大韓環境工學會誌 論文 - Original Paper 1017~1023, 2010

지질매질체내에서 계면활성제가 박테리아 이동 증진에 미치는 영향

Influence of Surfactants on Enhancing Transport of Bacteria in Geological Materials

최낙철 · 박성직 · 김성배† · 김동주* · 이성재**
Nag-Choul Choi · Seong-Jik Park · Song-Bae Kim† · Dong-Ju Kim* · Seong-Jae Lee**

서울대학교 환경바이오콜로이드공학연구실 · *고려대학교 환경지질연구실 · **(주)한라산업개발 환경기술연구소
Environmental Biocolloid Engineering Laboratory, Seoul National University
**Environmental Hydrogeology Laboratory, Korea University · **Environmental R&D Center, Halla Energy & Environment*

(2010년 7월 23일 접수, 2010년 11월 17일 채택)

Abstract : This study investigated the effect of surfactants (nonionic surfactant (Tween 20), biosurfactant) on enhancing transport of bacteria (*Bacillus subtilis* ATCC 6633) in geological materials. Column experiments were performed under various surfactant conditions with columns packed with quartz sand (particle size distribution: 0.5~2.0 mm, mean diameter: 1.0 mm). Bacterial mass recovery, sticking efficiency, and other parameters were quantified from breakthrough curves. Results indicate that bacterial attachment to sand surfaces increased considerably in the presence of mineral salt medium (MSM), especially at the inlet, which was due to the increase of ionic strength by MSM. It was observed that bacterial transport in sand columns was enhanced in the presence of surfactant. Results also show that simultaneous injection of both surfactant and MSM or pre-injection of surfactant was more effective in bacterial transport enhancement than after-injection of surfactant. This study suggests that transport of bacteria in geological materials could be influenced by surfactants and their injection methods.
Key Words : *Bacterial Transport, Nonionic Surfactant, Biosurfactant, Geological Materials*

요약 : 본 연구에서는 지질매질체내에서 계면활성제(비이온성 계면활성제(Tween 20), 생계면활성제)가 박테리아(*Bacillus subtilis* ATCC 6633)의 이동 증진에 미치는 영향을 분석하였다. 계면활성제가 존재하는 다양한 실험조건에서 석영모래(입경분포: 0.5~2.0 mm, 평균입경: 1.0 mm)로 충진된 칼럼을 이용하여 박테리아의 이동에 관한 칼럼실험을 수행하였고, 박테리아 파과곡선으로부터 질량회수율과 부착효율 등을 정량화하였다. 실험결과, MSM(박테리아 성장에 필요한 무기물 배지)의 존재 하에서 매질체 표면에 박테리아의 부착이 상당히 증가하였는데(특히, 주입부분에), 이는 MSM으로 인한 이온강도의 증가 때문이다. 계면활성제가 존재할 경우에는, 계면활성제로 인하여 매질체내에서 박테리아 이동이 증진됨을 관찰할 수 있었다. 또한, MSM과 생계면활성제 주입방법에 따른 박테리아의 이동을 비교한 결과, 박테리아의 이동 증진을 위한 주입조건은 박테리아를 함유한 MSM용액보다 계면활성제를 선주입하거나, 또는 MSM용액과 계면활성제를 동시주입하는 것이 효과적임을 알 수 있었다. 본 연구를 통해 계면활성제의 존재와 주입방법이 박테리아의 이동에 영향을 미칠 수 있음을 알 수 있었다.
주제어 : 박테리아 이동, 비이온성 계면활성제, 생계면활성제, 지질매질체

1. 서 론

전 세계적으로 토양 · 지하수 오염과 그에 따른 수자원 오염이 큰 문제가 되고 있는 가운데, 유류로 오염된 토양 · 지하수의 복원과 관련하여 원위치 생물학적 복원법(in situ bioremediation)에 대한 관심이 높아지고 있다. 생물학적 복원법은 미생물을 이용하여 토양 · 지하수에 존재하는 독성 오염물질을 저독성 물질로 변환시키거나 완전히 분해시키는 방법이다. 이 복원법은 복원비용이 저렴하고, 유지관리가 용이하며, 넓은 지역에 적용 가능하다는 장점을 가지고 있어서 현장 적용사례가 증가하고 있다.

원위치 생물학적 복원법 중 생물학적 증대법(bioaugmentation)은 오염된 현장에 존재하는 오염물질 분해 박테리아의 양을 인위적으로 증가시키는 방법이다. 이를 위하여, 오염현장에서 분리한 박테리아나 특정 오염물질을 분해할 수 있는 박테리아를 실험실에서 배양하여 인위적으로 오염현장에 공급하는데, 이 복원방법의 효율성 증대에 있어서 박테리아의 이동은 매우 중요한 역할을 한다. 지질매질체내에서 박테리아의 이동은 박테리아의 특성(표면전하, 소수성, 크기 등), 지질매질체의 특성(표면전하, 입자크기, 입자모양 등), 그리고 수용액 특성(pH, 이온구성, 이온강도 등)의 영향을 받는다.

생물학적인 복원에 있어서, 계면활성제(surfactant)를 적용하여 오염물질의 분해를 촉진시키려는 연구들이 여러 연구자들에 의해 수행되었다. Kim 등[1]은 비이온성 계면활성제(nonionic surfactant)가 존재하는 환경에서 다환방향족 탄화수소(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)의 저감에 관한 연구를 수행하였다. Catherine 등[2]은 안트라센(anthracene)과 피렌(pyrene)의 생물학적 분해에 있어서, 비이온성 계면활성제와 온도의 영향을 분석하였다. Gao 등[3]은 계면활성제의 독성이 소수성 유기화합물(hydrophobic organic compounds)의 생분해에 미치는 영향을 연구하였다. 또한, 생물

† Corresponding author E-mail: songbkim@snu.ac.kr Tel: 02-880-4587 Fax: 02-873-2087

학적 복원을 위하여 박테리아를 주입하는 하는 과정에서, 박테리아의 이동을 증진시키기 위하여 계면활성제(surfactant)를 적용하려는 연구가 여러 연구자들에 의하여 수행되었다. 예를 들면, 다환방향족 탄화수소와 페난트렌(phenanthrene)과 같은 유기오염물질로 오염된 지역에서 계면활성제가 미생물의 이동에 미치는 영향에 관한 연구가 수행되었다.[4~6] 또한, 몇몇 연구자들은 생물학적 복원 증진을 위하여 계면활성제가 미생물과 콜로이드(colloid)의 표면전하에 미치는 영향과 그에 따른 이동에 미치는 영향을 연구하였다.[7~11] 이외에도, 계면활성제가 미생물의 정전기적 특성과 소수성에 미치는 영향 연구[12,13]와 계면활성제의 특성(구조, 농도)이 매질체 표면에 미치는 영향에 관한 연구[14,15]가 수행되었다. 하지만, 생물학적인 복원과 관련하여, 생계면활성제(biosurfactant)가 박테리아의 이동에 미치는 영향에 관한 연구는 거의 전무한 실정이다.

본 연구목적은 지질매질체내에서 계면활성제가 박테리아의 이동에 미치는 영향을 조사하는 것이었다. 이를 위하여, 비이온성 계면활성제와 생계면활성제가 존재하는 다양한 실험조건에서 박테리아(*Bacillus subtilis*)의 이동에 관한 칼럼실험을 수행하였다. 박테리아 파과곡선(breakthrough curve)으로부터 질량회수율(mass recovery)과 매질체로의 부착효율(sticking efficiency) 등을 정량화하였고, 이를 통하여 계면활성제의 종류나 주입방법이 박테리아의 이동에 미치는 영향을 분석하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 박테리아 배양

실험에 사용된 박테리아는 생물학적 복원에 적용 가능한 *B. subtilis* ATCC 6633 (KCCM 11316)이며, 한국 미생물 보존센터(Korea Culture Center for Microorganism)에서 구입하였다. 박테리아의 준비과정은 멸균된 LB배지(tryptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 5 g, distilled water 1 L) 200 mL가 담긴 삼각플라스크에 계대배양된 박테리아를 3 mL 주입하고, 배양기(Daihan scientific, DH. LIB. 200M)에서 박테리아 성장과정 중 정상기까지 84시간 동안 30℃로 배양하였다. 배양된 박테리아 현탁액을 4℃조건의 원심분리기(Vision Scientific, VS-24SMTi)에서 10,000 rpm으로 20분 동안 원심분리한 후 상등액을 버렸다. 영양배지물질을 확실하게 제거하기 위하여, 농축된 박테리아에 멸균된 3차 증류수를 넣고 위와 동일한 조건에서 다시 원심분리를 하였다. 칼럼실험에 사용된 박테리아의 초기농도는 자외선-가시선 분광광도계(UV-visible spectrophotometer, Thermo, Helios)를 이용하여 1.0 OD_{600} (1.25×10^{10} CFU/ml)으로 맞추었다.[16] 실험에 사용된 모든 배지와 초자기구들은 다른 미생물에 의한 오염을 방지하기 위하여 17.6 psi, 121℃ 조건의 가압멸균기(JISICO, J-NAS2)에서 15분간 멸균시켜 사용하였다.

실험에 사용된 *B. subtilis*의 입자크기는 투과전자현미경(transmission electron microscope)을 통해 이미지를 얻은 후, 이미지 처리 프로그램(Image-Pro Plus)를 이용하여 결정하였다. *B. subtilis*의 크기는 평균길이 1.67±0.31 μm, 평균직경 0.77±0.07 μm이며, 구 모양으로 환산된 직경(equivalent diameter)은 1.18±0.10 μm이었다. 박테리아 표면의 정전기적 특징은 전기영동광산란계(ELS-8000, Otsuka Electronics, Japan)를 이용하여 분석하였다. *B. subtilis* 표면의 전기영동이동도(electrophoretic mobility)를 측정한 후(pH=6.2, 온도=25℃, 이온강도≈0 mM), Smoluchowski식을 이용하여 제타전위(zeta potential)을 결정하였는데, *B. subtilis*의 제타전위는 -31.9±2.5 mV이었다.

2.2. 매질체와 계면활성제

실험에는 매질체로 석영모래(quartz sand)를 사용하였다. 석영모래는 유기물을 미리 제거한 모래(주문진사)로서, 실험에 사용된 모래의 입경분포는 0.5~2.0 mm (No. 35~10 mesh, US standard sieve)사이에 있었으며, 평균입경은 1.0 mm이었다. 모래에 존재하는 부유물질에 의한 미생물 농도 측정 시(OD를 이용한) 오차를 방지하기 위하여, 증류수로 OD_{600}에서 0.01 이하가 될 때까지 세척하였다. 세척된 모래는 가압멸균기(JISICO, J-NAS2)에서 121℃, 17.6 psi 조건하에 15분간 2회에 걸쳐 멸균하여, 다른 미생물에 의한 오염을 최소화하였다. 한편, 본 실험에서 사용된 계면활성제는 비이온성 계면활성제인 Tween 20과 생계면활성제이며, 생계면활성제는 *B. licheniformis*, *B. subtilis*, 그리고 *Achromobacter*의 생산물로 이루어져 있었다.

2.3. 박테리아 생존실험

*B. subtilis*에 대한 계면활성제(Tween 20, 생계면활성제)의 독성을 알아보기 위하여, 정적인 배치조건에서 박테리아 생존실험을 수행하였다. 실험에는 박테리아 생장에 필수적인 영양소로 이루어진 무기물 배지(mineral salt medium, MSM)를 멸균하여 사용하였다. 또한, MS 배지[17]는 멸균된 MSM 배지에 약간의 성분 변화를 준 것으로서, 증류수(liter)에 K_2HPO_4 6 g, KH_2PO_4 4 g, $(NH_4)_2SO_4$ 2 g, $MgCl_2$ 4.95 g, $CaCl_2$ 1.25 g, H_3BO_3 0.255 g, $ZnSO_4$ 0.6 g, $NiSO_4$ 0.18 g, $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ 0.18 g, $CuSO_4$ 0.03 g, $MnSO_4$ 0.5 g, $CoCl_2$ 0.19 g, $FeCl_3$ 0.04 g를 첨가하여 제조하였다.[18] 박테리아 생존율은 250 mL 삼각플라스크에 약 1.0 OD_{600} 농도의 박테리아(MSM이 함유된) 용액 200 mL를 넣고, 실험조건에 따라 Tween 20이나 생계면활성제를 첨가하여(농도조건, 0.1%, v/v), 진탕배양기(shaking incubator, DAIHAN Scientific, SHAKI16)에서 30℃, 140 rpm 조건으로 24시간 반응시킨 후, 박테리아 농도를 자외선-가시선 분광광도계(OD_{600})로 측정하여 결정하였다. 실험결과의 신뢰도를 높이기 위하여, 생존실험은 각 조건에서 중복 수행하였다.

2.4. 칼럼실험

계면활성제의 존재 하에서 박테리아의 이동 특성을 분석

Table 1. Column experimental conditions and results for bacteria transport under different surfactants and injection conditions

Exp.	Surfactant injection	Flow rate (mL/min)	Bulk density (g/cm^3)	Porosity	Influent bacteria (OD_{600})	Mass recovery (%)	Sticking efficiency (α)	Collector efficiency (C_e)
A	MSM*	2	1.624	0.387	0.995	48.9	0.00536	0.000259
B	Simultaneous injection of MSM/Tween 20**	2	1.614	0.391	1.029	54.9	0.00457	0.000219
C	Simultaneous injection of MSM/Biosurfactant	2	1.620	0.389	0.985	45.9	0.00589	0.000283
D	Biosurfactant followed by MSM	2	1.597	0.398	0.983	44.0	0.00644	0.000303
E	MSM followed by Biosurfactant	2	1.634	0.383	0.988	26.5	0.00979	0.000478

*: mineral salt medium; **: nonionic surfactant

하기 위하여 동적인 포화 흐름조건에서 칼럼실험을 수행하였다. 실험에는 폴리카보네이트(polycarbonate) 재질의 칼럼(내경 5 cm, 높이 30 cm)을 사용하였다. 매질체를 30 cm까지 충진한 후 칼럼조건을 측정한 결과, 매질체 질량은 918.7±9.1 g, 체적밀도 1.560±0.015 g/cm^3, 공극율 0.411±0.006 이었다(Table 1). 매질체로 채워진 칼럼에 정량펌프(FASCO, QG400)를 이용하여 2 mL/min의 유량조건에서 상향으로 멸균된 증류수를 주입하여(8~10 pore volume) 포화된 정상류 상태에 이르게 하였고, OD_{600}이 0임을 확인 후 주입용액을 상향으로 60분 동안 주입하였다. 그리고, 유출수를 자동포집기(auto collector, TELEDYNE, Retriever 500)를 이용하여 일정한 시간간격으로 획득한 후, 자외선-가시선 분광광도계(OD_{600})로 박테리아 농도를 측정하였다. 다섯 가지 칼럼실험의 주입조건(용액)을 정리하면, 다음과 같다: Exp. A (박테리아 1.0 OD_{600} 함유 MSM 용액 주입), Exp. B (박테리아 1.0 OD_{600} 함유 MSM 과 Tween 20 동시주입), Exp. C (박테리아 1.0 OD_{600} 함유 MSM과 생계면활성제 동시주입), Exp. D (생계면활성제 선주입, 박테리아 1.0 OD_{600} 함유 MSM 후주입), Exp. E (박테리아 1.0 OD_{600} 함유 MSM 선주입, 생계면활성제 후주입). 실험결과의 신뢰도를 높이기 위해 실험은 각 조건에서 반복 수행하였다. 또한, 칼럼실험 종료 후 매질체에 박테리아의 부착 여부를 파악하기 위하여, 주사전자현미경(scanning electron microscope, SEM) 분석을 실시하였다. 또한, 칼럼 내 이동거리에 따른 박테리아의 부착 정도를 정량화하기 위하여, 칼럼실험 후 충진 매질체를 10 cm 간격으로 채취하여 유기물 함량을 측정하였다.

2.5. 데이터 분석

칼럼실험을 통해 얻은 유출수 데이터로부터 획득된 박테리아의 질량회수율을 이용하여 매질체내에서 계면활성제가 박테리아의 이동에 미치는 영향을 분석하였다. 질량회수율(M_r)은 다음식을 이용하여 계산하였는데:

$$M_r = \frac{\int_0^t C_t dt}{C_0 t_0} \quad (1)$$

여기서, t는 시간, C_t는 시간 t에 따른 박테리아 농도, C_0는 초기 박테리아 주입 농도, 그리고 t_0는 박테리아 주입 시간이다. 일반적으로, 박테리아 이동 칼럼실험에서 박테리아의 부착에 의한 질량회수율 감소는 콜로이드 여과 이론(colloid filtration theory)의 여재효율(collector efficiency, C_e)을 이용하여 나타낼 수 있는데:

$$C_e = \eta \times \alpha \quad (2)$$

여기서, 충돌효율(collision efficiency, η)은 박테리아와 매질체 사이의 충돌확률을 뜻한다. 충돌효율은 Tufenkji과 Elemelech식[19]을 이용하여 계산하였는데:

$$\eta = 2.4 A_S^{1/3} N_R^{-0.081} N_{Pe}^{-0.052} + 0.55 A_S N_R^{-1.675} N_A^{-0.125} + 0.22 N_R^{-0.24} N_G^{-1.11} N_{vd}^{-0.053} \quad (3)$$

여기서, A_S는 공극관련 변수, N_R은 형상비, N_{Pe}은 Peclet 수, N_{vd}는 van der Waals 수, N_A은 인력수 그리고 N_G은 중력수이다. 그리고, α는 매질체와 충돌한 박테리아의 매질체로의 부착효율(sticking efficiency)을 나타낸다. 부착효율은 다음 식을 이용하여 계산하였는데:

$$\alpha = -\frac{2}{3}\frac{d_C}{(1-n)L\eta}\ln\left(\frac{M_r}{100}\right) \quad (4)$$

여기서, d_C는 매질체 입자크기, L은 칼럼길이 그리고 n은 공극율이다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 계면활성제와 박테리아 생존율

동일한 계면활성제 농도조건(0.1%, v/v)에서, 계면활성제(Tween 20, 생계면활성제)가 *B. subtilis* ATCC 6633에 미치는 독성을 파악하기 위하여 수행한 생존실험 결과를 Table 2에 나타내었다. 0.1% (v/v)농도의 MSM용액 조건에서는 24시간 후 박테리아의 농도가 초기에 비하여 약 20% 감소하였다. MSM에 Tween 20이 첨가된 조건에서는 박테리아의

농도가 초기에 비하여 약 12% 감소하였고, MSM용액 조건과 비교하였을 때 약 8% 정도 생존율이 높게 나타났다. 이는 0.1%에서 Tween 20의 독성이 박테리아의 생존에 영향을 미치지 않음을 나타낸다. Streger 등[20]의 연구에 의하면, Tween 20이 존재하는 조건에서 24시간 생존실험을 수행한 결과, MTBE분해 미생물인 *Hydrogenophaga flava* ENV735는 0.01% (v/v)에서는 102%, 0.1% (v/v)에서는 2%의 생존율을 보였다. MSM에 생계면활성제가 첨가된 조건에서는 박테리아 농도가 약 20% 정도 감소하였고, MSM용액 조건과 비슷한 생존율을 보였다. 이는 역시 0.1%조건 하에서 생계면활성제의 독성이 박테리아의 생존에 영향을 미치지 않음을 나타낸다. 따라서, 0.1% 초기농도로 본 연구에 사용된 두 계면활성제(Tween 20, 생계면활성제)는 칼럼실험 기간 중 박테리아의 생존에 영향을 주지 않았음을 알 수 있다.

3.2. 계면활성제 종류에 따른 박테리아의 이동

MSM 용액(박테리아 포함), MSM에Tween 20 (0.1%, v/v)이 추가된 용액, 그리고 MSM에 생계면활성제(0.1%, v/v)가 추가된 용액 조건에서 수행한 칼럼실험으로부터 얻어진 박테리아 파과곡선과 매질체에 부착된 박테리아의 부착퍼센트(attachment percent)를 Fig. 1에 나타내었다. 또한, 칼럼 실험조건과 실험을 통해 얻어진 박테리아의 질량회수율과 부착율 등은 Table 1에 정리하였다. 더불어, 칼럼 실험결과에 대한 콜로이드 여과 이론의 변수 값은 Table 3에 제시하였다. 박테리아 이동 실험결과, MSM용액(계면활성제가 없는)조건(Exp. A)에서의 질량회수율은 48.9%이었고, MSM에 생계면활성제가 추가된 조건(Exp. C)에서의 질량회수율은 MSM 용액조건과 비슷한 45.9%로 나타났다. 반면, MSM에 Tween 20이 추가된 조건(Exp. B)에서는 앞의 두 경우보다 약간 높은 질량회수율(54.9%)을 보였다. 박테리아의 부착효율(α)의 경우, Exp. A와 Exp. C에서 각각 0.00536과 0.00589이었고, Exp. B에서는 0.00457로써, 앞의 두 경우보다 낮았다.

일반적으로, 박테리아와 석영모래는 중성 pH조건에서 음전하를 띄고 있다.[21] 따라서, 석영모래와 박테리아 사이에

Table 2. Survival percents of *Bacillus subtilis* ATCC 6633 in the presence of surfactants (0.1%)

Surfactant	0 h (OD_{600})	24 h (OD_{600})	Survival percent (%)
MSM*	1.041±0.010	0.843±0.004	80.9
MSM+Tween 20**	1.040±0.006	0.918±0.050	89.0
MSM+Biosurfactant	1.032±0.003	0.852±0.014	82.0

*: mineral salt medium; **: nonionic surfactant

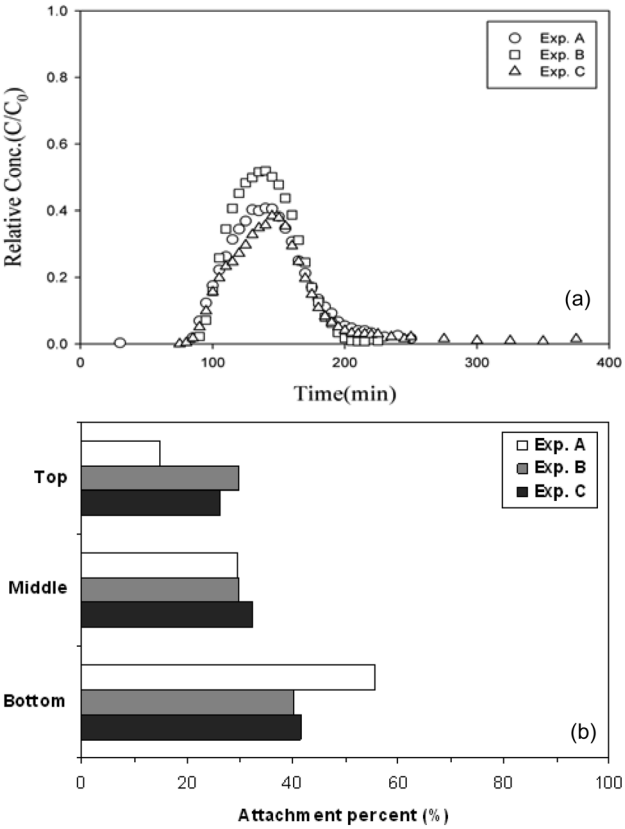

Fig. 1. Column experimental results in the presence of surfactants: (a) breakthrough curves; (b) percent of bacteria attached to sand. Exp. A = mineral salt medium (MSM), Exp. B = MSM and nonionic surfactant (Tween 20), Exp. C = MSM and biosurfactant. Note that bacteria were injected in upflow mode during column experiments.

는 정전기적인 반발력이 작용하여, 석영모래에서의 박테리아 부착은 용이하지 않다. 본 칼럼실험(Exp. A-C)의 결과를 보면, 약 50% 정도의 박테리아가 석영모래 표면에 부착된 것으로 보이는데, 이는 MSM용액의 이온강도(565 mM)와 밀접한 관련이 있다. 석영모래에서는 이온강도가 증가하면, 박테리아의 부착이 증가하는데, 이러한 현상은 DLVO이론으로 설명할 수 있다.[22] 즉, 이온강도가 증가하면 박테리아와 모래표면 사이에 존재하는 정전기적 이중층(electrostatic double layer)이 압축됨으로써, 박테리아의 부착이 증가한다. Choi 등[23]은 석영모래로 충진된 칼럼을 이용한 실험을 통해, 증류수 조건(이온강도=0 mM)에서의 *Pseudomonas aeruginosa*의 질량회수율은 83.8%인 반면, MSM용액 조건에서는 질량회수율이 56.4%로 상당히 감소함을 보고하였다. 즉,

Table 3. Parameters and their values obtained from filtration theory

Exp.	A_s	N_R	N_{Pe}	N_{vdW}	N_{gr}	N_A	N_G	η_D	η_I	η_G
A	41.2	0.0083	2877.3	1.581	0.0320	0.0662	0.0027	0.0421	0.0053	0.000995
B	40.2	0.0083	2877.3	1.581	0.0320	0.0662	0.0027	0.0417	0.0051	0.000995
C	40.7	0.0083	2877.3	1.581	0.0320	0.0662	0.0027	0.0419	0.0052	0.000995
D	38.5	0.0083	2877.3	1.581	0.0320	0.0662	0.0027	0.0411	0.0049	0.000995
E	42.3	0.0083	2877.3	1.581	0.0320	0.0662	0.0027	0.0425	0.0054	0.000995

MSM용액으로 인하여 박테리아의 부착이 상당히 증가함을 제시하였다.

칼럼내의 이동거리에 따른 박테리아의 부착 정도를 비교 분석하여, Table 4와 Fig. 1(b)에 나타내었다. 또한, 모래표면에 부착된 *B. subtilis*의 SEM 이미지를 Fig. 2에 제시하였다. 세가지 실험조건(Exp. A-C) 모두, 칼럼주입부분(bottom)에서 부착퍼센트가 가장 높고, 칼럼 유출부분(top)에서 가장 낮은 log-linear의 부착분포를 보였다. MSM용액 조건(Exp. A)의 경우, bottom부분에서 55.7%로 가장 높고, middle 부분에서 29.5%, top부분에서 14.8%의 부착퍼센트를 보였다. MSM에 Tween 20이 추가된 조건(Exp. B)에서는, bottom부분에서 40.4%로 가장 높고, middle과 top부분에서는 각각 29.9%와 29.7%의 부착퍼센트를 보였다. 그리고, MSM에 생계면활성제가 추가된 조건(Exp. C)에서는 bottom, middle, top에서의 부착퍼센트가 각각 41.4%, 32.3%, 그리고 26.2%이었다(Fig. 1(b)). Streger 등[20]도 미생물 이동실험을 통해, 미생물 주입부분에서 *H. flava*의 부착이 가장 높다고 보고하였다. William 등[24]은 현장 조건에서 미생물의 부착율은 이동거리에 반비례한다고 보고하였다. 칼럼내의 이동거리에 따른 상대적 부착비율(bottom/top)를 분석한 결과(Table 4), MSM에 계면활성제가 추가된 조건에서의 상대적 부착비율(Exp. B=1.337, Exp. C=1.588)이 MSM용액만 존재하는 조건(Exp. A=3.778)에 비하여 낮게 나타났다. 즉, 유입된 박테

Table 4. Bacteria attachment ratio in sand columns under different surfactants and injection conditions

Location in sand column	Exp. A	Exp. B	Exp. C	Exp. D	Exp. E
Bottom	0.557	0.404	0.415	0.544	0.708
Middle	0.295	0.299	0.323	0.241	0.167
Top	0.148	0.297	0.262	0.215	0.125
Total	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Bottom/Top	3.778	1.357	1.588	2.529	5.667

Note: upflow mode in bacteria injection during sand column experiments

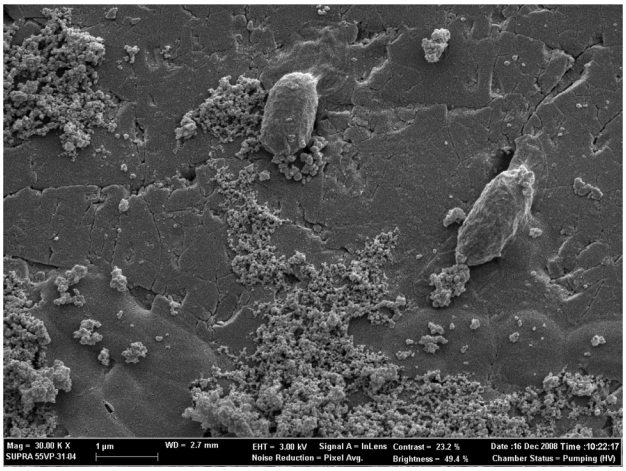

Fig. 2. A SEM image of *Bacillus subtilis* ATCC 6633 attached to sand surfaces.

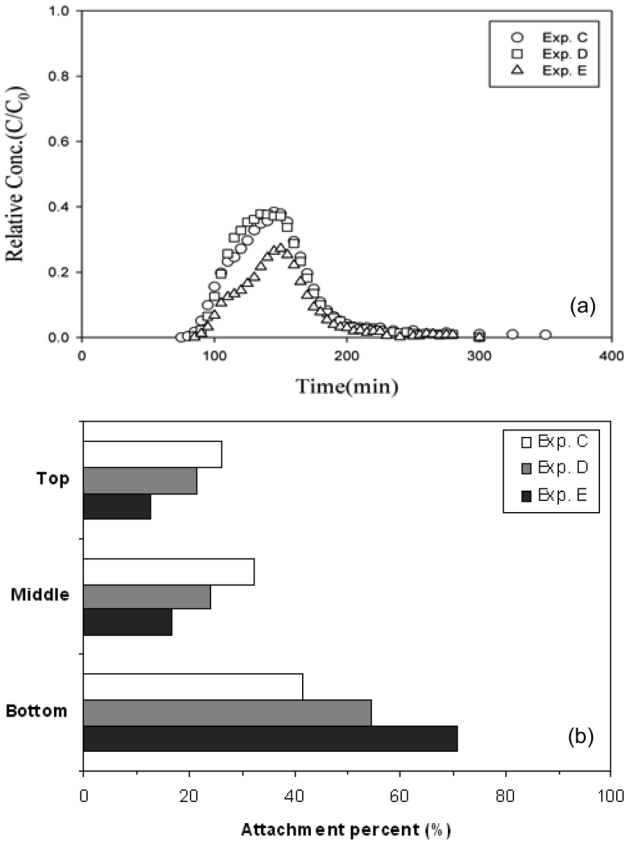

Fig. 3. Column experimental results under various surfactant injection conditions: (a) breakthrough curves; (b) percent of bacteria attached to sand. Exp. C = simultaneous injection of MSM/biosurfactant, Exp. D = biosurfactant injection followed by MSM, Exp. E = MSM injection followed by biosurfactant. Note that bacteria were injected in upflow mode during column experiments.

리아가 계면활성제의 영향에 의하여 유출부 쪽으로 상당히 이동한 것을 알 수 있다. 따라서, 이러한 결과는 계면활성제가 매질체내에서 박테리아의 이동을 증진시킴을 보여준다. Mark와 Bruce[14]는 다양한 계면활성제 조건에서 수행한 칼럼실험을 통해, 계면활성제 농도가 증가할수록 미생물의 부착율이 감소한다는 것을 보였다. 즉, 계면활성제가 미생물 표면특성(표면전하, 소수성 등)에 영향을 줌으로써, 매질체내에서 미생물의 이동을 증진시킴을 보고하였다.

3.3. 계면활성제 주입조건에 따른 박테리아의 이동

MSM과 생계면활성제(0.1%, v/v)가 동시에 주입된 조건, 생계면활성제가 선주입되고 MSM이 후주입된 조건, 그리고 MSM이 선주입되고 생계면활성제가 후주입된 조건에서 수행한 칼럼실험으로부터 얻어진 파과곡선과 박테리아의 부착퍼센트를 Fig. 3에 나타내었다. 더불어, 실험을 통해 얻어진 박테리아의 질량회수율과 부착율 등은 Table 1, 콜로이드 여과 이론의 변수 값은 Table 3에 제시하였다. 박테리아 이동 실험결과, 생계면활성제가 선주입되고 MSM이 후주입된 조건(Exp. D)에서의 질량회수율은 44.0%로, MSM과 생

계면활성제가 동시에 주입된 조건(Exp. C)에서의 질량회수율(45.9%)와 유사하였다. 하지만, MSM이 선주입되고 생계면활성제가 후주입된 조건(Exp. E)에서의 질량회수율은 26.5%로 앞의 두 경우보다 낮았다. 박테리아의 부착효율(α)의 경우, Exp. E에서 가장 높은 0.00979이었고, Exp. C와 Exp. D에서는 각각 0.00589와 0.00644이었다.

생계면활성제의 주입조건에 따른 박테리아의 부착 정도를 비교하여, Table 4와 Fig. 3(b)에 나타내었다. 세가지 실험조건(Exp. C-E) 모두, 칼럼주입부분(bottom)에서 부착퍼센트가 가장 높고, 칼럼 유출부분(top)에서 가장 낮았다. 생계면활성제가 선주입되고 MSM이 후주입된 조건(Exp. D)의 경우, bottom부분에서 54.4%로 가장 높고, middle부분에서 24.1%, top부분에서 21.5%의 부착퍼센트를 보였다. MSM이 선주입되고 생계면활성제가 후주입된 조건(Exp. E)에서의 부착퍼센트는 70.8% (bottom), 16.7% (middle), 12.5% (top)이었다. 칼럼내의 이동거리에 따른 상대적 부착비율(bottom/top)을 보면(Table 4), 생계면활성제가 MSM보다 후주입된 경우(Exp. E=5.667)가 생계면활성제가 MSM과 동시주입되거나 선주입된 경우(Exp. C=1.588, Exp. D=2.529)에 비하여 높게 나타났다. 즉, 생계면활성제가 MSM보다 후주입되는 경우, 계면활성제가 박테리아의 이동 증진에 미치는 영향은 없는 것으로 판단된다.

4. 결 론

본 연구에서는 계면활성제의 종류 및 주입조건이 생물학적 복원에 사용되는 박테리아의 이동에 미치는 영향을 조사하였다. 실험결과, MSM(박테리아 성장에 필요한 무기물 배지)의 존재 하에서 매질체(석영모래) 표면에 박테리아의 부착이 상당히 증가하였는데(특히, 주입부분에), 이는 MSM으로 인한 이온강도의 증가 때문이다. MSM과 더불어 계면활성제(비이온성 계면활성제, 생계면활성제)가 존재할 경우에는, 계면활성제로 인하여 매질체내에서 박테리아 이동이 증진됨을 관찰할 수 있었다. 또한, MSM과 생계면활성제를 이용하여 다양한 주입방법에 따른 박테리아의 이동을 비교한 결과, 박테리아의 이동 증진을 위한 주입조건은 박테리아를 함유한 MSM용액보다 계면활성제를 선주입하거나, 또는 MSM용액과 계면활성제를 동시주입하는 것이 효과적임을 알 수 있었다. 본 연구를 통해 계면활성제의 존재와 주입방법이 박테리아의 이동에 영향을 미칠 수 있음을 알 수 있었다.

사 사

이 논문은 2007년 교육과학기술부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구입니다 [NRF-2007- C00054].

KSEE

참고문헌

1. Kim, I. S., Park, J. S. and Kim, K. W., "Enhanced biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons using nonionic surfactants in soil slurry," *Appl. Geochem.*, **16**, 1419~1428(2001).
2. Catherine, S., Laleh, Y., Patrick, B. and Serge R. G., "Effects of surfactant and temperature on biotransformation kinetics of anthracene and pyrene," *Chemosphere*, **61**, 1042~1050 (2005).
3. Gao, Y. Z., Ling, W. T., Zhu, L. Z., Zhao, B. W. and Zheng, Q. S., "Surfactant-enhanced phytoremediation of soils contaminated with hydrophobic organic contaminants: potential and assessment," *Pedosphere*, **17**(4), 409~418(2007).
4. Andreas, T., Michael, S., Peter, W. and Fritzh H. F., "Surfactant-enhanced mobilization and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in manufactured gas plant soil," *Environ. Sci. Technol.*, **31**, 2570~2576(1997).
5. Marta, G. J., Cesar, G. L., Jose-Luis, N. A. and Jose-Julio, O. C., "Biosurfactant- and biodegradation-enhanced partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons from nonaqueous-phase liquids," *Environ. Sci. Technol.*, **37**, 2988~2996 (2003).
6. Perry, F. C., Richard J. D. and Sharon, A. C., "Surfactant-enhanced bioremediation," *Waste Manage.*, **15**, 371~377(1995).
7. Powelson, D. K. and Mills, A. L., "Water saturation and surfactant effects on bacterial transport in sand columns," *Soil Sci.*, **163**, 694~704(1998).
8. Robert, W. P., Cynthia, J. P. and Donald, A. C., "Surface chemical effects on colloid stability and transport through natural porous media," *Colloid. Surf. A*, **73**, 287~300(1993).
9. Litton, G. M. and Olson, T. M. J., "Colloid deposition kinetics with surface-active agents: evidence for discrete surface charge effects," *J. Colloid Interface Sci.*, **165**, 522~525(1994).
10. Johnson, W. P., Martin, M. J., Gross, M. J. and Logan, B. E., "Facilitation of bacterial transport through porous media by changes in solution and surface properties," *Colloid. Surf. A*, **107**, 263~271(1996).
11. Jackson, A., Roy, D. and Breitenbeck, G., "Transport of a bacterial suspension through a soil matrix using water and an anionic surfactant," *Water Res.*, **28**, 943~949(1994).
12. Guiyun, B., Mark, L. B. and Raina, M. M., "Influence of a rhamnolipid biosurfactant on the transport of bacteria through a sandy soil," *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 1866~1873(1997).
13. Liu, Y, Yang C. h., and Li, J., "Influence of extracellular polymeric substances on Pseudomonas aeruginosa transport and deposition profiles in porous media," *Environ. Sci. Technol.*, **41**, 198~205(2007).
14. Mark, J. G. and Bruce E. L., "Influence of different chemical treatments on transport of Alcaligenes paradoxus in porous media," *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 1750~1756 (1995).
15. Gang, C. and Honglong, Z., "Bacterial deposition in porous

medium as impacted by solution chemistry," *Res. Microbiol.*, **155**, 467~474(2004).
16. Harsh, P. B., Ray, F. and Jorge, M. V., "Biocontrol of Bacillus subtilis against infection of arabidopsis roots by Pseudomonas syringae is facilitated by biofilm formation and surfactin production," *Plant Physiol.*, **134**, 307~319 (2004).
17. Vrionis, H. A., Kropinski, M. A. and Daugulis, A. J., "Enhancement of a two-phase partitioning bioreactor system by modification of the microbial catalyst: demonstration of concept," *Biotechnol. Bioeng.*, **79**, 587~594(2002).
18. Kim, D. J., Choi, J. W., Choi, N. C., Mahendran, B. and Lee, C. E., "Modeling of growth kinetics for *Pseudomonas spp*. during benzene degradation," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **69**, 456~462(2005).
19. Tufenkji, N. and Elimelech, M., "Correlation equation for predicting single-collector efficiency in physicochemical filtration in saturated porous media," *Environ. Sci. Technol.*, **38**, 529~536(2004).
20. Streger, S. H., Vainberg, S., Dong, H. and Hatzinger, P. B., "Enhancing transport of Hydrogenophaga flava ENV735 for bioaugmentation of aquifers contaminated with methyl *tert*-butyl ether," *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 5571~5579(2002).
21. Scholl, M. A., Mills, A. L., Herman, J. S. and Hornberger, G. M., "The influence of mineralogy and solution chemistry on the attachment of bacteria to representative aquifer materials," *J. Contam. Hydrol.*, **6**, 321~336(1990).
22. Poortinga, A. T., Bos, R., Norde, W. and Busscher, H. J., "Electric double layer interactions in bacterial adhesion to surfaces," *Surf. Sci. Report.*, **47**, 1~32(2002).
23. Choi, N. C., Kim, D. J. and Kim, S. B., "Quantification of bacterial mass recovery as a function of pore-water velocity and ionic strength," *Res. Microbiol.*, **158**, 70~78(2007).
24. William, P. J., Michael, J. M., Mark, J. G. and Bruce, E. L., "Facilitation of bacterial transport through porous media by changes in solution and surface properties," *Colloid. Surface. A*, **107**, 263~271(1996).