

광주지역 공공수역의 미생물 군집 다양성 및 항생제 내성에 관한 연구

김선정* , 박지영 , 김승호 , 임민화 , 유지용 , 한규성 , 박세일 , 서광엽 , 조광운 

광주광역시 보건환경연구원

A Study on Microbial Community Diversity and Antibiotic Resistance in Public Waters in Gwangju

Sun-Jung Kim*, Ji-Young Park, Seung-Ho Kim, Min-Hwa Lim, Ji-Yong Yu, Kyu-Sung Han, Se-Il Park, Gwangyeob Seo, and Gwangwoon Cho

Health and Environment Research Institute of Gwangju

ABSTRACT

Background: As pollutants caused by non-point sources flow into rivers, river water quality monitoring for fecal pollution is becoming increasingly important.

Objectives: This study was conducted to investigate the distribution of microbial communities in the Yeongsangang River water system and sewage treatment plants in Gwangju and to evaluate their antibiotic resistance.

Methods: In the experiment, samples were distributed to five selective media at each point and then cultured for 18 to 24 hours. When bacteria were observed, they were sub-cultured by size and shape and identified using MALDI-TOF MS equipment. When identification was completed, 17 types of antibiotic susceptibility tests were performed using VITEK II equipment, focusing on gram-negative dominant species among the identified strains.

Results: During the study period, a total of 266 strains were isolated from 39 samples. Gram-positive bacteria were 37 strains in four genera, or 13.9% of the total, and Gram-negative bacteria were 229 strains in 23 genera, or 86.1% of the total. Antibiotic susceptibility testing of 23 strains, the major dominant species, showed that one strain (4.3%) was resistant to only one antibiotic, and two strains (8.7%) were 100% susceptible to the 17 antibiotics tested. The other 20 strains (87.0%) were multidrug resistant bacteria resistant to two or more antibiotics. There were various types of multidrug resistance. Among them, penicillin and cephalosporin series showed the highest resistance.

Conclusions: Based on the results of this study, it was found that the bacterial community structure changed according to regional and environmental factors, and it was judged that continuous research such as genetic analysis of antibiotic-resistant bacteria present in natural rivers is necessary.

Key words: Non-point pollution source, fecal pollution, MALDI-TOF MS, microbial community, antibiotic resistance

Received February 27, 2024

Revised March 18, 2024

Accepted March 27, 2024

Highlights:

- Water quality monitoring by non-point sources is becoming important.
- Most of the isolated bacteria were identified as gram-negative bacteria.
- Of the 23 strains, 87.0% were multidrug resistant.

*Corresponding author:

Health and Environment Research Institute of Gwangju, 584 Mujin-daero, Seo-gu, Gwangju 61954, Republic of Korea

Tel: +82-62-613-7602

Fax: +82-62-613-7619

E-mail: ksj0762@korea.kr

I. 서 론

인간의 활동으로 인해 배출되는 오염물질이 하천으로 유입되고, 자정능력의 범위를 넘어서게 되면 하천에서의 수질오염은 점점 심각해지게 된다. 또한 지구온난화로 인해 국지성 집중호우의 발생빈도가 높아지고 있으며, 이는 대규모 홍수 피해를 유

발하는 동시에 막대한 양의 비점오염물질을 하천으로 유입시키고 있어 하천환경에 악영향을 미치고 있다.¹⁾ 하천 주변 도로나 근처 숲길, 하천변을 운동이나 휴식 공간으로 이용하는 시민과, 반려동물 등으로부터 유입되는 비점오염물질은 분변성 오염물질을 포함하고 있어 수상 레저 활동을 위한 목적으로 사용할 시에 수인성 질병의 원인이 되어 감염이나 병이 유발될 수

있다.²⁾ 특히 분변에 의한 오염은 병원성 미생물과 관련이 깊어 면역력이 취약한 사람의 경우, 병원성 미생물에 직접적으로 노출될 수 있으며, 병원성 대장균을 비롯한 세균 감염에 의한 질환과 질병을 치료하기 위해 항생제를 사용하여 치료하고 있다.³⁾ 또한 항생제는 치료하는 목적 이외에도 가축의 성장촉진이나 질병치료를 위해 사료에 첨가하는 등 광범위하게 사용되고 있다.⁴⁾ 이러한 항생제는 인류의 건강에 많은 도움을 주었으나 고농도 항생제의 환경으로의 노출로 이어져 항생제 내성 균주를 증가시키는 역효과를 초래하였고, 항생제의 자연 환경으로의 전이 결과 다제 내성균과 슈퍼박테리아가 출현함에 따라 중요한 이슈로 대두되고 있다.⁵⁾ 인구와 산업 공단이 밀집되어 있는 지역의 하천은 항생제를 포함한 다양한 오염물질들이 유입되어 항생제 내성균의 하천 유입 가능과 항생제 감수성균의 내성 획득 기회가 상대적으로 높다.⁴⁾ 전 세계적으로 세균의 항생제 내성이 문제 되고 있으며 국내에서도 항생제 내성률이 세계적으로 손꼽을 정도로 높은 실정인바, 내성균 문제는 심각한 상황으로 발전될 가능성을 지니고 있다.⁶⁾

현재 국내에서는 하천 수질환경 기준으로 총대장균군(Total coliform)과 분원성대장균군(fecal coliform)이 포함되어 있다. 총대장균군과 분원성대장균군은 분변오염의 지표로, 병원성 미생물의 오염 가능성을 추측할 수 있는 대표적인 항목이지만 최근 미생물 지표로서 분변오염의 원인이 무엇인지를 찾아가는 오염원 추적 기법(microbial source tracking, MST)이 주목을 받

고 있다.⁷⁾ 이 중 차세대 염기서열 분석방법(next generation sequencing, NGS)을 비롯하여 DNA 추출 및 유전자 분석을 통한 분자생물학적 방법은 미생물 군집 구조를 모니터링하고 생태학적인 관계를 규명하고 있다. 그러나 이러한 방법들은 전처리에 수시간이 걸리며 비용이 많이 소모되는 단점이 있어 신속하게 유해미생물 검출을 위한 새로운 방법을 모색할 필요가 있다.⁸⁾

MALDI-TOF MS (Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry)는 검체를 이온화하여 진공관에서 검출기에 도달하는 시간을 근거로 구성 물질의 질량을 측정하는 방법이다. 그리고 이 장비는 다수의 의심 집락을 수분 내로 동정할 수 있고, 개당 비용이 다른 동정법보다 현저히 낮으며 많은 선행연구를 통해 정확성이 입증되어 최근 가장 주목받는 기술이다.⁹⁾ 혐기성이나 배양이 길고 까다로운 균도 쉽게 동정할 수 있으며, 배지 위의 세균을 직접 채취해 장비에 도입 가능하다는 점에서 긴급 동정과 반복 작업이 필요한 세균 모니터링 방법에 효과적으로 알려져 있다.¹⁰⁾

이에 따라 이 연구에서는 미생물 동정 장비인 MALDI-TOF MS를 이용하여 광주지역 영산강 본류와 주요 지천 및 하수처리장 유입수 및 방류수에서 미생물 군집 다양성을 조사하고, 항생제 내성 여부를 파악하기 위해 항생제 감수성 검사를 실시하여 우리시 수환경 관리의 기초자료로 활용하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 연구지점 및 시기

광주광역시 권역 내 영산강 본류와 주변 주요지천의 미생물 군집 분포를 알아보기 위해 총 6지점을 대상으로 실험하였다. 해당 지점은 광주천 A지점, 영산강 본류이며 상류 지점인 B지점, 하수처리장 유입수 C지점과 방류수 D지점, 풍영정천 E지점, 황룡강 F지점, 그리고 하류 지점인 G지점으로 총 6지점을 선정하였다. 연구 지점은 Fig. 1 및 Table 1과 같다. 시료는 2023년 2월부터 8월까지 분기별로 2회 분석하였으며, 모든 시료는 아이스박스에 넣어 냉장온도인 4°C 정도를 유지하여 실험실로 운반한 후 24시간 이내에 실험하였다.

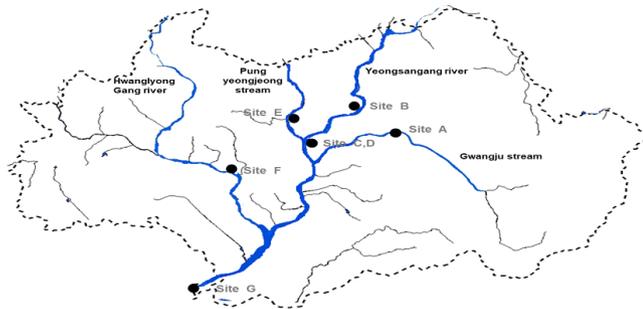


Fig. 1. Location of sampling site

Table 1. Information of sampling site in Gwangju region

| Name | Type (no. of site) | Sampling site name (location of Fig. 1) |
|--------------------------------|-----------------------------|--|
| Gwangju stream | Tributary (1) | Gwangun (Site A) |
| Yeongsan river | Main stream (1) | Gwangsin (Site B) |
| | Main stream (1) | Gwangsan (Site G) |
| Pungyeongjeong stream | Tributary (1) | Pungyeongjeong (Site E) |
| Hwanglyong river | Tributary (1) | Hwanglyong (Site F) |
| Wastewater treatment plant (1) | WWTP [A ₂ O]-(2) | 1st-Wastewater treatment plant influent (Site C) |
| | | 1st-Wastewater treatment plant effluent (Site D) |

2. 분석방법

2.1. 균주 분리

이 연구에서는 장내세균과 병원성 세균배양에 주로 사용되는 선택배지인 Bismuth Sulfite Agar, MacConkey agar, Mannitol salt agar, SS agar, XLD agar를 사용하였으며, 각각의 선택배지에 시료를 분주 후 35.0±0.5°C에서 18~24시간 배양하였다. 선택배지에서 자란 균은 형태, 크기, 색 등으로 집락을 선택하여 증균배지인 TSA (Tryptic soy agar, Difco, USA) 배지에 계대배양 후 순수분리를 하였다. 순수분리된 균주는 bacto-bank vial에 담아 -20°C에 냉동 보관하며 사용하였다.

2.2. 균주 동정

분리된 집락은 MALDI-TOF MS를 이용하여 동정하였다. 동정 장비는 MALDI Biotyper System (Bruker, Germany)으로 분리된 집락을 target plate에 얇게 펴 바른 다음 Matrix HCCA (α-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid)에 Standard solvent (50% acetonitrile, 47.5% water, 2.5% trifluoroacetic acid) 250 µl를 넣어 완전히 녹인 후 제조한 Matrix solution을 target plate 위에 1 µl 떨어뜨린 후 상온에서 건조하여 MALDI-TOF MS 장비에 장착하는 Direct transfer (DT) 방법을 사용하였다. 측정된 균주의 단백질 질량 스펙트럼은 MBT_autoX method로 분석하였으며, 측정값은 MALDI Biotyper version 3.1의 library와 비교 분석되어 score value로 동정 수치가 표현되었다. Score value에 따라 2가지(2.0 이상: Species까지 동정, 1.7 이상 2.0미만: Genus까지 동정)로 구분하여 결과를 분류하였다.

2.3. 항생제 감수성 실험

MALDI-TOF MS에서 동정이 확인된 균주 중 항생제 내성 유형을 파악하기 위해 주요 우점균 또는 기회감염균 등 병원

성을 나타낼 수 있는 균을 선별하여 항생제 감수성 시험을 실시하였다. 항생제 감수성 시험은 식품의약품안전처에서 발간된 항생제 내성균 검사 표준시험법 중 미생물 자동화기기를 이용한 감수성 검사법으로 최소억제농도(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)를 측정하였다. 시험에 사용된 기기는 BioMerieux사(France)의 VitekII이며, 항생제 키트는 bioMerieux의 AST-N169를 사용하였고, 2021년 임상검사실표준기구(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) guidelines에 따라 액체 배지 희석법(microdilution broth method) 기준에 따랐다. 시험방법은 Tryptic soy agar (Difco, USA)에 접종하여 35.0±0.5°C에서 24시간 배양한 후, 단일 집락을 bioMerieux사에서 제공한 AST-N169 사용법에 따라 3 mL의 saline에 균액을 희석하여 0.6 McF로 만들고, 이 균액 145 µl를 취해 3 mL saline에 주입하고 잘 섞은 후 키트에 주입하여 검사를 실시하였다. MIC의 측정은 Penicillin계 Ampicillin, Amoxicillin, Ampicillin/Sulbactam, Cephalosporin계 Cefalotin, Cefazolin, Cefotetan, Cefoxitin, Cefotaxime, Ceftriaxone, Carbapenem계 Imipenem, Aminoglycoside계 Amikacin, Gentamicin, Quinolone계 Nalidixic acid, Ciprofloxacin, Tetracycline계 Tetracycline, Sulfonamide계 Trimethoprim/sulfamethoxazole, 그 외 Chloramphenicol의 17종의 항생물질을 사용하여 감수성 시험을 실시하였다.

III. 결과 및 고찰

1. MALDI-TOF MS를 이용한 미생물 동정

광주지역 내 영산강 수계를 중심으로 각 지점별 미생물 동정결과 총 266개의 균주를 분리하였다. 이 중 그람양성균이 4속 37균주로 전체의 13.9%이고, 그람음성균은 23속 229균주로 86.1%였다. 그람양성균 중 *Bacillus* 속이 34균주가 동정되었으며 *Enterococcus* 속, *Exiguobacterium* 속, *Staphylococcus* 속은 각각 1균주씩 동정되었다. 그람음성균은 *Aeromonas* 속이 95균주로 41.5%를 차지하여 가장 높은 비율을 나타내었고, *Escherichia* 속 9.2%, *Pseudomonas* 속, *Raoultella* 속 각각 7.9%, *Klebsiella* 속 7.4% 순으로 조사되었다(Fig. 2). MALDI-TOF MS로 분석한 결과 Biotyper score가 1.7 이상 2.0 미만인 경우는 73균주(27.4%)이며, 2.0 이상인 경우는 193균주로 종(species)기준 동정률이 72.6%를 나타내었다(Table 2).

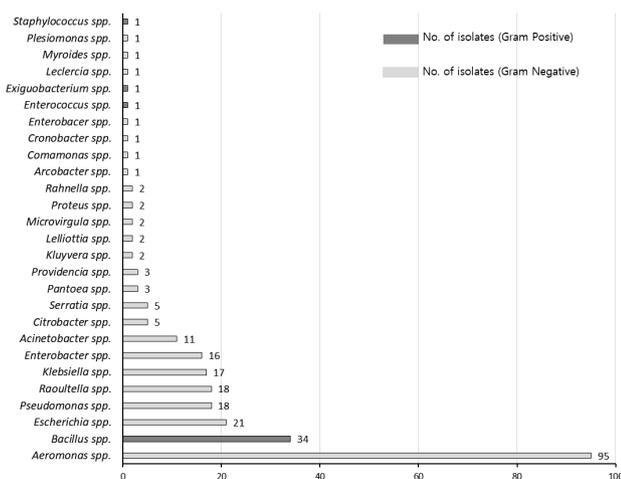


Fig. 2. Distribution of genus isolated by MALDI-TOF MS

Table 2. MALDI-TOF MS scores of isolated strains

| Identification | Species | Genus |
|---------------------|------------|-------------|
| Score value | ≥2.0 | ≥1.7 & <2.0 |
| No. of isolates (%) | 193 (72.6) | 73 (27.4) |
| Total | 266 (100) | |

종(species) 기준으로 동정된 193균주 중 *Aeromonas* 속이 42.0% (81주)로 *A. veronii* (30주)가 가장 많았고, *Escherichia*

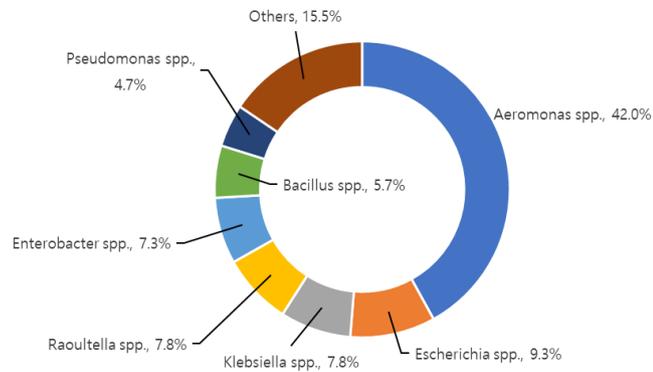


Fig. 3. Species distribution of isolated strains (score ≥ 2.0 , n=193)

속 9.3% (18주), *Klebsiella* 속 7.8% (15주), *Raoultella* 속 7.8% (15주), *Enterobacter* 속 7.3% (14주), *Bacillus* 속 5.7% (11주), *Pseudomonas* 속 4.7% (9주) 순이었으며(Fig. 3) 기타 세균으로는 *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Acinetobacter* spp. 등이 동정되었다. 분리 균주의 MALDI-TOF MS 결과는 Table 3과 같다.

동정된 균주는 그람양성균인 *Bacillus* 속 등을 제외한 대부분의 균들이 주로 그람음성균으로 식물, 토양, 물 등 자연계에 널리 존재하는 균과 사람, 동물 등 분변에 존재하는 균 등 장내 세균이 우점하는 것으로 나타났다(Fig. 2). Chung 등(2013)⁷⁾이 연구한 국내 영산강 유역의 Pyrosequencing을 이용한 세균 군집 현황 조사에서 phylum 계층의 군집 조사와 *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*의 분포를 통해 지천의 특성, 토지 이용, 시기적인 요인 등 환경적 요인에 따라 세균 군집 구조가 민감하게 변하는 경향을 나타낸다는 결과가 있는데 이 연구

Table 3. Distribution of species isolated by MALDI-TOF MS

| Score valve ≥ 2.0 organism | No. of isolates (%) | Score valve ≥ 2.0 organism | No. of isolates (%) |
|------------------------------------|---------------------|---------------------------------------|---------------------|
| <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> | 1 (0.5) | <i>Klebsiella oxytoca</i> | 6 (3.1) |
| <i>Acinetobacter junii</i> | 1 (0.5) | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 5 (2.6) |
| <i>Acinetobacter seifertii</i> | 1 (0.5) | <i>Klebsiella variicola</i> | 3 (1.6) |
| <i>Aeromonas bestiarum</i> | 6 (3.1) | <i>Kluyvera cryocrescens</i> | 1 (0.5) |
| <i>Aeromonas caviae</i> | 13 (6.7) | <i>Leclercia adecarboxylata</i> | 1 (0.5) |
| <i>Aeromonas eucrenophila</i> | 2 (1.0) | <i>Lelliottia amnigena</i> | 2 (1.0) |
| <i>Aeromonas hydrophila</i> | 18 (9.3) | <i>Microvirgula aerodenitrificans</i> | 2 (1.0) |
| <i>Aeromonas jandaei</i> | 2 (1.0) | <i>Myroides odoratimimus</i> | 1 (0.5) |
| <i>Aeromonas media</i> | 3 (1.6) | <i>Pantoea agglomerans</i> | 1 (0.5) |
| <i>Aeromonas popoffii</i> | 1 (0.5) | <i>Pantoea ananatis</i> | 1 (0.5) |
| <i>Aeromonas salmonicida</i> | 4 (2.1) | <i>Plesiomonas shigelloides</i> | 1 (0.5) |
| <i>Aeromonas sobria</i> | 2 (1.0) | <i>Proteus hauseri</i> | 1 (0.5) |
| <i>Aeromonas veronii</i> | 30 (15.5) | <i>Proteus mirabilis</i> | 1 (0.5) |
| <i>Arcobacter butzleri</i> | 1 (0.5) | <i>Providencia alcalifaciens</i> | 1 (0.5) |
| <i>Bacillus altitudinis</i> | 1 (0.5) | <i>Providencia rettgeri</i> | 1 (0.5) |
| <i>Bacillus licheniformis</i> | 1 (0.5) | <i>Pseudomonas alcaligenes</i> | 3 (1.6) |
| <i>Bacillus marisflavi</i> | 2 (1.0) | <i>Pseudomonas corrugata</i> | 1 (0.5) |
| <i>Bacillus pumilus</i> | 4 (2.1) | <i>Pseudomonas extremorientalis</i> | 1 (0.5) |
| <i>Bacillus subtilis</i> | 3 (1.6) | <i>Pseudomonas monteilii</i> | 1 (0.5) |
| <i>Citrobacter freundii</i> | 5 (2.6) | <i>Pseudomonas putida</i> | 2 (1.0) |
| <i>Comamonas testosteroni</i> | 1 (0.5) | <i>Pseudomonas synxantha</i> | 1 (0.5) |
| <i>Enterobacter asburiae</i> | 7 (3.6) | <i>Rahnella aquatilis</i> | 1 (0.5) |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | 6 (3.1) | <i>Raoultella omithinolytica</i> | 4 (2.1) |
| <i>Enterobacter kobei</i> | 1 (0.5) | <i>Raoultella ornithinolytica</i> | 10 (5.2) |
| <i>Escherichia coli</i> | 18 (9.3) | <i>Raoultella planticola</i> | 1 (0.5) |
| <i>Exiguobacterium sp</i> | 1 (0.5) | <i>Serratia fonticola</i> | 1 (0.5) |
| <i>Klebsiella aerogenes</i> | 1 (0.5) | <i>Serratia marcescens</i> | 3 (1.6) |
| | | Total | 193 (100) |

에서도 이러한 환경의 변화들로 인하여 식물, 토양, 물 등 환경에 널리 존재하는 균과 사람과 동물 등의 분변에 존재하는 균 등이 복합적으로 존재하여 세균 군집 구조에 영향을 주었다고 판단되었다.

주요 우점균의 특성을 살펴보면, *Aeromonas* 속은 그람음성 통성혐기성 세균이며 수계의 토착성 세균으로서 오염된 물이나 토양, 지하수 등 자연계에 널리 존재한다. 사람에게 병원성이 있다고 알려진 *A. hydrophila*, *A. sobria* 등은 세균성 식중독의 원인균으로서 설사와 복통 등의 증상을 수반한다고 알려져 있다. 특히 본 연구에서 검출된 *A. hydrophila*에 대한 감염은 보통 위장관염으로 나타나지만, 드물게 기저질환이 있는 면역 저하 환자에게서 폐렴, 뇌농양, 안구내염, 패혈증으로 발현되기도 한다.¹¹⁾

Bacillus 속은 자연계에서 주요 부패 원인균으로 물, 토양, 공기 중에도 부유하고 자연계에 널리 존재하며 그람양성의 간균으로 편모가 있어 운동성이 있다. 이 균 속은 포자를 형성하기 때문에 음식을 조리하는 과정 중에 열처리에 의해 사멸되지 않으므로 조리하는 음식에서도 생존한다. 대표적인 식중독 병원체인 *B. cereus sensu stricto*는 인체에 감염된 후 설사와 구토를 유발한다고 알려져 있다.¹²⁾

Pseudomonas 속은 자연계에서 널리 분포하고, 녹농균 *Pseudomonas aeruginosa*가 대표적인 병원균이다. 본 연구 결과에서 검출된 *P. alcaligenes* 및 *P. putida*는 기회감염을 일으킬 수 있는 균으로써, 건강한 사람에게는 거의 위해 요소가 아니지만 면역력이 약해지면 균이 감염증을 일으키는 기회를 가지게 된다.^{13,14)} 분리된 균주 중 *Klebsiella* 속 또한 대표적인 기회감염균으로, 특히 *Klebsiella pneumoniae*의 경우 급성폐렴의 원인균으로서 *E. coli*, *E. cloacae* 등의 카바페넴 내성 장내세균(Cabapenem Resistance Enterobacteriaceae, CRE)으로 알려져 있다.¹⁵⁾

주요하천과 지천으로부터 16srRNA 유전자 분석을 통해 균을 동정한 이전 연구 사례에서 Go 등(2015)⁴⁾은 국내 하천에서 *Aeromonas* 속이 31.7%로 가장 분포율이 높았고, *Acidovorax* (28.1%), *Elizabethkingia* (8.2%), *Pseudomonas* (5%), *Raoultella* (3.2%), *Brevundimonas* (3.2%), *Pedobacter* (2%) 속의 순서로 나타났으며, 이 외 *Sphingobium*, *Sphingobacterium*, *Comamonas*, *Chromobacterium*, *Pelomonas*, *Chryseobacterium* 등의 속이 동정되었다. 이 연구 결과는 동정된 미생물 종에 따른 차이는 있겠지만, 본 연구와 유사한 결과를 나타내었다.

2. 지점별 미생물 군집 특성

영산강 본류와 주요 지천 및 하수처리장 유입수 및 방류수에 대한 지점별 미생물 분포 비율을 상류(Site. A)에서 하류(Site. G) 순으로 Fig. 4에 나타내었다. 분리된 균종 수는 A지점의 경우, *Aeromonas* 속의 비중이 51.1%로 조사

되어 다른 지점과 비교하여 가장 비중이 컸으며, 그 이외에 *Escherichia* 속, *Raoultella* 속이 비교적 높게 검출되었다. B지점에서도 *Aeromonas* 속이 가장 높았고, 그 외 *Bacillus* 속과 *Pseudomonas* 속의 순서로 나타났다. C지점은 하수 유입수로서 유입 원수를 다양한 농도로 희석시킨 후 배양된 집락을 확인한 결과, 다른 지점에 비해 균종의 수가 가장 적고 단순하였지만, *E. coli*의 비율이 가장 높게 검출되었다. 광주천 유지용수로 이용되는 하수처리장 방류수인 D지점에서는 가장 다양한 종의 수가 분리되었다. 다른 지천과 본류에 비해 *Enterobacter* 속이 가장 높았고, 그중 *E. asburiae*이 4종, *E. cloacae*이 3종 검출되었다. *E. coli*도 지점 C와 비슷하게 검출되었으며, 그 외 *Aeromonas* 속, *Bacillus* 속이 비교적 높게 검출되었다. 주변에 많은 아파트와 상업시설이 위치하고 있는 E지점에서는 *Aeromonas* 속이 가장 높았으며, 하수처리장에서 검출된 *E. coli*는 검출되지 않았고, *Pseudomonas* 속의 비율이 상대적으로 다른 지점에 비해 높게 나타났다. 지천인 F지점과 영산강 하류지점인 G지점에서도 다른 지점과 비슷하게 *Aeromonas* 속의 비중이 가장 높았으며, 두 지점 모두 *Raoultella* 속(지점 F, 16.2%)과 *Klebsiella* 속(지점 G, 11.1%)의 기회감염균이 검출되었다.

지점별 균종 분포에서, 주로 발견된 균종은 물, 식물, 토양 등에서 발견되는 균으로 대부분 자연계에 존재하는 균이었지만, 사람이나 동물 등 분변에 존재하는 인위적인 오염원에 의해 나타나는 균도 복합적으로 존재하는 것으로 조사되었다. 특히 물, 토양 및 사람이나 동물의 분변에 존재하여 유아에게 요독성 요독증의 원인균으로 알려진 *Enterobacter* 속의 *E. cloacae*가 D지점에서 높게 검출되었다. 이 균은 기회감염, 요로감염, 호흡기감염, 피부 상처 감염, 패혈증, 수막염 등의 원인균으로도 알려져 있으며¹⁶⁾ 이와 관련된 여러 건의 감염 사례 중 특히 신생아 패혈증을 발병시킨다는 연구가 보고되었다.¹⁷⁾

미생물 군집 분포를 조사해 본 결과, 각각의 미생물들은 지

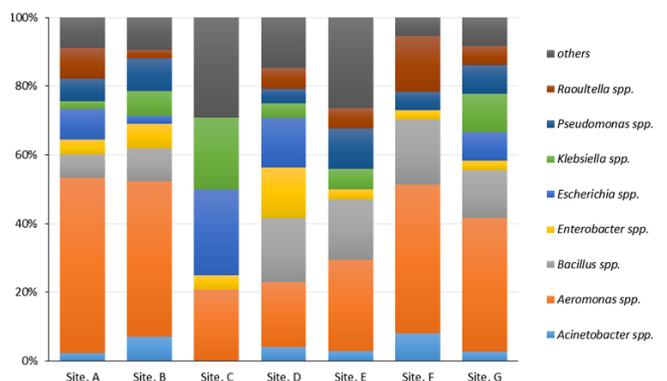


Fig. 4. Comparison of bacterial communities at the genus level by sites

역적 및 환경적인 요인, 주변의 토지 이용과 비점오염원 같은 외부적인 요인들에 의해 변화한다는 것을 알 수 있으며, 또한 이 연구 결과를 통해 하천환경의 분변오염 감시를 위한 새로운 방안 마련에 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

3. 주요 균의 항생제 감수성 시험

이 연구에서 분리된 세균의 항생제 내성 여부를 분석하기 위해 주요 우점종을 중심으로 23균주에 대해 항생제 감수성 시험을 실시하였다. 대상 균주는 해당 지점에서 분리된 *Aeromonas* 속 6주, *Klebsiella* 속 4주, *Acinetobacter* 속, *Citrobacter* 속, *Enterobacter* 속, *Pseudomonas* 속 각각 2주씩, 그리고 *Bacillus* 속, *Escherichia* 속, *Providencia* 속, *Raoultella* 속, *Serratia* 속은 각각 1주씩 수행하였다(Table 4).

총 23균주의 항생제 17종에 대한 항생제 감수성 시험 결과는 Table 5에 나타내었다. 그중 penicillin 계열의 ampicillin과 cephalosporin 계열의 cefalotine에 내성을 나타내는 균주가 각각 18주(78.3%), 17주(73.9%)로 가장 높게 나타났다. 또한 ampicillin-sulbactam, cefazolin, amoxicillin-clavulanic acid, nalidixic acid에 각각 16균주(69.6%), 13균주(56.5%), 9균주(39.1%), 9균주(39.1%)가 내성을 보였다. 이 외에 cefoxitin, tetracycline, imipenem, cefotetan 등에 내성이 있는 균주도 확인되었다. 다제 내성 유형은 다양하게 나타났으며, 항생제 내성을

가진 균주 중 20균주(87.0%)가 2제 이상의 항생제에서 내성을 가진 다제 내성균이었다. 8제 내성 균주가 4균주로 가장 많았으며, 3제 내성, 4제 내성, 6제 내성, 9제 내성은 각각 3균주이고, 2제, 7제 내성 균주도 각각 2균주가 확인되었다. 그 외 한 가지 항생제만 내성을 가진 균주는 1균주(4.3%)였으며, 나머지 2균주(8.7%)는 검사한 17종의 항생제에 100% 감수성을 보였다(Table 6).

Go 등(2015)⁴⁾이 연구한 국내 하천에 분포하는 ampicillin 내성균의 다양성 조사에서 14종의 항생제 중 6종 이상의 항생제에 내성을 보이는 내성균들의 분포가 66%를 차지하였으며, 그중 7종의 항생제에 내성을 보이는 내성균들의 분포가 19.7%로 가장 높게 나타났고, Jang 등(2015)¹⁸⁾은 국내 하천에서 분리된 그람음성 *Enterobacteriaceae*의 항생제 다제 내성 조사 결과, 8종의 항생제에 내성을 보이는 내성균들이 30% 비율로 가장 우점하였으며, 7종 이상의 항생제에 내성을 보이는 내성균들의 분포가 78.3%를 차지하였다고 보고하였는데 이 연구에서는 6종 이상의 항생제에 내성을 보이는 비율이 52%로 조사되었고, 그중 8제 항생제에 가장 높게 나타난 결과와는 다소 차이를 보여주었다.

이 연구에서는 분리된 항생제 내성균들에 대한 내성 유전자 조사는 이루어지지 못했지만 이 연구 결과를 통해 자연 하천에 존재하는 세균들 중에서 다제 내성을 보이는 항생제 내성균들

Table 4. Classification of species for antimicrobial susceptibility

| Strains | Number of isolates | | | | | | Total |
|--------------------------------|--------------------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|
| | Site.A | Site.B | Site.C | Site.D | Site.E | Site.G | |
| <i>Acinetobacter baylyi</i> | | 1 | | | | | 1 |
| <i>Acinetobacter junii</i> | | 1 | | | | | 1 |
| <i>Aeromonas caviae</i> | 1 | | | 1 | | | 2 |
| <i>Aeromonas hydrophila</i> | | 1 | | 1 | | | 2 |
| <i>Aeromonas jandaei</i> | | 1 | | | | | 1 |
| <i>Aeromonas veronii</i> | 1 | | | | | | 1 |
| <i>Bacillus pumilus</i> | | | | | | 1 | 1 |
| <i>Citrobacter freundii</i> | 1 | 1 | | | | | 2 |
| <i>Enterobacter asburiae</i> | 1 | | | | | | 1 |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | | 1 | | | | | 1 |
| <i>Escherichia coli</i> | | 1 | | | | | 1 |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | | | | 1 | | | 1 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | | 1 | 1 | | | | 2 |
| <i>Klebsiella variicola</i> | | 1 | | | | | 1 |
| <i>Providencia rettgeri</i> | | | | | 1 | | 1 |
| <i>Pseudomonas alcaligenes</i> | | 1 | | | | 1 | 2 |
| <i>Raoultella planticola</i> | 1 | | | | | | 1 |
| <i>Serratia marcescens</i> | | | | | | 1 | 1 |
| Total | 5 | 10 | 1 | 3 | 1 | 3 | 23 |

Table 5. Antimicrobial susceptibility rates of isolated strains (n=23)

| Classification | Names | No. of isolates (%), n=23 | | |
|-----------------|-------|---------------------------|---------------------|--------------------|
| | | Resistant, n (%) | Intermediate, n (%) | Susceptible, n (%) |
| β-lactams | AMP | 18 (78.3) | 2 (8.7) | 3 (13.0) |
| | AMC | 9 (39.1) | 5 (21.7) | 9 (39.1) |
| | SAM | 16 (69.6) | 3 (13.0) | 4 (17.4) |
| Cephalosporins | CF | 17 (73.9) | 1 (4.3) | 5 (21.7) |
| | CZ | 13 (56.5) | 1 (4.3) | 9 (39.1) |
| | CTT | 4 (17.4) | 4 (17.4) | 15 (65.2) |
| | FOX | 8 (34.8) | 2 (8.7) | 13 (56.5) |
| | CTX | 4 (17.4) | 3 (13.0) | 16 (69.6) |
| | CRO | 3 (13.0) | 4 (17.4) | 16 (69.6) |
| | IPM | 5 (21.7) | 3 (13.0) | 15 (65.2) |
| Carbapenems | | | | |
| Aminoglycosides | AN | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 23 (100.0) |
| | GM | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 23 (100.0) |
| Quinolones | NA | 9 (39.1) | 0 (0.0) | 14 (60.9) |
| | CIP | 1 (4.3) | 1 (4.3) | 21 (91.3) |
| Tetracyclines | TE | 5 (21.7) | 0 (0.0) | 18 (78.3) |
| Phenicol | C | 1 (4.3) | 3 (13.0) | 19 (82.6) |
| Sulfa-drug | STX | 4 (17.4) | 0 (0.0) | 19 (82.6) |

AMP: ampicillin, AMC: amoxicillin-clavulanic acid, SAM: ampicillin-sulbactam, CF: cefalotin, CZ: cefazolin, CTT: cefotetan, FOX: ceftaxime, CTX: cefotaxime, CRO: ceftriaxone, IPM: imipenem, AN: amikacin, GM: gentamicin, NA: nalidixic acid, CIP: ciprofloxacin, TE: tetracycline, C: chloramphenicol, STX: trimethoprim-sulfamethoxazole.

Table 6. Antimicrobial resistance patterns of isolated strains

| No. of antimicrobials | Resistance patterns | No. strains (%) |
|-----------------------|-----------------------------------|-----------------|
| 0 | All susceptible | 2 (8.7) |
| 1 | AMP | 1 (4.3) |
| 2 | CF-CZ | 1 (4.3) |
| | CTX-NA | 1 (4.3) |
| 3 | AMP-AMC-SAM | 1 (4.3) |
| | AMP-SAM-CF | 1 (4.3) |
| | AMP-SAM-NA | 1 (4.3) |
| 4 | AMC-SAM-CF-TE | 1 (4.3) |
| | AMP-SAM-CF-CZ | 2 (8.7) |
| 6 | AMP-CF-NA-CIP-TE-C | 1 (4.3) |
| | AMP-SAM-CF-CZ-FOX-NA | 1 (4.3) |
| | AMP-SAM-CF-CZ-NZ-STX | 1 (4.3) |
| 7 | AMP-AMC-SAM-CF-CTT-NA-TE | 1 (4.3) |
| | AMP-AMC-SAM-CF-CZ-CTT-FOX | 1 (4.3) |
| 8 | AMP-AMC-CF-CZ-CTT-FOX-IPM-STX | 1 (4.3) |
| | AMP-AMC-SAM-CF-CZ-CTT-FOX-NA | 1 (4.3) |
| | AMP-SAM-CF-CZ-FOX-IPM-NA-STX | 1 (4.3) |
| | AMP-SAM-CF-CZ-FOX-NA-TE-STX | 1 (4.3) |
| 9 | AMP-AMC-SAM-CF-CZ-CTX-CRO-IPM-TE | 1 (4.3) |
| | AMP-AMC-SAM-CF-CZ-FOX-CTX-CRO-IPM | 2 (8.7) |
| Total | | 23 (100.0) |

이 서식 생태계를 우점하고 있다는 것을 알 수 있었다. 또한 동일 균주라도 채취 지점에 따라 서로 다른 항생제 내성 패턴을 보이고 있으므로 향후 항생제 내성 유전자 분석을 통해 내성균의 변화 양상의 조사가 필요할 것으로 생각된다.

IV. 결 론

이 연구는 미생물 동정 장비인 MALDI-TOF MS를 이용하여 광주지역 영산강 본류와 주요 지천 및 하수처리장 유입수 및 방류수에서 분리된 미생물의 균집 다양성을 조사하였고 결론은 다음과 같다.

1. 연구 기간 전체 시료에 대해 총 266균주를 분리하였으며, 대부분의 균들은 주로 그람음성균으로 식물, 토양, 물 등 자연계에 널리 존재하는 균과 사람, 동물의 분변에 존재하는 균 등 주로 장내세균이 우점하는 것으로 나타났다.

2. 하수처리장 유입수 및 방류수의 미생물 동정결과, 유입수의 경우 다른 지점에 비해 *E.coli*의 비율이 가장 높게 검출되어 사람이나 동물 등 분변오염에 대한 영향으로 보이며, 방류수는 다른 지천과 본류에 비해 가장 다양한 균종이 분리되었고, 특히 기회 감염균으로 작용할 수 있는 *Enterobacter* 속이 가장 높게 검출되어 수질오염에 대한 관리가 더 필요할 것으로 판단된다.

3. 주요 우점종을 중심으로 항생제 감수성 시험을 실시한 결과, 한 가지 항생제만 내성을 가진 균주는 1균주(4.3%)였으며, 2균주(8.7%)는 검사한 17종의 항생제에 100% 감수성을 보였다. 그 외 20균주(87.0%)는 2제 이상의 항생제에서 내성을 가진 다제 내성균이었다. 다제 내성 유형은 다양하게 나타났으며, 그중 penicillin 계열과 cephalosporin 계열의 내성이 가장 높게 나타났다. 따라서 자연 하천에 존재하는 세균들 중에서 다제 내성을 보이는 항생제 내성균들이 서식 생태계를 우점하고 있다는 것을 알 수 있었다.

이번 연구는 광주지역 주변 영산강 수계에서 미생물의 균집 다양성 및 항생제 내성균 분포조사를 목적으로 수행되었지만, 연구 조사 시기가 단년 과제에 이루어져 계절적인 영향을 파악하기에는 다소 아쉬운 점이 있어, 향후 계절적인 하천 미생물 변화 양상과 이에 따른 항생제 내성균의 유전자 분석을 통한 추가연구가 이루어진다면 하천환경 변화에 대응하여 기초자료를 확보하는데 도움이 될 것으로 생각한다.

감사의 글

이 연구는 2023년 환경부의 「환경분야 시험검사의 국제적 적합성 기반구축사업」재원으로 국립환경과학원의 지원(2023-01-03-002)과 광주광역시 보건환경연구원의 「연구지원 및 역량강화」의 일환으로 수행하였습니다.

Conflict of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

References

- Kim HG. Management of Young-san river: water quality improvement and flood safety evaluation [dissertation]. [Jeollanam-do]: Mokpo National University; 2011.
- Lee SM. Modification of multiple antibiotic resistance analysis technique for nonpoint fecal bacteria sources tracking [dissertation]. [Seoul]: Hanyang University; 2011.
- Lee MG, Lee HH, Jeong HJ, Cho SJ, Jeong SH, Seo YJ, et al. Antimicrobial resistance and genetic characterization of pathogenic escherichia coli isolated from distribution beef in Gwangju. *J Food Hyg Saf.* 2021; 36(2): 180-187.
- Go EB, Chung IY, Kim H, Seok KS, Kim B, Yoo YJ, et al. Diversity of ampicillin resistant bacteria in domestic streams. *Korean J Microbiol.* 2015; 51(4): 440-443.
- Lee GY, Kim KH, Kwon MJ, Kwon HK, Kim YH, Lee JH. A study of antimicrobial resistance in escherichia coli and the distribution of indicator microorganisms in Asan city. *J Environ Health Sci.* 2010; 36(3): 229-235.
- Kim JG, Lee JH, Kwon HK. The distribution of indicator microorganisms and identification of antibiotic resistant strains in domestic animal feces. *J Environ Health Sci.* 2011; 37(4): 289-297.
- Chung J, Park SJ, Unno T. Use of pyrosequencing for characterizing microbial community at phylum level in Yeongsan river watershed during early summer. *Korean J Microbiol.* 2013; 49(2): 150-155.
- Choi HS, Park JA, Lee SR, Jeon SJ, Park JA, Lee JH, et al. Characteristics of microbial community in the Han river system using MALDI-TOF MS. *Seoul Inst Health Environ.* 2017; 53: 221-231.
- Jeong HW, Jung JH, Park SH, Seung HJ, OH SA, Shin MH, et al. Investigation of intestinal opportunistic bacteria using MALDI-TOF MS. *Seoul Inst Health Environ.* 2015; 51: 155-163.
- Sung HK, Jeong YK, Chae HS, Lee HH, Kim HH, YOU MJ, et al. Study on the recognition of dental management of the dog and the identification of bacteria on the surface of oral teeth. *Seoul Inst Health Environ.* 2018; 54: 58-83.
- Jung MH, Lee KH, Hwang DY, Jo KH, Han SY, Kim SA, et al. *Aeromonas hydrophila* myonecrosis in an immunocompetent patient. *Infect Chemother.* 2011; 43(2): 213-216.
- Yu WS, Lee KM, Hwang KJ. Taxonomic identification of bacillus species using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *Ann Clin Microbiol.* 2016; 19(4): 110-120.
- Horii T, Muramatsu H, Iinuma Y. Mechanisms of resistance to fluoroquinolones and carbapenems in *Pseudomonas putida*. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 56: 643-647.
- Gopal M, Gupta A. An opportunistic bacterial pathogen, *Pseudomonas alcaligenes*, may limit the perpetuation of oryctes virus, a biocontrol agent of oryctes rhinoceros L. *Biocontrol Sci Technol.*

- 2002; 12: 507-512.
15. Netikul T, Kiratisin P. Genetic characterization of carbapenem-resistant enterobacteriaceae and the spread of carbapenem-resistant klebsiella pneumonia ST340 at a university hospital in Thailand. *PLoS One*. 2015; 10(9): e0139116.
16. Kim SJ. Identification and distribution of the pathogenic microorganisms isolated from edible ice in north area of Daegu, Korea. *Korean J Microbiol*. 2009; 45(1): 86-90.
17. Dalben M, Varkulja G, Basso M, Krebs VLJ, Gibelli MA, van der Heijden I, et al. Investigation of an outbreak of enterobacter cloacae in a neonatal unit and review of the literature. *J Hosp Infect*. 2008; 70(1): 7-14.
18. Jang YJ, Song KB, Chung IY, Kim H, Seok KS, Go EB, et al. Prevalence of multi-drug resistant bacteria belonging to gram negative enterobacteriaceae isolated from a domestic stream. *Microbiol Biotechnol Lett*. 2015; 43(4): 396-400.

〈저자정보〉

김선정(환경연구사), 박지영(환경연구사), 김승호(환경연구사), 임민화(환경연구사), 유지용(환경연구사), 한규성(환경연구사), 박세일(공무직), 서광엽(환경연구관), 조광운(환경연구관)