

금강 하구 해역의 해수에서 분리한 장염비브리오(*Vibrio parahaemolyticus*) 균의 특성 및 항균제 내성

이신혜 · 김희대¹ · 박권삼*

군산대학교 식품생명공학과, ¹충북도립대학 바이오생명의약과

Characterization and Antimicrobial Resistance of *Vibrio parahaemolyticus* Strains Isolated from Seawater of Geum River Estuary Area, West Coast of Korea

Shin-Hye Lee, Hee-Dai Kim¹ and Kwon-Sam Park*

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

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

Seventy-five *Vibrio parahaemolyticus* isolates from the surface seawater of the Geum River Estuary area, on the west coast of Korea, were analyzed for the presence of virulence genes and susceptibility to 17 different antimicrobials. All 75 isolates were examined for the presence of two virulence genes (*tdh* or *trh*) using polymerase chain reaction; Only one of the isolates possessed the *tdh* or *trh* gene. According to the results of disk diffusion susceptibility tests, all of the strains were resistant to penicillin G, 92.0% were resistant to ampicillin, 82.7% were resistant to amoxicillin, 2.7% were resistant to ciprofloxacin, 2.7% were resistant to trimethoprim, 1.3% were resistant to cephalothin, and 1.3% were resistant to erythromycin. However, all of the strains were susceptible to amikacin, cefoxitin, chloramphenicol, gentamycin, kanamycin, nalidixic acid, nitrofurantoin, rifampin, streptomycin, and tetracycline. The average minimum inhibitory concentrations for ampicillin for *V. parahaemolyticus* was 557.6 µg/mL. These results not only provide novel insight into the necessity for seawater sanitation in Geum river estuary area, but they help reduce the risk of contamination of antimicrobial-resistant bacteria.

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

서론

장염비브리오균(*Vibrio parahaemolyticus*)은 그람 음성, 무포자 간균의 저도 호염성균으로 해수 또는 기수에 서식하며 이 균에 오염된 어패류를 생식하거나 불충분하게 가열 처리된 수산물 섭취를 통해 감염되면 복통, 설사, 구토, 오한 및 미열 등을 동반하는 급성위장염 증상을 유발하는 식중독 원인세균이다(Honda and Iida, 1993; Zhang and Orth, 2013). 이 균의 병원성 인자로는 내열성용혈독소(thermostable direct hemolysin, TDH), 내열성용혈독 관련용혈독소(TDH-related hemolysin, TRH), urease, type III secretion systems (T3SSs) 및 type VI secretion systems (T6SSs)를 통해 분비되는 각종 effector 단

백질 등이 보고되어 있으나(Honda and Iida, 1993; Park et al., 2000; Park et al., 2004; Letchumanan et al., 2014; Wang et al., 2015; Li et al., 2019), TDH와 TRH는 용혈능, 세포독성 및 장관독성을 나타내고 있어 장염비브리오균의 주요 병원성 인자로 인식된다(Honda and Iida, 1993; Li et al., 2019). 환자의 가검물 등에서 분리한 대부분의 임상 분리 장염비브리오균은 TDH 또는 TRH 유전자를 보유하고 있는 반면(Honda and Iida, 1993), 해수 또는 수산물 유래 환경 분리 장염비브리오균에서 TDH 및 TRH 유전자를 보유하고 있는 비율은 분리장소, 분리원 및 분리방법에 따라 차이가 있어 대략 1-10% 전후라고 보고되어 있지만 ST broth에서 증균하여 PCR (polymerase chain reaction) method 또는 colony hybridization에 의해 검출하면

*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.2022.0850>

Korean J Fish Aquat Sci 55(6), 850-857, December 2022

Received 18 October 2022; Revised 23 November 2022; Accepted 28 November 2022

저자 직위: 이신혜(학부생), 김희대(교수), 박권삼(교수)

검출율은 향상되었다는 보고도 있다(Deepanjali et al., 2005; Jones et al., 2012; Ellingsen et al., 2013; Gutierrez et al., 2013; Letchumanan et al., 2014; Raghunath, 2015).

식품의약품안전처 식품안전정보포털의 식중독 통계에 의하면 2012년부터 2021년까지 최근 10년간 장염비브리오에 의한 식중독 사고는 6월에서 10월 사이의 하절기에 집중적으로 발생하였으며 발생건수 및 환자수는 전체 세균성 식중독 사고의 7.5% 및 3.0%를 차지하고 있으며, 최근 3년간 발생건수 및 환자수는 10건 및 45명으로 파악되어 장염비브리오균에 의한 식중독 사고는 과거보다는 다소 감소하는 추세를 나타내고 있다(MFDS, 2022). 세균이 항균제에 내성을 갖게 되는 이유로는 분해 효소 작용에 의한 항균제의 불활성화, 표적 항균 물질의 변화, 세포막에 항균제의 투과성 변화 및 세포 밖으로 항균제의 유출 등의 다양한 원인에 의한 것으로 알려져 있으며 단독 또는 복합적으로 작용하여 세균은 항균제에 내성을 갖게 된다(Martinez et al., 2009; Munita and Arias, 2016). 내성은 세균 염색체의 유전자 변이, plasmid 또는 transposon에 매개되는 내성유전자의 획득에 의해 생기며 내성 유전자는 염색체 DNA (deoxyribo nucleic 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 이동되는데 일반적으로 접합을 통하여 동종 및 이종 세균으로 확산된다고 보고되어 있다(Rowe-Magnus and Mazel, 2002).

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(Kim et al., 2014; Kang et al., 2016, 2018; Kim et al., 2016; Ryu et al., 2017). 따라서 항균제 내성균의 실태 파악 및 수산물의 안전성 확보를 위하여 장염비브리오균의 각종 항균제 내성에 대한 기초자료의 축적은 절실히 필요하다. 이를 위하여 본 연구에서는 금강 하구 해역의 표층 해수에서 분리한 총 75균주의 장염비브리오균을 대상으로 병원성 유전자의 유무와

항균제 내성 양상을 검토하였다.

재료 및 방법

시험 균주

실험에 사용한 장염비브리오균은 2021년 6월부터 2021년 12월까지 금강 하구 해역의 표층 해수에서 분리한 75균주 및 병원성 유전자 유무를 확인하기 위하여 2종의 표준 균주로 TDH 양성 균주이며 genome sequence가 완료된 *V. parahaemolyticus* RIMD2210633 (Makino et al., 2003) 및 TRH 양성 균주 *V. parahaemolyticus* TH3996 (Park et al., 2000)는 일본 오사카대학교 미생물병연구소에서 분양 받아 사용하였다. 항균제 감수성 정도 관리에는 *Escherichia coli* ATCC 25922와 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 균주를 사용하였다.

장염비브리오균의 분리 및 동정

장염비브리오균의 분리를 위하여 금강 하구 해역의 표층 해수는 채수기를 사용하여 멸균채수병에 채수하여 얼음이 채워진 아이스박스에 넣어 10°C 이하로 유지하면서 실험실로 옮겨 사용하였다. 해수는 10 mL double strength alkaline peptone water (APW, pH 8.5)에 10 mL를 접종하여 35±1.0°C에서 16–18시간 배양하였다. 배양액은 thiosulfate-citrate-bile salts (TCBS) agar (Difco, Detroit, MI, USA)에 백금으로 접종 후 35±1.0°C에서 18–24시간 배양하였다. TCBS agar 배지에서 장염비브리오균으로 추정되는 전형적인 2–3 mm 크기의 청록색 집락을 대상으로 *toxR* (Kim et al., 1999), *hns* (No et al., 2011) 및 β-lactamase (VPA0477) (Park, 2014) 유전자의 존재 유무를 PCR assay로 확인하였으며 이들 유전자가 모두 존재하는 균주에 한하여 최종적으로 장염비브리오균으로 동정하였다. 동정이 완료된 장염비브리오균은 Luria-Bertani (LB; tryptone 1%, yeast-extract 0.5%, NaCl 3%) broth에 배양 후 최종 농도 15%가 되도록 멸균된 글리세린을 첨가하여 cryovial storage box (Simport, Saint-Mathieu-de-Beloeil, Canada)에 넣어 -80°C에 보관하면서 실험에 사용하였다. 유전자 증폭에는 Emerald-

Table 1. 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'-TGGAATAGAACCCTTCATCTTCACC-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	Park (2014)

dAmp PCR Master Mix (Takara, Otsu, Japan)를 사용하였으며, urease 활성은 Urea agar (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)에 시험 균주를 접종하여 35±1.0°C에서 24시간 배양 후 배지의 알카리화로 urease 활성을 확인하였다.

PCR assay에 의한 유전자 분석

실험에 사용한 DNA 증폭용 primers의 염기서열 및 증폭 DNA 크기 등은 Table 1에 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. β-lactamase (VPA0477) 유전자는 다른 조건은 상기와 동일하나 증폭 산물의 DNA 크기가 760 bp이기 때문에 extension 시간은 72°C에서 1분간 실시하였다. 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

항균제에 대한 시험 균주의 감수성은 Acar and Goldstein (1991)의 디스크확산법으로 시험하였다. LB broth에 시험 균주를 접종하여 35±1.0°C에서 14시간 동안 150 rpm으로 진탕 배양 후 균체는 phosphate buffered saline (PBS; 140 mM NaCl, 5 mM anhydrous Na₂HPO₄ and 1.5 mM KH₂PO₄; pH 7.4)로 2회 세정하고 농도를 McFarland No. 0.5 (Kesici et al., 2019)로 조정하여 두께 0.4 mm의 Mueller Hinton agar (Becton, Dickinson and Company) 평판에 멸균유리봉으로 균을 접종하였다. 여기에 검사 항균제 디스크를 고착하여 35±2.0°C에서 18시간 배양 후 각 항균제에 의해 형성된 생육저지환의 크기를 측정하여 시험 균주의 항균제에 대한 감수성, 중간내성 및 내성의 정도는 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2010)의 기준에 따라 판정하였다. 시험 항균제는 amikacin (30 µg), amoxicillin (25 µg), ampicillin (10 µg), cefoxitin (30 µg), cephalothin (30 µg), chloramphenicol (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), erythromycin (15 µg), gentamicin (10 µg), kanamycin (30 µg), nalidixic acid (30 µg), nitrofurantoin (100 µg), penicillin G (10 µg), rifampicin (5 µg), streptomycin (10 µg), tetracycline (30 µg) 및 trimethoprim (5 µg) 등 17종의 항균제 디스크는 BBL Sensi-Disk (Becton, Dickinson and Company)를 사용하였다. Multiple antimicrobial resistance (MAR) index는 내성을 나타내는 항균제 수를 실험에 사용한 전체 항균제 수로 나누어 값으로 계산하였다.

최소발육억제농도 측정

시험 균주의 ampicillin에 대한 최소발육억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC)를 측정하기 위한 항균제는 Sigma (St. Louis, MO, USA)사의 제품을 사용하여 Clinical

and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2010)에 기초한 방법으로 측정하였다. 멸균된 Mueller Hinton broth (Becton, Dickinson and Company)에 2,048 µg/mL에서 1 µg/mL까지 절반씩 농도를 달리한 항균제를 첨가한 후 멸균된 소형시험관에 각 농도의 항균제가 첨가된 배지를 3.0 mL씩 분주하였다. 여기에 NaCl이 3% 첨가된 LB broth에서 14시간 동안 150 rpm으로 진탕 배양한 시험균액 3 µL을 접종하여 35±2.0°C에서 18시간 정지 배양 후 균 증식 여부는 육안으로 확인하여 MIC를 측정하였다.

결과 및 고찰

금강 하구 해역의 해수에서 분리한 장염비브리오균의 특성

금강 하구 해역은 북동쪽으로 충남 서천군을 따라 광활한 서천 갯벌이 분포하며, 남쪽으로는 군산 산업단지가 조성되어 있으며 담수와 해수의 특성이 혼합된 완충지대로서 수질 인자의 변화가 심하게 나타나는 해역이지만 해역에 대한 미생물학적 연구는 거의 없는 실정이다. 본 연구는 금강 하구 해역의 해수에서 분리한 장염비브리오균에 대한 병원성 유전자의 보유성 및 항균제 내성 양상을 검토하기 위하여 2021년 6월부터 12월까지 해역의 10개 지점(Fig. 1)에서 선박을 이용할 수 없었던 8월을 제외한 매월 1회 총 60개 해수 표층 시료에서 장염비브리오균으로 추정되는 97균주를 TCBS agar 선택배지에서 분리하였다. 분리한 균주는 장염비브리오균에서만 증폭되는 3종(*toxR*, *hns* 및 VPA0477)의 유전자 프라이머를 사용하여 PCR assay로 각 유전자의 존재 유무를 확인하였다. 그 결과 *toxR*, *hns* 및 β-lactamase (VPA0477) 유전자 중 증폭이 확인되지 않았거나 표준균주와는 다른 결과를 나타내는 22균주를 제외한 75균주를 최종적으로 장염비브리오균으로 확정하여 추후 실험에 사용하였다(결과 미제시). 장염비브리오균의 대표적인 병원성 유전자인 TDH 및 TRH 유전자의 보유성을 PCR assay로 검토한 결과, 표준균주에서는 병원성 유전자의 증폭이 확인된 반면, 1균주를 제외한 74균주에서는 TDH 또는 TRH 유전자의 증폭은 확인되지 않았지만, 1균주는 TDH와 TRH 유전자를 동시에 보유하고 있는 것으로 확인되었다(결과 미제시). TRH 유전자를 보유하는 장염비브리오균은 urease 활성을 나타낸다는 기존의 보고(Suthienkul et al., 1995; Park et al., 2000)를 확인하기 위하여 urea agar 배지를 사용하여 효소 활성을 확인하였다. 그 결과 urease에 의해 요소가 분해되어 암모니아가 생성됨에 따라 배지의 pH가 알카리로 변하여 시험 균주의 집락 주위가 분홍색(pink-red)으로 바뀐 urease 양성 결과를 확인하였다(결과 미제시).

일반적으로 해수 또는 어패류 등의 환경 유래 장염비브리오균에서 병원성 유전자 보유율은 대체로 낮은 것으로 보고되어 있다(Honda and Iida, 1993). 우리나라의 경우, 경남 연안 해역의

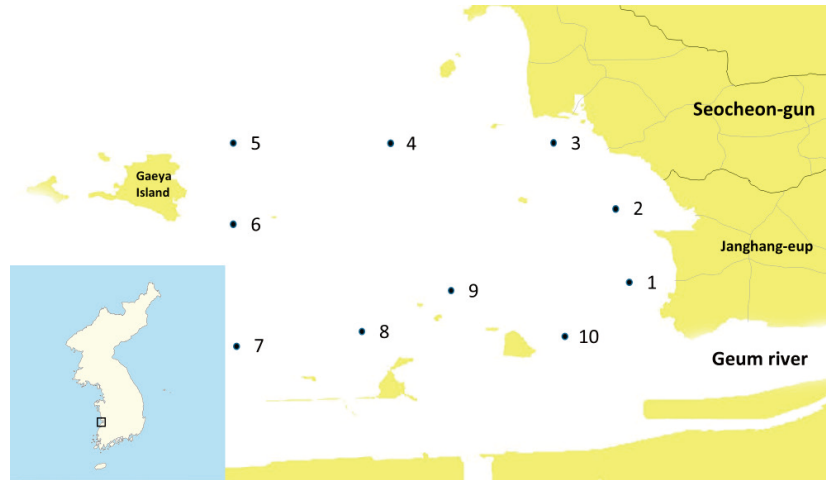


Fig. 1. Location of sampling stations in Geum river estuary area, the west coast of Korea, from June 2021 to December 2021.

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 287균주 장염비브리오균에서 TDH 및 TRH 유전자 보유 양성율은 1.7% 및 3.5%인 것으로 밝혀졌다는 보고도 있다(Park et al., 2018). 또한 완도 해역의 표층 해수에서 분리한 67균주의 장염비브리오균, 고평만 해역의 표층 해수에서 분리한 79균주의 장염비브리오균 및 고평만 해역의 표층 해수 유래 24균주와 군산수산물센터에서 시판되고 있는 어패류에서 분리한 59균주의 장염비브리오균에서 TDH 또는 TRH 유전자를 보유하는 균주는 검출되지 않았다는 보고도 있다(Kim et al., 2014, 2016; Cho et al., 2019). 결론적으로 이번 실험에 사용한 금강 하구 해역의 표층 해수에서 분리한 75균주 중 1균주를 제외한 74균주의 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, clindamycin, cephalothin, cefoxitin, gentamicin, kanamycin, oxacillin, penicillin, rifampin, streptomycin, ticarcillin 및 vancomycin 등의 단독 항균제에 내성을 나타낼 뿐만 아니라 다제내성균의 검출 빈도도 높은 것으로 보고되어 있다(Han et al., 2012; Ottaviani et al., 2013; Kim et al., 2014, 2016; Lopatek et al., 2015; Xie et al., 2015; Kang et al., 2016; Cho et al., 2019). 금강 하구 해역의 표층 해수에서 분리한 장염비브리오균 75균주를 대상으로 항균제에 대한 감수성 여부를 확인하기 위하여 17종의 항균제를 사용하여 디스크확산법으로 측정하였으며 그 결과는 Table 2에 나타내었다. 17종의 항균제 중 7종의 항균제는 75균주 전

부 또는 일부 균주에서 내성을 나타낸 반면 나머지 10종의 항균제는 모든 균주에서 감수성을 나타내었다. 내성율이 높은 항균제는 penicillin G (100%), ampicillin (92.0%), amoxicillin (82.7%), ciprofloxacin (2.7%), trimethoprim (2.7%), cephalothin (1.3%) 및 erythromycin (1.3%) 순서였다. 모든 균주는

Table 2. Antimicrobial susceptibility and resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from surface seawater in Geum river estuary area

Antimicrobials	Disc content (µg)	No. of isolates		
		Resistant	Intermediate	Susceptible
Amikacin (AK)	30	0	1	74
Ampicillin (AMP)	10	69	2	4
Amoxicillin (AML)	25	62	5	8
Cefoxitin (FOX)	30	0	5	70
Cephalothin (KF)	30	1	3	71
Chloramphenicol (C)	30	0	1	74
Ciprofloxacin (CIP)	5	2	1	72
Erythromycin (E)	15	1	2	72
Gentamicin (GN)	10	0	0	75
Kanamycin (K)	30	0	0	75
Nalidixic acid (NA)	30	0	0	75
Nitrofurantoin (F)	100	0	0	75
Penicillin G (P)	10	75	0	0
Rifampin (RD)	5	0	1	74
Streptomycin (S)	10	0	0	75
Tetracycline (TE)	30	0	0	75
Trimethoprim (W)	5	2	0	73

amikacin을 포함한 10종의 항균제에 대해서는 감수성을 나타내었다(Table 2). 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(Han et al., 2012; Kim et al., 2014, 2016; Kang et al., 2016, 2017; Cho et al., 2019). 또한 실험에 사용한 75균주에 대한 항균제 내성 양상에 관한 결과는 Table 3과 같다. Penicillin G에만 내성을 나타내는 균주는 4균주(5.3%)이며 MAR index는 0.06로 확인되었다. Penicillin G-ampicillin 2종의 항균제에 내성을 나타내는 9균주(12.0%) 및 amoxicillin-penicillin G에 내성을 나타내는 균주는 2균주(2.7%)로 MAR index는 0.12로 확인되었다. Amoxicillin-ampicillin-penicillin G 3종에 내성을 나타내는 균주는 54균주(72.0%)이며 MAR index는 0.18로 확인되었다.

Amoxicillin-ampicillin-ciprofloxacin-penicillin G 4종에 내성을 나타내는 2균주(2.7%), amoxicillin-ampicillin-erythromycin-penicillin G 4종에 내성을 나타내는 균주는 1균주(1.3%), amoxicillin-ampicillin-cephalothin-penicillin G 4종에 내성을 나타내는 균주는 1균주(1.3%) 및 amoxicillin-ampicillin-penicillin G-trimethoprim 4종에 내성을 나타내는 균주는 2균주(2.7%)이며 MAR index는 0.24로 확인되었다. 실험에 사용한 75균주 장염비브리오균은 평균 2.8종의 항균제에 내성을 나타내며, amoxicillin-ampicillin-penicillin G 3종의 항균제 내성 조합이 가장 일반적인 항균제 내성 양상으로 확인되었다(Table 3).

금강 하구 해역의 표층 해수에서 분리한 장염비브리오균이 다양한 항균제에 내성을 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 가능성 등이 추정된다(Kuhl et al., 1978; Jo et al., 2020; Mok et al., 2021). 국내외적으로 장염비브리오균의 항균제 내성 양상에 관한 연구는 많으나 내성유전자에 관한 연구는 대체로 적다는 점에서 항균제 내성 유전자의 획득 메커니즘에 관한 연구의 필요성은 강조된다.

Ampicillin에 대한 장염비브리오균의 최소발육억제농도 측정

장염비브리오균에서 내성이 가장 광범위하게 보고되어 있는 항균제인 ampicillin에 대한 75균주의 MIC를 측정한 결과는 Table 4와 같다. 75균주 장염비브리오균의 ampicillin에 대한 MIC는 4-2,048 µg/mL 수준으로 확인되었는데 2,048 µg/mL의 MIC를 나타내는 균주는 5균주(6.7%), 1,024 µg/mL의 MIC를 나타내는 균주는 19균주(25.3%), 512 µg/mL의 MIC를 나타내는 균주는 14균주(18.7%), 256 µg/mL의 MIC를 나타내는 균주는 13균주(17.3%), 128 µg/mL의 MIC를 나타내는 균주는 8균주(10.7%), 64 µg/mL의 MIC를 나타내는 균주는 7균주(9.3%), 32 µg/mL의 MIC를 나타내는 균주는 3균주(4.0%), 16 µg/mL의 MIC를 나타내는 균주는 2균주(2.7%), 8 µg/mL의 MIC를 나타내는 균주는 3균주(4.0%) 및 4 µg/mL의 MIC를 나타내는 균주는 1균주(1.3%)로 확인되었으며, 75균주의 평균 MIC는 557.6 µg/mL이었다. 이 결과는 장염비브리오균은 일반적으로 ampicillin에 고도 내성을 나타내고 있다는 기존의 결과와 대체로 일치한다(Lee et al., 2011; Kim et al., 2014, 2016; Cho et al., 2019). 임상 유래 장염비브리오균의 ampicillin에 대한 MIC의 농도는 >256-24 µg/mL의 범위였다는 결과(Pazhani et al., 2014) 및 환경 유래 장염비브리오

Table 3. Antimicrobial resistance patterns and multiple antimicrobial resistance (MAR) indices of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from surface seawater in Geum river estuary area

Antimicrobial resistant pattern	No. of resistant strains	MAR index
P	4	0.06
AMP-P	9	0.12
AML-P	2	0.12
AMP-AML-P	54	0.18
AMP-AML-CIP-P	2	0.24
AMP-AML-E-P	1	0.24
AMP-AML-KF-P	1	0.24
AMP-AML-P-W	2	0.24
Total	75	

AMP, Ampicillin; AML, Amoxicillin; CIP, Ciprofloxacin; E, Erythromycin; KF, Cephalothin; P, Penicillin G; W, Trimethoprim.

Table 4. Minimum inhibitory concentration (MIC) to ampicillin of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from surface seawater in Geum river estuary area

MIC to ampicillin (µg/mL)	Ratio (%)
2,048	5/75 (6.7)
1,024	19/75 (25.3)
512	14/75 (18.7)
256	13/75 (17.3)
128	8/75 (10.7)
64	7/75 (9.3)
32	3/75 (4.0)
16	2/75 (2.7)
8	3/75 (4.0)
4	1/75 (1.3)

균의 ampicillin에 대한 MIC의 농도는 400 µg/mL이었다는 결과(Silva et al., 2018) 보다 본 실험에 사용한 균주의 ampicillin에 대한 평균 MIC가 높다는 점에서 심각성은 크다고 판단된다. Ampicillin에 감수성을 나타내는 4균주(5.3%)의 MIC는 <8.0 µg/mL이었다. Ampicillin 분해 유전자인 β-lactamase와 상동성이 있는 VPA0477 유전자를 보유하고 있으면서도 ampicillin에 감수성을 나타내는 4균주는 Lee et al. (2011)이 보고한 바와 같이 VPA0477 유전자 프로모터 영역의 변이 또는 결손에 의한 전사 또는 번역 과정의 문제로 인해 β-lactamase의 발현이 전혀 불가능하거나 또는 불충분하여 ampicillin에 감수성을 나타낸다고 판단된다.

본 실험에 제공된 금강 하구 해역의 표층 해수에서 분리한 75 균주의 장염비브리오균은 1균주를 제외한 74균주는 이 균의 주요 병원성 독소인 TDH 또는 TRH 유전자를 보유하지 않은 비병원성이며, 1종 이상의 항균제에 내성을 나타낼 뿐만 아니라 ampicillin에 대해서는 매우 높은 MIC를 나타내는 것으로 확인되었다. 또한 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 어류 양식장에서 사용되고 있는 항균제의 오남용 방지를 위한 교육과 당국의 지속적인 점검이 요구된다. 또한 내성 유전자에 관한 연구가 부족한 상황이라 다양한 항균제 내성 유전자의 동정 및 염색체 또는 plasmid DNA상에서의 존재 양상 등의 파악은 내성유전자의 획득 및 확산 메커니즘을 이해하는데 큰 도움이 될 것으로 기대된다.

References

- Acar JF and Goldstein FW. 1991. Disk susceptibility test. In: Antibiotics in Laboratory Medicine. Lorian V, ed. Williams and Wilkins, Baltimore, U.S.A., 17-52.
- Cho ED, Kim HD and Park KS. 2019. Antimicrobial resistance and minimum inhibitory concentration of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from seawater and commercial fisheries. Korean J Fish Aquat Sci 52, 587-595. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2019.0587>.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2010. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 20th Informational Supplement. M100-S20-U. CLSI, Wayne, PA, U.S.A.
- 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>.
- Jo S, Shin C, Shin Y, Kim PH, Park JI, Kim M, Park B and So JS. 2020. Heavy metal and antibiotic co-resistance in *Vibrio parahaemolyticus* isolated from shellfish. Mar Pollut Bull 156, 111246. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111246>.
- 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.marpolbul.2017.02.070>.
- 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 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.marpolbul.2018.07.007>.
- Kesici U, Demirci M and Kesici S. 2019. Antimicrobial effects of local anaesthetics. Int Wound J 16, 1029-1033. <https://doi.org/10.1111/iwj.13153>.
- 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 *Vib-*

- rio 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. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.4.1173-1177.1999>.
- Kuhl SA, Pattee PA and Baldwin NJ. 1978. Chromosomal map location of the methicillin resistance determinant in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 135, 460-465. <https://doi.org/10.1128/jb.135.2.460-465.1978>.
- 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. <https://doi.org/10.5657/kfas.2010.43.6.637>.
- 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 advance 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, Wiczorek K and Osek J. 2015. Prevalence and antimicrobial resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from raw hellfish 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. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12659-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12659-1).
- 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). 2022. Food Poisoning Statistics. Retrieved from http://www.foodsafetykorea.go.kr/portal/healthyfoodlife/foodPoisoningStat.do?menu_no=4425&meun_grp=MENU_NEW02 on Oct 14, 2022.
- Mok JS, Cho SR, Park YJ, Jo MR, Ha KS, Kim PH and Kim MJ. 2021. Distribution and antimicrobial resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from fish and shrimp aquaculture farms along the Korean coast. Mar Pollut Bull 171, 112785. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112785>.
- Munita JM and Arias CA. 2016. Mechanisms of antibiotic resistance. Microbiol Spectr 4, 1-37. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>.
- 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 KS. 2014. Application of the β -lactamase (VPA0477) gene for the detection of *Vibrio parahaemolyticus* by polymerase chain reaction. Korean J Fish Aquat Sci 47, 740-744. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2014.0740>.
- 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. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.10.5742-5748.2000>.
- 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. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.11.6659-6665.2004>.
- 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>.
- Raghunath P. 2015. Roles of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin (TRH) in *Vibrio parahaemolyticus*. Front Microbiol 5, 805. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00805>.
- Rowe-Magnus DA and Mazel D. 2002. The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. Int J Med Microbiol 292, 115-125. <https://doi.org/10.1078/1438-4221-00197>.
- 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>.
- 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.marpollbul.2018.05.007>.
- Suthienkul O, Ishibashi M, Iida T, Nettip N, Supavej S, Eampokalap B, Makino M and Honda T. 1995. Urease production correlates with possession of the *trh* gene in *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated in Thailand. J Infect Dis 172, 1405-1408. <https://doi.org/10.1093/infdis/172.5.1405>.
- 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, 1-7. <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>.