

재증식속도에 의한 상수도 시스템의 세균재증식능 평가

오 정 우[†]

동경대학 대학원 도시공학과 환경공학전공

(2004년 12월 1일 접수, 2005년 2월 25일 채택)

Assessment of the Bacterial Regrowth Potential in Drinking Water System Using Specific Regrowth Rate

Oh, Jung-Woo[†]

Department of Urban Engineering, School of Engineering, University of Tokyo

ABSTRACT : In this study, the bacterial regrowth characteristics in drinking water were investigated for various nutrient concentrations and forms using improved BRP method as a traditional approach and specific regrowth rate as a new index. The results of bacterial regrowth potential for glucose and $\text{NH}_4^+\text{-N}$, which was evaluated by BRP method as a traditional index, appeared to be higher relative to that of acetate or humic acids as carbon source and $\text{NO}_2^-\text{-N}$ or $\text{NO}_3^-\text{-N}$ as nitrogen sources, respectively. The results obtained by specific regrowth rate as a new index were similar to that of BRP method with respect to the nutrient conditions examined in this study; i.e., the specific regrowth rate for glucose (ranged from 0.005 to 0.082 hr^{-1}) was greater than that acetate and humic acids (ranged from 0.005 to 0.068 hr^{-1} and from 0.005 to 0.008 hr^{-1} , respectively). And specific regrowth rate for $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (ranged from 0.008 to 0.072 hr^{-1}) was greater than that $\text{NO}_2^-\text{-N}$ and $\text{NO}_3^-\text{-N}$ (ranged from 0.008 to 0.055 hr^{-1} and from 0.008 to 0.059 hr^{-1} , respectively). Therefore, specific regrowth rate can be applied in order to evaluate the bacterial regrowth potential in drinking water.

Key Words : Bacterial Regrowth, Specific Regrowth Rate, Drinking Water

요약 : 본 연구에서는, 탄소원, 질소원 및 인산염 인의 형태별, 농도별 각각 다른 배양조건에 대하여, 세균의 재증식 특성을 기존 지표인 BRP(Bacterial regrowth potential)법과 새로운 지표인 세균 재증식속도를 이용하여 비교평가하였다. 기존지표인 BRP법에 의해 평가된 세균재증식능은 유기탄소원의 경우 Glucose를 주입했을 경우가 Acetate 및 Humic acids를 주입했을 경우보다 상대적으로 크게 나타났다. 또한 질소원에 대해서는 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 을 주입한 재증식량이 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 및 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 을 주입한 경우보다 높게 나타났다. 인산염 인의 경우, 10 $\mu\text{gP/L}$ 이하의 매우 낮은 농도범위에서도 급격한 재증식량의 증가가 나타났다. 새로운 지표로서 세균 재증식속도에 의한 평가에서는 유기탄소원에 대해서, Glucose의 경우(0.005~0.082 hr^{-1})가 Acetate(0.005~0.068 hr^{-1}) 및 Humic acids(0.005~0.008 hr^{-1})의 경우보다 높게 나타났으며, 질소원에 대해서도, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 의 경우(0.008~0.072 hr^{-1})가 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ (0.008~0.055 hr^{-1}) 및 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ (0.008~0.059 hr^{-1})보다 높은 재증식속도를 갖는 것으로 나타났다. 새로운 평가지표로서 재증식속도에 의해 평가된 결과는 기존지표에 의한 결과와 동일한 경향을 나타내었으며, 따라서 세균 재증식속도에 의한 재증식능 평가방법은 기존지표의 단점을 개선할 수 있는 대체지표로, 적용성이 높은 것으로 판단되었다.

주제어 : 세균재증식, 재증식속도, 상수도

1. 서론

상수도 시스템에 있어서 세균의 재증식능은 수돗물 안전성에 관한 가장 중요한 수질지표의 하나로써 인식되어져 왔다. 이러한 세균재증식능을 평가하는 기존의 지표로는 AOC(Assimilable organic carbon),¹⁾ BDOC(Biodegradable dissolved organic carbon),²⁾ 및 BRP(Bacterial regrowth potential)³⁾법 등이 사용되고 있다. 이들 기존지표는 주어진 시료에 특정세균을 주입하고 일정기간 배양한 후, 재증식된

세균의 수 또는 세균에 의해 소비된 영양원의 농도에 의해 표현된다. 그러나 세균의 재증식량과 영양원의 농도는 재증식된 세균수가 최대치라는 확증이 없는 한 배양기간에 따라 변할 수 있다. 또한 최대치의 세균재증식량을 얻기 위해서는 장시간의 배양기간을 반드시 필요로 한다.

세균재증식능을 평가하기 위한 지표로서 대수증식기에서의 세균 재증식속도를 이용하는 방법은, 앞서 서술한 기존 지표의 단점을 해결할 수 있는 좋은 대안 중 하나가 될 수 있다. 시료에 주입된 세균은 주어진 환경에 적응하기 위한 유도기(Lag phase)를 갖는다. 그 후, 배양조건에 의해 결정되는 일정한 속도에 의해 증식하게 되는데, 이 시기를 대수증식기(Exponential phase)로 구분한다.⁴⁾ 이러한 대수증식기에서의 세균의 증식속도는, 주어진 시료에 대해 배양기간

[†] Corresponding author
E-mail: ohjungwoo@hotmail.com
Tel: +81-3-5841-6255 Fax: +81-3-5841-8533

에 의존하지 않고 일정한 값을 유지한다. 또한 증식속도를 도출하기 위해 필요한 배양기간도, 기존지표에 비해 매우 단축된 배양기간내에 평가결과의 도출이 가능하리라 판단된다. 따라서 본 연구에서는, 상수도 시스템에서 세균의 재증식능을 평가하는 새로운 지표로써, 대수증식기에서의 세균재증식속도를 이용하는 방법을 적용하고자 하였다. 먼저 각각의 다른 탄소원, 질소원 및 인산염 인의 다양한 농도 조건하에서 세균의 재증식특성을 분석하였다. 또한 이들 조건들에 대해서 세균재증식속도를 계산하였으며, 산출된 값들이 각 조건의 세균재증식능을 반영할 수 있는지 분석하였다. 세균재증식능을 평가하기 위한 세균재증식속도의 적용성은 기존지표의 결과와 비교분석에 의해 실시되었으며, 비교대상의 기존지표로는 BRP법^{3,5)}을 이용하였다.

2. 실험방법

2.1. 접종세균

접종세균으로는 *Pseudomonas aeruginosa*(ATCC 10145)와 수돗물의 토착세균을 이용하였다. *Pseudomonas aeruginosa*는 Nutrient broth 배지(Peptone : 5.0 g/L, Meat extract : 3.0 g/L, NaCl : 5.0 g/L, pH 7.0)를 이용해 20±2℃에서 배양한 후, 적당량을 초순수(Milli-Q water)에 희석하여 접종세균액(세균농도 약 10⁵ cell/mL)을 만들었다. 또한 수돗물의 토착세균은 다음과 같은 과정에 의해 분리되었다(Fig. 1 참조).⁵⁾ ① 동경대학 혼고캠퍼스의 수돗물 100 mL를 채취, 1.0 mg/L의 잔류염소에 대하여 0.1% 티오황산나트륨을 100 µL의 비율로 주입하여 탈염소시켰다. ② 세균이외의 이물질 제거를 위해서, 공경 2.0 µm의 막(110℃에서 10분간 Autoclave 멸균한 후, 초순수 500 mL로 세정한 막)으로 여과하였다. ③ 그 여과액을 50 mL의 시험관에 20 mL씩 옮긴 후, 45° 경사판의 회전배양기(회전속도 50 rpm; RT-50, Taiteq. Corp.)를 이용하여 20±2℃에서 5일간 배양하였다. ④ 배양 후, 세균만을 분리해내기 위하여, 원심식 한의여과기구(Centriprep YM-50, Millipore Corp.)을 이용하여 1500×g, 10분간 원심막분리에 의해 농축한 후, 다시 초순수로 희석하여 토착세균에 대한 접종세균액(세균농도 약 10⁵ cell/mL)을 만들었다.

2.2. 세균의 접종, 영양원의 첨가, 배양 및 시료의 고정처리

공경 0.2 µm의 막(지름 47 mm의 Polycarbonate membrane; 110℃에서 10분간 Autoclave 멸균한 후, 초순수 500 mL로 세정한 막)에 의해 세균처리된 초순수를 19 mL씩 시험관에 넣은 후, 앞서 제작된 *Pseudomonas aeruginosa*의 접종세균액 1 mL를 접종하였다. 또한 동일한 실험조작을 수돗물 토착세균에 대해서도 행하였다. 접종과 동시에 10 mgC/L당량의 무기영양염류(Table 1)를 첨가하고, 탄소(C), 질소(N) 및 인(P)을 Table 2에 제시된 조건과 같이 주입하였다. 각 조건에 대해 두개씩 측정시료를 만들어 45° 경사

Table 1. Required nutrients to get final concentration (10 mgC/L Equivalent)

Compounds	Added concentration (µg/L)
Na ₂ SO ₄	442.91
CaCl ₂ · 2H ₂ O	183.78
MgCl ₂ · 6H ₂ O	418.31
FeCl ₃ · 6H ₂ O	96.88
KCl	190.66
CoCl ₂ · 6H ₂ O	4.039
CuCl ₂ · 2H ₂ O	5.366
MnSO ₄ · 5H ₂ O	219.403
ZnCl ₂	2.085
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	1.288

Table 2. Final concentration of carbon, nitrogen, and phosphorus

Medium-C ^a			Medium-N ^b			Medium-P ^c
Carbon (mgC/L)			Nitrogen (mgN/L)			Phosphate (µgP/L)
Glucose	Acetate	Humic acids	NH ₄ ⁺ -N	NO ₂ ⁻ -N	NO ₃ ⁻ -N	PO ₄ ³⁻ -P
0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.05	0.05	0.05	0.01(0.1)	0.05(0.1)	0.1(0.1)	0.5(1.0)
0.1	0.1	0.1	0.03(0.3)	0.1(0.3)	0.3(0.3)	1.0(2.5)
0.5	0.5	0.5	0.05(0.5)	0.2(0.5)	0.5(0.5)	2.5(5.0)
1.0	1.0	1.0	0.1(1.0)	0.5(1.0)	1.0(1.0)	5.0(10.0)
3.0	3.0	3.0	0.2(2.0)	1.0(2.0)	1.5(2.0)	10.0(30.0)
				1.5		15.0

a) Medium-C added 1.4 mgN/L of NH₄⁺-N and 0.3 mgP/L of PO₄³⁻-P

b) Medium-N added 10.0 mgC/L of glucose and 0.3 mgP/L of PO₄³⁻-P

c) Medium-P added 10.0 mgC/L of glucose and 1.4 mgN/L of NH₄⁺-N

d) Humic acids used the thing of Wako corporation.

The numbers in parenthesis represent the added concentration with *P.aeruginosa*.

판의 회전배양기(회전속도 50 rpm)를 이용하여 20±2℃에서 5일간 배양하였다.³⁾ 배양이 종료된 각 시료로부터 1 mL씩 분석용 시료를 채수한 후, 전처리로써 25% Glutaraldehyde용액을 100 µL씩 첨가하여 세균을 고정처리한 후 분석때까지 -20℃에서 보관하였다.

2.3. 세균재증식능의 평가지표

(1) BRP법(Bacterial regrowth potential method)

상수도 시스템에서 세균재증식능을 평가하기 위한 기존 지표로써, 본 연구에서는 Sathasivan 등³⁾이 개발하고 뒷 등⁵⁾에 의해 수정개선된 BRP법을 이용하였다. BRP법은, 수돗물에서 세균재증식능을 측정하기 위해 일반적으로 적용되어 왔던 AOC방법의 단점을 보완하기 위해 개발되었다. 즉 특정지표세균(*Pseudomonas fluorescens* P17 및 *Spirillum* sp. NOX)을 접종균으로 이용하는 AOC방법의 한계성을 극

복하기 위해, 수돗물에서 직접 분리한 토착세균을 접종균으로써 이용한다. 또한 AOC방법이 탄소만에 대한 세균재증식능 평가지표라면, BRP법은 탄소 이외의 다양한 영양원의 영향을 종합적으로 평가할 수 있다는 장점이 있다. 그러나 접종균으로 이용한 수돗물의 토착세균이 지역적 특성에 의존한다는 단점이 있다. BRP법의 실험절차를 Fig. 1에 나타내었다.

(2) 재증식속도(Specific regrowth rate)

재증식속도는 *Pseudomonas aeruginosa*에 대하여 산출되었다. 본 연구에서 산출한 재증식속도는 대수증식기(Exponential regrowth phase)에 있는 세균을 전제로 한다. 대수증식기를 결정하기 위하여, 수돗물 토착세균을 본 연구의 배양조건인 인공수돗물에 접종한 후, 5일간 24시간 간격으로 재증식량을 측정하였다. 그 결과 접종된 세균은 접종 후 약 24시간 혹은 48시간 이후에 본격적인 재증식을 나타내었으며(Fig. 3참조), 따라서 본 연구에서는 *Pseudomonas aeruginosa*를 접종한 후, 48시간 이후를 대수증식기라고 가정하고, 이 기간동안의 증식량을 근거로 식 (1)에 의해 비증식속도 μ 를 계산하였다.

$$N(t) = N_0 e^{\mu t} \quad (1)$$

N_0 : Number of bacteria at time (t) zero

μ : Bacterial regrowth rate, hr^{-1}

t : Time, hr

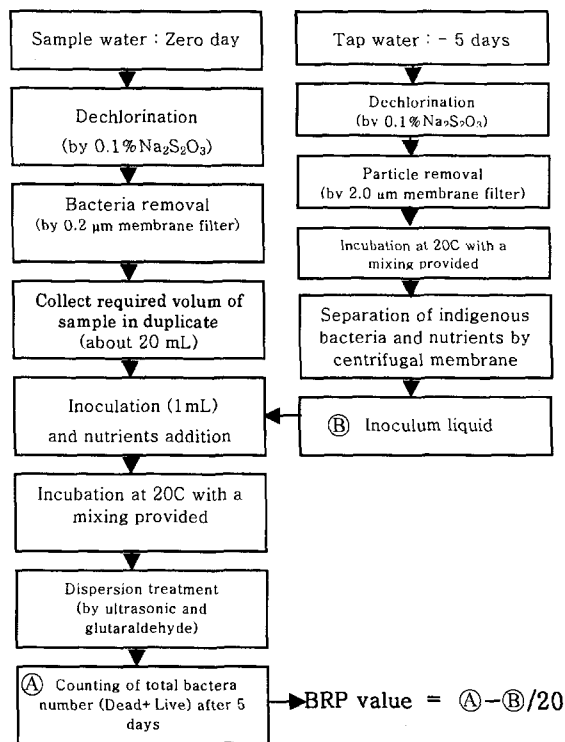


Fig. 1. The flow sheet of BRP method

2.4. 세균수의 측정

세균수의 측정을 위하여, 시료속의 세균은 핵산 염색시약인 SYBR Green I (Molecular Probes Inc.)에 의해 염색되었다. 세균수는 EPICS ALTRA Flow cytometer (Beckman Coulter Corp.)를 이용하여 측정하였으며, 이때 사용된 필터는 Right angle light scatter (RALS, 488 ± 15 nm)와 Green fluorescence (525 ± 15 nm)를 이용하였다.⁵⁻⁷⁾

3. 결과 및 고찰

3.1. 영양원에 의한 세균의 재증식 특성

수중에는 수많은 영양원들이 다양한 형태로 존재한다. 이들 영양원들은 다양한 경로로 세균의 구성물질과 에너지원으로 이용된다. 세균의 생존과 증식에 이용되는 영양원은 수많은 종류가 있지만, 제한인자로서 인식되는 가장 중요한 영양원으로는 탄소, 질소 및 인 등을 거론할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 세가지의 영양원에 대하여, 수돗물에서 가능한 농도별 및 형태별로 세균의 재증식 특성을 분석하였다.

(1) 탄소의 영향

자연수계에서 유기탄소는 일반적으로 탄수화물(Polymeric carbohydrates), 카르복실산(Carboxylic acids) 또는 휴믹/펄빅산(Humic/Fulvic acids)의 형태로 존재한다.⁸⁾ 따라서 본 연구에서는 탄수화물 및 카르복실산의 대표적인 형태인 Glucose 및 Acetate, 그리고 자연유기물질(Natural organic matter, NOM)의 형태로써 Humic acids를 대상으로 재증식 특성을 조사하였다.

Fig. 2(a)에 각 탄소원의 농도별 수돗물 토착세균에 대한 재증식 특성을 나타내었다. 탄소원에 따른 재증식량은 Glucose를 주입했을 경우가 가장 크게 나타났으며, 그 다음으로 Acetate, Humic acids의 순으로 나타났다. 이와같은 재증식특성은 단일접종균으로써 이용한 *Pseudomonas aeruginosa*에 대해서도 동일한 경향이 나타났다(Fig. 2(b)). 또한 각각의 탄소원을 동일한 농도인 1 mgC/L씩 주입한 시료에 대해, BRP법의 배양기간인 5일 동안 24시간 간격으로 수돗물 토착세균의 재증식량을 모니터링 한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 역시 배양기간 동안의 세균의 재증식량도 Glucose, Acetate, Humic acids의 순으로 나타나, Fig. 2(a) 및 Fig. 2(b)의 결과와 일치되는 결과를 나타냈다.

종속영양세균은 새로운 세포물질을 만들거나(Assimilation), 에너지원을 얻기 위해(Dissimilation) 수계에 존재하는 다양한 형태의 유기탄소원을 이용할 수 있다.⁴⁾ 단, 대부분의 세균은 그들의 물질대사에 우선적으로 선호하는 유기탄소원이 존재하며, 따라서 탄소원의 종류에 따라 증식량의 차이를 나타내게 된다. 예를들어, *Pseudomonas aeruginosa* 및 *Pseudomonas fluorescens* 등은 TCA(Tricarboxylic acid) cycle상에서의 중간체로 생성되는 탄소원의 대부분의 형태를 물질대사에 이용할 수 있으며, 특히 다른 탄소원에 대하여 Glucose의 이용은 경쟁적으로 일어난다.⁹⁻¹¹⁾ 이에 반해 Acetate

의 경우는 pH저하에 따른 충격과 ATP의 가수분해가 증식에 있어 이화작용의 저해요소로 작용할 수 있음이 보고된 바 있다.^{11,12)} 또한 Humic acids의 거대한 분자량은 세균의 직접적 이용에 불리하기 때문에, 낮은 증식률을 기록하게 된다. 그러나 세균의 종류에 따라서는 Glucose보다 Acetate에 의해 더 높은 증식률을 나타내는 것도 있으며, *Spirillum* sp. NOX는 그 좋은 예가 될 수 있다.

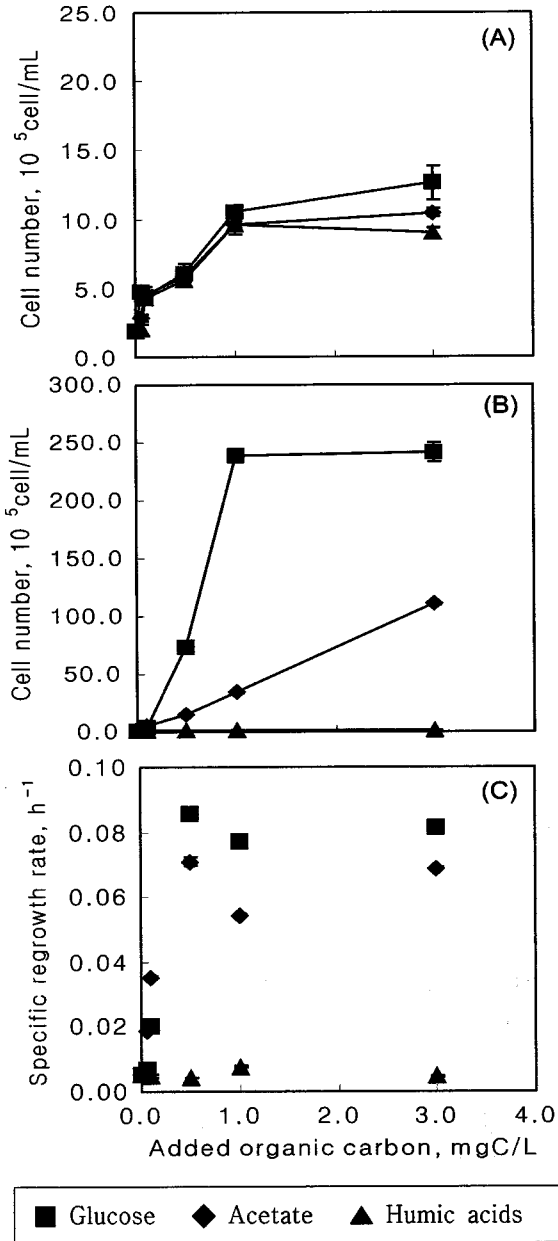


Fig. 2. Profile of bacterial regrowth potential for the different concentrations and forms of carbon sources. (a) regrowth counts of indigenous bacteria incubated for 5 days (b) regrowth counts of *Pseudomonas aeruginosa* incubated for 5 days (c) specific regrowth rate based on the bacterial counts during exponential regrowth phase. The vertical error bars through the symbol indicate the maximum and minimum values (n=2).

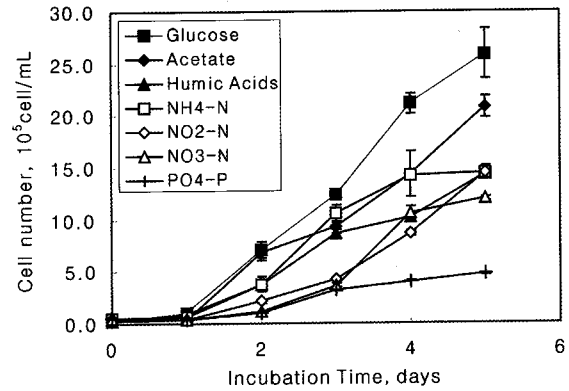


Fig. 3. Profile of bacterial regrowth counts during 5 days with different nutrient types with respect to indigenous bacteria. Glucose, Acetate, and Humic acids 1.0 mgC/L, NH₄⁺-N 0.1 mgN/L, NO₂⁻-N 0.2 mgN/L, NO₃⁻-N 0.5 mgN/L, and PO₄³⁻-P 10.0 μgP/L. The vertical error bars are described in the legend to Fig. 2.

(2) 질소의 영향

수계에 존재하는 질소의 형태로써 중속영양세균의 증식에 영향을 줄 수 있는 질소원으로는 NH₄⁺-N, NO₂⁻-N 및 NO₃⁻-N 등이 대표적이다. 이들 질소원에 대한 수도물의 토착세균 및 *Pseudomonas aeruginosa*의 재증식특성을 Fig. 4(a) 및 (b)에 나타내었다. 그 결과 NH₄⁺-N을 주입한 경우가 NO₂⁻-N 및 NO₃⁻-N을 주입한 경우보다 재증식량이 높게 나타났다. 특히 수도물 토착세균의 경우 상대적으로 낮은 NH₄⁺-N의 농도(0.1 mgN/L)에서도 급격한 증가를 나타내었다. 이와같은 재증식특성은 각 질소원에 대하여 5일간 실시된 모니터링 결과에서도 나타났다(Fig. 3). 즉, 토착세균은 0.1 mgN/L의 NH₄⁺-N가 주입된 경우가, NO₂⁻-N 0.2 mgN/L 및 NO₃⁻-N 0.5 mgN/L를 주입한 경우의 재증식량보다 높게 나타났으며, 이 결과로부터 질소원으로써 NH₄⁺-N에 의한 재증식량은 동일한 농도의 NO₂⁻-N 및 NO₃⁻-N보다 2배 및 5배 이상의 재증식능을 갖고 있는 것으로 판단되었다. 이와 더불어 NO₂⁻-N가 질소원으로 주입된 경우 토착세균은 0.5 mgN/L 이상, *Pseudomonas aeruginosa*는 0.3 mgN/L 이상의 농도에서 재증식량이 급격히 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 수도물에 있어서 일정농도 이상의 고농도의 NO₂⁻-N은 세균의 재증식에 저해요소로써 작용할 수 있는 것으로 판단되었다.

세균의 생체합성과정에서 질소는 세균의 유기구성성분의 질소원자와 동일한 산화환원전위인 -3가의 형태로 존재할 경우 이용가능하다. 즉 -3가의 산화환원전위 수준을 갖고 있는 암모니아(NH₃)는, 별도의 산화나 환원의 과정없이 세균의 생체합성에 이용될 수 있다. 반면에 NO₂⁻(+4가) 및 NO₃⁻(+5가)는 세균의 생체합성과정에서 있어서 질소원으로 이용되기 위해서는, 암모니아의 산화환원전위수준까지 환원되지 않으면 안된다.⁴⁾ 또한 *Pseudomonas aeruginosa*를 대상으로 한 연구에서, 암모니아는 우선적인 질소원으로 이용되며, Nitrite 및 Nitrate와 동시에 존재할 경우, 암모니아는 세균의 Nitrite 및 Nitrate의 이용을 방해하는 것으로 보고된 바

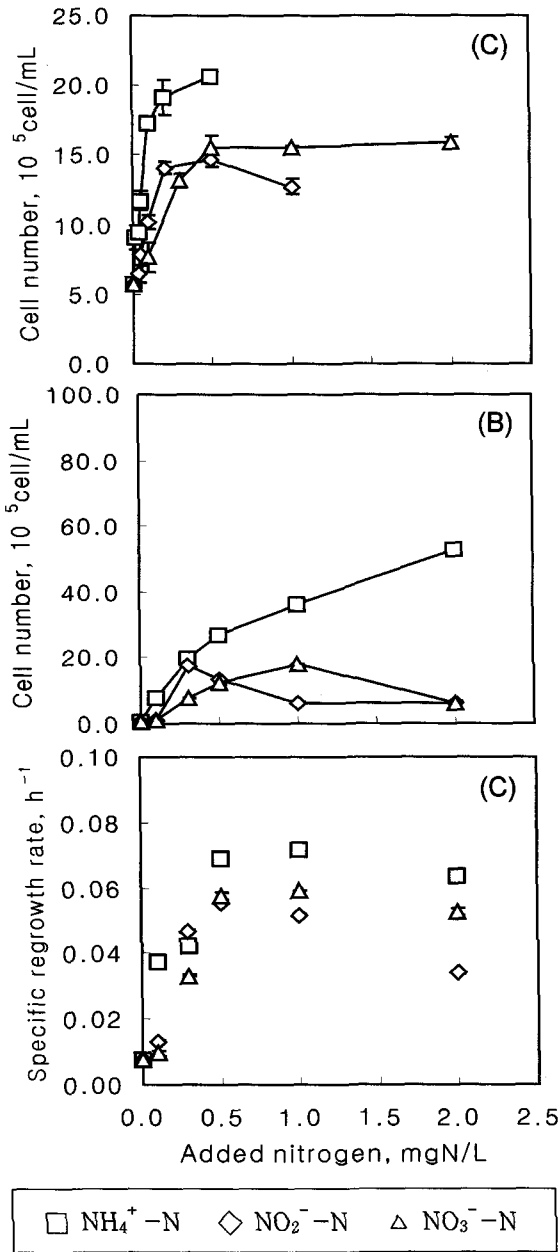


Fig. 4. Profile of bacterial regrowth potential for the different concentrations and forms of nitrogen sources. (A) regrowth counts of indigenous bacteria incubated for 5 days (B) regrowth counts of *Pseudomonas aeruginosa* incubated for 5 days (C) specific regrowth rate based on the bacterial counts during exponential regrowth phase. The vertical error bars are described in the legend to Fig. 2.

다.^{11,13} 본 연구에서의 각 질소원에 대한 재증식특성은 이상의 이론들이 반영된 것으로 판단된다.

(3) 인의 영향

수계에서의 인은 유기인과 인산염 인($\text{PO}_4^{3-} - \text{P}$)의 형태로 존재하지만, 총인의 대부분은 세균이 이용불가능한 유기인의 형태로 존재한다. 또한 인산염 인의 대부분은 수중의

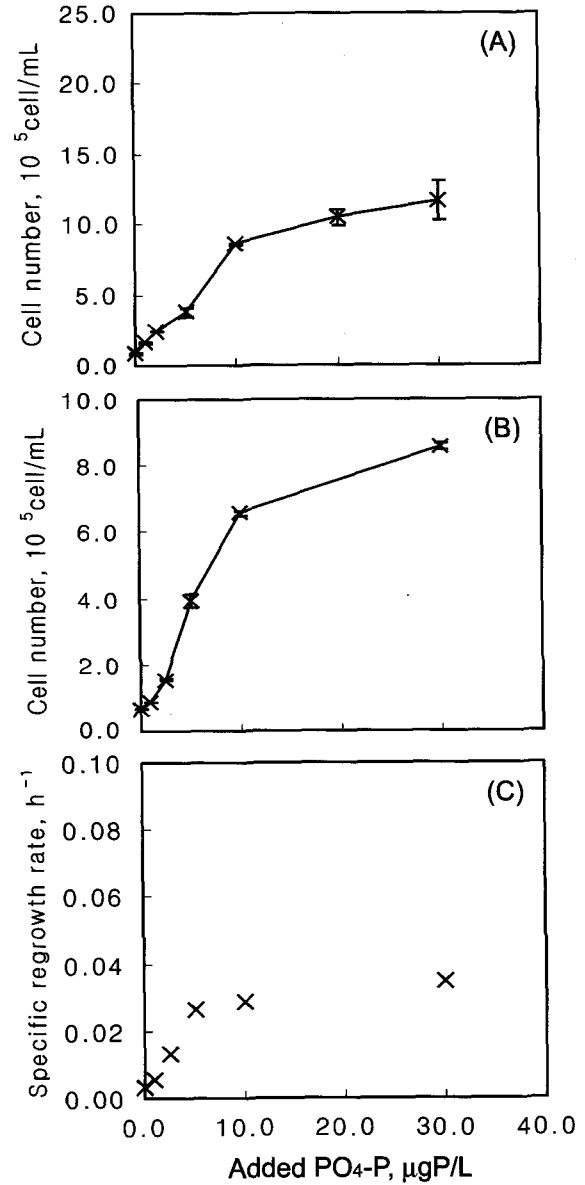


Fig. 5. Profile of bacterial regrowth potential for the different concentrations of $\text{PO}_4^{3-} - \text{P}$ as a phosphorus source. (A) regrowth counts of indigenous bacteria incubated for 5 days (B) regrowth counts of *Pseudomonas aeruginosa* incubated for 5 days (C) specific regrowth rate based on the bacterial counts during exponential regrowth phase. The vertical error bars are described in the legend to Fig. 2.

유기 및 무기 콜로이드와 결합되어 있으며, 물리화학적인 충격에 의해 수중에 분리되어 나왔을 때 세균이 이를 이용하게 된다.^{14,15} 따라서 수중에 세균이 이용가능한 인은 매우 낮은 농도로 존재하며, 세균재증식의 제한인자로 작용될 수 있음이 보고된 바 있다.^{16,17} 본 연구에서는 0~30 $\mu\text{gP/L}$ 의 농도 범위에서 각 접종세균의 재증식 특성을 조사하였다(Fig. 5(a) 및 (b)). 그 결과 10 $\mu\text{gP/L}$ 이하의 매우 낮은 농도범위에서도 농도의 증가에 따라 재증식량이 급격히 증가되는 것으로 나타났다.

3.2. 재증식속도에 의한 세균재증식능의 평가

(1) 재증식속도에 의한 평가방법의 적용성

본 연구에서는, 일정기간 배양한 후의 재증식량에 의해 세균재증식능을 평가하는 기존방법외에, 대수증식기에서의 재증식속도에 의해 세균재증식능을 평가하고자 하였다. Fig. 2(c), Fig. 4(c) 및 Fig. 5(c)에 각 영양원의 농도에 대한 *Pseudomonas aeruginosa*의 재증식속도를 나타내었다. 먼저, 0~3.0 mgC/L의 유기탄소원 농도범위에 대해서, Glucose의 경우는 0.005~0.082 hr⁻¹, Acetate 및 Humic acids의 경우는 각각 0.005~0.068 hr⁻¹ 및 0.005~0.008 hr⁻¹로, Glucose의 재증식속도가 Acetate 및 Humic acids의 재증식속도보다 높게 나타났다. 또한, 0~2.0 mgN/L의 질소원 농도범위에 대해서는, NH₄⁺-N의 경우가 0.008~0.072 hr⁻¹로, 0.008~0.055 hr⁻¹ 및 0.008~0.059 hr⁻¹를 각각 기록한 NO₂⁻-N 및 NO₃⁻-N보다 높은 재증식속도를 갖는 것으로 나타났다. 인산염 인의 재증식속도는 0~30 µgP/L의 농도 범위에서 0.004~0.035 hr⁻¹를 나타내었다. 이러한 각 영양원에 대한 재증식속도의 분포결과는 재증식량에 의해 세균재증식능 평가한 결과(Fig. 2(a) 및 (b), Fig. 4(a) 및 (b), Fig. 5(a) 및 (b))와 일치하는 경향으로써, 따라서 세균 재증식속도에 의한 재증식능 평가결과는 기존지표의 평가결과를 매우 잘 반영하는 것으로 나타났다.

(2) 재증식속도에 의한 평가방법의 장점

본 연구에서는 상수도 시스템에서 세균재증식능을 측정하는 새로운 지표로 재증식속도에 의한 평가방법을 제시하였다. 평가지표로서 적용가능성을 갖기 위해서는 측정방법의 효율성 및 정확성, 그리고 측정결과의 합리성 등이 동시에 충족되어야 한다.

일정기간 재증식된 세균의 수로 평가하는 기존지표인 AOC, BDOC 및 BRP법의 가장 큰 단점은 장기간의 배양기간이 필요하다는 것이다. 상대적으로 짧은 배양기간을 갖는 BRP법도, 영양원의 소비패턴을 고려할 때 5일간의 배양기간을 제시한 바 있다.³⁾ 이와같은 장기간의 배양기간은 재증식속도에 의한 평가방법에 의해 상당히 단축될 수 있다. 즉 재증식속도는 일정기간 재증식되는 재증식량 곡선의 기울기로부터 직접 계산가능하며, 이러한 기울기는 대수증식기에서 세균 재증식량의 차이를 판단할 수 있는 두 점으로부터 계산가능하다. 따라서 시료의 상태가 대수증식기라고 가정할 때, 재증식량 곡선의 기울기를 산출할 수 있는 최소배양기간에 결과를 도출할 수 있게 된다. 물론, 시료의 접종균으로써 단일균이나 또는 외부에서 인위적으로 작성된 세균을 이용한다면, 대수증식기까지 도달하는 시간을 배양시간에 포함시켜야 한다. 하지만, 그것은 본 연구에서 도입한 BRP법의 원리를 이용하면 해결할 수 있으리라 판단된다. 즉, BRP법은 접종균으로써 수도물 토착세균을 그대로 이용하며, 이러한 토착세균은 이미 주어진 환경에 적응된 상태이기 때문에 대수증식기의 결정과정을 생략할 수 있다. 따라서 재증식속도에 의한 평가방법의 적용에 의해,

측정방법의 효율성이 향상될 수 있을 것으로 판단된다.

기존지표가 갖는 또하나의 단점은, 측정결과가 배양기간 및 접종균의 주입량에 독립적이지 못하다는 것이다. 즉 기존의 방법에 의해 도출된 세균의 숫자가 주어진 배양조건 및 배양기간에 대해서 최대치를 기록하지 않았다면, 배양기간이 연장될 경우 세균의 숫자, 즉 결과치가 변하게 된다. 또한 배양시작전에 시료에 주입하는 접종균의 숫자에 따라서도 최종적으로 도출되는 결과가 달라질 가능성이 있다. 이는 도출된 결과의 절대치에 의한 평가를 불가능하게 만들며, 경우에 따라서는 해석이 곤란해 질 우려를 내포하고 있다고 볼 수 있다. 이러한 관점에서 볼 때, 세균재증식능을 평가하기 위해 대수증식기의 재증식속도를 이용하는 방법은 매우 합리적인 결과를 도출해 낼 수 있다. 즉, 대수증식기의 재증식속도는 배양기간 및 접종균의 수에 의존하지 않기 때문에 주어진 배양조건에 대해 고유의 측정치를 기록할 수 있을 것으로 판단된다. 따라서 측정결과의 합리성 측면에서도 충분한 타당성을 갖는다고 판단된다.

세균의 비증식속도는 일정기간동안 증식된 세균의 증가분을 의미한다. 이러한 수학적 의미로부터, 배수관망에서의 각 측정지점까지의 도달시간을 배양시간으로 고려한다면, 세균의 비증식속도는 실제 배급수관망의 임의의 지점에서 재증식가능한 세균의 양을 계산해 낼 수 있다. 이 또한 상수도 시스템에서 세균재증식능 평가를 위해 재증식속도를 이용할 경우 중요한 장점으로 고려될 수 있을 것으로 판단된다.

4. 결 론

본 연구에서는, 상수도 시스템에 대해서 탄소원, 질소원 및 인산염 인의 형태별, 농도별 각각 다른 배양조건에 대하여, 세균의 재증식 특성을 조사하였다. 또한 재증식능을 평가하기 위한 새로운 지표로써, 재증식속도를 이용하는 방법의 적용성을 연구하고자 하였다.

수돗물 토착세균과 *Pseudomonas aeruginosa*를 접종균으로 한 시료에 대해, 각 영양원에 대한 재증식 특성을 기존 지표인 BRP법에 의해 분석하였다. 0~3.0 mgC/L의 유기탄소원 농도범위에 대한 재증식량은, Glucose를 주입했을 경우가 Acetate 또는 Humic acids를 주입했을 경우보다 상대적으로 크게 나타났다. 또한 0~2.0 mgN/L의 질소원 농도범위에 대해서는, NH₄⁺-N을 주입한 재증식량이 NO₂⁻-N 또는 NO₃⁻-N을 주입한 경우보다 높게 나타났다. 0~30 µgP/L의 농도 범위에 대해서 분석된 인산염 인의 경우, 10 µgP/L 이하의 매우 낮은 농도범위에서도 급격한 재증식량의 증가가 나타났다.

세균재증식능의 새로운 지표로써 세균 재증식속도의 적용성을 평가하기 위하여, 같은 배양조건에 대해 *Pseudomonas aeruginosa*의 재증식속도를 측정하였다. 먼저, 유기탄소원에 대해서, Glucose의 경우(0.005~0.082 hr⁻¹)가 Acetate(0.005~0.068 hr⁻¹) 및 Humic acids(0.005~0.008 hr⁻¹)의 경우보다 높게 나타났으며, 질소원에 대해서도, NH₄⁺-N의

경우($0.008 \sim 0.072 \text{ hr}^{-1}$)가 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ ($0.008 \sim 0.055 \text{ hr}^{-1}$) 및 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ ($0.008 \sim 0.059 \text{ hr}^{-1}$)보다 높은 재증식속도를 갖는 것으로 나타났다. 이러한 재증식속도의 분포결과는 기존지표에 의해 세균 재증식능을 평가한 결과와 일치하는 것으로 나타났으며, 따라서 새로운 지표로써 세균 재증식속도에 의한 재증식능 평가방법은 기존지표의 단점을 개선할 수 있는 대체 지표로, 적용성이 높은 것으로 판단되었다.

참고문헌

1. Van der, Kooij, D., and Hijnen Wim, A. M., "Measuring the concentration of easily assimilable organic carbon in water treatment as a tool for limiting regrowth of bacteria in distribution systems," *Proceedings-AWWA Water Quality Technology Conference*, 729~744(1986).
2. Joret, J. C., Levi, Y., and Volk, C., "Biodegradable dissolved organic carbon (BDOC) content of drinking water and potential regrowth of bacteria," *Water Sci. Technol.*, **2**, 95~101(1991).
3. Sathasivan, A., Ohgaki, S., Yamamoto, K., and Kamiko, N., "Role of inorganic phosphorus in controlling regrowth in water distribution system," *Water Sci. Technol.*, **35**, 37~44(1997).
4. Roger, Y. S., Ingraham, J. L., Mark, L. W., and Page R. P., "The microbial world," Prentice-Hall(1986).
5. 吳政祐, 渡部 雅智, 神通 浩二, 片山 浩之, 大垣 眞一郎, "フロ-サイトメトリ-を用いた細菌再増殖能測定法の開発及びその適用に関する研究," *日本水道協會雜誌*, **73**(2), 2~15(2004).
6. Philippe, L., Servais, P., Agogue, H., Courties, C., and Joux, F., "Does the high nucleic acid content of individual bacterial cells allow us to discriminate between active cells and inactive cells in aquatic system?," *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 1775~1782(2001).
7. Stephan, J., Partensky, F., Marie, D., Casotti, R., and Vaulot, D., "Cell cycle regulation by light in *Prochlorococcus* strains," *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 782~790(2001).
8. LeChevallier, M. W., Olson, B. H., and McFeters, G. A., "Assessing and controlling bacterial regrowth in distribution system," *American Water Works Association Research Foundation*(1990).
9. Lynch, W. H. and Franklin, M., "Effect of temperature on diauxic growth with glucose and organic acids in *Pseudomonas fluorescens*," *Arch. Microbiol.*, **118**, 133~140(1978).
10. Ma, J. F., Paul, W. H., Michael, L. H., Paul, V. P., and Daniel, J. H., "Cloning and Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* zwf gene encoding glucose-6-phosphate dehydrogenase, an enzyme important in resistance to methyl viologen (Paraquat)," *J. Bacteriology*, **180**, 1741~1749(1998).
11. Christophe, R. and Lisbeth, O., "Dynamic responses of *Pseudomonas fluorescens* DF57 to nitrogen or carbon source addition," *J. Biotechnol.*, **86**, 39~50(2001).
12. Russel, J. B., "Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling," *J. Appl. Bacteriol.*, **73**, 363~370(1992).
13. Betlach, M. R., Tiedje, J. M., and Firestone, R. B., "Assimilatory nitrate uptake in *Pseudomonas fluorescens* using ^{15}N ," *Arch. Microbiol.*, **129**, 135~140(1981).
14. Baldwin, D. S., "Reactive "organic" phosphorus revisited," *Water Res.*, **32**, 2265~2270(1998).
15. Markku, J. L., Miettinen, I. T., Vartiainen, T., Myllykangas, T., and Martikainen, P. J., "Microbially available organic carbon, phosphorus, and microbial growth in ozonated drinking water," *Water Res.*, **35**(7), 1635~1640(2001).
16. Sathasivan, A. and Ohgaki, S., "Application of new bacterial regrowth potential method for water distribution system a clear evidence of phosphorus limitation," *Water Res.*, **33**, 137~144(1999).
17. Markku, J. L., Miettinen, I. T., Vartiainen, T., and Martikainen, P. J., "A New Sensitive Bioassay for Determination of Microbially Available Phosphorus in Water," *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 3242~3245(1999).