Korean Journal of Microbiology (2014) Vol. 50, No. 4, pp. 384-386
DOI http://dx.doi.org/10.7845/kjm.2014.4068
Copyright ⓒ 2014, The Microbiological Society of Korea

| 단 보 |

국제표준화기구 ISO/NP 16266 방법을 이용한 환경 중 *Pseudomonas aeruginosa*의 분리 및 동정

이시원† · 김지혜† · 이보람† · 주윤리† · 최 별 · 박수정 · 정현미 · 정원화*

국립환경과학원 상하수도연구과

Isolation and Identification of *Pseudomonas aeruginosa* in Natural Environments by International Organization for Standardization ISO/NP 16266

Siwon Lee†, Ji Hye Kim†, Bo-Ram Lee†, Youn-Lee Joo†, Byeol Choe, Su Jeong Park, Hyen-Mi Chung, and Weon Hwa Jheong*

Water Supply and Sewerage Research Division, National Institute of Environmental Research, Incheon 440-170, Republic of Korea

(Received October 22, 2014 / Accepted December 24, 2014)

***Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen that inhabits various natural and artificial environments, such as pathogenesis, water, soil and air. They can cause serious problems, such as pathogenic infection. In this study, 220 colonies were isolated from water and soil environment that assumed to be *P. aeruginosa* using a membrane filter method based on International Organization for Standardization (ISO/NP 16266). Identification of the isolates was determined by physiobiochemical characteristics using newly modified ISO method which includes the resistance to 1,10 phenanthroline test. Only one of 220 presumed *P. aeruginosa* strains isolated from effluence water using a drain swab was determined as *P. aeruginosa*-positive by the ISO/NP 16266 method. Subsequently, the resistance to 1,10 phenanthroline test, which was newly proposed by ISO in 2014 and applied in this study, was considered as more precise and improvable method for identification of *P. aeruginosa*.**

***Keywords*:** *Pseudomonas aeruginosa*, International Organization for Standardization, ISO/NP 16266

*Pseudomonas aeruginosa*는 자연적 방어가 손상된 사람에게 감염되는 기회주의적 병원체로, 병원, 물, 토양 및 대기 등 많은 자연과 인공환경에서 서식한다(Lee *et al*., 1999; Arora *et al*., 2011; Bae, 2005; Kim *et al*., 2011; Mahmoud *et al*., 2013). *P. aeruginosa*는 병원 내 감염(Kang *et al*., 2011)과 다중 내성(Hota *et al*., 2009)을 가지는 등 심각한 문제점이 유발될 가능성이 제기되었다. 이에 따라 국제표준화기구(ISO) ISO/NP 16266에서는, 녹농균을 동정하기 위한 방법 중 1,10 phenanthroline 저항성 실험의 추가를 제안하였다. 따라서 본 연구에서는, 녹농균을 검출하기 위하여 추가된 1,10 phenanthroline 저항성 실험을 포함한 ISO의 방법을 적용하여, 환경 중 녹농균을 분리 및 동정하였다.

녹농균이 검출될 것이라고 예상되는 인천과 서울 근방의 물(25개 시료; 수돗물, 수영장, 연못, 하천 및 방류수 포함), drain swab (19개 시료; 수도꼭지, 가장집 및 사무실 하수구, 수영장 및 방류수 포함) 및 토양(26개 시료; 저수지 저질토, 하천 토양, 밭 토양 및 습지토양 포함) 시료 총 70점을 수집하였다(Supplementary data Table S1). 또한, 표준균주 *P. aeruginosa* KCTC 2592^{T}를 분양 받아 실험에 양성대조구로 사용하였다.

실험에 사용한 필터는 0.45 μm pore size의 sterile cellulose ester membrane filter (Whatman®, UK)를 사용하였다. 수집한 물 시료 중, 수돗물과 수영장 시료는 원액 500 ml, 연못, 하천 및 방류수 시료들은 10^{-2}-10^{-4} 희석하여 100 ml을 필터에 통과시켰으며, 토양 시료는 탈이온멸균증류수 100 ml에 10 g을 넣고 1시간 동안 25℃ 진탕 후 10^{-3}–10^{-4} 희석하여 100 ml을 필터에 통과시켰다. 녹농균 추정집락 분리를 위하여, 시료를 통과시킨 필터는 Pseudomonas agar base/CN-agar (MB Cell, USA)에 부착시켰으며, drain swab 시료들은 필터를 사용하지 않고 100 μl 접종한 뒤, 36±2℃에서 48시간 동안 배양하였다. ISO/NP 16266에 따라, 배양된 집락 중 녹농균 추정 균주들을 계수한 뒤, 시료 당 최대 5개의 집락을 tryptic soy agar (TSA; Difco, USA)에 순수분리 하였다.

†These authors contributed equally to this work.
*For correspondence. E-mail: purify@korea.kr; Tel.: +82-32-560-8353; Fax: +82-32-563-7085

Table 1. Results of confirmatory test using ISO and Korea drinking water standard method in this study*

Colony	Positive for Oxidase	Fluorscence on King's B media	Positive for Ammonia production	Resistance of 1,10-phenanthroline	Milk cetrimide agar	
					Pyocyanin production	Casein hydrolysis
Pseudomonas aeruginosa KCTC 1750^T	+	+	+	R	+	+
Number of isolates	210	161	34	13	183	157

*Detailed results are listed in the Table 2 and Supplementary data Table S2.

물 시료 25개 중 17개(75 집락), swab 시료 19개 중 12개(51 집락) 및 토양시료 26개 중 22개(94 집락)에서 녹농균 양성 추정 집락이 관찰되었고, 분리한 녹농균 추정 집락은 총 220개였으며 모두 20% glycerol을 사용하여 -80℃ 초저온 냉동고에서 보존하였다(Supplementary data Table S1).

녹농균 추정 220개 집락에 대한 확정실험을 수행하기 위하여, ISO/NP 16266에 따라 생리생화학적 실험인 cytochrome oxidase (bioMérieux, France), King's B Medium (Difco), milk cetrimide agar를 사용한 pyocyanin 생산과 casein 가수분해, acetamide로부터 암모니아 생성 및 1,10 phenanthroline [Mueller Hinton agar (Difco) 및 1,10 phenanthroline (Sigma Aldrich, USA) 80 μg/ml에 대한 저항성 실험을 수행하였다. 특히 1,10 phenanthroline 저항성 실험은 ISO에서 2014년 새롭게 제안한 방법으로, disc페이퍼를 사용하여 수행하였고, disc를 포함하여 직경 14 mm 이상의 클리어존이 형성되는 균주는 녹농균으로 간주하지 않았다. 한편, 모든 확정 실험에는 *P. aeruginosa* KCTC 2592^{T}를 양성대조구로 사용하였다.

양성대조구 *P. aeruginosa* KCTC 2592^{T}은 cytochrome oxidase, King's B Medium, pyocyanin 생산, casein 가수분해 및 ammonia 생성실험에서 모두 양성이었으며, 1,10 phenanthroline 실험결과, 저항성으로 분석되었다. 순수 분리한 220개 추정 집락들 중, cytochrome oxidase test 양성 210개, King's B Medium에서 형광을 띄는 집락은 161개, pyocyanin 생산균주 182개, casein 가수분해 양성균주는 157개 및 ammonia 생성균주 34개였으나, 1,10 phenanthroline 저항성을 나타내는 균주는 13개로 가장 적은 수의 집락이 분석되었다(Table 1). 1,10 phenanthroline 저항성 실험이 포함되지 않은 기존 ISO 방법에 따르면, 총 16개의 집락(W15-4, W15-5, W16-1, W18-5, S6-5, S12-1, S12-2, S17-1, S17-2, S17-5, S18-1, S18-2, S18-3, S18-5, S19-1 및 S19-3)을 양성으로 판정(약 7.3%) 할 수 있었다(Supplementary data Table S2). 그러나, strain S18-1을 제외한 나머지 15개의 집락들은 모두 1,10 phenanthroline 감수성으로 분석되어, effluence에서 drain swab으로 분리한 오직 1개 집락인 strain S18-1만이 녹농균으로 확정(0.5%)되었다(Table 2).

본 연구에서는 ISO/NP 16266에 따라 환경 중 녹농균을 분리 및 동정하였으며, ISO에서 새롭게 제안한 1,10 phenanthroline 저항성 실험을 국내에서 최초로 적용해보았다. 1,10 phenanthroline ($C_{12}H_8N_2$)은 180.21 g/mol의 분자량을 가진 헤테로사이클릭 유기화합물로, 다양한 금속이온들과 안정한 킬레이트 화합물을 형성한다. 또한 1,10 phenanthroline은 페닐리간드와 관련되어 있고(Luman and Castellano, 2003), Fe^{2+}와 배위결합하여 착화합물인 페로인을 만들어 산화-환원 지시약으로 사용되며, 금속-단

Table 2. Physiobiochemical characteristics of 16 isolates for *P. aeruginosa* presumed colonies

Colony information			Oxidase	King's B fluorescence	Ammonia from acetamide	Phenanthroline*		Milk cetrimide agar	
No	Strain	Source				Resistance	Zone size (mm)	Pyocyanin	Casein hydrolysis
1	W15-4	Shallow stream	+	+	+	S	18	+	+
2	W15-5	Shallow stream	+	+	+	S	20	+	+
3	W16-1	Shallow stream	+	+	+	S	24	+	+
4	W18-5	Shallow stream	+	+	+	S	44	+	+
5	S6-5	Drain swab (House)	+	+	+	S	22	+	+
6	S12-1	Drain swab (Effluence)	+	+	+	S	22	+	+
7	S12-2	Drain swab (Effluence)	+	+	+	S	38	+	+
8	S17-1	Drain swab (Effluence)	+	+	+	S	20	+	+
9	S17-2	Drain swab (Effluence)	+	+	+	S	28	+	+
10	S17-5	Drain swab (Effluence)	+	+	+	S	34	+	+
11	S18-1	Drain swab (Effluence)	+	+	+	R	12	+	+
12	S18-2	Drain swab (Effluence)	+	+	+	S	32	+	+
13	S18-3	Drain swab (Effluence)	+	+	+	S	32	+	+
14	S18-5	Drain swab (Effluence)	+	+	+	S	44	+	+
15	S19-1	Drain swab (Effluence)	+	+	+	S	30	+	+
16	S19-3	Drain swab (Effluence)	+	+	+	S	16	+	+

백질 분해효소의 억제제로 작용하는 등 펩티다아제를 억제할 수 있다(Salvesen and Nagase, 2001). Keeven and Decicco (1989)에 의하면, 1,10 phenanthroline은 녹농균에 대한 selective agent로, 녹농균이 1,10 phenanthroline에 감수성을 보이려면 160 μg/ml 이상이 필요하지만, *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus* spp., *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus* 및 *Pseudomonas*속의 균주들은 32 μg/ml 이상이면 충분히 감수성이 확인되었다. 녹농균 확정 시험에 1,10 phenanthroline 80 μg/ml에 대한 저항성 실험 도입은, 환경 중 다중 내성을 가지는 병원성 녹농균에 대한 특이성을 높이고 동정과 확정을 더욱 명확하게 할 수 있는 것으로 분석되었다. 따라서 1,10 phenanthroline을 포함한 ISO/NP 16266 방법은, 더욱 많은 시료에서 검증이 이루어진다면 환경 중 녹농균을 확정하기에 적합한 실험 방법으로 활용될 것이라고 기대된다.

적 요

녹농균은 병원, 물, 토양 및 대기 등의 많은 자연과 인공환경에서 서식하는 기회주의적 병원체로, 병원 내 감염 등의 심각한 문제점을 야기할 수 있다. 본 연구에서는 신뢰높은 표준화 방법인 International Organization for Standardization (ISO)을 적용하여, 물과 토양에서 220개의 녹농균의 추정 집락을 분리하였으며, 생리생화학적 특성으로 녹농균을 동정하였다. ISO/NP 16266 방법을 적용하였을 때, 총 220개의 추정 집락 중 방류수에서 drain swab으로 채취한 오직 1개의 집락만이 최종적으로 녹농균 양성으로 확정되었다. 한편, ISO에서 2014년 새롭게 제안한 1,10 phenanthroline 저항성 실험은, 환경 중 *P. aeruginosa*를 검출 및 동정하기 위해 적합한 방법으로 사료된다.

Acknowledgements

This work was supported by the National Research Foundation of Korea Grant funded by the Korean Government. We thank the editor and two anonymous reviewers for their constructive comments, which helped us to improve the manuscript.

References

Arora, D., Jindal, N., and Kumarx Romit, R. 2011. Emerging antibiotics resistance in *Pseudomonas-A* challenge. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **3**, 82-84.

Bae, J.H. 2005. Antimicrobial effect of *Hedyotis diffusa* extracts on food-borne pathogens. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **34**, 107-112.

Hota, S., Hirji, Z., Stockton, K., Lemieux, C., Dedier, H., Wolfaardt, G., and Gardam, M.A. 2009. Outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* colonization and infection secondary to imperfect intensive care unit room design. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* **30**, 25-33.

Kang, D.H., Bae, H.K., and Kim, H.S. 2011. Isolation and antibacterial activity of Actinomycetes producing growth inhibition compounds against multi-antibiotic resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Korean J.* Soc. *Biotechnol. Bioeng.* **26**, 19-26.

Keeven, J.K. and Decicco, B.T. 1989. Selective medium for *Pseudomonas aeruginosa* that uses 1,10-phenanthroline as the selective agent. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 3231-3233.

Kim J.R., Lee, D.K., An, H.M., Kim, M.J., Lee, S.W., Cha, M.K., Lee, K.O., and Ha, N.J. 2011. Antimicrobial activity of commonly used antibiotics and DNA fingerprint analysis of *Pseudomonas aeruginosa* obtained from clinical isolates and unchlorinated drinking water in Korea, 2010. *Arch. Pharm. Res.* **34**, 1353-1361.

Lee, S.H., Kim, Y.R., and Yu, M.J. 1999. Removal efficiency of VOCs with GAC and BAC enhanced by advanced oxidation processes. *J.KSWQ* **15**, 283-289.

Luman, C.R. and Castellano, F.N. 2003. Comprehensive Coordination Chemistry II, Phenanthroline Ligands, the Netherlands.

Mahmoud, A.B., Zahran, W.A., Hindawi, G.R., Labib, A.Z., and Galal, R. 2013. Prevalence of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in patients with nosocomial infections at a university hospital in Egypt, with special reference to typing methods. *J. Virol. Microbiol.* DOI: 10.5171/2013.290047.

Salvesen, G.S. and Nagase, H. 2001. Proteolytic enzymes: a practical approach, 2nd ed., pp. 105-130. Oxford University, UK.