

제약공단 방류수 유입 하천에서의 항생제 내성 bacteria에 관한 연구

김영진 · 김영규*[†]

(주)청룡환경

*용인대학교 환경학과

Study on Antibiotic Resistant Bacteria in Surface Water Receiving Pharmaceutical Complex Effluent

Young Jin Kim and Young Gyu Kim*[†]

Chung Ryong Environment Co., LTD. Seoul, Korea

*Department of Environmental Science, Yongin University, GyeonggyDo, Koerea

ABSTRACT

Objectives: The purpose of this study was to characterize penicillin G resistant bacteria in surface water from pharmaceutical complex effluent.

Methods: Surface water was sampled from pharmaceutical complex effluent 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 bacteria were selected from the effluent and subjected to 16S rRNA analysis for the penicillin G resistant species determination. Identified resistant strains were tested for resistance to various antibiotics.

Results: Penicillin G resistant bacteria were present at 8.0% in terms of culturable heterotrophic bacteria. Identified penicillin G resistant bacteria exhibited resistance to more than nine of the antibiotics studied. These resistant bacteria are gram negative and are closely related to pathogenic species.

Conclusion: Multi-antibiotic resistant bacteria in the surface water of pharmaceutical complex effluent suggest the need for disinfection and advanced oxidation processed for pharmaceutical effluent.

Key words: aeromonads, multi-antibiotic resistant bacteria, penicillin G, pharmaceutical effluent, surface water

I. 서 론

60여년 동안 인간과 가축 의약품, 농업에의 항생제 이용은 항생제에 대해 저항성을 나타내거나 저항성을 획득한 세균의 발달을 초래하였다. Plasmid, phage, conjugative transposon, IS element, gene cassette 같은 이동 가능한 유전 요소들은 세균들에 대한 선택적 압력에 빠르게 작용하고 있다. 오늘날

다제내성과 임상적으로 중요한 여러 가지 약제에 저항성을 보이는 감염균의 증가는 효과적인 의학치료를 위협하고 있다.¹⁾ 임상치료 농도보다 낮은 수준의 항생제 농도는 항생제에 대한 저항성 선택과 항생제 내성 유전자 전달에 중요한 역할을 할 수 있으며, 낮은 농도에 노출되면 항생제 내성균의 선택 속도를 증가시키는 것으로 생각되고 있다.²⁾

병원 방류수나 도시하수 처리공정의 폭기조 및 혐

[†]Corresponding author: Department of Environmental Science, Yongin University, Yongin, Korea, Tel : +82-31-8020-2751, Fax : +82-31-8020-2886, E-mail : envinet1004@hanmail.net

Received: 21 June 2016, Revised: 14 December 2016, Accepted: 16 December 2016



Fig. 1. Sampling site.

기성 공정에 존재하는 항생물질에 의해 내성 세균들이 선택될 수 있으며, 실제로 방류수나 폐수처리공정에서 내성 또는 다제내성균들이 확인되고 있다. 이들 항생제 내성균은 방류수, 토양이나 다른 환경으로도 배출되게 된다.³⁾

제약회사는 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.^{2,4,5)}

환경부에서 발표한 자료에 의하면 국내 10 여 개 제약회사 방류수에서 항생제를 조사한 결과 penicillin G, ciprofloxacin, lincomycin, tylosin 등의 항생제가 검출되었으며, 특히 ciprofloxacin과 oxytetracycline 같은 항생제는 외국의 도시하수 방류수나 제약회사 방류수 유입하천에서도 확인되고 있다.^{4,6,7)}

산업공단 폐수처리장의 경우 현재까지 법적으로

일반하수 및 폐수와 마찬가지로 일반항목에 대한 배출기준을 만족시키면 하천으로 방류가 가능하다. 공단 폐수처리장의 방류수는 수질오염방지시설에 의해 처리되고 있으며 수질오염물질 배출허용기준은 Table 1과 같다.⁸⁾

선정된 제약단지는 경기도 화성시에 위치하는 산업단지로 10여 개의 제약회사가 입주해 있는 산업단지로 하나의 종말처리장에서 폐수가 처리되어 방류되고 있다. 본 연구는 제약단지 방류수가 유입되는 하천을 선정하여 하천수 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 내성균의 항균제 spectrum을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 채취지점 및 채취방법

2015년 5월 경기도 화성시에 위치하는 H 제약공단 방류수가 유입되는 하천에서 I L를 채취하여 무균 채수병에 담아 냉장 보관하여 실험실로 이송하였다.

2. 방류수 수질조사

유입하천의 수온, 용존산소농도(dissolved oxygen), pH는 DO/pH meter (DH-32P, Toa, Japan)으로 측정하였다. 하천의 총질소, 총인 및 총유기탄소는 분석 전에 0.45 μm 기공의 여과지 (Advnatec, Japan)를 사용하여 부유물질을 제거하였으며, 총질소 및 총인은 연속측정기인 Integral Futura (Alliance, USA)로 측정하였으며, 총유기탄소는 TOC-L (Shimadzu, Japan)을 이용하여 분석하였다.

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

District	Scale	Public wastewater treatment facility					
	BOD (mg/L)	COD (mg/L)	SS (mg/L)	T-N (mg/L)	T-P (mg/L)	Total coliforms (cfu/mL)	Ecotoxicity (TU)
I	10	20	10	20	0.2	3,000	1
II	10	20	10	20	0.3	3,000	1
III	10	40	10	20	0.5	3,000	1
IV	10	40	10	20	2	3,000	1

3. Penicillin G 내성균 선별

1) 종속영양세균 측정

시료 내 종속영양세균의 수를 파악하기 위해 멸균된 생리식염수로 100배 희석하여 1.0 mL씩 표준화 천배지(plate count agar, Difco, USA) plate 3장에 분주하여 35°C에서 48시간 배양하였다.

2) Penicillin G 내성균 선별

시료를 멸균된 생리식염수로 10배 희석하여 TS(tryptic soy) agar(Difco, USA)에 penicillin G (Sigma-Adrich, USA)의 MIC(minimum inhibitory concentration)인 32 mg/L 농도⁹⁾로 첨가된 고체배지에 각각 0.2 mL씩 3장에 도말하고 35°C에서 24시간 배양하여 출현하는 Penicillin G 내성균을 선별하였다.¹¹⁾

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 순수분리하였다.¹⁰⁾

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.¹¹⁾ 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 MgCl₂, 200 µM dNTPs, 그리고 Taq buffer, 1 unit Taq DNA polymerase)로 다음과 같은 조건으로 PCR을 수행하였다. Initial denaturation step을 95°C에서 2분, 30주기 반복으로 denaturation step: 95°C에서 30초, annealing step: 58°C에서 30초, elongation step: 72°C에서 1분 동안 실시하고, 72°C에서 final elongation step을 7분간 실시하였다. 증폭된 PCR 산물

은 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 염기서열분석(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) guideline⁹⁾, Sutter 등¹²⁾, Finlay 등¹³⁾의 판정방법에 따라 각각의 항생제에 대한 내성을 판정하였다.

III. 결 과

1. 제약공단 방류수 유입하천의 수질조사

방류수가 유입되는 하천의 수질측정 결과는 Table 2와 같다. 수온은 23.7°C, pH는 7.13, 용존산소는 9.7 mg/L이었다. 총유기탄소는 206 mg/L, 총인은 0.089 mg/L, 총질소는 15.282 mg/L이었다.

2. 종속영양세균수

Table 3는 제약공단 방류수 유입하천에서 종속영양세균의 검출된 숫자를 보여주고 있다. 종속영양세균은 6.9×10³ CFU/mL이 검출되었다.

Table 2. Wastewater qualities of the stream that receives the pharmaceutical complex effluent

Items	Results
Temperature(°C)	23.7
pH	7.13
DO(mg/L)	9.7
Total organic carbon(mg/L)	206.43
Total phosphorus (mg/L)	0.089
Total nitrogen (mg/L)	15.282

Table 3. Penicillin G resistant bacteria cell number in the stream that receives the pharmaceutical complex effluent

Classification	CFU/mL
Heterotropic bacteria	$6.9 \times 10^3 \pm 3.1 \times 10^3^*$
Penicillin G resistant bacteria	$5.5 \times 10^2 \pm 1.8 \times 10^2$

* : standard deviation

Table 4. Frequencies of isolated penicillin G resistant bacteria in the stream water that receives the pharmaceutical complex effluent

species name	CFU/mL
<i>Aeromonas salmonicida</i>	135
<i>Aeromonas hydrophila</i>	15
<i>Aeromonas</i> sp.	120
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	70
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	65
<i>Enterobacter</i> sp.	90
<i>Microvirgula aerodenitrificans</i>	10
<i>Burkholderia caryophylli</i>	5
<i>Comamonas jiangduensis</i>	5
<i>Pseudomonas putida</i>	5
<i>Acidovorax temperans</i>	5
<i>Citrobacter freundii</i>	20

3. Penicillin G 내성균 선별

방류수 유입하천의 penicillin G 내성균을 확인하기 위해 TSA 항생제 배지에 0.2 mL씩 3장의 plate에 도말하여 배양한 결과, 12개중 109개의 penicillin G 내성균이 확인되었고 16S rRNA를 이용하여 균을 동정한 결과 *A. salmonicida*가 27개, *C. indologenes* 14개, *Aeromonas* sp. 24개 *Enterobacter* sp. 18개, *R. ornithinolytica* 13개, *A. hydrophila* 3개, *M. aerodenitrificans* 2개, *B. caryophylli* 1개, *C. jiangduensis* 1개, *P. putida* 1개, *A. temperans* 1개, *C. freundii* 4개로 확인되었으며 희석을 고려한 이들 내성균의 빈도는 Table 4에 나타났다.

4. Penicillin G 내성주의 항균 spectrum

확인된 *Aeromonas salmonicida*, *Chryseobacterium indologenes*, *Aeromonas* sp., *Enterobacter* sp., *Raoultella ornithinolytica*, *Aeromonas hydrophila*, *Microvirgula aerodenitrificans*, *Burkholderia caryophylli*,

Comamonas jiangduensis, *Pseudomonas putida*, *Acidovorax temperans*, *Citrobacter freundii* 등의 penicillin G 내성균 모두를 디스크 확산법으로 각각의 항생제에 대한 억제존의 크기를 측정하여 분리·확인된 균에 대한 내성균의 내성%를 계산하였으며 결과는 Table 5에 나타나 있다. 확인된 *A. salmonicida*는 tetracycline, clindamycin, erythromycin, lincomycin, vancomycin, ampicillin, quinupristin/dalfopristin, linezolid, mupirocin, penicillin G, imipenem 등 11종의 항생제에 내성을 보였으며, *C. indologenes*는 tetracycline, erythromycin, lincomycin, gentamicin, vancomycin, ampicillin, quinupristin/dalfopristin, linezolid, mupirocin, penicillin G, imipenem 등 12종, *Aeromonas* sp.는 clindamycin, lincomycin, vancomycin, ampicillin, quinupristin/dalfopristin, linezolid, mupirocin, penicillin G, imipenem 등 9종, *Enterobacter* sp.는 clindamycin, erythromycin, lincomycin, vancomycin, ampicillin, quinupristin/dalfopristin, linezolid, mupirocin, penicillin G, imipenem 등 11종, *Raoultella ornithinolytica*는 clindamycin, erythromycin, lincomycin, gentamicin, Vvancomycin, ampicillin, quinupristin/dalfopristin, linezolid, mupirocin, penicillin G 등 10종, *Aeromonas hydrophila*는 tetracycline, clindamycin, erythromycin, lincomycin, vancomycin, ampicillin, quinupristin/dalfopristin, linezolid, mupirocin, penicillin G 등 10종, *Microvirgula aerodenitrificans*는 clindamycin, erythromycin, lincomycin, vancomycin, ampicillin, quinupristin/dalfopristin, linezolid, mupirocin, penicillin G 등 9종, *Burkholderia caryophylli*는 clindamycin, erythromycin, lincomycin, vancomycin, ampicillin, quinupristin/dalfopristin, linezolid, mupirocin, chloramphenicol, penicillin G, ceftizoxime 등 11종, *Comamonas jiangduensis*는 clindamycin, erythromycin, lincomycin, gentamicin, vancomycin, ampicillin, quinupristin/dalfopristin, linezolid, mupirocin, ciprofloxacin, penicillin G, ceftizoxime, imipenem 등 13종, *Pseudomonas putida*는 clindamycin, erythromycin, lincomycin, vancomycin, ampicillin, quinupristin/dalfopristin, linezolid, mupirocin, ciprofloxacin, penicillin G, ceftizoxime 등 10종, *Acidovorax temperans*는 tetracycline, clindamycin, erythromycin,

Table 5. Resistant test to various antibiotics of isolated bacteria

Antibiotic	<i>A. salmonicida</i> (n=27)	<i>C. indologenes</i> (n=14)	<i>A. sp.</i> (n=24)	<i>E. sp.</i> (n=18)	<i>R. orithinolytica</i> (n=13)	<i>A. hydrophila</i> (n=3)
	Resistant(%)	Resistant(%)	Resistant(%)	Resistant(%)	Resistant(%)	Resistant(%)
Tetracycline	27(100%)	14(100%)	3(13%)	1(6%)	1(8%)	3(100%)
Clindamycin	27(100%)	0(0%)	24(100%)	18(100%)	13(100%)	3(100%)
Erythromycin	27(100%)	14(100%)	3(13%)	18(100%)	13(100%)	3(100%)
Lincomycin	27(100%)	14(100%)	24(100%)	18(100%)	13(100%)	3(100%)
Gentamicin	0(0%)	14(100%)	1(4%)	0(0%)	13(100%)	1(33%)
Vancomycin	27(100%)	14(100%)	24(100%)	18(100%)	13(100%)	3(100%)
Amicillin	27(100%)	14(100%)	24(100%)	18(100%)	13(100%)	3(100%)
Quinupristin/ Dalfopristin	27(100%)	14(100%)	24(100%)	18(100%)	13(100%)	3(100%)
Linezolid	27(100%)	14(100%)	24(100%)	18(100%)	13(100%)	3(100%)
Mupirocin	27(100%)	14(100%)	24(100%)	18(100%)	13(100%)	3(100%)
Ciprofloxacin	0(0%)	0(0%)	0(0%)	2(11%)	1(8%)	0(0%)
Chloramphenicol	0(0%)	2(14%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	1(33%)
Ceftizoxime	0(0%)	14(100%)	0(0%)	17(95%)	0(0%)	1(33%)
Penicillin G	27(100%)	14(100%)	24(100%)	18(100%)	13(100%)	3(100%)
Imipenem	27(100%)	14(100%)	24(100%)	17(95%)	2(15%)	0(0%)

Table 5. Resistant test to various antibiotics of isolated bacteria(continued)

Antibiotic	<i>M. aerodenitrificans</i> (n=2)	<i>B. caryophylli</i> (n=1)	<i>C. jiangduensis</i> (n=1)	<i>P. putida</i> (n=1)	<i>A. temperans</i> (n=1)	<i>C. freundii</i> (n=4)
	Resistant(%)	Resistant(%)	Resistant(%)	Resistant(%)	Resistant(%)	Resistant(%)
Tetracycline	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	1(100%)	4(100%)
Clindamycin	2(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	4(100%)
Erythromycin	2(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	4(100%)
Lincomycin	2(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	4(100%)
Gentamicin	0(0%)	0(0%)	1(100%)	0(0%)	1(100%)	4(100%)
Vancomycin	2(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	4(100%)
Amicillin	2(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	4(100%)
Quinupristin/ Dalfopristin	2(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	0(0%)	4(100%)
Linezolid	2(100%)	1(100%)	1 (100%)	1(100%)	1(100%)	4(100%)
Mupirocin	2(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	4(100%)
Ciprofloxacin	0(0%)	0(0%)	1(100%)	0(0%)	0(0%)	1(25%)
Chloramphenicol	0(0%)	1(100%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	4(100%)
Ceftizoxime	0(0%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	0(0%)	1(25%)
Penicillin G	2(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	4(100%)
Imipenem	0(0%)	0(0%)	1(100%)	0(0%)	0(0%)	4(100%)

lincomycin, gentamicin, vancomycin, ampicillin, linezolid, mupirocin, penicillin G 등 10종, *Citrobacter freundii*는 tetracycline, clindamycin, erythromycin, lincomycin, gentamicin, vancomycin, ampicillin, quinupristin/dalfopristin, linezolid, mupirocin, chloramphenicol, penicillin G, imipenem 등 13종의 항생제에 내성을 나타냈다.

IV. 고 찰

제약공단 방출수 유입하천의 수질에서 총유기탄소는 206 mg/L, 총질소는 15.282 mg/L으로 일반 하천에 비해 높게 나타났다. Levy 등¹⁴⁾은 세균의 수가 증가하면 공생관계가 있는 병원성 세균으로부터 유전자 이동을 통해 비병원성 세균이 항생제 내성유전자를 받아들여 내성균이 증가할 수 있다고 보고하였다. 따라서, 하천에서 TOC나 총질소 같은 영양물질에 의한 오염도와 내성균 발생에 대해서는 좀더 정밀한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

조사된 하천수의 배양 가능한 종속영양세균의 수는 6.9×10^3 CFU/mL로 Kim 등¹⁵⁾이 기존에 발표된 하천에서의 종속영양세균수 6.0×10^3 CFU/mL와 유사하였다. Penicillin G 내성균의 빈도는 5.5×10^2 CFU/mL였으며 배양 가능한 종속영양세균에 대해 8.0%로 Oh 등¹⁶⁾이 기존에 발표된 도시하수처리장 방류수에서의 penicillin계인 ampicillin의 내성균을 조사한 결과인 12.9%보다는 낮은 결과를 보이고 있다.

제약공단 방류수 하천수에서 우점종으로 나타난 *Aeromonads*는 수생태계, 식품, 어류, 애완동물, 조류, 무척추동물, 진드기 및 곤충류, 자연 토양 등에서 흔히 발견되는 그람 음성 간균이다. 특히 이 *Aeromonas* 속은 음용수, 강, 호수, 저수지, 강하구, 지하수, 하수, 하수처리장 슬러지 등과 같은 수생태계에 항상 존재하고 있으며, 하수처리장의 슬러지에서 최고 10^8 CFU/mL까지도 검출되고 있다. 일반적으로 *Aeromonas* 속은 고인 물보다는 흐르는 물에서 흔히 발견되고 25~35°C에서 빈도가 높다고 알려져 있다.¹⁷⁾ 가장 높은 빈도로 확인된 *A. salmonicida*는 어류에서 furunculosis와 septicaemia를 일으키는 것으로 알려져 있으며 주로 연어류 같은 저온성 어류에 감염한다고 알려져 있다. 일반적으로 *A. salmonicida*는 인간에게는 비병원성이며 37°C에서는 배양되지 않

는 것으로 알려지고 있다. 그러나 본 연구에서는 35°C에서 배양이 가능하였으며 사람 혈액에서 분리된 *A. salmonicida*도 37°C에서 배양이 가능하였다. 사람혈액, 수족관, 연어류 양식장에서 검출된 *A. salmonicida*는 tetracycline과 quinolone에 저항을 보이는 것으로 보고되고 있으나, 본 연구의 하천에서 분리된 *A. salmonicida*는 tetracycline에는 저항성을 보였으나 quinolone계인 ciprofloxacin에는 민감한 것으로 나타났다.^{18,19)} *A. hydrophila*는 넓은 범위의 온도, conductivity, pH, 탁도에서 발견되고 있다. 특히 문제가 되는 것은 해산물, 닭고기, 돼지고기, 쇠고기 등의 식품에서 $10^2 \sim 10^5$ CFU/g 검출되고 있어 건강의 위해 요인으로 작용할 수 있다. 급성장염 같은 질병부터 패혈증, 뇌사성 근막염, 근괴사와 같은 치명적인 질환을 일으킬 수 있다고 알려지고 있다.¹⁹⁾ 기존의 연구에 의하면 이 *Aeromonas*속은 β -lactamase를 갖고 있어 penicillin계 항생물질에 대한 내성을 갖고 있는 것으로 알려지고 있다. 일반적으로 *Aeromonas*속은 fluoroquinolone인 ciprofloxacin에 대해서는 민감하다고 알려져 있는데 본 연구에서 확인된 모든 *Aeromonas*속도 ciprofloxacin에 대해 민감한 것으로 나타나고 있다.¹⁷⁾

일부 *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 내성균이 carbapenem를 가수분해하는 효소인 KPC-2와 동일한 효소를 생산하는 지는 자세한 연구가 필요할 것으로 생각된다.²⁰⁾

*Pseudomonas putida*는 환경에서 β -lactam계 항생제에 대한 내성 유전자의 reservoir로 작용하는 것으로 알려지고 있으며, 도시지역의 하천이나 농촌지역의 농장에서 검출된 *P. putida*에서 β -lactam계 항생제인 ampicillin, amoxicillin, cefoxitin, cefpodoxim, cefotaxime에 대해 내성을 보였으며,²¹⁾ 강에서 분리된 *P. putida*도 imipenem, acylureidopenicillin, meropenem, levofloxacin, ciprofloxacin 등의 항생제에 내성을 나타내는 것으로 보고 되고 있다.²²⁾ 본 연구에서 확인된 *P. putida*도 ampicillin, penicillin G, ceftizoxime 같은 β -lactam계 항생제에 내성을 나타

냈으며 clindamycin, erythromycin, lincomycin, vancomycin, ampicillin, quinupristin/dalfopristin, linezolid, mupirocin, ciprofloxacin 등 10종에 항생제에 내성을 보이고 있다.

*Acidovorax*속은 토양, 수생태계 등에서 흔히 발견되며, 과실썩음병과 잎마름 같은 식물 질병을 일으키는 주요 병원체의 하나로 작용하고 있다. *A. temperans*는 생물막과 플록을 형성할 수 있는 능력을 갖고 있어 슬러지, 하수처리장, 병원 등에서 흔히 발견되고 있으나,²³⁾ 이 세균의 항생제 내성에 대해 연구된 바는 거의 없다. 본 연구에서 확인된 *A. temperans*는 tetracycline, clindamycin, erythromycin, lincomycin, gentamicin, vancomycin, ampicillin, linezolid, mupirocin, penicillin G 등 10종의 항생제에 내성을 보이고 있다.

*Microvirgula aerodenitrificans*는 호기적 조건에서 탈질 반응을 하는 세균으로 슬러지, 폐수처리장, 수로, 연못 등에서 발견되고 있다.²⁴⁾ 임상에서 확인된 일부 *M. aerodenitrificans*는 균혈증을 일으키는 것으로 확인되었고, amoxicillin과 trimethoprim에 저항을 보이는 것으로 보고되고 있으나,²⁵⁾ 본 연구에서 확인된 *M. aerodenitrificans*는 clindamycin, erythromycin, lincomycin, vancomycin, ampicillin, quinupristin/dalfopristin, linezolid, mupirocin, penicillin G 등 9종의 항생제에 내성을 보이고 있다. 이 세균은 임상에서 발견된 예는 없으나 항생제를 처리하는 폐수처리장에 존재할 가능성이 있어 이들 작업장에서 미세물방울로 인한 감염은 배제할 수 없다.²⁶⁾

*Raoultella ornithinolytica*는 Enterobacteriaceae과에 속하는 세균으로 곤충, 어류, 염수에서 분리되고 있으며 어류의 histamine 독성의 원인으로 알려지고 있다.²⁷⁾ *R. ornithinolytica*에 오염된 어류를 부적절한 섭취에 의한 감염, 병원감염이나 지역사회감염이 자주 발생하여 그 위험이 높아지고 있다.²⁸⁾ 또한, 이 세균은 ampicillin과 같은 β -lactam계 항생제 뿐만 아니라 다수의 항생제에 내성을 나타내는 것으로 알려지고 있으며 본 연구에서 확인된 *R. ornithinolytica*도 clindamycin, erythromycin, lincomycin, gentamicin, vancomycin, ampicillin, quinupristin/dalfopristin, linezolid, mupirocin, penicillin G 등 10종의 항생제에 내성을 보였다.

*Citrobacter freundii*는 토양, 수생태계, 하수, 음식

물, 동물과 사람의 장에서 사는 세균으로 기회감염성 세균인 동시에 병원 감원균이다.²⁹⁾ 임상에서 확인된 *C. freundii*는 β -lactamase와 carbapenemase 효소를 갖고 있어³⁰⁾ ampicillin, piperacillin, temocillin 같은 β -lactam계 항생제와 imipenem, ertapenem, meropenem 같은 carbapenem계 항생제뿐만 아니라 vancomycin, cephalosporin, ceftriaxone과 같은 항생제에 내성이 있는 것으로 알려지고 있다. 본 연구에서도 *C. freundii*는 imipenem, vancomycin, ampicillin, chloramphenicol 등 13종의 항생제에 내성을 보이고 있다.

*Comamonas*속은 흰개미 소화관, 습지, 활성 슬러지, 토양, 건조침출액의 여과액, 사람, 담수, 산림의 지하침전지역, 유허샘 침전지역 등 다양한 환경에서 발견되는 것으로 보고되고 있다. 이중 *C. testosteroni* 같은 균은 인간에게 질병을 일으키는 알려지고 있으나, *C. jiangduensis*가 질병을 일으키는 지 여부는 알려지지 않고 있다.³¹⁾ 본 연구에서 확인된 *C. jiangduensis*는 clindamycin, erythromycin, lincomycin, gentamicin, vancomycin, ampicillin, quinupristin/dalfopristin, linezolid, mupirocin, ciprofloxacin, penicillin G, ceftizoxime, imipenem 등 13종의 항생제에 내성을 보이고 있다.

*Chryseobacterium indologenes*는 *Chryseobacterium*속 중에서 임상감염을 가장 일으키는 균으로 알려지고 있으며 개방 상처나 병원 장비에 존재하면서 병원감염을 일으키는 기회감염성 병원체로 면역이 떨어진 환자에게는 치명적일 수 있다. 낭포성 섬유증을 겪고 있는 환자에서 분리된 *C. indologenes*는 penicillin, cephalosporin, imipenem에 내성을 보이는 것으로 보고 되었다.³²⁾ 본 연구에서 확인된 *C. indologenes*도 ampicillin, penicillin G 등의 penicillin계 항생제와 imipenem뿐만 아니라 tetracycline, erythromycin, lincomycin, gentamicin, vancomycin, quinupristin/dalfopristin, linezolid, mupirocin, ceftizoxime 등 12종에 내성을 보였다.

Burkholderia속 중 *B. cepacia*나 *B. gladioli* 같은 균은 인간에게 질병을 일으키는 것으로 알려져 있다.³³⁾ 그러나 *Burkholderia caryophylli*는 카네이션의 질병을 일으키는 주요 원인균 중 하나로 인간에게 질병을 일으키는 지에 대한 임상정보는 없다.³⁴⁾ 본 연구에서 확인된 *B. caryophylli*는 clindamycin, erythromycin,

lincomycin, vancomycin, ampicillin, quinupristin/dalfopristin, linezolid, mupirocin, chloramphenicol, penicillin G, ceftizoxime 등 11종의 항생제에 내성을 보이고 있다. 식물 병원체가 인간에게 사용되고 있는 항생제 내성을 보이고 있어 자연계에서 항생제에 대한 내성 유전자가 쉽게 이동할 수 있음을 보여주고 있다.¹⁾

본 연구에서 확인된 12종의 하천 세균들은 기존에 발표된 *Citrobacter freundii* 등 보다 더 많은 항생제에 대해 내성을 보이고 있으며 특히, 식물성 병원체로 알려진 *Burkholderia caryophylli*는 다수의 항생제에 내성을 나타내고 있어, 이들 세균들의 항생제 내성을 유발하는 유전자에 대해 연구가 필요할 것으로 생각된다.

이들 penicillin계에 대해 내성을 보이는 그람 음성균은 erythromycin, linezolid와 같은 non β -lactam계 항생제에도 내성을 보이고 있어 환경에서의 다제내성균은 일반적인 현상이라고 보여지며 본 연구에서도 penicillin G에 내성을 보인 균주는 모두 다제내성균임을 확인할 수 있었다.^{3,20)} 특히, 메티실린 내성균에 치료에 사용되는 vancomycin은 본 연구에서 확인된 12종 모두가 내성을 갖는 것으로 확인되었으며 Kim 등^{3,5,15)}이 발표한 논문에서도 대부분의 다제내성균들이 이 항생제에 내성을 갖고 있어 메티실린 내성균 치료에 사용이 어려울 것으로 생각된다.

다제내성균들의 감염에 의한 유병률 및 사망률이 증가되고 있고, 감염에 따른 치료에 상당한 경제적 비용이 들 뿐 아니라, 내성유전자의 보관소로 작용할 수 있다고 알려지고 있어 이들에 의한 감염에 주의하는 것이 필요하다. 질병관리본부의 발표에 의하면 국내에서도 다제내성균에 의한 감염이 꾸준히 증가하고 있으며 2011년 2만2928건에서 2014년 3만8074건으로 감염사례가 꾸준히 증가하고 있다.³⁵⁾

따라서 제약공단 방류수에 포함되어 있는 항생제나 항생제 내성균들이 생태계로 방출될 경우 위험성이 높아 항생제가 포함된 방류수에 대해 독성테스트뿐만 아니라 환경위해성평가가 수행되어야 할 것으로 생각된다.^{36,37)}

V. 결 론

제약공단 하수처리 방류수에 존재하는 항생제나

다제내성균은 생태계 및 인간을 위협할 수 있어, 방류수에 존재하는 항생제와 다제내성균을 오존이나 이산화염소 등으로 처리하는 산화법, 자외선을 이용한 살균법, 막분리 공정 등의 도입을 적극적으로 검토하는 것이 필요하며 폐수처리 공정의 고도화를 통해 처리 효율을 높이는 노력이 필요하다고 생각된다.³⁸⁻⁴⁰⁾

또한, 항생제에 대한 적절한 연관이 없어도 저항성이 지속적으로 증가되고 있기 때문에 항생제 내성균의 출현이나 확산을 막기 위해 지표수에서 이들 다제내성균의 지속적인 모니터링을 함으로써 잠재적인 수인성 병원균의 확인뿐만 아니라 이들의 건강상의 위험을 감소시키기는 것이 중요하다고 생각된다.⁴¹⁾

본 연구에서는 제약공단 하수처리장 방류수 유입 하천에 존재하는 penicillin G 내성균의 종류 및 오염도, 이들의 항생제 spectrum에 대해 파악하였다. 그러나 본 연구는 특정 시기에 국한되어 현장조사하였기 때문에 계절적 특성 등을 충분히 반영하고 있지 못하고 있다. 또한 우점종의 출현이 희석에 의해 영향을 받고 있어 내성균 선별을 위한 도말에 의한 실험방법이 개선이 필요하다. 따라서 하천의 계절적 특성 및 실험방법 등에 대한 심도 깊은 연구조사가 추후 수행되어야 할 것으로 사료된다.

References

1. Heuer H, Krögerrecklenfort E, Wellington EMH, Egan S, van Elsaas JD, van Overbeek L, et al. Gentamicin resistance in environmental bacteria : prevalence and transfer. *FEMS Microbiol Ecol.* 2002; 42: 289-302.
2. Kümmerer K. Significance of antibiotics in the environment. *J Antimicrob Chemother.* 2003; 52: 5-7.
3. Kim YJ, Kim JG, Kim JO. Study on Antibiotic Resistant Bacteria in Hospital Effluent. *J. Korea Soc Environ Admin.* 2015; 21(1): 23-30.
4. Larsson DGK. Pollution from drug manufacturing: review and perspectives, Available: <http://rstb.royalsocietypublishing.org> [assessed 9 February 2015]
5. Kim JG, Kim YJ. Study on Antibiotic Resistant Enterobacteria in Pharmaceutical Effluent. *J. Environ Health Sci.* 2016; 42(1): 34-40.
6. National Institute of Environmental Research. Available: <http://img.kisti.re.kr/originalView/origi->

- nalView.jsp [accessed 20 May 2016]
7. Andreozzi R, Raffaele M, Nicklas P. Pharmaceutical in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere*. 2003; 50: 1319-1330.
 8. Ministry of Environment. Available: <http://www.law.go.kr/DRF/lawService.do?OC=jaa806&target=law&MST=166074&type=HTML&mobileYn=&efYd=20150101> [accessed 20 May 2016]
 9. Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 23rd informational supplement: M100-S23. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute; 2013.
 10. QIAGEN. DNeasy® Blood & Tissue Handbook. Available: <https://www.qiagen.com/kr/resources/resource-detail?id=6b09dfb8-6319-464d-996c-79e8c7045a50&lang=en> [assessed 12 February 2016]
 11. 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 National Acad Sci* 1996; 93:7979-7984.
 12. 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.
 13. Finlay JE, Miller LA, Poupard JA. Interpretive criteria for testing susceptibility of staphylococci to mupirocin. *Antimicrob. Agents Chemother* 1997; 41(5): 1137-1139.
 14. Levy SB, Marshall B. Antibacterial resistance worldwide. *Nat Med*. 2004; 10(12): 122-129.
 15. Kim YJ, Kim JO. Study on Oxytetracycline Resistant Bacteria in the Surface Water Environment. *J Environ Health Sci* 2015; 41(1): 40-48.
 16. Oh HK, Park JH. Characteristics of Antibiotic Resistant Bacteria in Urban Sewage and River. *Journal of KSEE*. 2009; 31(3): 232-239.
 17. Janda JM, Abbott SL. The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity and Infection. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23(1): 35-73.
 18. Tewar R, Dudeja M, Nandy S, Das AK. Isolation of *Aeromonas salmonicida* from Human Blood Sample: A Case Report. *J Clin Diag Res* 2014; 8(2): 139-140.
 19. Kim JH, Hwang SY, Son JS, Han JE, Jun JW, Shin SP, et al. Molecular characterization of tetracycline- and quinolone-resistant *Aeromonas salmonicida* isolated in Korea. *J Vet Sci* 2010; 12(1): 41-48.
 20. 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. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(11): 4438-4440.
 21. Meireles C, Costa G, Guinote I, Albuquerque T, Botelno A, Corlos C, et al. *Pseudomonas putida* are environmental reservoirs of antimicrobial resistance to β -lactamic antibiotics. *World J Microbiol Biotechnol* 2013; 29: 1317-1325.
 22. Kittinger C, Lipp M, Baumert R, Folli B, Koraimann G, Toplitsch D, et al. Antibiotic Resistance Patterns of *Pseudomonas* spp. Isolated from the River Danube. *Front Microbiol*. 2016; 7: 1-8.
 23. Andersen BM, Teige B, Hochlin K, Elsebutangen N, Fagerbakk L, Seljorslia B, et al. Failure of Ionised Water Produced by Activation Ionator to Kill Potential Harmful Bacteria. *Microbial Biochem Technol* 2012; 4(3): 82-85.
 24. https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Microvirgula_aerodenitrificans [assessed June 2016]
 25. Murphy ME, Goodson A, Malnick H, Shah J, Neelamkavil R, Devi R. Recurrent *Microvirgula aerodenitrificans* Bacteremia. *J Clin Microbiol*. 2012; 50(8): 2823-2825.
 26. Li J, Zhou L, Zhang X, Xu C, Dong L, Yao M. Bioaerosol emissions and detection of airborne antibiotic resistance genes from a wastewater treatment plant. *Atm Environ* 2016; 124: 404-412
 27. Kanki M, Tsukamoto T, Shbata T. *Klebsiella pneumoniae* produces no histamine: *Raoutella plantico* and *Raoutella omithinolytica* strains are histamine producers. *Appl Environ Microbiol*. 2014; 68(7): 305-312.
 28. Seng P, Boushab BM, Romain F, Gouriet F, Bruder N, Martin C, et al. *Int J Infect Disease*. 2016; 45: 65-71.
 29. https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Citrobacter_freundii [assessed 9 June 2016]
 30. Poirel L, Ros A, Carricajo A, Berthelot P, Pozzetto B, Bernabeu S, et al. Extremely Drug-Resistant *Citrobacter freundii* Isolate Producing NDM-1 and Other Carbapenemases Identified in a Patient Returning from India. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55(1): 447-448.
 31. Sun LN, Zhang J, Chen Q, He J, Li QF, Li SP. *Comamonas jiangduensis* sp., a biosurfactant-producing bacterium isolated from agricultural soil. *Int J Systemic Evolu Microbiol*. 2013; 63: 2168-2173.
 32. Cimmion T, Rolain JM. Whole genome sequencing for deciphering the resistant of *Chryseobacterium*

- indologenes*, an emerging multidrug-resistant bacterium from a cystic fibrosis patient in Marseille, France. *New Microbe New Infect* 2016; 12: 35-42.
33. Baxter IA, Lambert PA, Simpson N. Isolation from clinical sources of *Burkholderia cepacia* possessing characteristics of *Burkholderia gladioli*. *J Antimicrob Chemother* 1997; 39: 169-175.
34. Kawanishi T, Uematsu S, Nishimura K, Otani T, Tanaka-Miwa C, Hamamoto H, et al. A new selective medium for *Burkholderia caryophylli*, the causal agent of carnation bacterial wilt. *Plant Pathology* 2009; 58: 237-242.
35. Available : <http://news.joins.com/article/19094395> [accessed 20 November 2015]
36. Larsson DGJ, Pedro CD, Paxeus N. Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *J Hazard Materials* 2007; 148: 751-755.
37. 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.
38. G. Hey G, Grabic R, Ledin A, Jansen JLC, Andeson HR. Oxidation of pharmaceuticals by chlorine dioxide in biologically treated wastewater. *J Chem Eng* . 2012; 185(5): 236-242.
39. 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. *J Hazard Materials* 2007; 149(3): 631-642.
40. Wellington EM, Boxall ABA, Cross P, Feil E, Gaze WH, Hawkey PM, et al. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistant in Gram-negative bacteria. *Infect Dis* 2013; 13(2); 155-165.
41. Martin da Costa P, Loureiro L, Matos AJF. Transfer of Multidrug-Resistant Bacteria Between Intermingled Ecological Niches: The Interface Between Humans, Animals and the Environment. *Int J Environ Res Public Health* 2013; 10: 278-294.