

금강호의 항생제 내성세균의 분포 및 동정

배명숙 · 최강국 · 박석환 · 최문술¹ · 이건형*

군산대학교 자연과학대학 과학기술학부, ¹해양대학 해양생명과학부

적 요: 2002년 1월부터 12월까지 매월 전북 군산시 인근에 위치한 금강호를 대상으로 항생제 내성균의 월별 분포변화와 조사기간 중 분리된 균주를 동정하였다. 종속영양세균의 연중 분포는 $4.1 \pm 1.0 \times 10^2 \sim 6.7 \pm 1.1 \times 10^3$ cfu mL⁻¹의 범주에서 변화하였다. 항생제 내성균의 연중 분포는 ampicillin 내성균의 경우, $1.5 \pm 0.7 \times 10 \sim 4.3 \pm 0.3 \times 10^3$ cfu mL⁻¹, chloramphenicol 내성균의 경우, $0 \sim 6.4 \pm 0.4 \times 10^2$ cfu mL⁻¹, gentamicin 내성균의 경우, $0 \sim 2.8 \pm 0.3 \times 10^3$ cfu mL⁻¹, kanamycin 내성균의 경우, $0 \sim 4.5 \pm 1.0 \times 10^3$ cfu mL⁻¹, 그리고 streptomycin 내성균은 $1.0 \pm 0.4 \times 10^2 \sim 2.3 \pm 0.5 \times 10^3$ cfu mL⁻¹의 범주에서 변화하였다. 조사된 항생제 내성균들 중 ampicillin 내성균이 모든 정점에서 가장 높은 균체수를 나타냈다. 조사기간 중 60균주의 항생제 내성균이 분리되었으며, 그 중 그람양성 세균은 6균주, 그람음성세균은 54균주를 차지하였다. 항생제 내성균으로 분리된 균주는 *Pseudomonas* 속, *Aeromonas* 속, 그리고 *Bacillus* 속과 *Sienotrophomonas* 속 등이 우점으로 나타났으며, 이외에도 *Enterobacter* 속, *Sphingobium* 속, *Variovorax* 속, 그리고 *Serratia* 속, *Acinetobacter* 속, *Mycoplana* 속, *Psychrobacter* 속과 *Xanthomonas* 속 등이 포함되었다. 동정된 균들은 ampicillin, kanamycin, chloramphenicol, streptomycin, gentamicin 순으로 높은 내성을 나타냈다.

검색어: 금강, 종속영양세균, 항생제내성세균, 16S rDNA 분석

서 론

금강호는 1990년에 전북 군산시 성산면 성덕리에서 충남 서천군 마서면 도삼리까지 1,841 m 구간에 방조제의 축조로 형성된 인공호이다. 이 담수호는 충남 서면, 부여군, 전북 군산시, 익산시, 김제시를 비롯하여 완주군 등 2도 3시 43,000 ha에 농업용수 2.44×10^8 m³/년, 생활 및 공업용수 1.21×10^8 m³/년 등 총 3.65×10^8 m³/년의 가용수의 공급원으로 사용되고 있으며, 연간 $5.0 \sim 6.4 \times 10^9$ m³의 담수를 서해로 유출한다(이와 권 1999). 금강은 대청댐 하류에서 대전시를 경유하는 갑천과 합류하고 공주시, 부여군을 거치면서 산업 폐기물, 도시생활하수, 축산단지 방류수의 증가로 수질환경이 급속도로 악화되고 있으며(Baeg et al. 1996, Jung et al. 1997) 특히, 금강 상·중류 인근에 위치한 축산목장, 양어장, 양계장 등에서 사료 첨가물로 사용되는 다양한 종류의 항생제들을 사용하고 있어 이들이 여러 경로와 단계를 통해서 금강으로 다량 유입될 것으로 예상된다. 유입된 항생제는 높은 농도로 장시간 잔존하게 되므로, 금강호 수계에서 존재하는 미생물들 중 일부는 이러한 항생제에 대하여 내성을 나타내는 요인으로 생각된다.

많은 연구에서 밝혀진 바와 같이, 항생제에 대한 내성은 염색체 돌연변이 혹은 전이유전자(플라스미드, 전이요소)의 도입에 따른 내성인자(R-factor)의 획득에서 기인한다(Rice and Bonomo 1996). 항생제 내성균에 대한 생태학적인 연구는 국내의 경우 어

러 사람들(이 1991, 안 1991, 이와 이 1993, 최 등 1993, 1995)에 의해 이루어진 적이 있었으나, 금강호에서 항생제 내성균에 관한 연구는 드물다. 본 연구에서는 담수호로 만들어진 금강호를 대상으로 실생활에서 많이 사용되는 항생제에 대한 내성균의 분포와 16S rDNA 염기서열분석 방법을 이용하여 항생제 내성균간의 계통분류에 대하여 조사하였다. 이러한 연구는 최근 항생제 사용으로 인해 매우 심각해진 자연환경 내 미생물들의 다제내성에 대한 연구로서 미생물 생태학과 공중위생 및 임상 의학적 측면에서 이용될 수 있는 기초자료로 이용될 수 있다.

재료 및 방법

연구지역 및 채수방법

전북 군산시와 충남 서천군 위치한 금강하구둑 인근의 금강호를 대상으로 3개 정점을 선정하여 표층수에서 2002년 1월부터 12월까지 매월 1회 채수하였다. 각 정점의 특성을 살펴보면, 정점 1과 2는 금강 하구둑 수문 근처 담수호 내측이며, 정점 3은 하구둑에서 상류쪽으로 5 km 떨어진 곳이다(Fig. 1). 각 정점별 시료는 Niskin 채수기를 사용하여 표층과 50 cm 사이에서 채수하였다.

종속영양세균의 분리 및 배양

현장에서 채수한 시료를 멸균된 시험관에 넣어 4℃를 유지하여 운반한 후 종속영양세균의 균체수는 멸균된 희석액에 1/10단

* Corresponding author; Phone: 82-63-469-4584, Fax: 82-63-463-1560, e-mail: ghlee@kunsan.ac.kr

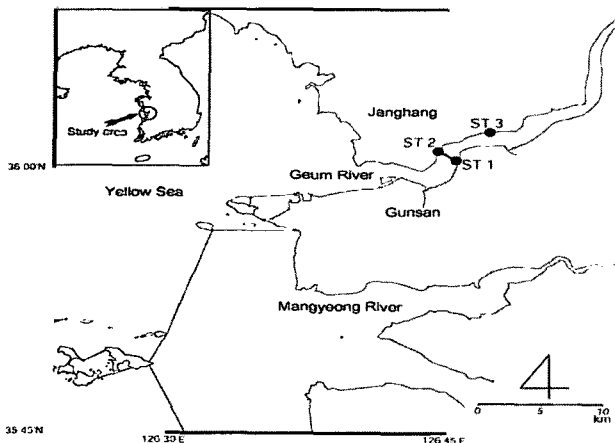


Fig. 1. A map of sampling stations in the lower artificial Lake Geumgang during January to December, 2002.

위로 희석한 후 Nutrient Agar(Difco)배지에 도말하여 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 3일간 배양한 후 계수하였다. 균체수를 계수한 배지에서 형태적으로 다른 콜로니 60개를 선별하여 Nutrient Agar 평판 배지에서 3차에 걸쳐 순수분리를 하였다. 순수분리된 균주는 Nutrient Broth (Difco, USA)에서 2일간 배양하여 genomic DNA를 분리하였다.

항생제 내성균

항생제 내성균을 측정을 위해 사용된 항생제는 Sigma(USA)사 제품으로 ampicillin(Am), chloramphenicol(Cm), gentamicin(Gm), kanamycin(Km), streptomycin(Sm)을 사용하였다. 각 항생제 내성균의 측정은 Luria-Bertani(LB) 고체배지 (trypton 1%, sodium chloride 1%, yeast extract 0.5%, agar 1.5%)에 NCCLS(National Committee for Clinical Laboratory Standards; Thornsberry *et al.* 1985)가 추천한 MIC 농도인 Am($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), Cm($25 \mu\text{g mL}^{-1}$), Gm($25 \mu\text{g mL}^{-1}$), Km($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) 및 Sm($50 \mu\text{g mL}^{-1}$)을 각각 첨가하여 30°C 에서 48시간 배양한 후 형성된 균체수를 계수하였다.

염색체 DNA 추출

항생제 내성균이 배양된 용액 1 ml를 $15,000 \times g$ 에서 3분간 원심분리하여 얻은 pellet을 멸균된 증류수로 2회 세척하여 다시 $15,000 \times g$ 에서 5분간 원심분리하여 세균을 농축하였다. 농축된 세균으로부터 genomic DNA의 추출을 위하여 SDS, CTAB (Cetyl-trimethyl ammonium bromide), 그리고 PCI[phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1)]를 처리하였다(Gerhardt *et al.* 1994). 추출한 genomic DNA 시료에 RNase(최종농도 $10 \mu\text{g mL}^{-1}$)를 첨가하고 37°C 에서 30분간 반응하여 RNA를 제거하여, PCR용 template DNA로 사용하였다.

PCR 증폭 및 서열 분석

세균의 16S rDNA를 증폭하기 위하여 universal primer로 사용된 27f와 1522r를 사용하였다. Forward primer로 27f(AGA GTT

TGA TCM TGG CTC AG)(Bruce *et al.* 2000)과 1522r(AAG GAG GTG WTC CAR CC)을 reverse primer로 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 $10 \times$ PCR 완충액(최종농도: 50 mM KCl, 0.01% gelatin, 10 mM Tris-HCl, pH 9.0)은 $5 \mu\text{L}$, 2.5 mM MgCl_2 는 $4 \mu\text{L}$, 10 mM dNTP는 $1 \mu\text{L}$, 10 pmol oligonucleotide primer는 $1 \mu\text{L}$, 그리고, 1 U의 Taq polymerase(TaKaRa, Japan)를 넣은 후, 여기에 100 ng의 template DNA를 첨가하고 증류수로 최종 반응 부피를 $50 \mu\text{L}$ 로 맞추었다. PCR 증폭은 thermal cycler (GeneAmp PCR system 9700, Perkin Elmer, USA)를 사용하여 수행하였다. PCR 증폭 과정은 전 변성 과정으로 94°C 에서 10분간 수행하였고, 94°C 에서 30초간 변성, 55°C 에서 30초간 primer annealing, 72°C 에서 5분간 증폭을 총 30회 반복하고 72°C 에서 7분간 최종 반응시켰다. 증폭된 PCR 산물은 0.7% agarose gel (SeaKem[®]LE, FMC)에서 전기영동한 후 ethidium bromide($0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$)로 염색 하여 UV 분광광도계로 1.5 kb에 해당하는 DNA 밴드를 확인하였다. 16S rDNA 유전자서열을 분석하기 위해 증폭된 PCR 산물을 agarose gel에서 전기영동한 후, Gel extraction kit(Spin Kit; Nucleogen, Korea)를 이용하여 정제하였다. 유전자서열 분석은 (주) 제노텍(Korea)에 의뢰하여 ABI PRISM 3700 Genetic analyzer (Applied Biosystems, USA)에 의하여 수행하였으며, 유전자 서열 분석을 위해 primer로는 27f, 1522r, 1088r(GGT TAA GTC CCG CAA CGA GC)를 사용하였다.

계통수 작성

항생제 내성균들의 16S rDNA의 부분 염기 서열을 Blast network service를 이용하여 EMBL/GeneBank databas의 염기 서열을 비교하여 속명을 확정하고(Altschul *et al.* 1997), PHYDIT (version 3.1)를 이용하여 Ribosomal Database Project(RDP) II database의 표준 균주의 염기서열과 비교함으로써 계통분류학적 유연관계를 분석하였다(Maidak *et al.* 2000). 16S rDNA의 부분 염기 서열의 배열은 우선 CLUSTAL W를 사용하여 결정하였으며, PHYDIT를 이용하여 RDP의 대표적인 세균의 염기 서열을 참조하여 재 배열을 수행하였다(Joung *et al.* 2001). 계통수(phylogenetic tree)는 neighbor-joining method(Saitou and Nei 1987)를 이용하여 작성하였다.

핵산 염기서열 번호

본 연구에서 분석된 60 종류의 16S rDNA 계통형에 대한 부분 염기서열을 GeneBank database에 제출하여 승인번호(AY680925 - AY689084)를 부여 받았다.

결과 및 고찰

중속영양세균의 연중 변화

조사기간 중 호기성 중속영양세균의 년중 분포는 $4.1 \pm 1.0 \times 10^2 \sim 6.7 \pm 1.1 \times 10^3 \text{ cfu mL}^{-1}$ 의 범주에서 변화하였다. 이를 각 정점별로 살펴보면, 정점 1에서는 $5.5 \pm 1.7 \times 10^2 \sim 4.6 \pm 2.6$

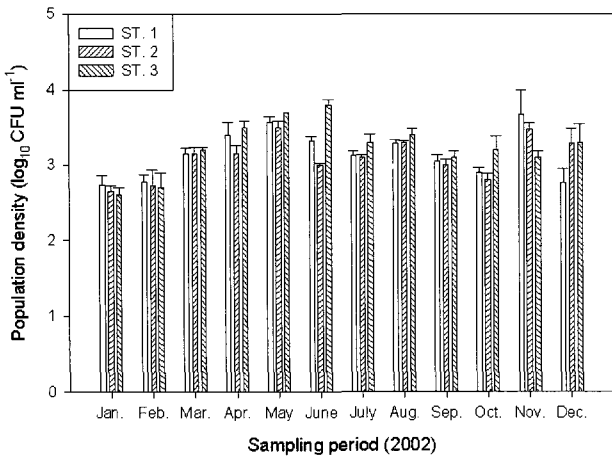


Fig. 2. The annual variation of population densities of heterotrophic bacteria in surface water at each sampling sites from January to December, 2002.

$\times 10^3$ cfu mL⁻¹, 정점 2에서 $4.5 \pm 1.5 \times 10^2 \sim 3.4 \pm 0.6 \times 10^3$ cfu mL⁻¹, 정점 3에서는 $4.1 \pm 1.0 \times 10^2 \sim 6.7 \pm 1.1 \times 10^3$ cfu mL⁻¹의 범주에서 측정되었다(Fig. 2).

각 정점별 년평균 값은 정점 1, 2, 3의 경우 각각 $1.7 \pm 0.4 \times 10^3$ cfu mL⁻¹, $1.6 \pm 0.3 \times 10^3$ cfu mL⁻¹, $2.3 \pm 0.5 \times 10^3$ cfu mL⁻¹로 나타났으며, 최고값은 정점 6월에 최저값은 1월에 각각 $6.7 \pm 1.0 \times 10^3$ cfu mL⁻¹과 $4.1 \pm 0.1 \times 10^2$ cfu mL⁻¹을 나타냈다. 이러한 측정값은 하구둑이 축조되기 이전에 이(1986)에 의해서 측정된 값보다 낮게 나타났는데 이는 기수지역의 특성이 사라졌기 때문일 것으로 생각된다.

항생제 내성균의 연중 변화

평판배지법(NCCLS 1997, 2001)으로 금강호에서 분포하는 항생제 내성균을 정점별로 조사하였다(Fig. 3). Am에 내성을 보이는 균체수(Am^r)의 분포는 정점 1은 $6.0 \pm 2.8 \times 10 \sim 4.3 \pm 0.3 \times 10^3$ cfu mL⁻¹, 정점 2는 $6.0 \times 10 \sim 2.4 \pm 0.2 \times 10^3$ cfu mL⁻¹, 정점 3은 $1.5 \pm 0.7 \times 10 \sim 2.5 \pm 0.6 \times 10^3$ cfu mL⁻¹의 범주로 나타났다. 조사기간 중 각 정점별 년 평균값은 정점 1, 2, 3의 경우, 각각 $7.4 \pm 1.2 \times 10^2$ cfu mL⁻¹, $5.4 \pm 1.0 \times 10^2$ cfu mL⁻¹, $8.1 \pm 1.5 \times 10^2$ cfu mL⁻¹로 나타났다. Cm 내성균(Cm^r)의 경우, 정점 1은 $0 \sim 5.1 \pm 0.1 \times 10^2$ cfu mL⁻¹, 정점 2는 $0 \sim 6.4 \pm 0.4 \times 10^2$ cfu mL⁻¹, 정점 3은 $0 \sim 2.9 \pm 0.5 \times 10^2$ cfu mL⁻¹의 범주에서 나타났으며, 조사기간 중 각 정점별 년 평균값은 정점 1, 2, 3의 경우 각각 $6.5 \pm 1.1 \times 10$ cfu mL⁻¹, $1.1 \pm 0.1 \times 10^2$ cfu mL⁻¹, $1.0 \pm 0.2 \times 10^2$ cfu mL⁻¹로 나타났다. 또한 각 정점별 Gm 내성균(Gm^r)의 경우, 정점 1은 $0 \sim 1.5 \pm 0.6 \times 10^3$ cfu mL⁻¹, 정점 2는 $0 \sim 1.1 \pm 0.2 \times 10^3$ cfu mL⁻¹, 정점 3은 $1.0 \times 10 \sim 2.8 \pm 0.3 \times 10^3$ cfu mL⁻¹의 범주로 변화하였으며, 조사기간 중 각 정점별 년 평균값은 정점 1, 2, 3의 경우 각각 $2.8 \pm 0.7 \times 10^2$ cfu mL⁻¹, $1.7 \pm 0.3 \times 10^2$ cfu mL⁻¹, $4.5 \pm 0.9 \times 10^2$ cfu mL⁻¹로 나타났다. Km 내성균(Km^r)은 정점

1은 $0 \sim 4.5 \pm 1.0 \times 10^3$ cfu mL⁻¹, 정점 2는 $1.3 \pm 0.9 \times 10 \sim 2.0 \pm 0.2 \times 10^3$ cfu mL⁻¹, 정점 3은 $0 \sim 3.5 \pm 0.7 \times 10^3$ cfu mL⁻¹의 범주에서 변화하였으며, 조사기간 중 각 정점별 년 평균값은 정점 1, 2, 3의 경우 각각 $5.8 \pm 1.2 \times 10^2$ cfu mL⁻¹, $4.1 \pm 0.5 \times 10^2$ cfu mL⁻¹, $6.6 \pm 1.0 \times 10^2$ cfu mL⁻¹로 나타났다. 한편 Sm 내성균(Sm^r)은, 정점 1은 $1.0 \pm 0.4 \times 10 \sim 5.3 \pm 0.9 \times 10^2$ cfu mL⁻¹, 정점 2는 $5.7 \pm 0.6 \times 10 \sim 2.3 \pm 0.3 \times 10^3$ cfu mL⁻¹, 정점 3은 $1.5 \pm 0.7 \times 10 \sim 2.3 \pm 0.5 \times 10^3$ cfu mL⁻¹의 범주로 변화하였으며, 조사기간 중 각 정점별 년 평균값은 정점 1, 2, 3의 경우 각각 $1.5 \pm 0.4 \times 10^2$ cfu mL⁻¹, $4.4 \pm 0.7 \times 10^2$ cfu mL⁻¹, $5.1 \pm 1.0 \times 10^2$ cfu mL⁻¹로 나타났다. 이상의 결과로 볼 때, 본 연구에서 조사기간 중 항생제 내성균의 분포는 Am^r, Km^r, Cm^r, Sm^r, Gm^r의 순으로 높게 나타났으며(Fig. 4). 이를 정점별로 살펴보면, Am^r, Sm^r은 모든 정점에서 높게 분포한 반면, Cm^r, Gm^r, Km^r은 정점에 따라 균체수의 차이를 보였다. Am^r이 높게 나타난 것은 금강수역에서 최 등(1995)에 의해 조사된 결과와 일치하였다.

PCR 증폭 및 16S rDNA의 염기서열

금강호에서 존재하는 항생제 내성균에서 분리된 60균주의 genomic DNA를 분리하고 16S rDNA를 증폭하여 0.7% agarose

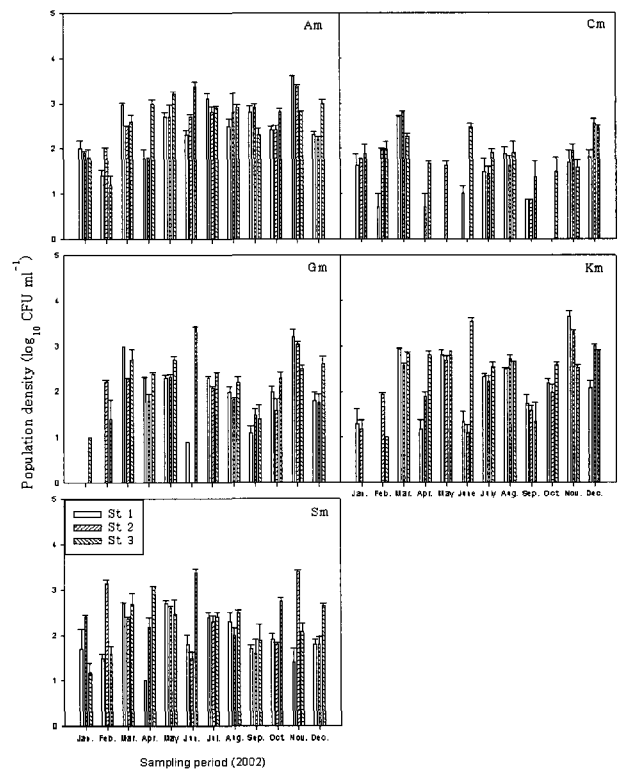


Fig. 3. The annual variation of population densities of antibiotics-resistant bacteria in the surface water at each sampling site during January to December, 2002 (Am: ampicillin, Cm: chloramphenicol, Gm: gentamicin, Km: kanamycin, Sm: streptomycin).

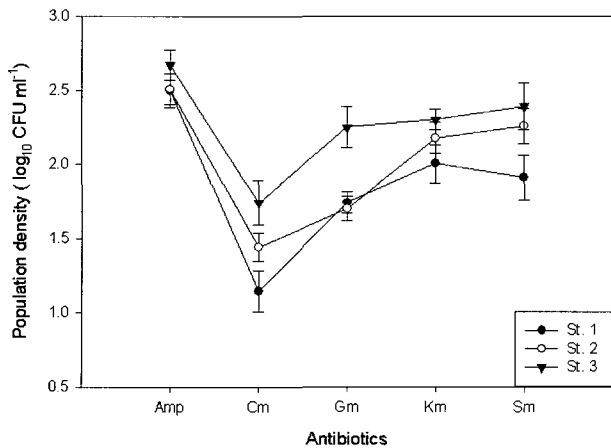


Fig. 4. Average population densities of each antibiotic-resistant bacteria during January to December, 2002.

gel로 전기영동한 결과, 모든 시험균주에서 뚜렷한 약 1.5 kb의 PCR 산물을 얻었다. 60개의 PCR 산물을 gel extraction kit을 이용하여 정제한 후, autosequencer를 이용하여 16S rDNA의 부분 염기 서열을 파악하였다.

계통수 분석

금강호에서 항생제 내성균으로 분리된 60 균주를 동정한 결과 *Pseudomonas* 속이 20 균주로 가장 많았고, *Aeromonas* 속은 14 균주, 그리고 *Bacillus* 속과 *Stenotrophomonas* 속은 각각 6 균주로 나타났다. 한편 *Enterobacter* 속은 4 균주, *Sphingobium* 속과 *Variovorax* 속, 그리고 *Serratia* 속은 각각 2 균주씩 존재하였고, *Acinetobacter* 속, *Mycoplana* 속, *Psychrobacter* 속, *Xanthomonas* 속은 각각 1 균주씩 존재하였다(Fig. 5).

이를 각 항생제 종류별로 내성을 보이는 균주의 우점을 살펴 보면, Am^r에서는 *Pseudomonas* 속이 19 균주, *Aeromonas* 속은 14 균주로 나타났으며, Cm^r에서는 *Pseudomonas* 속이 8 균주, Gm^r에서는 *Pseudomonas* 속이 2 균주, *Aeromonas* 속은 2 균주, Km^r에서는 *Aeromonas* 속은 14 균주, Sm^r에서는 *Bacillus* 속은 2 균주, *Spingobium* 속은 2 균주로 나타났다(Table 1). 본 실험에서 항생제에 대해 내성을 나타낸 균주의 수는 *Pseudomonas* 속, *Aeromonas* 속, *Bacillus* 속, *Stenotrophomonas* 속, *Enterobacter* 속, *Variovorax* 속 순으로 높게 나타났다. 이러한 결과는 항생제 내성이 주로 *Enterobacteriaceae*, *Aeromonas* 속 그람음성세균, 중속영양세균에서 나타난다는 보고와 일치한다(Fernandez *et al.* 1990, Andersen and Sandaa 1994). 또한 내성을 가진 중속영양세균 60 종류의 세균으로부터 얻은 염기 서열을 GeneBank database의 염기 서열과 비교한 결과 6개 그룹으로 정리해 보면 항생제 내성을 가진 중속영양세균 중 그람양성세균이 차지하는 비율은 분리된 균주의 10% 이었다. 그람 음성세균의 경우에는, γ -Proteobacteria(49 균주), α -Proteobacteria(3 균주), β -Proteobacteria (2 균주) 순으로 존재하였다(Table 2, Fig. 5). 16S rDNA의 염기서열 분석

Table 1. Susceptibility test for antibiotic resistant bacterial strains isolated from artificial Lake Geumgang during 2002

Genus	No. of isolates	No. of Antibiotics - resistance				
		Am	Cm	Gm	Km	Sm
<i>Pseudomonas</i> spp.	20	19	8	2	1	3
<i>Aeromonas</i> spp.	14	14	1	2	3	2
<i>Stenotrophomonas</i> spp.	6	8	-	1	1	1
<i>Bacillus</i> spp.	7	5	-	-	-	2
<i>Enterobacter</i> spp.	3	3	-	-	-	-
<i>Variovorax</i> spp.	2	-	-	1	-	1
<i>Serratia</i> spp.	2	2	-	-	-	-
<i>Sphingobium</i> spp.	2	-	-	-	-	2
<i>Acinetobacter</i> spp.	1	-	1	-	-	-
<i>Mycoplana</i> spp.	1	1	-	-	-	-
<i>Psychrobacter</i> spp.	1	-	-	-	1	-
<i>Xanthomonas</i> spp.	1	1	-	-	-	-

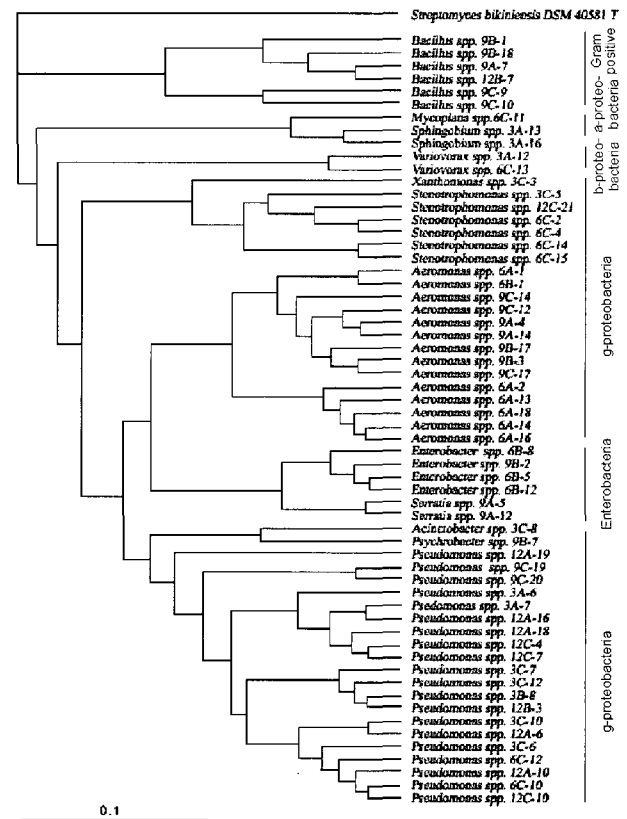


Fig. 5. Phylogenetic tree showing the affiliation of 16S rDNA sequences to selected reference sequence of the antibiotic-resistant bacteria.

Table 2. The results of blast search of antibiotic-resistant bacteria isolated from artificial Lake Geumgang during 2002

Lab. No	Genus	Subdivision	Similarity (%)	Sequence length(nt)
3A-6	<i>Pseudomonas</i> sp.	γ-proteobacteria	99	1476
3A-7	<i>Pseudomonas</i> sp.	γ-proteobacteria	99	1475
3A-12	<i>Variovorax</i> sp.	β-proteobacteria	99	1473
3A-13	<i>Sphingobium</i> sp.	α-proteobacteria	99	1441
3A-16	<i>Sphingobium</i> sp.	α-proteobacteria	100	1432
3B-8	<i>Pseudomonas</i> sp.	γ-proteobacteria	100	1485
3C-3	<i>Xanthomonas</i> sp.	γ-proteobacteria	99	1487
3C-5	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	γ-proteobacteria	99	1487
3C-6	<i>Pseudomonas</i> sp.	γ-proteobacteria	99	1481
3C-7	<i>Pseudomonas</i> sp.	γ-proteobacteria	100	1489
3C-8	<i>Acinetobacter</i> sp.	γ-proteobacteria	100	1488
3C-10	<i>Pseudomonas</i> sp.	γ-proteobacteria	99	1009
3C-12	<i>Pseudomonas</i> sp.	γ-proteobacteria	100	1489
6A-1	<i>Aeromonas</i> sp.	γ-proteobacteria	99	1478
6A-2	<i>Aeromonas</i> sp.	γ-proteobacteria	100	1495
6A-13	<i>Aeromonas</i> sp.	γ-proteobacteria	100	1492
6A-14	<i>Aeromonas</i> sp.	γ-proteobacteria	100	1495
6A-16	<i>Aeromonas</i> sp.	γ-proteobacteria	100	1494
6A-18	<i>Aeromonas</i> sp.	γ-proteobacteria	100	1495
6B-1	<i>Aeromonas</i> sp.	γ-proteobacteria	99	1489
6B-5	<i>Enterobacter</i> sp.	γ-proteobacteria	92	1370
6B-8	<i>Enterobacter</i> sp.	γ-proteobacteria	100	1484
6B-12	<i>Enterobacter</i> sp.	γ-proteobacteria	91	1353
6C-2	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	γ-proteobacteria	92	1471
6C-4	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	γ-proteobacteria	98	1088
6C-10	<i>Pseudomonas</i> sp.	γ-proteobacteria	99	1479
6C-11	<i>Mycoplana</i> sp.	α-proteobacteria	99	1408
6C-12	<i>Pseudomonas</i> sp.	γ-proteobacteria	100	1486
6C-13	<i>Variovorax</i> sp.	β-proteobacteria	99	1472
6C-14	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	γ-proteobacteria	100	1498
6C-15	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	γ-proteobacteria	100	1495
9A-4	<i>Aeromonas</i> sp.	γ-proteobacteria	98	1478
9A-5	<i>Serratia</i> sp.	γ-proteobacteria	99	1484
9A-7	<i>Bacillus</i> sp.	low G+C Gram ⁺	100	1498
9A-12	<i>Serratia</i> sp.	γ-proteobacteria	100	1486
9A-14	<i>Aeromonas</i> sp.	γ-proteobacteria	98	1478
9B-1	<i>Bacillus</i> sp.	low G+C Gram ⁺	99	1045
9B-2	<i>Enterobacter</i> sp.	γ-proteobacteria	96	1443
9B-3	<i>Aeromonas</i> sp.	γ-proteobacteria	99	1485
9B-7	<i>Psychrobacter</i> sp.	γ-proteobacteria	99	1483
9B-17	<i>Aeromonas</i> sp.	γ-proteobacteria	99	1488
9B-18	<i>Bacillus</i> sp.	low G+C Gram ⁺	99	1492
9C-9	<i>Bacillus</i> sp.	low G+C Gram ⁺	100	1494
9C-10	<i>Bacillus</i> sp.	low G+C Gram ⁺	99	1486
9C-12	<i>Aeromonas</i> sp.	γ-proteobacteria	99	1485
9C-14	<i>Aeromonas</i> sp.	γ-proteobacteria	98	1474
9C-17	<i>Aeromonas</i> sp.	γ-proteobacteria	99	1490
9C-19	<i>Pseudomonas</i> sp.	γ-proteobacteria	98	1462
9C-20	<i>Pseudomonas</i> sp.	γ-proteobacteria	100	1488
12A-6	<i>Pseudomonas</i> sp.	γ-proteobacteria	99	1474
12A-10	<i>Pseudomonas</i> sp.	γ-proteobacteria	99	1088
12A-18	<i>Pseudomonas</i> sp.	γ-proteobacteria	100	1486
12A-19	<i>Pseudomonas</i> sp.	γ-proteobacteria	100	1484
12B-3	<i>Pseudomonas</i> sp.	γ-proteobacteria	99	1482
12B-7	<i>Bacillus</i> sp.	low G+C Gram ⁺	100	1501
12C-4	<i>Pseudomonas</i> sp.	γ-proteobacteria	100	1485
12C-7	<i>Pseudomonas</i> sp.	γ-proteobacteria	99	1483
12C-10	<i>Pseudomonas</i> sp.	γ-proteobacteria	100	1483
12C-21	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	γ-proteobacteria	98	1482
12A-16	<i>Pseudomonas</i> sp.	γ-proteobacteria	100	1487

에 의한 세균 분류에 대한 연구는 고전적인 생리, 생화학적인 방법으로는 동정이 불가능하였던 균주들에 대하여 정확한 동정이 가능하게 되었다. 따라서 앞으로 이러한 동정방법으로 환경에 존재하는 미생물들을 분류 동정하는 데에도 폭넓게 활용될 수 있으리라 생각된다.

항생제 감수성

항생제 내성균으로 분리 동정된 60 균주에 대해 조사된 5 종의 항생제 중 가장 많은 내성을 보인 항생제는 Am으로써 실험 대상 60 균주 중 51 균주가 내성을 보여 85%의 높은 비율을 차지하였다. 반면에 Cm, Gm, Km과 Sm에 대해서 내성은 각각 17%, 10%, 12%, 17%의 비교적 낮은 비율로 내성을 나타냈다 (Fig. 6). 이렇게 Am에 대하여 높은 내성을 나타낸 것은 최근에 치료를 위한 목적으로 사용되는 항생제 중에서 Am이 다른 항생제에 비해 더 빈번히 사용되기 때문에 내성전달이 다른 항생제에 비하여 용이하기 때문인 것으로 사료된다. 실제로 항생제 내성균의 항생제 내성실험조사에서 Am이 33.7%, Cm이 3.8%, Km이 2.5%의 내성을 나타냈으며(안 1991), 하 등(1990)에 조사에서도 Am이 73.1%의 내성을 나타내는 것으로 보고된 바 있다. 항생제 내성 범주를 항생제 별로 살펴보면, 60 균주 중에서 두 가지 항생제에 대하여 내성을 갖는 균주는 모두 15 균주로써 전체 조사균주의 25%를 차지하였으며, 3가지 이상의 항생제에 내성을 가지는 균주는 *Pseudomonas* 속 2 균주와 *Aeromonas* 속 2 균주로 7%를 차지하였다(Table 3). 또한 김 등(1986)은 *Pseudomonas* 속의 항생제 내성조사에서 Am에 100%의 내성을 나타낸 것으로 보고된 바 있다.

이를 정점별로 보면, 정점 1에서 2가지 항생제에 대하여 내성을 나타내는 균주는 4 균주, 정점 2에서는 1 균주, 정점 3에서는 9 균주였다. 또한, 3 종의 항생제에 내성을 나타낸 균주는 정점 1과 3에서 각각 2 균주였다. 그러나 4 가지 종류의 항생제에 대하여 내성을 보인 것은 정점 3에서만 *Aeromonas* 속 1 균주가 검출되었다. 이는 인근의 인구 밀집지역에서 다량의 항생제를 남용하여 생기는 생활폐수나 축산 폐수 또는 그와 관련된 산업 폐

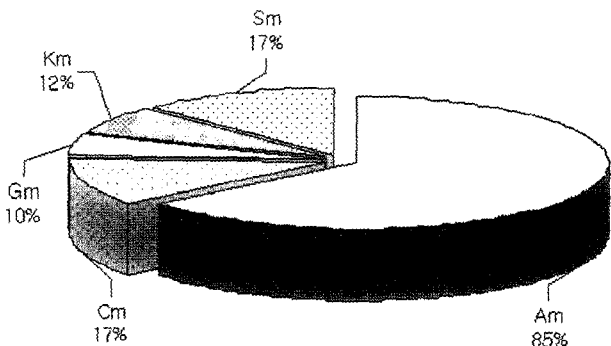


Fig. 6. Antibiotic-resistance patterns isolates from surface water at each sampling site during January to December, 2002(Am: ampicillin; Cm: chloramphenicol; Gm: gentamicin; Km: kanamycin; Sm: streptomycin).

Table 3. Multiple antibiotic-resistance pattern of isolates from Lake Geumgang

No. of drugs	Resistant pattern	No. of strains	Genus
4	Am Gm Km Sm	1	<i>Aeromonas</i> spp.
3	AM Cm Km	1	<i>Pseudomonas</i> spp.
	Am Gm Km	1	<i>Aeromonas</i> spp.
	Am Cm Sm	1	<i>Pseudomonas</i> spp.
2	Am Cm	7	<i>Pseudomonas</i> spp. <i>Aeromonas</i> spp.
	Am Sm	3	<i>Pseudomonas</i> spp. <i>Stenotrophomonas</i> spp.
	Am Km	3	<i>Aeromonas</i> spp. <i>Stenotrophomonas</i> spp.
	Am Gm	2	<i>Stenotrophomonas</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.

수의 유입의 증가로 인하여 야기된 결과라고 생각된다.

각 정점별로 항생제 내성을 보이는 균주의 우점을 살펴보면, 정점 1의 경우, 8 속의 21 균주 중 가장 내성을 많이 나타낸 종으로는 *Aeromonas* 속이었다. 정점 2에서는 5 속의 13 균주 중 *Enterobacter* 속, 정점 3에서는 7 속의 26 균주 중에 *Pseudomonas* 속으로 나타났다. 이러한 결과는 이와 이(1993)가 만경강 하류에서 조사한 결과와 유사하였다. 전형적으로 담수에서 존재하는 *Enterobacteria* 속과 *Aeromonas* 속이 항생제에 대해 높은 내성을 보인다는 보고와 유사한 결과를 나타냈다(Marisol *et al.* 2000).

이와 같이 수계 생태계 내에서 종속영양세균이 항생제에 대하여 내성을 나타내는 것은 주로 유전적 기원에서 유래하는 것으로 내성인자가 형질도입, 형질전환, 접합 등의 기작으로 전이 되는 것으로 생각된다(Nester *et al.* 2001).

사 사

본 연구는 연구진흥을 위한 군산대학교 해양개발연구소 2003년 특별연구사업에 의해서 수행되었습니다.

인용문헌

김상윤, 이유철, 설성용, 조동택, 전도기. 1986. 녹농균의 항생제 내성의 특성. *대한미생물학회지* 25: 393-398.
 이견형. 1986. 금강하구 퇴적토에서 종속영양 세균의 분포와 부착에 관한 연구. 서울대학교 박사학위논문. 120 p.
 이규춘. 1991. 만경강 하류에 분포하는 항생제 내성 세균에 관한 연구. *군산대학교 석사학위논문*. 54 p.
 이견형, 이규춘. 1993. 만경강 하류에서의 종속영양 세균의 계절

적 분포와 항생제 내성세균의 특성. *한국육수학회지* 26: 73-82.
 이상호, 권효근. 1999. 하구언 수문작동으로 인한 금강 하구역의 물리적 환경변화 I. 평균해수면과 조석. *한국해양학회지* 4: 93-100.
 안경준. 1991. 무심천 지소별 장내세균의 항생제 내성 분포에 관한 연구. *서원대학 기초과학논집*. pp. 209-218.
 최영길, 이기성, 공동규, 최원창, 오태영, 박영식, 최청일. 1993. 금강수역내 항생제 및 중금속내성균의 분포 및 동시내성 빈도. *환경생물학회지* 11: 131-144.
 최영길, 이기성, 공동규, 박영식, 최청일. 1995. 대청호 및 금강수역의 유기물 분해능과 오염의 신호지표. *환경생물학회지* 13: 27-44.
 하경임, 서성일, 박종욱, 서민호. 1990. 대장균 R-plasmid의 특성과 항균제 내성. *대한미생물학회지* 25: 19-26.
 Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D.J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
 Andersen, S.R. and R.A. Sandaa. 1994. Distribution of tetracycline resistance determinants among Gram-negative bacteria isolated from polluted and unpolluted marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 908-912.
 Baeg, C.O., S.G. Kang and K.S. Lee. 1996. A status of agricultural water quality and improvable countermeasure in Korea. *Korean F. Environ. Agric.* 15: 506-519.
 Fernandez, A.A., A. Fernandez de Aranguiz, A.A. Umanan and R. Cisterna. 1990. Comparison of antibiotic resistance and plasmid bands between two identical sets of raw sewage enterobacterial strains. *Acta. Hydrochem. Hydrobiol.* 18: 345-350.
 Gerhardt, P.M., W.A. Wood and N.R. Krieg. 1994. *Methods for general and molecular bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
 Joung, P.-M., K.-S. Shin, J.-S. Lim, I.S. Lee and S.J. Park. 2001. Diversity of acid-tolerant epiphytic bacterial communities on plant leaves in the industrial area and the natural forest area based on 16S rDNA. *Kor. J. Microbiol.* 37: 265-272.
 Jung, Y.S., J.E. Yang and B.Y. Kim 1997. Current status of agricultural water quality, diffuse pollution problems and improvement in Korea. 97 Symposium of Agri. Environ. pp. 65-94.
 Maidak, B.L., J.R. Cole, T.G. Lilburn, C.T. Parker, P.R. Saxman Jr. and J.M. Stredwick. 2000. The RDP (Ribosomal Database Project) continues. *Nucleic Acids Res.* 28: 173-174.
 Marisol, G.U., C. Michele, A. Corinne, R. Nathalie, C. Pierre and Q. Claudine. 2000. Impact of an urban effluent on antibiotic resistance of riverine *Enterobacteriaceae* and *Aeromonas* spp.

- Appl. Environ. Microbiol. 66: 125-132.
- Moffett, B.F., K.A. Walsh, J.A. Hrris and T.C. Hill. 2000. Analysis of bacterial community structure using 16S rDNA analysis. *Anaerobe* 6: 129-131.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1997. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A4. National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Eleventh informational supplement M100. NCCLS, Washington D.C., S11. 21: 123.
- Nester, E.W., D.G. Anderson, C.E. Roberts, Sr., N.N. Pearsall and M.T. Nester. 2001. *Microbiology: A human perspective*. pp. 191-220. McGraw Hill.
- Rice, L.B. and R.A. Bonomo. 1996. Genetic and biochemical mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents, pp. 453-501. *In* B. Lorian (ed.), *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Williams and Wilkins Co. Baltimore, MD.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Thornsberry, C.J., J. Anhalt, A.L. Barry, J.L. Cotton, E.H. Gerlach, R.N. Jones, R.C. Moelling and R.A. Norton. 1985. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that growth aerobically. NCCLS, Villanova. pp. 581-587.
- (2004년 7월 28일 접수; 2004년 8월 17일 채택)

Annual Population Variation and Identification of Antibiotic-Resistant Bacteria in the Lower Lake Geumgang

Bae, Myoung-Sook, Gang-Guk Choi, Suhk-Hwan Park, Moon-Sul Choi¹ and Geon-Hyoung Lee*

Faculty of Science & Technology, Kunsan National University, Gunsan, Jeon-buk 573-701, Korea

¹*Faculty of Marine Life Science, Kunsan National University, Gunsan, Jeon-buk 573-701, Korea*

ABSTRACT : This study was conducted to evaluate the annual population variation and identification of antibiotic-resistant bacteria in the lower artificial Lake Geumgang from January to December, 2002. Samples were taken from the surface waters at 3 stations near the estuarine barrage. The results were as follows; the population densities of heterotrophic bacteria varied from $4.1 \pm 1.0 \times 10^2$ to $6.7 \pm 1.1 \times 10^3$ cfu ml⁻¹ during the investigation periods. The population densities of antibiotic-resistant bacteria ranged from $1.5 \pm 0.7 \times 10$ to $4.3 \pm 0.3 \times 10^3$ cfu ml⁻¹ for ampicillin; from 0 to $6.4 \pm 0.4 \times 10^2$ cfu ml⁻¹ for chloramphenicol; from 0 to $2.8 \pm 0.3 \times 10^3$ cfu ml⁻¹ for gentamicin; from 0 to $4.5 \pm 1.0 \times 10^3$ cfu ml⁻¹ for kanamycin; and from $1.0 \pm 0.4 \times 10$ to $2.3 \pm 0.5 \times 10^3$ cfu ml⁻¹ for streptomycin, respectively. Of the sixty isolates, 90% were Gram negative. Dominant genera by 16S rDNA analysis were identified *Aeromonas* spp. (14 strains), *Bacillus* spp. (6 strains), *Enterobacter* spp. (4 strains), and *Stenotrophomonas* spp. (6 strains). These strains were clustered into 12 groups based on relatedness by average linkage method. Of the 60 isolates, 85% had the resistance to ampicillin and 32% were shown resistance to more than 2 kinds of antibiotics.

Key words : Antibiotic-resistant bacteria, Geum River, Heterotrophic bacteria, 16S rDNA analysis
