

## 상수원수 및 정수처리공정별 가시아메바 분포특성에 관한 연구

정은영 · 정미은 · 박홍기 · 정종문 · 노재순 · 유평중

부산광역시 상수도사업본부 수질연구소

(2008년 6월 20일 접수; 2008년 7월 30일 수정; 2008년 9월 8일 채택)

### Distribution of *Acanthamoeba* spp. in Raw Water and Water Treatment Process

Eun-Young Jung, Mi-Eun Jung, Hong-Gi Park, Jong-Moon Jung,  
Jae-Sun Rho and Pyung-Jong Ryu

Water Quality Institute, Busan Water Authority, Gimhae 621-813, Korea

(Manuscript received 20 June, 2008; revised 30 July, 2008; accepted 8 September, 2008)

#### Abstract

The free-living amoeba and *Acanthamoeba* sp. are widely distributed in fresh water, soil, air and dust in the world. We studied distribution of amoeba from low Nakdong River(Mulgum and Maeri) and removal efficiency in water treatment process of Busan metropolitan city. During this investigation, water quality showed pH 7.4~9.6( $\pm 1.1$ ), water temperature 2.0~29.0( $\pm 17$ ) $^{\circ}$ C, turbidity 4.8~27.4( $\pm 11.0$ ) NTU, chlorophyll-a 10.3~109.0( $\pm 44.3$ ) mg/m<sup>3</sup>, BOD 1.7~4.9( $\pm 2.6$ ) mg/L, COD 3.1~6.9( $\pm 5.0$ ) mg/L and total coliform 17~920( $\pm 200.5$ ) MPN/100 mL. The free-living amoeba were detected highly than *Acanthamoeba* sp., 11 out of 22 in raw water samples were positive (50%) for *Acanthamoeba* sp. from February 2005 to December 2005. The seasonal characteristics of free-living amoeba and *Acanthamoeba* sp. in raw water were mainly distributed through the spring to the early fall. When free-living amoeba and *Acanthamoeba* sp. were passed through the water treatment of pilot-plant, approximately 80% was sure to be removed through pre-ozonation, sedimentation, sand filtration. 100% was removed after post-ozonation process. All of the isolated amoebas from Nakdong River were *Acanthamoeba* sp. AC311 18S ribosomal RNA gene with 98% nucleotide sequence homology.

**Key Words** : Free-living amoeba, *Acanthamoeba*, Water treatment process, Low Nakdong River

#### 1. 서론

수인성 미생물은 주로 분변-구강(fecal-oral route) 경로를 통해 인체로 유입되어지며, 상수계통에 오

염되었을 경우에는 폭발적인 양상으로 질병을 발생 시킨다<sup>1,2)</sup>. 이들 미생물 중 여러 나라에서 대규모적 감염 사례를 발생시킨 바 있는 원생동물은 염소 소독에 대하여 극히 강한 내성을 갖고 있어, 표준정수 처리의 효과에 의문이 제기되고 있는 실정이다<sup>3,4)</sup>. 크기가 아주 작은 바이러스는 여과법에 의하여 거의 처리가 되지 않고, 응집침전을 거친 여과나 소독

과정에서 주로 제거되는 반면, 원생동물은 포낭형(cyst) 혹은 난포낭(oocyst) 형태를 가지므로, 소독보다는 여과에 의하여 더 효과적으로 제거된다<sup>3,5</sup>. 인체의 질병과 관련된 원생동물은 기생성으로서, 수처리에 내성을 지닌 (우)시스트((oo)cyst)라는 형태로 수계에 존재하므로, 수처리에 특별한 주의가 요구된다<sup>1,3</sup>.

자유생활아메바(Free-Living Amoeba)는 물, 토양 등 환경 중에서 고루 분포하며, 자유생활을 하는 아메바를 지칭하는 것으로, *Acanthamoeba* sp., *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris*, *Sappinia diploidea* 등이 속한다<sup>5,6</sup>. 20~60  $\mu\text{m}$  크기의 영양형 및 5~20  $\mu\text{m}$  크기의 포낭형의 상태로 존재하며, 인체와의 직접적인 접촉에 의해 감염되어 질병을 일으킬 수 있다. 다른 기생충에 비해 감염률이 낮으나, 기회적으로 감염되었을 경우 발병률이 높게 나타나며, 감염될 경우 주로 호흡기, 중추신경계 등에 이상을 초래할 수 있다고 보고되고 있다<sup>7</sup>. 이들 아메바들 중 가시아메바(*Acanthamoeba* sp.)는 12~45  $\mu\text{m}$  크기의 영양형 및 8~25  $\mu\text{m}$  크기의 포자상태로 존재하며, 사람의 폐, 생식기, 피부 등에 침입하여 무증상으로 잠복하고 있다가, 면역능력이 저하 되었을 경우 아메바성 육아종 뇌염을 일으킬 수 있다. 이들은 건강한 사람에게도 아메바성 각막염 등을 일으킬 수 있으며, 면역결핍증(AIDS)환자에게 감염되었을 경우 치명적인 결과를 초래할 수 있음이 보고되었다<sup>8~10</sup>.

가시아메바의 분포 조사에 대한 외국조사 결과를 살펴보면, 2004년 영국의 경우 아메바성 각막염환자의 가정수도전을 대상으로 조사한 결과 가정수도전의 89%에서 자유생활아메바가 검출되었고, 26.9%에서 가시아메바가 검출되었음이 보고되었다<sup>11,12</sup>. 2005년 스페인에서는 약 59.5%의 수도전에서 가시아메바가 검출되어 콘택트렌즈 사용자에게 수도물 사용에 대해 경고하였다<sup>13</sup>. 그리고, 국내에서도 콘택트렌즈 보존용기에서 11~16%의 가시아메바가 검출됨이 여러 차례 보고되었는데<sup>13,14</sup>, 이는 가시아메바가 오염되어진 수도물과 식염수로 렌즈를 저장하고 행군 것이 오염의 주 원인으로 밝혀졌다<sup>10</sup>. 따라서 본 연구는 부산시 상수원수 및 정수공정별 처리수에 존재할 것으로 예상되는 자유생활아메바 및 가시아메바의 분포실태를 조사하여 기초 자료를 확보하고, 생산되는 수도물에 대한 안정성을 확인하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 조사지점 및 기간

상수원수에 대한 조사는 물금 및 매리 지점을, 정수공정별 조사는 3개 정수장(덕산, 화명, 명장)에서 전염소, 전오존, 침전수, 여과수, 후오존, BAC 여과수, 정수를 대상으로, 2005년 2월부터 2005년 12월까지 월 1회 실시하였다(Fig. 1).

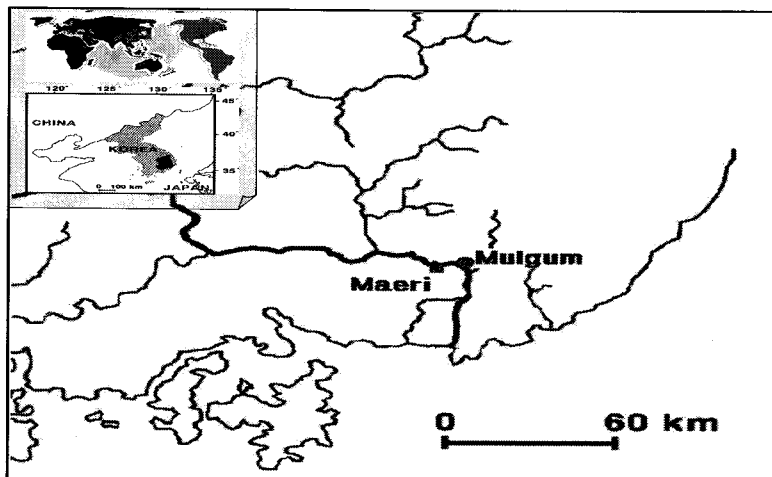


Fig. 1. Sampling sites for surveying of *Acanthamoeba* sp. in Nakdong River(No. 1 site: Maeri, No. 2 site: Mulgum).

## 2.2. 이화학 및 미생물학적 수질 조사

수온, pH는 각각 온도계, pH meter(Orion, Model 260)로 현장에서 즉시 측정하였으며, 생물학적 산소 요구량(BOD)은 시료를 5일 동안 20°C로 저장하여 Winkler 변법에 따라 측정하였다<sup>15)</sup>. 화학적 산소 요구량(COD)은 과망간산법에 따라 측정하였으며, 클로로필(Chlorophyll)-a 농도는 500 mL의 시료를 0.45 µm filter로 여과시킨 후 90% acetone 용액에서 24시간 chlorophyll을 추출하여 측정하였다<sup>15)</sup>. 추출된 용액을 4,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 취해 각각 750, 664, 647, 630 nm에서의 흡광도를 측정하여 trichromatic method의 계산식에 따라 측정하였다<sup>15)</sup>.

총대장균군수(Total coliforms)는 적당량의 시료를 멸균된 회석수로 적당히 희석하여 0.45 µm filter로 여과시킨 후 m-Endo LES 한천배지에 옮겨 35°C 배양기에서 1~2일 배양한 후 붉은색의 금속성 광택을 띄는 집락을 측정하였다<sup>16)</sup>.

## 2.3. 아메바 배양

원수 100 mL과 정수공정별 시료 각 1 L씩을 5.0 µm 구경의 polycarbonate filter를 이용하여 흡착여과를 실시하였다. 여과지는 열처리된 *E. coli*가 깔려진 고체배지에 뒤집어 올린 다음, 25°C 배양기에서 7일간 배양하였다.

## 2.4. 아메바 분리 및 동정

현미경 관찰을 통하여 시료로부터 유래된 아메바를 분리하여 새로운 고체배지에서 5일간 재배양하였다. 배양 후, 영양형의 아메바가 많이 분포하는 부분을 절단하여 0.1 M HCl을 처리하였다. 25°C 배양기에서 24시간 반응시킨 후 2000 rpm, 5분간 원심분리하여 HCl을 제거하고 PBS로 3회 세척하여 PYG(Malt extract 0.1 g, Yeast extract 0.1 g, Bacto agar 10.0 g)배지에서 7일간 배양하였다. 영양형 상태의 아메바를 현미경으로 관찰 하며, 크기 및 모양의 형태학적인 특징을 고려하여, 자유생활아메바 및 가시아메바를 동정하였다.

## 2.5. 분자생물학적 동정

### 2.5.1. DNA의 추출 및 정제

동정된 아메바의 DNA를 Quigen kit(QIAamp DNA mini kit)를 이용하여 추출하였다. 먼저 배양액

시료 1 mL를 ATL Buffer 180 µl와 Proteinase K(20 mg/mL) 20 µl를 넣고 잘 섞은 후 56°C에서 1시간 이상 반응시켰다. 반응 후 각 튜브에 200 µl AL buffer를 첨가하여 15초간 조심스럽게 vortexing하고 70°C에서 10분간 반응시켰다. 반응 후 200 µl ethanol(100%)을 넣고 15초 정도 inverting하여 QIAamp spin column에 넣어 8,000 rpm, 5분간 원심분리 하였다. 여기에 500 µl AW 1을 넣고 같은 조건으로 원심분리 한 후 다시 500 µl AW 2를 첨가하여 14,000 rpm, 3분간 원심분리하여 세척하였다. 여기에 AE buffer 200 µl를 넣어 5분간 반응시킨 후 8000 rpm, 1분간 원심분리한 후 이를 PCR의 주형으로 사용하였다.

### 2.5.2. PCR(Polymerase Chain Reaction)

가시아메바 검출을 위해 *Acanthamoeba* sp.의 18S ribosomal RNA 유전자부위의 증폭이 가능한 프라이머를 제작(FLA-F5'-CGCGGTAATCCAGCTCCAATAGC-3', FLA-R5'CAGGTTAAGGTCCTCGTTTCGTTAAC3')하였다. PCR 반응액은 총 100 µl [DNA template, 10 × PCR buffer, 각각의 -F, -R primer(50 pmol/µl), 5 U/µl Taq polymerase(Takara사), H<sub>2</sub>O]가 되도록 하여 PCR 반응을 수행하였다. PCR은 94°C에서 1분, 52°C에서 1분, 72°C에서 1분 동안 35번을 반복시켜 PCR 산물을 얻었다. PCR 반응 결과 생겨난 산물을 1.5% agarose gel에 전기영동 하여 각각의 PCR 산물의 형성 유무를 확인하였다.

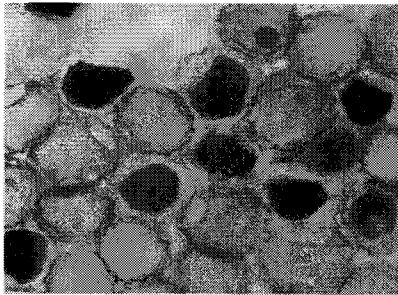
### 2.5.3. 염기서열 분석

위에서 얻은 시료 및 표준균주의 PCR 산물을 pGEM-T Vector(Takara)에 cloning하고 plasmid DNA를 추출하여 DNA autosequencer ABI PRISM 3700 DNA Analyzer를 이용하여 염기서열을 결정하였다. 염기서열의 분석은 GenBank를 이용하여 기존에 알려진 가시아메바의 염기서열과 그 유사성을 비교하였다.

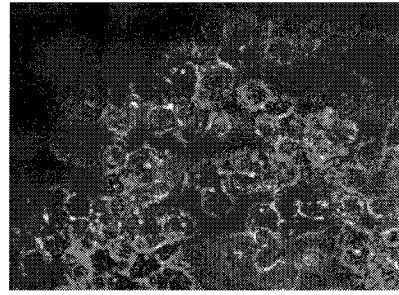
## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 수질변화

조사 기간 동안 수질은 pH 7.4~9.6(±1.1), 수온20~29.0(±17)°C, 탁도 4.8~27.4(±11.0) NTU, chl-a 10.3~109.0(±44.3) mg/m<sup>3</sup>, BOD 1.7~4.9(±2.6) mg/L, COD 3.1~6.9(±5.0) mg/L, 총대장균군 17~920



Acanthamoeba cyst



Acanthamoeba trophozoite(Maeri)

Fig. 2. Morphological identification of *Acanthamoeba* by microscope.

( $\pm 200.5$ ) MPN/100 mL 범위로 나타나 같은 지점을 대상으로 2001년과 2002년에 걸쳐 조사된 농도에 비해 전년도에 비해 양호한 것으로 나타났다. 이는 낙동강 상류지역의 지속적인 환경기초시설 확충과 빈번한 강수량에 의해 수질이 향상된 결과로 보여진다.

### 3.2. 아메바 분리

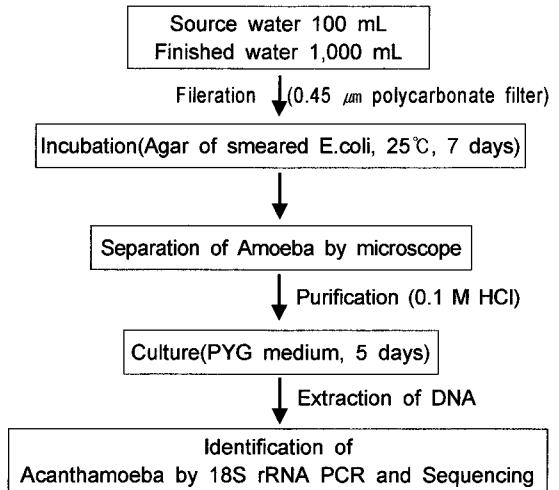
상수원인 물금 및 매리 2곳을 지정하여 자유생활 아메바와 가시아메바의 분포를 조사하였다(Fig. 1). 조사시료의 양은 원수중의 총대장균군 및 분원성 대장균군의 검사기준인 100 mL의 시료를 대상으로 농축, 배양하였다(Fig. 2). 배양된 시료는 현미경을 통해 분리, 동정하였으며, 가시아메바로 분류된 시료는 DNA를 추출하여 증폭시켜, 염기서열 분석으로 최종 확인하였다(Fig. 3).

### 3.3. 원수의 아메바 분포 실태

조사 결과, 물금 및 매리지점의 모든 시료에서 자유생활아메바가 100% 검출되었으며, 가시아메바는 각각 54.5%(6/11회) 45.5%(5/11회) 검출되었다(Table 1). 수온이 높아지는 봄부터 가을까지 고루 검출되었으며 겨울철에는 검출되지 않았다.

### 3.4. 정수공정별 아메바 분포 실태

2005년 2월부터 12월까지 부산시의 덕산, 화명, 명장정수장의 정수공정별 시료를 대상으로 자유생활아메바와 가시아메바의 분포를 조사하였다. 정수를 제외한 정수공정별 단계에서 자유생활아메바의 경우 평균 각각 68.2%, 62.1%, 46.9%, 그리고 가시아메바는 27.3%, 27.3%, 16.7% 순으로 검출되었다.

Fig. 3. Schematic view of *Acanthamoeba* spp. detection.Table 1. Prevalence of *Acanthamoeba* and FLA contamination in Nakdong River

Step	Sampling Site	Mulgum	Maeri
		Free-Living Amoeba	11/11
<i>Acanthamoeba</i> sp.		6/11	5/11

덕산, 화명정수장이 명장 정수장에 비해 가시아메바의 검출률이 높게 나타났으나, 3개 정수장 모두 후오존 공정을 거치면서 검출률이 낮아짐을 알 수 있었다. 정수공정별 처리수를 살펴보면, 전염소와 전오존 공정에서 자유생활아메바의 분포비율이 평균 80% 이상 관찰 되었으며, 가시아메바의 경우에도 약 30%로 나타났다. 침전, 여과 공정을 거치면서

**Table 2.** Contamination of FLA contamination and *Acanthamoeba* in water samples of 3 water treatment plants

Step	Sampling Site	Duksan	Hwamyung	Myoungjang
Pre-chlorination		91%(54.5%)	81.8%(63.6%)	81.8%(18.2%)
Pre-ozone		81.8%(27.3%)	91%(36.4%)	36.4%(36.4%)
Sedimentation		72.7%(36.4%)	72.7%(54.5%)	54.5%(27.3%)
Sand filter		72.7%(27.3%)	72.7%(9.1%)	45.5%(9.1%)
Post-ozone		54.5%(18.2%)	18.2%(0%)	36.4%(9.1%)
BAC		36.4%(0%)	36.4%(0%)	27.3%(0%)
Finished water		0%(0%)	0%(0%)	0%(0%)

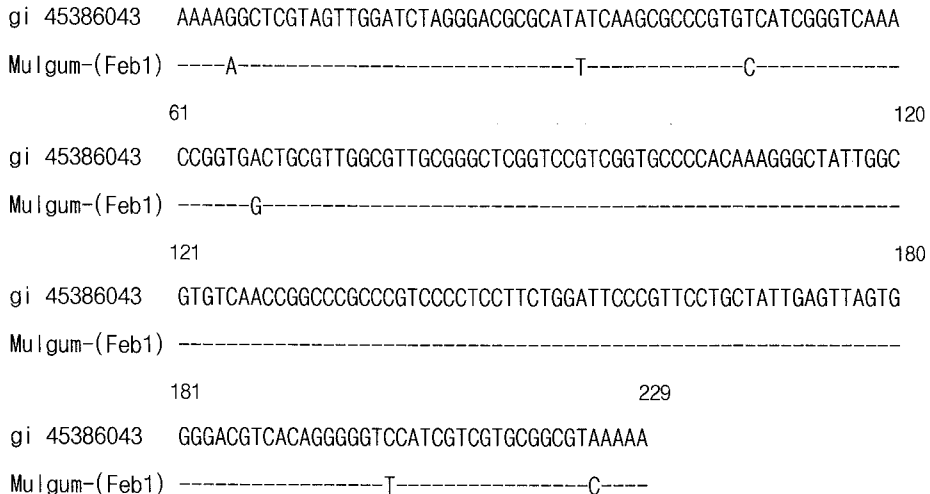
가시아메바는 50% 이상 제거 되어졌으며, BAC 공정 이후의 시료에서는 검출되지 않았다(Table 2). BAC 여과수에서 약 30%의 자유생활아메바가 검출 되었으나, 최종 처리수인 정수에서는 발견출 되었다. 따라서, 부산시의 3개 정수장(덕산, 화명, 명장)에서 생산된 정수는 자유생활아메바 및 병원성 미생물인 가시아메바에 대해 안전함을 알 수 있었다.

그러나, 정수장에서 정수가 가정 수도전으로 급수 되면서 급수관 또는 물탱크의 오염에 의해 수도 물내에 가시아메바가 존재하는 가능성은 배제할 수 없다. 따라서, 병원성을 가지고 있는 아메바성 원생동물의 오염을 최소화하기 위해 가정 내 물탱크를 효율적으로 관리 할 수 있는 방안 등을 제시하고, 아울러 기초 자료 축적을 위한 지속적인 감시가 병

행되어야 할 것으로 판단되어진다. 그리고, 현재 아메바 등을 분리하기 위해 사용되는 방법은 오랜 배양시간과 현미경 관찰을 통한 형태학적인 분리를 기초로 하는데, 이는 시스트의 형태학적 다양성에 의해 분리가 용이 하지 못한 단점이 있다. 따라서 이들을 보다 신속하고 정확하게 분리 동정할 수 있는 방법에 관한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

**3.5. 가시아메바 동정**

PCR에 의해 얻어진 산물의 염기서열을 결정 한 후 Genbank에서 염기서열의 상동성을 조사하였다. 검출된 가시아메바는 *Acanthamoeba* sp. AC311 18S ribosomal RNA gene(accession number gi 45386043)와 98% 상동성을 보여 가시아메바로 최종 확인하였다(Fig. 4).



**Fig. 4.** Alignment of the nucleotide sequences of the *Acanthamoeba* sp.(gi 45386043) isolated from the Mulgum sample(Feb.).

선진국인 일본, 미국, 영국 및 호주 등지에서 원생동물인, 지아디아(*Giardia*)와 크립토스포리디움(*Cryptosporidium*)에 의한 수질사고에 대비하기 위하여 선진국에서는 여러 가지 대책을 마련하고 있다. 미국의 경우, 환경청(USEPA)의 지표수처리강화규정(ESWTR; Enhanced Surface Water Treatment Rule)에서 수돗물 속 원생동물의 최대오염 허용농도를 0으로 두고 수처리 시설에서 최대오염 허용농도를 99.9% 까지 제거하는 기준을 마련하고, 미국 내 모든 정수장에서 원생동물에 대한 모니터링을 실시하도록 하고 있다.

우리나라에서는 2002년 7월에 제정된 바이러스 및 원생동물에 대한 정수처리기준을 시행하여 5만톤 이상의 정수장의 경우 99.9% 까지 제거할 수 있는 정수장 시설 기준을 제시하고 있다. 이 기준들을 준수하는 정수장에서는 원생동물 등에 대한 오염을 최소한으로 할 수 있으므로 원생동물에 의한 정수의 오염은 불가능할 것으로 보인다. 그러나, 이러한 분포조사를 통한 자료의 축적은 먹는물 수질기준 개선에도 활용될 수도 있을 뿐 아니라, 정기적으로 모니터링 할 수 있는 시험법의 제정에도 기여할 수 있을 것으로 판단된다.

#### 4. 결 론

본 연구는 낙동강 하류의 매리, 물금 지점과 부산시 수돗물 생산하는 3개 정수장을 대상으로, 2005년 2월부터 12월까지 월 1회, 자유생활아메바 및 가시아메바의 분포 실태를 조사하였다.

1) 조사 기간 동안 수질은 pH 7.4~9.6( $\pm 1.1$ ), 수온 2.0~29.0( $\pm 17$ ) °C, 탁도 4.8~27.4( $\pm 11.0$ ) NTU, 클로로필-a 10.3~109.0( $\pm 44.3$ ) mg/m<sup>3</sup>, BOD 1.7~4.9( $\pm 2.6$ ) mg/L, COD 3.1~6.9( $\pm 5.0$ ) mg/L, 총대장균군은 17~920( $\pm 200.5$ ) MPN/100 mL 범위로 나타났다.

2) 자유생활아메바는 모든 지점에서 검출률이 높았으나, 가시아메바는 물금에서 54.5%(6/11회), 매리에서 45.5%(5건/11회)가 검출되었다. 수온이 높아지는 봄부터 가을철에 높은 검출률로 나타났고, 겨울에는 검출되지 않았다.

3) 덕산, 화명, 명장 정수장의 정수공정별 시료를 대상으로 검사한 결과, 정수를 제외한 정수공정별

단계에서 자유생활아메바의 경우 평균 68.2%, 62.1%, 46.9%, 그리고 가시아메바는 27.3%, 27.3%, 16.7% 순으로 검출되었다.

4) 3개 정수장 모두 BAC을 거친 후의 시료에서는 가시아메바가 검출되지 않았으며, 최종 처리수에서는 자유생활아메바 및 가시아메바 모두 불검출되었다.

5) 검출된 가시아메바는 18S rRNA 부위를 증폭, 정제한 후 염기서열분석을 실시하였다. *Acanthamoeba* sp. AC311 18S rRNA gene(accession number gi 45386043) 과 98% 상동성을 보여 가시아메바로 최종적으로 동정되었다.

#### 참 고 문 헌

- 1) Bitton G., 1994, Wastewater Microbiology, Wiley-Liss, New York, 478pp.
- 2) Casemore D. P., 1994, Enteric protozoa and the water route of transmission epidemiology and dynamics, In Water and public health, London, 123-136.
- 3) Campbell D. M., 1999, Waterborne disease surveillance: A prospective study, SCIEH weekly Rep., 31(17), 82-86.
- 4) Martinez A. J., Visvesvara G. S., 1997, Free-living, amphizoic and opportunistic amoebas, Brain Pathol., 7, 583-598.
- 5) 정현미, 윤제용, 1994, 미국 음용수의 미생물학적 기준에 관한 고찰, 수질보전학회지, 10, 16-23.
- 6) Mergeryan H., 1991, The prevalence of *Acanthamoeba* in the human environment, Rev. Infect. Dis., 5, 390-391.
- 7) Yagita K., 1993, Characterization of *Acanthamoeba* isolated from eye infection and the environment by restriction endonuclease digestion of mitochondrial DNA, Jpn. J. Parasitol., 42, 468-478.
- 8) Sell J. J., Rupp F. W., Orrison W. W., 1997, Granulomatous amebic encephalitis caused by *acanthamoeba*, Neuroradiology, 39, 434-436.
- 9) Naginton J, Watson P. G, Playfair T. J., McGill J., Jones B. R., Steele A. D., 1974, Amoebic infection of the eye, Lancet, 2(7896), 1537-1540.
- 10) Seal D., Stapleton F., Dart J., 1992, Possible environmental sources of *Acanthamoeba* spp in contacts lens wearers, Br. J. Ophthalmol., 76, 424-427.
- 11) Liesack W., Stackebrandt E., 1992, Occurrence of novel groups of the domain Bacteria as revealed by analysis of genetic material isolated from an Australian terrestrial environment, J. Bacteriol., 174,

- 5072-5078.
- 12) Jones D. B., Visvesvara G. S., Robinson N. M., 1975, *Acanthamoeba* polyphage keratitis and *acanthamoeba* uveitis associated with fatal meningoencephalitis, Trans. Ophthalmol. Soc., 95, 221-232.
  - 13) Schuster F. L., Visvesvara G. S., 2004, Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals, Int. J. Parasitology, 34, 1001-1027.
  - 14) Yu H. S., Choi K. H., Kim H. K., Kong H. H., Chung D. I., 2001, Genetic analyses of *Acanthamoeba* isolates from contacts lens storage cases of students in Seoul, Korea, Korean J. Parasitol., 39, 161-170.
  - 15) APHA, 1992, Standard methods for the examination of water and wastewater, 18th ed., APHA-AWWA-WPCF, New York.
  - 16) Ministry of Environment, 2002, Standard Method for the Drinking Water Quality, U.S.A..