



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0085914
(43) 공개일자 2014년07월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/04 (2006.01) C12Q 1/24 (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0155774
(22) 출원일자 2012년12월28일
심사청구일자 2012년12월28일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
주식회사 삼천리
서울특별시 영등포구 국제금융로6길 42 (여의도동)
(72) 발명자
최성찬
경기 성남시 분당구 내정로 186, 106동 1404호 (수내동, 파크타운대림아파트)
김영관
강원 춘천시 후석로 325, 105동 1303호 (후평동, 춘천더샵아파트)
(74) 대리인
강성혜

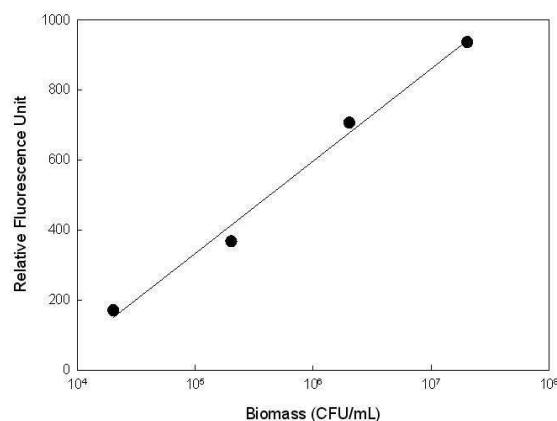
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 형광 기질 혼합물을 이용하여 수도관 내의 생물막을 정량하는 방법

(57) 요약

표면 부착 생물막은 많은 분야에서 심각한 문제들을 유발한다. 종래에 많은 연구자들이 생물막 제어에 관해 연구하고 여러 가지 방법을 제안했으나, 목표 생물막을 효과적으로 빠르게 신뢰도가 높게 정량하는 방법은 없었다. 본 발명자들은 MUF (4-methylumbelliferone) 함유 형광 기질을 이용하여 생물막을 빠르고 편리하게 정량할 수 있는 새로운 방법을 발명하였다. MUF 기질 중 MUF- α - 및 MUF- β -글루코피라노사이드와 MUF-부티르산을 함께 기질로 사용하여 세포의 효소에 의하여 이 기질들이 절단되면 형광물질인 4-MUF가 얻어지는데, 이 물질은 형광을 발광한다. 형광 강도는 생물막 시료의 바이오매스 양과 비례하고, 효소 활성 또한 바이오매스가 증가함에 따라 증가한다. 형광에 기반한 본 발명의 측정방법은 음용수 분배 시스템에 형성되는 생물막을 현장 모니터링으로 측정하기에 충분히 신뢰성이 있고 민감하다.

대표도 - 도4



(72) 발명자

박경란

강원 춘천시 동면 만천로 242, 107동 903호 (춘천 장학아이파크)

전시형

대전 중구 보문로336번길 52, 505호 (선화동, 삼화 빌딩)

서정철

서울특별시 용산구 이촌로 347 신동아아파트 13동 1003호

차현주

경기 부천시 원미구 조마루로 134, 1103동 1801호 (중동, 보람마을아주아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 GT-11-G-02-001-5

부처명 환경부

연구사업명 차세대 에코이노베이션 기술개발사업

연구과제명 종합적 상수관망 이상관리시스템 및 최적 수질관리기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 (주)삼천리

연구기간 2012.05.01 ~ 2013.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

가늘고 긴 기둥형 쿠폰이 내재된 반응조 내에 수돗물을 일정 속도로 계속하여 흘려주며 반응조를 회전시켜 생물막을 형성하는 단계;

반응조에서 생물막이 형성된 쿠폰을 무균상태로 꺼내고 소독된 물로 부드럽게 세척하여 느슨하게 부착된 세균을 제거하는 단계;

꺼낸 쿠폰을 완충액이 든 튜브로 옮겨 초음파 처리하는 단계;

쿠폰 표면의 생물막을 끊어 완충액에 가하고, 원심분리하여 세포를 모으는 단계;

원심분리 후 상층액을 제거하고 펠렛을 재현탁시켜 세포시료를 제조하는 단계;

상기 세포시료에 MUF(4-methylumbelliferone)-기질인 4-메틸움벨리페틸- α -D-글루코피라노사이드, 4-메틸움벨리페틸- β -D-글루코피라노사이드 및 4-메틸움벨리페틸 부티르산을 가하고 반응시키는 단계; 및

반응 후 형광을 측정하는 단계;를 포함하는, 형광 기질 혼합물을 이용하여 물 분배관 내의 미생물을 정량하는 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 MUF(4-methylumbelliferone)-기질은 4-메틸움벨리페틸 초산, 4-메틸움벨리페틸 엘라이드산(elaidate), 4-메틸움벨리페틸- α -D-갈락토피라노사이드, 4-메틸움벨리페틸- β -D-갈락토피라노사이드, 4-메틸움벨리페틸- α -D-글루코피라노사이드, 4-메틸움벨리페틸- β -D-글루코피라노사이드, 4-메틸움벨리페틸 헵타노산(heptanoate), 4-메틸움벨리페틸 인산, 4-메틸움벨리페틸 올레산(oleate), 4-메틸움벨리페틸 프로피온산, 4-메틸움벨리페틸- β -D-갈락토사이드, 4-메틸움벨리페틸- β -D-글루코사이드, 4-메틸움벨리페틸- α -D-글루코사이드 및 4-메틸움벨리페틸- α -L-퓨라노사이드 중 선택된 1종 이상을 부가하는 것을 특징으로 하는, 형광 기질 혼합물을 이용하여 물 분배관 내의 미생물을 정량하는 방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 세 종류의 MUF-기질은 각각 동일 물비를 가하는 것을 특징으로 하는, 형광 기질 혼합물을 이용하여 물 분배관 내의 미생물을 정량하는 방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 생물막 형성 단계는 반응조 회전속도를 20~50 rpm으로, 수돗물 흐름속도를 2~5 ℓ /hr로 하여 진행함을 특징으로 하는, 형광 기질 혼합물을 이용하여 물 분배관 내의 미생물을 정량하는 방법.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명자들은 MUF (4-methylumbelliferone) 함유 형광 기질을 이용하여 생물막을 빠르고 편리하게 정량할 수

있는 새로운 방법을 발명하였다. MUF-기질 중 MUF- α - 및 MUF- β -글루코피라노사이드와 MUF-부티르산을 함께 기질로 사용하여 세포의 효소에 의하여 이 기질들이 절단되면 형광물질인 4-MUF가 얻어지는데, 이 물질은 형광을 발광한다. 형광 강도는 생물막 시료의 바이오매스 양과 비례하고, 효소 활성 또한 바이오매스가 증가함에 따라 증가한다. 형광에 기반한 본 발명의 측정방법은 음용수 분배 시스템에 형성되는 생물막을 현장 모니터링으로 측정하기에 충분히 신뢰성이 있고 민감하다.

배경 기술

- [0002] 수도분배관 내의 생물막이 세균 재성장에 기여하고 지속되는 감염 및 재발성 감염, 기구 관련 감염과 같은 의학 분야 및 음용수 분배 시스템에서의 생물부착과 식품 처리환경 등 비의학 분야와 같은 다양한 분야에서 심각한 문제를 야기하고 있음이 분명해지고 있다 (Flemming, 2002; Fux *et al.*, 2005; Rode *et al.*, 2007). 생물막은 스스로 생산한 세포외 폴리머 기질에 포매된, 표면에 부착된 세포들의 미생물 집합체이다 (Donlan and Costerton, 2002). 생물막은 많은 분야에서 기계적 손상으로 경제적 손실을 유발하며, 따라서 거의 모든 위생 분야에서 생물막의 예방, 제거 및 살해로의 접근법이 모색되고 있다. 표면에 생물막이 증가할수록, 파이프의 미생물 점착 평가의 중요성이 증대되고 있다.
- [0003] Flemming (Flemming, H.-C. 2003. Role and levels of real-time monitoring for successful anti-fouling strategies- an overview. *Wat. Sci. Technol.* **47**:1-8)은 산업적 생물막 모니터링 시스템을 다음의 세 가지 카테고리로 나누었다; (i) 바이오매스를 다른 구성요소와 구분하지 않고 표면에 축적된 물질의 증가와 감소를 탐지하는 시스템, (ii) 생물 물질과 무생물 물질을 구분할 수 있는 시스템, 그리고 (iii) 생물막의 상세한 화학 정보를 제공하는 시스템이다. Jankecht와 Melo (Janknecht, P. and Melo, L. F. 2003. Online biofilm monitoring. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **2**:269-283)는 산업 시스템에의 응용을 비교하면서 온라인 생물막 모니터링 기술을 비슷한 방식으로 분류하였는데, 대사 활성을 모니터링하는 시스템을 카테고리에 추가하였다.
- [0004] 지난 수년간 표면에서 세균의 거동 설명을 개선시킬 수 있는 형광 현미경, 공초점 레이저 스캐닝 현미경, 주사 전자현미경 및 원자간력 현미경에 의한 인시투 (in situ) 시각화와 같은 기술적 발전에 의하여 부착 세균 정량에 관한 연구에 있어서 괄목할 만한 향상이 이루어져왔다 (Kroukamp and Wolfaardt, 2009; Zago *et al.*, 2012). 비록 현미경 관찰에 의하면 부착 미생물을 가장 직접적으로 측정할 수는 있지만, 미생물 계수는 고생스러운 작업인데, 이는 요구되는 고배율 광학장치에 의하여 한 번에 관찰할 수 있는 부분이 작기 때문이다. 반면, 간접 계수법의 전제조건인 세균 분리는 제어가 어려운데, 이는 어떤 세균은 표면에서 쉽게 제거되지 않거나 손상되기 때문이다.
- [0005] 그러한 결점을 극복하기 위해 세포외 기질을 크리스탈 바이올렛으로 염색하는 방법, 핵산을 염색하는 형광안료 Syto-9 염색법, 형광안료 이초산 (diacetate) 측정방법 및 세균 염색용 레자주린 (resazurin) 측정방법을 포함하여 마이크로플레이트 상의 생물막을 정량하는 다양한 방법이 제안되고 있다. 그러나, 이들 방법 중 대부분은 여전히 시간이 많이 소요되고, 노동집약적이며 종종 재현이 불가능하고, 민감하지 않다.
- [0006] 공개특허공보 제10-2011-125510호는 음용수 내 세균 검사를 위한 전처리 및 검침장치에 관한 것으로, 필터를 통해 반응 챔버로 측정 시료 및 반응 시료를 투입하여 측정 시료에 포함된 세균을 외부 ATP와 매질로부터 신속하게 분리하여 농축 및 포집하고 그 포집된 세균의 광반응을 발생시키는 전처리부, 전처리부에서 발생하는 세균의 광반응에 의한 발광도를 측정하여 시료 내의 세균의 양을 검출하는 측정부를 포함하는 음용수 내 세균 검사를 위한 전처리 및 검침장치 및 그 방법을 제공하여, 수질 내에 있는 저농도 세균의 농축과 포집을 신속하게 실시하고 세균 내에 있는 ATP를 ATP-발광반응을 통하여 측정하고 이를 통하여 세균의 개수를 정량적으로 표시할 수 있게 하는 기술을 제공한다. 그러나, 이 방법은 세균을 분리, 농축하고, 세균 내 ATP를 추출하고, ATP에 광반응을 야기시켜 발광반응을 측정하는 방법으로서, 매우 복잡하고 시간이 많이 소요된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명의 목적은 형광성 기질을 이용한 효소활성에 기초하여 생물막 형성의 정도를 측정하는 새로운 진단방법을 개발하려는 것이다. 이 결과는 수도분배관 시스템 유지를 위한 생물막 제어 지시자 및 관리 지표로서 유용할 것으로 예상된다.

과제의 해결 수단

- [0008] 본 발명은
- [0009] 가늘고 긴 기둥형 쿠폰이 내재된 반응조 내에 수돗물을 일정 속도로 계속하여 흘려주며 반응조를 회전시켜 생물막을 형성하는 단계;
- [0010] 반응조에서 생물막이 형성된 쿠폰을 무균상태로 꺼내고 소독된 물로 부드럽게 세척하여 느슨하게 부착된 세균을 제거하는 단계;
- [0011] 꺼낸 쿠폰을 완충액이 든 튜브로 옮겨 초음파 처리하는 단계;
- [0012] 쿠폰 표면의 생물막을 긁어 완충액에 가하고, 원심분리하여 세포를 모으는 단계;
- [0013] 원심분리 후 상층액을 제거하고 펠렛을 재현탁시켜 세포시료를 제조하는 단계;
- [0014] 상기 세포시료에 MUF(4-methylumbelliferone)-기질인 4-메틸움벨리페릴- α -D-글루코피라노스, 4-메틸움벨리페릴- β -D-글루코피라노스 및 4-메틸움벨리페릴 부티르산을 가하고 반응시키는 단계; 및
- [0015] 반응 후 형광을 측정하는 단계;를 포함하는, 형광 기질 혼합물을 이용하여 물 분배관 내의 미생물을 정량하는 방법에 관한 것이다.
- [0016] 또한, 본 발명은 상기 MUF(4-methylumbelliferone)-기질이 4-메틸움벨리페릴 초산, 4-메틸움벨리페릴 엘라이드산(elaidate), 4-메틸움벨리페릴- α -D-갈락토피라노스, 4-메틸움벨리페릴- β -D-갈락토피라노스, 4-메틸움벨리페릴- α -D-글루코피라노사이드, 4-메틸움벨리페릴- β -D-글루코피라노사이드, 4-메틸움벨리페릴- α -D-갈락토피라노사이드, 4-메틸움벨리페릴- β -D-갈락토피라노사이드, 4-메틸움벨리페릴 헵타노산(heptanoate), 4-메틸움벨리페릴 인산, 4-메틸움벨리페릴 올레산(oleate), 4-메틸움벨리페릴 프로피온산, 4-메틸움벨리페릴- β -D-갈락토사이드, 4-메틸움벨리페릴- β -D-글루코사이드, 4-메틸움벨리페릴- α -D-글루코사이드 및 4-메틸움벨리페릴- α -L-푸라노사이드 중 선택된 1종 이상을 추가하는 것을 특징으로 하는, 형광 기질 혼합물을 이용하여 물 분배관 내의 미생물을 정량하는 방법에 관한 것이다.
- [0017] 또한, 본 발명은 상기 세 종류의 MUF-기질을 각각 동일 물비로 가하는 것을 특징으로 하는, 형광 기질 혼합물을 이용하여 물 분배관 내의 미생물을 정량하는 방법에 관한 것이다.
- [0018] 또한, 본 발명은 상기 생물막 형성 단계에서 반응조 회전속도를 20~50 rpm으로, 수돗물 흐름속도를 2~5 l/hr로 하여 진행함을 특징으로 하는, 형광 기질 혼합물을 이용하여 물 분배관 내의 미생물을 정량하는 방법에 관한 것이다. 반응조 회전속도 및 수돗물 흐름속도가 너무 빠르면 생물막이 잘 형성되지 않고, 너무 느리면 실제 수도관의 조건과 맞지 않는다.
- [0019] 본 발명에 따르면, 다양한 종류의 형광 기질 혼합물을 이용함으로써 관내 생물막에 존재하는 여러 가지 분해효소를 생산하는 다양한 세균을 탐지할 수 있으므로, 종래 단일 형광 기질을 이용하는 방법과 비교할 때 정확성, 민감성이 현저히 높아진다.

발명의 효과

- [0020] 본 발명의 방법에 의하면, 종래 단일 기질에 의한 수도관 내 생물막 정량방법보다 더 정확하게 미생물 양을 측정할 수 있다.
- [0021] 또한, 본 발명의 방법에 의하면, 시간이 많이 소요되지 않고 미생물 계수에 노동력이 많이 소요되지 않는다.

도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1은 본 발명에 사용된 환상 생물막 반응조의 구조도 및 실물사진이다.
- 도 2는 MUF 표준물질로 얻은 보정곡선이다.

도 3은 생물막 세균의 활성에 의하여 MUF-기질로부터 배양시간별로 생성된 형광물질의 양을 나타내는 그래프이다.

도 4는 세포 바이오매스와 형광물질 생성 간의 관계를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 아래에서는 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재에만 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.

[0024] 수질분석

[0025] 반응기 내부로 유입되는 수돗물에는 어떠한 처리도 하지 않고 실험실로 공급되는 수돗물을 직결하여 사용하였다. 수돗물의 수질은 표준방법 (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 측정기 (Fisher Scientific, AR15)로, 탁도는 탁도계 (Fisher Scientific, Inc., DRT-15CE)를 이용하여 측정하였다. 잔류염소량은 *N,N*-diethyl-p-phenylenediamine ferrous titrimetric method로 분석하였고, 암모니아성 질소와 인산염 인의 농도는 각각 인도페놀법 (Phenate method)과 아스코르브산법 (Ascorbic acid method)을 이용하여 분석하였다. AOC의 측정은 ATCC로부터 구입한 표준 균주인 슈도모나스 플루오레스센스 (*Pseudomonas fluorescens*) 균주 P-17과 아쿠아스피릴럼 속 (*Aquaspirillum* sp.) NOX 균주를 이용하여 분석하였다 (Lehtola, M. J., Nissinenb, K. T., 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**:601-610).

[0026] 생물막 시료

[0027] 음용수 분배 시스템의 수질 시물레이션에 환상 생물막 반응조 (Annular Biofilm Reactor; ABR)가 이용되었다 (도 1). 반응조는 제거 가능한 쿠폰을 수용하는 고정된 외부 실린더와 믹싱 및 전단력 양자를 모두 제공하는 다양한 스피드 모터에 의해 회전되는 내부 드럼으로 구성되어 있다. 환상 생물막 반응조 (ABR)는 38 rpm의 고정 회전속도와 3.36 l/hr의 수돗물 흐름 속도로 유지되었다. 실험은 주변 온도 20±2 °C에서 수행되었다. 생물막은 지속적으로 수돗물이 흐르는 조건에서 기밀 환상 생물막 내에서 10 일간 성장시켰다.

[0028] 20 개의 PVC 쿠폰 (15 cm × 1.4 cm × 0.15 cm, 길이 × 폭 × 두께) 각각은 반응조에서 무균상태로 제거되어 소독된 증류수로 부드럽게 세척하여 느슨하게 부착된 세균을 제거하였다. 그런 다음, 쿠폰은 50 ml의 인산 완충액 (400 mM, pH 7)이 들어 있는 유리튜브로 옮겼다. 그 후 튜브는 초음파 세척조 (모델번호 8210, Branson)에 놓은 후 5분간 초음파 처리하였다. 마지막으로, 쿠폰 표면의 생물막 시료는 소독된 세포 긁개를 이용하여 수동으로 긁어 인산 완충액에 놓았고, 세포는 원심분리 (20,000 x g, 15 분)로 모았다. 상층액을 제거한 후 최소배지 (KH₂PO₄ 2.78 g/l, Na₂HPO₄ 2.78 g/l, (NH₄)₂SO₄ 1.0 g/l, Hutner's mineral base 20 ml) 3 ml를 펠렛에 가하여 균일하게 재현탁하였다. 필요한 경우, 세포 현탁액은 최소배지로 수 배 희석하였다. 생존세포는 Difco R2A 배지 (효모 추출물 0.5 g/l, 프로테오즈 펩톤 0.5 g/l, 카사미노산 0.5 g/l, 텍스트로즈 0.5 g/l, 수용성 전분 0.5 g/l, 피루브산 나트륨 0.3 g/l, 이칼람 인산 0.3 g/l, 황산 마그네슘 0.05 g/l, 한천 15 g/l)를 이용하여 평판도말배양법으로 측정하였다.

[0029] 표준물질 및 효소 기질 제조

[0030] 형광을 이용한 효소분석법은 MUF (4-methylumbelliferone)를 함유한 기질의 가수분해에 바탕을 둔다. MUF-기질 (즉, MUF-α-글루코피라노스, MUF-β-글루코피라노스 및 MUF-부티르산 등)이 외부효소에 의하여 절단되면 형광물질인 4-MUF를 얻게 되는데, 이 물질은 364 nm의 빛에 의하여 여기되어 445 nm에서 발광한다. 가수분해에 의하여 유리된 형광물질은 형광광도계 (Model RF-5301PC, Shimadzu)로 측정하였다. MUF-기질과 4-MUF 표준물질은 Sigma (Sigma-Aldrich Chemical Co)에서 구입하였다.

[0031] MUF 농축 용액 (1 mM)은 17.617 mg의 MUF를 100 ml의 Milli-Q 물에 용해시켜 제조하였다. 검정곡선

(calibration curve)을 얻기 위해 농축 용액을 초순수로 희석하여 0.05 ~ 1.5 μM 과 같이 일련의 농도를 가지는 용액을 제조하였다. MUF-기질 용액은 초순수로 제조하여 생물막 시료 시험에 이용할 때까지 -20 $^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다. MUF와 MUF-기질 용액은 이 온도에서 수 개월간 안정적이었다.

[0032] **효소활성 측정**

[0033] 제조한 세포 현탁액 (45 ml)과 450 μl 의 세 가지 다른 MUF-기질 (10 μM) 각각을 무균 상태로 혼합하여 최종농도 0.38 μM 의 MUF-기질을 제조하여 암소에서 25 $^{\circ}\text{C}$ 로 배양하였다. 시간 간격을 달리하여 (5, 10, 15, 20, 25, 30 분) 세포가 든 MUF-기질 용액 1.7 ml를 소독된 갈색 마이크로원심분리 튜브에 옮겼다. 이후 용액에 0.3 ml의 트리스 완충액 (pH 10.3)을 가하고 형광광도계로 형광을 측정하였다. 최초 형광은 배양을 마친 직후에 관찰되었고, 형광광도계를 영점보정하여 배양된 시료에서 배경형광을 보정하였다. 트리스 완충액의 pH는 10.3으로 조정하였는데, 이는 MUF의 형광이 pH 의존적이고 최대 형광이 pH 10.3에서 얻어지기 때문이다. 배경의 자발 형광은 세포를 넣지 않은 MUF-기질을 함유한 대조군 시료에서 측정하였고, 이를 음성 대조군으로 이용하였다.

[0034] **<결과>**

[0035] 수돗물에서 AOC (Assimilable Organic Carbon)는 세균이 동화할 수 있는 유기탄소를 의미하며, 보통 총유기탄소 (TOC)의 0.1~9% 수준이다 (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**:540-545). 배급수 시스템에서 AOC 농도와 종속영양세균의 개체수 사이에는 밀접한 상관관계가 존재하며, AOC가 10 $\mu\text{g}/\ell$ 보다 낮은 경우에는 잔류염소를 유지시키지 않아도 종속영양세균의 증가가 일어나지 않는다 (Van der Kooij, D. 1992. Assimilable organic carbon as an indicator of bacterial regrowth. *J. AWWA*. **84**:57-65). 본 실험에서 AOC는 평균 35 $\mu\text{g}/\ell$ 수준으로 측정되어 위 문헌에서 제안한 종속영양세균의 성장을 제한할 수 있는 농도를 초과하므로 생물학적 안정성을 확보하기 위해서는 잔류염소의 존재가 필수적인 상황으로 판단된다 (표 1). 많은 연구에서 수돗물의 수질분석시 유기탄소를 COD (Chemical Oxygen Demand) (Martiny, A. C., Jrgensen, 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**:6899-6907), TOC (Total Organic Carbon; 총 유기탄소)(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**:5557-5561), 또는 DOC (Dissolved Organic Carbon; 용존성 유기탄소)(Eichler, S., Christen, R., Hltje, C., Westphal, P., Btel, J., Brettar, I., Mehling, A., and Hfle, 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**:1858-1872)의 농도로 제시하고 있으나, 이러한 유기탄소의 상당부분이 세균이 동화하여 이용할 수 없는 부분이라는 점을 감안한다면 AOC에 대한 분석 결과가 제시되어야 할 것이다.

[0036] 한편 본 실험에 사용된 수돗물에서 측정된 암모니아성 질소와 인산염 인의 평균 농도는 각각 0.02와 0.008 mg/ℓ 로 나타났다 (표 1). 따라서, 탄소:질소:인의 비율을 감안하면 탄소가 미생물의 재생장을 제한하는 주된 제한요인 (limiting factor)이 되고 있음을 보여준다. Chu *et al.* (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**: 255-263)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/ℓ 로 증가시켰을 때는 모형수도관에 형성된 생물막에 지대한 영향을 미쳤음을 보고하였다. 따라서 본 실험에서 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). 배급수 시스템에서는 관의 부식을 제어하기 위해 인산염을 첨가하기도 하는데, 일부 연구들에서는 수돗물에 인산염 인을 첨가했을 때 물에서 상당한 종속영양세균수의 증가를 유발한다고 보고하였다 (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**:1635-1640; 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**:434-439).

- [0037] 생산된 4-MUF의 농도를 결정하기 위해 양을 알고 있는 MUF 표준물질로 보정곡선을 얻었다 (도 2). 10 μ M의 MUF 농축 용액을 0.05 ~ 1.5 μ M로 희석하고 여기파장 365 nm 및 발광파장 445 nm로 조정된 형광광도계로 측정하였다. 형광 강도는 MUF 표준물질 ($r^2 = 0.99$)의 양과 선형 상관관계를 나타내었다.
- [0038] 배양된 시료에서 얻은 형광 강도는 배양시간이 증가함에 따라 비례하여 증가하였다 (도 3). 형광 안료 (MUF)는 효소 촉매작용에 의하여 기질로부터 유리되기 때문에 낮은 형광강도와 비교하여 높은 형광강도는 좀더 많은 기질이 분해되었음을 가리킨다. 이 선형성 (linearity)은 배양시간 한 시간까지 계속되었는데, 이것은 생물막 시료가 민감성 한계에 의존적으로 평가될 수 있음을 의미한다. 모든 배양은 자발 형광을 방지하기 위해 어두운 곳에서 수행하였다.
- [0039] 형광물질 생산에 대한 세포 바이오매스의 효과는 MUF-기질과 현탁 세포를 배양함으로써 결정되었다. 세포 현탁액을 연속 희석하면 $10^4 \sim 10^7$ CFU/ml 시리지가 제조되며, 형광물질 생산은 세포 바이오매스와 정확히 비례하였다 ($r^2 = 0.99$)(도 4). 세포를 가지지 않은 MUF-기질 대조군의 형광값도 측정하여 시험시료의 값에서 대조군의 형광 값을 감하였다. 2.02×10^7 CFU/ml 시료의 상대형광단위 (relative fluorescence unit; RFU)는 가한 총 MUF-기질 (0.65 μ M)의 약 45%에 해당하였다. 이러한 결과는 단지 한 시간의 배양반응 동안 MUF-기질에 대한 매우 높은 세포 활성을 나타내는 것이다.
- [0040] 이 측정방법의 최소검출한계 (minimum detection limit; MDL)는 생물막 시료에서 회수한 세포 현탁액의 소멸까지 순차적인 희석에 의해 결정되었다 (표 2). 형광은 PVC 쿠폰 10 cm^2 당 2 CFU까지 탐지할 수 있는데, 이는 형광 측정 및 효소 활성 측정에 필요한 최소세포수가 꽤 낮음을 나타낸다. 이 방법은 생물막 형성을 평가하는 가장 민감한 정량방법 중 하나이다.
- [0041] Wildeboer 등 (Wildeboer, D., Amirat, L., Price, R. G., and Abuknesha, R. A. 2010. Rapid detection of *Escherichia coli* in water using a hand-held fluorescence detector. *Wat. Res.* **44**:2621-2628)은 지표수 및 물놀이시설과 관련된 감염 위험성을 예측하기 위한 새로운 *E. coli* 휴대용 형광측정기술을 설명하였다. 임상 또는 환경시료의 *E. coli*는 β -D-글루쿠로니데이스 (β -D-glucuronidase) 형광형성 기질인 MUG (4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide)를 이용하여 측정하였다. MUG의 가수분해는 형광성 MUF를 분리하며, 측정된 형광신호의 강도는 존재하는 효소의 양과 비례하므로, 따라서 시료에 존재하는 *E. coli*의 수를 나타낸다. 소형화된 형광탐지장치가 사용되었고, *E. coli*의 수가 증가함에 따라 형광신호가 높은 선도 (linearity)를 나타내었고, 100 CFU/ml 및 $100 \sim 10^8$ CFU/ml 범위의 민감도를 나타내었다. 비록, 목표 미생물 (*E. coli* vs. 생물막 세균)과 적용되는 형광 기질이 동일하지는 않지만, 이 방법의 검출한계는 10 CFU/ml보다 낮은 범위였고, 이것은 본 발명의 결과와 필적할 만하다.
- [0042] 최근 생물막을 제어하고 제거하기 위하여 생물막의 새로운 정량 분석방법이 개발되었다 (Simes, M., Simes, L. C., Machado, I., Pereira, M. O., and Viera, M. J. 2006. Control of flow generated biofilm using surfactant- evidence of resistance and recovery. *Food Bioprod. Process.* **84**:338-345; Lehtola, M. J., Nissinenb, K. T., 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**:601-610; Sidhu, M. S., Langsrud, S., and Holck, A. 2001. Disinfectant and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from food industry. *Microb. Drug Resist.* **7**:73-83). 그러나, 대부분의 이러한 연구들은 생물막 정량이 노동집약적이고 느린 종래 플레이팅 방법으로 진행되었다 (Donlan, R. M. and Costerton, J. W. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**:167-193). 게다가, 생물막의 미생물 인시투 확인 및 정량을 위하여 형광을 이용한 새로운 고급기술들도 또한 제시되었다.
- [0043] 생물막 측정에는 생물막 세포들이 부착되어 있는 기저 (substratum)로부터 세포가 제거되거나 또는 생물막을 제거하지 않고 측정이 인시투 (in-situ)에서 수행될 것이 요구된다. 인시투 생물막 측정은 기저 표면이 파괴되기 쉽거나 잘 분해되는 경우 특히 매력적이다. 그러나, 음용수 분배시스템과 같은 빈(貧)영양 환경에서 탐지 효율은 일반적으로 꽤 낮고 형광 인시투 하이브리디제이션 방법 (fluorescence *in situ* hybridization; FISH)으로 측정을 완료하기 위해서는 수 시간이 필요하다 (Wagner, M. and Haider, S. 2012. New trends in fluorescence

in situ hybridization for identification and functional analysis of microbes. *Curr. Opin. Biotechnol.* **23**:96-102).

[0044] 본 발명자들은 현장 모니터링이 가능한 새로운 생물막 정량방법을 제안한다. 세포외 효소 활성은 생물막 시료의 세포 바이오매스가 증가함에 따라 비례하여 증가하므로, 형광을 더 많이 생성한다. 이 방법은 비파괴적이며, 실시간 생물막 형성 모니터링에 가까워 유용할 것으로 사료된다. 결론적으로, 이 방법은 수도관 시스템에서 형성되는 생물막을 간단하고 빠르며, 신뢰할 만하고 유효한 정량을 가능하게 하므로, 생물막 형성 제어 및 효과적인 관리에 도움이 된다.

표 1

[0045]

Parameters	Average	Range
Temperature(°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
NH ₃ -N (mg/L)	0.020	0.003~0.059
PO ₄ -P (mg/L)	0.008	0.003~0.020
AOC (μg/L)	35.0	20.0~48.5
HPC (CFU/mL)	15	2~60

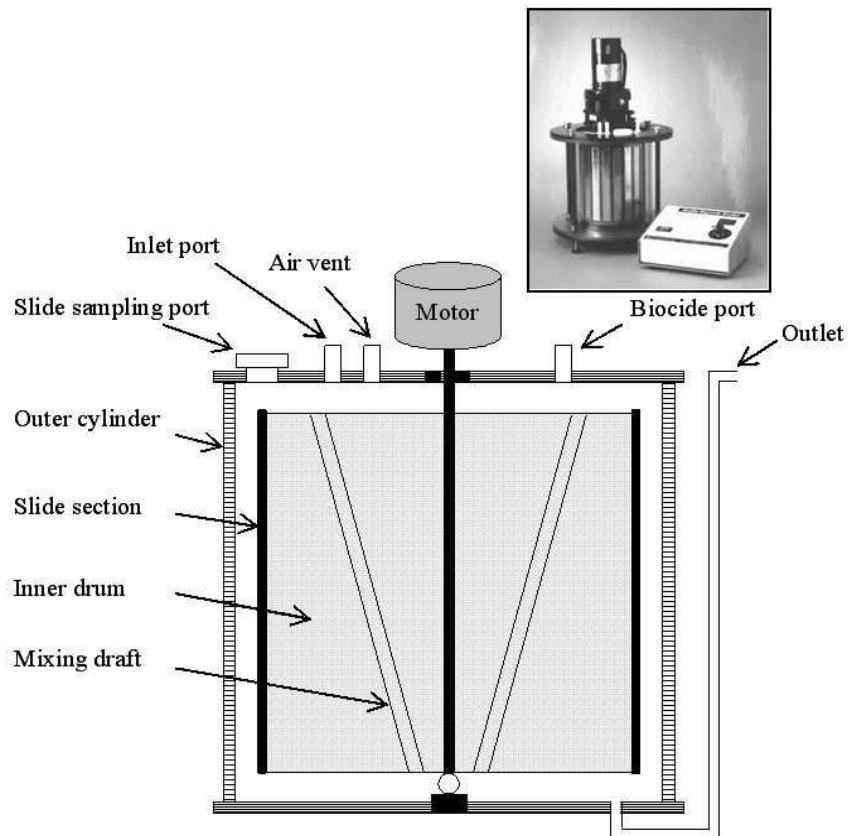
표 2

[0046]

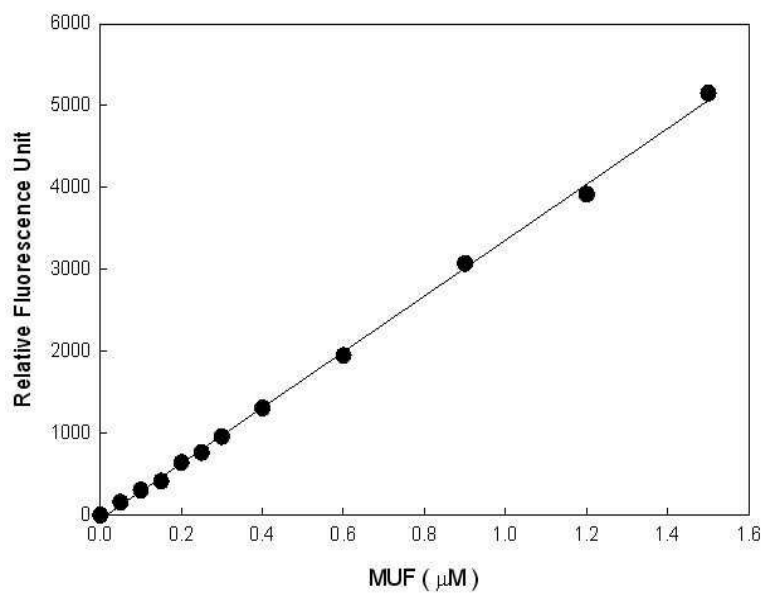
No. of cells (CFU/10 cm ² coupon)	Relative Fluorescence Unit ^a
2,150 ± 146	253.1 ± 1.0
215 ± 15	151.1 ± 1.1
21 ± 2	117.0 ± 1.0
2	61.4 ± 0.5
0	0

도면

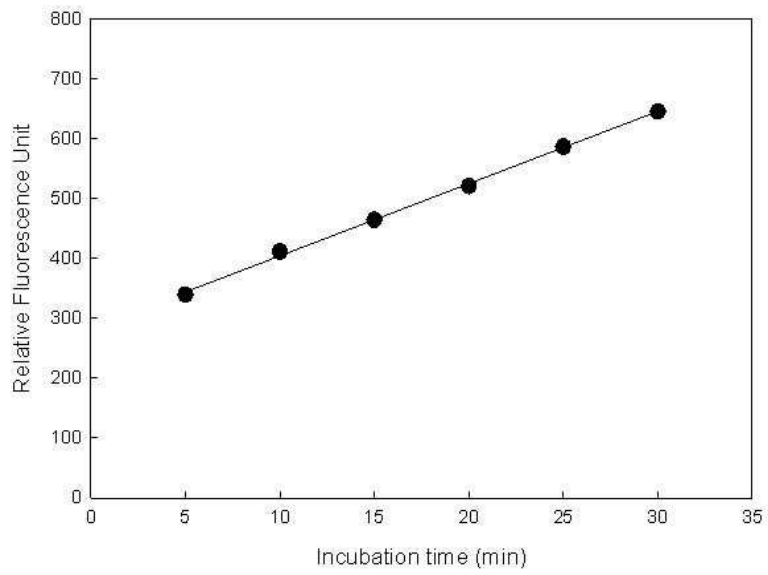
도면1



도면2



도면3



도면4

