



미세플라스틱 표면에 형성된 담수 유래 생물막 군집 고찰

Investigation of microplastic biofilm communities originated from freshwater

최우단^{1,2}·히엔 티 뉴엔^{1,2}·김은주^{1,2}·조경진^{1,2*}
Woodan Choi^{1,2}·Hien Thi Nguyen^{1,2}·Eun-Ju Kim^{1,2}·Kyungjin Cho^{1,2*}

¹한국과학기술연구원 물자원순환연구단, ²과학기술연합대학원대학교 한국과학기술연구원 스쿨 에너지-환경 융합 전공
¹Center for Water Cycle Research, Korea Institute of Science and Technology
²Division of Energy and Environment Technology, KIST school, Korea University of Science and Technology (UST)

pp. 059-079

pp. 081-095

pp. 097-106

pp. 107-119

pp. 121-134

ABSTRACT

Recently microplastic (MP) biofilm is being attracted as an important environmental issue because it can act as a pollutant carrier in aqueous system. Therefore, this study investigated the MP biofilm communities originated from freshwater. The results showed the bacterial community structure of MP biofilm was distinctively different from the freshwater regardless of biofilm-forming condition and MP type. For MP biofilm communities exposed to raw freshwater, *Solimonas variicoloris*-like microbe, *Frigidibacter albus*-like microbe, *Nitrospirillum amazonense*-like microbe, and *Pseudochroococcus couteii*-like microbe became abundant, while *Acinetobacter johnsonii*, *Macellibacteroides fermentans*, and *Sedimentibacter acidaminivorans*-like microbe were found as major bacteria for MP biofilm communities exposed to organic rich condition. The results of this study suggest that the unique freshwater biofilm community could be formed on the MP surface.

Key words: Microplastic, Biofilm, Freshwater, Microbial community, Next generation sequencing

주제어: 미세플라스틱, 생물막, 담수, 미생물 군집, 차세대 염기서열 분석

Received 22 February 2022, revised 2 March 2022, accepted 7 March 2022.

*Corresponding author: Kyungjin Cho (E-mail: faith@kist.re.kr)

- 최우단 (학생) / Woodan Choi (Student)
서울특별시 성북구 화랑로 14길 5, 02792
5, Hwarang-ro 14-gil, Seongbuk-gu, Seoul 02792, Republic of Korea
- 히엔 티 뉴엔 (박사 후 연구원) / Hien Thi Nguyen (Postdoctoral Researcher)
서울특별시 성북구 화랑로 14길 5, 02792
5, Hwarang-ro 14-gil, Seongbuk-gu, Seoul 02792, Republic of Korea
- 김은주 (책임연구원) / Eun-Ju Kim (Principal Research Scientist)
서울특별시 성북구 화랑로 14길 5, 02792
5, Hwarang-ro 14-gil, Seongbuk-gu, Seoul 02792, Republic of Korea
- 조경진 (선임연구원) / Kyungjin Cho (Senior Research Scientist)
서울특별시 성북구 화랑로 14길 5, 02792
5, Hwarang-ro 14-gil, Seongbuk-gu, Seoul 02792, Republic of Korea

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1. 서 론

미세플라스틱(microplastic)은 대체적으로 크기가 5 mm 이하인 고분자 폴리머로 정의되며, 1차 미세플라스틱과 2차 미세플라스틱으로 구분할 수 있다 (Koelmans et al., 2019). 1차 미세플라스틱은 제조 당시부터 크기가 5 mm 이하인 플라스틱으로서 플라스틱 원료나 화장품 제조 시 발생된다 (Cole et al., 2011; Koelmans et al., 2019). 2차 미세플라스틱은 크기가 큰 플라스틱이 생물학적, 물리적, 화학적 작용 등에 의해 파쇄 혹은 분해되어 형성된 미세플라스틱을 지칭하며, 자연계에서 풍화, 침식에 의해서도 형성될 수 있다 (Cole et al., 2011). 2차 미세플라스틱은 주로 해양 쓰레기, 매립장, 세탁폐수, 농공 산업 시설 등에서 발생된다 (Rezania et al., 2018). 이러한 미세플라스틱은 담수 수계를 거쳐 해양으로 배출되며, 이는 수계 생태계에 부정적인 영향을 줄 수 있다 (Rezania et al., 2018).

수계 내 미세플라스틱은 다양한 오염물질이 부착 혹은 탈착 될 수 있는 매질을 제공하며, 오염물질을 이송시키는 운반체(carrier) 역할을 할 수 있다 (Koelmans et al., 2016). 이러한 이유로 미세플라스틱 생물막(microplastic biofilm, MP biofilm)에 대한 이슈가 최근 들어 제기되고 있다. 이는 미생물이 미세플라스틱 표면에 부착되어 생물막을 형성한 것으로서, 미생물이 분비하는 세포외분비물질(extracellular polymeric substances, EPS)로 인해 오염물질의 흡착을 촉진시킬 수 있다 (Rummel et al., 2017). 특정 환경 조건에서 부착된 미세플라스틱 생물막이 다른 환경으로 이송될 경우, 기존의 미생물 생태계를 교란시키거나 전염성 미생물의 확산을 유발할 수도 있다 (Arias Andres et al., 2019). 또한, 미세플라스틱 생물막 내에서 수평적 유전자 전달(horizontal gene transfer)이 발생할 수도 있으며, 이는 수계 생태계에 영향을 줄 수 있다 (Arias Andres et al., 2019). 실제 환경 수계에서는 다양한 종의 미생물이 공존하기 때문에 미세플라스틱 생물막도 미생물 군집으로 구성되어 있으며, 최근 들어 이를 이해하기 위한 연구가 수행되고 있다.

기존 미세플라스틱 생물막 연구는 해양 환경에서 유래하는 미세플라스틱 생물막 군집 규명에 집중해 왔다. 예를 들어, De Tender 등은 해양 플라스틱 폐기물에 부착된 우점 미생물 군집을 조사하였으며(De

Tender et al., 2015), Kirstein 등은 미세플라스틱 표면에 해수와는 다른 종류의 미생물이 우점하는 것을 확인하고 미세플라스틱 종류에 따라서 미생물 군집이 다를 수 있음을 추가적으로 밝혔다 (Kirstein et al., 2018). 다른 선행연구에서는 해안 연안에서 미세플라스틱 생물막에 잠재적인 전염성 미생물이 존재함을 확인하였다 (Frère et al., 2018). 그러나 염도(salinity)는 미생물 군집을 결정하는 중요한 환경 인자로서, 염분이 낮은 담수 환경에서는 해양 환경과는 다른 종류의 미생물 군집이 미세플라스틱 생물막을 형성할 수 있다. 또한, 다량의 미세플라스틱이 담수 수계로부터 배출되기 때문에 담수 환경에서의 미세플라스틱 생물막 군집에 대한 관심이 증가되고 있으나, 아직까지 담수 유래 미세플라스틱 생물막 연구는 매우 제한적이며 이에 대한 연구가 필요하다.

따라서 본 연구에서는 담수 환경에서 유래하는 미세플라스틱 생물막 군집을 규명하고자 하였다. 이를 위하여, 실험실 규모의 생물막 형성 반응조에 담수를 유입시키며 미세플라스틱 표면에 생물막을 형성시키고, 분자생물학적 기법을 적용하여 생물막을 분석하였다. 또한, 유기물이 수계에 유입되는 상황을 추가로 모사하여 미세플라스틱 생물막을 형성시켜, 이 때의 생물막 군집을 담수만 유입시켜준 상황에서 형성된 미세플라스틱 생물막 군집과 비교하였다.

2. 연구 방법

2.1 미세플라스틱 생물막 반응조 구축 및 운전

본 실험에서 사용한 담수는 하천 환경 수계에서 채취하였으며 53 um 체를 사용하여 협잡물을 제거한 후, 사용 전까지 4°C에 냉장 보관하였다. 모델 미세플라스틱으로 PS(polystyrene)와 PE(polyethylene)를 선정하였으며, 그레놀 타입(약 3 mm)의 미세플라스틱을 구입하여 사용하였다(Goodfellow Cambridge Ltd., England). 담수 유래 미세플라스틱 생물막 형성을 위하여 3 L 비커를 활용하여 2기의 생물막 반응조(유효 체적 2 L)를 구축하였으며, 각 반응조에 PE와 PS 미세플라스틱을 50 g씩 담지시켜 주었다. 1기의 생물막 반응조는 담수 시료를 3일 주기로 유효 체적의 10%(v/v)만큼 교환해 주었으며, 다른 1기의 반응조는 유기물 노출 상황 모사 및 미세플라스틱 표면 생물막 형성



가속화를 위하여, yeast extract(BD Difco, USA)와 peptone(BD Difco, USA)을 각각 0.5 g/L, 1 g/L가 되도록 초기 조건을 조성하여 주고, 10배 기질을 3일 주기로 20 mL씩 주입시켜 주었다. 담수 주입 생물막 반응조의 경우, 미생물 농도가 매우 낮을 것을 고려하여 장기간(약 150일) 운전하였으며, 유기물 주입 생물막 반응조는 30일 동안 운전하였다. 각 배양조는 상온 조건에서 100 rpm으로 간헐 교반(주 3회, 2분) 하였다.

2.2 DNA 추출

미생물 분석을 위하여 담수 시료 원수와 미세플라스틱 생물막 시료로부터 DNA를 추출하였다. 미세플라스틱 생물막의 경우, 각 반응조의 운전 종료 시점에 반응조 내에 담지 되어 있는 PE와 PS 미세플라스틱 전량을 회수하고 세척하였으며, 20분 동안 볼텍싱하며 생물막을 떨어뜨려 준 후, 이를 농축하여 DNA를 추출하였다. DNA 추출에는 시판되는 DNeasy Power soil kit(Qiagen, Germany)를 사용하였으며, 추출된 DNA는 미생물 정량, 정성 분석 전까지 -80°C에 냉동 보관하였다. 본 연구에서 분석한 생물 시료에 대한 정보는 Table 1에 요약하였다.

Table 1. Sample information for microbial analysis

No.	Sample name	Sample information
1	RFW	Raw freshwater
2	PE-RFW	PE biofilm exposed to raw freshwater
3	PS-RFW	PS biofilm exposed to raw freshwater
4	PE-OR	PE biofilm exposed to organic rich condition
5	PS-OR	PS biofilm exposed to organic rich condition

2.3 미생물 정량 분석

미세플라스틱 생물막 농도를 측정하기 위해서, 실시간 중합효소연쇄반응(Real-time quantitative polymerase chain reaction, qPCR) 기법을 사용하였으며, 전체 박테리아를 정량할 수 있는 Taqman primer-probe set(Forward primer-331F, Taqman probe-515F, reverse primer-797R)를 사용하였다 (Nadkarni et al., 2002). AriaMx Real-Time PCR system(Agilent Technologies, USA) 장비를 이용하여 측정하였으며, TaqMan® Fast Advanced Master Mix(Applied Biosystems, USA) 시약을 사용하였다. 상

제한 시약 농도 조건, qPCR 온도 및 시간 조건은 선행 문헌을 참고하였다 (Choi et al., 2018).

2.4 미생물 정성 분석

미생물 군집은 차세대 염기서열 분석(Next generation sequencing, NGS) 기법으로 분석하였으며, MiSeq amplicon sequencing 플랫폼으로 분석하였다(Macrogen, South Korea). 전체 박테리아를 증폭시킬 수 있는 primer set(Forward primer-341F, reverse primer-805R)를 사용하여 라이브러리를 구축하였다 (Klindworth et al., 2013). NGS 분석을 통해 생성된 raw sequences는 어댑터 sequence와 low quality sequence(<400bp, >500bp, potential chimeric sequence) 제거 과정을 거쳐 정제되었다. 정제된 sequence는 CD-HIT-OTU 프로그램을 이용하여, 97% 이상 동일한 염기서열을 갖는 sequence끼리 grouping 하여 operational taxonomic units(OTU)으로 구분해주었다. 도출된 OTUs의 상대비율 결과를 바탕으로 PC-ORD7 프로그램을 이용하여 clustering 분석을 수행하였다. 각 샘플에서 5위까지 우점하는 OTUs(major OTUs)들은 NCBI database와 매칭시켜 미생물 종 규명 분석을 수행하였다.

2.5 물리화학적 성상 분석

본 연구에 사용한 담수 시료 성상은 다음과 같은 방법으로 분석하였다. pH는 Hach 사의 HQ40d 휴대용 측정장비와 pHCI01 probe를 이용하여 측정하였고, 전기전도도는 HQ40d 휴대용 측정장비와 CDC40101 probe를 이용하여 분석하였다. 음이온 농도는 이온크로마토그래피(ICS-1000, Dionex)를 이용하여 측정하였으며, NH₄⁺-N 농도는 Ammonia-kit(Hach)와 분광광도계(DR 5000)를 사용하여 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 담수 성상 분석 결과

본 연구에서 사용된 담수의 경우, 중성 pH를 나타내었다. 전기전도도는 235.0±1.4 μS/cm으로 담수 범위로 확인되었으며, 염소 이온도 저농도로 존재함을 확인할 수 있었다. 질소화합물 농도의 경우, 암모니아 질소와 아질산염 질소 성분은 거의 검출되지 않았으며,

Table 2. Characteristics of freshwater used for biofilm formation

Component	Value
pH	7.7 ± 0.0
Electric conductivity (μS/cm)	235.0 ± 1.4
Cl ⁻ (mg/L)	34.0 ± 0.2
NO ₂ ⁻ -N (mg/L)	0.0
NO ₃ ⁻ -N (mg/L)	2.4 ± 0.0
NH ₄ ⁺ -N (mg/L)	0.0

질산염 질소 농도도 2.4±0.0 mg/L으로서, 전형적인 국내 담수 수계의 범위임을 확인하였다 (Lee et al., 2016). 본 연구에서 미세플라스틱 생물막 형성을 위하여 사용된 담수 성상 정보는 Table 2에 요약하였다.

3.2 미세플라스틱 생물막 정량 분석 결과

본 연구에서 획득한 미세플라스틱 생물막에 대하여 qPCR 기반 미생물 정량 분석을 수행하였다. Table 3은 담수만 유입시켜주며 형성된 미세플라스틱 생물막과 유기물을 과량으로 주입해준 미세플라스틱 생물막의 16S rRNA gene 농도 결과를 나타낸다.

먼저, 담수 미세플라스틱 생물막의 경우, PE 표면 (PE-RFW)에는 $2.1 \pm 0.1 \times 10^6$ copies/g MP particle, PS 표면 (PS-RFW)에는 $4.2 \pm 1.3 \times 10^7$ copies/g MP particle의 미생물이 부착되어 있음을 확인하였다 (Table 3). 본 연구 결과는 외부의 유기물 주입이나 오염물질 주입이 없더라도 환경 담수 수계에 미세플라스틱이 장기간 체류될 경우, 미세플라스틱 표면에 생물막이 형성될 수 있음을 보여준다.

한편, 유기물을 과량으로 주입해준 경우, PE 표면 (PE-OR)에는 $4.7 \pm 0.5 \times 10^9$ copies/g MP particle, PS 표면 (PS-OR)에는 $6.1 \pm 1.6 \times 10^9$ copies/g MP particle의 미생물이 부착되어 있었으며, 담수만 주입하여 형성시킨 미세플라스틱 생물막과 비교하여 고농도의 미생물이 부착되어 있음을 나타낸다 (Table 3). 담수 수계에 유기물이 주입되면 수계에 이미 존재하고 있는 종속 영양미생물의 활성을 급격하게 증가시켜, 미생물의 농도를 증가시킬 수 있다 (Fellman et al., 2010; Thomas, 1997). 본 연구 결과는 반응 시스템 내의 부유 미생물의 농도 증가가 미세플라스틱 생물막 형성을 가속화시킬 수 있음을 나타낸다. 특히, 유기물을 주입하지 않은 경우보다 5배 가량 짧은 시간 노출시켰음 (150일 vs. 30일)에도 불구하고 생물막이 고농도로

Table 3. The 16S rRNA gene concentration form on microplastic particles (Unit : copies/g microplastic particle)

No.	Sample name	Average	Standard deviation
1	PE-RFW	2.1×10^6	1.5×10^5
2	PS-RFW	4.2×10^7	1.3×10^7
3	PE-OR	4.7×10^9	4.7×10^8
4	PS-OR	6.1×10^9	1.6×10^9

형성되었으며, 이는 담수 수계에 오염물질 유입을 차단하는 것이 미세플라스틱 생물막 제어에 효과적일 수 있음을 제한한다. 또한, 담수 수계 퇴적물의 경우 다량의 유기물을 함유할 수 있으며 (Findlay et al., 1991; Kurek et al., 2020), 이는 외부 유기물 유입이 없더라도 담수 수계 퇴적층에서 미세플라스틱 생물막이 잘 형성될 수 있음을 시사한다. Brailsford 등은 담수 환경에서 퇴적물 1 kg당 250 mg의 탄소가 함유되어 있는 것을 확인하였으며(Brailsford et al., 2019), Zha 등은 8.77 %~21.05 % 정도의 총유기탄소가 담수 퇴적물에 함유되어 있음을 보고한 바 있다 (Zha et al., 2018). Nel 등은 Bloukrans 강의 퇴적물에서 1.1 %~59.8 %의 유기물이 존재함을 확인하였다 (Nel et al., 2018). 향후, 담수 퇴적물에서의 미세플라스틱 생물막과 유기물 간의 상관관계에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 사료된다.

3.3 미생물 군집 clustering 특성

5개의 DNA 샘플(원수 1개, 미세플라스틱 생물막 4개)에서 총 133,425개의 정제된 sequence를 획득하였으며, 이는 1,491개의 OTU로 grouping되었다. 미생물 군집의 clustering 패턴을 시각적으로 도출하여 위하여 clustering 분석을 수행하였으며, 분석 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 연구 결과, 미세플라스틱 생물막 군집은 유입 담수와 매우 상이함을 나타내었으며, 이는 해수 유래 미세플라스틱 생물막 군집 연구들과 유사한 경향을 나타내었다 (De Tender et al., 2015; Kirstein et al., 2018). 일반적으로 생물막이 형성되는 매질의 특징에 따라 다른 종류의 미생물 군집이 형성된다고 알려져 있으며, 이러한 경향은 미세플라스틱뿐만 아니라, 분리막 표면 등의 환경 공정에서도 발견되고 있다 (Cho et al., 2018). 또한, 연구 결과 유기물을 주입 조건에서 형성된 미세플라스틱 생물막 군집은 담수 주입 미세플라스틱 생물막 군집과 다른 경향을 나타내었으며,

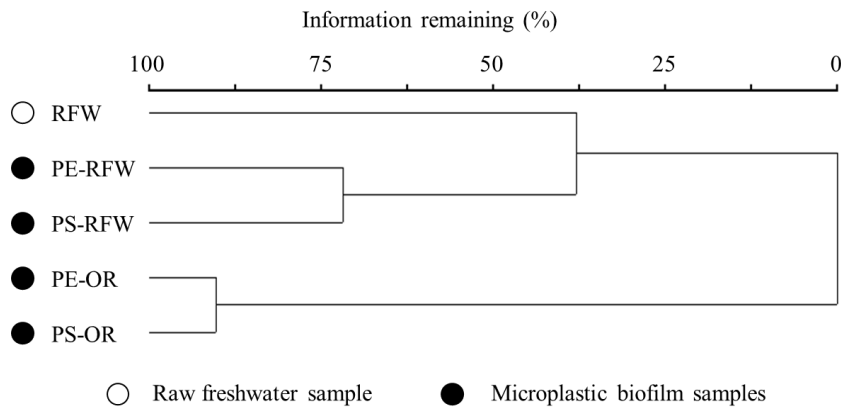


Fig. 1. Clustering dendrogram of the freshwater and microplastic biofilms.

이는 유기물이 유입되는 상황에서는 다른 미생물 군집이 미세플라스틱 표면에 생물막으로 형성될 수 있음을 나타낸다.

3.4 Phylum 수준에서의 미세플라스틱 생물막 군집

담수 원수와 담수 유래 미세플라스틱 생물막 군집을 phylum 수준에서 분석하였으며, 해당 연구 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 전체 샘플에서 평균 우점도가 1% 이상인 phylum을 선별하였으며, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria*,

Verrucomicrobia, *Cyanobacteria*, *Firmicutes*와 같이 8개의 주요 phylum이 도출되었다.

먼저, 담수 원수(RFW)에서는 *Proteobacteria*(46.0%), *Actinobacteria*(17.9%), *Bacteroidetes*(12.9%), *Cyanobacteria*(12.2%) 순으로 우점하는 것을 확인하였다. 해당 phylum 미생물들은 담수 환경에서 흔히 발견된다. 문헌에 따르면, 담수 하천 시료에서 *Proteobacteria*가 가장 많이 우점하였으며 *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*가 뒤를 이었다 (Reza et al., 2018). 또한, 다른 선행연구에서도 유사한 결과가 관찰되었으며, 담수 호소에

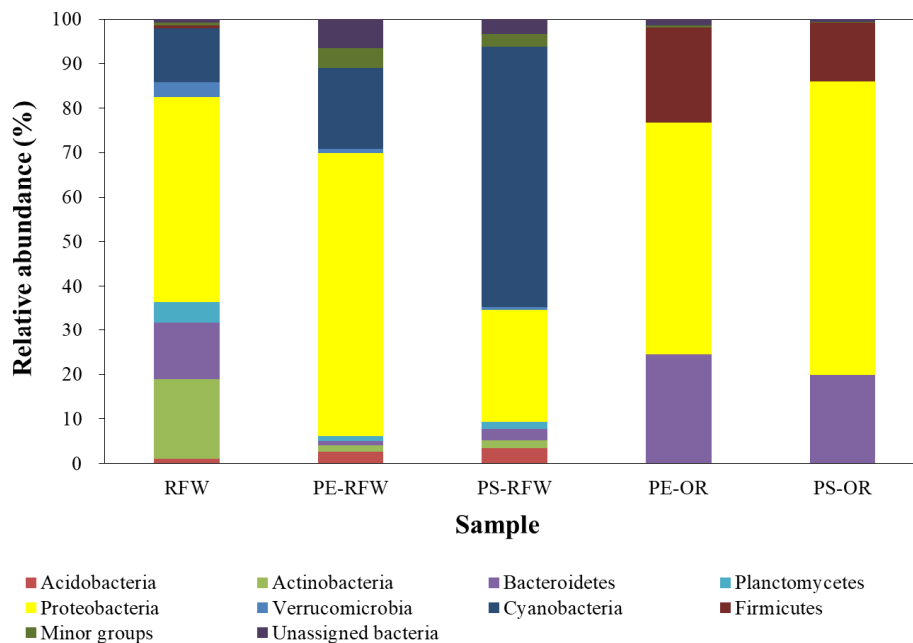


Fig. 2. Relative abundance of bacterial communities at phylum level.

pp. 059-079

pp. 081-095

pp. 097-106

pp. 107-119

pp. 121-134

서 *Proteobacteria*가 가장 높은 우점도로 존재하였고, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Cyanobacteria*도 함께 우점하였다 (Dai et al., 2016).

미세플라스틱 생물막 군집은 담수 원수와 다른 형태의 군집을 나타내었다. 먼저, 담수 주입 조건에서 형성된 미세플라스틱 생물막(PE-RFW, PS-RFW)의 경우, *Proteobacteria*와 *Cyanobacteria*가 공통적으로 우점하였으며, 원수에서 10% 이상의 우점도를 보였던 *Actinobacteria*와 *Bacteroidetes*는 2-3% 이하로 감소하였다. PE 생물막(PE-RFW)에서는 *Proteobacteria*(63.7%)가 *Cyanobacteria*(18.2%) 보다 우점도가 높았으나, PS 생물막(PS-RFW)의 경우, *Cyanobacteria*(58.5%)가 *Proteobacteria*(25.4%) 보다 높은 우점도를 나타내었으며, 이는 미세플라스틱의 종류가 달랐기 때문으로 추측된다. 한편, 유기물을 주입하며 형성시킨 미세플라스틱 생물막의 경우, *Proteobacteria*가 가장 높은 우점도를 보였다. 그러나 담수를 주입하며 형성시킨 미세플라스틱 생물막과는 달리, *Bacteroidetes*와 *Firmicutes*가 플라스틱 종류와 관계 없이 유기물 주입 조건에서 우점하였으며, 이는 유기물이 해당 미생물 그룹의 성장을 촉진시켰기 때문으로 추측된다.

3.5 OTU 수준에서의 미세플라스틱 생물막 군집

미세플라스틱 생물막 군집을 깊이 이해하기 위해서

OTU 수준(종 수준)에서 우점 미생물 종을 분석하였으며, 총 19개의 우점 OTU가 도출되었다. 각 샘플 당 주요 OTU 우점 결과는 Fig. 3에 정리하였으며, 각 OTU 미생물에 대한 종 분석 결과는 Table 4에 정리하였다.

먼저, 담수 원수(RFW)의 경우, *Dulcicalothrix necridiiformans*와 유사한 미생물 종이 8.4%으로 가장 높은 우점도를 나타내었으며, 순차적으로 *Sphingorhabdus wooponensis*, *Limnohabitans planktonicus*, *Tetrasphaera jenkinsii*와 유사한 미생물, *Tundrisphaera lichenicola*와 유사한 미생물이 우점함을 확인하였다 (Fig. 3, Table 4). *D. necridiiformans*는 담수성 cyanobacterium 계열의 미생물로서, 얇은 물가에서 발견되었으며(Saraf et al., 2019), *Sphingorhabdus wooponensis*는 국내 담수 습지에서 발견된 호기성 종속영양미생물로서 저농도 염분 조건을 선호하는 것으로 알려져 있다 (Baik et al., 2013). *L. planktonicus*는 담수에서 발견된 통성 혐기성 미생물로서 다양한 종류의 유기탄소를 에너지원으로 활용할 수 있으며, 0.5% 보다 낮은 NaCl 조건에서만 성장 가능한 전형적인 담수 미생물이다 (Kasalický et al., 2010). *T. lichenicola*은 호기성 종속영양미생물로서, 염분에 민감한 특성을 갖는 담수성 미생물로 알려져 있다 (Kulichevskaya et al., 2017). 본 연구 결과는 채취한 담수 원수 시료에는 각기 다른 대사 기작을

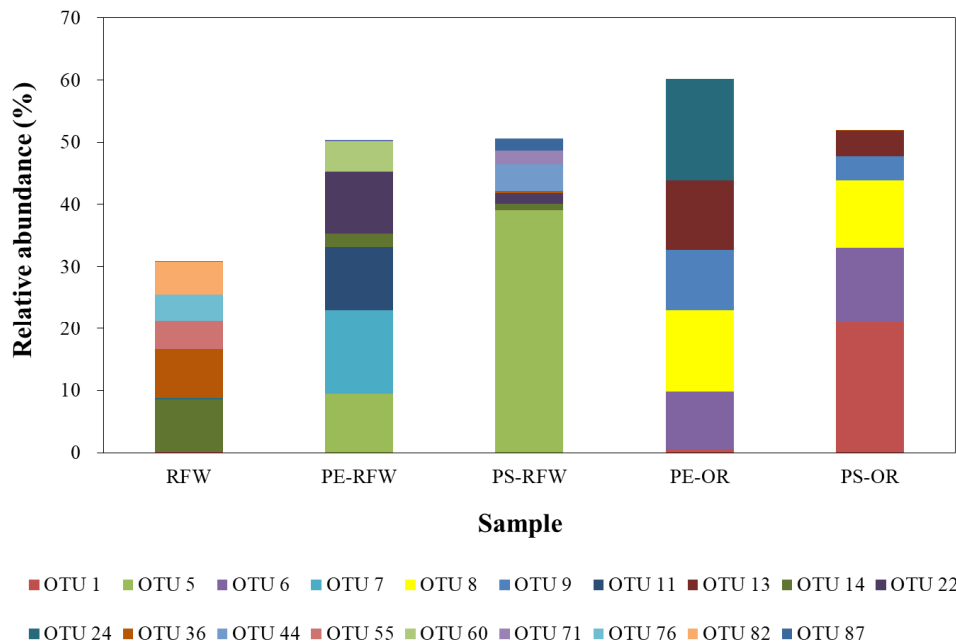


Fig. 3. Relative abundance of the major bacterial OTUs (i.e., ranked top five OTUs in each biomass sample).

**Table 4.** Taxonomic information of the major bacterial OTUs described in Fig. 3

	Rank	OTU No.	Relative abundance (%)	Closest isolated species	Similarity (%)	Accession No.
RFW	1	OTU 14	8.4	<i>Dulcicalothrix necridiiformans</i>	86.6	NR_164867.1
	2	OTU 36	7.8	<i>Sphingorhabdus wooonensis</i>	99.5	NR_109148.1
	3	OTU 82	5.3	<i>Limnohabitans planktonicus</i>	97.3	NR_125541.1
	4	OTU 55	4.7	<i>Tetrasphaera jenkinsii</i>	92.2	NR_043461.1
	5	OTU 76	4.2	<i>Tundrisphaera lichenicola</i>	87.5	NR_158050.1
PE-RFW	1	OTU 7	13.5	<i>Solimonas variicoloris</i>	95.5	NR_042175.1
	2	OTU 11	10.1	<i>Frigidibacter albus</i>	93.8	NR_134731.1
	3	OTU 22	9.9	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	93.2	NR_104981.1
	4	OTU 5	9.5	<i>Dulcicalothrix necridiiformans</i>	87.1	NR_164867.1
	5	OTU 60	4.7	<i>Hydrocarboniphaga daqingensis</i>	100.0	NR_114263.1
PS-RFW	1	OTU 5	39.1	<i>Dulcicalothrix necridiiformans</i>	87.1	NR_164867.1
	2	OTU 44	4.3	<i>Pseudochroococcus couteii</i>	93.3	NR_172711.1
	3	OTU 71	2.2	<i>Altericista variichlora</i>	90.2	NR_172620.1
	4	OTU 87	1.9	<i>Symplocastrum torsivum</i>	93.8	NR_172658.1
	5	OTU 22	1.7	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	93.2	NR_104981.1
PE-OR	1	OTU 24	16.3	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	99.5	NR_117624.1
	2	OTU 8	13.2	<i>Macellibacteroides fermentans</i>	98.9	NR_117913.1
	3	OTU 13	11.2	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	99.1	NR_074446.1
	4	OTU 9	9.7	<i>Sedimentibacter acidaminivorans</i>	95.9	NR_148817.1
	5	OTU 6	9.4	<i>Comamonas testosteroni</i>	99.8	NR_029161.2
PS-OR	1	OTU 1	21.1	<i>Brevundimonas naejangsanensis</i>	99.3	NR_116722.1
	2	OTU 6	12.0	<i>Comamonas testosteroni</i>	99.8	NR_029161.2
	3	OTU 8	10.8	<i>Macellibacteroides fermentans</i>	98.9	NR_117913.1
	4	OTU 13	4.1	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	99.1	NR_074446.1
	5	OTU 9	3.8	<i>Sedimentibacter acidaminivorans</i>	95.9	NR_148817.1

갖는 다양한 종의 담수성 미생물이 혼재되어 존재함을 나타낸다.

미세플라스틱 생물막의 경우, 담수 원수와 매우 다른 독특한 미생물이 우점함을 확인하였다. 먼저 담수를 주입하며 형성시킨 미세플라스틱 생물막 중, PE 미세플라스틱 생물막 시료의 경우(PE-RFW), *Solimonas variicoloris*, *Frigidibacter albus*, *Nitrospirillum amazonense*, *D. necridiiformans*, *Hydrocarboniphaga daqingensis*와 유사한 미생물이 우점하는 것을 확인하였다. 한편 PS 표면에 형성된 생물막 시료(PS-RFW)에서는 *D. necridiiformans*, *Pseudochroococcus couteii*, *Altericista variichlora*, *Symplocastrum torsivum*, *N. amazonense*와 유사한 미생물이 우점하였다 (Fig. 3, Table 4). 문헌에 따르면, *F. albus*는 호기성 미생물로서, 비교적 넓은 NaCl 조건에서 성장할 수 있으나(0.4%), 최적 성장조건은 저농도 염분 조

건에서 성장하는 미생물로 알려져 있다 (Li and Zhou, 2015). *S. variicoloris*와 *H. daqingensis* 역시 담수에서 발견된 미생물로서, 다양한 종류의 탄소원으로 에너지원으로 활용할 수 있는 담수성 미생물이라고 보고되고 있다 (Liu et al., 2011; Sheu et al., 2011).

본 연구 결과는 *D. necridiiformans*와 유사한 미생물을 제외하고서는 원수에서 우점하지 않았던 미생물이 미세플라스틱 생물막에서 우점함을 나타내며, 이는 독특한 형태의 미생물 군집이 미세플라스틱 표면에 형성될 수 있음을 제안한다. 또한, *D. necridiiformans*, *N. amazonense*와 유사한 미생물을 제외한 나머지 우점종이 각각 PE 미세플라스틱과 PS 미세플라스틱 표면에서 존재하였으며, 이와 같은 연구 결과는 플라스틱 종류에 따라 우점 생물막 군집이 다를 수 있음을 시사한다. 한편, 담수 미세플라스틱 생물막(PE-RFW,

PS-RFW)의 우점종은 *H. daqingensis*를 제외하고는 모두 기존에 보고된 미생물 종의 염기서열과 97% 미만의 유사도를 나타내었으며, 이는 아직까지 미세플라스틱 생물막에 대한 연구가 매우 제한적이기 때문으로 사료된다. 본 연구 결과는 담수 미세플라스틱 생물막에는 지금까지 보고되지 않은 미생물 종이 우점할 수 있음을 시사하며, 이에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 사료된다.

유기물을 주입하여 형성시킨 미세플라스틱 생물막 군집(PE-OR, PS-OR)은 담수 원수 시료나 담수만 주입하여 형성시킨 미세플라스틱 생물막 군집과 매우 다른 우점종 결과를 나타내었다. 특히, 담수 미세플라스틱 생물막과는 달리 *Sedimentibacter acidaminivorans*와 유사한 미생물, *Macellibacteroides fermentans*, *Desulfovibrio vulgaris*와 같이 PE 미세플라스틱과 PS 미세플라스틱 모두에서 우점하는 종이 다수 관찰되었다. *M. fermentans*, *S. acidaminivorans*는 다양한 종류의 탄소원을 기질로 이용할 수 있는 미생물로서, 대체적으로 낮은 염도 조건을 선호하는 미생물이다 (Imachi et al., 2016; Jabari et al., 2012). *Acinetobacter johnsonii*도 유기물을 분해할 수 있는 미생물 종으로서, PE 미세플라스틱 표면에서 높은 우점도를 나타내었다. 또한, 유기물 과량 조건에서 형성된 미세플라스틱의 경우, 대체적으로 기존 database에 보고된 미생물과 높은 염기서열 유사도를 나타내었다.

본 연구의 미세플라스틱 생물막에서 우점종 중, 일부 미생물은 환경 조건에서 형성된 생물막에서 발견된 사례가 있다. 예를 들어, *S. variicoloris*는 미생물 연료 전지 시스템의 전극 표면에 형성된 생물막 시료에서 발견된 바 있으며(Baranitharan et al., 2015), 또 다른 선행 연구에서는 *A. johnsonii*가 생물막을 잘 형성할 수 있는 미생물임을 확인하였다 (Wang and Xie, 2020). 또한, *M. fermentans*는 하수 배관에서 형성된 생물막에서 발견된 바 있다 (Auguet et al., 2015). 이러한 미생물 종을 생물막을 형성할 수 있는 가능성이 있는 미생물로서, 미세플라스틱 표면에서도 잘 부착되었을 것으로 추측된다. 본 연구 결과는 아직까지 규명되지 않은 다양한 종의 미생물이 담수 미세플라스틱 생물막에서 우점할 수 있음을 보여주며, 향후 미세플라스틱 우점 생물막 군집에 대한 정보와 환경적 영향에 대한 연구가 추가로 수행되어야 할 것으로 사료된다.

4. 결 론

본 연구에서는 담수 미세플라스틱 생물막 군집을 규명하고자 하였으며, 연구 결과 담수 원수와 매우 상이한 독특한 군집 구조가 미세플라스틱 표면에 형성되었음을 나타낸다. 또한 유기물 주입 유무 및 미세플라스틱 종류에 따라 서로 상이한 담수 유래 미세플라스틱 생물막 군집이 형성될 수 있음을 보여주며, 미생물 개체수도 크게 달라질 수 있음을 제안한다.

사 사

본 연구는 과학기술정보통신부 해양극지기초원천 기술개발사업 (2019M1A5A1101470)과 한국과학기술 연구원 기관과유사업 (2E31932)의 지원을 받아 수행되었습니다.

References

- Arias Andres, M., Rojas Jimenez, K., and Grossart, H.P. (2019). Collateral effects of microplastic pollution on aquatic microorganisms: An ecological perspective, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 112, 234-240.
- Auguet, O., Pijuan, M., Batista, J., Borrego, C.M., Gutierrez, O., and Voordouw, G. (2015). Changes in Microbial Biofilm Communities during Colonization of Sewer Systems, *Appl. Environ. Microbiol.*, 81(20), 7271-7280.
- Baik, K.S., Choe, H.N., Park, S.C., Hwang, Y.M., Kim, E.M., Park, C., and Seong, C.N. (2013). *Sphingopyxis rigui* sp. nov. and *Sphingopyxis wooonensis* sp. nov., isolated from wetland freshwater, and emended description of the genus *Sphingopyxis*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 63(Pt_4), 1297-1303.
- Baranitharan, E., Khan, M.R., Yousuf, A., Teo, W.F.A., Tan, G.Y.A., and Cheng, C.K. (2015). Enhanced power generation using controlled inoculum from palm oil mill effluent fed microbial fuel cell, *Fuel*, 143, 72-79.
- Brailsford, F.L., Glanville, H.C., Golyshin, P.N., Marshall, M.R., Lloyd, C.E., Johnes, P.J., and Jones, D.L. (2019). Nutrient enrichment induces a shift in dissolved organic carbon (DOC) metabolism in oligotrophic freshwater sediments, *Sci. Total Environ.*, 690, 1131-1139.
- Cho, K., Jeong, D., Lee, S., and Bae, H. (2018). Chlorination caused a shift in marine biofilm niches on



- microfiltration/ultrafiltration and reverse osmosis membranes and UV irradiation effectively inactivated a chlorine-resistant bacterium, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 102(16), 7183-7194.
- Choi, M., Cho, K., Lee, S., Chung, Y.C., Park, J., and Bae, H. (2018). Effective seeding strategy using flat type poly (vinyl alcohol) cryogel for anammox enrichment, *Chemosphere*, 205, 88-97.
- Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., and Galloway, T.S. (2011). Microplastics as contaminants in the marine environment: A review, *Mar. Pollut. Bull.*, 62(12), 2588-2597.
- Dai, Y., Yang, Y., Wu, Z., Feng, Q., Xie, S., and Liu, Y. (2016). Spatiotemporal variation of planktonic and sediment bacterial assemblages in two plateau freshwater lakes at different trophic status, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 100(9), 4161-4175.
- De Tender, C.A., Devriese, L.I., Haegeman, A., Maes, S., Ruttink, T., and Dawyndt, P. (2015). Bacterial community profiling of plastic litter in the Belgian part of the North Sea, *Environ. Sci. Technol.*, 49(16), 9629-9638.
- Fellman, J.B., Hood, E., and Spencer, R.G.M. (2010). Fluorescence spectroscopy opens new windows into dissolved organic matter dynamics in freshwater ecosystems: A review, *Limnol. Oceanogr.*, 55(6), 2452-2462.
- Findlay, S., Pace, M., and Lints, D. (1991). Variability and transport of suspended sediment, particulate and dissolved organic carbon in the tidal freshwater Hudson River, *Biogeochem.*, 12(3), 149-169.
- Frère, L., Maignien, L., Chalopin, M., Huvet, A., Rinnert, E., Morrison, H., Kerninon, S., Cassone, A. L., Lambert, C., Reveillaud, J., and Paul Pont, I. (2018). Microplastic bacterial communities in the Bay of Brest: Influence of polymer type and size, *Environ. Pollut.*, 242, 614-625.
- Imachi, H., Sakai, S., Kubota, T., Miyazaki, M., Saito, Y., and Takai, K. (2016). *Sedimentibacter acidaminivorans* sp. nov., an anaerobic, amino-acid-utilizing bacterium isolated from marine subsurface sediment, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 66(3), 1293-1300.
- Jabari, L., Gannoun, H., Cayol, J.L., Hedi, A., Sakamoto, M., Falsen, E., Ohkuma, M., Hamdi, M., Fauque, G., Ollivier, B., and Fardeau, M.L. (2012). *Macelibacteroides fermentans* gen. nov., sp. nov., a member of the family Porphyromonadaceae isolated from an upflow anaerobic filter treating abattoir wastewaters, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 62(Pt_10), 2522-2527.
- Kasalický, V., Jezbera, J., Šimek, K., and Hahn, M.W. (2010). *Limnohabitans planktonicus* sp. nov. and *Limnohabitans parvus* sp. nov., planktonic betaproteobacteria isolated from a freshwater reservoir, and emended description of the genus *Limnohabitans*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 60(Pt 12), 2710-2714.
- Kirstein, I.V., Wichels, A., Krohne, G., and Gerds, G. (2018). Mature biofilm communities on synthetic polymers in seawater - Specific or general?, *Mar. Environ. Res.*, 142, 147-154.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., and Glöckner, F.O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies, *Nucleic Acids Res.*, 41(1), e1-e1.
- Koelmans, A.A., Bakir, A., Burton, G.A., and Janssen, C.R. (2016). Microplastic as a vector for chemicals in the Aquatic environment: critical review and model-supported reinterpretation of empirical studies, *Environ. Sci. Technol.*, 50(7), 3315-3326.
- Koelmans, A.A., Mohamed Nor, N.H., Hermsen, E., Kooi, M., Mintenig, S.M., and De France, J. (2019). Microplastics in freshwaters and drinking water: Critical review and assessment of data quality, *Water Res.*, 155, 410-422.
- Kulichevskaya, I.S., Ivanova, A.A., Detkova, E.N., Rijpstra, W.I.C., Sinninghe Damsté, J.S., and Dedysh, S.N. (2017). *Tundrisphaera lichenicola* gen. nov., sp. nov., a psychrotolerant representative of the family Isosphaeraceae from lichen-dominated tundra soils, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 67(9), 3583-3589.
- Kurek, M.R., Harir, M., Shukle, J.T., Schroth, A.W., Schmitt Kopplin, P., and Druschel, G.K. (2020). Chemical fractionation of organic matter and organic phosphorus extractions from freshwater lake sediment, *Anal. Chim. Acta*, 1130, 29-38.
- Lee, J., Park, T., Kim, M.S., Kim, J., Lee, S., Lee, S.K., Lee, Y.S., Lee, W.S., Yu, S., and Rhew, D. (2016). Stable isotope on the evaluation of water quality in the presence of WWTPs in rivers, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 23(18), 18175-18182.
- Li, A.H., and Zhou, Y.G. (2015). *Frigidibacter albus* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family Rhodobacteraceae isolated from lake water, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 65(Pt_4), 1199-1206.
- Liu, Y., Song, X.F., Jiang, J.T., Liu, Y.H., Xu, C.J., Li, H., and Liu, Z.P. (2011). *Hydrocarboniphaga daqingensis* sp. nov., isolated from a freshwater lake, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 61(2), 408-411.
- Nadkarni, M.A., Martin, F.E., Jacques, N.A., and Hunter, N.

- (2002). Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set, *Microbiol.*, 148(1), 257-266.
- Nel, H.A., Dalu, T., and Wasserman, R.J. (2018). Sinks and sources: Assessing microplastic abundance in river sediment and deposit feeders in an Austral temperate urban river system, *Sci. Total Environ.*, 612, 950-956.
- Reza, M.S., Mizusawa, N., Kumano, A., Oikawa, C., Ouchi, D., Kobiyama, A., Yamada, Y., Ikeda, Y., Ikeda, D., Ikeo, K., Sato, S., Ogata, T., Kudo, T., Jimbo, M., Yasumoto, K., Yoshitake, K., and Watabe, S. (2018). Metagenomic analysis using 16S ribosomal RNA genes of a bacterial community in an urban stream, the Tama River, Tokyo. *Fish. Sci.*, 84(3), 563-577.
- Rezania, S., Park, J., Din, M.F.M., Taib, S.M., Talaiekhazani, A., Yadav, K.K., and Kamyab, H. (2018). Microplastics pollution in different aquatic environments and biota: A review of recent studies, *Mar. Pollut. Bull.*, 133, 191-208.
- Rummel, C.D., Jahnke, A., Gorokhova, E., Kühnel, D., and Schmitt Jansen, M. (2017). Impacts of Biofilm Formation on the Fate and Potential Effects of Microplastic in the Aquatic Environment, *Environ. Sci. Technol. Lett.*, 4(7), 258-267.
- Saraf, A., Suradkar, A., Dawda, H.G., Gaysina, L.A., Gabidullin, Y., Kumat, A., Behere, I., Kotulkar, M., Batule, P., and Singh, P. (2019). Phylogenetic complexities of the members of Rivulariaceae with the re-creation of the family Calothrixaceae and description of *Dulcicalothrix necridiiformans* gen nov., sp nov., and reclassification of *Calothrix desertica*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 366(17).
- Sheu, S.Y., Cho, N.T., Arun, A.B., and Chen, W.M. (2011). Proposal of *Solimonas aquatica* sp. nov., reclassification of *Sinobacter flavus* Zhou et al. 2008 as *Solimonas flava* comb. nov. and *Singularimonas variicoloris* Friedrich and Lipski 2008 as *Solimonas variicoloris* comb. nov. and emended descriptions of the genus *Solimonas* and its type species *Solimonas soli*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 61(9), 2284-2291.
- Thomas, J.D. (1997). The role of dissolved organic matter, particularly free amino acids and humic substances, in freshwater ecosystems, *Freshwat. Biol.*, 38(1), 1-36.
- Wang, X.Y., and Xie, J. (2020). Quorum sensing system-regulated proteins affect the spoilage potential of co-cultured *acinetobacter johnsonii* and *pseudomonas fluorescens* from spoiled bigeye tuna (*Thunnus obesus*) as determined by proteomic analysis, *Front. Microbiol.*, 11.
- Zha, D., Li, Y., Yang, C., and Yao, C. (2018). Assessment of organophosphate flame retardants in surface water and sediment from a freshwater environment (Yangtze River, China), *Environ. Monit. Assess.*, 190(4), 222.