

먹는물 대장균군 연구

미생물과 · 수질보전과

박연경 · 정구영 · 김미희 · 김정아 · 김현실

Characterization of Coliform Group Isolates from Drinking Water

Microbiology Division · Water Conservation Division

Yon-Koung Park · Gu-Young Jeong · Mi-Hee Kim · Jeong-A Kim · Hyun-Sil Kim

Abstract

We attempted isolation of *Escherichia coli* from drinking water in Busan. *E. coli* recovered from drink water was carried out serotyping and tested for virulence factors. A total of 211 *E. coli* strains were isolated from 280 drink water. Seasonal distribution of *E. coli* was shown the most high at June(32.2 %). The serotypes of 211 *E. coli* isolates were in order of serotype O8(4.3 %), O159(1.4 %), O6, O28ac, O128 and O153(0.9 %), O1, O55, O63, O126 and O152(0.5 %). The isolates were examined by Multiplex PCR for genes encoding virulence factors of pathogenic *E. coli*. Virulence factors were not detected in any strains(211 *E. coli* strains)

Key word : *Escherichia coli*, drinking water

서론

대장균은 Gram 음성간균으로 통성 혐기성이고 flagella를 가지고 있어 운동성을 나타내고 아포는 없으며 lactose를 분해하여 가스를 생성하는 장내세균이다. 운동성이 없거나 섬모를 가진 균주도 간혹 있으며 현재 균체항원인 O항원이 70여종, K항원이 100여종, H항원이 50여종 밝혀져 있다¹⁾.

대장균은 분변에 특이적으로 존재하지만²⁾ 환경에서도 발견되는데 이것은 사람과 다른 온혈동물의 분변을 통하여 외부로 배출된 것이다. 일반적으로 이렇게 배출된 대장균은 환경에 생존은 하지만 증식되지는 않는다(단, 열대지방 제외). 이런 이유로 분변오염의 지표로 사용되며 식품과 물의 위생학적 측면으로 중요한 지표로 사용된다¹⁾. 우리나라에서도 먹는물의 오염 지표로 대장균을 사용하고 있다.

이렇게 대장균은 오염지표로 사용되지만 자체로도 질병을 일으키는 원인균이 될 수도 있는데 대장균은 사람과 동물의 장내 정상세균총으로 존재하며 분변을 통해 외부로 배출되 장관 외 다른 장기에 침입하여 여러 가지 질환을 야기하는데 가장 대표적인 것이 요로감염증이다. 대장균에 의해 유발되는 요로감염증은 젊은 여성의 경우 약 90%정도를 차지하며³⁾ 그 외 뇌막염, 패혈증, 농양, 창상감염 등을 일으킨다^{4,5)}. 또한 급성 대장염, 여행자설사증과 혈변을 증상으로 하는 출혈성대장염을 일으키는

원인 균이 된다.

현재까지 사람의 장관계 질환의 원인으로 작용하는 대장균은 독력의 특징과 독력이 작용하는 메카니즘에 따라 5종류로 나눌 수 있다^{1,3,4)}.

Enterotoxigenic *E. coli*(ETEC)는 개발도상국의 중요한 설사 원인 균으로 우리나라에서도 외래장관감염 중 가장 많은 것으로 알려져 있다. 증상은 설사를 주 증상으로 발열이 거의 없으며 콜레라와 유사한 쌀뜨물변이다. 생화학적 성상은 보통의 대장균과 거의 동일하며 균이 생산하는 2종류의 enterotoxin(LT, ST)의 검출이 필수적이다. Enteropathogenic *E. coli*(EPEC)는 전형적인 장독소생산은^{6,7,8,9,10,11)} 없지만 소장 세포에 부착해 microvilli를 손상시켜 설사를 유발시킨다. 주로 영유아의 외래성 설사 원인 균으로 설사, 복통, 발열 등의 증상을 나타낸다. 독소를 생성하는 유전자는 아니지만 병원성을 나타내게 하는 virulence factors(*eae*, EAF 등)가 여러 연구로 알려져 있다^{12,13,14)}. Enterohemorrhagic *E. coli*(EHEC)는 Vero cells을 사멸시키는 verotoxin인 VT1과 VT2를 장관 부착 후 생산하여 혈변과 심한 복통을 주 증상으로 하는 출혈성결장염을 유발시키고 어린이와 노인에서 용혈성 요독 증후군을 일으킨다. Enteroinvasive *E. coli*(EIEC)는 결장세포에 침입해 광범위하게 손상시켜 설사를 유발하고 청소년이나 성인에게 많이 나타나며 세균성 이질과 유사한 증상을 일으킨다. Enteroggregative *E. coli*(EAEC)는 수양성

점액성설사를 유발하고 발열증상은 없다. 아직 EAEC독력 작용에 대해서는 잘 알려져 있지 않지만 Natoro와 Kaper¹⁵⁾에 의하면 일단 점액상피세포에 부착하여 mucus biofilm를 형성하고 여기에 세균이 군집을 이루어 독소를 분비하여 증상을 유발한다.

ETEC $10^8 \sim 10^{10}$, EPEC $10^5 \sim 10^{10}$, EHEC 10^2 , EIEC 10^8 의 균량으로 감염 증상을 일으키는데 이 균량은 감염되는 사람의 나이, 성별, 위산도에 따라 차이가 있다¹⁶⁾.

실제 사람의 설사 원인 균으로 병원성대장균인 경우가 많고 먹는물이 오염되었을 경우에는 짧은 시간 내에 광범위한 감염을 일으킬 수 있는 위험성이 있다.

이 연구에서는 병원성을 가지고 있는 *E. coli*가 실제 먹는물에서 분포하는지 알아보기 위하여 부산시 각 구·군에서 의뢰된 먹는물(먹는물공동시설, 민방위비상급수 시설, 간이상수도 등)과 민원인이 의뢰한 먹는물(지하수, 상수도탱크수)을 먹는물수질공정시험법¹⁷⁾의 분원성대장균군검출방식에 의해 분원성대장균군이 검출된 배양액만 선택하여 대장균을 분리하고 그 대장균의 혈청형과 혈청형별 생화학적 특성, virulence factors 여부를 알아보았다.

재료 및 방법

시료

부산시 각 구·군(약수터, 민방위비상급수, 간이상수도 등)과 민원인(지하수, 상수도탱크수)이 2004년 1월에서 9월까지 의뢰

한 먹는 물 중 먹는물수질공정시험법으로 실험했을 경우 분원성대장균군이 검출되는(EC에서 가스발생) 280건의 배양액을 시료로 선택하였다.

대장균 분리 및 동정

분원성대장균군이 검출된 EC 배지(Merck) 시험관으로부터 1백금이를 Eosin methylene-blue lactose sucrose agar(EMB agar, Merck)에 희석 접종하여 35 °C, 24시간 배양하였다. Metallic sheen 또는 purple black이 나타나는 colony를 Kligler Iron agar(KIA, Merck)와 tryptic soy agar(TSA, Difco)에 접종한 후 35 °C, 24시간 배양하고 KIA에서 lactose 양성, glucose 양성, gas양성이 나타나는 균주만 선택하여 IMViC test를 실시하였다. IMViC test 결과 indol 양성, MR 양성, citrate 음성인 균주를 API 20E strip(BioMerieux)을 이용하여 동정하였다.

분리된 대장균은 20% glycerol이 첨가된 tryptic soy broth에 -70 °C로 보관하였다.

혈청형 시험

병원성대장균 O항혈청(Denka Seiken Co., Japan)을 이용하여 slide 응집반응을 실시하였다(Table 1). 동정된 대장균을 TSA에 접종하여 35 °C, 24시간 배양하여 균을 활성화 시켰다. 이렇게 활성화된 균을 3 mL의 생리식염수에 부유시킨 후 121 °C, 15분간 가열하고 3000 rpm, 20분간 원심분리하여 상층액을 버리고 침전물에 0.5 mL생리식염수를 가해 부유시키고 이 액을

항원액으로 사용하였다.

Slide glass 위에 칸을 나누어 다가혈청 10 µL와 항원액 10 µL를 혼합하여 응집을 관찰하고 응집이 일어날 경우 다가혈청에 속하는 단일혈청 10 µL와 항원액 10 µL를 혼합하여 응집반응을 실시하였다. 응집유무의 판정은 육안으로 분명하게 확인되는 응집이 30초 이내에 일어나는 경우를 양성으로 판정하고, 응집이 일어나지 않거나 늦게 일어나는 응집은 음성으로 판정하였다.

Multiplex PCR을 통한 virulence factors 조사

Polymerase chain reaction(PCR)을 통해 대장균 211건에 대하여 virulence factors를 조사하였다. *E. coli* Multiplex(RapiGen)를 사용하여 아래와 같은 방법으로 virulence factors를 검출하였다.

TSA에 35 °C, 24시간 배양된 균을 1 mL의 생리식염수에 균일하게 부유시켰다. 13000 rpm에서 3분간 원심분리한 후 상층액을 버리고 멸균중류수 500 µL로 현탁시키고 다시 13000 rpm에서 3분간 원심분리했다. 상층액을 버리고 DNA추출액 100 µL를 첨가하여 vortex하여 균체를 완전히 현탁시켰다. 현탁액을 끓는 물에 10분간 가열하고 실온으로 식힌 후 가볍게 섞어주고 13000 rpm에서 5분간 원심분리 한다. 이때 나온 상층액 10 µL를 template로 사용한다. 염색액이 든 premix에 primer mixture 10 µL와 위에서 준비된 template 10 µL를 첨가하여 PCR 시켰다. PCR 반응은 95°C 3분 1cycle, 94°C 20초, 63°C 25초, 72°C 45초 40cycle, 72°C 5분 1cycle로 수행되었다. PCR이 끝난 후 PCR 산물을 2% agarose gel에 loading하고 전기영동을 실시하여 증폭유전자를 확인하였다.

Table 1. *Escherichia coli* O antiserum used in this study

<i>E. coli</i> O antiserum							
Polyvalent I	O1	O26	O86	O111	O119	O127a	O128
Polyvalent II	O44	O55	O125	O126	O146	O166	
Polyvalent III	O18	O114	O142	O151	O157	O158	
Polyvalent IV	O6	O27	O78	O148	O159	O168	
Polyvalent V	O20	O25	O63	O153	O167		
Polyvalent VI	O8	O15	O115	O169			
Polyvalent VII	O28ac	O112ac	O124	O136	O144		
Polyvalent VIII	O29	O143	O152	O164			

결과 및 고찰

대장균 분리

부산광역시보건환경연구원에 의뢰된 먹는 물 중 2004년 1월에서 9월까지 먹는물 수질공정시험방법에 의해 분원성대장균군이 검출된 280건을 검사한 결과 211건에서 대장균이 분리되어 양성률 75.4%로 나타났다.

시설별로 대장균 분리현황을 살펴보면 관원으로 의뢰된 먹는 물 중 먹는물공동시설에서 95건 중 77건(81.1%), 민방위비상급수시설 94건 중 66건(70.2%), 간이급수시설 52건 중 42건 양성(80.8%), 간이상수도 8건 중 7건(80.8%), 매립장수 5건 중 5건(100%), 소규모급수시설 2건 중 2건(100%)의 대장균이 분리되어 전체 256건 검사결과 대장균이 199건 분리되어 양성률은

77.7%로 나타났고 민원인들이 의뢰한 먹는 물에서는 지하수 16건 중 9건(56.3%), 상수도(탱크수) 8건 중 3건(37.5%)의 대장균이 분리되어 전체 24건 검사결과 대장균이 12건으로 양성률은 50%로 나타났다(Table 2).

월별 대장균 분리현황은 Fig. 1과 같다. 6월은 68건(32.2%), 5월 55건(26.1%), 9월 17건(8.0%), 7월 16건(7.6%), 2월 15건(7.1%), 8월 14건(6.6%), 3월 13건(6.2%), 4월 9건(4.3%), 1월 4건(1.9%) 순으로 많이 분리 되었으며 양성률은 53.8%에서 100%까지 나타났다.

혈청형 분포 및 생화학적 특성

먹는 물에서 분리된 211건의 대장균 중 25건(11.8%)이 병원성대장균 혈청형(43종)으로 분류되었다. 그 외 184건은 43종의 혈청형으로는 분류되지 않았다.

Table 2. Numbers of *E. coli* isolates from drinking water systems

시 설 명	총 건수	대장균 검출 건수(%)
먹는물공동시설	95	77 (81.1)
민방위비상급수시설	94	66 (70.2)
간이급수시설	52	42 (80.8)
간이상수도	8	7 (80.8)
매립장수	5	5 (100)
소규모급수시설	2	2 (100)
지하수	16	9 (56.3)
상수도(탱크수)	8	3 (37.5)
계	280	211 (75.4)

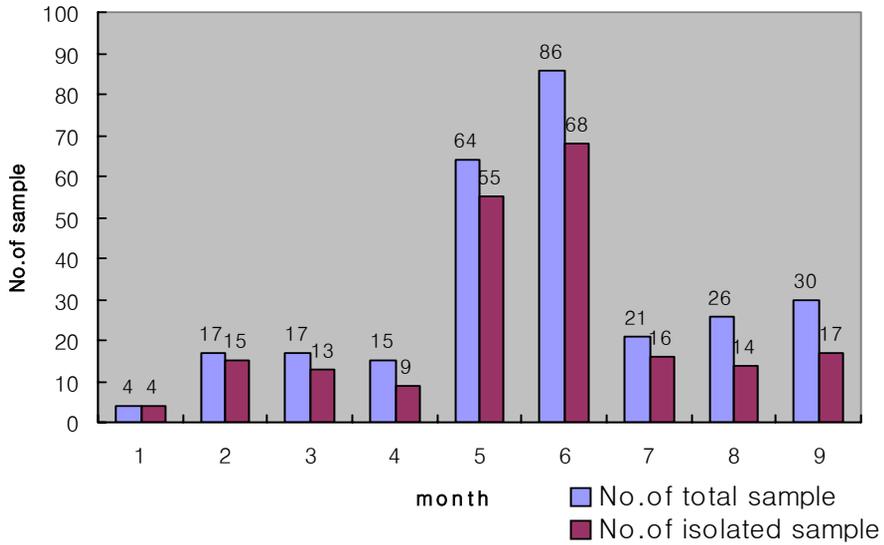


Fig. 1. Distribution of *E. coli* isolates from drinking water by month

Table 3. Serological distribution of serotype isolated *E. coli* from drinking water

serotype	No. of isolates(%)
O1	1 (0.5%)
O6	2 (0.9%)
O8	9 (4.0%)
O28ac	2 (0.9%)
O55	1 (0.5%)
O63	1 (0.5%)
O126	1 (0.5%)
O128	2 (0.9%)
O152	1 (0.5%)
O153	2 (0.9%)
O159	3 (1.4%)
ND*	186 (88%)
total	211 (100%)

* : not detected

혈청형별 분포로는 O8이 9건(4.3%)으로 가장 높은 분포를 나타냈으며 그 외 O159 3건(1.4%), O6, O28ac, O128과 O153이 각각 2건(0.9%), O1, O55, O63, O126과 O152가 각각 1건(0.5%)씩 총 11종의 혈청형으로 분류되었다(Table 3).

시설별로 나타난 혈청형을 살펴보면 관원의뢰먹는물인 먹는물공동시설에서 O6, O8(5건), O28ac, O126, O159(3건)로 총 11

건, 민방위비상급수시설 O1, O8, O55, O63, O153(2건)로 총 6건, 간이급수시설 O8, O128, O152로 총 3건, 매립장수 O8 2건, 소규모급수시설 O28ac 1건, 민원의뢰먹는물인 지하수에서 O128 1건, 상수도(탱크수) O6 1건의 분포를 나타내었다. Cha 등¹⁸⁾에 의해 연구된 부산시 설사환자로부터 분리된 대장균의 혈청형 분포에서는 O44가 가장 많이 분류되었는데 이번 연구에서는 O44가 분류되지 않는 등 혈청

Table 4. Biochemical properties of serotyping *E. coli* isolates from drinking water

Biochemical test	No. of positive in serotyped <i>E. coli</i> (%)	No. of positive in isolated <i>E. coli</i> (%)
beta-galactosidase	25 (100)	211 (100)
arginine dihydrolase	0	0
lysine decarboxylase	21 (84)	168 (79.6)
ornithine decarboxylase	18 (72)	147 (69.7)
citrate utilization	0 (0)	0 (0)
H ₂ S production	0 (0)	0 (0)
urease	0 (0)	0 (0)
tryptophane desaminase	0 (0)	0 (0)
indole production	25 (100)	211 (100)
acetoin production	0 (0)	0 (0)
gelatinase	0 (0)	0 (0)
glucose fermentation	25 (100)	211 (100)
mannitol fermentation	25 (100)	211 (100)
inositol fermentation	3 (12)	22 (10.4)
sorbitol fermentation	25 (100)	211 (100)
rhamnose fermentation	17 (68)	173 (82.0)
sucrose fermentation	18 (72)	129 (61.1)
melibiose fermentation	25 (100)	203 (96.2)
amygdalin fermentation	2 (8)	11 (5.2)
arabinose fermentation	25 (100)	211 (100)
cytochrom-oxidase	0 (0)	0 (0)

형 분포에서 다른 양상을 나타내었다.

전체 211건의 대장균과 혈청형으로 분류된 25건의 대장균의 생화학적 특성은 유사하게 나타났다(Table 4).

혈청형으로 분류된 전체 25건 중 14건에서 beta-galactosidase, lysine decarboxylase, ornithine decarboxylase, indole, glucose, mannitol, sorbitol, rhamnose, sucrose, melibiose, arabinose 양성, arginine dihydro-lase, citrate utilization, H₂S production, urease, tryptophane desaminase, acetoin production, gelatinase, inositol, amygdalin, cytochrome-oxidase 음성의 생화학적 특성이 나타났다. 가장 많이 분리된 O8의 경우는 생화학적 특성이 4가지의 다른 형태로 나타나 O혈청형과 생화학적 특성과는 유의성이 없었으며, 같은 O혈청형이라도 생화학적 특성은 다르게 나타남을 알 수 있었다.

Multiplex PCR을 통한 virulence factors 조사

211건의 대장균을 Multiplex PCR을 통하여 ETEC의 ST와 LT, EPEC의 *eae*^{9,19)}, EIEC의 *spa*, EHEC의 VT1과 VT2 gene 존재 여부를 알아본 결과 O항혈청형으로 분류된 25건의 대장균과 분류되지 않은 186건의 대장균 모두에서 병원성 gene은 검출되지 않았다.

본 연구결과 부산시내 먹는물에서는 대장균은 검출되었으나 병원성대장균은 검출되지 않아 아직까지는 병원성대장균에 대

해서는 안전하다고 조사되었다. 그러나 대장균이 검출된다는 것은 병원성대장균 뿐만 아니라 다른 장내병원성 세균도 유입되었을 가능성이 크므로 부적합 판정된 먹는 물의 관리를 더욱 철저히 하여 앞으로도 병원성대장균 뿐만 아니라 대장균의 유입도 미연에 방지하는 것이 중요할 것이라 사료된다.

결론

1. 2004년 1월에서 9월까지 의뢰된 먹는 물에서 병원성대장균이 검출된 검체 280건에서 대장균을 분리한 결과 211건에서 211주의 대장균이 분리 동정되었다.
2. 대장균이 분리된 211건 중 시설별로 보면 먹는물공동시설에서 77건(36.5%)으로 가장 많이 검출되었고, 소규모급수시설과 매립장수에서 각각 2건(0.9%)으로 가장 적게 검출되었다. 월별로 보면 6월에 68건(32.2%)으로 가장 많이 검출되었고 1월에 4건(1.9%)으로 가장 적게 검출되었다.
3. 분리된 211건의 대장균 중 혈청형으로 분류된 대장균은 25건이며 혈청형별 분포로는 O8이 9건(4.3%)로 가장 높은 분포를 나타냈으며, 그 외 O159 3건(1.4%), O6, O28ac, O128과 O153이 각각 2건(0.9%), O1, O55, O63, O126과 O152가 각각 1건(0.5%)씩 총 11종의 혈청형이 나타났다.

4. 211건의 대장균을 multiplex PCR을 통하여 virulence factors를 조사한 결과 모든 대장균에서 virulence factors는 검출되지 않았다.
5. 부산시내 먹는물에서는 대장균은 검출되었으나 병원성대장균은 검출되지 않았다.

참 고 문 헌

1. S.L. Percival, R.M. Chalmer, and M. Embrey. 2004. Microbiology of Waterborne Diseases. ELSEVIER. press. p 71-90
2. 박석기, 안승구, 엄석원. 1998. 해설먹는물의 수질관리. 동화기술. p53-62
3. Geo. F. Brooks, Janet S. Butel, and L. Nicholas Ornston. 1995. Medical Microbiology. Appleton&Lange. p209- p212
4. 김성광, 김영부, 김익중. 2001. 병원미생물학. 정문각. p191-192
5. Frankel, G., A. D. Phillips, L. R. Trabulsi, S. Knutton, G. Dougan, and S. Matthews. 2001. Intimin and the host cell-is it bound to end in Tir(s). Trends Microbiol. 9:214-218.
6. Trabulsi, L. R., R. Keller, and T. A. T. Gomes. 2002. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. Emerg. Infect. Dis. 8:508-513.
7. Vallance, B. A., and B. B. Finlay. 2000. Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:8799-8806.
8. Anna Giammanco, Margherita Maggio, Giovanni Iammanco, Roberto Morelli, Fabio Minelli, Flemming Scheutz, and Alfredo Caprioli. 1996. Characteristics of *Escherichia coli* Strains Belonging to Enteropathogenic *E. coli* Serogroups Isolated in Italy from Children with Diarrhea. Journal Of Clinical Microbiology. 3;689-694
9. Vania M. Carvalho, Carlton L. Gyles, Kim Ziebell, Marcela A. Ribeiro,1 JoseL. Catao-Dias, Idercio L. Sinhorini, Jamile Otman, Rogeria Keller, Luiz R. Trabulsi, and Antonio F. Pestana de Castro. 2003. Characterization of Monkey Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Human Typical and Atypical EPEC Serotype Isolates from Neotropical Nonhuman Primates. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 1225-1234
10. Donnenberg, M. S., and J. B. Kaper. 1992. Enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect. Immun. 60:3953-3961.
11. Donnenberg, M. S., J. Yu, and J. B. Kaper. 1993. A second chromosomal gene necessary for intimate attachment of enteropathogenic *Escherichia coli* to epithelial cells. J. Bacteriol. 175:4670-4680.

12. Jerse, A. E., J. Yu, B. D. Tall, and J. B. Kaper. 1990. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:7839-7843.
13. Law, D. 1994. Adhesion and its role in the virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. 7:152-173.
14. Tesh, V. L., and A. D. O'Brien. 1992. Adherence and colonization mechanisms of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. Microb. Pathog. 12:245-254.
15. Nataro, J.P. and Kaper, J.B. 1998. Diarrheagenic *E. coli*. Clin Rev Microbiol. 11:142-201
16. Bolton FJ, Crozier L, and Williamson JK. 1996. Isolation of *Escherichia coli* O157 from raw meat products. Lett Appl Microbiol. 23(5):317-21.
17. 환경부 고시 제2002-91호, 먹는물수질 공정시험법, 2002.6.21
18. I.H. Cha, S.H. Jin, E.H. Park, H.C. Cho, S.A. Park, Y.S. Lee. 1999. serological Distribution and Properties of Antibiotic Resistance of *Escherichia coli* from Patients with Diarrhea. Rep. Pusan Inst. Health&Environ. 9:62-82.
19. Eunice C. Chern, Yu-Li Tsai, and Betty H. Olson. 2004. Occurrence of Genes Associated with Enterotoxigenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in Agricultural Waste Lagoons. Appl. Envir. Microbiol. 70:356-362