The Korean Journal of Microbiology, Vol. 40, No. 1, March 2004, p. 1-6
Copyright©2004, The Microbiological Society of Korea

김치에서 tetracycline 내성 유산균의 분리

강효진 · 김병천 · 박 완*
경북대학교 자연과학대학 미생물학과

대구지역에서 수집한 50점의 김치 중에서 10점의 김치로부터 tetracycline 내성 세균을 분리하였다. 이 균주들의 tetracycline에 대한 MIC는 25-100 mg/l 이상의 범위로 분포하였으며 다른 항생제에 대한 내성도 다양하였다. *tet*(M), *tet*(O) 특이적 primer를 이용한 PCR에서 HJ9 한 균주에서만 *tet*(M) 유전자가 검출되었으며, *tet*(M)은 플라스미드 상에 존재하는 것으로 나타났다. HJ9 균주의 *tet*(M) 부분 염기서열을 분석한 결과 기존에 보고된 Gram 양성균의 *tet*(M)의 DNA 염기서열 및 아미노산 서열과 각각 90-99%, 94-100%의 높은 상동성을 보였다. 16S rRNA 염기서열을 분석한 결과 HJ9 균주는 *Lactobacillus sakei* 로 동정되었다. 김치를 통하여서도 항생제 내성 유전자의 전파 확산이 가능할 것으로 생각된다.

Key words □ **kimchi, tetracycline resistant lactic acid bacteria, *tet*(M), plasmid, *Lactobacillus sakei***

항생제를 임상 치료제로 사용한 이래 지난 수십 년 동안 항생제 내성균에 대한 연구는 주로 임상 병원성 세균에 초점을 맞추어 이루어져 왔다(1). 그러나 항생제의 이용범위가 점차 넓어져 수의, 축산, 어류 양식 등의 분야에서 치료제, 예방제, 또는 생육촉진제로, 채소 원예 및 과수 작물생산 분야에서는 생물농약으로 사용되기까지 이르렀다(3, 30). 이에 따라 항생제의 무분별한 오 · 남용으로 항생제 내성균의 문제는 이제 임상분야뿐만 아니라 우리의 일상생활 주변까지 침투해 들어오고 있다. 항생제에 노출되어 있는 농장의 가축과 농산물은 먹이연쇄를 통해 동물과 인간에게 내성균이 역류될 가능성이 있어 최근에는 식품의 안정성 측면에서 우유, 고기, 채소 등의 농산물 가공제품이 항생제 내성세균의 운반기구로 역할 할 수 있을 가능성에 대해 많은 관심이 집중되고 있다.

특히 *Lactobacillus* 같은 유산균의 경우 동물과 사람의 소화관에 서식하는 주요 세균이다(7). 이런 세균들은 인체 병원균에서 발견되는 내성 유전자의 저장고 역할을 할 가능성이 있으며, 실제 닭, 송아지, 돼지 같은 가축 또는 그 분변에서(15, 16, 29, 34, 35), 건강한 사람의 분변에서(20) 항생제 내성 유산균을 분리한 보고가 있다. 이들 공생세균들은 항생제에 노출되어 있는 농장의 가축 장내에 서식할 수 있고, 따라서 이들로부터 제조된 우유, 고기의 가공제품이 내성세균에 오염될 수 있으며, 실제 축산물의 가공제품으로부터 항생제 내성 유산균이 분리되어(18, 23, 27, 28, 37) 농, 축산물의 발효가공품이 먹이연쇄를 통해 내성 유산균의 확산에 중요한 운반기구가 될 수 있음을 보여주었다. 유산균은 식품, 사료, 제약 공업에 널리 이용되고 있어 앞으로 식품, 사료, 의학 공업 분야에서 세균 간에 내성유전자의 상호 교환, 전달은 주요 관심사로 대두될 것이다.

이 연구에서 우리는 한국의 가장 대표적인 유산균 발효식품중의 하나로 한국인의 식생활과 아주 밀접한 김치로부터 항생제 내성 균주의 분리를 시도하여 tetracycline 내성 균주를 분리하고, 균주의 동정, *tet* 유전자의 분자적 특성을 밝힌 결과를 보고한다.

재료 및 방법

항생제 내성 유산균의 분리

김치로부터 항생제 내성 유산균을 분리하기 위하여 가정에서 담근 김치나 시판 배추김치를 사용하였다. 시기와 장소를 달리하여 무작위적으로 수집한 배추김치를 무균적으로 잘게 다진 다음, 그 중 1 g을 살균 생리식염수 20 ml에 현탁하고 단계적으로 희석하여 0.2% $CaCO_3$를 포함한 MRS (Difco)고체 배지에 도말하여 30°C에서 48 시간동안 배양하였다. 이중에서 약 100-300 개의 콜로니가 출현한 plate를 master plate로 하여 항생제가 첨가된 MRS 평판배지에 replica하고 30°C에서 48 시간동안 배양한 후 출현한 콜로니 주위에 투명환을 생성하는 균주를 항생제 내성 유산균으로 분리하였다. 이 때 첨가한 항생제는 ampicillin (50 mg/l), kanamycin (30 mg/l), streptomycin (30 mg/l), chloramphenicol (50 mg/l), tetracycline (12 mg/l)을 사용하였다. 내성균을 분리할 때, 한 시료로부터는 특정의 항생제 평판배지 상에 다수의 콜로니가 출현하더라도 그 항생제에 대한 내성균주로서 한 콜로니만 임의적으로 선택하였다.

분리한 균주는 30%의 glycerol이 첨가된 MRS액체 배지에 균을 넣어 -70°C에서 보존하였다.

항생제 감수성 검사

Tetracycline에 대한 감수성 검사는 2 배씩 단계적으로 희석한

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 053-950-5376, Fax: 053-955-5522
E-mail: celllife@knu.ac.kr

약제를 포함하는 MRS 액체 또는 고체 평판배지에서 실시하였다. 생육저지 최소 농도(MIC)는 육안으로 증식이 관찰되지 않는 최소 농도로 하였다. 기타 항생제에 대한 감수성 검사는 ampicillin, STX (sulfamethoxazole/trimethoprim), kanamycin, tetracycline, chloramphenicol, amoxicillin, cephalothin, streptomycin, gentamycin, amikacin, nalidixic acid, ampicillin/sulbactam, cefoxitin, ciprofloxacin, ceftriaxone, ticacillin, bacitracin 등 총 17 종을 사용하여 디스크 확산법으로 실시하였다. 항생제 디스크는 BBL 회사 (Becton Dickinson Microbiology Systems Cokeysville, MD., USA)의 제품을 사용하였으며 내성균의 판정은 National Committee for Clinical Laboratory Standards에 따랐다(25).

분리균주의 동정

균의 형태, Gram 염색, API 20E reagent kit (BioMeriux, France)을 이용한 생리적 특성의 검사와 함께 16S rRNA 염기서열 분석을 통하여 분리균주의 동정을 행하였다. 1.5 kb의 16S rRNA 유전자는 primer GF1, GR1 (Table 1)을 사용하여 염색체 DNA의 PCR 증폭을 통하여 분석하였다.

DNA 분리

염색체 DNA 분리는 하룻밤 배양한 균체를 STES buffer (8% sucrose, 5% triton X-100, 50 mM Tris pH8.0, 50 mM EDTA)로 씻은 후, 같은 완충액에 현탁하여 lysozyme (20 mg/l), 2% SDS의 처리, phenol과 PCI (phenol:chloroform:isoamylalcohol) 추출 과정을 거쳐 ethanol 침전으로 DNA를 회수, 건조 후 멸균 증류수에 용해하였다(21).

플라스미드 DNA 분리는 Danielsen의 방법을 따랐다(2, 12). 0.1%의 glycine을 첨가한 MRS액체 배지에 균을 접종하여 30°C에서 24 시간 배양한 균액 10 ml를 취하여 원심 집균하여 STE buffer (6.7% sucrose, 50 mM Tris pH8.0, 0.1 mM EDTA)로 세척, 집균한 후 -20°C에서 1 시간 동결하였다. 이를 STE buffer 370 µl에 현탁하고 50 mg/l lysozyme 용액 50 µl, 100 U mutanolysin (Sigma, MO., USA)을 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 처리하였다. 여기에 50 µl의 0.25 M EDTA, 50 mM Tris - HCl buffer (pH8.0)를 더해 얼음 위에서 5 분간 방치하고 또 실온에서 5 분간 방치한 후, 20% SDS를 30 µl 첨가해서 37°C에서 10 분간 반응시키고 다시 3 N NaOH를 30 µl 첨가하여 실온에서 10 분간 반응시켰다. 그리고 50 µl의 2 M Tris - HCl buffer (pH7.0)를 넣고 3분간 교반하고 70 µl의 5 M NaCl을 넣어주었다. 이어서 이 용균액을 같은 용량의 PCI (phenol:chloroform:isoamylalcohol)로 3번 추출한 후 ethanol로 DNA를 침전 시키고 건조 후 멸균 증류수에 용해하였다.

PCR, 클로닝, DNA 염기서열 분석, Southern blot

특정 유전자의 존재 여부나 염기서열 분석을 위한 유전자의 클로닝은 PCR을 이용하여 DNA를 증폭시켜 수행하였다. PCR은 염색체 또는 플라스미드 DNA의 주형 DNA, 10 pmol의 primer, 10 mM dNTP, 10 mM Tris-HCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 1 U Taq DNA polymerase를 함유한 반응액을 Thermal cycler (PROGENE, TECHNE, UK)를 사용하여 94°C에서 5 분간 전처리 한 후, 94°C에서 1 분간 변성, 재생반응은 primer에 따라 온도를 달리한 각 온도에서 1 분간, 연장반응은 72°C에서 2 분간, 30 회 반복하고 마지막 연장반응을 70°C에서 10 분간 실시하였다. 각 실험에 사용한 primer와 재생온도는 Table 1에 나타내었다.

필요에 따라 증폭한 PCR 산물은 agarose gel 전기영동으로 목적 밴드를 분리하고 Accuprep Gel purification kit (Bioneer, Daejeon, Korea)으로 정제하여 pT7 blue vecter (Novagen Co., Madison, WI, USA)에 클로닝하여(14) Automatic DNA sequencer (ABI prism 3700, Applied Biosystems, Foster City, USA)를 사용하여 염기서열을 읽었다. 염기서열의 비교, 분석은 GenBank의 자료를 이용하여 NCBI BLAST와 DNASIS ver2.6 (Hitachi software), CLUSTAL X ver1.81을 이용하였다.

Southern blot의 전체과정은 대체로 Sambrook 등(32)의 방법에 따랐다. 플라스미드의 Southern blot은 플라스미드를 그대로, 또는 제한효소 *Sac*I, *Eco*RI/*Sal*I 처리하여 수행하였으며 probe는 tet(M)1, tet(M)2 primer로 증폭한 PCR 산물 670 bp를 제조사의 지시에 따라 Gene images AlkPhos Direct labelling kit (Amershampharmacia Biotech, USA)으로 표지하여 사용하였다.

Tetracycline 내성 유전자 및 분리한 균의 16S rRNA 염기서열 등록번호

Tetracycline에 대한 내성 유전자인 *tet*(M)의 1535 bp의 염기서

Table 1. Primers for PCR detection of *tet* and 16S rRNA genes

Primer	Target gene	Sequence[a]	Annealing Temp.	Reference
GF1(+)	16S rRNA	5'-TAACACATGCAAGTCGAACG-3'	56°C	4
GR1(-)		5'-GGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAG-3'		
tet(M)1(+)	*tet* (M)	5'-GTTAAATAGTGTTCTTGGAG-3'	58°C	9
tet(M)2(-)		5'-CTAAGATATGGCTCTAACAA-3'		
RPP1(+)	*tet* (M)	5'-GAYACNCCNGGNCAYRTNGAYTT-3'	55°C	9
tet(M)R-2(-)		5'-CACCGAGCAGGGATTTCTCCAC-3'		
tet(O)1(+)	*tet* (O)	5'-GATGGCATACAGGCACAGAC-3'	55°C	9
tet(O)2(-)		5'-CAATATCACCAGAGCAGGCT-3'		

[a] Y= C and T, N= A, C, G and T, R= A and G

열은 GenBank database에 accession No. AY442935로, 또 *tet*(M)이 검출된 균의 16S rRNA 염기서열은 accession No. AY442936으로 등록되었다.

결과 및 고찰

김치로부터 tetracycline 내성 유산균의 분리

서로 다른 시기와 장소에서 독립적으로 수집한 50 점의 배추김치로부터 항생제 내성 유산균의 분리를 시도한 결과, ampicillin, chloramphenicol에 대한 내성균주는 출현하지 않았으며 tetra-cycline 내성균주는 10 점의 시료로부터 분리할 수 있었으며 이를 HJ1~10으로 명명하였다. 한편 streptomycin과 kanamycin에 대해서는 거의 모든 콜로니가 내성을 나타내었는데 이는 유산균 특히 *lactobacilli*가 streptomycin, kanamycin과 같은 aminoglycoside계 항생제에 비감수성을 나타낸다는 보고와 잘 일치하고 있다(13, 22).

10 점의 시료에서 분리한 tetracycline 내성의 10 균주의 tetracycline에 대한 MIC를 측정한 결과 HJ5, 6, 7, 10 네 균주는 25 mg/l, HJ1, 2 두 균주는 50 mg/l, HJ3 한 균주는 100 mg/l, 나머지 HJ8, 9 두 균주는 100 mg/l 이상의 MIC를 나타내었다. 여러 종류의 다른 항생제에 대한 이들 균주의 감수성을 조사한 결과도 다양한 감수성 양상을 보였으며(자료 미제시), 이는 유전적 배경이 다른 다양한 종류의 tetracycline 내성균주가 분리된 것을 보여주고 있다. 이처럼 다른 항생제에 비해 tetracycline에 대해 비교적 높은 빈도로 김치로부터 내성균이 분리되는 것은 tetracycline이 항균 스펙트럼, 안정성, 경제성 등의 이유로 많은 가축의 성장촉진제나 치료제로서, 또 작물이나 과수의 생산에 전 세계적으로 광범위하게 사용되고 있는 실정을 반영하는 것일 수도 있을 것이다(17). 실제 유럽 등지에서 유제품이나 축산제품의 발효식품에서 tetracycline 내성 유산균의 분리가 다수 보고되고 있다(5, 12, 17, 19, 36)

항생제 내성세균이 microflora로 있는 김치의 존재는 우리가 일상적으로 섭취하는 김치가 항생제 내성세균의 운반기구로 작용할 가능성을 보여주고 있으며, 특히 최근에는 김치가 식품공장에서 대량으로 제조되어 전국적으로 공급되고 있는 실정임을 감안할 때 항생제 내성 유전자의 확산 전파가 한층 더 가속화될 수 있을 것으로 생각된다.

Tetracycline 내성 유전자

Tetracycline에 대한 내성 기작은 에너지 의존성의 세포 바깥으로 약제의 수송이나 tetracycline 공격으로부터 리보좀의 보호, 효소적인 약제의 불활성화(33), 그리고 아직 그 내용이 알려져 있지 않는 기작 등 크게 네 가지로 나눌 수 있으며, 각각의 기작과 관련된 다수의 유전자가 알려져 있다(8, 30). Gram 양성균의 경우 가장 높은 빈도로 출현하는 tetracycline 내성 유전자는 리보좀 보호 단백질을 생성하는 부류에 속한 *tet*(M)으로 알려져 있다(11, 26, 30, 31).

김치에서 분리한 tetracycline 내성균주의 tetracycline 내성 관련 유전자를 규명하기 위하여 우선 Gram 양성균에 높은 빈도로 출현하는 *tet*(M) 유전자와 *tet*(M)과 67%의 상동성을 가진 *tet*(O)유전자의 존재를 PCR로 검출 하고자 했다. 각 균주로부터 분리한 전 DNA를 주형으로 *tet*(M)을 검출하기 위하여 primer tet(M)1과 tet(M)2, RPP1과 tet(M) R-2를, *tet*(O)의 경우는 tet(O)1과 tet(O)2를 사용하여 PCR을 수행한 결과 HJ9 균주만 *tet*(M) 유전자가 검출되었고 나머지 9 균주는 검출되지 않았으며, *tet*(O) 유전자는 모든 균주에서 검출되지 않았다(자료 미제시). HJ9균주와 나머지 다른 균주들은 서로 다른 기작에 의해 tetracycline에 대해 내성을 나타내는 것으로 생각된다.

HJ9 균주로부터는 플라스미드 DNA를 주형으로 PCR을 하여도 전 DNA를 주형으로 한 경우와 마찬가지의 결과를 얻을 수 있었는데, tet(M)1, tet(M)2 primer로는 예상 크기 약 670 bp의 산물을, RPP1과 tet(M) R-2의 경우는 예상 크기 약 1.5 kb 크기의 생성물을 확인할 수 있었으나 *tet*(O) 유전자는 이 경우에도 확인할 수 없었다(Fig. 1).

tet(M) 유전자는 Gram 양성세균에서 많은 경우 Tn*916*, Tn*1545* 등의 접합성 인자와 함께 염색체에 존재하는 것으로 알려져 있으나(6, 8, 10, 24), 발효 소시지에서 분리한 *Lactobacillus* 의 경우 24 균주 중에서 20 균주(16)에서, 또 silage에서 분리된 *L. plantarum*의 경우도 *tet*(M) 유전자가 플라스미드에 존재한다는 보고가 있는데(12), HJ9의 경우도 플라스미드 DNA를 주형으로 한 PCR에서 *tet*(M)이 검출됨으로 플라스미드성일 가능성도 생각되어 플라스미드를 대상으로 Southern blot을 실시하였다. Fig. 2에서 보는 것처럼 *tet*(M) 유전자는 HJ9 균주의 네 개의 플라스미드 밴드 가운데 두 번째 큰 플라스미드(46 kb) 밴드 상에 존재하는 것으로 나타났으며, 또 플라스미드를 임의의 제한효소로 처리한 경우 *Sac*I의 9.3 kb와, *Eco*RI-*Sal*I 7.8 kb 단편 상에 있는 것으로 나타났다. 따라서 HJ9 균주의 *tet*(M)은 플라스미드

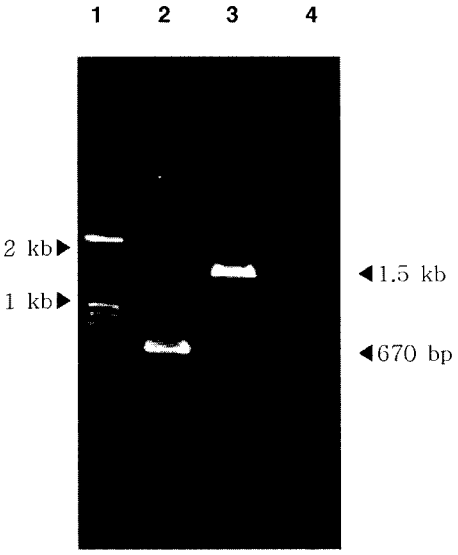

Fig. 1. PCR detection of *tet*(M) gene on the plasmid of HJ9 isolate. Lanes: 1, 100 bp ladder marker; 2, primer tet(M)1/tet(M)2; 3, primer RPP1/tet(M)R-2; 4, tet(O)1/tet(O)2.

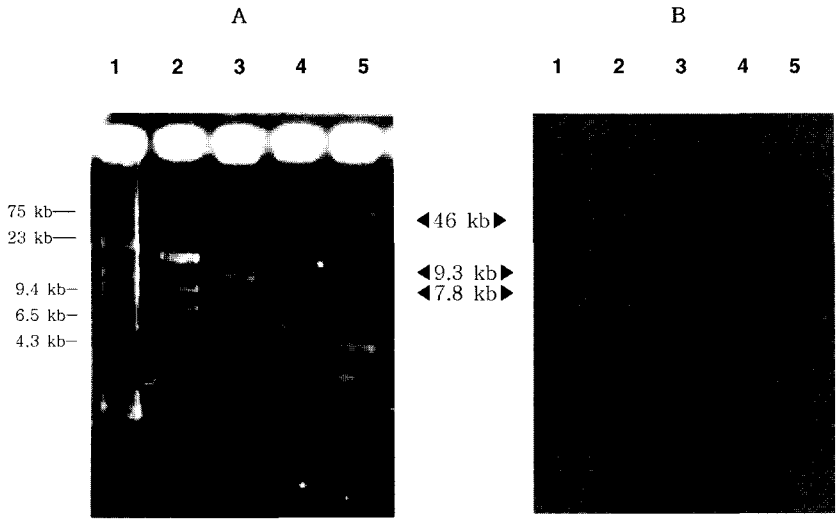

Fig. 2. Southern blot analysis of the plasmid of HJ9 using the *tet*(M) probe. Uncut plasmid and restriction enzyme digested plasmid were fractionated on agarose gel (A). The DNA transferred on the membrane was hybridized with labeled 650 bp *tet*(M) PCR product as a probe (B). The hybridized 46 kb uncut plasmid and restriction fragments were indicated by the arrowhead. Molecular sizes are indicated on the left in kb. Lanes: 1, plasmid DNA of molecular weight size marker; 2, lambda *Hind*III size marker; 3, uncut plasmid; 4, *Sac*I-digested plasmid; 5, *Eco*RI and *Sal*I digested plasmid.

상에 존재하는 것으로 생각된다. 플라스미드성 tetracycline 내성 *Lactobacillus* 균주의 경우 염색체성 내성 균주보다 tetracycline에 대한 MIC가 적어도 네 배 이상 높다는 보고가 있는데(30), HJ9 균주도 MIC가 100 mg/l 이상으로 분리된 균주 중에서 가장 높은 값을 보였는데 *tet*(M) 내성 유전자가 플라스미드 상에 존재하는 것과 관련이 있을 것으로 생각된다. 항생제 내성 유전자를 지닌 플라스미드의 존재는 내성 유전자의 수평적 전달에 중요한 역할을 담당할 수 있는데, HJ9 균주의 플라스미드가 전달성 플라스미드인지, 아니면 *tet*(M) 내성 유전자가 transposon으로 있는지는 앞으로 규명해야 할 과제로 생각한다.

HJ9 균주의 *tet*(M) 유전자의 특성을 좀 더 규명하기 위하여 *tet*(M)의 일부분 서열인 PCR 산물 1.5 kb 단편을 클로닝하여 DNA 염기서열을 분석하였다 (GenBank accession no. AY442935). Methionine에서 시작하는 *tet*(M)의 ORF는 639 아미노산 잔기로 이루어져 있는데, 결정된 1.5 kb의 염기서열은 74-584 번 아미노산 잔기에 해당하였다. HJ9 균주의 *tet*(M) 부분 염기서열은 보고된 *Lactobacillus* 염기서열과 최소 97%에서 99%로 높은 상동성을 나타냈으며, 아미노산 서열로 변환한 경우에는 더욱 높아져 98%에서 100%의 상동성을 보였다. 유산균을 포함하는 다른 Gram 양성세균과도 최소 90% (*C. septicum*)에서 99%의 높은 염기서열 상동성을 보였으며, 아미노산 서열로도 94%에서 99%의 높은 상동성을 보여주었다(Table 2). *tet*(M) 유전자의 기원은 tetracycline 생산균 *Streptomyces* 균으로 추정되는데, 이 유전자가 플라스미드나 tarnsposon 같은 가동성 유전자에 실려서 광범위하게 퍼져 나갔을 것으로 생각되고 있다(8, 24).

Table 2. Comparison of the partial nucleotide and deduced amino acid sequence of *tet*(M) of HJ9 isolate to other reported sequences of Gram-positive bacteria

	Strain[a]	Identity(%)	
		DNA	Amino acid
Lactic Acid Bacteria	*Lactobacillus sakei* HJ9	100	100
	Lactobacillus sakei DG525	99	100
	Lactobacillus sakei carnosus	99	100
	Lactobacillus curvatus DG524	99	100
	Lactobacillus plantarum MD5057	97	98
	Lactobacillus plantarum DG520	97	98
	Lactobacillus alimentarius DG500	98	100
	Streptococcus pneumoniae	93	96
	Enterococcus faecalis	97	98
Other Gram-Positive Bacteria	*Bacillus* R89	98	99
	Staphylococcus aureus	99	99
	Clostridium septicum	90	94

[a]*Lactobacillus sakei* DG525 (GenBank Accession No. AY149596)
Lactobacillus sakei carnosus (GenBank Accession No. AY149592)
Lactobacillus curvatus DG524 (GenBank Accession No. AY149595)
Lactobacillus plantarum MD5057 (GenBank Accession No. AF440277)
Lactobacillus plantarum DG520 (GenBank Accession No. AY149593)
Lactobacillus alimentarius DG500 (GenBank Accession No. AY149587)
Streptococcus pneumoniae (GenBank Accession No. X90939)
Enterococcus faecalis (GenBank Accession No. X92947)
Bacillus R89 (GenBank Accession No. AF491293)
Staphylococcus aureus (GenBank Accession No. M21136)
Clostridium septicum (GenBank Accession No. AB054984)

Tetracycline 내성 유산균 HJ9의 동정

Tetracycline 내성 유전자 *tet*(M)을 플라스미드 상에 가지고 있는 HJ9 균주의 동정과 생리적 특성을 살펴보았다. Gram 양성 간균으로 catalase가 없는 HJ9 균주의 생리적 특성은 Table 3에

Table 3. Morphological and physiological characteristics of *Lactobacillus sakei* HJ9[a]

Characteristics	
Gram staining	+
Cell type	Rod
Mobility	-
Catalase	-
β-galactosidase	-
Arginine dihydrolase	-
Lysine decarboxylase	-
Ornithine decarboxylase	-
Citrate utilization	-
H_2S production	-
Urease	-
Triptophan deaminase	+
Indole production	-
Gelatinase	-
Glucose	+
Mannitol	+
Inositol	+
Sorbitol	+
Rhamnose	+
Sucrose	+
Melibiose	+
Amygdalin	+
Arabinose	+
NO_2 production	+

[a]Results were obtained after culture for 24 h at 30°C

나타내었다. PCR을 이용해 클로닝한 HJ9 균주의 16S rRNA 유전자의 염기서열을(GenBank Accession No. AY442936) 분석한 결과 유산 간균 *Lactobacillus sakei* 유전자의 염기서열과 99%의 상동성을 가진 것으로 나타나, HJ9 균주를 *Lactobacillus sakei* HJ9로 명명하였다.

김치에서 tetracycline 내성균주로 분리된 HJ9 균주가 플라스미드 상에 *tet*(M) 유전자를 갖고 있고 *Lactobacillus*로 동정됨에 따라 *Lactobacillus*가 플라스미드성 *tet* 유전자의 숙주가 될 수 있음을 보여주고 있다. *Lactobacillus*는 김치의 주요한 microflora로 동물과 사람의 소화관에 서식하는 미생물로 중요한데, 김치가 항생제 내성 *Lactobacillus*의 운반수단으로 작용하고 항생제 내성 *Lactobacillus*는 장내 세균군에 내성 유전자를 전달할 수 있는 저장고로 기능할 가능성을 생각할 수 있을 것이다. 우리가 일상적으로 섭취하고 있는 김치와 같은 유산균 발효식품을 통해서도 항생제 내성 유전자가 확산 전파될 수 있는 가능성을 생각할 때, 특히 공장에서 대량생산되는 김치의 생산과 품질관리 면에서 내성균의 오염을 감시하는 시스템의 확립 등, 이에 대한 대비책을 강구해야 할 것이다.

참고문헌

1. 마점술. 1988. 항생제 및 약품에 대한 내성세균의 문제. *Kor. J. Anim. Nutr. Feed.* 12, 58-68.
2. 백영진. 1985. 유산균 plasmid DNA의 신속 간편한 분리 방법. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 13, 289-296.
3. 이연희. 2001. 항생제 내성세균의 문제점. 제 83차 대한미생물학회 학술대회 초록집. 109-116.
4. 최은화, 이상은, 윤기순, 권덕기, 손재근, 박승환, 한명숙, 김사열. 2003. 벼과식물로부터 질소고정세균의 분리와 nitrogenase 활성 측정. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 31, 18-24.
5. Aarestrup, F.M., Y. Agerso, P. Gerner-Smidt, M. Madsen, and L.B. Jensen. 2000. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus* faecalis and *Enterococcus* faecium from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diag. Microbiol. Inf. Dis.* 37, 127-137.
6. Agerso, Y., L.B. Jensen, M. Givskov, and M.C. Roberts. 2002. The identification of a tetracycline resistance gene *tet*(M), on a Tn*916*-like tansposon, in the *Bacillus cereus* group. *FEMS Microbiol. Lett.* 214, 251-256.
7. Baek Y.J. Health benefits of yogurt cultures. 2000. Proc. KSAM Fall Meeting.
8. Chopra, I. and M. Roberts. 2001. Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65, 232-260.
9. Clermont, D., O. Chesneau, G.D. Cespedes, and T. Horaud. 1997. New tetracycline resistance determinants coding for ribosomal protection in *Streptococci* and nucleotide sequence of *tet*(T) isolated from *Streptococcus* pyogenes A498. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 112-116.
10. Clewell, D.B., S.E, Flannagan, and D.D. Jaworski. 1995. Unconstrained bacterial promiscuity: the Tn*916*-Tn*1545* family of conjugative transposons. *Trends Microbiol.* 3, 229-236.
11. Connell, S.R., C.A. Trieber, G.P. Dinos, E. Einfeldt, D.E. Taylor, and K.H. Nierhaus. 2003. Mechanism of TET(O)-mediated tetracycline resistance. *EMBO J.* 22, 945-953.
12. Danielsen, M. 2002. Characterization of the tetracycline resistance plasmid pMD5057 from *Lactobacillus* plantarum 5057 reveals a composite structure. *Plasmid* 48, 98-103.
13. Danielsen, M. and A. Wind. 2003. Susceptibility of *Lactobacillus* sp. to antimicrobial agents. *Int. J. Food Microbiol.* 82, 1-11.
14. Escalante, A., C. Wacher, and A. Farres. 2001. Lactic acid bacterial diversity in the traditional Mexican fermented dough pozol as determined by 16S rRNA sequence analysis. *Int. J. Food Microbiol.* 64, 21-31.
15. Fons, M., T. Hege, M. Ladire, P. Raibaud, R. Ducluzeau, and E. Maguin. 1997. Isolation and characterization of a plasmid from *Lactobacillus fermentum* conferring erythromycin resistance. *Plasmid* 37, 199-203.
16. Frei, A., D. Goldenberger, and M. Teuber. 2001. Antimicrobial susceptibility of intestinal bacteria from Swiss poultry flocks before the ban of antimicrobial growth promoters. *Syst. Appl. Microbiol.* 24, 116-121.
17. Gervers, D. and G. Huys. 2000. Isolation and identification of tetracycline resistant lactic acid bacteria from pre-packed sliced meat products. *Syst. Appl. Microbiol.* 23, 279-284.
18. Gervers, D., G. Huys, and J. Swings. 2003. In vitro conjugal transfer of tetracycline resistance from *Lactobacillus* isolates to other gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 1-6.
19. Gervers, D., M. Danielsen, G. Huys, and J. Swings. 2003. Molecular characterization of tet(M) genes in *Lactobacillus* isolates from different types of fermented dry sausage. *Appl. Environ.*

Microbiol. 69, 1270-1275.
20. Ishiwa, H. and S. Iwata. 1980. Drug resistance plasmids in *Lactobacillus fermentum*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 26, 71-74.
21. Johanson, E. and A. Kibenich. 1992. Characterization of *Leuconostoc* isolates from commercial mixed strain mesophilic starter cultures. *J. Dairy Sci.* 75, 1186-1191.
22. Katla, A-K., H. Kruse, G. Johnsen, and H. Herikstad. 2001. Antimicrobial susceptibility of starter culture bacteria used in Norwegian dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 67, 147-152.
23. Klein, G., A. Pack, and G. Reuter. 1998. Antibiotic resistance patterns of enterococci and occurrence of vancomycin-resistant enterococci in raw minced beef and pork in Germany. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1825-1830.
24. Lanella, P., M. Zagorec, S.D. Ehrlich, and F. Morel-Deville. 1996. Intergeneric and intrageneric conjugal transfer of plasmids pAMâ1, pIL205 and pIP501 in *Lactobacillus sake*. *FEMS Microbiol. Lett.* 139, 51-56.
25. National committee for Clinical Laboratory Standards. 1997. Performance standards for antimicobial disk susceptibility tests, 6th ed. Approved Standard NCCLS document M2-A6. National committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa. USA.
26. Oggioni, M.R., C.G. Dowson, J.M. Smith, R. Provvedi, and G. Pozzi. 1996. The tetracycline resistance gene *tet*(M) exhibits mosaic structure. *Plasmid* 35, 156-163.
27. Pavia, M., C.G.A. Nobile, L. Salpietro, and I.F. Angelillo. 2000. Vancomycin resistance and antibiotic susceptibility of enterococci in raw meat. *J. Food Prot.* 63, 912-915.
28. Quednau, M., S. Ahrné, A.C. Petersson, and G. Molin. 1998. Antibiotic-resistant strains of *Enterococcus* isolated from Swedish and Danish retailed chicken and pork. *J. Appl. Microbiol.* 84, 1163-1170.
29. Rinckel, L.A. and D.C. Savage. 1990. Characterization of plasmids and plasmid-borne macrolide resistance from *Lactobacillus* sp. strain 100-33. *Plasmid* 23, 119-125.
30. Roberts, M.C. 1996. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiol. Rev.* 19, 1-24.
31. Roberts, M.C. 1996. Tetracycline resistance in *Pediococcus* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35, 1682-1684.
32. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
33. Taylor, D.E. and A. Chau. 1996. Tetracycline resistance mediated by ribosomal protection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 1-5.
34. Tannock, G.W., J.B. Luchansky, L. Miller, H. Connell, S. Thode-andersen, A.A. Mercer, and T.R. Kalenhammer. 1994. Molecular characterization of a plasmid-borne (pGT633) erythromycin resistance determinant (*erm*GT) from *Lactobacillus reuteri* 100-163. *Plasmid* 31, 60-71.
35. Vescovo, M., L. Morelli, and V. Bottazzi. 1982. Drug resistance plasmids in *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus reuteri*. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 50-56.
36. Vidal, C.A. and D. Collins-Thompson. 1987. Resistance and sensitivity of meat lactic acid bacteria to antibiotics. *J. Food Prot.* 50, 737-740.
37. Witte, W. 1998. Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science* 279, 996-997.

(Received December 4, 2003/Accepted February 2, 2004)

ABSTRACT: Isolation of Tetracycline-resistant Lactic Acid Bacteria from Kimchi

Hyo-Jin Kang, Byung-Chun Kim and Wan Park*
(Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea)

Tetracycline resistant bacterial strains were isolated from 10 batches of Kimchi among 50 batches collected in Taegu restrict. The MIC of tetracycline ranged between 25 and > 100 mg/l. Total genomic DNA preparation from all 10 tetracycline resistant lactic acid bacterial isolates were subjected to PCR amplification with class-specific primers for *tet*(M) and *tet*(O). In only one isolate, HJ9, *tet*(M) was detected. By Southern blotting and hybridization with a *tet*(M)-specific probe, the *tet*(M) gene of HJ9 isolate could be localized on a plasmid. The partial nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *tet*(M) of HJ9 showed 90-99% and 94-100% homology to those of Gram positive bacteria, respectively. With sequencing of 16S rRNA, HJ9 isolate from Kimchi was identified as *Lactobacillus sakei*. From these results, Kimchi can be considered potential vehicle for the spread of antibiotic-resistant lactic acid bacteria along the food chain to the consumer.