

藥水에서 分離한 大腸菌群의 一部 重金屬 및
抗生劑耐性에 關한 研究

鄭 趾 淵 · 鄭 文 植

서울大學校 保健大學院

**Antibiotic and Heavy Metal Resistance of Coliform Bacteria
Isolated from Mineral Water**

Jee Yeon Jeong · Moon Shik Zong

School of Public Health, Seoul National University

Abstracts

The purposes of this study were to find out the heavy metal and antibiotic resistant coliform bacteria from mineral water and the resistant factors. For the experiment, mineral water samples were taken from A area and B area during the period from march to July, 1988.

The results of the experiment were as follows;

1. From mineral water, eleven resistant coliforms and one susceptible coliform were isolated.
2. All resistant isolates harbored diverse plasmids of ranged ca. 14-54kb.
3. Susceptible coliform harbored a only plasmid of ca. 2.8 kb.
4. All resistant isolates harbored common size of plasmid of ca. 14kb.
5. As a result of the transformation and agarose gel electrophoresis experiments, resistant factor was R-plasmid.

In conclusion, It is suggested that heavy metal contamination of mineral water is the selective pressure for the plasmid encoding the tolerance. Heavy metal resistance, in some case, is present with antibiotic resistance.

Therefore, heavy metal contamination of mineral water induces antibiotic resistant bacteria.

I. 緒 論

水中環境에서 重金屬의 生物學的 利用과 地質學的 分布는 水中環境에 存在하는 유기 및 무기물질에 의해 크게 左右된다.¹⁾ 특히 최종 분해자인 미생물집단은 毒性物質에 노출될 때 이를 分解 또는 利用할 수 있는 새로운 菌株가 出現할 수 있다.²⁾

대부분의 細菌은 毒性을 갖는 重金屬에 대해 다양한 耐性機轉을 發現시켜 살아갈 수 있다. Gadd와 Griffiths³⁾에 의하면 細菌의 重金屬에 대한 耐性機轉은 세 가지로 區分할 수 있는데, 첫째 各種 重金屬과 착화합물을 形成하여 無毒化시킬 수 있는 代謝產物을 生成하는 경우, 둘째는 세포내에서 毒性이 약한 物質로 轉換시키는 경우, 셋째는 重金屬 物質의 세포내 축적을 감소시키는 方法으로서 이러한 機轉의 대부분이 plasmid에 의해 이루어진다고 한다.

카드뮴은 電氣鍍金, 땀납, 플라스틱안정제, 축전지, 殺蟲劑 및 殺菌劑 등에⁴⁾ 다양하게 사용되고 있다.

카드뮴에 대한 細菌耐性은 그람양성 및 음성 細菌에서 報告되었고⁵⁾ 카드뮴 耐性決定因子는 plasmid⁵⁾와 chromosome에서^{6,7)} 발견되었다.

耐性機轉은 *Staphylococcus aureus*의 경우 카드뮴배출系(efflux system)에 의해서⁸⁾, *Citrobacter species*는 카드뮴과 不溶性의 磷酸鹽을 形成하여 耐性을 갖게 되고⁹⁾ *Klebsiella aerogenes*는 細胞外캡슐을 形成하여 카드뮴의 細胞內 침투를 抑制시킴으로서 耐性을 갖는 것으로 밝혀졌다.¹⁰⁾

납은 주로 제련공정이나 배기가스에 의해 大氣中으로 排出되고 大氣中의 납은 토양과 물을 汚染시키게 된다.¹¹⁾ 이와 같은 납에 대해 많은 細菌들이 耐性을 갖는다는 報告는 있지만^{12,13)} 이들의 機轉에 대해서는 밝혀진 것이 없다.

各種 重金屬에 대해 耐性을 갖는 細菌들은

藥劑耐性을 갖는 경우가 있으며, *Staphylococcus aureus*의 경우 penicillinase plasmid에 의해 Hg, Cd, As, Pb, Zn과 같은 金重屬에 耐性을 갖게 되고¹⁴⁾, *Escherichia coli*도 R-plasmid에 의해 Hg, Co, Ni에 대해 耐性을 갖는 것으로 밝혀졌다.¹⁵⁾

傳達性耐性因子인 R-plasmid에 關해서는國內에서 많은 研究가 進行되었으며^{16,17)} 종래의 生化學的, 血清學的 諸性狀 外에도 抗生劑耐性 및 plasmid 行態調查, plasmid의 分子的 特性 등이 耐性菌株의 由來를 追跡하는데 重要한 端緒가 된다.^{18,19)}

藥水의 各種 環境汚染, 특히 重金屬汚染에 의해 耐性菌株가 出現할 수 있다고 思料되어서 本 研究에서는 서울 시내 일부 藥水중에서 分離한 大腸菌群(coliform)의 납과 카드뮴에 대한 耐性有無와 이들의 抗生劑에 대한 耐性形態 및 分子的 特性을 調査하였다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 實驗菌株

서울시의 A지역 所在 세 곳과 B지역 所在 한 곳에서 各各 3回, 1回씩 總 四回를 1988年 3~7月 동안에 採取하여 分離한 大腸菌群中 1個의 感受性菌株와 11個의 耐性菌株를 實驗菌株로 使用하였다.

2. 實驗材料

가. 培地

大腸菌群의 分離는 선택배지 deoxycholate lactose agar (DL培地, bacto)를 使用하였으며 抗生劑 및 重金屬에 대한 耐性檢査는 Müller Hinton broth(MHB)와 Müller Hinton agar(MHA) 및 trypticase soy broth(TSB) 등을 使用하였다.²⁰⁻²²⁾

나. 抗生劑 및 重金屬

本 實驗에 使用된 抗生劑는 aminoglycoside

계열의 kanamycin(KM, 동아제약)과 tetracycline 계열의 tetracycline(TC, pfizer)을 사용하였으며 重金屬으로는 lead acetate $Pb(CH_3CO_2)_2 \cdot 3H_2O$, Shinyo pure chemical Co. EP)와 cadmium chloride($CdCl_2 \cdot 2 \frac{1}{2}H_2O$, Hayashi pure chemical Ind. EP)를 사용하였다.

3. 實驗方法

가. 大腸菌群 分離

Greenberg 等²³⁾의 方法에 따라 藥水를 滅菌된 容器에 採取하여 즉시 실험실로 운반한 후 300ml 를 멤브레인여과지(porosity 0.45 μm)를 사용하여 여과시킨 후 이 여과지를 DL 培地 위에 놓고 37 °C에서 24 시간 동안 培養하였다.

菌을 分離 同定하기 위해 여과지에서 자란 菌株를 DL 培地에 塗抹(streaking)하여, 37 °C, 24 시간 동안 再培養시켜 자란 菌을 API Identification System(API 20 E Kit, API Int., USA)과 Bergey's Manual of Sys-

tematic Bacteriology 에²⁴⁾ 따라 종(species) 또는 속(genus)까지 同定하였다.

나. 抗生劑耐性 調査

抗生劑 KM, TC를 溶媒에 녹여 -20°C 냉동고에 保管하면서 使用하였다(Table 1).

抗生劑 耐性調査는 寒天平板稀釋法으로^{25,26)} 實施하였으며 培地는 MHA와 MHB를 使用하였다. 抗生劑를 녹여 2배수로 順次的으로 희석시킨 후 MHA에 포함시켜 寒天培地를 만들어 4°C 냉장고에 保管하였다가 다음날 무균상자 안에서 자연건조시켜 培地表面의 습기를 除去한 후 使用하였다.

MHB에 實驗菌株를 접종시켜 37°C에서 18 시간 배양한 후 식염수로 菌液을 희석하여 菌量을 10^5 cells/ml로 한 다음 MHA에 접종하여 37°C, 18 시간 培養시켜서 이들의 成長有無를 肉眼으로 觀察하여 耐性여부를 判別하였다.

對照菌株로는 *E. coli* ATCC 25922를 使用하였다.

實驗에 쓰인 抗生劑 濃度는 NCCLS²⁶⁾ (Na-

Table 1. Solvent and diluents for stock solution of antimicrobial agents

Antimicrobial agents	Solvent	Diluent
Amikacin	Water	Water
Ampicillin	Phosphate buffer pH 8.0, 0.1M	Phosphate buffer pH 8.0, 0.1M
Carbenicillin	Water	Water
Cephalothin	Phosphate buffer pH 6.0, 0.1M	
Chloramphenicol	Ethanol	Water
Gentamycin	Phosphate buffer pH 8.0, 0.1M	Water
Kanamycin	Phosphate buffer pH 8.0, 0.1M	Water
Nalidixic acid	NaOH, 1N	Water
Streptomycin	Water	Water
Tetracycline	Water	Water
Trimethoprim	NaOH to dissolve 0.05N latic or hydrochloric acid, 10% of final volume	Water (may require heat)

tional committee for clinical laboratory standards) 基準에 따랐다(Table 2).

다. 重金屬 耐性調查

Cadmium chloride 와 lead acetate 를 증류수에 녹여 耐性 基準濃度로 만든 후 MHA 와 따로 滅菌시켜 혼합한 후 培地의 酸도가 7.0 이 되도록 1N-NaOH 를 使用하여 調節하였다.

製造된 培地는 4°C 냉장고에 保管한 후 다음 날 무균상자 안에서 자연건조시켜 습기를 제거하여 使用하였다. 實驗菌株를 TSB 에서 37°C, 18시간 培養하여 菌量이 10^5 cells/ml 이 되도록 희석시켜 MHA 에 접종한 후 37°C, 18시간 培養시켜 이들의 成長有無를 肉眼으로 觀察하여 耐性여부를 判別하였다.

重金屬 耐性判別 濃度는 아직 公認된 것이 없어서 Calomiris 等²¹⁾의 方法에 따랐다(Table 3).

對照菌株로는 비교적 다양한 重金屬에 대해 耐性を 갖는 *Bacillus sp.* 를 使用하였다.

라. Plasmid 分離 및 形質轉換(transformation)

Plasmid 分離 및 형질전환은 Maniatis 方法²⁵⁾을 使用하였다.

Maniatis 方法에 따라 分離된 pellet $10\mu l$ 를 0.8% agarose gel 에서 수평전기영동 장치를 利用하여 60V로 2시간 동안 전기영동시켰으며 플라로이드 카메라를 사용하여 plasmid 밴드를 촬영하였다. size marker 로 λ /Hind III 를 使用하였다.

형질전환에 使用된 受容菌(recipient)인 *E. coli* JM 83 과 실험에 使用된 菌株의 特性은 Table 4 와 같다.

E. coli JM 83 을 형질전환된 特性에 따라 各 重金屬 및 抗生劑 培地에 펼쳐서 37°C, 24시간 동안 培養시켜 이들의 成長有無를 肉眼으로 관찰하였으며 成長菌株에서 다시 plasmid 를 分離하여 형질전환 시키기전의 plasmid 밴드 形態와 비교 分析하였다.

Table 2. Criteria of resistant strains expressed by minimum inhibitory concentration

(unit: $\mu g/ml$)	
Antibiotics	Resistant concentration
Amikacin	> 16
Ampicillin	> 16
Carbenicillin	> 128
Cephalothin	> 16
Chloramphenicol	> 16
Gentamycin	> 8
Kanamycin	> 32
Nalidixic acid	> 16
Tetracycline	> 8
Trimethoprim	> 2/38

Table 3. Criteria of resistant strains expressed by heavy metals minimum inhibitory concentration

(unit: $\mu g/ml$)	
Heavy metals	Resistant concentration
Cd	> 200
Zn	> 1600
Cu	> 3200
Pb	> 3200
Al	> 3200
Sn	> 3200

앞에서 記述한 實驗方法을 要約하면 Fig. 1 과 같다.

III. 實驗結果 및 考察

1. 大腸菌群의 菌株同定

大腸菌群에 대한 選擇培地인 DL 培地에 자란 菌株를 그람염색하여 현미경 觀察 및 API 20E Kit 시험 등의 結果를 통해서 이들 菌株가 그람음성, 通性嫌氣性인 短杆狀의 大腸菌群임을 確認하였다.

分離된 菌中 耐性菌株에 대한 API 20E Kit

Table 4. Experimental bacterial strain

Strain	Relevant properties	Source
<i>E. coli</i> strain		
<i>E. coli</i>	Sensitive*	B area
<i>E. coli</i>	Pb ^r Cd ^r **	A area
<i>E. coli</i>	reference strain	ATCC 25922
<i>E. coli</i> JM 83	are, (lac pro A, B) rsPL 080 lac ZM15 (r ⁺ , m ⁺)	Vieira, J. et al.
<i>Enterobacter</i> strain		
<i>Enterobacter</i> sp.	Pb ^r	B area
<i>Enterobacter</i> sp.	Pb ^r TC ^r	
<i>E. intermedium</i>	Pb ^r KM ^r	A area
<i>E. asslomerans</i>	Cd ^r	B area
<i>Klebsiella</i> strain		
<i>K. pneumoniae</i>	Pb ^r Cd ^r TC ^r KM ^r	B area
<i>K. oxytoca</i>	TC ^r	A area
<i>Serratia</i> sp.		
<i>S. marcescens</i>	Cd ^r TC ^r	B area
<i>Serratia</i> sp.	KM ^r	A area
<i>Serratia</i> sp.	Pb ^r Cd ^r KM ^r	B area
<i>S. odorifera</i>	Pb ^r Cd ^r TC ^r	A area
λ/Hind III	size marker	Daniels, D.L et al (1983)

* Sensitive : susceptible strain to heavy metals (Pb, Cd) and antibiotics (KM, TC).

* r : resistant strain.

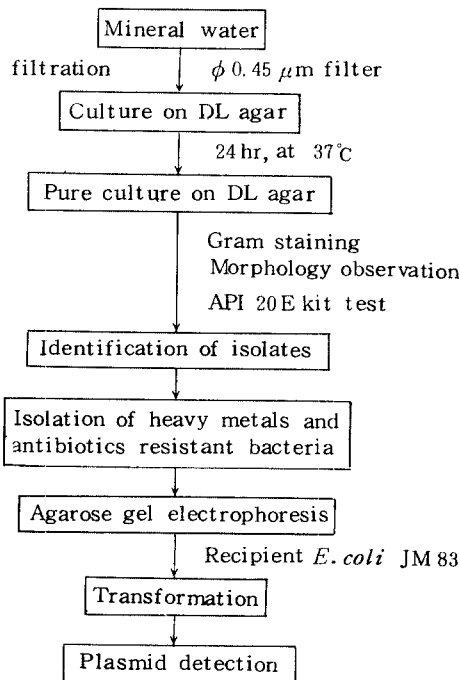


Fig. 1. Flow sheet of Experimental procedure.

試驗結果는 Table 5 와 같다. A지역에서 分離된 1~5번까지의 耐性菌株는 各各 *Escherichia coli* (prob. 56.7%), *Enterobacter intermedium* (prob. 97.2%), *Serratia odorifera* (prob. 99.8%), *Klebsiella oxytoca* (prob. 99.6%), *Serratia* sp. (prob. 61.8%) 있으며 B지역에서 分離된 耐性菌株 6~12번은 各各 *Escherichia coli* (prob. 61.6%), *Enterobacter* sp. (prob. 77.1%), *Enterobacter* sp. (prob. 77.1%), *Enterobacter asslomerans* (prob. 84.8%), *Klebsiella pneumoniae* (prop. 97.5%), *Serratia marcescens* (prop. 98.6%), *Serratia* sp. (prop. 76.0%) 로 同定되었다.

2. 重金屬 및 抗生劑耐性 結果

重金屬 및 抗生劑 耐性結果는 Table 6 과 같다.

같은 細菌이라도 分離된 地域에 따라 耐性이 各各을 알 수 있는데, *E. coli* 경우 A지역에

Table 5. Typical API 20E test results for the isolates

Test	Strain											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
β -galactosidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
arginine dehydrolase	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
lysine decarboxylase	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
ornithine decarboxylase	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
citrate	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
production of H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
urease	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
tryptophane deaminase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
indol	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-
voges -proskauer	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+
gelatin liquefaction	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
mannitol	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
inositol	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-
sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
rhamnose	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
saccharose	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
melibiose	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
amygdaline	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
arabinose	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
cytochrome oxidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
identification probability (%)	56.7	97.2	99.8	99.6	61.8	61.6	77.1	77.1	84.8	97.5	98.6	76.0

+ : positive reaction - : negative reaction

Table 6. Growth response of the isolates to antibiotics and heavy metals (unit: $\mu\text{g}/\text{ml}$)

Strain	Antimicrobial			
	Pb > 3200	Cd > 300	KM > 32	TC > 16
<i>E. coli</i> (1)	+	+	-	-
<i>E. intermedium</i> (2)	-	+	+	+
<i>S. odorifera</i> (3)	+	+	-	+
<i>K. oxytoca</i> (4)	-	-	-	+
<i>Serratia sp.</i> (5)	-	-	+	-
<i>E. coli</i> (6)	-	-	-	-
<i>Enterobacter sp.</i> (7)	-	+	-	-
<i>Enterobacter sp.</i> (8)	-	+	-	+
<i>E. asslomerans</i> (9)	+	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i> (10)	+	+	+	+
<i>S. marcescens</i> (11)	+	-	+	-
<i>Serratia sp.</i> (12)	+	+	+	-

Pb: lead (II)

Cd: cadmium (II)

+ : growth

KM: kanamycin

TC: tetracycline

- : no growth

(1)~(5) : strains isolated from A area ground water

(6)~(12) : strains isolated from B area ground water

서 分離된 것은 카드뮴과 납에 대해 耐性を 갖는 반면에 B지역에서 分離된 것은 重金屬(Pb, Cd)과 抗生劑(KM, TC)에 대해 耐성이 없었다. 이는 細菌의 棲息處環境에 따른 重金屬物質의 分布 차이와 耐성에 關여하는 耐性傳達因子가 같은 속(genus)뿐만 아니라 다른속(genus)사이에도 傳達되기 때문인 것으로 생각된다.^{27, 28)}

本實驗에 使用된 kanamycin과 tetracycline의 作用機轉을 살펴보면 各各 aminoglycoside 계열과 tetracycline 계열의 抗生劑로서 菌細胞內에 축적된 후 단백질 合成을 抑制함으로써 菌을 死滅시킨다는 점에서^{29, 30)} 비슷한 作用機轉을 갖지만, 耐性細菌에 있어서 耐性機轉은 tetracycline 경우 R-plasmid에 의한 排出系(efflux system)에 의해 細胞內의 tetracycline을 細胞外로 排出시킴으로써 耐성을 갖게 되고 kanamycin 경우는 R-plasmid에 의한 Phosphotransferase, acetyltransferase, adenylyltransferase 등과 같은 各種 효소에 의해 kanamycin를 변조(modifying)시킴으로써 kanamycin이 리보솜(ribosome)에 결합하는 것을 抑制시켜 耐성을 갖는 것으로 밝혀져 있다.⁵⁾

따라서 本實驗에서 分離된 耐性菌中 tetracycline과 kanamycin에 대해 同時에 耐성을 갖는 菌은 耐성을 決定하는 유전자가 transposon 형태로 同一 R-plasmid에 存在할 것으로 생각된다.

本實驗에서 分離된 耐性菌株中 *K. pneumoniae*와 같은 병원성 細菌이 重金屬(Pb, Cd)뿐만 아니라 抗生劑(KM, TC)에 대해 耐성을 갖는 것으로 나타났다.

3. Plasmid 分離

耐性菌株의 plasmid 有無를 확인하기 위하여 Maniatis의 方法을 使用하여 plasmid를 分離하여 전기영동시킨 結果는 Fig. 2와 같다.

Plasmid 분자량은 size marker인 λ /Hind III와 비교하여 分離된 plasmid의 전개거리와 size marker 분자량의 상용대수 분포로부터 推定하였다.

Plasmid는 細菌細胞內에 存在하는 염색체와 DNA 분자로서 이중나선구조로 存在하며 이中 抗生劑耐성에 關여하는 plasmid를 R-plasmid라 하며 대부분의 R-plasmid는 RTF(resistant transfer factor)와 RDF(resistant determinant factor) 두 부분으로 구분되며, RTF는 복제에 關여하고 RDF는 耐성에 關여한다.³⁰⁾

Fig. 2에서 나타난 바와 같이 耐性菌株는 14-15kb 크기의 plasmid를 가지고 있었으며 感受性菌株는 2.8 kb 정도의 plasmid를 하나만 가지고 있었다. 感受性菌株에서 발견된 2.8 kb의 plasmid는 耐성에 關여하는 plasmid가 아니거나 本實驗에 使用된 重金屬(Pb, Cd)과 抗生劑(KM, TC) 이외의 다른 종류의 重金屬과 抗生劑 耐성에 關여할 것으로 생각된다.

모든 耐性菌株에서 觀察된 14 kb 정도의 plasmid가 實驗에 使用한 重金屬(Pb, Cd)과 抗生劑(KM, TC) 耐성에 重要한 역할을 할 것으로 생각되며 이의 증명은 各各의 plasmid를 分離하여 형질전환시킨다든지 표현벡터(expression vector)를 使用하여 各 plasmid의 特性을 밝히는 세부적인 實驗을 통해서 밝혀질 수 있다고 본다.

4. 形質轉換(transformation) 및 plasmid 再分離

耐性菌株中 *S. marcescens*(Cd^r, TC^r), *Enterobacter sp.*(Pb^r, TC^r), *E. coli*(Pb^r, Cd^r)를 형질전환시켜 各各의 重金屬 및 抗生劑 培地에 접종시켜 자란 菌株와 이 菌株에서 plasmid를 再分離시킨 結果는 Fig. 3, 4와 같다. Plasmid 밴드패턴에 나타난 結果를 보면 形

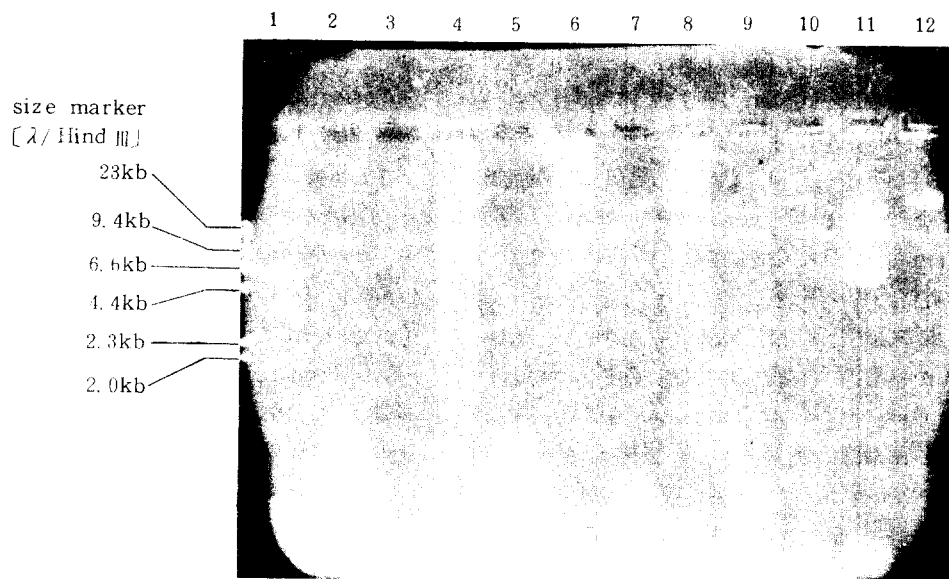


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis pattern of plasmids of the isolates.

- | | |
|---|---|
| lane 1 : <i>E. coli</i> (sensitive) | lane 7 : <i>E. coli</i> (Pb ^r Cd ^r) |
| lane 2 : <i>E. sp</i> (Pb ^r) | lane 8 : <i>S. odorifera</i> |
| lane 3 : <i>E. intermedium</i> (Pb ^r , KM ^r) | lane 9 : <i>S. sp</i> (Pb ^r Cd ^r KM ^r) |
| lane 4 : <i>E. sp.</i> (Pb ^r TC ^r) | lane 10 : <i>K. pneumoniae</i> (Pb ^r Cd ^r TC ^r KM ^r) |
| lane 5 : <i>E. asslomerans</i> (Cd ^r) | lane 11 : <i>S. sp</i> (KM) |
| lane 6 : <i>S. marcescens</i> (Cd ^r TC ^r) | lane 12 : <i>K. oxytoca</i> (TC ^r) |



Fig. 3. Transformants on Müller-Hinton Agar.

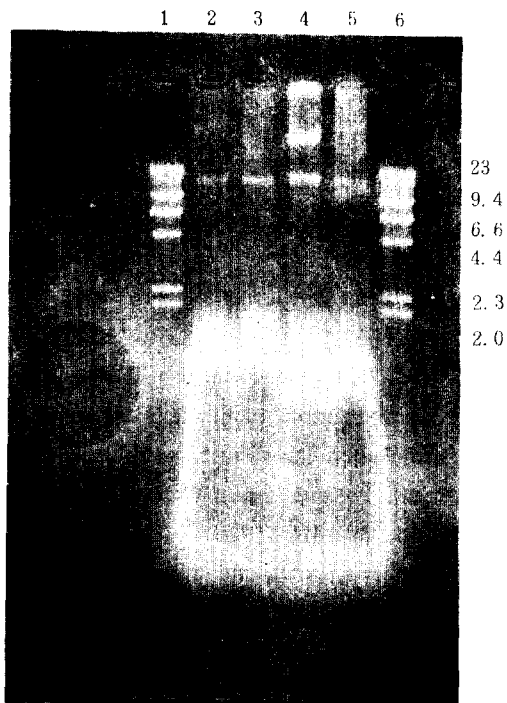


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis pattern of plasmid of the transformants.

lane 1,6 : size marker (λ /Hind III)
 lane 2,3 : *E. sp.* (Pb^r TC^r)
 lane 5 : *S. marcescens* (Cd^r TC^r)
 lane 4 : *E. coli* (Pb^r Cd^r)

質轉換시키기 前과 同一하게 14 kb에서 plasmid 밴드가 觀察되었으나 28 kb와 45 kb 정도에서는 plasmid 밴드가 觀察되지 않았다. 이는 14 kb 정도의 plasmid가 dimer와 concatamer를 形成했기 때문에 28 kb와 45 kb에서 plasmid 밴드가 觀察된 것으로 생각된다.²⁷⁾

위의 結果를 綜合해 볼 때 重金屬(Pb, Cd) 및 抗生劑(KM, TC) 耐性を 갖는 菌株는 plasmid 上에 이들 耐性에 關여하는 유전자가 存在함을 알 수 있었으며 重金屬 종류에 따른 交叉耐性의 存在 與否는 역학적 조사와 유전학적 조사를 통해 밝혀질 수 있을 것이다.

이와같은 實驗結果를 볼 때 藥水의 環境汚染

특히 重金屬汚染이 되었을 때, 지금까지는 抗生劑 남용에 의한 耐性菌株의 出現을 우려해 왔으나 重金屬汚染에 의해서도 抗生劑에 耐性菌株가 出現할 수 있음에 注意해야 할 것으로 생각된다.

IV. 要約 및 結論

1988年 3月~7月까지 서울市內에 있는 藥水中 A지역 한 곳, B지역 세 곳에서 分離한 大腸菌群의 重金屬(Pb, Cd)과 抗生劑(KM, TC) 耐性菌株의 耐性特性 및 耐性決定因子에 關한 實驗結果는 다음과 같다.

1. 分離된 耐性菌株는 A지역의 경우 *E. coli* (Pb^r, Cd^r), *E. intermedium* (Cd^r, KM^r, TC^r), *S. odorifera* (Pb^r, Cd^r, TC^r), *K. oxytoca* (TC^r) *Serratia sp.* (KM^r)였으며 B지역의 경우는 *E. coli* (Sensitive), *Enterobacter sp.* (Cd^r) *Enterobacter sp.* (Cd^r, TC^r), *E. aslomerans* (Pb^r), *K. pneumoniae* (Pb^r, Cd^r, KM^r, TC^r), *S. marcescens* (Pb^r, KM^r) *Serratia sp.* (Pb^r, Cd^r, KM^r)였다.

2. *E. coli*의 경우 A지역에서 分離된 菌株는 납과 카드뮴에 대해 耐性を 갖는 반면에 B지역에서 分離된 菌株는 重金屬(Pb, Cd) 및 抗生劑(KM, TC)에 대한 耐性이 없었다. 이는 細菌의 棲息處環境에 따른 重金屬物質의 分布차이와 耐性에 關여하는 耐性傳達因子가 같은 속(genus)뿐만 아니라 다른 속(genus) 사이에도 傳達되기 때문인 것으로 생각된다.

3. 耐性菌株는 14-45 kb의 plasmid를 가지고 있었으며 14 kb의 plasmid는 모든 耐性菌株들이 가지고 있었다.

4. 感受性 菌株는 2.8 kb의 plasmid만을 가지고 있었다.

5. 形質轉換 實驗結果를 볼 때 耐性菌株의 耐性決定因子가 plasmid에 存在하였다.

參 考 文 獻

1. Mittelman, M.W., and G.G. Geesey: Copper-binding Characteristics of exopolymer from a fresh water sediment bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49: 846-851, 1985.
2. Barkay, T., D.L. Fouts, and B.H. Olson: Preparation of a DNA gene probe for detection of mercury resistance genes in Gram-negative bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49: 686-692, 1985.
3. Gadd, G.M., and A.J. Griffiths: Microorganisms and heavy metal toxicity. *Microbial Ecol.*, 14: 303-317, 1978.
4. Degraeve, N.: Carcinogenic, teratogenic and mutagenic effects of cadmium. *Mutation Research*, 86: 115-135, 1981.
5. Foster, T.J.: Plasmid-determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metal ions in bacteria. *Microbiol. Rev.*, 47: 361-409, 1983.
6. Laddaga, R.A., R. Bessen, and S. Silver: Cadmium-resistant mutant of *Bacillus subtilis* 168 with reduced cadmium transport. *J. Bacteriol.*, 162: 1106-1110, 1985.
7. Surowitz, K.G., J.A. Titus, and R.M. Pfister: Effects of cadmium accumulation on growth and respiration of a cadmium-sensitive strain of *Bacillus subtilis* and selected cadmium-resistant mutant. *Arch. Microbiol.*, 140: 107-112, 1984.
8. Tynecka, Z., Z. Gos, and J. Zajac: Energy-dependent efflux of cadmium coded by a plasmid resistance determinant in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, 147: 313-319, 1981.
9. Macakie, L.E., and A.C.R. Dean: Cadmium accumulation by a *Citrobacter* sp. *J. Gen. Microbiol.*, 130: 53-62, 1984.
10. Bitton, G., and V. Freiholfer: Influence of extracellular polysaccharides on the toxicity of copper and cadmium toward *Klebsiella aerogenes*. *Microb. Ecol.* 4 : 119-125, 1978.
11. Elias, R.W., C.C. Patterson: The toxicological implications of biochemical studies of atmospheric lead. Toribara, Miller, Morrow (ed.), *Polluted Rain*, Plenum Press, New York, 391-400, 1980.
12. Summers, A.O., and S. Silver: Microbial transformation of metals. *Annu. Rev. Microbiol.*, 32: 637-672, 1978.
13. Marques, A.H., F. Congregad., and D.M. Simonpujol: Antibiotic and heavy metal resistance of *pseudomonas aeruginosa* isolated from soils. *J. Appl. Bacteriol.*, 47: 347-350, 1975.
14. Novick, R.P. and C. Roth: Plasmid-linked resistance to inorganic salts in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, 95: 1335-1342, 1968.
15. Smith, D.H.: R-factors mediate resistance to mercury, nickel and cobalt. *Science*, 156: 1114-1116, 1967.
16. 이유헌, 설상용, 조동택, 진도기 : Shigella R-plasmid 의 분자적 특징, 대한미생물학회지, 22 : 35-53, 1987.
17. 홍성노, 이연태 : Shigella 균속의 항균제 내성, 전달성 R-plasmid 및 제거에 관한 연구, 대한미생물학회지, 21 : 33-45, 1986.
18. Brunner, F., A. Margadent, R. Pedazzi, and J.C. Piffarent: The plasmid pattern as

- an epidemiological tool for *Salmonella typhimurium* epidemics; Comparison with the lyotype. J. Infect. Dis., 148: 7-11, 1983.
19. Farrar, W.E. Jr.: Investigation of nosocomial infection by plasmid analysis. Clin. Investigative Med., 6: 213-220, 1983.
 20. Armstrong, J.L., J.J. Calomiris, and R.J. Sedler: The Selection of antibiotic-resistant standard plate count bacteria during water treatment. Appl. Environ. Microbiol., 44: 308-316, 1982.
 21. Calomiris, J.J., J.L. Armstrong, and R.J. Seidler: Association of metal tolerance with multiple antibiotic resistance of bacteria isolated from drinking water. Appl Environ. Microbiol., 47(6): 1238-1242, 1984.
 22. Washington II J.A.: Susceptibility test: Agar dilution Lennette E.H., A. Balows, W.J. Hausler, JR. H. Jean Shadomy (ed.), Manual of Clinical Microbiology, 4th ed., American Society for Microbiology, Washington, D.C., 967-971, 1985.
 23. Greenberg, A.E., R.R. Trussell, and L.S. Clessari: Standard method for the examination of water and waste water. 16th ed., American Public Health Association, Washington, D.C., 827-859, 1985.
 24. Brenner, D.J.: Facultatively anaerobic gram-negative rods., N.R. Krieg and J.G. Holt (ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 1, The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 406-600, 1984.
 25. Maniatis, T.E.F. Fritsch and J. Sambrook: Molecular cloning A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 2nd ed., 1983.
 26. Thornsberry, C. et. al.: Method for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, NCCLS, Villanova, 1983.
 27. Tompkins, L.S., J.J. Plorde, and S. Falkow: Molecular analysis of R-factor from multiresistant nosocomial isolates. J. Infect. Dis., 141(5): 625-636, 1980.
 28. Parish, J.T., and D.W. Hecht: Plasmid profiles in epidemiologic studies of infections by *Staphylococcus epidermis*. J. Infect. Dis., 141(5): 637-643, 1980.
 29. Davies, J., and D.I. Smith: Plasmid-determined resistance to antimicrobial agent, Annu. Rev. Microbiol., 32: 469-477, 1978.
 30. Hardy, K: Bacterial plasmids, Thomas Nelson Ltd., Hong Kong, 104, 1981.