pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 38, No. 4, pp. 246~254 (2023)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2023.38.4.246

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

제주지역 해수, 수족관물, 유통수산물에서 분리된 장염비브리오균의 분자생물학적 특성

조만재* · **강은옥** · **허예슬** · **고은아**
제주특별자치도 보건환경연구원 미생물과

Molecular Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* Isolates from Seawater, Fish Tanks, and Distributed Fishery Products in Jeju

Man Jae Cho*, Eunok Kang, Ye-seul Heo, Eun A Koh
Microbiology division, Jeju Institute of Health and Environment, Jeju, Korea

(Received July 4, 2023/Revised August 1, 2023/Accepted August 2, 2023)

ABSTRACT - *V. parahaemolyticus* causes waterborne and foodborne disease such as acute diarrhea. In this study, *V. parahaemolyticus* isolates from seawater, fish tanks, and distributed fishery products in Jeju were investigated for potential toxin or species-specific genes (*tdh*, *trh*, *tlh*, and *tox*R) using RT-PCR and their genetic characteristics were analyzed using Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Overall, *V. parahaemolyticus* of 90 strains (36.7%), including 33 strains from seawater, 8 strains from fish tanks, and 50 strains from fishery products, were isolated from 245 samples. All *V. parahaemolyticus* strains did not detect the *tdh* gene, whereas all strains detected *tlh* or *tox*R genes. In addition, *trh* genes were detected in 3 strains from seawater and 1 strain from fishery products. Monthly quantitative testing of seawater revealed that *V. parahaemolyticus* was positively correlated with water temperature. The 90 strains of *V. parahemolyticus* obtained in this study showed by gene homology between types, ranging from 64.0–97.3%. Among these, thirteen types showed 100% homology between genes. These results indicate that continuous monitoring is needed to facilitate food poisoning epidemiological investigations because some isolated *V. parahaemolyticus* strains harbored toxin genes and *V. parahaemolyticus* strains isolated from seawater, fish tanks, and distributed fishery products showed genetic similarity.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*, Toxin gene, PFGE, Seawater, Fishery products

장염비브리오균(*Vibrio parahaemolyticus*)은 *Vibrionaceae*과 *Vibrio*속에 속하고, 해수 또는 강하구에 널리 분포하는 호염성 그람음성 간균으로 급성설사를 일으키는 원인균이다[1,2]. 해수 온도가 13-15°C 미만인 겨울에는 장염비브리오균이 거의 증식하지 않지만, 온도가 15°C 이상으로 상승하는 늦봄이나 초여름에는 균이 활발하게 증식하기 시작하며, 여름에서 초가을에 가장 많이 검출된다[3-5]. 이 균에 오염된 수산물을 섭취하게 되면 구토, 복통, 설사, 미열 등의 급성위장염 증상이 나타난다[6,7].

식품의약품안전처 식품안전정보포털의 식중독 통계자료에 따르면, 2016년 제주에서 장염비브리오균에 감염된 환자는 151명이었다[8]. 다른 해보다 2016년에 장염비브리오균 환자가 많이 발생한 이유는 서귀포시 소재 음식점에서 충분히 세척하지 않은 수입산 냉동피뿔고동살로 뿔고동무침을 요리하였고, 이 음식을 취식한 사람에게서 장염비브리오균에 의한 집단식중독이 발생했기 때문이었다[9]. 최근 제주도는 장염비브리오균 감염환자가 거의 발생하고 있지는 않지만, 지리적으로 해양 환경과 밀접한 관계가 있고, 수산물을 다른 지역보다 날 것으로 많이 먹고 있기 때문에 장염비브리오균 감염에 항상 주의할 필요가 있다[8,10].

장염비브리오균의 병원성 진단지표로 사용되는 주요 독소 유전자로는 내열성 용혈독(*tdh*, thermostable direct hemolysin)와 내열성 용혈독 관련 용혈독(*trh*, TDH-related

*Correspondence to: Man Jae Cho, Microbiology division, Jeju Institute of Health and Environment, Jeju 63142, Korea
Tel: +82-64-710-6953, Fax: +82-64-710-7549
E-mail: cmj0521@korea.kr

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal 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.

hemolysin)이 있는데, 이 유전자들은 염기서열구조가 약 67% 정도 비슷하고, 숙주세포에 용혈작용과 세포독성을 나타내는 것으로 알려져 있다[11-13]. 설사 환자에서 분리된 장염비브리오균은 대부분 *tdh* 유전자 또는 *trh* 유전자를 보유하고 있었지만, 자연환경에서 분리되는 장염비브리오균은 이 독소 유전자를 0-6%만 보유하고 있다고 보고되고 있다[14,15]. 그리고 종특이성 유전자로는 열불안정성 용혈독(*tlh*, thermolabile hemolysin)와 독소 유전자 오페론 조절 유전자 *tox*R이 있으며, 이 유전자들은 병원성을 나타내지는 않지만 장염비브리오균의 분자생물학적 동정에 유용하게 사용되고 있다[16].

세균의 유전자 유형을 분석하는데 최적 표준(Gold standard)인 PFGE (Pulsed-field gel electrophoresis)는 집단 식중독이 발생하였을 때 환자에게서 분리한 균이 집단 발생의 원인균인지를 조사하는데 가장 좋은 방법으로 PFGE 실험 방법은 PulseNet에 의해 국제적으로 표준화되어 있다[17,18]. 이 PFGE 실험법을 이용하면 세균의 DNA 염색체를 제한효소로 절단하고, 균주에게서 나타나는 독특한 절단 패턴을 비교하여 유전자 상동성을 비교할 수 있다[19].

이에 따라, 본 연구에서는 제주지역 항·포구의 해수와 주변 횟집에 수족관물, 제주도내 유통되고 있는 수산물의 장염비브리오균 오염정도를 확인하고, 분리된 균주의 독소 유전자 보유 및 PFGE를 통해 유전자 상동성을 조사하여 감염병 및 식중독 발생 시 오염원 추적을 위한 역학조사 기초자료로 활용하고자 하였다.

Materials and Method

조사대상 및 시료수집

2022년 2월부터 2022년 12월까지 항·포구 (제주시외항, 자구내포구, 서귀포외항, 성산항) 4곳의 해수를 수심 1 m 이내 표층에서 2 L씩 매달 1회 채수하여 해수 44건을 실험하였다. 그리고 총 16회에 걸쳐 제주도 내 전통시장과 마트에서 판매하는 유통 수산물 187건 및 수족관물 14건을 구입하여, 총 245건을 본 연구에 사용하였다. 식품의약품안전처 식중독 원인조사 시험법[20]에 따르면, 비브리오속 병원균은 저온(0-5°C)에서 사멸하기 쉽고, 냉동온도에서 일반적으로 1-2 log로 감소한다고 알려져 있기 때문에 모든 시료는 실온 상태로 신속하게 운반하여 실험을 하였다.

장염비브리오균 증균배양 및 유전자 보유 여부 확인

장염비브리오균의 증균배양은 식품의약품안전처 식품공전[21] 방법에 따라 실시하였다. 시료 25 g 또는 25 mL에 2% NaCl (Samchun chemicals, Pyeongtaek, Korea)이 첨가된 peptone (BD, Sparks, MD, USA)을 225 mL을 가한 후 35°C에서 18-24시간 동안 배양기(HB-103-4, Hanbaek sci., Bucheon, Korea)에서 증균배양을 하였다. DNA 추출은 boiling법으로 배양 후 증균액 1 mL을 취하여 13,000 rpm에서 5분간 Legend Micro 17R (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)을 이용하여 원심분리 후 상층액을 제거하였고, 여기에 세척을 위해 멸균증류수 500 µL를 넣어 13,000 rpm에서 원심분리를 2회 실시하여 배지의 염을 제거하였다. 수집된 균체에 멸균증류수를 100 µL를 첨가 후 충분히 혼합하고, 100°C에서 10분간 Dry Bath (MaXtable H10, DAIHAN Scientific, Wonju, Korea)을 이용하여 가열한 뒤 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 DNA를 추출하였다. 여기서 추출된 주형 DNA를 PowerChek™ *Vibrio* Multi II Real-Time PCR Kit (Kogenebiotech Co., Seoul, Korea) 또는 PowerChek™ *Vibrio parahaemolyticus* Real-Time PCR Kit (Kogenebiotech Co., Seoul, Korea)와 혼합하여 ABI 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA)를 이용하여 각각 *tox*R 유전자와 *tlh*, *trh*, *tdh* 유전자 보유 여부를 확인하였다. PCR 반응조건은 제조사 시험법에 따라 50°C에서 2분 반응 후 95°C에서 10분 반응시키고, 95°C에서 15초 반응 후 60°C에서 1분간 반응 시킨 것을 1 cycle로 하여 총 40 cycle을 반복하였다.

장염비브리오균 분리배양 및 동정

실험결과 장염비브리오균 유전자가 검출된 시료의 증균액을 식품의약품안전처 식품공전[21] 방법을 변형하여 분리배양 및 동정하였다. Thiosulfate Citrate Bile-salt Sucrose (TCBS, BD, Sparks, MD, USA) 배지에 접종하여 35°C에서 18-24시간 배양 후 직경 2-4 mm인 청록색의 서당(sucrose) 비분해 집락을 선별한다. 선별된 전형적인 집락을 1% NaCl이 첨가된 Tryptic soy agar (TSA, BD, Sparks, MD, USA)에 접종하여 35°C에서 18-24시간 배양 후 Vitek II (BioMerieux, Marcy-l'Etoile, France) 및 Maldi-Tof (Bruker, Billerica, MA, USA)를 이용하여 생화학적 방법으로 장염비브리오균 최종 동정하였다.

장염비브리오균 유전자 최종확인

분리된 장염비브리오균은 *tdh*, *trh*와 같은 독소 유전자와 *tlh*, *tox*R와 같은 종특이성 유전자가 존재하는지 여부는 식품의약품안전처 식중독 원인조사 시험법[20]을 변형하여 확인하였다. 1% NaCl이 첨가된 TSA에 순수분리된 장염비브리오균 집락을 취하여 멸균증류수 100 µL에서 부유시키고, 100°C에서 10분간 가열한 뒤 13,000 rpm에서 10분간 원심분리한 상층액을 주형 DNA로 사용하였다. 여기서 추출된 주형 DNA를 PowerChek™ 2X Premix strip kit (Kogene biotech Co., Seoul, Korea) 및 primer와 혼합하여 conventional PCR (C1000 Touch Thermal Cycler, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 실시하였다. 사용한 primer 및 실험조건은 Table 1와 같으며, PCR 결과는 1.5% agarose

Table 1. Primer sequences and amplification conditions of virulence genes and species-specific genes

Target genes	Primer Sequence (5′to 3′)	Product size (bp)	Amplification conditions
tdh[1]	TGG TTG ACA TCC TAC ATG ACT GTG GGG GAT CCC TCA GTA CAA AGC CTT	400	Initial denaturation (94°C, 5 min) 30 cycles: denaturation (94°C, 1 min) annealing (60°C, 1 min) elongation (72°C, 1 min) Final elongation (72°C, 10 min)
trh[2]	GGC TCA AAA TGG TTA AGC G CAT TTC CGC TCT CAT ATG C	250	
tlh[3]	AGC TTG TCT GAT ACA GGC AAC ATC GAG TTG CTG TTG GGT GCG TG	739	Initial denaturation (94°C, 5 min) 30 cycles: denaturation (94°C, 1 min) annealing (63°C, 1 min) elongation (72°C, 1 min) Final elongation (72°C, 10 min)
*tox*R[4]	AGC CGC CTT TCT TCA GAC TC AAC GAG TCT TCT GCA TGG TG	399	Initial denaturation (94°C, 5 min) 20 cycles: denaturation (94°C, 1 min) annealing (55°C, 1 min 30 s) elongation (72°C, 1 min) Final elongation (72°C, 10 min)

[1]thermostable direct hemolysin, [2]TDH-related hemolysin, [3]thermolabile hemolysin, [4]regulatory gene of the toxin operon

gel (SeaKem LE Agarose, Takara Bio Inc., Shiga, Japan)로 전기영동하고, Gel-Doc System (Universal Hood II, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)으로 확인하였다. 분리된 장염비브리오균은 CryoCare Bacteria Preservers (KEY Scientific Produsts, Stamford, TX, USA)에 넣고, –72°C deep freezer (ULT-587, GMS, Yangju, Korea)에 보관하였다가 PFGE 실험에 사용하였다.

장염비브리오균 정량검사 및 환경요인 측정

해수의 환경요인과 월별 장염비브리오균의 검출률 상관관계를 확인하기 위해 항·포구 4곳에서 매달 채수하여 장염비브리오 정량검사 및 환경요인(수온, 염도, pH) 측정을 실시하였다. 해수의 장염비브리오균 정량검사는 Lee 등[22]에 제시한 방법에 따라 실시하였다. 2% NaCl이 첨가된 peptone 10 mL에 3개 시험관법으로 해수 10 mL, 1 mL, 0.1 mL씩 접종하여 35°C에서 18-24시간 동안 배양 후 DNA 유전자 추출을 하여 유전자(*tdh*, *trh*, *tlh*, *tox*R) 보유 여부를 conventional PCR로 확인하였다. 유전자의 증폭산물이 검출된 시험관을 양성으로 판정하고, 최확수법(MPN)을 적용하여 100 mL 중에 존재하는 균수를 산출하였다. 그리고 해수의 환경요인 중에서 수온과 염도는 Orion star A216 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 측정하였고, pH는 Seal analytical (Bltec, Seoul, Korea)을 이용하여 측정하였다.

또한, 수산물은 장염비브리오 정성검사에서 검출된 시료에 대하여 장염비브리오균이 법적기준치 이상 검출되는지 여부를 확인하기 위하여 식품의약품안전처 식품공전[21] 방법에 따라 정량검사를 실시하였다. 시료 25 g에 10배의 멸균생리식염수(Saline)을 가한 후 TCBS 배지 3장에 0.3 mL, 0.4 mL, 0.3 mL씩 접종액이 1 mL이 되도록 도말하였고, 35°C에서 18-24시간 배양한 다음 청록색 서당 비분해 집락을 계수하였다.

PFGE 실험 및 분석

분리된 병원성비브리오균을 대상으로 분리 균주들간의 유전학적 연관관계의 확인을 위하여 PulseNet에 참여기관들이 사용하는 국제적으로 표준화된 PFGE 표준실험법으로 PFGE를 실시하였다[23]. 1% NaCl이 첨가된 TSA에 접종하여 순수분리된 균을 멸균된 면봉으로 취한 뒤, 1 M Tris-HCl 50 mL (pH 8.0, Bioneer, Daejeon, Korea)와 0.5 M EDTA 100 mL (pH 8.0, Bioneer, Daejeon, Korea)을 넣고 증류수로 500 mL 되도록 넣은 뒤 멸균하여 만든 Cell suspension TE buffer (CSB) 2 mL에 Multi Colorimeter (DR900, HACH, Loveland, CO, USA)을 이용하여 투명도가 20%이 되도록 균을 현탁하였다. 1.5 mL microcentrifuge tube를 균 현탁액 200 μL와 1.2% Seakem gold agarose (Lonza, Basel, Switzerland) 200 μL를 넣고, 1000 μL 용량의 micropipette을 사용하여 가볍게 4회 이하로 섞은 뒤 바로 plug mold에 넣어 실온에서 15분간 굳혀서 plug를 만들었다. 1 M Tris-HCl 25mL (pH 8.0), 0.5 M EDTA 50 mL (pH 8.0), 10% Sodium-lauroyl sarcosine 50 mL (Sigma-Aaldrich, Saint Louis, MO, USA)을 넣고 증류수로 500 mL 되도록 넣은 뒤 멸균하여 만든 Cell lysis buffer (CLB) 1.5 mL와 proteinase K (20 mg/mL) 50 μL가 들어있는 2 mL microcentrifuge tube에 잘 굳은 plug를 넣고, 진탕 항온수조(SW-90MW, Sang Woo Scientific Co., Bucheon, Korea)에서 100 rpm으로 1시간 30분동안 반응시켰다. Screen cap에 plug를 옮기고 Screen cap을 조립하여 PVC

tube에 넣은 후에 1 M Tris-HCl (pH 7.6, Bioneer, Daejeon, Korea) 10 mL, 0.5 M EDTA (pH 8.0) 2 mL을 넣고 증류수로 1000 mL 되도록 넣은 뒤 멸균한 Plug wash TE buffer (PWB)를 PVC tube에 가득 채워서 55 ℃ 진탕항온수조에서 100 rpm으로 20분간 5회 세척하였다. 세척이 끝난 plug를 1 mm 두께로 잘라 *Not I* (40 U/μL) 제한효소(Roche, Mannheim, Germany)를 사용하여 37℃ 항온수조(LB-WM651, LK Labkorea, Namyangju, Korea)에서 3시간동안 반응시켰다. 전기영동장치(Chef Mapper Power Module, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)에 0.5 X TBE buffer (Bioneer, Daejeon, Korea) 2 L를 채우고 1.5 M Tiourea (Sigma-Aaldrich, Saint Louis, MO, USA) 1 mL을 첨가하여 14℃가 되도록 하였다. 제한효소 처리가 끝난 plug은 1% Seakem Gold agarose을 이용하여 gel을 만들고, 굳힌 뒤 전기영동장치에 옮겨서 included angle 120, initial time 2초, final time 40초, 전압 6 V/Cm, ramping factor 0으로 설정하고 18시간동안 전기영동을 하였다. 표준균주 *Salmonella* Braende rup BAA-664를 size marker로 이용하기 위해 *Xab I* (40 U/μL) 제한효소(Roche, Mannheim, Germany)를 사용하여 분리균주와 동일하게 실험을 진행하였다. 전기영동이 완료된 후 SYBRTM Gold 염색시약(Invitogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 gel을 20분간 염색하였다. 염색이 끝난 gel을 증류수에 넣고 2시간동안 탈색을 실시하였고, 탈색 후에 Gel-Doc System으로 확인하였다. 유전자 상동성 분석은 식품의약품안전평가원 미생물과에 의뢰하여 결과를 얻었다.

통계분석

유의성 검증은 SPSS Statistics (IBM, Chicago, IL, USA)를 이용하여 ANOVA 분석 후 Duncan의 다중범위검정을 실시하였다. 각 실험값 사이의 유의적인 차이는 $P<0.05$ 수준에서 검증하였다.

Results and Discussion

시료별 장염비브리오균 분리현황

검사한 시료는 총 245건이고, 시료별로 장염비브리오균 분리현황 및 검출률은 Table 2에 나타내었다. 항·포구에서 채수된 해수 44건, 횟집 수족관물 14건과 제주지역에서 유통·판매되고 있는 수산물 187건에서 장염비브리오균이 각각 33주(75.0%), 7주(50.0%), 50주(26.7%)가 분리되었다. 최종적으로 총 245건의 시료 중 90주(36.7%)의 장염비브리오균이 분리되었고, 검사 결과를 보면 해수 및 수족관물과 같은 자연환경이 수산물보다 검출률이 높게 나타나는 것을 알 수 있었다. 이는 유통·판매되는 수산물의 손질 및 관리되는 위생 상태 등이 검출률에 영향을 미친 것으로 판단된다. 유통·판매되고 있는 수산물 종류별로는 장염비브리오균이 해양어류 78건 중 30주(38.5%), 연체류 46건 중 12주(26.1%), 손질회 46건 중 7주(15.2%), 피낭류 10건 중 0주(0%), 해초류 3건 중 1주(33.3%), 해삼류 2건 0주(0%), 갑각류 1건 중 0주(0%), 성게류 1건 0주(0%)가 분리되었다. 그리고 장염비브리오균이 검출된 시료를 대상으로 장염비브리오균 정량검사 결과 10-80 CFU/g으로 식품의약품안전처 식품공전[21]에 제시된 장염비브리오균 법적 기준인 g당 100 이하와 비교하였을 때 법적 기준치 이하로 적합 수준임을 알 수 있었다. 법적 기준치 이하이긴 하지만, 장염비브리오균에 오염된 수산물을 생식하거나 불충분하게 가열하여 섭취하게 되면 급성위장염이 발생할 수도 있다. 그렇기 때문에 85℃ 이상으로 충분히 가열하여 먹으면 안전하므로 수산물을 섭취할 때는 주의를 기울여야 할 것으로 보인다.

해수의 환경요인과 장염비브리오균 상관관계

해수의 환경요인과 장염비브리오균 사이에 상관관계를 알아보기 위하여 매달 채수된 해수에서 장염비브리오균 정량검사와 수온, 염도, pH와 같은 환경요인을 측정하였고, 그 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 해수의 수온은 2월에 8.5℃로 가장 낮게 측정되었고, 8월에 30.0℃로 가장 높게 측정되었으며 평균 19.8℃를 나타내었다. 염도는 9월에 10.48 psu로 가장 낮았고, 2월에 54.66 psu로 가장 높게 측정되었으며 평균 염도는 46.72 psu를 나타내었다. 해수의 pH는 pH 7.4-7.8로 측정되었다.

해수에서 첫 번째 장염비브리오균 분리는 2월 성산항(12.4℃)에서 채수된 해수에서 분리하였고, 수온이 높아지는 6월(40.4 MPN/mL)에 서서히 증가하여 8월(144.0 MPN/mL)에 가장 높은 수치를 나타내었다. 장염비브리오균은 수온과 양의 상관관계(R^2=0.82)가 있었으나, 염도(R^2=-0.43)와 pH(R^2=-0.14)는 상관관계가 거의 없는 것으로 나타났다.

Table 2. Isolation status of *V. parahemolyticus* by samples

Sample type	No. of samples	No. of isolates	Detection rate (%)
Seawater	44	33	75.0
Fish tank	14	7	50.0
Fishery products	187	50	26.7
Total	245	90	36.7

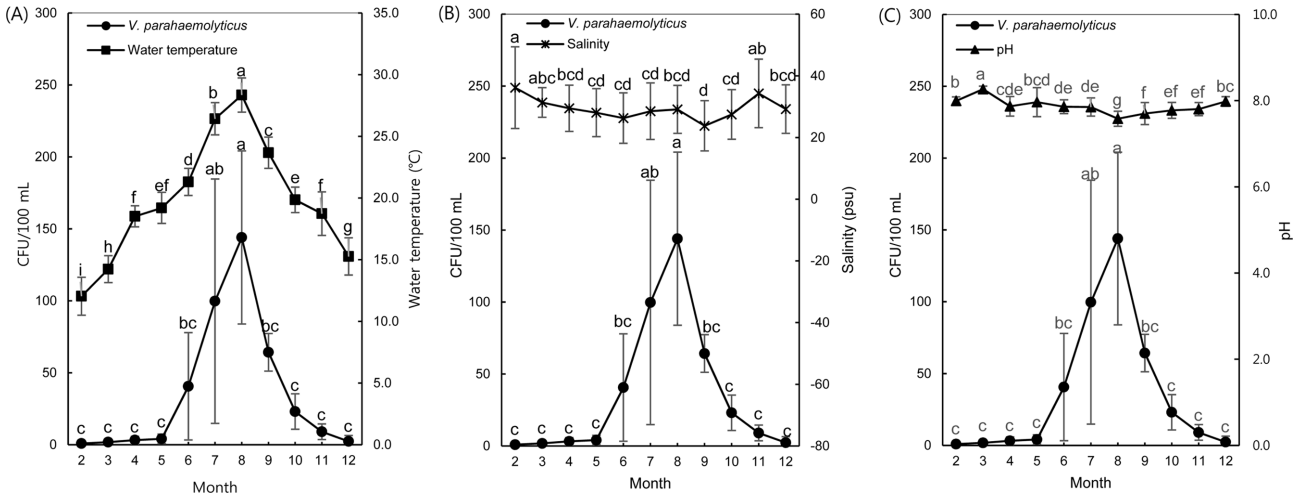


Fig. 1. Water temperature (A), salinity (B), and pH (C) of seawater and quantitative test results of *V. parahemolyticus* in Jeju area seawater from February 2022 to December 2022. Mean±SD. Means with different small letters on the bar indicate significant difference within other months at $P<0.05$.

Table 3. Genes types of *V. parahemolyticus* isolated from seawater, fish tank, and distributed fishery products in Jeju

Sample type	No. of *V. parahemolyticus* samples	Toxin or species-specific genes profile			
		*tox*R	*tlh*	*trh*	*tdh*
Seawater	22	+	+	-	-
	5	+	-	-	-
	3	-	+	-	-
	3	+	+	+	-
Fish tank	6	+	+	-	-
	1	-	+	-	-
Fishery products	45	+	+	-	-
	3	+	-	-	-
	1	-	+	-	-
	1	+	+	+	-

독소 유전자 및 종특이성 유전자 확인

245건 시료에서 분리된 장염비브리오균 90주를 대상으로 conventional PCR을 이용하여 장염비브리오균의 독소 유전자(*tdh*, *trh*) 보유 여부와 종특이성 유전자(*tlh*, *tox*R) 보유 여부를 확인하였다(Table 3).

해수에서 분리된 장염비브리오균 중에서 *tox*R 유전자와 *tlh* 유전자를 중복으로 보유하는 균주는 22주이고, *tox*R 유전자만 보유하고 있는 균주는 5주, *tlh* 유전자만 보유하고 있는 균주는 3주가 검출되었다. 그리고 *tox*R 유전자, *tlh* 유전자 및 *trh* 유전자를 중복으로 보유하는 균주가 3주 검출되었고, *tdh* 유전자를 보유하는 균주는 검출되지 않았다. 종특이성 유전자인 *tox*R 유전자와 *tlh* 유전자의 검출률은 각각 90.9%, 84.8%이였고, *trh* 유전자 검출률은 9.1%로 나타났다. Cabrera-García 등[24]은 자연환경에서 분리한 장염비브리오균의 0-5% 정도가 *trh* 유전자를 보유하고 있다고 보고하였고, Robert-Pillot 등[25]은 강하구에서 채수한 물에서 분리한 장염비브리오균의 15-20%가 *trh* 유전자를 보유하고 있었다고 보고한 것으로 보아 지역적으로 독소 유전자 보유 정도가 다소 차이가 있음을 알 수 있었다.

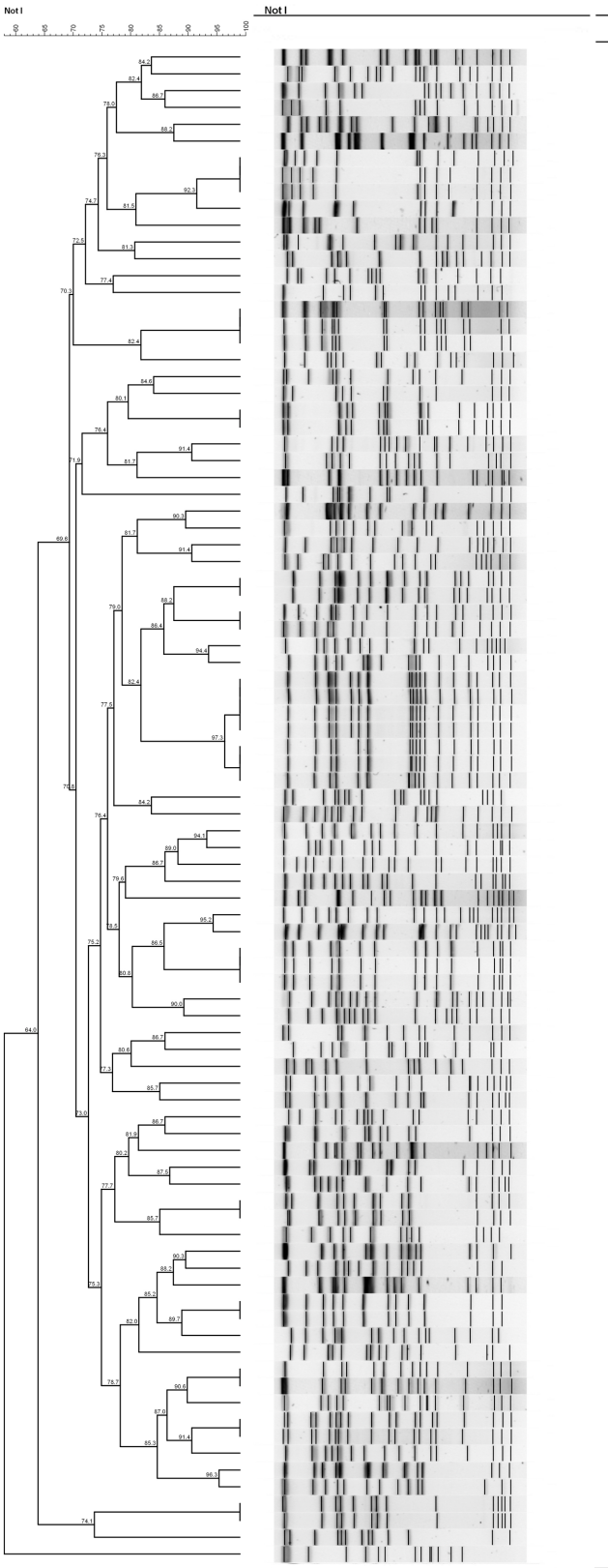
수족관물에서 분리된 장염비브리오균 중에서 *tox*R 유전자와 *tlh* 유전자를 중복으로 보유하는 균주는 7주이고, *tlh* 유전자만 보유하고 있는 균주는 1주가 검출되었으며 *trh* 유전자와 *tdh* 유전자를 보유하는 균주는 검출되지 않았다. 종특이성 유전자인 *tox*R 유전자와 *tlh* 유전자의 검출률은 각각 85.7%, 100%로 나타났다.

수산물에서 분리된 장염비브리오균 중에서 *tox*R 유전자와 *tlh* 유전자를 중복으로 보유하는 균주는 45주이고, *tox*R 유전자만 보유하고 있는 균주는 3주, *tlh* 유전자만 보유하고 있는 균주는 1주가 검출되었다. 그리고 *tox*R 유전자, *tlh* 유전자 및 *trh* 유전자를 중복으로 보유하는 균주가 1주 검출

되었고, *tdh* 유전자를 갖는 균주는 검출되지 않았다. 종특이성 유전자인 *tox*R 유전자와 *tlh* 유전자의 검출률은 각각 98.0%, 94.0%이였고, *trh* 유전자 검출률은 2.0%로 나타났다.

PFGE에 의한 유전자 상동성 분석

해수, 수족관물, 수산물에서 분리된 장염비브리오균 90주를 대상으로 균주간의 유전적 상동성을 알아보기 위하



No.	Date	Sample
7	2022.05.02.	Seogwipo Outer Harbor
79	2022.11.04.	Molluscs-1
63	2022.09.07.	Sashimi-1
80	2022.11.04.	Molluscs-1
3	2022.03.28.	Jagunae Port
9	2022.06.20.	Jejusi Outer Harbor
32	2022.11.21.	Seogwipo Outer Harbor
78	2022.11.04.	Molluscs-3
83	2022.11.04.	Fish-17
45	2022.07.25.	Fish-9
4	2022.04.18.	Seongsan Harbor
25	2022.10.11.	Jagunae Port
73	2022.10.17.	Seaweed
30	2022.11.14.	Seongsan Harbor
37	2022.08.08.	Fish Tank-4
10	2022.06.20.	Seogwipo Outer Harbor
17	2022.08.09.	Seongsan Harbor
89	2022.11.21.	Sashimi-5
31	2022.11.21.	Jagunae Port
38	2022.08.08.	Fish Tank-5
39	2022.08.08.	Fish Tank-6
66	2022.09.07.	Sashimi-4
90	2022.12.05.	Sashimi-5
12	2022.06.21.	Jagunae Port
87	2022.11.14.	Fish-20
5	2022.04.25.	Jejusi Outer Harbor
28	2022.10.28.	Jejusi Outer Harbor
11	2022.06.20.	Seongsan Harbor
41	2022.07.21.	Fish-3
77	2022.10.27.	Fish-16
85	2022.11.04.	Fish-19
48	2022.08.02.	Fish-2
50	2022.08.02.	Fish-5
26	2022.10.11	Seogwipo Outer Harbor
82	2022.11.04.	Molluscs-4
22	2022.09.07.	Seongsan Harbor
24	2022.09.26.	Seogwipo Outer Harbor
53	2022.08.08.	Fish-6
54	2022.08.08.	Fish-1
56	2022.08.08.	Fish-7
57	2022.08.08.	Fish-2
43	2022.07.21.	Fish-1
58	2022.08.22.	Molluscs-4
70	2022.09.13.	Fish-13
44	2022.07.21.	Molluscs-5
86	2022.11.08.	Molluscs-3
20	2022.08.16.	Jagunae Port
33	2022.12.06.	Seongsan Harbor
29	2022.11.14.	Jejusi Outer Harbor
72	2022.10.04.	Fish-4
1	2022.02.21.	Seongsan Harbor
16	2022.07.19.	Seongsan Harbor
49	2022.08.02.	Fish-8
15	2022.07.19.	Jejusi Outer Harbor
35	2022.08.08.	Fish Tank-2
36	2022.08.08.	Fish Tank-3
19	2022.08.16.	Seogwipo Outer Harbor
62	2022.08.22.	Fish-11
18	2022.08.09.	Jejusi Outer Harbor
34	2022.08.08.	Fish Tank-1
68	2022.09.13.	Molluscs-1
23	2022.09.19.	Jagunae Port
69	2022.09.13.	Fish-12
40	2022.09.19.	Fish Tank-7
60	2022.08.22.	Fish-2
2	2022.03.21.	Jejusi Outer Harbor
47	2022.07.25.	Fish-3
55	2022.08.08.	Fish-5
46	2022.07.25.	Fish-10
76	2022.10.27.	Fish-15
88	2022.11.21.	Fish-21
52	2022.08.08.	Fish-4
74	2022.10.27.	Fish-14
6	2022.05.02.	Jagunae Port
64	2022.09.07.	Sashimi-2
65	2022.09.07.	Sashimi-3
61	2022.08.22.	Fish-1
42	2022.07.21.	Molluscs-2
14	2022.07.04.	Jagunae Port
8	2022.05.09.	Jejusi Outer Harbor
21	2022.09.07.	Jejusi Outer Harbor
13	2022.07.04.	Seogwipo Outer Harbor
27	2022.10.28.	Seongsan Harbor
59	2022.08.22.	Molluscs-1
51	2022.08.02.	Molluscs-2
81	2022.11.04.	Molluscs-6
71	2022.10.04.	Fish-2
75	2022.10.27.	Fish-1
67	2022.09.07.	Sashimi-5
84	2022.11.04.	Fish-18

Fig. 2. Pulsed-field gel electrophoresis analysis of *V. parahemolyticus* isolates.

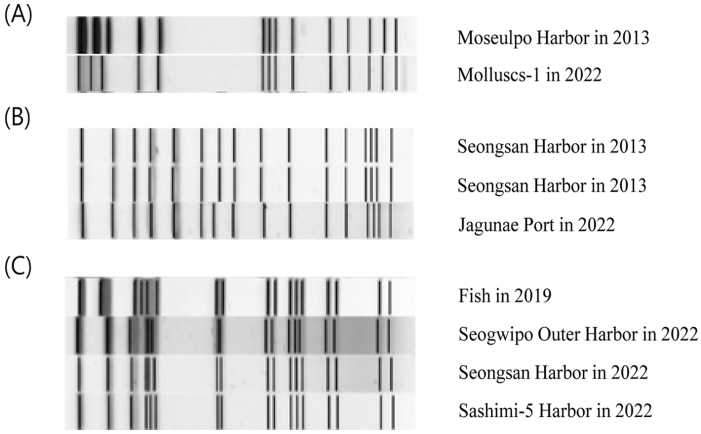


Fig. 3. Comparison of *Vibrio* genes homology within food poisoning bacteria tracking and management project.

Table 4. *V. parahemolyticus* PFGE genotype analysis result

Tpye	No.	Date	Sample	Target genes	Homology
A	32	2022.11.21.	Seogwipo Outer Harbor	*tox*R, *tlh*, *trh*	100%
	78	2022.11.04.	Molluscs-3	*tox*R, *tlh*	
	83	2022.11.04.	Fish-17	*tox*R, *tlh*	
B	10	2022.06.20.	Seogwipo Outer Harbor	tlh	100%
	17	2022.08.09.	Seongsan Harbor	*tox*R, *tlh*, *trh*	
	89	2022.11.21.	Sashimi-5	*tox*R, *tlh*	
C	66	2022.09.07.	Sashimi-4	*tox*R, *tlh*	100%
	90	2022.12.05.	Sashimi-5	*tox*R, *tlh*	
D	48	2022.08.02.	Fish-2	*tox*R	100%
	50	2022.08.02.	Fish-5	*tox*R, *tlh*	
E	26	2022.10.11.	Seogwipo Outer Harbor	*tox*R, *tlh*	100%
	82	2022.11.04.	Molluscs-4	*tox*R, *tlh*	
F	53	2022.08.08.	Fish-6	*tox*R, *tlh*	100%
	54	2022.08.08.	Fish-1	*tox*R, *tlh*	
	56	2022.08.08.	Fish-7	*tox*R, *tlh*	
	57	2022.08.08.	Fish-2	*tox*R, *tlh*	
G	43	2022.07.21.	Fish-1	*tox*R, *tlh*	100%
	58	2022.08.22.	Molluscs-4	*tox*R, *tlh*	
	70	2022.09.13.	Fish-13	*tox*R, *tlh*	
H	15	2022.07.19.	Jejusi Outer Harbor	*tox*R	100%
	35	2022.08.08.	Fish Tank-2	*tox*R, *tlh*	
	36	2022.08.08.	Fish Tank-3	*tox*R, *tlh*	
I	46	2022.07.25.	Fish-10	*tox*R, *tlh*	100%
	76	2022.10.27.	Fish-15	*tox*R, *tlh*	
J	64	2022.09.07.	Sashimi-2	*tox*R, *tlh*	100%
	65	2022.09.07.	Sashimi-3	*tox*R, *tlh*	
K	14	2022.07.04.	Jagunae Port	*tox*R	100%
	8	2022.05.09.	Jejusi Outer Harbor	*tox*R, *tlh*	
L	13	2022.07.04.	Seogwipo Outer Harbor	*tox*R	100%
	27	2022.10.28.	Seongsan Harbor	*tox*R, *tlh*	
M	71	2022.10.04.	Fish-2	*tox*R, *tlh*	100%
	75	2022.10.27.	Fish-1	*tox*R, *tlh*	

여 PFGE를 실시하여 Fig. 2와 같이 실험결과를 얻었으며, 실험결과는 식품의약품안전처 미생물과에 의뢰하여 분석결과를 얻었다. 장염비브리오균은 총 13개 유형에서 유전자 상동성이 100%로 나타났으며(Table 4), 유사도는 64.0-97.3%이다. A, B, E 유형은 해수와 수산물에서 분리된 장염비브리오균의 유전자 상동성이 100%로 나타났고, 해수는 K, L유형, 해수와 수족관물은 H유형, 수산물은 C, D, F, G, I, J, M 유형에서 각각 분리된 장염비브리오균도 유전자 상동성이 100%로 나타났다. 식품의약품안전처와 공동사업으로 진행한 식중독균 추적관리 사업에서 분리된 2013년 모슬포항 해수의 장염비브리오균과 수산물 중 Molluscs-1에서 분리된 장염비브리오균의 유전자 상동성이 100%로 나타났고, 2013년 성산항 해수와 2022년 자구내포구 해수에서 분리된 장염비브리오균의 유전자 상동성이 100%로 나타났다(Fig. 3). 또, 2019년 수산물에서 분리한 장염비브리오균와 2022년 성산항, 서귀포외항 및 Sashimi-5에서 분리한 장염비브리오균의 유전자 상동성도 100%으로 나타난 것으로 보아, 우리는 장염비브리오균의 위험요소에 언제나 노출되어 있으며, 매년 비브리오균 모니터링을 통한 연관성 분석으로 식중독 오염원 추적을 위한 기초자료에 도움이 될 수 있는 많은 균주 확보가 필요할 것으로 보인다.

Acknowledgement

본 연구는 제주특별자치도 보건환경연구원 연구사업의 지원으로 수행되었기에 감사드립니다.

국문요약

장염비브리오균은 급성 설사와 같이 수인성·식품매개 질병을 일으키는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 제주지역 해수, 수족관수, 유통 수산물에서 분리한 장염비브리오균을 real-time PCR을 이용하여 잠재적인 독소 유전자 또는 종특이성 유전자(*tdh*, *trh*, *tlh*, *tox*R)를 조사하고, 이 균주의 유전적인 특성을 PFGE로 분석하였다. 총 245개 시료 중 해수에서 33주, 수족관수에서 7주, 수산물에서 50주로 90주(36.7%)의 장염비브리오균을 분리하였다. 모든 장염비브리오균에서 *tdh* 유전자는 검출되지 않았지만, *tlh* 유전자 또는 *tox*R 유전자는 검출되었다. 또한, 해수에서 3주와 수산물에서 1주 분리된 균주에서 *trh* 유전자가 검출되었다. 매달 해수를 정량검사한 결과 장염비브리오균은 수온과 양의 상관관계를 가지고 있었다. 90주의 장염비브리오균은 64.0-97.3% 범위에서 유사한 유전자 상동성을 보였다. 이중에서 13개 유형에서 유전자 상동성이 100%였다. 이러한 결과는 일부 독소 유전자를 가진 장염비브리오균이 분리되었고, 해수, 수족관물, 유통 수산물에서 분리된 장염비브리오균 사이에 유전적 유사성이 있기 때문에 식중독 역학조사에 도움이 되도록 지속적인 모니터링이 필요함을 나타낸다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Man Jae Cho https://orcid.org/0000-0002-0166-4111
Eunok Kang https://orcid.org/0000-0003-3897-265X
Ye-seul Heo https://orcid.org/0009-0000-8466-0417
Eun A Koh https://orcid.org/0009-0009-7733-503X

References

1. Boyd, E.F., Carpenter, M.R., Chowdhury, N., Cohen, A.L., Haines-Menges, B.L., Kalburge, S.S., Kingston, J.J., Lubin, J.B., Ongagna-Yhombi, S.Y., Whitaker, W.B., Post-genomic analysis of members of the family *Vibrionaceae*. *Microbiol. Spectr.*, **3**, 1-26 (2015).
2. Yáñez, R., Bastías, R., Higuera, G., Salgado, O., Katharios, P., Romero, J., Espejo, R., García, K., Amplification of *tlh* gene in other *Vibrionaceae* specie by specie-specific multiplex PCR of *Vibrio parahaemolyticus*. *Electron. J. Biotechnol.*, **18**, 459-463 (2015).
3. Wong, H.C., Wang, P., Induction of viable but nonculturable state in *Vibrio parahaemolyticus* and its susceptibility to environmental stresses. *J. Appl. Microbiol.*, **96**, 359-366 (2004).
4. Julie, D., Solen, L., Antoine, V., Jaufrey, C., Annick, D., Dominique, H.H., Ecology of pathogenic and non-pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* on the French Atlantic coast. Effects of temperature, salinity, turbidity and chlorophyll a. *Environ. Microbiol.*, **12**, 929-937 (2010).
5. Park, Y.S., Park, K., Kwon, J.Y., Yu, H.S., Lee, H.J., Kim, J.H., Lee, T.S., Kim, P.H., Antimicrobial resistance and distribution of virulence factors of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from shellfish farms on the southern coast of Korea. *Korean J. Fish Aquat. Sci.*, **49**, 460-466 (2016).
6. Kim, T.O., Eum, I.S., Jo, S.M., Kim, H.D., Park, K.S., Antimicrobial-resistance profiles and virulence genes of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from seawater in the Wando area. *Korean J. Fish. Aquat. Sci.*, **47**, 220-226 (2014).
7. Klein, S.L., Gutierrez West, C.K., Mejia, D.M., Lovell, C.R., Genes similar to the *Vibrio parahaemolyticus* virulence-related genes *tdh*, *tlh*, and *vsc*C2 occur in other *Vibrionaceae* species isolated from a pristine estuary. *Appl. Environ. Microbiol.*, **80**, 595-602 (2014).
8. Ministry of Food and Drug Safety, (2023, February 24). Food poisoning statistics. Retrieved from https://www.foodsafetykorea.go.kr/portal/healthyfoodlife/foodPoisoningStat.

do?menu_no=3724&menu_grp=MENU_NEW02
9. Korea Centers for Disease Control and Prevention (KCDC), Epidemiological investigation of infectious diseases in Korea. Annual report, Cheongju, Korea (2016).
10. Jeon, D.Y., Lee, J.C., Song, H.J., Molecular epidemiological characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from diarrheal patients in Jeonnam, Korea. *J. Bacteriol. Virol.*, **39**, 229-235 (2009).
11. Raghunath, P., Roles of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin (TRH) in *Vibrio parahaemolyticus*. *Front. Microbiol.*, **5**, 805 (2015).
12. Li, L., Meng, H., Gu, D., Li, Y., Jia, M., Molecular mechanisms of *Vibrio parahaemolyticus* pathogenesis. *Microbiol. Res.*, **222**, 43-51 (2019).
13. Gutierrez West, C.K., Klein, S.L., Lovell, C.R., 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 (2013).
14. Kim, S.S., Lee, H.M., Lee, J.B., Molecular epidemiological characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* as recently wildespreaded in Korea. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **18**, 522-528 (2003).
15. Jeong, H.J., Lee, M G., Lee, H.H., Seo, S.E., Jeong, S.H., Cho, B.S., Seo, J.M., Distribution of toxin genes and antimicrobial resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from seafood in Gwangju. *J. Food Hyg Saf.*, **37**, 63-68 (2022).
16. Seung, H.J., Kim, L.L., Park, J.E., Ryu, S.H., Jin, Y.H., Kim, O.H., Yun, E.S., Virulence genes and antimicrobial resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from commercial marine products and aquarium waters. *Korea J. food Sci. Technol.*, **55**, 159-164 (2023).
17. Koh, E.H., Kim, S.J., Kim, E.C., Clinical characterization of group A Streptococcal bacteremia and restriction-fragment length polymorphism of emm gene and pulsed-field gel electrophoresis. *Korean J. Lab. Med.*, **24**, 119-125 (2004).
18. Kim, S.H., Kim, S.H., Park, J.H., Lee, K.S., Park, M.S., Lee, B.K., Clustering analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhi isolates in Korea by PFGE, ribotyping, and phage typing. *Foodborne Pathog. Dis.*, **6**, 733-738 (2009).
19. Kim, S.H, Lee, S.W., Kim, S.H., Kim, J.Y., Lee, H.Y., Kang, Y.H., Park, M.S., Lee, B.K., National early warning system construction for timely surveillance of foodborne disease outbreaks-PulseNet Korea. *Infect. Chemother.*, **38**, 309-315 (2006).
20. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), (2023, August 1). Detection method foodborne pathogens investigation. Retrieved from https://www.kfia.or.kr/base/download/bbs.php?fno=9488&bid=%2A%0B%BD9%E6%BCJk&did=%2A%0B%BD%3A%E6%B4Ko
21. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), (2023, August 1). Food code. Retrieved from https://various.foodsafetykorea.go.kr/fsd/#/ext/Document/FC
22. Lee, D.S., Shin, H.Y., Park, K.S., Shin, I.S., Distribution of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in seawater and shellfish at Gomso Bay. *Korean J. Fish. Aquat. Sci.*, **52**, 114-120 (2019).
23. Korea Disease Control and Prevention Agency (KDCA), PFGE standard test method, Cheongju, Korea (2022).
24. Cabrera-García, M.E., Vázquez-Salinas, C., Quiñones-Ramírez, E.I., Serologic and molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from seawater and fish products of the Gulf of Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 6401-6406 (2004).
25. Robert-Pillot, A., Guénolé, A., Lesne, J., Delesmont, R., Fournier, J.M., Quilici, M.L., Occurrence of the tdh and trh genes in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from waters and raw shellfish collected in two French coastal areas and from seafood imported into France. *Int. J. Food Microbiol.*, **91**, 319-325 (2004).