

Note

하수처리장 방류수에 존재하는 항생제 내성인자가 하천에 미치는 영향

장예진¹ · 유용재¹ · 설우준² · 차창준² · 이옥재³ · 채종찬^{1*}

¹전북대학교 생명공학부 및 환경생명신기술연구소, ²중앙대학교 시스템생명과학과, ³DK EcoV 환경미생물연구소

Effect of antibiotic resistant factors in effluent of wastewater treatment plant on stream

Yejin Jang¹, Yong-Jae Yoo¹, Woo Jun Sul², Chang-Jun Cha², Ok-Jae Rhee³, and Jong-Chan Chae^{1*}

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

²Department of Systems Biotechnology, Chung Ang University, Anseong 17546, Republic of Korea

³DK EcoV Environmental Microbiology Lab., Cheonan 31075, Republic of Korea

(Received October 19, 2017; Revised October 20, 2017; Accepted October 20, 2017)

The antibiotic resistant genes (ARG) and mobile genetic elements (MGE) were investigated with the effluent of wastewater treatment plant (WWTP), and river waters of upstream and downstream in order to elucidate the effect of effluent on antibiotic resistance in a natural river. Total numbers of 134~183 of ARG and MGE were detected and the abundance of ARG and MGE was 0.063~0.422 copies per one of 16S rRNA gene in three water samples. Effluent sample contained the highest amount of the total number and abundance of ARG and MGE whereas total viable cells were observed in the lowest amount among the three samples. This indicated that the genes were originated from cells died during the wastewater treatment process. In addition, the co-relationship of abundance between ARG and MGE suggested that acquired resistance was a prevalent mechanism among the antibiotic-resistant bacteria existing in WWTP.

Keywords: antibiotic resistance, effluent, wastewater treatment plant

환경에 서식하는 미생물들은 항생제내성인자의 전파 경로 중 하나로서 인식되고 있으며 환경 중 잔류항생제에 의해 항

생제 내성유전자를 가지고 있는 환경미생물들이 증가될 수 있다(Knapp *et al.*, 2010). 의료시설이나 축산 농가 등에서 사용된 항생제는 병원 폐수, 생활하수, 가축분뇨 등의 형태로 배출된다. 배출된 항생제가 완전하게 처리되지 못하여 환경 중으로 유입된 잔류항생제는 항생제 내성균의 발생 및 증가를 유발할 수 있다(Ohlsen *et al.*, 2003; Reinthaler *et al.*, 2003; Ikehata *et al.*, 2006).

또한 Su 등(2014)은 잔류항생제와 더불어 총질소(TN), 총황(TS), 총유기탄소(TOC), 구리, 아연, 니켈과 같은 환경오염 지표와 항생제 내성유전자의 분포 사이에 상관관계가 있다고 보고하였다. 이것은 환경 중의 항생제 내성유전자 오염문제는 잔류항생제 원인 뿐만이 아니라 농업활동, 산업활동, 하수방류와 같은 인위적인 활동(anthropogenic activity)들과 밀접한 상관관계가 있다는 것을 의미한다.

환경에서 분리된 항생제내성균과 임상에서 분리된 항생제 내성균들의 항생제 내성유전자 사이에는 높은 염기서열 상동성을 보일 뿐만 아니라 유전자 전이에 관여하는 유전자들도 높은 상동성을 보인다고 Forsberg 등(2012)은 보고하였다. 또한 환경에 존재하는 미생물 중 99% 이상이 배양이 어려운 비배양성 미생물들이다. 따라서 환경 중의 항생제 내성인자 파악과 전파 양상 등을 이해하기 위해서는 배양법에 의한 연구 뿐만 아니라 메타게놈을 이용하여 항생제 내성유전자를 분석

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

하는 비배양법에 기반한 연구도 요구된다.

이와 같이 최근 주요 쟁점으로 떠오르는 항생제 내성균의 역학조사 및 특성규명을 위하여, 균주를 분리하지 않고 하천 및 토양 등 환경시료로부터 항생제 내성유전자를 직접 분리하고 내성유전자의 분포와 특징을 이해하기 위한 다양한 분자생물학적 연구방법이 수행되고 있다. Quantitative PCR이나 microarray와 같은 분자생물학적 검출기법을 통해 특정 내성유전자의 존재를 확인하는 것이 가능해졌고 메타게놈의 염기서열을 결정하여 분석하는 연구가 적용되고 있다(Schmieder and Edwards, 2012; Chen *et al.*, 2013; de Castro *et al.*, 2014).

하수처리장에서 방류되는 처리수의 영향을 알아보기 위해 만경강 유역에 위치한 하수처리장을 중심으로 3지점을 선정하였으며 방류구 상류지점 하천수(J1; 35°52'31", 127°06'06"), 방류수(J2; 35°52'38", 127°06'02"), 방류구 하류지점 하천수(J3; 35°52'46", 127°05'45")로부터 물 시료를 2015년 7월에 채취하였다.

일반세균은 먹는 물 공정시험기준에 따라 시료를 10단계 희석법으로 희석하고 시료 1 ml를 영양배지(nutrient agar)에 혼합평판배양법으로 접종하고, 35°C에서 48시간 배양 후 형성된 집락을 계수하여 CFU/ml로 표기하였다. 총대장균군과 대장균은 수질오염공정시험기준의 효소기질이용법을 준용하여 분석하였다. 시료 100 ml에 Colilert (IDEXX)를 혼합하여 녹인 후 Qunti-tray에 주입하고 35°C에서 24시간을 배양하였으며, 노란색이 발색한 경우에는 총대장균군으로, 자외선 조사에서 형광이 발생한 경우에는 대장균으로 계수하고, 제작사에서 제공한 MPN표에 대입하여 MPN/100 ml로 표기하였다.

상류지점(J1)에서 일반세균은 1.5×10^4 CFU/ml, 대장균은 2.6×10^4 MPN/100 ml로 가장 높은 반면 하수처리장 방류수(J2)에서는 일반세균이 6.6×10^1 CFU/ml, 대장균은 1.0×10^0 MPN/100 ml로 가장 낮았으며, 방류수의 영향을 받는 것으로 생각되는 하류지점(J3)에서는 일반세균이 7.8×10^3 CFU/ml, 대장균은 1.2×10^4 MPN/100 ml로 상류지점에 비해 낮아지는 경향을 보였다(Table 1). 이러한 결과는 하수처리에 의해 세균이 제거된 방류수가 다량 유입됨에 따라 방류수 합류 이후 희석되는 효과로 판단된다.

Table 1. Abundance of bacteria in water samples collected in this study

Site	Total colonies (CFU/ml)	Total coliform (MPN/100 ml)	<i>E. coli</i> (MPN/100 ml)
J1	1.5×10^4	1.5×10^5	2.6×10^4
J2	6.6×10^1	7.2×10^1	1.0×10^0
J3	7.8×10^3	9.2×10^4	1.2×10^4

채취한 5 L의 물 시료에 부유하는 세균으로부터 DNA를 추출하기 위하여 다음과 같은 여과방법을 사용하였다. 10 µm cellulose acetate filter (Advantec)로 전처리 여과를 수행하여 큰 크기의 부유물 및 조류 등과 같은 진핵미생물을 제거하였으며 전처리 된 시료에서 세균을 회수하기 위해 0.2 µm cellulose acetate filter (Advantec)로 여과하여 균체를 모았고 그 여과막을 게놈 DNA 추출을 위해 사용하였다.

여과막은 액체질소에서 동결 후, 막대사발을 이용하여 균질화 하였으며 FastDNA Spin Kit (for Soil, MP Biomedicals)를 사용하여 균질화 된 시료로부터 메타게놈 DNA를 추출하였다. DNA는 SmartChip real-time PCR (Wafergen Biosystems)의 주형으로 사용되었다. 총 342개의 항생제 내성 유전자(antibiotic resistance gene, ARG)와 37개의 전파 관련 유전자(mobile genetic elements, MGE) 검출을 위해 각 유전자들을 증폭할 수 있도록 제작된 primer들을 사용하였으며 이들은 항생제 내성 유전자를 정량하는 연구에 이미 사용되어 항생제 내성유전자 모니터링에 적합하다는 것이 이미 검증된 primer들이다(Looft *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2013).

Wafergen Biosystems의 SmartChip real-time PCR system을 사용하여 고속 대용량 정량 PCR을 제조사의 방법에 따라 수행하였다. PCR 혼합액은 1X light cycler 480 SYBR green I master (Roche Life Sciences), 1 mg/ml bovine serum albumin (New England Biolabs), 500 nM의 forward primer와 reverse primer, 5 ng/µl의 DNA 주형으로 구성되었으며, PCR 혼합액은 5184-well chip에 SmartChip multisample nanodispenser (Wafergen Biosystems)를 사용하여 분주되었다. SmartChip cycler를 사용하여 다음과 같은 조건으로 real-time qPCR을 수행하였다: 95°C 10분, 40 cycles (95°C 30초/60°C 30초).

정량 PCR 결과는 SmartChip qPCR software (v2.7.0.1, Wafergen Biosystems)를 사용하여 분석하였으며, 다양한 이중의 melting peak가 있는 경우와 증폭 효율 1.8~2.2 외의 결과는 삭제하였다. 정량 PCR은 3 반복으로 수행되었으며, threshold cycle (Ct) 30을 검출한계로 사용하여 유전자의 copy 수를 아래의 식과 같이 계산하였다.

$$\text{Gene copy number} = 10^{(30-Ct)/(10/3)}$$

DNA를 추출한 각 하천시료에 존재하는 미생물 개체수가 다르므로 동일한 미생물 개체수로 보정하기 위해 모든 미생물에 존재하는 16S rRNA 유전자를 표준유전자로 사용하였다. 그리고 산출된 항생제 관련 유전자의 copy 수를 표준화하기 위해 각 시료의 16S rRNA 유전자 copy 수로 나누어 상대적 값

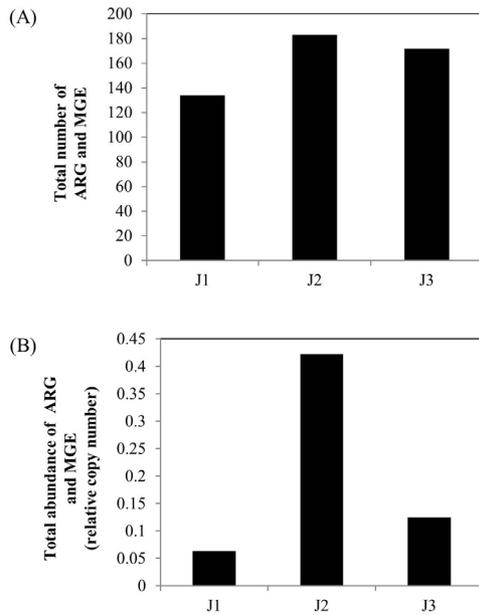


Fig. 1. Total number (A) and total abundance (B) of antibiotic resistant genes (ARG) and mobile genetic elements (MGE) in water samples.

을 도출한 후 분석에 적용하였다.

각 시료에 대한 항생제 내성 관련 유전자(ARG와 MGE)의 종류와 존재량을 분석한 결과는 Fig. 1과 같으며 항생제 내성 기작 및 대상 항생제 계열에 따른 분석은 Fig. 2와 같다.

항생제 내성기작에 따른 분류는 항생제 불활성화 관련 유전자(deactivate), 항생제의 세포 내 농도를 감소시켜 내성을 갖는 efflux pump 관련 유전자, 항생제 표적 부위의 변형 및 보호와 관련된 유전자(protection), 내성유전자의 발현을 조절하는 유전자(regulator) 그리고 MGE로 구분되었다. 대상 항생제 계열은 aminoglycoside, beta-lactam, sulfonamide, tetracycline, amphenicol, macrolide-lincosamide-streptogramin B (MLSB), vancomycin, fluoroquinolone, multi-drug resistance (MDR) 및 기타(other)로 분류하였다.

조사된 3개 시료에서 134~183개의 ARG 및 MGE 유전자가 검출되었으며(Fig. 1A), 1개의 16S rRNA 유전자에 대한 ARG 및 MGE 유전자의 상대적 양은 0.063~0.422 copy로 분석되었다(Fig. 1B). 총 ARG 및 MGE의 양은 방류수가 합류하기 전 지점인 상류의 하천수(J1, 0.063 copy)에 비해 하수처리장 방류수(J2, 0.422 copy)에서 급격히 증가한 후, 방류수 합류 후 지점인 하류의 하천수(J3)에서 다시 감소하는 양상을 보였다(Fig. 1B). 그리고 항생제 관련 유전자의 수도 유사한 경향을 나타냈다(Fig. 1A).

J2 시료의 내성관련 유전자의 수와 양이 상대적으로 높게

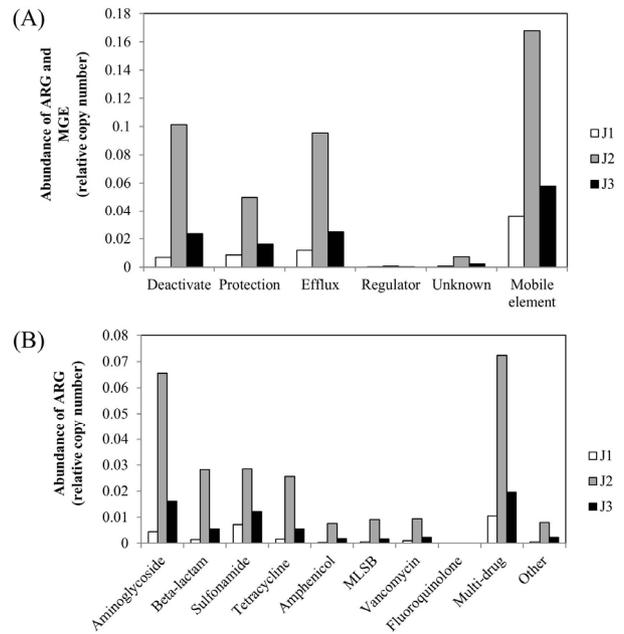


Fig. 2. Diversity and abundance profiles of antibiotic resistant genes (ARG) and mobile genetic elements (MGE) in water samples. (A) abundance of ARG and MGE classified depending on resistant mechanisms; (B) abundance of ARG classified depending on antibiotics families.

분석된 결과는 상대적으로 낮게 분석된 총 세균 수와 상반된다. 이것은 하수처리과정에서 사용되는 소독제의 영향으로 항생제내성균들이 사멸된 결과라고 판단된다. 즉 세균의 수는 감소하였으나 사균에 포함되어있는 유전자가 함께 검출됨으로서 도출된 분석결과이며 방류수에 포함된 항생제 내성유전자들이 하천수에 영향을 주었다고 해석된다. 그러나 총 세균 수와 환경에 노출된 DNA의 자연분해를 고려하였을 때, 하수 처리된 방류수에 포함되어 있는 항생제 내성인자들이 하천에 미치는 영향은 매우 적을 것으로 사료된다.

항생제 내성 기작에 따른 분류에서 MGE 관련 유전자 계열의 존재량이 가장 높았으며, deactivate, efflux, 그리고 protection 순으로 높게 조사되었다(Fig. 2A). 그리고 항생제 계열에 따른 분류에서는 aminoglycoside와 MDR 계열 항생제의 내성유전자 존재량이 높은 것으로 조사되었다(Fig. 2B). 기작 또는 항생제 계열에 따른 모든 분류에서 유전자의 상대적 양이 J1 시료에서 제일 적고, J2 시료에서 가장 높은 후, J3 시료에서 다시 감소하는 공통된 양상이 관찰되었다(Fig. 2). 특히 항생제 내성 유전자와 마찬가지로 전파 관련 유전자(MGE)의 존재량이 J2 시료에서도 높으며 상류지점보다 하류지점에서 다소 높은 유사한 경향이 관찰되었다(Fig. 2A). 이것은 내성유전자가 플라스미드에 존재하거나 트랜스포존과 같은 전파 관련 유전자들

과 함께 유전자군을 이루고 있음으로서 획득내성과 연관되어 있을 가능성을 제시한다. 따라서 이러한 현상에 대한 원인 규명이 후속적으로 이루어져야 한다고 사료된다.

적 요

하수처리장 방류수와 하천 중의 항생제 내성인자 분포에 대한 상관성을 분석하기 위해 방류수와 상류 하천수, 하류 하천수를 대상으로 항생제 내성유전자와 전파 관련 유전자를 조사하였다. 3개 지점에서 134~183개의 항생제 내성유전자(ARG) 및 전파 관련 유전자(MGE)가 검출되었으며, 1개의 16S rRNA 유전자에 대한 ARG 및 MGE 유전자의 상대적인 총 함이 0.063~0.422 copy로 분석되었다. ARG와 MGE의 수와 존재량은 방류수에서 가장 높게 검출된 반면, 총 세균 수는 가장 적게 검출됨으로서 하수처리 과정에서 사멸된 세균에 포함된 유전자들이 검출된 것으로 판단된다. 또한 MGE의 존재량 양상이 ARG의 존재량과 상관관계를 보임으로서 항생제 내성균들의 내성기작이 자연내성보다는 획득내성일 가능성을 제시하였다.

감사의 말

본 연구는 환경부 “생활공감환경정보기술개발사업”(과제 번호: 2016001350005)의 지원에 의해 수행되었음.

References

Chen, B., Yang, Y., Liang, X., Yu, K., Zhang, T., and Li, X. 2013.

Metagenomic profiles of antibiotic resistance genes (ARGs) between human impacted estuary and deep ocean sediments. *Environ. Sci. Technol.* **47**, 12753-12760.

de Castro, A.P., Fernandes, G.R., and Franco, O.L. 2014. Insights into novel antimicrobial compounds and antibiotic resistance genes from soil metagenomes. *Front. Microbiol.* **5**, 489.

Forsberg, K.J., Reyes, A., Wang, B., Selleck, E.M., Sommer, M.O., and Dantas, G. 2012. The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. *Science* **337**, 1107-1111.

Ikehata, K., Naghashkar, N.J., and El-Din, M.G. 2006. Degradation of aqueous pharmaceuticals by ozonation and advanced oxidation processes: a review. *Ozone Sci. Eng.* **28**, 353-414.

Knapp, C.W., Dolfing, J., Ehlert, P.A., and Graham, D.W. 2010. Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940. *Environ. Sci. Technol.* **44**, 580-587.

Looft, T., Johnson, T.A., Allen, H.K., Bayles, D.O., Alt, D.P., Stedtfeld, R.D., Sul, W.J., Stedtfeld, T.M., Chai, B., Cole, J.R., et al. 2012. In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 1691-1696.

Ohlsen, K., Temes, T., Werner, G., Wallner, U., Löffler, D., Ziebuhr, W., Witte, W., and Hacker, J. 2003. Impact of antibiotics on conjugational resistance gene transfer in *Staphylococcus aureus* in sewage. *Environ. Microbiol.* **5**, 711-716.

Reinthal, F.F., Posch, J., Feierl, G., Wüst, G., Haas, D., Ruckebauer, G., Mascher, F., and Marth, E. 2003. Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. *Water Res.* **37**, 1685-1690.

Schmieder, R. and Edwards, R. 2012. Insights into antibiotic resistance through metagenomic approaches. *Future Microbiol.* **7**, 73-89.

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.

Zhu, Y.G., Johnson, T.A., Su, J.Q., Qiao, M., Guo, G.X., Stedtfeld, R.D., Hashsham, S.A., and Tiedje, J.M. 2013. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, 3435-3440.