

대장균의 random motility coefficient 와 chemotaxis coefficient 측정

이진원, 윤성윤
광운대학교 화학공학과

Measurement of *E. coli* Random Motility and Chemotaxis Coefficients

Jinwon Lee and Seong Yun Yun
Department of Chemical Engineering, Kwangwoon University

서론

최근에 미생물을 이용하여 오염물을 자연적으로 분해 처리하는 기술로서 *in situ* bioremediation (ISB) 이 각광을 받고 있다. 이 기술의 성패는 미생물이 얼마나 용이하게 오염물에 접근하여 제 역할을 수행할 수 있는냐에 달려있다. 미생물의 종류도 다양하고 분해 가능한 화합물의 종류도 미생물 마다 한정되어 있으므로 이를 일반적으로 해석할 수 있는 모델링과 각 경우에 대한 데이터를 구할 수 있는 효과적인 실험 방법이 요구 된다. 본 연구에서는 Rivero 등이 제안한 미생물의 이동 모델을 채택하였고, random motility 와 chemotaxis 데이터를 측정하는 방법에는 capillary assay, laser densitometry assay, stopped-flow diffusion chamber (SFDC) assay 등이 있는데, 본 연구에서는 원하는 chemical gradient 를 손쉽게 만들수 있고 chemotaxis 측정에 적절한 SFDC 방법을 사용하였다.

이론

attractant 의 gradient 가 존재할 때 미생물이 보여주는 chemotaxis 는 그림 1 과 같이 나타낼 수 있다. 이때 미생물의 이동을 나타내는 모델식은 (Rivero 등) 다음과 같다.

$$\frac{\partial b}{\partial t} = \mu \frac{\partial^2 b}{\partial x^2} - \frac{\partial}{\partial x} (Vb)$$

attractant 의 flux 는 다음과 같다.

$$\frac{\partial a}{\partial t} = D \frac{\partial^2 a}{\partial x^2} - \left[\frac{K_{\max} a}{K_s + a} \right] b$$

SFDC 구조에 (그림 2) 초기 조건과 경계 조건은 다음과 같이 나타내진다.

$$b(x, 0) = b_0$$

$$\frac{\partial b}{\partial x} (0, t) = \frac{\partial b}{\partial x} (L, t) = 0$$

$$a(x, 0) = 0 \quad 0 < x < \frac{1}{2} L$$

$$a(x, 0) = a_0 \quad \frac{1}{2} L \leq x \leq L$$

$$\frac{\partial a}{\partial x}(0, t) = \frac{\partial a}{\partial x}(L, t) = 0$$

chemotaxis 속도 (V) 를 나타내는 모델은 여러가지가 제안되어 있는데 Rivero 등 에 의한 것은 다음과 같다.

$$V(a) = s \tanh \left\{ \sigma s \frac{R_T K_d}{(K_d + a)^2} \frac{\partial a}{\partial x} \right\}$$

gradient 가 크지 않을 때는 위 식은 다음과 같이 간단화 될 수 있다.

$$\chi(a) = \sigma^2 \frac{R_T K_d}{(K_d + a)^2} = \frac{\chi_0}{K_d} \frac{1}{(1 + a/K_d)^2}$$

여기서 χ_0 는 $\sigma^2 R_T$ 와 같으면서 chemotactic sensitivity 계수를 나타낸다.

random motility 계수도 attractant 의 영향을 받는데 다음과 같다.

$$\mu(a) = \mu_0 \exp \left\{ \sigma \frac{R_T K_d}{(K_d + a)^2} \frac{\partial a}{\partial t} \right\} \operatorname{sech} \left\{ \sigma s \frac{R_T K_d}{(K_d + a)^2} \frac{\partial a}{\partial x} \right\}$$

(각 문자의 의미는 지면 관계상 생략하고 참고문헌을 참조하기 바람.)

본 연구에서는 μ_0 와 χ_0 를 SFDC 를 이용하며 측정하였다.

실험 방법

미생물의 종류 및 배양: 대장균 K12 종 NR50 를 대상으로 하였다. LB 배양액 에서 배양하여 glycerol 을 섞어 40 % 로 만든 다음 -80 C 에 보관하였다. 실험 을 위하여 galactose 배양액에서 대장균을 얻었는데 그 조성은 1 l 의 용액당 K_2HPO_4 11.2 g, KH_2PO_4 4.8 g, $(NH_4)_2SO_4$ 2.0 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25 g, $Fe_2(SO_4)_3 \cdot 5H_2O$ 0.0006 g, thiamine 0.0005 g, galactose 1 g 이다. 30 C 에서 150 rpm 으로 flask shaker 에서 배양하였다.

motility buffer: SFDC 실험을 위한 buffer 는 용액 1 l 당 K_2HPO_4 11.2 g, KH_2PO_4 4.8 g, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 0.029 g 을 포함한다.

SFDC 실험방법: 대장균의 motility 측정 실험을 위해서 SFDC 의 위쪽 반은 농도가 알려진 대장균 용액으로 채웠고 아래쪽 반은 buffer 로 채웠다. 위와 아래의 경계선을 안정하게 만들기 위해 아래쪽 buffer 에는 50 ml 용액 당 0.25 ml 의 Percoll (Sigma P-1644) 을 첨가해 주었다. chemotaxis 실험에서는 위쪽 반에 대장균을, 아래쪽 반에는 대장균, attractant, Percoll 을 넣어 주었다. 경계선 위의 이동은 CCD 비디오 카메라로 찍어 화상 파일로 컴퓨터에 저장한 다음 분석에 이용하였다. 대표적인 대장균 농도 변화를 시간에 따라 나타낸 것이 그림 3 이다.

결과 및 토론

대표적인 random motility 를 보여주는 예를 그림 3에 나타냈다. 시간에 따른 대장균의 농도 gradient 를 보여주는 것으로 10 분 동안 관찰하였다. motility

buffer 만을 사용했을 때 random motility coefficient (μ_0) 를 $2.59 \pm 0.41 \times 10^{-6}$ cm^2/sec 로 측정했다. buffer 중에 α -methylaspartate 가 0.01 mM 존재할 경우에는 $2.61 \pm 0.67 \times 10^{-6}$ cm^2/sec , 0.1 mM NiCl_2 가 존재할 경우에는 $1.22 \pm 0.28 \times 10^{-6}$ cm^2/sec 로 측정했다. chemotaxis 의 경우는 SFDC 의 아래쪽 반에 0.01 mM α -methylaspartate 을 넣은 경우, 0.1 mM NiCl_2 를 넣은 경우, α -methylaspartate 와 NiCl_2 를 동시에 아래쪽에 넣은 경우, 또 위쪽에 NiCl_2 아래쪽에 α -methylaspartate 를 넣은 경우에 대해 chemotaxis 를 관찰했다. 또 α -methylaspartate 와 L-aspartate 의 chemotaxis 특성 비교를 위해서 여러 농도에서의 반응을 관찰했다 (10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 5×10^{-4} mM). chemotaxis 의 정량적인 데이터는 현재 분석중에 있다.

위 실험과 지금까지 보고된 motility 데이터를 비교하면 Rivero 모델의 타당성을 검증할 수 있고, SFDC 를 이용한 측정 방법의 실효성을 평가할 수 있다. 또한 chemotaxis 반응의 관찰을 통해서 현재까지 정성적으로는 타당한 데이터를 얻었다. 이어지는 모델링과 시뮬레이션을 통해 위 데이터의 분석도 이루어질 것이다. 한가지 특이한 현상은 α -methylaspartate 에 대해 chemotaxis 띠가 하나가 아니라 2 개의 띠가 형성되는 것이 지속적으로 관찰되어 modeling 에 변형이 불가피하게 되었다.

참고문헌

1. Ford, R.M. and D.A. Lauffenburger, *Biotech. Bioeng.*, **37**, pp 661-672 (1991)
2. Keller, E.F. and L.A. Segel, *J. Theor. Biol.*, **30**, pp 225-234 (1971)
3. Rivero, M.A., Tranquillo, R.T., Buettner, H.M., and Lauffenburger, D.A., *Chem. Eng. Sci.*, **44**, 2881-2897 (1989)

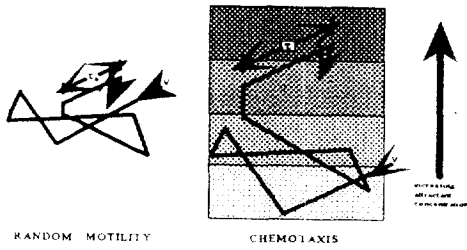


그림 1. 미생물의 chemotaxis

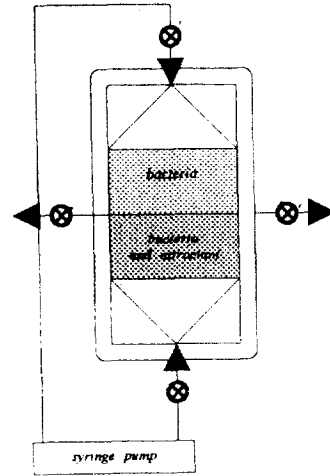


그림 2. SFDC 모형도

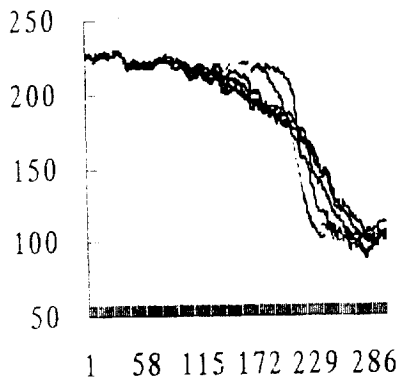


그림 3. random motility 실험 결과

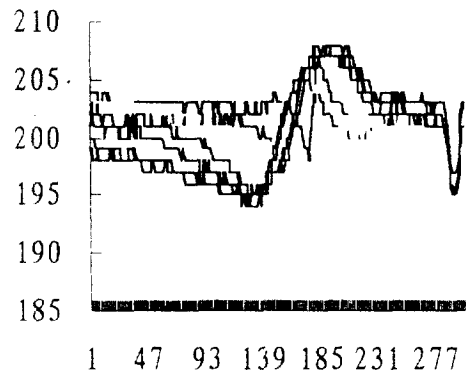


그림 4. chemotaxis 실험 결과