KOR. JOUR. MICROBIOL June, 1993 p. 255~260 Vol. 31, No. 3

생물막 세균의 염소소독제에 대한 내성

조재창 · 박성주 · 김상종*

서울대학교 자연과학대학 미생물학과

*Enterobacter cloacae*를 이용하여 슬라이드(slide glass)와 아연도강관조각(galvanized-iron coupon)상에 생물막을 형성시킨 후 부착생장세균의 염소에 대한 내성을 측정한 결과 부유생장세균에 비해 각각 14배와 480배의 내성증가를 나타내었다. 또한 입자에 부착된 세균군집의 경우 부유세균군집에 비해 48배로 내성이 증가되었다. 슬라이드와 아연도강관조각을 수돗물에 75일간 접촉했을 때 각각 4.75×10^4 cfu/cm^2, 1.12×10^5 cfu/cm^{2}의 생물막이 형성되는 것을 관찰하였다. 따라서 수돗물에서의 장내세균과 종속영양세균은 입자에 부착 혹은 흡착되거나 응집된 상태로 존재함으로써 잔류염소에 대한 내성을 가지게 되며, 또한 정수과정에서 염소살균을 피하여 배급수계통으로 유입되면 배급수관 내벽에 생물막을 형성하여 잔류염소에 대한 내성을 가지게 됨으로써 배급수계통에서 생장하는 것으로 판단된다.

KEY WORDS □ tap water, biofilm, particle-attached bacteria, chlorine resistance

최근 수돗물 등에서 세균을 검출, 계수하는 방법이 발달하여 염소소독을 포함한 정수처리를 끝낸 수돗물에서 장내세균과 일반세균이 과다하게 검출된다는 보고가 있다(1, 3, 5, 10, 11). 정수계통에서의 소독공정은 대상미생물을 완전히 불활성화시키는 멸균과는 달리 대부분의 미생물 즉 주로 병원성 미생물의 불활성화를 목적으로 한 것이기 때문에 소독결과 세균의 완전한 제거는 불가능하지만 수돗물에서 장내세균과 일반세균이 다량 검출되는 현상은 공중보건의 측면에서 매우 심각한 문제가 아닐 수 없다. 이와 같이 수돗물에서 장내세균과 일반세균이 다량 검출되는 원인으로는 정수장에서의 부적절한 정수처리에 의해 세균이 불활성화 또는 손상받지 않은 상태로 수도관으로 유입됨으로써 수돗물에서의 세균수가 증가되는 breakthrough 현상과(3), 이렇게 유입된 세균과 통상적인 배지에서는 집락을 형성하지 않는 손상세균(injured bacteria)이 잔류염소에 대하여 내성을 가지게 되어 수도관에서 재생장하는 것 등이 알려져 있다(1, 3, 10, 11).

소독제의 살균효과는 미생물 99%를 사멸시킬 수 있는 소독제의 농도(C)와 접촉시간(T)의 곱으로 표현되며(CT_{99}), 그 값은 Chick-Watson법칙인 $\ln(N/No)=K\cdot Cn\cdot t$ 식에 의하여 산정될 수 있다(17). 이 방정식에 의거하여 여러 조건하에서 소독제와 살균제에 대한 미생물의 내성이 보고되었다(7-9, 15, 16). 그러나 소독제나 살균제에 대한 미생물의 내성기구는 아직 완전히 규명되지 않아 정수과정에서 보다 효과적인 소독방법에 대한 연구는 불충분한 상태이다.

본 연구에서는 수돗물에서의 과다한 세균 검출원인을 연구하기 위하여 원수와 정수에서 분리동정된 세균을 대상으로 여러 조건하에서 염소소독제에 대한 내성을 조사하였으며 실제 수돗물에서 세균이 생물막을 형성하여 생장하는 것을 관찰하였다.

재료 및 방법

서울시 상수원수에서 분리동정된 *E. cloacae*를 배양조건에 따른 염소소독제 내성변화 연구에, 그리고 입자부착세균이나 생물막세균의 내성시험에는 원수나 수돗물에 존재하는 종속영양세균(heterotrophic plate count bacteria ; HPC)을 사용하였다. 소독시험을 위하여 접종세균을 R_2A 액체배지에서 진탕배양하였다. 그리고 실험당일 계대배양중인 세균을 원심분리하여 농축한 후 인산완충용액으로 세척한 후 사용하였다.

실험에 사용된 소독제는 차아염소산나트륨용액(sodium hypochlorite solution)이며 소독제의 농도는 *o*-toluidine 비색법을 이용하여 측정하였다. 소독실험에 사용되는 모든 희석용액은 3차 증류수를 사용하였고 사용되는 초자류는 170°C의 건조기에서 24시간 동안 멸균건조시켜 초자표면상의 유기물을 제거함으로써 염소요구량을 최소화하였다.

세균의 소독제에 대한 내성시험

10 mM 인산완충용액(pH 7.2) 100 m*l*에 배양된 접종세균을 10^6 cfu/*l* 정도의 개체가 되도록 접종하고 차아염소산나트륨용액을 유리잔류염소농도가 1 mg/*l*가 되도록 첨가하여 일정시간 후 시료 1 m*l*을 채취해 10% sodium thiosulfate로 탈염소시킨 다음 R_2A 한천배지(16)에서 배양된 집락을 계수하였다. 염소소독제에 대한 생물막 내성시험에서는 생물막이 형성되어 있는 슬라이드와 아연도강관 등 2종류의 기저(substratum)를 인산완충용액내에서 소독시킨 후 기

저에 부착된 생물막세균을 1분간 3회에 걸쳐 30초 간격으로 초음파처리하여 분리하였다.

부유세균의 염소소독제 내성은 초음파처리된 상수원수중의 HPC 세균을 일정시간별로 1 mg/l의 유리잔류염소와 접촉시킨 후의 집락수로서 측정하였고, 입자부착세균의 내성정도는 부유세균수에서 공극 5 μm의 막여과지로 여과된 상수원수(filtered raw water)를 같은 조건에서 소독시킨 후 계수된 HPC 세균수를 뺀 5 μm 이상의 입자부착세균의 HPC 세균수로서 내성정도를 추정하였다. 그리고 이러한 부유세균 및 입자부착세균의 내성과 상수원수 중의 HPC 세균의 소독제에 대한 내성도 비교하였다.

배양조건

세균의 염소소독제 내성에 영향을 주는 요인을 연구하기 위하여 *E. cloacae*를 여러가지 배양조건하에서 배양하여 그 내성변화를 관찰하였다. 온도 변화에 따른 세균의 염소소독제에 대한 내성은 계대배양중인 *E. cloacae*를 R_2A 액체배지에서 1 mg/l의 잔류염소농도를 유지시키면서 15, 25 및 35°C에서 1, 3, 7일간 배양하였고, 영양물질량에 따른 내성변화는 R_2A 액체배지와 이것을 각각 1/100 및 1/1000로 희석한 R_2A 액체배지에서 1 mg/l의 잔류염소농도를 유지하면서 25°C로 각각 1일, 3일, 10일간 진탕배양(100 rpm)한 후의 세균수를 계수하였다.

생물막세균의 소독제에 대한 내성은 실험실의 수돗물을 이용하여 2종류의 기저에 형성된 생물막을 이용하였다. 생물막은 초음파세척과 170°C의 건조기에서 24시간 동안 멸균건조를 실시하여 표면의 유기물이 제거된 기저를 멸균된 EPS 액체배지(14)에 넣은 후 *E. cloacae*를 10^6 cfu/l 정도로 접종하여 25°C에서 7일간 진탕배양(100 rpm)하면서 형성시켰다.

수돗물 중에서의 생물막생성

실제 수돗물 중에서 생물막이 형성되는 것을 관찰하기 위해 실험실내의 수도꼭지로 공급되는 수돗물을 이용하여 수돗물 중에 존재하는 HPC 세균의 생물막을 형성시켰다. 기저가 들어있는 반응조에 수돗물을 수중의 부유세균의 증식을 방지할 수 있는 유속인 6/h의 희석율(19)로 흐르게 하면서 일정기간별로 기저를 채취하였다. 기저표면에 형성된 생물막세균은 1분간 30초 간격으로 3회에 걸쳐 초음파세척하여 기저에서 분리시킨 후 R_2A 한천배지에서 25°C에서 14일간 배양하여 형성된 집락을 계수하였다.

결과 및 고찰

장내세균들의 CT_{99}값을 측정한 결과 *Enterobacter aerogenes* 0.045, *Escherichia coli* 0.047, *Salmonella typhi* 0.049, *Shigella dysenteriae* 0.048, *Klebsiella pneumoniae* 0.069 mg·min/l로 각각 나타났다. 이러한 염소내성과 비교할 때 상수원수에서 분리동정된 *E. cloacae*는 0.093 mg·min/l로서 보관된 장내세균보다 높은 염소내성을 나타내었다. LeChevallier(13)는 *K. pnuemoniae*의 염소내성이 피막형성여부에 따라 약간 변하기는 하지만 CT_{99}값이 대체로 0.06~0.17 정도인 것으로 보고하였는데, 이 값은 본 연구와 비슷하다. 반면 King 등(8)은 장내세균의 염소에 대한 CT_{99}값을 0.4 mg·min/l 내외인 것으로 보고하였다. 일반적으로 염소에 대한 세균의 CT_{99}값은 염소 접촉 후 수초내에 결정되는데, King 등이 측정한 CT_{99}값은 염소와 1분간 접촉시킨 후 형성되는 집락을 계수하여 내삽법으로 추정한 것이어서 다소 과대평가된 것으로 생각된다.

온도의 영향

세균의 생장온도에 따른 *E. cloacae*의 염소에 대한 내성변화 결과를 보면 배양온도 15°C에서의 CT_{99}값이 0.1164, 25°C와 35°C에서의 CT_{99}값이 각각 0.1158, 0.1157 mg·min/l로서 온도가 낮아질 때 내성이 조금 증가하는 경향을 보였다(Fig. 1). 15°C에서 배양된 세균은 접촉시간이 15초 이후에는 개체수가 감소되지 않고 일정한 수준을 유지한 반면 25°C나 35°C에서 배양된 세균은 30초 부터는 세균수의 감소현상이 관찰되었다.

생장온도에 따른 세균의 소독제 내성변화에 대한 연구는 많이 보고되었는데(2, 6), 이중 Harakeh 등(5)은 *K. pneumoniae*의 이산화염소에 대한 내성은 15°C에서 생장한 경우가 37°C에서 생장한 것에 비해 약 2.5배 정도 증가했다고 보고했으며, 이러한 생장온도에 따른 내성변화는 세포막의 지질유동성(lipid fluidity)이 수온에 따라 변화하고 지질유동성의 변화는 곧 세포막의 물질투과능을 변화시키는 데서 기인된다고 주장하였다.

영양물질농도의 영향

영양물질농도의 변화에 따른 세균의 내성은 1/1000로 희석된 R_2A 액체배지가 가장 큰 것으로 나타났다

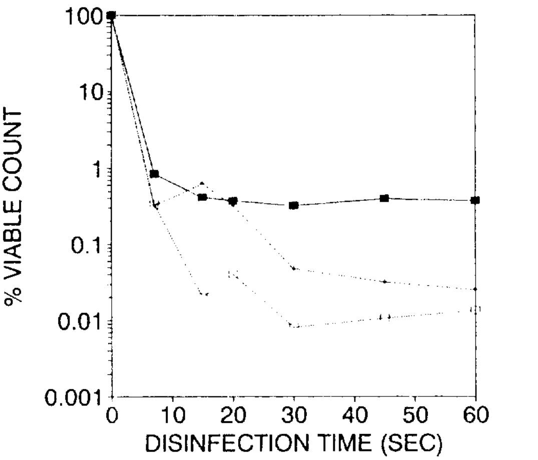

Fig. 1. *Effect of growth temperature on the chlorination of Enterobacter cloacae by 1 mg/l of sodium hypochlorite solution at pH 7.2 and 23°C.*
15°C (-■-); 25°C (-□-); 35°C (-*-).

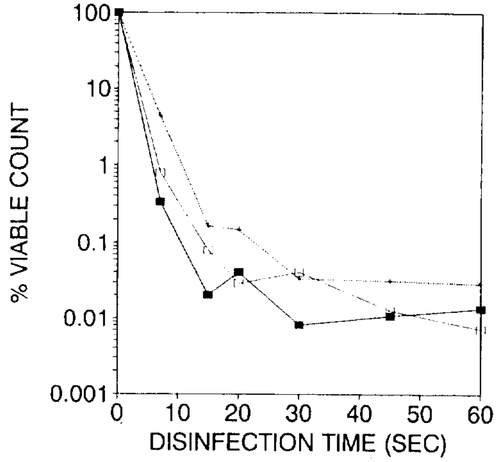

Fig. 2. *Effect of nutrient concentrations of R_2A broth medium on the chlorination of Enterobacter cloacae by 1 mg/l of sodium hypochlorite solution at pH 7.2 and 23°C.*
undiluted (-■-); 1/100 diluted (-□-); 1/1000 diluted (-*-).

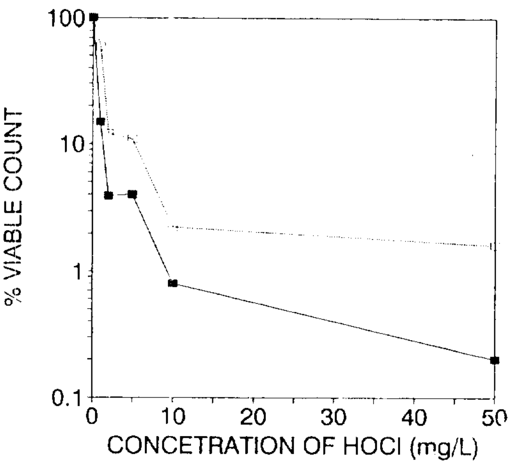

Fig. 3. *Disinfection of Enterobacter cloacae biofilms grown on the slide glass and galvanized-iron coupons by 10 mg/l of sodium hypochlorite solution at pH 7.4 and 25°C.*
biofilms on slide glasses (-■-); biofilms on galvanized-iron coupons (-□-).

(Fig. 2). 즉 *E. cloacae*의 내성은 1/1000 희석배지에서 가장 높았고, 다음이 1/100 희석배지, 그리고 희석되지 않은 배지의 순서로서 23°C에서 배양한 세균의 CT_{99} 값은 각각 0.223, 0.116, 0.110 mg·min/*l*이었다. 따라서 1/1000로 희석된 R_2A 액체배지에서 생장한 *E. cloacae*는 희석되지 않은 배지에서 자란 경우에 비해 약 2배 가량의 내성증가가 관찰되었다. 이렇게 상대적으로 빈영양의 낮은 영양물질조건에서 소독제에 대한 세균의 내성이 증가한다는 다른 보고들도 많이 있기 때문에(2, 13), 일반적으로 영양물질의 농도가 낮은 자연환경에서 생장한 미생물일수록 소독제에 대하여 비교적 높은 내성을 갖게 되는 것으로 판단된다.

LeChevallier(13)는 *K. pneumoniae*를 1/1000로 희석된 EPS 액체배지에서 배양했을 경우 희석되지 않은 배지에서보다 염소에 대하여 약 2배 가량의 내성이 증가된다고 보고하였다. Stewart와 Olson(18)은 빈영양환경에서 나타나는 기아효과(starvation effect)와 같은 생리적인 변화가 세균의 소독제에 대한 내성을 증가시킬 수 있다고 하였다. 따라서 정수과정을 거친 물은 일반적으로 TOC가 1.0 mg/*l* 내외의 빈영양 조건이므로(1), 수돗물에서 생장하는 세균의 경우 염소에 대한 내성이 클 가능성이 많은 것으로 판단된다.

부 착

수도관 내벽에서 부착생장할 수 있는 생물막세균에 대한 염소내성을 보면 *E. cloacae*가 슬라이드상에서 생물막을 형성했을 때의 CT_{99}값은 1.615, 아연도강관조각상에서 생물막을 형성했을 때의 CT_{99}값은 55.683 mg·min/*l*로서 생물막을 형성하지 않은 부유세균의 CT_{99}값인 0.116 mg·min/*l*에 비해 각각 14배 및 480배의 내성증가를 갖는 것으로 나타났다(Fig. 3). Fig. 3의 생물막소독곡선에서 보면 생물막세균을 10 mg/*l*의 염소농도에서 10분간 접촉시켰을 때 슬라이드 생물막세균은 99.2%의 개체수가 감소하였으나 아연도강관조각 생물막세균은 97.9%만이 감소하였고, 50 mg/*l*의 염소농도에서 10분간 접촉시킨 후에는 슬라이드 생물막의 세균감소율은 99.9%인 반면 강관조각 생물막의 세균감소율은 98.4%에 그쳐 염소에 대한 내성이 금속표면의 생물막세균이 유리표면의 생물막세균에 비하여 높은 것으로 나타났다. 여기서 아연도강관조각표면에서의 생물막세균은 주입된 염소농도 범위에서는 99% 이상의 세균감소율을 보이지 않았기 때문에 외삽법으로 CT_{99}값을 산정하였다. 따라서 강관조각 생물막세균의 염소내성은 실제보다 다소 과소평가된 것으로 보이는데, LeChevallier(14)는 구리표면에 형성된 생물막에서 생장하는 HPC 세균의 경우 염소에 대한 내성이 부유세균에 비하여 2400배 정도라고 보고하였다. 염소 1 mg/*l*를 주입한 경우 강관조각 생물막세균은 40.7%가 감소하였는데, 이러한 결과는 본 연구기간중 정수장에서의 염소주입농도가 1.0 mg/*l* 내외, 관말지점의 수돗물의 잔류염소농도가 평균 0.2 mg/*l* 내외인 것을(1) 고려하면 실제 상수도계통의 생물막세균은 주입되는 염소에 의하여 절반이상이 사멸되지 않고 생존하고 있다고 볼 수 있다.

상수원수 중의 입자부착세균의 CT_{99}값은 140.766이고 상수원수 중의 입자부착세균을 초음파분리시킨 부유세균의 CT_{99}값은 2.955 mg·min/*l*로서 입자부착세균이 부유세균에 비하여 47.6배의 내성을 가진 것으로 나타났다(Fig. 4). 부유세균은 염소 1 mg/*l*에서 180초 동안 접촉시켰을 때 90% 이상이 감소되었고

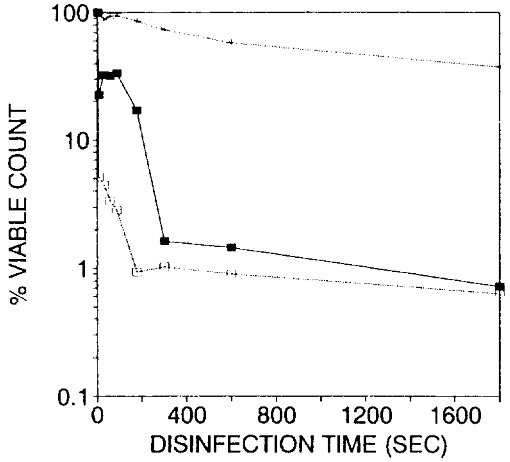

Fig. 4. *Disinfection of particle-attached and suspended bacteria in raw water by 1 mg/l of sodium hypochlorite solution at pH 7.4 and 25°C.* unmodified raw water (—■—); suspended bacteria by ultrasonication (—□—); particle-attached bacteria by filtration (—*—).

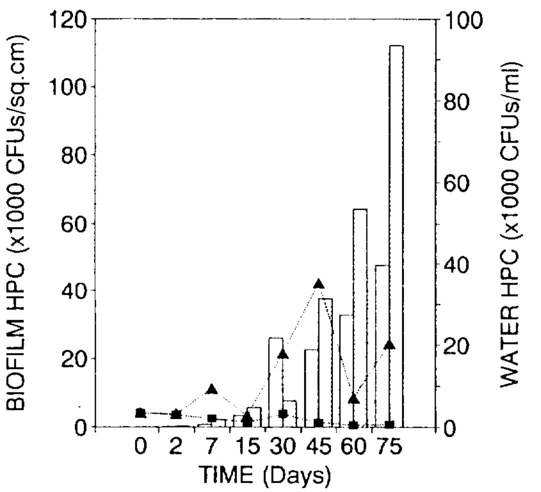

Fig. 5. *Temporal change of heterotrophic plate count bacterial densities of biofilms, influent and effluent of the biofilm formation reactor.* biofilm bacteria on slide glasses (□); biofilm bacteria on galvanized-iron coupons (▨); suspended bacteria in influent (—■—); suspended bacteria in effluent (—▲—).

3분간 접촉시켰을 때는 99.3%의 세균이 감소되었다. 반면 입자부착세균은 1 mg/*l*의 염소농도에서 10초간 접촉시켰을 때는 소독효과가 나타나지 않았으며, 3분간 접촉시킨 후에도 겨우 37.5%의 세균감소만을 보였다. 한편 초음파분리를 실시하지 않은 상수원수 중에 존재하는 HPC 세균의 CT_{99}값은 22.432 mg·min/*l*로서 부유세균과 입자부착세균의 CT_{99}값의 중간값을 나타내었다. 이때 사용된 상수원수의 탁도는 15 NTU, 입자부착세균이 제거된 여과원수의 탁도는 0.54 NTU로서 이 여과원수의 탁도는 대체로 정수나 수돗물과 같은 수준이었다. 또한 상수원수의 HPC 세균수는 1.52×10^4 cfu/m*l*, 초음파세척을 실시하여 부착세균을 모두 분리시킨 후의 HPC 세균수는 1.93×10^4 cfu/m*l*인 것으로 미루어 부유세균의 21% 정도가 직경 5 μm 이상의 입자에 부착되어 있거나 서로 응집되어 있는 세균의 형태로 존재하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 HPC 세균을 계수할 때 초음파세척 등 적절한 방법으로 입자에 부착되어 있거나 응집된 세균을 분리시키지 않을 경우 이들이 배지상에서 모두 1개의 집락만을 형성하게 되므로 HPC 세균수가 과소평가될 수 있음을 보여주는 것이다. 상수원수에서 부유하고 있는 HPC 세균의 CT_{99}값은 부유하고 있는 *E. cloacae*보다 높게 나타났는데, 이것은 세균종에 따라 염소에 대한 내성정도가 다른 것 이외에도 상수원수 중의 용존유기물이나 환원성물질 등에 의하여 염소가 세균에 접촉하기 이전에 미리 소모되는 데에도 그 원인이 있는 것으로 생각된다(12).

부착세균의 염소에 대한 내성이 부착되지 않은 부유세균에 비해 높게 나타나는 것은 입자나 생물막 자체가 염소와 같은 소독제를 미리 산화시켜 염소를 소모하기 때문에 입자나 생물막 속에 생장하는 세균에 살균작용을 나타낼 수 있는 소독제의 농도가 그만큼 감소되기 때문인 것으로 보고되고 있다(12, 14). 따라서 생물막이나 입자에 부착된 세균에 대한 소독제의 살균효과는 소독제가 생물막을 침투하여 세균에 도달할 수 있는 능력, 즉 입자나 생물막내로의 소독제 확산율이 결정하는 것이다. 염소는 반응 대상물질이 다양하여 세균 뿐만 아니라 생물막의 세포외 복합물(extracellular polymeric substances ; EPS)이나 기저와도 반응한다(13). 또한 세균의 부착은 소독제와 세균과의 상호작용기구에 변화를 가져오게 되는데, LeChevallier 등(12)은 부유세균의 경우 모든 방향에서 모든 각도로 소독제의 공격을 받게 되나 부착된 세균의 경우 생물막 내에서의 lateral diffusion을 무시할 때 단 1방향으로 부터만 공격을 받게 되는 physical hindrance에 의해 소독제가 세포막에 접근하는 능력에 영향을 주게 된다고 했다. 본 연구에서도 화학적으로 불활성 표면인 슬라이드에 생물막을 형성했을 때, 부유세균에 비해 14배의 내성이 관찰되었다.

수돗물에서의 생물막형성

슬라이드와 아연도강관조각이 들어 있는 생물막형성반응조로 평균잔류염소농도가 0.1 mg/*l* 미만인 수돗물을 흐르게 하면서 3개월간 기저에 형성된 생물막세균을 관찰한 결과 접촉 2일 후에는 각각 4.81×10 및 7.62×10 cfu/cm², 75일 후에는 각각 4.75×10^4 및 1.12×10^5 cfu/cm²의 생물막세균이 검출되었으며, 기저표면의 생물막세균의 밀도가 증가함에 따라서 박

응조에서 나오는 유출수중의 부유세균수도 증가하였다(Fig. 5).

수돗물과 같은 빈영양의 환경조건에서도 슬라이드나 강관조각과 같은 기저표면에 수중의 유기물이 침적되고 농축되어 기저표면은 쉽사리 유기물로 조절되며, 따라서 정수과정에서 살균을 피하여 배급수계통으로 유입된 부영양세균은 빈영양환경에서 기저표면에 부착함으로써 생존하게 되며(4) 이러한 부착이 바로 높은 농도의 잔류염소에 대해서도 사멸되지 않고 생존하는 능력을 발휘하는 것으로 생각되고 있다(3). 그리고 배급수계통에서 형성된 생물막은 전단력이나 생물막세균의 증식으로 인하여 기저로부터 분리되어 수중으로 유리됨으로써 수돗물 중의 세균이 증가될 수 있는 것으로 보인다(20).

이렇게 수돗물 중의 세균이 입자에 부착된 상태이거나 생물막을 형성하여 잔류염소에 대한 내성이 증가됨으로써 일어나는 배급수계통에서의 세균재생장을 방지하기 위해서는 적절한 소독방법이 연구되어야 하는데, 현재 염소소독으로 인한 발암성물질인 trihalomethanes(THM) 생성을 방지하고 생물막세균에 대한 살균효과가 좋은 것으로 보고되고 있는 결합잔류염소인 monochloramine에 대한 연구가(12, 14) 보다 활발히 수행되어야 할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. **박성주, 조재창, 김상종,** 1993. 상수도계통에서의 세균 분포 및 변화. 미생물학회지 **31**, 245-254.
2. **Berg, J.D., A. Matin, and P.V. Roberts,** 1982. Effect of antecedent growth conditions on sensitivity of *Escherichia coli* to chlorine dioxide. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**, 814-819.
3. **Characklis, W.G.,** 1988. Bacterial regrowth in distribution systems, p. 1-11. *In* W.G. Characklis (ed.), Research report. AWWA Research Foundation, Denver.
4. **Characklis, W.G.,** 1990. Biofilm processes, p. 195-231. *In* W.G. Characklis and K.C. Marshall (ed.), Biofilms. John Wiley & Sons, Inc., New York.
5. **Gambassini, L., C. Sacco, E. Lanciotti, D. Burrini, and O. Griffini,** 1990. Microbial quality of the water in the distribution system of Florence. *Aqua* **39**, 258-264.
6. **Harakeh, M.S., J.D. Berg, J.C. Hoff, and A. Matin,** 1985. Susceptibility of chemostat-grown *Yersinia enterocolitica* and *Klebsiella pneumoniae* to chlorine dioxide. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 69-72.
7. **Herson, D.S. and K.H. Baker,** 1982. New approches to measuring total bacterial populations in water supplies. *Jour. AWWA.* **74**(10), 537-539.
8. **King, C.H., E.B. Shotts, Jr., R.E. Wooley, and K. G. Porter,** 1988. Survival of coliforms and bacterial pathogens whithin protozoa during chlorination. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 3023-3033.
9. **Kutcha, J.M., S.J. States, J.E. McGlaughlin, J.H. Overmeyer, R.M. Wadowsky, A.M. McNamara, R. S. Wolford, and R.B. Yee,** 1984. Enhanced chlorine resistance of tap water adapted *Legionella pneumoniae* as compared with agar medium passed strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 21-26.
10. **LeChevallier, M.W.,** 1990. Coliform regrowth in drinking water. *Jour. AWWA.* **82**(11), 74-86.
11. **LeChevallier, M.W., T.M. Babcock, and R.G. Lee,** 1987. Examination and characterization of distribution system biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 2714-2724.
12. **LeChevallier, M.W., C.D. Cawthon, and R.G. Lee,** 1988. Factors promoting survival of bacteria in chlorinated water supplies. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 649-654.
13. **LeChevallier, M.W., C.D. Cawthon, and R.G. Lee,** 1988. Mechanisms of bacterial survival in chlorinated drinking water. *Wat. Sci. Tech.* **20**, 145-151.
14. **LeChevallier, M.W., C.D. Cawthon, and R.G. Lee,** 1988. Inactivation of biofilm bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 2492-2499.
15. **Matin, A. and S. Harakeh,** 1990. Effect of starvation on bacterial resistance to disinfectants, p. 88-103. *In* G.A. McFeters (ed.), Drinking water microbiology. Springer-Verlag, New York.
16. **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.
17. **Reilly, K. and J.S. Kippin,** 1983. Relationship of bacterial counts with turbidity and free chlorine in two distribution systems. *Jour. AWWA.* **75**(6), 309-312.
18. **Stewart, M.H. and B.H. Olson,** 1992. Impact of growth conditions on resistance of *Klebsiella pneumoniae* to chloramines. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 2649-2653.
19. **van der Kooij, D. and W.A.M. Hijnen,** 1982. Nutritional versatility of a starch-utilizing flavobacterium at low substrate concentrations. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 804-810.
20. **van der Wende, E., W.G. Characklis, and D.B. Smith,** 1989. Biofilms and bacterial drinking water quality. *Wat. Res.* **23**, 1313-1322.

(Received April 24, 1993)
(Accepted May 7, 1993)

ABSTRACT: Resistance of Biofilm Bacteria to Chlorination

Cho, Jae-Chang, Seong Joo Park and Sang-Jong Kim* (Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea)

The *Enterobacter cloacae* biofilms developed on slide glasses and galvanized-iron coupons were applied to test the attached bacterial resistance to chlorination. The chlorine resistances of biofilm bacteria grown on the slide glasses and galvanized-iron coupons were 14 and 480 times that of the suspended bacteria, respectively. The chlorine resistance of particle-attached bacterial populations was 48 times that of suspended bacterial populations. The biofilm bacterial densities developed on the slide glasses and galvanized-iron coupons which were immersed in the flowing tap water for 75 days were 4.75×10^4 and 1.12×10^5 cfu/cm^2. It is concluded that main mechanisms of enteric or HPC bacterial resistance to chlorination in tap waters are bacterial attachment or adsorption to particles or bacterial aggregations and formation of biofilms on the inner wall of distribution systems by escaped bacteria from chlorination in water treatment processes, which results in bacterial regrowth in water distribution systems.