

미생물의 초기 생물막 부착과 성장에 미치는 *Zoogloea ramigera*의 영향

박 영 식 · 서 정 호* · 송 승 구
부산대학교 화학공학과 · 울산전문대학교 공업화학과
(1998년 3월 6일 접수)

Zoogloea ramigera Effects on the Initial Attachment and Growth of Microorganism on Biofilm

Young-Seek Park, Jung-Ho Suh*, and Seung-Koo Song
Dept. of Chem. Eng., Pusan National University, Pusan, Korea,
*Dept. of Industrial Chemistry, Ulsan Junior College, Ulsan, Korea
(Manuscript received 6 March 1998)

This paper discussed about the effect of *Zoogloea ramigera* on the initial microorganism attachment and the biofilm growth. The additions of 5, 10 and 15%(w/w) of *Zoogloea ramigera* were facilitated for the initial attachment on the surface of the acryl disk. At biofilm growth, the more *Zoogloea ramigera* added to the activated sludge, the more biofilm dry weight was obtained.

In order to get the stable biofilm and to minimize the start-up periods, initial biofilm formation using activated sludge with floc forming microorganisms like *Zoogloea ramigera* was recommended rather than that without floc forming microorganisms.

Key words : *Zoogloea ramigera*, initial attachment, biofilm growth, activated sludge, extracellular polymer substance

1. 서 론

담체에 고정된 미생물을 이용하여 폐수를 처리하는 생물막 공정은 생물막 내의 미생물이 폐수와 연속적으로 또는 간헐적으로 접촉하여 폐수를 정화하는 공정이며, 최근에 질소와 인의 제거가 관심의 대상이 되면서 연구가 많이 이루어지고 있다(박영식 외, 1993). 그러나 생물막 발달과 생물막에 의한 기질 제거 속도에 관해 상당히 많은 정보가 있으나(박영식 외, 1997(1)) 생물막 자체에 대한 연구는 많지 않다.

생물막을 이용한 폐수처리 공정에서 호기성 생물막(회전원판, 살수여상, 유동층 생물막)이 형성되기까지는 수 일에서 수 주일 이상이 걸리며 혐기성 생물막 공정에서 안정된 생물막의 형성에는 수 주일이나 수 개월이 걸리므로 반응기의 생물막 형성을 촉진시켜 반응기의 start-up 기간을 줄이는 연구가 요구된다.

활성슬러지 공정의 반응슬러지가 폐수처리용 생물막 반응기의 start-up에 주로 이용되는데 활성슬러지의 성상에 따라 생물막 형성 기간이 달라진다. 활성슬러지는 다양한 종속영양 박테리아로 이루어져 있는데, 그 중에서 *Zoogloea ramigera*는 활성슬러지를 구성하고 있는 미생물 중에서 플록을 형성하는 미생물로 알려져 있고, 여러 종류의 탄소, 질소원에서 세포외 고분자 물질

(EPS : extracellular polymer substances)을 생성한다(Norberg, 1982). *Z. ramigera*에 의하여 생성된 고분자 물질은 아직 정확한 구조가 밝혀져 있지 않지만 대개 glucose, galactose, pyruvate 등으로 구성되어 수용성 형태의 다당류인 것으로 알려져 있으며, gum의 점도는 25℃, 0.75% 수용액에서 2000cp에 이르는 높은 점도를 나타내며(안대희 등, 1992), 이런 특성으로 인하여 응집제로서의 사용가능성을 제시하고 있다(Magaritis와 Pace, 1985). 생성된 세포외 고분자 물질은 세포외 응집과 중금속 흡착능력을 가지며(Brown과 Lester, 1982), 활성슬러지의 물성에 영향을 미쳐 활성슬러지의 분리, 폐수중의 BOD 감소에 중요한 기능을 담당하고 있다(정운철, 1990).

본 연구의 목적은 *Zoogloea ramigera*가 미생물 초기 부착과 생물막 성장에 미치는 영향을 조사하고 생물막 반응기에서 초기 start-up을 촉진하기 위한 것이다.

2. 재료 및 방법

2.1 사용된 미생물 및 미생물 성장곡선

활성슬러지는 부산광역시 소재의 수영 하수종말처리장의 반응슬러지를 3000mg/L로 희석하여 사용하였으며, *Zoogloea ramigera* KCTC 2531을 증류수 1L에

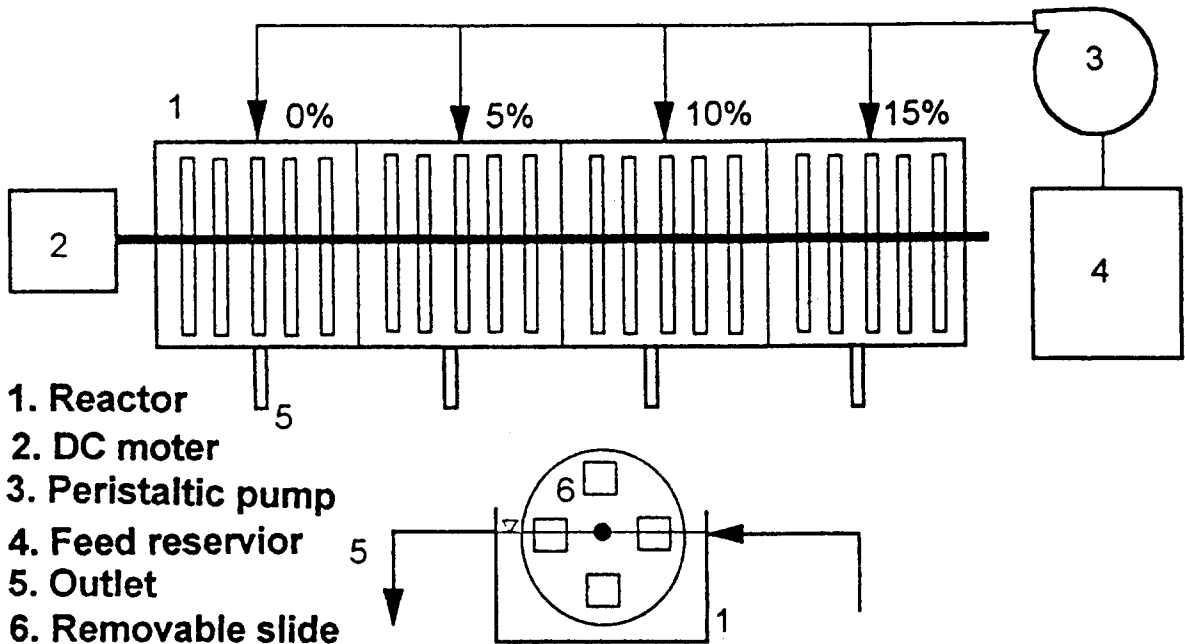


Fig. 1. A Schematic diagram of a RBC reactor.

- 1. Reactor
- 2. DC moter
- 3. Peristaltic pump
- 4. Feed reservior
- 5. Outlet
- 6. Removable slide

Table 1. Specifications of a rotating biological contactor(RBC)

Contents	Values
Number of stage per unit operation	4
Number of disc per stage	5
Disc diameter(cm)	15
Disc thickness(cm)	0.3
Submergence(%)	40

Table 2. Compositions of synthetic wastewater (Basis : CODcr = 2500mg/L)

Item	Value(g/L)
Glucose	4
Na ₂ HPO ₄	1
KCl	0.14
Urea	1
CaCl ₂	0.14
NaCl	0.3
MgSO ₄	0.1

yeast extract 3.0g과 peptone 5.0g를 넣은 진탕 배양기에서 150rpm, 30℃로 유지하면서 24시간 배양하였다. 진탕배양 후 4500rpm에서, 10분간 원심분리시키고 초순수증류수로 여러 번 세척하여 *Zoogloea ramigera*를 수확하였다.

미생물의 성장곡선은 활성슬러지 또는 *Zoogloea ramigera*를 OD(optical density)를 0.03으로 조절하여 배양시키면서 분광광도계(spetriconic 20, Milton Roy Company)로 660nm에서 시간에 따른 OD를 측정하여 구하였다.

2.2 실험장치

용적이 1.2L, 4구획으로 나누어진 RBC반응기(Fig. 1)를 사용하였으며, 온도는 20±1℃. 수리학적 체류시간(HRT)은 6시간으로 유지하였다(Table 1). 지름이 15cm이고 두께가 3mm인 원판에 사포로 일정하게 마모시킨, 2.5cm x 2.5cm 크기의 아크릴 판을 원판 끝에서 3.5cm가 되는 지점에 12개를 부착하였다. Table 2와 같이 SCOD 400mg/L로 조절된 폐수를 유입하였으며, 이때의 원판 단위 표면적당 유기물 부하량은 12.7gSCOD/m²day이었다. 초기 생물막 형성과 성장의 상

태를 관찰하였으므로 생물막이 과다 성장하여 악취를 발생시키지 않는 12.7gSCOD/m²day정도로 부착 및 성장 실험을 수행하였다(정재춘, 1991).

2.3 운전조건

RBC 반응기를 4구획으로 나누어 첫 번째 구획에는 3000mg/L의 활성슬러지만 넣고, 나머지 구획에는 *Zoogloea ramigera*가 무게 비로 활성슬러지 농도의 5%, 10% 및 15%(w/w)가 되도록 첨가하였으며 총 미생물의 양은 *Z. ramigera* 첨가에 관계없이 각 구획에서 3000mg/L로 동일하였다. 이때 원판의 회전수는 10rpm으로 고정하고, 미생물을 용이하게 부착시키기 위해서 5일간 동안 폐수를 주입하지 않았고, 부착된 미생물에 과부하를 주지 않고 성장시키기 위해서 2주일 간 폐수를 하루에 12시간 동안만 투입하였으며, 공급된 폐수에 의해 부착되지 않은 미생물이 반응기 외부로 유출되기 때문에 폐수 공급 후에 3000mg/L의 활성슬러지를 매일 500mL씩 일정하게 첨가하였다. 2주 후 실험이 끝날 때까지 폐수를 연속적으로 공급하였으며, 생물막 성장을 위해서 활성슬러지를 더 이상 주입하지 않았다.

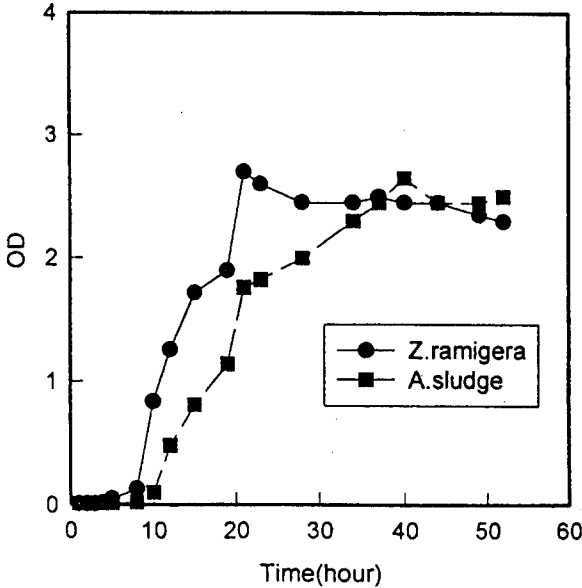


Fig. 2. The growth curves of *Z. ramigera* and activated sludge.

2.4 생물막 두께 및 생물막 건조밀도

생물막이 부착된 아크릴 판을 원판에서 분리시키고 생물막을 탈리시켜 10mL graduated cylinder를 사용하여 생물막 부피를 측정하고, 이를 생물막이 탈리된 부분의 원판 면적으로 나누어서 생물막 두께를 구하였다 (Zahid, 1993). 탈리된 생물막을 glass micro fiber filter에서 여과하여, 105℃에서 2시간 건조시킨 후 생물막의 건조무게를 측정하였고, 이를 graduated cylinder를 사용해서 구한 생물막 부피로 나누어서 생물막 건조밀도를 계산하였다.

2.5 회분 실험에서 부착된 미생물의 균집 수 측정

2.5cm x 2.5cm 크기의 아크릴 판을 페트리 접시에 부착시키고 활성슬러지에 *Zoogloea ramigera* 무게 비를 0%, 5%, 10% 및 15%(w/w)가 되도록 첨가하고 총 미생물 농도를 90mg/L로 조절하고, 30℃에서 3시간 동안 부착 실험을 행한 후 아크릴 판을 20mL의 증류수가 들어 있는 시험관에 넣어 4000rpm에서 10분간 원심분리시키고, Vortex mixer(Vision KMC-1300V)에서 5분간 미생물 균집을 파쇄하였다. 파쇄된 시료 1mL를 8.5% 생리식염수 9mL에 넣고 10배씩 적절하게 희석하여 페트리 접시에 1mL를 넣고 plate counter agar (Difco)를 붓고 agar가 굳어지면 30℃로 고정된 배양기에서 24시간 동안 배양 후 colony counter(Fisher Accu-lite Model 133-8002)로 배양된 미생물 균집수(CFU : colony forming unit)를 측정하였다.

2.6 세포의 고분자 물질 추출

세포의 고분자 물질(extracellular polymer substance : EPS)은 TETA법 과 원심분리법을 혼합하여 사용하여 추출하였으며, 활성슬러지와 *Z. ramigera* 농도

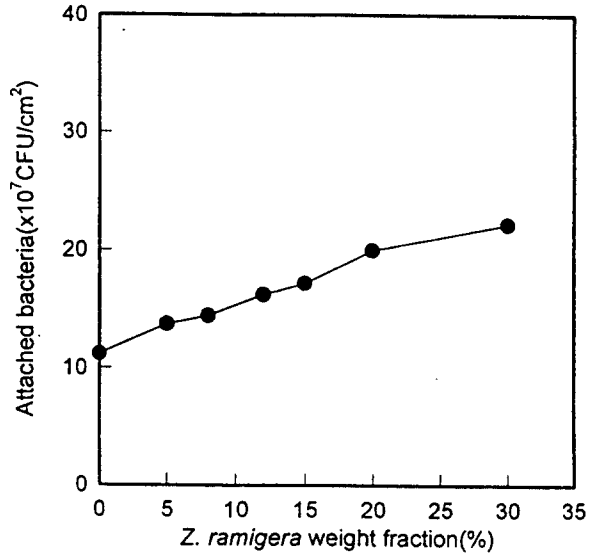


Fig. 3. Effect of *Z. ramigera* on the initial attachment. (attachment time : 3hr, activated sludge conc. : 90mg/L)

를 15000mg/L로 조절하여 순수 증류수에 25mL첨탁시키고 5M NaCl과 5M TETA(tetrasodium ethylene tetracetel)을 각각 0.2mL씩 첨가한 후 vortex mixer로 교반하였다. 이 시료를 고속원심분리(36000g x 40min)하고 상등액과 iso-propyl alcohol을 1대4의 부피비로 혼합한 후 4℃에서 3시간동안 정제시킨 후 EPS를 침전시키고 무게를 아는 여과지에 여과한 다음 건조 질량을 측정하여 wet cell 1g당 EPS 추출량으로 환산하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 미생물 성장곡선

Fig. 2는 활성슬러지와 *Zoogloea ramigera* 각각의 성장곡선을 보여주며, *Zoogloea ramigera*는 20시간 정도에서 활성슬러지는 37시간 정도에서 정지기(stationary growth phase)에 도달되었다. 그러나 지수성장기(exponential growth phase)에서 같은 OD 값에 도달되는데 *Zoogloea ramigera*가 활성슬러지보다 3~5시간 빠르기 때문에 *Zoogloea ramigera*의 성장속도가 활성슬러지보다 빠른 것을 알 수 있었다.

3.2 회분 실험에 의한 부착 특성

Fig. 3은 *Z. ramigera* 양을 변화시켰을 때, 3시간 동안에 아크릴 판 단위면적당 부착된 미생물 균집수를 나타낸 것으로 *Z. ramigera*가 포함되지 않은 활성슬러지에서 부착된 균집수는 11.4×10^7 CFU/cm²이었으며, 무게 비로 5%의 *Z. ramigera*를 함유한 구획에서는 13.7×10^7 CFU/cm², 15%에서는 17.2×10^7 CFU/cm²이었으며 20%에서는 20.0×10^7 CFU/cm², 30%에서는 22.0×10^7 CFU/cm²이 부착되었으며, 활성슬러지 내에 존재하는 *Z. ramigera* 무게 비에 따른 초기 부착은 선형적으로 증가되었으며, 사상성 미생물인 *Sphaerotilus*

Table 3. Concentration of suspended solid at each compartment after 5 days

Concentration of SS(mg/L)	Z. ramigera fraction			
	0%	5%	10%	15%
	2900	1800	800	300

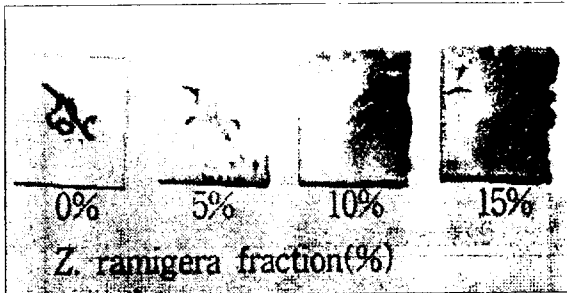


Fig. 4. Photographs of biofilms at acryl surface after 3 days.

natans를 같은 조건으로 15% 첨가하였을 때의 초기 부착 증가율과 비슷하였다(박영식 외, 1997(2)).

실험에 사용된 활성슬러지를 TETA와 원심분리법으로 세포의 고분자 물질을 추출하면 0.0475g/g cell가 얻어지는 반면, Z. ramigera의 경우는 0.36g/g cell이 추출되기 때문에 Z. ramigera가 많이 첨가될수록 초기 부착이 증가하는 것은 응집 능력이 있는 세포의 고분자 물질을 많이 생성하기 때문에 부착이 잘되는 것으로 사료되었다.

3.3 생물막 변화

RBC 반응기에 미생물을 투입한지 몇 시간이 지난 후 아크릴 판에 미생물이 부착되는 것이 육안으로 관찰되었으며, 하루가 지났을 때 Z. ramigera 첨가량에 따라 부착량이 증가되기 시작하였으며, 24시간 후 부착된 미생물의 양은 0% < 5% < 10% < 15%의 순이었다. Fig. 4는 부착 후 3일이 지났을 때의 아크릴 판 표면을 촬영한 것으로 Z. ramigera 무게 비에 따라 부착된 미생물량은 현격한 차이를 보여주었다. Z. ramigera가 10% 이상 첨가된 곳에는 생물막이 두껍게 형성되었지만 5% 이하 첨가된 구획에서는 부착된 미생물이 많지 않았다.

Seeding 5일 후까지는 폐수가 유입되지 않았기 때문에 활성슬러지의 성장속도보다 Z. ramigera의 성장속도가 빠르기 때문에 생기는 Z. ramigera 자체의 증가량에 의한 부착증가 요인은 거의 없는 것으로 사료되었다. 미생물이 생성하는 EPS는 응집성과 침강성을 가지기 때문에(Morgan et al., 1990), bioflocculation 과정에 큰 영향을 미친다고 알려져 있고(Forster, 1971), 영양분이 결핍된 상태에 있을 때는 박테리아의 생장이 억제되고 floc화를 촉진하게 되는데(정윤철, 1990), 빈 영양상태에서 Z. ramigera의 첨가량이 많을수록 EPS와 수 많은 박테리아로 구성되는 floc의 형성이 촉진되고 이에 따른 부착이 주요 원인이라고 사료되었다.

또한 한 번 미생물이 부착된 곳에는 미생물이 계속 부착되어 미생물이 부착된 곳과 부착되지 않은 곳 사이의

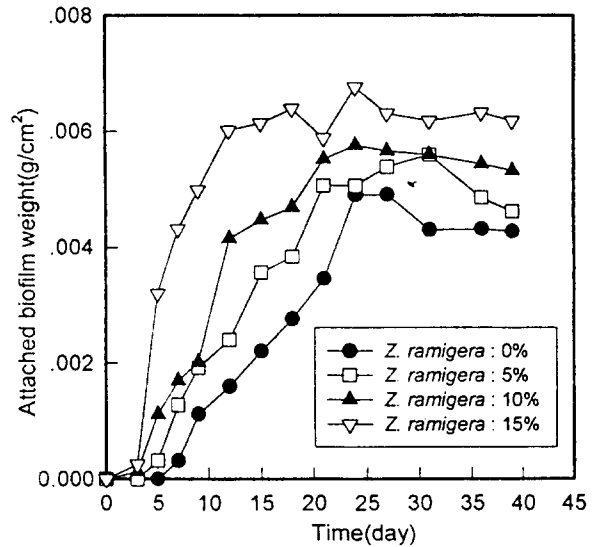


Fig. 5. Effect of Z. ramigera on the biofilm growth.

생물막 두께 차이는 크게 나타났는데, 이는 미생물이 담체보다는 응집력과 침강력이 있는 이미 형성된 floc에 더 부착되기 쉽기 때문이라고 사료되었다.

Table 3에 부착 5일 후의 반응기의 각 구획에서 부유하고 있는 미생물을 나타내었다. Z. ramigera가 10%와 15%가 첨가된 영역에서 반응기 내에 부유하는 미생물은 비교적 적었으나, 5% 이하가 첨가된 영역에서는 부유하고 있는 미생물이 많이 존재하였으며, Z. ramigera가 첨가되지 않은 구획에서는 대부분의 미생물이 부착에 참여하지 않고 부유하고 있는 것이 관찰되었다. 이것으로 볼 때 Z. ramigera가 많이 첨가된 영역에서는 floc을 형성하고 응집작용을 하는 Z. ramigera가 미생물을 담체에 부착시키는 역할을 하고 미생물과 미생물의 cohesion 역할을 하기 때문에 첨가된 미생물이 반응기 내에 부유상태로 존재하지 않고 거의 다 부착에 참여한다고 사료되었다.

3.4 생물막 건조무게

Fig. 5는 Z. ramigera 첨가량에 따른 아크릴 판에서 부착된 생물막 건조무게를 나타낸 것으로 Z. ramigera가 15% 첨가된 구획의 생물막은 초기에 거의 지수적으로 성장하여 열흘만에 생물막 건조무게가 0.006g/cm²에 도달되었다. 10% 첨가된 구획에서는 0.005g/cm²에 도달되는데 22일 가량 소요되고, 0%에서는 0.004g/cm² 정도 부착되는데 25일이 요구되는 것으로 나타났다. 생물막 건조무게가 정상상태에 도달되었을 때 15% 첨가된 영역에서는 0.0063g/cm², 10%에서는 0.0053g/cm², 5%에서는 0.0047g/cm²에, Z. rami-

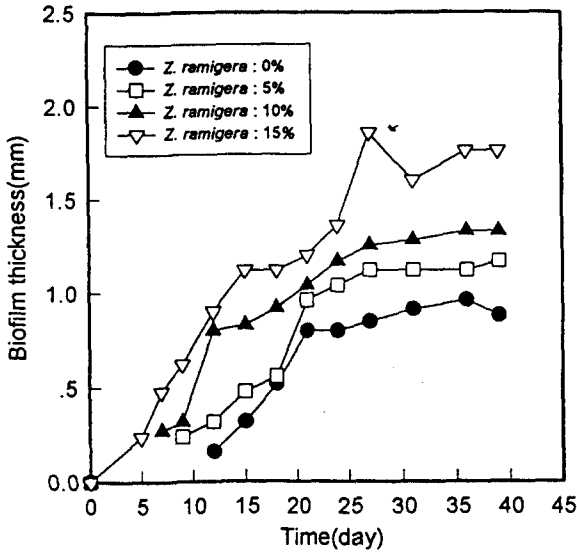


Fig. 6. Effect of *Z. ramigera* on the biofilm thickness.

*gera*가 첨가되지 않은 영역에서는 $0.0043\text{g}/\text{cm}^2$ 이 부착되어 *Z. ramigera* 첨가량에 따라 아크릴 판에 부착되는 미생물 건조무게가 달라진다는 것을 알 수 있었다.

사상성 미생물인 *S. natans*가 첨가되었을 때 아크릴 판에 형성된 생물막 건조무게는 $0.003\sim 0.004\text{g}/\text{cm}^2$ 에 불과한 것을 볼 때 생물막 형성에는 사상성 미생물보다는 *Z. ramigera*와 같은 플록형성 미생물이 더 큰 영향을 미치는 것을 알 수 있었다(박영식 외, 1997(2)).

Geesey 등(1977)에 의하면 미생물에서 생산된 slime fiber가 미생물과 고체 표면과의 물리적 접촉을 촉진시켜 미세균집을 형성시키고 박테리아가 고체표면에 뿌리를 내리게 한다고 하였으며, EPS가 담체에 미생물이 부착되고, 생물막의 cohesion에 관여한다고 보고한 Flemming(1995)의 연구 결과와 비교해 볼 때 미생물이 고체 표면에 굳게 부착되는데 결정적인 역할을 한다고 알려진 EPS가 *Z. ramigera*에서 활성슬러지보다 7.6배 더 생성되기 때문에 *Z. ramigera* 첨가량에 따라 부착·형성된 생물막이 많아 미생물 건조무게가 높은 것으로 사료되었다.

3.5 생물막 두께

시간에 따른 생물막 두께의 변화를 Fig. 6에 나타내었다. *Z. ramigera*가 15% 첨가된 구획에서는 생물막 두께가 25일 정도까지 계속 증가하여 1.9mm까지 성장하여 정상상태에 도달되었다. *Z. ramigera*가 10% 첨가된 구획에서는 10일 정도 빠르게 증가하다 이후에 성장속도가 둔화되었다. 생물막 두께가 1mm에 도달되는 데는 15%에서는 13일, 10%에서는 20일, 5%에서는 22일이 걸렸으며 *Z. ramigera*가 첨가되지 않은 구획에서는 실험기간 중에 생물막 두께가 1mm에 도달되지 못하였다. *Z. ramigera*가 15% 첨가된 구획과 첨가되지 않은 구획의 생물막 두께 차이는 2배 정도였다.

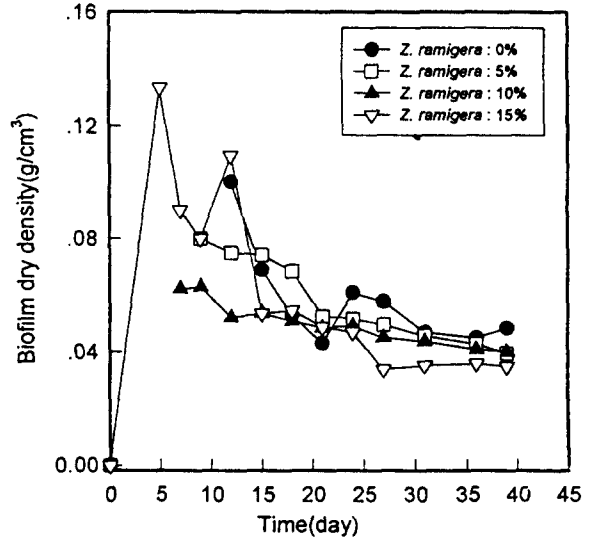


Fig. 7. Effect of *Z. ramigera* on the biofilm dry density.

*Z. ramigera*가 15% 첨가되었을 때 생물막 두께가 1.9mm까지 성장하지만 생물막 탈피 현상은 발생하지 않는데 이는 *Z. ramigera*에 의해 생성된 EPS가 생물막을 단단하게 유지시키는 작용을 하기 때문에 탈피가 일어나지 않는 것으로 사료되었으며, 생물막 부착세기는 생성된 EPS 양에 상당히 영향을 받았다고 보고한 Ohashi와 Harada(1994)의 연구에서 이 사실을 간접적으로 확인할 수 있었다.

3.6 생물막 건조밀도

Fig. 7은 시간에 따라 각 구획에서의 생물막 건조밀도의 변화를 나타낸 것으로 생물막의 성장 초기에는 생물막 건조밀도가 높으나 생물막이 빠르게 성장하는 1주일에서 20일까지 생물막 건조밀도가 감소하였으며, 생물막 성장이 둔화되면서 생물막 건조밀도는 거의 일정하게 유지되었다.

4. 결 론

1) 활성슬러지에 *Zoogloea ramigera*를 첨가하였을 때 초기 부착과 생물막 형성은 첨가량에 따라 증가하였는데 seeding 5일 후까지는 폐수가 유입되지 않기 때문에 미생물의 성장에 의한 *Z. ramigera* 수 증가량에 의한 부착증가는 영향을 미치지 못하며, 그 보다는 *Z. ramigera*가 생성하는 세포의 고분자 물질에 의한 부착 증가요인이 더 크다고 사료되었다.

2) 생물막이 정상상태에 도달되었을 때 *Z. ramigera*가 15% 첨가된 영역에서는 $0.0063\text{g}/\text{cm}^2$, 10%에서는 $0.0053\text{g}/\text{cm}^2$, 5%에서는 $0.0047\text{g}/\text{cm}^2$ 에, *Z. ramigera*가 첨가되지 않은 영역에서는 $0.0043\text{g}/\text{cm}^2$ 이 부착되어 *Z. ramigera* 첨가량에 따라 아크릴 판에 부착되는 미생물 건조무게가 증가하였다. *Z. ramigera*가 15% 첨가된 구획과 첨가되지 않은 구획의 생물막 두께 차이

는 2배 정도였지만, 생물막 건조밀도는 유사한 경향을 보여주어 *Z. ramigera* 첨가에 따른 악 영향은 없는 것으로 사료되었다.

3) 위의 결과를 종합해 볼 때 *Z. ramigera*는 부착에 결정적인 역할을 하는 EPS를 많이 생성하고 플록을 형성하는 성질을 가지고 있기 때문에 생물막 반응기의 start-up시 *Z. ramigera*가 적절하게 존재하는 활성슬러지를 사용하여 생물막을 형성시키는 것이 start-up기간이 단축되고, 안정적인 생물막을 형성할 것이라고 사료되었다.

감사의 글

이 논문은 1996년도 신진연구인력 연구장려금에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

참고 문헌

박영식, 김동석, 안갑환, 서근학, 송승구, 1993, 산업폐수처리를 위한 호기성 생물막 반응기의 연구(1)-온도와 pH 영향을 중심으로, 환경공학회지, 15(6), 821-828.

박영식, 안갑환, 서정호, 최윤찬, 추석열, 송승구, 1997, 역유동층 생물막 반응기를 이용한 아파트 오수 처리, 화학공학, 35(1), 8-13.

박영식, 구기우, 이석렬, 나영수, 서정호, 송승구, 1997, 생물막 형성과 성장에 미치는 *Sphaerotilus natans*의 영향, 19(10), 959-972.

안대회, 권해수, 정윤철, 1992, *Zoogloea ramigera*에 의한 생물고분자 생산에 관한 연구, 생물공학회지, 7(3), 166-171.

정윤철, 1990, *Zoogloea ramigera*에 의한 Biopolymer 생산과 환경분야 이용, 생물화학, 4(1), 33-38.

정재춘, 1991, 미생물고정화법에 의한 배수처리, 1판,

동화기술, 서울, 81-82.

Brown, M.J. and J.N. Lester, 1982, Role of Bacterial Extracellular Polymers in Metal Uptake in Pure Bacterial Culture and Activated Sludge-1, Wat. Res., 16, 1539-1548.

Flemming, H.C., 1995, Sorption Sites in Biofilms, Wat. Sci. Tech., 32(8), 27-33.

Forster, C.F., 1971, Activated Sludge Surfaces in Relation to the Sludge Volume Index, Wat. Res., 5, 861-870.

Geesey, G.G., W.T. Richardson, H.G. Yeomans, R. T. Irvin, and J.W. Costerton, 1977, Microscopic Examination of Natural Sessile Bacterial Populations from an Alpine Stream, Can. J. Microbiol., 23, 1733-1736.

Magaritis, A. and G.W. Pace, 1985, Microbial Polysaccharide, in comprehensive Biotechnology (eds. M. Moo-Young), Pergamon Press, 1005.

Morgan, J.W., C.F. Forster, and L. Evison, 1990, A Comparative Study of the Nature of Biopolymers extracted from Anaerobic and Activated Sludge, Wat. Res., 24(6), 743-750.

Norberg, A.B., and S.O. Enfors, 1982, Production of Extracellular Polysaccharide by *Zoogloea ramigera*, Appl. Environ. Micro., 44(5), 1231-1237.

Ohashi, A. and H. Harada, 1994, Adhesion Strength of Biofilm developed in an Attached-Growth Reactor, Wat. Sci. Tech., 29(10/11), 281-289.

Zahid, W.M.K., 1993, Physical Properties of Rotating Biological Contactor Biofilms Ph. D. Thesis, Dept. of Civil. Eng., Univ. of Toronto, Canada.