

# 하수 처리시설의 공간 및 운전인자에 따른 항생제 내성의 통계학적 분석

김 성 표\* / 조 윤 철\*\* / 김 이 형\*\*\* / 카틱 찬드란\*\*\*\*

## The Statistical Analysis for the fate of Antibiotic Resistance according to the Spatial and Operational Wastewater Treatment Factors

Sungpyo Kim\* / Yunchul Cho\*\* / Leehyung Kim\*\*\* / Kartik Chandran\*\*\*\*

**요약** : 본 연구의 목적은 하수처리장의 공간적 그리고 운전인자에 따른 테트라사이클린 내성균(TRB) 및 테트라사이클린 내성 유전자(TRG)들의 거동을 파악하는데 있다. 이를 위한 노력으로, 세 개의 실제 다른 하수처리장내에서 7개월 이상 각각의 반응조별로 시료를 채취하여 TRB 및 TRG가 분석되었다. 통계 기법은 주성분분석(PCA)을 통해 이들 간에 어떠한 일반적 관계식이 성립하는지 알아보려 노력하였다. 통계 분석결과, 활성슬러지내에 TRB 농도는 1차 침전 유입수에 있는 TRB 농도에 많은 영향을 받는 것을 알 수 있었다. 또한, 본 연구를 통해 TRB와 TRG의 내거동이 하수처리장 SRT 조건에 많이 영향을 받는 것을 알 수 있었다.

**핵심용어** : 하수처리장, 테트라사이클린 내성균, 테트라사이클린 내성유전자, 테트라사이클린

**Abstract** : The aim of this study was to examine the fate of tetracycline resistant bacteria (TRB) and tetracycline resistant genes (TRG) according to the spatial and operational wastewater treatment factors. As part of the effort, TRB and TRG of water samples at each unit processes of three different wastewater treatment plants (WWTPs) were analyzed over seven month study periods. With the data about different spatial and operating conditions of these WWTPs, TRB and TRGs, principal component analysis (PCA) was performed to find out any general correlation trend. Based on the statistic analysis results, the extent of TRB concentration in the activated sludge (TRBAS) is much related to the TRB concentration in primary clarifier effluent (TRBPE). Also, the study results indicated that the fate of TRB and TRG are significantly affected by the SRT variations.

**Keywords** : Wastewater Treatment Plants, Tetracycline Resistant Bacteria, Tetracycline, Resistant Genes, Tetracycline

### < 약자 명명법 >

PE: Primary Effluent (1차 침전지 유출수)

AS: Activated Sludge (활성 슬러지)

BD: Before Disinfection (소독전 2차 침전지 유출수)

AD: After Disinfection (소독 후 방류수)

TRG: Tetracycline Resistant Gene (테트라사이클린 내성유전자)

† Corresponding author : ub1905ub@korea.ac.kr

\* 정회원 · 고려대학교 환경시스템공학과 · 교수, E-mail : ub1905ub@korea.ac.kr

\*\* 비회원 · 고려대학교 환경기술정책연구소 · 연구교수, E-mail : cyccce2007@gamil.com

\*\*\* 정회원 · 공주대학교 건설환경공학부 · 교수, E-mail : leehyung@kongju.ac.kr

\*\*\*\* 비회원 · 컬럼비아대학교 지구환경공학과, E-mail : kc2288@columbia.edu

- TRBPE: Tetracycline Resistant Bacteria Concentration in Primary Effluent (1차 침전지 유출수내 테트라사이클린 내성균 농도, CFU/mL)
- TRBAS: Tetracycline Resistant Bacteria Concentration in Activated Sludge (활성 슬러지내 테트라사이클린 내성균 농도, CFU/mL)
- TRBBD: Tetracycline Resistant Bacteria Concentration in Before Disinfection (소독전 2차 침전지 유출수내 테트라사이클린 내성균 농도, CFU/mL)
- TRBAD: Tetracycline Resistant Bacteria Concentration in After Disinfection (소독 후 방류수내 테트라사이클린 내성균 농도, CFU/mL)
- TRBPEr: Tetracycline Resistant Bacteria Ratio in Primary Effluent (1차 침전지유출수내 테트라사이클린 내성균 분율, %)
- TRBASr: Tetracycline Resistant Bacteria Ratio in Activated Sludge (활성 슬러지내 테트라사이클린 내성균 분율, %)
- TRBBDr: Tetracycline Resistant Bacteria Ratio in Before Disinfection (소독전 2차 침전지 유출수내 테트라사이클린 내성균 분율, %)
- TRBADr: Tetracycline Resistant Bacteria Ratio in After Disinfection (소독 후 방류수내 테트라사이클린 내성균 분율, %)
- TRGPE: Tetracycline Resistant Gene Concentration in Primary Effluent (1차 침전지 유출수내 테트라사이클린 내성유전자 농도, copies/ $\mu$ L)
- TRGAS: Tetracycline Resistant Gene Concentration in Activated Sludge (활성슬러지내 테트라사이클린 내성유전자 농도, copies/ $\mu$ L)
- TRGBD: Tetracycline Resistant Gene Concentration in Before Disinfection (소독전 2차 침전지 유출수내 테트라사이클린 내성유전자 농도, copies/ $\mu$ L)
- TRGAD: Tetracycline Resistant Gene Concentration in After Disinfection (소독 후 방류수내 테트라사이클린 내성유전자 농도, copies/ $\mu$ L)
- TRGPEr: Tetracycline Resistant Gene Ratio in Primary Effluent (1차 침전지 유출수내 테트라사이클린 내성유전자 분율, %)
- TRGASr: Tetracycline Resistant Gene Ratio in Activated Sludge (활성 슬러지내 테트라사이클린 내성유전자 분율, %)
- TRGBDr: Tetracycline Resistant Gene Ratio in Before Disinfection (소독전 2차 침전지 유출수내 테트라사이클린 내성유전자 분율, %)
- TRGADr: Tetracycline Resistant Gene Ratio in After Disinfection (소독 후 방류수내 테트라사이클린 내성유전자 분율, %)
- TRB: Tetracycline Resistant Bacteria (테트라사이클린 내성균)

## 1. 서 론

최근 다제 내성 병원균(multi antibiotic resistant pathogen)에 의해 야기되는 공공보건의 위협은 발생된 지역의 국지적 수준의 문제뿐만 아니라 국제적인 문제로도 심화되고 있다. 최근의 예로, NDM-1형 카바페넴(Cabapenem) 내성 장내세균이 인도와 일본을 비롯한 6개국에서 발견

된 뒤 2010년 12월 한국에도 4명의 환자가 발생하였다(내일 신문, 2010). 이러한 다제 내성병원균의 급속한 확산은, 환경미생물내의 항생제 내성균의 증가에 의해 비롯된 것이 아닌가에 대한 우려를 불러일으키고 있다 (Knapp et al., 2010).

인간이 배출하는 하수에는 많은 항생제 내성균 및 유전자가 존재한다 (Auerbach et al., 2007; Iwane et al., 2001; Mezrioui and Baleux,

1994). 최근 논문에 의하면 (Auerbach et al., 2007), 유입하수에 조사된 10 종류의 테트라사이클린 항생제 내성유전자[tet(A),tet(B), tet(C), tet(D), tet(E), tet(G), tet(M), tet(O), tet(S), tet(Q)]중 대부분이 유출수에 검출되며 (약 7-9 종) UV 소독 공정하에서도 제거되지 않았다. 다른 연구에서도(Kim et al., 2007), 간헐식 반응조 (Sequencing Batch Reactor, SBR) 유출수내의 테트라사이클린 내성균의 농도는 여러 운전조건 하에서 약  $10^1$  에서  $10^2$  CFU/mL 정도의 농도가 지속적으로 검출 되었다. 따라서, 하수처리장은 궁극적으로 환경 내에서의 항생제 내성 저항병원균을 증가시키는 점오염원 역할을 할 가능성이 매우 크다. 테트라사이클린계 항생제는 1940년 이후로 사람과 가축에 전 세계적으로 널리 쓰인 항생제로 (Col and O'Connor, 1987), 환경 내에서 항생제 내성균을 관찰할 때 가장 대표적으로 연구 되는 항생제이다 (Kim et al, 2010; Auerbach et al., 2007; Kang et al., 2005).

일반적으로 하수처리장내 미생물군집의 형태는 처리장내 운전조건 변화에 따라 그 양상이 달라질 수 있다 (Molina-Muñoz et al., 2009; Metcalf and Eddy, 1991). 따라서, 하수처리장 운전조건은 항생제 내성균의 거동에도 영향을 줄 수 있는 잠재적 요소이며, 이전 lab-scale 연구에 의하면 처리시설 운전조건 변화에 따른 테트라사이클린 내성균의 거동변화가 통계학적으로 유의하게 관찰된 바 있다 (Kim et al., 2007). 그러나 실제 하

수처리장의 공간적 특성 및 운전 인자에 따른 항생제 내성균과 내성 유전자 거동에 관한 연구는 세계적으로 매우 드문 편이다.

본 연구의 목표는 테트라사이클린 내성특성(내성균 및 내성유전자)거동을 실제 세 곳의 하수처리장의 공간 특성, 운전특성과 연계하여 일반적 관계식이 도출될 수 있는지를 알아보는데 있다. 만약 일반화된 관계식이 이 연구를 통해 도출된다면 이는 향후 테트라사이클린 내성균 및 내성 유전자를 하수처리장에서 제어하는 기초자료로 활용 가능하리라 판단된다.

## 2. 연구방법

### 2.1. 하수처리장에서의 시료 채취

본 연구에서는 미국 뉴욕주와 커넥티컷주에 위치한 세 곳의 하수처리시설을 연구 대상으로 삼았다.(Plant Y, Plant S, Plant O) Plant Y 와 O의 경우, 유기물 제거가 목적으로 설계 운영 중이며, Plant S의 경우는 5단계 Bardenpho로 설계되어 질소제거에 초점을 맞춰 운영 중에 있다. 소독시설로 보았을 때, Plant Y는 염소 소독을, Plant S는 자외선 (UV), Plant O의 경우는 여름에만 염소소독을 실시하고 있다. 본 연구에서의 처리장 공간 특성자료(BOD, TSS, TN, Flow rate)및 운전자료(유량, HRT, SRT)는 각각 하수처리장에서 제공하는 실제 자료를 사용하였다. (Table 1)

Table 1. The summary of operating conditions in three wastewater treatment plants (WWTPs) during sampling campaigns.

Plant	Flow rate ( $\times 10^4$ m <sup>3</sup> /day)	TSS (mg/L)	BOD (mg/L)	TN (mg/L)	SRT (days)	MLSS (mg/L)	HRT (hrs)
Y	36.0 $\pm$ 7.3*	122 $\pm$ 28	90 $\pm$ 37	39 $\pm$ 11	2.0 $\pm$ 0.8	1943 $\pm$ 738	2.4 $\pm$ 0.4
S	6.8 $\pm$ 1.6	84 $\pm$ 11	115 $\pm$ 24	24 $\pm$ 4	23.1 $\pm$ 5.6	2615 $\pm$ 254	6.8 $\pm$ 1.5
O	2.1 $\pm$ 0.4	150 $\pm$ 52	122 $\pm$ 21	34 $\pm$ 7	1.7 $\pm$ 0.4	717 $\pm$ 131	3.4 $\pm$ 0.6

\* Average  $\pm$  Standard Deviation

시료채취는 2006년 12월부터 2007년 7월까지 진행되었으며, Plant Y 및 O의 경우 각 7회의 시료채취, Plant S의 경우 6회의 시료를 월 간격으로 채취하였다. 시료채취 장소는 1차 침전지 유출수(Primary Effluent, PE), 활성 슬러지(Activated Sludge, AS), 소독전 2차 침전 유출수(Before Disinfection, BD), 소독 후 방류수(After Disinfection, AD)에서 채취 하였다. Plant O의 경우 계절별 염소 소독을 실시하였기 때문에, 소독 후 방류수(AD)시료는 여름기간(6, 7월) 2번만 확보 되었다.

시료채취는 에탄올로 살균한 1L 용 Nalgene® HDPE 용기를 이용하여 무작위 샘플(grab sample)로 채취하였다. 시료는 채취 즉시 아이스박스에 보관하여 운반 과정 중에 변질을 최소화하였다. 실험실 도착 후 테트라사이클린 내성균 분석은 24 시간 안에 수행하였고, 테트라사이클린 내성 유전자 분석을 위한 시료내 고품질 채취는, 시료의 TSS 농도가 높은 경우(예, AS)에는 원심분리기 7000 rpm에서 5분간 돌려 채취하거나 TSS 농도가 낮은 경우(예, AD)에는 0.45 mm GF/C glass fiber filter (Millipore®, AnnArbor, MI)를 이용하여 고품질 시료를 채취 하였다. 이 후 분자 미생물 실험을 할 때까지 고품질 시료는 -80°C에서 냉동 보관 하였다.

## 2.2. 항생제 내성균 및 항생제 내성 유전자 검출

시료내에서 일반 미생물 및 테트라사이클린 내성균(Tetracycline Resistant Bacteria, TRB)을 검출하기 위해, 테트라사이클린이 포함되지 않았거나(0 mg/L), 테트라사이클린을 포함한(32 mg/L) R2A agar 플레이트를 준비하였다. 테트라사이클린을 함유한 플레이트에 자란 콜로니를 TRB로 여기고, 시료당 3개의 중복된 플레이트를 사용하여, 평균값(CFU/mL)으로 TRB 수치를 산정하였다. 테트라사이클린이 포함되지 않은 플레이트에서 자란 콜로니의 평균값을 일반 총미생물수로 여기고, 시료당 테트라사이클린 내성균주의 비율(%)

은 위에서 구한 테트라사이클린 내성균 평균값을 일반 미생물 평균값으로 나눠 100을 곱한 것으로 산정 하였다 (Kim et al., 2007). (식 1)

$$TRB \text{ 비율}(\%) = \frac{\text{테트라사이클린 내성균 평균값}(CFU/mL)}{\text{총미생물 평균값}(CFU/mL)} \times 100 \quad (\text{식 } 1)$$

테트라사이클린 내성유전자(Tetracycline Resistant Genes, TRG)는 현재 40개 이상 발견 되었는데(Roberts, 1996), 환경 내에서 많이 발견 되리라 예상되는 7개 테트라사이클린 유전자 [tet(A), tet(B), tet(C), tet(M), tet(O), tet(Q), tet(W)]를 문헌연구를 통해 선정하였다. (Auerbach et al., 2007, Roberts, 1996) 항생제 내성유전자를 산정하기 위해서 Quantitative Polymerase Chain Reaction 기법을 사용하였다. (qPCR) 총 DNA 추출은 상업적 kit (DNeasy Blood & Tissue kit, Qiagen, Irvine, CA)을 이용하였고, qPCR의 검량선 (standard curve)은 각 클론 된 TRG가 포함된 플라스미드를 연속 희석해 만들었다. TRG의 농도는 (copies/ml) (식 2)를 이용하여 산정하였다. 또한 각 샘플별로 총 미생물의 변화를 16S rDNA universal primer인 BACT1369F 와 PROK1492R를 이용하여 산정하였다.(Table 2) 본 qPCR 실험에 사용된 primer 에 관련된 정보는 (Table 2)에 나와 있다.

$$TRG \text{ 농도}(\text{copies}/\mu\text{L}) = 6.023 \times 10^{23} \times \left( \frac{\text{DNA plasmid 농도}}{(\text{Plasmid Size}) \times 660 \text{ g/mole/bp}} \right) \quad (\text{식 } 2)$$

TRB의 경우 연구기간동안의 수집된 모든 시료에 대해 실험을 하여 TRB 농도 및 비율값을 구하였고, TRG의 경우 7개의 TRG를 대상으로 조사한 관계로, 수집된 시료 중 계절별 변화가 뚜렷한 기간(2, 4, 7월)동안의 TRG농도 및 비율값을 구하였다. 본 연구에서 총 TRG 농도(copies/ micro L)라 함은 이 7가지 테트라사이클린 내성 유전자 농도의 총합을 의미한다. 이 7개의 TRG의 농도를

Table 2 : Primers for qPCR assays used to target TRG

Primer	Primer sequence	Annealing temperature (°C)	Reference
tet(A)f tet(A)r	GCTACATCCTGCTTGCCTTC CATAGATCGCCGTGAAGAGG	55	(Macovei and Zurek, 2006)
tet(B)f tet(B)r	TACGTGAATTTATTGCTTCGG ATACAGCATCCAAAGCGCAC	61	(Aminov et al., 2002)
tet(C)f tet(C)r	CTTGAGAGCCTTCAACCCAG ATGGTCGTCATCTACCTGCC	55	(Ng et al., 2001)
tet(M)f tet(M)r	GTGGACAAAGGTACAACGAG CGGTAAAGTTCGTCACACAC	55	(Ng et al., 2001)
tet(O)f tet(O)r	AACTTAGGCATTCTGGCTCAC TCCCACTGTTCCATATCGTCA	55	(Macovei and Zurek, 2006)
tet(Q)f tet(Q)r	AGAATCTGCTGTTTGCCAGTG CGGAGTGTC AATGATATTGCA	63	(Aminov et al., 2001)
tet(W)f tet(W)r	GAGAGCCTGCTATATGCCAGC GGGCGTATCCACAATGTTAAC	64	(Aminov et al., 2001)
BACT1369F PROK1492R	CGGTGAATACGTTTCYCGG GGWTACCTTGTTACGACTT	55	(Suzuki et al., 2000)

전부 합산한 값을 총 미생물의 농도를 16S rDNA 로 산정한 수치를 구해서 이를 나눠 구한 것을 TRG 비율(%)로 산정하였다. (식 3)

$$TRG \text{ 비율}(\%) = \frac{\text{합산된 총 TRG 농도}(\text{copies}/\mu\text{L})}{16S \text{ rDNA 농도}(\text{copies}/\mu\text{L})} \times 100 \quad (\text{식 } 3)$$

PCR 조건 등 실험에 대한 더욱 자세한 내용은 다른 연구논문에 기술하였다 (Kim et al., 2010).

### 2.3 통계 분석

본 연구에서 TRB 및 TRG에 대한 뚜렷한 시간적 변화에 따른(계절적 변화)특성은 없었기에 통계 분석은 공간 및 운전 특성값에 집중하였다. 하수처리장의 공간 및 운전 특성 값과 산정된 TRB 및 TRG 수치(농도와 비율)값들은 통계프로그램인 SPSS(Statistical Package for the Social Sciences) version 12.01에서 제공하는 주성분

분석(PCA)을 이용하여 분석되었다. 누적점유율 60%이상을 주성분공간의 차원수를 결정하는 인자로 결정하였는데(허명회 외 1인, 2001), 본 연구에서는 모든 경우에 제 1 (Component 1), 제2 (component 2)성분으로 누적점유율을 넘겨서, 모든 분석에서 2차원으로 표시 가능하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1 현장하수 처리장 내에서의 테트라사이클린 내성균과 테트라사이클린 내성 유전자 거동

본 연구에서는 약 7개월에 걸쳐 실제 3개 하수 처리장 반응 운전조(unit process)에서 테트라사이클린 내성균(TRB) 및 테트라사이클린 내성 유전자(TRG)의 거동을 연구하였다. 기존 연구를 간단히 정리하면 TRB는 물론 연구된 총 7개의 TRG 모두가 하수처리장 시설 내 유입, 슬러지, 유출수 모두에서 발견되었고 이중 리보솜 보호유전자인 tet(W)가 가장 하수처리장 단위

프로세스 내에서 가장 높은 농도로 발견되는 항생제 내성 유전물질이었다.

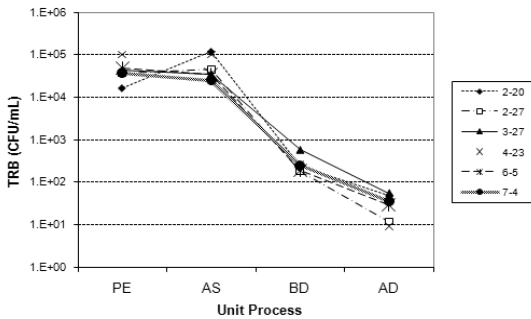


Fig. 1 The fate of tetracycline resistant bacteria (TRB, CFU/mL) in each unit process in Plant S.

Fig. 1은 Plant S의 반응조별 TRB의 농도 변화를 나타낸 것으로, 하수처리장의 각각의 반응조(PE, AS, BD, AD)를 거치면서 유입하수 대비 약

103 (CFU/mL) 정도의 TRB농도가 감소되는 것을 보여 주고 있다. 그림에서 보여 지는 바와 같이 TRB 농도는 1차침전지 유출수(PE)에서 높은 농도로 활성슬러지(AS)에 유입되어 그 농도가 유지되거나 조금 높게 나타나며, 2차 침전지를 거치고 난 2차침전지 유출수(BD)에서는 감소하게 됨을 알 수 있고 소독공정(AD) 후에 약 10배정도 감소하였다. 2차 침전지 유출수(BD)에서 TRB 농도가 급격히 감소되는 것은 슬러지 침전을 통한 감소가 큰 영향을 미치는 것으로 사료된다. 다른 나머지 두 개의 하수처리장에도 (Plant Y, Plant O), 이와 같은 경향으로 TRB 농도가 반응조를 따라 감소됨이 관찰되었다 [약 102 -103 배] (Table 3). 하나의 흥미로운 사실은 처리장별 TRB 농도변화 (Figure 1)에 비해 TRB 분율(%) (Table 3)의 변화는 처리장별로 다른 경향을 보였다.

Table 3. The summary of tetracycline resistant bacteria (TRB) and lumped tetracycline resistant genes (TRGs) in each unit process of WWTPs.

Plant		TRB ( $\times 10^4$ CFU/mL)				TRGs ( $\times 10^7$ Copies/micro L)			
		PE	AS	BD	AD	PE	AS	BD	AD
Y	value	6.5 $\pm 5.8^*$	20.7 $\pm 4.3$	0.4 $\pm 0.5$	0.01 $\pm 0.03$	259.6 $\pm 173.1$	353.2 $\pm 224.2$	4.1 $\pm 7.1$	2.7 $\pm 4.4$
	%	1.4 $\pm 1.0$	0.4 $\pm 0.3$	1.2 $\pm 1.5$	0.6 $\pm 0.8$	9.0 $\pm 5.9$	2.8 $\pm 1.5$	4.6 $\pm 2.4$	5.0 $\pm 3.7$
S	value	4.7 $\pm 2.9$	6.0 $\pm 3.9$	0.03 $\pm 0.02$	0.003 $\pm 0.002$	249.9 $\pm 277.3$	123.5 $\pm 829.5$	0.04 $\pm 0.01$	0.01 $\pm 0.009$
	%	1.2 $\pm 1.4$	0.2 $\pm 0.1$	0.2 $\pm 0.1$	2.6 $\pm 2.3$	11.5 $\pm 7.3$	1.6 $\pm 0.6$	1.9 $\pm 1.3$	1.0 $\pm 0.5$
O	value	7.6 $\pm 6.2$	17.8 $\pm 14.6$	0.3 $\pm 0.2$	0.002 $\pm 0.004$	219.1 $\pm 26.0$	207.9 $\pm 53.5$	0.40 $\pm 0.40$	0.5* $\pm 0.5$
	%	1.8 $\pm 2.7$	1.1 $\pm 1.0$	0.3 $\pm 1.2$	1.5 $\pm 1.9$	6.7 $\pm 0.2$	2.0 $\pm 0.7$	6.3 $\pm 3.7$	11.1* $\pm 3.7$

\* Average  $\pm$  Standard Deviation

TRG 농도도 하수처리장 반응조를 거치면서 약 102 - 104 배 정도 감소함을 알 수 있었다.(Table 3) 그러나, 어떤 소독 공정하에서도 (염소 소독이나 자외선 소독) 완전하게 테트라사이클린 내성균 및 내성 유전자를 제거 하지는 못하였고, 약 101 - 102 CFU/mL의 TRB 과 약

105 - 107 Copies/micro L의 TRG가 하수처리장 최종 유출수에서 검출되었다. 테트라사이클린 7개 각각의 내성 유전자 측정 결과에 대한 보다 자세한 자료는 이전 발표 논문에 기술되어 있다.(Kim et al., 2010)

Table 3에서 보면, 대체적으로 활성슬러지에서

는 TRB 및 TRG 분율(%)은 유입하수내의 분율(%)보다 감소하였으나, 2차 침전지유출수에서의 TRB 및 TRG 분율은 대부분 증가되는 경향(Plant O의 TRB 분율 제외)을 보여주었다. 이후, 소독 전후 TRB 및 TRG 분율 경향은 처리장 별로 다른 경향을 띄었다. 침전지에서의 TRB에 대한 연구는 세계적으로 무척 드문 편이다. 이에 대한 정확한 이유는 알 수 없으나 가능한 예상은, TRB 또는 TRG를 포함한 내성균은 총 미생물의 비해 침전이 잘되지 않거나 활성 슬러지내에서 내성유전자가 다른 미생물에게 전이되면서 내성 유전자를 받은 미생물이 좀 더 2차 침전지에서 우점 할 수도 있을거라 사료된다. 하지만 이는 단순한 예상일 뿐이며 추후 좀 더 면밀한 연구가 필요하다라고 사료된다. 처리장별로 소독 전후 TRB 및 TRG 분율 경향의 다른 경향은 소독 공정의 효과와 관련된다고 판단된다. 특히 자외선(UV) 소독 이후 TRB 분율이 증가 되는 경향이 발견되었는데 이는 이전의 연구결과와 비슷하다(Meckes, 1982). 기존의 연구에서는 플라스미드 내 항생제 내성유전자와 UV 내성유전자가 함께 존재하여, 플라스미드를 가진 항생제 내성균이 UV 노출에 상대적으로 살아남을 가능성이 커진 것으로 설명 되었다. 그러나 이에 대한 현상에 대해선 좀 더 추후 연구가 필요하다고 사료 된다.

### 3.2 하수처리장 특성과 테트라사이클린 내성균 및 내성유전자와의 관계

본 연구의 목적은 공간 및 운전특성이 다른 하수처리장에 따른 TRB 및 TRG 거동을 비교하는데 그 목적이 있다. 우선 하수처리장 특성에 따른 TRB 및 TRG와의 관계차이를 알아보기 위해 하수처리장 공간특성 (TSS, BOD, TN)과 운전조건(Flow rate, MLSS, SRT, HRT)을 처리장의 반응조별(PE, AS, BD, AD) TRB 농도 [TRBPE(1차 침전지 유출수), TRBAS(활성슬러지), TRBBD(소독전 2차 침전지 유출수), TRBAD(소독 후 방류수)] 및 분율(%) [TRBPEr, TRBASr, TRBBDr, TRBADr], 그리고 TRG 농도 [TRGPE(1차 침전

지 유출수), TRGAS(활성슬러지), TRGBD(소독전 2차 침전지 유출수), TRGAD(소독 후 방류수)] 및 분율(%) (TRGPEr, TRGASr, TRGBDr, TRGADr)을 PCA분석을 통해서 비교 분석하였다. (Fig. 2)

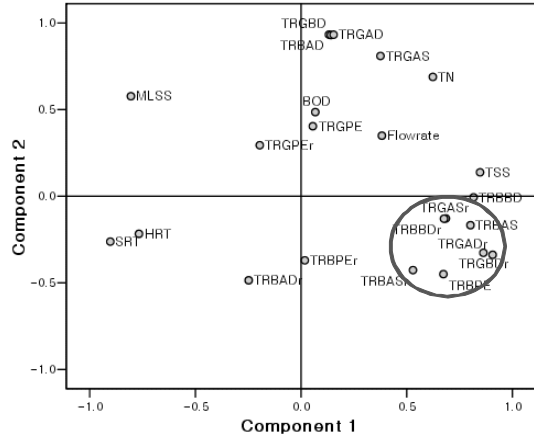


Fig. 2 PCA analysis for TRB and TRGs under various spatial character and operating conditions.

이 분석은 세 하수처리장 데이터를 전부 합쳐 분석한 것으로 다음과 같은 세 가지 경향성을 발견하였다. 첫째, 1차 침전지 유출수의 특성이 활성슬러지내 TRB 농도와 유입수내 TRG 농도에 영향을 끼치는 것으로 판단되었다. 1차 침전지 유출수내 TRB 농도(TRBPE), 활성슬러지내의 TRB 농도(TRBAS) 및 분율(TRBASr)이 상당한 연관성(원이 그려진 부분)을 가지는 것으로 분석 되었다. 또한 처리장 유입수의 특유의 성질(BOD, Flow rate)과 1차 침출수의 TRG의 농도(TRGPE)가 밀접한 관계가 있는 것으로 나타났다. (그림 윗부분) 즉 이는, 유입수의 오염물질 농도나 유입량이 증가하게 되면 유입수내 TRG 농도가 증가되는 경향이 있음을 의미한다. 이전연구에서 합성 폐수(TRB나 TRG가 포함되지 않은 폐수)를 지속적으로 주입한 lab-scale 활성 슬러지 반응조 내에서 TRB 분율이 점차 감소되는 경향이 관찰되었다. 또한 이러한 연구결과 및 현 PCA 결과를 유추해 볼 때, 실제 하수처리장에서의 활성슬러지내의

TRB 농도는 유입하수내의 TRB의 지속적인 주입에 의해 많은 영향을 받는 것으로 사료된다.

둘째, 하수처리장 운전 조건에서 중요한 인자인 SRT와 HRT가 TRB와 TRG 농도 및 분율과는 대칭의 관계를 가짐을 알 수 있다. 즉 테트라사이클린 내성의 증가와 SRT, 또는 HRT 증가와는 역비례관계가 될 수 있음을 암시한다. 보통 HRT와 SRT는 하수처리장내 중요 운전인자이며 이중 SRT가 더욱 중요한 운전인자로 취급 된다 (Metcalf and Eddy, 1999). 이전의 실험실 규모의 연구에서, SRT가 길게 운전 되는 경우 TRB 농도가 감소되는 경향이 있음을 통계적으로 밝힌 바 있다 (Kim et al., 2007). SRT와 반응조내 TRB 및 TRG 내성 특성을 직접 비교하기 위해서, 반응조를 거처기 전(TRBPE, TRGPE), 후 (TRBBD, TRGBD)의 항생제 내성균 및 유전자의 농도 그래프를 그려 보았다.(Fig. 3)

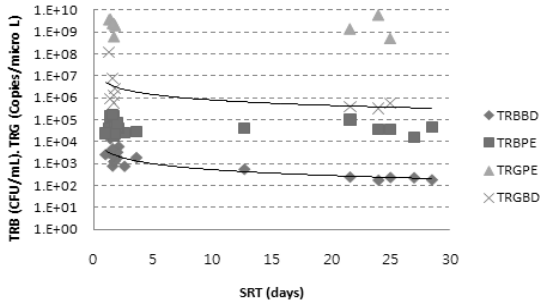


Fig. 3 The TRB and TRG concentration changes as a function of SRT.

그림에서 보여 지는 바와 같이, 각 하수처리장 별로 처리장별로 유입(1차 침전지 유출수)되는 TRB 및 TRG 농도가 비슷함에도 불구하고 (TRBPE, TRGPE), 활성슬러지 반응조의 SRT가 길 경우(> 20 days) 그렇지 않은 경우(< 5 days) 보다 TRB 및 TRG 농도가 10배 이상 더 감소함을 알 수 있었다. 이러한 결과는 위에서 보여준 PCA 분석결과해석과 일치하였다. 정확한 이유는 알 수 없으나 하수 내 항생제 내성균 중 대부분은 인간에서 비롯되었다는 가정을 할 수 있고, 이것

이 사실이라면 항생제 내성 중 장내 세균의 비율이 크다고 예상할 수 있다. 보통 SRT가 길어지면 장내 세균은 다른 미생물에 의한 포식활동이 커져서 제거가 가능해 지기에 (Maier et al., 1999) 이러한 영향이 아닌가 사료된다. 셋째, TRGBD와 TRGAD가 매우 밀접하게 있는 것으로 보아, 소독공정의 효과가 TRG 제거에 큰 영향을 주지 못하는 것으로 나타났다. 이전 연구에서도 UV 소독에 따른 TRG 제거가 효과적이지 못함이 보고되었다 (Auerbach et al., 2007). 추후 더 세밀한 소독공정 효율에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

처리장별 특성에 따른 TRB 연관성을 통계학적으로 분석하기 위해서 이번에는 처리장별 공간 및 운전특성과 TRB 농도와 분율에 대한 PCA분석을 실시하였다.(Fig. 4)

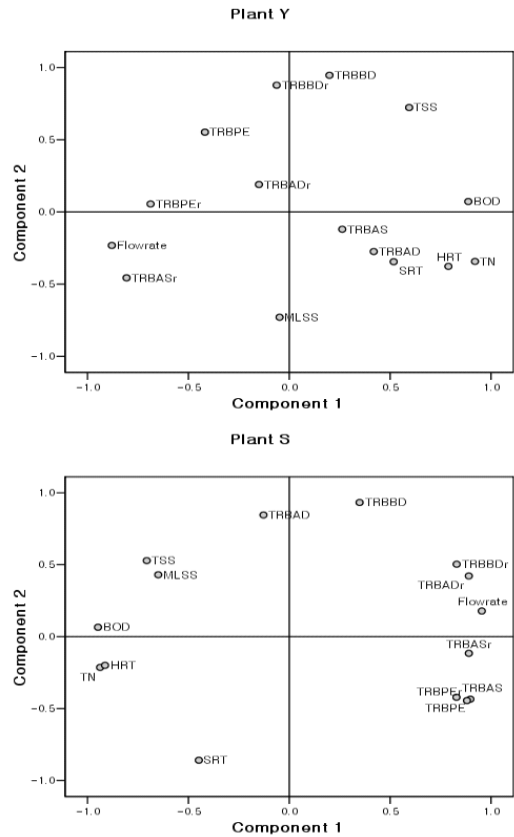


Fig. 4 PCA analysis between operating conditions and TRB in each WWTP.(continued)



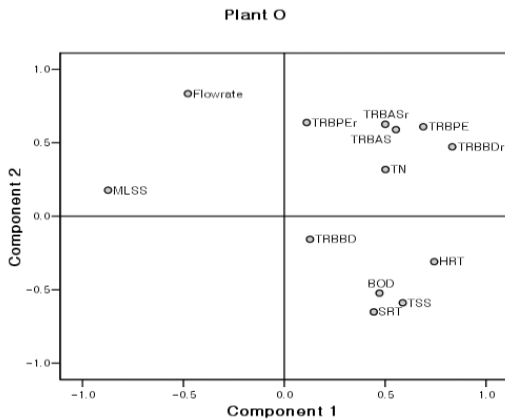


Fig. 4 PCA analysis between operating conditions and TRB in each WWTP.

[전술한 대로 TRG의 경우 각 처리장당 확보된 데이터수가 3개로 TRB에 비해(6-7개) 적어 PCA 분석 신뢰도가 떨어진다고 예상하여 분석에서 제외하였다.] 특히, 위에서 유추한 1차 침전지 유출수 및 활성슬러지 반응조에서의 테트라사이클린 내성균관계(TRBPE vs. TRBAS)에 초점을 맞추었다. 분석결과 Plant O와 S에서는 이 둘 인자간에 가장 밀접(가장 시각적으로 가까운 관계)한 관계를 보여주었으나, Plant Y에서는 큰 상관성이 없었다. 이는 TRB의 거동이 각 하수처리장 운전 특성에 따라 영향을 받게 됨을 암시하는 것이다.

이에 대한 정확한 이유는 알 수 없으나, Plant Y, S, O간의 가장 큰 차이는 하수처리장의 규모이다. Plant Y의 경우 하루 평균 약 35 만톤의 하수를 처리하고, Plant O와 S의 경우 각각 약 2 만톤과 7 만톤의 하수를 처리한다. 보통 소규모 하수처리장일수록 외부조건에 대해 민감하다고 알려져 있기에(Metcalf and Eddy, 1991), 규모가 작은 Plant S와 O의 경우, 1차 유입수에서의 TRB 농도에 대해 활성슬러지에서 TRB 농도상관성이 더 큰 것으로 판단된다. 그 외의 다른 운전관계간의 상관성은 시각적으로 고찰하기 어려웠다.

### 3.3 하수처리장에서의 테트라사이클린 내성균과 내성유전자와의 관계

환경으로 배출된 항생제 내성 유전자문제는 내성균보다 더욱 큰 공중보건학적 잠재적 위험성을 가지고 있다. 그 이유로는 첫째, 일단 수계로 배출된 내성유전물질은 다른 일반 미생물에게 전과되어 그 확산을 가중 시킬 수 있고, 둘째 항생제 내성 유전물질의 측정이 항생제 내성균의 측정보다 쉽지 않기 때문이다. 실제로, 잠재적 공중보건위험성을 가진 항생제 내성 유전자를 실제 하수처리장에서 분석하고 관리하기에는 현실적으로 분석의 숙련도나 비용 면에서 어려운 일이다. 그러나, 현재 선진국에서는 항생제 내성균을 차세대 오염물질로 간주하고 어떻게 수계에서 제어 할 것인가를 고민하는 시점에 와 있다. (Pruden et al., 2006)

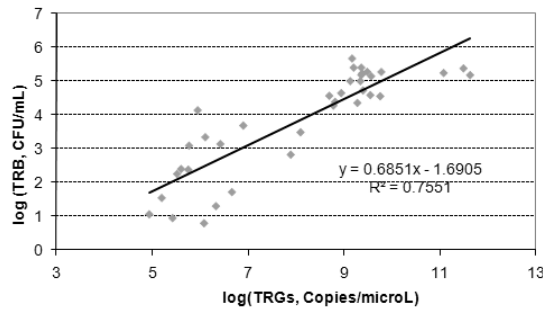


Fig. 5 TRB and TRGs correlation in investigated all samples

Fig. 5에서는 세 개 하수처리장 모든 샘플에서의 TRB 농도 (TRB, CFU/mL)를 로그(log)로 변환 시킨 것과 이에 대응하는 log의 총 TRG (TRG, copies/μL)의 상관관계를 그림으로 도식화한 것이다. 이를 보면 처리장 샘플내에서 TRB과 TRG가 선형 비례함을 알 수 있었다. 이러한 결과는 하수처리장내에 발견되는 TRB는 많은 부분의 경우 TRG를 가지고 있다는 것을 암시한다. 이는 본 연구에서 검출된 TRB들이 유전물질과는 무관한 자연내성 (Intrinsic resistance)이라기보다는 획득내성을 가진 TRB 일 수 있음을 예시한다. 전술한 것처럼, 하수내의 항생제 내성균은 주로 인간의 장내세균에서 비롯된 것으로 가정할 수 있다

면, 자연환경보다는 높은 농도의 항생제에 노출빈도가 빈번한 인간의 체내에서, 대부분의 장내 항생제내성균은 자연내성에 의한 내성보다는 항생제 내성 유전자를 획득하여 자신의 안전을 보장받으려는 획득형질의 성질을 가질 가능성이 높다 (Salyers et al., 2004).

#### 4. 결 론

- 1) 여러 복잡한 운전조건과 항생제 내성균간의 관계를 알기 위해서 다변량 자료분석의 기법의 하나인 주성분 분석 기법(PCA)이 사용되었고, 중요한 하수처리장 운전 조건인 SRT가 길수 TRB 및 TRG 제어가 좀 더 효율적일 수 있음이 본 연구를 통해 관찰되었다.
- 2) PCA분석 및 상관 관계 분석을 통해, 대체적으로 1차 침전 유입수가 활성슬러지내에 TRB 농도에 기여하는 바가 크고 규모가 작은 하수처리장 일수록 이러한 경향이 큼을 알 수 있었다.
- 3) 항생제 내성균 및 유전자는 차세대 오염물질로 여겨지는데, 하수처리장에서 항생제 내성균을 제어 하는 기법을 운전조건 및 공정조건과 연계 하는 연구가 지속적으로 필요하다고 사료된다.

#### 참 고 문 헌

1. 김성표 (2006). 생물학적 하수처리장에서 테트라사이클린 저항 세균의 거동. 한국물환경학회, 22(3), pp. 527-533.
2. 내일 신문, 다제내성균 환자 2명 추가 발견, 2010년 12월 14일자
3. <http://www.naeil.com/News/economy/ViewNews.asp?nnum=586144&sid=E&tid=4>
4. 허명희, 양경숙 SPSS 다변량자료분석, 한나래출판사, 2007
5. Aminov, R.I., Chee-Sanford, J.C., Garrigues, N., Teferedegne, B., Krapac, I.J., White, B.A., Mackie, R.I., 2002. *Development,*

*Validation, and Application of PCR Primers for Detection of Tetracycline Efflux Genes of Gram-Negative Bacteria.* Appl. Environ. Microbiol. 68, 1786-1793.

6. Aminov, R.I., Garrigues-Jeanjean, N., Mackie, R.I., 2001. *Molecular Ecology of Tetracycline Resistance: Development and Validation of Primers for Detection of Tetracycline Resistance Genes Encoding Ribosomal Protection Proteins.* Appl. Environ. Microbiol. 67, 22-32.
7. Auerbach, E. A., Seyfried, E. E., and McMahon, K. D. (2007). *Tetracycline resistance genes in activated sludge wastewater treatment plants.* Water Res. 41(5), pp. 1143-1151.
8. Col, N. F., and O'Connor, R. W. (1987). *Estimating world-wide current antibiotic usage: report of task force 1.* Rev. Infect. Dis., 9(S3), pp. S232-243.
9. Iwane, T., Urase, T., and Yamamoto, K. (2001). *Possible impact of treated wastewater discharge on incidence of antibiotic resistant bacteria in river water.* Water Sci. Technol., 43(2), pp. 91-99.
10. Kang, H., Jeong, Y., Oh, J., Tae, S., Choi, C., Moon, D., Lee, W., Lee, Y., Seol, S., Cho, D., and Lee, J. (2005). *Characterization of antimicrobial resistance and class 1 integrons found in Escherichia coli isolates from humans and animals in Korea.* J. Antimicrob. Chemother., 55(5), pp. 639-644.
11. Kim, S., Aga, D. S., Jensen J. N., and Weber, A., S. (2007). *Effect of sequencing batch reactor operation on presence and concentration of tetracycline-resistant organisms.* Water Environ. Res. 79(11), pp. 2287-2297.

12. Kim, S., Park, H., and Chandran, K. (2010). *Propensity of activated sludge to amplify or attenuate tetracycline resistance genes and tetracycline resistant bacteria: A mathematical modeling approach.* Chemosphere, 78(9), pp. 1071-1077.
  13. Knapp, C. W., Dolfing, J., Ehlert, P. A. I., and Graham, D. W. (2010). *Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940.* Environ. Sci. Technol. 44(2), pp. 580-587.
  14. Macovei, L., Zurek, L., 2006. *Ecology of Antibiotic Resistance Genes: Characterization of Enterococci from Houseflies Collected in Food Settings.* Appl. Environ. Microbiol. 72, 4028-4035.
  15. Maier, R. M., Pepper, I. L., Gerba, C. P. (1999) *Environmental Microbiology*, Academic Press.
  16. Meckes, M.C., (1982). *Effect of UV light disinfection on antibiotic-resistant coliforms in wastewater effluents.* Appl. Environ. Microbiol. 43, 371-377.
  17. Metcalf and Eddy. (1991). *Wastewater Engineering, 3rd Ed.*, McGraw-Hill.
  18. Mezrioui, N., and Baleux, B. (1994). *Resistance patterns of E. coli strains isolated from domestic sewage before and after treatment in both aerobic lagoon and activated sludge.* Water Res., 28(11), pp. 2399-2406.
  19. Molina-Muñoz, M., Poyatos, J. M, Sánchez-Peinado, M., Hontoria, E., González-López, J., Rodelas, B. (2009). *Microbial community structure and dynamics in a pilot-scale submerged membrane bioreactor aerobically treating domestic wastewater under real operation conditions* Sci. Total. Environ. 407(13), pp. 3994-4003.
  20. Ng, L.K., Martin, I., Alfa, M., Mulvey, M., 2001. *Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes.* Mol. Cell. Probes 15, 209-215.
  21. Pruden, A., Pei, R., Storteboom, H., and Carlson, K. H. (2006). *Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in Northern Colorado* Environ. Sci. Technol. 40(23), pp. 7445-7450.
  22. Roberts, M. (1996). *Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution.* FEMS Microbiol. Rev. 19(1), pp. 1-24.
  23. Salyers, A.A., Gupta, A., Wang, Y., 2004. *Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes.* Trends Microbiol. 12, 412-416.
  24. Suzuki, M.T., Taylor, L.T., DeLong, E.F., 2000. *Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 5'-nuclease assays* Appl. Environ. Microbiol. 66, 4605-4614.
- 논문접수일 : 11년 03월 18일  
○심사의뢰일 : 11년 03월 22일  
○심사완료일 : 11년 04월 25일