

## 광합성세균에 의한 미생물막의 형성

오광근\* · 이철우 · 전영중 · 이재홍  
제일제당(주) 종합연구소

**Formation of Microbial Films with Phototrophs in a Packed-Bed Reactor. Kwang-Keun Oh\*, Cheol-Woo Lee, Yeong-Joong Jeon and Jae-Heung Lee.** R & D Center, CHEILJEDANG Corporation, Ichon 467-810, Korea - The formation of microbial films(biofilm) by a non-sulfur phototrophic bacteria, *Rhodospseudomonas capsulata*, on inorganic media was studied. Porous ceramic beads(PCB) were superior to other immobilizing media for the biofilm formation in a packed-bed reactor. It was found that the formation of microbial films favored a lower hydraulic retention time, showing a higher ratio of cells attached to the media to those suspended in the solution. The cell concentration in the biofilm reactor was as high as 11,400 mg/l, which is 8-folds of the cell concentration in an ordinary suspended treatment. It was observed that the formation of microbial film by *R. capsulata* followed a general serial process of cell attachment, microcolony formation, and biofilm formation. The microbial films thus formed was very stable even for an extremely high volumetric BOD loading rate of 15 gBOD/l·day. The scanning electron micrographs of the microbial films showed that the cells were attached to both the surface and pores of the media.

광합성세균(phototrophs)은 다른 미생물과는 달리 증식특성이 매우 다양하여 호기적 암조건(aerobic dark), 혐기적 명조건(anaerobic light), 미호기적 조건(micro-aerobic) 등 여러 조건에서 유기물을 이용, 증식이 가능하므로 양식 및 축산사료의 첨가제, 유기질 비료의 기능개선제, 수소생산 및 폐수처리 등에 광범위하게 이용되고 있으며(1-3), 폐수처리에 이용할 경우 고농도폐수 및 유해물질의 처리가 가능하다는 장점을 갖고 있다(4). 광합성세균을 이용한 종래의 폐수처리 방법에서는, 광합성세균의 성장속도가 느리고 균체농도가 낮아 필요량을 얻는데 장시간이 걸리므로 계속적으로 광합성세균의 투입이 필요하였으며, 이를 위해 폐수처리 시설과 함께 종균배양조가 필요하였다. 광합성세균을 효율적으로 이용하기 위하여 광합성세균을 흡착제로 처리하여 생균을 함유한 상태로 흡착시키는 방법이나 광투과성이 있는 재질을 폐수처리수조내에 설치하여 광투과성 용기표면상에 광합성세균 및 호기성세균을 부착증식시켜 미생물막(microbial films, biofilms)을 형성하는 방법 등이 제시되었으며, 광합성세균의 미생물막을 수소생산에 이용한 보고가 있다(5). 그러나 광합성세균을 고농도로 유지하는 방법이나 미생물막의 형성특성에 관하여는 충분한 연구가 되어있지 않다.

본 연구는 광합성세균을 이용한 폐수처리의 효율을 높이는 방법으로서 흡착이 용이한 담채표면에 광합성세균의 미생물막을 형성하는 방법 및 특성에 관하여 고찰한 것이다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배양

본 연구에 사용한 균주는 토양으로부터 분리한 것으로 *Rhodospseudomonas capsulata* ATCC 11166으로 확인된 공지의 균주(6)이다. 초산나트륨 3 g, 황산암모늄 0.3 g, 인산제2수소칼륨 0.5 g, 황산마그네슘 0.2 g, 염화나트륨 0.1 g, 염화철6수화물 5 mg, 염화칼슘2수화물 50 mg, 효모추출물 10 mg을 물 1 l에 가하여 만든 배지(기본배지, pH 7.3) 100 ml가 함유된 500 ml 플라스크에 *R. capsulata*를 접종하여 표면조도 3,000 Lux의 빛을 쬐어주면서 혐기조건하에서 온도 28°C로 3일간 배양후, 본배양을 위하여 기본배지 2 l를 함유한 광합성세균 배양기에 5%의 *R. capsulata*를 접종하고 표면조도 3,000 Lux의 빛을 쬐어주고 혐기조건하에서 pH 7.5, 온도 28~32°C로 조정하면서 3~5일간 배양하였다.

### 폐수의 조성 및 특성

본 연구에서는 합성폐수와 실제 산업폐수인 G폐수를 사용하였다. 합성폐수 I은 포도당 3 g, 황산암모늄 1.5 g, 인산제2수소칼륨 0.5 g, 황산마그네슘 0.2 g, 염화나트륨 0.1 g, 염화철6수화물 5 mg, 염화칼슘2수화물 50 mg, 효모추출물 10 mg을 물 1 l에 가하여 만든 COD<sub>Cr</sub>농도 3,000 mg/l인 폐수(pH 7.0)이며, 합성폐수 II는 포도당 20 g, 황산암모늄 10 g, 인산제2수소칼륨 0.5 g, 황산마그네슘 0.2 g, 염화나트륨 0.1 g, 염화철6수화물 5 mg, 염화칼슘2수화물 50 mg, 효모추출물 10 mg을 물 1 l에 가하여 만든 COD<sub>Cr</sub>농도 20,000 mg/l인 폐수(pH 7.0)이다. G폐수는 음료공장에서 발생하는 고농도폐수(BOD

\*Corresponding author.

Key words: *Rhodospseudomonas capsulata*, phototrophs, microbial films, porous ceramic beads

35,000 mg/l)로서 필요에 따라 5,000~10,000 mg/l(pH 7.0으로 조정)로 희석하여 사용하였다.

### 담체

본 연구에서 검토한 담체는 무기담체 중 활성탄과 세라믹이었다. 활성탄은 Norit사의 과립형(RB-4)과 무정형(PK 3-5)을 사용하였고, 세라믹은 바인더, 유리분말, 발포제를 혼합, 혼연, 성형한 후 소결, 용출시켜 제조한 것인 porous ceramic bead(PCB, WG-1, 쌍용양회)를 사용하였으며 각각의 특성비교를 Table 1에 나타내었다.

### 미생물막의 형성

원통형 컬럼(60(φ)×400(H)mm, vol=1130 ml)에 각각 PCB와 RB-4, PK 3-5를 충전하고 자체순환(linear velocity 0.15 m/hr, 순환조에서 1,500 Lux의 빛을 조사)할 수 있도록 완전혼합형의 충전형반응기(packed-bed reactor, PBR)를 준비하였다(7). 위의 광합성세균 배양액과 합성폐수 I을 1:1로 혼합하여 체류시간(hydraulic retention time, HRT)이 1일 되게하여 PBR에 상향류식으로 1일간 연속유입한 후, 다음 2~3일간은 합성폐수 I만을 유입시켰다. 같은 조건으로 다음 30일간은 합성폐수 II를 유입시켜서 광합성세균의 미생물막을 형성시켰다. 그리고 G폐수를 5,000~10,000 mg/l로 희석하여 동일한 조건으로 10~20일간 유입시키며 미생물막의 성장 및 폐수적응을 진행하였다.

### 분석

시료를 분석하기 위하여, 생화학적 산소요구량(biochemical oxygen demand, BOD)과 화학적 산소요구량(chemical oxygen demand, COD<sub>Cr</sub>) 등은 Standard Methods(8)을 기준으로 행하였고, 반응기내의 균체량(biomass)의 농도는 반응기 중간지점에서 시료(폐수+부유균체+미생물막담체)를 채취하여 0.1% NaOH 용액을 일정량 섞은 후 교반기로 맹렬교반하여 담체와 균체를 완전분리시킨 다음 Standard Methods(9)에 의해 측정하였다. 이때 측정된 값에 NaOH용액 희석배율을 곱하여 균체농도로 결정하였다. 측정후 담체는 105°C에서

건조시켜 무게를 측정하여 반응기 단위부피당 입자의 양을 파악한 후 폐기시켰고 폐기시킨 담체량만큼 새로운 담체를 반응기에 충전시켜 반응기내의 담체량을 일정하게 유지시켰다. 담체에 부착한 미생물의 양은 일정량의 담체를 반응기에서 취하여 증류수로 2~3회 세척하고 동결건조하여 무게(Ⓐ)를 측정한 후 그 담체를 다시 500~550°C로 30분간 열처리하고 무게(Ⓑ)를 측정하여 그 무게의 차이(Ⓐ-Ⓑ)를 계산하고 담체량을 환산하여 정하였다.

## 결과 및 고찰

### 광합성세균의 배양

배양은 일반적인 보통의 방법으로 실시하였으며 분리한 광합성세균을 기본배지에서 배양하여 얻은 cell농도는 1.5~2.0 g/l이었고, 혐기적 명조조건과 호기적 암조조건에서 성장이 거의 비슷하였다. 기본배지의 각 성분이 광합성세균의 성장에 미치는 영향을 조사한 결과 *R. capsulata*의 성장은 질소원이나 미량원소에 의해서는 별로 영향을 받지 않았으며, 탄소원이 중요한 제한인자로 작용하는 것을 알 수 있었다. 탄소원으로 당류, 유기산류 및 지방산을 잘 이용하여 증식할 수 있으며 본 연구에서는 초산나트륨을 사용하여 농도에 따른 성장에의 영향을 보았고, 이를 기초로 하여 배양에 따라 초산나트륨의 농도를 단계별로 증가시키는 유가식배양에 의해 cell농도를 크게 높일 수 있었다. Table 2에 나타낸 것과 같이 유가식배양에 의해 초산나트륨을 0.3%, 3% 첨가하였을 경우 기본배지에서보다 cell농도를 20배정도 증가시킬 수 있었다.

### 미생물막의 형성

PCB가 충전된 PBR에 광합성세균의 미생물막을 형성시켜 합성폐수 II를 유입시켰을 경우 유출수의 COD는 300~500 mg/l로 유지되었으며 반응기내의 균체량은 11,400 mg/l, 담체상의 균체량은 17.1 g/m<sup>2</sup>이었고, 형성된 미생물막의 표면적은 667 m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup>, 단위면적당 유기물부하는 9.0 gCOD/m<sup>2</sup>·day이었다. 위의 실험과 동일한 조건으로 반응기에 담체를 넣지 않고 현탁배양에 의한 처리를 하여 광합성세균의 농도 및 유출수의

Table 1. Characteristics of immobilization media.

| Characteristics              | Porous ceramic bead | Activated carbon |           |
|------------------------------|---------------------|------------------|-----------|
|                              |                     | RB-4             | PK 3-5    |
| Type                         | Spherical           | Granular         | Amorphous |
| Size (mm)                    | 7~8                 | 3(φ)×7~10(H)     | 2.8×4.0   |
| Micropore (μm)               | 0.1~100             | ~1 mm: 40%       | -         |
| (Average)                    | (14~19)             | (0.05)           | -         |
| Porosity (%)                 | 73~78               | 35~40            | 28~32     |
| Density (g/cm <sup>3</sup> ) | 0.33~0.37           | 0.45             | 0.25      |

Table 2. Effect of culture media on the growth of *R. capsulata*.

|                               | Basal medium | +0.3% Na-acetate | +3% Na-acetate |
|-------------------------------|--------------|------------------|----------------|
| X <sub>max</sub> (g/l)        | 1.5~2        | 8~10             | 30~40          |
| Increment fold                | 1            | 5                | 20             |
| T <sub>min</sub> (hr)         | 60           | 72               | 118            |
| Y <sub>time</sub> (g cell/hr) | 0.03         | 0.14             | 0.31           |

X<sub>max</sub>: maximum cell mass concentration; T<sub>min</sub>: time required for X<sub>max</sub>; Y<sub>time</sub>: growth rate

COD 농도 등을 비교한 결과, 반응기내 균체농도는 1,500~1,900 mg/l로 미생물막의 결과와 비교하여 약 1/8정도 되었고 유출수의 COD는 5,000~8,000 mg/l로 10배 정도 높은 값을 나타내었다.

따라서 광합성세균의 미생물막을 형성함으로써 기존의 현탁배양에 의한 처리에서보다 반응기의 균체농도는 8배 증가되었고 유출수의 COD농도는 1/10이상 저하되었다.

**담체별 미생물막형성 비교**

Atkinson 등(10)은 담체는 미생물이 잘 부착할 수 있는 표면(거칠기)과 높은 공극률을 가져야 하며 생분해가 되지 않으면서 어느정도의 강도나 내구성이 있어야 하므로 모래, 활성탄, 무연탄, 다공성 유리입자, 폴리우레탄 등이 좋은 담체라고 하였다. 담체특성에 따라서 미생물의 부착성능과 반응기의 운전형태가 달라질 수 있으므로 담체의 선정은 미생물막 반응기에 있어서 중요한 인자라 할 수 있다. 본 연구에서는 활성탄과 다공성 유리입자를 사용하였으며 종류별로 PCB, RB-4 및 PK 3-5를 각각 충전시킨 PBR(60(Φ)×400(H)mm, vol=1130 ml)를 준비하여 미생물막을 형성시킨 후, HRT를 1일로 하여 30일간 합성폐수 II를 유입시키며 각 담체에 대한 광합성세균의 미생물막 형성특성을 비

교하였다. 그 결과는 Table 3과 같으며 PCB를 사용한 경우가 RB-4 또는 PK 3-5를 사용한 경우보다 양호하게 미생물막을 형성하는 것을 알 수 있었다. 이는 재질특성뿐 아니라 Table 2에서 보듯이 PCB가 RB-4나 PK 3-5보다 더 다공성(75%정도)이며 세공의 크기가 크기 때문인 것으로 판단된다.

**HRT별 미생물막형성 비교**

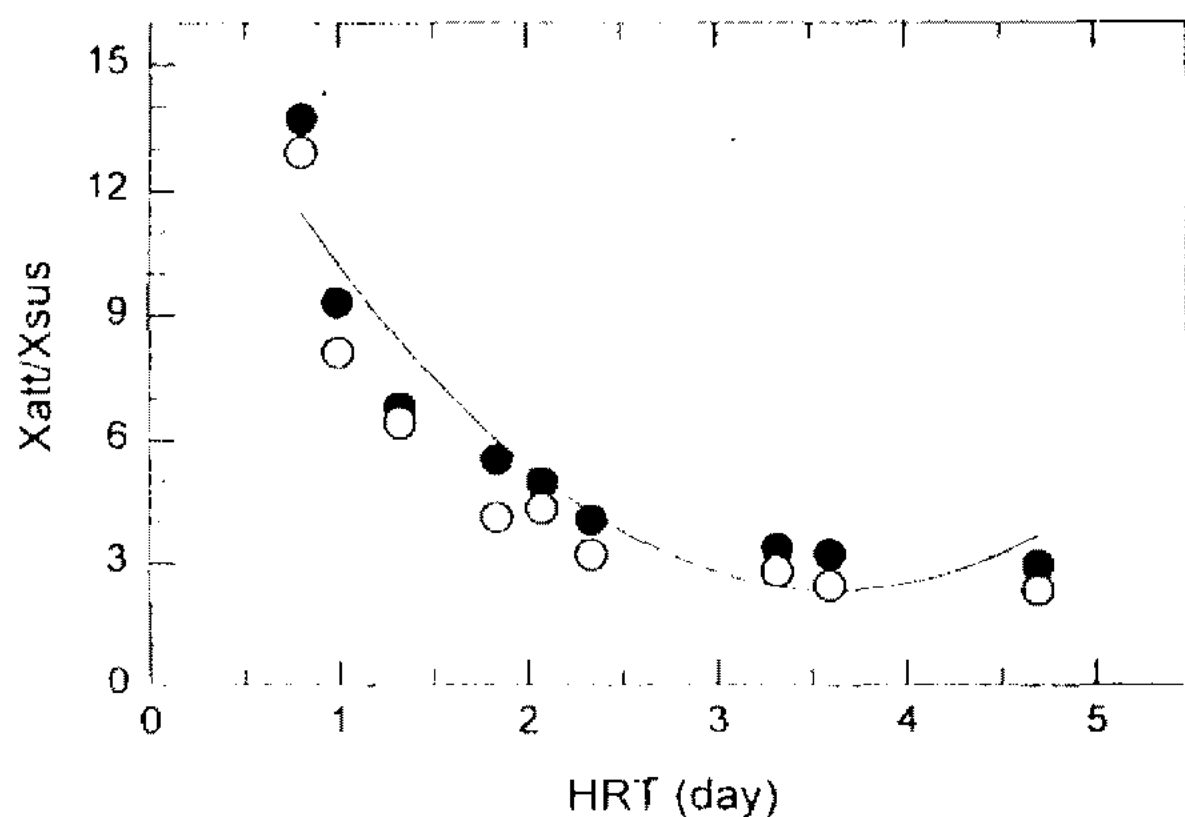
미생물막 담체로 PCB를 충전시킨 동일한 PBR을 여러 개 준비하고 각 반응기별로 HRT를 0.5~5일로 달리하여 30~50일간 합성폐수 II를 연속적으로 유입시키면서 HRT에 따른 미생물막의 형성을 비교하였다. Fig. 1에 나타낸 것과 같이, 유입농도가 COD 10,000 mg/l인 경우와 20,000 mg/l인 경우는 서로 유사하게 미생물막을 형성하였으며 일정한 유입농도하에서 HRT가 짧아질수록 미생물막형성이 양호하였다. HRT를 2일이하로 유지할 경우에 미생물막이 잘 형성되었으며 HRT가 길어질수록 미생물막형성이 감소하였는데 HRT 3.5일 이상이 되면 HRT가 0.5~1일인 경우보다 미생물막의 형성이 1/5정도로 감소되었다. 이러한 현상은 반응기내 현탁액 중에 유기물이 충분하여 현탁미생물의 농도가 높아지고 아울러 미생물의 부착능력이 저하되기 때문일 것이다.

**Table 3. Effect of beads on the formation of microbial films. (HRT=1 day)**

|  | PCB   | PK 3-5 | RB-4 |
|--|-------|--------|------|
| Biomass in reactor (mg/l)                        | 11400 | 6100   | 3700 |
| Biomass on bead (g/m <sup>2</sup> )              | 17.1  | 9.5    | 6.7  |
| Biofilm area (m <sup>2</sup> /m <sup>3</sup> )   | 667   | 642    | 552  |
| Feed per biofilm area (gCOD/m <sup>2</sup> ·day) | 9.0   | 9.3    | 10.9 |

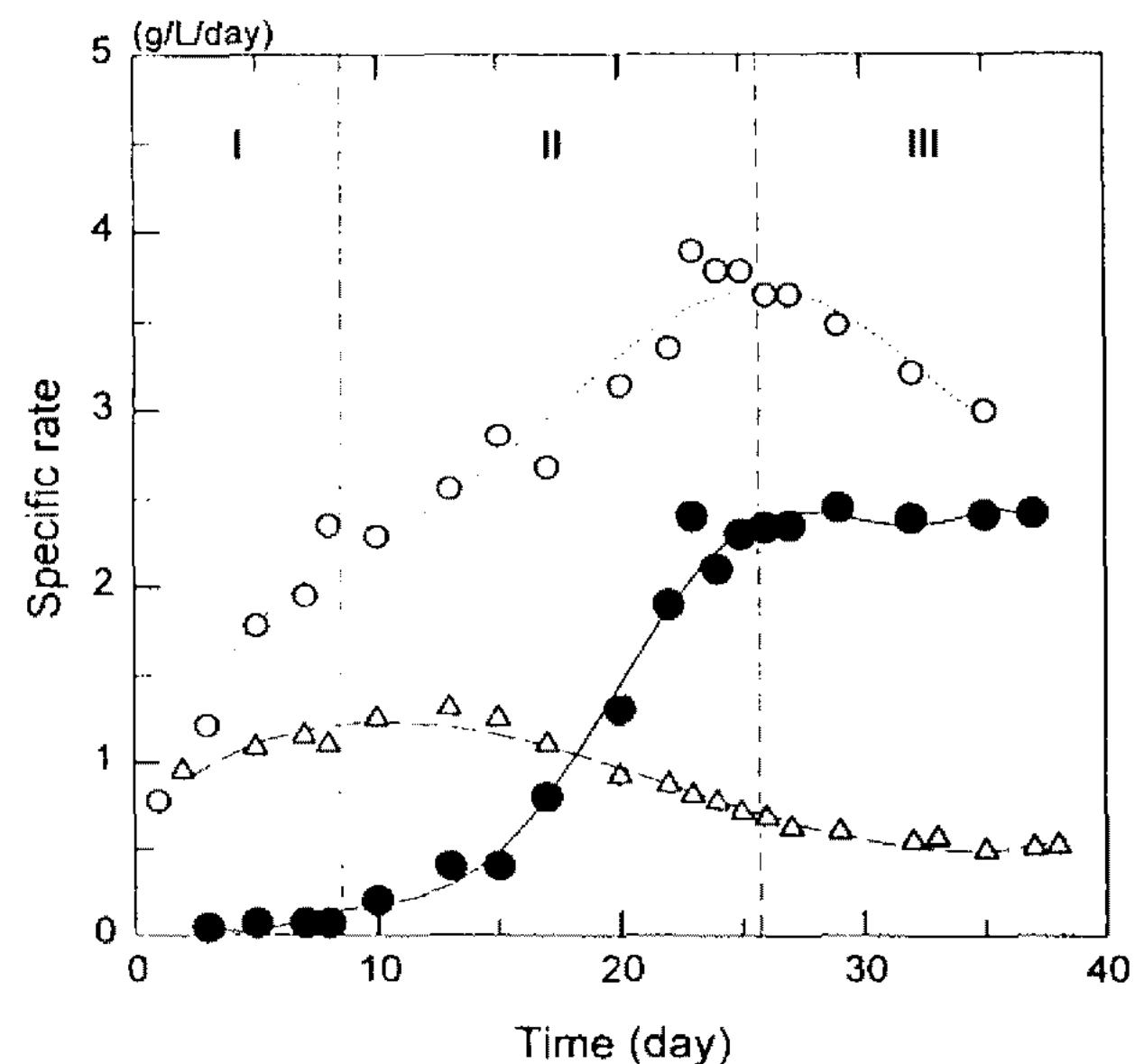
**미생물막 형성단계**

미생물과 담체간의 결합에 의하여 담체표면에 균체가 부착되어 만들어지는 미생물막의 형성과 증식은 담체표면으로 미생물 이동, 담체표면에 미생물 흡착, 미생물막내에서 증식과 그 외의 대사과정 진행, 미생물막의



**Fig. 1. Influence of HRT on the formation of microbial films.**

X<sub>att</sub> and X<sub>sus</sub> were indicated the amount of cells on the microbial film and suspended cells, respectively.  
●: influent COD=10,000 mg/l; ○: influent COD=20,000 mg/l



**Fig. 2. The relationship of microbial film development and cell growth in a packed-bed reactor.**

○: cell growth rate; ●: biofilm growth rate; △: waste cell forming rate.

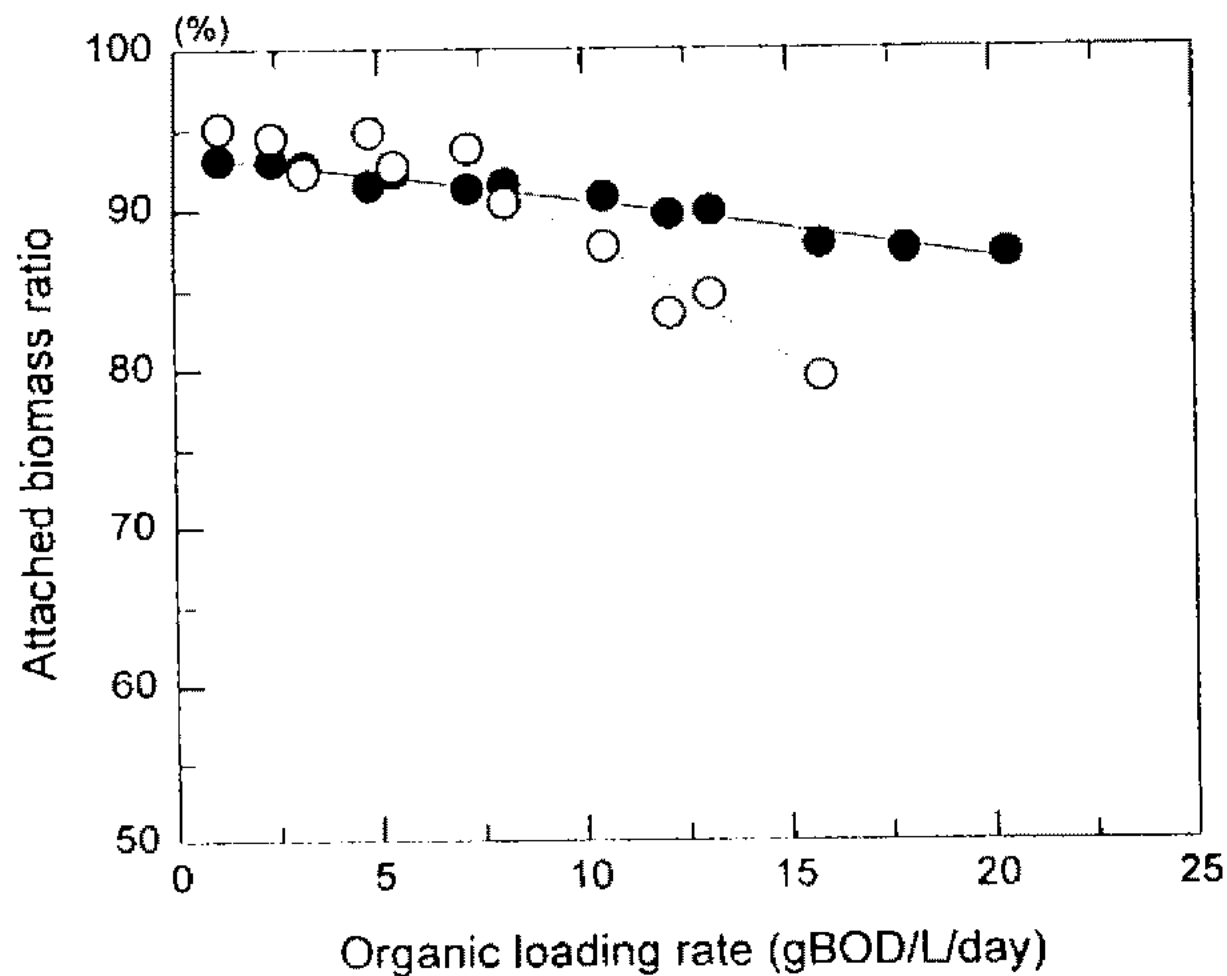


Fig. 3. The effect of organic loading rate on the stability of the microbial films in two types of reactors. HRT=1 day; ●: PBR; ○: FBR

일부분 탈락과 같은 공정의 조합으로 이루어지는 것으로 보고되어 있다(11).

실제로 광합성세균의 미생물막을 형성하는 동안 반응기내의 biofilm, cell mass, waste cell의 specific forming rate 변화를 관찰한 결과 Fig. 2에서와 같이 크게 세단계로 구분할 수 있었다. 제1단계로 반응기내 cell mass의 growth rate는 증가되고 biofilm growth rate는 없는 부착단계(cell attachment)가 있었고, 제2단계는 cell mass 및 biofilm의 growth rate는 증가되는 반면 waste cell의 growth rate는 감소되는 단계로서 microcolony formation 단계가 있었다. 마지막으로 cell growth rate는 감소되어 어느 정도 선에서 유지되고 biofilm growth는 일정한 수준을 유지하는 단계로서 미생물막형성의 정상상태라 볼 수 있는 단계가 있었다(biofilm formation 단계).

#### 미생물막의 유기물부하에 대한 안정성

PCB를 충전하여 형성된 미생물막에 대하여 PBR에서의 안정성을 실험하기 위해서 HRT를 1일로 고정하고 유입농도를 높이며 유기물부하에 대한 미생물막부착률을 보았다. 결과는 Fig. 3과 같으며, 정상상태에 도달한 미생물막에서의 미생물부착비율을 100%라 했을 때 유기물부하가 증가함에 따라 미생물막에 부착되었던 광합성세균은 서서히 탈리하게 되지만 BOD용적부하가 15 gBOD/l·day 정도까지는 미생물막의 부착비율이 90% 이상을 유지하였다.

이에 대한 비교목적으로 미생물막이 형성된 담체를 유동시키면서 유동상반응기(fluidized-bed reactor, FBR)를 사용하여 유기물부하를 증가시키며 미생물막의 부착률을 살펴본 결과, BOD용적부하 7 gBOD/l·day 이하에서는 PBR에서보다 더 높은 부착률을 나타내었으나 10 gBOD/l·day 정도에서 미생물막의 탈리가 급격하게

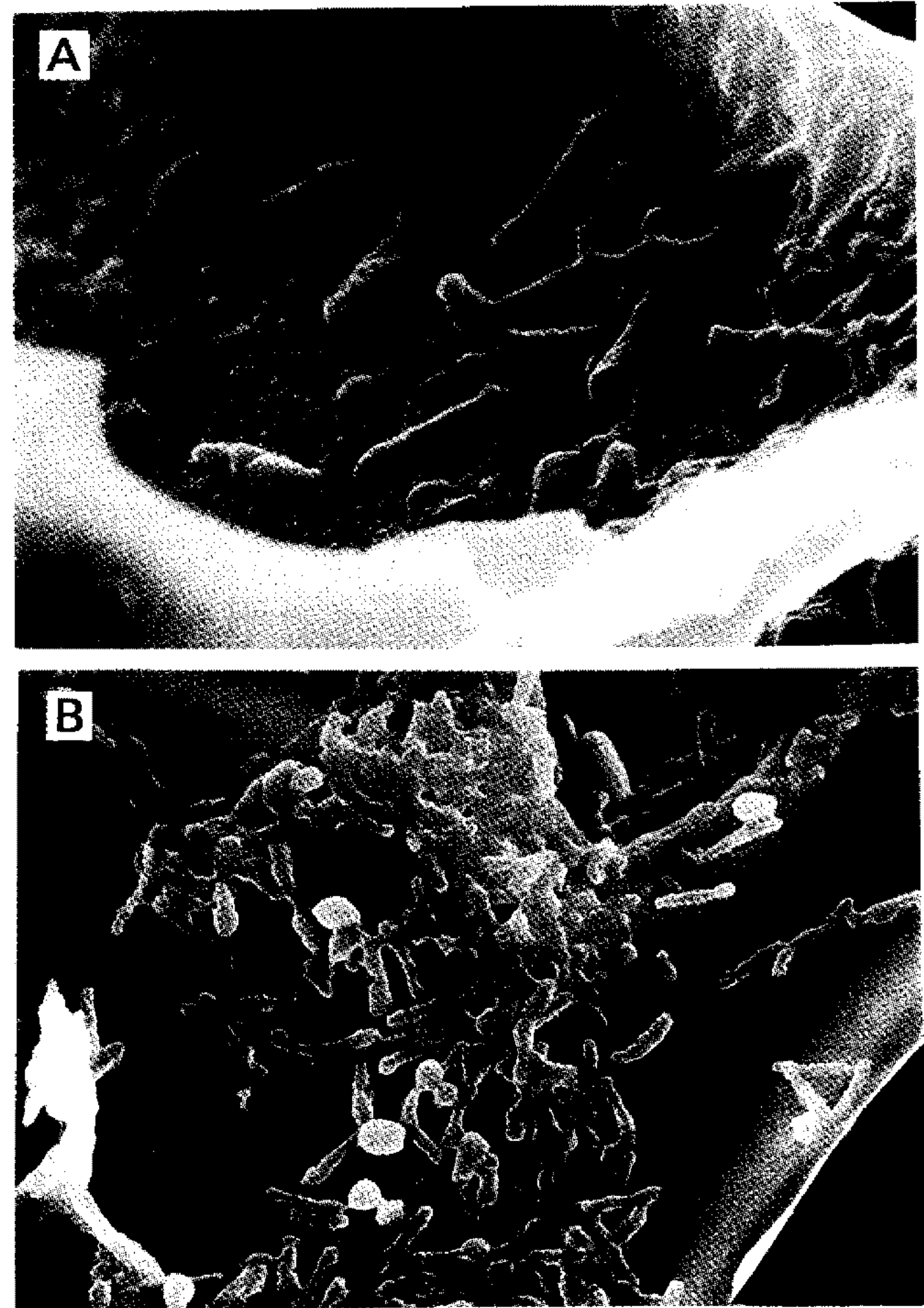


Fig. 4. Scanning electron micrographs of microbial films. A: SEM photograph of phototrophs immobilized in a surface of PCB; B: SEM photograph of phototrophs immobilized in an inner pore of PCB.

발생하였다. 이의 결과에서 보면 광합성세균의 미생물막은 7 gBOD/l·day 이하의 유기물부하에서는 PBR보다 FBR이 비교적 부착률이 높으며 다소 안정적이지만, 그 이상의 부하에서는 PBR에서 미생물막 탈리가 FBR에 비하여 서서히 일어나고, 또 BOD용적부하 15 gBOD/l·day에서도 90%의 부착률을 가짐을 알 수 있다. 따라서 부하가 높은 고농도의 유기물이 유입되어도 PBR의 미생물막은 안정성이 유지되며 고부하의 처리능력이 있을 것으로 판단되었다.

#### 미생물막의 전자현미경 관찰

Fig. 4는 PCB에 형성된 미생물막을 전자현미경으로 찍은 사진이다. 이것을 보면 광합성세균이 담체의 표면 뿐 아니라 내부의 공극에도 부착되어 고정화되었음을 알 수 있으며 기본배지에서 액체배양을 하였을 때의 균체형태와 동일하였다. 한편 담체내부로의 물질전달에 의해 유기물질이 공급되므로 담체내부에서 광합성세균이 계속적으로 증식하는 것을 관찰할 수 있었다.



## 요 약

홍색비유황 광합성세균인 *Rhodospseudomonas capsulata*를 선택하여 packed-bed reactor에서 미생물막을 형성할 때, porous ceramic bead가 다른 담체에 비해 우수하였고, 일정한 유입농도하에서 체류시간(hydraulic retention time, HRT)이 짧을수록 미생물막 형성이 양호하였으며, 그때 반응기내의 세포농도는 11,400 mg/l로 현탁처리시의 세포농도에 비하여 3~8배 증가하였다. PBR에서 미생물막의 형성은 cell attachment, microcolony formation, biofilm formation의 단계를 거쳐 형성되는 것으로 관찰되었으며, PBR이 FBR보다 안정적인 미생물 부착을 보였고 특히 PBR에서는 BOD용적 부하가 15 gBOD/l·day 이상이 되어도 미생물막의 부착비율은 90% 이상을 유지하였다. 전자현미경으로 담체의 표면 및 내부에 고정화된 광합성세균을 확인할 수 있었다.

## 참고문헌

1. Kobayashi, M. and M. Z. Haque. 1971. Contribution to nitrogen fixation and soil fertility by photosynthetic bacteria. *Plant. Soil. Special Vol.*: 443-456.
2. Kobayashi, M. and Y. T. Tchan. 1973. Treatment of industrial waste solutions and production of useful by-products using a photosynthetic bacterial methods. *Wat. Res.* 7: 1219-1224.
3. Kobayashi, M., N. Shiomi and A. Okuda. 1966. Studies on utilization of photosynthetic bacteria(1). *J. Sci. Soil Manure, Tokyo* 37: 305-310.
4. Sasaki, K., M. E. Hurtado, Y. Nishizawa and S. Nagai. 1985. Aerobic-heterotrophic and photoheterotrophic growth in microaerobic-light chemostat cultures of *Rhodospseudomonas sphaeroides* S. *J. Ferment. Technol.* 63: 377-381.
5. Vincenzini, M., W. Balloni, D. Mannelli and G. Florenzano. 1981. A bioreactor for continuous treatment of waste waters with immobilized cells of photosynthetic bacteria. *Experientia.* 37: 710-712.
6. van Niel, C. B. 1931. On the morphology and physiology of the purple and green sulphur bacteria. *Arch. Mikrobiol.* 3: 1-112.
7. Rittmann, B. E., L. Crawford, C. K. Tuck and E. Nankung. 1986. In situ determination of kinetic parameters for biofilms: isolations and characterization of oligotrophic biofilms. *Biotechnol. Bioeng.* 28: 1753-1760.
8. Greenberg, A. E., R. R. Trussell and L. S. Clesceri. 1989. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, p. 503-538. 17th ed. APHA, AWWA, WPCF, Washington D.C.
9. Greenberg, A. E., R. R. Trussell and L. S. Clesceri. 1989. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, p. 92-100. 17th ed. APHA, AWWA, WPCF, Washington D.C.
10. Atkinson, B., G. M. Black, P. J. S. Lewis and A. Pinches. 1979. Biological particles of given size, shape and density for use in biological reactors. *Biotechnol. Bioeng.* 21: 193-200.
11. Characklis, W. G. and K. C. Marshall. 1990. *Biofilms*, p. 73-86. John Wiley & Sons, New York.

(Received 1 September 1996)