

Tetracycline 경구 투여가 조피볼락의 장내 내성균 비율 변화와 *tet* 유전자 분포에 미치는 영향

전려진 · 류지효 · 윤소혜 · 정현도
부경대학교 수산생명의학과

서론

여러 종류의 항생제를 경구 투여 후 장내 세균에서의 내성균 증가에 대한 조사가 많이 되어있는데 (Kerry *et al.*, 1997), 그 중에서 특히 Oxytetracycline (OTC)을 경구 투여 했을 때 내성균 빈도가 확실히 증가하였다고 보고하였다. 그리고 Depaola (1995)는 OTC를 투여하기 전에는 20~40%의 내성 빈도를 보였고 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. 본 실험실에서 직접 항생제를 투여하는 *in vivo*에서의 내성균 발생과 *tet* 유전자의 변화를 분석하여 그 내성균 발생의 빈도와 장내에서의 유지기간 그리고 이용한 *tet* 유전자의 활용도 변화를 함께 분석해보고자 하였다.

재료 및 방법

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

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 0.5 g을 5 ml의 0.15M PBS 완충용액에 현탁시켜 분쇄하였다. 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°C에서 24시간 배양한 후 각각의 plate에서 자란 colony수를

확인하여 내성 빈도를 백분율로 계산하였다. OTC 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 첨가된 배지에서 자란 colony를 50~100개정도 취하여 순수 분리한 후 colony의 형태, 크기, Gram 염색, oxidase test등으로 분류하여 API 20E로 균을 동정하였다.

PCR 방법을 통한 *tet* gene의 분포조사: OTC가 첨가된 배지에서 자란 colony를 50~100개정도 취하여 TSB에 접종한 후 25°C에서 18~24시간 배양하였다. 배양액으로부터 분리된 whole cell은 multiplex PCR을 위한 template로 이용되었다 (Jun *et al.*, 2004).

결과 및 요약

이전의 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. 내성 변화의 경향은 유사하게 나타났으나 내성 빈도의 수치에는 많은 차이를 보였다. 분리된 내성균의 대부분은 *Vibrio sp.*, *Aeromonas hydrophila*이었고 이들 균주들이 가지는 *tet* 유전자는 *tet B*, *tet C*임을 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 *G*를 가지지 않는 균도 존재하였다.

참고문헌

- 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.
- Jun, L. J., Jeong, J. B., Huh, M. D., Chung, J. K., Choi, D. L., Lee, C. H., and Jeong, H. D. 2004. Detection of tetracycline-resistance determinants by multiplex polymerase chain reaction in *Edwardsiella tarda* isolated from fish farms in Korea. *Aquaculture*, 240, 89-100.
- 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.
- 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.