

경기인천 연안에서 분리된 장염비브리오균의 항생제 내성 및 플라스미드 보유 현황

한아름 · 윤영준 · 김정원*

인천대학교 생명과학기술대학 생명공학부

Antibiotic Resistance and Plasmid Profile of *Vibrio parahaemolyticus* Strains Isolated from Kyunggi-Incheon Coastal Area

A Rheum Han, Young June Yoon, and Jung Wan Kim*

Division of Bioengineering, University of Incheon, Incheon 406-772, Republic of Korea

(Received February 16, 2012 / Accepted March 16, 2012)

Vibrio parahaemolyticus is one of the major agents responsible for food poisoning during summer in Korea, which is transmitted via seawater or seafoods. Recently, distribution of the bacteria in the marine environment has been increased due to global warming. Great concern also has been raised regarding public hygiene as well as marine culture by the emergence of pathogens with antibiotic resistance. Therefore, distribution of *V. parahaemolyticus* and antibiotic resistance of the isolates were monitored in 7 coastal areas of Kyonggi Province and Incheon by sampling seawater, fishes and clams monthly. *V. parahaemolyticus* was detected from 47.7% of 966 samples (seawater 61.9%, seafoods 41.8%) analyzed using CHROMagar™ and TCBS agar plates as well as multiplex PCR. Among 13 antibiotics tested, resistance to vancomycin and ampicillin was observed in 97.3% and 87.3% of the isolates, respectively, and the ratios of them resistant to cephalothin (48.8%) and rifampin (46.1%) were also high. The isolates were most highly sensitive to chloramphenicol (91.7%) and trimethoprim-sulfamethoxazole (91.8%). The ratio of sensitivity for other antibiotics was also high in the descending order of gentamycin (82.3%), tobramycin (74.8%), nalidixic acid (71.6%), tetracyclin (69.4%), cefotaxime (63.0%). About 69% of the isolates showed multiple drug resistance toward 3 antibiotics including vancomycin and ampicillin. Two of them exhibited resistance for 11 antibiotics used in this study. Plasmid profile analysis of the isolates with antibiotic resistance revealed that 55.1% of them retained plasmids of 24 different types. However, no clear inter-relationship between the resistance and the plasmid profile has been observed.

Keywords: *V. parahaemolyticus*, antibiotics resistance, distribution, multiple resistance, plasmid profile

장염비브리오균(*Vibrio parahaemolyticus*)은 비브리오과(Family Vibrionaceae)에 속하는 해양세균이며 그들 중 일부는 식중독의 주요 원인균으로(Fujino *et al.*, 1953) 주로 설사, 구토, 복부 경련 및 미열, 오한을 동반하는 위장염을 일으킨다. 이 균은 단일 편모로 운동하는 그람음성 다형성 단간균으로 염분의 농도가 3%일 때 가장 잘 성장한다. 여름철에 해수의 온도가 상승함에 따라 균의 번식이 활발해지며 어패류 생식 등을 통해 사람에게 감염되어 약 4-96시간 후 세균성 식중독 증상을 일으켜 3-4일간 지속된다. 최적 성장 조건 하에서 장염비브리오균의 세대시간은 대장균이나 포도상구균 등 보다 훨씬 짧은 10분 정도이기

때문에 단시간(3-4시간)에 식중독을 일으킬 수 있는 균체 수(약 10만-1,000만 개)로 급격히 증식할 수 있다(Martinez and Baquero, 2000). 한국식품의약품안전청의 자료에 따르면 노로바이러스, 병원성대장균, 황색포도상구균, 살모넬라에 이어 장염비브리오균이 최근 6년간 우리나라에서 식중독을 가장 많이 일으킨 원인균으로 나타나고 있다(<http://www.kfda.go.kr/fm/index.do>). 주요 병원성 인자로는 열불안정성 용혈독소(thermolabile direct hemolysin; *tlh*)와 내열성 용혈독소(thermostable direct hemolysin; *tdh*)를 들 수 있다(Taniguchi *et al.*, 1986; Shirai *et al.*, 1990). 이러한 장염비브리오균에 의한 장내감염은 대부분의 경우 증상이 심하지 않고 자가치유가 가능하나, 장외감염의 경우에는 수분과 전해질을 공급해야 하며 필요에 따라 적절한 항생제로 치료해야 한다.

1940년대 초에 항생제가 최초로 개발된 이래 많은 종류의 항

*For correspondence. E-mail: kjw5864@incheon.ac.kr; Tel.: +82-32-835-8244; Fax: +82-32-835-0763

생제가 감염질환 치료제로 널리 사용되어 왔으나, 항생제의 오남용에 따라 세균의 내성획득으로 야기된 병원균의 항생제 내성이 큰 사회적 문제로 대두되고 있고, 특히 여러 항생제에 대해 동시에 내성을 갖는 슈퍼박테리아의 출현으로 질병 치료의 어려움과 추가적인 내성균 확산 등이 우려되고 있다(Shanthini *et al.*, 2004). 항생제에 대한 의존도는 지난 수 십 년간 의학, 수의학, 농업, 수산업 등의 분야에서 꾸준히 증가되어 왔으나, 그 결과 얼마나 많은 양의 항생제가 자연계로 유입되었는지에 대해서는 파악된 바가 없다. 항생제 사용 범위는 곧 바로 세균들에 가해지는 선택압력의 지표가 되며(Schwartz *et al.*, 2003), 그로 인해 많은 세균들이 항생제를 무력하게 하는 다양한 효과적인 기작들을 획득하게 되었다(Mudryk, 2005). 특히 항생제가 많이 사용되는 병원 같은 곳에서 다제 내성균들이 많이 출현하게 되었고, 양식장에서 질병 예방이나 치료를 위해 사료에 항생제를 첨가하게 되면서 수계에서도 많은 항생제 내성균들이 발견되고 있다(Schwartz *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2009).

우리나라의 경우, 항생제 오남용으로 인한 항생제 내성균의 출현빈도가 다른 나라에 비해 상당히 높으며, 이러한 현상이 병원, 식품, 축산, 수산, 환경 등 다양한 분야에서 나타나고 있다(Chong and Lee, 1998; Lee, 2005; Chung *et al.*, 2006; Hwang *et al.*, 2008). 특히 제한된 공간에서 수행되는 수산양식의 경우 생산량 증대뿐 아니라 질병예방을 위해서 종사자들에 의해 임의로 사용되거나, 육지로부터 혹은 하천을 통해 해양환경으로 유입되는 항생제가 미치는 영향에 대한 모니터링과 이에 대한 대책 마련이 시급한 상황이다. 이러한 항생제에 대한 내성은 돌연변이(Martinez and Baquero, 2000), 염색체 상의 저항성 유전자의 유전(수직적 유전자 전이; Kuhl *et al.*, 1978), 혹은 플라스미드 등 유전적 인자의 생태계 내 확산(수평적 유전자 전이) 등의 기작을 통해 발생된다고 알려져 있다(Davies, 1997; Rowe-Magnus and Mazel, 2002).

이에, 본 연구에서는 경기도 및 인천 연안 7개 지역의 해수 및 어패류를 채집하여 장염비브리오균을 분리하고 임상에 흔히 사용되는 13종의 항생제에 대한 감수성을 검사하여 내성패턴을 조사하고 해수환경 중 항생제 내성균주의 분포와 내성범위 및 양상을 파악하고자 하였다. 또한 이러한 항생제 내성의 주요 매개 전달체로 알려진 플라스미드 DNA 보유여부를 검사하여 항생제 내성과 플라스미드 DNA 보유 간의 상관성을 분석하였다.

재료 및 방법

시료채취

경기-인천 연안지역 중 육지로 접근이 쉽고 어패류의 구입이 용이하여 사람들이 많이 찾는 곳 가운데 송도, 연안부두, 율미도, 영종도, 소래, 강화도 및 대부도 등 총 7개 지역을 선정하여 3월부터 10월까지 매월 중순경 시료를 채취하였다. 해수는 해변가에서 채수 하였고, 어패류는 해수를 채취한 인근지역에서 주로 구입하였는데 어류는 주로 국내연안에서 양식되는 것이었고 패류는 인천 근해 혹은 서해안 어장에서 채취된 것이었다. 이 기간 동안 해수 281건, 어패류 685건 등 총 966건의 시료 혹은 검체를

채취하였다. 시료들을 실험실에 옮겨 아래에 기술한 바와 같이 적절한 방법으로 전 처리한 다음 평판배지법과 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR) 기법을 사용하여 장염비브리오균을 검색하였다.

균주의 분리 및 동정

살균된 병에 채수한 해수(200 ml)는 실험실로 옮긴 후 3% (w/v) NaCl이 포함된 멸균수로 적절히 희석하거나 적정량의 원액을 CHROMagar™ Vibrio (Microbiology, France) 혹은 thiosulfate citrate bile salt sucrose 평판배지[TCBS; 0.5% (w/v) Bacto yeast extract, 1.0% (w/v) Bacto proteose peptone No. 3, 1.0% (w/v) sodium citrate, 1.0% (w/v) sodium thiosulfate, 0.8% (w/v) Bacto oxgall, 2.0% (w/v) Bacto saccharose, 1.0% (w/v) sodium chloride, 0.1% (w/v) ferric citrate, 0.04% (w/v) Bacto bromothymol blue, 1.5% (w/v) Bacto agar; Difco Co., USA]에 도달하여 30℃에서 16시간 이상 배양하였다. 어시장이나 횃집에서 구입한 어류는 아이스박스에 보관하여 실험실로 옮겨 어류의 살이나 아가미, 내장 등의 부위 1 g을 2.5% NaCl이 포함된 9 ml의 멸균된 증류수에 잘게 썰어 넣고 적절히 희석한 후 CHROMagar™나 TCBS 평판배지에 도달하여 30℃에서 16-24시간 배양하였다. 이때 장염비브리오 KCTC2729 (ATCC17802) 표준균주, KCTC2471 (ATCC33844) 균주, ATCC41664 균주 등을 대조균으로 사용하였다.

분리균주의 동정

TCBS 평판배지 상에서 초록색을 띠거나 CHROMagar™ 상에서 보라색을 띠는 균집락을 잠정적인 장염비브리오균으로 선발하였다. 정확한 균동정을 위해 이들 균집락에서 취한 균체를 끓여 염색체 DNA를 추출한 뒤 아래와 같이 PCR을 수행하였다. 장염비브리오균의 독소유전자(*toxR*)와 16S rRNA 유전자에 대해 종 특이적인 두 primer (rVPTOX1, 5'-ATACGAGTGGTTGCTGT CATG-3'/fVPTOX1, 5'-CTCTTCT GACGCAATCGTTG-3'; fA1, 5'-AGTTATCTGAACCTTCG G-3'/rV1, 5'-ACACGCGG CATGGCT GCATC-3')로 증폭(75 mM KCl 첨가; 95℃에서 2분간 변성시키고 60℃에서 30초간 annealing 시킨 다음 72℃에서 30초간 중합반응을 수행하여 35회 반복) 했을 때 370 bp와 340 bp 길이의 두 DNA 단편이 생성되는지 확인하였다. 또한 이러한 균주들 가운데 API 20E kit (bioMérieux, France)를 이용해 동정한 결과 장염비브리오균일 확률이 80% 이상인 균주들을 선발하여 본 연구에 사용하였다. 장염비브리오균의 병원성 인자인 *tdh* 유전자 보유여부는 fVPTDH1 (5'-GCACCGGTCAATGTAGAGG-3')와 rVPTDH1 (5'-CACAGCAGAATGACCGTGC-3')를 사용하여 PCR 했을 때 200 bp 길이의 DNA 단편이 증폭되는 것으로 판단하였다.

Agar Diffusion 시험법

장염비브리오 분리균주들의 항생제에 대한 감수성을 시험하기 위하여 2.5% (w/v) NaCl을 포함하는 LB 액체배지에서 16시간 전배양해서 Mueller-Hinton 한천배지(beef extract powder

0.2%, acid digest of casein 1.75%, starch 0.15%, Agar 1.7%; Difco Co.)에 10^4 colony forming unit 정도의 균체를 도말하였다. 분리균주가 도말된 배지 위에 ampicillin (AM; 10 µg), tetracycline (TE; 30 µg), cephalothin (CF; 30 µg), erythromycin (E; 15 µg), nalidixic acid (NA; 30 µg), gentamicin (GM; 120 µg), kanamycin (K; 30 µg), rifampin (RA; 5 µg), trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT; 1.25 µg), vancomycin (VA; 30 µg), chloramphenicol (C; 30 µg), tobramycin (NN; 10 µg), cefotaxime (CTX; 30 µg) 등 총 13종의 항생제 디스크(BBL™, Becton Dickinson, USA)를 무균적으로 올려놓은 뒤 30°C 항온배양기에서 16시간 배양하여 각 항생제에 의해 형성된 생육저지환의 크기를 측정하고(mm), 표준지표에 따라 감수성 여부를 평가하였다(Bauer et al., 1966).

내성균주의 플라스미드 프로파일 분석

항생제에 내성을 보이는 장염비브리오균주들의 플라스미드 보유여부와 그 프로파일을 분석하기 위하여 장염비브리오 분리균주들을 2.5% NaCl을 포함하는 LB 액체배지에서 16시간 배양한 다음 alkaline lysis 방법으로(Sambrook et al., 1989) 플라스미드 DNA를 분리하고 0.8% agarose 겔 상에서 전기영동을 통해 전개시켰다. 전기영동 후 전개된 플라스미드 DNA 프로파일을 Chemidoc (Kodak Image Station 4000R, CARESTREM HEALTH Inc., USA)을 사용하여 비교·분석하였다.

결과 및 고찰

장염비브리오균의 검출 빈도

수집된 시료들에서 분리된 균들 중 TCBS 평판배지에서 초록색을 띠는 비브리오 속 세균들을 선택하여 CHROMagar™에 배양했을 때 보라색 집락을 이루는 균주들을 잠정적 장염비브리오균으로 선별하였다. CHROMagar™는 주요 병원성 비브리오속 세균들을 β-galactosidase 활성여부를 배지에 포함된 발색시약을 통해 구분할 수 있도록 고안된 것으로 장염비브리오균은 보라색, *V. vulnificus*와 *V. cholerae*는 파란색, *V. alginolyticus*는 하얀색의 균집락을 형성한다. 잠정적 장염비브리오균으로 선별된 균주들의 염색체 DNA를 분리하여 16S rRNA 및 *toxR* 유전자 부위를 duplex PCR로 증폭했을 때 각 유전자에 대하여 340 bp와 370 bp 길이의 두 DNA 단편이 생성되는 것들을 장염비브리오균으로 동정하였다(Fig. 1; Yoon et al., 2000). 병원성 인자인 *tdh* 유전자를 포함하여 triplex PCR을 했을 때 *tdh* 유전자를 보유하고 있는 분리균주의 빈도는 매우 낮아 거의 검출되지 않았으며, 대조균으로 사용된 장염비브리오균주 중에서는 KCTC 2471와 KCTC 2729 균주들이 보유하고 있는 것으로 확인되었다. 이들의 생리생화학적 특성을 API20E kit를 사용하여 분석했을 때 장염비브리오일 확률이 80% 이상인 것들을 최종적으로 선별하였다.

3월부터 각 종 어패류 및 해수 시료에서 검출되기 시작한 장염비브리오균은 5월까지 각 시료에서의 검출빈도가 증가하다가 6월에 다소 감소하였는데 특히 어패류에서의 감소세(29%)가 현저하였다(Fig. 2). 장염비브리오균의 검출빈도는 기온의 상승에

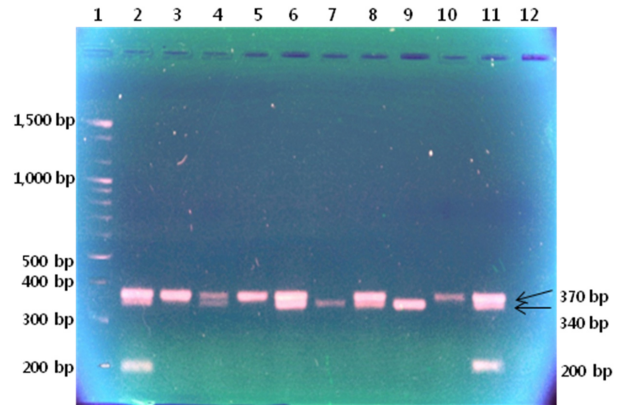


Fig. 1. Identification of *V. parahaemolyticus* using multiplex PCR. The PCR products were analyzed by 1.2% agarose gel electrophoresis. Lanes: 1, 100 bp ladder; 2, PCR product of *V. parahaemolyticus* KCTC 2729; 3–10, PCR product of putative *V. parahaemolyticus* isolates; 11, PCR product of *V. parahaemolyticus* KCTC 2471; 12, negative control.

따라 해수온도가 상승하면서 7월(63.9%)과 8월(76.8%) 중 급증하였고, 9월(59.8%)과 10월(57%) 중에는 다소 감소하였다. 대체로 어패류 보다 해수시료에서 검출빈도가 훨씬 높았고 계절에 따른 영향도 더 크게 받아 7, 8월에는 검출빈도가 각각 85.0%와 92.9%에 달했다. 8개월 간의 모니터링 결과 전체 해수 시료의 61.9%, 어패류 시료의 41.8%에서 장염비브리오균이 검출되어, 본 연구에서 분석된 시료 총 966건 중 47.7%의 시료에서 검출된 것으로 나타났다. 이렇게 다양한 해수시료 및 어패류 시료에서 분리된 장염비브리오균들을 -70°C에 냉동 저장하고, 이들의 항생제에 대한 내성을 분석하였다.

장염비브리오균의 항생제 내성

자연시료에서 분리된 장염비브리오균의 항생제 내성 실태를 분석하기 위하여 광역 항생제인 ampicillin, tetracycline, cephalothin, nalidixic acid, rifampin, trimethoprim-sulfamethoxazole, chloramphenicol, cefotaxime, 그람 양성균에 대해 특이적으로 항

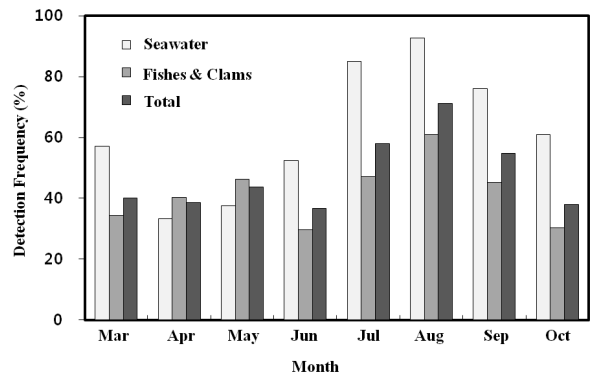


Fig. 2. Monthly detection frequency of *V. parahaemolyticus* from the samples.

Table 1. Antibiogram of three *V. parahaemolyticus* strains

Antibiotics ^a (Conc.)	Inhibition zone (mm) for <i>V. parahaemolyticus</i>					
	R ^b	I ^c	S ^d	KCTC 2729	KCTC 2471	ATCC 27969
AM (10 µg)	≤13	14-16	≥17	0 (R)	0 (R)	0 (R)
TE (30 µg)	≤14	15-18	≥19	22 (S)	30 (S)	25 (S)
CF (30 µg)	≤14	15-17	≥18	23 (S)	29 (S)	20 (S)
E (15 µg)	≤13	14-22	≥23	17 (I)	20 (I)	19 (I)
NA (30 µg)	≤13	14-18	≥19	22 (S)	23 (S)	24 (S)
GM (120 µg)	≤12	13-14	≥15	18 (S)	20 (S)	12 (R)
K (30 µg)	≤13	14-17	≥18	20 (S)	22 (S)	18 (S)
RA (5 µg)	≤16	17-19	≥20	19 (I)	18 (I)	19 (I)
SXT (1.25 µg)	≤10	11-15	≥16	22 (S)	23 (S)	23 (S)
VA (30 µg)	≤14	15-16	≥17	9 (R)	11 (R)	12 (R)
C (30 µg)	≤12	13-17	≥18	26 (S)	28 (S)	29 (S)
NN (10 µg)	≤12	13-14	≥15	16 (S)	17 (S)	16 (S)
CTX (30 µg)	≤14	15-22	≥23	32 (S)	28 (S)	32 (S)

^a abbreviated as shown in materials and methods
^b resistant
^c intermediate
^d sensitive

생능을 보인다고 알려진 vancomycin과 erythromycin 및 그람 음성균에 항생능을 보이는 gentamycin, kanamycin, tobramycin 등 13종의 항생제 디스크를 사용하였으며, 먼저 표준균주인 *V. parahaemolyticus* KCTC 2729 균주 등 공인된 균주들에 대한 항생제 내성을 분석하였다(Table 1). 그 결과 KCTC 2729 표준균주는 ampicillin 및 vancomycin에 대해서 내성을 보였고, erythromycin과 rifampin에 대해서는 중도내성을, 그 외 항생제에 대해서는 감수성을 보이는 것으로 나타났다. 본 연구에 사용된 항생제 중 vancomycin은 주로 그람 양성균에 항생능을 보이고 그람 음성균들은 이들에 의해 거의 영향을 받지 않기 때문에 그람 음성균인 장염비브리오 균주들도 영향을 받지 않는 것으로 사료되었다. KCTC 2729 표준균주는 vancomycin과 ampicillin 외에 본 연구에서 사용된 그람 음성균에 작용하거나 혹은 광역활성범위를 갖는 기타 항생제들에 대해 내성을 갖지 않는 것으로 나타났다. 또 다른 장염비브리오 균주인 KCTC 2471는 표준균주와 비슷한 양상을 보인 반면, ATCC 27969는 두 항생제 및 그람 음성균에 작용하는 gentamycin에 내성을 보여 위의 두 균주들과 다른 내성 양상을 갖고 있는 것으로 분석되었다.

자연시료에서 분리된 총 639개 장염비브리오 균주들에 대해서도 위의 13종 항생제에 대한 내성을 분석하였다(Fig. 3). 그 결과 vancomycin에 대해서 97.3%의 분리주들이 내성을 나타냈으며 단 1.5%만이 감수성을 보였다. Ampicillin에 대해서는 87.3%의 분리주들이 내성을 그리고 11.7%가 감수성을 보였다. 이러한 장염비브리오균의 ampicillin에 대한 내성은 1978년 미국에서 수행된 연구에서 160개의 장염비브리오 분리주들이 모두 이 항생제에 내성을 보였다는 보고(Joseph *et al.*, 1978)와 Han 등(2007)이 분석한 168개의 장염비브리오 분리주들 중 81%가 ampicillin에 대해 내성을 보였다는 결과와 부합되어 보편적인 현상인 것으로 사료된다. Han 등(2007)의 보고서에서 패혈증을 유발시킬 수 있는 151개의 *V. vulnificus* 균주들은 모두 ampicillin에 대해 감수성을 갖는 것으로 분석되어, *Vibrio* 속 세균이라도 종에 따라 이 항생제에 대한 내성이 다르다는 것을 알

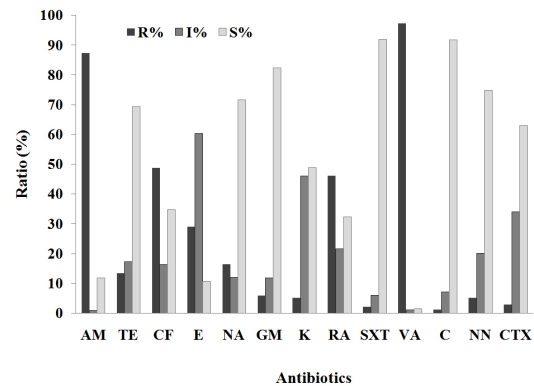


Fig. 3. Resistance (R), intermediate resistance (I), and sensitivity (S) ratios of the *V. parahaemolyticus* isolates against various antibiotics. Antibiotics were abbreviated as shown in materials and methods.

수 있었다. 또한 cephalothin (48.8%)과 rifampin (46.1%)에 대해 내성을 갖는 분리주들의 비율도 기타 다른 항생제들에 비해 뚜렷하게 높았다. 가장 많은 분리주들이 감수성을 보인 항생제는 trimethoprim-sulfamethoxazole (91.8%)과 chloramphenicol (91.7%)이었고, 단 2.1%와 1.2%만이 각 항생제에 대해서 내성을 보이는 것으로 나타났다. 이외에도 gentamycin (82.3%), tobramycin (74.8%), nalidixic acid (71.6%), tetracyclin (69.4%), cefotaxime (63.0%) 등의 순서로 감수성을 갖는 비율이 높았다. Erythromycin의 경우에는 중도내성을 갖는 비율(60.3%)이 내성(28.9%)이나 감수성(10.7%)을 보이는 분리주들의 비율보다 훨씬 더 높았다. Kanamycin의 경우에도 중도내성을 보이는 균주들의 비율(46.0%)이 높았으나 감수성을 보이는 균주들의 비율(48.9%)과 비슷했으며, 내성을 보이는 균주들의 비율(5.0%)은 상당히 낮았다. Shanthini 등(2004)은 인도의 튜티코린 지역에서 분리된 장염비브리오균주들의 항생제 내성을 10개의 항생제들에 대해 분석한 결과 97.6%가 bacitracin과 vancomycin에 대해 내성을 보였고, bacitracin > vancomycin >

erythromycin> penicillin> oxytetracyclin> streptomycin> ampicillin> gentamycin> neomycin> chloramphenicol의 순서로 내성이 높았다고 보고한 바 있다. 또한, chloramphenicol의 경우 분리균주의 81%가 감수성을 보였는데 이는 Sanjeev (1999)가 그들이 시험한 장염비브리오 분리균주가 모두 이 항생제에 대해 감수성을 보였다는 보고와 비교할 때 그 동안 장염비브리오균의 이 항생제에 대한 내성이 증가되어 왔음을 알 수 있었다.

장염비브리오균의 다중 항생제 내성

자연시료에서 분리된 장염비브리오균 중 총 716개 균주들에 대한 항생제 내성을 분석한 결과 146개 균주들이(20.39%) 표준균주처럼 ampicillin과 vancomycin의 두 항생제에 대해서 모두 내성을 보이고 다른 항생제에 대해서는 내성을 보이지 않는 것으로 나타났다(Fig. 4). 이러한 양상을 보이는 균주들은 67% 정도가 해수시료에서 발견되어 어패류 보다 해수에 더 많이 존재하고 있는 것으로 분석되었다. 분리균주들 중 75개 균주들은 (10.47%) vancomycin에 대해서만 내성을 보였고 2개 균주들은 (0.28%) ampicillin에 대해서만 내성을 보였으며, 두 항생제 모두에 대해서 내성을 보이지 않은 균주는 단 1개(0.14%) 뿐이었다.

Vancomycin과 ampicillin을 포함하여 3개의 항생제에 대해 내성을 보이는 분리균주들은 총 191개 균주(26.68%)였고, 4개에 대해서 내성을 보이는 균주는 117개(16.34%), 5개에 대해서는 92균주(12.85%), 6개에 대해서는 47균주(6.56%), 7개에 대해서는 16균주(2.23%), 8개에 대해서는 15균주(2.10%)들이 내성을 나타냈다. 9개 혹은 10개의 항생제에 대해 내성을 갖는 것은 각각 6균주(0.84%), 11개에 대해 내성을 보이는 것도 2균주(0.28%)가 있는 것으로 분석되었다. 태국의 새우양식장에서 분리된 *Vibrio* 속 세균들의 경우 89%가 적어도 1개 이상의 항생제에 내성을 갖고 있고 26%는 3개 이상의 항생제에 내성을 보이는

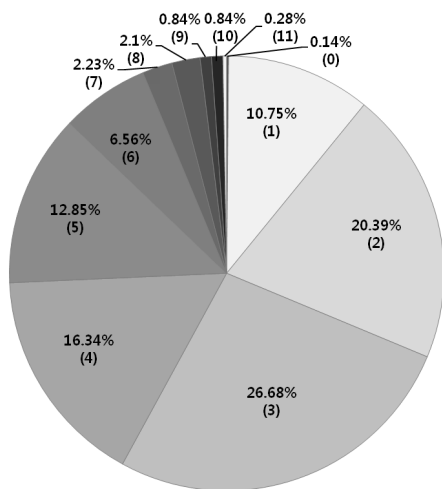


Fig. 4. Ratio of the *V. parahaemolyticus* isolates with multiple drug resistance at various degrees. Multiplicity of the resistance is presented in a parenthesis.

다중 내성균으로 보고된 바 있다(Kitiyodom et al., 2010). 호주의 양식장에서 분리된 해양세균들의 경우에도 다중 내성균의 비율이 상당히 높은 것으로 보고된 바 있는데 26.7%가 1개의 항생제에 내성을 보였고, 73.1%가 2개 이상의 항생제에 내성을 보였으며 이 중 2균주(2.3%)는 사용된 10개의 항생제 중 8개에 대해 내성을 나타냈다고 보고된 바 있다(Akinbowale et al., 2006).

우리나라에서, 장염비브리오균의 항생제 내성에 대한 실험은 Son 등(2003)에 의해 작은 수의 분리균주들을 대상으로 수행된 바 있는데, ampicillin에 대해 내성을 보이는 분리균주들의 비율이 높으며 chloramphenicol과 trimethoprim-sulfamethoxazole에 대해 감수성을 갖는 분리균주들의 비율이 높다는 점은 일치했지만 nalidixic acid와 gentamycin에 대해 모든 분리균주들이 감수성을 보였다는 점과 tetracycline에 대해 대부분의 분리균주들이 중도내성을 보였다는 점에서 차이가 있다. 또한, 전북 부안군의 해수에서 분리된 장염비브리오균들이 100% ampicillin에 대해 내성을 보이고 다른 12종의 항생제에 대해서는 감수성을 보였다는 보고도 있었는데(Lee and Park, 2010), 본 연구 결과와 차이를 보인 것은 시험한 분리균주 규모의 차이에 따른 것으로 사료된다.

위의 결과들로부터 해수환경에서 분리되는 장염비브리오균들의 다중 항생제 내성 보유현상이 매우 광범위하게 보편화되어 있는 것을 나타내며 향후 이러한 양상에 대한 꾸준한 모니터링이 필요하다고 사료되었다. 분리균주들의 다중 항생제 내성은 육지 혹은 연안지역으로부터 유입되는 다량의 항생제로 인해 자연계에서 획득하게 되었거나, 항생제에 대해 이미 내성을 갖고 있는 균주들이 보유하고 있는 플라스미드나 해수에 존재하는 장염비브리오 특이적인 박테리오파아지 등의 DNA (Alagappan et al., 2010)를 수평적 전이를 통해 받아들여 획득하게 되었기 때문인 것으로 추정할 수 있다. 수산 양식장에서 tetracycline, chloramphenicol, streptomycin 등의 항생제에 대한 내성 유전자를 보유하고 수평적으로 확산될 수 있는 R-플라스미드가 분리되었다는 보고도 있다(Aoki and Takahashi, 1987). 따라서 이러한 가능성을 분석하기 위한 시도로 본 연구를 통해 분리된 장염비브리오 균주들이 보유하고 있는 플라스미드 프로파일을 분석하였다.

항생제 내성 장염비브리오균 보유 플라스미드 프로파일

표준균주인 KCTC 2729 및 KCTC 2471, ATCC 27296 장염비브리오균주와 다양한 항생제 내성 양상을 보였던 분리균주들 중 670개 균주들의 플라스미드 보유 현황을 분석하였다(Fig. 5). 본 연구에서는 플라스미드 DNA를 추출하여 제한효소를 절단하지 않고 전기영동 했기 때문에 정확한 크기나 보유 플라스미드의 숫자는 파악할 수 없었고 단지 플라스미드 보유 유무 및 프로파일만 파악할 수 있었다. KCTC 2729와 KCTC 2471 균주들은 1개의 플라스미드를 보유하고 있는 것으로 나타난 반면(Fig. 5, lane 1), ATCC 27296 균주의 경우에는 아무 것도 감지되지 않았다. 따라서, 이들의 플라스미드 보유 현황 및 항생제 내성 양상을 비교했을 때, 이들이 나타내는 항생제 내성은 플라스미드 상의 유전자에 의한 것이 아니라 염색체 상의 유전자 조성에 의해

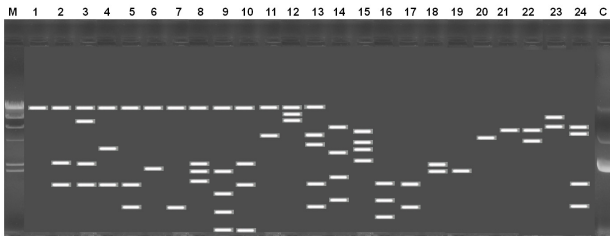


Fig. 5. A diagram of plasmid profiles observed in the *V. parahaemolyticus* strains. The plasmids isolated from the bacterial strains were observed by 0.8% agarose gel electrophoresis and their profiles were summarized as a diagram (lanes 1–24) along with a size marker (lane M, Lambda DNA digested with *Hind*III) and a control plasmid (lane C, pJM109).

Table 2. Comparison of antibiograms and plasmid profiles of various *V. parahaemolyticus* strains.

<i>V. parahaemolyticus</i>	Resistance to ^a	Plasmid profile ^b
KCTC 2729	AM, VA	1
KCTC 2471	AM, VA	1
ATCC 27969	AM, VA, GM	- ^c
SRSW3-1-12	AM, TE, CF, NA, K, RA, VA	1
KHF14-2-9	AM, CF, RA, VA	1
SRSW10-2-4	-	1
WMSW8-3-5	AM, CF, E, GM, RA, VA	2
KHSW6-3-1	AM, RA, VA	2
YJSW10-3-7	AM, VA	2
WMSW8-1-2	AM, CF, VA	2
WMSW8-3-2	AM, CF, E, RA, VA, CTX	2
SRCL8-16	AM, TE, CF, E, RA, VA, NN	3
SROY10-5	AM, VA	4
YACL8-8	AM, VA	5
SRF19-2-3	AM, E, RA, VA	6
YACL8-5	AM	7
SRSW8-2-4	AM, VA	11
SDSW4-2-5	AM, CF, RA, VA	15
SDSW8-2-7	AM, RA, VA	16
SRSW7-2-9	AM, VA	17
SRSW3-3-2	AM, CF, RA, VA	18
YJF15-2-12	AM, CF, RA, VA	19
SRSW7-1-15	AM, CF, E, RA, VA	20
SDSW-10-1-16	AM, VA	20
SRSW9-3-24	AM, CF, K, RA, VA, NN, CTX	20
SRSW3-3-1	AM, CF, RA, VA	23

^a abbreviated as shown in materials and methods

^b plasmid profile as shown in Fig. 5

^c not detected

결정되는 것임을 알 수 있었다.

분리균주들 가운데 플라스미드를 보유하고 있는 균주들은 369개로 약 55.1%에 달하였고, 총 24가지의 프로파일을 보이는 것으로 분석되었다. 그 중 KCTC 2729과 같은 플라스미드 프로파일을 보이는 경우가 133개로 가장 많았다(19.8%; Fig. 5). 이 플라스미드와 함께 다른 플라스미드를 동시에 보유하여 변형된 프로파일을 보이는 균주들은 12가지 유형의 83개로 나타났다. 따라서 85.6%의 분리균주들이 표준균주와 같거나 변형된 플라스미드 프로파일을 보이는 것을 알 수 있었다. 나머지 53개 분리

균주들은 11종류의 서로 다른 프로파일을 보였다(Fig. 5). 그러나 같은 플라스미드 프로파일을 보이는 균주들이 동일한 항생제 내성을 보이는 등 두 특성 간의 상호연관성은 관찰되지 않았다(Table 2). 따라서 표준균주를 비롯한 공인균주들과 마찬가지로 분리균주들이 갖고 있는 항생제 내성도 그들이 보유하고 있는 플라스미드에 의한 것이 아니라 염색체 상에 있는 유전적 구성에 의해 결정되는 것으로 사료되었다.

Li 등(1999)은 양식된 청돔에서 분리된 51개의 *Vibrio* 속 세균들 중 15개(29.4%) 균주들이 1-4개의 플라스미드를 보유하고 있었고, 이들 중 9개 균주들의 플라스미드 및 그와 연관된 ampicillin, cefuroxime, trimethoprim에 대한 내성이 1단계 접합 과정을 통해 다른 균주들로 전이되었다고 보고하였다. 반면에 Devie 등(2009)은 인도 남부의 새우 양식장에서 채취한 새우, 물, 흙 등의 시료 중 46%에서 장염비브리오균을 분리하여, 이들 가운데 50% 이상이 chlorotetracycline, chloramphenicol, nitrofurantoin에 대해서 감수성을 나타내며 다양한 크기와 패턴의 10가지 플라스미드 프로파일을 보이는 것으로 분석하였는데, 이들 분리균주들에서 플라스미드 DNA를 제거했을 때에도 항생제에 대한 내성에는 변화가 없었다고 보고하였다. 그러므로 이러한 내성이 염색체 상의 유전정보에 의한 것으로 추정되고, 본 연구의 결과도 이들의 보고와 비슷한 것으로 판단된다. 따라서, 향후 이렇게 다양한 항생제 내성 양상을 보이는 균주들의 염색체 상에 위치한 integron을 분석함으로써 각 항생제에 대한 내성 유전자 및 그들의 기능을 파악하고 이를 토대로 이러한 특성들이 확산되는 기작 및 경로를 이해할 수 있을 것으로 기대된다.

적 요

장염비브리오는 우리나라에서 하절기에 발생하는 식중독의 주요 원인균으로 주로 해수 및 어패류를 통해 인체에 감염된다. 최근 지구 온난화로 해수의 온도가 상승하면서 해양환경 중 세균들의 분포도가 증가하고 또 다양한 항생제에 대한 내성을 보이는 병원균들이 확산되고 있어 국민보건 및 수산양식 등의 분야에 큰 문제로 대두되고 있다. 이에 본 연구에서는 경기, 인천지역 7곳에서 해수 및 어패류 시료를 채취하여 장염비브리오균의 분포도를 모니터링하고 이들의 항생제 내성 양상을 분석하였다. 총 966건의 시료를 CHROMagar™ 및 TCBS 평판배지와 multiplex PCR기법으로 동정했을 때 전체 해수 시료의 61.9%, 어패류 시료의 41.8% 등 총 47.7%의 시료에서 장염비브리오균이 검출되었다. 이들 분리균주들의 항생제 내성을 13종의 항생제에 대해 분석한 결과 97.3%와 87.3%가 각각 vancomycin과 ampicillin에 대해 내성을 보였고 cephalothin (48.8%)과 rifampin (46.1%)에 대한 내성비율도 기타 다른 항생제들에 비해 상대적으로 높은 것으로 나타났다. 분리균주들의 항생제 감수성은 chloramphenicol (91.7%)과 trimethoprim-sulfamethoxazole (91.8%)에 대해 가장 높았고, gentamycin (82.3%), tobramycin (74.8%), nalidixic acid (71.6%), tetracyclin (69.4%), cefotaxime (63.0%) 등의 순서로 감수성 비율이 높았다. 분리균주들의 약 69%가 vancomycin과 ampicillin을 포함하여 3개 이상의 항생제

에 대해 다중내성을 보였고 특히 11개 항생제에 대해 내성을 보이는 균주도 2개 검출되었다. 항생제 내성 장염비브리오 분리균주들의 플라스미드 프로파일을 분석한 결과 55.1%가 플라스미드를 보유하고 있었으며, 이들은 총 24가지 유형으로 분류되었으나 플라스미드 프로파일과 항생제 내성 간의 뚜렷한 상관관계는 관찰되지 않았다.

감사의 말

위의 연구는 인천대학교 교내연구비를 지원받아 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

참고문헌

- Akinbowale, O.L., Peng, H., and Barton, M.D. 2006. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. *J. Appl. Microbiol.* **100**, 1103–1113.
- Alagappan, K.M., Devivasigamani, B., Somasundaram, S.T., and Kumaran, S. 2010. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and its specific phages from shrimp ponds in east coast of India. *Curr. Microbiol.* **61**, 235–240.
- Aoki, T. and Takahashi, A. 1987. Class D tetracycline resistance determinants of R-plasmids from fish pathogens *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda* and *Pasteurella piscisida*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31**, 1278–1280.
- Bauer, H.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C., and Turk, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* **45**, 493–496.
- Chong, Y. and Lee, K. 1998. Antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from Korean patients. *Microb. Ind.* **24**, 1–11.
- Chung, Y.H., Jeoung, H.H., Kwon, Y.I., and Kim, H.R. 2006. The monitoring of antibiotic resistant bacteria from environment (River and Downstream). *Ann. Report KFDA.* **10**, 1022–1023.
- Davies, J.E. 1997. Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants. *Ciba F. Symp.* **207**, 15–27; discussion 27–35.
- Devie, R., Surendran, P.K., and Chakraborty, K. 2009. Antibiotic resistance and plasmid profiling of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from shrimp farms along the southwest coast of India. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 2005–2012.
- Fujino, T., Okuno, Y., Nakada, D., Aoyama, A., Fukai, K., Mukai, T., and Ueho, T. 1953. On the bacteriological examination of shirasu food poisoning. *Med. J. Osaka Univ.* **4**, 299–304.
- Han, F., Walker, R.D., Janes, M.E., Prinyawiwatkul, W., and Ge, B. 2007. Antimicrobial susceptibilities of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* isolates from Louisiana Gulf and retail raw oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 7096–7098.
- Hwang, I.G., Kwak, H.S., Kim, M.K., Han, J.A., Park, Y.C., Kim, E.J., Lee, G.Y., Yoon, H.S., Lee, J.S., Cho, J.H., and et al. 2008. Monitoring and evaluation of antimicrobial resistance of foodborne pathogenic bacteria. *Ann. Report KFDA.* **12**, 191–192.
- Joseph, S.W., DeBell, R.M., and Brown, W.P. 1978. *In vitro* response to chloramphenicol, tetracycline, ampicillin, gentamicin, and beta-lactamase production by halophilic vibrios from human and environmental sources. *Antimicrob. Agents Chemother.* **13**, 244–248.
- Kitiyodom, S., Khemtong, S., Wongtavatchai, J., and Chuanchuen, R. 2010. Characterization of antibiotic resistance in *Vibrio* spp. isolated from farmed marine shrimps (*Penaeus monodon*). *FEMS Microbiol. Lett. Ecol.* **72**, 219–227.
- Kuhl, S.A., Pattee, P.A., and Baldwin, N.J. 1978. Chromosomal map location of the methicillin resistance determinant in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **135**, 460–465.
- Kumar, P.A., Patterson, J., and Karpagam, P. 2009. Multiple antibiotic resistance profiles of *Vibrio cholerae* non-O1 and non-O139. *Jpn. J. Infect. Dis.* **62**, 230–232.
- Lee, T.S. 2005. Establishment of antimicrobials management systems for aquaculture. *Ann. Report KFDA.* **9**, 422–423.
- Lee, K. and Park, P. 2010. Antibiotic-resistance profiles and the identification of the ampicillin-resistance gene of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from Seawater. *Kor. J. Fish Aquat. Sci.* **43**, 637–641.
- Li, J.J., Yie, R., Foo, W.T., Ling, J.M.L., Xu, H., and Woo, N.Y.S. 1999. Antibiotic resistance and plasmid profiles of vibrio isolates from cultured silver sea bream, *Sparus sarba*. *Mar. Pollut. Bull.* **39**, 245–249.
- Martinez, J.L. and Baquero, F. 2000. Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 1771–1777.
- Mudryk, Z. 2005. Occurrence and distribution antibiotic resistance of heterotrophic bacteria isolated from a marine beach. *Mar. Pollut. Bull.* **50**, 80–86.
- Rowe-Magnus, D.A. and Mazel, D. 2002. The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. *Int. J. Med. Microbiol.* **292**, 115–125.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning : A laboratory manual, pp. 142–152. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- Sanjeev, S. 1999. Incidence, enteropathogenicity and antibiotic sensitivity of *V. parahaemolyticus* from a brackish water culture pond. *Fish. Technol.* **36**, 13–18.
- Schwartz, T., Kohonen, W., Jansen, B., and Obst, U. 2003. Detection of antibiotic resistant bacteria and their resistant genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS Microbiol. Ecol.* **43**, 325–335.
- Shanthini, C.F., Kumar, P.A., and Patterson, J. 2004. Incidence and antibiotic susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* from sea foods of Tuticorin. *Indian J. Fish.* **51**, 43–47.
- Shirai, H., Ito, H., Hirayama, T., Nakabayashi, Y., Kumagai, K., Takeda, Y., and Nishibuchi, M. 1990. Molecular epidemiologic evidence for association of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* with gastroenteritis. *Infect. Immun.* **58**, 3568–3573.
- Son, J.C., Park, S.W., and Min, K.J. 2003. Environmental and antimicrobial characteristics of *Vibrio* spp. isolated from fish, shellfish, seawater and brackish water samples in Gyeongbuk Eastern Coast. *Kor. J. Environ. Hlth.* **29**, 94–102.
- Taniguchi, H., Hirano, H., Kubomura, S., Higashi, K., and Mizuguchi, Y. 1986. Comparison of the nucleotide sequences of the genes for the thermostable direct hemolysin and the thermolabile hemolysin from *Vibrio parahaemolyticus*. *Microb. Pathog.* **1**, 425–432.
- Yoon, Y.J., Kim, D.Y., Lee, U.Y., Koh, Y.H., Kim, S.K., and Kim, J.W. 2000. Isolation and identification of *Vibrio* species contaminated in imported frozen seafoods. *J. Food Hyg. Safety* **15**, 128–136.