

패류에서 분리한 고농도 streptomycin에 대해 저항성인 대장균의 저항성 유전자

임찬석¹ · 이영선¹ · 강형일^{2,3} · 안삼영^{2,3} · 정재성^{1,3*} 

¹순천대학교 생물학과, ²순천대학교 환경교육과, ³순천대학교 연안해역위생환경연구소

Resistance genes in high-level streptomycin resistant *Escherichia coli* isolated from shellfish

Chan Seok Lim¹, Young Sun Lee¹, Hyung-Yeel Kahng^{2,3}, Samyoung Ahn^{2,3}, and Jae Sung Jung^{1,3*} 

¹Department of Biology, ²Department of Environmental Education, ³The Research Institute for Sanitation and Environment of Coastal Areas, Suncheon National University, Suncheon 57922, Republic of Korea

(Received April 30, 2018; Revised June 18, 2018; Accepted June 18, 2018)

The aim of this study was to investigate the distribution of resistance genes in high-level streptomycin resistant *Escherichia coli* isolated from shellfish collected between April 2015 and March 2016 in Korea. From the 269 *E. coli* isolates obtained from shellfish samples, a total of 40 streptomycin-resistant isolates with MICs of > 1,024 µg/ml were screened and the prevalence of streptomycin resistance determinants was analyzed by PCR. Among the isolates, *strA-strB* gene structure (77.5%) was the most frequent streptomycin resistance determinant, followed by *aadA* (30.0%). Six isolates (15.0%) simultaneously contained *aadA* and *strA-strB* determinants, whereas three of the isolates (7.5%) did not contain both resistance determinants examined in this work. The difference of MICs between the isolates having the same resistance gene was elucidated by real-time PCR results. The copy number of resistance genes differed considerably among the isolates, which solely harbored an *aadA* or *strA-strB* and showed different MICs.

Keywords: *Escherichia coli*, *aadA*, resistance gene, *strA-strB*, streptomycin

대장균(*Escherichia coli*)은 사람이나 동물의 장관에서 정상적인 미생물상을 이루고 있으며 분변을 통해 체외로 배출된 뒤 물이나 먹이사슬 등을 통해 다른 생태계로의 전파가 쉽게 일어나는 세균이다. 대장균의 존재는 분변에 의한 오염을 의미하기 때문에 물이나 식품의 세균학적 상태를 모니터링하는 지표세균으로 사용되어 왔다. 또한 대장균은 항생제 저항성을 비교적 쉽게 획득하는 것으로 알려져 있어, 분변성 세균의 항생제 저항성 정도를 파악하는 수단으로도 쓰여져 왔다(Erb *et al.*, 2007). 특히 많은 항생제 저항성 유전자가 전이요소 등과 연관되어 있기 때문에 항생제 저항성 대장균에 오염된 식품은 공중보건을 위협하는 요인이 될 수도 있다. 항생제 저항성 유전자가 대장균으로부터 사람에게 질병을 일으킬 수 있는 병원성 세균으로 이동될 가능성에 대한 우려가 제기되고 있기 때문이다(Alexander *et al.*, 2010).

Streptomycin은 1943년에 aminoglycoside계 항생제 중 가장 먼저 발견된 항생제로 결핵을 비롯한 그람 음성세균에 의한 감염 등의 질병치료에 사용되어왔다. 축산분야에서는 세균성 질환의 치료와 함께 성장촉진을 위한 목적으로 사료첨가제로도 쓰여왔다(Graham *et al.*, 2007). 그 뿐 아니라 많은 국가에서, 사용이 제한되어 있기는 하지만 세균성 식물병의 방제를 위한 농약으로도 사용되고 있다(McManus *et al.*, 2002). Streptomycin을 포함한 항생제의 광범위한 사용은 항생제 저

*For correspondence. E-mail: jjung@scnu.ac.kr;
Tel.: +82-61-750-3616; Fax: +82-61-750-3208

항성 세균의 출현이라는 새로운 문제를 야기시켰다(Aarestrup *et al.*, 2008). Streptomycin 저항성 세균에 대하여 보고된 많은 연구가 동물 또는 식물에 병원성인 세균에서 이루어졌다.

Streptomycin의 작용기전은 세균 리보솜의 30S 소단위를 구성하는 16S rRNA와 S12 단백질에 비가역적으로 결합하여 단백질 합성을 억제하는 것이다. 그러므로 세균이 streptomycin에 대해 저항성을 갖게 하는 원인 중 하나는 돌연변이에 의한 이들 표적의 변형이다. S12 단백질 유전자인 *rpsL* 또는 16S rRNA 유전자인 *rrs*에 생긴 많은 돌연변이가 streptomycin의 결합을 저해시켜 세균이 저항성을 갖게 되는 원인이 된다(Finken *et al.*, 1993; Springer *et al.*, 2001). *rpsL*에 돌연변이가 일어난 경우에는 32,000 µg/ml 이상의 높은 수준의 최소저해농도(minimum inhibitory concentration, MIC)를 나타내지만 *rrs* 유전자의 돌연변이는 중간 수준의 저항성을 띠게 되는 것으로 보고되고 있다(Eliopoulos *et al.*, 1984; Nhu *et al.*, 2012). 그러나 16S rRNA의 이차구조에 영향을 미치는 7-methylguanosine methyltransferase 유전자인 *gidB*의 돌연변이는 낮은 수준의 저항성을 갖게 한다(Okamoto *et al.*, 2007).

Streptomycin에 대한 또 다른 저항성 기전은 항생제를 변형시켜 작용하지 못하게 하는 방법이다. Streptomycin에 인산기 또는 아데닐기를 붙여 무독화 시키는 것이 일반적이며 주로 세 개의 유전자에 의해 일어나고 있음이 보고되고 있다(Shaw *et al.*, 1993; Sunde and Norström, 2005). 인산기를 전이시키는 phosphotransferase는 streptomycin의 3' 또는 6 위치의 hydroxyl기를 인산화시킨다. 이들 효소의 유전자는 *aph(3')*와 *aph(6)* 또는 *strA*와 *strB*로 각각 불리어지고 있다. 특이하게 이 두 유전자는 병렬로 연결되어 *strA-strB* 구조를 이루면서 사람, 동물 및 식물 등 다양한 환경에 분포하는 적어도 21개 속의 세균에서 발견되고 있다(Sundin and Bender, 1996; Sundin, 2002). 아데닐기를 전이시키는 효소로는 *aadA*에 의해 암호화되는 adenylyltransferase로 streptomycin의 3'의 hydroxyl기를 변형시켜 무독화 시키는 경우가 일반적이다(Clark *et al.*, 1999).

본 연구에서는 우리나라 남해안에서 채취한 패류로부터 분리한 대장균 중 높은 농도의 streptomycin에 저항성을 갖는 균주가 어떤 저항성유전자를 갖고 있는지를 조사하였다. 또한 동일한 저항성유전자를 가지고 있으면서도 MIC에서 차이가 나는 이유를 규명하고자 하였다. 이를 통해 남해안에서 생산되는 패류의 위생상태를 점검하고 공중보건에 미칠 영향을 분석하는데 필요한 기초자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

패류 시료 및 대장균의 분리

대장균을 분리하기 위한 패류 시료는 2015년 4월부터 2016년 3월까지 전남지역 남해안에서 채취하였다. 바지락(*Ruditapes philippinarum*)과 새꼬막(*Scapharca subcrenata*)은 고흥군 득량만 해역에서, 굴(*Crassostrea gigas*)과 전복(*Haliotis discus*)은 완도 주변 해역에서 채취하였다.

대장균의 분리는 ISO 16649-3 (2015)의 방법에 따라 패류에 존재하는 대장균을 계수하는 과정을 통해 이루어졌다. 요약하면, 탈각한 패류시료 200 g에 2배의 0.1% peptone 용액(pepton 1.0 g, sodium chloride 8.5 g per L)을 넣고 blender로 60초간 파쇄하였다. Peptone 용액을 10배로 단계 희석한 시료를 10 ml의 MMGM 배지(mineral modified glutamate medium) (Oxoid)에 1 ml씩 접종하였다. 시료를 접종한 배지는 37°C에서 24시간 배양한 뒤 배지의 색이 노란색으로 변한 시험관을 대상으로 확정시험을 실시하였다. 양성 시험관으로부터 백금으로 배양액을 TBX agar (tryptone bile glucuronide agar) (Oxoid) 평판배지에 도말하여 44°C에서 24시간 배양하였다. TBX agar에서 푸른색 콜로니가 형성되면 대장균 양성으로 판정하고 단일 균주를 확보하였다. 분리된 균주는 16S rRNA 유전자 염기서열을 결정하여 대장균으로 최종 동정하였다. 16S rRNA 유전자는 27f와 1525r primers (Lane, 1991)를 사용하여 증폭하였고, 염기서열은 SolGent Co.에 의뢰하여 결정하였다. 분리된 대장균 균주의 배양액을 65% glycerol 용액에 넣어 -80°C에 보관 하였다가 다음 실험에 사용하였다.

고농도 Streptomycin 저항성 대장균의 선별 및 MIC 측정

최소저해농도(MIC)는 Kim 등(2016)의 방법을 변형하여 측정하였다. 먼저, 분리된 대장균 중에서 고농도의 streptomycin에 대해 저항성을 갖는 균주를 선별하였다. 이를 위해 1,024 µg/ml 되도록 streptomycin을 첨가한 Muller-Hinton broth (Becton Dickson) 3 ml를 시험관에 분주하였다. 여기에 LB broth에서 전 배양한 대장균 배양액 10 µl를 접종하여 35°C에서 18시간 배양한 후 세균의 증식 여부를 확인하였다. 1,024 µg/ml의 streptomycin에서 자란 균주를 대상으로 한 MIC의 측정을 위해 4,096 µg/ml에서 1,024 µg/ml까지 1/2씩 streptomycin 농도를 달리하여 배지를 제조한 뒤, 같은 방법으로 접종 및 배양을 하였다. 분리된 대장균 균주의 목록은 Table 1에 제시하였다.

Table 1. List of *Escherichia coli* isolates used in this study

No.	Name	MIC (µg/ml)	Source ^a	No.	Name	MIC (µg/ml)	Source
1	DMRP546	2,048	<i>Ruditapes philippinarum</i>	21	WSCG51110	> 4,096	<i>Crassostrea gigas</i>
2	DMRP548	4,096	<i>Ruditapes philippinarum</i>	22	WNCG5111	> 4,096	<i>Crassostrea gigas</i>
3	DMRP5410	2,048	<i>Ruditapes philippinarum</i>	23	WSCG5126	> 4,096	<i>Crassostrea gigas</i>
4	DNRP543	4,096	<i>Ruditapes philippinarum</i>	24	WJCG5121	> 4,096	<i>Crassostrea gigas</i>
5	DNRP545	4,096	<i>Ruditapes philippinarum</i>	25	WJCG5124	> 4,096	<i>Crassostrea gigas</i>
6	DMRP552	> 4,096	<i>Ruditapes philippinarum</i>	26	JDCG5121	> 4,096	<i>Crassostrea gigas</i>
7	JDCG571	2,048	<i>Crassostrea gigas</i>	27	DNRP611	> 4,096	<i>Ruditapes philippinarum</i>
8	WNHD571	> 4,096	<i>Haliotis discus</i>	28	DNRP612	> 4,096	<i>Ruditapes philippinarum</i>
9	WSCG574	> 4,096	<i>Crassostrea gigas</i>	29	DNRP613	> 4,096	<i>Ruditapes philippinarum</i>
10	WSCG575	> 4,096	<i>Crassostrea gigas</i>	30	DNRP614	> 4,096	<i>Ruditapes philippinarum</i>
11	DMSS571	> 4,096	<i>Scapharca subcrenata</i>	31	DNRP615	> 4,096	<i>Ruditapes philippinarum</i>
12	DMSS573	4,096	<i>Scapharca subcrenata</i>	32	DMRP613	> 4,096	<i>Ruditapes philippinarum</i>
13	JDCG5101	> 4,096	<i>Crassostrea gigas</i>	33	DMRP614	2,048	<i>Ruditapes philippinarum</i>
14	WSCG5105	4,096	<i>Crassostrea gigas</i>	34	DMRP615	> 4,096	<i>Ruditapes philippinarum</i>
15	WNCG5102	> 4,096	<i>Crassostrea gigas</i>	35	DSRP611	> 4,096	<i>Ruditapes philippinarum</i>
16	DMRP5101	> 4,096	<i>Ruditapes philippinarum</i>	36	DSRP612	> 4,096	<i>Ruditapes philippinarum</i>
17	DMRP5102	> 4,096	<i>Ruditapes philippinarum</i>	37	JDCG621	> 4,096	<i>Crassostrea gigas</i>
18	GJCG5111	2,048	<i>Crassostrea gigas</i>	38	DSRP622	> 4,096	<i>Ruditapes philippinarum</i>
19	GJCG5119	> 4,096	<i>Crassostrea gigas</i>	39	DNRP626	> 4,096	<i>Ruditapes philippinarum</i>
20	WSCG5119	> 4,096	<i>Crassostrea gigas</i>	40	DMRP632	> 4,096	<i>Ruditapes philippinarum</i>

^a*Ruditapes philippinarum*, short-neck clam; *Crassostrea gigas*, Pacific oyster; *Haliotis discus*, abalone; *Scapharca subcrenata*, small ark shell

Table 2. Primers used for detection of genes encoding resistance to streptomycin

Primer	Nucleotide sequences (5'→3')	Product size	Target	Reference
ant(3'') F	CAG CGA ATG ACA TTC TTG C	295 bp	<i>aadA</i>	van Overbeek et al. (2002)
R	GTC GGC AGC GAC AYC CTT CG			
aph(3'') F	GAC TCC TGC AAT CGT CAA GG	518 bp	<i>strA</i>	van Overbeek et al. (2002)
R	GCA ATG CGT CTA GGA TCG AG			
aph(6) F	GAC TCC TGC AAT CGT CAA GG	560 bp	<i>strB</i>	van Overbeek et al. (2002)
R	GCA ATG CGT CTA GGA TCG AG			
strA	TAT CTG CGA TTG GAC CCT CTG	538 bp	<i>strA-strB</i>	Sunde and Norström (2005)
strB	CAT TGC TCA TCA TTT GAT CGG CT			

Streptomycin 저항성 유전자의 확인

Streptomycin 저항성유전자를 확인하기 위한 PCR 증폭에 사용된 primer는 Table 2와 같다. ant(3'') F/R primer는 *aadA*를, aph(3'') F/R과 aph(6) F/R은 각각 *strA*와 *strB* 유전자 부분을 증폭시키도록 설계된 primers이다(van Overbeek et al., 2002). 한편, strA는 *strA* 유전자에서 설계된 forward primer이고, strB는 reverse primer로 *strB* 유전자에서 설계되었다(Sunde and Norström, 2005). 이 primer set를 통해 두 유전자가 병렬로 연결된 *strA-strB* 구조를 하고 있는지 여부를 확인할 수 있다.

대장균으로부터 genomic DNA의 추출은 AccuPrep DNA Extraction Kit (Bioneer)를 사용하여 제조사가 추천한 방법으로 실시하였다. 추출된 DNA는 NanoDrop One spectrophotometer (Thermo Scientific)로 농도를 측정하였다.

PCR 반응액은 1 µl (20 ng)의 주형 DNA, 1.25 µl (2 unit)의 Taq DNA polymerase (Bioneer), 2.5 µl의 10X buffer (100 mM Tris-HCl, 25 mM MgCl₂, 500 mM KCl, pH 8.0), 2.5 µl (0.2 mM)의 dNTPs 용액, 각각 1 µl의 primer (20 pmol)를 넣은 후 증류수로 최종 반응용액의 부피를 20 µl로 조절하였다. PCR

기기는 Thermal Cycler Dice (Takara Shuzo)를 사용하였으며, 반응조건은 ant(3'') F/R, aph(3'') F/R 및 aph(6) F/R primer의 경우 95°C에서 5분간 전 처리한 후, 95°C에서 30초 동안 denaturing, 55°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 30초간 extension 과정을 30회 반복하였고, 마지막으로 72°C에서 7분간 final extension을 실시하였다. *strA-strB* 유전자구조를 확인하기 위한 primer set인 *strA/strB*의 annealing은 60°C에서 30초 동안 실시하였다.

Real-time PCR

Real-time PCR 반응액의 조성은 1 µl (20 ng)의 주형 DNA, 10 µl의 iQ SYBR Green supermix (Bio-Rad)에 각 5 pmol의 primer를 넣은 후 증류수로 최종 반응용액의 부피를 20 µl로 조절하였다. 대장균 유전자로는 대장균의 adenylate kinase 유전자인 *adh*를 사용하였다. House keeping 유전자인 *adh*의 증폭을 위한 primer 염기서열은 *adh*-F; 5'-ATT CTG CTT GGC GCT CCG GG-3', *adh*-R; 5'-CCG TCA ACT TTC GCG TAT TT-3'이었다(Nemoy *et al.*, 2005). Real-time PCR의 조건은 95°C에서 3분간 전 처리한 후, 95°C에서 10초간 denaturing, 55°C에서 10초간 annealing, 72°C에서 10초간 extension을 30회 반복하고 마지막 extension 반응은 72°C에서 7분간 실시하였다. Real-time PCR 기기는 Thermal Cycler Dice Real Time System III (Takara Shuzo)를 사용하였다. 이 실험은 3회 반복하였다.

결과 및 고찰

고농도 streptomycin에 대한 저항성 대장균

2015년 4월부터 2016년 3월까지 채취한 패류로부터 총 269개의 대장균 균주를 분리하였다. 그 중 1,024 µg/ml의 streptomycin에서 자라는 고농도 저항성 균주는 40개로 전체의 14.9%에 달하였다(Table 1). 저항성 균주들에 대한 16S rRNA 유전자의 염기서열을 결정한 결과 대장균의 type strain과 비교하여 1~3 염기가 차이 나는 것으로 확인되어 99.8% 이상의 유사성을 보였다.

지금까지의 연구결과 중 고농도의 streptomycin에 대해 저항성을 갖는 균주만을 대상으로 한 조사결과는 없기 때문에 직접적인 비교는 불가능하다. 다만 분리된 대장균 중에서 streptomycin 저항성 균주의 출현빈도는 시료의 종류에 따라 다양한 것으로 나타나고 있다. Park 등(2013)에 따르면 남해안 패류에서 분리한 대장균 204개 중 streptomycin 저항성 균주

는 52개로 평균적으로 25.5%를 차지하였으나, 채취 장소에 따라 10~90% 범위에서 편차가 큰 것으로 나타났다. Kwon 등(2016)의 보고에 의하면 지중해담치로부터 분리한 대장균의 83.6%, 육상오염원으로부터 분리한 균주의 67.4%가 streptomycin 저항성 균주였다. 한편 서해안에서 채취한 패류로부터 분리한 대장균에서 streptomycin 저항성 균주의 출현빈도는 7.2%였다(Jo *et al.*, 2016). 이렇게 차이가 크게 나는 현상은 패류 생산 해역 인근으로부터 해역으로 유입되는 가축 유래의 분변성 오염원에 의해 영향을 받는 것으로 보여진다. 특히 사육밀도가 높아 질병의 치료와 예방에 항생제의 사용이 많은 돼지와 닭에서 저항성 대장균의 출현빈도가 높은 것으로 보아(Lanz *et al.*, 2003; Enne *et al.*, 2008) 이들 가축의 분변이 큰 영향을 미치는 것으로 생각된다.

가축의 분변으로부터 분리한 대장균의 경우 닭에서 분리한 대장균의 59.2% (Lee *et al.*, 2005), 돼지로부터 분리된 균주의 50.0%가 streptomycin 저항성 균주였다(Choi *et al.*, 2006). 다른 연구 결과에 의하면 소로부터 분리한 균주의 42.6%, 돼지 균주의 64.6%, 닭 균주의 65.5%가 저항성을 나타내었다(Lim *et al.*, 2014). 영국에서는 돼지에서 분리된 대장균 중 37.5%가 streptomycin 저항성이었음이 보고된 바 있다(Enne *et al.*, 2008). 일반적으로 가축에서 분리된 대장균 중 tetracycline, ampicillin, sulphonamide와 함께 streptomycin에 대한 저항성 빈도가 다른 항생제에 비해 높게 나타나고 있다(Lanz *et al.*, 2003). 따라서 가축 분뇨가 육상오염원인 경우 여기에서 유래한 항생제 저항성 대장균이 해역으로 유입되어 패류에서 검출될 가능성이 매우 높다.

Streptomycin 저항성 유전자

고농도의 streptomycin에 대해 저항성을 갖는 40개의 대장균이 가지고 있는 저항성 유전자를 검출한 결과는 Fig. 1과 같다. 전체의 77.5% (31/40)에서 *strA*와 *strB*가 각각 검출되었다(Fig. 1B and C). *strA*에서 forward primer를 *strB*에서 reverse primer를 제작하여 PCR을 수행한 결과에서도, *strA* 또는 *strB* 유전자를 가지고 있는 모든 대장균에서 예상되었던 538 bp의 DNA가 증폭되어 두 유전자가 나란히 결합되어 있는 *strA-strB* 구조를 하고 있음을 알 수 있었다(Fig. 1D). *strA-strB*는 사람을 비롯한 동·식물에 병원성인 다양한 세균에서 흔히 나타나는 유전자 구조이다(Sundin and Bender, 1996). 본 연구에서는 40개 균주 중 *strA-strB*를 가지고 있는 균주가 77.5% (31/40)로 가장 많은 것으로 나타났다. *aadA*는 30.0% (12/40)에서 검출되었으며(Fig. 1A), 전체의 15% (6/40)에서는 *aadA*와 *strA-strB*가 함께 검출되었다(Fig. 1A and D).

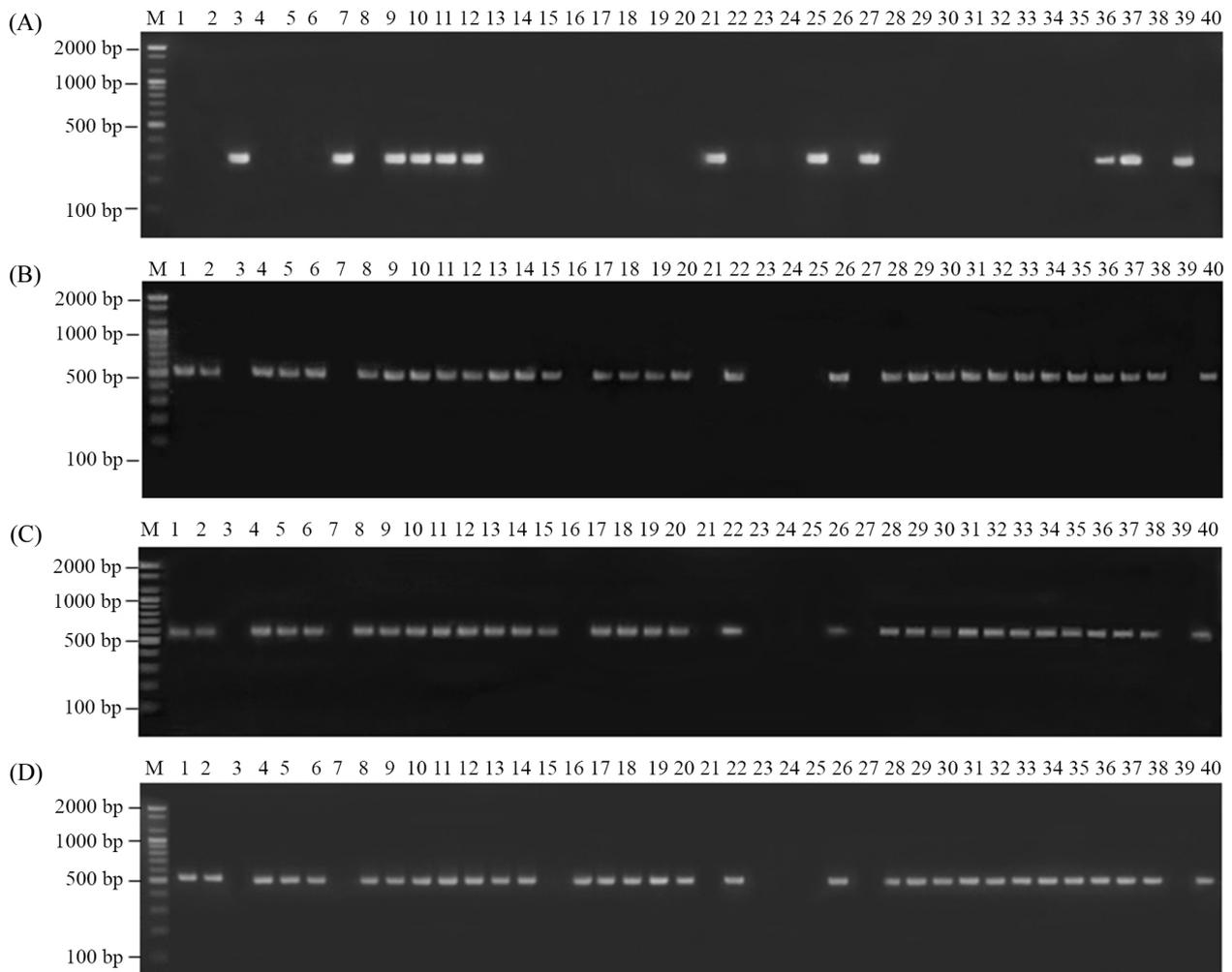


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified with *ant*(3'') F/R (A), *aph*(3'') F/R (B), *aph*(6) F/R (C), and *strA/strB* primers (D). Lanes 1~40 correspond to the strain numbers in Table 1. M, 100-bp DNA size marker (Bioneer).

대장균이 가지고 있는 streptomycin 저항성 유전자 중에서 *aadA*와 *strA-strB*가 출현하는 빈도는 균주의 기원에 따라 다양한 것으로 나타나고 있다. 육류로부터 분리한 streptomycin에 저항성인 대장균 중 81.8% (90/110)가 *strA-strB*를, 26.4% (29/110)가 *aadA*를 가지고 있었으며, 두 유전자를 함께 가지고 있는 균주는 8.2% (9/110)였음이 보고되고 있다(Sunde and Norström, 2005). 우리나라에서 시판되고 있는 수산물로부터 분리한 179개의 대장균을 조사한 결과에서는 12.8% (23/179)가 streptomycin에 저항성을 나타내었고, 그 중 69.6% (16/23)가 저항성 유전자로 *aadA*를 가지고 있었다(Ryu *et al.*, 2012). 한편, 건강한 돼지로부터 분리된 streptomycin 저항성 대장균에서 *strA-strB*가 61.1% (44/72)를 차지하여 가장 출현빈도가 높았고, 그 다음으로 *aadA*가 54.2% (39/72)를 차지하였다. 25.0% (18/72)는 *strA-strB*와 *aadA*를 함께 가지고 있었다(Enne *et al.*,

2008). 육가공 공장에서 분리한 streptomycin 저항성 대장균에서는 76.5% (13/17)가 *strA-strB* 구조를 가지고 있었으나 11.8% (2/17)는 *strA* 유전자만 가지고 있었다(Aslam *et al.*, 2009). 질병에 감염된 돼지에서 분리한 streptomycin 저항성 대장균에서는 60% (39/65)가 *aadA*를, 12.3% (8/65)가 *strA-strB*를 가지고 있었으며, *strA-strB*와 *aadA*를 함께 가지고 있는 균주가 27.7% (18/65)에 달하였다(Lanz *et al.*, 2003). 이와 같이 streptomycin 저항성 유전자의 출현빈도는 대장균의 기원과 분리된 환경에 따라 달라지는 것을 알 수 있다.

고농도의 streptomycin에 대한 저항성 균주를 대상으로 유전자의 분포를 조사한 본 연구에서는 77.5%가 *strA-strB*를 가지고 있었다. *strA-strB*는 streptomycin을 불활성화 시키는 두 개의 효소를 암호화하는 유전자가 반복적으로 연결된 구조이기 때문에 고농도 저항성 균주 중에서 높은 빈도로 출현한 것

으로 보인다. 대장균에서 streptomycin에 대한 MIC는 저항성 유전자에 따라 큰 영향을 받고 있으며, 그 중 *strA-strB*가 높은 수준의 저항성을 제공한다는 보고가 있다(Sunde and Norström, 2005). 40개 중 3개(7.5%)에서는 조사한 유전자가 검출되지 않았다. 세 개의 streptomycin 저항성 유전자를 조사한 다른 연구에서, 유전자가 검출되지 않은 빈도는 1.0% (Lanz *et al.*, 2003) 또는 9.7% (Enne *et al.*, 2008)인 것으로 나타났다. 이 경우 다른 종류의 불활성화 효소를 암호화하는 유전자를 가지고 있을 수 있으나, 고농도의 streptomycin에 대해 저항성을 나타내는 점에 비추어 *rpsL* 유전자의 돌연변이에 의한 표적의 변형일 가능성이 크다.

MIC와 저항성 유전자의 copy number

동일한 *strA-strB* 구조를 가지면서 MIC가 다른 세 개의 균주를 대상으로 real-time PCR를 수행하였다(Fig. 2). MIC가 2,048 µg/ml인 DMRP546는 바지락(*R. philippinarum*)에서, 4,096 µg/ml인 WSCG5105와 > 4,096 µg/ml인 WSCG5119는 굴(*C. gigas*)에서 분리된 균주이다. 동일한 양의 DNA와

housekeeping 유전자인 *adk*를 증폭시키는 primer를 사용한 대조군 실험에서 세 균주의 Ct값이 같은 것으로 확인되었다(Fig. 2B). 그러나 *strA-strB* 유전자를 증폭시켰을 경우에는 MIC에 따라 Ct값에서 차이가 있었다(Fig. 2A). $\Delta\Delta Ct$ 방법으로 유전자의 copy number를 상대적으로 정량하였을 때, MIC가 2,048 µg/ml인 DMRP546을 기준으로 4,096 µg/ml인 WSCG5105는 2.52배, > 4,096 µg/ml인 WSCG5119는 9.96배의 copy number를 갖는 것으로 나타났다. *aadA* 유전자의 경우도 같은 양상을 보였다. MIC가 > 4,098 µg/ml인 WSCG51110의 저항성 유전자 수가 2,048 µg/ml인 JDCG571보다 2.42배 많은 것으로 나타났다(Fig. 3). 따라서 동일한 유전자를 가지면서 MIC에서 차이가 나는 주요 원인은 저항성 유전자의 copy number의 차이에 기인함을 알 수 있다.

많은 항생제 저항성 유전자들이 플라스미드 또는 transposon과 같은 이동성 유전인자에 자리 잡고 있어 다른 종의 세균으로 전파될 수 있다. 또한 integron을 통해 저항성 유전자가 포획되고 전이됨으로써 저항성 유전자의 확산이 촉진되기도 한다(van Hoek *et al.*, 2011). 특히, 유전체 염기서열의 분석이 보편화되면서 유

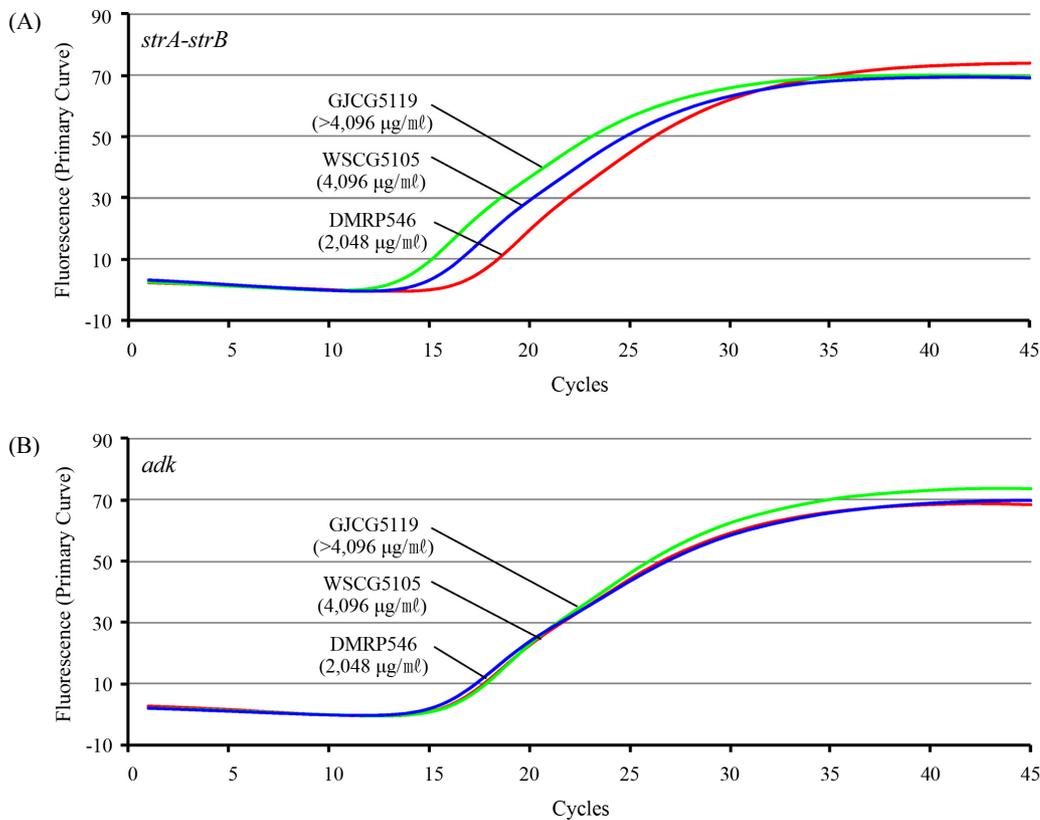


Fig. 2. Result of real-time PCR to determine the relative copy number of *strA-strB* (A). The housekeeping gene, *adk*, was used as control (B). A 20 ng of genomic DNA from isolate was used for each reaction.

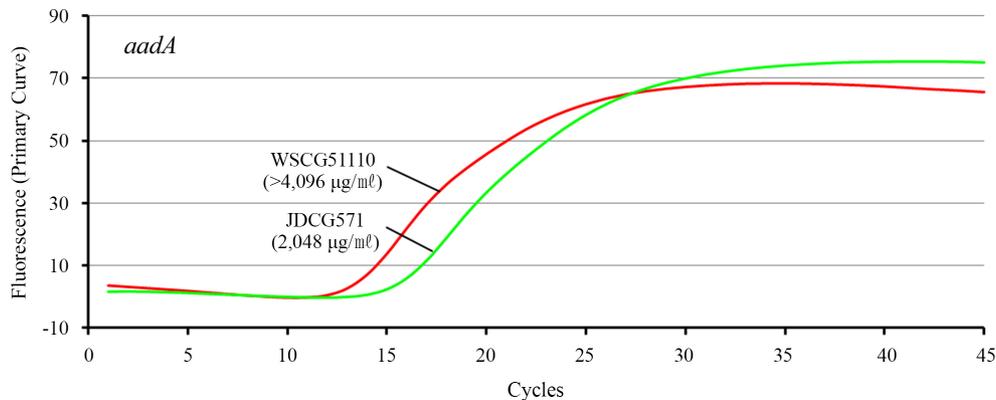


Fig. 3. Real-time PCR for comparison of *aadA* gene copy numbers between WSCG51110 and JDCG571 isolates having different MICs of streptomycin.

전자증복 및 증폭(gene duplication and amplification)에 의한 유전자 수의 증가가 항생제 저항성 증가의 원인이 되는 사실이 확인되고 있을 뿐 아니라(Sun et al., 2009; Elliott et al., 2013), 항생제 투여에 따른 저항성 플라스미드의 copy number가 증가하는 현상도 보고되고 있다(Millan et al., 2015). 따라서 앞서 결과에서 보는 바처럼 같은 저항성 유전자를 가지고 있더라도 copy number가 다른 플라스미드에 있거나, 전이요소 등에 의해 세포 당 유전자의 수가 다를 경우 MIC가 달라질 수 있다.

일반적으로 *strA-strB*를 단독으로 가지고 있는 경우가 *aadA*만을 보유하고 있는 균주보다 MIC가 높은 것으로 알려지고 있다. 즉, 대장균에서 streptomycin에 대한 높은 수준의 MIC는 *strA-strB*가 관여하는 반면, 낮은 수준의 MIC는 *aadA*에 의한 것으로 알려지고 있다(Sunde and Norström, 2005). 그러나 본 연구 결과에서 *aadA*를 단독으로 가지고 있는 6개 균주 중 4개 균주의 MIC가 > 4,096 µg/ml로 높았다(Fig. 1 and Table 1). 그러므로 사본수가 많은 플라스미드에 위치하는 등의 방법으로 세포 내 유전자 수가 많아지면 *aadA*도 높은 수준의 streptomycin 저항성에 관여함을 알 수 있다.

적 요

2015년 4월부터 2016년 3월까지 우리나라에서 채취한 패류로부터 분리한 대장균 중에서 고농도의 streptomycin에 저항성을 갖는 균주의 저항성 유전자를 조사하기 위하여 이 연구를 수행하였다. 패류 시료로부터 분리한 269개 대장균 중에서 최소저해농도(MIC)가 1,024 µg/ml 이상인 40개 균주를 선발하여 PCR을 통해 저항성 유전자를 확인하였다. 전체의 77.5%가 *strA-strB* 유전자를 가지고 있어 출현빈도가 가장 높았으며, 그 다음이 *aadA* 유전자로 30.0%에 달하였다. 6개 균

주(15.0%)는 *aadA*와 *strA-strB*를 함께 가지고 있었다. 반면에 3개 균주(7.5%)는 조사된 두 유전자 어느 것도 가지고 있지 않았다. 동일한 저항성 유전자를 가지고 있으면서 MIC가 다른 이유를 real-time PCR로 규명하였다. *aadA* 또는 *strA-strB*를 단독으로 가지고 있는 균주들 사이에 MIC가 다른 이유는 가지고 있는 저항성 유전자의 copy number에서 차이가 나기 때문이었다.

감사의 말

이 논문은 2017년 순천대학교 학술연구비로 연구되었음.

References

- Aarestrup FM, Wegener HC, and Collignon P. 2008. Resistance in bacteria of the food chain: epidemiology and control strategies. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **6**, 733-750.
- Alexander TW, Inglis GD, Yanke LJ, Topp E, Read RR, Reuter T, and McAllister TA. 2010. Farm-to-fork characterization of *Escherichia coli* associated with feedlot cattle with a known history of antimicrobial use. *Int. J. Food Microbiol.* **137**, 40-48.
- Aslam M, Diarra MS, Service C, and Rempel H. 2009. Antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli* isolates recovered from a commercial beef processing plant. *J. Food Protect.* **72**, 1089-1093.
- Choi SH, Lee YJ, Kim BH, Kim KS, park CK, Bae DH, Cho JK, Kim JW, Kim BH, and Kang MS. 2006. Antibiotic resistance and genotypic characterization of *Escherichia coli* isolated from pig farm environment. *J. Bacteriol. Virol.* **36**, 159-165.
- Clark NC, Olsvik Ø, Swenson JM, Spiegel CA, and Tenover FC. 1999. Detection of a streptomycin/spectinomycin adenyltransferase gene (*aadA*) in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 157-160.

- Eliopoulos GM, Farber BF, Murray BE, Wennersten C, and Moellering RC Jr.** 1984. Ribosomal resistance of clinical enterococcal isolates to streptomycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **25**, 398–399.
- Elliott KT, Cuff LE, and Neidle EL.** 2013. Copy number change: evolving view on gene amplification. *Future Microbiol.* **8**, 887–899.
- Enne VI, Cassar C, Springs K, Woodward MJ, and Bennett PM.** 2008. A high prevalence of antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolated from pigs and a low prevalence of antimicrobial resistant *E. coli* from cattle and sheep in Great Britain at slaughter. *FEMS Microbiol. Lett.* **278**, 193–199.
- Erb A, Stürmer T, Marre R, and Brenner H.** 2007. Prevalence of antibiotic resistance in *Escherichia coli*: overview of geographical, temporal and methodological variations. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **26**, 83–90.
- Finken M, Kirschner P, Meier A, and Böttger EC.** 1993. Molecular basis of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: alteration of the ribosomal protein S12 gene and point mutation within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot. *Mol. Microbiol.* **9**, 1239–1246.
- Graham JP, Boland JJ, and Silbergeld E.** 2007. Growth promoting antibiotics in food animal production: an economic analysis. *Pub. Health Rep.* **122**, 79–87.
- ISO 16649-3.** 2015. Microbiology of the food chain—horizontal method for the enumeration of β -glucuronidase-positive *Escherichia coli*—Part 3: Detection and most probable number technique using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide. International standardization for organization, Geneva, Switzerland.
- Jo MR, Park YS, Park K, Kwon JY, Yu HS, Song KC, Lee HJ, Oh EK, Kim JH, Lee TS, et al.** 2016. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from shellfish farms on the west coast of Korea. *Korean J. Fish. Aquat. Sci.* **49**, 13–19.
- Kim TO, Um IS, Kim HT, and Park KS.** 2016. Antimicrobial resistance and minimum inhibitory concentration of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from Gomsu Bay, Korea. *Korean J. Fish. Aquat. Sci.* **49**, 582–588.
- Kwon SJ, Lee KJ, Jung YJ, Park SG, Go KR, Yang JH, and Mok JS.** 2016. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from mussel *Mytilus galloprovincialis* farms and inland pollution sources in the Changseon area, Korea. *Korean J. Fish. Aquat. Sci.* **49**, 564–572.
- Lane DJ.** 1991. 16S/23S rRNA sequencing, pp. 115–175. In Stackebrandt E and Goodfellow M. (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons, New York, USA.
- Lanz R, Kuhnert P, and Boerlin P.** 2003. Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. *Vet. Microbiol.* **91**, 73–84.
- Lee YJ, Kim AR, Jung SC, Song SW, and Kim JH.** 2005. Antibiotics resistance pattern of *E. coli* and *Salmonella* spp. isolated from chicken feces. *Korean J. Vet. Serv.* **45**, 75–83.
- Lim SK, Nam HM, Moon DC, Jang GC, Jung SC, and Korea Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Group.** 2014. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from health animals during 2010–2012. *Korean J. Vet. Res.* **54**, 131–137.
- McManus PS, Stockwell VO, Sundin GW, and Jones AL.** 2002. Antibiotic use in plant agriculture. *Annu. Rev. Phytopathol.* **40**, 443–465.
- Millan AS, Santos-Lopez A, Ortega-Huedo R, Bernabe-Balas C, Kennedy SP, and Gonzalez-Zorn B.** 2015. Small-plasmid-mediated antibiotic resistance is enhanced by increases in plasmid copy number and bacterial fitness. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 3335–3341.
- Nemoy LL, Kotetishvili M, Tigno J, Keefer-Norris A, Harris AD, Perencevich EN, Johnson JA, Torpey D, Sulakvelidze A, Morris JG Jr, et al.** 2005. Multilocus sequence typing versus pulse-field gel electrophoresis for characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 1776–1781.
- Nhu NTQ, Lan NTN, Phuong NTN, Chau NV, Farrar J, and Caws M.** 2012. Association of streptomycin resistance mutations with level of drug resistance and *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **16**, 527–531.
- Okamoto S, Tamura A, Nakajima C, Nishimura K, Tanaka Y, Tokuyama S, Suzuki Y, and Ochi K.** 2007. Loss of a conserved 7-methylguanosine modification in 16S rRNA confers low-level streptomycin resistance in bacteria. *Mol. Microbiol.* **63**, 1096–1106.
- Park K, Park JY, Jo MR, Yu HS, Lee HJ, Kim JH, Oh EG, Shin SB, Kim YG, and Lee TS.** 2013. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from the shellfish farms in the southern coast of Korea. *Korean J. Fish. Aquat. Sci.* **46**, 528–533.
- Ryu SH, Park SG, Choi SM, Hwang YO, Ham HJ, Kim SU, Lee YK, Kim MS, Park GY, Kim KS, et al.** 2012. Antimicrobial resistance and resistance genes in *Escherichia coli* isolated from commercial fish and seafood. *Int. J. Food Microbiol.* **152**, 14–18.
- Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, and Miller GH.** 1993. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside modifying enzymes. *Microbiol. Rev.* **57**, 138–163.
- Springer B, Kidan YG, Prammananan T, Ellrott K, Böttger EC, and Sander P.** 2001. Mechanism of streptomycin resistance: selection of mutations in the 16S rRNA gene conferring resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 2877–2884.
- Sun S, Berg OG, Roth JR, and Andersson DI.** 2009. Contribution of gene amplification to evolution of increased antibiotic resistance in *Salmonella typhimurium*. *Genetics* **182**, 1183–1195.
- Sunde M and Norström M.** 2005. The genetic background for streptomycin resistance in *Escherichia coli* influences the distribution of MICs. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**, 87–90.
- Sundin GW.** 2002. Distinct recent lineages of the *strA-strB* streptomycin-resistance genes in clinical and environmental bacteria. *Curr. Microbiol.* **45**, 63–69.

Sundin GW and Bender CL. 1996. Dissemination of the *strA-strB* streptomycin-resistance gene among commensal and pathogenic bacteria from humans, animals, and plants. *Mol. Ecol.* **5**, 133–143.

van Hoek AHAM, Mevius D, Guerra B, Mullany P, Roberts AP, and Aarts HJM. 2011. Acquired antibiotic resistance genes: an

overview. *Front. Microbiol.* **2**, 203.

van Overbeek LS, Wellington EMH, Egan S, Smalla K, Heuer H, Collard JM, Guillaume G, Karagouni AD, Nikolakopoulou TL, and van Elsas JD. 2002. Prevalence of streptomycin-resistance genes in bacterial populations in European habitats. *FEMS Microbiol. Ecol.* **42**, 277–288.