

## 제약회사 폐수처리장 방류수 중 항생제 내성 Enterobacteria에 관한 연구

김재건 · 김영진\*†

신한대학교 에너지환경공학과

\*동남보건대학교 환경보건과

## Study on Antibiotic Resistant Enterobacteria in Pharmaceutical Effluent

Jae-Gun Kim and Young Jin Kim\*†

Department of Energy and Environment Engineering, Shinhan University, Gyeonggi-do Province, Korea

\*Department of Environmental Health, Dongnam Health University, Gyeonggi-do Province, Korea

### ABSTRACT

**Objectives:** This study aims to examine the concentration, diversity, and antibiotic characteristics of penicillin G resistant enterobacteria present in pharmaceutical effluent.

**Methods:** Water sampling was performed from a pharmaceutical company in Gyeonggi-do Province, Korea in March 2015. Water samples were plated in triplicate on tryptic soy agar plates with 32 mg/L of penicillin G. Penicillin G resistant enterobacteria were selected from the effluent and were subjected to 16S rRNA analysis for penicillin G resistant species determination. Identified resistant strains were tested for resistance to various antibiotics.

**Results:** Penicillin G resistant enterobacteria were present at 6.2% as to culturable heterotrophic bacteria. Identified penicillin G resistant enterobacteria exhibited resistance to more than 10 of the antibiotics studied. These resistant bacteria are gram negative and are closely related to pathogenic species.

**Conclusion:** Multi-antibiotic resistant bacteria in the effluent suggest a need for disinfection and advanced oxidation processes for pharmaceutical effluents.

**Keywords:** *Enterobacter*, *Klebsiella*, multi-antibiotic resistant enterobacteria, penicillin G, pharmaceutical effluent

### I. 서 론

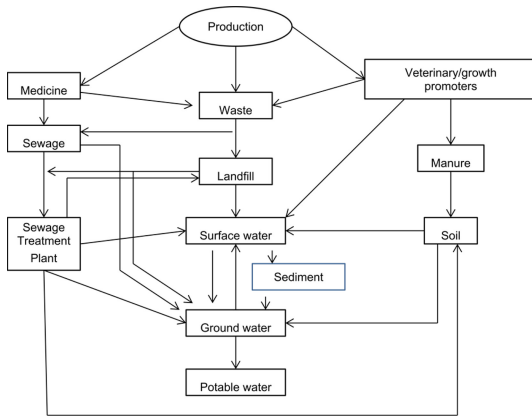
Enterobacteria는 보통 1~5  $\mu\text{m}$ 의 크기를 갖는 통성혐기성 그람음성 간균으로 당을 발효시켜 젖산과 기타 다른 물질로 전환시키는 세균이다. Enterobacteria 속은 *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Yersinia pestis*, *Klebsiella*, *Shigella*와 같은 병원성 미생물과 밀접한 연관성이 있으며, *Proteus*, *Enterobacter*, *Serratia*,

*Citrobacter*와 같은 질병을 일으키는 세균을 포함하고 있다. 몇몇 enterobacteria가 생산하는 endotoxin은 침투성 염증이나 혈관확장 반응을 일으키며 심한 경우 endotoxic shock를 일으켜 사망에 이르기까지 한다. 또 일부 enterobacteria는 항생제 방어의 last line으로 생각되고 있는 carbapenem 등의 항생제에 대해 내성이 있는 것으로 알려지고 있다.<sup>1)</sup>

제약회사 폐수처리장의 경우 현재까지 법적으로

†Corresponding author: Department of Environmental Health, Dongnam Health University, Gyeonggi, 16328, Korea  
Tel : +82-31-249-6459, Fax : +82-31-249-6450, E-mail : jin2701@hanmail.net

Received: 7 December 2015, Revised: 15 February 2016, Accepted: 15 February 2016



1. Source and distribution of pharmaceuticals in the environment<sup>3)</sup>

일반하수 및 폐수와 마찬가지로 일반항목에 대한 배출기준을 만족시키면 하천으로 방류가 가능하다. 제약회사 방류수는 수질오염방지시설에 의해 처리되고 있으며 수질오염물질 배출허용기준은 Table 1과 같다.<sup>2)</sup>

제약회사에서는 여러 종류의 항생제를 생산하고 있어 공정에서 발생한 폐수가 폐수처리장으로 유입될 수 있기 때문에 항생제의 농도가 높을 것으로 예상할 수 있다. 폐수처리 과정에서 분해되지 않은 항생제는 방류수를 통해 도시하수로 방류되게 된다. 이렇게 완벽하게 처리되지 않은 항생제가 하천으로 유입되면 수생태계가 교란될 수 있고, 그 결과 인간 생활에 악영향을 미칠 가능성이 있다.<sup>3,4)</sup>

실제로 환경부에서 조사한 자료에 의하면 국내 10여 개 제약회사 방류수에서의 항생제를 조사한 결과에 의하면 ciprofloxacin, penicillin G, lincomycin, tylosin 등의 항생제가 검출되었으며 특히 ciprofloxacin과 같은 항생제는 외국의 제약회사 방류수에서도 확인되고 있다.<sup>5-7)</sup>

본 연구는 경기지역에 있는 5개 제약회사의 방류수를 분석하여 enterobacteria가 가장 많이 검출된 한 곳을 연구대상으로 선정하여 방류수 중에 항생제 내성을 갖는 균의 수를 측정하였다. 항생제 내성균 분리를 위한 항생제로는 penicillin G를 사용하였으며 penicillin G에 대해 내성을 보이는 균의 농도, 종의 다양성 및 내성균들의 항균제 spectrum을 조사하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 채취지점 및 채취방법

시료채취지점은 경기도에 위치하는 항생제 생산회사 5개의 회사를 무작위로 선정하였다. 2015년 5월에 각 회사의 방류구에서 1 L를 무균 채수병에 채취한 후 냉장 보관하여 실험실로 이송하였다.

### 2. 방류수 수질조사

방류수의 pH는 pH meter(HM-30R, TOA, Japan), 총질소와 총인은 연속측정기인 Integral Futura (Alliance, USA)로 측정하였다. 부유물질, 생물화학적 산소요구량, 화학적 산소요구량은 수질오염공정시험기준에 따라 분석하였다.<sup>8)</sup>

### 3. Penicillin G 내성균 선별

1) 종속영양세균, 총대장균군 및 enterobacteria 측정  
시료 내 종속영양세균의 수를 파악하기 위해 멸균된 생리식염수로  $10^3 \sim 10^5$ 배 희석하여 1.0 mL씩 표준한천배지(plate count agar, Difco, USA) plate 3장에 분주하여 35°C에서 48시간 배양하였다.<sup>8)</sup> 총대장균군은 멸균된 생리식염수로  $10 \sim 10^3$ 배 희석하여 1 mL씩 desoxycholate agar (Difco, USA) plate 3장에 도말한 후 35°C에서 24시간 배양하여 측정하였다.<sup>8)</sup> Enterobacteria는 멸균된 생리식염수로  $10 \sim 10^3$ 배 희석

Table 1. Regional standards for permitting the discharge of water quality released by water discharge facilities

District	Scale < 2,000 m <sup>3</sup> /day						
	Item	BOD (mg/L)	COD (mg/L)	SS (mg/L)	T-N (mg/L)	T-P (mg/L)	Ecotoxicity (TU)
I		40	50	40	30	4	1
II		80	90	80	60	8	2
III		120	130	120	60	8	2
IV		30	40	30	60	8	2

하여 0.1 mL씩 EMB agar (Difco, USA) plate 3장에 도말한 후 35°C에서 24시간 배양하여 계수하였다.<sup>9)</sup>

#### 2) Penicillin G 내성균 선별

5개 회사의 시료 중 enterobacteria가 가장 많이 검출된 한 곳을 선정하여 penicillin G 내성균주를 선별하였다. Penicillin G 내성균 선별을 위해 시료를 멸균된 생리식염수로 1,000배 희석하여 EMB agar(Difco, USA)에 penicillin G (Sigma-Adrich, USA)를 MIC(minimum inhibitory concentration)인 32 mg/L 농도<sup>10)</sup>로 첨가된 고체배지에 각각 0.1 mL씩 3장에 도말하고 35°C에서 24시간 배양하여 출현하는 균을 선별하였다.<sup>11)</sup>

#### 4. Penicillin G 내성균의 동정

##### 1) 균주의 배양

Luria-Bertani broth배지 (Difco, USA)에 penicillin G 내성균을 접종한 후 37°C에서 18~24시간 동안 배양하였다.

##### 2) Total DNA 분리

배양된 균주는 total DNA를 분리하기 위하여 DNeasy® Blood & Tissue kit (Qiagen, USA)을 이용하여 제조사의 지시사항에 따라 total DNA를 순수분리 하였다.<sup>12)</sup>

##### 3) 16S rRNA 유전자 염기서열 분석

분리된 total DNA를 주형으로 27F (5'-AGAGTTTGTATCMTGGCTCAG-3')와 1518R (5'-AAGGAGGTGATCCANCCRCA-3')를 이용하여 PCR (Polymerase Chain Reaction)을 진행하였다.<sup>13)</sup> PCR은 Expand High Fidelity PCR system (Roche, Mannheim, Germany)를 사용하여 총 20 µL (주형 DNA 10 ng, 각각의 primer 200 nM, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTPs, 그리고 Taq buffer, 1 unit Taq DNA polymerase)로 다음과 같은 조건으로 PCR을 수행하였다. Initial denaturation step을 95°C에서 2 분, 30 주기 반복으로 denaturation step: 95°C에서 30 초, annealing step: 58°C에서 30 초, elongation step: 72°C에서 1 분 동안 실시하고, 72°C에서 final elongation step을 7 분간 실시하였다. 증폭된 PCR 산물은 1% agarose gel에서 전기영동한 후 Ethidium Bromide (EtBr)로 염색하여 확인하고

LaboPass™ PCR purification kit (COSMO Genetech, Korea)을 이용하여 증폭된 PCR 산물을 순수분리 하였다. 순수분리된 PCR 산물은 27F (5'-AGAGTTTGTATCMTGGCTCAG-3')와 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')를 이용하여 염기서열 분석(ABI 3730XL, applied biosystems, USA)을 진행하였다. 얻어진 염기서열 데이터를 GenBank에 데이터와 비교하기 위하여 National Center for Biotechnology Information (NCBI)내에 BLAST를 사용하였다.

#### 5. Penicillin G 내성균의 항생제 내성 spectrum 조사

종이 확인된 penicillin G 내성균의 다른 항생제에 대한 감수성 조사는 디스크 확산법(OXOID, UK)을 적용하였다. 억제대의 직경을 mm 단위로 측정하여 Clinical Laboratory Standards Institute(CLSI) guideline,<sup>10)</sup> Sutter 등,<sup>14)</sup> Finlay 등<sup>15)</sup>의 판정방법에 따라 각각의 항생제에 대한 내성을 판정하였다.

### III. 결 과

#### 1. 제약회사 방류수 수질조사

5개 제약회사의 방류수 수질을 조사한 결과는 Table 2에 나타나 있다. BOD 범위는 9.8~33.0 mg/L, COD는 10.3~34.5 mg/L, 부유물질은 12.4~20.1 mg/L, 총질소는 2.27~19.4 mg/L, 총인은 0.10~1.12 mg/L으로 조사한 5개 회사의 방류수 모두 BOD, COD, 부유물질, 총질소 및 총인 항목이 수질 및 수생태계 보전에 관한 법률 시행규칙 상의 나)지역(Table 2의 III 지역) 배출허용기준을 만족하고 있다.

#### 2. 종속영양세균, enterobacteria 및 총대장균수

Table 3는 5개의 제약회사 방류수에서 종속영양세균, enterobacteria, 총대장균의 검출된 숫자를 보여주고 있다. B사의 방류수에서 종속영양세균은  $7.2 \times 10^6$  CFU/mL, enterobacteria는  $7.4 \times 10^5$  CFU/mL, 총대장균은  $3.1 \times 10^3$  CFU/mL이 검출되었고, S사는  $5.4 \times 10^4$  CFU/mL,  $6.5 \times 10^3$  CFU/mL,  $2.5 \times 10^2$  CFU/mL, K사는  $2.7 \times 10^5$  CFU/mL,  $2.6 \times 10^4$  CFU/mL,  $8.0 \times 10^2$  CFU/mL, D사는  $6.9 \times 10^5$  CFU/mL,  $7.9 \times 10^4$  CFU/mL,  $4.7 \times 10^2$  CFU/mL, Y사는  $3.5 \times 10^4$  CFU/mL,  $5.3 \times 10^3$  CFU/mL,  $2.5 \times 10^2$  CFU/mL이 각각 검출되었다. 따라

**Table 2.** Wastewater qualities of pharmaceutical effluents

Item \ Company	B	S	K	D	Y
BOD (mg/L)	10.2	33.0	23.0	15.1	9.8
COD (mg/L)	13.3	12.5	28.2	34.5	10.3
SS (mg/L)	16.4	12.4	16.1	17.8	20.1
Total phosphorus (mg/L)	0.10	0.42	0.52	0.29	1.12
Total nitrogen (mg/L)	6.34	2.27	10.11	8.92	19.4

**Table 3.** Bacterial cell number in pharmaceutical effluents

Bacteria \ Company	B	S	K	D	Y
Heterotropic bacteria (CFU/mL)	$7.2 \times 10^6$ ( $\pm 4.0 \times 10^5$ )*	$5.4 \times 10^4$ ( $\pm 1.1 \times 10^4$ )	$2.7 \times 10^5$ ( $\pm 7.5 \times 10^4$ )	$6.9 \times 10^5$ ( $\pm 2.0 \times 10^5$ )	$3.5 \times 10^4$ ( $\pm 4.0 \times 10^3$ )
Enterobacteria (CFU/mL)	$7.4 \times 10^5$ ( $\pm 1.3 \times 10^5$ )	$6.5 \times 10^3$ ( $\pm 1.5 \times 10^3$ )	$2.6 \times 10^4$ ( $\pm 3.5 \times 10^3$ )	$7.9 \times 10^4$ ( $\pm 1.6 \times 10^4$ )	$5.3 \times 10^3$ ( $\pm 10^3$ )
Total coliform (CFU/mL)	$3.1 \times 10^3$ ( $\pm 3.2 \times 10^2$ )	$2.5 \times 10^2$ ( $\pm 1.5 \times 10$ )	$8.0 \times 10^2$ ( $\pm 1.7 \times 10^2$ )	$4.7 \times 10^2$ ( $\pm 2.5 \times 10^2$ )	$2.5 \times 10^2$ ( $\pm 1.8 \times 10$ )

\* : standard deviation

서 본 연구에서는 5개 회사 중 종속영양세균과 enterobacteria가 농도가 가장 높고 총대장균군 기준치를 초과한 B사를 연구대상으로 선정하였다.

### 3. Penicillin G 내성균 선별

선정된 B사는 경기도 안산에 위치하는 회사로 penicillin계인 amoxicillin과 macrolide계인 clarithromycin 등의 항생제를 생산하고 있는 제약회사이다. B사의 폐수는 유입오폐수 → 스크린 → 균등조 → 폭기조 → 중화조 → 응집조 → 침전조 → 방류수조 → 방류의 순서로 처리되고 있다. 항생제 내성균을 확인하기 위해 2015년 5월 B사의 폐수 방류구에서 다시 채수하여 종속영양세균, enterobacteria의 수를 확인하여 1차 실험 결과와 비교하였으며 그 결과는 표 4에 나타나 있다. 종속영양세균 수와 enterobacteria의 수는 실험대상을 선정하기 위해 실험한 1차 실험 결과와 유사한 결과를 보였다. B사의 방류수에서 penicillin G에 내성을 보인 enterobacteria의 농도는  $4.9 \times 10^5$  CFU/mL이었다.

또한 2차로 채수된 B사 방류수 내의 penicillin G 내성균의 우점종을 확인하기 위해 1,000배 희석한 후 EMB 항생제 배지에 0.1 mL씩 3장의 plate에 도말하여 배양한 결과, 3개중 147개의 penicillin G 내성균이 확인되었고 16S rRNA를 이용하여 균을 동

**Table 4.** Bacterial cell number in B pharmaceutical effluent

	Cell number (CFU/mL)
Heterotropic bacteria	$7.9 \times 10^6$ ( $\pm 3.2 \times 10^5$ )*
Enterobacteria	$1.2 \times 10^6$ ( $\pm 1.8 \times 10^5$ )
Penicillin G resistant enterobacteria	$4.9 \times 10^5$ ( $\pm 1.3 \times 10^5$ )

\* : standard deviation

**Table 5.** Number of isolated penicillin G resistant enterobacteria in B pharmaceutical effluent

species	Cell number (CFU/mL)
<i>Enterobacter</i> sp.	39
<i>Klebsiella variicola</i>	15
<i>Klebsiella oxytoca</i>	93

정한 결과는 표 5에 나와 있다. 147개의 penicillin G 내성균 중 *Enterobacter* sp.가 39개, *Klebsiella variicola*가 15개, *Klebsiella oxytoca*가 93개로 *K. oxytoca*가 가장 많이 검출되었다.

### 4. Penicillin G 내성주의 항균 spectrum

우점종으로 확인된 *Enterobacter* sp., *Klebsiella variicola*, *Klebsiella oxytoca* 등의 penicillin G 내성

**Table 6.** Resistant test to various antibiotics of isolated penicillin G resistant enterobacteria

Antibiotic	Species	<i>Enterobacter</i> sp. (n=39)	<i>Klebsiella variicola</i> (n=15)	<i>Klebsiella oxytoca</i> (n=93)
		Resistance(%)	Resistance(%)	Resistance(%)
Tetracycline		0	0	0
Clindamycin		97	93	97
Erythromycin		97	93	96
Lincomycin		95	93	100
Gentamicin		51	100	75
Vancomycin		92	93	98
Ampicillin		100	100	100
Quinupristin/ Dalfopristin		100	100	100
Linezolid		97	93	99
Mupirocin		100	100	100
Ciprofloxacin		51	27	97
Chloramphenicol		8	93	0
Ceftizoxime		67	100	55
Pencillin G		100	100	100
Imipenem		95	100	55

균 모두를 디스크 확산법으로 각각의 항생제에 대한 억제존의 크기를 측정하여 분리·확인된 균에 대한 내성균의 내성%를 계산하였으며 결과는 Table 6에 나타나 있다. B제약회사의 방류수에서 분리된 *Klebsiella variicola*는 실험에 사용된 항생제 중 tetracycline과 ciprofloxacin을 제외한 13종의 항생제에 대해 90% 이상의 내성을 나타내고 있으며 *Klebsiella oxytoca*는 penicillin G, ciprofloxacin, lincomycin 등 10종에 대해 90% 이상의 내성을 보였으며, *Enterobacter* sp.는 penicillin G, clindamycin, erythromycin 등 10종의 항생제에 대해 90% 이상의 내성을 나타내 기존에 발표된 것보다 더 많은 항생제에 대해 내성을 보이고 있어, 항생제 내성을 유발하는 유전자에 대해 연구가 필요할 것으로 생각된다.

#### IV. 고 찰

조사된 B 제약회사 방류수의 penicillin G 내성균의 빈도는  $4.9 \times 10^5$  CFU/mL였으며 배양 가능한 중속영양세균에 대해 6.2%, enterobacteria에 대해서는 40.8%로 높게 나타났다. 실제로 도시하수처리장의 방류수에서 penicillin G의 내성균을 조사한 결과와

비슷한 결과를 보이고 있다.<sup>16)</sup>

방류수에 존재하는 penicillin G 내성균의 우점종을 확인하기 위해 회석 도말하여 배양한 결과 *Enterobacter* sp., *Klebsiella variicola*, *Klebsiella oxytoca* 등 3종의 enterobacteria가 확인되었다.

*Enterobacter*속은 세균의 몇몇 종류는 면역기능이 떨어진 환자나 호흡장치를 달고 있는 사람들에게 병원성 세균 및 기회감염성 세균으로 작용하며 주요 요로와 기도가 주요 감염경로이다. 특히,  $\beta$ -lactam 항생제, aminoglycosides, trimethoprim-sulfamethoxazole, quinolone 등과 같은 항생제에 대한 내성이 흔하게 보고 되고 있다.<sup>17,18)</sup> 어떤 *Enterobacter* sp.는 enterobacteria의 항생제 치료의 last line으로 생각되고 있는 carbapenem을 가수분해하는 효소를 갖고 있어 carbapenem을 무력화시키는 것으로 알려지고 있으며 본 연구에서 확인된 *Enterobacter* sp.도 carbapenem의 하나인 Imipenem 항생제에 대해 내성을 보이고 있다. 본 연구에서 확인된 균주가 carbapenem를 가수분해하는 효소인 KPC-2와 동일한 효소를 생산하는 지는 자세한 연구가 필요할 것으로 생각된다.<sup>19)</sup>

*Klebsiella*속의 세균은 septicemia, 폐렴, 요도감염,

soft tissue 감염과 같은 심각한 질병을 일으킬 수 있는 기회감염성 세균이다. 특히 병원 내에서 *Klebsiella* 감염은 면역력이 떨어진 환자에게 가장 흔하게 발생하는 원내감염의 하나이다.<sup>20)</sup> *Klebsiella* 속은 aminopenicillins(ampicillin & amoxicillin), carboxypenicillins(carbenicillin & ticarcillin), cephalosporins(cephalotin & cephalixin), cephemes(cefotaxime), animoglycoside, carbapenem 등의 항생제에 내성이 있다고 알려지고 있다.<sup>21,22)</sup> 특히 ciprofloxacin와 같은 quinolone에 대해서는 염색체 상의 *gyrA* 유전자와 *parC* 유전자의 돌연변이에 의해 내성을 나타내는 것으로 알려지고 있다.<sup>20,23)</sup> 본 연구에서도 *Klebsiella oxytoca*는 ampicillin이나 ciprofloxacin에 대해서는 90% 이상의 높은 내성을 보였다. 특히 *Klebsiella variicola*는 ampicillin, gentamicin, imipenem에 대해서는 100%의 내성을 나타냈다.

이들 penicillin계에 대해 내성을 보이는 그람음성균은 erythromycin, linezolid와 같은 non  $\beta$ -lactam계 항생제에도 내성을 보이고 있어 환경에서의 다제 내성균은 일반적인 현상이라고 보여지며 본 연구에서도 penicillin G에 내성을 보인 균주 모두 다제 내성균임을 확인할 수 있었다.<sup>19,24)</sup>

다제 내성균들은 감염의 유병률, 사망률 및 치료에 상당한 경제적 비용이 들 뿐 아니라, 내성유전자의 보관소로 작용할 수 있다고 알려지고 있어 이들에 의한 감염에 주의하는 것이 필요하다. 국내에서도 다제 내성균에 의한 감염이 꾸준히 증가하고 있으며 질병관리본부의 발표에 의하면 2011년 2만2928건에서 2014년 3만8074건으로 감염사례가 꾸준히 증가하고 있다.<sup>25)</sup>

따라서 이들 제약회사 방류수에 포함되어 있는 항생제들이 생태계로 방출될 경우 위험성이 높아 항생제가 포함된 방류수에 대해 독성테스트뿐만 아니라 환경위해성평가가 수행되어야 할 것으로 생각된다.<sup>26,27)</sup>

## V. 결 론

경기지역 위치하는 제약회사 한 곳을 선정하여 하수처리장 방류수에서 종속영양세균, enterobacteria, penicillin G 내성균의 빈도를 측정하였다. 종속영양세균은  $7.9 \times 10^6$  CFU/mL, enterobacteria는  $1.2 \times 10^6$  CFU/mL, penicillin G 내성균은  $4.9 \times 10^5$  CFU/mL의

빈도를 보였다.

Penicillin G에 내성을 보이는 균들의 우점종을 확인한 결과 *Enterobacter* sp., *Klebsiella variicola*, *Klebsiella oxytoca* 등 3종의 enterobacteria가 확인되었다. 확인된 3개의 균주 모두 10종 이상의 항생제에 대해 내성을 보이고 있다. 특히 *Klebsiella variicola*는 사용된 13종의 항생제에 대해 내성을 보이고 있어 제약회사 하수처리장 방류수 중에 존재하는 세균의 항생제 내성의 심각성을 알 수 있다.

제약회사나 병원 등 항생제를 다루고 있는 곳의 하수처리 방류수에 존재하는 다제 내성균이나 항생제는 생태계 및 인간을 위협할 수 있어, 오존이나 이산화염소 등으로 방류수를 처리하여 방류수 중의 다제 내성균 살균하면서 항생제를 동시에 제거에 하는 방법의 도입을 적극적으로 검토하는 것이 필요하다고 생각된다.<sup>28,29)</sup>

본 연구에서는 제약회사 하수처리장 방류수에 존재하는 penicillin G 내성균의 종류 및 오염도, 이들의 항생제 spectrum에 대해 파악하였다. 그러나 본 연구는 특정 제약회사에 국한되어 현장조사 하였기 때문에 회사의 규모나 폐수처리장의 특성 등을 충분히 반영하고 있지 못하고 있다. 또한 우점종의 출현이 희석에 의해 영향을 받고 있어 도말에 의한 실험방법이 개선이 필요하다. 따라서 폐수처리방법, 계절별 특성, 실험방법 등에 대한 심도 깊은 연구조사가 추후 수행되어야 할 것으로 사료된다.

## References

1. Available: <http://en.wikipedia.org/wiki/Enterobacteriaceae> [accessed 19 March]
2. Ministry of Environment. Available: <http://www.law.go.kr/DRF/lawService.do?OC=jaa806&target=law&MST=166074&type=HTML&mobileYn=&efYd=20150101> ?accessed 19 May 2015?
3. Kümmerer K. Significance of antibiotics in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2003; 52: 5-7.
4. Larsson DGK. Pollution from drug manufacturing: review and perspectives. Available: <http://rstb.royalsocietypublishing.org> [assessed 9 February 2015]
5. National Institute of Environmental Research. Available: <http://img.kisti.re.kr/originalView/originalView.jsp> [accessed 20 May 2015]

6. Andreozzi R, Raffaele M, Nicklas P. Pharmaceutical in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *CHEMOSPHERE*. 2003; 50: 1319-1330.
7. Larsson DGK, Pedro CD, Paxcus N. Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *Journal of Hazardous materials*. 2007; 148: 751-755.
8. National Institute of Environmental Research. Available: <http://qaqc.nier.go.kr/qaqcnew/standard/standardlist.do> [accessed 20 May 2015]
9. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Fluka/Datasheet/70186dat.pdf> [accessed 21 May 2015]
10. Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 23<sup>rd</sup> informational supplement: M100-S23. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute; 2013.
11. Kim YJ, Kim JO. Study on Oxytetracycline Resistant Bacteria in the surface water Environment. *J Environ Health Sci*. 2015; 41(1): 44-48.
12. QIAGEN. DNeasy® Blood & Tissue Handbook. Available: <https://www.qiagen.com/kr/resources/resourcedetail?id=6b09dfb8-6319-464d-996c-79e8c7045a50&lang=en> [assessed 12 February 2016]
13. Giobannoni SJ, Rappe MS, Vergin KL, Adair NL. 16S rRNA genes reveal stratified open ocean bacterioplankton populations related to the Green Non-Sulfur bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1996; 93: 7979-7984.
14. Sutter VL, Kwock YY, Finegold SM. Susceptibility of *Bacteroides fragilis* to Six Antibiotics Determined by Standardized Antimicrobial Disc Susceptibility Testing. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1973; 3(2): 188-193.
15. Finlay JE, Miller LA, Poupard JA. Interpretive criteria for testing susceptibility of staphylococci to mupirocin. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1997; 41(5): 1137-1139.
16. Oh HK, Park JH. Characteristics of Antibiotic Resistant Bacteria in Urban Sewage and River. *Journal of KSEE*. 2009; 31(3): 232-239.
17. Available: <https://en.wikipedia.org/wiki/Enterobacter> [accessed 8 July 2015].
18. Enterobacter Infections. Available: <http://emedicine.mediscape.com/article/216845-overview> [accessed 21 October 2015].
19. Hossain A, Ferraro MJ, Pino RM, Dew RB, Moland ES, Lockhart TJ, et al. Plasmid-Mediated Carbapenem-Hydrolyzing Enzyme KPC-2 in an Enterobacter sp. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*. 2004; 48(11): 4438-4440.
20. Brisse S, Milatovic D, Fluit AC, Verhoef J, Schmitz FJ. Epidemiology of Quinolone Resistant of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2000; 19: 64-68.
21. Brisse S, Grimont F, Grimont PAD. The Genus *Klebsiella*. *Prokaryotes*. 2006; 6: 159-196.
22. Yigit H, Queenan AM, Rasheed JK, Biddle JW, Domenech-Sanchez A, Alberti S, et al. Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella oxytoca* Harboring Carbapenem-Hydrolyzing  $\beta$ -Lactamase KPC-2. *ANTIMICROB. AGENTS CHEMOTHER*. 2003; 47(12): 3881-3889.
23. Brisse S, Milatovic D, Fluit AD C, Verhoef J, Martin N, Sheuring S, et al. Comparative In Vitro Activities of Ciprofloxacin, Clinafloxacin, Gatifloxacin, Levofloxacin, Moxifloxacin, and Trovafloxacin against *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, and *Enterobacter aerogenes* Clinical Isolates with Alterations in GyrA and ParC Proteins. *ANTIMICROB. AGENTS CHEMOTHER*. 1999; 43(8): 2051-2055.
24. Kim YJ, Kim JG, Kim JO. Study on Antibiotic Resistant bacteria in Hospital Effluents. *J. Korea Society of Environmental Administration*. 2015; 21(3): 23-30.
25. Available : <http://news.joins.com/article/19094395> [accessed 20 November 2015]
26. Larsson DGJ, Pedro CD, Paxcus N. Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *Journal of Hazardous Materials*. 2007; 148: 751-755.
27. Hernando MD, Mezcuca M, Fernández-Alba AR, Barceló D. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta*. 2006; 69: 334-342.
28. G. Hey G, Grabic R, Ledin A, Jansen JLC, Andeson HR. Oxidation of pharmaceuticals by chlorine dioxide in biologically treated wastewater. *Chemical Engineering Journal*. 2012; 185(5): 236-242.
29. Santiago Esplugas S, Bila DM, Krause LGT, Dezotti M. Ozonation and advanced oxidation technologies to remove endocrine disrupting chemicals (EDCs) and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in water effluents. *Journal of Hazardous Materials*. 2007; 149(3): 631-642.