

지표미생물을 이용한 시화호 유입수의 수질평가

이희태 · 김희연 · 박현진 · 조영은 · 유소영 · 이경진 · 정종선 · 고광표*†

서울대학교 보건대학원 환경보건학과
(2007. 12. 18. 접수/2008. 2. 18. 채택)

Evaluation of Influent Water Quality Using Indicator Microorganisms in Lake Shiwha

Heetae Lee · Heeyeon Kim · Hyunjin Park · Youngeun Cho · Soyoung Ryu ·
Kyungjin Lee · Jongsun Jung · GwangPyo Ko*†

Department of Environmental Health Graduate School of Public Health, Seoul National University
(Received December 18, 2007/Accepted February 18, 2008)

ABSTRACT

Lake Shiwha, an artificial lake located near metropolitan Seoul, offers a unique water environment and has been suspected to have high levels of chemical and microbiological contaminations. Lake Shiwha was originally connected to the sea but currently has four major surface water inputs from agricultural, municipal, industrial areas and in addition an occasional inflow from the sea. The objectives of this study are to investigate the relative contribution of microbial contaminants from each of the inflowing surface waters and to identify appropriate microbial indicator organisms in this unique water environment. We measured the levels of microbial contaminations in the four inflowing surface waters. A number of microbial indicator organisms including total coliform (TC), fecal coliform (FC), *E. coli*, *Enterococci*, somatic and male-specific coliphages were analyzed. Bacterial indicator microorganisms were detected and quantified by the Colilert[®], Enterolert[®] kit. Surface water (50 l) was sampled by ViroCap[™] 5" cartridge filters and analyzed by the single agar layer method for detecting coliphages. The concentrations of TC, FC, *E. coli*, and *Enterococci* were 1543 CFU/100 ml~1.99×10⁶ CFU/100 ml, 0 CFU/100 ml~202 CFU/100 ml, 0 CFU/100 ml~1.80×10⁵ CFU/100 ml, 74 CFU/100 ml~3408 CFU/100 ml, respectively. The male-specific and somatic coliphages were detected in three different inflowing surface waters. Isolated *E. coli* and *Enterococci* strains were further analyzed by 16s rDNA amplification and subsequent phylogenetic analysis from Jungwang-chun, Ansan-chun, Banwol-chun and penstock of inflowing surface water. Our results indicated that the concentrations of different fecal indicator microorganisms might not be highly correlated with each other. Multiple microbial indicator organisms should be used for monitoring microbial contamination and microbial source tracking methods.

Keywords: Lake Shiwha, water quality, indicator microorganisms, phylogenetic analysis

I. 서 론

시화호는 안산시, 시흥시, 화성시와 인접한 인공호수로, 인근 간척지에 농업용수를 공급할 목적으로 1994년에 시화방조제공사가 완공되었다. 하지만 반월공단과 시화공단에서의 공장폐수와 늘어나는 거주지의 생활하수가 유입되면서 심각한 수질오염이 발생하였다. 정부

는 다년간의 수질개선대책을 수립하는 등의 노력을 기울였지만 결국 시화방조제의 배수갑문을 열어 2001년 2월 공식적으로 해수호로 인정하였고, 그 이후 하수처리장의 확장, 인공습지 조성, 조력발전소 건설 계획 등 시화호 종합관리계획을 진행하고 있다.¹⁾ 수질 개선 정도를 파악하기 위해 BOD, COD의 화학적 지표를 통한 관리가 매년 이루어지고 있지만 기준에 미치지 못하고 있다.²⁾

시화호에 수질오염을 가중시키는 요인으로는 시화호로 유입하는 지표수로부터 확인할 수 있다. 반월공단과 시화공단의 토구로부터 유입되는 토구천, 안산시를 통해 흐르는 하천, 상류지대에 위치하고 있는 농업 및 축

*Corresponding author : Department of Environmental Health Graduate school of Public Health, Seoul National University
Tel: 82-2-3668-7881, Fax: 82-2-745-9104
E-mail : gko@snu.ac.kr

산 지대로 부터 유입하는 지천으로 나눌 수 있다. 또한 배수갑문을 통해 해수가 유입되고 있어 상류 쪽은 담수성질을 나타내고 하류 쪽은 해수성질이 강하나 순환 능력이 좋지 않아 서로 다른 수질 특성을 나타내고 있다. 이런 독특한 환경에서 미생물 지표를 이용한 연구는 큰 의미를 가지고 있다.

수질오염을 평가하는데 있어서 미생물지표를 이용하여 수질을 관리하고 평가하려는 노력이 오래 전부터 시도되어왔고, 이미 세계 각국은 오염 정도를 파악할 수 있는 기준을 마련하고 보다 정확하고 믿을 수 있는 수질관리를 위한 연구를 진행하고 있다. 현재 우리나라 먹는 물 수질 기준 목록에는 총대장균군(Total coliform), 분원성 대장균군(Fecal coliform), 분원성연쇄상구균(*Enterococcus*), 대장균(*E. coli*), 일반세균(Total Colony Counts), 녹농균(*Pseudomonas*), 쉬겔라(*Shigella*), 살모넬라(*Salmonella*), 아황산 환원 혐기성 포자 형성균(Spore forming sulfite Reducing *Anaerobes*)이 포함되어 있으며, 하천수 및 호소수질환경기준에는 총대장균군과 분원성 대장균군이 포함되어 있다.³⁾ 미생물의 대한 기준을 수질관리에 적용하기 위한 연구가 우리나라에도 폭넓게 진행되고 있으며,^{4,6)} 기준이 점차 강화되는 경향을 보이고 있다.

수질오염을 평가하기 위한 미생물학적인 지표로서 대장균(*E. coli*), 장내연쇄상구균(*Enterococcus*), 박테리오파지(Bacteriophage) 등이 대표적이다. 이들은 사람과 환경 내에 많이 분포하고 환경의 변화에 안정하여 지표미생물로서의 기본 조건을 충족시키며 오염원에 대한

특이성을 가지고 있어 수질을 평가하는데 널리 이용되고 있다.^{7,8)} 본 연구를 통해 시화호로 유입하는 지표수에서 미생물학적인 수질오염의 평가와 비교를 실시해 보고 환경적인 특성을 고찰해보자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 시료 채취 지점 선정 및 채수

시화호로 흘러들어오는 유입수는 바닷물이 유입되는 배수갑문, 반월공단과 시화공단 사이로 흐르는 토구천, 안산시를 통과하여 흐르는 하천 그리고 농업지역 및 가축농가가 밀집한 상류에서 유입되는 지천으로 크게 4곳으로 나눌 수 있다. 각각의 유입수를 대표하여 표본수를 선정하였는데, 배수갑문을 통과하여 시화호로 유입이 시작되는 부분, 공단을 통과하여 흐르는 토구 중 시화공단과 반월공단 중간에 위치한 정왕천 하류 그리고 안산시에서 흘러 들어오는 안산천 하류에서 채수하였다. 또한 동화천, 삼화천, 반월천은 갈대습지를 통과하여 시화호로 유입하는 지천으로, 동화천에서는 습지를 통과하기 전 지점과 반월천에서는 습지를 통과한 후 지점을 선정하여 총 5곳에서 채수하였다(Fig. 1).

시료 수집은 2007년 6월 19일과 20일 동안 실시하였고, 기온이 높지 않은 오전 시간에 주로 채수하였다. 표본 수집은 직접 채수 방법과 필터를 이용한 흡착 방법으로 나눌 수 있다. 직접 채수는 Colilert[®]와 Enterolert[®](IDEXX, USA)를 이용한 총대장균군, 분원

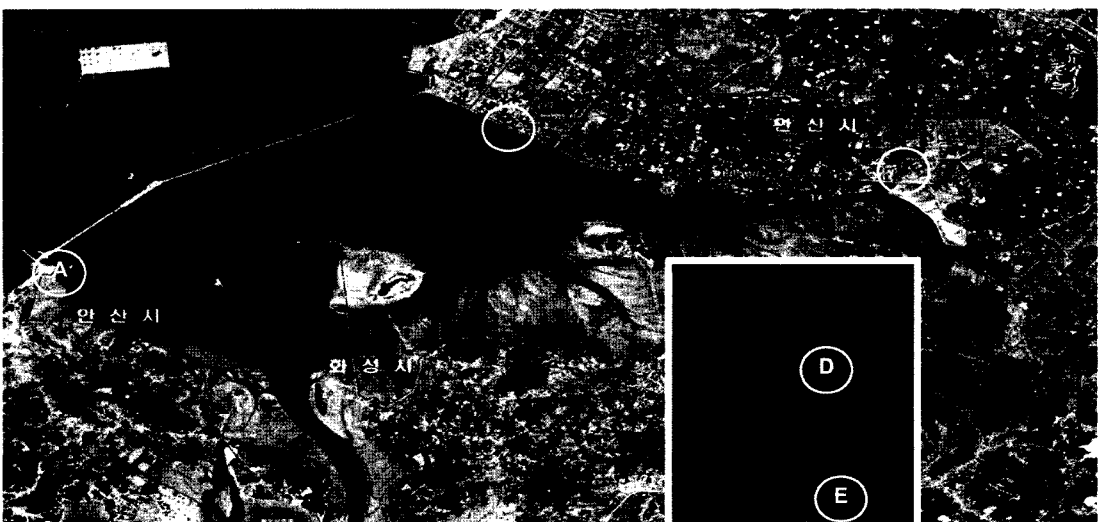


Fig. 1. Sampling sites around Lake Shiwha.

A: Penstock, B: Jungwang-chun, C: Ansan-chun, D: Donghwa-chun, E: Banwol-chun

Table 1. Summary of sampling location, date and environmental conditions

	Sampling date	Temp.	Microbial indicator			Method
			Colilert [®]	Enterolert [®]	Coliphage	
Donghwa-chun	6/19, 10:40	29.0°C	○	○	○	bottle/filter
	6/20, 12:45	28.5°C	-	-	○	filter
Banwol-chun	6/19, 11:25	29.5°C	○	○	○	bottle/filter
	6/20, 13:27	29.0°C	-	-	○	filter
Jungwang-chun	6/20, 8:50	27.0°C	○	○	○	bottle/filter
Ansan-chun	6/19, 9:20	28.5°C	○	○	○	bottle/filter
Penstock	6/20, 10:00	28.5°C	○	○	○	bottle/filter

성대장균군, 대장균, 장내연쇄상구균을 검사하기 위한 목적으로, 각각의 지점에서 채수통에 1ℓ씩 담아서 바로 4°C 아이스박스에 보관하여 채수 당일에 실험실로 이동하였다. 필터를 이용한 방법은 coliphage를 검사하기 위하여 실시되었고 5" Virocap[™] 카트리지 필터 (Scientific Methods Inc., USA)를 이용하였다. 필터가 들어있는 필터용기에 호스와 peristaltic pump (Masterflex[®]/L/S, Cole-Parmer Inc., USA)를 연결하고 분당 1700 ml의 유속으로 50 l의 표본수가 흐르도록 하였고, 끝난 후에는 외부와의 접촉이 없도록 필터만 꺼내어 밀폐용기에 담아서 직접 채수 방법과 동일하게 즉시 4°C의 아이스박스에 넣어 채수 당일에 실험실로 이동하였다(Table 1).⁹⁾

2. 실험방법

1) 총대장균군, 분원성대장균군, 대장균, 장내연쇄상구균 검사

Colilert[®]와 Enterolert[®] kit를 이용하여 총대장균군, 분원성대장균군, 대장균, 장내연쇄상구균의 정성검사와 정량검사를 실시하였다. 이는 호소발색법(Defined Substrate Technology(DST))의 원리를 기본으로 하고 있고, 우리나라에서는 2002년 7월 1일 먹는 물 수질공정 시험방법에 등재되었다. Colilert[®]와 Enterolert[®] kit의 이용방법은 제조자의 지시를 따라 진행하였고, 이는 다음과 같다. 먼저 정성검사를 위해서 채수한 물 100 ml를 검사용 플라스틱 용기에 담고 Colilert[®] 시약을 넣는다. 시약이 모두 녹을 때까지 흔들어진 후 35±0.5°C에서 24시간 동안 배양한다. 배양 후 변화한 색의 정도를 comparator와 비교하여 결과를 확인하는데, comparator보다 진하면 양성, 진하지 않으면 음성으로 판정한다. 총대장균군 양성의 경우 노란색을 나타내고, 10 cm 거리에서 UV 램프로 비추어 봤을 때 파란색 형광을 나타내면 대장균 양성을 나타낸다. 분원성대장균군의 경우는 위와 동일한 방법으로 진행되나 배양조건

을 44±0.5°C, 24시간으로 배양하고 노란색으로 보일 때 양성이다. Enterolert[®]를 이용한 장내연쇄상구균의 정성검사에서는 Enterolert[®]용 시약을 사용하고 41±0.5°C, 24시간 배양조건으로 진행되며 양성은 UV상에서 파란색 형광을 나타낸다. 정량검사는 우선 표본수를 10배, 100배, 1000배 희석한 후 각각 100 ml씩 사용하였다. 방법은 정성검사와 동일하게 진행되나 검사용 플라스틱 용기 대신에 Quanti-Tray[®]/2000를 사용하는데 기포가 생기지 않도록 용액을 넣고 sealer로 봉합한 후 위와 동일한 배양조건에서 배양한다. 배양 후 Quanti-Tray[®]/2000 색의 수를 통해 제공된 최적확수시험법(Most Probable Number, MPN) 표를 참조하여 결과를 판독한다.

2) 대장균과 장내연쇄상구균의 분리

Quanti-Tray[®]/2000에서 양성으로 나온 tray의 뒷면을 70% 알코올로 닦은 후 피펫으로 구멍을 뚫어 20 μl을 뽑아낸다. 대장균은 MUG(4-Methyl Umbelliferyl β-D-Glucuronide, Sigma, 10 mg MUG/100 ml agar), 장내연쇄상구균은 IBDG(indoxyl-β-D-glucoside, Sigma, 75 mg IBDG/100 ml agar)를 넣은 nutrient agar에서 각각 37°C, 41°C에서 24시간 배양한다. 대장균과 장내연쇄상구균은 UV에서 파란형광이 확인된 콜로니를 각각 이쑤시게를 이용하여 분리하고 20% 글리세롤에 넣어 -70°C에 보관한다.¹⁰⁾

3) 콜리파지(Coliphage) 검사

콜리파지는 Single Agar Layer(SAL) 방법으로 검사하였다.¹¹⁾ SAL 방법에 앞서 탈리, 침전, 농축 3가지 단계를 거치게 되는데, 우선 4°C로 보관하여 가져온 필터를 필터용기에 넣고 호스를 양쪽으로 연결하여 호스의 두 입구를 1.5% beef extract buffer 1 l가 담긴 비커에 담근다. 호스에 peristaltic pump 장치하고 20분간 순환시켜 필터에 붙은 콜리파지를 탈리시킨다. 탈리된

coliphage가 담긴 1 l buffer에 마그네틱 바를 넣은 후 휘저으면서 1 M HCl를 조금씩 넣어 pH 3.5 ± 0.05 가 되도록 한다. 침전물이 생길 때까지 실온에서 30분간 진행시키고 침전은 2,500 g, 4°C 조건으로 20분간 원심 분리한다. 상층액은 버리고 바닥에 가라앉은 침전물을 PBS(Phosphate Buffer Saline, pH=9.5) 3 ml로 완전히 풀어준다. 다시 4,000 g, 4°C 조건으로 10분간 원심분리 후 상층액만 취하여 pH를 7.0~7.5로 맞춰준다. 농축된 용액에 다른 미생물을 제거하기 위해 0.22 μ m 주사기 필터를 이용해 정제한 후 최종 용량을 확인한다. 농축된 표본을 10^1 ~ 10^4 까지 희석하여 각각 3 ml씩 튜브에 담는다. MgCl₂ 75 μ l와 숙주 대장균인 CN13(Somatic coliphage 검사)과 Famp(Male-specific coliphage 검사)를 각각 1.5 ml씩 넣고 2×TSB와 혼합하여 18~24시간 동안 37°C에서 배양한 후 플라크 수를 세어 검사한다. 비교균으로서 MS2 coliphage를 5 l 증류수에 100 μ l(10^{11} PFU/ml)를 접종하고 숙주 대장균인 C3000을 이용하여 동일한 방법으로 진행하였다. 비교균의 결과를 통해 회수율을 계산하여 각각의 표본 수에서의 coliphage를 비교하였다.⁹⁾

4) 16s rDNA를 이용한 분자 계통학적 연구 (Phylogenetic analysis)

Nucleic acid extraction : -70°C에서 보관하고 있는 대장균과 장내연쇄상구균 분리균을 이췌시개를 이용하여 LB broth 3 ml가 담긴 튜브에 넣고 진탕배양기에서 37°C로 하룻밤 배양한다. 배양 후 300 μ l을 1.5 ml micro tube에 넣고 96°C에서 10분간 배양한다. 이를 16,000 g로 3분간 원심분리하고 상층액을 분리하여 새로운 tube에 담아 중합효소 연쇄반응에 이용한다.¹²⁾

16S rDNA 유전자의 중합효소 연쇄반응(Polymerase chain reaction, PCR)을 이용한 유전자 증폭 : 분리한 16S rDNA를 ABI 2320의 중합효소연쇄반응기(DNA thermal cycler, Applied Biosystems 2720)를 이용하여 유전자 증폭을 수행하였다. 중합효소연쇄반응을 위해서 Bioneer Taq DNA polymerase(Korea, cat. E-2011-2)를 사용하였고, PCR reaction mix에 표본을 첨가하는 방법으로 시행하였는데, mix는 총 20 μ l로 구성되어 있으며, 여기에 5 μ l의 표본이 첨가된다. PCR에 사용된 프라이머(10 pmol)는 forward가 63f(5'-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3'), reverse가 1387r(5'- GGG CGG WGT GTA CAA GGC-3')이며 COSMO Co., Ltd.에서 주문하여 각각 1.25 μ l씩 첨가하였다.¹³⁾ 중합효소연쇄반응의 증폭주기반응(amplification cycling reaction)은 다음과 같은 조건으로 진행되었다.

DNA 변성(Denaturation)은 94°C에서 1분, 프라이머의 수소결합(annealing)은 55°C에서 1분 30초, 신장반응(extension)은 72°C에서 2분으로, 이 3가지 반응단계는 총 30주기로 반복되도록 하였다. 부가적인 신장반응 단계(additional extension step)를 72°C에서 10분간 수행한 후, 중합효소연쇄반응 산물을 얻을 수 있다. 증폭된 산물은 0.5 μ g/ml의 ethidium bromide가 포함된 1% ethidium bromide stained agarose gel에서 50 V로 전기영동하여 DNA image analyzer로 확인하였고 1.3 kb의 단편을 확인할 수 있다. 증폭된 DNA 단편의 정제를 위해서 QIAquick Gel Extraction Kit(USA, cat no. 28706)을 사용하였으며, 실험방법은 제조자의 지시를 따라 진행되었다. 정제된 DNA는 -20°C에서 보관하였다.

TA Vector cloning 및 DNA sequencing : DNA 염기서열 분석을 위한 ligation 과정은 pGEM-T Easy Vector system(Promega, USA, cat. A1360)을 이용하였다. Ligation mix는 다음과 같이 이루어진다. 2× rapid ligation buffer 5 μ l, pGEM T-easy vector(50 ng) 1 μ l, T4 DNA ligase(3 weiss units/ μ l) 1 μ l을 넣고, insert와 vector의 비가 2~10:1이 되도록 하여 PCR 산물 3 μ l를 첨가한다. 이를 피펫으로 잘 섞어준 뒤, 실온에서 1시간동안 배양한다. Ligation 후, 재조합 벡터는 열에 의한 충격(heat shock)의 방법으로 반응능 대장균(competent *E. coli*)중에 하나인 DH5 α 로 형질전환(transformation)한다. 이를 ampicillin이 포함된 LB broth 배지에 도말하여 10~12시간 정도 배양한다. PCR 산물과 TA 벡터가 cloning된 재조합 벡터를 2× cracking(5N NaOH 20 μ l, 10% SDS 50 μ l, sucrose 200 mg, 증류수 930 μ l) 방법으로 처리한 후 0.5 μ g/ml의 ethidium bromide가 포함된 1% ethidium bromide stained agarose gel에서 100 V로 전기영동한 후 image analyzer로 확인하였다. 확인된 샘플은 plasmid miniprep kit(Labopass mini plasmid DNA purification kit, Korea, cat. CMP 0112)로 제조자의 지시에 따라 플라즈미드를 추출하여 DNA 염기서열을 분리하였다.

계통학적 분석(phylogenetic analysis) : 16S rDNA의 염기서열을 Lasergene6 program(DNASTAR Inc., USA)을 이용하여 계통학적 분석을 실시하였다. 미국국 가생물공학센터(NCBI) BLAST search를 통해 보고된 대장균 및 장내연쇄상구균의 유전자 염기서열정보를 토대로, Megalign program에서 Crustal W 방법으로 정렬된 결과를 얻었고, 같은 program에서 neighbor-joining analysis를 이용하여 계통수(phylogenetic tree)를 구성하였다.¹⁴⁾

III. 결과 및 고찰

1. Colilert[®]와 Enterolert[®] kit 분석

Colilert[®]와 Enterolert[®] kit와 이용한 MPN결과는 정성검사와 정량검사로 나눌 수 있다. 정성검사에서는 모두 대부분 양성으로 나와 예상했던 바와 같이 오염이 심화된 상태를 보여주고 있다. 정량검사의 경우 표본 100 ml과 10배(10 ml), 100배(1 ml), 1000배(0.1 ml)로 희석하여 표본마다 총 4개씩 검사를 실시하였다. 표본 수마다 희석된 4개의 결과의 평균값으로 각각의 지표수의 오염 정도를 비교 분석하였다. 정왕천이 총대장균군(1986300 CFU/100 ml), 분원성대장균군(202 CFU/100 ml), 대장균(179645 CFU/100 ml), 장내연쇄상구균(3408 CFU/100 ml) 모두에서 가장 높은 값을 보이고 있어 시화호로 유입되는 지표수 중에 오염도가 가장 높았다. 정왕천은 반월공단과 시화공단의 중간에 위치하고 있는 토구로 공단을 대표하는 채수지점이다. 공단의 공장폐수는 모두 하수처리시설로 모여 정화되지만, 일부는 빗물등의 형태로 토구로 흘러들어 시화호로 유입된다. 그러므로 토구인 정왕천에서 가장 높은 오염도를 보이는 것은 토구관리에 문제점이 있음을 보여주고 시화호 오염의 주된 원인으로 의심할 수 있다. 반월공단과 시화공단에서 시화호로 유입되는 토구는 정왕천 뿐만이 아니기 때문에 토구 오염에 대한 체계적인 연구가 필요하다.

총대장균군과 분원성대장구균은 해수의 유입이 많은 배수갑문이 다른 곳보다 낮았다. 이는 배수갑문이 해수의 물이 유입되는 부분으로 시화호에서 물이 순환이 가장 많은 곳이기 때문으로 생각된다. 배수갑문에서의 장

내연쇄상구균(125 CFU/100 ml)은 상류인 동화천(74 CFU/100 ml)과 반월천(83 CFU/100 ml)보다 높게 나타났다. 장내연쇄상구균은 일반적으로 해수와 같이 염도가 높은 물의 오염도를 평가하는 지표미생물로 알려져 있는데, 이번 연구에서도 해수의 유입에 많은 배수갑문에서의 높은 농도로 나타나 이를 입증하는 자료라 사료된다.

반면에 분원성대장균군은 배수갑문과 안산천에서 검출되지 않았고 대장균은 동화천에서 발견되지 않았다.

동화천과 반월천을 통해 갈대습지 통과 전 후를 비교했을 때, 총대장균군과 분원성대장균군은 통과 전인 동화천(187680 CFU/100 ml, 50 CFU/100 ml)에서 높게 나타났으나, 대장균과 장내연쇄상구균은 통과 후인 반월천(106 CFU/100 ml, 83 CFU/100 ml)에서 더 높게 나타났다(Fig. 2). 갈대습지는 시화호로 유입되는 오염원을 제거하기 위해 조성되었다. 갈대 습지의 정화 능력에 대한 여러 연구가 이미 보고되었는데,^{15,16)} 본 연구의 결과에서 볼 때, 총대장균군과 분원성대장균군은 각각 86%와 74%의 감소효과를 보이고 있다. 하지만 대장균과 장내연쇄상구균의 경우는 그 효과가 없었고, 오히려 처리 후 검출 농도가 증가하였다.

분원성대장균군의 농도는 총대장균군보다 낮고, 대장균보다는 높게 측정되는 것이 일반적이다. 하지만 이번 연구에서는 분원성대장균군의 농도가 대장균보다 대체적으로 낮게 나타났다. 이는 실험 과정에서 배양조건등의 문제를 의심해 볼 수 있다.

수질 파악과 관리 기준을 정하기 위한 연구에 있어서 물리적인 방법과 이화학적 방법을 통해 오래전부터 진행되어왔고,^{17,18)} 지역적 특성에 맞게 적용되어 왔다.

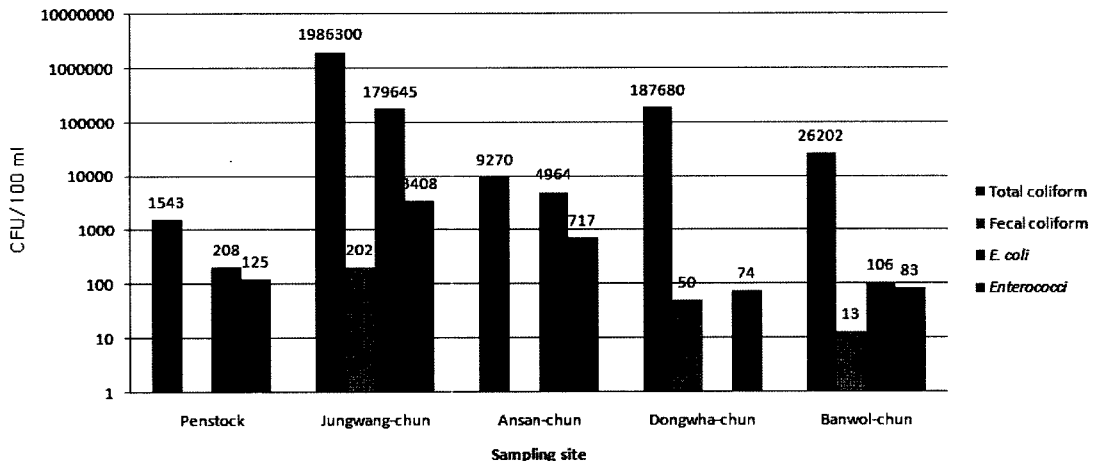


Fig. 2. Levels of microbial contamination in sampled surface water.

하지만 수질 오염으로 인한 전염병을 미리 예측하고 예방하기 위해 미생물학적인 수질관리체계의 확립 또한 요구된다. 그러므로 지표미생물을 비롯한 통합적인 수질평가관리에 있어서 널리 이용되고 있다.¹⁹⁾ 방조제 건설 후(1995년)부터 시화호 종합관리계획 실시 이후(2002년)까지의 물환경정보시스템 자료에 의하면 COD, BOD 값이 감소함에 따라 총대장균군도 같이 감소함을 보이고 있다. 이는 수질 오염을 측정하는 지표물질 간에 연관성을 의미하며, 이번 연구의 지표 미생물 자료는 기존의 다른 방법과 더불어 시화호 수질 관리에 있어서 의미있는 자료를 제공할 수 있다고 판단된다.

2. 콜리파지(Coliphage)

배수갑문, 안산천, 정왕천은 한 번씩 검출한 결과이고 동화천과 반월천은 이틀에 걸쳐 두 번씩 검출한 결과의 평균값이다. 최종 농축 양은 3 ml이고 10에서 10000배 희석하여 배양하였다. 플라크 결과로 평균값을 구하여 1에 들어있는 콜리파지의 양을 추적하였는데, 비교군을 통해 얻은 검출의 회수율은 1.9%이었다. 검출 결과 정왕천에서 male-specific coliphage는 $5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ PFU/L, somatic coliphage는 1×10^5 PFU/L 이상을 나타내어 가장 높은 농도를 보이고 있으며 이는 박테리아 지표미생물의 결과와 일치한다. 배수갑문, 안산천과 반월천에서는 콜리파지 검출에 실패했고, 정왕천과 동화천에서만 coliphage의 양을 확인할 수 있었다. 정왕천에서는 male-specific coliphage보다 somatic

coliphage의 농도가 더 높게 나타났고, 반면에 갈대습지를 통과하기 전인 동화천에서는 이와 반대로 나타났다. 회수율을 통해 환산하였을 때, 50배 이상의 콜리파지가 있을 것으로 예상되나 검출이 되지 않은 지표수에서도 coliphage의 농도는 확인할 수 없었다(Table 2).

콜리파지는 coliform 박테리아를 숙주로 하는 바이러스로, 환경에서 박테리아 지표미생물 보다 높은 안정성을 보이고 있어 바이러스 오염의 지표미생물로 제안되었고, microbial source tracking 방법에서 중요하게 여겨진다.^{20,21)} 본 연구에서 콜리파지 검사에서는 회수율이 1.9%로 낮아 정왕천과 동화천에서만 검출이 가능하여서 전반적인 비교가 힘들지만, 정왕천에서의 높은 검출 농도는 박테리아에서의 결과와 같이 가장 높게 나타났고, 이 역시 공단지역의 오염이 심각함을 지적해준다. 일반적으로 somatic coliphage는 사람과 가축에서 모두 나타나고 있으며, male-specific coliphage는 사람보다 가축에서 더 높은 농도를 보이고 있는데, 정왕천과 동화천을 비교한 결과 서로 다른 양상을 보이고 있어 동화천이 가축농가가 밀집한 지대에서 유입하는 하천임을 예측할 수 있다. 또한 갈대습지 통과 후 채취지점인 반월천에서는 콜리파지가 검출이 되지 않아 갈대습지의 콜리파지가 정화작용을 확인할 수 있다.

3. 박테리아 지표미생물(bacterial indicators)과 콜리파지(coliphage)와의 상관관계

Male-specific coliphage가 1×10^3 PFU/L 이하로 검출되었던 곳과 $5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ PFU/L에서 검출되었던

Table 2. Prevalence and levels of male-specific and somatic coliphages

	Penstock	Jungwang-chun	Ansan-chun	Donghwa-chun	Banwol-chun
Male-specific coliphage	-	++	-	++	-
Somatic coliphage	-	+++	-	+	-

+: $1 \times 10^3 \sim 2 \times 10^3$ PFU/L, ++: $5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ PFU/L, +++: $>1 \times 10^5$ PFU/L and -: $<1 \times 10^3$ PFU/L.

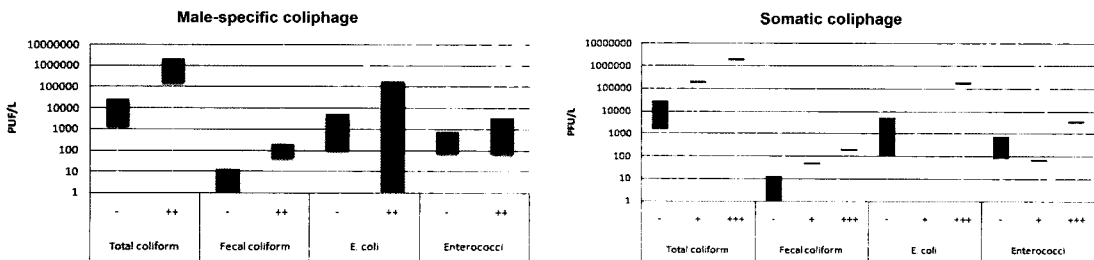


Fig. 3. Correlation between bacterial indicators and coliphages. -, +, ++, +++ are levels of coliphages (+: $1 \times 10^3 \sim 2 \times 10^3$ PFU/L, ++: $5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ PFU/L, +++: $>1 \times 10^5$ PFU/L and -: $<1 \times 10^3$ PFU/L).

곳으로 나누어 살펴볼 때, 총대장균군과 분원성대장균군의 경우, 검출 농도가 높게 나오는 곳에서 콜리파지의 농도도 더 높았다. 하지만 대장균과 장내연쇄상구균의 검출 농도와 콜리파지의 농도와는 연관성이 없었다. Somatic coliphage의 경우, 1×10^3 PFU/L보다 검출 농도가 낮은 곳, $1 \times 10^3 \sim 2 \times 10^3$ PFU/L, 1×10^5 PFU/L 이상 검출된 곳으로 나누어 살펴볼 때, male-specific coliphage와 같이 총대장균군과 분원성대장균군에서만 연관성을 보이고 있다(Fig. 3). 콜리파지가 박테리아 미생물군과 연관성이 보여지나, 특정 지표미생물과는 연관성을 보이지 않는 이유는 콜리파지마다 다른 숙주를 가지고 있기 때문이라 사료된다.

4. 계통적학 분석(Phylogenetic analysis) 결과 및 Multiple Alignment

16S rDNA의 중합효소 연쇄반응의 결과 대장균은 5곳 모두에서 DNA 단편을 확인하였고(Fig. 4), 장내연쇄상구균은 동화천을 제외한 4곳에서 확인하였다. 하지만 BLAST search 결과에서 대장균의 경우 정왕천과 반월천의 16S rDNA만 대장균과 유사한 strain으로 확인되었고, 장내연쇄상구균의 경우 배수갑문을 제외한 정왕천, 안산천, 반월천의 16S rDNA만 장내연쇄상구균과 유사한 strain으로 확인되어 이 16S rDNA들로만 계통분석을 실시하였다.

대장균과 장내연쇄상구균의 16s rDNA를 이용한 계통학적 분석을 하기 위해 계통수(phylogenetic tree)를 제작하였다. 대장균의 경우, 반월천과 정왕천에서의 분리한 대장균의 염기서열을 확인하여 이미 알려진 다른 염기서열정보와 분석을 실시하였고, 장내연쇄상구균의 경우는 정왕천, 안산천, 반월천에서 각각 분리한 균을 통해 대장균과 같은 방법으로 계통연구를 실시하였다. 반월천과 정왕천의 대장균은 비교 대장균과의 차이를 보이고 있는데, 정왕천의 대장균이 반월천보다 다수의 대장균들과 높은 유사성을 보이고 있다. 장내연쇄상구균의 경우, 안산천, 반월천, 정왕천 모두에서 다른 비교 균들과 높은 유사성을 보이고 있다(Fig. 5, Fig. 6).

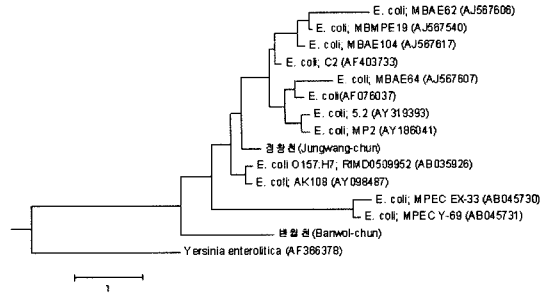


Fig. 5. Phylogenetic tree of *E. coli* isolates and other reference strains. *Yersinia enterocolitica* is as an outgroup.

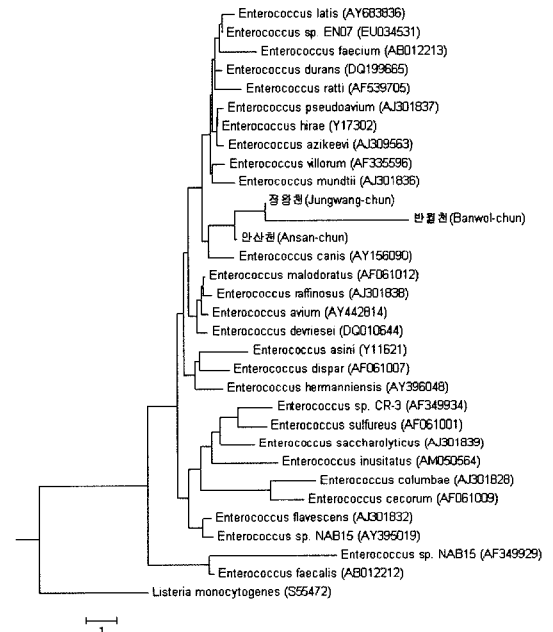


Fig. 6. Phylogenetic tree of *Enterococcus* isolates and other reference strains. *Listeria monocytogenes* is as an outgroup.

IV. 결 론

본 연구는 시화호 수질오염의 원인인 지표수를 환경

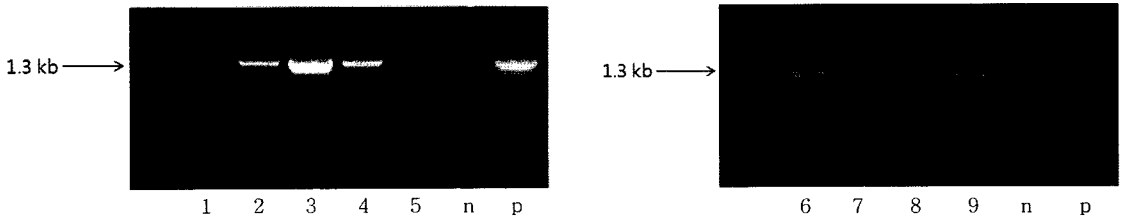


Fig. 4. PCR amplification of 16S rDNA from *E. coli* and *Enterococcus* using universal primers. Lane 1~5 are *E. coli* strains, lane 6~9 are *Enterococcus* strains p: positive control; n: negative control; product size is about 1.3 kb.

적 특성 별로 선정하여 각각의 유입수에서 미생물 지표를 이용하여 수질을 검사해보고 서로간의 오염 정도를 비교 분석하는데 가장 큰 목적이 있다. 이런 미생물학적인 접근 및 평가는 인간의 삶과 밀접한 수질의 관리에 중요한 자료로 사용될 수 있기 때문에 의미있는 연구이다.

Colilert[®]와 Enterolert[®] kit는 세계 여러 나라에서 미생물학적 수질을 평가하는데 기준으로 사용되고 있으며, 이번 실험의 결과 또한 신뢰할 수 있는 미생물학적 수질평가 검사라 할 수 있다. 정왕천은 모든 지표미생물의 측정값에 있어서 다른 유입수보다 높게 나타났다. 정왕천은 공단지역에서 흘러들어온 토구 중 하나로서, 오염된 토구의 물은 시화호 수질 환경에 악영향을 끼친다. 그러므로 토구 수질 관리가 요구되며, 모든 토구들을 대상으로 수질오염에 관한 연구가 진행되어야 하겠다.

정왕천을 제외하고, 분원성대장균군은 안산천과 배수갑문보다 동화천과 반월천에서 검출 농도가 높았다. 이로써 상류지대에 농업지대와 가축농가가 많다는 것과, 시화호에 분변에 의한 오염이 있음을 예측할 수 있다. 또한 갈대습지를 통과하기 전인 동화천과 후인 반월천을 비교했을 때 갈대습지의 분원성미생물 정화능력을 확인할 수 있다.

바이러스 지표미생물인 콜리파지는 역시 정왕천에서 가장 높게 검출되었다. 하지만 동화천에서는 male-specific coliphage가 somatic coliphage보다 높게 나타나 분변 오염의 근원이 가축농가에 있음을 예상할 수 있다. 또한 콜리파지의 농도는 총대장균군과 분원성대장균군의 검출 농도가 높을수록 높은 것으로 나타났다.

계통학적 분석을 통한 대장균과 장내연쇄상구균의 군집을 확인하였다. 정왕천과 반월천에서 얻은 대장균은 서로 유사성이 높지 않는데 반해, 정왕천, 반월천, 안산천의 장내연쇄상구균의 유사성은 매우 높은 것으로 확인되었다.

본 연구는 시화호 주변의 5곳의 지표수를 채취 지점으로 선정하고, 이들에 걸친 채수과정을 통해 미생물학적인 측면에서 분석한 연구 결과이다. 각각의 지표수를 비교 및 평가하고 이를 통한 시화호 수질 관리를 위한 보다 신뢰할 수 있는 데이터를 얻기 위해서는 충분한 표본을 통한 연구가 필수적이지만, 본 연구에서는 그렇지 못하여 제한점으로 남는다. 그러므로 향후 충분한 표본의 수를 통한 연구가 이루어져야 할 것이다. 더 나아가 microbial source tracking 연구 목적을 위해서 시화호 주변 지역의 오염원과 시화호 수질의 평가 및

관계에 대한 포괄적인 연구가 필요하다.

감사의 글

본 연구는 서울대학교 환경보건학과 공동교과목인 지역사회보건실습 일환으로 실시되었으며, 지원해주신 서울대학교에 감사드립니다. 또한, 환경부 차세대 과제(900-20070024)의 지원으로 일부 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 해양수산부(관계부처합동) : 시화호 종합관리계획, 2001.
2. 수질측정망, <http://water.nier.go.kr/>, 1997~2004.
3. Korea Water Resources Corporation : A Fundamental Law for Environmental Policy, 2006.
4. Chung, H. M., Park, S. J., Jheong, W. H., Kwon, O. S., Park, J. S., Oh, D. H. and Oh, S. H. : The applicability of coliforms as a fresh water quality standard. *Report of NIER, Korea*, **23**, 315-328, 2001.
5. Park, J. E., Kim, S. D., Cho, J. R., Kim, S. H., Lee, H. J. and Lee, Y. O. : Comparative studies on detecting methods of fecal indicators (coliforms) in surface water. *Journal of the Korean Society of Water and Wastewater*, **22**(6), 1052-1059, 2006.
6. Lee, M. A. and Sung, I. W. : Comparative study on detecting methods for total coliform in sewage effluent. *Korean Journal of Environmental Health*, **33**(1), 422-427, 2007.
7. U.S EPA : Microbial Source Tracking Guide Document, 2005.
8. Geldreich, E. E., Kenner, B. A. and Kabler, P. W. : Occurrence of coliforms, fecal coliforms, and fecal streptococci on vegetation and insects. *Applied Environmental Microbiology*, **12**(1), 63-69, 1964.
9. U.S EPA : Manual of Methods for Virology. 2001.
10. Budnick, G. E., Howard, R. T. and Mayo, D. R. : Evaluation of Enterolert for enumeration of *Enterococci* in recreational waters. *Applied Environmental Microbiology*, **62**(10), 3881-3884, 1996.
11. U.S EPA : Method 1602. Male-specific (F+) and somatic coliphage in water by single agar layer (SAL) procedure. Washington, DC. EPA-821-R-01-029, 2001.
12. Christensen, J. J., Dargis, R., Kaltoft, M. S., Andresen, K. and Kemp, M. : Ribosomal DNA sequencing of streptococci : Usefulness in species identification? *International Congress Series*, **1289**, 155-158, 2006.
13. Marchesi, J. R., Sato, T., Weightman, A. J., Martin, T.A., Fry, J.C., Hiom, S.J. and Wade, W.G. : Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Applied Environmental Microbiology*, **64**(2), 795-799, 1998.

14. Saitou, N. and Nei, M. : The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, **4**(4), 406-25, 1987.
15. Collings, J.M. and Phillips, C.A. : Bacteriocin-like inhibition of *Bacillus subtilis* by an indigenous reed bed bacterium. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **17**, 321-324, 2001.
16. 권순국, 이경도, 조영현, 김성배, 전기설 : 하천수 정화를 위한 시화인공습지의 초기 수질 정화능. *한국농공학회논문집*, **47**(1), 93-102, 2005.
17. Huh, I. R., Choi, J. Y., Kim, Y. J. and Kim, S. S. : A study on the establishment and achievement of target water quality by water system of major streams in the Gangwon province. *Korean Journal of Environmental Health*, **32**(5), 424-430, 2006.
18. Kwon, K. H. : A study on the characteristic evaluation of sewage and industrial wastewater treatment sludges by physico-chemical analysis. *Korean Journal of Environmental Health*, **31**(1), 86-93, 2005.
19. Pennington, A. T., Harding, A. K., Hendricks, C. W. and Campbell, H. M. : Evaluating microbial indicators of environmental condition in Oregon rivers. *Environmental Management*, **28**, 833-841, 2001.
20. Gerba, C. P. : Phage as indicators of fecal pollution. In: *Phage Ecology*: Goyal, S. M., Gerba, C. P., and G Bitton. (eds.), Wiley-Interscience Publication, New York, 197-205, 1987.
21. Dhillon, T. S., Dhillon, E. K. S., Chau, H. C., Li, W. K. and Tsang, A. H. C. : Studies on bacteriophage distribution - virulent and temperate bacteriophage content of mammalian feces. *Applied Environmental Microbiology*, **32**, 68-74, 1976.