이 학 석 사 학 위 논 문

# 어류 장내 세균에서 나타나는 tetracycline 내성 유전자의 정량적 분석

2008년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 명 의 학 과

윤 소 혜

이 학 석 사 학 위 논 문

# 어류 장내 세균에서 나타나는 tetracycline 내성 유전자의 정량적 분석

지도교수 정 현 도

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함

2008년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 명 의 학 과

윤 소 혜

# 윤소혜의 이학석사 학위논문을 인준함.

2008년 2월 26일

주 심 약학박사 정 준 기 印

위 원 이학박사 강 주 찬 印

위 원 이학박사 정 현 도 印

# 목 차

Abstract

Ⅰ. 서 론 ····· 1

Ⅱ. 재료 및 방법 ····· 5

1. 어류 장내 세균 ····· 5

1-1. 어류 채집 ····· 5

1-2. 장내 세균 분석 ····· 7

2. Conventional multiplex PCR amplification ····· 8

2-1. Primer ····· 8

2-2. Total Nucleic acid 분리 ····· 11

2-3. Multiplex PCR ····· 11

3. Real-time PCR의 도입 ····· 12

3-1. Primer 제작 ····· 12

3-2. Stool DNA 분리 ····· 15

3-3. Stool DNA를 이용한 primer의 특이성 ····· 15

3-4. Real-time PCR을 standard DNA 제조 ····· 16

3-4-1. Plasmid standard의 제조 ····· 16

3-4-2. Amplicon standard의 제조 ····· 16

3-4-3. Standard DNA의 정량 ····· 17

3-5. Real time PCR의 최적화 ····· 17

4. 어류 장내 microflora number와 16s rDNA gene copy값과의 관계 ····· 20

5. Multiplex real-time PCR의 활용 ····· 21

5-1. *tet* gene의 그룹화 ····· 21

5-2. Spiking test ····· 23
5-3. Single qPCR과 multi qPCR의 실시 ····· 23
5-4. 장내 세균 *tet* 유전자의 정량적 분석 ····· 24
**Ⅲ. 결 과** ····· 25
1. 어류 장내 세균의 분포 ····· 25
2. 어류 장내 세균의 Tc 내성 비율 ····· 28
3. Tetracycline 내성 유전자 분포 조사 ····· 30
4. Real-time PCR assay의 확립 ····· 42
4-1. 제작된 primer의 특이성 확인 ····· 42
4-2. Plasmid standard와 amlplicon standard 사용에 따른 *tet* gene의 copy 값 비교 ····· 44
5. Multiplex real-time PCR ····· 48
5-1. Spiking test ····· 48
5-2 Single qPCR과 multi qPCR의 copy 값 비교 ····· 50
6. 어류 장내 Tc 내성 유전자의 정량 ····· 52
**Ⅳ. 고 찰** ····· 57
**Ⅴ. 요 약** ····· 69
**Ⅵ. 감사의 글** ····· 71
**Ⅶ. 참고문헌** ····· 73

Quantitation of *tet* genes in the intestinal microflora of fish

So Hye Yoon

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

## Abstract

This study was investigated the proportion of tetracycline (Tc) resistant bacteria with quantitative analysis of tetracycline resistance genes (*tet* genes) in fish intestines. Proportion of antibiotic resistance bacteria of ornamental fishes in Korea (20~30%) appeared to be the lowest level compared to that of other Asian countries (60~65%). In case of cultured marine fish, the Tc resistant proportion was very low (10~20%). And the determination and distribution of *tet* genes in Tc resistant bacteria using conventional multiplex PCR (multi PCR) showed diverse *tet* genes in ornamental fish but *tet*(B) showed mainly in marine fishes.

We reported here the development, validation and use of multiplex real-time PCR (multi qPCR) for both detection and quantification of various efflux *tet* genes,: *tet*(A), *tet*(B), *tet*(C), *tet*(D), *tet*(E) and *tet*(G), common in microflora of aquatic environment by high use of tetracycline. For multi qPCR of this study, two sets of DNA standards were prepared; purified 6 different plasmids contain each specific *tet* gene and sample-derived *tet* gene amplicons purified from multiPCR products using template DNA extracted

from microflora in samples. The multi qPCR assays with two different standards, plasmid and amplicon, were significantly correlated in quantification *tet* genes in fish stool DNA. And we sured that qPCR assay used amplicon standard-degenerated primer had no difference with qPCR assay used plasmid standard-specific primer in *tet* gene copy number. The abundances of two *tet* gene groups (*tet*(A/C/G), *tet*(B/D/E)) parted according to their homologies were determined by comparing with sum of the *tet* genes quantified with degenerated primer sets separately. In imported ornamental fish, abundance of *tet*(A/C/G) was higher than *tet*(B/D/E) and it was opposed in domestic ornamental fish. In marine fish, *tet*(B/D/E) was higher than the other group, constantly, independent of fish species. We also examined the relationship between the frequency of Tc resistance colonies on the conventional agar plate and abundances analyzed by qPCR. These two assays for *tet* gene load in Tc resistant bacteria also significantly correlated each other, and evidenced the potential of qPCR for determination of the load of Tc resistant bacteria with involved *tet* gene in the microflora in aquatic environment.

# Ⅰ. 서 론

어류에서 발생하는 세균성 질병의 치료를 위하여 많은 양의 항생제가 사용되어지고 있으며, 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. 기존에 발표된 보고에서는, Bell *et al.* (1988)과 Smith *et al.* (1994)은 양식장에서 사용하는 항생제에 대한 다제 내성균의 출현에 대하여 언급하였고, Stamm *et al.* (1989)은 항생제에 노출되는 시간이 길수록 각종 질병 원인 균의 Minimum Inhibition Concentration (MIC) 값이 증가한다고 하였다. 더구나 사람에게 병원성이 있는 *Vibrio parahaemolyticus* 등에서도 새로운 내성 유전자의 출현이 보고되고 있으며 (Twiddy *et al.*, 1994), 이는 수산물을 섭취하는 사람에게 까지 위협이 되고 있다. 항균성 약제에 의한 질병 예방 및 치료는 일시적인 효과는 있으나 근본적이고 종합적인 질병 방지책으로는 매우 미흡하여, 무분별한 약제의 오용 및 남용은 추후 더욱 강력한 항생제를 필요로 하게 되고 결과적으로는 내성균의 만연으로 인하여 질병의 확산이 발생할 수도 있다.

Tetracycline (Tc)은 광역성 항생물질로서 많은 그람 양성 및 음성 세균, *Rickettsia, Mycoplasma* 및 *Chlamydia* 등에 효과적으로 작용하여 어류 양식장에서 질병을 치료하고 예방하기 위해 광범위하게 이용되어져 왔다. Tc계 약물의 작용 기전으로는 세균 내에서 30S ribosome에 결합함으로써 aminoacyl tRNA가 50S ribosome 내 acceptor site와 결합하는

것을 봉쇄하여 단백 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 단백에 의해 일어나는 Tc의 energy-dependent efflux, 둘째 용해성 단백에 의한 ribosomal protection, 마지막으로 효소에 의한 Tc의 불활성화에 의해 일어나는 세 가지로 분류 된다 (Levy, 1992; Taylor&Chau, 1996; Chopra&Roberts, 2001). 내성 기작의 특성에 따라 Tc 내성 유전자도 그 종류를 달리하는데 efflux 내성 기작을 가지는 *tet* gene으로 *tet*(A), (B), (C), (D), (E), (G), (H), (I), (J), (K), (L), (Y), (V), (Z), (30) 그리고 (31) 등이 있으며, 현재 *tet*(33), (35), (38), (39) 등 총 23개의 내성 유전자가 같은 기작을 가진 것으로 밝혀졌다. Ribosomal protection의 경우는 *tet*(M), (O), (S), (W), (Q), (T), (32) 그리고 (36) 등 11 종류가 있고 enzymatic은 *tet*(X)가 있는 것으로 알려져 Unknown *tet* gene 인 *tet*(U)까지 포함하면 총 38가지의 Tc 내성 유전자가 존재하는 것으로 밝혀졌다 (Roberts, 2005). 각종 Tc 저항성 세균의 *tet* gene 종류는 세균에 따라 다소 차이가 있지만 (Roberts, 1989; Roberts *et al.*, 1990), 대부분의 gram 음성 세균에는 *tet*(A), *tet*(B), *tet*(C), *tet*(D), *tet*(E) 및 *tet*(G)의 6종이 major type의 내성유전자로 분포한다는 것이 보고된 바 있다 (Chopra & Roberts, 2001). *tet* gene 검출에 관한 여러 연구에서는 *tet* probes를 제작하여 hybridization으로 내성 유전자의 종류를 확인하는 방법이 보고되었지만 (Depaola *et al.*, 1988; Marshall *et al.*, 1983; Lee *et al.*, 1993), 이러한 방법은 실험 과정이 복잡하며 시간이 많이 소비된다는 단점이 있다. 현재는 polymerase chain reaction (PCR) 기법이 일반적으로 널리 사용되

어 유전자 검출이 보다 간편하며 신속하게 되었을 뿐만 아니라 정량적 분석까지 가능한 quantitative real-time PCR (qPCR) 기법이 도입되어 일반화되고 있는 실정이다.

qPCR은 실시간으로 PCR 증폭산물의 생성과정을 모니터링하여 target DNA의 양을 분석하는 장비로써 PCR 증폭 산물의 확인을 위한 전기영동이 필요 없으며, 증폭이 지수 함수적으로 일어나는 영역에서 증폭 산물량을 비교하여 보다 정확한 정량이 가능한 신속성과 정량성이 뛰어난 방법이며 (Heid *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2001), 현재 환경 속에 내재하는 여러 가지 미생물을 검출하고 정량하는 분자 생물학적 진단 방법으로 사용되고 있다 (Bach *et al.*, 2002; Stubner *et al.*, 2002). qPCR은 bio-sample 간에서 나타날 수 있는 항생제 내성균의 부하(load) 차이를 비교 분석 할 수 있고 그 결과 또한 보다 정밀하고 객관적이며 직접 내성 유전자까지 검출 할 수 있다. 특히 총 미생물 군 혼합물에서의 양적 분석은 non-culturable bacteria까지 정량 할 수 있어 single bacterial colony를 사용 한 classical method에 비해 빠르고 정확하다.

동물, 축산물 및 환경유래 항생제 내성 원인균과 인체임상 내성 균주에 관한 qPCR법을 이용한 연구는 많이 보고되어 왔다 (Peak *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2004). 이러한 연구는 내성균에 대한 종류, 빈도, 분포뿐만 아니라 내성 결정 유전자의 유전적인 변화도 함께 분석하여 향후 어떠한 내성균 발생이 나타날 것인지, 새로운 내성균의 유입은 없는지, 그리고 내성균의 진화는 어떻게 이루어지고 있는지에 대한 유전적인 정확한 분석이 이루어지고 있다. 하지만 수산생물에 대한 이러한 연구는 큰 관심을 끌지 못하고, 다만 내성균의 비율 조사에서 그 수치가 높게 나타나므로 수산생물에서 나타나는 내성 유전자의 포괄적이고 가상적인 내재적

위험에 대한 경고만 이루어지고 있다. 특히 무분별한 항생제의 사용에서 예외적인 부분으로 인식되고 있는 관상어에서 어떠한 종류의 내성 유전자가 변화해 가고 어느 정도의 위험성을 가지고 있는지에 대한 정확한 분석이 우리나라에서는 전혀 이루어지지 않고 있다. 또한 우리나라로 수입되는 관상어에는 어류의 폐사 및 여러 병원성 미생물에 의한 질병을 줄이기 위해 여러 항생제 및 화학요법제를 사용하는데 그로 인해 항생제에 대한 내성균이 발생 할 수 있으며, 나라간 교역으로 항생제 내성균이 다른 환경으로의 이동과 다재 내성균의 출현 및 어류에서 사람에게로의 내성 유전자 전이 등이 나타날 수 있다. 하지만 외국으로부터의 이식용 관상어에 있어서도 현재 우리나라의 수산업법 및 수산물품질관리법에 관상용 어류에 대한 검역 근거가 없고, 통합공고에도 자가 관상용으로 어류를 수입하는 경우 검역을 제외하도록 규정하고 있다. 그러므로 이러한 제도적인 허점들은 관상어로부터 많은 전염성 위험이 야기 될 수 있으며 또한 그 위험성은 곧바로 양식 현장의 실질적인 문제점으로 대두 되게 되어 있다. 따라서 관상어 교역에 대한 정확한 실태 조사가 이루어 지지 않아 보다 실질적인 조사와 관리가 필요하다.

따라서 본 연구에 있어서는 수입된 담수 관상어와 국내산 담수 관상어 및 해산어 장내 세균에서 존재하는 Tc 항생제에 대한 내성 세균의 비율 및 내성 유전자 분포를 조사하고자 하였다. 또한 내성 비율에 따른 내성 유전자 부하 량의 변화분석도 함께 분석하였다. 본 연구에서는 gram 음성균에 주요하게 검출되는 *tet*(A), *tet*(B), *tet*(C), *tet*(D), *tet*(E) 및 *tet*(G)을 대상으로 하여 어류 장내 Tc 내성균이 가지는 내성 유전자의 총량을 qPCR을 이용하여 정량 하고 어종별, 국가별에 따른 어류 장내 Tc 내성균의 특성을 알아보고자 하였다.

# Ⅱ. 재료 및 방법

## 1. 어류 장내 세균

### 1-1. 어류 채집

수입산 관상어를 샘플링 하기 위해 2006년 11월에서 2007년 9월에 이르기까지 공항을 통하여 수입된 관상어를 펄 구라미 종에 대해 싱가포르에서 9차례, 중국과 태국에서 각각 3차례에 걸쳐 채집하였고, 국내산 관상어는 우리나라 경기도에서 양식하는 펄 구라미 종을 3차례 샘플링 하였다. 국내산 해산어의 경우는 2006년 12월에서 2007년 9월까지 양식된 해수 양식 어류 Rock bream (*Oplegnathus fasciatus*)에 대하여 4차례, Red sea bream (*Pagrus major*)에 대하여 3차례, Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*)를 2차례 그리고 Sea bream (*Acanthopagrus schlegelii*)에 대하여 3차례 샘플링 하였다 (Table 1).

Table1. Tested ornamental fishes and marine cultured fishes in this experiment.

| | Country | Names of fishes | Body weight (g) |
|---|---|---|---|
| Marine Cultured fishes | Korea | Rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) | 30 ± 20 |
| | | Red sea bream (*Pagrus major*) | 40 ± 20 |
| | | Flounder (*Paralichthys olivaceus*) | 50 ± 20 |
| | | Black sea bream (*Acanthopagrus schlegelii*) | 40 ± 10 |
| Ornamental fishes | Korea | Pearl gourami (*Trichogaster leeri*) | 5 ± 2 |
| | Singapore | Pearl gourami (*Trichogaster leeri*) | |
| | China | Pearl gourami (*Trichogaster leeri*) | |
| | Thailand | Blue gourami (*Trichogaster trichopterus sumatranus*) | |

## 1-2. 장내 세균 분석

샘플링한 어류의 어체를 해부하여 중장을 분리한 후 무균적으로 장내 stool을 모으고, 그 중 0.1g 을 1X PBS 에 현탁하여 10-fold씩 희석하여 각 단계의 희석 액을 0.45 ㎛ (pore size) membrane filter (ADVANTEC, Japan)에 통과시켜 고정하였다. Filter에 걸린 세균을 1% NaCl 첨가 TSA (Tryptic soy agar, Difco, USA) 배지와 tetracycline (Tc 16 ㎍/㎖)이 첨가된 TSA배지의 표면에 부착되도록 하였다. 또한 다양한 장내 세균과 Tc 내성균에 대하여 각각의 선택배지에 따른 특징적인 집락의 색을 정의하여 균을 분리·동정하였다. Lactose의 유무에 따라 붉은 색과 상아색의 집락을 나타내는 *Enterobacteriaceae* 선별 배지인 CC (Chromocult agar MERCK, Germany), 각각 노란색과 자주색의 집락을 나타내는 *Aeromonas* spp.와 *Pseudomonas* spp. 선별 배지인 GSP (MERCK, Germany) 그리고 노란색과 초록색 colony를 나타내는 *Vibrio* spp. 선별 배지인 TCBS (Difco, USA) agar와 각각의 Tc 첨가 배지에도 부착하였다. 이러한 agar plate를 25℃에서 18~24시간 배양한 후 각각의 plate에서 자란 colony수를 확인하여 내성 비율을 백분율로 계산하였다. Tc 16 ㎍/㎖ 이 첨가된 배지에서 자란 colony를 일부 취하여 순수 분리한 후 PCR 방법으로 분석하였다. 또한 어류 장내 정상 세균총의 동정을 위하여 위의 3가지 선택 배지 외에도 필요에 따라 API 20E test (Biomerieux, France)를 통하여 일부 균을 동정하였다.

## 2. Conventional multiplex PCR amplification

### 2-1. Primer

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

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

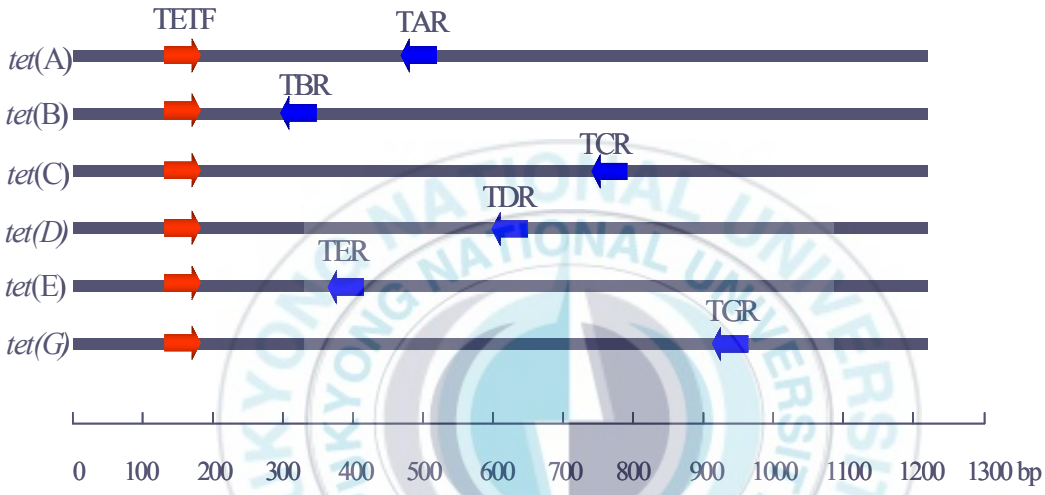


Fig 1. Illustrated positions of primers used for multi PCR of *tet* genes.
( ➡ : sense primer, ⬅ : antisense primers)

Table 2. Expected sizes of various *tet* genes by multi PCR

| *tet* genes | Oligomers name | Primer sequence (5' to 3') | Expected size |
|---|---|---|---|
| | TETF | GCGCTNTATGCGTTGATGCA | |
| *tet*(A) | TAR | ACAGCCCGTCAGGAAATT | 387 bp |
| *tet*(B) | TBR | TGAAAGCAAACGGCCTAA | 171 bp |
| *tet*(C) | TCR | CGTGCAAGATTCCGAATA | 631 bp |
| *tet*(D) | TDR | CCAGAGGTTTAAGCAGTGT | 489 bp |
| *tet*(E) | TER | ATGTGTCCTGGATTCCT | 246 bp |
| *tet*(G) | TGR | ATGCCAACACCCCCGGCG | 803 bp |

## 2-2. Total nucleic acid 분리

The boiling method (Roberts *et al.*, 1993)을 이용하여 total nucleic acid를 분리하였다. Tc 가 첨가된 배지에서 자란 colony를 무작위로 선택하여 TSB (Tryptic soy broth, Difco, USA)에 접종한 후 25℃에서 18~24시간 배양하였다. 배양액 1㎖을 12000rpm에서 10분 동안 원심 분리 한 후 상징액을 버리고 pellet을 다시 1X PBS 1㎖에 현탁, 12000rpm에 다시 10분 원심 분리한 다음 상징액을 완전히 제거했다. Pellet을 TE 600㎕에 현탁하여 95~97℃의 물에서 10분간 heating시킨 후 상징액을 multi PCR을 위한 template로 이용하였다.

## 2-3. Multiplex PCR

Heating 하여 분리한 DNA를 template로 하여 multi PCR을 실시하였다. 10X PCR buffer 2㎕, 200μM의 각각의 dNTP, 2μM의 sense primer와 1μM의 각각의 antisense primer, Taq DNA polymerase (Taq DNA polymerase, Cosmo, Korea) 및 template 1㎕를 첨가한 후 distilled water로 최종액의 volume이 20㎕가 되도록 했다. PCR 혼합물은 Perkin-Elmer 2400 thermal cycler (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA)를 사용하여, 94℃에서 3분간 pre-denaturation 시킨 후, 94℃에서 30초 denaturation, 55℃에서 30초 annealing, 72℃에서 30초 extension의 반응을 30 cycle 수행 한 후 72℃에서 7분간 post-extension 시켰다. PCR 후 증폭 산물은 0.5×TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA)를 전기영동을 위한 완충액으로 하여, 0.5㎍/㎕ EtBr (Ethinium Bromide)이 첨가된 2% agarose gel (SeaKem® LE Agarose, CAMBREX Bio

Science Rockland, Inc, USA) 상에서 전기 영동한 후, UV 검출기 (Seoulin Scientific Co., Ltd., Korea)를 이용하여, ultraviolet상에서 검출되는 band의 길이를 관찰하여 *tet* gene의 종류를 확인하였다.

## 3. Real-time PCR의 도입

### 3-1. Primer 제작

qPCR에 사용하기 위해서 6개의 *tet* gene을 검출하기 위한 primer를 제작하였다. Sense primer는 degenerated primer 인 TETF의 sequence 중에서 6개의 *tet* gene에 각각 100% 일치하는 specific primer로 제작하였으며 antisense primer는 6개의 *tet* gene이 모두 같은 size로 나타나도록 하여 multiplex real-time PCR (multi qPCR)에 사용 할 수 있도록 제작하였다. Primer의 모식도와 nucleotide 염기서열은 Fig. 2와 Table 3에 나타내었다. 또한 총 microflora를 대상으로 하는 실험에 앞서 eubacterial 16s rDNA에 대한 primer도 함께 나타내었다.

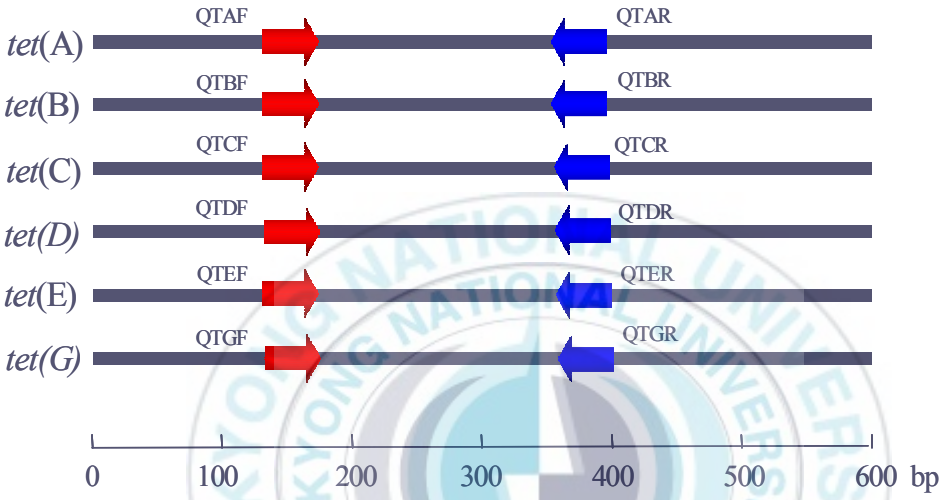


Fig. 2. Illustrated positions of primers used for the qPCR of *tet* genes.
( ➡ : sense primer, ⬅ : antisense primers)

Table 3. Oligonucleotide primers used for qPCR assays.

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

## 3-2. Stool DNA 분리

qPCR을 위한 standard 및 template로 사용하기 위해 싱가포르 담수 관상어의 장내에서 분리한 stool 중 0.1g을 stool DNA kit (AccuPrep® Stool DNA extraction kit, Bioneer, Daejeon, Korea)을 이용하여 DNA를 추출하였다. 20㎎/㎖의 proteinase K 20㎕와 lysis buffer 400㎕를 첨가하여 60℃에서 10분간 반응 한 후 12000rpm에서 5분 원심 분리 후 상징액을 새 microtube에 옮겼다. 400㎕의 binding buffer 첨가 후 다시 60℃에서 10분 반응 하고 난 뒤 isopropanol 100㎕을 넣고 구비 된 column tube에 옮겼다. Ethanol을 이용하여 2번 washing 한 후 50㎕의 EB buffer에 최종적으로 현탁 하였다.

## 3-3. Stool DNA를 이용한 primer의 특이성

분리한 stool DNA를 이용하여 conventional PCR과 multiplex PCR을 실시하였다. 먼저 conventional PCR은 specific primers를 사용하였으며 10X PCR buffer 2㎕, 200μM의 각각의 dNTP, 1μM씩의 sense primer와 antisense primer, Taq DNA polymerase (Taq DNA polymerase, Cosmo, Korea)를 첨가한 후 distilled water로 최종액의 volume이 20㎕가 되도록 했다. PCR 혼합물은 Perkin-Elmer 2400 thermal cycler (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA)를 사용하여, 94℃에서 3분간 pre-denaturation 시킨 후, 94℃에서 30초 denaturation, 55℃에서 30초 annealing, 72℃에서 30초 extension의 반응을 35 cycle 수행 한 후 72℃에서 7분간 post-extension 시켰다. Multiplex PCR은 degenerated primer를 사용하였으며 2-3의 방법을 적용하여 35 cycle 수행 하였다.

PCR 후 증폭 산물은 0.5㎍/㎕ EtBr이 첨가된 2% agarose gel 상에서 전기 영동한 후, UV 검출기를 이용하여, ultraviolet상에서 검출되는 band의 길이를 관찰하였다.

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

### 3-4-1. Plasmid standard의 제조

제작된 primer의 위치가 포함 된 6개 PCR 생성물은 PCR Purification kit (Labopass$^{TM}$)를 통하여 정제 한 후 새 microtube에 옮긴 후, salt solution 1㎕, distilled water 4㎕ 그리고 TOPO-TA cloning® vector (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) 1㎕를 첨가하여 상온에서 30분간 반응시켰다. 다음에 competent cell (E.coli DH5α-T1$^{R}$ OR) 50㎕를 첨가하여 ice 내에서 20분간 반응시키고, 42℃에서 30초간 heat-shock 시켰다. Heat-shock이 끝난 후 바로 ice에 2~3분간 두었다가, SOC 배지를 250㎕ 첨가하여, 37℃에서 90분간 진탕 배양 시켰다. 배양액은 X-Gal 40 ㎍/㎖, Ampicillin 50㎍/㎖이 첨가된 LB agar plate에 도말하여 24시간 배양하였다. White colony를 취하여 Ampicillin 50㎍/㎖이 첨가된 LB broth에 접종한 후 24시간 배양 한 후. Gene-all$^{TM}$ plasmid SV mini kit (General biosystem, Korea)를 이용하여 plasmid를 분리하였다.

### 3-4-2. Amplicon standard의 제조

싱가포르 관상어의 장에서 분리한 stool DNA를 주형으로 하여 6개의 *tet* gene에 대한 specific primer를 이용하여 각각 single conventional

PCR을 실시 한 후 PCR 증폭 산물을 PCR Purification kit (Labopass$^{TM}$)를 통하여 정제 하였다.

### 3-4-3. Standard DNA의 정량

준비된 두 가지 standard인 plasmid DNA와 amplicon DNA를 Picogreen (Quant-iT$^{TM}$ Picogreen$^{®}$ dsDNA Assay kit, Invitrogen, USA)으로 정량하여 copy 값을 결정 한 후 $1 \times 10^{7}$-$1 \times 10$ copies/㎕ 값을 가지도록 10-fold 씩 단계 희석하여 qPCR 정량에 필요한 표준 검량곡선을 작성하는데 사용하였다 (Yu *et al.*, 2005).

## 3-5. Real-time PCR의 최적화

Plasmid standard와 amplicon standard를 사용하여 sense primer로써 TETF (degenerated primer)와 specific sense primer를 각각 이용하여 각기 다른 4개의 set로 qPCR을 실시하였다. 이때에 antisense primer는 모두 specific antisense primer를 사용하였다 (Table 4). qPCR을 하기 위해 10X buffer 2㎕, 200μM의 각각의 dNTP, 1μM의 각각의 primer, Hot start Taq (HS prime Taq DNA polymerase, Genet Bio, Korea) 및 template로써 추출한 stool DNA 1ng과 10-fold 씩 희석된 standard sample을 넣은 후 최종적으로 EvaGreen (Biotium, Korea) 1㎕를 첨가한 후 qPCR (Rotor-Gene 6000 series, Corbett Research, AUS)을 실시하였다. qPCR은 95℃에서 10분간 pre-denaturation 시킨 후, 95℃에서 10초 denaturation, 55℃에서 15초 annealing, 72℃에서 20초 extension의 반응을 40 cycle 수행하였다. 40 cycle이 끝난 후 72~95℃에서 1℃/sec의

속도로 Tm (melting point) 값을 측정하였다. 모든 실험은 3번 반복 실험하여 재현성을 확인 한 후 plasmid standard와 amplicon standard 그리고 degenerated primer와 specific primer 사용의 차이에 따른 각각의 $C_T$ value와 *tet* gene copy 값을 비교하여 standard DNA와 primer 차이에 따라 분석하였다.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

Table 4. Arrangement and naming of 4 standard sets used real-time PCR.

| Standard | Primer | | Name |
|---|---|---|---|
| | Sense-primer | Antisense-primer | |
| Plasmid DNA | QTAF~QTGF (specific primer) | QTAR~QTGR | Plasmid-Specific (P-S) |
| | TETF (degenerated primer) | QTAR~QTGR | Plasmid-Degenerated (P-D) |
| Amplicon DNA | QTAF~QTGF (specific primer) | QTAR~QTGR | Amplicon-Specific (A-S) |
| | TETF (degenerated primer) | QTAR~QTGR | Amplicon-Degenerated (A-D) |

## 4. 어류 장내 microflora number와 16s rDNA gene copy값과의 관계

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

먼저 *Edwardsiella tarda* (*E.tarda*) 단일 균주를 이용하여 10-fold로 단계 희석하여 TSA 배지에 smear하여 24시간 배양 후 counting 하였다. 같은 양의 세균을 High pure PCR template preparation kit (Roche, USA)를 이용하여 DNA를 분리 한 후 16s rDNA primer를 사용하여 qPCR을 실시하였다. 이때에 사용된 standard는 역시 amplicon standard를 제작하여 사용하였다. 각각의 희석 배수에 따른 counting number와 16s rDNA gene의 copy 값을 연관 지어 나타내었다.

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

## 5. Multiplex real-time PCR의 활용

### 5-1. *tet* gene의 그룹화

본 연구에서는 6개의 *tet* gene을 신속하고 정확하게 정량하기 위하여 multiplex real-time PCR (multi qPCR) 법을 적용하였다. *tet*(A)~(G)을 amino acid sequence homology에 따라 *tet*(A), *tet*(C), *tet*(G) 와 *tet*(B), *tet*(D), *tet*(E)의 두 그룹으로 나누어 실시하였다 (Allard *et al*., 1993). 6개 *tet* gene 간의 amino acid sequence homology 차이와 degenerated primer와 specific primer간의 염기서열 차이를 Table 5에 나타내었다.

Table 5. Comparison of *tet*(A) through (E) and *tet*(G) sequences.

| *tet* gene | Oligomer name | Primer sequence 5' → 3' | Homology (%) | |
|---|---|---|---|---|
| | TETF | GCGCTNTATGCGTTGATGCA | - | |
| *tet*(A) | QTAF | GCGCTGTATGCGTTGGTGCA (1)[a] | 78% identity between *tet*(A/C)<br>60% identity among *tet*(A/C/G) | Less than 50% identity between *tet*(A/C/G) and *tet*(B/D/E) |
| *tet*(C) | QTCF | GCGCTATATGCGTTGATGCA (0) | | |
| *tet*(G) | QTGF | TCGCTCTATGCATTGATGCA (2) | | |
| *tet*(B) | QTBF | GCACTTTATGCGTTAATGCA (2) | 55~60% identity among *tet*(B/D/E) | |
| *tet*(D) | QTDF | GCGCTGTATGCGGTGATGCA (1) | | |
| *tet*(E) | QTEF | GCGCTGTATGCAATGATGCA (2) | | |

[a] Number of nucleotide different with TETF (degenerated primer) sequence was considerated with the exception of N site.

.

## 5-2. Spiking test

Amplicon standard를 사용한 multi qPCR의 정밀성을 확인하고자 하였다. 싱가포르 관상어에서 분리한 stool DNA를 동일한 양으로 하여, 10-fold 로 단계 희석한 amplicon standard에 각각 첨가 하여 degenerated primer를 사용하여 qPCR을 실행하였다. qPCR의 조건은 3-5와 같으며 amplification 이 끝난 후 spike 한 standard sample에서 본래의 stool DNA의 gene copy 값을 뺀 후 그 값을 standard sample의 실제 copy 값과 상응하는 좌표를 정하여 직선을 그렸다 (Yu *et al.*, 2005). 위와 동일한 방법으로 세균의 eubacterial 16s rDNA gene을 target으로 한 primer (Table 3)을 이용하여 spike 실험을 실시하였다. 역시 16s rDNA 부분을 이용하여 amplicon standard를 만든 후 여기에 stool DNA를 spike 하였다. qPCR은 3번 반복 실험 후 재현성을 확인, 평균값과 표준 편차를 산출 하였다.

## 5-3. Single qPCR과 multi qPCR의 실시

두 그룹으로 나눈 6개의 *tet* gene 중 *tet*(A), *tet*(C), *tet*(G)를 각각 단독으로 qPCR을 실시 한 후 결정 된 3개의 *tet* gene copy 값을 산술적으로 더하였다 (Smith *et al.*, 2004). Multi qPCR은 TETF 2μM을 사용하였고, 3개의 antisense primer를 1μM씩 첨가하여 3-5의 조건으로 실시하여 3개의 *tet* gene을 산술적으로 더한 copy 값과 비교하였다. *tet*(B), *tet*(D), *tet*(E)도 위와 동일한 방법으로 실시하였고 모든 실험은 3번 반복 실험하여 재현성을 확인, 평균값과 표준 편차를 산출 하였다.

## 5-4. 장내 세균 *tet* 유전자의 정량적 분석

채집한 관상어와 해산어를 대상으로 stool DNA를 분리한 후 multi qPCR을 실시하였다. Amplicon standard – degenerated primer를 사용하였으며 multi qPCR을 수행 한 후 어종별, 국가별 그리고 어류 장내의 Tc 내성 비율에 따른 Tc 내성균의 내성 유전자를 정량 · 비교 분석하였다. qPCR은 3번 반복 실험 후 재현성을 확인, 평균값과 표준 편차를 산출 하였다.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

# Ⅲ. 결 과

## 1. 어류 장내 세균의 분포

장내 세균의 Tc 내성 비율을 알아보기에 앞서 어류의 장내 세균을 다양한 선택배지를 통해 그 비율을 알아보았다 (Fig. 3). 그 결과 수입산, 국내산 관상어 모두 계절에 관계없이 1.15 ~ 4.5 × $10^7$ colony forming units (cfu) $100mg^{-1}$ stool 정도의 장내 정상 세균 총을 가지고 있었으며 그 중에서도 GSP 배지에서 노란색, 자주색 집락을 형성하는 *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp.와 CC 배지에서 붉은색과 상아색 집락을 형성하는 *Enterobacteriaceae*, 등이 전체 세균 수에서 높은 비중을 차지하고 있었으며 TCBS에서 노란색, 초록색 집락을 형성하는 *Vibrio* spp.는 전체의 5%에도 못 미치는 낮은 비율을 보였다. 선택배지에서 추출한 몇몇 세균들을 대상으로 API 20E test를 실시한 결과, 선택 배지에서 나타나는 집락의 특징적 색을 이용하여 동정한 결과와 일치하였으며 신뢰성은 대부분 95% 이상 이었다 (Table 6). 해산어의 경우 감성돔 (1.23±0.5 × $10^7$ cfu $100mg^{-1}$ stool)을 제외한 참돔, 돌돔, 넙치에서는 4.92 ~ 5.09 × $10^6$ cfu $100mg^{-1}$ stool 정도로 관상어에 비해 약 10배 정도 낮은 세균수를 가지고 있었다. 또한 균주별 비율로 보았을 때도 *Vibrio* spp.의 비중이 50%가 넘고 상대적으로 *Pseudomonas* spp., *Enterobacteriaceae* 그리고 *Aeromonas* spp.가 낮은 비율로 나타나 관상어 장내 세균 비율과 차이를 보였다.

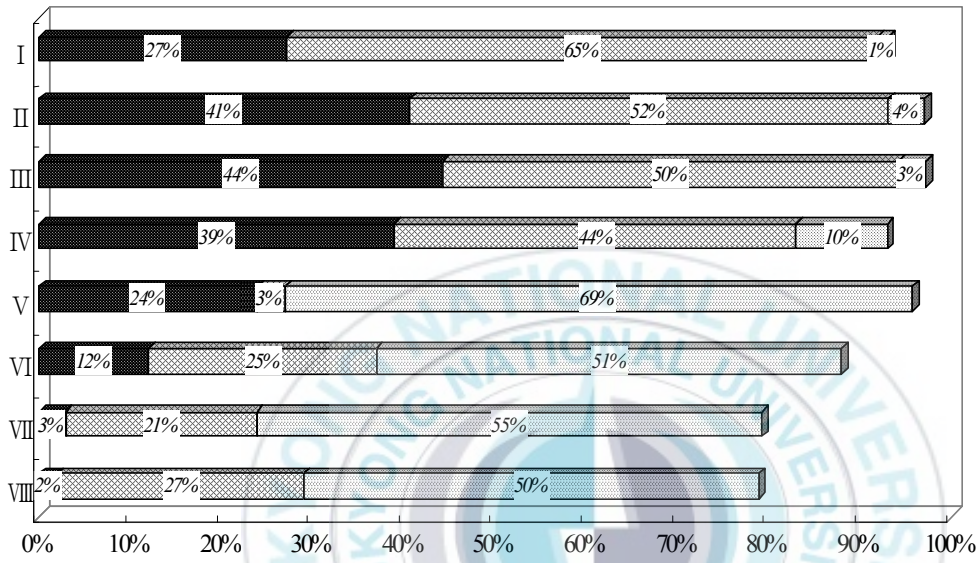


Fig. 3. Proportion of normal microflora in intestinal tract of imported and domestic fish. Pearl Gourami cultured in Korea (Ⅰ), Pearl Gourami imported from Singapore (Ⅱ), Pearl Gourami, China (Ⅲ), Pearl Gourami, Thailand (Ⅳ), Red sea bream, Korea (Ⅴ), Rock bream, Korea (Ⅵ), Flounder, Korea (Ⅶ), Black sea bream, Korea(Ⅷ) were used.
( ■ : CC/TSA ▨ : GSP/TSA □ : TCBS/TSA )

Table 6. Percentage of intestinal bacteria species in ornamental fish imported Singapore[a]

| Species[b] | % bacteria isolates from intestine |
|---|---|
| *Citrobacter freundii* | 42.8 |
| *Aeromonas hydrophyla* | 26 |
| *Vibrio* spp. | 12 |
| *Klebsiella pneumoniae* | 9 |
| *Salmonella* spp. | 4.7 |
| *Pseudomonas* spp. | 2.3 |
| Unknown | 7 |

[a] 44 intestinal bacteria isolates were tested.
[b] Identified by API 20E system.

## 2. 어류 장내 세균의 Tc 내성 비율

싱가포르, 중국 그리고 태국에서 수입된 관상어와 국내산 관상어, 양식 해산어의 장내 세균에서 나타나는 Tc 내성 비율은 Fig. 4에 나타냈다. 우리나라에서 양식된 담수 관상어 장내 세균에서 약 20~30%의 내성 비율이 나타났으며 이는 싱가포르 60%, 중국 65%, 태국 58%를 나타낸 다른 아시아 국가의 수입된 관상어 장내 세균의 내성 비율에 비해 낮은 수치이다. 균주별 Tc 내성 비율도 역시 거의 대부분의 균주가 모두 수입산 관상어에서 50% 이상의 높은 Tc 내성을 가지고 있었으며 특히 Tc가 첨가 된 CC 배지에서는 *Enterobacteriaceae*의 Tc 내성 비율이 80%에 육박하였다.

해산어의 경우 장내 세균의 Tc 내성 비율은 20~27%로 비교적 낮았지만 TCBS 배지에서 자라는 *Vibrio* spp.의 Tc 내성 비율은 실험에 쓰인 4종의 해산어 중 특히 돌돔과 감성돔이 50~70% 가 나타난 것을 포함 하여 모두 30%가 넘었다.

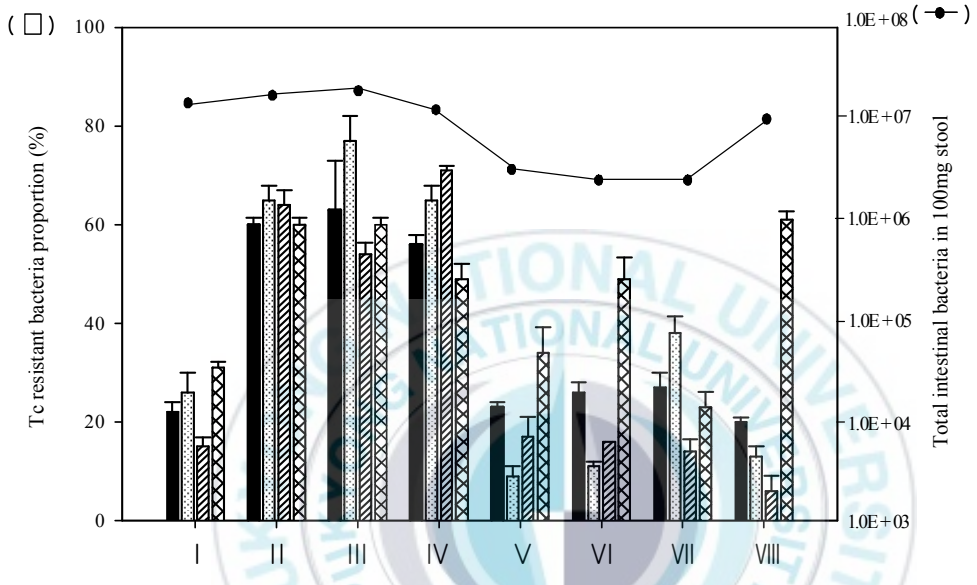


Fig. 4. Proportion of Tc resistant bacteria in the intestinal flora of fish on on TSA media and various selective media. Pearl Gourami cultured in Korea ( Ⅰ ), Pearl Gourami imported from Singapore( Ⅱ ), Pearl Gourami, China (Ⅲ), Pearl Gourami, Thailand (Ⅳ), Rock bream, Korea ( Ⅴ ), Red sea bream, Korea (Ⅵ), Flounder, Korea (Ⅶ), Black sea bream, Korea(Ⅷ) were used. ( ■ :TSA(Tc) / TSA ▨ : CC(Tc) / CC ▨ : GSP(Tc) / GSP ▨ : TCBS(Tc) / TCBS )

## 3. Tetracycline 내성 유전자 분포 조사

수입된 담수 관상어와 국내산 관상어, 해산어를 대상으로 Tc 내성 유전자 분석을 실시하였다. Gram 음성 세균에서 많이 나타난다는 *tet*(A), *tet*(B), *tet*(C), *tet*(D), *tet*(E) 그리고 *tet*(G)에 대해서 multi PCR법을 통해 검출하고자 하였고 다양한 크기의 PCR 산물을 전기영동을 통해 확인할 수 있었다 (Fig. 5). 싱가포르 산 펄 구라미에서는 *tet*(A)가 32.5%, *tet*(D)가 5%, *tet*(E)가 2.5% 였고 *tet*(B), *tet*(C), *tet*(G)는 단독으로 확인되지 않았다. 우리나라에서는 *tet*(A)가 5%, *tet*(D)가 25%, *tet*(E)가 20%, 그리고 역시 *tet*(B), *tet*(C), *tet*(G)는 단독으로 존재하지 않았으며 이는 싱가포르에서 수입된 펄 구라미와 유사한 경향을 보였다. 중국에서는 *tet*(A)가 50%, *tet*(B)~*tet*(D)가 3.3% 씩, *tet*(E)가 6.6%로 싱가포르와 우리나라 관상어에 비해 다양한 내성 유전자가 단독으로 확인되었으며 *tet*(G)는 검출되지 않았다. 태국산 관상어의 경우 *tet*(A)가 가장 많이 단독으로 확인되었으며 *tet*(B)와 *tet*(D)가 각각 5%, 1%로 검출되었다 (Table 7.). 두 가지 이상 내성 유전자를 포함하는 비율은 싱가포르 산 관상어가 가장 높았고, 그 종류도 다양하게 관찰 되었으며 전체 Tc 내성 균주 중 5%는 *tet*(A), *tet*(C), *tet*(E), *tet*(G), 4개의 내성 유전자를 동시에 가지고 있는 multi-*tet* gene 으로 확인되었다. 중국산, 태국산 관상어의 경우 2개의 내성 유전자를 가지는 균주가 각각 26%, 55% 정도였고, 3개 이상의 내성 유전자를 가지는 균주는 중국산은 확인 되지 않았으며 태국산은 전체의 2%였다. 국내산 관상어의 경우 multi-*tet* gene의 비율이 전체의 40% 정도였으며 3개 이상의 유전자를 가지는 균주는 검출 되지 않아 중국과 유사한 결과를 보였다.

해산어의 경우 *tet*(B)가 단독으로 가장 많이 검출 되었으며, 3개의 Tc 내성 유전자를 가지는 균주가 전체의 20% 정도인 것으로 확인되었는데 모두 *tet*(A)와 *tet*(B)을 포함하고 있었다 (Table 8, 9).

이러한 결과로부터 각 *tet* 유전자의 출현 빈도를 Table 10와 11에 나타내었다. 관상어의 경우 *tet*(A), *tet*(D), *tet*(E), *tet*(G)가 각 나라별로 가장 빈번하게 확인되었으며, 싱가포르 산에서 가장 다양한 종류의 내성 유전자가 나타났다. 해산어의 경우 6개의 *tet* gene 중 *tet*(B)의 비중(90%)이 유의적으로 가장 높았다.

싱가포르에서 수입한 펄 구라미를 대상으로 다양한 Tc 내성 균주가 가지는 *tet* gene에 대하여 알아보았다. 선택 배지로부터 얻은 Tc 내성 균주에 대하여 multi PCR 을 실시한 결과 *Enterobacteriaceae*는 latose의 유무에 관계없이 *tet*(A)와 *tet*(D)가, *Vibrio* spp.의 경우 *tet*(B)와 *tet*(D)가 주요 내성 유전자로 확인 되었고, GSP agar에서 노란색 집락을 나타내는 *Aeromonas* spp.는 *tet*(A),(B),(D)가 주요 내성 유전자로 나타났으며 자주색 집락을 나타내는 *Pseudomonas* spp. 경우 *tet*(A),(D),(G)의 비율이 높았다 (Table 12~15).

Fig. 5. Agarose gel electrophoresis of amplicons generated by the multiplex PCR for efflux *tet* genes. Lane 1~23 : Tc resistant bacteria isolated TSA containing Tc (16㎍/ml) randomly, M : 100bp DNA ladder.

Table 7. Proportion of Tc resistant bacterial isolates identified as a single *tet* gene.

| | Pearl Gourami, Korea (40)[a] | Pearl Gourami, Singapore (80) | Pearl Gourami, China (30) | Blue Gourami, Thailand (40) | Marine Fish, Korea (60) |
|---|---|---|---|---|---|
| *tet*(A) | 5 | 32.5 | 50 | 30 | 0 |
| *tet*(B) | 0 | 0 | 3.3 | 12.5 | 25 |
| *tet*(C) | 0 | 0 | 3.3 | 0 | 0 |
| *tet*(D) | 25 | 5 | 3.3 | 2.5 | 5 |
| *tet*(E) | 20 | 2.5 | 6.6 | 0 | 0 |
| *tet*(G) | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 |

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

Table 8. Proportion of Tc resistant bacterial isolates identified as dual *tet* genes.

| | Pearl Gourami, Korea (40)[a] | Pearl Gourami, Singapore (80) | Pearl Gourami, China (30) | Blue Gourami Thailand (40) | Marine Fish, Korea (60) |
|---|---|---|---|---|---|
| *tet*(A), *tet*(B) | 5 | 2.5 | 0 | 27.5 | 5 |
| *tet*(A), *tet*(C) | 0 | 10 | 0 | 5 | 0 |
| *tet*(A), *tet*(D) | 15 | 0 | 0 | 5 | 0 |
| *tet*(A), *tet*(E) | 0 | 12.5 | 0 | 2.5 | 0 |
| *tet*(A), *tet*(G) | 10 | 2.5 | 6.6 | 0 | 0 |
| *tet*(B), *tet*(C) | 0 | 0 | 0 | 5 | 5 |
| *tet*(B), *tet*(D) | 10 | 0 | 6.6 | 0 | 10 |
| *tet*(B), *tet*(E) | 0 | 0 | 0 | 0 | 40 |
| *tet*(B), *tet*(G) | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 |
| *tet*(C), *tet*(D) | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 |
| *tet*(D), *tet*(E) | 0 | 12.5 | 6.6 | 0 | 0 |
| *tet*(D), *tet*(G) | 0 | 0 | 6.6 | 0 | 0 |

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

Table 9. Proportion of Tc resistant bacteria isolates identified more than three *tet* genes.

| | Pearl Gourami, Korea (40)[a] | Pearl Gourami, Singapore (80) | Pearl Gourami, China (30) | Blue Gourami, Thailand (40) | Marine Fish, Korea (60) |
|---|---|---|---|---|---|
| *tet*(A), *tet*(B), *tet*(C) | 0 | 2.5 | 0 | 2.5 | 0 |
| *tet*(A), *tet*(B), *tet*(D) | 0 | 0 | 0 | 2.5 | 0 |
| *tet*(A), *tet*(B), *tet*(E) | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 |
| *tet*(A), *tet*(B), *tet*(G) | 0 | 2.5 | 0 | 0 | 15 |
| *tet*(A), *tet*(C), *tet*(E) | 0 | 2.5 | 0 | 0 | 0 |
| *tet*(A), *tet*(C), *tet*(G) | 0 | 2.5 | 0 | 0 | 0 |
| *tet*(A), *tet*(D), *tet*(E) | 0 | 2.5 | 0 | 0 | 0 |
| *tet*(A), *tet*(C), *tet*(E), *tet*(G) | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 |

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

Table 10. Distribution of Tc resistant genes among bacteria isolates from the imported fresh water ornamental fishes, the domestic fresh water and marine fish.

| | Pearl Gourami, Korea (40)[a] | Pearl Gourami, Singapore (80) | Pearl Gourami, China (30) | Blue Gourami Thailand (40) | Marine Fish, Korea (60) |
|---|---|---|---|---|---|
| *tet*(A) | 40 | 65 | 53.3 | 75 | 25 |
| *tet*(B) | 15 | 7.5 | 10 | 50 | 95 |
| *tet*(C) | 0 | 20 | 0 | 17.5 | 5 |
| *tet*(D) | 45 | 18.7 | 23.3 | 15 | 15 |
| *tet*(E) | 10 | 23 | 10 | 2.5 | 25 |
| *tet*(G) | 20 | 12.5 | 13.3 | 0 | 25 |
| ND | 0 | 2.5 | 6.6 | 0 | 0 |

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

Table 11. Comparisom of multi-*tet* genes in tetracycline resistant bacteria from different fishes (%).

| Country | Fish | Number of genes 2, 3, 4 | | | Single genes | Multi genes | Not detected |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Two genes | Three genes | Four genes | | | |
| Korea | Marine fish (60)[a] | 50 | 20 | 0 | 30 | 70 | 0 |
| Korea | Pearl Gourami (40) | 40 | 0 | 0 | 60 | 40 | 0 |
| Singapore | Pearl Gourami (80) | 40 | 12.5 | 5 | 40 | 57.5 | 2.5 |
| China | Pearl Gourami (30) | 26.6 | 0 | 0 | 66.6 | 26.6 | 6.6 |
| Thailand | Pearl Gourami (40) | 50 | 5 | 0 | 45 | 55 | 0 |

[a] Number of isolates analyzed.

Table 12. Proportion of Tc resistant bacterial isolates identified as a single *tet* gene from the Singapore fresh water ornamental fishes.

| | *Enterobacteriaceae* latctose - (21)[a] | *Enterobacteriaceae* latctose + (29) | *Pseudomonas* spp. (25) | *Aeromonas* spp. (17) | *Vibrio* spp. (29) |
|---|---|---|---|---|---|
| *tet*(A) | 71 | 14 | 4 | 6 | 0 |
| *tet*(B) | 0 | 0 | 0 | 0 | 14 |
| *tet*(C) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *tet*(D) | 0 | 21 | 0 | 0 | 52 |
| *tet*(E) | 5 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| *tet*(G) | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 |

[a] Number of tested isolates ; Tc resistant isolates were isolated from the imported fresh water ornamental fishes on each media with Tc 16㎍/ml.

Table 13. Proportion of Tc resistant bacterial isolates identified as dual *tet* gene from the Singapore fresh water ornamental fishes.

| | *Enterobacteriaceae* latctose - (21)[a] | *Enterobacteriaceae* latctose + (29) | *Pseudomonas* spp. (25) | *Aeromonas* spp. (17) | *Vibrio* spp. (29) |
|---|---|---|---|---|---|
| *tet*(A), *tet*(B) | 0 | 0 | 0 | 6 | 0 |
| *tet*(A), *tet*(C) | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 |
| *tet*(A), *tet*(D) | 14 | 41 | 12 | 12 | 17 |
| *tet*(A), *tet*(E) | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *tet*(A), *tet*(G) | 0 | 3 | 20 | 6 | 0 |
| *tet*(B), *tet*(D) | 0 | 3 | 0 | 18 | 17 |
| *tet*(B), *tet*(G) | 0 | 0 | 0 | 6 | 0 |
| *tet*(D), *tet*(E) | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| *tet*(D), *tet*(G) | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 |
| *tet*(E), *tet*(G) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

[a] Number of tested isolates ; Tc resistant isolates were isolated from the imported fresh water ornamental fishes on each media with Tc 16㎍/ml.

Table 14. Proportion of Tc resistant bacterial isolates identified more than three *tet* genes from the Singapore fresh water ornamental fishes.

| | *Enterobacteriaceae* latctose - (21)[a] | *Enterobacteriaceae* latose + (29) | *Pseudomonas* spp. (25) | *Aeromonas* spp. (17) | *Vibrio* spp. (29) |
|---|---|---|---|---|---|
| *tet*(A), *tet*(B), *tet*(C) | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 |
| *tet*(A), *tet*(C), *tet*(D) | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 |
| tet(A), *tet*(D), *tet*(E) | 5 | 0 | 0 | 6 | 0 |
| *tet*(A), *tet*(D), *tet*(G) | 0 | 3 | 36 | 0 | 0 |
| *tet*(A), *tet*(E), *tet*(G) | 0 | 0 | 4 | 6 | 0 |
| *tet*(B), *tet*(D), *tet*(E) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *tet*(A), *tet*(C), *tet*(E), *tet*(G) | 0 | 0 | 0 | 12 | 0 |

[a] Number of tested isolates ; Tc resistant isolates were isolated from the imported fresh water ornamental fishes on each media with Tc 16㎍/ml.

Table 15. Distribution of Tc resistant genes among bacteria isolates from the Singapore fresh water ornamental fishes.

| | *Enterobacteriaceae* latctose - (21)[a] | *Enterobacteriaceae* latctose + (29) | *Pseudomonas* spp. (25) | *Aeromonas* spp. (17) | *Vibrio* spp. (29) |
|---|---|---|---|---|---|
| *tet*(A) | 90 | 62 | 92 | 53 | 17 |
| *tet*(B) | 0 | 3 | 4 | 29 | 31 |
| *tet*(C) | 0 | 0 | 16 | 12 | 0 |
| *tet*(D) | 19 | 72 | 60 | 35 | 86 |
| *tet*(E) | 14 | 7 | 4 | 23 | 0 |
| *tet*(G) | 0 | 10 | 68 | 29 | 0 |
| ND | 0 | 0 | 0 | 23 | 0 |

[a] Number of tested isolates ; Tc resistant isolates were isolated from the imported fresh water ornamental fishes on each media with Tc 16㎍/ml.

# 4. Real-time PCR assay의 확립

## 4-1. 제작된 primer의 특이성 확인

담수 관상어의 장에서 분리한 stool DNA를 이용하여 본 실험에서 사용한 primer로 PCR 한 결과를 Fig. 6에 나타내었다. Specific primers를 이용하여 PCR 하였을 때 6개의 내성 유전자 모두 똑같은 크기의 증폭산물을 보였고 비 특이적 band도 검출되지 않음으로써 qPCR을 위하여 제작된 specific primer의 특이성을 확인할 수 있었다.

Fig. 6의 lane 7번은 multi PCR에 사용 되었던 전 (2003)의 primer를 사용한 것으로써 싱가포르에서 수입된 펄 구라미의 stool 샘플 안에서 6개의 *tet* gene이 모두 검출 되었다. 이는 stool DNA와 TETF primer를 이용한 Tc 내성 유전자의 검출이 기존의 single isolate를 이용한 방법에 비해 빠르고 정확하다는 것을 보여주며 qPCR 사용에 있어서 적합함을 확인하였다.

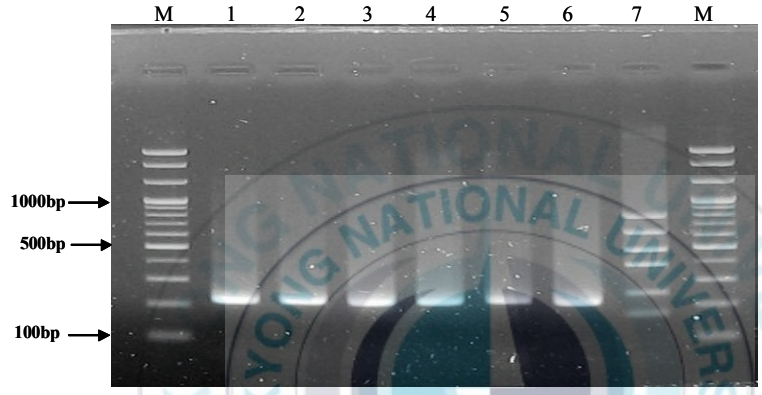


Fig. 6.Agarose gel eletrophoresis of the PCR products from stool DNA with specific and multiplex *tet* gene primers. Lane 1 ~ lane 6 : specific primer of *tet*(A)-(G) respectively, lane 7 : *tet*(A)-(G) genes with multiplex PCR primer, M : 100bp DNA ladder.

## 4-2. Plasmid standard와 amlplicon standard 사용에 따른 *tet* gene의 copy 값 비교

Amplicon standard - Degenerated primer, Amplicon standard - Specific primer, Plasimid standard - Degenerated primer 그리고 Plasmid standard - Specific primer를 이용하여 qPCR을 실시, 4가지 표준 검량 곡선을 얻었다 (Fig. 7). 그 결과, 4가지 표준 검량 곡선을 비교하여 보았을 때 standard 차이에 의한 copy 값의 차이는 나지 않았지만 specific primer와 degenerated primer의 사용에 따라 표준 곡선이 이동함을 확인할 수 있었고 결과적으로 $C_T$ value의 차이 또한 나타났다.

먼저 Plasmid standard를 사용한 실험 결과 QTBF의 $C_T$ value(17.55 ± 0.53)가 TETF의 $C_T$ value(26.48 ± 0.3)보다 9 cycle 정도 앞섰으나 *tet*(B)의 copy 값은 각각 4.82 ± 2.1 × $10^3$ copies $\mu\ell^{-1}$ 과 3.54 ± 0.8 × $10^3$ copies $\mu\ell^{-1}$로 유사한 결과를 보였다. Amplicon standard를 사용한 실험 결과 역시 degenerated TETF sense primer로 인해 specific한 QTBF sense primer 보다 약 10 cycle 가량 $C_T$ value가 높았지만 *tet*(B)의 copy 값은 각각 2.22 ± 0.3 × $10^3$ copies $\mu\ell^{-1}$과 4.22 ± 1.8 × $10^3$ copies $\mu\ell^{-1}$로 정량되었다 (Table 16).

결과적으로 $C_T$ value와 *tet*(B) copy 값을 비교 하였을 때 plasmid standard와 amplicon standard를 이용한 표준 곡선의 수평적 이동에 의해서 $C_T$ value가 각각 다르게 결정되었지만 결과적으로 계산된 *tet* gene의 copy 값은 4개의 sample이 모두 유사하게 나타났다. 즉 stool DNA를 이용한 *tet* gene을 정량 하는 연구에서 amplicon standard - Degenerated sense primer를 썼을 때에도 plasmid standard - Specific

sense primer를 사용한 결과와 비교하였을 때 정량 된 copy 값에 있어 차이가 없었다. 이에 어류 장내 세균 속 다양한 Tc 내성 유전자를 검출·정량하기 위한 multi qPCR법에서 amplicon standard – Degenerated primer의 사용이 가능함을 확인하였다.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

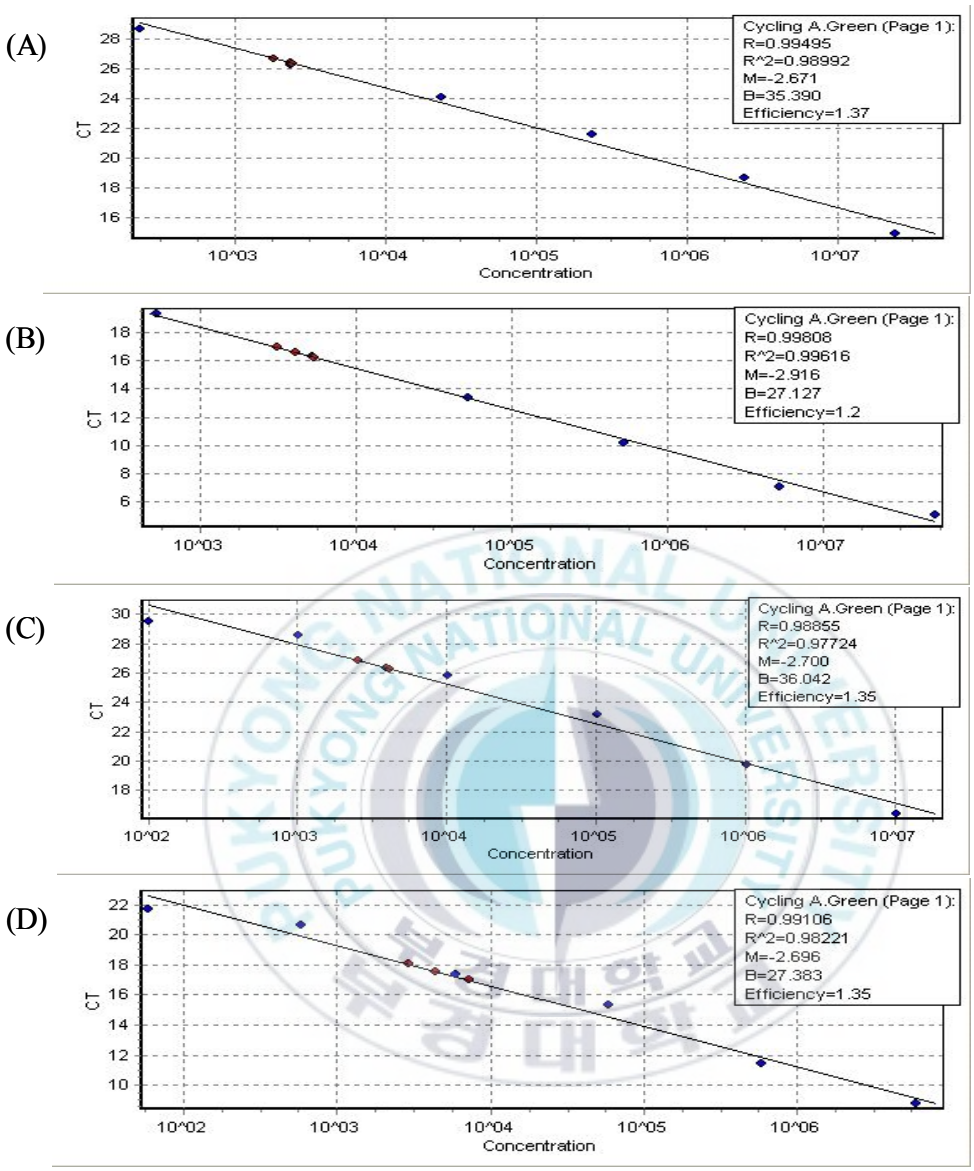


Fig. 7. Standard curve of *tet*(B) abundance with real-time assay used the different standard and primer. Stool DNA in the intestine of Pearl gourami imported from Singapore was used as template. (A) Amplicon standard-Degenerated primer, (B) Amplicon standard-Specific primer, (C) Plasmid standard-Degenerated primer (D) Plasmid standard-Specific primer

Table 16 . *tet*(B) abundance, mean ± standard deviation (copies $\mu\ell^{-1}$ ) with real-time assay used the different standard and primer. Stool DNA in the intestine of Pearl gourami imported from Singapore was used as template.

| Type of standard | Primer | $C_T$ value | Copy number (copies $\mu\ell^{-1}$ ) |
|---|---|---|---|
| Amplicon standard | Degenerated Primer (A-D) | 26.46 ± 0.18 | 2.22 ± 0.3 × $10^3$ |
| | Specific primer (A-S) | 16.58 ± 0.36 | 4.22 ± 1.8 × $10^3$ |
| Plasmid standard | Degenerated Primer (P-D) | 26.48 ± 0.3 | 3.54 ± 0.8 × $10^3$ |
| | Specific primer (P-S) | 17.55 ± 0.53 | 4.82 ± 2.1 × $10^3$ |

# 5. Multiplex real-time PCR

## 5.1 Spiking test

Multi qPCR의 정밀성은 copy 값을 알고 있는 *tet* gene template를 stool DNA에 첨가하여 정량함으로써 증명되었다. *tet*(A/C/G)의 표준 검량 곡선의 $R^2$은 0.9939였으며 이에 앞서 실험된 16s rDNA 부분을 대상으로 한 spike 실험에서도 표준 곡선의 $R^2$값이 0.9979로 높은 신뢰도를 보였다. Fig. 8의 (A)와 (B)의 그래프는 spike sample에서 본래의 stool DNA 의 copy 값을 뺀 후 그 값을 standard sample의 실제 copy 값과 상응하는 좌표를 정하여 직선을 그린 것이다. 그 결과, 2개의 직선은 거의 일치하였으며 직선의 기울기와 지수로 보아 높은 정밀성을 보였다.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY 부경대학교

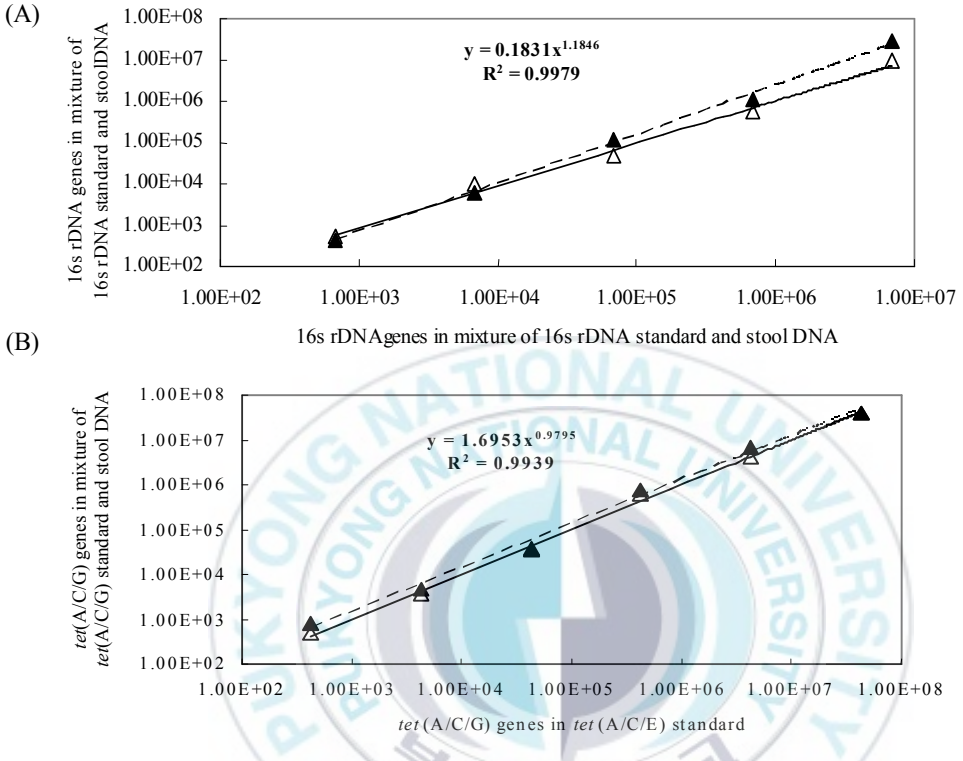


Fig. 8. Validation curves plotting actual gene copies versus quantified gene copies by real-time PCR assays. (A) 16s rDNA genes (B) *tet*(A/C/G) genes. The actual numbers of genes copies (x axis, solid lines) were plotted against the quantification values (y axis) for the genes (dashed lines).

## 5.2 Single real-time PCR과 multiplex real-time PCR의 copy 값 비교

Amplicon standard - degenerated primer를 이용한 *tet* gene copy 수 결정이 가능함을 확인 한 후 어류 장내 stool 속 *tet* gene을 보다 신속하고 정확하게 정량하기 위해 single qPCR과 multi qPCR을 비교 분석하였다. 먼저 *tet*(A), *tet*(C), *tet*(G)를 대상으로 하였을 때 3개의 *tet* gene을 specific primers로 단독으로 정량한 copy 수를 산술적으로 더한 copy 값은 $5.96 \times 10^5$ copies · $ng^{-1}$ 였고, multi qPCR은 $4.86 \times 10^5$ copies · $ng^{-1}$로 결정되었다. *tet*(B), *tet*(D), *tet*(E) 경우도 multi qPCR을 통한 Tc 내성 유전자 수가 $1.02 \times 10^5$ copies · $ng^{-1}$로 단독으로 정량된 *tet* gene을 산술적으로 더한 $1.07 \times 10^5$ copies · $ng^{-1}$에 거의 근접하게 정량 되었다 (Fig. 7). qPCR 실시 후 산출되는 Tm (melting temperature) 값에 의해서도 6개의 *tet* gene을 구별 할 수 있었다. *tet*(A)의 경우 94.5℃, *tet*(B)는 89℃, *tet*(C)는 93.5, *tet*(D)와 *tet*(G)는 91.5℃, *tet*(E)는 88.5℃로 나타났으며 multi qPCR 시 고농도의 template를 사용한 sample에서는 고유한 melting curve를 확인할 수 있었다.

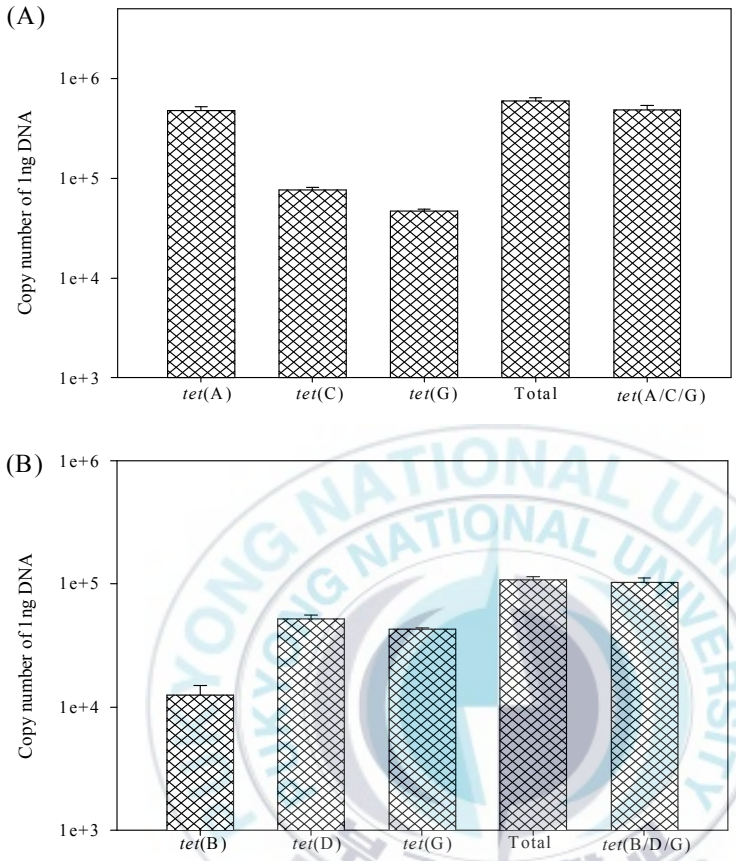


Fig. 9. *tet* gene copy numbers were determined by real-time PCR assay of stool DNAs extracted from ornamental fish imported singapore. (A) *tet*(A), *tet*(C), *tet*(G), the total of these three genes and *tet*(A/C/G). (B) *tet*(B), *tet*(D), *tet*(E), the total of these three genes and *tet*(B/D/E).

## 6. 어류 장내 Tc 내성 유전자의 정량

2006년 12월부터 2007년 9월에 걸쳐 샘플링한 수입산 관상어, 국내산 관상어와 해산어를 대상으로 multiplex real-time PCR을 실시하였다. 먼저 절대적인 *tet* gene copy number의 정량에선 수입산 관상어의 경우 싱가포르 산 관상어가 *tet*(A/C/G)가 $7.84 \times 10^5$ copies · $ng^{-1}$, *tet*(B/D/E)가 $1.48 \times 10^5$ copies · $ng^{-1}$으로 정량되었다. 중국산 관상어도 이와 마찬가지로 *tet*(A/C/G)가 $1.45 \times 10^6$ copies · $ng^{-1}$, *tet*(B/D/E)가 $4.05 \times 10^5$ copies · $ng^{-1}$의 *tet* gene copy 값을 가졌다. 태국산 관상어는 *tet*(A/C/G)와 *tet*(B/D/E)가 각각 $6.29 \times 10^5$ copies · $ng^{-1}$, $1.36 \times 10^5$ copies · $ng^{-1}$으로 결정되었다. 이에 비해 국내산 관상어는 *tet*(A/C/G)가 $3.72 \times 10^3$ copies · $ng^{-1}$, *tet*(B/D/E)가 $5.28 \times 10^5$ copies · $ng^{-1}$로써 수입산 관상어와는 반대로 *tet*(B/D/E)의 copy 값이 더 높게 나타났다 (Table 17).

이는 TSA 배지에서 무작위로 추출한 Tc 내성 균주를 이용한 일반 multi PCR의 결과와도 일치하였다. 싱가포르, 중국, 그리고 태국에서 수입한 관상어 장내 세균의 Tc 내성 균주가 가지는 내성 유전자의 비율은 *tet*(A)가 전체의 50% 이상으로 6개의 내성 유전자 중 가장 높았고 그로 인해 *tet*(A/C/G)의 비율이 높았다. 반면 국내산 관상어 장내 세균의 Tc 내성 균주가 가지는 내성 유전자는 *tet*(B/D/E)의 비율이 *tet*(A/C/G) 보다 높았다.

또한 본 연구에서는 세균의 16s rDNA gene을 이용하여 Tc 내성 유전자의 양과 상관관계를 알아보고자 하였다. 앞서, Fig. 10에서 culturable intestinal microflora와 16s rDNA gene의 copy 수는 비례하였다. 이것은

단일 균주를 대상으로 하였을 때와 (Fig. 10 (A)) 채집 어류의 총 장내 세균수를 대상으로 하였을 때 (Fig. 10 (B)) 모두 동일하게 나타났다. 이러한 결과를 바탕으로 multi qPCR을 통해 정량된 *tet*(A/C/G)와 *tet*(B/D/E)를 16s rDNA와의 상대적인 비율로 나타내었다 (Fig. 11). 그 결과 역시 수입산 관상어의 경우 *tet*(A/C/G)가 *tet*(B/D/E) 그룹에 비해 여전히 높았으며 국내산 관상어에서는 이와 반대로 나타났다. 또한 Tc 내성균을 이용한 multi PCR 시 확인 되었던 6개 *tet* gene의 비율과 비교하였을 때 일치하였다.

해산어의 경우 어종에 관계없이 *tet*(B/D/E)가 *tet*(A/C/G)에 비해 높게 검출 되었으며 특징적으로 넙치와 감성돔의 장내 세균에서 *tet*(B/D/E)의 copy 값이 유의적으로 높았다.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

Table 17 . Absolute copy numbers of *tet* genes in intestinal microflora of fish.

| Country | Fish | *tet* gene (copies·ng$^{-1}$) | | | Frequency of Tc resistant bacteria (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| | | *tet*(A/C/G) | *tet*(B/D/E) | Sum | |
| Korea | Pearl Gourami (3)[a] | 3.72E + 04[b] | 5.28E +05 | 5.65E + 05 | 22[C] |
| Singapore | Pearl Gourami (9) | 7.84E + 05 | 1.48E +05 | 8.96E + 05 | 60 |
| China | Pearl Gourami (3) | 1.45E + 06 | 4.05E +05 | 1.55E + 06 | 63 |
| Thailand | Blue Gourami (3) | 6.29E + 05 | 1.36E +05 | 7.65E + 05 | 56 |
| Korea | Rock bream (4) | 1.76E +04 | 2.34E+04 | 4.10E + 04 | 23 |
| | Red sea bream (3) | 2.02E+04 | 3.44E+04 | 5.46E + 04 | 26 |
| | Flounder (2) | 1.81E+04 | 3.67E+04 | 5.48E + 04 | 27 |
| | Black sea bream (3) | 1.63E+04 | 6.64E+05 | 8.27E + 04 | 20 |

[a] Number of tested sampling times.
[b] Mean of *tet* gene copy numbers determined using multiplex real-time PCR.
[c] Frequency of Tc resistant bacteria on TSA media contained Tc 16㎍/㎖.

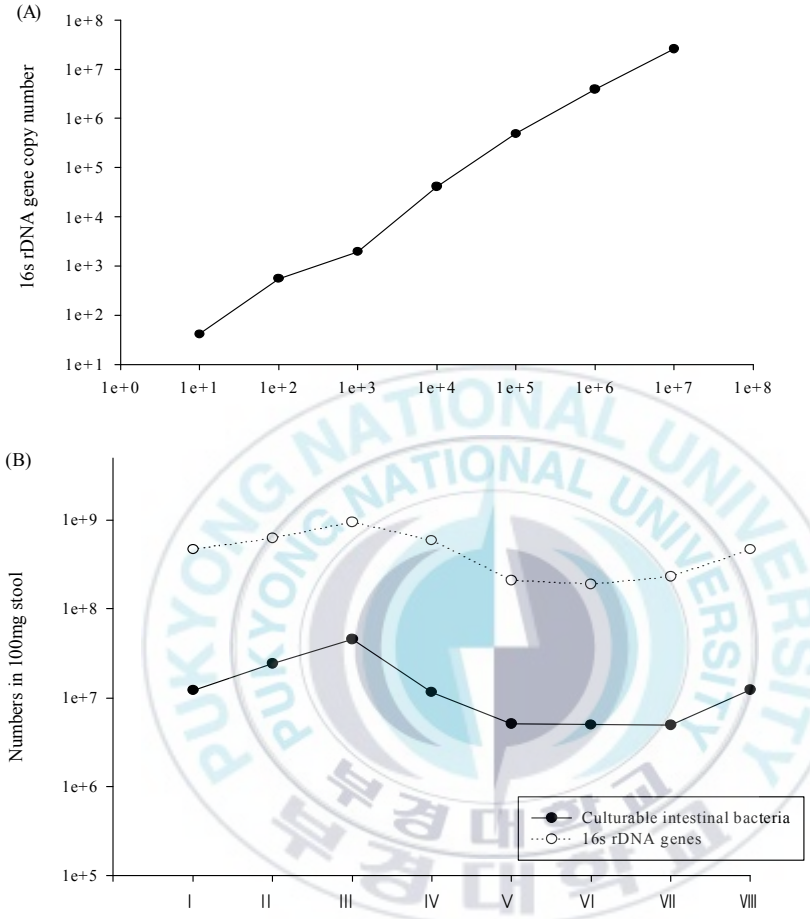


Fig. 10. Correlation between 16s rDNA gene copy number and culturable bacteria number. (A)16s rDNA gene copy number (x axis) were plotted against the quantification values (y axis) for culturable bacteria number. (B) Copy number of 16s rDNA genes and culturable intestinal microflora (y axis) were plotted against different samples (x axis), Pearl Gourami cultured in Korea (Ⅰ), Pearl Gourami imported from Singapore(Ⅱ), Pearl Gourami, China (Ⅲ), Pearl Gourami, Thailand (Ⅳ), Red sea bream, Korea (Ⅴ), Rock bream, Korea (Ⅵ), Flounder, Korea (Ⅶ), Black sea bream, Korea(Ⅷ) were used.

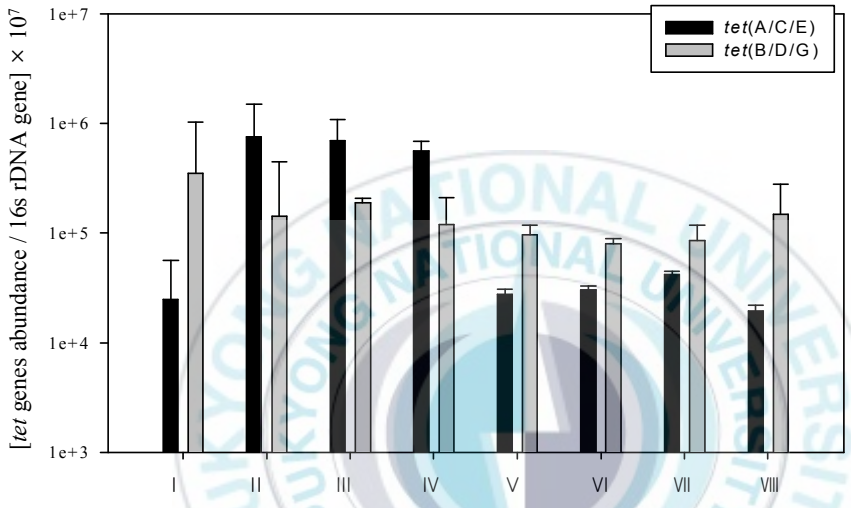


Fig. 11. *tet* gene copy number relative to 16s rDNA using multi qPCR. Pearl Gourami cultured in Korea (Ⅰ), Pearl Gourami imported from Singapore(Ⅱ), Pearl Gourami, China (Ⅲ), Pearl Gourami, Thailand (Ⅳ), Rock bream, Korea (Ⅴ), Red sea bream, Korea (Ⅵ), Flounder, Korea (Ⅶ), Black sea bream, Korea(Ⅷ) were used.

# Ⅳ. 고 찰

우리나라에서는 항생제 사용에 대한 규제 및 전문적인 교육이 미비한 실정이라 가축, 어류뿐만 아니라 기호 식품에까지 여러 종류의 항생제가 무분별하게 쓰이고 있다. 더욱이 문제 되는 것은 이러한 항생제의 오용 및 남용으로 인하여, 약제 내성 세균의 출현 및 분포의 확대, 약체의 체내 잔류 그리고 세균 간의 교차 내성의 발생 등 많은 문제점들이 발생하고 있다.

본 연구에서는 아시아에서 수입된 담수 관상어와 국내산 담수 관상어 그리고 해산어 장내 세균의 Tc 내성 비율을 알아보고, Tc 내성 유전자를 정량하였다.

Tc 내성 비율을 보기에 앞서 선택 배지를 이용하여 장내 정상 세균총의 동정에서 *Aeromonas* spp., *Enterobacteriacea*, *Pseudomonas* spp. 그리고 *Vibrio* spp. 등의 gram 음성균이 주요한 것으로 밝혀졌으며 수입산 담수 관상어의 44개의 장내 세균을 무작위로 추출하며 API 20E를 실시한 결과 *Citrobacter freundii*, *A. hydrophyla* 그리고 *Vibrio* spp. 등의 순으로 비중을 차지하였다. 따라서 선택배지의 집락의 특이적 색을 이용하여 분류, 동정한 결과와 일치하였다. 담수산 어류인 틸라피아의 경우 역시 *A.hydrophila*, *Corynebacterium urealyticum*, *Ecsherichia coli* 등의 gram 음성균이 장내 정상 세균 총에 빈번하게 존재한다고 밝혀져 있으며 (Al-Harbi *et al.*, 2004), 미국산 channel catfish의 장내 세균에서도 *Vibrionaceae*, *A. hydrophyla*, *C. freundii*가 주요 균주로 조사되었다 (DePaola *et al.*, 1995). 그러나 남극산 Antarctic fish인 *Notothenia*

*neglecta*에는 *Vibrio* spp.가 주요 장내 세균으로 알려져 있다 (Mac Cormack *et al.*, 1990). 또한 기수 지역과 해안 지역의 농어 (*Micropterus* sp.)를 대상으로 장내 세균을 조사한 결과 기수 지역에서는 *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp., *Enterobacteriacea* 그리고 *Vibrio* spp. 순으로 나타났지만 해안지역에서는 *Vibrio* spp., *Aeromonas* spp., *Flavobacteria* 그리고 *Enterobacteriacea* 순으로 장내 세균 비중이 높은 것으로 나타나 어류의 수중 환경에 따른 장내 세균 비율의 차이를 보여주었다 (MacFarlane *et al.*, 1986).

장내 세균의 Tc 내성 비율은 싱가포르, 중국산 펄 구라미에 비해 국내산 펄 구라미가 상대적으로 낮은 내성 비율을 보였다. 박 (2006)의 연구에서도 역시 중국, 싱가포르뿐만 아니라 태국, 인도네시아에서 수입된 관상어에서도 장내 세균이 높은 Tc 내성 비율 (48~88%)을 가지고 있고, 이러한 내성 비율의 차이는 항생제 저항성 유전자의 존재 유무와 장내 세균의 종류에 따라서 일정한 영향을 받는다고 하였다. 프랑스에서 조사된 논문에서는 2005년 3월에 무지개 송어 (*Oncorhynchus mykiss*) 양식장에서 분리된 *Aeromonas* spp.의 OTC 내성이 100%에 이른다고 보고하였다 (Gordon *et al.*, 2006). 본 연구에서도 담수산 관상어종을 대상으로 한 Tc 내성 비율 연구에서 *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp. 그리고 *Enterobacteriacae*의 Tc 내성 비율이 60~80%까지 나타났다. 또한 해산어의 경우 TCBS plate에서 자라는 *Vibrio* 균주가 다른 gram 음성균 보다 주요한 장내 세균으로 나타났으며 Tc 내성 비율 또한 다른 선택 배지에 비해 높게 나타났다. Kim *et al.* (2004)의 연구에서는 1999년 일본 방어 (*Seriola quinqueradiata*)의 장에서 분리된 34개의 *Vibrio/Aeromonas* 균주가 OTC에 대한 MIC 값이 62.5㎍/ml 이상인 것

으로 나타났다 (Kim *et al.*, 2004). 2005년 스페인에서 발표된 또 다른 논문에 의하면 뱀장어 (*Anguilla japonica*) 장에서 분리된 *Vibrio furnissii* 의 OTC 내성 비율은 33% 였고, TSA plate에서 조사된 전체 Tc 내성 균주의 내성 비율은 18% 정도로 나타나 (Alcaide *et al.*, 2005) 본 연구의 결과와 비슷하였다.

Bacterial isolates를 이용한 multi PCR은 어류의 장내에서 존재하는 균들을 대상으로 하여 TSA 배지와 3가지 선택배지에서 무작위로 균을 추출하여 조사하였다. 관상어의 경우 *tet*(A)-(G)까지 대상으로 한 6가지 내성 유전자가 모두 빈번하게 검출되었으며 그 중에서도 *tet*(A), *tet*(D), *tet*(E) 그리고 *tet*(G)가 주요하게 나타났다. 선택 배지에서 분리된 내성 균주로 확인해 전체 장내 세균 중 비중이 높았던 *Enterobacteriacea*, *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp. 등에서 *tet*(A)와 *tet*(D)가 주요 내성 유전자로 존재하는 것을 확인 하였다. 특히 싱가포르 관상어의 장내 세균 중 Tc 내성을 가지는 *Aeromonas* spp.를 대상으로 multi PCR 하였을 때 전체 17개 내성 균주 중 53%가 *tet*(A)를 가지는 것으로 확인되어 *Aeromonas* spp.에서는 *tet*(A)가 주요 내성 유전자로 추정된다. 또한 수입산 관상어의 경우 하나의 균주가 2개 이상의 내성 유전자를 가지는 multi-*tet* gene이 많은 것으로 밝혀졌다. 특히 싱가포르에서 수입된 펄구라미의 경우 TSA plate에서 무작위로 추출한 내성 균주 중 5%가 *tet*(A), *tet*(C), *tet*(E), *tet*(G) 4개의 *tet* gene을 가진 것으로 조사되었다. 따라서 이러한 multi-*tet* gene이 다른 세균으로 이동 될 가능성과 이동 시 recipient들에 더욱 큰 영향을 미칠 것으로 생각되어진다.

중국산과 국내산 관상어는 *tet*(A), *tet*(D), *tet*(G)가 주요 내성 유전자로 확인 되었으며 *tet*(C)는 검출되지 않았다. 또한 싱가포르 관상어에 비해

multi-*tet* gene의 비율이 높지 않았고 3개 이상의 Tc 내성 유전자를 가지는 균주는 검출 되지 않았다. 다른 연구에서는 같은 담수어인 메기(*Silurus asotus*)의 장내 세균에서 분리된 A.*hydrophila* 에는 *tet*(A)와 *tet*(E)가 빈번하게 나타났으며 (Depola *et al*., 1988), *tet*(D)는 주요 어병 세균인 *A.hydrophyla*, *E.tarda*와 *Pasturella piscicida* 등에서 주로 확인되는 내성 유전자로 알려져 있다 (Aoki and Takahashi, 1987).

해산어 장내 세균의 경우 *tet*(B)가 가장 빈번하게 검출되었고 multi-*tet* gene의 경우 *tet*(B)와 *tet*(D)가 전체 조사된 Tc 내성 균주 중 40%를 차지하였다. *tet*(B)는 gram 음성균에 많이 존재하는 것으로 알려져 있다 (Roberts *et al*., 2005). 해수 환경 저질 내 *A. hydrophyla*, *P. fluorescens* 등의 균주에서는 *tet*(E)가, lactose fermenting 균주에서는 *tet*(B)가 주요 내성 유전자로 보고되었다 (Andersen and Sandaa, 1994). 특히 노르웨이에서는 *tet*(E) 유전자가 어병 세균인 *Vibrio salmonicida*, *Vibrio anguillaruim, Aermononas salmonicida* 등에서 주로 검출된다고 하였다 (Serum *et al*. 1992). *tet*(G) 또한 *Vibrio* spp., *Pseudomonas* spp. 와 *Salmonella* spp. (31) 등의 병원성 세균에 존재하는 주요 내성 유전자로 알려져 있다 (Furushita *et al*., 2003; Miranda *et al*., 2003). 이와 관련지어 사람이나 포유류의 장내 세균 *Escherichia coli* 에는 *tet*(A), *tet*(B), *tet*(C) 그리고 *tet*(D) 등이 빈번하게 검출된다는 연구로 보아 해산어를 섭취하는 최종 소비자에게로의 내성 유전자 전이의 가능성이 의심 된다 (Bryan *et al*., 2004). Aoki *et a*l (1988)과 Furushita *et al* (2003)은 Tc 내성 유전자의 연구에서 R-plasmid의 전이 위험성에 대하여 언급한 바 있다. 현재 항생제 내성 유전자의 전환, 형질도입 또는 플라스미드에 의한 접합에 의해서 내성유전자를 전이는 인류의 보건 위생을 끊임없이 위

협하고 있다. 특이하게도 한국에서 발견된 *Vibrio* spp. 중 대부분이 Tc 내성 기작 중 ribosomal protection 기능을 가지는 *tet*(M)이 efflux pump 기작을 가지는 *tet*(B)와 함께 존재한다는 연구가 있었다 (Kim *et al.*, 2007). 본 연구에서는 수입산 관상어 장내 세균 중 *Vibrio* spp.에서 *tet*(A), (B) 그리고 (D) 등의 내성 유전자를 확인 하였지만 반면, *tet*(M)은 함께 검출 되지 않아서 국내에 존재하는 *Vibrio* spp.와는 다른 경향을 보였다.

기존의 연구 (박, 2006) 에서는 어류 장내 세균의 Tc 내성 비율과 내성 유전자를 조사하기 위해 중장을 homogenate하여 사용하였다. 하지만 이번 연구에서는 중장에서 stool을 무균적으로 분리하여 조직 분쇄 과정 없이 qPCR을 위한 template로써 stool DNA를 추출하여 사용하였다. Stool DNA의 사용은 본 연구에서 새로이 제작된 primer와 함께 적합성을 확인하였으며 non-culturable 균주까지 정량 할 수 있어 qPCR을 통한 정량적 분석에서 효율성의 극대화를 가져왔다.

본 연구에서는 기존의 conventional PCR법과 EvaGreen 시약을 이용하여 qPCR법으로 어류 장내 세균의 Tc 내성 유전자를 정량하였다. qPCR은 형광 염색 시약을 통하여 형광 분광 광도계를 이용하여 실시간으로 PCR 증폭산물의 생성과정을 모니터링하여 target 유전자를 정량하는 방법으로써, 사용되는 형광 염색 시약에는 DNA에 Primer와 같이 상보적인 염기서열을 이용한 TaqMan, Molecular beacon 등이 있고 DNA의 이중 나선에 비특이적으로 결합하는 EvaGreen, SYBR Green 등이 있다. Maeda *et al.*(2003)의 연구에서는 동일한 유전자에 대해 이 두 가지 서로 다른 원리의 형광 염색 시약을 모두 사용한 결과 정량된 copy 값에서는 차이가 없음을 밝혔다. 이에 본 연구에서는 경제력 있고 probe 제

작의 수고를 덜 수 있는 Evagreen 형광 염색 시약을 사용하였다. 이러한 qPCR 기법을 사용하여 새롭고 신속하게 어류 생체 내 microflora에 존재하고 있는 모든 내성균이 갖고 있는 전체 유전자의 분자 생물학적인 특성과 정량적인 분석까지도 동시에 할 수 있었다. 또한 실험 균주에만 국한 되지 않고 어류 장내 세균 속 잠재적인 Tc 내성 유전자도 정량 할 수 있다. 즉 어류 장내의 모든 microflora에 적용이 가능하다. 더불어 배지를 이용하여 배양 되지 않는 non-culturable bacteria가 가지는 Tc 내성 유전자에 대한 정량이 가능하고 이러한 균주가 가지는 내성 유전자가 전체 내성균의 부하에 어느 정도의 영향을 미치는지 알 수 있다.

현재까지는 이러한 qPCR의 표준 검량 곡선을 결정하기 위해 copy 수를 알고 있는 세균이나 (Hein *et al.*, 2001) target이 되는 유전자 원형의 copy 수를 계산하여 사용하였는데 (O'Mahony *et al.*, 2004) 본 연구에서는 정량적인 multiplex PCR을 하기 위해 다음과 같은 이유로 sample derived standard 인 amplicon standard를 사용하였다 (Yu *et al.*, 2005). 첫째, plasmid standard로는 multiplex real-time PCR을 수행 할 수 없다. microflora에 존재하는 내성 균주가 가지는 내성 유전자의 종류는 다양하다. 또한 이러한 다양한 내성 유전자가 존재하는 비율은 각각의 환경에 따라 다를 것이다. 이처럼 어류 장내 속 존재하는 Tc 내성 유전자의 비율을 알 수 없기 때문에 임의로 plasmid standard를 혼합하여 쓰게 되면 정량된 결과에 혼란을 가져 올 수 있다. 하지만 amplicon standard를 사용하게 되면 실제 어류 장내 속 Tc 내성 유전자의 비율을 그대로 적용하여 정량 할 수 있다. 둘째, 자신의 template으로부터 증폭된 amplicon standard이므로 stool DNA를 이용한 qPCR 시 inhibitor에 의한 오차가 동일하게 적용될 수 있다. 즉 multi qPCR을 환경 또는 현장

의 미생물 군에 적용하여 다양한 항생제 내성 유전자 분석에 적용하기 위하여서는 자신의 template로부터 추출된 amplicon standard를 사용하는 검량곡선의 표준화 개발은 잠재력이 매우 크다고 할 수 있다. 셋째, 균주를 배양 필요 없이 PCR 증폭 산물의 정제만 거치면 바로 real-time PCR 에 사용 할 수 있다. 위와 같은 이유로 사용한 amplicon standard와 전통적인 plasmid standard의 *tet* gene copy 값의 비교 실험에서도 두 개의 표준 검량 곡선을 이용한 정량에서 copy 값은 차이 나지 않았고 그 후의 실험에 모두 degenerated primer를 이용하여 amplicon standard로 정량하는 방법을 적용하였다.

현재 가축사육장이나 병원 근교의 저수지나 하수 등에서 검출된 Tc 내성균을 대상으로 한 내성 유전자의 정량에 대한 연구는 많이 보고되었다. 하지만 기존의 연구는 단일 유전자를 대상으로 정량하였고, 2개 이상의 유전자를 정량하기 위해서는 primer pairs의 개수도 유전자의 개수만큼 사용하였다 (Smith *et al*, 2004; Peak *et al*, 2007). Allard *et al.* (1993)는 6개의 Tc 내성 유전자의 amino acid sequences를 비교해 본 결과, *tet*(A), *tet*(C), *tet*(G)와 *tet*(B), *tet*(D), *tet*(E)가 각각 유사한 염기서열을 가지고 높은 homology를 보인다고 보고하였다. 이에 본 연구에서도 PCR amplification시 생기는 비 특이적 증폭 산물의 생성 가능성을 줄이고자 6개의 *tet* gene을 모두 한 번에 검출하기보단 위와 같이 두 그룹으로 나누어 multi qPCR을 실시하였다. 또한 본 연구에서는 multi qPCR을 보다 효율적으로 실행하기 위하여 먼저 6개의 *tet* gene의 염기서열을 분석하여 제작된 하나의 degenerated sense primer인 TETF를 이용하여 multi qPCR 시 사용되는 primer의 개수를 줄여 편리성을 높이고 primer 끼리의 교차 반응의 가능성을 줄이고자 하였다. 전 (2003)은

TETF가 *tet*(A)-(G)에 90% 정도의 binding 확률을 가지고 있다고 하였다. 이러한 TETF primer는 conventional multiPCR을 실시한 결과에서 6개의 내성 유전자에 대하여 각각 특이적으로 결합하는 것을 확인하였다. 또한 muiti qPCR에 사용하기 위하여 똑같은 크기의 증폭 산물이 되도록 6개의 antisense primer도 제작하였다. 이러한 primer pairs로 qPCR 한 결과 6개 내성 유전자 모두 각 유전자의 염기서열에 대해 특이적으로 제작된 sense-antisense primer pairs를 사용한 결과와 비교하여, 표준 검량 곡선의 수평적 이동으로 인해 $C_T$ 값의 차이만 있을 뿐 정량된 copy 값에는 큰 차이가 나지 않았다.

앞서, amplicon standard - degenerated primer를 사용한 multi qPCR의 정확성을 알아보고자 spiking 실험 한 결과, spike된 stool DNA에 아무런 저해를 받지 않으며 미리 결정되어 알고 있는 copy 수에 매우 근접한 값을 얻을 수 있었다 (Fig. 8,9). 이는 Yu *et al.* (2005)의 연구에서와 같이 spike sample에서 본래의 stool DNA의 copy 값을 뺀 후, 그 값을 standard sample의 실제 copy 값과 상응하는 좌표로 만들어진 직선식의 기울기와 지수가 모두 정수 1에 가까운 값을 나타내며 높은 신뢰성과 정확성을 보였다. 또한 multi qPCR시 결정된 copy값이 single qPCR 결과 나온 *tet* gene copy 값의 산술적 합계에 근접하게 결정된 것을 확인함으로써 amplicon standard - degenerated primer에 대한 편리성과 잠재력을 확인할 수 있었다.

실제 이러한 증명 실험들을 바탕으로 10개월에 걸쳐 샘플링 한 관상어와 해산어의 장내 stool DNA를 분리하여 multi qPCR 방법을 적용하여 *tet* gene abundance를 결정 하였다. Copy 값을 분석하기에 앞서 multi qPCR 시 그룹화 된 *tet* gene이 가지는 고유의 Tm (melting point) 값을

확인할 수 있었다. qPCR에서 Tm 값은 증폭된 유전자와 결합 하고 있는 형광 색소가 떨어져 나가는 온도를 말하는데 증폭하고자 하는 유전자의 길이나 염기 서열, GC 의 비율에 따라 고유의 값을 가진다 (Fan *et al.*, 2007). 본 연구에서도 multi qPCR시 고농도의 DNA를 첨가 하였을 때 그룹에 속해있는 각각의 *tet* gene이 고유한 Tm 값을 가졌고 이러한 Tm 값을 바탕으로 내성 유전자의 Type의 구별이 가능했을 뿐만 아니라 primer dimer나 비 특이적인 증폭 산물의 유무를 확인할 수 있었다.

Peak *et al.* (2007)은 Tc 내성 유전자를 정량하는데 16s rDNA gene이나 항생제의 양, 생물 유래 유기물등이 내성 유전자의 양과 비례하는 상관관계를 가진다고 하였다. 이러한 결과는 본 실험에서도 역시 증명되었다. 수입산 관상어의 경우 여전히 높은 Tc 내성 유전자 수를 보였고, 특징적으로 *tet*(A/C/G)의 abundance가 *tet*(B/D/E)에 비해 높았고, 국내산 펄 구라미의 경우 *tet*(B/D/E)가 *tet*(A/C/G)보다 높게 나타나 Tc 내성 유전자의 절대적인 정량 값과 Tc resistant bacterial isolates을 이용한 multi PCR의 결과와 모두 일치하였다 (Table 10, 17). 해산어의 경우는 실험에 쓰인 4가지 어종 모두 *tet*(B/D/E)가 다른 그룹에 비해 높은 copy 값을 보였으며 그 중 넙치와 감성돔이 유의적으로 높았다.

*tet*(A/C/G)와 *tet*(B/D/E)의 합으로 나타낸 *tet* gene copy 값과 Tc 내성 비율과의 상관관계를 살펴본 결과, 관상어 그룹에서는 Tc 내성 비율이 높을수록 *tet* gene copy 값도 증가하였다. 하지만 20~27% 사이의 Tc 내성 비율을 가지는 국내산 해산어의 *tet* gene copy 값은 내성 비율에 따라 증가하는 경향을 보였지만 비슷한 내성 비율을 보인 국내산 관상어에 비해 비교적 낮은 *tet* gene copy 값을 나타내었다. 이는 담수와 해수에 존재하는 주요 내성 균주에 의한 차이로 보이며 담수 관상어의 장내

세균에서 주로 나타나는 *Aeromonas* spp.는 50% 이상이 tetracycline과 ampicillin 관련 내성 유전자가 주로 plasmid 상에 존재한다고 밝혀져 있고 이러한 plasmid는 self-transmissible하며 다른 균주로의 전이 가능성이 높다고 알려져 있다 (Jacobs and Cheina, 2007). 이에 plasmid와 R-plasmid상에 존재 하는 내성 유전자에 대한 정확한 copy 값에 대한 연구 또한 지속되어야 할 것이다.

본 연구에서는 16s rDNA gene과 Tc 내성 유전자 사이의 상관관계를 알아보기 위하여 16s rDNA 부분의 universal primer를 이용하여 stool DNA 로부터 amplicon standard를 만들고 이것으로 어류 장내 정상 세균 총을 정량하여 *tet* gene copy 수와의 상대적인 비율을 나타내는 데 사용하였다. 16s rDNA와의 상대적 분석의 장점은 microflora의 분석에서 여러 생사료등이 어류 장내에 있거나 어류 장내 조직으로 인해 total DNA의 양을 기준으로 하는 것이 의미가 없을 때에 적용할 수 있다는 것이다. Nadkarni *et al* (2002)는 16s rDNA gene을 사용한 총 세균의 abundance가 agar plate를 통해 계수된 세균의 수보다 40배 가량 많다고 하였고. 또한 이 논문에 따르면 *Escherichia coli*는 7개, *Pseudomonas* spp.는 4개, S*taplylococce*는 9개 정도의 16s rRNA operon을 한 single chormosome에 가지고 있다고 하였다. 본 연구는 단일 균주로는 *E.tarda*를 대상으로 하였고 16s rDNA gene의 copy 수와 viable counting에서 4~6배 차이가 남을 확인하였고 위의 연구와 유사하게 16s rDNA gene의 abundance가 더 높았다.

국가별로 살펴본 어류 장내 세균 속 *tet* gene의 양은 stool 100mg으로 환산하고 동량의 stool에 들어있는 총 내성 균주 수를 계산하여 보면 평균적으로 하나의 세균이 1~4개 까지 내성 유전자를 가지고 있는 것으로

보인다. 이것은 서로 다른 환경에서의 microflora가 가지는 내성 균주 중 Plasmid 상 내성유전자 함유균의 비율에 의하여 각 sample의 *tet* gene copy 수의 변화가 있을 수 있으나, Tc 내성균의 비율이 높은 것은 내성 유전자의 양에 있어서도 높은 *tet* gene copy 수를 보이는 것으로 보아 전체 비율에서 변화가 거의 없는 정규 분포를 이루는 것으로 추정된다.

예전의 연구에서 가축 양식장 주변의 lagoon 2㎖에 *tet*(O), *tet*(W), *tet*(Q)가 약 4.5~4.8 × $10^4$ copies가 존재한다는 연구 (Smith *et al.*, 2004)가 있었다. 이 연구에서는 세 개의 내성 유전자를 single qPCR 한 후 copy 값을 각각 더하였고 이것을 microflora에서 잔류하는 항생제량과 비교 하였다. 결과 항생제의 잔류량이 높을수록 *tet* gene copy number가 증가하는 것으로 나타났다. 항생제 사용이나 총 내성 균주에 대한 세부적 정보가 충분하진 않지만 관상어류 장내 세균 속 Tc 내성 유전자는 이러한 lagoon sample에 비해 다소 높은 abundance를 가지는 것으로 보인다. 이를 위해 Tc 내성 유전자에 대한 plasmid상 내성 유전자의 존재 유무 확인에 대한 조사와 보충 실험이 뒤따라야 할 것으로 본다. 또한 해산어의 경우 관상어에 비해 Tc 내성 비율이나 *tet* gene의 abundance 모두 낮았다. 이는 어류 채집 시 항생제 처리 이력을 조사한 결과 Tc의 사용이 없었던 것을 확인하였다.

현재 어류 양식 산업에서는 해산 양식어에 비해 관상어에서 많은 양의 항생제를 사용하고 있다. 이것은 특히 관상어의 국가 간 이동시 질병예방, 치료의 목적으로 항생제를 과다 사용하는 것과 연관이 있다. 특히 우리나라에는 중국과 일본으로부터의 양식어, 그리고 싱가포르와 인도네시아로부터는 관상어가 대량으로 수입되고 있으므로 이들 나라로부터 수입된 어류의 장내세균에서 나타나는 내성 유전자 종류 및 특성에 대한 분

석은 향후의 무역 분쟁 또는 수입 금지책 마련을 위하여서라도 필히 이루어지고 계속적인 monitoring이 있어야 할 것이다.

본 연구에서는 multi qPCR을 이용한 정량적 분석이 수생 환경뿐만 아니라 생태계에서 존재하는 다양한 Tc 내성 유전자를 검출 할 수 있는 신속하고 감도 높은 분자 생물학적 방법이 된다는 것을 증명하였으며 어류 장내 Tc 내성 비율이 증가함에 따라 내성 유전자의 abundance 역시 증가 한다는 것을 확인 하였다. 이러한 Tc 내성 유전자의 부하 분석은 chromosome, plasmid 그리고 R-plasmid에 의한 것이 모두 포함 되어야 할 것이나 일반적으로 서로 다른 다양한 어종의 microflora에 있는 내성균 함유 구성의 평균은 동일할 것이므로 Tc 내성균의 내성 유전자의 부하와 전체 microflora에서의 내성균 비율의 상관관계를 조사하면 수계 환경에서의 resistance indicator를 선정하고 이를 활용 할 수 있는지에 대한 접근이 가능할 것이다. 앞으로 여러 항생제의 광범위한 사용으로 인해 생긴 항생제 내성 유전자들에 대한 다른 세균으로의 수평 전이나 다재 내성 유발 등에 대한 보다 깊은 관심과 연구가 필요할 것이며 efflux pump의 내성 기작 외에 ribosomal protection이나 enzymatic 기능을 가지는 다른 *tet* gene에 대한 위와 같은 연구도 진행 되어야 할 것으로 사료된다.

# Ⅴ. 요 약

본 연구에서 조사된 바에 의하면 국내산 관상어의 장내 Tc 내성 비율은 20~30% 정도로 중국이나(65%), 싱가포르(60%), 태국 (57%)에서 수입된 관상어종에 비해 상대적으로 낮았다. 이는 관상어종의 국가간 지역간 이동시 많은 양의 Tc 항생제가 쓰이기 때문으로 해석된다. 또한 해산어의 경우 연구에 사용 된 4가지 어종 모두 낮은 Tc 내성 비율을 보였으며 특이적으로 TCBS의 내성 비율이 20% 이상으로 높았다. qPCR 정량에 앞서 살펴본 Tc 내성 균주를 이용한 multi PCR에서는 수입산, 국내산 관상어에서 *tet*(A)-(G) 까지 다양한 내성 유전자가 검출 되었으며 multi-*tet* gene 을 가지는 내성 유전자도 상당 수 확인 되었으며, 그 중 싱가포르에서 수입된 담수 관상어에서는 약 5% 가 4개의 내성 유전자를 모두 가지는 것으로 조사 되었다. 해산어의 경우 *tet*(B)가 가장 빈번하게 검출 되었으며 multi-*tet* gene은 관상어종에 비해 작았으며 주로 *tet*(B)와 함께 나타났다.

*tet* gene 정량을 위한 qPCR의 사용에서는 plasmid standard와 amplicon standard를 사용한 서로 다른 두 set의 qPCR이 실시되었으며 표준 검량 곡선을 통한 *tet* gene copy 수의 차이는 없었다. 또한 multi qPCR의 spike 실험에서도 spike된 stool DNA에 아무런 저해를 받지 않으며 예상된 copy 수에 근접하여 정량 되었고, spike sample에서 본래의 stool DNA 의 copy 값을 뺀 후, 그 값을 standard sample 의 실제 copy 값과 상응하는 좌표로 만들어진 직선식의 기울기와 지수 모두 높은 신뢰도과 정확성을 보였다.

관상어와 해산어의 장내 stool DNA 를 분리하여 multi qPCR 방법을 적용하여 *tet* gene abundance를 결정 하였다. 또한 이를 16s rDNA gene과의 상대적인 비율로 나타내었을 때 절대적인 Tc 내성 유전자의 정량값과 동일한 결과를 보여 장내 세균 내의 정상 세균총의 수와 Tc 내성 유전자의 수가 비례하는 상관관계를 가지는 것을 확인하였다. 6개 Tc 내성 유전자의 abundance는 관상어의 경우 두 개의 *tet* gene group 중 수입산 관상어에서는 *tet*(A/C/G)가 높게, 국내산 관상어에서는 *tet*(B/D/E)가 높게 나타났다. 해산어의 경우 어종에 관계없이 *tet*(B/D/E)의 양이 더 많았다.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

# Ⅵ. 감사의 글

실험실 생활을 시작 한지가 엊그제 같은데 벌써 2년의 석사 과정을 마치고 졸업을 앞두고 있으니 세월의 속도가 참으로 빠름을 다시 한 번 깨닫게 됩니다. 고된 실험실 생활이었지만 옆에서 도와주신 많은 분들 덕분에 3여 년간의 시간이 힘들지 만은 않았습니다. 특히 언제나 제가 가야할 길을 제시해 주시고 따끔한 교훈도 아끼지 않으시며 제 논문을 논문답게 만들어 주신 정현도 교수님께 감사드립니다. 또한 바쁘신 와중에도 논문 수정에 신경 써 주신 정준기 교수님, 강주찬 교수님과 자주 뵙진 못하지만 만나면 항상 다정하게 웃어 주시고 따뜻한 말씀 해주시는 박수일 교수님, 김기홍 교수님, 허민도 교수님께도 감사드리고 싶습니다.

진단생화학 실험실 선배님들과 후배들에게도 이 자리를 빌어 고맙단 말을 전합니다. 먼저 좋은 선배와 좋은 남편(?)의 모범이 되시는 준범선배, 그리고 저의 정신적 지주인 싸랑하는 려진 언니 감사합니다. 두 분이 언제나 제 곁에 있어 주셔서 얼마나 든든하고 힘이 되었는지 몰라요. 이제 졸업하는 저희 대신 진단방을 이끌어나갈 사랑하는(!!) 주헌이와 매력덩어리 정희, 잘 해나가리라 언니는 믿는다.^^ 내년에 대학원생이 되는 알뜰 영진이, 섹쉬하고 쉬크한 기원이, 진단방 얼짱 광일이 (됐나!), 석사 생활이 쉽지는 않겠지만(!!) 너희에게 반드시 귀하고 값진 시간이 될 거라 생각한다. 벌써 실험실 생활 3년차 윤준이, 엉뚱 진지남 영길이, 2월에 군대 가는 매너남 병아리 우섭이, 입방식 때문에 고생한 귀염둥이 효선이까지 앞으로 진단방을 잘 지켜주실 바란다.^^ 그 동안 실험 도와주고 부족한 선배 밑에 있는다고 고생했다. 전부 너무 고마워!

그리고 졸업하신 선배들께도 감사드립니다. 잘 뵙지 못하지만 늘 관심 가져 주시는 명석 선배, 준효 선배, 우열 선배, 신후 선배 (논문 고마워요 ^^), 순범 선배, 재훈 선배, 호열 선배, 영화 언니, 대심 언니, 현정 언니, 지효 언니 감사드립니다. 복도에서 만나면 항상 관심 가져 주시고 살갑게 대해주신 예방방 승호

선배 그리고 기방 은혜언니 감사합니다.

또한 이번에 같이 졸업하는 동기들에게도 감사드립니다. 윤경 언니, 동진이, 한나, 새봄 언니, 수진언니 우리 너무 수고 했어요~^^ 또 같이 졸업은 못하지만 꼭 잘 하리라 믿는 수현이, 내년에 애기 낳는 지윤 언니 모두 파이팅~! 마지막으로 우리 혜진이, 동기란 말보다는 이제는 내 인생에서 빠질 수 없는 친구가 된 조뽕~ 3년 동안 우리한테 참 많은 일들이 있었지만 니랑 같이 할 수 있어서 정말 다행 이었던 것 같다. 쑥스러워서 그 동안 고맙단 말도 잘 못했지만 니가 내 친구여서 너무 고맙고, 사랑해~ 우리 꼭 성공하자.~!!^^ (항상 맘 써주신 막내 고모님께도 감사드립니다.)

대학생활 동안 내가 건진 최고의 보물들.. 대학교 1학년 때부터 지금까지 그리고 앞으로도 언제나 내 편이 되어주는 쪼로미들 -항상 우리를 웃게 만드는 은정이, 매력적인 성격의 소유자 희정이, 얼굴만큼이나 마음도 너무 예쁜 윤영이 전부 알러지~^^ (신경써서 본명 썼다.) 그 밖에 전과했다고 구박했지만 항상 챙겨주는 02 환경 동기들 전부 고맙다.

그리고 우리 쌍코피 짝지들 - 지은이, 은혜, 민경이, 일 년에 손꼽아 만나지만 만날 때마다 어제 만난 것처럼 너무 편하고 좋은 친구들 고마워. 너네랑 함께한 일본 여행 잊지 못할 거고 빨리 또 여행가자.^^

마지막으로 내가 이 세상에서 가장 사랑하는 우리 가족, 막내딸 짜증도 다 받아주시고 언제나 사랑으로 감싸주시는 아빠, 엄마, 가끔씩(?) 예쁜 옷으로 힘든 동생 위로해 주는 언니 전부 너무 고맙고 진심으로 사랑합니다. 그리고 항상 격려해 주시고 저를 자랑스러워 해주시는 친가댁, 외갓댁 어른들께도 감사 인사 전합니다.

언제나 초심의 마음을 잃지 않으며 어디에 있더라도 주위의 고마운 분들의 도움과 가르침을 잊지 않고 살아가겠습니다. 끝으로 언제나 저와 함께 하시며 항상 지켜주시는 하나님 아버지께 이 논문을 받칩니다.

# Ⅶ. 참고 문헌


Andersen S. R. and Sandaa R. A. 1994. Distribution of tetracycline resistance determinants among gram-negative bacteria isolated from polluted and unpolluted marine sediments. *Appled and Environmental Microbiology.* 60: 908-912.

Alcaide, E., Blasco, M-D. and Esteve, C. 2005. Occurrence of drug-resistant bacteria in two European eel farms. *Appled and Environmental Microbiology.* 3348-3350.

Al-Harbi, A. H., Uddin, M. N. 2004. Seasonal variation in the intestinal bacterial flora of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*×*Oreochromis aureus*) cultured in earthen ponds in Saudi Arabia. *Aquaculture*. 229: 37-44.

Allard, J. D. and K. P. Bertrand. 1993. Sequence of class E tetracycline resistance gene from *Escherichia coli* and comparison of related tetracycline efflux proteins. *Journal of Bacteriology*, 175: 4554-4560.

Bach, H. J., Tomanova, J., Schltoer, M., Munch, J. C. 2002. Enumeration of total bacteria and bacteria with genes for proteolytic activity in pure cultures and in environmental samples by quantitative PCR mediated amplification. *Journal of microbiological methods*. 49: 235-245.

Bell, G. R., Traveler, G. S. and Dworschak, C. 1988. Development

in vitro and pathogenicity of an erythromycin-resistant strain of *Renibacterium salmoninarum*, the causative agent of bacterial kidney disease in salmonids. *Disease of Aquatic Organism*, 4: 19-25.

Bryan, A., Shapir, N., and Sadowsky, M. J. 2004. Frequency and distribution of tetracycline resistance genes in genetically diverse, non-selected, and nonclinical *Escherichia coli* strains isolated from diverse human and animal sources. *Appled and Environmental Microbiology*, 70: 2503-2507.

Chopra, I. and Roberts, M. C. 2001. Tetracycline Antibiotics: Mode of action, application, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology And Molecular Biology Review*, 65(2): 232-260.

DePaola, A., Flynn, P. A., McPhearson R. M. and Levy, S. B. 1988. Phenotypic and genotype characterization of tetracycline and oxytetracycline resistance *Aeromonas hydrophila* from cultured channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and their environments. *Appled and Environmental Microbiology*, 54: 1861-1863.

DePaola, A., Peeler, J. T. and Rodrick, G. E. 1995. Effect of oxytetracycline-medicated feed on antibiotic resistance of gram-negative bacteria in catfish Ponds. *Appled and Environmental Microbiology,* 2335-2540.

Fan, W., Hamilton, T., S. Webster-Sesay, Nikolich, M. P., Lindler,

L. E. 2007. Multiplex real-time SYBR Green I PCR assay for detection of tetracycline efflux genes of Gram-negative bacteria. *Molecular and Cellular Probes,* 21(4): 245-56.

French, G. and Schwarz, S. 2000. Molecular analysis of tetracycline resistance in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars *typhimurium*, *Enteritidis*, *Dublin*, *Choleraesuis*, *Hadar* and *Saintpaul*: construction and application of specific gene proves. *Journal of Applied Microbiology*, 89: 633-641.

Furushita, M., Shiba, T., Maeda, T., Yahata, M., Kaneoka, A., Takahashi, Y., Torii, Hasegawa, T., and Ohta M. 2003. Similarity of tetracycline resistance genes isolated from fish far bacteria to those from clinical isolates. *Applied and environmental microbiology*, 69: 5336-5342.

Gordon, L., Giraud, E., JGanie`re, J-P., Armand, F., Bouju-Albert, A., Cotte, N. de la, Mangion C. and Le Bris, H. 2007. Antimicrobial resistance survey in a river receiving effluents from freshwater fish farms. *Journal of Applied Microbiology,* 1167-1176.

Guardabassi, L., Dijkshoorn. L., Collard, J. M., Olsen, J. E. and Dalsgaard, A. 2000. Distribution and in-vitro transfer of tetracycline resistance determinants in clinical and aquatic *Acinetobacter* strain. *Journal of medical microbiology*. 49: 929-936.

Heid, C., Stevens, J., Livak, KJ., Williams PM., 1996. Real-time

quantitative PCR. *Genome Research*, 6: 986-994.

Hein, I., lehner, A., Rieck, P., Klein, K., Brandl, E., Waqner, M., 2001. Comparison of different approaches to quantify *Staphylococcus aureus* cells by real-time quantitative PCR and application of this technique for examination of cheese. *Appled and Environmental Microbiology*. 67: 3122-3126.

Jacobs, L., Cheian, H. Y. 2007. Characterization of integrons and tetracycline resistance determinants in *Aeromonas* spp. isolated from South African aquaculture systems. *International Journal of Food Microbiology*. 114: 295-306.

Kim, D. 2001. Real-time quantitative PCR. *Experimental & Molecular medicine*. 33: 101-109.

Kim, S. R., Nonaka, L., Suzuki S. 2004. Occurrence of tetracycline resistance genes *tet*(M) and *tet*(S) in bacteria from marine aquaculture sites. *FEMS Microbiology Letters*. 237: 147-156.

Kim, Y. H., Jun, L. J., Park, S. H., Yoon, S. H. 2007. Prevalence of *tet*(B) and *tet*(M) genes among tetracycline-resistant *Vibrio* spp. in the aquatic environments of Korea. *Disease of aquatic organisms*. 75: 209-216.

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. *Appled and Environmental Microbiology*, 59: 1467-1472.

Levy, S. B., McMurry, L. M., Barbosa, T. M.. Burdett V.,

Courvalin, P., Hillen, W., Roverts, M. C., Rood, J. I. and Tayor, D. E. 1999. Nomenclature for new tetracycline resistance determinants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43: 1523 - 1524.

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

Mac Cormack, W. P. and Fraile, E. R., 1990. Bacterial flora of newly caught Antarctic fish *Notothenia neglecta. Polar Biology,* 10: 413-417.

Maeda, H., Fujimoto, C., Haruki, Y., Maeda, T., Kokeguchi, S., Petelin, M., Arai, H., Tanimoto, I., Nishimura, F., Takashiba. S. 2003. Quantitative real-time PCR using TaqMan and SYBR Green for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *tet*Q gene and total bacteria. *FEMS. Immunology and Medical Microbiology*. 39: 81-86.

Marshall, B. C., C. Tachibana and S. B. Levy. 1983. Frequency of tetracycline resistance determinant classes among lactose-fermenting coliforms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 24: 835-840.

Miranda, C. D., Kehrenberg, C., Ulep, C., Schwarz, S. and Roberts, M. C. 2003. Diversity of tetracycline resistance genes in

bacteria from chilean salmon farms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 47: 883-888.

Nadkarni, M. A., Martin, F. E., Jacques, N. A., and Hunter, N. 2002. Determination of bacteria load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology*. 148: 257-266.

NCCLS (2001). Performance Standards for Antimicrobial susceptibility testing, eleventh informational supplement. NCCLS Document M100-S11. *National Committe of Clinical Laboratory Standards. Wayne, PA, USA.* ISBN 1-56238-426-0.

O'Mahony, J., and Hill, C. 2004. Rapid real-time PCR assay for detection and quantitation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DNA in artificially contaminated milk. *Applied and environmental microbiology*. 70: 4561-4568.

Peak, N., Knapp, C. W., Yang, R. K., Hanfelt, M. M., Smith, M. S. Aga, D. S., and Graham, D. W. 2007. Abundance of six tetracycline resistance genes in wastewater lagoons at cattle feedlots with different antibiotic use strategies. *Environmental Microbiology*. 9(1): 143-151.

Roberts, M. C., Pang, Y., Riley, D. E., Hillier, S. L., Berger, R. C. and Krieger, J. N. 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:

mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Review*. 19: 1-24.

Roberts, M. C. 2005. Updated on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS, Microbiolgy letters.* 245: 195-203.

Serum, H., Roberts, M. C. and Crosa, J. H. 1992. Identification and cloning of a tetracycline resistance gene from the fish pathogen *Vibrio salmonicida. Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 36:611-61.

Smith, P., J. Donlon, R. Coyne and D. J. Cazabon. 1994. Fate of oxytetracycline in a fresh water fish farm : influence of effluent treatment systems. *Aquaculture*, 120: 319-325.

Smith, M. S., Yang, R. K., Knapp, C. W., Niu, Y., Peak, N., Hanfelt, M. M., Galland, J. C., and Graham, D. W. 2004. Quantification of tetracycline resistance genes in feedlot lagoons by real-time PCR. *Appled and Environmental Microbiology*, 70: 7372-7277.

Stamm, J. M. 1989. In vitro resistance by fish pathogen to aquacultural antibacterial including the quinolones difloxacin(A-56619) and sarafloxacin(A-56620). *Journal of Aquatic Animal Health*, 1: 135-141.

Stubner, S. 2002. Enumeration of 16S rDNA of Desulfotomaculum lineage 1 in rice field soil by real-time PCR with SybrGreen detection. *Journal of microbiological methods*. 50; 155-164

Taylor, D. E. and A. Chau. 1996. tetracycline resistance mediated by ribosomal protection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40: 1-15.

Twiddy, D. R. and P. J. A. Reilly. 1994. Occurrence of antibiotic resistant human pathogens in integrated fish farm. Research contributions presiented at the ninth session of Indo Pacific fishery commission working party on fish technology and marketing. *Cochin, India, March, Rome, Italy FAO*, 514: 23-37.

Yu, Z., Michel F. C., Jr., Hansen G., Wittum T., and Morrison M.. 2005. Development and application of real-time PCR assays for quantification of genes encoding tetracycline resistance. *Appled and Environmental Microbiology*, 71: 6926-6933.

Zucol, F., Ammann, R. A., Berger, C., Aebi, C., Altwegg, M., Niggli, F. K., and Nadal. D. 2006. Real-time quantitative broad-range PCR assay for detection of the 16S rRNA gene followed by sequencing for species identification. *Journal of clinical microbiology*. 44: 2750-2759.

박신후. 2006. 수입 관상어 및 해수 양식 어류 장내세균의 항생제 내성 유전자 특성. 부경대학교 대학원 석사 논문.

전려진. 2003. 우리나라 어병 세균이 갖는 *tet* 유전자의 특성 분석. 부경대학교 대학원 석사 논문.