

상수도관망에서 분리한 잔류염소 내성균에 관한 연구

현재열 · 윤종호^{*,†}

대구광역시 상수도사업본부 수질연구소

^{*}대구광역시 보건환경연구원

Study on the Chlorine-Resistant Bacteria Isolated from Water Pipe Network

Jae-Yeoul Hyun · Jong-Ho Yoon^{*,†}

Water Quality Research Institute, Waterworks Headquarters, Daegu Metropolitan City

^{*}Institute of Health and Environment, Daegu Metropolitan City

(Received 8 March 2011, Revised 20 April 2011, Accepted 20 April 2011)

Abstract

The free residual chlorine of tap water samples, collected from 266 faucets on the water pipe network in Daegu City, was between 0.1 and 0.79 mg/L. On microorganic tests, general bacteria and the coliform group were not detected and thus the tap water was turned out to be fit to drink. In particular, samples of which free residual chlorine was 0.1 mg/L and over were cultured in R2A agar media at 25°C for 7 days, and as a result heterotrophic bacteria were detected in 65.9% of samples; (1). The closer tap water got to the faucet from the stilling basin, the lower residual chlorine concentration became but the more the bacterial count became. And, more bacteria were detected in the R2A agar medium than in the PCA medium. (2). In the case of separated strains, most colonies were reddish or yellowish. 16S rRNA sequence was identified as *Methylobacterium sp.* and *Williamsia sp.*, and yellow strain was identified as *Sphingomonas sp.*, *Sphingobium sp.*, *Novosphingobium sp.*, *Blastomonas sp.*, *Rhodococcus sp.* and *Microbacterium sp.* White strain was identified as *Staphylococcus sp.* (3). Sterilized tap water in polyethylene bottles was inoculated with separated strain and was left as it was for 2 months. As a result, bio-film was observed in tap water inoculated with *Methylobacterium sp.* and *Sphingomonas sp.* It was found that heterotrophic bacteria increased when free residual chlorine was removed from tap water in the water pipe network. Thus, there is a need to determine a base value for heterotrophic bacteria in order to check the cleanliness of tap water in the water pipe network.

keywords : Chlorine-resistant bacteria, Daegu city, Faucets, Free residual chlorine, Water pipe network

1. 서론

수인성 전염병 방지와 먹는물의 안전성 확보를 위하여 대부분의 정수장에서 염소 소독을 실시하고 있으며 수돗물은 4.0 mg/L 이하, 수도꼭지는 0.1 mg/L 이상의 유리 잔류염소가 유지되도록 하고 있다. 수돗물의 세균학적 안전을 위하여 소독효과의 지표인 일반세균과 분변오염지표인 총대장균군을 감시항목으로 정하고 있다. 우리나라는 수돗물 생균수 측정을 위하여 표준한천배지를 이용해 35±0.5°C에서 48±2시간 배양하는 방법을 채택하고 있으며, 이 배양 조건으로 형성된 세균을 총칭해 중온일반세균이라고 한다(환경부, 2009). 이는 호기성 또는 통성혐기성 조건에서 종속영양 발육하는 세균 중 온혈동물의 체온과 비슷한 온도에서 고농도의 유기물 함유 배지상 단시간 빠르게 성장해 집락을 형성하는 세균으로, 장내세균이나 식품 등의 부패세균과 같은 하수성 세균이 이러한 성질을 가진다. 수중 상태는

영양원이 되는 유기물량이 매우 적고 수온도 온혈동물의 체온보다 낮는데, 이러한 곳을 성장환경으로 하는 세균의 대부분은 저농도의 유기물을 이용해 생활할 수 있도록 적응되었으며 또한 중온성을 가지는 이러한 세균 군을 종속 영양세균이라고 한다. 종속영양세균은 자연 환경 중에서 유기물의 분해나 생물막(biofilm)을 형성하는 등의 물질순환 과정에 밀접하게 관계하고 있으며, 수질의 관점에서 보면 소독 처리에 의해 일반세균이 검출되지 않더라도 많은 종속영양세균의 일부가 생존하고 있는 경우가 있기 때문에 소독의 효과 판정에도 이용된다. 상수도관망에서는 잔류염소의 소실이나 물의 장기 체류에 따른 세균의 재증식, 슬라임 형성 등의 수질 장애를 일으키는 원인이 되기도 한다. 그렇기 때문에 대장균군이나 일반세균과 같은, 장관계 병원 미생물 지표와는 다른 관점에서 미생물학적 수질 지표의 의를 가진다 할 수 있다. 환경수 중 종속영양세균은 표준한천배지보다 유기물농도가 낮은 배지에서 10~10,000배의 세균이 더 계수되는 특성을 가지는 것으로 알려져 있다(일본약학회, 2005; APHA, 2005).

본 연구에서는 대구시의 급수구역 내 정기적인 수질검사

[†] To whom correspondence should be addressed.
fabreyoon@daegu.go.kr

를 수행하는 과정에서 48시간 배양 이후에 형성되는 여러 가지 세균집락을 관찰하였고 잔류염소가 존재하는 수돗물에서도 여러 가지 세균이 존재하고 있는 것에 주목하였다. 그리고 상수도관망에서 분리된 세균에 대하여 종을 동정하고 분포실태를 조사하였으며 분리된 세균의 염소 저항성에 대해서도 검토하였다. 또한 배양조건과 배양온도 등 실험조건을 바꾸어 세균 검사를 실시하고 수질지표로서 종속영양 세균의 시험방법 도입에 대해서도 검토하였다.

2. 연구방법

2.1. 조사대상 및 시료채취

2009년 9월부터 2010년 8월까지 문산, 매곡, 시설, 고산, 가장 등 대구시 5개 정수장에서 생산되는 수돗물 상수도관망의 급수과정별시설 69개소, 수도꼭지 20개소를 대상으로 멸균티오황산나트륨이 들어 있는 멸균용기에 296개 시료를 채수하였다. 시료 채수 시 휴대용잔류염소계(HACH Chlorine Test Kit)로 DPD(N-N-dimethyl-p-phenylenediamine)법에 의한 잔류염소농도를 측정하였으며 시료 채수 후 1~5°C로 냉장보관하여 실험실로 운반하고, 4시간 이내에 시험을 완료하였다.

2.2. 세균학적 시험

일반세균과 총대장균군시험은 먹는물수질공정시험법에 따랐고, 종속영양세균은 먹는물수질공정시험법과 저온세균수 시험법에 근거하여 배양시간과 온도를 변경하면서 시험하였다. 일반세균과 저온일반세균은 실험목적에 따라 배지의 농도와 온도, 배양시간을 달리하여 실험하였다. 분리된 균주의 동정은 순수분리 및 그람염색을 실시하여 형태 관찰을 하고 API 20NE 키트를 사용하여 생화학적검사를 하였으며, 한국생명공학연구원 미생물자원센터(Biological Resource Center)에 의뢰하여 16S rRNA partial sequence (900~1,055 bp) 분석을 통하여 최종 동정하였다.

2.3. 염소저항시험

상수도관망 시료에서 분리된 균주를 R2A Agar 배지(Oxoid CM0906, England)에서 순수 배양 시키고 이를 멸균된 수돗물에 접종하여 5일간 25°C에서 배양하여 약 10^5 CFU/mL 농도로 만들어 염소저항시험에 사용하였다. 차아염소산나트륨 원액(Waco 197-02206, Japan)에 대하여 먹는물수질공정시험기준에 따라 유효염소농도를 측정하여 9.40% 용액임을 확인하고, 염소농도가 각각 0.1, 0.5, 1.0 mg/L의 농도가 되도록 멸균증류수로 희석하고 0.1N HCl로 pH를 7.2으로 조정하였으며 염소농도를 최종 확인하였다. 염소저항성의 유무는 염소농도 0.1 mg/L에서 5분간 접촉 하였을 때 초기 농도의 10%이상이 생존하면 염소저항이 있는 것으로 판단하였다. 염소저항성이 강한 균주는 농도별 염소수를 각각 30초, 1분, 3분, 5분, 10분, 20분, 12시간 동안 실온에서 접촉시킨 후, 접촉시간별 시료에 0.3 M 티오황산나트륨(Sigma 7143, USA) 0.05 mL로 중화하고 주입평판법

에 따라 R2A Agar 배지에 접종하였다. 그리고 25°C±1°C에서 7일간 배양하여 균의 생존량을 측정하여 생존율을 계산하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 분리 균주의 동정 특성

상수도관망에서의 잔류염소 농도는 0.1이상 0.79 mg/L이하였으며, 일반세균검사를 통하여 48시간~7일간 배양하여 자란 일부 집락을 실온에서 배지가 마르지 않게 장시간 방치하여 배지 표면 위로 돌출될 때 까지 배양한 결과 붉은색 또는 노란색 색소를 가진 집락을 얻었다. 분홍색 또는 붉은색 집락 5주와 노란색 또는 오렌지색 집락 11주, 흰색 집락 1주 등 총 17주를 순수 분리하여 동정한 결과, *Methylobacterium sp.* 4주, *Sphingomonas sp.*, *Sphingobium sp.* 2주, *Novosphingobium sp.* 2주, *Blastomonas sp.* 3주, *Rhodococcus sp.* 2주, *Microbacterium sp.*, *Williamsia sp.*, *Staphylococcus sp.*로 분석되었다(Table 1). 특히 붉은색 색소를 가진 균주 4주는 *Methylobacterium isbiliense*, *Methylobacterium fujisawaense* (2주), *Methylobacterium brachiatum* 등 3종의 *Methylobacterium* 속으로 조사되었다. *Methylobacterium* 속은 혈액한천배지에는 발육하지 못하고 R2A Agar 배지에서 양호하게 증식하였으며 PCA배지에서도 자라는 특성을 보여 주었는데 증식의 최적온도는 25~30°C였으며, 배지 속에 함몰되어 있을 때는 색소가 선명하게 관찰되지 않았으나 배지 표면 위로 돌출되어 공기와 접촉하게 되면 아주 선명한 붉은색을 나타내었다. 따라서 염소가 존재하는 상수도관망 시료를 배양하여 성장한 집락을 와이어로 찢어 주면 선홍색의 집락을 보다 빨리 관찰할 수 있었다. 현재 이 속은 API 20NE Kit로 종을 분류하는 것은 곤란하였고, 16S rRNA 유전자의 염기 배열을 기본으로 한 분류 검사에 의해 가능하였다.

Methylobacterium 속의 증식 속도는 매우 늦고 1회의 세포 분열이 일어나는데 소요되는 세대 시간은 5시간 전후로 추정되며 육안으로 집락을 확인할 수 있을 때까지 증식하려면 최소 3일 이상이 필요하였다. *Methylobacterium* 속은 그람음성호기성간균으로 facultative methylophilic이며 집락은 분홍색 또는 붉은색의 비수용성 색소를 띠며 1976년 Patt 등에 의해 처음으로 보고되었다. 2006년 11월까지 22 종이 알려져 자연계에 널리 분포하고 있으며 주로 물 환경에서 분리되는 것으로 알려져 있다(Furuhata and Koike, 1990, 1993; Furuhata and Matsumoto, 1983, 1984, 1987, 1992; Furuhata et al., 1987, 1991, 2006, 2007; Hiraishi et al., 1995). 일본 각지의 병원내 수돗물 대상으로 *Methylobacterium* 을 조사한 결과에 따르면 16S rRNA의 부분 염기 배열에 근거해 분류한 결과, *M. aquaticum* 과 *M. fujisawaense* 이 가장 많았고, 그 외에 *M. mesophilicum*, *M. radiotolerans*, *M. aminovorans*, *M. hispanicum* 등이 검출되었으며 염소 소독된 수돗물에서 *Methylobacterium* 속이 고빈도로 분리되어 분리율이 60~80%에 달하는 것으로 조사되었다(古畑勝則와

Table 1. Morphological and physiological characteristics of bacteria isolated from tap water

Characteristic	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Gram stain	GNR	GNR	GNR	GNR	GNR	GNR	GNR	GNR	GPR	GPR	GPR
Cell length(μm)	2-5	2-4.4	2-3.5	3-3.8	0.9	2.4	1.1	1.8	2.1	0.6	3.5
Cell width(μm)	0.8-1	0.8-1	0.9-1.1	0.7-0.8	0.3	0.6	0.4	0.7	0.7	0.5	0.7
Pigmentation	Red	Red	Red	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Pink
Diameter of colonies (mm)	1-3	1-3	1-2	2-3	1-2	1-2	1-2	2-5	1-2	2-5	1-1.5
Oxidase	-	+(w)	+	+	+	-	+(w)	-	-	-	-
Blood plate agar	-	-	-	+(w)	-	+	-	+(w)	+	+	+
REACTIONS/ENZYMES*											
Reduction of nitrates to nitrites	-	-	-	-	-	+	-	-	NT	NT	NT
Reduction of nitrates to nitrogen	-	-	-	-	-	-	-	-	NT	NT	NT
Indole production	-	-	-	-	-	-	-	-	NT	NT	NT
Glucose acidification	-	-	-	-	-	-	-	-	NT	NT	NT
Arginine dihydrolase	-	-	-	-	-	-	-	-	NT	NT	NT
Urease	+	+	+	-	-	-	-	-	NT	NT	NT
Esculin hydrolysis (β -glucosidase)	-	-	-	+	-	+	-	+	NT	NT	NT
Gelatine hydrolysis (protease)	+	-	-	+	-	-	-	-	NT	NT	NT
β -galactosidase	-	-	-	+	+	+	+	-	NT	NT	NT
Glucose assimilation	+	+	+	+	-	+	-	+	NT	NT	NT
Arabinose assimilation	+	+	+	+	-	+	+	-	NT	NT	NT
Mannose assimilation	-	-	-	+	-	-	-	-	NT	NT	NT
Mannitol assimilation	-	-	-	-	-	-	-	-	NT	NT	NT
N-acetyl-glucosamine assimilation	-	-	-	+	-	-	-	-	NT	NT	NT
Maltose assimilation	-	-	-	+	-	+	-	+	NT	NT	NT
Gluconate assimilation	+	+	+	-	-	+	-	-	NT	NT	NT
Caprate assimilation	-	-	-	-	-	-	-	-	NT	NT	NT
Adipate assimilation	-	+	-	-	-	+	-	+	NT	NT	NT
Malate assimilation	-	-	-	+	-	+	-	-	NT	NT	NT

GNR : Gram-negative rods; GPR : Gram-positive rods; W : weak; + : positive; - : negative; NT : not tested; * : API 20NE TEST(7days); 1, *Methylobacterium isbilense* 99.3(similarity%); 2, *Methylobacterium fujisawaense* 100; 3, *Methylobacterium brachiatum* 100; 4, *Sphingomonas asaccharolytica* 97.7; 5, *Sphingobium aromaticiconvertens* 97.3; 6, *Sphingobium olei* 98.5; 7, *Novosphingobium aromaticivorans* 98.6; 8, *Blastomonas natatoria* 100; 9, *Rhodococcus fascians* 99.9; 10, *Microbacterium esteraromaticum* 99.8; 11, *Williamsia muralis* 99.9.

福山正文, 2006). 건강한 사람에 대해서는 강한 병원성을 일으키는 세균은 아니지만, 가끔 유아나 고령자, 결핵, 신부전증, 알콜중독, AIDS, 백혈병환자, 혹은 면역 기능이 떨어져 저항력이 없는 사람 등, 이른바 면역결핍자에게 질병을 일으키기도 하며 요도관감염도 보고되었다(Chen-hsiang et al., 2004; Hornei et al., 1999; Rosa et al., 2010; Sanders et al., 2000; Truant et al., 1998). 이러한 면역력이 약한 사람에게 다량의 균을 체내에 집어넣지 않는 이상 *Methylobacterium* 이 원인으로 질병에 걸리는 경우는 없으나 바이러스나 원충과는 달리 물 환경 속에서 재증식이 가능하기 때문에 옥상 물탱크 등 잔류염소가 약해지기 쉬운 곳 등을 대상으로 한 실태조사나 증식방지를 위한 대책은 강구되어야 할 것으로 판단된다. Furuhata 등(2006)에 의하면 병원 수돗물에서 분리한 *Methylobacterium* 속의 항생제 감수성 시험에서 8개 항생제에 대하여 내성을 가지며 imipenem(MIC₉₀ = 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)과 tetracycline(MIC₉₀ = 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 등에는 감수성이 있는 것으로 보고되었다.

노란색계통 색소를 가진 균주를 동정한 결과 *Sphingomonads* 8주가 분리되었으며, 분리된 균주는 *Sphingomonas asaccharolytica* (97.7%), *Sphingobium aromaticiconvertens*

(97.3%), *Sphingobium olei* (98.5%), *Novosphingobium aromaticivorans* (98.6, 98.2%), *Blastomonas natatoria* (99.3, 100% 2주)였다. *Sphingomonas* 속은 분류학적으로 16S rRNA의 계통수, nucleotide signatures, 세포내 지방산의 구성, 스핑고지질의 2-hydroxy fatty acid 구성, polyamine의 세포 내 농도, 분해 물질의 종류 등 특성에 따라 2001년 Takuchi 등에 의해, *Sphingomonas* (cluster I), *Sphingobium* (cluster II), *Novosphingobium* (cluster III), *Sphingopyxis* (cluster IV)로 재분류 제안된 바 있으며 그람음성편성호기성간균으로 화학합성종속영양(chemoheterotrophic)을 한다. 세포막은 lipopolysaccharide 대신 glycosphingolipids를 가지며, 노란색의 색소를 띠고 37종이 보고되어져 있다. *Sphingomonas*, *Sphingobium*, *Novosphingobium* 그리고 *Sphingopyxis* 4가지 속들로 구분되는데 이러한 속들을 “sphingomonads”라 부르고 자연계에 널리 분포함은 물론 식물뿌리계, 병원내, 물 환경에서 자주 분리되고 있다. 또한 그람음성간균으로 혈액하천배지에는 약하게 발육하였고 *S. aromaticiconvertens*, *N. aromaticivorans* 은 성장하지 않았다. R2A Agar 배지에서는 비교적 양호하게 증식 하였으며 PCA 배지에서도 증식하는 것으로 조사되었다. 이동근(2007)의 수돗물에

서 생물막 형성의 초기단계에 관여하는 세균군집과약연구 보고에서는 *Sphingomonas* 속 세균의 16s rRNA와 유사한 염기서열을 발견한 보고가 있으며, 서울시의 배급수관로의 생물막 저감방안연구(장현정, 2009)에서도 생물막 세균종을 분석한 결과 *Sphingomonas*와 *Methylobacterium*이 주요세균인 것으로 보고하고 있다. 그람양성균으로는 *Rhodococcus fascians*, *Microbacterium esteraromaticum*, *Williamsia muralis* 등 3주가 분리되었는데 *R. fascians*, *M. esteraromaticum*은 노란색 집락을 형성하였고, *W. muralis*는 분홍색 집락을 형성하는 것으로 조사되었다.

3.2. 분리균주의 염소저항성

분리균주들의 유리잔류염소에 대한 저항성을 조사한 결과는 Table 2와 같으며 잔류염소농도 0.1 mg/L에서 5분 접촉하였을 때 37~87% 생존하였고 *Methylobacterium sp*와 *Saccharolytica*, *Rhodococcus sp*, *W.mulralis* 등은 80%이상의 강한 생존율을 나타내었다. 다른 균주와 달리 *M. isbiliense*는 1.0 mg/L의 잔류염소농도에서도 34%의 생존율을 나타내었고 초기 100,000 CFU/mL이던 세포수가 12시간 경과한 후에도 32 CFU/mL가 생존하여 염소에 대해 강한 저항성을 나타내는 것으로 확인되었다.

여러 환경에서 분리한 77주의 *Methylobacterium sp*를 대상으로 한 염소저항성 연구(Hiraishi et al., 1995)에 의하면 먹는물탱크 분리 30주 중 28주(93%), 공기 28주 중 9주(32%), 우물 10주 중 4주(40%), 병실 7주 중 2주(29%), 정수처리공정 2주 중 2주(100%)가 0.1 mg/L 농도 유리잔류염소를 5분간 접촉하여 10%이상 생존한 것으로 보고하였다. Furuhata 등(2007)이 일본병원 수도물에서 노란색 색소를 띠는 25균주에 대하여 동정한 결과 *Sphingomonas ursincola/natatoria* 12주(48%), *Mycobacterium frederiksbergense* 2주(8%), *Sphingomonas adhaesiva*, *Sphingopyxis witflariensis*

그리고 *Porphyrobacter donghaensis* 등이 분리되었으며 이들을 0.1 mg/L 농도의 유리잔류염소를 1분간 접촉시킨 결과 22균주(88.0%)가 생존한 것으로 보고하였다. 이렇게 영양이 부족한 환경에서 성장한 미생물 균주가 소독제에 대한 내성이 증가하는 것으로 볼 때 거의 유기물을 함유하지 않는 저영양 상태로 관내부에 생물막을 형성하게 되면 잔류염소에 더 강한 저항성을 가질 것으로 생각된다.

3.3. 분리균주의 생물막 형성

플리에틸렌병에 멸균한 수도물(유리잔류염소 0.05 mg/L)을 담아 놓고 분리된 균주를 각각 접종하여 2달간 정지 보관한 결과 *Methylobacterium sp*와 *Sphingomonas sp*를 접종한 병에서 생물막이 형성되는 것을 관찰하였다(Fig. 1). 입주시기 또는 화장실 수리 후 2년 이내의 아파트의 경우 화장실에서의 붉은 물때가 생성된다는 민원이 자주 발생하는데, 이는 미생물군의 천이과정 초기, 화장실 내부에 미생물이 희박한 상태에서 수도물 또는 공기 중의 붉은색소를 가지는 염소내성균들이 화장실 실리콘, 타일 등에 부착하게 되고 계속된 수도물 사용으로 염소에 감수성이 있는 종들은 성장하기 어려운 환경이 되어 경쟁상대가 없는 새 화장실에서 염소 내성이 가장 강한 *Methylobacterium*이 우점종으로서 생물막을 형성함으로써 붉은 물때로 보이게 되는 것이다. 실내 화장실은 습도는 높고 온도가 외부 보다 높기 때문에 미생물이 성장하기 좋은 환경이다. 따라서 화장실 내 미생물군의 천이는 많은 시간이 흐름에 따라 다양한 세균 및 포자를 가진 곰팡이들로 혼합군을 이루어 경쟁하게 되어 오래된 화장실에서는 붉은색 색소를 가진 *Methylobacterium* 등이 우점 할 수 없게 되어 시간이 경과할수록 붉은 물때의 생성 빈도는 감소하게 된다.

LeChevallier 등(1988)의 생물막 연구보고에 의하면 바이오 필름을 형성한 세균은 부유 세균보다 유리염소에 대해

Table 2. Survival rate of bacteria exposure to residual chlorine

Strains	Survival rate (%)			
	0.1 mg/L	0.2 mg/L	0.5 mg/L	1.0 mg/L
<i>Methylobacterium isbiliense</i>	85	80	65	34
<i>Methylobacterium fujisawaense</i>	82	76	35	3
<i>Methylobacterium brachiatum</i>	80	57	23	3
<i>Sphingomonas asaccharolytica</i>	85	14	0.13	0
<i>Sphingobium aromaticiconvertens</i>	37	0.5	0	0
<i>Sphingobium olei</i>	65	0.2	0	0
<i>Novosphingobium aromaticivorans</i>	75	44	0.3	0
<i>Blastomonas natatoria</i>	67	24	0.1	0
<i>Rhodococcus fascians</i>	86	58	1.2	0
<i>Microbacterium esteraromaticum</i>	41	0.5	0	0
<i>Williamsia muralis</i>	87	15	0	0

Table 3. Survival rate of *Methylobacterium isbiliense*

(Unit : %)

Residual chlorine	The first	30 sec.	1 min.	3 min.	5 min.	10 min.	20 min.	12 hour
0.1 ppm	100	94	91	87	85	80	78	42
0.5 ppm	100	79	76	70	65	55	43	19
1.0 ppm	100	43	37	35	34	31	28	0.03

서 150~3,000배, 결합염소인 모노크로라민에 대해서 2,100 배 저항성이 높은 것으로 증명되었으며, Anderson 등(1990)은 녹농균이 파이프 내부에 쌓이는 점착성의 슬라임을 분비하여 급수 시스템안에 존재하며 살균제가 부유 미생물을 죽이기는 하지만, 점착성의 생물막에 매몰 된 세균에는 접할 수 없다고 보고하였다. Borenstein (1994)은 세균이 바이오 필름 안에 있을 때 자신을 지키기 위해서 많은 세포외 폴리머를 생산하여 소독제에 매우 저항성이 있는 것으로 보고하였는데 이는 소독제가 먼저 주위의 폴리머 네트워크와 반응해 소독약의 산화력은 세포에 도달하기 전에 다 써 버려진다고 추정하였다. 본 실험에서 분리한 균주들은 부유 미생물상태로 염소내성이 확인되었고 생물막을 형성하면 염소에 더 높은 저항성이 생길 것으로 추정이 된다. 생물막 파괴의 방법으로는 물리 화학적 방법이 사용되는데 화학적 방법으로는 고농도의 염소, 오존, 포르말린, 계면활성제 등이 있으며 상수관망에서는 고농도의 염소(50~100 mg/L)에 1~2시간의 접촉이 필요하며, 저 농도에서 접촉시간을

늘리는 것보다 고농도로 짧은 시간 접촉하는 것이 더 효율적인 것으로 알려져 있다.

3.4. 잔류염소 농도와 세균수

3.4.1. 잔류염소

상수도관망에서의 유리잔류염소농도는 최저 0.1 mg/L, 최고 0.79 mg/L의 범위로써 먹는물수질기준을 만족하였으며 월평균은 0.36~0.41 mg/L의 범위로 조사되었다.

3.4.2. 종속영양세균의 분리현황

먹는물수질공정시험법에 따른 일반세균과 총대장균군시험은 총 296개 시료 모두에서 0/mL와 불검출/100 mL로 나타나 수질기준을 만족하였다. 그러나 유리잔류염소가 0.1~0.79 mg/L의 범위로 존재함에도 불구하고 190개 시료 (64.9%)에서 R2A agar, 25°C, 7일 이상 배양에서 붉은색 또는 노란색 색소를 가진 집락이 관찰되었다. 잔류염소농도 별 종속영양세균 검출현황은 Table 4와 같으며 잔류염소

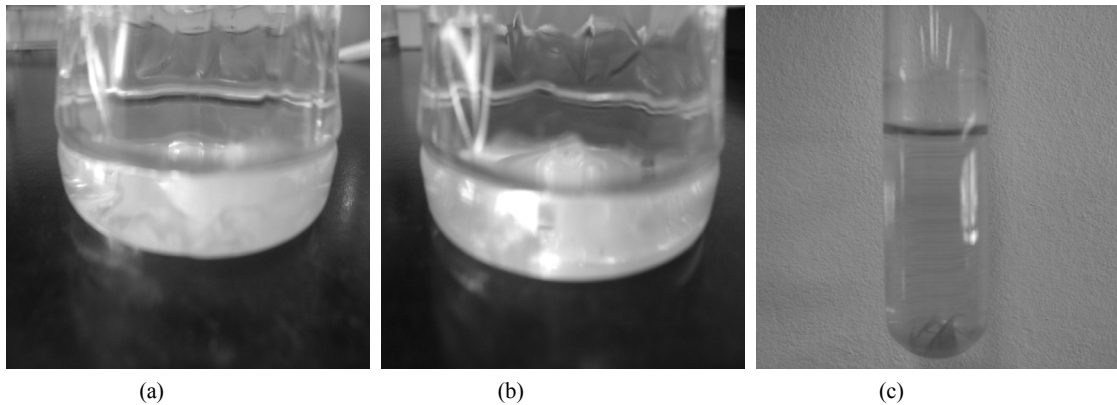


Fig. 1. Biofilm of *Sphingomonas* sp. (a) and *Methylobacterium* sp. (b and c).

Table 4. Residual chlorine and detection rate of heterotrophic bacteria (R2A agar, 25°C, 7 days)

Residual chlorine (mg/L)	No. of sample	Detection sample	Detection rate (%)	HPC (CFU/mL)		
				min.	max.	average
0.1~0.19	14	12	85.7	0	240	67
0.2~0.29	48	38	79.1	0	600	46
0.3~0.39	62	46	74.2	0	300	18
0.4~0.49	108	66	61.1	0	150	9
0.5~0.59	44	21	47.7	0	13	1.9
0.6~0.79	20	7	35.0	0	11	1
Total	296	190	64.9	0	600	18

Table 5. Detection rate of heterotrophic bacteria by tap water (R2A agar, 25°C, 7days)

Residual chlorine (mg/L)	HPC (CFU/mL)				Total sample
	<10	10-49	50-100	100-600	
0.1~0.19	6	2	1	3	12
0.2~0.29	16	14	4	4	38
0.3~0.39	32	12	0	2	46
0.4~0.49	51	13	0	2	66
0.5~0.59	20	1	0	0	21
0.6~0.79	6	1	0	0	7
Total	131	43	5	11	190

0.1~0.19 mg/L에서 검출률 85.7%, 평균 세균수는 67 CFU/mL로 가장 높았으며, 0.6~0.79 mg/L에서는 검출률 35%, 평균 세균수는 1 CFU/mL로 유리잔류염소농도가 높아짐에 따라 검출률과 평균 세균수는 감소하였다.

검출된 시료 190개 가운데 131개 시료(69%)에서는 세균수가 10 CFU/mL이하였고, 100 CFU/mL이상은 잔류염소 0.5 mg/L이하 시료에서만 나타났다. 최고 균수는 600 CFU/mL로써 일본의 잠정규격 2,000 CFU/mL 보다는 낮은 수치였으며 수도물 중 잔류염소가 기준치 이상임에도 불구하고 종속영양세균의 존재를 확인할 수 있었다.

상수도관망에서의 종속영양세균수는 Table 6과 같으며 정수에서 관말 수도꼭지로 갈수록 잔류염소 농도는 감소하고 세균수는 증가하는 경향을 보여주었다. 이러한 종속영양세균은 정수 처리되지 않은 원수 중에 많이 존재하며, 응집·침전·여과·염소소독 등 정수처리공정에 의해 대부분 사멸하지만 염소에 저항성을 가지는 종은 사멸하지 않고 존재하게 된다. 그리고 상수도관망 내에서 생물막을 형성하여 재증식 하는 것으로 추정된다. 국내외에서도 염소소독을 실시한 수도물 중에 종속영양세균이 검출된 보고 예는 다수 있다(박성주 등, 1993; Niquette et al., 2001; Prevost et al., 1998; Zhang and DiGiano, 2002). 미국에서는, 배수관망에서의 잔류염소 유지 필요성 논의에 종속영양세균이 이용되었고, 급수전으로 세균이 검출됨으로써 배수관망 내 생물막의 형성을 시사하였다. 또 생물막은 종속영양 세균뿐만 아니라 다른 세균들도 증식할 수 있는 장소인 동시에 잔류염소로부터의 피난처가 될 가능성이 있다고 결론지었다. 이러한 상황에 대해서, 미국 EPA에서는 현재 시행하고 있는 대장균시험 규칙의 개정과 배수시스템에 있어서 새로운 요구사항이 검토되고 있다(USEPA, 2004). 일본에서도 잔류염소가 존재하는 물탱크 및 병원내 수도물에서 종속영양

세균의 존재를 확인하고(古畑勝則 등, 2007) 2008년 4월 厚生労働省(2007)에서 종속영양세균을 수질관리 목표설정 항목에 추가시켰으며 R2A Agar배지에서 7일간 배양하여, 집락수(CFU)가 1 mL 중에 2,000 이하로 할 것을 잠정기준을 설정하였다. 이러한 조치는 종속영양세균을 감소시키기 위한 방안과 배수관망 내에서의 생물막 형성을 가능한 방지하기 위한 것으로 이해된다. 국내의 경우 세균 오염과 소독 효과의 확인을 위해 대장균(균)과, 일반세균시험만이 활용되고 있다. 본 연구결과 종속영양세균의 검출은 외국기준과 비교하면 높은 수준은 아니었으나 잔류염소 농도가 낮아지면 종속영양세균이 급격히 증식 할 것으로 추정되며 이는 하천이나 호수 등의 원수 중에 일반세균보다 더 많이 존재하고 있기 때문인 것으로 보인다. 정수처리나 소독 과정의 적절성, 배수관망 내에서 유리 잔류 염소의 소실에 따른 종속영양세균의 증가와 수도물의 청정한 상태 유지 여부 등을 체크하기에 유용한 장점이 있기 때문에 향후 안전 한 수도물 관리를 위해 종속영양세균에 관한 정보를 모으고 지식을 축적하여 종속영양세균에 대한 목표치를 설정할 필요성이 있으며 모니터링 측정 결과를 평가하고 비교하여 비정상인 증가 현상 등의 거동을 파악하는 것이 중요하다고 생각된다.

3.5. HPC검출을 위한 배지와 배양조건 검토

배지종류에 따른 종속영양세균수의 차이를 조사하기 위하여 Table 7과 같이 고영양배지인 PCA와 저영양배지인 R2A Agar배지에 온도와 시간을 달리하여 배양 실험하였으며 정수의 경우 세균의 검출률을 높이기 위하여 시료량을 증가시켜 1 L 5개, 100 mL 5개, 10 mL 5개를 만들어 티오황산나트륨으로 잔류염소를 제거하지 않고 5배 농축 R2A Broth (MB cell)를 20, 2, 0.2 mL를 각각 넣어 7일간

Table 6. The number of heterotrophic bacteria in water pipe network

A filtration plant	Filtered water			A water pipe			Tap water		
	R2A(CFU/mL) 25°C, 7days min.-max. (average)	Residual chlorine(mg/L) min.-max. (average)	No. of sample	R2A(CFU/mL) 25°C, 7days min.-max. (average)	Residual chlorine(mg/L) min.-max. (average)	No. of sample	R2A(CFU/mL) 25°C, 7days min.-max. (average)	Residual chlorine(mg/L) min.-max. (average)	No. of sample
Maegok	0~3(0.5)	0.25~0.7(0.51)	8	0~230(13.9)	0.2~0.7(0.42)	34	0~320(22.3)	0.2~0.68(0.34)	25
Munsan	0	0.4~0.65(0.52)	5	0~16(3.4)	0.3~0.6(0.43)	10	0~600(52.5)	0.15~0.49(0.31)	15
Gongsan	0~1(0.2)	0.45~0.6(0.56)	5	0~20(6.1)	0.15~0.5(0.36)	10	0~240(30.4)	0.1~0.6(0.34)	17
Gachang	0~2(0.3)	0.3~0.5(0.41)	8	0~180(28)	0.2~0.4(0.34)	10	0~300(40)	0.15~0.50(0.33)	22
Gosan	0	0.4~0.5(0.46)	5	0~23(3.6)	0.2~0.5(0.30)	20	0~130(9.3)	0.2~0.50(0.36)	23

Table 7. The result of HPC by culture medium

Filtered water	PCA (CFU/mL) 35°C		R2A (CFU/mL) 25°C		R2A broth (MPN/10L) 7days	Tap water (No. of collection site)	PCA (CFU/mL) 35°C		R2A (CFU/mL) 25°C	
	48hrs	7days	48hrs	7days			48hrs	7days	48hrs	7days
	Maegok	0	0	0	0.2		350	Maegok(24)	0	0-60(2.3)
Munsan	0	0	0	0	33	Munsan(8)	0	0-20(2.1)	0	0-87(5.4)
Gongsan	0	0	0	0	70	Gongsan(9)	0	0-11(2.2)	0	0-55(11.5)
Gachang	0	0	0	0.3	540	Gachang(10)	0	0-130(7.1)	0	0-320(38.9)
Gosan	0	0	0	0	17	Gosan(17)	0	0-7(0.2)	0	0-23(2.8)

배양한 후 다시 R2A Agar배지에 접종하여 세균의 유무를 확인하고 MPN방법으로 계수하였다.

시험결과 정수는 PCA(35°C)와 R2A Agar(25°C)배지에서 7일간 배양하더라도 대부분 검출되지 않았으나 MPN/10 L 실험에서는 17~350 MPN/10 L의 중속영양세균의 존재를 확인하였다. 수도꼭지는 PCA(35°C), R2A Agar(25°C)배지 48 시간 배양에서는 세균이 검출되지 않았지만, PCA, 35°C 7일간 배양에서 0~130 CFU/mL 범위로 검출되었고, 평균은 0.2~7.1 CFU/mL 였다. R2A Agar, 25°C, 7일간 배양에서는 0~320 CFU/mL 범위였으며, 평균은 2.8~38.9 CFU/mL로 PCA배지 보다 R2A Agar배지에서 더 많은 세균이 검출되어 경우에 따라 20배까지 높게 나타났다. 이러한 이유는 빈영양 상태, 저온 등으로 대사계가 저하된 상태였으나 영양이 풍부한 상태로 이동하게 되면서 대사가 활발해졌을 것으로 판단된다. R2A 배지는 수질 환경에 맞추어 효모 추출물, 카제인펩톤 등 유기 영양분이 억제된 조성으로 해독 및 H₂O₂ 제거작용이 있는 용해 전분, 피루브산 나트륨이 첨가되어 광범위 손상 균의 성장이 가능한 배지이다. 따라서 유기탄소 농도가 낮은 10~30°C의 환경인 수도물 중에서도 생육할 수 있는 세균을 잘 검출할 수 있었고 PCA배지보다 R2A Agar배지에서 더 많은 세균이 검출되었다고 추정된다. 일본 UBE 과학분석센터의 실험에 의하면 총 균수를 측정하는 가장 간편한 방법은 형광색소 미생물 핵산을 특이적으로 염색하여 형광 현미경으로 직접 세균을 관찰하는 형광 현미경에 의한 총 균수 측정방법으로서 동일 시료에 대해 중속영양세균과 전체 균수 측정결과 높은 상관 관계를 보인 반면 일반세균은 상관관계가 없는 것으로 나타났다. 坂保三継와 眞木俊夫(2001) 보고에서는 PGY Agar와 R2A Agar로 25°C, 7일간 배양이 넓은 범위의 수질 검사에 적용할 수 있는 중속영양세균 계수용 배지로서 적합하다고 보고하였다. 또 25~30°C 범위의 배양으로 항상 양호한 결과를 얻었으며, 기존 시험방법을 고려해 25°C, 7일간의 배양으로 최종 집락수와 비슷한 값을 얻어 가장 바람직하다고 보고하였다. 따라서 본 연구 실험결과에서 나타난 것처럼 이러한 조건이 저영양배지인 R2A Agar를 이용해 25°C로 7일간 배양하는 방법이 수도물의 중속영양세균 시험방법으로서 가장 적합한 것으로 판단되었다.

4. 결론

대구시 상수도관망 수도꼭지 296개 시료의 유리잔류염소는 최저 0.1 mg/L에서 최고 0.79 mg/L의 범위로 조사되었으며, 미생물 검사결과 일반세균과 대장균군은 검출되지 않아 먹는물수질기준에 적합한 것으로 나타났다. 그 중 유리잔류염소가 0.1 mg/L 이상인 시료를 대상으로 25°C, R2A agar배지에 7일간 배양한 결과 65.9%에서 중속영양세균이 검출되었다.

1) 정수에서 관말 수도꼭지로 갈수록 잔류염소농도는 감소하고 세균수는 증가하는 것으로 나타났다. 잔류염소농도 0.1~0.19 mg/L 범위에 있는 시료에서는 검출률은 85.7%,

평균세균수는 67 CFU/mL로 높았으며, 0.6~0.79 mg/L 범위의 시료에서는 검출률 35%, 평균세균수 1 CFU/mL로 조사되었다.

- 2) PCA배지에서 7일간 배양(35°C)하여 세균수는 0~130 CFU/mL(평균 0.2~7.1 CFU/mL)로 나타났고, R2A Agar 배지, 7일간 배양(25°C)에서는 세균수가 0~320 CFU/mL(평균 2.8~38.9 CFU/mL)로 나타나 PCA배지 보다 R2A Agar배지에서 더 많은 세균이 검출되었다.
- 3) 분리된 균주의 집락 대부분은 붉은색 또는 노란색계통 색소를 띠었으며, 16S rRNA sequence 동정결과 붉은색 또는 분홍색 균주는 *Methylobacterium sp.* (4주), *Williamsia sp.* 로 동정되었고, 노란색 균주는 *Sphingomonas sp.*, *Sphingobium sp.* (2주), *Novosphingobium sp.* (2주), *Blastomonas sp.* (3주), *Rhodococcus sp.* (2주), *Microbacterium sp.* 였으며 그리고 흰색 균주는 *Staphylococcus sp.* 으로 확인되었다.
- 4) 유리잔류염소농도 0.1 mg/L에서 5분간 접촉시켜 저항성을 조사한 결과 분리균주의 40% 이상이 생존하였으며 *Methylobacterium sp.* 와 *Sphingomonas*, *Rhodococcus sp.* 등 일부균주는 80% 이상 높은 생존률을 보여 주었다. 특히 *Methylobacterium isbiliense* 는 잔류염소농도 0.5 mg/L에서 5분간 접촉에서 65%의 생존률을 나타내었다.
- 5) 멸균한 수도물(유리잔류염소 0.05 mg/L)이 들어있는 폴리에틸렌병에 분리균주를 접종하고 2개월 동안 정치한 결과 *Methylobacterium sp.* 와 *Sphingomonas sp.* 가 접종된 병에서 생물막이 형성되는 것을 확인하였다.
- 6) 상수도관망에서 유리잔류염소가 소실되면 중속영양세균이 증가되는 결과를 얻었으며 관망내 수도물의 청정상태 체크를 위하여 중속영양세균에 대한 기준치 설정이 필요한 것으로 판단된다.

참고문헌

- 박성주, 조재창, 김상종(1993). 상수도계통에서의 세균 분포 및 변화. *미생물학회지*, **31**, pp. 245-254.
- 이동근(2007). 수도물속 생물막 형성의 초기 세균. *한국환경보건학회지*, **33**(5), pp. 428-433.
- 일본약학회(2005). 위생시험법주해, *금원출판주식회사*.
- 장현정(2009). 배급수관로의 생물막 저감방안연구 요약문, 서울시상수도연구원 홈페이지.
- 환경부(2009). 먹는물수질공정시험기준.
- 古畑勝則, 福山正文(2006). 病院内水道水からの貧栄養細菌の分離状況. *防菌防黴*, **34**(6), pp. 323-328.
- 古畑勝則, 福山正文, 大仲賢二(2007). 病院内水道水における貧栄養細菌の生息状況. *麻布大學雑誌*, **15**, pp. 243-247.
- 坂保三継, 眞木俊夫(2001). 水の從屬栄養細菌試験における培地並びに培養條件の検討. *東京衛生年報*, **52**, pp. 245-249.
- 厚生労働省(2007). 水質基準に關する省令の一部改正における留意事項について (平成19年 11月 15日 健水發第1115002号).
- Anderson, R. L., Holland, B. W., Carr, J. K., Bond, W. W., and Favero, M. S. (1990). Effect of disinfectants on *Pseudomonas*

- colonized on the interior surface of PVC pipes. *AJPH*, pp. 17-21.
- APHA (2005). *Standards Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21th ed., AWWA and WEF.
- Borenstein, S. B. (1994). Microbiologically influenced corrosion handbook. *Industrial Press Inc.*, New York.
- Chen-hsiang L., Ya-Fen, T., and Jien-Wei, L. (2004). Under-diagnosis of urinary tract infection caused by *Methylobacterium* species with current standard processing of urine culture and its clinical implications. *J. Med. Microbiol.*, **53**, pp. 755-759.
- Furuhata, K., Kato, Y., Goto, K., Hara, M., Yoshida, S., and Fukuyama, M. (2006). Isolation and identification of *Methylobacterium* species from the tap water in hospitals in Japan and their antibiotic susceptibility. *Microbiol. Immunol.*, **50**(1), pp. 7-11.
- Furuhata, K., Kato, Y., Goto, K., Saitou, K., Sugiyama, J., Hara, M., and Fukuyama, M. (2007). Identification of yellow-pigmented bacteria isolated from hospital tap water in Japan and their chlorine resistance. *Biocontrol Sci.*, **12**(2), pp. 39-46.
- Furuhata, K. and Koike, K. A. (1990). Characteristics and antibiotic susceptibility of *Methylobacterium extorquens* isolated from drinking water and air in the hospital. *Nikkanshi.*, **5**, pp. 47-51.
- Furuhata, K. and Koike, K. A. (1993). Isolation of *Methylobacterium* spp. from drinking tank-water and resistance of isolates to chlorine. *Koshu.*, **40**, pp. 1047-1053.
- Furuhata, K., Koike, K. A., Koike, J., Kishikawa, S., Fukuyama, M., Taguchi, H., Tsuchiya, E., and Matsumoto, A. (1991). The mechanism of resistance to free residual chlorine in *Protomonas extorquens* isolated at a high frequency from drinking tank-water. *J. Antibact. Antifung. Agents*, **19**, pp. 395-399.
- Furuhata, K., Koike, K. A., and Matsumoto, A. (1987). Growth and survival of a chlorine resistive gram-negative rod bacterium, *Protomonas extorquens*, isolated dominantly from drinking tank-water. *Bull. Jpn. Soc. Microb. Ecol.*, **4**, pp. 35-47.
- Furuhata, K. and Matsumoto, A. (1983). Some heterotrophic bacteria in drinking tank water, and their resistance for chlorine and heat. *Ann. Rep. Tokyo Metrop. Res. Lab. Public Health*, **34**, pp. 282-289.
- Furuhata, K. and Matsumoto, A. (1984). Bacteriological characteristics of chlorine resistive *Pseudomonas* isolated dominantly from drinking tank water. *Ann. Rep. Tokyo Metrop. Res. Lab. Public Health*, **35**, pp. 352-362.
- Furuhata, K. and Matsumoto, A. (1987). A study on a selective medium for the isolation and enumeration of gram-negative rod bacterium *Protomonas extorquens* from drinking tank water. *Ann. Rep. Tokyo Metrop. Res. Lab. Public Health*, **38**, pp. 333-342.
- Furuhata, K. and Matsumoto, A. (1992). Some bacteriological studies on the pinkish slimy films formed on the tiles using bathrooms and washstands. *Ann. Rep. Tokyo Metrop. Res. Lab. Public Health*, **43**, pp. 197-204.
- Hiraishi, A., Furuhashi, K., Matsumoto, A., Koike, K. A., Fukuyama, M., and Tabuchi, K. (1995). Phenotypic and genetic diversity of chlorine-resistant *Methylobacterium* strains isolated from various environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**(6), pp. 2099-2107.
- Hornei, B., Lüneberg, E., Schmidt-Rotte, H., Maaß, M., Weber, K., Heits, F., Frosch, M., and Solbach, W. (1999). Systemic infection of an immunocompromised patient with *Methylobacterium zatmanii*. *Journal of Clinical Microbiology*, **37**(1), pp. 248-250.
- LeChevallier, M. W., Cawthon, C. D., and Lee, R. G. (1988). Inactivation of biofilm bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **54**(10), pp. 2492-2499.
- Niquette, P., Servais, P., and Savoie, R. (2001). Bacterial dynamics in the drinking water distribution systems of brussels. *Water Research*, **32**(3), pp. 675-682.
- Patt, T. E., Cole, G. C., and Hanson, R. S. (1976). *Methylobacterium*, a new genus of facultatively methylotrophic bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **26**, pp. 226-229.
- Prevost, M., Romprea, A., Coalliera, J., Servais, P., and Laurent, P. (1998). Suspended bacterial biomass and activity in full-scale drinking water distribution systems : Impact of water treatment. *Water Research*, **32**(5), pp. 1393-1406.
- Rosa, F., Giampaolo, C., Alessandro, B., and Enrico, T. (2010). AlessandroMariottini 4 and Patrizia Pecile 3 unusual *Methylobacterium fujisawaense* infection in a patient with acute leukaemia undergoing hematopoietic stem cell transplantation: First Case Report, *Hindawi Publishing Corporation Case Reports in Medicine*, Article ID 313514, pp. 3.
- Sanders, J. W., Martin, M., and Hooke, J. (2000). *Methylobacterium mesophilicum* infection: case report and literature review of an unusual opportunistic pathogen. *Clinical Infectious Diseases*, **30**(6), pp. 936-938.
- Takuchi, M., Hamana, K., and Hiraishi, A. (2001). Proposal of the genus *Sphingomonas sensu stricto* and three new genera, *Sphingobium*, *Novosphingobium* and *Sphingopyxis*, on the basis of phylogenetic and chemotaxonomic analyses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **51**, pp. 1405-1417.
- Truant, A. L., Gulati, R., Giger, O., Satishchandran, V., and Caya, J. G. (1998). *Methylobacterium bacteraemia* in AIDS. *Clinical Microbiology and Infection*, **4**(2), pp. 112-113.
- USEPA (2004). The effectiveness of disinfectant residuals in the distribution system, Draft, Washington DC, Total Coliform Rule Issue Paper.
- Zhang, W. and DiGiano, F. A. (2002). Comparison of bacterial regrowth in distribution systems using free chlorine and chloramine : a statistical study of causative factors. *Water Research*, **36**(6), pp. 1469-1482.