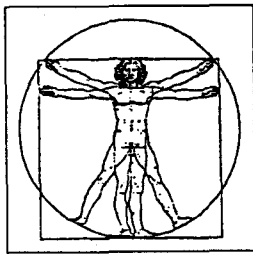


# 超純水中의 微生物評價技術



## 1. 머 리 말

반도체 제조와 같이 고순도의 순수가 필요한 공업에서는 순수를 사용하는 측과 순수를 제조하는 장치·설비를 기술적으로 연구하는 측과의 밀접한 협력관계가 필요한것이 당연하다.

10 여년에 걸쳐 양자일체의 노력결과 수질 향상도 거의 만족할 수 있는 수준에 도달했다.

물의 순수화 과정에서 제거되어야 할 것으로는 이온분·콜로이드질·유기물·용존가스·TOC 물질·미립자와 미생물등을 들수있으며 그중 미생물(초순수속에서는 세균류가 거의 100%를 차지한다.)은 순수속에서 증식하는 유일한 것이다.

순수속에서 증식불가능한 미생물중 조류·사상균(곰팡이)·효모·방사균은 세균류에 비하여 풍부한 영양을 필요로 하기 때문에 순수제조과정의 1차 순수 이전에는 존재한다 해도 좋으며, 1차순수 이후에는 세균류가 유일한 미생물로 확인되고 있다.

1차순수 이후에 사상균(곰팡이류)등이 확인되는 경우는 그곳이 미생물 오염을 심하게 받고 있는것으로 판단할 수 있다. 1차순수 속에서도 증식가능한 세균은 대부분 세균분류학상 Gram염색성의 음성에 속하는 Pseudomonas, Flavobactium, Alcaligenes 와 Achromobacter속 등이다. 그러나 세정(polishing) 과정을

거쳐 전기비저항치  $18M\Omega \cdot m$ 의 초순수속에 존재하는 세균은, 대부분이 *Pseudomonas* 속에 속하는 것이다. *Pseudomonas* 속의 세균중 어떤것은 표 1 과 그림 1.2에 표시된 것 처럼 초순수속에서도 왕성한 번식을 하고 있음을 알 수 있다.

그림 1에 표시된 *Pseudomonas - A*라 호칭한 세균은 조사온도 ( $25 \sim 37^{\circ}C$ ) 사이에서는 동일한 번식 Pattern을 보이며, 최초에는 수개 / ml만 존재하던 것이 초순수속에서 48시간 정도 경과하자  $10^5$  개/ml까지 증가했다.

표 1. *Pseudomonas*속 2 균의 초순수속에서의 증식

균 주	온 도	START시	15시간후	24 시간후	48 시간후	72 시간후
Pseu - A	25°C	2개 / ml	$2.0 \times 10$	$2.0 \times 10^2$	$2.8 \times 10^5$	$4.0 \times 10^5$
	30	3	$1.4 \times 10^2$	$3.5 \times 10^4$	$5.5 \times 10^5$	$6.5 \times 10^5$
	37	5	$5.0 \times 10^2$	$2.5 \times 10^5$	$6.0 \times 10^5$	$7.0 \times 10^5$
Pseu - B	25°C	5개 / ml	8	$6.3 \times 10$	$9.4 \times 10^4$	$2.5 \times 10^5$
	30	4	8	$6.0 \times 10$	$4.5 \times 10$	3
	37	$1.0 \times 10$	0	0	0	0

또 그림 2에 표시된 *Pseudomonas - B*는  $25^{\circ}C$  부근에서 잘번식하지만  $30^{\circ}C$  이상이면 그다지 번식하지 않음을 알수있다.

같은 *Pseudomonas*속의 세균이라도 다양한 번식패턴을 나타내는 것이 밝혀졌다. 이처럼 초순수라 할만큼 순수화되어 영양원이 거의 없다고 생각되는 환경속에서도 충분히 번식할 수 있는 것이다.

따라서 초순수라 할지라도 미생물에 대한 관리대책은 불가결하며, 반도체 제조에 사용되는 순수속의 세균은 이물질, 불순물로서 제품불량등을 야기시키는 원인이 되기때문에

그 종류와 수등을 정확하게 파악해야 한다. 세균균체의 하나하나가 이물이며 불순물이기 때문에 세균이 살아있거나, 죽어있거나 반도체 제조용 초순수속의 세균류 평가는 살아있는 세균수를 추정하는 배양법과 이미 죽어버린 세균 및 부적당한 배양으로 Colony에 의한 관찰이 불가능한 개체등을 포함한 총세균수의 측정법, 이 두가지 기법이 필요하게 되었다.

본 장에서는 초순수속의 미생물(세균류) 평가법으로 생균수 측정법과 총세균수 측정법에 대하여 설명하고자 한다.

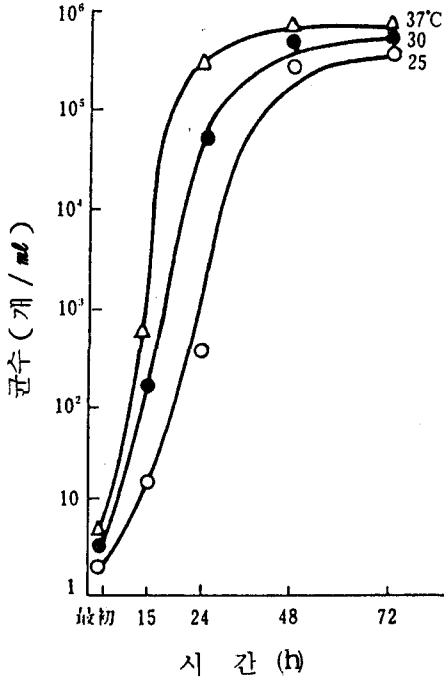


그림 1 Pseudomonas - A

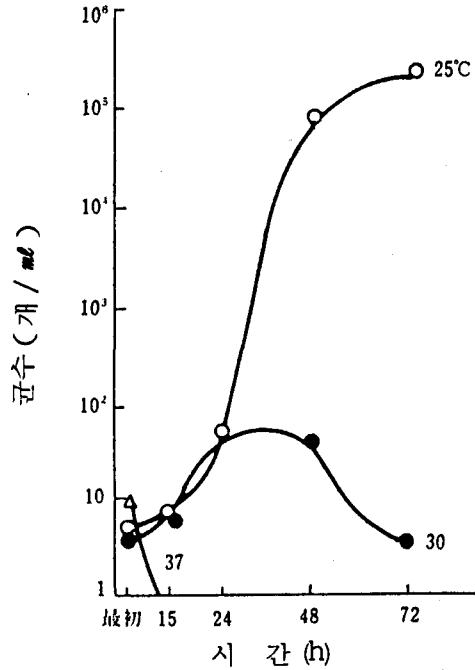


그림 2 Pseudomonas - B

## 2. 배양법에 의한 세균수의 측정

물속의 세균조사에 관해서는 상수시험법이나 일본약국법등에 상세하게 설명되어 있다.

어느 방법이나 그 기법은 초순수속의 세균수측정에 그대로 적용할 수는 있지만, 물속세균의 영양원이 될 배지(培地)의 조성, 농도 및 배양의 시간, 온도등 검토해야할 것이 많으며, 그 기법이 꼭 정해져 있는 것은 아니다. 일본의 학자 나가사기(中崎) 씨는 제약용 정제수(일본약국법에 의하면 상수를 증류나 이온교환 처리를 거친물)속의 세균에 대해 SCDA배지, 보통한천배지등을 사용하여 세균수를 측정할 경우 배지의 영향, 배양온도(27, 37°C)와 생균수 관계등의 조

사와 분리된 세균의 동정법(同定法)에 대해서도 검토하고 있다.

필자들은 반도체제조현장에서 초순수제조과정의 몇 포인트를 선정하여 각 포인트의 세균수를 조사하였다.

배지는 보통한천배지와 CPS배지를 이용하여 배양온도 25, 30, 37°C로 한 결과는 표 2와 같다.

표 2에서 명확하게 알수 있듯이 역삼투(Reverse Osmosis) 처리전의 물속에는  $10^3$  개/ml 정도의 세균이 확인되고 있지만 배지와 배양온도차에 의한 수적인차는 그다지 크지 않았다. 그런 경향은 1차 이온교환후의 순수에도 나타나고 있으며, 이것은

표 2. 배지와 온도별에 의한 각수질의 세균수

	25°C		30°C		37°C	
	보 통	CPS	보 통	CPS	보 통	CPS
1. 역삼투처리전	$1.4 \times 10^3$	$2.2 \times 10^3$	$1.2 \times 10^3$	$2.7 \times 10^3$	$1.2 \times 10^3$	$1.3 \times 10^3$
2. 역삼투처리후	6	1	$1.1 \times 10$	0	1	0
3. 1차이온처리후	$4.9 \times 10$	$3.9 \times 10$	$5.3 \times 10$	$4.0 \times 10$	$4.4 \times 10$	$3.6 \times 10$
4. POLISHING후	1	0	1	1	0	0
5. USE POINT-1	0	0	0	0	0	0
6. USE POINT-2	1	1	1	0	1	0
7. USE POINT-3	1	1	1	0	0	0

물속에 잔존하는 영양원의 양, 질 및 존재하는 세균의 종류에 관계하고 있는 것으로 추측된다.

표중에서 No.4 이후 즉 최종적으로 세정된 초순수속에서 확인된 세균은 대부분 *Pseudomonas*속에 속하지만, 원수에서 1차순수단계까지의 순수속에서 확인되는 세균으로는 전술한 *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*과 *Achromobacter*속 등이다.

다음은 배양기법에 대한 예를 소개한다.

#### (1) 한천평판 회석법

시료 1 ml씩을 멸균된 3~5개의 Petri dish(90 mm  $\phi$  정도)에 무균적으로 접종하며, 사전에 고압멸균후 40~50°C로 냉각시킨 배지를 무균적으로 유입시켜 잘 교반한뒤 정치시켜 항온기속의 적정온도하에

서 배양시킨다. 배양일정시간(24~96시간) 경과후에 배지속과 표면에 육안으로 Colony가 관찰될정도 증식한 세균을 계수(計數)하여 시료 ml 당의 세균수(생균수)로 하는 방법이다.

이 방법은 배지의 종류·농도·PH 및 배양시간, 온도등 시험목적에 따라 폭넓게 변화시킬수 있는점이 유리하다. 또 시료 1 ml속의 세균수 측정용으로 간단한 Water Sampler도 시판되고 있으나 초순수속의 세균수 측정에는 적합하지 못하다.

#### (2) Membrane Filter 포집법

초순수처럼 세균수가 극히 적은 시료인 경우는 전술한(1)과 같이 세균수로 평가하는 것이 어렵다.

표 3에 1 ml 배양법(1985년도) 및 100 ml 배양법(1986년도)으로 조사한 결과를 예

시한다.

1 ml배양에서는 0 개 / ml라는 숫자가 여  
기저기 확인되고 있으나 100 ml 배양에서는  
1 ml배양과는 달리 수개~수십개 / ml라는숫  
자를 볼수있다.

1 ml속의 세균수를 측정하여 0 개라 하더  
라도 100 ml속에서는 적지만 세균은 확인된  
다. 세균중 가령 Pseudomonas속 등의  
세균은 초순수속에서도 쉽게 증식하기 때문

에 Sample Volume을 확대한 검출법이  
필요함은 당연하다고 하겠다.

본항에서는 Sample Volume을 확대  
해서 실시하는 방법의 하나로 Membrane  
Filter포집법에 대하여 설명하고자 한다.

이방법은 대략 다음과 같은 방법으로 실  
시된다. 우선 직경 47 mm, 구경 0.2~0.45  
μm의 Membrane Filter를 전용패널에  
넣어 미리 멸균시켜두며, 그 Filter로

표 3.

		4 월	5 월	6 월
FF 후 (FINAL FILTER)	1985년 1 ml배양	3개/ml	1.0 × 10	4
	1986년 100 ml배양	8.2×10개/100ml	4.7 × 10	2.2 × 10 <sup>2</sup>
UP - 1 (USE POINT)	1985년 1 ml배양	0	0	2
	1986년 100 ml배양	2	0	2
UP - 2 ( " )	1985년 1 ml배양	0	0	0
	1986년 100 ml배양	2	5.0 × 10	6
UP - 3 ( " )	1985년 1 ml배양	0	0	1
	1986년 100 ml배양	1.0×10	3	3.5 × 10
UP - 4 ( " )	1985년 1 ml배양	0	0	1
	1986년 100 ml배양	3	2.0 × 10	1.0 × 10
UP - 5 ( " )	1985년 1 ml배양	4	0	0
	1986년 100 ml배양	2.3×10	2.2 × 10	4.4 × 10

시료(100~1000 ml)를 여과한다. 여과후의  
Filter를 사전에 멸균Schale(Patri  
dish)에 유입시켜 고체화시킨 한천평판  
(寒天平板)위에 여과 포착면을 위로하여

옮기면서 일정온도하에서 배양하며, 필요시  
간 경과후 Membrane Filter위에 확  
인된 Colony수를 측정하여 Sample  
Volume속의 세균수로 평가한다.

이 방법은 세균에 필요한 영양원과 온도·시간등을 제공한 결과 형성된 Colony 수로 평가한다는 점에서 앞의(1)과 원리적으로 같다.

최근 다수메이커의 Membrane Filter 가 시판되고 있지만 Filter에 따라 회수율, 즉 세균의 검출수에 차이가 생기게 되므로 사전에 적당한 Filter를 결정해 둘 필요가 있다.

또 이방법과 유사한 방법으로 시판되고 있는 박테리아 분석기(Bacteria Analysis Monitor)가 있지만, 이방법은 현장에서 시료채취시의 오염방지등 고도한 기술이 요구되며 간이법으로 그대로 실시하는데는 약간의 위험성도 있다. 또한 사용해야 할 배지등에도 제한되어 있기때문에 초순수속의 세균평가로는 완전하지 않다고 생각된다.

### (3) MPN법 (最確數法)

이 방법은 본래 액체또는 액상의 음료·식품속의 대장균수 조사에 사용된 것이다. 많은 세균은 한천등의 고형배지보다 액체배지속에서 번식하는 쪽이 일반적으로 현저하기 때문에 세균의 존재에 의한 증식이 액체의 탁도로 확인할 수 있다는 이점을 가지고 있다. 따라서 순수속의 세균수 조사에 쉽게 적용할 수 있기 때문에 그 방법을 간략하게 소개하고자 한다.

MPN법이란 Most probable Number의 약자로 최확수법이라고도 한다. 이

방법은 1/10 씩 수단계로 연속하여 희석한 시료를 각각 5분씩 유당(乳糖)부이용(bouillon)발효관에 접종한후 가스발생이나 배지액의 탁도에 의해 대장균의 존재여부를 확인하며 그 결과로 부터 확률적으로 대장균의 수로써 산출하며 이것을 MPN으로 나타내는 방법이다.

순수인 경우는 시료를 원배(무희석), 1/10, 1/100 에 무세균적으로 희석하여 각각 1 ml씩의 적당한 액체배지를 주입한 후 사전에 멸균냉각시킨 시험관에 5분씩 접종하여 적당온도에서 배양하며 존재한 세균의 증식에 의해 탁하게 되지않은 시험관의 본수를 각희석단계에서 조사하여 최확수표에 의해 신뢰한계 95%의 최확수를 구하는것이다.

세균수가 매우적다고 생각되는 경우는 Membrane Filter를 사용하여 10배, 100배로 여과농축한후 Filter를 액체배지속에 넣어 배양하는 기법도 사용되고 있다. MPN법은 배지의 선택이나 기타의 배양조건이 적절하면 정도가 높다. 그러나 번거로움과 숙련도가 요구되기 때문에 손쉽게 실시할 수 없다는 단점이 있다.

### 3. 총세균수 측정방법

세균류는 그 생사와는 관계없이 각종 이온이나 금속을 포함하여 반도체 제조에 불순물을 내포한 1가지의 형태나 물체로 순수속에 존재하고 있다.

미생물이 반도체 제조에 영향을 주는 요인으로 일본의 학자 스즈끼(鈴木)씨는 ①이물로서, ②불순물로서, ③표면특성으로서의 3가지점으로 나누어 각각에 대하여 상술하고 있다. 따라서 세균은 살아있거나 죽어 있거나 같은 문제를 가지고 있기 때문에 사균을 포함한 총세균수의 측정이 필요하게 되었다.

세균이외의 다른 미립자는 초순수 속에서 그수가 증가하는 일은 없으며, 초순수 속의 미립자중 약 80%이상이 세균류란것을 고려하면 반드시 세균류와 그이외의 미립자를 분별하면서 정량하는 방법이 바람직하다.

여기서는 세균류와 기타 미립자를 분별적으로 정량하여 0.2 $\mu$ m 이상의 규모에 충분한 정도를 가진 Membrane Filter를 이용한 직접검경법(直接檢鏡法)에 대하여 설명한다.

이방법은 간단히 말하면 검사해야할 물을 Membrane Filter로 여과하여 Filter위에 포착된 미생물·미립자에 대하여 현미경 관찰을 쉽게 하기 위한 염색을 한후 현미경으로 세균류와 기타 미립자를 분별적으로 정량화(定量化)하는 비교적 평이한 방법이다.

● 직접검경법에 의한 순수속의 미생물·미립자수의 평가법

(1) 시료의 여과 포집

시료(400~500 ml 그 이상도 좋음)를 구

경 0.2 $\mu$ m의 Nuclepore Membrane Filter를 사용하여 전용 시료채취기로 가압여과 한다. 이 Filter를 사용하는 이유는 다른 Filter에서 확인할 수 없는 다음과 같은 특징이 있다.

(a) 균일한 직경의 세공이기 때문에 Filter구멍이상의 미생물, 미립자를 완전히 Filter표면에 포착시킬 수 있다.

(b) 박막(10~13 $\mu$ m)으로 투명성이 뛰어나고, 투과광에 의한 현미경관찰이 쉽다.

(c) 염색시 Filter는 염색되지 않고 표면에 포착된 미생물·미립자만이 염색된다.

(2) 건조

여과후의 Filter를 petri dish에 옮겨 두껍을 한후 은실에서 건조시킨다.

(3) 염 색

메칠렌 블루나 흑신등을 사용하며 양자의 혼합용액도 가능하다. Filter표면에 염색액이 직접 닿지 않도록 종이 Filter에 염색액을 침투시켜 그위에 Membrane Filter를 두어 Filter 뒤쪽에서 표면으로 Filter의 모세관을 통하여 나온 무립자(無粒子)의 염색액이 Filter 표면에 포착된 세균이나 기타 미립자를 염색하게 한다.

(4) 물세척

종이 Filter에 깨끗한 물을 침투시켜 그위에 염색된 Filter를 두어 조용히 이

동시키면서 몇분간 염색액을 씻어낸다.

(5) 건조

(2)와 동일

(6) Präparat의 작성

염색건조한 Filter를 슬라이드글래스 위에 놓고, Filter위에 테딜유를 한방울 떨어뜨린후 카바글래스를 얹는다.

(7) 현미경 관찰

비교적 큰입자 (5 $\mu$ m이상)는 80~200배의 배율로 관찰하지만 세균류는 역시 1000배이상의 배율로 관찰이 가능하다. 전자현미경에 의한 관찰법도 가능하지만 관찰할 수 있는 시야가 광학현미경에 비해서 좁기 때문에 다소 정도가 저하하는 것도 고려해야 한다. 전자현미경은 정량보다는 정성적 평가에 매우 유리하다. 광학현미경을 사용할때 정량법의 개략은 다음과 같다. 우선 시료 1 ml당 검사에 필요한 관찰해야할 시야수(視野數)를 사전에 조사해 둘 필요가 있다. 시료 1 ml당 검사에 필요한 현미경의 시야수를 N이라 하면 다음 식과 같다.

$$N = \frac{\text{필터 여과 유효면적}(cm^2)}{\text{시야면적}(cm^2) \times \text{시료량}(ml)}$$

만일 500 ml의 시료량으로 여과 유효직경을 23 mm라 하고 600배로 관찰할 때의 해당 현미경 시야 직경이 0.23 mm였다고 하면

$$N = \frac{(23/2)^2 \pi}{(0.23/2)^2 \pi \times 500} = 20$$

결국, 20시야를 관찰해야 시료 1 ml당을 관찰할 수 있게 된다. 이 방법의 실시에서는 외적 오염을 완전히 배제 해야함은 당연하다. 또 관찰시에는 미생물과 미생물 이외입자와의 판별이 되어야 한다.

4. 맺 음 말

순수를 다량 사용하는 반도체 공업에서 사용 순수속의 세균류 존재는 가령 그것이 살았거나 죽었거나 각종의 이온이나 물질을 내포한 1개의 물체로서 제품율이나 품질에 큰 영향을 준다. 번거롭지만 그 조절은 중요하다. 조절에는 정확한 현황의 평가법이 불가결함은 당연하다. 이상에서 언급한 방법이 이 분야에 종사하시는 관련자여러분께 다소나마 도움이 되었으면 한다.