

알루미늄 표면에 생물막의 형성인자 및 항균제에 의한 생물막 제거효과 분석

박상준*[†] · 오영환** · 조보연** · 이재신** · 이상화** · 정재현**

*서울시립대학교 화학공학과
02792 서울특별시 동대문구 시립대로 163
**FITI시험연구원 환경바이오평가팀
28115 충청북도 청주시 청원구 오창읍 양청3길 21
(2015년 3월 13일 접수, 2015년 4월 28일 수정본 접수, 2015년 5월 4일 채택)

Study of Formation Factor of Biofilm on Aluminum surface and Removal Efficiency of Biofilm by Antimicrobials

SangJun Park*[†], YoungHwan Oh**, BoYeon Jo**, JaeShin Lee**, SangWha Lee** and JaeHyun Jeong**

*Department of Chemical Engineering, University of Seoul, 163 Siripdae-ro, Dongdaemun-gu, Seoul 02792, Korea
**Environment & Assessment Team, FITI Testing & Research Institute, 21, Yangcheong 3-gil, Ochang-eup, Cheongwon-gu, Cheongju si, Chungcheongbuk-do 28115, Korea

(Received 13 March 2015; Received in revised form 28 April 2015; accepted 4 May 2015)

요 약

에어컨을 작동 시 악취가 심하게 느껴지는 차량 25대에서 총 108종의 미생물(곰팡이 79종, 세균 29종)이 분리되었으며, 곰팡이 43종, 세균 23종이 동정되었다. 차량 내 에어컨 작동 시 발생하는 응축수를 분석한 결과 pH 6.4~7.1, 탄소원 12.5~34.2 mg/L, 질소원 0.9~18.6 mg/L, 이온성분 0.5~27.8 mg/L, 미네랄성분 0.1~7.7 mg/L로 분석되었다. 생물막은 중온성 세균에 의해 여름철 온-습도 조건(26 °C, 70% R.H.)에서 형성되었고, 생물막을 인위적으로 제거하더라도 환경인자(영양성분 및 온-습도)가 적합하면 재생됨이 확인되었다. 항균제의 항균 활성은 부유성 세균에 대해 15분 이내에 99.9%의 균 감소율을 보였지만, 항균제의 생물막 제거효과는 없었다. 항균제를 처리한 차량 내에서는 에탄올 성분이 최대 1,940 ppm이 검출되었고, 에탄올의 흡입 시 급성독성치 보다는 작았지만, 사용된 화학물질들의 인체 안전성에 대한 검토가 필요하다.

Abstract – 108 microorganism types (79 types of fungi and 29 types of bacteria) were isolated from 25 automobiles generating bad odor when the air conditioner was turned on, and 43 types of fungi and 23 types of bacteria were identified. The analysis of condensate generated by the air conditioners in the automobiles indicated pH 6.4~7.1, 12.5~34.2 mg/L carbon source, 0.9~18.6 mg/L nitrogen source, 0.5~27.8 mg/L ion contents, and 0.1~7.7 mg/L mineral contents. The biofilms were formed by the mesophiles under the summer temperature/humidity condition (26 °C, 70% R.H.), and they were regenerated when the environmental factors (nutritional contents and temperature/humidity) were appropriate even after they were artificially removed. Although the antimicrobials removed 99.9% of planktonic cells within 15 minutes, they were not effective in removing biofilm. Up to 1,950 ppm of ethanol was observed in the automobile treated with the antimicrobials. Although the figure is lower than the acute toxicity level when inhaled by humans, the health safety of the chemical substances used in the antimicrobials needs to be reviewed.

Key words: Microorganism, Automobile, Biofilm, Environmental Factor, Antimicrobial

1. 서 론

생물막(Biofilm)이란 고체 표면에 붙어있는 미생물이 대사과정에 서 분비한 세포외고분자물질(Extracellular polymeric substances,

EPS)로, 대부분의 세균은 생물막의 상태로 존재하며, 세균 감염의 65%는 생물막에 기인한다고 추정된다[1,2]. Costerton 등[3]은 생물막의 형성 및 발달 단계를 세균이 표면에 부착하는 단계, 표면에 강하게 고착하는 단계(단일막 형성), 미세미생물군락을 형성하는 단계, 3차원 구조의 생물막을 형성하는 단계, 생물막을 해체 및 전이하는 단계를 거친다고 보고 하였다. 생물막 내 미생물은 외부환경(온도, 습도, 산도, 자외선 노출 등)으로부터 보호를 받는다[4]. 예를 들면, 생물막 내 세균은 부유세균(Planktonic cells)보다 항균제(Antimicrobials)나 항생제(Antibiotics)에 대한 내성이 10 배~1000

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: sjpark@fiti.re.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

배 정도로 크다[5]. 또한, 일반적으로 유전자는 번식을 통해 전달되지만 생물막 내 세균들은 수평적 유전자 도입(Horizontal gene transfer)을 통해 서로 새로운 유전자를 쉽게 획득할 수 있다[6]. 따라서, 세균의 항생제에 대한 내성도 이런 과정을 통해 생기는 것으로 알려져 있다.

생물막에 의한 오염(Biofouling)은 수돗물, 음식 및 의료산업 등 모든 분야에 걸쳐 인간생활에 막대한 피해를 입히고 있다. 특히, 증기차의 에어컨 작동 시 발생하는 악취는 증발기(Evaporator)의 표면에 생물막을 형성하며 번식하는 다수의 미생물에 의해 생성된 휘발성 유기화합물(Microbial volatile organic compounds, MVOCs)이 주요 원인으로 인식되고 있다[7]. Park & Kim[8]은 차량용 공조시스템을 통해 유입되는 미생물을 동정하였고, 이 미생물들에 의해 생성된 MVOCs가 악취를 유발한다고 보고하였다. 또한, Park 등[9]은 세균이 증발기 표면에 생물막을 형성함을 확인하였고, 미생물에 의해 생성된 MVOCs가 차량 내로 유입되는 화학물질과 동일하다고 보고하였다. 한편, Simmons 등[10]은 증발기 표면에서 미생물에 의해 형성된 생물막을 확인하였고, 세균과 곰팡이에 의해 생성된 생물막은 증발기를 27개월 동안 건조보관한 후에도 다시 발현되었다고 보고하였다.

증발기 표면에 미생물이 번식할 수 있는 이유는, 에어컨 작동 시 증발기 표면에는 공기중의 수분이 응결되어 응축수가 발생되며, 공기 중의 먼지와 미생물이 증발기 표면에 부착하게 된다. 즉, 증발기 표면에 미생물이 증식하기에 적절한 환경이 만들어지며, 다양한 미생물들이 생물막을 형성하며 공생할 수 있게 된다.

이렇듯, 차량 내 에어컨 작동 시 악취의 발생을 예방하기 위해서는 증발기 표면에 생물막의 형성을 억제하거나 형성된 생물막을 효율적으로 제거해야만 한다. 현재는 항균제 처리 또는 Non-biofouling materials를 이용한 표면 개질 방법이 활용되고는 있지만 큰 효과를 기대하기 어려운 실정이다[11-13].

본 연구에서는 증발기의 재질과 같은 알루미늄 표면에 생물막의 형성 및 재생을 유발하는 환경인자를 파악하고, 상용화된 항균제의 생물막 제거효과 및 항균제 처리 후 차량 내 화학물질의 잔류량을 분석하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2-1. 실험 균주 및 시약

에어컨을 작동 시 악취가 심하게 느껴지는 차량 25대를 대상으로, 운전석방향 송풍구에서 에어샘플러(MAS-100, Merck, Germany)를 이용하여 20 L의 공기를 흡입하였다. 흡입된 공기를 성장배지(Envirocheck plates, Merck, Germany)의 표면에 충돌시킨 후 배양기(VS-1203P3L, Vision, Korea)로 옮겨 28 °C에서 48 시간 동안 배양하였다. 배양기에서 48 시간 동안 증식한 미생물 중에서 곰팡이류는 PDA 배지에, 세균류는 TSA배지를 이용하여 28 °C에서 5일간 배양하였다. 순수 분리된 미생물을 (주)마크로젠(Seoul, Korea)에 의뢰하여 16S rRNA 및 18s rRNA 유전자 염기서열분석방법을 통해 미생물을 동정하였다. 동정된 미생물 중 차량에서 2회 이상 검출된 세균인 *Bacillus megarterium*, *Arthrobacter oxydans*, *Micrococcus luteus*, *Methylobacterium aquaticum*을 실험 균주로 하였다.

실험에 사용되는 모든 배지 및 시액은 식품공전 제 9장 일반시험법 제3항 미생물시험법에 따라서 제조하였다[14].

2-2. 미생물의 성장과 영양성분

실험 균주들이 발견된 차량을 대상으로 에어컨을 작동 시 발생하는 응축수를 채취하여 증발기 표면에 존재하는 탄소원(Carbon source), 질소원(Nitrogen source), 이온성분(Ions) 및 미네랄성분(Minerals)을 분석하였다. 탄소원은 Total Organic Carbon analyzer(Multi N/C 3100, Analytikjena, Germany), 질소원 및 이온성분은 Ion Chromatography (ICS-1500 Acc-AS40, Dionex, USA) 및 UV/VIS spectrophotometer (Specord s300 vis, Analytikjena, Germany), 미네랄성분은 Inductively Coupled Plasma Spectrometer(Optima 5300DV, PerkinElmer, USA)를 이용하여 분석하였다.

2-3. 생물막의 형성을 유발하는 환경인자

환경인자(영양성분, 온-습도)가 생물막의 형성(Formation)에 미치는 영향을 분석하였다. 먼저, 영양성분에 대한 영향을 알아보기 위해 멸균된 증류수와 해당 차량의 응축수를 배지로 사용하였다. 멸균된 증류수와 응축수에 해당 차량에서 동정된 균주를 각각 접종한 후, 28 °C에서 5일간 진탕 배양하였다. 증발기의 재질이 알루미늄임을 고려하여 실험재료로 알루미늄 판을 구입하여 사용하였다. 알루미늄 판(0.3 mm, Daekwang Co., Korea)을 7 cm×4 cm 크기로 자른 후, 알루미늄 표면에 균주 배양액을 각각 접종하였다. 접종된 알루미늄을 28 °C에서 5일간 보관한 후, 생물막의 형성 여부를 SEM(Scanning electron microscopy, VEGA 3SB, Tescan, Czech)을 이용하여 2,000배의 배율로 관찰하였다.

또한, 온-습도가 생물막의 형성에 미치는 영향을 알아보기 위해, 2013년도 계절별 기온 및 상대습도를 산술평균하여 온-습도 실험조건을 설정하였으며, Table 1에 요약하여 나타내었다[15].

먼저, 응축수에 해당 차량에서 동정된 균주를 각각 접종한 후, 28 °C에서 5일간 진탕 배양하였다. 알루미늄 표면에 균주 배양액을 각각 접종한 후, 계절별 온-습도 조건에서 5일간 처리하였다. 5일 경과 후 생물막의 형성 여부를 SEM을 이용하여 2,000배의 배율로 관찰하였다.

2-4. 생물막의 재생을 유발하는 환경인자

알루미늄 표면에 형성된 생물막을 세제 처리(Detergent treatment) 및 수세(Rinse)를 통해 인위적으로 제거하였다. 생물막을 제거한 알루미늄을 멸균된 증류수 및 해당 차량의 응축수에 각각 침지하였다. 침지된 알루미늄을 꺼내어 40 °C에서 24 시간 동안 건조하였다. 이렇게 침지와 건조를 동일하게 3회 반복한 후, 처리된 알루미늄을 시험관에 넣고 시험관 입구를 솜가개로 막았다. 알루미늄이 든 시험관을 여름철 온-습도 조건(26 °C, 70% R.H.)에서 5일간 처리한 후, 생물막의 재생 여부를 SEM을 이용하여 2,000배의 배율로 관찰하였다.

2-5. 항균제의 항균 활성 및 생물막 제거 효과

항균제는 국산 액상 스프레이식 제품 2종(A (Evaporator cleaner, H사), B (Evaporator cleaner, M사))을 사용하였다. 이 항균제는 에어

Table 1. Seasonal temperatures and relative humidity (2013).

Season	Temperature (°C)	Relative Humidity (%)
Spring	11	54
Summer	26	70
Fall	15	60
Winter	-2	57

컨 증발기에 서식하고 있는 미생물과 퇴적되어 있는 오염물질을 제거를 위해 개발된 제품으로, 제조사의 물질안전보건자료(Material Safety Data Sheet)에 의하면 이들 항균제의 주성분은 물, 에탄올, 프로판, 부탄이라고 언급되어 있다.

항균제의 항균 활성(Antimicrobial activity)은 ASTM E 2315-03(2008)을 준용하여 측정하였다[16].

실험 균주를 한천 배지(Nutrient agar)에 접종하고 37 °C에서 24 시간 동안 배양하였다. 한천 배지에서 배양된 세균을 영양 배지(Nutrient broth)에 접종한 후, 37 °C에서 24 시간 동안 진탕 배양하였다. UV/VIS spectrophotometer를 이용하여 흡광도를 측정하여 생균수를 추정한 후, 영양 배지 및 완충용액(Butterfield's phosphate buffered dilution water)등을 이용하여 최종 생균수가 10⁶ cfu/mL 이상이 되도록 조제한 것을 접종액으로 하였다. 시험관에 항균제 및 대조용액(생리식염수) 각각 9.9 mL와 접종액 0.1 mL를 첨가하여 즉시 혼합하고 실온에서 5 분, 15 분, 30 분 동안 반응시켰다. 이 반응액 1 mL를 취하여 중화제 (Dey-Engley neutralizing broth) 9 mL가 들어있는 시험관에 넣고 5 분 동안 중화시켰다. 중화시키는 이유는 실험 균주가 일정한 시간 이후에는 더 이상 활성화되지 못하도록 하기 위해서이다. 중화반응액을 계단희석(10⁰, 10¹, 10², 10³, 10⁴ 배)한 후 1 mL씩 분취하여 페트리 디쉬(Petri dishes)에 각각 넣고, 45 °C로 유지한 표준한천배지(Plate count agar) 15 mL와 잘 섞고 응고시켰다. 응고시킨 페트리 디쉬는 거꾸로 하여 28 °C에서 24 시간 ~ 48 시간 동안 배양하였다. 배양 후 페트리 디쉬의 Colony를 세어 기록하였다. 항균제의 항균 활성은 식 1과 같이 균 감소율로 나타내었다.

$$\text{감소율(Percent reduction, \%)} = \frac{M_a - M_b}{M_a} \times 100 \quad (1)$$

여기서, M_a = 접종 균수(cfu/mL)

M_b = 특정시간 이후 균수(cfu/mL)

항균제를 이용한 생물막 제거 효과는 다음과 같이 확인하였다. 알루미늄 표면에 각 실험 균주를 개별 접종하여 인위적으로 생물막을 형성하였다. 생물막이 형성된 알루미늄을 각 항균제에 15분간 침지시켰다. 침지된 알루미늄 조각을 꺼내어 증류수로 표면에 묻어 있는 항균제를 린스한 후, 데시케이터(Desiccators) 안에서 건조시켰다. 알루미늄 표면에 형성된 생물막의 제거 여부를 SEM을 이용하여 2000배의 배율로 관찰하였다.

2-6. 항균제 처리 후 차량 내 화학물질의 잔류량 측정

항균제 2종을 사용설명서에 따라 차량에 처리한 후, 24시간마다 화학물질의 차량 내 잔류성 여부를 확인하였다. 실험을 진행하기 전에 차문을 모두 개방하여 차량 내 공기를 30분간 환기시켰다. 차량을 밀폐한 후 에어컨을 내기모드로 작동시키고 Tenax-TA 흡착튜브(Supelco, USA)와 소형펌프(MP-Σ100, Sibata, Japan)를 이용하여 100 mL/min으로 10 min 동안 차량 내 공기를 포집하였다. 차량 내 공기를 포집한 Tenax-TA 흡착튜브를 GC/MSD-Thermal Desorption system(Agilent 6890N/5973-PerkinElmer Turbomatrix ATD, USA)로 분석하여, 차량 내에서 잔류하고 있는 화학물질을 확인하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 미생물의 분리 및 동정 결과

에어컨 작동 시 악취가 심하게 느껴지는 차량 25대에서 총 108종의

Table 2. No. of microorganism colonies entering the automobiles through the HVAC

Automobile		No. of colonies (CFUs)	
Model	Mileage	Fungi	Bacteria
H-S(2002)	194600	3	1
K-K(2002)	185000	5	2
H-A(2002)	290000	4	2
H-S (2004)	121500	7	4
S-S(2004)	12500	2	0
K-S(2007)	145000	3	1
K-M(2007)	87200	2	1
K-S(2008)	50800	2	3
H-I(2008)	65200	4	1
K-F(2009)	72300	4	0
G-M(2009)	86300	3	2
H-S(2009)	75200	1	0
G-L(2010)	123000	2	0
H-T(2010)	63000	1	1
G-S(2011)	85200	3	0
K-S(2011)	32500	7	6
K-F(2011)	38500	4	1
K-F(2011)	91500	4	0
S-S(2011)	69300	3	1
S-R(2011)	48000	3	0
S-S(2012)	28200	4	1
G-M(2012)	38300	3	1
K-K(2013)	12000	2	0
K-C(2013)	25200	1	1
G-S(2014)	6000	2	0
Total		79	29

미생물(곰팡이 79종, 세균 29종)이 분리되었으며 Table 2에 요약하여 나타내었다. 차량의 연식이 오래될수록 주행거리가 비교적 길었다. 차량의 연식과 분리된 미생물의 집락 수(No. of colonies)사이의 상관관계를 분석한 결과, Pearson상관계수가 -0.29로 차량의 연식과 집락 수 사이에는 유의성 있는 상관관계는 없었다. 또한, 차량의 주행거리와 분리된 미생물의 집락 수(No. of colonies)사이의 상관관계를 분석한 결과, Pearson상관계수가 0.22로 차량의 주행거리와 집락 수 사이에도 유의성 있는 상관관계는 없었다. 따라서, 차량 내 에어컨을 통해 실내로 유입되는 미생물의 집락 수는 여러 원인(운전특성, 에어컨 청소여부, 필터 교체주기 등)들이 복합적으로 작용하는 것으로 추정된다.

순수 분리된 미생물을 (주)마크로젠에 의뢰하여 16S rRNA 및 18S rRNA 유전자 염기서열분석방법을 통해 동정한 결과를 Table 3에 나타내었다. 순수 분리된 108종의 미생물 중 곰팡이 43종과 세균 23종이 동정되었다. 43종의 곰팡이 중 *Penicillium* 속이 9회(20.9%)로 가장 많이 검출되었고, 다음으로 *Aspergillus* 속이 7회(16.3%), *Cladosporium* 속과 *Herbaspirillum* 속이 각각 5회씩(11.6%), *Alternaria* 속이 3회 (7.0%), *Fungal* 속과 *Simplicillium* 속이 각각 2회씩(4.7%), 그리고 나머지 *Oryza* 속, *Hypocreales* 속, *Corynespora* 속, *Torula* 속, *Lecanicillium* 속, *Leptosphaerulina* 속, *Cercospora* 속, *Xylariales* 속, *Irpex* 속, *Acremonium* 속이 각각 1회씩(2.3%) 검출되었다.

Table 3. Identified microorganisms and their detection frequencies in the automobiles

Fungi isolated	No. of automobiles	Bacteria isolated	No. of automobiles
<i>Acremonium implicatum</i>	1	<i>Arthrobacter oxydans</i>	2
<i>Alternaria alternate</i>	1	<i>Bacillus aryabhatai</i>	1
<i>Alternaria brassicae</i>	2	<i>Bacillus cereus</i>	1
<i>Aspergillus fumigates</i>	2	<i>Bacillus marisflavi</i>	1
<i>Aspergillus versicolor</i>	5	<i>Bacillus megaterium</i>	2
<i>Cercospora zebrina</i>	1	<i>Bacillus pumilus</i>	1
<i>Cladosporium sp.</i>	1	<i>Bacillus stratosphericus</i>	1
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	2	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i>	1
<i>Cladosporium silences</i>	1	<i>Methylobacterium aquaticum</i>	4
<i>Cladosporium tenuissimum</i>	1	<i>Micrococcus luteus</i>	3
<i>Corynespora sp.</i>	1	<i>Microbacterium testaceum</i>	1
<i>Fungal endophyte</i>	2	<i>Ornithinibacillus californiensis</i>	1
<i>Herbaspirillum sp.</i>	5	<i>Paenibacillus tundrae</i>	1
<i>Hypocreales sp.</i>	1	<i>Sporosarcina luteola</i>	1
<i>Irpex lacteus</i>	1	<i>Sporosarcina ureae</i>	1
<i>Lecanicillium sp.</i>	1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1
<i>Leptosphaerulina chartarum</i>	1		
<i>Oryza glumipatula</i>	1		
<i>Penicillium herquei</i>	1		
<i>Penicillium multicolor</i>	1		
<i>Penicillium qii</i>	4		
<i>Penicillium thomii</i>	1		
<i>Penicillium vanoranjei</i>	2		
<i>Simplicillium sp.</i>	2		
<i>Torula caligans</i>	1		
<i>Xylariales sp.</i>	1		
Total	43		23

특히, 검출된 *Aspergillus* spp.는 아스페르길루스증(Aspergillosis)을 유발시킬 수 있고, *Penicillium* spp.는 페니실리움증(Penicilliosis)을 일으킬 수 있는 기회감염균(Opportunistic pathogens)로 알려져 있다[17,18]. 기회감염균이란 건강한 사람에게는 문제를 일으키지 않으나 노약자나 면역력이 약해진 사람에게 질병을 유발시킬 수 있는 미생물을 일컫는다.

23종의 세균 중 *Bacillus* 속이 7회(30.4%)로 가장 많이 검출되었고, 다음으로 *Methylobacterium* 속이 4회(17.4%), *Micrococcus* 속이 3회(13.0%), *Arthrobacter* 속과 *Sporosarcina* 속 각각 2회씩(8.7%), 그리고 나머지 *Brevibacterium* 속, *Ornithinibacillus* 속, *Staphylococcus* 속, *Microbacterium* 속, *Paenibacillus* 속이 각각 1회씩(4.3%) 검출되었다. 검출된 세균의 대부분은 일상적인 환경에서 흔히 존재하고 병원성을 나타내지 않는 균들이나, 병원성 세균인 *Bacillus cereus* 와 기회감염균인 *Staphylococcus* sp.도 검출되었다.

동정된 미생물 중 차량에서 2회 이상 검출된 세균인 *B. megarterium*, *A. oxydans*, *M. luteus*, *M. aquaticum*을 실험 균주로 하였다.

Simmons 등[10]은 12대의 중고차 에어컨 증발기 중 10대의 증발기 표면에서 생물막이 발견되었으며, 그 중 4대의 증발기에서 *Penicillium viridicatum*과 *Methylobacterium mesophilicum*이 존재함을 확인하였다.

Rose 등[19]은 *P. viridicatum*과 *M. mesophilicum*이 중고차 공조 시스템에 공생하며 증발기와 단열재(Insulation foam)에 생물막을 형성하고, 이 미생물들에 의해 생성된 휘발성유기화합물(Microbial Volatile Organic Compounds, MVOCs)이 유해한 냄새를 유발한다고 보고하였다.

3-2. 미생물의 성장과 영양성분의 영향

차량 내 에어컨 작동 시 발생하는 응축수를 채취하여 성분 분석한 결과를 Table 4에 나타내었다. 응축수의 성분분석을 통해 증발기 표면에 존재하는 수분, 탄소원, 질소원, 이온성분 및 미네랄성분에 대한 정성적인 확인이 가능하다. 응축수의 pH는 6.4~7.1 범위로, 약산성에서부터 중성까지의 액성을 나타냈다. 대부분의 세균은 pH 6.5~7.5 범위에서 잘 성장한다고 알려져 있으며, 응축수는 미생물의 성장에 적합한 수분공급원임을 알 수 있다[20].

탄소원으로서 총유기탄소(TOC) 함량은 12.5~34.2 mg/L 범위로 측정되었다. 수중 TOC 함량이 8 mg/L 초과 시 수질이 매우 나쁘다고 평가되는 점을 고려한다면, 응축수 내 TOC 함량이 매우 높음을 알 수 있다[21]. 즉, 증발기 표면에는 미생물이 성장에 이용할 수 있는 탄소원이 상당히 많음을 알 수 있다.

질소원으로서 암모니아성질소(NH₃-N) 함량은 1.3~18.6 mg/L 범위로 측정되었다. 일반적으로 NH₃-N은 아미노산 구성을 위한 질소원으로 사용된다. 또한, 유기물이 부패, 분해하는 과정에서 생성되는 NH₃-N은 시간이 경과됨에 따라 아질산성질소(NO₂⁻)와 질산성질소(NO₃⁻)로 산화된다. 응축수의 NO₂⁻ 함량은 0.9~13.4 mg/L, NO₃⁻ 함량은 1.0~4.3 mg/L 범위로 측정되었다.

이온성분 중 황산이온(SO₄²⁻) 함량은 0.5~2.1 mg/L 범위로 측정되었다. 차량의 연료 성분 중 유황(S)은 연소되어 이산화황(SO₂)으로 배출되는데, 일부 SO₂는 응축수에 녹아 부식성 황산(H₂SO₄)로 전환되며, 증발기 등을 포함한 차체에 농축된다. 미생물은 산화형태인 SO₄²⁻을 환원시키거나, S가 포함된 유기물을 이용하여 성장한다.

Table 4. Content analysis of condensate water and sterilized distilled water

Unit: mg/L

Condensate	pH	Carbon source		Nitrogen source			Ions			Minerals				
		TOC	NH ₃ -N	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	F ⁻	Cl ⁻	SO ₄ ²⁻	Ca	Cu	Mg	P	Zn	Al
c1	7.0	25.2	10.3	6.3	2.5	ND	0.7	0.7	0.2	ND	ND	ND	ND	ND
c2	6.6	21.0	12.1	8.1	4.0	ND	0.8	1.6	0.5	ND	0.1	ND	0.1	ND
c3	6.5	12.5	1.3	0.9	1.0	27.8	0.6	0.5	0.4	ND	0.1	ND	ND	7.7
c4	6.4	32.2	6.2	4.8	2.5	1.1	0.8	2.1	0.3	ND	0.1	ND	ND	ND
c5	7.0	26.9	18.6	13.4	2.7	2.4	0.9	1.2	0.4	ND	0.1	0.1	0.2	ND
c6	6.8	19.3	5.3	3.5	2.1	1.1	1.0	1.0	0.7	ND	0.1	ND	ND	ND
c7	6.8	28.6	4.5	2.1	4.3	0.6	2.0	2.1	1.1	ND	0.2	ND	ND	ND
c8	7.1	34.2	14.7	12.3	3.3	ND	1.2	1.0	0.5	ND	0.2	ND	ND	ND
SDW	6.3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Detection limit = 0.1 mg/L

ND = Not Detected

SDW: Sterilized distilled water

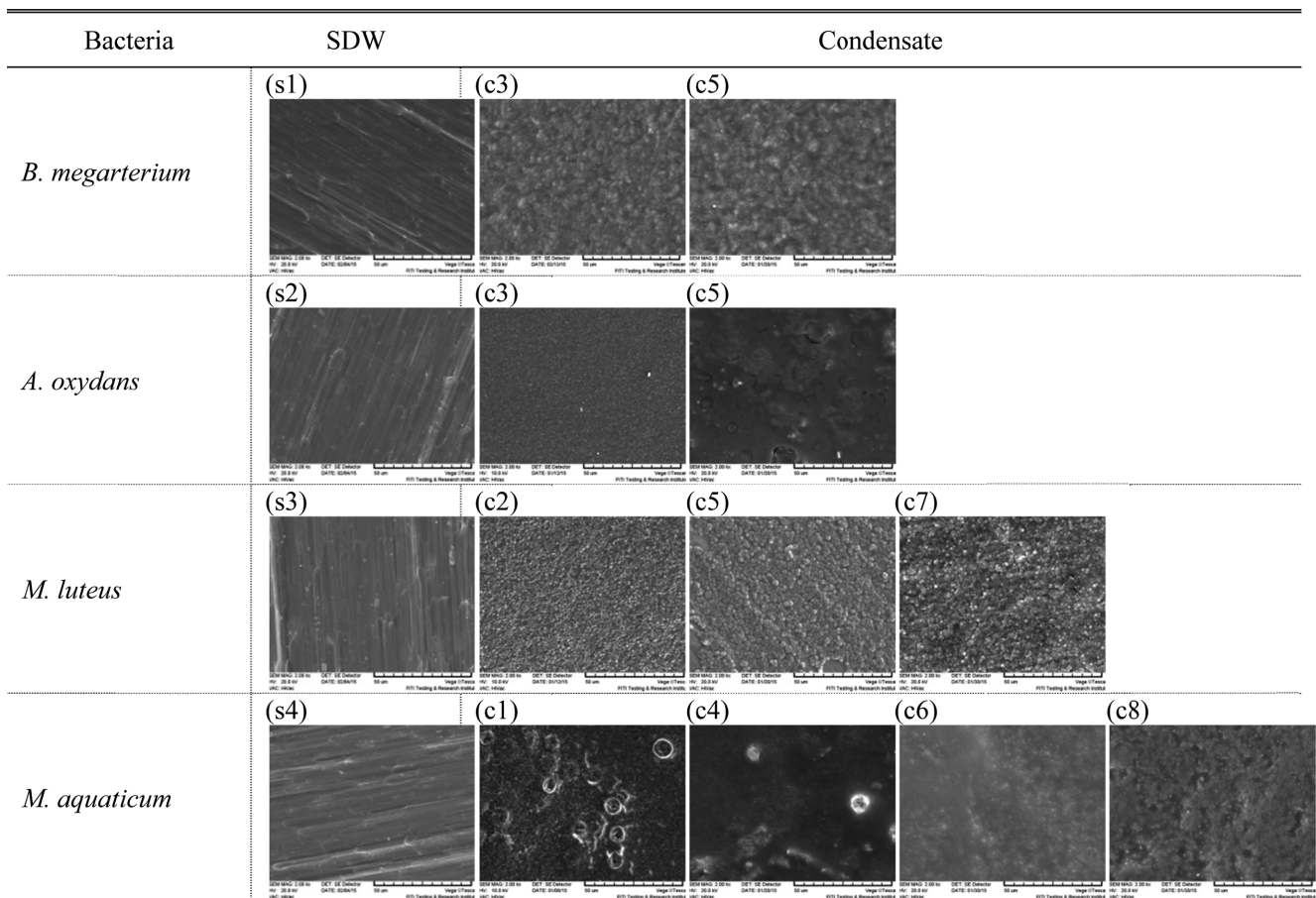


Fig. 1. Impact of nutritional contents on formation of biofilms. s1~s4: The SEM image of aluminum surface inoculated with sterilized distilled water as the medium. c1~c8: The SEM image of aluminum surface inoculated with condensate as the medium.

불소이온(F⁻) 함량은 0~27.8 mg/L 범위로 측정되었고, 염소이온(Cl⁻) 함량은 0.6~2.0 mg/L 범위로 측정되었다. F는 지표토양의 0.3 g/Kg을 차지하는 비교적 흔히 발견되는 원소이며, Cl은 토양 중에 염화물 형태로 존재하거나 세차 시 사용하는 세제에도 다량 포함되어 있어 증발기 표면에 잔류하는 것으로 추정된다.

미네랄성분인 칼슘(Ca)은 0.2~1.1 mg/L, 마그네슘(Mg)은 0~0.2 mg/L, 인(P)은 0~0.1 mg/L, 아연(Zn)은 0~0.2 mg/L, 알루미늄(Al)은 0~7.7 mg/L 범위로 측정되었다. Ca, Mg, P는 미생물의 성장에 필요한 대

량원소이며, Cu와 Zn은 미량원소이다. 이 실험결과를 통해, 증발기 표면에는 미생물이 성장하는데 필요한 영양성분이 충분히 존재하고 있음이 확인되었다.

3-3. 생물막의 형성을 유발하는 환경인자

환경인자(영양성분, 온·습도)가 생물막의 형성에 미치는 영향을 분석하였다. 먼저, 영양성분이 생물막의 형성에 미치는 영향에 대해 실험한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 멸균된 증류수를 사용한 균주

배양액을 알루미늄 표면에 접종한 후, 28 °C에서 5일간 처리한 한 결과, 모든 실험 군주가 생물막을 형성하지 못하였다(Fig. 1(s1)~(s4)). 이유는 멸균된 증류수는 Table 4의 분석결과에서 알 수 있듯이 영양 성분이 없어 실험 군주가 성장하지 못했고, 결과적으로 생물막도 형성되지 않은 것으로 보인다.

반면, 응축수를 사용한 군주 배양액을 접종한 경우, 모든 실험 군주가 생물막을 형성하였다(Fig. 1(c1)~(c8)). 이 결과를 통해 증발기 표면의 응축수 및 영양성분은 생물막의 형성에 영향을 미치는 중요한 환경인자임이 확인되었다.

온·습도가 생물막의 형성에 미치는 영향에 대해 실험한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 멸균된 증류수에는 실험 군주가 성장하지 못하는 것이 확인되었으므로 응축수를 군주 배양액으로 선택하였다. 응축수를 사용한 군주 배양액을 알루미늄 표면에 접종한 후, 각 온·습도 조건에서 5일간 처리한 결과, 봄철, 가을철 및 겨울철의 온·습도조건에서는 모든 실험 군주가 생물막을 형성하지 못하였다(Fig. 2(a), (c)~(e), (g)~(i), (k)~(m), (o)~(p)).

반면, 여름철의 온·습도조건으로 처리한 경우에는 모든 실험 군주가 생물막을 형성하였다(Fig. 2(b), (f), (j), (n)). 이 실험 결과를 통해, 실험 군주들은 생장에 적합한 온도가 20~40 °C인 중온성 세균임을 알 수 있었다. 또한, 생물막은 중온성 세균에 의해 여름철 온

습도 조건에서 형성되는 것으로 확인되었다. 물론, 온·습도도 생물막의 형성에 영향을 미치는 중요한 환경인자임이 확인되었다.

3-4. 생물막의 재생을 유발하는 환경인자

생물막을 인위적으로 제거한 알루미늄을 여름철 온·습도 조건(26 °C, 70% R.H.)에서 5일 동안 처리한 후, 생물막의 재생여부를 관찰한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 멸균된 증류수에 침지한 알루미늄에서는 5일이 경과한 후에도 세균이 증식하거나 생물막이 형성되지 않았다(Fig. 3(a), (c), (e), (g)).

반면, 응축수에 침지한 알루미늄에서는 3일이 경과하자 실험 군주들이 활발히 증식하며 여러 부위로 전이되었고, 미세미생물군락의 수도 증가하였다. 또한, 5일이 경과하자, 3차원구조의 성숙된 생물막도 여러 부위에서 관찰되었다(Fig. 3(b), (d), (f), (h)).

이 실험결과를 통해, 생물막을 인위적으로 제거하더라도 환경인자(영양성분 및 온·습도)가 적합하면 생물막이 재생될 수 있음이 확인되었다.

3-5. 항균제의 항균 활성 및 생물막 제거 효과

실험 군주에 대한 항균제의 항균 활성을 분석한 결과를 Table 5에 나타내었다. 실험 군주와 항균제를 5분간 접촉시킨 경우, 항균제 A

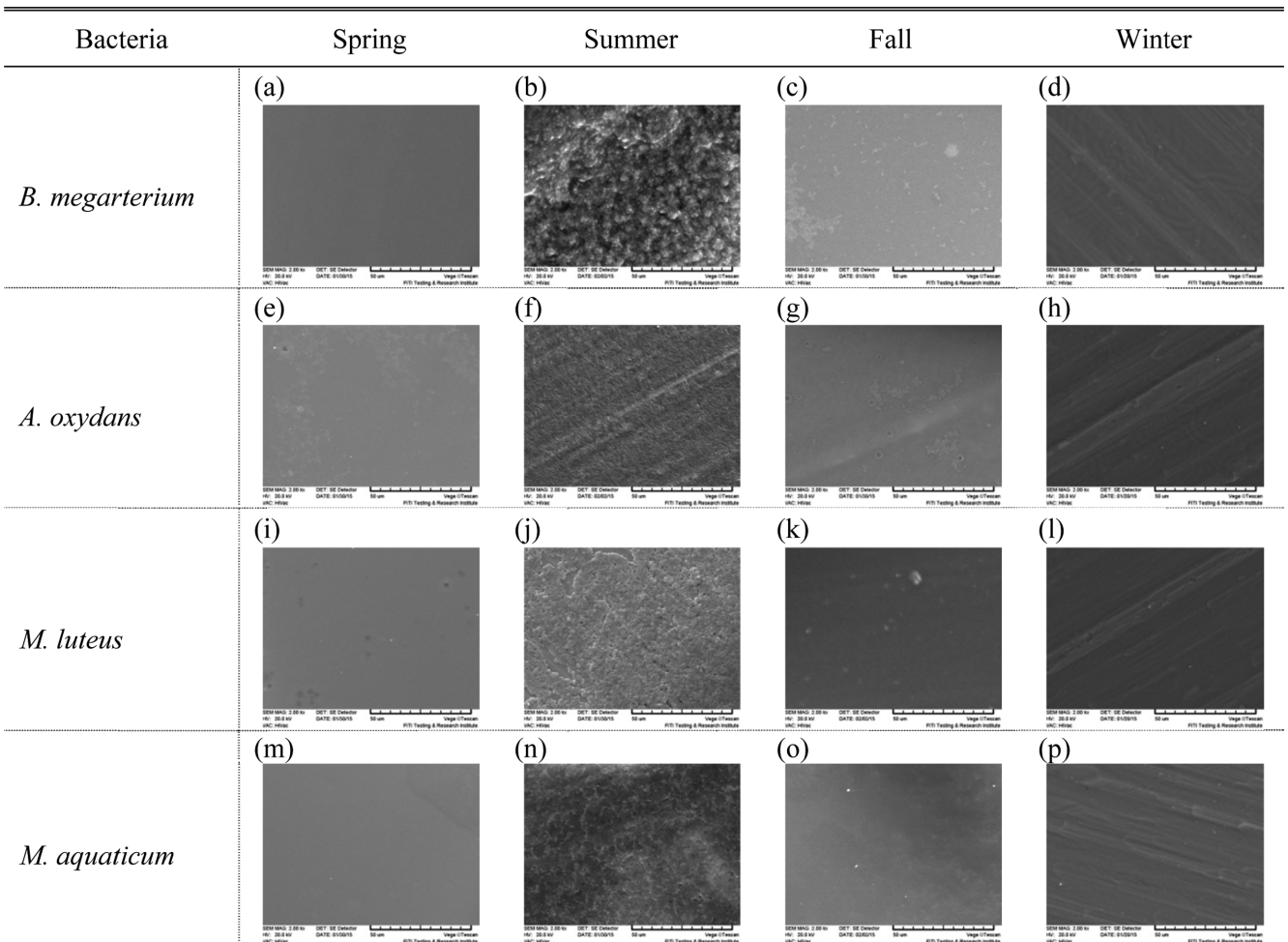


Fig. 2. Impact of temperature/humidity on formation of biofilms. (a), (e), (i), (m): The SEM image of aluminum surface incubated in spring conditions. (b), (f), (j), (n): The SEM image of aluminum surface incubated in summer conditions. (c), (g), (k), (o): The SEM image of aluminum surface incubated in fall conditions. (d), (h), (l), (p): The SEM image of aluminum surface incubated in winter conditions.

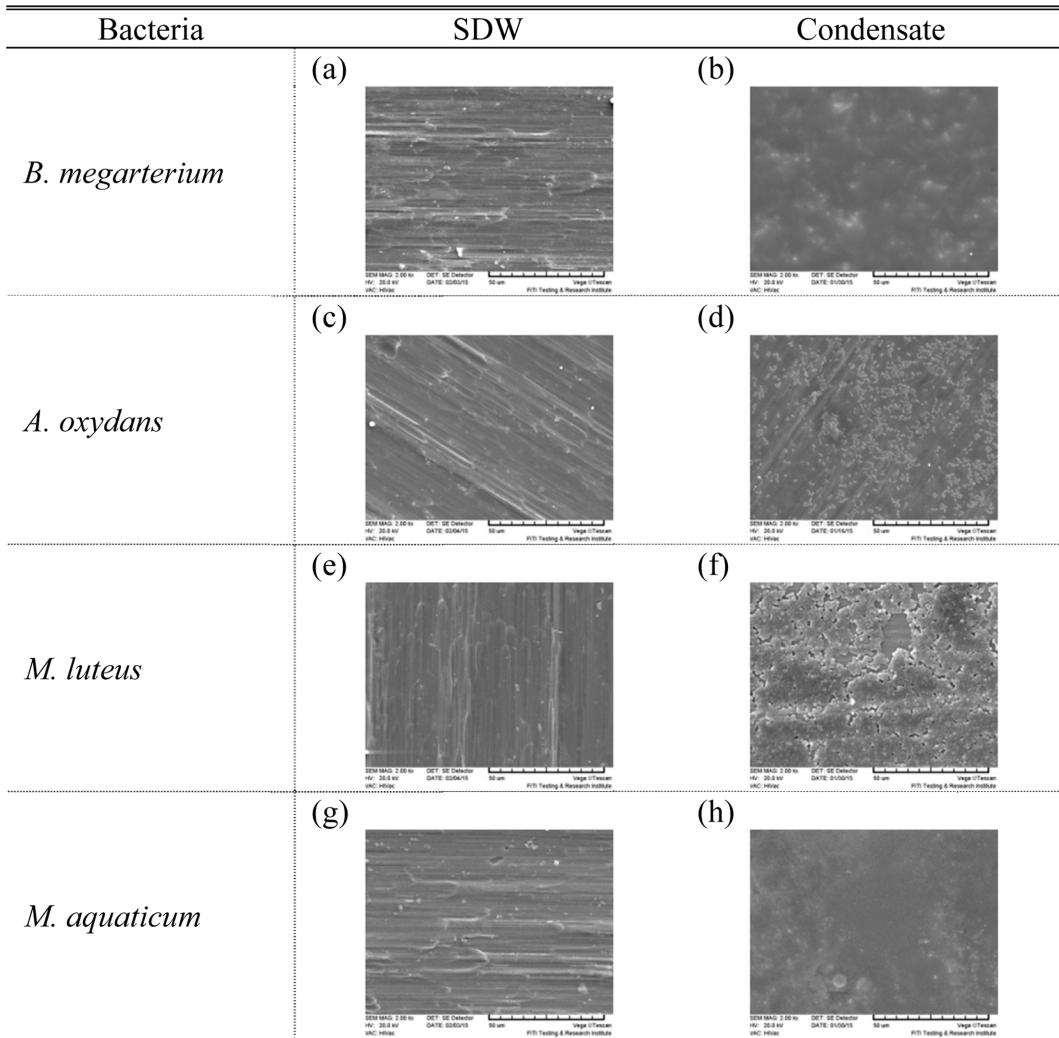


Fig. 3. Environmental factors causing regeneration of biofilms. (a), (c), (e), (g): The SEM image of the aluminum surface immersed in sterilized distilled water and incubated with summer conditions. (b), (d), (f), (h): The SEM image of the aluminum surface immersed in condensate and incubated with summer conditions SDW: Sterilized distilled water.

Table 5. Measurement of antibacterial activities of antimicrobials to tested bacteria culture

Unit: cfu/mL

Bacteria	Antimicrobials	Contact time (min)					
		5		15		30	
		Colony	Reduction	Colony	Reduction	Colony	Reduction
<i>B. megarterium</i>	A	<10	99.9%	<10	99.9%	<10	99.9%
	B	1.3×10^2	99.9%	1.3×10^2	99.9%	<10	99.9%
<i>A. oxydans</i>	A	<10	99.9%	<10	99.9%	<10	99.9%
	B	<10	99.9%	<10	99.9%	<10	99.9%
<i>M. luteus</i>	A	1.0×10^2	99.9%	<10	99.9%	<10	99.9%
	B	2.1×10^2	99.9%	1.3×10^2	99.9%	<10	99.9%
<i>M. aquaticum</i>	A	1.0×10^3	99.8%	<10	99.9%	<10	99.9%
	B	<10	99.9%	<10	99.9%	<10	99.9%

및 B에 의한 균 감소율은 99.8~99.9%로 분석되었다. 또한, 15분 이상 접촉시킨 경우, 항균제 A 및 B에 의한 균 감소율은 모두 99.9%로 분석되었다.

이 실험결과를 통해, 실험에 사용된 항균제는 모두 우수한 항균 활성을 갖고 있음이 확인되었다. 실험에 사용된 항균제의 구성 성분 중 에탄올이 차지하는 비중은 5~60%로, 항균 활성은 주로 에탄올

에 의한 것으로 생각된다. 에탄올은 삼투능력이 매우 커서 미생물의 외벽을 뚫고 들어가 단백질을 응고시키고 지방의 구조를 파괴하여 미생물을 불활성화시킨다고 알려져 있다[22].

항균제를 이용한 생물막의 제거 효과를 Fig. 4에 나타내었다. *B. megarterium*, *A. oxydans*, 및 *M. aquaticum*에 의해 형성된 생물막의 일부가 항균제 A 및 B에 의해 제거된 것이 관찰되었다(Fig. 4(a),

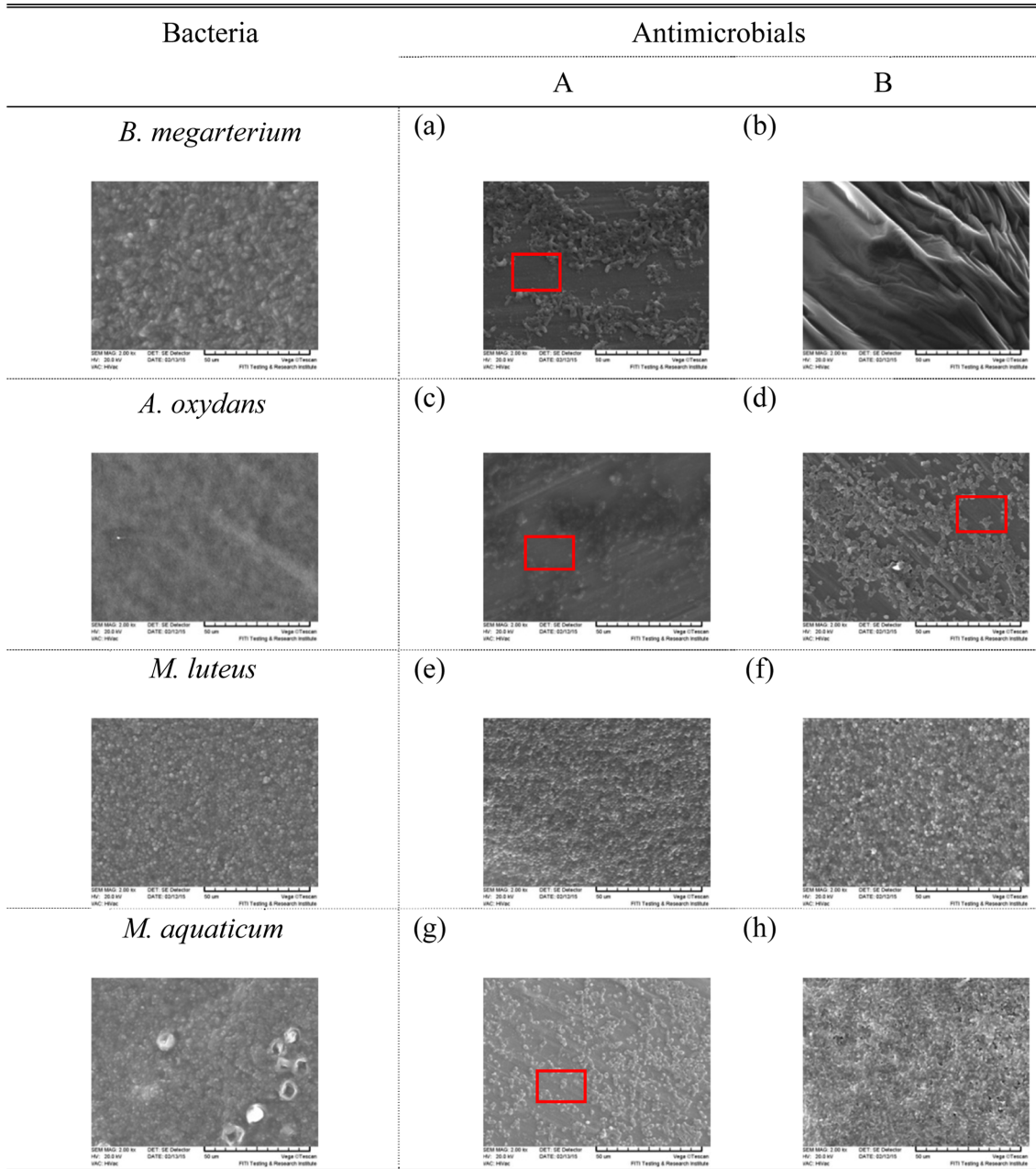


Fig. 4. Effectiveness of antimicrobials on removing biofilms. (a), (c), (e), (g): The SEM image of the aluminum surface immersed in antimicrobial A for 15 min. (b), (d), (f), (h): The SEM image of the aluminum surface immersed in antimicrobial B for 15 min.

(c), (d), (g)). 항균 성분에 의해 알루미늄 표면에 존재하는 부유성 세균이 사멸되었고, 계면활성제 성분에 의해 알루미늄과 생물막간의 계면장력이 약화되어 생물막의 일부가 제거된 것으로 보인다. 하지만, 생물막의 일부가 제거된 알루미늄을 배양기에 넣어 28 °C에서 5일간 방치하자 세균이 또 다시 증식하고 생물막이 형성되는 것이 확인되었다. 즉, 사멸되지 않은 생물막 내 세균에 의해 생물막이 쉽게 재생될 수 있음을 알 수 있었다.

한편, 항균제와 생물막간의 반응으로 인해 생물막의 일부가 부풀어 오르고, 생물막의 표면이 뭉그러지는 형상이 관찰됐지만, 궁극적으로 생물막은 제거되지 않았다(Fig. 4(b), (e), (f), (h)).

생물막은 Polysaccharides, Proteins, Glycoproteins, Glycolipids, Extracellular DNA 등으로 구성되어 있는데, 이러한 다양한 EPS 중

일부가 에탄올에 의해 용해되어 세균의 일부 사멸되고 생물막의 형태를 변화시킨 것으로 보여진다[23,24].

결과적으로, 실험에 사용된 항균제는 생물막을 용해시키거나 생물막 안으로 침투하여 생물막을 효과적으로 파괴시키는 역할을 못하는 것으로 확인되었다.

형성된 생물막을 물리·화학적처리방법으로 제거하기란 매우 어렵기 때문에 생물막의 형성을 억제하는 방향으로 연구가 진행되어 오고 있다.

생물막의 형성을 억제하기 위해 활용되어 온 방법에는 크게 두 가지가 있다[11-13]. 첫 번째는 항균제(양이온성 고분자, 은 이온 등을 사용하는 것이다. 하지만, 시간이 지나면 자체 분해가 일어나기도 하고, 항균제에 대한 내성을 가지는 세균들도 생겨 큰 효과를 기대

하기는 어려운 실정이다. 이러한 단점을 개선하고 항균 성분의 지속적인 방출효과를 얻기 위해 마이크로캡슐화(Microcapsulation)에 대한 연구가 진행되어오고 있다[25,26].

두 번째는 세균이 표면에 부착하지 못하도록 Non-biofouling materials(Polyethyleneglycol, Polyoxazoline, Polyvinylpyrrolidone 등)로 표면을 개질 하는 것이다. 표면 개질의 목적은 세균의 표면 흡착을 억제하는 동시에 항균력을 가지는 기능성 표면을 개발하는 것이다. Yuan 등[27]은 스테인리스 스틸 표면에 고분자 중합 개시제를 처리한 후, PEG를 중합하고 결사슬에 Lysozyme을 결합시켜 E. Coli 및 S. aureus의 표면 흡착을 억제하고 동시에 사멸하는 효과가 있음을 보고하였다. 또한 Liu 등[28]은 실리콘 고무기판에 Polydopamine으로 코팅한 후 아민화된 폴리카보네이트(Aminated polycarbonate, APC)와 PEG를 Michael 첨가반응으로 도입하여 PEG-APC hydrogel을 형성하였다. PEG는 세균의 표면 흡착을 억제하고 APC는 세균을 사멸하는 이중기능을 갖게 되어 E. Coli, S. aureus 및 C. albicans에 대해 효과적 이었다고 보고하였다.

3-6. 항균제 처리 후 차량 내 화학물질의 잔류량 분석

항균제를 사용설명서에 따라 차량에 처리한 후, 차량 내 화학물질의 잔류량을 측정 한 결과를 Table 6에 나타내었다. 항균제 A 및 B를 처리한 차량에서는 이들 항균제의 주성분인 에탄올이 검출되었다. 프로판과 부탄은 차량에 처리됨과 동시에 기화되어 검출되지 않았고, 성분을 공개하지 않았거나 상온에서 휘발성이 없는 화학물질은 검출되지 않았다.

항균제 A를 처리한 차량 내에서 에탄올의 검출량은 24 시간 경과 후 1,940 ppmv, 72시간 경과 후 305 ppmv, 168 시간 경과 후 177 ppmv로 측정되었다.

항균제 B를 처리한 차량 내에서 에탄올의 검출량은 24 시간 경과 후 299 ppmv, 72시간 경과 후부터는 검출한계치 이하로 측정되었다.

이 시험결과를 통해, 항균제를 처리한 후 일정한 시간이 경과했음에도 불구하고 화학물질이 차량 내로 유입되는 것이 확인되었다. 항균제에는 항균성분뿐만 아니라 코팅제 등이 혼합되어 있어, 화학물질이 응축수에 의해 급격하게 용해되어 것을 막아줘 잔류하고 있는 화학물질이 차량 내로 지속적으로 유입되는 것으로 보인다.

이 화학물질들이 차량 내로 지속적으로 유입될 경우, 인체에 대한 안전성도 반드시 고려해 보아야 한다. 한국산업안전보건공단의 물질안전보건자료(Material Safety Data Sheet)에 의하면 에탄올의 급성독성은 증기 흡입 시 LC₅₀ 20,000 ppmv 4 h Rat 입을 알 수 있다[29]. 비록, 차량 내 에탄올의 잔류량이 흡입 시 급성독성치 보다는 작았지만, 항균제 원액 내에는 항균성분을 포함하여 여러 종의 화학물질들이 퍼센트(%) 단위로 함유되어 있으므로, 항균제를 과도하게 사용할 경우 승차자의 건강에 유해할 수도 있다.

더욱이, 제조사에서는 영업비밀 등을 이유로 일부 화학물질에 대

해서 성분 및 함량을 명확히 표기하지 않고 있으며, 사용된 화학물질들의 인체에 대한 유해성 자료도 대부분 없는 실정이었다.

따라서, 항균력도 물론 중요하지만 인체에 안전하고 친환경적인 항균성분의 사용을 적극 검토해 보아야 할 것이다.

4. 결 론

본 연구에서는 증발기의 재질과 같은 알루미늄 표면에 생물막의 형성 및 재생을 유발하는 환경인자를 파악하고, 상용화된 항균제의 생물막 제거효과 및 항균제 처리 후 차량 내 화학물질의 잔류량 분석을 통하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

차량의 연식 및 주행거리와 분리된 미생물의 집락 수(No. of colonies)사이의 Pearson상관계수는 각각 -0.29 및 0.22로 분석되었고, 모두 유의성 있는 상관관계는 없었다.

차량 내 에어컨 작동 시 발생하는 응축수를 분석한 결과 pH 6.4~7.1, 탄소원 12.5~34.2 mg/L, 질소원 0.9~18.6 mg/L, 이온성분 0.5~27.8 mg/L, 미네랄성분 0.1~7.7 mg/L로 분석되었다.

생물막은 중온성 세균에 의해 여름철 온·습도 조건(26 °C, 70% R.H.)에서 형성되었고, 생물막을 인위적으로 제거하더라도 환경인자(영양성분 및 온·습도)가 적합하면 생물막이 재생되는 것으로 확인되었다.

항균제의 항균 활성은 부유성 세균에 대해 15분 이내에 99.9%의 균 감소율을 보였지만, 항균제의 생물막 제거효과는 없었다.

항균제를 처리한 차량 내에서는 에탄올 성분이 최대 1,940 ppmv 이 검출되었고, 에탄올의 흡입 시 급성독성치 보다는 작았지만, 사용된 화학물질들의 인체 안전성에 대한 검토가 필요하다.

References

- Fergie, N., Bayston, R., Pearson, J. P. and Birchall, J. P., "Is Otitis Media with Effusion a Biofilm Infection?" *Clin Otolaryngol.* **29**, 38-46(2004).
- Potera, C., "Forging a Link Between Biofilms and Disease," *Science* **283**, 1837-1839(1999).
- Costerton, J. W., Stewart, P. S. and Greenberg, E. P., "Bacterial Biofilm: a Common Cause of Persistent Infection," *Science* **284**, 1318-1322(1999).
- Chung, S. K., "Biofilm," *J. Rhinol.* **12**, 5-9(2005).
- Gilbert, P., Das, J. and Foley, I., "Biofilms Susceptibility to Antimicrobials," *Adv. Dent. Res.*, **11**, 160-167(1997).
- Ochman, H., Lawrence, J. G. and Groisman, E. A., "Lateral Gene Transfer and the Nature of Bacterial Innovation," *Nature* **405**, 299-304(2000).
- Uchiyama, K., Kasebe, O., Kobayashi, K., Sato, S. and Ito, H., "Analysis for Adsorbed Odor from Car Air Conditioner Evaporator," *JSAE Annual Congress* **37**, 1-4(2003).
- Park, S. J. and Kim, E. Y., "Determination of Malodor-causing Chemicals Produced by Microorganisms Inside Automobile," *KSBB J.*, **29**, 118-123(2014).
- Park, S. J., Oh, Y. H., Jo, B. Y., Lee, J. S. and Kim, E. Y., "Investigation on the Cause of Malodor Through the Reproduction of Chemicals," *KSBB J.*, **29**, 392-398(2014).
- Simmons, R. B., Noble, J. A., Rose, L., Price, D. L., Crow, S. A. and Ahearn, D. G., "Fungal Colonization of Automobile Air Condi-

Table 6. Measurement of residual chemical substances in the automobiles Unit: ppmv

Chemicals	Antimicrobials					
	A			B		
	24 h	72 h	168 h	24 h	72 h	168 h
Ethanol	1,940	305	177	299	ND	ND

Detection limit = 1 ppmv

ND = Not Detected

- tioning Systems," *J. Indust. Microbiol. Biotechnol.*, **19**, 150-153 (1997).
11. Zhang, L., Pornpattananangkul, D., Hu, C. M. J. and Huang, C. M., "Development of Nanoparticles for Antimicrobial Drug Delivery," *Curr. Med. Chem.*, **17**, 585-594(2010).
 12. Privett, B. J., Deupree, S. M., Backlund, C. J., Rao, K. S., Johnson, C. B., Coneski, P. N. and Schoenfisch, M. H., "Synergy of Nitric Oxide and Silver Sulfadiazine Against Gram-negative, Gram-positive, and Antibiotic-resistant Pathogens," *Mol. Pharm.*, **7**, 2289-2296(2010).
 13. Kim, D. H., Lim, E. S. and Cho, W. K., "Design of Dual Functional Surfaces: Non-Biofouling and Antimicrobial Activities," *Polym. Sci. Technol.*, **25**, 315-321(2014).
 14. Ministry of food and drug safety, Korea food additives codex. <http://www.mfds.go.kr>(2014).
 15. Korea meteorological administration, Climate data. <http://www.kma.go.kr>(2013).
 16. ASTM international, standard guide for assessment of antimicrobial activity using a time-kill procedure. <http://www.astm.org>(2008).
 17. Kim, Y. Y., "Pulmonary Aspergillosis," *Korean J. Med. Mycol.*, **6**, 247-253(2001).
 18. Chung, Y. H., Hong, J. B. and Chang, Y. H., "A Study on the Microbial Air Pollution of Urban Living and Indoor Environment," *Kor. J. Env. Hlth. Soc.*, **27**, 1-9(2001).
 19. Rose, L. J., Simmons, R. B., Crow, S. A. and Ahearn, D. G., "Volatile Organic Compounds Associated with Microbial Growth in Automobile Air Conditioning Systems," *Curr. Microbiol.*, **41**, 206-209(2000).
 20. Ko, J. S., Ko, Y. H., Kim, J. H., Oh, N. S., In, M. J. and Chae, H. J., *Biotechnology and Biochemical Engineering*, pp. 70-74, Yu Han Publishing Co., Seoul, Korea(2009).
 21. Ministry of environment, Enforcement decree of the framework act on environmental policy. <http://www.me.go.kr>(2009).
 22. Block, S. S., *Disinfection, Sterilization, and Preservation*, 4th ed., pp. 229-254. Lippincott Williams & Wilkins Press, Philadelphia, USA(1991).
 23. Jung, D. H., *Control of food-borne microorganism*, pp. 296-304. Daekwang Book, Seoul, Korea(2001).
 24. Presterl, E., Suchomel, M., Eder, M., Reichmann, S., Lassnigg, A., Graninger, W. and Rotter, M., "Effects of Alcohols, Povidone-iodine and Hydrogen Peroxide on Biofilms of *Staphylococcus epidermidis*," *J. Antimicrob. Chemoth.*, **60**, 417-420(2007).
 25. Park, S. J. and Seok, S. J., "Release Behavior of Poly(ϵ -caprolactone)/poly(ethyleneimine) Microcapsules Containing Fragrant Oil," *Korean Chem. Eng. Res.*, **43**, 482-486(2005).
 26. Park, S. J. and Lee, Y. M., "Preparation and Release Behaviors of Chitosan Microcapsules Containing Fragrant Oil," *Korean Chem. Eng. Res.*, **43**, 511-516(2005).
 27. Yuan, S., Wan, D., Liang, B., Pehkonen, S. O., Ting, Y. P., Neoh, K. G. and Kang, E. T., "Lysozyme-coupled Poly(poly(ethylene glycol) methacrylate)-stainless Steel Hybrids and Their Antifouling and Antibacterial Surfaces," *Langmuir*, **27**, 2761-2774(2011).
 28. Liu, S. Q., Yang, C., Huang, Y., Ding, X., Li, Y., Fan, W. M., Hedrick, J. L. and Yang, Y. Y., "Antimicrobial and Antifouling Hydrogels Formed in situ from Polycarbonate and Poly(ethylene glycol) via Michael Addition," *Adv. Mater.*, **24**, 6484-6489(2012).
 29. Korea occupational safety & health agency, Material Safety Data Sheet. <http://www.kosha.go.kr>(2014).