

# 제주지역 양식 넙치(*Paralichthys olivaceus*)에서 분리한 어병세균 내 Erythromycin 내성 유전자 분석

이다원 · 전려진 · 김승민<sup>1</sup> · 정준범\*

제주대학교 해양의생명과학부, <sup>1</sup>주식회사 우진비앤지

## Analysis of Erythromycin Resistance Gene in Pathogenic Bacteria Isolates from Cultured Olive flounder *Paralichthys olivaceus* in Jeju

Da Won Lee, Lyu Jin Jun, Seung Min Kim<sup>1</sup> and Joon Bum Jeong\*

School of Marine Biomedical Sciences, Jeju National University, Jeju 63243, Korea

<sup>1</sup>Central Research Institute, Woo Gene B&G, Hwaseong 48513, Korea

We determined the resistance rates of pathogenic bacteria isolated from cultured olive flounder *Paralichthys olivaceus* to erythromycin (Em), antibiotic typically used in aquaculture and analyzed the genotypes of resistant bacteria using polymerase chain reaction (PCR). We isolated and utilized 160 isolates of *Streptococcus parauberis*, 1 of *S. iniae*, 66 of *Edwardsiella tarda*, 56 of *Vibrio* sp. and 23 of unidentified bacteria from presumed infected olive flounder from Jeju Island from March 2016 to October 2017. Of the 306 isolated strains, Em-resistant strains included 33 of *S. parauberis*, 39 of *E. tarda* and 2 of *Vibrio* sp. We conducted PCR to assess the resistance determination of Em-resistant strains. Five different types of Em-resistance genes were detected in the 74 Em-resistant strains: *erm* (A), *erm* (B), *erm* (C), *mef*(A) and *mef*(E); *erm* (A) and *erm* (B) were detected in 1 (3%) and 24 (72.7%) *S. parauberis* isolates, respectively. In *E. tarda*, *erm* (B) was detected in five isolates (12.8 %) and no Em-resistance genes were detected in the two *Vibrio* sp. isolates.

Key words: Erythromycin, Olive flounder, Resistance gene, Jeju, *erm* (B)

### 서론

1920년대 항생물질이 발견된 이래로 항생제는 질병의 예방이나 치료 목적으로 사용되어져 왔으나, 항생제의 오·남용에 의하여 발생한 항생제 내성균은 질병 치료의 어려움 및 약물 잔류에 의한 안전성 문제 등을 야기하였고, 최근 사회적 문제로서 대두되고 있다. 특히, 동물용 항생제는 감염성 질환의 예방이나 치료 목적 외에도 사료와 혼합하여 가축이나 어류의 성장 촉진을 목적으로도 사용되어졌으며(Lee et al., 2010a), 이와 같은 무분별하고 광범위한 항생제 사용으로 인하여 내성균의 출현이라는 문제가 발생하고 있다.

Animal and Plant Quarantine Agency (APQA, 2009)에 따르면 erythromycin (Em)은 어류양식 산업에서 6.3%의 비중을 차지하며, oxytetracycline에 이어 높은 사용률이 확인되었다. Em은 macrolide계 항생제로서, 세균의 50S ribosome에 가역

적으로 결합하여 세균의 ribonucleic acid (RNA) 의존성 단백질 합성을 억제함으로써 작용한다(Hansen et al., 1999). Em 내성 기전은 크게 두 가지로 밝혀져 있으며, 내성유전자 또한 내성기작에 따라 구분된다. 첫 번째는 methylase를 통해 세균의 ribosome에 항균제가 결합하는 부위를 변화시키는 기작으로, *erm* (erythromycin ribosome methylation) 유전자와 연관되어 있으며, 두 번째로 내재성 막 단백질에 의해 일어나는 efflux pump에 의한 것으로 *mef*(A) (macrolide efflux), *msr* (A) (macrolide and streptogramin B), *vag* (virginiamycin factor) 유전자와 관련이 있다(Lee and Kim, 2013). 내성기작의 특성에 따라 Em 내성 유전자도 그 종류를 달리하는데 rRNA methylase의 경우는 *erm* (A), *erm* (B), *erm* (C) 등이 존재하는 것으로 알려져 있으며, efflux 내성기작을 가지는 유전자는 *mef*(A)가 대표적인 것으로 보고되었다(Sapkota et al., 2006).

최근 들어 macrolide계 항생제 역시 사용량이 증가함에 따라

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2018.0397>



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Korean J Fish Aquat Sci 51(4) 397-403, August 2018

Received 2 July 2018; Revised 5 August 2018; Accepted 14 August 2018

\*Corresponding author: Tel: +82. 64. 754. 3426 Fax: +82. 64. 756. 3493

E-mail address: jeongjb@jejunu.ac.kr

이들 항생제에 대한 내성을 가지는 세균 비율이 증가하고 있다 (Lee and Kim, 2013). 제주지역에서도 분리한 어병세균 내 항생제 내성률을 비교한 결과, 균주 별로 차이가 있으나 Em에 대해 높은 내성률이 확인되었다(Lee et al., 2016). 2016년도 Korean statistical information service (KOSIS) 통계에 따르면, 수산식품 수요 증가에 따른 수산양식량은 증가하고 있으며, 항생제 사용량 역시 증가하고 있는 추세이다. 그에 따라 다양한 균주에서 항생제 내성양상에 대한 많은 연구가 이루어지고 있으나, 국내 양식어류에서 분리한 Em 내성균 및 내성유전자에 대한 연구는 거의 이루어지지 않고 있다(Han et al., 2012; Sung et al., 2013; Lee et al., 2016). 이에 본 연구에서 제주지역에서 분리한 어병세균 내 macrolide계 항생제인 Em에 대해 내성 수준을 확인하고, 내성균주들이 가지는 내성유전자에 대해 분석하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 균주의 채집 및 분리

실험균주는 2016년부터 2017년 제주지역 넙치 양식장의 병

어로부터 분리하여 실험에 사용하였다. 채집한 균주들의 동정을 위해 시료의 내부 장기를 증균배지인 tryptic soy agar (TSA, Difco., USA) 및 brain heart infusion agar (BHIA, Difco., USA)와 선택배지인 thiosulfate citrate bile salts sucrose (TCBS) agar (Difco., USA), salmonella shigella (SS) agar (MB cell, Korea), glutamate starch phenol-red agar (GSP, Sigma-Aldrich, Korea), blood agar (KOMED, Korea)배지에 도말하고, 27°C에서 18-24시간 배양하여 균의 집락 형성 및 형태를 확인하였다. 분리된 균주는 추가적인 실험에 사용되기 전까지 -70°C에서 보관하였다.

### 균주의 동정

분리한 균주 중 선택배지 SS 배지 상에서 검은색 집락을 형성하는 균주를 *Edwardsiella tarda* 균주로 추정하였으며, 비브리오 선택배지인 TCBS 배지 상에서 초록색 또는 노란색 집락을 형성하는 균주를 *Vibrio* sp. 균주로 추정하였다. 각 균주들의 정확한 균 동정은 Higene™ genomic DNA prep kit (BIO-FACT, Korea)를 사용하여 균주들의 genomic DNA를 추출한 후, Table 1에 제시한 primer sets를 사용하여 PCR을 통해 확인하였다.

Table 1. Primer sets used for the identification of bacteria in this study

Target pathogen	Oligonucleotide sequences (5'-3')	Product size (bp)	Reference	
<i>Streptococcus iniae</i>	AAGAGACGCAGTGTCAAAAG	220	Woo et al., 2006	
	CGTTTCTTATCTTGTACTC			
<i>Streptococcus parauberis</i>	TCCAGTCTTTCGACCTTCTT	107		
	CAAAGAGATGTTTCGGCTTG			
<i>Lactococcus garvieae</i>	AAGCAGTCTTTTGATGCAAG	307		
	ACTGTGCGCCCTTATTAAC			
<i>Edwardsiella tarda</i>	CGGTAAAGTTGAGTTTACGGGTG	415		Sakai et al., 2007
	TGTAACCGTGTGGCGTAAG			
<i>Vibrio</i> genus	GTCARATTGAAAARCARTTYGGTAAAGG	689		
	ACYTTRATRCGNGTTTCRTTRCC			
<i>Vibrio alginolyticus</i>	ACGGCATTGGAAATTGCGACTG	199		Kim et al., 2015
	TACCCGTCTCACGAGCCCAAG			
<i>Vibrio anguillarum</i>	GTTTCATAGCATCAATGAGGAG	519		Demircan and Candan, 2006
	GAGCAGACAATATGTTGGATG			
<i>Vibrio harveyi</i>	GTGATGAAGAAGCTTATCGCGATT	601		Kim et al., 2014
	CGCCTTCTTCAGTTAACGCGAGGA			
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	AGCTTATTGGCGGTTTCTGTCCG	297	Kim et al., 2015	
	CKCAACACCAAGAAAAGCCGTC			
<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	GACCTCGGCCATTA	438	Blanco et al., 2002	
	CTCAGCAGTTTTGAAAG			
<i>Flexibacter maritimus</i>	TGTAGCTTGCTACAGATGA	400	Cepeda et al., 2003	
	AAATACCTACTCGTAGGTACG			

## 항생제 감수성 검사

Em 내성균 분리 및 균주 내 항생제계열에 따른 내성비율 확인을 위하여, 항생제 감수성 시험을 clinical and laboratory standards institute (CLSI, 2017) 기준에 따라 실시하였으며, 그 방법은 다음과 같다. 분리균의 증균을 위하여 tryptic soy broth (TSB, Difco., USA)를 사용하였으며, 27°C에서 18-24시간 배양하였다. 배양액은 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup>으로 희석하여 실험에 사용하였으며, 멸균한 면봉을 이용해 mueller hinton agar (MHA, Difco., USA) 평판에 도말한 후, 항생제 디스크를 부착시키고 27°C에서 24시간 배양하였다. 항생제 디스크는 모두 Liofilchem®에서 구입하였으며, amoxicillin (10 µg, AML), amoxicillin/clavulanic acid (30 µg, AUG), ampicillin (10 µg, AMP), chloramphenicol (10 µg, C), ciprofloxacin (5 µg, CIP), doxycycline (30 µg, DXT), enrofloxacin (5 µg, ENR), erythromycin (15 µg, E), gentamycin (10 µg, CN), kanamycin (30 µg, K), minocycline (30 µg, MN), nalidixic acid (30 µg, NA), neomycin (30 µg, N), norfloxacin (10 µg, NOR), ofloxacin (5 µg, OFX), oxolinic acid (2 µg, OA), oxytetracycline (30 µg, OT), penicillin (10 µg, P), streptomycin (10 µg, S), sulfadiazine (300 µg, SUZ), tetracycline (30 µg, TE)으로 총 21종을 사용하였으며, 배양 후 증식억제대를 확인하여 내성균을 분리하였다. 또한, Em 내성균의 내성수준은 broth dilution method를 적용한 minimum inhibitory concentration (MIC) test를 통해 확인하였고, Lee et al. (2010b)의 방법과 유사하게 실시하여 다음과 같다. 항생물질의 최고 농도가 100 µg/mL가 되도록 하여 최종 농도가 0.78 µg/mL가 되도록 mueller hinton broth (MHB, Difco., USA)로 1/2씩 단계희석하였으며, 균 배양액의 농도는 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup>이 되도록 희석하여 준비하였다. 균주들의 MIC 값은 plate를 27°C에서 24시간 배양하여 균의 증식여부에 따른 액체배지의 혼탁도를 확인하여 균이 자라지 않은 최소농도로 결정하였다.

## Erythromycin 내성유전자 검출

분리된 Em 내성균주들은 *erm* (A), *erm* (B), *erm* (C), *mef* (A) 및 *mef* (E)를 후보 유전자로 하여 PCR을 통해 존재여부를 살펴보았으며, 각 내성 관련 유전자 검출을 위한 primer 서열은 Table 2에 나타내었다. PCR 분석을 위하여 1 µM의 각 primer, 2.5 µM의 각 dNTP, 10x G-Taq Buffer, 2.5 U G-Taq DNA polymerase (Gene Pro Thernal Cyclor Cosmo) 및 template DNA를 첨가한 후, distilled water로 PCR 혼합물의 최종 volume이 20 µL가 되도록 하였다. PCR 반응은 94°C에서 3분간 pre-denaturation 실시한 후, 94°C 30초 denaturation, 55°C 30초 annealing, 72°C 30초 extension 반응을 1 cycle로 하여 30 cycles 한 후, 72°C에서 7분간 post-extension 시켰다. 증폭 산물은 1% agarose gel 상에서 전기영동시킨 후, UV 검출기 (UVP, USA)에서 band의 크기를 확인하여 내성유전자의 종류를 확인하였다.

## 결 과

### 세균의 분리 및 동정

2016년 3월부터 2017년 10월까지 제주지역 넙치 양식장에서 질병에 감염된 것으로 추정되는 넙치로부터 총 306균주를 분리하여 실험에 사용하였다. 선택배지인 SS, TCBS, GSP, Blood agar를 사용하여 분리균을 구분한 결과, *Streptococcus* sp. 161균주, *E. tarda* 66균주, *Vibrio* sp. 56균주, 그리고 종이 확인되지 않은 23균주를 분리하였다. PCR을 통해 연쇄구균병의 원인균을 확인한 결과, *S. parauberis*가 160균주, *S. iniae*가 1균주로 확인되었으며, *Lactococcus garvieae*는 검출되지 않았다. *E. tarda* 균주는 선택배지인 SS배지 상에서 검은색 집락이 형성된 66균주를 채집하였으며, 정확한 동정을 위해 실시한 PCR 분석에서도 동일한 결과를 보였다. *Vibriocae*의 동정 역시 PCR 분석을 통해 실시되었으며, 56균주의 *Vibrio* sp. 중 *V. alginolyticus*가

Table 2. Primers and expected sizes of PCR products of various *erm* / *mef* genes

Gene	Primer	Oligonucleotide sequences (5' to 3')	Product size (bp)	Reference
<i>erm</i> (A)	Em (A)F	GTTCAAGAACAATCAATACAGAG	421	Jun, 2010
	Em (A)R	GCATCAGGAAAAGGACATTTTAC		
<i>erm</i> (B)	Em (B)F	GAAAAGGTACTCAACCAAAT	639	
	Em (B)R	AGTAACGGTACTTAAATTGT		
<i>erm</i> (C)	Em (C)F	GCTAATATGTTTAAATCGTCAATTCC	572	
	Em (C)R	GGATCAGGAAAAGGACATTTTAC		
<i>mef</i> (A)	<i>mef</i> -F	ATGGAAAAATACAACAATTGG	646	
	<i>mef</i> A-R	GTAGTACAGCCATTCCTTC		
<i>mef</i> (E)	<i>mef</i> -F	ATGGAAAAATACAACAATTGG	812	
	<i>mef</i> E-R	CCTATCAACATTCAGATGC		

PCR, polymerase chain reaction; *erm*, erythromycin ribosome methylation; *mef*, macrolide efflux.

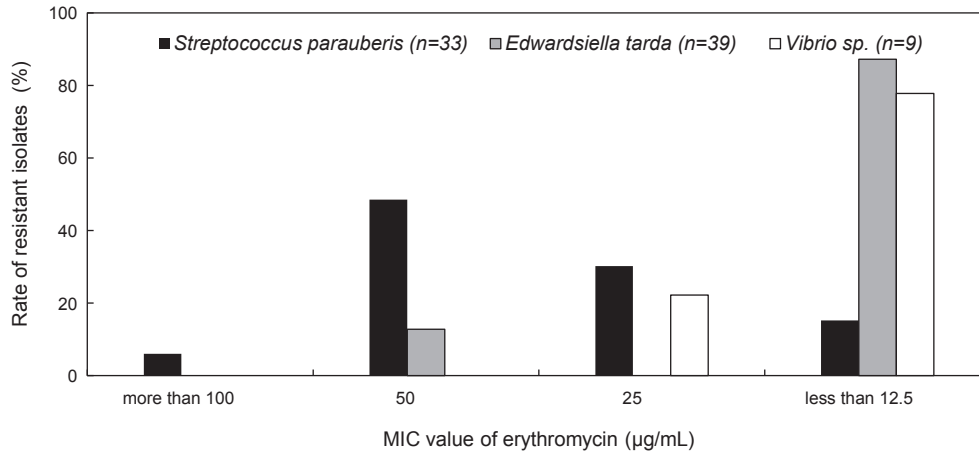


Fig. 1. MIC value distribution of erythromycin against *Streptococcus parauberis*, *Edwardsiella tarda*, *Vibrio sp.* isolated from olive flounder *Paralichthys olivaceus*.

4균주, *V. harveyi*가 2균주로 확인되었다. 50개의 *Vibrio* 균주는 본 연구에서 동정을 위해 사용한 primer sets로는 확인되지 않아 *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*의 다른 *Vibrio* 균주로 추정하였다. 또한, 306균주 중 23균주는 본 연구에서 동정을 위해 사용한 선택배지와 primer sets로는 확인할 수 없어 미동정 균주로 분류하였다.

제주도 내 양식장 지역 분포에 따른 균주 발생 차이 확인을 위해 시험균주들의 지역별 분포를 확인하였으며, 제주시에 속해 있는 양식현장(한경, 애월, 조천, 구좌 등)에서 전체 306균주 중 총 99균주, 서귀포시에 위치하고 있는 양식현장(대정, 남원, 표선, 성산 등)에서 *S. parauberis* 119균주, *S. iniae* 1균주, *E. tarda* 46균주, *Vibrio sp.* 38균주, 미동정 균주 3균주로 207균주가 분리되었음을 확인하였다.

### Erythromycin 내성균주 분리

Em 내성균주는 약제감수성 실험에서 Em에 대해 증식억제대를 형성하지 않는 균으로 구분하였다. 분리균주 별 Em 내성균은 *S. parauberis*가 33균주, *E. tarda*는 39균주, *Vibrio sp.*로 추정되는 균주는 9균주로 확인되었다. 내성균주들의 제주도 내 양식지역 별 분포를 살펴보았을 때, 제주시에 한림, 애월, 조천, 구좌 등의 양식장에서 분리된 99균주 중 내성균주는 *S. parauberis* 5균주, *E. tarda* 10균주, *Vibrio sp.* 1균주로 총 16균주(16.2%)가 확인되었으며, 성산, 남원, 대정 등의 서귀포시에서 분리된 207균주 중 내성균주는 *S. parauberis* 28균주, *E. tarda* 29균주, *Vibrio sp.* 8균주로 총 65균주(31.4%)가 분리되어 지역에 따른 내성균의 출현에 차이를 보였으며, 내성균주는 양식현장이 밀집되어 있는 서귀포시 지역에 많이 분포하고 있음을 알 수 있었다. 또한, 조사 시기에 따른 내성균의 비율을 분석하였으며, 2016년도에 분리한 163균주 중 49 내성균주(30.1%), 2017년도에 분리한 143균주 중 32 내성균주(22.4%)로 Em 내성균의

비율을 확인할 수 있었다.

### Minimum inhibitory concentration (MIC)

약제감수성 검사 결과에 의하여 Em에 내성을 가지는 것이 확인된 81 내성균들을 대상으로 MIC test를 실시하여 내성수준을 확인하였다. *S. parauberis* 33균주 중 2균주가 100 µg/mL 이상, 16균주가 50 µg/mL, 10균주는 25 µg/mL 그리고 5균주가 12.5 µg/mL 이하의 MIC 값을 나타내었다(Fig. 1). *E. tarda* 내성균주에서는 5균주가 50 µg/mL, 나머지 34균주가 12.5 µg/mL 이하의 값을 나타내었다. *Vibrio sp.* 9균주는 *E. tarda* 균주와 유사하게 7균주가 12.5 µg/mL 이하의 값을 나타내었으며, 2균주가 25 µg/mL의 MIC 값을 나타내었다. 본 실험에서 분리한 *S. parauberis* 균주는 그람음성균인 *E. tarda*, *Vibrio sp.*에 비하여, Em에 대해 넓은 범위의 MIC 값을 가질 뿐만 아니라 비교적 높은 내성수준의 값을 가지는 것을 확인하였다.

### 약제감수성

제주지역 넙치양식장 내 병어로부터 분리한 *S. parauberis*, *E. tarda* 및 *Vibrio sp.* 균주들에 대하여 macrolide계 항생제 외에도 penicillins, tetracyclines 등을 포함한 다양한 계열의 항생제에 대해 증식억제대를 형성하지 않는 균주를 내성균주로 구분하였으며 각 균주 별 내성경향의 결과는 Table 3에 나타내었다. *S. parauberis* 균주는 quinolone계(91.9%), sulfonamide계(79.4%), tetracycline계(50%) 항생제 순서로 높은 내성률을 보였으며, *E. tarda* 균주에서는 penicillin계(80.3%), tetracycline계(75.8%), quinolone계(54.5%), sulfonamide계(45.5%) 항생제가 순서로 높은 내성비율을 나타내어 분리된 대부분의 균주들이 특정 계열에 국한되지 않고 다양한 계열의 항생제에 대해 내성을 가지는 것을 확인할 수 있었다. 그러나, *Vibrio sp.* 균주에서는 penicillin계 항생제를 제외한 나머지 계열의 항생제

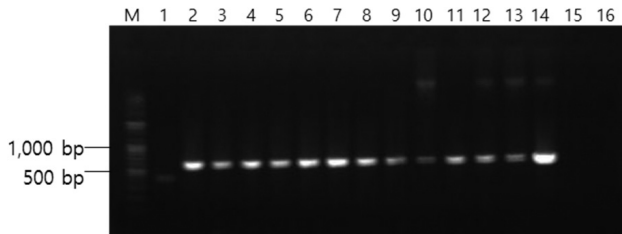


Fig. 2. DNA amplification of *erm* gene in erythromycin resistant isolates of *Streptococcus parauberis*, *Edwardsiella tarda* and *Vibrio* sp. from cultured fish in Jeju. Lane 1, *S. parauberis-erm* (A); Lane 2-9, *S. parauberis-erm* (B); Lane 10-14, *E. tarda-erm* (B); Lane 15 and 16, *Vibrio* sp.-not detected; M, 100bp DNA ladder.

에 대해 대체로 낮은 내성률이 관찰되었으며, 실험에 사용된 모든 균주는 chloramphenicol계 항생제에 대해 매우 낮은 내성률을 보였다.

### Erythromycin 내성 유전자 분석

Em에 대해 내성을 가지는 내성균으로부터 total nucleic acid를 분리한 후, PCR을 통해 Em 내성 유전자를 확인하였다. *erm* (A), *erm* (B), *erm* (C), *mef*(A) 및 *mef*(E)의 검출을 위한 PCR은 이전 Jun (2010)을 참고하여 수행하였으며, *S. parauberis* 33 균주 중 *erm* (B)가 24균주(72.7%)로 확인되었고, 1균주(3%)에서 *erm* (A)가 검출되었다(Table 4, Fig. 2). Em에 대해 내성을 가지는 *E. tarda* 39 내성균주 중 5균주(12.8%)에서 *erm* (B)가 확인되었으며, 그 외 다른 유전자는 발견되지 않았다. 또한, *Vibrio* sp. 균주의 경우, 본 연구에서 검출을 시도한 5종류의 *erm/mef* 유전자는 검출되지 않았다.

### 고찰

에드워드병, 연쇄구균병, 비브리오병, 활주세균병 등과 같은 세균성 질병은 매년 양식현장에서 연중 발생하여 피해를 유발하며, 양식현장에서는 발생한 세균성 질병의 치료를 목적으로 항생제를 사용하고 있다. 그 중 Em의 수산용 항생제 판매량에 근거한 사용률은 6.3%로 oxytetracycline에 이어 국내 양식현장에서 많이 사용되고 있는 항생제로 알려져 있다(APQA, 2009). 이에 본 연구에서는 양식넙치에서 분리한 어병세균에서 Em 내성균주를 분리하고, PCR을 통해 Em에 대해 내성을 유발하는 내성유전자를 확인하고자 하였다.

2016년부터 2017년까지 제주도 내 넙치 양식장에서 *S. parauberis* 160균주, *S. iniae* 1균주, *E. tarda* 66균주, *Vibrio* sp. 56균주 및 미동정 균주 23균주 등 총 306균주를 분리하여 실험에 사용하였다. 이전 연쇄구균병은 *L. garviciae*, *S. parauberis*, *S. iniae*, *Enterococcus* sp. 등에 의해 발생된다고 보고되었으나 (Domeenech et al., 1996; Eldar and Ghittino, 1999), 본 연구에서 분리한 연쇄구균의 세부적인 동정 결과, *S. parauberis* 균주가 160균주로 뚜렷하게 검출빈도가 증가하고 있는 것을 확인하였다. 이전 제주도 내 연쇄구균병 원인체의 동정 결과, *S. iniae*와 *S. parauberis*의 검출량이 비슷하다는 보고(Jeong et al., 2006)와 검출률에서 차이를 보였는데 이는 이전 *S. iniae* 균주에 대한 안정적인 백신이 개발됨에 따라 발병률이 낮아짐으로 현재 *S. parauberis* 균주에 의한 연쇄구균병이 다발하고 있는 것으로 보인다. 또한, Thompson et al. (2004)은 비브리오병이 60종이 넘는 다양한 비브리오균에 의해 발생되며, 계속해서 새로운 종이 발견되는 추세라 보고하였으며, 본 연구에서는 선택배지인 TCBS 배지 상에서 노란색 또는 초록색 집락을 형성하는 것으로 구분한 후, 이전 Demircan and Candan (2006), Kim et

Table 3. Number of bacterial isolates from cultured fish against various antimicrobial agents

Isolates	Antimicrobial agents					
	Penicillins	Tetra-cyclines	Quinolones	Amino-glycosides	Sulfon-amides	Chloram-phenicols
<i>Streptococcus parauberis</i> (n=160)	11 (6.9%)	80 (50%)	147 (91.9%)	70 (43.8%)	127 (79.4%)	4 (2.5%)
<i>Edwardsiella tarda</i> (n=66)	53 (80.3%)	50 (75.8%)	36 (54.5%)	15 (22.7%)	30 (45.5%)	0 (0%)
<i>Vibrio</i> sp. (n=56)	49 (87.5%)	15 (26.8%)	5 (8.9%)	10 (17.9%)	12 (21.4%)	3 (5.4%)

Table 4. Detection of various *erm* / *mef* genes in erythromycin resistant isolates from cultured fish in Jeju

Resistance isolates	Genotypes of erythromycin resistance factor				
	<i>erm</i> (A)	<i>erm</i> (B)	<i>erm</i> (C)	<i>mef</i> (A)	<i>mef</i> (E)
<i>Streptococcus parauberis</i> (n=33)	1	24	0	0	0
<i>Edwardsiella tarda</i> (n=39)	0	5	0	0	0
<i>Vibrio</i> sp. (n=2)	0	0	0	0	0

*erm*, erythromycin ribosome methylation; *mef*, macrolide efflux.

al. (2014), Kim et al. (2015)의 방법을 참고하여 각 균주의 세부적인 동정을 실시하였다. 그 결과, *V. alginolyticus*가 4균주, *V. harveyi*가 2균주로 확인되었다. 이전 제주도 내 *Vibrio* sp. 균주들의 세부적 종을 확인한 결과, *V. scophthalmi*, *V. harveyi*, *V. anguillarum*, *Photobacterium damsela* 등이 검출되어 본 연구에서 동정을 실시하지 않았던 다양한 종류의 비브리오 균주들이 제주도 내에 분포하고 있음을 확인할 수 있었다(Jo, 2006).

넙치로부터 분리한 어병세균 내 Em 내성균주는 약제감수성을 통해 증식억제대를 CLSI (2017)에서 내성의 기준으로 보는 13 mm 이하로 규정하였으나 내성을 보이는 모든 균주는 증식억제대를 형성하지 않았다. 그 결과 *S. parauberis* 33균주, *E. tarda* 39균주, *Vibrio* sp. 9균주로 총 81균주를 내성균주로 구분하였다. 2016년과 2017년도에 분리한 어병세균 내 내성균주는 각각 47균주(30.1%), 32균주(22.4%)로 Em 내성균 발생률이 감소한 것을 확인하였다. 이에 조사기간 내 균종 별 발생비율을 조사한 결과, *E. tarda* 균주는 2016년과 2017년에 각각 42.9%, 56.3%의 내성균이 확인되었으며, *Vibrio* sp. 균주도 10.2%, 12.5%로 *E. tarda* 균주와 유사하게 조사기간동안 내성균의 출현이 증가한 것을 확인할 수 있었다. 그러나 *S. parauberis* 균주는 각 년도에 대해 23균주(46.9%), 10균주(31.3%)로 감소한 것을 확인하였다. 각 균종 별 내성균 발생양상은 조사기간이 짧아 규정하기에 어려움이 있으며, 추후 Em 내성균주 발생에 대한 지속적인 모니터링이 실시되어야 할 것으로 판단된다. Em 내성균주들은 MIC test를 통해 내성수준을 살펴본 후, 균주들이 지니고 있는 내성인자의 유전형을 PCR을 통해 분석하였다. CLSI 판단 기준(>8 µg/mL)에 따라 내성균주를 구분하였을 때, *Vibrio* sp. 균주 내 확인된 Em 내성균주는 총 2균주로, 본 연구에서 검출을 시도한 어떠한 gene도 확인되지 않았다. 이전 Luna et al. (1999)와 Portillo et al. (2000)은 장구균의 내성에 주로 *erm* (B) 유전자가 관여하며, 일부에서 *erm* (A)가 존재한다고 보고하였다. 본 연구에서도 *S. parauberis*에서 *erm* (B)가 24균주, *erm* (A)가 1균주로 확인되어 이전의 보고와 유사한 결과를 확인할 수 있었다. *E. tarda*를 대상으로 Em에 대한 내성비율을 조사하고 유전자 분석을 실시한 이전의 연구는 없었으며, 본 연구가 국내에서의 첫 보고라고 할 수 있다. *E. tarda*의 39균주가 Em에 대해 내성을 보였지만 *erm* (B)는 5균주에서만 확인할 수 있었다(Fig. 2). *E. tarda*와 *Vibrio* sp.의 내성수준이 *S. parauberis*에서 보다 낮게 나타나는 것은 Em과 같은 항생제가 그람음성균보다 그람양성균에 높은 활성을 보인다는 보고와 연관성이 있을 것으로 여겨진다(Hiroshi, 1996). 또한, 내성을 가지고 있지만 *erm* 및 *mef* 유전자를 확인할 수 없는 균주는 본 연구에서 검출을 시도하지 않은 다른 유전형이나 새로운 종류의 내성인자 출현 등의 결과로 해석할 수 있으며, Lee et al. (2010a)의 연구에서는 Em 내성유전자 검출을 위해 *erm*과 *mef* 유전자 외 *msr* 유전자를 추가적으로 실험을 실시하였으나 검출되지 않았으며, *erm* (B)와 *mef* (A)가 높은 비율로 확인되었다

보고하였다. 이에 본 연구에서도 그람양성균에 대해 *msr* 유전자의 primer를 제작하여 존재유무를 확인할 필요가 있다고 생각된다. 또한, 비브리오에서는 *mef* 유전자 외 *mph* 유전자의 확인이 보고되어 있으며 추후 이에 대한 확인유무도 필요할 것으로 판단된다(Nonaka et al., 2015).

국내 양식현장에서는 외국에 비해 비교적 자유롭게 항생제를 투여하고 있기 때문에 기존에 존재한다고 보고되어진 유전자 이외의 새로운 내성결정인자가 발생할 가능성이 높으며, 이를 방지하기 위한 지속적인 연구가 필요하다. 본 연구 결과는 국내 양식넙치에서 분리되는 어병세균 내 다양한 계열의 항생제 내성비율 및 Em 내성유전자 분포에 관한 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 사 사

이 논문은 2017학년도 제주대학교 교원성과지원사업에 의하여 연구되었음.

## References

- APQA (Animal and Plant Quarantine Agency). 2009. National antibiotic use and monitoring of antimicrobial resistance in 2015 [Internet]. Retrieved from www.qia.go.kr on Jun 18, 2018.
- Blanco MM, Gibello A, Vela AI, Moreno MA, Dominguez L and Fernandez-Garayzabal JF. 2002. PCR detection and PFGE DNA macrorestriction analyses of clinical isolates of *Pseudomonas anguilliseptica* from winter disease outbreaks in sea bream *Sparus aurata*. Dis Aquat Org 50, 19-27. <https://dx.doi.org/10.3354/dao050019>.
- Cepeda C, Garcia-Marquez S and Santos Y. 2003. Detection of *Flexibacter maritimus* in fish tissue using nested PCR amplification. J Fish Dis 26, 65-70. <https://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2761.2003.00431.x>.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2017. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 28th edition [Internet]. Retrieved from www.clsi.org on Jun 14, 2018.
- Demircan D and Candan A. 2006. Identification of *Vibrio anguillarum* by PCR (rpoN Gene) associated with vibriosis in marine fish in Turkey. Turk J Vet Anim Sci 30, 305-310.
- Domeenech A, Derenaandez-Garayzabal JF, Pascual C, Garcia JA, Cutuli MT, Moreno MA, Collins MD and Dominguez L. 1996. Streptococcosis in cultured turbot, *Scophthalmus maximus*, associated with *Streptococcus parauberis*. J Fish Dis 19, 33-38. <https://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2761.1996.tb00117.x>.
- Eldar A and Ghittino C. 1999. *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus imiae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: similar, but different diseases. Dis Aquat Org 36,

- 227-231. <https://dx.doi.org/10.3354/dao36227>.
- Han AR, Yoon YJ and Kim JW. 2012. Antibiotic Resistance and Plasmid Profile of *Vibrio parahaemolyticus* Strains Isolated from Kyunggi-Incheon Coastal Area. *Kor J Microbiol* 48, 22-28. <https://dx.doi.org/10.7845/kjm.2012.48.1.022>.
- Hansen LH, Mauvais P and Douthwaite S. 1999. The macrolide-ketolide antibiotic binding site is formed by structures in domains II and V of 23S ribosomal RNA. *Mol Microbiol* 31, 623-631. <https://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01202.x>.
- Hiroshi N. 1996. Multidrug Efflux Pumps of Gram-Negative Bacteria. *J Bacteriol* 178, 5853-5859.
- Jeong YU, Kang CY, Kim MJ, Heo MS, Oh DC and Kang BJ. 2006. Characterization of Streptococcosis occurrence and molecular identification of the pathogens of cultured flounder in Jeju island. *J Microbiol* 42, 199-204.
- Jo MR. 2006. Rapid molecular identification and antibiotic resistance of *Vibrio* spp. Isolated from the farmed olive flounders in Jeju island, Korea. Master's Thesis, Jeju National University, Jeju, Korea.
- Jun LJ. 2010. Characterization of antibiotic resistant genes carried by fish pathogens in Korea. Ph. D. Thesis, Pukyong National University, Busan, Korea.
- Kim HJ, Ryu JO, Lee SY, Kim ES and Kim HY. 2015. Multiplex PCR for detection of the *Vibrio* genus and five pathogenic *Vibrio* species with primer sets designed using comparative genomics. *BMC Microbiol* 15, 239. <https://dx.doi.org/10.1186/s12866-015-577-3>.
- Kim MS, Cho JY and Choi HS. 2014. Identification of *Vibrio harveyi*, *Vibrio ichthyenteri* and *Photobacterium damselae* isolated from olive flounder *Paralichthys olivaceus* in Korea by multiplex PCR developed using the *rpoB* gene. *J Fish Sci* 80, 333-339. <https://dx.doi.org/10.1007/s12562-014-0702-5>.
- Lee SY and Kim YH. 2013. Incidence of Erythromycin Resistance Genes, *erm(B)* and *mef(A)*, in Streptococci Isolated from Dental Plaques of Koreans. *Int J Oral Biol* 38, 61-65. <https://dx.doi.org/10.11620/IJOB.2013.38.2.061>.
- Lee DW, Jun LJ and Jeong JB. 2016. Distribution of Tetracycline Resistance Genes in Pathogenic Bacteria Isolated from Cultured Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*) in Jeju in 2016. *JFMSE* 29, 834-846. <https://dx.doi.org/10.13000/JFMSE.2017.29.3.834>.
- Lee HI, Jung JH, Lee SJ and Choi SS. 2010a. Analysis of Genotype and Phenotype of Erythromycin Resistance in Enterococci spp. Isolated from Raw Milk Samples. *Kor J Microbiol* 46, 148-151.
- Lee HY, Lim JE, Kim SC, Kim KR, Lee SS, Kwon OK, Yang JE and Ok YS. 2010b. Environmental Monitoring of Selected Veterinary Antibiotics in Soils, Sediments and Water Adjacent to a Poultry Manure Composting Facility in Gangwon Province, Korea. *J Korean Soc Environ Eng* 32, 278-286.
- Luna VA, Coates P, Eady EA, Cove JH, Nguyen TH and Roberts MC. 1999. A variety of Gram-positive bacteria carry mobile *mef* genes. *J Antimicrob Chemother* 44, 19-25. <https://dx.doi.org/10.1093/jac/44.1.19>.
- Nonaka L, Maruyama F, Suzuki S and Masuda M. 2015. Novel macrolide-resistance genes, *mef* (C) and *mph* (G), carried by plasmids from *Vibrio* and *Photobacterium* isolated from sediment and seawater of a coastal aquaculture site. *Appl Microbiol* 61, 1-6. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/lam.12414>.
- Portillo A, Ruiz-Larrea F, Zarazaga M, Alonso A, Martinez JL and Torres C. 2000. Macrolide Resistance Genes in *Enterococcus* spp.. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 967-971. <https://dx.doi.org/10.1128/AAC.44.4>.
- Sakai T, Iida T, Osatomi K and Kanai K. 2007. Detection of type 1 fimbrial genes in fish pathogenic and non-pathogenic *Edwardsiella tarda* strains by PCR. *Fish Pathol* 42, 115-117. <https://dx.doi.org/10.3147/jsfp.42.115>.
- Sapkota AR, Ojo KK, Roberts MC and Schwab KJ. 2006. Antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Enterococcus* spp. And *Streptococcus* spp. Recovered from the indoor air of a large-scale swine-feeding operation. *Lett Appl Microbiol* 43, 534-540. <https://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01996.x>.
- Sung CH, Chon JW, Kwak HS, Kim HS and Seo KH. 2013. Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Isolated from Beef, Pork, Chicken and Sashimi. *Korean J Food Sci* 33, 133-138. <https://dx.doi.org/10.5851/kosfa.2013.33.1.133>.
- Thompson FL, Iida T and Swings J. 2004. Biodiversity of *Vibrios*. *Microbiol Mol Biol Rev* 68, 403-431. <https://dx.doi.org/10.1128/MMBR.68.3>.
- Woo SH, Kim HJ, Lee JS, Kim JW and Park SI. 2006. Pathogenicity and classification of streptococci isolated from cultured marine fishes. *J Fish Pathol* 19, 17-33.