

Isolation and Identification of Ampicillin-resistant Bacteria in Changwon

Young-Min Bae*

Department of Life Science and Public Health, Changwon University, Changwon, Kyungnam 51140, Korea

Received September 17, 2018 / Revised October 1, 2018 / Accepted October 10, 2018

The number of antibiotic-resistant bacteria is increasing rapidly while the discovery rate of new antibiotics is in decline. A systematic study is therefore necessary to investigate which bacteria are resistant to medically important antibiotics and how high that resistance is. To that end, this study aimed to analyze which bacteria demonstrated resistance to ampicillin, one of the currently most-widely used medical antibiotics. Water samples were collected from the Changwon-Cheon that runs through Changwon City and from the pond in front of the dormitory building at Changwon University. Hundreds of ampicillin-resistant colonies were obtained and 22 morphologically distinct examples were chosen for further study. These bacteria were identified by amplifying their 16S rRNA genes and comparing those sequences with data in GenBank. The bacteria was identified as belonging to 10 families, 12 genera, and 17 species, and all were able to grow in the presence of 50 µg/ml ampicillin while seven showed growth at ampicillin concentrations as high as 1.5 mg/ml.

Key words : Ampicillin, antibiotic resistance, polymerase chain reaction, 16S rRNA gene

서 론

Alexander Fleming에 의해서 발견된 최초의 penicillin (benzyl penicillin 또는 penicillin G)은 그람 양성 세균들에 대해서는 탁월한 효과를 나타내었지만 대부분의 그람 음성 세균들에 대해서는 활성이 낮았다[4]. 또한 이 penicillin G는 내산성이 약해서 경구 투여를 할 경우에 활성의 대부분이 위에서 사라지는 단점이 있었다[4]. 이러한 단점을 개선하기 위해서 개발된 ampicillin은 내산성이 우수해서 경구 복용이 가능하게 되었고, 대부분의 그람 양성 및 그람 음성 병원성 세균들에 대해서 우수한 최소억제 농도(minimum inhibitory concentration, MIC)를 나타내었다[9]. 따라서 ampicillin은 개발된 이후로 소화기관, 호흡기, 요도, 피부 및 연조직 감염 등의 치료에 널리 사용되어 왔다[9]. 그러나 ampicillin이 널리 사용되면서 내성세균의 출현도 증가하였다[9]. 원래 ampicillin과 같은 β-lactam 항생제들은 세균의 penicillin-binding proteins (PBPs)에 결합하여서 세균의 peptidoglycan 합성에 필요한 transpeptidation 반응을 저해함으로써 세균을 사멸시킨다[9]. 내성 세균들은 이러한 작용 과정을 변형시켜서 내성을 나타내는데, 주로 β-lactam 항생제들이 PBP와 접촉하거나 결합하는 것을 감소시키거나 아니면 β-lactamase를 생성해서 β-lactam

항생제들을 분해한다[9]. β-lactamase의 경우에는 1980년대에 extended-spectrum β-lactamase (ESBL)에 대해서 보고가 된 이후로 ESBL을 생성하는 세균들이 많이 보고되어 왔으며, 이러한 ESBL들은 β-lactam 항생제들을 좀 더 효율적으로 분해하도록 진화해 왔다[15]. 항생제 내성관련 유전자들은 세균들 사이에서 수평적 전달이 가능하여 다제 항생제 내성균(multiple-antibiotic resistant bacteria)도 빠르게 증가하고 있다[12, 13]. 또한 우리나라에서는 산업체에서 발생하는 폐수와 가정에서 발생하는 하수 중의 항생제가 거의 분해되지 않고 자연계로 배출되면서 다제 내성균의 출현을 더욱 빠르게 하고 있다[13]. 병원성 세균이 여러 가지 항생제에 대해서 항생제 내성 유전자를 획득하게 되는 경우 그 병원성 세균으로 인한 질병 통제가 불가능해지고 다제 내성균인 *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella* sp. DT 104와 같이 치명적인 세균이 나타날 수도 있다[13].

본 연구에서는 현재에도 병원성 세균의 감염을 치료하기 위하여 널리 사용되고 있는 ampicillin에 대한 내성 세균들의 현황을 조사하기 위하여 ampicillin 내성 세균들을 자연에서 분리하고 그 세균들을 동정하였다.

재료 및 방법

항생제

본 연구에 사용된 ampicillin sodium salt는 Sigma-Aldrich의 제품을 사용하였다.

시료의 채집

본 연구에서 사용된 미생물 시료는 창원시 소재 정병산에서

*Corresponding author

Tel : +82-55-213-3483, Fax : +82-55-213-3480

E-mail : yominbae@changwon.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

발원하여 마산만으로 흘러 들어가는 창원천 2개 지점 및 창원대학교 기숙사 앞의 연못에서 채취하였다. 채취된 시료는 즉시 스티로폼 상자에 담아서 온도변화를 최소화 하며 실험실로 운반하였다.

시료의 분석

Ampicillin (25 µg/ml)을 함유한 0.5X nutrient agar에 채취된 시료를 여러 가지 농도로 희석하여 도말하고 25°C에서 3일간 배양하였다. 3일 후에 나타난 집락들의 형태 및 색을 기준으로 세균들을 여러 그룹으로 나누고 각 그룹을 대표하는 세균들을 선정하였다.

Genomic DNA Preparation

선정된 세균들을 25 µg/ml의 ampicillin을 포함하는 nutrient broth에 접종하고 25°C에서 180 rpm으로 교반하며 충분한 농도에 도달할 때까지 배양하였다. 이렇게 배양된 세균 세포로부터 genomic DNA를 추출하였다. Genomic DNA의 추출에는 Macherey-Nagel, Inc. (Bethlehem, PA, USA)의 Nucleo Spin Microbial DNA kit를 사용하였고, 실험방법은 kit에 동봉된 protocol에 따랐다.

Amplification of the 16S rDNA

추출된 genomic DNA를 template로 사용하여 16S rDNA를 증폭하였다. PCR 반응을 위해서는 DNA template 200 ng, forward primer 2.5 pmol, reverse primer 2.5 pmol, dNTPs mixture 2 µl (10 nM each) 그리고 *Pfu* DNA polymerase 2 µl (6 U)를 포함하는 100 µl의 반응액에서 반응을 진행하였다. *Pfu* DNA polymerase 및 dNTP mixture는 Promega Corporation (Madison, WI, USA)의 제품을 사용하였다. PCR에 사용된 forward primer는 16S rDNA 5'-말단의 conserved region을 target으로 하여 제조된 fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')이고, reverse primer는 16S rDNA 3' 부위를 target으로 하여 제조된 rP2 (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3')이었다[18]. 이때에 반응조건은 95°C에서 2분간 한 cycle, 그리고 95°C에서 45초, 55°C에서 45초, 72°C에서 2분씩 30 cycle을 진행시킨 후, 최종적으로 72°C에서 5분간 유지시켰다. PCR에는 error가 적게 발생하는 *Pfu* DNA polymerase를 사용함으로써 반응 중에 DNA의 염기서열이 변경되는 것을 최소화하였다.

Cloning of the PCR products

PCR products는 0.7% agarose gel에서 분자량에 따라 separation 시켜서 산물을 확인한 후, Promega Corporation의 Gel and PCR purification system을 사용하여 DNA를 정제 하였다. 정제된 PCR product는 제한효소 *Sma* I으로 절단하고 bacterial alkaline phosphatase로 처리된 pBluscript II SK-plasmid와 섞어서 ligation 시키고, competent *Escherichia coli*

DH5a에 transformation 하였다. Transformation된 *E. coli* 세포들을 100 µg/ml의 ampicillin을 함유하는 MacConkey agar에 도말하고 37°C에서 배양하였다. 나타난 colony들 중에서 흰색 colony들을 selection하여서 이들로부터 plasmid DNA를 추출한 후에, supercoiled plasmid DNA 및 제한효소 *Pvu* II로 절단된 plasmid DNA를 agarose gel electrophoresis로 분석하였다. 예상되는 크기의 PCR 산물이 확인되면 (주)솔젠트(Daejeon, Korea)에 의뢰 하여 insert DNA들의 염기서열을 분석하였다.

염기서열의 분석

얻어진 염기서열은 Genbank의 BLAST program으로 similarity를 분석하였다[8]. 수집된 염기서열은 ClustalW 2.1을 사용하여 서로 align하고 MEGA6를 사용하여 neighbor-joining tree를 작성하였다[16].

온도 및 여러 가지 항생제 농도에 대한 반응

0.5X nutrient agar에 도말된 세균들을 4°C 또는 37°C에서 3일간 배양하고 증식 여부를 육안으로 확인하였다. 항생제 농도에 따른 반응을 관찰하기 위해서는 여러 가지 농도의 ampicillin을 함유한 0.5X nutrient agar에 선정된 세균들을 도말하고 3일간 배양한 후에 증식 여부를 판단하였다.

결 과

Ampicillin 내성 세균의 분리

창원시 여러 지점에서 채취한 시료를 25 µg/ml의 ampicillin을 포함하는 고체 배지에 도말하고 3일간 배양하였다. 나타난 집락들의 형태 및 색을 기준으로 22 가지의 세균들을 선정하고 genomic DNA를 추출하였다.

분리된 ampicillin 내성세균의 동정

선정된 22 가지의 ampicillin 내성세균의 16S rDNA를 PCR로 증폭하였고, 증폭된 PCR 산물의 염기서열을 분석하였다. 이렇게 얻어진 염기서열을 BLAST program으로 분석하였다[8]. 분석된 22 가지의 세균들 중에서 5 가지 세균들은 16S rDNA의 염기서열이 분리된 다른 세균들의 염기서열과 10 개 염기 이내의 차이 밖에 보이지 않았으므로, 이러한 세균들을 제외한 나머지 17 가지 세균들의 염기서열을 가지고 BLAST로 분석을 진행하였다. 이 중에서 13가지는 genbank에서 99.0% 이상의 유사성을 보이는 염기서열을 발견할 수 있었다. 따라서 이러한 세균들은 유전적 방법만으로 종(species) 단위까지 동정할 수가 있었다. 그러나 나머지 4 가지 세균들은 99.0% 이상의 유사성을 보이는 염기서열을 genbank에서 찾을 수 없었기 때문에 유전적 방법만으로는 종 단위까지 동정할 수가 없었다(Table 1). 따라서 이러한 경우에는 bioMérieux, Inc.

(Durham, NC, USA)의 API system을 사용해서 생화학적 분류를 시도 하였다.

A9 세균의 경우에는 BLAST search 결과, 99.0% 이상의 유사성을 보이는 염기서열은 genbank에서 발견할 수가 없었고, 가장 높은 유사성을 보이는 염기서열이 *Flavobacterium* sp. WB3.2-27의 16S rDNA 염기서열(accession AM934658)로서 98.6%의 유사성을 보였다. 이 세균을 API 20 NE로 분석한 결과, %ID가 81.3으로 *Sphingomonas paucimobilis*로 동정이 되었다. 그러나 genbank에 등록되어 있는 *Sphingomonas paucimobilis* 16S rDNA 염기서열 중에서 accession D16144, HF558376 및 KR080483과 비교해 본 결과 A9의 염기서열은 이들 중에서 어느 것보다도 유사성이 90%를 넘지 않았다. 따라서 A9 세균은 *Sphingomonas paucimobilis*가 될 수가 없다고 판단되고, 또한 A9 세균의 집락이 *Flavobacterium* 균주들의 특징인 짙은 노랑색의 넓게 퍼지는 형태이므로 A9 세균은 *Flavobacterium* spp.로 동정하였다.

세균 15는 BLAST search 결과, *Janthinobacterium* sp. TP-Snow-C16의 16S rDNA 염기서열(accession HQ327125)과 98.8%의 유사성을 나타냈다. 이 세균을 API 20 NE로 분석한 결과, 역시 %ID가 69.7로 *Sphingomonas paucimobilis*로 동정이 되었다. 그러나 genbank에 등록되어 있는 *Sphingomonas paucimobilis* 16S rDNA 염기서열 중에서 accession D16144, HF558376 및 KR080483과 비교해 본 결과 세균 15의 염기서열 역시 이들 중에서 어느 것보다도 유사성이 90%를 넘지 않았다. 또한 세균 15와 세균 A9의 염기서열을 비교해 본 결과, 이 두 세균 간에도 유사성이 90%를 넘지 않았다. 따라서 세균 15도 *Sphingomonas paucimobilis*로 동정 될 수가 없다고 판단되므로 세균 15도 *Janthinobacterium* spp.로 동정하였다.

세균 22는 BLAST search 결과, *Sphingomonas wittichii* strain RW1의 16S rDNA 염기서열(accession NR074268)과 97.6%의 유사성을 나타냈다. 이 세균을 API 20 NE로 분석한 결과, 역시 %ID가 75.7로 *Brevundimonas vesicularis*로 동정이 되었다. 그러나 genbank에 등록되어 있는 *B. vesicularis* 16S rDNA 염기서열 중에서 accession FM955876, KF975414 및 MF541532와 비교해 본 결과 세균 22의 염기서열 역시 이들 중에서 어느 것보다도 유사성이 90%를 넘지 않았다. 그러나 genbank에 등록되어 있는 이 세 가지 *B. vesicularis* 종들의 16S rDNA 염기서열 끼리는 서로 99.0% 이상의 유사성을 나타내었다. 따라서 세균 22도 *Sphingomonas* spp.로 동정할 수밖에 없었다. 또한 본 연구에서 분리되고 *B. vesicularis*로 동정된 세균 29는 4℃에서는 증식하였으나 37℃에서는 증식이 관찰되지 않았다(Table 2). 반면에 세균 22는 4℃에서는 증식하지 않았으며 37℃에서는 증식이 관찰되었다(Table 2). 이러한 결과도 세균 22가 *B. vesicularis*가 될 수 없음을 뒷받침하고 있다고 볼 수 있다.

세균 25는 BLAST search 결과, *Chryseobacterium* sp. strain 17S1E7의 16S rDNA 염기서열(accession MG385858)과 99.7%의 유사성을 보였고, *Chryseobacterium culicis* strain AL18의 16S rDNA 염기서열(accession MG819177)과 98.6%의 유사성을 보였다. 따라서 세균 25가 *Chryseobacterium* spp.일 가능성은 높지만 종 단위까지의 동정은 할 수 없었다.

분리된 세균 중에서 A2는 BLAST search 결과 *Acidovorax eubreus* Tpsy (accession CP001392) 및 *Diaphorobacter polyhydroxybutyrativorans* SL-205 (accession CP016278) 균주들과 16S rDNA의 염기서열이 100% 일치하였다. 이 경우에 속(genus)이 서로 다른 두 가지 세균이 같은 16S rDNA 염기서열을 가지고 있는 사례가 된다. *Acidovorax eubreus* Tpsy는 gen-

Table 1. BLAST search result of ampicillin-resistant bacteria isolated in this study

No.	Genus	Family	Similarity
A2	<i>Acidovorax ebreus</i>	Comamonadaceae	100%
A7	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae	100%
A9	<i>Flavobacterium</i> spp.	Flavobacteriaceae	98.6%
1	<i>Burkholderia vietnamiense</i>	Burkholderiaceae	100%
3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pseudomonadaceae	100%
5	<i>Pseudomonas putida</i>	Pseudomonadaceae	99.9%
6	<i>Chromobacterium aquaticum</i>	Neisseriaceae	99.9%
7	<i>Chryseobacterium endophyticum</i>	Flavobacteriaceae	99.9%
9	<i>Pedobacter terrae</i>	Sphingobacteriaceae	99.5%
10	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	Enterobacteriaceae	99.9%
11	<i>Acidovorax temperans</i>	Comamonadaceae	99.9%
15	<i>Janthinobacterium</i> spp.	Oxalobacteraceae	98.8%
16	<i>Acidovorax delafieldii</i>	Comamonadaceae	99.8%
22	<i>Sphingomonas</i> spp.	Sphingomonadaceae	97.6%
25	<i>Chryseobacterium</i> spp.	Flavobacteriaceae	98.6%
26	<i>Sphingomonas azotifigens</i>	Sphingomonadaceae	99.9%
29	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	Caulobacteraceae	100%

Table 2. Bacterial growth at 4°C and 37°C

Bacteria	4°C	37°C
A2 (<i>Acidovorax ebreus</i>)	-	+
A7 (<i>Escherichia coli</i>)	-	+
A9 (<i>Flavobacterium</i> spp.)	-	+
1 (<i>Burkholderia vietnamiense</i>)	-	+
3 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	-	+
5 (<i>Pseudomonas putida</i>)	-	-
6 (<i>Chromobacterium aquaticum</i>)	-	+
7 (<i>Chryseobacterium endophyticum</i>)	-	+
9 (<i>Pedobacter terrae</i>)	-	-
10 (<i>Raoultella ornithinolytica</i>)	-	+
11 (<i>Acidovorax temperans</i>)	+	+
15 (<i>Janthinobacterium</i> spp.)	-	+
16 (<i>Acidovorax delafieldii</i>)	-	-
22 (<i>Shingomonas</i> spp.)	-	+
25 (<i>Chryseobacterium</i> spp.)	-	+
26 (<i>Shingomonas azotifigens</i>)	-	+
29 (<i>Brevundimoas vesicularis</i>)	+	-

bank에 등록된 날짜가 2013년 12월 24일이고, *Diaphorobacter polyhydroxybutyrativorans* SL-205는 genbank에 등록된 날짜가 2017년 7월 5일 이기 때문에, 이 경우에는 어쩔 수 없이 A2는 더 먼저 genbank에 등록된 *Acidovorax eubreus*인 것으로 잠정적으로 결론을 내렸다.

분리된 세균들의 분류학적 특징

분리된 세균들은 Burkholderiaceae, Caulobacteraceae, Comamonadaceae, Enterobacteriaceae, Flavobacteriaceae, Neisseriaceae, Oxalobacteraceae, Pseudomonadaceae, Sphingobacteriaceae 및 Sphingomonadaceae의 10개 과(family)에 속하는 것으로 밝혀졌다(Table 1). 이러한 세균들의 16S rDNA 염기서열로 neighbor-joining rooted tree를 작성해 보았다(Fig. 1). Enterobacteriaceae에 속하는 *Raoultella ornithinolytica*는 예상대로 *Escherichia coli*와 유연관계가 가장 높고, Oxalobacteraceae에 속하는 *Janthinobacterium* spp.는 Burkholderiaceae에 속하는 *Burkholderia vietnamiense*와 유연관계가 가장 높은 것으로 나타났다. 또한 Flavobacteriaceae에 속하는 *Flavobacterium* spp.는 예상대로 같은 과에 속하는 *Chryseobacterium* 속 세균들과 가까운 것으로 나타났다.

분리된 세균들의 생리적 특징

분리된 17종의 세균들을 4°C 및 37°C에서 배양하며 관찰한 결과, 4°C에서는 세균 11(*Acidovorax temperans*)과 세균 29(*Brevundimoas vesicularis*) 만이 증식하였다. 37°C에서는 세균 5(*Pseudomonas putida*), 세균 9(*Pedobacter terrae*), 세균 16(*Acidovorax delafieldii*) 및 세균 29(*Brevundimoas vesicularis*)가 증식하지 못 하였다(Table 2).

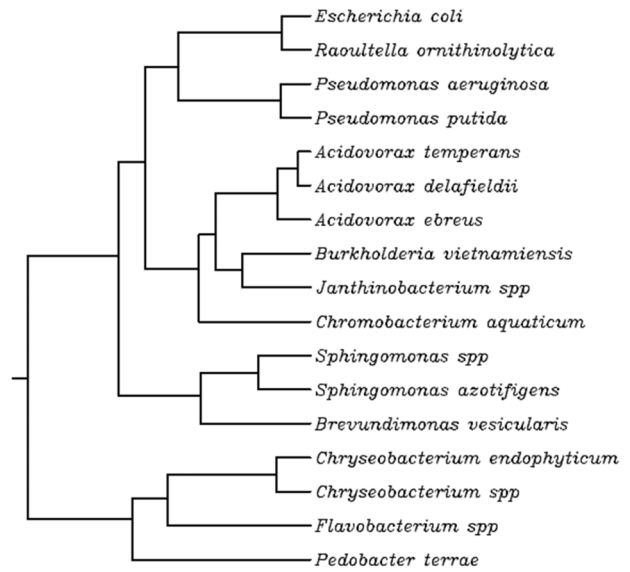


Fig. 1. Neighbor-joining phylogenetic tree determined from the 16S rDNA sequences isolated in this study. Bootstrap values are based on 1,000 replications.

분리된 세균들의 ampicillin에 대한 내성의 정도를 파악하기 위해서 각각 50, 100, 300, 500, 700, 900, 1,200, 1,500 µg/ml의 ampicillin을 포함하는 0.5X nutrient agar에 분리된 세균들을 도말하고 25°C에서 3일간 배양한 후에 증식여부를 판단하였다. 그 결과, 모든 세균들이 50 µg/ml의 ampicillin 농도에서 증식하였고, 세균 A2(*Acidovorax ebreus*), A7(*Escherichia coli*), 1(*Burkholderia vietnamiense*), 3(*Pseudomonas aeruginosa*), 6(*Chromobacterium aquaticum*), 11(*Acidovorax temperans*), 15(*Janthinobacterium* spp.), 16(*Acidovorax delafieldii*)은 1,500 µg/ml의 높은 ampicillin 농도에서도 증식하는 것을 관찰 할 수 있었다(Table 3). 또한 4°C 또는 37°C에서 증식하는 세균들은 각각 4°C 또는 37°C에서 여러 농도의 ampicillin에 대한 내성을 조사하였지만 온도에 의해 내성의 정도가 변하지는 않았다.

고 찰

본 연구에서는 창원시 여러 지점에서 ampicillin에 내성을 보이는 세균들을 분리하고 분리된 세균들의 16S rDNA의 염기서열을 genbank의 자료들과 비교하여 세균들의 동정을 시도하였다. 그 결과, 분리된 세균들 중에서 13종 세균들의 16S rDNA와 99.0% 이상의 유사성을 보이는 염기서열이 genbank에서 발견이 되었다. 따라서 이 13종의 세균들은 종(species)단위까지 동정을 할 수가 있었다. 그러나 나머지 4종의 세균들은 genbank에서 16S rDNA 염기서열이 99.0% 이상 일치하는 세균을 찾을 수가 없었다. Clarridge는 같은 속(genus)에 속하는 다른 세균들과 16S rDNA의 염기서열이 최소 0.5% - 1.0%가 다르면 새로운 종으로 볼 수 있을 것이라고 하였다[2]. Dran-

Table 3. Bacterial growth at various ampicillin concentrations

Bacteria	Concentrations ($\mu\text{g/ml}$)							
	50	100	300	500	700	900	1,200	1,500
A2 (<i>Acidovorax</i>)	+	+	+	+	+	+	+	+
A7 (<i>Escherichia</i>)	+	+	+	+	+	+	+	+
A9 (<i>Flavobacterium</i>)	+	-	-	-	ND	ND	ND	ND
1 (<i>Burkholderia</i>)	+	+	+	+	+	+	+	+
3 (<i>Pseudomonas</i>)	+	+	+	+	+	+	+	+
5 (<i>Pseudomonas</i>)	+	+	-	-	ND	ND	ND	ND
6 (<i>Chromobacterium</i>)	+	+	+	+	+	+	+	+
7 (<i>Chryseobacterium</i>)	+	-	-	-	ND	ND	ND	ND
9 (<i>Pedobacter</i>)	+	-	-	-	ND	ND	ND	ND
10 (<i>Raoultella</i>)	+	-	-	-	ND	ND	ND	ND
11 (<i>Acidovorax</i>)	+	+	+	+	+	+	+	+
15 (<i>Janthinobacterium</i>)	+	+	+	+	+	+	+	+
16 (<i>Acidovorax</i>)	+	+	+	+	+	+	+	+
22 (<i>Shingomonas</i>)	+	-	-	-	ND	ND	ND	ND
25 (<i>Chryseobacterium</i>)	+	-	-	-	ND	ND	ND	ND
26 (<i>Shingomonas</i>)	+	-	-	-	ND	ND	ND	ND
29 (<i>Brevundimoas</i>)	+	-	-	-	ND	ND	ND	ND

ND: Not determined

court et al.은 새로 분리된 세균이 기존에 보고된 세균들과 같은 종으로 동정되기 위해서는 16S rDNA의 염기서열이 99% 이상 일치하여야 한다고 하였고, Janda 및 Abbott는 최소 99% 이상, 이상적으로는 99.5% 이상이 일치하여야 같은 종으로 볼 수 있다고 하였다[3, 7]. 본 연구에서는 세균 A9, 15, 22 및 25가 genbank의 어떠한 염기서열들과도 99.0% 이상의 유사성을 보이지 않았다. 따라서 이 세균들은 유전적 방법으로는 종 단위까지는 동정할 수가 없으므로, 이 세균들은 *Flavobacterium* spp., *Janthinobacterium* spp., *Sphingomonas* spp. 및 *Chryseobacterium* spp.로 동정할 수밖에 없었다.

항생제가 처음 사용되기 시작한 1940년대에는 페렴, 수막염, 매독 등이 penicillin G 투여로 극적으로 완치되어 기적의 약으로 생각되었으나 이들 항생제가 임상에 사용되기 시작한 후 얼마 지나지 않아서 이들에 내성인 세균이 출현하였다[12]. 그 후 내성세균에 유효한 새로운 항생제가 개발되었으나 거의 항상 내성세균의 출현이 뒤따랐다[12]. 우리나라에서의 항생제 내성이 심각함은 이미 잘 알려져 있고, 일부 내성세균의 비율은 세계적으로 가장 높은 수준이라 할 수 있다[13]. 따라서 병원성 세균의 항생제에 대한 내성률을 조사하는 것은 치료 목적의 항생제 선택을 위해 매우 중요하며 내성균의 확산을 막기 위한 정책 수립의 기초 자료가 된다[13]. 그러므로 환경에서의 항생제 내성세균의 존재여부 및 그 양에 대한 연구가 중요하다고 볼 수 있다.

본 연구에서는 현재에도 광범위하게 사용되는 ampicillin에 대한 내성세균들을 주변 수계에서 분리하였다. 그 결과 10개과, 12개 속, 17종의 내성 세균들이 분리되었으며 이 중에서

7종의 세균들은 1.5 mg/ml의 높은 ampicillin 농도에서도 증식이 억제되지 않았다. 세균에 감염된 환자의 혈중 항생제 농도를 이렇게 높게까지 올리는 것은 사실상 불가능하므로 이 정도의 내성을 가지고 있는 병원성 세균에 감염이 되었을 경우에는 내성을 나타내는 항생제로는 치료가 전혀 불가능하다는 것을 알 수 있다.

우리나라에서 발표된 항생제 내성세균들에 대한 주요한 연구결과를 살펴보면, Kim et al. (2008)은 ampicillin을 포함한 8가지의 항생제에 대하여 동시에 내성을 나타내는 *Enterococcus* 속 균주가 한강유역에서 분리되었다고 보고하였다[10]. Bae et al. (2004)은 전북 군산시 인근에 위치한 금강호에서 항생제 내성균에 대해서 조사하였는데, ampicillin 내성균이 가장 빈번하게 분리되었다[1]. 분리된 세균들은 *Pseudomonas* 속, *Aeromonas* 속, *Bacillus* 속, *Stenotrophomonas* 속, *Enterobacter* 속, *Sphingobium* 속, *Variovorax* 속, *Serratia* 속, *Acinetobacter* 속, *Mycoplana* 속, *Psychrobacter* 속, *Xanthomonas* 속 등으로 동정되었다[1]. 따라서 이미 우리나라도 전국의 여러 수계에 다양한 항생제 내성 세균들이 존재할 가능성이 높음을 암시하고 있다.

Oh et al. (2009)은 도시 하수처리장의 미생물 군집 내 항생제 내성 세균의 특성을 평가하였는데, ampicillin과 sulfathiazole의 내성률이 다른 나라에 비해 높게 측정 되었으며 병원성 세균의 항생제 내성 정도가 일반 세균보다 높은 것으로 나타났다[13]. Huh et al. (2013)은 인천지역 식중독 환자에서 분리 배양된 병원성 세균 210주에 대한 항생제 내성시험 결과, tetracycline (43.8%)이 가장 높고, 이어서 ampicillin (34.8%), nali-

dixic acid (23.8%), sulfamethoxazole/trimethoprim와 chloramphenicol (12.4%), ampicillin/sulbactam (11.4%) 순을 나타냈다[6]. 분리 동정된 병원성 세균의 항생제 다제 내성률은 10개 항생제에 대하여 1제(26.2%, 55/210주), 2제(9.0%, 19/210주), 3제(9.5, 20/210주) 내성 균주의 비율이 높게 나타났다[6]. 따라서 여러 가지 항생제에 동시에 내성을 보이는 다제 내성 세균들도 이미 우리나라에 널리 퍼져 있는 것을 알 수 있다. Lee et al. (2014)은 가정집, 대학교, 대중교통, 소지품 등 일반인들이 자주 접촉하는 다양한 주변환경에서 여러 가지 항생제 내성세균들이 존재하고 있음을 보고하였다[11]. 그러므로 수계뿐만 아니라 우리들이 일상적으로 접촉하는 주변의 여러 가지 물체 표면 및 사람 피부에도 내성 세균들이 광범위하게 존재하고 있음을 알 수 있다.

본 연구에서 분리된 세균들 중에는 인간의 병원균들도 여러 가지가 포함되어 있는데, 병원성 *Escherichia coli*는 인체에 작용하는 기작 및 증상에 따라서 enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), 및 enteroinvasive *E. coli* (EIEC)의 다섯 그룹으로 나뉘는 세균으로서 아직도 전 세계에서 매년 수십만의 생명을 앗아가고 있다[5]. 또한 *Pseudomonas aeruginosa*는 기회성 병원체로서 피부, 귀, 눈, 요도, 심장, 상기도, 폐 등의 넓은 범위의 인체 감염증과 연관되어 있다[17]. 그 외에도 *Burkholderia*, *Sphingomonas*, *Brevundimonas* 속 에 속하는 많은 종들이 인체의 기회성 병원체로 알려져 있다[14]. 따라서 여러 가지 항생제에 대해서 내성을 나타내는 병원성 세균들이 이미 우리 주변에서 쉽게 분리되고 있다는 것을 본 연구를 통해서 확인할 수 있었다.

본 연구에서 얻어진 결과와 다른 연구자들의 결과들을 종합해 보면 우리나라의 항생제 내성 세균문제가 얼마나 심각한 상태인가 하는 것을 쉽게 짐작할 수 있게 해 준다. 더군다나 분리된 내성 세균들 중에서 상당수가 여러 가지 항생제에 대해서 동시에 내성을 보이는 다제내성 세균이라는 점이 문제를 더욱 더 심각하게 만들고 있다. 또한 많은 의료인들이 최후의 항생제로 여기고 있는 vancomycin에 대한 내성조차도 이미 자연계에 광범위하게 확산이 되어 있다는 점이 큰 걱정을 불러일으키고 있다. 현재에도 많은 연구자들이 새로운 항생제를 개발하기 위하여 지구상의 여러 곳을 누비고 있지만 새로운 항생제가 발견되는 경우는 급격히 감소하고 있다. 따라서 이와 같은 추세가 지속되면 머지않은 장래에 우리 인류가 항생제가 없던 시절의 생활로 되돌아가는 상황도 배제할 수 없다.

감사의 글

본 연구는 창원대학교 학술연구조성비(2017-2018)의 지원에 의해서 수행되었습니다.

References

- Bae, M. S., Choi, G. G., Park, S. H., Choi, M. S. and Lee, G. H. 2004. Annual population variation and identification of antibiotic-resistant bacteria in the lower lake Geumgang. *Kor. J. Ecol.* **27**, 283-289.
- Clarridge III, J. E. 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**, 840-862.
- Drancourt, M., Bollet, C., Carlioz, A., Martelin, R., Gayral, J. P. and Raoult, D. 2000. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 3623-3630.
- Garrod, L. P. 1974. Choice among penicillins and cephalosporins. *Br. Med. J.* **3**, 96-100.
- Gomes, T. A., Elias, W. P., Scaletsky, I. C., Guth, B. E., Rodrigues, J. F., Piazza, R. M., Ferreira, L. C. and Martinez, M. B. 2016. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Braz. J. Microbiol.* **47 Suppl 1**, 3-30.
- Huh, M. J., Oh, S. S. and Jang, J. S. 2013. Antimicrobial resistance and multi-drug resistance patterns of pathogenic bacteria isolated from food poisoning patients in Incheon. *Kor. J. Food Nutr.* **26**, 132-113.
- Janda, J. M. and Abbott, S. L. 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 2761-2764.
- Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., Merezuk, Y., McGinnis, S. and Madden, T. L. 2008. NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Res.* **36**, W5-9.
- Kaushik, D., Mohan, M., Borade, D. M. and Swami, O. C. 2014. Ampicillin: rise fall and resurgence. *J. Clin. Diagn. Res.* **8**, ME01-3.
- Kim, M. N. and Kwon, O. M. 2008. Antimicrobial susceptibility of *Enterococcus* spp. isolated from Han-river area in Korea. *Kor. J. Environ. Biol.* **26**, 240-246.
- Lee, D. K., Park, J. E., Kim, K. T., Jang, D. H., Song, Y. C. and Ha, N. J. 2014. Bacterial contamination and antimicrobial resistance of the surrounding environment influencing health. *Kor. J. Microbiol.* **50**, 101-107.
- Marti, E., Variatza, E. and Balcazar, J. L. 2014. The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance. *Trends Microbiol.* **22**, 36-41.
- Oh, H. and Park, J. 2009. Characteristics of antibiotic resistant bacteria in urban sewage and river. *J. Kor. Society Environ. Eng.* **31**, 232-239.
- Ryan, M. P. and Pembroke, J. T. 2018. *Brevundimonas* spp: emerging global opportunistic pathogens. *Virulence* **9**, 480-493.
- Tamma, P. D. and Rodriguez-Baño, J. 2017. The use of non-carbapenem β -lactams for the treatment of extended-spectrum β -lactamase infections. *Clin. Infect. Dis.* **64**, 972-980.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**, 2725-2729.
- Valentini, M., Gonzalez, D., Mavridou, D. A., Filloux, A.

2018. Lifestyle transitions and adaptive pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr. Opin. Microbiol.* **41**, 15-20.
18. Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. and Lane,

D. J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **173**, 697-703.

초록 : 창원근교에서의 ampicillin 내성세균의 분리 및 동정

배영민*

(창원대학교 생명보건학부)

우리 인간이 병원성 미생물에 감염되었을 경우에 주로 사용되는 항생제들은 현재 수백 가지가 넘지만 각각의 항생제에 대한 내성세균이 발견되는 빈도수가 가파르게 증가하고 있다. 또한 항생제에 대한 내성이 병원성 세균들 사이에서 빠르게 확산되고 있으나 새로운 항생제가 발견되는 속도는 눈에 띄게 감소하고 있다. 따라서 현 시점에서 우리 주변 환경에서 항생제 내성 세균이 얼마나 많이 존재하는 지에 대한 체계적인 연구가 필요하다고 할 수 있다. 본 연구에서는 현재 의료용으로 널리 사용되고 있는 항생제 중에서 ampicillin에 대한 내성 세균에 대한 조사를 진행하였다. 창원시를 가로지르는 창원천 및 창원대학교 기숙사 앞의 연못에서 미생물 시료를 채취하였다. 각 지점에서 채취된 시료를 분석한 결과 많은 내성 세균들이 나타났는데, 이러한 세균들을 집락의 형태에 따라 몇 그룹으로 나누고 각 그룹을 대표하는 22종 세균들의 genomic DNA를 추출하고, 이것을 template로 사용하는 16S rRNA 유전자 증폭반응을 수행 하였다. 얻어진 산물의 염기서열을 밝히고 genbank의 자료들과 비교해서 분리된 내성세균들을 동정하였다. 그 결과 10개 과, 12개 속, 17종의 세균들이 동정되었으며, 분리된 세균들의 ampicillin에 대한 내성을 조사해 본 결과, 17종 모두가 50 µg/ml의 ampicillin 농도에서 증식을 하였고, 이 중에서도 7종의 세균들은 1.5 mg/ml의 농도에서도 증식 가능하다는 것을 알 수 있었다.