

단 보

## 국내 하천에 분포하는 ampicillin 내성균의 다양성

고은별<sup>1</sup> · 정인영<sup>2</sup> · 김혁<sup>2</sup> · 석광설<sup>2</sup> · 김벼리<sup>1</sup> · 유용재<sup>1</sup> · 장예진<sup>1</sup> · 채종찬<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>전북대학교 생명공학부 및 환경생명기술연구소, <sup>2</sup>국립환경과학원 화학물질연구과

## Diversity of ampicillin resistant bacteria in domestic streams

Eun Byeul Go<sup>1</sup>, In-Young Chung<sup>2</sup>, Hyuk Kim<sup>2</sup>, Kwang-Seol Seok<sup>2</sup>, Byeori Kim<sup>1</sup>, Yong-Jae Yoo<sup>1</sup>, Yejin Jang<sup>1</sup>, and Jong-Chan Chae<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Division of Biotechnology and Advanced Institute of Environmental and Bioscience, Chonbuk National University, Iksan 54596, Republic of Korea

<sup>2</sup>Chemicals Research Division, Environmental Health Research Department, National Institute of Environmental Research Complex, Incheon 22689, Republic of Korea

(Received December 15, 2015; Accepted December 18, 2015)

**ABSTRACT:** The widespread emergence of antibiotic resistant microorganisms in clinics and natural environments has attracted public concern. Especially, microorganisms inhabiting natural environment is considered as a source responsible for increasing the abundance of antibiotic resistant genes in ecosystem. In this study, the diversity of culturable bacteria resistant to ampicillin was investigated with water samples collected from seven locations in Korea. The genera belonging to *Aeromonas* and *Acidovorax* were dominant among the isolated 498 strains. The 66% of isolates showed multi-drug resistance against more than six antibiotics among tested fourteen ones and isolates resistant to seven antibiotics were the most prevalent with 19.7% abundance. Using the antibiotics susceptibility results, the intrinsic resistance profile was suggested for the most dominant genera, *Aeromonas*, *Acidovorax*, *Pseudomonas*, and *Elizabethkingia*.

**Key words:** ampicillin, multi-drug resistance, prevalence

항생제는 penicillin이 처음 발견된 이후, 3,000여 종 이상의 다양한 항생제가 개발되었고, 병원에서 환자를 치료하는 목적 이외에도 가축의 성장촉진이나 질병치료를 위해 사료에 첨가하는 등 광범위하게 사용되고 있다(Oh and Park, 2009). 우리나라의 경우, 2006년부터 의료기관별 항생제 처방률이 공개되고, 2011년부터 동물용 항생제에 대한 규제가 실시되면서 항생제 사용량이 감소하였으나 여전히 다른 OECD 국가들에 비해 항생제 사용량이 상대적으로 높은 수준이다(Kim *et al.*, 2010). 과도한 양의 항생제가 투여된 인체나 동물들에게서 배출되는 분뇨의 경우, 30-90%가 분뇨에 잔류하며 특히 동물의 경우 분뇨에 포함된 항생제가 분해되지 않고 잔류함으로써 주변 환경 오염을 유발하고 있다(Kwon *et al.*, 2012). 우리나라에서 사용량이 많은 tetracycline계열 항생제와 sulfonamide 항생

제를 대상으로 한 환경 중 이동성 실험에서 tetracycline 계열 항생제는 토양에 흡착되어 잔류하는 성질을 띠고, sulfonamide 계열 항생제는 쉽게 지표수로 이동하여 잔류하는 것으로 보고된 바 있다(Oh and Park, 2009).

다제내성세균의 경우, 1961년 영국에서 최초의 MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)가 보고된 이래로 1980년대부터 국내에서도 검출되기 시작했으며, 이외에도 VRSA (vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*), VRE (vancomycin-resistant enterococci) 등이 있으며 국내에서는 법정감염병으로 지정되어 있다(Lee, 2011; Yoon, 2014). 또한 penicillin과 cephalosporin 등의 항생제를 동시에 불활성화시키는 ESBL (extended-spectrum  $\beta$ -lactamase)을 생성하는 균주가 증가하여 국제적으로 문제가 되고 있다(Livermore, 2012; Tang *et al.*, 2014).

자연 환경에서 점진적인 항생제 노출에 의해 미생물은 내성 유전자를 비롯한 항생제 내성 유발 유전인자들과 플라스미

\*For correspondence. E-mail: chae@jbnu.ac.kr;  
Tel.: +82-63-850-0840; Fax: +82-63-850-0834

드나 트랜스포존과 같은 유전자의 전이와 관련된 유전인자 (mobile genetic elements) 들을 획득한다(Tan *et al.*, 2015). 이러한 항생제 내성 유전자 전이는 밀집된 미생물 군집에서 빈번히 발생하며, 세균간의 수평적 유전자 전이를 통해 항생제 내성이 전파된다(Heuer *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2015). 그리고 수계나 토양 환경에서 검출되는 수준인 극소량의 항생제가 더 선택적으로 항생제 내성균을 발생시킨다고 보고되었다(Gullberg *et al.*, 2011; Vos *et al.*, 2015).

인구가 밀집되거나 산업 공단이 밀집되어있는 지역의 하천은 항생제를 포함한 다양한 오염 물질들이 유입되며, 하수처리장의 침전물 및 유출수가 유입되는 등 항생제 내성균의 하천 유입 가능성과 항생제 감수성균의 내성 획득 기회가 상대적으로 높다. 국내에서는 강원도와 수도권인구의 주요 상수원으로 이용되는 한강 유역에서 채수한 시료로부터 분리한 *Enterococcus* 76종의 20%에 해당하는 15종이 VRE인 것으로 보고된 바 있다(Kwon *et al.*, 2012; Su *et al.*, 2014).

전 세계적으로 항생제 내성균의 증가가 주요 안전으로 부각됨에 따라, 내성에 대한 안전 관리를 위해 미국과 일본에서는 NARMS (National antimicrobial resistance monitoring system)과 JVARMS (Japanese veterinary antimicrobial resistance monitoring system) 같은 광범위한 내성균 감시시스템을 확립하여 내성균 모니터링을 실시하고 있다(Hur *et al.*, 2012). 국내에서도 국가 항생제내성 안전관리사업을 통해 사람, 가축, 환경 등의 항생제 내성균 모니터링을 실시하고 있지만 국내 주요 하천을 대상으로 한 내성균 분포와 항생제 내성 전이성에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 본 연구에서는 주요 하천과 지천 7지점으로부터 ampicillin 내성균을 분리하여 종다양성과 항생제 다제내성을 분석하였다.

시료 채취는 2014년 6월과 9월에 이루어졌으며 항생제감수성 조사에서 일반적으로 사용하는 Muller-Hinton (MH) 배지(MBcell, Korea)를 사용하였다. 연속희석법으로 희석된 하천시료는 고체 배지의 표면에 도말하여 30°C에서 48시간 정체배양시킨 후, 형성된 균집락을 최대 100개씩 선발하였다. 이때 배지에 첨가된 ampicillin (Sigma) 농도는 100 µg/ml이었다.

선발된 균주의 동정은 16S rRNA 유전자 분석을 통해 이루어졌으며 유전자 증폭을 위한 PCR 반응조건은 다음과 같다. 총 50 µl의 반응액에 1 µl의 균주 현탁액과 0.2 µM의 16S rRNA primer인 27F와 1492R universal primer (Cosmogenetech), 그리고 25 µl의 Taq mastermix (Doctor protein)를 첨가하여 반응시켰다. PCR은 95°C에서 10분간의 boiling 후, 95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 1분 30초씩 30회 증폭하고, 최종적으로 extension을 72°C에서 7분간 실시하였다.

PCR 산물은 PCR DNA Purification kit (Doctor protein)를 이용하여 정제하였고, 정제된 PCR 산물은 Cosmogenetech에 의뢰하여 염기서열 분석을 실시하였다. 염기서열 결정은 27F primer를 이용하여 Sanger 방법으로 진행하였으며 결정된 650 bp의 염기서열은 Ez-Taxon 데이터베이스(Chun *et al.*, 2007)를 통해 분류학적 정보를 비교·분석하였다.

균주 동정 결과는 Fig. 1과 같다. *Aeromonas* 속이 31.7%로 가장 분포율이 높았으며 *Acidovorax* (28.1%), *Elizabethkingia* (8.2%), *Pseudomonas* (5%), *Raoultella* (3.2%), *Brevundimonas* (3.2%), *Pedobacter* (2%) 속의 순서로 분포율이 조사되었다. 이외에도 *Sphingobium*, *Sphingobacterium*, *Comamonas*, *Chromobacterium*, *Pelomonas*, *Chryseobacterium* 등의 속이 동정되었다.

동정된 세균들의 항생제 감수성 검사를 위해 세균들을 MH 액체배지를 이용하여 30°C에서 16시간 동안 진탕배양시켰다. 그리고 MH 고체배지에 배양액을 도말한 후 항생제 디스크를 올려놓고 30°C에서 16시간 정체배양 시켰으며 균의 생장이 억제된 원의 직경을 측정함으로써 균의 항생제 감수성을 분석하였다. 항생제 감수성 검사를 위해 14종의 항생제 감수성 테스트 디스크(Liofilchem)를 사용하였으며 항생제 디스크 종류와 농도는 다음과 같다: ampicillin, 10 µg; cephalixin, 30 µg; ciprofloxacin, 5 µg; clindamycin, 2 µg; erythromycin, 15 µg; gentamicin, 120 µg; kanamycin, 30 µg; lincomycin, 15 µg; penicillin G, 10 IU; sulfamethoxazole, 50 µg; tetracycline, 30 µg

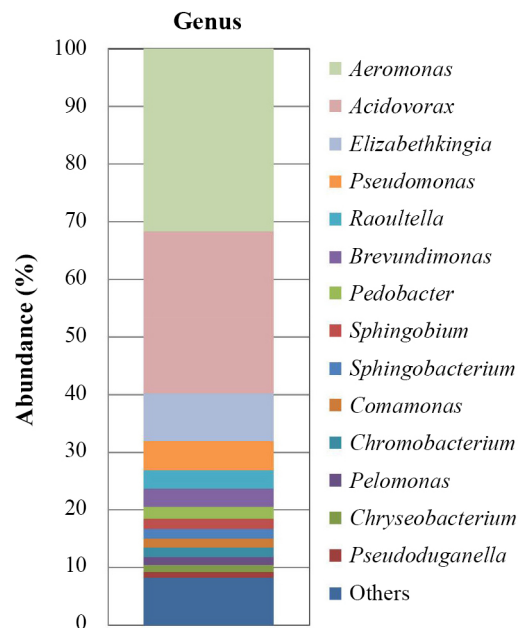
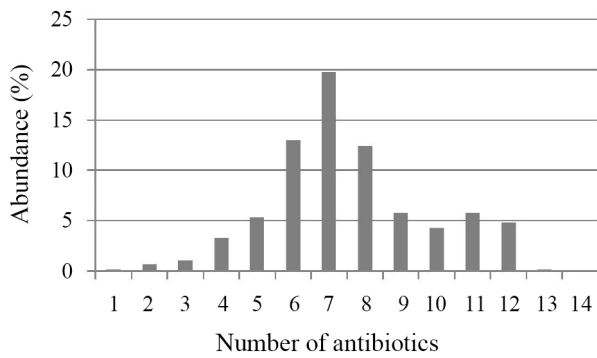


Fig. 1. Diversity of bacteria isolated from domestic streams.



**Fig. 2.** Ampicillin resistant bacteria showing multi-drug resistance which were isolated from domestic streams.

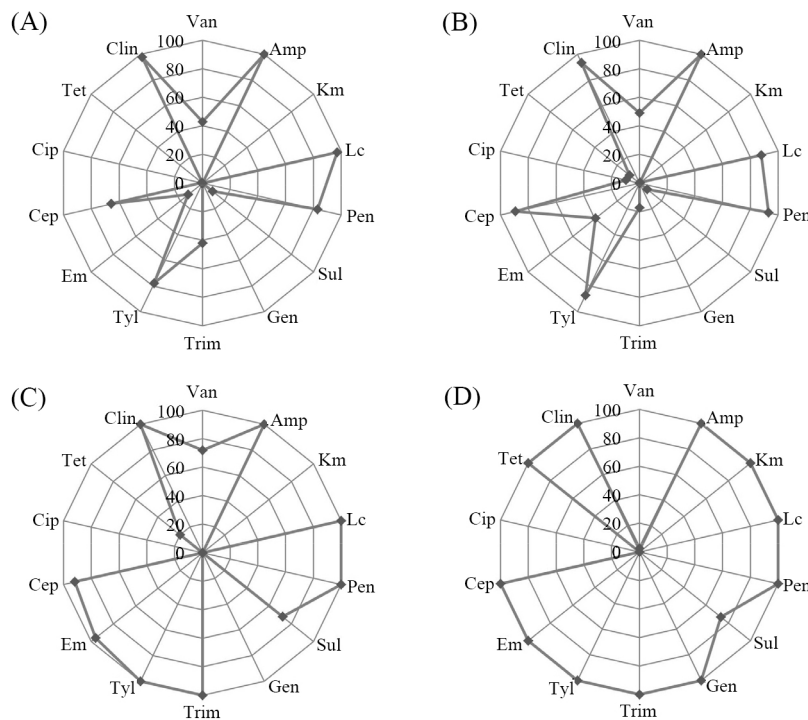
g; trimethoprim, 5 µg; tylosin, 30 µg; vancomycin, 30 µg.

항생제 감수성 조사 결과(Fig. 2), *Aeromonas sharmans* 1개 균주 이외의 모든 균주들이 2개 이상의 항생제에 대해 내성을 보이는 다제내성 특징을 나타내었다. 7종의 항생제에 내성을 보이는 내성균들의 분포가 19.7% 비율로 가장 높았으며 6종 이상의 항생제에 내성을 보이는 내성균들의 분포가 66%를 차지하였다. 그러나 조사된 항생제 내성균의 다제내성 분포율은 내성유전자의 유무에 의해 분류되는 자연내성과 획득내성을 구분하지 않는 결과이다.

비록 분리된 내성균들에 대한 내성유전자 조사가 이루어지지 못했지만 항생제 감수성 조사 결과를 바탕으로 분포율이 높았던 4개 속 균주들의 자연내성 특징을 파악하고자 하였다 (Fig. 3). 균 분리에서 선택적 배양의 요인이었던 ampicillin을 제외하고 *Acidovorax* 속(Fig. 3A)과 *Aeromonas* 속(Fig. 3B)의 경우에는 100% 내성을 보이는 항생제가 조사되지 않았으나 *Pseudomonas* 속의 경우(Fig. 3C) clindamycin, lincomycin, trimethoprim, tylosin에 대한 내성비율이 100%로 조사되었고 *Elizabethkingia* 속의 경우(Fig. 3D) cephalixin, clindamycin, erythromycin, gentamicin, kanamycin, lincomycin, penicillin G, tetracycline, trimethoprim, tylosin에 대한 내성비율이 100%로 조사되었다. 따라서 100%의 내성을 보이는 항생제에 대해서는 자연내성일 가능성을 제시하고 있으며 내성유전자 조사에 관한 후속연구를 통해 검증할 필요가 있다고 사료된다.

### 적 요

임상과 자연환경에서 발견되는 항생제내성균의 문제는 보건학적 관심의 대상이 되고 있으며 환경 중의 미생물은 항생제 내성유전자 확산의 한 요인으로 판단되고 있다. 본 연구에



**Fig. 3.** Antibiotics resistance profiles of abundant genus among isolated ampicillin resistant bacteria. (A) *Acidovorax*; (B) *Aeromonas*; (C) *Pseudomonas*; (D) *Elizabethkingia*. Van, vancomycin; Amp, ampicillin; Km, kanamycin; Lc, lincomycin; Pen, penicillin G; Sul, sulfamethoxazole; Gen, gentamicin; Trim, trimethoprim; Tyl, tylosin; Em, erythromycin; Cep, cephalixin; Cip, ciprofloxacin; Tet, tetracycline; Clin, clindamycin.

서는 국내 하천 7지점으로부터 분리한 배양성 ampicillin 내성균의 다양성을 조사하였다. 분리된 498종의 세균들 중에서 *Aeromonas*와 *Acidovorax* 속의 내성균 분포가 가장 높았으며, 66%의 분리균들이 조사된 14종의 항생제 중 6종 이상의 항생제에 내성을 나타내었다. 그리고 7종의 항생제에 내성을 보이는 비율이 19.7%로 가장 높았다. 또한 항생제감수성 조사 결과를 바탕으로, 분포율이 높았던 *Aeromonas*, *Acidovorax*, *Pseudomonas*, *Elizabethkingia* 속의 내성균에 대한 자연내성 특징을 파악하였다.

## 감사의 말

본 연구는 환경부 국립환경과학원(과제번호: NIER-SP2014-187)의 지원에 의해 수행되었음.

## References

- Chun, J., Lee, J.H., Jung, Y., Kim, M., Kim, S., Kim, B.K., and Lim, Y.W.** 2007. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**, 2259–2261.
- Gullberg, E., Cao, S., Berg, O.G., Ilback, C., Sandegren, L., Hughes, D., and Andersson, D.I.** 2011. Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS Pathog.* **7**, e1002158.
- Heuer, H., Schmitt, H., and Smalla, K.** 2011. Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Curr. Opin. Microbiol.* **14**, 236–243.
- Hur, J., Jawale, C., and Lee, J.H.** 2012. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: A review. *Food Res. Int.* **45**, 819–830.
- Kim, H.Y., Chung, S.Y., Choi, S.H., Lee, J.S., Choi, I.S., Cho, M.J., Shin, M.S., Song, J.S., Choi, J.C., Park, H.O., et al.** 2010. Monitoring of veterinary drug residues in foods produced in Korea. *Korean J. Food Sci. Technol.* **42**, 653–663.
- Kwon, H.K., Lee, J.H., and Kim, J.G.** 2012. A study on the distribution of antibiotic resistant bacteria in domesticated animal feces. *J. Environ. Health Sci.* **38**, 142–150.
- Lee, K.** 2011. Trend of bacterial resistance for the past 50 years in Korea and future perspectives - Gram-negative bacteria. *Infect. Chemother.* **43**, 458–467.
- Li, B., Yang, Y., Ma, L., Ju, F., Guo, F., Tiedje, J.M., and Zhang, T.** 2015. Metagenomic and network analysis reveal wide distribution and co-occurrence of environmental antibiotic resistance genes. *ISME J.* **9**, 2490–2502.
- Livmore, D.M.** 2012. Fourteen years in resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents* **39**, 283–294.
- Oh, H.K. and Park, J.H.** 2009. Characteristics of antibiotic resistant bacteria in urban sewage and river. *J. Kor. Soc. Environ. Eng.* **31**, 232–239.
- Su, H.C., Pan, C.G., Ying, G.G., Zhao, J.L., Zhou, L.J., Liu, Y.S., Tao, R., Zhang, R.Q., and He, L.Y.** 2014. Contamination profiles of antibiotic resistance genes in the sediments at a catchment scale. *Sci. Total Environ.* **490**, 708–714.
- Tan, B., Ng, C., Nshimiyimana, J.P., Loh, L.L., Gin, K.Y., and Thompson, J.R.** 2015. Next-generation sequencing (NGS) for assessment of microbial water quality: current progress, challenges, and future opportunities. *Front. Microbiol.* **6**, 1027.
- Tang, S.S., Apisamthanarak, A., and Hsu, L.Y.** 2014. Mechanisms of  $\beta$ -lactam antimicrobial resistance and epidemiology of major community- and healthcare-associated multidrug-resistant bacteria. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **78**, 3–13.
- Vos, M., Hesselman, M.C., Te Beek, T.A., van Passel, M.W., and Eyre-Walker, A.** 2015. Rates of lateral gene transfer in prokaryotes: high but why? *Trends Microbiol.* **23**, 598–605.
- Yoon, J.** 2014. Vancomycin resistance of *Staphylococcus aureus* in Korean primary hospitals. *J. Bacteriol. Virol.* **44**, 305–310.