

영남지역 지하수에서 대장균군의 분포 및 분리한 세균의 특성

이인환¹ · 김수경¹ · 최윤희¹ · 김종설^{1,2,*}

¹울산대학교 교육대학원, ²울산대학교 자연과학대학 생명과학부

생활용수로 사용하는 영남지역 지하수의 세균학적 수질을 평가하기 위해, 여름 123개 지점, 겨울 117개 지점에서 지하수 시료를 채수하였다. 일반세균 수의 중앙값은 여름 30 CFU/ml, 겨울 40 CFU/ml이었고, 25% 이상의 조사 지점에서 일반세균 수는 먹는물수질기준 100 CFU/ml을 초과하였다. 전체 조사지점 중 여름 46%, 겨울 30%의 지점에서는 대장균군이 검출되었으며, 이들 지점에서 대장균군 수의 중앙값은 여름 20 CFU/ml, 겨울 4 CFU/ml로 여름이 겨울보다 높았다. 분리한 대장균군 세균은 *Citrobacter* 속, *Enterobacter* 속, *Escherichia* 속, *Klebsiella* 속, *Pantoea* 속, *Rahnella* 속, 그리고 *Serratia* 속으로 동정되었으며, *Enterobacter* 속이 48%를 차지하여 가장 많았다. 종별로는 *E. cloacae*, *E. amnigenus*, *K. pneumoniae* 등이 빈도가 높게 분리되었으며, 반면 *E. coli*는 1개 조사지점에서만 분리되었다. 대장균군 수는 일반세균 수와 양의 상관관계를 보였으며, 일반세균 수는 수온과도 양의 상관관계가 있었다. 본 연구의 결과는 지하수에서 대장균군의 오염에 대한 보다 자세한 정보를 제공해 주며, 영남지역의 지하수에서 병원성 미생물의 오염 가능성이 여전히 높음을 시사한다.

Key words □ coliform bacteria, groundwater, heterotrophic plate count, water quality

서 론

지하수는 지하의 지층이나 암석사이의 빈틈을 채우고 있거나 흐르는 물로 정의된다. 우리나라의 2001년 연간 지하수 이용량은 총 용수이용량의 약 10%에 해당하는 32억 m³ 수준으로, 이중 생활용수로 이용하는 양은 50%인 16억 m³ 정도로 파악되고 있다(1). 국내의 경우 주로 농어촌의 많은 지역에서 간이상수도, 소규모급수시설, 전용상수도 등의 방식으로 생활용수를 공급받고 있으며, 이들 소규모 시설의 취수원은 대부분 지하수이다. 2003년 기준으로 국내 인구의 약 6%는 이러한 시설에 생활용수를 의존하고 있으며, 약 5%의 인구는 우물 등을 이용한 자가수도를 통해 지하수를 생활용수 및 음용수로 사용하고 있다(7).

토양과 암석층에 의한 자연 여과 등을 통해 지하수 취수원은 병원성 미생물에 의한 오염으로부터 보호가 된다고 여겨졌지만, 오염된 지표수, 하수, 정화조와 같은 미생물 오염원과 인접한 지하수에서는 세균의 오염이 발생하고 있다(22). 오염원으로부터 1000 m 거리에 위치한 지하수에서도 오염원의 세균이 검출되는 데(23), 미생물의 대수층으로의 이동은 주로 온도, 토양 구조, 유기물 함량, 양이온 농도 등과 같은 토양 환경적 요인과 미생물의 크기, 모양, 불활성화 정도, 표면의 전기적 성질 등과 같은 생물적 특성에 의해 영향을 받는다(22, 27).

생활용수 및 음용수로 이용하는 지하수에서 주요 지표미생물의 분포 및 특성에 관한 정보는 공중보건의 관점에서 매우 중요

하다. 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(16). 대장균군과 *Escherichia coli*는 수인성 질병의 주요 원인이 되는 병원성 오염을 진단하는 대표적인 지표미생물이다. 최근에는 지하수를 대상으로 여과성 세균의 검출 및 동정도 행해지고 있으며, 사람 장내바이러스의 존재에 대한 조사도 많이 진행되고 있다(14, 15, 25, 29). 국내에서도 지하수 세균 군집과 환경요인의 영향, 지하수 세균 군집의 유전적 다양성 등 지하수계의 미생물에 관한 여러 연구 결과가 발표되고 있다(2-5, 18).

공중보건 측면의 중요성에 따라 국내에서도 지하수 수질측정망을 운영하고 있지만(8), 대장균군으로 검출되는 세균의 다양성과 세균학적 특성, 그리고 환경적 요인과의 상관성에 대한 정보는 매우 제한적이다. 특히 대장균군이 검출되는 지하수의 경우 그 오염원을 구체적으로 확인하는 것이 효율적인 지하수 관리를 위해서도 매우 필요하다. 따라서 본 연구에서는 생활용수 및 음용수로 이용되는 영남지역의 지하수에서 대장균군의 분포 및 이에 영향을 주는 환경요인을 살펴보고, 지하수로부터 대장균군 세균을 분리하여 그 특성을 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

조사지역 및 시료 채취

영남지역(경남, 경북, 대구, 부산, 울산)에 위치한 생활용수 및 음용수로 사용하고 있는 지하관정을 대상으로, 여름(2003년 7-8월)에 123개 지점, 겨울(2003년 12월-2004년 1월)에 117개 지점

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 052-259-2387, Fax: 052-259-1694
E-mail: jkim@mail.ulsan.ac.kr

에서 지하수 시료를 채수하였다(Table 1). 행정구역(시, 군, 구)별로 1-4개 지점을 선정하였으며, 임의의 수도꼭지나 펌프출구로부터 10분 이상 지하수를 흘려보낸 후, 물리·화학적 분석과 미생물 수 측정을 위한 시료의 보관 용기를 서로 달리하여 채수하였다. 비가 오는 날은 채수를 하지 않았으며, 채수한 지하수 시료는 4°C의 냉장상태를 유지하면서 실험실로 운반하였다.

물리·화학적 특성

수온과 pH는 각각 온도계와 pH meter를 사용하여 채수 현장에서 측정하였다. 질산성 질소(NO₃⁻-N), 암모니아성 질소(NH₄⁺-N), 인산염 인(PO₄³⁻-P), 화학적 산소요구량(COD_{Mn}) 등의 항목은 여름에 채수한 시료를 대상으로 채수 후 48시간 이내에 측정하였다. 모든 측정항목은 환경부 먹는물수질공정시험방법과 수질오염공정시험방법, 그리고 American public health association의 Standard methods에 의거하여 분석하였다(9-11).

미생물의 분포

지하수의 미생물 수 측정을 위한 접종은 채수 후 24시간 이내에 실험실에서 행하는 것을 원칙으로 하였고, 실제적으로 24시간 이내에 실험실로 가져올 수 없는 일부 조사지점의 경우에는 48시간 이내에 접종하였다. 일반세균(중속영양평판계수)은 채수한 시료를 표준한천배지(plate count agar)에 도말평판법으로 접종하여 35°C에서 48시간 배양한 후 계수하였다(6, 8). 대장균군의 수는 막여과법(추정시험)으로 측정하였으며, 지하수 시료 50 ml을 여과하여 m-Endo LES 한천배지에 접종한 다음, 35°C에서 48시간 배양하여 금속성 광택을 띠는 붉은 색 집락을 계수하였다(9, 11).

대장균군의 동정

대장균군에 대한 추정시험에서 금속성 광택을 나타내는 모든 집락을 대상으로, 1개 지점에서 최대 5개 집락까지 임의로 선정하여 EMB 한천배지(12)에 최초 접종하였으며, 이를 동일 배지에 계대배양하여 순수분리하였다. EMB 한천배지에서 금속성 광택을 보이는 세균은 API 20E kit (bioMerieux, France)를 사용하여 잠정적으로 동정하였으며, 동정확률(% id)이 90% 이상인 균종을 선택하였고, 90% 미만일 경우 동정하지 못한 것(identified)으로 간주하였다.

Table 1. Number of sampling locations within each provincial administration district

Region	Season	
	Summer	Winter
Kyungnam	38	35
Kyungbook	50	49
Daegu	8	6
Busan	17	17
Ulsan	10	10
Total	123	117

상관분석

지하수 시료에서 물리·화학적 환경요인과 미생물 분포 사이의 상호 관계를 파악하기 위해 Windows용 SPSS v.10.0을 사용하여 Spearman의 순위상관계수(r_s)를 구하였다.

결 과

지하수의 물리·화학적 특성

여름 123개 지점과 겨울 117개 지점의 지하수 시료에서 측정된 물리·화학적 환경요인의 평균, 중앙값(median), 최대값을 Table 2에 정리하였다. 수온의 조사지점 전체 평균과 최대값은 여름이 각각 21.6°C와 28.1°C, 겨울이 10.9°C와 19.5°C로 여름이 겨울보다 높았으며, 광역 행정구역에 따른 지하수의 수온 차이는 미미하였다. 조사지점 전체 지하수의 pH 평균과 최대값은 여름이 각각 7.0과 8.5, 겨울이 6.9와 7.9였고, 계절 및 행정구역에 따른 뚜렷한 차이는 없었다. 질산성 질소(NO₃⁻-N)의 조사지점 전체 평균과 중앙값은 각각 3.2 mg/L과 1.9 mg/L로 평균이 중앙값보다 높았으며, 행정구역별 평균과 중앙값은 대구가 가장 높아 각각 5.3 mg/L과 4.6 mg/L로 측정되었다. 질산성 질소의 최대값은, 경북, 대구, 부산에서 먹는물 수질기준인 10 mg/L를 초과하는 것으로 나타났다. 군에 위치한 조사지점에서 질산성 질소의 평균과 중앙값은 각각 3.7 mg/L과 2.3 mg/L이었고, 시(혹은 구)에서는 각각 2.7 mg/L과 1.4 mg/L로 측정되어, 군의 조사지점에서 시(혹은 구)보다 더 높았다(자료 미제시). 암모니아성 질소(NH₄⁺-N)의 평균 농도는 0.02 mg/L이었고, 최대값은 0.48 mg/L로 먹는물 수질기준인 0.5 mg/L보다 낮았으며, 암모니아성 질소의 평균과 중앙값은 시(혹은 구)와 군의 조사지점에서 큰 차이가 없었다. 질산성 질소와 암모니아성 질소의 농도 사이에는 유의성이 있는 상관관계가 없었다(Table 3). 미생물 분포와의 상관성을 살펴보기 위해 인산염 인(PO₄³⁻-P)과 COD_{Mn}도 측정하였다. 인산염 인(PO₄³⁻-P)과 COD_{Mn}의 농도는, 조사지점 전체 평균이 각각 0.06 mg/L과 0.42 mg/L이었고, 최대값이 2.06 mg/L과 2.70 mg/L이었으며, 서로 약한 양의 상관관계(P<0.05)를 나타내었다(Table 2, Table 3). 또한 인산염 인은 질산성 질소와, COD_{Mn}은 pH와도 약한 양의 상관관계(P<0.05)가 있었다. COD_{Mn}의 경우 군에 위치한 조사지점에서의 평균과 중앙값이 각각 0.46 mg/L과 0.32 mg/L로, 시(혹은 구)에 위치한 조사지점의 평균과 중앙값인 0.39 mg/L과 0.24 mg/L 보다 더 높았으며, 인산염 인의 경우에는 시(혹은 구)와 군의 조사지점에서 큰 차이가 없었다(자료 미제시).

지하수의 미생물 분포

영남지역에서 채수한 지하수 시료의 일반세균 수를 사분위값(quartile)을 보여주는 box plot으로 나타내었다(Fig. 1). 조사지점 전체의 중앙값은 여름 30 CFU/ml, 겨울 40 CFU/ml로 겨울이 여름보다 높았으며, 행정구역별 중앙값의 경우 여름은 경남 45 CFU/ml, 경북 30 CFU/ml, 울산 18 CFU/ml, 부산 15 CFU/ml, 대구 13 CFU/ml의 순으로 높았고, 겨울은 경북 70 CFU/ml, 부산 35 CFU/ml, 경남 27.5 CFU/ml, 대구 23 CFU/ml, 울산 18

Table 2. Average, median, and maximum values of some physicochemical parameters in groundwater samples

Season	Parameter	Average±S.D. (Median/maximum)					
		Overall	Kyungnam	Kyungbook	Daegu	Busan	Ulsan
Summer	Water temperature (°C)	21.6±2.6 (21.8/28.1)	21.5±2.5 (21.0/26.5)	22.0±2.9 (21.8/28.1)	21.0±2.4 (20.9/25.1)	21.8±2.6 (22.2/27.0)	20.1±2.3 (20.0/24.3)
	pH	7.0±0.7 (7.0/8.5)	7.1±0.5 (7.0/8.4)	6.8±0.8 (6.7/8.0)	7.0±1.1 (7.0/8.5)	7.0±0.6 (7.0/8.2)	6.9±0.6 (6.9/7.8)
	NO ₃ ⁻ -N (mg/L)	3.2±3.3 (1.9/15.7)	2.7±2.3 (1.5/7.8)	3.2±3.6 (1.7/14.8)	5.3±5.0 (4.6/15.7)	3.7±3.2 (2.9/11.6)	1.8±2.6 (1.1/8.5)
	NH ₄ ⁺ -N (mg/L)	0.02±0.05 (0.01/0.48)	0.03±0.08 (0.01/0.48)	0.01±0.02 (0.01/0.11)	0.01±0.01 (0.00/0.03)	0.02±0.01 (0.03/0.04)	0.04±0.05 (0.02/0.16)
	PO ₄ ³⁻ -P (mg/L)	0.06±0.21 (0.03/2.06)	0.02±0.02 (0.00/0.06)	0.11±0.33 (0.03/2.06)	0.04±0.06 (0.02/0.18)	0.03±0.03 (0.02/0.09)	0.04±0.04 (0.03/0.14)
	COD _{Mn} (mg/L)	0.42±0.50 (0.25/2.70)	0.42±0.46 (0.34/0.91)	0.52±0.61 (0.29/2.70)	0.28±0.28 (0.20/0.78)	0.16±0.08 (0.16/0.29)	0.44±0.4 (0.28/1.41)
Winter	Water temperature (°C)	10.9±3.9 (10.0/19.5)	9.6±3.1 (9.2/15.0)	10.9±4.2 (10.5/19.2)	12.3±4.5 (14.2/15.9)	12.4±3.7 (13.5/19.5)	11.4±4.0 (12.4/16.0)
	pH	6.9±0.6 (6.9/7.9)	6.7±0.5 (6.7/7.8)	7.0±0.6 (7.0/7.9)	6.8±0.6 (6.8/7.7)	6.8±0.6 (6.8/7.8)	6.9±0.5 (6.9/7.5)

Table 3. Spearman's rank correlation coefficient between various parameters (summer)

		Water temperature	pH	HPC	Coliform	NO ₃ ⁻ -N	NH ₄ ⁺ -N	PO ₄ ³⁻ -P
pH	r	-0.04						
	N	83						
HPC	r	0.34**	0.07					
	N	115	83					
Coliform	r	0.18	0.13	0.25**				
	N	115	83	118				
NO ₃ ⁻ -N	r	-0.10	-0.22	-0.04	0.03			
	N	111	79	114	114			
NH ₄ ⁺ -N	r	0.10	0.11	0.10	0.09	-0.11		
	N	106	74	108	108	107		
PO ₄ ³⁻ -P	r	0.03	-0.15	0.01	-0.06	0.23*	0.14	
	N	106	75	108	108	105	101	
COD _{Mn}	r	-0.00	0.24*	0.13	0.13	0.07	0.04	0.25*
	N	110	79	112	112	108	103	104

* : P < 0.05, ** : P < 0.01

CFU/ml의 순서였다(Fig. 1). 조사지점 전체의 삼사분위값(3rd quartile)은 여름 105 CFU/ml, 겨울 300 CFU/ml로 나타나 적어도 조사지점의 25% 이상에서 먹는물 수질기준인 100 CFU/ml을 초과하였다. 행정구역별로는 여름에는 경남, 부산, 울산에서, 겨울에는 경남, 경북, 부산, 울산에서 일반세균 수의 삼사분위값이 100 CFUs/ml을 초과하였다(Fig. 1). 한편, 시(혹은 구)에 위치한 조사지점에서 일반세균 수의 중앙값은 여름 28 CFU/ml, 겨울 35 CFU/ml, 군에 위치한 조사지점에서의 중앙값은 여름 40 CFU/ml, 겨울 70 CFU/ml로 나타나, 여름과 겨울 모두 시(혹은 구)보다 군에 위치한 지점에서 더 높은 중앙값을 보였다(자료 미제시). 여름과 겨울에 측정된 일반세균 수 사이에는 유의성이 있는 상관관계가 없었으며, 여름의 경우 지하수의 일반세균 수는 수온과 양의 상관관계(P<0.01)를 나타내었다(Table 3).

대장균군에 대한 추정시험 결과를 살펴보면, 여름에는 123개

조사지점 중 57개 지점(46%)에서 1개 이상의 대장균군 집락이 검출되었고, 겨울에는 117개 조사지점 중 39개 지점(33%)에서 대장균군 집락이 검출되어 여름의 검출지점 수가 더 많았다(Fig. 2). 행정구역별로는 여름의 경우 경남 24개 지점, 경북 15개 지점, 대구 5개 지점, 부산 6개 지점, 울산 7개 지점으로부터 추정 시험에서 대장균군을 검출할 수 있었고, 겨울에는 경남 9개 지점, 경북 19개 지점, 대구 1개 지점, 부산 7개 지점, 울산 3개 지점 으로부터 대장균군을 검출할 수 있었다. 시(혹은 구)에 위치한 조사지점의 경우 여름에는 68개 조사지점 중 51%인 35개 지점에서, 겨울에는 66개 조사지점 중 32%인 21개 지점에서 대장균군 추정시험 양성이었다, 군에 위치한 조사지점에서는 여름 55개 조사지점 중 40%인 22개 지점에서, 겨울 51개 조사지점 중 35%인 18개 지점에서 대장균군 양성이었다(자료 미제시). 대장균군 추정시험 양성인 이들 지점에서 대장균군 수의 중앙값은 여름

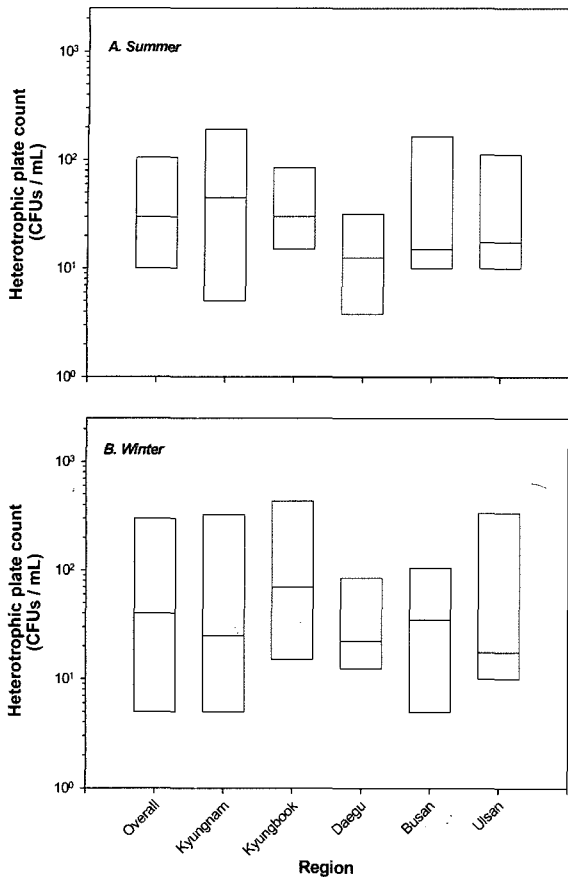


Fig. 1. Box plots showing the quartiles of heterotrophic plate counts in groundwater of Yeungnam province sampled during summer (A) and winter (B) seasons.

20 CFU/ml, 겨울 4 CFU/ml로 여름이 겨울보다 더 높았다(Fig. 3A). 여름과 겨울에 측정된 대장균군 수 사이에는 유의성이 있는 상관관계가 없었다. 한편 대장균군이 검출된 지점에서 일반세균 수의 중앙값은 여름 50 CFU/ml, 겨울 150 CFU/ml로 측정되어, 검출되지 않은 지점에서 여름과 겨울의 중앙값인 20 CFU/ml 보다 더 높았다(Fig. 3B). 여름 123개 조사지점 중 15개 지점(12%)과 겨울 117개 조사지점 중 21개 지점(18%)에서는 대장균군은 검출되지 않았으나 일반세균 수는 먹는물 수질기준인 100 CFU/ml을 초과하였다. 지하수의 대장균군 수는 일반세균 수와 양의 상관관계($P < 0.01$)를 보였으며, 조사한 물리·화학적 환경요인과는 유의성이 있는 상관관계가 없었다(Table 3).

대장균군의 동정

대장균군 추정시험 결과 양성으로 나타난 여름 199개, 겨울 91개 집락을 EMB 한천배지에 최초 접종하였으며, 동일한 배지에 연속으로 계대하여 여름 57개(29%), 겨울 25개(27%)의 순수 배양을 얻을 수 있었다. 분리한 이들 세균은 모두 EMB 한천배지에서 금속성 광택을 띠는 것으로, 여름 57개 집락은 26개 서로 다른 조사지점의 지하수로부터 유래하였으며, 겨울 25개 집락

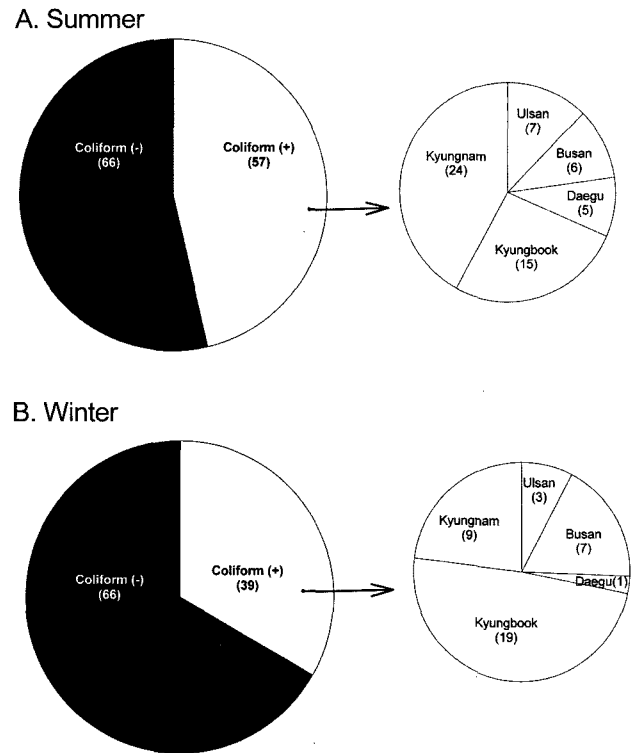


Fig. 2. Diagrams showing the number sampling locations where groundwater showed positive for coliform bacteria (presumptive test) during summer (A) and winter (B) seasons.

은 14개 조사지점으로부터 유래하였다(Table 4). 이들 집락을 대상으로, API 20E kit를 이용하여 생리적, 생화학적 특징에 따른 동정시험을 행하였으며, 이중 여름 31개 집락(6속 11종)과 겨울 15개 집락(5속 6종)을 잠정적으로 동정할 수 있었다(Table 4). 동정한 여름 31개 대장균군 세균 집락은 123개 조사지점의 15%인 19개 지점으로부터 유래하였고, 겨울 15개 집락은 117개 조사지점의 9%인 10개 지점으로부터 유래하였으며, 이중 2개 지점으로부터는 여름과 겨울 모두 대장균군 세균을 분리하여 동정할 수 있었다.

여름 57개 중 동정한 31개 집락을 살펴보면, *Enterobacter* 속이 20개로 가장 많아 동정한 집락의 65%를 차지하였고, *Klebsiella* 속이 4개(13%), *Serratia* 속이 3개(10%), *Citrobacter* 속이 2개(6%), 그리고 *Escherichia coli*와 *Pantoea spp.*가 각각 1개였다(Table 4). *Enterobacter* 속의 경우, 종별로는 *E. cloacae* 10개, *E. amnigenus* 9개, *E. sakazakii* 1개의 분포를 보였다. *Klebsiella* 속은 *K. terrigena* 2개, *K. pneumoniae* 1개였고, *Serratia* 속은 *S. liquefaciens* 2개, *S. ficaria* 1개였으며, *Citrobacter* 속은 *C. freundii*와 *C. youngae*가 각 1개씩이었다(Table 4). 겨울 25개 중 동정한 15개 집락의 경우, *Klebsiella pneumoniae*가 8개로 가장 많았고, *Citrobacter* 속의 *C. youngae*와 *C. braakii*이 각각 2개와 1개, *Enterobacter aerogenes* 2개, 그리고 *Rahnella aquatilis*와 *Serratia rubidaea*가 각각 1개씩이었

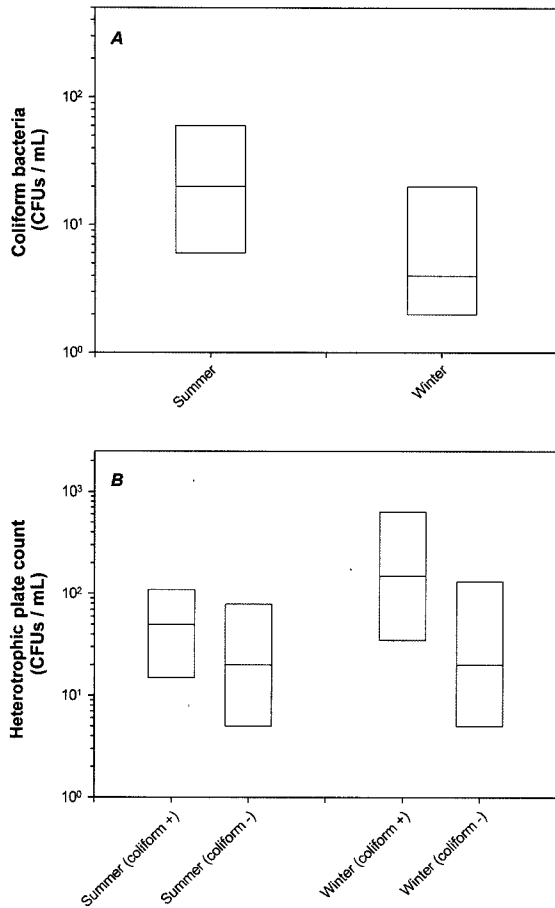


Fig. 3. (A) The quartiles of coliform bacteria in groundwater samples which were positive for coliform bacteria (presumptive test). (B) Comparison of heterotrophic plate counts between groundwater samples of coliform positive and negative (presumptive test).

다(Table 4). 여름과 겨울을 합쳐 모두 7속 15종의 대장균군 세균을 확인할 수 있었다. 여름 57개 집락 중 46%인 26개 집락과 겨울 25개 집락 중 40%인 10개 집락은 동정확률(% id)이 90% 미만이어서 사용한 kit로 확인되지 않았다(Table 4).

고 찰

전체 조사지점 중 여름 46%, 겨울 33%의 지하수는 대장균군 추정시험 결과 양성으로 판정되었으며, 여름 15%, 겨울 9%의 지하수로부터 대장균군 세균을 분리하여 확인할 수 있었다. 또한 여름 12%, 겨울 18%의 조사지점에서는, 대장균군은 검출되지 않았으나 일반세균 수는 국내 먹는물 수질기준을 초과하였다. 이러한 결과는 1980년대 이전 미국 시골지역에서 주택 지하수의 대장균군 검출 빈도보다는 낮지만, 생활용수 및 음용수로 사용하는 영남지역의 지하수에서 병원성 미생물의 오염 가능성이 여전히 높음을 시사한다. 1970년대 미국 South Carolina주 시골지역에서 임의로 채수한 460개 지하수 시료의 경우 90%이상에서 대장균군 오염이 있었고(28), 1980년대 West Virginia주에서는 시골 지역의 69개 지하수 중 58%에서 대장균군이 검출되었다(13). 1999년 미국 Wisconsin주에서 50개 지하수를 계절별로 조사한 결과, 28%인 14개소에서 1회 이상 대장균군에 대한 양성을 나타내었다(14). 한편, 환경부의 2004년 지하수 수질측정망의 운영 결과는, 조사시료 중 일반세균은 44%, 대장균은 9%에서 수질기준을 초과한 것으로 보고하고 있다(8).

영남지역의 지하수로부터 모두 7속 15종의 대장균군 세균을 분리하여 확인할 수 있었다. 동정한 세균을 속별로 살펴보면, *Enterobacter* 속이 48%를 차지하여 가장 많았고, 다음으로 *Klebsiella* 속 26%, *Citrobacter* 속 11%, *Serratia* 속 9%, 그리고 *Escherichia* 속, *Pantoea* 속, *Rahnella* 속이 각각 2%였다. 종별로는 *E. cloacae* 22%, *E. amnigenus*와 *K. pneumoniae*가 각각

Table 4. Tentative identification of coliform bacteria from groundwater samples

Season	# of colonies isolated (sampling locations)	# of colonies identified (sampling locations)	Identification (# of colonies)
Summer	57 (26)	31 (19)	<i>Enterobacter cloacae</i> (10)
			<i>Enterobacter amnigenus</i> (9)
			<i>Klebsiella terrigena</i> (3)
			<i>Serratia liquefaciens</i> (2)
			<i>Citrobacter freundii</i> (1)
			<i>Citrobacter youngae</i> (1)
			<i>Enterobacter sakazakii</i> (1)
			<i>Escherichia coli</i> (1)
			<i>Klebsiella pneumoniae</i> (1)
			<i>Pantoea</i> spp. (1)
Winter	25 (14)	15 (10)	<i>Serratia ficaria</i> (1)
			unidentified (26)
			<i>Klebsiella pneumoniae</i> (8)
			<i>Citrobacter youngae</i> (2)
			<i>Enterobacter aerogenes</i> (2)
			<i>Citrobacter braakii</i> (1)
			<i>Rahnella aquatilis</i> (1)
			<i>Serratia rubidaea</i> (1)
			unidentified (10)

20%, *C. youngae*와 *K. terrigena*가 각각 7%, *E. aerogenes*와 *S. liquefaciens*가 각각 4%, 그리고 *C. braakii*, *C. freundii*, *E. coli*, *E. sakazakii*, *R. aquatilis*, *S. ficaria*, *S. rubidaea* 등이 2%를 차지하였다. 외국의 예를 보면, 미국 Oregon주 시골지역의 78개 지하수에서는 *C. freundii*이 46%로 가장 많았고, *K. pneumoniae* 18%, *E. coli* 14%, *E. agglomerans* 12%, *E. cloacae* 4%, *E. hafniae* 3%, *S. iquefaciens* 1% 등의 순서였다(24). 지표수의 경우, 정수 처리한 음용수에서는 *E. agglomerans* 33%, *K. pneumoniae* 27%, *E. aerogenes* 24%, *E. cloacae*, 7%, *K. oxytoca* 5%, *C. freundii* 4% 등의 빈도로 확인되었고(26), 원수에서는 *K. pneumoniae* 24%, *E. cloacae* 19%, *K. oxytoca* 13%, *E. agglomerans* 10%, *C. freundii* 9%, *E. coli* 6%, *S. fonticola* 6% 등의 순서로 많았다(20). 본 연구에서 분원성 오염의 가장 직접적인 증거가 될 수 있는 *E. coli*는 동정한 대장균군 세균의 2%였고, 1개 조사지점에서만 분리되었다. 미국 Wisconsin주에서의 조사에서도 대장균군은 지하수 50개소 중 14개소에서 검출된 반면, *E. coli*는 1개소에서만 양성을 나타내었다(14). 대장균군은 토양과 식물 등에도 많은 수로 존재하며, 대장균군의 검출이 긴급한 공중보건상 위협의 지표라기보다는 지하수원 자체의 오염 위험성을 의미하기 때문에(21), 효율적인 지하수 관리를 위해서는 수질 모니터링시 대장균군과 *E. coli*를 같이 검사하는 것이 필요하다고 판단된다. 외국의 예에서 높은 빈도로 분리된 *E. agglomerans*는 영남지역의 지하수에서 확인되지 않았으며(20, 24, 26), 주로 물에서 분리되는 *Rahnella* 속의 세균이 확인된 것은 흥미롭다. 본 연구에서는 수도꼭지나 펌프출구로부터 지하수를 채수하였으며, 대장균군 세균의 오염이 확인된 간이상수도의 경우 지하수 자체의 오염인지 배수관로에서의 오염인지 여부와 잔류 염소농도 등을 확인할 필요가 있다.

대장균군 추정시험의 경우 보통 24시간 배양 후 판정하는 것으로 되어 있으나(9-11), 본 연구에서는 48시간까지 배양시간을 연장하여 금속성 광택을 띠는 집락을 계수하였다. 24시간 배양 후 대장균군 추정시험 양성을 나타낸 지점은 여름 49개 지점(40%), 겨울 23개 지점(20%)이었다. 여름 8개 지점과 겨울 16개 지점의 경우 24시간 배양 후에는 대장균군 추정시험 양성의 집락이 나타나지 않았으나 48시간 배양에서 관찰되었다. 이들 지점에서 분리한 대장균군 세균은 여름 *E. amnigenus*, 겨울 *E. aerogenes*와 *K. pneumoniae*로 확인되었다. 한편 미생물 시험용 시료는 채수 후 즉시 시험하여야 하고, 불가능할 경우 일반세균은 24시간, 대장균군은 30시간 이내에 시험하여야 하지만(9), 채수 당일 실험실로 가져올 수 없었던 일부 조사지점의 지하수는 채수 후 24-48시간에 미생물 수 측정을 위한 집종을 하였다. 따라서 본 연구에서 보관시간의 경과에 의한 지하수 시료의 대장균군 사멸과 이에 따른 대장균군 추정시험 양성 지역의 과소평가 가능성은 있으나 그 차이는 크지 않으리라 판단된다. 미국 Wisconsin주에서 행한 실험 결과는 4°C를 유지하여 보관한 시료의 경우 채수 후 적어도 48시간까지는 보관시간이 대장균군의 검출에 영향을 주지 않음을 보여준다(17).

추정시험에서 대장균군 양성으로 확인된 290개 집락을 EMB

한천배지에 최초 접종하였으며, 금속성 광택을 띠는 82개(28%)의 집락만을 분리하여 동정시험을 행할 수 있었다. 분리하지 못한 대부분의 집락은 EMB 한천배지에서 충분한 성장을 하지 않았으며, 일부 집락의 경우 EMB 한천배지에서 금속성 광택을 보이지 않아 계대하여 배양하지 않았다. 이러한 결과는 대장균군 추정시험 배지와 분리에 사용한 배지의 선택성 차이, 추정시험 배지에서 다른 세균과의 경쟁에 따른 대장균군 세균의 미약한 성장, 실험자의 실수 등에 기인한 것으로 보인다. 한편 동정시험을 행한 82개 집락 중 36개 집락(44%)은 동정확률이 90% 미만 이어서 동정할 수 없는 것으로 판정하였다. 이들 집락이 EMB 한천배지에서 금속성 광택을 띠지만 대장균군에 속하지 않는 세균인지 아니면 대장균군에 속하는 세균이지만 생리적 다양성 때문에 사용한 kit로 확인할 수 없는 것인지는 현재 결과로는 불분명하며, 다른 동정 방법을 이용한 추가적인 확인이 필요하다고 본다. 또한 대장균군 추정시험 양성인 시료가 확정시험에서 음성으로 판정되는 빈도 및 관련 세균에 대한 정보도 효율적인 지하수 관리를 위해 중요하다고 판단된다.

본 연구의 전체 조사지점을 도시와 농(어)촌으로 나누는 것은 쉽지 않으며, 관정이 위치한 주소지에 따라 시(혹은 구)와 군으로 구분하여 살펴보면, 질산성 질소, COD_{Mn} 의 농도, 일반세균 등의 항목에서 군지역의 평균과 중앙값이 시(혹은 구)보다 높았다. 질산성 질소의 경우 여름 123개 조사지점 중 5개 지점(4%)은 국내 먹는물 수질기준의 기준치보다 높은 농도를 보였다. 국내 다른 지역의 조사결과를 보면, 북한강 수계 충청평야의 지하수 20개소에서 질산성 질소의 평균과 중앙값은 각각 12.6 mg/L과 8.7 mg/L로(6), 본 연구에서 군에 위치한 조사지점의 평균과 중앙값 3.7 mg/L과 2.3 mg/L보다 높았다. 한편, 서울시내 10개 지점 지하수의 질산성 농도는 0.9-97.4 mg/L의 범위로 매우 높은 최대치를 나타내었으며, 또 다른 3개 지점에서의 농도는 1.1-7.0 mg/L의 범위였다(2, 4).

본 연구에서는 배양에 기초한 방법으로 지하수에서 일반세균과 대장균군의 분포를 조사하고 대장균군 세균을 동정하였다. 지하수에서 전체 세균의 농도 수준을 파악하고자 형광염색을 통한 총 세균수 측정을 행하였으나, 시료에 존재하는 무기성 입자 물질로 인해 유효한 결과를 얻지 못하였다. 조사대상 시료의 수가 많고 배양실험에서의 시간적 제약 때문에 지하수에 존재하는 세균의 분자적 검출 및 정량은 시도하지 않았다. 본 연구에서 대장균군을 검출할 수 있었던 조사지점의 지하수를 대상으로 오염원의 확인, 토착미생물과의 상호작용, 다른 지표미생물의 존재 여부, 세균 분포의 계절적 변화 및 환경요인의 영향 등에 대한 보다 체계적인 연구가 필요하다고 판단된다. 또한 대장균군의 분포는 바이러스에 의한 수인성 질병의 발생과 연관이 있음이 제안되었다(19). 세균에 비해 훨씬 작은 크기인 장내바이러스(25-100 nm)는 세균보다 더 쉽게 토양을 통과하여 지하수를 오염시킬 수 있다(22, 27). 본 연구의 결과는 음용수로 사용하는 지하수의 장내바이러스 모니터링에 있어 소요되는 비용과 시간 등을 최소화할 수 있는 기초 자료로도 활용될 수 있을 것이다.

감사의 말

본 연구는 울산대학교의 연구비 지원에 의해 수행되었음. 지하수 채수에 도움을 준 여러분께 감사드립니다.

참고문헌

1. 건설교통부. 2002. 지하수조사연보.
2. 김여원, 민병례, 최영길. 2000. 지하수 세균 군집의 유전적 다양성. *환경생물학회지* 18, 53-61.
3. 김인기, 橋本知義, 황경숙. 2002. 음용 지하수중에 분포하는 저영양세균의 계통학적 해석. *미생물학회지* 38, 293-298.
4. 안영범, 김여원, 이대영, 민병례, 최영길. 1998. 지하수 세균 군집에 미치는 물리화학적 환경요인의 영향. *지하수환경* 5, 215-222.
5. 조장천, 김상중. 1999. 심층피압지하수에서 세균군집의 분석에 의한 분변성 오염 평가. *미생물학회지* 35, 47-52.
6. 최종대, 장석오, 최병용, 류순호. 2000. 북한강 수계 충적 평야의 지하수 수질 모니터링 연구. *한국물환경학회지* 16, 283-294.
7. 환경부. 2005. 환경백서.
8. 환경부. 2005. 2004년 지하수 수질측정망 운영결과.
9. 환경부. 2002. 먹는물수질공정시험방법. 환경부 고시 2002-91.
10. 환경부. 2000. 수질오염공정시험방법.
11. American Public Health Association. 1996. Standard methods for the examination of water and wastewater, 19th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
12. Atlas, R.M. and L.C. Parks. 1996. Handbook of microbiological media. CRC press, Boca Raton, Florida.
13. Bifulco, J.M., J.J. Shirey, and G.K. Bissonnette. 1989. Detection of *Acinetobacter* spp. in rural drinking water supplies. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 2214-2219.
14. Borchardt, M.A., P.D. Bertz, S.K. Spencer, and D.A. Battigelli. 2003. Incidence of enteric viruses in groundwater from household wells in Wisconsin. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1172-1180.
15. Borchardt, M.A., N.L. Haas, and R.J. Hunt. 2004. Vulnerability of drinking-water wells in La Crosse, Wisconsin, to enteric-virus contamination from surface water contributions. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5937-5946.
16. 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.
17. Bussen, M. and J. Standridge. 2001. Preservation and survival of *E. coli* in well water samples submitted for routine analysis. Proceedings, 2001 American waterworks association water quality technology conference.
18. Cho, H.-B., J.-K. Lee, and Y.-K. Choi. 2003. The genetic diversity analysis of the bacterial community in groundwater by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *J. Microbiol.* 41, 327-334.
19. Craun, G.F., P.S. Berger, and R.L. Calderon. 1997. Coliform bacteria and waterborne disease outbreaks. *J. Am. Water Works Assoc.* 89, 96-104.
20. Edberg, S.C., M.J. Allen, D.B. Smith, and N.J. Kriz. 1990. Enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* from source water by the defined substrate technology. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 366-369.
21. Edberg, S.C. and J. Robertson. 1997. Natural protection of spring and well drinking water against surface microbial contamination. II. Indicators and monitoring parameters for parasites. *Crit. Rev. Microbiol.* 23, 179-206.
22. Gerba, C.P. and G. Bitton. 1984. Microbial pollutants: their survival and transport pattern to groundwater, p. 65-86. In G. Bitton and C.P. Gerba (ed.), *Groundwater pollution microbiology*. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y.
23. Keswick, B.H., D. Wang, and C.P. Gerba. 1982. The use of microorganisms as groundwater tracers: a review. *Groundwater* 20, 142-149.
24. Lamka, K.G., M.W. LeChevallier, and R.J. Seidler. 1980. Bacterial contamination of drinking water supplies in a modern rural neighborhood. *Appl. Environ. Microbiol.* 39, 734-738.
25. Lillis, T.O. and G.K. Bissonnette. 2001. Detection and characterization of filterable heterotrophic bacteria from rural groundwater supplies. *Let. Appl. Microbiol.* 32, 268-272.
26. McFeters, G.A., J.S. Kippin, and M.W. LeChevallier. 1986. Injured coliforms in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 1-5.
27. Robertson, J.B. and S.C. Edberg. 1997. Natural protection of spring and well drinking water against surface microbial contamination. I. Hydrogeological parameters. *Crit. Rev. Microbiol.* 23, 143-178.
28. Sandhu, S.S., W.J. Warren, and P. Nelson. 1979. Magnitude of pollution indicator organisms in rural potable water. *Appl. Environ. Microbiol.* 37, 744-749.
29. Shirey, J.J. and G.K. Bissonnette. 1991. Detection and identification of groundwater bacteria capable of escaping entrapment on 0.45- μ m-pore-size membrane filters. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2251-2254.

(Received February 2, 2006/Accepted April 13, 2006)

ABSTRACT : Distribution and Characteristics of Coliform Bacteria in Groundwater of Yeungnam Province**Inhwan Lee¹, Sookyung Kim¹, Yunhee Choi¹, and Jongseol Kim^{1,2*}** (¹Graduate School of Education, and ²Division of Biological Sciences, University of Ulsan, Ulsan 680-749, Korea)

To evaluate bacteriological water quality of groundwater in Yeungnam Province, samples were taken from 123 locations during summer and 117 locations during winter. The medians of heterotrophic plate counts (HPCs) were 30 CFU/mL for the summer samples and 40 CFU/ml for the winter, and more than 25% showed HPCs higher than 100 CFU/ml. Coliform bacteria were detected from 46% of the summer samples and 30% of the winter. In these coliform-positive samples, the medians of coliform counts were 20 CFU/ml for the summer samples and 4 CFU/ml for the winter. Genera such as *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Rahnella*, and *Serratia* were identified from the coliform isolates; among them, 48% were members of the genus *Enterobacter*. While *E. cloacae*, *E. amnigenus*, and *K. pneumoniae* were the most frequently isolated species, *E. coli* was isolated only from 1 location. The coliform counts were positively correlated with the HPCs, which also positively correlated with water temperature. The results of present study provide further insight on the extent of groundwater contamination with coliform bacteria.