

가축 분뇨 중의 항생제 내성 균주

문 경 호 · 이 중 철

부산산업대학교 약학과

(Received January 10, 1986)

Antibiotic Resistance in Gram Negative Enteric Bacteria Isolated from Feces of Domestic Animals

Kyung Ho Moon and Jong Chul Lee

Department of Pharmacy, Pusan Sanub University, Pusan 608, Korea

Abstract—Fecal samples from Kim-Hae farm animals were examined for the frequency of gram-negative enteric organisms resistant to tetracycline, streptomycin, or penicillin. The proportions of antibiotic resistant to total organisms in fecal specimens of poultry, swine and cow were as follows: 95%, 92%, 70% for tetracycline, 100%, 27%, 9% for streptomycin, 18%, 1%, 1% for penicillin, respectively. The bacteria had multiresistance to antibiotics. These strains had more than one plasmid. From the transformation study, it was concluded that the resistance to streptomycin was attributed to one of these plasmids.

페니실린과 스트렙토마이신으로 대표되는 항생제의 출현은 질병의 치료에 있어서 새로운 장을 열었음에도 불구하고¹⁾ 항생제의 남용으로 인한 내성 균주의 증가라는 역작용도 낳고 있다.²⁾ 이러한 현상은 사람 뿐만 아니라 가축에서도 공통적으로 나타나는 것으로 알려져 있다.^{3,4)} 현재 미국의 농장에서는 가축을 사육할 때 질병 예방과 성장 촉진을 목적으로 치료 시에 사용하는 양보다 적은 양의 항생제를 먹이에 섞어서 일상적으로 투여하는 것으로 알려져 있으며 이때 먹이와 함께 두어던 항생제로 인해 장내에 내성 균주들이 형성되며 이 내성 균주들이 가축으로부터 사람에게 옮겨지는 현상이 보고되었다.⁷⁻¹²⁾ 최근에 미국에서는 항생제에 내성이 있는 *Salmonella newport*에 감염된 쇠고기를 먹고 *Salmonella* 중독을 일으킨 일이 보고되었다.^{13,14)} 이에 저자들은 우리나라 가축의 분뇨 중에 있는 항생제 내성 균주에 관하여 조사하여 이에 보고하는 바이다.

실 험 방 법

균주—형질 전환을 위한 수여 균주로 항생제

에 내성이 없고 플라스미드를 갖고 있지 않은 *E. coli* C600을 한국 과학기술원 생물공학과에서 분양받아 사용하였다.

배지—가축 분뇨 중에 있는 그람 음성 장내 세균 중에서 항생제 내성 균주의 분포 비율을 결정하기 위하여 MacConkey 배지를 사용하였으며 분리된 내성 균주와 *E. coli* C600의 배양에는 LB(Luria-Bertani) 배지를 사용하였다.

항생제—항생의 농도가 아래와 같이 되도록 MacConkey배지에 첨가하여 사용하였다: 클로르테트라사이클린 (TC), 20 μ g/ml; 황산스트렙토마이신 (SM), 25 μ g/ml; 페니실린 G(PC), 50 units/ml.

분뇨—김해 지방의 한 농장에서 채취하여 사용하였다.

항생제 내성 균주의 분포 비율 결정—무균적으로 채취한 분뇨를 일정량 취하여 100ml의 멸균 생리 식염수에 넣고 유리병으로 잘 파쇄한 다음 실온에서 30분 방치하여 얻은 상정액을 균원액으로 사용하였다. 상정액을 10배씩 계열 희석시키고 각 농도에서 1ml씩 취하여 주가법으로 접종한 후 37°C에서 24시간 배양하여 총 균수를 측정하였다. 동일한 방법으로 시료를 취하여 각

각 일정한 농도의 항생제를 함유한 배지에 접종하고 24시간 배양하여 내성 균주의 수를 측정하였다. 모든 실험은 2배수법으로 시행하였으며 실험치는 두 값의 평균치를 사용하였다.

다중 내성 조사—분리된 내성 균주의 다중 내성을 아래와 같은 방법으로 조사하였다. 분리된 SM 내성 균주를 PC 혹은 TC 함유 배지에 접종시키고 동일한 방법으로 TC 내성 균주는 SM 혹은 PC 함유 배지에, PC 내성 균주는 SM 혹은 TC 함유 배지에 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 다음 성장한 균락수를 측정하였다.

플라스미드 분리—분리된 내성 균주에서 플라스미드를 분리하기 위하여 alkaline lysis법을 사용하였다.¹⁵⁾

전기영동—분리한 플라스미드를 0.7% agarose 겔 상에서 50V로 3시간 전기영동시켰다.

형질전환—CaCl₂방법을 사용하여¹⁶⁾ 내성 균주로부터 분리한 플라스미드로 항생제 내성이 없는 *E. coli* C600을 형질전환시켜 내성 기전을 조사하였다.

실험결과 및 고찰

가축 분뇨 중 항생제 내성 균주의 분포 비율—닭, 돼지, 소의 분뇨 중에 있는 그람 음성 장내세균 중에서 항생제 내성 균주가 차지하는 비율은 Table I과 같다.

가축의 경우 항생제 내성 균주의 분포비율은

Table I—Percentage of antibiotic resistant bacteria to total gram negative enteric bacteria of feces of farm animals.

Antibiotics	Percentage of antibiotic resistant bacteria in feces of		
	Poultry	Swine	Cow
None ^a	100	100	100
Tetracycline ^b	95	92	70
Streptomycin ^c	100	27	9
Penicillin ^d	18	1	1

a. MacConkey agar

b. MacConkey agar+tetracycline (20μg/ml)

c. MacConkey agar+streptomycin (25μg/ml)

d. MacConkey agar+penicillin (50units/ml)

Table II—Multiple antibiotic resistance.

Resistant colony to	Number of colony grown in medium containing		
	Tetracycline	Streptomycin	Penicillin
Tetracycline	—	20 ^b /25 ^a	3/25
Streptomycin	27/30	—	2/30
Penicillin	28/30	27/30	—

a. 25 Tetracycline resistant colonies were transferred to medium containing streptomycin by tooth pick method.

b. 20 Colonies were found after 24hr. incubation.

닭이 가장 높았으며 돼지, 소의 순으로 감소하였다. TC 내성 균주의 분포 비율은 닭, 돼지, 소에서 모두 높게 나타났으나 SM 내성 균주는 닭에서만 높게 나타났으며 PC 내성 균주는 전체적으로 낮은 편이었다. 닭에서 높게 나타나는 것은 가축을 사육할 때 닭은 주로 공장에서 만들어 파는 닭 사료를 이용하지만 돼지의 경우 사람이 먹고 남은 음식을 먹이로 주고, 소의 경우 풀을 사료로 쓰기 때문이라고 사료되며 이것은 닭의 사료에 항생제가 포함되어 있을 가능성을 제시해준다.

다중내성—분리된 내성 균주들은 Table II와 같이 대부분 다중 내성을 가지고 있었다.

TC 내성 균주의 80% 정도가 SM에 대하여 내성을 가지고 있었으며 PC에 대한 내성은 적은 편이었다. 마찬가지로 SM 내성 균주의 90% 정도가 TC에 대하여 내성을 가지고 있었으며 PC에 대한 내성은 드물게 가지고 있었다. 이와는 반대로 PC 내성 균주의 90% 이상이 TC과 SM 내성을 가지고 있었다.

내성 균주의 플라스미드—내성 균주의 내성이 플라스미드에 기인하는지의 여부를 알기 위하여 내성 균주에서 플라스미드를 분리 확인하였다. 플라스미드를 분리하기 위하여 분뇨에서 분리한 내성균주 중 임의로 6개를 선택하였다. 이들 균주들의 항생제에 대한 내성과 유당 분해능은 Table III과 같다.

이들 균주 배양액 3ml로부터 alkaline lysis법을 사용하여 플라스미드를 분리하였으며 분리된 플라스미드를 전기영동하여 확인하였다(Fig. 1).

Table III—Antibiotic resistance pattern and lactose fermentation ability of isolated strain used for plasmid isolation.

Resistant strain No.	Resistance to			Lactose fermentation
	Streptomycin	Tetracycline	Penicillin	
1.	+	+	+	+
2.	+	+	+	-
3.	+	+	-	+
4.	+	+	-	+
5.	+	+	-	+
6.	-	+	+	-

Table IV—Number of transformants.

Plasmid from strain No.	Number of transformants resistant to		
	Streptomycin	Tetracycline	Penicillin
1.	-	-	-
2.	-	-	-
3.	-	-	-
4.	303/282	-	-
5.	26/36	-	-
6.	-	-	-

Transformation of plasmid-less and antibiotic susceptible *E. coli* C600 was carried out by using plasmids from isolated antibiotic resistant strains.

E. coli C600을 형질 전환시키고 PC 혹은 TC 혹은 SM 함유 배지에 배양시킨 결과 4번과 5번 내성균주의 플라스미드를 받은 *E. coli* C600에서 SM 내성을 획득한 형질전환체를 얻을 수 있었다(Table IV).

4번 균주의 플라스미드를 사용하여 얻은 형질 전환체 중 3개 그리고 5번 플라스미드 형질전환체 중 2개를 임의로 선택하여 플라스미드를 분리하고 이들 플라스미드와 공여 균주인 4번과 5번 균주의 플라스미드 그리고 수어균주인 *E. coli* C600과 비교하였다(Fig. 2).

수어 균주인 *E. coli* C600은 플라스미드를 가지고 있지 않았지만 형질전환체들은 한개 혹은 두개의 플라스미드를 가지고 있었으며 이 플라스미드들은 4번과 5번 균주의 플라스미드와 동일한 것임을 확인할 수 있었다. 또한 옮겨진

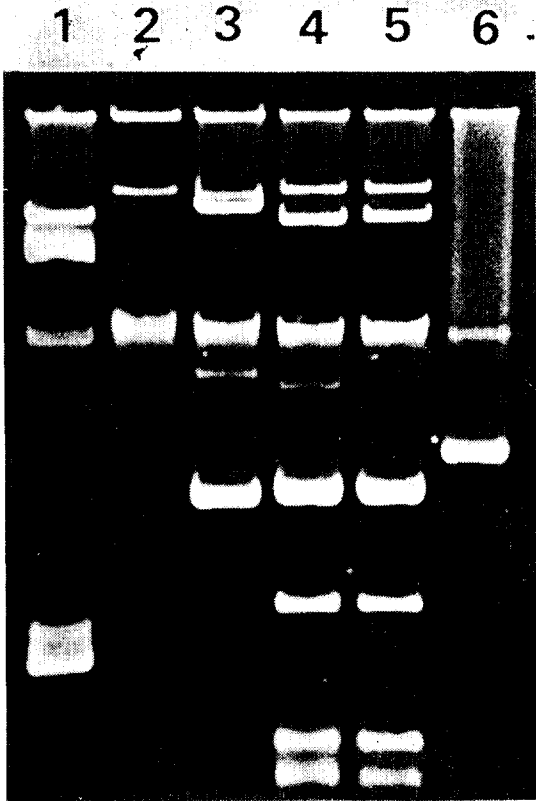


Fig. 1—Agarose gel electrophoresis of plasmids of resistant strains. Lanes: 1, strain No. 1; 2, No. 2; 3, No. 3; 4, No. 4; 5, No. 5; 6, No. 6.

분리된 내성 균주들은 모두 플라스미드를 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

형질전환—내성 균주로부터 분리한 플라스미드를 가지고 플라스미드와 항생제 내성이 없는

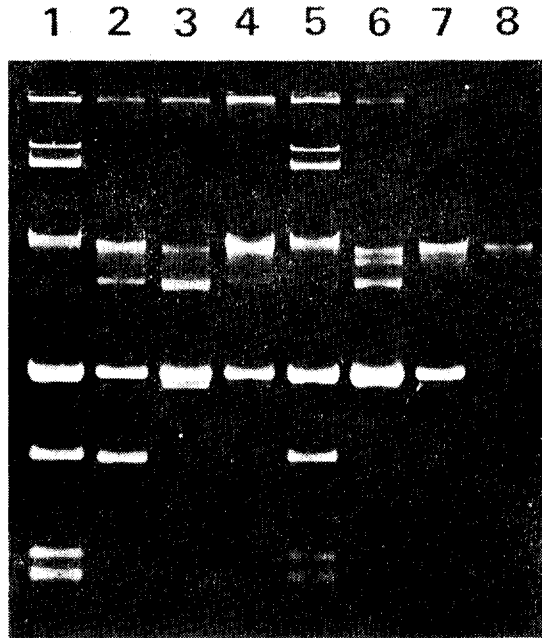


Fig. 2—Agarose gel electrophoresis of plasmids of transformants. Lanes: 1, strain No.4; 2, transformant harboring plasmids of strain No.4; 3, another transformant harboring plasmid of strain No.4; 4, another transformant harboring plasmid of strain No.4; 5, strain No.5; 6, transformant harboring plasmid of strain No.5; 7, another transformant harboring plasmid of strain No.5; 8, *E. coli* C600.

두개의 플라스미드 중에서 형질전환체에서 공통적으로 발견되는 크기가 큰 플라스미드가 SM 내성에 관여 함을 알 수 있었다.

이상의 결과에서와 같이 비록 한 농장의 경우이지만 높은 비율로 항생제 내성 균주가 존재하고 또한 이 내성이 형질전환이나 집합에 의해서 다른 병원성 세균으로의 전달이 용이한 플라스미드에 기인한다는 점에서 이에 대한 종합적인 연구가 시행되어야 할 것이다.

결 론

1. 우리나라 가축의 분뇨 중에는 높은 비율로 SM, TC 내성 균주가 있었다.

2. 분리된 내성 균주는 다중내성 현상을 보였다.

3. SM 내성은 플라스미드에 기인하였다.

문 헌

- 1) Brock, T.D.: *Biology of Microorganism*, Prentice-Hall, 3rd Ed., p.226 (1979).
- 2) Ryder, R.W., Blake, P.A., Murlin, A.C., Carter, G.P., Pollard, R.A., Merson, M.H., Allen, S.D., and Brenner, P.J.: *J. Infect. Dis.* **142**, 485 (1980).
- 3) Siegel, D., Huber, W.G., and Enloe, F.: *Antimicrob. Agents Chemother.* **6**, 697 (1974).
- 4) Williams, R.D., Rollins, L.D., Pocurull, D.W., and Selwyn, M.: *Antimicrob. Agents Chemother.* **14**, 710 (1978).
- 5) Sun, M.: *Science*, **226**, 144 (1984).
- 6) O'Brien, T.F., Hopkins, J.D., Gilleece, E.S., Medeiros, A.A., Kent, R.L., Blackburn, B.O., Holmes, M.B., Reardon, J.P., Vergeront, J.M., Schell, W.L., Christenson, E., Bissett, M.L., and Morse, E.V.: *New Engl. J. Med.* **307**, 1 (1982).
- 7) Holmberg, S.D., Wachsmath, I.K., Hickman-Brenner, F.W., and Cohen, M.L.: *J. Clin. Microb.* **19**, 100 (1984).
- 8) Holmberg, S.D., Wells, J.G., and Cohen, M.L.: *Science*, **225**, 833 (1984).
- 9) Howe, K., and Linton, A.H.: *J. Appl. Bacteriol.* **41**, 37 (1976).
- 10) Levy, S.B., Fitzgerald, G.B., and Maccone, A.B.: *Nature*, **260**, 40 (1976).
- 11) Linton, A.H., Howe, K., Bennett, P.M., and Richmond, M.H.: *J. Appl. Bacteriol.* **43**, 465 (1977).
- 12) Neu, H.C., Cherubin, C.E., Longo, E.D., Flouton, B., and Winter, J.: *J. Infect. Dis.* **132**, 617 (1975).
- 13) Holmberg, S.D., Osterholm, M.J., Senger, K.A., and Cohen, M.L.: *New Engl. J. Med.* **311**, 617 (1984).
- 14) Sun, M.: *Science*, **226**, 30 (1984).
- 15) Maniatis, T., Fritsch, E., and Sambrook, J.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, **8**, 368 (1982).
- 16) Mandel, M., and Higa, A.: *J. Mol. Biol.* **53**, 154 (1970).