

## 방향족화합물을 분해하는 *Alcaligenes xylosoxidans*의 모래속에서의 무작위운동 계수 측정

이정훈 · 유영제 · 유인상 · 김상용 · 이진원  
광운대학교 화학공학과, <sup>1</sup>서울대학교 화학공학과, <sup>2</sup>경원대학교 화학공학과, <sup>3</sup>한국생산기술연구원  
(접수 : 1998. 3. 27., 게재승인 : 1998. 6. 29.)

### Measurements of Random Motility Coefficients of *Alcaligenes xylosoxidans* Decomposing Aromatic Compounds in Sands

Jeong-Hoon Lee, Young Je Yoo<sup>1</sup>, In Sang Yoo<sup>2</sup>, Sangyong Kim<sup>3</sup>, and Jinwon Lee<sup>†</sup>  
Department of Chemical Engineering, Kwangwoon University, Seoul, 139-701, Korea  
<sup>1</sup>Department of Chemical Engineering, Seoul National University, Seoul, 151-742, Korea  
<sup>2</sup>Department of Chemical Engineering, Kyungwon University, Seongnam, Kyeonggi, 461-701, Korea  
<sup>3</sup>KITECH, Chonan, Chungnam, 330-820, Korea  
(Received : 1998. 3. 27., Accepted : 1998. 6. 29.)

The bacterial motility in sand was studied with *Alcaligenes xylosoxidans* Y234 which is known as a strong decomposer of aromatic chemicals, especially toluene. Apparent random motility coefficient ( $\mu_{\text{RDP}}$ ) and apparent chemotaxis coefficient ( $\mu_{\text{C,APP}}$ ) for toluene were measured in the sands which have four different porosities. Adsorption ratio of *Alcaligenes xylosoxidans* Y234 on the sands was measured as 17%. The random motility coefficients were  $0.85\sim 1.68 \times 10^{-3} \text{cm}^2/\text{sec}$ , and decreased as the porosity of sands decreased. Apparent chemotaxis coefficients were measured as  $1.1\sim 6.8 \times 10^{-5} \text{cm}^2/\text{sec}$ , and decreased as the porosity decreased and with time. The tendency of *Alcaligenes xylosoxidans* Y234 movement towards toluene seemed very weak and showed little chemotaxis.

Key Words : *Alcaligenes xylosoxidans*, random motility, chemotaxis, toluene degradation

### 서론

토양오염은 유류의 방출로 인한 오염, 쓰레기 매립지에서의 침출수로 인한 오염, 각종 화학공장에서 배출된 용제 및 유기화합물질로 인한 주변의 토양오염, 폐광산에서 나오는 유해금속 침출수로 인한 주변지역의 오염, 그리고 광범위한 지역에서 많이 사용하고 있는 농약과 화학비료로 인한 농토의 오염 등을 들 수 있다. 이러한 오염물을 제거하고 원래의 토양으로 복원시키는 방법으로서, 미생물을 이용하여 자연 분해시키는 원위치 생물학적 복원기술 (*in situ* bioremediation, ISB)이 주목을 받고 있다.

오염물질은 보통 포화 또는 불포화 토양에 흡착, 지하수에 용해, 지하수 위에 부유, 또는 증기상으로 존재하는데, 미생물을 생물학적 복원공정에 이용할 경우에 미생물이 얼마나 오염물에 용이하게 접근하여 오염물을 분해시킬 수 있는지가 중요한 문제

가 된다. 이와 관련된 미생물의 특성이 무작위운동인 미생물의 유동성과 분포를 결정하여 주는 역할을 한다(1, 2). 토양속에 존재하는 오염물이 미생물에 의해 분해되기 위해서는 서로간의 접촉이 일어나야 하는데, 오염물의 분포 못지않게 미생물의 분포와 이동성이 생물학적 복원 전체의 효율성에 영향을 미치는 주요 변수가 된다(6, 11). 그런데 미생물의 유동성에 대한 연구는 잘 정의된 실험조건에서 얻어진 믿을만한 데이터가 부족하다는 단점이 있다. 연구자들이 제각기 설계한 실험장치와 통일성이 결여된 실험조건에서 한정된 데이터를 얻어 보고하였기에 이들을 비교하여 설계인자로 이용하기는 곤란하다. 생물학적 복원 기술에 이용되는 미생물의 다양함을 고려할 때 미생물의 이동성을 나타내는 일반적인 방법이 필요한데, 미생물의 운동을 물질의 확산현상과 비슷한 개념으로 설명하는 예가 많았다(7).

미생물이 외부화합물의 농도 변화에 따라 운동에 변화를 보이는 현상을 chemotaxis라 하는데, 생물학적 복원공정에서도 오염물의 농도가 미생물의 운동에 미치는 영향을 정량화할 필요가 있다. 지금까지 가장 많이 연구가 되어 잘 알려진 대장균은 주로 아미노산이나 당분과의 관계를 다루어 왔기 때문에 토양을 정화하는 기술에 직접 적용하기에는 부적당하나 무작위 운동이나 chemotaxis에 대한 기초연구로서 가치가 있어 계속 많은 연

<sup>†</sup> Corresponding Author : Department of Chemical Engineering, Kwangwoon University, Seoul 139-701, Korea  
Tel: 02-940-5172, Fax: 02-909-0701  
e-mail: jwlee@daisy.kwangwoon.ac.kr

구가 되고 있다. Harwood (3,13)에 의해 *Pseudomonas putida* 가 3-chlorobenzoate에 대해 보이는 chemotaxis가 대장균이 당분이나 아미노산에 대해 보이는 특성과 비슷하다고 보고되어 있다. Lopez de Victoria (4)에 의한 연구는 오염된 땅속 1214 ft에서 골라진 미생물을 이용하였는데 trichloroethylene (미국내 지하수에서 많이 발견되는 오염물질)에 대해 매우 민감한 chemotaxis를 보인다고 알려졌다.

토양의 다공성이 미생물의 이동에 미치는 영향을 완전히 정량화 하기는 매우 어려운 문제중의 하나이다. 미생물과 토양구멍과의 상호 영향도 존재하고, 미생물의 방향전환에 제약이 따르기 때문이다. 그렇지만 토양의 다공성이 미생물의 이동에 미치는 영향을 포괄적인 "겉보기" 형태로 정량화하는 것은 가능하며, 실험을 통하여 미생물의 이동성과 오염물에 의한 영향을 검증할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 토양과 같은 다공성 시스템에서 미생물의 이동을 정량적으로 분석할 수 있는 방법을 제안하였으며, 모래를 이용한 실험을 통하여 미생물의 무작위 운동(random motility) 계수를 측정하였고, 오염물 (톨루엔)이 미생물의 유동성에 미치는 영향을 연구하였다.

**미생물의 이동 모델링**

토양중의 오염물 분해에 있어서 미생물의 이동은 토양수의 흐름에 영향을 받게 되는데, 확산(diffusion) 및 분산(dispersion)의 효과 이외에 미생물 자체의 능동적인 움직임이 있다. 미생물은 세포 표면에 위치한 감지기(receptor)에서 화학물의 농도변화를 느끼는데, 이것은 효소와 마찬가지로 특정한 화학물에 대해서만 반응한다. 얼마나 많은 감지기에 화학물이 붙는지에 따라 화학물의 농도 변화를 인지하게 되는데, 이동을 위해서 미생물은 편모(flagella)를 회전시킨다. 개개 미생물의 이동은 전진과 방향전환으로 이루어져 있다. 방향전환은 무작위(random)로 이루어지며, 원하는 화학물의 방향으로 전진시에 많이 나감으로써 전체적인 이동을 하게 된다. 이러한 자발적인 이동이 보통의 확산 현상과 크게 다른 점이다(5, 6).

미생물의 이동성이 토양과 같은 다공성 시스템에서 오염물의 농도 변화가 존재할 때, 오염물의 분해에 미치는 효과를 측정하기 위해서는 미생물의 이동을 정량적으로 나타낼 수 있는 수학적 모델과 반응 정도를 표시할 수 있는 상수가 필요하다. 미생물의 농도가  $c$ 일 때 1차원 시스템에서 무작위 운동계수(random motility coefficient)를 구하는 모델식은 확산식과 유사한데 다음과 같다(7-10).

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \mu \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} \tag{1}$$

여기서,  $c$ 는 미생물의 농도,  $\mu$ 는 무작위 운동계수,  $t$ 는 시간,  $z$ 는 거리를 각각 의미한다. 보다 엄밀한 모델링이 되고 정확한 무작위 운동계수를 구하기 위해서는 미생물의 성장과 소멸에 대한 항이 식 (1)에 추가되어야 한다. 그러나, 본 연구에서는 미생물 성장과 소멸에 대한 항을 제외한 대신에 실험중에 탄소원을 배제함으로써 미생물의 농도변화를 가능한 한 억제하였다. 또한, 모래속에서의 흡착률과 소멸율을 측정함으로써 시간에 따른 미생물 농도변화를 보정할 수 있게 하였다. Figure 1과 같은 모래관 시스템에서 미생물의 평균 운동거리에 비해 모래관이 무한히 길다고 가정하면 위 모델식의 초기조건 및 경계조건은 다음

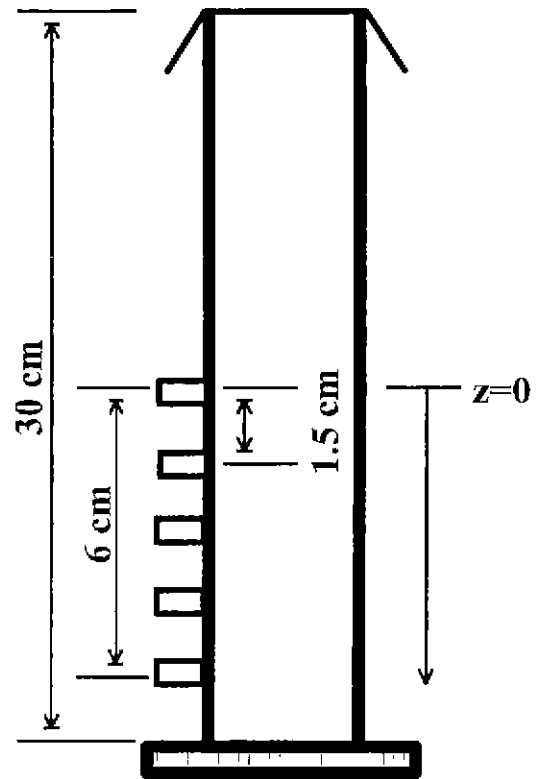


Figure 1. The structure of sand column used in the experiment.

과 같다(11, 12).

$$c(z \rightarrow \infty, t) = 0 \tag{2}$$

$$c(z, t) = c_0, \quad z \leq 0, \tag{3}$$

$$c(z, 0) = 0, \quad z > 0, \tag{4}$$

위와 같은 조건하에서 미분방정식의 해를 구하면 다음과 같다.

$$c(z, t) = c_0 \operatorname{erfc}\left(\frac{z}{\sqrt{4\mu_0 t}}\right), \quad z > 0 \tag{5}$$

여기서  $\mu_0$ 는 일정한 값을 갖는 상수로서 무작위 운동계수를 의미한다. 모래관내에서 미생물이 이동하여 측정된 미생물수는 다음과 같다.

$$N_{RM}(t) = \pi r^2 \int_0^L c(z, t) dz \tag{6}$$

여기서  $N_{RM}(t)$ 는 무작위 운동으로 모래관내에서 움직여 축적된 박테리아의 전체 갯수이다.  $r$ 은 관의 반경이고,  $L$ 은 관의 길이이다. 식 (6)에 식 (5)를 대입하여 적분하면 무작위 운동, 실험시간, 모래관의 기하학적인 모양의 함수로서  $z = 0$ 인 평면에서 축적된 박테리아의 수를 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$N_{RM}(t) = \pi r^2 c_0 \left\{ \operatorname{Lerfc}\left(\frac{L}{\sqrt{4\mu_0 t}}\right) + \sqrt{\frac{4\mu_0 t}{\pi}} \left(1 - \exp\left(-\frac{L^2}{4\mu_0 t}\right)\right) \right\} \tag{7}$$

그리고, 짧은 실험시간( $t \ll L_0/4\mu_0 t$ ) 동안에 움직인 박테리아의 수는 다음과 같이 표현할 수 있다.

$$N_{RM}(t) = \pi r^2 c_0 \sqrt{\frac{4\mu_0 t}{\pi}} \quad (8)$$

윗 식에서  $N_{RM}(t)$ 을  $\pi r^2$ 으로 나누면 미생물의 단위면적당 농도를 나타낸다. 여기에 초기농도  $c_0$ , 시간  $t$ 를 대입하여 풀면 구하고자 하는  $\mu_0$ 값을 측정할 수 있다(11). 측정된  $\mu_0$ 는 엄밀한 의미에서 개개 미생물의 무작위 운동계수가 아니라 개괄적인 (apparent 또는 macroscopic)한 값이므로,  $\mu_{app}$ 라 구별하여 표시한다.

## 재료 및 방법

### 균주

본 실험에 사용된 균주는 서울대학교의 생물화학연구실로부터 얻은 *Alcaligenes xylosoxidans* Y234를 사용하였다. 이 균주는 방향족 화합물, 특히 톨루엔을 분해시키는 능력이 뛰어난 미생물 종으로 밝혀져 있다(14).

### 저장

미생물은 0.5 mL의 살균된 80% glycerol과 0.5 mL의 배양액 (overnight culture)을 섞어  $-15^\circ\text{C}$ 에서 냉동 저장하였다. 실험을 할 때에는 루프를 이용하여 냉동 저장된 미생물을 채취하여 배지에 접종시켰다.

### 배지조성

미생물 배양에 사용된 배지의 조성은  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  45 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.3 g, 미량금속 200  $\mu\text{L}$ , sodium benzoate 1 g (1 L당) 이다. 여기서 미량금속은  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1.20 g,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1.20 g,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.22 g,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.15 g,  $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.13 g,  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.09 g, Citric acid 40.00 g (1 L당)의 조성을 갖도록 준비하였다. 계대 배양을 위한 Agar 배지는 sodium benzoate 1 g, agar 20 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.5 g, NaCl 0.1 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1 g (1 L당)의 조성으로 준비하여 사용하였다. 미생물의 이동분포를 위한 실험에서 모래관을 채우기 위해 사용된 완충용액은  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4.5 g (1 L당)의 조성으로 준비하여 삼투압의 변화로 인한 미생물의 파열을 방지하였다. 위의 모든 배양액과 용액은  $121^\circ\text{C}$ , 1.5기압으로 20분간 살균하여 사용하였다.

### 사용된 토양

본 실험에서 사용된 토양은 강모래를 사용하였으며 4 가지 크기의 메쉬 (mesh)로 나누어 각각을 사용하기전 수돗물로 여러 번에 걸쳐 씻은 후, 다시 증류수로 세척하여  $120^\circ\text{C}$ 의 오븐에서 24 시간동안 건조시킨 후 사용하였다. 사용된 모래는 메쉬 14-28, 28-48, 48-60, 60 이상의 4종류로서, 직경이 1.190 mm 에서 0.250 mm 이하로 크기가 고운 모래와 거친 모래에 해당한다. 모래의 다공도를 보면 크기가 큰 것부터 52%, 49%, 45%, 44%의 공극률을 가지고 있다. 공극률은 메스실린더에 정해진 부피가 되도록 모래를 채우고, 모래 윗부분과 수면이 일치하도록 물

을 채운 후, 넣은 물의 부피를 전체 부피로 나누어 구하였다. 모래관에 충전된 모래와 배양액의 질량비는 공극률이 52%인 경우 2.44 이었고, 44%인 경우 3.37 이었다. 여기서 모래의 평균 비중은 2.65로 계산하였다.

### 오염물질 선택 및 분석

본 실험에 사용된 토양오염 물질로 톨루엔을 선택하였다. 그것은 화학산업으로부터 배출되는 방향족 화합물중에 톨루엔이 많은 부분을 차지하고 있으며, 본 실험에서 연구대상으로 선택한 박테리아 종인 *Alcaligenes xylosoxidans* Y234가 방향족 화합물, 특히 톨루엔에 대한 분해능이 뛰어나기 때문이다(14). 톨루엔의 물에 대한 용해도는  $16^\circ\text{C}$ 에서 0.05 g/100 g 증류수 (= 500 ppm)이며, 무색, 가연성의 벤젠범새를 가지는 액체로 녹는 점이  $-95^\circ\text{C}$ , 끓는점  $110.8^\circ\text{C}$ , 비중은 0.867이다. 톨루엔의 분석은 Supelco 칼럼 (Catalog No. 1-2106)을 장착한 Shimadzu GC-14P를 이용하여 Flame-Ionization Detector (FID)로 측정하였다.

### 미생물 갯수 측정방법

미생물의 갯수 측정에는 여러 가지 방법이 있으나, 본 연구에서는 가장 간단한 방법 중 하나인 플레이트 카운트법을 사용하였다.

### 모래관

미생물의 이동계수를 측정하기 위해서는 여러 가지 방법이 있으나, 본 실험에 사용된 방법은 모래로 채워진 관을 만들어 이용하는 탐 처리법이다. 실험에 사용된 모래관은 파이렉스로 제작되었으며 내경이 4.5 cm, 길이가 30 cm, 샘플 채취를 위한 구멍 (hole) 간의 거리가 15 cm이며, 모두 4개의 구멍을 가지고 있다. 각각의 구멍에는 샘플 채취가 용이하도록 실리콘 튜브가 달려있으며, 각각의 실리콘 튜브는 집게로 집혀져 있다. 샘플 채취는 0.1 게이지 (gauge)의 바늘이 달린 2 mL의 주사기를 사용하였으며, 실제 실험에서 모래관의 중앙에서 샘플을 채취할 수 있도록 고안하였다. Figure 1에 실험에 사용된 모래관의 단면도를 나타내었다.

### 미생물의 모래흡착 실험

미생물 흡착을 위한 실험에서는 두 개의 모래관을 준비하여 한쪽은 배양액 만을 넣고 다른 한쪽은 모래와 배양액을 같이 넣었다. 이때 각각의 모래관에 공기층이 생기지 않도록 모래관의 2 cm까지 모래를 채운 다음 준비된 배양액을 마이크로피펫을 사용하여 벽면을 통해 조심스럽게 넣고, 다시 2 cm까지 모래를 채운 다음 배양액을 넣는 방식으로 6 cm까지 모래와 배양액을 채웠다. 이와같은 방법은 다음에 모래를 충전하는 모든 실험에도 동일하게 적용되었다. 5시간 동안 매시간에 채취한 샘플에 미생물이 얼마나 있는지를 알아보기 위해 플레이트 카운트법을 사용하여 미생물의 개체수를 측정하였다.

### 미생물의 성장 및 소멸 실험

*Alcaligenes xylosoxidans* Y234의 성장곡선을 얻기위해 호기적 및 혐기적 상태로 나누어 실험을 하였다. 사용된 모든 실험 기구 및 배지 용액은  $121^\circ\text{C}$ , 1.2기압으로 살균 처리하여

사용하였다. 모래관 실험이 진행되는 동안 미생물의 성장과 소멸에 따른 농도변화를 검증하기 위해 다음과 같은 실험을 하였다. 먼저 15 mL의 시험관 10개를 준비하여 각각의 시험관에 sodium benzoate가 포함된 배지 12 mL와 전날부터 배양시킨 미생물 배양액 3 mL를 채운 다음 켈을 덮었다. 그 후 한 시간 간격으로 5시간동안 시험관의 용액을 마이크로피펫으로 채취하여 OD와 미생물 개체 산정 실험을 측정하였다. 또한 sodium benzoate를 제외한 배지를 이용하여 동일한 방법으로 실험을 수행하여 탄소원이 있는 경우와 없는 경우 모두 관찰하였다.

#### 모래관실험

모래의 크기, 모래관의 길이, 그리고 시간에 따른 미생물의 이동분포를 알아보기 위한 실험으로 동일한 세 개의 모래관을 이용하였다. 각각의 모래관에 모래와 완충용액을 중간정도까지 채운 후, 윗부분은 미생물 배양액을 넣었다. 세 개의 모래관을 각각 1, 3, 5시간 동안 정치시킴으로서 미생물이 모래속으로 이동하도록 하였다. 그리고 각각의 모래관 옆에 있는 작은 구멍을 통해 주사기를 사용하여 시료를 채취하였으며, 플레이트 카운트법으로 미생물 개수를 측정하였다. 이와 같은 실험을 4종류 크기의 모래에 대해 실험을 수행하여 미생물의 이동 분포를 구하였다.

#### Chemotaxis 실험

이 실험은 미생물의 chemotaxis를 측정하기 위한 것으로 앞의 모래관 실험과 다른 점은 모래 속에서 기질을 향해 이동하는 미생물의 이동 분포를 측정한다는 것이다. 이를 위해 먼저 완충용액에 톨루엔으로 포화시킨 용액을 준비하였다. 톨루엔은 본 실험에서 선택한 *Alcaligenes xylosoxidans* Y234의 기질이 된다. 다음으로 모래관내에 모래와 미생물 배양액을 넣어 잘 충전시켰다. 그 위에 톨루엔으로 포화된 완충용액을 모래관의 상부까지 채웠다. 톨루엔은 휘발성이 있기 때문에 모래관의 윗부분을 파라핀 랩으로 잘 봉하였다. 동일한 3개의 모래관을 위와같이 준비하여 각각 1, 3, 5시간 후의 미생물 분포를 측정하였다.

#### 톨루엔 분포 실험

이 실험은 톨루엔이 모래관에서 확산되는 정도를 알아보기 위한 것이다. 먼저 세 개의 모래관에 각각 모래와 완충용액으로 충전하고 윗부분에 톨루엔으로 포화된 완충용액을 채웠다. 각각의 모래관을 1, 3, 5시간 동안 정치시켜 놓은 후 모래관에서 시료를 채취하여 GC로 분석하였다. 4종류의 크기의 모래에 대하여 각각 동일한 실험을 수행하였다.

## 결과 및 고찰

#### 호기적 및 혐기적 조건에서의 성장곡선

*Alcaligenes xylosoxidans* Y234의 최소 배가시간 (doubling time,  $t_d$ )은 50분으로 측정되었다. 미생물 배양 전 배지의 pH는 7이었으며, 호기적 조건에서 배양 후 pH는 6.2였다. 혐기적인 조건에서는 호기적인 조건에 비해 성장속도가 느리며 성장정지기가 일찍 나타나는 것을 관찰할 수 있었다. 혐기적 조건에서 실험한 경우는 미생물의 배가시간이 91분이었다.

#### 혐기적 조건에서 미생물의 생존

미생물의 이동분포를 측정하는 실험은 거의 혐기적 상태로 진행되므로 이러한 조건에서의 미생물 생존 여부를 조사할 필요가 있다. 따라서 혐기적 상태에서의 미생물의 생존을 측정하는 실험을 하였는데 미생물의 탄소원 (sodium benzoate)이 존재할 때와 존재하지 않을 때로 나누어 관찰하였다. 탄소원이 존재하지 않을 때의 미생물 생존률이 탄소원이 존재할 때보다 낮았고 미생물의 소멸이 상대적으로 빠르게 진행됨을 볼 수 있었다. 탄소원이 존재할 때의 미생물 소멸 반감기는 약 50시간이었으며, 탄소원이 존재하지 않을 때는 이보다 짧은 약 30시간이었다. 따라서 본 연구에서와 같이 5시간 동안의 실험관찰은 미생물의 성장과 소멸에 의한 영향이 매우 적은 것으로 가정하였다.

#### 미생물의 모래흡착 실험

미생물이 모래에 흡착되는 데에는 여러 인자가 영향을 미친다. 그 중에는 모래 표면의 타입, 박테리아의 특성, 이온세기, pH, 분해된 유기물 등이 있다. 일반적으로 고체 표면으로의 흡착정도는 이온의 세기가 증가할수록 커진다. 이는 정전기적인 이중층의 감소로 인한 입자 표면과 박테리아 표면사이의 전기적인 반발력이 감소함으로써 나타난다. pH 또한 중요한 인자가 되는데, 일반적으로 높은 pH (7.0 이상)에서는 쉽게 흡착되지 않으려는 경향을 보이고 있다. 미생물들은 주로 세포에서 분비하는 점액이 모래에 붙는 점착제 역할을 하거나 기다란 모양의 편모가 모래에 달라붙게 한다. 완충용액으로 포화된 모래에서 미생물의 모래에 대한 흡착정도를 비교하기 위해 한쪽은 배양액만 들어있는 모래관을, 다른 쪽은 모래와 배양액을 넣어 비교 분석한 결과 미생물의 모래에 대한 흡착율은 약 17%정도였다.

#### 무작위 운동계수 측정실험

이 실험은 미생물의 모래속에서의 이동에 관한 실험으로 모래 크기, 시간, 그리고 거리에 따른 미생물의 분포를 플레이트 카운트법을 사용하여 알아보았다. Figure 2는 미생물의 이동분포를 모래크기, 시간, 거리에 따라 나타낸 것이다. 먼저 Figure 2의 (A)에서 거리에 따른 미생물의 분포가 나타나 있는데, 여기서 x축의 거리가 점점 커질수록 미생물의 개수가 점점 감소하고, 시간이 지날수록 미생물이 감소하는 정도가 줄어드는 것을 볼 수 있다. 이로서 미생물이 모래 속을 이동하고 있음을 알 수 있다. 또한 시간이 증가할수록 보다 많은 미생물이 모래 속을 이동하고 있음을 알 수 있다. 그리고 모래의 크기가 점점 작아질수록 시간대별로의 미생물 이동 분포곡선이 점점 작아지고 있음을 볼 수 있다. 이는 모래 크기가 작아질수록 입자 사이의 거리가 감소되어 미생물이 이동할 수 있는 공간이 점점 작아져 이동을 쉽게 할 수 없음을 나타낸다.

Table 1의 첫 번째 줄은 결보기 무작위 운동계수를 측정된 값이다. 먼저 무작위 운동계수 그래프 (Figure 2)에서 각각 측정시간 (1, 3, 5시간)별로 총 미생물의 농도를 구하였다. 여기서 구한 값이 식 (8)에서 모래속으로 침투한 미생물의 농도인  $N_{RM}(t)$ 이 되고,  $\pi r^2$ 으로 나누어 단위 면적당 미생물의 농도를 구하였다. 이 값에 초기 미생물 농도로 나누어 제공하고,  $(\pi/4t)$ 를 곱하여 미생물의 이동 속도인 결보기 무작위 운동계수를 구하였다. 측정결과  $0.85 \sim 1.68 \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{sec}$  정도의 값을 얻었으며, 공극률이 감소할수록 미생물의 유동성이 감소함을 보였다.

Table 1. Coefficients measured in sand column experiments. (unit: cm<sup>2</sup>/sec)

Coefficient	Sand Size	14-28 mesh (Porosity: 0.52)	28-28 mesh (Porosity: 0.49)	48-60 mesh (Porosity: 0.45)	60 mesh 이상 (Porosity: 0.44)
Apparent random motility coefficient in sand column		0.00168 <sup>1</sup> (±0.00067)	0.00136 (±0.00036)	0.00080 (±0.00027)	0.00085 (±0.00024)
Apparent random motility coefficient in sand column saturated by toluene		0.00125 (±0.00036)	0.00116 (±0.00042)	0.00105 (±0.00023)	0.00103 (±0.00043)
Apparent chemotaxis coefficient toward toluene in sand column		0.000068 (±0.000014)	0.000031 (±0.000017)	0.000033 (±0.000023)	0.000011 (±0.000002)
Diffusivity of toluene in sand column		0.00059 (±0.00022)	0.00071 (±0.00046)	0.00016 (±0.00008)	0.00021 (±0.00018)

<sup>1</sup> The data was taken as the average of each coefficient calculated on each time interval (for example, 1 hr, 3 hr, and 5 hr). The confidence of error range was 95%.

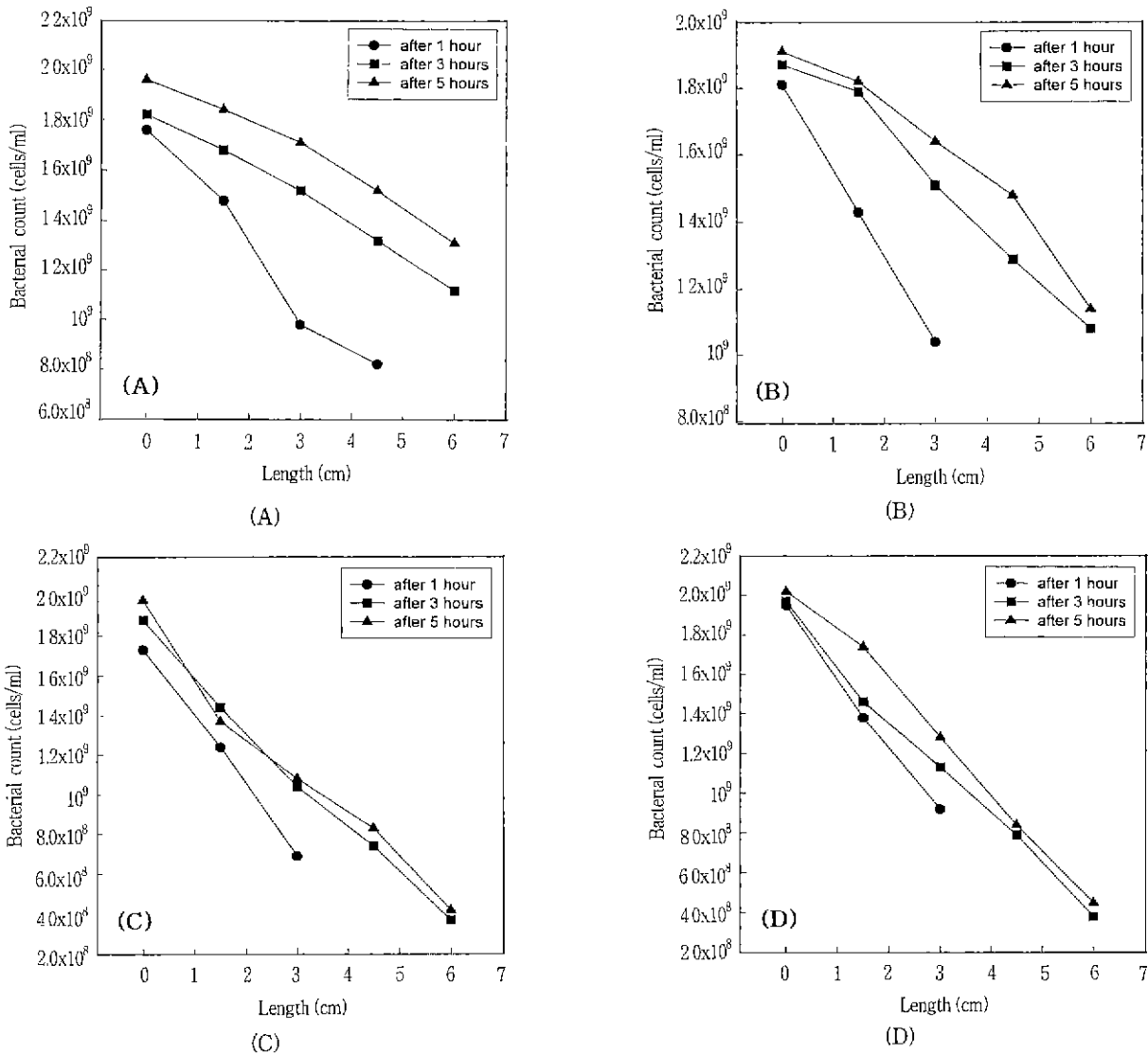


Figure 2. Distribution of bacteria in sand column due to random motility. The abscissa represents length of sand column from the top to the bottom, and the ordinate represents the number of bacteria measured by plate count method. Mesh size of sands is: (A), 14-28; (B), 28-48; (C), 48-60; (D) above 60.

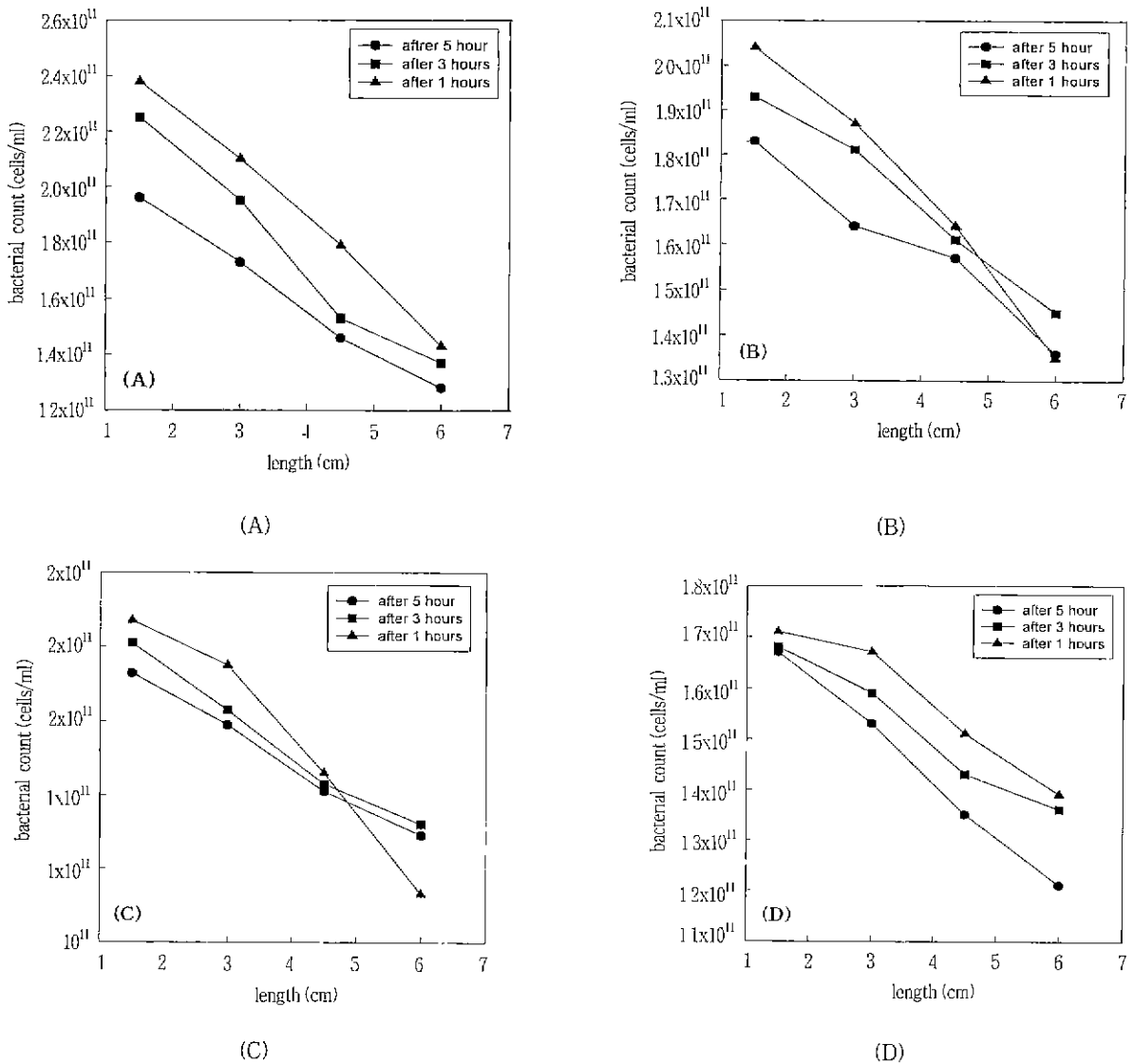


Figure 3. Distribution of bacteria in sand column due to chemotactic motility. The abscissa represents length of sand column from the top to the bottom, and the ordinate represents the number of bacteria measured by plate count method. Mesh size of sands is: (A), 14-28; (B), 28-48; (C), 48-60; (D) above 60.

Table 1의 두 번째 줄은 톨루엔으로 포화된 모래 속에서의 미생물의 이동속도를 측정된 값으로 무작위 운동계수와 같은 방법으로 계산한 결과이다. 주변환경에 톨루엔이 존재하는 경우도 겔보기 무작위 운동계수가 거의  $1.03 \sim 1.25 \times 10^{-3} \text{cm}^2/\text{sec}$  정도인 것으로 보아 미생물의 이동성에는 톨루엔이 크게 영향을 미치지 않는 것으로 보인다. 미생물의 이동과 공극률과의 관계는 톨루엔 유무에 관계없이, 공극률이 감소할수록 미생물의 이동성이 감소하는 경향을 보였다.

**Chemotaxis 계수 측정실험**

이 실험은 모래 속에서 미생물의 chemotaxis 특성을 관찰하기 위한 실험으로, 모래관 윗부분을 톨루엔으로 포화시키고, 아래의 모래층은 미생물로 포화시킨 후 톨루엔을 향해 이동하는 미생물의 분포를 알아보기 위한 실험이다. Figure 3은 으름물질인 톨루엔에 대한 미생물의 이동특성을 나타낸 것으로 모래 크

기가 커질수록, 시간이 증가할수록 미생물의 이동이 많아짐을 볼 수 있다. Figure 3의 (A)에서는 거리에 따른 미생물의 수를 측정된 것으로 거리가 증가할수록 미생물의 농도가 감소하고 있음을 보이고 있다. 이는 모래에 포화되어 있는 배양액내의 미생물이 모래관 윗부분에 있는 기질인 톨루엔을 향해 아래에서 위를 향해 움직이고 있음을 나타낸다. 미생물의 이동량은 시간이 흐를수록 증가하며, 미생물의 농도는 거리가 증가할수록 감소하고, 모래의 크기가 클수록 미생물의 농도가 빠르게 감소하고 있음을 알 수 있었다. Table 1의 세 번째 줄은 미생물의 겔보기 chemotaxis 계수를 측정된 값들을 요약한 것이다. 먼저 길이에 따른 미생물의 분포를 나타내는 그래프에서 모래속을 통과하여 톨루엔을 향해 이동한 미생물의 농도를 구하였다. 이는 실험초기 미생물의 농도와 실험중에 측정된 그래프의 미생물 농도의 차이로 구하였다. 이렇게 구해진 미생물의 농도를  $N_{RM}(t)$ 로 하여 식 (8)에 대입하고 단위면적으로 나누어 단위면적당 미생물

농도를 구했다. 그런다음 무작위 운동계수를 구할 때와 마찬가지로 초기 미생물의 농도로 나누어 제곱한 다음,  $(\pi/4t)$ 를 곱함으로써 톨루엔을 향해 이동하는 미생물의 겉보기 chemotaxis 계수를 구하였다. 겉보기 chemotaxis 계수는  $1.1 \sim 6.8 \times 10^{-5} \text{cm}^2/\text{sec}$  정도로 얻었으며, 공극률과 시간의 변화에 대한 미생물의 이동성 변화는 무작위 운동의 경우와 유사하게 얻어졌다. 여기서 측정된 chemotaxis 계수는  $10^{-5}$  단위로 무작위 운동계수의  $10^{-3}$  단위 보다 매우 작게 나타났는데, 이것은 *Alcaligenes xylosoxidans* Y234가 비록 톨루엔을 기질로 사용할 수는 있으나 강한 chemotaxis를 유발하지는 않고 오히려 떨어지는 경향을 보이는 것으로 해석할 수 있다. 즉 무작위운동에 의한 이동보다 톨루엔의 자극에 의한 이동이 덜 활발한 것은 톨루엔이 본 균주에 대해 매우 약한 chemotaxis를 갖는 것으로 보인다.

#### 톨루엔 확산계수 측정

이 실험은 모래관의 상층부를 톨루엔으로 포화된 용액으로 채우고, 하층부는 모래와 톨루엔이 없는 용액으로 채운 후 미생물의 무작위 운동계수 측정의 경우와 마찬가지로 시간별로 (1, 3, 5시간) 톨루엔의 농도를 측정할 것이다. 무작위 운동계수 측정의 경우와 마찬가지로 계산하여 톨루엔의 모래관에서의 확산계수를 구한 것을 Table 1의 네 제곱에 나타내었다 여기서도 시간이 지날수록, 모래 크기가 커질수록 모래관 하층부에서 톨루엔의 농도가 증가하고 있음을 볼 수 있다. 측정값을 보면 톨루엔의 확산계수가 chemotaxis 계수보다 약 10배 정도 크므로 미생물의 chemotaxis 이동 실험에서 미생물이 톨루엔에 의한 영향을 충분히 받았음이 증명된다.

#### 요 약

방향족 화합물, 특히 톨루엔에 대한 분해능력이 우수하다고 알려진 미생물종인 *Alcaligenes xylosoxidans* Y234를 대상으로 모래속에서의 이동성을 연구하였다. 대상 오염물질로는 톨루엔을 선택하여 4가지의 다른 공극률을 갖는 모래 시스템에 대해 *Alcaligenes xylosoxidans* Y234의 겉보기 무작위 운동계수 ( $\mu_{\text{app}}$  coefficient)와 겉보기 chemotaxis 계수 ( $\mu_{\text{c,app}}$  coefficient)를 측정하였다.

*Alcaligenes xylosoxidans* Y234가 실험에 사용된 모래에 대한 흡착율은 17%로 측정되었고, 모래관 실험을 통하여 겉보기 무작위 운동계수를 측정된 결과  $0.85 \sim 1.68 \times 10^{-3} \text{cm}^2/\text{sec}$  정도의 값을 얻었으며, 공극률이 감소함에 따라 미생물의 이동성이 감소함을 정량적으로 증명하였다. 겉보기 chemotaxis 계수는  $1.1 \sim 6.8 \times 10^{-5} \text{cm}^2/\text{sec}$  정도로 얻었으며, 공극률과 시간의 변화에 대한 미생물의 이동성 변화가 무작위 운동의 경우와 유사한 결과를 얻었다. 그리고 톨루엔에 대한 *Alcaligenes xylosoxidans* Y234의 chemotaxis 이동은 매우 약하게 나타났다.

#### 감 사

본 연구는 1996-1997년도 교육부의 생물화공 연구비 지원에

의하여 수행되었기에 감사드립니다. 또한 1997년도 광운대학교 교내연구비의 지원으로 부분적인 도움을 받았기에 감사드립니다.

#### 참 고 문 헌

- Adler, J. (1966), Chemotaxis in Bacteria, *Science*, **153**, 708-716.
- Lauffenburger, D. A (1985), Chemotaxis: Analysis for Quantitative Studies, *Biotechnology Progress*, **1**, 151-160.
- Harwood, C. S., R. E. Parales, and M. Dispensa (1990), Chemotaxis of *Pseudomonas putida* toward Chlorinated Benzoate, *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 1501-1503.
- Lopez de Victoria, G. (1989), Master's Thesis. University of Puerto Rico, Rio Piedras Campus.
- Harwood, C. S., K. Fosnaugh, and M. Dispensa (1989a), Flagellation of *Pseudomonas putida* and Analysis of Its Motile Behavior, *Journal of Bacteriology*, **171**, 4063-4066.
- Barton, J. W. and R. M. Ford, Quantitative Characterization of Bacterial Migration Through Sand Cores, *Environmental Biotechnology for Waste Water Treatment*, ed., R. Govind, C. D. Litchfield and P. R. Bienkowski, CRC Press-Lewis Publishers, in press.
- Keller, E., and L. Segel (1971), Model for Chemotaxis, *J. Theor. Biol.*, **30**, 225-234.
- Ford, R. M. and D. A. Lauffenburger (1991a), Measurement of Bacterial Random Motility and Chemotaxis Coefficients: I. Stopped-Flow Diffusion Chamber Assay, *Biotechnol. Bioeng.*, **37**, 647-660.
- Ford, R. M. and D. A. Lauffenburger (1991b), Measurement of Bacterial Random Motility and Chemotaxis Coefficients: II. Application of Single-Cell-Based Mathematical Model, *Biotechnol. Bioeng.*, **37**, 661-672.
- Rivero, M. A., R. T. Tranquillo, H. Buettner, and D. A. Lauffenburger (1989), Transport Models for Chemotactic Cell Populations Based on Individual Cell Behavior, *Chem. Eng. Sci.*, **44**, 2881.
- Roseanne M. Ford (1992), Mathematical modeling and quantitative characterization of bacterial motility and chemotaxis, *John Wiley & Sons, Inc.*, **7**, 199-200.
- Ford, R. M. and P. T. Cummings (1992), On the relationship between cell balance equations for chemotactic cell populations. *SIAM J. Appl. Math.*, **52**, 1426-1441.
- Harwood, C. S., R. E. Parales, and M. Dispensa (1990), Chemotaxis of *Pseudomonas putida* toward Chlorinated Benzoates, *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 1501-1503.
- Yeom, S. H., S. H. Kim, Y. J. Yoo, and I. S. Yoo (1997), Microbial Adaptation in the Degradation of Phenol by *Alcaligenes xylosoxidans* Y234, *Korean J. of Chem. Eng.*, **14**, 37-40.