

다양한 물 환경시료에서 항생제 내성 미생물 유해성 검출을 위한 배양 분리방법 개발

Development of a Cultivation Method for Detecting Antibiotic Resistant Microorganisms from Various Water Samples

저자 (Authors)	오향균, 이재진, 이재영, 박준홍 Oh Hyangkyun, Lee Jaejin, Lee Jai-Young, Park Joonhong
출처 (Source)	대한토목학회논문집 B 27(6B) , 2007.11, 711-717(7 pages) JOURNAL OF THE KOREAN SOCIETY OF CIVIL ENGINEERS B 27(6B) , 2007.11, 711-717(7 pages)
발행처 (Publisher)	대한토목학회 KOREAN SOCIETY OF CIVIL ENGINEERS
URL	http://www.dbpia.co.kr/journal/articleDetail?nodeId=NODE01227284
APA Style	오향균, 이재진, 이재영, 박준홍 (2007). 다양한 물 환경시료에서 항생제 내성 미생물 유해성 검출을 위한 배양 분리방법 개발. 대한토목학회논문집 B, 27(6B), 711-717
이용정보 (Accessed)	연세대학교 165.***.140.30 2019/11/11 17:01 (KST)

저작권 안내

DBpia에서 제공되는 모든 저작물의 저작권은 원저작자에게 있으며, 누리미디어는 각 저작물의 내용을 보증하거나 책임을 지지 않습니다. 그리고 DBpia에서 제공되는 저작물은 DBpia와 구독계약을 체결한 기관소속 이용자 혹은 해당 저작물의 개별 구매자가 비영리적으로만 이용할 수 있습니다. 그러므로 이에 위반하여 DBpia에서 제공되는 저작물을 복제, 전송 등의 방법으로 무단 이용하는 경우 관련 법령에 따라 민, 형사상의 책임을 질 수 있습니다.

Copyright Information

Copyright of all literary works provided by DBpia belongs to the copyright holder(s) and Nurimedia does not guarantee contents of the literary work or assume responsibility for the same. In addition, the literary works provided by DBpia may only be used by the users affiliated to the institutions which executed a subscription agreement with DBpia or the individual purchasers of the literary work(s) for non-commercial purposes. Therefore, any person who illegally uses the literary works provided by DBpia by means of reproduction or transmission shall assume civil and criminal responsibility according to applicable laws and regulations.

다양한 물 환경시료에서 항생제 내성 미생물 유해성 검출을 위한 배양 분리방법 개발

Development of a Cultivation Method for Detecting Antibiotic Resistant Microorganisms from Various Water Samples

오향균* · 이재진** · 이재영*** · 박준홍****

Oh, Hyangkyun · Lee, Jaejin · Lee, Jai-Young · Park, Joonhong

Abstract

Microorganisms often develop the way to survive against antibiotics and other antimicrobial drugs as people overuse them. Antibiotic resistant microorganisms could threaten human health with deadly disease. In nature, microorganisms need few nutrients to stay alive. In laboratory conditions, however, microbes from environmental samples are normally grown in nutrient-rich culture media. Because of this, the currently-used and typical cultivation methods are not suitable for microbial risk assessment of environment water samples. The purpose of this research is to develop new cultivation method to detect oligotrophic antibiotic resistant bacteria. For this, one of general high nutrient media, LB, was diluted in series, and then amended with tetracycline at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. For quantification of antibiotic resistant bacteria, a standard spread plate method was modified using the antibiotic-amended diluted LB plates. The ability of the new method to detect oligotrophics and antibiotic resistant microorganisms was confirmed when analyzing drinking water and swine manure wastewater, respectively, followed by 16S rDNA analysis of cultivated isolates from the plates. When this method was applied in evaluating antibiotic resistant microbial risk in river water, microbial risk seemed to be low. However, in the case of Asian dust rain, the relative abundance of antibiotic resistant microorganisms in total culturable bacteria was higher than that for swine manure. This suggests that microbial risk due to antibiotic resistant microbes could be high in the Asian dust containing rain water.

Keywords : *antibiotic resistance, oligotrophic, microbial risk, Asian dust, river water quality*

요 지

최근 들어 항생제 남용으로 인한 항생제 내성 미생물의 출현으로 인간의 건강을 위협하는 질병들이 생겨나고 있으므로 항생제 혹은 항생제 내성 미생물을 검출하는 생태유해성 및 보건 유해성에 대한 평가가 중요해졌다. 한편, 자연계에 존재하는 많은 미생물들은 저영양상태에서 살아가고 있다. 그러나 일반적인 고영양성 배양방법으로는 환경시료 내 미생물들을 분리해 내는데 한계가 있기 때문에, 기존의 방법은 환경시료 내 미생물 유해성을 판단하는데 적합하지 않다. 이러한 이유로, 본 연구는 다양한 환경시료 내 항생제 내성 저영양성 미생물들을 분리해 내는 방법을 개발하는데 목표를 두고 있다. 실험은 고영양 물질, LB를 희석하고 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 tetracycline을 투여 하여 배지를 만들고 평판확산법을 이용해서 다양한 시료 내에서, 항생제 내성 미생물 유해성을 평가하였다. 개발된 방법으로 음용수와 축산폐수를 분석한 결과 플레이트에서 확인된 미생물들은 저영양성 혹은 항생제 내성 세균이었음을 16S rDNA 분석으로 확인하였다. 그리고 청계천수 내 항생제 내성 미생물 유해성 평가 결과, 항생제를 포함하는 플레이트에서는 미생물이 자라지 않은 것으로 보아, 청계천 수는 항생제 내성 미생물에 대한 유해성이 낮은 것으로 여겨진다. 황사 빗물의 경우, 배양된 전체 미생물 중 항생제 내성 미생물의 상대적인 검출빈도는 황사 빗물의 경우가 축산폐수의 그것보다 높은 것을 본 연구 결과에서 보였다. 이는 황사 빗물에 항생제 내성 미생물 유해성이 높을 가능성을 시사한다.

핵심용어 : 항생제 내성, 저영양성, 미생물유해성, 황사빗물, 하천수질

1. 서 론

최근 들어 항생제 남용으로 인한 항생제 내성 미생물로

인해 야기되는 질병 때문에 생태유해성이나 보건유해성에 대한 평가가 중요한 이슈로 대두되고 있다(Coleman *et al.*, 2007). 국내의 경우도 예외는 아니다. 최근 국립환경과학원의

*정회원 · 연세대학교 공과대학 대학원 토목공학과 석사과정 (E-mail : hyangkyun@gmail.com)

**정회원 · 연세대학교 공과대학 대학원 토목공학과 석사과정 (E-mail : up61_kr@hanmail.net)

***서울시립대학교 환경공학부 교수 (E-mail : leeji@uos.ac.kr)

****정회원 · 교신저자 · 연세대학교 공과대학 사회환경시스템공학부 조교수 (E-mail : parkj@yonsei.ac.kr)

보고서(국립환경과학원, 2006)에 따르면 하천이나 하수 내에서 항생제의 농도는 ppb수준이므로, 생태 유해도에 직접적이고 심각한 영향을 미칠지는 다소 명확하지 않아 보인다. 그러나 다량의 항생제를 투여한 동물과 인체에서 배설되는 분뇨의 경우 투여분의 30~90%가 분뇨에 잔류한다. 특히 동물의 경우에는 배설물에 높은 농도의 항생제가 분해되지 않고 잔류하여, 이러한 고농도의 항생제의 환경으로의 노출은 강력한 항생제 내성 미생물의 도출을 야기 할 것이다(Jindal *et al.*, 2006). 항생제 내성 미생물의 출현 자체보다는 항생제 내성 유전자가 수평이동(antibiotic resistant gene horizontal transfer)을 통해서 축산분뇨 내 병원성 미생물들에 전해져서 이들이 항생제 내성을 갖게 되는 것이 문제가 되는 것이다(Dzidic and Bedekovic, 2003; Klare *et al.*, 2003). 이러한 항생제 내성 병원성 미생물에 의한 질병은 치료가 어려우므로 그 보건유해성은 높은 것으로 평가 할 수 있다. 그러므로 환경시료에서 미생물 유해성을 신뢰성 있고 타당하게 진단하기 위해서는 항생제 내성 미생물의 검출방법이 중요하다.

한편, 자연에 존재하는 대부분의 미생물은 유기물이 극히 적은 저영양성 상태에서 살고 있고, 저영양 상태의 미생물들은 고영양 상태에 노출되면 성장하지 않을 수도 있다(Colwell *et al.*, 1985; Kogure, 1997). 하지만 현재의 수질 오염 공정시험방법(국립환경과학원, 2004)의 미생물 유해성 분석은 대부분 배양 의존적 방법인데 고영양성배지를 사용하기 때문에 환경시료에 존재하는 저영양성 상태의 미생물들을 배양 분리 해 낼 수 없다. 이러한 기존의 미생물 배양 방법의 한계를 극복하기 위해 저영양성 세균을 배양하는 연구 방법(황경숙 등, 2004)이 선행 된 바 있다. 선행 기술은 음용수 내 미생물 유해성 진단을 위한 검사 방법 개발이었으나 보건유해성에 관련된 항생제 내성이나 병원성 미생물들에 대한 정보는 제공하지 못하였다. 따라서 다양한 영양조건 하에서 유해성 미생물을 배양검출하는 방법이 필요하다. 상기의 연구배경에 의해 본 연구는 다양한 물 환경 시료에서 미생물 유해성 진단을 위해 저영양성에서 고영양성까지의 다양한 영양조건하에 항생제 내성 미생물을 배양검출하는 새로운 방법을 개발하였다. 본 연구에서 고안된 개발 내용은 국내특허로 출원되었다(특허출원 제 2006-94909 호).

2. 연구방법

2.1 시료 선정

본 연구의 목적은 다양한 물 환경시료에서 항생제 내성 저영양성 미생물을 검출 하는 것이므로 음용수, 청계천 수, 황사빗물을 대표 시료로 사용하였다. 본 연구에서 개발된 방법이 저영양성 세균을 배양 분리함을 보이기 위해 수돗물을 정수해서 사용하는 음용수를 시료로 사용하였다. 음용수는 통상적으로 사용하는 정수기에서 채수했다. 축산폐수는 tetracyclin부류의 항생제를 투여한 돼지분뇨에서 항생제 내성 미생물의 검출이 검증된 바 있기에(한일, 2005) 본 연구에서 개발된 방법이 고영양성조건 뿐만 아니라 저영양성에서도 항생제 내성 미생물을 배양 분리 할 수 있음을 평가하는데 사용하였다. 축산폐수는 경기도 안성시 'P 돼지농장'에서 채취

하였다. 이러한 기지의 시료를 이용한 검증을 거친 뒤에 본 연구에서 개발된 배양 방법을 미생물 유해성이 미지인 시료(test sample)인 청계천 수와 황사빗물 분석에 적용하여 보았다. 황사 빗물은 2006년 4월 9일 황사주의보 상황에서 초기 강우 3 mm를 획득하여 실험에 사용하였다.

2.2 다양한 영양조건에서 항생제 내성 미생물의 배양 검출 방법

본 연구에서는 저영양성 뿐 아니라 고영양성 미생물도 함께 배양하기 위해서 일반 미생물배양에 통상적으로 사용되는 고영양성 물질인 LB(Luria-Bertani Broth)의 영양 정도를 변화시키기 위해 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} 으로 각각 희석시키고 agar와 혼합하여 미디움을 만든 후 6-well multiwell plates(6 다중 웰플레이트) 혹은 일반 plate(이하 플레이트)에 부어 고형배지를 제작하였다. 항생제 내성을 가진 미생물의 선택적 배양 분리를 위해서, 앞서 언급된 다양한 영양정도의 LB배지에 tetracycline 100 $\mu\text{g/mL}$ 을 투여하여 항생제가 함유된 고형배지를 상기와 같은 방식으로 제작하였다. Tetracycline은 현재 항생제 남용 문제가 심각하다고 알려진 축산 농가에서 가장 많이 사용하고 있는 chlortetracycline, oxytetracycline 같은 계열인, 매우 광범위 하게 사용되는 인체용 항생제이고, 이에 대해서 내성을 갖는 세균이 많아지게 되면 인체보건 상 큰 문제가 될 수 있기 때문에 본 연구에서는 여러 가지 항생제 중 대표적으로 tetracycline을 선별하여 사용하였다. 그리고 실험에 사용한 tetracycline의 농도인 100 $\mu\text{g/mL}$ 은 하수처리장, 강물에 대해 최근에 수행된 연구(Novais *et al.*, 2007)에서 제시한 tetracycline MIC농도인 64 $\mu\text{g/mL}$ 보다 약 1.5배 높은 임의의 농도이다. 따라서 이 농도에 내성을 가지는 미생물은 매우 위험한 미생물이라고 판단 할 수 있기 때문에 상기의 농도로 실험을 하였다.

미지의 시료 내 배양 미생물을 정량적으로 검출하기 위해서 무 세균 phosphate buffer(NaH_2PO_4 , pH = 6.7)와 섞어 다양한 농도로 희석시킨 후 플레이트에 뿌리는 평판확산법(spread plate method)을 이용했다(Sambrook and Russell, 2001). 일반 고형 배지의 경우 분주된 희석시료의 양은 100 μL 이고, 한 고형배지 상에 30~300개의 콜로니가 있을 때 효과적인 분리와 정량화가 가능하다. 같은 방식으로 6-well multiwell plates(6 다중 웰플레이트)의 경우는 희석시료를 하나의 well당 17.6 μL 만큼 분주한 후 배지표면에 고르게 분포시켜서 자라난 콜로니의 숫자가 5~50개인 경우에 정량적 검출을 하였다. 이렇게 환경시료가 접종된 플레이트를 25°C에서 3일간 배양한 후에 형성된 콜로니를 확인하고, 그 수를 세었다. 정량화된 데이터의 신뢰성 평가를 위해서 각 시료는 최소 세 번 반복 실험하여 표준편차를 계산하고 이를 평균값으로 나눈 coefficient of variation도 산정하였다.

2.3 배양 분리된 항생제 내성 미생물 동정 방법

본 연구에서는 시료가 분주된 배지에서 자라난 세균들의 계통학적 특성을 파악하기 위해 플레이트상 콜로니의 community 중에서 같은 morphology를 띄는 콜로니들을 하나의 종류라고 보고, 그 종(種)의 개체수가 약 40개 이상을 차지하는 것들을 선택하였다. 그리고 이것들에 대해서 16S

rDNA의 PCR(polymerase chain reaction)을 수행하였다. 분석을 위해서 PCR primer는 27F(5'-AGAGTTTGATCA-TGGCTCAG-3')와 1492R(5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Lane, 1991; Marcelino and Stephen, 1996)을 사용하였다. 각 PCR반응의 전체 부피는 25 μ L 인데, 1 nM 농도의 forward primer와 reverse primer를 각각 2.5 μ L, 10X PCR buffer 2.5 μ L, 20 mM의 MgCl₂ 2.0 μ L, 100 mM의 dNTP 0.05 μ L, 5U/ μ L의 Taq polymerase(Invitrogen) 0.625 μ L, sterilized water 13.325 μ L를 포함하고 있다. 상기의 것을 PCR 반응튜브에 넣고 잘 섞어준 후 thermal cycler를 이용해 PCR 반응을 실시하였다. 94°C로 5분간 반응시킨 후, 94°C(3분)-50°C(25초)-72°C(2분)을 한 사이클로 25회 반복하고, 72°C에서 최종 반응을 시키는 조건으로 DNA를 증폭하였다.

증폭된 DNA의 크기를 확인하기 위해서 PCR 반응물을 1%의 agarose gel, 1X TAE buffer에서 100V, 400 mA로 40분간 전기영동을 실시하였다(Sambrook and Russell, 2001). Ethidium bromide를 이용해 DNA염색을 하고 UV에 노출시켜 증폭된 DNA의 크기가 목표한 1.5 kb와 유사한지 확인했다. Qiagen Purification Kit(Qiagen)를 이용해서 증폭된 DNA를 정제시키고 그것들의 염기서열 분석을 마크로젠(<http://www.macrogen.com>)에 의뢰하였다. 그리고 RDP (Ribosomal Protein Database Project) II의 Classifier 프로그램(<http://rdp.cme.msu.edu>)을 사용해서 미생물의 동정을 수행하였다. RDP 사이트에서의 동정방법으로는 먼저 classifier 프로그램에 알고자 하는 sequence를 입력한다. 결과를 얻은 후 계(kingdom) > 문(devision) > 강(class) > 목(order) > 과(family) 단계에 이은 ‘속(genus)’ 단계에서 해당 미생물을 구분해

내었다. 이 때, sequeunce matching 비율은 97% 이상으로 하였다.

3. 실험결과 및 토의

3.1 저영양성 항생제 내성 미생물 배양 검출능력 평가결과
음용수, 축산분뇨, 청계천수, 황사뒹뒶물 시료를 플레이트에 접종해서 배양 분리 해 낸 콜로니의 수를 세어 Table 1에 기재하였다. 각각의 열(列)은, 하나의 시료 당 항생제를 포함하고 있지 않은 플레이트와(CFU without Antibiotic), 항생제를 포함하는 플레이트(CFU with Antibiotic)로 나누어 LB의 영양 정도(10⁰, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴)에 따른 콜로니 수를 정량화 시켜 기재하도록 되어있다. 또한 LB의 희석 정도에 따라 배지의 영양등급을 나누어 보았다. Kuznetsov (1979)와 Poindexter(1981)는 1~15 mg/L의 유기탄소원을 함유하는 배지에서 자라는 미생물을 저영양성 미생물이라 정의하였는데, 본 연구에서 사용된 LB 배지는 1리터당 15,000 mg의 유기탄소원을 함유하므로 LB를 희석시키지 않은 플레이트는 ‘고영양성’, LB를 10⁻¹, 10⁻² 배 희석시킨 플레이트는 중영양성, LB를 10⁻³, 10⁻⁴배 희석시킨 플레이트는 저영양성 배지라고 정하였다. 이와 같은 방법을 반영하여 예를 들어 보면, A라는 시료의 열(列)의 항생제를 포함하고 있는 LB를 10⁻³, 10⁻⁴배 희석시킨 플레이트에서 콜로니가 확인되었다면 포괄적으로 그 시료에는 항생제 내성 저영양성 미생물이 존재함을 보일 수 있는 것이다.

음용수에 있는 미생물을 배양 해 본 결과 통상적인 플레이트법에 사용되는 LB의 농도를 희석시킨 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴인 플레이트에서 미생물이 자라남을 확인 할 수 있었다.

Table 1. Detection of Microorganisms from Various Water Samples (Unit : CFU/mL)

	LB concentration	drinking water	swine manure	Cheonggye cheon	Asian dust rain
CFU* without Antibiotic	LB 10 ⁰	0	6,700,000	467	242,000
	LB 10 ⁻¹	2,600	2,400,000	3,400	254,000
	LB 10 ⁻²	2,740	1,200,000	4,433	288,000
	LB 10 ⁻³	2,590	1,000,000	3,300	245,000
	LB 10 ⁻⁴	2,340	1,200,000	2,067	282,000
CFU with Antibiotic (Tetracycline)	LB 10 ⁰	0	133,333	0	7,100
	LB 10 ⁻¹	0	20,667	0	5,940
	LB 10 ⁻²	0	1,667	0	4,530
	LB 10 ⁻³	0	5,867	0	4,355
	LB 10 ⁻⁴	0	4,633	0	2,435

*CFU : Colony Forming Unit

Table 2. Bacteria from Drinking Water

Genus	LB Concentration	Characteristics	References
<i>Arcicella</i>	10 ⁻²	Oligotrophic bacteria from fresh water neuston biofilm and a mattock spring cave	Nikitin <i>et al.</i> (2004)
<i>Chitinophaga</i>	10 ⁻²	Isolated from pine litter, fresh water and soil	Sangkhol and Skerman (1981)
<i>Rhizobium</i>	10 ⁻³ (Oligotrophic)	Legume root nodule bacteria, isolated from the root nodules of <i>Astragalus sinicus</i>	Lindstrm (1989) Chen <i>et al.</i> (1991)
<i>Pedobacter</i>	10 ⁻²	Isolated climate warming and tundra viable bacteria	Hwang <i>et al.</i> (2006)

Table 3. Identified Bacteria from Swine Manure and Their Characteristics

Genus	Characteristics	References
<i>Bacillus</i>	눈, 폐질환, 식중독 원인균. Vacomycin, Clindamycin, Aminoglycosides, Imipenem, Penicillin에 내성이 있음	Reboli <i>et al.</i> (1989) Weber <i>et al.</i> (1988) Dryde and Kramer (1987) Slimans <i>et al.</i> (1987) Isaacson <i>et al.</i> (1976)
<i>Vagococcus</i>	인간 질병의 원인균. Clindamycin, Lomefloxacin, Ofloxacin에 내성이 있음	Teixeira <i>et al.</i> (1997)
<i>Staphylococcus</i>	균혈증, 심장 내막염, 요로감염증, 눈병, 골수염의 원인균, 식중독 원인균	Kloos and Bannerman (1994)

LB를 희석시켜 만든 플레이트에서 자란 음용수 내의 미생물들이 유기탄소원이 적은 환경에서 사는 미생물임을 보이기 위해 16S rDNA 분석을 실시했다. Table 2에 음용수에서 분리해 낸 미생물과 그 특징을 나타냈다. *Arcicella*는 깨끗한 물의 표면이나 동굴에서 검출된 것처럼 유기물이 적은 환경에서 사는 것으로 보고되어 저영양성 환경에서 사는 미생물로 볼 수 있다. *Chitinophaga*도 소나무 목재, 깨끗한 물이나 흙과 같이 유기물이 적은 환경에서 사는 것으로 알려져 있고, *Pedobacter* 또한 툰드라 지방에서 사는 저영양성 미생물로 알려져 있다. *Rhizobium*은 보통 토양에서 식물의 뿌리 근처에서 사는 미생물로 알려져 있는데 물 시료에서 이 미생물이 발견된 것으로 미루어 보아, 이 실험에서 분리된 *Rhizobium* 들은 정수기 필터에 부착서식하는 미생물로 여겨진다. 상기의 결과들은 본 연구에서 개발한 방법이 저영양성 미생물을 검출할 수 있음을 보이는 것이다. 또한 같은 음용수 시료를 tetracycline이 함유된 배지에서 배양했을 때 콜로니가 형성되지 않은 것으로 보아 이 시료는 상대적으로 인체 유해성이 적은 것으로 볼 수 있다.

축산폐수는 다중 항생제 내성 미생물에 대한 유해성이 이미 알려져 있다(한일, 2005). 이에 본 연구에서 개발한 배양 방법이 항생제 내성 미생물을 검출할 수 있는지를 판별하기 위해서 축산폐수를 사용하였다. 실험 결과, tetracycline이 들어간 배지에서 다량의 콜로니가 확인됨에 따라(Table 1) 본 연구에서 개발한 방법이 항생제 내성 미생물을 배양분리할 수 있음을 보일 수 있다. 또한 축산폐수 내 미생물의 항생제 내성 여부를 증명하기 위해 tetracycline이 함유된 배지에서 콜로니를 분리해 16S rDNA 분석을 해 보았고, 그 결과를 Table 3에 나타냈다. 대표적으로 *Bacillus*, *Vagococcus*, *Staphylococcus*가 분리되었다. 표에서 보는 바와 같이 *Bacillus*와 *Vagococcus*는 특정 항생제에 대해 이미 내성을 갖고 있고, *Staphylococcus*는 인간에게 여러 질병을 안겨주는 병원성 미생물로 알려져 있었다. 따라서 본 연구에서 개발된 방법이 미생물 유해성 평가에 적용될 수 있음을 보이고 있다.

이 검출능을 가지고 영양 정도에 따른 축산폐수 내 미생물의 분포를 보았다. 흔히 다량의 유기물이 있다고 판명된 축산분뇨에서(Miller and Varel, 2003) 저영양성인 10^{-3} , 10^{-4} 플레이트에서 배양된 미생물이 전체 미생물 중 약 17.6%를 차지하고 있다. 이는 본 연구에서 개발한 방법이 항생제 내성 미생물을 분리해 내는데 있어서 통상적으로 실험실에서 쓰는 고영양성 환경은 물론, 기존에 검출할 수 없었던 저영

양성 항생제 내성 미생물까지 배양분리가 동시에 가능함을 보인다.

3.2 한강수 및 황사 초기 강우 내 미생물 유해성 평가 결과

본 연구에서 개발한 방법을 이용해서 한강수를 순환해 이용하는 청계천 시료에서 항생제 내성 미생물을 분석한 결과가 Table 1에 나타나있다. 청계천 수 시료 내에서는 저영양성 뿐 아니라 고영양성 미생물들도 검출되었다. 고영양성 미생물들은 하수처리장 방류수나 비점오염원에 의해서 파생된 것이라고 볼 수 있는데, 이는 청계천 시료에서 검출된 전체 미생물중 3.4%를 차지한다. 이 결과는 미생물 개체 수 측면에서 하수처리장의 방류수 및 비점오염원이 한강에 미치는 영향이 상대적으로 적다는 것을 시사한다.

청계천에 존재하는 미생물들은 tetracycline에 대해 항생제 내성을 지니지 않은 것으로 측정되었다. 그러나 최근 국립환경과학원이 발표한 자료에 따르면 우리나라의 4대 강 유역에서 검출된 인체용 항생제인 린코마이신, 소염제인 이부프로펜, 동물용 항생제인 설파메타진의 농도가 미국 FDA의 기준을 초과한 것으로 드러났다(국립환경과학원, 2006). 따라서 상기의 결과는 서울시 주변에서 tetracycline 남용이 적다는 것을 보여주고, 또한 상기의 항생제와 tetracycline에 대해 상호 내성을 띄는 미생물이 없다고 판단된다.

황사빛물 또한 본 연구에서 개발한 방법으로 분석해 보았다(Table 1). 그 결과 황사 빛물 내에는 항생제 내성을 띄는 미생물들이 영양정도에 관계없이 황사빛물에 골고루 분포하고 있음을 볼 수 있다. 이 결과는 황사 내에 항생제 내성이 있는 미생물의 존재를 보여주는데, 이와 같은 방식으로 황사의 유해성을 실험적으로 증명 한 기존 연구는 보고된 바 없다. 이는 황사의 유해성을 보다 객관적으로 제시할 수 있게 되었음을 시사한다.

황사비의 초기강우 내에 존재하는 미생물의 동정결과로 LB를 10^{-3} 배 희석한 플레이트에서 *Variovorax*가 검출되었는데, 이들은 중금속이 많이 함유된 토양이나 폐광산에서 서식한다고 이미 알려져 있다(Piotrowska-Seget *et al.*, 2005). 또 황사 빛물에 많은 중금속이 포함되어 있고(김형철 등, 1995), 중금속에 내성이 있는 저영양성 미생물에 대한 연구가 이미 보고된 바 있는 것으로 보아(Wyszkowska and Wyszkowski, 2002), 본 연구에서 사용된 방법으로 LB가 희석된 플레이트에서 황사 빛물에서 저영양성 미생물을 검출할 수 있음을 보여준다.

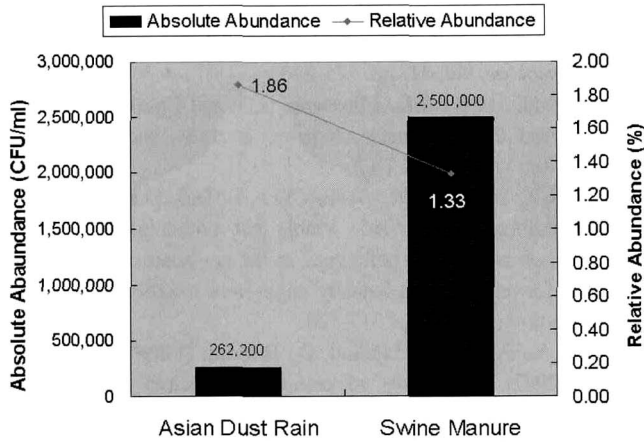


Fig. 1 Microbial Risk Evaluation of Antibiotic Resistant Microorganisms in Asian Dust Rain

항생제에 대해 내성을 갖는 미생물 유해성이 높다고 확인된 축산폐수와 황사빗물 내 항생제 내성 미생물에 의한 유해성 정도를 정량적으로 비교 분석하였다(Fig. 1). 두 시료의 정량적인 유해성 분석을 위해 Table 1의 축산폐수, 황사시료에 대해서 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} 의 각각의 플레이트에서 나타난 콜로니를 합하였다. 유해성 비교 분석 시 그 기준은 1 mL에 존재하는 미생물의 수로 정하였으므로, 총 합계 데이터를 5로 나누어 표준화 시켰다. 황사빗물 초기 강우내 항생제 내성 미생물의 콜로니 수(262,200/mL)는 축산폐수(2,500,000/mL)에 비해서 낮다. 그렇지만 배양된 전체 미생물에 대한 항생제 내성을 가진 미생물의 상대적 비율은 황사빗물의 경우(1.86%)가 축산폐수보다(1.33%)높은 것을 알 수 있다. 이는 인체가 같은 양의 미생물에 노출 된다면, 황사빗물 내 미생물 유해성이 축산폐수보다 높다는 것을 시사한다.

3.3 신뢰성 분석

Fig. 2는 본 연구에서 사용된 음용수, 청계천수, 축산폐수, 황사빗물에서 검출된 콜로니 수 데이터의 신뢰성 분석 결과를 나타내고 있다. 여기서 같은 시료, 같은 농도에 대해서 3개의 플레이트로 실험을 해서 얻은 콜로니 수 데이터의 coefficient of variation값을 구해 신뢰성을 평가하였다. 먼저 음용수의 경우, coefficient of variation값이 20% 이내로 데이터 간의 신뢰도가 다른 시료에 비해서 높았다. 황사빗물과 청계천 수의 경우, 저영양 상태로 가면서 coefficient of variation값이 증가하기는 하지만 그 값이 60% 이내이다. 그러나 축산폐수의 경우 LB 10^{-1} , 10^{-2} 인 플레이트에서의 coefficient of variation값은 60% 이상으로 다른 시료의 데이터에 비해서 그 오차가 컸다.

플레이트 방법에서 나타나는 오차 발생의 일반적인 이유로는 첫째, 실험실에서 콜로니 수를 정량화 할 때 콜로니의 크기, 모양 등을 정의함에 있어 그 기준이 확실하지 않으면 콜로니 카운팅 시 오차가 증가 할 수 있다. 둘째, 미생물의 농도가 높은 경우 시료 희석에 의해서 오차가 발생 할 수 있다. 음용수의 경우 10배, 청계천 수의 경우 100배, 황사빗물의 경우 1,000배, 축산폐수의 경우 100,000배로 희석 하여 정량화를 했는데, Fig. 2에서 보는 바와 같이 희석율

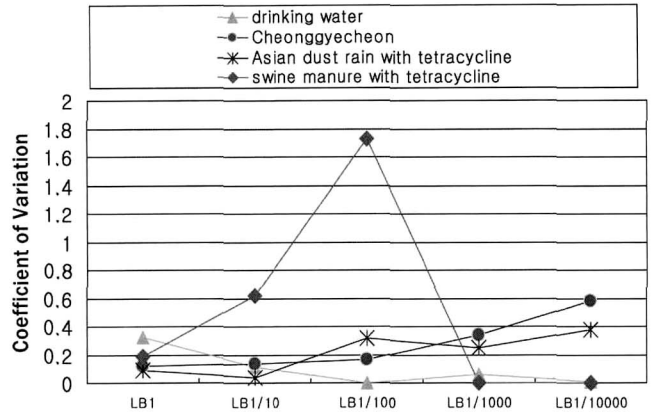


Fig. 2 Uncertainty Analysis

많이 한 시료일수록 coefficient of variation값이 크다. 마지막으로, 시료의 비 균질성에 의한 오차를 들 수 있다. 축산폐수와 같이 다량의 유기물이 섞여 있다고 밝혀진 시료는 액상과 고체상태의 중간상태이므로 비 균질성이 일반 물 시료에 비해서 높다. 그리고 이러한 시료들의 비 균질성에 때문에 매 실험마다 재연성이 떨어질 수 있다.

청계천, 황사 시료에서 보듯이 저영양 상태로 갈 수록 데이터의 오차 값은 점점 커지는 경향을 확인 할 수 있다. 이는 저영양성과 같이 극한환경에서 사는 극한미생물(Extremophile)은 콜로니의 배양정도와 그것들의 크기와 모양이 불규칙적으로 된다(Rothschild and Mancinelli, 2001; Cavicchioli, 2002). 이러한 결과들은 일반적인 플레이트의 오차 요인뿐만 아니라 영양정도에 따른 미생물 특성적 요인도 검출 신뢰성에 영향을 줄 수 있음을 보여주고 있다.

축산폐수를 제외한 황사, 청계천, 음용수 시료와 같은 물 환경 시료의 분석에서 오차 범위는 60% 이내이다. 이는 플레이트 방법으로 물 환경 시료의 미생물 배양 검출 시, 일반적인 coefficient of variation 범위인 0.66~1.79(Pepper *et al.*, 2004), 0.64~2(de Garca *et al.*, 2007)와 비교 할 때 그 신뢰도가 유사하거나 높음을 알 수 있다. 따라서 본 연구에서 개발된 방법으로 항생제 내성 미생물을 정량화 시켜 미생물 유해성 분석을 할 경우, 신뢰 할 수 있는 검출 결과를 보인다고 평가된다.

4. 결 론

본 연구는 일반적인 실험실 배양 분리법으로는 한계가 있어 기존에 분리 할 수 없었던 항생제 내성 저영양성 미생물을 분리해 내는 방법 개발에 관한 연구이다. 하천 수나 황사 발생 시 초기 강우 수와 같은 다양한 물 환경 내 미생물 유해성 진단이 중요함에도 불구하고, 기존의 저영양성 미생물을 분리 배양해서 검출하는 방법은 음용 지하수내 미생물 분석에 다소 한정되어 온 것인 국내 현황이다(황경숙 등, 2004). 이에 저영양성 미생물의 검출 뿐 아니라 항생제 내성 유해성 진단을 위해서 저영양성 배지에 항생제를 첨가하여 플레이트 배지를 제작했다. 통상적인 고영양 배지 방법으로 가능한 시료는 물론이고, 기존에 검출 할 수 없었던 저영양 환경의 시료의 미생물 검출을 위해서 통상적인 고영양성 배지인 LB를 희석해서 만든 영양정도가 다양한 배지를 제작하

여 항생제 플레이트로 사용한 것이 본 연구개발기술의 특징이다. 음용수 실험과 축산폐수 실험에서, 본 연구에서 개발된 방법이 저영양성 미생물과 항생제내성 미생물을 효과적으로 검출할 수 있음을 16S rDNA 분석결과로서 입증하였다.

본 연구에서 개발되고 검증된 방법으로 한강 하천수와 황사빗물 내 항생제 내성 미생물 검출 분석을 수행하였다. 청계천 수에서는 고영양성 배지에 비해 저영양성 배지에서 더 많은 미생물을 검출할 수 있었다. 이는 통상적인 고영양성 배지로는 검출되지 않는, 보다 더 많은 미생물의 존재를 본 연구에서 개발한 기술로 검출할 수 있음을 의미한다. 그리고 tetracycline를 포함하는 플레이트에서는 미생물이 자라지 않은 것으로 보아 청계천 수는 항생제 내성 미생물에 대한 유해성이 상대적으로 낮은 것으로 여겨진다. 황사빗물 초기 강우 시료에서도 고영양성 뿐만 아니라 저영양성 세균들이 검출되었는데, 청계천 시료의 경우와는 달리 항생제 내성 세균들이 다양한 영양상태의 배지에서 검출되었다. 항생제 내성 미생물의 검출 빈도수는 이미 미생물 유해성이 높다고 알려진 축산폐수에 비해서 낮았지만, 상대적인 검출빈도 수는 황사 빗물의 경우가 축산폐수보다 높았다. 이는 기존의 배양검출 방법으로 가능하지 않았던 저영양성 상태의 항생제내성 미생물 유해성 평가를 본 연구의 개발성고가 가능하게 하였을 뿐만 아니라, 새로이 개발된 기술을 미지의 환경 시료에 성공적으로 활용할 수 있음을 보인다. 본 연구에서 개발된 기술로 획득된 정량적 검출 결과의 신뢰성 분석(오차 분석)을 수행한 결과, 다양한 물 환경 시료 내 미생물의 정량적 검출의 정확도가 기존의 배양방법에 비해서 최소 유사하거나 우수한 것으로 나타났다. 따라서 본 연구에서 개발된 방법은 다양한 물 환경 시료 내 항생제 내성에 의한 미생물 유해성을 체계적이고 정량적으로 검출분석 하는데 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 행정자치부의 ‘자연재해 저감기술개발사업’과 환경부 서울지역환경기술개발센터의 ‘서울시 하수/병원폐수/하천 내 항생제 내성 미생물 유해성 조사 연구’지원으로 수행되었음에 감사를 드립니다.

참고문헌

국립환경과학원(2004) **수질오염 공정시험법**, 물환경정보시스템 (<http://water.nier.go.kr/>)

국립환경과학원(2006) **환경 중 의약품질 분석방법 연구 및 노출 실태 조사 보고서**

김형철, 허철구, 이기호(1995) 제주지역 부유분진의 화학적 성상에 관한 연구 (황사의 영향을 중심으로), 1995년도 추계 학술발표회 논문집, 대한환경공학회, pp. 333-335.

한일 (2005) *Microbial evaluation of antibiotic resistance and pathogenicity in autothermal aerobic digestion - treated manure wast*, 석사학위논문, 연세대학교.

황경숙, 김인기, 하시모토모야시(2004) **음용지하수 내 저영양세균의 분리방법**, 특허등록번호 10-0494373.

Cavicchioli, R. (2002) Extremophiles and the search for extraterrestrial life, *Astrobiology*, Vol. 2, No. 3, pp. 281-292.

Chen, W.X., Li, G.S., Qi, Y.L., Wang, E.T., Yuan, H.L. and Li, J.L.

(1991) *Rhizobium huakuii* sp. nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Vol. 41, pp. 275-280.

Coleman, M.E., Hope, B.K., Claycamp, H.G., and Cohen, J.T. (2007) Microbial risk assessment scenarios, causality, and uncertainty, *Microbe*, Vol. 2, pp. 13-17.

Colwell, R.R., Brayton, P.R., Grimes, D.J., Roszak, D.B., Huq, S.A. and Palmer, L.M. (1985) Viable but non-culturable *Vibrio Cholerae* and related pathogens in the environment : implications for release of genetically engineered microorganism, *Bio Technology*, Vol. 3, pp. 817-820.

de Garca, V., Brizzio, S., Libkind, D., Buzzini, P. and van Broock, M. (2007) Biodiversity of cold-adapted yeasts from glacial meltwater rivers in Patagonia, Argentina, *FEMS Microbiol Ecology*, Vol. 59, No. 2, pp. 331-341.

Dryden, M.S. and Kramer, J.M. (1987) Toxigenic *Bacillus cereus* as a cause of wound infections in the tropics, *Journal of Infection*, Vol. 15, pp. 207-212.

Dzidic, S. and Bedekovic, V. (2003) Horizontal gene transfer-emerging multidrug resistance in hospital bacteria, *Acta Pharmacologica Sinica*, Vol. 24, No. 6, pp. 519-526.

Hwang, C.Y., Choi, D.H., and Cho, B.C. (2006) *Pedobacter roseus* sp. nov., isolated from a hypertrophic pond, and emended description of the genus *Pedobacter*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 56, pp. 1831-1836. DOI 10.1099/ijs.0.64045-0.

Isaacson, P., Jacobs, P.H., Mackenzie, A.M.R., and Mathews, A.W. (1976) Pseudotumour of the lung caused by infection with *Bacillus sphaericus*, *Journal of Clinical Pathology*, Vol. 29, pp. 806-811.

Jindal, A., Kocherginskaya, S., Mehboob, A., Robert, M., Mackie, R.I., Raskin, L., and Zilles, J.L. (2006) Antimicrobial use and resistance in swine waste treatment systems, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 72, No. 12, pp. 7813-7820.

Klare, I., Konstabel, C., Badstubner, D., Werner, G., and Witte, W. (2003) Occurrence and spread of antibiotic resistance in *Enterococcus faecium*, *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 88, pp. 269-290.

Kloos, W.E. and Bannerman, T.L. (1994) Update on clinical significance of coagulase-negative *Staphylococci*, *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 7, No. 1, pp. 117-140.

Kogure, K. (1997) Viable but nonculturable (VBNC) state, *Microbes and Environments*. Vol. 12, pp. 135-145.

Kuznetsov, S.I., Dubinnina, G.A. and Lapteva, N.A. (1979) Biology of oligotrophic bacteria, *Annual Review of Microbiology*, Vol. 33, pp. 377-387

Lane, D.J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. in: E. Stackebrandt and M. Goodfellow (Eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, John Wiley and Sons, New York, NY, pp. 115-175.

Lindström, K. (1989) *Rhizobium algegae*, a new species of legume root nodule bacteria, *International Journal of Systematic Bacteriology*, Vol. 39, pp. 365-367.

Marcelino, T.S. and Stephen, J.G. (1996) Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 62, No. 2, pp. 625-630.

Miller, D.N. and Varel, V.H. (2003) Swine manure composition affects the biochemical origins, composition, and accumulation of odorous compounds, *Journal of Animal Science*, Vol. 81, pp. 2131-2138.

Nikitin, D.I., Strmpl, C., Oranskaya, M.S., and Abraham, W.R. (2004) Phylogeny of the ring-forming bacterium *Arcicella aquatica* gen. nov., sp. nov. (ex Nikitin et al. 1994), from a freshwater neuston biofilm, *International Journal of System-*

- atic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 54, pp. 681-684.
- Novais, C., Coque, T.M., Ferreira, H., Sousa, J.C., and Peixe, L. (2005) Environmental Contamination with vancomycin-resistant enterococci from hospital sewage in Portugal, *Applied and Environmental Microbiology*, doi:10.1128/AEM.71.6.3364-3368.2005 (accessed June 2005)
- Pepper, I.L., Rusin, P., Quintanar, D.R., Haney, C., Josephson, K.L., and Gerba, C.P. (2004) Tracking the concentration of heterotrophic plate count bacteria from the source to the consumer's tap, *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 92, No. 3, pp. 289-295.
- Piotrowska-Seget, Z., Cycon, M. and Kozdroj, J. (2005) Metal-tolerant bacteria occurring in heavily polluted soil and mine spoil, *Applied Soil Ecology*, Vol. 28, pp. 237-246.
- Poindexter J.S. (1981) *Oligotrophy. Fast and famine existence.* in M. Alexander(ed) *advances in microbiol ecology*. Plenum Press, New York, Vol. 5, pp. 63-89
- RDP (Ribosomal Database Project II) <http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>
- Reboli, A.C., Bryan, C.S., and Farrar, W.E. (1989) Bacteremia and infections of a hip prosthesis caused by *Bacillus alvei*, *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 27, No. 6, pp. 1395-1396.
- Rothschild, L.J. and Mancinelli, R.L. (2001) Life in extreme environments, *Nature*, Vol. 409, No. 6823, pp. 1092-1101.
- Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York.
- Sangkhol, V. and Skerman, V.B.D. (1981) *Chitinophaga*, a new genus of chitinolytic myxobacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Vol. 31, No. 3, pp. 285-293.
- Sliman, R., Rehm, S., and Shlaes, D.M. (1987) Serious infections caused by *Bacillus species*, *Medicine*, Vol. 66, No. 3, pp. 218-223.
- Teixeira, L.M., Carvalho, M.G., Merquior, V.L., Steigerwalt, A.G., Brenner, D.J., and Facklam, R.R. (1997) Phenotypic and genotypic characterization of *Vagococcus fluvialis*, including strains isolated from human sources, *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 35, No. 11, pp. 2778-2781.
- Weber, D.J., Susan, M.S., Rutala, W.A., and Thomann, C.A. (1988) In vitro susceptibility of *Bacillus Spp.* to selected antimicrobial agents, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 32, No. 5, pp. 642-645.
- Wyszkowska, J. and Wyszowski, M. (2002) Effect of cadmium and magnesium on microbiological activity in soil, *Polish Journal of Environmental Studies*, Vol. 11, No. 5, pp. 585-591.

(접수일: 2007.8.3/심사일: 2007.10.1/심사완료일: 2007.10.1)