

서해안에서 분리한 비브리오균의 항생제 감수성 특성

강창호 · 오수지 · 소재성*

인하대학교 생물공학과

Antibiotic Susceptibility of *Vibrio* spp. Isolated from West Sea

Chang-Ho Kang, Soo Ji Oh, and Jae-Seong So*

Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Republic of Korea

(Received April 16, 2013 / Accepted June 19, 2013)

Bacteria of genus *Vibrio* are Gram-negative, curved, halophilic, nonspore-forming bacteria, autochthonous inhabitants of the marine and estuarine environments. Some of the *Vibrio* species such as *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, and *V. cholerae* are associated with human disease. Each year many people have been suffering from food-borne disease caused by the ingestion of seafood. In this study, we have monitored antibiotic resistance of this microorganism in 6 coastal areas of West Sea by sampling shellfish monthly. *Vibrio* spp. were detected from 23.3% of 120 samples analyzed using TCBS agar plates as well as API 20E kit. Among 16 antibiotics tested, resistance to vancomycin and ampicillin was observed in 82.1% of the isolates, and *Vibrio* spp. resistant to rifampin (71.4%) and cephalothin (53.6%) were also high. Most of the isolates were sensitive to chloramphenicol (92.9%), sulfamethoxazole/trimethoprim (92.9%), and tetracycline (96.4%). About 71.4% of the isolates showed multiple drug resistance toward 3 antibiotics including vancomycin and ampicillin.

Keywords: antibiotics resistance, food-borne disease, multiple drug resistance, *Vibrio*

패류는 생식, 가열조리 등 다양한 형태로 소비되는 국민기호 식품이지만, 식품의 특성상 원료 수확해역이 연안에 위치하고 있어, 도시화, 산업화에 따라 연안해역의 오염도가 매년 증가하면서 여러 위생안전의 위해물질에 노출됨에 따라 생산단계에서부터 철저한 위생 안전관리가 요구되고 있다. 비브리오균은 전 세계적으로 연안의 해수와 수산물에서 널리 검출되는 해양상재세균이다(Urakawa *et al.*, 2000). 비브리오균속 중에서는 *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*와 같은 강력한 병원균 뿐만 아니라 *V. alginolyticus*, *V. mimicus*, *V. fluvialis*와 같은 집단 식중독을 유발시키는 종들도 포함되어 있다(Klonze *et al.*, 1994; Lesmana *et al.*, 2002). 항생제와 다른 화학제제들은 가축이나 어류에 대한 질병 발생의 예방이나 치료를 위하여 광범위하게 사용되어지고 있을 뿐 아니라 생산성 증대를 위한 성장촉진을 목적으로 사료와 혼합하여 사용되어지고 있다(Tollefson *et al.*, 1997; Gaskins *et al.*, 2002; Giguere *et al.*, 2006).

최근 도시화, 산업화에 따라 생활 폐수와 산업폐수 그리고 사람이나 가축으로부터 배설된 분변 등의 오염원이 강우나 하천을 통하여 해상으로 유입됨으로써 연안 해역의 오염도는 증가하고 있는 추세이다. 특히 항생제를 투여한 가축 또는 반려동물이나 사람의 분변으로부터 약제 내성균이 자연환경으로 방출되기도

하는데, 사람이나 동물에게 투여한 항생제가 완전히 소화·흡수되지 않고 약 70% 정도가 성분이 변하지 않은 상태로 배설된다는 보고도 있다(Kümmerer, 2009). 또한 농장에서 발생하는 가축들의 분변이나 농작물의 성장을 위해 사람이나 동물들의 분변을 이용하여 만든 퇴비의 경우에도 대량 강우 시 하천으로 유입되어 일부는 직접적으로 바다로 유입되기도 한다. 이처럼 하천 및 연안해역은 육상으로부터 각종 오염원 뿐만 아니라 항생제 내성을 가진 세균들도 포함되어 있어 환경 중으로 방출된 항생물질에 의한 생태계로의 영향 및 양식 생물에 미치는 영향도 무시할 수 없다. 최근 하천 및 연안해역에서 의약품, 항생제 잔류 및 하천수가 유입되는 수역에서 분리되어진 세균에 대한 항생제 내성에 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 서해안 연안 패류양식장의 비브리오균에 대한 항생제 내성 실태 파악을 위하여 2012년 5월부터 12월 까지 서해안 패류양식장을 대상으로 비브리오균을 분리하고 분리된 균에 대한 항생제내성 특성에 대해서 조사하였다.

재료 및 방법

시료채취

주요 서해안 패류양식장인 태안 소원면, 가로림만, 영흥도, 대

*For correspondence. E-mail: sjaeseon@inha.ac.kr; Tel.: +82-32-860-8666; Fax: +82-32-872-4046

부도, 무의도, 강화도 등 총 6개 지역을 선정하여 2012년 5월부터 12월까지 매월 패류시료를 채취하였다. 이 기간동안 패류 120건의 검체를 채취하여 비브리오 균주를 분리하였다. 확인동정을 위한 실험방법으로 선택배지는 Thiosulfate Citrate Bile-salt Sucrose (TCBS, Difco, USA) 한천배지를 사용하여 녹색의 집락을 확인한 후 3% (w/v) NaCl이 첨가된 Nutrient 한천배지(NA, Difco)에 계대배양하였다.

균주의 분리 및 동정

채취한 시료는 멸균된 스테인리스 통에 담아 냉장상태를 유지하면서 실험실로 옮긴 후 3% (w/v) NaCl이 포함된 멸균수로 적절히 희석하거나 적정량의 원액을 TCBS에 도말하여 35°C에서 16-24시간 배양하였다. TCBS 평판배지 상에서 초록색 또는 노란색을 띠는 균집락을 잠정적인 비브리오균으로 선발하고, 선별된 균주들은 API 20E kit (bioMérieux, France)를 이용해 동정한 결과 비브리오균일 확률이 80% 이상인 균주들을 선발하여 본 연구에 사용하였다.

항생제 감수성 시험

항생제 감수성 시험은 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines (2007)를 따라 Müller-Hinton 배지를 이용 disc method에 의해 수행하였다. 3% (w/v) NaCl을 포함하는 Tryptic soy broth (TSB, Difco)에 16시간 전배양해서 10^4 colony forming unit 정도의 균체를 MHA (Muller Hinton Agar, Difco) 배지 표면에 도말한 후, 항생제 디스크(BBL, Becton Dickinson, USA)를 올려놓았다. 35°C에서 18시간 배양한 후 억제환의 크기를 mm 단위로 측정하여 표준지표에 따라 판정하였다(Bauer *et al.*, 1966). 사용한 항생제 디스크는 모두 BD BBL (Becton Dickinson and Company, USA)사 제품으로 ampicillin (AM, 10 µg), cefotaxime (CTX, 30 µg), cefotetan (CTT, 30 µg), cephalothin (CF, 30 µg), chloramphenicol (C, 30 µg), ciprofloxacin (CIP, 5 µg), cefepime (CEP, 30 µg), erythromycin (E, 15 µg), gentamicin (GM, 10 µg), kanamycin (K, 30 µg), nalidixic acid (NA, 30 µg), rifampin (RA, 5 µg), streptomycin (S, 10 µg), tetracycline (TE, 30 µg), trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT, 1.25 µg/23.75 µg), vancomycin (VA, 30 µg)을 사용하였다.

결과 및 고찰

양식 패류에서 비브리오균의 분리 및 동정

서해안 패류양식장 6개 지역에서 분리된 비브리오속 세균의 동정 결과, *V. parahaemolyticus* 11균주, *V. alginolyticus* 10균주 및 *V. fluvialis* 7균주로 총 28균주가 동정되었다.

분리된 비브리오균의 항생제 내성

패류시료에서 분리된 비브리오균주의 항생제 내성 실태를 분석하기 위하여 광역 항생제인 ampicillin, tetracycline, cephalothin, nalidixic acid, rifampin, trimethoprim-sulfamethoxazole, chloramphenicol, cefotaxime, ciprofloxacin, cefepime, cefotetan,

그람 양성균 항생제인 vancomycin과 erythromycin 및 그람 음성균 항생제인 gentamicin, kanamycin 등 16종의 항생제에 대한 내성을 분석하였다. 먼저 표준균주인 *V. parahaemolyticus* KCCM 11965에 대한 항생제 내성을 분석하였다. 그 결과 KCCM 11965 표준 균주는 ampicillin, vancomycin, streptomycin 및 rifampin에 대해서 내성을 보였고, erythromycin, gentamicin 및 cephalothin에 대해서는 중도내성을, 그 외 항생제에 대해서는 감수성을 보이는 것으로 나타났다. KCCM 11965 표준균주는 vancomycin과 ampicillin 외에 본 연구에서 사용된 그람 음성균에 작용하거나 혹은 광역 활성범위를 갖는 기타 항생제들에 대해 내성을 갖지 않는 것으로 나타났다.

패류에서 분리된 28균주 중 높은 내성을 나타낸 항생제는 vancomycin 및 ampicillin (82.1%), rifampin (71.4%), cephalothin (53.6%) 순이었고, 높은 감수성은 tetracycline (96.4%), chloramphenicol 및 sulfamethoxazole/trimethoprim (92.9%), nalidixic acid (82.1%), ciprofloxacin 및 cefepime (53.6%), streptomycin (42.9%) 순이었으며, 중등도 내성은 erythromycin (75.0%), kanamycin (60.7%), cephalothin 및 ciprofloxacin (39.3%) 순이었다(Fig. 1). Son 등(2003)은 동해안 해수에서 분리한 16주의 *V. parahaemolyticus*를 대상으로 항생제 감수성 측정결과 ampicillin과 cephalothin에 높은 내성을 보인다고 보고하였으며, Son 등(2005)은 남해안 어류양식장의 어류와 해수에서 분리한 *V. parahaemolyticus*와 *V. alginolyticus*에서 ampicillin과 amikacin에 높은 내성을 보고하였다. 한편 외국의 자료를 보면, Zanetti 등(2001)의 경우 LaMaddalena의 해수에서 분리한 *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*에서 ampicillin에 높은 항생제 내성을 나타냈으며, cephalosporin계 항생제는 거의 내성이 나타나지 않았다고 보고하였으며, Vaseeharan 등(2005)은 India의 블락 타이거 새우(*Penaeus monodon*) 양식장의 양식 해수에서 분리한 비브리오속 세균에서 oxytetracycline과 ampicillin의 내성을 보고하였다. Erythromycin의 경우에는 중도내성을 갖는 비율(75.0%)이 내성(25.0%)을 보이는 분리주들의 비율보다 훨씬 더 높았다. Kanamycin의 경우에도 중도내성을 보이는 균주들의 비율(60.7%)이 감수성을 보이는 균주(17.9%)와 내성을 보이는 균주의 비율(21.4%)보다 높게 조사되었다. Neela 등(2007)

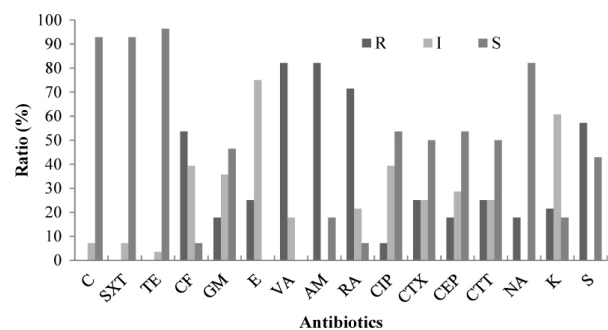


Fig. 1. Resistance (R), intermediate resistance (I), and sensitivity (S) ratios of the *Vibrio* spp. isolates against various antibiotics. Antibiotics were abbreviated as shown in 'Materials and Methods'.

은 비브리오 균종에 따라서는 내성 결정인자들이 수계 침전물이나 주변 환경으로부터 획득된다고 보고한 바 있으며, Oh 등(2009)은 기수지역의 항생제내성패틴의 차이가 하천이나 마을 하수를 통하여 육지로부터 유입되어 해양환경에 존재하는 이중 또는 동종 세균으로 plamid, transposon, integron 등과 같은 이동성 인자 (mobile element)의 수평적 전이(horizontal transfer)를 통하여 내성 유전자가 전이될 수 있다고 보고하였다. 따라서 본 연구에서 분리한 균주의 항생제 내성의 차이도 시료 특성과 환경 조건에 의한 결과로 사료된다.

분리된 비브리오균의 다중 항생제 내성

패류시료에서 분리된 비브리오균주 중 총 28개 균주들에 대한 항생제 내성을 분석한 결과 23개 균주가(82.1%) ampicillin과 vancomycin의 두 항생제에 대해서 모두 내성을 보였으며, 두 항생제 모두에 대해서 내성을 보이지 않은 균주는 총 5균주(17.9%)였다. Ampicillin과 vancomycin을 포함하여 3개의 항생제에 대해 내성을 보이는 분리균주는 총 3균주(10.7%)였고, 4개에 대해서 내성을 보이는 균주는 11균주(39.3%), 5개에 대해서는 5균주(17.9%), 7개에 대해서는 1균주(3.5%)가 내성을 나타냈다(Fig. 2). 우리나라에서, 어패류에서 분리한 비브리오균의 항생제 내성에 대한 실험은 수산물 시장에서 판매되는 어패류에서 분리된 *V. parahaemolyticus*가 100% ampicillin에 대해 내성을 보이고 다른 10종의 항생제에 대해서는 감수성을 보였다는 보고도 있었는데(Lee and Park, 2010), 이는 본 연구 보고와 유사하였다. 또한, 경기 인천 연안에서 분리된 *V. parahaemolyticus*가 vancomycin에 대해서 97.3%의 내성을 나타냈으며, ampicillin에 대해서도 87.3%의 내성을 보이고, cephalothin (48.8%)과 rifampin (46.1%)에 대해 내성을 갖는 분리균주들의 비율도 기타 다른 항생제들에 비해 뚜렷하게 높았다고 보고하고 있는데 (Han et al., 2012), 본 연구 결과에서도 ampicillin과 vancomycin의 내성률이 높고, rifampin (74.1%)과 cephalothin (51.9%)에 대해 내성을 갖는 분리균주들의 비율이 증가된 것을 확인할 수 있었다. 시험한 분리균주 규모의 차이가 있겠지만, 위의 결과들

로부터 서해안 패류양식장에서 분리되는 비브리오 균주들의 다중 항생제 내성 보유현상이 매우 광범위하게 보편화되고 있다는 것을 알 수 있다. 이는 패류 양식장 주변의 연안지역으로부터 유입되는 다량의 항생제로 인해 광범위한 항생제내성이 획득하거나, 기존에 내성을 가지고 있는 비브리오균주로부터 내성인자의 전이(Ellingsen et al., 2008)를 통해 항생제내성 능력이 전파된 것이라 사료된다.

적 요

비브리오균은 해양 및 하구 환경에서 상재하는 균으로 그람 음성 간균, 호염성, 비포자형성의 특징을 가지고 있다. 질병과 관련된 균주로는 *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio cholera* 등이 있다. 매년 어패류의 섭취 등을 통해 식중독 사고가 빈번하게 발생하고 있으며, 이에 본 연구에서는 서해안 6곳에서 패류를 채취하여 비브리오균의 분포도를 모니터링하고, 이들의 항생제 내성을 분석하였다. 총 120건의 패류를 TCBS 평판배지와 API 20E kit 기법으로 동정하였을 때 23.3%의 시료에서 비브리오균이 검출되었다. 이들 분리균주들의 항생제 내성을 16종의 항생제에 대해 분석한 결과 82.1%가 각각 vancomycin과 ampicillin에 대해 내성을 보였고, rifampin (71.4%)과 cephalothin (53.6%)에 대한 내성비율도 다른 항생제들에 비해 상대적으로 높은 것으로 나타났다. 분리균주들의 항생제 감수성은 chloramphenicol (92.9%), sulfamethoxazole/trimethoprim (92.9%)과 tetracycline (96.4%)에 대해 가장 높았다. 분리균주들의 약 71.4%가 vancomycin과 ampicillin을 포함하여 3개 이상의 항생제에 대해 다중내성을 보였다.

감사의 말

본 연구는 인하대학교의 지원에 의해 이루어진 연구입니다.

참고문헌

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.

Clinical Laboratory Standard Institute. 2007. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: seventeenth informational supplement, M100-S17. Wayne, PA, USA.

Ellingsen, A.B., Jørgensen, H., Wagley, S., Monshaugen, M., and Rørvik, L.M. 2008. Genetic diversity among Norwegian *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Appl. Microbiol.* **105**, 2195-2202.

Gaskins, H.R., Collier, C.T., and Anderson, D.B. 2002. Antibiotics as growth promotants: Mode of action. *Anim. Biotechnol.* **13**, 29-42.

Giguere, S., Prescott, J.F., Baggot, J.D., Walker, R.D., and Dowling, P.M. 2006. Antimicrobial therapy in veterinary medicine, 4th Ed. Blackwell Publishing, Iowa, USA.

Han, A.R., Yoon, Y.J., and Kim, J.W. 2012. Antibiotic resistance and plasmid profile of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from Kyunggi-Incheon coastal area. *Kor. J. Microbiol.* **48**, 22-28.

Klonze, K.C., Cover, D.E., Hyman, F.N., and Mullen, R.C. 1994. Fatal

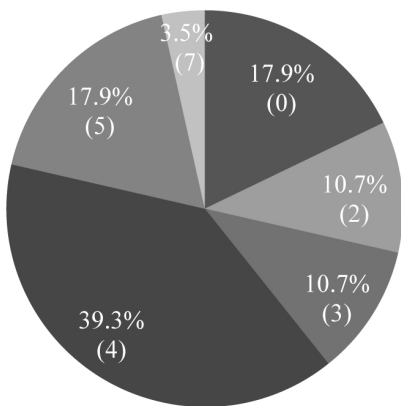


Fig. 2. Ratio of the *Vibrio* spp. isolates with multiple drug resistance at various degrees. Multiplicity of the resistance is presented in a parenthesis.

- gastroenteritis due to *Vibrio fluvialis* and nonfatal bacteremia due to *Vibrio mimicus*: unusual *Vibrio* infections in two patients. *Clin. Infect. Dis.* **19**, 541-542.
- Kümmerer, K.** 2009. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. *Chemosphere* **75**, 417-434.
- 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.
- Lesmana, M., Subekti, D.S., Tjaniadi, P., Simanjuntak, C.H., Punjabi, N.H., Campbell, J.R., and Oyoyo, B.A.** 2002. Spectrum of *Vibrio* species associated with acute diarrhea in North Jakarta, Indonesia. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **43**, 291-297.
- Neela, F.A., Nonaka, L., and Suzuki, S.** 2007. The diversity of multi-drug resistance profiles in tetracycline resistant *Vibrio* species isolated from coastal sediments and seawater. *J. Microbiol.* **45**, 64-68.
- Oh, E.G., Son, K.T., Ha, K.S., Yoo, H.D., Yu, H.S., Shin, S.B., Lee, H.J., and Kim, J.H.** 2009. Antimicrobial resistance of *Vibrio* strains from brackish water on the coast of Gyeongsangnamdo. *Kor. J. Fish. Aquat. Sci.* **42**, 335-343.
- Son, K.T., Oh, E.G., Lee, T.S., Lee, H.J., Kim, P.H., and Kim, J.H.** 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, 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. Env. Hlth.* **29**, 94-102.
- Tollefson, L., Altekruze, S.F., and Potter, M.E.** 1997. Therapeutic antibiotics in animal feeds and antibiotic resistance. *Rev. Sci. Tech.* **16**, 709-715.
- Urakawa, H., Yoshida, T., Nishimura, M., and Ohwada, K.** 2000. Characterization of depth-related population variation in microbial communities of a coastal marine sediment using 16S rDNA-based approaches and quinone profiling. *Environ. Microbiol.* **2**, 542-554.
- Vaseeharan, B., Ramasamy, P., Murugan, T., and Chen, J.C.** 2005. *In vitro* susceptibility of antibiotics against *Vibrio* spp. and *Aeromonas* spp. isolated from *Penaeus monodon* hatcheries and ponds. *Int. J. Antimicrob. Agents* **26**, 285-291.
- Zanetti, S., Spanu, T., Deriu, A., Romano, L., Sechi, L.A., and Fadda, G.** 2001. *In vitro* susceptibility of *Vibrio* spp. isolated from the environment. *Int. J. Antimicrob. Agents* **17**, 407-409.