

# 수도관 재질에 따른 생물막 형성 미생물의 Community-Level Physiological Profile(CLPP) 특성

## Characteristics of Community-Level Physiological Profile (CLPP) of Biofilm Microorganisms Formed on Different Drinking Water Distribution Pipe Materials

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

Park, Se-Keun<sup>1</sup> · Lee, Hyun-dong<sup>2</sup> · Kim, Yeong-Kwan<sup>1,\*</sup>

1 강원대학교 환경공학과

2 한국건설기술연구원

(2006년 4월 19일 논문 접수; 2006년 5월 23일 최종 수정논문 채택)

### Abstract

This study investigated the physiological characteristics of biofilm microorganisms formed onto the different drinking water distribution pipe surfaces. The simulated drinking water distribution pipe system which had several PVC, STS 304, and GS coupons was operated at flow velocity of 0.08 m/sec (Re 1,950) and 0.28 m/sec (Re 7,300), respectively. At velocity of 0.08 m/sec, the number of viable heterotrophic bacteria in the biofilm over the 3 months of operation averaged  $3.3 \times 10^4$ ,  $8.7 \times 10^4$ , and  $7.2 \times 10^3$  CFU/cm<sup>2</sup> for PVC, STS, and GS surfaces, respectively. The number of attached heterotrophic bacteria averaged  $1.4 \times 10^3$ ,  $5.6 \times 10^2$ , and  $6.5 \times 10^2$  CFU/cm<sup>2</sup> on PVC, STS, and GS surfaces at the system with relatively high flow velocity of 0.28 m/sec. The changes of physiological profile of biofilm-forming microorganisms were characterized by community-level assay that utilized the Biolog GN microplates. Biofilms that formed on different pipe surfaces displayed distinctive patterns of community-level physiological profile (CLPP), which reflected the metabolic preference for different carbon sources and/or the utilization of these carbon sources to varying degrees. The CLPP patterns have shown that the metabolic potential of a biofilm community was different depending on the pipe material. The effect of the pipe material was also characterized differently by operation condition such as flow rate. At flow velocity of 0.08 m/sec, the metabolic potential of biofilm microorganisms on GS surface showed lower levels than PVC and STS biofilms. For biofilms on pipe material surfaces exposed to water flowing at 0.28 m/sec, the metabolic potential was in order of PVC>GS>STS. Generally, the levels of the bacterial biofilm's metabolic potentials were shown to be notably higher on pipe surfaces exposed to water at 0.08 m/sec when compared to those on pipe surfaces exposed to water at 0.28 m/sec.

**Key words:** biofilm, drinking water, pipe material, community-level physiological profiles (CLPP), metabolic potential

**주제어:** 생물막, 수돗물, 관 재질, community-level physiological profile(CLPP), 물질대사능력

\*Corresponding author Tel: +82-33-250-6353, FAX: +82-254-6357, E-mail: yeong@kangwon.ac.kr (Kim, Y.K.)

## 1. 서론

생물막은 미생물이 분비한 세포외분비물질(extracellular polymeric substances, EPS)과 함께 미생물이 결합하여 고체 표면에 형성된 층으로서(Characklis and Marshall, 1990), 배·급수 시스템에서는 주로 관 표면과 저수조의 내벽에서 생물막 형성이 발견되고 있다. 배·급수관 내부 표면에서의 생물막 형성은 수도물의 화학적 및 미생물학적 수질에 부정적인 영향을 미칠 뿐만 아니라 소독제의 소독 효과를 감소시켜 소독제의 사용량을 증가시키는 원인이 되고 있다(Percival et al., 2000).

수도관에서의 생물막 형성은 수도물의 BOM(biodegradable organic matter)과 소독제 농도 등을 포함한 여러 환경 요인들의 복합적인 작용에 의해 영향을 받을 수 있는데(Ollos et al., 2003; Percival, 2000), 여러 인자들 중에서 수도물 운송을 위한 수도관의 물리·화학적 재질 특성에 따라라도 생물막 형성은 차이를 나타낼 수 있는 것으로 보고되고 있다(Camper et al., 2003; Niquette et al., 2000). 특히 관 표면의 조도(roughness)는 미생물 부착에 영향을 미치는 중요한 인자로 알려지고 있으며(Percival et al., 1998), 부식과 같은 재질의 안정성도 생물막 형성을 자극하는 원인이 될 수 있다(LeChevallier et al., 1996). van der Kooij et al.(1995)은 수도물과 접촉한 관 재질은 수도물에 생분해 가능한 화합물을 발생시켜 생물막 형성을 증가시킬 수 있는 원인이 될 수 있다고 지적하였다. 더불어 Schwartz et al.(1998)이 PE와 PVC 재질에서 형성된 생물막은 주로  $\beta$ -와  $\gamma$ -*Proteobacteria*에 속하는 세균으로 구성된 반면에 강(steel) 재질의 생물막에서는  $\beta$ -*Proteobacteria*의 구성 비율이 높았다고 보고한 것처럼 관 재질은 생물막을 구성하는 미생물 군집의 조성에도 영향을 미칠 수 있다. 관 재질과 생물막 형성을 다룬 최근의 연구들에서는 철(iron) 재질이 PVC(polyvinyl chloride), PE(polyethylene), 시멘트 라이닝 등의 관 재질보다 생물막 형성 정도가 더 높은 것으로 보고되었다(Camper et al., 2003; Hallam et al., 2001; Niquette et al., 2000). 한편 Schwartz et al.(2003)은 구리(copper) 재질에서 형성된 생물막 세균의 활성도가 PE, PVC,

강 재질에서 형성된 생물막의 활성도보다 낮았다고 보고하였다. 생물막 형성과 관 재질을 다룬 대부분의 연구들은 수도물의 수질 특성이나 배·급수 시스템의 운전조건에 따라 생물막의 형성에 미치는 관 재질의 영향이 다르게 나타날 수 있음을 지적하고 있다.

수도관 표면에서 형성되는 생물막 수준을 분석하기 위해 heterotrophic plate count(HPC)를 비롯하여 adenosinetriphosphate(ATP), potential exoproteolytic activity(PEPA), acridine orange direct count(AODC), 4',6-diamidino-2-phenyl indole(DAPI), 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride(CTC) 등을 이용한 여러 방법이 사용되고 있다. 또한 미생물 군집 구조를 분석하기 위해 polymerase chain reaction(PCR)이나 fluorescent *in situ* hybridization(FISH) 등을 이용한 분자학적 방법이 사용되고 있다. 최근에는 몇몇 연구자들이 환경조건의 변화에 따라 수도관에서 생물막을 형성하는 미생물 군집의 생리학적 및 기능적 특성을 간편하고 빠르게 분석할 수 있는 방법으로서 Biolog gram negative(GN) microplate를 이용한 community-level assay를 적용하였다(박 등, 2004, 2005; Park et al., 2006).

Community-level assay는 종속영양성 미생물의 군집 특성을 평가하기 위한 방법으로 community-level physiological profile(CLPP)로 알려져 있다(Garland and Mills, 1991; 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. 접촉된 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. Biolog GN microplate에 함유된 95개의 탄소원은 11개 그룹으로 분류된다(Garland and Mills, 1991): polymers( $n=5$ ), carbohydrates( $n=28$ ), esters( $n=2$ ), carboxylic acids( $n=24$ ), brominated chemicals( $n=1$ ), amides( $n=3$ ), amino acids( $n=20$ ), aromatic chemicals( $n=4$ ), amines( $n=3$ ), alcohols

( $n=2$ ), phosphorylated chemicals( $n=3$ ). Biolog GN microplate는 원래 그람 음성 세균을 동정하기 위한 목적으로 개발되었으나, 이러한 미생물 군집의 분류 기능과 더불어 군집 수준의 유사성과 차이점을 평가하는데 유용하다는 것이 알려지면서 여러 가지 환경 시료(예, 토양, 담수, 활성슬러지, 해수 등)에 적용하고 있다.

생물막 형성과 관 재료의 상호관계에 대한 이해 증진을 위해 본 연구에서는 생물막 형성에 미치는 관 재료의 영향을 다룬 기존의 연구와는 다른 측면에서 community-level assay를 이용하여 수도관에서 형성되는 생물막 미생물의 CLPP 패턴을 분석함으로써 수도관 재료에 따른 생물막 형성 미생물의 생리학적 또는 기능적 특성을 비교 조사하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 실험장치 및 운전조건

Fig. 1은 실험에 사용한 모형 수도관의 개략도이며, 동일한 규격의 수도관 2set를 실험에 이용하였다. 모형 수도관은 전체 길이가 5m이고 내부 단면적이  $9\text{cm}^2$  ( $3\text{cm} \times 3\text{cm}$ )인 정사각형 구조로서, 관을 따라 80 개소에 test plug를 설치할 수 있도록 되어 있다. Test plug는 수도관 시편을 부착하기 위한 용도로 사용하

였으며, Fig. 1과 같이 직경이 20mm가 되게 홈을 낸 모형 수도관 표면에 설치할 수 있도록 제작하였다.

실험에서 수도관 재료로는 두께가 2mm이고 유효 표면적이 각각 2.0, 2.27, 2.27 $\text{cm}^2$ 인 PVC, STS (stainless steel) 304, GS(galvanized steel) 시편을 사용하였다. 모든 시편은 모형 수도관에 설치하기 전에 test plug에 부착시켜서 증류수로 수회 세척한 후 clean bench에서 건조시켰다.

재료(PVC, STS, GS)에 따른 생물막 형성을 알아보기 위한 본 실험에서는 모형 수도관에서의 유속을 0.08m/sec와 0.28m/sec로 각각 유지하였다. 즉, 시편(PVC, STS, GS)을 설치한 모형 수도관 2set 중 1set는 수도관내 유속이 0.08m/sec가 되도록 정량펌프(peristaltic pump)를 이용하여 수돗물을 4L/min의 유량으로 모형 수도관에 연속적으로 공급하였으며, 나머지 1set는 관내 유속을 0.28m/sec로 유지하기 위하여 수돗물을 15L/min으로 공급하여 운전하였다. 관내 유속 0.08m/sec와 0.28m/sec에 대한 이론적인 Re(Reynolds number)는 각각 1,950과 7,300이다. Re는 유체입자에 작용하는 관성력과 점성력의 비로서, Re 1,950과 7,300은 각각 층류흐름과 난류흐름으로 볼 수 있다. 모형 수도관은 실내( $13 \sim 15^\circ\text{C}$ )에서 3개월 동안 운전하였으며, 운전 시작으로부터 각각 20, 40, 70, 90일 경과 후에 수도관 시편 표면에서 생물막

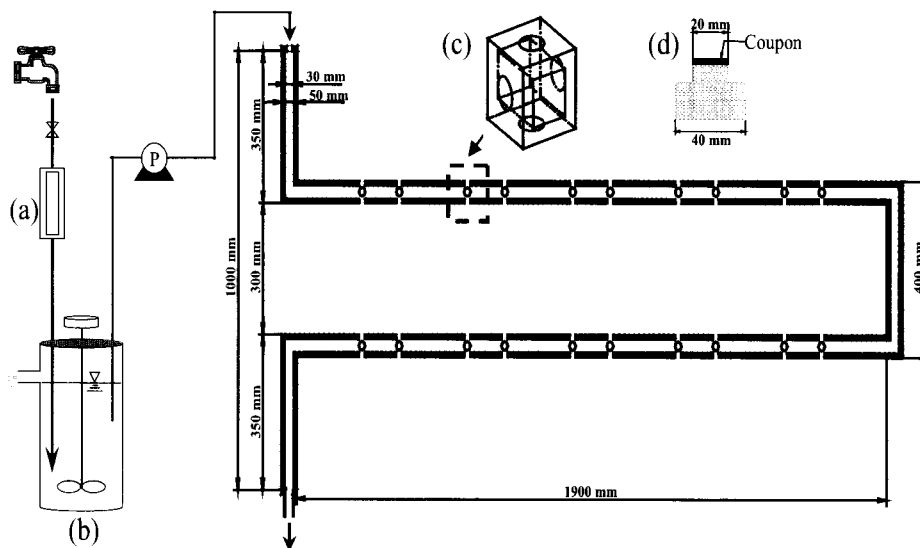


Fig. 1. Schematic diagram of the simulated water distribution pipe used in experiment: (a) flowmeter, (b) tank, (c) pipe section, (d) biofilm test plug.

**Table 1.** Characteristics of the tap water sample used in experiment

Parameters	Average	Range	n <sup>a</sup>
pH	6.87	6.80~7.20	50
Total chlorine (mg/L)	0.22	0.10~0.30	65
Free chlorine (mg/L)	0.20	0.05~0.28	65
Alkalinity (mg/L as CaCO <sub>3</sub> )	38.5	30~50	30
Hardness (mg/L as CaCO <sub>3</sub> )	55.5	42~64	30
NH <sub>3</sub> -N (mg/L)	0.025	0.003~0.048	30
PO <sub>4</sub> -P (mg/L)	0.010	0.005~0.025	30
TOC (mg/L)	0.57	0.52~0.65	65
BDOC (mg/L)	0.25	0.10~0.48	35
AOC (μg/L)	38.0	25.0~45.5	35
HPC (CFU/mL)	15	3~50	50

<sup>a</sup>n: number of measurements during a 3-month period

형성을 조사하였다.

실험에 사용한 수돗물 시료는 배·급수 계통을 거쳐 실험실로 공급되는 수돗물이었으며, **Table 1** 은 모형 수도관에 공급한 수돗물의 물리·화학적 및 미생물학적 수질 특성이다. 수돗물에서 검출된 잔류염소의 평균 농도는 0.20mg/L이었으며, TOC(total organic carbon) 농도는 0.57mg/L이었고, AOC(assimilable organic carbon)와 BDOC(biodegradable dissolved organic carbon)의 평균 농도는 각각 38μg/L과 0.25mg/L이었다. 그리고 수돗물에서 검출된 평균 HPC(heterotrophic plate count)는 15CFU/mL이었다.

### 2.3. 분석방법

#### 2.3.1. 생물막 시료 회수

수도관 시편 표면에 형성된 생물막을 회수하기 위해 ultrasonic cleaner(Model 2210, Branson<sup>®</sup>)와 cell scraper(Becton & Dickinson Co.)를 이용하였다(Gagnon and Slawson, 1999). 시편에 가역적으로 부착한 생물막 세균을 증류수로 우선 제거한 후 시편을 60mL 인산염 완충용액(0.3mM, pH 7.2)에 옮겨 ultrasonic cleaner로 3분씩 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 R2A-agar(Difco)를 이용한 도말

평판법과 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 assay

Community-level assay는 시편으로부터 회수한 생물막 현탁액 시료를 Biolog GN microplate(Biolog Inc., Hayward, CA)의 각 well당 150μL씩 직접 접종한 후 30°C에서 5일간 배양하였다(박 등, 2004; Park et al., 2006). 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<sub>590</sub>>0.25)을 positive well로 간주하였다.

Community-level assay를 이용하여 작성한 CLPP 패턴은 기질이용수와 MPI(metabolic potential index)에 근거하여 분석하였다. 기질이용수는 탄소원을 함유한 95개 well 중에서 positive well(A<sub>590</sub>>0.25)의 전체수로 나타냈다(Zak et al., 1994). 그리고 MPI는 다음 식과 같이 Biolog GN microplate에서의 전체 positive well 수(S)와 평균 흡광도 값(A·P)을 곱해서 나타냈다(박 등, 2004; Park et al., 2006). 이러한 MPI는 미생물이

이용한 기질수와 이용한 각 기질에 대한 평균 활성도를 포함시킨 지수로서 미생물 군집의 물질 대사 능력을 절대값으로 나타내기 위함이다.

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

여기서,  $i$ : well 번호(1, 2, ..., 95),

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

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

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

$A \cdot P$ : Biolog GN microplate에서 측정된 평균 흡광도.

### 2.3.4. 생물막 관찰

관 표면에 형성된 생물막은 주사형 현미경(SEM, scanning electron microscope)을 이용하여 관찰하였다. 먼저, 모형 수도관에서 회수한 시편을 2.5%(w/v) glutaraldehyde에 옮기고 4°C에서 생물막을 고정시켰다. 그리고 고정된 시편을 0.1M phosphate buffer(pH 7.2)로 세척한 후에 ethanol 농도를 50~100%까지 10%씩 증가시키면서 탈수(dehydration)시키고 임계 점건조기(critical point dryer)로 건조시켰다. 건조한 시편은 ion sputter(Model E-1010, HITACHI)에서 Pt-Pd로 coating한 후 SEM(Model S-4300, HITACHI)을 이용하여 적당한 배율에서 생물막을 관찰하였다.

### 2.3.5. 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, Tekmar-

Dohrmann)를 이용하여 측정하였으며, BDOC는 미생물이 부착된 모래  $100 \pm 10g$ 를 수돗물 시료 300mL에 첨가하여 5일간 배양한 후 DOC 차이로 측정하였다(Park et al., 2004). AOC는 *Pseudomonas fluorescens* strain P17 & *Aquaspirillum* sp. strain NOX method를 이용하여 분석하였다(APHA et al., 1998). 수돗물에 존재하는 부유성 HPC는 R2A-agar를 이용한 막여과법과 도말평판 방법으로 분석하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 생물막 형성

Fig. 2는 수돗물을 0.08m/sec(Re 1,950)의 유속으로 3개월 동안 연속적으로 공급한 모형 수도관의 PVC, STS, GS 시편 표면을 SEM으로 관찰한 사진이다. 수돗물과 접촉한 PVC, STS, GS 시편의 모든 표면에서 생물막을 형성하는 세균이 부착되어 있음을 확인할 수 있었는데, 이는 Table 1과 같이 AOC나 BDOC가 낮은 빈영양성 수돗물일지라도 수돗물에 존재하는 미생물이 수도관 표면에 부착하여 생물막을 형성할 수 있다는 것을 의미한다. 수도관 시편 표면에서는 약 5  $\mu m$ 보다 작은 크기의 자루형(stalked-shaped), 간상형(rod-shaped), 구형(spherical-shaped) 세균이 두드러지게 관찰되었으며, 대부분 세균들은 표면에 침적된 입자성 물질과 결합한 상태로 존재하였다. 그러나 전반적인 SEM 관찰에서는 재질에 따른 생물막 형성 세균의 형태적 차이는 뚜렷하지 않았다.

Fig. 3은 수돗물을 각각 0.08m/sec(Re 1,950)과 0.28 m/sec(Re 7,300)의 유속으로 공급한 모형 수도관에서 운전기간 20, 40, 70, 90일째에 PVC, STS, GS 표면에 형성된 생물막 수준을 HPC로 측정하여 나타낸 결과이다. 수돗물을 0.08m/sec의 유속으로 공급한 수도관의 PVC, STS, GS 표면에 대한 부착성 HPC의 수준은 각각  $10^3 \sim 10^4$ ,  $10^4 \sim 10^5$ ,  $10^3 \sim 10^4$ CFU/cm<sup>2</sup>이었다(Fig. 3a). 그리고 유속이 0.28m/sec인 수도관의 PVC, STS, GS 표면에서 검출된 부착성 HPC의 수준은 각각  $10^2 \sim 10^3$ ,  $10^2 \sim 10^3$ ,  $10^1 \sim 10^2$ CFU/cm<sup>2</sup>이었다(Fig. 3b). 생물막을 형성하는 부착성 HPC의 수준은 수돗물을 0.08m/sec의 유속으로 공급한 수도관에서 보다 유속을 상대적으로 빠르게 운전한 수도관에서 1~2log CFU/cm<sup>2</sup> 정도가 낮았다. 유속이 빠른 수

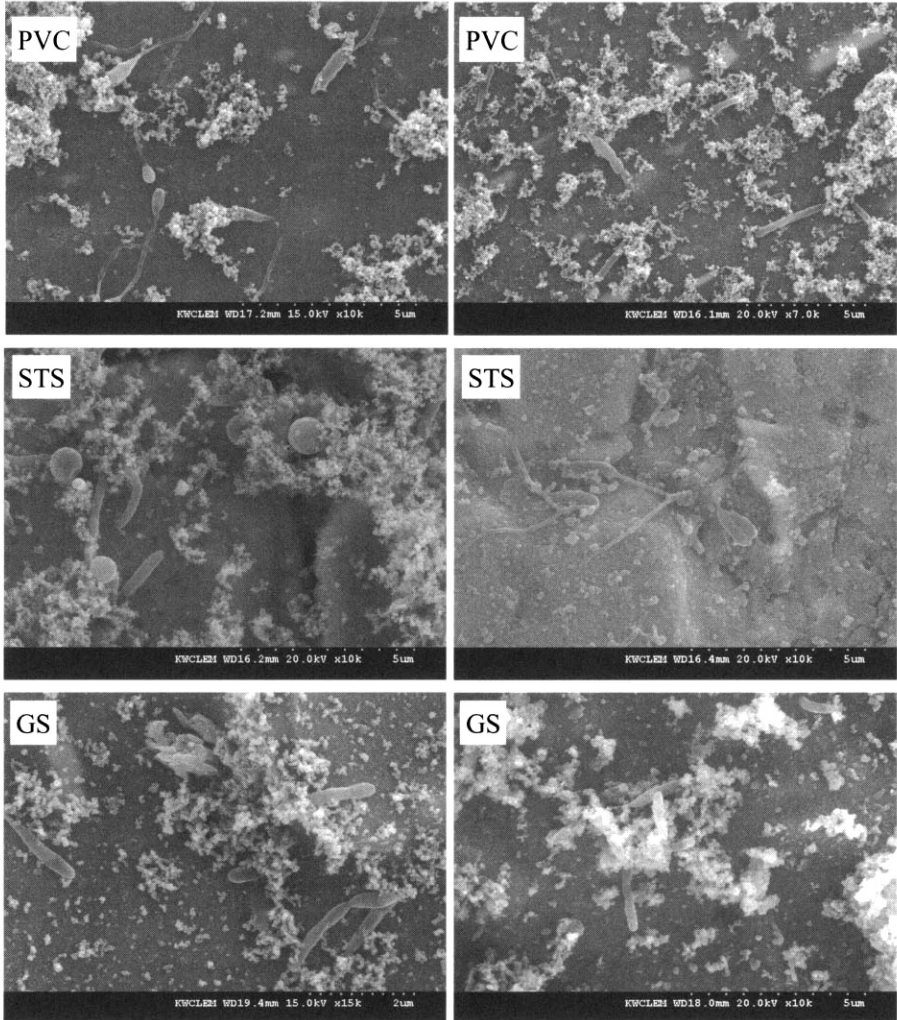


Fig. 2. SEM photos showing biofilms formed on several coupons after 3-months exposure to tap water at 0.08 m/sec (Re 1,950) of flow velocity.

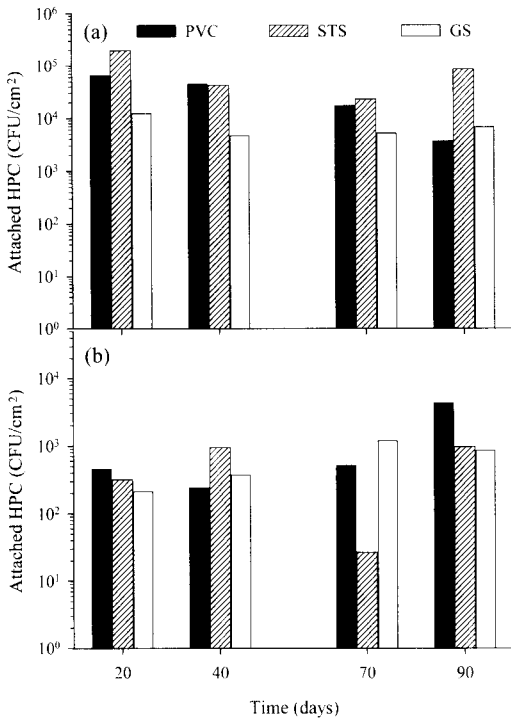
도관일수록 관 표면과 인접한 부분에서 유체의 지속적인 변동이라든가 전단력이 증가하게 되어 생물막 형성이 감소한 것으로 판단된다(박 등, 2004).

전반적으로 동일 조건의 수도관에서 재질에 따른 부착성 HPC의 차이는 약 1log CFU/cm<sup>2</sup> 이하로서 생물막을 형성하는 부착성 HPC의 수준에 미치는 재질의 영향은 그렇게 크지 않았다. Fig. 3a와 같이 수돗물을 0.08m/sec의 유속으로 공급한 수도관의 경우 GS 표면에 형성된 생물막 HPC 수준을 기준으로 볼 때 PVC와 STS에서 검출된 부착성 HPC의 수준이 평균적으로 각각 0.49와 0.98log CFU/cm<sup>2</sup> 높았다. 또한

Fig. 3b같이 수돗물을 0.28m/sec의 유속으로 공급한 수도관의 경우에는 부착성 HPC의 수준에 미치는 재질의 효과는 더욱 작게 나타났는데, STS와 PVC 사이의 부착성 HPC의 평균적인 차이는 0.37log CFU/cm<sup>2</sup>이었고, STS와 GS 사이의 부착성 HPC의 평균적인 차이는 0.06log CFU/cm<sup>2</sup>이었다.

### 3. 2. 생물막 형성 미생물의 CLPP 패턴

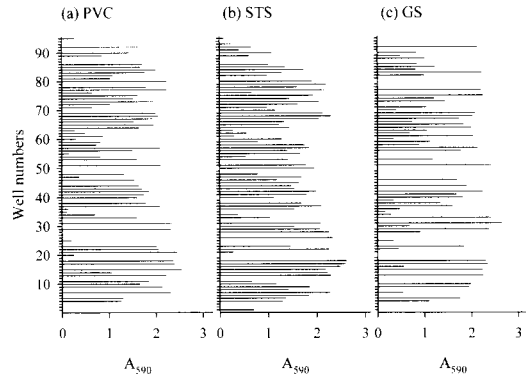
Fig. 4는 0.08m/sec(Re 1,950)의 유속으로 수돗물을 공급한 모형 수도관에 설치한 시편(PVC, STS, GS) 표면으로부터 회수한 생물막 시료를 Biolog GN



**Fig. 3.** Viable counts of heterotrophic bacteria in the biofilms formed on PVC, STS, and GS surfaces in simulated drinking water distribution pipes which were operated at either (a) 0.08m/sec (Re 1,950) or (b) 0.28m/sec (Re 7,300) of flow velocity.

microplate에 직접 접종하여 5일간 배양함으로써 PVC, STS, GS 표면에 형성된 생물막 미생물이 각각 나타낸 CLPP 패턴으로서, y축은 서로 다른 탄소원이 1개씩 포함된 Biolog GN microplate의 well 번호를 의미한다: 1-5, polymers: 6-33, carbohydrates: 34-35, esters: 36-59, carboxylic acids: 60, brominated chemical: 61-63, amides: 64-83, amino acids: 84-87, aromatic chemicals: 88-90, amines: 91-92, alcohols: 93-95, phosphorylated chemicals. 그리고 x축은 생물막 미생물이 형성기간 동안 Biolog GN microplate의 95개 탄소원들 중에서 이용한 탄소원들에 대한 평균 흡광도 값이다.

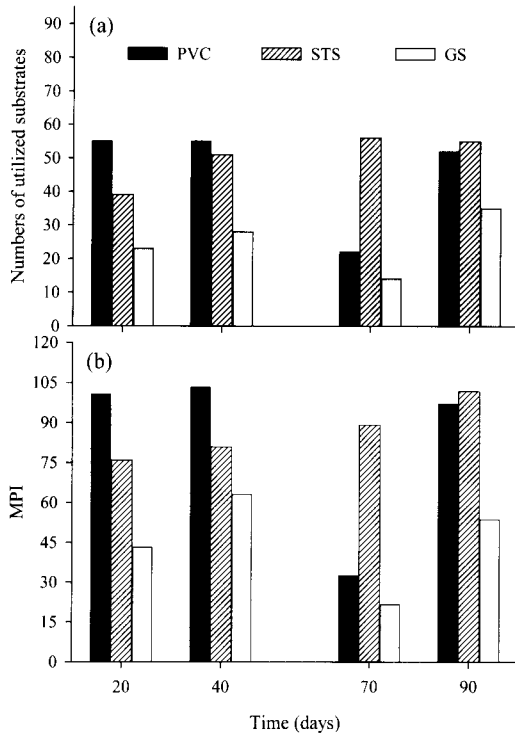
CLPP 패턴은 제공된 기질의 이용을 의미하는 물질대사 능력 (metabolic potential)과 관련이 있는데 (Wünsche et al., 1995), 생물막 형성 미생물의 CLPP 패턴은 재질에 따라 차이를 나타냈다. Fig. 4의 CLPP 패턴과 같이 생물막 미생물은 공통적으로 몇몇 탄소



**Fig. 4.** CLPP patterns of biofilm microorganisms formed on several pipe surfaces exposed to tap water at 0.08m/sec (Re 1,950) of flow velocity.

원 (dextrin, glycogen, *i*-erythritol,  $\alpha$ -D-lactose, D-melibiose, D-raffinose, turanose, itaconic acid,  $\alpha$ -keto valeric acid, thymidine, glucose-1-phosphate)에 대해서는 전혀 대사 능력을 나타내지 않았지만, STS 표면에 형성된 생물막 미생물은 형성기간 동안 Biolog GN microplate의 95개 탄소원들 중에서 각각 69종과 60종의 탄소원을 이용한 PVC와 GS 표면의 생물막 미생물보다 상대적으로 많은 78종의 탄소원을 이용하는 특징을 보였다. 특히 STS 표면에 형성된 생물막 미생물은 PVC와 GS 표면에서 형성된 생물막 미생물과는 달리 특정 탄소원 ( $\alpha$ -cyclodextrin, N-acetyl-D-galactosamine, adonitol, D-psicose,  $\alpha$ -hydroxybutyric acid, D-serine, 2,3-butanediol, D,L- $\alpha$ -glycerol phosphate)을 추가적으로 이용하는 능력을 나타냈다. 또한 GS 표면에 형성된 생물막 미생물은 STS와 PVC 표면에 형성된 생물막 미생물이 이용한 몇몇 탄소원 (celloboise, L-fucose, maltose, D-glucosaminic acid,  $\gamma$ -hydroxybutyric acid, p-hydroxy phenylacetic acid, malonic acid, propionic acid, L-histidine, L-phenylalanine, L-pyroglyutamic acid, glucose-6-phosphate)을 전혀 이용하지 않는 특징을 보이기도 하였다. 이러한 결과는 동일한 운전조건에서 수질 특성이 같은 수도물을 공급한 수도관에서도 서식처 역할을 하는 재질에 따라 형성되는 생물막 미생물의 기질이용다양성이 서로 차이를 나타낼 수 있다는 것으로 의미한다.

Fig. 5는 각각의 재질별 형성기간에 따라 생물막 미



**Fig. 5.** (a) Numbers of utilized substrates and (b) MPI (metabolic potential index) of biofilm microorganisms formed on several pipe surfaces exposed to tap water at 0.08m/sec (Re 1,950) of flow velocity.

생물이 나타낸 CLPP 패턴에 기초하여 생물막 형성 미생물의 물질대사 능력 차이를 비교하기 위해 사용된 생물막 미생물의 기질이용수와 MPI 변화를 분석한 결과이다. Fig. 5a에 제시한 바와 같이 수도물을 0.08m/sec의 유속으로 공급한 수도관에서 PVC, STS, GS 표면에 각각 형성된 생물막 미생물이 형성기간 동안 이용한 기질의 수는 각각 22~55, 39~56, 14~35 범위이었다. 그리고 미생물의 기질이용수와 이용 기질의 활성도를 이용하여 산출한 지수인 MPI의 경우 형성기간 동안 재질별로 각각 32.6~103.3(PVC), 75.9~101.8(STS), 21.5~63.2(GS) 범위이었다(Fig. 5b). 생물막 형성 미생물의 MPI의 변화 패턴은 기질 이용수와 서로 유사하게 나타났는데, 이는 MPI 수준이 주로 기질이용수에 의해 크게 좌우되기 때문이다. 그러나 기질이용수가 유사한 군집일 경우는 이용 기질의 활성도 크기에 비례하여 나타날 수 있다. 생물막을 구성하는 미생물의 시간적인 변화라든가 생물막

군집의 생리화학적 불균일성으로 판단되는 원인에 의하여 생물막 형성기간에 따라 생물막 미생물의 기질 이용수와 MPI가 변화하는 특성을 나타내기는 하였으나, 전반적으로 GS 표면에 형성된 생물막 미생물이 PVC와 STS 표면에서 형성된 생물막 미생물보다 동일기간에서 상대적으로 낮은 물질대사 능력을 나타냈다. PVC와 STS 표면에 형성된 생물막 군집이 특정 기질에 대한 생리적 또는 기능적 활성도가 상대적으로 높은 미생물로 구성되었을 것으로 판단된다.

Fig. 6은 수도물을 0.28m/sec(Re 7,300)의 유속으로 공급한 수도관의 PVC, STS, GS 표면에 형성된 생물막 미생물이 형성기간 동안 탄소원에 대하여 나타낸 평균적인 CLPP 패턴이다. 수도물을 0.28m/sec의 유속으로 공급한 수도관에서 형성된 생물막 미생물의 탄소원에 대한 대사 능력은 대부분 0.08m/sec의 유속에서 형성된 생물막 미생물보다 현저히 낮은 수준이었다. 이러한 패턴은 상대적으로 빠른 유속에서 생물막을 형성하는 미생물의 대사특성을 반영한 결과로 보인다. 특히 상대적으로 느린 유속에서 형성된 생물막 미생물과 비교하여 감소된 물질대사 능력은 유속과 전단력의 증가로 인해 발생한 생물막 형성 미생물의 군집 수준 감소와 관련이 있는 것으로 판단된다. 수도관에서 유속의 증가는 표면에 대한 세균 이동과 영양물질의 공급을 증가시키는 원인이 될 수 있지만, 소독제인 잔류염소의 전달을 증가시키게 되어 결국 세포 구성성분의 손상과 대사작용의 저해를 유발할 수도 있다.

수도물을 0.28m/sec의 유속으로 공급한 수도관의 PVC 표면에서 형성된 생물막 미생물은 형성기간 동안 주로 polymers(dextrin, tween40, tween80), carbohydrates(cellobiose, gentiobiose,  $\alpha$ -D-glucose, lactulose), carboxylic acids(citric acid, D-galacturonic acid,  $\beta$ -hydroxybutyric acid,  $\gamma$ -hydroxybutyric acid, D,L-lactic acid, propionic acid, succinic acid), amino acids(L-alanine, L-aspartic acid, L-glutamic acid, glycyl-L-aspartic acid, glycyl-L-glutamic acid, L-histidine, hydroxy-L-proline, L-leucine,  $\gamma$ -amino butyric acid)에 해당하는 몇몇 탄소원만을 이용하는 경향을 나타냈으며(Fig. 6a), STS 표면에서 형성된 생물막 미생물은 carbohydrates( $\alpha$ -D-lactose), carboxylic acids( $\gamma$ -hydroxybutyric acid, malonic acid),



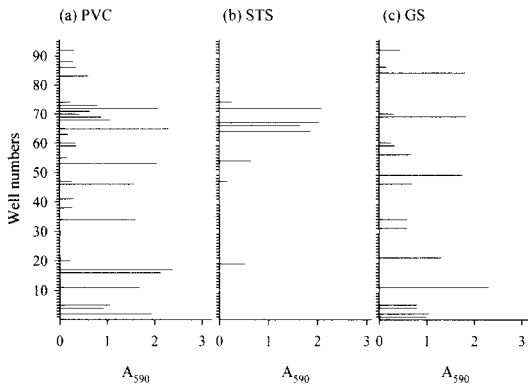


Fig. 6. CLPP patterns of biofilm microorganisms formed on several pipe surfaces exposed to tap water at 0.28m/sec (Re 7,300) of flow velocity.

amino acids(D-alanine, L-alanyl-glycine, L-asparagine, L-histidine, L-leucine)에 해당하는 일부 탄소원만을 이용하였다(Fig. 6b). 또한 GS 표면에서 형성된 생물막 미생물은 주로 polymers( $\alpha$ -cyclodextrin, dextrin, tween40, tween80), carbohydrates(cellobiose, maltose, D-trehalose), carboxylic acids( $\beta$ -hydroxybutyric acid, itaconic acid, quinic acid, succinic acid), amino acids(L-glutamic acid, glycyl-L-aspartic acid), aromatic chemicals(urocanic acid, uridine)에 해당하는 몇몇 탄소원만을 이용하였다(Fig. 6c).

Fig. 7은 0.28m/sec의 유속으로 수도물을 공급한 수도관에서 각각의 재질별 형성기간에 따라 생물막 미생물이 나타낸 CLPP 패턴에 기초하여 생물막 미생물의 기질이용수와 MPI 변화를 보여주는 결과이다. Fig. 7a와 같이 PVC, STS, GS 표면에 각각 형성된 생물막 미생물의 기질이용수는 각각 7~16, 1~5, 2~13 범위이었으며, 재질별 생물막 형성 미생물의 MPI는 각각 5.1~25.6(PVC), 0.3~9.0(STS), 0.6~16.8(GS) 범위이었다(Fig. 7b). 생물막 미생물의 기질이용수와 MPI에 근거하여 볼 때(Fig. 7) 주어진 수도관의 운전조건에서 PVC 표면에 형성된 생물막 미생물의 물질대사 능력이 상대적으로 가장 높았으며, STS 표면에서 형성된 생물막 미생물의 물질대사 능력이 상대적으로 가장 낮은 특성을 보였다.

Biolog GN microplate에 포함된 95개의 탄소원은 형태라든가 농도에 있어 실제 수도물에 존재하는 탄

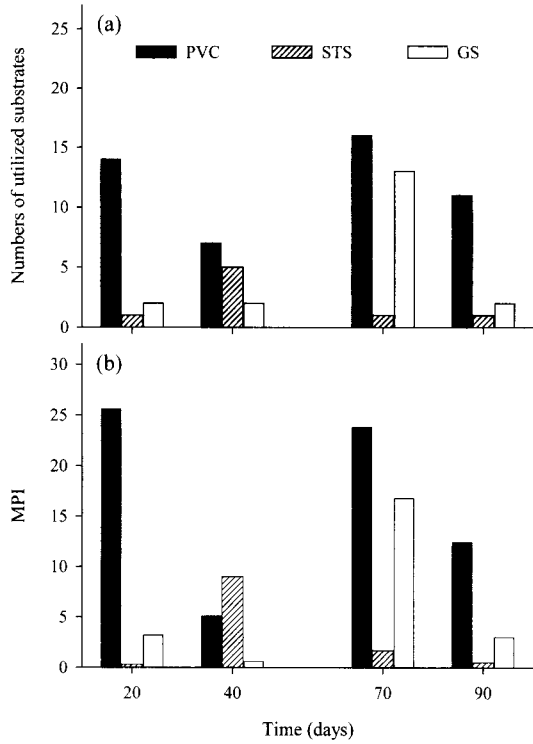


Fig. 7. (a) Numbers of utilized substrates and (b) MPI (metabolic potential index) of biofilm microorganisms formed on several pipe surfaces exposed to tap water at 0.28m/sec (Re 7,300) of flow velocity.

소원과 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. 비록 본 연구에서 분자생물학적 기법에 근거한 생물막 구성 미생물의 군집 구조 변화에 대한 정성적인 분석을 수행하지 않은 관계로 재질에 따른 미생물 종의 분포나 변화에 대해서는 알 수 없지만, 미생물 군집의 물질대사 능력 차이에 기초한 CLPP 결과들은 관 재질과 같은 생물막 형성을 위한 서식 환경에 따라 생물막을 구성하는 미생물의 생리적 또는 기능적 대사 활성도에 차이

가 발생할 수 있다는 것을 의미한다. CLPP 패턴은 접종원의 세포 밀도(cell density)에 의해 영향을 받을 수 있으나(Garland and Mills, 1991; Zak et al., 1994), 본 연구에서와 같이 희석하지 않은 본래의 생물막 시료를 microplate에 직접 접종하고 배양기간을 5일로 길게 한 assay의 적용은 접종원의 영향을 완화시킬 수 있을 뿐만 아니라 상대적으로 생장이 느린 미생물의 반응을 유도할 수 있다(Wünsche et al., 1995). 그러므로 고정된 배양기간 이후의 CLPP 패턴은 생물막 미생물 본래의 특성이 반영된 결과라고 할 수 있을 것이다. 비록 CLPP 패턴에 포함된 모든 잠재적 차이들을 모두 파악할 수는 없지만, 본 연구에서 적용한 방법은 환경 조건에 따른 생물막 군집의 기능적 및 대사적인 능력을 평가하는데 유용할 것으로 판단된다.

생물막 미생물의 기질이용수와 MPI에 근거하여 볼 때 유속이 0.08m/sec인 수도관에서는 GS에 형성된 생물막 미생물보다 PVC와 STS에 각각 형성된 생물막 미생물의 물질대사 능력이 동일기간에서 상대적으로 높았지만, 유속이 0.28m/sec인 수도관에서는 STS 표면에 형성된 생물막 미생물의 물질대사 능력 수준이 PVC나 GS에 형성된 생물막 미생물보다 상대적으로 가장 낮았다. 특히 0.08m/sec의 유속으로 운전한 수도관에서는 PVC와 STS 표면에 각각 형성된 생물막 미생물의 물질대사 능력이 서로 큰 차이를 나타내지는 않았지만, 유속이 0.28m/sec인 수도관에서는 PVC 표면에 형성된 생물막 미생물의 물질대사 능력 수준이 다른 재질에서 형성된 생물막 미생물보다 상대적으로 높았다. 이러한 점은 생물막 미생물의 생리적 및 기능적 특성에 미치는 재질의 효과가 유속과 같은 수도관의 운전조건에 의해서도 변화할 수 있다는 것을 나타낸다. 더불어 생물막 형성에 미치는 효과의 크기 측면에서 재질보다는 유속의 영향이 크다는 것을 의미한다. 일반적으로 배·급수 시스템에서 생물막 형성 영향 인자의 효과를 다른 연구들에서 생물막 형성에 미치는 재질의 효과는 BOM이나 소독제에 비해 적은 것으로 보고되고 있다(Hallam et al., 2001; Ollos et al., 2003). 따라서 생물막 형성 미생물의 제어를 위한 재질의 선택은 수질을 비롯한 운전조건이 함께 고려되어야 할 것으로 판단되어진다.

#### 4. 결론

수도관 재질(PVC, STS 304, GS)에 따른 생물막 형성과 미생물 군집의 CLPP 특성을 알아보기 위해 수행한 실험 결과는 다음과 같다.

1) 수도물과 접촉한 PVC, STS, GS 표면에서는 5  $\mu$ m 미만의 자루형, 간상형, 구형 세균이 입자성 물질과 결합하여 형성된 생물막이 관찰되었다. 운전조건이 동일한 수도관에서 재질에 따른 생물막 형성 부착성 HPC의 차이는 약 1log CFU/cm<sup>2</sup> 이하였다. 수도물을 0.08m/sec(Re 1,950)의 유속으로 3개월 동안 공급한 수도관의 PVC, STS, GS 표면에 대한 부착성 HPC의 수준은 각각 10<sup>3</sup>~10<sup>4</sup>, 10<sup>4</sup>~10<sup>5</sup>, 10<sup>3</sup>~10<sup>4</sup> CFU/cm<sup>2</sup>이었다. 그리고 유속이 0.28m/sec(Re 7,300)인 수도관의 PVC, STS, GS 표면에 형성된 부착성 HPC의 수준은 각각 10<sup>2</sup>~10<sup>3</sup>, 10<sup>2</sup>~10<sup>3</sup>, 10<sup>1</sup>~10<sup>2</sup> CFU/cm<sup>2</sup>이었다.

2) 생물막 형성 미생물은 탄소원에 대한 물질대사 능력이 반영된 독특한 CLPP 패턴을 나타냈다. 특히 서로 다른 재질에서 형성된 생물막 미생물의 CLPP 패턴은 이용하는 탄소원의 종류 및 이용한 탄소원의 활성화도에 있어 차이를 나타냈다. 또한 동일 재질에서도 형성기간에 따라 생물막 미생물의 CLPP 패턴은 변화하는 특성을 보였다.

3) 생물막 미생물의 기능적 특성에 미치는 재질의 효과는 유속과 같은 수도관의 운전조건에 의해 변화하는 특징을 나타냈다. 유속이 0.08m/sec인 수도관에서는 GS에서 형성된 생물막 미생물보다 PVC와 STS에 각각 형성된 생물막 미생물의 물질대사 능력이 동일기간에서 상대적으로 높았으며, 유속이 0.28m/sec인 수도관에서는 STS 표면에 형성된 생물막 미생물의 물질대사 능력 수준이 PVC나 GS에 형성된 생물막 미생물보다 상대적으로 가장 낮았다.

#### 사 사

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

## 참고문헌

1. 박세근, 박재우, 최성찬, 김영관 (2004) 모형 수도관에서 유속 변화에 따른 생물막 형성 미생물의 기능적 특성, *대한환경공학회지*, **26**(11), 1251-1258.
2. 박세근, 최성찬, 김영관 (2005) 요인실험계획을 이용한 수도관 생물막 형성 영향 인자의 효과 분석, *상수도학회지*, **19**(2), pp. 181-192.
3. APHA, AWWA, and WEF. (1998) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20th Ed., Washington, D.C.
4. Camper, A.K., Brastrup, K., Sandvig, A., Clement, J., Spencer, C., and Capuzzi, A.J. (2003) Effect of distribution system materials on bacterial regrowth, *J. Am. Wat. Wks. Assoc.*, **95**(7), pp. 107-121.
5. Characklis, W.G. and Marshall, K.C. (1990) *Biofilms*, John Wiley & Sons, New York.
6. 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.
7. Garland, J.L. and Mills, A.L. (1991) Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization, *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**(8), pp. 2351-2359.
8. 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.
9. Garland, J.L. (1997) Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **24**, pp. 289-300.
10. Hallam, N.B., West, J.R., Forster, C.F., and Simms, J. (2001) The potential for biofilm growth in water distribution systems, *Water Res.*, **35**(17), pp. 4063-4071.
11. 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.
12. LeChevallier, M.W., Welch, N.J., and Smith, D.B. (1996) Full-scale studies of factors related to coliform regrowth in drinking water, *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**(7), pp. 2201-2211.
13. Niquette, P., Servais, P., and Savoie, R. (2000) Impacts of pipe materials on densities of fixed bacterial biomass in a drinking water distribution system, *Water Res.*, **34**(6), pp. 1952-1956.
14. Ollos, P.J., Huck, P.M., and Slawson, R.M. (2003) Factors affecting biofilm accumulation in model distribution systems, *J. Am. Wat. Wks. Assoc.*, **95**(1), pp. 87-97.
15. Park, S.K., Choi, S.C., and Kim, Y.K. (2006) Characteristics of biofilm community formed in the chlorinated biodegradable organic-limited tap water, *Environ. Technol.*, **27**(4), pp. 377-386.
16. 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 Part A*, **39**(1), pp. 103-112.
17. Percival, S.L., Knapp, J.S., Edyvean, R.G.J., and Wales, D.S. (1998) Biofilms, mains water and stainless steel, *Water Res.*, **32**(7), pp. 2187-2201.
18. Percival, S.L., Walker, J.T., and Hunter, P.R. (2000) *Microbiological Aspects of Biofilms and Drinking Water*, CRC Press, Boca Raton, FL.
19. Schwartz, T., Hoffmann, S., and Obst, U. (1998) Formation and bacterial composition of young, natural biofilms obtained from public bank-filtered drinking water systems, *Water Res.*, **32**(9), pp. 2787-2797.
20. Schwartz, T., Hoffmann, S., and Obst, U. (2003) Formation of natural biofilms during chlorine dioxide and u.v. disinfection in a public drinking water distribution system, *J. Appl. Microbiol.*, **95**, pp. 591-601.
21. van der Kooij, D., Vrouwenvelder, H.S., and Veenendaal, H.R. (1995) Density and composition of biofilms in drinking water distribution systems in the Netherlands, In *Proc. AWWA Water Quality Technology Conference*, Nov. 12-16, New Orleans, LA, pp. 1055-1062.
22. Wünsche L., Brüggemann L., and Babel W. (1995) Determination of substrate utilization patterns of soil microbial communities: an approach to assess population changes after hydrocarbon pollution, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **17**, pp. 295-306.
23. Zak, J.C., Willig, M.R., Moorhead, D.L., and Wildman, H.G. (1994) Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach, *Soil Biol. Biochem.*, **26**(9), pp. 1101-1108.