

양식 극동산 뱀장어(*Anguilla japonica*)에서 분리된 *Lactococcus lactis*의 항생제 내성

김현우* · 이은섭* · 이승준* · 한소라*** · 오태진** ,
김명식**** · 김수진**** · 권세련*,***†

*선문대학교 수산생명의학과, **선문대학교 제약생명공학과
유전체 기반 바이오IT 융합연구소, *국립수산과학원 병리연구과

The antibiotic resistance of *Lactococcus lactis* isolated from the farmed *Anguilla japonica*

Hyunwoo Kim*, Eunsup Lee*, Sung Jun Lee*, So-Ra Han***, Tae-Jin Oh****,
Myoung Sug Kim****, Soo-Jin Kim**** and Se Ryun Kwon*,***†

*Department of Aquatic Life Medical Sciences, Sunmoon University, Asan 31460, Korea

**Department of Pharmaceutical Engineering and Biotechnology, Sunmoon University, Asan 31460, Korea

***Genome-based BioIT Convergence Institute, Asan 31460, Korea

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

Spleen, liver and intestinal mucus of *Anguilla japonica* cultured in a domestic recirculating aquaculture system were sampled to isolate and identify culturable bacteria. Based on 16s rRNA sequence analysis, the most frequently isolated bacterium was *Lactococcus lactis*. To determine the antibiotic susceptibility of *L. lactis*, the minimum inhibitory concentration (MIC) test was conducted using five isolates (A1, A21, A65, A125 and A130) from *Anguilla japonica* and three isolates (KCTC2013, KCTC3769 and KCTC3899) from Korean Collection for Type Culture. Differences of MICs between *A. japonica*-derived isolates and KCTC isolates were observed in Tetracycline, Oxytetracycline, Doxycyclin and Erythromycin. MICs obtained for five *L. lactis* isolates from *A. japonica* were >64 µg/mL for Tetracycline, >256 µg/mL for Oxytetracycline, 16-32 µg/mL for Doxycyclin, and > 64µg/mL for Erythromycin. On the other hand, KCTC isolates showed the MICs of 0.25 µg/mL, 0.25 µg/mL, 0.12 µg/mL and 0.03-0.06 µg/mL for respective antibiotics. Furthermore, it was confirmed that genomic DNA and plasmid DNA isolated from *A. japonica*-derived *L. lactis* isolates have antibiotic resistance genes and transfer origin. These findings suggest that *A. japonica*-derived *L. lactis* isolates may have the potential to mediate the transfer of various antibiotic resistance genes. Therefore, it is advisable to use probiotics along with the feed or use them as postbiotics rather than dispersing them directly into the water in aquaculture system.

Key words: Antibiotic resistance, Resistance gene, *Lactococcus lactis*, *Anguilla japonica*

†Corresponding author: Se Ryun Kwon
Tel: +82-41-530-2289, Fax: +82-41-530-2917
E-mail: srkwon@sunmoon.ac.kr

서 론

뱀장어는 극동산 뱀장어(*Anguilla japonica*), 유럽산 뱀장어(*Anguilla anguilla*), 북미산 뱀장어(*Anguilla rostrata*), 호주산 뱀장어(*Anguilla australis*) 등 여러 종이 있으며 그중 국내에서 가장 많이 소비되는 뱀장어는 극동산 뱀장어다. 극동산 뱀장어를 양식하기 위해서는 실뱀장어를 입식하여 입 불임사료, 백자사료, 흑자사료 등의 사료를 투여하여 지수식 양식을 하며, 실뱀장어 이후에는 순환여과식 방법으로 양식을 한다(백은경, 2020). 뱀장어에 흔한 질병은 현재 AngHV-1, JEECV 등의 바이러스성 질병(Jang et al., 2021; 김 등, 2019)과 *Edwardsiella tarda*, *Aeromonas hydrophilla*, *Pseudomonas anguilliseptica*, *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas veronii*, *Lactococcus garveiae*, *Streptococcus iniae* 등의 어병세균이 세균성 질병을 일으킨다고 알려졌다(권 등, 2005). 그러나 바이러스성 질병에 대한 대책은 현재 존재하지 않으며(Jang et al., 2021) 세균성 질병의 대책으로는 Oxytetracycline, Neomycin, Florfenicol, Erythromycin 등의 허가된 수산용 항생제가 있다(국립수산물품질관리원, 2022).

뱀장어 양식에 프로바이오틱스의 효과를 연구한 사례 중 *Bacillus subtilis*를 사료에 섞어 투여한 경우 성장을 증가와 소화 활성, 라이소자임 활성, 백혈구 면역 반응, *Vibrio anguillarum*과 *Aeromonas hydrophilla*에 대한 내병성 증가 등의 긍정적인 효과가 있었음을 보고한 바 있다(Zheng et al., 2019). 또한 *Lactobacillus plantarum* 급이시 비특이적 면역 반응에서 대조구에 비해 유의적 차이를 보였으며 IgM, HSP70, HSP90 유전자 발현 또한 유의적으로 증가하고 *Edwardsiella tarda*의 인위감염에 대한 생존률이 증가했다고 보고한 바 있다(Lee et al., 2017). *Lactococcus lactis*는 그람 양성 의 젖산구균(Song et al., 2017) 으로, 프로바이오틱스로 사용되는 균이다(Han et al., 2015). *L. lactis*는 일반적으로 성장촉진(Nguyen et al., 2017), 면역력 증가(Heo et al., 2013; Won et al., 2020), 항병원성(Ryu et al., 2022; Sequeiros et al., 2014; Touraki et al., 2012; 손 등, 2022) 등의 효과를 가진다고 알려져 있다. 이러한 특성에 의해 일반적으로 안전하고 유익한

균이라고 알려져 있다.

우리 연구팀은 양식 극동산 뱀장어의 장내에 서식하는 세균 종류와 각 세균의 항생제 감수성 현황을 알아보는 연구를 진행하던 중, 수중에 유산균을 살포하는 양식장에서 우점균으로 분리된 *L. lactis*가 항생제 감수성 시험법을 통하여 다양한 항생제에 대해 내성을 가지고 있다는 결과를 얻었다. 따라서 본 연구에서는 뱀장어 양식장에서 성장, 면역력 증가, 질병 예방을 위해 유산균을 살포 시 장내 우점균으로 분리되는 *L. lactis*의 항생제 내성 특성에 대해 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

실험어

극동산 뱀장어(*Anguilla japonica*)를 국내 순환여과식 양식장에서 연중 28°C로 사육되던 것을 2022년 4월과 6월에 총 60마리를 채집하였다. 실험에는 소형 29마리(체중 32.8±14.8g, 전장 29.3±4.4cm)와 중형 31마리(체중 259.3±45.3g, 전장 51.9±3.7cm)를 사용하였으며, 채집된 개체에서는 특별한 육안적 임상증상은 없었다.

실험 균주

뱀장어 각 개체의 비장과 간을 채취하여 BHIA(BD, USA)에 접종하였고 장 점액은 메스로 긁어 모은 후 멸균 생리식염수로 희석하여 배지에 도말한 후 28°C에서 배양하였다. 배양된 세균 중 동일한 성상을 가진 집락끼리 분류하고 순수 분리 배양을 실시하였다. 순수 분리된 세균은 16s rRNA universal primers (Table 1)을 사용하여 동정하였다.

뱀장어에서 분리된 *Lactococcus lactis* 중 임의로 A1 균주(4월 시료, 비장에서 분리), A21 균주(4월 시료, 장 점액에서 분리), A65 균주(6월 시료, 간에서 분리), A125 균주(6월 시료, 비장에서 분리), A130 균주(6월 시료, 장 점액에서 분리)의 5개 균주를 선택하여 실험에 사용하였으며 양식 뱀장어에서 분리된 *Lactococcus lactis* 균주와의 성상 비교를 위해 KCTC (Korean Collection for Type Culture, 생물자원센터)에서 *L. lactis* subsp. *lactis* KCTC 3899, KCTC2013, KCTC3769 균주를 분양받아 실

Table 1. PCR primer sets and conditions used in this study

Antibiotics group/ Function	Genes	Primer	Sequence	PCR condition
β-Lactam	blaTEM	TEM F TEM R	ATGAGTATTCAACATTTCCGT TTACCAATGCTTAATCAGTGA	94°C 5 min + 30X (94°C 30sec + 52°C 20sec + 72°C 40sec) + 72°C 7 min
	blaSHV	SHV F SHV R	CCGGGTATTCTTATTGTGCT TAGCGTTGCCAGTGCTCG	
	blaCTX-M-1	CTXM-1 F CTXM-1 R	ACCGTCACGCTGTTGTTAGG GTCCGTGACGATTTTAGCCG	
	blaCTX-M-2	CTXM-2 F CTXM-2 R	AATGTTAACGGTGATGGCGA ACCGTGGGTACGATTTTCG	
	blaPER	PER F PER R	GAATGTCATTATAAAAGCTGTAGT CTTAGGGCAGAAAGCTTTTC	
	blaIMP	IMP F IMP R	TGAGCAATGTATCTGTATTCT TTAGTTGCTTGGTTTGTATG	
	blaVIM	VIM F VIM R	TGGTCTACATGACCGCGTCT CGACTGAGCGATTGTGTG	
	blaCMY-2	CIT F CIT R	TGATGAAAAAATCGTTATGCTCC GTTAGGATAGCTTTTGTGTGCC	
	blaACT-1	ACT F ACT R	GATGACAAAAATCCCTAAGCTGT GGGTTCGGATAGCTTTTATTCT	
	glmM	glmmF glmmR	GAGTCAACTGCGGTCCAAAC ACGGTATTCTCGCAAAGCC	94°C 5 min + 30X (95°C 1 min + 55°C 1 min + 68°C 1 min) + 68°C 5 min
Tetracycline	tet Forward	TETF	GCGCTNTATGCGTTGATGCA	94°C 3 min + 30X (94°C 3 min + 55°C 30 sec + 72°C 30 sec) + 72°C 7 min
	tet(A)	TAR	ACAGCCCGTCAGGAAATT	
	tet(B)	TBR	TGAAAGCAAACGGCCTAA	
	tet(C)	TCR	CGTGCAAGATTCCGAATA	
	tet(D)	TDR	CCAGAGGTTTAAAGCAGTGT	
	tet(E)	TER	ATGTGTCCTGGATTCT	
	tet(G)	TGR	ATGCCAACACCCCGGCG	
Quinolones	qnrA	qnrA_F qnrA_R	GGCCATGGATATTATTGATAA GGATCCGGGCAGCACTATTACTCC	95°C 15 min + 30X (94°C 1 min + 52°C 2 min + 72°C 3 min) + 72°C 10 min
	qnrB1	qnrB1_F qnrB1_R	CAGATTTCCGCGGCGCAAGC CGCGATGCCAAGTCGCTCCA	
	qnrB4	qnrB4_F qnrB4_R	TGACTCTGGCGTTAGTTGGCGA GCAACGATGCCTGGTAGCTGTCC	
	qnrS	qnrS_F qnrS_R	TGCTGCGTCAGGAACGGCTG TGAGCGTGGGTCTCGCGGTA	
Glycopeptide	mecA1	mA1_F mA2_R	TGCTATCCACCTCAAAACAGG AACGTTGTAACCAACCCCAAGA	94°C 2 min + 30X (94°C 2 min + 57°C 1 min + 72°C 2 min) + 72°C 2 min
	mecC2	mecC MFP mecC MRP	GAAAAAAAGGCTTAGAACGCCTC GAAGATCTTTCCGTTTTCAGC	
	vanA1	vanA_F vanA_R	AGCTGTACTCTCGCCGGATA CCGGCTTAACAAAAACAGGA	
	vanB1	vanB_F vanB_R	GGCTCAGAAAATGCGATGAT TGTCATCAGTGCAGGAAGC	
	vanM	vanHM_F vanHM_R	CAGCGTGGGGCACAAAGTCTGA TGCCGTACGCCAACACGTGA	
Aminoglycoside	aacA4	aacA4-F aacA4-R	AACTTGCGAGCGATCCGATG ATGTACACGCTGGACCATC	94°C 5 min + 30X (95°C 1 min + 55°C 1 min + 68°C 1 min) + 68°C 5 min
	aacA7	aacA7-F aacA7-R	AATGGATAGTTGCGCGCTCG TTCCGGAAGCAGCGTACTTG	
	strA	strAF strAR	TCTGTGCACTGCTTGATC CATTGCTGATGAATGCGCG	
Macrolide- lincosamide- streptogramin	MefA/MefE	MefAE F MefAE R	AGTATC ATTAATCACTAGTGC TTCTTCTGGTACTAAAAGTGG	35X (98°C 10sec + 53°C 1 min + 72°C 2 min)
	ErmA	ErmA F ErmA R	TCTAAAAAGCATGTAAAAAGAA TGATTATAATTATTGATAGCTTC	
	ErmB	ErmB F ErmB R	GAAAAGGTACTCAACCAAATA CATTTGTAAATTCATGGCAATGA	
	ErmC	ErmC F ErmC R	TCAAAACATAATATAGATAAA TAACTGCTAAATTGTTATAATCG	

Table 1. Continued

Antibiotics group/ Function	Genes	Primer	Sequence	PCR condition
Macrolide	All ISCR	CRFF-F CRFF-R	GGRYGCAACGSCCTCAAGCG CGCTTGAGSCGTTGCRYCC	94°C 5 min + 30X (95°C 1 min + 55°C 1 min + 68°C 1 min) + 68°C 5 min
	ISCR2	LECR2_F RECR2_R	CACCTGGCTGGCAATGTCTAG CTTTGGACCGCAGTTGACTC	
Folate-pathway inhibitor	Int1	Ina-F Ina-R	GCCTGTTCCGGTTCGTAAGCT CGGATGTTGCGATTACTTCG	94°C 5 min + 30X (95°C 1 min + 55°C 1 min + 68°C 1 min) + 68°C 5 min
	Sul1	Sul1-F Sul1-R	ATGGTGACGGTGTTCGGCATTCTA CTAGGCATGATCTAACCTCGGTCT	
	Sul2	Sul2-F Sul2-R	GAATAAATCGCTCATCTTTTCGG CGAATTCTTGCAGTTTCTTCAGC	
	dfra20	dfra20F dfra20R	GGGAAACACCGAGAAATGGG TTCTTCTTCCCATCTCTCCC	
	dfra9	dfra9F dfra9R	CAGATTCCGTGGCATGAACC GACCTCAGATACGAGTTTCC	
	dhfr10	dhfr10F dhfr10R	TGTAGCGCGTGGTGTAACG ACGTCTACGTGAGTATCCGC	
Transfer organization	oriT	oriT F oriT R	CGACACVVTCAAAGGGG ATAAAATGCCHCAGCGCT	94°C 3 min + 30X (94°C 30sec + 52°C 30sec + 72°C 1min) + 72°C 5min
Identification	16s rRNA	27F 1492R	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG GGTTACCTTGTTACGACTTC	95°C 5 min + 35X (95°C 1min + 54°C 1min + 72°C 2min) + 72°C 10min

험에 사용하였다. KCTC3899 균주는 BHI 배지로 28°C에서, KCTC2013 균주는 MRS 배지(BD, USA)로 37°C에서, KCTC3769 균주는 MRS 배지로 30°C에서 배양 후 항생제 감수성 시험에 사용하였다.

항생제 감수성 시험

항생제 감수성 시험은 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI; www.clsi.org) Guidelines VET04, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST; www.eucastrg.org) 및 국립수산물과학원에서 발간한 수산물 항생제 감수성 검사 매뉴얼에 제시된 broth microdilution법으로 진행되었다(CLSI, 2018; EUCAST, 2022; 국립수산물과학원, 2021)

실험에 사용된 Sensititre KRAQ3, KRAQ4 panel (Thermofisher, USA)은 국립수산물과학원에서 디자인된 것으로(국립수산물과학원, 2021) β-lactam 계열의 Ampicillin, Amoxicillin, Amoxicillin/Clavulanic acid과 Cephalosporin 계열의 Cephalexin, Ceftiofur과 Tetracycline 계열의 Tetracycline, Oxytetracycline, Doxycycline과 Quinolone 계열의 Nalidixic acid, Enrofloxacin, Oxolinic acid, Ciprofloxacin, Flumequine과 Aminoglycoside 계열의 Neomycin, Gentamycin과 Lincosamide 계열의 Clindamycin과 Macro-

lide 계열의 Erythromycin과 Phenicol 계열의 Florfenicol과 Folate-pathway inhibitor와 관련된 Trimethoprim/Sulfadiazine의 19개의 항생제가 단계회석되어 있어 각 well에 세균 현탁액을 접종하였다.

BHIA에 배양된 *L. lactis* 집락을 demineralized water에 현탁하고 Nephelometer (Thermofisher, USA)를 사용하여 McFarland standard 0.5로 조정된 후 최종 농도 5×10^5 CFU/ml이 되도록 cation-adjusted Mueller-Hinton broth containing TES buffer (CAMHBT) 5 ml에 접종하여 현탁하였다. 세균 현탁액을 각 well 당 100 μl 씩 접종하고 24시간 배양 후 세균이 자라지 않은 최소 농도를 MIC (Minimum Inhibitory Concentration) 값으로 판독하였다. 뱀장어 분리 균주는 28°C에서 배양되었고 KCTC 균주는 분양 설명서에 제시된 온도에서 배양되었다.

Genomic DNA 및 plasmid DNA 추출

뱀장어의 장 점액과 장기에서 분리된 *L. lactis* 5개 균주(A1, A21, A65, A125, A130)을 BHI Broth에 배양한 후 Polymerase Chain Reaction 실험을 위해 genomic DNA와 plasmid DNA를 각각 추출하였다. Genomic DNA 추출은 같은 조건에서 액체 배지에 배양하여 원심분리 후 침전물을 QIAmp DNA Mini kit (Qiagen, USA)를 통해 genomic DNA를 획

특하였고, plasmid DNA의 경우에는 Exprep™ Plasmid SV (GeneAll, Korea)를 사용하였다. 각 실험 모두 제조사의 지침대로 수행하여 genomic DNA와 plasmid DNA를 획득하였다. 분리한 genomic DNA는 0.6% agarose gel에서 전기영동하여 genomic DNA의 존재여부를 확인하였고, plasmid DNA는 Novel juice (GeneDireX, Taiwan)와 혼합 후 0.7% agarose gel에서 전기영동하여 plasmid DNA의 존재 여부를 확인하였다. 각 DNA의 양과 순도는 spectrophotometer (Biochrome, Libra S35PC, UK)를 사용하여 A260/A280값 측정 후 계산하여 사용하였으며, 각 DNA는 실험에 사용될 때까지 -20°C에 보관하여 사용하였다.

PCR (Polymerase Chain Reaction)

뱀장어에서 분리된 *L. lactis* 균주가 항생제 내성 유전자를 보유하고 있는지 확인하기 위해 PCR 분석을 실시하였다. 균 배양액은 원심분리 후 QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, USA)을 이용하여 DNA 추출에 사용되었다. 각 계열별 항생제 내성 유전자의 검출을 위해 Table 1에 제시된 특이 primer sets와

PCR 조건으로 진행하였다.

추출한 plasmid를 대상으로 항생제 내성 유전자의 검출도 진행하였으며 유전자 전달과 관련된 *oriT* 유전자가 존재하는지에 대하여 검사하였다. *oriT* primer set는 NCBI genebank에 등록된 pSRQ 800, pSRQ900 (Genbank access no: NC_004960.1, NC_004959.1)의 Transfer origin 유전자를 기반으로 제작하였다(Boucher et al., 2001). *oriT* primer set와 PCR 조건은 Table 1에 제시되었다.

PCR은 Noblezyme™ PCR Plus Premix 2X (Noble Bioscience Inc., Korea)을 사용하여 20 µl 반응액 중 Noblezyme™ PCR Plus Premix 2X 10 µl, forward primer와 Reverse primer 각 1 µl, DEPC-treated water 6 µl, template 2 µl를 포함하였다. *oriT*에 대한 PCR은 TaKaRa Ex Taq (Takara, Japan) 0.125 µl, 10X Ex Taq Buffer 2.5 µl, dNTP Mixture (2.5 mM each) 2 µl, forward primer와 reverse primer 각 1 µl, DEPC-treated water 18.5 µl, template 1 µl를 혼합하여 conventional PCR을 수행하였다. 증폭된 PCR product는 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 증폭 여부를 확인하였다.

Table 2. The MIC value of five *L. lactis* isolates from farmed *Anguilla japonica* (A1, A21, A65, A125, A130) and three KCTC strains

Antibiotics Group	Antibiotics	Range	MIC (µg/mL)							
			A1	A21	A65	A125	A130	KCTC3899	KCTC2013	KCTC3769
β-Lactam	Ampicillin	0.25~128	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.5	0.25	0.25
	Amoxicillin	0.06~16	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.06	0.12
	Amoxicillin/Clavulanic acid	0.06/0.03~8/4	0.25/0.12	0.25/0.12	0.25/0.12	0.25/0.12	0.25/0.12	0.25/0.12	0.25/0.12	0.12/0.06
Tetracycline	Tetracycline	0.06~64	>64	>64	>64	>64	>64	0.25	0.25	0.25
	Oxytetracycline	0.12~256	>256	256	256	>256	256	0.25	0.25	0.25
	Doxycycline	0.12~128	32	32	16	32	16	0.12	0.12	0.12
Cephalosporin	Cephalexin	0.25~64	16	>16	16	16	16	16	16	16
	Ceftiofur	0.03~32	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06
Quinolone	Nalidixic acid	0.5~64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64
	Enrofloxacin	0.03~32	2	2	1	2	1	0.5	0.5	0.5
	Oxolinic acid	0.5~32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32
	Ciprofloxacin	0.015~64	8	8	8	8	8	2	2	4
	Flumequine	0.12~128	128	128	64	128	64	64	128	128
Aminoglycoside	Neomycin	0.5~64	>64	>64	>64	>64	>64	16	0.5	0.5
	Gentamycin	0.12~32	2	1	1	2	1	2	0.25	0.12
Chloramphenicol	Florfenicol	0.06~64	4	4	2	2	2	2	2	2
Macrolide	Erythromycin	0.03~64	>64	>64	>64	>64	>64	0.06	0.03	0.03
Lincomycin	Clindamycin	0.015~16	>16	>16	0.5	1	2	0.12	0.015	0.03
Folate-pathway inhibitor	Trimethoprim/Sulfadiazine	0.12/2.38~16/304	>16/304	>16/304	0.5/9.5	16/304	0.5/9.5	16/304	0.5/9.5	0.12/2.38

결 과

분리세균

장 점액과 간, 신장, 비장에서 분리된 세균들에 대해 16s rRNA 염기서열을 이용하여 Sanger Sequencing 방법으로 동정한 결과 *L. lactis*는 2022년 4월에 채집한 뱀장어의 장 점액에서 34.2%의 빈도로 분리되었고 장기에서는 40%의 빈도로 분리되었다.

항생제 감수성

시험 균주인 뱀장어에서 분리된 5개 균주와 대조 균주인 KCTC 분양 균주 3개에 대한 MIC 값을 Table 2에 제시되었다. β -Lactam 계열의 Ampicillin은 KCTC3899를 제외한 모든 균주에 대하여 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 의 MIC값을 보였고 KCTC3899는 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 의 MIC값을 보였다. Amoxicillin은 KCTC2013이 0.06 $\mu\text{g/mL}$, KCTC3769가 0.12 $\mu\text{g/mL}$ 의 MIC값을 보였고 나머지 모든 균주는 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 의 MIC값을 보였다. Amoxicillin/Clavulanic acid는 KCTC3769 0.12/0.06 $\mu\text{g/mL}$ 을 제외한 모든 균주가 0.25/0.12 $\mu\text{g/mL}$ 의 MIC값을 보였다. Cephalosporin 계열의 Cephalexin에 대해서는 모든 균주에서 16 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 MIC 값을 보였다(Table 2).

Tetracycline 계열의 Tetracycline, Oxytetracycline, Doxycycline과 Macrolide 계열의 Erythromycin 그리고 Aminoglycoside 계열의 Neomycin에 대해서는 실험 균주와 대조 균주 간의 MIC 값에서 매우 큰 차이를 보였다. 뱀장어 분리 균주 모두 Tetracycline 64 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 MIC가 도출되어 대조 균주 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 와 비교 시 차이가 컸다. Oxytetracycline의 경우에는 분리 균주 모두 256 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 값을 보여 대조 균주 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 에 비해 매우 큰 차이를 보였고, Doxycycline은 분리 균주 5개 중 3개가 32 $\mu\text{g/mL}$, 2개가 16 $\mu\text{g/mL}$ 의 MIC값을 보였으며 대조 균주 모두 0.12 $\mu\text{g/mL}$ 의 값을 가져 큰 차이를 보여주었다. Macrolide 계열의 Erythromycin의 경우 KCTC 균주는 0.03~0.06 $\mu\text{g/mL}$ 의 값을 보인 반면, 분리 균주는 모두 64 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 값을 보였다. 또한 Aminoglycoside 계열의 Neomycin은 대조 균주가 0.05~16 $\mu\text{g/mL}$ 을 보이는 반면 분리 균주 모

두 64 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 값을 보였다. Quinolone 계열에서는 대부분의 균주가 Nalidixic acid, Oxolinic acid, Flumequine에 대해 높은 MIC 값을 보였고 (Nalidixic acid : 64 $\mu\text{g/mL}$ 이상, Oxolinic acid : 32 $\mu\text{g/mL}$ 이상, Flumequine : 64 $\mu\text{g/mL}$ 이상) 실험 균주와 대조 균주 간의 MIC 값에서 큰 차이를 보이지 않았다(Table 2). Lincomycin 계열의 Clindamycin에 대해서는 A21 균주와 A65 균주가 16 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 MIC 값을 나타냈다. 결과를 종합해보면 대조 균주에 비해 실험 균주의 MIC값이 더 높은 양상을 보였다(Tetracycline : 256배 이상, Oxytetracycline : 1024배 이상, Doxycycline : 133배 이상, Neomycin : KCTC3899 대조 균주에 비해 4배 이상, 그 외 대조 균주에 대해 128배 이상, Erythromycin : 1066배 이상, Clindamycin : A1, A21균주는 130배 이상).

항생제 내성 유전자

뱀장어 유래의 A1, A21, A65, A125, A130 균주에서 분리한 gDNA를 대상으로 항생제 내성 유전자를 검출해 본 결과, A125 균주를 제외한 4개 균주에서는 Tetracycline계 항생제에 대한 내성 유전자를 보유하고 있었다. A125 균주에서는 Tetracycline계 내성 유전자는 검출되지 않았고 β -lactam, Quinolone, Aminoglycoside, Folate-pathway inhibitor에 대한 항생제 내성 유전자는 보유하고 있으며 다른 균주에는 존재하지 않는 Macrolide계 항생제에 대한 내성유전자 ISCR2가 확인되었다(Table 3).

5개 균주 배양액에서 plasmid isolation kit를 사용하여 추출한 것을 전기영동하여 plasmid DNA를 확인하였다(Fig. 1A). 분리된 plasmid로 항생제 내성 유전자를 검출해 본 결과 β -lactam 계열과 Folate-pathway inhibitor에 대한 항생제 내성 유전자는 검출되지 않았으나, Tetracycline 계열, Aminoglycoside 계열과 Quinolone 계열에 대한 항생제 내성은 다수 보유하고 있었다(Table 3). 또한 A1, A65, A125, A130 균주에서 분리된 plasmid에는 유전자 전달과 관련한 *oriT*가 검출되었다(Fig. 1B).

고 찰

본 연구에서 조사한 양식장에서 채집된 뱀장어

Table 3. Amplified antibiotic resistance gene in genomic DNA (gDNA) and plasmid DNA (pDNA) of *L. lactis* isolates from the farmed *Anguilla japonica*

Antibiotics group	Gene	A1		A21		A65		A125		A130	
		gDNA	pDNA	gDNA	pDNA	gDNA	pDNA	gDNA	pDNA	gDNA	pDNA
β -Lactam	blaTEM	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	blaSHV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	blaCTX-M-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	blaCTX-M-2	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	blaPER	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	blaIMP	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-
	blaVIM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	blaCMY-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tetracycline	blaACT-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	glmM	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	tet(A)	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
	tet(B)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	tet(C)	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
	tet(D)	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+
Quinolones	tet(E)	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-
	tet(G)	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	qnrA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	qnrB1	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+
Glycopeptide	qnrB4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	qnrS	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Aminoglycoside	mecA1	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-
	mecC2	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
	vanA1	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
	vanB1	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-
	vanM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Macrolide-lincosamide-streptogramin	aacA4	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-
	aacA7	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	strA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Macrolide	MefA/MefE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ErmA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ErmB	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
	ErmC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Folate-pathway inhibitor	All ISCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ISCR2	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Folate-pathway inhibitor	Intl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Sul1	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	Sul2	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	dfrA9	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	dfrA10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	dfrA20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

에서 장내 세균총을 조사한 결과 2022년 4월에 채집한 시료에서는 *L. lactis*가 장 점액에서 분리된 세균 중 34.2%, 장기에서 분리된 세균 중 40%의 비율로 분리되어 우점균으로 판정되었다. 6월 채집 시료에서도 장 점액에서 10%의 비율로 4번째로 많이 분리되었고 장기에서는 15.6%의 비율로 우점하였다. *L. lactis* 외에는 *Plesiomonas shigelloides*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Aeromonas* spp.가 분리되어(data not shown), Joh et al. (2013)의 연구에서 검출된 세균종과 유사함을 알

수 있었다. 그러나 Joh et al. (2013)의 연구에서는 임상증상이 있는 뱀장어에서 *Edwardsiella tarda*가 46.4%의 높은 빈도로 분리되었다고 보고하였으나 본 연구 결과에서는 검출되지 않았다. 이는 실험어로 사용된 뱀장어가 임상증상이 전혀 없었던 건강한 개체였기 때문이라고 판단된다. 한편 *L. lactis*의 경우에는 Joh et al. (2013)의 연구에서 2.7%의 빈도로 검출되었고 우리 연구팀이 조사한 다른 지역 양식장의 뱀장어 시료에서는 검출되지 않아(data not shown), 양식 환경의 차이에 의해 *L. lactis*가 해당

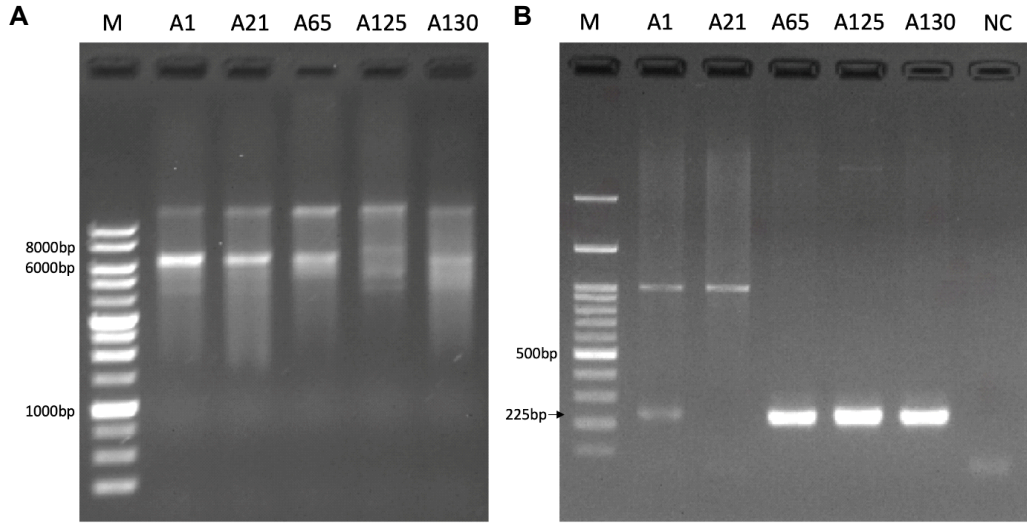


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis. Extracted plasmid of *L. lactis* isolates (A1, A21, A65, A125 and A130) from *Anguilla japonica* (A). Amplified *oriT* gene of purified plasmid of *L. lactis* isolates from *Anguilla japonica* (B). M, molecular marker; NC, negative control.

양식장에서 우점균으로 분리되었다고 판단된다. 본 연구에서 뱀장어를 채집한 양식장에서는 수중에 유산균 혼합액을 살포하였기 때문에 *L. lactis*가 우점종으로 분리된 것으로 사료된다.

본 연구에서 비교한 KCTC 분양 균주와 뱀장어 분리 균주 간의 항생제 감수성 결과 차이가 있는 것은 Tetracycline 계열의 항생제와 Macrolide 계열의 Erythromycin이었다. MIC breakpoint 즉 항생제 내성을 결정하는 농도의 기준은 각 세균 종에 따라 확립되어 있으며(CLSI, EUCAST), *Lactococcus* 종의 경우 Tetracycline 8 µg/mL 이상인 경우 내성으로 판단한다(CLSI, 2018). 뱀장어 분리 균주 모두 Tetracycline 내성이었으며, Oxytetracycline의 경우에는 기준값이 설정되어 있지 않으나 분리 균주 모두 256 µg/mL 이상의 값을 보여 내성으로 추정되었다. Macrolide 계열의 Erythromycin의 경우 8 µg/mL 이상인 경우 내성으로 판단하며 0.5 µg/mL 이하일 때는 감수성이 있다고 판단한다(CLSI, 2018). KCTC 균주는 Erythromycin에 대해 전부 감수성이 있었으나, 분리 균주는 모두 내성을 가지고 있었다. 또한 Aminoglycoside 계열의 Neomycin은 기준값이 설정되어 있지 않으나 분리 균주 모두 64 µg/mL 이상의 값을 보여 내성으로 추정되었다. 한편

β-lactam 계열에 대해서는 A21 균주를 제외하면 분양 균주와 뱀장어 분리 균주 간의 MIC 값에 차이가 없이 감수성이 높았다. 이는 *Lactococcus* 종이 Ampicillin, Penicillin 등의 항생제에 감수성이 높다는 이전의 결과와 일치하였다(Elliott and Facklam, 1996; Kim et al., 2022). Quinolone 계열 항생제에 대해서도 분양 균주와 뱀장어 분리 균주 간의 MIC 값에 차이가 없었으나, Nalidixic acid, Oxolinic acid, Flumequine에 대해 높은 MIC 값을 보였고 Enrofloxacin과 Ciprofloxacin에 대해서는 감수성을 보였다.

항생제 내성 유전자는 모든 뱀장어 분리 균주에서 검출되었는데 특히 다양한 Tetracycline resistance (*tetR*) 유전자와 Quinolone resistance 유전자가 검출된 것이 특징적이었다. *tetR* 유전자의 경우 gDNA로부터 *tet(C)*, *tet(E)*, *tet(G)*가 검출되었고 plasmid로부터 *tet(A)*, *tet(D)*, *tet(G)*가 검출되어 *tet(B)*를 제외한 모든 *tetR* 유전자가 검출되었다. Quinolone resistance 유전자도 마찬가지로 *qnrA* 유전자를 제외하고 *qnrB1*, *qnrB4*, *qnrS*가 검출되었다. Aminoglycoside resistance gene인 *aacA4*, *aacA7*도 모든 조사 균주에서 검출되었다. 이 결과는 뱀장어 분리 균주가 Tetracycline 계열의 모든 항생제와

Quinolone 계열의 3개 항생제 및 Aminoglycoside 계열의 Neomycin에 내성을 보였던 결과와 일치하였다. 뱀장어에서 분리된 *Aeromonas hydrophila*와 *Aeromonas veronii*에서 항생제 내성 유전자를 검출했던 연구에서도 *tet(B)*와 *qnrA*는 검출되지 않았다 (Woo et al., 2022).

항생제의 지속적인 사용은 항생제 내성균 출현 및 확산을 야기하며 유익균이라고 알려져 있는 *L. lactis*에도 예외가 아니다. 또한 항생제 내성은 세균의 저항성 플라스미드에 의해 생기기도 한다고 알려졌으며 세균끼리 conjugative transfer를 통하여 플라스미드를 수평전달 한다는 것 또한 알려졌다 (Bennett, 2008). *L. lactis*가 항생제 내성을 가지고 다른 병원성 세균에게 이를 전달하게 된다면, 세균성 질병 발생 시 항생제가 약효를 발휘하기 힘들어지고 새로운 항생제 개발을 해야 하는 상황에 이를 수 있다(박 등, 2021). 따라서 이러한 문제를 해결하기 위하여 항생제 내성균에 대한 관리 및 대책이 필요하다.

*L. lactis*에서의 conjugative transfer를 보기 위하여 실험 균주를 대상으로 *oriT* 유전자의 여부를 PCR로 검사한 결과, 5개의 실험 균주 중 A21을 제외한 4개 균주에서 *oriT*가 검출되어 항생제 내성을 다른 세균으로 전달할 가능성이 있을 것으로 예상되었다. Transfer origin의 경우 GenBank를 이용하여 분석하였을 때 *L. lactis*에만 존재 하는게 아닌, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus parauberis*, *Streptococcus agalactiae*, *Lactococcus garvieae*, *Lactobacillus plantarum* 등 여러 세균이 가지고 있다(Genbank access no: CP034950.1, CP104191.1, MW118670.1, CP071296.1, CP097178.1). 차후 *oriT* 유전자가 검출된 *L. lactis* 균주를 대상으로 항생제 내성 유전자를 다른 세균으로 전달하는지를 확인하는 실험을 진행할 필요가 있다.

본 연구에서는 사육수에 유산균을 살포하는 양식장에서 사육된 극동산 뱀장어에서 분리된 장내 세균 중 *L. lactis*가 우점종으로 검출되었고, 이것이 다양한 항생제에 내성을 가지고 있음은 물론 내성 유전자 및 transfer origin을 가지고 있음을 보고하고 있다. 해당 양식장에서 사용하는 유산균의 제품 자체를 조사하지 않았기 때문에 항생제 내성이 양

식장에 사용된 이후 획득되었는지 알아보기 위한 추가적인 조사는 필요하나, 다양한 항생제 내성 유전자와 transfer origin에 의해 내성 유전자 전달을 매개할 가능성이 있으며 추후 항생제 내성 관리를 위한 연구가 지속적으로 수행될 필요성을 시사하고 있다. 따라서 수산생물 양식에서 유산균을 사용할 경우, 수중에 살포하는 방식보다 사료에 섞어 먹이거나 사균화된 포스트바이오틱스 형태의 제제를 사용하는 것이 바람직하다고 판단된다.

감사의 글

이 연구는 국립수산물과학원 (R2023058, 수산분야 항생제 통합감시 및 내성균 연구)의 지원에 의해 진행되었습니다.

References

- Bennett, P. M.: Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal of Pharmacology*. 153 (S1): 347-357, 2008.
- Boucher, I., Emond, E., Parrot, M., Moineau, S.: DNA sequence analysis of three *Lactococcus lactis* plasmids encoding phage resistance mechanisms. *Journal of Dairy Science*, 84:1610-1620, 2001.
- Clinical and Laboratory Standards Institute.: M45 Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria. 2018.
- Elliott, J. A., Facklam, R. R.: Antimicrobial susceptibilities of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garvieae* and a proposed method to discriminate between them. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(5): 1296-1298, 1996.
- European Committee On Antimicrobial Susceptibility Testing: Broth microdilution – EUCAST reading guide v 4.0, EUCAST, 2022.
- Han, K. J., Lee, N. K., Park, H., Paik, H. D.: Anticancer and Anti-Inflammatory Activity of Probiotic *Lactococcus lactis* NK34. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(10): 1697-1701, 2015.
- Heo, W. S., Kim, Y. R., Kim, E. Y., Bai, S. C., Kong, I. S.: Effects of dietary probiotic, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* I2, supplementation on the growth and immune response of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 376-379:20-24, 2013.

- Kim, J. H., Lee, C. H., Heui, K. E.: Transferable R plasmid of Streptococci Isolation from Diseased Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*) in Jeju. JOURNAL OF FISH PATHOLOGY, 19(3): 267-276, 2006.
- Jang, M. H., Lee, N. S., Cho, M., Song, J. Y.: Status and Characteristics of JEECV (Japanese Eel Endothelial Cell-infecting Virus) and AnHV (Anguillid Herpesvirus 1) Infections in Domestic Farmed Eels *Anguilla japonica*, *Anguilla bicolor* and *Anguilla marmorata*. Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 54(5): 668-675, 2021.
- Joh, S. J., Ahn, E. H., Lee, H. J., Shin, G. W., Kwon, J. H., Park, C. G.: Bacterial pathogens and flora isolated from farm-cultured eels (*Anguilla japonica*) and their environmental waters in Korean eel farms. Veterinary Microbiology, 163: 190-195, 2013.
- Kim, T. O., Mondal, S. C., Jeong, C. R., Kim, S. R., Ban, O. H., Jung, Y. H., Yang, J. W., Kim, S. J.: Safety evaluation of *Lactococcus lactis* IDCC 2301 isolated from homemade cheese. Food Science & Nutrition, 10: 67-74, 2022.
- Kohler, V., Keller, W., Grohmann, E.: Regulation of gram-positive conjugation. Frontiers in Microbiology, 10(MAY): 1134, 2019.
- Lee, S. H., Katya, K., Park, Y. J., Won, S. H., Seong, M. J., Hamidoghli, A., Bai, S. C.: Comparative evaluation of dietary probiotics *Bacillus subtilis* WB60 and *Lactobacillus plantarum* KCTC3928 on the growth performance, immunological parameters, gut morphology and disease resistance in Japanese eel, *Anguilla japonica*. Fish & Shellfish Immunology, 61: 201-210, 2017.
- Nguyen, T. L., Park, C. I., Kim, D. H.: Improved growth rate and disease resistance in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, by probiotic *Lactococcus lactis* WFLU12 isolated from wild marine fish. Aquaculture, 471:113-120, 2017.
- Ryu, S. D., Kim, K. Y., Cho, D. Y., Kim, Y. H., Oh, S. J.: Complete genome sequences of *Lactococcus lactis* JNU 534, a potential food and feed preservative. Journal of Animal Science and Technology, 64(3): 599-602, 2022.
- Sequeiros, C., Garcés, M. E., Vallejo, M., Marguet, E. R., Olivera, N. L.: Potential aquaculture probiont *Lactococcus lactis* TW34 produces nisin Z and inhibits the fish pathogen *Lactococcus garvieae*. Archives of Microbiology, 197(3): 449-458, 2015.
- Song, A. AL., In, L. L. A., Lim, S. H. E., Rahim, R. A.: A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory. Microbial Cell Factories, 16:55, 2017.
- Touraki, M., Karamanlidou, G., Koziotis, M., Christidis, I.: Antibacterial effect of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* on *Artemia franciscana* nauplii and *Dicentrarchus labrax* larvae against the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. Aquaculture International 2012 21:2, 21(2): 481-495, 2012.
- Virolle, C., Goldlust, K., Djermoun, S., Bigot, S., Lesterlin, C.: Plasmid Transfer by Conjugation in Gram-Negative Bacteria: From the Cellular to the Community Level. Genes, 11(11): 1239, 2020.
- Won, S. H., Hamidoghli, A., Choi, W. S., Park, Y. J., Jang, W. J., Kong, I. S., Bai, S. C.: Effects of *Bacillus subtilis* WB60 and *Lactococcus lactis* on Growth, Immune Responses, Histology and Gene Expression in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. Microorganisms, 8(1): 67, 2020.
- Woo, S. J., Kim, M. S., Jeong, M. G., Do, M. Y., Hwang, S.D., Kim, W. J.: Establishment of Epidemiological Cut-Off Values and the Distribution of Resistance Genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* Isolated from Aquatic Animals. Antibiotics, 11: 343, 2022.
- Zheng, C. C., Cai, X. Y., Huang, M. M., Mkingule, I., Sun, C., Qian, S. C., Wu, Z. J., Han, B. N., Fei, H.: Effect of biological additives on Japanese eel (*Anguilla japonica*) growth performance, digestive enzymes activity and immunology. Fish & Shellfish Immunology, 84: 704-710, 2019.
- 국립수산물품질관리원: 2021 수산물 항생제 감수성 검사 매뉴얼. 해양수산부 국립수산물품질관리원, 2021.
- 국립수산물품질관리원: 2022 수산물의약품 제품 요약해설집. 해양수산부 국립수산물품질관리원, 2022.
- 권용국, 조성준, 김민철, 장환, 권준현.: 국내 양식 뱀장어의 세균성 질병 발생 실태 조사. 농림수산검역검사본부 조류질병과, 2005.
- 김대현, 이희건, 임병성, 박성우.: 2004-2017년 충청도 및 전라도 지역 양식 뱀장어, *Anguilla japonica*의 질병 감염 현황. 수산해양교육연구, 31(3): 884-892, 2019.
- 박보미, 김민주, 정연경, 박진일, 유홍식, 오은경.: 태안군 이원면 육상오염원 배출수에서 분리한 그람 음성균의 항생제 내성 특성. 한국수산물학회지, 54(4): 377-387, 2021.
- 백은경.: 지속가능한 뱀장어 양식업을 위한 자원관리 개선방안 - 한국과 일본을 중심으로 -. 한국도서연구, 32(3):103-125, 2020.
- 손나연, 김태운, 육현균.: 김치에서 분리한 *Lactococcus lactis* 균주의 항리스테리아 활성 및 부분 정제된 박테리오신의 특성. 한국식품위생안전성학회지, 32(2): 97-106, 2022.