

## 서울에서 시판중인 굴의 세균학상 오염과 분리된 비브리오속 균의 항생제 내성 양상

홍은경, 박소희, 윤지희, 강병용<sup>1</sup>, 하남주\*

삼육대학교 약학과, <sup>1</sup>삼육대학교 생명과학연구소

### Antibiotic Resistance of *Vibrio* spp. and Bacterial Contamination of Commercial Oysters in Seoul, Korea

Eun-Kyung Hong, So-Hee Park, Ji-Hee Yun,  
Byung Yong Kang<sup>1</sup> and Nam-joo Ha\*

Dept. of Pharmacy, Sahmyook University, <sup>1</sup>Research Institute for Life Science, Sahmyook University

#### ABSTRACT

The purpose of this investigation was to measure the level of bacterial contamination of oysters, and observe antibiotic resistance pattern of *Vibrio* spp. found in oysters. For this experiment, 100 oysters were collected from 100 markets around seoul area from October, 2004 to January, 2005. Bacterial contaminations of the oysters were confirmed by performing the method of standard plate count and desoxycholate lactose agar plate. Total plate counts were  $2.7 \times 10^2 \sim 1.2 \times 10^5$  cfu/g. Coliform group were  $1.0 \times 10^1 \sim 3.2 \times 10^5$  cfu/g. Results have shown that *Vibrio* spp. was present in 64% of the 100 sampls. Antibiotic resistance pattern of *Vibrio* spp. showed that MIC<sub>50</sub> of chloramphenicol was 0.2 g/mL, MIC<sub>90</sub> was 25 µg/mL, and MIC<sub>50</sub> of tetracycline was <0.05 µg/mL, MIC<sub>90</sub> was 25 µg/mL, and MIC<sub>50</sub> of ciprofloxacin was 0.01 g/mL, MIC<sub>90</sub> was 10 > µg/mL. Three of the six strains were identified as *Vibrio alginolyticus*.

**Key words** : antibiotic resistance oyster, and *vibrio* spp.

#### 서 론

문명의 발달과 사회구조의 변화에 따라 식생활에 있어서도 과거와는 다른 많은 변화가 일어나고 있다. 또한 식자재의 다양화로 식중독의 원인도 매우 다양하며 발생 양상도 나라에 따라 다르다. 최근 우리나라에서 발병한 식중독의 원인 식품을 보면 육류 및 가공 식품이 30~70%를 차지하고 그 다음이 어패류 및 가공 식품으로 11~37%를 차지

한다. 또한 원인 미생물로는 살모넬라균이 23.5%, 장염 비브리오균이 28.6%이며 다음이 황색 포도상구균으로 15.5%이다. 이중 특히 비브리오나 살모넬라 식중독 등은 여름철에 발생하는 식중독의 50% 이상을 차지할 정도로 가장 흔한 식중독인데, 주로 어패류를 날로 먹는 것으로 인해 발생된다(Park *et al.*, 1993). 비브리오속의 세균은 일반적으로 호염성 균으로서 해수, 해니, 연안 어패류, 특히 수온이 높은 계절의 해역에 널리 분포되어 있으며, 이 균속에 속하는 종은 40여종 이상이 명명되어 있는데 사람에게서 분리되는 것만도 *V. parahaemolyticus*와 *V. vulnificus*를 비롯하여 15종 이상인 것으로

\* To whom correspondence should be addressed.

Tel: +82-2-3399-3653, E-mail: hanj@syu.ac.kr

알려져 있다 (Janda *et al.*, 1988). 비브리오속 균은 Vibrionaceae family에 속하며 이 family에는 *Aeromonas*, *Plesiomonas* 및 *Photobacterium*속 균이 포함되어 있는 것으로 알려져 있다.

비브리오균은 통성 혐기성 그람음성 간균 중 호염균으로 바다와 하구에 존재하며 (Baffone *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2003), 이외에도 담수, 강, 연못 및 호수 등지에도 분포하고 있는 것으로 알려져 있다 (Kim *et al.*, 1997). 이 균은 단포성의 편모를 가지고 있어 운동성이 활발하며, 포도당을 발효하여 산을 만드나 가스는 생성하지 않는다. 또한 이 균은 주로 오염된 식수, 음식물 및 어패류를 먹은 숙주를 감염시키는데 (Lee and Park, 1996), 특히 하절기에 기승을 부리는 장염 비브리오균속은 식중독과 장염 패혈증을 일으키는 세균으로서 국민건강과 식생활에 큰 위협을 가하고 있다 (김영표 등, 1985; 김학경 등, 1985). 수온이 높은 여름철에 이 균이 증식하고 있는 어패류를 날것으로 먹는 사람에게 원발성 패혈증을 일으킬 수 있으며 손상된 피부를 통해서도 창상 감염을 일으킬 수 있는 것으로 알려지고 있다. *V. cholerae*와 *V. parahaemolyticus*가 비브리오 장염의 가장 흔한 원인균이다. 이 균 이외에도 *V. vulnificus*와 *V. alginolyticus* 등은 인체 병원균으로서 앞으로 더욱더 중요시 되고 있다 (West and Lee, 1982). 이 종들 대부분은 임상 환자에서 분리되고 있지 않지만, 모두 증식에 소금을 필요로 하며, 생육에 필요한 소금의 농도는 종에 따라 다양하다. *V. fluvialis*, *V. furnissii* 그리고 *V. anguillarum*균의 대부분과 *V. cholerae*, *V. metschnikovii* 및 *V. mimicus*와 같은 균들은 성장을 하는데 적은 농도의 소금이 첨가된 Tryptone water에서 잘 자란다. 그러나 *V. alginolyticus*와 *V. parahaemolyticus*는 6~8% 농도의 소금이 포함된 환경에서 잘 자란다. 그러나 임상학적으로 중요시되는 모든 균들을 분리하고 동정하는 데는 1% NaCl이 첨가된 배지가 필요하다. *V. hollisae*을 제외한 병원성 비브리오균은 선택배지인 TCBS (Thiosulphate citrate bile-salt sucrose) 배지에서 잘 자란다. 이들 호염성 세균들은 어패류 또는 해수에 상존하면서 여름철에 해산물을 생식한 숙주에게 Vibriosis를 발병시켜서 매년 수십 명씩의 인명피해를 일으킬 뿐만 아니라, 이로 인해 사람들이 여름철에 해산물을 기피하게 하여, 결국에는 어민들에게 막대한 경제

적 손실을 초래하기도 한다. 더욱이 간질환과 알콜 중독에 이환된 사람에 있어서의 *Vibrio* 감염은 치명적이어서 공중 보건학상 그 중요성이 강조 되고 있다. 비브리오 균속에 속하는 균들은 서식환경 조건인 수온, pH 그리고 유기물량에 따라서 하절기에는 더 많은 주의를 요한다 (Kelly, 1982; Kasper and Tamplin, 1993). 굴을 비롯한 홍합, 피조개, 바지락 등 패류는 육수의 유입, 공장 폐수, 기타 오염물질에 오염되기 쉬운 연안 해역에 정착하여 서식하므로 보다 효율적인 위생관리가 필요하다.

지금까지 남해안이나 서해안 연안의 해역에서 분리되는 비브리오균에 관한 연구는 많지만 (Jang *et al.*, 1998), 직접 접하는 시중에서 유통 되고 있는 어패류에 관한 연구 보고는 거의 전무한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 어패류로 인한 비브리오 감염의 심각성을 고려해서 시중에서 유통되는 어패류 중 굴의 세균학상 오염 정도를 조사하고 해양 생태계에서 조사된 기존 자료와 비교가 용이하도록 비브리오 균 분리에 가장 보편적인 방법을 사용하여 해양환경에 빈번히 출현하거나 인체 병원성에 관련이 있는 비브리오 균 속의 항생제 내성에 관한 연구를 수행하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 재료

2004년 10월~2005년 1월까지의 서울에서 시판 중인 굴 100건을 수집 공기재료로 하여 연구를 수행하였다.

### 2. 실험 방법

실험방법은 식품공전의 일반시험법 중 미생물 시험법에 준하여 수행하였다.

#### 1) 오염지표균

세균수 실험을 위하여 시료를 단계적으로 희석한 후, 2개의 멸균 petridish에 각각 1 mL씩 접종하고 Plate Count Agar (Difco, USA) 20 mL를 부어 잘 섞어 굳힌 후에  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 48시간 동안 배양하였으며, 집락수가 30~300개인 희석 평판으로 세균수를 세고 희석배수를 곱하여 세균수를 추정하였다. 대장균군의 실험을 위하여 시료를 단계적으로

회석한 후 2개의 멸균 petridish에 각각 1 mL씩 접종하고 Desoxycholate Lactose agar (Difco, USA) 20 mL를 부어 잘 섞어 굳힌 후 35±1°C에서 24시간 배양하였으며, 집락수가 30~300개인 회석 평판으로 대장균군 수를 세고 회석배수를 곱하여 대장균군 수를 추정하였다.

2) 비브리오속 균

시료를 2% Alkaline peptone water (Difco, USA)에 접종하여 24시간 증균 배양하였으며, 증균배양 후 Thiosulfate citrate bile sucrose (TCBS) agar (Difco)에 증균용액을 접종하고 35±1°C에서 24시간 동안 배양하여 집락생성 여부를 관찰하였다.

3) 항생제 감수성 시험

항생제 감수성 검사는 NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standard, 2000)의 고체 배지 회석법에 의해 최소발육 억제농도 (MIC: Minimum Inhibitory Concentration)를 측정하였다. 본 실험에서는 ciprofloxacin, chloramphenicol 및 tetracycline을 사용하였다. 먼저 각 항생제의 농도를 2배씩 단계적으로 희석하였다. 희석된 각 항생제를 Nutrient broth agar 배지에 넣고 plate에 부어서 굳혔다. 글에서 분리된 균들을 Nutrient broth에 배양하여, 각각 희석하여 10<sup>4</sup> cells/mL이 되도록 조정하였으며, 이를 MIC 측정용 균액으로 사용하였다. 준비된 각 균액을 각각의 항생제를 함유하는 plate 위에 도말하였으며, 이를 37°C에서 48 h 동안 배양하였다. 배양 후 콜로니가 생성되지 않는 plate에 첨가한 항생제의 농도를 MIC로 결정하였다.

4) 균주 동정

MIC측정 결과 높은 항생제 내성을 보이는 6균주를 동정하였다. 균의 생화학적 동정을 위하여 VITEK32 (Biomeriux, France)를 사용 하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서는 날로 먹는 해산물 중의 식중독 균의 오염도 및 이 균들의 항생제 내성 유형을 조사하고자 하였다. 본 실험을 위하여 2004년 10월부터 2005년 1월까지 서울 시내 100곳의 시장에서 판매 중인 굴을 무작위 검사 대상으로 선정하여 시료

Table 1. Distribution of total plate counts in commercial oysters in Seoul (unit : CFU/g)

Region	Total count				Total
	Less than 1.0 × 10 <sup>3</sup>	1.0 × 10 <sup>3</sup> ~ 1.0 × 10 <sup>4</sup>	1.0 × 10 <sup>4</sup> ~ 1.0 × 10 <sup>5</sup>	Over than 1.0 × 10 <sup>5</sup>	
A-Gu	-	4	3	-	7
B-Gu	1	13	5	-	19
C-Gu	-	5	10	2	17
D-Gu	-	2	5	-	7
E-Gu	-	-	2	6	8
F-Gu	-	-	2	1	3
G-Gu	-	-	5	3	8
H-Gu	3	6	2	1	12
I-Gu	6	11	2	-	19
Total	10	41	36	13	100

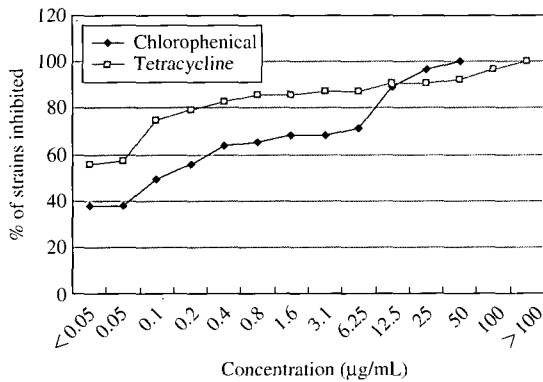
Table 2. Distribution of coliform groups in commercial oysters in Seoul (unit : CFU/g)

Region	Total count				Total
	Less than 1.0 × 10 <sup>0</sup>	1.0 × 10 <sup>0</sup> ~ 1.0 × 10 <sup>2</sup>	1.0 × 10 <sup>2</sup> ~ 1.0 × 10 <sup>3</sup>	Over than 1.0 × 10 <sup>3</sup>	
A-Gu	3	2	2	-	7
B-Gu	7	8	4	-	19
C-Gu	2	5	9	1	17
D-Gu	1	2	4	-	7
E-Gu	1	-	1	6	8
F-Gu	1	-	2	-	3
G-Gu	2	-	4	2	8
H-Gu	3	8	1	-	12
I-Gu	3	12	4	-	19
Total	23	37	31	9	100

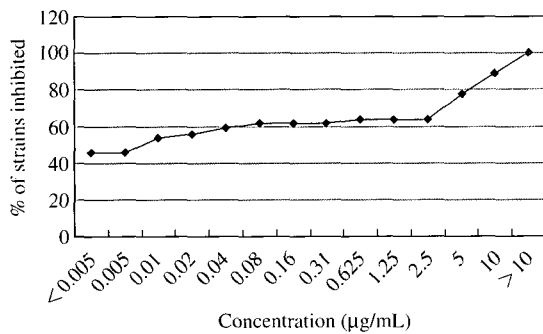
수집대상으로 선별하였다. 세균학상 오염도를 측정해 보기 위하여 세균수와 대장균 균을 측정 한 결과 세균 수는 각각 2.7 × 10<sup>2</sup> ~ 1.2 × 10<sup>5</sup> cfu/g (Table 1), 대장균군은 1.0 × 10<sup>1</sup> ~ 3.2 × 10<sup>5</sup> cfu/g (Table 2)의 분포를 나타내었다. 해산물에서 가장 문제가 되는 식중독 균인 비브리오속 균은 64%의 검출율을 나타내었다. 분리된 비브리오속 균의 항생제 내성 유형을 조사한 결과 (Table 3), 비브리오속 균에 대한 chloramphenicol의 MIC<sub>50</sub>은 0.2 µg/mL, MIC<sub>90</sub>은 25 µg/mL (<0.05 ~ 50 µg/mL)이었으며 (Fig. 1), tetracycline의 MIC<sub>50</sub>은 <0.05 µg/mL, MIC<sub>90</sub>은 25 µg/mL (<0.05 ~ 100 µg/mL)이었고 (Fig 1), ciprofloxacin의 MIC<sub>50</sub>은 0.01 µg/mL, MIC<sub>90</sub>은 10 > µg/

**Table 3.** Susceptibility of *Vibrio* spp., against commonly used antibiotics (Unit: µg/mL)

Strain (number)	Antibiotic	MIC (µg/mL)		
		MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	Range
<i>Vibrio</i> spp.	Chloramphenicol	0.2	25	<0.05 ~ 50
	Tetracycline	<0.05	25	<0.05 ~ 100>
	Ciprofloxacin	0.01	>10	<0.005 ~ 10>



**Fig. 1.** Cumulative inhibition curve by chloramphenicol and tetracycline for *Vibrio* spp.



**Fig. 2.** Cumulative inhibition curve by ciprofloxacin for *Vibrio* spp.

mL (<0.005 ~ 10 µg/mL)으로 나타났다 (Fig. 2). 이들 중 항생제에 고도내성을 보이는 6균주를 택하여 동정한 결과, 3균주는 *Vibrio alginolyticus*로 동정되었고 3균주는 정확한 동정이 이루어지지 않았다.

회를 비롯한 해산물을 날로 먹는 식습관은 비브리오성 질병의 주요한 원인이 되고 있는데, 특히

이 세균이 질병을 유발하는데 필요한 개체 수는 100만에서 10억 개체 정도로 분열 주기가 10분밖에 되지 않기 때문에 약 10개체만 있어도 3~4시간 이내에 질병 유발이 가능한 숫자에 도달한다. 대부분의 해양 세균들은 병원성과 무관하며 비브리오균도 연안 환경의 토착 세균으로 오염과의 관계는 적지만 유기물 오염의 결과로 그 수가 증가하면 발병 가능성이 높아진다는 점에서 유의할 필요가 있다 (Ottaviani *et al.*, 2001). 여름철에 비브리오균에 감염된 어패류를 생식함으로써 생명을 잃게 되는 비브리오속 균에 대한 관심이 지대해에도 불구하고 그 종류가 점차 늘어나는 현상을 보이고 있으며, 이들 비브리오속 균속에서 공중보건학상 중요한 의의를 갖는 *V. vulnificus*, *V. cholerae* 및 *V. parahaemolyticus* 균종 등은 이미 많은 연구자에 의해 연구가 이루어졌다 (Sakazaki *et al.*, 1968; Ripabelli *et al.*, 2003). 최근에는 *V. vulnificus*가 관심의 대상이 되고 있는데 이 세균은 상처를 통해 감염되어 피부 괴사나 패혈증을 유발하는 세균으로 치사율이 40~80%에 이르는 것으로 알려졌다 (Tison and Kelly, 1986). *V. parahaemolyticus*와 *V. alginolyticus*는 몇 가지 생화학적인 특성을 제외하고는 생태학적으로 비브리오속 중 서로간에 가장 큰 유사성이 있는 종들로 알려져 있으며 Sakazaki *et al.*, (1968)은 비브리오속 균들을 생화학적, 형태학적 특징에 따라 *V. parahaemolyticus*를 Biotype I으로 *V. alginolyticus*를 Biotype II로 분류한 바 있다. 해수에 다수 분포하고 있는 이 세균들이 인체에 감염될 경우 *V. alginolyticus*는 눈과 귀의 감염 원인균으로, *V. parahaemolyticus*는 식중독과 설사 질환 원인균으로 알려져 있으며 온도에 민감한 영향을 받는 생태학적 특징을 가지고 있다. 이태식 등 (1999)의 연구 보고에 의하면 비브리오속 균은 20°C 이하의 낮은 온도에서는 증식이 억제되나 30°C 이상의 높은 온도에서는 세균 수가 급격히 증가하는 것으로 알려졌다. 본 실험은 2004년 10월~2005년 1월까지 시중에 시판중인 굴만을 시료로 사용하여 이들의 세균학상 오염 정도와 식중독 균의 오염정도를 파악하였으며, 분리된 식중독 균에 대한 항생제의 내성정도를 파악하였으며, 고도 내성을 보이는 균주를 선택하여 이를 분리 동정하였다. 따라서 본 연구에서 수행한 이러한 결과들은 비브리오균에 대한 공중보건학적 역학 연구를 위한 기

초 자료로써 유용한 정보를 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

### 참 고 문 헌

- 김영표, 전인기, 이재준. *Vibrio vulnificus* 감염증, 대한의학 학회지 1985; 28: 773.
- 김학경, 최은영, 이수택, 안관용, 백홍현, 안득수, 이춘희, 박 숙자, *Vibrio vulnificus* 패혈증 3예. 대한내과학회지 1985; 29: 112.
- 이태식, 이희정, 김지희, 박정흠. 수산물 저장중의 *Vibrio vulnificus*균 수의 변화, 수산연구보고 1999; 55: 145-150.
- Baffone W, Citterio B, Vittoria E, Casaroli A, Pianetti A, Campana R and Bruscolini. Determination of several potential virulence factors in *Vibrio* spp. isolated from sea water, Food Microbiol 2001; 18: 479-488.
- Janda JM, Powers C, Bryant RG and Abbott SL. Current perspectives on the epidemiology and pathogenesis of clinically significant *Vibrio* spp., Clin Microbiol Rev 1988; 1: 245-267.
- Jang DS, Jeong ET, Yu HS, Lee EW and Lim SM. Bacteriological quality of sea water in DJ, Korean Fish Soc 1998; 31: 77-81.
- Kasper CW and Tamplin ML. Effect of temperature and salinity on the survival of *Vibrio vulnificus*, Appl Environ Microbiol 1993; 59: 2425-2429.
- Kelly MT. Effect of temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* occurrence in a Gulf coast environment, Appl Environ Microbiol 1982; 44: 820-824.
- Kim CR, Lee JI, Shin EH and Lee YH. Inhibition of *Vibrio vulnificus* in oyster using organic acids, Korean J Food & Nutr 1997; 10: 320-324.
- Lee BH and Park HJ. Persistence of marine *Vibrio vulnificus* in oyster within environmental parameters, J. Korean Environ Parameters 1996; 5: 329-335.
- Ottaviani O, Bacchiocchi I, Masini L, Leoni F, Carraturo A, Giammarioli M and Sbaraglia G. Antimicrobial susceptibility of potentially pathogenic halophilic vibrios isolated from seafood, Int J Antimicrob Agents 2001; 18: 135-140.
- Park KS, Han C and Suk KY. Microbiological study and isolation of the *Vibrio vulnificus* in the sea water, sediment, fish and shellfish, kitchen environment of Chunnam coastal area, Korean J Food Sci Technol 1993; 25: 449-455.
- Park MY, Lee EW, Seung HK, Shin IS and Chang DS. Purification of emolysin produced by *Vibrio cholerae non-01* isolated from seawater, Food Sci Biotechnol 2003; 12: 228-232.
- Ripabelli G, Sammarco ML, Mclauchlin J and Fanelli I. Molecular characterization and antimicrobial resistance of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio alginolyticus* isolated from Mussels (*Mytilus galloprovincialis*), System Appl Microbiol 2003; 26: 119-126.
- Sakazaki R. Proposal of *Vibrio alginolyticus* for the biotype 2 of *Vibrio parahaemolyticus*, Jap J Med Sci Biol 1968; 21: 359-362.
- Tison, DL and Kelly TM. Virulence of *Vibrio vulnificus* strains from marine environments, Appl Environ Microbiol 1986; 5: 1004-1006.
- West PA and Lee JV. Ecology of *Vibrio* species including *V. cholerae* in natural waters of Kent, Eng J Appl Bacteriol 1982; 52: 435-448.