

표면특성 변화에 따른 유류분해 미생물의 토양내 기동성 조절

류두현* · 목지에* · 최상일** · 김용미* · 이경애*

전주대학교 환경과학과*, 광운대학교 환경공학과**

<요약문>

The adhesion of hydrocarbon degrading bacteria(HDB) differing in surface hydrophobicity was investigated. Cell wall hydrophobicity was modified chemically and physiologically. Modified adhesion deficient mutant of HDB was selected in a soil column assay. Physiologically and chemical modification increased cell surface hydrophobicity. Cell surface characteristics including BATH and zeta potential were measured. Physiological modification using ampicillin was not stable, but chemical modification was stable. Hydrocarbon degrading potential was measured for modified and unmodified HDB.

key word : Bacteria, Cell Surface, Hydrophobicity

1. 서론

국내외적으로 토양내 유기성 오염물질의 분해속도를 가속화하기 위해서 오염물질 분해성이 우수한 미생물을 분리 증식하여 첨가하는 연구가 많이 진행되어 왔다. 인공제조된 미생물 첨가가 특정오염물질의 분해율을 촉진시킬 수도 있지만, 이러한 미생물은 자연적으로 서식하고 있는 미생물에 비하여 경쟁력이 낮으므로 시간이 지남에 따라 미생물 첨가의 영향이 감소하는 경향을 보인다. 그러나 오염물질에 순응된 미생물을 첨가하는 것은 초기의 분해속도를 가속화시킴으로써 오염토양 정화기간을 단축시켜 줄 수 있다. 오염토양을 굴착하여 지상에서 처리하는 생물학적 *ex-situ* 기술에서는 미생물을 첨가하여 혼합함으로써 미생물을 비교적 골고루 오염토양과 혼합시킬 수 있다. 반면에 토양을 굴착하지 않고 지중(地中)에서 처리하는 바이오벤팅(bioventing)과 같은 *in-situ* 기술에서는 미생물을 오염토양 내에 균일하게 주입하는 데에 많은 제약이 따른다. 지금까지는 미생물을 주입하기 위하여 토양내에 미생물 주입정을 설치한 후 미생물을 주입하면서 공기압으로 밀어넣거나 자연유하시키는 방법에 의존하여 왔다. 그러나 이러한 방법들로 미생물을 토양에 주입할 경우 미생물 대부분이 토양상부층에서 여과(filtering)되어 오염지역 심부까지 미생물을 이동시키기가 어려우므로 고가의 인공제조 미생물 사용시 만족할 만한 효과를 얻는 것은 어렵다.

유류는 소수성(hydrophobic)이므로 토양공극내에 강하게 흡착되어 액상에서의 이동이 제한된다. 또한 미생물이 오염물질을 분해하기 위해서는 수분에 녹아있는 오염물질을 세포내로 흡수하여야 하므로 일반적으로 소수성 물질은 친수성 물질보다 생물학적 분해가 용이하지 않다. 미생물 세포벽의 특성이 변

화하는 경우도 미생물의 토양입자에 대한 물리적 흡착성과 토양내 미생물의 이동성에 영향을 미치므로 이에 대한 연구도 관심의 대상이 되고 있다.

본 연구에서는 *in situ* 생물학적 정화기술 적용시 오염물질의 분해속도를 가속화하기 위하여 미생물을 주입할 경우에 미생물의 토양내 이동성을 개선하기 위한 기초연구로 실시하였으며, 주요 연구내용으로 계면활성제의 첨가와 세포벽 조성변화의 영향에 대하여 검토하였다.

2. 본 론

본 실험에 사용된 토양은 J대학교 교정에서 채취하였으며, 그늘에서 풍건시킨 후 2 mm체로 거른 후 통과된 토양은 다시 40~70 mesh 토양체로 선별하여 미생물의 토양투과성 실험에 사용하였다. 3 mL 용량의 플라스틱 주사기를 미니컬럼으로 사용하여 여과지(Whatman No. 4)를 깔 후 토양(40~70 mesh 토양체를 이용하여 선별된 토양) 1.5g을 주입하였다. 실험 전 각 컬럼을 습윤 멸균(121°C, 15min)하였으며, 하루 이상 건조 오븐에 넣어 습기를 제거하여 균일한 조건의 습도를 유지하도록 하였다. 위와 같은 방법으로 직경 1cm, 길이 20cm인 유리 컬럼에 토양 8g씩을 주입하여 실험하였다.

실험에 사용된 미생물은 오염 토양에서 선별하여 유류 분해성이 좋다고 판명된 *Acinetobacter calcoaceticus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter caucerogenus* 등에 대하여 비교실험 하였다. 배양된 미생물을 LB 배지에 OD₆₀₀ 0.05~0.1에서 OD₆₀₀ 0.6~0.8(exponential phase)까지 재배양하였다. 배양된 미생물을 원심분리(VS-15 CFN, 8000 rpm, 10 min)하여 상등액은 버리고 셀을 분리한 후, 멸균증류수로 3회 반복 세척하여 영양원 및 이온성분을 제거한 후 OD₆₀₀ 0.2의 현탁액을 제조하였다. 미생물 현탁액과 토양의 충분한 접촉을 위하여 상온에서 무균상에서 30분간 방치 후 현탁액을 중력배수 시켰고 컬럼을 통과한 여액을 멸균 증류수로 적당히 희석하여 LB agar 배지에 도말하고, 37°C, 16~18시간 배양하였다. 콜로니수를 측정하여 CFU값을 계산하고 투과성은 컬럼에 투여된 미생물의 개체수에 대한 투과된 미생물의 개체수의 비를 백분율하고 다음 식에 의해 α (Sticking coefficient) 값을 계산하였다. α 는 미생물이 토양 컬럼 투과시 토양 입자에 부착하는 정도를 나타내는 상수로써¹, 값이 작을수록 토양내 투과성이 증진된다.

$$\frac{C}{C_0} = \exp\left[-\frac{3}{2} \frac{(1-\theta)}{d_r} \alpha \eta L\right]$$

α : column porosity

η : collector efficiency

L : distance

d_r : diameter of the porous medium particle

각각의 미생물은 여러 성장조건에 따라 표면특성이 변화하게 되고 이에 따라 친수성과 소수성으로 나뉘게 되어 이동성에도 영향을 주는데, BATH test를 통하여 미생물들의 표면특성을 알아보았다. 항생제 중 Ampicillin을 이용하여 미생물의 생장에 조건을 다르게 해주어 세포벽의 특성을 변화시켰다. Ampicillin의 농도는 MIC(minimum inhibition concentration)값까지 변화시켜 관찰하여 보았다. LB배지에 Ampicillin의 농도를 변화시켜 미생물을 배양한 후, 위의 투과성 실험과 마찬가지로 현탁액을 제조하고 미생물의 토양 투과성에 대한 영향을 살펴보았다.

3. 결 론

계면활성제의 첨가와 세포벽 조성변화의 영향을 검토한 결과 얻어진 결론은 다음과 같다. 미생물 세

포벽의 특성을 알아보기 위해 BATH test를 실시한 결과 *A. calcoaceticus*는 소수성이 가장 높으며, *E. caucerogenus* 표면은 가장 친수성이 높았다. 세포 표면이 특히 소수성인 *A. calcoaceticus*의 투과성이 제일 낮았으며, 세포벽이 친수성인 *E. caucerogenus*의 토양내 투과성이 가장 우수하였다. 즉, 세포벽의 친수성이 높은 미생물을 적용하는 것이 생물학적 복원에 더 효과적인 것으로 판단된다. 이에 Ampicillin을 첨가하여 배양시킨 미생물의 투과성 실험은 2cm 주사기 컬럼과 9cm 유리컬럼 모두 MIC 값에 가까울수록 미생물의 표면특성이 소수성으로 변화하여 투과성이 낮아졌다.

토양내 이동성을 증진시키기 위해 MMS(methyl methanesulfonate, Sigma)의 투입 농도를 다르게 하여 미생물의 세포벽 조성을 화학적으로 변화시켰는데, 원래의 균주보다 투과성이 향상됨을 알 수 있었다. *A. calcoaceticus* 경우 6.25 μ l의 농도의 MMS로 변이된 미생물의 투과성은 *A. calcoaceticus*가 0%일 때 14.7 \pm 2.9%로 투과성이 향상 되었으며, *K. pneumoniae* 경우 원주의 토양 투과성이 0%일 때 6.25 μ l, 12.5 μ l의 농도로 변이시켜 변화된 것의 투과성은 각각 3 \pm 0.25%, 99 \pm 13.82%으로 상대적으로 향상됨을 알 수 있었다. 그러나 원래 세포벽의 친수성이 높은 *E. caucerogenus*의 경우는 원주의 토양 투과성이 약 1 \pm 0.27%일 때 6.25 μ l, 12.5 μ l의 농도로 변화시킨 것의 경우 각각 3.3 \pm 1.13%, 2.2 \pm 0.95%로 토양 투과성이 향상되어 다른 균주에 비하여 상대적으로 토양 이동성의 증진이 크지 않음을 알 수 있다.

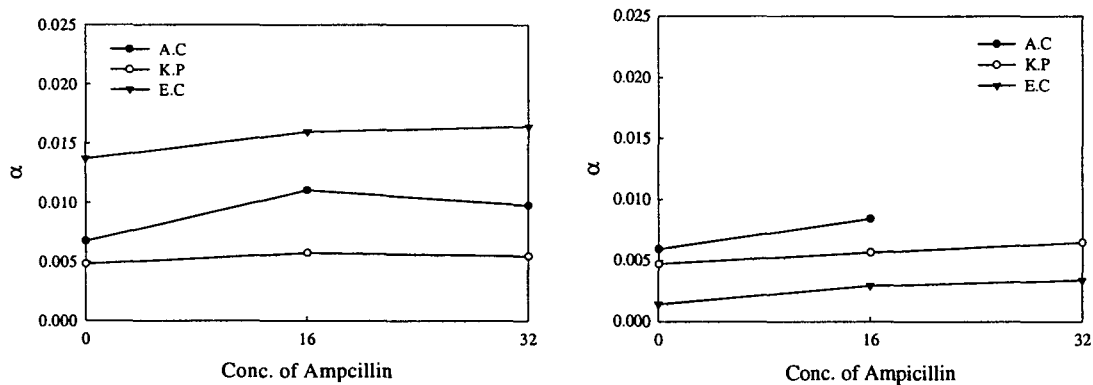


Fig. 1. Variation of soil transport tendency induced by ampicillin treatments were characterized by sticky coefficient(α).

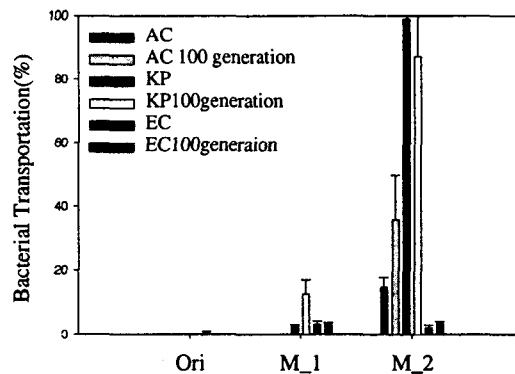


Fig. 2. Variation of soil transport tendency induced by chemical treatments.

4. 참고문헌

1. M.J. Gross and B.E. Logan, *Influence of different chemical treatment on transport of Alcaligenes paradoxus in porous media*, Appl. & Env. Microbiol. 61(5), 1750-1756(1995).