먹는물 약수터 장구균의 검출 특성과 반코마이신 내성 현황

Detection of Enterococci and their Vancomycin Resistance in Drinking Spring-Water

윤태호† · 이 향 · 이승주 · 여인학 · 엄석원
Tae-Ho Yoon† · Hyang Lee · Seung-Joo Lee · In-Hak Yeo · Seok-Won Eom

서울특별시 보건환경연구원
Seoul Metropolitan Government Research Institute of Public Health and Environment

(2010년 9월 9일 접수, 2010년 10월 29일 채택)

Abstract : This study was performed to detect enterococci strain as an indicator of faecal contamination, to identify of 16S rDNA sequence and vancomycin resistance by MIC (Minimum Inhibitory Concentration) test from drinking spring-water samples in Seoul. The detection frequency of enterococci was 42 (19.8%) among 212 samples, and its concentration was ranged from 0 to 110 CFU/100 mL. These results were confirmed the possibility as an indicator microorganisms that similar to the frequency of *E. coli* detection (*t* test *p*-value 0.268, significant level 0.05). Isolated 56 enterococci samples were identified by 16S rDNA sequence data and their NCBI BLAST searching. They were identified to *Enterococcus faecalis* of 24 samples, *E. faecium* (10), *E. casseliflavus* (10), *E. gallinarum* (3), *E. hirae* (2), *E. durans* (2), *E. sanguinicola* (1). *E. faecalis* was dominant species that clinical case report of a domestic was similar. Vancomycin resistant enterococci (VRE) of 53 samples showed that *vanB* and *vanC1*/*C2* type with 2 and 12 case, respectively. These results indicated that the drinking spring-water quarantined to fecal pollution for block out outbreak of gastrointestinal symptom with using such as disinfection process.
Key Words : *Enterococci, Drinking Spring-water, VRE*

요약 : 본 연구는 서울시에 위치한 먹는물 약수터를 대상으로 분변오염 지표미생물인 장구균 검출 특성과 염기서열을 이용한 동정 및 반코마이신 내성 장구균 특성을 평가하였다. 먹는물 약수터의 장구균은 212건의 시료 중 42건(19.8%)에서 0~110 CFU/100 mL의 범위로 검출되었고 대장균의 검출빈도와 유사(*t*-검정, *p*-값 0.268, 유의수준 0.05)하여 지표미생물로서 적용가능성을 확인하였다. 16S rDNA 염기서열을 이용한 동정에서는 표본적으로 추출한 56개 검체에서 *Enterococcus faecalis* (24검체), *E. faecium* (10검체), *E. casseliflavus* (10검체), *E. gallinarum* (3검체), *E. hirae* (2검체), *E. durans* (2검체), *E. sanguinicola*(1검체) 순서로 나타났으며, 가장 높은 빈도로 검출되는 *E. faecalis*는 국내 병원환자의 임상검체에서 분리되는 우점종 분포와 유사하였다. 반코마이신 내성 장구균은 검체 시료 53검체 중 14(26.4%)검체에서 *vanB* 및 *vanC1*/*C2* 형이 각각 2와 12검체가 확인 되었다. 본 연구결과는 먹는물 약수터가 분변오염 등으로 인하여 장구균 검출 가능성이 있을 것으로 판단되어 소독 등 외부오염물질 유입 차단 및 저감대책이 필요할 것을 시사하였다.
주제어 : 장구균, 먹는물 약수터, 반코마이신 내성 장구균

1. 서 론

장구균은 거의 모든 자연계에 생존하며 토양, 음식, 물, 동물, 새, 곤충 등에서 분리되며, 동물과 사람 모두 장관계(Enteric)에 주로 분포되어 있고 다음으로 비뇨 생식계에 상재하는 통성혐기성 그람양성 구균이다.[1)] 비교적 독성이 약하여 정상인에서는 질병을 일으키지 않으나 노인이나 면역저하 환자 또는 병원에 입원중인 환자에게 요로감염, 창상감염, 균혈증 등의 기회 감염증을 유발하는 것으로 알려져 있으며, *Enterococus faecalis*, *Enterococcus faecium*이 임상적으로 중요하게 취급되며 최근에는 반코마이신 내성 장구균이 병원내 감염의 주요 원인중 하나로 취급되고 있다.[2)]

세계보건기구(WHO)에서는 먹는물에서 대표적인 분변오염지표미생물로 대장균(*E. coli*)과 장구균(Enterococci)을 선정하여 각국의 음용수에 대한 가이드라인을 설정하고 있다.[3)]

장구균이 분변오염 지표세균으로 주목받기 시작한 것은 대장균에 비해 역사가 짧다고 할 수 있으나, 이에 대한 시험방법이 정립되어 있으며 물 환경에서는 증식하지 않으나 *E. coli* 보다 오래 생존 가능하고, 열과 소독제에 대한 내성이 강한 특성을 나타내고 있어, 지표세균으로서 유용성이 확보되어 있다고 볼 수 있다.[4)]

실제로 미국 환경보호청(USEPA)에서는 먹는물로 이용되는 지하수와 위락용수에서 장구균의 존재 여부를 검사하도록 규정하고 있으며, 호주, 뉴질랜드, 유럽(EU) 등 선진 외국에서는 장구균을 분변오염지표항목으로 설정하여 관리하고 있다.[5,6)] 한편, 기존 병원내 감염의 주요 원인 병원균으로 인식되어졌던 장구균은 도시하수나 가축사육 및 인체분변 배출로 인해 반코마이신 항생제 내성 장구균이 물 환경에 노출되어지는 것으로 보고되고 있으며 항생제 내성 장구균을 섭취 하였을 경우 인체에 유해하다는 결과도 보고되고 있다.[7~11)] 아직까지 국내에서는 먹는물 약수터(먹는물공동시설) 등 먹는물에 대한 장구균 검사 방법이나 현황조사가 미흡한 실정이며, 체계적인 조사가 이루어지지 않은 상태이다. 따라서 본 연구는 환경에 노출되어 있고 사람이 자

† Corresponding author E-mail: fuco99@seoul.go.kr Tel: 02-570-3287 Fax: 02-570-3374

주 이용하지만 상수도와 같이 소독 등의 물리화학적 처리가 이루어지지 않는 취약 시설인 먹는물 약수터를 대상으로 장구균 오염 실태를 조사하고 검출된 장구균에 대한 16S rDNA 분석 등을 통한 장구균 동정과 반코마이신 내성 장구균(VRE: Vancomycin Resistant Enterococci)의 검출 특성을 분석하고자 하였다.

2. 연구대상 및 방법

2.1. 연구대상

먹는물 약수터에 대한 장구균 분포실태 및 검출특성을 연구하기 위해 서울시에 위치한 총 307개 약수터(2009년 기준)중 176개 약수터에 대해 2009년 4월부터 9월 까지 시료를 채취하여 212건에 대한 장구균 정량 분석을 실시하였다. 한편, 검출경향 비교를 위해 환경부에서 고시한 수질오염공정시험기준 방법으로 지표미생물인 총대장균군과 대장균을,[12] 먹는물수질공정시험기준 방법으로 일반세균을[13] 정량분석 하였다.

2.2. 장구균 분석방법

채취된 샘플은 막 여과장치(Millipore Microfil system)을 이용하여 여과 47 mm, 여과경 0.45 μm 크기의 멸균된 멤브레인 필터에 시료 100 mL을 여과하였다. 여과된 필터는 USEPA에서 제시한 장구균 검출실험법에 준하여 실험하였는데,[14] 우선 여과된 필터는 장구균 선택배지인 mEIA (membrane-Enterococcus Indoxyl-β-D-Glucoside, Difco) 고체배지에 올려놓고 충분히 배지에 스며들도록 정치 한 후 페트리디쉬를 거꾸로 뒤집어 41±0.5℃ 인큐베이터에서 24± 2시간 배양하였다. 배양 후 여과지 위에 형성된 전형적인 blue halo 콜로니를 계수하여 100 mL당 장구균 수치로 환산하였다.

장구균 수치로 확정된 장구균은 확인 실험을 통하여 최종 확정하는데, 여지에 형성된 장구균 추정 콜로니를 BHI (Brain heart infusion, Difco) 사면고체배지에 이식하여 35℃에서 48시간 배양하고, 이를 BEA (Bile Esculin Agar, Difco) 배지에 획선 접종하고 6.5% NaCl이 첨가된 BHI 액체배지에 이식한 후 35℃에서 48시간 배양하였다. 배양 후 BEA 배지에서 검은색 반응과 BHI 액체배지에서 성장여부를 관찰하였고, BHI 액체배지를 45℃에서 48시간 배양 관찰하여 최종적으로 장구균을 확정하였다.

2.3. 장구균의 생화학적동정과 16S rDNA을 이용한 동정 및 계통분석

생화학적 동정을 위해 막여과법에 의해 형성된 장구균 콜로니를 순수분리 배양한 후 BHI 고체배지에 백금이를 이용하여 획선접종하고 36±2℃에서 24~48시간 배양하였다. 배양하여 형성된 단일콜로니는 0.3 mL 멸균증류수에 현탁한 후 멸균된 면봉을 이용하여 Columbia sheep blood agar (MB cell) 배지가 든 페트리디쉬에 완전 도말하였다. 도말된 페트리디쉬는 anaerobic jar (Oxoid)를 이용하여 혐기성 조건하에서 36±2℃ 24시간 배양하였다. 혐기성 배양상태에서 자란 배양물은 멸균된 증류수 2 mL에 희석농도가 4 McFarland 이상의 농도가 되도록 하여 API 20 strep kit (Biomerieux)의 사용지침에 따라 접종한 후 1차 판독은 4시간 배양 후, 2차 판독은 24시간 배양 후 수행 하였다. 판독은 Kit 제조회사에서 제공해주는 지침에 따라 장구균을 동정하였다.

장구균으로 확정된 세균을 16S rDNA gene으로 동정하기 위해 단일 콜로니로 순수배양 보관된 균을 TSA에 획선접종하여 배양한 후 염기서열 분석을 (주)마크로젠에 의뢰하였다.[15] 의뢰된 cell에서 genomic DNA를 추출한 후 16S rDNA gene을 증폭하기 위해 사용한 primer인 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCA-3')와 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT518FCCAGCAGCCGCGGTAATACG -3')로 end sequencing을 수행한 후 얻은 결과물은 internal primer인 518F (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3')와 800R (5'-TACCAGGGTATCTAATC-3')을 사용하였다.[16] 시퀀싱 반응은 ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems)을 이용하여 진행하였으며 PTC-225 Peltier Thermal Cycler (MJ Research) 를 사용하여 PCR 반응을 진행하였고, 반응물 2 μL를 1% agarose gel에 전기영동하여 약 1.5 kbp 크기를 확인하였다.[17] 정제된 PCR product는 3차 증류수에 다시 녹여 ABI PRISM 3730XL Analyzer에서 분석을 하였다. 분석된 염기서열을 이용한 장구균 동정은 미국 NCBI (National Center for Biotechnology Information)에서 제공하는 BLAST를 이용하여 염기서열 상등 비율을 99% 이상으로 하였다.

계통분석을 실시하기위해 GenBank에 등재되어 있는 *E. durans* (accession no. AJ420801), *E. faecium* (AY735408), *E. hirae* (AJ420799), *E. faecium* (AJ420800), *E. avium* (AY 442814), *E. raffinosus* (AJ301838), *E. dispar* (AF061007), *E. asini* (Y11621), *E. saccharolyticus* (AJ301839), *E. flavescens* (AJ420802), *E. casseliflavus* (AJ301832), *E. gallinarum* (AJ 420805), *E. faecalis* (AJ420803), *E. columbae* (AJ301828), *E. cecorum* (AF061009))과 표준균주 *E. faecalis* (ATCC 29212) 및 *Vibrio fluvialis* (X74703)을 참고로 하여 계통수를 제작하였다.[18,19] 제작된 계통수에 시료로부터 분석된 염기서열 자료를 삽입하여 Neighbor-Joining 연산법으로 1,000회 반복하여 신뢰도를 확보하여 CLUSTAL-W 방법으로 정렬된 결과를 얻은 후 MEGA4 프로그램을 이용하여 계통분석을 실시하였다.[20~22]

2.4. 먹는물 약수터에서 검출된 장구균 반코마이신 내성 시험

분리된 장구균에 대해서 반코마이신 내성균을 선별하기 위해 균 성장 여부를 확인하고 희석액에 2 McFarland 탁질용액을 만든 후 BHI agar 평판배지에 0.1 mL을 모든 표면

Table 1. Minimal Inhibitory Concentration test for phenotype interpretation of vancomycin resistance enterococci using E-test kit

Phenotype	$MIC_{Vancomycin}$ (μg/mL)		$MIC_{Teicoplanin}$ (μg/mL)	Species	Resistance type
vanA	≥32 (R)	and	≥16 (I-R)	*E. faecalis*, *E. faecium*	Acquired
vanB	≥8~256 (I-R)	and	≤4 (S)	*E. faecalis*, *E. faecium*	Acquired
vanC1	4~16 (S-I)	and	≤4 (S)	*E. gallinarum*	Intrinsic
vanC2	4~16 (S-I)	and	≤4 (S)	*E. casseliflavus*, E. flavescens	Intrinsic
vanD	64 (R)	and	≤4 (S)	*E. faecium*	Acquired
vanE	16 (I)	and	≤4 (S)	*E. faecalis*	Acquired

(R) : Resistant, (I) : intermediate, (S) : Susceptible

에 완전히 획선 접종 도말한 후 E-test (AB biodisk, Sweden) Kit중 반코마이신(0.016~256 μg/mL)과 테이코플라닌(0.016~256 μg/mL)를 사용하여 35℃에서 24~48시간 배양하여 항생제 감수성 결과를 확인하였다. 항생제 감수성(MIC: Minimal Inhibitory Concentration)시험 해석은 제조사 지침과 CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)기준에 따라 수행하였으며, Table 1에 장구균 항생제 감수성 시험의 판단기준을 나타내었다.[23)]

3. 결과 및 고찰

3.1. 먹는물 공동시설에서 지표미생물 평가

조사대상 먹는물 약수터 212건 대해 지표미생물을 측정한 결과는 Table 2에 나타내었다. 먹는물의 위생상태를 나타내는 지표인 일반세균은 먹는물 적합기준이 100 CFU/mL 이하인 점을 고려할 경우 기준 초과 검출률은 8.5%로 나타났다. 총대장균군의 경우는 검출률이 84.0%로 나타났는데, 이는 기존의 먹는물 수질공정시험기준에 고시된 정성 분석방법을 사용하지 않고 하천수 등에 적용되는 수질오염공정시험기준에 따라 정량 분석을 실시한 결과이다. 총대장균군과 일반세균은 일반적으로 환경시료에서 분변오염을 지표하기에는 적당하지 않는 것으로 알려져 있다.[24)] 단지 물의 위생학적인 상태를 파악하는 차원에서 접근 할 경우 수질인자로 타당성이 있다고 할 수 있으나, 약수터와 같이 외부환경에 노출되어 있고 소독 등의 수처리가 이루어지지 않는 경우에는 본 연구의 측정 결과처럼 검출률이 높게 분포 할 것으로 판단된다. 먹는물 약수터의 분변오염을 좀더 명확하게 나타낼 수 있는 지표로서 대장균이 현재 널리 이용되고 있는데, 분변오염과 밀접한 관련이 있는 지표미생물인 대장균의 경우 검출률이 18.4%로 나타났고, 장구균의 경우도 19.8%로 대장균과 유사한 검출률을 나타냈다. 대장균의 분포 범위는 0~81 CFU/100mL, 장구균의 분포범위는 0~110 CFU/100 mL이고 평균 농도는 각각 2 CFU/100 mL로 나타나 물에서 분변오염을 측정하는 지표미생물로서 유용성이 높을 것으로 판단되었다. 통계학적인 분석법을 사용하여 대장균과 장구균에 대한 *F*-검정 결과 유의수준 0.05에서(양측검정 *p*-value 0.174) 두 분변오염 지표세

Table 2. Indicator microorganism quantity from a drinking spring-water in Seoul (n=212)

Item (unit)	Min	Max	Mean	S.D.	Detection ratio(%)
pH	5.3	8.1	6.6	0.4	not applied
Turbidity (NTU)	0.0*	3.6	0.2	0.3	not applied
SPC bacteria (100 CFU/mL)	0	1,000	48	135	8.5
Total coliforms (CFU/100 mL)	0	1,986	102	266	84.0
E. coli (CFU/100 mL)	0	81	2	10	18.4
Enterococci (CFU/100 mL)	0	110	2	9	19.8

*: Below detection limit, S.D.: Standard Deviation, SPC: Standard Plate Count

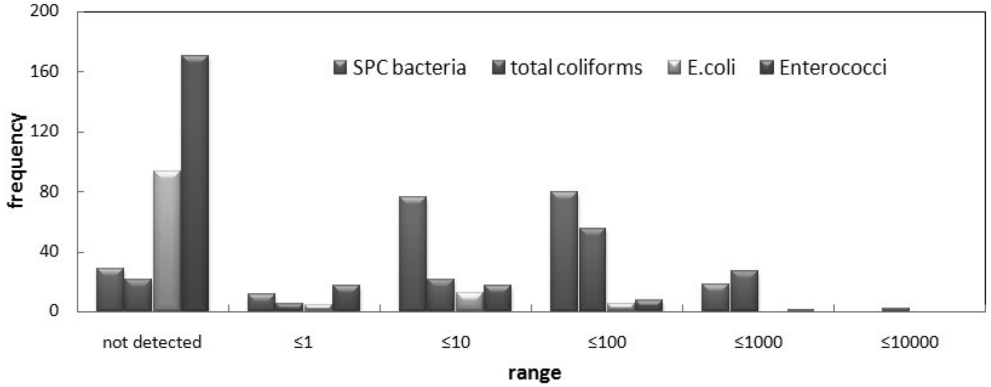


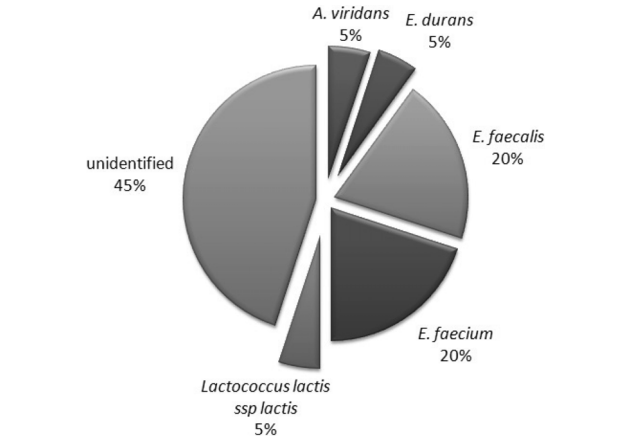
Fig. 1. Detection levels of indicator microorganisms from drinking spring-water in Seoul.

균이 동일하게 약수터에 적용될 수 있는 것으로 나타났으며, 동일하게 적용할 수 있을지를 판단하기 위해 실시한 *t*-검정 결과 유의수준 0.05에서(단측검정 *p*-value 0.268) 적용 가능성을 확인하였다.

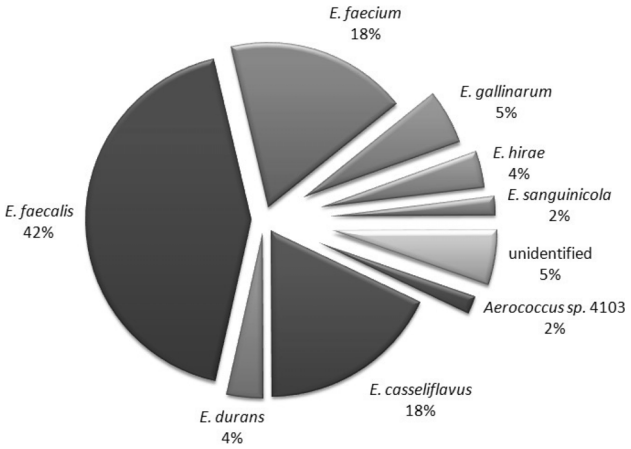
약수터의 지표미생물 측정결과에 대한 검출농도 분포를 살펴보면 Fig. 1에 나타낸바와 같이 일반세균은 100 CFU/mL 이하가 91.5%를 나타냈고, 총대장균군의 경우 100 CFU/100 mL 이하가 77.9%, 10 CFU/100 mL 이하가 35.9%를 나타내고 있다. 반면에 장구균과 대장균군의 검출범위는 10 CFU/100 mL 이하가 각각 95.6%, 96.2%를 나타내었다. 전반적으로 총대장균군과 대장균 및 장구균에 대한 검출 범위를 비교 해봤을 때 총대장균군의 검출범위가 폭넓은 것을 알 수 있으며, 장구균과 대장균이 검출되었을 경우 먹는물 약수터에서의 농도는 대부분 10 CFU/100 mL 이하의 분포를 나타내는 것으로 판단되었다.

3.2. 장구균에 대한 생화학적 동정과 16S rDNA 염기서열을 이용한 동정

먹는물 약수터에서 검출된 장구균을 순수분리 배양하여 생화학적인 방법과 염기서열 분석을 통한 동정결과를 Fig. 2에 나타내었다. 검출된 장구균에서 표본적으로 추출한 20개 검체를 API strep kit를 사용하여 분석한 결과 총 11검체에서 *E. faecalis*, *E. faecium E. durans*, *Aerococcus Viridans*, *Lactococcus lactis ssp lactis* 순서로 각각 20%, 20%, 5%, 5%, 5% 동정되었으며 9개의 검체(45%)는 생화학적 검사로는 확인 할 수 없었다(Fig. 2(a)). 한편 16S rDNA 염기서열을 이용한 동정에서는 표본적으로 추출한 56개 검체에서 *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. hirae*, *E. durans*, *E. sanguinicola*, *Aerococcus SP. 4103* 순서로 각각 42%, 18%, 18%, 5%, 4%, 4%, 2%, 2% 순으로 동정 되었으며 3개의 검체(3%)는 염기서열분석으로 동정되지 않았다(Fig. 2(b)).



(a) Biochemical identification of enterococci using API 20 Strep kit



(b) Genotyping identification of enterococci using 16S rDNA gene sequencing

Fig. 2. Distribution of enterococci species in drinking spring-water in Seoul.

두가지 장구균 동정방법에서 분리율과 우점종의 차이가 큰 것으로 나타났으며, 이는 생화학적인 검사에서 *E. faecium*을 *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*로 구별할 수 있는 방법이 제한적이기 때문으로 판단되었다. 하지만 두가지 방법 모두 *E. faecalis*가 우점종으로 나타나 기존의 환경검체에서 조사된 자료와 비슷한 결과를 얻을 수 있었으며, 국내외 임상 검체에서 분리한 장구균의 우점종 분포와 일치하는 것을 확인하였다.[25,26]

생화학적인 방법으로 20건의 검체에 대해 동시에 염기서열분석을 수행한 결과를 살펴보면 Table 3에 나타낸 바와

Table 3. Comparison of enterococci identification with 16S rDNA gene sequencing and biochemical test from isolates in drinking spring-water

Genotype (16S rDNA gene sequencing)	Phenotype (API 20 Strep)	VRE	Sample code
Aerococcus sp. 4103	*Aerococcus viridans*	nd	W09-24735-05A
E. casseliflavus	nd	*vanC2*	W09-25079-09A
E. casseliflavus	nd	*vanC2*	W09-00998-04A
E. casseliflavus	nd	*vanC2*	W09-00998-05A
E. casseliflavus	nd	*vanC2*	W09-24446-18A
E. durans	*E. faecium*	nd	W09-24735-03A
E. durans	nd	nd	W09-24905-07A
E. faecalis	*E. faecalis*	nd	W09-24905-04A
E. faecalis	*E. faecalis*	nd	W09-00998-03A
E. faecalis	*E. faecalis*	nd	W09-06609-01A
E. faecalis	*E. faecium*	nd	W09-24905-01A
E. faecalis	nd	nd	W09-25079-22A
E. faecium	*E. faecalis*	nd	W09-24471-05A
E. faecium	*E. faecium*	nd	W09-24749-01A
E. faecium	nd	nd	W09-24474-10A
E. faecium	nd	nd	W09-24735-01A
E. faecium	nd	*vanB*	W09-24837-01A
E. gallinarum	*E. faecium*	*vanC1*	W09-24474-04A
E. hirae	*E. durans*	nd	W09-24471-05B
E. sanguinicola	*Lactococcus lactis ssp lactis*	nd	W09-24446-01A

같이 분석되지 않은 4건의 검체에서 *vanC2* 형인 *E. casseliflavus*로 나타났으며, *E. faecium*으로 분석된 검체는 *vanC1* 형인 *E. gallinarum*로 나타났고, 이는 생화학적 동정에서 *E. faecium*으로 분석되는 것을 16S rDNA 유전자 염기서열 분석을 이용하여 구별해 낼 수 있는 것으로 보고되었다.[30] 본 연구의 결과처럼 먹는물 약수터에서 다양한 장구균 종(Species)을 나타내고 있고 생화학적인 동정방법에서는 자연내성 형태의 장구균 동정이 복잡 할 수 있으므로 환경시료의 다양한 장구균 속을 구별하기 위해서는 염기서열분석법에 의한 동정이 신속하고 편리 할 것으로 판단된다.[27]

3.3. 장구균에 대한 계통학적인 분석결과

장구균의 16S rDNA를 이용한 계통학적인 분석을 위해 이미 알려진 장구균 자료들을 이용하여 계통수(phylogenetic tree)를 제작하였고, 먹는물 약수터에서 검출된 장구균 염기서열 자료를 삽입하여 Fig. 3과 같이 장구균 계통도를 작성 하였다. 계통도를 살펴보면 기존의 보고된 장구균 그룹과 동일하게 일치하는 것으로 확인되었고[28] *E. faecalis*는 24검체(Sample no. W09-10803-02A~W09-10847-03B) 모두 매우 밀접한 유사성을 나타내었다. 마찬가지로 *E. faecium*도 10검체 모두 밀접한 유사성을 나타냈으나, *E. faecium* 계통 중 NCBI no. AY735408 계통 5검체(W09-10918-02B, W09-10918-02A, W09-24905-01B, W09-24735-01A, W09-24837-01A)와 AJ420800 계통 3검체(W09-24749-01A, w09-24474-10A, W09-00998-03C)로 분류되었고, 이에 속하지 않은 2검체(W09-24471-05A, W09-00998-04B)로 분석되었다. *E. durans* 검체 2건의 경우(W09-24735-03A, W09-24905-07A)는 *E. faecium* 계통과 유사하여 구별하기 어려웠으며, *E.*

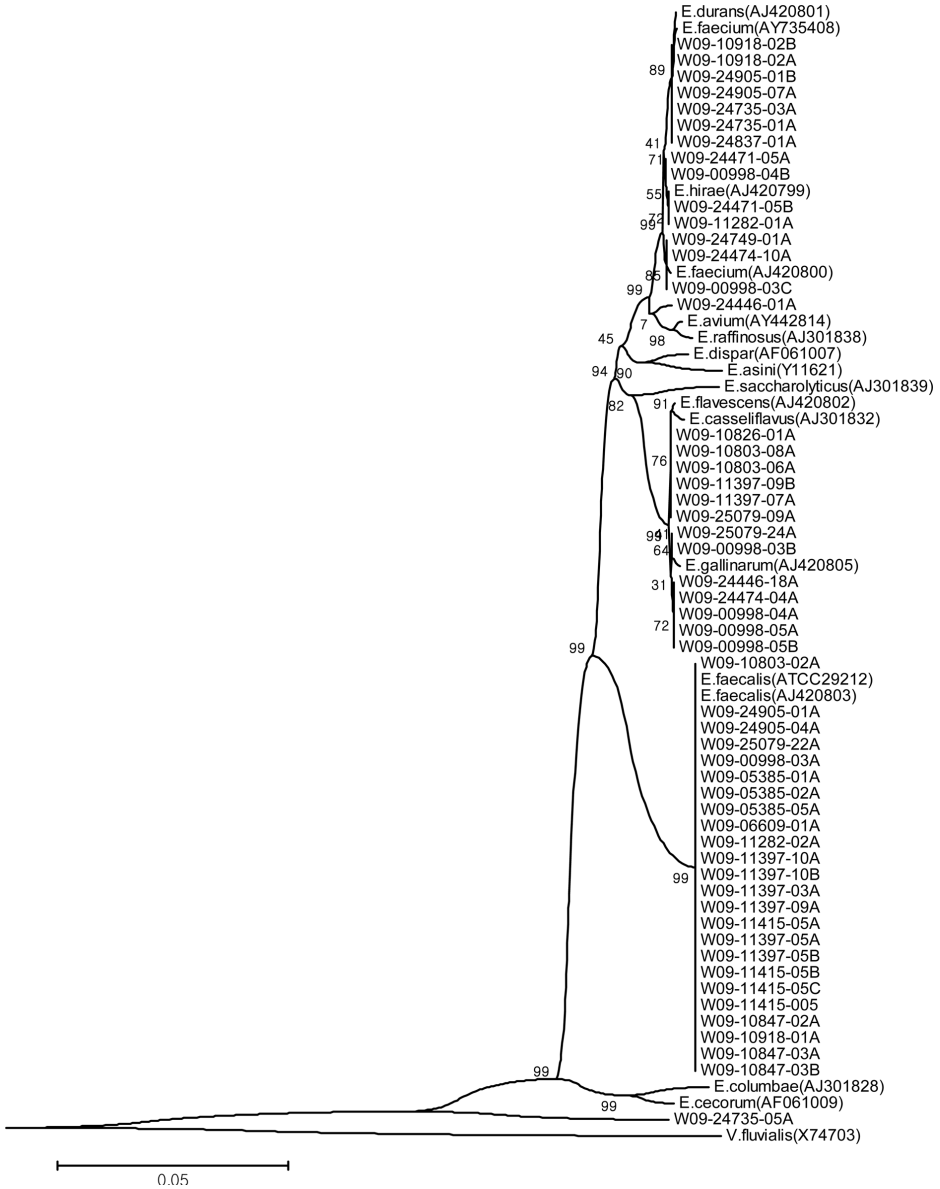


Fig. 3. 16S rDNA-based tree reflecting the relationship of enteroccoci species on drinking spring water samples. *Vibrio fluvialis* is an outgroup.

*hirae*의 경우 2건의 검체 모두 매우 밀접한 유사도를 나타냈다. *E. gallinarum* 2검체(W09-25079-24A, W09-00998-03B)는 매우 밀접한 유사도를 나타냈으며, *E. casseliflavus*의 경우는 11검체로 분류되었는데 이중 *E. gallinarum*로 동정된 1검체(W09-24474- 04A)가 포함 되었다. 실제로 같은 계열의 그룹인 *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. flavescens*는 검체에 대한 16S rDNA gene를 이용한 계통 분석에서 뚜렷하게 구별하기 어려울 것으로 판단되었다. 그 밖에 *E. sanguinicola* (W09-24446-01A)의 경우 *E. avim* 또는 *E. raffinosus*와 유사한 형태로 분류되었다. 또한 장구균으로 분류되지 않은 *Aerococcus spp. 4103* (sample no. W09-24735-05A)의 경우 장구균과 유사 하지 않는 계통결과를 나타내었다.

3.4. 분리 검출된 장구균에 대한 반코마이신 항생제 내성 조사

먹는물 약수터 시료 212개소 중 42개소에서 분리검출한 장구균을 이용하여 반코마이신 내성균을 검출하기 위해 총 53검체의 분리균주에 대해 디스크 확산법인 E-test를 통한 내성타입을 실험한 결과 14검체(26.4%)에서 VRE 내성균주를 확인 하였으며 임상학적으로 의미가 크다고 할 수 있는 항생제 고농도 획득 내성을 나타내는 것으로 사료되는 *vanA* 형[29]은 검출되지 않았고, 반코마이신 유도내성이나 테이코플라닌 감수성을 나타내는 *vanB* 형[29]의 경우 3.8%를 나타냈으며 임상학적인 중요성이 떨어지는 저농도 자연내성형태[29]인 *vanC1/C2* 형이 22.7%를 나타내어 아직까지 먹는물 약수터에서 검출되는 장구균은 임상검체에 비해 내성확률이 낮은 것으로 판단되었다.[26] 한편, 먹는물 약수터에서는 검출된 VRE 14건중 중 자연내성 형태인 *E. casseliflavus*과 *E. gallinarum*가 85.7%로 대부분을 나타내는 것으로 판단되며 고농도 내성 형태인 *vanA* 형은 검출되지 않았으나 유도내성 형태인 *vanB* 형은 *E. faecalis*와 *E. faecium*에서 각각 1건씩 검출되었음을 확인하였다. 각각의 장구균 검체시료의 분포를 살펴보면 *E. faecalis*가 확인된 시료 24검체에서 VRE로 확인된 경우는 1검체(4.2%)이고, *E. faecium*의 경우는 10검체 중 1검체(10%)로 낮은 비중을 나타내고 있으나, *E. casseliflavus*는 10검체 중 9검체(90%)과 *E. gallinarum* 3검체 중 3검체(100%)로 확인되어 먹는물 약수터에서 분리 검출한 VRE는 자연내성인 *vanC1/C2*가 우점종 형태의 분포를 나타내고 있는 것으로 판단되었다 (Table 4).

Table 4. Classification of vancomycin resistance enrtococci from drinking spring -water in Seoul

VRE type	No. of isolates	isolate ratio(%)	Enterococci species of samples
vanA	0	0	
vanB	2	3.8	*E. faecalis* (1), *E. faecium* (1)
vanC1	3	5.7	*E. gallinarum* (3)
vanC2	9	17.0	*E. casseliflavus* (9)
non VRE	39	73.6	*E. faecalis* (23), *E. faecium* (9), *E. durans* (2), *E. hirae* (2) *E. casseliflavus* (1), *E, sanguinicola* (1) *Aerococcus sp. 4103* (1)*

* non-enterococci

4. 결 론

본 연구는 서울시내 위치한 먹는물 약수터에서 분변오염 지표미생물인 장구균 검출실태를 조사하는 것으로써 사람들이 빈번히 이용하지만 소독 등의 처리가 이루어지지 않아 약수터의 구조에 따라 외부 오염 물질 등의 유입 가능성이 상존하여 이에 대해서 분변오염 지표미생물의 검출 특성을 파악하고자 하는 것이었다.

조사 결과 먹는물 약수터에서 장구균의 검출률은 19.8 %로 이와 유사한 지표 미생물인 대장균의 18.4%와 유사한 검출률을 나타내어 지표 미생물로써 유용성 높을 것으로 확인되어 이에 대한 기준 설정 등의 검토가 필요할 것으로 판단되었다.

조사 시료에서 검출된 장구균 종(Species)을 파악하기 위해 대표적 검출시료 56건에 대한 염기기서열을 이용한 동정결과 우점종이 *E. faecalis* (42.9%)로 나타나 임상시료의 우점종과 동일한 분포양상을 나타내는 것으로 파악됐으며 생화학적인 동정방법으로는 *E. faecium*중 *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*로 구별하는게 복잡하고 까다로우나 염기서열을 이용한 동정은 이를 쉽게 구별해 낼 수 있었다. 한편, 임상시료에 비해 먹는물 약수터에서는 *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* 가 높은 빈도로 검출되는 특성을 나타내었다.

병원내 감염에서 중요하게 고려되는 반코마이신 내성 장구균에 대해서 먹는물 약수터에서 검사한 결과 고도내성을 나타내는 *vanA* 형 장구균은 검출되지 않았으며 유도내성 형태인 *vanB* 형의 경우 낮은 빈도로 검출되었으며 자연내성 형태인 *vanC1/C2* 형이 대부분을 차지하는 것을 확인하였다.

본 연구 결과 먹는물 약수터가 사람의 왕래가 많은 산 주변이나 체육시설 등이 있는 공원에 위치하고 있어 잠재적인 병원성 미생물에 오염될 가능성이 있는 것으로 파악되었으므로 향후 먹는물 약수터 계통에서 장구균에 대한 검사기준과 모니터링을 체계화 할 필요성이 있고 사람 또는 가축 사육과 농작물 경작에 의한 분변오염상태를 파악하는 검출원인 조사도 필요할 것으로 판단되었다.

KSEE

참고문헌

1. Murray, P. R., Baron, E. J., Pfaller. J. H., Jorgensen, J. H. and Yolken, R. H., "Manual of Clinical Microbiology," 8th ed., American Society for Microbiology, Washington, pp. 422~433(2003).
2. 질병관리본부, 감염병실험실진단, 3개정판, pp. 296~308

(2005).
3. Ashbolt, N. J., Grabow, W. O. J. and Snozzi, M., "Indicators of microbial water quality," Guidelines, standards and health assessment of risk and risk management for water-related infectious disease, Fewtrell, L. and Bartran J.(Eds), IWA Publication, London, pp. 289~315(2001).
4. Godfree, A. F., Howard, R. T. and Mayo, D. R., "Faecal streptocci as indicators of faecal contamination in water," *J. Appl. Microbiol.*, **S83**, 110~119(1997).
5. U. S. Environmental Protection Agency, National Primary Drinking Water Regulations: Ground Water Rule, Federal Register, **71**(216), pp. 65574~65660(2006).
6. Ministry of the Environment, Microbial water quality guidelines for marine and freshwater recreational area, New Zealand(2003).
7. Amy, R. S., Frank C, C., Kristen E. G. and Kellogg, J. S., "Antibiotic-resistant enterococci and fecal indicators in surface water and groundwater impacted by a concentrated swine feeding operation," *Environ. Health Perspect.*, **115**(7), 1040~1045(2007).
8. Patrizia, M., Elisa, G., Simona, N., Carla, S. and Moreno B., "Vancomycin-resitance enterococci (VRE) in meat and environmental samples," *Int. J. Food Microbiol.*, **107**, 218~222(2006).
9. Junco, T, T., Martin, M, G., Toledo, L, P., Gomez, P, L. and Barrasa, J, L, M., "Identification and antibiotic resistance of faecal enterococci isolated from water samples," *Int. J. Hyg. Environ. Health*, **203**, 363~368(2001).
10. Seo, K. S., Lim, J. Y., Yoo, H. S., Bae, K. W. and Park, Y. H., "Comparison of vancomycin-resistat enterococci isolates from human, poultry and pigs in korea," *Veterinary Microbiol.*, **106**, 225~233(2005).
11. Blom, M., Sorensen, T. L., Poulsen, R. L., Frimodt-Moller, N., Monnet, D. L., Aarestrup, F. M. and Espersen, F., "Ingestion of Vancomycin Resistant *Enterococcus faecium* strains of food animal origin by human healthy volunteers a randomized double bind study," 40th ICAAC Abstracts, Toronto, Canada, pp. 432(2000).
12. 환경부, 수질오염공정시험기준(2008).
13. 환경부, 먹는물수질공정시험기준(2008).
14. U.S Environmental Protection Agency, "Enterococci water by membrane filtration using membrane-enterococcus indoxyl-β-D-glucoside agar (mEI) : method 1600," (2006).
15. Http://www.macrogen.co.kr
16. Manero, A. and Blanch, A, R., "Identification of Enterococcus spp. Based on specific hybridization with 16S rDNA probes," *J. Microbiol. Method*, **50**, 115~121(2002).
17. 김미순, 이영민, 김성근, 서지현, 지경희, 오지윤, 고기동, 고광표., "서울특별시 종로구 대중목욕탕의 수질 중 미생물 오염도 조사 연구," 한국환경보건학회지, **35**(3), 162~168(2009).
18. 이희태, 김희연, 박현진, 조영은, 유소영, 이경진, 정종선, 고광표, "지표미생물을 이용한 시화호 유입수의 수질평가," 한국환경보건학회지, **34**(1), 86~94(2008).
19. Leclerc, H., Devriese, L. A. and Mossel, D. A. A., "Taxonomical changes intestinal (faecal) enterococci and streptococci: consequences on their use as indicators of faecal contamination in drinking water," *J. Appl. Bacteriol.*, **81**, 459~466(1996).
20. 오향균, 박준홍., "도시하수 및 그 주변 하천 환경 중 항생제 내성 세균 노출 특성," 대한환경공학회지, **31**(3), 232~239(2009).
21. Saitou, N. and Nei, M., "The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tree," *Molecular Biology and Evolution*, **4**, 406~425(1987).
22. Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S., "MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0," *Mol. Biol. Evol.*, **24**, 1596~ 1599(2007).
23. Clinical and Laboratory Standards Institute, "Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; fifteenth infomational supplement," M100-S15, Wayne, Pa(2005).
24. U.S Environmental Protection Agency, "Ambient water quality criteria for bacteria," (1986).
25. Panagiota, G., Irish, S., Eleni., S. and Maria, P., "PFGE analysis of enterococci isolates from recreational and drinking water in Greece," *J. Water and Health*, **4**(2), 263~269(2006).
26. 식품의약품안전청, "지역사회내 항생제 내성 감시사업; The surveillance of antimicrobial resistant pathogens in community," (2006).
27. Silvia, A., Giulia, L., Giovanni, G., Fabrizio, B., Marina, D. C. and Giordano, D., "Routine molecular identification of enterococci by gene specific PCR and 16S ribosomal DNA sequencing," *J. Clin. Microbiol.*, **39**(2), 794~797(2001).
28. Charles, M. A. P. F., Michael, E. S., Karl, H. S. and Wilhelm, H. H., "Enterococci in foods - a conundrum for food safety," *Int. J. Food Microbiol.*, **88**, 105~122(2003).
29. Patrice Courvalin, "Genetics of glycopeptide resistance in gram-positive pathogens," *Int. J. Medical Microbiol.*, **294**, 479~486(2005).
30. Robin, P., Kerryl, E. P., Mark, S. R., James, M. S., Jim, R. U., Peggy, K., Marlene, K. H., Franklin, R. C. III. and Bruce, C. K., "Determination of 16S r RNA sequences of enterococci and application to species identification of nonmotile enterococcus gallinarum isolates," *J. Clin. Microbiol.*, **36**(11), 3399~3407(2001).