로 이용	28
4. 내성균주에서의 <i>tet</i> gene 검출	32
5. <i>tet</i> gene의 위치 확인	35
6. Detection limit	35
7. 해양 환경에서의 내성 분포 조사	38
8. 항생제 투여에 따른 내성 변화	38
IV. 고 찰	44
V. 요 약	51
VI. 감사의 글	52
VII. 참고 문헌	53

Characterization of *tet* genes in fish pathogenic bacteria from Korea

Lyu Jin Jeon

*Department of Fish Pathology, Graduate School
Pukyong National University*

Abstract

Multi-drug resistant isolates carrying tetracycline resistance gene were obtained from various locations in Korea and were analyzed the distribution and origin of the *tet* genes. Frequency of tetracycline resistance bacteria found in *E. tarda* and *Vibrio* sp. as major fish pathogenic isolates from 1993 to 2002 was 15% and 26%, respectively. Specific primer pairs were designed to determine of *tet* A, B, C, D, E and G commonly found in Gram-negative organism by PCR. With the developed multiplex PCR method, it was found that *Edwardsiella tarda* isolates contained diverse *tet* genes, *tet* A, *tet* D, *tet* B, *tet* A-D and *tet* A-G, in contrast *Vibrio* sp. contained only *tet* B. Additionally, multiplex PCR with the mixture of an one sense primer derived from the conserved region of six different *tet* genes and six antisense primers specific to each different *tet* gene was developed to analyze the *tet* genes in a single tube with one reaction. Multiplex PCR should result in significant savings in terms of labour and cost in analysis of a large number of strains when compared with using an individual PCR for targeting each gene. It may also be a useful method to differentiate the types of tetracycline resistance when used as an additional market for the purpose of outbreak investigation and surveillance. Most of *tet* genes of the analyzed 18 *E. tarda* isolates found in

plasmid, while *tet B* gene of two *E. tarda* isolates was localized on chromosome. The frequency of oxytetracycline resistance in the aquatic environmental bacteria were monitored from the farms in filed. The frequency of Tc resistant bacteria present in the seawater, sediment and net was 6.7%, 24.4% and 30.7%, respectively. The analyzed Tc resistant frequency in intestinal microflora of rockfish treated OTC before 1 week of sampling was 2.83% compared with the 0.25% in rockfish without antibiotics treatment at least before 3 months of sampling. Rockfish were held in experimental tanks and oxytetracycline-HCl was administered at 125mg/kg body weight per day for 10 day via medicated feed. The changes of oxytetracycline resistance was monitored in samples taken from the intestinal contents of the fish. The range of the mean frequencies of resistance of the intestinal flora in the period before medication (6~27%) were lower than the frequency of resistance in the microflora after medication (32~85%).

I. 서론

양식 현장에서 생산성 향상을 위한 밀식, 과다한 사료 투여 등으로 수질악화 및 스트레스 요인의 증가와 함께 세균성 질병의 발생률도 증가하고 있기 때문에 항생제의 사용은 어류 양식에서 필수적이라고 할 수 있다. 그러나 항생제 사용으로 인한 세균의 내성증가, 어류에서 사람으로 세균의 내성이 전이되는 문제, 다제 내성의 발생문제, 그리고 약물의 유실로 인한 환경오염 등의 문제가 제기되고 있다. 그러나 이러한 문제점에 대하여 여러 가지 국내 법의 문제, 양식 현장 종사자들의 문제의식 부족 등에 의하여 아직도 우리나라는 외국 선진국에 비하여 구체적으로 접근하지 못하고 있다. 그러므로 우리나라 양식 현장에서의 내성균 발생은 어떤 항생제에 대하여 어느 정도의 수준에 와 있으며, 그리고 이에 대한 대책 방안은 무엇인지 충분히 이루어지지 않고 있다.

양식 현장에서 발생하는 세균성 질병의 치료를 위하여 우리나라에서는 많은 양의 항생제가 사용되어지고 있으며, 더구나 새로운 병원체에 의한 어병 발생이 증가함에 따라 항생제의 사용 빈도수가 현재 점차 증가 추세에 있다. 그 결과 항생제에 대한 내성균의 출현이 양식 현장에서 가장 큰 현안 문제로 나타나고 있다. 최근의 보고를 보면, Bell et al. (1988)과 Smith et al. (1994)은 양식장에서 사용하는 항생제에 대한 다제 내성균의 출현, Stamm et al. (1989)은 항생제에 노출되는 시간이 길수록 각종 질병 원인 균의 Minimum Inhibition Concentration (MIC) 값이 증가한다고 하였다. 더구나 사람에게 병원성이 있는 *Vibrio parahaemolyticus* 등에서도 새로운 내성균의 출현이 보고되고 있으며 (Twiddly et al., 1994), 국민 건강에까지 영향을 미치고 있다.

미국 FDA가 어류의 세균성 질병에 의한 치료를 위해 공식적으로 허가한 항생제에는 Terramycin(oxytetracycline; Pfizer)과 Romet-30(5:1, sulfadimethoxin: ormethoprim; Hoffmann-La Roche) 두 종류뿐이며 (Bower et al., 1990), 그 중에서 oxytetracycline (OTC)은 다른 항생제와 비교하여 질병치료 효과, 약동학 등에 관해 비교적 많은 연구가 되어 있다. Tetracycline (Tc)은 정균 작용을 나타내는 광역성 항생물질로서 많은 그람 양성 및 음성 세균, *Rickettsia*, *Mycoplasma* 및 *Chlamydia* 등에 효과적으로 작용하여 어류 양식

장에서 질병을 치료하고 예방하기 위해 광범위하게 이용되어져 왔다. Tetracycline계 약물의 작용 기전으로는 세균 내에서 30S ribosome에 결합함으로써 aminoacyl tRNA가 50S ribosome내 acceptor site와 결합하는 것을 봉쇄하여 단백질 합성의 장애를 일으킨다 (Roberts, 1996). 그러나 무분별한 Tetracycline계 약물의 이용으로 Tc에 대해 내성을 가지는 많은 종류의 내성균이 발생하게 되었다. 이러한 내성균이 가지는 내성 기작의 특성을 보면, 첫째, 내재성 막 단백질에 의해 일어나는 Tc의 energy-dependent efflux, 둘째 용해성 단백질에 의한 ribosomal protection, 마지막으로 효소에 의한 Tc의 불활성화에 의해 일어나는 세 가지로 분류된다 (Levy, 1992; Taylor&Chau, 1996; Chopra&Roberts, 2001). 내성 기작의 특성에 따라 Tc 내성 유전자도 그 종류를 달리하는데 efflux 내성 기작을 가지는 *tet* gene으로 *tet* A, B, C, D, E, G, H, I, J, K, L 그리고 Z등이 있으며, ribosomal protection의 경우는 *tet* M, O, S, W, Q 그리고 T등이 있고 enzymatic은 *tet* X가 있는 것으로 알려져 있다 (Levy et al., 1999). Chopra et al. (2001)은 다양한 종류의 *tet* 유전자 중 그람 음성균에는 *tet* A, B, C, D, E 그리고 G등이 많이 분포한다고 보고하였다. 이전의 *tet* gene 검출에 관한 여러 연구에서는 *tet* probes를 제작하여 hybridization으로 내성 유전자의 종류를 확인하는 방법이 보고 되었지만 (Depaola et al., 1988; Marshall et al., 1983; Lee et al., 1993), 이러한 방법은 실험 과정이 복잡하며 시간이 많이 소비된다는 단점이 있다.

해양 환경에서 oxytetracycline의 내성 빈도에 관한 연구가 있었지만 (Ervik et al., 1994; Kerry et al., 1994; Schmit et al., 2000), 빈약한 점이 많았으며, 대부분의 연구가 담수에서 이루어진 것으로 보고 되었다 (Mcphearson et al., 1991; Spanggard et al., 1993; Vaughan et al., 1996). 또, Hekton et al. (1995)은 OTC, oxolinic acid (OA)등의 약품이 180~230일이 지난 후에도 저질에 잔류함을 확인하였다고 보고하였다.

몇몇 연구자들이 항생제를 경구 투여 했을 때 장내 세균에 내성 빈도의 변화에 대해 조사 하였으며, 여러 종류의 항생제를 이용한 경우가 많았지만 (Kerry et al., 1997). Sugita et al. (1988)은 그 중에서 특히 OTC를 경구 투여 했을 때 내성 빈도가 확실히 증가하였다고 보고하였다. 그리고 Depaola (1995)는 OTC를 투여하기 전에는 20~40%의 내성 빈도를 보

였고 10일 동안 OTC를 투여한 후에는 내성 빈도가 100%까지 증가한 것을 확인할 수 있었다고 하였으며, Depaola et al. (1995)의 연구에서는 이러한 내성 변화에 계절적 차이를 보고하기도 하였다. 그렇지만 위의 결과들은 모두 담수어에서 이루어졌기 때문에 해산어에 관한 연구가 부족한 실정이다.

어류에 발생하는 질병의 원인 균에는 *Edwardsiella tarda*, *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas hydrophila* 등 그람 음성균이 많은 비중을 차지하고 있으며, 이들에 의한 질병이 담수어 및 해산어에서 빈번히 발생되어 큰 피해를 주고 있다. 그러므로 본 연구에서는 이러한 균들의 치료를 위해 항생제를 많이 사용하는 양식현장이나 병어로부터 이 균을 직접 분리해내고, 여러 항생제에 대한 내성정도의 결정에 의한 내성 수준의 분포를 분석함으로써 내성 문제의 심각성을 조사하였다. 또한, 수산용 항생제 중 그 사용 빈도가 높고 이전에 많은 연구가 되어 있는 tetracycline 내성 유전자를 indicator gene으로 사용하여 우리나라 양어장의 어병 세균에서는 어떤 유전자 type이 널리 분포되어 있는지 PCR 기법을 이용하여 분석하고자 하였다.

그리고, 다양한 양식장의 주변 환경 속에 있는 미생물은 Tc에 대해 어느 정도의 내성을 나타내는지 분석하고자 하였으며, 해산어에 항생제를 직접 투여했을 때 장내 세균의 내성 빈도에 대한 변화를 살펴보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 균주

여수대학교 수산생명의학과 병원 미생물학 연구실과 부경대학교 미생물학과 미생물 유전학 연구실의 협조로 *Escherichia coli* C600 R222, *E. coli* HB101 pPT3, *E. coli* C600 pJA8122, 그리고 *E. coli* HB101 pBR322를 분양받아 실험의 표준 균주로 이용하였으며, *Edwardsiella tarda* RE1과 *Aeromonas hydrophila* HA 균주는 부경대 해양 식량자원 개발 공동 실습관에 유전자의 염기서열에 대한 분석을 의뢰하여, 이전에 알려진 *tet* gene type과 동일한지를 확인한 후 표준균주로 이용하였다 (Table1).

균의 분리 및 증균용으로는 Tryptic Soy Broth (TSB, Difco)나 Tryptic Soy Agar (TSA, Difco)를 사용하였으며, *E. coli* 균주는 37℃에서 16시간 배양하고, *E. tarda*와 *A. hydrophila*, 병어로부터 분리된 채집 균주는 25℃에서 16시간 배양한 후 균수를 측정하고, spectrophotometer (UVIKON, KONTRON INSTRUMENTS)를 이용하여 OD₆₀₀값을 구한 후 실험에 사용하였다. 또한, 실험균은 보존을 위해 배양액에 20% glycerol (Sigma)을 첨가한 후, -70℃에서 사용 전까지 보관하였다.

내성 균주를 screening하기 위해 1993년부터 2002년까지 우리나라 남해안과 동해안의 양식장의 병어로부터 균주를 분리하여 내성균을 찾고자 하였다.

2. 약제 감수성 실험

본 실험에서 사용한 항생제는 Ampicillin(Am), Ciprofloxacin(Ci), Chloramphenicol(Cm), Gentamycin(G), Nalidixic acid(Na), Oxolinic acid(Oa), Penicillin(Pe), Tetracycline(Tc) 등이며, 모두 sigma로부터 구입하여 사용하였다.

채집 균주의 tetracycline에 대한 내성 정도는 MIC값으로 나타냈으며, broth dilution method를 사용하여 측정하였다 (Kim, 1997). 먼저 96 wells plate에 멸균된 TSB를 160

μl , 각 농도로 희석된 항생제를 $20\mu\text{l}$, TSB에 $10^7\text{cell}/\text{ml}$ 로 현탁시킨 균액을 $20\mu\text{l}$ 넣었고, positive control은 TSB $180\mu\text{l}$ 와 희석시킨 균액 $20\mu\text{l}$ 를 넣고, negative control은 TSB만 $200\mu\text{l}$ 넣었다. 25°C 에서 18시간 배양 후 세균의 증식에 따른 액체 배지의 혼탁도를 관찰하여 세균이 자라지 않는 항생제의 최저 농도를 MIC값으로 결정하였다. 다른 항생제에 대한 내성 정도는 ampicillin($10\mu\text{g}$), ciprofloxacin($5\mu\text{g}$), chloramphenicol($30\mu\text{g}$), gentamycin($10\mu\text{g}$), nalidixic acid($30\mu\text{g}$), oxolinic acid($2\mu\text{g}$), penicillin(10U), tetracycline($30\mu\text{g}$)의 농도로 하여 thick paper disc에 $50\mu\text{l}$ 를 떨어뜨린 후 실온에서 overnight 동안 건조시키고 test tube에 담아 agar diffusion method 실험 전 까지 -20°C 에 보관하였다. 채집 Tc 내성균들을 4ml TSB에 집중하여 25°C 에서 overnight 배양한 후 동일한 배지에 한 번 더 개대 배양하여 활성화시켰다. 활성화시킨 균들은 균 농도가 $2\times 10^8\text{cells}/\text{ml}$ 임을 viable counting으로 확인하였으며, 595nm 에서 흡광도를 측정하였을 때 흡광도 값은 0.5이었다. 9.5ml TSB에 균액 $500\mu\text{l}$ 를 첨가하여 $10^7\text{cells}/\text{ml}$ 로 현탁 시킨 후 측정한 흡광도 값은 0.125이었으므로, 활성화시킨 균은 흡광도를 측정하여 동일한 균수로 조절한 후 사용하였다. 균액에 적신 멸균된 면봉으로 $1.5\sim 2.0\text{mm}$ 두께의 TSA에 골고루 도말을 하고 배지가 마르면 하나의 TSA에 다양한 항생제 disc를 놓고 25°C 에서 18~20시간 배양한 후 지지대를 측정하였다.

Table 1. Used bacteria in this study.

Strains	Characteristics	<i>tet</i> genes	Accession No. (GenBank)
<i>Edwardsiella tarda</i> RE1	plasmid	<i>tet</i> A	X0006
<i>Escherichia coli</i> C600 R222	plasmid	<i>tet</i> B	J01830
<i>Escherichia coli</i> HB101 pBR322	plasmid	<i>tet</i> C	J01749
<i>Escherichia coli</i> HB101 pPT3	plasmid	<i>tet</i> D	X65876
<i>Aeromonas hydrophila</i> HA	chromosome	<i>tet</i> E	L06940
<i>Escherichia coli</i> C600 pJA8122	R plasmid	<i>tet</i> G	S52437

3. PCR amplification

3-1. Primer 제작

GenBank (EMBL)로부터 약 1.2kbp 크기의 *tet* gene A, B, C, D, E, 그리고 G의 sequence를 얻었다. Macaw program을 이용하여 6개의 *tet* gene sequence를 비교한 후, 가장 많이 conserve되어있는 148~168bp 부위로부터 sense primer를 제작하였는데 이 sense primer *tet* gene A, B, C, D, E, 그리고 G에 90%정도의 binding 확률을 가지고 있다. 각각의 *tet* gene에 대한 specific antisense primer는 다른 *tet* gene에 binding 될 수 없도록 뒷쪽 부위의 variable region인 301~318bp (*tet* B), 377~393bp (*tet* E), 517~534bp (*tet* A), 613~631bp (*tet* D), 761~778bp (*tet* C) 그리고 933~950bp (*tet* G) 부위를 사용하였으며, PCR product 크기가 171 (*tet* B), 246 (*tet* E), 387 (*tet* A), 489 (*tet* D), 631 (*tet* C) 그리고 803 (*tet* G) bp가 되도록 하여 전기영동시 각각의 type 이 size에 의해 구별되도록 제작하였다. 본 실험에 사용한 primers는 Figure 1, Table 2에 나타내었다.

3-2. Total nucleic acid 분리

균을 TSB에 접종하여 25℃ 또는 37℃에서 24시간 배양한 다음, 배양액 1.5ml을 취하여 12,000rpm, 10분간 원심분리하고, TE-buffer (10mM Tris/Cl, pH 8.0, 1mM EDTA)로 재 현탁시킨 후 20% SDS와 20mg/ml의 proteinase K를 첨가하여 37℃에서 1시간 반응시켰다. 위의 lysates에 5M sodium chloride 100μl를 첨가한 후, phenol : chloroform : isoamylalcohol (25: 24: 1)로 3회 추출하여 DNA가 녹아있는 수용액층을 단백질 성분과 분리하였다. 위의 수용액층에 2 volume ethanol과 0.3M sodium acetate를 넣고, vortex로 혼합하여, -70℃에서 1시간동안 침전시켰다. 12,000rpm, 4℃, 10분간 원심분리하여, 상등액을 완전히 제거한 후, 70% ethanol 1ml을 첨가하여 12,000rpm, 4℃, 10분간 원심분리하였다. 상등액을 완전히 제거한 후, 10분간 상온에서 자연건조 시키고, 50μl distilled water에 현탁시켰다 (Chen&Kuo, 1993). 그리고, UV spectrophotometer(UVIKON, KONTRON INSTRUMENTS, S.P.A., Milan, Italy)를 사용하여, 260nm에서 흡광도를 측정한 다음 각각의 DNA 농도를 정량하여 사용하였다.

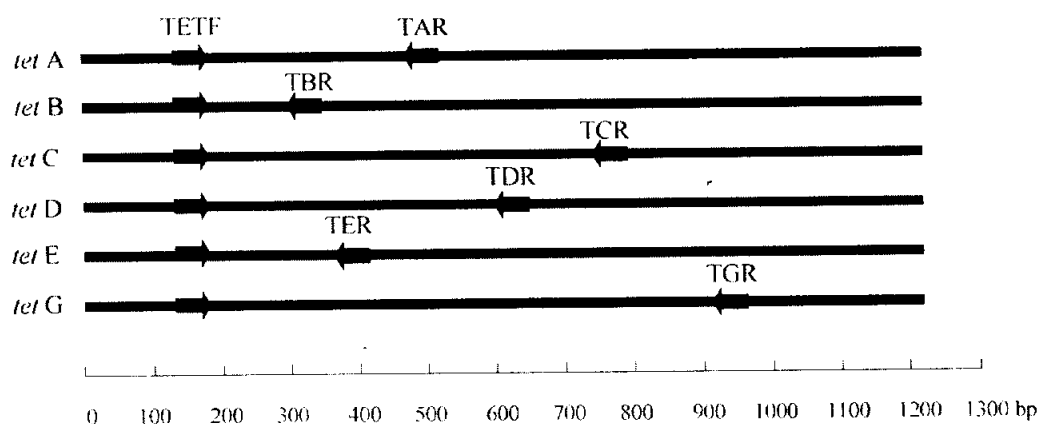


Fig. 1. Illustrated positions of primers used to specify the types of *tet* genes.

( : sense primer,  : antisense primers)

Table 2. Primers used to determine the types of different *tet* genes.

<i>tet</i> genes	Oligomers name	Primer sequence (5' to 3')	Position* (bp)
	TETF	GCGCTNTATGCGTTGATGCA	148~168
<i>tet A</i>	TAR	ACAGCCCGTCAGGAAATT	534~517
<i>tet B</i>	TBR	TGAAAGCAAACGGCCTAA	318~301
<i>tet C</i>	TCR	CGTGCAAGATTCCGAATA	778~761
<i>tet D</i>	TDR	CCAGAGGTTTAAGCAGTGT	631~613
<i>tet E</i>	TER	ATGTGTCCTGGATTCCT	393~377
<i>tet G</i>	TGR	ATGCCAACACCCCCGGCG	950~933

Note : TETF designed from the conserved region of six different *tet* genes and used as a common sense primer for PCR amplification.

* : Based on the sequence of *tet* A, B, C, D, E and G.

3-3. PCR and multiplex PCR

PCR 혼합물은 0.2ml용 microtube에 10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50mM KCl, 1.5mM $MgCl_2$, 0.001% w/v gelatin, 0.5% Tween-20, 200 μ M 각각의 dNTP, 1 μ M 각각의 primer, 1.25U AmpliTaq DNA polymerase (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA) 그리고 template DNA로써 추출한 total nucleic acid 1ng을 첨가한 후, distilled water로 최종액 50 μ l가 되게 하였다. PCR 혼합물은 Perkin-Elmer 2400 thermal cycler (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA)를 사용하여, 94℃에서 3분간 predenaturation 시킨 후, 94℃-30초, 55℃-30초, 72℃-30초간 반응을 1cycle로 해서 30cycle을 반응시켰다. 그리고, cycle이 끝난 뒤에는 72℃에서 7분간 extention time을 주었다. Multiplex PCR에서는 6종의 specific primer pairs를 혼합하여 사용하였으며, amplification cycle은 PCR과 동일하게 하였다. PCR 생성물은 0.5×TAE buffer (40mM Tris-acetate, 1mM EDTA)에 담겨진, 0.5 μ g/ml EtBr (ethidium bromide)이 첨가된 1% agarose gel 상에서 전기영동을 실시한 후, UV(ultraviolet)하에서 나타나는 band를 관찰하여 증폭 여부를 확인하였다.

4. pUC18에 *tet* gene cloning

4-1. PCR

본 실험의 정확성을 확인하고자 각각의 *tet* gene을 cloning 할 수 있는 primer를 제작하였다. GenBank (EMBL)로부터 약 1.2kbp 크기의 *tet* gene A, B, C, D, E, 그리고 G sequence를 얻어 앞에서 제작된 primer로 PCR test시에 생성되는 product의 크기가 포함되도록 *tet* A (27~45bp, 760~778bp), *tet* B (12~30bp, 718~736bp), *tet* C(102~120bp, 804~820bp), *tet* D (96~114bp, 667~685bp), *tet* E (7~24bp, 778~795bp) 그리고 *tet* G (96~114bp, 973~990bp)와 같이 제작하여 사용하였다 (Fig. 2).

각각의 *tet* gene에 specific한 한 쌍의 primers를 이용하여 PCR하였다. PCR amplification은 앞에서 설명한 3-3의 방법과 동일하게 실시하였다.

4-2. Gel elution

PCR 생성물은 Prep-A-Gene[®] DNA purification kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 사용하여 정제하였다. 먼저 전기영동으로 확인된 band를 절단하여 새 microtube에 옮긴 후, binding buffer 500 μ l를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C, 10분간 반응으로 PCR 생성물이 들어있는 gel을 녹였다. 그리고, matrix 15 μ l를 첨가하여 상온에서 5분간 반응시킨 후, 12,000rpm에서 1분간 원심분리 하였다. Gel 성분이 포함된 상등액을 모두 제거하고, 다시 binding buffer 375 μ l를 첨가하여 같은 방법으로 원심분리 한 후, 상등액을 제거하였다. 침전물에 washing buffer 375 μ l를 첨가하여 같은 방법으로 원심분리하고 상등액을 제거하는 것을 2회 실시한 후, 침전물은 상온에서 10분간 자연건조 시켰다. 건조시킨 침전물에 elution buffer 20 μ l를 현탁시킨 후, 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시켰다. 12,000rpm에서 10분간 원심분리해서 상층의 DNA 용액을 새 microtube로 옮겼으며, cloning을 시키기 위해 정제한 DNA는 사용 전까지 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

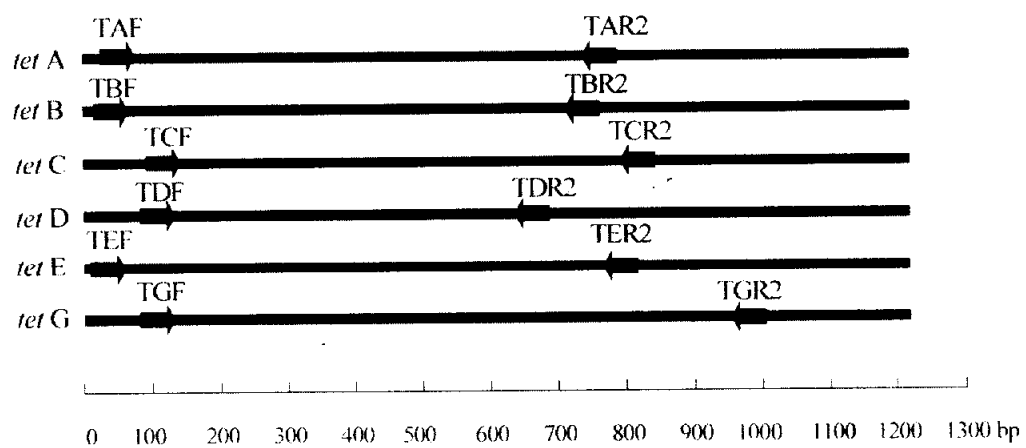


Fig. 2. Illustrated positions of primers used for the cloning of *tet* genes.

( : sense primer,  : antisense primers)

4-3. Cloning

정제한 DNA는 TOPO-TA Cloning[®] Kit (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 cloning시켰다. 먼저 정제한 DNA 4 μ l를 새 microtube에 옮긴 후, salt solution 1 μ l, distilled water 4 μ l 그리고 TOPO[®] vector 1 μ l를 첨가하여 상온에서 30분간 반응시켰다. 다음에 competent cell (*E. coli* DH5 α -T1[®] OR) 50 μ l를 첨가하여 ice 내에서 20분간 반응시키고, 42 $^{\circ}$ C에서 30초간 heat-shock시켰다. Heat-shock가 끝나고 바로 ice에 2~3분간 두었다가, SOC 배지를 250 μ l 첨가하여, 37 $^{\circ}$ C에서 90분간 진탕 배양시켰다. 배양액은 X-Gal 40 μ g/ml, Ampicillin 50 μ g/ml이 첨가된 LB plate에 도말하여 24시간 배양하였다. 그리고, blue/white colonies가 자라는 것을 관찰하였다.

4-4. Plasmid 분리

배양된 blue/white colonies 중 white colony를 취하여, ampicillin 50 μ g/ml이 첨가된 LB broth에 접종한 후 24시간 배양하였다. 배양액 1.5ml을 microtube에 옮기고 12,000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10분 원심 분리하여 균을 침전시킨 후, 상층의 배지 성분을 제거하였다. 침전된 균에 100 μ l ice-cold solution I (50mM glucose, 25mM Tris/Cl, pH 8.0, 10mM EDTA, pH 8.0)을 넣고, vortex를 사용하여 완전히 부유시켰다. 200 μ l solution II (0.2N NaOH, 1% SDS)를 넣고, 5회 invert mixing하여 혼합한 후, ice 내에서 5분간 반응시켰다. 150 μ l ice-cold solution III (60ml 5M potassium acetate, 11.5ml glacial acetic acid, 28.5ml distilled water)를 넣고, 5회 invert mixing하여 혼합한 후, ice 내에서 5분간 반응시켰다. 12,000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10분간 원심 분리하여, 상층의 plasmid 용액을 새 microtube에 옮겼다. Plasmid 용액과 동량의 phenol/chloroform을 넣고, vortex한 후, 12,000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10분간 원심 분리하여, 상층의 DNA 용액을 새 microtube에 옮겼다. 2 volume ethanol과 0.3M sodium acetate를 넣고, vortex로 혼합하여, -70 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 침전시켰다. 12,000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10분간 원심 분리하여, 상층액을 완전히 제거한 후, 70% ethanol 1ml을 첨가하여 12,000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10분간 원심 분리하였다. 상층액을 완전히 제거한 후, 10분간 상온에서 자연 건조시켰다. 20 μ g/ml RNase가 첨가된 50 μ l TE-buffer를 DNA 침전물에 넣어, 녹인 후 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

5. Transformation

Calcium chloride법을 이용하여 실시하였다 (Kim, 1993). *E. coli* HB101을 5ml LB배지에 접종하여 24시간 배양한 것을 접종량이 1%되도록 5ml LB에 다시 접종하여 OD₅₅₀에서 0.4가 될 때까지 2~3시간 배양한 다음 얼음에 10분간 냉각시켰다. 1.5ml을 취하여 미리 냉각시킨 microtube에 옮긴 후 5,000rpm, 5분간 원심 분리하여 상등액을 제거하고, 침전물에 50mM CaCl₂ + 10mM Tris-Cl (pH8.0)용액 750μl을 가한 다음 얼음에서 15분간 냉각시켰다. 5,000rpm, 5분 동안 원심 분리하여 침전물을 얻고, 여기에 다시 50mM CaCl₂ + 10mM Tris-Cl (pH8.0)용액 100μl을 넣은 후 4℃에서 12~24시간 방치하여 competent cell을 제조하였다. Tc 내성 유전자를 가진 채집 내성 균주 중 *E. tarda*로부터 plasmid를 분리하여 transformation실험에 이용하였다. Competent cell에 복작하는 plasmid DNA를 넣고 잘 섞어준 다음 얼음에 30분간 방제한 후 42℃의 water bath로 옮겨 2분 동안 처리하였다. 그 다음 1ml의 SOC배지를 첨가하여 37℃에서 1시간 동안 배양시킨 후 tetracycline 30μg/ml이 들어 있는 LB agar에 200μl도말하였다. 12~24시간 배양하여 transformant를 선별하였다.

6. Conjugation

Conjugation은 Aurora et al. (1992)의 방법을 수정하여 실시하였다. *E. coli* HB101을 recipient 균주로 사용하였으며, 채집균주들을 donor 균주로 사용하였다. 또한, 이 실험의 결과를 확인하기 위해 *E. coli* 선택 배지인 chromocult 한천 배지에 항생제를 첨가하여 확인하였다 (Yoo, 2000). 본 실험에서는 chromocult 한천 배지에서 각 균주들이 나타내는 특성을 이용하여 donor, recipient, conjugant를 구별하였으며, filter mating법을 이용하였다. Donor cell과 recipient cell을 1.0×10^7 cell/ml이 되도록 혼합하여, 0.22μm (pore size) membrane filter (millipore Corp, Bedford, Mass)에 통과시켜 고정하였으며, filter에 고정된 세균을 TSA plate의 표면과 부착되도록 하였다. 이 agar plate를 배양한 후, filter를

때내어 TSB 1ml에 혼합시켰으며, 혼합 배양된 균주를 적당히 단계 희석하여 항생제가 함유된 선택배지에 도말하였다. 37℃에서 24시간 배양한 후 transconjugant를 확인하였다.

7. 해양 환경에서의 내성분포 조사

7-1. 내성균 분리

해양 환경에서의 내성분포 조사를 위해 남해안 일대의 양어장으로부터 양어장 주변의 해수, 저질, net의 부착물, 조피볼락 (*Sebastes schlegelii*)을 채집하여 시료로 이용하였다. 해수, 저질, net의 부착물은 0.15M phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2) 완충용액으로 10배씩 단계 희석한 후 희석액을 0.45 μ m (pore size) membrane filter에 통과시켜 고정하였으며, filter에 고정된 세균을 1% NaCl 첨가 TSA배지와 oxytetracycline (10 μ g/ml)이 첨가된 1% NaCl 첨가 TSA배지의 표면과 부착되도록 하였다. 이 agar plate를 25℃에서 24시간 배양한 후 각각의 plate에서 자란 colony수를 확인하여 내성 빈도를 백분율로 계산하였다. 조피볼락은 해부하여 장을 분리한 후 중장 0.5g을 5ml의 0.15M PBS 완충용액에 현탁시켜 분쇄하였다. 내성 빈도에 관한 조사는 위와 동일한 방법으로 이행되었다. OTC 10 μ g/ml이 첨가된 배지에서 자란 colony를 50~100개정도 취하여 순수 분리한 후 colony의 형태, 크기, Gram 염색, oxidase test등으로 분류하여 API 20E로 균을 동정하였다.

7-2. PCR 방법을 통한 *tet* gene의 분포

OTC가 첨가된 배지에서 자란 colony를 50~100개정도 취하여 TSB에 접종한 후 25℃에서 18~24시간 배양하였다. 배양액 1ml을 12,000rpm, 10분간 원심 분리하였으며, 상등액을 제거하고 pellet에 0.15M PBS 완충용액 1ml를 첨가하여 vortex한 후 12,000rpm, 10분간 원심 분리한 다음 상등액을 완전히 제거하고 TE buffer 500 μ l에 현탁하여 95℃의 물에서 7분간 heating시켰다 (Roberts et al., 1993). 이렇게 분리된 whole cell은 multiplex PCR (3-4)을 위한 template로 이용되어졌으며, PCR 산물은 0.5 μ g/ml EtBr이 첨가된 1% agarose gel로 TAE buffer에서 전기영동을 실시한 후 어떤 종류의 *tet* gene이 존재하는지 확인하였다.

8. 항생제 투여에 따른 내성 변화

8-1. 항생제 투여

평균 체장 16cm, 체중 50g의 채집된 시료와 동일 어종인 조피볼락, *S. schlegelii*을 남해의 양어장으로부터 분양 받아서 실험실의 사육 수조에 1주일간 순치 시킨 후 실험에 사용하였다. OTC농도는 125mg/kg으로 하여 사료에 배합한 후 사료를 어류의 체중당 3.2%씩 10일 동안 매일 투여하였다.

8-2. 내성 변화 관찰

항생제를 투여하기 하루 전에 한번 sampling을 하였으며, 투여를 시작한 후 5일째 되는 날 그리고, 투여가 끝난 후 1, 4, 12, 16, 20일 되는 날 각각 3마리씩 sampling하였다. 3마리의 조피볼락으로부터 장을 분리한 후 중장 0.5g씩을 섞어 7-1과 같은 방법으로 내성 빈도를 조사하여 변화 정도를 관찰하였다.

III. 결 과

1. 내성균주의 분리

1993년부터 2002년까지 우리나라 동해안과 남해안의 양어장에서 *Edwardsiella tarda* 127균주, *Vibrio* sp. 50균주, *Aeromonas hydrophila* 4균주, *Proteus mirabilis* 3균주, *Acinetobacter lwoffii* 한 균주를 병어로부터 얻을 수가 있었으며, 분리된 균들은 대체로 *E. tarda*와 *Vibrio* 계열의 균주들이 많았으므로 분석 대상이 된 대부분의 병어는 *E. tarda*와 *Vibrio*에 감염되었던 것으로 추정할 수 있었다. 이들 균주의 내성 분포를 조사해본 결과, *E. tarda*는 20균주(11%), *Vibrio* sp.는 14균주(8%), *Aeromonas hydrophila*는 2균주(1%), *Proteus mirabilis*는 2균주(1%) 그리고 *Acinetobacter lwoffii*는 한 균주(0.5%)가 내성균으로 동정되었으며(Table 3), Tc에 대한 내성 기준은 MIC로써 나타내었으며 그 농도는 16 μ g/ml (NCCLS, 1993)로 하였다.

약제 감수성 실험결과, 총 185개 균주 중에서 39개의 균주가 Tc에 대해서 내성을 나타낼 수 있었다. 이들 39균주를 연도별로 분류할 경우 1993년에서 1995년 사이에는 분석된 64균주 중 8균주, 1996년에서 1998년 사이에는 27균주 중 8균주, 그리고, 1999년에서 2002년 사이에는 94균주 중 23균주가 Tc에 내성을 나타내었으며, 각 연도별로 나타난 내성균의 비율이 비슷하게 나타나 본 분석기간 동안 뚜렷한 내성균의 증가나 감소가 없었음을 알 수 있었다 (Table 4). 또한, Tc에 대해 내성을 갖는 39균주의 지역별 분포를 보면 남해안 (남해, 통영, 여수, 거제, 광주, 제주등)에서는 118균주 중 24균주가, 동해안 (기장, 구룡포, 울진등)에서는 67균주 중 15균주가 발견되어 지역에 따른 내성균 발현 빈도에서도 차이를 발견 할 수 없었다.

실험에 이용된 균주들 중 *E. tarda* 127균주의 Tc에 대한 MIC값을 조사해본 결과, 54.3%가 1.56 μ g/ml미만으로 나타났고 30%는 6.25 μ g/ml이하의 값을 보였다. 그리고 15.7%는 25 μ g/ml이상의 MIC값을 보여 Tc에 대한 내성균으로 정의할 수 있었다. (Fig. 3). *Vibrio* sp.의 50균주 중 28%는 50 μ g/ml이상의 MIC값을 보여 내성균으로 보았으며, 나머지

72%는 1.56 μ g/ml미만으로 나타났다. Disc diffusion method를 통하여 Tc 이외에 이들 39균주가 갖는 또 다른 내성 분포를 조사해본 결과, Ampicillin(Am), Ciprofloxacin(Ci), Chloramphenicol(Cm), Gentamycin(G), Nalidixic acid(Na), Oxolinic acid(Oa), Penicillin(Pe)등 여러 종류의 항생제에 대해서도 내성을 나타내어 본 실험에서 분리한 대부분의 균이 다제 내성균임을 확인할 수 있었다 (Table 5). 또한 *E. tarda* 20균주, *Vibrio* sp. 14균주 즉 동일 균주 간에는 내성 marker의 유사성이 관찰되지 않았고, *A. hydrophila*의 경우는 조사된 모든 항생제에 대해 내성을 나타내는 특징을 보여주었다.

Table 3. Tetracycline resistant isolates in Korea.

Stains	Source	Area	Year
<i>Vibrio</i> sp. RV4	flounder	Namhae	1993
<i>Vibrio</i> sp. RV5	sea bass	Hadong	1993
<i>Vibrio</i> sp. RV11	flounder	Namhae	1993
<i>Vibrio</i> sp. YV1	flounder	Yosu	1994
<i>Vibrio</i> sp. YV4	flounder	Yosu	1994
<i>Vibrio</i> sp. YV5	flounder	Yosu	1994
<i>Edwardsiella tarda</i> RE23	flounder	Namhae	1994
<i>Edwardsiella tarda</i> RE1	eel	Kwangju	1995
<i>Edwardsiella tarda</i> YSF1	flounder	Yosu	1996
<i>Edwardsiella tarda</i> YSF12	flounder	Yosu	1996
<i>Edwardsiella tarda</i> YSF15	flounder	Yous	1997
<i>Edwardsiella tarda</i> JH10	flounder	Yosu	1997
<i>Edwardsiella tarda</i> J1	flounder	Gijang	1997
<i>Edwardsiella tarda</i> KS1	flounder	Kuryongpo	1998
<i>Vibrio</i> sp. J15	flounder	Kuryongpo	1998
<i>Aeromonas hydrophila</i> HA	Catfish	Uljin	1998
<i>Edwardsiella tarda</i> MH1	flounder	Namhae	2000
<i>Edwardsiella tarda</i> MH3	flounder	Gijang	2000
<i>Edwardsiella tarda</i> MH4	flounder	Kuryongpo	2000

Table 3. Continued.

Stains	Source	Area	Year
<i>Vibrio</i> sp. J2	flounder	Namhae	2001
<i>Vibrio</i> sp. J3	mullet	Namhae	2001
<i>Vibrio</i> sp. J4	flounder	Pohang	2001
<i>Vibrio</i> sp. J5	sea perch	Yosu	2001
<i>Edwardsiella tarda</i> J6	flounder	Pohang	2001
<i>Edwardsiella tarda</i> J7	flounder	Kuryongpo	2001
<i>Edwardsiella tarda</i> J8	flounder	Kuryongpo	2001
<i>Edwardsiella tarda</i> J9	flounder	Gijang	2001
<i>Edwardsiella tarda</i> J10	flounder	Gijang	2001
<i>Edwardsiella tarda</i> J11	flounder	Gijang	2001
<i>Edwardsiella tarda</i> J12	rock fish	Namhae	2001
<i>Edwardsiella tarda</i> J13	flounder	Tongyoung	2001
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	sea perch	Yosu	2001
<i>Proteus mirabilis</i> 1	sea perch	Yosu	2001
<i>Proteus mirabilis</i> 2	sea perch	Yosu	2001
<i>Vibrio</i> sp. J14	flounder	Gijang	2002
<i>Vibrio</i> sp. J15	sea perch	Yosu	2002
<i>Vibrio</i> sp. J16	sea perch	Yosu	2002
<i>Edwardsiella tarda</i> J14	flounder	Gijang	2002
<i>Aeromonas hydrophila</i>	sea perch	Yosu	2002

Table 4. Distribution of tetracycline resistance bacteria isolated from diseased fish from 1993 to 2002 in Korea.

Area	Proportion of Tc resistance isolates			Total
	1993~1995	1996~1998	1999~2002	
East sea	0 / 4	4 / 15	11 / 48	15 / 67
South sea	8 / 60	4 / 12	12 / 46	24 / 118
Total	8 / 64	8 / 27	23 / 94	39 / 185

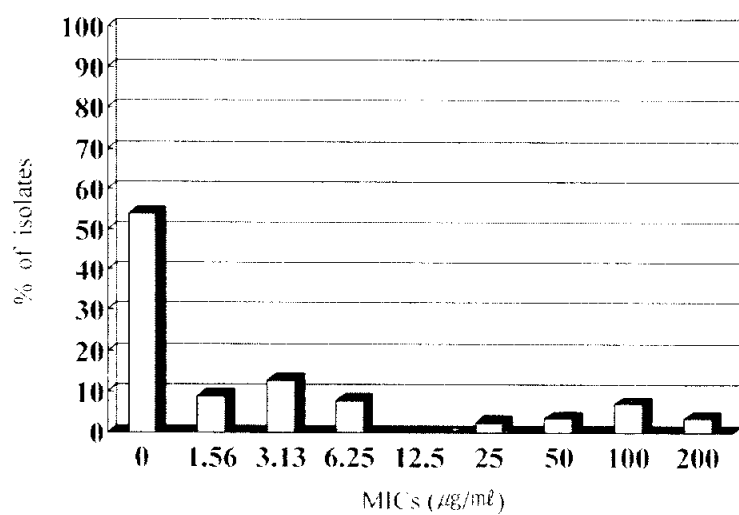


Fig. 3. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of tetracycline for *Edwardsiella tarda* isolates from Korea. (n=127)

Table 5. Proportion of the resistant strains against different drugs in the isolates from Korea.

Species (No.)	% of resistant isolates						
	Am	Ci	Cm	G	Na	Oa	Pe
<i>Edwardsiella tarda</i> (20)	20(4)*	-	50(10)	-	65(13)	55(11)	85(17)
<i>Vibrio</i> sp. (14)	28(4)	7(1)	7(1)	7(1)	28(4)	21(3)	71(10)
<i>Aeromonas hydrophila</i> (2)	100(2)	100(2)	100(2)	50(1)	50(1)	50(1)	100(2)
<i>Acinetobacter lwoffii</i> (2)	100(2)	-	-	-	-	-	100(2)
<i>Proteus mirabilis</i> (1)	100(1)	-	-	-	-	-	100(1)

Abbreviation : Cm- chloramphenicol, Na- nalidixic acid, Pe- penicillin, Oa- oxolinic acid, Am- ampicillin, Ci- ciprofloxacin, G- gentamicin

* : numbers of isolates

2. PCR

2-1. Primer specificity

E. tarda RE1과 *A. hydrophila* HA가 이미 알려진 *tet* A, *tet* E의 염기 서열과 동일한지를 조사하기 위해 *tet* A는 TAF, TAR3 primers, *tet* E는 TEF, TER2 primers로 cloning 하여 각각 385bp, 600bp의 PCR 생성물을 sequence한 후 분석하였다 (Fig. 4). 그 결과 *E. tarda* RE1은 *tet* A와 99.7%, *A. hydrophila* HA는 *tet* E와 98.5%의 높은 homology를 나타내 이 두 균주를 표준 균주로 이용하였다.

본 실험에 사용한 primer는 *tet* A, B, C, D, E, 그리고 G gene의 150bp 부위의 conserved region을 sense primer로 제작하여 사용하였고, 300~1000bp 부위의 variable region을 각 type에 대해 특이적으로 제작하여 antisense primer로 사용하였다. 표준 균주의 total nucleic acid를 주형으로 PCR을 실시한 결과, 171 (*tet* B), 246 (*tet* E), 387 (*tet* A), 489 (*tet* D), 631 (*tet* C) 그리고 803 (*tet* G)bp의 특이적 PCR산물을 얻을 수 있었다 (Fig. 5). 이러한 결과는 PCR산물의 크기에 차이가 나도록하여 어떤 종류의 *tet* gene인지를 명확하게 구별할 수 있었다.

2-2. Cloning된 *tet* gene의 확인

Cloning된 *tet* gene의 *E. coli*로부터 plasmid를 분리한 후 Table 2에서 보여준 각각의 *tet* gene에 specific primers를 이용해 PCR을 실시한 결과, 표준 균주의 total nucleic acid를 사용한 경우와 같이 크기가 명확하게 구별되는 *tet* B (171bp), *tet* E (246bp), *tet* A (387bp), *tet* D (489bp), *tet* C (631bp) 그리고 *tet* G (803bp)의 특이적 PCR산물을 얻을 수 있었다 (Fig. 6).

<i>tet A</i>	gcgctgtatgcgttgatgcaatttgcctgcgccacctgtgctggcgccgctgtcgatcgt	60
<i>E. tarda</i> RE1		60
<i>tet A</i>	ttcgggcgggcgccgggtcttgctcgctcgcctggccggcgctgctgtcgactacgccatc	120
<i>E. tarda</i> RE1	a.....	120
<i>tet A</i>	atggcgacggcgccctttcccttgggttctctatatacgggcggatcgtggccggcatcacc	180
<i>E. tarda</i> RE1		180
<i>tet A</i>	ggggcgactggggcggtagccggcgcttatattgccgatatcactgatggcgatgagcgc	240
<i>E. tarda</i> RE1		240
<i>tet A</i>	gcggcgccacttcggcttcatgagcgccgtgttgcgggttcgggatggtcgcccggacctgtg	300
<i>E. tarda</i> RE1		300
<i>tet A</i>	ctcggtgggctgatggcggtttctccccccacgctccgttcttcggccggcgagccttg	360
<i>E. tarda</i> RE1		360
<i>tet A</i>	aacggcctcaatttccctgacgggct	385
<i>E. tarda</i> RE1		385

(A)

<i>tet E</i>	cgcactgtgatgatggcactggatcatatttttagatgctatggggattggcataatt	60
<i>A. Hydrophila</i> HA	C..a.....	60
<i>tet E</i>	atgcctgtcttgccggcggtattacgggagtttgttggaaaggctaatgttcagagaac	120
<i>A. Hydrophila</i> HA	a.....g.....	120
<i>tet E</i>	tacgggtgttttattggcgctgatgcaatgatgcaagtgtttttgccccctcttctcggc	180
<i>A. Hydrophila</i> HA		180
<i>tet E</i>	cgctggtcagatcgcataggtcgtcgccctgtattgttacttttcaacttttaggtgcaaca	240
<i>A. Hydrophila</i> HA	a.....	240
<i>tet E</i>	ctggactacgcattaatggcaacagccagcgtagtgtgggtgttgtatttgggacgctta	300
<i>A. Hydrophila</i> HA	C.....	300
<i>tet E</i>	attgctggatttaccgggtcgactggagctgttcgagcctcaacaattgccgatgtcaca	360
<i>A. Hydrophila</i> HA		360
<i>tet E</i>	cctgaggaatccaggacacattgggttgggtatgatgggtgcctgttttgggtggcggtatg	420
<i>A. Hydrophila</i> HA		420
<i>tet E</i>	attgctggaccagtcattgggtgggttttgcgggtcaactttcggtacaggcaccgtttatg	480
<i>A. Hydrophila</i> HA	a.....	480
<i>tet E</i>	ttcgctgctgctattaacgggctggcatttctgggtctccctattcattttacatgagacc	540
<i>A. Hydrophila</i> HA	C.....	540
<i>tet E</i>	cataatgctaatacaggttagtgacgagttaaagaatgaaacaatcaatgaaaccacatcc	600
<i>A. Hydrophila</i> HA	a.....	600

(B)

Fig. 4. Comparative analysis of the DNA nucleotides for using as standard strain. Identical residues are represented as dots. (A): *tet A* and *E. tarda* RE1- homology of 99.7%. (B): *tet E* and *A. hydrophila* HA- homology of 98.5%.

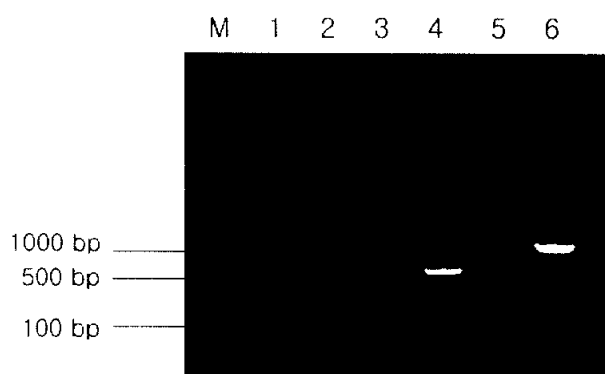


Fig. 5. Agarose gel electrophoresis of the PCR products from nucleic acids of reference strains with specific *tet* gene primers. Lane 1: *Escherichia coli* C600 R222 (*tet* B), lane 2: *Aeromonas hydrophila* HA (*tet* E), lane 3: *Edwardsiella tarda* RE1 (*tet* A), lane 4: *Escherichia coli* HB101 pPT3 (*tet* D), lane5: *Escherichia coli* HB101 pBR322 (*tet* C), lane 6: *Escherichia coli* C600 pJA8122 (*tet* G), M: 100bp DNA ladder.

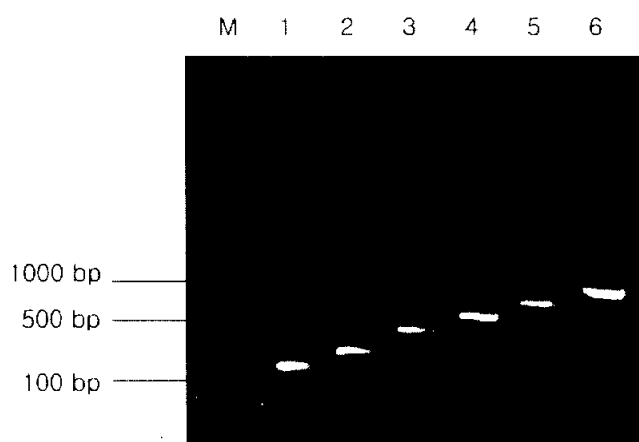


Fig. 6. Agarose gel electrophoresis of the PCR products from the cloned *tet* genes in pUC18 plasmid. Lane 1: *tet* B, lane 2: *tet* E, lane 3: *tet* A, lane 4: *tet* D, lane5: *tet* C, lane 6: *tet* G, M: 100bp DNA ladder.

3. Multiplex PCR

3-1. Cloning된 *tet* gene을 template로 이용

각각의 *tet* gene은 그 크기가 다른 plasmid를 가지고 있어 동일한 copy수를 맞추는데 어려움이 있었다. 그래서 primers를 제작한 후 유사한 크기의 PCR product로 동일한 pUC18 plasmid에 cloning시켜 모두 동일한 copy수로 맞추어 실험에 이용하였다. 분리된 plasmid를 template로 하여 multi-template에 대한 multi-primer의 실험, 즉 6종의 template와 6종의 primer를 사용하여 6개의 PCR 산물을 얻고자 하였다. 그 결과 3개의 template를 혼합한 경우부터 6개의 template를 혼합한 경우까지 모든 경우에서 뚜렷한 특이적 band를 확인할 수 있었다 (Fig. 7).

3-2. Total nucleic acid를 template로 이용

실험에 사용한 primer는 *tet* A, B, C, D, E, 그리고 G gene의 150bp 부위의 conserved region을 sense primer로 제작하여 사용하였고, 300~1000bp 부위의 variable region을 각 type에 대해 특이적으로 제작하여 antisense primer로 사용하였다. 이렇게 제작된 primers를 이용하여 표준 균주의 total nucleic acid를 주형으로 multiplex PCR을 실시한 결과, 특이적 PCR 산물을 얻을 수 있었으나, target template의 specific primer를 제외한 5개의 antisense primers를 혼합하여 PCR을 실시했을 때는 PCR 산물을 확인할 수 없었다 (Fig. 8). 그러므로 특이적 primer의 다른 primer는 PCR 과정에 어떠한 영향도 미치지 않음을 알 수 있었다.

6종류의 *tet* gene 각각을 가진 표준 균주들로부터 total nucleic acid를 분리한 후 분리된 templates를 2~6개까지 혼합하여 multi-template를 이용한 multiplex PCR을 실시하였다. 그 결과 3개의 template를 혼합한 경우까지는 정확한 3종류의 PCR 산물을 얻을 수 있었으나 4개의 template를 혼합한 경우부터는 혼합된 *tet* gene의 종류에 따라 차이를 보였다 (Fig. 9). 그러나 가장 유사한 sequence를 보이는 *tet* A, C, G와 *tet* B, D, E의 구별이 가능하고 *tet* E, D에 *tet* A 또는 *tet* C, G에 *tet* D등을 같이 혼합하여도 한 내성균에 3개 이내의 gene이 있다면 구별이 가능하였다.

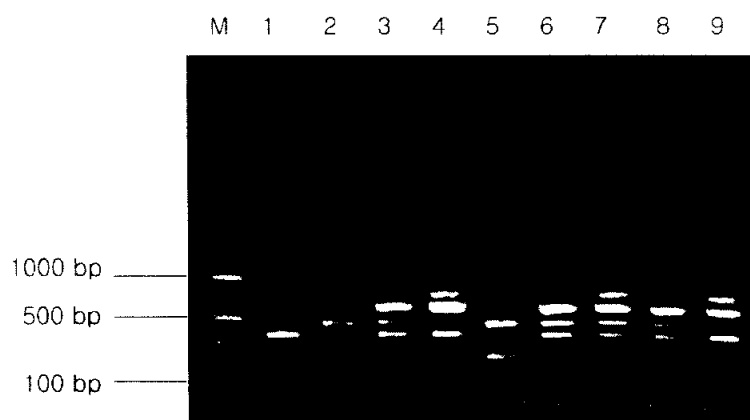


Fig. 7. Agarose gel electrophoresis of amplicons generated by multiplex PCR from mixture of the cloned *tet* genes in pUC18 plasmid. Lane 1: *tet* B, *tet* E and *tet* A, lane 2: *tet* B, *tet* E and *tet* D, lane 3: *tet* A, *tet* D and *tet* C, lane 4: *tet* A, *tet* C and *tet* G, lane 5: *tet* B, *tet* E, *tet* A and *tet* D, lane 6: *tet* E, *tet* A, *tet* D and *tet* C, lane 7: *tet* A, *tet* D, *tet* C and *tet* G, lane 8: *tet* B, *tet* E, *tet* A, *tet* D and *tet* C, lane 9: *tet* B, *tet* E, *tet* A, *tet* D, *tet* C and *tet* G. M: 100bp DNA ladder.



Fig. 8. Agarose gel electrophoresis of amplicons generated by multiplex PCR from the nucleic acids of standard strains. Lane 1: *Escherichia coli* C600 R222 (*tet* B), lane 3: *Aeromonas hydrophila* HA (*tet* E), lane 5: *Edwardsiella tarda* RE1 (*tet* A), lane 7: *Escherichia coli* HB101 pPT3 (*tet* D), lane 9: *Escherichia coli* HB101 pBR322 (*tet* C), lane 11: *Escherichia coli* C600 pIA8122 (*tet* G), lane 2, 4, 6, 8, 10,12: negative control (contained sense primer and 5 different antisense primers except each one specific primer), M: 100bp DNA ladder.

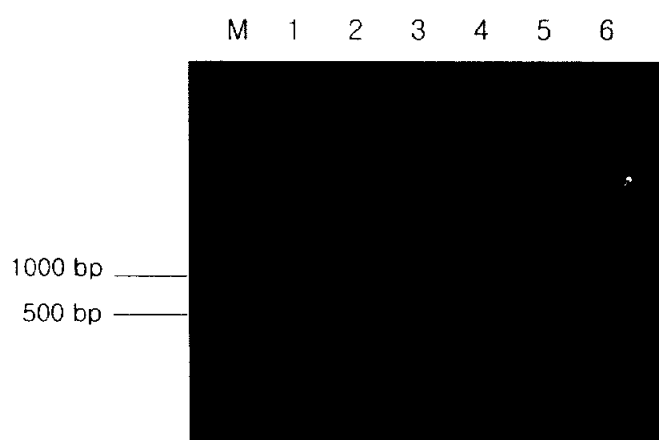


Fig. 9. Agarose gel electrophoresis of amplicons generated by multiplex PCR from mixture of total nucleic acid of standard stains. Lane 1: *tet* B and *tet* D, lane 2: *tet* E and *tet* C, lane 3: *tet* B, *tet* E and *tet* D, lane 4: *tet* E, *tet* A and *tet* D, lane 5: *tet* A, *tet* C and *tet* G, lane 6: *tet* D, *tet* C and *tet* G, M: 100bp DNA ladder.

4. 내성 균주에서의 *tet* gene 검출

채집 내성 균주의 total nucleic acid를 분리한 후 multiplex PCR을 실시하여 *tet* gene을 분석한 결과, *E. tarda*에서 *tet* A가 40%, *tet* D가 35%, *tet* B가 10%, 그리고 *tet* A-D, *tet* A-G와 같이 두 종류의 gene을 가진 균주가 각각 10%, 5%로 나타났다. 가장 dominant한 *tet* gene은 *tet* A, *tet* D이고 *tet* B는 적은 수였으나 이전과 다른 분포를 확인할 수 있었으며, *tet* A-D, *tet* A-G와 같이 두 종류의 gene이 존재하는 경우 multiplex PCR을 이용하여 한번의 PCR로 확인하는 것이 가능했다. *Vibrio* sp.로 추정되는 균주는 모두 *tet* B를 가짐을 확인할 수 있었다. 그리고, 나머지 *A. hydrophila*의 두 균주에서는 *tet* E-C, *tet* C, *P. micrabilis*의 두 균주는 모두 *tet* C, 그리고 *Acinetobacter lwoffii*는 *tet* B가 있음을 확인하였다 (Fig. 10, Table 6).

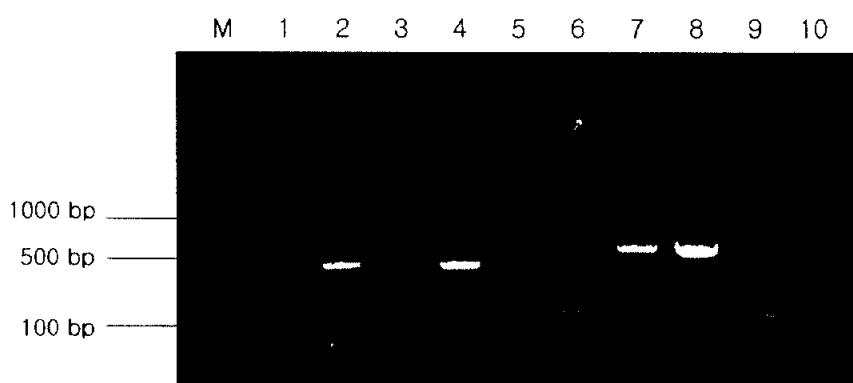


Fig. 10. Agarose gel electrophoresis of amplicons generated by multiplex PCR from the nucleic acids of the tetracycline resistant isolates in Korea. Lane 1: *Edwardsiella tarda* with *tet A*, lane 2: *Edwardsiella tarda* with *tet D*, lane 3: *Edwardsiella tarda* with *tet B*, lane 4: *Edwardsiella tarda* with *tet A-D*, lane 5: *Edwardsiella tarda* with *tet A-G*, lane 6: *Fibrio* sp. with *tet B*, lane 7 : *Aeromonas hydrophila* with *tet E-C*, lane 8: *Aeromonas hydrophila* with *tet C*, lane 9: *Acinetobacter lwoffii* with *tet B*, lane 10 : *Protens mirabilis* with *tet C*, M: 100bp DNA ladder.

Table 6. Detection of various *tet* genes in tetracycline resistant isolates from Korea.

Isolates	No. of isolates	<i>tet</i> genes
<i>Edwardsiella tarda</i>	8	<i>tet</i> A
	7	<i>tet</i> D
	2	<i>tet</i> B
	2	<i>tet</i> A & D
	1	<i>tet</i> A & G
<i>Vibrio</i> sp.	14	<i>tet</i> B
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1	<i>tet</i> E & C
	1	<i>tet</i> C
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	1	<i>tet</i> B
<i>Proteus mirabilis</i>	2	<i>tet</i> C
Total	39	

5. *tet* gene의 위치 확인

채집 내성 균주에서 그 수가 많고 다양한 종류의 *tet* gene을 가진 *E. tarda* 균주를 선택하여 내성 유전자가 plasmid에 위치해 있는지 chromosome에 위치해 있는지를 확인해 보았다. *E. tarda* 20균주 중 *tet* A, *tet* D, *tet* A·D, *tet* A·G를 가진 18종의 균주는 모두 tetracycline 30 μ g/ml이 들어 있는 LB agar에서 transformant를 보였으며, transformant로부터 plasmid를 분리한 후 PCR 방법을 이용해 동일한 *tet* gene을 확인할 수 있었지만 *tet* A·G를 가진 gene의 경우 transformant에서 *tet* A만이 확인되어 *tet* G는 chromosome에 존재할 것이라 추정하였다. 그리고 실험에 이용된 *E. tarda* 균주는 Tc, OA, Na, Pe에 대해 내성을 나타내었지만 이 균주의 transformant는 Tc, Pe에만 내성을 나타내었다. *tet* B를 가진 두 균주는 Tc가 첨가된 항생제 배지에서 transformant를 확인할 수 없어 transformation이 이루어지지 않았음을 알 수 있었다.

Conjugation 실험을 통한 transconjugant의 검출은 recipient 균주 (*E. coli* HB101)가 donor 균주로부터 그 내성을 전달받았을 경우, 항생제가 첨가된 chromocult 한천 배지에서 recipient 균주 (*E. coli* HB101)는 진한 보랏빛 집락을 형성하게 되며, *E. coli*를 제외한 다른 donor 균주들은 이 배지에서 무색의 집락을 나타냈다. 그 결과, *E. tarda* 균주 중 *tet* B를 가진 두 균주는 여전히 transconjugant를 확인할 수 없었다 (Table 7).

6. Detection limit

pUC18에 cloning되어 있어 *tet* A가 plasmid에 존재하는 *E. coli*와 *tet* B가 chromosome에 위치해있는 것으로 확인된 *E. tarda*로부터 total nucleic acid를 분리하여 두 종류의 template를 동일한 혼합한 후 단계 희석하였다. 희석된 template를 이용하여 multiplex PCR을 실시한 결과, template 농도가 1000ng에서 1ng까지는 뚜렷한 두개의 band가 나타났으나, 0.1ng의 template 농도에서는 *tet* B가 거의 희미하게 나타났으며, 그 이하의 농도에서는 *tet* B의 band가 나타나지 않은 것으로 보아 본 실험의 *tet* B에 대한 detection limit가 1~0.1ng임을 확인하였다 (Fig. 11).

Table 7. Location of tetracycline resistance determinants in 20 *Edwardsiella tarda* isolates.

Location	<i>tet</i> genes	No. of isolates (%)	MIC of isolates (%)	
			≤50 µg/ml	≥100 µg/ml
Plasmid	<i>tet</i> A	8 (40)	2 (25)	6 (75)
	<i>tet</i> D	7 (35)	2 (28)	5 (72)
	<i>tet</i> A and <i>tet</i> D	2 (10)	0 (0)	2 (100)
	<i>tet</i> A and <i>tet</i> G*	1 (5)	0 (0)	1 (100)
Chromosome	<i>tet</i> B	2 (10)	2 (100)	0 (0)

* Location on chromosome

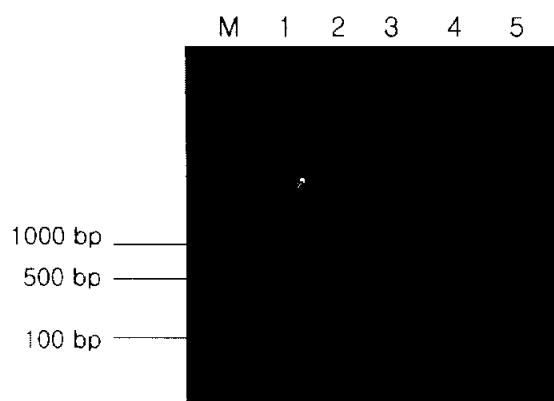


Fig. 11. Determination of the detection limits using multiplex PCR for mixture the total nucleic acid of *Edwardsiella tarda* contained *tet B* and cloned *tet A* in pUC18 plasmid. Serial dilution by a factor of 10 of template DNA from 1000ng to 0.1ng. M: 100bp DNA ladder. The limit of detection of *Edwardsiella tarda* contained *tet B* was found to be between 1ng and 0.1ng (lane 4).

7. 해양 환경에서의 내성분포 조사

양어장 환경에서 채집된 시료를 분석한 결과, 양식장 주변 해수에서는 6.7%, 저질에서는 24.4% 그리고 net의 부착물질에서는 30.7%의 내성균 빈도를 보였으며, 항생제를 투여한 조피볼락의 장내 세균에서의 내성균 빈도는 2.83%, 항생제를 투여하지 않은 조피볼락은 0.25%의 내성균 빈도를 보여 항생제를 투여한 어류가 항생제를 투여하지 않은 어류에 비하여 높게 나타났다 (Table 8). 균을 동정해본 결과, 해수와 저질, 조피볼락의 장에서는 *Enterobacter* sp.가 50~80%, net의 부착물질에서는 40%로 나타나 분리된 대부분의 내성균이 *Enterobacter* sp.임을 확인할 수 있었으며, net의 경우는 *Vibrio* sp.가 60%로 나타나 다른 결과를 보였다. *A. hydrophila*균은 해수, 저질, net의 부착물질 그리고 조피볼락의 장에서 5%이하로 동정되었다. 분리된 내성균으로부터 whole cell bacteria를 분리하여 이용하여 PCR을 실시한 결과, 양식장 주변의 해수와 저질, 그리고 항생제를 투여하지 않은 조피볼락에서 분리된 내성균에는 *tet* B, *tet* C를 확인할 수 있었으며, net의 부착물질과 항생제를 투여한 조피볼락에서 분리된 내성균에서는 *tet* B가 나타났고 *Vibrio* sp.는 *tet* B, *A. hydrophila*는 *tet* C만이 나타나 대부분이 두 종류의 내성 유전자에 편중됨을 알 수 있었다 (Fig. 12, Table 9).

8. 항생제 투여에 따른 내성 변화

항생제를 투여한 후 조피볼락의 장내 세균에서의 내성 변화를 관찰한 결과 항생제 투여가 끝난 후 1, 4일째까지는 85, 83%로 내성균의 빈도가 증가하다가 그 후로는 감소하는 경향을 보였으며, 실험 마지막 날인 20일에는 항생제를 투여하기 전과 같은 내성균의 빈도를 나타냈다 (Fig. 13). 검출된 내성균으로부터 whole cell bacteria를 분리하여 어떤 종류의 *tet* gene이 존재하는지 PCR을 실시한 결과, *tet* B, *tet* C를 확인할 수 있었다 (Table 10). 확인된 *tet* gene의 종류는 환경에서 조사한 결과와 동일하게 나타났다.

Table 8. Proportion of OTC resistant bacteria in marine aquactic environment of Korea.

Samples	% of OTC resistant isolates
Seawater of farm	6.7
Sediment	24.4
Net	30.7
Intestine of rockfish (A)	2.83
Intestine of rockfish (B)	0.25

•Rockfish (A) : OTC treatment before 1 week of sampling.

•Rockfish (B) : no antibiotics treatment before 3 months of sampling.

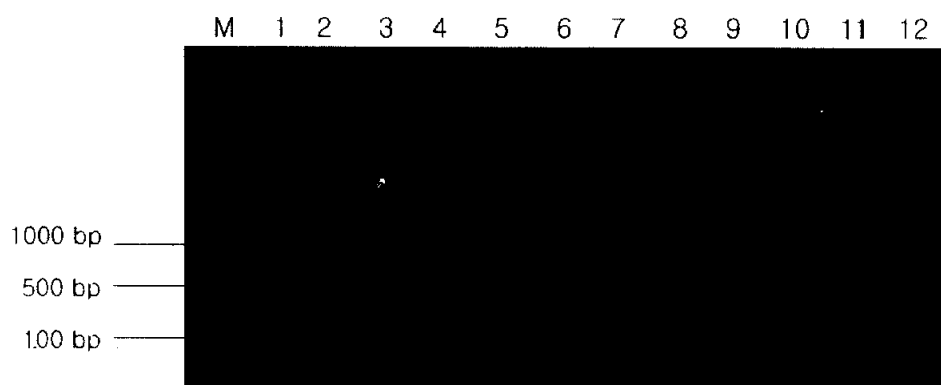


Fig. 12. Agarose gel electrophoresis of amplicons generated by multiplex PCR from the nucleic acids of oxytetracycline resistance bacterias choosed randomly in marine aquatic environment. Lane 1, 2: *tet B*, lane 3: *tet C*, lane 4, 5: *tet B*, lane 6: *tet C*, lane 7-12: *tet B*. M: 100bp DNA ladder.

Table 9. Distribution of *tet* genes in the isolates of marine aquatic environment.

Sample type	Number of isolates tested	<i>tet</i> gene	%
Seawater	100	B	70 %
		C	30 %
Sediment	50	B	98 %
		C	2 %
Net	50	B	100%
Fish (A)	50	B	100%
Fish (B)	100	B	96 %
		C	4 %

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

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

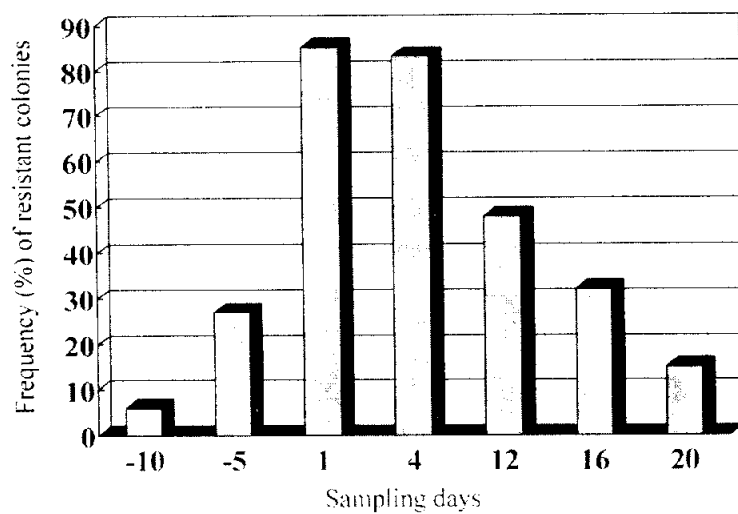


Fig. 13. Frequencies of OTC resistant bacteria in microflora cultured on various days and after a 10-days oral administration of oxytetracycline.

Table 10. Distribution of *tet* genes in the intestinal flora of rockfish after oral administration of oxytetracycline.

Species	No. of Isolates tested	% of each determinant class	
		<i>tet</i> B	<i>tet</i> C
<i>Vibrio</i> sp.	123	100 %	0
<i>Aeromonas hydrophila</i>	64	0	100 %
Unidentified (A)	11	100 %	0
(B)	12	0	0
Total	210		

(A) : Unidentified isolates contained an one *tet* genes of the six detectable with multiplex PCR.

(B) : Unidentified isolates do not contained *tet* genes detectable with multiplex PCR.of this study.

IV. 고 찰

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

이러한 내성균의 분포와 그 원인에 관한 연구가 일본의 경우 오래 전부터 주요 어류질병 세균의 약제내성 경향을 주기적으로 파악하여 효과적인 약제를 사전에 제시해 주거나 내성균주가 출현하고 있는 약제를 사전에 파악해 둬으로써 어민 지도 자료로 활용하고 있다 (Kim and Aoki, 1993; Kusuda et al., 1990). 뿐만 아니라 어병 세균의 약제내성 전달 plasmid 및 내성 유전자에 관한 연구도 어류병원 균주 별로 다양하게 이루어져 있다 (Aoki, 1992; Depaola et al., 1988; Sourm et al., 1992; Toranzo et al., 1991). 우리나라에서는 *E. tarda*의 약제감수성에 관하여는 몇몇 보고가 있지만 (최와 김, 1994, 1996), 이렇게 체계적인 조사 연구가 거의 이루어지고 있지 않은 실정이다. 그러므로 본 연구에서는 우리나라 양식 현장의 병어로부터 분리한 어병 세균중에 tetracycline 내성균의 비율이 어느 정도로 높게 나타나는지를 분석하고 그러한 내성균의 다른 항생제에 대한 내성을 조사하고자 하였다.

1993년부터 2002년까지 우리나라 동해안과 남해안의 양어장에서 *Edwardsiella tarda* 127균주, *Vibrio* sp. 50균주, *Aeromonas hydrophila* 4균주, *Proteus mirabilis* 3균주, *Acinetobacter lwoffii* 한 균주를 병어로부터 얻을 수가 있었으며, 분리된 균들은 대체로 *E. tarda*와 *Vibrio* 계열의 균주들이 많았으므로 분석 대상이 된 대부분의 병어는 *E. tarda*와 *Vibrio*에 감염되었던 것으로 추정할 수 있었다. 이들 균주의 tetracycline에 대한 내성 정도를 MIC값으로 나타낸 결과, Table 3에서 보듯이 *E. tarda*는 20균주, *Vibrio* sp.는 14균주, *Aeromonas hydrophila*는 2균주, *Proteus mirabilis*는 2균주 그리고 *Acinetobacter lwoffii*는 한 균주가 내성균으로 동정되었다. 그중 *E. tarda* 127균주의 내성분포를 살펴보

면, 54.3%는 1.56 μ g/ml이하의 MIC값을 나타내어 Tc에 감수성을 보였으며 30%는 1.56~6.25 μ g/ml으로 Tc에 대해 중간정도의 내성을 보였다. 그리고 25 μ g/ml이상의 MIC값을 가진 15.7%는 Tc에 대한 내성균으로 정의할 수 있었다. 그것은 *tet gene*을 확인한 결과, 25 μ g/ml이상의 MIC값을 가진 모든 *E. tarda*는 *tet gene*을 가지고 있었으나 그 이하의 MIC값을 가진 균들은 내성 유전자를 가지고 있지 않았으므로 25 μ g/ml이상의 MIC값을 가진 *E. tarda*를 Tc 내성균으로 보는 것이 타당하였다 (Fig. 3). 분석대상이 된 *Vibrio*의 경우는 많은 종류가 존재하며 동정에 까다로움이 있어 TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Salt)배지에서 yellow colony로 자란 균을 *Vibrio* sp.로 분류하였기 때문에 *E. tarda*와 같이 구분하여 MIC값의 분포를 조사하기가 어려웠으며, *Aeromonas hydrophila*, *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter lwoffii*의 내성분포는 적은 sample 수에 의한 신뢰성 문제가 있다고 보아 조사가 불가능했다. Table 4의 결과에서 우리나라 양식장에서 나타난 어병 세균 중 tetracycline에 대하여 내성을 나타내는 세균은 약 20%를 보여 1973년부터 1983년까지 조사된 은어 양식장의 병어에서 분리된 *Vibrio anguillarum*의 내성 비율은 90%이상에 달한다고 보고한 Aoki et al. (1988)의 연구와는 차이를 보였다. 이러한 차이를 보인 것은 내성균의 직접적 검출을 위해 매년 실시된 Aoki의 연구와는 달리 병어로부터 분리된 균 중에서 내성 test를 실시하였기 때문에 낮은 비율로 나타난 것으로 여겨진다. Tc 이외에 이들 39균주가 갖는 또 다른 내성 분포를 조사해본 결과, Ampicillin(Am), Ciprofloxacin(Ci), Chloramphenicol(Cm), Gentamycin(G), Nalidixic acid(Na), Oxolinic acid(Oa), Penicillin(Pe)등 여러 종류의 항생제에 대해서도 내성을 나타내어 본 실험에서 분리한 대부분의 균이 다제 내성균임을 확인할 수 있었다 (Table 5). Tetracycline계 약물은 교차내성을 가지므로 한 가지 tetracycline 항생물질에 내성이 생기면 다른 tetracycline에 대해서도 저항성을 가지는 것으로 알려져 있다. 그러나, Mendez et al. (1980)과 Chpora et al. (1993)의 연구에 따르면, tetracycline계 약물중 minocycline에 높은 MIC값을 보이는 내성 유전자는 *tet B*, *tet M*뿐이며 나머지 *tet* 유전자는 낮은 MIC값을 보인다고 보고하였다. 본 실험에서 다양한 *tet* 유전자의 minocycline에 대한 MIC값을 조사해본 결과, 이전의 보고와는 달리 모든 내성 유전자에서 높은 MIC값을 나타내 차이를 보였다 (data not shown).

Edwardsiella tarda RE1과 *Aeromonas hydrophila* HA를 표준 균주로 이용하기 위하여 염기 서열을 분석하고 GeneBank에서 X0006와 L06940 (Guillaume et al., 2000)의 accession no.를 가진 *tet* A와 *tet* E의 nucleotides와 비교하였더니 각각 99.7, 98.5%의 homology를 보였으며, amino acid의 비교에서 *tet* A의 경우는 99.2%로 비슷한 %를 나타냈으나 *tet* E의 경우는 99.5%로 nucleotides와 비교했을 때 보다 증가된 homology를 보여 실험의 표준 균주로써 이용이 가능했다 (Fig. 4).

본 연구에서는 specific하게 제작한 *tet* gene의 primer를 이용한 PCR기법으로 우리나라 양어장의 어병 세균의 Tc 내성 유전자의 분포와 그 기원을 추적하였다. *tet* A, B, C, D, E, 그리고 G genes의 conserved region을 sense primer, variable region을 각 type에 대해 특이적 primer로 PCR을 실시하여 PCR 생성물의 크기에 차이를 두어 어떤 종류의 *tet* gene이 검출되는지 명확하게 구별하였다 (Fig. 5). 또, 공통적인 1개의 sense primer와 6개의 antisense primer를 이용한 multiplex PCR을 실시하여 single PCR때와 동일한 band를 얻을 수 있어 본 방법의 특이적 PCR 반응을 확인할 수 있었다 (Fig. 8).

각 *tet* gene을 plasmid에 cloning한 후 다시 그 plasmid를 분리하여 *tet* A, B, C, D, E, 그리고 G가 포함된 plasmids를 혼합한 multitemplates를 이용해 multiplex PCR을 실시하여 6개까지의 PCR 생성물을 얻는 것이 가능하였다 (Fig. 7). 그러나, *tet* A, B, C, D, E, 그리고 G를 가진 각각의 표준균주로부터 분리한 total nucleic acid를 이용해 동일한 방법으로 PCR을 실시한 결과, 균의 숫자 또는 내성 유전자의 copy 수 차이 때문인지 각각의 *tet* 유전자에 대해 증폭된 PCR 생성물이 양적 차이를 보여 3개의 templates를 혼합한 경우까지는 정확한 3종류의 PCR 생성물을 얻을 수 있었으나 4개의 templates를 혼합한 경우부터는 혼합된 *tet* gene의 종류에 따라 차이를 보였다 (Fig. 9). 그렇지만 Depaola et al. (1993)과 Lee et al. (1993)은 하나의 내성균에서 3개 이상의 *tet* gene이 나타난 경우가 없었다고 보고하였으므로, total nucleic acids를 이용하여 multiplex PCR을 실시하는 것이 가능하였다. 또한, Allard et al. (1993)의 연구에 따르면, *tet* A, B, C, D, E, 그리고 G gene의 amino acid sequences를 비교해 본 결과, *tet* A, C, G와 *tet* B, D, E가 각각 유사한 homology를 보인다고 보고하였으며, multiplex PCR을 이용하여 유사한 sequence를 보

이는 *tet* A, C, G와 *tet* B, D, E의 구별이 가능하고 *tet* E, D에 *tet* A 또는 *tet* C, G에 *tet* D등을 같이 혼합하여도 *gene*의 구별이 가능하였다.

분리된 tetracycline 내성균에서 *tet gene*을 검출하기 위해 39균주의 total nucleic acid를 주형으로 multiplex PCR을 실시한 결과 *E. tarda*에서 *tet* A가 40%, *tet* D가 35%, *tet* B가 10%, 그리고 *tet* A-D, *tet* A-G와 같이 두 종류의 *gene*을 가진 균주가 각각 10%, 5%로 나타났다. 가장 dominant한 *tet gene*은 *tet* A, *tet* D이고 *tet* B는 적은 수였으나 이전과 다른 분포를 확인할 수 있었으며 *tet* A-D, *tet* A-G와 같이 두 종류의 *gene*이 존재하는 경우 multiplex PCR을 이용하여 한번의 PCR로 확인하는 것이 가능했다. *Vibrio*종에서 여러 다른 종이 있을 수 있지만 *Vibrio* sp. 균주는 모두 *tet* B만이 검출되어 그 origin이 한정됨을 알 수 있었다. 그리고, 나머지 *A. hydrophila*의 두 균주에서는 *tet* E-C, *tet* C, *P. micrabilis*의 두 균주는 모두 *tet* C, 그리고 *Acinetobacter lwoffii*는 *tet* B가 있음을 확인할 수 있었다 (Fig. 10, Table 6). 이러한 결과는 Roberts (1996)에 의해 이미 보고 되어진 *E. tarda*에서는 *tet* A, D만이 *Vibrio* sp.에서는 *tet* A, B, C, D, E, 그리고 G와 같은 다양한 *tet gene*들이 발견되었던 것과는 차이를 보였다. 그리고, *tet* G *gene*의 nucleotide sequence는 *Vibrio anguillarum*에서 처음 보고되어 졌는데 (Zhao et al. 1992), 본 실험의 결과에서는 *tet* G가 *Vibrio* sp.에서 발견되지 않았고 오히려 *E. tarda*에 존재함을 확인할 수 있었으며, Sorum et al. (1992)의 연구에 따르면, *Vibrio salmonicida*의 *tet* 내성유전자에 관한 연구에서도 *tet* A, B, C, D, 그리고 E가 분포함이 보고 되어 졌다. 실험에서 사용한 PCR assay법은 최근 들어 Warsa et al. (1996), Hanse et al. (1996)등 여러 연구가들에 의해 항생제 내성 유전자를 검출하는데 많이 이용되어 왔지만 본 연구에서처럼 conserved region으로부터 하나의 sense primer 그리고 PCR 생성물의 크기 차이로 *tet genes*이 구별되는 6개의 antisense primer를 제작하여 이용한 경우는 없었다.

다제 내성 특성을 나타내는 유전자는 chromosome, plasmid 그리고 R plasmid 등에 존재하고 있는 것으로 알려져 있다 (Aoki et al. 1988). 채집 내성균주에서 PCR 방법으로 조사되어진 *tet gene*이 plasmid에 위치해 있는지 chromosome에 위치해 있는지를 확인해 본 결과, *E. tarda*의 경우 *tet* B를 가진 균을 제외한 *tet* A, D, A-D, A-G를 가진 균들의 경우

Tc가 첨가된 항생제 배지에서 transformant와 transconjugant를 확인할 수 있었으므로, 내성유전자가 plasmid에 존재할 것이라 추정 가능케 하였다 (Table 7). transformant로부터 plasmid를 분리한 후 PCR 방법을 이용해 동일한 *tet* gene을 확인할 수 있었지만 *tet* A-G를 가진 gene의 경우 transformant에서 *tet* A만이 확인되어 *tet* G는 chromosome에 존재할 것이라 추정하였다. 그리고 실험에 이용된 *E. tarda* 균주는 Tc, OA, Na, Pe에 대해 내성을 나타내었지만 이 균주의 transformant는 Tc, Pe에만 내성을 나타내어 quinolone계 항생제인 OA, Na에 대한 내성은 확인할 수 없어 OA, Na의 내성 gene은 chromosome에 존재함을 알 수 있었다. *Vibrio* sp.에서 *tet* B가 존재하는 내성균의 경우, transformation과 conjugation이 이루어지지 않아 내성유전자가 chromosome에 위치하고 있을 것이라 여겨지지만, origin 등의 차이로 *E. coli* HB101에서 replication이 일어나지 않을 수도 있으며, Frech et al. (2000)은 *tet* gene의 위치를 확인하기 위해 *tet* probes를 제작하여 hybridization을 시킨 후, plasmid의 유무를 조사하는 것이 선행되어야 한다고 보고하였는데, 본 실험에서는 이 방법을 이용하지 않았기 때문에 더욱 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 사료되어진다. 그리고 Chaslus-dancla et al. (1995)는 *Pasteurella haemolytica*와 *Pasteurella multocida*에서 *tet* B, *tet* M을 검출하였으며, 이 내성 유전자는 chromosome에 위치해 있음을 확인할 수 있었다고 보고하였다.

Cloning된 *tet* A가 포함된 *E. coli*와 chromosome에 위치해 있는 *tet* B가 포함된 *E. tarda*로부터 total nucleic acids를 분리한 후, 각각의 정량된 DNA를 동일 농도로 섞어서 단계 희석하여 PCR template로 사용하였다. 그 결과, *tet* B의 detection limit는 1~0.1ng임을 확인할 수 있었으나, *tet* A의 경우는 그 이하까지도 PCR 생성물을 얻을 수 있었다. 그 이유로는 plasmid에 위치해 있는 *tet* A의 copy 수가 chromosome에 존재해 있는 *tet* B에 비해 많았기 때문이라고 추정된다. 그렇지만, 1ng의 농도 이상에서는 chromosome에 위치해 있어도 검출이 되었으므로, 한 내성균에 두 종류의 내성유전자가 다른 위치에 존재하여도 multiplex PCR을 이용하여 확인하는 것이 가능하였다.

Table 8에서 보듯이 양어장 환경에서 채집된 시료를 분석한 결과, 양식장 주변 해수에서는 6.7%, 저질에서는 24.4% 그리고 net의 부착물질에서는 30.7%의 내성균 빈도를 보였으

며, 항생제를 투여한 조피볼락의 장내 세균에서의 내성균 빈도는 2.83%, 항생제를 투여하지 않은 조피볼락은 0.25%의 내성균 빈도를 보여 항생제를 투여한 어류가 항생제를 투여하지 않은 어류에 비하여 높게 나타났다. Kerry et al. (1995)의 조사에 따르면 저질에서의 OTC에 대한 내성 비율이 $26 \pm 8.7\%$ 로 나타나 본 실험 결과와 유사함을 확인할 수 있었으며, 해양 환경의 경우 해수에 존재하는 이가 양이온이 항생제와 불활성 복합체를 형성하여 저질 등에 축적된다는 보고도 있다 (Puseil et al. 1996). 그리고, 저질과 net의 부착물질에서 조사된 내성균의 빈도가 24.4%, 30.7%로 각각 높게 나타나 내성균의 reservoir 역할을 할 수 있을 것이라 추정되어졌다. 양식장 주변 환경에서 내성분포를 조사하여 분리되어진 균을 동정해본 결과, 해수와 저질, 조피볼락의 장에서는 *Enterobacter* sp.가 50~80%, net의 부착물질에서는 40%로 나타나 분리된 대부분의 내성균이 *Enterobacter* sp.임을 확인할 수 있었으며, net의 경우는 *Vibrio* sp.가 60%로 나타나 다른 결과를 보였다. *A. hydrophila* 균은 해수, 저질, net의 부착물질 그리고 조피볼락의 장에서 5%이하로 동정되었으며 (data not shown). 이러한 내성균에는 어떤 종류의 *tet* gene이 검출되는지 multiplex PCR 방법을 이용하였다. Andersen et al. (1994)은 해양 저질에서 분리된 내성균 중 그람 음성균에 존재하는 *tet* 유전자를 조사해본 결과, *tet* A, B, C, D, 그리고 E등의 다양한 분포를 보였다고 보고하였지만 본 실험에서는 *tet* B, C만을 확인할 수 있었으며 *Vibrio* sp.는 *tet* B, *A. hydrophila*는 *tet* C만이 나타나 이 두 종류의 내성 유전자에 관중됨을 알 수 있었다 (Fig. 2, Table 9).

Kerry et al. (1997)의 항생제 투여 후 내성 변화에 대한 연구에 의하면 항생제 투여기간에는 내성균 빈도가 변화하지 않았으며, 투여가 끝난 후에는 증가하는 경향을 보이다가 감소하였다고 보고하였다. 본 실험에서도 이와 비슷하게 OTC를 투여한 후 조피볼락의 장내 세균에서의 내성 변화를 관찰한 결과 항생제 투여가 끝난 후 1, 4일째까지는 85, 83%로 내성균의 빈도가 증가하다가 그 후로는 감소하는 경향을 보였으며, 실험 마지막 날인 20일에는 항생제를 투여하기 전과 같은 내성균의 빈도를 나타냈다 (Fig. 13). 내성 변화의 경향은 유사하게 나타났으나 내성 빈도의 수치에는 많은 차이를 보였다. 그 이유로는 Kerry et al. (1997)의 내성균에 대한 정의가 $25 \mu\text{g/ml}$ 이 첨가된 2216V배지에서 자란 colony를 의미했으

나 본 실험에서는 OTC 10 μ g/ml이 첨가된 TSA를 이용하였으므로 내성균이라 정의되는 범위가 넓어 내성 빈도가 높게 나타난 것에 영향을 끼쳤을 것이라 생각된다. 그리고, Smith et al. (1994)은 배지의 종류에 따라 첨가된 항생제의 활성에 차이를 보이기도 함으로 Depaola (1995)와 Depaola et al. (1995)가 MacConkey 배지에 25 μ g/ml의 항생제를 첨가시켜 내성 빈도를 실험한 것은 Mueller-Hinton 배지에 6.2 μ g/ml의 항생제를 첨가하여 조사한 것과 동일하다고 보고하였다. 분리된 내성균의 대부분은 *Vibrio* sp., *Aeromonas hydrophila*이었고 이들 균주들이 가지는 *tet* 유전자는 *tet* B, *tet* C임을 확인할 수 있었으며, 확인된 *tet* gene의 종류는 환경에서 조사한 결과와 동일하게 나타났다. 정확한 균의 동정이 되지 않았지만 *tet* B gene을 가지는 내성균도 있었으며, Tc 내성균이기는 하나 실험에 이용된 *tet* A, B, C, D, E 그리고 G를 가지지 않는 균도 존재하였다 (Table 10).

여러번 PCR을 수행할 경우 시간적, 경제적으로 손실이 많기 때문에, 본 실험에서는 균이 가지고 있는 *tet* gene의 종류를 한번의 PCR로써 구별할 수 있는지에 대해 실험을 하였다. 이는 한 template에 multiprimer 즉 *tet* A, B, C, D, E, 그리고 G에 대한 specific primer를 모두 적용시켰을 때 원하는 하나의 PCR product가 생성되는지 확인하였고, 이러한 multiprimer를 multitemplate에 적용했을 때, 즉 6종의 primer에 대해 6종의 specific template을 반응시켰을 경우 6개의 size가 구별되는 PCR 생성물이 형성되는지를 확인하였다. 끝으로 우리나라의 tetracycline 내성 유전자 분포가 이전의 보고와 다른 결과들을 보였으며, 내성기작 중 efflux를 제외한 ribosomal protection이나 enzymatic 기능을 가진 *tet* genes에 관한 더 많은 연구가 있어야 할 것으로 생각된다.

V. 요약

우리나라 양식현장의 병어로부터 분리한 어병 세균 중에 tetracycline에 대한 내성균의 비율을 분석하였으며, 이들 내성균이 갖는 내성 유전자 분석을 위하여 *tet* A, B, C, D, E, 그리고 G에 대해 그 크기가 구별되는 specific primers를 제작한 후 PCR기법으로 어병 세균의 Tc 내성 유전자의 분포와 기원을 간접적으로 추정하고자 하였다. 1993년부터 2002년까지 우리나라 양식장에서 분리된 대부분의 어병 세균은 *E. tarda*와 *Vibrio* sp.로 나타났으며, tetracycline에 대한 내성균의 비율은 각각 15%, 26%임을 확인할 수 있었다. 그리고 이러한 내성균들에는 어떤 종류의 *tet* gene이 분포하고 있는지 분석한 결과 *E. tarda*에서 8균주는 *tet* A, 7균주는 *tet* D, 2균주는 *tet* B, 그리고 *tet* A-D, *tet* A-G와 같이 두 종류의 gene을 가진 균주가 각각 2, 1로 나타났으며, *Vibrio* sp. 균주는 모두 *tet* B를 가짐을 확인할 수 있었다. 그리고 나머지 *A. hydrophila*의 두 균주에서는 *tet* E-C, *tet* C, *P. micrabilis*의 두 균주는 모두 *tet* C, 그리고 *Acinetobacter lwoffii*는 *tet* B가 있음을 확인할 수 있었다. 채집 내성 균주에서 그 수가 많고 다양한 종류의 *tet* gene을 가진 *E. tarda* 균주를 선택하여 내성 유전자가 plasmid에 위치해 있는지 chromosome에 위치해 있는지를 확인해 보았다. *E. tarda* 20균주 중 *tet* A, *tet* D, *tet* A-D, *tet* A-G를 가진 18종의 균주는 모두 plasmid에 위치해 있었으며, 나머지 *tet* B를 가진 두 균주는 chromosome에 위치해 있는 것을 알 수 있었다. 양어장 환경에서 채집된 사료를 분석한 결과, 양식장 주변 해수에서는 6.7%, 지질에서는 24.4% 그리고 net의 부착물질에서는 30.7%의 내성균 빈도를 보였으며, 항생제를 투여한 조피볼락의 장내 세균에서의 내성균 빈도는 2.83%, 항생제를 투여하지 않은 조피볼락은 0.25%의 내성균 빈도를 보여 항생제를 투여한 어류가 항생제를 투여하지 않은 어류에 비하여 높게 나타났다. 분리된 내성균에는 *tet* B, *tet* C만을 확인할 수 있어 대부분이 두 종류의 내성 유전자에 편중되게 나타났다. 항생제를 투여한 후 조피볼락의 장내 세균에서의 내성 변화를 관찰한 결과 항생제 투여가 끝난 후 1, 4일째까지는 85, 83%로 내성균의 빈도가 증가하다가 그 후로는 감소하는 경향을 보였으며, 실험 마지막 날인 20일에는 항생제를 투여하기 전과 같은 내성균의 빈도를 나타냈다. 검출된 내성균으로부터 whole cell bacteria를 분리하여 어떤 종류의 *tet* gene이 존재하는지 PCR을 실시한 결과 *tet* B, *tet* C를 확인할 수 있었다.

VI. 감사의 글

힘들었지만 소중한 소망을 이루었다는 기쁨과 함께 지난 2년 동안의 대학원 생활을 돌아보며 그 동안 많은 분들의 도움으로 지금의 제가 있을 수 있었기에 그분들께 감사의 마음을 전하고자 합니다.

먼저, 언제나 한없는 이해와 자상한 가르침으로 학문적 소양을 길러주셨으며 삶의 지혜를 더 많이 깨우쳐 주신 사랑하고 존경하는 지도 교수님이신 정현도 선생님께 마음속 깊이 진심어린 감사를 드립니다. 그리고 바쁘신 중에서도 저의 부족한 논문에 관심을 가져 주시고 제가 저의 논문을 성찰할 수 있도록 도와주신 김기홍 교수님과 정준기 교수님께 정말 감사드리며 늘 따뜻한 웃음과 눈길로 지켜봐 주신 박수일 교수님 그리고 강주산 교수님께 감사드립니다.

학문적 도움부터 인생 상담까지 동생처럼 살피주시고 충고를 아끼지 않은 수희언니, 몸이 부거워 고생하는 남실언니, 광규 선배님, 언제나 마음 써주는 은아언니, 바다 건너 멀리 있지만 동생을 웃게 만드는 울 쭈언니에게 고마움을 전합니다. 그리고, 저의 실험을 물심양면으로 도와주신 준효선배, 종영선배, 월라언니, 영재선배, 걱려를 아끼지 않고 좋은 말씀을 많이 해주신 명석선배, 수미언니, 정수선배, 우열선배, 영이 언니에게 감사드립니다.

처음 실험실에 들어왔을 때부터 논문을 마감하려는 지금 이 순간까지 희노애락을 같이한 저의 실험동지이자 인생동지인 사랑하는 준범선배, 2년 동안 동고동락하며 서로에게 힘이 되어 주었던 천수·찬희·재혁·갑민이 선배에게도 감사드립니다.

실험실의 꽃은 일을 힘들다하지 않고 지금도 열심히 실험에 열중한 실험실 재롱둥이 영화, 마음 씩씩이가 이쁜 대심, 새로운 시작을 하려는 재훈·호연·순범선배 그 동안 많이 도와주셔서 감사합니다. 진단생화학 실험실 막둥이들 윤경, 영아, 현정, 지효, 선후 선배도 고맙습니다.

대학·대학원 생활동안 저에게 생긴 소중한 보물 같은 친구 소정아, 힘들고 지쳤을 때 언제나 마음의 휴식이 되어준 남현이, 항상 그리움이란 단어로 마음 한 구석을 자리 잡고 있는 임숙이에게 고마운 마음을 전합니다.

끝으로 한결같이 변함없는 믿음과 사랑과 이해로 가장 든든한 후원자가 되어주신 사랑하는 할머니와 부모님께 감사드리며 오빠같이 누나의 버팀목이 되어준 진수와 언니를 많이 이해해준 미진이에게 작지만 소중한 저의 노력이 담긴 이 논문을 바칩니다.

VII. 참고 문헌

- Allard, J. D. and K. P. Bertrand. 1993. Sequence of class E tetracycline resistance gene from *Escherichia coli* and comparison of related tetracycline efflux proteins. *Journal of Bacteriology*, 175, 4554-4560.
- Andersen, S. R. and R. A. Sandaa. 1994. Distribution of tetracycline resistance determinants among gram-negative bacteria isolated from polluted and unpolluted marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 908-912.
- Aoki, T. 1988. Drug resistant plasmids from fish pathogen. *Microbiology Science*, 5, 219-223.
- Aoki, T. 1992. Chemotherapy and drug resistance in fish farms in Japan. *Diseases in Asian Aquaculture*, 1, 519-529.
- Aurora, F. A., A. Muela, R. Cisterna, J. Iriberry and I. Barcina. 1992. Biotic and abiotic factors affecting plasmid transfer in *Escherichia coli* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 392-398.
- Bell, G. R., G. S. Traveler and C. Dworschak. 1988. Development in vitro and pathogenicity of an erythromycin-resistant strain of *Renibacterium salmoninarum*, the causative agent of bacterial kidney disease in salmonids. *Disease of aquatic organism*, 4 19-25.
- Bower, P. R., JR. J. H. Schachhate, G. A. Wooster and J. G. Babish. 1990.

Experimental treatment of *Aeromonas salmonicida* infections with enrofloxacin and oxolinic acid : fields trails. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2, 198-203.

Chaslus-dancla Elisabeth, Marie-claude Lesage-descauses, Sabine Leroy-setrin, Jean-louis Martel and Jean-pierre Lafont. 1995. Tetracycline resistance determinants, Tet B and Tet M, detected in *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida* from bovine herds. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 36, 815-819.

Chen, W. and T. Kuo. 1993. A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Research*, 21, 2260.

Chopra, I. and M. Roberts. 2001. Tetracycline antibiotic: mode of action, application, molecular biology and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology*, 65, 232-260.

Chopra, I., P. M. Hawkey and M. Hinton. 1992. Tetracycline, molecular and clinical aspects. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 29, 245-277.

DePaola, A., P. A. Flynn, R. M. McPherarson and S. B. Levy. 1988. Phenotypic and genotypic characterization of tetracycline and oxytetracycline resistant *Aeromonas hydrophila* from cultured channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and their enviroments. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 1861-1863.

Depaola, A., W. E. Hill and F. M. Harrell. 1993. Oligonucleotide probe determination of tetracycline resistant bacteria isolated from catfish ponds. *Molecular and Cellular Probes*, 7, 345-348.

- DePaola, A. and M. C. Roberts. 1995. Class D and E tetracycline resistance determinants in Gram-negative bacteria from catfish ponds. *Molecular and Cellular Probes*, 9, 311-313.
- DePaola, A., J. T. Peeler and G. E. Rodrick. 1995. Effect of oxytetracycline-mediated feed on antibiotic resistance of gram-negative bacteria in catfish ponds. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 2335-2340.
- Ervic, A., B. Thorsen, V. Eriksen, B. T. Lunestad and O. B. Samuelsen. 1994. Impact of administering antibacterial agent on wild fish and blue mussels *Mytilus edulis* in the vicinity of fish farm. *Diseases Aquatic Organism*, 18, 45-51.
- Frech, G. and S. Schwarz. 2000. Molecular analysis of tetracycline resistance in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Typhimurium, Enteritidis, Dublin, Choleraesuis, Hadar and Saintpaul: construction and application of specific gene probes. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 633-641.
- Guillaume, G., D. Verbrugge, M. L. Chasseur-Libotte, W. Moens, J. M. Collard. 2000. PCR typing of tetracycline resistance determinants (Tet A-E) in *Salmonella enterica* serotype Hadar and in microbial community of activated sludges from hospital and urban wastewater treatment facilities in Belgium. *FEMS Microbiology Ecology*, 32, 77-85.
- Hanse, L. M., P. C. Blanchard and D. C. Hirsh. 1996. Distribution of tet (H) among *Pasteurella* isolates from the United States and Canada. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40, 1558-1560.

- Hektoen, H., J. A. Berge, V. Hormazabal and M. Yndestad. 1995. Persistence of antibacterial agents in marine sediment. *Aquaculture*, 133, 175-184.
- Kim, E. H. and T. Aoki. 1993. The structure of the chloramphenicol resistance gene on transferable R plasmid from the fish pathogen, *Pasteurella piscicida*. *Microbiology Immunology*, 37, 705-712.
- Kerry, J., M. Hiney, R. Coyne, D. Cazabon, S. NicGabhainn and P. Smith. 1994. Frequency and distribution of resistance to oxytetracycline in micro-organisms isolated from marine fish farm sediments following therapeutic use of oxytetracycline. *Aquaculture*, 123, 43-54.
- Kerry, J., M. Hiney, R. Coyne, S. N. Gabhainn, D. Gilroy, D. Cazabon and P. Smith. 1995. Fish feed as a source of oxytetracycline resistance bacteria in the sediments under fish farms. *Aquaculture*, 131, 101-113.
- Kerry, J., S. NicGabhainn and P. Smith. 1997. Changes in oxytetracycline resistance of intestinal microflora following oral administration of this agent to Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) smolts in a marine environment. *Aquaculture*, 157, 187-195.
- Kusuda, R., H. Sugiura and K. Kawai. 1990. Drug sensitivity of *Pasteurella piscicida* isolated from cultured yellow tail from 1986 to 1988. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 56, 239-242.
- Lee, C., B. E. Langlois and K. L. Dawson. 1993. Detection of tetracycline

- resistance determinants in pig isolates from three herds with different histories of antimicrobial agent exposure. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 1467-1472.
- Levy, S. B. 1992. Active efflux mechanism for antimicrobial resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36, 695-703.
- Levy, S. B., L. M. McMurray, T. M. Barbosa, V. Burdett, P. Courvalin, W. Hillen, *et al.* 1999. Nomenclature for new tetracycline resistance determinants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43, 1523-1524.
- Marshall, B. C., C. Tachibana and S. B. Levy. 1983. Frequency of tetracycline resistance determinant classes among lactose-fermenting coliforms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 24, 835-840.
- McPhearson, R. M., A. DePaola, S. R. Zywno, M. L. Motes Jr. and A. M. Guarino. 1991. Antibiotic resistance in gram-negative bacteria from cultured catfish and aquaculture ponds. *Aquaculture*, 99, 203-211.
- Mendez B., C. Tachibana and S. B. Levy. 1980. Heterogeneity of tetracycline resistance determinants. *Plasmid*, 3, 99-108.
- Miranda, C. D. and R. Zemelman. 2002. Bacterial resistance to oxytetracycline in Chilean salmon farming. *Aquaculture*, 212, 31-47.
- Pursell, L., T. Dineen, J. Kerry, S. Vaughan and P. Smith. 1996. The biological significance of breakpoint concentration of oxytetracycline in media for the

- examination of marine sediment microflora. *Aquaculture*, 145, 21-30.
- Roberts, M. C., Y. Pang, D. E. Riley, S. L. Hillier, R. C. Berger and J. N. Krieger. 1993. Detection of Tet M and Tet O tetracycline resistance genes by polymerase chain reaction. *Molecular and Cellular Probes*, 7, 387-393.
- Roberts, M. C. 1996. Tetracycline resistance determinants: mechanism of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiology Review*, 19, 1-24.
- Schmidt, A. S., Bruun, M. S., Dalsgaard, I., Pedersen, K. and Larsen, J. 2000. Occurrence of antimicrobial resistance in fish-pathogenic and environmental bacterial associated with four Danish rainbow trout farms. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4908-4915.
- Smith, P., J. Donlon, R. Coyne and D. J. Cazabon. 1994. Fate of oxytetracycline in a fresh water fish farm : influence of effluent treatment systems. *Aquaculture*, 120, 319-325.
- Sorum, H., M. C. Roberts and J. H. Crosa. 1992. Identification and cloning of a tetracycline resistance gene from the fish pathogen *Vibrio salmonicida*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36, 611-615.
- Spanggaard, B., F. Jorgensen, L. Gram and H. H. Huss. 1993. Antibiotic resistance in bacteria isolated from three freshwater fish farms and unpolluted stream in Denmark. *Aquaculture*, 115, 195-207.

- Stamm, J. M. 1989. In vitro resistance by fish pathogen to aquacultural antibacterial including the quinolones difloxacin(A-56619) and sarafloxacin(A-56620). *Journal of Aquatic Animal Health*, 1, 135-141.
- Taylor, D. E. and A. Chau. 1996. Tetracycline resistance mediated by ribosomal protection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40, 1-15.
- Tranzo, A. E., Y. Santos, S. Nunez and J. L. Barga. 1991. Biochemical and serological characteristics, drug resistance and plasmid profiles of Spain isolate of *Aeromonas salmonicida*. *Fish Pathology*, 26, 55-60.
- Twiddy, D. R. and P. J. A. Reilly. 1994. Occurrence of antibiotic resistant human pathogens in integrated fish farm. Research contributions presented at the ninth session of Indo Pacific fishery commission working party on fish technology and marketing. *Cochin, India, March, Rome, Italy FAO*, 514, 23-37.
- Vaughan S., R. Coyne and P. Smith. 1996. The critical importance of sample site in the determination of the frequency of oxytetracycline resistance in the effluent microflora of a fresh water fish farm. *Aquaculture*, 139, 47-54.
- Warsa, U. C., M. Nonoyama, T. Ida, T. Okamoto, T. Okubo, C. Shimau-chi, A. Kuga and M. Inoue. 1996. Detection of *tet(K)* and *tet(M)* in staphylococcus aureus of Asian countries by polymerase Chain Reaction. *Journal of Antibiotics*, 49, 1127-1132.
- Zhao, J. and T. Aoki. 1992. Nucleotide sequence analysis of the class G tetracycline resistance determinant from *Vibrio anguillarum*. *Microbiology Immunology*, 36,

1051-1060.

김명석. 1997. 환경적 변화에 따른 나일 틸라피아의 oxolinic acid 흡수와 배설. 부경대학교 어병학과 석사논문.

김종명. 1993. 테트라사이클린 내성 황색포도상구균으로부터 테트라사이클린 내성 유전자의 클로닝. 경성대학교 약학과 박사논문.

유민호. 2000. 어병 세균에서 chloramphenicol 내성 유전자 분포와 R plasmid. 부경대학교 어병학과 석사논문.

최민순, 김영길. 1994. 양만장 사육조에서 분리한 *Edwardsiella tarda*의 약제 내성과 R plasmid. 한국어병학회지, 제 7권, 37-46.

최민순, 최상훈, 박관하. 1996. 뱀장어 병어로부터 분리한 *Edwardsiella tarda*의 약제 내성. 한국어병학회지, 제 9권, 195-201.