Korean Journal of Environmental Agriculture

Korean J Environ Agric. 2014;33(4):409-413. Korean
Published online 2014 November 12. http://dx.doi.org/10.5338/KJEA.2014.33.4.409

Online ISSN: 2233-4173
Print ISSN: 1225-3537

Short Communication

Open Access

가축분 퇴비 시용 농경지 내 Tetracyclines 내성균 분포 특성

김송엽,[1] 김장환,[1] 김성철,[2] 이용복[3*]

[1]경상대학교 응용생명과학부, [2]충남대학교 농업생명과학대학 생물환경화학과, [3]경상대학교 생명과학연구원

Occurrence of Tetracyclines Resistant Bacteria in the Soil Applied with Livestock Manure Compost

Song-Yeob Kim,[1] Jang Hwan Kim,[1] Sung Chul Kim[2] and Yong-Bok Lee[3*] ([1]Division of Applied Life Science (BK21plus program), [2]Department of Bio Environmental Chemistry, Chungnam National University, Daejeon, 305-764, Korea, [3]Research Institute of Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea)

Received: 24 October 2014 / Revised: 6 November 2014 / Accepted: 12 November 2014
Copyright ⓒ 2014 The Korean Society of Environmental Agriculture
This is an Open-Access article 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.

Abstract

BACKGROUND: Large amount of veterinary antibiotics have been used in the livestock industry to prevent diseases and promote growth. These antibiotics are excreted through feces and urine in unchanged form and reach to agricultural fields via application of the livestock manure based composts. The purpose of this study was to evaluate the occurrence of tetracyclines-resistant bacteria in the soil received livestock manure compost for a long term.
METHODS AND RESULTS: Tetracyclines (tetracycline TC, chlortetracycline CTC, and oxytetracycline OTC) resistance bacteria in the soil of rice-onion field applied pig manure compost (PM), in the soil of grass-rye field received cow manure compost (CM), and in the soil of rice field applied inorganic fertilizer (NPK) were determined. The soil received livestock manure composts clearly showed higher number of TC, CTC, and OTC resistance bacteria compared with the soil treated with inorganic fertilizer. The antibiotic resistant bacteria recovered appeared at 80 mg/L of tetracyclines was identified 1 specie, 6 genera 7 species, and 6 genera 7species in the soils received CM, PM, and NPK, respectively. The dominant resistant bacteria with the CM and PM application were *Ochrobactrum* and *Rhodococcus*.
CONCLUSION: The application of livestock manure compost in the agricultural field is likely to contribute the occurrence of antibiotic resistance bacteria in the agricultural environment.

Key words: Livestock manure compost, Soil, Tetracyclines

*교신저자(corresponding author): Yong-Bok Lee
Phone: +82-55-772-1967; Fax: +82-55-772-1969;
E-mail: yblee@gnu.ac.kr

서 론

항생제는 인간과 동물의 병 치료 목적으로 개발되어 이용되고 있다. 특히 축산 분야에서 항생물질은 가축의 질병 치료 목적 이외에도 생육촉진을 위해 다량 사용되어 왔다(Seo *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2009). 국내의 항생물질 계열별 사용량은 Tetracycline계열이 연간 700여 톤으로 전체 사용량인 1368톤의 약 50%를 차지하고 있어, 가장 많이 사용되는 것으로 나타났고, 이외에 Sulfonamide 및 Penicillin계열이 많이 사용되고 있다. Tetracycline 계열 중에서는 Oxytetracycline과 Chlortetracycline이 가장 많이 사용되는 것으로 보고되고 있다(식품의약품안전청, 2005).

동물에 투여 되는 항생제는 모두 이용되지 못하고 상당량

이 분뇨의 형태로 배출된다. Seo 등(2007)에 의하면 동물에 투여된 Penicillins 및 Tetracyclines 항생제의 30-60% 및 70-80%가 체외로 배출되는 것으로 보고하였다. 현재 국내에서 생성되는 가축분뇨(우분, 돈분, 계분)는 약 3천 6백만톤으로 이중 약 85%가 자원화 과정을 거쳐서 농경지에 투입되고 있다(RDA, 2007). 가축분뇨에 포함된 항생제는 자원화 과정에서 상당량 제거되는 것으로 알려져 있지만 가축분뇨의 종류와 자원화 조건에 따라서 상이한 결과를 보이고 있다. 예를 들면 계분의 경우 42일간 호기적 퇴비화 조건에서 Chlortetracycline (CTC)은 92.6%가 제거되고, 동일 조건에서 돈분의 경우 27.3%가 제거 된다고 보고하였다 (Bao *et al.*, 2009). 2010년 국내 가축분 퇴비를 포함한 유기성 농자재 생산량은 3,908천톤으로 우리나라에서 약 2.2 Mg/ha 가 사용된 것으로 추정할 수 있다 (농협, 2012). 따라서 우리나라 농경지에 가축분 퇴비를 통한 항생물질의 이입 가능성은 대단히 높을 것으로 예측된다.

최근 항생물질의 농경지 이입에 의한 내성균의 출현에 대한 우려의 관심이 고조되고 있다. 농경지 항생물질 내성균 출현율과 토양중 항생물질의 양은 고도의 정의 상관관계를 보이고 (Luo *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2012), 항생물질 내성균 유전자는 인간 병원균으로 전이 될 가능성이 높기 때문에 항생제를 새로운 오염물질로 구분하였다 (Pruden *et al.*, 2006; Shah *et al.*, 2012). 농경지내 항생물질에 관한 연구는 항생물질의 농도 그리고 식물전이 등에 관한 연구가 일부 수행되었다(Xuede *et al.*, 2013). 그러나 농경지내 항생물질의 내성균에 관한 연구는 이루지지 못하고 있다. 이에 본 연구는 국내에서 가장 많이 사용되어지고 있는 Tetracycline (TC), Chlortetracycline (CTC), Oxytetracycline (OTC)을 대상으로 가축분퇴비 장기연용 농경지와 자연계 토양의 항생물질 내성균 분포 특성을 비교 분석 하였다.

재료 및 방법

시료 채취

항생물질 내성균 분포 특성 조사를 위한 토양은 가축분 퇴비의 종류와 영농방법에 따라서 3군데에서 채취하여 사용하였다(Table 1). 가축분 퇴비를 전혀 시용하지 않은 대조 토양은 지난 45년간 무기질 비료만을 시비한 논토양 (NPK)을 채취하였다. 그리고 우분퇴비를 약 5년간 시용하면서 grass-rye를 재배한 토양(CM) 논에서 돈분 퇴비를 약 10년간 시용하여 양파와 벼를 윤작한 토양(PM)을 선발하였다. 본 시험을 위해서 선발된 토양의 이화학적 특성은 Table 2와 같으며 토양의 이화학적 특성은 농촌진흥청 표준 분석법에 준하여 실시하였다(NIAST, 2000).

항생물질 내성균 배양 및 동정

항생물질 내성균의 밀도 조사는 도말 희석법을 이용하였다. 토양 1 g을 9 mL 멸균수에 현탁하여 TC, CTC, OTC 항생제가 각각 0, 20, 40, 80 mg/L 이 포함된 Lysogeny Broth(LB) 배지에 10^2-10^6 까지 희석 도말하였다. 도말 후 배지는 건조를 방지하기 위하여 밀봉하여 28℃에서 24시간 배양 후 개체수를 조사하였으며, 모든 시험은 3반복으로 수행하였다. 항생물질 내성균의 저항성율은 무항생제 배지에서 자란 총 CFU/g에 대한 세가지 항생제 각각의 농도에서 자란 CFU/g의 백분율로 계산하였다 (Gao *et al.*, 2012).

세 가지 항생물질에 대한 내성균의 동정은 세 가지 항생제가 각각 40 mg/L 포함된 LB 배지에 형성된 콜로니를 50개씩을 무작위 선택하여 MALDI-TOF (Bio Typer, Bruker, Germany)를 이용하였다. MALDI-TOF를 이용한 항생제 내성균 동정의 방법을 요약하면 다음과 같다. 먼저 동정하고자 하는 내성균의 콜로니를 멸균수 300 μL와 함께 E-tube에 넣고 1분 이상 vortexing한 다음 순수 에탄올 900μL를 더 첨가하여 3-5분 vortexing한다. 그다음 E-tube를 13000rpm으로 5분간 원심 분리하여 상층 액을 제거한 후 가라앉은 침전물을 실온에 3분정도 말렸다가 사용하는데, 앞의 과정을 실험효율을 높이기 위해 3번 반복한다. 이렇게 얻어진 샘플에 20μ

Table 1. Brief description of soils used in this study

Identification	Soil collection location	Crop	Agricultural Practice
NPK	Paddy soil	Rice	Only chemical fertilizer application during last 45 years
CM	Upland soil	Grass-Rye	30 Mg/ha/year of cow manure compost application during last 5 years
PM	Paddy soil	Rice - Onion	20-30 Mg/ha/year of pig manure compost application during last 10 years

Table 2. Chemical and physical properties of the soil selected for study

Site	pH (1:5)	T-C (g/kg)	T-N (g/kg)	Av.P_2O_5 (mg/kg)	Ex.-cations ($cmol^+$/kg)			Soil Texture
					K	Ca	Mg	
NPK	5.6	17.8	3.5	31.7	0.1	5.5	1.2	SiCL
CM	5.7	14.8	2.8	77.2	0.4	3.9	1.4	SCL
PM	6.7	39.8	8.7	199.9	1.2	9.9	2.7	SL

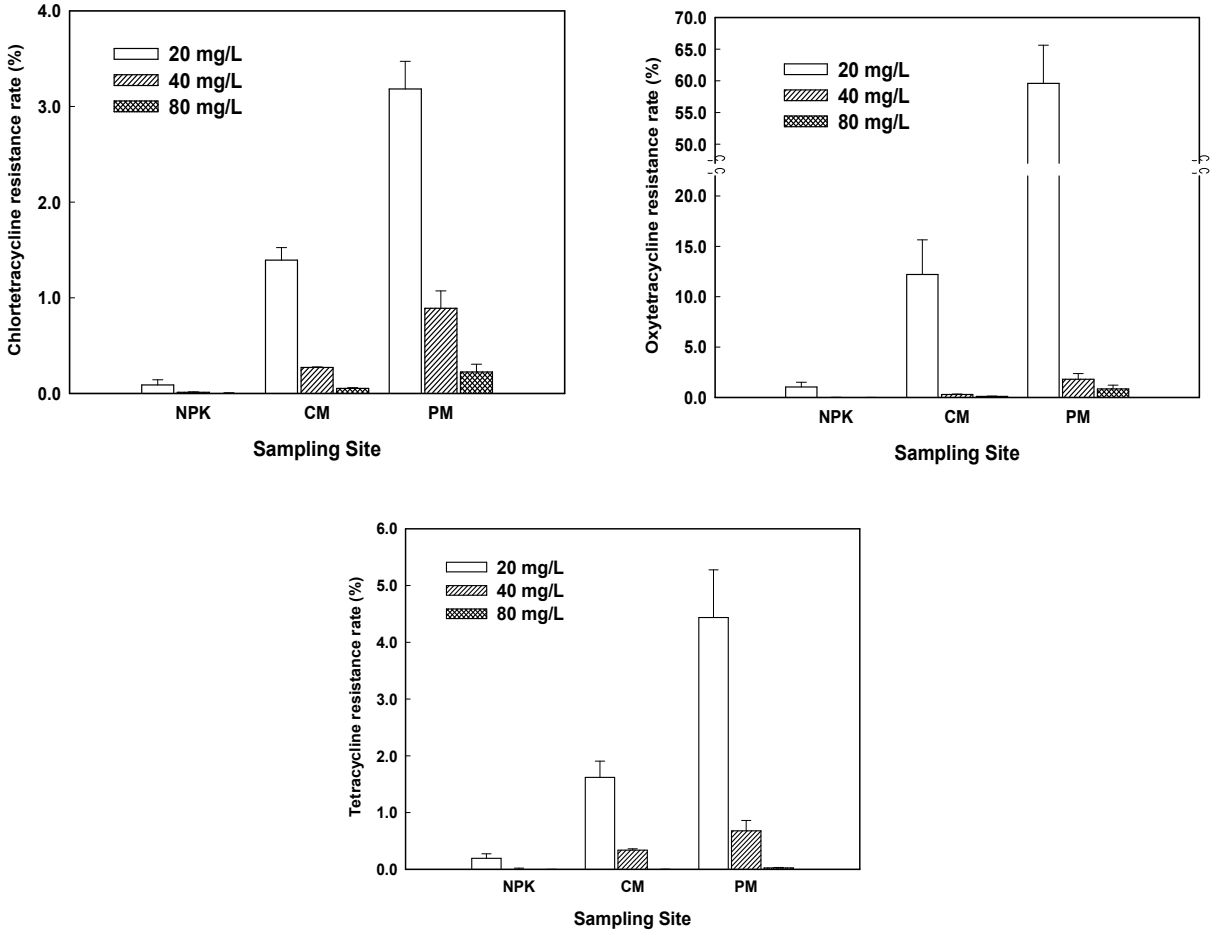

Fig. 1. Resistance rates of bacteria at different concentration of tetracycline, oxytetracycline, and chlortetracycline in soil sample. Antibiotics resistance rates calculated as the CFU/g of bacteria that grew on antibiotic plates divided by the CFU/g of bacteria that grew on plate containing no antibiotics.

L의 70% formic acid를 첨가하여 vortexing 한 후 다시 20 μL acetonitrile을 첨가하여 vortexing한다. 만들어진 샘플을 13,000rpm에서 2분 동안 원심분리 한 후 샘플 플레이트에 1 μL를 정해진 부분에 정확히 떨어뜨려 준다. 마지막으로 건조시킨 샘플 플레이트 위에 matrix solution을 1 μL 떨어뜨린 후 건조시켜 사용한다. MALDI-TOF를 이용한 미생물 동정은 score 값을 이용하여 동정하며 score 값이 2.0 이상은 신뢰성 있는 종(species) 동정이 가능하며, score 값이 1.70-1.90은 신뢰성 있는 속 (genus) 동정이 가능하다(van Veen *et al.*, 2010)

결과 및 고찰

가축분 퇴비 시용에 의한 항생물질 내성균 분포 특성토양 채취 지점별 총 균수는 NPK, CM, PM에서 각각 2.20×10^5 CFU/g, 8.20×10^5 CFU/g, 2.21×10^6 CFU/g 순으로 나타났다. 본 연구에서 농경지 토양의 항생물질 내성균 출현율은 가축분의 종류와 항생물질의 종류에 따라서 상당한 차이를 보였다 (Fig 1.). 장기간(45년 이상) 무기질 비료만 시용한 NPK에서 TC, OTC, CTC의 20 mg/L 농도에서 내성균 출현율은 각각 0.19, 1.03, 0.08%로 나타났으며, 40, 80 mg/L 농도에서는 내성균 출현이 확인되지 않았다. 이는 중국 농경지 토양의 TC 20 mg/L 에서 내성균 출현율 1.0-10% 보다 낮은 수준이며 (Chen *et al.*, 2014), 양식장 퇴적토의 TC 동일농도의 0.1% 이하보다는 높은 수준이다 (Gao *et al.*, 2012). 가축분 퇴비 종류에 따른 항생물질 내성균 출현율은 돈분퇴비에서 우분퇴비보다 높게 나타났다. 특히, 우분퇴비의 경우 세 가지 항생물질 80 mg/L 농도에서는 항생물질 내성균 출현이 거의 관찰되지 않았지만 돈분퇴비의 경우 80 mg/L 에서도 내성균 출현이 확인되었다. 그리고 세 가지 항생물질 중에서 OTC의 내성균 출현율이 TC 와 CTC에 비해 대단히 높은 것으로 확인되었다. 예를 들면, 돈분퇴비 시용지의 TC, CTC, 및 OTC 20 mg/L 농도에서 내성균 출현율은 각각 4.4, 3.2 및 59.5%, 그리고 우분퇴비의 경우 1.6, 1.4 및 12.2% 이었다. Chen 등(2014)은 폐수처리장의 폐수 유입 농경지의 OTC 와 TC 내성균 최대 출현율이 21, 35% 으로 나

Table 3. Species composition of tetracyclines resistance bacteria (recovered from 80 mg/L plates) in soil samples

Site	Tetracycline		Chlortetracycline		Oxytetracycline	
	Closest species	Score†	Closest species	Score	Closest species	Score
NPK					*Arthrobacter Oxydans*	1.98
CM	*Solibacillus silvestris*	2.11	*Ochrobactrum tritici*	2.124	*Acidovorax temperans*	2.341
	Streptomyces violaceoruber	1.85	*Ochrobactrum tritici*	2.356	*Lysinibacillus fusiformis*	1.788
			Ochrobactrum tritici	2.295	*Ochrobactrum* sp.	2.184
			Ochrobactrum sp.	2.349	*Ochrobactrum tritici*	2.063
			Ochrobactrum sp.	2.208		
			Ochrobactrum sp.	2.078		
			Ochrobactrum sp.	2.180		
			Serratia marcescens	2.511		
PM	*Lysinibacillus fusiformis*	2.14	*Ochrobactrum intermedium*	2.135	*Bacillius cereus*	1.844
	Ochrobactrum tritici	2.35		2.258	*Acidovorax temperans*	1.754
	Rhodococcus rhodochrous	2.36	*Nocardia nova*	2.30		
	Rhodococcus rhodochrous	2.37				
	Rhodococcus rhodochrous					

†Score of ≥ 2.0 indicated species identification; 1.7-1.9 indicated genus identification; <1.7 indicated no reliable identification (van Veen *et al.*, 2010).

타났으며, Negreanu 등(2012)은 폐수 유입농경지 TC 내성균 출현율은 5%로 보고 하였다. Gao 등(2012)은 양식장 퇴적토에서 TC 20 mg/L 농도에서 내성균 출현율은 0.1% 미만인 반면 Sulfamethoxazole 50 mg/L에서 내성균 출현율은 약 60%로 보고 하였으며, 이와 같은 차이는 양식장에서 사용되는 항생제 양이 TC (7.5 g/1000kg feed) 보다는 Sulfamethoxazole (60-100g/1000kg feed) 이 훨씬 많아 세균에 대한 항생물질의 노출빈도가 높기때문인 것으로 설명하였다. 따라서 본 연구에서 가축분 퇴비의 종류에 관계없이 OTC에 대한 내성균 출현율이 TC, CTC에 보다 높은 것은 2011년 OTC 판매량(한국동물약품협회, 2012)이 201톤인 반면 CTC는 약 95톤으로 항생물질 사용량에 따른 노출 빈도 차이에서 기인된 것으로 추정된다.

가축분 퇴비시용에 의한 항생물질 내성균 동정

가축분퇴비 시용에 의한 농경지 내 tetracycline 계열 항생물질의 내성균 동정 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다. 45년간 가축분 퇴비를 전혀 사용하지 않은 NPK 에서는 OTC 내성균 *Arthrobacter Oxydans* 만이 동정되었으며, 이는 우분 및 돈분퇴비 시용 농경지에서는 관찰되지 않았다. 그리고 우분퇴비 시용 농경지(CM)에서 세 가지 tetracycline 에 대한 내성균은 6 속 7 종이 동정되었고, 돈분퇴비 시용 농경지(PM)에서는 6속 7 종이 동정되었다. 우분퇴비 시용 농경지의 우점 내성균은 *Ochrobactrum tritici* 이었으며, 돈분퇴비 시용농경지의 우점 내성균은 *Rhodococcus rhodochrous* 로 동정되었으며, 이 속은 우분퇴비 시용 농경지에서는 관찰되지 않았다. *Ochrobactrum tritici* 는 밀의 근권 부생균으로 처음 보고 되어 농경지에 많이 분포하고 있으며, *Ochrobactrum* 속은 pyrethroids 와 같은 많은 유기성 오염물질의 생분해 미생물로 보고되어 항생물질의 생분해와 연관성이 있는 것으로 예측된다. (Zhang *et al.*, 2006; Yuan *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2011). 본 연구에서 동정된 *Lnibacillus*, *Bacillius* 속은 양식장 퇴적토의 TC 내성균으로 보고되었다 (Gao *et al.*, 2012). 중국의 양식장 퇴적토의 TC 내성균의 군집구조는 양식대상 물고기와 양식장의 위치, 그리고 항생물질 사용 내역에 따라 큰 차이를 보인다고 보고하고 있다 (Dang *et al.*, 2007). 결과적으로 본 연구에서 가축분 퇴비 시용 유무와 가축분의 종류에 따라서 다르게 나타난 내성균의 종류는 영농방법과 가축분퇴비 투입에 의한 항생물질 투입량과 종류의 차이에서 기인된 것으로 생각된다.

Acknowledgment

This study was supported by Rural Development Administration, Republic of Korea (Project No. PJ906961).

References

Bao, Y., Zhou, Q., Guan, L., Wang, Y., 2009. Depletion of chlortetracycline during composting of aged and spiked manures, *Chemosphere* 40, 751-757.

Chen, C., Li, J., Chen, P., Ding, R., Zhang, P., Li, X., 2014. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistances in soils from wastewater irrigation areas in Beijing and Tianjin, China, *Environ. Pollution* 193, 94-101.

Dang, H., Zhang, X., Song, L., Chang, Y., Yang, G., 2007.

Molecular determination of oxytetracycline-resistant bacteria ad their resistance genes from mariculture environment of China, *J. Applied Microbiology* 103, 2580-2592.

Gao, P.P., Mao, D.Q., Luo, Y., Wang, L.M., Xu, B.J., Xu, L., 2012. Occureence of sulfonamide and tetracycline-resistant bacteria and resistance genes in aquaculture environment, *Water Res.* 2355-2365.

Lee, H.Y., Lim, J.E., Kwon, O.K., Kim, S.C., Yang, J.E., Ok, Y.S., 2009. Removal of antibiotics in soil and water: a literature review, *J. Agric. Life Sci.* 20, 45-54.

Luo, Y., Mao, D.Q., Rysz, M., Zhou, Q., Zhang, H., Xu, L., 2010. Trends in antibiotic resistance genes occurrence in the Haihe River, China. *Environ. Sci. Technol.* 44, 7220-7225.

Negreanu, Y., Pasternak, Z., Jurkevitch, E., Cytryn, E., 2012. Impact of treated wastewater irrigation on antibiotic resistance in agricultural soils, *Environ. Sci. Technol.* 46, 4800-4808

Pruden, A., Pei, R., Storteboom, H., Carlson, K., 2006. Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in northern Colorado, *Environ. Sci. Technol.* 40, 7445-7450

Seo, Y.H., Choi, J.K., Kim, S.K., Min, H.K., Jung, Y.S., 2007. Priortizing environmental risks of veterinary antibiotics based on the use and the potential to reach environment, *Korean J. Soil Sci. Fert.* 40, 43-50.

Shah S.Q.A., Colquhoun, D.J., Nikuli, H.L., Sorum, H., 2012. Prevalence of antibiotic resistance genes in the bacterial flora of integrated fish farming environments of Pakistan and Tanzania, *Environ. Sci. Technol.* 46, 8672-8679.

Van Veen, S.Q., Claas, E.C.J., Kuijper, E.J., 2010. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories, *J. Clin. Microbiol.* 48, 900-907.

Wang, B.Z., Ma, Y., Zhou, W.Y., Zheng, J.W., Zhu, J.C., He, J., Li, S.P., 2011. Biodegradation of synthetic pyrethroids by *Ochrobactrum tritici* strain pyd-1, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27, 2315-2324.

Xuede, L., Hongxia, Y., Shanshan, X., Rimao, Hua., 2013. Uptake of three sulfonamides from contaminated soil by pakchoi cabbage, *Ecotoxicology and Environmental safety* 92, 297-302.

Yuan, Y.J., Lu, Z.X., Huang, L.J., Li, Y., Lu, F.X., Bie, X.M., Teng, Y.Q., Lin Q., 2007. Biodegradation of nicotine from tobacco waste extract by *Ochrobactrum intermedium* DN2, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34, 567-570.

Zhang, X.H., Zhang, G.S., Zhang, Z.H., Xu, J.H., Li, S.P., 2006. Isolation and characterization of a dichlorvos-degrading strain DDV-1 of *Ochrobactrum* sp., *Pedospher* 16, 64-71.