

서울시 상수계통에서 병원성균 *Aeromonas* (감마-프로테오박테리아) 분포연구

이은숙* · 이목영 · 한선희 · 가종억¹

서울시 상수도연구소, ¹서울대학교 농업생명과학대학 농생명공학부

USEPA 1605 방법을 이용하여 서울시 상수도계통에서 *Aeromonas*를 조사하였다. 2002년 7월부터 2003년 12월까지 매월 한강수계 하천수와 서울시 정수장에서 공급되는 정수, 수돗물에서 시료를 채취하였다. *Aeromonas*는 선택배지(ADA-V)를 사용하여 membrane 필터 표면에 성장한 노란색 집락을 계수하여 측정하였다. 하천수에서는 *Aeromonas*가 $1.0 \times 10^0 - 9.8 \times 10^3$ CFU/ml의 농도로 검출되었으며, 정수에서는 검출되지 않았다. 수돗물에서는 141개 중 1개의 시료에서 1 CFU/500 ml의 농도로 검출되었다. 확인된 *Aeromonas*는 대부분 비병원성인 *A. salmonicida* (51%)였고, 이외에도 *A. caviae* (4.7%), *A. schubertii* (3.4%), *A. sobria* (3.8%), *A. hydrophila* (2.1%), *A. ichthiosmia* (0.4%) 등이 동정되었다. *A. salmonicida*에 대한 염소 저항성을 평가한 결과, 0.2 mg/L 염소농도에서 30초 접촉 후, 99.99% (일부)가 제거되었다. USEPA 1605 방법에서 제시한 정도관리를 수행한 결과, 정도관리 허용기준을 만족하였다. 본 연구를 통해 서울시 상수도계통에서 *Aeromonas*에 대한 안전성이 확보되었다.

Key words □ *Aeromonas*, chlorine resistance, Quality Control (QC), USEPA Method 1605

감마-프로테오박테리아에 속하는 *Aeromonas* 속은 지표수에 흔히 서식하는 세균이지만 이들 중 일부는 기회성 병원균으로써 사람에게 질병을 일으킬 수 있다. 특히 *Aeromonas hydrophila*는 exotoxin, hemolysin 등의 다양한 독소를 생산하며 인체 감염의 경우 창상감염, 장염, 폐렴, 복막염, 수막염, 패혈증 등을 유발하는 기회성 병원균으로 물 환경에 상존하며, 지표수, 지하수, 해수, 병물, 염소 소독을 하지 않은 먹는 물, 심지어 염소 소독을 하였더라도 배급수계통에서 발견된다고 보고되었다(2, 6, 8).

미국에서는 1999년에 UCMR (Unregulated Contaminant Monitoring Regulation, 이하 UCMR) List 2에 *Aeromonas hydrophila*를 포함하였으며, WHO (World Health Organization)에서도 배급수계통과 관련하여 감시를 권장하고 있고, 네델란드는 정수와 배급수계에서 *Aeromonas* 제한 농도를 설정하여 감시를 강화하고 있다(4).

USEPA 1605 방법은 막여과법에 기초해 처리수에서 *Aeromonas*를 정량분석하기 위한 방법이다. Ampicillin과 vancomycin을 첨가해 다른 방해균의 성장을 제한하는 선택배지를 사용하며, *Aeromonas*에 의한 dextrin 발효로 산이 생성되어 형성된 노란색 집락으로 *Aeromonas*수를 추정 계수하고, 이어 추정 집락에 대해 oxidase test에 의한 cytochrome c의 존재와 trehalose 발효능 및 indole 생성능을 확인하여 *Aeromonas*로 확정짓게 된다(12). 이 방법은 미국의 UCMR에 따라 실시되는 *Aeromonas* 조사에서 공식적인 검출방법으로 사용되고 있다.

*Aeromonas*에 대한 관심과 보건학적 중요성 증대와 함께, 외국에서는 이들에 대한 연구가 활발히 진행되고 있지만 우리나라에서는 먹는 물에서의 *Aeromonas*에 대한 연구가 미흡한 상태이다. 그러므로 본 연구는 상수도계통에서 *Aeromonas*의 분포와 관련 요인 등을 조사하여 기초 자료를 마련하고, 이들에 대한 먹는 물의 안전성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

시료채취

서울시 8개 정수장에서 처리된 정수(강북, 광암, 암사, 구의, 뚝도, 보광, 영등포, 신월), 각 정수장에서 정수처리 후 배급수관을 거쳐 공급되는 수돗물 8점, 서울시 6개 취수장(강북, 광암, 암사, 구의, 자양, 풍납)에서 채취한 한강수계 하천수를 2002년 9월부터 2003년 12월까지 매월 채취하였다. 2003년 10월부터 12월까지는 신월정수장을 제외한 7지점의 정수, 수돗물을 매월 채취하여 최종적으로 하천수 96점, 정수 141점, 수돗물 141점을 분석하였다(Table 1). 시료 채취 후, 1-5°C로 냉장 보관하여 실험실로 운반한 후, 24시간 이내에 분석하였다.

물리·화학적 환경요인

수온, 탁도, pH는 먹는물수질공정시험법(환경부, 2002)과 수질오염공정시험방법(환경부, 2000)에 따라서 분석하였다. 잔류염소농도는 휴대용 잔류염소계(Hach DPD Colorimeter, USA)를 사용하여 DPD (N-N-dimethyl paraphenylene diamine)법으로 측정하였다.

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-2-2049-1087, Fax: 82-2-2049-1013
E-mail: leuns@freechal.com

Table 1. Sampling site in this study

Intakes	Water treatment plant (WTP)	Tap water
Gangbuk	Gangbuk	
Gwangam	Gwangam	
Amsa	Amsa	
Guui	Guui	terminal site in water system of each 8 water treatment plant
Jayang	Ttukdo	
	Bogwang	
	Youngdeungpo	
Pungnap	Sinwoul	

세균학적 요인

일반세균(Heterotrophic Plate Count bacteria, 이하 HPC)과 총 대장균군(Total Coliform, 이하 TC)은 먹는물수질공정시험법(환경부, 2002)과 수질오염공정시험방법(환경부, 2000)에 따라서 분석하였다.

Aeromonas 검사 방법

정수와 수돗물 시료 500 ml을 여과막(공극크기 0.45 μm , 직경 47 mm, Millipore, USA)으로 여과하고 ADA-V (Ampicillin-Dextrin Agar with Vancomycin, Tec Pac-Biolife Italiana 401019, Italy) 배지에 여과지를 올려놓고 35 \pm 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 에서 24 \pm 2시간 배양한 후, 노란색 집락을 *Aeromonas*로 추정 계수하였다. 이들 추정 집락에 대해 cytochrome c (oxidase test)의 존재와 trehalose의 발효능, indole 생산능을 실험하여 모두 양성인 경우에 *Aeromonas*로 확정 계수하였다.

이 방법은 처리수 분석에 사용하도록 고안된 것으로 현탁성 입자가 많이 함유된 하천수는 매일 수질에 따라 희석하여 적정 부피를 여과하고, 정수, 수돗물과 같은 방법으로 분석하였다.

Aeromonas 종(species) 확인

시료에서 분리된 *Aeromonas* 확정 집락은 균체 지방산을 추출하여 동정하는 미생물분류동정장치(Microbial Identification System, MIDI)로 분석하였다. 시료를 분석하기 전에 Calibration mixture를 이용하여 분석 초기에 2회, 매 10개의 시료마다 1회 분석하여 GC기기 상태에 대한 Calibration을 실시하여 0.99 이상의 Similarity Index를 확인하였다.

상관분석

수온, 탁도, pH의 물리·화학적 환경요인과 일반세균(HPC), 총 대장균군(TC)의 수질지표세균과 *Aeromonas*와의 상관성을 조사하기 위해 SAS ver.8.0.1 (SAS Institute Inc., USA)을 이용하여 스피어만(Spearman) 순위상관분석을 하였다.

염소 저항성 평가

하천수에서 분리된 *Aeromonas*를 순수 배양하여 약 10⁵ CFU/

ml 농도로 준비하고 pH 7.0, 수온 20 $^{\circ}\text{C}$ 조건에서 0.1 mg/L, 0.2 mg/L, 0.4 mg/L의 농도가 되도록 조제한 염소수를 넣고 교반하면서 30초, 1분, 2분, 3분, 5분 동안 접촉시켰다. 각 접촉시간별로 시료를 취하여 3% 티오황산나트륨($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, Sigma 7143, USA)용액을 주입하여 미리 멸균 처리한 시험관으로 옮긴 후, 주입평판법에 따라 표준한천배지(Difco 247140, USA)에 접종하였다. 35 \pm 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 에서 48 \pm 2시간 동안 배양하여 *Aeromonas* 잔존량을 측정하고, 퍼센트 제거율을 계산하였다.

정도관리

초기수행평가(Initial demonstration of capability, IDC)는 현장 시료 분석 전에 분석방법에 따라서 실험을 수행할 수 있는지를 증명하기 위한 것으로 *Aeromonas*의 적절한 희석액을 정제수 4 점(이하 A, B, C, D)에 접종하여 분석방법에 따라서 실험하여 그 결과를 다음과 같이 상대표준편차(relative standard deviation, 이하 RSD)로 계산하였다.

$$RSD = \frac{X_{S.D.}}{X_{mean}} \times 100$$

X_{SD} : A, B, C, D 시료에서 확인된 *Aeromonas* 수의 표준편차 (standard deviation)

X_{mean} : A, B, C, D 시료에서 확인된 *Aeromonas* 평균 수

교차오염의 가능성을 확인하기 위하여 각 여과 과정의 처음과 끝에 미접종 정제수 시료(Dilution/rinse water blanks)를 분석 방법에 따라서 실험하였으며, 분석에 사용되는 모든 배지는 35 \pm 0.5 $^{\circ}\text{C}$, 24 \pm 2시간 동안 배양하고 성장을 관찰하면서 배지의 멸균을 점검하였다.

또한, *Aeromonas*의 적절한 희석액을 접종한 현장 시료 2점(이하 A, B)과 미접종 현장 시료 1점에 대해서 실험하는 접종실험/복수현장시료 접종실험(Matrix spike/Matrix spike duplicate, MS/MSD)시료를 분석하였고 그 결과를 다음과 같이 상대퍼센트차이(relative percent difference, 이하 RPD)로 계산하였다.

$$RPD = \frac{|X_A - X_B|}{X_{mean}} \times 100$$

X_A : A 시료에서 확인된 *Aeromonas* 수 (미접종 현장 시료에서 관찰된 *Aeromonas* 수를 제외)

X_B : B 시료에서 확인된 *Aeromonas* 수 (미접종 현장 시료에서 관찰된 *Aeromonas* 수를 제외)

X_{mean} : A와 B 시료에서 확인된 *Aeromonas* 평균 수

분석 전 과정이 잘 관리되고 있는지를 확인하기 위해서 중도 수행평가(Ongoing demonstration of capability, ODC)를 수행하였다. 연구 진행 중에 *Aeromonas*의 적절한 희석액을 정제수에 접종한 positive control (PC)과 positive control duplicate (PCD) 실험을 하고 결과를 RPD로 계산하였다.

$$RPD = \frac{|X_{PC} - X_{PCD}|}{X_{mean}} \times 100$$

X_{PC} : PC 시료에서 확인된 *Aeromonas* 수

X_{PCD} : PCD 시료에서 확인된 *Aeromonas* 수

X_{mean} : PC와 PCD 시료에서 확인된 *Aeromonas* 평균 수

IDC 분석은 초기수행평가로 실험 전 1번 수행되었고 MS/MSD 분석은 처음 현장시료 분석 시에 분석하였고 이후에는 현장시료 5%를 분석하고 ODC 분석도 20개의 현장시료마다 분석하게 되어 있는데 한번 분석하는 시료수가 적어 매 실험마다 MS/MSD, ODC 분석을 수행하였다. 양성 대조군으로 *Aeromonas hydrophila* (ATCC 7966)를 사용하였다.

결 과

정수 및 수돗물

서울시 정수 141점, 수돗물 141점을 분석한 결과, 정수는 pH 7.1-7.7, 탁도 0.06-0.08 NTU (Nephelometric turbidity units), 잔류염소 0.82-0.90 mg/L였고 수돗물은 pH 7.1-7.3, 탁도 0.15-0.20 NTU, 잔류염소 0.33-0.52 mg/L였다. 일반세균과 총대장균군은 정수에서 모두 불검출되었고 수돗물에서는 일반세균이 0-12 CFU/ml 범위로 검출되었고 총대장균군은 불검출되었다. *Aeromonas*는 2002년 12월에 수돗물에서 1 CFU/500 ml로 검출된 1건 이외에는 모두 불검출 되었다.

하천수

한강수계에서 채집한 96점의 하천수는 수온 0.3-24.2°C, pH 7.4-9.2, 탁도 1.6-20.0 NTU의 범위를 나타내었다. 총대장균군은 $1.0 \times 10^0 - 1.7 \times 10^5$ CFU/ml, 일반세균은 $1.0 \times 10^0 - 8.3 \times 10^4$ CFU/ml, *Aeromonas*는 $1.0 \times 10^0 - 9.8 \times 10^3$ CFU/ml의 농도로 검출되었다. *Aeromonas*의 월 평균 분포는 7월에 2.9×10^3 CFU/ml로 가장 높게 검출되었으며 2월에 6.7×10^1 CFU/ml로 가장 낮은 값을 나타내었다.

스피어만 순위상관분석 결과, *Aeromonas*는 물리화학적 환경요인과의 상관성은 보이지 않았으나, 총대장균군(TC), 일반세균(HPC)과 통계적으로 유의한 양의 상관성을 나타내었다(TC: $r = 0.776, p < 0.0001$ HPC: $r = 0.855, p < 0.0001$) (Table 2).

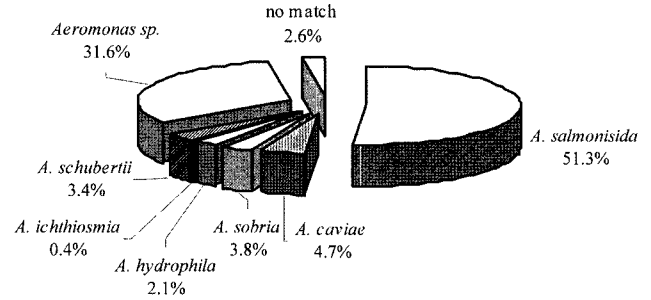


Fig. 1. Percent composition of *Aeromonas* isolated in Han river.

Aeromonas 종(species) 확인 결과

96점의 하천수에서 분리된 234개의 *Aeromonas* 확정집락을 MIDI로 동정한 결과, 비병원성인 *A. salmonicida*가 51.3%로 대부분을 차지하였고 *A. caviae* (4.7%), *A. schubertii* (3.4%), *A. sobria* (3.8%), *A. hydrophila* (2.1%), *A. ichthiosmia* (0.4%)도 동정되었다. Similarity Index값이 0.5 미만인 경우는 신뢰성이 없는 것으로 보고 동정하지 못한 것(no match)으로 표기하였고 각 종 사이의 Similarity Index값이 0.1 미만인 경우는 *A. sp.*로 표기하였다(Fig. 1). 수돗물에서 분리된 1개의 집락을 동정한 결과, 하천수에서 우점종으로 나타난 *A. salmonicida*로 확인되었다.

염소 저항성 평가 결과

하천수에서 분리된 *Aeromonas*의 대부분을 차지하고 있는 *A. salmonicida*에 대한 염소 저항성을 평가한 결과, 0.2 mg/L(접촉 시간 30초) 농도에서 99.99%가 제거되었고 0.4 mg/L 농도에서 99.9999% 이상으로 거의 모두 제거되었다.

정도관리 결과

미접종 정제수 시료에서는 어떠한 세균도 관찰되지 않았다. 초기수행평가는 RSD=19%, 현장접종시료는 RPD=3-34%, 중도수행평가는 RPD=1-33%로 정도관리 허용기준을 만족하였다(Table 3).

고 찰

서울시 정수, 수돗물을 분석한 결과, 수돗물에서 *A. salmonicida* 1점이 검출되었다. 스웨덴의 정수, 수돗물을 분석한 결과, 정수 0-20 CFU/100 ml, 수돗물 0-220 CFU/100 ml의 범

Table 2. Spearman's rank correlation coefficient between various parameters and concentration of *Aeromonas* in Han river

	Temperature	pH	Turbidity	TC	HPC
<i>r</i> ^a	0.149	-0.092	0.058	0.776	0.855
<i>p</i> ^b	0.142	0.367	0.569	<0.0001	<0.0001
<i>n</i> ^c	98	98	98	96	96

^a*r*, correlation coefficient

^b*p*, p-value

^c*n*, observed number

Table 3. QC acceptable criteria for method 1605 and QC result

QC specification	Maximum acceptable precision	QC result
IDC	RSD=22%	RSD=19%
MS/MSD	RPD=48%	RPD=3-34%
ODC	RPD=37%	RPD=1-33%

위로 *Aeromonas*가 발견되었고 검출된 *Aeromonas* 중 인간에게 감염을 일으키는 종으로 알려진 *A. hydrophila*가 53%를 차지하였다는 보고와 호주의 정수에서 0-99 CFU/100 ml, 수돗물에서는 0-150 CFU/100 ml 이상으로 *Aeromonas*가 발견되었다는 외국의 연구결과와 비교하면, 상당히 낮은 수준이었다(2, 8).

수돗물에서 분리된 *Aeromonas*가 정수에서는 검출이 되지 않았고 염소저항성 평가 결과, 염소에 대한 민감성이 크고 시료 채취 시 충분한 잔류염소(0.38 mg/L)를 유지한 것으로 보아 정수처리상의 문제라기 보다는 실험시 오염 또는 배급수관내 생물막(biofilm)의 지역화 된 성장에 의한 결과로 추정된다. 그러나 이번 연구결과로 배급수계통에서의 *Aeromonas* 존재에 대한 최종적인 판단을 내리기에는 한계가 있으며, 향후 보다 정밀하게 조사할 필요가 있다고 판단된다. 또한 하천수에서 분리된 *Aeromonas*의 molecular typing 결과와의 비교를 통해서 수돗물에서의 *Aeromonas* 존재에 대한 가능한 이유를 설명할 수 있도록 해야 할 것이다.

참고문헌

- Biscardi, D., A. Castaldo, O. Gualillo, and R. de Fusco. 2002. The occurrence of cytotoxic *Aeromonas hydrophila* strains in Italian mineral and thermal waters. *Sci. Total Environ.* 292, 255-263.
- Burke, V., J. Robinson, M. Gracey, M. Peterson, and K. Partridge. 1984. Isolation of *Aeromonas hydrophila* from metropolitan water supply: seasonal correlation with clinical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 361-366.
- David, A.C. and P. Adcock. 1989. Isolation of *Aeromonas* spp. from water by using anaerobic incubation. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 2138-2140.
- Gavriel, A.A., J.P.B. Landre, and A.J. Lamb. 1998. Incidence of mesophilic *Aeromonas* within a public drinking water supply in north-east Scotland. *J. Appl. Microbiol.* 84, 383-392.
- Havelaar, A.H., M. During, and J.F.M. Versteegh. 1987. Ampicillin-dextrin agar for the enumeration of *Aeromonas* species by membrane filtration. *J. Appl. Bacteriol.* 62, 279-287.
- Holmes, P. and L.M. Nicolls. 1995. *Aeromonads* in drinking water supplies: their occurrence and significance. *J. Chart. Inst. Water Environ. Manage.* 9, 464-469.
- Ivanova, E.P., N.V. Zhukova, N.M. Gorshkova, and E.L. Chaikina. 2001. Characterization of *Aeromonas* and *Vibrio* species isolated from a drinking water reservoir. *J. Appl. Microbiol.* 90, 919-927.
- Kuhn, I., G. Allestam, G. Huys, P. Janssen, K. Kersters, K. Krovacek, and T. Stenstrom. 1997. Diversity, persistence, and virulence of *Aeromonas* strains isolated from drinking water distribution system in Sweden. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2708-2715.
- Kuhn, I., M.J. Albert, M. Ansaruzzaman, N.A. Bhuiyan, S.A. Alabi, M.S. Islam, P.K. Neogi, G. Huys, P. Janssen, K. Kersters, and R. Mollby. 1997. Characterization of *Aeromonas* spp. isolates from humans with diarrhea, from health controls, and from surface water in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 35, 369-373.
- Massa, S., C. Altieri, and A. D'Angela. 2001. The occurrence of *Aeromonas* spp. in natural mineral water and well water. *Int. J. Food Microbiol.* 63, 169-173.
- Sisti, M., A. Albano, and G. Brandi. 1998. Bacterial effect of chlorine on motile *Aeromonas* spp. in drinking water supplies and influence of temperature on disinfection efficacy. *Lett. Appl. Microbiol.* 26, 347-351.
- USEPA. 2001. Method 1605: *Aeromonas* in finished water by membrane filtration using ampicillin-dextrin agar with vancomycin (ADA-V).

(Received January 15, 2007/Accepted June 11, 2007)

ABSTRACT: Detection and Distribution of the Pathogenic Bioagent *Aeromonas* (Gamma-Proteobacteria) in Water Supplies of Seoul

Eun-Sook Lee*, Mok-Young Lee, Sun-Hee Han, and Jong-Ok Ka¹ (Seoul Waterworks Research Institute, Seoul 130-1, Republic of Korea, ¹Department of Agricultural Biotechnology, College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Seoul 151-921, Republic of Korea)

The detection and distribution of *Aeromonas* in water supplies were investigated by using the USEPA Method 1605. Water samples were collected from the Han River, finished waters and tap waters supplied from Water Treatment Plants in Seoul monthly from July 2002 to December 2003. *Aeromonas* species in each water sample were quantified based on the development of yellow colonies on the surface of membrane filter using a selective medium (Ampicillin-Dextrin Agar with Vancomycin). The Quality Control (QC) for this study met the acceptance criteria of Method 1605. The concentrations of *Aeromonas* species in surface water samples ranged from

1.0×10^0 to 9.8×10^3 CFU/ml. *Aeromonas* species were found only in one tap water sample with concentration of 1 CFU/500 ml. No *Aeromonas* species were found in any finished water samples. *Aeromonas* species detected here were identified as *A. salmonicida* (51%), *A. caviae* (4.7%), *A. schuberti* (3.4%), *A. sobria* (3.8%), *A. hydrophila* (2.1%), and *A. ichthiosmia* (0.4%). *A. salmonicida* was the dominant species, which is of no significance to human health. Chlorine resistance of *A. salmonicida* was evaluated and as a result, 99.99% of *A. salmonicida* decreased after 30 seconds exposure at residual free chlorine 0.2 mg/L. These suggest that the waters supplied in Seoul may be safe against the pathogenic agent *Aeromonas*.