



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

어류 병원성 세균의 항생제
감수성 검사를 위한 MIC panel의
최적화 배양조건 확립

濟州大學校 大學院

海洋生命科學科

金睿智

2021年 2月

어류 병원성 세균의 항생제
감수성 검사를 위한 MIC panel의
최적화 배양조건 확립

指導教授 鄭 煥 範

金 睿 智

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2021年 2月

金 睿 智의 理學碩士 學位論文을 認准함

審査委員長 여 인 규



委 員 전 려 진



委 員 정 준 범



濟州大學校 大學院

2021年 2月



Establishing of optimal culture conditions
for MIC panels for antibiotic susceptibility
test of fish bacterial pathogens

YE JI KIM

(Supervised by professor Joon Bum Jeong)

A thesis submitted in partial fulfillment of the
requirement for the degree of Master of Science

Department of Marine Biomedical Science
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

February, 2021

목 차

목 차	i
Abstract	iii
LIST OF FIGURES	iv
LIST OF TABLES	v
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	3
1. 실험균주	3
2. 균주의 동정	4
2.1. DNA 분리	4
2.2. Polymerase Chain Reaction (PCR)	5
3. MIC panel을 이용한 항생제 감수성 검사	7
III. 결 과	13
1. 균주의 동정	13
2. MIC panel의 최적화 배양조건	15
2.1. <i>Streptococcus</i> spp. 균주의 MIC panel 최적화 배양조건	15
2.2. <i>E. piscicida</i> 균주의 MIC panel 최적화 배양조건	24
2.3. <i>Vibrio</i> spp. 균주의 MIC panel 최적화 배양조건	31
2.4. <i>Aeromonas</i> spp. 균주의 MIC panel 최적화 배양조건	38

2.5. <i>Pseudomonas</i> spp. 균주의 MIC panel 최적화 배양조건	45
IV. 고찰	50
V. 요약	53
VI. 참고문헌	55
VII. 감사의 글	58

Abstract

No established method can be used to select effective antibiotics in antibiotic susceptibility tests for fish bacterial pathogens quickly and accurately. Existing methods of antibiotics susceptibility tests were complicated and time consuming in the experimental process. The minimal inhibitory concentration (MIC) panel, which can be tested rapidly, have been used for bacteria isolated from human and livestock until now. However fish bacterial pathogens are not suitable for the same method of previous MIC panel.

Here, we established the optimal conditions for determining the MIC of major fish bacterial pathogens (*Streptococcus* spp., *Edwardsiella piscicida*, *Vibrio* spp., *Aeromonas* spp. and *Pseudomonas* spp.) using the KRAQ1 and CAMPY2 panels. The MIC panel used 18 antibiotics of two types and we conducted experiments to establish the optimal culture medium and temperature for each species.

The optimal conditions for incubating *Streptococcus* spp. were in cation-adjusted Mueller-Hinton broth with TES buffer (CAMHBT) at 28°C, using 5% lysed horse blood (LHB) as recommended by the Clinical Laboratory Standards Institute. For *Vibrio* spp. the optimal culture conditions were 28°C in CAMHBT supplemented with 1% NaCl. The optimal conditions for culturing *E. piscicida*, *Aeromonas* spp. and *Pseudomonas* spp. were in CAMHBT at 28°C. Using the optimized conditions established in this study, rapid and accurate test will be possible at the fish farm.

LIST OF FIGURES

- Fig. 1. Schematic of the Sensititre plate (KRAQ1) showing antibiotics and concentrations in micrograms/milliliter. 9
- Fig. 2. Schematic of the Sensititre plate (CAMPY2) showing antibiotics and concentrations in micrograms/milliliter. 10

LIST OF TABLES

Table 1. Primer sets used for the detection of isolates in this study	6
Table 2. Range of concentrations used for MIC determination by sensititre panels	11
Table 3. Culture conditions and medium for representative bacterial species	12
Table 4. List of bacterial strains used in this study	14
Table 5. Results of MIC using MHB supplemented with 1% NaCl at 28°C for <i>Streptococcus</i> spp.	16
Table 6. Results of MIC using CAMHBT at 28°C for <i>Streptococcus</i> spp.	17
Table 7. Results of MIC using CAMHBT at 35°C for <i>Streptococcus</i> spp.	18
Table 8. Results of MIC using CAMHBT supplemented with 1% NaCl at 28°C for <i>Streptococcus</i> spp.	19
Table 9. Results of MIC using CAMHBT supplemented with 1% NaCl at 35°C for <i>Streptococcus</i> spp.	20
Table 10. Results of MIC using CAMHBT supplemented with 5% LHB at 22°C for <i>Streptococcus</i> spp.	21

Table 11. Results of MIC using CAMHBT supplemented with 5% LHB at 28°C for <i>Streptococcus</i> spp.	22
Table 12. Results of MIC using CAMHBT supplemented with 5% LHB at 35°C for <i>Streptococcus</i> spp.	23
Table 13. Results of MIC using MHB supplemented with 1% NaCl at 28°C for <i>E. piscicida</i>	25
Table 14. Results of MIC using CAMHBT at 22°C for <i>E. piscicida</i>	26
Table 15. Results of MIC using CAMHBT at 28°C for <i>E. piscicida</i>	27
Table 16. Results of MIC using CAMHBT at 35°C for <i>E. piscicida</i>	28
Table 17. Results of MIC using CAMHBT supplemented with 1% NaCl at 28°C for <i>E. piscicida</i>	29
Table 18. Results of MIC using CAMHBT supplemented with 1% NaCl at 35°C for <i>E. piscicida</i>	30
Table 19. Results of MIC using MHB supplemented with 1% NaCl at 28°C for <i>Vibrio</i> spp.	32
Table 20. Results of MIC using CAMHBT at 22°C for <i>Vibrio</i> spp.	33
Table 21. Results of MIC using CAMHBT at 28°C for <i>Vibrio</i> spp.	34

Table 22. Results of MIC using CAMHBT at 35°C for <i>Vibrio</i> spp.	35
Table 23. Results of MIC using CAMHBT supplemented with 1% NaCl at 28°C for <i>Vibrio</i> spp.	36
Table 24. Results of MIC using CAMHBT supplemented with 1% NaCl at 35°C for <i>Vibrio</i> spp.	37
Table 25. Results of MIC using MHB supplemented with 1% NaCl at 28°C for <i>Aeromonas</i> spp.	39
Table 26. Results of MIC using CAMHBT at 22°C for <i>Aeromonas</i> spp.	40
Table 27. Results of MIC using CAMHBT at 28°C for <i>Aeromonas</i> spp.	41
Table 28. Results of MIC using CAMHBT at 35°C for <i>Aeromonas</i> spp.	42
Table 29. Results of MIC using CAMHBT supplemented with 1% NaCl at 28°C for <i>Aeromonas</i> spp.	43
Table 30. Results of MIC using CAMHBT supplemented with 1% NaCl at 35°C for <i>Aeromonas</i> spp.	44
Table 31. Results of MIC using CAMHBT at 22°C for <i>Pseudomonas</i> spp.	46
Table 32. Results of MIC using CAMHBT at 28°C for <i>Pseudomonas</i> spp.	47

Table 33. Results of MIC using CAMHBT at 35°C for *Pseudomonas* spp. 48

Table 34. Optimized culture conditions of MIC panel for representative bacterial species 49

I. 서론

국내 수산양식업은 경제적 효율성을 위해 고밀도 및 대형화 양식을 추구해 왔으며, 이로 인해 질병의 발생 증가와 빠른 전파로 인한 대량폐사와 같은 문제가 발생하고 있다. 양식현장에서는 질병으로 인한 경제적 손실을 막고 생산량을 높이기 위하여 항생제를 세균성 질병의 치료에 지속적으로 이용해 왔으며, 일부 항생제는 감염성 질병의 치료 목적 외에도 어류의 성장을 촉진하기 위해 사료와 혼합하여 사용되어 왔다(Son et al., 2011; Gaskins et al., 2002). 또한 양식장에서는 세균성 질병을 치료하기 위하여 양식현장 종사자의 임상적 경험을 토대로 항생제를 선택한 후 무분별하게 사용하는 경우가 빈번하다. 이러한 비전문가적인 치료방법으로 유발되는 항생제 오남용은 세균의 항생제 내성을 증가시켜 치료가 어려워지고, 약물의 잔류로 인한 양식생물의 안전성 및 수산식품의 공중위생학적 안전성에도 심각한 문제를 일으킨다(Kwon et al., 2017). 그러므로 양식생물에서 질병이 발생하게 되면 원인이 되는 세균을 분리한 후, 동정된 세균의 항생제 감수성 검사를 신속하게 실시하여 적절한 항생제를 선택하고 용법과 용량에 맞도록 항생제를 사용하여야 한다. 최근까지 효율적인 항생제 선택을 위하여 항생제 감수성 검사로 disk diffusion susceptibility test와 broth microdilution test 등의 방법이 주로 사용되고 있지만, 실험 단계가 복잡하고 시간이 많이 소요된다는 단점이 있다. 이러한 기존의 항생제 감수성 검사 방법은 질병이 발생하고 대량폐사로 인하여 많은 경제적 피해가 발생한 후 결과가 확인되는 경우가 많아 신속하게 적절한 항생제를 처리해야 하는 상황에 비효율적인 측면을 가지고 있다. 따라서 양식생물의 질병 원인을 분석함과 동시에 보다 신속하고 효율적인 방법을 이용하여 항생제 감수성과 내성을 구분할 수 있는 방법이 필요한 실정이다.

다양한 항생제가 농도별로 coating되어 있는 MIC (minimal inhibitory concentration) panel은 간편하고 신속하게 항생제 감수성 검사를 실행할 수 있도록 상품화되어 판매되고 있지만, 현재까지는 인체 및 가축에서 유래된 세균을 대상으로 제작되어 사용되어 왔다. 그러나 다양한 환경 조건을 요구하는

수산생물에서 분리한 세균은 적용되는 항생제의 종류와 배양조건이 다르기 때문에 기존에 연구된 동일한 방법을 적용하기에는 적합하지 않다. 또한 국외기관인 clinical and laboratory standards institute (CLSI, 2020)와 european committee on antimicrobial susceptibility testing (EUCAST, 2020)에서 발간한 인체 및 가축에서 분리한 세균의 항생제 감수성 검사 표준 방법에서 권장되는 배양조건은 $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 에서 16-20시간 동안 배양하는 것이지만, 어병세균은 이러한 배양조건이 적합하지 않다. 이전의 연구에서 어병세균의 항생제 검사를 위한 표준방법(CLSI, 2006; CLSI, 2014a)으로서 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ 에서 24-28시간 배양을 권장한다고 명시되어 있지만, 다양한 어병세균에 대한 명확한 조건을 제시하고 있지 않으며 실험실에서 많이 사용하고 있는 Mueller-Hinton broth (MHB, Difco, Detroit, MI, USA) 배지의 활용성에 관한 연구도 부족한 실정이다.

본 연구에서는 수산용 항생제들이 96 well plate에 coating된 Sensititre™ KRAQ1, CAMPY2 panel (TREK Diagnostic system, East Grinstead, UK)을 이용하여, 어류에서 분리한 세균 종에 대한 MIC 분석을 실시하고 효율적인 항생제 감수성 검사를 위한 최적화 조건을 확립하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 균주

어류에서 분리되는 대표적인 병원성 세균인 *Streptococcus* spp., *Edwardsiella piscicida*, *Vibrio* spp., *Aeromonas* spp. 및 *Pseudomonas* spp.를 본 연구에 사용하였다. *Streptococcus* spp.와 *E. piscicida*, *Vibrio* spp.의 경우, 넙치 병어로부터 균을 직접 분리하여 이용하였으며, *Aeromonas* spp.와 *Pseudomonas* spp.는 국립수산과학원 병리연구과로부터 분양을 받아서 본 실험에 사용하였다.

세균은 2%의 NaCl이 첨가된 tryptic soy broth (TSB, Difco, Detroit, MI, USA)에서 증균 배양하였으며, 균의 구분을 위해 선택배지인 thiosulfate citrate bile salts sucrose (TCBS) agar (Difco, Detroit, MI, USA), Salmonella Shigella (SS) agar (MB cell, Seoul, Korea)와 감별배지인 blood agar (KOMED, Seongnam, Korea)에 희석 도말하고, 27℃에서 18-24시간 배양하여 균의 집락 형성 및 형태를 확인하였다.

Vibrio spp. 균주의 구분을 위해 TCBS 선택배지에서 초록색 또는 노란색 집락을 형성하는 것을 확인하였고, *E. piscicida* 균주는 선택배지인 SS 배지에서 검은색 집락을 형성하는 것으로 규정하였다.

실험균은 보존을 위해 20% glycerol (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 첨가한 후 실험에 사용하기 전까지 -80℃에서 보관하였다.

2. 균주의 동정

2.1. DNA 분리

세부적인 균 동정은 polymerase chain reaction (PCR) 방법을 통해 확인하였다. PCR을 위한 template DNA는 Higene™ Genomic DNA prep kit (BIOFACT, Daejeon, Korea)를 사용하여 분리하였다. 먼저 DNA의 추출을 위하여, 균을 TSB에 접종하고 27°C에서 18-24시간 배양한 후 배양액 1.5 ml를 microtube에 넣고, 10,000 rpm에서 1분간 원심분리하여 pellet을 수집하였다. Cell re-suspension solution 300 μ l를 넣어 pellet을 현탁시킨 후, lysozyme 2 μ l를 첨가하여 37°C에서 1시간 반응시켰다. 반응 후 13,000 rpm에서 1분간 원심분리하고, cell lysis solution 300 μ l를 넣어 pellet을 현탁시킨 다음 RNase A 1.5 μ l를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 실온에서 식힌 후에 protein precipitation solution 100 μ l를 넣고, 강하게 vortex하여 13,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상층액은 100% isopropanol 500 μ l가 들어있는 새 microtube에 넣고 50회 inverting하여 13,000 rpm에서 1분간 원심분리하였다. 상층액을 제거한 후 80% ethanol로 2번 세척하고, 15분간 상온에서 건조시킨 후, DNA hydration solution 50 μ l를 넣고 5초간 vortex하여 DNA를 추출하였다. 분리된 DNA는 실험에 사용하기 전까지 -20°C에서 보관하였다(Lee et al., 2017).

2.2. Polymerase Chain Reaction (PCR)

세균 동정을 위한 PCR 방법은 이전의 연구논문을 참고하여 수행하였다(Woo et al., 2006; Griffin et al., 2014; Kim et al., 2015; Demircan and Candan, 2006; Kim et al., 2014).

PCR은 0.2 ml microtube에 1 μ M의 각 primer, 2.5 mM의 각 dNTP, 10 x G-Taq Buffer, 2.5 U G-Taq DNA polymerase (Gene Pro Thernal Cyclor Cosmo, Korea) 및 template DNA로서 추출된 핵산을 첨가한 후 distilled water로 PCR 혼합물의 최종 volume이 20 μ l가 되도록 하였고, 사용된 primer sets는 Table 1에 나타내었다.

PCR 후 증폭 산물은 1×TAE buffer (40 Mm Tris-acetate, 1 mM EDTA)를 전기영동을 위한 완충액으로 하여, SYBR safe DNA gel stain (10,000×, Invitrogen, USA)를 첨가한 1% agarose gel 상에서 전기영동 한 후, UV 검출기에서 결과를 관찰하였다.

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

Target pathogen	Oligonucleotide sequences (5' to 3')	Product size (bp)	Reference
<i>Streptococcus iniae</i>	AAGAGACGCAGTGTCAAAAG CGTTTCTTATCTTGTTACTC	107	Woo et al., 2006
<i>Streptococcus parauberis</i>	TCCAGTCTTTCGACCTTCTT CAAAGAGATGTTTCGGCTTG	220	
<i>Edwardsiella tarda</i>	CAGTGATAAAAAGGGGTGGA CTACACAGCAACGACAACG	114	Griffin et al., 2014
<i>Edwardsiella piscicida</i>	CTTTGATCATGGTTGCGGAA CGGCGTTTTCTTTTCTCG	130	
<i>Vibrio</i> genus	GTCARATTGAAAARCARTTYGGTAAAGG ACYTTRATRCGNGTTTCRTTRCC	689	
<i>Vibrio alginolyticus</i>	ACGGCATTGGAAATTGCGACTG TACCCGTCTCACGAGCCCAAG	199	Kim et al., 2015
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	AGCTTATTGGCGGTTTCTGTCCG CKCAAGACCAAGAAAAGCCGTC	297	
<i>Vibrio anguillarum</i>	GTTTCATAGCATCAATGAGGAG GAGCAGACAATATGTTGGATG	519	Demircan and Candan, 2006
<i>Vibrio harveyi</i>	GTGATGAAGAAGCTTATCGCGATT CGCCTTCTTCAGTTAACGCAGGA	601	
<i>Photobacterium damsela</i>	CAAGACATCATCGATGTGATGCGT GAAACTTTACCATCTACCACTTTG	533	Kim et al., 2014
<i>Vibrio ichthyenteri</i>	ATGCAATCATGCCTCAAGATCTA AAATGTACCTTCTTCAGTCAACTT	434	

3. MIC panel을 이용한 항생제 감수성 검사

MIC panel을 이용한 항생제 감수성 검사 방법은 국립수산과학원 병리연구과에서 설계하였고, Thermo사에서 제작한 KRAQ1 panel의(Fig. 1) oxytetracycline, ceftiofur, flumequine, enrofloxacin, neomycin, ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid, doxycycline, trimethoprim/sulfamethoxazole 및 sulfisoxazole 10종과 CAMPY2 panel의(Fig. 2) azithromycin, ciprofloxacin, clindamycin, erythromycin, florfenicol, gentamicin, nalidixic acid 및 tetracycline 8종을 사용하였다(Table 2).

1% NaCl이 첨가된 tryptic soy agar (TSA, Difco, Detroit, MI, USA)에서 순수 배양된 세균의 colony를 멸균 loop를 이용하여 3-5개를 취한 후, 1% NaCl이 첨가된 distilled water에 희석하여 0.5 McFarland (1.5×10^8 CFU/ml)가 되도록 Sensititer™ Nephelometer (TREK Diagnostic system, Cleveland, OH)로 농도를 맞추었다. 농도를 맞춘 균액은 최적화 조건 확립을 위해 균종별로 설정한 조건에 맞춰 각각의 broth 배지에 100 μ l씩 넣었다. 사용한 broth 배지의 종류로는 실험실에서 제작하여 사용하는 MHB 배지와 항생제 감수성 검사를 위해 최적의 양이온 비율로 조절된 cation-adjusted Mueller-Hinton broth with TES buffer (CAMHBT) 배지를 사용하였다.

Streptococcus spp.의 경우, CLSI에서 제시한 기준에 따라 5%의 lysed horse blood (LHB)가 첨가된 CAMHBT 배지와 1% NaCl의 첨가 유무를 다르게 하여 실험을 진행하였고, MHB 배지에서 배양했을 때 MIC 값의 차이점을 확인하고자 하였다. *E. piscicida*, *Vibrio* spp. 그리고 *Aeromonas* spp.는 CAMHBT 배지, 1% NaCl이 첨가된 CAMHBT 배지 그리고 1% NaCl이 첨가된 MHB에서 배양하였다. *Pseudomonas* spp.의 경우는 CAMHBT 배지에서 온도의 조건을 CLSI 가이드라인에서 권장하는 22°C, 28°C와(CLSI, 2006; CLSI, 2014a) 인체 유래 세균의 배양온도인 35°C로 나누어 실험을 진행하였다(Table 3).

준비된 균액을 96 well panel에 100 μ l씩 분주한 후 kit well 전용 필름으로 sealing하고 panel을 각 조건에 맞는 배양온도에서 24시간 배양하였다. 배양된

panel을 Sensititer™ Manual Viewbox를 이용하여 육안으로 관찰하였을 때, 충분한 성장저해가 일어나 투명한 상태로 남아 있는 well 중 가장 적은 양의 항생제를 포함하는 well의 항생제 농도를 최소억제농도(MIC)로 결정하였다.

SENSITITRE CUSTOM PLATE FORMAT

2011140914

Plate Code: **KRAQ1**

Date: **12-Mar-19**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	OXY 0.25	OXY 0.5	OXY 1	OXY 2	OXY 4	OXY 8	OXY 16	OXY 32	OXY 64	OXY 128	OXY 256	POS
B	XNL 0.03	XNL 0.06	XNL 0.12	XNL 0.25	XNL 0.5	XNL 1	XNL 2	XNL 4	XNL 8	XNL 16	XNL 32	XNL 64
C	FLUQ 0.12	FLUQ 0.25	FLUQ 0.5	FLUQ 1	FLUQ 2	FLUQ 4	FLUQ 8	FLUQ 16	FLUQ 32	FLUQ 64	FLUQ 128	FIS 32
D	ENRO 0.03	ENRO 0.06	ENRO 0.12	ENRO 0.25	ENRO 0.5	ENRO 1	ENRO 2	ENRO 4	ENRO 8	ENRO 16	ENRO 32	FIS 64
E	NEO 0.5	NEO 8	AMP 1	AMP 2	AMP 4	AMP 8	AMP 16	AMP 32	AMP 64	AMP 128	AMP 256	FIS 128
F	NEO 1	NEO 16	AUG2 1/0.5	AUG2 2/1	AUG2 4/2	AUG2 8/4	AUG2 16/8	AUG2 32/16	AUG2 64/32	AUG2 128/64	AUG2 256/128	FIS 256
G	NEO 2	NEO 32	DOX 0.25	DOX 0.5	DOX 1	DOX 2	DOX 4	DOX 8	DOX 16	DOX 32	DOX 64	FIS 512
H	NEO 4	NEO 64	SXT 0.12/2.38	SXT 0.25/4.75	SXT 0.5/9.5	SXT 1/19	SXT 2/38	SXT 4/76	SXT 8/152	SXT 16/304	FIS 16	FIS 1024

ANTIMICROBICS

OXY	Oxytetracycline
XNL	Ceftiofur
FLUQ	Flumequine
ENRO	Enrofloxacin
NEO	Neomycin
AMP	Ampicillin
AUG2	Amoxicillin / clavulanic acid 2:1 ratio
DOX	Doxycycline
SXT	Trimethoprim / sulfamethoxazole
FIS	Sulfisoxazole
POS	Positive Control

Fig. 1. Schematic of the Sensititre plate (KRAQ1) showing antibiotics and concentrations in micrograms/milliliter.

THERMO SCIENTIFIC™ SENSITITRE™ CAMPYLOBACTER PLATE FORMAT

Plate Code: **CAMPY2**

Plate Type: **MIC**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	AZI 0.015	AZI 0.03	AZI 0.06	AZI 0.12	AZI 0.25	AZI 0.5	AZI 1	AZI 2	AZI 4	AZI 8	AZI 16	AZI 32	ANTIMICROBICS AZI Azithromycin CIP Ciprofloxacin CLI Clindamycin ERY Erythromycin FFN Florfenicol GEN Gentamicin NAL Nalidixic Acid TET Tetracycline POS Positive Control
B	AZI 64	CIP 0.015	CIP 0.03	CIP 0.06	CIP 0.12	CIP 0.25	CIP 0.5	CIP 1	CIP 2	CIP 4	CIP 8	CIP 16	
C	CIP 32	CIP 64	CLI 0.03	CLI 0.06	CLI 0.12	CLI 0.25	CLI 0.5	CLI 1	CLI 2	CLI 4	CLI 8	CLI 16	
D	ERY 0.03	ERY 0.06	ERY 0.12	ERY 0.25	ERY 0.5	ERY 1	ERY 2	ERY 4	ERY 8	ERY 16	ERY 32	ERY 64	
E	FFN 0.03	FFN 0.06	FFN 0.12	FFN 0.25	FFN 0.5	FFN 1	FFN 2	FFN 4	FFN 8	FFN 16	FFN 32	FFN 64	
F	TET 0.06	TET 0.12	TET 0.25	TET 0.5	TET 1	TET 2	TET 4	TET 8	TET 16	TET 32	TET 64		
G	GEN 0.12	GEN 0.25	GEN 0.5	GEN 1	GEN 2	GEN 4	GEN 8	GEN 16	GEN 32				
H	NAL 4	NAL 8	NAL 16	NAL 32	NAL 64							POS	

Fig. 2. Schematic of the Sensititre plate (CAMPY2) showing antibiotics and concentrations in micrograms/milliliter.

Table 2. Range of concentrations used for MIC determination by sensitive panels

Antimicrobial subclass	Antimicrobial agents (Abbreviation)	Test range ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
(A) KRAQ1 panel		
Tetracyclines	Oxytetracycline (OXY)	0.25–256
Cephalosporins	Ceftiofur (XNL)	0.03–64
Fluoroquinolones	Flumequine (FLUQ)	0.12–128
	Enrofloxacin (ENRO)	0.03–32
Aminoglycosides	Neomycin (NEO)	0.5–64
Penicillins	Ampicillin (AMP)	1–256
β -lactam/ β lactamase-inhibitor combination	Amoxicillin/clavulanic acid (AUG2)	1/0.5–256/128
Tetracyclines	Doxycycline (DOX)	0.25–64
	Trimethoprim/sulfamethoxazole	0.12/2.38–16/3
Sulfonamides	(SXT)	04
	Sulfisoxazole (FIS)	16–1024
(B) CAMPY2 panel		
Macrolides	Azithromycin (AZI)	0.015–64
Fluoroquinolones	Ciprofloxacin (CIP)	0.015–64
Lincosamides	Clindamycin (CLI)	0.03–16
Macrolides	Erythromycin (ERY)	0.03–64
Chloramphenicols	Florfenicol (FFN)	0.03–64
Aminoglycosides	Gentamicin (GEN)	0.12–32
Quinolones	Nalidixic acid (NAL)	4–64
Tetracyclines	Tetracycline (TET)	0.06–64

Table 3. Culture conditions and medium for representative bacterial species

Species	<i>Streptococcus</i> spp.				<i>E. piscicida</i> , <i>Vibrio</i> spp., <i>Aeromonas</i> spp.			<i>Pseudomonas</i> spp.
Panel	KRAQ1, CAMPY2				KRAQ1, CAMPY2			KRAQ1, CAMPY2
Medium	MHB ¹ +1% NaCl	CAMHBT ²	CAMHBT +1% NaCl	CAMHBT +5% LHB ³	MHB +1% NaCl	CAMHBT	CAMHBT +1% NaCl	CAMHBT
				22°C		22°C		22°C
Culture temperature	28°C	28°C	28°C	28°C	28°C	28°C	28°C	28°C
	35°C	35°C	35°C	35°C	35°C	35°C	35°C	35°C

¹MHB, Mueller-Hinton broth.

²CAMHBT, cation-adjusted Mueller-Hinton broth with TES buffer.

³LHB, Lysed horse blood.

* Incubation time, 24h.

Ⅲ. 결 과

1. 균주의 동정

본 연구에서 PCR 을 통해 연쇄구균의 동정을 실시한 결과, *S. parauberis* 3 균주, *S. iniae* 2 균주로 확인되었다. *E. piscicida* 균주는 선택배지인 SS 배지에서 검은색 집락이 형성되었으며, 정확한 동정을 위한 PCR 결과에서도 동일한 결과가 나타났다. 이전 Demircan and Candan (2006), Kim et al. (2014), Kim et al. (2015)의 방법을 참고하여 각 비브리오 균주에 대한 세부적인 동정을 실시한 결과, *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. parahaemolyticus*, *V. scophthalmi* 및 *V. harveyi*로 동정되었고, 해당 균주를 본 실험에 사용하였다(Table 4).

Table 4. List of bacterial strains used in this study

Bacteria	Year	Location	Host fish	Source
<i>S. parauberis</i> - 1	2019			
<i>S. parauberis</i> - 2	2019			
<i>S. parauberis</i> - 3	2019	Jeju	Olive flounder	This study
<i>S. iniae</i> - 4	2015			
<i>S. iniae</i> - 5	2015			
<i>E. piscicida</i> - 1	2019			
<i>E. piscicida</i> - 2	2019			
<i>E. piscicida</i> - 3	2019	Jeju	Olive flounder	This study
<i>E. piscicida</i> - 4	2015			
<i>E. piscicida</i> - 5	2015			
<i>V. alginolyticus</i> - 1	2018			
<i>V. anguillarum</i> - 2	2013			
<i>V. parahaemolyticus</i> - 3	2013	Jeju	Olive flounder	This study
<i>V. scophthalmi</i> - 4	2015			
<i>V. harveyi</i> - 5	2015			
<i>A. caviae</i> - 1	2018	Jeonnam	Eel	NIFS ¹ , 18FBACa0003
<i>A. hydrophila</i> - 2	2018	Jeonnam	Eel	NIFS, 18FBAhy0003
<i>A. sobria</i> - 3	2019	Gangwon	Rainbow trout	NIFS, 19FBASo0001
<i>A. veronii</i> - 4	2018	Busan	Eel	NIFS, 18FBAVe0001
<i>A. salmonicida</i> - 5	2018	Gyeonggi	Masu salmon	NIFS, 18FBASa000
<i>P. plecoglossicida</i> - 1	2015	Sacheon	-	NIFS, FPa4754
<i>P. monteili</i> - 2	2015	Jeju	Olive flounder	NIFS, FPa4827
<i>P. fluorescens</i> - 3	-	Jeju	Olive flounder	NIFS, FP6086
<i>P. protegens</i> - 4	2016	Gyeongbuk	Freshwater fish	NIFS
<i>P. putida</i> - 5	2019	Yeosu	Korean Rockfish	NIFS, 19FBPPU0001

¹NIFS, National Institute of Fisheries Science, Korea.

2. MIC panel의 최적화 배양조건

2.1. *Streptococcus* spp. 균주의 MIC panel 최적화 배양조건

Streptococcus spp.는 1% NaCl이 첨가된 MHB 배지와 CAMHBT 배지 그리고 염분이 첨가되지 않은 CAMHBT 배지를 각각 28℃와 35℃로 온도를 나눠서 실험을 진행하였고, CLSI의 권고사항이기도 한 5% LHB를 첨가한 CAMHBT 배지는 22℃, 28℃, 35℃에서 panel을 배양한 MIC 값을 Table 5부터 Table 12까지 나타내었다. *S. parauberis*-3 균주의 doxycycline 결과를 확인하면, 5% LHB를 첨가하고 28℃에서 배양한 panel에서는 MIC 값이 16 µg/ml로 명확하게 나타났다. 나머지 8가지의 다른 조건에서는 탁도가 불분명해 값을 결정하기가 어려운 경우가 있었고, 8-16 µg/ml의 MIC 값을 보였다. *S. parauberis* 중 한 균주는 1% NaCl의 첨가 유무에 따라 다른 환경조건에 비하여 neomycin의 MIC 값이 3-4배 정도 차이를 보이는 경우가 있었다. *Streptococcus* spp. 5균주 모두에 대한 MIC 값을 분석한 결과, 5% LHB를 첨가하고 28℃에서 배양하는 것이 가장 최적화 조건인 것으로 확인되었으며, 이는 CLSI에서 권고하는 사항과 동일하다. *Streptococcus* spp. 균주의 최적화 조건에서 배양된 panel에서 정확한 MIC 값을 확인할 수 있었으며 *S. parauberis* 균주와 *S. iniae* 균주의 MIC 값을 비교한 결과, *S. iniae* 균주는 tetracycline계열의 항생제와 macrolide계열의 항생제에 대하여 비교적 낮은 MIC 값을 가지는 것으로 나타났다(Table 11).

Table 5. Results of MIC using MHB supplemented with 1% NaCl at 28°C for *Streptococcus* spp.

Culture Condition	Bacteria	Antibiotics (KRAQ1 panel)									
		OXY	XNL	FLUQ	ENRO	NEO	AMP	AUG2	DOX	SXT	FIS
MHB ¹ +1% NaCl 28°C	<i>S. parauberis</i> - 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. parauberis</i> - 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. parauberis</i> - 3	32	0.06	128	0.5	32	< 1	< 1/0.5	8	4/76	> 1024
	<i>S. iniae</i> - 4	< 0.25	< 0.03	32	1	32	< 1	< 1/0.5	< 0.25	< 0.12/2.38	> 1024
	<i>S. iniae</i> - 5	0.5	< 0.03	16	0.25	32	< 1	< 1/0.5	< 0.25	< 0.12/2.38	> 1024
	Bacteria		Antibiotics (CAMPY2 panel)								
			AZI	CIP	CLI	ERY	FFN	GEN	NAL	TET	
		<i>S. parauberis</i> - 1	> 64	0.25	8	> 64	1	4	> 64	64	
		<i>S. parauberis</i> - 2	> 64	0.5	> 16	> 64	1	8	> 64	64	
		<i>S. parauberis</i> - 3	> 64	0.5	8	> 64	1	4	> 64	64	
	<i>S. iniae</i> - 4	0.12	1	< 0.03	0.06	2	8	> 64	0.25		
	<i>S. iniae</i> - 5	0.12	0.5	0.06	0.06	1	16	> 64	1		

¹MHB, Mueller-Hinton broth.

*OXY, oxytetracycline; XNL, ceftiofur; FLUQ, flumequine; ENRO, enrofloxacin; NEO, neomycin; AMP, ampicillin; AUG2, amoxicillin/clavulanic acid; DOX, doxycycline; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; FIS, sulfisoxazole.; AZI, azithromycin; CIP, ciprofloxacin; CLI, clindamycin; ERY, erythromycin; FFN, florfenicol; GEN, gentamicin; NAL, nalidixic acid; TET, tetracycline.

Table 6. Results of MIC using CAMHBT at 28°C for *Streptococcus* spp.

Culture Condition	Bacteria	Antibiotics (KRAQ1 panel)									
		OXY	XNL	FLUQ	ENRO	NEO	AMP	AUG2	DOX	SXT	FIS
CAMHBT ¹ 28°C	<i>S. parauberis</i> - 1	256	0.06	128	0.5	4	< 1	< 1/0.5	16	0.5/9.5	> 1024
	<i>S. parauberis</i> - 2	256	0.06	128	0.5	8	< 1	< 1/0.5	16	0.5/9.5	> 1024
	<i>S. parauberis</i> - 3	128	0.06	128	0.5	8	< 1	< 1/0.5	16	1/19	> 1024
	<i>S. iniae</i> - 4	< 0.25	< 0.03	32	1	4	< 1	< 1/0.5	< 0.25	< 0.12/2.38	> 1024
	<i>S. iniae</i> - 5	0.5	< 0.03	16	0.5	8	< 1	< 1/0.5	< 0.25	< 0.12/2.38	> 1024
	Bacteria	Antibiotics (CAMPY2 panel)									
		AZI	CIP	CLI	ERY	FFN	GEN	NAL	TET		
	<i>S. parauberis</i> - 1	> 64	0.5	> 16	> 64	1	1	> 64	64		
	<i>S. parauberis</i> - 2	> 64	0.5	> 16	> 64	1	1	> 64	> 64		
	<i>S. parauberis</i> - 3	> 64	0.5	> 16	> 64	1	1	> 64	64		
<i>S. iniae</i> - 4	0.12	1	< 0.03	< 0.03	2	2	264	0.5			
<i>S. iniae</i> - 5	0.12	0.5	0.06	0.06	1	2	> 64	1			

¹CAMHBT, cation-adjusted Mueller-Hinton broth with TES buffer.

*OXY, oxytetracycline; XNL, ceftiofur; FLUQ, flumequine; ENRO, enrofloxacin; NEO, neomycin; AMP, ampicillin; AUG2, amoxicillin/clavulanic acid; DOX, doxycycline; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; FIS, sulfisoxazole.; AZI, azithromycin; CIP, ciprofloxacin; CLI, clindamycin; ERY, erythromycin; FFN, florfenicol; GEN, gentamicin; NAL, nalidixic acid; TET, tetracycline.

Table 7. Results of MIC using CAMHBT at 35°C for *Streptococcus* spp.

Culture Condition	Bacteria	Antibiotics (KRAQ1 panel)										
		OXY	XNL	FLUQ	ENRO	NEO	AMP	AUG2	DOX	SXT	FIS	
CAMHBT ¹ 35°C	<i>S. parauberis</i> - 1	256	0.06	128	0.5	4	< 1	< 1/0.5	16	0.5/9.5	> 1024	
	<i>S. parauberis</i> - 2	256	0.06	128	0.5	8	< 1	< 1/0.5	16	0.5/9.5	> 1024	
	<i>S. parauberis</i> - 3	64	0.06	128	0.5	2	< 1	< 1/0.5	8	0.5/9.5	> 1024	
	<i>S. iniae</i> - 4	< 0.25	< 0.03	64	2	4	< 1	< 1/0.5	< 0.25	< 0.12/2.38	> 1024	
	<i>S. iniae</i> - 5	0.5	< 0.03	8	0.25	2	< 1	< 1/0.5	< 0.25	< 0.12/2.38	> 1024	
	Bacteria		Antibiotics (CAMPY2 panel)									
			AZI	CIP	CLI	ERY	FFN	GEN	NAL	TET		
		<i>S. parauberis</i> - 1	> 64	0.5	> 16	> 64	1	1	> 64	64		
		<i>S. parauberis</i> - 2	> 64	1	> 16	> 64	1	1	> 64	> 64		
		<i>S. parauberis</i> - 3	> 64	0.5	> 16	> 64	1	1	> 64	64		
	<i>S. iniae</i> - 4	0.12	1	< 0.03	0.06	2	1	> 64	0.5			
	<i>S. iniae</i> - 5	0.06	0.5	0.06	0.06	1	1	> 64	2			

¹CAMHBT, cation-adjusted Mueller-Hinton broth with TES buffer.

*OXY, oxytetracycline; XNL, ceftiofur; FLUQ, flumequine; ENRO, enrofloxacin; NEO, neomycin; AMP, ampicillin; AUG2, amoxicillin/clavulanic acid; DOX, doxycycline; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; FIS, sulfisoxazole.; AZI, azithromycin; CIP, ciprofloxacin; CLI, clindamycin; ERY, erythromycin; FFN, florfenicol; GEN, gentamicin; NAL, nalidixic acid; TET, tetracycline.

Table 8. Results of MIC using CAMHBT supplemented with 1% NaCl at 28°C for *Streptococcus* spp.

Culture Condition	Bacteria	Antibiotics (KRAQ1 panel)									
		OXY	XNL	FLUQ	ENRO	NEO	AMP	AUG2	DOX	SXT	FIS
CAMHBT ¹ +1% NaCl 28°C	<i>S. parauberis</i> - 1	256	0.06	128	0.5	4	< 1	< 1/0.5	16	0.5/9.5	> 1024
	<i>S. parauberis</i> - 2	256	0.06	128	0.5	8	< 1	< 1/0.5	16	0.5/9.5	> 1024
	<i>S. parauberis</i> - 3	64	0.06	128	0.5	32	< 1	< 1/0.5	16	0.5/9.5	> 1024
	<i>S. iniae</i> - 4	< 0.25	< 0.03	64	1	32	< 1	< 1/0.5	< 0.25	< 0.12/2.38	> 1024
	<i>S. iniae</i> - 5	0.5	< 0.03	16	0.25	32	< 1	< 1/0.5	< 0.25	< 0.12/2.38	512
	Bacteria	Antibiotics (CAMPY2 panel)									
		AZI	CIP	CLI	ERY	FFN	GEN	NAL	TET		
	<i>S. parauberis</i> - 1	> 64	0.5	> 16	> 64	1	8	> 64	64		
	<i>S. parauberis</i> - 2	> 64	0.5	> 16	> 64	1	8	> 64	64		
	<i>S. parauberis</i> - 3	> 64	1	16	> 64	1	8	> 64	64		
<i>S. iniae</i> - 4	0.06	1	< 0.03	< 0.03	1	16	> 64	0.25			
<i>S. iniae</i> - 5	0.06	0.5	< 0.03	< 0.03	0.5	16	> 64	1			

¹CAMHBT, cation-adjusted Mueller-Hinton broth with TES buffer.

*OXY, oxytetracycline; XNL, ceftiofur; FLUQ, flumequine; ENRO, enrofloxacin; NEO, neomycin; AMP, ampicillin; AUG2, amoxicillin/clavulanic acid; DOX, doxycycline; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; FIS, sulfisoxazole.; AZI, azithromycin; CIP, ciprofloxacin; CLI, clindamycin; ERY, erythromycin; FFN, florfenicol; GEN, gentamicin; NAL, nalidixic acid; TET, tetracycline.

Table 9. Results of MIC using CAMHBT supplemented with 1% NaCl at 35°C for *Streptococcus* spp.

Culture Condition	Bacteria	Antibiotics (KRAQ1 panel)									
		OXY	XNL	FLUQ	ENRO	NEO	AMP	AUG2	DOX	SXT	FIS
CAMHBT ¹ +1% NaCl 35°C	<i>S. parauberis</i> - 1	256	0.06	128	0.5	4	< 1	< 1/0.5	16	0.5/9.5	> 1024
	<i>S. parauberis</i> - 2	256	0.06	128	0.5	8	< 1	< 1/0.5	16	0.5/9.5	> 1024
	<i>S. parauberis</i> - 3	64	0.06	128	0.5	16	< 1	< 1/0.5	16	0.5/9.5	> 1024
	<i>S. iniae</i> - 4	< 0.25	< 0.03	16	2	16	< 1	< 1/0.5	< 0.25	< 0.12/2.38	> 1024
	<i>S. iniae</i> - 5	1	< 0.03	16	0.25	32	< 1	< 1/0.5	0.5	< 0.12/2.38	> 1024
	Bacteria	Antibiotics (CAMPY2 panel)									
		AZI	CIP	CLI	ERY	FFN	GEN	NAL	TET		
	<i>S. parauberis</i> - 1	> 64	1	8	> 64	1	4	> 64	64		
	<i>S. parauberis</i> - 2	> 64	1	> 16	> 64	1	8	> 64	> 64		
	<i>S. parauberis</i> - 3	> 64	1	2	> 64	1	4	> 64	64		
<i>S. iniae</i> - 4	0.06	2	< 0.03	< 0.03	2	16	> 64	0.5			
<i>S. iniae</i> - 5	0.12	0.5	0.06	< 0.03	1	4	> 64	1			

¹CAMHBT, cation-adjusted Mueller-Hinton broth with TES buffer.

*OXY, oxytetracycline; XNL, ceftiofur; FLUQ, flumequine; ENRO, enrofloxacin; NEO, neomycin; AMP, ampicillin; AUG2, amoxicillin/clavulanic acid; DOX, doxycycline; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; FIS, sulfisoxazole.; AZI, azithromycin; CIP, ciprofloxacin; CLI, clindamycin; ERY, erythromycin; FFN, florfenicol; GEN, gentamicin; NAL, nalidixic acid; TET, tetracycline.

Table 10. Results of MIC using CAMHBT supplemented with 5% LHB at 22°C for *Streptococcus* spp.

Culture Condition	Bacteria	Antibiotics (KRAQ1 panel)									
		OXY	XNL	FLUQ	ENRO	NEO	AMP	AUG2	DOX	SXT	FIS
CAMHBT ¹ +5% LHB ² 22°C	<i>S. parauberis</i> - 1	256	2	64	0.25	8	< 1	< 1/0.5	16	0.5/9.5	> 1024
	<i>S. parauberis</i> - 2	256	2	64	0.25	8	< 1	< 1/0.5	16	0.5/9.5	> 1024
	<i>S. parauberis</i> - 3	64	2	64	0.5	8	< 1	< 1/0.5	16	0.5/9.5	> 1024
	<i>S. iniae</i> - 4	< 0.25	0.06	64	0.5	32	< 1	< 1/0.5	< 0.25	< 0.12/2.38	> 1024
	<i>S. iniae</i> - 5	0.5	< 0.03	32	0.25	32	< 1	< 1/0.5	< 0.25	< 0.12/2.38	> 1024
	Bacteria	Antibiotics (CAMPY2 panel)									
		AZI	CIP	CLI	ERY	FFN	GEN	NAL	TET		
	<i>S. parauberis</i> - 1	> 64	0.25	4	> 64	1	2	> 64	> 64	> 64	> 64
	<i>S. parauberis</i> - 2	> 64	0.5	0.5	> 64	1	2	> 64	> 64	> 64	> 64
	<i>S. parauberis</i> - 3	> 64	0.5	4	> 64	1	2	> 64	> 64	> 64	> 64
<i>S. iniae</i> - 4	0.12	1	0.06	< 0.03	1	8	> 64	0.25			
<i>S. iniae</i> - 5	0.12	0.5	0.06	0.06	1	8	> 64	1			

¹CAMHBT, cation-adjusted Mueller-Hinton broth with TES buffer.

²LHB, Lysed horse blood.

*OXY, oxytetracycline; XNL, ceftiofur; FLUQ, flumequine; ENRO, enrofloxacin; NEO, neomycin; AMP, ampicillin; AUG2, amoxicillin/clavulanic acid; DOX, doxycycline; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; FIS, sulfisoxazole.; AZI, azithromycin; CIP, ciprofloxacin; CLI, clindamycin; ERY, erythromycin; FFN, florfenicol; GEN, gentamicin; NAL, nalidixic acid; TET, tetracycline.

Table 11. Results of MIC using CAMHBT supplemented with 5% LHB at 28°C for *Streptococcus* spp.

Culture Condition	Bacteria	Antibiotics (KRAQ1 panel)									
		OXY	XNL	FLUQ	ENRO	NEO	AMP	AUG2	DOX	SXT	FIS
CAMHBT ¹ +5% LHB ² 28°C	<i>S. parauberis</i> - 1	256	2	128	0.25	8	< 1	< 1/0.5	16	0.5/9.5	> 1024
	<i>S. parauberis</i> - 2	256	2	64	0.5	16	< 1	< 1/0.5	16	0.5/9.5	> 1024
	<i>S. parauberis</i> - 3	128	2	64	0.5	8	< 1	< 1/0.5	16	0.5/9.5	> 1024
	<i>S. iniae</i> - 4	< 0.25	0.06	64	0.5	32	< 1	< 1/0.5	< 0.25	< 0.12/2.38	> 1024
	<i>S. iniae</i> - 5	0.5	< 0.03	32	0.25	32	< 1	< 1/0.5	< 0.25	< 0.12/2.38	> 1024
	Bacteria	Antibiotics (CAMPY2 panel)									
		AZI	CIP	CLI	ERY	FFN	GEN	NAL	TET		
	<i>S. parauberis</i> - 1	> 64	0.25	4	> 64	1	2	> 64	> 64	> 64	> 64
	<i>S. parauberis</i> - 2	> 64	0.5	> 16	> 64	1	2	> 64	> 64	> 64	> 64
	<i>S. parauberis</i> - 3	> 64	0.5	4	> 64	1	2	> 64	> 64	> 64	> 64
<i>S. iniae</i> - 4	0.12	1	0.06	< 0.03	1	8	> 64	0.25			
<i>S. iniae</i> - 5	0.12	0.5	0.06	0.06	1	8	> 64	1			

¹CAMHBT, cation-adjusted Mueller-Hinton broth with TES buffer.

²LHB, Lysed horse blood.

*OXY, oxytetracycline; XNL, ceftiofur; FLUQ, flumequine; ENRO, enrofloxacin; NEO, neomycin; AMP, ampicillin; AUG2, amoxicillin/clavulanic acid; DOX, doxycycline; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; FIS, sulfisoxazole.; AZI, azithromycin; CIP, ciprofloxacin; CLI, clindamycin; ERY, erythromycin; FFN, florfenicol; GEN, gentamicin; NAL, nalidixic acid; TET, tetracycline.

Table 12. Results of MIC using CAMHBT supplemented with 5% LHB at 35°C for *Streptococcus* spp.

Culture Condition	Bacteria	Antibiotics (KRAQ1 panel)									
		OXY	XNL	FLUQ	ENRO	NEO	AMP	AUG2	DOX	SXT	FIS
CAMHBT ¹ +5% LHB ² 35°C	<i>S. parauberis</i> - 1	> 256	2	128	0.5	8	< 1	< 1/0.5	8	0.5/9.5	> 1024
	<i>S. parauberis</i> - 2	256	1	128	1	8	< 1	< 1/0.5	16	0.5/9.5	> 1024
	<i>S. parauberis</i> - 3	128	2	128	0.5	8	< 1	< 1/0.5	16	0.5/9.5	> 1024
	<i>S. iniae</i> - 4	< 0.25	0.06	128	1	64	< 1	< 1/0.5	< 0.25	< 0.12/2.38	> 1024
	<i>S. iniae</i> - 5	0.5	< 0.03	64	0.5	64	< 1	< 1/0.5	< 0.25	< 0.12/2.38	> 1024
	Bacteria	Antibiotics (CAMPY2 panel)									
		AZI	CIP	CLI	ERY	FFN	GEN	NAL	TET		
	<i>S. parauberis</i> - 1	> 64	0.5	4	> 64	1	2	> 64	> 64	> 64	> 64
	<i>S. parauberis</i> - 2	> 64	1	> 16	> 64	1	2	> 64	> 64	> 64	> 64
	<i>S. parauberis</i> - 3	> 64	0.5	8	> 64	1	2	> 64	> 64	> 64	> 64
<i>S. iniae</i> - 4	0.12	2	0.06	< 0.03	2	8	> 64	0.5			
<i>S. iniae</i> - 5	0.25	1	0.12	0.12	1	8	> 64	2			

¹CAMHBT, cation-adjusted Mueller-Hinton broth with TES buffer.

²LHB, Lysed horse blood.

*OXY, oxytetracycline; XNL, ceftiofur; FLUQ, flumequine; ENRO, enrofloxacin; NEO, neomycin; AMP, ampicillin; AUG2, amoxicillin/clavulanic acid; DOX, doxycycline; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; FIS, sulfisoxazole.; AZI, azithromycin; CIP, ciprofloxacin; CLI, clindamycin; ERY, erythromycin; FFN, florfenicol; GEN, gentamicin; NAL, nalidixic acid; TET, tetracycline.

2.2. *E. piscicida* 균주의 MIC panel 최적화 배양조건

E. piscicida 균주의 최적화된 배양조건을 설정하기 위하여 CAMHBT 배지는 22℃, 28℃와 35℃ 온도로 배양하였고, 1% NaCl이 첨가된 CAMHBT 배지와 1% NaCl이 첨가된 MHB 배지는 28℃와 35℃에서 배양하였다. 각 조건에 맞게 배양한 panel의 MIC 값을 Table 13부터 Table 18까지 나타내었다.

*E. piscicida*의 경우도 연쇄구균과 유사하게 MIC 값이 조건에 따라 큰 차이를 보이지는 않았으나 28℃에서 배양한 panel에서 다른 조건들에 비하여 명확한 MIC 값을 관찰할 수 있었다. 최적화된 조건에서 *E. piscicida*-4 균주와 *E. piscicida*-5 균주는 다른 3균주보다 tetracycline계열의 oxytetracycline, doxycycline, tetracycline 항생제에 높은 MIC 값을 가지는 내성균주인 것으로 확인되었다(Table 15).

Table 13. Results of MIC using MHB supplemented with 1% NaCl at 28°C for *E. piscicida*

Culture Condition	Bacteria	Antibiotics (KRAQ1 panel)									
		OXY	XNL	FLUQ	ENRO	NEO	AMP	AUG2	DOX	SXT	FIS
MHB ¹ +1% NaCl 28 °C	<i>E. piscicida</i> - 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>E. piscicida</i> - 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>E. piscicida</i> - 3	< 0.25	0.06	2	1	8	< 1	< 1/0.5	1	< 0.12/2.38	< 16
	<i>E. piscicida</i> - 4	128	0.12	4	1	8	< 1	16/8	64	> 16/304	> 1024
	<i>E. piscicida</i> - 5	256	0.12	8	16	4	> 256	16/8	> 64	> 16/304	> 1024
	Bacteria	Antibiotics (CAMPY2 panel)									
		AZI	CIP	CLI	ERY	FFN	GEN	NAL	TET		
	<i>E. piscicida</i> - 1	> 64	0.06	> 16	64	0.5	4	32	0.25		
	<i>E. piscicida</i> - 2	32	0.25	> 16	64	0.5	4	> 64	0.5		
	<i>E. piscicida</i> - 3	32	0.25	> 16	64	0.5	4	> 64	0.5		
<i>E. piscicida</i> - 4	> 64	0.12	> 16	> 64	0.5	4	> 64	64			
<i>E. piscicida</i> - 5	32	4	> 16	32	0.5	2	64	> 64			

¹MHB, Mueller-Hinton broth.

*OXY, oxytetracycline; XNL, ceftiofur; FLUQ, flumequine; ENRO, enrofloxacin; NEO, neomycin; AMP, ampicillin; AUG2, amoxicillin/clavulanic acid; DOX, doxycycline; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; FIS, sulfisoxazole.; AZI, azithromycin; CIP, ciprofloxacin; CLI, clindamycin; ERY, erythromycin; FFN, florfenicol; GEN, gentamicin; NAL, nalidixic acid; TET, tetracycline.

Table 14. Results of MIC using CAMHBT at 22°C for *E. piscicida*

Culture Condition	Bacteria	Antibiotics (KRAQ1 panel)										
		OXY	XNL	FLUQ	ENRO	NEO	AMP	AUG2	DOX	SXT	FIS	
CAMHBT ¹ 22°C	<i>E. piscicida</i> - 1	< 0.25	0.25	1	0.25	4	4	4/2	1	< 0.12/2.38	1024	
	<i>E. piscicida</i> - 2	< 0.25	0.25	1	0.25	4	4	4/2	1	< 0.12/2.38	1024	
	<i>E. piscicida</i> - 3	< 0.25	0.25	1	0.25	4	4	4/2	1	< 0.12/2.38	1024	
	<i>E. piscicida</i> - 4	128	0.25	1	0.25	4	4	4/2	64	> 16/304	> 1024	
	<i>E. piscicida</i> - 5	256	0.25	4	4	4	> 256	8/4	> 64	16/304	1024	
	Bacteria		Antibiotics (CAMPY2 panel)									
			AZI	CIP	CLI	ERY	FFN	GEN	NAL	TET		
		<i>E. piscicida</i> - 1	8	0.03	> 16	16	0.25	1	16	0.25		
		<i>E. piscicida</i> - 2	8	0.03	> 16	16	0.25	1	16	0.25		
		<i>E. piscicida</i> - 3	16	0.03	> 16	16	0.5	1	32	0.25		
	<i>E. piscicida</i> - 4	64	0.03	> 16	> 64	0.5	1	32	64			
	<i>E. piscicida</i> - 5	16	1	> 16	16	0.5	1	32	> 64			

¹CAMHBT, cation-adjusted Mueller-Hinton broth with TES buffer.

*OXY, oxytetracycline; XNL, ceftiofur; FLUQ, flumequine; ENRO, enrofloxacin; NEO, neomycin; AMP, ampicillin; AUG2, amoxicillin/clavulanic acid; DOX, doxycycline; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; FIS, sulfisoxazole.; AZI, azithromycin; CIP, ciprofloxacin; CLI, clindamycin; ERY, erythromycin; FFN, florfenicol; GEN, gentamicin; NAL, nalidixic acid; TET, tetracycline.

Table 15. Results of MIC using CAMHBT at 28°C for *E. piscicida*

Culture Condition	Bacteria	Antibiotics (KRAQ1 panel)									
		OXY	XNL	FLUQ	ENRO	NEO	AMP	AUG2	DOX	SXT	FIS
	<i>E. piscicida</i> - 1	< 0.25	0.06	2	0.25	4	< 1	2/1	1	< 0.12/2.38	> 1024
	<i>E. piscicida</i> - 2	0.5	0.25	2	0.25	2	2	2/1	1	< 0.12/2.38	> 1024
	<i>E. piscicida</i> - 3	< 0.25	0.25	2	0.25	4	4	4/2	1	< 0.12/2.38	< 16
	<i>E. piscicida</i> - 4	256	0.12	2	0.5	2	2	4/2	64	> 16/304	> 1024
	<i>E. piscicida</i> - 5	256	0.12	8	8	4	> 256	8/4	> 64	> 16/304	> 1024
CAMHBT ¹ 28°C	Bacteria	Antibiotics (CAMPY2 panel)									
		AZI	CIP	CLI	ERY	FFN	GEN	NAL	TET		
	<i>E. piscicida</i> - 1	16	0.06	> 16	16	0.5	1	32	0.5		
	<i>E. piscicida</i> - 2	32	0.12	> 16	64	0.5	2	> 64	1		
	<i>E. piscicida</i> - 3	32	0.12	> 16	64	1	2	> 64	1		
	<i>E. piscicida</i> - 4	> 64	0.06	> 16	> 64	0.5	2	64	> 64		
	<i>E. piscicida</i> - 5	16	1	> 16	32	0.5	1	64	> 64		

¹CAMHBT, cation-adjusted Mueller-Hinton broth with TES buffer.

*OXY, oxytetracycline; XNL, ceftiofur; FLUQ, flumequine; ENRO, enrofloxacin; NEO, neomycin; AMP, ampicillin; AUG2, amoxicillin/clavulanic acid; DOX, doxycycline; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; FIS, sulfisoxazole.; AZI, azithromycin; CIP, ciprofloxacin; CLI, clindamycin; ERY, erythromycin; FFN, florfenicol; GEN, gentamicin; NAL, nalidixic acid; TET, tetracycline.

Table 16. Results of MIC using CAMHBT at 35°C for *E. piscicida*

Culture Condition	Bacteria	Antibiotics (KRAQ1 panel)									
		OXY	XNL	FLUQ	ENRO	NEO	AMP	AUG2	DOX	SXT	FIS
CAMHBT ¹ 35°C	<i>E. piscicida</i> - 1	< 0.25	0.06	2	0.25	2	< 1	2/1	1	< 0.12/2.38	> 1024
	<i>E. piscicida</i> - 2	0.5	0.25	2	0.25	2	2	2/1	1	< 0.12/2.38	> 1024
	<i>E. piscicida</i> - 3	1	0.12	4	0.5	2	2	4/2	1	< 0.12/2.38	> 1024
	<i>E. piscicida</i> - 4	128	0.12	2	0.25	4	2	4/2	64	> 16/304	> 1024
	<i>E. piscicida</i> - 5	256	0.25	8	8	4	> 256	8/4	64	> 16/304	> 1024
		Antibiotics (CAMPY2 panel)									
	Bacteria	AZI	CIP	CLI	ERY	FFN	GEN	NAL	TET		
	<i>E. piscicida</i> - 1	16	0.12	> 16	64	1	1	> 64	1		
	<i>E. piscicida</i> - 2	16	0.06	> 16	64	1	1	> 64	1		
	<i>E. piscicida</i> - 3	16	0.06	> 16	64	1	1	> 64	1		
	<i>E. piscicida</i> - 4	> 64	0.06	> 16	> 64	0.5	2	64	> 64		
	<i>E. piscicida</i> - 5	16	2	> 16	32	0.5	1	64	> 64		

¹CAMHBT, cation-adjusted Mueller-Hinton broth with TES buffer.

*OXY, oxytetracycline; XNL, ceftiofur; FLUQ, flumequine; ENRO, enrofloxacin; NEO, neomycin; AMP, ampicillin; AUG2, amoxicillin/clavulanic acid; DOX, doxycycline; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; FIS, sulfisoxazole.; AZI, azithromycin; CIP, ciprofloxacin; CLI, clindamycin; ERY, erythromycin; FFN, florfenicol; GEN, gentamicin; NAL, nalidixic acid; TET, tetracycline.

Table 17. Results of MIC using CAMHBT supplemented with 1% NaCl at 28°C for *E. piscicida*

Culture Condition	Bacteria	Antibiotics (KRAQ1 panel)										
		OXY	XNL	FLUQ	ENRO	NEO	AMP	AUG2	DOX	SXT	FIS	
CAMHBT ¹ +1% NaCl 28°C	<i>E. piscicida</i> - 1	< 0.25	0.06	2	0.25	4	< 1	2/1	1	< 0.12/2.38	> 1024	
	<i>E. piscicida</i> - 2	0.5	0.25	2	0.25	2	2	2/1	1	< 0.12/2.38	> 1024	
	<i>E. piscicida</i> - 3	< 0.25	0.12	2	0.5	8	< 1	2/1	2	< 0.12/2.38	< 16	
	<i>E. piscicida</i> - 4	128	0.12	2	0.5	8	< 1	2/1	64	> 16/304	> 1024	
	<i>E. piscicida</i> - 5	256	0.12	8	16	8	> 256	4/2	> 64	> 16/304	> 1024	
	Bacteria		Antibiotics (CAMPY2 panel)									
			AZI	CIP	CLI	ERY	FFN	GEN	NAL	TET		
		<i>E. piscicida</i> - 1	16	0.06	> 16	16	0.25	4	32	0.5		
		<i>E. piscicida</i> - 2	32	0.12	> 16	64	1	4	> 64	1		
		<i>E. piscicida</i> - 3	32	0.12	> 16	64	1	4	> 64	1		
	<i>E. piscicida</i> - 4	> 64	0.06	> 16	> 64	0.5	4	64	> 64			
	<i>E. piscicida</i> - 5	32	2	> 16	32	0.5	4	64	> 64			

¹CAMHBT, cation-adjusted Mueller-Hinton broth with TES buffer.

*OXY, oxytetracycline; XNL, ceftiofur; FLUQ, flumequine; ENRO, enrofloxacin; NEO, neomycin; AMP, ampicillin; AUG2, amoxicillin/clavulanic acid; DOX, doxycycline; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; FIS, sulfisoxazole.; AZI, azithromycin; CIP, ciprofloxacin; CLI, clindamycin; ERY, erythromycin; FFN, florfenicol; GEN, gentamicin; NAL, nalidixic acid; TET, tetracycline.

Table 18. Results of MIC using CAMHBT supplemented with 1% NaCl at 35°C for *E. piscicida*

Culture Condition	Bacteria	Antibiotics (KRAQ1 panel)									
		OXY	XNL	FLUQ	ENRO	NEO	AMP	AUG2	DOX	SXT	FIS
CAMHBT ¹ +1% NaCl 35°C	<i>E. piscicida</i> - 1	0.5	0.25	2	0.25	2	2	2/1	1	< 0.12/2.38	> 1024
	<i>E. piscicida</i> - 2	0.5	0.25	2	0.25	2	2	2/1	1	< 0.12/2.38	> 1024
	<i>E. piscicida</i> - 3	1	0.12	4	0.5	4	< 1	2/1	1	< 0.12/2.38	> 1024
	<i>E. piscicida</i> - 4	128	0.12	2	0.5	8	< 1	2/1	> 64	> 16/304	> 1024
	<i>E. piscicida</i> - 5	256	0.12	8	16	8	> 256	4/2	> 64	> 16/304	> 1024
	Bacteria	Antibiotics (CAMPY2 panel)									
		AZI	CIP	CLI	ERY	FFN	GEN	NAL	TET		
	<i>E. piscicida</i> - 1	32	0.12	> 16	64	1	4	> 64	1		
	<i>E. piscicida</i> - 2	32	0.12	> 16	64	1	4	> 64	1		
	<i>E. piscicida</i> - 3	32	0.12	> 16	64	1	4	> 64	1		
<i>E. piscicida</i> - 4	> 64	0.06	> 16	> 64	0.5	4	32	64			
<i>E. piscicida</i> - 5	32	2	> 16	32	0.25	4	64	> 64			

¹CAMHBT, cation-adjusted Mueller-Hinton broth with TES buffer.

*OXY, oxytetracycline; XNL, ceftiofur; FLUQ, flumequine; ENRO, enrofloxacin; NEO, neomycin; AMP, ampicillin; AUG2, amoxicillin/clavulanic acid; DOX, doxycycline; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; FIS, sulfisoxazole.; AZI, azithromycin; CIP, ciprofloxacin; CLI, clindamycin; ERY, erythromycin; FFN, florfenicol; GEN, gentamicin; NAL, nalidixic acid; TET, tetracycline.

2.3. *Vibrio* spp. 균주의 MIC panel 최적화 배양조건

Vibrio spp.는 1% NaCl을 첨가한 조건의 panel에서 bottom이 더 명확하게 나타났다. 염분이 첨가된 MHB와 CAMHBT 배지에서 육안으로는 명확한 차이가 없었으나, CLSI에서 권고한 사항인 최적의 양이온 비율로 조절된 CAMHBT 배지에 1% NaCl을 첨가하여 사용하는 것이 MIC 값 분석에 가장 적절한 것으로 확인되었다. 온도 설정 실험에서는 *V. scophthalmi* 균주가 35°C의 조건하에서 전혀 배양되지 않았으므로, 35°C는 *Vibrio* spp.의 배양조건에 적합하지 않은 것으로 판명되었다(Table 22, Table 24). 그러므로, *Vibrio* spp.는 1% NaCl을 첨가한 CAMHBT 배지를 이용하여 실험을 실시하고 28°C에서 panel을 배양하는 것으로 최적화 조건을 설정하였다. 최적화 조건에서 배양된 MIC panel에서 *V. parahaemolyticus* 균주는 tetracycline계열과 macrolid계열의 항생제에 높은 MIC 값을 가지는 것을 정확하게 확인할 수 있었다(Table 23).

Table 19. Results of MIC using MHB supplemented with 1% NaCl at 28°C for *Vibrio* spp.

Culture Condition	Bacteria	Antibiotics (KRAQ1 panel)										
		OXY	XNL	FLUQ	ENRO	NEO	AMP	AUG2	DOX	SXT	FIS	
MHB ¹ +1% NaCl 28°C	<i>V. alginolyticus</i> - 1	0.5	2	0.5	0.5	8	> 256	8/4	< 0.25	< 0.12/2.38	32	
	<i>V. anguillarum</i> - 2	< 0.25	< 0.03	< 0.12	< 0.03	8	16	16/8	< 0.25	< 0.12/2.38	32	
	<i>V. parahaemolyticus</i> - 3	64	0.5	2	0.25	8	2	8/4	8	< 0.12/2.38	1024	
	<i>V. scophthalmi</i> - 4	< 0.25	0.25	0.25	0.06	32	> 256	16/8	< 0.25	< 0.12/2.38	512	
	<i>V. harveyi</i> - 5	< 0.25	4	32	16	16	> 256	8/4	< 0.25	0.5/9.5	> 1024	
	Bacteria		Antibiotics (CAMPY2 panel)									
	AZI	CIP	CLI	ERY	FFN	GEN	NAL	TET				
	<i>V. alginolyticus</i> - 1	8	2	> 16	8	1	4	< 4	0.25			
	<i>V. anguillarum</i> - 2	4	< 0.015	8	8	0.5	4	< 4	0.12			
	<i>V. parahaemolyticus</i> - 3	32	0.12	> 16	> 64	8	2	< 4	16			
<i>V. scophthalmi</i> - 4	2	0.06	> 16	4	1	16	< 4	0.5				
<i>V. harveyi</i> - 5	16	32	> 16	16	1	16	> 64	0.5				

¹MHB, Mueller-Hinton broth.

*OXY, oxytetracycline; XNL, ceftiofur; FLUQ, flumequine; ENRO, enrofloxacin; NEO, neomycin; AMP, ampicillin; AUG2, amoxicillin/clavulanic acid; DOX, doxycycline; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; FIS, sulfisoxazole.; AZI, azithromycin; CIP, ciprofloxacin; CLI, clindamycin; ERY, erythromycin; FFN, florfenicol; GEN, gentamicin; NAL, nalidixic acid; TET, tetracycline.

Table 20. Results of MIC using CAMHBT at 22°C for *Vibrio* spp.

Culture Condition	Bacteria	Antibiotics (KRAQ1 panel)									
		OXY	XNL	FLUQ	ENRO	NEO	AMP	AUG2	DOX	SXT	FIS
CAMHBT ¹ 22°C	<i>V. alginolyticus</i> - 1	0.5	2	0.5	0.5	8	> 256	8/4	< 0.25	< 0.12/2.38	32
	<i>V. anguillarum</i> - 2	< 0.25	0.06	< 0.12	< 0.03	4	32	16/8	< 0.25	< 0.12/2.38	< 16
	<i>V. parahaemolyticus</i> - 3	64	1	2	0.5	4	32	4/2	8	< 0.12/2.38	1024
	<i>V. scophthalmi</i> - 4	0.5	0.5	0.5	0.12	8	> 256	32/16	< 0.25	< 0.12/2.38	1024
	<i>V. harveyi</i> - 5	1	4	64	16	8	> 256	8/4	< 0.25	0.25/4.75	> 1024
		Antibiotics (CAMPY2 panel)									
	Bacteria	AZI	CIP	CLI	ERY	FFN	GEN	NAL	TET		
	<i>V. alginolyticus</i> - 1	2	1	> 16	8	0.5	4	< 4	0.5		
	<i>V. anguillarum</i> - 2	1	< 0.015	8	4	0.25	2	< 4	0.12		
	<i>V. parahaemolyticus</i> - 3	8	0.12	> 16	64	8	4	8	16		
	<i>V. scophthalmi</i> - 4	2	0.06	> 16	8	0.25	4	< 4	0.5		
	<i>V. harveyi</i> - 5	4	16	> 16	8	1	4	> 64	1		

¹CAMHBT, cation-adjusted Mueller-Hinton broth with TES buffer.

*OXY, oxytetracycline; XNL, ceftiofur; FLUQ, flumequine; ENRO, enrofloxacin; NEO, neomycin; AMP, ampicillin; AUG2, amoxicillin/clavulanic acid; DOX, doxycycline; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; FIS, sulfisoxazole.; AZI, azithromycin; CIP, ciprofloxacin; CLI, clindamycin; ERY, erythromycin; FFN, florfenicol; GEN, gentamicin; NAL, nalidixic acid; TET, tetracycline.

Table 21. Results of MIC using CAMHBT at 28°C for *Vibrio* spp.

Culture Condition	Bacteria	Antibiotics (KRAQ1 panel)									
		OXY	XNL	FLUQ	ENRO	NEO	AMP	AUG2	DOX	SXT	FIS
CAMHBT ¹ 28°C	<i>V. alginolyticus</i> - 1	< 0.25	1	0.5	0.12	4	> 256	4/2	< 0.25	< 0.12/2.38	32
	<i>V. anguillarum</i> - 2	< 0.25	< 0.03	< 0.12	< 0.03	2	16	16/8	< 0.25	< 0.12/2.38	32
	<i>V. parahaemolyticus</i> - 3	128	0.25	4	0.5	2	8	32/16	16	< 0.12/2.38	1024
	<i>V. scophthalmi</i> - 4	0.5	0.12	0.25	0.06	2	> 256	8/4	< 0.25	< 0.12/2.38	512
	<i>V. harveyi</i> - 5	0.5	1	64	8	8	> 256	4/2	< 0.25	0.25/4.75	> 1024
		Antibiotics (CAMPY2 panel)									
		AZI	CIP	CLI	ERY	FFN	GEN	NAL	TET		
CAMHBT ¹ 28°C	<i>V. alginolyticus</i> - 1	1	0.5	> 16	4	0.5	2	< 4	0.5		
	<i>V. anguillarum</i> - 2	0.5	< 0.015	4	4	0.5	1	< 4	0.12		
	<i>V. parahaemolyticus</i> - 3	8	0.06	> 16	> 64	16	0.5	8	32		
	<i>V. scophthalmi</i> - 4	0.5	0.06	16	4	0.5	1	< 4	0.5		
	<i>V. harveyi</i> - 5	8	16	16	8	0.5	1	> 64	0.5		

¹CAMHBT, cation-adjusted Mueller-Hinton broth with TES buffer.

*OXY, oxytetracycline; XNL, ceftiofur; FLUQ, flumequine; ENRO, enrofloxacin; NEO, neomycin; AMP, ampicillin; AUG2, amoxicillin/clavulanic acid; DOX, doxycycline; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; FIS, sulfisoxazole.; AZI, azithromycin; CIP, ciprofloxacin; CLI, clindamycin; ERY, erythromycin; FFN, florfenicol; GEN, gentamicin; NAL, nalidixic acid; TET, tetracycline.

Table 22. Results of MIC using CAMHBT at 35°C for *Vibrio* spp.

Culture Condition	Bacteria	Antibiotics (KRAQ1 panel)									
		OXY	XNL	FLUQ	ENRO	NEO	AMP	AUG2	DOX	SXT	FIS
CAMHBT ¹ 35°C	<i>V. alginolyticus</i> - 1	< 0.25	1	0.25	0.12	2	> 256	4/2	< 0.25	< 0.12/2.38	32
	<i>V. anguillarum</i> - 2	< 0.25	< 0.03	< 0.12	< 0.03	1	4	4/2	< 0.25	< 0.12/2.38	32
	<i>V. parahaemolyticus</i> - 3	128	0.5	2	0.25	2	4	16/8	16	< 0.12/2.38	1024
	<i>V. scophthalmi</i> - 4	N/G ²	N/G	N/G	N/G	N/G	N/G	N/G	N/G	N/G	N/G
	<i>V. harveyi</i> - 5	0.5	1	128	8	2	> 256	2/1	< 0.25	0.25/4.75	> 1024
		Antibiotics (CAMPY2 panel)									
	Bacteria	AZI	CIP	CLI	ERY	FFN	GEN	NAL	TET		
	<i>V. alginolyticus</i> - 1	0.5	0.12	8	4	1	0.5	< 4	0.5		
	<i>V. anguillarum</i> - 2	0.25	< 0.015	4	4	0.25	0.5	< 4	0.25		
	<i>V. parahaemolyticus</i> - 3	16	0.12	> 16	> 64	16	1	8	64		
	<i>V. scophthalmi</i> - 4	N/G	N/G	N/G	N/G	N/G	N/G	N/G	N/G		
	<i>V. harveyi</i> - 5	4	16	> 16	16	2	16	> 64	1		

¹CAMHBT, cation-adjusted Mueller-Hinton broth with TES buffer.

²N/G, no growth.

*OXY, oxytetracycline; XNL, ceftiofur; FLUQ, flumequine; ENRO, enrofloxacin; NEO, neomycin; AMP, ampicillin; AUG2, amoxicillin/clavulanic acid; DOX, doxycycline; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; FIS, sulfisoxazole.; AZI, azithromycin; CIP, ciprofloxacin; CLI, clindamycin; ERY, erythromycin; FFN, florfenicol; GEN, gentamicin; NAL, nalidixic acid; TET, tetracycline.

Table 23. Results of MIC using CAMHBT supplemented with 1% NaCl at 28°C for *Vibrio* spp.

Culture Condition	Bacteria	Antibiotics (KRAQ1 panel)									
		OXY	XNL	FLUQ	ENRO	NEO	AMP	AUG2	DOX	SXT	FIS
CAMHBT ¹ +1% NaCl 28°C	<i>V. alginolyticus</i> - 1	0.5	2	0.5	0.5	8	> 256	8/4	< 0.25	< 0.12/2.38	32
	<i>V. anguillarum</i> - 2	< 0.25	< 0.03	< 0.12	< 0.03	8	16	16/8	< 0.25	< 0.12/2.38	32
	<i>V. parahaemolyticus</i> - 3	128	1	4	0.5	4	4	8/4	8	< 0.12/2.38	1024
	<i>V. scophthalmi</i> - 4	0.5	0.25	0.5	0.12	16	> 256	32/16	< 0.25	< 0.12/2.38	512
	<i>V. harveyi</i> - 5	0.5	2	128	16	8	> 256	16/8	< 0.25	0.25/4.75	> 1024
		Antibiotics (CAMPY2 panel)									
	Bacteria	AZI	CIP	CLI	ERY	FFN	GEN	NAL	TET		
	<i>V. alginolyticus</i> - 1	1	0.5	> 16	4	0.5	2	< 4	0.5		
	<i>V. anguillarum</i> - 2	1	< 0.015	4	4	0.5	2	< 4	0.25		
	<i>V. parahaemolyticus</i> - 3	16	0.06	> 16	> 64	16	2	8	32		
	<i>V. scophthalmi</i> - 4	2	0.06	> 16	8	1	8	< 4	1		
	<i>V. harveyi</i> - 5	8	16	> 16	16	1	4	> 64	1		

¹CAMHBT, cation-adjusted Mueller-Hinton broth with TES buffer.

*OXY, oxytetracycline; XNL, ceftiofur; FLUQ, flumequine; ENRO, enrofloxacin; NEO, neomycin; AMP, ampicillin; AUG2, amoxicillin/clavulanic acid; DOX, doxycycline; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; FIS, sulfisoxazole.; AZI, azithromycin; CIP, ciprofloxacin; CLI, clindamycin; ERY, erythromycin; FFN, florfenicol; GEN, gentamicin; NAL, nalidixic acid; TET, tetracycline.

Table 24. Results of MIC using CAMHBT supplemented with 1% NaCl at 35°C for *Vibrio* spp.

Culture Condition	Bacteria	Antibiotics (KRAQ1 panel)									
		OXY	XNL	FLUQ	ENRO	NEO	AMP	AUG2	DOX	SXT	FIS
CAMHBT ¹ +1% NaCl 35°C	<i>V. alginolyticus</i> - 1	0.5	1	0.5	0.25	4	> 256	8/4	< 0.25	< 0.12/2.38	64
	<i>V. anguillarum</i> - 2	< 0.25	< 0.03	< 0.12	< 0.03	2	8	8/4	< 0.25	< 0.12/2.38	32
	<i>V. parahaemolyticus</i> - 3	128	1	4	0.5	4	4	4/2	8	< 0.12/2.38	1024
	<i>V. scophthalmi</i> - 4	N/G ²	N/G	N/G	N/G	N/G	N/G	N/G	N/G	N/G	N/G
	<i>V. harveyi</i> - 5	0.5	2	128	16	8	> 256	8/4	< 0.25	0.25/4.75	> 1024
	Bacteria	Antibiotics (CAMPY2 panel)									
		AZI	CIP	CLI	ERY	FFN	GEN	NAL	TET		
	<i>V. alginolyticus</i> - 1	2	0.25	> 16	8	1	8	< 4	1		
	<i>V. anguillarum</i> - 2	0.5	< 0.015	8	8	0.5	1	< 4	0.25		
	<i>V. parahaemolyticus</i> - 3	32	0.12	> 16	> 64	8	2	8	32		
<i>V. scophthalmi</i> - 4	N/G	N/G	N/G	N/G	N/G	N/G	N/G	N/G			
<i>V. harveyi</i> - 5	4	16	> 16	16	2	16	> 64	1			

¹CAMHBT, cation-adjusted Mueller-Hinton broth with TES buffer.

²N/G, no growth.

*OXY, oxytetracycline; XNL, ceftiofur; FLUQ, flumequine; ENRO, enrofloxacin; NEO, neomycin; AMP, ampicillin; AUG2, amoxicillin/clavulanic acid; DOX, doxycycline; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; FIS, sulfisoxazole.; AZI, azithromycin; CIP, ciprofloxacin; CLI, clindamycin; ERY, erythromycin; FFN, florfenicol; GEN, gentamicin; NAL, nalidixic acid; TET, tetracycline.

2.4. *Aeromonas* spp. 균주의 MIC panel 최적화 배양조건

Aeromonas spp.는 6가지 조건을 달리하여 실험을 실시하였으며(Table 25~Table 30), 모든 조건에서 유사한 MIC 값을 나타내었지만, *A. sobria*는 35℃에서 배양한 panel에서는 세균이 배양되지 않았다(Table 28, Table 30). 그러므로, 35℃의 배양조건을 제외시켰으며, 1% NaCl 첨가 유무와 22℃, 28℃의 조건에서 측정된 MIC 값을 비교한 결과, 1% NaCl이 첨가된 결과에서는 특정 항생제에 상이한 값이 확인되는 경우도 있었으며, 22℃에 배양한 panel은 세균의 탁도가 명확하지 않아 적절한 조건이 아닌 것으로 확인되었다. CAMHB T 배지에서 28℃에서 배양된 MIC 결과를 확인하였을 때, *A. caviae* 균주와 *A. hydrophila* 균주는 나머지 *Aeromonas* spp. 3균주보다 tetracycline계열, fluoroquinolone계열, sulfonamide계열 그리고 macrolide계열의 항생제에 높은 내성 수준을 확인할 수 있었다(Table 27).

Table 25. Results of MIC using MHB supplemented with 1% NaCl at 28°C for *Aeromonas* spp.

Culture Condition	Bacteria	Antibiotics (KRAQ1 panel)										
		OXY	XNL	FLUQ	ENRO	NEO	AMP	AUG2	DOX	SXT	FIS	
MHB ¹ +1% NaCl 28°C	<i>A. caviae</i> - 1	256	8	> 128	> 32	32	> 256	16/8	32	> 16/304	> 1024	
	<i>A. hydrophila</i> - 2	256	8	> 128	16	> 64	> 256	16/8	32	> 16/304	> 1024	
	<i>A. sobria</i> - 3	8	0.25	0.5	0.12	2	16	4/2	< 0.25	< 0.12/2.38	< 16	
	<i>A. veronii</i> - 4	64	1	1	0.25	8	> 256	8/4	4	< 0.12/2.38	> 1024	
	<i>A. salmonicida</i> - 5	< 0.25	2	< 0.12	< 0.03	4	> 256	16/8	< 0.25	< 0.12/2.38	< 16	
	Bacteria		Antibiotics (CAMPY2 panel)									
			AZI	CIP	CLI	ERY	FFN	GEN	NAL	TET		
		<i>A. caviae</i> - 1	32	> 64	> 16	64	> 64	2	> 64	> 64		
		<i>A. hydrophila</i> - 2	> 64	32	> 16	> 64	> 64	1	> 64	> 64		
		<i>A. sobria</i> - 3	0.5	0.06	> 16	1	0.25	1	32	2		
	<i>A. veronii</i> - 4	2	0.12	> 16	8	0.25	4	> 64	16			
	<i>A. salmonicida</i> - 5	8	< 0.015	> 16	32	0.5	8	< 4	0.12			

¹MHB, Mueller-Hinton broth.

*OXY, oxytetracycline; XNL, ceftiofur; FLUQ, flumequine; ENRO, enrofloxacin; NEO, neomycin; AMP, ampicillin; AUG2, amoxicillin/clavulanic acid; DOX, doxycycline; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; FIS, sulfisoxazole.; AZI, azithromycin; CIP, ciprofloxacin; CLI, clindamycin; ERY, erythromycin; FFN, florfenicol; GEN, gentamicin; NAL, nalidixic acid; TET, tetracycline.

Table 26. Results of MIC using CAMHBT at 22°C for *Aeromonas* spp.

Culture Condition	Bacteria	Antibiotics (KRAQ1 panel)										
		OXY	XNL	FLUQ	ENRO	NEO	AMP	AUG2	DOX	SXT	FIS	
CAMHBT ¹ 22°C	<i>A. caviae</i> - 1	> 256	8	> 128	32	8	> 256	16/8	> 64	> 16/304	> 1024	
	<i>A. hydrophila</i> - 2	> 256	8	> 128	32	8	> 256	16/8	> 64	> 16/304	> 1024	
	<i>A. sobria</i> - 3	16	0.25	0.5	0.12	2	> 256	4/2	0.5	< 0.12/2.38	< 16	
	<i>A. veronii</i> - 4	64	0.5	1	0.25	4	> 256	8/4	4	< 0.12/2.38	> 1024	
	<i>A. salmonicida</i> - 5	< 0.25	1	< 0.12	< 0.03	8	> 256	8/4	< 0.25	< 0.12/2.38	1024	
	Bacteria		Antibiotics (CAMPY2 panel)									
	AZI	CIP	CLI	ERY	FFN	GEN	NAL	TET				
	<i>A. caviae</i> - 1	> 64	64	> 16	> 64	> 64	0.5	> 64	> 64			
	<i>A. hydrophila</i> - 2	> 64	64	> 16	> 64	> 64	0.5	> 64	> 64			
	<i>A. sobria</i> - 3	0.25	0.06	> 16	1	0.25	1	32	8			
<i>A. veronii</i> - 4	1	0.12	> 16	4	0.25	1	64	16				
<i>A. salmonicida</i> - 5	4	< 0.015	> 16	16	0.5	4	< 4	0.12				

¹CAMHBT, cation-adjusted Mueller-Hinton broth with TES buffer.

*OXY, oxytetracycline; XNL, ceftiofur; FLUQ, flumequine; ENRO, enrofloxacin; NEO, neomycin; AMP, ampicillin; AUG2, amoxicillin/clavulanic acid; DOX, doxycycline; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; FIS, sulfisoxazole.; AZI, azithromycin; CIP, ciprofloxacin; CLI, clindamycin; ERY, erythromycin; FFN, florfenicol; GEN, gentamicin; NAL, nalidixic acid; TET, tetracycline.

Table 27. Results of MIC using CAMHBT at 28°C for *Aeromonas* spp.

Culture Condition	Bacteria	Antibiotics (KRAQ1 panel)									
		OXY	XNL	FLUQ	ENRO	NEO	AMP	AUG2	DOX	SXT	FIS
CAMHBT ¹ 28°C	<i>A. caviae</i> - 1	256	16	> 128	> 32	16	> 256	32/16	32	> 16/304	> 1024
	<i>A. hydrophila</i> - 2	256	16	> 128	32	16	> 256	32/16	> 64	> 16/304	> 1024
	<i>A. sobria</i> - 3	16	0.25	0.5	0.12	2	128	8/4	1	< 0.12/2.38	< 16
	<i>A. veronii</i> - 4	64	1	0.25	0.25	4	> 256	16/8	8	< 0.12/2.38	> 1024
	<i>A. salmonicida</i> - 5	< 0.25	4	< 0.12	< 0.03	4	> 256	16/8	< 0.25	< 0.12/2.38	< 16
		Antibiotics (CAMPY2 panel)									
	Bacteria	AZI	CIP	CLI	ERY	FFN	GEN	NAL	TET		
	<i>A. caviae</i> - 1	16	> 64	> 16	64	> 64	1	> 64	> 64		
	<i>A. hydrophila</i> - 2	> 64	32	> 16	> 64	> 64	1	> 64	> 64		
	<i>A. sobria</i> - 3	0.5	0.06	> 16	1	0.25	0.5	32	8		
	<i>A. veronii</i> - 4	2	0.12	> 16	8	0.5	1	> 64	16		
	<i>A. salmonicida</i> - 5	4	< 0.015	> 16	16	0.5	2	< 4	0.25		

¹CAMHBT, cation-adjusted Mueller-Hinton broth with TES buffer.

*OXY, oxytetracycline; XNL, ceftiofur; FLUQ, flumequine; ENRO, enrofloxacin; NEO, neomycin; AMP, ampicillin; AUG2, amoxicillin/clavulanic acid; DOX, doxycycline; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; FIS, sulfisoxazole.; AZI, azithromycin; CIP, ciprofloxacin; CLI, clindamycin; ERY, erythromycin; FFN, florfenicol; GEN, gentamicin; NAL, nalidixic acid; TET, tetracycline.

Table 28. Results of MIC using CAMHBT at 35°C for *Aeromonas* spp.

Culture Condition	Bacteria	Antibiotics (KRAQ1 panel)										
		OXY	XNL	FLUQ	ENRO	NEO	AMP	AUG2	DOX	SXT	FIS	
CAMHBT ¹ 35°C	<i>A. caviae</i> - 1	256	16	> 128	> 32	8	> 256	16/8	32	> 16/304	> 1024	
	<i>A. hydrophila</i> - 2	256	8	> 128	32	16	> 256	32/16	64	> 16/304	> 1024	
	<i>A. sobria</i> - 3	N/G ²	N/G	N/G	N/G	N/G	N/G	N/G	N/G	N/G	N/G	
	<i>A. veronii</i> - 4	64	1	4	0.25	4	> 256	16/8	8	< 0.12/2.38	> 1024	
	<i>A. salmonicida</i> - 5	0.5	2	< 0.12	< 0.03	2	> 256	32/16	0.5	0.25/4.75	32	
	Bacteria		Antibiotics (CAMPY2 panel)									
	AZI	CIP	CLI	ERY	FFN	GEN	NAL	TET				
	<i>A. caviae</i> - 1	16	> 64	> 16	64	> 64	1	> 64	> 64			
	<i>A. hydrophila</i> - 2	> 64	64	> 16	> 64	> 64	0.5	> 64	> 64			
	<i>A. sobria</i> - 3	N/G	N/G	N/G	N/G	N/G	N/G	N/G	N/G			
<i>A. veronii</i> - 4	2	0.25	> 16	8	0.5	1	> 64	32				
<i>A. salmonicida</i> - 5	2	< 0.015	> 16	16	0.5	1	< 4	0.5				

¹CAMHBT, cation-adjusted Mueller-Hinton broth with TES buffer.

²N/G, no growth.

*OXY, oxytetracycline; XNL, ceftiofur; FLUQ, flumequine; ENRO, enrofloxacin; NEO, neomycin; AMP, ampicillin; AUG2, amoxicillin/clavulanic acid; DOX, doxycycline; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; FIS, sulfisoxazole.; AZI, azithromycin; CIP, ciprofloxacin; CLI, clindamycin; ERY, erythromycin; FFN, florfenicol; GEN, gentamicin; NAL, nalidixic acid; TET, tetracycline.

Table 29. Results of MIC using CAMHBT supplemented with 1% NaCl at 28°C for *Aeromonas* spp.

Culture Condition	Bacteria	Antibiotics (KRAQ1 panel)										
		OXY	XNL	FLUQ	ENRO	NEO	AMP	AUG2	DOX	SXT	FIS	
CAMHBT ¹ +1% NaCl 28°C	<i>A. caviae</i> - 1	256	8	> 128	> 32	32	> 256	16/8	32	> 16/304	> 1024	
	<i>A. hydrophila</i> - 2	256	8	> 128	32	64	> 256	16/8	64	> 16/304	> 1024	
	<i>A. sobria</i> - 3	8	0.25	0.5	0.12	2	32	4/2	0.5	< 0.12/2.38	< 16	
	<i>A. veronii</i> - 4	32	1	1	0.25	8	> 256	16/8	8	< 0.12/2.38	> 1024	
	<i>A. salmonicida</i> - 5	< 0.25	2	< 0.12	< 0.03	8	> 256	16/8	< 0.25	< 0.12/2.38	< 16	
	Bacteria		Antibiotics (CAMPY2 panel)									
			AZI	CIP	CLI	ERY	FFN	GEN	NAL	TET		
		<i>A. caviae</i> - 1	32	> 64	> 16	> 64	> 64	2	> 64	> 64		
		<i>A. hydrophila</i> - 2	> 64	64	> 16	> 64	> 64	2	> 64	> 64		
		<i>A. sobria</i> - 3	0.5	0.06	> 16	1	0.25	1	64	4		
	<i>A. veronii</i> - 4	4	0.12	> 16	8	0.25	4	> 64	16			
	<i>A. salmonicida</i> - 5	8	< 0.015	> 16	32	0.5	4	< 4	0.25			

¹CAMHBT, cation-adjusted Mueller-Hinton broth with TES buffer.

*OXY, oxytetracycline; XNL, ceftiofur; FLUQ, flumequine; ENRO, enrofloxacin; NEO, neomycin; AMP, ampicillin; AUG2, amoxicillin/clavulanic acid; DOX, doxycycline; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; FIS, sulfisoxazole.; AZI, azithromycin; CIP, ciprofloxacin; CLI, clindamycin; ERY, erythromycin; FFN, florfenicol; GEN, gentamicin; NAL, nalidixic acid; TET, tetracycline.

Table 30. Results of MIC using CAMHBT supplemented with 1% NaCl at 35°C for *Aeromonas* spp.

Culture Condition	Bacteria	Antibiotics (KRAQ1 panel)										
		OXY	XNL	FLUQ	ENRO	NEO	AMP	AUG2	DOX	SXT	FIS	
CAMHBT ¹ +1% NaCl 35°C	<i>A. caviae</i> - 1	256	8	> 128	> 32	64	> 256	32/16	32	> 16/304	> 1024	
	<i>A. hydrophila</i> - 2	256	4	> 128	> 32	> 64	> 256	16/8	16	> 16/304	> 1024	
	<i>A. sobria</i> - 3	N/G ²	N/G	N/G	N/G	N/G	N/G	N/G	N/G	N/G	N/G	
	<i>A. veronii</i> - 4	64	1	2	0.5	16	> 256	16/8	4	< 0.12/2.38	> 1024	
	<i>A. salmonicida</i> - 5	< 0.25	2	< 0.12	< 0.03	4	> 256	32/16	0.5	0.25/4.75	32	
	Bacteria		Antibiotics (CAMPY2 panel)									
			AZI	CIP	CLI	ERY	FFN	GEN	NAL	TET		
		<i>A. caviae</i> - 1	64	64	> 16	> 64	> 64	2	> 64	> 64		
		<i>A. hydrophila</i> - 2	> 64	32	> 16	> 64	> 64	4	> 64	> 64		
		<i>A. sobria</i> - 3	N/G	N/G	N/G	N/G	N/G	N/G	N/G	N/G		
	<i>A. veronii</i> - 4	4	0.12	> 16	16	0.5	4	> 64	32			
	<i>A. salmonicida</i> - 5	4	< 0.015	> 16	16	0.5	4	< 4	0.25			

¹CAMHBT, cation-adjusted Mueller-Hinton broth with TES buffer.

²N/G, no growth.

*OXY, oxytetracycline; XNL, ceftiofur; FLUQ, flumequine; ENRO, enrofloxacin; NEO, neomycin; AMP, ampicillin; AUG2, amoxicillin/clavulanic acid; DOX, doxycycline; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; FIS, sulfisoxazole.; AZI, azithromycin; CIP, ciprofloxacin; CLI, clindamycin; ERY, erythromycin; FFN, florfenicol; GEN, gentamicin; NAL, nalidixic acid; TET, tetracycline.

2.5. *Pseudomonas* spp. 균주의 MIC panel 최적화 배양조건

Pseudomonas spp. 균주는 온도 설정 조건에 대해서만 실험을 진행하였으며(Table 31~Table 33), 22℃, 28℃ 및 35℃ 모두에서 유사한 값을 확인할 수 있었으나 가장 명확한 bottom을 나타낸 것은 28℃에서 배양한 panel이었다. *Pseudomonas* spp. 균주의 최적화된 조건을 적용하여 배양된 panel에서 정확한 MIC 값을 확인할 수 있었으며, tetracycline계열, fluoroquinolone계열, aminoglycoside계열의 항생제에서만 감수성을 가졌고, 나머지 항생제 계열에 대해서는 내성을 나타내는 것을 신속하게 확인할 수 있었다(Table 32).

이와 같은 결과를 바탕으로 *E. piscicida*, *Aeromonas* spp. 그리고 *Pseudomonas* spp.는 CAMHBT 배지를 이용하여 28℃에서 배양하는 것으로 최적화 조건을 설정하였다(Table 34).

Table 31. Results of MIC using CAMHBT at 22°C for *Pseudomonas* spp.

Culture Condition	Bacteria	Antibiotics (KRAQ1 panel)									
		OXY	XNL	FLUQ	ENRO	NEO	AMP	AUG2	DOX	SXT	FIS
CAMHBT ¹ 22°C	<i>P. plecoglossicida</i> - 1	4	16	16	1	1	256	128/64	2	16/304	> 1024
	<i>P. monteilii</i> - 2	4	32	8	1	1	256	64/32	2	16/304	> 1024
	<i>P. fluorescens</i> - 3	0.5	64	8	0.5	< 0.5	> 256	> 256/128	0.5	1/19	128
	<i>P. protegens</i> - 4	8	32	16	1	1	> 256	256/128	4	4/76	512
	<i>P. putida</i> - 5	4	64	16	1	1	256	128/64	4	16/304	> 1024
CAMHBT ¹ 22°C	Bacteria	Antibiotics (CAMPY2 panel)									
		AZI	CIP	CLI	ERY	FFN	GEN	NAL	TET		
CAMHBT ¹ 22°C	<i>P. plecoglossicida</i> - 1	> 64	0.06	> 16	> 64	> 64	0.5	32	8		
	<i>P. monteilii</i> - 2	> 64	0.25	> 16	> 64	> 64	1	32	4		
	<i>P. fluorescens</i> - 3	> 64	0.12	> 16	> 64	64	< 0.12	16	2		
	<i>P. protegens</i> - 4	> 64	0.25	> 16	> 64	> 64	0.25	32	8		
	<i>P. putida</i> - 5	> 64	0.12	> 16	> 64	> 64	1	16	4		

¹CAMHBT, cation-adjusted Mueller-Hinton broth with TES buffer.

*OXY, oxytetracycline; XNL, ceftiofur; FLUQ, flumequine; ENRO, enrofloxacin; NEO, neomycin; AMP, ampicillin; AUG2, amoxicillin/clavulanic acid; DOX, doxycycline; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; FIS, sulfisoxazole.; AZI, azithromycin; CIP, ciprofloxacin; CLI, clindamycin; ERY, erythromycin; FFN, florfenicol; GEN, gentamicin; NAL, nalidixic acid; TET, tetracycline.

Table 32. Results of MIC using CAMHBT at 28°C for *Pseudomonas* spp.

Culture Condition	Bacteria	Antibiotics (KRAQ1 panel)									
		OXY	XNL	FLUQ	ENRO	NEO	AMP	AUG2	DOX	SXT	FIS
CAMHBT ¹ 28°C	<i>P. plecoglossicida</i> - 1	4	32	16	0.5	1	> 256	64/32	2	16/304	> 1024
	<i>P. monteilii</i> - 2	4	32	8	1	1	256	64/32	2	16/304	> 1024
	<i>P. fluorescens</i> - 3	1	64	8	0.5	1	> 256	> 256/128	1	8/152	1024
	<i>P. protegens</i> - 4	4	64	8	1	2	> 256	256/128	4	8/152	1024
	<i>P. putida</i> - 5	2	32	8	2	2	256	64/32	1	16/304	> 1024
		Antibiotics (CAMPY2 panel)									
	Bacteria	AZI	CIP	CLI	ERY	FFN	GEN	NAL	TET		
	<i>P. plecoglossicida</i> - 1	> 64	0.12	> 16	> 64	> 64	0.5	32	4		
	<i>P. monteilii</i> - 2	> 64	0.25	> 16	> 64	> 64	1	32	4		
	<i>P. fluorescens</i> - 3	> 64	0.12	16	> 64	64	0.25	16	2		
	<i>P. protegens</i> - 4	> 64	0.12	> 16	> 64	> 64	0.5	32	8		
	<i>P. putida</i> - 5	> 64	0.12	> 16	> 64	> 64	1	16	4		

¹CAMHBT, cation-adjusted Mueller-Hinton broth with TES buffer.

*OXY, oxytetracycline; XNL, ceftiofur; FLUQ, flumequine; ENRO, enrofloxacin; NEO, neomycin; AMP, ampicillin; AUG2, amoxicillin/clavulanic acid; DOX, doxycycline; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; FIS, sulfisoxazole.; AZI, azithromycin; CIP, ciprofloxacin; CLI, clindamycin; ERY, erythromycin; FFN, florfenicol; GEN, gentamicin; NAL, nalidixic acid; TET, tetracycline.

Table 33. Results of MIC using CAMHBT at 35°C for *Pseudomonas* spp.

Culture Condition	Bacteria	Antibiotics (KRAQ1 panel)										
		OXY	XNL	FLUQ	ENRO	NEO	AMP	AUG2	DOX	SXT	FIS	
CAMHBT ¹ 35°C	<i>P. plecoglossicida</i> - 1	4	16	8	0.5	< 0.5	256	64/32	2	16/304	> 1024	
	<i>P. monteilii</i> - 2	2	32	8	0.5	1	256	64/32	2	16/304	1024	
	<i>P. fluorescens</i> - 3	0.5	64	8	0.25	< 0.5	> 256	> 256/128	0.5	2/38	1024	
	<i>P. protegens</i> - 4	4	32	16	1	1	> 256	256/128	4	4/76	512	
	<i>P. putida</i> - 5	2	32	8	0.5	1	256	64/32	1	16/304	> 1024	
	Bacteria		Antibiotics (CAMPY2 panel)									
	AZI	CIP	CLI	ERY	FFN	GEN	NAL	TET				
	<i>P. plecoglossicida</i> - 1	> 64	0.12	> 16	> 64	> 64	0.5	32	4			
	<i>P. monteilii</i> - 2	> 64	0.25	> 16	> 64	> 64	1	32	4			
	<i>P. fluorescens</i> - 3	> 64	0.06	> 16	> 64	32	< 0.12	16	1			
<i>P. protegens</i> - 4	> 64	0.25	> 16	> 64	> 64	0.25	32	4				
<i>P. putida</i> - 5	> 64	0.12	> 16	> 64	> 64	1	32	2				

¹CAMHBT, cation-adjusted Mueller-Hinton broth with TES buffer.

*OXY, oxytetracycline; XNL, ceftiofur; FLUQ, flumequine; ENRO, enrofloxacin; NEO, neomycin; AMP, ampicillin; AUG2, amoxicillin/clavulanic acid; DOX, doxycycline; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; FIS, sulfisoxazole.; AZI, azithromycin; CIP, ciprofloxacin; CLI, clindamycin; ERY, erythromycin; FFN, florfenicol; GEN, gentamicin; NAL, nalidixic acid; TET, tetracycline.

Table 34. Optimized culture conditions of MIC panel for representative bacterial species

Species	Culture conditions	Culture temperature
<i>Streptococcus</i> spp.	CAMHBT ¹ +5% LHB ²	28℃
<i>Edwardsiella piscicida</i>	CAMHBT	28℃
<i>Vibrio</i> spp.	CAMHBT+1% NaCl	28℃
<i>Aeromonas</i> spp.	CAMHBT	28℃
<i>Pseudomonas</i> spp.	CAMHBT	28℃

¹CAMHBT, cation-adjusted Mueller-Hinton broth with TES buffer.

²LHB, Lysed horse blood.

* Incubation time, 24h.

IV. 고찰

수산업에서는 양식현장에서 연중 발생하는 연쇄구균병, 에드워드병, 비브리오병 등과 같은 세균성 질병에 의한 피해를 막고 생산성 향상을 위한 수단으로서 항생제를 사용한다. 현재 국내에서 승인된 수산용 항생·항균물질은 36종으로 다양한 항생제를 양식장에서 사용하고 있으며(NIFS, 2018), 제주지역에서의 수산용 항생제 사용량은 2012년도에는 35톤이었지만 2015년도에는 48톤으로 약 13톤 증가하였다(Kim et al., 2019). 이와 같이 수산생물의 생산량 증가와 함께 질병 발생이 증가하면서 항생제의 사용량도 매년 증가하고 있는 추세이다. 의약품의 사용량이 증가함에 따라 오남용으로 인한 위험성이 고조되고 있으나(Son et al., 2009; Yoon et al., 2012; Romero et al., 2012) 즉시 항생제의 사용을 줄이는 것은 불가능하기 때문에 현재로서는 유효 항생제를 용법과 용량에 맞도록 사용하는 것이 최선의 방법이다. 따라서 양식현장에서 광범위 항생제를 경험적으로 투여하는 대신, 질병의 원인 세균을 정확하게 동정하고 신속한 항생제 감수성 검사를 통하여 해당 균에 효과가 검증된 항생제를 효율적으로 투여해야한다.

이전의 연구에 사용했던 항생제 감수성 검사 중 disk diffusion test의 방법은 broth microdilution test 방법에 비하여 저렴한 비용과 많은 항생제 수의 결과가 간편하게 도출된다. 하지만 정량적인 해석이 불가능하고 명확하지 않은 저지대를 육안으로 판독하는데 검사자간의 주관적인 판단이 개입되는 단점이 있다. Disk diffusion test로는 검사할 수 없는 배양조건이 까다로운 세균의 감수성 결과를 정밀하게 얻을 수 있는 broth microdilution test의 방법은 단계별로 희석한 항생제와 균 배양액을 96 well plate에 넣고 배양한 후 균의 증식 여부에 따른 액체배지의 혼탁도를 육안으로 확인하여 균이 자라지 않는 최소농도를 MIC 값으로 판독한다. Broth microdilution test 방법은 정확한 최소억제농도를 얻을 수 있지만 다양한 항생제를 직접 단계희석하여 농도별로 96 well plate에 넣어야 하는 번거로움이 있으며, 실험균의 탁도를 맞출 때 분광광도계를 이용하기 때문에 실험의 준비 과정이 복잡하다는 단점이 있다. MIC panel을 사용한 broth

microdilution test 방법은 항생제가 coating되어 나오는 제품이기 때문에 별도의 항생제 준비과정 없이 균 배양액을 바로 plate에 접종할 수 있다. 이로 인해 항생제 감수성 검사 시간을 단축시킬 수 있을 뿐만 아니라, 연구자에 의한 분석 절차를 줄여서 실험적 오류를 최소화시킬 수 있다. 이와 같이 MIC panel은 신속하고 정확한 결과를 제공할 수 있으므로, 양식현장에 더욱 효율적인 분석 방법이 될 수 있을 것이다.

현재로서는 어병세균에 대한 정확한 배양조건에 대한 정보가 부족한 실정이며, 본 연구에서는 최대한 많은 세균에 동일한 조건이 적용될 수 있는 범위에서 실험을 진행하여 조건이 설정된 후에도 실험이 간편하게 진행될 수 있도록 최적화된 배양조건을 확립하고자 하였다. *Streptococcus* spp.는 5% LHB를 첨가한 CAMHBT 배지, *Vibrio* spp.는 1% NaCl을 첨가한 CAMHBT 배지, *E. piscicida*, *Aeromonas* spp. 그리고 *Pseudomonas* spp.는 CAMHBT 배지를 이용하여 KRAQ1 panel과 CAMPY2 panel에 접종하고 28℃에서 24시간 배양하여 결과를 확인하는 것으로 최적화 조건을 설정하였다. 이와 같이 용혈성 *Streptococcus* spp. 균주와 염분에 민감한 *Vibrio* spp. 균주를 제외하고는 모두 아무것도 첨가되지 않은 CAMHBT 배지에서 배양하는 것을 최적화된 조건으로 설정함에 따라서 양식현장에서는 더욱 간편하고 신속한 검사가 가능해질 것으로 판단된다. 또한 CLSI 가이드라인(CLSI, 2014b)의 배양조건인 22℃와 28℃ 중에서 본 연구에서는 28℃로 조건을 세부화 하였고, 다양한 균주의 배양온도를 모두 통일하여 양식현장에서 더욱 효율적인 검사가 가능하도록 하였다.

본 연구를 통하여 확립한 배양조건을 검증하기 위하여, MIC panel의 실험에 사용한 균주 중 *S. parauberis* 3균주와 *E. piscicida* 3균주를 disk diffusion test로 실험을 실시한 후 비교 분석하였다. 그 결과, 균의 농도를 정확하게 맞추어 실험이 진행되는 MIC panel과 비교하여 disk diffusion test 방법은 세균의 종류에 따라 균이 평판배지에서 성장하는 속도가 다르게 나타나 정확한 저지대를 측정할 수 없었기 때문에 검사자간의 판독 결과가 다른 경우가 있었다(data not shown). 반면에 MIC panel을 사용한 분석에서는 결과를 명확하게 확인할 수 있었고 다른 조건에 영향을 받지 않는 것으로 나타났다.

인체나 가축에 질병을 일으키는 세균의 항생제에 대한 감수성과 내성을 구분할

수 있는 해석기준(interpretive criteria)에 관한 연구들은 많이 이루어졌으나, 어류의 세균에 관한 내성 판단을 위한 표준화 작업은 부족한 실정이다. 예를 들어 현재 많은 관련 실험실에서 참고하는 국제 프로토콜인 CLSI 가이드라인 중 VET03/VET04-S2 (CLSI, 2014b)는 어병세균용으로 마련된 국제 표준 방법인데도 불구하고 *A. salmonicida* 한 종에 대해서만 해석기준이 마련되어 있다. 최근 국내에서 수산용 항생제에 대한 내성 기준과 매뉴얼에 대한 연구가 진행되고 있지만(Chun et al., 2019; NIFS, 2017), 다양한 어병세균을 대상으로 실험이 이루어져 있지 않기 때문에 세균성 질병 발생 시 초기 치료로 적절한 유효 항생제 선택에 어려움이 많다. 이러한 세균종별 항생제 해석기준의 부재로 인하여 내성이 증가되고, 내성균에 의한 치료 실패가 중요한 임상적 문제로서 대두됨에 따라 수산용 항생제에 대한 내성 판정 기준을 명확히 설정할 필요가 있다. 또한 세균성 질병의 치료를 위한 항생제 선정과 항생제 내성 연구를 위해 동일한 방법의 검사가 필요하며, 다양한 검사 능력을 갖고 있는 검사자 혹은 연구자가 쉽게 이해하고 실행할 수 있는 검사법의 설정이 필요하기 때문에 본 연구에서의 항생제 panel을 이용한 액체 배지 희석법은 항생제 내성 검사를 위한 표준화된 방법으로 제시될 수 있다. 본 연구에서 확립한 최적화된 조건을 사용하여 많은 균주를 대상으로 신속하고 정확한 MIC 값을 분석하고 내성균에 대한 정보를 축적함으로써, 향후 수산생물 병원성 세균에 대한 항생제 내성 판정을 위한 기준 설정이 가능할 것으로 판단된다.

V. 요약

국내의 항생제 사용과 관련하여 인체와 축산의 경우는 질병관리본부, 식품의약품안전처, 농림축산검역본부 등 여러 연구기관에서 체계적으로 연구가 진행되어 왔다. 최근 국내의 수산분야에서 수산용 항생제에 대한 내성 기준과 매뉴얼에 대한 연구가 진행되고 있지만, 다양한 어병세균을 대상으로 한 항생제 사용과 내성 판단을 위한 표준화 작업은 연구가 부족한 실정이다. 특히, 양식생물의 질병 원인을 분석함과 동시에 신속하게 항생제 감수성과 내성을 구분할 수 있는 표준화된 방법이 필요하다. 이에 본 연구에서는 항생제가 농도별로 coating되어 있어 검사 시간을 단축할 수 있는 MIC panel(KRAQ1, CAMPY2)을 사용하여, 어류에서 분리되는 대표적인 병원성 세균 5종(*Streptococcus* spp., *Edwardsiella piscicida*, *Vibrio* spp., *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp.)의 최적화된 배양조건을 확립하고자 하였다. *Streptococcus* spp.의 경우, CLSI에서 제시한 기준에 따라 5%의 lysed horse blood (LHB)가 첨가된 CAMHBT 배지와 1% NaCl의 첨가 유무를 다르게 하여 실험을 진행하였고, MHB 배지에서 배양했을 때 MIC 값의 차이점을 확인하고자 하였다. *E. piscicida*, *Vibrio* spp. 그리고 *Aeromonas* spp.는 CAMHBT 배지, 1% NaCl이 첨가된 CAMHBT 배지 그리고 1% NaCl이 첨가된 MHB에서 배양하였다. *Pseudomonas* spp.의 경우는 CAMHBT 배지에서 온도의 조건을 CLSI 가이드라인에서 권장하는 22℃, 28℃와(CLSI, 2006; CLSI, 2014a) 인체 유래 세균의 배양온도인 35℃로 나누어 실험을 진행하였다.

Streptococcus spp.를 배양하기 위한 최적의 조건은 국제규범인 Clinical Laboratory Standards Institute(CLSI)의 권고사항이기도 한 5% lysed horse blood(LHB)가 첨가된 cation-adjusted Mueller-Hinton broth with TES buffer(CAMHBT)를 28℃의 온도에서 배양하는 것으로 설정하였다. 염분에 민감한 *Vibrio* spp.의 경우, 1% NaCl이 첨가된 CAMHBT 배지를 이용하여 28℃에서 panel을 배양하는 것으로 최적화 조건을 수립하였으며, *E. piscicida*, *Aeromonas* spp, *Pseudomonas* spp.의 MIC 값을 확인하기 위한 배양조건은

CAMHBT 배지를 이용하여 28℃의 온도가 적합한 것으로 확인하였다. 이와 같이 설정된 조건들은 용혈성 *Streptococcus* spp. 균주와 염분에 민감한 *Vibrio* spp. 균주를 제외하고는 모두 아무것도 첨가되지 않은 CAMHBT 배지에서 배양하는 것을 최적화된 배양조건으로 설정하였고, 다양한 균주 모두 28℃로 배양온도를 통일하였기 때문에 양식현장에서는 더욱 간편하고 신속한 검사가 가능해질 것으로 판단된다. 또한 본 연구에서 확립된 조건으로 새로 분리되는 균주의 MIC 값을 분석한 후, 그 결과를 지속적으로 축적하면 향후 수생동물 병원성 세균에 대한 항생제 내성을 판정하는 기준이 설정될 것으로 사료된다.

VI. 참고 문헌

- Chun WK, Lee YH, Kim YJ, Roh HJ, Kim AR, Kim NE, Seo JS, Kwon M G, Lee JH and Kim DH. 2019. Epidemiological cut-off values generated for disc diffusion data from *Streptococcus parauberis*. Korean J Fish Aquat Sci 52, 382–388. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2019.0382>.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2006. Method for antimicrobial disk susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals. CLSI document M42–A. CLSI, Wayne, PA, U.S.A.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2014a. Methods for broth dilution susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals. CLSI document VET04–A2. CLSI, Wayne, PA, U.S.A.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2014b. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals; Second informational supplement. CLSI document VET03/ VET04–S2. CLSI, Wayne, PA, U.S.A.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2020. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; thirtieth informational supplement. CLSI document M100–ED30. CLSI, Wayne, PA, U.S.A.
- Demircan D and Candan A. 2006. Identification of *Vibrio anguillarum* by PCR (*rpoN* Gene) associated with Vibriosis in marine fish in Turkey. Turk J Vet Anim Sci 30, 305–310.
- EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)

web site. 2020. Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method, Version 8.0. Retrieved from http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2020_manuals/Manual_v_8.0_EUCAST_Disk_Test_2020.pdf.

Gaskins HR, Collier CT and Anderson DB. 2002. Antibiotics as growth promotants. *Animal Biotechnology* 13, 29– 42. <https://doi.org/10.1081/abio-120005768>.

Griffin MJ, Ware C, Quiniou SM, Steadman JM, Gaunt PS, Khoo LH and Soto E. 2014. *Edwardsiella piscicida* identified in the southeastern USA by *gyrB* sequence, species-specific and repetitive sequence-mediated PCR. *Dis Aquat Org* 108, 23–35. <https://doi.org/10.3354/dao02687>.

Kim HJ, Ryu JO, Lee SY, Kim ES and Kim HY. 2015. Multiplex PCR for detection of the *Vibrio* genus and five pathogenic *Vibrio* species with primer sets designed using comparative genomics. *BMC Microbiol* 15, 239. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0577-3>.

Kim MS, Cho JY and Choi HS. 2014. Identification of *Vibrio harveyi*, *Vibrio ichthyenteri* and *Photobacterium damsela* isolated from olive flounder *Paralichthys olivaceus* in Korea by multiplex PCR developed using the *rpoB* gene. *J Fish Sci* 80, 333–339. <https://doi.org/10.1007/s12562-014-0702-5>.

Kim YJ, Seo JS, Park JO, Jeong AH and Lee JH. 2019. Monitoring of aquatic medicine managements in South Korea. *J Fish Pathol* 32, 37–43. <https://doi.org/10.7847/jfp.2019.32.1.037>.

Kwon MG, Seo JS, Hwang JY, Son MH and Park MA. 2017. A study of aquatic drugs classification system. *JFMSE* 29, 571–585. <https://doi.org/10.13000/JFMSE.2017.29.2.581>.

- 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. JFMSE 29, 834–846. <https://doi.org/10.13000/JFMSE.2017.29.3.834>.
- NIFS (National Institute of Fisheries Science). 2017. Antibiotic resistant bacteria inspection manual (11-1192266-000195-01). GMK communication, Busan, Korea, 34–49.
- NIFS (National Institute of Fisheries Science). 2018. Aquatic medicine catalog. Aquatic Disease Control Division, Busan, Korea, 12–101
- Romero J, Feijo CG and Navarrete P. 2012. Antibiotics in aquaculture—use, abuse and alternatives. In: Carvalho E (ed) Health and environment in aquaculture. 159–198.
- Son KT, Jo MR, Oh EG, Mok JS, Kwon JY, Lee TS, Song KC, Kim PH and Lee HJ. 2011. Residues of ampicillin and amoxicillin in olive flounder *Paralichthys olivaceus* following oral administration. Korean J Fish Aquat Sci 44, 464–469. <http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2011.0464>.
- Son KT, Oh EG, Park K, Kwon JY, Lee HJ, Lee TS and Kim JH. 2009. Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from fish farms on the southern coast of Korea. Korean J Fish Aquat Sci 42. 322–328. <https://doi.org/10.5657/kfas.2009.42.4.322>.
- Woo SH, Kim HJ, Lee JS, Kim JW and Park SI. 2006. Pathogenicity and classification of streptococci isolated from cultured marine fishes. J Fish Pathol 19, 17–33.
- Yoon SH, Jun LJ, Kim YJ, Jin JW and Jeong HD. 2012. Comparative risks of resistant microorganisms in the intestinal track of imported freshwater ornamental fish and cultured marine fish. J Fish Pathol 25. 77–84. <https://doi.org/10.7847/jfp.2012.25.2.077>

VII. 감사의 글

대학원에 입학한지 어느 새 2년이라는 시간이 흘러 석사생활을 마치게 되었습니다. 아직 배운 것보다 배워야 할 것이 더 많이 남았지만, 많은 분들의 도움으로 석사과정 동안 제가 애정을 가지고 연구했던 주제로 학위 논문을 제출하게 되었습니다. 미흡하지만 저에게 도움을 주신 분들께 감사의 말씀을 전합니다.

가장 먼저 지도교수님인 정준범 교수님과 전려진 박사님께 감사의 말씀을 드리고 싶습니다. 항상 제가 나아가야 할 방향에 대해서 아낌없는 지도와 관심을 주셨던 정준범 교수님께 감사드립니다. 저를 학문의 길로 이끌어 주신 교수님을 통해 배운 경험과 지식을 소중히 간직하겠습니다. 그리고 언제나 자상하고 따뜻하게 저를 챙겨주시고 격려해주신 전려진 박사님께도 감사의 말씀을 드립니다. 전려진 박사님께서 그동안 저에게 주신 많은 가르침 덕분에 아무것도 모르던 제가 연구자가 되는 꿈을 가지게 되었습니다. 계속해서 두 분의 제자로서 멋진 연구자가 되도록 더욱더 성장하고 앞으로 나아가도록 노력하겠습니다. 또한 제 학위논문의 심사위원을 맡아주시고 날카로운 코멘트를 해주신 여인규 교수님과 수업시간에 많은 지식을 가르쳐 주신 송춘복 교수님, 전유진 교수님, 허문수 교수님, 이승현 교수님, 그리고 언제나 다정하게 챙겨주신 박상률 교수님 감사드립니다.

제가 힘들거나 어려울 때 항상 먼저 전화해서 상담해주신 승민 오빠, 현경 언니와 다원 언니 그리고 바이러스학 실험실에서 저와 함께 생활했던 미래 언니, 학부생 후배들, 앞으로 오랫동안 같이 연구할 영준, 지은, 응준이에게도 고마운 마음을 전하고 싶습니다. 또 1층 복도에서 간담회를 나누었던 나의 선배 경림 언니, 해대 생활의 버팀목 가은이(JWJ)에게도 너무나 고맙습니다.

마지막으로 제가 이 자리까지 올 수 있게 해준 존경하고 사랑하는 가족들에게 감사의 말씀을 전합니다. 타지에서 제가 하고 싶은 공부를 할 수 있도록 항상 저를 믿고 부족함 없이 지지해주신 아빠, 엄마, 오빠, 할머니, 이모할머니, 외할아버지, 외할머니에게 이 논문을 바칩니다.