

수돗물속 생물막 형성의 초기 세균

이동근[†]

신라대학교 의생명과학대학 제약공학과
(2007. 3. 16. 접수/2007. 9. 20. 채택)

Initial Bacterial Groups in the Development of Biofilm in Drinking Water

Dong-Geun Lee[†]

Department of Pharmaceutical Engineering, College of Medical Life Science, Silla University, Busan 617-736, Korea
(Received March 16, 2007/Accepted September 20, 2007)

ABSTRACT

To clarify the pioneer group in the development of biofilms in high chlorine residual water, a semi-pilot model system was operated and 16S rDNA V3 targeted PCR-DGGE was submitted. Biofilm formation occurred rapidly in the model of a drinking water distribution system. It reached 10^3 CFU/cm² or more on the surface of stainless steel, PVC, and galvanized iron in chlorinated (1.0 mg/l) water within a week. Within a week, uncultured Proteobacteria- and Bacillales group-like sequences were detected and *Sphingomonas*-like sequences were identified from all season and all pipe materials tested. Hence *Sphingomonas* species were regarded as the potential pioneer group in the development of biofilm in drinking water and this results would be useful for the prevention of biofilm formation and safety of drinking tap water.

Keywords: biofilm, drinking water, DGGE, *Sphingomonas* sp

I. 서 론

수돗물은 영양분 농도가 낮으며 소독제가 존재하여 세균의 생존에는 적합하지는 않지만 생물막을 구성하는 미생물 군집구조^{1,2)}와 활성³⁾에 대한 보고에서 알 수 있듯, 생물막은 관말에서의 급격한 세균수 증가와 기회성병원균(opportunistic pathogen) 유출로 보건학적인 문제를 일으킬 수 있다.³⁻⁵⁾ 수돗물 배급수관 내부에서 세균이 성장할 수 있는 장소는 수체(water body)와 관표면 등이다. 배급수관망에서 미생물의 표면부착과 생물막 형성에는 표면의 재질, 수체내의 미생물, 영양분과 소독제의 농도와 종류, 수온 그리고 수리동역학 등이 관여한다고 알려져 있다.^{6,7)}

생물막은 표면에 부착하여 성장하는 미생물 군집으로 '미생물의 도시(city of microbes)'라고 할 수 있다.⁸⁾ Davey와 O'Toole는 생물막 형성을 기아(starvation)에

대한 반응기작으로 간주하였고 생물막 천이의 단계를 개시(initiation), 성숙(maturation), 유지(maintenance), 탈착(dissolution)의 4단계로 구분하였다.⁹⁾ 수돗물속의 생물막 천이의 첫 단계인 개시에 관여하는 세균의 파악은 배급수관망에서의 생물막 형성 저해를 위한 기초 자료로 사용될 수 있어 보건학적인 측면에서도 중요한 것이다.

한편 군집구조파악을 위한 배양법은 환경미생물의 10% 이상을 배양시킬 수 없는 한계가 있어 비배양법을 이용한 기법들이 발달하였다.¹⁰⁾ 비배양법을 통한 종다양성에 대한 측정 방법에는 현미경 관찰¹⁰⁾과 생체 고분자에 대한 조사 방법이 있다. 조사대상 생체 고분자는 주로 인지질이나 지방산 그리고 핵산이다.¹²⁾ 동일한 길이의 PCR 산물이라도 구성원의 DNA 염기서열의 차이를 이용한 fingerprinting 기법이 많이 이용되는데 DGGE(denaturing gradient gel electrophoresis),^{2,11)} TGGE(temperature gradient gel electrophoresis),¹²⁾ SSCP(single-strand-conformation polymorphism),¹³⁾ 그리고 c-RFLP(communitiy restriction fragment length polymorphism)¹⁴⁾ 등이 있다. 이러한 것들은 다른 비배

[†]Corresponding author : Department of Pharmaceutical Engineering, College of Medical Life Science, Silla University
Tel: 82-51-999-6282, Fax: 82-51-999-5636
E-mail : ldg@silla.ac.kr

양법에 비해 많은 시료들을 한꺼번에 비교할 수 있으며 비교적 시간이 적게 소요되는 장점이 있다. 이 등^{1,2)}은 잔류염소 농도가 낮은 배급수관말의 동일한 생물막 시료에 대한 배양법과 비배양법에 근거한 군집구조 분석을 통하여, 비배양법인 DGGE¹⁾가 배양법²⁾에서 검출하지 못한 혐기성세균과 배양 불가능한 세균을 검출한다는 것을 밝혔다. 정수장을 비롯한 배급수관 상류는 배급수관 하류인 관말에서 검출된 세균들의 주요한 공급처 중 하나이고 배급수관 상류 등 잔류염소가 높은 수계에서 생물막 형성의 초기 단계에 관여하는 개척자(pioneer) 그룹을 파악하는 것은 수돗물 이용의 보건학적 측면에서 중요하다고 할 것이다.

정수장에서 생산되는 수돗물은 잔류염소의 농도가 높고 관말의 수돗물과 조건이 다를 가능성이 크므로, 이 논문에서는 모델시스템을 이용하여 잔류염소 농도를 높이는 등의 배급수관 상류와 같은 조건을 형성한 후¹⁵⁾ 생물막 형성 초기에 관여하는 미생물을 파악하고자 스테인레스, PVC, 아연도강관 등의 관재질을 대상으로 DGGE 방법을 이용하였다.

II. 재료 및 방법

1. Semi-pilot plant

정수장에서 생산된 수돗물을 모방하기 위해 Norton과 LeChevallier¹⁵⁾의 방법에 따라 관말의 수돗물에 모래여과한 상수원 여과수를 inoculum source로 이용하였다. 관말의 수돗물과 모래여과된 상수원수를 200:1로 섞

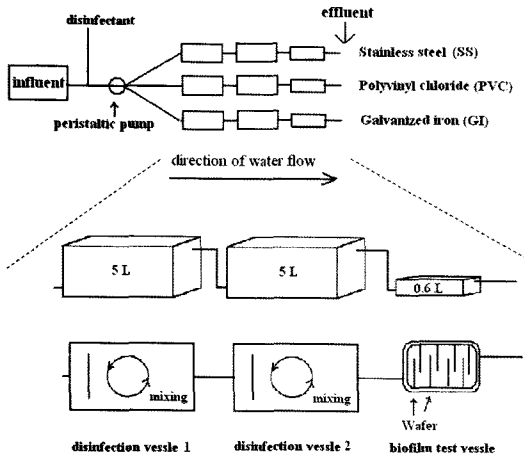


Fig. 1. Schematic diagram of the experimental model system. Vessels were made of stainless steel. Target dose of disinfectant was 1.0 mg/l chlorine residual and retention time in disinfection vessel was 300 minutes. Flow rate was 30 ml/min.

고²⁰⁾ 소독조(disinfection vessel)에서 잔류염소 1.0 mg/l의 고농도에서 5시간 동안 처리하였다. 쿠폰의 규격은 25×75×1 mm(면적 39.5 cm²)이었고 30 ml/min(0.05 dilution rate)의 유하속도로 물을 흘렸다(Fig. 1). 생물막 형성의 개시 단계에 관여하는 세균을 파악하고자 1주일동안 연속적으로 물을 흘렸으며, 계절별 요인을 분석하고자 5월(봄), 8월(여름), 12월(겨울) 등 3회 실험을 수행하였고 관종별 영향을 파악하기 위해 스테인레스, PVC, 아연도강관을 이용하였다.

2. 미생물군집 회수와 종속영양세균계수

쿠폰들을 무균적으로 채취한 후 30 ml의 탈착용액을 이용하여 가역적으로 흡착한 미생물을 제거하였다.¹²⁾ 탈착용액 100 ml에 쿠폰을 넣고 45 kHz에서 초음파세척(Branson 3210 washing sonicator, USA), 냉장, 교반, 냉장을 각 1분씩 총 3회 실시하여 생물막의 세균을 탈착시켰다.¹²⁾ 원심분리(10000×g, 20 min)와 멸균된 10 ml 인산완충용액(pH 7.0)을 이용한 세척을 3회 실시하여 생물막의 미생물을 분리하였다. 최종적인 세포 덩어리는 20 ml의 멸균된 0.7% NaCl로 희석하였다. 매회 5개의 쿠폰을 채취하였고 DNA 추출 때까지 초저온 냉동고에 보관하였다. 종속영양세균은 0.05% (wt/vol) sodium pyruvate를 첨가한 R2A agar 배지를 이용하여 20°C에서 1주일간 배양하여 계수하였다.¹⁶⁾

3. DNA 추출, 정제, PCR

DNA 추출을 위한 세포파괴는 bead beater법을 적용한 후 액체질소와 끓는 물을 이용한 3번의 freeze-thaw 법 그리고 phenol-chloroform 법으로 DNA를 추출한 후에 Sephadex G-50 칼럼으로 정제하였다.¹⁷⁾

Perkin-Elmer model 2400 thermal cycler로 16S rDNA의 V3 region을 증폭하였는데 reverse-primer는 534r(5'ATTACCGCGGCTGCTGG)을 forward-primer는 GC clamp(5'CGCCC GCCGCGCGCGGCGGGCGGGGGGGGGGGCACGGGGGG)가 부착된 gc338f(5'ACTCCTACGGGAGGCGAGCAG)를 이용하였다. PCR 조건은 Muyzer 등의 touch down법을 이용하였다.¹¹⁾ 하나의 시료에 대하여 각각 3번의 PCR 반응을 시키고 서로 섞어 PCR의 오류를 최소화하고자 하였고 이를 정제하여 DGGE를 수행하였다.

4. DGGE

아가로스 gel(1.5%, wt/vol)로 전기영동하여 PCR 증폭을 확인한 후 PCR 산물을 정제하였다. Bio-Rad 회사의 DGene을 이용하여 Muyzer 등의 방법으로 8%

(w/v) polyacrylamide gel로 DGGE를 수행하였다.¹¹⁾ 변성제(denaturant)의 농도는 35%에서 70% 범위였고 100%의 변성제는 7 M urea(Sigma)와 40%(vol/vol) deionized formamide(Sigma)로 구성하였다. 전기영동은 60°C에서 행하였고 15분동안 70 V로 stacking한 후에 6시간동안 120 V로 하였다.¹⁾

5. 염색 및 DGGE bands 분석

Ethidium bromide로 겔을 염색한 후 UV transilluminator (Eagle eye II, Stratagene, USA)에서 촬영하였고 특징적인 DNA band를 겔에서 추출하였다. 겔 조각을 멸균된 eppendorf-tube에 넣고 25 μ l의 멸균된 무이온수(deionized water)를 첨가한 후 4°C에서 12시간 이상 방치하였다. DNA 용출액을 주형으로 하여 GC clamp가 없는 338f-534r primer set로 증폭하였고 이를 T-vector (Promega)에 ligation시킨 후 transformation 등을 거친 후에 capillary-type automatic DNA sequencer(ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, California)로 서열을 분석하였다. 분석된 16S rDNA 서열을 BLAST database(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에서 비교하였다.

III. 결과 및 토의

1. 종속영양세균계수(HPC)

종속영양세균의 농도를 Table 1에 나타내었다. 모래 여과한 상수원수와 수돗물의 혼합물에 염소소독을 하면 최소 2 log에서 최대 4 log까지 세균수가 감소하는 것으로 나타났다. 염소소독을 하여도 일부 배지에서는 종속영양세균의 성장이 있었는데 이는 Gauthier 등^{18,19)}이 보고한 소독제의 농도와 접촉시간을 늘려도 배양가능한 세균이 존재하는 것과 일치하는 것이었다. 생물막

의 세균량은 스테인레스, PVC, 아연도강관 순으로 증가하였고 계절적으로는 여름과 봄이 비슷하였고 겨울이 낮았다(Table 1). Lee 등²⁰⁾은 본 연구와 동일한 시료에 대하여 일반세균, 배양은 되지 않지만 살아있는(Viable-but-non-culturable) 세균, 총세균수를 분석하여 세균의 분포는 관재질, 노출시간, 계절에 따라 상관관계가 있음을 밝혔고(ANOVA, $p \leq 0.01$) 단기간의 결과이지만 스테인레스에서 세균성장이 최소인 것을 발견하였으며 느린 유속에 의한 세균성장이 실제 배양수시시스템의 결과와 유사함을 보고하였다.

2. 생물막의 DGGE 패턴

계절과 시간에 따른 PCR-DGGE 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 봄에 아연도강관은 모델시스템 가동 1일부터 band가 검출되어 7일까지 변화가 없었고, PVC는 1일째 아연도강관과 공통적인 band가 하나였는데 3일과 7일째는 일치하였다. 스테인레스는 3일째 band가 처음 검출되었는데 7일째에 변화가 있었다. 7일째는 모든 관종에서 동일한 DGGE 패턴이 보여 관재질에 상관없이 비슷한 종류의 세균들에 의해 생물막이 형성된 것으로 생각되었다(Fig. 2a). 스테인레스에서는 주형 DNA가 추출되었음을 자외선분광기로 확인하였지만 1일째 PCR이 되지 않았다. PCR bias가 원인일 수도 있겠지만 primer set가 증폭시키지 못하는 세균군집의 존재 가능성도 무시할 수 없었다.

여름에 PVC와 아연도강관은 1일째와 3일째 동일한 위치에 하나의 band를 보이다가 7일째는 특징적인 band와 공통 band를 보였다(Fig. 2b). 스테인레스의 경우 사진에서는 잘 보이지 않을 정도로 희미한 band(8b)가 3일과 7일째에 검출되었다.

겨울시료는 아연도강관의 경우 1일째부터 7일째까지 동일한 band(12b)가 검출되었고 3일째와 7일째에 특정

Table 1. HPC concentrations of mixture (tap water + sand filtrate of raw water), disinfected influent, and biofilm in minimal R2A medium.²⁰⁾ Numbers in parentheses represent mean values

	May (Spring)	August (Summer)	December (Winter)	
Mixture (CFU/ml)	$4.5 \times 10^2 - 4.5 \times 10^3$ (2.5×10^3)	$7.0 \times 10^3 - 6.1 \times 10^4$ (4.2×10^4)	$6.8 \times 10^1 - 1.2 \times 10^3$ (6.2×10^2)	
Disinfected influent (CFU/ml)	N.D. - 2.0×10^0 (1.0×10^0)	N.D. - 2.0×10^0 (1.3×10^0)	N.D. - 1.0×10^0 (0.8×10^0)	
Biofilm (CFU/cm ²)	Stainless steel	$4.1 \times 10^1 - 1.2 \times 10^3$ (7.8×10^2)	$1.6 \times 10^2 - 8.2 \times 10^2$ (4.1×10^2)	$2.0 \times 10^0 - 1.6 \times 10^1$ (7.0×10^0)
	PVC	$9.1 \times 10^1 - 1.1 \times 10^3$ (7.6×10^2)	$2.6 \times 10^2 - 1.0 \times 10^3$ (5.8×10^2)	$3.5 \times 10^0 - 2.5 \times 10^1$ (1.7×10^1)
	Galvanized iron	$6.2 \times 10^1 - 1.7 \times 10^4$ (5.9×10^3)	$1.4 \times 10^2 - 3.4 \times 10^3$ (1.6×10^3)	$1.8 \times 10^0 - 7.0 \times 10^1$ (3.5×10^1)

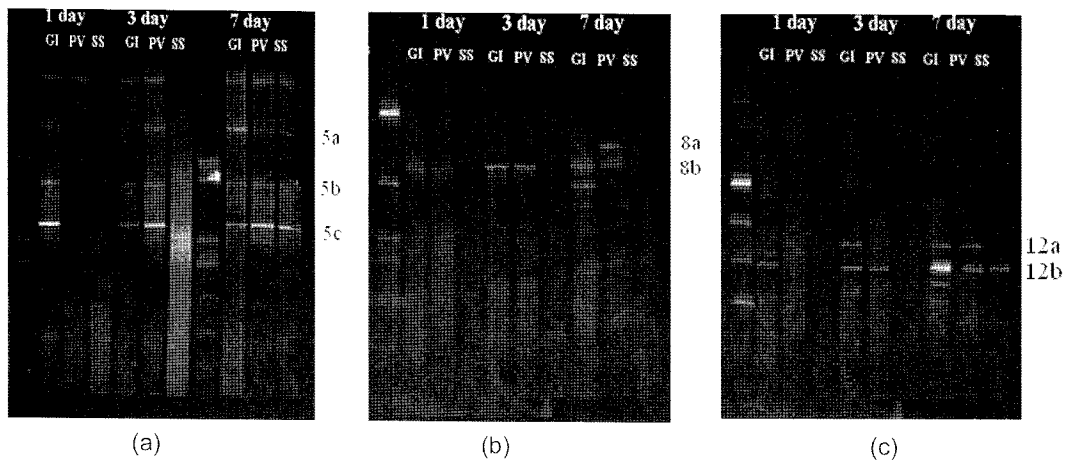


Fig. 2. Image of DGGE (35% to 70% denaturant) at spring (a), summer (b) and winter (c). Marked bands were sequenced. GI, PV and SS mean galvanized iron, PVC and stainless steel, respectively.

적인 band도 검출되었다. PVC의 3일째 시료와 7일째 시료는 각각 아연도강관의 1일째와 3일째 시료와 같은 pattern을 보였으며 스테인레스의 경우 7일째에 다른 관재질과 동일한 위치에서 band(12b)를 처음 보였다.

3. DGGE band 염기서열 분석

Table 2에 염소처리된 상태에서 초기 생물막 형성의 pioneer group이 나타내는 PCR-DGGE band의 염기서열 결과를 나타내었다. DNA band의 염기서열은 보고된 것들과 93% 이상의 유사성을 보였다(Table 2). DNA band들은 여름과 겨울시료의 경우 모두 분석하였고 봄 시료는 2개 이상 분석하였다. Gel 상에서 동일

한 위치에 있는 band들의 염기서열이 일치하는 것을 확인하였다(data not shown). 그리고 Fig. 2에서 labelling이 되지 않은 band는 338f-538r primer set에서 증폭이 되지 않거나 염기서열 분석결과 정상적인 16S rDNA 서열이 아닌 것으로 나타났다.

계절별로 세균군집의 구조가 변하고 이에 따라 수돗물속에서 생물막 형성에 관여하는 세균 종류에 변화가 있을 수 있어 5월(봄), 8월(여름), 12월(겨울) 등 3회 실험을 수행하였다. 봄 시료에서 검출된 5a, 5b, 5c band는 각각 *Sphingomonas capsulatum*(Accession #: D16147), uncultured bacterium clone(AB238055), uncultured beta proteobacterium clone(AF353283) 유

Table 2. Sequence analyses of bands derived from the bacterial 16S rDNA V3 region on PCR-DGGE gels of biofilm samples from drinking water containing 1.0 mg/l free chlorine

DGGE band (Accession no.)	Phylogenetic group	Most closely related bacterial sequence	Sequence length (bp)	% similarity	GenBank accession no.
5a (DQ841344)	Alpha	alpha proteobacterium clone <i>Sphingomonas capsulata</i>	174	97	DQ295404 D161475
5b (DQ841346)		Uncultured bacterium clone	196	97	AB238055
5c (DQ841347)	Beta	Uncultured beta proteobacterium clone	175	96	AF353283
8a (DQ841342)		Uncultured bacterium clone	127	93	AY375102
8b (DQ841345)	Alpha	<i>Sphingomonas</i> sp. Drinking water bacterium clone	174	97	AB242809 AY328849
12a (DQ841343)	Bacillales	<i>Anoxybacillus flavithermus</i> <i>Bacillus</i> sp. OS-ac-18	197	99	AY643748 U46747
12b (DQ841348)		Alpha	Uncultured proteobacterium clone <i>Sphingomonas</i> sp.	112	98

래의 DNA와 유사한 서열을 보였다.

여름 시료에서 검출된 8a band는 unclutred bacterium clone(AY375102)과 93% 유사하였고 α -proteobacterium F06021(AF242809)와 92%의 유사성을 보여 α -proteobacterium에서 유래했을 가능성이 높은 것으로 생각되었다. 8b band는 *Sphingomonas* sp.(AB242809)와 유사한 서열을 가지고 있었으며 또한 수돗물에서 추출한 세균 유래의 16S rRNA와도²¹⁾ 97%의 유사성을 보였다. 8a band의 경우 127 bp에 지나지 않았지만 chimera form이 아닌 것을 rdp-II에서 확인하였고 blast 검색결과도 연속된 서열이 AY375102 염기서열과 gap없이 유사성을 보였다.

겨울 시료에서는 *Anoxybacillus flavithermus*(AY643748) 혹은 *Bacillus* sp.(U46747)과 99%의 유사성을 보이는 band(12a)와 *Sphingomonas* sp.(AF411072)와 98% 유사성을 보이는 band(12b)가 검출되었다. 혐기성인 *Anoxybacillus* sp가 수돗물에 있었다면 수돗물의 생물막에는 부분적으로 혐기성이 있다는 보고¹⁾와 일치하며, 본 연구에서는 관말의 수돗물을 이용하였으므로 배급수관의 상류 생물막에서 탈착한 *Anoxybacillus* sp가 염소소독에서 살아남아 생물막 형성에 관여하는 것으로 생각되었다. 하지만 본 연구의 12a band의 염기서열은 혐기성인 *Anoxybacillus flavithermus*²¹⁾ 뿐 아니라 호기성인 *Bacillus* sp.와도 유사하여 혐기성세균 유래인지는 확신할 수는 없었다. *Sphingomonas* sp.와 유사한 12b band의 경우 8a band와 같이 길이가 짧았다.

실험에 이용한 모든 관재질에서 계절에 상관없이 *Sphingomonas* sp. 유래의 DNA band가 검출되어 *Sphingomonas* sp.가 생물막 형성의 초기 단계에 관여하는 결과가 도출되었고 기존 배양법으로 검출할 수 없는 unclutred bacteria가 봄, 여름 시료에서 검출되었고 겨울에는 Bacillales에 속하는 세균이 검출된 것이 특이한 점이었다(Table 2). *Sphingomonas* 속 세균들은 편모를 가지고 있으며 봄 시료에서 검출된 *S. capsulatum*은 세포 외부에 capsule을 생산하여 염소에 대한 내성을 나타낼 가능성이 높을 것이다. 생물막 형성초기 부착과정에 운동성을 띠는 편모가 필수적이라는 보고²²⁾와 1.0 mg/l 잔류염소농도의 수돗물에서 1시간 처리한 후에도 *Sphingomonas* sp.가 살아 있으며 aggregate를 생성하였다는 배양법에 근거한 보고¹⁸⁾를 본 연구의 비배양적 연구 결과와 비교하면 *Sphingomonas* 속 세균들이 수돗물 속의 생물막 형성의 pioneer 역할을 할 가능성이 높을 것으로 생각된다.

또한 이 등¹⁾은 수온이 16°C 이상이고 잔류염소농도가 0.3 mg/l 이하인 관말의 수돗물을 이용한 DGGE

연구를 통하여 α -Proteobacteria에 속하는 *Sphingomonas* sp.와 *Rhodobacter gluconicum* 그리고 unclutred beta proteobacterium의 16S rRNA 유전자 염기서열을 수돗물 노출 1일째 아연도강관 시편에서 검출하였다. 본 연구와 이 등¹⁾의 보고의 공통점은 첫째 *Sphingomonas* sp.가 생물막 형성 초기에 검출된 점이며 둘째 α -와 β -Proteobacteria가 생물막 형성초기에 검출되었다. 이 등¹⁾은 실험 3주째에 처음으로 γ -Proteobacteria를 검출하였다. 따라서 잔류염소의 농도에 상관없이 수돗물에서는 빈영양환경에서도 생존 가능한 α -와 β -Proteobacteria가 생물막 형성초기에 중요한 역할을 수행하는 것으로 생각되며 *Sphingomonas* sp.가 중요한 역할을 할 것으로 생각된다. 셋째 혐기성세균 유래의 가능성이 있는 염기서열이 검출되었다. 이 등¹⁾의 연구와 차이점은 검출된 DNA band의 수가 본 연구에서 적었는데, 이는 염소농도의 차이에 따른 세균농도의 차이나 소독제 내성을 가지는 일부 세균들만 성장한 것에서 비롯된 것으로 생각되었다.

비배양법을 이용한 본 연구 결과와 이 등¹⁾의 보고 그리고 배양법을 통한 Gauthier 등¹⁸⁾의 결과 사이에 검출된 공통세균인 *Sphingomonas* sp.가 수돗물에서 생물막 형성에 있어 개척자(pioneer) 역할을 할 가능성이 높을 것으로 유추된다. 추후에 unclutred bacterial sequence 등에 대한 정보가 추가되면 수돗물에서 pioneer group에 대하여 더 명확히 알 수 있을 것이며 수돗물의 안전성 확보를 위한 보건학적 자료로 활용될 수 있을 것이다.

IV. 결 론

수돗물에서 생물막 형성의 초기단계에 관여하는 세균 군집 파악을 위해 잔류염소 농도를 1.0 mg/l로 처리한 수돗물 배급수관 모델시스템을 이용하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 생물막은 1주일만에 최대 10⁴ CFU/cm²의 농도로 스테인레스, PVC, 그리고 아연도강관에서 검출되었다.
2. PCR-DGGE 분석으로 봄, 여름, 겨울 시료에서 계절에 따라 unclutred proteobacteria와 Bacillales group의 세균들과 유사한 16S rRNA band들이 검출되었다.
3. PCR-DGGE 분석으로 계절에 상관없이 모든 시료에서 *Sphingomonas* 속 세균의 16S rRNA와 유사한 염기서열이 검출되어, 이들이 수돗물에서 생물막 형성의 초기단계에 중요한 역할을 할 가능성이 높은 것으로 나타났고 향후 수돗물의 보건학적 안전성을 확보하는데 본 연구결과가 일조를 할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Lee, D.-G. and Kim, S.-J. : Bacterial species in biofilm cultivated from the end of the Seoul water distribution system. *Journal of Applied Microbiology*, **95**, 317-324, 2003.
2. Lee, D.-G., Lee, J.-H. and Kim, S.-J. : Diversity and dynamics of bacterial species in a biofilm at the end of the Seoul water distribution system. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **21**, 155-162, 2005.
3. Lee, D.-G. : Safety Investigation of tap water and biofilm by isolated bacteria. *Korean Journal of Environmental Health*, **30**, 207-213, 2004.
4. Lee, D.-G. : CLPP of Biofilm in Free Chlorine Residual and Monochloramine. *Korean Journal of Environmental Health*, **31**, 147-151, 2005.
5. Schwartz, T., Hoffmann, S. and Obst, U. : Formation and bacterial composition of young, natural biofilms obtained from public bank-filtered drinking water systems. *Water Research*, **32**, 2787-2797, 1988.
6. Lund, V. and Ormerod, K. : The influence of disinfection processes on biofilm formation in water distribution systems. *Water Research*, **29**, 1013-1021, 1995.
7. Piriou, P., Dukan, S., Levi, Y. and Jarrige, P. A. : Prevention of bacterial growth in drinking water distribution system. *Water Science and Technology*, **35**, 283-287, 1997.
8. Wantnick, P. and Kolter, R. : Biofilm, city of microbes (minireview). *Journal of Bacteriology*, **182**, 2675-2679, 2000.
9. Davey, M. E. and O'toole, G. A. : Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, **64**, 847-867, 2000.
10. Amann, R. I., Ludwig, W. and Schleifer, K. H. : Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology Review*, **59**, 143-169, 1995.
11. Muyzer, G., DeWall, E. C. and Uitterinden, A. G. : Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**, 695-700, 1993.
12. Eichner, C. A., Erb, R. W., Timmis, K. N. and Wagner-Dobler, I. : Thermal gradient gel electrophoresis analysis of bioprotection from pollutant shocks in the activated sludge microbial community. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 102-109, 1999.
13. Lee, D.-H., Zo, Y.-G. and Kim, S.-J. : Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial community by PCR-single-strand-conformation polymorphism. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**, 3112-3120, 1996.
14. Martinez-Marcia, A. J., Acinas, S. G. and Rodriguez-Valeria, F. : Evaluation of prokaryotic diversity by restriction digestion of 16S rDNA directly amplified from hypersaline environments. *FEMS Microbiology Ecology*, **14**, 219-232, 1995.
15. Norton, C. D. and LeChevallier, M. W. : A pilot study of bacteriological population changes through potable water treatment and distribution. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 268-276, 2000.
16. Alonso, J. L., Soriano, A., Carbajo, O., Amoros, I. and Garelick, H. : Comparison and recovery of *Escherichia coli* and thermotolerant coliforms in water with a chromogenic medium incubated at 41 and 44.5°C. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 3746-3749, 1999.
17. Miller, D. N., Bryant, J. E., Madsen, E. L. and Giorse, W. C. : Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment sample. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 4715-4724, 1999.
18. Gauthier, V., Redercher, S. and Block, J.-C. : Chlorine inactivation of *Sphingomonas* cells attached to goethite particles in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 355-357, 1999.
19. Kim, T. H., Lee, Y.-J. and Lim, S. J. : The influence of chlorine application on corrosion and bacterial in home plumbing systems. *Korean Journal of Environmental Health*, **32**, 431-439, 2006.
20. Lee, D.-G., Park, S. J. and Kim, S.-J. : Influence of pipe materials and VBNC cells on culturable bacteria in a chlorinated drinking water model system. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **17**, 1558-1562, 2007.
21. Pikuta, E., Lysenko, A., Chuvilskaya, N., Mendrock, U., Hippe, H., Suzina, N., Nikitin, D., Osipov, G. and Laurinavichius, K. : *Anoxybacillus pushchinensis* gen. nov., sp. nov., a novel anaerobic, alkaliphilic, moderately thermophilic bacterium from manure, and description of *Anoxybacillus flavithermus* comb. nov. *International Journal of Systematic Evolution and Microbiology*, **50**, 2109-2117, 2000.
22. Lee, J.-H., Rho, J. B., Park, K.-J., Kim, C. B., Han, Y.-S., Choi, S. H., Lee, K.-H. and Park, S.-J. : Role of flagellum and motility in pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *Infection and Immunity*, **72**, 4905-4910, 2004.