

Community characteristics of early biofilms formed on water distribution pipe materials

수도관 재질에 형성된 초기 생물막 형성 미생물의 군집 특성

Yeong-Kwan Kim¹ · Sung-Gu Park² · Dong-Hun Lee³ · Sung-Chan Choi^{2*}

김영관¹ · 박성구² · 이동훈³ · 최성찬^{2*}

1 강원대학교 환경공학과 · 2 한림대학교 환경생명공학과 · 3 충북대학교 미생물학과

Abstract : Annular Biofilm Reactor (ABR) equipped with coupons of three different pipe materials (STS 304, PVC, PE) was used to generate drinking water biofilm samples. The level of assimilable organic carbon (AOC) during the sample generation period was 37.3 $\mu\text{g/L}$, and this level did not seem to be low enough to limit the formation of biofilm in this study. Terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analyses determined T-RF profile as early as 3 h of exposure on PVC coupons. Average surface roughness (R_a) measured by atomic force microscopic analyses was 125.7 nm for PVC, and this value was higher than for STS (71.6 nm) and PE (74.0 nm). However, biofilm formation was faster on STS (6 h) than on PE (12 h), which indicated that surface roughness might not be the only factor that controlled the initiation of biofilm development. Upon detection of the T-RF peaks, richness (S) and diversity indices such as Shannon (H) and Simpson ($1/D$) demonstrated a rather slow increase until 48 h followed by rapid increase regardless of the pipe materials. Differences of microbial community structures among the biofilm samples were determined based on the cluster analysis using Jaccard coefficients (S). Biofilm communities could be divided into two distinct groups according to the exposure time regardless of the pipe materials. First group contained a young (< 48 h) biofilm samples (10 out of 11) but second group contained a mature (≥ 48 h) samples (11 out of 14). Results suggested that, due to the complexity of biofilm, the targeting of the first group of cluster was crucial for optimizing the management of drinking water distribution systems and controlling microbial growth.

Key words : biofilm, T-RFLP, AOC, drinking water, microbial community

주제어: 생물막, 말단제한절편길이 다형성, 동화가능유기탄소, 수돗물, 미생물 군집

1. 서론

양질의 수돗물을 공급하기 위해 정수처리장에 고도처리공정이 도입되어 개선되고는 있지만 정수처리된 수돗물은 관로를 통해 가정으로 공급되는

과정에서 관의 부식에 의한 오염, 노후한 관 또는 관의 교차연결(cross connection) 부분에서 유입되는 오폐수와 병원성 미생물에 의한 오염, 그리고 관 표면에 부착하여 성장하는 미생물에 의한 오염 등 2차 오염에 의하여 수질이 저하될 수 있다(Szewzyk *et al.*, 2000; Eboigbodin *et al.*, 2008). 이러한 2차 오염의 근본적인 원인은 미생물의 재생장(regrowth) 즉, 정수시설에서 생산된

* Received 21 September 2012, accepted 12 November 2012.

* Corresponding author: Tel.: +82-33-248-2151 Fax: +82-33-242-9300, E-mail: schoi@hallym.ac.kr

수돗물이 배·급수관을 흐르면서 미생물 수가 급격히 증가하는 현상 때문이다(Wingender and Flemming, 2004). 배·급수관과 같은 빈영양성(oligotrophic)이면서 소독제가 잔류하고 있는 불리한 환경에서 미생물의 재생장은 주로 생물막(biofilm) 형성과 탈리(detachment)에 연관되어 있다(O'Toole *et al.*, 2000; Jefferson, 2004).

생물막은 미생물과 그들이 생산한 EPS (Extracellular Polymeric Substances), 유기물, 그리고 유기물과 미생물이 흡착될 수 있는 표면 등 네 가지 조건만 만족된다면 어디든지 형성될 수 있다. 생물막은 드물게 한 종류의 미생물로 구성되어 균일하고 연속적인 층을 형성할 수도 있고, 다양한 종류의 미생물들이 서로 점착하여 불균일하고 복잡한 형태로 존재할 수도 있다. 이와 같이 미생물로 형성된 생물막은 수돗물에 불쾌한 맛과 냄새(Hallam *et al.*, 2001)를 발생시키거나 바이러스를 포함한 기회성/감염성 미생물 성장 장소를 제공함으로써 생물학적 안정성을 위협하는 요인이 될 수 있다(Armon *et al.*, 1997). 현재까지 배·급수관망에서 생물막 형성에 영향을 주는 주요 요인들에는 유기물과 소독제의 농도, 수온, 체류시간, 관 라이닝의 물리화학적 특성 등이 있는 것으로 알려져 있다(Eboigbodin *et al.*, 2008).

다양한 연구에서 배양의존적 방법을 통해 수돗물과 관망에 형성된 생물막으로부터 세균을 확인하는 작업이 이루어져 왔으며(Lee and Kim, 2003), 평판배지에 나타나는 종속영양세균수(Heterotrophic Plate Counts)를 수돗물의 미생물학적 수질 평가 기준으로 채택하여 사용하고 있다(Sartory, 2004). 그러나 대부분의 미생물들은 인위적인 배양 환경에서 집락(colony)을 형성하지 못하거나, 살아 있지만 배양 불가능한(VBNC: viable but non-culturable) 상태로 존재하고 있다. 따라서 배양의존적 방법에 의한 분석은 관망에 형성된 생물막의 실제적 종 조성이나 군집의 동적 변화를 평가하거나 이해하기에 무리가 많다.

이러한 문제점을 극복하고 수생태계의 다양한 시료로부터 미생물 군집의 변화를 추적하기 위해 분자생물학적 방법이 적용되고 있다. 그중 T-RFLP (Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism) 분석은 대표적인 community fingerprinting 기술로서 형광물질로 표지된 primer를 이용하여 증폭된 PCR (polymerase chain reaction) 산물을 제한효소(restriction enzyme)로 절단하여 말단의 단편들을 분석하는 방법이다. 일반적으로 하나의 미생물 종은 특정 길이의 TRFs (Terminal Restriction Fragments)를 나타내는데 이 분석 방법은 신속하게 많은 시료를 처리할 수 있고, 군집에서 특정 유전자의 정량적/정성적 분석을 모두 수행할 수 있으며, 재현성이 높은 방법이다. 동시에 이 방법의 가장 큰 장점은 미생물 군집의 적은 구성원(rare member)까지 검출할 수 있는 민감도를 가지고 있다는 점으로서 본 연구의 목적인 초기 생물막 군집 분석에 적합한 방법이다(Liu *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2008).

상수관로는 빈영양성 조건을 나타내는 대표적인 환경으로서 생물막 형성수준이 종속영양세균수 기준으로 12시간 경과 시 10^3 CFU/cm² 정도에 불과하여 소량의 생물막을 손실 없이 회수하고 양질의 DNA를 얻는 방법이 생물막 연구의 관건이다. 또한 수돗물에는 PCR에 방해가 되는 억제제(inhibitor)가 많이 존재하는 것으로 알려져 있다(Janzon *et al.*, 2009). 수돗물과 관련된 생물막에서 미생물 군집에 대한 분자생물학적 연구가 많이 진행되었지만, 위와 같은 이유로 대부분의 분석이 생물막 형성 초기단계의 연구보다는 군집의 복잡성과 환경 조건에 따른 군집구조의 차이를 비교하는데 초점을 맞추고 있다. 따라서 본 연구에서는 배·급수 관망의 모사 실험 장치에 형성된 생물막으로부터 시간에 따른 초기 미생물 군집의 동적 변화를 추적하고 궁극적으로 생물막 형성을 지연 또는 제어하기 위해 target으로 해야 할 대상을 확인하고자 하였다.

2. 실험 방법

2.1 생물막 형성 반응기

생물막 형성 반응기(ABR; Annular Biofilm Reactor, Model 1120LS, Biosurface Technologies Co., USA)는 배·급수관의 수리학적 흐름을 모사할 수 있을 뿐만 아니라 미생물이 부착할 수 있는 기저표면을 제공하여 유체의 흐름과 접촉하는 표면에 형성되는 생물막을 지속적으로 모니터링 할 수 있는 장치이다. ABR의 구성은 유리 재질의 outer cylinder (I.D. 156 mm x H180 mm)와 polycarbonate 재질의 회전형 inner drum (O.D. 140 mm x H155 mm), 그리고 반응기 상부에 설치된 모터와 모터의 속도를 조절할 수 있는 제어판으로 구성되어 있다. Slide section의 표면은 홈(slot) 형태(15 mm x 145 mm x 1.5 mm)로 되어 있어 20개의 시편을 장착할 수 있다. 반응기는 실험을 수행하기 전에 멸균(121 °C, 15 psi, 15 min)하여 사용하였으며, inner drum에 설치되는 각 수도관 재질의 시편은 에탄올로 3회, 증류수로 3회씩 각각 세척한 후 설치하였다. 반응기내로 유입되는 수돗물의 유량은 3.36 L/h였으며, 수리학적 체류시간은 0.3 h, 그리고 전단력은 0.48 N/m²가 되도록 설정하여 운전하였다.

2.2 수도관 재질 및 조도

실험에 사용된 시편의 재질은 STS 304 (stainless steel 304), PVC (polyvinyl chloride), PE (polyethylene)이며, ABR에 장착이 가능하도록 제작하여 사용하였다. 각각의 재질은 표면 조도를 비교 분석하기 위해 1x1x1(cm)로 절단한 시편을 AFM (Atomic Force Microscopy)을 이용하여 측정하였다. 표면 조도 파라미터로서 평균 조도(R_a ; roughness average, arithmetic mean of the surface roughness)를 비교하였으며 이는 조도 곡선에서 기준길이 전체에 걸쳐 평균선에서 벗어나는 모든 peak과

valley의 편차 평균값을 표면 조도로 사용하였다. 평균 조도 값은 기준 길이 내 조도의 평균값이므로 우연히 나타나는 한 두 개의 이례적인 peak이나 valley는 평균값에 크게 영향을 주지 않는다. AFM image는 100 × 100 μm의 scan size로 측정하였으며, 표면 조도뿐만 아니라 표면형상을 2D, 3D로 나타내었다.

2.3 수질분석

반응기 내부로 유입되는 수돗물에는 어떠한 처리도 하지 않고 실험실로 공급되는 수돗물을 직결하여 사용하였다. 수돗물의 수질은 Standard Method(APHA, 2005)에 준하여 분석하였으며 분석 항목은 pH, 탁도, 잔류염소, 온도, 암모니아성 질소, 인산염 인, AOC (assimilable organic carbon)등 총 7가지 항목을 검사하였다. 분석에 있어서 pH는 pH meter (Fisher Scientific, AR15)로, 탁도는 Turbidity meter (Fisher Scientific, Inc., DRT-15CE)를 이용하여 측정하였다. 잔류염소량은 *N,N*-diethyl-*p*-phenylenediamine ferrous titrimetric method로 분석하였고, 암모니아성 질소와 인산염 인의 농도는 각각 Phenate method와 Ascorbic acid method를 이용하여 분석하였다. AOC의 측정은 ATCC로부터 구입한 표준 균주인 *Pseudomonas fluorescens* strain P-17과 *Aquaspirillum* sp. strain NOX 균주를 이용하여 분석하였다(Lehtola *et al.*, 2004).

2.4 생물막 회수

크기가 작은 시편 한 개에서 나타나는 단위면적당 미생물량(biomass)은 넓은 표면에서 나타나는 미생물량을 대표하기 곤란할 수 있으므로 생리적 활성도의 정량적 측정이나 생물막 형성 군집의 동적변화를 추적하는 연구에는 제한적 일 수 있다(Gjaltema *et al.*, 1994). 이러한 문제점을 최소화하기 위해 생물막 회수시 설치된 복수의 시편을 모두 회수하여 분석에 사용하였다. 시편의

회수는 에탄올에 담가둔 핀셋을 화염멸균 한 후 사용하였으며, 회수된 시편은 0.9 % NaCl 용액이 담겨져 있는 culture tube에 넣고 sonicator (Branson Ultrasonic Cleaner, Model 2210)로 sonics mode 5 min, vortex mixing 2 min을 3회 반복한 뒤 cell scraper로 수 회 긁어서 회수하였다. 회수된 생물막 시료는 분자생물학적 분석을 위해 DNA 추출 전 시료를 원심분리 하는 것을 지양하였다. 이는 시각적으로 확인 가능한 pellet을 찾기가 힘들고, 상대적으로 양이 적으며, 시료의 손실이 크기 때문이었다. 따라서 본 연구에서는 실험 목적에 맞게 준비하기 위해 pore size 0.2 μm , 25 mm의 polycarbonate membrane (Poretics, USA)으로 여과하고 멸균된 수술용 가위로 잘게 잘라 microcentrifuge tube에 넣은 뒤 분석할 때까지 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다.

2.5 생물막 군집 분석

2.5.1 핵산 추출

여과를 통해 회수된 생물막 시료로부터 Rochelle *et al.* (1992)의 방법으로 핵산을 추출하였다. 우선 시료에 200 μL 의 0.9 % NaCl을 첨가하고 freezing ($-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 h)/thawing ($70\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 min) cycle을 3회 반복 수행하였다. 이후 STE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl) 1.5 mL를 첨가 후 Mini Bead Beater Cell Disruptor (Bio-Spec Product, USA)에서 2,500 rpm으로 3분간 처리하고 0.1 V 10 % SDS (sodium dodecyl sulfate, Sigma)를 첨가하고 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 1.5 ~ 2분간 유지하여 cell lysis를 수행하였다. 계속해서 원심분리(10,000 \times g, 10 min) 과정을 거쳐 상등액을 새로운 1.5 mL tube에 옮긴 후 QIAgen Stool Minikit (QIAgen, USA)을 이용하여 정제하였다.

2.5.2 16S rRNA 유전자의 PCR 증폭

회수된 생물막 형성 미생물의 16S rRNA 유전자는 labeled forward primer 27F (5'-

Hexachlorofluorescein-AGAGTTTGTATC-MTGGCTCAG-3')와 reverse primer 1518R (5'-AAGGAGGTGATCCANCCRCA-3')을 이용하여 PCR 방법으로 증폭시켰다. PCR 조건은 DNA template 5 μL , 1X reaction buffer, 1.5 mM MgCl_2 , 200 μM dNTP, 0.2 μM primer, 5 % DMSO, 1 ~ 40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ bovine serum albumin, 그리고 1 unit Taq polymerase (Takara, Japan)를 혼합하여 최종부피 50 μL 로 핵산 증폭기(My CyclerTM, Bio-Rad)를 이용하여 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ initial denaturation 5 min, $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ denaturation 1 min, annealing $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ extension 2 min을 30 cycle 수행한 뒤, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ final extension 10 min을 수행하여 증폭하였으며 양성/음성 대조군도 함께 확인하였다.

PCR 산물은 0.8 % agarose gel에 전기영동하여 관찰한 후에 AccuPrep PCR purification kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 정제하였으며, Biodoc Analyzer (Biometra, Netherlands)에서 1 kb ladder (Promega, Germany)를 이용하여 정량하였다.

2.5.3 T-RFLP 분석

정제된 PCR 산물은 제한효소 Hha I (Promega)을 제조사의 방법에 따라 처리하였으며, 생성된 말단제한절편의 크기는 Solgent (Korea)에 의뢰하여 자동염기서열분석장치 (Model 377, Applied Biosystems Instrument)로 확인하였다. 생물막 시료의 TRF profile에서 30 bp 보다 작거나 800 bp 보다 큰 TRFs는 분석에서 제외하였다. 각각의 시료에서 reproducible peak 만을 numerical analysis에 사용하였으며 ± 0.5 bp 이내의 차이를 보이는 peak을 동일 peak로 규정하였다.

2.6 생물막 군집 다양성 및 유사성 분석

수도관 재질에 따른 생물막 군집의 다양성과 재질 및 시간에 따른 유사성 분석은 생물막 군집

분석에서 얻어진 electropherogram의 결과에 기초하여 수행하였다. 우선 phylotype richness (S)는 전체 T-RF 중 구별되는 T-RF 길이를 갖는 phylotype의 수로 나타내었다. 군집 다양성은 Shannon-Weaver diversity index (H)로 다음 식을 이용하여 구하였다.

$$H = -\sum(p_i)(\log p_i)$$

(p_i ; proportion of an individual height relative to the sum of all peak height)

Inverse Simpson's index($1/D$)는 다양성의 증가를 더욱 확실하게 보여주며, 군집에서 우점도(dominance level)에 민감하고, 군집 내에서의 변화를 구별하는 능력이 탁월하다. Index 값이 0에 가까울수록 군집은 경쟁적이며 특정 종에 의하여 우점되며, 값이 클수록 군집내의 종은 비경쟁적 관계에 있다(Stach *et al.*, 2003).

$$1/D = 1/\sum(p_i)^2$$

수도관 재질과 시간 경과에 따른 생물막 군집의 유사성 비교는 Jaccard coefficients (S_j)를 적용하여 다음과 같이 계산하였다

$$S_j = \frac{W}{\alpha_1 + \beta_2 - W}$$

W ; number of peaks in sample A that are also found in sample B

α_1 : total number of peaks in sample A

β_2 : total number of peaks in sample B

Similarity distance를 측정하기 위해 계산된 coefficients 값들은 similarity matrix로 만들어 cluster analysis를 수행하였으며 SPSS, XLstat (AddinSoft SARL), Mega 4.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 4.0) 프로그램을 이용하여 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 수질 분석

일반적으로 종속영양세균이 생장을 위해 필요로 하는 탄소:질소:인의 비율은 약 100 : 10 : 1이며, 필수 영양물질 외에도 미량 원소(trace element), 보조인자(cofactor)를 필요로 한다. 수돗물에서 미생물이 이용할 수 있는 영양물질의 존재는 미생물의 재생장을 유발할 수 있는 중요한 인자가 될 수 있으므로 생물막 형성과 관련이 깊다. 영양물질 중에서 특히 유기탄소는 종속영양세균의 새로운 세포 물질 생성과 에너지원으로 이용되는데 상수에 존재하는 유기탄소는 주로 humic acids, fulvic acids, 탄수화물, 단백질, 카르복실산, 아미노산 등과 같은 천연 유기물질이며(Krasner *et al.*, 1996), 이러한 유기탄소는 대부분의 수돗물에서 극히 낮은 농도로 존재한다.

수돗물에서 AOC (Assimilable Organic Carbon)는 세균이 동화할 수 있는 유기탄소를 의미하며, 보통 TOC의 0.1 ~ 9 % 수준이다(van der Kooij *et al.*, 1982). 배·급수 시스템에서 AOC 농도와 종속영양세균의 개체수 사이에는 밀접한 상관관계가 존재하며, AOC가 10 $\mu\text{g/L}$ 보다 낮은 경우에는 잔류염소를 유지시키지 않아도 종속영양세균의 증가가 일어나지 않는다(van der Kooij, 1992). 본 연구에서 AOC는 평균 35 $\mu\text{g/L}$ 수준으로 측정되어 위 문헌에서 제안한 종속영양세균의 생장을 제한할 수 있는 농도를 초과하므로 생물학적 안정성을 확보하기 위해서는 잔류염소의 존재가 필수적인 상황으로 판단된다(Table 1).

Table 1. Characteristics of the tap water used in this study.

Parameters	Average	Range
Temperature($^{\circ}\text{C}$)	11.5	8.7 ~ 12.5
pH	6.90	6.50 ~ 7.37
Free residual chlorine (mg/L)	0.20	0.02 ~ 0.28
Turbidity (NTU)	0.34	0.28 ~ 0.43
$\text{NH}_3\text{-N}$ (mg/L)	0.020	0.003 ~ 0.059
$\text{PO}_4\text{-P}$ (mg/L)	0.008	0.003 ~ 0.020
AOC ($\mu\text{g/L}$)	35.0	20.0 ~ 48.5
HPC (CFU/mL)	15	2 ~ 60

많은 연구에서 수돗물의 수질분석시 유기탄소를 COD (Martiny *et al.*, 2003), TOC (White *et al.*, 2011), 또는 DOC (Eichler *et al.*, 2006)의 농도로 제시하고 있으나 이러한 유기탄소의 상당 부분이 세균이 동화하여 이용할 수 없는 부분이라는 점을 감안한다면 AOC에 대한 분석 결과가 제시되어야 할 것이다.

한편 본 연구에 사용된 수돗물에서 측정된 암모니아성 질소와 인산염 인의 평균 농도는 각각 0.02와 0.008 mg/L로 나타났다(Table 1). 따라서 탄소:질소:인의 비율을 감안하면 탄소가 미생물의 재생장을 제한하는 주된 제한요인(limiting factor)이 되고 있음을 보여준다. Chu *et al.* (2005)의 연구에서는 질소와 인의 농도가 각각 0.1과 0.005 mg/L 이하일 때는 생물막 형성에 미치는 영향이 거의 미미했으나, 이들 농도를 각각 0.5와 0.01 mg/L로 증가시켰을 때는 모형 수도관에 형성된 생물막에 지대한 영향을 미쳤음을 보고하였다. 따라서 본 연구에서 사용한 수돗물의 수질 상태로 판단할 때 질소의 경우는 안전한 수준으로 판단되나 인의 경우는 경계해야 할 농도 수준으로 생각된다. 특히 분석에 사용된 수돗물처럼 많은 양의 유기탄소를 함유한 수돗물에서는 인이 미생물 생장에 영향을 미칠 수 있는 것으로 보고된 바 있다(Miettinen *et al.*, 1997; Sathasivan and Ohgaki, 1999). 배·급수 시스템에서는 관의 부식을 제어하기 위해 인산염을 첨가하기도 하는데, 일부 연구들에서는 수돗물에 인산염 인을 첨가했을 때 물에서 상당한 종속영양세균수의 증가를 유발한다고 보고하였다(Lethola *et al.*, 2001; Keinänen *et al.*, 2002).

3.2 초기 생물막 형성 특성

각기 다른 재질의 수도관에서 초기 생물막 형성의 메커니즘을 알아보기 위해 T-RFLP 분석을 수행하였다. 사용된 제한효소는 Hha

I(GC▼GC)이며, ± 0.5 bp 이내의 차이를 보이는 peak을 동일 peak으로 규정하고 검출된 peak 하나를 하나의 미생물로 간주하였다. ABR에서 시편의 회수는 12시간 간격을 기본으로 하였으나, 초기 수도관내 생물막 형성 메커니즘의 규명에서 pioneer의 검출이 중요하여 이들이 검출될 수 있도록 반응기 가동시간을 점차 줄이면서 모니터링 하였다. STS 304 재질에서는 반응기 가동 후 6시간이 경과되었을 때 최초 211 bp의 T-RF를 갖는 pioneer가 검출되었으며(Fig. 1). PVC와 PE 재질에서는 각각 3시간과 12시간이 경과된 후 205 bp의 T-RF가 검출되었다(결과 미제시). 모든 경우에서 초기 T-RF 출현 이후 시간이 경과됨에 따라 군집의 구성이 역동적(dynamic)으로 변화하였다. T-RFs profile에서 시간에 따라 동일 peak의 fluorescence intensity에 변동이 있는 것은 생물막 형성 시 미생물에 의한 흡착(attachment)과 수도관 내에서 발생하는 전단력(본 실험에서는 ABR 내부 rotor의 회전에 의하여 생긴 전단력)에 의한 탈착(detachment)이 연속적으로 일어나는 현상이 반영된 결과로 추정된다.

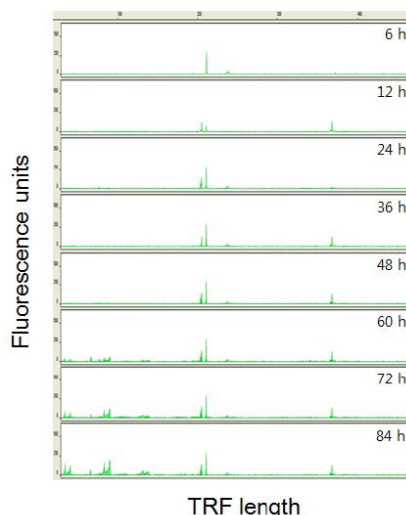


Fig. 1. Electropherograms of the T-RFLP by Hha I digestion of bacterial 16S rDNA amplified from biofilm samples formed on STS304 at various time intervals.

T-RFLP 분석을 통해 얻어진 T-RF profile 을 이용하여 각각의 수도관 재질에서 시간 경과에 따라 형성되는 생물막 군집의 다양성 관련 지표들을 평가하여 초기 수도관내 생물막 군집의 기능적 특성 및 재질에 따른 군집 특성 차이를 분석하였다. 실험에 사용된 세 가지 재질(STS, PVC, PE) 모두에서 시간의 경과에 따라 생물막 군집의 종풍부도를 나타내는 richness (S)가 48 시간을 경계로 급격히 증가하는 현상이 뚜렷이 관찰되었다(Fig. 2A). 생물막 형성 미생물 군집의 다양성을 나타내는 Shannon-Weaver diversity index (H)는 그 수치가 높을수록 구성원이 다양함을 의미하는데, 세 가지 재질 모두에서 역시 시간이 경과함에 따라 증가하였다(Fig. 2B). Inverse Simpson's index (1/D)는 군집에서의 우점도 정도를 나타내는 지수로서 Simpson's index D 값의 역수를 취한 값이며 군집 내에서의 우점도를 적절히 묘사해준다(Stach *et al.*, 2003). 분석된 시료에서 우점도 경향은 시간이 경과할수록 특정 종에 의한 우점도가 낮아지는 경향을 보여주었다(Fig. 2C).

이상의 결과로부터 수도관 내 초기 생물막 군집의 변화는 우선 pioneer가 관 표면에 부착되어 우점하지만 시간이 경과함에 따라 군집을 구성하는 생물막 형성 미생물의 수가 점차 증가하며, 군집의 구조가 다양화되면서 군집내 미생물들은 점차 균등화됨을 알 수 있다. 즉 수도관 내벽에서 초기 생물막 형성은 단순하지만 점차 복잡하면서 안정한 형태를 향하여 진행됨을 반영한다. 따라서 상수관망에서 생물막 형성을 효과적으로 억제하기 위해서는 초기 생물막 형성에 중요한 역할을 하고 있는 핵심종(keystone species)에 대한 심도 있는 연구와 억제 방안의 도출이 요구된다. 이는 새로운 관망의 설치뿐만 아니라 물리적인 flushing과 같은 세척작업 이후 생물막의 재형성을 늦출 수 있는 방안이기도 하다.

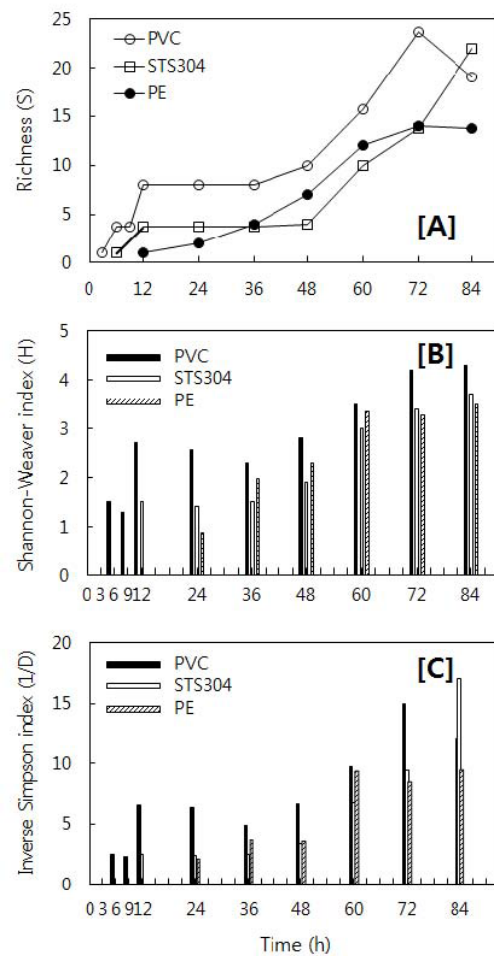


Fig. 2. Time Course of changes in Richness (A), Shannon-Weaver diversity index (B), and Inverse Simpson's index (C) of biofilm communities formed on STS304, PVC, and PE exposed to tap water.

3.3 초기 생물막 형성과 표면 조도의 관계

배·급수 계통과 같은 빈영양성 환경에서는 표면 조도가 클 경우 초기 생물막 형성 단계에서 전단력이나 소독제로부터 미생물이 보호받을 수 있는 서식지(niche)를 제공하는 중요한 역할을 하며, 영양물질의 축적정도에 큰 영향을 미치는 중요한 인자로 작용할 수 있다. 또한 일부 연구자들은 수도관 재질보다는 재질의 표면 조도와 생물막 형성 사이에 일정부분의 관계가 있음을 보여 왔다(Percival *et al.*, 2000; Bachmann and Edyvean, 2006). 본 연구에서는 각

각의 재질별(STS 304, PVC, PE)로 초기 생물막 형성이 감지되는 시간이 각 수도관 재질의 표면 조도 값(R_a)과 어떤 상관관계를 갖는지 알아 보았다.

AFM 측정 결과, STS 304의 경우 금속재료의 압출과정에서 고온, 고압에 의해 발생하는 grain(결정입자)과 grain boundary(결정입자 경계)가 나타남을 볼 수 있었다(Fig. 3). Grain을 가로 질러 굽힘과 블로홀(blowhole)이 관찰되었으며, grain 사이의 경계(boundary)에서는 틈(crack)이 관찰되었다. STS 표면의 grain boundary, inclusion, 용접 후에 발생하는 HAZ (heat-affected zone)와 같은 곳은 미생물 집락이 쉽게 발생될 수 있는 장소이다(Zachaeus et al., 2000). PVC 시편의 경우 grain은 관찰되지 않았으나, STS 304 시편에서 나타나는 굽힘, 블로홀, 틈, 그리고 결(layer) 등이 모두 관찰되었다. PE의 경우도 유사한 표면 형태가 관찰되었으나 고열에 의해 재료가 만들어질 때 고분자 물질이 뭉쳐져서 둥근 모양을 나타내는 현상이 PVC 보다 많이 관찰되었다(Fig. 3).

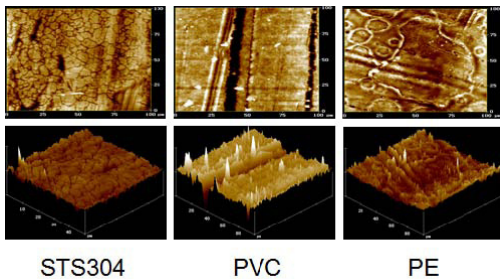


Fig. 3. Atomic force microscopic images of the surface topography of pipe materials.

AFM image 분석을 통해 임의로 3곳씩 지정하여 얻어진 평균 조도 값 R_a 의 경우, 기준길이 100 μm 일 때, STS 304 (71.6 nm), PVC (125.7 nm), PE (73.9 nm)로 각각 측정되었다. 즉 실험에 사용된 수도관 재질 중 PVC 재질이 상대적으로 표면 평균 조도가 가장 높았으며, PE \approx STS 304로 나타났다. 평균 조도 값이 가

장 큰 PVC 재질에서 가장 신속하게(3 h) T-RF가 검출되기 시작한 것은 이들 사이의 높은 상관관계를 의미하지만, 표면 조도 값이 비슷하게 나타났음에도 불구하고 STS 304와 PE 재질에서는 STS 304 (6 h)가 PE (12 h) 재질보다 상당히 빠르게 생물막이 형성되었다. 이러한 결과로부터 만약 재질별로 평균 조도 값의 차이가 상당히 크다면 초기 생물막의 형성속도에 있어서 어느 정도 차이를 유발할 수 있으나, 평균 조도 값이 유사한 경우에는 재질 자체가 갖는 다른 요인들에 의해 조절되는 것으로 판단된다.

3.4 생물막 군집구조의 유사도 분석

수돗물에 노출된 시간의 경과와 수도관 재질에 따라 형성된 생물막 군집의 유사성 분석 결과, 초기 생물막 형성 시 플라스틱 재질인 PVC와 PE 재질에서 형성된 생물막 군집의 유사성이 금속 재질인 STS 304와 비교할 때 상대적으로 높게 나타났다(Fig. 4). 한편 시간 경과에 따른 군집의 차이는 매우 뚜렷하게 2개의 cluster로 나누어지는 것을 볼 수 있었다. 첫 번째 cluster I (Fig. 4)은 11개의 시료 중 10개 시료(90.9%)가 재질에 상관없이 48시간 이전에 형성된 생물막이었으며, cluster II의 경우 14개의 시료 중 11개의 시료(78.6%)가 48시간 이후에 형성된

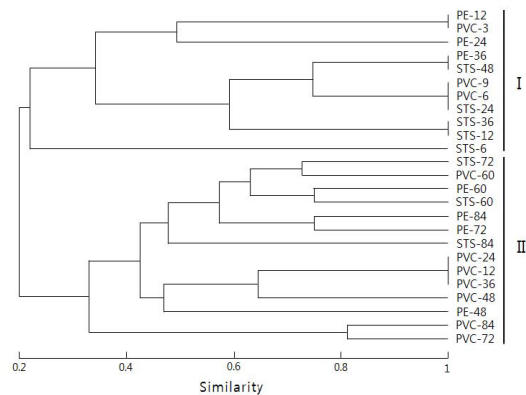


Fig. 4. Similarity assessed in biofilm communities formed on various pipe materials (PVC, STS304, PE) with time.

생물막이었다. 따라서 이들 cluster는 각각 초기 (early) 생물막과 성숙된(mature) 생물막 군집으로 이루어졌음을 보여준다. 생물막 군집의 구분이 48시간을 경계로 clustering되는 결과는 종풍부도를 나타내는 richness(S)가 48시간을 경계로 급격히 증가하는 현상과도 일치하는 결과이다(Fig. 2A). 즉 서로 다른 수도관 재질이라도 초기 생물막 형성에 관여하는 미생물 군집은 큰 차이를 보이지 않고 특정 종에 제한되다가 일정 시간이 경과하면 생물막 형성 미생물의 종류가 빠른 속도로 다양화되며 특정 종에 국한되지 않는다는 특성을 의미한다.

Stainless steel을 이용한 모형 상수관망에서 장기간(3년)에 걸쳐 형성된 생물막을 분석한 연구(Martiny *et al.*, 2003)에서는 94일을 경계로 이전과 이후(young vs. old)의 생물막으로 구분되었다. 이때 전기의 생물막 군집은 1 ~ 20일 시료와 27 ~ 94일 시료로 더욱 세분화되어 clustering되는 결과를 보여 주었다. 또한 상대적인 종풍부도의 변화에 있어서는 256일까지 계속 감소하다가 다시 증가하는 일종의 천이현상을 관찰하였다. 이와는 달리 본 연구는 생물막 형성 초기 단계에서 미생물 군집의 천이를 추적하고 제어대상 미생물 군집을 확인했다는 점에서 의미가 있다. 흔히 않은 초기 생물막 군집 연구 중 Deines *et al.* (2010)은 DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) 분석법을 이용하여 수도관 생물막 군집을 비교하였는데 접촉 후 5분이 경과 후 회수한 0일째 시료에서는 매우 단순한 밴드 패턴을 보이지만 3일, 7일, 그리고 11일 째로 갈수록 군집 구성이 다양해짐을 확인하였다. 그러나 시료 채취와 분석의 횟수가 제한되어 있어 실제적인 pioneering group의 확인은 이루어지지 못한 것으로 판단된다. 비록 수도물 생물막은 아니지만 해양 환경에서 형성된 생물막의 군집 구조 분석에 T-RFLP가 응용된 예를 Lee *et al.* (2008)의 연구에서 찾아 볼 수 있다. 아크릴, 유리, 그리고 철판 된

시편을 in situ 상태의 바닷물에 접촉시키고 3 ~ 15시간 간격으로 초기 36시간 동안의 군집구조를 분석한 결과에서 시편의 재질은 군집구조에 큰 영향을 주지 못하는 것으로 나타났다. 하지만 9시간 이내의 생물막 군집과 24시간 이후의 생물막 군집은 뚜렷이 구분되는 결과를 보여주었다. 이러한 결과는 48시간을 기준으로 초기 생물막과 성숙된 생물막 군집으로 구분된 본 연구의 결과와 크게 다르지 않은 것으로 bulk water의 물리화학적 영향에 따라 시간적 차이는 있으나 적어도 pioneering group의 존재에 의해 진행되는 생물막 형성 메커니즘은 유사한 것으로 추측된다.

4. 결론

상수관망에서 형성되고 증식하는 생물막에 의한 다양한 문제점을 해결하기 위해서는 우선 생물막을 구성하는 미생물 군집의 다양성과 구조의 변화에 대한 이해가 선행되어야 한다. 특히 초기 단계에서의 생물막 형성에 대한 연구는 생물막 형성 제어를 위해 반드시 필요한 연구로서, 이러한 목적으로 수행된 본 연구의 결론은 다음과 같다.

1. 수질분석을 통해 측정된 AOC 농도(37.3 $\mu\text{g/L}$)는 자체만으로는 생물막 형성을 제어하기 어려운 수준이었으며, 수도물에 접촉시킨 후 3시간 만에 PVC 시편에서 T-RF profile을 관찰할 수 있었다.
2. AFM 분석으로 측정된 평균 조도가 가장 높은 PVC 시편에서 가장 먼저 T-RF peak이 관찰되었으나 STS와 PE의 경우는 재질 표면의 조도가 생물막 형성 시간을 결정하는 유일한 요인은 아니었다.
3. T-RF peak의 변화를 추적한 결과 재질에 상관없이 48시간까지는 종풍부도와 군집 다양성, 우점도 등이 낮았으나 이후 빠르게 증가하는 경향을 볼 수 있었다.

4. Cluster 분석을 통해 생물막 미생물의 군집 구조를 비교했을 때 재질보다는 접촉시간에 따라 뚜렷한 2개의 그룹으로 나누어졌으며 생물막 형성을 지연시키거나 제어할 대상인 pioneer 군집이 초기 48시간의 짧은 시간에 형성되는 것을 확인하였다.

사 사

본 연구는 환경부 “차세대 에코이노베이션 기술개발사업(GT-11-G-02-001-3)”과 2011년도 한림대학교 교비연구비(HRF-2011-023) 지원으로 연구되었습니다.

참고문헌

- American Public Health Association (2005) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 21st Ed. APHA, Washington DC.
- Armon, R., Starosvetsky, J., Arbel, T., and Green, M. (1997) Survival of *Legionella pneumophila* and *Salmonella typhimurium* in biofilm systems. *Wat. Sci. Technol.*, **35**(11), pp. 293-300.
- Bachmann, R.T. and Edyvean, R.G.J. (2006) AFM study of the colonisation of stainless steel by *Aquabacterium commune*. *Int. Biodegrad. Biodegrad.*, **58**, pp. 112-118.
- Chu, C., Lu, C., and Lee, C. (2005) Effects of inorganic nutrients on the regrowth of heterotrophic bacteria in drinking water distribution systems. *J. Environ. Manage.*, **74**, pp. 255-263.
- Deines, P., Sekar, R., Husband, P.S., Boxall, J.B., Osborn, A.M., and Biggs, C.A. (2010) A new coupon design for simultaneous analysis of in situ microbial biofilm formation and community structure in drinking water distribution systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **87**, pp. 749-756.
- Eboigbodin, K.E., Seth, A., and Biggs, C.A. (2008) A review of biofilms in domestic plumbing. *J. AWWA*, **100**, pp. 131-138.
- Eichler, S., Christen, R., Hölting, C., Westphal, P., Bötzel, J., Brettar, I., Mehling, A., and Höfle, G. (2006) Composition and dynamics of bacterial communities of a drinking water supply system as assessed by RNA- and DNA-based 16S rRNA gene fingerprinting. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, pp. 1858-1872.
- Gjaltema, A., Arts, P.A.M., van Loosdrecht, M.C.M., Kuenen, J.G., and Heijnen, J.J. (1994) Heterogeneity of biofilms in rotating annular reactors: occurrence, structure, and consequences. *Biotech. Bioeng.*, **44**, pp. 194-204.
- Hallam, N.B., West, J.R., Forster, C.F., and Simms, J. (2001) The potential for biofilm growth in water distribution systems. *Wat. Res.*, **35**, pp. 4063-4071.
- Janzon, A., Sjöling, A., Lothigius, A., Ahmed, D., Qadri, F., and Svennerholm, A.-M. (2009) Failure to detect *Helicobacter pylori* DNA in drinking and environmental water in Dhaka, Bangladesh, using highly sensitive real-time PCR assays. *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, pp. 3039-3044.
- Jefferson, K.K. (2004) What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol. Lett.*, **236**(2), pp. 163-173.
- Keinänen, M.M., Korhonen, L.K., Lehtola, M.J., Miettinen, I.T., Martikainen, P.J., Vartiainen, T., and Suutari, M.H. (2002) The microbial community structure of drinking water biofilms can be affected by phosphorus availability. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, pp. 434-439.
- Krasner, S.W., Croue, J.P., Buffle, J., and Perdue, E.M. (1996) Three approaches for characterizing NOM. *J. AWWA*, **88**(6), pp. 66-79.
- Lee, J.-W., Nam, J.-H., Kim, Y.-H., Lee, K.-H., and Lee, D.-H. (2008) Bacterial communities in the initial stage of marine biofilm formation on artificial surfaces. *J. Microbiol.*, **46**, pp. 174-182.
- Lee, D.-G. and Kim, S.-J. (2003) Bacterial species in biofilm cultivated from the end of the Seoul water distribution system. *J. Appl. Microbiol.*, **95**, pp. 317-324.

- Lehtola, M.J., Miettinen, I.T., Vartiainen, T., Myllykangas, T., and Martikainen, P.J. (2001) Microbially available organic carbon, phosphorus, and microbial growth in ozonated drinking water. *Wat. Res.*, **35**, pp. 1635–1640.
- Lehtola, M.J., Nissinen, T.K., Miettinen, I.T., Martikainen, P.J., and Vartiainen, T. (2004) Removal of soft deposits from the distribution system improves the drinking water quality. *Wat. Res.*, **38**, pp. 601–610.
- Liu, W.T., Marsh, T.L., Cheng, H., and Forney, L.J. (1997) Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, pp. 4516–4522.
- Martiny, A.C., Jørgensen, T.M., Albrechtsen, H.-J., Arvin, E., and Molin, S. (2003) Long-term succession of structure and diversity of a biofilm formed in a model drinking water distribution system. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, pp. 6899–6907.
- Miettinen, I.T., Vartiainen, T., and Martikainen, P.J. (1997) Phosphorus and bacterial growth in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, pp. 3242–3245.
- O'Toole, G., Kaplan, H.B., and Kolter, R. (2000) Biofilm formation as microbial development. *Ann. Rev. Microbiol.*, **54**, pp. 49–79.
- Percival, S.L., Walker, J.T., and Hunter, P.R. (2000) *Microbiological Aspects of Biofilms and Drinking Water*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Rochelle, P.A., Fry, J.C., Parkes, R.J., and Weightman, A.J. (1992) DNA extraction for 16S rRNA gene analysis to determine genetic diversity in deep sediment communities. *FEMS Microbiol. Lett.*, **79**, pp. 59–65.
- Sartory, D.P. (2004) Heterotrophic plate count monitoring of treated drinking water in the UK: a useful operational tool. *Int. J. Food Microbiol.*, **92**, pp. 297–306.
- Sathasivan, A. and Ohgaki, S. (1999) Application of new bacterial regrowth potential method for water distribution system— a clear evidence of phosphorus limitation. *Wat. Res.*, **33**, pp. 137–144.
- Stach, J.E.M., Maldonado, L.A., Masson, D.G., Ward, A.C., Goodfellow, M., and Bull, A.T. (2003) Statistical approaches for estimating actinobacterial diversity in marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, pp. 6189–6200.
- Szewzyk, U., Szewzyk, R., Manz, W., and Schleifer, K.-H. (2000) Microbiological safety of drinking water. *Ann. Rev. Microbiol.*, **54**, pp. 81–127.
- van der Kooij, D. (1992) Assimilable organic carbon as an indicator of bacterial regrowth. *J. AWWA*, **84**(2), pp. 57–65.
- 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.
- White, C., Tancos, M., and Lytle, D.A. (2011) Microbial community profile of a lead service line removed from a drinking water distribution system. *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, pp. 5557–5561.
- Wingender, J. and Flemming H.-C. (2004) Contamination potential of drinking water distribution network biofilms. *Wat. Sci. Technol.*, **49**(11), pp. 277–286.
- Zacheus, O.M., Iivanainen, E.K., Nissinen, T.K., Lehtola, M.J., and Martikainen, P.J. (2000) Bacterial biofilm formation on polyvinyl chloride, polyethylene and stainless steel exposed to ozonated water. *Wat. Res.*, **34**, pp. 63–70.