

## 폴리에틸렌 담체에 부착된 혐기성 생물막 부착 특성

이 승 란·김 도 한·나 영 수·이 창 한·박 영 식·윤 태 경\*\*·송 승 구  
부산대학교 화학공학과·대구대학교 보건환경과·\*\*동의대학교 화학공학과  
(2002년 2월 18일 접수; 2002년 3월 22일 채택)

### Characteristics of attach of biomass on PE substratum under anaerobic condition

Seung-Lan Lee, Do-Han Kim, Young-Soo Na, Chang-Han Lee, Young-Sik Park\*,  
Tae-Kyung Yoon\*\* and Seung-Koo Song

Dept. of Chemical Engineering, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

\*Dept. of Health Environment, Daegu University, Daegu 705-714, Korea

\*\*Dept. of Chemical Engineering, Dong-eui University, Busan 614-714, Korea

(Manuscript received 18 February, 2002; accepted 22 March, 2002)

Optical microscope, SEM (Scanning Electron Microscopy) and fluorescent microscope were used for qualitative and morphological studies of the attached biomass on PE (polyethylene) substratum under anaerobic condition. It was shown by the observation of optical microscope that the initial attachment of biomass began in crevices of the surface of PE. The shape and structure of the attached biofilm could be observed by SEM photographs, but species of bacteria were and methanogens were not classified. A large number of methanogenic bacteria were identified on the surface of PE substratum by fluorescence under 480nm of radiation. It was estimated that methanogenic bacteria was also related to initial attachment of biomass under anaerobic condition.

Key words : attached biofilm, anaerobic condition, methanogens

#### 1. 서 론

미생물이 고체나 담체 표면에 생물막을 형성하는 것은 자연에서 일반적으로 관찰할 수 있는 현상으로, 생물막은 입자 표면에 부착되어 있는 미생물과 여러 가지 생성물로 구성되어 있다. 생물막은 유기 고분자 겔 속에 갇혀 있는 살아있는 미생물과 유기 고분자 겔로서 여겨진다. 생물막 자체는 흡착력이 매우 강하고 물이 95% 이상인 다공성 구조이며 매트릭스 내에서 무기물질을 포획하기도 한다. 생물막은 젖어있는 모든 표면에서 성장한다.

혐기성 미생물은 그 증식속도가 매우 느리고 생물활동의 폭이 느리기 때문에 안정된 생물막의 형성에 수일에서 수개월이 소요되기도 한다. 미생물이 부착되는 담체의 복잡한 구조와 미생물의 상호작용

이 영커있기 때문에 담체에 미생물이 부착되고 생물막이 축적되는 생물고정화 (bioimmobilization) 현상은 잘 알려지지 않고 있다. 따라서 생물막의 올바른 이해를 위해서는 담체 표면에서 미생물이 부착되고 축적되는 현상을 고찰할 필요가 있다. 본 연구는 담체의 연속적으로 부착되고 탈착되는 과정을 현미경으로 관찰하여 혐기성 미생물의 부착과 생물막 형성과정을 고찰하였다.

#### 2. 재료 및 방법

##### 2.1. 실험장치

부산광역시 수영 하수 처리장의 혐기성 소화조에서 농축조로 유입되는 혐기성 슬러지 (MLSS 약 33,000 mg/L)를 채취하여 250 $\mu$ m 체로 걸러낸 슬러지에 탈기한 증류수를 부피비 1:1로 혼합·회석하여 반응기에 주입한 후, 반응기를 밀폐하고 펌프를 이용하여 5 L/min의 유량속도로 용액을 순환시켰다. 그리고 80번 사포로 거칠기를 준 1.8cm×1.8cm

Corresponding Author : Seung-koo Song, Dept. of Chemical Engineering, Pusan National University, Busan 609-735, Korea  
Phone : +82-51-510-2398  
E-mail : sksong@pusan.ac.kr

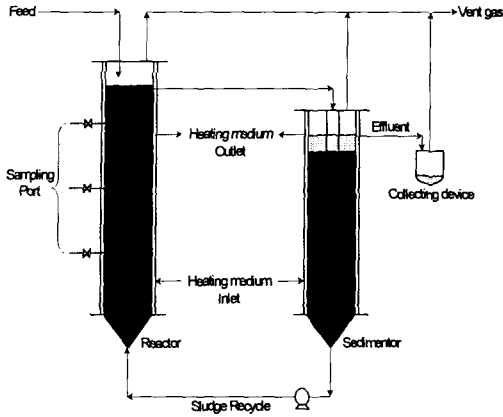


Fig. 1. Schematic diagram of the anaerobic reactor for this experiment.

크기의 폴리에틸렌 판을 아크릴 지지대에 부착시켜 혐기성 반응기에 장착하여 미생물 부착실험을 위한 담체로 사용하였다. 반응기는 직경 8cm, 높이 40cm이고 2.1 l의 유효부피를 가지며, 침전조는 직경 12cm, 높이 30cm이고 3.1 l의 유효부피를 가진다 (Fig. 1). 반응기와 침전조에 항온 jacket을 설치하여 반응기 내 혐기성 슬러지의 온도를 35°C로 유지하였다.

## 2.2. 담체 표면적당 생물막 부착량 측정

지지대에 부착시킨 담체를 혐기성 연속 반응기에 장착하고, 일정 시간이 경과한 후 담체를 떼어낸 후, 10ml 증류수에 담겨 부착된 미생물을 35°C에서 90분간 초음파를 이용하여 탈착시킨 후 진공여과시켜 Standard Methods<sup>1)</sup>에 따라 MLSS와 MLVSS 측정 시와 같은 방법으로 생물막 부착량을 구하고 담체 표면적으로 나누어 담체 표면적당 미생물 부착량을 계산하였다.

## 2.3. 담체에 부착된 미생물의 관찰

### 2.3.1. 광학 현미경을 이용한 관찰

연속식 혐기성 반응기에서 담체 표면에 혐기성 미생물이 부착되는 진행 과정 및 형태를 관찰하기 위해 반응기에서 제거한 담체를 증류수로 2번 세척한 뒤 광학 현미경 (Nikon Labophot-2)을 이용하여 배율 40배로 관찰하고 화상은 디지털 카메라 (Olympus C-2000 Z)로 촬영하여 화상분석기 (ImageScope 2.3 경일 테크놀로지)에서 처리하였다.

### 2.3.2. SEM (Scanning Electronic Microscopy) 관찰

담체를 증류수에 2회 세척한 뒤 25% glutaraldehyde에서 2시간 동안 탈수하고 60°C에서 2시간 동안 건조한 후 1,000 및 30,000배로 SEM 촬영을 실

시하였다.

### 2.3.3. 형광현미경을 이용한 관찰

SEM 사진에 대한 육안 관찰로는 부착된 미생물에 대한 명확한 규명이 어려우므로 부착된 각각의 미생물 중에 대한 규명은 힘들더라도 메탄 생성균의 부착 여부를 확인하기 위해 형광 현미경 관찰을 통해 실시하였다. Cheeseman 등<sup>2)</sup>의 연구에서 보고된 바와 같이 메탄 생성균들이 파장 420nm인 laser를 쬐이게 되면 auto-fluorescence를 나타내는 성질을 이용하였다. 이러한 현상은 메탄 생성균만이 독특하게 가지는 cofactor F<sub>420</sub>에 의한 것이다. 본 실험에서는 박성열 등<sup>3)</sup>이 보고한 바와 같이 담체에 부착된 혐기성 미생물을 탈착시켜 슬라이드 글라스 위에 떨어뜨린 후 형광 현미경에서 green filter를 이용하여 파장 480nm인 argon laser를 조사하여 담체에 부착된 미생물 중 메탄 생성균과 부유 슬러지 중의 메탄 생성균을 관찰하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 담체 표면적당 생물막 부착량 측정

LaMotta<sup>4)</sup>의 연구 보고에 따르면 생물막의 두께는 시간에 따라 증가하는 경향을 보이다가 그 두께가 충분히 두꺼워지면 더 이상 증가하지 않는다고 하였다. 또 미생물 부착량은 생물막 두께와 비례하므로 시간에 따라 그 양이 증가하다가 더 이상 증가하지 않고 일정량을 유지할 것으로 예측되었다. 시간에 따른 담체 표면적당 생물막 부착량 변화를 나타낸 Fig. 2에서, 시간에 따라 부착량이 증가하다가 부착 28일 이후에 그 양이 일정해지는 경향을 나타낼 수 있었다.

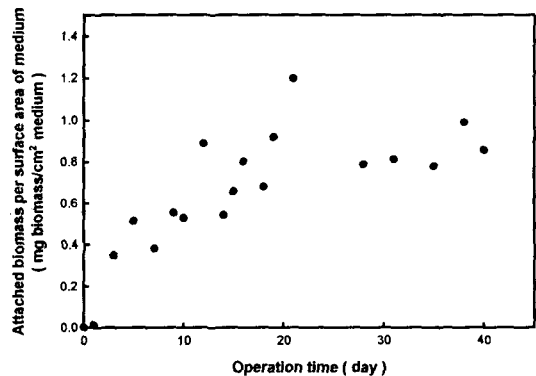


Fig. 2. Weight of the attached biomass per surface area of the medium under continuous operation of the anaerobic reactor.

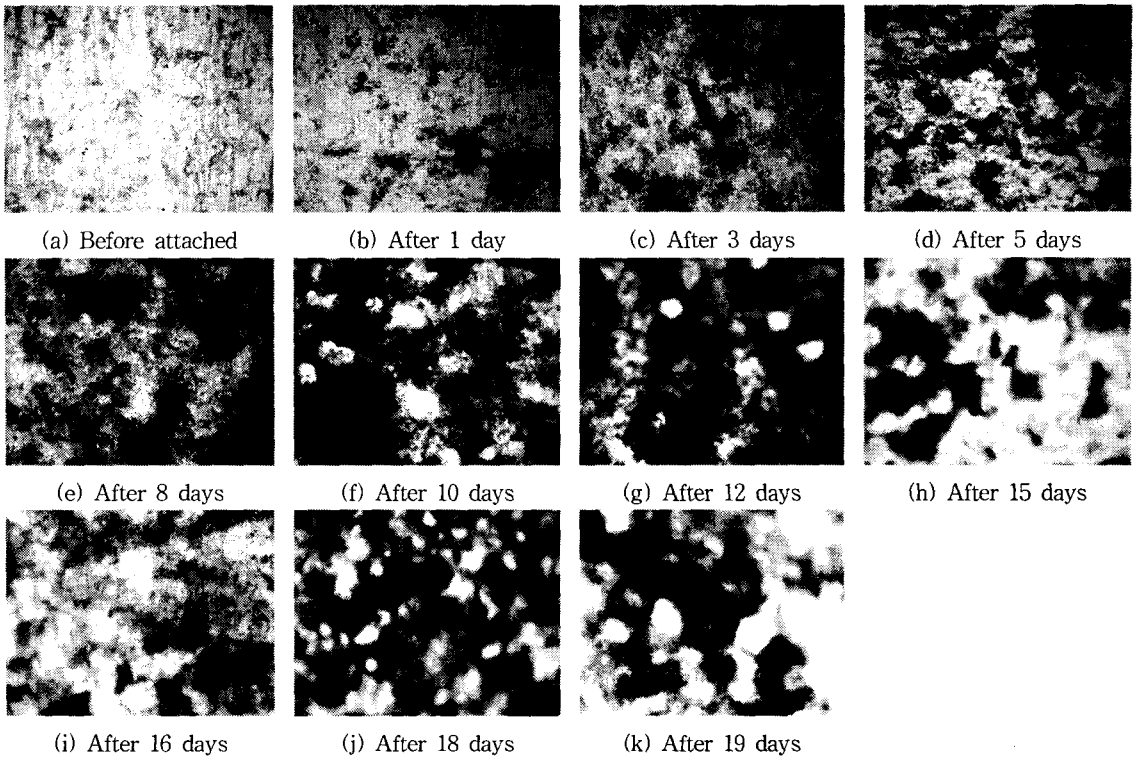


Fig. 3. Optical micrographs of the attached biomass on the surface of polyethylene support medium. ( $\times 40$ )

### 3.2. 광학 현미경을 이용한 관찰

Fig. 3에 부착 실험 전후에 촬영된 담체의 광학 현미경 사진을 나타내었다. Fig. 3(a)는 미생물이 부착되기 전의 80번 사포로 표면을 거칠게 한 폴리에틸렌 담체를 촬영한 사진인데, 사포에 의해 형성된 거칠기가 일정 방향으로 나타나 있음을 관찰할 수 있었으며 부착 1일 후의 사진 Fig. 3(b)에서 관찰된 바와 같이 홈이 거칠게 패인 부분을 중심으로 미생물의 부착이 시작되고 있음을 볼 수 있었다. Fig. 3(c)는 부착 실험 3일 후의 담체 표면 사진이며 거칠기가 형성된 부분에 부착된 미생물 주위에 미생물이 부착되어 전체적으로 부착 미생물의 면적이 넓어지고 동시에 두꺼워지는 모습을 관찰할 수 있었다. 부착 실험이 계속 진행됨에 따라 담체 표면 사진 Fig. 3(d)~(k)에서 관찰된 바와 같이 점차 미생물 부착이 증가하여 담체 표면을 대부분 덮게 되고 거칠기가 주어진 부분에 특히 더 두껍게 덮여 점을 관찰할 수 있었다. 혐기성 미생물이 담체 표면에 부착할 때 부착은 편평한 면보다는 거칠기가 주어진 부분에 우선적으로 일어나고 부착된 미생물의 표면으로부터 부착이 진행됨을 알 수 있었다.

### 3.3. SEM 관찰

Fig. 4에 폴리에틸렌 담체 표면에 부착된 미생물을 시간에 따라 1,000배 및 30,000배로 확대 촬영한 SEM 사진을 나타내었다. 1,000배로 촬영한 SEM 사진 결과, 부착 실험 5일 이후에는 미생물이 담체 표면을 덮고 있는 것을 관찰할 수 있었다. 담체 표면에 부착된 미생물 종을 규명하고자 배율을 30,000배로 확대하여 촬영한 SEM 사진 결과, Meraz 등<sup>5)</sup>의 플라스틱 담체에 형성된 생물막 관찰 결과로 보고된 rod 모양의 *Methanotrix*나 *Methanotrix-like bacilli*가 거의 발견되지 않았으며 Syutsubo 등<sup>6)</sup>이 UASB start-up 시 형성된 granule에 대한 SEM 사진 결과에서 보고한 rod 형태의 *Methanosaeta*, *Methanobacterium* 등의 미생물도 발견할 수 없었다.

고분자 물질에 *Methanosarcina*를 부착하였을 때 전혀 부착되지 않았고 *Methanobrevibacter*만이 소수 부착되었다는 Verrier<sup>7)</sup>의 연구 결과와 비교할 때 폴리에틸렌 담체를 이용한 미생물의 부착에 있어서는 SEM 사진을 통한 형태상의 미생물 관찰만으로는 부착된 미생물 종을 규명하기는 어려울 것으로 판단되었다.

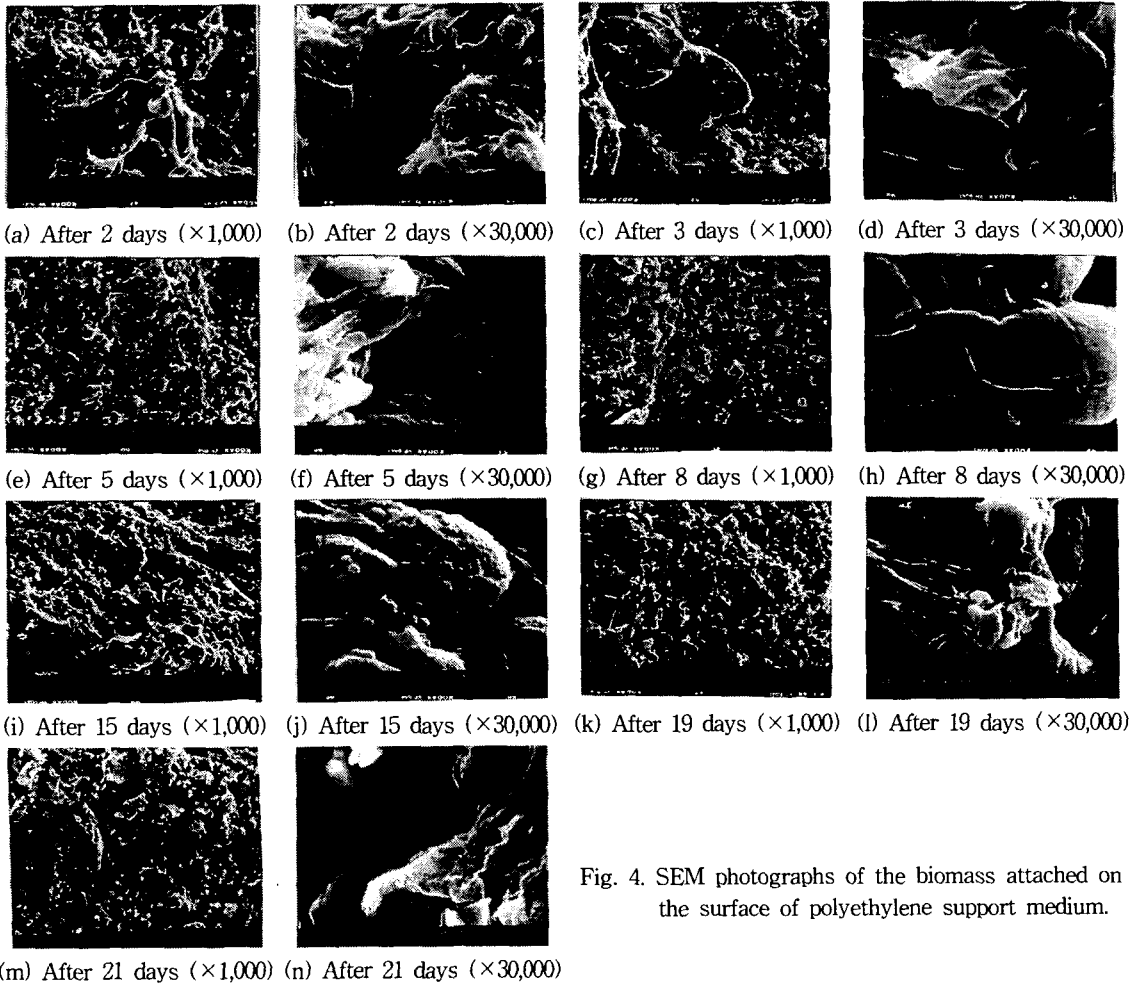


Fig. 4. SEM photographs of the biomass attached on the surface of polyethylene support medium.

3.4. 형광 현미경을 이용한 미생물의 관찰

SEM 사진에 대한 육안 관찰로는 부착된 미생물에 대한 명확한 규명이 어려우므로 부착된 각각의 미생물 중에 대한 규명은 힘들더라도 메탄 생성균의 부착 여부를 확인하기 위해 형광 현미경 관찰을 통해 실시하였다. Table 1에 Jan Dolfing 등<sup>8)</sup>의 논문에서 보고된 문헌상으로 알려진 메탄 생성균들의 종류와 cofactor  $F_{420}$ 의 함량 및 메탄 생성 정도에 대해 나타내었다. Table 1에 나타난 바와 같이 혐기성 미생물 중 거의 모든 메탄 생성균들은 cofactor  $F_{420}$ 을  $0.027 \sim 3.6 \mu\text{mol } F_{420}/\text{g cell}$  정도로 함유하고 있으므로 Cheeseman 등의 연구 결과와 같이 파장 420nm인 UV laser에서 auto-fluorescence를 나타낸다고 사료되었다.

Fig. 5에 혐기성 부유 슬러지와 담체에 부착된 혐기성 미생물에 형광 현미경으로 관찰한 사진을 나타내었다. Fig. 5 (b)는 혐기성 부유 슬러지와 담체에

Table 1. The levels of  $F_{420}$  present in various methanogenic bacteria and their specific methanogenic activities

Bacterium	$F_{420}$ content ( $\mu\text{mol } F_{420}/\text{g cell}$ )	Specific Methanogenic Activity ( $\mu\text{mol CH}_4/\text{g dry cell} \cdot \text{min}$ )
Hydrogen-Utilizing Methanogens		
<i>Methanobacterium formicicum</i>	1.2	350 ~ 550
<i>Methanobacterium bryantii</i>	1.4 ~ 2.4	300
<i>Methanobrevibacter ruminantium</i>	0.04	-
<i>Methanobrevibacter arborophilus</i>	1.8	600
<i>Methanogenium marisnigri</i>	0.7	-
<i>Methanospirillum hungatei</i>	1.9	260
Formate-Utilizing Methanogen		
<i>Methanobacterium formicicum</i>	3.0 ~ 3.6	8000 ~ 14000
Acetate-Utilizing Methanogens		
<i>Methanosarcina acetivorans</i>	0.027	200
<i>Methanotherix soehngenii</i>	0.33	25

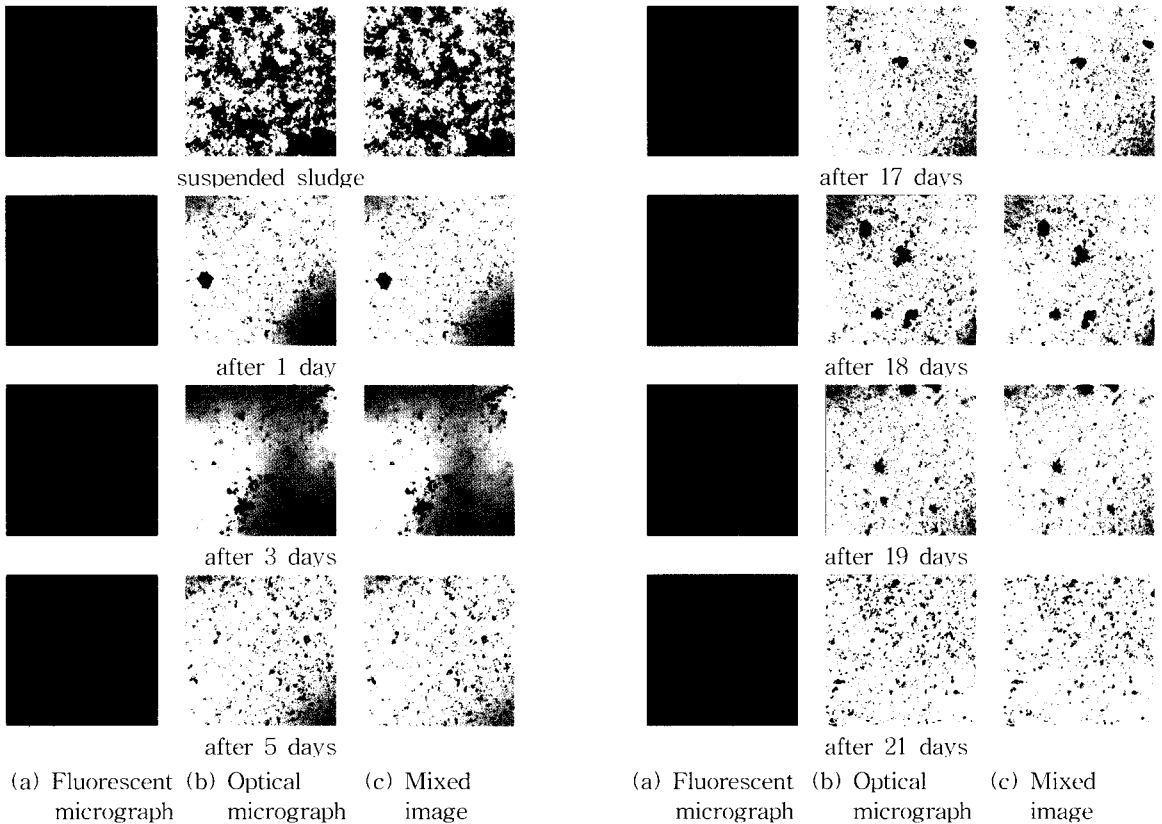


Fig. 5. Optical and fluorescent micrographs of the suspended anaerobic sludge and the detached biomass from PE support medium. ( $\times 100$ )

부착된 혐기성 미생물에 대해 광학 현미경에서 100 배로 촬영한 사진이고 (a)는 (b) 시료의 같은 위치에 대해 green filter (480nm)를 사용하여 100배로 촬영한 사진인데 green filter 파장의 빛을 받게 되면 420nm와 같이 480nm에서도 auto-fluorescence에 의해 메탄 생성균들이 녹색으로 나타남을 관찰할 수 있었다. Fig. 5 (c)는 (a)와 (b)를 합성하여 촬영한 사진이며 녹색과 회색이 겹치는 부분은 혐기성 미생물 덩어리 중에서 메탄 생성균이 있는 부분을 나타낸다고 사료되었다.

Fig. 5에서 나타난 바와 같이 형광 현미경 관찰에 의해 혐기성 부유 슬러지와 부착된 혐기성 미생물 중에 메탄 생성균들의 존재를 관찰할 수 있었다. 특히 메탄 생성균이 비교적 초기인 부착 실험 1일, 3일, 5일의 사진에서 관찰할 수 있었으므로 메탄형성 박테리아는 부착력이 약하므로 초기부착과는 큰 관계가 없고 다른 미생물이 부착되고 난 뒤에 부착된다고 보고한 Verrier (1987)의 연구결과와 다르게 메탄 생성균도 미생물의 초기 부착에 관여한다는 것을 확인할 수 있었다. 시간에 따라 혐기성 미생

물 중의 메탄 생성균 함량이 증가하는 경향을 보이지만 부착 실험 17일 이후부터는 그 함량이 거의 일정함을 관찰할 수 있었다. 본 결과를 기초로 하여 혐기성 미생물 중의 메탄 생성균 함량을 정량화할 수 있는 방법을 모색할 수 있을 것으로 판단되었다.

## 5. 결론

혐기성 상태에서 미생물이 담체 표면에 부착되고 축적되는 현상을 현미경으로 관찰하여 혐기성 미생물의 연속식 부착과 생물막 형성과정을 고찰하여 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었다.

1. 시간에 따른 담체 표면적당 생물막 부착량 변화는 부착 28일 이후에 그 양이 거의 일정해지는 경향을 나타내었다. 이는 생물막의 두께가 시간에 따라 충분히 두꺼워진 이후에는 두께가 더 이상 증가하지 않음을 알 수 있었다.
2. 시간에 따라 흠이 거칠게 패인 부분을 중심으로 미생물의 부착이 시작되어 점차 미생물 부착이 증가하여 담체 표면을 덮는다는 것을 광학현미

경 사진 분석으로 확인하였다.

3. 30,000배로 촬영한 SEM 사진 결과 문헌에서 보고된 rod모양의 *Methanothrix*, *Methanothrix-like bacilli*, *Methanosaeta*, *Methanobacterium* 등의 미생물을 발견할 수 없었으나, 480nm파장의 argon laser의 조사에 의한 auto-fluorescence에 의해 메탄 생성균이 시간이 증가됨에 따라 일정하게 증가됨을 볼 수 있었고, 부착 실험 17일 이후부터는 그 함량이 거의 일정함을 관찰할 수 있었다.

#### 감사의 글

이 논문은 1998년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음(KRF-119005-E00021).

#### 참 고 문 헌

- 1) Eaton, A. D., L. S. Clesseri and A. E. Greenberg, 1995, Standard Methods, APHA AWWA WEF, 19th ed.
- 2) Cheeseman, P., A. Toms-Wood, and R. S. Wolfe, 1972, Isolation and properties of a fluorescent compound, factor 420, from *Methanobacterium* strain M.O.H., J. Bacteriol., 112, 2451-2476.
- 3) 박성열, 김도한, 나영수, 박영식, 송승구, 2001, 혐기성 조건에서 담체에 부착된 미생물의 관찰, 환경위생학회지, 27(1), 100-105.
- 4) LaMotta, E. J., 1976, Internal diffusion and reaction in biological films, Environmental Science & Technology, 10(8), 765-769.
- 5) Meraz, M., O. Monroy, A. Noyola and K. Ilangovan, 1995, Wat. Sci. tech., 32(8), 243-250.
- 6) Syutsubo, K., H. Harada, A. Ohashi and H. Suzuki, 1997, An Effective Start-up of Thermophilic UASB Reactor by Seeding Mesophilically-grown Granular Sludge, Wat. Sci. Tech., 36(6/7), 391-398.
- 7) Verrier, D., B. Mortier and G. Albagnac, 1987, Initial Adhesion of Methanogenic Bacteria to Polymer, Biotech. Letters, 9(10), 735-740.
- 8) Dolfig, J., and J. W. Mulder, 1985, Comparison of Methane production rate and coenzyme F<sub>420</sub> content of methanogenic consortia in anaerobic granular sludge, Appl. Environ. Microbiol., 49(5), 1142-1145.