

서울 약수터의 지표세균 분포 및 16S rRNA 염기서열을 이용한 총대장균군 동정 및 계통분석

윤태호[†] · 이향 · 최금숙 · 이승주 · 이목영 · 어수미

서울시보건환경연구원

Occurrence of Indicator Bacteria and Identification of Total Coliforms Using 16S rRNA Gene in Drinking Spring Water in Seoul

Tae-ho Yoon[†], Hyang Lee, Geum-sook Choi, Seung-joo Lee, Mok-young Lee, and Soo-mi EO

Seoul metropolitan government Institute of Health & Environment

ABSTRACT

Objectives: This study was performed in order to detect indicator bacteria in drinking spring water (DSW) samples in Seoul Metropolitan City, and to identify their genus through 16S rRNA sequencing and then assessing the genetic relation of their strains.

Methods: For indicator bacteria detection and identification of total coliforms, we analyzed DSW between the spring and summer seasons. In particular, DSW samples were chosen from sites repeatedly found unsatisfactory in recent years.

Results: Heterotrophic plate counts of DSW in the spring and summer season were investigated in the range of 0-550 and 0-800 CFU/mL, respectively. Total coliforms of these were 0-1,900 and 0-2,100 CFU/100mL, fecal coliforms were 0-600 and 0-550 CFU/100mL, and *Escherichia coli* were 0-7 and 0-326 MPN/100mL. The detection ratio of fecal pollution indicators and that of fecal coliforms increased to 58.6% in the summer from 12.5% in the spring and *Escherichia coli* increased to 51.4% from 4.7%. As a result of genetic analysis on the isolated bacteria, the genus of total coliforms was classified in the order of *Enterobacter spp.* 12.7%, *Serratia spp.* 7.3%, *E. hermannii* 6.4%, *Rahnella spp.* 5.5%, *Hafnia spp.* 4.5%, *Escherichia coli* 3.6%, *Klebsiella spp.* 3.6% in the spring season. In the summer season, it was classified in order of *Klebsiella spp.* 16.6%, *Enterobacter spp.* 13.0%, *Escherichia coli* 11.0%, *Serratia spp.* 8.6%, *Raoultella spp.* 7.0%, *Kluyvera spp.* 5.6% and *Citrobacter spp.* 3.0%.

Conclusions: The increase of fecal pollution in summer indicates that special attention to drinking DSW is required.

Keywords: Fecal pollution, Indicator bacteria, Drinking spring water, 16S rRNA, Coliforms

I. 서 론

약수터는 시민들이 쉽게 접근 할 수 있는 먹는 물 공동시설로써 시민 여론조사에 의하면 장년층 이상이 주로 이용하며 조사대상 중 21.1%가 음용 목적

으로 약수터를 이용하고 있는 것으로 나타났다.¹⁾ 서울은 2011년 말 기준으로 276개소의 약수터를 각 구청에서 시설유지 및 수질관리를 담당하고 있다. 약수터를 이용하는 시민들에게 안전한 음용을 위해 매 분기마다 수질검사를 실시하여 먹는 물 공동시설 수

[†]Corresponding author: Seoul metropolitan government Institute of Health & Environment, Seoul, 427-070, Korea, Tel : +82-2-570-3287, Fax : +82-2-570-3214, E-mail : fuco99@seoul.go.kr

Received: 19 November 2013, Revised: 20 December 2013, Accepted: 27 December 2013

질기준 검사 결과에 따라 음용 적합 여부를 판단하여 사용 안내하고 있다. 하지만 서울시 자료에 의하면 검사 대상 약수터의 음용 부적합율은 2011년 말 기준 35.8%로 매우 높은 것으로 나타났으며 부적합 요인의 96.5%가 총대장균군 등 미생물에 의한 것으로 나타났다. 특히 강수량이 많고 기온이 상승하는 여름철에 음용 부적합율이 50.1%로 상승하여 이에 대한 각별한 주의를 요구하고 있는 실정이다.²⁾ 한편 지속적인 음용 부적합으로 안전성 확보를 위해 집중 관리 하고 있는 중점관리 대상시설은 오염에 더욱 취약한 것으로 판단하고 있다.

현재 약수터는 먹는물 수질기준에 따라 총대장균군 등 지표세균에 대한 정성시험으로만 판정기준을 정하고 있어 약수터의 지표세균 농도를 파악하기가 어려우며 검출세균에 대한 세부적인 속(Genus)의 구성을 판단하기 어려울 뿐만 아니라 검출세균의 건강상 위해가능성 여부도 판별하기는 쉽지 않다.

따라서 본 연구는 최근 반복적인 음용 부적합으로 중점관리가 필요한 서울 소재 약수터에 대해 봄과 여름철로 나누어 지표세균 현황을 파악하고 검출된 총대장균군에 대한 16S rRNA 분석 등을 통해 출현 빈도가 높은 미생물을 분류하였다.

II. 재료 및 방법

1. 연구대상 및 검사항목

서울시 소재 약수터에 대한 지표세균의 조사 및 검출특성 연구를 위해 최근 1년간 4회 이상 반복 부적합 등의 사유로 인해 집중 관리대상으로 지정된 약수터에 대해 조사하였다. 봄철 조사는 2012년 4~6월까지 64개소이며, 2차 조사는 여름철에 해당하는 8월에 70개소에 대해 실시하였다. 시료채취는 무균 채수병에 4리터씩 각각 채수하여 일반세균, 총대장균군, 분원성대장균군 및 대장균을 정량 분석하였으며, 여시니아는 정성 분석하였다.

2. 지표세균 정량실험

검사방법은 지표세균인 총대장균군, 분원성 대장균군 및 대장균의 경우 환경부에서 고시한 수질오염 공정시험기준을 사용하였으며,³⁾ 일반세균 및 여시니아는 먹는물수질공정시험기준에 준하여 실험하였다.⁴⁾

약수터의 지표세균의 정량화를 위해 시료분석량을

100 mL로 조정하여 총대장균군, 분원성대장균군 및 대장균을 분석하였다. 총대장균군과 분원성대장균군은 막 여과장치(Millipore Microfil system, USA)을 이용하여 직경 47 mm, 여과경 0.45 μm 크기의 멸균된 멤브레인 필터에 집락수가 20~80개가 되도록 희석한 시료를 각각 여과하였고, 대장균은 효소발색기질을 이용하는 Coli-ert kit(IDEXX, USA)를 사용하여 분석하였다.

총대장균군은 수질오염공정시험기준에 따른 선택배지인 m-ENDO(Difco, USA) 고체배지에 올려놓고 충분히 배지에 스며들도록 정지한 후 페트리디쉬를 뒤집어 (35.0 \pm 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 인큐베이터에서 (24 \pm 2)시간 배양하였다. 배양 후 여과지 위에 형성된 전형적인 금속성 광택을 나타내는 콜로니를 계수하여 100 mL당 총대장균군 수치로 정량하였고, 분원성대장균군은 선택배지인 m-FC(Difco, USA)를 사용하여 (44.5 \pm 0.2) $^{\circ}\text{C}$ 인큐베이터에서 (24 \pm 2)시간 배양한 후 여과지 위에 형성된 전형적인 파란색 콜로니를 계수하여 100 mL당 분원성대장균군 수치로 정량하였다. 대장균은 제조사의 지시에 따라 Quanti-Tray 2000(IDEXX, USA)을 이용하여 정량범위가 2400이하가 되도록 시료를 희석하여 (35 \pm 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간 배양한 다음 진한 노란색을 발색하는 부분을 총대장균군 양성으로 판정하였고, 360 nm UV 파장에서 형광 빛을 발색하는 부분을 대장균 양성으로 판정하였다. 각각의 양성 웰(well)수를 산출하여 최확수법(most probable number, MPN)으로 정량적인 수치(MPN/100 mL)를 나타냈다.

한편 일반세균 정량은 Plate Count Agar(Difco, USA) 배지를 사용하여 시료 1 mL를 (35 \pm 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 인큐베이터에서 (48 \pm 2)시간 배양한 후 형성되는 콜로니를 계수하였으며, 여시니아 검출은 CIN 및 m-MC 고체배지를 사용하여 시료 1L씩 여과한 후 20 $^{\circ}\text{C}$ 인큐베이터에서 48시간 배양한 후 전형적인 콜로니에 대해 예비동정실험과 API 20E kit를 사용하여 최종 확정하였다.

3. 총대장균군의 16S rRNA 염기서열을 이용한 동정 및 계통분석

약수터 시료 중 막여과법에 의해 총대장균군으로 확정된 세균을 16S rRNA gene으로 동정하기 위해 검출세균농도를 감안하여 각각의 시료에 대해 1~10

개 정도의 콜로니를 순수분리 배양하여 분리된 균을 TSA에 희석 접종 배양한 후 염기서열 분석을 (주)마크로젠에 의뢰하였다. 의뢰된 cell에서 genomic DNA를 추출한 후 16S rDNA gene을 증폭하기 위해 사용한 primer인 27F(5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCA-3')와 1492R(5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3')로 end sequencing을 수행한 후 얻은 결과물은 internal primer인 518F(5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3')와 800R(5'-TACC AGGGTATCTAATC-3')을 사용하였다.⁵⁾ 시퀀싱 반응은 ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kits(Applied Biosystems)을 이용하여 진행하였으며 PTC-225 Peltier Thermal Cycler(MJ Research)를 사용하여 PCR 반응을 진행하였고, 반응물 2 µL를 1% agarose gel에 전기영동하여 약 1.5 kbp 크기를 확인하였다.⁶⁾ 정제된 PCR product는 3차 증류수에 다시 녹여 ABI PRISM 3730XL Analyzer에서 분석을 하였다. 분석된 염기서열을 이용한 총대장균군 동정은 미국 NCBI(National Center for Biotechnology Information)에서 제공하는 BLAST를 이용하여 염기서열 상등비율을 99% 이상으로 하였다.⁷⁾

총대장균군 계통분석을 실시하기 위해 GenBank에 등재되어 있는 *Escherichia coli* ATCC 11775 (accession no. X80725), *E. coli* O157:H7(HQ658163), *Shigella dysenteriae*(X96966), *Citrobacter freundii* (AJ233408), *C. braakii*(AF025368), *Enterobacter aerogenes*(AB004750), *E. aerogenes*(FJ823005), *E. cloacae* ATCC 13047T(AJ251469), *Hafnia alvei* (M59155), *Klebsiella pneumoniae*(X87276), *K. pneumoniae* ATCC13884(Y17657), *Serratia marcescens* (AJ233431), *S. rubidaea*(AJ233436), *Raoultella ornithinolytica*(U78182), *R. planticola*(NR024996), *Buttiauxella brennerae*(AJ233401), *Leclercia adecarboxylata* (JX501721), *Rahnella aquatilis*(NR025337)를 이용한 총대장균군 계통⁸⁾과 *Aeromonas hydrophila* (AJ508765)을 총대장균군 계통 외(outgroup)로 지정하여 계통수를 제작하였다.⁹⁾ 한편 계통수의 정확성을 판단하기 위해 표준 균주인 *Escherichia coli* ATCC9001(This study)과 *Enterobacter aerogenes* ATCC10006(This study)를 염기서열 분석 후 계통수 분석에 삽입하였다. 제작된 계통수에 시료로부터 분석된 염기서열 자료를 삽입¹⁰⁾하여 Neighbor-Joining 연산법¹¹⁾으로 1,000

회 반복하여 신뢰도를 확보하고 CLUSTAL-W 방법¹²⁾으로 정렬된 결과를 얻은 후 MEGA5 프로그램을 이용하여 계통분석을 실시하였다.¹³⁾

III. 결과 및 고찰

1. 약수터 지표세균 분포

서울시에 위치하고 있는 중점관리 약수터를 대상으로 봄과 여름에 걸쳐 지표세균을 조사하였다. 지표세균 모니터링 항목은 기존 먹는물 수질공정시험 기준에 정하고 있는 방법을 사용하여 일반세균과 여시니아에 대하여 실험하였으며 총대장균군, 분원성 대장균군 및 대장균은 정량실험을 하여 약수터 오염 수준¹⁴⁾을 파악하였다.

중점관리 약수터에 대한 지표세균 조사 결과 일반세균은 봄철 64개소 조사 대상으로 0~550 CFU/mL이고 여름철 70개소 조사 대상으로 0~800 CFU/mL로 조사되었으며, 조사 대상 약수터의 봄철 평균은 30.7 CFU/mL이고 여름철은 45.2 CFU/mL로 여름철에 증가하는 경향을 나타냈다. 총대장균군의 정량분석 결과는 봄과 여름철에 각각 0~1,900 CFU/100 mL, 0~2,100 CFU/100mL로 평균값은 82.4 CFU/ 100mL, 128.3 CFU/100mL로 조사됐다. 분원성대장균군의 경우 0~600 CFU/100 mL, 0~550 CFU/100 mL로 평균값은 13.7 CFU/100 mL, 13.4 CFU/100 mL로 조사됐으며, 대장균의 경우는 0~37 MPN/100 mL, 0~326 MPN/100 mL로 평균값은 1.2 MPN/100 mL, 7.2 MPN/100 mL로 조사됐다. 한편 여시니아는 조사대상 중 봄철 3건이 검출되었으며, 여름철에는 1건이 검출되었다(Table 1). 조사기간에 따른 지표세균 검출은 평균농도를 이용하여 비교한 결과 강우량이 많아지고 온도가 상승하는 여름철에 일반세균, 총대장균군, 대장균의 검출농도가 각각 높아지는 것을 확인할 수 있었으며 분원성대장균군도 마찬가지로 최대값을 제외한 결과로 살펴보았을 때 평균 2.6에서 5.5 CFU/100 mL로 상승하는 것을 확인하였다.

먹는물 수질기준에서는 총대장균군, 분원성대장균군 및 대장균 항목에 대해 검출 유무로만 판단기준을 정하고 있어 약수터에서 검출되더라도 농도는 파악할 수 없어 농도 계산이 가능한 막여과법 및 최적확수법을 이용하여 분석대상시료를 정량분석 하였으며, 이를 각각 봄철 및 여름철 시료로 구분하여

Table 1. Level of indicator bacteria for drinking spring water chosen by repeated unsatisfied water quality sites in seoul area

Parameters (Unit)	Criteria of water quality	Spring(n=64) (April ~ June)			Summer(n=70) (August)		
		Range	Average	No. of unsatisfied site(%)	Range	Average	No. of unsatisfied site(%)
Heterotrophic plate counts (CFU/mL)	100	ND ~ 550	30.7	3(4.7)	ND ~ 800	45.2	4(5.7)
Total coliforms (CFU/100mL)	ND*	ND ~ 1900	82.4	49(76.6)	ND ~ 2100	128.3	58(82.9)
Fecal coliforms (CFU/100mL)	ND	ND ~ 600	13.7	8(12.5)	ND ~ 550	13.4	41(58.6)
<i>E. coli</i> (MPN/100mL)	ND	ND ~ 37	1.2	3(4.7)	ND ~ 326	7.2	36(51.4)
<i>Yersina</i> (Detect or not/2L)	ND	Three case detected(4.7)		One case detected(1.4)			

*ND : Not Detect.

Table 2. Frequency number for indicator bacterial counts in drinking spring water at spring and summer season

Season	Range of counts	No. of distribution of indicator bacterial counts (%)			
		Heterotrophic plate counts (CFU/mL)	Total coliforms (CFU/100mL)	Fecal coliforms (CFU/100mL)	<i>E. coli</i> (MPN/100mL)
Spring (n=64)	Not detect	17(26.6)	15(23.4)	56(87.5)	61(95.3)
	1 ~ 10 ¹	28(43.8)	20(31.3)	4(6.3)	1(1.6)
	>10 ¹ ~ 10 ²	16(25.0)	21(32.8)	3(4.7)	2(3.1)
	>10 ² ~ 10 ³	3(4.7)	6(9.4)	1(1.6)	0(0.0)
	>10 ³	0(0.0)	2(3.1)	0(0.0)	0(0.0)
Summer (n=70)	Not detect	18(25.7)	12(17.1)	29(41.4)	34(48.6)
	1 ~ 10 ¹	16(22.9)	23(32.9)	32(45.7)	29(41.4)
	>10 ¹ ~ 10 ²	32(45.7)	26(37.1)	7(10.0)	6(8.6)
	>10 ² ~ 10 ³	4(5.7)	6(8.6)	2(2.9)	1(1.4)
	>10 ³	0(0.0)	3(4.7)	0(0.0)	0(0.0)

지표세균 검출농도 범위 별로 분포율을 나타내었다 (Table 2). 일반세균의 경우 봄철의 경우 1~10 CFU/mL 분석대상 시료 중 43.8%로 검출빈도가 가장 높았으나 여름철의 경우는 11~100 CFU/mL 분석 대상시료 중 45.7%로 검출빈도가 높은 것으로 나타났다. 총대장균군은 1~10 CFU/100 mL과 11~100 CFU/100mL 범위의 농도가 봄철에는 각각 31.3%, 32.8%로 여름철에는 32.9, 37.1%로 다소 증가하는 경향을 나타냈다. 분원성대장균군은 봄철에는 불검출이 87.5%로 가장 높았으나 여름철의 경우는 41.4%로 감소하였으며 10 CFU/100 mL 이하로 검출되는 빈도가 45.7%로 높게 나타났다. 대장균의 경우는 봄철에는 불검

출이 95.3%로 가장 높았으나 여름철의 경우는 48.6%로 감소하였으며 10 CFU/100 mL 이하로 검출되는 빈도가 41.4%로 높게 나타났다. 특히 분원성대장균군과 대장균이 봄철에 비해 여름철에 검출빈도 및 농도가 증가하는 경향이 뚜렷하게 높아지는 것을 확인할 수 있었으며 이러한 세균들이 분변오염지표세균인 점을 감안할 때 여름철 약수터 이용에 특별한 주의가 요구되는 것으로 판단되었다.

2. 약수터 지표세균 검출 특성

지표세균에 대한 먹는물 수질기준에서 정한 음용으로써의 적합성여부는 일반세균은 100 CFU/mL 이

Table 3. Types for unsatisfied criteria of indicator bacteria by one site with drinking spring water

Types of indicator bacteria	No. of sites for unsatisfied criteria (%)	
	Spring(n=64) (April ~ June)	Summer(n=70) (August)
*TC	38(59.4)	12(17.1)
TC + †FC	3(4.7)	11(15.7)
TC + FC + ‡EC	3(4.7)	33(47.1)
§HPC	0(0.0)	1(1.4)
HPC + TC	1(1.6)	0(0.0)
HPC + TC + FC	2(3.1)	1(1.4)
HPC + TC + FC + EC	0(0.0)	2(2.9)
<i>Yersina</i>	1(1.6)	0(0.0)
<i>Yersina</i> + TC	2(3.1)	0(0.0)
<i>Yersina</i> + TC + FC + EC	0(0.0)	1(1.4)

*TC: Total Coliforms, †FC: Fecal Coliforms, ‡EC: *E.coli*, §HPC: Heterotrophic plate counts

하, 총대장균군과 분원성대장균군 및 대장균은 100 mL 당 검출유무, 여시니아는 2L 검출유무로 평가하였다 (Table 1). 적합성 여부를 약수터 시료에 대해서 봄과 여름으로 구분하여 적용하면 여시니아를 제외한 일반세균은 3지점에서 4지점으로, 총대장균군은 49 지점에서 58지점으로 다소 증가 하였으며, 분원성대장균군 및 대장균의 경우는 봄에 비해 여름에 증가하는 경향이 뚜렷하게 나타나는 것을 확인하였다. 특히 분변오염 지표항목인 분원성대장균군 검출은 봄철 분석대상 시료 중 8개소(12.5%)로 나타난 것에 비해 여름철 41개소(58.6%)로, 대장균은 3개소(4.7%)에서 36개소(51.4%)로 증가하여 기온이 상승하는 여름철 약수터 음용 부적합 요인이 상대적으로 상승하는 것으로 나타나 분변오염 가능성에 따른 음용에 각별한 주의가 요구되는 것으로 판단되었다. 한편 Table 3과 같이 약수터 개별지점에서 지표세균 검출에 따른 지표세균 부적합 유형을 살펴보면 봄철의 경우 총대장균군 단일항목 검출이 59.4%로 주요 원인으로 나타났지만, 여름철의 경우는 총대장균군에 의한 검출은 17.1%로 감소하였다. 이와 관련하여 여름철 약수터 지표세균 검출유형을 살펴보면 총대장균군, 분원성대장균군 및 대장균이 동시에 검출되는 경우는 47.1%로, 총대장균군과 분원성대장균군 동시검출은 15.7%로 봄철과 같은 지표세균 검출유형

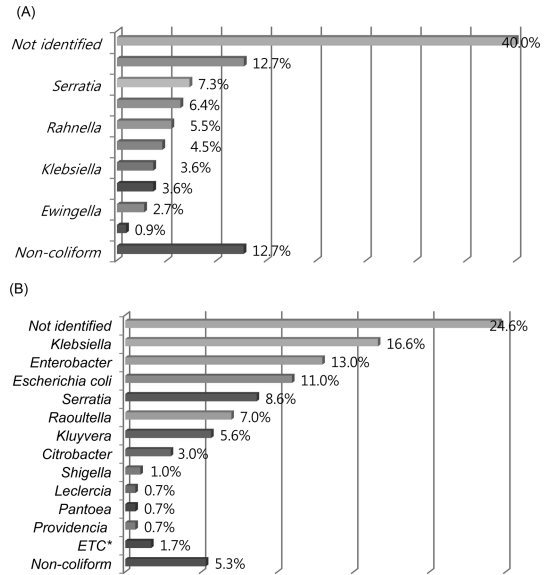


Fig. 1. Genus identification of total coliforms in DSW samples using 16S rRNA sequence at (A)spring season(n=110) and (B)summer season(n=301). *Including in *Salmonella*, *Morganella*, *Pectobacterium*, *Escherichia hermannii* and *Rahnella*.

이 각각 4.7%인 것을 감안하면 여름철 약수터 분변오염 지표세균인 분원성대장균군과 대장균이 크게 증가하여 분변오염유입에 대해 취약한 것으로 판단하였다.

3. 총대장균군의 16S rRNA 염기서열을 이용한 동정

총대장균군은 *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Citrobacter spp.* 등을 포함하고 있는 세균을 지칭하며, 사람과 동물 배설물을 통해 배출되지만 모든 세균이 분변에서 유래하지는 않는다.¹⁵⁾ 약수터에서 검출된 총대장균군 집락을 16S rRNA 유전자 분석후 NCBI에서 제공하는 BLAST 프로그램을 이용하여 99% 이상의 상동성을 나타내는 세균을 봄과 여름으로 나누어 각각 동정¹⁶⁾하였다(Fig. 1). 총대장균군이 검출된 약수터에 대해 검출농도를 감안하여 전형적인 콜로니를 봄철 총대장균군이 검출된 49개 지점에서 110개 시료를 여름철 검출된 58개 지점에서 301개 시료를 순수 분리 배양하였으며, 동정 결과는 *Bergey's manual*에 따라 총대장균군 그룹의 특성으로 분류 할 수 있는¹⁷⁾ 동정결과로 약수터에서 출현하는 총대장균군으로 분류하였다. 전체

411개 시료를 총대장균군 주요 우점종으로 분류한 결과는 *Klebsiella spp.* 13.1%, *Enterobacter spp.* 12.9%, *Escherichia coli* 9%, *Serratia spp.* 8.3%, *Raoultella spp.* 5.1% 순서 등으로 나타났다. 봄과 여름 검출되는 총대장균군 동정결과를 각각 살펴보면 봄철의 경우 *Enterobacter spp.* 12.7%로 우점종으로 나타났으며, *Serratia spp.* 7.3%, *Escherichia hermannii* 6.4%, *Rahnella spp.* 5.5%, *Hafnia spp.* 4.5%, *Escherichia coli* 3.6%, *Klebsiella spp.* 3.6% 순으로 동정되었다. 한편 *Pseudomonas spp.* 10.9%, *Aeromonas spp.* 0.9% 등 총대장균군으로 검출되어 동정했지만 위 양성(false positive)인 것으로 판단되는 경우가 12.7%로 나타났다. 여름철의 경우 *Klebsiella spp.* 16.6%로 우점종으로 나타났으며 *Enterobacter spp.* 13.0%, *Escherichia coli* 11.0%, *Serratia spp.* 8.6%, *Raoultella spp.* 7.0%, *Kluyvera spp.* 5.6%, *Citrobacter spp.* 3.0% 순으로 동정되었다. 한편 *Pseudomonas spp.* 3.3%, *Aeromonas spp.* 0.7% 등 총대장균군 위양성 결과는 5.3%를 나타냈다. 또한 염기서열을 이용한 동정결과 비배양 또는 특징적인 세균명으로 동정되지 않는 그룹이 봄철 및 여름철에 각각 40.0%, 24.6%를 나타냈다. 총대장균군 동정결과는 이 등¹⁸⁾이 여름에 조사한 지하수와 김 등¹⁹⁾이 조사한 약수터에서 동정한 총대장균군은 생화학적 동정결과로 우점종은 *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Serratia spp.*, *Citrobacter spp.* 순서 등으로 분리됐으며, 금번 조사결과가 16S rRNA 동정결과인 점을 감안하더라도 우점종의 순서는 상이할 수 있으나 주로 검출되는 총대장균군은 *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*임을 확인하였고 *Escherichia coli*가 금번 조사에서 다수 동정검출된 것이 특징적이라 할 수 있다. 기온상승 등 계절적인 요인에 의해 총대장균군 그룹 내에 분원성지표인 대장균의²⁰⁾ 비율이 높아지는 것으로 나타났다.

약수터에 대한 총대장균군의 동정결과는 조사 시기에 따른 우점종의 변화 및 검출되는 속(Genus)의 검출 비율의 양상이 다르다는 것을 확인할 수 있었는데 특히 분변오염 지표항목인 *Escherichia coli*의 구성 비율이 봄 3.6%에서 여름 11.0%로 증가하였으며, 분변오염 지표세균으로 분류될 수 있는 *Klebsiella spp.*의 경우도 3.6%에서 16.6%로 증가되는 것으로 나타나 여름철 약수터의 분변오염에 의한 건강 위해 가능성²¹⁾이 높은 것으로 판단되었다.

Table 4. Closet genus classification of total coliforms by phylogenetic tree analysis for drinking spring water

Closet genus(spp.)	No. of classification (%)		
	Spring(n=110) (April ~ June)	Summer (n=301) (August)	Total (n=411)
<i>Enterobacter</i>	20(18.2)	36(12.0)	56(13.6)
<i>Serratia</i>	20(18.2)	46(15.3)	66(16.1)
<i>Enterobacteriaceae</i> (Family)	11(10.0)	13(4.3)	24(5.8)
<i>Hafnia</i>	10(9.1)	0(0.0)	10(2.4)
<i>Rahnella</i>	8(7.3)	1(0.3)	9(2.2)
<i>E. hermannii</i>	7(6.4)	1(0.3)	8(1.9)
<i>Ewingella</i>	6(5.5)	0(0.0)	6(1.5)
<i>E. coli</i>	5(4.5)	41(13.6)	46(11.2)
<i>Raoultella</i>	3(2.7)	50(16.6)	53(12.9)
<i>Klebsiella</i>	2(1.8)	40(13.3)	42(10.2)
<i>Buttiauxella</i>	1(0.9)	0(0.0)	1(0.2)
<i>Citrobacter</i>	1(0.9)	20(6.6)	21(5.1)
<i>Kluyvera</i>	0(0.0)	21(7.3)	21(5.1)
<i>Providencia</i>	0(0.0)	2(0.7)	2(0.5)
<i>Morganella</i>	0(0.0)	1(0.3)	1(0.2)
<i>Pectobacterium</i>	0(0.0)	1(0.3)	1(0.2)
<i>Salmonella</i>	0(0.0)	1(0.3)	1(0.2)
Not available	4(3.6)	4(1.3)	8(1.9)
Outgroup (non-coliforms)*	12(10.9)	23(7.6)	35(8.5)

*Including in *Aeromonas* and *Pseudomonas spp.*

4. 총대장균군의 16S rRNA를 이용한 계통분석

약수터 총대장균군 검출 세균에 대한 동정결과 NCBI에서 제공하는 BLAST 프로그램을 이용하여 99% 이상의 상동성을 나타내는 세균종 비 배양된(Uncultured) 세균으로 동정되거나 정확한 세균으로 분류 되지 않는 시료를 포함하여 총대장균군 계통분석을 수행하여 유사한 속 그룹으로 분류²²⁾하였다(Fig. 2).

총대장균군 그룹으로 분류 특정할 수 없었던 시료들은 계통분석결과 대부분 총대장균군 그룹으로 분류되었으며 총대장균군 그룹에는 속할 것으로 판단되어지나 특징적인 명칭으로 분류되지 않는 시료는 *Enterobacteriaceae*(Family)로 분류하였다. 계통분석에서 이를 포함한 시료들을 계통학적으로 유사한 그룹으로 분류한 결과 봄철의 경우 *Enterobacter spp.*,

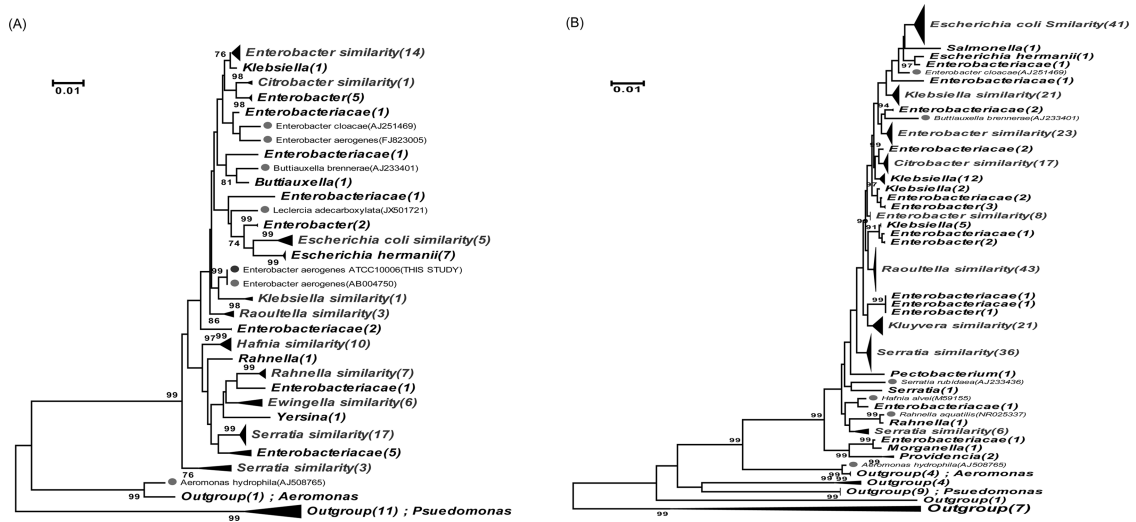


Fig. 2. 16S rRNA-based tree reflecting the relationship of total coliforms in drinking spring water samples at (A)spring and (B)summer season.

Serratia spp., *Hafnia spp.*, *Rahnella spp.*, *Escherichia hermannii*, *Ewingella spp.*, *Escherichia coli*, *Raoultella spp.*, *Klebsiella spp.* 등의 순서로 나타났으며, 여름의 경우 *Raoultella spp.*, *Serratia spp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Kluyvera spp.*, *Citrobacter spp.* 등의 순서로 유사한 속으로 분류되었다(Table 4). 계통분석에 의한 총대장균군 그룹의 분류에서도 마찬가지로 분변오염 지표항목인 *Escherichia coli*가 봄 4.5%에서 여름 13.6%로 증가하는 것을 확인하여 공중 보건학상 여름철 약수터 음용에 각별한 주의가 요구되는 것으로 판단하였다. 계통분석을 이용하여 유사한 그룹으로 분류된 총대장균군은 기존 비 배양된 세균이나 동정 속명을 알 수 없는 자료를 분류할 수 있었으며 약수터 검출 총대장균군의 그룹을 분류하는데 도움이 될 것으로 판단하였다.

유사한 속으로 분류된 결과에서 특징적인 점은 상동성 분석에서 *Klebsiella spp.*로 동정되었던 시료의 다수가 계통분석에서는 *Raoultella spp.*로 재분류되었는데 이러한 결과는 초기 16S rRNA 분석자료에서 0.2~19.0%까지 *Klebsiella spp.*로 분류됐었다는 보고²³⁾와 *Klebsiella spp.* 일부가 *Raoultella spp.*로 재명명²⁴⁾ 된 결과로 해석할 수 있다. 봄철과 여름철 총대장균군 우점 형태 변화를 비교해보면 *Enterobacter*

spp. 는 봄철 18.2 %에서 여름철 12.0%로, *Serratia spp.*는 18.2%에서 15.3%로 다소 감소하는 경향을 보였으나 다수 검출되는 우점의 형태를 보였으며, 봄철 9.1%로 상위 우점형태를 나타냈던 *Hafnia spp.* 와 5.5%의 우점형태인 *Ewingella spp.*는 여름철 출현하지 않았으며, *Rahnella spp.*는 7.3%에서 0.3% 거의 출현하지 않았다. 반대로 봄철 출현빈도가 적게 나타난 *Escherichia coli* 4.5%, *Raoultella spp.* 2.7%, *Klebsiella spp.* 1.8%, *Citrobacter spp.* 0.9% 는 여름철 각각 13.6%, 16.6%, 13.3%, 6.6%로 크게 증가하여 총대장균군 우점형태 변화를 확인하였다. 종합해보면 *Enterobacter spp.* 및 *Serratia spp.* 는 계절에 상관없이 상시 출현하는 총대장균군이며, 봄에 출현하는 *Hafnia spp.* *Ewingella spp.*, *Rahnella spp.*는 여름에 거의 출현하지 않고, *Escherichia coli*, *Raoultella spp.*, *Klebsiella spp.*, *Citrobacter spp.*는 여름에 출현빈도가 높은 것으로 분석되었다.

IV. 결 론

본 연구에서는 서울에 음용 부적합이 반복적인 양상을 보이는 중점관리 약수터를 대상으로 지표세균에 대하여 분포 현황과 검출된 세균의 유전학적인 계통분석을 수행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 중점관리 약수터에 대한 지표세균의 조사 결과 일반세균은 봄철 64개소에서 0~550 CFU/mL이고 여름철 70개소에서 0~800 CFU/mL로 조사되었으며 총대장균군의 정량분석 결과는 봄과 여름철에 각각 0~1,900, 0~2,100 CFU/100 mL로, 분원성대장균군의 경우 0~600, 0~550 CFU/100 mL로, 대장균의 경우는 0~37, 0~326 MPN/100 mL로 조사됐다. 한편 여시니아는 조사대상 중 봄철 3건이 검출되었으며 여름철에는 1건이 검출되었다.

2. 분변오염 지표세균인 분원성대장균군 검출은 봄철 12.5%에 비해 여름철 58.6%로, 대장균은 4.7%에서 51.4%로 검출률이 증가하는 경향을 나타내어 기온이 상승하는 여름철 약수터 음용 부적합 요인이 상대적으로 상승하는 것으로 나타나 분변오염 가능성에 따른 음용에 각별한 주의가 요구되는 것으로 판단되었다.

3. 지표 세균에 의한 약수터 음용 기준 부적합 유형은 봄철의 경우 총대장균군이 59.4%로 주요 원인으로 나타났지만 여름철의 경우는 같은 시료에 대해 총대장균군, 분원성대장균군 및 대장균이 동시 복합적으로 검출되는 비율이 47.1%로 주요 원인으로 나타나 여름철 약수터 분변오염원 유입에 대해 취약한 것으로 판단되었다.

4. 약수터 검출 총대장균군의 주요 동정결과를 살펴보면 봄철의 경우 *Enterobacter spp.* 12.7%로 우점종으로 나타났으며, *Serratia spp.* 7.3%, *Escherichia hermannii* 6.4%, *Rahnella spp.* 5.5%, *Hafnia spp.* 4.5%, *Escherichia coli* 3.6%, *Klebsiella spp.* 3.6% 순으로 동정되었다. 여름철의 경우 *Klebsiella spp.* 16.6%로써 우점종으로 나타났으며, *Enterobacter spp.* 13.0%, *Escherichia coli* 11.0%, *Serratia spp.* 8.6%, *Raoultella spp.* 7.0%, *Kluyvera spp.* 5.6%, *Citrobacter spp.* 3.0% 순으로 동정되었으며, 분변오염지표항목인 *Escherichia coli* 가 봄에 비해 여름철에 상대적으로 증가하여 건강 위해 가능성이 높은 것으로 판단되었다.

5. 시민들이 자주 이용하는 약수터는 특히 여름철 지표세균에 의한 오염이 분변에서 유래 가능성이 증가하는 점을 감안할 때 오염원 제거 및 지속적인 수

질 조사를 통해 음용 관리를 위한 제도적 보완이 세심한 주의가 필요할 것으로 판단되었다.

참고문헌

1. Kim KR, Gil HK, Lee MH, Eom SW, Lee JY. Survey of citizens public opinion for natural spring water in seoul. *J Soil Groundwater Env.* 2011; 16(2): 1-5.
2. Seoul Metropolitan Government, 2012 Year's Guide for Management of Drinking Spring Water in Seoul; 2012.
3. Korea Ministry of Environment, Standard Method for Water Quality Pollution(ES 04701.1~04703.1); 2011.
4. Korea Ministry of Environment, Standard Method for Drinking Water Quality(ES 05701.1b~05711.1a); 2012.
5. Manero A, Blanch AR. Identification of enterococcus spp. based on specific hybridization with 16S rDNA probes. *J Microbiol Methods.* 2002; 50(2): 115-121.
6. Kim MS, Lee YM, Kim SK, Seo JH, Ji KH, Oh JY, et al. Investigation of microbial contamination of public bath in jongno-gu, Seoul. *J Environ Health Sci.* 2009; 35(3): 162-168.
7. National Center for Biotechnology Information. Available: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blast_home;insert_16S_rRNA_gene [accessed 5 October 2013].
8. National Center for Biotechnology Information. Available: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/search_of_coliforms [accessed 5 October 2013].
9. Lee HT, Kim HY, Park HJ, Cho YE, Ryu SY, Lee KJ, et al. Evaluation of influent water quality using indicator microorganisms in lake shiwha. *J Environ Health Sci.* 2008; 34(1): 86-94.
10. Oh HK, Park JH. Characteristics of antibiotic resistant bacteria in urban sewage and river. *J Kor Soc Environ Eng.* 2009; 31(3): 232-239.
11. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tree. *Mol Biol Evol.* 1987; 4(4): 406-425.
12. Kumar S, Nei M, Dudley J, Tamura K. MEGA: a biologist centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinform.* 2008; 9(4): 299-306.
13. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular evolutionary gene tics analysis (MEGA)

- software version 4.0. *Mol Biol Evol.* 2007; 24(8): 1596-1599.
14. Fielda KG, Samadpourb M. Fecal source tracking, the indicator paradigm, and managing water quality. *Water Res.* 2007; 41(16): 3517-3538.
 15. Grabow WOK. Microbiology of drinking water treatment, Reclaimed wastewater, 1st ed. New York: Springer-Verlag Press; 1990. p.185-203.
 16. Randy PR, Adin P, Regina L, Brandon I, Jorge W, Santo D. Identification of bacterial populations in drinking water using 16S rRNA-based sequence analyses. *Water Res.* 2010; 44(5): 1353-1360.
 17. George MG, The Gammaproteobacteria. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2B*, 2nd ed. New York: Springer-Verlag Press; 2005. p.1108-1193.
 18. Lee IH, Kim SK, Choi YH, Kim JS. Distribution and characteristics of coliform bacteria in ground-water of yeungnam province. *Kor J Microbiol.* 2006; 42(2): 95-102.
 19. Kim KA, Lee BO, Kim OM, Hur MJ, Kim KT, Ro ji, et al. A Study on pollution of spring in Incheon area. *Kor J Environ Health.* 2007; 22(3): 35-50.
 20. Paruch AM, Mahlum T. Specific features of *Escherichia coli* that distinguish it from coliform and thermotolerant coliform bacteria and define it as the most accurate indicator of faecal contamination in the environment. *Ecological Indicators.* 2012; 23: 140~142.
 21. Ashbolt NJ, Grabow, WOK, Snozzi M. Indicators of microbial water quality. In: Fewtrell L, Bartran J. editors. Guidelines, standards and health assessment of risk and risk management for water-related infectious disease, 1st ed. London: IWA Press; 2008. p.289-315.
 22. David JL, Bernadette P, Gary JO, David AS, Mitchell LS, Norman RP. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc Natl Acad Sci.* 1986; 82(20): 6955-6959.
 23. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. Manual of clinical microbiology, 9th ed. Washington DC: ASM Press; 2007.
 24. Drancourt M, Bollet C, Carta A, Rousselier P. Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001; 51(3): 925-932.