

# 낙동강 원수에 대한 대장균군 막여과시험법에 있어서 여러 인자가 결과에 미치는 영향

현재열 · 윤종호<sup>†</sup> · 신상희 · 김종우

대구광역시 상수도사업본부 수질연구소

## The Influence of Various Factors upon the Membrane Filter Technique on Raw Water of the Nak-Dong River

Jae-Yeoul Hyun · Jong-Ho Yoon<sup>†</sup> · Sang-Hee Shin · Jong-Woo Kim

Water Quality Research Institute, Waterworks Headquarters, Daegu Metropolitan City

(Received 2 September 2008, Revised 15 January 2009, Accepted 23 January 2009)

### Abstract

In this study, the membrane filter method was compared to the MPN method for the analysis of total coliforms from raw water using raw test waters and controls including 6 standard strains of coliforms, and the various factors were analyzed on the detection of general and fecal origin coliforms. The range of error rate for the detection of 5 standard strains using the membrane filter and the MPN methods was 0 to 6% and 45 to 133%, respectively. The error rate of the membrane filter method was lower than that of the MPN method. The membrane filter method (m-Endo) showed 10% (11 out of 111) of difference for the detection sensitivity of coliforms isolated from raw water compared to the MPN method (BGLB). The membrane filter method was less affected by the factors including temperature, turbidity, charcoals of powder form, contamination, and reverse pressure. In conclusion, the membrane filter method is a better method for the analysis of total coliforms from raw water than the MPN method, considering the accuracy of detection and the tolerance to various experimental factors.

**keywords** : Coliforms, Cross-matching test, Membrane filter technique, MPN method, Nak-Dong river

### 1. 서론

대장균군(Coliform organisms)은 소화기 전염병세균, 식중독균, 엔테로바이러스를 포함하는 대부분 병원체의 존재 가능성을 추정케 하는 분변오염 지표 미생물로서, 그람음성 무아포 간균, lactose 분해, 산과 가스를 생성하는 호기성 또는 통성혐기성균이다. 분류학적으로 반드시 대장균과 가까운 관계라고는 볼 수가 없어 분류학적 정의는 아니며 공중위생 응용세균학에서 사용되어지는 편의적인 용어라 할 수 있다. 대장균군에 속하는 세균 중 *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*는 분원성이며, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*는 분변과 자연계 모두에 존재하며, *Citrobacter freundii*, *Erwinia carotovora* 등은 토양, 물, 식물 등에 존재하는 자연환경 유래이다(일본약학회, 2005).

이러한 대장균군에 대한 시험방법에는 유당을 분해하여 가스를 생성하는 특성을 이용한 시험관법과 막여과시험법, 그리고 대장균군에 특이적으로 존재하는 효소인  $\beta$ -D-galactosidase가 특정효소기질배지에서 ONPG(o-nitrophenyl- $\beta$ -D-galacto pyranoside)를 분해하여 o-nitrophenyl을 생성시켜 황색발색을 일으키거나 대장균에 존재하는  $\beta$ -D-glu-

curonidase가 MUG(4-methyl-umbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronide)를 분해해 4-methyl umbelliferine의 형광을 생성시키는 원리를 이용한 효소발색시험법 등이 있다(환경부, 2004). 특히 효소발색법은 *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*의 1 CFU/100 mL 검출이 가능하나 10,000 CFU/100 mL의 *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Aeromonas* 등이 존재하면 방해 받을 수 있다(Edberg et al., 1988, 1989).

시험관법인 최적확수시험법은 세균의 분포가 Poisson분포의 법칙에 준한다는 원리로서 시간과 인력 소요가 많이 들고 시험결과에 많은 오차가 존재하는 단점이 있으며(안태석 등, 2005), 막여과시험법은 시료의 종류 및 특성에 따라 적당량의 시료를 취하여 여과막에 걸린 대장균군 및 분원성대장균을 m-Endo agar LES배지와 m-FC배지에 집락을 형성시켜 계수하는 정량방법으로 확률이 아닌 실측치를 나타내어 주기 때문에 최적확수시험법보다 정확하고 실험시간도 단축되어 실용적인 방법으로 알려져 있다(장현경, 2002). 하지만 *Aeromonas hydrophila* 등에 의한 성장방해와 위양성의 문제점 또한 가지고 있다. 물에 존재하는 대장균군 검사에서 막여과시험법이 최적확수시험법보다 신뢰도와 정밀도가 높은 것으로 조사된 바 있어(박상정 등, 2006; 이영옥, 1996; 이영옥 등, 2006; APHA, 1980; Garbow and DuPreez, 1979; McCarthy et al., 1958), 본 연구에서는 현재까지 시행하고 있는 최적확수시험법을 막여과시험법으

<sup>†</sup> To whom correspondence should be addressed.  
fabreyoon@daegumail.net

로 변경을 검토하고자 대구 낙동강수계 상수원수 시료를 대상으로 대장균군으로 알려진 6종의 표준균주의 각 배지에서 나타나는 성장과 특징을 알아보고 최적확수시험법과 막여과시험법을 비교하였으며 또한 막여과시험법을 중심으로 대장균군과 분원성대장균군시험에서 간편하고 정확한 검출결과를 보이는지 다양한 인자 분석을 통해 결과에 미치는 영향을 조사하였다.

## 2. 연구방법

낙동강 수계 상수원수는 두류와 매곡정수장에 유입되는 원수를 사용하였으며 현장에서 멸균 병에 채수하여 냉장운반한 뒤 4시간 이내 시험하였다(Table 1).

**Table 1.** Total coliforms from the MPN method of Raw water in Nak-Dong river

A filtration plant	Capacity (m <sup>3</sup> /day)	Average annual total coliforms (1994~2005) (MPN/100mL)
Mae-gok	800,000	773~4,877
Du-ryu	310,000	1,099~12,346

*E. coli*와 *K. pneumonia*(*Aerobacter aerogenes*), *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Pectobacterium carotovorum* (*E. carotovora*) 등 대장균군 6종의 표준균주를 질병관리본부 국립보건연구원과 한국농업미생물자원센터(KACC)에서 동결건조상태로 분양받았으며 *E. coli* 1종은 건강한 사람 대변에서 분리 배양하여 추가하였다. 각 균주는 Lactose Broth에 증식시켜 멸균증류수로 희석하여 실험하였고 균수 측정은 일반세균시험방법에 의해 계수하였다. 표준균주의 종류는 다음과 같다(Table 2).

시험은 수질오염공정시험법 제 39항 총대장균군과, 제 42항 분원성대장균군에 따라 각각 추정시험과 확정시험을 거쳐 최종 판정 및 정량하였으며 일반세균시험은 먹는물 수질오염공정시험방법에 따라 시험하였다. 그리고 MLGA, EC Blue, Colilert배지는 각 제품사의 매뉴얼에 따라 시험하였으며 사용한 배지 및 시약은 아래와 같다. 낙동강 수계에서 균의 분리는 Oxidase test, 운동성시험, API 20E Kit(BIOMERIEUX, France)와 Vitek(BIOMERIEUX, France)을 사용하여 111개 균주를 동정하였다.

- PCA(Plate Count Agar, Merck)

- LB(Lactose Broth, Merck)
- BGLB(Bililant Green Lactose broth, Merck)
- EMB(Eosin Methylene blue, Merck)
- EC broth(Merck)
- m-Endo agar LES(Merck)
- m-FC agar(Merck)
- MLGA(Membrane Lactose Glucuronide Agar, Oxoid) : *Escherichia coli*와 대장균군을 감별하는 배지
  - 수질오염 공정시험방법에서 공정법은 아님
  - 30°C에서 4시간 배양 후, 37°C에서 14시간 배양
  - 그람양성균 억제제 lauryl sulphate 함유
  - phenol red 지시약에 의해 lactose 발효능을 관찰하고 산이 생성되면 노란색을 띤다.
  - 발색성분인 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide (BCIG)는 효소인 glucuronidase에 의해 분해되어 파란색 발색소를 만들고 이 발색소는 세균 세포 안에 쌓인다.
  - 대장균군은 노란색 집락이다.
  - 대장균은 녹색 집락으로 자라게 된다.
- EC Blue 100P(Nissui)
- Colilert(IDEXX)
- EZ-Pak Membrane filter(0.45um, Milipore)

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 대장균군 표준균주의 성장

대장균군 표준균주 6종과 분변에서 추출한 *E. coli* 등 7종에 대한 배지종류별 증식 양상은 Table 3과 같으며, 모든 균주가 m-Endo agar LES에서 2 mm정도의 전형적인 금속성광택의 집락을 형성하였다. 그중 *Erwinia carotovora*는 EMB에서는 금속성광택을 나타내며 증식하였지만 BGLB에서는 가스가 생성되지 않았고 m-Endo agar LES에서 48시간 만에 금속성광택의 집락을 형성하였다. *E. coli*만이 EC(44.5±0.2°C), m-FC(44.5±0.2°C)에서 양성으로 나타났다.

### 3.2. 분리균주의 교차시험

각 원수로부터 배양한 BGLB, m-Endo agar LES, MLGA에서 111종의 대장균군 추정세균을 분리하여, 동정된 균주를 각각의 배지에 교차시험 한 결과는 Table 4와 같다.

분원성대장균시험인 EC(44.5°C)와 m-FC(44.5°C)에서 *E. coli*는 90%이상이 양성을 보였으며, *Klebsiella sp*는 약 20%만 양성으로 나타났다. *E. cloacae*와 *C. freundii*의 일

**Table 2.** Bacterial standard strains

Source	Strains	Number	Offer organ
Stool	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	NIH Korea
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KACC 11402	KACC
Stool and nature	<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 10173	NIH Korea
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 10462	NIH Korea
Plant, soil, water	<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 10916	NIH Korea
	<i>Pectobacterium carotovorum</i> ( <i>Erwinia carotovora</i> )	KACC 10226	KACC

**Table 3.** Characteristics of standard strains

Strains	PCA (35±0.5°C)	BGLB (35±0.5°C)	EMB (35±0.5°C)	m-Endo LES (35±0.5°C)	EC (44.5±0.2°C)	m-FC (44.5±0.2°C)
<i>Escherichia coli</i> 25922	+	+(G)	+(M)	+(M)	+(G)	+(DB)
<i>Escherichia coli</i> (stool)	+	+(G)	+(M)	+(M)	+(G)	+(DB)
<i>Klebsiella pneumonia</i>	+	+(G)	+(M)	+(M)	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	+(G)	+	+(M)	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+	+(G)	+	+(M)	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	+	+(G)	+	+(M)	-	-
<i>Erwinia carotovora</i> ( <i>Pectobacterium carotovorum</i> )	+	-	+(M)	+(M) 48hrs	-	-

+ : Growth, - : No growth, (G) : Gas, (M) : Metallic sheen, (DB) : Dark blue

**Table 4.** The cross-matching result of isolated strains from raw water sample

Isolated strains	No. of isolated strains				No. of positive									
	Total	ML GA	BG LB	m- Endo	BG LB	m- Endo	colilet	EC- blue	EMB	colilet flu.	EC-blue flu.	EC (44.5°C)	m-FC (44.5°C)	Oxidase
	111	23	23	65	96	99	111	107	107	31	31	33	33	6
<i>Escherichia coli</i>	31	23	2	6	31	31	31	31	31	31	31	29	28	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	16	0	8	8	16	16	16	16	16	0	0	3	4	0
<i>Klebsiella oxitoca</i>	5	0	0	5	5	5	5	5	5	0	0	1	1	0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
<i>Enterobacter amnigenus</i> biogroup2	4	0	2	2	3	4	4	4	2	0	0	0	0	0
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	2	0	0	2	0	2	2	2	2	0	0	0	0	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	20	0	7	13	18	15	20	20	20	0	0	0	0	0
<i>Enterobacter Intermedius</i>	3	0	0	3	2	2	3	3	3	0	0	0	0	0
<i>Enterobacter sakazakii</i>	2	0	0	2	0	0	2	2	2	0	0	0	0	0
<i>Citrobacter braakii</i>	3	0	0	3	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
<i>Citrobacter freundii</i>	13	0	3	10	12	13	13	13	13	0	0	0	0	0
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	3	0	0	3	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
<i>Serratia fonticola</i>	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
<i>Serratia plymuthica</i>	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
<i>Aeromonas hydrophila</i>	6	0	0	6	0	2	6	2	2	0	0	0	0	6

부 균주는 가스 생성량이 적거나 48시간 이후에 조금 생성되어 BGLB(최적확수시험법)에서 음성으로 오인할 수도 있을 것으로 생각된다. *Leclercia adecarboxylata*와 *Serratia spp*는 대장균군이 아니지만 교차시험 모두에서 양성으로 나타났다. *A. hydrophila* 6개 균주는 BGLB에서 모두 음성이었으나 m-Endo에서 2개 균주는 대장균과 같이 전형적인 금속성광택을 보이진 않았지만 비전형적이고 작은 금속성광택 집락을 형성하였다.

교차시험에서 11개 균주는 결과에서 차이를 나타냄으로써 이러한 균주가 존재할 경우 같은 시료에서 시험법 간에 다른 결과를 나타내는 원인이 될 것으로 생각된다.

### 3.3. 최적확수시험과 막여과시험 비교

#### 3.3.1. 대장균군 표준균주 이용한 비교시험

막여과시험에서 20~80 CFU 범위 정도의 집락을 형성시키기 위해 균주를 BGLB배지에 증식시킨 뒤 멸균증류수에 희석하여 제조하였으며, 7개 균주에 대하여 최적확수시험과 막여과시험을 실시하였다.

총대장균군 검사를 위한 막여과시험(m-Endo agar LES 배지)에서는 오차율이 0~6% 범위로 모든 균주에서 낮게 나

타났으며, 최적확수시험(LB, BGLB 배지)에서는 오차율이 45~133% 범위로 상당히 높게 나타났다. 분원성대장균군 검사를 위한 m-FC에서는 오차율이 4~11% 범위로 낮았으나, EC broth에서는 오차율이 45~80%로 높게 나타났다. 따라서 총대장균군과 분원성대장균군 검사 모두 막여과시험의 오차율이 현저히 낮은 것으로 조사되어 최적확수시험보다 정밀도가 높은 것으로 판단된다(Table 5).

#### 3.3.2. 상수원수를 이용한 비교시험

보고에 의하면 낙동강 수계에서 최적확수시험으로 분리된 균종 35종 중 대장균군은 *Klebsiella sp*(43%), *E. coli* (14%), *Enterobacter sp*(17%), *Citrobacter*(3%)이었으며, *Serratia sp*(6%), *Rahnella sp*(3%), Cytochrom 산화산소 양성인 *Pseudomonas sp*가 14%가 분리되었다고 보고하였다(이영옥 등, 2006). m-Endo agar LES를 사용한 막여과시험에서는 분리된 342균주 중 대장균군 외에 *Aeromonas hydrophila*가 31% 분리되었다. 따라서 최적확수시험에서는 *Pseudomonas sp*, 막여과시험에서는 *A. hydrophila*가 위양성의 주된 원인이라 생각되며 본 조사에서는 11균주 중 6균주가 분리되었고 이 6균주 중 2균주만이 m-Endo 배지에

**Table 5.** Result of MPN and membrane filter technique test on the standard strains

Strains	PCA (CFU/mL)	Total coliforms (35±0.5°C)				Fecal coliforms (44.5±0.2°C)			
		MFT		MPN		MFT		MPN	
		(m-Endo agar)	LES	(LB, BGLB)	Error rate (%)	(m-FC agar)	Error rate (%)	(EC broth)	Error rate (%)
<i>Escherichia coli</i> 25922	91	88	3	50(20~170)	45	72	11	50(20~170)	45
<i>Escherichia coli</i> (Stool)	50	49	2	90(30~290)	80	48	4	90(30~290)	80
<i>Klebsiella pneumonia</i>	30	30	0	70(30~210)	133	0		Neg.	
<i>Enterobacter cloacae</i>	45	45	0	90(40~250)	100	0		Neg.	
<i>Enterobacter aerogenes</i>	51	48	6	90(40~250)	80	0		Neg.	
<i>Citrobacter freundii</i>	40	39	2	70(30~210)	75	0		Neg.	
<i>Erwinia carotovora</i>	45	0	100	Neg.		0		Neg.	

( ) : 95% Confidence interval of MPN table (The lower limit-the upper limit), Error rate(%) : | true value - measuring value | / true value × 100, True value : Average colony number by Plate count agar, Measuring value : Coliform number by m-Endo, LB · BGLB, m-FC, EC

**Table 6.** Result of MPN and membrane filter technique test on the raw water (four times average)

A filtration plant	Total coliforms		Fecal coliforms		
	MFT	MPN	MFT	MPN	
	(CFU/100mL)	(MPN/100mL)	(CFU/100mL)	(MPN/100mL)	
Medium	m-Endo agar	LES	LB, BGLB broth	m-FC agar	EC broth
Du-ryu	1700	900 (300~2900)	110	240 (100~940)	
Mae-gok	1900	1600 (600~5300)	140	140 (60~360)	

( ) : 95% confidence interval of MPN table (The lower limit-the upper limit)

서 양성을 보였다. Cytochrom 산화산소 양성인 미생물 *Pseudomonas sp*와 *A. hydrophila*는 간단한 Oxidase test로 확인하여 대장균군에서 제외할 수 있을 것으로 생각된다. 잠재적인 병원체를 포함하며 그 존재가 처리 정도의 불충분함을 나타내기 때문에 제외해서는 안 된다는 보고도 있다.

광택을 나타내는 71% 정도가 유당 발효를 하였고, 광택을 나타 내지 않는 40%도 유당 발효를 하였다고 보고하였으며, 가스를 생성하지 않는 16균주 중 13균주가 대장균군으로 동정되었다(Ostensvik, 2000).

효소발색법인 Colilert에서의 대장균군 위양성 반응은 *Aeromonas sp* 관여에 의해 일어나는 것으로 보고하였다. *A. hydrophila*는 매우 낮은 농도로 대장균군 양성 반응을 일으키는 것으로 명확하게 나타났으며, 불과 1 CFU/mL의 균액으로도 양성 반응을 나타내는 것으로 관찰되었다(Landre et al., 1998).

β-D-galactosidase 활성 유무에 의해 대장균군을 검출하는 효소발색법은 대장균군에 속한 *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*의 1 CFU/100 mL로도 검출 가능하지만, 10000 CFU *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Aeromonas* 등의 존재에 의해서 방해를 받는다고 보고되었다(Edberg et al., 1998, 1989). 표준균주 시험에서 효소발색법이 분석 소요시간이나 방법이 간단하여 우수하다고 하였으며, 실제 환경시료에서 막여과시험과 최적확수시험보다 4.7배, 7.4배 높게 나타났다고 보고하였다(박상정 등, 2006).

종합해보면 대장균군 시험방법인 최적확수시험법, 막여과 시험법 그리고 효소발색법 모두 장단점을 가지고 있으나 분석 방법의 간편성과 정확도에서 막여과시험법이 보다 우

수한 것으로 생각된다.

### 3.4. 막여과시험법의 적합성 평가

막여과시험법으로 대장균군 시험을 할 경우 예상할 수 있는 여러 가지 요인의 적합성 평가를 수행한 결과는 다음과 같다.

#### 3.4.1. 배양온도 및 배지종류별 성장양상

7종의 표준균주를 희석하여 m-FC, m-Endo agar LES, MLGA에서 35±0.5°C와 44.5±0.2°C에서 각각 배양 실험한 결과는 Table 7과 같다.

35±0.5°C배양에서는 m-Endo agar LES에서, 44.5±0.2°C에서는 m-FC가 전체적으로 정확도가 높은 것으로 나타났다. 균주별 특성을 보면 *E. coli* 경우는 35±0.5°C에서 모든 배지가 정확도가 높았으나 m-Endo agar LES(44.5±0.2°C)에서는 정확도가 낮았다. *K. pneumoniae*는 m-FC(35±0.5°C)에서 정확도가 낮았다. 특히 MLGA에서는 35±0.5°C와 44.5±0.2°C 모두에서 높은 정확도를 보였다.

#### 3.4.2. 원수 시료 보존시간에 따른 균수의 변화

m-Endo agar LES에서 최적 계수 조건인 30 CFU 형성집락 시료 원수 1 mL를 검체량으로 하여, 각 온도별로 2개씩 대장균군수를 측정하였다(Table 8).

보존온도 4°C에서 균수의 변화가 적어 시료가 가장 안정되었으며 나머지 온도에서는 24시간 이후에 균수가 급격히 줄어들었다. 따라서 시료의 보관은 4°C에서 이루어져야 하며 즉시 실험하는 것이 타당한 것으로 판단된다.

**Table 7.** Growth of standard strains by incubation temperature in m-FC, m-Endo agar LES, MLGA

Strains	PCA (CFU/mL)	m-Endo LES (CFU/mL)		m-FC (CFU/mL)		MLGA (CFU/mL)	
		35±0.5°C	44.5±0.2°C	35±0.5°C	44.5±0.2°C	35±0.5°C	44.5±0.2°C
<i>Escherichia coli</i> 25922	91	88	37	86	72	89	86
<i>Escherichia coli</i> (Stool)	50	49	15(24hrs) 45(48hrs)	48	48	47	51
<i>Klebsiella pneumonia</i>	30	30	No growth	6	No growth	28	No growth
<i>Enterobacter cloacae</i>	45	45	No growth	43	No growth	44	No growth
<i>Enterobacter aerogenes</i>	51	48	No growth	37	No growth	51	No growth
<i>Citrobacter freundii</i>	40	39	No growth	37	No growth	41	No growth
<i>Erwinia carotovora</i>	45	0	No growth	0	No growth	0	No growth

MLGA : Distinguishable media between *Escherichia coli* and other coliforms, Accuracy : Colony number by m-Endo agar LES, m-FC, MLGA/colony number by PCA × 100

**Table 8.** Coliform number by incubation time and temperature

Incubation time	0°C	4°C	15°C	25°C	35°C
	m-Endo agar LES 35±0.5°C (CFU/mL)	m-Endo agar LES 35±0.5°C (CFU/mL)	m-Endo agar LES 35±0.5°C (CFU/mL)	m-Endo agar LES 35±0.5°C (CFU/mL)	m-Endo agar LES 35±0.5°C (CFU/mL)
0 hrs	32	31	34	31	32
4 hrs	27	35	38	41	37
12 hrs	20	39	37	45	33
24 hrs	19	33	30	25	12
10 days	12	35	12	4	3

**3.4.3. 대기에 의한 오염 유무**

막여과시험에서 시료가 흡입되는 과정에 여과막을 통한 대기의 오염이 있는지 조사하였다. 먼저 멸균증류수 100 mL를 통과시킨 후 5분 동안 계속 공기 흡입을 유지시켰으며 건조한 상태를 막기 위하여 멸균증류수 20 mL로 한번 더 통과시키고 공기를 재흡입시켜 m-FC, m-Endo agar LES, MLGA에 각각 배양시험을 하였다. 그 결과 모든 배지에서 증식된 균은 발생되지 않아 대기에 의한 대장균군 오염은 없는 것으로 판단하였다.

**3.4.4. 음압에 의한 대장균의 손상**

막여과시 발생하는 음압이 대장균 손상을 일으켜 집락 성장을 저해하는지 조사하였다. 멸균증류수 100 mL에 표준균주 희석수(*E. coli*, 60 CFU/mL - Plate count agar로 확인) 1 mL를 가하여 충분히 혼합하여 여과시킨 후, 10분간 흡입상태를 지속한 후 배양 시험하였으며 이때 2분마다 여과막의 건조를 막기 위해 멸균증류수 10 mL를 가하였다. 대조군과 비교한 결과 음압에 의한 대장균의 손상은 없는 것으로 나타났다.

**3.4.5. 오염시료 사용에 따른 2차 오염발생**

먼저 오염시료로 막여과시험을 실시하고 난 뒤 다음실험에서 2차 오염이 발생되는지 여부를 조사하였다. 시험전에 여과장치 상부를 가스토티치로 화염살균 후 필터와 편넬을 장착하고 대장균군 표준균주(5,000 CFU /100 mL 정도)와 멸균증류수 100 mL를 편넬에 가하여 여과 배양하고 바로 필터장치 살균 없이 2차 여과막을 장착하여 멸균증류수 100

mL로 여과한 후 m-FC, m-Endo agar LES, MLGA에 각각 배양 시험하였다. 그 결과 대장균군 표준균주 배양에서는 모든 배지에서 균이 증식하였으나, 2차 여과막 시험 9건은 모두 음성으로 나타났다. 이는 0.45 μm 여과막을 대장균군이 통과하지 못함으로써 여과장치가 오염되지 않는 것으로 생각되며, 다만 오염된 시료가 필터를 통과하지 않고 옆으로 흘러 필터장치 상부를 오염시킬 수 있으므로 주의해야 할 것으로 생각된다. 또한 여과 전·후 30 mL의 증류수로 세척하거나, 소독제가 포함된 시료를 시험한 뒤에는 증류수로 충분히 세척하여 시험에 임해야 할 것으로 생각된다.

**3.4.6. 시료중 부유물 및 활성탄에 의한 대장균 집락 형성의 저해**

시료 중에 부유물이 존재함으로써 여과막을 막아 대장균 집락 성장을 저해하는지 알아보기 위해, 탁도 40의 낙동강 원수 2 L를 멸균하여 Table 8과 같이 원수 일정량(0~200 mL)을 먼저 편넬에 가한 후 표준균주 희석수(*E. coli*, 60 CFU/mL - Plate count agar로 확인) 1 mL를 증류수 100 mL에 희석하여 각각 편넬에 가하여 충분히 혼합하고 여과시켜 배양하였다. 그 결과 Plate count agar로 확인한 60 CFU의 *E. coli*는 원수 시료 량에 상관없이 비슷한 결과로 나타나 부유물에 의한 콜로니 형성을 저해하지 않는 것으로 조사되었다.

분말활성탄에 의한 저해를 관찰하기 위해 증류수 1 L에 분말활성탄 0.5 g을 혼합·멸균 처리한 활성탄수를 제조한 뒤, 증류수 100 mL와 활성탄수를 Table 9와 같이 편넬에 각각 가한 후, 표준균주 희석수(*E. coli* 85 CFU/mL - Plate

**Table 9.** The CFU result of *E. coli* by turbidity treatment

Media (Temp.)	Raw water volume (Turbidity 40NTU)	200 mL	100 mL	50 mL	20 mL	10 mL	0 mL
	m-Endo agar LES (35±0.5°C)		60	57	58	57	62
m-FC agar (44.5±0.2°C)		59	58	60	54	62	57

**Table 10.** The result of CFU by activated carbon treatment

Media (Temp.)	Activated carbon volume (mg/100 mL)	10 mL (50mg/100mL)	3 mL (15mg/100mL)	1 mL (5mg/100mL)	0.5 mL (2.5mg/100mL)	0.2 mL (10mg/100mL)	0 mL (0mg/100mL)
	m-Endo agar LES (35±0.5°C)		Spreading (76)	Spreading	Spreading	69	68
m-FC agar (44.5±0.2°C)		Spreading (64)	Spreading (70)	Spreading	88	70	72

count agar로 확인) 1 mL씩을 각각 편별에 가하여 충분히 혼합하고 여과시켜 배양하였다.

m-Endo agar에서 18시간 배양한 경우 활성탄수 1 mL, 3 mL에서 퍼짐현상이 나타났고, m-FC배지에서는 1 mL에서 퍼짐현상이 나타났다. 배양 24시간 후에는 활성탄수 1 mL, 3 mL, 10 mL 모두 퍼짐 현상을 보였다. Camper 등(1986)은 입상활성탄 여과처리수의 대장균시험에서 활성탄 입자가 Membrane filter 표면의 공극을 변화시켜 대장균의 생육을 저해하며, LeChvallier 등(1981)은 부유물이 대장균 검출을 저해한다고 보고한 바 있다(박중현, 1994). 본 시험에서는 0.5 mL이하 활성탄수에서는 균주가 뚜렷하게 잘 자랐으며, 이는 활성탄 입자가 Membrane filter 표면의 공극을 변화시켜 저해한 것이 아니라 구조적으로 대장균이 자라면서 활성탄을 타고 번지는 것으로 사료된다.

**3.4.7. background colony에 의한 대장균 집락 형성의 변화**

Background colony 수에 따른 대장균의 집락 형성 정도를 관찰하기 위하여 원수 중 m-Endo agar LES에서 성장한 background colony 3종을 LB에서 재증식 시킨 후, Table 10과 같이 멸균증류수로 A에서 F까지 10배씩 단계 희석한 1 mL와 표준균주 희석수(*E. coli* 85 CFU/mL - Plate Count Agar로 확인) 1 mL를 증류수 100 mL에 혼합하여 막여과 한 후 m-Endo agar LES(35±0.5°C)와 m-FC (44.5±0.2°C)에 Membrane filter를 부착하여 배양하였다.

m-FC(44.5±0.2°C)에서는 모두 Background colony가 형성되지 않았으며 이는 고온에서 증식하는 내열성 균이 아닌 때문으로 판단되며, m-Endo agar LES(35±0.5°C)에서는 background colony가 510에서 대장균 집락 형성이 67개로 일반세균시험법 대비 87% 정도로 나타났고, background colony가 50,000 정도에서도 대장균이 background colony 위로 불특하게 돌출되어 70개가 계수되었다. 이는 background colony가 TNTC상태에서도 *E. coli*를 계수할 수 있는 것은 background colony보다 성장이 더 빠르기 때문인 것으로 생각된다.

**4. 결론**

상수원수 시료와 대장균군 표준균주 6종을 사용하여 최적확수시험법과 막여과시험법을 비교하였으며, 막여과시험법을 중심으로 대장균군과 분원성대장균군의 검출을 위한 다양한 인자분석을 실시하였다.

- 1) *E. carotovora*를 제외한 표준균주의 최적확수시험법과 막여과시험법을 비교한 결과 막여과시험에서 오차율이 0~6%로 낮았고, 최적확수시험은 45~133%로 오차율이 높게 나타났다. 분리된 대장균군 111균주에 대한 교차 시험 결과에서는 동일한 시료에 대해서도 시험법 간에 상이한 결과를 보여 주었다.
- 2) 막여과시험법에서 총대장균군은 m-Endo agar LES, 분원

**Table 11.** The result of CFU by background colony

Media (Temp.)	<i>E. coli</i>	Results					
		A	B	C	D	E	F
Background colony (CFU/mL)		50000	5000	510	51	6	2
<i>E. coli</i> standard (CFU/mL)	71						
<i>E. coli</i> standard (CFU/mL) +	m-Endo agar LES (35±0.5°C)	70	67	67	75	79	80
	m-FC agar (44.5±0.2°C)	62	48	47	45	62	60
(Background colony)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)

TNTC : Too numerous to count

성대장균군은 m-FC와 MLGA가 정확도가 높았다. 감압 시 대기에 의한 오염과 음압에 의한 대장균군의 손상은 나타나지 않았으며, 탁도 80NTU 100 mL를 초과해도 대장균 집락형성에는 저해가 없었으나, 분말활성탄 5 mg/100 mL 이상 포함된 시료에서는 퍼짐현상을 관찰할 수 있었다. 연속 막여과시험에서는 대장균이 다량 함유된 시료 시험 후 막여과 장치를 멸균처리 하지 않더라도 다음 실험에서 대장균군의 오염은 관찰되지 않았다.

- 3) 막여과시험에서 Background colony에 의한 방해현상을 관찰하였을 때 대장균의 성장이 훨씬 빠른 특성으로 m-FC와 m-Endo agar LES에서 0~13%의 미미한 영향을 보여 주었다. 막여과시험법은 정확도가 높고 시험 준비 및 실험이 간편하고 효소발색시험법에 비해 비용이 저렴하며 여러 시료의 결과를 한눈에 비교하기가 좋아 대장균군 및 분원성대장균군 시험에 우수한 것으로 생각된다.

### 참고문헌

박상정, 김종민, 양상용, 원성민, 정향희, 박상희(2006). 수질 오염공정시험법 중 총대장균군 분석방법인 시험관법 및 막여과법과 효소발색법과의 비교. *공동춘계 학술발표회 논문집, 한국물환경학회 · 대한상하수도학회*, pp. 428-435.

박중현(1994). *수돗물의 미생물학*, 화학공업조사회.

안태석, 이재관, 김창수(2005). 현행수질기준 중 총대장균 기준의 의미와 문제점. *제13회 세계물의날 기념 심포지움*, pp. 3-23.

이영옥(1996). 지표수에서의 대장균검출에 관한 비교연구. *한국육수학회지*, **29**(4), pp. 313-321.

이영옥, 박지은, 김선덕, 조주례, 김상현, 이혜진(2006). 분변 오염 지표세균(대장균군) 검출방법의 비교연구. *공동춘계 학술발표회 논문집, 한국물환경학회 · 대한상하수도학회*, pp. 414-419.

일본약학회(2005). *위생시험법 · 주해*, 금원출판주식회사.

장현정(2002). 먹는물의 대장균군 검출을 위한 시험관법, 막여과법, 효소발색법 동시 평가. *수질보전 한국물환경학회지*, **18**(5), pp. 501-508.

환경부(2004). 수질오염공정시험법. 환경부 고시 제2004-188호.

APHA (1980). *American Public Health Association, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 15th Ed, Washington, D.C., U.S.A.

Camper, A. K., LeChevallier, M. W., Broadaway, S. C., and McFeter, G. A. (1986). Bacteria associated with granular activated carbon particles in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology*, **52**, pp. 434-438.

Edberg, S. C., Allen, M. J., and Smith, D. B. (1988). National field evaluation of a defined substrate method for the simultaneous evaluation of total coliforms and Escherichia coli from drinking water : comparison with the standard multiple tube technique. *Appl. Env. Microbiol.*, **54**, pp. 1595-1601.

Edberg, S. C., Allen, M. J., and Smith, D. B. (1989). National field evaluation of a defined substrate method for the simultaneous evaluation of total coliforms and Escherichia coli from drinking water : comparison with presence-absence techniques. *Appl. Env. Microbiol.*, **55**, pp. 1003-1008.

Garbow, W. O. K. and DuPreez, M. (1979). Comparison of m-Endo LES, MacConkey, and Teepol media for membrane filtration counting of total coliform bacteria in water. *Applied and Environmental Microbiology*, **38**, pp. 351-358.

Landre, J. P., Gavriel, A. A., and Lamb, A. J. (1998). False-positive coliform reaction mediated by Aeromonas in the Colilert defined substrate technology system. *Letters in Appl. Microbiology*, **26**, pp. 352-354.

LeChevallier, M. W., Evans, T. M., and Seider, R. J. (1981). Effect of turbidity on chlorination efficiency and bacterial persistence in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology*, **42**, pp. 159-167.

McCarthy, J. A., Thomas, H. A. J., and Delaney, J. E. (1958). Evaluation of the Reliability of Coliform Density Tests. *AJPH*, **48**, pp. 16-28.

Ostensvik, O. (2000). Coliform bacteria and *E. coli* in Norwegian drinking water sources-Comparison of methods based on the fermentation of lactose and methods based on the activity of specific enzymes, AWWA Water Quality Technology Conference Proceedings.