

## MALDI-TOF MS를 이용한 한강수계의 미생물 군집 특성 연구

먹는물분석팀 · 감염병검사팀\*

최현숙 · 박진아<sup>B</sup> · 이새람 · 전수진\* · 박진아<sup>A</sup> · 이집호\* · 김현정 · 이목영

### Characteristics of Microbial Community in the Han River System Using MALDI-TOF MS

*Drinking Water Analysis Team·Infectious Disease Team\**

Hyun-suk Choi, Jin-a Park<sup>B</sup>, Sae-ram Lee, Su-jin Jeon\*,  
Jin-a Park<sup>A</sup>, Jib-ho Lee\*, Hyun-jeong Kim and Mok-young Lee

#### Abstract

In this study, to facilitate the management of opportunistic water-borne infections and unregulated microorganisms, we investigated the characteristics of microbial communities in the Han River system using MALDI-TOF MS. A total of 467 strains were isolated from 66 samples in tributaries, main streams, and sewage treatment plants(STPs). The isolated bacteria in order of abundance were *Aeromonas* spp.(39.6%), *Klebsiella* spp.(9.4%), *Proteus* spp.(8.6%), and *Enterobacter* spp.(7.1%). Comparisons of microbial community characteristics at each site showed, it was found that some bacteria detected in tributaries were derived from the effluent water of STPs. In contrast to the tributaries, main streams did not contain *E. coli*, and their levels of *Klebsiella* spp. were relatively low. Therefore, it is considered that water quality control for fecal contamination is more important necessary in the tributaries than in the main streams. Antimicrobial resistance tests of five major strains isolated during the study showed that 84.5% of the strains were resistant to one or more antibiotics. Also, high resistance was shown against penicillin, cephalosporin, and quinolone antibiotics. In addition, in the same strains, showed varying patterns of antibiotic resistance patterns across the sampling sites. To ensure safe river management in future, it is, therefore, necessary to continue research on the acquisition mechanism, transition patterns, and pathogenicity of antibiotic-resistant bacteria.

**Key words** : MALDI-TOF MS, Han River system, microbial community, antimicrobial resistance

## 서 론

분변오염이 진행된 강이나 호소에서 수영을 할 경우 병원성미생물에 의해 소화기, 호흡기, 피부 관련 질병 등 수인성 전염병에 걸릴 확률이 높다고 알려져 있다. 최근 기후변화에 따른 이상 강우 증가로 비점오염원에 의한 오염물질의 하천 유입이 늘고 있으며, 병원성미생물에 의한 수인성 전염병 유발에 잠재적인 영향으로 하천의 위생학적 관리를 위해 분변오염과 병원성미생물에 대한 수질 감시가 중요시 되고 있다(1).

특히 항생물질의 환경으로 유출은 주로 체내에 투여된 항생물질 중 일부가 그대로 또는 생체내에서 대사체로 변환되어 소변이나 대변으로 지표수 중으로 배설되며, 점차 증가하는 항생제 사용으로 미생물의 항생제 내성율은 높아지고 있다(2~5). 이에 국가 항생제 내성 안전관리사업은 사람, 가축, 환경 등의 항생제 내성균 모니터링을 실시하고 있지만 국내 주요 하천에서 내성균 분포와 항생제 내성 전이성 연구는 미흡한 실정이다(6).

통상 수질관리 관점에서 오랫동안 미생물 지표를 적용해왔으며(7), 최근 미생물지표로서 분변오염의 원인이 무엇인지를 찾아가는 오염원 추적 기법(microbial source tracking: MST)이 주목을 받고 있다(8, 9). 이 기법은 주로 지하수, 식수, 야생 동물 거주 지역의 수질 오염원 규명과 수질 감시 방법에 새로운 지표로 사용하고 있다(10, 11).

각각의 미생물들은 주변 환경에 따라 다른 미생물들과 상호작용을 통해 군집을 형성하기 때문에 개별적으로 존재하는 미생물과는 다른 특성을 가지며, 매우 복잡한 상호작용을 통해 발현하게 된다. 따라서 미생물 각각을 이해하는 것보다 미생물군집을 이해하는 것이 매우 중요하다(12).

이러한 시대적 변화에 따라 고전적인 배양기법은 모든 미생물을 배양할 수 없다는 제한적 한계가 있어(13), 최근에는 차세대 염기서열 분석방법(next generation sequencing)을 비롯하여 DNA 추출 및 유전자 분석을 통한 분자생물학적 방법으로 미생물 군집 구조를 모니터링하고 생태학적인 관계를 규명하고 있다(14). 대표적인 방법은 16S

rRNA 염기서열 분석을 이용하는 Denaturing Gradient Gel Electrophoresis(DGGE), Restriction Fragment Length Polymorphism(RFLP), Fluorescent *in situ* Hybridization (FISH) 등이 있으며(15~18), 이들은 미생물 군집 다양성 및 군집 중 유해 미생물 선별과 분포 분석에 주로 사용되고 있다(19).

그러나 이러한 방법들은 분석절차가 까다롭고 비용이 많이 소요되는 단점이 있으며 기후변화에 따른 다양한 오염원의 발생과 수질 사고 시 즉각적인 대응이 어려워 신속한 유해 미생물의 검출을 위한 새로운 방법을 모색할 필요가 있다.

MALDI-TOF MS(Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry)는 다수의 의심집락을 수분내로 동정할 수 있고 개당 비용이 다른 동정법보다 현저히 낮으며 많은 선행연구를 통해 정확성이 입증되어 최근 가장 주목받는 기술이다. 또한 혐기성이나 배양이 길고 까다로운 균도 쉽게 동정할 수 있다(20, 26).

장비 도입초기에는 임상의학에서 빠른 시간에 질병을 진단하거나, 보건학적으로 감염병을 진단하기 위해 사용되었다. 환경분야의 외국 선행연구는 온대수역에서 비브리오균 동정(21), 지하철역 내 부유세균의 특성(22), 수처리공정에서 세균의 모니터링(23), 토양에서 PCB 대사작용 박테리아의 동정(24) 등 다양한 분야에서 활발히 진행되고 있다. 반면 국내에서는 돼지유래 Salmonella속균의 동정(25), 인체 분변에서 기회감염균 조사(26) 등 축산, 질병분야에서 진행되었으나, 환경 분야에 적용한 연구 사례는 적고 특히 수계를 중심으로 미생물 군집 특성을 조사한 사례는 거의 없다.

이에 본 연구는 미생물 동정 장비인 MALDI-TOF MS를 이용하여 한강 지천과 본류, 하수 유입수 및 방류수에서 미생물 군집 특성을 조사하고 항생제 내성여부를 분석하여, 향후 하천에서 기회감염균 및 미규제 유해 미생물에 대한 감시체계를 구축하고자 하였다.

## 자료 및 방법

### 1. 연구대상 및 시료채취

2017년 6월부터 9월까지 한강을 중심으로 주요 지천 17개와 분류 5개 지점, 4개 물재생센터의 유입수 및 방류수 12개 지점을 대상으로 실험하였다. 각 채수 지점 및 시기는 표 1, 그림 1과 같다.

6월과 7월에는 지천 17개 지점에서 시료를 채수하였고, 8월과 9월에는 지천 중 물재생센터의 영향을 받는 5개 지점(중랑천 상·하류, 안양천 하류, 탄천 하류, 홍제천)을 선정하여 지점별 군집 특성을 비교하였다. 전체 시료 수는 총 66건이며, 모든 시료는 무균채수병에 채수하여 실험실로 운반직후 분석하고 즉시 실험이 어려운 경우에는 4℃ 이하에서 냉장 보관하여 24시간 이내에 실험하였다.

**Table 1.** Sampling site and period

Type(No. of site)	Sampling site(Name)	Period
Tributary(17)	Godeok, Seongnae, Yangjae, Ui, Seonbuk, Jeongneung, Hongje, Dorim, Gaehwa, Cheonggye1,2,3, Jungnang1,2,3, Anyang, Tancheon	Jun.~Jul. (monthly)
Tributary(5)	Hongje, Jungnang1,3, Anyang, Tancheon	Aug.~Sep. (monthly)
Main stream(5)	Seongsan, Mapo, Hangang, Hannam, Seongsu	Aug.~Sep. (monthly)
Sewage treatment plant(12)	Jungnang STP : Influent #2, #3, Effluent #2, #3, Nanji STP : Influent, Effluent #1, #2, Tancheon STP : Influent, Effluent #1, #2, Seonam STP : Influent, Effluent	Sep.



**Fig. 1.** Sampling sites in Han river.

## 2. 분석방법

### 1) 균주 분리

장내세균과 병원성세균 배양에 사용되는 증균배지 및 선택배지로 세균을 분리하였다. 특히 선택배지로 MacConkey agar, XLD agar, SS agar, Mannitol salt agar, Enterococci selective agar, MYP agar를 사용하였으며, 시료를 도말한 후 30~37°C, 18~24시간 배양하였다. 선택배지에서 자란 균은 형태, 크기, 색 등으로 분류하고 각 검체마다 평균 3~6개 이상의 집락을 선택하여 TSA(Tryptic soy agar, Difco, USA)배지에 계대배양한 후 순수 분리하였다. 분리된 균주는 세라믹 beads가 포함된 bactobank vial에 담아 -20°C에 냉동 보관하며 사용하였다.

### 2) 균주 동정

순수 분리된 집락은 최종적으로 MALDI-TOF MS (Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry)를 이용하여 동정하였다. 사용한 장비는 MALDI Biotyper System(Bruker, Germany)으로 순수 분리된 집락을 target plate에 얇게 도포한 다음 matrix(10 mg/mL of  $\alpha$ -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid [ $\alpha$ -HCCP] in 50% acetonitrile-2.5% trifluoroacetic acid; Bruker Daltonik, Bremen, Germany) 1  $\mu$ L 떨어뜨린 후 실온에서 건조시켰다. MALDI-TOF MS 장치에 target plate를 장착하고 진공 상태를 만들어 MTB\_autoX method로 분석하였으며, 확인된 균주 중 score value 2.0 이상의 결과만을 선택하여 사용하였다.

### 3) 항생제 감수성 시험

동정이 확인된 균주 중 우점균 또는 기회감염 등 건강에 영향을 미칠 수 있는 세균을 선별하고 항생제 내성 유형을 파악하기 위해 항생제 감수성 시험을 실시하였다. 항생제 감수성 시험은 VITEK2-compact System(BioMerieux, France)에 의한 최소억제농도(Minimum Inhibitory Concentration: MIC)를 이용하였다. 실험방법으로는 실험 균주를 TSA 한천배지에서 37°C, 24시간 배양한

후 단일 집락을 멸균된 0.45% NaCl 3 mL에 균질화하였다. VITEK colorimeter에서 최종 탁도를 0.6 McFarland barium sulfate turbidity standard에 맞춘 뒤 2~3초 동안 교반한 다음 VITEK AST-N169 card에 접종하고 MIC를 측정하였다. MIC의 측정은 penicillin계 ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid, ampicillin/sulbactam, cephalosporin계 cefalotin, cefazolin, cefotetan, cefoxitin, cefotaxime, ceftriaxone, carbapenem계 imipenem, aminoglycoside계 amikacin, gentamicin, quinolone계 nalidixic acid, ciprofloxacin, tetracycline계 tetracycline, sulfar계 trimethoprim/sulfamethoxazole, 그 외 chloramphenicol 등 17종의 항생물질을 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. MALDI-TOF MS에 의한 미생물 동정

2017년 6월부터 9월까지 한강 지천과 본류, 하수 처리장 유입수와 방류수 전체 66건에서 최종 628개의 균주를 분리하였고 score value 2.0 이상, 종(species) 기준으로 동정된 균주는 467개로 동정률 74.4%를 나타내었다. 동정된 균주는 *Aeromonas* 속 39.6%(185주), *Klebsiella* 속 9.4%(44주), *Proteus* 속 8.6%(40주), *Enterobacter* 속 7.1%(33주), *Bacillus* 속 6.6%(31주) 순으로 나타났다(그림 2). *Aeromonas* 속은 *A. caviae*(56주), *A. hydrophila*(64주)가 가장 많았고, *Klebsiella* 속은 *K. pneumoniae*(39주), *Proteus* 속은 *P. mirabilis*(28주), *Enterobacter* 속은 *E. asburiae*(18주)가 동정되었다. 기타 세균으로는 *Acinetobacter baumannii*, *Serratia fonticola*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Salmonella* spp. 등이 일부 동정되었다.

국내 하천에서 미생물 군집 특성 연구 사례로서 정 등(10)이 영산강 유역에서 DNA 추출과 PCR 분석을 통해 phylum계층의 군집 조사와 *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Acinobacteria*의 분포를 통해 지천의 특성, 토지 이용, 시기적인 요

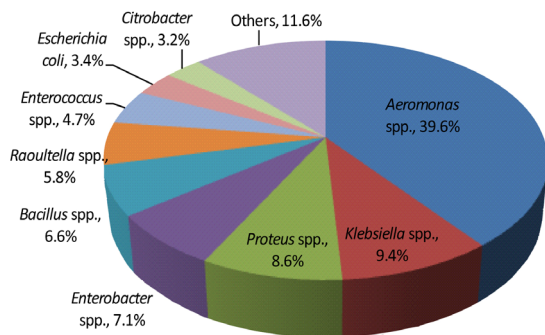


Fig. 2. Distribution of bacteria isolated from Han river(n=467).

인 등 환경적 요인에 따라 군집 구조가 민감하게 변화하는 것을 보고하였다. 또한 식품의약품안전청(27)은 환경 중 항생제 내성균 모니터링을 위해 한강, 금강, 낙동강, 영산강 유역과 하수, 축산폐수의 유입수 및 방류수에 대한 세균을 분리하여 *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Salmonella* spp., *Campylobacter coli/jejuni*를 동정할 수 있었다. 고 등(6)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%) 속 순서로 나타났으며, 이 외 *Sphingobium*, *Sphingobacterium*, *Comamonas*, *Chromobacterium*, *Pelomonas*, *Chryseobacterium* 등의 속이 동정되어 본 연구와 유사한 결과를 나타내었다.

본 연구에서 분리된 세균 중 *Bacillus* 속과 *Enterococcus* 속, *Staphylococcus* 속을 제외한 나머지 균들은 주로 그람음성균으로 토양, 물 등 환경 중에 널리 분포하며, 사람이나 동물의 분변에 존재하는 장내세균들이 우점하였다. 하지만 이들 균 중 *Klebsiella*은 대표적인 기회감염균으로 면역력이 저하되었을 때 비병원성균에 의해 감염증을 유발할 수 있다고 알려져 있으며(26, 28), 특히 *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*은 카바페넴 내성 장내세균(Cabapenem resistance Enterobacteriaceae)으로(29) 하천에서 분포 특성 조사와 지속적인 관리가 필요하다.

## 2. 지점별 군집 특성

지천과 분류, 하수 유입수 및 방류수에 대한 각 지점별 분리 세균의 분포 비율은 그림 3과 같으며, 모든 지점에서 *Aeromonas* 속이 가장 높고, *Proteus* 속, *Bacillus* 속, *Klebsiella* 속이 비교적 높게 검출되었다. 지점별 주요 특징은 *Acinetobacter* 속은 지천에서만 검출되었고 특히 *A. baumannii*는 중랑과 탄천 하류 지점에서 각 1주씩 검출되었다. *E. coli*와 *Serratia* 속은 지천과 하수에서만 검출되었다. 우선순위에는 다소 차이가 있으나 대부분 지천과 하수에서 검출되는 세균은 유사한 종이 많았으며, 특히 물재생센터가 위치한 중랑과 탄천 하류는 하수에서 검출되는 *E. coli*, *Enterobacter* 속, *Raoultella* 속 등이 동일하여 하수 방류수에 직접적인 영향을 받는 것으로 나타났다.

이에 반해 분류에서 분리된 세균은 지천과 하수에 비해 동정된 종의 수가 적고 단순하였으며 *Rhizobium* 속은 분류에서만 검출되었다. *Bacillus* 속이 지천과 하수에 비해 높은 비율을 나타낸 반면, 하수와 함께 *Proteus* 속은 지천에 비해 높은 비율을 나타내었다. 지천과 하수에서 검출되었던 *E. coli*는 검출되지 않았고 *Klebsiella* 속은 상대적으로 낮은 비율로서, 분류 보다 지천에서 분변오염에 대한 수질관리가 더 필요한 것으로 판단되었다.

하수는 분류와 시료 수는 비슷하나 다양한 종과 2배 이상의 많은 균주가 분리되었다. 지천과 분류에 비해 *Proteus* 속이 높았고, *Enterococcus* 속은 *E. gallinarum*, *E. faecium*, *E. hirae* 3종이 분리되었다. 또한 지천과 분류에서 불검출된 균들이 하수 유입수에서 다양하게 검출되었는데, 대표적으로 그람음성균은 *Salmonella* 속, *Pseudomonas* 속, 그람양성균은 *B. subtilis*, *Staphylococcus saprophyticus*가 검출되었다.

지점별 군집 특성을 비교한 결과, 서로 상이하고 지천에서 검출되는 일부 세균들이 하수 방류수에서 유래됨을 확인할 수 있었다. 또한 지역적 환경요인에 따라 미생물 군집의 변화가 있었으며, 향후 지속적인 모니터링을 통해 수질 감시 및 오염원 규명에 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

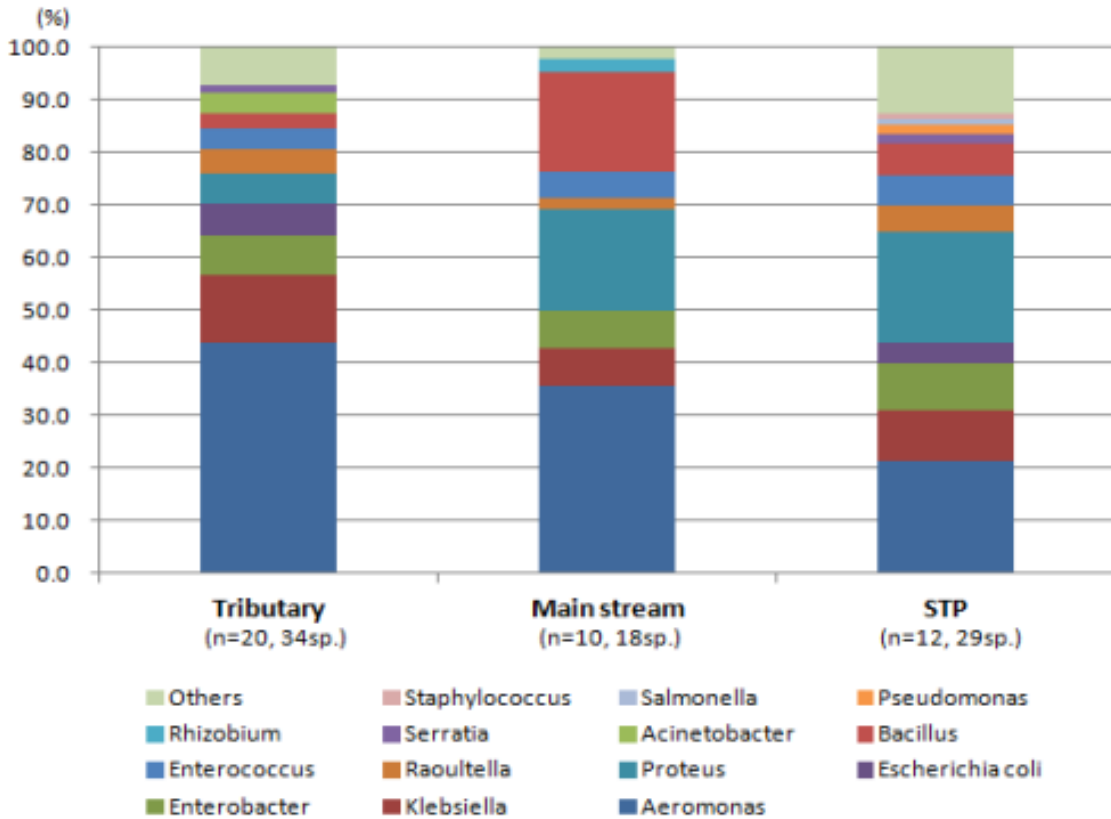


Fig. 3. Comparison of bacterial communities at the genus level by sites.

### 3. 주요 균의 항생제 감수성 시험

항생제 사용이 증가함에 따라 환경생태계 중 잔류성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있지만 잔류 물질이 항생제 내성균에 미치는 영향에 대한 연구는 전 세계적으로 미흡한 실정이다. 특히 항생제 내성이 문제가 되는 주요 병원균은 *Enterococci*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* species 등이 있다 (30). 하지만 본 연구결과 일부 균이 적은 수(5균주 이내)로 분리되어, 주요 우점균을 중심으로 *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter asburiae* 총 5종에 대해 항생제 감수성 시험과 지점별 항생제 내성 패턴의 변화를 중점적으로 실시하였다.

총 58 균주에 대한 항생제 감수성 시험 결과는

표 2와 같으며, 한 가지 이상의 항생제에 내성을 보인 균은 49주(84.5%)로 나타났다. 각 항생제에 대한 내성은 ampicillin이 41주(70.7%)로 가장 높았고, ampicillin/sulbactam, cefazolin, cefalotin, nalidixic acid 순으로 나타났다. Penicillin계와 cephalosporin계, quinolone계 중 이들 5종의 항생제 내성균이 전체 내성균주의 72.4%를 차지하였다. 일반적으로 penicillin계 항생제는 세포벽 합성을 억제하고, cephalosporin계 항생제는 세균 내 조직침투가 우수하여 penicillin의 대체 항생제로 사용되며, quinolone계 항생제는 핵산 합성 및 활성을 억제하는 것으로 알려져 있다(30). 특히 ampicillin은 사람의 치료를 목적으로 다른 항생제에 비해 더 빈번히 사용되어 항생제 내성률이 증가함에 따라(31), 하천 및 도시 하수 등에서 검출된 균들에 높은 내성이 있는 것으로 보고되었다(32, 33).

표 3은 시험 균주의 항생제 내성 양상으로 모두 28가지 패턴을 나타내었다. *Aeromonas* 속은 4주를 제외한 모든 균주에서 ampicillin에 내성이 있었고, 2개 이상의 항생제에 내성을 나타내었다. AM-SAM, AM-SAM-NAL, AM-SAM-CFZ 양상이 높았고, 3제 이하의 내성균이 61.9%를 차지하였다. 고 등(6)은 국내 하천에서 분리된 *Aeromonas* 속에서 6종 이상의 항생제에 내성을 보이는 균이 66%이며 그 중 7종 내성균이 19.7%로 가장 높았지만, 7종 이상의 다제내성균의 비율이 낮은 본 연구결과와는 다소 차이를 보였다.

*E. coli*는 2제 이상의 양상으로 nalidixic acid, ciprofloxacin, tetracycline, ampicillin, genta-

micin, trimethoprim/sulfamethoxazole 항생제에 내성을 나타내었다. 2006년 식품의약품안전청 연구(27)에 따르면 국내 하천과 하수, 폐수 유입수 및 방류수에서 분리된 *E. coli*의 경우 한 가지 이상의 항생제 내성을 보인 균은 72.5%이며, 네 가지 이상의 다제내성균은 35.3%로 보고한 바 있다. 특히 박(32)이 중국의 하천에서 분리된 *E. coli*의 13.8%가 ampicillin, tetracycline, trimethoprim/sulfamethoxazole에 내성이 있었다는 결과는 본 연구와 유사하였다.

*K. pneumoniae*는 5균주에서 ampicillin 단독 내성을 나타내었고, 3제 이상의 다제내성균도 5균주로 나타났다. 대표적인 기회감염균에 속하는

**Table 2.** Antimicrobial susceptibility rates of isolated *A. caviae*, *A. hydrophila*, *E. coli*, *K. pneumoniae* and *E. asburiae*

Antimicrobial	No. of isolates(%), n=58			
	Resistant	Intermediate	Susceptible	
Penicillin	AM	41(70.7)	6(10.3)	11(19.0)
	AMC	9(15.5)	6(10.3)	43(74.1)
	SAM	27(46.6)	7(12.1)	24(41.4)
	CF*	10(41.7)	2(8.3)	12(50.0)
	CFZ	27(46.6)	7(12.1)	24(41.4)
Cephalosporin	CTT	2(3.4)	0(0.0)	56(96.6)
	CXT	9(15.5)	5(8.6)	44(75.9)
	CTX*	0(0.0)	0(0.0)	24(100.0)
	CRO	2(3.4)	0(0.0)	56(96.6)
Carbapenem	IPM	5(8.6)	1(1.7)	52(89.7)
Aminoglycoside	AMK	1(1.7)	0(0.0)	57(98.3)
	GM	1(1.7)	1(1.7)	56(96.6)
Quinolone	NAL	21(36.2)	0(0.0)	37(63.8)
	CIP	3(5.2)	0(0.0)	55(94.8)
Tetracycline	TET	8(13.8)	3(5.2)	47(81.0)
Chloramphenicol	CHL	3(5.2)	4(6.9)	51(87.9)
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	SXT	5(8.6)	0(0.0)	53(91.4)

AM: ampicillin, AMC: amoxicillin/clavulanicAcid, SAM: ampicillin/sulbactam, CF: cefalotin, CFZ: cefazolin, CTT: cefotetan, CXT: cefoxitin, CTX: cefotaxime, CRO: ceftriaxone, IPM: imipenem, AMK: amikacin, GM: gentamicin, NAL: nalidixic acid, CIP: ciprofloxacin, TET: tetracycline, CHL: chloramphenicol, SXT: trimethoprim /sulfamethoxazole(\*n=24).

**Table 3. Antimicrobial resistance patterns by isolated bacteria type**

	Multi drug-resistant patterns	No. of resistant antibiotics	No. of isolates(%)	Sites
<b>A. caviae</b> (n=11, Tri.(8), M. stream(3))	AM-SAM	2	3(27.3)	Tri.(2), M. stream(1)
	AM-SAM-NAL	3	1(9.1)	Tri.
	AM-SAM-TET	3	1(9.1)	Tri.
	AM-NAL-TET	3	1(9.1)	M. stream
	AM-CFZ-NAL-CHL-SXT	5	1(9.1)	Tri.
	AM-SAM-CFZ-NAL-TET-CHL-SXT	7	1(9.1)	Tri.
	AM-SAM-CFZ-NAL-CIP-TET-CHL	7	1(9.1)	Tri.
<b>A. hydrophila</b> (n=23, Tri.(15), M. stream(4), STP*(4))	AM-CFZ	2	1(4.3)	Tri.
	AM-SAM-NAL	3	5(21.7)	Tri.(3), STP(2)
	AM-SAM-CFZ	3	5(21.7)	Tri.(3), M. stream(2)
	AM-IPM-TET	3	1(4.3)	STP
	AM-SAM-CFZ-NAL	4	3(13.0)	Tri.
	AM-SAM-CFZ-CRO	4	1(4.3)	Tri.
	AM-SAM-CFZ-IPM-SXT	5	1(4.3)	Tri.
	AM-SAM-CFZ-CXT-IPM-NAL	6	1(4.3)	Tri.
	AM-AMC-SAM-CFZ-IPM-NAL	6	2(8.7)	Tri.(1), M. stream(1)
	AM-AMC-SAM-CFZ-CRO-SXT	6	1(4.3)	Tri.
<b>E. coli</b> (n=6, Tri.(4), STP(2))	NAL-CIP	2	1(16.7)	Tri.
	NAL-CIP-TET	3	1(16.7)	Tri.
	AM-GM-TET-SXT	4	1(16.7)	STP
<b>K. pneumoniae</b> (n=11, Tri.(5), M. stream(2), STP(4))	AM	1	5(45.5)	Tri.(1), M. stream(2), STP(2)
	AM-CF-CFZ	3	2(18.2)	Tri.
	AM-SAM-CF	3	1(9.1)	Tri.
	CIT-CXT-AMK-NAL-TET	5	1(9.1)	Tri.
	AM-AMC-CF-CFZ-CXT-NAL	6	1(9.1)	M. stream
<b>E. asburiae</b> (n=7, Tri.(5), STP(2))	AMC-CF-CFZ-CXT	4	4(57.1)	Tri.(3), STP(1)
	CF-CFZ-CXT-NAL	4	1(14.3)	STP
	AM-AMC-CF-CFZ-CIT-CXT	6	1(14.3)	Tri.

\*STP : Effluent water.



*E. coli*와 *K. pneumoniae*는 최근 카바페넴 내성 장내세균으로 알려져 있으나, imipenem 항생제에서 내성은 없었다. *E. asburiae*는 모두 4제 이상의 항생제 내성을 나타내었으며, AMC-CF-CFZ-CXT 양상이 57.1%로 가장 높았다.

또한 표 3에서 동일 균주라도 채취 지점에 따라 서로 다른 항생제 내성 패턴을 보여, 향후 내성유전자의 전파기전과 유전학적 유연관계를 고려하여 내성균의 변화 양상을 조사할 필요가 있다. 특히 인구와 산업 공단이 밀집되어 있는 지역, 하수처리장이 위치한 지역은 항생제 내성균의 하천 유입과 항생제 감수성균의 내성획득 기회가 상대적으로 높기 때문에(6) 안전한 수계 관리를 위한 추가 연구가 필요하다.

## 결 론

본 연구는 미생물 동정 장비인 MALDI-TOF MS를 이용하여 한강 지천과 분류, 하수 유입수 및 방류수에서 분리한 균의 미생물 군집 특성 조사와 항생제 감수성 시험을 통해 검출 세균의 내성여부를 분석하였다. 전체 66건 시료에서 467종의 균주를 분리하였으며, *Aeromonas* 속 39.6%, *Klebsiella* 속 9.4%, *Proteus* 속 8.6%, *Enterobacter* 속 7.1% 순으로 조사되었고 환경 중에서 검출될 수 있는 다양한 세균들을 확인할 수 있었다.

지천과 분류 그리고 하수 유입수 및 방류수 지점별 군집 특성을 비교한 결과, 지천에서 검출된 일부 세균들은 하수 방류수에서 유래됨을 알 수 있었다. 또한 지천과 하수 시료에서 검출된 *E. coli*는 분류에서 검출되지 않았으며 *Klebsiella* 속은 상대적으로 낮아, 분류 보다 지천에서의 분변 오염에 대한 수질관리가 더 필요한 것으로 판단되었다.

한강수계에서 분리된 주요 우점균 5종에 대한 항생제 감수성을 조사한 결과, 한 가지 이상의 항생제에 내성을 보인 균은 84.5%로 penicillin계와 cephalosporin계, quinolone계 항생제에 높은 내성을 나타내었다. 또한 동일 균주라도 채취 지점

에 따라 서로 다른 항생제 내성 패턴을 보여, 향후 안전한 수계 관리를 위해 하천뿐만 아니라 하수처리장에 대한 항생제 내성균의 지속적인 모니터링과 내성균의 전파 기전, 변화 양상 그리고 병원성 유무에 대한 추가 연구가 필요할 것이다.

## 참고문헌

1. ECDC : Assessing the potential impacts of climate change on food and waterborne disease in Europe, ECDC Technical Report, 2012.
2. Baquero, F, Martinez, J-L and Canton, R : Antibiotics and antibiotic resistance in water environments, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 19:260~265, 2008.
3. Golet, EM, Alder, AC and Giger, W : Environmental exposure and risk assessment of fluoroquinolone antibacterial agents in wastewater and river water of the Glatt valley Watershed, Switzerland, *Environ. Sci. Technol.*, 36:3645~3651, 2002.
4. Rodriguez-Mazaz S and Weinberg HS : Meeting report: Pharmaceuticals in water-An interdisciplinary approach to a public health challenge, *Environ. Health Perspect*, 118:1016~1020, 2010.
5. Zhao L, Dong YH and Wang H : Residues of veterinary antibiotics in manures from feedlot livestock in eight provinces of China, *Sci. Total Environ.*, 408:1069~ 1075, 2010.
6. 고은별, 정인영, 김혁, 석광설, 김벼리, 유용재, 장예진, 채종찬 : 국내 하천에 분포하는 ampicillin 내성균의 다양성, *한국미생물학회지*, 51(4):440~443, 2015.
7. Scott, TM, Rose, JB, Jenkins, TM, Farrah, SR and Lukasik, J : Microbial source tracking; Current methodology

- and future directions, *Appl. Environ. Microbiol.*, 68:5796~5803, 2002.
8. Simpson, JM, Santo Domingo, JW and Reasoner, DJ : Microbial source tracking : State of the science, *Environ. Sci. Technol.*, 36:5279~5288, 2002.
  9. Stoeckel, DM and Harwood, VJ : Performance, design, and analysis in microbial source tracking studies, *Appl. Environ. Microbiol.* 73:2405~2415, 2007.
  10. 정진, 박상정, 운노타쯔야 : Pyrosequencing 을 이용한 하절기 영산강 유역의 Phylum 계층의 세균 군집 조사, *미생물학회지*, 49(2): 150~155, 2013.
  11. 국립환경과학원: 수환경에서의 미생물 생태조사 및 수생태계 영향 연구(I), 2013.
  12. 김병혁, 조대현, 성열봉, 안치용, 윤병대, 고성철, 오희목, 김희식: DGGE를 이용한 PCE 및 TCE의 혐기적 탈염소화 군집의 미생물 군집분석, *한국미생물학회지*. 38(4):448~454, 2010.
  13. 한국연구재단, 수계 내에 존재하는 병원성 미생물의 분포 조사, 2015.
  14. 이영옥, 박지은, 신승필, 안영희: FISH법을 이용한 낙동강 상·중·하류의 세균군집 구조 분석, *한국물환경학회지*, 19(3):311~320, 2003.
  15. Gonzalez, JM, A. Ortiz-Martinez, MA, GonzalezdelValle, L. Laiz and Saiz-Jimenez C : An efficient strategy for screening large cloned libraries of amplified 16S rDNA sequences from complex environmental communities, *J. Microbiol. Methods* 55:459~463, 2003.
  16. Koizumi, Y, Kojima, H and Fukui, M : Characterization of depth-related microbial community structure in lake sediment by denaturing gradient gel electrophoresis of amplified 16S rDNA and reversely transcribed 16S rRNA fragments, *FEMS Microbiol. Ecol.* 46:147~157, 2003.
  17. Muyzer, G : 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems., *Curr. Opin. Microbiol.* 2:317~322, 1999.
  18. 정주용, 이경희 : 유전자지문분석법(T-RFLP)을 이용한 하천 미생물의 다양성 평가, *한국물환경학회지*, 24(2):195~200, 2008.
  19. 국립환경과학원, 기후변화 대응 환경중 유해 미생물 감시기법 개발2: 102~114, 2011.
  20. Biswas, S and Rolain, JM : Use of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of bacteria that are difficult to culture, *Journal of Microbiological Methods*, 92(1):14~24, 2013.
  21. Sonja O., Antje W., Thomas M., Markus K., Sarah R., Gunnar G.: A polyphasic approach for the differentiation of environmental *Vibrio* isolates from temperate waters, *FEMS Microbiol Ecol.* 75:145~162, 2011.
  22. Marius, D, Per, EG, Per, B, Janet, MB : Characterization of Airborne Bacteria at an Underground Subway Station, *Appl. Environ. Microbiol.* p.1917~1929, 2012.
  23. Laura, SC, Carles, V, Belen, G, Anicet, and R Blanch : Use of matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for bacterial monitoring in routine analysis at a drinking water treatment plant, *J Hygiene and Environmental Health*, 219:577~584, 2016.
  24. Ondrej, U, Michal, S, Petra, J, Miloslav, S, Miluse, H, Cestmir, V, Martina, M and Tomas M : Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) - Time of Flight Mass Spectrometry-and MALDI Biotyper-Based Identification of Cultured

- Biphenyl-Metabolizing Bacteria from Contaminated Horseradish Rhizosphere Soil, *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(19): 6858~6866, 2011.
25. 손준형, 전우진, 이영미, 김선수: 돼지유래 Salmonella속 균의 동정을 위한 MALDI TOF MS 활용, *한국가축위생학회지*, 39(4): 247~251, 2016.
  26. 정효원, 정지현, 박상훈, 승현정, 오세아, 신명희, 권은영, 김경식, 오영희: MALDI-TOF MS를 이용한 장내 기회감염균 조사, *서울특별시 보건환경연구원보*, 51:155~163, 2015.
  27. 식품의약품안전청, 환경 중 항생제내성균 모니터링(강과 하천을 중심으로), 2006.
  28. Araneo, BA, Cebra, JJ, Beuth, J, Fuller, R, Heidt, PJ, Midvedt, T, Nord, CE, Nieuwenhuis, P, Manson, WL, Pulverer, G, Rusch, VC, Tanaka, R, Van Der Waaif, D, Walker, RI, Wells, CL: Problems and priorities for controlling opportunistic pathogens with New antimicrobial strategies; an Overview of Current Literature, *Zbl. Bakt.*, 283:431~465, 1996.
  29. Netikul, T and Kiratisin, P : Genetic characterization of carbapenem - Resistant Entero -bacteriaceae and the spread of carbapenem - Resistant *Klebsiella pneumonia* ST340 at a university hospital in Thailand, *PLOS ONE*, 25:10(9):e0139116, 2015.
  30. 국립환경과학원, 환경 중 항생제 내성균 관리 방안 마련( I ) 최종보고서, 2013.
  31. 윤상훈, 김선경, 김난희, 위환, 이세행, 조광운, 김동수, 조영관: 물놀이형 수경시설의 수질과 항생제 내성 대장균 분포에 관한 연구, *한국환경보건학회지*, 40(3):225~233, 2014.
  32. 박준홍: 환경 내 항생제 내성 세균 및 유해성에 관한 국내 조사 현황, *Infection and Chemotherapy*, 40(2):S150~157, 2008.
  33. 오향균, 박준홍: 도시하수 및 그 주변 하천 환경 중 항생제 내성 세균 노출 특성, *대한환경공학회지*, 31(3):232~239, 2009.