

경남연안 기수지역에서 분리된 비브리오균의 항균제 내성

오은경·손광태*·하광수¹·유현덕¹·유홍식·신순범·이희정·김지희¹
국립수산과학원 식품안전연구단, ¹국립수산과학원 양식환경연구소

Antimicrobial Resistance of *Vibrio* Strains from Brackish Water on the Coast of Gyeongsangnamdo

Eun Gyoung OH, Kwang Tae SON*, Kwang Soo HA¹, Hyun Duk YOO¹,
Hong Sik YU, Soon Bum SHIN, Hee Jung LEE and Ji Hoe KIM¹

Food Safety Research Center, National Fisheries Research & Development Institute,
Busan 619-902, Korea

¹Aquaculture Environment Institute, National Fisheries Research & Development Institute,
Tongyeong 650-943, Korea

Antimicrobial resistance patterns of *Vibrio* species isolated from brackish water in Geoje, Tongyeong and Goseong, Gyeongsangnamdo province into which streams, sewage and leachate all flowed. Only 19 strains (10.7%) of 177 *V. parahaemolyticus* were susceptible to 15 antimicrobials. 146 strains (69.5%) proved resistant against more than one antimicrobial and 12 strains (6.8%) were multi-drug resistant. The resistance rate of 152 strains were 85.9% against AM and 26.6% against RA, 16.4% against AN, 13.6% against S and 13.0% against TMP. 86 strains of 129 *V. cholerae* non-O1 (66.7%) were susceptible to antimicrobials and 31 strains (24.0%) were resistant to more than one antimicrobial and 12 strains (9.3%) were multi-drug resistant. The antimicrobial resistance rate of 129 strains against 15 antimicrobials, with the exception of C, CIP, E and GM, *i.e.* 11 antimicrobials, was 0.7-16.2%, 16.2% of 129 strains proved resistant against RA and 13.9% against AM, 9.3% against TMP, 7.7% against SXT and 6.9% against TE. 19 of 49 strains of *V. mimicus* (38.8%) were susceptible to antimicrobials and 31 strains (61.2%) were resistant against more than one antimicrobial; none of the strains were multi-drug resistant. 15 strains of *V. mimicus* were resistant against only RA, AmC and TE. The resistance rate was 59.2% against RA (highest) 4.1% against AmC and 2.0% against TE.

Key words: Antimicrobial resistance, *Vibrio* species, Brackish water

서 론

비브리오균은 전 세계적으로 기수지역이나 연안의 해수와 수산물에서 널리 검출되는 해양상재세균이다(Urakawa et al., 2000; Diggles et al., 2000; Ortigosa et al., 1994). 비브리오에 의한 발병은 다양한 경로를 통하여 보고되고 있는데, 비브리오에 오염된 수산물(Lozano-Leon et al., 2003; Martinez-Urtaza et al., 2004)이나 물(Thomson et al., 1998; Beatty et al., 2004)을 섭취하거나 혹은 상처가 노출됨으로써 감염(French et al., 1989)이 되어 발병된 사례도 있다. 비브리오균들 중에서는 *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*와 같은 인체에 질병을 일으키는 중요한 병원균도 있을 뿐만 아니라 *V. alginolyticus*, *V. mimicus*, *V. fluvialis*와 같이 집단 식중독을 유발시키는 종들도 있다(Klonze et al., 1994; Ho et al., 1998; Lesmana et al., 2002). 뿐만 아니라 비브리오균은 각종 양식 수산물에서도 질병을 일으키기도 하는데, *V. harvey*가 새우양식장의 새우에서(Austin and Zhang 2006), *V. alginolyticus*가 대합에서(Lee et al., 1996) 질병을 발생시킨다는 보고도 있다.

한편 항균제와 다른 화학제제들은 가축이나 어류에 대한 질병 발생의 예방이나 치료를 위하여 광범위하게 사용되어지고 있을 뿐 아니라 생산성 증대를 위한 성장촉진을 목적으로 사료와 혼합하여 사용되어진다(Tollefson et al., 1997; Gaskins et al., 2002; Giguere et al., 2006). 어류양식장의 경우에는 항균제를 사료에 첨가하거나 약욕(immersion bath)을 통하여 질병을 예방할 뿐 아니라 치료하고 있는데, 이로 인하여 항생제 내성균과 내성유전자를 가진 플라스미드(R-plasmid)의 증가를 발생시키는 원인이 되기도 한다(Saitanu et al., 1994.; Son et al., 1997).

최근 인구의 증가와 급속한 산업발전으로 인하여 일부 생활 폐수와 산업폐수 그리고 사람이나 가축으로부터 배설된 분변 등의 오염원이 강우나 하천을 통하여 해상으로 유입됨으로써 하천 및 연안 해역 등의 환경오염에 영향을 주고 있다. 특히 항균제를 투여한 축산동물이나 사람의 분변으로부터 약제내성균이 자연환경으로 방출되기도 하는데, 사람이나 동물에게 투여한 항균제가 완전히 소화 흡수되지 않고 섭취된 항균제의 경우 약 70%정도가 성분이 변하지 않은 상태로 배설된다는 보고도 있다(Kümmerer, 2009). 또한 농장에서 발생하는 가축들의 분변이나 농작물의 성장을 위해 사람이나 동물들의 분변

*Corresponding author: ktson@nfrdi.go.kr

을 이용하여 만든 퇴비의 경우에도 대량 강우시 하천으로 유입되어 일부는 직접적으로 바다로 유입되거나 일부는 하수처리장과 같은 정화시설을 거쳐서 최종적으로는 바다로 유입된다.

이처럼 하천은 육상으로부터 각종 오염원 뿐 만 아니라 이들로부터 기인되거나 서식하는 세균, 특히 항균제 내성을 가진 세균들도 포함되어 있어 환경 중으로 방출되어진 항생물질에 의한 생태계에의 영향 및 양식생물에 미치는 영향도 무시할 수 없다. 최근 하천에서 의약품 및 항생제잔류 및 하천수가 유입되는 수역에서 분리되어진 세균에 대한 항생제내성에 대한 연구가 진전되어지고 있으나 아직 미비한 실정이며, 대부분이 대장균, 장구균 및 살모넬라 등과 같은 장내세균과에 대한 연구결과로 수산물에서 문제가 되고 있는 해양상재세균인 비브리오균에 대한 연구는 미비한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 어패류 양식장이 밀집되어 있으며 우리나라 굴 생산량의 약 85%를 차지하고 있는 경남지역을 대상으로 육상으로부터 유입되는 하천수, 마을오수 그리고 쓰레기 매립장에서 바다로 유입되는 기수지역에서 분리한 비브리오균을 중심으로 약제내성세균의 내성패턴에 대해서 조사하였다.

재료 및 방법

시료채취지역

본 연구는 2005년 6월, 8월, 10월 3회에 걸쳐 경남일원(거제, 통영, 고성)에 소재하는 주요 하천들 중 지방 2급 하천 5개소(둔덕천, 간덕천, 오수천, 산양천(거제), 병산천)와 소하천(서정천, 산양천(통영)), 마을오수(달아), 그리고 통영 쓰레기 매립장 등 육상으로부터 발생한 오수가 바다로 유입되는 기수지역에서 각각 시료를 채취하였다(Fig. 1). 시료는 1 L용량의 멸균된 용기에 채수하여 10°C로 유지하면서 실험실로 운반하여 실험에 사용하였다.

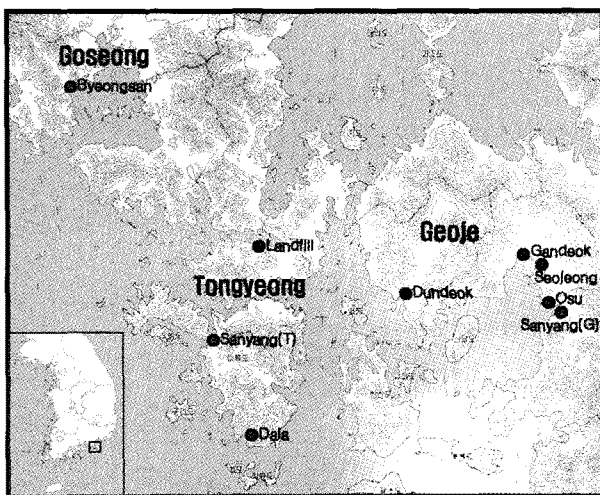


Fig. 1. Sampling sites to isolate *Vibrio* strains from Brackish Water on the Coast of Gyeongsangnam-do.

병원성 비브리오균의 분리 및 동정

병원성 비브리오균은 Bacteriological Analytical Manual (BAM, Elliot et al., 1992)에 준하여 분리·동정하였다. 하천수는 pore size가 0.8, 0.45 및 0.2 μm 인 멸균된 membrane filter (Millipore, Ireland)로 순차적으로 여과한 다음, filter를 모아서 Alkaline Peptone Water (pH 8.5 \pm 0.2, 2% NaCl 함유)에 접종하고 35 \pm 0.5°C에서 배양하였다. *V. cholerae* 분리를 위하여 6-8시간, 그 외의 *Vibrio spp.*는 18-24시간 각각 배양한 후 Thiosulfate Citrate Bile Salt Agar (TCBS agar, Difco)에 희석 도말하여, 35°C에서 18-24시간 배양하였다. *V. cholerae*와 *V. alginolyticus*의 경우에는 황색집락을, *V. parahaemolyticus*, *V. mimicus* 및 *V. vulnificus*는 녹색집락을 각각 취하여 Triple Sugar Iron Agar (Difco)에 접종하여 35°C에서 24시간 배양한 후, 전형적인 반응을 나타내는 균주를 대상으로 동정시험을 실시하였다. 즉, 내염성 시험, 42°C 발육시험, ONPG (O-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside)시험 등 생화학시험 및 VITEK system (BioMerieux Vitek, France)으로 동정하였다.

독소유전자시험

동정된 *V. parahaemolyticus* 균주를 대상으로 식중독을 유발시키는 독소 유전자인 *tdh*, *trh* 유전자의 존재유무 확인은 PCR 방법을 사용하였다. 유전자 검출 PCR시험을 위한 primer는 *tdh* 및 *trh* 검출용으로 각각 VPD-1/VPD-2와 VPR-1/VPR-2 (Takara, Japan)를 사용하였다. 시험균주는 Tryptic soy broth (Difco, USA) 10 mL에 접종하여 37°C, 18~24시간 배양한 다음 10분간 heating block (EYELA, MG-1200, Japan)에서 가열한 후 균액 5 μL , deoxynucleoside triphosphate mixture (1 mM dATP, 1 mM dCTP, 1 mM dTTP, 1 mM dGTP) 2 μL , 10 \times PCR 용액 5 μL , primer (100pmol/ μL) 1 μL , Taq polymerase 1.25 U를 혼합하여 총 부피를 50 μL 로 제조하여 Thermal cycle (Takara, Japan)로 94°C에서 60초, 60°C에서 60초, 72°C에서 60초의 반응을 35회 반복하여 실시하였다.

항혈청을 이용한 콜레라균 검사

*V. cholerae*의 혈청검사는 Polyvalent (Serovar Ogawa & Inaba), Inaba, Ogawa 및 O139 antiserum을 이용한 슬라이드 응집반응으로 콜레라균의 특이항원 보유여부를 검사하였다. 분리된 균은 Tryptic Soy Agar (TSA, Difco)에 배양한 후 균체 10 μL 를 생리식염수 0.5 mL에 넣고 균질하게 부유시켜 슬라이드 글라스에 구획을 그어 각각의 구획에 콜레라균 진단혈청을 1방울 떨어뜨리고 그 위에 균부유액 20 μL 를 떨어뜨린 후 잘 섞었다. 이때 자가 응집 여부를 확인하기 위하여 생리식염수와 균 부유액을 반응시켜 확인하였다. 슬라이드 글라스를 전후로 기울여 응집여부를 광원하에서 관찰하여 1분 이내에 나타나는 강한 응집반응만을 양성으로 판독하였다. 혈청검사는 먼저 Polyvalent (Serovar Ogawa & Inaba)로 응집반응을 확인한 후, 양성이면 Inaba 및 Ogawa 혈청으로 추가로 확인하며 Polyvalent (Serovar Ogawa & Inaba)에 음성일 경우에는 O139 항혈청에 대한 응집여부를 확인하였다. 본시험에 사용한 혈청은 질병관리본부 국립보건연구원에서 제공받은 콜레

라균 진단혈청을 사용하였다.

항균제 감수성 시험

분리·동정된 각 비브리오 균주의 항균제 감수성은 Acar and Goldstein (1991)의 디스크 확산법과 미국 NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2004)에 준하여 시험하였다. 즉, 분리된 각 균주는 Müller Hinton Broth (Merck, Germany)에서 35°C, 18~24시간 배양한 다음 균주 배양액의 농도를 McFarland No. 0.5로 희석 조정하였다. 각 희석된 균액은 미리 1% 농도가 되도록 NaCl를 첨가한 두께 4 mm의 Müller Hinton Agar (Merck, Germany, 이하 MHA) 평판에 도말하였다. 균액이 접종된 MHA 평판은 5분간 방치하여 균액을 흡수시킨 후 항균제 디스크 (φ 8 mm)를 평판에 고착시켰다. 이 때 항균제 디스크는 균 접종 후 15분 이내에 고착시켰으며, 시험 항균제는 amikacin (30 µg, AN), ampicillin (10 µg, AM), amoxicillin/clavulanic acid (30 µg, AmC), cefepime (30 µg, FEP), cefotaxime (30 µg, CTX), chloramphenicol (5 µg, C), ciprofloxacin (5 µg, CIP), erythromycin (5 µg, E), gentamycin (10 µg, GM), nalidixic acid (30 µg, NA), rifampin (5 µg, RA), streptomycin (10 µg, S), sulfamethoxazole/trimethoprim (25 µg, SXT), tetracycline (5 µg, TE), trimethoprim (5 µg, TMP) 등 15종으로 BBL사 제품을 사용하였다. 항균제 디스크를 고착시킨 MHA 평판은 35°C, 16~18시간 배양한 다음 균의 증식 저해대 (inhibition zone)의 크기를 calipers로 측정하여 감수성 유무를 판별하였으며, 감수성 결과의 정도관리를 위하여 *Escherichia coli* ATCC 25922를 표준균주로 사용하여 각 항균제 디스크에 대한 역가를 확인하였다.

결과 및 고찰

병원성 비브리오의 분리

경남 거제, 통영 및 고성에 소재하는 지방 2급 하천 5개소(둔덕천, 간덕천, 오수천, 산양천 (거제), 병산천)와 소하천(서정천, 산양천 (통영)), 마을오수 (달아), 그리고 통영 쓰레기 매립장으로부터 유래한 오수가 바다로 유입되는 기수지역을 대상으로 2005년 6월, 8월 및 10월에 채취한 시료를 대상으로 병원성 비브리오균을 분리하였다 (Table 1). 국내 연안해수에서는 특히 하절기에 병원성 비브리오가 빈번히 검출되고 있다는 보고는 많이 있는데 (Chang et al., 1986; 1996; Kim et al., 1997a; 1997b), 본 연구에서 분리된 병원성 비브리오는 모두 355균주로써 *V. parahaemolyticus*가 177균주, *V. cholerae* non-O1 129균주, *V. mimicus* 49균주 등의 순으로 *V. parahaemolyticus*가 49.9%로 가장 많이 분리되었으며, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus* 등 그 외 비브리오속의 균주는 분리되지 않았다. *V. parahaemolyticus*는 우리나라 연안의 해수와 수산물에서 널리 분포하여 연중 검출되고 있는데, 경북 동해와 울산, 그리고 통영연안의 해수 및 기수지역을 대상으로 병원성 비브리오를 분리한 결과 *V. parahaemolyticus*가 27.1~35.4%로 검출되어 본 연구결과보다는 낮은 검출율을 나타내었으나 (Choi and Jeong, 2001; Son et al., 2003; Gim et al., 2004), *V. parahaemolyticus*의 검출율은

다른 비브리오균에 비하면 대체적으로 높은 검출율을 나타내고 있다.

Table 1. Number of pathogenic *Vibrio* strains isolated from brackish water by region

Samples	No. of isolated strain (%)		
	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. cholerae</i> non-O1	<i>V. mimicus</i>
Geoje			
Dundeok stream	30	54	49
Gandeok stream	0	20	0
Osu stream	0	8	0
Sanyang stream (G)	10	18	0
SeoJeong stream	0	0	0
Tongyeong			
Sanyang stream (T)	11	3	0
Dala stream	17	10	0
Landfill	40	0	0
Goseong	0	0	0
Byeongsan stream	69	16	0
Total	177	129	49

일반적으로 *V. parahaemolyticus*의 주요 병원인자로는 Wagatsuma 혈액 한천배지상에서 Kanagawa phenomenon (이하 KP)을 일으키는 내열성 용혈독 (thermostable direct hemolysin; TDH)이 알려져 있는데, KP 음성균주 중에서도 tdh 유전자는 갖지 않으나 TDH와 유사한 내열성 용혈독 유사독소(TDH-related hemolysin; TRH)를 code하는 유전자를 보유하는 균주의 출현이 자주 보고되고 있다 (Nishibuchi et al., 1989). 본 연구에서 분리동정된 *V. parahaemolyticus* 177균주에 대해서도 식중독을 유발시키는 독소 유전자인 내열성 용혈독 (TDH) 및 그 유사독소 (TRH) 유무시험을 실시하여 병원성 유무를 확인해 본 결과 둔덕천 1개소를 제외하고는 내열성 용혈독소를 생산하는 균주가 검출된 지역은 없었다. 둔덕천에서는 2008년 8월에 분리된 30균주 중 13균주에서 내열성 용혈독소를 생산하는 것으로 확인되었다.

그리고 *V. cholerae*로 동정된 129균주는 Polyvalent (Serovar Ogawa & Inaba), Inaba, Ogawa 및 O139 antiserum의 4종의 콜레라 진단혈청을 이용하여 시험한 결과 각각의 혈청에 반응하지 않아 모두 *V. cholerae* non-O1인 것으로 확인되었다.

생태와 병원성에 있어서도 *V. cholerae*와 극히 유사하고 또 혈청학적으로도 공통성이 있으며 동시에 *V. cholerae*로 분류되어 있지만 (Kenyon et al., 1984; Venkateswaran et al., 1989; Chowdhury et al., 1989) *V. cholerae*와의 사이에 DNA-DNA상 동성에서의 차이가 명확하다는 점에서 별도의 균종으로 나누어진 (Desmarchelier and Reichelt, 1984) *V. mimicus*의 경우도 49균주가 분리되었다.

지역별 검출분포를 살펴보면 *V. parahaemolyticus*의 경우 지역적인 차이 없이 전 조사지점에서 검출되었으나, *V. cholerae* non-O1와 *V. mimicus*는 생활기수역인 둔덕천에서 주로 분리되었다 (Table 1). 둔덕천은 한산·거제만으로 유입되는 천으로 대부분 자연하천수로 구성되어 있지만, 발원지에서

하구사이의 취락지구를 거치면서 생활하수 등이 하천수로 유입되어 자연하천과 생활하수가 혼합된 형태로 해역으로 유입된다. *V. cholerae* non-O1 및 *V. mimicus*는 본래 열대와 아열대의 콜레라 유행지역에 분포하는 상재균이지만 현재는 유럽이나 우리나라, 일본 등의 도시하천, 하수, 연안해수 및 어패류에서도 본 균이 검출되어진다 (Chawdhury et al., 1989; Kodama et al., 1984). 특히, *V. cholerae* non-O1 및 *V. mimicus*는 식염을 포함하지 않는 무염 펩톤수중에서 발육할 수 있어 연안해역과 하구 부근의 해수 및 침전물, 원생동물, 어패류 등에도 널리 분포하고 있다고 보고되어지고 있다 (Wayne et al., 1983; Kodama et al., 1984; Chowdhury et al., 1989). 본 연구결과에서도 *V. parahaemolyticus*의 경우 지역적인 차이 없이 전 조사지점에서 검출된 반면, *V. cholerae* non-O1은 약

40%이상인, 그리고 *V. mimicus*는 분리균주의 100%가 생활하수와 자연하천이 합쳐진 생활기수역인 둔덕천에서 분리되었다.

분리균종별의 항균제 내성율

경남 거제, 통영 및 고성에 위치하고 있는 하천수 8개소와 통영 쓰레기 매립장 유출수에서 분리된 *V. parahaemolyticus* 177균주, *V. cholerae* non-O1 129균주 그리고 *V. mimicus* 49균주를 대상으로 각 균종별 항균제 내성 차이를 알아보기 위하여 분리된 균주들 중 1종 이상의 항균제에 내성을 나타내는 내성균 (Antimicrobial resistant bacteria; ARB)과 4종 이상의 항균제에 내성을 나타내는 다제내성균 (Multiple antimicrobial resistant bacteria; MARB)의 비율을 균종별로 Fig. 2에 나타내었다.

Table 2. Antimicrobial resistance profile of *Vibrio parahaemolyticus*, *V. cholerae* non-O1 and *V. mimicus* from brackish water

Resistant profile of isolated strains	Number of resistant isolates (%)		
	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. cholerae</i> non-O1	<i>V. mimicus</i>
None	19(10.7)	86(66.7)	19(38.8)
AM	78(44.1)	9(7.0)	-
TMP	4(2.3)	1(0.8)	-
RA	2(1.1)	10(7.8)	27(55.1)
NA	-*	2(1.5)	-
FEP	-	1(0.8)	-
AmC	-	-	1(2.0)
AM, S	5(2.8)	1(0.8)	-
AM, AN	5(2.8)	-	-
AM, RA	24(13.6)	4(3.1)	-
AM, TMP	5(2.8)	1(0.8)	-
RA, TMP	-	1(0.8)	-
RA, AN	-	1(0.8)	-
RA, TE	-	-	1(2.0)
RA, AmC	-	-	1(2.0)
AM, AN, RA	7(3.9)	-	-
AM, AN, E	1(0.5)	-	-
AM, S, AN	4(2.3)	-	-
AM, S, RA	3(1.7)	-	-
AM, S, TMP	3(1.7)	-	-
AM, S, E	1(0.5)	-	-
AM, S, GM	1(0.5)	-	-
AM, RA, TMP	3(1.7)	-	-
AM, AN, TMP	1(0.5)	-	-
AM, AN, TMP, S	2(1.1)	-	-
AM, AN, TMP, E	1(0.5)	-	-
AM, AN, TMP, RA	1(0.5)	-	-
AM, AN, S, RA	4(2.3)	1(0.8)	-
AM, AmC, FEP, CTX	-	1(0.8)	-
AM, AN, RA, E, TMP	2(1.1)	-	-
AM, AN, RA, E, S	1(0.5)	-	-
AM, AN, GM, S, TMP	1(0.5)	-	-
S, SXT, TE, NA, TMP	-	5(3.9)	-
NA, S, TE, AM, CTX, FEP,	-	1(0.8)	-
NA, S, TE, RA, SXT, TMP	-	4(3.1)	-
Total	177	129	49

* -, Not detected.

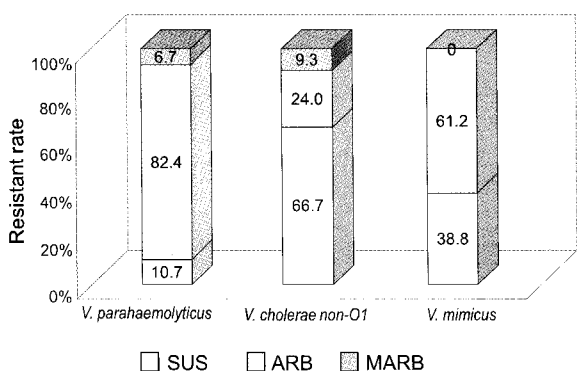


Fig. 2. Resistant rate of antimicrobial resistant bacteria (ARB) and multiple antimicrobial resistant bacteria (MARB) from brackish water.

분리된 *V. parahaemolyticus* 177균주에서는 15종의 항균제에 대하여 19균주 (10.7%)에서만 감수성을 나타내었고, 146균주 (82.4%)에서 최소 1종 이상, 그리고 12균주 (6.7%)에서는 다제내성을 나타내었다. 이는 Son et al. (2005)이 보고한 해수에서 분리한 *V. parahaemolyticus* 균주의 내성을 및 다제내성율이 각각 97.9% 및 3.4%로 1종 이상의 항균제에 대한 내성율은 낮았으나, 다제내성율은 본 연구결과에서 분리한 *V. parahaemolyticus* 균주에서 더 높은 것으로 나타났다.

V. cholerae non-O1 129균주에서는 86균주(66.7%)에서 감수성을 나타내었고, 31균주(24.0%)에서 1종 이상, 그리고 12균주 (9.3%)에서 다제내성을 나타내었다. 이는 Bakhshi et al. (2009)이 보고한 해양환경에서 분리한 *V. cholerae non-O1* 및 non-O139에서 1종 이상의 항균제 내성을 및 다제내성율이 각각 40.5% 및 8.1%로 나타내어 본 연구결과와 비슷한 경향을 나타내었다. 그러나 환경에서 분리된 *V. cholerae non-O1*의 내성정도는 병원 환자들로부터 분리된 *V. cholerae O1*의 내성과 비교하면 훨씬 낮다는 보고도 있다 (Iwanaga et al., 2004).

그리고 *V. mimicus* 49균주에서는 19균주(38.8%)에서 감수성을 나타내었으며, 31균주(61.2%)에서 1종 이상의 감수성을 나타내었고, 다제내성균은 검출되지 않는 것으로 나타났다.

분리된 *V. parahaemolyticus* 177균주, *V. cholerae non-O1* 129균주 그리고 *V. mimicus* 49균주에 대한 항균제별 내성양상을 Table 2에 나타내었다. *V. parahaemolyticus* 177균주에 있어 15종의 항균제에 대한 내성양상을 살펴보면 AM의 단일 내성이 44.1%로 가장 높았으며, 다음으로 AM, RA의 2제 내성이 13.6%를 나타내었다. 다제내성 정도는 단일내성이 차지하는 비율이 47.5%로 가장 높았으며, 2제 내성이 22.2%, 3제 내성이 13.3%, 4제 내성이 4.4%, 5제 내성이 2.1%의 순이었다. *V. cholerae non-O1* 129균주에 있어 항균제별 내성양상은 RA와 AM의 1제 내성이 각각 7.8% 및 7.0%로 높은 값을 나타내었으며, 다제내성 정도는 단일내성이 17.8%, 2제 내성이 6.2%, 5제 및 6제 내성이 3.9%의 순으로 나타났다. *V. mimicus* 49균주에 있어 항균제별 내성양상은 모두 4가지 패턴으로 다른 균종들에 비하여 매우 단순하였는데, 단일내성이 57.1%, 2제 내성

이 4.0%로 나타났다. *V. mimicus* 분리균주는 모두 둔덕천에서 분리되었는데, 단일내성 중 RA에 대한 내성율이 55.1%로 모든 분리균주 중에서 가장 높게 나타난 것에 대해서는 *V. mimicus*균의 본질적인 내성인지, 아니면 분리원인 둔덕천으로 유입되는 하천수에 의한 영향인지는 향후 연구가 보완되어져야 할 것으로 생각된다.

분리균주의 항균제별 내성경향

분리된 *V. parahaemolyticus* 177균주, *V. cholerae non-O1* 129균주 그리고 *V. mimicus* 49균주에 대하여 15종의 항균제별 내성 경향을 Fig. 3~Fig. 5에 나타내었다.

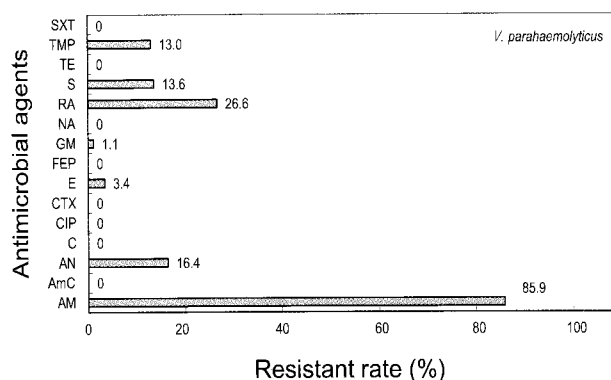


Fig. 3. Antimicrobial resistant pattern of *V. parahaemolyticus* isolates from brackish water (SXT, Sulfamethoxazole /trimethoprenem; TMP, Trimethoprim; TE, Tetracycline; S, Streptomycin; RA, Rifampin; NA, Nalidixic acid; GM, Gentamycin, FEP, Cefepime; E, Erythromycin; CTX, Cefotaxime; CIP, Ciprofloxacin; C, Chloramphenicol; AN, Amikacin; AmC, Amoxillin/clavulanic acid; AM, Ampicillin).

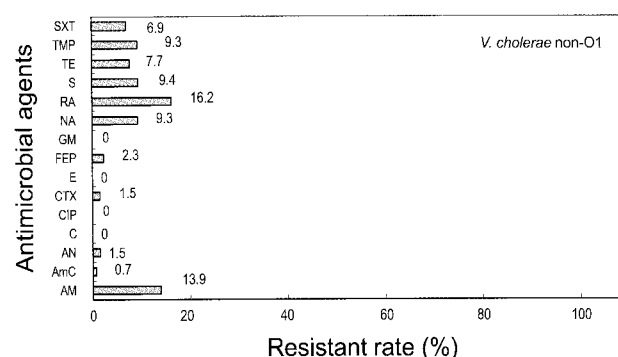


Fig. 4. Antimicrobial resistant pattern of *V. cholerae non-O1* isolates from brackish water (SXT, Sulfamethoxazole /trimethoprenem; TMP, Trimethoprim; TE, Tetracycline; S, Streptomycin; RA, Rifampin; NA, Nalidixic acid; GM, Gentamycin, FEP, Cefepime; E, Erythromycin; CTX, Cefotaxime; CIP, Ciprofloxacin; C, Chloramphenicol; AN, Amikacin; AmC, Amoxillin/clavulanic acid; AM, Ampicillin).

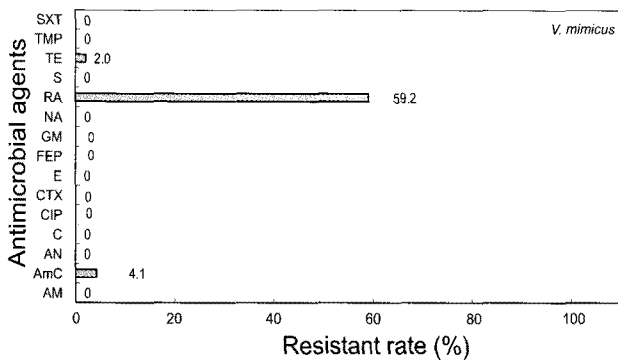


Fig. 5. Antimicrobial resistant pattern of *V. mimicus* isolates from brackish water (SXT, Sulfamethoxazole/trimethoprenem; TMP, Trimethoprim; TE, Tetracycline; S, Streptomycin; RA, Rifampin; NA, Nalidixic acid; GM, Gentamycin, FEP, Cefepime; E, Erythromycin; CTX, Cefotaxime; CIP, Ciprofloxacin; C, Chloramphenicol; AN, Amikacin; AmC, Amoxicillin/clavulanic acid; AM, Ampicillin).

V. parahaemolyticus 분리균주 177균주 중 152균주에서 15종의 항균제 중 AM에 대하여 85.9%로 가장 높은 내성을 나타내었으며, RA에 26.6%, AN에 16.4%, S에 13.6%, TMP에 13.0%의 순이었다. 그리고 E과 GM에서 1.1~3.4%의 비교적 낮은 내성을 나타내었으며, 그 외 TE, CIP 등 8종의 항균제에서는 감수성을 나타내었다. 본 연구에서도 알 수 있듯이 자연 환경에서 분리된 비브리오균에 있어서 AM에 대한 높은 내성에 관해서는 많은 보고가 이루어져 있는데, Son et al. (2005)이 보고한 남해안 어류양식장의 해수 및 양식어류로부터, 그리고 Ferrini et al. (2008)은 해수와 다양한 수산물로부터 분리한 *V. parahaemolyticus* 균주에서 AM에 대한 내성이 각각 98% 및 81%를 나타내었으며, Lee (2008)이 보고한 서해 연안 해수로부터, 그리고 Lee et al. (2007)은 국내 유통 수산물로부터 분리한 *V. parahaemolyticus* 균주에서 AM에 대한 내성이 모두 100%를 나타내었다.

그러나 자연환경에서 분리한 *V. parahaemolyticus* 균주에서만 AM에 대한 내성이 절대적으로 높은 것은 아니며, 임상에서 분리한 *V. parahaemolyticus* 균주에서도 AM의 대해 높은 내성을 나타낸다는 보고도 다수 있다. Lesmana et al. (2001)은 인도네시아의 병원에 입원한 설사환자에서 분리한 *V. parahaemolyticus*의 98%에서, 그리고 Heitmann et al. (2005)은 2005년 하절기에 칠레에서 발생한 집단 식중독 환자들로부터 분리한 *V. parahaemolyticus* 99균주 중 62%에서 AM에 대한 내성을 나타내었다고 보고하였다.

V. cholerae non-O1 분리균주 129균주 중에서는 15종의 항균제 중 C, CIP, E, GM을 제외한 11종의 항균제에 대하여 0.7~16.2%의 내성율을 나타내었는데, RA에서 16.2%로 가장 높은 내성을 나타내었으며, 다음으로 AM에 13.9%, NA와 TMP에서 9.3%, 그리고 TE과 SXT에서 각각 7.7% 및 6.9%를 나타내었다. 본 연구에서 분리된 *V. cholerae* non-O1 균주에서는 AM에 대한 내성율이 *V. parahaemolyticus*에 비하여 훨씬

낮았는데, 이는 Sciortino et al. (1996)이 전 세계에서 식중독을 일으킨 *V. cholerae* non-O1 112균주를 대상으로 23종의 항균제에 대한 감수성시험을 실시한 결과 AM에서 12.6%로 가장 높은 내성을 나타내었다는 보고와 유사하였다. 그러나 멕시코에서 사람들에게 식수용으로 공급되기 전 단계에서의 다양한 원수에서 분리한 *V. cholerae* non-O1에서는 AM에 대한 내성이 60%로 매우 높게 나타난 사례도 있었다 (Isaac-Marquez et al., 1998).

일반적으로 AM에 내성을 나타내는 *V. cholerae* 균주들은 내성을 지닌 플라스미드를 보유하고 있으며, 이로 인하여 다제내성을 나타내기도 한다 (Young et al., 1989; Dalsgaard et al., 1999; Thomson et al., 1998). 그러나 환경에서 분리된 *V. cholerae* 균주들 중에는 내성을 지닌 플라스미드도 가지고 있지 않으면서도 AM에 내성을 나타내는 반면, 콜레라 환자로부터 분리된 *V. cholerae* O1 중에서도 AM에 감수성을 나타내기도 한다 (Phantouamath et al., 2001).

V. mimicus 분리균주 49균주 중에서는 15종의 항균제 중 RA, AmC, TE 등 3종의 항균제에 대해서만 내성을 나타내어 비교적 낮은 내성율을 나타내었는데, RA에서 59.2%로 가장 높은 내성을 나타내었고, AmC과 TE에서 각각 4.1% 및 2.0%의 내성율을 나타내었다. Chowdhury et al. (1986)에 의하면 환경으로부터 분리한 *V. mimicus*에서의 항균제 내성이 임상으로부터 분리한 균주에서보다 항균제 내성이 높은 것으로 나타났는데, 방글라데시에서 임상과 해양환경에서 분리한 *V. mimicus*를 대상으로 항균제 내성시험을 실시한 결과 해양환경에서 분리한 *V. mimicus*에서 S에 대해 100%의 내성을 나타낸 반면 임상 분리균주에서는 단지 11%의 내성을 나타내었고, 환경 분리균주에서 TE, kanamycin (KAN) trimethoprim-sulfamethoxazole (TMP/SMX)에 대해 92%, AM에 대해 44%의 내성을 나타낸 반면 임상 분리균주에서는 모두 감수성을 나타내어 자연환경에서 분리한 *V. mimicus*의 높은 항균제 내성을 확인할 수 있었다. 그리고 C와 GM에 대해서는 모두 감수성을 나타내었다. 그러나 Chowdhury et al. (1989)에 의하면 일본에서의 기수와 해수 등 해양환경에서 분리한 *V. mimicus*에 대한 AM의 내성은 83%, S에 17%, KAN에 3%를 나타내었고, C, GM, TE, TMP/SMX에서는 감수성을 나타내어 *V. mimicus* 분리균주도 지역에 따라, 환경조건에 따라 많은 내성의 차이를 나타내었다.

비브리오 균종에 따라서는 내성 결정인자들이 수계 침전물이나 주변 환경으로부터 획득되어진다는 보고도 있기 때문에 (Neela et al., 2007) 기수지역에서의 비브리오에 대한 항생제 내성경향을 파악하는 것은 아주 중요한 의미를 가질 수 있다. 본 연구결과에 의하면 분리한 기수지역의 특성에 따라서 항생제내성패턴에 차이가 나타났으며 특히 인가가 밀집하여 있는 마을오수로부터 유입되는 지역에서 채취한 시료에서 높은 내성율을 나타내었다. 따라서 다양한 내성인자를 보유한 세균들이 하천이나 마을 하수를 통하여 육지로부터 유입되어 해양 환경에 존재하는 이종 또는 동종 세균으로 plasmid, transposon, integron 등과 같은 이동성 인자 (mobile element)의 수평적 전이(horizontal transfer)를 통하여 내성유전자가 전이될 수

있기 때문에 항생제 내성인자의 해양환경으로의 유입은 육상에서 근원적으로 차단되어야 할 것으로 생각된다.

사 사

본 연구는 국립수산물과학원(생물학적 위생안전 위해관리연구, RP-2009-FS-009)의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Acar, J.F. and F.W. Goldstein. 1991. Disk Susceptibility Test. In : Antibiotics in Laboratory Medicine (Lorian, V. ed.). Williams & Wilkins, Baltimore, 17-52.
- Austin, B. and X.H. Zhang. 2006. *Vibrio harvey*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. Lett. Appl. Microbiol., 119-124.
- Bakhshi, B., H.M. Barzelight, M. Adabi, A.R. Lari and M.R. Pourshafie. 2009. A molecular survey on virulence associated genotypes of non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* in aquatic environment of Tehran, Iran. Water research, 43, 1441-1447.
- Beatty, M.E., T. Jack, S. Sivapalasingam, S.S. Yao, I. Paul, B. Bibb, K.D. Greene, K. Kubota, E.D. Mintz and J.T. Brooks. 2004. An outbreak of *Vibrio cholerae* O1 infections on Ebeye Island, Republic of the Marshall Islands, associated with use of an adequately chlorinated water source. Clin. Infect. Dis., 1-9.
- Chang, D.S., I.S. Shin, S.T. Choi and Y.M. Kim. 1986. Distribution and bacteriological characteristics of *Vibrio vulnificus*. J. Korean Fish. Soc., 19, 118-126.
- Chang, D.S., C.H. Kim, H.S. Yu, S.H. Kim, E.T. Jeong and I.S. Shin. 1996. Relationship between pathogenic vibrios and zooplankton biomass in coastal area, Korea. J. Korean Fish. Soc., 29, 557-566.
- Choi, J.D. and W.G. Jeong. 2001. Bacteriological and physiochemical water quality of seawater in Tongyeong harbor, Korea. J. Korean Fish. Soc., 34(6), 611-616.
- Chowdhury, M.A.R., H. Yamanaka, S. Miyoshi, K.M. S. Aziz and S. Shinoda. 1989. Ecology of *Vibrio mimicus* in aquatic environments. Appl. Environ. Microbiol., 55, 2073-2078.
- Chowdhury, M.A.R., K.M.S. Aziz, Z. Rahim and B.A. Kay. 1986. Antibiotic resistance pattern of *Vibrio mimicus* isolated from human and environmental sources in Bangladesh. Antimicrob. Agents Chemother., 30, 622-623.
- Dalsgaard, A., A. Forslund, L. Bodhidatta, O. Serichantalg, C. Pitarangsi, L. Pang, T. Shimada and P. Echeverria. 1999. A high proportion of *Vibrio cholerae* strains isolated from children with diarrhea in Bangkok, Thailand are multiple antibiotic resistant and belong to heterogeneous non-O1, non-O139 O-serotypes. Epidemiol. Infect., 217-226.
- Davis, B.R., G.R. Fanning, J.M. Madden, A.G. Steigerwalt, H.B. Brenner. 1981. Characterization of biochemically atypical *Vibrio cholerae* strains and designation of a new pathogenic species, *Vibrio mimicus*. J. Clin. Microbiol., 14, 631-639.
- Diggles B.K., G.A. Moss, J. Carson and C.D. Anderson. 2000. Luminous vibriosis in rock lobster *Jasus verreauxi* (Decapoda: Palinuridae) phyllosoma larvae associated with infection by *Vibrio harvey*. Dis. Aquat. Org., 43, 127-137.
- Elliot, E.L., C.A. Kaysner and M.L. Tamplin. 1992. *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* and other *Vibrio* spp. In: Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual, 7th ed., AOAC International, Arlington, 111-140.
- Ferrini, A.M., V. Mannoni, E. Suffredini, L. Cozzi and L. Croci. 2008. Evaluation of antibacterial resistance in *Vibrio* strains isolated from imported seafood and Italian aquaculture settings. Food Anal. Methods, 1, 164-170.
- French, G.L., M.L. Woo, Y.W. Hui and K.Y. Chan. 1989. Antimicrobial susceptibilities of halophilic vibrios. J. Antimicrob. Chemoth., 183-194.
- Gaskins, H.R., C.T. Collier and D.B. Anderson. 2002. Antibiotics as growth promotants: mode of action. Anim. Biotechnol., 13, 29-42.
- Giguere, S., J.F. Prescott, J.D. Baggot, R.D. Walker and P.M. Dowling. 2006. Antimicrobial therapy in veterinary medicine. 4th Ed. Blackwell Publishing, Iowa, USA.
- Gim, B.J., D.S. Gim, S.N. Hwang, I.H. Bag, H.W. Gim, S.G. Jeong and Y.S. Ham. 2004. A study on the distribution of pathogenic *Vibrio* spp. in Ulsan coastal area. Rep. Insp. Health & Environ., 3, 5-25.
- Heitmann, I., L. Jofre, J.C. Hormazabal, A. Olea, C. Vallebuona and C. Valdes. 2005. Review and guidelines for treatment of diarrhea caused by *Vibrio parahaemolyticus*. Rev. Chilena. Infectol. 22, 131-140.
- Ho, P.L., W.M. Tang, K.S. Lo and K.Y. Yeun. 1998. Necrotizing fasciitis due to *Vibrio alginolyticus* following an injury inflicted by a stingray. Scand.

- J. Infect. Dis., 192-193.
- Isaac-Marquez, A.P., C.M. Lezama-Davila, C. Eslava-Campos, A. Navarro-Ocana and A. Cravioto-Quintana. 1998. Serotypes of *Vibrio cholerae* non-O1 isolated from water supplies for human consumption in Campeche, Mexico and their antibiotic susceptibility pattern. Mem. Inst. Oswaldo Cruz., 93, 17-22.
- Iwanaga, M., C. Toma, T. Miyazato, S. Insisiengmay, N. Nakasone and M. Ehara. 2004. Antibiotic resistance conferred by a class integron and SXT constin in *Vibrio cholerae* O strains isolated in Laos. Antimicrob. Agents Chemother., 48, 2364-2369.
- Kim, S.M., G.B. Choi and M.Y. Park, Y.M. Kim and D.S. Chang. 1997a. Physiological and psychrotrophic characteristics of *Vibrio mimicus* SM-9 isolated from sea water. J. Food Hyg. Safety, 12, 9-14.
- Kim, Y.M., G.B. Choi and D.S. Chang. 1997b. Isolation and identification of novel pathogenic *Vibrio* sp. producing hemolysin. J. Korean Fish. Soc., 30, 361-366.
- Klonze K.C. D.E. Cover, F.N. Hyman and R.C. Mullen. 1994. Fatal gastroenteritis due to *Vibrio fluvialis* and nonfatal bacteremia due to *Vibrio mimicus*: unusual vibrio infections in two patients. Clin. Infect. Dis., 541-542.
- Koh, B.H., Lee, W.J. and Lee, M.S., 1994. Characterization of *Vibrio mimicus* K-1 Isolated from Coastal Sea Water. Bull. Korean Fish. Soc., 27, 292-298.
- Kodama, H., Y. Gyobu, N. Tokuman, I. Okada, H. Uetake, T. Shimada and R. Sakazaki. 1984. Ecology of non-O1 *Vibrio cholerae* in Toyama prefecture. Microbiol. Immunol., 28, 311-325.
- Lee, H., Y.H. Oh, S.G. Park and S.M. Choi. 2007. Antibiotic susceptibility and distribution of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from the seafood. Kor. J. Env. Hlth., 33, 16-20.
- Lee, H.W., Lee, S.K. and Kim, M.S., 2008. Characteristics of ampicillin-resistant *Vibrio* spp. isolated from a west coastal area of Korean Peninsula. J. Kor. Fish. Soc., 42, 20-25.
- Lee, K.K., S.R. Yu, T.I. Yang, P.C. Liu and F.R. Chen. 1996. Isolation and characterization of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. Lett. Appl. Microbiol., 111-114.
- Lesmana, M., D. Subekti, C.H. Simanjuntak, P. Tjaniadi, J.R. Campbell and B.A. Oyofo. 2001. *Vibrio parahaemolyticus* associated with cholerae-like diarrhea among patients in north Jakarta, Indonesia. Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 39, 71-75.
- Lesmana, M., D. Subekti, P. Tjaniadi, C.H. Simanjuntak, N.H. Punjabi, J.R. Campbell and B.A. Oyofo. 2002. Spectrum of vibrio species associated with acute diarrhea in North Jakarta, Indonesia. Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 91-97.
- Lozano-Leon, A., J. Torres, C.R. Osorio and J. Martinez-Urtaza. 2003. Identification of tdh-positive *Vibrio parahaemolyticus* from an outbreak associated with raw oyster consumption in Spain. FEMS. Microbiol. Lett., 281-284.
- Kümmerer, K. 2009. Antibiotics in the aquatic environment: a review-part I. Chemosphere, 417-434.
- Martinez-Urtaza, J., A. Lozano-Leon, A. DePaola, M. Ishibashi, K. Shimada, M. Nishibuchi and E. Liebana. 2004. Characterization of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* isolates from clinical sources in Spain and comparison with Asian and North American pandemic isolates. J. Clin. Microbiol., 4672-4678.
- Neela, F.A., L. Nonaka and S. Suzuki. 2007. The diversity of multi-drug resistance profiles in tetracycline-resistant *Vibrio* species isolated from coastal sediments and seawater. J. Microbiol., 45, 64-68.
- Nishibuchi, M., T. Taniguchi, T. Misawa, V. Khaeomaneem, T. Honda and T. Miwatani. 1989. Cloning and nucleotide sequence of the gene (*trh*) encoding the hemolysin related to the thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. Infect. Immun., 57, 2691-2697.
- NCCLS. 2004. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. NCCLS document M100-S14. National committee for clinical laboratory standards., Wayne, PA.
- Ortigosa, M., E. Garay and M.J. Pujalte. 1994. Numerical taxonomy of vibriaceae isolated from oysters and seawater along an annual cycle. Syst. Appl. Microbiol., 17, 216-225.
- Phantouamath B., N. Sithivong, L. Sisavath, K. Munalath, C. Khampheng, S. Insisiengmay, N. Higa, S. Kakinohana and M. Iwanaga. 2001. Transition of drug susceptibility of drug susceptibilities of *Vibrio cholerae* O1 in Lao People's Democratic Republic. Southeast. Asian. J. Trop. Med. Public Health., 95-99.
- Rhodes, B. J., H. L. Smith, Jr. and J. E. Ogg. 1986.

- Isolation of non-O1 *Vibrio cholerae* serovars from surface waters in Western Colorado. *Appl. Environ. Microbiol.*, 51, 1216-1219.
- Saitanu, K., A. Chongthaleong, M. Endo., T. Umeda, K. Takami., T. Aoki and T. Kitao. 1994. Antimicrobial susceptibilities and detection of transferable R-plasmids from *Aeromonas hydrophila* in Thailand. *Asian Fish. Sci.*, 7, 41-46.
- Sciortino, C.V., J.A. Johnson and A. Hamad. 1996. Vitek system antimicrobial susceptibility testing of O1, O139, and Non-O1 *Vibrio cholerae*. *J. Clin. Microbiol.*, 34, 897-900.
- Son, J.C., S.W. Park and K.J. Min. 2003. Environmental and antimicrobial characteristics of *Vibrio* spp. isolated from fish, shellfish, seawater and brackish water samples in Gyeongbuk eastern coast. *Kor. J. Env. Hlth.*, 29, 94-102.
- Son, K.T., E.G. Oh, T.S. Lee, H.J. Lee, P.H. Kim and J.H. Kim. 2005. Antimicrobial susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* from fish farms on the southern coast of Korea. *J. Kor. Fish. Soc.*, 38, 365-371.
- Son, R., G. Rusul, A.M. Sahilah, A. Zainuri, A.R. Raha and I. Salmah. 1997. Antibiotic resistance and plasmid profile of *Aeromonas hydrophila* isolates from cultured fish, Tilapia (*Tilapia mossambica*). *Lett. Appl. Microbiol.*, 24, 479-482.
- Thomson, C.J., M.V. Jesudason, V. Balaji, B. Malathi, M. Uma and S.G.B. Amyes 1998. The prevalence of *Vibrio* spp. in drinking water and environmental samples in Vellore South India. *Epidemiol. Infect.*, 67-76.
- Tollefson, L., S.F. Altekruze and M.E. Potter. 1997. Therapeutic antibiotics in animal feeds and antibiotic resistance. *Rev. Sci. Tech.*, 16, 709- 715.
- Urakawa, H., T. Yoshida, M. Nishimura and K. Ohwada. 2000. Characterization of depth related population variation in microbial communities of coastal marine sediment using 16S rDNA-based approaches and quinone profiling. *Environ Microbiol.*, 2, 542-554.
- Venkateswaran, K., T. Takai, I. M. Navarro, H. nakano, H. Hashimoto and R. J. Eiebeling. 1989. Ecology of *Vibrio cholerae* non-O1 and *Salmonella* spp. and role of zooplankton in their seasonal distribution in Fukuyama coastal waters, Japan. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 1591-1598.
- Young, H., L.S. Nandivada and G.B. Amyes. 1989. Antibiotic resistance in the tropics. 1. The genetics bacterial ampicillin resistance in tropical areas. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 38-41.

2009년 4월 24일 접수

2009년 5월 18일 수정

2009년 7월 31일 수리