

Research Article



CrossMark

Open Access

## 사람 및 가축 유래 분변 미생물 군집과 항생제 내성 유전자 간 상관 관계에 대한 연구

정지원<sup>†</sup>, 반다리 아프라지타<sup>†</sup>, 운노 타쓰야<sup>\*</sup>

제주대학교 생명자원과학대학 분자생명공학전공(생명공학부)

### Co-occurrence Analyses of Antibiotic Resistance Genes and Microbial Community in Human and Livestock Animal Feces

Jiwon Jeong<sup>†</sup>, Aprajita Bhandari<sup>†</sup>, Tatsuya Unno<sup>\*</sup> (Molecular Biotechnology (Faculty of Biotechnology), College of Applied Life Sciences, Jeju National University, Jeju 63243, Korea)

Received: 15 December 2022/ Revised: 20 December 2022/ Accepted: 21 December 2022

Copyright © 2022 The Korean Society of Environmental Agriculture

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

#### ORCID

Jiwon Jeong

<https://orcid.org/0000-0001-7159-8722>

Aprajita Bhandari

<https://orcid.org/0000-0002-6505-4267>

Tatsuya Unno

<https://orcid.org/0000-0003-2373-2100>

#### Abstract

**BACKGROUND:** Antibiotics used in animal husbandry for disease prevention and treatment have resulted in the rapid progression of antibiotic resistant bacteria which can be introduced into the environment through livestock feces/manure, disseminating antibiotic resistant genes (ARGs). In this study, fecal samples were collected from the livestock farms located in Jeju Island to investigate the relationship between microbial communities and ARGs.

**METHODS AND RESULTS:** Illumina MiSeq sequencing was applied to characterize microbial communities within each fecal sample. Using quantitative PCR (qPCR), ten ARGs encoding tetracycline resistance (*tetB*, *tetM*), sulfonamide resistance (*sul1*, *sul2*), fluoroquinolone resistance (*qnrD*, *qnrS*), fluoroquinolone and aminoglycoside resistance (*aac(6)-Ib*), beta-lactam resistance (*bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>CTX-M</sub>*), macrolide resistance (*ermC*), a class 1 integron-integrase gene (*int11*), and a class 2 integron-integrase gene (*int12*) were quantified. The results showed that *Firmicutes* and *Bacteroidetes* were dominant in human,

cow, horse, and pig groups, while *Firmicutes* and *Actinobacteria* were dominant in chicken group. Among ARGs, *tetM* was detected with the highest number of copies, followed by *sul1* and *sul2*. Most of the genera belonging to *Firmicutes* showed positive correlations with ARGs and integron genes. There were 97, 34, 31, 25, and 22 genera in chicken, cow, pig, human, and horse respectively which showed positive correlations with ARGs and integron genes. In network analysis, we identified diversity of microbial communities which correlated with ARGs and integron genes.

**CONCLUSION(S):** In this study, antibiotic resistance patterns in human and livestock fecal samples were identified. The abundance of ARGs and integron genes detected in the samples were associated with the amount of antibiotics commonly used for human and livestock. We found diverse microbial communities associated with antibiotic resistance genes in different hosts, suggesting that antibiotic resistance can disseminate across environments through various routes. Identifying the routes of ARG dissemination in the environment would be the first step to overcome the challenge of antibiotic resistance in the future.

<sup>†</sup>These two authors contributed equally to this work.

\* Corresponding author: Tatsuya Unno

Phone: +82-64-754-3354; Fax: +82-64-756-3351;

E-mail: [tatsu@jejunu.ac.kr](mailto:tatsu@jejunu.ac.kr)

**Key words:** Animal husbandry, Antibiotic resistance genes

(ARGs), High-throughput sequencing (MiSeq), Network analysis, Quantitative PCR (qPCR)

## 서론

지난 수십 년간 사람의 질병 치료[1], 가축의 전염병 예방 및 성장 촉진을 목적으로 항생제가 널리 사용되어 왔다[2]. 그러나 이러한 여러 가지 이점에도 불구하고, 항생제 내성균의 출현으로 인해 항생제 사용에 대한 문제가 공중 보건 문제로 제기되고 있으며, 세계보건기구(WHO)에서는 2050년 항생제 내성균에 의한 사망자 수가 연간 1,000만 명에 도달할 것으로 예측했다[3]. 이러한 우려 때문에 많은 국가들에서는 매년 항생제 사용량에 대한 모니터링을 실시하고 있다[4, 5]. 2021년 보건복지부에서는 국내 인체 항생제 사용량이 경제협력개발기구(OECD) 국가 가운데 3번째로 높다고 발표하였다. 또한 식약처와 농림축산식품부에서 발표한 『2020년 국가 항생제 사용 및 내성 모니터링(동물, 축산물)』에 따르면 축산업계로 판매된 항생제의 총 양이 2013년에는 820톤이었으나, 점차 증가하여 2020년에는 895톤에 이르렀다고 보고했다. 축종별로는 돼지, 닭, 소 순으로 항생제가 많이 판매되었으며 각각 전체 판매량 중 55%(507톤), 17%(155톤), 11%(99톤)를 차지하였다. 항생제 사용량이 점차 증가함에 따라 다제내성균을 포함한 항생제 내성균의 출현 빈도가 높아지기 시작했으며, 가축 분변 유래 항생제 내성균이 환경으로 유입되어 항생제 내성 전파가 가속화되고 있다[6]. 여러 계열의 항생제에 대한 내성 유전자를 가지고 있는 항생제 내성균이 가축 분변에서 검출되었고 이는 항생제 사용량과 밀접한 관련이 있는 것으로 나타났다[7]. 가축에서 유래된 항생제 내성균은 비료로 만들어진 가축 분변을 통해 환경으로 유입되고 있다[8]. 가축 분변을 처리하는 과정에서 사라지지 않고 남아있던 잔류 항생제는 항생제 내성균에 의해 우리 주변의 환경으로 전파되어 항생제 내성의 발달을 촉진한다[9]. 항생제 내성에 관한 선행 연구들에서는 환경에서 분리된 항생제 내성균과 임상에서 분리된 항생제 내성균이 가지고 있는 ARG의 염기서열이 높은 비율로 일치하는 결과를 발표했으며[10], 이는 환경 내 ARG가 가축 분변에서 기원했다는 하나의 근거 자료로 이용되고 있다[11, 12].

ARG는 플라스미드, 인테그론(integron), 트랜스포존(transposon) 등의 이동성유전 인자(MGE; mobile genetic elements)에 의해 동종 혹은 이종간 전달될 수 있다[13]. 특히 인테그론의 경우, 유전자 카세트(cassette)를 쉽게 포착하고 통합할 수 있으며, 이는 항생제 내성 전파에 큰 영향을 미친다[14]. 이러한 기작을 통해 일부 박테리아는 다제 내성을 확보할 수 있으며, 환자들에게 전파되었을 때 병원내 감염의 주요 원인으로 작용할 수 있다[15, 16]. 가축 농장과 같이 박테리아가 항생제에 지속적으로 노출되는 환경에서는 ARG가 빠르게 전파될 수 있기 때문에 이동성 유전 인자를 포함하여 연구를 진행할 필요가 있다.

정량적 PCR (quantitative PCR, qPCR)은 환경 샘플에 존재하는 ARG의 양을 파악하는데 이용될 수 있다[17-19]. 따

라서 본 연구에서는 MiSeq과 qPCR 방법을 사용하여 가축과 사람의 분변에서 나타나는 항생제 내성 패턴을 파악하고 ARG를 가진 숙주를 예측하고자 했다. 본 연구는 다환경 항생제 내성균 모니터링 시스템 구축에 활용될 수 있을 것이다.

## 재료 및 방법

### Site descriptions and sample preparation

본 연구에서 사용한 분변 시료는 제주도 소제 돼지 농장 4곳, 소 농장 4곳, 닭 농장 5곳, 승마장 5곳에서 채취하였으며, ice box에 담아 운반하였다. 사람 분변의 경우 기저질환을 갖고 있지 않은 건강한 성인 남녀 5명으로부터 기증받았다. 모든 분변 시료들은 채취 당일 homogenization한 뒤 동결건조하였으며, 그 후 3개로 나누어 DNA 추출 전까지 -80°C에서 보관하였다.

### genomic DNA 추출

분변 내 미생물의 genomic DNA를 추출하기 위해 QIA-amp PowerFecal Pro DNA Kit (QIAGEN, Germany)를 사용하였으며 제조사의 방법에 따라 DNA를 추출하였다. 닭 분변의 경우 DNA 추출과정에서 inhibitor로 작용하는 요산을 포함하고 있을 수 있기 때문에 다음과 같은 lysis 과정을 추가적으로 진행하였다. 800 µl의 lysis 용액을 닭의 분변이 들어있는 micro tube에 넣고 65°C에서 20분 간 incubate하였다. 이후의 과정은 다른 시료들과 같이 제조사의 방법에 따라 진행하였다.

### 사람 및 축종 별 분변 미생물 군집 분석

MiSeq library는 Illumina의 16S metagenomic library prep guide sequencing을 참고하여 2-step PCR protocol로 제작하였다. 추출된 genomic DNA를 주형으로 16S rRNA의 V3-V4 영역을 증폭시키는 primer 쌍(Forward: TCGT CGGC AGCG TCAG ATGT GTAT AAGA GACA GCCT ACGG GNGG CWGC AG, Reverse: GTCT CGTG GGCT CGGA GATG TGTA TAAG AGAC AGGA CTAC HVGG GTAT CTAA TCC)과 KAPA HiFi HotStart ReadyMix polymerase chain reaction (PCR) kit (Roche, CA, USA)를 사용하여 PCR을 진행하였다. PCR 산물은 HiAccuBead를 사용하여 정제과정을 한 번 더 정제하였고, Illumina에서 제공한 barcode 서열을 2차 PCR을 통해 부착하였다. HiAccuBead를 사용하여 정제과정을 한 번 더 거친 뒤 library pooling 과정을 진행했으며, pooling된 library를 마크로젠(Macrogen, Seoul, South Korea)에 의뢰하여 MiSeq 시퀀싱을 진행하였다.

미생물 군집 분석을 위해 Mothur 소프트웨어를 사용했다. 16S rRNA 유전자의 모든 원시 시퀀싱 데이터는 Mothur SOP ([https://mothur.org/wiki/miseq\\_sop/](https://mothur.org/wiki/miseq_sop/))에 따라 다음과 같이 처리되었다. 1) low quality read를 trimming, 2) SILVA[20] DB 기반 aligning, 3) VSEARCH[21]를 이용

하여 chimera 서열 제거, 4) Opti-clust 알고리즘[22] 기반 97% 유사성 기준 operational taxonomic units (OTUs) clustering. Diversity를 계산하기에 앞서 샘플 당 11,348개의 read를 랜덤으로 추출하였으며, Mothur의 merge.groups command를 이용하여 triplicate 샘플을 하나로 병합했다. Alpha-diversity (i.e., Chao, Shannon, Invsimpson)는 Mothur를 이용하여 계산하였고 beta-diversity는 R의 vegan

package를 이용하여 Bray-Curtis 거리를 계산한 뒤 non-multidimensional scaling (NMDS)으로 시각화하였다. 항생제 내성 유전자의 abundance와 미생물 군집 간의 관계를 파악하기 위해 R vegan package의 envfit을 이용했으며, envfit결과는 NMDS 상 화살표로 표시하였다. Taxonomic composition은 R의 pheatmap를 이용해서 heatmap으로 시각화하였다.

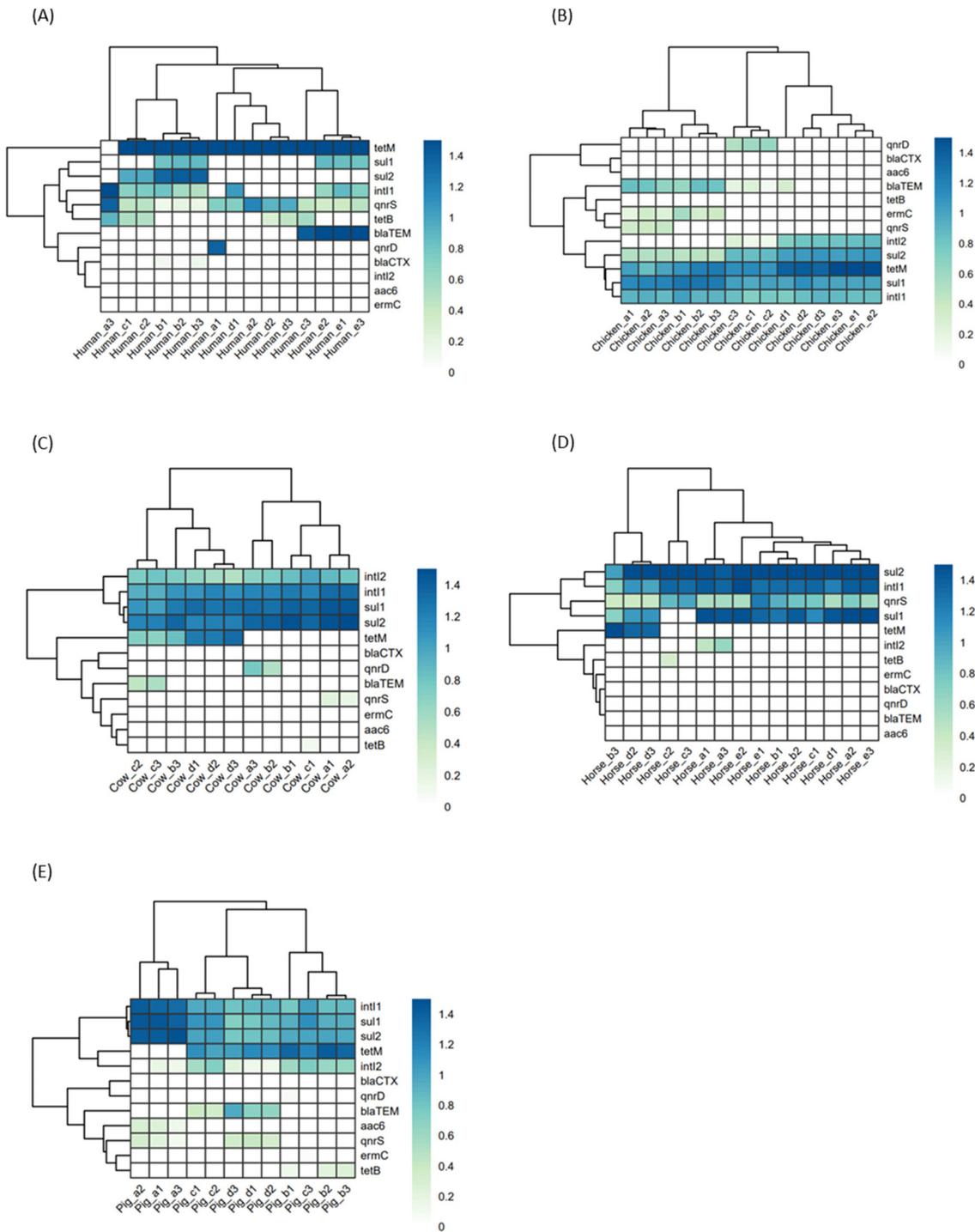


Fig. 1. Abundance of antibiotic resistance genes in humans (A), chickens (B), cows (C), horses (D), and pigs (E).

### Quantitative PCR (qPCR) 의한 ARG 정량분석

환경에서 주로 발견되는 10개의 ARG[23] 및 2개의 인테그론 유전자(*int11*, *int12*)를 대상으로 qPCR을 진행하였다 (Table S1). qPCR에는 TB Green® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus, TaKaRa, Japan) kit를 사용했으며, target gene이 포함된 플라스미드 DNA를 standard로, nuclease free water를 음성 대조군으로 사용하였다. Target gene의 abundance는 16S rRNA gene copy 당 target gene의 copy로 계산했으며, R의 heatmap package를 이용하여 시각화하였다. 모든 qPCR standard curve에 대한 상관계수 ( $R^2$ )는 > 0.995였다.

ARG와 인테그론, 미생물 군집 간의 상관관계를 조사하기 위해 genus table과 qPCR abundance 결과를 기반으로 Spearman 상관계수(spearman coefficient>0.7,  $p<0.005$ )를 계산하였고, unclassified 한 속은 제거한 다음 Cytoscape

(v 3.9.1) 를 사용하여 시각화하였다.

### 결과 및 고찰

#### 사람 및 축종 별 ARG 정량분석

69개 중 47개의 샘플에서 tetracyclines계 내성 *tetM* 유전자가 검출되었으며, 평균 abundance는 1.740 copies/16S rRNA gene copies로 실험 대상 항생제 중 가장 높았다(Fig. 1). 그 다음으로 sulfonamides계 내성 *sul1*과 *sul2* 유전자가 각각 평균 0.422, 0.285 copies/16S rRNA gene copies로 많이 검출되었다. *bla<sub>CTX-M</sub>*, *aac(6)-Ib*, *ermC*, *qnrD*, *qnrS*, *tetB* 유전자는 모든 시료에서 평균 0.188 copies/16S rRNA gene copies 미만으로 검출되었다. 닭과 돼지 그룹에서는 10개의 ARG와 2개의 인테그론 유전자가 모두 검출되었으며, 소에서는 beta-lactams계 내성 *bla<sub>CTX-M</sub>* 유전자를 제외한 모든

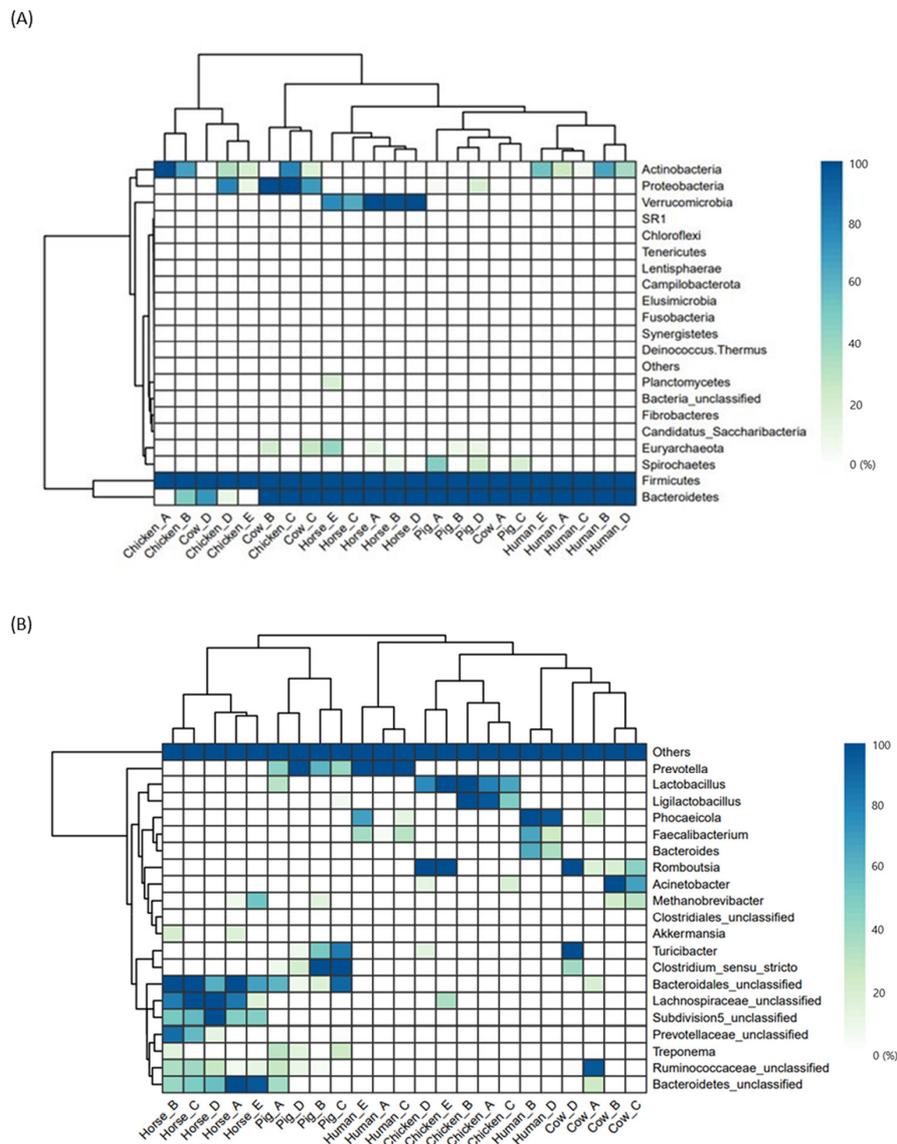


Fig. 2. Averaged taxonomic composition of in each source at the phylum level (A) and genus level (B).

target gene이, 말과 사람에서는 fluoroquinolones계 및 aminoglycosides계 내성 *aac(6)-Ib* 유전자를 제외한 모든 target gene이 검출되었다. 사람을 제외한 모든 그룹에서 *tetM*, *sul1*, *sul2* 유전자가 ARG abundance의 89% 이상을, 사람 그룹에서는 *tetM*, *bla<sub>TEM</sub>*, *sul2* 유전자가 ARG abundance의 98% 이상을 차지하였다. 인테그론 유전자 중 *intI1*은 모든 그룹에서 검출되었으며, *intI2*는 사람 그룹을 제외한 모든 그룹에서 검출되었다. 평균 abundance는 각각 0.188, 0.034 copies/16S rRNA gene copies였다.

### 사람 및 축종 별 분변 미생물 군집 비교 분석

Illumina MiSeq 결과, 총 3,813,962개의 read를 얻었으며, filtering 후 1,299,847개의 read를 미생물 군집 비교에 사용하였다. 문(phylum) 수준에서 분석한 결과, 닭을 제외한 모든 샘플에서 *Firmicutes*와 *Bacteroidetes*가 우점하였다 (Fig. 2). 사람 그룹에서는 *Actinobacteria*가 *Firmicutes*와 *Bacteroidetes* 다음으로 가장 많았으며, 소, 말, 돼지 그룹에서는 각각 *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Spirochaetes*가 *Firmicutes*와 *Bacteroidetes*의 다음으로 가장 많았다. 닭 그룹의 경우 *Firmicutes*와 *Actinobacteria*가 우점했으며 *Bacteroidetes*가 그 다음으로 많았다. 같은 가축일 경우 속 수준 조성이 비슷했으며, 사람의 경우 A, C, E와 B, D 두 그룹으로 나뉘는 것을 확인하였다(Fig. 2b).

### ARG와 미생물 군집 상관 분석

Fig. 3은 미생물 군집과 target gene의 상관관계를 보여준다. 대부분의 ARG와 인테그론 유전자는 닭과 소의 분변 샘플에 많이 존재했으며, *tetB*, *sul1*, *sul2*, *qnrD*, *ermC* 유전자와 *intI1*, *intI2* 유전자는 미생물 군집과 유의미한 상관관계를 가지고 있었다. Fig. 4는 ARG 및 인테그론 유전자의 양과 속의 상대 빈도 간 상관관계를 network analysis을 통해 분석한 그림이다. Node의 크기는 ARG 또는 인테그론과 연결된 edge의 수에 따라 나타내었다. 닭 그룹에서는 97개의 속이 ARG 및 인테그론 유전자와 양의 상관관계를 가지고 있었고, 소, 돼지, 사람, 말의 경우 각각 34, 31, 25, 22개의 속이 ARG 및 인테그론 유전자와 양의 상관관계를 가지고 있었다. 모든 그룹에서 양의 상관관계를 보인 박테리아는 *Firmicutes* 문에 속해있었지만 각각의 그룹마다 ARG 또는 인테그론 유전자와 양의 상관관계를 가진 속은 모두 다른 것으로 확인되었다. 사람 그룹에서는 *Coprobacter*, *Coprobacillus*, 닭 그룹에서는 *Cloacibacillus*, *Myroides*, *Glutamicibacter*, *Prevotella*, 소 그룹에서는 *Gemmabacter*, *Paenalcaligenes*, 돼지 그룹에서는 *Mediterranea*가 강한 양의 상관관계를 보였다. 말 그룹에서는 모든 속에 연결된 edge의 수가 동일했다.

## Discussion

본 연구를 통해 사람과 가축의 분변에 다양한 계열의 ARG 및 인테그론 유전자가 포함되어 있음을 확인할 수 있었고, 이

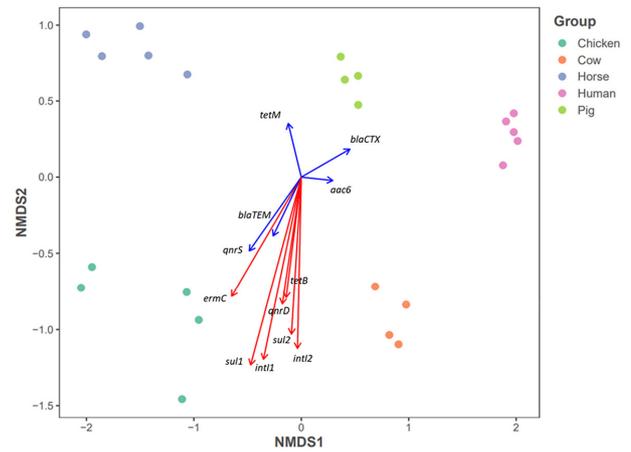


Fig. 3. Correlation analysis between the abundance of antibiotic resistance genes and microbial community. Arrows indicate spearman correlations.

Red arrows:  $p < 0.05$ .

는 tetracyclines, sulfonamides, fluoroquinolones, macrolides계 항생제가 병원 및 축산업계에서 널리 사용되고 있기 때문에 보인다[24]. 특히 국내 축산용 항생제 중 판매량이 가장 많은 tetracyclines, sulfonamides계 내성 유전자 *tetM*, *sul1*, *sul2*가 본 연구에서 가장 많이 검출되었다.

Tetracyclines계 항생제는 그람 양성 및 그람 음성 박테리아, 그람 염색으로 정의할 수 없는 atypical organisms의 성장을 억제할 수 있다는 장점이 있고, 주요 부작용이 없어 사람과 가축에게 널리 사용되는 항생제이다. Song et al.은 닭 농장 대기에 존재하는 ARG의 양과 항생제 소비량 사이 관계에 대해 연구했으며, 대기 내 *tetM* 유전자의 양이 닭 분변에 존재하는 *Jeotgalibaca*, *Corynebacterium*의 상대 빈도와 양의 상관관계를 가지고 있다고 밝혔다[25]. 본 연구에서도 소의 분변에 존재하는 *Jeotgalibaca*, *Corynebacterium*의 상대 빈도가 *tetM*과 양의 상관관계를 강하게 가지는 것으로 확인했다.

*sul1* 유전자는 MGE의 일종인 인테그론 유전자(*intI1*)와 인접한 경우가 많다[26]. MGE와 인접한 ARG는 그렇지 않은 ARG에 비해 더 빠른 속도로 전파될 수 있으며, 이로 인해 항생제 내성을 가지고 있지 않던 균도 쉽게 다제내성을 확보할 수 있다. 본 연구의 결과, 소의 분변에서 *sul1* 유전자와 양의 상관관계를 가지고 있는 속 11개 중 9개가 *intI1* 유전자와 양의 상관관계를 가지고 있었으며, 닭의 분변에서는 *sul1* 유전자와 양의 상관관계를 가지고 있는 속 11개 중 7개가 *intI1* 유전자와도 양의 상관관계를 가지고 있었다. 본 연구의 결과는 소와 돼지의 분변에서 *Corynebacterium*과 *sul1* 유전자 사이 양의 상관관계가 있음을 나타냈으며, 이는 *Corynebacterium*이 *sul1* 유전자의 주요 carrier로 작용할 수 있음을 밝힌 Lin et al.의 연구 결과와 흡사하다. 본 연구에서 *sul1* 유전자는 *Corynebacterium* 외에 *Caryophanon*, *Jeotgalibaca* 또한 *sul1* 유전자의 carrier로 작용할 수 있음을 암시한다. 이는 또한 ARG 또는 인테그론 유전자가 가축의 종류와는 상관없이

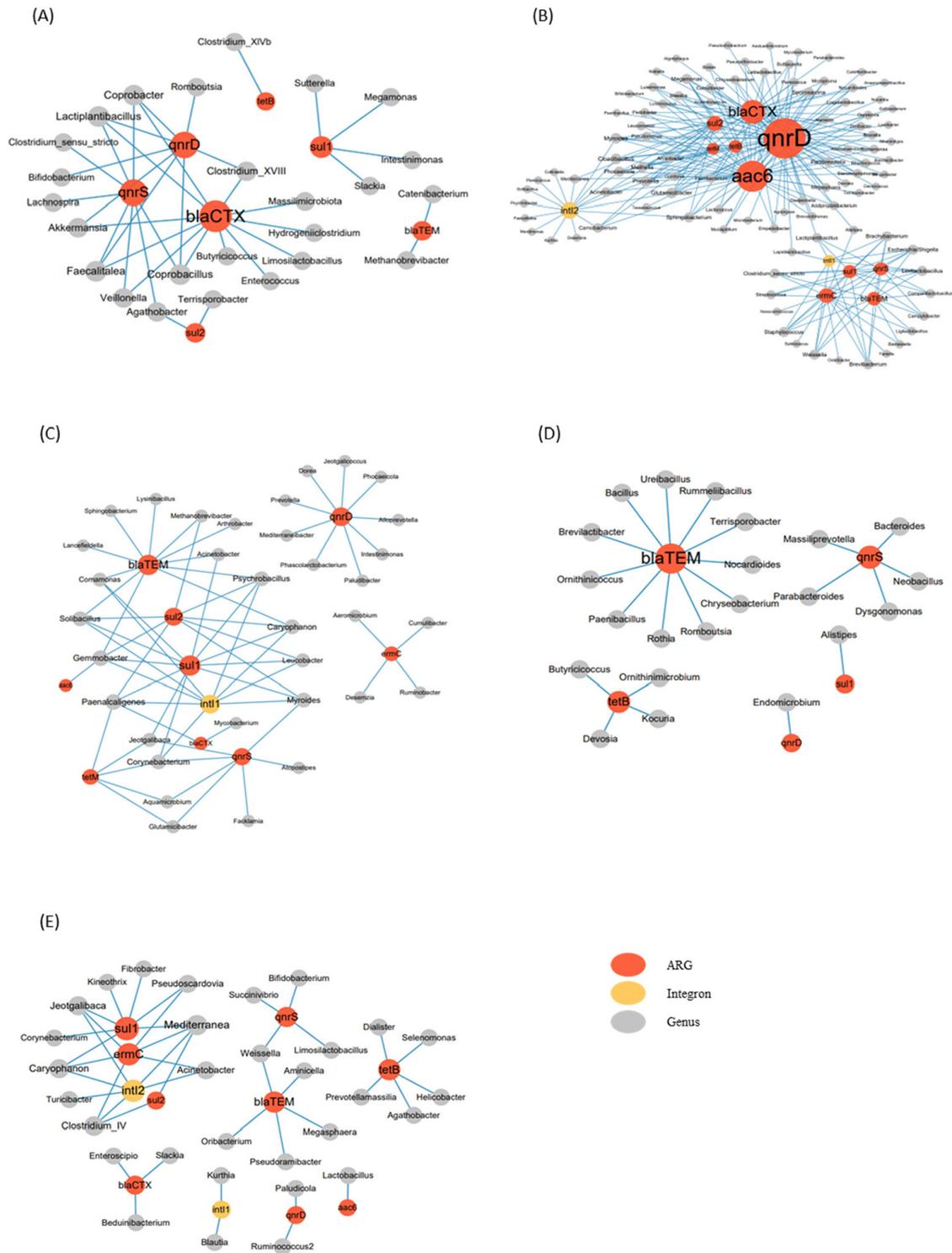


Fig. 4. Abundance of antibiotic resistance genes in humans (A), chickens (B), cows (C), horses (D), and pigs (E). (spearman coefficient>0.7, p<0.05).

분변에 존재하는 미생물에 따라 전파 양상이 달라질 수 있다는 점을 시사한다.

가축 농장은 자연환경에 노출되어 있는 경우가 많아 직·간접적 항생제 전파 매개 장소로 작용할 수 있다. 특히 가축의 경우 horizontal gene transfer (HGT)에 의한 ARG 전파의

주요 매개체로 작용할 수 있기 때문에 분변 처리에 대한 꾸준한 모니터링이 필요하다. 이 연구를 시작으로 다양한 환경에서 검출되는 ARG와 상관관계를 가진 미생물 군집 분석이 항생제 내성 패턴 분석 연구에 도움이 되길 바란다.

## Note

The authors declare no conflict of interest.

## Acknowledgement

This research was supported by the 2022 scientific promotion program funded by Jeju National University.

## References

1. Liu B, Pop M (2009) ARDB—antibiotic resistance genes database. *Nucleic Acids Research*, 37(suppl\_1), D443-D447. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn656>.
2. Viola C, DeVincent SJ (2006) Overview of issues pertaining to the manufacture, distribution, and use of antimicrobials in animals and other information relevant to animal antimicrobial use data collection in the United States. *Preventive Veterinary Medicine*, 73(2-3), 111-131. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2005.09.020>.
3. O'Neill J (2014) Antimicrobial resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations, *Review on Antimicrobial Resistance*, UK, p. 6.
4. Van Boeckel TP, Brower C, Gilbert M, Grenfell BT, Levin SA, Robinson TP, Teillant A, Laxminarayan R (2015) Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(18), 5649-5654. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112>.
5. Chantziaras I, Boyen F, Callens B, Dewulf J (2014) Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: A report on seven countries. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(3), 827-834. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt443>.
6. He L-Y, Ying G-G, Liu Y-S, Su H-C, Chen J, Liu S-S, Zhao J-L (2016) Discharge of swine wastes risks water quality and food safety: Antibiotics and antibiotic resistance genes from swine sources to the receiving environments. *Environment International*, 92, 210-219. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.03.023>.
7. Mu Q, Li J, Sun Y, Mao D, Wang Q, Luo Y (2015) Occurrence of sulfonamide-, tetracycline-, plasmid-mediated quinolone- and macrolide-resistance genes in livestock feedlots in Northern China. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(9), 6932-6940. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3905-5>.
8. Pu Q, Zhao L-X, Li Y-T, Su J-Q (2020) Manure fertilization increase antibiotic resistance in soils from typical greenhouse vegetable production bases, China. *Journal of Hazardous Materials*, 391, 122267. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122267>.
9. Chee Sanford JC, Mackie RI, Koike S, Krapac IG, Lin YF, Yannarell AC, Maxwell S, Aminov RI (2009) Fate and transport of antibiotic residues and antibiotic resistance genes following land application of manure waste. *Journal of Environmental Quality*, 38(3), 1086-1108. <https://doi.org/10.2134/jeq2008.0128>.
10. Forsberg KJ, Reyes A, Wang B, Selleck EM, Sommer MO, Dantas G (2012) The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. *Science*, 337(6098), 1107-1111. <https://doi.org/10.1126/science.1220761>.
11. Zhao Y, Yang QE, Zhou X, Wang F-H, Muurinen J, Virta MP, Brandt KK, Zhu Y-G (2021) Antibiotic resistome in the livestock and aquaculture industries: Status and solutions. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 51(19), 2159-2196. <https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1777815>.
12. Burch TR, Stokdyk JP, Firnstahl AD, Kieke Jr BA, Cook RM, Opelt SA, Spencer SK, Durso LM, Borchardt MA (2022) Microbial source tracking and land use associations for antibiotic resistance genes in private wells influenced by human and livestock fecal sources. *Journal of Environmental Quality*. <https://doi.org/10.1002/jeq2.20443>.
13. Li W, Su H, Cao Y, Wang L, Hu X, Xu W, Xu Y, Li Z, Wen G (2020) Antibiotic resistance genes and bacterial community dynamics in the seawater environment of Dapeng Cove, South China. *Science of The Total Environment*, 723, 138027. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138027>.
14. An X-L, Chen Q-L, Zhu D, Zhu Y-G, Gillings MR, Su J-Q (2018) Impact of wastewater treatment on the prevalence of integrons and the genetic diversity of integron gene cassettes. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(9), e02766-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.02766-17>.
15. Krauland MG, Marsh JW, Paterson DL, Harrison LH (2009) Integron-mediated multidrug resistance in a global collection of nontyphoidal *Salmonella enterica* isolates. *Emerging Infectious Diseases*, 15(3), 388. <https://doi.org/10.3201/eid1503.081131>.
16. Blake KS, Choi J, Dantas G (2021) Approaches for characterizing and tracking hospital-associated multidrug-resistant bacteria. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 78(6), 2585-2606. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03717-2>.

17. Yang Y, Li B, Ju F, Zhang T (2013) Exploring variation of antibiotic resistance genes in activated sludge over a four-year period through a metagenomic approach. *Environmental Science & Technology*, 47(18), 10197-10205. <https://doi.org/10.1021/es4017365>.
18. Crossette E, Gumm J, Langenfeld K, Raskin L, Duhaime M, Wigginton K (2021) Metagenomic quantification of genes with internal standards. *MBio*, 12(1), e03173-e03220. <https://doi.org/10.1128/mBio.03173-20>.
19. Li B, Yang Y, Ma L, Ju F, Guo F, Tiedje J M, Zhang T (2015) Metagenomic and network analysis reveal wide distribution and co-occurrence of environmental antibiotic resistance genes. *The ISME Journal*, 9(11), 2490-2502. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.59>.
20. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO (2012) The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D590-D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>.
21. Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F (2016) VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, 4, e2584. <https://doi.org/10.7717/peerj.2584>.
22. Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH et al. (2009) Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(23), 7537-7541. <https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09>.
23. Jang HM, Kim YB, Choi S, Lee Y, Shin SG, Unno T, Kim YM (2018) Prevalence of antibiotic resistance genes from effluent of coastal aquaculture, South Korea. *Environmental Pollution*, 233, 1049-1057. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.10.006>.
24. Jechalke S, Heuer H, Siemens J, Amelung W, Smalla K (2014) Fate and effects of veterinary antibiotics in soil. *Trends in Microbiology*, 22(9), 536-545. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.05.005>.
25. Song L, Jiang G, Wang C, Ma J, Chen H (2022) Effects of antibiotics consumption on the behavior of airborne antibiotic resistance genes in chicken farms. *Journal of Hazardous Materials*, 129288. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129288>.
26. Byrne-Bailey K, Gaze W, Kay P, Boxall A, Hawkey P, Wellington E (2009) Prevalence of sulfonamide resistance genes in bacterial isolates from manured agricultural soils and pig slurry in the United Kingdom. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(2), 696-702. <https://doi.org/10.1128/AAC.00652-07>.
27. Mao D, Yu S, Rysz M, Luo Y, Yang F, Li F, Hou J, Mu Q, Alvarez P (2015) Prevalence and proliferation of antibiotic resistance genes in two municipal wastewater treatment plants. *Water Research*, 85, 458-466. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.09.010>.
28. Speldooren V, Heym B, Labia R, Nicolas-Chanoine M-H (1998) Discriminatory detection of inhibitor-resistant  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* by single-strand conformation polymorphism-PCR. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(4), 879-884. <https://doi.org/10.1128/AAC.42.4.879>.
29. Henriques IS, Fonseca F, Alves A, Saavedra MJ, Correia A (2006) Occurrence and diversity of integrons and  $\beta$ -lactamase genes among ampicillin-resistant isolates from estuarine waters. *Research in Microbiology*, 157(10), 938-947. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2006.09.003>.
30. Pei R, Kim S-C, Carlson KH, Pruden A (2006) Effect of river landscape on the sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes (ARG). *Water Research*, 40(12), 2427-2435. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.04.017>.
31. Park CH, Robicsek A, Jacoby GA, Sahm D, Hooper DC (2006) Prevalence in the United States of *aac(6)-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(11), 3953-3955. <https://doi.org/10.1128/AAC.00915-06>.
32. Knapp CW, Dolfing J, Ehler PA, Graham DW (2010) Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940. *Environmental Science & Technology*, 44(2), 580-587. <https://doi.org/10.1021/es901221x>.
33. Luo Y, Mao D, Rysz M, Zhou Q, Zhang H, Xu L, JJ Alvarez P (2010) Trends in antibiotic resistance genes occurrence in the Haihe River, China. *Environmental Science & Technology*, 44(19), 7220-7225. <https://doi.org/10.1021/es100233w>.
34. Goldstein C, Lee MD, Sanchez S, Hudson C, Phillips B, Register B, Grady M, Liebert C, Summers AO, White DG (2001) Incidence of class 1 and 2 integrases in clinical and commensal bacteria from livestock, companion animals, and exotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(3), 723-726. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.3.723-726.2001>.

Table S1. Primers used for qPCR

Antibiotic class	Gene target	Primers	Sequence (5'-3')	Annealing Temp. (°C)	Amplicon size (bp)	References
Tetracyclines	<i>tetM</i>	Forward	ACAGAAAGCTTATTATATAAC	55	171	(Mao, Yu et al., 2015)
		Reverse	TGGCGTGTCTATGATGTTTAC			
	<i>tetB</i>	Forward	GGTTGAGACGCAATCGAATT	60	206	(Mao, Yu et al., 2015)
		Reverse	AGGCTTGGAACTAGTGTAA			
β-lactams	<i>bla<sub>TEM</sub></i>	Forward	AAAGATGCTGAAGATCA	55	425	(Speldooren, Heym et al., 1998)
		Reverse	TTTGGTATGGCTTCATTC			
	<i>bla<sub>CTX-M</sub></i>	Forward	CGCTTTGCGATGTGCAG	60	550	(Henriques, Fonseca et al., 2006)
		Reverse	ACCGCGATATCGTTGGT			
Sulfonamides	<i>sul1</i>	Forward	CGCACC GGAAACATCGCTGCAC	65	163	(Pei, Kim et al., 2006)
		Reverse	TGAAGTTCGCCGCAAGGCTCG			
	<i>sul2</i>	Forward	TCCGGTGGAGCCGGTATCTGG	65	191	(Pei, Kim et al., 2006)
		Reverse	CGGGAATGCCATCTGCCTTGAG			
Fluoroquinolones	<i>qnrD</i>	Forward	AGTGAGTGTITAGCTCAAGGAG	60	175	(Mao, Yu et al., 2015)
		Reverse	CAGTGCCATTCCAGCGATT			
	<i>qnrS</i>	Forward	GTATAGAGTTCGGTGGGTGTGA	63	189	(Mao, Yu et al., 2015)
		Reverse	GGTTCGTTCTATCCAGCGATT			
Fluoroquinolones, Aminoglycosides	<i>aac(6)-Ib</i>	Forward	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	60	428	(Park, Robicsek et al., 2006)
		Reverse	CTCGAATGCCTGGCGTGTTT			
Macrolides	<i>ermC</i>	Forward	GAAATCGGCTCAGGAAAAGG	60	190	(Knapp, Dolfing et al., 2010)
		Reverse	TAGCAAACCCGTATCCACG			
Integron	<i>int1</i>	Forward	GGCTTCGTGATGCCTGCTT	60	146	(Luo, Mao et al., 2010)
		Reverse	CATTCCTGGCCGTGGTTCT			
	<i>int2</i>	Forward	TTATTGCTGGGATTAGGC	60	233	(Goldstein, Lee et al., 2001)
		Reverse	ACGGCTACCCTCTGTTATC			