

도시하수 및 그 주변 하천 환경 중 항생제 내성 세균 노출 특성

오향균 · 박준홍[†]

연세대학교 사회환경시스템공학부

(2008년 12월 18일 접수, 2009년 3월 27일 채택)

Characteristics of Antibiotic Resistant Bacteria in Urban Sewage and River

Hyangkyun Oh · Joonhong Park[†]

School of Civil and Environmental Engineering, Yonsei University

ABSTRACT : This research investigated the characteristics of antibiotic resistance of bacteria in microbial communities from municipal wastewater treatment plants (MWTPs), and monitored seasonal changes of antibiotic resistant bacteria (ARB) from MWTPs and Han river. When antibiotics were amended to either R2A agar (R2A) for general heterotrophs or MacConkey sorbitol agar (MSA) for coliform bacteria, all the MWTP samples exhibited multiple antibiotic resistance on the antibiotic-amended solid media. The antibiotic resistance appearing frequencies of ampicillin and sulfathiazole, respectively, were higher than reported data for other countries. The antibiotic resistance appearances differed depending upon the concentrations of primary substrate and nutrients and the types of cultivation media. The following 16S rRNA gene phylogenetic analysis showed that the identified multiple-antibiotic resistant microbes on R2A plates were more likely to be known human-pathogenic bacteria than the background heterotrophic bacteria were, suggesting a high risk of antibiotic resistance appearance to public health. In addition, according to our investigation of seasonal changes of ARB from urban MWTP and river samples, the frequency of ARB appearances was shown to correlate positively with temperature. This indicates a possibility that global warming result in increase in microbial risk to public health.

Key Words : Antibiotic Resistance, Microbial Risk, Water Quality, Urban Sewage

요약 : 본 연구는 도시 하수처리장의 미생물 군집 내 항생제 내성 세균의 특징과 하천으로의 항생제 내성 세균 노출의 계절적 변화의 특성을 평가하였다. 일반 종속영양세균 배양을 위한 R2A agar (R2A)와 대장균군을 선택하여 배양하는 MacConkey sorbitol agar (MSA)에 항생제를 첨가 하여 제작한 배지에 하수처리장 시료를 도말하여 배양한 결과 모든 시료에서 다제 항생제 내성 세균을 검출해 낼 수 있었다. Ampicillin과 sulfathiazole의 내성률이 다른 나라에 비해 높게 측정 되었으며 시료내 유기물의 정도, 사용된 배지에 따라 내성률이 다름을 볼 수 있었다. R2A 배지에서 분리된 다제 항생제 내성 세균은 모두 기존에 알려진 병원성 세균과 그 염기서열이 유사한 것으로 볼 때 병원성 세균의 항생제 내성 정도가 일반 세균보다 높음을 본 연구 결과로 보일 수 있었다. 또한 본 연구에서는 하수처리장이 하천에 미치는 유해성을 계절별로 관찰하여 전체 미생물중 항생제 내성 세균의 비율은 수온과 비례한다는 결과를 얻었다. 이 결과는 지구 온난화가 미생물 유해성을 증가시킬 가능성을 시사한다.

주제어 : 항생제 내성, 미생물 유해성, 하천수질, 도시하수

1. 서론

1928년 Alexander Fleming이 penicillin을 발명한 이래로 현재까지 수많은 항생제가 발명되었고 이들은 병원성 세균으로 발생하는 많은 질병으로부터 인류를 보호해 왔다. 그러나 의료산업 · 축산업 · 농업 · 양식업 등지에서 발생하는 폐수와 가정에서 발생하는 하수 중의 항생제가 하폐수 처리과정 중 거의 분해되지 않고 자연계로 배출되면서 두 가지 이상의 항생제에 대해 내성을 갖는 다제 항생제 내성균(multiple-antibiotic resistant bacteria)이 출현하게 되었다. 이들은 자연 환경 내에 존재하면서 서로 다른 세균들과 함께 항생제 내성 유전자를 교환하며 항생제에 대해

더 강한 내성을 키운다.¹⁾ 이때, 병원성 세균이 여러 가지 항생제에 대해서 항생제 내성 유전자를 획득하게 되는 경우 그 병원성 세균으로 인한 질병 통제가 불가능해지고 다제 항생제 내성균인 *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella sp.* *DT 104*와 같이 치명적인 세균에 의해 목숨을 잃는 경우도 보고되고 있다.^{2~4)}

국내의 경우도 예외는 아니다. 2006년 식품의약품 안전청에서 「환경 중 항생제 내성균 모니터링」을 발간하여 우리나라 하천 및 하수처리장 내의 다제 항생제 내성 세균의 실태를 밝힌 바 있다.⁸⁾ *Staphylococcus aureus*의 경우 88.6%가 한 가지 이상의 항생제에 내성을 보이는 것으로 나타났다. 네 가지 이상의 항생제에 내성을 보이는 다제 내성균도 약 14.3%로 나타났다. 또한 *Enterococcus spp.*의 경우 한 가지 이상의 항생제에 내성을 보인 균은 97.2%이며, 네 가지 이상의 항생제에 내성이 있는 다제 내성균은 약 33.3%

[†] Corresponding author

E-mail: parkj@yonsei.ac.kr

Tel: 02-2123-5798

Fax: 02-346-5300

로 나타났다. 항생제 사용량의 증가에 따라 동물의 장(腸)은 항생제 내성 세균의 병원소(病原巢)중에 하나임은 이미 알려져 있는데,⁵⁻⁷⁾ 동물 체외로 방출된 이것들은 그대로 하수종말처리장으로 유입되고, 완벽하게 처리되지 않은 방류수는 하천 내 항생제 내성 미생물을 발생시키는 주요 원인이라고 보고되어 왔다.⁸⁻¹¹⁾ 이러한 종류의 조사를 위해서 기존에는 특정 병원성 혹은 대장균을 배양·검출하는 방법으로 환경 내 항생제 내성 미생물의 유해성을 평가하였다. 하지만 비병원성 세균에도 항생제 내성 유전자가 존재할 수 있어¹²⁾ 환경 내 일반중속영양 세균의 항생제 내성 특성 규명이 필요하다.

자연환경으로 노출된 항생제로 말미암아 환경은 항생제 내성 세균과 유전자의 발원지이며,¹³⁾ 이러한 항생제 내성 세균은 온도 변화에 따라 항생제 내성률이 서로 다른 이미 여러 선행연구에서 보고되었다.¹⁴⁻¹⁶⁾ 그리고 기온이 상승하면 병원성 유전자나 항생제 내성 유전자의 세균 간 이동이 빨라지므로 미생물에 의한 보건유해성이 증가할 수 있다.^{17,18)} 현재 전 세계는 지구 온난화의 문제에 직면해 있고, 우리나라의 경우 일 년 사계절에 따른 기온변화가 높아 온도에 따른 미생물 유해성의 변화가 환경보건에 있어 중요할 것이다. 그럼에도 불구하고 물 환경에서 항생제 내성 미생물의 노출 변화를 계절에 따라 조사한 사례는 국내에서 아직까지 보고된 바 없다.

상기의 연구배경에 의거하여 본 연구에서는 국내 도시하수처리장의 항생제 내성 세균 특성과, 하천으로의 항생제 내성 세균 노출의 계절적 변화에 대한 기초조사를 하고자 하였다. 이를 위해서 도시하수처리장 하수(유입원수·폭기조·방류수)와 그 주변 하천수의 항생제 내성 세균을 배양·검출 한 후 분리·동정하였고, 계절별로 한강과 도시 하수 및 하수처리장 시료 내 관련 항생제 내성 특성을 분석하였다.

2. 실험 재료 및 방법

2.1. 시료 선정

하수처리장 시료 내 항생제 내성 세균을 분석하기 위해 2008년 9월 서울 소재 한 종말하수처리장의 유입수, 방류수, 폭기조에서 5 L의 시료를 한 번씩 채취하여 시료로 사용하였다. 그리고 하수 및 처리수 내 항생제 내성 세균이 하천에 미치는 영향을 계절별로 알아보기 위해 서울 소재 4곳의 하수처리장 유입수·방류수와 도시를 가로질러 흐르는 하천의 다섯 지점(Fig. 1)에서 2007년 8월과 11월 그리고 2008년 1월과 5월에 시료를 채취하였다. 하천수 시료의 경우 강 하류부(Down-stream)의 세 지점과 상류부(Up-stream)의 두 지점에서 시료를 채취하였다. 채취해 온 시료는 공극 0.45 μm, 지름 47 mm의 필터(Watman)로 걸러 시료 안의 고형물을 제거하였고, 세균 배양실험 전까지 4℃에서 시료를 보관하였다.

2.2. 항생제 내성 세균 배양 방법

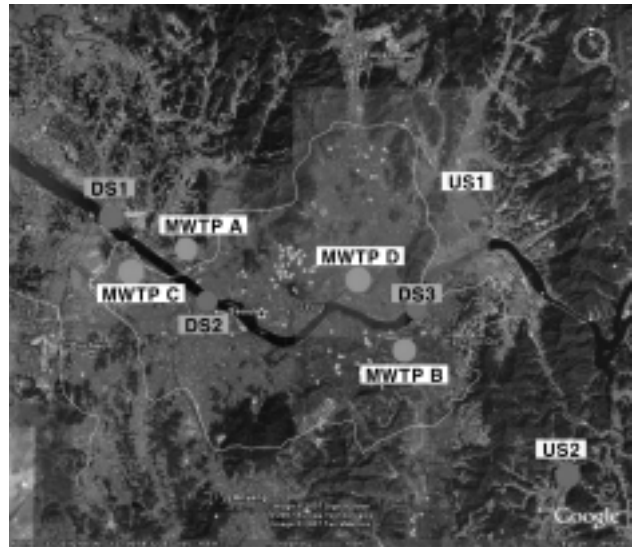


Fig. 1. Sampling positions along the Han river.

물 환경 시료 내 일반 중속영양세균을 배양하기 위해서 상대적으로 낮은 탄소원을 가지고 있는 R2A agar (R2A)¹⁹⁾를 배지로 사용하였다. 그리고 동물의 장내세균인 Enterobacteriaceae과(family)에 속한 세균을 분리하기 위해 MacConkey sorbitol agar (MSA)^{14,20)}를 배지로 사용하였다. 여기에 ampicillin (10 μg/mL), sulfathiazole (200 μg/mL), tetracycline (30 μg/mL)을 문헌^{15,16)}에 근거한 농도만큼 배지에 각각 넣어 항생제가 함유된 고형배지를 제작하였다. 시료 내 배양된 세균을 정량적으로 검출하기 위해서 시료를 무세균 phosphate buffer (NaH₂PO₄, pH = 6.7)와 혼합하여 다양한 농도로 희석시킨 후 배양된 집락을 확인하는 평판확산법(spread plate method)을 이용하여 계수(計數)하였다.¹⁹⁾ 일반 고형 배지(90×15 mm size)에 도말된 희석시료의 양은 100 μL이고, 한 고형배지 상에 30~300개의 집락이 있을 때 미생물의 분리와 정량화를 시행하였다. 이렇게 환경시료가 집중된 배지를 R2A의 경우는 21℃에서 5일,²⁰⁾ MSA는 37℃에서 24시간 배양한 후에 형성된 집락을 계수하였다. 집락 측정 결과의 정량적 신뢰성 평가를 위해서 각 시료의 평판확산법 분석은 최소 세 번 반복 수행 하였다.

하수 및 처리장과 하천에 노출된 항생제 내성 세균수의 계절별 변화를 조사하기 위해 강력한 인체용 항생제 중 하나인 vancomycin 100 μg/mL이 첨가된 R2A 고형배지를 사용하였다. Vancomycin 내성 세균은 다제 내성을 지니는 경우가 많아²¹⁾ 그 위험도가 높기에 vancomycin을 선정하였고, 상기와 같은 평판확산법을 이용해서 미생물 배양·검출을 수행하였다.

2.3. 배양 분리된 항생제 내성의 세균 동정과 계통분석

시료가 분주된 배지에서 자라난 세균의 계통학적 특성을 파악하기 위해 colony PCR 방법을 수행하였다. 우선 배양 배지상의 집락을 멸균된 이쑤시게를 이용하여 각각의 PCR tube에 넣었다. 그리고 분리된 세균의 DNA를 추출하기

위해 5% Chelex-100(Bio-rad) 100 μ L을 넣고²²⁾ 95 $^{\circ}$ C에서 10분간 가열한 후 소형 원심분리기를 이용하여(Labnet C1301B, 6,000 rpm) 약 30초~1분간 원심분리 하고 그 상등액을 PCR 반응의 template로 사용하였다. 세균의 16S rDNA gene을 증폭하기 위해서 primer는 27F (5' - AGAGTTTGATCAT GGCTCAG - 3')와 1492R (5' - TAC GGTTACCTTGTTAC GACTT - 3')^{23,24)}을 사용하였다. 각 PCR반응의 전체 부피는 50 μ L였으며, 10 nM 농도의 forward primer와 reverse primer를 각각 5.0 μ L, 10X PCR buffer 5.0 μ L, 20 mM의 MgCl₂ 4.0 μ L, 100 mM의 dNTP 0.10 μ L, 5 U/ μ L의 Taq polymerase (Invitrogen) 1.25 μ L, sterilized water 25.65 μ L, DNA template 4 μ L을 포함하고 있었다. 상기의 혼합액을 PCR 반응튜브에 넣고 고르게 섞은 후 thermal cycler를 이용해 PCR 반응을 실시하였다. 94 $^{\circ}$ C로 5분간 반응시킨 후, 94 $^{\circ}$ C(3분)-50 $^{\circ}$ C(25초)-72 $^{\circ}$ C(2분)을 한 사이클로 35회 반복하고, 72 $^{\circ}$ C에서 최종 반응을 시키는 조건으로 DNA를 증폭하였다. 획득된 PCR 반응물을 1%의 agarose gel, 1X TAE buffer에서 100 V, 400 mA로 40분간 전기영동을 실시하고 증폭된 PCR 반응물의 DNA 크기를 확인했다.¹⁹⁾

PCR Purification Kit (Qiagen)를 이용해서 증폭된 DNA를 정제시킨 후 염기서열 분석을 (주)마크로젠³¹⁾에 의뢰하였다. 그리고 RDP(Ribosomal Protein Database Project) II의 Classifier 프로그램과 GenBank의 nucleotide blast를 사용해서 세균의 계통분석을 수행하였다. 이 때, 염기서열 상등(相等) 비율은 97% 이상으로 하였다.

또한 분리된 세균의 염기서열과 이들과 계통학적으로 가장 가까운 미생물(reference bacteria)들의 염기서열을 함께 CLUSTAL-W³²⁾프로그램을 이용하여 700 bp 크기로 multiple alignment 시켰다. 이때 reference bacteria의 유전자 정보는 RDP와 GenBank의 데이터 검색 결과를 사용하였다. 이렇게 정렬된 염기서열로 MEGA4 프로그램의 neighbor-joining 연산법(1000 replicates)을 사용하여 계통수(系統樹, phylogenetic tree)를 작성하였다.

2.4. 핵산 염기서열 번호 등록

본 연구에서 획득한 다제 항생제 내성 세균 102종의 염기서열을 NCBI GenBank에 제출하고 승인번호(FJ789663 ~ FJ789764)를 받았다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 도시하수 및 처리수내 항생제 내성 세균 노출 분석 결과

하수처리장 C의 물 시료에 존재하는 세균을 R2A 배지와 MSA 배지에서 배양·분리하여 검출한 전체 세균수(total CFU)와 그 중 항생제가 첨가된 배지에서 자라난 세균 수의 비율(이하 항생제 내성률, antibiotic resistant ratio)을 Table 1에 나타내었다. R2A 배지에서 분리된 총 세균의 평균값(CFU/mL)은 유입수에서 7.3 \times 10⁴, 1차 침전지 폭

Table 1. Viable colony counting results of antibiotic resistant and total heterotrophic bacteria from a municipal wastewater treatment plant in Seoul

Medium	Sample	Antibiotic resistant ratio (%)							Total CFU/mL
		A	S	T	A+S	S+T	A+T	A+S+T	
R2A	Influent	23.3	17.0	1.9	5.3	1.0	1.3	0.7	73,000
	S.D.	4.2	5.2	0.7	2.1	0.7	0.3	0.1	4,333
	Sludge in aeration tank	18.7	10.1	1.9	6.7	1.4	2.0	0.7	857,000
	S.D.	5.6	6.4	0.9	3.3	0.4	0.5	0.2	107,990
	Effluent	12.9	12.7	1.2	1.9	0.6	0.4	0.1	2,330
	S.D.	2.1	3.2	0.3	0.2	0.2	0.2	0.1	931
MSA	Influent	34.9	45.6	2.0	2.1	1.1	2.3	0.3	27,000
	S.D.	10.2	11.7	1.0	0.6	0.9	0.2	0.2	7,300
	Sludge in aeration tank	28.9	14.1	0.6	2.8	0.5	0.6	0.2	29,300
	S.D.	7.6	3.4	0.2	0.6	0.2	0.1	0.1	15,367
	Effluent	4.3	3.1	1.1	0.3	0.2	0.1	0.0	7,470
	S.D.	1.0	0.9	0.3	0.1	0.1	0.0	0.0	970

A(ampicillin); S(sulfathiazole); T(tetracycline); Control(no antibiotic amendment)
S.D.; Standard Deviation

기조 시료에서 8.5 \times 10⁵, 방류수에서 2.3 \times 10³을 나타내었다. 또한 MSA배지에서 분리된 총 세균의 평균값(CFU/mL)은 유입수에서 2.7 \times 10⁴, 1차 침전지 폭기조 시료에서 2.9 \times 10⁴, 방류수에서 7.4 \times 10³을 나타내었다.

물 환경 시료에서 항생제 내성 대장균을 연구한 기존 연구의 결과와 본 연구 결과의 항생제 내성률은 큰 차이를 보이고 있었다.

Ampicillin의 경우 중국의 강물에서 *Escherichia coli*를 분리해 내성 정도를 연구한 결과 7.9%의 *Escherichia coli*가 ampicillin에 대해 내성을 갖는 것으로 검출되었다.¹⁶⁾ 반면에 호주에서는 ampicillin에 대해 내성을 갖는 *Escherichia coli*는 1~13%의 분포를 보였다.²⁵⁾ 그 외 프랑스에서는 30%,²⁶⁾ 슬로바키아에서는 80%의 *Escherichia coli*가 내성을 갖는 것²⁷⁾으로 조사 되었다. 본 연구의 MSA 배지분석 결과에 의하면 ampicillin 내성을 갖는 대장균군은 전체 배양된 대장균군 수에 대해 약 34.9%로 측정되었다(Table 1). 이는 슬로바키아와 같은 소수의 국가를 제외하고는 기타 국가에 비해 높은 편임을 알 수 있었다.

Tetracycline의 경우 1940년대에 개발되어 지난 몇 십년 동안 꾸준히 사용된 항생제이다. 그만큼 항생제 내성률도 그람 양성균/음성균 모두에서 증가한다고 보고되고 있다.²⁸⁾ 대장균군의 tetracycline 내성률을 조사한 기존 연구에 따르면 호주에서는 0~14%,²⁵⁾ 슬로바키아에서는 30%,²⁷⁾ 프랑스에서는 약 44%²⁶⁾로 조사 되었다. 이에 비해 본 연구 결과의 tetracycline 내성률은 상대적으로 낮음을 볼 수 있다(Table 1). 이것은 본 연구대상 지역의 도시는 하천의 하류부에 위치하고 있으며 chlortetracycline이나 oxytetracy-

cline과 같은 동물용 항생제를 주로 사용하는 축산업이 존재하지 않으며 인체용으로는 tetracycline 자체를 사용하고 있지 않기 때문으로 볼 수 있다.

Sulfathiazole의 경우 우리나라에서 많이 사용하고 있는 항생제²⁹⁾임에도 불구하고 ampicillin과 tetracycline에 비해 항생제 내성 미생물에 대한 연구가 부족한 실정이다. 환경에서 sulfathiazole에 대해 내성을 갖는 미생물에 대한 연구는 단 한건이 소개가 되어있다.¹⁵⁾ 이 선행 연구에 따르면 캐나다의 거위 분변에 존재하는 *Enterococcus* spp.의 경우 약 70%가 sulfathiazole에 대해 내성을 갖고, *Escherichia coli*의 경우 96%가 내성을 갖는 것으로 보고되었다. 동물 분변 내 세균의 항생제 내성률을 분석한 기존 연구와 본 연구의 결과를 직접 비교 분석 할 수는 없다. 그렇지만 sulfathiazole 내성률이 본 연구의 결과(유입수 45.6%)와 Middleton의 연구결과(70%)에서 모두 높게 나타났기 때문에 sulfonamide계 항생제를 많이 사용하는 우리나라의 경우 이 항생제들의 사용과 관리에 특별한 주의를 기울여야 한다.

Table 1에서 하수처리장 유입수와 폭기조 시료에 대해 MSA배지에서 검출된 전체 대장균군에 대해 항생제 내성을 갖는 대장균군의 비율은 일반 종속영양 세균을 대상으로 검출한 R2A 배지의 결과보다 높았다. 반면 하수처리장 방류수 내 대장균군의 항생제 내성률은 R2A 배지에서 더 높았다. 이 결과는 하수처리장 방류수나 하천 수와 같이 유기물이 보다 적은 환경에서는 병원성 미생물의 항생제 내성률이 그 외 일반 종속영양세균의 그것보다 더 낮

고, 하수나 폭기조 시료와 같이 유기물 농도가 상대적으로 높은 경우는 그 반대이다. 이는 항생제 내성률에 의한 미생물 유해성 평가 시 환경 내 영양조건과 배지조건에 따라서 항생제내성에 대한 측정 결과가 다를 수 있음을 보여주는 것이다. 환경 내 미생물 보건 유해성 평가 시 MSA와 같이 대장균군을 검출하는 배지를 사용할 경우 고영양성 시료에서는 일반 종속영양세균들에 비해서 항생제 내성률을 높게 판정하고, 저영양성 시료에서는 상대적으로 낮게 판정할 여지가 있다는 것이다. Levy and Marshall¹²⁾은 병원성 세균과 공생관계에 있는 비병원성 세균도 세균간 유전자 이동을 통해서 항생제 내성 유전자를 갖고 있을 수 있다고 언급하였다. 이와 같이 본 연구의 결과는 특정 미생물이나 유전자로 한정짓는 기존의 환경시료 내 항생제 내성 미생물의 유해성 평가는 그 환경에 대한 대표성이 떨어져 다소 한계가 있다는 선행연구결과 일치하므로 미생물 유해성 평가는 보다 생태적인 관점에서 이루어져야 함을 보여준다.

일반 종속영양 세균 배양용 R2A 배지에 ampicillin, sulfathiazole, tetracycline 을 모두 첨가한 배지에서 배양된 세균을 colony PCR (16S rRNA 유전자의 염기서열 분석)방법으로 동정하였다. 분리된 미지의 세균에서 획득된 16S rRNA 유전자 정보와 이와 가장 유사하다고 알려진 기존의 세균 16S rRNA 유전자 정보(reference bacteria)를 계통학적으로 비교한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 그 결과 분리·동정된 60개 집락의 염기서열과 가장 유사한 세균들

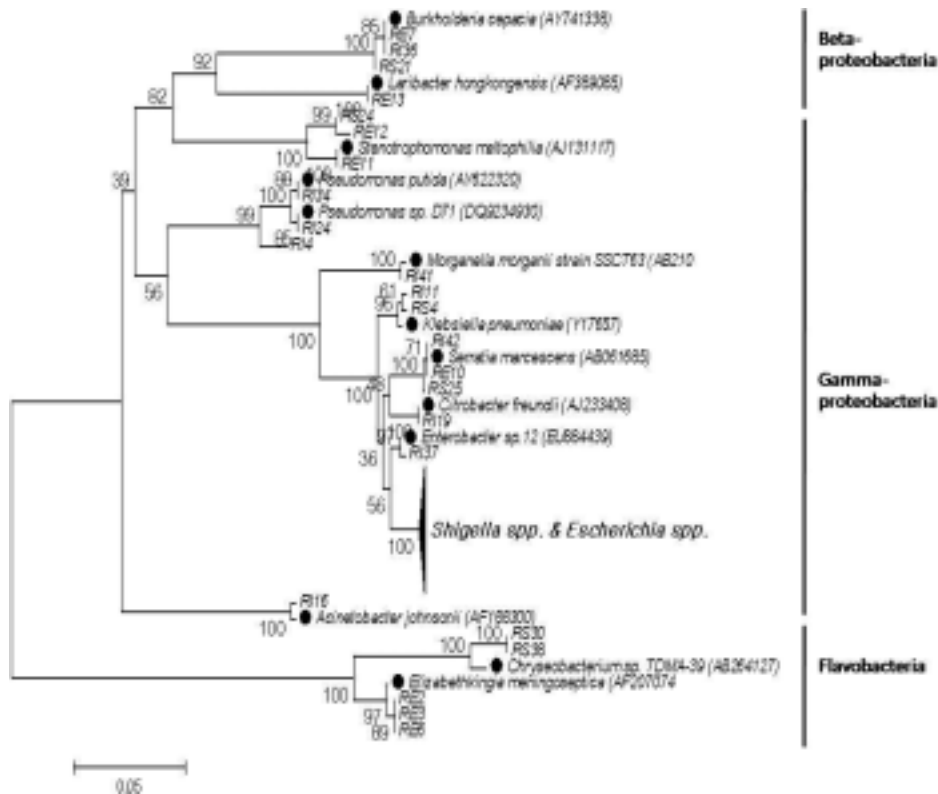


Fig. 2. Phylogenetic comparison of 16S rDNA sequences of multi-antibiotic resistant isolates on R2A plate (RI: Influent, RS: Sludge in aeration tank, RE: Effluent) with the closest known bacterial sequences from RDP and GenBank databases (●).

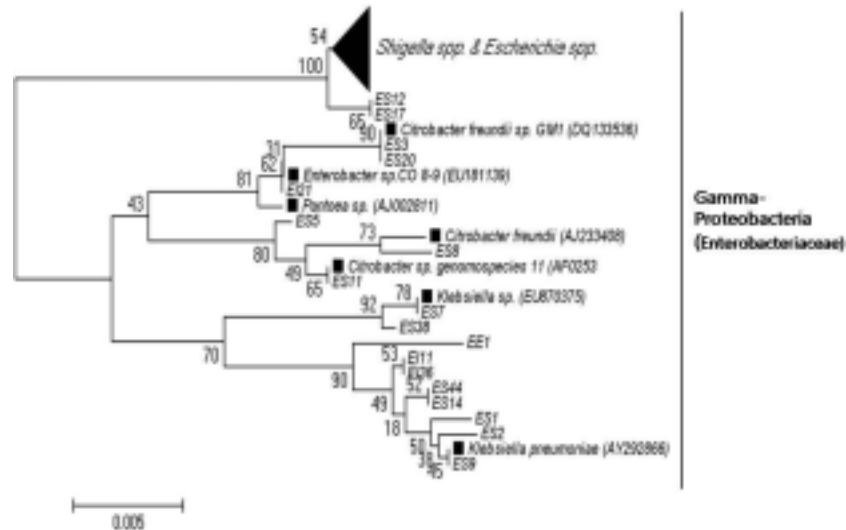


Fig. 3. Phylogenetic comparison of 16S rDNA sequences of multi-antibiotic resistant isolates on MSA plate (RI: Influent, RS: Sludge in aeration tank, RE: Effluent) with the closest known bacterial sequences from RDP and GenBank databases (●).

은 병원성 세균인 것으로 판명되었다. 분리·동정된 집락 중 51%(31개)가 *Shigella* spp.이고, 8%(5개)가 *Escherichia* spp.인 것으로 나타났다. 그 외에 집락들도 *Acinetobacter johnsonii* P152 (AF188300), *Burkholderia cepacia* ATCC 21809 (AY741338), *Citrobacter freundii* DSM 30039 (AJ233408), *Chryseobacterium* sp. TDMA-39 (AB264127), *Enterobacter* sp. 12 (EU884439), *Elizabethkingia meningoseptica* CIP 79.5 (AF207074), *Klebsiella pneumoniae* ATCC13884T (Y17657), *Laribacter hongkongensis* HKU1 (AF389085), *Serratia marcescens* subsp. sakuensis (AB061685), *Stenotrophomonas maltophilia* LMG 10857 (AJ131117), *Pseudomonas* sp. D71 (DQ923493), *Pseudomonas putida* AS90 (AY622320) 등과 같이 다양한 계통의 기지의 병원성 세균들과 매우 유사하게 나타났다. 물론 16S rRNA 유전자 염기서열 분석으로는 미지의 세균이 병원성 세균인지를 판단할 수는 없다. 그렇지만 본 연구의 계통분석 결과는 다제 내성이 있는 일반 종속영양 세균들이 병원성 세균일 가능성이 높다는 것을 나타내고, 이는 다제 내성 세균들이 병원성을 동시에 갖는 것이므로 미생물 유해성이 높음을 보여준다.

일반 종속영양세균 배양용 R2A의 경우와 마찬가지로, 대장균군 배양용 MSA배지에 ampicillin, sulfathiazole, tetracycline을 모두 첨가한 다제 항생제 배지에서 분리된 다제 내성 세균의 동정 결과를 Fig. 3에서 나타내었다. 일반 종속영양세균의 결과와 달리 대장균군의 경우에는 gamma subclass에 속한 *Proteobacteria* 세균, 특히 Enterobacteriaceae family에 속하는 세균들만 분리·동정되었다. 이는 R2A에 비해서 MSA배지는 대장균군에 속하는 세균을 선택적으로 분리하는 능력이 있음을 나타낸다. MSA배지로 분리·동정된 미지의 총 42개 세균의 경우와 가장 유사한 기지의 세균들은 병원성인 것으로 판명되었다. 분리·동정된 세균들 중 63%(30개)가 *Shigella* spp., 23%(11개)가 *Klebsiella* spp.인 것으로 각각 나타났으며, 나머지 분

리·동정된 세균들도 *Citrobacter freundii* DSM 30039 (AJ233408), *Citrobacter freundii* sp. GM1 (DQ133536), *Citrobacter* sp. 'genomospecies 11' (AF025369), *Enterobacter* sp. CO 8-9 (EU181139), *Escherichia coli* O157:H7 (AM 184233), *Escherichia coli* SMS-3-5 (CP000970), *Escherichia coli* BE14 (EF560776)와 같은 기지의 병원성 세균과 가장 유사한 것으로 나타났다. 따라서 다제 항생제 내성 세균이 동시에 병원성 세균일 가능성이 높음을 본 계통학적 분석결과로부터 알 수 있었다. 이러한 결과들은 항생제를 탄소원으로 삼아 생존하는 토양 미생물이 대부분 병원성 미생물과 비슷함을 밝힌 Dantas et al.³⁰⁾의 연구결과와도 일치한다.

3.2. 하수처리장 및 하천 환경 내 항생제 내성 세균 노출수의 계절별 변화

일반 종속영양세균을 배양·검출하는 R2A 분석 결과 하수처리장의 유입수와 유출수내 배양·검출된 세균 수는 연중 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 4). 반면 하천의 경우 일반 종속영양세균의 수가 강우기인 8월에 감소하는 경향을 보였다. 이는 하천 내 세균 수는 수온 보다는 강우에 의해 희석되는 영향에 기인한 것으로 해석된다. 한편 동일 계절에는 하천의 위치에 관계없이 일반 종속영양세균의 수가 일정한 것을 볼 수 있었다.

R2A배지를 이용해서 검출한 항생제(vancomycin)내성 세균 수 또한 계절별로 측정하였고, 그 결과를 항생제 미투입 R2A에서 배양된 일반 종속영양세균수로 나눈 내성률을 산정하여 Fig. 4에 나타내었다. 일반 종속영양세균수의 결과와 달리 수온이 높은 5월과 8월에 내성률이 상대적으로 높게 나타났고 저온인 1월과 11월에는 낮게 나타났다. 이러한 경향이 하천과 하수처리장 모두에서 공통적으로 관찰되었다. 이는 하수처리장에서 기인된 항생제 내성 발생이 하천에 영향을 주거나 하수처리장 혹은 하

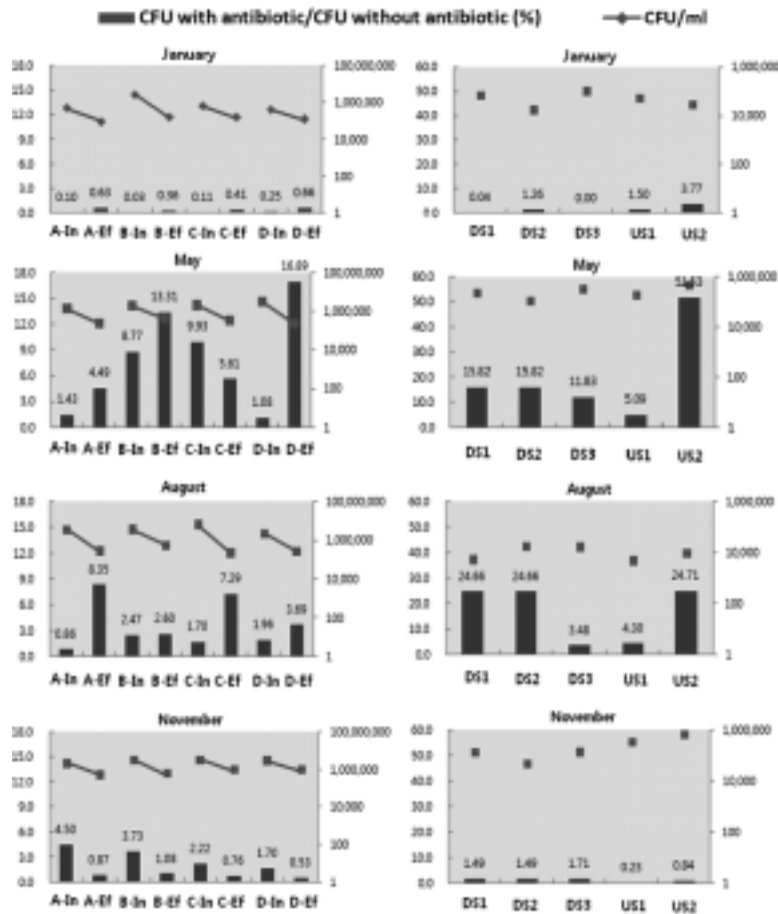


Fig. 4. Antibiotic resistance ratios (bars indicated by the left Y axis) and total viable counts for heterotrophs (dots indicated by the right Y axis) from four municipal wastewater treatment plants in Seoul and from five different locations of Han River in response to four different seasons (January, May, August and November). “In” and “Eff” indicate influent and effluent of each wastewater treatment plant, respectively “DS” and “US” indicate down-stream and the up-stream of Han River, respectively.

천의 수온 영향에 따라 내성률이 변동되기 때문에 판단되었다. 이와 같은 요인 중 어느 것이 주요 원인인지 아니면 둘 다 동시에 중요한 원인인지는 본 연구의 결과로는 판단할 수 없다.

그럼에도 불구하고 하수처리장 유입수의 내성률과 하수처리장 방류수의 내성률을 자세히 분석해 보면 항생제 내성률이 온도에 영향을 받는다는 것을 알 수 있었다. 하수처리장 유입수의 수온은 지중의 하수관거를 통해서 하수처리장으로 유입되므로 1월과 같은 겨울을 제외하고는 계절별로 큰 차이가 없는 반면, 하수처리장 방류수는 지표 경로를 거쳐서 방류되므로 온도의 영향에 민감하다. 본 연구의 결과를 보면 수온이 낮은 11월에는 유출수의 내성률이 유입수의 그것보다 감소하고, 수온이 높은 5월과 8월에는 유출수의 내성률이 유입수의 그것보다 증가하는 경향을 보였다. 따라서 항생제에 대한 미생물의 내성률은 수온이 높아지면 상승하는 경향이 있다는 것을 본 연구의 결과에서 알 수 있었다. 이는 최근에 보고되고 있는 vector-borne disease 가설^{17,18)}과 일치한다. 이들의 기온이 높을수록 병원성 세균이나 유해 유전자의 증식속도가 증가하

는 반면 낮은 온도에서는 유해 유전자의 증식이나 개체간 이동속도가 감소하거나 사멸한다고 보고하였다. 항생제 내성 유전자들도 plasmid라는 유전자적 vector를 통해서 세균 간 이동을 하는 점을 고려해 보면 vector-borne disease 가설이 본 연구의 결과를 잘 설명하고 있으며, 지구 기온 상승에 따라서 항생제 내성 세균의 발생률이 증가할 수 있다는 점을 보여준다.

4. 결론

최근 항생제 내성 미생물의 인체 위해성에 대한 문제가 큰 이슈로 떠오르고 있음에도 불구하고 환경 내 항생제 내성 미생물의 위해성 평가 시 고려하는 대상이 한 두 가지 병원성 미생물이나 유전자에 국한되어 있었다. 게다가 연구 조사 시기 또한 일시적이라는 한계점을 가지고 있기에 본 연구의 목적은 국내 하수처리장 시료의 항생제 내성 세균의 특징과 하천으로의 항생제 내성 세균 노출의 계절적 변화에 대한 기초조사를 하는 것이다.

본 연구에서는 하수처리장 시료 내에서 다제 항생제 내

성을 포함한 항생제 내성 세균을 배양·분리 할 수 있었다. MSA배지 내 항생제 내성률을 평가하여 해외의 선행 연구와 비교한 결과 ampicillin은 높게, tetracycline은 낮게 평가 되었다. 또한 R2A 배지에서 배양·분리된 세균은 모두 기존의 병원성 세균과 유사한 것으로 밝혀져 병원성 세균이 항생제에 대해서 강한 내성을 갖는 것을 나타낸다. 따라서 토양 환경이든 물 환경이든 항생제 내성을 지닌 세균은 병원성 세균일 가능성이 높다는 것을 보여주고 이러한 항생제 내성과 병원성간의 일치성 여부에 대한 추가 연구가 필요하다.

또한 하수처리장이 하천에 미치는 항생제 내성 미생물 위해성을 계절별로 관찰한 결과, 하천 내 일반 증속영양 세균들은 기온 보다는 강우량에 영향을 받는 것으로 나타났다. 하천과 하수처리장 방류수의 항생제 내성률은 기온이 높아지면 상승하는 경향이 있다는 것을 알 수 있었다.

본 연구의 결과로 제시된 우리나라 하수처리장 내의 항생제 내성률, 항생제 내성 미생물 분석방법의 제안, 온도 상승과 항생제 내성 미생물의 출현률은 국내 도시 하수 및 하천 환경에 존재하는 항생제 내성 세균의 노출 경로와 보건 유해성을 판단할 수 있는 기초 데이터로 활용할 수 있을 것이다. 추후 기온 상승에 따른 세균의 항생제 내성률의 변화양상이나 오염원 추적에 관한 연구가 뒤따른다면 보다 정확한 항생제 내성 미생물 위해성 평가가 이루어 질 수 있을 것이다.

사 사

이 논문 또는 저서는 교육과학기술부 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-2008-314-F00012).

참 고 문 헌

1. Baquero, F., Martínez, J-L., and Cantón, R., "Antibiotics and antibiotic resistance in water environments," *Curr. Opin. Biotechnol.*, **19**, 260~265(2008).
2. Daly, M. and Fanning, S., "Characterization and Chromosomal Mapping of Antimicrobial Resistance Genes in *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium," *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**(11), 4842~4848(2000).
3. Hance, F. L., Steingart, K. R., Hahn, C. G., Pascopella, L., and Nolan, C. M., "Field assessment of a model tuberculosis outbreak response plan for low-incidence areas," *BMC Public Health*, **7**, 307~314(2007).
4. Kahn, L. H., "The scourge of antibiotic-resistant bacteria," *Bull. At. Sci.*, 16th December(2007).
5. Ash, R. J., Mauck, B., and Morgan, M., "Antibiotic resistance of gram-negative bacteria in rivers, United States," *Emerging Infect. Dis.*, **8**(7), 713~716(2002).
6. Whitehead, T. R., Cotta, M. A., Whittle, G., Shoemaker, N., and Salyers, A. A., "The commensal bacterial populations of swine feces and stored swine manure: reservoirs of antibiotic resistance?," *J. Anim. Sci.*, **81**, 461(2003).
7. Salyers, A. A., Gupta, A., and Wang, Y., "Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes," *Trends Microbiol.*, **12**(9), 412~416(2004).
8. 식품의약품안전청, "환경 중 항생제내성균 모니터링," (2006).
9. Cook, M., Moloto, E., and Anerson, C., "Fluorochrome labelling in roman period skeletons from dakhleh oasis, Egypt," *Am. J. Phys. Anthropol.*, **80**(2), 137~143(1989).
10. Iwane, T., Urase, T., and Yamamoto, K., "Possible impact of treated wastewater discharge on incidence of antibiotic resistant bacteria in river water," *Water Sci. Technol.*, **43**(2), 91~99(2001).
11. Kim, S., Jensen, J. N., Aga, D. S., and Weber, A. S., "Tetracycline as a selector for resistant bacteria in activated sludge," *Chemosphere*, **66**, 1643~1651(2007).
12. Levy, S. B. and Marshall, B., "Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses," *Nat. Med.*, **10**(12), S122~S129(2004).
13. Martínez, J. L., "Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments," *Science*, **321**, 365~367(2008).
14. Guardabassi, L., Danilo, M. A. L. F. W., and Dalsgaard, A., "The effects of tertiary wastewater treatment on the prevalence of antimicrobial resistant bacteria," *Water Res.*, **36**, 1955~1964(2002).
15. Middleton, J. H. and Ambrose, A., "Enumeration and antibiotic resistance patterns of fecal indicator organisms isolated from migratory Canada geese (*Branta Canadensis*)," *J. Wildl. Dis.*, **41**(2), 334~341(2005).
16. Hu, Z., Shi, J., Chang, H., Li, D., Yang, M., and Kamagata, Y., "Phenotyping and genotyping of antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolated from a natural river basin," *Environ. Sci. Technol.*, **42**, 3415~3420(2008).
17. Sutherst, R. W., "Global change and human vulnerability to vector-borne diseases," *Clin. Microbiol. Rev.*, **17**(1), 136~173(2004).
18. Lima-Bittencourt, C. I., Cursino, L., Gonçalves-Dornelas, H., Pontes, D. S., Nardi, R. M., Callisto, M., Chartone-Souza, E., and Nascimento, A. M., "Multiple antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae isolates from pristine freshwater," *Genet. Mol. Res.*, **6**(3), 510~521(2007).
19. Reasoner, D. J. and Geldreich, E. E., "A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water," *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**(1), 1~7(1985).
20. Moura, A., Henriques, I., Ribeiro, R., and Correia, A., "Prevalence and characterization of integrons from bacteria isolated from a slaughterhouse wastewater treatment plant," *J. Antimicrob. Chemother.*, **60**(6), 1243~1250(2007).

19. Sambrook, J. and Russell, D. W., "Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor," New York (2001).
20. 환경부, 먹는 물 수질공정시험 방법(2007).
21. Huycke, M. M., Sahm, D. F., and Gilmore, M. S., "Multiple-drug resistant Enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future," *Emerg Infect Dis.*, **4**(2), 239~249(1998).
22. McCaig, A. E., Embely, T. M., and Prosser, J. I., "Molecular analysis of enrichment cultures of marine ammonia oxidisers," *FEMS Microbiol. Lett.*, **120**, 363~368(1994).
23. Lane, D. J., "16S/23S rRNA sequencing. in: E. Stackebrandt and M. Goodfellow (Eds.), Nucleic acid techniques in bacterial systematics," *John Wiley and Sons, New York, NY*, 115~175(1991).
24. Suzuki, M. T. and Giovannoni, S. J., "Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR," *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**(2), 625~630(1996).
25. Boon, P. I. and Cattanaach, M., "Antibiotic resistance of native and faecal bacteria isolated from rivers, reservoirs and sewage treatment facilities in Victoria, south-eastern Australia," *Lett. Appl. Microbiol.*, **28**(3), 164~168(1999).
26. Tamanai-Shacoori, Z., Arturo, M., Pommepuy, M., Mamez, C., and Cormier, M., "Conjugal transfer of natural plasmids between E.coli strains in sterile environmental water," *Curr. Microbiol.*, **30**, 155~160(1995).
27. Krcmery, V., Bajizuková, A., Langsádl, L., Kotuliaková, M., and Sobotová, O., "Evaluation of the resistance of Enterobacteriaceae strains to antibiotics-comparison of strains from clinical material versus environment," *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.*, **33**(3), 299~304(1989).
28. Chopra, I. and Roberts, M., "Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **65**(2), 232~260(2001).
29. 국립환경과학원, "환경 중 의약품물질 분석방법 연구 및 노출실태 조사 보고서," (2006).
30. Dantas, G., Sommer, M. O. A., Oluwasegun, R. D., and Church, G. M., "Bacteria subsisting on Antibiotics," *Science*, **320**, 100~103(2008).
31. <http://www.macrogen.co.kr>
32. <http://www.ebi.ac.uk/clustalw>