

## 국내 하천에서 분리된 그람 음성 *Enterobacteriaceae*의 항생제 다제내성

장예진<sup>1</sup>, 송기봉<sup>2</sup>, 정인영<sup>3</sup>, 김혁<sup>3</sup>, 석광설<sup>3</sup>, 고은별<sup>1</sup>, 김버리<sup>1</sup>, 유용재<sup>1</sup>, 이옥재<sup>4</sup>, 채종찬<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>전북대학교 생명공학부 및 환경신기술연구소

<sup>2</sup>화학물질안전원 연구개발교육과

<sup>3</sup>국립환경과학원 화학물질연구과

<sup>4</sup>DK EcoV 환경미생물연구소

Received: December 8, 2015 / Revised: December 9, 2015 / Accepted: December 9, 2015

### Prevalence of Multi-drug Resistant Bacteria Belonging to Gram Negative *Enterobacteriaceae* Isolated from a Domestic Stream

Yejin Jang<sup>1</sup>, Ki-Bong Song<sup>2</sup>, In-Young Chung<sup>3</sup>, Hyuk Kim<sup>3</sup>, Kwang-Seol Seok<sup>3</sup>, Eun Byeul Go<sup>1</sup>, Byeori Kim<sup>1</sup>, Yong-Jae Yoo<sup>1</sup>, Ok-Jae Rhee<sup>4</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>Development and Education Division, National Institute of Chemical Safety, Daejeon 34111, Republic of Korea

<sup>3</sup>Chemicals Research Division, Environmental Health Research Department, National Institute of Environmental Research Complex, Incheon 22689, Republic of Korea

<sup>4</sup>DK EcoV Environmental Microbiology Lab., Cheonan 31075, Republic of Korea

*Enterobacteriaceae* is one of the major families responsible for public health threats. Due to the emergence of pathogens with antibiotic resistance, great concern has been raised regarding the prevalence of antibiotic resistant bacteria in natural environments. Therefore, the diversity of Gram negative *Enterobacteriaceae* was investigated in water samples collected from five streams in Korea using the cultivation method. Profiling of multi-drug resistance was conducted with isolates via disk diffusion assay. The results indicated that the Gram negative *Enterobacteriaceae* consisted of the following genus; *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Pantoea*, *Plesiomonas*, *Raoultella*, *Shigella* and *Enterobacter*. These latter strains represented 49% of identified isolates. In addition, 78.3% of the identified genus exhibited resistance against more than seven out of thirteen tested antibiotics, suggesting a high prevalence of multi-drug resistant bacteria in natural environments.

**Keywords:** Multi-drug resistance, prevalence, *Enterobacteriaceae*

항생제는 인간 및 동물의 건강 증진 또는 가축의 생산 발달을 위하여 널리 사용되고 있다[16]. 항생제의 발견은 의학 및 축산 분야에 획기적인 전기를 이루었으나 항생제 내성 미생물의 출현으로 인해 새로운 대처방안의 모색이 시급해지고 있다[5]. 지속적인 항생제 내성 미생물의 증가와 다제내성균의 출현은 심각한 보건학적 문제가 초래되고 있으며 이에 대응하여 세계 각 국에서 항생제 오남용에 대한 교육 등

다양한 정책을 마련하고 있다[14].

항생제 내성 미생물의 증가는 항생제 노출량 증가에 의한 현상으로 여겨지고 있는 반면, 항생제 노출량 이외의 환경요인과 상관관계가 있다는 연구 결과도 발표되고 있다. 고대 영구동토층으로부터 분리된 미생물로부터 항생제 내성 유전자가 검출되었고 검출된 유전자들이 최근 보고되는 유전자들과 상동성이 높으며 구조가 유사한 것으로 밝혀짐에 따라 항생제 내성 미생물의 존재는 자연현상이라는 내성체(resistome) 개념이 발표되었다[5]. 또한 잔류 항생제가 남아 있는 축산 분뇨로부터 분리된 미생물에서 일시적인 항생제 저항성 증가가 관찰되기는 하였으나 지속적으로 유지되지

#### \*Corresponding author

Tel: +82-63-850-0840, Fax: +82-63-850-0834

E-mail: chae@jbnu.ac.kr

© 2015, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

않음을 증명한 결과 역시 발표되었다[6, 13]. 그러나 이와 달리 활성 슬러지 내에서 잔류한 항생제 농도가 높을수록 항생제 내성 유전자를 보유한 플라스미드의 전이율이 증가한다고 보고되었으며, 항생제에 대한 노출 빈도가 항생제 내성 미생물 발생 및 확산의 주요 인자로 작용한다고 보고되었다[2, 9]. 또한 축산 농가 종사자와 비종사자의 분변으로부터 각각 분리된 *Escherichia coli*의 다제내성을 평가한 결과 축산 농가 종사자 유래 *E. coli*에서 2배 이상의 높은 내성율을 보였다. 이러한 결과는 축산 농가에서 항생제를 빈번하게 사용함에 따라 해당 종사자의 항생제 노출 빈도가 높아졌기 때문에 나타나는 결과로 추정할 수 있다[3].

항생제 내성 문제와 관련된 대표적인 균주들로 *Staphylococcus aureus*, *Enterococci*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Salmonella* 등이 알려져 있으며, 해당 균주들이 다제내성을 보유하고 있는 경우 심각한 문제를 초래할 수 있다[8, 14]. 이 중에서도 그람 음성 *Enterobacteriaceae*과의 미생물로 인한 감염 질환은 개발도상국을 비롯하여 전 세계적으로 큰 위협이 되고 다제내성으로 인해 점점 제어가 어려워지고 있다[1, 7].

그람 음성 *Enterobacteriaceae*는 요로 감염, 혈류 감염, 폐렴, 복강 감염 등의 주요 원인이 되는 균주로  $\beta$ -lactamase를 생성하여 penicillin, carbapenem, cephamycin 등의  $\beta$ -lactam 계열 항생제에 대한 내성을 갖는다[11].

최근 프랑스 파리에서 50% 이상의 입원 환자로부터 다제내성 그람 음성 병원균이 검출되었고[15], 독일의 도축장에서 항생제 내성을 갖는 그람 음성 미생물이 검출됨에 따라 이에 의한 인체 감염의 위험성을 경고하고 있다[12]. 태국의 가장 규모가 큰 대학병원에서도 carbapenem에 저항성을 갖는 그람 음성 박테리아가 검출된 보고가 있어, 항생제 내성 박테리아의 확산 및 통제와 지속적인 모니터링의 필요성이 강조되고 있다[10].

본 연구에서는 국립환경과학원이 실시한 잔류의약품질 분

석방법 연구 및 실태조사에서 잔류항생제가 검출되었던 국내 3곳의 하천과 가축농가 밀집지역 인근 하류 하천 1곳, 하수처리시설이 위치한 인근 하류 하천 1곳에서 채취된 하천 시료로부터 그람 음성 *Enterobacteriaceae* 분포 조사를 배양법을 통해 실시하였다. 시료 채취는 2013년 9월에 이루어졌으며 시료의 이화학적 분석 결과는 Table 1과 같다. 수온과 pH, 탁도는 현장에서 온도계(Thermo, USA), pH 미터(Thermo, USA), 및 탁도계(Hach, USA)를 이용하여 측정하였다. 양이온과 음이온의 분석을 위해 시료를 0.45  $\mu$ m 실린지 필터를 이용하여 여과한 후, IC(Metrohm 761 Compact IC, Switzerland)를 이용하여 각 항목을 측정하였다. 음이온 컬럼은 Metrosep A Supp5(150/4.0 mm, Switzerland)를 사용하였으며 양이온 분석에 사용한 컬럼은 Metrosep C4 150(150/4.0 mm, Switzerland)이었다. 수질시료의 BOD 측정은 수질오염 공정시험방법에 따라 분석을 실시하였으며, 수질에 용해되어 있는 DO(dissolved oxygen) 농도는 DO meter(HI 9146, Hanna Instruments, USA)를 이용하여 측정하였다. 세 곳의 하천시료들(H, Y, N)은 유사한 생물학적 오염도를 보였으며 J 시료의 경우 방류수의 특성으로 인하여 염소이온 농도가 다른 시료에 비해 11-33배 높게 측정되었다.

그람 음성 *Enterobacteriaceae* 세균을 배양하기 위해 그람 양성균에 항균효과가 있는 vancomycin(40  $\mu$ g/ml, Sigma, USA)이 첨가된 *Enterobacteriaceae* Enrichment(EE) 고체 배지(MBcell, Korea)를 사용하였다. 하천시료를 0.85% 생리식염수 용액에 연속희석법으로 희석하여 고체 배지의 표면에 도말하였다. 그리고 25°C에서 48시간동안 정체배양하여 생성된 균집락 중에서 50개씩을 선별하였다.

선별된 균주의 16S rRNA 유전자를 증폭하기 위한 PCR 반응을 실시하였다. 총 50  $\mu$ l의 반응액에 1  $\mu$ l의 균주 현탁액과 0.2  $\mu$ M의 16S rRNA primer인 27F와 1492R universal primer(Cosmogenetech, Korea), 그리고 25  $\mu$ l의 Taq mastermix

Table 1. Characteristics of water samples collected from domestic streams.

Sampling site (latitude/longitude)	Tm	pH	Turbidity (NTU)	DO (mg/l)	TOC (mg/l)	BOD (mg/l)	NO <sup>3-</sup> (mg/l)	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (mg/l)	Cl <sup>-</sup> (mg/l)
H (37.24.06 / 127.55.50)	20.0	7.6	2.03	7.7	10.00	0.4	3.06	0.375	32.9
Y (34.47.11 / 126.27.52)	21.0	7.6	41.70	8.0	12.19	1.6	1.34	0.910	99.6
N (35.53.15 / 128.38.31)	21.0	8.3	4.65	9.1	11.08	1.7	9.02	0.068	43.5
I (35.54.01 / 127.01.41)	20.0	7.8	39.30	7.6	15.55	6.9	1.23	1.073	43.8
J (35.52.38 / 127.06.02)	21.0	7.1	13.80	4.6	16.60	5.8	1.60	0.752	303.6

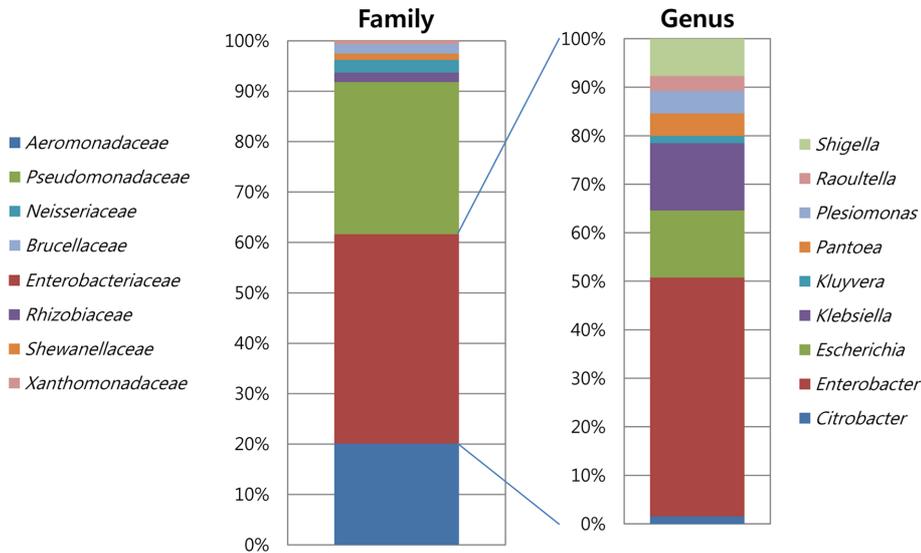


Fig. 1. Diversity of bacteria isolated from domestic streams.

(Doctor protein, Korea)를 첨가하여 진행하였다. PCR은 95°C에서 10분간의 boiling 후에, 95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 1분 30초씩 30회 증폭 후, 최종 extension을 72°C에서 7분간 실시하였다.

PCR 산물은 PCR DNA Purification kit(Doctor protein, Korea)를 이용하여 정제하였고, 염기서열 분석을 위하여 정제된 PCR 산물을 Cosmogenetech(Korea)에 의뢰하였다. 염기서열 결정은 27F primer를 이용하여 Sanger 방법으로 진행하였다. 결정된 염기서열은 Ez-Taxon 데이터베이스[4]에서 동정된 세균들의 분류학적 정보와 비교하였다. 그 결과, 조사된 세균들 모두 데이터베이스와 99.9% 이상의 유사도를 보였다.

비록 EE 배지에서 배양되어 분리되었지만 균주 동정 결과(Fig. 1), 41%만 *Enterobacteriaceae*에 속하는 균주였으며 30% *Pseudomonadaceae*, 20% *Aeromonadaceae*, 3% *Neisseriaceae*, 2% *Rhizobiaceae*, 2% *Brucellaceae*, 1% *Shewanellaceae*, 1% *Xanthomonadaceae*로 분류되었다.

H 시료에서는 *Enterobacteriaceae*와 *Aeromonadaceae*가 각각 47.6%씩 분포하였고 Y와 N 시료에서는 *Aeromonadaceae*가 44.5%과 41.7%로 우점하였다. I 시료에서는 *Enterobacteriaceae*와 *Pseudomonadaceae*가 36%와 44%로 유사하게 분포하였으며, J 시료에서는 *Enterobacteriaceae*가 70.4%로 우점하였다.

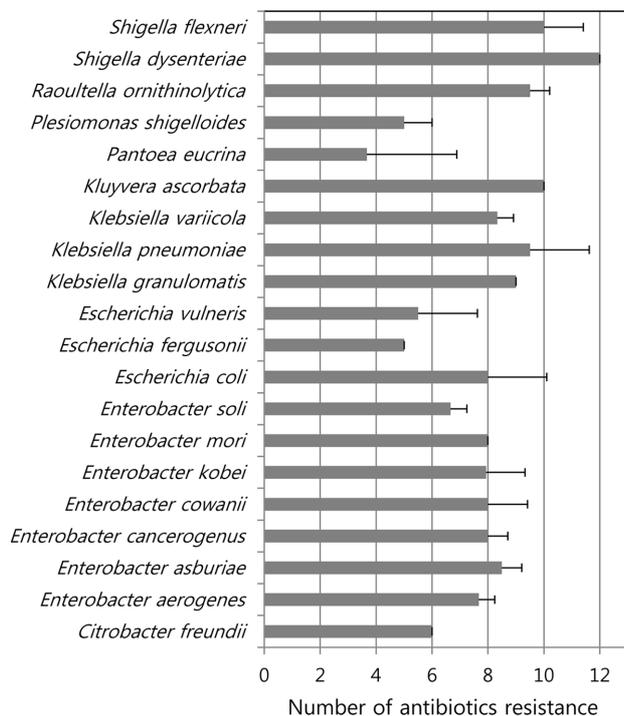
동정된 균주들 중에서 *Enterobacteriaceae*에 속하는 41%의 균주를 속에 따라 분류한 결과는 Fig. 1과 같다. *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Pantoea*, *Plesiomonas*, *Raoultella*, *Shigella* 9개의 속으로 분류되었

으며 *Enterobacter*가 49%로서 우점종으로 조사되었다.

*Enterobacteriaceae*로 동정된 세균의 항생제 감수성 검사를 위해 Muller-Hinton(MH) 배지(MBcell, Korea)를 사용하였으며 분리된 세균들을 MH 액체배지를 이용하여 25°C에서 16시간 진탕배양시켰다. 그리고 MH 고체배지에 균주를 도말한 후 항생제 디스크를 올려놓고 25°C에서 16시간 정제 배양시켰으며 균의 생장이 억제된 원의 직경을 측정함으로써 균의 항생제 감수성을 분석하였다. 항생제 감수성 검사를 위해 13종의 항생제 감수성 테스트 디스크(Liofilchem, Italy)를 사용하였으며 항생제 디스크 종류와 농도는 다음과 같다: penicillin G, 10 IU; ampicillin, 10 µg; lincomycin, 15 µg; clindamycin, 2 µg; tetracycline, 30 µg; gentamicin, 120 µg; kanamycin, 30 µg; erythromycin, 15 µg; tylosin, 30 µg; cephalixin, 30 µg; sulfamethoxazole, 50 µg; trimethoprim, 5 µg; ciprofloxacin, 5 µg.

항생제 감수성 조사 결과(Fig. 2), *Pantoea eucrina* 1개 균주 이외의 모든 균주들이 4개 이상의 항생제에 대해 내성을 보이는 다제내성 특징을 나타내었다. 8종의 항생제에 내성을 보이는 내성균들이 30% 비율로 가장 우점하였으며 7종 이상의 항생제에 내성을 보이는 내성균들의 분포가 78.3%를 차지하였다. 그러나 조사된 항생제 내성균의 분포비율은 하천의 수질과는 상관관계가 나타나지 않았으며(결과 미제시) 기작으로서 자연내성과 획득내성을 구분하지 않는 결과이다.

본 연구결과는 자연하천에 존재하는 세균들 중에서 다제내성을 보이는 항생제 내성균들이 서식 생태계를 우점하고 있다는 것을 제시한다. 그러나 내성균들의 내성기작이 자연내성인지 전이유전자에 의한 획득내성인지 분석되지 못했



**Fig. 2. Multi-drug resistance of bacteria belonging to *Enterobacteriaceae*.**

며 이를 위해서는 항생제 내성유전자 및 전이 관련 유전자의 분석이 후속되어야 한다고 사료된다.

## 요 약

*Enterobacteriaceae*에 속하는 세균들은 보건학적 문제를 발생시키기도 하며 항생제 내성 병원균의 발생으로 인하여 자연환경 중의 항생제 내성균에 분포에 대한 관심이 증대되고 있다. 따라서 배양법을 이용하여 국내 5개의 하천시료로부터 그람 음성 *Enterobacteriaceae*의 종 다양성을 조사하였으며 분리된 세균에 대한 다제내성을 항생제디스크 확산법으로 분석하였다. 그 결과, 분리된 그람 음성 *Enterobacteriaceae*는 *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Pantoea*, *Plesiomonas*, *Raoultella*, *Shigella*로 동정되었으며 49%가 *Enterobacter*로서 우점종으로 분석되었다. 또한 이들 세균들의 78.3%가 조사된 13종의 항생제 중에서 7종 이상에 내성을 보였으며 이것은 국내 자연하천환경에 높은 비율의 다제내성균이 서식한다는 것을 제시한다.

## Acknowledgments

This study was supported by grant from National Institute of Environmental Research, Ministry of Environment in 2013.

## References

- Azevedo I, Albano H, Silva J, Teixeira P. 2015. Antibiotic resistance of *Enterobacteriaceae* isolated from the domestic food related environments. *J. Food Qual. Hazards Control* **2**: 51–55.
- Canton R, Morosini MI. 2011. Emergence and spread of antibiotic resistance following exposure to antibiotics. *FEMS Microbiol. Rev.* **35**: 977–991.
- Cho SH, Lim YS, Kang YH. 2012. Comparison of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* strains isolated from healthy poultry and swine farm workers using antibiotics in Korea. *Osong Public Health Res. Perspect* **3**: 151–155.
- Chun J, Lee JH, Jung Y, Kim M, Kim S, Kim BK, Lim YW. 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.
- D'Costa VM, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WW, Schwarz C, et al. 2011. Antibiotic resistance is ancient. *Nature* **477**: 457–461.
- Ding C, He J. 2010. Effect of antibiotics in the environment on microbial populations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **87**: 925–941.
- Fankam AG, Kuate JR, Kuete V. 2015. Antibacterial and antibiotic resistance modifying activity of the extracts from *allanblackia gabonensis*, *combretum molle* and *gladiolus quartinianus* against Gram-negative bacteria including multi-drug resistant phenotypes. *BMC Complement. Altern. Med.* **15**: 206.
- Kang CI. 2011. Therapeutic strategy for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *J. Korean Med. Assoc.* **53**: 325–331.
- Kim S, Yun Z, Ha UH, Lee S, Park H, Kwon EE, et al. 2014. Transfer of antibiotic resistance plasmids in pure and activated sludge cultures in the presence of environmentally representative micro-contaminant concentrations. *Sci. Total Environ.* **468-469**: 813–820.
- Netikul T, Kiratisin P. 2015. Genetic characterization of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* and the spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST340 at a university hospital in Thailand. *PLoS One* **10**: e0139116.
- Paterson DL. 2006. Resistance in Gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *Am. J. Med.* **119**: S20–S28.
- Schwaiger K, Huther S, Hölzel C, Kämpf P, Bauer J. 2012. Prevalence of antibiotic-resistant *enterobacteriaceae* isolated from chicken and pork meat purchased at the slaughterhouse and at retail in Bavaria, Germany. *Int. J. Food Microbiol.* **154**: 206–211.
- Sengeløv G, Agersø Y, Halling-Sørensen B, Baloda SB, Andersen JS, Jensen LB. 2003. Bacterial antibiotic resistance levels in Danish farmland as a result of treatment with pig manure slurry. *Environ. Int.* **28**: 587–595.
- Sharama R, Sharma CL, Kapoor B. 2005. Antibacterial resistance: current problems and possible solutions. *Indian J. Med.*

*Sci.* **59**: 120–129.

15. Tebano G, Geneve C, Tanaka S, Grall N, Atchade E, Augustin P, *et al.* 2015. Epidemiology and risk factors of multidrug-resistant bacteria in respiratory samples after lung transplantation. *Transpl. In. Dis.* doi: 10.1111/tid.12471.
16. Zhang X, Zhang T, Fang HH. 2009. Antibiotic resistance genes in water environment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **82**: 397–414.