P431

# 고분자 담체에 부착된 미생물 형상

박성열, 이승란, 박영식*, 송승구
부산대학교 화학공학과, 서봉리사이클링(주)*
전화 (051) 510-3082, FAX (051) 512-8563

Abstract

Optical microscope, SEM and fluorescent microscope were used for qualitative and morphological studies of the attachment bacteria on PE substratum under anaerobic condition.

The observation of optical microscopic has demonstrated that the initial attachment of bacteria began in crevices of surface.

In SEM photographs, shape and structure of biofilm could be observed, but bacteria species and methanogens was not identified.

A large number of methanogenic bacteria were showed on the surface of PE substratum by fluorescence under 480nm of radiation. It was estimated that methanogenic bacteria was related to initial attachment of bacteria under anaerobic condition.

## 서론

생물막 반응기에 이용되는 미생물 고정화는 미생물이 담체의 표면에 생물막을 형성하는 것으로 자연에서 쉽게 관찰되는 현상이지만, 담체 표면의 물리화학적 구조와 성질, 그에 따른 미생물의 상호작용이 복잡하기 때문에 생물고정화 (bioimmobilization)의 세부과정은 자세히 알려져 있지 않다. 생물막 공정의 올바른 이해와 효율적인 공정관리를 위해서 담체 표면에서 미생물이 부착되어 생물막이 축적되는 현상과 형태를 고찰하여야 하므로 본 실험에서는 여러 조건 변화에 따른 미생물의 거동을 광학현미경, SEM, 형광현미경을 이용하여 관찰해 보았다.

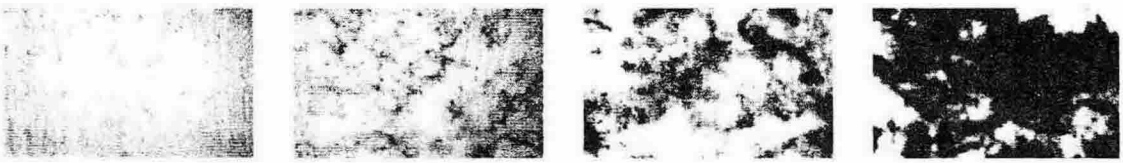
## 재료 및 방법

본 연구에서는 부산광역시 수영 하수처리장의 소화조에서 농축조로 보내지는 혐기성 슬러지를 증류수와 1:1로 희석하여 26900mg/L로 만든 후 회분식 부착 장치에 주입시켰다. 담체는 본 실험 이전 예비실험으로 행해졌던 PE, PVC, PP, Acryl에 대한 혐기성 미생물의 초기부착 연구에서 PE가 가장 잘 부착된다는 것을 바탕으로 본 실험에서 PE를 가로 2.0cm, 세로 1.8cm인 직사각형판을 80번 사포로 거칠게 하여 사용하였다. 그리고 질소를 주입하여 용존산소를 제거한 후 35℃로

유지되는 shacking incubator에서 3일간 부착을 실시하였다.
담체를 제거한 후 증류수로 2회 세척한 후 광학현미경을 이용하여 배율 40배로 관찰하고 화상은 디지털 카메라로 촬영하여 화상분석에서 처리하였다.
또 담체표면에 부착된 미생물에 대한 더욱 세밀한 관찰을 위해 SEM사진을 촬영하였다. 광학현미경을 이용한 관찰에 적용된 방법과 동일한 실험 후 제거된 담체를 증류수에 2회 세척후 25% glutaraldehyde에서 2시간 동안 탈수를 실시하고 60℃에서 2시간 동안 건조한 후 Pt coating을 하고 SEM 촬영을 실시하였다.
SEM사진 촬영은 40, 1000 및 30000배로 실시하였다.
PE담체에 부착된 미생물 중 메탄생성균을 규명하기 위해 형광현미경(Cnfocal)에서 부유슬러지와 담체에 부착된 미생물을 35℃에서 90분간 초음파를 이용하여 탈착시켜 슬라이드 글라스 위에 떨어뜨린 후 green filter를 이용하여 파장 480nm인 argon laser를 쪼여 배율 100배로 촬영한 후 화상분석기를 이용하여 화상을 조정하였다.

결과 및 고찰

Fig. 1(a)은 미생물이 부착되기 전 80번 사포로 표면에 거칠기를 준 PE 담체를 촬영한 사진이고 여기서 거칠게 홈이 패인 부분을 중심으로 미생물 부착이 일어나고 있음을 실험 1일 후 촬영한 사진 Fig. 1(b)에서 관찰할 수 있었다. 실험 2일 후 촬영한 사진 Fig. 1(c)은 거친 홈이 있는 부분부터 부착된 미생물이 면적이 넓어지는 동시에 두꺼워지고 Fig. 1(d)의 실험 3일 후 촬영사진은 담체 표면 대부분이 미생물로 덮여 지는 것을 관찰할 수 있었다.
Kenji 등(1990)은 혐기성 유동층 반응기에서 혐기성 미생물의 부착은 담체 표면적의 크기보다 담체 표면이 거칠수록 잘 부착된다고 보고하였는데 본 실험에 사용된 고분자 담체 PE의 경우의 부착 결과와 일치함을 알 수 있었다.[1)]



(a) Before attached (b) After 1 day (c) After 2 days (d) After 3 days

Fig. 1. Optical micrographs of attached bacteria on the surface of PE support media.

Fig. 2에 PE 담체 표면에 부착된 미생물에 대한 SEM사진을 나타내었는데 Fig. 2(a)와 같이 40배 촬영사진에서는 부착 미생물의 형태 관찰이 용이하지 않아 1000배, 3000배로 확대 촬영한 것을 각각 Fig.2 (b)와 (c)에 나타내었다. *Methanosarcina*와 비슷한 구형의 미생물들은 조금씩 관찰되었으나 문헌에서 보고된 rod모양의 *Methanothrix, Methanothrix-lile bacilli, Methanosaeta, Methanobacterium*등의 미생물을 발견할 수 없었다.[2), 3)]

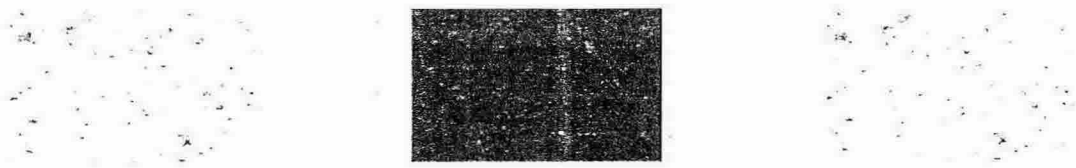
(a) ( ×40 ) (b) ( ×1000 ) (c) ( ×30000 )

Fig. 2. SEM photographs of bacteria attached on the surface of PE support media.

PE 담체에 부착된 미생물을 SEM사진을 통한 관찰만으로는 각각의 종을 규명하기 어려웠기 때문에 형광현미경의 관찰을 통해 메탄 생성균의 부착여부를 규명하였다. Fig. 3과 4는 각각 혐기성 부유슬러지와 부착실험 1일 후 담체에 부착된 미생물을 형광현미경으로 관찰한 사진인데 Fig. 3(a)과 Fig. 4(a)는 각각 혐기성 부유슬러지와 담체에 부착된 미생물을 광학 현미경에서 100배로 촬영한 사진이다. Fig. 3(b)와 Fig. 4(b)는 혐기성 부유슬러지 시료와 담체에 부착된 미생물을 같은 위치에 대해 green filter(48nm)를 사용하여 100배로 촬영한 사진인데 green filter 파장의 빛을 받게 되면 auto-fluorescence에 의해 메탄 생성균들이 녹색으로 나타남을 관찰할 수 있었다. Fig. 3(c)과 Fig. 4(c)는 각각의 (a)와 (b)를 합성하여 촬영한 사진으로 녹색과 회색이 겹치는 부분은 혐기성 미생물 중에서 메탄 생성균이 있는 부분을 나타내고 있다.

(a) Optical micrograph (b) Fluorescent micrograph (c) Mixed image

Fig. 3. Optical and fluorescent micrographs of suspended anaerobic sludge.



(a) Optical micrograph (b) Fluorescent micrograph (c) Mixed image

Fig. 4. Optical and fluorescent micrographs of anaerobic bacteria attached on PE support media.

Fig. 4에서 관찰된 바로는 메탄 생성균은 초기부착과 큰 관계가 없다고 다른 문헌에서 보고된 바와 다르게 메탄 생성균들도 미생물 초기 부착에 관여한다는 것을 알 수 있었다.[4)]

요약

고분자 담체 PE에 대한 미생물의 초기부착 현상과 그 형태를 광학현미경, SEM, 형광현미경을 이용하여 관찰하였는데 광학현미경 관찰에 의한 관찰에서 미생물의 초기부착은 거친 표면의 홈에서 시작한다는 것을 알 수 있었고 SEM 사진에 의해서는 미생물 형태를 명확히 파악할 수 없고 특히 메탄 형성 미생물의 존재를 규명하기 어려워 형광현미경을 이용하였다. 형광현미경에 의한 혐기성 부유슬러지와 담체에 부착된 미생물의 관찰 결과 메탄생성균을 확인할 수 있었고 초기 부착에 메탄생성균이 관여함을 알 수 있었다.

참고문헌

1. Kenji Kida, "Support media for microbial adhesion in an anaerobic fluidized-bed reactor"(1990), J. Fermentation and Bioengineering, 69(6), 354~359.

2. Meraz, M., Monroy, O., Noyola, A., and Ilangovan, K., "Studies on the Dynamics of Immobilization of Anaerobic Bacteria on a Plastic Support"(1995), Wat. Sci. tech., 32(8), 243~250.

3. Syutsubo, K., Harada, H., Ohashi, A., and Suzuki, H., "An Effective Start-up pf Themophilic UASB Reactor by Seeding Mesophilically-grown Granular Sludge"(1997), Wat. Sci. Tech., 36(6/7), 391~398.

4. Verrier, D., Mortier, B., and Albagnac, G., "Initial Adhesion of Methanogenic Bacteria to Polymer"(1987), Biotech. Letters, 9(10), 735~740.