

콘크리트 포장도로에서 분리한 탄산칼슘형성미생물의 다양한 환경 스트레스반응

한상현¹, 김성근¹, 강창호¹, 박주영², 정진훈², 소제성^{1*}

Environmental Stress Response of Calcite Forming Bacteria Isolated from Concrete Pavement

Sang-Hyun Han¹, Sung-Keun Kim¹, Chang-Ho Kang¹, Joo Young Park², Jin Hoon Jeong², and Jae-Seong So^{1*}

접수: 2012년 5월 17일 / 게재승인: 2012년 5월 31일
© 2012 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Microbially induced calcite precipitation (MICP) has been explored for protection and consolidation of construction materials such as concrete. In this study, we isolated 54 calcite forming bacteria from concrete pavement and selected 5 isolates which showed high specific urease activity. Also response of the 5 strains against various environmental stresses was examined. BC 4 and BC 5 showed 35% and 26% viability at heat stress (50°C), respectively. BC 1 and BC 4 maintained 60.4% and 70.4% viability upon osmotic stress (1 M NaCl), respectively. Among the 5 isolates BC 4 had the highest viability upon alkaline stress (pH 10).

Keywords: Bio-concrete, *Sporosarcina pasteurii* KCTC3558, MICP, Specific urease activity

1. 서론

콘크리트는 건설 분야에서 사용되는 가장 대표적인 건설

재료로써 높은 강도와 내구성 및 상대적으로 저렴한 가격 때문에, 매년 세계적으로 60억톤 이상 소비되고 있다 [1]. 콘크리트 생산 시 발생하는 이산화탄소는 연간 지구 이산화탄소 발생량의 7-8%를 차지한다. 콘크리트 파손 시 발생하는 황화물질 및 염소화합물 등은 환경적으로 매우 유해한 부산물로 알려져 있다 [2-4]. 이를 막기 위한 보수제인 epoxy, resins, epoxy mortar 등은 어느 정도 균열보수효과가 있지만, 보수제 자체가 환경에 유해하며, 그 효과가 짧아 지속적으로 보수제를 사용해야하는 단점이 있다 [5]. 이를 개선하기 위해 폐 콘크리트나 비산회를 이용한 재활용 콘크리트 개발 [6,7] 등의 연구가 진행되고 있으며, 최근 탄산칼슘형성 미생물을 콘크리트 구조물의 표면코팅, 균열보수, 압축강도증진, 자가 회복제 등에 이용한 연구들이 발표되었다 [8-11].

그러나 콘크리트 경화 시 발생하는 수화열 (50-60°C) 등에 의한 미생물의 사멸과 콘크리트의 강알칼리성 (pH 12) 특성은 탄산칼슘형성 미생물을 콘크리트에 적용하는데 어려움을 갖게 한다 [12]. 따라서 극한 환경을 극복할 수 있는 포자형성 미생물이 연구의 대상이 되어왔으며, 이 중 포자형성 능력과 탄산칼슘형성 능력이 우수한 *Sporosarcina pasteurii* 가 주로 이용되어 왔다 [13-17].

본 연구에서는 한국형 기후에 맞는 콘크리트 적용을 위해 콘크리트 포장도로로 부터 탄산칼슘형성 미생물을 분리하여 대조군인 *Sporosarcina pasteurii* KCTC3558과 콘크리트 환경에 대한 생장률을 비교하고자 하였으며, 추가적으로 요소 분해 활성과 탄산칼슘형성을 확인하였다.

¹인하대학교 생물공학과

¹Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea
Tel: +82-32-860-7516, Fax: +82-32-872-4046
e-mail: sjaeseon@inha.ac.kr

²인하대학교 토목공학과

²Department of Civil Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea

2. 재료 및 방법

2.1. 배지 및 시약

실험에 사용된 시약으로 Phosphate buffer (PB) (NaH_2PO_4 : 0.10 g/L, Na_2HPO_4 : 26.61 g/L, pH 9.0, 1 mM EDTA) [15], urea solution (3 M urea), phenol-nitroprusside solution ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$: 43.90 mL/L, $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 60 mg/L), hydrochlorite solution (NaOH : 20 g/L, 8% NaOCl : 46.875 g/L), Bradford reagent (SIGMA, St. Louis, MO, USA), crystalline bovine serum albumin (TaKaRa, Kyoto, Japan)을 사용하였다. 탄산칼슘형성 미생물의 선택 배지는 BPU 배지 (Beef extract: 3 g/L, Peptone: 5 g/L, Urea: 20 g/L, pH: 9.0) [2]를 사용하였고, 성장 배지로는 YA 배지 (Yeast: 20 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 9.9 g/L, pH 9.0) [14]가 사용되었으며 121°C, 15분의 조건에서 멸균되었다.

2.2. 균주의 분리

시료의 채취는 강원도 원주 내 만중분기점 부근 제 7 지구대 전방의 광장영업소 콘크리트 도로 현장을 답사하였고, 도로 중앙, 방벽, 배수구 등 도로와 도로 주변에서 시료를 채취, 멸균 stainless 용기에 담아 냉장 상태로 운반하였다. 채취한 시료는 분말상태로 만들어 10 g을 계량, 10 mL PB에 넣어 진탕하였다. 포자를 형성할 수 없는 미생물을 제거하기 위해 진탕한 시료를 80°C에서 10분간 처리하여 28°C, 200 rpm에서 24시간 동안 배양하였다. 단일 콜로니를 얻기 위해 진탕 배양액 100 μL 를 취해 BPU 고체배지에 분산 도말하였고, 28°C로 72시간 동안 배양하였다. 형성된 단일 콜로니의 탄산칼슘 형성을 확인하기 위해 액체 배지에 28°C, 200 rpm으로 72시간 동안 배양한 후, 이를 0.2 μm syringe filter로 여과하여 미생물을 제거하였다. 여과액 1 mL에 100 μL 의 50 mM CaCl_2 멸균 수용액을 첨가하여 침전반응을 통한 탄산칼슘 형성을 확인하였다. 요소 분해 활성, 탄산칼슘 확인, 다양한 환경 스트레스에 대한 생존률 비교를 위해 기존에 연구된 *S. pasteurii* KCTC3558을 대조군으로 사용하였다. 추가적으로 분리된 미생물들 중 요소 분해 활성이 좋은 5종의 미생물을 선택하여 16S rDNA 염기서열분석을 통하여 분자 동정하였다.

2.3. 요소 분해 활성 측정

본 연구에는 K. R. Natarajan *et al.* [18]이 사용한 요소 효소 측정을 변형하여 요소 분해 활성을 측정, 계산하였다. 분리된 탄산칼슘형성 미생물과 *S. pasteurii* KCTC3558를 5 mL YA 배지에 접종하여 28°C, 200 rpm 24시간 동안 전배양하였다. 전배양이 완료된 후 배양액을 5 mL YA 배지에 1% 접종하여 28°C, 200 rpm 8시간 본배양하였다. 그 후 원심분리기 (VS-550, Vision Scientific Co., LTD, Bucheon, Korea)를 이용, PB로 3회 세척하였고, 분광광도계 (Utrospec 2000, Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)로 $\text{O.D}_{600} = 0.1$ 이 되도록 미생물 시료를 PB로 희석하였다. 각 미생물의 요소분해 활성 측정을 위해 250 μL 미생물시료, 500 μL urea solution, 그리고 250 μL PB를 혼합하여 37°C에서 5분간 반응시킨

후 phenol-nitroprussid solution과 hydrochlorite solution을 각각 2 mL씩 가하였다. 50°C에서 혼합물을 5분간 배양한 후 O.D_{600} 에서 흡광도를 측정하였다. Standard curve는 0.1 mM-1 M의 NH_4Cl 을 사용하여 측정하였으며, 시료의 흡광도를 standard curve에 적용시켜 암모늄의 농도를 산출하였다. 실험에 사용된 미생물의 단백질 양을 측정하기 위해 M. M. Bradford [19]의 protein assay를 이용하여 측정하였다.

2.4. 탄산칼슘형성 확인

Park *et al.* [20]에서 연구된 배지를 일부 변형하여 CaCl_2 -BPU 고체배지 (BPU media, 1.5% agar, 50 mM CaCl_2)에 미생물을 희석도말하여 28°C에서 3일간 배양한 후, 광학현미경 (LEICADMLS, Leica, Weitzlar, German)으로 탄산칼슘 형성 여부를 확인하였다. 5 mL BPU 액체배지에 탄산칼슘형성 미생물을 접종하여 24시간 동안 배양한 후, 0.2 μm syringe filter를 이용하여 여과액을 회수하였다. 25 mM CaCl_2 100 μL 를 첨가한 후 원심 분리 (16179 \times g, 5 min)하여 침전물을 획득하였다. 100 μL 멸균 증류수를 첨가한 후 진탕 혼합을 수행하였고, cover glass에 30 μL 의 혼합액을 떨어뜨려 50°C에서 완전히 건조시킨 다음 X-선 회절 분석기 (DMAX-2500, Rigaku, Tokyo, Japan)의 10-90°에서 2 θ 간격으로 탄산칼슘을 확인하였다.

2.5. 환경 스트레스 (pH, 염분, 온도)에 대한 생장을 비교

온도 (40-55°C), pH (9.0-13.0), 염분 (0-2.0 M)의 조건에서 미생물의 스트레스 내성을 분석하기 위해 환경 스트레스 (pH, 염분, 온도)에 대한 생장률을 비교하였다. pH와 염분 스트레스 실험은 24시간 배양한 미생물을 4045 \times g에서 5분간 원심 분리 하여, PB로 $\text{O.D}_{600} = 1.0$ 이 되도록 현탁하였다. 해당 stress 조건이 처리된 5 mL YA 액체 배지에 미생물을 1% 접종하여, 28°C에서 200 rpm으로 24시간 배양하였다. 그리고 24시간이 지난 후 O.D_{600} 에서 흡광도를 측정하여 생장률을 계산하였다 (처리군 배양액의 흡광도/비처리군 배양액의 흡광도).

온도 스트레스 실험을 위해 24시간 배양한 미생물을 4045 \times g에서 5분간 원심 분리 후 PB로 세척하여 $\text{O.D}_{600} = 1.0$ 이 되도록 설정하였다. 그 후 YA 한천 배지에 도말하였고, 각 온도의 조건에서 24시간 동안 배양하여 CFU (Colony Forming Unit)를 측정, 생장률을 계산하였다 (처리군 CFU/28°C 배양된 CFU).

3. 결과 및 고찰

3.1. 요소 분해 활성 측정

탄산칼슘형성 미생물은 요소 (urea)의 가수분해 시 발생하는 탄산염이온 (CO_3^{2-})과 칼슘이온 (Ca^{2+})이 결합하여, 탄산칼슘을 만드는 기작을 갖고 있다 [2]. 이때, 요소 분해 활성이 좋을수록 요소 분해에 의한 탄산염이온 (CO_3^{2-})의 형성이 증가하여 탄산칼슘 (CaCO_3)생성이 촉진된다. 결과적으로 요소 분해효소가 활성화되면, 암모늄이온 방출량이 촉진되어 pH

가 높아지게 되므로, 결국 미생물학적 탄산칼슘이 증가하게 된다 [15]. 분리된 탄산칼슘형성 미생물은 총 54종이었으며, 대조군 *S. pasteurii* KCTC3558과 함께 요소 분해 활성을 측정하였다 (Fig. 1). 그 후 분리 미생물 중 요소 분해 활성이 높은 5종을 선택 하였고, 대조군인 *S. pasteurii* KCTC3558과 비교하였다. 그 결과, *S. pasteurii* KCTC3558의 요소 분해 활성이 16.1 U으로 높았으며, 나머지 분리한 5종의 미생물 0.5-5 U 사이의 요소 분해 활성으로 측정되었다. 분리 미생물의 16S rDNA 염기서열 분석결과, 4종의 *Sporosarcina pasteurii*와 1종의 *Sporosarcina luteola*로 분자동정 되었으며, 이를 BC 1-5로 약칭하였다.

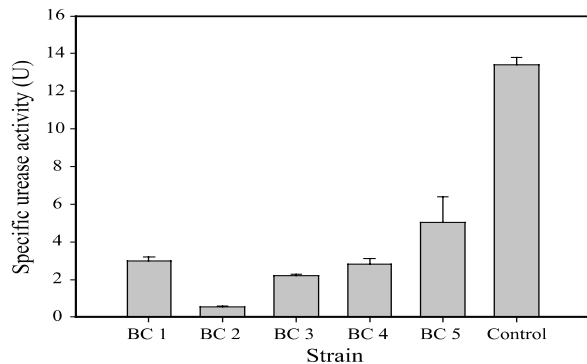


Fig. 1. Specific urease activity of strains (BC 1: *Sporosarcina luteola*, BC 2-BC 5: *Sporosarcina pasteurii*, Control: *Sporosarcina pasteurii* KCTC3558). Error bars were obtained by triplicate experiments.

3.2. 탄산칼슘 형성 확인

분리 균주의 탄산칼슘 형성능을 확인하기 위해 CaCl_2 -BPU

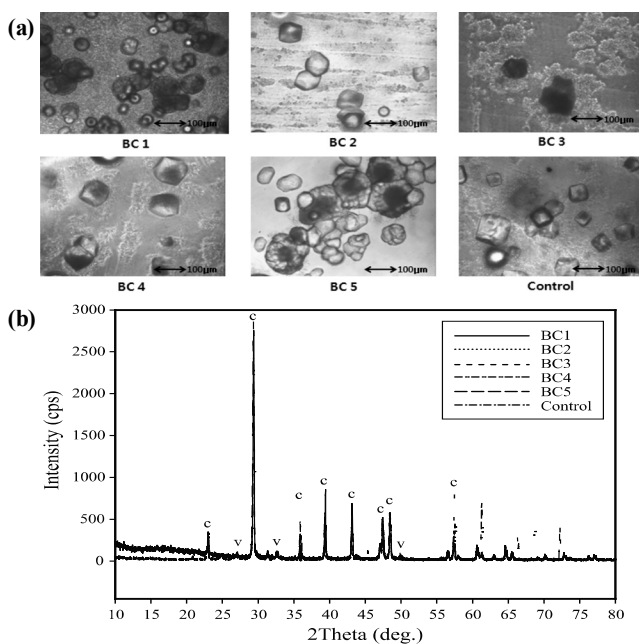


Fig. 2. Crystal morphology image of the accumulated CaCO_3 using microscopy (a) and X-ray diffraction of the calcite of each strain (b) (BC 1: *Sporosarcina luteola*, BC 2-BC 5: *Sporosarcina pasteurii*, Control: *Sporosarcina pasteurii* KCTC3558, C: Calcite, V: Vaterite).

고체 배지를 이용하였다. 이 배지에는 Ca^{2+} 과 urea가 들어 있기 때문에, urea가 탄산칼슘 미생물에 의해 분해 될 경우, CO_3^{2-} 가 방출되어 Ca^{2+} 와 반응, 탄산칼슘이 형성된다 [20]. 광학현미경 (LEICA DMLS, Leica, Weitzlar, German)을 이용하여 콜로니 주변에 형성된 광물결정을 관찰한 결과, 3가지 형태의 탄산칼슘결정이 관찰되었다 (Fig. 2(a)). BC 2, BC 4, 그리고 대조군에서 각주형태의 결정모양이 관찰되었고, BC 1과 BC 5에서는 둥근 형태의 결정모양이 관찰되었으며, BC 3의 경우, 다른 광물에 비해 다소 작은 형태의 광물이 관찰되었다 (Fig. 2(a)). 이는 다양한 광물결정의 모양과 크기는 콜로니 형태 및 분비되는 외부물질의 분자적 특이성에 기인하기 때문이다 [21]. 또한 X-선 회절분석 결과, 주로 탄산칼슘이 생성됨을 확인하였고, 탄산칼슘의 이성질체인 바테라이트도 미량 발견되었다 (Fig. 2(b)). 이와 같은 결과를 통해 0.3 M 이상의 Ca^{2+} 에서는 탄산칼슘만 형성되지만 그 이하의 농도에서는 바테라이트도 존재한다는 사실을 알 수 있었다 [2].

3.3. 스트레스 환경에 대한 성장률 비교

콘크리트 환경에 미생물을 적용시키기 위해, 콘크리트 경화 및 양생단계에서 발생하는 열과 pH 증가에 대한 성장률 실험을 하였다. 또한, 추가적으로 해양환경에 적용시키기 위해 염분에 대한 성장률 실험을 하였다. 대조군과 분리 미생물 간 열 스트레스에 대한 성장률은 5개의 분리 미생물 모두 대조군보다 높은 것으로 나타났다 (Fig. 3(a)). 40°C에서 대조군이 모두 사멸함에도 불구하고 분리 미생물 모두 60-80%의 높은 성장률을 나타냈으며, BC 4와 BC 5의 경우 50°C에서 40%의 성장률을 보였다. 이를 통해 분리 미생물 자체가 수화열 최저 온도인 50°C에서 증식이 가능함을 알 수 있었다. 열에 대한 내성이 강한 미생물일수록 포자 형성 시 더 높은 열 저항성을 보유하여 [22] 포자 형성 시 수화열 최고 온도인 60°C 이상에서 성장할 수 있다는 가능성을 보였다. pH에 대한 성장률은 분리 미생물 BC 1-3과 BC 5의 경우 pH 10에서 30%의 성장률을 보였으며, BC 4와 대조군에서는 각각 68.1%와 65.9%의 성장률을 보였다 (Fig. 3(b)). 그러나 pH 10을 초과한 환경에서는 성장을 확인할 수 없었다. 이 결과, 실험에 사용된 미생물은 콘크리트 환경 (pH 12)에서 사멸하거나 포자를 형성할 것으로 판단된다 [23]. 이에 대한 대책으로는 미생물의 포자 형성을 통해 콘크리트 중성화 시 영양 세포로 전환되어 탄산칼슘 형성 작용을 유지하거나, 미생물을 담체화시킴으로써 고 알칼리 (pH 12)에서 미생물의 내성을 높이는 방법, 또는 포자 형성과 담체화 방법을 동시에 적용시켜 미생물의 성장을 유지시키는 방법이 있다 [15,24]. 해양환경과 같은 높은 삼투압조건에서의 바이오콘크리트 적용을 위해 삼투압 스트레스 조건 (0-2 M NaCl)에 미생물을 노출시켰다. 그 결과 1 M의 NaCl에서, BC 1과 BC 4는 대조군보다 각각 60.4%와 70.4%의 높은 성장률을 보였다 (Fig. 3(c)). 평균 해수 염도보다 높은 염도 (평균 해수 염도: 3.4-3.5%, 1M NaCl: 5.8%)에서도 위 미생물들이 성장을 유지함을 고려하면, 해양환경에서도 높은 성장률을 유지할 수 있을 것으로 판단된다.

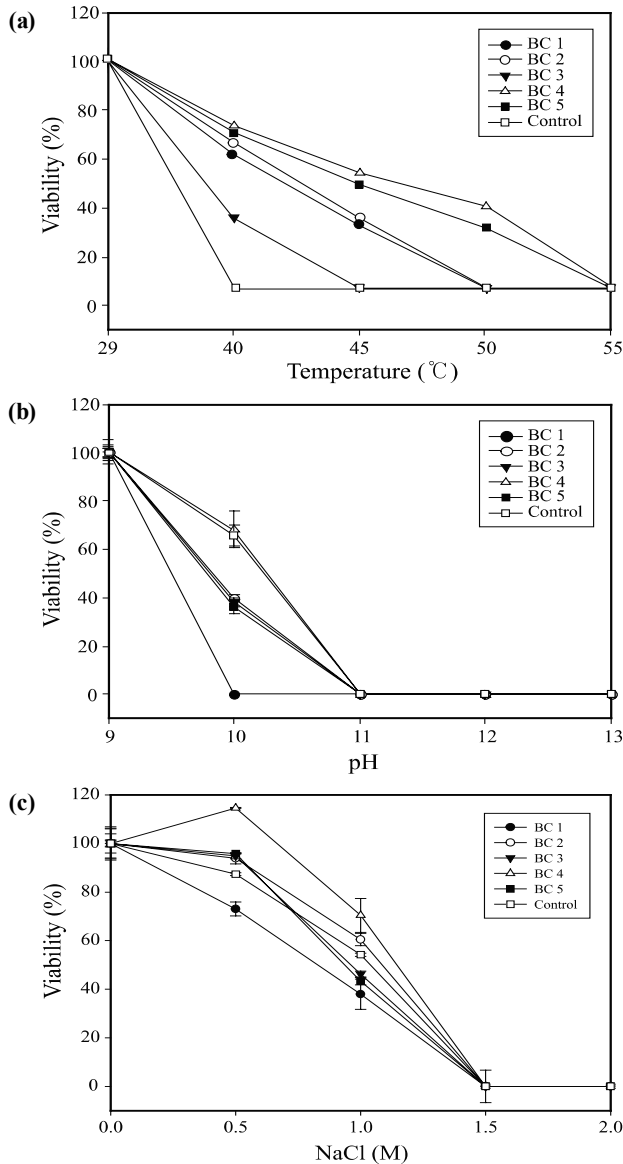


Fig. 3. Growth rate of strains exposed to temperature, pH and NaCl (BC 1: *Sporosarcina luteola*, BC 2-BC 5: *Sporosarcina pasteurii*, Control: *Sporosarcina pasteurii* KCTC3558). The control used were 28°C (a), pH 9 (b), and 0 M (c). Every data show the error bars for triplicate viability curves for strains.

4. 결론

본 연구에서는 콘크리트 내 탄산칼슘 형성 바이오콘크리트 개발을 위해 미생물을 분리하여 대조군인 *S. pasteurii* KCTC3558과 요소 분해 활성 측정, 탄산칼슘형성을 확인하고, 환경 stress에 대한 생존률을 비교 분석하였다.

분리된 미생물들은 모두 탄산칼슘 형성 능력을 보였지만, 형성된 광물의 형태는 3가지로 다르게 나타났다. 요소 분해 활성 측정에서, 분리 미생물들은 대조군에 비해 3-31%의 낮은 요소 분해 활성을 보였다. 그러나 대조군인 *S. pasteurii* KCTC3558이 40°C에서 어떠한 성장률도 보이지 않는데

반해, BC 4와 BC 5는 수화열의 최저 온도인 50°C에서도 높은 성장률을 나타내었다. 이는 포자 형성 시 최고 수화열에 해당되는 60°C에서도 높은 생존률을 보장할 수 있을 것으로 사료된다. 일반적인 해수 염도 3.4%-3.5% 보다 더 높은 염도인 5.8%에서는 대조군인 *S. pasteurii* KCTC 3558에 비해 BC 1과 BC 4가 높은 성장률을 보여, 해양환경에 대한 바이오 콘크리트 적용에 대한 가능성을 보였다. pH의 경우, 모든 미생물들이 pH 10까지 성장하며, 분리한 미생물인 BC 4와 대조군인 *S. pasteurii* KCTC3558이 각각 68.1%, 65.9%로 성장률이 비슷하였다. 위의 결과를 통해, BC 4가 온도, pH, 염도에 대해 가장 높은 성장률을 보임을 알 수 있었다. 추후, 분리한 BC 4 미생물을 이용하여 포자 형성 및 담체화를 통해 복합적인 콘크리트 환경을 동시에 적용할 수 있도록 할 계획이다.

감사

본 논문은 국토해양부, 인화대학교와 건설교통기술평가원의 국토해양기술연구개발사업인 “탄소중립형 도로 기술 개발”의 연구지원으로 수행되었습니다.

References

1. Korea Institute of Construction Technology. (2010) Construction Brief. pp. 2-3. In: K.T.Koh. Concrete Technology Development for Green Growth, Korea.
2. Chunxiang, Q., W. Jianyun, W. Ruixing, and C. Liang (2009) Corrosion protection of cement-based building materials by surface deposition of CaCO₃ by *Bacillus pasteurii*. *Mater. Sci. Eng. C*. 29: 1273-1280.
3. Bang, S. S. and V. Ramakrishnan (2001) Microbiologically-enhanced Crack Remediation (MECR). pp. 3-13. In: Proceedings of the International Symposium on Industrial Application of Microbial Genomes. June 20-22, Daegu, Korea.
4. Van Tittelboom, K., N. De Belie, W. De Muynck, and W. Verstraete (2010). Use of bacteria to repair cracks in concrete. *Cem. Concr. Res.* 40: 157-166.
5. Cunningham, A. B., R. Gerlach, L. Spangler, and A. C. Mitchell (2009) Microbially enhanced geologic containment of sequestered supercritical CO₂. *Energy Procedia* 1: 3245-3252.
6. Vilardell, J., A. Aguado, L. Agullo, and R. Gettu (1998) Estimation of the modulus of elasticity for dam concrete. *Cem. Concr. Res.* 28: 93-101.
7. Topcu, I. B. and S. Sengel (2004) Properties of concretes produced with waste concrete aggregate. *Cem. Concr. Res.* 34: 1307-312.
8. De Muynck, W., K. Cox, N. De Belie, and W. Verstraete (2008) Bacterial carbonate precipitation as an alternative surface treatment for concrete. *Constr. Build. Mater.* 22: 875-885.
9. De Muynck, W., D. Debrouwer, N. De Belie, and W. Verstraete (2008) Bacterial carbonate precipitation improves the durability of cementitious materials. *Cem. Concr. Res.* 38: 1005-1014.
10. Jonkers, H. M., A. Thijssen, G. Muyzer, O. Copuroglu, and E. Schlagen (2010) Application of bacteria as self-healing agent for the development of sustainable concrete. *Ecol. Eng.* 36: 230-235.

11. De Muynck, W., N. De Belie, and W. Verstraete (2010) Microbial carbonate precipitation in construction materials: a review. *Ecol. Eng.* 36: 118-136.
12. Lee, Y. G., S. C. Lee, and C. W. Park (2006) A recent concrete engineering. Goomibook, Seoul.
13. Dupraz, S., B. Ménéz, P. Gouze, R. Leprovost, P. Bénézeth, O. S. Pokrovsky, and F. Guyot (2009) Experimental approach of CO₂ biomineralization in deep saline aquifers. *Chem. Geol.* 265: 54-62.
14. Stocks-Fisher, S., J. K. Galinat, and S. S. Bang (1999) Microbiological precipitation of CaCO₃. *Soil Biol. Biochem.* 31: 1563-1571.
15. Bachmeier K. L., A. E. Williams, J. R. Warmington, S. S. Bang (2002) Urease activity in microbiologically-induced calcite precipitation. *J. Biotechnol.* 93:171-181.
16. Boer, J. L., S. Quiroz-Valenzuela, K. L. Anderson, and R. P. Hausinger (2010) Mutagenesis of klebsiella aerogenes ureg to probe nickel binding and interactions with other urease-related proteins. *Biochemistry.* 49: 5859-5869.
17. Achal. V., A. Mukherjee, P. C. Basu, and M. Sudhakara Reddy (2009) Strain improvement of *Sporosarcina pasteurii* for enhanced urease and calcite production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36: 981-988.
18. Natarajan, K. R. (1995) Kinetic study of the enzyme urease from *Dolichos biflorus*. *J. Chem. Educ.* 72: 556-557.
19. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
20. Park, S. J., N. Y. Lee, W. J. Kim, and S. Y. Ghim (2010) Application of bacteria isolated from Dok-do for improving compressive strength and crack remediation of cement-sand mortar. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 38: 216-221.
21. Hammes, F., N. Boon, J. De Villiers, W. Verstraete, and S. D. Siciliano (2003) Strain-specific ureolytic microbial calcium carbonate precipitation. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 4901-4909.
22. Nicholson, W. L., N. Munakata, G. Horneck, H. J. Melosh, and P. Setlow (2000) Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol Mol. Biol.* 64: 548-572.
23. Ramachandran, S. K., V. Ramakrishnan, and S. S. Bang (2001) Remediation of concrete using micro-organisms. *ACI Mater. J.* 98: 3-9.
24. Soltmann, U., J. Raff, and S. Selenska-pobell (2003) Biosorption of heavy metals by sol-gel immobilized *Bacillus sphaericus* cells, spores and s-layers. *J. Sol-gel Sci. Technol.* 26: 1209-1212.