

## 소독제에 따른 생물막 살균효율과 생물막 미생물집단의 탄소이용능 비교

이동근 · 이재화 · 이상현 · 하배진 · 하종명\*

신라대학교 공과대학 제약공학과

Received March 8, 2006 / Accepted April 10, 2006

**Efficiency of Different Disinfectants against Biofilm on Carbon Steel Pipe and Carbon Utilizing Ability of Biofilm.** Dong-Geun Lee, Jae-Hwa Lee, Sang-Hyeon Lee, Bae Jin Ha and Jong-Myung Ha\*. *Department of Pharmaceutical Engineering, College of Medical and Life Sciences, Silla University* – The influence of disinfectant on bacterial concentration and carbon usage patterns by Biolog GN plates were investigated for biofilm on carbon steel pipe. Heterotrophic bacterial concentrations were not different among non-, monochloramine- (1.0, 1.5 mg/l) and free chlorine- (0.5, 1.0 mg/l) treated samples ( $P = 0.56$ , ANOVA). However treatment of 1.5 mg/l free chlorine and 2.0 mg/l monochloramine showed significantly lower densities than control ( $P < 0.01$ , ANOVA). By the stepwise increase of disinfectant concentration, the carbon usage activities of biofilm microflora were decreased after increase without the decrease of bacterial concentration, following reduction of cell density. Carbon usage patterns were qualitatively and quantitatively different with similar bacterial concentrations. Principal component analysis suggested that type and concentration of disinfectant were main factors on the usage of carbons. Our result suggest that the differences of bacterial communities were different among the samples and the need of monochloramine for the reduction of biofilm in drinking water.

**Key words** – Monochloramine, free chlorine, biofilm, carbon steel pipe, drinking water, CLPP

### 서 론

미생물의 물속에서 서식형태는 부유생활과 생물막인데 이들은 세균군집 구조와 생활사가 서로 다른 것으로 알려져 있다[22]. 영양분 농도가 낮은 빈영양조건에서는 생물막을 구성하는 세균이 전체 생물량의 절반 이상을 차지한다[17].

수돗물 역시 빈영양조건이며 소독제가 존재하여 세균성장에는 불리할 것으로 생각되었지만, 관벽의 생물막에 세균이 고농도로 존재하며[11,19], 기회성병원균(opportunistic pathogen)이 검출되었다는 보고도 있다[10-12,20].

세균군집을 분석할 때 배양에 기초한 방법과 배양을 통하지 않는 방법이 있으며 수돗물도 이 두 방법이 적용되었다[11,12]. 하지만 둘 다 많은 시간과 경비가 소요된다. Biolog plate는 95개의 서로 다른 탄소원이 있어 세균종류에 따라 각 탄소원의 이용정도에 차이가 있는 점을 이용하여 세균 동정용으로 이용되고 있다[8]. 또한 Biolog plate는 세균군집의 잠재적 기능성 평가를 통해 군집을 비교하는 것으로도 이용 가능한데 이를 ‘군집수준의 생리양상’(CLPP, Community Level Physiology Profile)라고 한다[6]. CLPP는 미생물군집 각 구성원의 개별적 파악이 어려운 단점이 있지만 간편하고 분석속도가 빠르며 생리적 특성을 반영하는 장점이 있다[21]. CLPP는 각 세균의 종(species)에 따라 이용하는 탄소원

종류가 다른 것을 이용하여 군집구조를 분석하고 군집수준에서 대사활성도와 대사가능성을 평가하는 것으로, 유사한 종들로 구성된 군집들은 비슷한 CLPP를 보인다[6]. 한편 소독제가 존재하는 수돗물의 경우 비배양법은 활성을 보이는 군집구조 반영에 한계가 있을 수 있어[11,21] CLPP 등이 효율적일 것이다.

수돗물 소독을 위하여 유리잔류염소, 결합잔류염소, 오존 등이 이용되고 있는데 소독력은 오존, 유리잔류염소, 결합잔류염소 순서이지만 물속에서의 반감기는 역순이다[2]. 현재 우리나라는 주로 유리잔류염소가 이용되고 있다.

본 연구에서는 배급수관에 자주 사용되는 탄소강관에 형성된 생물막이 유리잔류염소와 대표적 결합잔류염소인 모노클로라민(monochloramine)에 노출되었을 때, 각 소독제의 생물막 살균력과 함께 미생물군집 양상을 Biolog GN plate를 이용한 CLPP로 분석하고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 모델시스템

탄소강관(carbon steel pipe)의 쿠펜을 15×75×1 mm (총 표면적 24.3 cm<sup>2</sup>)로 제작하였다. 멸균된 Milli-Q 증류수와 초음파세척기로(Branson 3210 washing sonicator, USA) 세척된 쿠펜들을, 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 처리 시점을 실험의 시작점으로 하였다. 대조구인 관말

#### \*Corresponding author

Tel : +82-51-999-5467, Fax : +82-51-999-5636

E-mail : jmha@silla.ac.kr

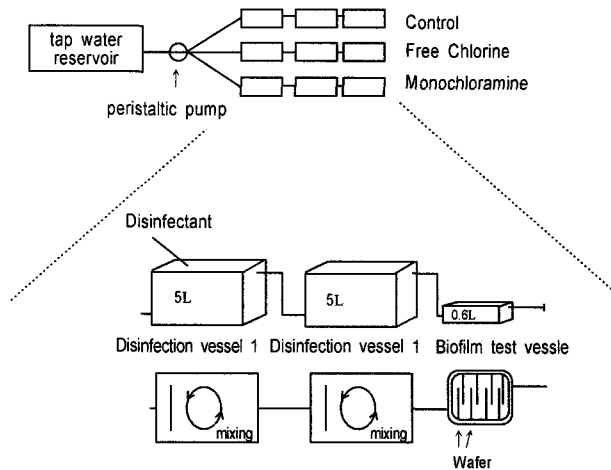


Fig. 1. Schematic diagram of semi-pilot plant system.

수돗물의 유리잔류염소와 결합잔류염소의 농도는 실험기간 동안 각각 0.2 mg/l, 0.3 mg/l 이하였다.

**소독제 제조 및 처리**

유리잔류염소는 10% NaOCl을 사용하여 그리고 결합잔류염소인 모노클로라민은 멸균된 증류수에 암모니아[ammonium sulfate; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>]와 염소(sodium hypochlorite; 10% NaOCl)의 몰비가 3:1이 되도록 제조하였다. 염소를 각 농도 별로 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 모노클로라민은 1.0, 1.5, 2.0mg/l을 단계적으로 높여 각 농도에서 3주 이상 생물막을 처리하였다.

**시료채취 및 생물막 미생물 분리**

쿠폰들을 무균적으로 채취한 후 30 ml의 탈착용액을[11] 이용하여 가역적으로 흡착한 미생물을 제거하였다. 탈착용액 100 ml에 쿠폰을 넣고 45kHz에서 초음파세척 (Branson 3210 washing sonicator, USA), 냉장, 교반, 냉장을 각 1분씩 총 3회 실시하여 생물막의 세균을 탈착시켰다[10]. 원심분리 (10,000×g, 20 min)와 멸균된 0.7% NaCl 용액을 이용한 세척을 3회 실시하여 생물막 미생물을 분리하였다. 최종적인 세포덩어리는 20 ml의 멸균된 0.7% NaCl로 희석하였다.

**세균농도측정 및 CLPP**

중속영양세균의 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 0.3g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.3g/l, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.03 g/l, agar 15 g/l)를 이용하여 측정하였다[1]. 3주, 6주, 11주 째 시료를 채취하여 각 단계의 소독제 농도에 3주 이상 노출시킨 후 CLPP를 수행하였다(Fig. 2). Biolog GN

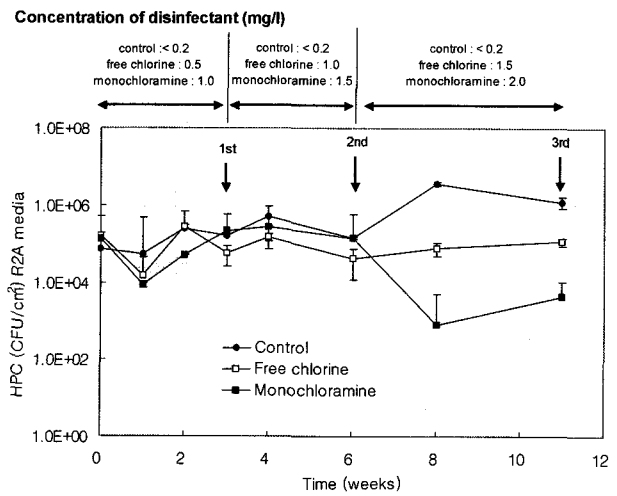


Fig. 2. Patterns of heterotrophic plate count on carbon steel in the tap water at the end of the drinking water distribution system. Arrows in figures represent the sampling time for CLPP analysis.

plate (Biolog, Hayward, CA, USA)의 각 well에 시료 180 µl 씩 접종하였고, 항습배양기(25℃)에서 4일간 배양하면서 매일 microtiter plate reader (model Vmax; Molecular Devices Corp., Menlo Park, CA.)를 이용하여 540 nm에서 광학밀도를 측정하였다. 멸균된 수돗물이 접종된 Biolog plate를 같이 배양하였고, 시료와 멸균된 수돗물의 광학밀도 차이가 나타내는 광학밀도로 간주하였다.

**통계분석**

통계분석 프로그램인 'The SAS (Statistical Analysis System) software package for Windows (ver 8.01)'을 이용하여 t-test, ANOVA, Principal Component Analysis를 수행하였다.

**결과 및 고찰**

**세균농도**

Fig. 2는 소독제 종류와 농도별로 보이는 생물막의 세균농도변화를 나타낸 그래프이다. 생물막을 형성시킨 후 각 화살표 지점에서 CLPP를 행한 후 소독제 농도를 높였다. 대조구와 처리구들 사이의 세균농도를 비교하면 유리잔류염소와 모노클로라민의 농도가 각각 1.0, 1.5 mg/l까지 적용한 6주까지는 차이가 없었고 (P = 0.56, ANOVA) 각 소독제 농도를 각각 1.5, 2.0 mg/l로 높인 6주 이후에는 세균농도의 차이가 보였고 (P < 0.01, ANOVA), 본 실험에서는 생물막의 세균농도 감소에는 유리잔류염소 1.5 mg/l, 모노클로라민 2.0 mg/l 이상이 필요한 것으로 사료되었다. LeChevallier 등[9]은 잔류염소의 농도가 4 mg/l가 되어도 강관에서 성장하는 생물막의 세균농도 감소가 없음을 보고하였는데, 본 연구 결과와

달랐다. 운전조건이나 장기적 효과 등에 대한 추후 연구가 필요할 것이다.

유리잔류염소와 결합잔류염소 사이의 세균농도를 보면 6주까지는 차이가 없었지만 ( $P = 0.40, t\text{-test}$ ) 6주 이후에는 차이가 보였다 ( $P = 0.05, t\text{-test}$ ). 모노클로라민은 유리잔류염소에 비해 생물막 살균력이 좋지만 낮은 반응성으로 유리잔류염소에 비해 높은 농도가 필요하다고 알려져 있는데[2] 본 연구도 여기에 부합되는 것으로 나타났다.

**CLPP(Community Level Physiology Profile)**

Fig. 3은 소독제 처리하지 않은 수도물과 (Fig. 3A) 유리잔류염소 (Fig.3B) 그리고 결합잔류염소에 (Fig.3C) 노출된 생물막 구성 미생물이 Biolog GN plate에서 나타내는, 각 well의 광학밀도를 매일 측정하여 나타낸 결과이다.

소독제 농도 상승에 의한 일시적인 변화의 관찰이 되지 않도록 하기 위하여 생물막이 높아진 소독제 농도에 3주 이상 노출된 후에 CLPP 분석을 하였다. 그리고 각 well 당 세균수는  $10^2$  cfu 이상으로 세포수 부족에 의한 발색 영향은 없었던

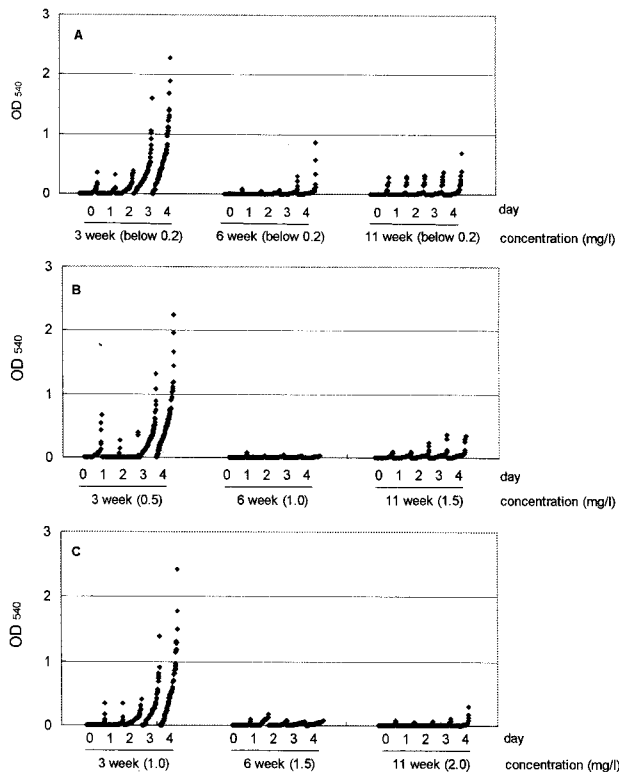


Fig. 3. Distribution of carbon usage (optical density) patterns of bacterial communities on carbon steel in tap water. Control (A) was not treated with disinfectant and others were treated with free chlorine (B) and monochloramine (C). Numbers are culture time (day) and 3, 6 and 11 week was the sampling time (see Fig. 2). Numbers in parenthesis represent concentrations of each disinfectant.

것으로[5] 사료된다. 실제로 유리잔류염소 처리구의 세균농도는 3번의 분석 모두 비슷했지만 (Fig. 2) CLPP 양상은 달라 (Fig. 3B), 세균농도가 아닌 다른 요인이 CLPP에 영향을 미치는 것으로 추정되었다. CLPP는 시료 특이적이며 재현성이 있고[7] 16S rDNA를 분석하는 비배양법과 상관관계가 높아 군집구조 분석에 유용한 것으로 알려져 있다[3,10,14-16, 18,21].

세균농도가 비슷한 3주와 6주 시료를 비교하면 (Fig. 2) 소독제 처리 유무와 소독제 종류별로 CLPP가 다르며 같은 소독제 처리를 하더라도 소독제 농도별로 CLPP가 달랐다 (Fig.3). 이러한 결과는 세균농도는 비슷하지만 시료채취시점에 따라 세균군집구조가 다르다는 보고[10,14]와 동일한 생물막의 CLPP 변화가 Cu 농도 변화에 따라 일어난 보고[18] 그리고 토양시료채취 지점보다는 오염된 탄수화물의 종류가 중요하다는 보고[16] 등과 부합되는 것이었다.

첫 번째 CLPP 분석결과를 보면 세균농도는 비슷하지만 (1st arrow in Fig. 2) 소독제를 처리한 실험구들이 대조구에 비해 활성이 높아 (Fig.3), 낮은 농도의 소독제는 생물막 군집의 탄소원 이용능을 증진시키는 것으로 관찰되었다. 소독제의 농도를 단계적으로 높일 때 탄소원 이용도의 감소가 (Fig. 3) 먼저 생기고 세균농도가 감소되었다 (Fig. 2). 본 연구에서는 소독제 농도 증가에 따라 소독제 감수성이 높은 세균들은 사멸하고 내성을 보이는 세균들만 성장하여 전체적인 탄소원 이용도가 감소하였고, 고농도의 소독제에서는 내성을 보이는 세균들의 성장속도도 둔화되는 것으로 사료되었다.

Table 1은 첫 번째 CLPP를 수행한 소독제 처리 시료들을 대상으로 4일째 광학밀도(Optical Density, OD)가 1.00 이상인 탄소원들을 내림차순으로 나열한 것이다. 세균 농도는 유사하였지만 (1st in Fig.2) OD가 1.00 이상인 탄소원의 개수가 소독제 처리별로 차이가 있어 (Table 1) 이미 군집의 구조나 생리의 변화가 일어났던 것으로 추측할 수 있었다. 공통적으로 L-glutamic acid와 succinamic acid가 가장 이용이 잘

Table 1. Actively used carbon sources by biofilm in each disinfectant

Rank	Free chlorine (0.5 mg/l)	Monochloramine (1.0 mg/l)
1	L-glutamic acid	L-glutamic acid
2	succinamic acid	succinamic acid
3	urocanic acid	L-histidine
4	citric acid	L-asparagine
5	γ-aminobutyric acid	urocanic acid
6	L-asparagine	cis-aconitic acid
7	L-arabinose	γ-aminobutyric acid
8	adonitol	citric acid
9	L-aspartic acid	adonitol
10	i-erythritol	
11	β-hydroxy butyric acid	
12	D-galactonic acid lactone	

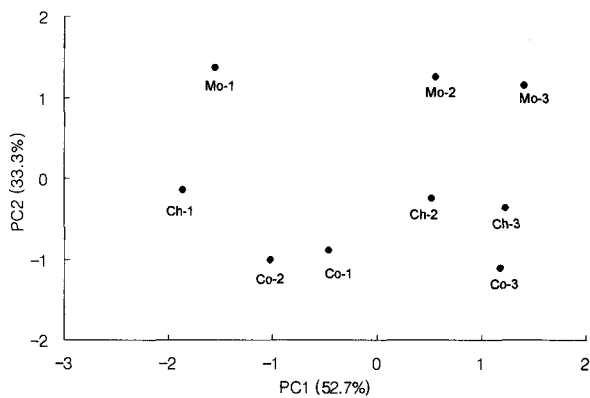


Fig. 4. Principal component analysis for the average values of each sample in the CLPP analysis.

되었으며 총 7종류가 공통적이었다. 배타적으로 이용되는 탄소원은 모노클로라민에서 2개, 유리잔류염소에서 5개로 (Table 1) 모노클로라민 처리구에서는 활성을 보이는 군집구조의 단순화 등 서로 상이한 군집구조에 의한 결과일 가능성이 높은 것으로 생각되었다.

각 시료를 구성하는 세균들의 탄소원 이용도에 영향을 미치는 요인들을 주요인분석(principal component analysis, PCA)으로 분석하였다. Fig. 4는 4일째 보이는 광학밀도의 평균값을 이용하여 주요인분석을 수행한 결과이다. 첫번째 주요인(PCA)과 두번째 주요인 (PC2), 세 번째 주요인 (PC3)이 각각 52.7, 33.3, 14.0%의 비중으로 탄소원 이용도에 영향을 미치는 것으로 나타났다. PC2는 소독제 처리 유무와 소독제 종류로 생각되었고 결합잔류염소 처리구가 많은 차이를 보였다. PC1과 PC3는 소독제 농도 혹은 시료채취시기로 사료되었다.

광학밀도 평균값을 이용하는 AWCD (average well color development)법에서는[7] 소독제 처리한 시료사이의 차이를 발견할 수 없었고, PCA법과 (Fig.4) 탄소원 이용의 정량적 결과로 (Fig. 3) 소독제 종류, 시료채취시기, 소독제 농도별로 군집구조의 차이가 있을 것으로 추정할 수 있었다. 그리고 각 탄소원 이용도를 조사하여 (Table 1) 군집구조의 차이를 더 강하게 추정할 수 있었다. 본 연구의 결과가 시료채취 당시의 미생물군집을 구성하는 종의 비율이 유지된 채 나타나는 활성도가 아닌, 일부 종의 성장에 의한 결과일 가능성이 있다[20]. 하지만 일부 종의 성장에 의한 결과라 하더라도 각 탄소원의 정성적, 정량적 이용이 다른 점은 군집구성 종의 차이에 의한 결과라 할 것이며 소독제 종류와 농도에 따라 이용할 수 있는 탄소원 이용의 정성적 (Table 1), 정량적 (Fig. 3) 값이 다르므로 미생물군집이 서로 상이함을 시사하는 결과라 할 것이다.

요 약

수돗물에서 생성된 탄소강관위의 생물막에 유리잔류염소

와 모노클로라민을 처리하여 세균농도 변화와 그에 따른 탄소원 이용능을 조사하였다. 소독제 농도를 단계적으로 올렸을 때 중속영양세균의 농도는 모노클로라민과 유리잔류염소의 농도가 각 1.5, 1.0 mg/l까지는 대조구에 비해 감소가 없었지만 (P = 0.56, ANOVA) 모노클로라민 2.0 mg/l, 유리잔류염소 1.5 mg/l 일때 감소되었다 (P < 0.01, ANOVA). 소독제의 농도를 단계적으로 높일때 세균활성의 증가 후 감소 그리고 세균농도의 감소가 관찰되었다. 세균농도가 유사하더라도 각 탄소원에 대한 정량적, 정성적 이용도가 서로 달라 군집구조가 상이할 것으로 생각되었다.

References

1. APHA. 1995. *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 19th edition. Washington, DC. 9.1-9.38.
2. AWWA. 1999. *Water quality and treatment: A handbook of community water supply*, 5th edition, McGraw-Hill, New York. 14.1-14.15
3. Braun, B., U. Böckelmann, E. Grohmann and U. Szewzyk. 2005. Polyphasic characterization of the bacterial community in an urban soil profile with *in situ* and culture-dependent methods. *Appl. Soil. Ecol.* **31**, 267-279.
4. Degens, B. P. and J. A. Harris. 1997. Development of a physiological approach to measuring the catabolic diversity of soil microbial communities. *Soil Biol. Biochem.* **29**, 1309-1320.
5. Gamo, M. and T. Shoji. 1999. A method of profiling microbial communities based on a most-probable-number assay that uses BIOLOG plates and multiple sole carbon sources. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4419-4424.
6. Garland, J. L. and A. L. Millis. 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community level sole carbon source utilization. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2311-2359.
7. Garland, J. L. 1996. Analytical approaches to the characterisation of sample microbial communities using patterns of potential C source utilisation. *Soil Biol. Biochem.* **28**, 213-221.
8. Khoodoo, M. H. R., F. Sahin, M. F. Donmez and Y. J. Fakim. 2005. Molecular characterisation of *Xanthomonas* strains isolated from aroids in Mauritius. *Syst. Appl. Microbiol.* **28**, 366-380.
9. LeChevallier, M. W., C. D. Lowry and R. G. Lee. 1990. Disinfection of biofilms in a model distribution system. *J. Am. Water Works Assoc.* **82**, 87-99.
10. Lee, D.-G. 2003. Bacterial growth on GAC (granular activated carbon) in a water purifier. *Korean J. Env. Heal.* **29**, 133-138.
11. Lee, D.-G. 2004. Safety Investigation of tap water and biofilm by isolated bacteria. *Korean J. Env. Heal.* **30**, 207-213.
12. Lee, D.-G. and S.-J. Kim. 2003. Bacterial species in biofilm cultivated from the end of the Seoul water distribution system. *J. Appl. Microbiol.* **95**, 317-324.

13. Lee, D.-G., J.-H. Lee, S.-H. Lee, B.-J. Ha and J.-M. Ha. 2004. CLPP of biofilm on different pipe materials in drinking water distribution system. *J. Life Sci.* **14**, 891-894.
14. Lee, D.-G., C. H. Lee and S.-J. Kim. 2005. Diversity and dynamics of bacterial species in a biofilm at the end of the Seoul water distribution system. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 155-162.
15. Lehman, R. M., F. S. Colwell and G. A. Bala. 2001. Attached and unattached microbial communities in a simulated basalt aquifer under fracture- and porous-flow conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 2799-2809.
16. Mphokgo, P., Maila, P. Randima, K. Drønen and Thomas E. Cloete. 2006. Soil microbial communities: Influence of geographic location and hydrocarbon pollutants. *Soil Biol. Biochem.* **38**, 303-310.
17. Marshall, K. C. 1988. Adhesion and growth of bacteria at surfaces in oligotrophic habitats. *Can. J. Microbiol.* **34**, 503-506.
18. Boivin, M.-E. Y., B. Massieux, A. M. Breure, G. D. Greve, M. Rutgers and W. Admiraal. 2006. Functional recovery of biofilm bacterial communities after copper exposure. *Environ. Poll.* **140**, 239-246.
19. Ridgway, H. F. and B. H. Olson. 1981. Scanning microscopic evidence for bacterial colonization of a drinking water distribution system. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**, 274-287.
20. Schwartz, T., S. Hoffmann and U. Obst. 1998. Formation and bacterial composition of young, natural biofilms obtained from public bank-filtered drinking water systems. *Water Res.* **32**, 2787-2797.
21. Smalla, K., U. Wachtemdorf, H. Heuer, W.-T. Liu and L. Forney. 1998. Analysis of Biolog GN substrate utilization patterns by microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 1220-1225.
22. Szewzyk, U., R. Szewzyk, W. Manz and K.-H. Schleifer. 2000. Microbiological safety of drinking water. *Ann. Rev. Microbiol.* **54**, 81-127.
23. Viti, C. and L. Giovannetti. 2005. Characterization of cultivable heterotrophic bacterial communities in Cr-polluted and unpolluted soils using Biolog and ARDRA approaches. *Appl. Soil Eco.* **28**, 101-112.