

## 河川水에서 *Escherichia coli*의 生存率에 대한 實驗室 및 原位置 實驗方法의 比較研究

金致卿·金根植

(忠北大學校 自然大 微生物學科)

### Comparison of Laboratory and *in situ* Studies on the Survival of *Escherichia coli* in River Waters

Kim, Chi K. and Keun S. Kim

Department of Microbiology, College of Natural Sciences,  
Chungbuk National University

The survival of *Escherichia coli* in river water was comparatively studied by laboratory and *in situ* study methods. The survival by two methods was evaluated as a function of *E. coli* strain, indigeneous predator, level of water pollution, and water temperature in different season. The survival rate of *E. coli* examined by laboratory method was lower than that by *in situ* method. That was found to be due to the fact that higher number of predator was maintained in laboratory study than in *in situ* study. The survival rates of *E. coli* in gradually polluted river waters could be differentiated by *in situ* study, but not by laboratory study. Therefore, an *in situ* method rather than laboratory method was thought to be a choice of study method for the survival of *E. coli* in river waters.

河川水에서 腸內細菌의 生存率을 測定하기 위한 方法은 주로 flask 등의 밀폐된 用器(jug)에 하천수와 試驗細菌을 넣어 실험실에서 실험하는 laboratory study 방법과 하천수에 넣어 실험하는 *in vitro* 방법이 주로 이용되어왔다. 그러나 이와같은 jug study의 경우 그 用器內의 水質環境은 predator나 다른 생물학적要因, 태양 광선, 물의 희석, 양분의 공급, 그리고 용기내 표면에 대한 吸着등의 조건이 自然상태의 河川水와는 相異하므로(Wuhrman, 1972; Zanoni, 1982) 문제 微生物의 生存率에는 차이가 생길 수 있다. 그래서 Vasconcelos(1976)와 McFeters(1972)는 membrane filter chamber나 diffusion chamber 등을 사용하여 自然의 河川環境에서 試驗細菌의 生存率을 연구하는 *in situ* study 방법을 개발하여 연구하였으며 그 후 di-

alysis sac(Hendricks, 1972; LaLiberte, 1982) 이나 membrane diffusion chamber(McFeters, 1972; Flierman, 1977; Granai III, 1981; Lessard, 1983; Anderson, 1983) 등에 시험세균을 넣고 自然의 水質環境에 設置하고 실험하는 原位置(*in situ*) 實驗方法이 도입되었다. 그러나 두가지 實驗方法에 의한 腸內細菌의 生存率을 直接 比較研究한 보고는 없었다. 그러므로 本 實驗에서는 *Escherichia coli*를 試驗細菌으로 하여 河川水에서 그 生存率을 laboratory study 방법과 *in situ* study 방법을 比較 研究하였고, 두 方法에 의한 *E. coli*의 生存率의 차이를 *E. coli*의 strain別, predator, 水質의 汚染度 및 季節에 따르는 水溫의 變化등 環境要素와의 相關性을 比較 分析하였다.

## 實驗材料 및 方法

### 試驗細菌 및 그 培養

本 실험에서 사용한 시험세균으로는 腸內細菌의 指標細菌인 *E. coli* 중 실험실에서 繼代培養해오고 있는 *E. coli* ATCC 25922를 laboratory strain으로, 제 3번 실험장소의 河川水로 부터 Standard Method(1981)에 따라 deoxycholate agar를 사용하여 분리 동정한 *E. coli*를 environmental strain으로 각각 선정하여 그들의 生存率을 비교 시험하였다. 이들 *E. coli*는 Kim(1984)의 방법에 따라 배양하여 inoculum으로 사용하였다.

### 實驗位置의 選定 및 水質檢査

淸川市를 管류하는 無心川은 인구 약 30만의 淸川市 家庭下水가 대부분 無心川으로 흘러들어 下流로 감에 따라 汚染度는 극심하게 증가된다. 本 研究를 수행한 실험장소는 淸川市 無心川의 3곳과 石南川의 1곳을 Kim(1984)의 보고서와 같이 선정하였다. Laboratory study方法과 *in situ* study方法에 따른 *E. coli*의 生存率은 실험장소 3번 위치에서 比較 연구하였으며, *E. coli*의 生存率과 水質汚染度와의 相關性에 관한 연구는 실험장소 1, 2, 3, 4에서 실시하였다.

각 실험위치의 水質 分析方法은 Kim(1984)의 보고서에 기술되어 있다.

### 實驗裝置의 設置 및 實驗過程

*E. coli*의 生存率을 原位置 實驗方法(*in situ* study)으로 실험하기 위한 실험장치의 설치 및 실험과정은 Kim(1984)의 方法에 따라 한 장소에 5가지의 dialysis sac을 설치하였다. *E. coli*의 生存率을 實驗室 실험방법(laboratory study)으로 실험하기 위한 方法은 原位置 실험방법에서와 같이 하천수의 5가지 시료를 滅菌한 Erlenmyer flask(250ml)에 넣고 原位置 실험방법에서의 河川水 平均水温과 같은 온도인 4°C, 20°C, 30°C에 각각 보관하면서 매일 각 flask에서 2ml씩의 시료를 채취하여 生存細菌數를 測定하였다.

### 生存細菌數의 測定

河川原水의 coliform과 滅菌한 河川水에 接種한 *E. coli*의 生存數는 표준방법(1981)에 따

라 Lauryl tryptose broth를 사용하는 3-tube MPN방법과 deoxycholate agar와 EMB agar를 사용하는 plate count방법으로 측정하였다.

### 季節에 따르는 溫度變化

두가지 實驗方法에 의한 *E. coli*의 生存率의 차이를 계절의 溫度變化에 따라 比較 연구하기 위하여 河川의 平均水温이 4°C인 12월, 20°C인 4월, 30°C인 8월에 각 실험위치에서 시행하였다. Laboratory study방법의 온도 변화는 각 계절의 하천 평균수온과 같은 온도의 항온기에서 시행하였다.

### Biotic component(predator)의 分析

각 河川水에 自生하는 biotic component는 McCambridge(1980)의 double-layer plate 방법으로 分析하였다. Total predator는 滅菌하지 않은 河川水의 시료 0.5ml와 함께 0.5ml의 *E. coli* prey ( $10^8$  CFU/ml)를 0.7%의 Bacto agar 3ml(45°C)에 혼합하여 Petri dish에 준비한 1.5%의 Bacto agar 基層위에 상층을 만들어 25°C에서 5일간 培養하면서 나타나는 plaque수를 측정하였다. 또 biotic component의 종류는 Verstraete(1976)의 方法을 一部 변형하여 하천수를 Whatman filter paper No. 2와 Millipore membrane filter(pore size 5.0 $\mu$ m)로 여과한 시료를 A라 하고 이를 다시 0.22 $\mu$ m Millipore membrane filter로 여과하여 B라 할 때 bacteriophage의 數는 B시료에서, 그리고 bacteria는 A시료에서 측정하였으며 protozoa는 total predator수에서 A와 B시료의 측정치를 감산하여 산출하였다.

## 結果 및 考察

Laboratory study方法과 *in situ* study方法에 의한 *E. coli*의 生存率의 比較 실험은 제 3번 위치에서 실시하였으며, 두가지 실험방법으로 *E. coli*의 生存率과 水質汚染度와의 相關性에 관한 연구는 제 1, 2, 3, 4번의 4곳에서 각각 실험을 진행하였다. 각 실험위치의 水質은 Kim(1984)의 보고서와 같이 1번 위치에서 4번 위치로 갈 수록 물리·화학 및 미생물학적 汚染度는 모두 漸進적으로 증가되었다. 3

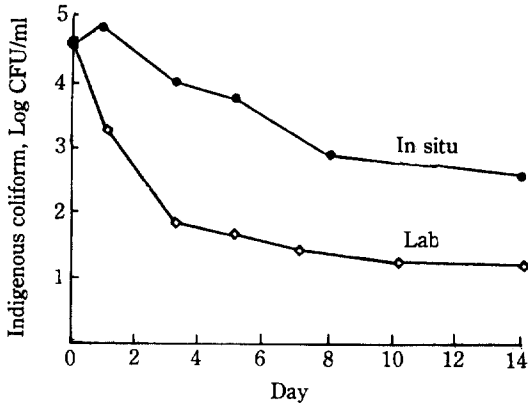


Fig.1. Comparison of the survival of indigenous coliform bacteria studied by laboratory and *in situ* methods at 20°C.

번 위치의 河川水에 自生하는 coliform bacteria의 生存率을 laboratory study 방법과 *in situ* study 방법으로 比較 실험한 결과는 Fig. 1과 같다. 原水에서 발견되는  $7.5 \times 10^4$  CFU/ml의 coliform 수는 laboratory study 방법으로 실험했을 경우 제 3일 까지 급격한 감소를 보인

후 약  $1.5 \times 10^4$  CFU/ml의 수준을 유지하였으며 *in situ* study 방법으로 실험했을 경우 제 14일 까지 서서히 감소하여 약  $2.3 \times 10^3$  CFU/ml의 生存數를 유지함으로써 두가지 실험방법에 의한 coliform bacteria의 生存율은 약 2 logs의 차이를 나타내었다. 그러므로 coliform bacteria의 生存率은 두가지 실험방법에 따라 많은 차이를 나타내었다. 그리고 河川原水에서 발견되는 coliform의 수가  $10^5$  CFU/ml 이하이고 실험기간 중 그 수가 점차 감소했던 것은 본 실험에서 인위적으로 接種한 시험細菌의 수가  $10^8$  CFU/ml라는 점에서 原水에 自生하는 coliform의 수는 무시할 수 있음을 알 수 있었다. Laboratory study 방법과 *in situ* study 방법에 의한 *E. coli*의 生存率 차이를 두가지 strain別, 그리고 滅菌한 河川水와 滅菌하지 않은 河川水別로 20°C 환경에서 비교 실험한 결과는 Fig. 2와 같다. Laboratory strain의 경우 滅菌한 하천수와 滅菌하지 않은 하천수에서 모두 laboratory study 방법으로 실험했을 경우 14일 후 *in*

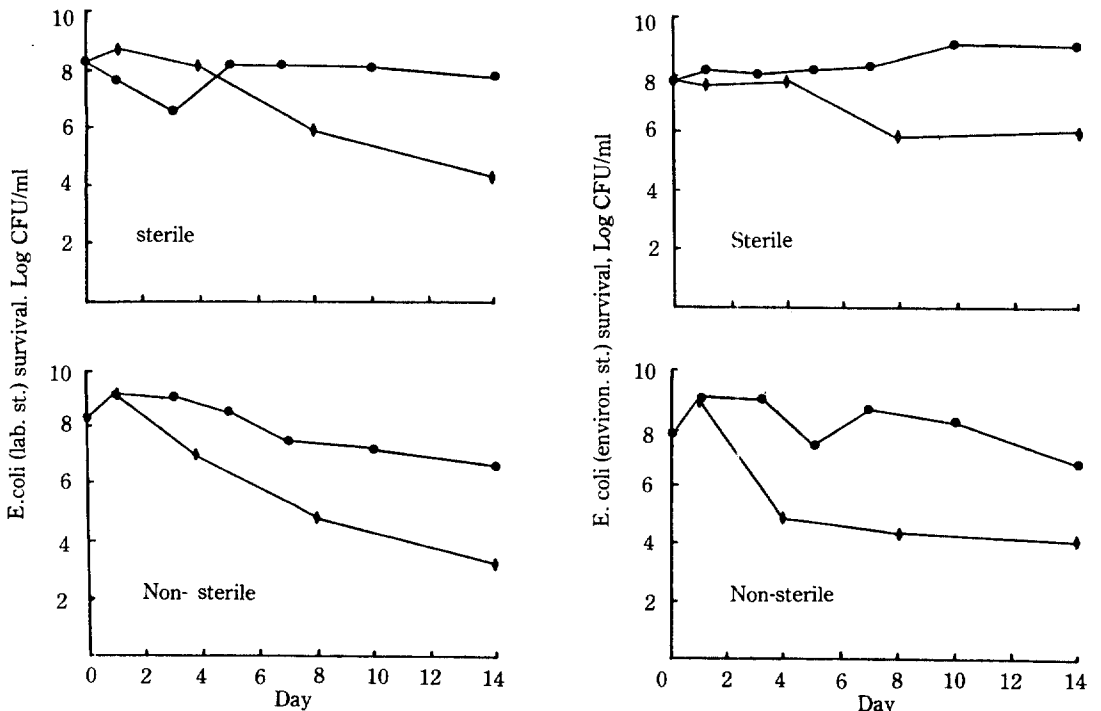


Fig. 2. Comparison of the survival of *E. coli* studied by laboratory and *in situ* methods at 20°C.  $\diamond - \diamond$ , laboratory study;  $\bullet - \bullet$ , *in situ* study.

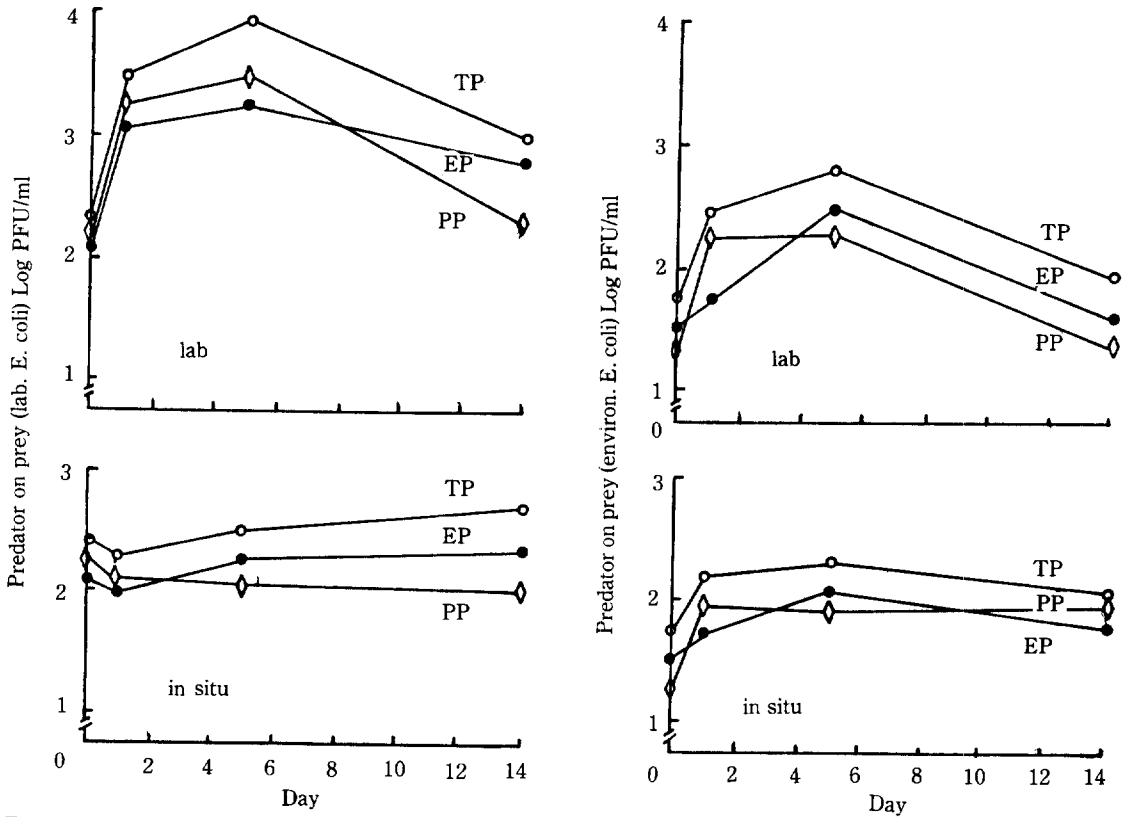


Fig. 3. Changes of predator microorganisms studied by laboratory and *in situ* methods at 20°C TP, total predator; PP, procaryotic predator and bacteriophage; EP, eucaryotic predator.

*situ* study 방법의 결과보다 약 3 logs 정도의 감소를 나타내었다. Environmental strain에서도 數的인 차이는 있었지만 두가지 實驗方法에 따른 生存率의 차이는 laboratory strain 에서의 결과와 같은 경향을 보였다. 위의 결과에서 두가지 實驗방법에 따라 *E. coli*의 生存率이 차이가 있었던 것은 주로 flask內에서의 양분의 고갈과 biotic component의 영향에 의하여 *E. coli*의 生存率이 감소된 것으로 해석할 수 있다. 滅菌하지 않은 河川水에서 2가지 實驗방법에 따른 *E. coli*의 生存率이 차이가 있었던 것은 *E. coli*를 死滅시키는 biotic component의 數와 연관이 있는 것으로 생각되었다. 그래서 두가지 實驗방법에 의한, 즉 flask와 dialysis sac內에서 14일의 實驗기간 동안 predator數의 變化를 20°C 환경에서 比較 實驗한 결과는 Fig. 3과 같다. Eucaryotic predator와 procaryotic predator를 구분하기 위하여 pore size가 다른

membrane filter를 사용하여 實驗하였다. Laboratory strain을 prey로 하였을 경우 河川原水에서 발견되는 total predator는  $2.6 \times 10^7$  PFU/ml였으며 그중 procaryotic predator가 75%였고 eucaryotic predator의 數도 25%나 되었다. Environmental strain의 경우 total predator의 數는  $1.5 \times 10^7$  PFU/ml였으며 predator 종류의 비율은 laboratory strain의 경우와 비슷한 비율이었다. Laboratory strain을 prey로 하였을 경우 laboratory study에서 procaryotic predator, eucaryotic predator, 그리고 total predator의 수는 모두 증가한 후 감소를 보였으나 *in situ* study방법에서 predator의 수는 처음과 같은 수준을 유지하면서 큰 변화가 없었다. Environmental strain을 prey로 하였을 경우에도 數의 차이는 있었지만 laboratory strain에서 보였던 결과와 같은 경향을 나타내었다.

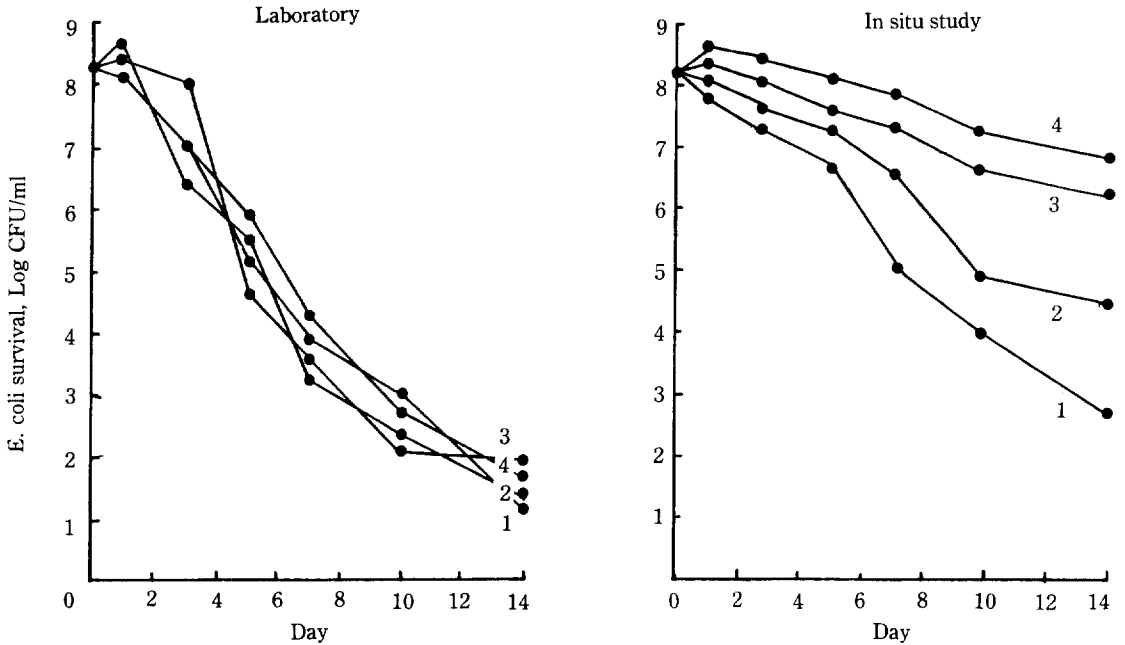


Fig. 4. Comparison of the survival of *E. coli* studied by laboratory and *in situ* methods in the river water of four study sites at 20°C. Numbers indicate the study sites.

이상의 結果에서 볼 때 두가지 실험방법에 의한 *E. coli*의 生存率의 차이는 predator수의 변화와 밀접한 관계가 있었다. 그러므로 本 실험의 結果에서 *E. coli*의 사멸은 predator에 의한 捕食作用이 주요요인이었으며, 실험방법에 따라 차이가 있었던 것은 河川水에 存在하는 predator의 수가 실험환경조건에 따라 많은 변화를 보인 것과 연관지어 해석할 수 있었다. 이는 시험세균의 生存率이 감소되는 요인이 주로 eucaryotic predator와 함께 procaryotic predator에 의한 biotic component에 기인하였다고 보고한 Mallory (1983), Oragui (1983), Anderson (1983), McCambridge (1980) 등의 실험결과와 一致하는 것이다. 두가지 실험방법에 따른 *E. coli*의 生存율의 차이가 河川의 汚染程度와 어떤 相關性이 있는가를 연구하기 위하여 無心川과 石南川의 1, 2, 3, 4번의 실험위치에서 比較 실험한 結果는 Fig. 4와 같다. Laboratory study方法으로 실험했을 경우 *E. coli*의 生存率은 汚染程度와 相關없이 어느 위치의 河川水에서나 모두 같은 비율로 감소하였으나, *in situ* study方法으로 실험했을 경우는 1, 2, 3, 4의

위치 순으로 수질 汚染도가 높아짐에 따라 *E. coli*의 生存율은 높게 나타났다. 이 結果에서 汚染程度가 相異한 河川水에서 腸內細菌의 生存率의 차이를 구분하기 위해서는 *in situ* study方法만이 가능하며 하천수에서 장내세균의 生存율에 대한 연구는 *in situ* study方法이 laboratory study方法보다 適當하다고 평가된다. 季節의 變化에 의한 하천수의 온도에 따라 두가지 실험방법으로 *E. coli*의 生存率을 比較 실험한 結果는 Fig. 5와 같다. Laboratory study와 *in situ* study方法에 의한 *E. coli*의 生存率은 4°C와 12월에서는 차이가 없었으나 20°C와 4월 그리고 30°C와 8월에서는 그 차이가 더욱 현저해졌다. *E. coli*의 사멸율은 높은 온도에서 보다 컸으며 온도의 상승에 따라 *E. coli*의 사멸율의 증가는 *in situ* study방법보다 laboratory study에서 더욱 뚜렷히 나타났다. Laboratory study방법에서 온도가 증가할 수록 *E. coli*의 死滅率이 증가된 것은 온도 상승으로 인하여 수질환경에 포함되어 있는 predator의 밀도가 증가하여 *E. coli*의 사멸효과가 증진되었다는 Anderson (1983)의 보고와, estuarine water에서

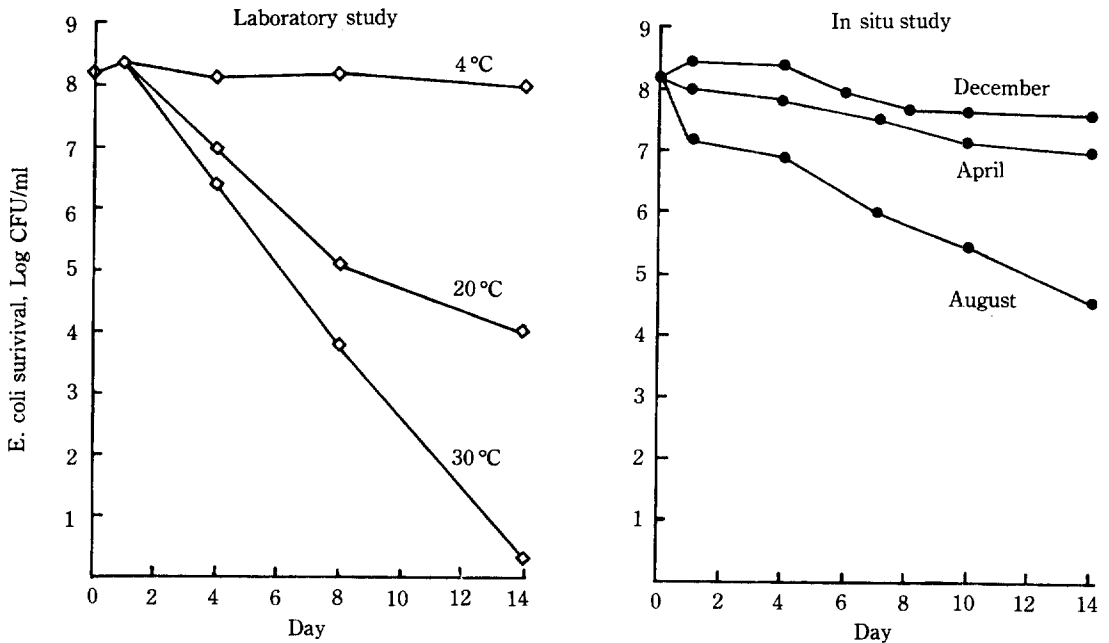


Fig. 5. Comparison of the survival of *E. coli* studied by laboratory and *in situ* methods at three different temperature.

4°C, 20°C, 35°C의 인위적인 온도 변화를 주었을 때 *E. coli*의 사멸율은 높은 온도에서 증가했었다는 Hood와 Ness (1982)의 보고, 그리고 自然水에서 5°C부터 25°C로 온도가 증가함에 따라 시험세균의 사멸율이 증가되었다는 MeFeters와 Stuart(1972)의 보고등은 본 실험의 결과와 일치하였다. 그리고 *E. coli*의 生存率과 predator數의 변화는 밀접한 연관성을 찾아 볼 수 있었던 Fig. 3의 결과에서 laboratory study 방법으로 실험했을 때 predator수가 현저히 증가했던 것과, Fig. 5에서 laboratory study의 경우 온도에 따라 많은 사멸율의 차이가 나타난 것은 flask內的 하천수에 포함되어 있는 pred-

ator가 온도의 상승에 따라 많은 수적인 증가가 있었던 것으로 연관지어 해석할 수 있었다.

이상의 결과에서 볼 때 laboratory study 방법은 自然의 水質環境에서 腸內細菌의 生存率을 연구하는 實驗方法으로 적합하지 못하다고 Wuhrman (1972)와 Zanoni (1982) 그리고 Lessard (1983) 등이 지적한 보고에서와 같이 predator, 溫度, 汚染程度등의 環境要素가 複合的으로 作用하는 河川水에서 腸內細菌의 生存率을 研究하는 方法으로는 laboratory study 방법 보다 *in situ* study 방법이 보다 合當한 것으로 사료된다.

摘 要

河川水에서 *E. coli*의 生存率을 실험실 方法과 原位置 實驗方法에 의하여 比較 研究하였으며 두 方法에 의한 *E. coli*의 生存率의 차이를 *E. coli*의 strain別, predator, 水質汚染度 및 季節에 따르는 水温의 變化등 環境要素와의 相關性을 比較 分析하였다. Laboratory study方法에 의한 *E. coli*의 生存率이 *in situ* study方法보다 현저히 낮았으며 이는 laboratory study方法의 경우 predator의 수가 급격히 증가되었던 점과 비교하여 볼 때 河川水에서 predator수의 변화가 腸內細菌의 生存率에 미치는 주요요인임을 알 수 있었다. 그러므로 河川水에서 *E. coli*의 生存率에 관한 연구 뿐 아니라 水質의 汚染程度, 水温 등이 *E. coli*의 生存率에 미치는 영향을 分析하기 위해서는 laboratory study方法 보다 *in situ* study方法이 보다 合當하다는 것이 立證되었다.

## 謝 辞

本研究는 1983年度 韩国科学財團 研究費에 의하여 遂行 되었음.

## REFERENCES

1. American Public Health Association. 1981. Standard methods for the examination of water and wastewater, 15th ed. American Public Health Association. Inc., New York.
2. Anderson, I.C., M.W. Rhodes and H.I. Kator. 1983. Seasonal variation in survival of *E. coli* exposed in *in situ* in membrane diffusion chambers containing filtered and non-filtered estuarine water. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**:1877-1883.
3. Fliermans, C.B. and R.W. Gorden. 1977. Modification of membrane diffusion chambers for deep-water studies. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**:207-210.
4. Granai III, C. and R.E. Sjogren. 1981. *In situ* and laboratory studies of bacterial survival using a microporous membrane sandwich. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**:190-195.
5. Hendricks, C.W. 1972. Enteric bacteria growth rates in river water. *Appl. Environ. Microbiol.* **24**:168-174.
6. Hendricks, C.W. and S.M. Morrison, 1967. Multiplication and growth of selective enteric bacteria in clear mountain stream water. *Water Res.* **1**:567-576.
7. Hood, M.A. and G.E. Ness. 1982. Survival of *Vibrio cholerae* and *E. coli* in estuarine waters and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**: 578-584.
8. Kaneko, T. and R.R. Colwell. 1978. The annual cycle of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. *Microbial Ecology* **4**:135-155.
9. Kim, C.K., M.H. Chung and K.S. Kim. 1984. An *in situ* study on the survival of *Escherichia coli* in gradually polluted river waters. *Kor. J. Limnol.* **17**:23-32.
10. LaLiberte, P. and D.J. Grimes. 1982. Survival of *E. coli* in lake bottom sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**:623-628.
11. Lessard, E.J. and J.M. Sieburth. 1983. Survival of natural sewage populations of enteric bacteria in diffusion and batch chambers in the marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**:950-959.
12. Mallory, L.M., C.S. Yuk, L.N. Liang and M. Alexander. 1983. Alternative prey; A mechanism for elimination of bacterial species by protozoa. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**:1073-1079.
13. McCambridge, J. and T.A. McMeekin. 1980. Relative effects of bacterial and protozoan predators on survival of *E. coli* in estuarine water samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**: 907-911.
14. McFeters, G.A. and D.G. Stuart. 1972. Survival of coliform bacteria in natural waters; Field and laboratory studies with membrane-filter chambers. *Appl. Environ. Microbiol.* **24**:805-811.
15. Oragui, J.I. and D.D. Mara. 1983. Investigation of the survival characteristics of *Rhodococcus copurophilus* and certain fecal indicator bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**: 356-360.
16. Vasconcelos, G.J. and R.G. Swartz. 1976. Survival of bacteria in seawater using a diffusion chamber apparatus *in situ*. *Appl. Environ. Microbiol.* **31**:913-920.
17. Verstraete, W. and J.P. Voets. 1976. Comparative study of *E. coli* survival in two aquatic ecosystems. *Water Res.* **10**:129-136.
18. Wuhrman, K. 1972. Stream purification, p.119-151. In R. Mitchell (ed.), *Water pollution microbiology*. Wiley-Interscience, New York.
19. Zanoni, A.E. and J.I. Fliessner. 1982. Indicator bacteria survival under laboratory condition. *J. Water Pollut. Cont. Fed.* **54**:500-503.

(Received, January 25, 1985)