

수환경 녹농균의 세포막 지방산 유사도 분석에 의한 Subgrouping과 활용

정현미* · 김동빈

국립환경연구원 물환경연구부 수질미생물과

본 연구는 수환경이나 먹는샘물 생산 공장 등에서 녹농균이 검출되었을 경우 오염원추적의 1차 조사수단으로 세포막 지방산의 유사도 분석 활용 가능성을 평가함을 목적으로 하였다. 이를 위하여 54개 수환경 분리 균주, 3개 표준 균주, 토양과 분변 분리 균주 4종 등 총 61개 녹농균의 세포 지방산을 분석하였고, 유사도를 산정하여 가계도식 도표(dendrogram)로 나타내었다. 그 결과 61개 균주 모두가 ED (Euclidian Distance) 8.4에서 단일한 cluster로 grouping되었고 ED 6.9에서 4개의 subgroups들로 분류되었다. 그 subgroups들은 현장 분리, 외국의 표준 균주 등 기원에 따라 각각의 subgroup으로 분류되어 미생물 동정에 사용되는 세포 지방산 분석의 유사도 산출이 먹는샘물 공장 등 수환경에서 경제적이고 간단한 오염원 조사의 1차 수단으로서 활용 될 가능성을 보여주었다.

Key words □ cellular fatty acid analysis, *Pseudomonas aeruginosa*, resemblance coefficient, water quality

녹농균은 자연에 널리 분포하는 $0.6 \times 2 \mu m$ 크기의 그람음성 호기성 운동성 간균으로서 식물, 곤충, 어류, 양서류, 파충류, 새, 포유류에 널리 분포하여 가장 넓은 감염대상을 가지고 있는 기회성 병원균이다. 병원성 폐렴의 주된 원인이 되는 등 병원 내에서의 감염에 중요한 녹농균은 환자들 사이의 교차 감염 등 임상 역학 측면에서 typing 전략이 필요함에도 불구하고 최상의 typing 방법에 대한 동의가 이루어지지 않고 있어, 녹농균의 typing에 대해 antimicrobial susceptibility profile, pyocin sensitivity 또는 pyocin production, phage sensitivity, biotype, O-serotype 등과 유전학적 방법으로 pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), field inversion gel electrophoresis (FIGE), random amplification of polymorphic DNA (RAPD) 등 다양한 방법이 제시되어 민감도, 재현성, 응용성, 비용이라는 면에서의 장, 단점에 따라 선택적으로 사용되어 왔다(4,10,11).

한편, 병원성미생물 동정과 같이 특정 목적 종의 동정에 편리한 기존의 생화학적 분석과 달리, 미지의 환경미생물을 분리하였을 경우 이의 1차적 동정을 위하여 세포 지방산 분석법의 사용이 증가하고 있는데(13), 그 원리는 세포 지방산을 methylation 시켜 생성된 fatty acid methyl ester (FAME)의 profile을 gas chromatography (GC)로 분석하여 reference 미생물의 library와 비교하는 것이다. 또한 기 분석된 각 균주의 FAME profile을 이용하여 주된 지방산 조성간에 유사계수 ED (euclidian distance)를 산정함으로써 균주간 유사도를 산정할 수 있다(2,5,9). 최근 미생물의 전체 지방산 조성이 중요한 계통학적 특성이라는 것이 잘 알려짐에 따라 환경 미생물학에서 동정을 위한 일차적 또는

부가적인 수단으로서 사용되는 세균의 FAME 분석법은 중 수준 또는 그 이하의 수준에서도 유용한 계통학적 정보를 제공하기 위해 사용되어 왔다(9).

수질관리에서 녹농균은 낮은 유기물 농도에서도 생존하거나 성장하는 특성으로 인하여(7,8) 생산량이 증대하는 먹는샘물 공장 등의 음용수 관리측면에서 주요 감시 미생물로 간주되면서, 오염에 대한 예방, 발견, 조치 등의 오염원 추적 조사의 필요성이 증가하고 있다. 예로 먹는샘물 제품에서 녹농균이 검출되었을 경우 원수에서 유래한 것인지, 병입 과정 등 공장에서 유래한 것인지를 파악할 필요가 있을 때 원수, 공장 등에서 녹농균을 검사하여 유사도를 측정함으로써 오염원을 발견하고 확실한 조치를 취할 수 있을 것이다. 그러나 녹농균은 자연에 산재해 있고 인간과 동물에 동시에 존재하는 미생물로서 위의 임상 역학 방법들은 오염원이 광범위한 음용수 관리 환경과 같이 다수 시료를 처리하고 정보를 관리하는데 상대적으로 어려움이 있다. 본 연구는 방법이 용이하고 경제적이며 재현성이 뛰어나 미지의 환경미생물 동정용으로 적용성이 증대하는 세포 지방산 분석법을 이용한 세균 동정 및 유사도 분석으로 물에서 분리한 녹농균 균주 추적에의 적용성을 검토하였다. 국내 활용도가 높은 먹는샘물 시료는 녹농균의 검출빈도가 매우 낮아, 지표수인 한강시료를 사용하여 우리나라 지표수에 있는 녹농균을 분리동정하고 유사도를 분석하였다.

재료 및 방법

사용 균주

녹농균 표준균주 3종(ATCC 10145, ATCC 27853, ATCC 29336)과 토양과 분변 분리균주(non-Han) 4종을 국립보건원과

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 032-560-7466, Fax: 032-560-7041
E-mail: hyenic@me.go.kr

생명공학연구소 유전자원센터에서 분양 받아 API20NE (bio-Merieux, France)로 종을 확인하여 사용하였다. 수환경 분리 균주로는 본 실험실에서 분리한 54 개의 균주를 사용하였다. 한강수계의 3 개 지점에서 1997 년 5 월에서 8 월 사이에 채수한 시료에서 53 개의 균주(Han-시기-분리배지-장소)를 분리하였고, 먹는샘물에서 1 개의 균주를 분리하였다. Chung and Kim (1)이 사용한 동일한 방법으로 아스파라진-아세트아미드, 드레이크10-세트리마이드첨가밀크, m-PAC, 드레이크19-세트리마이드첨가밀크 등 다양한 선택 배지에서 분리하여 API 20NE (bio-Merieux, France)를 이용한 생화학적 분석과 GC를 이용한 FAME profile 분석의 두 가지 방법으로 종을 확인하고 유사도 분석에 사용하였다.

지방산 분석

총 61 개 균주를 trypticase soy agar에서 28°C로 24 시간 동안 배양한 후 수확하고 지방산을 추출하여 FID와 capillary column 이 장착된 GC (HP6890, Hewlett Packard)로 구성된 미생물분류 동정장치(Sherlock system, MIDI)로 표준분석원안에 따라 분석하였다. 분석시 GC 기기상태에 대한 동일 조건을 확인하기 위하여 표준품(calibration mixture)으로 분석초기에 2 회, 매 10 개 시료마다 1 회 calibration을 실시하여 0.999이상의 Similarity Index를 확인하였다. 배지의 조제, 배양조건, 추출시약 및 절차 등의 오류를 점검하기 위하여 *Xanthomonas (Stenophomonas) maltophilia* ATCC 13637를 먼저 분석하여 0.82~0.918의 Similarity Index를 확인하였다.

유사도 분석

FAME profile로부터 얻어진 양적인 자료들이 numerical analysis에 사용되었다. 유사도 계산은 데이터 매트릭스를 11 차원으로 구성하여 분석을 시행하였고, 유사도 매트릭스를 피타고라스 방법을 이용한 두 점 사이의 거리를 나타내는 ED 수치로서 유사계수(resemblance coefficient)를 산정하였다. 산정된 ED 값은 Unweighted Pair-Group Method using Averages (UPGMA) 기법을 이용하여 가계도식 도표(dendro-gram)로 나타내었다. 이러한 유사도 분석은 dendrogram 프로그램(Sherlock MIDI, Inc. Library Generation Ver. 1.0)을 사용하였고 프로그램 매뉴얼에 제시된 바에 따라 ED 10 이하는 같은 종, ED 6 이하는 같은 아종(subspecies), ED 2.5 이하는 같은 균주로 판정하였다.

결과 및 고찰

유사도 분석을 통한 subgrouping

녹농균을 subgrouping 하기 전에 녹농균이 속한 *Pseudomonas* 속의 FAME profile의 유사도 분석에 의한 계통분류가 기존의 유전학적 homology를 이용한 계통분류 방법과 비교하여 어떠한 양상으로 나타나는지 알아보았다. *Pseudomonas* 속에서 녹농균의 계통분류학적 위치는 Sherlock library FAME profile의 dendrogram 분석을 통해 Fig. 1과 같이 확인하였다. 유전학적 계

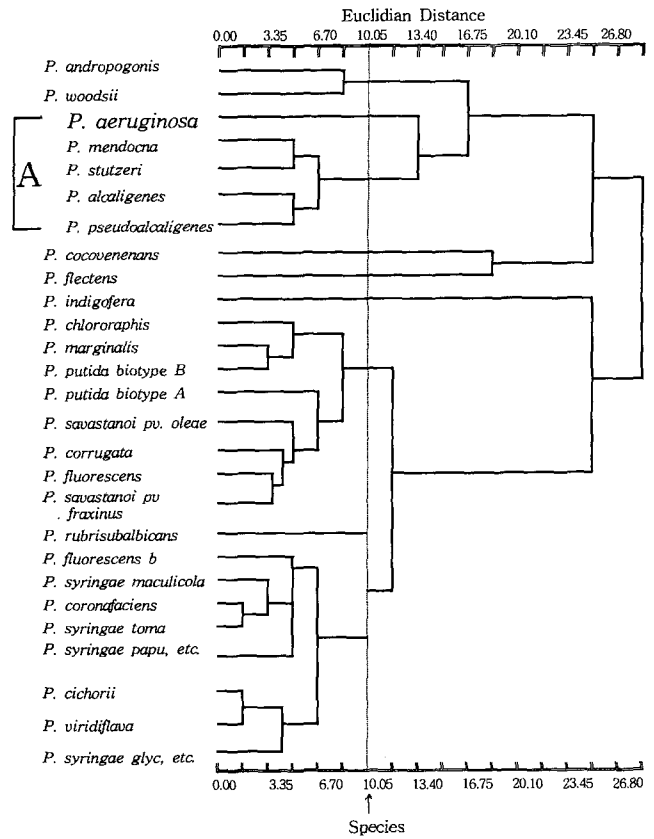


Fig. 1. Grouping of the genus *Pseudomonas* using Sherlock library

통 분류에서 녹농균은 16S rRNA 염기서열 분석 데이터에 의하면 PSEUDOMONADACEAE의 I 그룹에 들어가고 그 안에서 *P. stutzeri*, *P. alcaligenes*, *P. mendocina*, *P. pseudoalcaligenes*와 서로 가깝다(3,12). 이는 Fig. 1의 A (ED 13.4)로 표시된 Sherlock library FAME profile의 dendrogram 분석과 일치한 결과이다. 이러한 결과는 FAME에 의한 녹농균의 subgrouping 작업도 신뢰성이 있음을 간접적으로 보여주는 것으로 사료되었다.

총 61 개 녹농균 균주의 FAME profile들을 분석하고 그 관계를 각 균주들 사이의 유사 계수에 기초해서 dendrogram으로 나타내었다(Fig. 2). FAME profile 분석 결과 ED 8.4에서 61 개 균주 모두와 Sherlock library 데이터가 단일한 cluster로 함께 grouping되어 녹농균 단일 종임을 보였고 ED 6.9에서 4 개의 subgroup들로 나뉘었다(Fig. 2).

Subgroup별 지방산 조성 비교

세균의 지방산은 세포 내막의 인지질과 외막 LPS (lipopolysaccharides)의 lipid A(그램 음성 세균), lipoteichoic acid (그램 양성 세균)등에 존재한다. 이들 지방산은 primer로서 acetyl coenzyme A를 갖는 지방산 coenzyme A ester로부터 합성되기 시작하여 각 종별 특별한 합성경로를 통하여 생성되어진다. 대부분의 세균은 10~19 개의 탄소를 가지는 지방산을 만드는데 그중 16 또는 18 탄소 수를 가지는 지방산이 가장 많은 편이고 16 개의 탄소를 구성된 hexadecanoic acid가 원핵 생물 가운데 매우

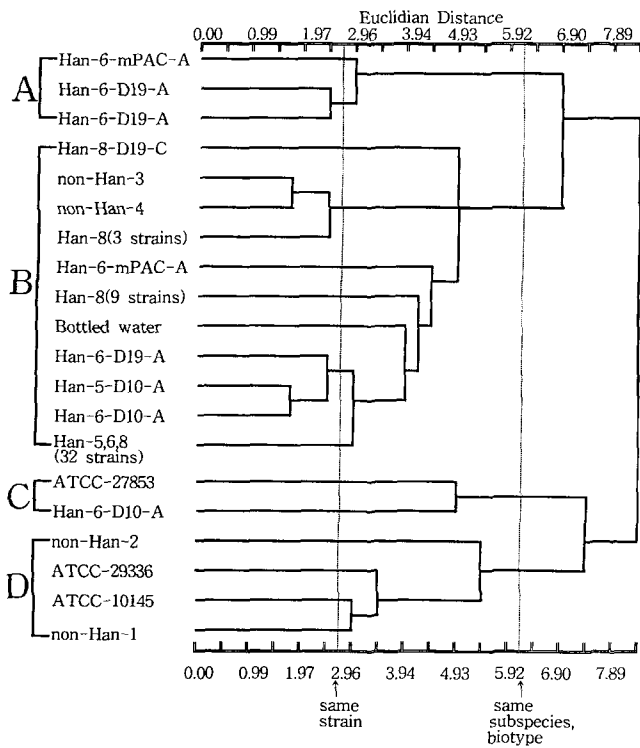


Fig. 2. Subgrouping of 61 isolates of *Pseudomonas aeruginosa*

잘 보존되어 있는 것으로 알려져 있다.

아중 수준관별에 FAME를 사용하기 위해서는 배지, 배양 온도, 시간 등 세심한 조절이 필요하다. 그러나 이러한 조건들의 차이는 일반적으로 주요 지방산 구성 요소들의 생성과 소실에 영향을 주기보다는 상대적인 비율에서 변화를 나타낸다. 그 예로서 *E. coli*의 경우, 배양 온도의 상승은 불포화 대 포화 지방산의 비율이 감소하는 것으로 나타났고(5), monoenoic acid로 부터 cyclopropane 지방산을 형성하는 세균의 경우에는, 정체가

(stationary phase)에 수확된 세포가 대수기(exponential phase)에 수확된 세포에 비하여 cyclopropane 양이 더 증가함이 보고되어 있다(2).

한강에서 분리한 녹농균 균주 들은 동일한 성장 조건에서 배양되었을 때 질적으로 비슷한 지방산 profile을 나타내었고 분리된 모든 균주의 profile은 공통적으로 saturated acid로서 dodecanoic acid ($C_{12:0}$)와 tetradecanoic acid ($C_{14:0}$), hexadecanoic ($C_{16:0}$); hydroxy acid로서 3-hydroxydecanoic acid (3-OH $C_{10:0}$), 2-hydroxydodecanoic acid (2-OH $C_{12:0}$)와 3-hydroxydodecanoic acid (3-OH $C_{12:0}$); cyclopropane acid로서 cis-9-10 methylene hexa-decanoic acid ($C_{17:0}$ cyc)와 cis-11-12 methylene octadecanoic acid ($C_{19:0}$ cyc); unsaturated acid로서 octadecenoic acid의 isomer ($C_{18:1}$) (summed feature 7); saturated ($C_{15:0}$ 의 isomer)와 unsaturated acid ($C_{16:1}$ 의 isomer)가 분리되지 않은 (summed feature 4)로 이루어져 있고, 전체 지방산의 10%이상을 차지하는 것은 hexadecanoic acid ($C_{16:0}$), summed feature 4와 summed feature 7 등 3 개였다.

Sherlock library profile과 한강에서 분리한 녹농균 subgroups의 profile 11 개중 1% 이상을 차지하는 dodecanoic acid ($C_{12:0}$), hexadecanoic acid ($C_{16:0}$), 3-hydroxy decanoic acid (3-OH $C_{10:0}$), 2-hydroxydodecanoic acid (2-OH $C_{12:0}$), 3-hydroxydodecanoic acid (3-OH $C_{12:0}$), octadecenoic acid의 isomer ($C_{18:1}$)인 summed feature 7, saturated ($C_{15:0}$ 의 isomer)와 unsaturated ($C_{16:1}$ 의 isomer)가 분리되지 않은 summed feature 4 등 7개 지방산에 대한 비교 결과를 Table 1에 나타내었다. 61 개 분리 녹농균의 지방산 평균 profile은 Sherlock library profile과 거의 일치하였지만 subgroup A는 dodecanoic acid ($C_{12:0}$)의 상대적 비중이 높았고 subgroup C는 dodecanoic acid ($C_{12:0}$)과 3-hydroxydecanoic acid (3-OH $C_{10:0}$)의 비중이 높게 나타나는 등 지방산 조성량의 순위에 있어 특징적인 결과를 나타내었다. 한강에서 분리한 녹농균들의 평균 profile은 Sherlock library profile과 거의 일치하였다.

Table 1. Composition of cellular fatty acids of *Pseudomonas aeruginosa* and its subgroups

Subgroup	No. of strains	% values ^a for the following fatty acid						
		Saturated			Hydroxy			Summed Feature
		12:0	16:0	3-OH 10:0	2-OH 12:0	3-OH 12:0	# 4	# 7
Sherlock library profile	-	3.17	24.69	3.64	4.41	4.34	16.64	39.53
All Isolated	61	3.29±0.83	24.94±1.57	3.52±0.87	4.14±0.67	4.02±0.62	14.47±2.31	41.16±1.90
Subgroup A	3	5.4±0.62 (4.8-5.86)	26.5±1.1 (25.8-27.71)	4.62±0.58 (4.03-5.18)	4.46±0.8 (3.62-5.2)	4.11±0.19 (3.94-4.31)	11.46±0.29 (11.23-11.79)	37.40±0.49 (37.01-37.95)
Subgroup B	52	3.13±0.44 (2.44-4.62)	25.55±1.39 (21.77-29.41)	3.48±0.65 (2.3-4.23)	4.16±0.67 (2.31-5.26)	4.05±0.64 (2.36-5.33)	14.28±1.33 (12.41-17.25)	42.35±1.24 (39.23-44.79)
Subgroup C	2	5.67±1.22 (4.81-6.53)	22.81±0.11 (22.73-22.88)	6.26±1.33 (5.32-7.2)	5.03±0.37 (4.77-5.29)	4.7±0.7 (4.18-5.17)	17.24±2.23 (15.66-18.82)	40.13±2.00 (38.71-41.55)
Subgroup D	4	3.19±0.99 (1.71-3.81)	22.70±0.61 (22.01-23.26)	3.3±0.77 (2.3-4.02)	4.11±0.60 (3.36-4.72)	4.10±0.48 (3.75-4.81)	20.87±2.47 (18.06-23.86)	38.76±2.36 (35.76-40.9)

^aMean±SD (Min. value-Max. value).

유사도 분석의 활용

먹는샘물 등의 음용수 관리시에 원수뿐만 아니라 생산되어 유통되기까지의 미생물 2차 오염에 대한 주의가 필요하며 오염원에 대한 효과적인 조치가 필요하다. 병입수와 원수는 원래 존재하는 미생물상(autochthonous microbial flora)에 의해 특징 지워 지지만 드물게 병입 과정의 펌프, 배관, 기계류, 고무링(rubber gasket), 종사자 등에 오염되어 있는 외래 미생물(allochthonous microorganisms)이 유입되어 오염 될 수 있다. 일례로 포르투갈에 있는 먹는샘물 병입 공장에서 5년간 선택 배지(cetrimide agar with nalidixic acid)로 분리한 추정 녹농균의 단백질을 추출하여 SDS-PAGE에 의한 단백질 profile을 이용하여 유사도를 dendrogram으로 분석한 결과 2개의 cluster로 분리되어 2개의 오염원으로 설명한 사례가 있다(6).

한강에서 분리한 53 균주의 대부분(92.5%)은 동일한 subgroup B에 속하였고 1 균주만 제외한 52개 균주가 subgroup A와 B에 속하였다. 반면 표준 균주 ATCC 10145, 29336는 subgroup D에, 표준 균주 ATCC 27853은 subgroup C에 속하였다. 한강 분리균주와 외국의 표준균주는 다른 subgroup으로 분류되어 분리원(origin)에 따른 구분이 가능함을 보여 주었다(Fig. 2). 외국에서 유래한 표준균주는 한 개의 균주가 혈액에서 분리되었고 다른 균주도 환자의 분변 등에서 분리되었을 가능성이 높아, 이와 같이 분리원에 따라 지방산 분석에 의한 subgroup이 뚜렷이 구분되므로, 세포의 지방산 분석을 통하여 환경에서 미생물 오염을 추적할 수 있는 경제적이고 신속한 1차 조사 수단으로 유용하게 사용될 수 있는 가능성을 제시하고 있다. 특히, 먹는샘물 공장의 위생 상태 불량에 의하여 녹농균이 오염되는 경우가 보고되었는데, 먹는샘물 병입 공장에서 원래 존재하는 미생물상에 대한 database를 구축하면 검출 미생물의 지방산 조성과의 유사도를 통한 ED 값(동일 strain의 ED 2.5) 산정으로 비교 분석하여 오염원에 대한 정보를 얻을 수 있을 것이다.

참고문헌

1. Chung, H.M. and D.B. Kim. 2000. Improving detection method of *Pseudomonas aeruginosa*, an important index organism of bottled

- water quality. *Korean J. Microbiol.* 36, 242-248.
2. Knivett, V.A. and J. Cullen. 1965. Some factors affecting cyclopropane acid formation in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 96, 771-776.
3. Krieg, N.R. and H.G. Holt. 1989. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*(Vol 1), p161. Williams & Wilkins, Baltimore/London.
4. Maher, W.E. M. Kobe, and R.J. Fass. 1993. Restriction endonuclease analysis of clinical *Pseudomonas aeruginosa* strains: useful epidemiologic data from a simple and rapid method. *J. Clin. Microbiol.* 31, 1426-1429.
5. Marr, A.G. 1962. Effect of temperature on the composition of fatty acids in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 84, 1260-1267.
6. Morais, P.V., C. Mesquita, J.L. Andrade, and M.S. da Costa. 1997. Investigation of persistent colonization by *Pseudomonas aeruginosa*-like strains in a spring water bottling plant. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 851-856.
7. Morelra, L., P. Agostinho, P.V. Morais, and M.S. Coata. 1994. Survival of allochthonous bacteria in still mineral water bottled in polyvinyl chloride(PVC) and glass. *J. Appl. Bacteriol.* 77, 334-339.
8. Mosso, M.A., M.C. Rosa, C.R.C. Vivar, and M.R. Medina. 1994. Heterotrophic bacterial populations in the mineral waters of thermal springs in Spain. *J. Appl. Bacteriol.* 77, 370-381.
9. Mukwaya, G.M. and D.F. Welch. 1989. Subgrouping of *Pseudomonas cepacia* by cellular fatty acid composition. *J. Clin. Microbiol.* 27, 2640-2646.
10. Ogle, J.W., J.M. Janda, D.E. Woods, and M.L. Vasil. 1987. Characterization and use of a DNA probe as an epidemiological marker for *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Infect. Diseases* 155, 119-126.
11. Renders, N., Y. Romling, H. Verbrugh, and A. van Belkum. 1996. Comparative typing of *Pseudomonas aeruginosa* by random amplification of polymorphic DNA or pulsed-field gel electrophoresis of DNA macrorestriction fragment. *J. Clin. Microbiol.* 34, 3190-3195.
12. Romling, U., J. Wingender, H. Muller, and B. Tummeler. 1994. A major *Pseudomonas aeruginosa* clone common to patient and aquatic habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1734-1738.
13. Welch, D.F. 1991. Applications of cellular fatty acid analysis. *Clin. Microbiol. Rev.* 4, 422-438.

(Received September 10, 2002/Accepted October 30, 2002)

ABSTRACT: Subgrouping of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates by Resemblance Coefficiency of the Cellular Fatty Acid Analysis

Hyen-Mi Chung and Dong-Bin Kim (Water Microbiology Division, Water Research Department, National Institute of Environmental Research, Incheon 404-170, Korea)

To find the applicability of resemblance of the fatty acid methyl ester (FAME) profile analysis to the primary examination for the tracing *P. aeruginosa* contamination in the environment and water plants, we designed this study. Of 61 *P. aeruginosa* isolates including 3 reference strains, 4 fecal or soil isolates and 54 water isolates, the resemblance coefficients of the FAMEs were calculated as euclidian distance (ED) and expressed as dendrogram. The 61 strains were clustered as the same group in the ED 8.4, and divided into 4 subgroups in the ED 6.9. The water isolates from Han River were classified into distinctively different subgroups from reference strains. These results provide the possibility of the dendrogram from FAME profile as a useful tools for tracing contamination as well as for identifying the species, especially in case of *P. aeruginosa*.