

수돗물속에서 관재질에 따른 생물막의 CLPP

이동근, 이재화, 이상현, 하배진, 하종명*

신라대학교 공과대학 생명공학과

Received September 14, 2004 / Accepted October 11, 2004

CLPP of Biofilm on Different Pipe Materials in Drinking Water Distribution System. Dong-Geun Lee, Jae-Hwa Lee, Sang-Hyeon Lee, Bae-Jin Ha and Jong-Myung Ha. *Department of Bioscience and Biotechnology, College of Engineering, Silla University* - The effect of pipe materials on biofilm communities were investigated by CLPP (community level physiology profile) using Biolog GN plates. Heterotrophic bacterial concentrations were $10^4 - 10^6$ CFU/cm² and there was no differences between galvanized iron and carbon steel. Average optical density of Biolog plate was similar between two pipe materials. However, CLPP was different according to the type of pipe materials and exposed times to tap water, and CLPP was independent of bacterial concentration. This represents the differences of bacterial communities with pipes and water contact times.

Key words – biofilm, tap water, CLPP, carbon steel, galvanized iron

생물막은 수계(水界)에 노출된 환경에서 발견되는 미생물의 서식지중 하나이다. 생물막은 수계의 부유환경과는 다른 특이한 세균을 가지고 있고 생활사도 다르며[20], 영양분의 농도가 낮은 빈영양조건에서 세균의 성장에 주요한 것으로 알려져 있다[13].

배급수관의 수돗물은 빈영양(oligotrophic) 조건과 소독제가 있지만 생물막의 존재가 발견되었으며[17], 생물막은 위생적 문제뿐 아니라[9,18] 관말에서의 급격한 세균수 증가를 초래하는 것으로 파악되었다[15]. 수돗물 배급수관망의 생물막에 존재하는 미생물군집을 분석할 때 배양에 기초한 방법[9]과 배양을 통하지 않은 방법[10]이 있지만, 모두 많은 시간과 경비가 소요된다.

Biolog GN plate는 95개의 서로 다른 탄소원의 이용능에 의한 발색양상의 차이를 근거로 세균 동정용으로 이용되어 왔다. 그리고 이것은 세균군집의 잠재적 기능성을 평가하여 군집을 비교하는[5] 것으로도 이용되고 있으며 그러한 방법은 CLPP (Community Level Physiology Profile)로 알려졌다. CLPP는 간편하고 분석속도가 빠른 장점이 있다[19].

배급수관망은 아연도강관, 탄소강관, PVC 등 다양한 재질의 파이프로 구성되어 있다. 아연도강관과 탄소강관은 공공과 빌딩의 배급수관에 널리 이용되는 재질이며[7], 배급수관망에 새로이 설치되는 관 역시 미생물 성장의 서식처로 이용될 가능성이 높다[9].

본 연구에서는 배급수관에 자주 사용되는 아연도강관과 탄소강관이, 관말의 수돗물에 노출된 이후에 나타나는 생물막의 세균농도 변화를 파악함과 동시에, 미생물군집의 양상

이 관 중 z류와 시기별로 변화하는 지를 Biolog GN plate를 이용한 CLPP로 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

모델시스템

탄소강관(carbon steel pipe)과 아연도강관(galvanized iron pipe)의 쿠편을 15×75×1 mm (총표면적 24.3 cm²)로 제작하였다. 멸균된 Milli-Q 증류수와 초음파세척기로(Branson 3210 washing sonicator, USA) 세척된 쿠편들을, 스테인레스 재질의 생물막실험 용기(36×105×225 mm)에 삽입한 후 70 ml/min의 유량으로(회전속 0.08/min) 관말의 수돗물을 흘렸다(Fig. 1).

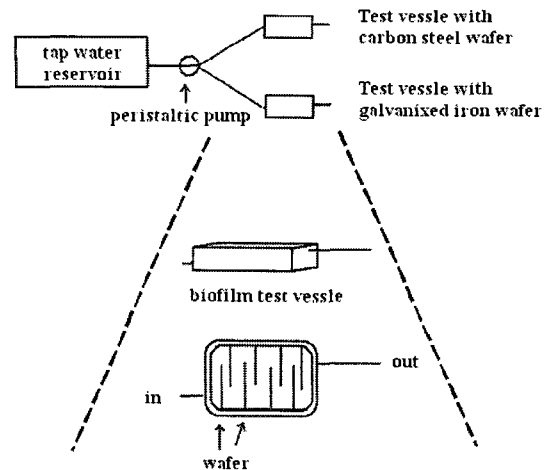


Fig. 1. Schematic diagram of semi-pilot plant system.

*Corresponding author

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

E-mail : jmha@silla.ac.kr

시료채취 및 생물막 미생물 분리

쿠폰들을 무균적으로 채취한 후 30 ml의 탈착용액을[9] 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[9]. 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.

세균농도측정 및 CLPP

중속영양세균의 농도는 R2A 배지를 이용하여[1] 매주 측정하였다. 3주, 6주, 12주 짜 시료를 채취한 후 Biolog GN plate (Biolog, Hayward, CA, USA)의 각 well에 시료 180 µl씩 접종하였고, 항습배양기(25℃)에서 1주일간 배양하였다. 매일 microtiter plate reader (model Vmax; Molecular Devices Corp., Menlo Park, CA.)를 이용하여 540 nm에서 광학밀도를 측정하였다. 대조군으로 멸균된 수도물을 이용하였다.

통계분석

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

결과 및 고찰

세균농도

실험에 사용된 배급수관말의 수도물에 함유된 잔류염소농도를 o-toluidine colorimetry 법으로 조사한 결과, 실험기간 동안 0.3 mg/l 이하로 나타났다(Advantec, Japan). Fig. 2는 관말의 수도물에 잠긴 아연도강관과 탄소강관의 생물막이 나타내는 세균농도의 변화 양상이다. 수도물에 노출된 1주일 후부터 생물막은 10⁴ CFU/cm² 이상의 농도를 보여, 생물막 성장 속도가 빠름을 알 수 있었고 이[9] 등의 결과와 유사함을 알 수 있었다. 실험기간동안 10⁴ - 10⁶ CFU/cm²의 농도를 보였고, 탄소강관과 아연도강관에 따른 생물막의 세균농도 차이가 없었다(P > 0.147, t-test).

LeChevallier 등은[8] 잔류염소의 농도가 4 mg/l가 되어도 강관에서 성장하는 생물막의 세균농도 감소가 없음을 보고하였는데, 본 연구에 사용된 수도물은 잔류염소농도가 0.3 mg/l 이하로 생물막 세균의 농도가 높았다(Fig. 2). 시간에 따라 각 쿠폰에서 녹이 발생하는 것으로 관찰되었다. 배급수관 내부에서 생기는 부식은[7] 생물막에 의한 biocorrosion과 관계가 있는 것으로 생물막을 소독제로부터 보호하는 것으로 보고되었다[12].

수도물 배급수관은 다양한 재질의 파이프로 구성되어 있어, 수계에 대한 미생물 오염의 원인이 될 수 있다. 본 연구에서는 배급수관망을 구성하는 재질 중 아연도강관과 탄소강관 위에서 생성되는 생물막을 구성하는 미생물군집의 농도와 활성을 비교하였다.

CLPP (Community Level Physiology Profile)

Biolog GN plate를 이용한 CLPP는 각 미생물군집의 구성원들이 보이는 탄소원의 이용도를 서로 비교하여 군집수준의 대사활성도와 대사가능성을 비교하는 것으로, 유사한 중들로 구성된 군집들은 유사한 CLPP를 보인다. CLPP가 시료 특이적이며 재현성이 있다는 것이 보고된 후[6], Biolog plate는 다양한 시료의 미생물군집 분석에 이용되어왔다.

Fig. 3은 생물막유래 미생물이 Biolog GN plate에서 나타내는, 각 well의 광학밀도를 매일 측정하여 나타낸 결과이다. 광학밀도 2 이상은 유효하지 않을 수도 있지만 높은 광학밀도를 보이는 탄소원의 종류와 숫자가 관종과 시기별로 다른 것을 알 수 있었다. Fig. 3을 통하여 첫째 광학밀도의 양상이 탄소강관과 아연도강관에 따라 그리고 시료채취 시기에 따라 다른 것으로 나타나, 미생물군집의 양상이 시간과 재질에 따라 다른 것을 알 수 있었다. 둘째 탄소강관은 아연도강관과 비슷한 세균농도를 보였지만(Fig. 2) 분해를 잘하는 탄소원의 종류가 많은 것으로 나타나(Fig. 3) 세균농도와 탄소원 이용성이 서로 다름을 알 수 있었고, 탄소강관이 다양한 탄소원 이용도를 보여 활성이 높은 세균을 많이 함유하는 것으로 파악되었다. 셋째 광학밀도가 증가되는 시기가 시료채취 시기에 따라 5일, 3일, 4일 등 모두 다른 것으로 나타나 1회 측정에는 문제가 있음을 알 수 있었다. 넷째 1주일도 지나도 각 탄소원에 대한 광학밀도의 범위가 넓게 나타났는데, 이는 미생물군집이 탄소원에 대한 이용정도가 다른 것을 알 수 있었다. 마지막으로 Fig. 3에서 고립된 점들이 존재하는 것은 영양분에 대한 선호도가 미생물군집에 따라 다르다고 유추할 수 있었다.

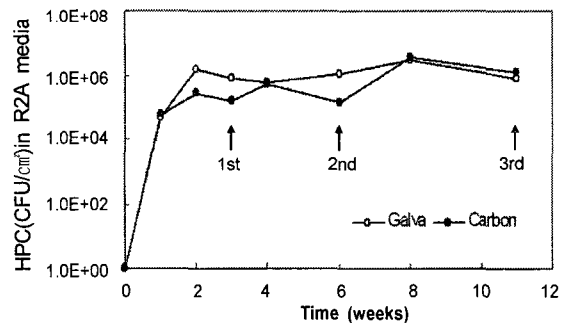


Fig. 2. Patterns of heterotrophic plate count (HPC) on galvanized iron and carbon steel in the tap water at the end of the drinking water distribution system. Arrows in figures represent the sampling time for CLPP analysis (Fig. 3).

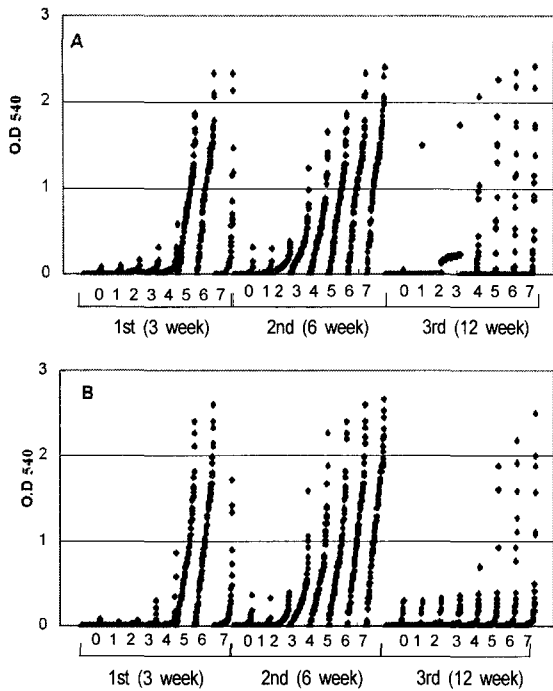


Fig. 3. Distribution of carbon usage (optical density) patterns of bacterial communities from galvanized iron (A) and carbon steel (B) pipe in Biolog GN plate. Numbers represent culture time (day) and 3W, 7W and 11W represent the sampling time (arrows in Fig. 2).

Lehman 등[11]은 빈영양조건(oligotrophic)의 수계를 대상으로 CLPP와 *in situ* hybridization을 수행하여 상호결과의 연관성이 높음을 보였는데, 수돗물도 빈영양조건이므로 Biolog GN plate를 이용한 CLPP 분석이 유용함을 알 수 있었다.

생물막을 구성하는 세균들의 탄소원 이용도에 영향을 미치는 요인들을 분석하기 위하여 주요인분석(principal component analysis, PCA)을 수행하였다. Fig. 4는 각 시료를 1주일간 측정된 광학밀도의 평균값을 이용하여 주요인분석을 수행한 결과이다. 탄소원 이용도의 차이에 영향을 미치는 전체 요인들 중에서, 첫번째 주요인(PCA1) 두번째 주요인(PCA2) 각각 47.8%와 33.3%의 비중을 갖는 것으로 나타났다. PCA2는 통계분석을 위해 아연도강관과 탄소강관의 결과에 인위적으로 번호를 부여했던 결과로 사료되었으며, 동일한 아연도강관과 탄소강관이라 하더라도 PCA1 축을 보면 시료채취 시기별로 각 점의 위치가 달라 PCA1은 시료채취 시기로 사료되었다. 이는 생물막의 군집이 나타내는 기능성이 시간에 따라 다르다는 것이므로, 시간에 따라 생물막의 미생물군집이 변화했음을 보여주는 것으로 추정된다. 그리고 Fig. 3에서 광학밀도의 전체적 양상이 탄소강관과 아연도강관에 따라 다른 것으로 나왔는데, 평균값에서는 차이가 없는 것으로 나타나 (Fig. 4) 평균값을 이용하는 AWCD (average well color development)법으로는[6] 미생물군집 분석에 문제가 될 수 있음을 알 수 있었다.

CLPP는 배양의존성 방법으로 현재의 미생물군집이 나타내는 대사활성도가 아닌, 일부 세균의 성장에 의해 결과가 나타나는 대사가능성을 나타내는 한계를 가지고 있으므로 [19], 배양시간을 짧게하여 배양성문제를 극복하려는 시도가 있었다[2]. 하지만 Smalla 등은 배양한계가 나타나지 않는 것을 보고하였으며[19], 배양을 통하지 않고 미생물군집을 분석하는 DGGE (denaturant gradient gel electrophoresis)와 CLPP에 의한 분석이 일치함을 보여준 사례도 있었다[3]. 두 보고의[3,19] CLPP의 분석시기가 서로 달랐는데, 본 연구의 결과에 의하면 같은 시료라도 시료채취시기에 따라 활성을 보이기까지의 시간이 서로 다른 것을 알 수 있었다(Fig. 3).

먹는물 여과층에 대한 CLPP 분석을 통해 오존처리 여부와 접촉시간, 온도 등이 미생물군집의 구조에 영향을 미치는 것으로 보고되었는데[14], 본 연구에서는 생물막을 구성하는 미생물 군집의 대사적 다양성이 관종과 시기별로 다른 것을 알 수 있었다.

탄소원의 발색과 세균수는 연관이 있어, 각 well당 세균의 절대수가 현미경을 이용한 계수에서 10^3 이하가 되면 발색이 잘 되지 않는 것으로 보고하였다[4]. 본 실험에서는 10^3 CFU/well 이상이 포함되어 있는 것으로 나타났으며(Fig. 2), 일반적으로 배양법보다 현미경관찰법이 10배 이상의 세균수를 나타내므로 본 연구에서 세포수 부족에 의한 영향은 없었던 것으로 사료된다. 실제로 세균농도는 3번의 실험 모두 비슷했지만(Fig. 2) 탄소원의 이용정도는 다른 것으로 나타나 (Fig. 3), 세균농도가 아닌 다른 요인이 CLPP에 영향을 미치는 것을 알 수 있었다.

Smalla 등은[19] 영양분 농도가 높은 곳에서 살아가는 γ -Proteobacteria가 발색에 영향을 미치는 것을 보고하였다. 본 연구결과도 현재의 미생물군집을 구성하는 종의 비율이 유지된 채 나타나는 활성도가 아닌, 일부 종의 성장에 의한 결과일 가능성이 있다[16]. 하지만 결과를 보면 시료채취시기와 관종에 따라 이용할 수 있는 탄소원 이용의 정성적, 정량적 값이 다른 것으로 나타났(Fig. 3). 이는 미생물군집이 서로 상이함을 시사하는 결과라 할 것이다. 그리고 Biolog

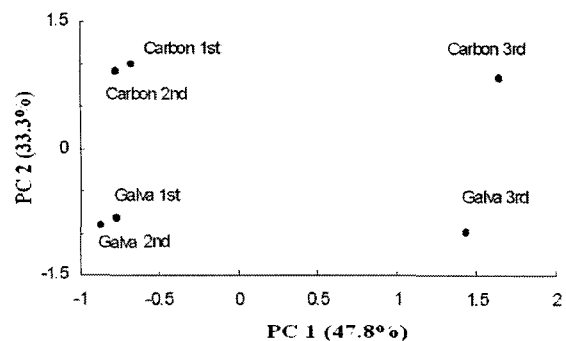


Fig. 4. Principal component analysis for the average values of each sample in the CLPP analysis.

GN plate에서 이용하는 탄소원을 이용하여 배지를 만들면 더욱 다양한 미생물의 배양도 가능할 것으로 사료되어 추후 계속 연구하여야 할 것으로 생각된다.

요 약

배급수관망에 사용되는 아연도강관과 탄소강관이, 수돗물 속에서 생장시키는 생물막의 세균농도와 미생물군집의 양상을 비교하기 위하여 Biolog GN plate를 이용한 CLPP를 수행하였다. 세균농도는 $10^4 - 10^6$ CFU/cm²이었고, 탄소강관과 아연도강관에 따른 생물막의 세균농도는 유의한 차이가 없었다. 평균적인 발색양상은 비슷하였지만 개별적인 CLPP 양상은 재질과 시기에 따라 다른 것으로 나타나, 미생물군집의 양상이 시간과 재질에 따라 다른 것을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 산업자원부의 지역혁신인력양성사업과 Brain Busan 21의 지원을 받아 수행되었습니다.

참 고 문 헌

1. APHA. 1995. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 19th edition. Washington, DC.
2. Degens, B. P. and J. A. Harris. 1997. Development of a physiological approach to measuring the catabolic diversity of soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry* **29**, 1309-1320.
3. Fantroussi, S. E., L. Verschuere, W. Verstraete and E. M. Top. 1999. Effect of phenylurea herbicide on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 982-988.
4. 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. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 4419-4424.
5. 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. *Applied and Environmental Microbiology* **57**, 2311-2359.
6. Garland, J. L. 1996. Analytical approaches to the characterisation of sample microbial communities using patterns of potential C source utilisation. *Soil Biology and Biochemistry* **28**, 213-221.
7. Geldreich, E. E. 1996. *Microbial Quality of Water Supply in Distribution Systems*. Lewis Publisher. NY.
8. LeChevallier, M. W., C. D. Lowry, and R. G. Lee. 1990. Disinfection of biofilms in a model distribution system. *Journal of American Water Works Association* **82**, 87-99.
9. Lee, D.-G. and S.-J. Kim. 2003. Bacterial species in biofilm cultivated from the end of the Seoul water distribution system. *Journal of Applied Microbiology* **95**, 317-324.
10. Lee, D.-G., C. H. Lee, and S.-J. Kim. 2004. Diversity and dynamics of bacterial species in a biofilm at the end of the Seoul water distribution system. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* in press.
11. 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. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 2799-2809.
12. Lo, W., Y. M. Nelson, L. W. Lion, M. L. Shuler and W. C. Ghiorse. 1996. Determination of iron colloid size distribution in the presence of suspended cells: application to iron deposition onto a biofilm surface. *Water Research* **30**, 2413-2423.
13. Marshall, K. C. 1988. Adhesion and growth of bacteria at surfaces in oligotrophic habitats. *Canadian Journal of Microbiology* **34**, 503-506.
14. Moll, D. M. and R. S. Summers. 1999. Assessment of drinking water filter microbial communities using taxonomic and metabolic profiles. *Water Science and Technology* **39**, 83-89.
15. Park, S. J. 1993. Bacterial regrowth and biofilm formation in water distribution system. Doctorial thesis. Seoul National University. Seoul.
16. Preston-Mafham, J., B. Lynne and P. F. Randerson. 2002. Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilisation profiles - a critique. *FEMS Microbiology Ecology* **42**, 1-14.
17. Ridgway, H. F. and B. H. Olson. 1981. Scanning microscopic evidence for bacterial colonization of a drinking water distribution system. *Applied and Environmental Microbiology* **41**, 274-287.
18. 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 Research* **32**, 2787-2797.
19. Smalla, K., U. Wachtendorf, H. Heuer, W.-T. Liu, and L. Forney. 1998. Analysis of Biolog GN substrate utilization patterns by microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 1220-1225.
20. Szewzyk, U., R. Szewzyk, W. Manz and K.-H. Schleifer. 2000. Microbiological safety of drinking water. *Annual Review of Microbiology* **54**, 81-127.