

연쇄상구균의 약제내성과 전이성 R-plasmid의 특성

김종훈 · 임대환 · 이창훈* · 이수정** · 이월라*** · 황미혜**** · 김은희†

여수대학교 수산생명의학과, *국립수산과학원 자원조성연구소, **부산지방해양수산청 수산관리과
마산지방해양수산청 남해수산기술관리소, *목포지방해양수산청 해남수산기술관리소

Multiple Drug Resistance and Transferable R plasmid of Streptococci Isolated from Diseased Olive Flounder

Jong-Hun Kim, Dae-Hwan Yim, Chang-Hoon Lee*, Su-Jung Lee**, Wall-La Lee***,

Mi-Hye Hwang**** and Eunheui Kim†

Department of Aqualife Medicine, Yosu National University, Yosu 550-749, Korea

*Resources Enhancement Institute, National Fisheries Research & Development Institute,
Cheju 690-192, Korea,

**Fisheries Management Division, Busan Maritime Affairs and Fisheries Office, Busan 601-050, Korea

***Namhae Fisheries Technology Institute, Masan Regional Maritime Affairs and Fisheries Office,
Namhae 668-840, Korea

****Haenam Fisheries Technology Institute, Mokpo Regional Maritime Affairs and Fisheries Office,
Haenam 536-812, Korea

MICs of 8 chemotherapeutic agents against forty streptococcal isolates were determined. These strains were isolated from diseased olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, and showed 2~5 multiple drug resistance against different antibacterial agents including ampicillin, doxycycline (DOXY), erythromycin, florfenicol, flumequine, norfloxacin, oxolinic acid, and oxytetracycline (OTC). In conjugation experiment, we found transferable R plasmids carrying OTC and DOXY resistance determinant in 3 drug resistance strains analyzed. Six out of 40 isolates showed positive signal in colony hybridization with the R plasmid DNA (pST9) as a probe. It suggests that other types R plasmid different from pST9 is also involving in multiple drug resistance of streptococci isolated from olive flounder.

Key words : Multiple drug resistance, Streptococci, Olive flounder, Transferable R plasmid,
DNA hybridization

해산 양식어류에 피해를 주는 세균성질병으로
는 어종에 따라 약간의 차이는 있으나, Strepto-
coccus, Vibrios, Edwardsiella, 활주세균증
(salt water columnaris disease) 등이 보고되고 있
다(심 등, 1995; Oh *et al.*, 1998). 이러한 피해를
최소화하기 위하여 백신개발 (Eldar *et al.*, 1997;
Kwon *et al.*, 1999) 및 면역증강사료개발 (Hwang
et al., 1999; Choi *et al.*, 1999) 등 예방차원의 노력이
이어지고 있으나, 아직 항균제에 의한 치료

에 거의 의존하고 있는 실정이다. 항균제에 의
한 치료효과를 높이기 위해서는 병원세균들의
약제감수성경향을 아는 것이 중요하지만 이와
관련된 자료가 충분치 않고, 또 지속적으로 제
공되지 않고 있다. 뿐만 아니라 빈번한 항균제
의 사용으로 인하여 어류병원세균들이 다양한
치료약제에 대하여 내성을 나타낼 뿐 아니라 그
내성의 정도가 점점 높아지고 있어 치료약제를
선택하는데 많은 어려움이 있다. 그러므로 주기

†Corresponding Author : Eunheui Kim, Tel. 061-659-3171,
Fax. 061-659-3171, E-mail. ehkim@info.yosu.ac.kr

적으로 병원균들을 분리하여 약제감수성 경향을 조사하는 것은 질병의 치료효과를 높이고, 약품의 사용량과 빈도를 줄임으로써, 경제적인 문제와 공중보건학상으로 발생할 수 있는 문제들을 예방할 수 있는 하나의 중요한 방법이 될 수 있다.

어류병원세균의 약제내성도 여러 종류의 전이성 R plasmid에 있는 내성유전자에 의하여 나타나며 (Adams *et al.*, 1998; Aoki, 1988; Choi *et al.*, 1996; Kim, 1999; Yoo *et al.*, 2002), 이들 R plasmid의 구조형성에 transposon이 관여하고있다는 증거가 제시되고있다 (L'Abée-Lund and Sorum, 2000; Kim and Aoki, 1994). 그러므로 어류 병원 세균들의 약제감수성경향 및 약제내성 전이성 plasmid에 관한 연구는 내성균 출현을 억제하기 위하여 기본적으로 필요하다.

양식 넙치에 발생하는 연쇄상구균증은 매년 반복적으로 출현하며, 특히 *Edwardsiella tarda* 등과의 혼합감염이 빈번하여 우리나라의 넙치 양식산업에 큰 피해를 주고있으며 (Oh *et al.*, 1998) 다양한 연쇄상구균이 관여하고 있는 것으로 알려져있다 (Lee *et al.*, 2001). 그러므로 오래 전부터 치료를 위하여 다양한 항균제가 사용되어왔으나, 이들 어류에서 분리되는 연쇄상구균의 항균제 내성에 관한 연구보고는 많지 않다.

그러므로 본 연구는 양식넙치 병어에서 분리된 연쇄상구균들의 약제에 대한 내성정도를 알아보고 이들 내성에 관여하는 전이성 R plasmid를 검출하고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주

본 실험에 사용된 균주는 남해안 넙치 양식장에서부터 감염어를 채집하여 안구, 복수, 간, 신장 부위로부터 분리하였다. 시료를 Brain Heart Infusion Agar (BHIA) medium에 접종하여 25°C에서 48시간 배양한 후, 균일하게 나타나는 세균의 집락을 선택하였다. 이들 중 그람양성 구균

이고 연쇄상 (chain)을 형성하며 catalase를 생성하지 않는 집락들만 선택하였으며, 여수에서 분리된 6균주, 남해에서 분리된 3균주, 제주의 19균주, 완도의 8균주, 영광의 2균주, 그리고 해남과 고흥에서 각각 1균주씩 분리되어 총 40균주를 실험에 사용하였다. 세균의 용혈성은 5% sheep blood가 첨가된 blood agar배지(아산제약)에서 확인하였다.

약제감수성 경향 및 내성균 분리

분리균에 대한 각종 화학요법제의 MIC는 Kim and Aoki (1993) 및 Murray *et al.* (1999)에 따라 two fold plate dilution 방법으로 조사하였다. 각각의 분리균을 BHI broth에서 24시간 전 배양한 후, 사용 당일 BHI broth를 이용하여 대수증식기에 이르도록 재배양하여 균부유액으로 이용하였다. 사용한 항균제는 양식현장에서 비교적 사용빈도가 높은 8종을 선택하였다 (Table 1). 각각의 화학요법제는 농도 100 µg/ml에서부터 1/2씩 단계 희석하였고, 총 12단계 농도의 약제를 함유하는 배지를 만들었다. 균 부유액을 각 약제의 농도별 배지위에 10⁴ CFU/ml 되도록 접종하여 25°C에서 48시간 동안 배양한 후 균의 성장여부를 약제를 포함하지 않은 대조구와 비교하여 확인하였다. 균의 생장이 완전히 저지되는 약제농도의 2배 농도를 그 균에 대한 약제의 MIC로 결정하였다. MIC 분포에서 breakpoint보다 높은 농도 쪽에 분포하는 균주들을 내성균으로 결정하였다.

전이성 R plasmid 검출

내성에 관여하는 전이성 R plasmid를 filter mating 법을 변형하여 실시하였다. 항균제들에 대하여 복합적으로 내성을 보인 균주들을 선별하여 R plasmid 공여균으로 이용하였다. R plasmid 수용균 (AR OA RFP)은, 넙치에서 분리된 연쇄상구균을 donor와 구분하기 위하여 시험관에서 rifampicin (RFP) 내성을 유도시켜 사용하

Table 1. List of antibacterial agents used in this study

Division	Chemotherapeutic agent (Abbs.)		Manufacture
Penicillin	ampicillin	(ABPC)	Sigma
Macrolide	erythromycin	(EM)	Sigma
Tetracycline	oxytetracycline	(OTC)	Sigma
	doxycycline	(DOXY)	Sigma
Chloramphenicol	florfenicol	(FFN)	Sigma
Quinolone	flumequine	(AR)	Sigma
	oxolinic acid	(OA)	Sigma
	norfloxacin	(NFLX)	Sigma
Etc.	rifampicin	(RFP)	Sigma

였다. 공여균과 수용균을 각각 broth에서 24시간 배양한 후 2:1의 비율로 섞어 BHI agar 배지에 떨어뜨려 24시간 동안 배양하였다. 이들을 다시 회수하여 공여균이 내성을 보이는 약제와 RFP 10 μ g/ml을 함유한 BHI plate에 접종하였으며 이때 자라난 세균집락을 transconjugant로 분리하였다. Transconjugant의 내성 pattern을 disc diffusion 방법으로 확인하여 전이된 내성 marker를 결정하였다.

전이성 R plasmid의 분리 및 DNA구조의 동일성 확인

전이성 R plasmid는 lysis broth를 이용하는 Anderson and McKay (1983)의 방법과 고농도의 lysozyme과 ethidium bromide를 이용하는 O'Sullivan and Klaenhammer (1993)의 방법을 응용하여 분리하였다. 액체배양한 transconjugant로부터 전이성 plasmid DNA를 추출하여 0.8% agarose gel 전기 영동으로 확인하였으며, plasmid DNA를 제한효소 BamH I으로 37°C에서 1시간 처리한 후 전기영동 하여 나타나는 DNA 단편들의 다양성을 비교하였다.

Probe 제작 및 DNA 혼성화 반응

Transconjugants중 한 균주의 plasmid DNA를

O'Sullivan and Klaenhammer (1993)의 방법에 준하여 대량으로 분리하였다. Ausbel *et al.* (1995)의 방법을 응용하여 DNA용액을 60,000 rpm으로 12시간 동안 CsCl밀도구배 원심분리를 실시하여 plasmid DNA만을 분리한 후, probe 제작에 이용하였다. Probe DNA는 DIG labeling kit(Roche)를 이용하여 labeling 하였으며, Southern blot 및 colony 혼성화에 사용된 wash and block solution, detection kit, nylon membrane, hybridization solution 등 (Roche, Germany)은 BMS사로부터 구입하였으며 제조사의 사용법을 따랐다.

결과 및 고찰

화학요법제의 MIC 분포와 내성균 출현률

각각의 화학요법제의 농도별 MIC에 해당하는 균주수를 Table 2에 나타내었다. 8약제에 대하여 모두 내성균이 나타났으며, 전체 항균제에 대하여 감수성인 1균주, ampicillin (ABPC)에만 내성을 보인 1균주를 제외한 나머지는 2약제 이상의 복합내성을 보였다. Quinolone계 약제인 flumequine (AR)과 oxolinic acid (OA)에 대하여는 대부분의 균주 (각각 약 75%, 90%)가 강한 저항

Table 2. MIC distributions of 8 chemotherapeutic agents in streptococcal strains isolated from diseased olive flounder

	Num. of strain	MIC($\mu\text{g}/\text{ml}$)											
		100	50	25	12.5	6.25	3.13	1.57	0.78	0.39	0.20	0.10	0.05
Ampicillin	1								4	1	1	1	32
Doxycycline	2			3	2	3		1	3	6	4	5	11
Erythromycin	9						2		1		3	1	24
Florfenicol	6				1	3	3	17	9				1
Flumequine	18	12					2	8					
Norfloxacin	1			3	5	6	13	9	3				
Oxolinic acid	21	9	6	2	1			1					
Oxytetracycline	8	2				3		6	5	5	5	3	3

성을 나타내었다. 이와 같은 결과는 심 등 (1995)의 연구에서도 나타났는데, 남해안 지역에서 분리된 연쇄상구균 11주 모두 OA에 대한 MIC값이 $25\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상이었으며, 8균주 (약 73%)는 AR에 대한 MIC값이 $25\mu\text{g}/\text{ml}$ 이었다. OA가 *Streptococcus iniae*의 분리를 위한 선택배지에 이용되는 항균제 (Nguyen and Kanai, 1999)인 점을 고려해볼 때, 연쇄상구균 중에는 OA나 AR에 대하여 선천적으로 내성을 갖는 균주가 많을 것으로 생각되지만, 한편 이들 약제가 양식장에서 빈번하게 사용되었음을 나타내기도 한다. 한편 퀴놀론 계열의 약제로 최근 선호하는 norfloxacin (NFLX)이나 florfenicol (FFN)에 대해서도 고농도 내성균이 출현하고 있었다. 뿐만 아니라, 많은 균주가 중등도의 내성을 보이고 있어 감수성이 점차로 떨어지고 있는 것으로 나타나, 지속적으로 사용했을 경우 급격한 내성균 증가를 가져올 것으로 생각되었다. 이와같은 결과를 Kim (1999)의 보고와 비교해 볼 때, 전체적으로 분리균에 대한 항균제의 MIC값이 2~3배 높아졌을 뿐 아니라, erythromycin (EM), FFN 및 oxytetracycline (OTC)에 대한 내성균이 증가했음을 알 수 있었다. 이는 이들 약제가 넙치의 연쇄상구균증 치료를 위하여 지속적으로 사용되었음을 의미한다고 볼 수 있다. 그러나 OTC와

EM의 경우, 각각 약 25%, 18%의 균주가 내성을 나타냈으나, 70%이상의 균은 여전히 감수성 균에 속해 있으므로 치료약제로 선택할 경우 감수성 test가 필수적이라 생각된다.

복합내성균주와 내성전이

MIC분포에서 나타나는 breakpoint를 중심으로 농도가 높은 영역의 MIC값을 갖는 균주들을 그 항균제에 대한 내성균 균으로 판정하였고, 내성균들의 복합내성 형태는 Table 3과 같았다. AR OA의 2약제에 대한 복합내성형태가 가장 많았으며, OTC, EM, AR, OA, doxycycline (DOXY)의 5약제에 대한 복합내성 균주도 5균주였다. 연쇄상구균으로부터 내성전이성 R plasmid를 검출하기 위하여 OTC EM AR OA DOXY의 5약제에 대한 복합내성을 보인 5균주 중 ST9, ST64, ST129의 3균주를 R plasmid 공여 균으로하여 conjugation을 실시하였다. OTC와 RFP를 각각 $30\mu\text{g}/\text{ml}$, $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 함유하고 있는 배지에서 분리된 transconjugant의 내성형태는 OTC, AR, OA, DOXY, 그리고 RFP의 복합내성이었다. 이들 conjugation에 사용된 donor의 EM 내성은 전달되지 않았고 OTC와 DOXY내성만 전달되었음을 알 수 있었다. 이번 mating에서 시간이 충분하였던 점으로 보아, EM내성 유전자

Table 3. Multiple drug resistance pattern of streptococcal isolates from diseased flounder

Resistance type	Number of isolate
AR OA	20
FFN OA	5
FFN OA DOXY	1
EM AR OA	2
OTC EM DOXY	2
OTC AR OA	1
OTC AR OA DOXY	1
OTC AR OA DOXY NFLX	1
OTC EM AR OA DOXY	5
Total	38

는 이들 전이성 R plasmid 위에 있지 않다고 할 수 있겠다. 한편 AR과 OA내성은 공여균과 수용균이 모두 내성을 갖고 있으므로 전이여부를 확인할 수 없었다. 그러나 이들 quinolone계 항균제에 대한 내성은 DNA gyrase 유전자 (*gyr*)의 변이에 의하여 나타나는 것이 일반적이므로 (전과 김, 2000), 넙치병어에서 분리되는 연쇄상구균의 AR과 OA내성도 염색체에 있는 이들 유전자의 변이에 의한 것으로 여겨진다. Adams *et al.* (1998)도 *Aeromonas salmonicida*의 OTC내성의 약 66%가 plasmid에 의하여 *Escherichia coli*로 전이되었음을 보고한바있다. 그러므로 본 연구에서 OTC 내성을 보인 10균주가 모두 전이성 R plasmid에 의한 내성인지를 추후 확인 해 볼 필요가 있다.

전이성 R plasmid

Aoki (1988)는 *A. hydrophila*, *Pasteurella piscicida*, *Vibrio anguillarum*, *Streptococcus sp. Edward-siella tarda* 등 대부분의 어류질병 세균에 있어서 다재약제내성 균주가 분리되며, 이들 내성이

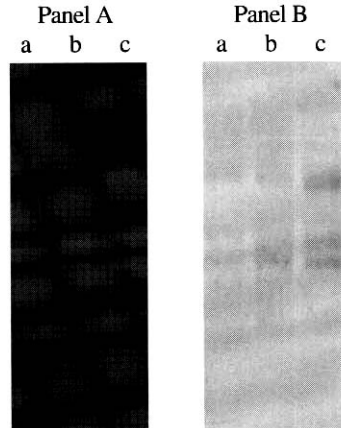


Fig. 1. Digestion profiles of R plasmid DNAs isolated from 3 multi drug resistance streptococcal isolates followed Southern blot hybridization. Panel A, Agarose gel electrophoretic profile of R plasmid DNAs digested by *Bam*H1 ; Panel B, Blotted with DNAs of panel A on nylon membrane and hybridized with pST9 DNA labeled with digoxigenin-dUTP. a, pST64, b ; pST129 ; c, pST9.

같은 DNA구조를 갖는 전이성 R plasmid에 의하여 전이된다고 하였다. 그러므로 본 연구에서 나타난 복합내성균주의 약제 내성전이에 R plasmid가 관여하고 있을 것으로 보아 R plasmid 분리를 시도하였다. 3균주로부터 전이성 R plasmid를 분리하였는데, 이들을 각각 pST9, pST64, pST129로 명명하였으며 pST9는 probe제작에 이용하였다. 이들 plasmid DNA의 *Bam*H I 절단형태 및 pST9로 제작된 probe와 Southern blot hybridization을 실시한 결과를 Fig. 1에 제시하였다. 이들 전이성 R plasmid DNA는 서로 동일한 구조임을 알 수 있었다. 그러므로 대부분의 어류병원세균에서와 같이 넙치병어에서 분리된 연쇄상구균들에도 동일한 DNA구조의 전이성 R plasmid가 널리 분포할 것으로 생각되었다.

동일 DNA구조인 R plasmid의 출현빈도

동일 DNA구조를 한 R plasmid의 집단내 출현 빈도를 보기 위하여 colony 혼성화 반응을 실시한 결과 (Fig. 2), 6균주에서 (1, 12, 13, 19, 29, 36) 강한 positive 결과가 나타났다. 이들 양성반응

균주 중 36번은 ABPC에만 저항성을 보여 다른 내성인자는 없었으나, 동일 DNA구조의 plasmid가 존재하는 것으로 보였다. 이 외에 donor를 포함한 양성반응균주들은 모두 OTC내성을 갖는 3약제이상의 내성균주였다. 그러나 양성반응이 나타날 것으로 예측하였던 다제내성인 15, 17, 22, 23, 27번의 균주가 혼성화음성 결과를 보였다. Adams *et al.* (1998)은 *Aeromonas salmonicida*의 OTC내성의 약 66%가 plasmid에 의하여 *Escherichia coli*로 전이되었는데, 이들 전이성 plasmid의 구조가 서로 다름을 보고하였다. 본 연구에 사용된 연쇄상구균에 있어서도 OTC 내성을 보인 10균주 중, 혼성화 반응에서 positive를 보인 균주는 7균주였고, 3균주는 negative 반응을 보였다. 그러므로 이들 OTC 내성 유전자는 본 실험에서 probe로 사용하였던 전이성 R plasmid와 DNA 구조가 다른 plasmid에 존재할 것으로 생각되나, 이들 plasmid의 분포는 EM내성 관련 plasmid의 유무와 함께 추가 연구가 필요할 것으로 생각되었다.

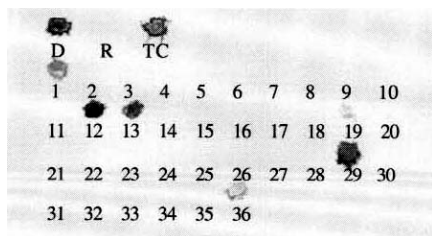


Fig. 2. Colony hybridization with digoxigenin-dUTP labelled pST9 DNA against different DNAs of streptococcal isolates. D, DNA of is donor strain (ST9); R, DNA of recipient strain; TC, DNA of transconjugant received R plasmid from the donor. Six strains, 1, 12, 13, 19, 29 and 36 show positive signal.

요 약

본 연구는 넙치 병어에서 분리된 연쇄상구균들의 항균제 내성 경향을 파악하고, 약제내성의 전이에 관여하는 R plasmid를 검출하여, 분리 균주들 내에서 이들 plasmid의 분포를 알아보기 위

하여 실시하였다. 넙치 병어에서 분리된 연쇄상구균 40 균주의 대부분은 ampicillin, doxycycline (DOXY), erythromycin, florfenicol, flumequine, norfloxacin, oxolinic acid, oxytetracycline (OTC)의 2~5약제에 동시내성을 나타내었다. 이들 내성균으로부터 내성 전이에 관여하는 R plasmid (pST9)가 검출되었으며, OTC와 DOXY내성이 R plasmid에 의하여 수용균인 *Streptococcus sp.*로 전이가 이루어졌다. 전이성 R plasmid의 분포를 알아보기 위하여 colony 혼성화 반응을 실시한 결과, 40 분리 균주 중 6 균주에 동일한 DNA구조의 R plasmid가 존재하는 것으로 나타났다. 그러므로 이들과 DNA구조가 다른 R plasmid도 넙치병어에서 분리되는 연쇄상구균의 약제내성에 관여하고 있음을 시사하였다.

감사의 말씀

이 논문은 2001년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구된 결과의 일부이며, 이에 감사드립니다. (KRF-2001-002-H00008)

참 고 문 헌

- Adams, C.A., Austin, B., Meaden, P.G. and McIntosh, D. : Molecular characterization of plasmid mediated oxytetracycline resistance in *Aeromonas salmonicida*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64 : 4194-4201, 1998.
- Anderson, D.G. and McKay, L.L. : Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46 : 549-552, 1983
- Aoki, T. : Drug resistant plasmids from fish pathogen. *Microbiol. Sci.*, 5 : 219-223, 1988.
- Ausbel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. : Short protocols in molecular biology, 3rd., John Wiley & Son, 1995.

- Choi, M.S., Park, K.H., Choi, S.H., Jang, S.I., Yoon, C. Y., Cho, J. G. and Song, H. J. : Survey of drug resistance in *Edwardsiella tarda* isolated from diseased eels (*Anguilla japonica*). J. Fish. Pathol., 9 : 195-210, 1996. (in Korean)
- Choi, M.S., Park, K.H., Joung, K.M., Shim, H.B. and Yun, S.H. : Effect of levamisole on immunomodulation of eels (*Anguilla japonica*) in vitro. J. Fish Pathol., 12 : 16-23, 1999. (in Korean)
- Eldar, A., Horovitz, A. and Bercovier, H. : Development and efficacy of a vaccine against *Streptococcus iniae* infection in farmed rainbow trout. Vet. Immunol. Immunopathol., 56 : 175-183, 1997.
- Hwang, M.H., Park, S.I. and Kim, Y.C. : Effect of dietary herb medical stuff on the non-specific immune response of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. J. Fish Pathol., 12 : 5-15, 1999. (in Korean)
- Kim, E. : Transferable R plasmid of *Edwardsiella tarda* isolated from diseased flounder, *Paralichthys olivaceus*. J. Fish Pathol., 12 : 115-121, 1999. (in Korean)
- Kim, E. : Drug sensitivity of *Streptococcus* sp. isolated from cultured flounders. Bull. Yosu Nat'l Univ., 14 : 583-589, 1999. (in Korean)
- Kim, E. and Aoki, T. : Drug resistance and broad geographical distribution of identical R plasmid of *Pasteurella piscicida* isolated from cultured yellowtail in Japan. Microbiol. Immunol., 37 : 103-109, 1993.
- Kim, E. and Aoki, T. : The transposon like structure of IS26-tetracycline, and kanamycin resistance determinant derived from transferable R plasmid of fish pathogen, *Pasteurella piscicida*. Microbiol. Immunol., 37 : 103-109, 1994.
- Kwon, M.G., Kim, Y.C., Sohn, Y.C. and Park, S.I. : The dietary supplementing effects of kugija, *Lycium chinense*, on immune responses of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, to *Edwardsiella tarda*. J. Fish Pathol., 12 : 73-81, 1999. (in Korean)
- L'Abée-Lund, T.M. and Sorum, H. : Functional Tn5393-like transposon in the R plasmid pRAS2 from the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* subspecies *salmonicida* isolated in Norway. Appl. Environ. Microbiol., 66 : 5533-5535, 2000.
- Lee, D.C., Lee, J.I., Park, C.I. and Park, S.I. : The study on the causal agent of streptococcosis (*Lactococcus garvieae*), isolated from cultured marine fishes. J. Fish Pathol., 14 : 71-80, 2001. (in Korean)
- Murray, P.R., Baron, E.J., Tenover, F.C. and Tenover, R.H. : Manual of clinical microbiology. 7th ed. 1469-1497. American Society for Microbiology, Washington, USA, 1999.
- Nguyen, H.T. and Kanel, K. : Selective agars for the isolation of *Streptococcus iniae* from Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, and its cultural environment. J. Appl. Microbiol., 86 : 769-776, 1999.
- Oh, S.P., Kim, D.W., Lee, J.J. and Lee, C.H. : Bacterial disease in flounder farms of Cheju island. J. Fish Pathol., 11 : 23-27, 1998. (in Korean)
- O'Sullivan, D.J. and Klaenhammer, T.R. : Rapid mini prep isolation of high quality plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus* spp. Appl. Environ. Microbiol., 59 : 2730-2733, 1993.
- Yoo, M.H., Jeong, J.B., Kim, E., Lee, H.H. and Jeong, H.D. : Application of a new conjugation method to fish pathogenic bacteria con-

taining R plasmid for the analysis of drug-resistant status in aquaculture. J. Korean Fish. Soc., 35 : 115-121, 2002. (in Korean)

심두생, 이주석, 허문수, 김진우. : 양식생물질병진단 연구. 국립수산진흥원 사업보고서, 405-423, 1995.

전홍기, 김선희 : 항생물질과 약제내성 메커니즘. pp. 395. 부산대학교, 2000.

Manuscript Received : January 28, 2003

Revision Accepted : April 3, 2003

Responsible Editorial Member : Jin-Woo Kim
(NFRDI)