

양식 넙치에서 분리한 어병세균의 lincomycin에 대한 내성 유전자의 분포

김예지 · 전려진 · 이영준 · 고예진 · 한소리* · 김성현* · 정준범†

제주대학교 해양생명과학과, *피쉬케어연구소

Distribution of resistance genes against lincomycin of pathogenic bacteria isolated from cultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)

Ye Ji Kim, Lyu Jin Jun, Young Juhn Lee, Ye Jin Ko, So Ri Han*,
Sung Hyun Kim* and Joon Bum Jeong†

Department of Marine Life Sciences, Jeju National University, Jeju 63243, Republic of Korea
*Fishcare laboratory, Jeju 63629, Republic of Korea

Lincomycin as one of the lincosamides antibiotics have been mainly used in human and livestock fields, but have not been used in aquaculture. In this study, the distribution of minimum inhibitory concentration (MIC) values against lincomycin and the detection of the macrolide-lincosamide-streptogramin (MLS) resistance gene were confirmed in bacterial pathogens isolated from cultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Of the 107 strains isolated from Jeju, 36 strains of Gram-positive bacteria and 71 strains of Gram-negative bacteria were identified. Most of *Streptococcus* spp. was found to have a MIC value of less than or equal to 0.5 µg/mL, and *Edwardsiella piscicida* was found to have a MIC value higher than 1,024 µg/mL. *V. harveyi* and *V. alginolyticus* mostly showed MIC values of 256 µg/mL, but *V. scophthalmi* displayed values of 8-64 µg/mL. In the detection of MLS resistance gene, *erm*(B) was detected in 9 strains of *Streptococcus* spp., and *erm*(A) was confirmed in one strain.

Key words: Lincomycin, Olive flounder, Minimum inhibitory concentration (MIC), Macrolide-lincosamide-streptogramin (MLS) resistance gene

서 론

전 세계적으로 어류의 소비량이 증가함과 동시에 국내 양식업이 급격하게 발달해 왔다. 1980년대 국내에서 넙치(*Paralichthys olivaceus*) 양식에 성공하며 현재까지 넙치는 국내 양식 어류의 대표어종

이다. 2021년 국내의 넙치 생산량은 41,777톤이며, 이 중 제주에서 생산되는 넙치는 21,463톤으로 국내 넙치 생산량의 약 51%를 차지한다(KOSIS, 2022).

양식넙치에 주로 발생하는 세균성 질병의 원인 균으로는 *Streptococcus* spp., *Vibrio* spp., *Edwardsiella piscicida*가 있다. 특히, 연쇄구균병과 에드워드병은 양식 현장에서 연중 발생하여 경제적 손실을 일으키는 주요 세균성 질병이다(Seo et al., 2016). 양식장에서는 이러한 세균성 질병으로 인

†Corresponding author: Joon Bum Jeong
Tel: +82-64-754-3426, Fax: +82-64-756-3493
E-mail: jeongjb@jejunu.ac.kr

한 피해를 최소화하기 위해서 항생제를 사육 수조에 침지시키거나, 사료에 첨가하여 경구투여하고 주사제로 사용한다. 국내에는 양식장에서 사용하는 항생제에 대한 정확한 규제가 없기 때문에 현장에서는 질병이 발생하면 항생제 감수성 검사를 통한 정확한 치료보다 비교적 자유롭게 항생제를 투여해왔다. 이로 인하여 기존에 사용해오던 항생제에 대한 내성의 수준이 높아지고 치료 효과도 떨어지는 실정이다.

국내에서는 β -lactam계열의 항생제로 ampicillin, amoxicillin, tetracycline계열에 oxytetracycline, doxycycline, tetracycline이 많이 사용되며, macrolide계열의 항생제로 erythromycin, quinolone계열의 flumequine, oxolinic acid, nalidixic acid 등이 수산용 항생제로 주로 사용되고 있다. 또한, lincosamide계열에 clindamycin은 lincomycin의 유도체로 넙치의 비브리옥, 연쇄구균병의 치료에 사용되어져 왔다(NIFS, 2022).

Lincomycin은 lincosamide계열의 항생제로, 리보솜의 50S subunit과 결합하여 단백질 합성을 억제하며, 항생제의 화학구조는 다르지만 비슷한 작용기전을 나타내는 macrolide계열과 streptogramin계열은 lincosamide계열의 항생제와 함께 MLS (macrolide-lincosamide-streptogramin) 항생제로 교차 내성을 나타내는 것으로 알려져 있다(Roberts, 2011). Lincomycin은 임상에서 주로 사용될 뿐 아니라 축산분야에서도 많이 사용되고 있다. 특히 2020년 농림축산식품부에서 발간한 ‘국가 항생제 사용 및 내성 모니터링’에 따르면, 2011년에 판매된 lincomycin 항생제는 6,212 kg에서 2020년 16,772 kg으로 지속적으로 증가하고 있는 것으로 나타났다. 축산용 약품으로는 주로 돼지의 유행성폐렴(*Mycoplasma hyopneumoniae*), 닭 피사성 장염(*Clostridium perfringens*)에 사용되고 있다(Maes *et al.*, 2020, Landoni and Albarellos, 2015). 이와 같이 lincomycin은 축산 질병 치료에 효과적이거나, 안정된 구조로 상대적으로 환경에서 발생하는 자연분해에 강하다고 알려져 있기 때문에, 축산폐수처리장에서는 최고 477 μ g/L의 항생제 잔류량이 고농도로 검출되었다(Mehrtens *et al.*, 2021, Li *et al.*, 2021, Lee *et al.*, 2013). 또한 Thiang *et al.* (2021)에 따르면, 말레이시아의

양식장 근처 해수에서 최고 74.7 ng/L 농도의 lincomycin이 검출된 것을 확인하였다. 국내에서는 수산용 약품으로 lincomycin이 현재까지 사용되지 않았으나 Kim *et al.* (2017)은 국내 양식장 근처 해수에서 14.8 ng/L 농도의 lincomycin이 검출된 것을 확인하였고 이것은 축산에서 사용된 항생제가 양식장 근처 해수로 유입된 것으로 여겨진다. 국내 넙치양식은 대부분 육상수조를 이용한 유수식 양식법을 사용하며, 이 양식법은 인근 바다에서 해수를 끌어와 양식장에 공급하여 사용한 사육수와 환수하는 방식이다(Jee *et al.*, 2013, Cho *et al.*, 2019, Jang *et al.*, 2018). 이러한 국내 넙치양식장의 구조상 lincomycin이 잔류되어 있는 해수가 양식장 내로 유입되었을 경우, 양식 현장에서 항생제를 사용하지 않아도 양식장 환경에 lincomycin에 내성을 가지는 어병세균이나 내성 유전자가 출현할 가능성이 있다.

세균의 chromosomal DNA 또는 plasmid DNA에 존재하는 항생제 내성 유전자는 conjugation, transduction, transformation 등의 방법으로 수평적 유전자 전달이 가능하다(Tenover, 2006, Chen *et al.*, 2020). 수평적 유전자 전달은 transposon, integron과 같은 이동성 인자를 통해서 다른 세균에 내성을 전달하기 때문에 넙치양식장에서 발생하는 어병세균의 항생제 내성 수준과 내성 유전자의 모니터링은 필요하며 지속적인 연구가 진행되어야 한다(Normark and Normark, 2002, Pepi and Focardi, 2021, Sáenz *et al.*, 2019).

따라서 본 연구에서는 넙치에서 분리되는 대표적인 어병세균의 lincomycin 항생제에 대한 내성 수준을 파악하고, MLS 내성 유전자를 PCR을 통해 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

시료채취 및 균주 분리

실험에 사용된 균주는 2019년부터 2021년도 제주도 내 양식현장에서 질병에 감염된 것으로 추정되는 넙치에서 분리하였다. 균의 증식을 위하여 2%의 NaCl이 첨가된 tryptic soy broth (TSB, Difco, USA)에 27°C에서 18~24시간 배양하였다. 그람양

성균과 그람음성균으로 분류하기 위하여 배양된 균의 colony를 선정하여 그람염색을 실시하였다. 또한 균의 구분을 위하여 blood agar plate (KOMED, Korea), thiosulfate citrate bile salts sucrose (TCBS) agar (Difco, USA) 그리고 salmonella-shigella (SS) agar (Difco, USA)에서 colony의 형태와 색상을 확인하였다. 각 배지에서 자란 세균은 tryptic soy agar (TSA, Difco, USA)에서 배양시켜 집락의 형태와 색깔을 통해 순수 분리하였다. 순수분리가 확인된 균주는 TSB에 배양하여 20% glycerol (Sigma, USA)을 첨가한 후 사용하기 전까지 -80°C에서 보관하였다.

균주의 동정

세균의 동정을 위하여, Genomic DNA prep kit (Biofact, Korea)로 DNA를 분리하여 polymerase chain reaction (PCR)을 수행하였다. PCR 분석을 위하여 사용한 primer sets는 Table 1에 제시하였다. PCR을 통해 증폭된 산물은 1X TAE buffer를 전기영동 완충액으로 사용하였고, SYBR safe DNA gel stain (invitrogen, USA)이 첨가된 1% agarose gel 상에서 전기영동 후, UV 검출기에서 band의 크기를 확인하여 세균을 동정하였다.

액체배지희석법

Lincomycin에 대한 항생제 감수성 검사는 액체

배지희석법으로 진행하였다. 실험에 사용할 균액의 탁도를 $10^5 \sim 10^6$ 으로 준비하였고, lincomycin은 mueller hinton broth (MHB, Difco, USA)로 1/2 단계 희석하여 0.125~1,024 $\mu\text{g/mL}$ 의 범위로 제작하였다. 96 well plate에 MHB 배지 160 μL 를 넣고, 탁도를 맞춘 균액과 항생제를 각각 20 μL 씩 넣었다. 준비된 plate는 27°C에서 24시간 배양하였고, 세균이 억제되어 자라지 않는 항생제의 농도 중 최소농도를 minimum inhibitory concentration (MIC)값으로 정하였다.

항생제 내성 유전자 검출

MLS 내성 유전자의 검출은 PCR을 통해 확인하였으며, 사용한 primer는 Table 2에 나타내었다. 본 연구에서는 *erm* (erythromycin ribosome methylation) 4종, *msr* (macrolide and streptogramin B) 1종, *vga* (virginiamycin factor) 4종, *mef* (macrolide efflux) 1종, *ere* (erythromycin esterase) 1종, *mph* (macrolide phosphotransferase) 3종, *lnu* (lincomycin nucleotidyltransferase) 3종을 대상으로 총 17종의 내성 유전자를 조사하였다. PCR 조건의 pre-denaturation은 95°C에서 3분, denaturation은 95°C에서 30초, annealing은 Table 2에 나타난 온도로 30초, extension은 72°C에서 30초로 30 cycles 실행한 후에 72°C에서 7분간 final extension하였다.

Table 1. Primer sets used for detection of bacterial isolates in this study

Target pathogen	Oligonucleotide sequences (5' to 3')	Product size (bp)	Reference
<i>Streptococcus parauberis</i>	TCCAGTCTTTCGACCTTCTT CAAAGAGATGTTTCGGCTTG	220	Woo <i>et al.</i> , 2006
<i>Streptococcus iniae</i>	AAGAGACGCAGTGTCAAAAG CGTTTCTTATCTTGTTACTC	107	
<i>Vibrio harveyi</i>	GTGATGAAGAAGCTTATCGCGATT CGCCTTCTTCAGTTAACGCAGGA	601	Kim <i>et al.</i> , 2014
<i>Vibrio scophthalmi</i>	ATGCAATCATGCCTCAAGATCTA AAATGTACCTTCTTCAGTCAACTT	434	
<i>Vibrio alginolyticus</i>	ACGGCATTGGAAATTGCGACTG TACCCGTCTCACGAGCCCAAG	199	Kim <i>et al.</i> , 2015
<i>Edwardsiella piscicida</i>	CTTTGATCATGTTGCGGAA CGGCGTTTTCTTTCTCG	130	Griffin <i>et al.</i> , 2014

Table 2. Primer sets used for detection of macrolide-lincosamide-streptogramin (MLS) resistance genes in this study

Mechanism	Target gene	Oligonucleotide sequences (5' to 3')	Product size (bp)	Annealing temp (°C)	Reference
rRNA methylase	<i>erm(A)</i>	TCTAAAAAGCATGTAAAAGAA CTTCGATAGTTTATTAATATTAGT	645	52	Chung <i>et al.</i> , 1999
	<i>erm(B)</i>	GAAAAGGTACTIONCAACCAAAT AGTAACGGTACTTAAATTGT	639	52	
	<i>erm(C)</i>	TCAAAACATAATATAGATAAAA GCTAATATTGTTTAAATCGTCAAT	642	52	
	<i>erm(F)</i>	CGGGTCAGCACTTTACTATTG GGACCTACCTCATAGACAAG	466	58	
Efflux pump	<i>msr(A)</i>	GGCACAATAAGAGTGTTTAAAGG AAGTTATATCATGAATAGATTGCTCTGTT	940	58	Lina <i>et al.</i> , 1999.
	<i>vga(A)</i>	AGTGGTGGTGAAGTAACACG CTTGTCTCCTCCGCGAATAC	659	58	Hammerum <i>et al.</i> , 1998
	<i>vga(B)</i>	TGACAATATGAGTGGTGGTG GCGACCATGAAATTGCTCTC	577	55	
	<i>vga(C)</i>	TAGCAGACGAACCGACGACC TTCACCACCGCTTAGCACAT	863	57	Li <i>et al.</i> , 2013
	<i>vga(D)</i>	CAACTGGAGCGAGCTGTTA GACAGCCGGATAATCTTTTG	201	57	Jung <i>et al.</i> , 2010
	<i>mef(A)</i>	ACCGATTCTATCAGCAAAG GGACCTGCCATTGGTGTG	940	55	Luna <i>et al.</i> , 2000
Inactivating enzyme	<i>ere(A)</i>	AACACCCTGAACCCAAGGGACG CTTCACATCCGGATTGCTCGA	420	63	Sutcliffe <i>et al.</i> , 1996
	<i>mph(A)</i>	AACTGTACGCACTTGC GGTACTCTTCGTTACC	837	49	Achard <i>et al.</i> , 2008
	<i>mph(B)</i>	ATTAAACAAGTAATCGAGATAGC TTTGCCATCTGCTCATATTCC	869	55	
	<i>mph(C)</i>	AAGGAATCCTTCTCTCTCCG GTAAACAAAATCGTTCCC G	343	55	Werner <i>et al.</i> , 2001
	<i>lnu(A)</i>	GGTGGCTGGGGGGTAGATGTATTAAGTGG GCTTCTTTTGAAATACATGGTATTTTTCGA	323	59	Lina <i>et al.</i> , 1999
	<i>lnu(B)</i>	CCTACCTATTGTTTGTGGAA ATAACGTTACTCTCTATTTC	944	59	Bozdogan <i>et al.</i> 1999
	<i>lnu(D)</i>	ACGGAGGGATCACATGGTAA TCTCTCGCATAATAACCTTACGTC	475	59	Haenni <i>et al.</i> , 2007

erm, erythromycin ribosome methylation; *msr*, macrolide and streptogramin B; *vga*, virginiamycin factor; *mef*, macrolide efflux; *ere*, erythromycin esterase; *mph*, macrolide phosphotransferase; *lnu*, lincomycin nucleotidyltransferase.

결 과

세균의 분리 및 동정

2019년부터 2021년까지 제주지역의 넙치 양식장의 병어로부터 총 107균주를 분리하여 실험에 사용하였다. 그람염색을 통하여 107균주 중 그람 양성균은 36균주, 그람 음성균은 71균주인 것으로 나타났다. 균의 구분을 위하여 *Streptococcus* spp.는 BAP에서의 증식여부를 확인하였고, *Vibrio* spp.는 TCBS에서 노란색 또는 초록색 colony 형성 여부와, *E. piscicida*는 SS 배지에서 검정색 colony를 형성하는 것을 확인하였다. 세부적인 균 동정은 PCR

을 통해 *S. parauberis* 34균주, *S. iniae* 2균주로 확인하였으며, *E. piscicida*는 30균주로 확인되었다. 41균주의 *Vibrio* spp.의 동정 결과로는 *V. scophthalmi* 27균주로 가장 많이 분리되었고, 나머지는 *V. harveyi* 8균주, *V. alginolyticus* 6균주로 확인되었다.

항생제 감수성 검사

Lincomycin에 대한 어병세균의 항생제 감수성 검사로 액체배지희석법을 사용하여 각 균주의 MIC 값을 확인하였다. 그람양성균 중 42%(*S. parauberis* 13균주 및 *S. iniae* 2균주)는 0.25 µg/mL 농도보다 낮은 MIC 값을 갖는 것으로 나타났고, *S. par-*

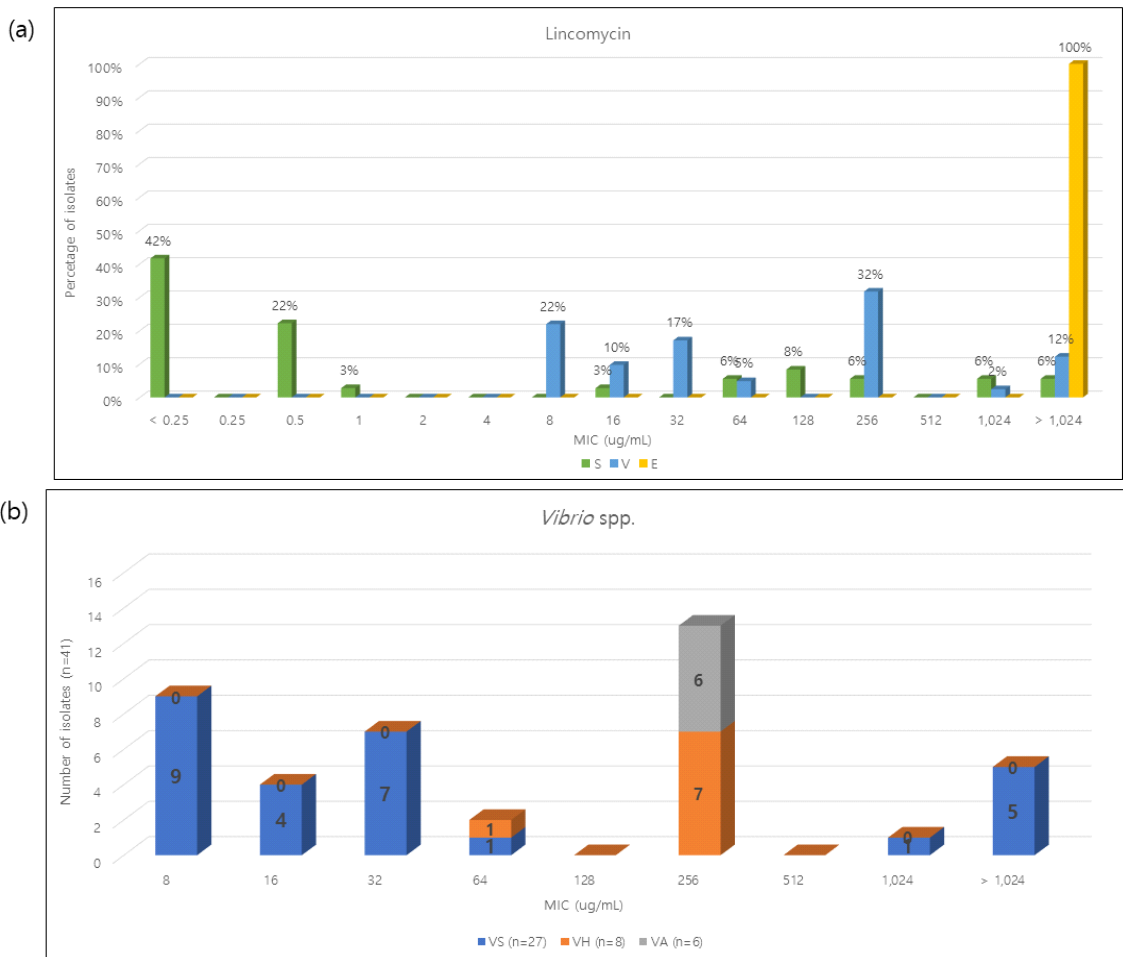


Fig. 1. The graph of minimum inhibitory concentration (MIC) distribution against lincomycin. (a) MIC values for representative 3 genera of bacteria isolated from olive flounders. S, *Streptococcus* spp.; V, *Vibrio* spp.; E, *Edwardsiella piscicida*. (b) MIC values for 41 strains of *Vibrio* spp. VS, *V. scophthalmi*; VH, *V. harveyi*; VA, *V. alginolyticus*.

Table 3. List of bacteria isolated in this study

Gram	Isolates	No.
Gram-positive	<i>Streptococcus parauberis</i>	34
	<i>S. iniae</i>	2
	Total	36
Gram-negative	<i>Vibrio scophthalmi</i>	27
	<i>V. harveyi</i>	8
	<i>V. alginolyticus</i>	6
	<i>Edwardsiella piscicida</i>	30
	Total	71

uberis 9균주(25%)는 0.5~1 µg/mL의 MIC 값을 가지는 것으로 나타났다. 나머지 *S. parauberis* 12균주(33%)는 16 µg/mL 이상의 높은 MIC 값을 가지는 것을 확인하였다. 반면, 그람음성균인 *E. piscicida* 30균주는 모두 1,024 µg/mL 농도보다 높은 MIC 값을 가지는 것으로 나타나, 고농도의 lincomycin 에도 균이 억제되지 않는 것으로 확인되었다(Fig. 1a). *Vibrio* spp. 균주도 그람양성균과 비교하였을

때, 높은 MIC 값을 가지는 것을 확인할 수 있었는데, *V. scophthalmi* 균주가 상대적으로 낮은 MIC 값을 가지는 것으로 확인되었다(Fig. 1b). *Vibrio* spp. 41균주 중에서 *V. harveyi* 7균주(17%)와 *V. alginolyticus* 6균주(15%)는 모두 256 µg/mL의 MIC 값을 가지는 것으로 나타났다. *V. scophthalmi* 9균주(22%)는 8 µg/mL, 4균주(10%)는 16 µg/mL, 7균주(17%)는 32 µg/mL로 다른 *Vibrio* spp. 균주보다 비교적 낮은 MIC 값을 가지는 것으로 확인되었다.

항생제 내성 유전자 분석

본 연구에서 분리한 107균주를 대상으로 PCR을 통해 MLS 내성 유전자 17종의 검출 여부를 확인하였다. 먼저 그람음성균인 *Vibrio* spp. 41균주와 *E. piscicida* 30균주는 본 연구의 조사대상 17종의 항생제 내성 유전자가 모두 불검출되었다(Table 4). 그러나, 그람양성균인 *Streptococcus* spp. 36균주 중 9균주에서 *erm(B)*가 검출되었고, *erm(B)*가 검출된 9균주 중 *S. parauberis* 1균주는 *erm(A)*도 같이 가

Table 4. Detection of macrolide-lincosamide-streptogramin (MLS) resistance genes for bacteria isolated from olive flounder

Isolates	rRNA methylase						Efflux pump				Inactivating enzyme							
	<i>erm</i>		<i>erm</i>		<i>msr</i>		<i>vga</i>		<i>vga</i>		<i>mef</i>		<i>ere</i>		<i>mph</i>		<i>lnu</i>	
	(A)	(B)	(C)	(F)	(A)	(A)	(B)	(C)	(D)	(A)	(A)	(A)	(C)	(A)	(D)	(D)		
<i>Streptococcus</i> spp. (n=36)	1	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Vibrio</i> spp. (n=41)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>E. piscicida</i> (n=30)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

erm, erythromycin ribosome methylation; *msr*, macrolide and streptogramin B; *vga*, virginiamycin factor; *mef*, macrolide efflux; *ere*, erythromycin esterase; *mph*, macrolide phosphotransferase; *lnu*, lincomycin nucleotidyltransferase; -, not detection.

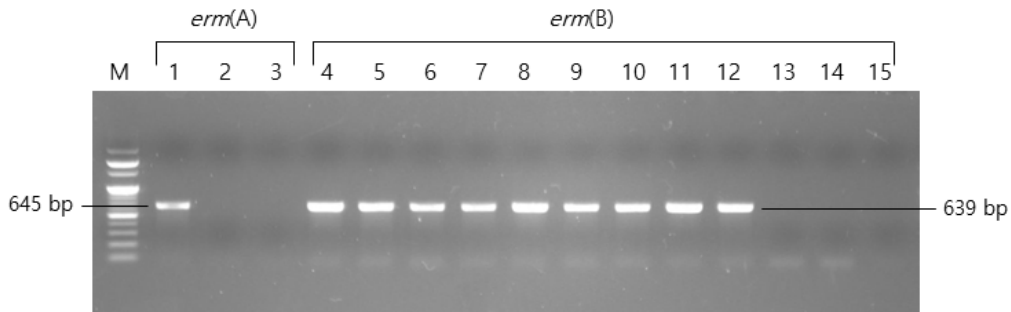


Fig. 2. PCR amplification for detection of *erm(A)* (Lane 1-3) and *erm(B)* (Lane 4-15). Lane 1, 4-12, *S. parauberis*; Lane 2, 13, *Vibrio* spp.; Lane 3, 14, *E. piscicida*; Lane 15, negative control; M, 100 bp DNA ladder.

지고 있는 것으로 확인되었다(Fig. 2 & Table 4).

고 찰

양식 현장에서의 항생제 오남용은 다제내성균 발생, 항생제 내성 유전자의 전이와 같은 내성 문제뿐만 아니라, 인근 해양 환경으로 항생제 내성균이 유입되면서 다양한 방식으로 내성을 전파시킨다(Hwang *et al.*, 2015, Kim *et al.*, 2018). 또한, 세균성 질병에 대해 치료 효과가 있었던 동일한 항생제를 사용하였음에도 불구하고, 항생제 내성의 출현으로 인하여 치료가 이루어지지 않는 경우가 발생한다. 이러한 악순환을 최소화하기 위해서는 양식장에서 세균으로 인한 질병이 발생했을 때, 신속하게 원인균을 분리하고 항생제 감수성 검사를 실시하여 적절한 항생제를 선택하고 용법·용량에 맞는 치료를 실시하여야 한다.

Lincomycin 항생제는 현재까지 국내의 수산분야에서 사용되지 않았으나, 인체나 축산분야에서 많이 사용되어 잔류항생제가 해양환경으로 축적되고 내성균이 발생하여 양식장에 유입되었을 가능성이 높다. 따라서 본 연구에서는 넙치에 질병을 일으키는 세균의 lincomycin에 대한 내성 정도를 파악하고 MLS 내성 유전자의 검출을 확인하고자 하였다.

임상적인 치료 효과를 나타내는 clinical breakpoint가 존재하면 항생제의 감수성과 내성을 판단할 수 있다(Kwon *et al.*, 2016). 미국의 clinical and laboratory standards institute (CLSI)와 유럽의 european union committee on antimicrobial susceptibility testing (EUCAST)에서 제시한 항생제 내성 기준은 전 세계의 임상 실험실에서 참고하는 것으로 알려져 있다(Weinstein and Lewis, 2020). Lincomycin에 대한 중단점은 CLSI와 EUCAST에서는 제시되어 있지 않으나, 프랑스에서 제시한 기준에서는 *Streptococcus* spp.에 대하여 MIC 값이 2 µg/mL 이하이면 감수성, 8 µg/mL 보다 높으면 내성균으로 중단점을 제시하고 있다(CA-SFM, 2019). 본 연구에서 분리된 *Streptococcus* spp. 36균주에 제시된 중단점을 적용하면, 24균주(67%)는 감수성, 12균주(33%)는 내성균주로 분류할 수 있다. Lincomycin의 작용

범위는 그람양성균 및 그람음성 혐기성균으로, 일반적으로 대부분의 그람음성균은 자연내성을 나타낸다(Spižek and Řezanka, 2004). 본 연구에서 분리한 *E. piscicida* 30균주는 모두 1,024 µg/mL 보다 높은 MIC 값을 가지는 것으로 나타났다. *V. harveyi* 균주와 *V. alginolyticus*는 대부분 256 µg/mL의 MIC 값을 나타냈으나, 흥미롭게도 *V. scopthalmi*의 경우 6균주를 제외한 21균주는 상대적으로 낮은 8~64 µg/mL의 MIC 값을 나타내어 같은 비브리오속 내에서도 MIC 값의 분포가 다르게 나타나는 것을 확인하였다.

MLS 항생제의 작용기전은 크게 3개로 나눌 수 있으며 다음과 같다. (1) 23S rRNA를 메틸화시켜 항생제가 표적에 결합하는 것을 방해하는 기작(rRNA methylase), (2) 세포 내로 침투한 항생제를 세포 외로 배출하는 기작(efflux pump), (3) 항생제를 인산화, 가수분해 등의 효소로 변형시켜서 불활성화 시키는 기작(inactivating enzyme)이 있다(Lecclercq, 2002). 본 연구에서 조사한 MLS 내성유전자 17종 중 *erm*(A), *erm*(B), *erm*(C), *erm*(F)는 rRNA methylase에 관여하며, *msr*(A), *vga*(A), *vga*(B), *vga*(C), *vga*(D), *mef*(A)는 efflux pump에, *ere*(A), *mph*(A), *mph*(B), *mph*(C), *lnu*(A), *lnu*(B), *lnu*(D)는 inactivating enzyme에 관여하는 것으로 알려져 있다(Roberts, 2011).

대부분의 MLS 내성 유전자는 *Streptomyces* spp., *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp. 등에서 발견된다고 보고되었으며, *erm*(B) 유전자는 *Streptococcus* spp.에 주요한 erythromycin 내성 유전자이다(Robert *et al.*, 1999, Hung *et al.*, 2008). 본 연구에서 분리한 *S. parauberis* 36균주 중 9균주는 *erm*(B)를 가지고 있는 것으로 확인되었다. *erm*(B)를 가지고 있는 9균주 중 8균주의 lincomycin에 대한 MIC 범위는 64-1,024 µg/mL로 나타났다. 또한, Park *et al.* (2009)이 제주 넙치에서 분리한 *S. parauberis*와 *S. iniae*에서 *erm*(A)는 검출되지 않았으나, 본 연구에서는 *erm*(B)와 *erm*(A)를 동시에 가지고 있는 *S. parauberis* 균주가 발견되어 다른 결과를 보였다. Roberts (2004)에 따르면, *erm*(B) 유전자는 다른 rRNA methylase 관련 유전자와 다르게 장내 그람음성균에서 확인되었고, Lee *et al.*

(2015)은 *E. tarda* 균주에서 *erm(B)*가 검출된 것을 보고하였다. 그러나, 본 연구에서 분리한 *E. piscicida* 30균주에서는 해당 유전자가 검출되지 않았으며, 이는 본 연구에서 분리한 균주들에 대하여 erythromycin의 내성 수준을 파악하는 것이 필요할 것으로 판단된다. *mph(A)*, *mph(B)* 유전자는 그람 음성균에서만 발견된다고 알려져 있으며, *ere(A)* 유전자는 *Vibrio* spp.에서도 발견된다고 알려져 있다(Roberts, 2004). 본 연구에서 분리한 *Vibrio* spp. 41균주에서는 MLS 관련 내성 유전자가 모두 검출되지 않았으나, Nonaka *et al.* (2015)의 연구에서는 양식장 인근의 해수에서 분리된 *Vibrio* spp.에서 *mef(C)*와 *mph(G)* 유전자가 검출되는 것을 확인하였기 때문에, 향후 이에 대한 유전자 조사가 필요할 것으로 판단된다.

MLS 항생제의 내성에 대한 문제는 공중보건학적으로도 주목받고 있으나, 국내 수산분야에서는 MLS 내성 유전자에 관한 연구가 아직 미흡한 실정이다. 그러므로, 양식 현장에서 분리된 세균을 대상으로 내성 수준을 확인하고 MLS 내성 유전자를 조사하는 체계적인 연구는 중요하며, 본 연구 결과는 어병세균 내 MLS 내성 유전자 분포에 대한 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2021학년도 제주대학교 교원성과지원사업에 의하여 연구되었음.

References

- Achard, A., Guérin-Faubleé, V., Pichereau, V., Villiers, C. and Leclercq, R.: Emergence of macrolide resistance gene *mph(B)* in *Streptococcus uberis* and cooperative effects with *rdmC*-Like gene. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 52:2767-2770, 2008.
- Bozdogan, B., Berrezouga, L., Kuo, M.S., Yurek, D.A., Farley, K.A., Stockman, B.J. and Leclercq, R.: A new resistance gene, *linB*, conferring resistance to lincosamides by nucleotidylation in *Enterococcus faecium* HM1025. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43:925-929, 1999.
- Chen, Y.M., Holmes, E.C., Chen, X., Tian, J.H., Lin, X.D., Qin, X.C., Gao, W.H., Liu, J., Wu, Z.D. and Zhang, Y.Z.: Diverse and abundant resistome in terrestrial and aquatic vertebrates revealed by transcriptional analysis. *Sci. Rep.*, 10:18870, 2020.
- Cho, Y.R., Kim, H.S., Kim, S.K., Kim, S.R., Hur, Y.B. and Kim, J.H.: Bio-floc technology application in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* aquaculture according to the difference of closed recirculating systems. *Korean J. Environ. Biol.*, 37:129-135, 2019.
- Chung, W.O., Werckenthin, C., Schwarz, S. and Roberts, M.C.: Host range of the *ermF* rRNA methylase gene in bacteria of human and animal origin. *J. Antimicrob. Chemother.*, 43:5-14, 1999.
- Griffin, M.J., Ware, C., Quiniou, S.M., Steadman, J.M., Gaunt, P.S., Khoo, L.S. and Soto, E.: *Edwardsiella piscicida* identified in the southeastern USA by *gyrB* sequence, species-specific and repetitive sequence-mediated PCR. *Dis. Aquat. Org.*, 108:23-35, 2014.
- Haenni, M., Saras, E., Chaussière, S., Treilles, M. and Madec, J.Y.: *ermB*-mediated erythromycin resistance in *Streptococcus uberis* from bovine mastitis. *Vet. J.*, 189:356-358, 2011.
- Hammerum, A.M., Jensen, L.B. and Aarestrup, F.M.: Detection of the *satA* gene and transferability of virginiamycin resistance in *Enterococcus faecium* from food-animals. *FEMS Microbiol. Lett.*, 168:145-151, 1998.
- Hung, S.W., Wang, S.L., Tu, C.Y., Tsai, Y.C., Chuang, S.T., Shieh, M.T., Liu, P.C. and Wang, W.S.: Antibiotic susceptibility and prevalence of erythromycin ribosomal methylase gene, *erm(B)* in *Streptococcus* spp.. *Vet. J.*, 176:197-204, 2008.
- Hwang, S.D., Jo, D.H., Cho, M.Y., Jee, B.Y., Park, M.A. and Park, C.I.: Application of water-soluble tetrazolium salt for development of rapid antimicrobial susceptibility testing methods. *J. Fish. Pathol.*, 28:71-78, 2015.
- Jang, H.M., Kim, Y.B., Choi, S.K., Lee, Y.H., Shin, S.G., Unno, T. and Kim, Y.M.: Prevalence of antibiotic resistance genes from effluent of coastal aquaculture, South Korea. *Environ. Pollut.*, 233:1049-1057, 2018.
- Jee, B.Y., Min, J.G., Kim, T.J., Choi, J.S. and Park, S.M.: Research on sanitation control for an HACCP application for a flatfish (*Paralichthys olivaceus*) aquaculture farm. *J. Fish Mar. Sci. Edu.*, 25:1179-1191, 2013.
- Jung, Y.H., Shin, E.S., Kim, O., Yoo, J.S., Lee, K.M., Yoo, J.I., Chung, G.T. and Lee, Y.S.: Characterization of two newly identified genes, *vgaD* and *vatG*, conferring resistance to streptogramin a in *Enter-*

- ococcus faecium*. Animicrob. Agents Chemother., 54:4744-4749, 2010.
- Kim, B.Y., Jeon, J.H., Choi, S.K., Shin, J.G., Lee, Y.H. and Kim, Y.M.: Use of a filtering process to remove solid waste and antibiotic resistance genes from effluent of a flow-through fish farm. Sci. Total Environ., 615:289-296, 2018.
- Kim, H.J., Ryu, J.O., Lee, S.Y., Kim, E.S. and Kim, H.Y.: Multiplex PCR for detection of the *Vibrio* genus and five pathogenic *Vibrio* species with primer sets designed using comparative genomics. BMC Microbiol., 15:239, 2015.
- Kim, H.Y., Lee I.S. and Oh, J.E.: Human and veterinary pharmaceuticals in the marine environment including fish farms in Korea. Sci. Total Environ., 579: 940-949, 2017.
- Kim, M.S., Cho, J.Y. and Choi, H.S.: Identification of *Vibrio harveyi*, *Vibrio ichthyoenteri*, and *Photobacterium damsela* isolated from olive flounder *Paralichthys olivaceus* in Korea by multiplex PCR developed using the *rpoB* gene. Fish Sci., 80:333-339, 2014.
- Korean Statistical Information Service (KOSIS). Retrieved from <http://kosis.kr>. 2022.
- Kwon, M.G., Lim, Y.J., Kim, M.S., Seo J.S. and Kim, D.H.: Epidemiological cut-off values generated for disc diffusion data from *Photobacterium damsela*. J. Fish Aquat. Sci., 49:838-844, 2016.
- Landoni, M.F. and Albarellos, G.: The use of antimicrobial agents in broiler chickens. Vet. J., 205:21-27, 2015.
- Leclercq, R.: Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: Nature of the resistance elements and their clinical implications. Clin. Infect. Dis., 34: 482-492, 2002.
- Lee, S.H., Jung, H.W., Jung, J.Y., Min, H.J., Kim, B.R., Park, C.G., Oh, J.E., Onoda, Y. and Satou, N.: Characteristics of occurrence of pharmaceuticals in the Nakdong river. J. Kor. Soc. Environ. Eng., 35: 45-56, 2013.
- Li, L., Sun, J., Liu, B., Zhao, D., Ma, J., Deng, H., Li, X., Hu, F., Liao, X. and Liu, Y.: Quantification of lincomycin resistance genes associated with lincomycin residues in waters and soils adjacent to representative swine farms in China. Front. Microbiol., 4:364, 2013.
- Li, Y., Fu, L., Li, X., Wang, Y., Wei, Y., Tang, J. and Liu, H.: Novel strains with superior degrading efficiency for lincomycin manufacturing biowaste. Eco-toxicol. Environ. Saf., 209:111802, 2021.
- Lina, G., Quaglia, A., Reverdy, M.E., Leclercq, R., Vandenesch, F. and Etienne, J.: Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among Staphylococci. Antimicrob. Agents Chemother., 43:1062-1066, 1999.
- Luna, V.A., Cousin, S., JR, Whittington, W.L. and Roberts, M.C.: Identification of the conjugative *mef* gene in clinical *Acinetobacter junii* and *Neisseria gonorrhoeae* isolates. Animicrob. Agents Chemother., 44:2503-2506, 2000.
- Maes, D., Boyen, F., Haesebrouck, F. and Gautier-Bouchardon, A.V.: Antimicrobial treatment of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections. Vet. J., 259: 105474, 2020.
- Mehrtens, A., Licha, T. and Burke, V.: Occurrence, effects and behaviour of the antibiotic lincomycin in the agricultural and aquatic environment – A review. Sci. Total Environ., 778:146306, 2021.
- Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, National antibiotic use and resistance monitoring-Animals, livestock and marine products. Retrieved from https://www.qia.go.kr/viewwebQiaCom.do?id=53852&type=50_Indyjsy. 2020.
- National Institute of Fisheries Science (NIFS). Retrieved from https://www.nifs.go.kr/page?id=antibiotics_1_08. 2022.
- Nonaka, L., Maruyama, F., Suzuki, S. and Masuda, M.: 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. Lett. Appl. Microbiol., 61: 1-6, 2015.
- Normark, B.H. and Normark, S.: Evolution and spread of antibiotic resistance. J. Intern. Med., 252:91-106, 2002.
- Park, Y.K., Nho, S.W., Shin, G.W., Park, S.B., Jang, H.B., Cha, I.S., Ha, M.A., Kim, Y.R., Dalvi, R.S., Kang, B.J. and Jung, T.S.: Antibiotic susceptibility and resistance of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus parauberis* isolated from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Vet. Microbiol., 136:76-81, 2009.
- Pepi, M. and Focardi, S.: Antibiotic-resistant bacteria in aquaculture and climate change: A challenge for health in the mediterranean area. Int. J. Environ. Res. Public Health, 18:5723, 2021.
- Roberts, M.C., Sutcliffe, J., Courvalin, P., Jensen, L.B., Rood, J. and Seppala, H.: Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. Antimicrob. Agents Chemother.

- er., 43:2823-2830, 1999.
- Roberts, M.C.: Distribution of macrolide, lincosamide, streptogramin, ketolide and oxazolidinone (MLSKO) resistance genes in gram-negative bacteria. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.*, 4:207-215, 2004.
- Roberts, M.C.: Environmental macrolide-lincosamide-streptogramin and tetracycline resistant bacteria. *Front. Microbiol.*, 2: 40, 2011.
- Sáenz, J.S., Marques, T.V., Barone, R.S.C., Cyrino, J.E.P., Kublik, S., Nesme, J., Schloter, M., Rath, S. and Vestergaard, G.: Oral administration of antibiotics increased the potential mobility of bacterial resistance genes in the gut of the fish *Piaractus mesopotamicus*. *Microbiome*, 7:24, 2019.
- Seo, J.S., Jeon, E.J., Kwon, M.G., Hwang, J.Y., Jung, S.H., Kim, N.Y., Jee, B.Y. and Park, M.A.: Disease resistance against bacterial infection on treatment of hot-water extract with 6 herbal mixtures in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *J. Fish Mar. Sci. Edu.*, 28:1715-1723, 2016.
- Société Française de Microbiologie. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) Recommandations Vétérinaires. 2019.
- Spížek, J. and Řezanka, T.: Lincomycin, clindamycin and their applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 64:455-464, 2004.
- Sutcliffe, J., Grebe, T., Tait-Kamradt, A. and Wondrack, L.: Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 40:2562-2566, 1996.
- Tenover, F.C.: Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am. J. Med.*, 34:S3-S10, 2006.
- Thiang, E.L., Lee, C.W., Takada, H., Seki, K., Takei, A., Suzuki, S., Wang, A. and Bong, C.W.: Antibiotic residues from aquaculture farms and their ecological risks in Southeast Asia: a case study from Malaysia. *Ecosyst. Health Sustain.*, 7: 1926337, 2021.
- Weinstein, M.P. and Lewis, J.S.: The clinical and laboratory standards institute subcommittee on antimicrobial susceptibility testing: Background, organization, functions, and processes. *J. Clin. Microbiol.*, 58:e01864-19, 2020.
- Werner, G., Hildebrandt, B. and Witte, W.: The newly described *msrC* gene is not equally distributed among all isolates of *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45:3672-3673, 2001.
- Woo, S.H., Kim, H.J., Lee, J.S., Kim, J.W. and Park, S.I.: Pathogenicity and classification of streptococci isolated from cultured marine fishes. *J. Fish Pathol.*, 19:17-33, 2006.

Manuscript Received : Apr 29, 2022

Revised : May 25, 2022

Accepted : May 27, 2022