

혐기성 조건에서 담체에 부착된 미생물의 관찰

박성열 · 김도한 · 나영수 · 박영식*† · 송승구

부산대학교 화학공학과
*서봉리사이클링(주)

Microscope Examination of Attached Biofilm under Anaerobic Conditions

Sung Youl Park, Do Han Kim, Young Soo Na, Young Seek Park*† and Seung Koo Song

Dept. of Chem. Eng, Pusan National University

*Seobong recycling Co. Ltd.

(Received 2 February 2001 ; Accepted 20 February 2001)

ABSTRACT

Microstructural examinations were performed on the anaerobic biofilm from reactor filled with PE support media. Optical microscope, SEM and fluorescent microscope were used for qualitative and morphological studies on the attached microorganism under anaerobic condition. Microorganisms were attached in crevices where protection from shear forces or surfaces where easy to contact with support media surface. A hypothesis for biofilm accumulation occurs on a surface such as polymer support media is presented schematically: 1st step; cell-support media attachment, 2nd step; cell-support media attachment and cell-cell attachment, 3rd step; attached biofilm from neighboring crevices joins together and growing, 4th step; mature and irregular biofilm was formed. In SEM photographs, shape and structures of biofilm were observed, but microorganism species and methanogens were not identified. A large number of methanogenic bacteria were identified on the surface of PE substratum by fluorescence under 480 nm of radiation and it was estimated that methanogenic bacteria was related to initial attachment of bacteria under anaerobic condition.

Keywords : Anaerobic biofilm, Initial attachment, Step of biofilm formation, Microscope

I. 서 론

미생물이 고체나 담체 표면에 생물막을 형성하는 것은 자연에서 일반적으로 관찰할 수 있는 현상으로 생물막은 입자 표면에 부착되어 있는 미생물로 구성되며 미생물 세포와 여러가지 생성물로 구성되어 있다.¹⁾ 생물막은 유기고분자 겔 속에 갇혀 있는 살아있는 미생물과 유기고분자 젤로서 여겨진다.²⁾ 생물막 자체는 흡착력이 매우 강하고 물이 95% 이상인 다공성 구조이며, 매트릭스 내에서 무기물질을 포획하기도 한다. 생물막은 젖어 있는 모든 표면에서 성장한다.

생물막을 이용하여 폐수를 처리하는 공정에서는 이 현상을 응용하여 하·폐수 처리에 사용하고 있다. 생

물막 공정은 유기물 처리율이 높지만 생물막이 형성되는 기간이 길다는 것이 주요 단점인데, 특히 혐기성 미생물은 그 증식속도가 매우 느리고, 생육활동의 폭이 느리기 때문에 start-up이 느려 안정된 생물막의 형성에는 수개월이 소요되기 때문에 생물막 공정에서는 생물막을 빠르게 형성하는 것이 중요하다.^{3,4)}

생물막 공정에서는 미생물 고정화가 일어나는 담체 내부와 담체 사이에서의 생물막 형성의 복잡성, 구조와 미생물 상호작용이 복잡하기 때문에 담체에 미생물이 부착되고 생물막이 축적되는 생물고정화(bioimmobilization) 공정은 잘 알려지지 않고 있다.^{5,6)} 그러나 생물막 공정의 올바른 이해를 위해서는 담체 표면에서 미생물이 부착되어 생물막이 축적되는 현상을 고찰할 필요가 있다.

따라서 본 연구는 담체의 회분 부착실험과 현미경 관찰을 통하여 혐기성 미생물의 초기부착과 생물막 형성 과정을 고찰하였다.

†Corresponding author : Seobong recycling Co. Ltd.
Tel: 051-518-4785, Fax: 051-518-4786
E-mail: ysparkk@yahoo.com

II. 재료 및 방법

1. 실험장치

본 실험에 사용된 슬러지는 부산광역시 수영 하수처리장의 혐기성 처리 과정 중 소화조를 거쳐 농축조로 유입되기 전 단계에서 채취하여 35°C로 유지되는 혐기성 배양기에서 배양된 슬러지를 혐기성 조건에서 부착 실험할 수 있는 담체부착용 반응기에서 부착실험하였다.

담체부착용 회전식 반응기(Fig. 1)는 직경이 10 cm, 높이가 4 cm이며 부피는 0.3 l이고 아크릴로 제작하였다. 회전식 반응기는 35°C, 50 rpm으로 유지되는 shacking incubator에 설치하였으며, 2일 동안 운전하였다.

2. 실험에 사용한 담체

PE(polyethylene), PVC(polyvinylchloride), PP(polypropylene) 및 Acryl(polymethylmethacrylate) 4종류의 관으로 예비 부착 실험하여 가장 많은 미생물이 부착된 PE(2.0 cm×1.8 cm) 사용하였으며, 미생물 부착을 촉진하기 위하여 No. 80 사포로 표면을 거칠게 하여 사용하였다.

3. 담체의 표면거칠기와 접촉각

사포로 고분자 담체 표면을 거칠게 만들었으며, 담체의 표면거칠기 측정은 표면거칠기 측정장치(Mitutoyo, surftest-501)를 사용하였다. 표면거칠기는 centre line average(CLA)로 얻어지며, CLA는 mean line에서의 거칠기 정도에 대한 산술평균이다.

담체의 소수성을 나타내는 접촉각을 접촉각 측정장치(Erma contact angle meter, G-1)로 담체 표면에 증류수를 떨어뜨려 담체 표면과 증류수가 이루는 접촉각을 15회 측정하고 평균하였다.

4. 미생물 부착실험

혐기성 미생물이 담체 표면에 부착된 상태를 관찰하기 위해 MLSS 16900 mg/l인 혐기성 슬러지가 주입된

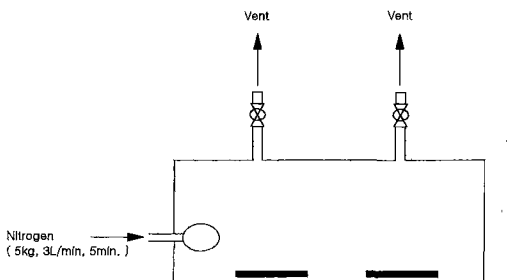


Fig. 1. Anaerobic reactor for batch attachment.

부착 장치에 담체(PE : 1.8 cm×2.0 cm)를 설치하고 질소를 주입한 후 35°C에서 50 rpm으로 shacking하면서 3일간 부착을 실시하였으며 담체를 제거한 후 증류수에 2회 세척한 후 관찰을 실시하였다.

5. 고분자 담체에 부착된 미생물의 관찰

(1) 광학 현미경을 이용한 관찰

담체 표면에 혐기성 미생물이 부착되는 진행 과정 및 형태를 관찰하기 위해 광학현미경(Nikon Labophot-2)을 이용하여 40배의 배율로 관찰하였으며 화상은 디지털 카메라(Olympus C-2000 Z)로 촬영하여 화상분석기(Image Scope 2.3, 경일테크놀로지)에서 처리하였다. 부착전, 부착 실험 1일, 2일, 3일 후로 나누어 각각 관찰을 실시하였으며 담체는 증류수 세척만을 실시하였다.

(2) SEM을 이용한 부착 미생물 관찰

담체 표면에 부착된 미생물에 대한 더욱 세밀한 관찰을 위해 SEM 사진을 촬영하였다. 광학 현미경을 이용한 관찰에 적용된 방법과 동일하게 3일 동안 부착 실험을 실시하고 증류수에 2회 세척한 후 25% glutaraldehyde에서 2시간 동안 탈수를 실시하고 60°C에서 2시간 동안 건조한 후 Pt coating을 하고 SEM(Joel JSM-6100) 촬영을 실시하였다. SEM 사진 촬영은 40, 1000 및 30000배로 실시하였다.

(3) 형광현미경을 이용한 미생물 관찰

폴리에틸렌 담체에 부착된 미생물에 대한 자세한 파악을 위해 SEM 사진을 촬영하여 관찰하였지만 다른 문헌에서 보고된 것과 같이 혐기성 미생물중 rod 형태의 메탄 생성균을 형태상으로 규명하기가 용이하지 않았다. 따라서 부착 미생물 중에서 메탄 생성균을 규명하기 위해 Cheeseman(1972) 등의 연구에서 보고된 바와 같이 메탄 생성균들이 파장 420 nm인 laser를 쬐이게 되면 auto-fluorescence를 나타내며 이러한 현상은 메탄 생성균만이 독특하게 가지는 cofactor F420에 의해 나타나는 현상으로 알려진 사실을 이용하여 형광 현미경에서 green filter를 이용하여 파장 480 nm인 argon laser를 쬐여 담체에 부착된 미생물 중 메탄 생성균과 부유 슬러지 중의 메탄 생성균을 관찰하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 광학 현미경을 이용한 관찰

Fig. 2에 부착 실험 전후에 촬영된 광학 현미경 사진을 나타내었다. Fig. 2(a)는 미생물이 부착되지 않은 폴리에틸렌 담체를 촬영한 사진이며 사포에 의해 형성된 거칠기가 나타나있다. 표면거칠기측정장치로 표면거칠

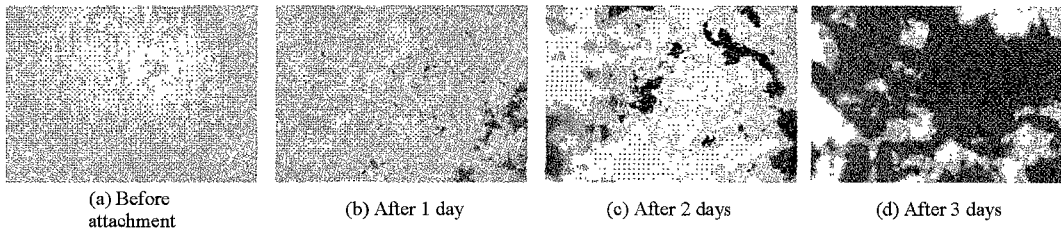


Fig. 2. Optical micrographs of attached microorganism on the surface of PE support media.

기를 측정 한 결과 $11.5 \mu\text{m}$ 의 거칠기를 나타내었으며, 이때의 접촉각은 930로 사포로 거칠게 하기 전의 담체의 접촉각인 860보다 증가하였다.

Fig. 2(b)는 부착 실험 1일 후의 사진이며 Fig. 2(a)에서 관찰된 거친 부분을 중심으로 미생물의 부착이 시작되고 있음을 관찰할 수 있었다. 이는 미생물-담체 표면 상호작용에 의해 부착되게 되는데, 이 때 거친 표면이 미생물이 접근하는데 유리하여 미생물이 거친 표면에 부착되는 것으로 사료되었다.

Fig. 2(c)는 부착 실험 2일 후의 담체 표면 사진이며 거칠기가 형성된 부분에 부착된 미생물을 중심으로 미생물의 부착이 진행됨을 관찰할 수 있었는데 이는 초기부착이 일어난 뒤 시간이 지남에 따라서 미생물 세포-담체 표면 부착보다는 부착된 세포-부착되지 않은 세포와의 상호작용을 선호하기 때문에 미부착 미생물이 담체표면에 부착되는 것보다 부착된 미생물에 많이 부착된다고 사료되었다.

부착 실험 3일 후의 담체 표면사진 Fig. 2(d)에서 관찰된 바와 같이 점차 미생물의 부착이 증가함을 관찰할 수 있었다.

혐기성 미생물의 고분자 담체 표면에서의 부착에 있어서 부착은 편평한 면보다는 거칠기가 주어진 부분에 우선적으로 일어나고 부착된 미생물의 표면으로부터 부착이 진행됨을 알 수 있었다. 미생물 부착에 의해 형성된 생물막이 담체의 많은 부분을 덮고 있는 것이 관찰되었다.

2. 미생물 부착

시간변화에 따른 미생물 부착량을 정량화하기 위하여 광학현미경으로 관찰한 미생물을 탈리시켜 Fig. 3에 시간변화에 따른 부착 미생물 농도를 표시하였다. Fig. 3에서 보듯이 시간에 따라 부착량이 매우 빠르게 증가하였다. 이는 Fig. 2에서 관찰한 결과와 일치하였다.

3. 미생물 부착의 모식화

Fig. 2의 광학현미경 사진에서 관찰되었듯이 담체의

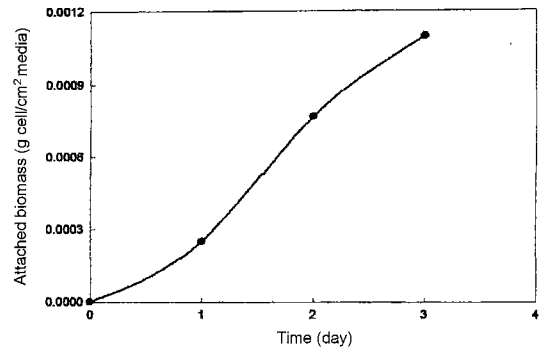


Fig. 3. Concentration change of attached biomass with time.

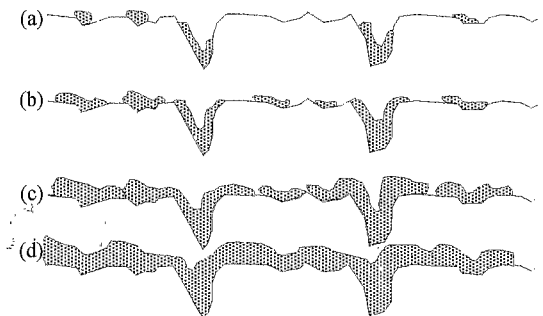


Fig. 4. Characteristic progression of biofilm accumulation with time (Shaded areas represent biofilm attachment on the PE support media).

틈에서 초기 미생물 부착이 일어나는 것이 관찰되었다. 고분자 담체에서 미생물이 부착되어 생물막이 형성되는 과정을 Fig. 4에 4단계로 도식화하였으며, Fig. 4(a)는 부착 1 단계, (b)는 부착 2단계, (c)는 부착 3단계, (d)는 부착완료 단계이다.

1단계(Fig. 4(a))에서 미생물은 초기에 액체의 전단력으로부터 보호받을 수 있는 틈이나 담체와 쉽게 접촉할 수 있는 표면에서 부착된다.

2단계(Fig. 4(b))에서 미생물은 1단계에서 부착되어 있는 미생물에 부착되고(i.e. cell-cell attachment) 담체표면

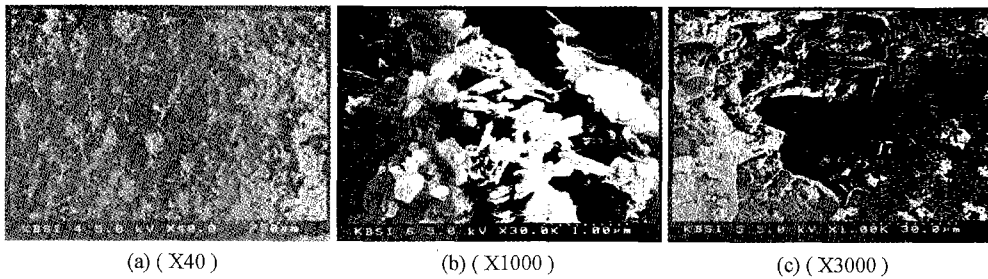


Fig. 5. SEM photographs of microorganism attached on the surface of PE support media.

에 부착된다(i.e. cell-support media surface attachment). 2단계 부착에서 담체 표면에 부착되는 생물막 두께가 불균일화되기 시작하는데, 이는 cell-cell attachment 부착이 cell-support media surface 부착량보다 많기 때문이다.

3단계에서는 더 많은 미생물이 담체와 미생물에 부착되고, 이웃생물막이 합쳐지는 현상이 발생한다. 또한 생물막 두께의 불균일성은 더 심화된다.

4단계에서는 생물막이 담체표면을 다 덮게되고 불균일한 생물막이 형성된다.

3. SEM을 이용한 부착 미생물의 관찰

Fig. 5에 폴리에틸렌 담체 표면에 부착된 미생물에 대한 SEM 사진을 나타내었다. Fig. 5(a)와 같이 40배로 촬영한 사진에서는 미생물이 담체 표면 전체에 부착되었으나 미생물의 형태 관찰이 용이하지 않아 Fig. 5(b)에 1000배, (c)에 3000배로 확대하여 촬영하였다.

SEM 사진 촬영 결과 세라믹 담체를 이용한 부착 실험에서 촬영한 SEM 사진에서 나타난 것과 유사한 Methanosarcina와 비슷한 형태인 구형의 미생물들은 조금씩 관찰되었으나 Meraz 등⁷⁾의 플라스틱 담체에 형성된 생물막 관찰 결과로 보고된 rod 모양의 Methanotrix나 Methanotrix-lile bacilli가 거의 발견되지 않았으며 Syutsubo 등⁸⁾이 UASB start-up시 형성된 granule에 대한 SEM 사진 촬영 결과에서 보고한 rod 형태의 Methanosaeta, Methanobacterium 등의 미생물도 발견할 수 없었다. 폴리에틸렌 담체를 이용한 미생물의 부착에 있어서는 SEM 사진을 통한 형태상의 미생물 관찰만으로는 부착된 미생물 종을 규명하는데는 어려움이 많은 것으로 판단되었다.

SEM 사진에 대한 육안 관찰로는 부착된 미생물에 대한 명확한 규명이 불가능하므로 부착된 각각의 미생물 종에 대한 규명은 힘들더라도 메탄 생성균의 부착 여부에 대한 규명은 형광 현미경 관찰을 통해 가능할

Table 1. Summary of previously reported data on the levels of F420 present in various mesophilic methanogenic bacteria and their potential specific methanogenic activities.

Bacterium	F420 content (μmol F420/g cell)	Specific Methanogenic Activity (μmol CH ₄ /g dry cell · min)	Potential Methanogenic Activity (μmol CH ₄ /μmol F420 · min)
Hydrogen-Utilizing Methanogens			
<i>Methanobacterium formicum</i>	1.2	350~550	290~460
<i>Methanobacterium bryantii</i>	1.4~2.4	300	125~214
<i>Methanobrevibacter ruminantium</i>	0.04	-	-
<i>Methanobrevibacter arboriphilus</i>	1.8	600	335
<i>Methanogenium marisnigri</i>	0.7	-	-
<i>Methanospirillum hungatei</i>	1.9	260	135
Formate-Utilizing Methanogen			
<i>Methanobacterium formicum</i>	3.0~3.6	8000~14000	40~80
Acetate-Utilizing Methanogens			
<i>Methanosarcina acetivorans</i>	0.027	200	7400
<i>Methanotrix soehngenii</i>	0.33	25	75

것으로 예측된다.

4. 형광 현미경을 이용한 미생물의 관찰

Table 1에 Dolfing 등⁹⁾의 논문에 보고된 문헌상으로 알려진 메탄 생성균들의 종류와 cofactor F420의 함량 및 메탄 생성 정도에 대해 나타내었다.

MLSS 17000 mg/l인 혐기성 슬러지를 슬라이드 글라스 위에 떨어뜨린 후 커버 글라스를 덮고 형광현미경 (Confocal)을 이용하여 배율 100배로 촬영한 후 화상 분석기(Image Scope 2.3 경일테크놀로지)를 이용하여 화상을 조정하였다.

Table 1에 나타난 바와 같이 혐기성 미생물 중 거의 모든 메탄 생성균들은 cofactor F420을 0.027~3.6 μmol F420/g cell 정도로 함유하고 있으므로 Cheeseman 등¹⁰⁾의 연구 결과와 같이 파장 420 nm인 UV laser에서 auto-fluorescence를 나타낸다고 볼 수 있다.

문헌상에 보고된 바에 의하면 파장 420 nm인 UV laser에 의해 cofactor F420이 auto-fluorescence를 나타낸다고 했지만 본 실험에 사용된 형광 현미경에 장착된 Green filter는 파장 420 nm로 고정된 값이 아니라 파장 480 nm인 argon laser를 이용하였다.

Fig. 6에 담체에 부착된 미생물에서 메탄형성균을 확인하기 전에 부착실험에 사용한 혐기성 미생물 중에서 메탄형성균의 존재를 확인하기 위하여 혐기성 부유 슬러지에 대해 형광 현미경으로 관찰한 사진을 나타내었다. Fig. 6(a)는 혐기성 배양기에서 채취하여 부착실험

에 사용한 슬러지를 광학 현미경에서 100배 촬영한 사진이고 (b)는 혐기성 부유 슬러지 시료의 같은 위치에 대해 green filter(480 nm)를 사용하여 100배 촬영한 사진인데 green filter 파장의 빛을 받게 되면 420 nm와 같이 480 nm에서도 auto-fluorescence에 의해 메탄 생성균들이 녹색으로 나타남을 관찰할 수 있었다. Fig. 6 (c)는 (a)와 (b)를 합성하여 촬영한 사진이며 녹색과 회색이 겹치는 부분은 혐기성 미생물 덩어리 중에서 메탄 생성균이 있는 부분을 나타낸다고 볼 수 있었다.

Fig. 7에 부착 실험 1일 후 담체에 부착된 혐기성 미생물에 대해 형광 현미경으로 관찰한 사진을 나타내었다. 부착 실험은 앞서 언급된 광학 현미경 관찰이나 SEM 촬영과 같은 방법 및 절차로 수행되었으며 증류수 10 ml에 미생물이 부착된 담체를 넣어 35°C에서 90분간 초음파 세척하고 다시 5분간 vortexing하여 부착된 미생물을 탈착시킨 후 슬라이드 글라스 위에 시료를 떨어뜨린 후 커버글라스를 덮고 형광 현미경으로 관찰하였다. Fig. 7(a)는 담체에 부착된 혐기성 미생물을 광학 현미경에서 100배 촬영한 사진이고 (b)는 담체에 부착된 혐기성 미생물 시료의 같은 위치에 대해 green filter(480 nm)를 사용하여 100배 촬영한 사진인데 green filter 파장의 빛이 조사되면 auto-fluorescence에 의해 메탄 생성균들이 녹색으로 나타남을 관찰할 수 있었다. Fig. 7(c)는 (a)와 (b)를 합성하여 촬영한 사진이며 녹색과 회색이 겹치는 부분은 혐기성 미생물 덩어리 중에서 메탄 생성균이 있는 부분을 나타낸다고 볼

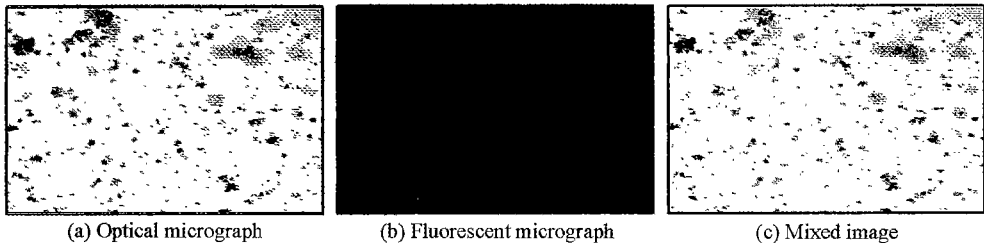


Fig. 6. Optical and fluorescent micrographs of suspended anaerobic sludge.

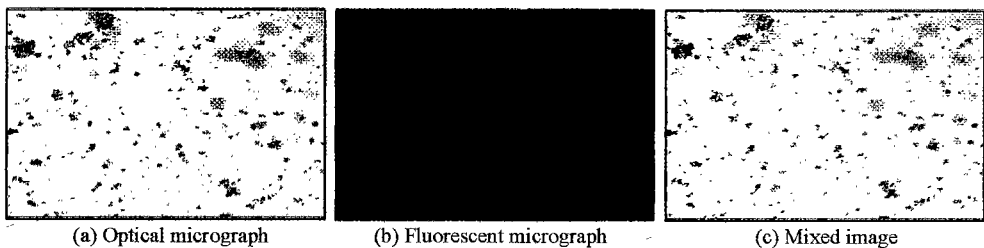


Fig. 7. Optical and fluorescent micrographs of anaerobic bacteria attached on PE support media.

수 있었다.

Fig. 6과 Fig. 7에서 나타난 바와 같이 형광 현미경 관찰에 의해 혐기성 부유 슬러지와 부착된 혐기성 미생물 중에 메탄 생성균들의 존재를 관찰할 수 있었으며 Fig. 2에서 관찰된 바와 같이 부착실험 1일째는 PE담체에 부착되는 전체 미생물 양이 적기 때문에 다른 미생물들이 부착된 뒤에 메탄형성 박테리아가 부착된다고는 볼 수 없었다. 메탄형성 박테리아는 부착력이 약하므로 초기부착과는 큰 관계가 없고 다른 미생물이 부착되고 난 뒤에 부착된다고 보고한 Verrier¹¹⁾의 연구결과와는 다르게 메탄 생성균들도 미생물의 초기 부착에 관여한다는 것을 확인할 수 있었고 혐기성 미생물 중의 메탄 생성균들의 함량을 정량화 할 수 있는 방법을 모색할 수 있는 기초가 될 것으로 판단되었다.

IV. 결 론

PE 담체를 사용하여 혐기성 조건에서 담체에 부착되는 미생물을 관찰하여 다음의 결론을 얻었다.

1. 미생물은 초기 부착시 담체표면의 거친부분을 중심으로 부착되고, 생물막이 형성되는 단계는 4단계로 모식화되었다.

1 단계 : 미생물의 전단력을 피할 수 있는 담체 표면의 틈이나 담체와 접촉하기 쉬운 면에 부착하는 단계,

2 단계 : 미생물-담체에 부착된 미생물과 미생물-담체 부착단계(생물막의 불균일성 시작), 3 단계 : 부유 미생물이 담체표면에 부착된 미생물과 담체 표면에 부착되고 인접한 생물막이 합쳐진다. 4 단계 : 부착 완료단계 - 완전한 생물막(불균일한 형태)이 형성된다.

2. 부착된 미생물을 SEM으로 관찰한 결과 구형의 미생물이 관찰되었으나 미생물 중 규명과 미생물 초기부착시 메탄형성 미생물의 부착여부를 확인할 수 없었다.

3. 형광현미경으로 480 nm의 argon laser를 이용하여 관찰한 결과 담체 표면에 부착된 미생물 중에 메탄생성균의 존재를 확인하여 메탄생성균이 초기부착에 관여한다는 것을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 학술진흥재단의 대학부설연구소 과제에 지원금에 의한 것으로 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 1) Marshall, K. C.: Biofilms- An Overview of Bacterial Adhesion, Activity, and Control at Surfaces, *ASM News*, **58**(4), 202-207, 1992.
- 2) Flemming, H. C.: Biofilms and Environmental Protection, *Wat. Sci. Tech.*, **27**(7/8), 1-10, 1993.
- 3) Tay, J. H. and Yan, Y. G.: Influence of Substrate Concentration on Microbial Selection and Granulation during Start-up of Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactors, *Water Environment Research*, **68**(7), 1140-1148, 1996.
- 4) Murray, W. D., and Van den Berg.: Effect of Support Materials on the Development of Microbial Fixed Films converting Acetic Acid to Methane, *J. Appl. Bacteriol.* **51**, 305-308, 1981.
- 5) Costerton, J. W., Irving, R. T., and Cheng, K. J.: Bacterial Surface Structures in Pathogenesis, *Brit. Rev. Microbiol.*, 303-338, 1981.
- 6) Kenji Kida: Support Media for Microbial Adhesion in an Anaerobic Fluidized-bed Reactor, *J. Fermentation and Bioengineering*, **69**(6), 354-359, 1990.
- 7) Meraz, M., Monroy, O., Noyola, A., and Ilangoan, K.: Studies on the Dynamics of Immobilization of Anaerobic Bacteria on a Plastic Support, *Wat. Sci. Tech.*, **32**(8), 243-250, 1995.
- 8) Syutsubo, K., Harada, H., Ohashi, A., and Suzuki, H.: An Effective Start-up of Thermophilic UASB Reactor by Seeding Mesophilically-grown Granular Sludge, *Wat. Sci. Tech.*, **36**(6/7), 391-398, 1997.
- 9) Dolfig J., and Mulder, J. W.: Comparison of Methane Production Rate and Coenzyme F200 Content of Methanogenic Consortia in Anaerobic Granular Sludge, *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**(5), 1142-1145, 1985.
- 10) Cheeseman, P., A. Toms-Wood, and R. S. Wolfe: Isolation and Properties of a Fluorescent Compound, Factor 420, from Methanobacterium Strain M.O.H., *J. Bacteriol.*, **112**, 2451-2476, 1972.
- 11) Verrier, D., Mortier, B., and Albagnac, G.: Initial Adhesion of Methanogenic Bacteria to Polymer, *Biotech. Letters*, **9**(10), 735-740, 1987.