

# 요 약 문

## I. 연구개요

- 우리나라는 항생제의 사용 빈도가 세계에서 가장 높은 국가 중 하나이며, 현재 OECD 가입국 중 다제 내성의 병원성 세균 (소위 슈퍼박테리아)의 출현 가능성이 높은 국가로 분류되어 있는 실정임
- 도시 하수에는 현대사회에서 막대한 양이 소비되는 의약품 (항생제), 살균제, 위생용품, 미세플라스틱, 중금속, 나노물질 등이 존재하고 이들은 대부분 하수처리장을 통해 수환경으로 유입되고 있음
- 다른 환경매체와 달리 하수 환경은 항생제 내성 유전자 및 박테리아의 다양성이 비교적 높고, 하수처리시설은 아래 그림과 같이 다양한 항생제 내성 유전자와 박테리아가 유입되고 증식될 수 있는 hotspot으로 여겨지고 있음

## II. 연구의 필요성 및 목적

- 부산의 경우 우리나라의 제2의 대도시이며, 해안도시이기 때문에 하수처리시설의 유출수에 포함되어 있는 항생제 내성 유전자와 박테리아가 해양환경까지 급속히 확산될 수 있어 피해의 범위와 위해성이 상당히 높음에도 불구하고, 하수처리시설 내 항생제 오염에 대한 현황과 실태에 대한 조사가 매우 미미한 실정임
- 이에 본 연구에서는 빅데이터 기반의 Shotgun Metagenomics 기술을 활용하여 부산 도시 하수처리시설 내 항생제 내성 유전자 및 박테리아의 분포와 항생제 오염 실태를 신속하고 정확하게 파악하고 자 함

## III. 연구의 내용 및 범위

- 하수처리시설의 유입수와 반응조, 유출수에서 항생제 내성 유전자와 박테리아 분포 및 추세 파악
  - 본 연구를 위해 부산시 주요 도시 하수처리시설에서 연구기간 동안 주기적으로 샘플링(유입수, 반응조, 유출수)을 실시하고 지속적인 모니터링을 수행

- 항생제 내성 유전자 및 박테리아의 전수조사를 위해 빅데이터 기반의 첨단 염기서열 기법인 Metagenomics 방법을 활용할 것이며, 최근 빅데이터와 함께 각광받고 있는 기술인 첨단 생물정보학(Bioinformatics) 방법을 활용하여 종합적인 항생제 내성 정보 (diversity, occurrence, abundances)와 미생물 군집 분석

#### ○ 하수처리시설 내 항생제 내성 유전자와 박테리아 간 상호연관관계 파악

- 추출된 항생제 내성 유전자와 박테리아의 co-occurrence pattern이나 연관관계를 파악하기 위해 Network 분석

#### ○ 하수처리시설 주요 항생제 내성 오염물질 및 유전자 정보 list 화

- 주요 항생제 내성 오염물질 및 유전자 정보 list up

## IV. 연구결과

- 봄부터 가을까지 부산시 하수처리시설에서 검출된 항생제 내성물질은 총 24개물질이었으며, 조사가 진행된 모든 하수처리시설(A, B, C, D; 총 4곳)에서 multidrug resistance와 MLS (macrolide-lincosamide-streptogramin) resistance, tetracycline resistance가 높은 빈도로 검출이 되었음. 계절별로 약간의 차이는 있으나, 이 세 가지 항생제가 전체 검출된 항생제의 약 70% 이상을 차지하고 있는 것으로 나타남
- 본 연구에서는 항생제 농도가 유입수-생물반응조-유출수에서 변화하는 추세를 확인하기 위해 염기서열 기반의 ppm 단위로 환산하여 항생제 농도를 분석하였음. 그 결과 모든 하수처리시설의 유입수에서 aminoglycoside, MLS, multidrug, tetracycline의 농도가 100ppm 이상 (120~140ppm)의 고농도인 것으로 나타났으나, 슬러지와 유출수에서는 10~40ppm 정도의 농도로 감소하는 것으로 나타남. 계절별로 약간의 차이는 있었으나, 전반적으로 85~95%의 효율로 운영중인 하수처리시설에서 항생제가 제거되고 있음을 확인함
- 계절별로 검출 빈도수가 높은 내성 유전자를 추출하여 Heatmap 분석을 실시한 결과, 대부분의 항생제 내성 유전자는 처리과정을 거치면서 제거가 되는 것으로 나타났으나, aac2-1, aadA (aminoglycoside 계열), bacA (bacitracin 계열), OXA resistance gene, GES-15 (beta-lactam 계열), ereA, ermF (MLS 계열), amrB, ceoB, mdtB (multidrug 계열), sul2 (sulfonamide 계열), tetA, tetC, tetM, tetG, (tetracycline 계열) 등의 일부 내성 유전자는 제거가 되지 않거나 처리 과정 중 증가하는 것으로 나타남
- 염기서열 분석결과의 신뢰성 확보를 위해 일부 유출수 샘플을 R2A, LB agar에 배양을 한

후, 항생제 (ampicillin, tetracycline, 다제내성(ampicillin+tetracycline))를 접종한 결과 항생제를 접종한 모든 배지에서 미생물이 증식하고 있음을 확인함. 이를 통해 실제 유출수에서 항생제 내성을 가지고 있는 미생물이 존재하고 있고 빅데이터 기반의 대용량 염기서열분석결과의 신뢰성을 확보할 수 있었음

- 각 하수처리시설별 유입수-생물반응조 슬러지-유출수의 항생제 물질간 통계적으로 차이가 있는지 분석하기 위해 PCoA 분석을 실시하였고, 유입수와 생물반응조 슬러지-유출수로 모두 구분되어 그룹핑 되는 것을 확인할 수 있었음. 이러한 결과는 각 하수처리시설별로 유입되는 항생제 물질이 비슷하지만, 생물반응조와 유출수에서 잔존해 있는 항생제 물질의 구성에 차이가 있음을 나타내는 것으로 판단됨
- Metagenomic 기반의 염기서열 (96.8~98.4 %)은 계통학적으로 박테리아인 것으로 나타났으며, 각 하수처리시설별 미생물 생태군집을 보다 잘 파악하기 위해 phylum level과 genus level로 구분하여 분석을 진행함
- 유입수-슬러지-유출수 각각의 미생물 군집을 Phylum 수준에서 분석한 결과, 계절별, 하수처리 규모와 용량, 공법과는 무관하게 거의 일정한 미생물 군집을 이루고 있었으며, 대부분 Proteobacteria (30~50%)와 Actinobacteria (20~25%), Bacteroidetes (5~10%)에 속하는 미생물 군집이 우점하고 있음을 확인할 수 있었음. 이러한 미생물 군집 분석결과는 서울, 광주, 대구 등의 선행연구들에서 주로 검출되고 있는 미생물 군집과 유사하며, 해외의 하수처리시설에서 검출되고 있는 미생물 군집과도 대부분 일치하는 결과임
- Genus 수준에서 미생물 군집을 분석한 결과, A~D 하수처리시설에서 우점하는 미생물 조성이 계절별로 상당히 차이가 있음을 확인할 수 있었음. 봄철 샘플의 경우, *Tetrasphaera*, *Mycolicibacterium*, *Micropruina*, *Pseudomonas*, *Nitrospira* genus 등이 약 20% 정도로 슬러지 샘플에서 우점하고 있었으며, 유출수의 경우에는 주로 슬러지에서 검출되었던 미생물이 여전히 우점하고 있는 것으로 검출되었음. 여름철 샘플의 경우, 유기오염물질과 질소, 인 제거에 기여하는 *Pseudomonas*, *Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Escherichia*, *Mycobacterium*, *Dechloromonas*, *Acidovorax*, *Chitinophaga*, *Sorangium* genus 등의 미생물이 약 20~30%로 상대적으로 우점하고 있었음. 가을철의 경우, *Tetrasphaera*, *Nitrospira*, *Pseudomonas*, *Dechloromonas*, *Nitromonas*, *Mycobacterium*, *Sorangium*, *Candidatus Accumulibacter* genus 등이 약 15~20% 정도 우점하고 있었으며, 여름 샘플과 비교하였을 시 큰 차이가 없는 것으로 분석이 되었음
- 하수처리과정에서 스트레스가 미생물들에게 주어지기 때문에 잠재적으로 내성 유전자의 수평적 유전자 전이(HGT) 메커니즘이 나타나 항생제 내성을 전파시킬 수 있음. 이에 본 연구에서는 HGT의 주요 인자인 mobile genetic elements (MGEs) 분석을 실시함

- 수평적 유전자 전이 가능성 분석 결과, HGT를 빠르게 촉진시킬 수 있는 MGEs 인자인 plasmid, integron, transposon이 매우 다양하고 높은 수준으로 부산시 하수처리시설에서 존재하고 있음을 파악할 수 있었음
- 실제 MGEs가 항생제 내성 유전자들과 상호연관관계를 가지고 있는지 통계적으로 검토하기 위해 네트워크 분석을 실시하였고, class 1 integron gene인 *Int1*은 *tetG*, *sul1*, *sul2*, *mefA*, *ereA*, *mexE* 등의 내성 유전자가 증가하면서 유의미한 양의 상관관계( $p < 0.05$ )를 가지는 것으로 나타났음. 또한, 하수 내 미생물 군집이 항생제 내성 유전자의 수평전이에 미치는 영향도 크기 때문에, 본 연구에서는 항생제 내성 유전자와 주요 미생물들과의 네트워크 관계를 분석하였음. 분석결과, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Bacteroides*, *Mycobacterium* 및 *Dechloromonas* 속은 활성화된 하수처리과정에서 *ermB*, *ermF*, *sul1*, *tetM* 및 *tetX*와 같은 여러 주요 ARG와 통계적으로 유의성을 가지고 있으면서, 상호연관관계가 높은 것으로 나타났음. 이러한 분석 결과를 통해 부산시 하수처리시설의 유출수에서 항생제 내성이 HGT를 통해 미생물에 전파되고 전이될 수 있을 잠재적 가능성이 있는 것으로 예상됨
- 하지만, 본 연구와 같이 단기 모니터링 결과만을 기반으로 하수처리과정 중 항생제 내성이 변화하는 원인에 대한 명확한 결론을 내리기는 어려운 한계점이 있음. 현재 metagenomics 기반의 대용량 염기서열 분석방법이 상용화되고 보편화되고 있는 추세이기 때문에 하폐수 환경에서 오염되어 있는 항생제 물질을 검출하고 분석하는데 유용할 것으로 보임
- 특히, 2003년 미국 미생물학회에 제출된 ‘Microbial Communities : From Life Apart to Life Together’에 따르면 항생제 내성은 미생물간의 작용으로 더욱 강화 될수 있으며 이러한 내성을 해결하기 위해 EPA (United States Environmental Protection Agency)에선 Metagenomic 기반의 분석을 통해 주요 항생제 오염현황과 내성유전자를 파악한 뒤, 지속적이고 장기적인 모니터링 체계를 마련해야할 필요가 있음을 제안하였음. 이러한 분위기로 인해 실제 EPA에서는 스크리닝된 일부 ARGs와 미량오염물질을 qPCR을 통해 모니터링하고 있는 것으로 조사됨
- 또한, 스위스의 연방환경청(FOEN, Federal Office of the Environment)도 2002년부터 미량오염물질에 대한 관리방안 및 수질보호법을 제정하여 항생제 내성물질에 대한 조사를 시행하고 있음
- 따라서, 빅데이터 기반의 대용량 염기서열 분석방법을 활용하여 장기적인 모니터링과 항생제 관련 자료 및 하수처리시설의 운영자료 등을 복합적으로 확보하고, 이를 체계적으로 분석하고 DB화 할 수 있는 종합적인 연구가 추후에 필요함. 또한, 이를 활용하여 하수처리기술개발 R&D 사업도 병행되어야 할 필요가 있는 것으로 사료됨

## V. 연구결과의 활용계획

- 본 연구에서 사용되는 방법과 결과는 향후 부산시 도시 하수처리시설을 개보수하고, 설계 및 운영할 시 항생제 내성을 컨트롤 할 수 있는 과학기술을 개발하는데 기여할 수 있을 뿐만 아니라, 토양/지하수, 대기, 하천, 해양환경 등의 환경 전분야에서 항생제 내성 오염 여부를 조사하고 판단하는데 필요한 기술과 배경정보를 제공할 수 있을 것으로 기대함
- 주요 연구결과를 활용하여 향후 부산시의 항생제 내성오염 현황을 파악하고 오염 저감을 위한 정책 및 관리방안을 마련하는데 필요한 과학적 근거자료로 폭넓게 활용될 수 있음
- 본 연구에서 사용되는 방법과 결과는 향후 부산시 도시 하수처리시설을 개보수하고, 설계 및 운영할 시 항생제 내성을 컨트롤 할 수 있는 과학기술을 개발하는데 기여할 수 있음