

Research Article



CrossMark

Open Access

울릉도의 항생제 내성균 조사

이준형, 홍혜원, 한덕기*

강릉원주대학교 해양생명과학과

Survey of Antibiotic Resistant Bacteria in Ulleungdo, Korea

Jun Hyung Lee, Hye Won Hong, Dukki Han* (Department of Marine Bioscience, College of Life Sciences, Gangneung-Wonju National University, Gangneung 25457, Korea)

Received: 16 December 2022/ Revised: 20 December 2022/ Accepted: 23 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

Jun Hyung Lee

<https://orcid.org/0000-0002-1693-1489>

Hye Won Hong

<https://orcid.org/0000-0003-2898-6062>

Dukki Han

<https://orcid.org/0000-0002-4387-5830>

Abstract

BACKGROUND: Although antibiotics have contributed to treatment of bacterial infection, the antibiotic abuse can lead to antibiotic resistant bacteria. Impact of human activities on distribution of antibiotic resistance has been intensively issued and occurrence of antibiotic resistant bacteria in contaminated environments would not be a surprise. Nonetheless, anthropogenic contamination with the dissemination of antibiotic resistance along uncontaminated environments has been less considered. The aim of this study is to investigate antibiotic resistant bacteria across Ulleungdo, known as antibiotic resistance free and anthropogenic pollution free environment in Rep. of Korea.

METHODS AND RESULTS: Antibiotic resistant bacteria in coastal seawater of Ulleungdo were investigated in July 2021. Antibiotic susceptibility test using the disk diffusion method was applied with six drugs according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guideline. Total 43 bacterial isolates were tested and 20 isolates among of them showed multidrug resistance. Particularly, the number and ratio of resistant bacteria were relatively high in a densely populated area of Ulleungdo. The bacte-

rial communities were investigated using 16S rRNA gene metabarcoding approach in the coastal seawater and soils of Ulleungdo. In the bacterial communities, Firmicutes were selectively distributed only in seawater, suggesting the possibility of anthropogenic contamination in coastal seawater of Ulleungdo.

CONCLUSION(S): We found antibiotic resistant bacteria in a populated area of Ulleungdo. The occurrence of antibiotic resistant bacteria in Ulleungdo seems to result from the recent anthropogenic impact. Consistent monitoring of antibiotic resistant bacteria in the uncontaminated environment needs to be considered for future risk assessment of antibiotics.

Key words: Antibiotic resistant bacteria, East Sea, eDNA, Metabarcoding, Microbial communities

서론

지난 세기 Penicillin의 등장 이후, 인류는 감염성 미생물로 인한 질병의 위협에서 벗어났지만, 과도한 항생제의 사용으로 항생제 내성(Antibiotic Resistance, AR)의 위협에 직면하게 되었다[1]. 항생제는 의학, 농업, 수산업 등 다양한 산업분야에서 사용되고 있으며, 사용된 항생제의 대부분이 오폐수 관로를 따라 도시하수처리장으로 유입되어 정수과정을 거치게 된다. 하지만 정수처리 과정에서 분해되지 않은 항생제들이 여전히 존재하며[2-4], 이러한 잔류 항생제들은 하천으로 배출되

* Corresponding author: Dukki Han

Phone: +82-33-640-1675; Fax: +82-33-640-2849;

E-mail: dukkihan@gwnu.ac.kr

어 최종적으로 도시 하천과 연안의 생태계에 항생제 내성을 유발하게 된다[5]. 항생제 내성 유전자(Antibiotics Resistance Gene, ARG)는 다른 미생물들 사이에서 수평적으로 전이가 되며[6, 7], 이 과정에서 병원성 미생물들이 항생제 내성을 획득하게 되는 결과를 초래하게 된다. 지속적으로 증가하는 항생제 내성 문제로 인하여, 인류는 2050년경 즈음에는 전 세계적으로 연간 1,000만 명 이상이 항생제 내성으로 사망할 것이라 예상된다[8]. 국내의 경우, 2019년 기준 항생제 사용량이 26.1 DDD(Defined Daily Dose)로 보고된 바 있으며, 이는 경제협력개발기구(OECD) 국가들 중 3번 째로 높은 것으로 평가된다.

늘어나는 인구와 함께 육류와 수산물의 소비량 역시 지속적으로 증가하고 있으며[9], 증가한 소비를 지탱하기 위해 축산업과 수산업의 규모도 커지고 있다. 축사와 수산 양식장에서 병원성 미생물의 감염을 예방하고 통제하기 위하여 항생제의 사용이 불가피하기에 항생제의 사용량은 앞으로도 증가할 것으로 판단된다[10, 11]. 최근 항생제 남용으로 인한 내성 전파의 양상이 해저 심해와 극지와 같은 청정지역으로 확대되고 있다는 우려가 있으며[12, 13], 이는 바야흐로 항생제와 내성 발생이 인류 활동의 지표로 간주할 수 있음을 시사한다. 항생제 남용으로 인한 내성균들의 출현과 환경으로의 확산에 대한 우려 속에서 국내에서는 제2차 국가 항생제 내성관리대책을 수립하였으며, 이에 따르면 항생제의 사용량 조절과 내성균 확산 방지 및 내성 출현의 감시체계 강화를 위해 주기적으로 항생제 내성을 모니터링 할 필요가 있다.

울릉도는 동해에 위치한 화산섬으로, 독특한 자연경관과 독도에 대한 사회적 관심으로 사람들에게 주목받고 있다. 이에 따라 연간 울릉도의 방문객 수는 지속적으로 증가하고 있으며, 울릉군 관광문화체육과의 조사에 의하면 2022년 한 해에만 40만명 이상이 울릉도를 방문하였다. 최근 울릉도는 늘어난 방문객들을 수용하기 위하여 숙박시설을 확충하고, 항만과 공항을 신설하는 등 관광개발사업들을 진행하고 있다. 울릉도내 인간 활동 증가는 울릉도 청정 환경에 대한 오폐수 유출량을 증가시키고, 이로 인한 수질오염과 항생제 내성 출현의 주요 원인으로 작용할 수 있다[14]. 따라서, 울릉도의 유동인구 증가로 인한 연안 수질오염과 항생제 내성 관리 및 감시가 필요한 상황이다.

본 연구에서는 국내 청정지역으로 알려진 울릉도를 대상으로 인간활동으로 인한 항생제 내성균의 출현 가능성을 조사하고자 한다. 이를 위해 울릉도의 연안에서 해수를 채집한 뒤, 미생물을 배양 및 동정하여 항생제 감수성 실험을 수행하였으며, 울릉도의 해수 및 토양에서 환경유전체(eDNA)를 추출하여 메타바코딩 기반의 미생물 군집 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

시료 채집 및 전처리

2021년 7월 울릉도 연안 8개 지역에서 해수(U1-U8)를 각각 4 L씩 채집하였으며, 동시에 수질 측정기(YSI5908, YSI Inc., USA)를 이용하여 수온(Temp.), 염분도(Salinity), 그리

고 용존산소(DO)를 측정하였다. 해수는 냉장(4°C) 상태에서 실험실로 운반하였다. 토양시료(U9-U13)는 해수를 채집한 인근의 2곳과 울릉도 중심부 3곳에서 표층 5-10 cm 아래의 토양을 채집한 후 냉동(-20°C) 보관하였다. 본 연구에서 채집한 시료 및 울릉도 지역의 정보는 Fig. 1과 Table 1에 제시하였다. 해수는 현장에서 50 mL를 덜어낸 뒤, 한국해양과학기술원 동해연구소의 영양염 자동분석기(QuAAtro, Seal Analytical, Germany)를 사용하여 규산염(SiO₂), 인산염(PO₄), (아)질산염(NO₂+NO₃) 및 암모니아(NH₄)를 분석하였다. 이 외, eDNA 추출을 목적으로 0.2 µm의 pore size를 가진 여과지(GSW P04700, Merck Millipore Ltd.)를 사용하여 해수 2 L를 필터한 뒤, 여과지를 냉동(-20°C) 보관하였다.

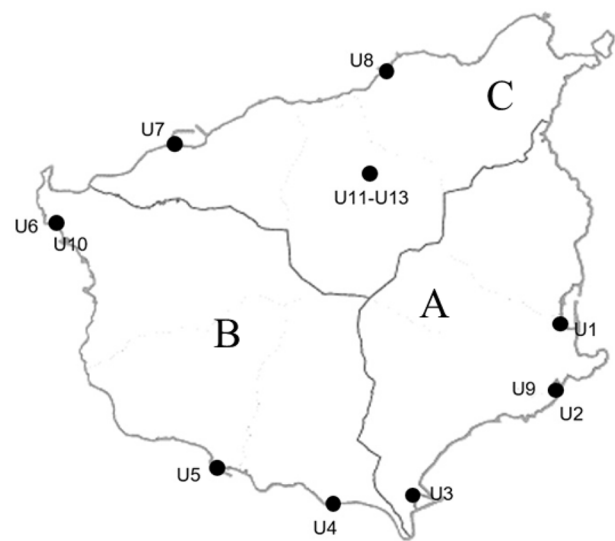


Fig. 1. Map of sampling sites in Ulleungdo. Details are described in Table 1.

Table 1. Information of sampling sites in Ulleungdo

Source	Site	GPS	Area (population*)
Seawater	U1	37°29'35"N 130°54'44"E	A(6,418)
	U2	37°28'55"N 130°54'31"E	
	U3	37°27'38"N 130°52'37"E	
	U4	37°27'49"N 130°52'41"E	B(1,361)
	U5	37°28'41"N 130°48'32"E	
	U6	37°31'37"N 130°49'37"E	
	U7	37°31'35"N 130°49'31"E	C(1,303)
	U8	37°32'25"N 130°52'21"E	
	U9	37°28'53"N 130°54'32"E	A
	U10	37°30'38"N 130°47'58"E	B
Soil	U11	37°31'14"N 130°52'14"E	C
	U12	37°31'12"N 130°52'17"E	
	U13	37°31'14"N 130°52'30"E	

*Population: peoples lived in certain area.

미생물 분리 및 동정

해수 시료는 채집한 즉시 미생물 배양을 수행하였다. 8개의 해수 시료와 PBS 용액을 각각 1:9의 비율로 섞은 뒤, 연속 희석을 통해 까지 희석하여 희석액 100 μ L를 Marine Broth (Kisan Bio Co., Ltd., Korea)의 고체배지에 접종한 뒤 25°C에서 24시간 배양하였다. 이후 각 시료의 배지에서 미생물 단일집락(single colony)의 색상과 크기를 육안으로 선별하여 시료당 12개씩 분리한 뒤, Marine Broth 고체배지에 다시 2차례 계대배양을 시도하여 단일집락을 확보하였다. 8개 해수 시료에서 Marine Broth의 고체배지로 배양한 96개의 단일집락 미생물들은 Mueller-Hinton(Kisan Bio Co., Ltd., Korea)의 고체배지에 다시 배양을 하여 집락을 형성한 43개의 균주들로 항생제 내성 실험을 수행하였다.

최초 Marine Broth의 고체배지에서 배양한 96개의 단일 집락 미생물들은 Genomic DNA extraction kit(Bioneer Co., Korea)를 사용하여 gDNA를 추출하였고, 추출한 gDNA를 주형으로 하여 bacterial 16s rRNA gene의 universal primer set(27F: AGAGTTTGATCMTGGCTCAG; 1492R: TACGGYTACCTTGTACGACTT)을 사용하여 PCR을 진행하였다. PCR 반응은 Solg™ 2X Taq PCR Pre-Mix (SolGent Co., Ltd. Korea)를 사용하여 denaturation 95°C에서 20초, annealing 55°C에서 40초, extension 72°C에서 1분의 조건에서 30 cycle을 수행하였다. Bacterial 16s rRNA gene의 PCR 산물은 Genomic Gel purification kit (Bioneer Co. Korea)를 사용하여 정제 한 뒤, 1% agarose gel 전기영동으로 1.4kb를 확인하였다. 정제한 bacterial 16s rRNA gene들은 마크로젠(Korea)에 의뢰하여 염기서열 분석을 수행하였다. 염기서열 정보는 NCBI의 BLASTN(blast.ncbi.nlm.nih.gov) 분석을 통해, 97% 이상의 염기서열 유사성으로 미생물을 동정하였다.

항생제 감수성 평가

Mueller-Hinton 고체배지에 분리한 43개의 균주들은 Clinical and Laboratory Standards Institute(CLSI, M100)의 프로토콜에 근거하여 디스크 확산법을 이용한 항생제 감수성 평가를 수행하였다. 먼저, 멸균된 면봉을 이용하여 균주를 Mueller-Hinton 고체 배지에 도말 한 뒤, 배양액이 흡수되도록 5분간 대기하였다. 이후 수산양식에서 빈번하게 사용하는 6종의 항생제 디스크(Chloramphenicol(CHL): 30 μ g; Trimethoprim-sulfamethoxazole(TRI/SUL): 25 μ g; Amoxicillin(AMX): 10 μ g; Streptomycin(STR):25 μ g; Tetracycline(TET): 30 μ g; Erythromycin(ERY): 15 μ g)를 사전에 균주를 도말한 배지 위에 부착하여 35°C에서 18시간 동안 배양시킨 뒤, 항생제 디스크 주변 환의 크기를 AntibioGram J (v1.0)([15]) 프로그램을 이용하여 측정하였다. 항생제 감수성 시험의 유효성을 확인하기 위해 표준 균주로 *Enterococcus faecalis*(KCTC3206)와 *Escherichia coli*(KCTC2441)를 이용하여 각각 그람양성균과 그람음성균에 대한 항생제 내성평가를 수행하였고, 6개 항생제 중 3개 이상의 항생제에 동시에 내성을 나타낸 경우 다제내성을 가지는 균주로 분류하였다.

eDNA의 메타바코딩 분석

해수를 필터한 여과지(U1-U8)와 토양 시료(U9-U13)에서 eDNA를 추출하기 위해 DNeasy PowerWater Kit(QIAGEN)와 DNeasy PowerSoil Pro Kit(QIAGEN)를 각각 사용하였다. 추출한 eDNA는 메타바코딩 기반의 미생물 군집분석을 목적으로, Illumina 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation protocol에 따라 Library를 제작하였다. 먼저, Bakt 341F/Bakt 805R primer set[16]을 사용하여 eDNA 내 16S rRNA gene의 V3-V4 영역을 증폭하는 Amplicon PCR을 수행하였다. Amplicon PCR의 구성은 2X KAPA HiFi Hotstart ready mix(Roche, Switzerland)를 12.5 μ L, Bakt 341F와 Bakt 805R primer를 각 2.5 μ L, D.W를 5 μ L, 그리고 eDNA를 2.5 μ L를 첨가하여 진행하였다. Amplicon PCR의 반응 조건은 denaturation(95°C에서 30초), annealing(55°C에서 30초), extension(72°C에서 30초) 과정을 25 cycle로 수행하였다. 이후 Amplicon PCR의 산물을 주형(template)으로 하여, Illumina Nextera XT Index Kit를 사용해 Index PCR을 실시하였다. Index PCR은 Illumina Nextera XT Index Kit를 사용하여 진행하였다. 구성은 2X KAPA HiFi Hotstart read mixIndex 25 μ L, Nextera XT Index primer set을 각 5 μ L, Amplicon PCR 산물 10 μ L를 첨가하여 진행하였다. Index PCR의 산물은HIACCUBEAD (AccuGene, Korea)를 이용하여 정제한 뒤, 1% agarose gel 전기영동으로 확인하였다. 이후 총 13개의 시료에 대한 Index PCR의 농도를 Qubit(Invitrogen Qubit 4, Thermo Fisher Scientific, USA)으로 측정하여, 각각의 Index PCR 산물이 서로 동일한 농도가 되도록 분배하여 Miseq platform (Illumina, USA) library를 준비한 뒤 마크로젠에 NGS(Next Generation Sequencing) 분석을 의뢰하였다.

NGS 자료분석 및 통계분석

NGS data는 Mothur software(version 1.44.3, <https://mothur.org/>)의 MiSeq SOP[17]를 참고하여 분석하였다. NGS 데이터 분석은 1) Sequencing error/Chimera/Low quality sequence 제거, 2) Singleton 제거, 3) ASVs(Amplicon Sequence Variants) Clustering, 4) Alpha/Beta diversity 계산, 그리고 5) Silva.seed_v132 데이터 베이스를 이용한 taxonomic classification의 순서로 진행하였다. 미생물 군집의 alpha diversity는 ASV를 기준으로 Chao1과 ACE 수치를 계산하였으며, Beta diversity는 NMDS(Non-metric Multidimensional Scaling)를 이용하여 Bray-Curtis distance를 계산하였다. 통계 분석은 R software(v.3.5.3; <https://www.R-project.org/>)를 사용하였고, R stats package에서 'prcomp' 함수를 이용하여, Principal Component Analysis(PCA)를 수행하였다.

결과 및 고찰

울릉도 해수의 환경 특성

울릉도 해수의 환경 특성을 분석하기 위하여, 수온(Temp.),

Table 2. Measurement of environmental factors in seawater

Site	Temp. (°C)	Salinity (psu)	eDNA (ng/μl)	DO ^a (ppm)	SiO ₂ (ppm)	NH ₄ (ppm)	NO ₂ +NO ₃ (ppm)	PO ₄ (ppm)
U1	26	33.2	11.9	8.5	13.1	3.9	0.7	3.2
U2	25.6	33.8	27.2	9.7	30.6	48.1	4.3	9.5
U3	25.7	33.9	3.07	10.9	4.7	2	0.5	1.2
U4	26	32.7	1.32	6.1	6.2	2.5	0.6	1.8
U5	25.9	33.8	2.67	7.4	3.8	1.5	0.3	0.8
U6	27.4	33	4.03	7.4	13.6	2.2	0.4	1.1
U7	28.6	33.3	4.85	6.5	2	1.3	0.3	0.3
U8	26.4	33.9	6.8	7.4	37.7	29.9	2.6	16.5

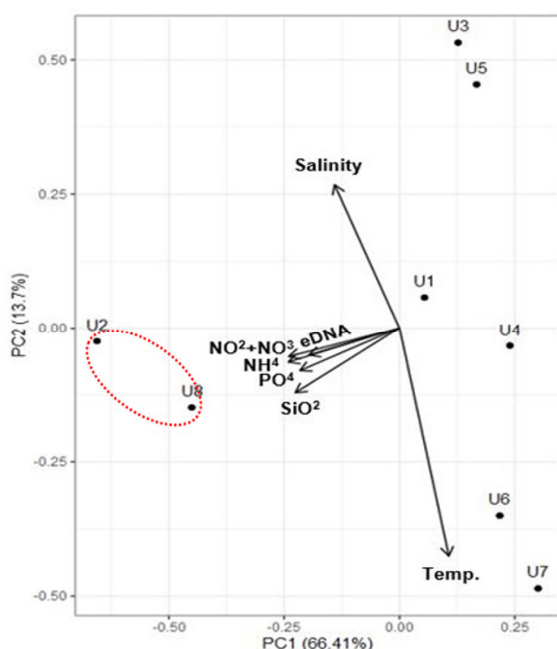
^a DO: Dissolved Oxygen

Fig. 2. Statistical separation with environmental factors supported by principal component analysis (PCA).

염분도(Salinity), 용존산소(DO), eDNA, 규산염(SiO₂), 인산염(PO₄), (아)질산염(NO₂+NO₃) 및 암모니아(NH₄)의 수치를 분석한 결과(Table 2), 온도(26.5±1.0°C), 염분도(33.5±0.5 psu), 용존산소(8.0±1.6)의 값에서는 서로 뚜렷한 차이가 관찰되지 않았다. 하지만 영양염의 분포에서는 규산염, (아)질산염, 인산염, 암모니아의 수치가 U2(DD)과 U8(CB)의 샘플링 지점에서의 값이 다른 곳에 비해 두드러지게 높게 나타났다. 이들 해수의 환경 특성 자료들을 PCA를 사용하여 분석한 결과(Fig. 2), 상기의 U2와 U8 시료들이 다른 해수들과 특이적으로 구분되는 양상을 확인하였다.

미생물 동정 및 항생제 감수성 평가

연안 해수에서 Marine Broth 고체배지를 사용하여 96개의 균주를 분리하였으며, 분리된 96개 균주의 16s rRNA gene sequence 정보의 GenBank accession number는 Table 7에 명시하였다. 이들은 *Proteobacteria*(N=87), *Firmicutes*(N=6), *Bacteroidota*(N=2), 그리고 *Actinobacteriota*(N=1)로 분류되었다(Fig. 3A). 상기의 배양균주들은 *Vibrio* 속이 모든 시료들에서 일정하게 분포하는 양상을 나타내었으며(Fig. 3B), 이중 Mueller-Hinton 고체배지에서 배양이 가

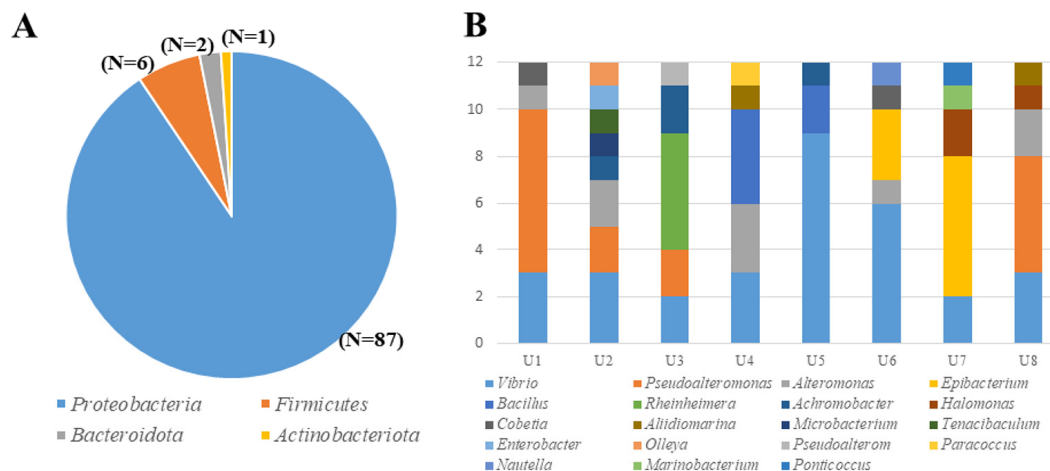


Fig. 3. The number of bacterial isolated in seawater at Phylum level (A) and at Genus level (B).

Table 3. Number of bacteria isolated on Mueller-Hinton agar

Bacteria isolated(N=43)	Gram staining type
<i>Vibrio</i> (N=13)	Gram positive(N=41)
<i>Pseudoalteromonas</i> (N=6)	
<i>Achromobacter</i> (N=4)	
<i>Rheinheimera</i> (N=4)	
<i>Alteromonas</i> (N=3)	
<i>Halomonas</i> (N=3)	
<i>Cobetia</i> (N=2)	
<i>Epibacterium</i> (N=1)	
<i>Tenacibaculum</i> (N=1)	
<i>Enterobacter</i> (N=1)	
<i>Pseudoalterom</i> (N=1)	
<i>Paracoccus</i> (N=1)	
<i>Nautella</i> (N=1)	
<i>Bacillus</i> (N=1)	Gram negative(N=2)
<i>Microbacterium</i> (N=1)	

능하였던 43개의 균주들은 대부분이 *Vibrio*(N=13)로 동정되었다(Table 3). 상기의 43개 균주들은 41개의 그람음성균과 2개의 그람양성균으로 분류되었으며, 그람양성균과 그람음성균들을 대상으로 항생제 감수성 실험을 수행한 결과 7개 균주를 제외한 36개의 균주에서 하나 이상의 항생제에 내성을 보였다. 지역적으로 항생제 내성균의 수는 A(울릉읍; N=17) 지역이 가장 많았으며, B(서면; N=12)와 C(북면; N=7)의 지역 순서로 관찰되었으며, 지역적으로 배양된 균주의 항생제 내성균의 비율도 동일한 것을 나타냈다(Table 4). 내성이 관찰된

Table 4. The number of antibiotic resistant bacteria isolated from the seawater

Area	Site	Number of bacterial isolated on MHA ^a	Number of ARB ^b	ARB ratio(%)
A	U1	5	5	89.5
	U2	7	5	
	U3	7	7	
B	U4	2	2	88.9
	U5	7	6	
C	U6	4	4	73.3
	U7	4	3	
	U8	7	4	
Total		43	36	-

^a MHA: Mueller Hinton Agar.

^b ARB: Antibiotic Resistant Bacteria.

36개 균주는 항생제 별로 STR(N=32)에서 가장 많은 내성을 보였으며, AMX(N=11)에서 가장 적은 내성을 나타내었다(Table 5). 3개 이상의 항생제들에 동시에 내성을 나타낸 다제 내성균의 수는 총 20개로 나타났으며, 지역적으로 A(울릉읍; N=9)와 B(서면; N=8)에서 C(북면; N=3)에 비해 높게 나타났다(Table 6).

해수 및 토양 미생물 군집 분석

울릉도의 해수(U1-U8)와 토양(U9-U13)에서 채집한 13개 시료에서 총 563,153개의 sequence를 확보하였으며, 전체 sequence에서 *Proteobacteria*(38.6%)의 분포가 가장 높게 나타났다. *Proteobacteria*의 분포는 해수(40.5±9.1%)와 토양(26.0±4.8%)에서 각각 다르게 나타났으며, 이는 *Bacteroidetes*

Table 5. Number of antibiotic resistant bacteria in seawater

Control	Antibiotics	Conc. (μg)	Zone of inhibition (mm)	U1 (N=5)	U2 (N=7)	U3 (N=7)	U4 (N=2)	U5 (N=7)	U6 (N=4)	U7 (N=4)	U8 (N=7)	Total
Gram positive (<i>E. faecalis</i>)	Chloramphenicol(CHL)	30	≤12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Trimethoprim-sulfamethoxazole(TRI/SUL)	1.25/23.75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Amoxicillin(AMX)	10	≤16	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Streptomycin(STR)	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Tetracycline(TET)	30	≤14	-	1	-	-	-	-	-	-	1
	Erythromycin(ERY)	15	≤13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gram negative (<i>E. coli</i>)	Chloramphenicol(CHL)	30	≤12	0	1	4	1	6	0	1	1	14
	Trimethoprim-sulfamethoxazole(TRI/SUL)	1.25/23.75	≤10	0	3	4	2	6	4	0	3	22
	Amoxicillin(AMX)	10	≤20	1	1	4	0	2	1	2	0	11
	Streptomycin(STR)	10	≤11	5	4	7	1	6	3	3	3	32
	Tetracycline(TET)	30	≤11	0	1	3	1	6	0	1	0	12
	Erythromycin(ERY)	15	-	1	4	5	1	6	1	2	0	20

Table 6. Profiling of antibiotic resistant bacteria in seawater

Area(N=20)	Taxa(Class/Genus)	CHL	TRI/SUL	AMX	STR	TET	ERY
A(N=9)	<i>Gammaproteobacteria/ Rheinheimera</i>	R ^a	R	R	R	S ^b	R
	<i>Gammaproteobacteria/ Pseudoalterom</i>	R	R	S	R	R	R
	<i>Gammaproteobacteria/ Rheinheimera</i>	R	R	S	R	R	R
	<i>Gammaproteobacteria/ Achromobacter</i>	R	R	S	R	R	R
	<i>Gammaproteobacteria/ Achromobacter</i>	R	S	S	R	R	R
	<i>Gammaproteobacteria/ Achromobacter</i>	S	R	R	R	S	R
	<i>Gammaproteobacteria/ Enterobacter</i>	S	R	R	R	S	R
	<i>Gammaproteobacteria/ Pseudoalteromonas</i>	S	S	R	R	S	R
	<i>Bacteroidia/ Tenacibaculum</i>	S	R	S	R	S	R
B(N=8)	<i>Gammaproteobacteria/ Vibrio</i>	S	R	R	R	S	S
	<i>Gammaproteobacteria/ Vibrio</i>	R	R	R	R	R	R
	<i>Gammaproteobacteria/ Vibrio</i>	R	R	R	R	R	R
	<i>Gammaproteobacteria/ Vibrio</i>	R	R	S	R	R	R
	<i>Gammaproteobacteria/ Vibrio</i>	R	R	S	R	R	R
	<i>Gammaproteobacteria/ Vibrio</i>	R	R	S	R	R	R
	<i>Gammaproteobacteria/ Vibrio</i>	R	R	S	R	R	R
	<i>Gammaproteobacteria/ Achromobacter</i>	R	R	S	R	R	R
C(N=3)	<i>Gammaproteobacteria/ Cobetia</i>	R	S	S	R	R	R
	<i>Gammaproteobacteria/ Vibrio</i>	R	R	S	R	S	S
	<i>Alphaproteobacteria/ Epibacterium</i>	S	S	R	R	S	R

^a R: Resistant to antibiotic; ^b S: Susceptible to antibiotic.

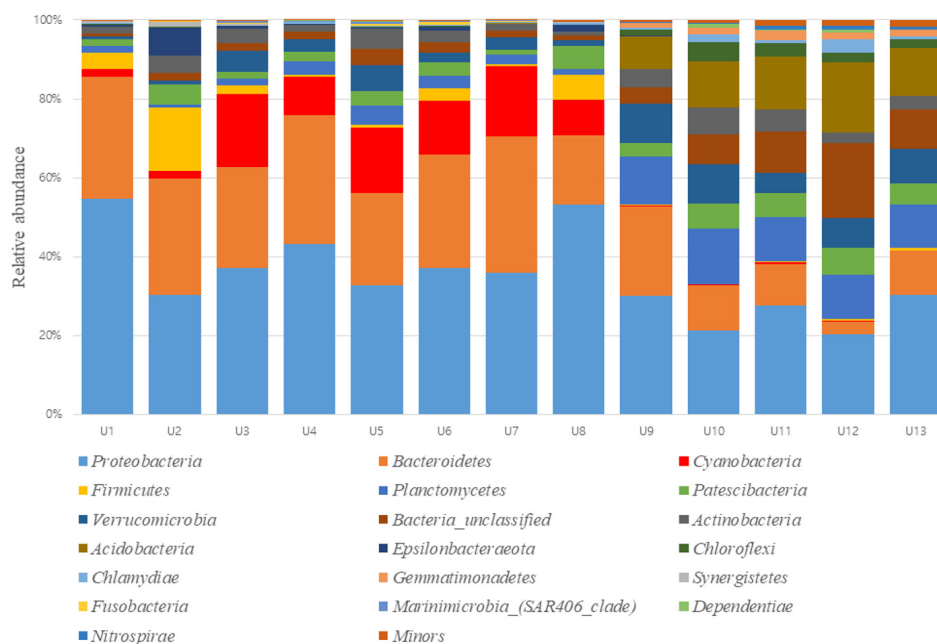


Fig. 4. The relative abundance of bacteria communities at Phylum level in environmental samples (U1-U8: Seawater; U9-U13: Soil).

Table 7. Gene bank accession number of 16s rRNA gene sequence

No.	GenBank no.Accession	Sample ID	No.	GenBank no.Accession	Sample ID
1	OQ101820	U1-1	49	OQ101737	U5-1
2	OQ101760	U1-2	50	OQ101738	U5-2
3	OQ101761	U1-3	51	OQ101739	U5-3
4	OQ101762	U1-4	52	OQ101740	U5-4
5	OQ101763	U1-5	53	OQ101741	U5-5
6	OQ101809	U1-6	54	OQ101825	U5-6
7	OQ101810	U1-7	55	OQ101742	U5-7
8	OQ101811	U1-8	56	OQ101788	U5-8
9	OQ101821	U1-9	57	OQ101789	U5-9
10	OQ101812	U1-10	58	OQ101790	U5-10
11	OQ101819	U1-11	59	OQ101791	U5-11
12	OQ101813	U1-12	60	OQ101787	U5-12
13	OQ101749	U2-1	61	OQ101732	U6-1
14	OQ101750	U2-2	62	OQ101733	U6-2
15	OQ101822	U2-3	63	OQ101755	U6-3
16	OQ101751	U2-4	64	OQ101754	U6-4
17	OQ101769	U2-5	65	OQ101772	U6-5
18	OQ101759	U2-6	66	OQ101773	U6-6
19	OQ101770	U2-7	67	OQ101774	U6-7
20	OQ101804	U2-8	68	OQ101775	U6-8
21	OQ101805	U2-9	69	OQ101776	U6-9
22	OQ101806	U2-10	70	OQ101777	U6-10
23	OQ101807	U2-11	71	OQ101827	U6-11
24	OQ101808	U2-12	72	OQ101778	U6-12
25	OQ101744	U3-1	73	OQ101734	U7-1
26	OQ101745	U3-2	74	OQ101735	U7-2
27	OQ101746	U3-3	75	OQ101736	U7-3
28	OQ101747	U3-4	76	OQ101758	U7-4
29	OQ101748	U3-5	77	OQ101779	U7-5
30	OQ101767	U3-6	78	OQ101780	U7-6
31	OQ101768	U3-7	79	OQ101781	U7-7
32	OQ101800	U3-8	80	OQ101782	U7-8
33	OQ101801	U3-9	81	OQ101783	U7-9
34	OQ101802	U3-10	82	OQ101784	U7-10
35	OQ101823	U3-11	83	OQ101785	U7-11
36	OQ101803	U3-12	84	OQ101786	U7-12
37	OQ101743	U4-1	85	OQ101752	U8-1
38	OQ101766	U4-2	86	OQ101753	U8-2
39	OQ101792	U4-3	87	OQ101771	U8-3
40	OQ101793	U4-4	88	OQ101764	U8-4
41	OQ101824	U4-5	89	OQ101765	U8-5
42	OQ101794	U4-6	90	OQ101756	U8-6
43	OQ101795	U4-7	91	OQ101757	U8-7
44	OQ101796	U4-8	92	OQ101814	U8-8
45	OQ101826	U4-9	93	OQ101815	U8-9
46	OQ101797	U4-10	94	OQ101816	U8-10
47	OQ101798	U4-11	95	OQ101817	U8-11
48	OQ101799	U4-12	96	OQ101818	U8-12

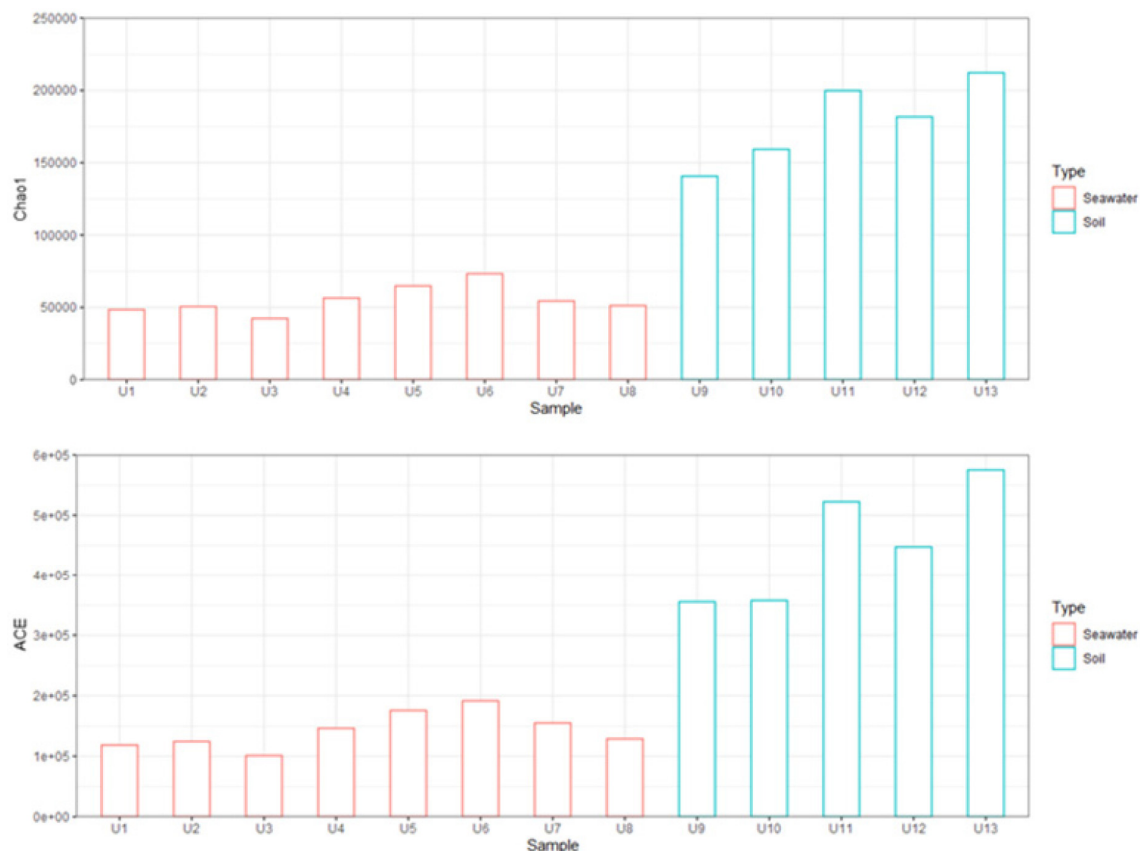


Fig. 5. Alpha diversity index (Chao1 and ACE) of environment samples (U1-U8: Seawater; U9-U13: Soil).

에서도 유사하게 나타났다. 아울러, 해수에서 특이적으로 *Cyanobacteria*와 *Firmicutes*의 분포가 관찰되었는데, 이는 토양에는 없는 해양 시료만의 특이성으로 사료되며, 반대로 토양시료에서만 존재하는 *Acidobacteria*의 분포가 이와 유사한 현상을 나타낸다(Fig. 4). Sequence(N=563,153)를 clustering 하여 총 113,186개의 ASV를 분류하였고, 이를 이용해 미생물 다양성(Alpha/Beta diversity)을 분석하였다. 울릉도 해수와 토양의 alpha diversity는 Chao1과 ACE로 측정하였다. Chao1과 ACE 수치 모두 토양에서 해수보다 높게 나타났으며, 이는 토양에 해수보다 더 많은 분류군이 존재함을 의미한다(Fig. 5). 울릉도 해수와 토양 간의 beta diversity 패턴을 확인하기 위해 NMDS 분석을 수행하였다. 울릉도 해수와 토양 시료의 미생물 군집은 서로 뚜렷하게 구분되는 양상을 나타내며, 해수 시료 내에서 U2와 U8은 다른 해수들과 구분되는 것을 확인하였다(Fig. 6)

고 찰

울릉도 해수에서 96개의 배양 가능한 균주들을 확보하였고, 이들은 대부분이 *Vibrio*(N=31), *Pseudoalteromonas*(N=16), 그리고 *Alteromonas*(N=9)와 같은 *Gammaproteobacteria*로 분류되었다. *Gammaproteobacteria*는 일반적인 해양환경에서 쉽게 배양 가능하며[18], 실제 울릉도의 해수에서 배양된 사례가 있다[19]. 울릉도에서 확인된 *Vibrio*, *Pseu-*

doalteromonas, 그리고 *Alteromonas*와 같은 균주들은 화학 비료나 오수의 유입과 관련된 부영양화를 지시하는 미생물로도 알려져 있다[20]. 특히, 울릉도 해수에서 가장 많이 배양된 *Vibrio*는 호염성의 그람음성균이며 분변성 오수에 존재하여 하천을 통해 해양으로 배출되기 쉬운 병원성 미생물들의 하나

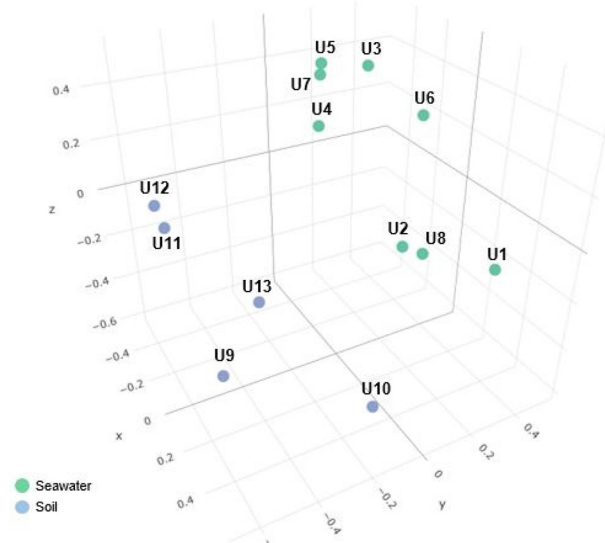


Fig. 6. NMDS of bacteria communities in the environmental samples.

로 알려져 있다[2-4]. 일반적으로 생활하수 및 산업 폐수는 가정과 산업 및 농업활동에서 배출되어 하수처리장의 정수과정을 거쳐 하천으로 방출된다. 만약 정수과정에서의 미비함 혹은 무단으로 방출된 경로에 의하여 *Vibrio*와 같은 병원성 미생물들이 하천 혹은 연안으로 유입되면 이는 향후 2차 감염의 위험을 발생시킬 수 있다[21]. 울릉도 토양의 환경유전체 메타바코딩 분석결과, *Firmicutes*의 sequence가 $0.4 \pm 0.2\%$ 정도의 낮은 분포를 나타냈지만 U2(16.1%)를 비롯한 일부 해수(U1: 4.17%; U8: 6.4%)에서만 높은 분포를 가지는 것을 확인하였다. *Firmicutes*는 인간과 동물의 장내 환경 혹은 토양에서 관찰되는 혐기성균으로, 분뇨성 폐기물을 통해 하천이나 연안으로 유입될 경우 수 생태계에 영향을 미치는 요인으로 알려져 있다[22]. 울릉도의 해수에서는 가장 많은 인구가 거주하는 울릉읍(6,418명 거주)의 항만(U1과 U2)에서 *Firmicutes*의 분포가 가장 높았으며, 울릉읍에 비해 상대적으로 인구는 적지만 하수처리장이 위치하고 있는 북면의 천부리 해수(U8)에서도 *Firmicutes*의 분포가 다소 높았다.

본 연구에서는 울릉도내 인간 활동으로 인한 해양오염의 가능성이 존재할 것으로 판단한다. 먼저 잠재적 오염지역에서 나타난 *Firmicutes*의 분포를 고려하고, *Firmicutes*가 ARG를 운반하는 주요 미생물 분류군이라는 점을 고려할 때[23, 24] 인간활동에 의한 울릉도 항생제 내성균 출현이 예상된다. 실제 본 연구에서는 울릉도의 항생제 내성균 현황을 확인하였으며, 항생제 내성 분석이 가능하였던 43개의 균주들 중 20개에서 다제내성을 확인하였다. 특히 다제내성을 가진 *Vibrio* 중 8균주의 경우, 울릉도 연안에 존재하는 해산물의 섭취로 인한 감염 가능성[25]이 우려된다. 이외 다제내성을 가진 *Achromobacter* 중 4균주의 경우 과거 의료기관에서 환경으로 유출되는 사례[26]가 있어 울릉도에서 의료기관이 가장 많이 소재한 울릉읍에서도 유사한 사례가 발생하지 않을까 염려된다. 본 연구에서는 배양 가능한 미생물의 다제내성을 조사하기 위해 CLSI 기준의 디스크 확산법을 이용하였다. CLSI에서는 미생물 배양의 표준배지로 Mueller-Hinton 배지를 권장하고 있으며[27], 울릉도 해수에서 Marine Broth 배지를 사용하여 분리한 96개 균주 중 43개 만이 Mueller-Hinton 배지에서 생장이 가능하였다. 이는 Mueller-Hinton 배지 조성에 NaCl이 포함되지 않아 해양미생물의 배양에는 적합하지 않기 때문이며, 일부의 연구에서는 해양미생물의 연구에 Mueller-Hinton 배지를 사용할 경우 NaCl을 일정량 혼합하여 사용하는 사례가 있다[28-30]. 하지만 NaCl의 혼합 비율은 연구자마다 다르며, 해양미생물의 항생제 내성 연구에 있어 적절한 NaCl 혼합비율이 어느정도 인지 그리고 NaCl 첨가로 인한 항생제 내성에 대한 영향은 어느정도 인지에 대한 논의가 반드시 필요할 것으로 판단된다.

본 연구에서는 청정지역인 울릉도의 해수에서 분리한 미생물들을 대상으로 항생제 내성을 확인하였으며, 이는 울릉도의 유동인구 증가로 인한 연안 수질오염의 영향으로 판단된다. 항생제의 남용으로 내성균이 출현하게 되면 지역사회에 심각한 공중보건의 위기를 초래할 가능성이 높다. 항생제 내성균들 간의 상호작용으로 인한 돌연변이 진화는 단일 항생제에 뿐만

아니라, 다수의 항생제에 내성을 갖는 다제내성균의 출현을 야기한다[31]. 울릉도를 방문하는 관광객의 수는 앞으로도 증가할 것으로 예상되며, 이로 인한 항생제 내성균의 증가를 방지하기 위해 지속적인 감시와 관리 대책이 필요할 것이라 생각된다.

Note

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgement

This study was supported by "2022 Academic Research Support Program in Gangneung-Wonju National University" and "Korea Institute of Marine Science & Technology Promotion (KIMST) funded by the Ministry of Oceans and Fisheries (20220533)".

References

1. English BK, Gaur AH (2010) The use and abuse of antibiotics and the development of antibiotic resistance. *Hot Topics in Infection and Immunity in Children* VI, 73-82. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0981-7_6.
2. Rai PK, Tripathi BD (2007) Microbial contamination in vegetables due to irrigation with partially treated municipal wastewater in a tropical city. *International Journal of Environmental Health Research*, 17(5), 389-395. <https://doi.org/10.1080/09603120701628743>.
3. Pant A, Mittal AK (2007) Monitoring of pathogenicity of effluents from the UASB based sewage treatment plant. *Environmental Monitoring and Assessment*, 133(1), 43-51. <https://doi.org/10.1007/s10661-006-9558-1>.
4. Igbinosa EO, Obi LC, Okoh AI (2009) Occurrence of potentially pathogenic vibrios in final effluents of a wastewater treatment facility in a rural community of the Eastern Cape Province of South Africa. *Research in Microbiology*, 160(8), 531-537. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2009.08.007>.
5. DeVries SL, Zhang P (2016) Antibiotics and the terrestrial nitrogen cycle: a review. *Current Pollution Reports*, 2(1), 51-67. <https://doi.org/10.1007/s40726-016-0027-3>.
6. Bennett PM (2008) Plasmid encoded antibiotic resistance: Acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal of Pharmacology*, 153(S1), S347-S357. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707607>.

7. Normark BH, Normark S (2002) Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal of Internal Medicine*, 252(2), 91-106. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2796.2002.01026.x>.
8. Aslam B, Wang W, Arshad MI, Khurshid M, Muzamil S, Rasool MH, Nisar MA, Alvi RF, Aslam MA et al. (2018) Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infection and Drug Resistance*, 11, 1645. <https://doi.org/10.2147/IDR.S173867>.
9. Kearney J (2010) Food consumption trends and drivers. *Philosophical Transactions of The Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1554), 2793-2807. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0149>.
10. Schar D, Klein EY, Laxminarayan R, Gilbert M, Van Boeckel TP (2020) Global trends in antimicrobial use in aquaculture. *Scientific Reports*, 10(1), 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78849-3>.
11. 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>.
12. Tortorella E, Tedesco P, Palma Esposito F, January GG, Fani R, Jaspars M, De Pascale D (2018) Antibiotics from deep-sea microorganisms: Current discoveries and perspectives. *Marine Drugs*, 16(10), 355. <https://doi.org/10.3390/md16100355>.
13. Van Goethem MW, Pierneef R, Bezuidt OK, Van De Peer Y, Cowan DA, Makhalanyane TP (2018) A reservoir of 'historical' antibiotic resistance genes in remote pristine Antarctic soils. *Microbiome*, 6(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0424-5>.
14. Michael I, Rizzo L, McArdell CS, Manaia CM, Merlin C, Schwartz T, Dagot C, Fatta-Kassinos D (2013) Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: A review. *Water Research*, 47(3), 957-995. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.11.027>.
15. Alonso CA, Domínguez C, Heras J, Mata E, Pascual V, Torres C, Zarazaga M (2017) Antibioqramj: A tool for analysing images from disk diffusion tests. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 143, 159-169. <https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2017.03.010>.
16. Herlemann DP, Labrenz M, Jürgens K, Bertilsson S, Waniek JJ, Andersson AF (2011) Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *The ISME Journal*, 5(10), 1571-1579. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.41>.
17. Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, Highlander SK, Schloss PD (2013) Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(17), 5112-5120. <https://doi.org/10.1128/AEM.01043-13>.
18. Spring S, Scheuner C, Göker M, Klenk HP (2015) A taxonomic framework for emerging groups of ecologically important marine gammaproteobacteria based on the reconstruction of evolutionary relationships using genome-scale data. *Frontiers in Microbiology*, 6, 281. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00281>.
19. Khang Y, Ahn M (2015) Phylogenetic diversity of marine bacteria dependent on the port environment around the Ulleng Island. *Korean Journal of Microbiology*, 51(3), 312-317. <https://doi.org/10.7845/kjm.2015.5040>.
20. Simonato F, Gómez-Pereira PR, Fuchs BM, Amann R (2010) Bacterioplankton diversity and community composition in the Southern Lagoon of Venice. *Systematic and Applied Microbiology*, 33(3), 128-138. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2009.12.006>.
21. Igbinosa EO, Okoh AI (2008) Emerging *Vibrio* species: an unending threat to public health in developing countries. *Research in Microbiology*, 159(7-8), 495-506. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2008.07.001>.
22. Paruch L, Paruch AM, Eiken HG, Sørheim R (2019) Aquatic microbial diversity associated with faecal pollution of Norwegian waterbodies characterized by 16S rRNA gene amplicon deep sequencing. *Microbial Biotechnology*, 12(6), 1487-1491. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13461>.
23. Huerta B, Marti E, Gros M, López P, Pompêo M, Armengol J, Barceló D, Balcázar JL, Sara Rodríguez-Mozaz S et al. (2013) Exploring the links between antibiotic occurrence, antibiotic resistance, and bacterial communities in water supply reservoirs. *Science of the Total Environment*, 456, 161-170. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.03.071>.
24. Lanza VF, Tedim AP, Martínez JL, Baquero F, Coque TM (2015) The plasmidome of Firmicutes: impact on the emergence and the spread of resistance to antimicrobials. *Microbiology Spectrum*, 3(2), 3.2.24. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PLAS-0039-2014>.
25. Matamp N, Bhat SG (2019) Phage endolysins as potential antimicrobials against multidrug resistant

- Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus*: Current status of research and challenges ahead. *Microorganisms*, 7(3), 84. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7030084>.
26. Spear JB, Fuhrer J, Kirby BD (1988) *Achromobacter xylosoxidans* (*Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans*) bacteremia associated with a well-water source: Case report and review of the literature. *Journal of Clinical Microbiology*, 26(3), 598-599. <https://doi.org/10.1128/jcm.26.3.598-599.1988>.
27. Hudzicki J (2009) Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. Washington, DC: American Society for Microbiology [Online]. Available at: <https://www.asm.org/Protocols/Kirby-Bauer-Disk-Diffusion-SusceptibilityTest-Pro>.
28. Dalsgaard I (2001) Selection of media for antimicrobial susceptibility testing of fish pathogenic bacteria. *Aquaculture*, 196(3-4), 267-275. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00538-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00538-5).
29. Sandsdalen E, Haug T, Stensvåg K, Styrvold OB (2003) The antibacterial effect of a polyhydroxylated fucophlorethol from the marine brown alga, *Fucus vesiculosus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(8), 777-782. <https://doi.org/10.1023/A:1026052715260>.
30. Baker-Austin C, McArthur JV, Tuckfield RC, Najarro M, Lindell AH, Gooch J, Stepanauskas R (2008) Antibiotic resistance in the shellfish pathogen *Vibrio parahaemolyticus* isolated from the coastal water and sediment of Georgia and South Carolina, USA. *Journal of Food Protection*, 71(12), 2552-2558. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-71.12.2552>.
31. Wright GD, Sutherland AD (2007) New strategies for combating multidrug-resistant bacteria. *Trends in Molecular Medicine*, 13(6), 260-267. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2007.04.004>.