

유전자 검색법을 이용한 상수원수와 정수처리 공정중의 병원성 미생물 검출 및 분포특성

박홍기* · 정은영 · 정종문 · 유평중

부산광역시 상수도사업본부 수질연구소

Received August 9, 2007 / Accepted October 8, 2007

Detection and Distribution of Bacterial Pathogens in Raw Water and During Water Treatment Process by Polymerase Chain Reaction. Hong Ki Park*, Eun Young Jung, Jong Moon Jung and Pyung Jong Yu. *Water Quality Institute, Water Works HQ of Busan Metropolitan City, Kyounghnam, 621-813, Korea* - The development of polymerase chain reaction (PCR) technology has the potential to solve for isolating pathogenic microorganisms from environmental samples than traditional plate counting methods. We have been detected pathogenic bacteria from raw water and water treatment process in Busan metropolitan city by PCR method. According to the result of survey from July 2004 to October 2005, 80 out of 92(87.0%) were positive for bacterial pathogens in raw water samples and positive rate of *Shigella* spp., *Yersinia* spp., *Salmonella* spp. and *Legionella* spp. were 46.2%, 40.7%, 17.6% and 9.9%, respectively. Pathogenic bacteria in raw water was mainly distributed through the lately Autumn to the winter and more highly detected Maeri than Mulgum region. During the period of survey in water treatment process, *Shigella* spp. was highly detected but all of bacterial pathogens were entirely removed after in post-ozonation step. These suggest that waters supplied in Busan metropolitan city may be safe against the pathogenic bacteria.

Key words – Pathogenic bacteria, post-ozonation step, polymerase chain reaction (PCR)

서 론

병원성 미생물에 의한 수인성 전염병은 짧은 시간 내에 많은 사람들에게 감염되어 병원균에 따라 치명적인 위험을 유발할 수 있다. 수인성 전염병에 의한 오염은 오랜 세월을 걸쳐 누적되어 나타나는 만성적인 질병을 유발하는 대부분의 화학물질과 달리 급성질환을 유발하여 단기간에 결과가 나타나고 2차 감염에 의한 확산의 우려가 있기 때문에 예방이 매우 중요하다. 이에 오래전부터 먹는 물에서 병원성 미생물에 의한 감염사고 예방을 위하여 병원성 미생물의 존재여부 확인을 위한 검사를 실시하고 있으나, 직접적인 검출을 위한 방법상의 장애 등 현실적으로 어려움이 많다. 따라서 간접적인 방식으로 대장균이나 분원성 대장균, 대장균, 분원성연쇄상구균 등과 같은 지표미생물을 사용하여 분원성 오염여부를 상시로 진단하여 수인성 질병을 미연에 예방하고 있다[15].

수인성 병원미생물은 감염되었던 사람이나 동물의 배설물로 배출되므로(fecal-oral route), 일정규모의 인구 중 일부는 환자로서 또는 보균자로 감염되어 이들 미생물들을 생산, 배출한다. 광의로는 수인성 미생물의 범위에 물에 자연적으로 존재하는 레지오넬라나 기생동물(parasite)과 같은 물에 근거한(water-based) 미생물을 포함하기도 한다[6,7]. 수인성 질병을 일으키는 병원성 미생물은 바이러스(0.5 μm)와 세균(0.5~

2 μm), 그리고 원생동물(2~50 μm)로 구분할 수 있다. 대부분이 설사, 구토, 복통, 두통 등의 증상을 보이다가 자연적으로 치유되는 가벼운 증상을 일으키나 콜레라, 장티푸스 등은 심각한 식중독 증세를 일으키고 일부는 간염이나 크립토스포리 오디시스, 지아디아시스 등 심각한 합병증을 발생시켜 면역체계가 약화된 사람에게는 치사까지 이르게 할 수 있다[11, 30]. 바이러스와 장내 기생성 원생동물은 세균과 비교하여 볼 때 더 낮은 농도에서도 감염, 발병하여 상대적으로 위험하다. 예를 들면 최소감염농도(minimal infective dose)가 장티푸스의 원인인 *Salmonella*는 > 100~1000개체, 세균성 이질의 원인인 *Shigella*는 > 100~1000개체인 반면 바이러스의 일종인 로타바이러스로는 1 PFU, 지아디아의 경우 1~10개체이다. 바이러스와 장내 기생성 원생동물은 세균성 보다 수처리 과정에 내성을 갖거나 낮은 효율로 제거된다[5,9,22,25].

이러한 이유로 현재 바이러스와 원생동물에 대해서는 정수처리시 탁도 기준을 강화하고 전국의 1일 5만톤 이상을 생산하는 정수장의 취수원을 대상으로 분포실태를 표준시험방법으로 조사중에 있어 검출기법을 추적하고 있으나 병원성 미생물에 대한 실태는 상대적으로 간과되고 있는 실정이다. 수계에 존재하는 병원성 미생물은 *Salmonella*, *Shigella*, pathogenic *E. coli* 등과 같이 장내세균들이 주를 이루지만 *Legionella* 등과 같이 장내세균들이 아닌 것들도 존재하는 것으로 여러 차례 보고되었다[24]. *Salmonella*는 2,300개 이상의 다양한 혈청형을 보유하고 있으며 사람에 감염하여 설사 등의 질병을 유발하는 병원성 세균으로써 오염된 물을 통해서 전염되며 자연계에 존재하는 병원성 *Salmonella*는 다량의 이

*Corresponding author

Tel : +82-55-323-4718, Fax : +82-55-323-4719

E-mail : pknuc@hanmail.net

물질속에 소량이 존재한다[3]. *Shigella*는 통성 혐기성 세균으로 4가지 종으로 이루어져 있으며 *Salmonella*와 같이 발열, 복통 설사 등의 증상이 있으며 심하면 죽음에 이르게 하는 질병으로 감염량이 매우 낮은 것으로 보고되고 있다[28]. *Legionella*는 41종으로 이루어져 있으며 그중 18종이 인간에게 병원성이 있는 것으로 알려져 있다. 특히 *Legionella pneumophila*에 의한 감염이 대부분이며 환경 시료에 존재하는 경우 배양이 어려운 종으로 조사되어 있다[4,10]. *Yersinia*는 사람의 소화기계로 감염되어 발열, 설사 및 복통을 수반하는 위장염을 특징으로 하는 패혈증 질환, 신장질환 및 급성 장관막 림프절염 등을 일으키며 *Y. enterocolitica* 등 4종이 대표적인 세균이다[12,21]. *E. coli*는 사람과 동물의 장내에 상재하는 비병원성 균으로 원수내의 분변오염의 지표 및 병원성 오염 정도를 평가하는 척도로 지금까지 광범위하게 사용하고 있다[27]. 현재 가장 빈번하게 발생하고 있는 식중독의 대표적인 병원성 미생물인 *Salmonella*, *Shigella* 등의 검출은 먹는 물 수질오염 공정시험방법에 근거하여 해당 미생물에 적합한 증균배지나 선택 배지를 이용하여 분리한 후 전통적 방법인 생화학 및 당분해능 시험을 실시하여 kit system으로 종 동정을 실시하고 있으나 복잡하고 많은 시간이 요구되어 병원성 미생물 검출시 신속하게 대처하는데 어려움이 있고 아울러 병원성의 존재 여부조차 다시 판단해야 하는 문제점이 존재한다[26]. 그러나 최근에는 유전공학과 분자생물학적 진단방법인 DNA-probe법, PCR법, DNA hybridization법 등을 이용한 최신 기법을 보건, 식품 등의 분야에 도입하여 병원성 미생물 등을 신속히 동정하는 단계에 이르고 있다[16]. 특히 특정한 target sequence를 선택적으로 증폭시킬 수 있는 PCR 방법은 이론적으로 정량화가 가능하며 적은 개체가 존재하더라도 검출이 가능하여 생태학적 연구에도 점차로 많이 적용되고 있다[3,29].

부산시의 식수원으로 이용되고 있는 낙동강 하류는 중상류 지역에 많은 공업단지와 인구밀집 도시가 위치하고 있어 국내에 있는 다른 하천보다도 각종 오염사고로 인한 크고 작은 수질 이상 현상이 자주 발생하고 있는 실정이다. 따라서 본 연구는 1987년 하구언 축조 이후 많은 생태계 변화를 초래하고 부영양호의 특징을 가지고 있는 낙동강 하류지역의 취수원(물금 및 매리)과 정수장 정수공정별 지점(화명 및 덕산계통)을 대상으로 PCR 방법을 이용하여 원수 및 정수공정별 지점 내에 존재 할 것으로 예상되는 장독소원성 대장균인 Enterotoxigenic *E.coli*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Legionella* spp., *Yersinia* spp., 및 *E.coli* 등 6종의 병원성 미생물의 검출과 분포특성에 대해 조사하였다.

재료 및 방법

조사지점 및 기간

년중 식물플랑크톤의 분포가 높은 낙동강 하류의 취수원

표층 및 정수장 정수공정별 지점을 대상으로 2004년 7월부터 2005년 10월까지 주1회(정수공정별 지점의 경우 월 1회) 간격으로 시료를 회수하여 병원성 미생물의 존재를 검사하였다(Fig. 1).

이화학 및 미생물학적 조사

수온, pH는 각각 온도계, pH meter (Orion, Model 260)로 현장에서 즉시 측정하였으며, 생물학적 산소요구량(BOD)은 시료를 5일 동안 20°C로 저장하여 Winkler 변법에 따라 측정하였다[1]. 또한 암모니아성 질소(NH₃-N)는 Indolphenol법에 의해 흡광도 640 nm에서 측정하였다[1]. Chl-a 농도는 500 ml의 시료를 0.45 µm filter로 여과시킨 후 90% acetone 용액에서 24시간 chlorophyll을 추출하였다. 이때 chlorophyll의 안정화를 위하여 포화 MgCO₃용액으로 세척하였다. 추출된 용액을 4,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 취해 각각 750, 664, 647, 630 nm에서의 흡광도를 측정하여 trichromatic method의 계산식에 따라 측정하였다.

그리고 식물플랑크톤의 세포수는 표층수 1 l를 채수하여 15 µm 체로 걸러 최종적으로 20 ml되게 농축한 후 중성 포르말린 1~2 ml로 고정하여 Sedgwick-Rafter chamber로 계수하였으며, ml당 세포수로 환산하여 현존량으로 표시하였다[1].

총대장균군수(Total coliforms)는 적당량의 시료를 멸균된 희석수로 적당히 희석하여 0.45 µm filter로 여과시킨 후 m-Endo LES 한천배지에 옮겨 35°C 배양기에서 1~2일 배양한 후 붉은색의 금속성 광택을 띠는 집락을 측정하였다[14]. 종속영양세균은 R₂A agar (Difco) 평판배지에 시료 1 ml를 도말 한 후 25°C 배양기에서 14일간 배양하여 형성된 집락을 계수하였다[14].

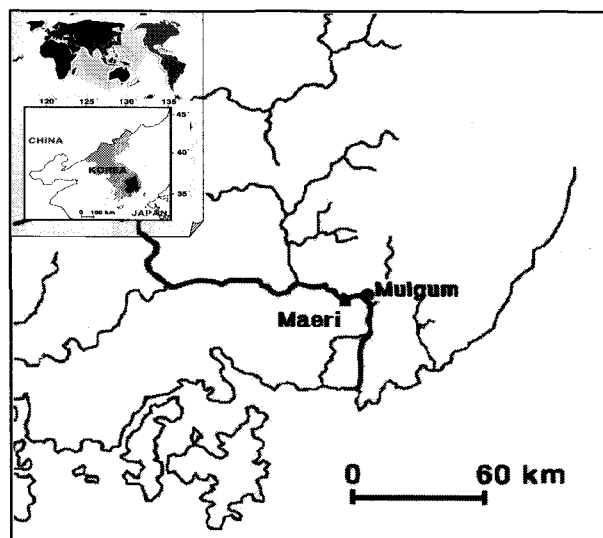


Fig. 1. Sampling sites for surveying of pathogenic bacteria in Nakdong river(No.1 site = Mulgum, No.2 site = Maeri)

표준균주

본 실험에 사용된 병원성 미생물 균주는 각각 *E.coli* (ATCC 9637), *Enterotoxigenic E.coli* (ATCC 25922), *Legionella pneumophila* (ATCC 33152), *Salmonella paratyphi B* (ATCC 10719), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Shigella sonnei* (ATCC 9290) 그리고 *Yersinia enterocolitica* (ATCC 27729)를 국립보건원으로부터 분양을 받아 증균 사용하였다. 증균된 표준균주는 제작된 primer를 이용하여 증폭시켜, pGEM-T Vector (Takara)에 cloning 하였다. plasmid DNA를 추출하여 DNA autosequencer ABI PRISM 3700 DNA Analyzer를 이용하여 염기서열을 확인하였다.

현장시료 배양

부산시 상수원인 취수원수의 경우 200 ml를, 정수공정별 지점의 시료는 0.2~2 l를 0.45 µm 여과지로 여과시킨 후 여지를 미리 멸균시킨 Tryptic Soy Broth(TSB)에 무균적으로 주입하여 35°C, 200rpm 조건으로 24시간 배양하였다. 배양 후 8000rpm, 5분간 원심 분리하여 상등액은 제거하고 남아있는 pellet를 PBS (pH 7.5)에 녹여 실험에 사용하였다(Fig. 2).

DNA 추출 및 정제

배양한 병원성 미생물의 DNA는 Quigen kit (QIAamp DNA mini kit)를 이용하여 추출하였다. 먼저 배양액 시료 1 ml를 ATL Buffer 180 µl 와 Proteinase K(20 mg/ml) 20 µl를 넣고 잘 섞은 후 56°C에서 1시간 이상 반응시켰다. 반응 후 각 튜브에 200 µl AL buffer를 첨가하여 15초간 조심스럽게 vortexing하고 70°C, 10분간 반응시켰다. 반응 후 200 µl

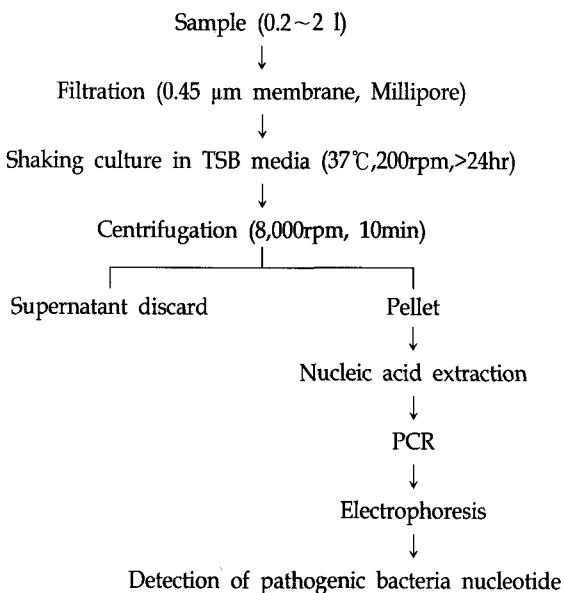


Fig 2. Isolation and Identification of pathogenic bacteria in environmental water samples

ethanol(100%)를 넣고 15초 정도 inverting하여 QIAamp spin column에 넣어 8,000 rpm, 5분간 원심 분리하였다.

여기에 500 µl AW 1를 넣고 같은 조건으로 원심분리 한 후 다시 500 µl AW 2를 첨가하여 14,000 rpm, 3분간 원심분리하여 세척하였다. 여기에 AE buffer 200 µl를 넣어 5분간 반응시킨 후 8000 rpm, 1분간 원심분리한 후 이를 PCR의 주형으로 사용하였다.

PCR (Polymerase Chain Reaction)

병원성 미생물 검출을 위한 6종류의 primer는 병원성 미생물 genome을 특이적으로 검출할 수 있는 염기서열로 제작하였다(Table 1). PCR 반응액은 총 100 µl [DNA template, 10×PCR buffer, 각각의 Forward, Reverse primer (50 pmol/µl), 5U/µl Taq polymerase (Takara Co., Japan), H₂O]이 되도록 하여 PCR 반응을 수행하였다.

PCR은 94°C에서 45초, 56°C에서 45초, 72°C에서 60초 동안 30번을 반복시켜 PCR 산물을 얻었다. PCR 반응 결과 생겨난 산물을 1.5% agarose gel에 전기영동 하여 각각의 PCR 산물의 형성 유무를 확인하였다.

결과 및 고찰

물리·화학적 수질특성

2004년 7월부터 2005년 10월까지 조사한 시료들의 물리·화학적 및 미생물학적 실험결과를 살펴보면 먼저 수온은 생물의 활성을 지배하는 중요한 환경요인으로 미생물의 영양요구성의 정도를 변화시킬 뿐만 아니라 세포내의 생화학적 반응을 결정하기도 한다[18]. 조사기간중 상수원수의 경우 수온은 8월에서 9월 초순까지는 25°C 이상의 높은 수온을 유지하였고 10월부터 점차 감소를 보이다 12월에서 2월까지의 10°C 이내로 떨어지는 경향을 보였다.

대부분의 수계는 생물의 생명활동에 적합한 pH 6~8 범위를 나타내지만 부영양화에 의한 수화현상이 심화되면 pH 9.5 이상 상승하는 경우가 많다[18]. 조사기간 동안의 pH는 3월부터 9월까지의 8.0 이하의 비교적 낮은 수치를 보였으나 갈수기인 10월부터 2월까지의 9.0 이상의 높은 수치를 나타냈는데 이는 *Melosira italica*, *Stephanodiscus hantzschii*에 의한 식물플랑크톤 등이 대량 증식하였기 때문인 것으로 생각되어진다. 그리고 이때의 평균 Chl-a 농도는 40 mg/m³ 이상으로 OECD 기준으로 평가할 때 이미 부영양화 상태에서 과영양화 상태로 전이한 것으로 보여진다[17].

수질오염의 대표적인 오염지표인 BOD와 NH₃-N는 각각 1.0~3.7 mg/l과 NH₃-N는 불검출~0.24 mg/l 범위로 나타나 이는 2001년과 2002년에 걸쳐 같은 지점에서 조사된 BOD 농도 0.8~4.1 mg/l과 1996년과 1997년에 조사된 물금지점의 0.02~0.75 mg/l 보다 낮게 나타났는데 이는 상류지역의 지

Table 1. Primers for the PCR amplification of bacterial strains

Strains	Target gene	Primer	Oligonucleotide sequence(5'→3')	Amplification region(bp)
<i>Legionella</i> spp	<i>Lmip</i>	forward	GCTACAGACAAGGATAAGTTG	650
		reverse	GTTTTGTATGACTTTAATTCA	
<i>Yersinia</i> spp	<i>Ail</i>	forward	CTATTGGTTATGCGCAAAGC	359
		reverse	TGGAAGTGGGTTGAATTGC	
<i>Salmonella</i> spp.	<i>IpaB</i>	forward	GGACTTTTTAAAAGCGGCGG	314
		reverse	GCCTCTCCAGAGCCGCTCTGG	
<i>Shigella</i> spp.	16S rRNA	forward	AAACTCAAAGGAATTGAC	500
		reverse	GACGGGCGGTGTGTACAA	
ETEC	<i>shiga toxin 1</i>	forward	TACAAGAGCGGTTACATTGTCTGG	368
		reverse	GAAATCTTCCAACACGAACGGA	
<i>Escherichia coli</i>	16S rRNA	forward	GACCTCGGTTTAGTTCACAGA	585
		reverse	CACACGCTGACGCTGACCA	

속적인 환경기초시설 확충과 빈번한 강우량에 의해 수질이 향상된 결과로 보여진다[18,19].

미생물학적 수질특성

상수원수에서 병원성 미생물의 존재는 언제나 공중위생에 있어 큰 관심사가 되고 있다. 따라서 미생물학적 감시는 채수시점에서 채취된 시료의 수인성 질병을 일으키는 감염체의 전염에 대하여 수원보호, 수처리, 급수 등이 어느 정도 효과적인 제어기능을 하는지에 대한 지표역할을 한다[31].

지표성 미생물 항목인 총대장균군수 실험결과 물금지점은 21~2100 MPN/100 ml, 매리지점의 경우에는 22~2800 MPN/100 ml 범위를 보여 매리지점의 수치가 높은 것으로 나타났으며 수온이 높은 하계에 미생물의 검출량이 높은 것으로 조사되었다. 이는 동일한 방법으로 2001년과 2002년 걸쳐 같은 지점을 대상으로 조사한 총대장균군수 10~8100 MPN/100 ml 보다는 낮은 분포를 보였다[19].

소독을 포함한 정수처리공정의 효율을 확인하는 항목으로 사용되고 있는 종속영양세균(Heterotropic Plate Count)은 원수에서 $3.2 \times 10^3 \sim 7.6 \times 10^4$ CFU/ml로 나타났는데 이 수치는 2001~2002년의 같은 지점에서 조사된 $1.6 \times 10^3 \sim 8.5 \times 10^4$ CFU/ml와 비슷한 경향을 보이는 것으로 나타났다. 조사된 2개 항목의 결과를 토대로 종합해보면 두 지점의 오염 정도는 점차 감소하는 추세에 있으나 미생물 오염수치는 상대적으로 높게 나타났기 때문에 원수에 대한 철저한 수질관리 방안과 이에 따른 대책이 요구되어진다.

상수원수 병원성 미생물 검출 및 분포특성

먼저 분양받은 6종류의 병원성 미생물 표준균주를 배양하여 DNA를 추출한 후 PCR을 실시하였는데 그 결과 Fig. 3과 같은 각각의 DNA band를 관찰할 수 있었다. 따라서 제작된 primer는 이번 실험에 조사하고자 하는 대상 병원성 미생물에 대한 감도가 뛰어나 농축시킨 현장시료도 같은 방법으로

PCR을 실시하여 검출여부를 확인하였다. 그 결과 총 46회 92개 시료중 80개 시료에서 5종류의 병원성 미생물이 최소 3회 이상 검출되는 것으로 나타났다(Table 2). 오염지표인 *E.coli*는 원수 시료 모두에서 검출되었으며, 장독소원성 대장균(Enterotoxigenic *E.coli*)은 원수에서는 존재하지 않은 것으로 조사되었다. 나머지 다른 병원성 미생물의 경우에는 *Shigella* spp. 46.2%, *Yersinia* spp. 40.7%, *Legionella* spp. 17.6% 그리고 *Salmonella* spp. 9.9%의 검출율을 각각 보였다.

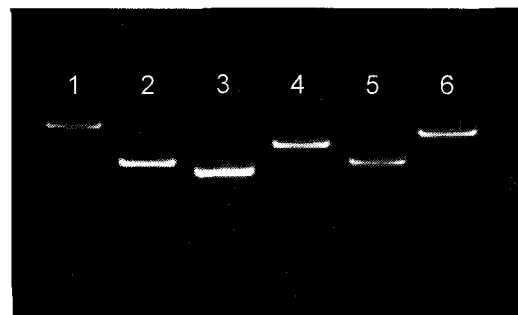


Fig 3. PCR amplification of pathogenic bacteria. 1. *Legionella* spp.(650bp), 2. *Yersinia* spp.(359bp), 3. *Salmonella* spp.(314bp), 4. *Shigella* spp.(500bp), 5. ETEC(368bp), 6. *E.coli*(585bp)

Table 2. Average detection ratio of pathogenic bacteria of Nak-dong river water in Mulgum and Maeri region by PCR based method

strains	No. 1	No. 2	average
<i>Legionella</i> spp.	17.4%	17.8%	17.6%
<i>Yersinia</i> spp.	39.1%	42.2%	40.7%
<i>Salmonella</i> spp.	8.7%	11.1%	9.9%
<i>Shigella</i> spp.	43.5%	48.9%	46.2%
ETEC spp.	0%	0%	0%
<i>E.coli</i> spp.	100%	100%	100%

※ No.1 site = Mulgum, No.2 site = Maeri

지점별로는 매리 원수가 물금 원수 보다 검출빈도가 약간 높았는데 이는 검출된 시기에 지표성 미생물인 총대장균군수 수치 농도가 상대적으로 높은 것과 밀접한 상관성이 있는 것으로 보여진다.

계절적으로는 수온이 높은 시기에 일시적으로 높았을 뿐 갈수기인 낮은 가을부터 봄철에 걸쳐 광범위하게 검출되는 분포 특성을 보여주었다. 따라서 갈수기 시기에는 병원성 미생물 검출율이 상대적으로 높게 나타나므로 이에 대한 분포 실태조사를 지속적으로 실시하여야 할 것으로 보인다.

정수처리 공정별 병원성 미생물 검출 및 분포특성

수중에 존재하는 바이러스를 비롯한 병원성 미생물과 유기물을 적절히 제어하기 위해 현재 부산시에서 사용하고 있는 고도정수처리공정은 활성탄 여과법이다. 이 방법은 활성탄 다공성에 의해 수중의 각종 유해물질들이 활성탄에 잘 흡착되므로 기존의 급속여과법에서는 제거되지 않는 용해성 유기물, 미량 유기화합물, 암모니아성 질소, 철, 망간, 이취미 원인 물질, 소독 부산물 등의 제거에 매우 효과적이어서 구미 각국에서도 고도정수처리에 많이 이용하고 있다[20]. 또

Table 3. Detection of pathogenic bacteria from each step of water treatment process using biological activated carbons by PCR based method

Micro organism	Step	Sampling time(day/mo/yr)											
		30/05/2005		20/06/2005		27/07/2005		30/08/2005		28/09/2005		28/09/2005	
		No.1	No.2	No.1	No.2	No.1	No.2	No.1	No.2	No.1	No.2	No.1	No.2
<i>Salmonella</i> spp.	1	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Shigella</i> spp.	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
	3	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
	4	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
	5	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+
	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Yersinia</i> spp.	1	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
	2	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
	3	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
	4	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
	5	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Legionella</i> spp.	1	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+
	2	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-
	3	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-
	4	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

※ Step 1 is a water sample from raw water tank. Step 3 from pre-Cl₂ contactor. Step 3 from pre-O₃ contactor. Step 4 from sedimentation basin. Step 5 from filtered water tank. Step 6 from post-O₃ contactor. Step 7 from BAC effluent. Step 8 from Treated water

※ No.1 site = Hoawamyung water plant, No.2 site = Duksan water plant

※ "+" = Detected, "-" = Not Detected

한 입상활성탄(GAC) 공정에서 GAC 파괴점을 지나 지속적으로 운전한 결과, GAC 표면에 부착된 미생물의 응집체에 의한 생물학적 분해 작용으로 인하여 용존유기탄소(DOC)가 제거된다는 보고가 알려져 있다[2]. 이것을 생물활성탄(BAC) 공정이라고 하는데[24] 부산시 정수장은 모두 이 공정을 도입하여 운영하고 있다. 또한, 기존에 사용하고 있는 염소 소독에 비해 10배 이상의 산화능을 가지고 있는 오존을 소독제로 사용하는 등 염소소독과 병행한 오존의 활용이 고도정수처리시설에 적극적으로 도입되고 있는 실정이다.

따라서 상수원수에서 대상 병원성 미생물이 빈번하게 검출되었기에 수돗물의 생물활성탄 공정에 대한 미생물학적 안전성을 확인하기 위해 4가지 종류의 병원성 미생물을 대상으로 정수처리 공정과정 중의 검출여부를 조사하였다. 화명 및 덕산 정수장 계통별 정수처리 공정별 지점을 대상으로 원수, 전염소 및 전오존 처리수는 0.2 l, 나머지는 2 l을 여과하여 동일한 방법으로 월 1회(총 6회, 2005. 5~2005. 10) 실시하였다. 실험결과 *Salmonella*의 경우 전염소 처리 이후부터 검출되지 않았고 *Legionella*, *Yersinia* 그리고 *Shigella*순으로 검출 빈도가 높았으며(Table 3), 병원성 미생물은 후오존 처리 공정 단계에서 완전히 제거되어 모든 정수시료에는 검출되지 않은 것으로 나타났다. 따라서 이번 연구에서 부산시 정수장은 병원성 미생물에 대해 안전함을 알 수 있었다.

Shigella spp.은 그람 음성, 통성 혐기성균으로 *Shigella dysenteriae*, *S. boydii*, *S. sonnei* 그리고 *S. flexneri* 등의 4가지 종으로 구성되어 있으며, 발열, 복통, 설사 등을 일으키는 이른바 shigellosis가 대표적인 증상이다. *Shigella*는 균의 대장 점막 상피에 침입 및 증식하여 인접한 세포의 상피 세포를 파괴하여 감염시키는데 이는 *Shigella*가 가지고 있는 120-230 kb의 plasmid에 의한 것이라고 알려져 있다. 또한 여러 가지 독소를 생산하고 항생제에 의한 효과가 미비하여 현재 미국을 비롯한 여러 나라에서 백신 생산 등의 임상학적 연구가 활발히 진행되고 있는 대표적인 병원성 미생물이다. 따라서 상수원수 및 정수처리 공정별 지점에서 *Shigella*가 가장 많이 검출되었기에 앞으로 생물활성탄 정수처리공정 안전성 검증차원에서 이 종에 대한 역학적 경로, 수질환경인자와의 상관관계 및 정확한 종 동정 등에 대한 정밀한 조사와 지속적인 관심이 요구되어진다[27,28,31].

현재 표준시험방법을 이용하면 수계환경에 존재하는 동안 여러 환경요인에 의하여 스트레스를 받아 이른바 살아 있지만 배양이 불가능하여 병원성 미생물이 많이 검출되지 않는 것으로 알려져 있다. 이번 실험에 사용된 PCR 방법은 검출된 병원성 미생물의 활성(전염성) 여부를 판단하기 어렵고 기존 표준시험방법에 비해 시료량이 상대적으로 과다하게(약 2 l) 사용된 문제점이 존재한다(먹는물의 경우 250 ml 시험). 그러나 일반적으로 적은 농도로 존재하는 병원성 미생물에 대한 검출감도가 기존 방법에 비해 탁월하기 때문에 검

사방법으로 활용하는데 적합하다고 판단되어진다. 또한 기존의 방법들에 비해 시간의 단축, 종 동정 용이 등 많은 장점을 지니고 있기 때문에 수계에 존재하는 병원성 미생물의 감염에 의한 질병을 예방하는 데에 많은 기여를 할 수 있을 것으로 예상된다. 그리고 수중에 극미량으로 존재하는 병원성 미생물에 대한 검출한계를 높이기 위해 해당 병원성 미생물에 적합한 primer 개발과 PCR법 보다 더욱 더 민감한 검출 기법인 Southern hybridization, 면역형광항체법에 대한 연구를 지속적으로 실시한다면 비상시 현장에서 신속하게 적용할 수 있는 검출방법은 확립될 수 있을 것으로 생각되어진다[8,16,23,31].

요 약

유전자 검색법(PCR)은 환경시료중의 병원성 미생물을 검출하는데 있어서 전통적인 배양법이 가지고 있는 문제점을 보완할 수 있는 장점을 지니고 있다. 이러한 PCR을 이용하여 부산시 취수원과 정수공정별 지점을 대상으로 병원성 미생물의 검출과 분포특성에 대해 조사하였다. 2004년 8월에서 2005년 10월까지의 실험 결과에 의하면 상수원수의 92개 시료중 80개 시료에서(87.0%) 병원성 미생물이 검출되었고, *Shigella* spp. 46.2%, *Yersinia* spp. 40.7%, *Legionella* spp. 17.6% 그리고 *Salmonella* spp. 9.9%의 검출율을 각각 보였다. 원수중의 병원성 미생물은 낮은 가을에서 겨울에 걸쳐 주로 분포하는 특징을 보였으며, 지점별로는 매리 원수가 물금 원수보다 높게 검출되었다. 정수처리 공정별 실험에서는 *Shigella*의 검출빈도가 높았으나 모든 병원성 미생물은 후오존 처리 공정 단계에서 완전히 제거되는 것으로 나타났다. 따라서 부산시 정수장은 병원성 미생물에 대해 안전함을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. APHA, Standard methods for the examination of water and wastewater. 1992. 18th eds., APHA-AWWA-WPCF, New York.
2. Bach, H., S. Tarre and M. Green. 1998. Post treatment of groundwater denitrification fluidized bed reactor effluents to achieve drinking water quality. *J. Industrial Microbiol. & Biotechnol.* **20**, 54-359.
3. Baudart, J., K. Lemarchand, A. Brisabois and P. Lebaron. 2000. Diversity of salmonella strains isolated from the aquatic environment as determined by serotyping and amplification of the ribosomal DNA spacer regions. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1544-1552.
4. Bej, A. K., M. H. Mahbubani and R. M. Atlas. 1991. Detection of viable *Legionella pneumophila* in water by Polymerase Chain Reaction and gene probe methods. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 597-600.

5. Benenson, A. S. 1990. Control of Communicable Disease in Man, 15th. American Public Health Association.
6. Craun, G. F. 1986. Waterborne Disease in the United States. CRC Press, Boca Raton, FL.
7. Feachem, R., D. J. Bradley, H. Garelick and D. Mara. 1983. Sanitation and Disease : Health Aspects of Excreta and Wastewater Management. John Wiley and Sons, New York.
8. Fred, G. P., E. Lee and J. L. Anne. 1993. Public health significance of waterborne pathogens in domestic water supplies and reclaimed water, Landfills and water quality management.
9. Graham, D. Y., G. R. Dufour, and M. Estes, 1987. Minimal infective G. R. Dufour and M. Estes. dose of rotavirus. *Arch. Virol.* **92**, 261-271.
10. Helbig, J. H., T. Engelstadter, M. Maiwald, S. A. Uldum, W. Witzleb and P. C. Luck. 1999. Diagnostic relevance of the detection of Legionella DNA in urine samples by the polymerase chain reaction. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect Dis.* **18**, 716-722.
11. Jung, H. M. and J. Y. Yoon. 1994. The Opinion with Microbiological Standard of American Drinking Water. *J. KSWQ.* **10**, 62-71.
12. Kapperud, G., T. Vardund, E. Skjerve, E. Hornes and T. E. Michaelsen. 1993. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in foods and water by immunomagnetic separation, nested polymerase chain reaction, and colorimetric detection of amplified DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 2938-2944.
13. Kong, R. Y. C., Kong, S. K. Y. Lee, T. W. F. Law, S. H. W. Law and R. S. S. Wu. 2002. Rapid detection of six types of bacterial pathogens in marine waters by multiplex PCR. *Water Research* **36**, 2802-2812.
14. Ministry of Environment. 2002. Standard Method for the Drinking Water Quality.
15. National Institute of Environmental Research. 1998. Water Quality Management for Health and Treatment related microorganisms.
16. National Institute of Environmental Research. 1994. Development of Rapid Detection Method of Hazardous Materials in Water.
17. OECD. Eutrophication of waters. 1982. Monitoring, Assessment and Control, **154**, Paris.
18. Park, H. K., C. M. Chung, J. R. Bahk and Y. K. Hong. 1999. The Relationship between Phytoplankton Productivity and Water Quality in Downstream of Nakdong River. *J. of the Korean Environmental Sciences Society* **8**, 101-106.
19. Park, H. K., E. Y. Jung, Y. J. Lee, J. M. Jung, D. H. Choi, H. J. Son, K. W. Kwon and Y. K. Hong. 2003. Distribution of Waterborne Enteric Viruses in Raw Water and Tap Water in Busan Metropolitan City. *Kor. J. of Life Science* **13**, 197-205.
20. Park, J. Y. 1994. Drinking Water Microbiology. pp. 385-396, Chemical Engineering Research Corporation, Seoul.
21. Radnedge, L., S. Gamez, P. M. McCreedy, P. L. Worsham and G. L. Andersen. 2002. Identification of nucleotide sequences for the specific and rapid detection of *Yersinia pestis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3759-3762.
22. Rose, J. B., C. N Haas and S. Regli. 1991. Risk assessment and control of waterborne giardiasis. *American J. Public Health* **81**, 709-713.
23. Roszak, D. B. and R. R. Colwell. 1987. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol. Rev.* **51**, 365-379.
24. Rou, D. C. 1997. Optimization of Water treatment process by Ozone and Granular Activated Carbon. Theme of Master in National of Bukyeng University.
25. Sobsey, M. D. 1989. Inactivation of health-related microorganism in water by disinfection process. *Wat. Sci. Tech.* **21**, 179-195.
26. Soumet, C., G. Ermel, N. Rose, V. Rose, P. Drouin, G. Salvat and P. Colin. 1999. Evaluation of a multiplex PCR assay for simultaneous identification of *Salmonella* sp., *Salmonella Enteritidis* and *Salmonella Typhimurium* for environmental swabs of poultry houses. *Letters in Applied Microbiology* **28**, 113-117.
27. Swapan, K. N. 2005. Shigellosis. *The Journal of Microbiology* **43**, 133-143.
28. Theron, J., D. Morar, M. D. U. Preez, V. S. Brozel and S. N. Venter. 2001. A sensitive seminested PCR method for the detection of *shigella* in spiked environmental water samples. *Wat. Res.* **35**, 869-874.
29. Waage, A. S., T. Vardund, V. Lund and G. Kapperud. 1999. Detection of low numbers of *Salmonella* in environmental water, sewage and food samples by a nested polymerase chain reaction assay. *Journal of Applied Microbiology* **87**, 418-428.
30. WHO. 1996. Guidelines for Drinking-Water Quality.
31. Xuanxian, P., L. Wen, Z. Jianying, W. Sanying and L. Shengcai. 2002. Rapid detection of *Shigella* species in environmental sewage by an immunocapture PCR with universal primers. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 2580-2583.