

하천에서 *tetQ*와 *aacC2* 유전자의 분포 양상

정재성* · 이영종*,** · 김종홍*

순천대학교 자연과학대학 생물학과*, 광주보건대학 임상병리과**

적 요: 하천에서 tetracycline과 gentamicin 저항성 유전자인 *tetQ*와 *aacC2*의 분포를 알아보기 위해 순천 지역의 하천수로부터 전체 세균군집의 DNA를 분석하였다. 배양되지 않는 세균의 저항성을 고려하여 1 liter의 하천수에 들어 있는 전체 세균의 DNA를 freeze-thaw 방법으로 추출하여 PCR을 통해 표적 유전자의 출현 정도를 조사하였다. 그 결과 *tetQ* 유전자는 축산농장이 있는 제 1지점에서 가장 많은 것으로 나타 난데 반해 *aacC2* 유전자는 하천의 하류인 제5지점에서 가장 많이 출현하였다. 이러한 결과는 항생물질 저항성 유전자가 수질의 오염원을 알 수 있는 표지로 사용될 수 있는 가능성을 시사한다.

검색어: *aacC2*, 저항성유전자, *tetQ*, PCR, 항생물질

서 론

1940년대초 처음으로 항생물질이 개발되어 의약품으로 사용된 이래 무분별한 사용은 많은 세균들이 항생물질에 대해 저항성을 갖게 하는 부작용을 야기시켜 왔다. 특히 세균성 감염을 치료하기 위한 의료목적 뿐 아니라, 축산산업에도 사용되어 지난 50여년간 축산물의 생산성 증대에 큰 공헌을 하여 왔다. 가축사료에 항생물질의 첨가는 사료의 이용률을 증진시켜 성장을 촉진시키고, 질병을 줄이거나 예방하는 목적으로 사용되어 왔다. 미국에서 연간 생산되는 항생물질의 약 45~55%가 사료에 첨가되는 형태로 가축에 투여되고 있는 것으로 알려지고 있다 (Gustafson 1986). 그러나 이러한 용도로 사용된 항생물질은 가축의 장내세균들에 대하여 도태압으로 작용하게 됨으로써 항생물질에 대한 저항성 세균이 나타나 널리 퍼지는 현상이 나타나게 되었다 (Dingell 1980).

자연환경에서 항생물질 저항성 세균의 출현빈도는 오염의 정도를 판단하는 지표 중 하나로 인식되어지고 있다. 최근 토양을 비롯한 자연환경에서 항생물질 저항성 세균이 높은 빈도로 출현하고 있음이 보고되고 있으며, 많은 경우 저항성 유전자는 중금속 저항성 유전자 등과 함께 플라스미드에 들어 있는 것으로 알려지고 있다 (Foster 1983).

Oxytetracycline과 chlorotetracycline 같은 tetracycline계 항생물질은 사료첨가제로서 축산산업에 사용된 최초의 화합물로 비교적 독성이 적고 광범위한 활성을 보이는 점 때문에 널리 사용되어 온 항생물질 중 하나이다. 그러나 주요 병원성 세균에서 저항성 세균이 발견됨에 따라 의약품으로의 사용이 감소되고 주로 사료첨가 항생물질로 쓰여지고 있다 (DuPont and Steele 1987). 한편 gentamicin은 1964년부터 지금까지 의약품으로 사용되어온 항생물질로 1975년부터 저항성 세균의 출현이 보고되고 있다 (Buckwold et al. 1979).

본 연구에서는 tetracycline 저항성 유전자인 *tetQ*와

gentamicin 저항성 유전자인 *aacC2*가 하천의 상류로부터 하류에 이르기까지 어떻게 분포하는지를 알아봄으로써 오염원의 특성과 항생물질 저항성 유전자의 분포와의 관련성을 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

시료채수 장소의 개요 및 채수시기

조사대상은 순천지역을 흐르는 하천인 동천으로 하였다. 이 하천은 순천시 서면 바랑산(619.6m)에서 발원하여 순천 도심을 통과하여 순천만으로 유입되는 유로연장이 23 km인 하천이다. 이 하천의 상류부터 하류까지 5개 지점에서 채수를 실시하였다 (Fig. 1). 채수지점 중 제 1지점과 제 2지점은 하천의 상류로 주변에 농가들이 산재하고 있다. 특히 1지점 부근에는 축산농장이 있어 축산 폐수의 유입이 부분적으로 일어나는 곳이다. 순천시의 시가지가 형성되기 시작하는 지점에서 제 3지점을, 도심지역에서 제 4지점을, 도심이 끝나는 지점에서 5지점을 선정하였다. 채수는 1997년 5월에 실시하였다.

DNA의 추출

물에 존재하는 세균으로부터 DNA의 추출은 Jung과 Lee (1997)의 방법을 따랐다. 각 지점에서 채취한 1 리터의 물을 16,000 xg로 30분간 원심분리하여 얻어진 침전물을 15 mg/ml의 lysozyme이 들어있는 300 μ l의 lysis 용액 (150 mM NaCl, 100 mM sodium EDTA, pH 8.0)을 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 흔들어 주면서 반응하였다. 여기에 300 μ l의 10% sodium dodecyl sulfate를 첨가한 뒤 -70 $^{\circ}$ C에서 얼리고 65 $^{\circ}$ C에서 녹이는 과정을 3회 반복하여 DNA를 세포 밖으로 노출시켰다. 여기에 동량의 phenol을 넣어 DNA를 추출한 다음 다시 phenol-chloroform으로 추출하고 ethanol로 침전시켰다. DNA는 100 μ l TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 mM EDTA)에 녹인 다음 GeneClean kit(Bio 101)로 정제하였다. 마지막 단계에서

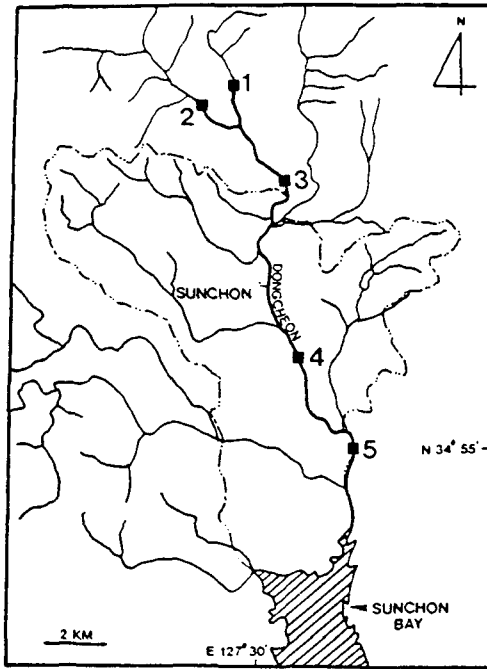


Fig. 1. A map showing the sampling sites.

glass matrix에 결합된 DNA는 50 μ l의 TE로 용출시켰다.

DNA 정량

추출된 DNA의 양은 TKO100 fluorometer(Hoefler Scientific Instruments)를 사용하여 측정하였다.

16S rDNA의 증폭

추출된 DNA가 PCR을 행하기에 적당한 순도를 가지고 있는지 여부를 판단하기 위하여 진정세균의 16S rRNA 유전자를 증폭시키는 primer를 사용하여 PCR을 행하였다. Forward primer는 *Escherichia coli*의 16S rRNA 유전자(Bosius *et al.* 1978)의 position 49에서 68에 해당하며 (5'-TNA NAC ATG CAA GTC GAI CG-3'), reverse primer는 position 1,510에서 1,492(5'-GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3')에 해당한다. 이 primer는 균집전체의 DNA로부터 진정세균의 16S rRNA 유전자를 증폭하는데 사용하였다 (Moyer *et al.* 1994).

tetQ와 aacC2 유전자의 증폭

세균 내에 들어있는 항생물질 저항성 유전자의 출현을 알아보기 위해 tetracycline 저항성 유전자인 *tetQ*와 gentamicin 저항성 유전자인 *aacC2*의 염기서열에서 primer를 선택하여 PCR을 실시하였다. *tetQ* primer는 다음과 같다. PCR1, 5'-CAT GGA TCA GCA ATG TTC AAT ATC GG-3'. PCR2, 5'-CCT GGA TCC ACA ATG TAT TCA GAG CGG-3'. 이 primer set는 *tetQ* 유전자에서

460 bp 부위를 증폭시킨다 (Nikolich *et al.* 1994). Gentamicin 저항성 유전자인 *aacC2* 유전자의 검출을 위한 primer는 다음과 같다. GenF, 5'-TTT TCG TTC CAT GAG CG-3'. GenR, 5'-CGC CAT TCA GAG TCT CCT-3'. 이 primer set는 276 bp를 증폭시킨다 (Jung *et al.* 1994, Han *et al.* 1997).

PCR 조건

PCR 반응액은 1 μ l의 DNA(20 ng), 5 μ l의 10X PCR buffer(100 mM Tris-HCl, 25 mM MgCl₂, 500 mM KCl [pH 8.3]), 각각 50 pM의 primer, 1.25 unit의 Taq DNA polymerase(Takara), 10 mM deoxyribonucleic acid 각 1 μ l를 넣고 증류수로 50 μ l되게 하였다. PCR은 Perkin Elmer사의 GenAmp PCR system 2400을 사용하여 94 $^{\circ}$ C에서 4분간 초기 denaturation을 행한 후 94 $^{\circ}$ C에서 30초간 denaturation, 55 $^{\circ}$ C에서 30초간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 30초간 extension 과정을 30회 반복하고 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시켰다. 증폭된 DNA 절편은 1.2%의 agarose gel 전기영동으로 확인하였다.

결과 및 고찰

물 속에 들어 있는 미생물의 DNA를 추출하는 다양한 방법들이 알려지고 있다. DNA 추출의 첫 번째 단계는 물 속에 들어 있는 세균을 농축하는 것이다. 이 방법으로 가장 효율적인 방법은 ultrafiltration이다. 그러나 자연환경의 물에는 다량의 부유물이 존재하여 여과에 어려움이 있어 여과할 수 있는 양에 한계가 있다. 그러므로 많은 양의 시료를 처리하기 위하여 본 실험에서는 원심분리 방법을 이용하여 물 속의 세균을 농축하였다. 저자 등은 전보 (Jung과 Lee 1997)에서, 효소처리와 함께 얼리고 녹이는 과정을 반복시킨 다음 phenol 추출을 한 경우가 DNA 추출의 높은 효율을 보였으므로 본 실험에서는 이 방법을 사용하였다. 각 지점의 물에서 얻어진 DNA의 수율은 Table 1과 같다. 이렇게 얻어진 DNA에는 일반적으로 유기물이 분해되어 생성된 다양한 polyphenolic 물질들이 포함되어 있어 PCR을 방해한다. 그러므로 추출된 DNA가 PCR을 행하기에 적당한 순도를 갖고 있는지와, 세균의 DNA가 추출되었는지 여부를 확인하기 위하여 진정세균의 16S rRNA 유전자를 증폭시키는 primer를 사용하여 PCR을 행하였다. 각 지점에서 추출한 DNA를 주형으로 PCR을 행했을 때 예상되는 1.5 kb의 DNA 절편이 증폭되었다 (Fig. 2). 이러한 사실로 추출한 DNA의 순도가 PCR에 적합함을 알 수 있었다.

이 DNA에 gentamicin에 대한 저항성을 나타내는 유전자 중 하나인 *aacC2* 유전자가 들어 있는지 알아보기 위해 GenF와 GenR primer를 사용하여 PCR을 한 결과 예상했던 278 bp의 DNA가 증폭되었다. band의 강도를 기준으로 비교할 때 전체적으로 상류에서 하류로 갈수록 더 많은 유전자가 검출됨을 알 수 있었다 (Fig. 3). 20 ng의 동일한

Table 1. DNA yield from 1 liter of stream water

Site	1	2	3	4	5
DNA yield (μg/l)	0.36	0.30	1.68	1.56	1.08

양의 DNA에 들어있는 유전자를 PCR을 통해 증폭시킨 결과이므로 이러한 사실은 세균군집 내에서 이 유전자 빈도가 하류로 갈수록 증가함을 말해 준다. 1과 2지점은 이 하천의 상류에 위치하여 있지만 두 지점의 주변환경은 서로 다르다. 두 지점 모두 깊은 곳의 수심이 20 cm 이하로 수량이 비교적 적었으며, 1지점 주변에는 축산농장이 산재해 있고 2지점 주변은 주택이 밀집되어 있는 농가지역이었다. Gentamicin 저항성 유전자인 *aacC2*에 특이적인 primer를 사용한 PCR에서 예상된 크기의 band가 1지점에서는 검출되지만 2지점에서는 나타나지 않았다 (Fig. 3). 두 지점에서 채수된 물로부터 추출된 DNA의 양이 비슷한 사실은 (Table 1) 두 지점의 수질이 유사함을 간접적으로 말해준다. 그러므로 1지점에서 검출된 이 유전자는 축산농장에서 유출된 세균에서 유래 된 것임을 알 수 있었다. 이 유전자에 대한 PCR 산물의 양은 도심을 통과하는 지점인 3과 4 지점에서 증가를 보이다가 5지점에서 가장 강한 band를 보이고 있다. 수계환경에 존재하는 항생물질 저항성 세균에 대해 1980년 초반이래 많은 연구가 이루어져 왔다 (Armstrong *et al.* 1981, 1982). 일반적으로 농촌보다 도시하수에서 더 많은 항생물질 저항성 균주가 나타나고 (Kaspar *et*

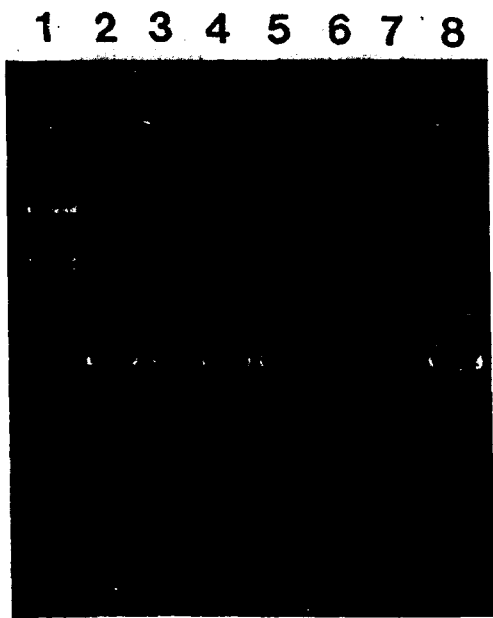


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of 16S rDNA amplification products. Ten ng of DNA samples extracted from stream water were used for PCR amplification. Lanes: 1, lambda DNA digested with *EcoRI-HindIII*; 2~6, site 1~site 5; 7, negative control; 8, positive control with *Pseudomonas syringae* DNA.

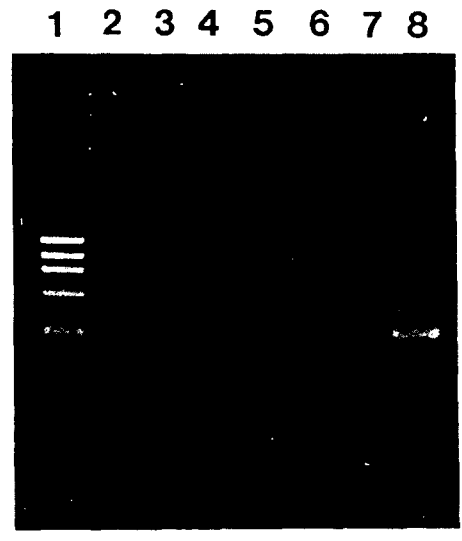


Fig. 3. PCR detection of *aacC2* gene in DNA extracted from stream water. Lanes: 1, Φ X174 DNA digested with *HaeIII*; 2~6, site 1~site 5; 7, negative control; 8, positive control with *aacC2* gene.

al. 1990), 사용되는 항생물질과 저항성 균주의 분포가 밀접하게 연관되어 있는 것으로 알려지고 있다 (Ogan과 Nwiika 1993). 저자 등은 전보 (Lee *et al.* 1998)에서, 하천에서 분리한 gentamicin 저항성 세균 중 약 5%의 세균이 *aacC2* 유전자를 가지고 있었으며, 특히 병원 하수에서 분리한 세균 중 높은 수준의 농도 (>2,000 μg/ml)에서 저항성을 보이는 세균의 87%가 이 유전자를 가지고 있음을 보고한 바 있다. 그러므로 하천이 도심을 통과하여 하류로 갈수록 이 유전자에 대한 PCR 산물이 강하게 나타나는 것은 도시하수의 유입이 *aacC2* 유전자의 출현빈도를 높였기 때문일 것으로 생각된다.

Tetracycline은 Gram 양성 및 음성, 호기성 및 혐기성 세균 뿐 아니라 mycoplasma 등에 광범위하게 작용하는 항생물질로 여러 종류의 질병의 치료제로 쓰여 왔으나 지난 10년이래 저항성 세균의 출현으로 그 사용이 감소되고 있다 (Roberts 1996). 지금까지 저항성에 대한 기작으로, tetracycline의 방출 및 변형과 함께 리보솜의 보호 등 세 가지가 알려지고 있다 (Salyers *et al.* 1990). 그 중 리보솜 보호에 관련하여 여러 종류의 세균에서 18 종류의 서로 다른 tetracycline 저항성 유전자가 밝혀져 왔다. 그 중 *tetM*, *tetO*, *tetB*, *tetQ*, *tetS* 등의 유전자들은 tetracycline의 표적이 되는 세균의 리보솜을 보호하는 단백질을 암호화함으로써 저항성을 나타낸다 (Taylor와 Chau 1996).

*TetQ*는 bacteroides에서 처음 발견된 tetracycline 저항성 유전자로 (Lepine *et al.* 1993), *Prevotella spp.*를 비롯한 다른 속의 세균으로 전달되고 있음이 보고되고 있다 (Nikolich *et al.* 1994). 주로 혐기성인 그램 음성균에서 발견되고 있으나 다른 유전자에 비해 숙주의 범위가 제한된

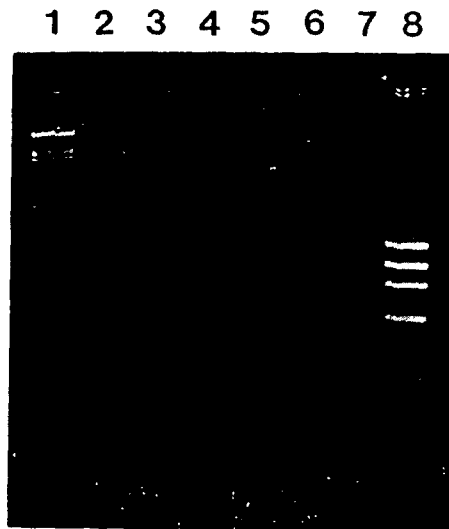


Fig. 4. PCR detection of *tetQ* gene in DNA extracted from stream water. Lanes: 1, lambda DNA digested with *EcoRI-HindIII*; 2~6, site 1~site 5; 7, negative control; 8, Φ X174 DNA digested with *HaeIII*.

것으로 알려지고 있다 (Leng *et al.* 1997). 이 유전자의 출현빈도를 알기 위해 물로부터 추출한 DNA를 주형으로 하여 *tetQ* 유전자의 염기서열로부터 설계한 PCR1과 PCR2를 primer로 PCR을 행하였을 때 예상했던 407 bp의 DNA절편을 얻을 수 있었다 (Fig. 4). 증폭된 band는 1지점에서 가장 강하였고 3, 4지점으로 갈수록 약해짐을 알 수 있었다. 특히 2지점과 5지점에서는 예상했던 band가 전혀 검출되지 않았다. 이와 같이 축산농장이 있는 상류에서 강한 band를 보이다가 도심을 통과하면서 약해지는 결과는 이 유전자가 축산폐수에서 유래했음을 말해 준다. 소나 양 같은 반추동물의 위장관에 존재하는 혐기성 세균들에서 tetracycline에 대해 저항성을 나타내는 경우가 많은 것으로 알려져 있고 (Flint *et al.* 1988), 특히 우점하는 세균중 하나인 *Prevotella*에서 tetracycline 저항성 형질은 *tetQ* 유전자에 의함이 보고되고 있다 (Nikolich *et al.* 1994). 그러므로 사료에 첨가된 tetracycline에 의하여 생긴 혐기성인 저항성 세균이 방출되어 이 세균에 있던 *tetQ* 유전자가 검출된 결과임을 추정할 수 있었다. 방출된 세균은 대부분 절대 혐기성이어서 산소에 민감하기 때문에 자연환경에서 오래 생존할 수 없을 뿐 아니라, tetracycline이 사람에게는 거의 쓰여지지 않아 새로운 유전자의 유입은 없고 하류로 갈수록 수량이 많아짐으로 인해 희석되기 때문에 band가 약해지는 것으로 생각된다. 같은 상류지역이면서 다른 지류인 2지점은 1지점과 달리 저항성 유전자가 검출되지 않은 사실도 이러한 가정을 뒷받침해 준다.

이와 같이 오염원에 따라 항생물질 저항성 유전자의 분포가 달라지는 사실은 저항성 유전자가 오염원의 추적의 지표로서 사용될 수 있는 가능성을 시사해 준다. 뿐만 아니

라 이들 유전자들은 자연환경에서 다른 세균으로 전달될 수 있으므로 저항성 유전자들의 분포와 전이에 대한 체계적인 감시가 필요할 것으로 생각된다.

인용문헌

- Armstrong, J.L., J.J. Calomiris and R.J. Seidler. 1982. Selection of antibiotic-resistant standard plate count bacteria during water treatment. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 308-316.
- Armstrong, J.L., D. S. Shigeno, J.J. Calomiris and R.J. Seidler. 1981. Antibiotic-resistant bacteria in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 42: 277-283.
- Bosius, J., M.L. Palmer, P.J. Kennedy and H.E. Noller. 1978. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosome RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 4801-4804.
- Buckwold, F.J., W.L. Albritton, A.R. Ronald, J. Lertzman and R. Henriksen. 1979. Investigations of the occurrence of gentamicin resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 15: 152-156.
- Dingell, J.D. 1980. Animal feeds: effect of antibiotics. *Science* 209: 1069.
- DuPont, H.L. and J.H. Steele. 1987. Use of antimicrobial agents in animal feeds: implications for human health. *Rev. Infect. Dis.* 9: 447-460.
- Flint, H.J., S.H. Duncan, J. Bisset and C.S. Stewart. 1988. The isolation of tetracycline-resistance strains of strictly anaerobic bacteria from the rumen. *Lett. Appl. Microbiol.* 6: 113-115.
- Foster T.J. 1983. Plasmid determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metal ions in bacteria. *Microbiol. Rev.* 47: 361-409.
- Gustafson, R.H. 1986. Antibiotics use in agriculture: an overview. pp 1-6. *In*: W. A. Moats (ed.), *Agricultural Uses of Antibiotics*. American Chemical Society Symposium Series 320, Washington, D. C.
- Han, H.S., N.D. Kim, Y.J. Lee, H.Y. Lee and J.S. Jung. 1997. Occurrence of Tn3 sequence upstream of *aacC2* gene in gentamicin resistance R plasmids. *J. Kor. Microbiol.* 33: 165-169.
- Jung, J.S. and Y.J. Lee. 1997. Methods for the extraction of DNA from water samples for polymerase chain reaction. *J. Microbiol.* 35: 354-359.
- Jung, J.S., T.C. Cheong, M.S. Cho, Y.C. Hah and J.H. Chung. 1994. Nucleotide sequence and expression of a gentamicin resistance gene isolated from the R plasmid in *Serratia marcescens*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 198: 1084-1089.
- Kaspar, C.W., J.L. Burgess, I.T. Knight and R.R. Colwell.

1990. Antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify sources of fecal contamination in water. *Can. J. Microbiol.* 36: 891-894.
- Lee, Y.J., H.S. Han, C.N. Seong, H.Y. Lee and J.S. Jung, 1998. Distribution of genes coding for aminoglycoside acetyltransferases in gentamicin resistant bacteria isolated from aquatic environment. *J. Microbiol.* 36: 249-255.
- Leng, Z., D.E. Riley, R.E. Berger, J.N. Krieger and M.C. Roberts. 1997. Distribution and mobility of the tetracycline resistance determinant *tetQ*. *J. Antimicrob. Chemother.* 40: 551-559.
- Lepine G., J.M. Lacroix, C.B. Waker and A. Progulske-Fox. 1993. Sequencing of a *tet (Q)* gene isolated from *Bacteroides fragilis* 1126. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 2037-2041.
- Moyer, C.L., F.C. Dobbs and D.M. Karl. 1994. Estimation of diversity and community structure through restriction fragment length polymorphism distribution analysis of bacterial 16S rRNA genes from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 871-879.
- Nikolich, M.P., G. Hong, N.B. Shoemaker and A.A. Salyers. 1994. Evidence for natural horizontal transfer of *tetQ* between bacteria that normally colonize humans and bacteria that normally colonize livestock. *App. Environ. Microbiol.* 60: 3255-3260.
- Ogan, M.T. and D.E. Nwiika. 1993. Studies on the ecology of aquatic bacteria of the lower Niger Delta: multiple antibiotic resistance among the standard plate count organisms. *J. Appl. Bacteriol.* 74: 595-602.
- Roberts, M.C. 1996. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbio. Rev.* 19: 1-24.
- Salyers, A.A., B.S. Speer and N.B. Shoemaker. 1990. New perspectives in tetracycline resistance. *Mol. Microbiol.* 4: 151-156.
- Taylor, D.E. and A. Chau. 1996. Tetracycline resistance mediated by ribosomal protection. *Antimicrob. Agents Chemoth.* 40: 1-5.

(1999년 5월 19일 접수)

Distributional Pattern of *tetQ* and *aacC2* genes in Stream Water

Jung, Jae Sung¹, Young Jong Lee^{1,2} and Jong Hong Kim¹

Department of Biology, Suncheon National University, Suncheon 540-742

Department of Clinical Pathology, Kwangju Health College, Kwangju 506-701, Korea

ABSTRACT: The occurrence of *tetQ* and *aacC2* genes encoding tetracycline and gentamicin resistance determinant, respectively, was assessed in total bacterial community DNA isolated from Dongchon stream of Suncheon area. To examine the resistance potential of bacteria that were not cultured, total DNA from 1 liter of stream water was extracted by freeze-thaw method. The PCR technique was employed to determine the abundance of the target genes. The highest frequency of *tetQ* gene was obtained from site 1, located near the animal farms area, whereas the incidence of *aacC2* was highest in site 5, the downstream area. These results showed that the occurrence of antibiotic resistance gene may be used as a convenient marker of water quality related to source.

Key words: *aacC2*, Antibiotics resistance, PCR, *tetQ*
