

## 요인실험계획을 이용한 수도관 생물막 형성 영향 인자의 효과 분석

# Analysis of Effects of Factors Influencing Biofilm Formation in Drinking Water Distribution Pipe Using Factorial Experimental Design

박세근<sup>1,\*</sup> · 최성찬<sup>2</sup> · 김영관<sup>1</sup>

Park, Se-Keun<sup>1,\*</sup> · Choi, Sung-Chan<sup>2</sup> · Kim, Yeong-Kwan<sup>1</sup>

1 강원대학교 환경공학과

2 한림대학교 환경시스템공학과

(2004년 12월 14일 논문 접수; 2005년 3월 18일 최종 수정논문 채택)

### Abstract

This study evaluated the effect of factors influencing the initial biofilm formation in drinking water distribution pipe by running experiments using a  $2^{4-1}$  fractional factorial experimental design with a replicate. Important variables used for assessing biofilm formation included BDOC(biodegradable dissolved organic carbon), viable heterotrophic bacteria present in drinking water, water temperature, and shear stress at two levels each. Based on the statistical analysis of biofilm levels measured as attached HPC(heterotrophic plate count) and community-level assay, the main factors that have significant effects on biofilm formation were found to be viable heterotrophic bacteria and BDOC. Water temperature only exhibited significant effect on the levels of attached HPC, while shear stress was not a significant factor under given conditions. Moreover, the statistical analysis revealed that interactions between the important variables were not statistically significant at a 0.05 significance level.

**Key words:** biofilm, drinking water distribution pipe, factorial experimental design, heterotrophic bacteria, BDOC

**주제어:** 생물막, 수도관, 요인실험계획, 종속영양세균, BDOC

## 1. 서론

정수처리 과정에서 생존하여 배·급수 시스템으로 유입된 미생물들은 배·급수관 또는 저장탱크의 내벽

에 부착·성장하고, 그들의 성장 과정에서 분비된 세포외분비물질(EPS; extracellular polymeric substances)과 결합하여 관 표면에 층을 형성하는데 이러한 층을 생물막이라고 한다(van der Wende and Characklis, 1990). 배·급수관 내부 표면에서의 생물막 형성은 수도물의

\*Corresponding author. Tel: +82-33-241-6350, FAX: +82-33-254-6357, E-mail: parkphd@empal.com (Park, S.K.)

화학적 및 미생물학적 수질에 부정적인 영향을 미칠 뿐만 아니라 소독제의 소독 효과를 감소시켜 소독제의 사용량을 증가시키는 원인이 되고 있다. 생물막 형성은 여러 가지 인자들의 복합적인 작용에 의해 영향을 받을 수 있는데, 대표적인 인자에는 배·급수시설로 유입되는 세균, 영양물질, 잔류 소독제, 수온 등과 같은 수돗물의 수질 특성, 관의 조성, 사용 연수, 조도와 같은 관의 재질 특성, 그리고 유속과 전단력 같은 시스템의 수리학적 특성이 해당된다(Percival et al., 2000). 여러 인자들 중에서 수돗물에서의 세균, 미생물이 이용할 수 있는 BOM(biodegradable organic matter), 수온, 그리고 전단력이 생물막 형성에 많은 영향을 미치는 것으로 평가되고 있다.

최근 수돗물의 생물학적 안정성에 부정적인 영향을 미치는 배·급수관에서의 생물막을 효과적으로 제어할 수 있는 방안에 대한 관심이 증가하고 있다. 이를 위해서는 배·급수관에서 생물막 형성과 관련이 있는 인자의 영향을 평가하는 것이 우선적인 단계일 것이다. 특히 생물막 형성과 상당한 관련이 있을 것으로 판단되어지는 수돗물에서의 세균, BOM, 수온, 그리고 전단력이 생물막 형성에 미치는 독립영향과 상호작용을 평가가 도움이 될 것으로 보인다. 이러한 측면에서 볼 때 관련된 인자가 많을 경우 중요한 인자를 모아 놓고 영향을 미치는 인자를 선택하거나 선택된 인자가 효과에 미치는 양의 크기를 추정하기 위해 사용하는 요인 실험 계획법이 유용할 것으로 판단되어진다.

일반적으로  $n^k$  요인 실험이란 인자의 수가  $k$ 이고, 각 인자의 수준(level) 수가  $n$ 인 실험계획을 의미한다. 즉,  $2^k$  요인 실험은  $k$ 개 인자의 수준이 2[high(+), low(-)]이다. 완전요인(full factorial) 실험은 모든 인자의 조합에서 실험이 실시되는 것을 의미하고, 부분요인(fractional factorial) 실험은 완전요

인 실험의 1/2 또는 1/4 등으로 일부만 실시하는 실험계획이다. 특히 부분요인 실험계획은 완전요인 실험계획에 실험 실행 횟수를 증가시키지 않으면서 하나 또는 더 많은 요인(독립변수)들을 추가하여 분석하기 위한 실험계획법이다. 이러한 실험계획은  $2^{k-p}$ 로 표기되는데, 여기서  $p$ 는 추가로 첨가되는 요인들의 수이다. 부분요인 실험계획은 필요로 하는 요인에 대한 정보를 얻기 위하여 값이 작은 고차(higher order)의 교호작용(interaction)을 희생시켜서 실험의 횟수를 줄일 수 있는 방법으로서, 이처럼 부분요인 실험계획을 사용하는 가장 큰 이유는 시간과 경제성 때문이다(Berthouex and Brown, 1994; Minitab, 2000).

본 연구는 수도관의 생물막 형성에 영향을 미치는 인자 중 가장 중요하다고 판단되는 인자인 BOM, 세균, 온도, 그리고 전단력에 대하여 부분요인 실험계획을 적용하여 이들 인자가 수도관 표면에서 초기 생물막 형성에 미치는 효과를 알아보고 중요한 영향을 미치는 인자를 규명하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 요인선정

Table 1은 수돗물에서의 BDOC, 종속영양세균, 수온, 그리고 전단력이 생물막 형성에 미치는 독립영향과 상호작용을 평가하기 위한 각 인자들의 수준이다. 4요인들 중 BDOC, 종속영양세균, 수온에 대해 선정한 2가지 수준(high(+), low(-))은 아래의 문헌 고찰 내용을 통하여 배·급수 시스템에서 미생물 재생장을 비롯하여 생물막 형성에 영향을 미칠 수 있는 임계 수준을 고려하여 선정하였다. 그리고 전단력의 수준은 생물막 형성 실험장치가 제공할 수 있는 범위 내에서 임의적으로 선정하였다.

일반적으로 배·급수 시스템에서 생물막이 세균의

Table 1. Summary of the factorial design with 4 factors at two levels

| Factor | Variable                         | Level   |          |
|--------|----------------------------------|---------|----------|
|        |                                  | Low (-) | High (+) |
| A      | BDOC (mg/L)                      | 0.1     | 1.5      |
| B      | Heterotrophic bacteria (CFU/mL)  | 10      | 1,000    |
| C      | Temperature (°C)                 | 5       | 15       |
| D      | Shear stress (N/m <sup>2</sup> ) | 0.03    | 0.21     |

수적인 증가를 유발하기도 하지만, 수돗물에서 부유성 세균의 수적인 증가( $10 \rightarrow 10^4$  CFU/mL)는 생물막 형성의 증가( $10^4 \rightarrow 10^7$  CFU/cm<sup>2</sup>)와 관련이 있다고 보고되었다(Donlan and Pipes, 1988). 그리고 수돗물에 존재하는 유기탄소 중에서 BOM은 AOC(assimilable organic carbon)와 BDOC(biodegradable dissolved organic carbon)로써 측정되고 있다. Volk and LeChevallier(2000)는 AOC와 BDOC 농도를 바탕으로 수돗물내 BOM 농도의 수준에 대한 개념을 제공하고자 하였는데, AOC와 BDOC 농도가 각각 0과 0.1mg/L 미만인 경우를 낮은 수준의 BOM, AOC와 BDOC 농도가 각각 0.15~1.0mg/L과 1.0~1.5mg/L인 경우를 높은 수준의 BOM으로 각각 분류하였다. 또한 van der Kooij(1992)와 Servais et al.(1993)은 미생물의 재생장을 제한시키기 위해서는 수돗물의 AOC와 BDOC 농도를 각각 10 $\mu$ g/L과 0.15mg/L로 유지해야 한다고 제안하였다. Lund and Ormerod(1995)는 5 $^{\circ}$ C 이상의 수온에서 생물막 형성이 가능하다고 보고하기도 하였다. 대부분 배·급수 시스템에서 15 $^{\circ}$ C 이상의 수온은 세균의 수적인 증가와 밀접한 관련이 있는 것으로 알려지고 있다(LeChevallier et al., 1991; Volk and LeChevallier, 2000).

2.2. 장치 및 방법

실험에서 사용한 장치는 Annular Biofilm Reactor(ABR, Model 1120LS, Biosurface Technologies Co., USA)이며, Fig. 1은 실험에 사용한 ABR의 개요도이다. ABR은 배·급수관의 수리학적 흐름을 모사할 수 있을 뿐만 아니라 미생물이 부착할 수 있는 기

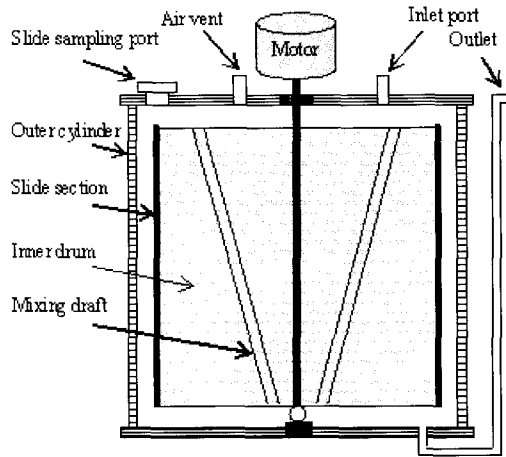


Fig. 1. Schematic diagram of the Annular Biofilm Reactor used in the experiment.

저 표면을 제공하여 좁으므로 유체의 흐름과 접촉하는 표면에 형성되는 생물막을 지속적으로 모니터링할 수 있는 장치이다. Slide section의 표면은 홈(slot) 형태(1.5cm × 14.5cm × 1.5mm)로 되어 있어 20개의 slide를 장착할 수 있다. 실험에서는 생물막 형성을 위한 시편 재질로 STS(stainless steel) 316을 사용하였다. 실험을 수행하기 전에 slide를 설치한 반응기는 멸균(121 $^{\circ}$ C, 15min) 처리하여 사용하였다.

실험에 사용한 시료는 배·급수 계통을 거쳐 실험실로 공급되는 수돗물을 GAC(granular activated carbon) column으로 처리한 수돗물이다. 본 실험에서는 수돗물에 잔류되어 있는 BOM을 제한하고 수돗물에 존재하는 부식 생성물과 같이 선정된 요인들의 효과에 방해가 될 수 있는 수질 특성을 배제하

Table 2. Characteristics of the tap water sample treated by GAC column

| Parameters                              | Average               | Range                                      |
|---|-----------------------|--|
| pH                                      | 6.85                  | 6.72~6.90                                  |
| Alkalinity (mg/L as CaCO <sub>3</sub> ) | 35.0                  | 32~40                                      |
| Hardness (mg/L as CaCO <sub>3</sub> )   | 45.0                  | 42~50                                      |
| Free chlorine residual (mg/L)           | ND <sup>a</sup>       | ND <sup>a</sup>                            |
| NH <sub>3</sub> -N (mg/L)               | 0.010                 | 0.008~0.015                                |
| PO <sub>4</sub> -P (mg/L)               | 0.005                 | 0.003~0.010                                |
| TOC (mg/L)                              | 0.20                  | 0.15~0.25                                  |
| BDOC (mg/L)                             | 0.10                  | 0.08~0.15                                  |
| Heterotrophic bacteria (CFU/mL)         | 2.0 × 10 <sup>3</sup> | 1.2 10 <sup>3</sup> ~3.5 × 10 <sup>3</sup> |

<sup>a</sup> ND = not detected

기 위하여 GAC column으로 수돗물을 처리하였다. GAC column의 규격은 직경과 높이가 각각 35cm와 160cm로서 내부에 8~30mesh 크기의 GAC(SLS 100, 삼천리활성탄소) 40kg을 채웠으며, 수돗물을 처리하기 위한 GAC column의 EBCT(empty bed contact time)는 25분이었다. **Table 2**는 실험기간 동안 GAC column으로 처리하여 사용한 수돗물의 수질 특성이 다.

요인실험계획에서 변수로 선택한 BDOC는 종속영양세균에 의해 생분해될 수 있는 DOC(dissolved organic carbon) 함량을 나타내는 BOM(organic carbon)으로서(Huck, 1990), 낮은 수준(- level)의 BDOC 농도는 GAC column으로 처리했을 때의 농도인 0.1mg/L로 하였고, 높은 수준(+ level)의 BDOC 농도는 1.5mg/L로 하였다. BDOC 농도를 높은 수준으로 만들기 위해 sodium acetate(Sigma)를 이용하여 TOC(total organic carbon) 농도가 400mg/L인 stock solution을 제조하여 GAC column을 통과한 수돗물에 첨가하였다. 수돗물에서의 종속영양세균 수준은 각각 10CFU/mL과 10<sup>3</sup> CFU/mL로 하였으며, 종속영양세균을 높은 수준으로 유지하기 위한 시료로는 GAC column을 통과한 수돗물을 그대로 사용하였다. GAC column은 수돗물에 존재하는 BDOC를 제거하기 위한 목적으로 사용되었지만, column을 통과한 물에서 BDOC의 감소와 더불어 세균의 수적인 증가(10CFU/mL → 10<sup>3</sup> CFU/mL) 현상이 나타났다. 이는 수돗물에 잔류되어 세균의 생장에 영향을 미치는 잔류염소가 GAC에 의해 제거된 것과 동시에 GAC 표면에 부착하여 생장한 세균의 탈리에 따른 세균 재생장 현상에 기인한 결과로 판단된다. 그리고 낮은 수준의 종속영양세균은 GAC column을 통과한 수돗물에 NaOCl을 첨가하여 종속영양세균의 수준이 10CFU/mL이 되도록 살균하였다. 종속영양세균의 살균을 위한 잔류염소 농도와 접촉시간은 각각 1.0mg/과 30분이었다. 이때 종속영양세균의 수준은 R2A agar(Difco™)를 이용하여 계수하였다(APHA et al., 1998). 또한 온도의 수준은 5°C와 15°C로 하였으며, 반응기의 온도는 Isotemp Refrigerated Circulator(Model 1028S, Fisher Scientific)를 이용하여 조절하였다. 그리고 반응기내 전단력은 motor controller를 이용하여 0.03N/m<sup>2</sup> (20rpm)를 낮은 수준으로, 0.21N/m<sup>2</sup> (170rpm)를 높

은 수준으로 하였다.

요인분석을 위한 모든 실험은 선정된 인자의 제어가 용이하도록 회분식(batch)으로 수행하였으며, ABR은 선정된 인자들의 조합으로 이루어진 각 실험 조건에 대하여 10일 동안 운전하였다. 실제 실험은 총 16회를 수행하도록 계획한 반복이 있는 2<sup>4+1</sup> 부분 요인 실험계획의 계획행렬에 준하여 무작위(random)하게 이루어졌으며, 각 실험 조건에 대한 반응은 반응기의 운전이 종료된 이후에 반응기내 slide 표면에 생물막을 형성하는 부착성 HPC(heterotrophic plate count)와 더불어 community-level assay에 의해 작성된 CLPP(community-level physiological profiles) 패턴에 기초하여 생물막 형성 미생물의 MPI(metabolic potential index)로 평가하였다. 그리고 실험을 통하여 얻은 모든 결과들은 Minitab(Minitab Inc., Release 13)을 이용하여 분석하였으며, 자료의 통계적 분석은 유의수준(significance level) 5%에서 수행하였다.

## 2.3. 분석방법

### 2.3.1. 생물막 시료 회수

Slide 표면에 형성된 생물막을 회수하기 위해 ultrasonic cleaner(Model 8210, Bransonic®)와 cell scraper(Becton & Dickinson Co.)를 이용하였다(Gagnon and Slawson, 1999). Slide에 가역적으로 부착한 생물막은 증류수로 우선 제거한 후 slide를 50mL의 0.3mM 인산염 완충용액(phosphate buffer solution, pH 7.2)이 담긴 borosilicate glass tube에 옮겨 ultrasonic cleaner로 5분씩 3회 처리하고, cell scraper로 수회 긁어 생물막을 회수하였다. 생물막 회수 과정은 멸균 조작법에 준해서 수행하였으며, 사용된 모든 용액 및 용기는 멸균 후 사용하였다.

### 2.3.2. 부착성 HPC(heterotrophic plate count)

생물막 시료 중의 부착성 HPC는 시료를 적당한 비율로 희석한 다음 저영양성 배지인 R2A agar(Difco™)를 이용한 도말평판법과 막여과법으로 28°C에서 7일간 배양(APHA et al., 1998)하여 나타난 colony를 계수하여 CFU(colony-forming units)/cm<sup>2</sup> 단위로 나타냈다.

### 2.3.3. Community-level assay와 MPI(metabolic potential index)

실험 조건에 따른 생물막 형성 미생물의 물질대사 능력을 분석하기 위하여 community-level assay를 수행하였다. Community-level assay는 종속영양성 미생물의 군집 특성을 평가하기 위한 방법으로서 CLPP로 알려져 있다(Garland, 1997). Community-level assay에서 이용하는 Biolog GN microplate는 95개의 서로 다른 탄소원을 1개씩 함유한 95개의 well과 탄소원을 함유하지 않은 1개의 well로 이루어져 있으며, 96개의 각 well에는 산화환원(redox) 지시약인 tetrazolium violet이 포함되어 있다. 접종된 미생물에 의해 탄소원이 산화되면 tetrazolium이 formazan으로 환원되면서 자주색을 나타내게 된다. 미생물 군집의 기질 이용 차이를 의미하는 발색 반응의 차이로부터 CLPP 패턴을 작성할 수 있으며, 이는 미생물 군집간의 유사성과 차이점을 평가하기 위한 자료로 사용될 수 있다.

Community-level assay는 시편으로부터 회수한 생물막 현탁액 시료를 Biolog GN microplate(Biolog Inc.)의 각 well당 150 $\mu$ L씩 직접 접종한 후 30°C에서 5일간 배양하였다(박 등, 2004). 배양 이후 기질 산화에 따른 well에서의 발색 정도는 multiwell reader(Molecular Devices Spectra Max 250, GMI Inc.)를 이용하여 590nm에서 측정된 흡광도로 나타냈다. 그리고 CLPP 패턴은 탄소원을 함유한 well의 흡광도 값에서 탄소원을 함유하지 않은 control well의 흡광도 값을 빼서 작성했으며, 이때 (-)를 나타낸 흡광도 값들은 0으로 기록하였다. Garland(1996)가 제안한 바와 같이 전혀 기질을 이용하지 않았거나 낮은 발색 반응을 나타낸 well을 명확하게 구별하기 위해서 흡광도가 0.25보다 큰 값을 나타낸 well( $A_{590} > 0.25$ )을 positive well로 간주하였다.

Community-level assay를 이용하여 작성한 CLPP 패턴은 MPI에 근거하여 분석하였다. MPI는 다음 식과 같이 Biolog GN microplate에서의 전체 positive well 수(S)와 평균 흡광도 값(A·P)을 곱해서 나타냈다(박, 2004). 이러한 MPI는 미생물이 이용한 기질수와 이용한 각 기질에 대한 평균 활성도를 포함시킨 지수로써 미생물 군집의 물질 대사 능력을 절대값으로 나타내기 위함이다.

$$MPI = S \cdot \sum_{i=1}^n (A_i \cdot P_i)$$

여기서, i: well 번호 (1, 2, ..., 95),

S: positive well( $A_{590} > 0.25$ )의 전체수,

$A_i$ : i번째 positive well( $A_{590} > 0.25$ )의 흡광도,

$P_i$ : 모든 positive well( $A_{590} > 0.25$ )의 전체 흡광도에 대한 i번째 positive well( $A_{590} > 0.25$ )의 흡광도가 차지하는 비율,

A·P: Biolog GN microplate에서 측정된 평균 흡광도.

### 2.4. 수돗물 분석

수돗물의 수질은 Standard Methods(APHA et al., 1998)에 준하여 분석하였다. 시료의 pH는 pH meter(Model 710A, Orion)를 이용하여 측정하였으며, 경도와 알칼리도의 분석에는 ethylenediaminetetraacetic acid를 이용한 적정법과 mixed bromocresol green-methyl red indicator를 이용한 적정법을 각각 사용하였다. 그리고 잔류염소는 N, N-diethyl-p-phenylenediamine ferrous titrimetric method로 분석하였고, 암모니아성 질소와 인산염 인은 각각 Phenate 방법과 Ascorbic acid 방법으로 분석하였다. TOC는 TOC analyzer(Model Phoenix 8000, Dohrmann)를 이용하여 측정하였으며, BDOC는 미생물이 부착된 모래 100  $\pm$  10g를 수돗물 시료 300mL에 첨가하여 5일간 배양한 후 DOC 차이로 측정하였다(Park et al., 2004). 수돗물에 존재하는 종속영양세균은 R2A agar를 이용한 막여과법과 도말평판 방법으로 분석하였다(APHA et al., 1998).

## 3. 결 과

### 3.1. 부착성 HPC에 미치는 요인들의 효과

BDOC, 종속영양세균, 온도, 그리고 전단력이 생물막을 형성하는 부착성 HPC에 얼마나 큰 영향을 미치는지를 알아보기 위해 2<sup>+1</sup> 부분요인 실험계획에 준하여 반복 실험을 수행하였으며, 실험은 해상도(resolution)가 IV인 실험에 해당한다. 해상도는 주효과(인자만의 효과)와 교호작용효과(인자간의 효과)

**Table 3.** Results of attached HPC according to the test matrix of 2<sup>4-1</sup> fractional factorial design

| Run | A             | B                 | C                | D                                | Response measured as attached HPC (CFU/cm <sup>2</sup> ) |                       |                       |
|-----|---------------|-------------------|------------------|----------------------------------|--|-----------------------|-----------------------|
|     | Heterotrophic |                   |                  |                                  | #1   | #2                    | Average               |
|     | BDOC (mg/L)   | bacteria (CFU/mL) | Temperature (°C) | Shear stress (N/m <sup>2</sup> ) |  |                       |                       |
| 1   | 0.1           | 10                | 5                | 0.03                             | 4.6 × 10 <sup>2</sup>                                    | 2.6 × 10 <sup>2</sup> | 3.6 × 10 <sup>2</sup> |
| 2   | 1.5           | 10                | 5                | 0.21                             | 4.7 × 10 <sup>3</sup>                                    | 1.2 × 10 <sup>3</sup> | 3.0 × 10 <sup>3</sup> |
| 3   | 0.1           | 1000              | 5                | 0.21                             | 9.2 × 10 <sup>3</sup>                                    | 4.7 × 10 <sup>3</sup> | 7.0 × 10 <sup>3</sup> |
| 4   | 1.5           | 1000              | 5                | 0.03                             | 6.8 × 10 <sup>4</sup>                                    | 4.9 × 10 <sup>4</sup> | 5.9 × 10 <sup>4</sup> |
| 5   | 0.1           | 10                | 15               | 0.21                             | 1.8 × 10 <sup>3</sup>                                    | 2.1 × 10 <sup>3</sup> | 2.0 × 10 <sup>3</sup> |
| 6   | 1.5           | 10                | 15               | 0.03                             | 7.4 × 10 <sup>3</sup>                                    | 3.7 × 10 <sup>3</sup> | 5.5 × 10 <sup>3</sup> |
| 7   | 0.1           | 1000              | 15               | 0.03                             | 2.2 × 10 <sup>4</sup>                                    | 1.6 × 10 <sup>4</sup> | 1.9 × 10 <sup>4</sup> |
| 8   | 1.5           | 1000              | 15               | 0.21                             | 5.8 × 10 <sup>4</sup>                                    | 5.2 × 10 <sup>4</sup> | 5.5 × 10 <sup>4</sup> |

사이에 일어나는 alias와 교락(confounding)을 뜻하는 데, 해상도가 높을수록 더 많은 정보를 얻을 수 있다. 본 실험과 같이 해상도 IV는 주효과(main effect)가 2요인 교호작용과는 교락되어 있지 않으나 3요인 교호작용과는 교락되어 있고, 2요인 교호작용이 서로 교락되어 있음을 의미한다(Minitab, 2000). 교락이란 두 개 이상의 요인 효과가 혼합되어서 추가 실험 없이는 각 요인의 효과를 분리할 수 없음을 의미한다. 그리고 요인의 주효과는 요인을 높은 수준으로 고정시키고 실험했을 때의 평균 반응값과 낮은 수준으로 고정시키고 실험했을 때의 평균 반응값과의 차이이며, 2요인의 교호작용은 2가지 요인의 수준이 변할 때에 반응값이 상승하거나 상쇄되는 경우를 의미한다.

Table 3은 2<sup>4-1</sup> 부분요인 실험계획에 준하여 각 실험별로 반복 수행했을 때 각 인자의 수준 변화에 따라 STS 316 표면에 형성된 생물막 수준을 부착성 HPC로 측정하여 얻은 결과값을 나타낸 결과이다. 실험계획에 준하여 수행한 실험범위 내에서 검출된 부착성 HPC는 10<sup>2</sup>~10<sup>4</sup>CFU/cm<sup>2</sup> 수준이었으며, 부착성 HPC에 근거했을 때 Run4, Run7, Run8이 다른 실험 조건과 비교하여 상대적으로 높은 생물막 형성 수준을 나타냈으며, 반면에 Run1에서 가장 낮은 수준을 나타냈다. 특히 Run4, Run7, Run8은 공통적으로 수도물에 존재하는 세균의 수준이 높은 조건이었다.

각 인자의 주효과와 교호작용이 실험값에 유의한 효과를 나타내는지 여부는 주효과 및 교호작용의 크

기를 standard error와 비교하여 판단할 수 있으며, 이 중에서 유의한 인자를 포함하는 추정 회귀 모델식이 적합한지 여부는 실제값과 모델식으로부터 구한 추정값(fitted value)과의 차이인 잔차(residual)에 대한 정규성(normality) 검정과 잔차의 분산(variance) 분석을 이용하여 평가할 수 있다.

Table 4는 각 실험별로 반복 측정해서 얻은 부착성 HPC 결과값을 자연대수로 변환시킨 자료를 이용하여 부착성 HPC에 대한 각 인자들의 주효과 및 교호작용을 Minitab으로 분석한 추정 효과로서, 실험에서 부착성 HPC에 영향을 미치는 각 인자들의 주효과와 교호작용의 크기를 보여준다. 본 연구에서는 부착성 HPC에 영향을 나타내는 인자의 효과를 효율적으로 분석하기 위해서 각 실험조건에서 측정된 부착성 HPC 반응값을 자연대수(natural logarithm)로 변환(Y = ln y)시켜서 사용하였다. 이는 자료의 변화가 크거나 분산이 불안정한 실험 자료를 분석하는데 대수(logarithm) 등을 이용하여 원 실험 자료를 적절하게 변환시켜 분석하는 방법이 효율적이기 때문이다(Daniel, 1976).

자연대수로 변환한 자료의 전체 평균은 8.7812이었으며, 수도물에 존재하는 BDOC와 세균의 수준이 증가하면 반응값은 각각 1.5369와 2.6884 정도 증가하였으며, 또한 수도물의 온도 수준이 높아지면 반응값은 0.8738이 증가하였다. 반면에 전단력의 증가는 반응값을 0.0397 만큼 감소시키는 것으로 나타났다. Table 4에 제시한 바와 같이 인자의 주효과와 교호작

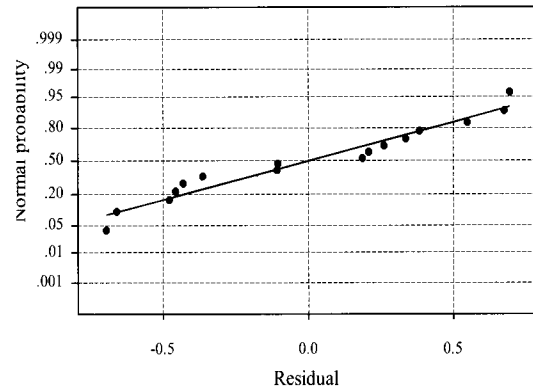
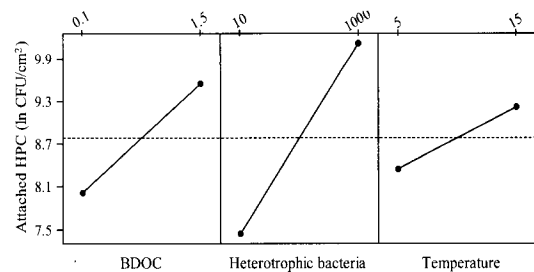
**Table 4.** Estimated effects and standard errors for attached HPC

| Identification            | Estimated effect<br>(on ln scale) | P <sup>a</sup> |
|---------------------------|-----------------------------------|----------------|
| Average                   | 8.7812 ± 0.1154                   | 0.000          |
| A(BDOC)                   | 1.5369 ± 0.1154                   | 0.000          |
| B(Heterotrophic bacteria) | 2.6884 ± 0.1154                   | 0.000          |
| C(Temperature)            | 0.8738 ± 0.1154                   | 0.005          |
| D(Shear stress)           | -0.0397 ± 0.1154                  | 0.868          |
| A*B                       | 0.0845 ± 0.1154                   | 0.724          |
| A*C                       | -0.5063 ± 0.1154                  | 0.059          |
| A*D                       | -0.3822 ± 0.1154                  | 0.136          |

<sup>a</sup> P value is the probability of wrongly rejecting the null hypothesis if it is in fact true. The p-value is compared with the desired significance level(5%) of our test and, if it is smaller, the result is significant.

용의 크기를 standard error와 비교했을 때 수돗물에 존재하는 세균의 수준이 생물막 형성에 가장 크게 영향을 미치는 것으로 나타났고, 다음으로는 BDOC, 온도의 순으로 생물막 형성에 유의한 효과를 갖는 것으로 분석되었다. 반면에 부착성 HPC에 대해 전단력과 인자들간의 교호작용이 미치는 유의한 효과는 발견되지 않았다. 이러한 각 인자들의 주효과와 교호작용의 분석 결과를 근거로 하여 생물막 형성에 유의한 효과를 나타내는 주인자 A(BDOC)와 B(중속영양세균) 그리고 C(온도)를 포함하는 모델이 적합한지를 판단하기 위해 Fig. 2에 나타난 바와 같이 잔차의 정규성을 분석한 결과 잔차는 정규분포를 따르는 것으로 나타났으며, 또한 잔차의 분산을 분석했을 때도 분산이 안정되게 나타났다(결과 미제시). 이는 자연대수로 변환시킨 자료가 분석에 적합함을 나타냄과 동시에 생물막 형성에 유의한 영향을 미치는 인자를 포함하는 모델이 적합하다고 판단할 수 있는 근거가 된다.

Fig. 3은 생물막 형성에 유의한 효과를 미치는 것으로 나타난 BDOC와 수돗물에서의 중속영양세균 그리고 온도의 주효과에 대한 결과이다. 주효과 분석에서 BDOC와 온도 수준의 변화보다는 수돗물에 존재하는 중속영양세균의 수준이 변화함에 따라 평균 부착성 HPC의 수준이 가장 많이 변화하는 결과를 보였다. 이는 수돗물에 존재하는 세균이 생물막 형성에 가장 큰 영향을 미친다는 것을 의미한다. 그러나 부착성 HPC에 대한 각 인자들의 교호작용 효과를 분석한 결과에서는 각 인자들의 교호작용이 유의하지 않은 것으로 나타났다(Table 4).

**Fig. 2.** Normal probability plot of residuals for attached HPC following natural logarithmic transformation.**Fig. 3.** Main effects of BDOC, heterotrophic bacteria, and temperature on levels of biofilm formation measured as attached HPC.

일반적으로 A와 B라는 두 인자 사이의 유의한 교호작용은 두 인자 사이의 상승 또는 상쇄 작용에 의하여 A의 낮은 수준이 B인자와 작용하여 변하는 추이와 A의 높은 수준이 B인자와 작용하여 변하는 추이가 서로 다를 경우에 존재한다(Berthouex and

Brown, 1994). 그러나 본 실험의 결과에서는 이러한 두 인자 사이에 유의한 교호작용의 효과는 발견되지 않았으며, 반면에 두 인자가 함께 작용할 때에 각 인자가 나타내는 효과의 합만으로 반응값에 영향을 미치는 가법성(additivity)이 유지되는 것으로 조사되었다. 가법성은 어떤 효과들의 합이 전체의 효과가 되는 성질을 의미한다. 그러므로 부착성 HPC에 미치는 유의한 교호작용의 효과가 없기 때문에 각 인자의 주효과는 가법성을 유지하며, 이로 인하여 종속영양 세균과 BDOC의 수준을 동시에 높이면 부착성 HPC는 평균 수준에 비해 약  $6.84 \times 10^3$  CFU/cm<sup>2</sup>가 증가하게 될 것이다. 따라서 주효과만을 고려했을 때 생물막을 형성하는 부착성 HPC가 최대가 되는 수준은 수도물에서의 세균 수준이  $10^3$ CFU/mL, BDOC가 1.5mg/L, 그리고 온도가 15°C일 때일 것이다.

### 3.2. 생물막 형성 미생물의 물질대사 능력에 미치는 요인들의 효과

4요인들(BDOC, 세균, 온도, 전단력)의 조합으로 이루어진 각 실험 조건에서 형성된 생물막에 대해 community-level assay를 수행함으로써 각 인자들이 생물막 형성 미생물의 물질대사 능력에 미치는 효과를 평가하였다. Community-level assay를 수행한 결과 생물막 미생물들은 각 실험조건에 따라 상이한 물질대사 능력이 반영된 독특한 CLPP 패턴을 나타냈다. 비록 Biolog GN microplate에 포함된 95개의 탄소원이

종류라든가 농도에 있어 실제 수도물에 존재하는 탄소원과 일치하지 않을 수 있지만, 주어진 실험 조건에서 형성된 생물막 군집이 나타낸 CLPP 패턴은 특정 기질에 대한 실제 생물막을 구성하는 미생물의 metabolic redundancy를 반영한 결과라고 할 수 있다. 이는 대부분의 미생물들이 특정 기질에 대해 물질대사 능력을 획득할 수 있는 유전적인 잠재력(genetic potential)을 갖고 있기 때문이다(Konopka et al., 1998). 그러므로 이러한 CLPP 패턴은 미생물 군집내에 우점하는 미생물의 물질대사 능력과 관련되어 나타난 결과라고 할 수 있을 것이다.

Table 5는 각 실험조건에서 형성된 생물막 미생물이 나타낸 CLPP 패턴을 기초로 하여 생물막 형성 미생물이 이용한 기질수와 이용 기질에 대한 흡광도 그리고 MPI를 평균한 결과이다. Biolog GN microplate에서 미생물이 이용한 전체 기질수에 해당하는 positive well 수와 positive well의 흡광도는 실험 조건에 따라 차이를 나타냈으며, 이러한 결과를 이용하여 실험 조건에 따른 생물막 형성 미생물의 물질대사 능력을 MPI로 나타냈다. 특히 MPI 수준은 기질 이용수에 의해 크게 좌우되지만 기질 이용수가 유사한 군집일 경우 이용 기질에 대한 활성도의 크기에 비례하여 나타난다.

Table 5와 같이 주어진 실험조건에서 생물막 형성 미생물이 나타낸 MPI는 Run4, Run7, Run8에서 형성된 생물막 미생물이 상대적으로 높은 값을 나타낸

**Table 5.** Results analyzed from CLPP patterns of biofilm-forming microorganisms according to the test matrix of 2<sup>4-1</sup> fractional factorial design

| Run | A           | B                               | C                | D                                | Average response |                                |                  |
|-----|-------------|---------------------------------|------------------|----------------------------------|------------------|--------------------------------|------------------|
|     | BDOC (mg/L) | Heterotrophic bacteria (CFU/mL) | Temperature (°C) | Shear stress (N/m <sup>2</sup> ) | Positive wells   | Absorbance (A <sub>590</sub> ) | MPI <sup>a</sup> |
| 1   | 0.1         | 10                              | 5                | 0.03                             | 22.5             | 1.342                          | 31.0             |
| 2   | 1.5         | 10                              | 5                | 0.21                             | 44.5             | 1.090                          | 48.0             |
| 3   | 0.1         | 1000                            | 5                | 0.21                             | 39.0             | 1.092                          | 42.6             |
| 4   | 1.5         | 1000                            | 5                | 0.03                             | 67.5             | 1.507                          | 101.2            |
| 5   | 0.1         | 10                              | 15               | 0.21                             | 50.0             | 0.900                          | 47.8             |
| 6   | 1.5         | 10                              | 15               | 0.03                             | 38.5             | 1.008                          | 36.2             |
| 7   | 0.1         | 1000                            | 15               | 0.03                             | 60.5             | 1.178                          | 71.3             |
| 8   | 1.5         | 1000                            | 15               | 0.21                             | 66.0             | 1.415                          | 93.4             |

<sup>a</sup> MPI = metabolic potential index.

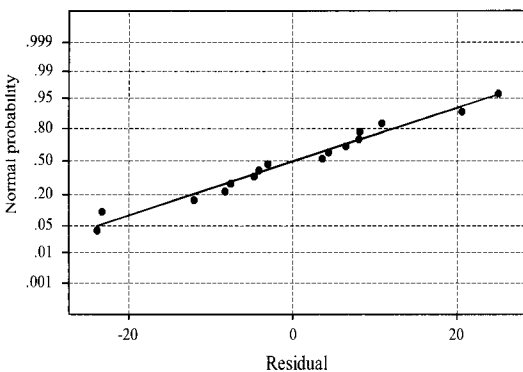


**Table 6.** Estimated effects and standard errors for MPI of biofilm-forming bacteria

| Identification            | Estimated effect | P     |
|---------------------------|------------------|-------|
| Average                   | 58.913 ± 3.669   | 0.000 |
| A(BDOC)                   | 21.500 ± 3.669   | 0.022 |
| B(Heterotrophic bacteria) | 36.375 ± 3.669   | 0.002 |
| C(Temperature)            | 6.475 ± 3.669    | 0.407 |
| D(Shear stress)           | -1.950 ± 3.669   | 0.798 |
| A*B                       | 18.850 ± 3.669   | 0.037 |
| A*C                       | -16.250 ± 3.669  | 0.062 |
| A*D                       | 3.975 ± 3.669    | 0.605 |

반면에 Run1과 Run6에서 형성된 생물막 미생물이 상대적으로 가장 낮은 값을 나타냈다. 각 실험조건에서 나타난 생물막 형성 미생물의 MPI를 바탕으로 4 인자의 주효과와 교호작용이 생물막 미생물의 물질대사 능력에 미치는 효과를 Minitab으로 분석하였으며, Table 6에는 생물막 형성 미생물의 MPI에 영향을 미치는 각 인자의 주효과와 교호작용의 추정 효과를 나타냈다. 생물막 형성 미생물의 평균 MPI는 58.913이었으며, 수돗물에 존재하는 BDOC와 세균의 수준이 증가하면 생물막 형성 미생물의 MPI는 각각 21.500과 36.375가 증가하였으며, 수돗물의 온도 수준이 높아지면 MPI는 6.475가 증가하였다. 반면에 전단력의 증가는 생물막 형성 미생물의 MPI를 감소시키는 것으로 나타났다.

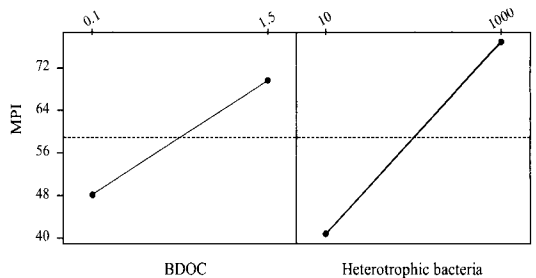
주인자와 교호작용에 의한 효과를 standard error와 비교했을 때 주효과 A(BDOC)와 B(중속영양세균) 그리고 교호작용 A\*B가 생물막 형성 미생물의 MPI에 유의한 효과를 갖는 것으로 분석되었으며, 반면에



**Fig. 4.** Normal probability plot of residuals for MPI of biofilm-forming bacteria.

다른 인자들은 유의한 영향을 미치지 않는 것으로 조사되었다. 이러한 유의한 인자들을 포함하는 모델로부터 잔차의 정규성을 분석한 결과 잔차는 정규 분포를 따르는 것으로 확인되었으며 (Fig. 4), 추정값에 대한 잔차의 분산 분석에서도 안정된 값을 갖는 것으로 조사되었다(결과 미제시).

Fig. 5는 생물막 형성 미생물의 MPI에 대해 유의한 영향을 갖는 수돗물의 BDOC와 세균의 주효과를 보여주는 결과로서, BDOC 수준의 변화에 비해 수돗물에 존재하는 중속영양세균의 수준 변화에 따라 생물막 형성 미생물의 MPI 변화 폭이 상대적으로 더 큰 것으로 나타났다. 이는 부착성 HPC에 대한 주효과 분석에서도 나타난 결과와 같이 수돗물에 존재하는 세균의 수준이 생물막 형성 수준과 함께 생물막 군집의 물질대사 능력에 가장 유의한 영향을 미치는 인자가 될 수 있음을 보여주는 결과이다. 그리고 생물막 형성 미생물의 MPI에 대한 각 인자들의 교호작용 효과를 분석한 결과, 특히 수돗물내 BDOC와 세균수의 교호작용이 유의한 것으로 나타났다. Fig. 6은 생물막 형성 미생물의 MPI에 미치는 각 인자들의 교호작용 효과를 보여주는 결과이다. 비록 실험 결과에서 생물



**Fig. 5.** Main effects of BDOC and HPC on MPI of biofilm-forming bacteria.

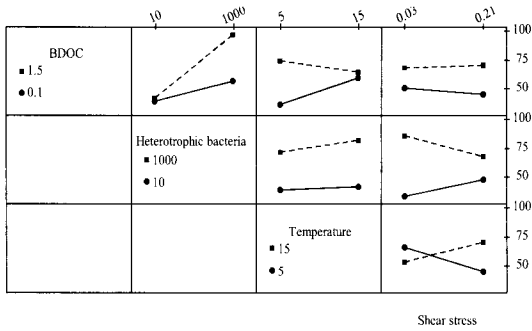


Fig. 6. Two-factor interactions for MPI of biofilm-forming bacteria.

막 형성 미생물의 MPI에 미치는 BDOC의 효과가 세균의 수준에 따라 유의한 차이를 보이긴 했으나, 부분요인 실험계획에서는 2요인 교호작용이 다른 2요인 교호작용과 교락되어 나타나게 된다. 즉, BDOC와 세균의 교호작용 효과는 수온과 전단력의 교호작용 효과와 교락되어 있기 때문에 교호작용의 해석이 불분명할 수도 있다. 특히 본 실험과 같이 주 관심의 대상이 주효과에 있고, 4요인 중에서 일부 요인만이 유의한 주효과를 나타내는 점을 고려했을 때 교호작용에 대한 해석이 명확하지 않을 수 있다(Berthouex and Brown, 1994).

#### 4. 고 찰

2<sup>+1</sup> 부분요인 실험계획에 준하여 4요인들(BDOC, 종속영양세균, 온도, 전단력)이 관 표면에 생물막을 형성하는 부착성 HPC와 생물막 미생물의 물질대사 능력에 미치는 주효과를 분석한 결과에서 무엇보다도 수돗물에 존재하는 세균의 수준이 생물막 형성에 가장 큰 효과를 미치는 인자로 나타났다. 비록 개체군의 조성이라든가 생리학적 특성에 있어 물에 존재하는 부유성 세균과 생물막을 구성하는 부착성 세균은 서로 차이를 나타낼 수 있지만, 실험 결과는 수돗물에 존재하는 세균이 초기 생물막 형성에 상당한 영향을 미칠 수 있음을 보여주고 있다. Norton and LeChevallier(2000)가 지적한 바와 같이 개체군의 조성 변화에 근거하여 초기 군체 형성 기간 이후에는 물에 존재하는 세균이 생물막 형성에 큰 영향을 미치지 않을 수도 있겠으나, 수돗물과 같이 세균과 영양물질이 매우 낮은 농도로 존재하는 물 환경에서 세균

의 유입 수준은 초기 생물막 형성 수준을 조절하는 인자로서의 역할을 할 것으로 판단된다. 물에 존재하는 세균이 생물막 형성 과정에서 1차 집락자(colonizer)이면서 접종원(inoculum)의 역할을 할 수 있다는 점에서 세균의 높은 수준은 표면에 대한 세균학적 부하를 증가시키는 원인으로 작용할 것이다. 생물막은 구조적으로나 기능적으로 복잡해지는 경향을 나타내는데, 생물막의 일반적인 특징인 미생물 군집의 천이도 1차 집락 세균에 의해 시작된다(Percival et al., 2000). 이러한 측면에서 볼 때, 비록 특정 실험 조건에서 수행한 결과이기는 하지만 주어진 조건에서 얻은 결과는 배·급수관에서 생물막 형성을 최소화하거나 제어하기 위해서는 정수처리과정에서 미생물학적 수질 특성이 우선적으로 고려되어야 한다는 것을 의미한다고 할 수 있겠다.

일반적으로 종속영양세균은 그들의 에너지 요구량을 만족시키기 위해 유기탄소의 약 50%를 CO<sub>2</sub>로 전환시키고, 나머지 50%를 새로운 세포물질 생성을 위해 이용한다(Momba et al., 2000). 주어진 실험조건에서 BDOC는 수돗물에 존재하는 세균 다음으로 생물막을 형성하는 부착성 HPC의 수준과 더불어 생물막 미생물의 물질대사 능력에 유의한 효과를 나타냈다. 이러한 점은 관 표면에서의 생물막 군집 수준이 BDOC의 농도 증가에 의해 증가할 수 있다는 것을 의미한다. 비록 부분요인 실험계획에서 나타난 것처럼 2요인이 미치는 교호작용의 효과가 불분명할 수도 있겠으나, 수돗물내에 여러 종류의 세균이 존재할 수 있을 뿐만 아니라 대부분의 이러한 세균은 acetate와 같이 쉽게 이용될 수 있는 수  $\mu\text{g/L}$ 의 낮은 유기탄소 농도에서도 최대속도로 증식할 수 있다(van der Kooij, 1990)는 점에서 BDOC의 증가는 수돗물에 존재하는 세균이 생물막 미생물의 군집 수준에 미치는 효과를 상승시키는 요인으로 작용할 수도 있을 것으로 판단된다.

일부 연구자들은 정수처리과정에서 BOM의 제거가 과도하게 소독제를 사용하지 않으면서 세균학적인 수질을 관리하는데 효과적인 방법이 될 수 있다고 제안하였다(Volk and LeChevallier, 2000). 특히 BOM은 세균에 미치는 잔류 소독제의 소독효과를 감소시킬 뿐만 아니라 생물막 형성 미생물에 이용됨으로써 결국 배·급수관내에서 생물막 형성을 촉진시키는 역할

을 한다(Volk and LeChevallier, 1999)는 점에서 중요한 인자가 되고 있다. 최근에는 생물학적 여과공정을 비롯한 다양한 공정들이 수돗물에서의 BOM 농도를 제한시키기 위해 적용되고 있다.

생물막 형성에 미치는 수온의 효과는 생물막 형성 미생물의 물질대사 능력보다는 오히려 생물막을 형성하는 세균의 수적인 증가에 유의한 효과를 나타냈다. 비록 수온이 수돗물에 존재하는 종속영양세균과 BDOC에 비해 상대적으로 작은 효과를 나타내긴 했으나, 수온은 미생물 생장을 좌우하는 모든 인자에 직·간접적으로 영향을 미칠 수 있다. 특히 수온은 정수처리 공정의 효율, 미생물 생장을, 소독효율, 잔류염소의 감소 속도, 관 부식, 관로의 수리학적 요소에 이르기까지 많은 영향을 미칠 수 있기 때문에 수온은 배·급수 시스템의 관리 측면에서 중요한 의미를 갖는다고 할 수 있다. 수온이 높은 여름철에 5°C 미만으로 수온을 유지시키는 것이 쉬운 과제는 아니겠으나 생물막 형성을 제한시키기 위해서는 가능하면 이 수온을 크게 초과하지 않도록 관리하는 것이 필요할 것으로 판단된다. 그리고 주어진 실험조건 범위내에서 생물막 형성에 미치는 전단력의 유의한 효과는 발견되지는 않았으나, 전단력과 같은 수리학적 인자는 구조적 또는 형태학적인 생물막의 불균일성에 영향을 미칠 수 있기 때문에 유체의 흐름이 연속적으로 제공되는 시스템에서는 다르게 나타날 수도 있을 것으로 판단된다. 특히 수도관에서 형성되는 생물막 미생물의 기능적 특성이 전단력과 밀접한 관련이 있는 수돗물의 유속 변화에 따라 변화하기도 한다(박 등, 2004).

## 5. 결 론

부분요인 실험계획법을 이용하여 수돗물에서의 종속영양세균, BDOC, 수온, 그리고 전단력이 생물막 형성에 미치는 효과를 분석한 결과로부터 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) 생물막을 형성하는 부착성 HPC의 수준에 가장 영향을 크게 미치는 인자는 수돗물에 존재하는 종속영양세균이었으며, 다음으로는 BDOC와 온도가 유의한 효과를 갖는 것으로 분석되었다. 실험 범위 내

에서 수돗물에서의 종속영양세균수가 103CFU/mL이고, BDOC가 1.5mg/L, 수온이 15°C 일 때 부착성 HPC가 가장 높은 수준으로 형성되었다.

2) 생물막을 형성하는 미생물 군집의 물질대사 능력에 가장 유의한 효과를 나타내는 인자는 수돗물에 존재하는 세균과 BDOC이었으며, BDOC의 수준은 수돗물에 존재하는 세균이 생물막 미생물의 군집 수준에 미치는 효과를 상승시킬 수 있을 것으로 판단되었다.

3) 생물막 형성에 유의한 효과를 나타낸 종속영양세균과 BDOC 그리고 수온을 고려하여 생물막 형성이 최저가 될 수 있는 수준은 수돗물에서의 세균이 10CFU/mL 이하이고, BDOC가 0.1mg/L 이하, 그리고 수온이 5°C 이하일 때 가능할 것으로 판단된다.

## 감사의 글

본 연구는 한국과학재단 특정기초연구(R01-2003-000-10494-0)의 지원을 받아 수행하였으며, 지원에 감사드립니다.

## 참고문헌

- 박세근, 박재우, 최성찬, 김영관 (2004) 모형 수도관에서 유속 변화에 따른 생물막 형성 미생물의 기능적 특성, 대한환경공학회지, 26(11), 1251-1258.
- 박세근 (2004) 상수관내 생물막 형성과 미생물 군집의 기능적 특성, 강원대학교 박사학위논문.
- APHA, AWWA, and WEF (1998) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20th Ed., Washington, D.C.
- Berthouex, P.M. and Brown, L.C. (1994) *Statistics for Environmental Engineers*, pp. 151-169, CRC Press, Inc., Boca Ratin, FL.
- Daniel, C. (1976) *Application of Statistics to Industrial Experimentation*, Wiley, NY.
- Donlan, R.M. and Pipes, W.O. (1988) Selected drinking water characteristics and attached microbial population density, *J. AWWA*, 80(11), pp. 70-76.
- Gagnon, G.A. and Slawson, R.M., (1999) An efficient biofilm removal method for bacterial cells exposed to drinking water, *J. Microbiol. Meth.*, 34, pp. 203-214.
- Garland, J.L. (1996) Analytical approaches to the characterization of samples of microbial communities using patterns of

- potential C source utilization, *Soil Biol. Biochem.*, **28**(2), pp. 213-221.
- Garland, J.L. (1997) Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **24**, pp. 289-300.
- Huck, P.M. (1990) Measurement of biodegradable organic matter and bacterial growth potential in drinking water, *J. AWWA*, **82**(1), pp. 78-86.
- Konopka, A., Oliver, L., and Turco Jr, R.F. (1998) The use of carbon substrate utilization patterns in environmental and ecological microbiology, *Microb. Ecol.*, **35**, pp. 103-115.
- LeChevallier, M.W., Schulz, W., and Lee, R.G. (1991) Bacterial nutrients in drinking water, *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**(3), pp. 857-862.
- Lund, V. and Ormerod, K. (1995) The influence of disinfection processes on biofilm formation in water distribution systems, *Water Res.*, **29**(4), pp. 1013-1021.
- Minitab (2000) *MINITAB User's Guide 2: Data Analysis and Quality Tools*, pp. 19:1-19:65, Minitab Inc., USA.
- Momba, M.N.B., Kfir, R., Venter, S.N., and Clote, T.E. (2000) An overview of biofilm formation in distribution systems and its impact on the deterioration of water, *Water SA*, **26**(1), pp. 59-66.
- Norton, C.D. and LeChevallier, M.W. (2000) A pilot study of bacteriological population changes through potable water treatment and distribution, *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**(1), pp. 268-276.
- Park, S.K., Pak, K.R., Choi, S.C., and Kim, Y.K. (2004) Evaluation of bioassays for analyzing biodegradable dissolved organic carbon in drinking water, *J. Environ. Sci. Health A*, **39**(1), pp. 103-112.
- Percival, S.L., Walker, J.T., and Hunter, P.R. (2000) *Microbiological Aspects of Biofilms and Drinking Water*, pp.82-102, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Servais, P., Billen, G., Laurent, P., Levi, Y., and Randon, G. (1993) Impact of biodegradable dissolved organic carbon (BDOC) on bacterial dynamics in distribution system, Proc. of Wat. Qual. Technol. Conf., Miami, FL, American Water Works Research Foundation, Denver, CO., pp. 963-980.
- van der Kooij, D. (1990) Assimilable organic carbon (AOC) in drinking water. In McFeters, G.A. (Ed.), *Drinking Water Microbiology: Progress and Recent Developments*, pp. 57-87. Springer-Verlag, New York.
- van der Kooij, D., Visser, A., and Hijnen, W.A.M. (1982) Determining the concentration of easily assimilable organic carbon in drinking water, *J. AWWA* **74**(10), pp. 540-545.
- van der Wende, E. and Characklis, W.G. (1990) Biofilms in potable water distribution system. In McFeters, G.A. (Ed.), *Drinking Water Microbiology: Progress and Recent Developments*, pp. 249-268. Springer-Verlag, New York.
- Volk, C.J. and LeChevallier, M.W. (1999) Impacts of the reduction of nutrient levels on bacterial water quality in distribution systems, *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**(11), pp. 4957-4966.
- Volk, C.J. and LeChevallier, M.W. (2000) Assessing biodegradable organic matter, *J. AWWA*, **92**(5), pp. 64-76.