한국환경보건학회지, 제31권 제2호(2005)
Kor. J. Env. Hlth., Vol. 31, No. 2, pp 147~151(2005)

유리잔류염소와 모노클로라민에서의 생물막의 CLPP

이동근†
신라대학교 공과대학 생명공학과

CLPP of Biofilm in Free Chlorine Residual and Monochloramine

Dong-Geun Lee†
Department of Bioscience and Biotechnology, College of Engineering, Silla University
(Received March 8, 2005; Accepted April 5, 2005)

ABSTRACT

The disinfection effect of free residual chlorine and monochloramine on biofilm communities were investigated by CLPP (community level physiology profile) using Biolog GN plates. Low concentration of disinfectant, 0.5 mg/l free chlorine and 1.0 mg/l monochloramine, stimulated the growth of bacteria rather than disinfection. Bacterial concentrations were decreased at more than 1.0 mg/l of disinfectants. CLPP was different with the type and concentration of disinfectant and sampling time. Common and different carbon sources were actively used with similar bacterial concentration in free chlorine and monochloramine. This represents the differences of bacterial communities with tap water contact times and disinfectant.

Keywords: CLPP, free chlorine, monochloramine, biofilm

I. 서 론

수돗물은 영양분 농도가 낮으며 소독제가 존재하여 세균성장에는 불리하지만 관벽의 생물막에 세균이 고농도로 있을 수 있고,[9,14] 생물막은 관말에서의 급격한 세균수 증가와 기회성병원균(opportunistic pathogen) 유출의 문제를 일으킬 수 있다.[9,10,15]

이는[8-10] 수돗물속의 세균이 생물막 형태로 성장하며 다양한 세균이 성장하는 것을 R2A 배지에서 분리한 세균들로 밝혔으며 기회성병원균이 존재함을 밝혔다.

우리나라를 포함한 많은 나라에서 수돗물 소독에 유리잔류염소(Free chlorine)를 사용하고 있지만 생물막에 대한 살균력이 낮은 단점이 있어, 대안으로 사용 가능한 결합잔류염소(Combined chlorine)인 monochloramine의 생물막 살균에 관한 보고도 있었다.[2]

수돗물 배급수관망의 생물막을 구성하는 미생물군집의 분석방법에는 배양과 동정을 통한 것과[10] 배양없는 분자생물학적 방법이[11] 있지만, 모두 많은 시간과 경비가 소요된다. Biolog plate는 95개의 서로 다른 탄소원을 함유하고 있는데, 세균종류에 따라 각 탄소원의 이용정도에 차이가 있는 점을 이용하여 세균 동정용으로 이용되고 있다.[6] 또한 Biolog plate는 세균군집의 잠재적 기능성 평가를 통해 군집을 비교하는 것으로도 이용 가능한데 이를 '군집수준의 생리양상'(CLPP, Community Level Physiology Profile)라고 한다.[5] CLPP는 미생물군집 구성원의 개별적 파악에는 단점이 있지만, 간편하고 분석속도가 빠른 장점이 있다.[16] Biological plate는 동정할 균체의 종류에 따라 그람양성균용의 Biolog GP plate와 그람음성균용의 Biolog GN plate, 효모용의 Biolog YT plate 등이 있으며 각 plate에 따라 탄소원의 종류가 다르며 CLPP에는 주로 Biolog GN plate가 이용된다.

본 연구에서는 배급수관에 자주 사용되는 아연도강관에 형성된 생물막이 유리잔류염소와 결합잔류염소에 노출되었을 때 보이는 각 소독제의 생물막 살균력과 함께 미생물군집 양상을 Biolog GN plate를 이용한 CLPP로 분석하고자 하였다.

†Corresponding author : Department of Bioscience and Biotechnology, Silla University
Tel: 82-51-999-5740, Fax: 82-51-999-5636
E-mail : ldg@silla.ac.kr

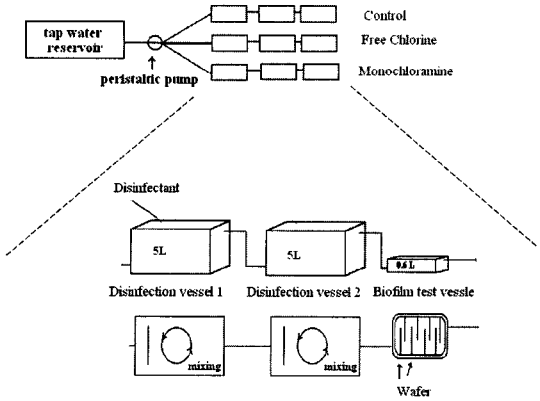

Fig. 1. Schematic diagram of semi-pilot plant system.

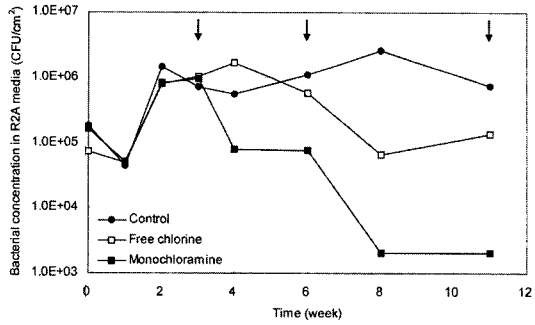

Fig. 2. Patterns of heterotrophic plate count (HPC) on galvanized iron. Arrows in figures represent the sampling time for CLPP analysis (Fig. 3).

II. 재료 및 방법

1. 모델시스템

아연도강관(galvanized iron pipe)의 쿠폰을 15×75×1 mm(총표면적 24.3 cm^2)로 제작하였다. 멸균된 Milli-Q 증류수와 초음파세척기로(Branson 3210 washing sonicator, USA) 세척된 쿠폰들을, 스테인레스 재질의 생물막실험 용기(36×105×225 mm)에 삽입한 후 70 ml/min의 유량으로 관말의 수돗물을 4주 동안 흘려 생물막이 형성되도록 하였고(Fig. 1) 소독제 재처리 시점을 실험의 시작점으로 하였다. 관말 수돗물의 유리잔류염소와 결합잔류염소의 농도는 실험기간 동안 각각 0.2 mg/l, 0.3 mg/l 이하였다.

2. 소독제 제조 및 처리

소독제로는 현재 정수장에서 사용되고 있는 유리잔류염소와 함께 결합잔류염소인 monochloramine을 이용하였다. 유리잔류염소는 10% NaOCl을 사용하여 그리고 결합잔류염소인 monochloramine은 멸균된 증류수에 암모니아(ammonium sulfate; $(NH_4)_2SO_4$)와 염소(sodium hypochlorite; 10% NaOCl)의 몰비가 3:1이 되도록 제조하였다. 염소를 각 농도별로 먼저 넣어주어 충분히 chlorination 시켜준 뒤 암모니아를 첨가하여 유기물에 의해 염소 요구량이 감소하는 것을 방지하였다. 소독제별, 농도별로 보이는 생물막의 살균효과를 보기위해 유리잔류염소는 0.5, 1.0, 1.5 mg/l 농도를 monochloramine은 1.0, 1.5, 2.0 mg/l을 단계적으로 유지하도록 하였고 CLPP 측정(Fig. 2 화살표) 후에 농도를 높였다.

3. 시료채취 및 생물막 미생물 분리

쿠폰들을 무균적으로 채취한 후 30 ml의 탈착용액을 이용하여 가역적으로 흡착한 미생물을 제거하였다.[10] 탈착용액 100 ml에 쿠폰을 넣고 45 kHz에서 초음파세척, 냉장, 교반, 냉장을 각 1분씩 총 3회 실시하여 생물막의 세균을 탈착시켰다.[10] 원심분리(10000×g, 20 min)와 멸균된 0.7% NaCl 용액을 이용한 세척을 3회 실시하여 생물막의 미생물을 분리하였다. 최종적인 세포덩어리는 20 ml의 멸균된 0.7% NaCl로 희석하였다.

4. 세균농도측정 및 CLPP

종속영양세균의 농도는 R2A 배지(yeast extract 0.5 g/l, polypeptone 0.5 g/l, casamino acid 0.5 g/l, soluble starch 0.5 g/l, sodium pyruvate 0.3 g/l, KH_2PO_4 0.3 g/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.03 g/l, agar 15 g/l)를 이용하여 매주 측정하였다.[1] 3주, 6주, 11주째(Fig. 2 화살표) 시료를 채취한 후 Biolog GN plate(Biolog, Hayward, CA, USA)의 각 well에 시료 180 μl씩 접종하였고, 항습배양기(25℃)에서 4일간 배양하였다. 매일 microtiter plate reader (model Vmax; Molecular Devices Corp., Menlo Park, CA.)를 이용하여 540 nm에서 광학밀도를 측정하였다. 대조군으로 멸균된 수돗물을 이용하였다.

III. 결과 및 토의

1. 세균농도

Fig. 2는 소독제 종류와 농도별로 보이는 생물막의 세균농도변화를 나타낸 그래프이다. 소독제 처리를 하지 않은 대조구와 유리잔류염소를 0.5 mg/l 그리고 결합잔류염소를 1.0 mg/l로 처리한 실험구의 세균농도가 유사함을 알 수 있었다(Fig. 2).

접촉시간에 따른 소독능을 소독제 종류와 농도별로 비교하면, 1.0 mg/l의 경우 결합잔류염소에서는 1주째 세균수가 일부 감소하였고 2주 후부터 생물막이 1 log

이상 성장하였으며, 유리잔류염소에서는 1주째와 3주 후 생물막의 일부 성장과 감소가 있었지만 큰 변화가 없었다(Fig. 2). 그리고 1.5 mg/l 농도일 때 결합잔류염소는 생물막의 세균수를 감소시킨 후 그 상태를 유지하였지만, 유리잔류염소는 감소시킨 상태를 유지하지 못하였다. 유리잔류염소와 결합잔류염소 모두 1.0 mg/l 이 초과되어야 생물막 살균 효과가 있었다. 결합잔류염소가 유리잔류염소에 비해 생물막 살균력이 좋지만 낮은 반응성으로 유리잔류염소에 비해 높은 농도가 필요하다고 알려져 있는데[2] 본 연구에서는 1.5 mg/l의 농도에서 결합잔류염소가 조금 우수하였지만 두 소독제가 유사한 살균력을 보이는 것으로 나타났다. 염소이온의 수용액에서의 존재형태가 pH에 따라 달라져 소독능에 차이를 가져온다는 보고가 있었지만[7] 본 실험에서는 소독제 농도에 따른 CLPP가 주요 실험대상이어서 pH와 소독능의 상관관계는 분석하지 않았다.

2. CLPP

Fig. 3은 서로 다른 소독제 농도와 종류에 노출된 생물막 구성 미생물이 Biolog GN plate에서 나타내는, 각 well의 광학밀도를 매일 측정하여 나타낸 결과이다.

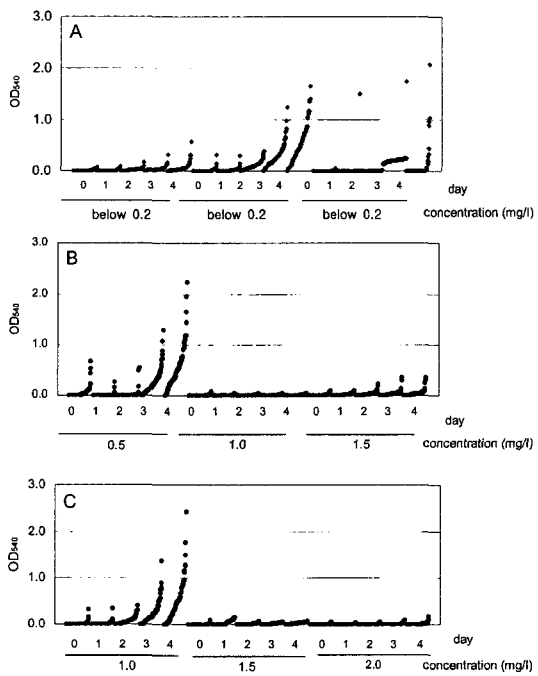

Fig. 3. Distribution of carbon usage (optical density) patterns of bacterial communities on galvanized iron in tap water. Treated disinfectant was nothing (A), free chlorine (B) and monochloramine (C). Numbers represent culture time (day) and the concentration of disinfectant.

CLPP 분석을 통해 다음이 관찰되었다. 첫째 세균농도와 CLPP가 일치하지 않는다는 것을 알 수 있었다. 대조구를 보면 CLPP 분석에 사용된 세균의 농도가 3번 모두 비슷한데(Fig. 2) 전체적인 활성과 분해를 잘하는 탄소원의 종류가 다른 것을 알 수 있다(Fig. 3A). 이는 시간에 따라 생물막상의 세균군집구조의 변화에 의한 것으로 생각된다.[12] 세균농도는 유사하더라도 시료채취시점에 따라 세균군집구조가 배양법과 비배양법 모두에서 다른 보고도 있었다.[10,11] 둘째 낮은 농도의 소독제는 생물막 미생물군집의 활성을 자극하는 것을 알 수 있었다. 첫 CLPP 분석 때 소독제 처리와 관계없이 생물막들의 세균농도가 비슷하지만(Fig. 2), 탄소원 이용정도는 소독제를 저농도로 처리한 두 경우가(Fig. 3B,C) 소독제 처리를 하지 않은 대조구에(Fig. 3A) 비해 높은 것으로 나타났다. 이는 미생물군집이 서로 다를 가능성도 내포한다고 할 것이다. 셋째 유리잔류염소와 결합잔류염소를 보면 탄소원 이용 양상이 소독제 종류와 농도에 따라 다른 것으로 나타났다. 유리잔류염소의 농도가 1.0 mg/l 이상 그리고 결합잔류염소의 농도가 1.5 mg/l 이상이 되면 탄소원의 이용도가 현저히 저하되는 것을 볼 수 있었다(Fig. 3B,C). 이는 소독제에 노출된 미생물군집이 소독제 종류와 농도에 따라 다른 것으로 생각되었다. 넷째 세균군집의 활성이 감소된 후 세균수가 감소되는 것을 유리잔류염소의 경우에서 관찰할 수 있었다. 첫 번째와 두 번째 CLPP 분석 때 세균의 농도는 비슷하였지만(Fig. 2) 탄소원 이용성이 다른 것을 알 수 있었고(Fig. 3A), 세 번째 CLPP 분석에서는 세균농도와 탄소분해능 모두 감소하였다. Fig. 2의 결과와 비교하면 본 연구에서는 세균의 활성이 감소된 후 세균수가 감소되는 것으로 생각되었다.

탄소원의 발색과 세균수는 연관이 있어, 각 well당 세균의 절대수가 현미경을 이용한 계수에서 10^3 이하가 되면 발색이 잘 되지 않는 것으로 보고되었다.[4] 본 실험에서는 결합잔류염소의 3번째 CLPP 분석 때 각 well당 균락형성단위(Colony Forming Unit : CFU)는 2.5×10^2이었고 나머지는 모두 10^3 CFU/well 이상이 포함되었다. 또한 각 well당 100 CFU 이상이면 세균농도와 발색양상이 상관없다는 보고와[17] 함께 일반적으로 배양법보다 현미경관찰법이 10배 이상의 세균수를 나타내므로[11] 본 연구에서 세포수 부족에 의한 영향은 없었던 것으로 사료된다. 특히 세균농도가 유사한 대조구의 CLPP 분석 결과가 서로 다른 것을 보면, 세균농도가 아닌 다른 요인이 CLPP에 영향을 미치는 것을 알 수 있었다.

Table 1. List of actively used carbon sources in CLPP analysis with similar bacterial concentration

	Free chlorine (0.5 mg/*l*)	Monochloramine (1.0 mg/*l*)
1	L-proline	L-proline
2	D-fructose	D-fructose
3	N-acetyl-D-glucosamine	N-acetyl-D-galactosamine
4	α-D-lactose	succinamic acid
5	glucose-1-phosphate	N-acetyl-D-glucosamine
6	succinamic acid	cellobiose
7	L-histidine	glucose-1-phosphate
8	D-alanine	α-D-lactose
9	L-glutamic acid	D-alanine
10	cyclodextrin	
11	amino butyric acid	
12	mono-methyl succinate	

Table 1은 유리잔류염소와 결합잔류염소가 각각 0.5와 1.0 mg/*l*인 조건에서 4일째 광학밀도(Optical Density : OD)가 1.00 이상인 항목들을 최대값부터 내림차순으로 나열한 것이다. 공통적으로 L-proline과 D-fructose가 가장 이용이 잘 되었으며 총 7종류가 공통적이었다. 유리잔류염소에서는 L-histidine, L-glutamic acid, cyclodextrin, amino butyric acid, mono-methyl succinate 등이 그리고 결합잔류염소에서는 N-acetyl-D-galactosamine, cellobiose 등이 특이적인 것이었다. 이는 상이한 군집에 의한 결과일 가능성이 높다고 할 수 있을 것이다.

영양분 농도가 낮은 수계의 미생물을 대상으로 세포를 파괴하지 않고 16S rDNA 등에 대한 probe를 이용하여 현장시료를 분석하는 *in situ* hybridization과 CLPP의 연관성이 높다는 보고가 있으며[13] 본 연구에 사용된 수돗물도 영양분의 농도가 낮으므로 Biolog GN plate를 이용한 CLPP 분석이 유용하다 할 것이다.

CLPP는 세균군집구조를 배양의존성 방법의 일종으로 파악하는 것으로 시료채취 당시의 미생물군집의 대사활성도가 아닌, 일부 세균의 성장에 의해 결과가 나타날 가능성이 있다.[16] 짧은 배양시간으로 배양성문제를 피하려는 시도가 있었지만,[3] 미생물군집을 비배양법인 DGGE(denaturant gradient gel electrophoresis)와 배양의존성인 CLPP로 분석하여 두 결과가 일치함을 보여준 사례도 있었다.[3,16] 본 연구에서는 시료채취시기 그리고 소독제 농도와 종류에 따라 이용할 수 있는 탄소원 이용의 정성적, 정량적 값이 다른 것으로 나타났다(Fig. 3). 이는 미생물군집이 서로 상이함을 시사하는 결과라 할 것이다.

IV. 결 론

수도관에 생성된 생물막의 살균력 비교를 위해 아연도강관에 생물막을 형성시킨 후 유리잔류염소와 모노클로라민의 농도를 단계적으로 높였고 Biolog GN plate를 이용하여 CLPP를 비교한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 유리잔류염소와 모노클로라민 모두 1.0 mg/*l*를 초과하여야 생물막 살균력을 보였으며 살균력은 결합잔류염소가 다소 우세하였다.

2. 유사한 세균농도를 가지더라도 생물막의 채취시기와 소독제 종류에 따라 미생물군집의 탄소분해능은 달랐으며, 이는 군집구조의 차이가 원인으로 사료되었다.

3. 소독제 농도에 따라 CLPP 양상을 서로 달랐으며 탄소분해능 감소가 세균수 감소보다 먼저 발생하였다.

4. 유리잔류염소 0.5 mg/*l*와 모노클로라민 1.0 mg/*l*의 저농도는 소독제를 처리하지 않은 대조구에 비해 미생물군집의 탄소분해능이 증가하였으며, 분해를 잘하는 탄소원의 종류에 공통점과 차이점이 있어 서로 다른 군집구조를 반영하는 것으로 생각되었다.

참고문헌

1. APHA-AWWA-APCF : Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 19th ed., APHA, Washington, D.C., 1996.
2. Camper, A. K. : Involvement of humic substances in regrowth. *International Journal of Food Microbiology*, **92**, 355-364, 2004.
3. Degens, B. P. and Harris, J. A. : Development of a physiological approach to measuring the catabolic diversity of soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, **29**, 1309-1320, 1997.
4. Gamo, M. and Shoji, T. : A method of profiling microbial communities based on a most-probable-number assay that uses BIOLOG plates and multiple sole carbon sources. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 4419-4424, 1999.
5. Garland, J. L. and Millis, A. L. : Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community level sole carbon source utilization. *Applied and Environmental Microbiology*, **57**, 2311-2359, 1991.
6. Khoodoo, M. H. R., Sahin, F., Donmez, M. F. and Fakim, Y. J. : Molecular characterisation of Xanthomonas strains isolated from aroids in Mauritius. Systematic and Applied Microbiology. 2005 (in press).
7. Le Dantec, C., Duguet, J.-P., Montiel, A., Dumoutier, N., Dubrou, S. and Vincent, V. : Chlorine disinfection of atypical mycobacteria isolated from a water

distribution system. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 1025-1032, 2002.
8. Lee, D.-G. : Bacterial growth on GAC (granular activated carbon) in a water purifier. *Korean Journal of Environmental Health*, **29**, 133-138, 2003.
9. Lee, D.-G. : Safety Investigation of tap water and biofilm by isolated bacteria. *Korean Journal of Environmental Health*, **30**, 207-213, 2004.
10. Lee, D.-G. and Kim, S.-J. : Bacterial species in biofilm cultivated from the end of the Seoul water distribution system. *Journal of Applied Microbiology*, **95**, 317-324, 2003.
11. Lee, D.-G., Lee, J. H. and Kim, S.-J. : Diversity and dynamics of bacterial species in a biofilm at the end of the Seoul water distribution system. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **21**, 155-162, 2005.
12. Lee, D.-G., Lee, J.-H., Lee, S.-H., Ha, B.-J. and Ha, J.-M. : CLPP of biofilm on different pipe materials in drinking water distribution system. *Journal of Life Science*, **14**, 891-894, 2004.
13. Lehman, R. M., Colwell, F. S. and Bala, G. A. : Attached and unattached microbial communities in a simulated basalt aquifer under fracture- and porous-flow conditions. *Applied and Environmental Microbiology,* **67**, 2799-2809, 2001.
14. Ridgway, H. F. and Olson, B. H. : Scanning microscopic evidence for bacterial colonization of a drinking water distribution system. *Applied and Environmental Microbiology*, **41**, 274-287, 1981.
15. Schwartz, T., Hoffmann, S. and Obst, U. : Formation and bacterial composition of young, natural biofilms obtained from public bank-filtered drinking water systems. *Water Research*, **32**, 2787-2797, 1988.
16. Smalla, K., Wachtemdorf, U., Heuer, H., Liu, W.-T. and Forney, L. : Analysis of Biolog GN substrate utilization patterns by microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology,* **64**, 1220-1225, 1998.
17. Viti, C. and Giovannetti, L. : Characterization of cultivable heterotrophic bacterial communities in Cr-polluted and unpolluted soils using Biolog and ARDRA approaches. *Applied Soil Ecology*, **28**, 101-112, 2005.