

## 냉온수기에서 일반세균의 분포 및 분리한 세균의 특성

이은화<sup>1</sup> · 고지윤<sup>2</sup> · 김종설<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>울산대학교 교육대학원, <sup>2</sup>울산대학교 자연과학대학 생명과학부

울산 소재 S회사(S-C)와 U고등학교(U-H)에 설치된 냉온수기를 대상으로, S-C에서 냉수 74개, U-H에서 냉수와 온수 각 36개의 시료를 채수하여 미생물 분포를 조사하였다. 일반세균 농도의 중간값은, S-C 시료에서 53 CFU/ml (0-4,135 CFU/ml)이었으며, U-H의 경우 냉수에서 80 CFU/ml (0-1,480 CFU/ml), 온수에서 0 CFU/ml (0-240 CFU/ml)이었다. S-C 시료의 38%, U-H 냉수 시료의 42%에서 일반세균에 대한 먹는 물 수질기준인 100 CFU/ml을 초과하였으며, 대장균군은 S-C의 1개 시료에서 검출되었다. 냉온수기에서 검출되는 미생물의 주요 오염 경로를 확인하고자, 2회에 걸쳐 먹는 샘물 용기로부터 각각 6일과 8일 동안 매일 시료를 채수하였으며, 2회 채수는 냉온수기의 꼭지에서도 행하였다. 일반세균 농도의 평균값은, 먹는 샘물 용기에서 1회 33 CFU/ml, 2회 132 CFU/ml이었으며, 냉수 꼭지 시료에서 1,022 CFU/ml로, 냉온수기 꼭지에서 검출되는 대부분의 세균은 먹는 샘물이 수조 통과 통로관을 거치면서 오염된 것으로 판단된다. 먹는 샘물 용기를 냉온수기에 연결한 후 시간의 경과에 따른 용기 내 일반세균수의 유의성 있는 증가는 없었다. 임의의 100개 일반세균 집락을 대상으로 순수배양 후 표현형에 따른 동정 시험을 하였으며, 그람양성 3속 6종, 그람음성 7속 7종 등, 모두 10속 13종의 세균을 잠정적으로 확인하였다. U-H의 4대 냉온수기 꼭지에서, 그람양성은 전체의 72%이었고, 그람양성의 *Micrococcus* spp.가 전체의 54%를 차지하여 가장 많았다. *Micrococcus* spp.와 그람음성의 *Sphingomonas paucimobilis*는 4대의 냉온수기 모두에서 분리되었다. 냉온수기의 일반세균은 주로 실내 공기중 미생물로부터 유래하며, 이들 미생물이 냉온수기의 수조통 혹은 통로관에서 생물막 형성에 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다.

**Key words** □ bottled water, drinking water dispenser, drinking water quality, heterotrophic plate count

냉온수기는 물을 차갑게 냉각시켜 주는 냉수기와 물을 따뜻하게 데워주는 온수기를 하나로 합쳐놓은 구조로, 대용량의 먹는 샘물(bottled water)을 간편하게 온수와 냉수로 먹을 수 있게 만든 것이다. 현재 많은 학교 및 공공장소에서는 수도물을 대신하여 냉온수기에 연결된 먹는 샘물을 음용수로 사용하고 있으며, 보편적으로 18.9 L (5 gallon) 용량의 먹는 샘물이 담긴 용기가 냉온수기와 연결된다. 냉온수기 사용의 증가는, 냉수와 온수를 쉽게 마실 수 있다는 점과 더불어 소비자의 수도물에 대한 막연한 불안감과 먹는 샘물이 수도물보다 더 안전하다는 생각 등에 기인하는 바가 크다.

음용수에서 주요 지표미생물의 분포 및 특성에 관한 정보는 공중보건의 관점에서 매우 중요하다. 음용수의 세균학적 수질과 관련한 대표적인 검사항목으로 일반세균(중속영양평판계수), 대장균군, *Escherichia coli* 등이 있다. 일반세균으로 측정되는 세균의 일부는 기회성 병원체일 가능성이 있으며, 높은 밀도의 일반세균은 대장균군의 검출을 교란하기도 한다(12). 대장균군과 *Escherichia coli*는 수인성 질병의 주요 원인이 되는 분변성 오염을 진단하는 대표적인 지표미생물이다. 먹는 샘물에서 지표미생물의 분포, 우점 세균의 동정, 저장에 따른 세균 농도의 변화, 병원성 세균과

항생제 내성세균의 검출 등에 관한 여러 결과가 발표되고 있다(3, 9, 16, 17). 현재 국내에서는 암반대수층의 지하수와 지하수가 지표로 흘러나오는 용천수가 먹는 샘물의 원수로 주로 사용되며, 냉온수기에 연결하는 먹는 샘물 자체는 생산 단계에서 먹는 물 수질기준에 의해 관리가 된다(5). 하지만 사람이 직접 음용하는 냉온수기의 꼭지로부터 나오는 냉수와 온수의 수질은 먹는 샘물 제조회사에서 출고되는 시점의 먹는 샘물 수질과는 차이가 있으며, 냉온수기의 사용빈도 및 먹는 샘물의 사용량, 소독 방법 및 주기, 설치된 지점의 환경 등에 따라 세균학적 수질의 저하가 발생할 수 있다.

국내에서는 냉온수기가 주로 사용되는 반면, 미주와 유럽의 국가에서는 냉수 공급기능을 주로 하는 water cooler가 일반적이다. 캐나다에서 water cooler를 사용하는 주택을 대상으로 수도물과 water cooler의 수질을 비교 조사한 결과, 지표미생물의 오염 빈도는 water cooler에서 더 높았다(14). 스위스의 한 조사에서 water cooler의 세균 농도가  $10^3 \sim 10^5$  CFU/ml의 범위로 매우 높았으나(11), 유럽 국가에서는 먹는 샘물의 살균 처리를 하지 않은 경우가 많아 국내 상황과는 차이가 있다. 국내에서 냉온수기의 미생물 오염 현황에 대한 조사 결과가 간헐적으로 발표되고 있으나 검출되는 세균의 다양성과 세균학적 특성에 대한 정보는 매우 제한적이다. 따라서 본 연구에서는, 냉온수기의 꼭지 뿐만 아니라 연결된 먹는 샘물 용기에서도 직접 채수하여, 미생물 분포 조사, 존재하는 미생물의 분리 및 표현형에 따른 동정

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 82-52-259-2387, Fax: 82-52-259-1694  
E-mail: jkim@ulsan.ac.kr

(phenotypic identification)을 통해, 냉온수기 미생물의 주요 오염 경로를 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 냉온수기에서 미생물의 분포

냉온수기의 미생물 오염 현황을 파악하기 위해, 울산 소재 S회사(S-C)에 설치된 19대 냉온수기를 대상으로 총 9회에 걸쳐 74개의 냉수 시료를 꼭지로부터 채수하였다. 또한 냉온수기의 사용 빈도 및 시간 경과에 따른 세균학적 수질 변화를 확인하기 위해, U고등학교(U-H)에 설치된 4대 냉온수기를 대상으로 13일 동안 냉수와 온수 시료를 꼭지로부터 채수하였으며, 같은 기간 냉온수기에 연결하기 전의 먹는 샘물 용기로부터 멸균된 주사기를 이용하여 먹는 샘물을 채수하였다.

시료의 미생물 수 측정을 위한 접종은 채수 후 12시간 이내에 실험실에서 행하였다. 일반세균(중속영양평판계수, heterotrophic plate count, HPC)은 채수한 시료를 표준한천배지(plate count agar)에 도말평판법으로 접종하여 35°C에서 48시간 배양한 후 계수하였다(6, 8, 10). 대장균군의 수는 막여과법으로 측정하였으며, 시료 100 ml을 여과하여 m-Endo LES 한천배지에 접종한 다음, 35°C에서 48시간 배양하여 금속성 광택을 띠는 붉은 색 집락을 계수하였다(6, 8, 10).

U-H의 냉온수기에서, 냉수와 온수 시료 일반세균 농도의 상관 계수( $r$ ) 계산 및 냉온수기별 일반세균 분포에 대한  $t$  test는 Windows 용 SPSS v.13.0을 이용하여 행하였다.

### 먹는 샘물 용기에서 미생물 수의 변화

음용수 사용과 시간의 경과에 따른 먹는 샘물 용기 내 미생물의 유입 및 생장 정도를 확인하고자 냉온수기 내부를 통과하지 않은 먹는 샘물을 다음과 같은 두 가지 방법으로 채수하였다. 첫 번째 방법의 경우, 먹는 샘물이 들어있는 새로운 용기에 멸균된 고무마개를 부착한 다음, 용기를 실험용 냉온수기에 연결하였다. 냉온수기 꼭지로부터 하루 200~250 ml의 먹는 샘물을 제거하면서 7일 동안 매일 멸균된 주사기를 사용하여 먹는 샘물 용기로부터 직접 시료를 채수하였다. 4주 후 멸균된 고무마개를 부착한 새로운 먹는 샘물 용기를 동일한 냉온수기에 연결하고 같은 방법으로 8일 동안 채수하였으며, 비교를 위해 먹는 샘물 용기로부터 뿐만 아니라 냉수와 온수 꼭지에서도 시료를 채수하였다. 두 번째 방법에서는, 새로운 먹는 샘물 용기를 냉온수기에 연결하지 않고 생수펌프를 이용하여 먹는 샘물을 제거하면서 7일간 매일 채수하였다. 시료에 존재하는 일반세균을 위의 '냉온수기에서 미생물의 분포'에 서술한 방법으로 계수하였다.

### 일반세균의 순수배양 및 표현형에 따른 동정

'냉온수기에서 미생물의 분포(U-H)' 실험과 '먹는 샘물 용기에서 미생물 수의 변화' 실험에서, 일반세균수 측정시 사용한 plate count agar에 생겨난 집락을 대상으로 일반세균의 분리와 동정 실험을 행하였다. U-H 냉온수기 시료의 경우, 매회 3배수로 측

정한 3개의 plate 중 임의의 1개 plate count agar에 생겨난 집락 중 최대 5개의 집락을 임의로 선정하여 동일 배지에 연속으로 계대배양하였으며, 최종적으로 50개 집락의 순수배양을 얻을 수 있었다. 먹는 샘물 용기 채수 실험에 사용된 냉온수기의 경우, 먹는 샘물로부터 직접 채수한 시료에서 30개, 냉온수기 꼭지에서 채수한 시료로부터 20개 등 모두 50개의 집락을 같은 방법으로 분리하여 순수배양을 얻었다. 분리한 세균은 그람염색과 현미경 관찰을 통해 형태적 특징을 조사하였으며(15), 그람양성 세균은 *Staphylococcus* 속, *Micrococcus* 속 등의 동정이 가능한 API Staph kit, 그람음성 세균은 API 20NE kit와 API 20E kit (bioMerieux, France)를 사용하여 잠정적으로 동정하였다. 2회 이상 반복 분석하였고, 동정확률(% id)이 90% 이상인 균종을 선택하였으며, 90% 미만일 경우 동정하지 못한 것(identified)으로 간주하였다.

## 결 과

### 냉온수기에서 미생물의 분포

S회사(S-C)에 설치된 19대 냉온수기의 냉수 시료에서 측정된 일반세균의 분포를 Table 1에 정리하였다. 74개 시료의 일반세균수는 0~4,135 CFU/ml의 범위였으며, 중간값은 52.5 CFU/ml, 평균은 351.6( $\pm$ 863.9) CFU/ml이었다. 우리나라 먹는물 수질기준의 일반세균에 대한 기준(1 ml에서 100 CFU 이하)을 초과하는 시료는 28개로 조사한 시료의 38%를 차지하였으며, 1개 시료는 대장균군 추정시험에서 양성을 나타내었다(Table 1).

U고등학교(U-H)에 설치된 4대 냉온수기(A~D)의 냉수와 온수 꼭지, 그리고 냉온수기에 연결하기 전의 먹는 샘물 용기로부터 채수하였으며, 일반세균수 측정 결과를 Table 2와 Fig. 1에 나타내었다. 냉온수기별로 13일 동안 냉수와 온수 시료 각각 36개, 그리고 사용 전의 먹는 샘물 시료 12개를 채수하였다. 냉수 시료의 일반세균수는 0~1,480 CFU/ml의 범위였으며, 중간값은 80.0 CFU/ml, 평균은 164.8( $\pm$ 262.5) CFU/ml이었다. 일반세균에 대한 먹는물 수질기준을 초과하는 시료는 15개로 조사한 시료의 42%를 차지하였다(Table 2). 온수 시료의 경우, 일반세균수는 0~240 CFU/ml의 범위였고, 중간값은 0.0 CFU/ml, 평균은 27.7( $\pm$ 49.6) CFU/ml으로 측정되었다. 온수 36개 중 17개 시료에서 일반세균이 검출되었으며, 3개 시료(8%)에서는 먹는 물 수질 기

**Table 1.** Distribution of indicator organisms for the samples from drinking water dispensers in S-C

		Cold water faucets
No. of water cooler/heater sampled		19
No. of samples tested		74
HPCs (CFU/ml)	median (range)	52.5 (0~4,135)
	mean ( $\pm$ SD)	351.6 ( $\pm$ 863.9)
No. of samples, HPCs >100 CFU/ml (%)		28 (37.8%)
No. of samples, coliform + (%)		1 (1.4%)

**Table 2.** Distribution of indicator organisms for the samples from drinking water dispensers in U-H

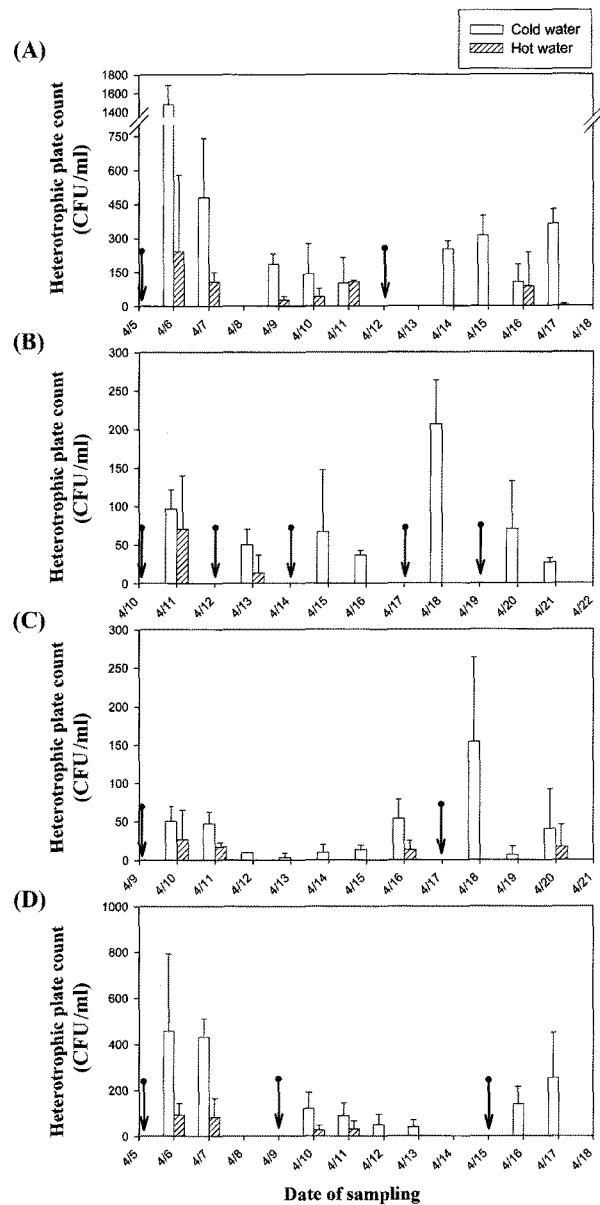
	Cold water faucets	Hot water faucets	Bottled water
No. of water cooler/heater sampled	4	4	4
No. of samples tested	36	36	12
HPCs (CFU/ml)	median (range)	80.0 (0~1,480)	0.0 (0~50)
	mean (±SD)	164.8 (±262.5)	27.7 (±49.6)
No. of samples, HPCs >100 CFU/ml (%)	15 (41.7%)	3 (8.3%)	0 (0.0%)
No. of samples, coliform + (%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)

준을 초과하는 일반세균수가 측정되었다(Table 2). 온수에서의 일반세균수는, 평균값 기준으로 냉수 시료의 1/6 수준이었으며, 냉수 시료와 온수 시료에서 측정된 일반세균의 수는 서로 유의성이 있는 양의 상관관계( $r=0.81, P<0.01$ )를 나타내었다. 냉수 시료의 수온은 평균  $8.1(\pm 2.2)^{\circ}\text{C}$ , 온수 시료는 평균  $82.1(\pm 3.6)^{\circ}\text{C}$ 로 측정되었다. 한편, 냉온수기에 연결하기 전의 먹는 샘물 시료의 경우, 일반세균수는 0~50 CFU/ml의 범위였고, 중간값은 0.0 CFU/ml, 평균은  $9.5(\pm 16.4)$  CFU/ml이었다. 12개 중 5개 시료에서 일반세균이 검출되었으며, 일반세균에 대한 먹는 물 수질 기준을 초과하는 시료는 없었다(Table 2). U-H의 모든 시료에서 대장균군은 검출되지 않았다(Table 2).

냉온수기의 사용빈도(먹는 샘물 용기의 교체주기) 및 교체 후 시간의 경과에 따른 세균학적 수질변화를 알아보기로 냉온수기의 일별 일반세균 수의 변화를 Fig. 1에 나타내었다. 냉온수기별로 13일의 채수 기간 동안 냉온수기 A는 2회, B는 5회, C는 2회, D는 3회 새로운 먹는 샘물로 용기를 교체하여, 사용빈도가 가장 높은 냉온수기는 B였고, 다음으로 D, 그리고 A와 C의 순서였다. 먹는 샘물 용기를 냉온수기에 연결한 후 냉수 쪽지에서 채수한 시료의 냉온수기별 일반세균 수는 A에서 평균 341.2 CFU/ml로 가장 높았고, 다음으로 D에서 175.6 CFU/ml, B에서 79.0 CFU/ml, 그리고 C에서 37.7 CFU/ml의 순서였으며, 온수 시료의 일반세균 수도 A에서 평균 60.8 CFU/ml로 가장 높았고, D에서 25.9 CFU/ml, B에서 11.9 CFU/ml, C에서 7.3 CFU/ml의 순서였다(Fig. 1). 냉온수기 냉수 시료에서 일반세균수의 전체 평균은 164.8 CFU/ml로 냉온수기에 연결하기 전 먹는 샘물 시료의 평균값인 9.5 CFU/ml에 비해 18배 이상 높은 수치를 보였다(Table 2 and Fig. 1). 일반세균 수의 분포에 대한 단순 *t* test에서, 냉온수기별 95% 수준 신뢰구간이 서로 겹쳐져 있어, 냉온수기의 사용빈도(먹는 샘물 교체 주기)에 따른 일반세균수의 유의성 있는 분포 차이는 없었다. 또한 새로운 먹는 샘물로 교체 후 시간의 경과에 따른 일반세균수의 뚜렷한 증가도 관찰되지 않았다.

**먹는 샘물 용기에서 미생물 수의 변화**

냉온수기의 먹는 샘물이 음용수로 사용되어 줄어듦에 따라 공기가 먹는 샘물 용기 내부로 들어가는 과정에서 공기 중 미생물이 유입될 수 있다. 공기 중 미생물에 의한 먹는 샘물의 오염 수준을 파악하고자 냉온수기에 연결된 먹는 샘물 용기로부터 직



**Fig. 1.** Heterotrophic plate counts for the cold and hot water samples from four drinking water dispensers (A, B, C, and D) in U-H. Arrows indicate the dates of bottled water exchange. Cold and hot water samples were not collected at these dates and April 8.

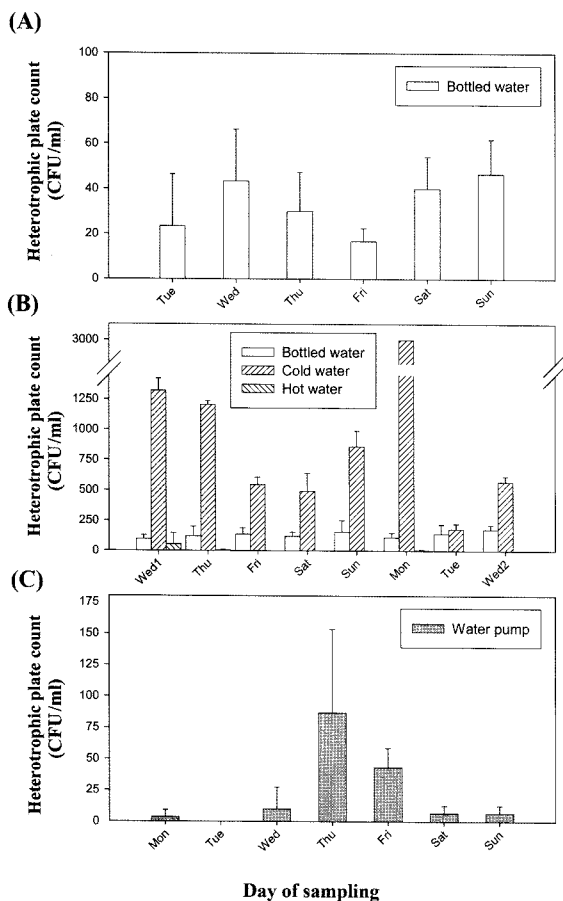
접 먹는 샘물을 채수하여 일반세균 수를 측정하였다(Fig. 2A and B). 냉온수기에 연결하기 전의 시료에서는 일반세균이 검출되지 않았으나, 연결 직후 용기로부터 채수한 시료에서의 일반세균 수는 23.3 CFU/ml이었으며, 6일만에 걸쳐 측정된 일반세균 수의 평균값은 33.3(±11.9) CFU/ml로 나타나, 냉온수기에 연결하기 전에 비해 연결 후의 먹는 샘물 용기에서 일반세균이 증가하였다(Fig. 2A). 하지만, 연결 후의 시간 경과, 즉, 먹는 샘물 용기로의 공기중 미생물 유입과 성장에 따른 일반세균수의 유의성 있는 증가는 없었다(Fig. 2A). 4주 후 동일한 냉온수기에서 새로운 먹는 샘물 용기를 가지고 실험을 반복하였으며, 비교를 위해 먹는 샘물 용기로부터 뿐만 아니라 냉수와 온수 꼭지에서도 시료를 채수하여 측정하였다(Fig. 2B). 냉온수기 연결 전 먹는 샘물에서는 일반세균이 검출되지 않았으며, 연결 직후 용기로부터 직접 채수한 먹는 샘물의 일반세균은 96.7 CFU/ml이었고, 8일만에 걸쳐 채수한 시료에서 일반세균 수의 평균값은 132.1(±25.9) CFU/ml이었다(Fig. 2B). 앞의 실험과 마찬가지로 냉온수기에 연결 후의 먹는 샘물 용기에서 일반세균수가 증가하였으며, 시간

경과에 따른 일반세균 수의 유의성 있는 변화는 없었다. 한편, 냉수의 꼭지에서 측정된 일반세균수는 매우 높아서, 8일간 채수한 냉수 시료의 평균값은 1,022.1(±884.8) CFU/ml이었다. 반면, 온수의 경우, 채수한 시료 8개 중 3개에서만 일반세균이 검출되어 8일간의 평균값이 7.5(±18.6) CFU/ml로 매우 낮았다(Fig. 2B).

공기중 미생물의 유입과 성장에 따른 세균 수의 변화를 확인하고자, 먹는 샘물 용기를 냉온수기에 연결하지 않고 생수펌프를 이용하여 먹는 샘물 용기로부터 7일만에 걸쳐 채수하였으며, 일반세균수는 0~86.7 CFU/ml의 범위로, 평균값은 22.4(±31.8) CFU/ml이었다(Fig. 2C).

**일반세균의 순수배양 및 표현형에 따른 동정**

일반세균수 측정에서 사용한 plate count agar에 생겨난 집락을 대상으로 순수배양 및 표현형에 따른 동정을 행하였다. U-H에 설치된 4대의 냉온수기 시료로부터 최종적으로 50개의 순수배양을 얻을 수 있었으며, 냉수 시료에서 분리한 것이 44개, 온수에서 분리한 것이 6개였다(Table 3). 그람염색을 통해 분리한 세균의 형태적 특징을 확인한 결과, 그람양성 세균이 36개로 전체의 72%를 차지하였고, 그람음성이 14개로 28%였다(Table 3). 그람양성 세균은 구균으로 관찰되었으며, 그람음성 세균은 구균 혹은 간균으로 관찰되었다. 이들 50개 순수배양을 대상으로, API kit를 이용하여 생리적, 생화학적 특징에 따른 잠정적 동정 실험을 행하였으며, 모두 7속 10종의 세균을 확인할 수 있었다. 그람양성 세균의 경우, *Micrococcus* 속이 27개로 가장 많아 전체 동정 시험한 집락의 54%를 차지하였고, 다음으로 *Staphylococcus* 속이



**Fig. 2.** Heterotrophic plate counts for the bottled water samples, which were taken using sterilized syringes from the bottled water containers connected with a water dispenser (A, B), or using water pump from the container (C). For comparison, samples were also collected from the cold and hot water faucets (B).

**Table 3.** Tentative identification of heterotrophic bacteria isolated from the cold and hot water samples of drinking water dispensers in U-H

Source (No. of colonies examined)	Gram stain	Identification (No. of colonies)
Cold water (44)	Gram +	<i>Micrococcus</i> spp. (23)
		<i>Staphylococcus sciuri</i> (3)
		<i>Kocuria kristinae</i> (1)
		<i>Staphylococcus capitis</i> (1)
		<i>Staphylococcus lentus</i> (1)
		<i>Staphylococcus warneri</i> (1)
	Gram -	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> (8)
		<i>Brevundimonas vesicularis</i> (3)
		<i>Brevundimonas diminuta</i> (1)
		<i>Chryseobacterium indologenes</i> (1)
	<i>Myroides</i> spp. (1)	
Hot water (6)	Gram +	<i>Micrococcus</i> spp. (4)
		<i>Kocuria varians/rosea</i> (1)
		Unidentified <sup>a</sup> (1)

<sup>a</sup> % id was less than 90%

전체의 12%인 6개였으며, 종별로는 *S. sciuri* 3개, *S. capitis*, *S. lentus*, *S. warneri*가 각 1개의 분포를 보였다. 그 외 *Kocuria* 속의 *K. kristinae*와 *K. varians/rosea*가 각 1개씩 확인되었으며, 그람양성으로 관찰된 나머지 1개 집락은 API kit를 이용한 2차에 걸친 동정에서도 동정확률(% id)이 90% 미만이어서 확인되지 않았다(Table 3). 그람음성 세균은 *Sphingomonas paucimobilis*가 8개로 전체 집락의 16%를 차지하였고, *Brevundimonas* 속이 전체의 8%인 4개로, *B. vesicularis* 3개, *B. diminuta* 1개였으며, 그 외 *Chryseobacterium indologenes*와 *Myroides* spp.가 각 1개 확인되었다(Table 3). 온수 시료로부터 분리한 6개 집락의 경우 *Micrococcus* 속이 4개, *K. varians/rosea* 1개 동정되었다. *Micrococcus* spp.와 *Sphingomonas paucimobilis*는 4대의 냉온수기 모두에서 분리되었다.

‘먹는 샘물 용기에서 미생물 수의 변화’ 실험에 사용된 냉온수기의 경우, 먹는 샘물 용기로부터 채수한 시료에서 최종적으로 30개의 순수배양을 얻을 수 있었다(Table 4). 그람염색의 결과, 그람양성 세균이 18개로 60%를 차지하였고, 그람음성 세균이 12개로 40%였으며, API kit를 이용한 잠정적 동정 실험으로부터 모두 6속 5종의 세균을 확인할 수 있었다. 그람양성으로 관찰된 18개 집락의 경우, *Micrococcus* 속이 15개로 전체의 50%를 차지하였고, *Kocuria varians/rosea*가 전체의 10%인 3개였다. 12개 그람음성 세균의 집락은 *Sphingomonas paucimobilis*가 9개로 전체 집락의 30%를 차지하였고, 그 외 *Brevundimonas vesicularis*, *Methylobacterium mesophilicum*, *Ochrobactrum anthropi*가 각 1개씩이었다(Table 4). 같은 실험의 냉수와 온수 꼭지에서 채수한 시료의 경우, 냉수 시료로부터 18개, 온수 시료로부터 2개 등 20개 집락을 분리하고 동정하였다. 그람양성 세균으로는 *Staphylococcus sciuri* 4개, *Micrococcus* spp. 3개가 냉수로부터 확인되었고, 그람음성 세균의 경우, *Sphingomonas paucimobilis*가 9개로 가장 많

았고, *Brevundimonas vesicularis* 2개, *Methylobacterium mesophilicum*, *Stenotrophomonas maltophilia*가 각 1개의 분포를 보였다(Table 4). 온수 시료로부터 분리한 2개 집락은 *Sphingomonas paucimobilis*와 *Stenotrophomonas maltophilia*로 동정되었다.

총 100개의 순수배양을 대상으로 동정 실험을 행하였으며, 10속 13종의 세균이 확인되었는데, 이중 그람양성 세균이 3속 6종, 그람음성 세균이 7속 7종으로 나타났다. 먹는 샘물 용기로부터 직접 채수한 시료에서 동정된 6속 5종의 세균 중 *Ochrobactrum anthropi*를 제외한 5속 4종의 세균은 냉수와 온수 꼭지에서 채수한 시료에서도 확인되었다(Table 3 and 4).

고 찰

울산 소재 S-C와 U-H에 설치된 냉온수기의 경우, S-C는 분석한 시료의 38%, U-H는 시료의 42%에서 우리나라 먹는 물 수질 기준을 초과하는 일반세균수를 나타내었다. 미생물 분포를 조사한 냉온수기는 사람들이 음용을 위해 사용하는 것으로, 통상적인 절차와 방법에 의해 관리되고 있었다. 현재까지 음용수에 존재하는 높은 농도의 일반세균이 건강에 위해가 될 수 있다고 결론지을 수 있는 충분한 임상적, 역학적인 증거는 없다(7, 13). 하지만, 일반세균의 농도는 음용수의 저장과 사용과정에서 발생하는 세균학적 수질 저하를 평가하는 데는 유용한 지표가 되며, 먹는 샘물을 냉온수기에 연결하여 사용하는 과정에서 음용수의 세균학적 수질 저하가 상당한 비율의 냉온수기에서 진행됨을 알 수 있다.

1992년 캐나다의 주택과 사무실 각 50곳에 설치된 water cooler를 대상으로 행한 조사에서, 일반세균수의 중간값은 주택 7,000 CFU/ml, 사무실 1,990 CFU/ml으로 주택이 사무실보다 높았으며, 2006년 스위스에서 3대의 water cooler로부터 3개월간 채수한 174개 시료의 일반세균 농도는 10<sup>3</sup>~10<sup>5</sup> CFU/ml의 범위

**Table 4.** Tentative identification of heterotrophic bacteria isolated from the samples taken at the bottled water containers and at the cold and hot water faucets of a drinking water dispenser

Source (No. of colonies examined)	Gram stain	Identification (No. of colonies)
Bottled water sampled with syringe (30)	Gram +	<i>Micrococcus</i> spp. (15) <i>Kocuria varians/rosea</i> (3)
	Gram -	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> (9) <i>Brevundimonas vesicularis</i> (1) <i>Methylobacterium mesophilicum</i> (1) <i>Ochrobactrum anthropi</i> (1)
	Gram +	<i>Staphylococcus sciuri</i> (4) <i>Micrococcus</i> spp. (3)
	Gram -	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> (8) <i>Brevundimonas vesicularis</i> (2) <i>Methylobacterium mesophilicum</i> (1)
Samples from cold water faucet (18)	Gram -	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> (1) <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (1)

로 평균값(geometric mean)은  $7.2 \times 10^3$  CFU/ml이었다(11, 14). 이러한 수치와 비교할 때, S-C와 U-H의 냉온수기에서 측정된 일반세균 농도의 중간값인 52.5 CFU/ml과 80.0 CFU/ml은 상대적으로 매우 낮았다. 캐나다 조사에서 사용 전 먹는 샘물 20개 시료의 일반세균 농도 중간값은 14 CFU/ml로, 본 조사에서의 중간값 0.0 CFU/ml, 평균값 9.5 CFU/ml과 비슷한 수준이었으나, 스위스 조사에서는 water cooler에 연결하는 먹는 샘물에서도 평균  $2.0 \times 10^3$  CFU/ml의 높은 일반세균 농도를 보였다(11, 14). 먹는 샘물에서 이러한 차이는 먹는 샘물 제조과정에서의 여과, 오존, 자외선 등에 의한 소독 처리 여부와 관련이 있을 것으로 생각된다. 본 조사의 먹는 샘물은 대수층 지하수를 원수로 사용한 것으로, 현재 국내에서는 먹는 샘물의 제조방법으로 여과, 자외선 살균 등 최소한의 물리적 처리와 오존 처리를 허용하고 있다(5). 한편, 생활용수로 사용하는 영남지역 지하수 및 간이상수도에 대한 조사에서, 일반세균 농도의 중간값은 여름에 채수한 123개 지점 지하수 시료에서 40 CFU/ml, 겨울 117개 지점 시료에서 30 CFU/ml이었다(4).

2회에 걸친 먹는 샘물 용기내 일반세균수 측정에서, 6일과 8일 동안 매일 채수한 시료의 일반세균 농도 평균값은 각각 33.3 CFU/ml과 132.1 CFU/ml로, 8일간 채수한 냉온수기 냉수 시료의 일반세균 농도 평균값인 1,022.1 CFU/ml에 비해 현저하게 낮았다. 이러한 결과는 냉수 꼭지의 시료에서 검출되는 대부분의 세균은 먹는 샘물 용기의 물에 포함된 것이 아니라 먹는 샘물이 수조통과 통로관을 거치면서 여기에 부착된 세균이 오염된 것으로 판단할 수 있다. 또한 1회에 비해 2회째 측정에서 일반세균의 농도가 더 높았는데, 1회 채수 실험에 사용한 냉온수기를 먹는 샘물이 연결된 상태에서 4주간 방치한 후 2회 채수 실험을 진행함에 따라, 이 기간동안 냉온수기 내부 수조통과 통로관에서의 미생물 오염과 성장이 많이 진행된 때문으로 판단된다. 생물막(biofilm)에 존재하는 *Escherichia coli*는 통상 적용되는 소독제의 농도에서 성장할 수 있음이 알려져 있으며(18), 수조통과 통로관에서 세균의 부착 및 생물막 형성 과정에 대한 보다 자세한 연구가 필요하리라 생각된다.

냉온수기에 연결하기 전에 채수한 시료에서는 일반세균이 검출되지 않았으나, 연결 직후 용기로부터 직접 채수한 시료에서의 일반세균 농도는 1회와 2회 실험에서 각각 23.3 CFU/ml과 96.7 CFU/ml로 증가하였다. 또한 먹는 샘물 용기를 냉온수기에 연결한 후 6~8일 동안 용기로부터 채수한 시료에서, 시간의 경과에 따른 일반세균수의 유의성 있는 증가는 없었다. 따라서 냉온수기에 연결한 후 먹는 샘물 용기에서 검출되는 일반세균의 농도는, 먹는 샘물 용기를 냉온수기에 연결하거나 냉온수기의 꼭지에서 물을 받아내는 과정에서 냉온수기의 수조통에 부착된 세균이 일시적으로 부유하면서 냉온수기 용기로 유입된 것에 의해 주로 영향을 받으며, 먹는 샘물 자체에 존재하는 미생물의 성장이나 외부 공기중 미생물의 직접 오염에 의한 영향은 미미한 수준으로 판단된다. 하지만, 본 실험은 실외의 고등학교 실내 공간에서 먹는 샘물이 6~8일간 계속 사용되는 조건하에 행해진 것으로,

냉온수기의 운영 상황, 설치된 곳의 환경 조건, 먹는 샘물의 수질 등에 따라 용기내 세균의 성장 가능성은 여전히 있다. 본 연구실에서 500 ml 용량의 먹는 샘물을 대상으로 차량의 실내 환경에서 시험한 결과, 구입 후 5일째에 일부 먹는 샘물에서 일반세균수의 급격한 증가가 있었으며, 타이완의 조사에서는 제품에 따른 용기내 미생물 성장의 상반된 결과를 보여주고 있다(16).

U-H에 설치된 4대 냉온수기의 꼭지에서 채수한 시료에서, 그람양성 세균은 전체 조사한 집락의 72%이었으며, *Micrococcus* spp.가 전체 집락의 54%를 차지하여 가장 많았다. 반면, 먹는 샘물(bottled water)을 대상으로 행한 외국의 연구 결과에서는 주로 그람음성의 *Pseudomonas* 속이 많이 분포함을 보여준다(9, 16, 17). 그리스에서 먹는 샘물을 대상으로 행한 조사는 *Pseudomonas* 속, *Aeromonas* 속, *Pasteurella* 속, *Citrobacter* 속, *Flavobacterium* 속, *Providencia* 속, *Enterococcus* 속의 세균이 검출됨을 보고하고 있으며(17), *Enterococcus* 속을 제외한 나머지는 모두 그람음성의 세균이다. 타이완에서 행한 연구에서도(16), 먹는 샘물에서 *Pseudomonas* 속, *Aeromonas* 속, *Pasteurella* 속, *Flavobacterium* 속, *Xanthomonas* 속, *Staphylococcus* 속의 세균을 확인하고 있는데, *Staphylococcus* 속을 제외하고는 모두 그람음성에 속한다. 국내 먹는 샘물에서 미생물을 분리하여 동정한 결과는 많지 않으며, 2005년 시판되고 있는 먹는 샘물을 대상으로 행한 한 연구의 경우(2), 그람음성의 *Pseudomonas fluorescens*와 *Comamomas acidovorans*가 조사한 39개 중 4개에서 검출됨을 보고하고 있다. 같은 연구에서 일반세균은 39개 중 19개에서 검출되고 있으나 이들 세균을 동정하지는 않았다. 한편, 울산지역의 초등학교와 중고등학교에서 실내 공기중 미생물의 분포를 조사한 연구에서는, 그람양성 세균이 전체 조사한 집락의 62~91% 수준이었으며, *Micrococcus* 속이 조사 대상 집락의 60% 수준으로 가장 많이 분포하였다(1, 3). 따라서 냉온수기로부터 채수한 시료에서 검출되는 일반세균은 주로 실내 공기중 미생물로부터 기인한 것으로, 공기중 미생물이 먹는 샘물 자체에 포함된 일부 미생물과 함께 냉온수기의 수조통 혹은 통로관에 생물막(biofilm)을 형성하는 것으로 추정된다. 위생적인 냉온수기의 수질관리를 위해서는, 냉온수기에서 분리한 세균의 생물막 형성 과정, 생물막에서 *Escherichia coli*와 병원성 세균의 성장, 그리고 냉온수기 내부 생물막의 제어 방법 등에 대한 보다 자세한 연구가 필요하리라 판단된다.

냉온수기의 먹는 샘물에서 검출되는 일반세균에 대한 정보를 다른 연구자들이 행한 동정 결과(9, 16, 17)와 비교하기 위해, 본 연구에서는 API kit를 사용한 표현형에 따른 동정(phenotypic identification) 시험을 행하고 그 결과를 분석하였다. 따라서 본 연구에서 냉온수기 시료로부터 분리한 세균의 동정 결과는 잠정적이며, 16S rRNA 유전자 서열분석에 기초한 분자적 동정을 행할 경우 종 수준 혹은 속 수준에서 동정 결과가 변경될 가능성은 여전히 있다. 환경시료에서 분리한 세균의 효율적인 동정을 위해, 다양한 균주를 대상으로 표현형에 따른 동정과 분자적 동정의 비교 연구가 필요하다고 생각된다.

## 감사의 말

본 연구는 울산대학교의 연구비 지원에 의해 수행되었음.

## 참고문헌

1. 김나영, 김영란, 김민규, 조두완, 김종설. 2007. 초등학교 실내환경에서 공기중 세균과 진균의 분리 및 특성. 미생물학회지 43, 193-200.
2. 김윤아, 이도경, 유경미, 강병용, 하남주. 2006. 2005년 한국에서 시판된 먹는 샘물의 미생물 오염. 환경독성학회지 21, 283-289.
3. 이아미, 김나영, 김소연, 김종설. 2005. 학교 실내환경에서 공기중 미생물의 분포 및 특성. 미생물학회지 41, 188-194.
4. 이인환, 김수경, 최윤희, 김종설. 2006. 영남지역 지하수에서 대장균군의 분포 및 분리한 세균의 특성. 미생물학회지 42, 95-102.
5. 환경부. 2001. 먹는 샘물의 기준과 규격 및 표시 기준, 환경부 고시 2001-15.
6. 환경부. 2002. 먹는 물 수질 공정 시험 방법, 환경부 고시 2002-91.
7. Allen, M.J., S.C. Edberg, and D.J. Reasoner. 2004. Heterotrophic plate count bacteria-what is their significance in drinking water? *Int. J. Food Microbiol.* 92, 265-274.
8. American Public Health Association. 1996. Standard methods for the examination of water and wastewater, 19<sup>th</sup> ed. American Public Health Association, Washington, D.C., USA.
9. Armas, A.B. and J.P. Sutherland. 1999. A survey of the microbiological quality of bottled water sold in the UK and changes occurring during storage. *Int. J. Food Microbiol.* 48, 59-65.
10. Atlas, R.M. and L.C. Parks. 1996. Handbook of microbiological media. CRC press, Boca Raton, Florida, USA.
11. Baumgartner, A. and M. Grand. 2006. Bacteriological quality of drinking water from dispensers (coolers) and possible control measures. *J. Food Prot.* 69, 3043-3046.
12. Burlingame, G.A., J. McElhaney, and W.O. Pipes. 1984. Bacterial interference with coliform colony sheen production on membrane filters. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 56-60.
13. Edberg, S.C. and M.J. Allen. 2004. Virulence and risk from drinking water of heterotrophic plate count bacteria in human population groups. *Int. J. Food Microbiol.* 92, 255-263.
14. Lévesque, B., P. Simard, D. Gauvin, S. Gingras, É. Dewailly, and R. Letarte. 1994. Comparison of the microbiological quality of water coolers and that of municipal water systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1174-1178.
15. Murray, R.G.E., R.N. Doetsch, and C.F. Robinow. 1994. Determinative and cytological light microscopy, p. 21-41. In P. Gerhardt, R.G.E. Murray, W.A. Wood, and N.R. Krieg (ed.), Methods for general and molecular bacteriology. American Society for Microbiology, Washington, D.C., USA.
16. Tsai, G.J. and S.C. Yu. 1997. Microbiological evaluation of bottled uncarbonated mineral water in Taiwan. *Int. J. Food Microbiol.* 37, 137-143.
17. Venieri, D., A. Vantarakis, G. Komminou, and M. Papapetropoulou. 2006. Microbiological evaluation of bottled non-carbonated ("still") water from domestic brands in Greece. *Int. J. Food Microbiol.* 107, 68-72.
18. Williams, M.M. and E.B. Braun-Howland. 2003. Growth of *Escherichia coli* in model distribution system biofilms exposed to hypochlorous acid or monochloramine. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5463-5471.

(Received May 18, 2008/Accepted August 13, 2008)

## ABSTRACT : Distribution and Characteristics of Heterotrophic Plate Count Bacteria in Water Samples from Drinking Water Dispensers

Eun Hwa Lee<sup>1</sup>, Ji Yun Koh<sup>2</sup>, and Jongseol Kim<sup>1,2\*</sup> (<sup>1</sup>Graduate School of Education, and <sup>2</sup>Department of Biological Science, University of Ulsan, Ulsan 680-749, Republic of Korea)

To evaluate bacteriological water quality, samples were taken from drinking water dispensers placed at S company (S-C) and U highschool (U-H) in Ulsan. The medians of heterotrophic plate counts (HPCs) were 53 CFU/ml for the 74 water samples of S-C and 80 CFU/ml for the 36 cold water samples of U-H, and 38% of the S-C and 42% of the U-H samples showed HPC bacterial concentrations higher than 100 CFU/ml. Coliform bacteria were detected from one sample of S-C. To determine the major source of bacterial contamination, water samples were taken daily for 6~8 days from the bottled water containers as well as the faucets of an experimental water dispenser. While the average HPCs in the bottled water containers were 33 CFU/ml for the first and 132 CFU/ml for the 2nd analysis, the HPC concentration in the cold water samples was 1,022 CFU/ml for the 2nd analysis. These results suggest that the majority of bacteria detected in the cold water samples were originated from the biofilms on the surface of water passages within the water dispensers. There was no significant increase in HPC bacterial concentrations within the bottled water container after installation on the water dispenser. We could isolate and tentatively identify 3 genera 6 species of Gram-positive and 7 genera 7 species of Gram-negative bacteria from the plate count agar plates of U-H samples. Among the isolates, 72% were observed as Gram-positive, and *Micrococcus* spp. was the most abundant with 54% of the total, followed by *Sphingomonas paucimobilis* with 16%. It appears that most of the HPC bacteria detected in water dispensers originate from indoor airborne bacteria, which may play important roles in the formation of biofilms on the surface of water passages within the water dispensers.