

국내 수산생물로부터 분리된 *Aeromonas* spp. 및 *Pseudomonas* spp.의 항생제 내성에 관한 특성 분석

김예지 · 전려진 · 이영준 · 고예진 · 오영은 · 우수지¹ · 김명석^{2*} · 정준범*

제주대학교 해양생명과학과, ¹국립수산물과학원 동해수산연구소 양식산업과, ²국립수산물과학원 병리연구과

Characterization of Antibiotic Resistance of *Aeromonas* spp. and *Pseudomonas* spp. Isolated from Domestic Aquatic Animals

Ye Ji Kim, Lyu Jin Jun, Young Juhn Lee, Ye Jin Ko, Yeong Eun Oh, Soo Ji Wo¹, Myoung Sug Kim^{2*} and Joon Bum Jeong*

Department of Marine Life Sciences, Jeju National University, Jeju 63243, Republic of Korea

¹Aquaculture Industry Division, East Sea Fisheries Research Institute, National Institute of Fisheries Science, Gangneung 25435, Republic of Korea

²Pathology Research Division, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Republic of Korea

Aeromonas spp. and *Pseudomonas* spp. are opportunistic pathogens widely distributed in the aquatic environment. To test the antibiotic susceptibility, the MIC of the 18 antibiotics mainly used in aquaculture were measured. *Aeromonas* spp. and *Pseudomonas* spp. strains had different resistance patterns against most antibiotics. The MIC of tetracycline for four *Aeromonas* spp. strains (10.5%) was < 0.25 µg/mL. However, 0.5–4 µg/mL tetracycline inhibited most *Pseudomonas* spp. strains. The *tet* resistance performance of 14 genes including *tet(B)*, *tet(E)*, and *tet(M)* were investigated. Investigating, the tetracycline resistance gene of 38 *Aeromonas* spp. strains detected *tet(A)* in 21 strains (55.3%). Two *Pseudomonas* spp. strains showed high MIC values and no inhibition zone. *tet* gene analysis detected *tet(D)* in only one strain (5%).

Keywords: *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp., Minimum inhibitory concentration (MIC) panel, Tetracycline resistance gene

서론

양식업에서 항생제의 사용은 세균성 질병의 감염을 예방하고 치료하기 위한 필수불가결한 요소이다. 2019년 세계보건기구(World Health Organization, WHO)에서는 항생제 내성을 세계 보건에 대한 10가지 위협으로 발표하여 지속적인 항생제 내성균 모니터링의 필요성을 강조하고 있다(WHO, 2019). 따라서 국가별로 표준화된 항생제 내성에 관한 데이터를 수집하고 공유하기 위하여 2015년에 WHO는 GLASS (Global Antimicrobial Resistance Surveillance System)를 개발하였다. 2016년도에 41개 국가들이 GLASS에 가입한 이후, 2021년도에는 109개 국가와 지역이 가입하였으며, 우리나라도 2016년 7월에

GLASS에 참여하였다(WHO, 2016). 이와 같이 항생제 내성의 출현과 확산은 전 세계적인 이슈로서 주목을 받고 있다. 항생제는 국내 양식업에서도 연쇄구균병 치료를 위해 ampicillin, amoxicillin, florfenicol 등이 사용되고 있으며, 비브리오팀 치료를 위해 주로 사용되는 항생제는 neomycin이 있다(Jee et al., 2014). 그 이외에도 tetracycline (Tc), oxytetracycline (OTC), doxycycline (DXT), erythromycin, flumequine 등의 항생제가 양식 산업에서 어류의 질병을 치료하기 위하여 사용되고 있다. 그 중 tetracycline 계열의 항생제는 그람양성균과 그람음성균 모두에 작용하는 광범위 항생제로 미국과 European Union (25개국)의 수의용 항생제 판매량 중 40%가 tetracycline 계열의 항생제로 조사되었다(Done et al., 2015). 또한 Sapkota et

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

E-mail address: fishdoc@korea.kr; jeongjb@jejunu.ac.kr



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.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2023.0388>

Korean J Fish Aquat Sci 56(4), 388-400, August 2023

Received 29 May 2023; Revised 22 July 2023; Accepted 10 August 2023

저자 직위: 김예지(대학원생), 전려진(학술연구교수), 이영준(대학원생), 고예진(대학원생), 오영은(대학원생), 우수지(연구사), 김명석(연구관), 정준범(교수)

al. (2008)이 조사한 양식 수산물 생산국가 15개국 중, 12개국 (92.3%)에서 OTC를 사용하는 것으로 나타나, 양식업에서 가장 일반적으로 사용되는 항생제로 확인되었다. 국내 수산생물 질병의 연구는 국내 양식어류 생산량의 46.61%를 차지하고 있는 넙치에서 주로 발병하는 병원체인 *Streptococcus* spp., *Vibrio* spp. 그리고 *Edwardsiella piscicida*를 중점적으로 이루어지고 있다(KOSIS, 2022). 그러나 이외에도 수산생물에 질병을 일으키는 세균은 *Tenacibaculum maritimum*, *Flavobacterium* sp., *Renibacterium* sp., *Aeromonas* spp. 및 *Pseudomonas* spp. 등 다양하게 있는 것으로 보고되고 있다. 특히, *Aeromonas* spp. 및 *Pseudomonas* spp.는 그람음성균으로 해양환경, 강 그리고 호수 등의 수중환경에 널리 분포하는 기회성 병원체로 숙주의 범위가 넓다고 알려져 있다(He et al., 2004; Figueira et al., 2011; Kim et al., 2019). 최근 연구에 따르면 2015–2018년 동안 경기도 내 약 300개의 양식장을 대상으로 분리한 101균주 중 *Aeromonas* spp.가 43.5%로 가장 많이 분리된 것으로 보고되었고, *Aeromonas* spp.와 *Pseudomonas* spp.가 주요 병원체로 확인되었다(Cho et al., 2021). 양식장에서 배출되는 사육수는 항생제 내성균 및 항생제 내성유전자를 환경으로 확산시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 숙주의 범위가 넓은 *Aeromonas* spp.와 *Pseudomonas* spp.는 수중환경에 널리 분포하고 있어, 항생제 내성 확산의 잠정적 원인이 될 수 있다(Guo et al., 2017; Kim et al., 2017; Jang et al., 2018; Raza et al., 2022). 국내 수산생물에 발병하는 주요 어병세균들에 대한 수산용 항생제 내성에 관한 특성 분석과 내성유전자에 관한 연구는 지속적으로 보고되고 있다(Kim et al., 2010, 2012, 2022a, 2022b; Kwon et al., 2016; Lee et al., 2017; Woo and Chung, 2018; Seo et al., 2019). 그러나, 다양한 *Aeromonas* spp.와 *Pseudomonas* spp.에 대한 항생제 내성 패턴과 내성유전자 분석에 관

한 연구는 부족한 실정이다. 또한 기존의 액체배지희석법은 항생제를 농도별로 단계희석하는 과정으로 인하여 검사 시간이 많이 소요된다. 이러한 단점을 보완하기 위하여 시판되고 있는 MIC panel은 plate의 well에 항생제가 농도별로 코팅되어 있어 간편하고 신속한 검사가 가능하다. 그러나 이러한 panel은 인체나 축산분야에서 많이 사용되어져 왔으며, 수산동물에서 분리되는 세균에는 아직까지 널리 활용되지 못하고 있다(Kim et al., 2020).

본 연구에서는 *Aeromonas* spp.와 *Pseudomonas* spp. 균주의 수산용 항생제 18종에 대한 내성 경향을 분석하고, tetracycline 내성유전자 검출률을 조사하여, 해당 병원체의 항생제 내성 모니터링에 필요한 기초자료로 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 배양

항생제 감수성 검사에는 국립수산과학원이 보유한 *Aeromonas* spp. 38균주와 *Pseudomonas* spp. 20균주를 사용하였다(Fig. 1, Table 1, Table 2). *Aeromonas* spp.는 뱀장어, 메기, 무지개 송어 등에서 분리되었고, *A. hydrophila*, *A. veronii*, *A. caviae* 등을 비롯한 총 11종류의 *Aeromonas* spp. 세균을 실험에 사용하였다. *Pseudomonas* spp.는 넙치, 뱀장어, 조피볼락 등에서 분리되었으며, *P. plecoglossicida*, *P. mandelii*, *P. koreensis* 등을 비롯한 총 16종류의 *Pseudomonas* spp. 세균을 항생제 감수성 검사에 사용하였다. 순수분리가 확인된 균의 증식은 2% NaCl이 첨가된 tryptic soy broth (TSB; Difco, Detroit, MI, USA)에 28°C에서 18–24시간 배양하였다. 배양된 세균은 20% glycerol (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 첨가한 후 사용하기 전까지 -80°C에서 보관하였다.

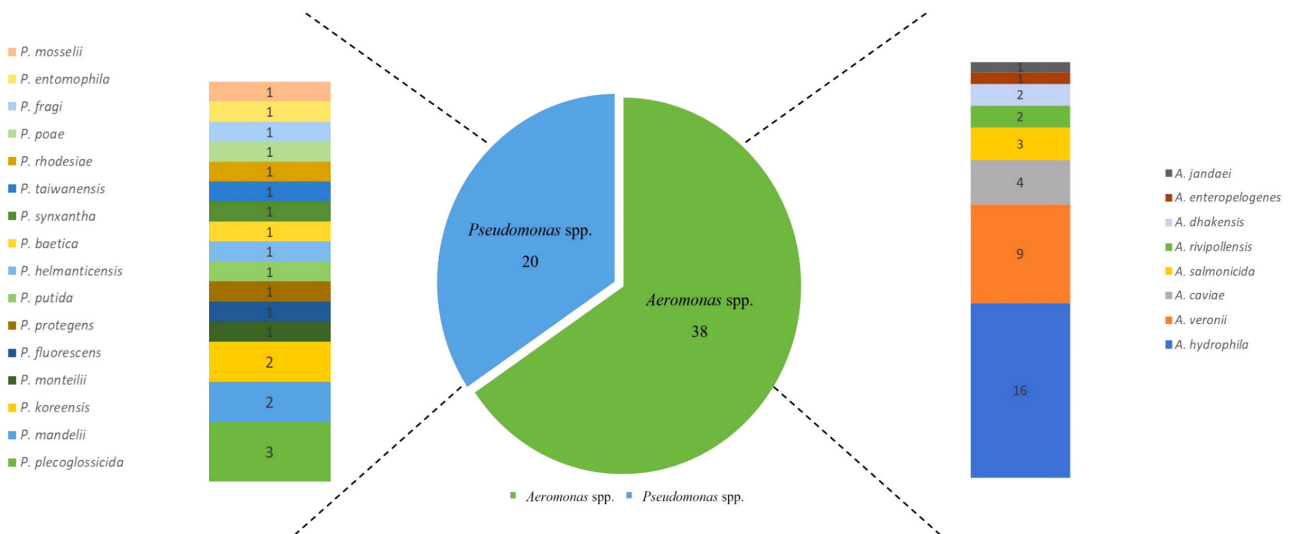


Fig. 1. List of strains used in this study.

Table 1. List of *Aeromonas* spp. strains used in this study

Bacteria	Year	Location	Host fish	Source
<i>A. hydrophila</i> -1			<i>Anguilla japonica</i>	19FBAHy0003
<i>A. hydrophila</i> -2		Gyeongnam	<i>Siniperca scherzeri</i>	17FBAHy0008
<i>A. hydrophila</i> -3			<i>Cyprinus carpio</i>	17FBAHy0007
<i>A. hydrophila</i> -4		Kyungpook	<i>Silurus asotus</i>	18FBAHy0001
<i>A. hydrophila</i> -5	2017	Jeonbuk	<i>Misgurnus mizolepis</i>	17FBAHy0006
<i>A. hydrophila</i> -6			<i>C. carpio</i>	17FBAHy0005
<i>A. hydrophila</i> -7				17FBAHy0009
<i>A. hydrophila</i> -8			<i>A. japonica</i>	17FBAHy0003
<i>A. hydrophila</i> -9		Jeonnam		17FBAHy0012
<i>A. hydrophila</i> -10				17FBAHy0011
<i>A. hydrophila</i> -11			<i>Pelteobagrus fulvidraco</i>	17FBAHy0010
<i>A. hydrophila</i> -12	2018	Jeonnam	<i>A. japonica</i>	18FBAHy0003
<i>A. hydrophila</i> -13			<i>P. fulvidraco</i>	18FBAHy0002
<i>A. hydrophila</i> -14		Chungnam	<i>S. asotus</i>	19FBAHy0002
<i>A. hydrophila</i> -15	2019			19FBAHy0001
<i>A. hydrophila</i> -16		Gangwon	<i>A. japonica</i>	19FBAHy0004
<i>A. veronii</i> -1				17FBABe0008
<i>A. veronii</i> -2	2017	Jeonnam	<i>A. japonica</i>	17FBABe0013
<i>A. veronii</i> -3				17FBABe0011
<i>A. veronii</i> -4		Jeonbuk	<i>C. carpio</i>	17FBABe0002
<i>A. veronii</i> -5		Gyeongnam		18FBABe0001
<i>A. veronii</i> -6	2018	Gyeonggi	<i>A. japonica</i>	18FBABe0002
<i>A. veronii</i> -7				18FBABe0003
<i>A. veronii</i> -8	2019	Gyeonggi		19FBABe0001
<i>A. veronii</i> -9		Gangwon		19FBABe0002
<i>Aeromonas caviae</i> -1	2017	Jeonnam		17FBACa0003
<i>A. caviae</i> -2	2018	Jeonnam	<i>A. japonica</i>	18FBACa0003
<i>A. caviae</i> -3	2018	Jeonbuk		18FBACa0001
<i>A. caviae</i> -4	2019	Gangwon		19FBACa0001
<i>A. salmonicida</i> -1	2018	Gyeonggi	<i>Oncorhynchus masou masou</i>	18FBASa0001
<i>A. salmonicida</i> -2			<i>Gadus chalcogrammus</i>	19FBASa0003
<i>A. salmonicida</i> -3	2019	Gangwon	<i>A. japonica</i>	19FBASa0004
<i>A. salmonicida</i> -4			<i>G. chalcogrammus</i>	19FBASa0002
<i>A. sobria</i> -1	2017			17FBASo0002
<i>A. sobria</i> -2	2019	Gangwon	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	19FBASo0001
<i>A. sobria</i> -3				19FBASo0002
<i>A. rivipollensis</i> -1	2017	Gangwon	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	17FBARi0001
<i>A. rivipollensis</i> -2	2018	Kyungpook	<i>A. japonica</i>	18FBARi0001
<i>A. dhakensis</i> -1	2018	Gyeongnam	<i>A. japonica</i>	18FBADh0001
<i>A. dhakensis</i> -2	2019	Gyeonggi		19FBADh0001
<i>A. enteropelogenes</i>	2019	Gangwon	<i>A. japonica</i>	19FBAEn0001
<i>A. jandaei</i>	2017	Jeonnam	<i>A. japonica</i>	17FBAJa0001

Table 2. List of *Pseudomonas* spp. strains used in this study

Bacteria	Year	Location	Host fish	Source
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> -1	2015	Gyeongnam	<i>Sebastes schlegelii</i>	FPa4754
<i>P. plecoglossicida</i> -2			<i>S. schlegelii</i>	FPa4759
<i>P. plecoglossicida</i> -3	2018	Gangwon	Caribbean reef squid	18FBPPI0001
<i>P. mandelii</i> -1	2015	Gyeongnam	<i>S. schlegelii</i>	FPa4755
<i>P. mandelii</i> -2			<i>S. schlegelii</i>	FPa4758
<i>P. koreensis</i> -1	2014	Jeju	<i>Paralichthys olivaceus</i>	FPa4730
<i>P. koreensis</i> -2	2017		<i>Anguilla japonica</i>	17FBPKo0001
<i>P. montelii</i>	2015	Jeju	<i>P. olivaceus</i>	FPa4827
<i>P. fluorescens</i>	-	Jeju	<i>P. olivaceus</i>	FP6086
<i>P. protegens</i>	2016	Kyungpook	fresh water fish	20160024
<i>P. putida</i>	2019	Jeonnam	<i>S. schlegelii</i>	19FBPPU0001
<i>P. helmanticensis</i>	2010	Jeju	<i>P. olivaceus</i>	FP3941
<i>P. baetica</i>	2011	Jeju	<i>A. japonica</i>	FPa4222
<i>P. synxantha</i>	2015	Jeju	<i>P. olivaceus</i>	FPa4828
<i>P. taiwanensis</i>	2015	Jeju	<i>P. olivaceus</i>	FPa4826
<i>P. rhodesiae</i>	2010	Jeonnam	Caridea	FP8413
<i>P. poae</i>	2009	Gyeongnam	marine fish	FP8149
<i>P. fragi</i>	-	Gangwon	-	-
<i>P. entomophila</i>	2019	Gyeonggi	<i>A. japonica</i>	19FBPEn0001
<i>P. mosselii</i>	2019	Gyeonggi	<i>A. japonica</i>	19FBPMo0001

액체배지희석법

항생제 감수성 검사는 액체배지희석법과 디스크 확산법으로 수행하였으며, 배양 조건은 Kim et al. (2020)의 연구에서 확립된 조건을 참고하여 실험을 진행하였다. 액체배지희석법은 국립수산과학원 병리연구과에서 어병세균을 대상으로 항생제 감수성 시험을 위해 제작한, Sensititre MIC panel인 KRAQ1 panel과 CAMPY2 panel을 사용하였다(NIFS, 2020) (Table 3). Panel을 사용하기 위하여 순수분리가 확인된 균주를 tryptic soy agar (TSA; Difco)배지에 28°C에 18–24시간 배양하였다. 평판배지에 배양된 세균의 colony를 일회용 백금이를 사용하여 1% NaCl이 첨가된 distilled water에 현탁한 뒤, 0.5 McFarland를 이용하여 균액의 탁도를 조정하였다. 탁도를 맞춘 균액은 cation-adjusted Mueller-Hinton broth (CAMHBT) 배지에 100 µL 첨가하여 강하게 vortex한 뒤 panel의 well에 100 µL씩 분주하였다. 균액을 접종한 panel은 28°C에서 24시간 배양하였다. 배양된 panel을 육안으로 관찰하였을 때, 세균이 자라지 않은 최저농도를 minimum inhibitory concentration (MIC) 값으로 판독하였다.

디스크 확산법

세균은 TSB로 증균시켰으며, 디스크 확산법을 위해 균액은 phosphate-buffered saline (PBS)를 이용해 $1.0\text{--}2.0 \times 10^8$ CFU/

Table 3. Panel antibiotic list used in this study

Antibiotics subclass	Antibiotic agents	Test range (µg/mL)
Tetracyclines	Tetracycline	0.06–64
	Oxytetracycline	0.25–256
	Doxycycline	0.25–64
Quinolones	Flumequine	0.12–128
	Ciprofloxacin	0.015–64
	Enrofloxacin	0.03–32
	Nalidixic acid	4–64
β-lactam	Ceftiofur	0.03–64
	Ampicillin	1–256
Aminoglycosides	Amoxicillin/ Clavulanic acid	1/0.5–256/128
	Neomycin	0.5–64
Sulfonamides	Gentamicin	0.12–32
	Trimethoprim/ sulfamethoxazole	0.12/2.38–16/304
Macrolides	Sulfisoxazole	16–1,024
	Azithromycin	0.015–64
Lincosamides	Erythromycin	0.03–64
	Clindamycin	0.03–16
Phenicols	Florfenicol	0.03–64

mL로 균수를 맞췄다. 균액은 멸균된 면봉을 이용하여 mueller-hinton agar (MHA; Difco)에 도말한 후 항생제 디스크를 일정한 간격으로 표면에 부착하였다. 사용된 항생제 디스크는 Liofilchem 제품의 Tc (30 µg), OTC (30 µg), DXT (30 µg)로 tetracycline 계열의 항생제 3종을 사용하였다. 디스크를 고착시킨 MHA는 28°C에서 18–24시간 배양한 뒤, 균의 주위에 형성된 발육저지대(inhibition zone)의 직경을 측정하였다.

Tc 내성유전자 검출

Tc 내성유전자의 검출은 polymerase chain reaction (PCR)법을 이용하여 확인하였으며, 사용한 primers는 Table 4에 나타내었다. 본 연구에서는 efflux pump 내성 기전에 관련된 *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(E)*, *tet(G)*, *tet(L)*, *tet(39)* 등의 8종과 ribosomal protection에 관련된 *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(Q)*, *tet(S)*, *tet(32)* 등의 5종을 대상으로 총 13종의 Tc 내성유전자를 조사하였다. PCR 조건의 pre-denaturation은 94°C에서 3분, denaturation은 94°C에서 30초, annealing은 55°C로 30초, extension은 72°C에서 30초로 30 cycles 실행한 후에 72°C에서 7분

간 final extension하였다. PCR을 통해 증폭된 산물은 1X TAE buffer를 전기영동 완충액으로 사용하였고, SYBR safe DNA gel stain (Invitrogen, Waltham, MA, USA)이 첨가된 1% agarose gel 상에서 전기영동 후, UV 검출기(Invitrogen, Waltham, MA, USA)에서 band의 크기를 확인하여 세균을 동정하였다.

결 과

액체배지희석법

Aeromonas spp.와 *Pseudomonas* spp. 균주의 항생제 내성 패턴을 분석하기 위하여 2종의 MIC panel을 이용하여 항생제 감수성 검사를 실시하였다(Table 5, Table 6). *Aeromonas* spp. 38균주는 6종의 항생제(nalidixic acid, ampicillin, trimethoprim/sulfamethoxazole, sulfisoxazole, erythromycin 및 clindamycin)에 대하여 모두 높은 MIC 값을 나타내는 것을 확인하였다. 특히, ampicillin 항생제에 대해서는 38균주 중 36균주(94.7%)가 256 µg/mL 이상의 MIC 값을 가지는 것으로 나타났다며, trimethoprim/sulfamethoxazole 항생제에 대해서는

Table 4. Primer sets used for detection of tetracycline resistance genes in this study

Mechanism	Target gene	Oligonucleotide sequences (5' to 3')	Product size (bp)	Reference
Efflux pump	<i>tet(A)</i> to <i>tet(G)</i>	F-GCGCTNTATGCGTTGATGCA	-	
	<i>tet(A)</i>	R-ACAGCCCGTCAGGAAATT	387	
	<i>tet(B)</i>	R-TGAAAGCAAACGGCCTAA	171	
	<i>tet(C)</i>	R-CGTGCAAGATTCCGAATA	631	Jun (2003)
	<i>tet(D)</i>	R-CCAGAGGTTTAAGCAGTGT	489	
	<i>tet(E)</i>	R-ATGTGTCCTGGATTCCT	246	
	<i>tet(G)</i>	R-ATGCCAACACCCCGGCG	803	
	<i>tet(L)</i>	F-GATCGATAGTAGCCATGG R-CTTCTATCAACAAGTATC	480	Kim et al. (2004)
	<i>tet(39)</i>	F-CTCCTTCTCTATTGTGGCTA R-CACTAATACCTCTGGACATCA	701	Agersø et al. (2007a)
Ribosomal protection	<i>tet(K)</i>	F-GTAATGGTACCTGGTAAATC R-CTATTACCTATTGTCGCTAC	329	Kim et al. (2004)
	<i>tet(M)</i>	F-GAATCTGAACAATGGGAT R-CTAACAATTCTGTTCCAGC	1,099	
	<i>tet(O)</i>	F-AGACGGAGCAGTATTAG R-CTGCCAACCTTTTGCTTCAC	200	
	<i>tet(Q)</i>	F-GACTCTATGGATATAGAG R-CCATATCCTCTACAATCG	835	Jun (2010)
	<i>tet(S)</i>	F-CATAGACAAGCCGTTGACC R-ATGTTTTTGGAACGCCAGAG	667	
	<i>tet(32)</i>	F-GAACCAGATGCTGCTCTT R-GAACCAGATGCTGCTCTT	620	Melville et al. (2001)

*F, Forward; **R, Reverse.

Table 5. Minimum inhibitory concentration (MIC) for 15 antibiotics against *Aeromonas* spp.

Bacteria	XNL	FLUQ	ENRO	NEO	AMP	AUG2	SXT	FIS	AZI	CIP	CLI	ERY	FFN	GEN	NAL
<i>A. hydrophila</i> -1	32	16	> 32	> 64	> 256	256/128	> 16/304	> 1024	8	0.25	> 16	32	1	1	> 64
<i>A. hydrophila</i> -2	0.5	128	> 32	2	> 256	16/8	> 16/304	> 1024	32	32	> 16	> 64	> 64	1	> 64
<i>A. hydrophila</i> -3	< 0.03	64	0.5	8	256	2/1	> 16/304	> 1024	2	0.5	> 16	16	0.5	16	> 64
<i>A. hydrophila</i> -4	1	128	> 32	64	> 256	32/16	> 16/304	> 1024	64	64	> 16	> 64	> 64	> 32	> 64
<i>A. hydrophila</i> -5	8	16	2	32	> 256	16/8	> 16/304	> 1024	> 64	32	> 16	> 64	> 64	8	> 64
<i>A. hydrophila</i> -6	1	0.5	0.12	2	> 256	16/8	< 0.12/2.38	32	1	0.06	> 16	8	0.25	1	> 64
<i>A. hydrophila</i> -7	2	< 0.12	< 0.03	> 64	> 256	32/16	2/38	> 1024	8	> 64	> 16	32	8	2	< 4
<i>A. hydrophila</i> -8	0.5	32	1	2	> 256	32/16	> 16/304	> 1024	64	0.5	> 16	> 64	64	1	> 64
<i>A. hydrophila</i> -9	1	2	0.25	4	> 256	16/8	> 16/304	> 1024	64	0.25	> 16	> 64	64	> 32	> 64
<i>A. hydrophila</i> -10	0.5	1	0.12	4	> 256	16/8	< 0.12/2.38	> 1024	8	0.12	> 16	16	1	1	64
<i>A. hydrophila</i> -11	0.25	0.5	0.12	2	256	16/8	< 0.12/2.38	1024	2	0.12	> 16	16	0.5	1	64
<i>A. hydrophila</i> -12	16	> 128	32	16	> 256	32/16	> 16/304	> 1024	> 64	32	> 16	> 64	> 64	1	> 64
<i>A. hydrophila</i> -13	1	64	16	> 64	> 256	16/8	> 16/304	> 1024	32	32	> 16	> 64	64	1	> 64
<i>A. hydrophila</i> -14	32	> 128	> 32	16	> 256	16/8	> 16/304	> 1024	32	> 64	> 16	> 64	> 64	0.5	> 64
<i>A. hydrophila</i> -15	2	128	32	32	> 256	16/8	> 16/304	> 1024	> 64	64	> 16	> 64	64	1	> 64
<i>A. hydrophila</i> -16	0.5	64	1	32	> 256	8/4	> 16/304	> 1024	32	2	> 16	> 64	32	2	> 64
<i>A. veronii</i> -1	0.5	1	0.5	4	> 256	16/8	> 16/304	> 1024	16	0.12	> 16	> 64	32	4	> 64
<i>A. veronii</i> -2	1	64	1	> 64	128	8/4	> 16/304	> 1024	16	0.5	> 16	> 64	16	2	> 64
<i>A. veronii</i> -3	0.25	64	1	4	> 256	16/8	0.5/9.5	> 1024	2	1	> 16	8	0.25	8	> 64
<i>A. veronii</i> -4	1	0.25	0.25	4	> 256	16/8	< 0.12/2.38	> 1024	2	0.12	> 16	8	0.5	1	> 64
<i>A. veronii</i> -5	1	1	0.5	4	> 256	16/8	0.12/2.38	> 1024	2	0.12	> 16	8	0.5	2	> 64
<i>A. veronii</i> -6	0.25	32	16	> 64	> 256	16/8	> 16/304	> 1024	32	16	> 16	> 64	16	2	64
<i>A. veronii</i> -7	0.25	< 0.12	< 0.03	8	> 256	16/8	0.5/9.5	> 1024	2	< 0.015	> 16	16	0.5	2	< 4
<i>A. veronii</i> -8	1	32	1	4	> 256	16/8	> 16/304	> 1024	32	0.25	> 16	> 64	32	1	> 64
<i>A. veronii</i> -9	1	0.5	0.12	2	> 256	16/8	< 0.12/2.38	256	1	0.06	> 16	2	0.25	1	> 64
<i>A. caviae</i> -1	32	128	2	> 64	> 256	64/32	0.5/9.5	> 1024	> 32	4	> 16	> 64	> 64	2	> 64
<i>A. caviae</i> -2	16	> 128	> 32	16	> 256	32/16	> 16/304	> 1024	16	> 64	> 16	64	> 64	1	> 64
<i>A. caviae</i> -3	2	128	2	> 64	> 256	16/8	> 16/304	> 1024	64	1	> 16	> 64	16	32	> 64
<i>A. caviae</i> -4	4	4	0.25	> 64	> 256	16/8	> 16/304	> 1024	> 64	0.25	> 16	> 64	0.5	4	> 64
<i>A. salmonicida</i> -1	4	< 0.12	< 0.03	4	> 256	16/8	< 0.12/2.38	< 16	4	< 0.015	> 16	16	0.5	2	< 4
<i>A. salmonicida</i> -2	0.25	> 128	8	2	4	2/1	< 0.12/2.38	512	16	1	> 16	16	0.5	1	> 64
<i>A. salmonicida</i> -3	1	64	16	> 64	> 256	16/8	> 16/304	> 1024	16	32	> 16	> 64	64	1	> 64
<i>A. rivipollensis</i> -1	1	32	0.5	> 64	32	16/8	> 16/304	> 1024	16	0.5	> 16	> 64	32	2	> 64
<i>A. rivipollensis</i> -2	8	4	0.5	4	> 256	32/16	> 16/304	> 1024	4	0.25	> 16	32	2	2	> 64
<i>A. dhakensis</i> -1	64	64	4	8	> 256	16/8	0.25/4.75	32	4	1	> 16	8	0.5	4	64
<i>A. dhakensis</i> -2	4	< 0.12	< 0.03	4	> 256	16/8	< 0.12/2.38	32	4	< 0.015	> 16	8	0.5	2	< 4
<i>A. enteropelogenes</i>	16	128	8	> 64	> 256	16/8	16/304	> 1024	4	2	> 16	8	> 64	2	> 64
<i>A. jandaei</i>	1	32	1	2	> 256	16/8	> 16/304	> 1024	> 32	0.5	> 16	> 64	32	1	> 64

*XNL, Ceftiofur; FLUQ, Flumequine; ENRO, Enrofloxacin; NEO, Neomycin; AMP, Ampicillin; AUG2, Amoxicillin/clavulanic acid; SXT, Trimethoprim/sulfamethoxazole; FIS, Sulfisoxazole; AZI, Azithromycin; CIP, Ciprofloxacin; CLI, Clindamycin; ERY, Erythromycin; FFN, Florfenicol; GEN, Gentamicin; NAL, Nalidixic acid.

Table 6. Minimum inhibitory concentration (MIC) for 15 antibiotics against *Pseudomonas* spp.

Bacteria	XNL	FLUQ	ENRO	NEO	AMP	AUG2	SXT	FIS	AZI	CIP	CLI	ERY	FFN	GEN	NAL
<i>P. plecoglossicida</i> -1	32	16	0.5	1	> 256	64/32	16/304	> 1024	> 64	0.12	> 16	> 64	> 64	0.5	32
<i>P. plecoglossicida</i> -2	16	8	0.5	1	256	64/32	16/304	> 1024	> 64	0.12	> 16	> 64	> 64	0.5	32
<i>P. plecoglossicida</i> -3	8	4	0.25	1	64	16/8	1/19	256	32	0.06	> 16	64	16	0.25	8
<i>P. mandelii</i> -1	16	4	0.12	< 0.5	> 256	128/64	4/76	256	64	0.03	> 16	> 64	32	< 0.12	8
<i>P. mandelii</i> -2	16	4	0.5	< 0.5	> 256	128/64	4/76	512	64	0.03	> 16	> 64	32	< 0.12	8
<i>P. koreensis</i> -1	16	4	0.25	1	> 256	256/128	4/76	256	> 64	0.06	> 16	> 64	64	0.5	8
<i>P. koreensis</i> -2	32	16	1	2	256	64/32	16/304	512	> 64	0.12	> 16	> 64	> 64	2	32
<i>P. montellii</i>	32	8	1	1	256	64/32	16/304	> 1024	> 64	0.25	> 16	> 64	> 64	1	32
<i>P. fluorescens</i>	64	8	0.5	1	> 256	> 256/128	8/152	1024	> 64	0.12	16	> 64	64	0.25	16
<i>P. protegens</i>	64	8	1	2	> 256	256/128	8/152	1024	> 64	0.12	> 16	> 64	> 64	0.5	32
<i>P. putida</i>	32	8	2	2	256	64/32	16/304	> 1024	> 64	0.12	> 16	> 64	> 64	1	16
<i>P. helmanticensis</i>	16	8	0.5	< 0.5	> 256	> 256/128	4/76	512	> 64	0.06	> 16	> 64	64	0.25	16
<i>P. baetica</i>	16	8	1	< 0.5	> 256	128/64	16/304	1024	> 64	0.12	> 16	> 64	> 64	0.25	32
<i>P. synxantha</i>	32	8	0.5	2	> 256	> 256/128	2/38	128	> 64	0.06	> 16	> 64	64	0.25	32
<i>P. taiwanensis</i>	16	8	1	1	256	64/32	16/304	> 1024	> 64	0.25	> 16	> 64	> 64	0.5	32
<i>P. rhodesiae</i>	> 64	8	0.5	1	> 256	> 256/128	4/76	256	> 64	0.06	> 16	> 64	> 64	0.25	16
<i>P. poae</i>	64	8	0.5	1	> 256	> 256/128	> 16/304	> 1024	64	0.12	> 16	> 64	16	< 0.12	32
<i>P. fragi</i>	16	16	2	64	> 256	64/32	> 16/304	> 1024	> 64	0.12	> 16	> 64	> 64	2	32
<i>P. entomophila</i>	32	8	0.5	1	256	256/128	8/152	1024	> 64	0.25	> 16	> 64	64	0.25	16
<i>P. mosselii</i>	32	16	1	1	256	64/32	8/152	> 1024	> 64	0.12	> 16	> 64	> 64	0.25	32

*XNL, Ceftiofur; FLUQ, Flumequine; ENRO, Enrofloxacin; NEO, Neomycin; AMP, Ampicillin; AUG2, Amoxicillin/clavulanic acid; SXT, Trimethoprim/sulfamethoxazole; FIS, Sulfisoxazole; AZI, Azithromycin; CIP, Ciprofloxacin; CLI, Clindamycin; ERY, Erythromycin; FFN, Florfenicol; GEN, Gentamicin; NAL, Nalidixic acid.

24균주(63.2%)가 16/304 µg/mL 이상의 MIC 값을 가지는 것으로 확인되었다. Ceftiofur 항생제에 대해서는 28균주(73.7%)가 0.25–4 µg/mL의 MIC 값을 가지는 것을 확인하였다. 또한, *Aeromonas* spp. 26균주(68.4%)는 amoxicillin/clavulanic acid에 16/8 µg/mL의 MIC 값을 나타내었다. 모든 균주는 azithromycin에 1 µg/mL 이상의 MIC 값을 가졌으며, 같은 계열의 항생제인 erythromycin에는 2 µg/mL 이상의 MIC 값을 나타내었다. 특히, *Aeromonas caviae* 4균주는 모두 erythromycin에 대하여 64 µg/mL 이상의 MIC 값을 가지는 것을 확인하였다. Nalidixic acid의 경우, 4 µg/mL 이하의 MIC 값을 보인 *Aeromonas salmonicida* 1균주와 *Aeromonas dhakensis* 1균주를 제외하고 모두 64 µg/mL 이상의 MIC 값을 나타내었다. Tetracycline 계열의 항생제 3종(Tc, OTC 및 DXT)에 0.25 µg/mL 이하의 MIC 값을 가지는 균주는 4균주(10.5%)였으며, *Aeromonas hydrophila* 16균주는 모두 OTC에 32 µg/mL 이상의 MIC 값을 가지는 것으로 나타났다(Table 7, Table 8).

Pseudomonas spp. 20균주는 ampicillin, azithromycin, erythromycin, clindamycin 및 florfenicol에 대해 높은 MIC 값을 보였다. Quinolone 계열인 flumequine에는 4–16 µg/mL, ciprofloxacin에는 0.03–0.25 µg/mL, enrofloxacin에는 0.12–2 µg/

mL, nalidixic acid에는 8–32 µg/mL의 MIC 값의 분포를 확인하였다. Aminoglycoside 계열의 neomycin에는 낮은 MIC 값을 보였고, gentamicin에는 높은 MIC 값을 보여 다른 내성 패턴을 가지는 것을 확인하였다. Sulfonamide, macrolide, lincosamide, phenicol 계열의 항생제 6종에 대해서는 모두 높은 MIC 값을 나타내었다. Tetracycline 계열 3종의 항생제에 대해서는 *Pseudomonas helmanticensis*와 *Pseudomonas fragi*를 제외한 대부분의 분리주는 0.5–4 µg/mL의 농도에서 균이 억제되는 것을 확인하였다(Table 5, Table 6)

디스크 확산법

Tetracycline 계열의 항생제에 대하여 내성 수준을 파악하기 위해 총 58균주를 대상으로 tetracycline 계열의 항생제 3종에 대해서 디스크 확산법을 진행하였다. *Aeromonas* spp. 38균주 중 Tc, OTC, DXT에 저지대를 형성하지 않은 균주는 각각 6균주(15.8%), 14균주(36.8%), 4균주(10.5%)로 확인되었다. *Pseudomonas* spp. 20균주 중 Tc, OTC, DXT에 저지대를 형성하지 않은 균주는 모두 2균주(10%)인 것으로 확인되어, *Aeromonas* spp.에 비해 상대적으로 내성이 적은 것으로 나타났다(Table 7, Table 8).

항생제 내성유전자 분석

본 연구에서는 58균주를 대상으로 PCR을 통해 Tc 내성유전자 14종의 검출 빈도를 확인하였다. 먼저 *Aeromonas* spp. 38균주 중 *tet(A)*가 검출된 균주는 12균주(31.6%), *tet(E)*가 10균주(26.3%)로 높은 비율로 검출되었다. 그 다음으로는 *tet(A)*와 *tet(M)*을 동시에 가지고 있는 균주가 5균주(13.2%), *tet(A)*와 *tet(E)*를 모두 가지고 있는 균주는 3균주(7.9%)로 나타났다. 각각 1균주(2.6%)만 검출된 내성유전자는 *tet(M)*, *tet(A)*와 *tet(C)*, *tet(D)*와 *tet(E)*, *tet(E)*와 *tet(M)*이었으며, 본 연구에서 조사한 14종의 *tet* gene이 모두 검출되지 않은 균주는 4균주(10.53%)로 나타났다. *Aeromonas* spp.에 비해 tetracycline 계열의 항생제에 내성을 가지는 균주가 적었던 *Pseudomonas* spp.는 1균주만이 *tet(D)*를 가지고 있었고, 나머지 19균주에서는 내성유전자가 검출되지 않았다(Table 7, Table 8).

고 찰

본 연구에서는 기회성 병원체인 *Aeromonas* spp. 38균주와 *Pseudomonas* spp. 20균주를 대상으로 항생제 내성 패턴과 Tc 내성 유전자의 분포에 대해 조사하였다. Tc는 세균의 단백질 합성을 억제하며 정균작용을 갖는 광범위한 항생제로, 1940년대 후반에 처음 발견된 이후로 인체 및 수의 분야에서 치료 및 예방에 일반적으로 사용되는 항생제 중 하나이다. Tetracycline 계열의 항생제로는 Tc, OTC, DXT, minocycline, tigecycline 등이 있으며, 많은 임상 현장에서 사용되어진 이후로 내성균 증가가 심각한 문제로 대두되었다.

다양한 수산생물에 질병을 일으키는 병원체 중 본 연구에서 사용한 *Aeromonas* spp.는 어류에 병원성을 나타내는 것으로 알려져 있으며, 그 중 *A. hydrophila*는 병원성이 높은 균주로 빈번하게 발생하는 것으로 보고되고 있다. 또한 *Pseudomonas* spp.도 같은 그람음성균으로 수계환경에 널리 분포하며 숙주 범위가 넓은 기회성 병원체이다. 그중 *P. plecoglossicida*는 *P. putida*와 유사한 세균으로 내부 장기에 육아종을 형성하여 은어(*Plecoglossus altivelis*)에 높은 폐사를 발생시켜 양식 산업에 큰 피해를 일으킨다는 보고가 있다(Park et al., 2000; Zhang et al., 2014). 또한, 어류의 피부를 붉게 만드는 *P. fluorescens*와 *P. putida*는 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*) 양식에 심각한 피해를 발생시킨다고 알려져 있다(Zhang et al., 2009; Oh et al., 2019). 따라서 본 연구에서는 *Aeromonas* spp.와 *Pseudomonas* spp.의 항생제 내성 수준을 분석하기 위하여 18종 항생제가 포함된 2종류의 MIC panel을 사용하여 검사를 실시하였다. 그 결과, *Aeromonas* spp.와 *Pseudomonas* spp.는 대부분의 항생제에 대해 다른 내성 패턴을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. *Aeromonas* spp.는 ampicillin에 상대적으로 높은 내성을 나타낸다고 보고되었으며, 본 연구에서도 *Aeromonas* spp. 38균주 중 36균주(94.7%)가 128 µg/mL 이상의 MIC 값을 보여 이전의

연구와 유사한 결과를 확인하였다(Son et al., 1997). Ampicillin과 같은 계열의 항생제인 amoxicillin과 clavulanic acid를 함께 사용하면 항균력이 향상된다고 알려져 있으며(Igbinosa et al., 2012), 본 연구에서 amoxicillin/clavulanic acid의 MIC 값은 8/4–32/16 µg/mL 범위로 확인되었다. 반면에 *Aeromonas* spp.는 fluoroquinolone 계열의 항생제와 gentamicin에 감수성을 나타낸다고 알려져 있으며, 본 연구에서도 해당 항생제에 낮은 MIC 값을 나타내어 유사한 결과를 보였다(Palú et al., 2006). 또한, *Aeromonas* spp.의 38균주 중 24균주(63.2%)는 trimethoprim/sulfamethoxazole에 16/304 µg/mL 이상의 MIC 값을 가지는 것을 확인하였는데, 베트남, 터키 등 여러 나라에서 분리된 *Aeromonas* spp.에서도 비슷한 결과를 확인할 수 있었다(Vila et al., 2003; Matyar et al., 2010; Nguyen et al., 2014).

Pseudomonas spp.는 대부분의 항생제에 대하여 *Aeromonas* spp.와 다른 내성 패턴을 보이는 것으로 확인되었으나, 그람 양성균에 효과가 있는 것으로 알려진 3종의 항생제(ampicillin, erythromycin 및 clindamycin)에 대해서는 동일하게 높은 MIC 값을 가지는 것으로 나타났다. 따라서, 양식어류에 발생한 *Aeromonas* spp. 및 *Pseudomonas* spp.의 치료에 ampicillin, erythromycin 및 clindamycin의 효과는 상대적으로 미흡할 것으로 여겨진다. Foyisal et al. (2011)이 어류에서 분리한 *P. fluorescens*는 gentamicin에 모두 감수성을 가지는 것으로 나타났으나, 본 연구에서는 0.5–32 µg/mL 이상의 MIC 값을 가지는 것을 확인하였다. 호주의 무지개송어(*O. mykiss*)와 저질에서 분리한 *Aeromonas* spp. 및 *Pseudomonas* spp.에 대한 항생제 감수성 검사 결과에서는 ciprofloxacin에 모두 감수성을 나타내었다고 보고하였다(Akinbowale et al., 2007). 반면에, 본 연구에서는 *Pseudomonas* spp.는 동일한 항생제에 0.03–0.25 µg/mL의 MIC 값을 가지는 것으로 나타났으나, *Aeromonas* spp.의 약 29%가 16–64 µg/mL의 MIC 값을 가지는 것으로 나타나 이전 연구와 차이가 있는 것으로 확인되었다.

Aeromonas spp.와 *Pseudomonas* spp.의 Tc 내성유전자의 분포를 알아보기 위하여, 총 14종의 *tet* gene에 대해서 조사하였다. *Aeromonas* spp.는 tetracycline 계열의 항생제에 32 µg/mL 이상의 높은 MIC 값을 가지는 것으로 나타나, 이전의 연구들과 비슷한 결과를 확인하였다(Kämpfer et al., 1999; Vivekanandhan et al., 2002; Castro-Escarpulli et al., 2003). 본 연구에서 조사한 *Aeromonas* spp. 38균주의 Tc 내성유전자는 *tet(A)*가 12균주(31.6%), *tet(E)*가 10균주(26.3%), 두 개의 유전자를 동시에 갖는 균주가 3균주(7.9%)로 높은 비율로 검출되는 것을 확인하였다. 이는 *Aeromonas* spp.가 일반적으로 *tet(A)* 및 *tet(E)*를 가진다는 이전 연구결과와 유사한 것으로 나타났다(Agersø et al., 2007b; Balassiano et al., 2007). Akinbowale et al. (2007)의 연구에서는 *Aeromonas* spp.에서 *tet(A)*, *tet(D)*, *tet(E)* 및 *tet(M)*이 검출되었다고 보고하였다. 본 연구에서도 *tet(M)*이 검출된 균주, *tet(E)*와 *tet(M)*을 모두 가지는 균주, *tet(D)*와

Table 7. The result of antibiotic susceptibility test and detection of tetracycline resistance genes against *Aeromonas* spp.

Bacteria	MIC ($\mu\text{g/mL}$)			Inhibition zone diameter (mm)			tet gene
	Tc	OT	DXT	Tc	OT	DXT	
<i>A. hydrophila</i> -1	16	> 256	> 64	< 6	< 6	< 6	tet(E)
<i>A. hydrophila</i> -2	64	128	16	11	< 6	12	tet(A), tet(E)
<i>A. hydrophila</i> -3	64	64	16	12	< 6	12	ND
<i>A. hydrophila</i> -4	> 64	> 256	32	< 6	< 6	< 6	tet(A)
<i>A. hydrophila</i> -5	64	64	2	18	13	19	tet(A)
<i>A. hydrophila</i> -6	16	64	2	20	18	23	tet(E)
<i>A. hydrophila</i> -7	64	64	32	15	10	15	tet(A)
<i>A. hydrophila</i> -8	16	32	2	15	12	16	tet(A)
<i>A. hydrophila</i> -9	16	64	4	16	12	18	tet(A), tet(E)
<i>A. hydrophila</i> -10	8	32	2	19	15	20	tet(E)
<i>A. hydrophila</i> -11	16	64	2	14	10	18	tet(E), tet(M)
<i>A. hydrophila</i> -12	> 64	256	> 64	12	< 6	12	tet(E)
<i>A. hydrophila</i> -13	16	64	8	10	< 6	12	tet(A)
<i>A. hydrophila</i> -14	> 64	> 256	64	< 6	< 6	< 6	tet(E)
<i>A. hydrophila</i> -15	> 64	256	16	14	< 6	16	tet(E)
<i>A. hydrophila</i> -16	16	32	2	18	14	24	tet(E)
<i>A. veronii</i> -1	16	64	4	14	11	17	tet(A)
<i>A. veronii</i> -2	8	16	1	18	15	22	tet(A), tet(M)
<i>A. veronii</i> -3	16	64	2	16	12	20	tet(E)
<i>A. veronii</i> -4	0.25	< 0.25	< 0.25	26	26	26	tet(M)
<i>A. veronii</i> -5	16	64	8	12	< 6	13	tet(A), tet(M)
<i>A. veronii</i> -6	32	64	8	14	< 6	14	tet(A), tet(M)
<i>A. veronii</i> -7	8	32	2	14	12	20	tet(A), tet(M)
<i>A. veronii</i> -8	0.25	< 0.25	< 0.25	32	30	30	ND
<i>A. veronii</i> -9	16	32	2	20	18	21	tet(A)
<i>A. caviae</i> -1	32	128	16	12	< 6	12	tet(A), tet(E)
<i>A. caviae</i> -2	> 64	256	32	< 6	< 6	10	tet(A), tet(C)
<i>A. caviae</i> -3	8	32	2	20	12	22	tet(A)
<i>A. caviae</i> -4	16	128	8	14	10	14	tet(A)
<i>A. salmonicida</i> -1	0.25	< 0.25	< 0.25	30	34	30	ND
<i>A. salmonicida</i> -2	> 64	256	> 64	< 6	< 6	< 6	tet(A)
<i>A. salmonicida</i> -3	32	128	8	14	11	12	tet(A)
<i>A. rivipollensis</i> -1	16	64	8	17	15	22	tet(E)
<i>A. rivipollensis</i> -2	8	32	1	16	12	16	tet(A), tet(M)
<i>A. dhakensis</i> -1	16	64	2	18	12	24	tet(E)
<i>A. dhakensis</i> -2	0.25	< 0.25	< 0.25	26	30	26	ND
<i>A. enteropelogenes</i>	64	128	32	< 6	< 6	10	tet(D), tet(E)
<i>A. jandaei</i>	16	32	1	16	12	20	tet(A)

*ND, Not detection; <6, No inhibition. Tc, Tetracycline; OT, Oxytetracycline; DXT, Doxycycline.

tet(E)가 동시에 검출된 균주가 1균주(2.6%)로 확인되었다. 또한, tet(A)와 tet(M)이 동시에 검출된 균주는 5균주(13.2%)로

나타났다. Piotrowska and Popowska (2014)는 *Aeromonas* spp.에서 총 8종의 tet gene [tet(A), tet(B), tet(C), tet(D), tet(E),

Table 8. The result of antibiotic susceptibility test and detection of tetracycline resistance genes against *Pseudomonas* spp.

Bacteria	MIC ($\mu\text{g/mL}$)			Inhibition zone diameter (mm)			tet gene
	Tc	OT	DXT	Tc	OT	DXT	
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> -1	4	4	2	22	25	22	ND
<i>P. plecoglossicida</i> -2	4	4	2	27	27	23	ND
<i>P. plecoglossicida</i> -3	1	1	0.5	18	18	18	ND
<i>P. mandelii</i> -1	2	1	0.5	28	30	24	ND
<i>P. mandelii</i> -2	2	1	0.5	32	34	30	ND
<i>P. koreensis</i> -1	4	2	1	28	30	25	ND
<i>P. koreensis</i> -2	4	4	2	26	32	30	ND
<i>P. montellii</i>	4	4	2	20	24	24	ND
<i>P. fluorescens</i>	2	1	1	20	22	24	ND
<i>P. protegens</i>	8	4	4	16	18	18	ND
<i>P. putida</i>	4	2	1	26	30	26	ND
<i>P. helmanticensis</i>	> 64	256	16	< 6	< 6	14	tet(D)
<i>P. baetica</i>	4	4	2	24	20	22	ND
<i>P. synxantha</i>	4	2	1	28	32	26	ND
<i>P. taiwanensis</i>	8	4	4	20	20	22	ND
<i>P. rhodesiae</i>	2	1	2	22	28	22	ND
<i>P. poae</i>	1	1	0.5	30	34	32	ND
<i>P. fragi</i>	> 64	> 256	> 64	< 6	< 6	< 6	ND
<i>P. entomophila</i>	4	4	2	22	20	22	ND
<i>P. mosselii</i>	4	2	2	28	28	34	ND

*ND, Not detection; <6, No inhibition. Tc, Tetracycline; OT, Oxytetracycline; DXT, Doxycycline.

tet(H), tet(G) 및 tet(M)]이 검출된다고 보고하였으나, 본 연구에서는 tet(B), tet(C), tet(H) 및 tet(G)를 제외한 4종의 유전자가 검출되었고 2종의 tet genes가 함께 존재하는 다양한 형태가 확인되었다. *Aeromonas* spp.에서 검출된 tet(M)의 경우, Park et al. (2012)의 연구처럼 분자생물학적 분석을 실시하여 다른 세균에서 확인된 tet(M)과 transposon간의 연관성과의 차이점을 비교할 필요가 있을 것으로 여겨진다. *Pseudomonas* spp.는 20 균주 중에서 2균주만 Tc에 대해서 높은 MIC 값과 저지대를 형성하지 않는 것으로 나타나, *Aeromonas* spp.에 비해 tetracycline 계열의 항생제에 감수성을 가지는 것으로 나타났다. Tet gene 분석 결과로는, tet(D)를 가지는 1균주(5%)만 검출되었으며, tetracycline 계열의 항생제에 대해 내성이 있었으나 내성 유전자를 확인할 수 없었던 *P. fragi* 균주는 본 연구에서 조사한 14 종 이외의 tet gene에 대한 추가적인 조사가 필요할 것으로 판단된다. 또한, 이전 연구에 따르면 중국의 다양한 물에서 분리된 *Pseudomonas* spp.는 Tc에 대해 높은 내성을 보이며 tet gene을 보유하고 있는 것으로 나타났으나(Li et al., 2010), 본 연구에서 분리한 대부분의 *Pseudomonas* spp.에서는 Tc에 대해 내성을 보이는 균주의 수가 적어 tet gene도 검출되지 않는 것으로 나타나, 국내의 어병세균에서 분리된 *Pseudomonas* spp.의 특징인 것인지에 대해서는 조사가 더 이루어져야 할 것으로 사료된다.

Aeromonas spp.와 *Pseudomonas* spp.는 기회성 병원체로 수생환경에 항상 존재하지만, 이들 균주가 가지는 다양한 항생제에 대한 내성 수준 및 내성유전자에 관한 연구가 부족한 실정이기 때문에 본 연구 결과는 수산생물에서 분리된 *Aeromonas* spp.와 *Pseudomonas* spp.의 항생제 내성 패턴 및 내성유전자 분포에 대한 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

사 사

본 연구는 국립수산과학원 수산과학연구사업(R2023058, 수산분야 항생제 통합감시 및 내성균 연구)의 지원에 의해 수행되었습니다.

References

- Agersø Y and Petersen A. 2007a. The tetracycline resistance determinant tet 39 and the sulphonamide resistance gene sulII are common among resistant *Acinetobacter* spp. isolated from integrated fish farms in thailand. J Antimicrob Chemother 59, 23-27. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl419>.
- Agersø Y, Bruun MS, Dalsgaard I and Larsen JL. 2007b. The tetracycline resistance gene tet(E) is frequently occurring

- and present on large horizontally transferable plasmids in *Aeromonas* spp. from fish farms. *Aquaculture* 266, 47-52. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.01.012>.
- Akinbowale OL, Peng H, Grant P and Barton MD. 2007. Antibiotic and heavy metal resistance in motile *Aeromonads* and *Pseudomonads* from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Australia. *Int J Antimicrob Agents* 30, 177-182. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.03.012>.
- Balassiano IT, Bastos MdCdF, Madureira DJ, Silva IGd, Freitas-Almeida de ÂC and OliveiraI de SS. 2007. The involvement of *tetA* and *tetE* tetracycline resistance genes in plasmid and chromosomal resistance of *Aeromonas* in Brazilian strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102, 861-866. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762007005000121>.
- Castro-Escarpulli G, Figueras MJ, Aguilera-Arreola G, Soler L, Fernández-Rendón E, Aparicio GO, Guarro J and Chacón MR. 2003. Characterisation of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. *Int J Food Microbiol* 84, 41-49. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(02\)00393-8](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00393-8).
- Cho KT, Hwang YJ, Lee SW, Kim KI and Jeong HD. 2021. Distribution of tetracycline-resistance genes detected from isolates of cultured fishes in gyeonggi-do. *J Fish Pathol* 34, 39-46.
- Done HY, Venkatesan AK and Halden RU. 2015. Does the recent growth of aquaculture create antibiotic resistance threats different from those associated with land animal production in agriculture?. *AAPS J* 17, 513-524. <https://doi.org/10.1208/s12248-015-9722-z>.
- Figueira V, Vaz-Moreira I, Silva M and Manaia CM. 2011. Diversity and antibiotic resistance of *Aeromonas* spp. in drinking and waste water treatment plants. *Water Res* 45, 5599-5611. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.08.021>.
- Foyals MJ, Rahman MM and Alam M. 2011. Antibiotic sensitivity and *in vitro* antimicrobial activity of plant extracts to *Pseudomonas fluorescens* isolates collected from diseased fish. *Int J Nat Sci* 1, 82-88. <https://doi.org/10.3329/ijns.v1i4.9733>.
- Guo J, Li J, Chen H, Bond PL and Yuan Z. 2017. Metagenomic analysis reveals wastewater treatment plants as hotspots of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements. *Water Res* 123, 468-478. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.07.002>.
- He J, Baldini RL, Déziel E, Saucier M, Zhang Q, Liberati NT, Lee D, Urbach J, Goodman HM and Rahme LG. 2004. The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 2530-2535. <https://doi.org/10.1073/pnas.0304622101>.
- Igbinosa IH, Igumbor EU, Aghdasi F, Tom M and Okoh AI. 2012. Emerging *Aeromonas* species infections and their significance in Public health. *Sci World J* 2012, 625023. <https://doi.org/10.1100/2012/625023>.
- Jang HM, Kim YB, Choi S, Lee Y, Shin SG, Unno T and Kim YM. 2018. Prevalence of antibiotic resistance genes from effluent of coastal aquaculture, South Korea. *Environ Pollut* 233, 1049-1057. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.10.006>.
- Jee BY, Shin KW, Lee DW, Kim YJ and Lee MK. 2014. Monitoring of the mortalities and medications in the inland farms of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, in South Korea. *J Fish Pathol* 27, 77-83. <https://doi.org/10.7847/jfp.2014.27.1.077>.
- Jun LJ. 2010. Characterization of antibiotic resistant genes carried by fish pathogens in Korea. Ph.D. Dissertation, Department of Fish Pathology, Pukyong National University, Busan, Korea.
- Jun LJ. 2003. Characterization of tet genes in fish pathogenic bacteria from Korea. M.S. Thesis, Department of Fish Pathology, Pukyong National University, Busan, South Korea.
- Kämpfer P, Christmann C, Swings J and Huys G. 1999. *In vitro* susceptibilities of *Aeromonas* genomic species to 69 antimicrobial agents. *System Appl Microbiol* 22, 662-669. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(99\)80019-8](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(99)80019-8).
- Kim HJ, Jung YJ, Kim HY and Hur M. 2019. Isolation and characterization of 6 unrecorded *Pseudomonas* spp. From Korean soil. *Korean J Microbiol* 55, 39-45. <https://doi.org/10.7845/kjm.2019.8099>.
- Kim HY, Lee IS and Oh JE. 2017. Human and veterinary pharmaceuticals in the marine environment including fish farms in Korea. *Sci Total Environ* 579, 940-949. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.039>.
- Kim MS, Seo JS, Park M, Cho JY, Hwang JY, Kwon MG and Jung SH. 2010. Antimicrobial resistance of *Edwardsiella tarda*, *Vibrio* spp. and *Streptococcus* spp. isolated from olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *J Fish Pathol* 23, 37-45.
- Kim MS, Cho JY, Seo JS, Jung SH, Choi HS and Park MA. 2012. Distribution of MIC value of antibiotics against *Edwardsiella tarda* isolated from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *J Fish Pathol* 25, 181-188. <https://doi.org/10.7847/jfp.2012.25.3.181>.
- Kim YH. 2004. Characterization of tetracycline resistance genes in *Vibrio* spp. isolated from marine fishes. M.S. Thesis, Department of Fish Pathology, Pukyong National University, Busan, Korea.
- Kim YJ, Jun LJ, Kang MR, Lee DW, Woo SJ, Kim MS and Jeong JB. 2020. Establishing of optimal culture conditions for MIC panels for MIC determination of fish bacterial pathogens. *Korean J Fish Aquat Sci* 53, 443-450. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2020.0443>.
- Kim YJ, Jun LJ, Lee DW, Lee YJ, Ko YJ, Oh YE, Woo SJ, Kim MS, Kim SM and Jeong JB. 2022a. Antibiotic susceptibility of bacterial pathogens that infect olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) cultivated in Korea. *Int J Environ Res Public*

- Health 19, 8110. <https://doi.org/10.3390/ijerph19138110>.
- Kim YJ, Jun LJ, Lee YJ, Ko YJ, Han SR, Kim SH and Jeong JB. 2022b. Distribution of resistance genes against lincomycin of pathogenic bacteria isolated from cultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *J Fish Pathol* 35, 47-56. <https://doi.org/10.7847/jfp.2022.35.1.047>.
- KOSIS (Korean Statistical Information Service). 2022. Current Status of Aquaculture by Fish Species by Aquaculture Method by City, County, and District (Fodder). Retrieved from https://kosis.kr/statHtml/statHtml.do?orgId=101&tblId=DT_1EZ0008&vw_cd=MT_ZTITLE&list_id=K2_4&seqNo=&lang_mode=ko&language=kor&obj_var_id=&itm_id=&conn_path=MT_ZTITLE on May 15, 2023.
- Kwon MG, Lim YJ, Kim MS, Seo JS and Kim DH. 2016. Epidemiological cut-off values generated for disc diffusion data from *Photobacterium damsela*. *Korean J Fish Aquat Sci* 49, 838-844. <https://doi.org/10.5657/kfas.2016.0838>.
- Lee DW, Jun LJ and Jeong JB. 2017. Distribution of tetracycline resistance genes in pathogenic bacteria isolated from cultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) in Jeju in 2016. *J Fish Mar Sci Edu* 29, 834-846. <https://doi.org/10.13000/JFMSE.2017.29.3.834>.
- Li D, Yu T, Zhang Y, Yang M, Li Z, Liu M and Qi R. 2010. Antibiotic resistance characteristics of environmental bacteria from an oxytetracycline production wastewater treatment plant and the receiving river. *Appl Environ Microbiol* 76, 3444-3451. <https://doi.org/10.1128/AEM.02964-09>.
- Matyar F, Akkan T, Ucak Y and Eraslan B. 2010. *Aeromonas* and *Pseudomonas*: Antibiotic and heavy metal resistance species from Iskenderun bay, Turkey (Northeast Mediterranean Sea). *Environ Monit Assess* 167, 309-320. <https://doi.org/10.1007/s10661-009-1051-1>.
- Melville CM, Scott KP, Mercer DK and Flint HJ. 2001. Novel tetracycline resistance gene, *tet*(32), in the *Clostridium*-related human colonic anaerobe K10 and its transmission *in vitro* to the rumen anaerobe *Butyrivibrio fibrisolvens*. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 3246-3249. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.11.3246-3249.2001>.
- Nguyen HN, Van TT, Nguyen HT, Smooker PM, Shimeta J and Coloe PJ. 2014. Molecular characterization of antibiotic resistance in *Pseudomonas* and *Aeromonas* isolates from catfish of the Mekong Delta, Vietnam. *Vet Microbiol* 171, 397-405. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.01.028>.
- NIFS (National Institute of Fisheries Science). 2020. Aquatic Antibiotic Susceptibility Test Manual. NIFS, Busan, Korea.
- Oh WT, Kim JH, Jun JW, Giri SS, Yun S, Kim HJ, Kim SG, Kim SW, Han SJ, Kwon J and Park SC. 2019. Genetic characterization and pathological analysis of a novel bacterial pathogen, *Pseudomonas tructae*, in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Microorganisms* 7, 432. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7100432>.
- Palu AP, Gomes LM, Miguel MA, Balassiano IT, Queiroz ML, Freitas-Almeida AC and de Oliveira SS. 2006. Antimicrobial resistance in food and clinical *Aeromonas* isolates. *Food Microbiol* 23, 504-509. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.07.002>.
- Park SC, Shimamura I, Fukunaga M, Mori KI and Nakai T. 2000. Isolation of bacteriophages specific to a fish pathogen, *Pseudomonas plecoglossicida*, as a candidate for disease control. *Appl Environ Microbiol* 66, 1416-1422. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.4.1416-1422.2000>.
- Park SH, Jun LJ, Cho KT, Jin JW and Jeong HD. 2012. Characterization of *tet*(M) and *tet*(G) genes among tetracycline resistant *Aeromonas* spp. isolated from imported ornamental fishes. *Korean J Fish Aquat Sci* 45, 238-245. <http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2012.0238>.
- Piotrowska M and Popowska M. 2014. The prevalence of antibiotic resistance genes among *Aeromonas* species in aquatic environments. *Ann Microbiol* 64, 921-934. <https://doi.org/10.1007/s13213-014-0911-2>.
- Raza S, Shin H, Hur HG and Unno T. 2022. Higher abundance of core antimicrobial resistant genes in effluent from wastewater treatment plants. *Water Res* 208, 117882. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117882>.
- Sapkota A, Sapkota AR, Kucharski M, Burke J, McKenzie S, Walker P and Lawrence R. 2008. Aquaculture practices and potential human health risks: Current knowledge and future priorities. *Environ Int* 34, 1215-1226. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2008.04.009>.
- Seo JS, Jo HS, Jeong AR, Jee BY, Kwon MG, Hwang JY, Hwang SD, Jeong JM and Lee JH. 2019. Monitoring of veterinary drug residues in cultured olive flounder *Paralichthys olivaceus* from Jeju and Wando regions. *J Fish Mar Sci Edu* 31, 1459-1464. <https://doi.org/10.13000/jfmse.2019.10.31.5.1459>.
- Son R, Rusul G, Sahilah A, Zainuri A, Raha A and Salmah I. 1997. Antibiotic resistance and plasmid profile of *Aeromonas hydrophila* isolates from cultured fish, *Telapia (Telapia mossambica)*. *Lett Appl Microbiol* 24, 479-482. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.1997.00156.x>.
- Vila J, Ruiz J, Gallardo F, Vargas M, Soler L, Figueras MJ and Gascon J. 2003. *Aeromonas* spp. and traveler's diarrhea: Clinical features and antimicrobial resistance. *Emerg Infect Dis* 9, 552-555. <https://doi.org/10.3201/eid0905.020451>.
- Vivekanandhan G, Savithamani K, Hatha A and Lakshmana-Perumalsamy P. 2002. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from marketed fish and prawn of South India. *Int J Food Microbiol* 76, 165-168. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00009-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00009-0).
- WHO (World Health Organization). 2016. National Antimicrobial Resistance Surveillance Systems and Participation in the Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS): A Guide to Planning, Implementation, and Moni-

toring and Evaluation. Retrieved from <https://www.who.int/> on May 20, 2023.

WHO (World Health Organization). 2019. Antimicrobial Resistance. Retrieved from <https://www.who.int/news-room/spotlight/ten-threats-to-global-health-in-2019> on May 15, 2023.

Woo SJ and Chung JK. 2018. Pharmacokinetics of oxytetracycline after dipping to cultured rock fish, *Sebastes schlegelii*. J Fish Mar Sci Edu 30, 2120-2129. <https://doi.org/10.13000/jfmse.2018.12.30.6.2120>.

Zhang JT, Zhou SM, An SW, Chen L and Wang GL. 2014. Visceral granulomas in farmed large yellow croaker, *Larimichthys crocea* (Richardson), caused by a bacterial pathogen, *Pseudomonas plecoglossicida*. J Fish Dis 37, 113-121. <https://doi.org/10.1111/jfd.12075>.

Zhang WW, Hu YH, Wang HL and Sun L. 2009. Identification and characterization of a virulence-associated protease from a pathogenic *Pseudomonas fluorescens* strain. Vet Microbiol 139, 183-188. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.04.026>.