

주변 수계에서 미생물유래 extended-spectrum beta-lactamase 유전자의 분포

배영민[†]

창원대학교 생명보건학부

(2022년 11월 30일 접수: 2022년 12월 28일 수정: 2022년 12월 29일 채택)

Distribution of the extended-spectrum beta-lactamase genes derived from microorganisms in the waterfront environments

Young-Min Bae[†]

Department of Life Science and Public Health, Changwon University

(Received November 30, 2022; Revised December 12, 2022; Accepted December 29, 2022)

요 약 : 창원시의 3개 지점(남천, 창원천, 청운지)에서 물 시료를 채취하고, 채취한 시료로부터 genomic DNA를 분리하였다. 분리된 DNA와 class A extended-spectrum beta-lactamase(ESBL) 유전자 5가지(bla_{OXA-1} , bla_{SHV} , bla_{TEM} , $bla_{CTX-M-1}$, $bla_{CTX-M-9}$)를 target으로 하는 primers를 사용하여 quantitative PCR을 수행하였다. 시료를 채취한 지점별로 ESBL 유전자들의 수와 비율에서 확연한 차이가 있음을 알 수 있었다. 남천의 경우 DNA 30ng당 ESBL 유전자가 1.93×10^6 copy나 존재하는 데에 반해 창원천의 경우에는 1.47×10^5 copy 그리고 청운지에는 9.5×10^3 copy 밖에 존재하지 않았다. 흐르는 하천인 남천과 창원천에서는 각 ESBL 유전자들의 비율에서 큰 차이가 없었다. 즉, 남천에서는 bla_{OXA-1} 유전자가 65.3%, $bla_{CTX-M-1}$ 유전자가 33.6%를 차지하여서 이 두 유전자가 전체 ESBL 유전자의 99% 가까이를 차지하고 있었다. 창원천에서도 bla_{OXA-1} 유전자가 64.1%, $bla_{CTX-M-1}$ 유전자가 19.1%를 차지하므로 이 두 유전자가 전체의 83% 이상을 차지하고 있었다. 하천과 다르게 폐쇄된 환경인 청운지 연못에서는 내성세균들의 총량 자체가 다른 두 하천에 비해서 월등하게 적었다. 또한 내성세균의 비율도 달라서 $bla_{CTX-M-1}$ 유전자가 전체의 87.5%, 그리고 $bla_{CTX-M-9}$ 유전자가 9.8%를 차지하고 있었다.

주제어 : 항생제내성, 페니실린, beta-lactam 항생제, extended-spectrum beta-lactamase, quantitative PCR

[†]Corresponding author
(E-mail: yominbae@changwon.ac.kr)

Abstract : Water samples were collected from three spots(Namcheon, Changwoncheon and Cheongwoonji) in Changwon and genomic DNA was isolated from them. Quantitative PCR was performed with the isolated DNA as template and primers targeting five different class A extended-spectrum beta-lactamase(ESBL) genes(*bla*_{OXA-1}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-9}). The number of total ESBL genes from each sample showed large variations between each sample. Thirty nanograms of DNA from Namcheon contained 1.93×10^6 copies of ESBL genes whereas the same amount of DNA from Changwoncheon contained 1.47×10^5 copies of ESBL genes. However, the same amount of DNA from Cheongwoonji pond contained only 9.5×10^3 copies of ESBL genes. The ratio of each ESBL genes showed little difference between Namcheon river and Changwoncheon river, but DNA from Cheongwoonji pond showed a large difference from the rest. *bla*_{OXA-1} gene was present at 65.3%, and *bla*_{CTX-M-1} gene 33.6% for Namcheon comprising together almost 99%. *bla*_{OXA-1} gene was present at 64.1%, and *bla*_{CTX-M-1} gene 19.1% for Changwoncheon comprising together over 83%. *bla*_{CTX-M-1} gene was present at 87.5% and *bla*_{CTX-M-9} genes 9.8% for Cheongwoonji, a pond which is a closed and isolated environment.

Keywords : Antibiotic-resistance, penicillin, beta-lactam antibiotics, extended-spectrum beta-lactamase, quantitative PCR

1. 서론

Alexander Fleming에 의해서 발견된 최초의 penicillin(benzyl penicillin 또는 penicillin G)은 그람 양성 세균들에 대해서는 탁월한 효과를 나타내었지만 다수의 그람 음성 세균들에 대해서는 활성이 낮았다[1]. penicillin G는 내산성이 약해서 경구 투여를 할 경우에 활성의 대부분이 위에서 사라지는 단점이 있었다[1]. 이러한 단점을 개선하기 위해서 개발된 ampicillin은 내산성이 우수해서 경구 복용이 가능하고, 대부분의 그람 양성 및 그람 음성 병원성 세균들에 대해서 우수한 최소억제 농도(minimum inhibitory concentration, MIC)를 나타낸다[2]. 그러나 ampicillin이 널리 사용되면서 내성세균의 출현도 증가하였고, 내성균에 대한 대응으로 수많은 유도체들이 개발되었다[2]. 원래 ampicillin과 같이 페니실린으로부터 유도된 항생제들은 공통적으로 β -lactam ring을 가지는데, 이러한 항생제들을 beta-lactam 항생제라고 한다. 광범위한 beta-lactam 항생제를 분해하는 extended-spectrum β -lactamase(ESBL)에 대해서 1980년대에 보고가 된 이후로 ESBL을 생성하는 세균들이 많이 분리되어 왔으며, 이러한 ESBL들은 beta-lactam 항생제들을 좀 더 효율적으로 분해하도록 진화해 왔다[3]. 현재 300가지 이상의 서로 다른 ESBL이 보고되어

있으며, 이들은 아미노산 배열의 상동성과 촉매 기작에 따라서 A, B, C, D의 4개의 class로 나뉜다[4]. Class A, C, D의 enzyme들은 활성을 나타내기 위하여 활성부위의 serine을 사용하는 반면에, class B enzyme들은 활성을 위하여 Zn^{2+} 을 필요로 한다[4]. ESBL 중에서 가장 먼저 발견된 것이 class A enzyme들인데, 이들은 주로 plasmid를 통해서 확산되며 전체 ESBL 중에서 대략 절반 가까이를 차지한다[4, 5]. Class A enzyme들은 다시 TEM, SHV, CTX-M 및 OXA type의 4가지로 나뉜다[6]. Ghafourian et al.은 유럽에서 분리되는 ESBL의 종류가 지역별로 큰 차이를 보인다고 보고하였다[5]. 또한 Ogotu et al.은 현재 중국에서 가장 많이 발견되고 있는 ESBL 다섯 가지(*bla*_{OXA-1}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-9}) 유전자들을 multiplex PCR로 확인하기 위하여 다섯 가지의 서로 다른 group-specific primers pair를 고안하였다[6].

Quantitative real-time PCR(qPCR)은 형광성 색소로부터 나오는 신호를 측정함으로써 PCR 반응 중에 생성되는 DNA의 양을 실시간으로 측정할 수 있는 방법이다[7, 8, 9]. 현재 qPCR은 임상적 또는 수의학적 진단, 식품 안전성 등의 분야에서 여러 가지 미생물들을 정성적 또는 정량적으로 분석하는 데에 널리 사용되고 있다[7, 8,

9]. 경상남도 창원시에는 불모산에서 발원한 창원 남천과 정병산에서 발원한 창원천이 시내를 가로 지르며 흘러서 마산만에서 합류한다. 하천은 흐르는 유역에서 오염원이 유입될 가능성은 항상 존재하고, 또한 온도나 강수량에 따라서 하천에 존재하는 미생물들의 총량이나 종류가 크게 영향을 받는다. 본 연구에서는 ESBL 유전자들을 정성적 및 정량적으로 분석하기 위하여 class A ESBL 유전자 중에서 다섯 가지를 선정하고, 각각의 유전자를 target으로 하는 group-specific primers를 사용하여 qPCR을 수행하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. Collection of sample

분석할 시료는 창원 시내의 창원천(경도 128.65, 위도 35.23), 남천(경도 128.67, 위도 35.21), 그리고 창원대학교 교내의 청운지(경도 128.69, 위도 35.25)에서 채취하였다. 채취된 시료 1 l를 4℃, 22,000 × g에서 15 분간 원심분리하였다. 상등액을 제거한 후, 가라앉은 미생물들로부터 genomic DNA를 분리하였다. Total genomic DNA 분리에는 NucleoSpin Microbial DNA Kit(Macherey-Nagel GmbH, Duren, Germany)가 사용되었고, 분리된 DNA는 U-2900 spectrophotometer(Hitachi High-Tech

Science Corp., Tokyo, Japan)를 이용하여 농도를 측정하였다.

2.2. Quantitative real-time PCR

Quantitative PCR을 수행할 때에는 TB Green Fast qPCR Mix(Takara Bio Inc, Shiga, Japan) 12.5 μ l, template DNA 3 μ l, forward primer 1 μ l, reverse primer 1 μ l를 포함하여 최종 volume이 25 μ l가 되도록 하였다. 최종 primer의 농도는 각각 400 nM로 조정하였다. 사용된 primer들은 Table 1에 나타내었다. qPCR은 Rotor-Gene Q(Qiagen Sciences, Germantown, MD, USA) thermal cycler에서 진행하였다. PCR 조건은 95 °C에서 3분간 유지시킨 후에, 95 °C 15초, 60 °C 20 초의 cycle을 45회 반복하였다. Melting curve 분석은 60 °C부터 95 °C의 범위에서 수행하였다. 모든 반응은 3회 반복하였고, 얻어진 Ct 값의 평균을 최종 data로 사용하였다.

2.3. 결과의 분석

세균들의 16S rRNA 유전자 중에서 conserved region을 target으로 하는 primer들이 많이 알려져 있는데, 이들 중에서 967f와 1,391r을 선정하여 분리된 genomic DNA를 10배씩 희석한 template와 함께 qPCR을 진행하였다[10]. 이렇게 얻어진 Ct 값으로 standard curve를 작성하였다 [Fig. 1]. Standard curve 작성 시에 x축에는

Table 1. Primers used in this study for quantitative real-time PCR

Gene targeted	Primer name	Sequence	Amplicon size(bp)	Source
16S rRNA	967f	CAACGCGAAGAACCTTACC	424	Thijs et al. ¹⁰
	1391r	GACGGGCGGTGWGTRCA		
<i>bla</i> _{TEM}	M-TEM-F	CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC	800	Ogutu et al. ⁶
	M-TEM-R	CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC		
<i>bla</i> _{SHV}	M-SHV-F	AGCCGCTTGAGCAAATTA AAC	713	Ogutu et al. ⁶
	M-SHV-R	ATCCCGCAGATAAATCACCAC		
<i>bla</i> _{OXA-1}	M-OXA-1-F	GGCACCAGATTCAACTTTCAAG	564	Ogutu et al. ⁶
	M-OXA-1-R	GACCCCAAGTTTCCTGTAAGTG		
<i>bla</i> _{CTX-M-1}	CTX-M-1-Seq-3F	GACTATTCATGTTGTTGTTATTTTC	924	Ogutu et al. ⁶
	CTX-M-1-Seq-3R	TTACAAACCGTTGGTGACG		
<i>bla</i> _{CTX-M-9}	CTX-M-9-Seq-F	ATGGTGACAAAGAGAGTGCAAC	876	Ogutu et al. ⁶
	CTX-M-9-Seq-3R	TTACAGCCCTTCGGCGATG		

\log_{10} Copy number of target gene을 표시하고 y 축에는 측정된 Ct 값을 표시하였다. 각각의 시료에 대한 회귀직선과 결정계수 R^2 를 계산하여서 통계적으로 유의성이 인정되는지를 확인하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Quantitative real-time PCR

본 연구에서는 Ogutu *et al.*이 제시한 primers를 사용하여 qPCR을 수행하였다[6]. 각 ESBL의 gene copy 수를 측정하기 위하여 세균들의 16S rRNA 유전자의 conserved region을 target으로 하는 primers인 967f와 1,391r을 사용하여 standard curve를 작성하였다. 세 지점에서 채취된 시료들을 사용하여 작성한 standard curve는 Fig. 1에 나타내었다. 각 standard curve의 기울기는 Figure 1에 포함시켰다.

3.2. ESBL 유전자들의 copy 수 계산

Herrig *et al.*은 standard curve를 작성하기 위한 qPCR을 수행할 때에 *Escherichia coli*의 genome을 5.142 Mb로 계산하였다[11]. 본 연구에서는 시료 중에 존재하는 각 세균 genome들의 길이를 정확하게 측정하기가 불가능하므로 *E. coli*의 genome 크기인 5.14 Mb를 시료 중에 존재하는 세균 genome들의 평균 크기로 삼았다. 또한 double-stranded DNA 1 bp의 분자량이 630이고, 세균 genome당 3 copy의 16S rRNA

유전자가 존재하므로 분리된 DNA 30ng에는 16S rRNA 유전자가 1.67×10^7 copy가 존재하고, 이를 상용대수(\log_{10})로 표시하면 7.22가 된다. 마찬가지로 genomic DNA 3ng에는 16S rRNA 유전자가 1.67×10^6 copy가 존재하고, 이를 상용대수로 바꾸면 6.22가 된다. 따라서 16S rRNA 유전자의 copy 수의 상용대수 값을 x 축에 표시하고, 각각에 해당되는 Ct 값을 y 축에 표시하면 Fig. 1에 나타낸 standard curve가 얻어진다.

남천의 경우에는 회귀식이 $y = -4.111x + 39.131$ 로 나타나고, 결정계수는 $R^2 = 0.9882$ 로서 거의 1에 가까우므로 함수적 관련성이 상당히 높다고 판단되었다[Fig. 1]. 창원천의 경우에는 회귀식이 $y = -3.815x + 42.868$ 로 나타나고, 결정계수는 $R^2 = 0.9946$ 로 나타났다[Fig. 1]. 청운지의 경우에는 회귀식이 $y = -3.833x + 40.366$ 로 나타나고, 결정계수는 $R^2 = 0.9968$ 로 나타났다[Fig. 1]. 따라서 이렇게 얻어진 회귀식으로 ESBL 다섯 가지 유전자들(*bla_{OXA-1}*, *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M-1}*, *bla_{CTX-M-9}*)의 copy 수를 계산하였다[Table 2].

3.3. ESBL 유전자들의 분포

시료를 채취한 지점별로 전체 ESBL 유전자들의 분포를 살펴보면 확연한 차이가 있음을 알 수 있다[Table 2]. 남천의 경우 DNA 30 ng당 ESBL 유전자가 1.93×10^6 copy나 존재하는 데에 반해 창원천의 경우에는 1.47×10^5 copy 그리고 청운지에는 9.5×10^3 copy 밖에 존재하지 않았다.

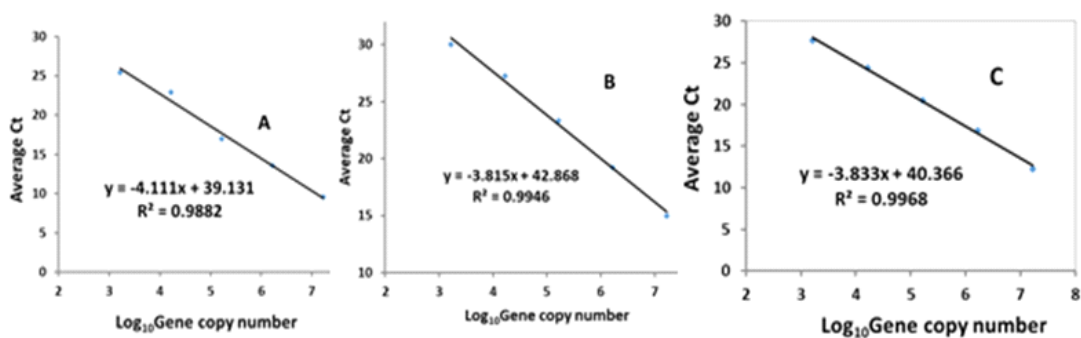


Fig. 1. Standard curves for quantification of the ESBL genes. A, Namcheon; B, Changwoncheon; C, Cheongwoonji. PCR were performed in triplicate and the average value of Ct was adopted to estimated the copy number of the target genes. Ct stands for cycles for threshold.

Table 2. Calculated number of gene copies of the extended-spectrum beta-lactamase genes in 30 ng of DNA derived from microorganisms in the waterfront environments.

Genes	Namcheon	Changwoncheon	Cheongwoonji
<i>bla</i> _{OXA-1}	1.26×10^6	9.42×10^4	82.5
<i>bla</i> _{SHV}	1.13×10^2	3.3×10^3	1.33×10^2
<i>bla</i> _{TEM}	2.52×10^4	1.98×10^4	48.6
<i>bla</i> _{CTX-M-1}	6.48×10^5	2.81×10^4	8.31×10^3
<i>bla</i> _{CTX-M-9}	1.82×10^3	1.9×10^3	9.27×10^2

즉, 남천에는 청운지보다 200배 이상 그리고 창원천에는 청운지보다 15배 이상의 ESBL 유전자가 존재하는 것을 알 수 있었다. 본 연구에서는 각 시료별로 분리된 총 DNA 양을 비교하지는 않았다. 왜냐하면 총 DNA 양은 매번 실험을 진행할 때마다 분리 효율이 상당한 차이를 보였기 때문에 총량을 비교하는 것은 의미가 없다고 판단되었기 때문이다. 만일 총 DNA의 양을 비교해서 수계에 존재하는 미생물의 총량을 파악하려면 좀 더 표준화된 DNA 분리 방식을 확립할 필요가 있다고 판단된다. 남천과 창원천의 경우에는 두 하천이 만나는 지점보다 훨씬 더 상류에서 시료를 채취했음에도 불구하고 두 하천에서 β -lactam 항생제에 내성을 갖는 세균들의 총량에서 큰 차이를 보이고 있었다. 따라서 남천에서는 시료를 채취한 지점의 상류 쪽에 내성세균들의 오염원이 존재할 가능성이 있다고 판단된다. 양쪽 모두에서 내성세균들의 총량에서는 큰 차이가 존재하지만 각 ESBL 유전자들의 비율에서는 큰 차이가 없었다. 즉, 남천에서는 *bla*_{OXA-1} 유전자가 65.3%, *bla*_{CTX-M-1} 유전자가 33.6%를 차지하므로 이 두 유전자가 전체 ESBL 유전자의 99% 가까이 차지하고 있었다. 창원천에서도 *bla*_{OXA-1} 유전자가 64.1%, *bla*_{CTX-M-1} 유전자가 19.1%를 차지하므로 이 두 유전자가 전체의 83% 이상을 차지하고 있었다. 반면에 하천과 다르게 폐쇄된 환경인 청운지에서는 내성세균들의 총량 자체가 다른 두 하천에 비해서 월등하게 적었다. 또한 내성 세균의 비율도 달라서 *bla*_{CTX-M-1} 유전자가 전체의 87.5%, 그리고 *bla*_{CTX-M-9} 유전자가 9.8%를 차지하고 있었다. 남천과 창원천에서 확실하게 많았던 *bla*_{OXA-1} 유전자는 청운지에서는 불과 0.87% 밖에 분포되어 있지 않았다. 따라서 폐쇄된 환경인 청운지는 물이 끊임없이 유입되어

섞이는 하천 환경과 확연한 차이를 보이고 있었다.

현재 qPCR은 환경이나 식품에 존재하는 미생물들을 정성적 및 정량적으로 분석하기 위해서 널리 사용되고 있다[7, 8, 9]. 본 연구에서는 창원 시내의 3개 지점에서 물 시료를 채취하고, 거기에 존재하는 beta-lactamase 유전자들을 정량적으로 분석하였다. 이러한 방법으로 주변 수계의 계절별 수질변화를 지속적으로 모니터링하여 자료를 확보해 놓으면 가축분뇨나 항생제 폐기 등에 의한 예상하지 못했던 오염이 발생했을 경우 또는 급격한 환경변화에 대해 신속한 대처가 가능해질 수가 있으리라고 생각한다. 또한 오염원의 추적도 가능할 것이므로 수질관리에 활용이 될 수 있다.

자연계에는 4개 class의 beta-lactamase들이 존재하는 것으로 알려져 있는데 그중에서 class A enzyme들이 가장 많이 분포하고 있다[4]. 또한 각 class enzyme들의 지역별 분포도 큰 차이를 보이는데, 예를 들면 동유럽에서는 CTX-M과 SHV-type의 enzyme들이 우세를 보이는데반해 북아메리카에서는 TEM-type enzyme들이 많이 분포하고 있다[5]. 중국에서는 beta-lactam 항생제에 내성을 나타내는 *Klebsiella pneumoniae*를 분석해 본 결과, *bla*_{SHV}가 46.9%로서 가장 많았고 다음으로는 *bla*_{TEM}이 21.1%로서 두 번째였다[6]. 그러나 창원 시내의 수계에서는 어느 경우에도 *bla*_{SHV}나 *bla*_{TEM}은 우점 유전자가 되지 못하였다. 따라서 우리나라의 ESBL 분포가 외국과는 다른 양상을 보일 가능성도 충분하다고 여겨진다.

창원의 수계에서 이미 beta-lactam 항생제에 대한 다양한 내성세균들이 분리되고 동정되었다[12]. 기존의 많은 연구들이 자연계에 존재하는 항생제 내성세균들을 연구하기 위해서 세균을 배

양한 고체배지 위에 항생제를 함유한 paper disc를 올리는 방법을 주로 사용해 왔다[13]. 그러나 이러한 방법으로는 실험실에서 배양이 되지 않는 항생제 내성 세균들에 대해서는 분석이 불가능하고, 또한 내성세균들이 항생제에 내성을 갖게 해주는 유전자에 대한 정보도 얻을 수가 없다. 따라서 현재는 이러한 목적으로 qPCR을 사용하는 사례가 늘고 있다. 본 연구에서는 SYBR Green dye를 사용하여 qPCR을 수행하였으나 qPCR에 사용되는 각각의 primer에 dye를 결합시켜서 여러 종류의 primers를 동시에 사용하는 multiplex qPCR 방법도 제시되었다[6, 14]. Multiplex qPCR은 여러 파장의 형광을 동시에 감지하므로 각각 다른 dye로 표시된 여러 종류의 primers를 한 tube에서 동시에 사용할 수가 있다. 따라서 시약을 여러 tube에 반복적으로 첨가할 때 발생하는 pipetting error를 최소화 할 수는 있으나 primers나 thermal cycler의 가격이 비싸다는 단점이 있다. 그러나 SYBR green dye를 사용하는 경우에는 한 파장의 형광만 인식하면 되므로 dye로 표시되지 않은 일반 primers를 사용해도 되며 thermal cycler도 저렴하다. 대신에 한 tube에서 한가지 primer pair만 사용해야 하므로 시료 수 만큼 시료 tube 수도 늘어나는 단점도 있다. 어느 방법을 사용하던 간에 qPCR을 사용하면 배양이 불가능한 세균들을 포함해서 자연계에 존재하는 거의 모든 미생물들이 가지고 있는 내성관련 유전자들을 신속하고 간편하게 분석할 수 있다.

현재 세균감염을 치료하기 위하여 여러 가지 다양한 항생제들이 사용되고 있는데, 그중에서도 β -lactam 항생제들은 가장 중요하고, 또 가장 널리 사용되고 있는 항생제들이다[15]. 그러나 이러한 β -lactam 항생제들을 분해하는 ESBL들은 이미 생활하수, 식품, 사람의 장내 균총 등 자연계에 광범위하게 분포되어 있음이 확인되었다[15, 16, 17]. 따라서 이처럼 ESBL이 자연계에서 빠른 속도로 확산된다면 β -lactam 항생제들이 더 이상 세균감염의 치료에 사용될 수 없는 시대가 의외로 빨리 도래할 수도 있다[15, 16].

각 class에 속하는 ESBL들은 그 구조 및 작용 기작이 서로 다르고, 따라서 enzyme 활성을 저해하는 inhibitor들이 서로 다르다[18]. 예를 들면 class A enzyme들의 active site는 Ser⁷⁰과 Lys⁷³으로 이루어져 있는데, Ser⁷⁰이 beta-lactam ring의 carbonyl carbon을 공격해서 acyl-enzyme

intermediate로 전환시킨다. 따라서 각 class에 속하는 enzyme들의 자연계에서의 분포가 밝혀지면 이러한 enzyme들의 진화과정을 예측할 수 있고, 또한 각 enzyme들의 inhibitor 개발에 도움이 될 수도 있으리라 예상한다[18]. 미생물의 증식은 온도나 영양분의 농도에 큰 영향을 받으므로 계절별로 같은 양의 물 시료 중에 존재하는 미생물의 총량도 크게 다를 수 있고, 각 미생물의 분포도 달라진다. 추후, 장기간에 걸친 모니터링을 통해 beta-lactam 항생제에 내성균주들을 모니터링해 볼 필요가 있다고 판단된다.

4. 결론

창원시의 3개 지점(남천, 창원천, 청운지)에서 물 시료를 채취하고, 채취한 시료로부터 DNA를 분리하였다. Class A extended-spectrum beta-lactamase 유전자 5가지(*bla*_{OXA-1}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-9})를 target으로 하는 primers와 시료로부터 분리된 genomic DNA를 사용하여 정량적 PCR을 수행하였다. 시료를 채취한 지점별로 전체 ESBL 유전자들의 수와 비율에서 확연한 차이가 있음을 알 수 있었다. 남천의 경우 genomic DNA 30 ng당 ESBL 유전자가 1.93×10^6 copy나 존재하는 데에 반해 창원천의 경우에는 1.47×10^5 copy 그리고 청운지에는 9.5×10^3 copy 밖에 존재하지 않았다. 즉, 남천에는 청운지보다 200배 이상 그리고 창원천에는 청운지보다 15배 이상의 ESBL 유전자가 존재하는 것을 알 수 있었다. 남천과 창원천에서는 각 ESBL 유전자들의 비율에서는 큰 차이가 없었다. 즉, 남천에서는 *bla*_{OXA-1} 유전자가 65.3%, *bla*_{CTX-M-1} 유전자가 33.6%를 차지하므로 이 두 유전자가 전체 ESBL 유전자의 99% 가까이를 차지하고 있었다. 창원천에서도 *bla*_{OXA-1} 유전자가 64.1%, *bla*_{CTX-M-1} 유전자가 19.1%를 차지하므로 이 두 유전자가 전체의 83% 이상을 차지하고 있었다. 반면에 하천과 다르게 폐쇄된 환경인 청운지에서는 내성세균들의 총량 자체가 다른 두 하천에 비해서 월등하게 적었다. 또한 내성 세균의 비율도 달라서 *bla*_{CTX-M-1} 유전자가 전체의 87.5%, 그리고 *bla*_{CTX-M-9} 유전자가 9.8%를 차지하고 있었다.

감사의 글

이 논문은 2021~2022년도 창원대학교 자율연구과제 연구비 지원으로 수행된 연구결과임.

References

1. L. P. Garrod, "Choice among penicillins and cephalosporins", *Br. Med. J.* Vol.3, pp.96-100, (1974).
2. D. Kaushik, M. Mohan, D. M. Borade, O. C. Swami, "Ampicillin: rise fall and resurgence". *J Clin. Diagn. Res.* Vol.8, No.5, pp.ME01-3, (2014).
3. P. D. Tamma, J. Rodriguez-Baño, "The use of noncarbapenem β -lactams for the treatment of extended-spectrum β -lactamase infections", *Clin. Infect. Dis.* Vol.64, No.7, pp.972-980, (2017).
4. F. K. Majiduddin, I. C. Materon, T. G. Palzkill, "Molecular analysis of beta-lactamase structure and function", *Int J Med Microbiol*, Vol.292, No.2, pp.127-137, (2002).
5. S. Ghafourian, N. Sadeghifard, S. Soheili S, Z. Sekawi, "Extended spectrum beta-lactamases: definition, classification and epidemiology", *Curr Issues Mol Biol*, Vol.17, No.1, pp.11-21, (2015).
6. J. O. Ogotu, Q. Zhang, Y. Huang, H. Yan, L. Su, B. Gao, W. Zhang, J. Zhao, W. Cai, W. Li, H. Zhao, Y. Chen, W. Song, X. Chen, Y. Fu, F. Zhang, "Development of a multiplex PCR system and its application in detection of *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-9} and *bla*_{OXA-1} group genes in clinical *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains", *J Antibiot (Tokyo)*, Vol.68, No.12, pp.725-733, (2015).
7. B. Kaltenboeck, C. Wang, "Advances in real-time PCR: application to clinical laboratory diagnostics", *Adv Clin Chem*, Vol.40, pp.219-259, (2005).
8. M. Botes, M. de Kwaadsteniet, T. E. Cloete, "Application of quantitative PCR for the detection of microorganisms in water", *Anal Bioanal Chem*, Vol.405, pp.91-108, (2013).
9. P. Kralik, M. Ricci, "A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: definitions, parameters, and everything", *Front Microbiol*, Vol.8, No.2, pp.108, (2017).
10. S. Thijs, M. Op De Beeck, B. Beckers, S. Truyens, V. Stevens, J. D. Van Hamme, N. Weyens, J. Vangronsveld, "Comparative evaluation of four bacteria-specific primer pairs for 16S rRNA gene surveys", *Front Microbiol*, Vol.8, No.3, pp.494, (2017).
11. I. Herrig, S. Fleischmann, J. Regnery, J. Wesp, G. Reifferscheid, W. Manz, "Prevalence and seasonal dynamics of *bla*_{CTX-M} antibiotic resistance genes and fecal indicator organisms in the lower Lahn River, Germany", *PLoS One*, Vol.15, No.4, pp.e0232289, (2020).
12. Y. Bae, "Isolation and identification of ampicillin-resistant bacteria in Changwon", *J Life Sci*, Vol.28, No.12, pp.1529-1535, (2018).
13. H. Oh, J. Park, "Characteristics of Antibiotic Resistant Bacteria in Urban Sewage and River", *J Kor Soci Environ Eng*, Vol.31, No.3, pp.232-239, (2009).
14. S. T. Han, Y. Fei, J. Y. Huang, M. Xu, L. C. Chen, D. J. Liao, Y. J. Tan, "Establishment of a simple and quick method for detecting extended-spectrum β -lactamase (ESBL) genes in bacteria", *J Biomol Tech*, Vol.27, No.4, pp.132-137, (2016).
15. I. Waško, A. Kozińska, E. Kotlarska, A. Baraniak, "Clinically Relevant β -Lactam Resistance Genes in Wastewater Treatment Plants", *Int J Environ Res Public Health*, Vol.19, No.21, pp.13829, (2022).
16. M. Sola, Y. Mani, E. Saras, A. Drapeau, R. Grami, M. Aouni, J. Y. Madec, M. Haenni, W. Mansour, "Prevalence and

- characterization of extended-spectrum β -lactamase- and carbapenemase-producing Enterobacterales from Tunisian seafood”, *Microorganisms*, Vol.10, No.7, pp.1364, (2022).
17. Q. R. Ducarmon, R. D. Zwiittink, R. P. J. Willems, A. Verhoeven, S. Nooij, F. R. M. van der Klis, E. Franz, J. Kool, M. Giera, C. M. J. E. Vandenbroucke-Grauls, S. Fuentes, E. J. Kuijper, “Gut colonisation by extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and its association with the gut microbiome and metabolome in Dutch adults: a matched case-control study”, *Lancet Microbe*, Vol.3, No.6, pp.e443-e451. (2022).
18. M. F. Mojica, M. A. Rossi, A. J. Vila, R. A. Bonomo, “The urgent need for metallo- β -lactamase inhibitors: an unattended global threat”, *Lancet Infect Dis*, Vol.22, No.1, pp.e28-e34, (2022).