

장내세균의 methyl paraben 내성 획득에 관한 연구

안 병 길

(피어리스 연구실)

A Study on the Resistance Acquirement for

Methyl Paraben of Enterobacter sp.

An Byung-Kil

(Peeres R&D Center)

I. 서 론

일반적으로 화장품에는 방부제가 첨가되어 소량의 균이 유입되더라도 곧 사멸하거나 생장이 저지된다. 그러나 균유입량이 많거나 유입된 균이 방부제 저항성을 가진 경우는 증식하여 제품을 오염시킬 수 있다.

본 연구에서는 주변에서 많이 발견되는 장내세균의 방부제 저항성 획득 가능성을 조사하였다. 방부제로 화장품에서 가장 많이 사용되고 있는 methyl paraben을 선정하였고, 공업용수원으로 사용되는 지하수에서 Enterobacter 속의 세균 3종을 분리하여 시험균으로 하였다. 시험은 최초 분리균들에 대한 methyl paraben의 최소 저해 농도(균 생육가능 최고농도)를 측정하고, 이 농도로부터 단계적으로 methyl paraben 양을 증가시킨 최소 배지에 시험균들을 연속 이식배양시켜 내성을 유도하는 방식으로 진행하였다. 그리고 내성이 유도된 균을 대상으로 methyl paraben 분해능을 조사하였다.

II. 재 료 및 방 법

1. 시험균의 분리 및 동정

EMB agar (Difco, USA)를 분리용 배지로 사용하여 membrane filter 법으로 colony 형태가 다른 수종의 세균을 분리하여 동정하였다(1,2). 동정결과 Enterobacter 속으로 확인된 3종을 시험균으로 선정하였다. 균 동정은 주로 Bergey's Manual에 기재된 내용에 준하여 실시하였으며 일부 시험은 API 세균 동

정 kits (API system, France) 를 이용하여 수행하였다 (3).

2. Methyl paraben 최소 저해농도 (MIC) 측정

분리균들에 대한 methyl paraben의 MIC는 broth dilution method로 측정하였으며 (4), 배지로 Nutrient broth (Difco, USA) 를 이용하였고 methyl paraben은 단일화학 회사에서 구입한 것을 사용하였다.

3. Methyl paraben 내성유도

내성유도용 배지로 Davis 최소 배지를 사용하였다 (5). 조성은 다음과 같다. K_2HPO_4 7g, KH_2PO_4 2g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g, $(NH_4)_2SO_4$ 1g, sodium citrate 0.25g, methyl paraben, 증류수 1000 ml.

내성유도는 다음과 같은 과정으로 실시하였다. 각 시험균에 대한 MIC의 methyl paraben을 첨가한 최소배지에 시험균을 접종하고 30℃에서 5일간 진탕배양 시켰다. 동일한 배지를 사용하여 같은 조건으로 2회 계대배양시킨 후, methyl paraben을 함유한 Nutrient agar (Difco, USA) 로 배양액을 plate culture 하였다.

Nutrient agar에 함유된 methyl paraben 양은 최초 MIC의 110%로 하였다. Plate 상에 잘자란 colony를 선별하여 methyl paraben을 증가시킨 (최초 MIC의 110%) 최소배지에 이식하여 처음과 동일한 조건으로 계대배양시켰다. 같은 방식으로 배지의 methyl paraben 양을 10%씩 단계적으로 증가시키면서 연속이식하여 배양시켰다. 균이식량은 배지량에 대해 배양균액이 1/50이 되게 하였다. 더이상 자라지 않는 농도를 확인하고, 최종으로 생육한 농도를 내성유도균의 MIC로 하였다.

4. Methyl paraben 분해능 측정

Sodium citrate를 빼고 0.10% (wt/wt)의 methyl paraben을 단독 탄소원으로 첨가한 상기의 최소배지에 시험균들을 각각 접종하고 35℃에서 7일간 진탕배양시키면서 배양 3일, 5일, 7일마다 배지에 남아있는 잔존 methyl paraben을 정량하여 비교하였다.

접종균액은 methyl paraben을 함유한 Nutrient agar로 배양한 plate 상 co-

lony를 saline에 현탁시켜 원심분리, 세척하고 다시 saline에 현탁시킨 것을 사용하였으며 (6), 균 접종량은 1×10^4 cells/ml가 되게 하였다.

잔존 methyl paraben의 정량에는 HPLC (Waters, UV 490 Detector)를 이용하였으며 다음과 같은 조건으로 분석하였다 (7). Column : μ -Bondapak C-18, wavelength : 254nm, mobile phase : 70% Methanol, flow rate : 1ml/min (1000psi), sensitivity : 1 AUFS.

III. 결 과 및 고 찰

시험 으로 선정한 분리균들은 *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter gergoviae*로 동정되었다 (표. 1). 분리당시 이들에 대한 methyl paraben의 MIC는 *En. cloacae* ; 0.090%, *En. aerogenes* ; 0.085% *En. gergoviae* ; 0.090%로 측정되었으며, 거의 유사한 methyl paraben 감수성을 갖는 것으로 나타났다.

Methyl paraben을 첨가한 최소배지를 사용하여 연속배양 시킴으로써 내성을 유도한 결과, *En. gergoviae*의 경우는 내성 획득 여부가 분명히 나타나지 않았으나 *En. cloacae*, *En. aerogenes*는 현저한 저항성 증가를 보였다. 내성 유도 후 시험균들에 대한 최종 MIC는 *En. cloacae* ; 0.180%, *En. aerogenes* ; 0.140%, *En. gergoviae* ; 0.100%였다 (표. 2). 내성 유도균의 methyl paraben 분해능은 *En. cloacae*가 가장 높았고, 7일간 배양 후 배지에 포함된 methyl paraben 양의 90% 이상을 분해하였다. *En. aerogenes*는 약 50%의 분해율을 보였으며 *En. gergoviae*는 거의 methyl paraben을 분해하지 못하는 것으로 나타났다 (표. 3). 이 실험의 결과는 유도된 methyl paraben 내성과 연관성을 보여주었다. 즉, MIC가 높을수록 우수한 분해능을 나타내었다. 참고로 말하면 methyl paraben 분해에 있어 균에 따라 생성하는 분해 중간산물에 차이가 있었다. *En. cloacae*의 배양액에서는 많은 양의 phenol이 검출되었으며, *En. aerogenes*의 경우 phenol은 발견되지 않았고 benzaldehyde가 확인되었다. 여기서 두균에 의한 methyl paraben 분해의 pathway가 다른 것으로 추정하였다. 이상의 결과로부터 지하수에서 분리한 3종의 장내세균 중 2종이 methyl paraben 내성을 획득하고, methyl paraben을 분해하여 탄소원으로 이용할 수 있음을 확인하였다.

Methyl paraben은 화장품에서 가장 오래되고 가장 많이 사용되고 있는 방부제이다 (8). 화장품에서 methyl paraben을 이처럼 즐겨쓰는 이유는 이 방부제가 다른 방부제에 비해 화장품에 적합하며 여러가지 장점을 갖고 있기 때문이다. 그러나 가장 오래동안, 가장 많이 사용된다는 것은 균에 가장 많이 노출되는 것을 의미하며 따라서 내성균 발생 가능성도 그만큼 크다고 할 수 있다. 실제로 methyl paraben을 비롯한 paraben류 내성균의 발견에 관한 보고는 상당히 많다(9,10). 이제까지 methyl paraben 내성균, 혹은 분해능을 가진 균으로 *Pseudomonas* 등 산화성 세균이 많이 알려져 왔으며, 본 연구에서 조사한 *Enterobacter*와 같은 발효균의 methyl paraben 내성이나 분해능은 잘 알려져 있지 않다. *Enterobacter*속의 세균은 사람이나 동물의 몸에 존재하며 하수나 지하수 혹은 수도물등 화장품 생산 환경에 근접한 부분에서 가장 많이 발견되는 균들 중의 하나이다. 따라서 이균이 방부제 내성을 보유한다면 그만큼 제품을 오염시킬 가능성도 높다고 할 수 있다.

본 연구를 통해 *Pseudomonas* 등 산화성 세균 뿐만 아니라 제품에 유입될 가능성이 큰 *Enterobacter*속의 세균도 조건이 적당할 경우 연속접촉에 의해 쉽게 methyl paraben내성 및 분해능을 가질 수 있음이 확인되었으며, 이점은 methyl paraben 의존도가 높은 현재의 화장품 방부제 system설계에 있어 충분히 감안되어야 할 것이다. 또한 내성균 발생에 대응하여 methyl paraben을 대체할 수 있는 새로운 방부제에 관한 탐색도 필요하리라 여겨진다.

IV. 요약

*Enterobacter*속의 세균 3종을 분리하여 방부제 내성획득 가능성을 시험하였다. 내성유도 결과 *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter gergoviae*로 동정된 3균중 *En. cloacae*와 *En. aerogenes*가 최초의 methyl paraben MIC보다 각각 2배, 1.6배 증가한 MIC를 나타내었다. *En. gergoviae*는 저항성 증가를 보이지 않았다. 또한 내성이 유도된 2종의 균은 methyl paraben을 분해하여 탄소원으로 이용할 수 있음이 확인되었다.

REFERENCES

1. M. P. Starr, H. Stolp, H. G. Truper, A. Balows, H. G. Schlegel, "The Prokaryotes" Volume II, Springer-Verlag, New York(1981)
2. R. E. Buchanan, N. E. Gibbons, "Bergey's manual of determinative bacteriology", 8th Edition, The Williams & Wilkins Co., Baltimore(1974)
3. G. Rasul Chaudhry, A. N. Ali, "Bacterial metabolism of carbofuran", Applied and Environmental Microbiology, Vol. 54, No. 6, 1414(1988)
4. Hirofumi Takigawa, "Test method of, efficacy of preservative and germicide in cosmetic and toiletry products", Fragrance J., 40(1989. Feb.)
5. 김찬조 & Eds., "미생물학 실험서", 수학사(1983)
6. W. J. Park, S. K. Yang, "Biodegradation of formaldehyde-releasing preservatives", 13th IFSCC Congress Buenos Aires, Vol. 2, 283(1984)
7. Yoshio Okaya, "Analysis of preservatives and germicides in cosmetics", Fragrance J. Special Issue, No. 5 121(1984)
8. R. L. Decker Jr., J. A. Wenniger, "Frequency of preservatives use in cosmetic formulas as disclosed to FDA-1987", Cosmetics & Toiletries, Vol. 102, No. 12, 22(1987. Dec.)
9. R. M. Baird, "Microbial Contamination of cosmetic products", J. S. C. C., 28, 17(1977)
10. 山里一英 & Eds., "微生物の分離法", 395, R&D プラフニフワ(昭和 61)

Ⅴ.1 Morphological and Biochemical Characteristics of Tested Isolates

Reaction	Isolate A	Isolate B	Isolate C
Gram Stain	-	-	-
Motility	+	+	+
Growth on KCN	+	+	-
Catalase	+	+	+
Oxidase	-	-	-
β -Galactosidase	+	+	+
Ornithine Decarboxylase	+	+	+
Arginine Dihydrolase	+	-	-
Lysine Decarboxylase	-	+	+
Urease	+	-	+
Phenylalanine Deaminase	-	-	-

