

형광현미경을 이용한 음용 지하수내 배양불능 세균의 관찰 및 정량적 평가

김인기 · 梁谷孝¹ · 황경숙*

목원대학교 생명과학부 미생물학과, ¹日本 佐賀大學 農學部應用科學科

직접생균수측정법(direct viable count; DVC)과 평판법(plate count; PC)을 이용하여 시판되고 있는 먹는샘물, 약수, 도시인근 지역과 축산농가 밀집지역의 음용 지하수로부터 채수된 시료에 대하여 정량적 평가를 실시하였다. DVC법에 의한 생균수는 전균수(total direct count; TDC)의 약 30-80%, 평판법에 의한 생균수는 DVC의 약 1-30%로 나타났다. 이와 같은 결과는 지하수내에 배양 불가능한(viable but non-culturable: VBNC) 세균이 높은 비율로 존재함이라고 판단된다. 한편, 통상농도의 영양배지(nutrient broth; NB)와 이를 10⁻²배로 희석한 영양배지(diluted nutrient broth; DNB) 및 R2A배지를 이용하여 계수한 결과, 통상농도의 NB배지에 비해 저영양배지인 DNB와 R2A에서 2-50배 이상 높은 계수치를 나타내었다. 이와 같은 결과로부터 지하수와 같이 빈영양 환경 내에는 통상농도의 NB배지에서는 증식이 현저히 저해되고 저영양배지에서 증식 가능한 저영양세균이 다수 분포해 있음이라 판단되었다.

Key words □ direct viable count (DVC), oligotrophic bacteria, potable groundwater, viable but non-culturable (VBNC) bacteria

지하수의 오염원인은 폐기물 매립지의 침출수, 불량정화조, 취수용 관정을 통한 오염물질의 유입, 생활하수 및 산업폐수에 의한 지표수 오염 등 각 지역에 따라 다양하다. 1995년 5월 「먹는물관리법」이 시행된 이후에는 「먹는샘물」 제조업체가 50여개로 늘어났다. 이 업체들이 지하 150 m 이상의 암반수를 취수하기 위해 뚫어 놓은 폐공을 통하여 지하수원이 급속하게 오염되고 있다. 그리하여 최근에는, 해발 500 m 이상의 고산 계곡수를 식수원으로 활용하여 물부족과 수질문제를 해결하려는 주장도 제기되고 있다. 조사연구에 의하면, 고산 계곡수의 안정성도 신뢰할 수 없는 상황이다(7). 국민건강을 보호하고 가까운 장래에 발생할 것이 확실한 물부족 문제를 해결하기 위해서도 지하수의 오염도 측정에 관한 과학적 기준을 설정하는 것은 더 이상 미룰 수 없는 중대한 과제이다.

음용 지하수의 수질기준은 「먹는물 수질기준 및 검사 등에 관한 규칙」 제2조 1항에 규정되어 있다(1). 이 규정은 샘물 또는 먹는샘물 이외의 지하수(먹는물)의 수질기준으로 일반세균·대장균군, 무기·유기물질 및 심미적 영향물질 등 45개 항목을 제시하고 있다. 전술한 「먹는물 수질기준 및 검사 등에 관한 규칙」이 미생물학적 기준 2개와 건강상 유해한 유기·무기물질 및 심미적 영향물질 등을 수질검사 항목으로 제시하고 있기 때문에, 지하수 수질에 관한 연구도 주로 위 기준항목의 범위에서 행해지고 있다. 수질오염으로 인한 병원성 미생물의 증식은 수인성

질병을 일으키기 때문에, 음용수의 적합성 여부를 판단하기 위해 분변성 장내세균 검사가 매우 중요한 의미를 가지는 것이 사실이지만, 대장균군과 같은 분변성 오염의 지표미생물이 검출되지 않는다고 하여 깨끗한 물이라고 단정할 수는 없다(3,10,12). 끊임 없이 변화하는 생태계 특성상 제한된 인자에만 의존하는 수질평가 결과는 정확하지 못한 경우가 많기 때문이다(2).

수질오염은 그 속에 서식하는 생물체의 서식환경이 변화하는 것을 의미한다. 따라서 지하수 속에 존재하는 미생물의 분포를 폭넓게 조사하여 그 변화에 따라 수질오염을 판단하는 것이야말로 물리화학적 분석에 의한 평가보다 훨씬 근본적인 방법이라고 할 수 있다. 특히 배양이 곤란하여 존재여부의 판명이 불확실한 VBNC와 같은 종류의 미생물의 실태가 주목되면서 미생물생태학을 연구하는 연구그룹 중에는 VBNC 미생물을 쾌속하게 검출·정량화하는 방법의 연구가 활발히 진행되고 있다(4,5,9,13,14). 그러나 이들 VBNC 미생물에 대한 국내의 연구는 미흡한 실정이고, 그 위험성도 해명되어 있지 않기 때문에 연구 필요성이 더욱 절실하다. 본 연구에서는 형광현미경을 이용하여 지하수내 배양불능 세균을 관찰하고 정량적 측정 가능성을 확인함과 동시에 다양한 농도의 영양배지를 이용하여 지하수 중의 세균수를 비교하였다.

재료 및 방법

지하수 시료

지하수 시료의 채취는 관정으로부터 지하수를 충분히 흘려보

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 042-829-7593, Fax: 042-829-7590
E-mail: kswhang@mokwon.ac.kr

Table 1. Sampling of potable groundwater

Group	Samples ^a	Source	Date
I	CW	bottled water	2000. 3. 7.
	CJ	bottled water	2000. 3. 7.
	GR	bottled water	2000. 3. 7.
II	DPG	mineral water (Daepyeongri)	2000. 5. 12.
	CJG1	mineral water (Cheongwongun)	2000. 5. 13.
III	CJG2	mineral water (Cheongwongun)	2000. 5. 13.
	TJ	edible water (Taejeongdong)	2000. 3. 7.
	WS	edible water (Wonshinheungdong)	2000. 3. 7.
IV	NPG1	edible water (Nonsan-stock farm area)	2000. 8. 4.
	NPG2	edible water (Nonsan-stock farm area)	2000. 8. 4.

^aShorthand names of potable groundwater samples.

낸 후 불꽃으로 배수관을 살균한 후 500 ml 멸균 채수병을 이용하여 무균적으로 채수하였다. 채수된 모든 시료는 4°C에서 보존하면서 채수 후 12시간 내에 실험되었다. 지하수 시료는 시장에서 판매되고 있는 먹는샘물(CJ, CW, GR), 충남 대평리의 약수(DPG)와 충북 청원군 초정리의 약수(CJG1, CJG2), 대전 인근지역의 가정에서 식수로 이용되고 있는 지하수(TJ, WS)와 충남 논산의 축산농가 밀집지역의 지하수(NPG1, NPG2) 등 크게 4 종류로 구분하여 채수하였다(Table 1).

배지

육즙영양배지(NB)와 육즙영양배지를 10⁻²로 희석한(DNB) 배지, 그리고 음용수 및 지하수의 미생물실험에 사용되고 있는 R2A배지(10)를 사용하였다. 육즙배지의 조성은 beef extract, 10 g; bacto peptone, 10 g; NaCl, 5 g; distilled water, 1,000 ml이며 pH 7.0~7.2로 조정하였다. R2A배지의 조성은 yeast extract, 0.5 g; proteose peptone, 0.5 g; casamino acids, 0.5 g; glucose, 0.5 g; soluble starch, 0.5 g; sodium pyruvate, 0.3 g; K₂HPO₄, 0.3 g; MgSO₄ · 7H₂O, 0.05 g; distilled water, 1,000 ml이며 pH 7.0~7.2로 조정하였다.

DVC법에 의한 전균수 및 생균수 측정

전세균수 측정에는 acridine orange (AO) 색소보다 DNA에 친화성이 높은 ethidium bromide (EB)를 이용하였다. DVC (direct viable count)법은 Kogure의 방법(8)을 변형하여, 지하수 시료에 DNA 합성저해제 nalidixic acid (100 µg/ml), pipemidic acid (50 µg/ml), piromidic acid (50 µg/ml)의 3제 혼합액과 영양기질로 DNB 배지를 첨가하였다. 혼합된 시료를 25°C에서 24시간 배양한 후에 EB로 염색하고 형광현미경(DMLS, Leica)으로 관찰하면서 신장·비대화된 세포를 생균수로 측정하였다. 세균 수는 20개 이상의 화상에서 평균값을 구하였다.

CFDA 형광염색에 의한 생균수 측정

흡인병 위에 nucleopore filter (0.2 µm, Millipore)를 고정시

킨 후, 지하수 시료를 투과시키고 2% 농도의 6-carboxyfluorescein diacetate (CFDA) 5 µl, 제균수 500 µl와 0.1 M의 phosphate buffer (pH 7.2)를 첨가하여 30°C에서 1시간 동안 배양한 후 형광현미경(DMLS, Leica)으로 관찰하였다. CFDA에 염색되어 황녹색의 형광을 발하는 세포를 생균 (viable cell)으로 간주하고 20개 이상의 화상에서 평균값을 구하였다.

평판법에 의한 생균수 측정

지하수 시료는 순차적으로 희석한 후 각 시료당 5개의 petri dish에 1 ml씩 접종하고 NB, DNB, 및 R2A 한천배지를 첨가하였다. 모든 시료는 25°C에서 10일 배양한 후 집락수를 측정하였다.

결과 및 고찰

DVC법에 의한 생균수

DVC법은 환경시료에 영양기질과 DNA 합성저해제를 첨가한 후 단시간 배양하면서 세포분열이 억제된 상태 하에서 신장·비대화된 세포(기질을 이용하여 단백질 합성 능력이 있는 생균)를 형광 염색하여 검출하는 방법으로 수계 미생물의 검출 및 정량에 사용되어져 왔다(9). 혼합된 시료를 25°C에서 36시간 동안 배양하면서 매 6시간마다 시료를 채취하여 관찰한 결과 24시간 후부터 세포분열이 일어나는 것으로 확인되었다. 모든 시료에 대한 계수 결과는 배양 24시간 내에 신장·비대화된 세포(Fig. 1)를 생균으로 계수하였다. Kogure (8)의 원법에서는 배양 6시간 후부터 세포분열이 일어나기 시작하였으나 본 연구에서는 저해제의 농도(nalidixic acid, 0.002%)를 5배 높임으로써 24시간까지 세포분열이 억제되는 효과를 볼 수 있었다.

DVC법에 사용된 EB는 DNA와 친화력이 높은 특성을 나타내는 형광염료로 생균 뿐만 아니라 사균(dead cell)도 염색되기에 EB에 의한 계수 결과는 전균수(total direct count: TDC)라 볼 수 있다. 각 시료 중의 전균수는 4.3×10⁴~9.9×10⁵/ml로 계수되었다. DVC법에 의한 생균수는 2.1×10⁴~8.3×10⁵/ml이 계수되어 TDC에 대한 DVC는 27~84%로 나타났다. 직접검정법에 의한 해양세균의 정량에 관한 Kogure 등(9)의 보고에 의하면 DVC법에 의한 계수결과는 TDC의 5~10%, PC법은 DVC의 0.1%에 불과하다고 하였다. 본 연구에서는 Kogure의 방법에서 사용된 저해제 (3종류의 세포분열 저해제)보다 높은 농도를 사용함으로써 세포분열이 24시간까지 억제되는 효과를 볼 수 있었기에 보다 높은 DVC 계수 결과를 얻을 수 있었다고 사료된다. 한편, 평판법에 의한 세균수 측정 결과 2.3×10²~3.8×10⁵/ml을 나타내어 TDC에 대한 PC는 0.2~30% 미만으로 나타났다(Table 2).

CFDA 형광염색에 의한 생균수 측정

Fluorescein diacetate (FDA) 형광염료는 세균의 세포막을 쉽게 통과하여 세포내에서 비특이적 esterase에 의해 가수분해되어 극성이 높은 fluorescein으로 변하면 막투과성이 낮아지게 되므로 세포내에 저장됨과 동시에 황녹색의 형광을 발하게 된다. FDA

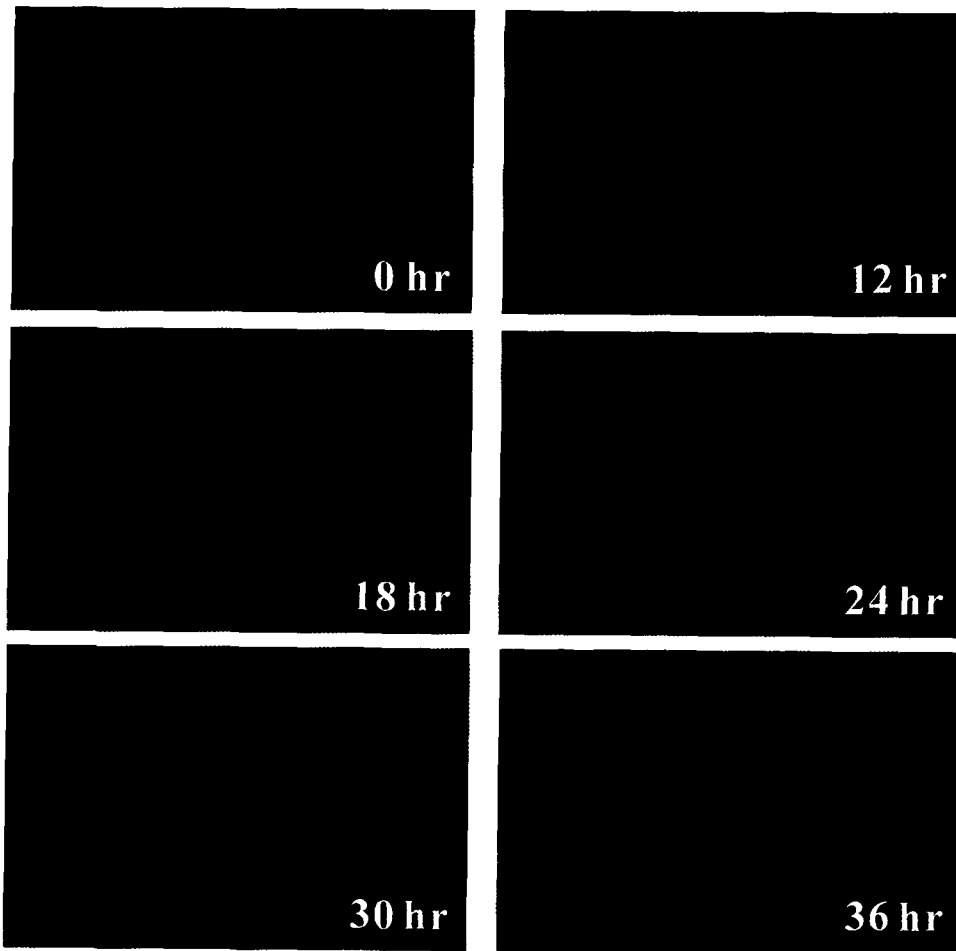


Fig. 1. Changes of cell length during incubation time in DNB medium with 0.01% nalidixic acid, 0.005% pipemidic acid and 0.005% piromidic acid. (stained with EtBr)

Table 2. TDC, DVC and PC value collected from 10 groundwater samples

Group	Samples	TDC ^a	DVC ^b	PC ^c
I	CW	2.9×10 ⁵	1.7×10 ⁵	4.4×10 ⁴
	CJ	9.9×10 ⁵	8.3×10 ⁵	3.8×10 ⁵
	GR	1.7×10 ⁵	1.3×10 ⁵	6.7×10 ⁴
II	DPG	4.3×10 ⁴	2.1×10 ⁴	2.8×10 ²
	CJG1	9.7×10 ⁴	5.1×10 ⁴	4.2×10 ²
III	CJG2	1.2×10 ⁵	7.8×10 ⁴	2.3×10 ²
	TJ	1.3×10 ⁵	1.0×10 ⁵	6.2×10 ³
IV	WS	5.4×10 ⁴	3.1×10 ⁴	2.1×10 ³
	NPG1	2.8×10 ⁵	2.1×10 ⁵	1.5×10 ⁴
	NPG2	2.6×10 ⁵	1.4×10 ⁵	8.7×10 ⁴

^aTDC; total direct count, ^bDVC; direct viable count, ^cPC; plate count.

는 그람음성균과 같이 외막을 갖는 세균의 세포막을 통과하기 어렵기 때문에 그람음성세균의 대부분은 염색되지 않는다. 따라서 수계와 같이 그람음성세균이 대부분인 자연환경 시료에는 사

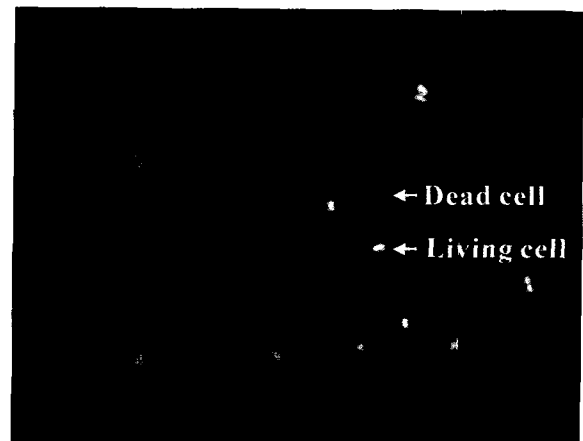


Fig. 2. Photograph of the detecting active bacteria in potable groundwater by the CFDA (6-carboxyfluorescein diacetate) method.

용하기 어렵다. 본 실험에서는 FDA보다 극성이 높고 세포밖으로 유출속도가 더디고 그람음성세균에 대한 염색성도 매우 탁월하다고 보고되고 있는 CFDA 형광염료를 지하수내 생균수 측정에 이용하였다(15). 지하수 시료중의 생균과 사균을 식별하기 위

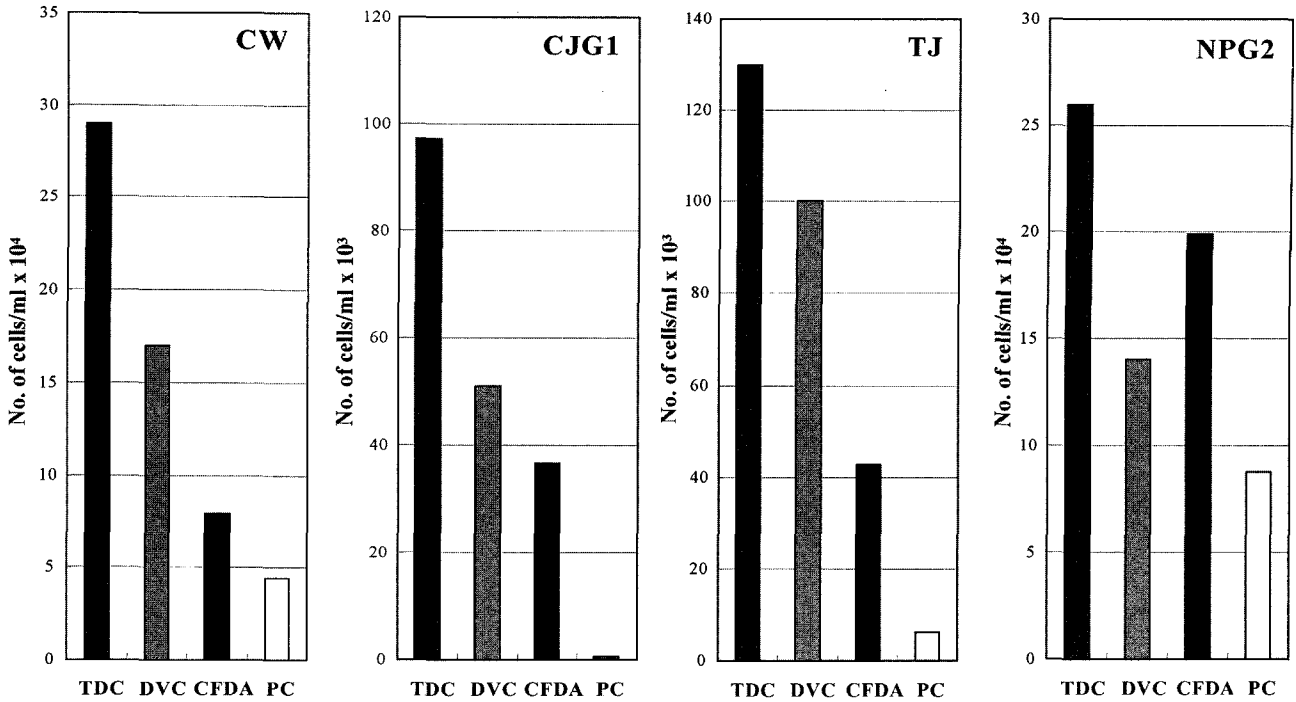


Fig. 3. Comparison of total direct count (TDC), direct viable count (DVC), CFDA count and plate count (PC) from representative 4 samples of potable groundwater.

하여 먼저 CFDA로 염색한 후 EB로 이중염색을 하였다. CFDA에 의해 염색되어 황녹색의 형광을 발하는 세포를 생균으로, EB에 의해 염색된 세포는 사균으로 간주하고 계수 하였다(Fig. 2).

CFDA에 의해 염색된 생균수는 $1.0 \times 10^4 \sim 1.9 \times 10^5 / ml$ 을 나타내어 TDC에 대한 CFDA는 23~73%를 나타내어 NPG2 시료를 제외한 대부분의 시료에서 DVC법보다 낮은 값을 나타냈다. 이는 DVC법이 CFDA를 이용한 생체염색보다 수계에 존재하는 세균을 검출하는데 보다 효과적임을 나타낸다. 그러나, CFDA법에 의해 검출된 생균수도 PC법에 의한 결과보다 2.2 배에서 122 배나 높은 값을 나타내었다(Fig. 3).

본 실험에서 형광현미경을 이용하여 DVC 및 CFDA에 의해 검출된 생균수는 평판법(PC)에 의한 생균수에 비해 2~500 배 이상 높은 계수치를 나타내었다. 이는 평판법으로는 배양할 수 없는 배양불능(VBNC)세균이 지하수내에 다수 존재해 있을 것으로 판단되며, 본 연구를 통하여 DVC법과 CFDA법에 의해 지하수내 배양관련한 “VBNC” 세균을 정량적으로 검출할 수 있는 가능성이 확인되었다.

지하수 시료를 평판배지에서 400 시간 이상 배양하면서 집락수가 최대치에 도달할 때의 시간을 결정하였다. 모든 시료에 대한 계수 결과는 배양 10 일 후에 측정된 집락수를 계수치로 정하였다. 시판용 먹는샘물(CW, CJ, GR)의 경우 DNB와 R2A 배지에서의 집락수는 통상 농도의 NB 배지보다 5~50 배 이상 높은 값을 나타내었다. 대평리 약수(DPG)와 초정리 약수(CJG1, CJG2) 시료의 계수 결과는 NB 배지보다 DNB와 R2A 배지에서 2~20배 이상 높은 값을 나타내었다. 대전 근교지역의 음용 지하

수(WS, TJ) 시료의 경우 DNB, R2A 배지와 NB 배지에서의 계수값은 거의 비슷한 결과를 나타내었으며, 논산 양돈농장 인근 지역의 음용 지하수(NPG1, NPG2)는 DNB와 R2A 배지에서 2~10 배 정도 높은 값을 나타내었다(Fig. 4). 희석영양배지를 이용하여 평판법에 의해 세균수를 측정된 결과, 통상농도의 육즙영양배지(NB)에서보다 저영양배지인 DNB와 R2A 배지에서 높은 계수치를 나타낸 결과는 지하수와 같이 빈영양한 환경 내에는 통상농도의 NB배지에서는 증식할 수 없고 저영양한 배지에서만 증식 가능한 세균이 다수 분포해 있음이라 추정되었으며 지하수 중 저영양세균(oligotrophic bacteria)에 대한 보다 깊은 연구가 필요할 것으로 판단된다(16).

VBNC 세균에 대한 인식은 자연환경 중에 존재하는 콜레라균과 같은 병원성미생물로부터 시작되었다(6). VBNC 세균이란 살아있는 상태로 자연환경 중에 존재하지만 배양이 곤란한 세균을 말한다. 여러 가지 환경요인에 의한 생리적 스트레스로 인해 배지에서 생육할 수 없는 것으로 추정되지만, 그 생리적 기구는 충분히 해명되지 못한 상태이다(8). 최근 우리나라를 비롯하여 세계 각국에서는 O157 대장균의 감염문제가 심각하게 대두되고 있다. 이들 O157 대장균의 감염경로에 관해서 여러 미생물생태학자들이 연구를 행해왔지만 특별한 감염경로는 밝혀지지 않은 채 그 대책이 심각한 상황에 놓여있다. Kogure (10)는 동경을 가로지르고 있는 3대 하천을 중심으로 기존의 평판법을 이용하여 O156 대장균의 분포상황을 조사한 결과 음성 결과를 나타내었으나 형광항체기법을 이용하여 하천내의 O157 대장균을 검색한 결과 다수의 O157 대장균이 존재해 있음을 밝히고, O157 대장

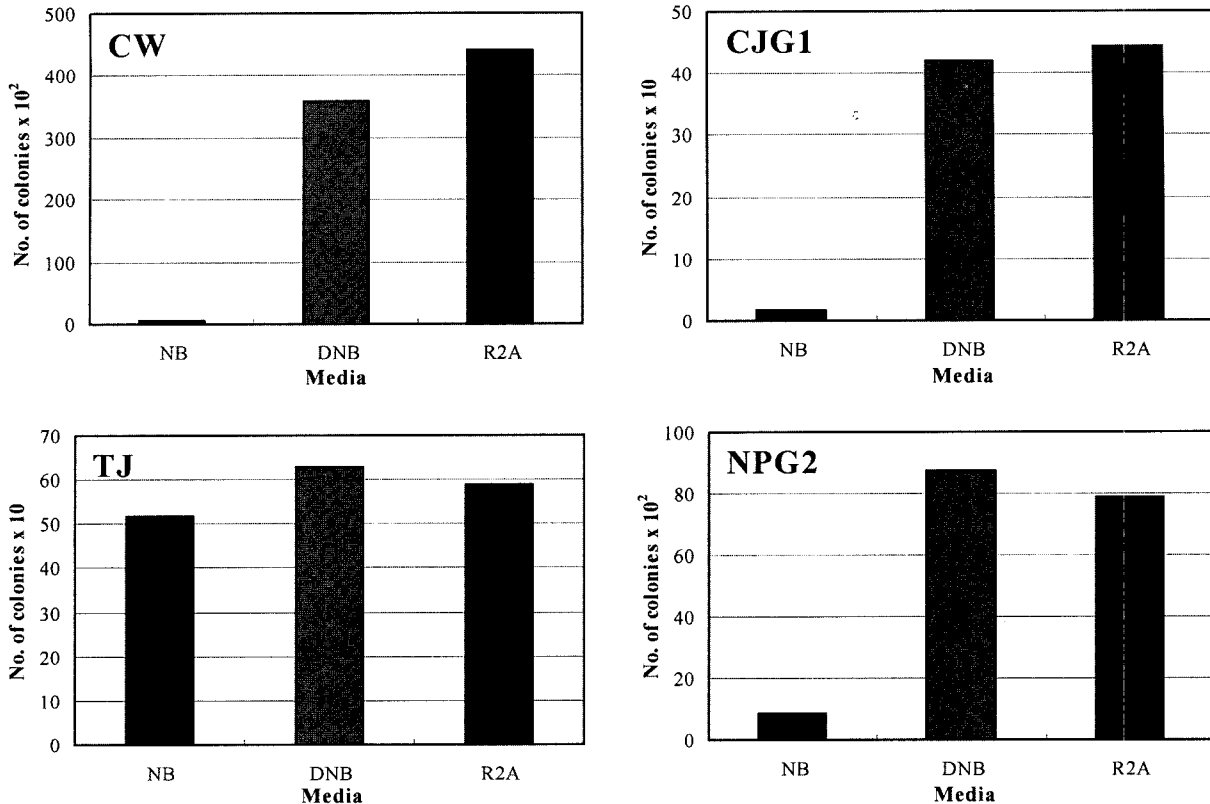


Fig. 4. Comparison of the number of bacterial colonies on nutrient broth (NB), 10⁻² diluted nutrient broth (DNB) and R2A plates from representative 4 samples of potable groundwater.

균이 자연환경에 노출되었을 경우 VBNC 상태로 존재하다 인체에 감염이 되면 증식가능 상태로 되어 병을 유발시킨다고 하였다. 이와같이 자연환경 중에 존재하는 대부분의 미생물은 VBNC 상태로 이들 중 배양 확인이 가능한 미생물은 1%도 못 미친다. 지하수 수질관리를 위한 검사기준에 미생물학적 검사보완을 위해서는 이들 VBNC 세균의 존재 여부를 계속해서 검출·정량화하는 방법의 연구뿐만 아니라 생리학적 특성이 해명되어야 한다.

참고문헌

1. 먹는물 수질기준 및 검사 등에 관한 규칙(환경부령 제 65호). 1999. 환경부
2. Balkwill, D.L. 1989. Numbers, diversity, and morphological characteristics of aerobic, chemoheterotrophic bacteria in deep subsurface sediments from a site in South Carolina. *Geomicrobiol. J.* 7, 33-52.
3. Berlin, D.L., D.S. Herson, D.T. Hicks, and D.G. Hoover. 1999. Response of pathogenic *Vibrio* species to high hydrostatic pressure. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2776-80
4. Bloomfield, S.F., G.S.A.B. Stewart, C.E.R. Dodd, I.R. Booth, and E.G.M. Power. 1998. The viable but nonculturable phenomenon explained. *Microbiology* 144, 1-3
5. Byrd J.J., H.S. Xu, and R.R. Colwell. 1991. Viable but nonculturable bacteria in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 875-878.
6. Colwell, R.R., P.R. Brayton, D.J. Grimes, D.B. Roszak, S.A. Huq, and L.M. Palmer. 1985. Viable but non-culturable *Vibrio cholera* and related pathogens in the environment: Implications for release of genetically engineered microorganisms. *Bio/Technol.* 3, 817-820.
7. Kim, I.G., Y. Kasahara, and K.S. Whang. 2001. Phylogenetic analysis of bacterial populations found in groundwater and an acidic stream draining from abandoned coal mine. *Microb. Environ.* 16, 169-176.
8. Kogure, K., U. Simidu, and N. Taga. 1984. An improved direct viable count method for aquatic bacteria. *Arch. Hydrobiol.* 102, 117-122.
9. Kogure, K., U. Simidu., N. Taga, and R.R. Colwell. 1987. Correlation of direct viable counts with heterotrophic activity for marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 2332-2337.
10. Kogure, K. 1997. 病原細菌の viable but nonculturable(VBNC) state について. *Microb. Environ.* 12, 135-145.
11. Reasoner, D.J. and E.E. Geldreich. 1985. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 1-7.
12. Rompre, A., P. Servais, J. Baudart, M.R. de-Roubin, and P. Laurent. 2002. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. *J. Microbiol. Methods* 49, 31-54.
13. Someya, T. 1995. 培養できない土壌細菌の謎に挑む. *化学と生物* 33, 355-356.
14. 染谷 孝, 犬伏和之, 山本啓之, 加藤憲二. 1999. 土壌・水圏における Viable but nonculturable (VBNC) 微生物の解析手法の進歩と課題. *土と微生物* 53, 45-5
15. Tsuji, T., Y. Kawasaki, S. Takeshima, T. Sekiya, and S. Tanaka.

1995. A new fluorescence staining assay for visualizing living microorganisms in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3415-3421.
16. Whang, K. and T. Hattori. 1988. Oligotrophic bacteria in rendzina

a forest soil. *Antonie van Leewenhoek J. Microbiol.* 54, 19-37.

(Received July 8, 2002/Accepted August 12, 2002)

ABSTRACT: The Observation and a Quantitative Evaluation of Viable but Non-Culturable Bacteria in Potable Groundwater Using Epifluorescence Microscopy

In-Gi Kim, Takashi Someya¹, and Kyung-Sook Whang* (Department of Microbiology, Mokwon University, Daejeon 302-729, Korea, ¹Department of Applied Biological Science Faculty of Agriculture, Saga University, Saga 840-8502, Japan)

The direct viable count (DVC) and plate count (PC) methods was used to measure the number of bacteria in potable groundwater samples collected from bottled water from the market, mineral water, and edible groundwater near the urban areas and the stock farming congested areas. As a result, the number of living bacteria by DVC was comprised 30~80% of the total direct count (TDC), whereas the number of living bacteria by PC was around 1~30% of DVC. Such results show that viable but non-culturable (VBNC) bacteria exist in the potable groundwater with high percentages. On the other hand, upon measuring the value from the conventional nutrient broth (NB), 10⁻² fold diluted nutrient broth (DNB), and R2A broth, the values from the DNB and R2A showed 2~50 times higher than the conventional NB medium. These results indicate that oligotrophic bacterial groups which can multiply in the low nutrient broth abundantly exist in the oligotrophic environment like potable groundwater.