

상수도 배급수관 생물막에서의 미생물 천이

박성주 · 조재창 · 김상종*

서울대학교 자연과학대학 미생물학과

상수도 급수관으로 가장 많이 이용되고 있는 아연도 강관 조각을 이용한 생물막 실험장치에서 형성된 생물막을 주사형 전자현미경으로 관찰하였다. 3일만에 조각 표면의 공동이나 균열부위를 중심으로 많은 유기물입자들이 조각 표면에 흡착되어 표면이 조절되었으며, 직경 $0.2 \sim 0.5 \mu\text{m}$ 정도의 아주 작은 구형세균이 유기물과 더불어 표면에 흡착되어 있었다. 1주일 후에는 이들 세균이 사슬형태의 군집으로 천이되었고, 3주일 후에는 포도송이 모양으로 천이됨과 더불어 유기물 층의 두께와 면적이 확대되었다. 4주일 후에는 표면에 흡착된 생물막 조각과 세균들이 탈착되어 수중으로 유입된 것으로 보이는 증거들이 확인되었다. 6주일 후에는 유기물 층이 조각 표면을 거의 덮어 버렸으며, 작은 구형세균 집단들이 다른 형태의 미생물 즉 간균의 집단, 이스트와 같은 균류, 규조류 등의 진핵생물 등과 함께 미생물 공동체 (microbial consortium)를 형성하고 있는 것이 관찰되었다. 3개월 후에는 생물막 미생물의 극상이라고 생각되는 사상 미생물 (filamentous microorganisms)도 관찰되었다. 초기에 구형형태의 세균이 주로 관찰되는 것은 빈영양환경에서 세균이 자신의 체적을 줄여 유기물이 상대적으로 많이 축적되어 있는 고체 표면에 부착하는 생존전략의 일환으로 추정되었다. 이러한 결과로부터 상수도 배급수관은 매설 약 3개월 후면 극상의 생물막이 형성되며 이후 정수장으로부터 배급수관으로 미생물이 전혀 유입되지 않는다는 하더라도 생물막이 관에서 분리되는 경우 수도물에서 많은 미생물이 검출될 수 있음을 알 수 있었다.

KEY WORDS □ succession, biofilm, water distribution systems, scanning electron microscopy, microbial consortium

가정의 수도꼭지에서 갑자기 많은 수의 세균이나 대장균군이 검출되는 현상인 세균 재생장 (bacterial regrowth) 현상은 우리 나라의 여름철에도 빈번하게 발생하고 있다 (1). 이런 현상은 정수장에서 살균 과정에서 살아 남아 배급수관으로 유입된 세균이 수도물의 운반과정에서 증식해서 나타나는 결과이기보다는 배급수관의 내부 표면에 세균이 부착성장하여 형성되는 생물막 (biofilm) 세균의 분리에 의하여 발생할 가능성이 높은 것으로 알려지고 있다 (4, 17, 29). 수도물에서의 많은 미생물은 입자에 부착되거나 응집된 상태에서 염소에 대한 내성이 커져 정수과정에서 살아 남아 배급수관으로 유입되어 생물막을 형성할 수 있다 (2). 최근 미국에서 *E. coli*를 비롯한 대장균군이 정수장에서는 전혀 검출되지 않다가 가정의 수도꼭지에서 나오는 수도물에서는 과다하게 검출되는 상수도 배급수계통에서의 대장균군 재생장 현상이 보고되고 있다 (4, 17). 이렇게 재생장된 미생물이 병원성일 경우 이를 직접 마시는 사람에게 있어서 급성 질병을 일으켜 심한 경우 죽음에 이를 수 있게 하므로 공중보건의 측면에서 다른 어떤 수질항목보다도 중요한 위치를 차지한다.

수도관의 생물막에 대한 기존 연구는 주로 매설된지 10년 이상의 노후관을 대상으로 하여 내부에 침적된

녹 (tubercles)이나 관 내부를 주사형 전자현미경 (scanning electron microscope, SEM)으로 관찰하여 여기에 부착성장하는 미생물을 확인하는 것이었다 (3, 25). 그러나 이러한 배급수관에서의 생물막을 형성하는 미생물의 천이과정에 대해서는 지금까지 전혀 연구가 이루어지지 않고 있다. 수도관의 생물막을 형성하는 미생물의 천이과정에 대한 연구는 고체표면에 부착성장하는 1차 집락자 (primary colonizers)와 2차 집락자 (secondary colonizers) 등을 확인할 수 있으므로, 빈영양 생태계인 수도관에서 기아상태의 미생물 특히 세균 (starved bacteria)의 생존전략 (13, 18)을 밝히는데 도움이 될 것이다.

본 연구에서는 응집, 침전, 여과, 염소소독을 거친 결과 세균의 수가 극히 적으며 아울러 세균의 영양소가 극히 적은 빈영양상태인 수도물을 운반하는 수도관에서 생물막이 형성되는 과정과 생물막을 이루는 미생물의 천이과정을 알아보기 위하여 생물막 실험장치를 만들었다. 이 실험장치를 통하여 수도물과 장기간 접촉시켜 형성된 수도관 조각 (coupons) 표면의 생물막에 대하여 접촉기간별로 SEM으로서 생물막의 미생물 군집을 관찰하고 동시에 생물막 세균은 물론 유입, 유출되는 수도물 중의 부유세균 군집의 개체수를 조사함으로써 그 천이과정을 파악하고자

하였다.

재료 및 방법

생물막 실험장치

생물막 실험장치는 1 l 용량의 비커 속에 가정용 수도관의 재질로 가장 많이 사용되는 아연도강관 조각 (galvanized-iron coupons)을 슬라이드 (slide glass)의 크기 (7.5×2.5 cm)로 잘라 생물막 형성 기저 (substratum)로 사용하였다. 강관 조각은 초음파 세척 및 170°C의 건열멸균기 내에서 24시간 처리하여 표면의 유기물을 완전 제거하고, 알코올 및 자외선으로 살균한 후 수중에 잠기도록 설치하였다 (Fig. 1). 장치의 상부는 공기가 통하지 않도록 밀폐한 다음 빛을 차단하였다. 이 장치로 실험실에 공급되는 수도물이 연속해서 유입 및 유출되도록 하였으며, 실험장치의 희석률 (dilution rate, D)은 부유세균의 생장을 충분히 무시할 수 있는 정도인 4.5 h^{-1} (28)보다 큰 6 h^{-1} 로 하였다.

SEM에 의한 생물막의 관찰

생물막 실험장치에 들어 있는 아연도강관 조각의 채취는 3일, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7주일과 3개월 후에 각각 실시하였다. SEM (Steroscan 260, Cambridge)을 이용하여 채취된 아연도강관 조각 표면에 부착생장하고 있는 미생물과 생물막 형성장치로부터 유출되는 수돗물 중에 부유생장하고 있는 미생물을 관찰하였다. SEM으로 관찰하기 전 채취된 관 조각을 먼저 멸균된 인산완충용액 (10 mM, pH 7.2)으로 3번 세척하여 쉽게 분리되는 가역적 흡착세균 (reversibly adsorbed bacteria)을 제거한 다음 조각에 묻어 있는 습기를 제거하였다 (16). 이어서 무균상태에서 충분히 말린 관 조각을 1×1 cm의 크기로 자른 다음 specimen stubs에 올려놓고 금으로 15 mA의 조건에서 75초 동안 도금하였으며, 유출수 시료는 1 ml를 공극 0.1 μm polycarbonate 여과지 (Gelman, 지름 10 mm)로 여과한 후 여과지를 specimen stubs 위에 올려놓고 진공상태에서 10분 동안 건조시켰다. 건조된 stubs는 생물막 시료와 동일한 조건에서 금으로 도금하여 SEM으로 적당한 배율 하에서 관찰하였다.

측정 항목

실험장치로 들어가는 유입수, 실험장치로부터 나오는 유출수, 그리고 장치내의 관 조각 시료에 대하여 각각 총세균수 (acridine orange direct count bacteria, AODC), 생존세균수 (direct viable count bacteria, DVC), 종속영양세균수 (heterotrophic plate count bacteria, HPC)를 측정하였다. 총세균수는 아크리딘 오렌지 직접계수법 (AODC법)을 사용하였다 (11). 이 방법은 유입수와 유출수의 경우 최종농도가 2%가 되도록 formaldehyde 용액을 첨가하여 수중의 미생물을 고정한 후 5 ml의 시료를 Sudan Black B (Merck)로 염색된 공극 0.2 μm polycarbonate 막여과지 (지름 25 mm, Nucleopore)로 여과하고 0.05%의

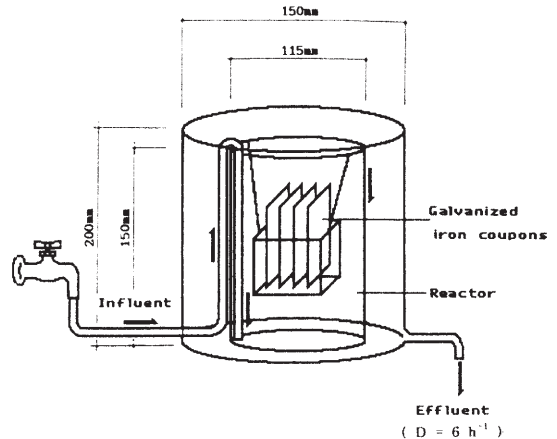


Fig. 1. Schematic diagram of the biofilm formation system.

acridine orange 1 m로 7분간 염색한 후 공기 중에서 건조된 여과지를 형광현미경 (Baplan, Baush & Lomb, light-blue daylight filter)으로 1,500배의 배율로 관찰하는 것이다. 채취된 관 조각은 SEM에서와 같은 전처리과정을 거친 후 150 ml의 완충 용액에 담그고 1분간 3회, 30초 간격으로 초음파 세척 (ultrasonication)하여 생물막 세균을 수중으로 분리시킨 후 (10), 이 용액 시료 1~2 ml를 물 시료와 동일한 방법으로 처리하여 총세균수를 측정하였다. 시료당 15~30 fields의 세균수를 센 후 이를 산술평균 하였다.

생존세균수는 Kogure 등 (14)의 방법으로 측정하였다. 현장에서 채취된 시료에 nalidixic acid와 yeast extract를 각각 최종농도가 0.002 및 0.025%가 되도록 첨가하여 20°C에서 8시간 배양한 후 formaldehyde 용액을 최종농도가 2%가 되도록 첨가하여 세균을 고정시켰다. 고정된 시료는 총세균수 측정과 같은 방법으로 형광현미경으로 1500배의 배율로 관찰하였는데, 이때 총세균수 측정에서 관찰된 세균과 비교하여 몸이 부풀어올랐거나 길이가 길어진 것만을 세었다. 생물막에서의 생존세균수는 총세균수 측정때와 같은 전처리를 거쳐 준비된 용액시료 1~2 ml를 물 시료와 같은 방법으로 측정하였으며, 시료당 15~30 fields에서 센 세균수를 산술평균하였다.

종속영양세균수를 세기 위하여 시료를 적당하게 희석한 다음 희석배율별로 1 ml를 각각 2개의 평판에 넣었다. 여기에 45°C 정도로 식힌 R2A 한천배지 (24) 20 ml 정도를 부은 다음 잘 흔들어 섞은 뒤 굳혀서 (pour plate 법), 20°C에서 14일간 배양하여 형성된 집락수 중 하나의 평판당 30~300개 범위의 것을 선택하여 평균값을 m/당 종속영양세균수로 계산하였다. 생물막의 종속영양세균은 총세균수 및 생존세균수와 같은 전처리 과정을 거쳐 준비된 용액시료를

연속회석한 후 물 시료와 같은 방법으로 측정하였다. 종속영양세균의 동정은 그람염색을 비롯한 18종류의 형태학적, 생화학적 및 생리학적 특성 실험을 하여 Bergey's manual (15)과 Shewan 등 (27)의 분류체계를 이용하여 속명까지 분류하였다.

결 과

SEM으로 관찰한 생물막에서의 미생물 천이

실험에 사용된 아연도강관 조각의 표면을 약 2000 배의 배율로 SEM으로 관찰한 결과 표면에 많은 구멍과 틈이 발견되었다 (Fig. 2A). 이러한 표면은 수 중의 유기물이 집중적으로 침적될 수 있는 장소를 제공하게 되므로 기저의 표면이 쉽사리 유기물에 의하여 조절되어 (conditioning of substratum) 부착성 미생물에 의하여 분해될 수 있는 조건을 제공하는 것이다 (9). 실험장치를 가동한지 3일 후에 채취한 관 조각의 표면은 구멍이나 틈 사이에 집중적으로 유기물이 침적되어 표면이 유기물로서 조절되어 있는 것을 쉽게 확인할 수 있었다. 표면에 침적된 유기물은 직경이 10~50 μm 정도로서 표면이나 주변에 직경 0.5 μm 이하의 microcolony들이 많이 붙어 있었다. 우점하고 있는 세균의 형태는 직경 0.5 μm 이하의 작은 구균이었으며 (Fig. 2B), 이밖에도 길이 1 μm 정도의 간균도 드물기는 하지만 관찰되었다. 3일 후 장치로부터의 유출수를 여과하여 여과지를 관찰한 결과에서도 관 조각의 생물막에서 관찰되었던 작은 구균들이 우점을 이루고 있었다. 이러한 결과는 수도관의 경우 3일 정도의 짧은 시간동안에도 유기물의 침적에 의하여 관 표면이 조절되며, 이어서 수돗물에 부유하고 있던 세균이 조절된 기저표면이나 주변에 부착될 수 있다는 사실을 보여준다.

1주 후의 관 조각표면은 3일 후에 비하여 유기물에 의하여 조절된 지역이 구멍이나 틈 주변으로부터 바깥으로 점차 확대된 것을 확인할 수 있었다. 여전히 우점하는 세균은 작은 구균이었으나 그 수가 3일 후의 생물막에 비해서 증가되었으며, 구균들이 서로 사슬 형태로 이루고 있는 경우가 많았다 (Fig. 2C). Ridgway와 Olson (25)은 이러한 사슬형태의 구균이 수도관 내부의 생물막에서 주로 발견되는 세균이며 생물막 내에서는 세균이 독립 개체로 존재하기 보다는 서로 결합하여 복잡한 구조인 사슬형태를 이루면서 성장하는 것으로 생각하였다. 또한 3일째의 생물막에서는 관찰되지 않았던 지름 2.5 μm 정도의 이스트와 비슷한 균류 미생물이 미세집단을 이루고 있었다 (Fig. 2C). 2주 후의 관 조각은 축적된 유기물 층에 의하여 덮여버려 표면을 거의 확인할 수 없었고, 유기물 층의 깊이도 더 깊어져서 세균들이 그 속에 파묻혀 있는 경우가 많았다 (Fig. 2D). 이때까지도 생물막에서 주로 발견되는 세균은 여전히 작은 구형의 형태를 하고 있었다. 3주 후의 조각표면은 무수한 구형의 세균이 사슬형태보다는 포도송이형태의 집단으로 덮혀 있었

다 (Fig. 2E). 이와 같은 송이형태나 사슬형태의 미세세균 집락의 형성은 반영양의 환경에서 세포가 분비하는 세포외 복합물질 (extracellular polymeric substances, EPS)에 의하여 이루어진다고 Marshall 등 (19)이 보고한 바 있다.

4주 후의 조각표면에서는 3주 후와 거의 같은 형태의 세균 집락이 관찰되었으나, 그 밀도가 다소 줄어든 것으로 보였다 (Fig. 2F). 이것은 3주 및 4주 후의 장치에서 나오는 유출수를 여과한 여과지를 SEM으로 관찰한 결과 3주 후의 유출수에서는 3일~2주 후의 유출수와 마찬가지로 세균을 많이 발견할 수 없었던 반면 (Fig. 2K), 4주 후의 유출수에서는 생물막에서 관찰되었던 것과 같은 형태의 유기물 덩어리와 세균의 군집이 많이 관찰되었다 (Fig. 2L). 이것은 이 시점에 이르러 관 조각표면에 형성되어 있던 생물막의 일부가 분리되거나 탈착되어 물로 유입된 결과로 생각할 수 있다. 이를 뒷받침하는 간접적인 증거의 하나로써 3주 및 4주 후의 유입수, 생물막, 유출수 각각에 대한 세균을 계수한 결과 유입수의 경우 3주 후나 4주 후의 총세균수와 생존세균수에 있어서는 거의 변화가 없었고 다만 종속영양세균수는 4주후가 3주 후의 5.7배였다. 이에 비하여 유출수의 경우 4주 후 총세균수는 3주 후 유출수의 1.5배, 생존세균수는 15배, 종속영양세균수는 10.4배로서 4주 후의 세균수가 3주 후에 비하여 현저히 증가하였다. 그러나 생물막의 세균수에 있어서는 4주 후가 3주 후보다 오히려 감소되었거나 비슷한 것으로 나타났는데, 4주 후 총세균수는 3주 후의 72%, 생존세균수는 44%에 불과하였고, 종속영양세균수는 거의 같은 수준인 103%이었다 (Fig. 3).

6주, 7주 및 3개월 후의 생물막은 관 조각 표면이 완전히 유기물과 미생물로 뒤덮여 그 표면을 전혀 식별할 수 없었다. 두드러진 특징은 이때부터 그 전까지는 별로 발견할 수 없었던 간균 (bacilli-shaped) 도 유기물의 표면에 집단으로 서식하고 있었으며, 크기가 작은 구형세균은 두꺼운 생물막의 매트릭스에 파묻혀 잘 발견할 수 없었으나 여전히 송이형태로서 많이 관찰되었다 (Fig. 2G). 그리고 세균보다 크기가 좀 더 크고 복잡한 구조를 가진 조류 등의 진핵생물이 생물막에 부착되어 미생물 공동체 (microbial consortia)를 형성하는 등 생물막에서 미생물의 천이가 일어나는 것을 확인할 수 있었다. 특히 빈번하게 관찰되었던 미생물은 규조류 (diatoms)로서 *Minidiscus* (Fig. 2H), *Melosira*, *Synedra*, *Pinularia*, *Cyclotella*, *Strangulonema*, *Navicula* 등이었다. 이런 규조류는 형태로서 Round 등 (26)의 자료를 참고하여 확인하였다. 7주 후의 생물막에서는 20 μm 크기의 세포가 몇 개 붙어 있는 형태의 동정되지 않은 미확인의 진핵생물이 관찰되었으며 (Fig. 2I), 3개월이 경과한 생물막에서는 길이가 20 μm 정도의 사상 미생물의 집단이 유기물 층에 결합되어 있는 것이 확인되었다 (Fig. 2J). 이들 미생물은 대개 두꺼운 유기물 층을

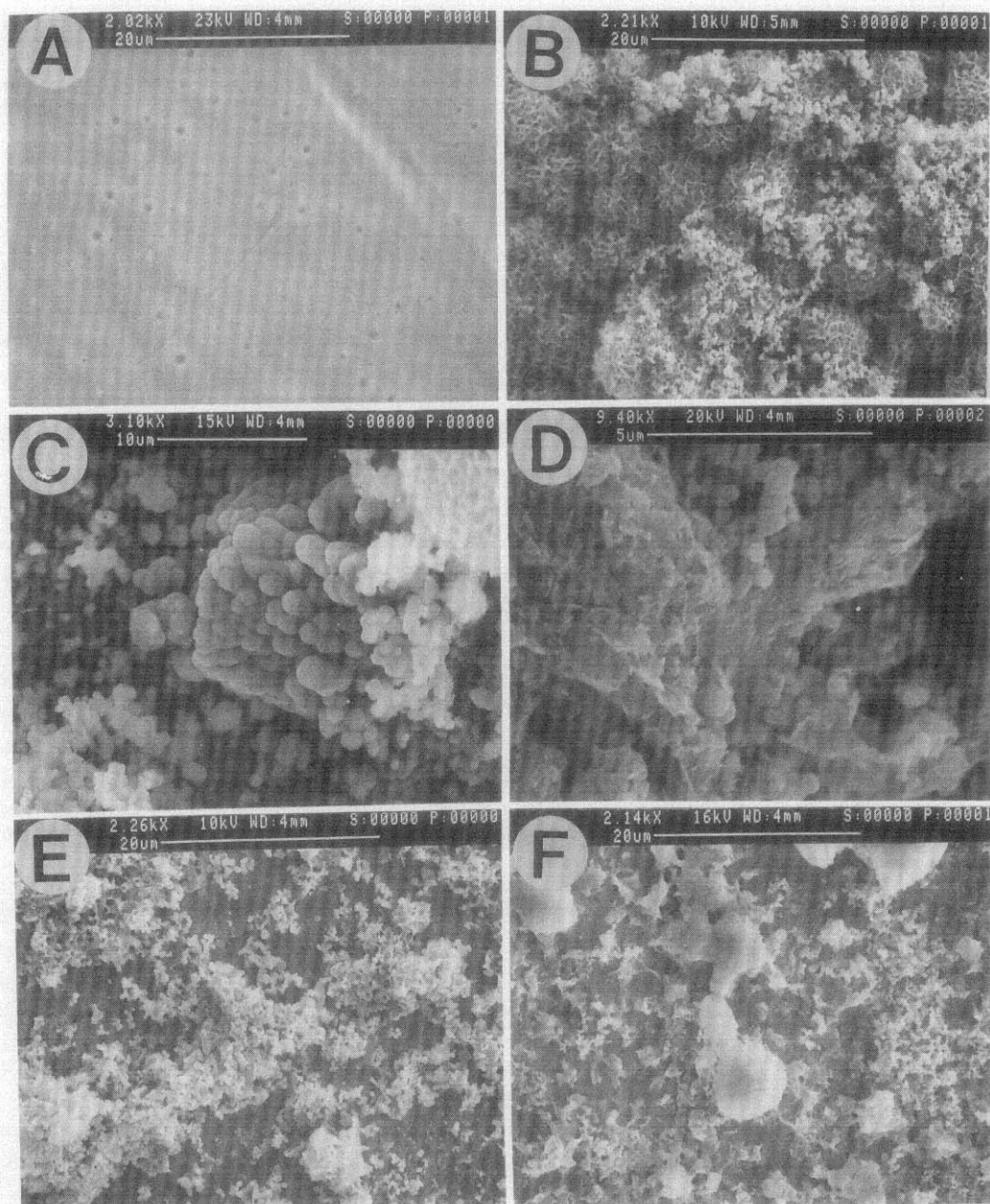


Fig. 2. Scanning electron micrographs (SEM) of biofilms on galvanized-iron coupons in the biofilm formation system by contact period.

A, naked surface of a coupon just before operating the system, on which a lot of micro-cavities and crevices are observed (2,020x); B, 3-day-immersed coupon, the surface of which is conditioned by organic molecules and microcolonies are attached to them (2,210x); C, one-week-immersed coupon, the conditioned surface area of which is extended and chain-forming micrococci with a diameter of $0.5\ \mu\text{m}$ and clusters of yeast-like microorganisms are attached to organic molecules (3,100x); D, 2-week-immersed coupon, the surface of which is covered with thick layers of organic molecules and micrococci are embedded into them (9,400x); E, 3-week-immersed coupon, on the surface of which lots of clusters of spherical microcolonies are observed (2,260x); F, on the surface of a 4-week-immersed coupon, the same kinds of clusters of spherical microcolonies as the 3-week-immersed one are observed but the density is lower (2,260x).

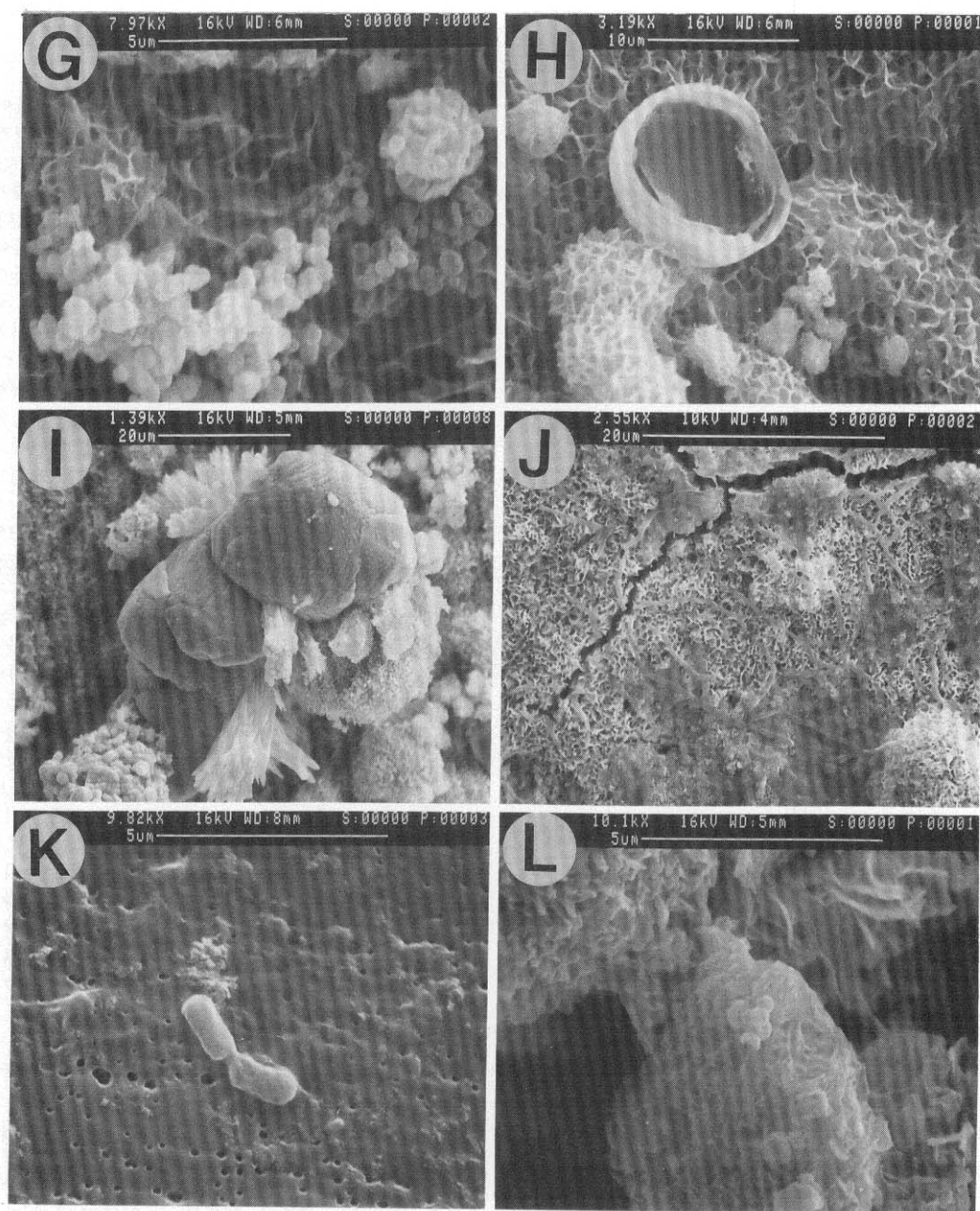


Fig. 2. Continued.

G, in the biofilm of a 6-week-immersed coupon, some genera of diatoms such as *Minidiscus* are involved as a member of microbial consortia (3,190x); H, clusters of spherical or rod-shaped microcolonies are associated with the biofilm matrix of a 6-week-immersed coupon, as well (7,970x); I, in the biofilm of a 7-week-immersed coupon, unidentified eucaryotes are found as another member of the microbial consortia (1,390x); J, after 3 months immersion, filamentous microorganisms, a climax member, are shown on the thick and compact biofilm matrix (2,550x); K, on the surface of a filtered membrane with the 3-week-immersed effluent from the biofilm formation system, free-living bacilli are rarely shown, and the density of microorganisms in the effluent are very low (9,820x); L, but on the surface of a filtered membrane with 4-week-immersed effluent, the massive fractions of desorbed biofilms are frequently observed and a lot of tiny coccoid or rod-shaped bacteria are attached to them (10,100x).

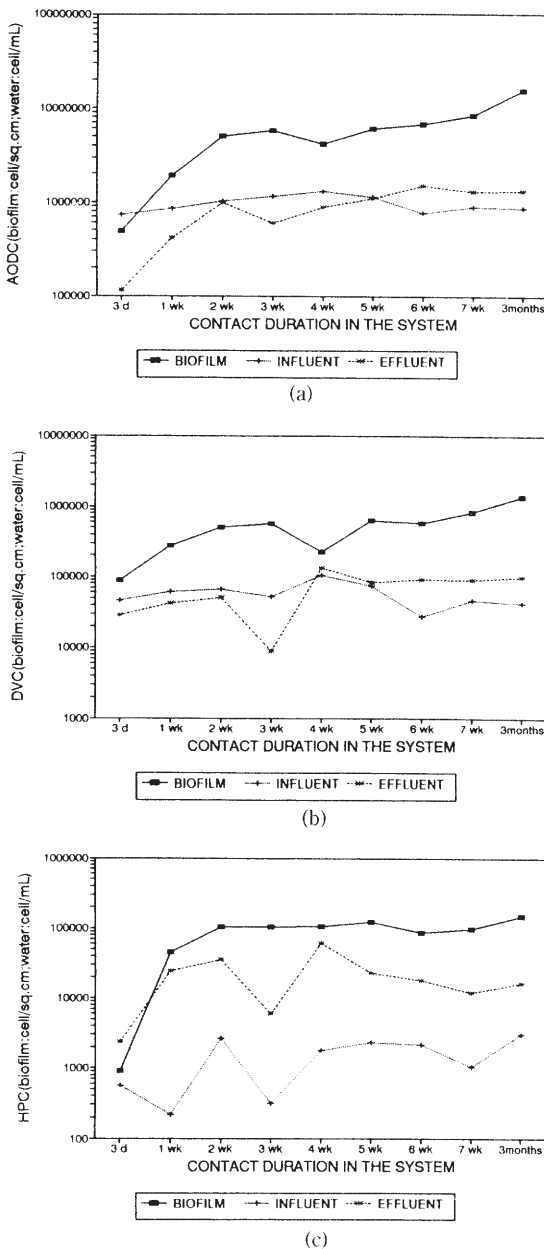


Fig. 3. Changes of (a) AODC, (b) DVC, and (c) HPC bacterial densities in biofilms, influent and effluent of the biofilm formation system during contact period.

이루고 있는 생물막 속에 파묻혀 있거나 유기물 입자의 표면에 결합된 형태로 존재하는 것이 대부분이었다.

고찰

수도관 생물막에서의 미생물의 천이

3일째 되는 날의 관 조각 표면은 많은 유기물이 침적되어 조절되어 있는 것을 확인하였고, 직경 0.25~0.5 μm 정도의 아주 작은 미세 집락 (micro-colony)들이 표면 군데군데의 틈새나 작은 구멍에 침적된 유기물 위나 그 부근에 많이 부착되어 있었다. 이것은 생물막 형성단계의 첫째 단계로서 유기물에 의한 기저표면의 조절을 보여주는 것이다 (5). 생물막에서 우점하는 초기의 작은 구형세균의 존재는 해수에 잠겨있는 고체표면에서도 발견된 것으로서 (20), 여기에 대해서는 다음과 같은 두 가지의 해석이 있다. 하나는 몸집이 큰 세균이 먼저 기저 표면에서 부착한 후 기아 상태에서 몸집이 작은 세균으로 천이가 일어난다는 것이고, 다른 하나는 빈영양의 물 환경에서 세균이 기아 상태가 되면 물 속에서 먼저 몸의 크기가 감소되며 이렇게 몸집이 줄어든 후 고체 표면에 부착한다는 것이다. 이러한 예로서 *Vibrio* DW1 균주의 경우 영양분이 극히 부족한 기아 상태의 환경 조건에서는 세균숫자는 증가하는 반면 세균의 체적은 감소되며, 동시에 부착능력이 증가한다고 Dawson 등 (7)은 보고하였다. 이들은 빈영양의 수계에서 기아상태의 환경 조건에서 세균이 살아갈 수 있는 전략이 다른 유익물이 풍부한 고체의 표면에 부착하여 성장하는 것이라고 주장하였다. 수중에 녹아 있는 당이나 아미노산과 같이 분자량이 적은 기질은 상대적으로 수중의 부유세균에 의하여 쉽게 소모되므로, 표면에 부착한 세균들은 이러한 기질을 이용하기보다는 상대적으로 표면에 흡착되어 있는 분자량이 보다 크고 분해가 쉽지 않은 지방산과 같은 물질을 이용하는 것으로 생각되고 있다 (12). 따라서 많은 양의 기질을 요구하는 부영양세균 (copiotrophs)은 빈영양의 환경에서 생존하기 위해서 기아 상태로 존재할 수밖에 없으며, 그 결과 자기 몸의 크기를 줄이고 고체 표면에 부착됨으로써 (18) 고체표면에 부착하는 초기의 세균이 크기가 작은 구형세균이 되는 것으로 생각되고 있다. 이러한 두 번째의 생존전략 즉 간균의 세균이 자기 몸의 체적을 줄여 구형으로 바꾸어 고체표면에 부착한다는 것은 배급수관 내부에 형성된 녹과 생물막 장치의 관 조각에서 부착성장하는 종속영양세균을 분리 동정한 결과 간균이 전체의 90% 이상을 차지하는 것으로 확인할 수 있었다 (Table 1). 물론 이러한 종속영양세균이 생물막의 총 세균수 즉 AODC의 1~2% 정도만을 차지하고 있어 전체를 대표하기에 어렵기는 하지만 생물막 세균의 형태에 관한 대체적인 정보는 제공해 줄 수 있을 것으로 생각된다 (Fig. 3).

아연도 강관 조각은 수도물에 접촉한 지 불과 3일 만에 생물막이 형성되었고, 또한 이 생물막이 탈착됨으로써 유입수에 비하여 유출수의 종속영양세균

Table 1. HPC bacteria identified from tubercles in water mains (18-year old) and those from waters and biofilm in the biofilm formation system (4-week immersion).

Generic name	No. of bacteria in tubercles	No. of bacteria in the biofilm formation system		
		Influent	Effluent	Biofilm
<i>Pseudomonas</i>	21 (43%)	13 (65%)	5 (25%)	18 (56%)
<i>Acinetobacter</i>	13 (27%)	1 (5%)	1 (5%)	2 (6%)
<i>Moraxella</i>	9 (18%)	5 (25%)	11 (55%)	8 (25%)
<i>Flavobacterium</i>	0	0	0	1 (3%)
<i>Pasteurella</i>	1 (2%)	0	0	0
<i>Chromobacterium</i>	1 (2%)	1 (5%)	1 (5%)	0
<i>Neisseria</i>	1 (2%)	0	1 (5%)	0
<i>Micrococcus</i>	3 (6%)	0	1 (5%)	3 (10%)
Sum	49 (100%)	20 (100%)	20 (100%)	32 (100%)

의 수가 증가하는 것으로 나타났다 (Fig. 3). 이러한 결과를 뒷받침해 주는 연구 가운데 하나는 Power와 Marshall (23)에 의하여 수행되었다. 이들은 해양에서 분리한 부착성 *Pseudomonas*종과 비부착성 *Vibrio*종을 이용하여 기아상태에 둔 결과 24~48시간 만에 크기가 준 구형의 기아상태의 세포로 변하였고, 이러한 기아상태의 세포는 유기물이 전혀 없는 기저 표면에 대해서도 2시간 만에 부착이 일어났으며 8시간 만에 최대 부착밀도를 보임을 발견하였다. 또한 부착된 세균이 기저 표면에서 다시 분리되는 것은 부착 후 4시간 후부터 시작되어 13시간 후에 최대 분리율을 보인다는 사실을 확인함으로써 기저 표면은 물과 접촉한 지 3일 후에도 생물막이 형성되고 이것은 다시 분리되어 물 속으로 유입될 수 있음을 보여 주었다.

생물막 형성장치에서 나오는 유출수에는 장치로 사용된 플라스크의 표면에서 탈착 및 분리된 생물막 조각 및 세균이 포함될 수도 있을 것이다. 그러나 유리표면은 아연도 강판 표면에 비하여 상대적으로 세균의 부착력이 현저하게 낮다는 것이 Fletcher와 Loeb (8)의 연구에서 확인되었기 때문에 이것에 의한 영향은 크지 않은 것으로 생각된다. 이들은 해양에서 분리한 *Pseudomonas*종을 이용하여 다양한 종류의 기저 표면에 부착하는 정도로 실험한 결과 소수성 및 친수성의 어느 기저에 대해서도 2시간 후면 세균이 부착되며 그 정도는 기저의 종류에 따라 각각 다른 것으로 확인하였다. 즉 친수성이고 표면이 (-)로 하전된 유리에 부착되는 세균의 수는 소수성의 폴리스티렌 기저의 1/50에 불과하였고, 같은 친수성 기저라고 하더라도 표면전하가 중성인 게르마늄에 비해서는 1/15, (+)로 하전된 백금의 1/35 정도라고 보고하였다. 따라서 본 연구에서 사용된 유리플라스크에 부착된 세균의 수는 (+)로 하전된 아연 도금된 강철 조각에 부착된 세균에 비하여 1 log 이상 적을 것이고 따라서 기저 표면에서 분리되는 세균의 숫자도 그만큼 적을 것으로 생각된다.

1주일 후의 생물막은 초기의 작은 구형세균이 사슬형태로 (chain-form) 많이 존재하는 것이 확인되었

다. 이것은 초기에 부착한 작은 구형세균이 고체표면에서 성장하면서 자신들이 세포바깥으로 주로 다당류로 구성되어 있는 glycocalyx라고 부르는 EPS를 분비하여 일종의 세균 공동체를 형성한 결과로 생각되고 있다 (6, 19). 2주 후의 생물막은 그 범위가 더욱 확대되었고, 3주 후에는 사슬형태의 작은 구형세균이 포도송이 모양의 더욱 복잡한 형태로 변한 것이 관찰되었다. 4주 후의 생물막에서는 생물막의 일부가 수중으로 탈착된 흔적이 유출수의 SEM에 의해 확인되었으며, 이러한 사실은 유출수중의 세균수로부터 간접 확인되었다. 즉 유출수를 여과한 여과지의 표면을 SEM으로 관찰한 결과 여태까지 생물막에서 관찰되었던 형태의 유기물 층과 여기에 부착된 크기가 작은 구형세균이 많이 관찰되었다 (Fig. 2L). 생물막 세균이나 생물막 구성물질이 생물막으로부터 떨어져 나오는 것은 탈착 (desorption)과 분리 (detachment)가 있는데, 4주 후에 관찰된 현상이 탈착인지 분리인지는 확실하지 않지만, 이후 계속적으로 생물막이 떨어져 나온 것이 관찰되지 않은 것으로 보아 생물막의 대량유실을 일으키는 요인인 물의 전단력 (shear forces) 등에 의한 계속적이고 대량의 분리현상이 아니라 가역적 흡착 세균의 일부가 탈착된 결과일 가능성이 큰 것으로 생각된다.

6주 후의 생물막은 그 전에 비하여 뚜렷한 변화를 가져 온 것이 관찰되었다. 즉 관 조각의 표면이 완전히 유기물의 두꺼운 층으로 덮여 버렸으며, 주로 포도송이나 사슬형태의 작은 구형세균이 거의 대부분이었던 것에 비하여 다른 형태의 세균 집단과 규조류 등의 진핵생물이 생물막의 미생물 공동체를 이루고 있었다. 이것은 배급수관의 생물막내에서는 세균 집단이 1차 집락자로서 먼저 폴로니를 이룬 후 진핵생물이 2차 이후의 집락자로서의 생태적 지위 (ecological niche)를 가지는 것으로 생각된다.

특히 3개월 후의 생물막 매트릭스에서는 생물막 미생물의 극상으로 생각되는 사상 미생물이 (21, 22) 기저표면에 견고히 부착되어 있었다. 생물막에서의 미생물집단의 천이는 반드시 일어나며 이러한 천이에

의하여 생물막이 자연생태계의 고체표면에서 더욱 광범위하게 확대된다고 Marshall 등 (20)은 보고하였다. 이렇게 빈영양환경에서 생물막을 형성하는 미생물 공동체는 외부로부터의 저해요인 즉 포식자, 항생제, 계면활성제 등의 효과를 감소시키거나 방지할 수 있는 방패의 역할을 함으로써 보다 유리한 생태적 지위를 가지게 되는 것이다 (7, 18). 본 연구의 3개월된 강관 조각에서 확인된 미생물은 매설 후 25년된 미국의 아연도 강관 내부에서도 모두 관찰되었으며 이 노후 관에서는 이 밖에 자루 (stalk)를 이용하여 표면에 부착되어 있는 철산화세균인 *Gallionella*와 사상균으로서 방선균인 *Streptomyces*가 빈번하게 관찰된 것으로 보고 되었다 (25).

이렇게 본다면 기저 표면의 생물막 매트릭스는 수돗물에 의하여 3개월만에 거의 안정단계인 극상에 도달한 것으로 생각되며, 따라서 수도관이 매설된 지 얼마 경과되지 않아도 내벽에 형성된 생물막의 분리나 탈착 등에 의하여 수질이 악화될 가능성이 확인된 것이다.

사 사

본 연구는 1991년도 교육부 국비해외과건연구비 지원사업으로 수행되었음.

참 고 문 헌

1. 박성주, 조재창, 김상중, 1993. 상수도계통에서의 세균 분포 및 변화. 한국미생물학회지 31, 245-254.
2. 조재창, 박성주, 김상중, 1993. 생물막 세균의 염소 소독제에 대한 내성. 한국미생물학회지 31, 255-260.
3. Allen, M.J., R.H. Taylor, and E.E. Geldreich, 1980. The occurrence of microorganisms in water main encrustations. *Jour. AWWA*. 72(11), 614-625.
4. Characklis, W.G., 1988. Bacterial regrowth in distribution systems. p. 13-42, AWWA Research Foundation, Denver.
5. Characklis, W.G. and K.C. Marshall, 1990. Biofilms, p. 195-231. John Wiley & Sons, Inc., New York.
6. Costerton, J.W., R.T. Irvin, and K-J. Cheng, 1981. The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Ann. Rev. Microbiol.* 35, 299-324.
7. Dawson, M.P., B.A. Humphrey, and K.C. Marshall, 1981. Adhesion, a tactic in the survival strategy of a marine vibrio during starvation. *Curr. Microbiol.* 6, 195-198.
8. Fletcher, M. and G.I. Loeb, 1979. Influence of substratum characteristics on the attachment of a marine pseudomonad to solid surfaces. *Appl. Envir. Microbiol.* 37, 67-72.
9. Geesey, G.G. and D.C. White, 1990. Determination of bacterial growth and activity at solid-liquid interfaces. *Ann. Rev. Microbiol.* 44, 579-602.
10. Herbert, R.A., 1990. Methods for enumerating microorganisms and determining biomass in natural environment, p. 1-39. In R. Grigorova (ed.), *Methods in microbiology*, Vol. 22. Academic Press, London.
11. Hobbie, J.E., R.R. Colwell, M. O'Brien, E. Weiss, A.D. Pearson, R.M. Weiner, and W.D. Burge, 1977. Use of nucleopore filters for counting bacteria by epifluorescence microscopy. *Appl. Envir. Microbiol.* 33, 1225-1228.
12. Kefford, B., S. Kjelleberg, and K.C. Marshall, 1982. Bacterial scavenging: Utilization of fatty acids localized at a solid-liquid interface. *Arch. Microbiol.* 133, 257-260.
13. Kjelleberg, S., B.A. Humphrey, and K.C. Marshall, 1983. Initial phases of starvation and activity of bacteria at surfaces. *Appl. Envir. Microbiol.* 46, 978-984.
14. Kogure, K., U. Simidu, and N. Taga, 1984. An improved direct viable count method for aquatic bacteria. *Arch. Hydrobiol.* 102, 117-122.
15. Krieg, N.R. and J.G. Holt, 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams & Wilkins, Baltimore/London.
16. Ladd, T.I. and J.W. Costerton, 1990. Methods for studying biofilm bacteria, p. 285-307. In R. Grigorova (ed.), *Methods in microbiology*, Vol. 22. Academic Press, London.
17. LeChevallier, M.W., T.M. Babcock, and R.G. Lee, 1987. Examination and characterization of distribution system biofilms. *Appl. Envir. Microbiol.* 53, 2714-2724.
18. Marshall, K.C., 1988. Adhesion and growth of bacteria at surfaces in oligotrophic habitats. *Can. J. Microbiol.* 34, 503-506.
19. Marshall, K.C., R. Stout, and R. Mitchell, 1971. Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacterial to surfaces. *J. Gen. Microbiol.* 68, 337-348.
20. Marshall, K.C., R. Stout, and R. Mitchell, 1971. Selective sorption of bacteria from seawater. *Can. J. Microbiol.* 17, 1413-1416.
21. McCoy, W.F., J.D. Bryers, J. Robbins, and J.W. Costerton, 1981. Observations of fouling biofilm formation. *Can. J. Microbiol.* 27, 910-917.
22. Nagy, L.A. and B.H. Olson, 1982. The occurrence of filamentous fungi in drinking water distribution systems. *Can. J. Microbiol.* 28, 667-671.
23. Power, K. and K.C. Marshall, 1988. Cellular growth and reproduction of marine bacteria on surface-bound substrate. *Biofouling* 1, 163-174.
24. Reasoner, D.J. and E.E. Geldreich, 1985. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl. Envir. Microbiol.* 49, 1-7.
25. Ridgway, H.F. and B.H. Olson, 1981. Scanning electron microscope evidence for bacterial colonization of a drinking water distribution system. *Appl. Envir. Microbiol.* 41, 274-287.
26. Round, F.E., R.M. Crawford, and D.G. Mann, 1990. The diatoms: Biology and morphology of the genera. Cambridge University Press, Camb-

- ridge.
27. Shewan, J.M., G. Hobbs, and W. Hodgekiss, 1960. A determinative scheme for the identification of certain genera of Gram-negative bacteria with special reference to the Pseudomonadaceae. *J. Appl. Bacteriol.* **23**, 379-390.
28. Van der Kooij, D. and W.A.M. Hijnen, 1983. Nutritional versatility of a starch-utilizing *Flavobacterium* at low substrate concentrations. *Appl. Envir. Microbiol.* **45**, 804-810.
29. Van der Wende, E., W.G. Characklis, and D.B. Smith, 1989. Biofilms and bacterial drinking water quality. *Wat. Res.* **23**(10), 1313-1322.
- (Received September 30, 1994)
(Accepted November 4, 1994)

ABSTRACT: Microbial Succession on Biofilms in Drinking Water Distribution Pipes

Park, Seong Joo, Jae Chang Cho, and Sang-Jong Kim* (Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea)

The biofilms produced on the surface of galvanized-iron coupons, most popular materials of drinking water distribution pipes in Korea, were observed by scanning electron microscopy. After 3 days immersion in the biofilm formation system, organic particles were adsorbed primarily to the crevices or cavities of coupons, and thus the surfaces were conditioned and occupied by spherical microcolonies with a diameter of 0.2~0.5 μm . One week later microcolonies were succeeded to chain-formed micro-coccoid cells. They were succeeded to clusters and the organic layer was thickened and expanded in 3 weeks. Four weeks later, it was observed that fractions of biofilms and biofilm bacteria were desorbed and released to the bulk water. After 6 weeks, the surface of coupons was completely covered with layers of organic molecules, in which many micro-coccoid cell clusters were embedded. In addition, the microbial consortia were formed by members of bacilli-shaped cell clusters, eucaryotic cells including yeast-like cells and diatoms, and micro-coccoid cell clusters. Finally, filamentous microorganisms, a climax member of the microbial consortia, were observed from the 3-month-immersed coupon. It was considered that the dominant micro-coccoid bacteria in the early stage biofilm resulted from the bacterial survival strategy that the bacterial cells in an oligotrophic environment reduce their volumes and are adsorbed to the solid surface on which organic molecules are accumulated. These observations gave us the information that the climax biofilm would be formed in the drinking water distribution pipes only in three months of installation. Thereafter, even if treated waters without any microorganism are introduced into the distribution system, tap waters from pipe-end may contain high density of microorganisms due to the desorption or detachment of biofilms.