

물에서의 분원성대장균군 검사를 위한 최적 배지 선정

이은숙^{a,†} · 고나윤^b · 최병도^c · 김복순^d

서울특별시 서울물연구원

Modification of Medium to Examine Fecal Coliforms in Water

Eunsook Lee^{a,†} · Nayun Ko^b · Byungdo Choi^c · Bogsoon Kim^d

¹Seoul Water Institute, Seoul Metropolitan Government

(Received 1 April 2020, Revised 11 June 2020, Accepted 22 June 2020)

Abstract

Fecal coliforms are indicator bacteria to evaluate fecal contamination and microbiological safety in environment water. To examine fecal coliforms by membrane filtration, 1% rosolic acid solution dissolved in sodium hydroxide(0.2 M) should be added to m-FC medium according to Korean standard method. To reduce the exposure of researchers to harmful chemicals and expenditure of unnecessary cost, we evaluated if the rosolic acid solution is required to detect fecal coliforms. For 113 samples collected from five intake sources of Seoul, 42 samples of six tributaries, and 11 samples of sewage, the number of fecal coliforms was compared in medium with or without the reagent. As a result, the number was higher in m-FC medium without the reagent, but there was not a statistically significant difference. In the water intake, m-FC medium without the reagent could be used to examine fecal coliforms except in July, August and in case of rainfall. When heterotrophic plate counts exceeded 1,000 CFU/filter, or during rainfall, there was an effect of background bacteria in two types of the medium. However, it was more appropriate to use m-FC medium with the reagent to suppress gram-positive bacteria that can grow on medium without the reagent. In the tributary and sewage samples, the effect of the background bacteria was low, allowing the use of medium without the reagent regardless rainfall. Thus, it is necessary to present in standard method that the addition of rosolic acid solution in m-FC medium can be selected according to the characteristics of samples.

Key words : Background bacteria, Fecal coliforms, Rosolic acid, Sodium hydroxide, Water

^{a,†} Corresponding author, 연구원(Researcher), leuns21@seoul.go.kr, https://orcid.org/0000-0003-3516-4649

^b 연구원(Researcher), nygo@seoul.go.kr, https://orcid.org/0000-0002-2157-499X

^c 연구원(Researcher), qudeh011@seoul.go.kr, https://orcid.org/0000-0002-7910-6486

^d 부장(Director), bbogsoon@seoul.go.kr, https://orcid.org/0000-0002-1180-3082

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1. Introduction

분원성대장균군은 병원균은 아니지만 병원균의 배출원인 분변에 의한 오염을 알려주는 지표세균으로 하천수에서 분변오염 및 미생물학적 안전성을 평가하기 위한 수질기준 항목이다(ME, 2019). 현재 하천수에서 분원성대장균군 시험법으로는 막여과법, 시험관법, 효소이용정량법이 있으나, 2018년 12월에 효소이용정량법이 추가되기 전에는 오랜 기간 막여과법 또는 시험관법이 분원성대장균군의 검사를 위한 시험법으로 사용되었다(NIER, 2017, 2018, 2019). 서울시에서는 수돗물의 원료인 상수원수의 분원성대장균군 검사를 위해 24시간 이내로 신속한 결과를 얻을 수 있는 막여과법을 적용하고 있다. 수질오염공정시험기준에 제시된 분원성대장균군 검사를 위한 막여과법은 적당량의 시료를 여과한 여과막을 수산화나트륨(0.2 M)에 용해된 1% 로졸릭산(Rosolic acid) 용액을 첨가한 m-FC 배지에 부착하고 (44.5 ± 0.2) $^{\circ}\text{C}$ 에서 (22~24) 시간 배양하여 파란색 집락수를 계수하는 방법이다(NIER, 2019).

로졸릭산은 m-FC 배지에 분원성대장균군 이외의 세균 성장을 억제하기 위해 사용되는 시약으로(Geldreich et al., 1965) 배지 조제시 따로 준비하여 넣어야 하므로 그만큼 실험준비 시간과 비용이 소요된다. 미국에서는 배경 성장에 간섭이 없다면 로졸릭산 용액의 첨가 없이 m-FC 배지를 사용할 수 있으나, 건기 후 첫 강우시 채수된 시료를 검사할 경우에는 로졸릭산 용액을 첨가하여 사용할 수 있다는 예외 사항을 시험방법에 제시하고 있다(APHA, 2017). 국외에서 막여과법에 의한 분원성대장균군 검사시 로졸릭산 용액의 사용 여부에 대한 연구가 이루어졌지만(Grabow et al., 1981; Presswood and Strong, 1978; Sartory, 1980), 우리나라에는 관련 연구 없이 분원성대장균군 검사를 위한 배지에 로졸릭산 용액을 필수로 첨가하여 사용하고 있다(NIER, 2019).

로졸릭산은 동물 실험에서 혈압 상승, 일시적인 호흡 억제, 심박수를 증가시키는 물질로 알려져 있다(Maeda et al., 1970). 로졸릭산 용액의 제조에 사용하는 수산화나트륨은 화학물질관리법에 따라 유독물질로 분류되어 관리되고 있으며(ME, 2020), 물질안전보건자료(Material Safety Data Sheet, MSDS)에 부식성이 있어 금속을 부식시키거나 눈이나 피부 접촉시 위험한 화학물질로 제시되어 있다(Thermo Fisher Scientific, 2018). 또한 미국방화협회(National Fire Protection Association, NFPA)의 위험물질 등급 규격에 따르면 화재 위험이 '3'으로 높고 인체 유해성이 약간('1') 있는 화학물질로 분류되어 있다(Thermo Fisher Scientific, 2018).

국내·외로 사용되고 있는 화학물질의 증가에 따라 화학물질의 위험성 및 건강·환경 위해성도 증가할 수 있다. 화학물질로부터 안전한 환경을 조성하고 미래의 환경 변화를 줄이기 위해 화학물질을 필요한 만큼만 사용하는 것이 필요하다.

따라서 본 연구에서는 시험자의 화학물질 노출 및 환경오염을 줄이기 위한 노력의 일환으로 서울시 취수원수, 지류천 및 하수를 대상으로 m-FC 배지에 로졸릭산 용액의 첨가 유

무에 따른 분원성대장균군의 검사결과를 비교하였다. 강우 및 계절에 따른 방해세균의 영향을 파악하여 막여과법에 의한 분원성대장균군 검사에 로졸릭산 용액의 필요성을 평가하고자 하였다.

2. Materials and Methods

2.1 채수지점

한강에 위치한 서울시 취수원수 5지점을 대상으로 2018년 2월부터 2019년 1월까지 1년간 매일 시료를 채수하였고 강우시 추가로 시료를 채수하였다. 또한 취수원수에 영향을 주는 지류천 6지점을 대상으로 2018년 5월부터 11월 동안 매일 시료를 채수하였고 다양한 시료에 대한 적용성을 평가하기 위해 물재생센터 1지점을 대상으로 2020년 5월부터 6월까지 유입수와 방류수를 채수하였다(Fig. 1). 채수한 시료는 탁도, 수온, 수소이온농도(pH) 항목을 측정하였고(NIER, 2017, 2018, 2019), 채수 기간 동안의 강수량 자료는 기상청 홈페이지에서 수집하였다(KMA, 2019).

2.2 분원성대장균군 검사

채수한 취수원수 113점, 지류천 42점, 유입 하수 2점 및 방류수 9점을 대상으로 로졸릭산 용액을 넣은 m-FC 배지와 넣지 않은 배지에 나누어 분원성대장균군을 검사하였다(NIER, 2017, 2018, 2019). 로졸릭산 용액의 첨가 유무에 따른 분원성대장균군 개수는 엑셀(Excel 2013)의 데이터 분석기능을 사용하여 t-test 분석으로 결과를 비교하였다.

2.3 방해세균 영향 실험

수질오염공정시험기준에서 제시하는 분원성대장균군의 적정 개수의 범위(20 CFU~60 CFU)에서 방해세균의 영향을 확인하기 위한 실험을 하였다. m-FC 배지에서 분리하고 동정한 방해세균을 여과막당 ($10^2 \sim 10^5$) CFU(Colony Forming Units)가 되게 10 단계별로 희석하고 동시에 대장균 표준균주(Biball, BTF, USA)를 여과막당 약 20 CFU 및 60 CFU가 되도록 넣은 시료를 조제하였다. 로졸릭산 용액을 넣은 m-FC 배지와 넣지 않은 m-FC 배지에 나누어 수질오염공정시험기준의 분원성대장균군 검사방법에 따라서 2회 반복 실험하였다(NIER, 2017).

2.4 세균동정

m-FC 배지에서 성장한 세균은 tryptic soy agar(Difco, USA)에 순수 배양하여 VITEK 2 systems(bioMerieux, France)을 이용하여 동정하였고, VITEK 2 systems으로 동정이 안 되는 경우에는 염기서열분석(ABI Sequencer, Applied Biosystems, USA)을 하였다. 세균의 DNA는 QIAamp DNA mini kit(Qiagen, Germany)을 사용하여 추출하였고, 16S rRNA 부위의 프라이머 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 1492R(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')을 사용하여 PCR(Polymerase Chain Reaction; ABI 9700, Biometra)을 하였다.

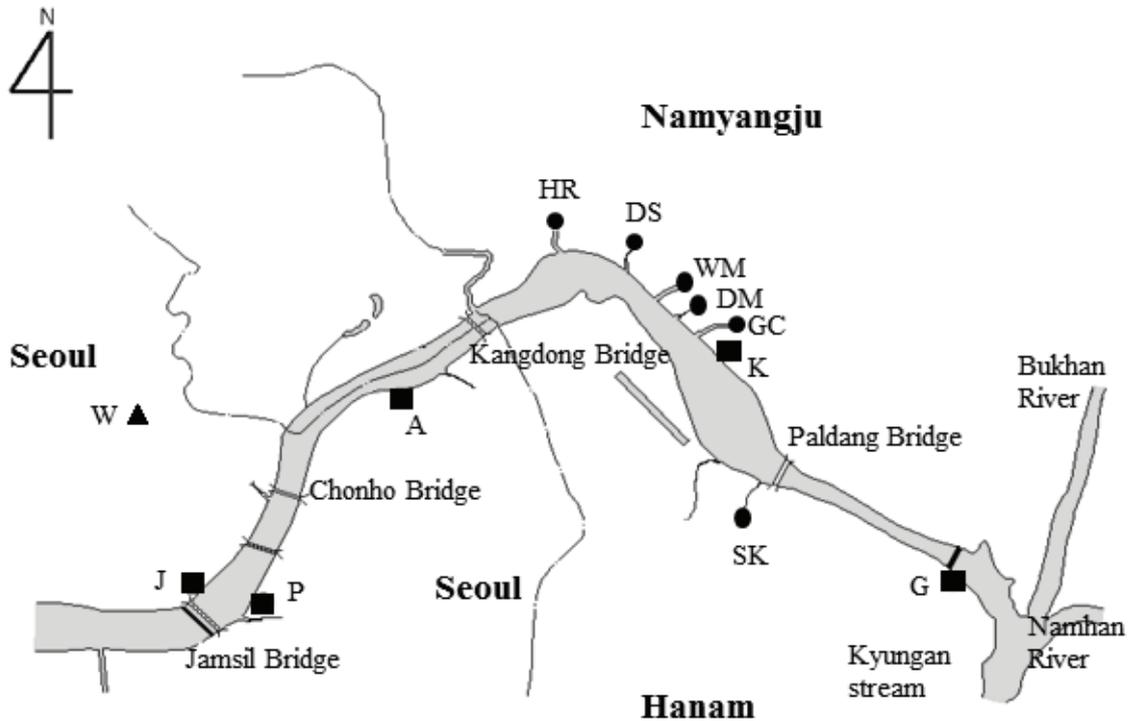


Fig. 1. Sampling sites (■ Intake, ● Tributary, ▲ Sewage).

반응조건은 95℃, 5분, 30 cycles(94℃, 1분; 55℃, 1분; 72℃, 1분); 72℃, 7분으로 하였다. PCR 산물은 PCR purification kit(Qiagen)을 사용하여 정제하고 염기서열분석을 하였다. 결정된 염기서열은 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)의 GenBank database를 이용하여 BLAST search를 통해 분석하였다.

2.5 군집분석

한강 하류 취수원수인 P지점을 대표로 선정하여 건기 시 채수한 시료(3월), 건기 후 봄철 강우시 채수한 시료(4월), 여름철 강우시 채수한 시료(8월), 강우 1일 후 채수한 시료(9월), 가을철 3일간 강우가 없었던 시기에 채수한 시료(11월)를 비교하여 강우와 계절에 의한 세균 군집변화를 분석하였다. 시료 1 L를 원심 분리하여 농축한 후 FastDNA™ SPIN kit for soil(MP, USA)를 사용하여 유전자를 추출하였다. 추출한 유전자는 세균의 16S rRNA 유전자의 V3-V4 영역을 증폭하는 프라이머(primer)를 사용하여 PCR을 하였다. 사용한 프라이머는 341F(5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3')와 805R(5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3')이었으며, 반응 조건은 95℃, 3분, 25 cycles(95℃, 30초; 55℃, 30초; 72℃, 30초); 72℃, 5분으로 하였다. Illumina Miseq(USA) 염기서열분석 시스템을 이용하여 chunlab, Inc.(Korea)에 의해 분석되었다. 결과 분석은 CLcommunity 및 EzBioCloud 프로그램(chunlab, Inc., Korea)을 이용하여 시료별 세균 군집변화를 분석하였다(<https://www.ezbiocloud.net>). Operation taxonomic units(OTUs)는 97% 유사도 기준으로 분류하였으며, 다양성 분석을 위해 Chao1, Shannon 및 Simpson 지수를 계산하였다.

3. Results and Discussion

3.1 분원성대장균군 검사 결과

서울시 취수원수 113점, 지류천 42점, 유입 하수 2점 및 방류수 9점을 대상으로 m-FC 배지에 로졸릭산 용액을 첨가한 배지와 첨가하지 않은 배지로 나누어 분원성대장균군의 결과를 비교하였다(Table 1). 취수원수 시료에서 로졸릭산 용액을 첨가한 배지에서 분원성대장균군이 평균 4.0×10^1 CFU/100 mL 으로 검출되었으나, 첨가하지 않은 배지에서는 평균 5.0×10^1 CFU/100 mL 으로 검출되어 로졸릭산 용액을 첨가한 배지에서 분원성대장균군이 낮게 검출되었다. 지류천 시료는 취수원수 시료보다 분원성대장균군이 평균적으로 100배 이상 높게 검출되었으나, 취수원수 시료와 마찬가지로 로졸릭산 용액을 첨가하지 않은 배지(5.5×10^3 CFU/100 mL)보다 첨가한 배지(4.9×10^3 CFU/100 mL)에서 분원성대장균군이 낮게 검출되었다. 유입 하수 시료에서도 로졸릭산 용액을 첨가한 배지에서 분원성대장균군이 5.7×10^5 CFU/100 mL 으로 검출되었으나, 첨가하지 않은 배지에서는 평균 6.4×10^5 CFU/100 mL 으로 검출되었다. 방류수 시료도 로졸릭산 용액을 첨가하지 않은 배지(4.2×10^3 CFU/100 mL)보다 첨가한 배지(3.7×10^3 CFU/100 mL)에서 분원성대장균군이 낮게 검출되었다. 이러한 결과는 로졸릭산 용액이 분원성대장균군이 아닌 방해세균 뿐만 아니라 손상된 분원성대장균군의 성장도 억제했기 때문으로 생각된다(Sartory, 1980). 그러나 t-test 분석결과, 두 배지간의 분원성대장균군 개수는 통계적으로 유의한 차이는 아니었다($p=0.10$).

Table 1. Fecal coliforms on m-FC agar with/without rosolic acid solution

Sample	Number of samples	Fecal coliforms count (CFU/100 mL)	
		with rosolic acid	without rosolic acid
Intakes water	113	0~ 8.6×10^3 ^a $4.0 \times 10^{1b} \pm 11.6^c$	0~ 1.1×10^4 $5.0 \times 10^1 \pm 10.7$
Tributary	42	2.0×10^2 ~ 5.5×10^5 $4.9 \times 10^3 \pm 6.4$	2.7×10^2 ~ 7.1×10^5 $5.5 \times 10^3 \pm 5.8$
Sewage (In)	2	5.0×10^5 ~ 6.4×10^5 $5.7 \times 10^5 \pm 1.2$	5.4×10^5 ~ 7.6×10^5 $6.4 \times 10^5 \pm 1.3$
Sewage (Out)	9	1.0×10^3 ~ 4.3×10^4 $3.7 \times 10^3 \pm 3.4$	8.8×10^2 ~ 4.5×10^4 $4.2 \times 10^3 \pm 3.5$
Total	166	0~ 6.4×10^5 $1.9 \times 10^2 \pm 25.9$	0~ 7.6×10^5 $2.3 \times 10^2 \pm 23.6$

^a range, ^b geomean, ^c standard deviation

취수원수 시료로 분원성대장균군을 검사할 때, m-FC 배지에서 자주 확인되는 방해세균을 동정하였다. *Acinetobacter baumannii* complex 및 *Pseudomonas aeruginosa*가 로졸릭산 용액의 첨가 및 미첨가 배지에서 모두 동정되었고 *Kurthia* sp.는 로졸릭산 용액을 넣지 않은 m-FC 배지에서만 분리되었다. *Acinetobacter* 속과 *Pseudomonas* 속은 총대장균군 검사시 위음성을 일으키는 세균으로 총대장균군 성장을 방해하는 세균으로 알려져 있다(Franzblau et al., 1984; Lechevallier et al., 1980). 본 연구를 통해서 이 세균들이 로졸릭산 용액의 사용에 관계없이 m-FC 배지에서 성장하여 분원성대장균군 성장을 방해하는 것을 알 수 있었다. 정확한 기작에 대한 연구가 향후 필요하겠지만, 분원성대장균군 배지에 로졸릭산 용액의 첨가는 분원성대장균군 검사 배지에서 성장 가능한 방해세균인 그람양성균을 억제하기 위한 것으로 알려져 있다(Bronfenbrenner et al., 1920; Geldreich et al., 1965; Presswood and Strong, 1978). *Kurthia* 속은 그람양성 세균이므로 로졸릭산 용액을 넣지 않은 m-FC 배지에서만 분리된 것으로 추정되었다(Bronfenbrenner et al., 1920).

3.2 방해세균의 영향

로졸릭산 용액을 넣지 않은 배지에서 성장하는 방해세균이 분원성대장균군 결과에 미치는 영향을 로졸릭산 용액을 넣은 배지의 결과와 비교하여 m-FC 배지에 로졸릭산 용액의 첨가 필요성을 평가하였다. m-FC 배지에서 성장하는 방해세균으로 시료에서 분리한 아시네토박터(*Acinetobacter baumannii* complex)를 여과막 당 10^2 CFU 부터 10^5 CFU가 되게 10 단계별로 넣고 대장균 표준균주를 여과막 당 약 20 CFU와 60 CFU가 되도록 섞은 시료를 조제하여 로졸릭산 용액을 첨가한 배지와 첨가하지 않은 배지로 나누어 분원성대장균군 실험을 하였다. 실험결과, 방해세균이 여과막에 10^3 CFU 존재할 경우 분원성대장균군의 집락이 작아지고 뚜렷하지 않게 되었으며, 10^4 CFU 이상 존재시 집락이 더 작아지고 파란색 집락 색깔이 얼어서 계수하기 어려웠다(Fig. 2). 또한 대장균 표준균주를 여과막 당 약 30 CFU가 되도록 넣은 시료에

Kurthia sp.를 여과막 당 약 1.5×10^2 , 4.5×10^2 , 7.5×10^2 , 1.1×10^3 , 1.5×10^3 , 1.8×10^3 CFU가 되게 단계별로 넣고 분원성대장균군을 실험한 결과, *Kurthia* sp.가 여과막에 1.1×10^3 CFU 이상 포함시 분원성대장균군 집락이 뚜렷하지 않았다(Fig. 3).

따라서 수질오염공정시험기준에 제시된 대로 여과막에 20 CFU~60 CFU의 분원성대장균군 집락이 형성되도록 실험을 할 경우, 여과막에 분원성대장균군이 아닌 세균이 10^3 CFU 이상 과도하게 존재하면 분원성대장균군의 성장을 억제하거나 파란색 집락 형성을 방해하는 것으로 생각되었다. 이러한 결과는 막여과법으로 총대장균군을 검사할 경우, 일반세균 수가 1,000 CFU/mL를 초과하면 총대장균군수가 감소한다는 이전의 연구결과와 유사하였다(Amanidaz et al., 2015; Geldreich et al., 1972). 다만 본 연구결과에서는 여과막 당 일반세균수가 1,000 CFU를 초과시 분원성대장균군수가 감소하였으므로 막여과법으로 분원성대장균군을 검사할 경우에는 mL 당 일반세균수 보다는 여과막 당 분원성대장균군 배양 온도인 44.5°C에서 성장 가능한 일반세균수를 고려하는 것이 더 적합하다고 판단되었다.

로졸릭산 용액의 첨가 및 무첨가 배지에서 수온에 따른 방해세균 및 분원성대장균군의 성장 차이를 분석하였다. Table 2에는 계절에 따른 비교를 위해 1월, 4월, 8월, 11월에 채수한 취수원수 시료(J, P 지점) 및 5월, 8월, 11월에 채수한 지류천 시료(DM, WM, DS 지점)의 결과를 나타내었다. 강우의 영향을 최대한 배제하기 위해 채수당일 및 채수 전날 강우가 없었던 시료만을 비교하였다. 1월에 채수한 취수원수 시료는 로졸릭산 용액의 첨가 유무에 상관없이 한번에 50 mL 이상의 시료를 여과하여도 방해세균의 영향없이 분원성대장균군을 계수할 수 있었다. 낮은 수온으로 세균의 성장이 둔화되어 방해세균의 영향이 없었던 것으로 추정되었다(Table 2). 4월 시료는 로졸릭산 용액의 첨가 및 무첨가 배지 모두에서 방해세균이 이전보다는 더 많이 성장하였다. 분원성대장균군이 20 CFU/100 mL 미만으로 검출되는 상류 지점(G, K 지점)에서는 분원성대장균군을 검출하기 위해 시료량을 한번에 100 mL로 늘리면서 로졸릭산 용액을 첨가하지 않은 배지에서 일부 방해세균이 퍼져서 성장하였다(data not shown). 방해세균의 영향은 100 mL의 시료를 2개~3개의 여과지에 나누어 실험하였을 때, 감소하였다. 동일 시기의 하류 지점(A, J, P 지점)에서 채수한 시료는 상류보다 약 1/2~1/10 정도의 시료량으로도 여과지에 20 CFU 이상의 분원성대장균군이 검출되었고 방해세균의 영향도 없었다(Table 2). 8월에 채수한 시료는 여과막에 방해세균이 많이 성장하였고 로졸릭산 용액을 넣지 않은 배지에서 성장한 분원성대장균군의 일부 집락이 뚜렷하지 않았다(Table 2). 11월에 채수한 시료는 4월에 채수한 시료와 같이 적정 개수의 분원성대장균군을 검출하기 위해 시료량을 늘리면서 로졸릭산 용액을 첨가하지 않은 배지에서 일부 방해세균이 퍼져서 성장하였다(Table 2). 따라서 취수원수 시료는 동절기에는 로졸릭산 용액을 넣지 않은 배지로 분원성대장균군 검사를 할 수 있었으나, 수온이 높아지는 여름철은 방해세

(a)	Background colony counts (CFU)		Type of medium					
	0	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵			
	without rosolic acid solution							
	with rosolic acid solution							
(b)	Background colony counts (CFU)		Type of medium					
	0	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵			
	without rosolic acid solution							
	with rosolic acid solution							

Fig. 2. Effect of *Acinetobacter baumannii* complex in medium without/with rosolic acid solution. (a) fecal coliforms 20 CFU/filter, (b) fecal coliforms 60 CFU/filter.

Background colony counts (CFU)					
1.5 × 10 ²	4.5 × 10 ²	7.5 × 10 ²	1.1 × 10 ³	1.5 × 10 ³	1.8 × 10 ³

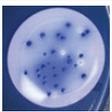
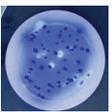
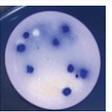
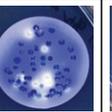
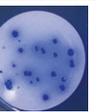
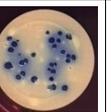
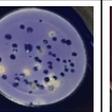
Fig. 3. Effect of *Kurthia* sp. in medium without rosolic acid solution (fecal coliforms 30 CFU/filter).

균의 성장이 활발하게 이루어지는 시기이므로 분원성대장균군의 뚜렷한 집락을 얻기 위해서는 로졸릭산 용액이 첨가된 배지를 사용하는 것이 적합하였다. 4월 및 11월에도 로졸릭산 용액을 넣지 않은 배지의 사용이 가능하였으나, 분원성대장균군이 20 CFU/100 mL 미만으로 검출되는 지점에서는 시료량 증가에 따른 방해세균의 영향을 줄이기 위해 여러 개의 여과막에 시료를 나누어 실험하는 것이 필요하였다.

지류천 시료는 0.01 mL~0.1 mL의 시료량으로도 걱정 범위의 분원성대장균군수를 얻을 수 있었다. 5월, 8월, 11월에 채수한 시료 모두에서 로졸릭산 용액을 넣지 않은 배지에서 방해세균의 영향없이 분원성대장균군의 집락이 뚜렷하게 관

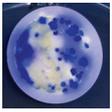
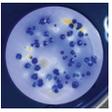
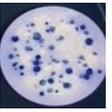
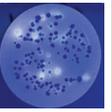
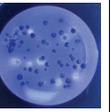
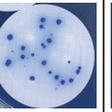
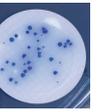
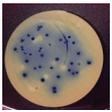
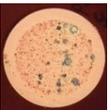
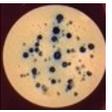
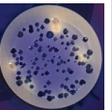
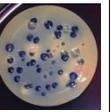
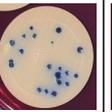
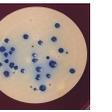
찰되어 로졸릭산 용액을 넣지 않은 배지로 분원성대장균군 검사가 가능하였다(Table 2). 유입 하수 시료는 0.005 mL~0.01 mL의 시료량, 하수 방류수 시료는 0.1 mL~5 mL의 시료량으로 걱정 범위의 분원성대장균군수를 얻을 수 있었다. 모든 하수 시료에서 로졸릭산 용액을 넣은 배지와 같이 로졸릭산 용액을 넣지 않은 배지에서도 방해세균의 영향이 없었고 분원성대장균군의 파란 집락이 뚜렷하였다. 하수 시료는 시료수가 적고 조사기간이 짧아 더 연구가 필요하겠지만, 검사한 시료에서는 로졸릭산을 넣지 않은 배지로 분원성대장균군 검사가 가능하였다(Table 2). 막여과법에 의한 분원성대장균군 검사에 로졸릭산 용액을 넣지 않은 m-FC 배지를

Table 2. Effect of season in intake, tributary and sewage samples

Sampling month Water quality data		Water intake samples in the Han River				Tributary samples			Sewage(out)
		January	April	August	November	May	August	November	May
Water temperature (°C)		3.2	13.6	29.2	15.4	15.7	27.1	12.4	21.7
Turbidity (NTU ^a)		4.9	10.5	5.1	9.8	13.5	3.7	- ^b	0.50
pH		8.2	8.0	7.8	8.3	7.8	7.2	7.6	6.4
Sample amount per filter (mL)		50	10	10	60	0.01	0.1	0.1	1
Type of medium	without rosolic acid solution								
		28 ^c	53	31	10	30	32	46	24
	with rosolic acid solution								
		24	39	22	11	23	27	48	20

^a NTU, Nephelometric Turbidity Unit, ^b missing data, ^c fecal coliforms count (CFU/filter)

Table 3. Effect of rainfall in water intake, tributary and sewage samples

Sampling month Water quality data		Water intake samples in the Han River				Tributary samples		Sewage(out)	Sewage(In)
		May	July	August	September	June	September	May	June
Water temperature (°C)		17.0	23.0	29.0	24.7	20.4	22.1	21.9	21.5
Turbidity (NTU)		19.2	34.8	11.7	34.4	1.2	- ^a	0.5	65.5
pH		8.2	7.3	7.3	7.4	7.3	7.3	6.5	7.1
Rainfall (mm)		6.5 ^b	59.5 ^c	6.5 ^d	34.5	5.0	0.0 ^e	29.8	2.0
Sample amount per filter (mL)		25	1	10	5	1	0.5	1	0.0005
Type of medium	without rosolic acid solution								
		uncountable ^f	37	uncountable	52	60	31	28	27
	with rosolic acid solution								
		36	32	uncountable	41	57	30	21	25

^a missing data, ^b 12.5 mm before 1 day of sampling, ^c 83.5 mm before 1 day of sampling, ^d 8.5 mm before 1 day of sampling, ^e 34.5 mm before 2 day of sampling, ^f fecal coliforms count (CFU/filter)

사용 할 수 있다는 결과는 미국, 남아프리카 공화국 등 국외의 여러 연구에서 제시된 바 있다(Grabow et al., 1981; Presswood and Strong, 1978; Sartory, 1980).

5월부터 9월 사이 채수된 시료에 대해 강우에 의한 방해세균의 영향을 조사하였다(Table 3). 채수 당일 강우량이 6.5 mm이었던 5월에 채수된 취수원수 시료(전날 12.5 mm)는 로졸릭산 용액을 첨가한 배지와 달리 첨가하지 않은 배지에서는 방해세균의 영향으로 분원성대장균군 집락을 뚜렷하게 확인하기 어려웠다. 그러나 채수 1일 전에도 80 mm 이상의 강우가 있었고 당일에도 강우량이 50 mm 이상이었던 7월에 채수한 시료는 로졸릭산 용액의 첨가 및 무첨가 배지 모두에

서 분원성대장균군의 뚜렷한 집락을 관찰할 수 있었다. 채수 당일 강우량이 6.5 mm이었던 8월에 채수된 시료(전날 8.5 mm)는 배지에 로졸릭산 용액의 첨가 유무에 상관없이 분원성대장균군의 뚜렷한 집락을 관찰하기 어려웠다. 반면 같은 지점에서 강우가 없었던 8월에 채수한 시료(Table 2)는 시료량(10 mL)이 같았으나, 분원성대장균군의 집락은 강우가 있었던 8월 시료보다 뚜렷하였다. 따라서 분원성대장균군 검사에서 강우에 의한 방해세균의 영향이 있었음을 알 수 있었다. 당일 강우량이 34.5 mm 이었던 9월 시료는 로졸릭산 용액의 첨가 및 무첨가 배지 모두에서 방해세균이 있었으나, 분원성대장균군의 계수를 방해할 정도는 아니었다(Table 3).

강우량이 많을 경우에는 강우시 토사 등을 통해 유입된 세균이 많은 강우로 인해 빨리 희석되는 효과가 있어 분원성대장균군 검사에서 방해세균의 영향이 적었으나, 강우량이 적었던 5월, 8월 시료는 강우로 인해 유입된 세균의 희석효과가 크지 않아 분원성대장균군 검사 시에 방해세균으로 작용했을 것으로 추정되었다. 특히 5월 시료는 로졸릭산 용액을 넣지 않은 배지에서만 성장 가능한 그람양성균의 영향이 있었던 것으로 생각되었다.

채수 당일 강우(5 mm)가 있었거나, 채수 2일 전 강우(34.5 mm)가 있었던 지류천 시료는 로졸릭산 용액의 첨가 및 무첨가 배지 모두에서 방해세균 영향 없이 뚜렷한 분원성대장균군의 집락을 관찰할 수 있었다(Table 3). 채수 당일 강우(2 mm)가 있었던 하수 유입시료도 로졸릭산 용액의 첨가 유무에 상관없이 방해세균의 영향이 없었고 뚜렷한 분원성대장균군의 집락을 관찰할 수 있었다(Table 3). 하수 방류수도 채수 당일 강우(29.8 mm)가 있었으나 로졸릭산 용액의 첨가 및 무첨가 배지 모두에서 방해세균의 영향이 없었다(Table 3). 따라서 강우에 의한 방해세균의 영향은 지류천, 하수 보다 취수원수 시료에서 더 크게 작용하였다. 조사기간 동안 취수원수, 지류천 및 하수 방류수의 평균 분원성대장균군수(로졸릭 용액 무첨가 배지)는 100 mL 당 각각 5.0×10^1 CFU, 5.5×10^3 CFU 및 4.2×10^3 CFU 로 검출되어 지류천, 하수 방류수가 취수원수 보다 분원성대장균군수가 약 100배 정도 높았다(Table 1). 그러므로 막여과법에서 분원성대장균군의 적정 개수(20 CFU~60 CFU)의 결과를 얻기 위해서 취수원수는 지류천 및 하수 방류수 보다 많은 시료량의 여과가 필요하였고 그만큼 방해세균의 영향이 컸던 것으로 추정되었다.

강우에 의한 세균 군집변화를 비교하기 위해 건기시 채수한 시료(p-3), 건기 후 봄철 강우시 채수한 시료(p-4), 여름철 강우시 채수한 시료(p-8), 강우 다음날 채수한 시료(p-9) 및 선행 3일간 강우가 없었던 시기에 채수한 시료(p-11)에 대해 차세대 염기서열 분석을 하였다(Table 4). 시료 내에 존재하는 종의 수(operational taxonomic unit, OTU; similarity 97%)는 p-4와 p-8 시료에서 각각 1163 및 1127로 높았으며, p-3 시료에서 760으로 가장 낮았다. Chao1 및 Shannon 값도 p-4 시료에서 가장 높아서 시료 내 종의 다양성이 풍부한 것으로 나타났다. Simpson 계수는 p-3 시료에서 상대적으로 높아 다른 시료보다 우점도가 높게 나타났다(Table 5). 군집분석 결과는 생물분류 체계에 따라서 세균의 가장 넓은 범위인 문(phylum) 수준과 두 번째로 좁은 범위인 속(genus) 수준에서 분석하였다. 당초 가장 좁은 범위인 종(species) 수준에서 구성비를 검토하고자 하였으나, unidentified bacteria가 많이 동정되어 종(species) 수준 보다 속(genus) 수준에서 구성비를 검토하였다. 문(phylum) 수준에서 분석한 결과, Proteobacteria와 Bacteroidetes가 세균 구성의 50% 이상을 차지하였다(Table 6). Actinobacteria 비율은 p-8 및 p-9 시료에서 20% 이상으로 높았고, Bacteroidetes 비율은 p-3 시료에서 가장 높았고 p-8 시료에서 가장 낮았다. Cyanobacteria 구성비는 p-8 시료에서 가장 높았는데 수온이 높을 때 왕성하게 성장하는 계절적인 특성인 것으로 생각되었다. 속

(genus) 수준에서 분석하였을 때, p-8 시료에서 다른 시기에 채수한 시료보다 *Anabaena* 속의 구성비가 최소 12배에서 최대 210배 이상 증가하였다(Table 6). p-4 시료는 다른 시기에 채수한 시료보다 *Pseudomonas* 속의 구성비가 최소 64배에서 최대 190배 이상 증가하였다. 또한 1% 미만의 구성비라 Table 6에 표시되지는 않았지만, *Acinetobacter* 구성비도 p-3 시료 보다 p-4 시료에서 60배 이상 증가하였다. 세균 군집분석 결과, 봄철 강우 및 여름철 강우시 세균의 다양성이 증가하여 분원성대장균군 실험시 방해세균으로 작용했을 것으로 추정되며, 특히 분원성대장균군 실험시 방해세균으로 확인되었던 *Pseudomonas*와 *Acinetobacter*는 건기 이후 봄철 강우시 구성비가 크게 증가하는 것을 알 수 있었다.

결과적으로 검사한 취수원수 시료 113점, 지류천 시료 42점, 유입 하수 2점 및 방류수 9점 중 취수원수 21점에서는 로졸릭산 용액을 넣지 않은 m-FC 배지에서 수온 상승 및 강우로 인한 방해세균의 영향이 있었다. 이를 제외한 145점(약 87%)은 로졸릭산 용액을 넣지 않은 m-FC 배지를 사용하여 분원성대장균군 검사를 할 수 있었다. 실제로 검사하는 시료의 특성 및 종류에 따라 다를 수 있겠지만 본 연구에서 검사한 시료를 기준으로 할 때, 분원성대장균군 검사에 소요되는 로졸릭산 용액(로졸릭산 및 수산화나트륨)의 비용 또한 87% 정도 절약할 수 있을 것으로 판단되었다. 비용 측면이외에도 환경, 검사시간 등을 고려한다면 물 시료에 대해 막여과법으로 분원성대장균군 검사를 할 경우에는 시료의 특성에 따른 배지 사용이 바람직하다고 생각되었다.

4. Conclusion

서울시 취수원수, 지류천 및 하수를 대상으로 m-FC 배지에 로졸릭산 용액의 사용 유무에 따라 분원성대장균군을 검사한 결과, 로졸릭산 용액을 첨가하지 않은 배지에서 분원성대장균군이 높게 검출되는 경향이 있었으나 통계적으로 유의한 차이는 아니었다. 취수원수의 경우, 세균의 성장이 둔화되는 동절기에는 분원성대장균군 검사시 로졸릭산 용액을 넣지 않은 배지를 사용할 수 있었다. 봄철 및 가을철에도 로졸릭산 용액을 넣지 않은 배지의 사용이 가능하였으나, 분원성대장균군수가 20 CFU/100 mL 미만으로 검출되는 지점은 시료의 여과량을 여러 개의 여과막으로 나누어 여과하면 방해세균의 영향을 최소화하여 분원성대장균군을 계수할 수 있었다. 44.5°C에서 성장 가능한 일반세균이 여과막당 1,000 CFU를 초과하거나 수온이 높은 여름철 및 강우시에는 로졸릭산 용액을 넣지 않은 배지에서 성장 가능한 그람양성균 등의 방해세균을 억제하기 위해서 로졸릭산 용액을 넣은 배지를 사용하는 것이 더 적합하다고 판단되었다. 그러나 분원성대장균군 오염도가 높은 지류천 및 하수시료는 5 mL 이하의 적은 시료량으로도 분원성대장균군의 적정 개수(20 CFU~60 CFU)를 얻을 수 있었고 방해세균의 영향도 적어 로졸릭산 용액을 첨가하지 않은 배지의 사용이 가능하였다. 따라서 막여과법으로 분원성대장균군을 실험할 때, 일률적으로 로졸릭산 용액을 첨가한 배지를 사용하기 보다는 강우를 제외한

Table 4. Characteristic of samples collected in p sites

Sample name	Sampling month	Water temperature (°C)	Turbidity (NTU)	pH	Rainfall (mm)		
					the day of sampling	before 1 day of sampling	before 2 day of sampling
p-3	March	10.0	2.1	7.5	0	0	0
p-4	April	15.7	2.0	7.8	5.5	13.5	8.5
p-8	August	24.6	2.7	7.4	16.5	0	0
p-9	September	21.5	2.9	8.1	0	16	0.5
p-11	November	10.1	2.1	7.7	0	0	0

Table 5. Number of alpha diversity indices for bacterial 16S rRNA libraries

Sample name	Number of reads	OTUs	Chao1	Shannon	Simpson
p-3	18015	760	789.61	5.01	0.02
p-4	29464	1163	1203.68	5.44	0.01
p-8	29436	1127	1141.86	5.34	0.01
p-9	19239	904	926.89	5.20	0.01
p-11	21958	857	885.34	5.17	0.01

Table 6. Changes in bacterial communities at phylum and genus level

Phylum	Genus	Composition proportion (%)				
		p-3	p-4	p-8	p-9	p-11
Actinobacteria	<i>Planktophila</i>	4.06	7.68	5.75	8.00	6.32
	<i>Nanopelagicus</i>	0.73	2.99	8.29	9.35	2.96
	Other genera	0.98	2.42	6.38	7.76	3.65
	total	5.77	13.09	20.42	25.11	12.93
Verrucomicrobia	<i>Luteolibacter</i>	0.56	0.77	0.53	1.15	0.24
	<i>Opitutus</i>	0.38	1.71	0.60	0.91	0.99
	Other genera	8.24	4.54	7.01	4.69	4.93
	total	9.18	7.02	8.14	6.75	6.16
Proteobacteria	<i>Limnhabitans</i>	6.28	7.05	5.31	6.61	8.91
	<i>Rhodiferax</i>	5.81	1.17	0.09	0.28	0.45
	<i>Albidiferax</i>	3.66	2.73	0.13	0.06	2.36
	<i>Pseudomonas</i>	0.06	3.87	0.04	0.03	0.02
	Other genera	21.42	28.59	28.79	23.72	26.94
	total	37.17	39.54	34.32	30.67	38.66
Bacteroidetes	<i>Flavobacterium</i>	17.81	9.51	4.38	3.97	16.66
	<i>Fluviicola</i>	4.12	2.29	2.11	2.90	1.32
	<i>Sediminibacterium</i>	1.12	2.07	1.41	3.09	5.11
	Other genera	21.65	19.99	12.66	20.05	12.81
	total	44.70	33.86	20.56	30.01	35.90
Cyanobacteria	<i>Anabaena</i>	0.04	0.03	6.44	0.53	0.06
	Other genera	0.52	1.68	5.86	2.13	3.04
	total	0.56	1.71	12.30	2.66	3.10
Other Phyla		3.93	5.32	5.22	4.79	4.38

시기에 채수된 시료, 일반세균이 여과막당 1,000 CFU를 초과하지 않는 시료 또는 5 mL 이하의 적은 시료량으로도 분원성대장균군의 적정 개수를 얻을 수 있는 시료 등 시료의 특성에 따라서 배지 조제시 로졸릭산 용액을 넣지 않을 수 있다는 예외사항의 제시가 필요할 것으로 판단되었다. 향후 수질오염공정시험기준에 로졸릭산 용액의 선택 사용에 대한 분원성대장균군 시험법의 개정으로 분석시간 및 불필요한 비용을 줄이고 화학물질로부터 시험자의 안전을 도모할 수 있을 것으로 생각된다.

References

- Amanidaz, N., Zafarzadeh, A., and Mahvi, A. H. (2015). The interaction between heterotrophic bacteria and coliform, fecal coliform, fecal streptococci bacteria in the water supply networks, *Iranian Journal of Public Health*, 44, 1685-1692.
- American Public Health Association (APHA). (2017). *Standard method for the examination of water and wastewater (23st edition)*, Washington, D. C., USA.
- Bronfenbrenner, J., Schlesinger, M. J., and Soletsky, D. (1920). On methods of isolation and identification of members of the colon-typhoid group of bacteria: Study of the bactericidal action of CR indicator, *Journal of Bacteriology*, 5, 79-87.
- Franzblau, S. G., Hinnebusch B. J., Kelley, L. M., and Sinclair, N. A. (1984). Effect of noncoliforms on coliform detection in potable groundwater: Improved recovery with an anaerobic membrane filter technique, *Applied and Environmental Microbiology*, 48, 142-148.
- Geldreich, E. E., Clark, H. F., Huff, C. B., and Best, L. C. (1965). Fecal-coliform-organism medium for the membrane filter technique, *Journal of the American Water Works Association*, 57, 208-214.
- Geldreich, E. E., Nash, H. D., Reasoner, D. J., and Taylor, R. H. (1972). The necessity of controlling bacterial populations in potable waters: community water supply, *Journal of the American Water Works Association*, 64, 596-602.
- Grabow, W. O. K., Hilner, C. A., and Coubrough, P. (1981). Evaluation of standard and modified M-FC, MacConkey, and Teepol media for membrane filtration counting of fecal coliforms in water, *Applied and Environmental Microbiology*, 42, 192-199.
- Korea Meteorological Administration (KMA). (2019). *Observation data*, https://www.weather.go.kr/weather/climate/past_cal.jsp (accessed Jan. 2019).
- Lechevallier, M. W., Seidler, R. J., and Evans, T. M. (1980). Enumeration and characterization of standard plate count bacteria in chlorinated and raw water supplies, *Applied and Environmental Microbiology*, 40, 922-930.
- Maeda, K., Oya, H., Yamada, K., Yamamoto, J., Nakashima, M., and Sekiya, A. (1970). Aute toxicity and pharmacological actions of rosolic acid, *Nagoya Journal of Medical Science*, 32, 453-458.
- Ministry of Environment (ME). (2019). *Enforcement decree of the framework act on environmental policy*, <http://www.law.go.kr/lsInfoP.do?lsiSeq=209805&ancYd=20190702&ancNo=29950&efYd=20190702&nwJoYnInfo=N&efGubun=Y&chrClsCd=010202&ancYnChk=0#0000> (accessed Aug. 2019).
- Ministry of Environment (ME). (2020). *Chemicals control act*, <http://www.law.go.kr/lsSc.do?menuId=1&query=%ED%99%94%ED%95%99%EB%AC%BC%EC%A7%88%EA%B4%80%EB%A6%AC%EB%B2%95#undefined> (accessed Jun. 2020).
- National Institute of Environmental Research (NIER). (2017). *Standard methods for the examination of water pollution*, <http://www.law.go.kr/admRulLsInfoP.do?chrClsCd=010202&admRulSeq=2100000107529> (accessed Feb. 2018).
- National Institute of Environmental Research (NIER). (2018). *Standard methods for the examination of water pollution*, <http://www.law.go.kr/admRulLsInfoP.do?chrClsCd=010202&admRulSeq=2100000174530> (accessed Jan. 2019).
- National Institute of Environmental Research (NIER). (2019). *Standard methods for the examination of water pollution*, <http://www.law.go.kr/admRulLsInfoP.do?chrClsCd=010202&admRulSeq=2100000184984> (accessed Jan. 2020).
- Presswood, W. G. and Strong, D. K. (1978). Modification of M-FC medium by eliminating rosolic acid, *Applied and Environmental Microbiology*, 36, 90-94.
- Sartory, D. P. (1980). Membrane filtration faecal coliform determinations with unmodified and modified M-FC medium, *Water S.A.*, 6, 113-115.
- Thermo Fisher Scientific. (2018). *Safety Data Sheet*, <https://www.fishersci.com/shop/msdsproxy?productName=S3181> (accessed Jan. 2018).