

해수 및 시판 수산물에서 분리한 장염비브리오균(*Vibrio parahaemolyticus*)의 항균제 내성 및 최소발육억제농도의 규명

조의동 · 김희대¹ · 박권삼*

군산대학교 식품생명공학과, ¹충북도립대학 바이오생명의약과

Antimicrobial Resistance and Minimum Inhibitory Concentrations of *Vibrio parahaemolyticus* Strains Isolated from Seawater and Commercial Fisheries

Eui-Dong Cho, Hee-Dai Kim¹ and Kwon-Sam Park*

Department of Food Science and Biotechnology, Gunsan National University, Gunsan 54150, Korea

¹Department of Biotechnology and Biomedicine, Chungbuk Provincial College, Cheongju 28160, Korea

Eighty-three *Vibrio parahaemolyticus* isolates from surface seawater in Gomso Bay on the west coast of Korea, and commercial fisheries from Gunsan fisheries center were analyzed for the presence of virulence genes and susceptibility to 30 different antimicrobials. All 83 isolates were examined for the presence of two virulence genes (*tdh* or *trh*) using polymerase chain reaction; however, neither gene was found in any of the isolates. A disk diffusion susceptibility test, showed that all of the strains studied were resistant to clindamycin, oxacillin, ticarcillin, and vancomycin, and also revealed varying levels of resistance to ampicillin (98.8%), penicillin G (95.2%), streptomycin (20.5%), cefoxitin (14.5%), amikacin (6.0%), cephalothin (4.8%), and erythromycin (3.6%). However, all of the strains were susceptible to 19 other antimicrobial agents, including cefepime, cefotaxime, chloramphenicol, gentamycin, nalidixic acid, sulfamethoxazole/trimethoprim, and trimethoprim. All 83 isolates (100%) were resistant to five or more classes of antimicrobials, and two strains exhibited resistance to ten antimicrobial agents. The average minimum inhibitory concentrations against *V. parahaemolyticus* of clindamycin, oxacillin, ticarcillin, and vancomycin were 55.9, 98.3, 499.3, and 44.3 $\mu\text{g/mL}$, respectively. These results provide new insight into the necessity for seawater sanitation in Gomso Bay and commercial fisheries, and provide evidence to help reduce the risk of contamination by antimicrobial-resistant bacteria.

Key words: Antimicrobial resistance, Minimum inhibitory concentration, *Vibrio parahaemolyticus*, Virulence genes

장염비브리오균(*Vibrio parahaemolyticus*)은 그람 음성, 무포자 균의 저도 호염성균으로 해수 또는 기수에서 서식하며 이 균에 오염된 어패류를 생식하거나 불충분하게 가열 처리된 수산물의 섭취를 통해 감염되면 일반적으로 4-96시간의 잠복기를 거쳐 발병하는데 주로 복통, 설사, 구토, 오한 및 미열 등을 동반하는 급성위장염 증상을 유발하는 식중독 원인세균이다(Takeda, 1988; Honda and Iida, 1993; Zhang and Orth, 2013). 식품의약품안전처 식품안전정보포털의 식중독통계에 의하면 2009년부터 2018년까지 최근 10년간 우리나라에서 발생한 장

염비브리오균에 의한 식중독 사고는 6월에서 10월 사이의 하절기에 집중적으로 발생하였으며 발생건수 및 환자수는 전체 세균성 식중독 사고의 9.8% 및 3.6%를 차지하고 있다(MFDS, 2019). 장염비브리오균에 의한 식중독 사고는 과거보다는 다소 감소 추세이나 세균성 식중독 원인세균으로 상위에서 자리매김하고 있는 실정이다(MFDS, 2019). 이 균이 생산하는 대표적인 병원성 인자로는 내열성용혈독소(thermostable direct hemolysin, TDH), 내열성용혈독 관련 용혈독소(TDH-related hemolysin, TRH), type III secretion systems (T3SS 1 및 2)를 통

*Corresponding author: Tel: +82. 63. 469. 1822 Fax: +82. 63. 469. 7448

E-mail address: parkks@kunsan.ac.kr



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2019.0587>

Korean J Fish Aquat Sci 52(6), 587-595, December 2019

Received 8 October 2019; Revised 5 November 2019; Accepted 11 November 2019

저자 직위: 조의동(대학원생), 김희대(교수), 박권삼(교수)

해 분비되는 각종 effector 단백질 및 type VI (T6SS) secretion systems 등이 보고되어 있으나 정확한 병원성 메커니즘에 관한 설명은 아직도 부족한 실정이다(Honda and Iida, 1993; Park et al., 2000; Park et al., 2004; Letchumanan et al., 2014; Wang et al., 2015; Li et al., 2019).

페니실린 발견 이후 다양한 종류의 항균제는 사람과 동물의 치료, 질병예방 및 성장촉진 등의 목적으로 사용되고 있으나 지속적인 항균제의 사용은 양식어류 및 해수 유래 장염비브리오균에서 다양한 항균제 내성균의 증가를 가중시키는 결과로 나타나고 있다고 보고되고 있다(Lee et al., 2007; Lee et al., 2009; Ryu et al., 2010; Kim et al., 2014; Kang et al., 2016; Kim et al., 2016; Ryu et al., 2017; Kang et al., 2018). 장염비브리오균에서 가장 높은 내성을 나타내는 항균제로는 ampicillin, rifampicin, streptomycin, vancomycin 등이 보고되어 있다(Ottaviani et al., 2013; Lopatek et al., 2015; Xie et al., 2015; Kang et al., 2018).

세균이 항균제 내성을 갖게 되는 이유는 분해 효소에 의한 항균제의 불활성화, 표적 항균 물질의 변화, 세포막의 항균제 투과성 변화 및 세포 밖으로 항균제의 유출 등의 다양한 방법에 의한 것으로 알려져 있으며 이들 메커니즘이 단독 또는 복합적으로 작용하여 세균은 항균제에 내성을 갖게 된다(Martinez et al., 2009; Munita and Arias, 2016). 획득 내성은 세균 염색체의 유전자 변이 및 plasmid 또는 transposon에 매개되는 내성유전자의 획득에 의해 생기며 내성 유전자는 염색체 DNA (deoxyribonucleic acid) 또는 plasmid DNA에 존재한다(Kuhl et al., 1978). 그람 음성 세균에서 항균제 다제내성유전자가 삽입되어 있는 integron은 세균 염색체에서 이동성을 가진 DNA 단편인 transposon을 통하여 유전자의 한 복제단위에서 다른 복제단위로 이동되는데 일반적으로 접합을 통하여 동종 및 이종 세균으로 확산된다고 보고되어 있다(Rowe-Magnus and Mazel, 2002).

장염비브리오균에 대한 항균제 내성 연구보고는 다수 존재하나 내성 항균제에 대한 최소발육억제농도에 관한 연구논문은 거의 없는 실정이다. 항균제 내성균의 실태 파악 및 수산물의 안전성 확보를 위하여 장염비브리오균의 각종 항균제 내성 및 내성 항균제에 대한 최소발육억제농도에 대한 기초자료의 축적은 절실히 필요하다. 이를 위하여 전북 곰소만해역의 표층 해수 및 군산수산물센터의 시판 수산물에서 분리한 총 83균주의 장염비브리오균을 대상으로 항균제 내성 양상 및 내성 항균제에 대한 최소발육억제농도를 검토하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 시약

실험에 사용한 장염비브리오균은 2018년 6월부터 2018년 10월까지 전북 곰소만해역의 표층 해수에서 분리한 24균주 및

2018년 8월부터 2018년 12월까지 군산수산물센터에서 시판되고 있는 어패류에서 분리한 59균주 및 병원성 유전자 유무를 확인하기 위하여 장염비브리오균 RIMD2210633 (Makino et al., 2003) 및 TH3996 (Park et al., 2000)를 표준 균주로 사용하였다. 항균제 감수성 정도 관리에는 *Escherichia coli* ATCC 25922와 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 균주를 사용하였다. 유전자 증폭을 위한 각종 효소는 Takara (Otsu, Japan)사의 제품, 항균제 디스크는 Becton Dickinson (BBL Sensi-Disk, Sparks, MD, USA)사의 제품 및 각종 항균제는 Sigma (St. Louis, MO, USA)사의 제품을 사용하였다.

장염비브리오균의 분리 및 동정

해수 및 시판 수산물 유래 장염비브리오균의 분리는 식품공전에서 제시한 방법에 준하여 분리하였다(MFDS, 2019). 곰소만 표층 해수는 선박을 이용하여 채수기로 멸균채수병에 채수하였으며, 시판 수산물은 구입 후 얼음이 채워진 아이스박스에 넣어 10°C 이하로 유지하면서 실험실로 옮겨 사용하였다. 고체 시료는 phosphate buffered saline (PBS; 140 mM NaCl, 5 mM anhydrous Na₂HPO₄ and 1.5 mM KH₂PO₄; pH 7.4)을 첨가하여 균질화 후 alkaline peptone water (pH 8.5; 2% NaCl 함유)에 접종하여 35 ± 1.0°C에서 16-18시간 배양하여 thiosulfate-citrate-bile salts (TCBS) agar (Difco, Detroit, MI, USA)에 백금이로 접종 후 35 ± 1.0°C에서 18-24시간 배양하였다. TCBS 배지에서 장염비브리오균으로 추정되는 전형적인 2-3 mm 크기의 청록색 침착을 대상으로 *toxR* (Kim et al., 1999) 및 *hns* (No et al., 2011) 유전자의 존재 유무를 PCR (polymerase chain reaction) assay로 확인하였으며 두 유전자 존재가 확인된 균주에 한하여 최종적으로 장염비브리오균으로 동정하였다. 동일 균주의 중복 분리를 배제하기 위하여 하나의 시료에서는 단일 균주의 장염비브리오균만을 분리하였다. 동정이 완료된 장염비브리오균은 Luria-Bertani (tryptone 1%, yeast-extract 0.5%, NaCl 3%) broth에 배양 후 최종 농도 15%가 되도록 멸균된 글리세린을 첨가하여 cryovial storage box (Simport, Canada)에 넣어 -80°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

DNA 증폭용 primer set

실험에 사용한 DNA 증폭용 primers의 염기서열 및 증폭 DNA 크기 등은 Table 2에 나타내었으며, primers는 Bioneer (Daejeon, Korea)에서 합성하였다. TDH, TRH, *toxR* 및 *hns* 유전자 증폭을 위한 PCR 조건은 95°C에서 3분간 1회 열 변성 후 95°C 30초, 55°C 30초, 72°C 30초를 한 단위로 하여 이를 30회 반복하여 DNA를 증폭하였다. 그러나 장염비브리오균의 β-lactamase (VPA0477) 유전자(Lee et al., 2011)는 다른 조건은 동일하나 extension 시간을 72°C에서 1분간 실시한 점이 다르다. 증폭된 DNA 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동 후 ethidium bromide로 염색하여 Vilber Lourmat (Bio-Paint ST4, France)사 Gel-Doc system으로 확인하였다.

항균제 감수성 시험

각종 항균제에 대한 분리 균주의 감수성은 Acar and Goldstein (1991)의 디스크확산법으로 시험하였다. 식염 3% 첨가된 LB broth에 시험 균주를 접종하여 35±1.0°C에서 하룻밤 진탕 배양 후 멸균 생리식염수로 2회 세정하고 농도를 McFarland No. 0.5로 조정하여 두께 0.4 mm의 Muller Hinton agar (Merck, Germany) 평판에 균을 도말 하였다. 여기에 검사 항균제 디스크를 고착하여 35±1.0°C에서 16시간 배양 후 각 항균제에 의해 형성된 생육저지환의 크기를 측정하고 표준 지표에 따라 감수성 여부를 평가하였다. 시험 항균제는 amikacin (AK; 30 µg), ampicillin (AMP; 10 µg), cefepime (FEP; 30 µg), cefotaxime (CTX; 30 µg), cefotetan (CTT; 30 µg), cefoxitin (FOX; 30 µg), cefuroxime (CXM; 30 µg), ceftriaxone (CRO; 30 µg), cephalothin (KF; 30 µg), cephalosporin (KZ; 30 µg), chloramphenicol (C; 30 µg), ciprofloxacin (CIP; 5 µg), clindamycin (CC; 2 µg), erythromycin (E; 15 µg), gentamicin (GN; 10 µg), imipenem (IPM; 10 µg), kanamycin (K; 30 µg), nalidixic acid (NA; 30 µg), nitrofurantoin (F; 100 µg), norfloxacin (NOR; 10 µg), oxacillin (OX; 1 µg), penicillin (P; 10 µg), pipemidic acid (PIP; 20 µg), rifampin (RD; 5 µg), streptomycin (S; 10 µg), sulfamethoxazole/trimethoprim (SXT; 23.75/1.25 µg), tetracycline (TE; 30 µg), ticarcillin (TIC; 75 µg), trimethoprim

Table 1. Coordinates of sampling stations (St.) in Gomso Bay, west coast of Korea, from June 2018 to October 2018

Station	Coordinate	
	Latitude	Longitude
St.1	35°33'22.00"	126°30'30.00"
St.2	35°33'38.00"	126°31'50.00"
St.3	35°34'34.00"	126°33'23.00"
St.4	35°33'54.00"	126°34'32.00"
St.5	35°34'09.00"	126°36'13.00"

Table 2. Primers used in this study

Target gene	Oligonucleotide sequence	Amplicon size (bp)	Reference
<i>toxR</i>	5'-AGCCCGCTTTCTTCAGACTC-3' 5'-AACGAGTCTTCTGCATGGTG-3'	399	Kim et al., 1999
<i>tdh</i>	5'-GTAAAGGTCTCTGACTTTTGGAC-3' 5'-TGGAATAGAACCTTCATCTTCACC-3'	269	Lee and Park, 2010
<i>trh</i>	5'-TTGGCTTCGATATTTTCAGTATCT-3' 5'-CATAACAAACATATGCCCATTTCCG-3'	486	Lee and Park, 2010
<i>hns</i>	5'-AAACACGTTAACCTATTAATAGG-3' 5'-AACGGGAGCCTTTTAAACAAGA-3'	465	No et al., 2011
<i>VPA0477</i>	5'-CCTCATCGAGAAACAAACAT-3' 5'-AGTGCTCTAAATCAGTTGG-3'	760	Lee et al., 2011



Fig. 1. Location of sampling stations in Gomso Bay, west coast of Korea, from June 2018 to October 2018.

(W; 5 µg), vancomycin (VA; 30 µg) 등 30종의 항균제 디스크를 사용하였다.

최소발육억제농도(Minimum Inhibitory Concentration, MIC) 측정

최소발육억제농도는 미국 NCCLS (2002)에 기초하여 변법으로 측정하였다. 멸균된 Muller Hinton broth (Merck, Germany)에 2,048 µg/mL에서 1 µg/mL까지 절반씩 농도를 달리 한 항균제를 첨가한 후 멸균된 소형시험관에 각 농도의 항균제가 첨가된 배지를 2 mL씩 분주하였다. 여기에 식염이 3% 첨가된 LB broth에서 하룻밤 전 배양한 시험균액 3 µL을 접종하여 35±1.0°C에서 16-18시간 정치 배양한 후 균 증식 여부는 육안으로 확인하여 최소발육억제농도를 측정하였다.

결과 및 고찰

해수 및 시판 수산물에서 분리한 장염비브리오균의 특성

해수 및 시판 수산물 유래 장염비브리오균의 항균제 내성 양상 및 최소발육억제농도를 검토하기 위하여 2018년 6월부터

10월까지 전북 곰소만해역의 5개 지점(Fig. 1 및 Table 1)에서 매월 1회 총 25개 해수 시료에서 24균주의 장염비브리오균을 분리하였다. 또한 2018년 8월부터 12월까지 군산수산물센터에서 구입한 각 15시료의 바지락 및 백합에서 12균주 및 13균주, 25시료의 전어에서 19균주, 각 8시료의 굴, 멍게 및 소라에서 각각 5균주 총 79시료에서 59균주의 장염비브리오균을 분리하였다. 장염비브리오균의 분리는 식품공전에서 제시하는 방법에 따라 실시하였으며 동정은 생화학적 시험 및 유전학적 방법 즉, *toxR* (Kim et al., 1999) 및 *hns* (No et al., 2011) 유전자의 존재 유무로 확인하였으며 두 유전자를 보유하는 균주는 최종적으로 장염비브리오균으로 동정하였다. 생화학적 시험에서는 장염비브리오균으로 확인되었지만 *toxR* 및 *hns* 유전자의 증폭이 확인되지 않았거나 애매한 결과를 나타낸 4균주를 제외한 나머지 83균주에서는 *toxR* 및 *hns* 유전자의 예상 DNA 증폭 산물과 동일한 크기의 DNA 단편이 확인되어 실험에 사용하였다(결과 미제시). 장염비브리오균의 대표적인 병원성 유전자인 TDH 및 TRH 유전자의 보유성을 PCR assay로 검토한 결과, 표준균주에서는 병원성 유전자의 증폭이 확인된 반면, 분리된 83균주에서는 TDH 또는 TRH 유전자가 증폭되지 않았다(결과 미제시). 해수 또는 어패류 등의 환경 유래 장염비브리오균의 대부분은 병원성 유전자 보유율이 매우 낮은 것으로 보고되어 있다(Sakazaki et al., 1968; Shirai et al., 1990; Honda and Iida, 1993). 우리나라의 경우, 경남 연안해역의 해수 및 이매패류에서 분리한 장염비브리오균을 대상으로 병원성 유전자의 보유성을 확인한 결과, 해수에서 분리한 98균주에서 TRH 유전자 보유 양성 균주는 5.1%인 반면 TDH 유전자 보유 양성 균주는 검출되지 않았으며, 이매패류에서 분리한 장염비브리오균의 TDH 및 TRH 유전자 보유 양성 균주는 1.7% 및 3.5%인 것으로 밝혀졌다는 보고도 있다(Park et al., 2018). 또한 완도해역 및 곰소만해역의 해수에서 분리한 장염비브리오균의 경우, TDH 및 TRH 유전자 보유 양성 균주는 검출되지 않았다는 보고도 있다(Kim et al., 2014; Kim et al., 2016). 최근에는 colony hybridization, 특이적 프라이머를 사용한 PCR assay 및 loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 등 새로운 검출 방법의 개발로 인하여 환경 유래 장염비브리오균에서 병원성 유전자를 보유하고 있는 균주의 검출율은 높아지고 있는 추세라는 보고도 있다(Deepanjali et al., 2005; Jones et al., 2012; Ellingsen et al., 2013; Gutierrez et al., 2013; Letchumanan et al., 2014). 결론적으로 이번 실험에 사용한 곰소만해역의 표층 해수 및 시판 수산물에서 분리한 83균주의 장염비브리오균은 병원성 독소(TDH 또는 TRH) 유전자를 보유하지 않은 비병원성 장염비브리오균인 것으로 확인되었다.

장염비브리오균의 항균제 내성 양상

해수 및 시판 어패류 등 다양한 환경시료에서 분리한 장염비브리오균은 amikacin, ampicillin, cephalothin, cefoxitin, gen-

tamicin, kanamycin, rifampin, streptomycin 및 vancomycin 등의 단독 항균제에 내성을 나타낼 뿐만 아니라 다제내성균의 검출 빈도도 높은 것으로 보고되어 있으며(Lee et al., 2009; Ryu et al., 2010; Han et al., 2012; Kim et al., 2014; Kang et al., 2016; Kim et al., 2016), 대체로 높은 내성을 나타내는 항균제로는 ampicillin, rifampicin, streptomycin, vancomycin 등이

Table 3. Antimicrobial susceptibility and resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from seawater and commercial fisheries

Antimicrobials	Disc content (µg)	No. of isolates		
		Resistant	Intermediate	Susceptible
Amikacin (AK)	30	5	0	78
Ampicillin (AMP)	10	82	0	1
Cefepime (FEP)	30	0	3	80
Cefotaxime (CTX)	30	0	1	82
Cefotetan (CTT)	30	0	4	79
Cefoxitin (FOX)	30	12	9	62
Cefuroxime (CXM)	30	0	5	78
Ceftriaxone (CRO)	30	0	0	83
Cephalothin (KF)	30	4	0	79
Cephazolin (KZ)	30	0	8	75
Chloramphenicol (C)	30	0	0	83
Ciprofloxacin (CIP)	5	0	6	77
Clindamycin (CC)	2	83	0	0
Erythromycin (E)	15	3	5	75
Gentamicin (GN)	10	0	4	79
Imipenem (IPM)	10	0	0	83
Kanamycin (K)	30	0	3	80
Nalidixic acid (NA)	30	0	0	83
Nitrofurantoin (F)	100	0	17	66
Norfloxacin (NOR)	10	0	7	76
Oxacillin (OX)	1	83	0	0
Penicillin G (P)	10	81	0	2
Pipemidic acid (PIP)	20	0	3	80
Rifampin (RD)	5	0	6	77
Streptomycin (S)	10	17	3	63
Sulfamethoxazole / Trimethoprim (SXT)	25	0	0	83
Tetracycline (TE)	30	0	2	81
Ticarcillin (TIC)	75	83	0	0
Trimethoprim (W)	5	0	2	81
Vancomycin (VA)	30	83	0	0

보고되어 있다(Ottaviani et al., 2013; Lopatek et al., 2015; Xie et al., 2015; Kang et al., 2018).

곰소만해역의 표층 해수 및 시판 수산물에서 분리한 장염비브리오균 83균주를 대상으로 항균제에 대한 감수성 여부를 확인하기 위하여 30종의 항균제를 사용하여 디스크확산법으로 측정하였으며 그 결과는 Table 3에 나타내었다. 30종의 항균제 중 11종의 항균제는 83균주 전부 또는 일부 균주에서 내성을 나타낸 반면 나머지 19종의 항균제는 모든 균주에서 감수성을 나타내었다. 내성율이 높은 항균제는 clindamycin, oxacillin, ticarcillin, vancomycin, ampicillin, penicillin G, streptomycin, cefoxitin, amikacin, cephalothin 및 erythromycin 순서였다. Clindamycin, oxacillin, ticarcillin 및 vancomycin은 100% 내성을 나타내며, ampicillin (98.8%), penicillin G (95.2%), streptomycin (20.5%), cefoxitin (14.5%), amikacin (6.0%), cephalothin (4.8%) 및 erythromycin (3.6%)이었다. Cefepime를 포함한 19종의 항균제에 대해서는 모든 균주는 감수성을 나타내었다. 분리원에 따른 항균제 내성을 살펴보면, 해수 유래 장염비브리오균은 평균 6.08종의 항균제에 내성을 나타내며, 바지락, 백합, 전어, 굴, 멧게 및 소라에서 분리한 장염비브리오균은 각각 평균 6.36, 6.77, 6.52, 6.20, 7.60 및 6.50종의 항균제에 내성을 나타내었다. 멧게에서 분리한 장염비브리오균은 가장 많은 항균제에 내성을 나타내며, 해수에서 분리한 장염비브리오균은 다른 분리원 유래의 균주에 비해 다소 적은 항균제에 내성을 나타내었다. 이는 인근 육상 또는 양식장 등에서 사용되고 있는 항균제의 영향을 받았을 가능성이 예상되며, 각종 항균제에 대한 장염비브리오균의 내성 및 감수성 비율은 분리원, 분리 시기 및 분리 장소 등의 요인에 따라 차이가 있다는 기존의 연구결과와 대체로 유사한 경향을 나타내고 있다(Lee and Park, 2010; Ryu et al., 2010; Han et al., 2012; Kim et al., 2014; Kang et al., 2016; Kim et al., 2016; Kang et al., 2017).

또한 실험에 사용한 83균주에 대한 항균제 내성 양상에 관한 결과는 Table 4와 같다. Clindamycin, oxacillin, streptomycin, ticarcillin 및 vancomycin를 포함한 5종의 항균제에 내성 나타내는 균주는 1균주(1.2%)이며, ampicillin, clindamycin, oxacillin, penicillin G, ticarcillin 및 vancomycin을 포함한 6종의 항균제 내성을 나타내는 균주는 57균주(68.7%)로 장염비브리오균의 가장 일반적인 항균제 내성 양상으로 밝혀졌다. Ampicillin, clindamycin, oxacillin, penicillin G, streptomycin, ticarcillin 및 vancomycin을 포함한 7종의 항균제에 내성을 나타내는 균주는 9균주(10.8%)로 두번째로 많은 항균제 내성 양상이며, 다음으로 ampicillin, clindamycin, cefoxitin, oxacillin, penicillin G, ticarcillin 및 vancomycin 조합이 6균주(7.2%)로 파악되었으며 기타 항균제 내성 조합 빈도는 2균주 이하로 낮은 편이나, 멧게에서 분리한 일부 균주는 10종의 항균제에 내성을 나타내고 있다(Table 4). 결과적으로 곰소만해역의 표층 해수 및 시판 수산물에서 분리한 장염비브리오균은 최소 5종 이상에

서 최대 10종의 항균제에 내성을 나타내고 있다는 점에서 항균제 다제내성의 심각성은 매우 크다고 판단된다. 이와 같이 다제내성을 나타내는 이유로는 인근 해역으로 유입되는 육상유입수에 항균제가 포함되어 있어 해수에 존재하는 장염비브리오균이 항균제 내성을 획득하게 되었거나, 항균제 내성을 갖고 있는 균주가 보유하고 있는 plasmid DNA가 장염비브리오균에 수평적 전이가 있었거나 또는 해수에 존재하는 장염비브리오균의 특이적인 bacteriophage에 존재하는 항균제 내성유전자가 장염비브리오균에 수평적 전이를 통해 내성유전자를 획득하였을 가능성이 추정된다. 국내외적으로 장염비브리오균의 항생제 내성 양상에 관한 연구는 많으나 내성유전자에 관한 연구는 적다는 점에서 이 부분에 관한 연구의 필요성은 절실한 실정이다.

내성 항균제에 대한 장염비브리오균의 최소발육억제농도 측정

내성을 나타내는 11종 항균제에 대한 장염비브리오균의 최소발육억제농도를 측정한 결과는 Table 5와 같다. Amikacin에 내성을 나타내는 5균주의 MIC는 32-128 µg/mL이었으며(평균 96.0 µg/mL), 감수성을 나타내는 나머지 78균주의 MIC는 4 µg/mL 이하로 측정되었다. Ampicillin에 내성을 나타내는 균주의 MIC는 128-2,048 µg/mL 수준으로 2,048 µg/mL의 MIC를 나타내는 균주는 3균주(3.6%), 1,024 µg/mL의 MIC를 나타내는 균주는 43균주(51.8%), 512 µg/mL의 MIC를 나타내는 균주는 28균주(33.8%), 256 µg/mL의 MIC를 나타내는 균주는 7균주(8.4%) 및 128 µg/mL의 MIC를 나타내는 균주는 1균주(1.2%)로 평균 MIC는 810.1 µg/mL이었다. 이 결과는 장

Table 4. Antimicrobial resistance patterns of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from seawater and commercial fisheries

Resistance type	No. of resistant strains
CC-OX-S-TIC-VA	1
AMP-CC-OX-P-TIC-VA	57
AMP-CC-OX-S-TIC-VA	1
AMP-CC-FOX-OX-P-TIC-VA	6
AMP-CC-KF-OX-P-TIC-VA	1
AMP-CC-OX-P-S-TIC-VA	9
AK-AMP-CC-OX-P-S-TIC-VA	2
AMP-CC-E-FOX-OX-P-TIC-VA	1
AK-AMP-CC-FOX-OX-P-S-TIC-VA	2
AMP-CC-E-FOX-KF-OX-P-TIC-VA	1
AK-AMP-CC-FOX-KF-OX-P-S-TIC-VA	1
AMP-CC-E-FOX-KF-OX-P-S-TIC-VA	1
Total	83

AK, amikacin; AMP, ampicillin; CC, clindamycin; E, erythromycin; FOX, cefoxitin; KF, cephalothin; OX, oxacillin; P, penicillin G; S, streptomycin; TIC, ticarcillin; VA, vancomycin.

염비브리오균은 일반적으로 ampicillin에 고도 내성을 나타내고 있다는 기존의 결과와 대체로 일치한다(Tanil et al., 2005; Lee et al., 2009; Lee and Park, 2010; Kim et al., 2014; Kim et al., 2016). 임상 유래 장염비브리오균의 ampicillin에 대한 MIC의 농도는 >256-24 µg/mL의 범위였다는 결과(Pazhani et al., 2014) 및 환경 유래 장염비브리오균의 ampicillin에 대한 MIC의 농도는 400 µg/mL이었다는 외국의 결과(Silva et al., 2018) 보다 본 실험에 사용한 균주의 ampicillin에 대한 평균 MIC가 높다는 점에서 심각성은 크다고 판단된다. Ampicillin에 감수성을 나타내는 1균주(1.2%)의 MIC는 2.0 µg/mL이었다. 감수성을 나타내는 균주를 포함한 시험에 사용한 모든 균주에서 ampicillin 분해 유전자인 β-lactamase와 상동성이 있는 VPA0477 유전자의 보유성이 PCR assay에 의해 확인되었다(결과 미제시). VPA0477 유전자를 보유하고 있으면서도 ampicillin에 감수성을 나타내는 한 균주는 VPA0477 유전자의 변이에 의한 전사 또는 번역 과정의 문제로 인해 β-lactamase의 발현이 전혀 불가능하거나 불충분하여 ampicillin에 감수성을 나타내다고 판단된다.

Clindamycin에 내성을 나타내는 83균주의 MIC는 32-128 µg/mL 수준이며 평균 MIC는 55.9 µg/mL로 확인되었다. Erythromycin에 내성을 나타내는 3균주의 MIC는 32-256 µg/

mL 수준으로 평균 MIC는 138.7 µg/mL로 확인되었으며, 감수성을 나타내는 80균주의 MIC는 4 µg/mL 이하로 확인되었다. Cefoxitin에 내성을 나타내는 12균주의 MIC는 32-128 µg/mL 수준(평균 42.7 µg/mL)이며, cephalothin에 내성을 나타내는 4균주의 MIC는 64-512 µg/mL 수준(평균 208.0 µg/mL)이며 감수성을 나타내는 균주의 MIC는 4 µg/mL 이하이다.

Penicillin G에 내성을 나타내는 81균주의 MIC는 32-2,048 µg/mL 수준(평균 869.5 µg/mL)이며 감수성을 나타내는 균주의 MIC는 4 µg/mL 이하이다. Streptomycin에 내성을 나타내는 17균주의 MIC는 32-128 µg/mL 수준(평균 56.5 µg/mL)이며 감수성을 나타내는 균주의 MIC는 4 µg/mL 이하이다. 모든 균주에서 내성을 나타내는 oxacillin, ticarcillin 및 vancomycin에 내성을 나타내는 균주의 MIC는 32-512 µg/mL, 32-1,024 µg/mL 및 16-512 µg/mL 수준이며 평균 MIC는 98.3 µg/mL, 499.3 µg/mL 및 44.3 µg/mL로 확인되었다.

결과적으로 장염비브리오균은 ampicillin, penicillin G, ticarcillin 및 cephalothin 등의 항균제에 대해서는 MIC가 매우 높은 반면 amikacin, clindamycin, erythromycin, cefoxitin, oxacillin, streptomycin, vancomycin 등의 항균제에 대한 MIC는 상대적으로 낮은 것으로 확인되었다(Table 5). 본 실험에 제공된

Table 5. Minimum inhibitory concentration of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from seawater and commercial fisheries

Antimicrobials	µg/mL											
	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1,024	2,048
Amikacin		64 (77.1%)	14 (16.9%)			1 (1.2%)	1 (1.2%)	3 (3.6%)				
Ampicillin		1 (1.2%)						1 (1.2%)	7 (8.4%)	28 (33.8%)	43 (51.8%)	3 (3.6%)
Cindamycin						25 (30.1%)	56 (67.5%)	2 (2.4%)				
Erythromycin	49 (59.1%)	26 (31.3%)	5 (6.0%)			1 (1.2%)		1 (1.2%)	1 (1.2%)			
Cefoxitin		2 (2.4%)	28 (33.7%)	41 (49.4%)		10 (12.1%)	1 (1.2%)	1 (1.2%)				
Cephalothin		55 (66.3%)	24 (28.9%)				1 (1.2%)	2 (2.4%)		1 (1.2%)		
Oxacillin						7 (8.4%)	42 (50.7%)	31 (37.3%)	1 (1.2%)	2 (2.4%)		
Penicillin G		1 (1.2%)	1 (1.2%)			1 (1.2%)	2 (2.4%)	1 (1.2%)	8 (9.6%)	15 (18.1%)	49 (59.1%)	5 (6.0%)
Streptomycin		4 (4.8%)	62 (74.7%)			8 (9.6%)	7 (8.5%)	2 (2.4%)				
Ticarcillin						1 (1.2%)	3 (3.6%)		23 (27.7%)	43 (51.8%)	13 (15.7%)	
Vancomycin					18 (21.7%)	58 (69.9%)	4 (4.8%)		1 (1.2%)	2 (2.4%)		

곰소만해역의 해수 및 시판 수산물에서 분리한 83균주의 장염비브리오균은 5종 이상의 항균제에 내성을 나타낼 뿐만 아니라 일부 항균제에 대해서는 매우 높은 MIC를 나타내는 것으로 확인되었다. 다수의 항균제에 대해서도 내성 보유 현상이 보편화되어 있다는 점에서 장염비브리오균의 항균제 내성에 관한 꾸준한 모니터링은 필요하며, 항균제 내성균의 확산방지와 수산물의 안전성 확보를 위해 적절한 오염원의 관리 대책과 어류양식장에서 사용되고 있는 항균제의 오남용 방지를 위한 교육과 당국의 지속적인 점검이 요구된다. 또한 내성유전자에 관한 연구가 부족한 상황이라 다양한 항균제 내성 유전자의 동정 및 염색체 DNA상에서의 존재 양상 등의 파악은 내성유전자의 획득 및 확산 메커니즘을 이해하는데 큰 도움이 될 것으로 기대된다.

사 사

이 논문은 2016년도 식품의약품안전처에서 시행한 용역연구개발과제(16162수산물607)의 연구개발비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

References

- Acar JF and Goldstein FW. 1991. Disk susceptibility test. In: Antibiotics in laboratory medicine, Lorian V, ed. Williams & Wilkins, Baltimore, U.S.A., 17-52.
- Deepanjali A, Kumar HS, Karunasagar I and Karunasagar I. 2005. Seasonal variation in abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters along the southwest coast of India. *Appl Environ Microbiol* 71, 3575-3580.
- Ellingsen AB, Olsen JS, Granum PE, Rørvik LM and González-Escalona N. 2013. Genetic characterization of *trh* positive *Vibrio* spp. isolated from Norway. *Front Cell Infect Microbiol* 3, 1-10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00107>.
- Gutierrez West CK, Klein SL and Lovell CR. 2013. High frequency of virulence factor genes *tdh*, *trh*, and *tlh* in *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from a pristine estuary. *Appl Environ Microbiol* 79, 2247-2252. <https://doi.org/10.1128/AEM.03792-12>.
- Han AR, Yoon YJ and Kim JW. 2012. Antibiotic resistance and plasmid profile of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from Kyunggi-Incheon coastal area. *Korean J Microbiol* 48, 22-28.
- Honda T and Iida T. 1993. The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of the thermostable direct haemolysin and related haemolysins. *Rev Med Microbiol* 4, 106-113.
- Jones JL, Ludeke CH, Bowers JC, Garrett N, Fischer M, Parsons MB, Bopp CA and DePaola A. 2012. Biochemical, serological, and virulence characterization of clinical and oyster *Vibrio parahaemolyticus* isolates. *J Clin Microbiol* 50, 2343-2352. <https://doi.org/10.1128/JCM.00196-12>.
- Kang CH, Shin Y, Kim W, Kim Y, Song K, Oh EG, Kim S, Yu H and So JS. 2016. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from oysters in Korea. *Environ Sci Pollut Res Int* 23, 918-926. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5650-9>.
- Kang CH, Shin Y, Jang S, Yu H, Kim S, An S, Park K and So JS. 2017. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from oysters in Korea: Resistance to various antibiotics and prevalence of virulence genes. *Mar Pollut Bull* 118, 261-266. <https://doi.org/10.1016/j.marpollbul.2017.02.070>.
- Kang CH, Shin YJ, Yu HS, Kim SK and So JS. 2018. Antibiotic and heavy-metal resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from oysters in Korea. *Mar Pollut Bull* 135, 69-74. <https://doi.org/10.1016/j.marpollbul.2018.07.007>.
- Kim SK, An SR, Park BM, Oh EG, Song KC, Kim JW and Yu HS. 2016. Virulence factors and antimicrobial susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from the oyster *Crassostrea gigas*. *Korean J Fish Aquat Sci* 49, 116-123. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2016.0116>.
- Kim TO, Eum IS, Jo SM, Kim HD and Park KS. 2014. Antimicrobial-resistance profiles and virulence genes of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from seawater in the Wando area. *Korean J Fish Aquat Sci* 47, 220-226. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2014.0220>.
- Kim TO, Um IS, Kim HD and Park KS. 2016. Antimicrobial resistance and minimum inhibitory concentrations of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from Gomso bay, Korea. *Korean J Fish Aquat Sci* 49, 582-588. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2016.0582>.
- Kim YB, Okuda J, Matsumoto C, Takahashi N, Hashimoto S and Nishibuchi M. 1999. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene. *J Clin Microbiol* 37, 1173-1177.
- Kuhl SA, Pattee PA and Baldwin NJ. 1978. Chromosomal map location of the methicillin resistance determinant in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 135, 460-465.
- Lee H, Oh YH, Park SG and Choi SM. 2007. Antibiotic susceptibility and distribution of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from the seafood. *Kor J Env Hlth* 33, 16-20.
- Lee HW, Lim SK and Kim MN. 2009. Characteristics of ampicillin-resistant *Vibrio* spp. isolated from a west coastal area of Korea peninsula. *J Kor Fish Soc* 42, 20-25.
- Lee KW and Park KS. 2010. Antibiotic-resistance profiles and the identification of the ampicillin-resistance gene of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from seawater. *Korean J Fish Aquat Sci* 43, 637-641.
- Lee NH, Song HJ, Park CS, Kim HD and Park KS. 2011. Genetic characterization of β -lactamase (VPA0477) in *Vibrio parahaemolyticus*. *Korean J Fish Aquat Sci* 44, 597-604. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2011.0597>.
- Letchumanan V, Chan KG and Lee LH. 2014. *Vibrio parahaemolyticus*: a review on the pathogenesis, prevalence, and ad-

- vance molecular identification techniques. *Front Microbiol* 5, 705. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00705>.
- Li L, Meng H, Gu D, Li Y and Jia M. 2019. Molecular mechanisms of *Vibrio parahaemolyticus* pathogenesis. *Microbiol Res* 222, 43-51. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.03.003>.
- Lopatek M, Wieczorek K and Osek J. 2015. Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Vibrio parahaemolyticus* Isolated from Raw Shellfish in Poland. *J Food Prot* 78, 1029-1033. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-437>.
- Makino K, Oshima K, Kurokawa K, Yokoyama K, Uda T, Tagomori K, Iijima Y, Najima M, Nakano M, Yamashita A, Kubota Y, Kimura S, Yasunaga T, Honda T, Shinagawa H, Hattori M and Iida T. 2003. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *Lancet* 361, 743-749.
- Martinez JL, Fajardo A, Garmendia L, Hernandez A, Linares JF, Martinez-Solano L and Sanchez MB. 2009. A global view of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 33, 44-65. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00142.x>.
- MFDS (Ministry of Food and Drug Safety). 2019. Food poisoning statistics. Retrieved from http://www.foodsafetykorea.go.kr/portal/healthyfoodlife/foodPoisoningStat.do?menu_grp=MENU_NEW02&menu_no=2786 on Oct 2, 2019.
- Munita JM and Arias CA. 2016. Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiol Spectr* 4, 1-37. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>.
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). 2002. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twelfth informational supplement M100-S12. Wayne, Pennsylvania, U.S.A., 19087-19098.
- No AR, Okada K, Kogure K and Park KS. 2011. Rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* by PCR targeted to the histone-like nucleoid structure (H-NS) gene and its genetic characterization. *Lett Appl Microbiol* 53, 127-133. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03072.x>.
- Ottaviani D, Leoni F, Talevi G, Masini L, Santarelli S, Rocchegiani E, Susini F, Montagna C, Monno R, D'Annibale L, Manso E, Oliva M and Pazzani C. 2013. Extensive investigation of antimicrobial resistance in *Vibrio parahaemolyticus* from shellfish and clinical sources, Italy. *Int J Antimicrob Agents* 42, 191-193. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.05.003>.
- Park K, Mok JS, Ryu AR, Kwon JY, Ham IT and Shim KB. 2018. Occurrence and virulence of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from seawater and bivalve shellfish of the Gyeongnam coast, Korea, in 2004-2016. *Mar Pollut Bull* 137, 382-387. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.10.033>.
- Park KS, Iida T, Yamaichi Y, Oyagi T, Yamamoto K and Honda T. 2000. Genetic characterization of DNA region containing the *trh* and *ure* genes of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect Immun* 68, 5742-5748.
- Park KS, Ono T, Rokuda M, Jang MH, Okada K, Iida T and Honda T. 2004. Functional characterization of two type III secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect Immun* 72, 6659-6665.
- Pazhani GP, Bhowmik SK, Ghosh S, Guin S, Dutta S, Rajendran K, Saha DR, Nandy RK, Bhattacharya MK, Mukhopadhyay AK and Ramamurthy T. 2014. Trends in the epidemiology of pandemic and non-pandemic strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from diarrheal patients in Kolkata, India. *PLoS Negl Trop Dis* 8, e2815. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002815>.
- Rowe-Magnus DA and Mazel D. 2002. The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. *Int J Med Microbiol* 292, 115-125.
- Ryu SH, Hwang YO, Park SG and Lee YK. 2010. Antibiotic susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from commercial marine products. *Korean J Food Sci Technol* 42, 508-513.
- Ryu AR, Park K, Kim SH, Ham IT, Kwon JY, Kim JH, Yu HS, Lee HJ and Mok JS. 2017. Antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* and *Vibrio parahaemolyticus* isolated from shellfish from the west coast of Korea. *Korean J Fish Aquat Sci* 50, 662-668. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2017.0662>.
- Sakazaki R, Tamura K, Kato T, Obara Y and Yamai S. 1968. Studies on the enteropathogenic, facultatively halophilic bacterium, *Vibrio parahaemolyticus*. 3. Enteropathogenicity. *Jpn J Med Sci Biol* 21, 325-331.
- Shirai H, Ito H, Hirayama T, Nakamoto Y, Nakabayashi N, Kumagai K, Takeda Y and Nishibuchi M. 1990. Molecular epidemiological evidence for association of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* with gastroenteritis. *Infect Immun* 58, 3568-3573.
- Silva IP, Carneiro CS, Saraiva MAF, Oliveira TAS, Sousa OV and Evangelista-Barreto NS. 2018. Antimicrobial resistance and potential virulence of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from water and bivalve mollusks from Bahia, Brazil. *Mar Pollut Bull* 131, 757-762. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.05.007>. Epub 2018 May 11.
- Takeda Y. 1988. Thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Method Enzymol* 165, 189-193.
- Tanil GB, Radu S, Nishibuchi M, Rahim RA, Napis S, Maurice L and Gunsalam JW. 2005. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from coastal seawater in peninsular Malaysia. *Southeast Asian J Trop Public Health* 36, 940-945.
- Wang R, Zhong Y, Gu X, Yuan J, Saeed AF and Wang S. 2015. The pathogenesis, detection, and prevention of *Vibrio parahaemolyticus*. *Front Microbiol* 6, 144. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00144>.
- Xie T, Wu Q, Xu X, Zhang J and Guo W. 2015. Prevalence and

population analysis of *Vibrio parahaemolyticus* in aquatic products from South China markets. FEMS Microbiol Lett 362, fnv 178. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv178>.

Zhang L and Orth K. 2013. Virulence determinants for *Vibrio parahaemolyticus* infection. Curr Opin Microbiol 16, 70-77. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.02.002>.