

# 스트론튬 격리화를 위한 요소 분해 박테리아의 분리 및 특성 연구

최재호, 강창호, 한상현, 곽대영, 오수지, 소재성\*

## Isolation and Characterization of Ureolytic Bacteria for Biosequestration of Strontium

Jae-Ho Choi, Chang-Ho Kang, Sang-Hyun Han, Dae Young Kwak, SooJi Oh, and Jae-Seong So\*

접수: 2013년 5월 8일 / 게재승인: 2013년 5월 28일  
© 2013 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

**Abstract:** In this study, 52 ureolytic bacterial strains were newly isolated from various environments. From these, 2 strains (TB-15 and TB-22) were selected based on their high urease activity. XRD spectra clearly showed presence of various sequestration products such as calcite and strontianite in samples. TB-22 showed 20~30% higher survivability upon Sr concentration (20 mM) than *Sporosarcina pasteurii* KCTC 3558. TB-15 and TB-22 showed 80~90% higher survivability at pH 6 than *S. pasteurii*. The results demonstrated that the 2 isolates could be good candidates for the bioremediation of Sr contaminated sites.

**Keywords:** MICP, Strontium, Sequestration, Calcite, Coprecipitation

### 1. 서론

원자력의 이용은 높은 에너지원으로 유용하지만 그 의존도가 높아지면서 방사성 폐기물도 지속적으로 늘어나고 있다. 국내의 경우 이미 세계 원전 10대 국가들 가운데 단위 면적당 핵 발전의 비중이 세계 1위이며 핵폐기물의 양 또한 높은

수준이다 [1]. 방사성 폐기물 중 스트론튬 ( $^{90}\text{Sr}$ )의 경우 29년의 긴 반감기를 가지고 있으며 토양, 대기 및 수중에서 다양한 형태로 존재한다. 인체에 들어오면 뼈에서 칼슘 대신에 흡수되어 골육종과 백혈병을 일으키며 갑상선 기능 저하, 태아기형, 골수 말초혈관 및 흉선과 지라의 핵산대사 저해 등을 유발하는 방사성 물질이다 [2,3].

이를 해결하기 위해 물리적, 화학적, 생물학적 방법이 사용되고 있으나, 물리·화학적 방법은 적용 방법 및 추가적인 오염 등의 문제로 인해 최근 생물학적 방법이 대두되고 있다. 요소 (urea) 분해 능력이 있는 미생물이 대사물질로 생성하는 탄산칼슘 ( $\text{CaCO}_3$ )과 방사성 물질과의 공침전을 통해 다양한 격리화 연구가 진행되고 있다 [4]. 국외의 경우 microbially induced calcite precipitation (MICP)의 대표적인 미생물로 탄산칼슘 형성 능력이 우수한 *Sporosarcina pasteurii*가 주로 연구 되어 왔으나, 국내 연구는 매우 미흡한 실정이다 [5-7].

이에 본 연구는 국내의 환경에 적합한 탄산칼슘 형성 균주를 선별하여 MICP를 통해 방사성 물질 격리를 위한 기초연구로 강원도 태백 내 탄광촌, 석회암 지대의 환경에서 균주를 분리·동정하여 대조균인 *S. pasteurii* KCTC 3558과 요소 분해 활성, 탄산칼슘과  $\text{SrCO}_3$ 의 정성 및 정량 측정, 스트론튬에 대한 내성과 다양한 환경 스트레스에 대해 비교·분석하였다.

### 2. 재료 및 방법

#### 2.1. 배지 및 시약

요소 분해 활성 측정은 phosphate buffer (PB;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.1 g/

인하대학교 생물공학과  
Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea  
Tel: +82-32-860-8666, Fax: +82-32-872-4046  
e-mail: sjaeseon@inha.ac.kr

L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 26.61 g/L, pH 9.0, 1 mM EDTA), urea solution (3 M urea), phenol-nitroprusside solution (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>OH 43.90 mL/L, Na<sub>2</sub>[Fe(CN)<sub>5</sub>NO]·2H<sub>2</sub>O 60 mg/L), hydrochlorite solution (NaOH 20 g/L, 8 % NaOCl 46.875 g/L), Bradford reagent (SIGMA, St. Louis, MO, USA)를 사용하였다. 탄산칼슘 형성 미생물의 선택 배지는 BPU 배지 (beef extract 3 g/L, peptone 5 g/L, urea 20 g/L, pH 9.0)를 사용하였으며 배양 후 탄산칼슘형성을 유도하기 위해 0.2 μm 여과 처리한 CaCl<sub>2</sub> solution (100 mM)을 첨가하여 침전반응을 확인하였다. 배양 배지로는 YE 배지 (yeast 20 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 9.9 g/L, pH 9.0)가 사용되었다. 환경 스트레스 실험을 위해 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4)를 사용하였으며 스트론튬 스트레스의 경우 성장 배지 (peptone 10 g/L, beef extract 1.5 g/L, yeast extract 1.5 g/L, NaCl 5 g/L, pH 7.5)를 121°C 15분간 멸균한 후 2% (v/w) urea가 함유된 농도별 SrCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O solution을 0.2 μm 여과 처리하여 사용하였다 [8].

## 2.2. 균주의 분리

시료의 채취는 강원도 태백 내 탄광촌, 석회암 지대의 토양을 채취하였고, 멸균 용기에 담아 냉장 상태로 운반하였다. 채취한 토양 시료는 PB에 10배 희석한 후 하루 동안 28°C, 200 rpm에서 배양하였다. 단일 콜로니를 얻기 위해 배양액을 다시 PB에 10배 희석 후 100 μL를 취해 BPU 한천배지에 분산 도말하여 28°C, 18시간 동안 배양하였다. 분리된 미생물은 탄산칼슘의 형성을 확인하기 위해 BPU 액체 배지에 28°C, 200 rpm으로 하루 배양한 후, 이를 0.2 μm 여과 처리하여 미생물을 제거하였다. 미생물이 제거된 여과액 1 mL에 100 μL의 CaCl<sub>2</sub> (100 mM)를 첨가하여 광물질의 침전반응을 통해 1차 선별하였으며 선별된 미생물들은 25% glycerol stock으로 70°C에서 보존하였다.

## 2.3. 요소 분해 활성 측정

요소 분해 활성 측정은 Natarajan [9] 연구에서 사용한 방법을 변형하여 실험하였다. 5 mL YE 액체 배지에 대조군 *S. pasteurii* KCTC 3558과 1차 선별된 미생물들을 28°C, 200 rpm으로 18시간 동안 전배양 한 후, 다시 5 mL YE 액체 배지에 10% (v/v) 접종하여 같은 조건으로 8시간 본배양 하였다. 본배양이 끝난 균주를 원심분리기 (VS-550, Vision Scientific Co., Bucheon, Korea)를 이용하여 6000 rpm, 10분간 원심 분리하여 상등액을 제거하고 준비한 PB를 이용하여 3회 세척한 후, 분광광도계 (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)를 이용하여 OD<sub>600</sub>=0.1이 되도록 희석하였다. 희석한 균주 250 μL와 500 μL의 urea solution (3 M), 250 μL의 PB 용액을 넣고 37°C, 5분간 반응시켰다. 반응물에 phenol-nitroprusside solution과 hydrochlorite solution을 각 2 mL씩 첨가하여 60°C, 10분간 반응 시킨 후 OD<sub>620</sub>에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도는 0.1 mM~1 M의 NH<sub>4</sub>Cl로 설정된 standard curve를 통해 암모늄의 농도를 계산하였다. 산출된 암모늄의 농도와 Bradford [10]의 단백질 정량법을 통해 얻

어진 단백질량을 계산하여 요소 분해 활성을 측정하였다. 그 후 요소 분해 활성이 좋은 2종의 균주를 선택하여 16S rDNA sequencing을 통하여 분자 동정하였다.

## 2.4. X-선 회절 분석

탄산칼슘과 SrCO<sub>3</sub>의 형성 유무를 확인하기 위하여 5 mL BPU 액체배지에 탄산칼슘 형성 미생물을 접종하여 18시간 동안 배양한 후, 0.2 μm 여과 처리하여 1 mL의 여과액을 얻었다. 탄산칼슘의 분석에서는 100 μL의 CaCl<sub>2</sub> (350 mM)을 처리하고, SrCO<sub>3</sub>의 분석에서는 100 μL SrCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (350 mM)를 각각 넣어 준 뒤 원심분리 (13000×g, 5 min)하여 침전물을 획득하였다. 100 μL 멸균 증류수를 첨가한 후 진탕 혼합을 수행하였고, cover glass에 각각의 50 μL 혼합액을 떨어뜨려 60°C에서 완전히 건조시킨 다음 X-선 회절 분석기 (DMAX-2500, Rigaku, Tokyo, Japan)를 이용하여 5~90°에서 2θ 간격으로 탄산칼슘과 SrCO<sub>3</sub>의 형성 유무를 확인하였다 [4].

## 2.5. 탄산칼슘과 SrCO<sub>3</sub> 정량 측정

탄산칼슘의 정량 측정을 위해 대조군 및 분리한 균주를 5 mL BPU 액체배지에 28°C, 200 rpm으로 18시간 배양한 뒤, 0.2 μm 여과를 사용하여 미생물을 제거하였다. 여과액 500 μL와 500 μL CaCl<sub>2</sub> (0.039 mg/mL)를 반응시킨 뒤 원심분리 (13000×g, 5 min)하여 상등액을 제거한 침전물을 얻었다. 침전물을 60°C에서 완전히 건조시켜 건조 중량을 측정하였다. SrCO<sub>3</sub>의 정량 측정을 위해 CaCl<sub>2</sub>를 대신하여 SrCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (0.093 mg/mL) 실험하였다.

## 2.6. 스트레스 (pH, 스트론튬, 기아)에 대한 생장을 비교

스트론튬 (0~100 mM), pH (5.0~9.0), 기아 (0~7 day)의 조건에서 균주의 스트레스 내성을 분석하기 위해 각 농도 별 성장 및 생존율을 비교하였다. 각 스트레스 조건으로 실험하기 위해 미생물들을 28°C, 200 rpm으로 18시간 배양한 뒤 0.1 M sodium phosphate로 2회 세척 후에 분광광도계를 이용하여 OD<sub>600</sub>=1.0으로 균체수를 설정하였다. 스트론튬의 경우 배양 배지에 2% urea (v/w)와 농도별 스트론튬 용액을 0.2 μm 여과 처리하여 5 mL 액체배지를 만든 후 OD<sub>600</sub>=1.0으로 설정된 미생물들을 1% (v/v) 접종하였다. 18시간 후 희석하여 YE 한천 배지에 도말한 후, CFU (colony forming unit)를 측정하였으며 스트론튬을 처리하지 않은 비처리군과 해당 농도별 스트론튬 처리군을 비교하여 생장율을 계산하였다. pH의 경우 해당 stress 조건이 처리된 YE 액체 배지에 미생물을 1% (v/v) 접종한 뒤 OD<sub>600</sub>에서 흡광도를 측정하였으며, pH 9에서 배양한 미생물의 흡광도를 기준으로 생장률을 계산하였다. 기아 스트레스의 경우 OD<sub>600</sub>=1.0으로 설정된 미생물을 7일 동안 매일 채취하여 희석한 뒤 YE 한천 배지에 도말하여 CFU를 측정하였다. 0 day CFU와 각 날짜 별 CFU를 비교 계산하여 생존율을 측정하였다.

$$[\text{Survivability (\%)} = (\text{Sample/Control}) \times 100]$$

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. 미생물 분리

탄광 지대는 중금속 및 석탄 폐기물 등에 의한 오염, 토양의 영양 결핍, 산성화로 인하여 극한 환경으로 조성되어 있다 [11]. 방사성 물질의 노출 또한 미생물이 살아가는데 불리한 환경을 제공하기 때문에 국내 탄광 지대인 강원도 태백을 중심으로 토양 시료를 채취하였다. 선택 배지인 BPU 배지를 통하여 총 52종의 단일 콜로니를 분리하였으며, 분리된 균주 중 16종이 광물질을 형성하여 25% glycerol stock 처리하여 -70°C 상태로 보관하면서 본 연구에 사용하였다.

#### 3.2. 요소 분해 활성 측정

미생물학적 탄산칼슘 형성량은 미생물의 요소분해 효소 (urease)의 활성 정도에 따라 그 양도 비례하는 것으로 알려져 있다. 이는 요소의 가수분해 시 발생하는 탄산염 이온 ( $\text{CO}_3^{2-}$ )과 칼슘 이온 ( $\text{Ca}^{2+}$ )이 결합하여 탄산칼슘을 형성하는데 요소 분해 효소의 활성이 높을 경우 보다 더 많은 탄산염 이온 ( $\text{CO}_3^{2-}$ )이 형성되어 반응하기 때문이다 [12]. 따라서 미생물의 탄산칼슘 형성에 있어서 요소 분해 효소 활성은 필수적이라고 할 수 있다. 본 연구를 통해 분리된 탄산칼슘 형성 균주는 총 16종이었다. Fig. 1을 보면 분리 미생물의 요소 분해 활성은 0.20~5.00 U/ $\mu\text{g}$  범위로 나타났으며, 그중 TB-15 (3.54 U/ $\mu\text{g}$ )와 TB-22 (5.09 U/ $\mu\text{g}$ )가 가장 높은 활성을 나타내어 실험균주로 선별하였다. 분리 균주의 16S rDNA 염기서열 결과, *Lysinibacillus fusiformis* (TB-15), *L. sphaericus* (TB-22)로 동정되었다. Ahmed 등 [13]의 연구에 의하면 *Lysinibacillus* spp.는 그람 양성 간균으로 포자를 형성하고 운동성이 있으며 중금속 중 하나인 붕소에 내성이 있는 것으로 알려져 있다.

#### 3.3. 탄산칼슘과 $\text{SrCO}_3$ 의 결정 확인

Fujita 등 [14]의 연구에 따르면, 요소 분해 활성을 통한 탄산칼슘의 형성과정에서 스트론튬 이온의 존재 시  $\text{SrCO}_3$ 가 생성되어 암석 등에 고착화 되어 스트론튬 억제 및 비활성화 된다고 알려져 있다. 본 연구에서는 실제 탄산칼슘에 의한

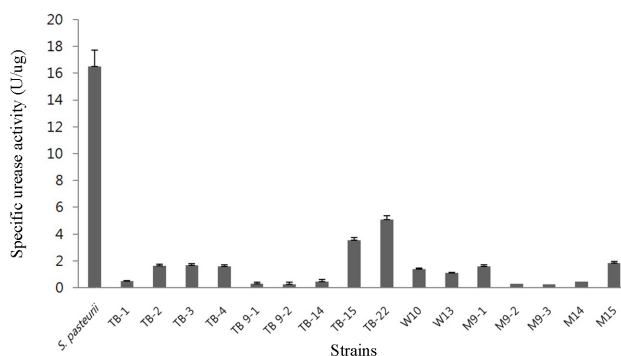


Fig. 1. Specific urease activity of isolated strains. Specific urease activity was expressed as  $\mu\text{mol}$  ammonia/min/mg protein.

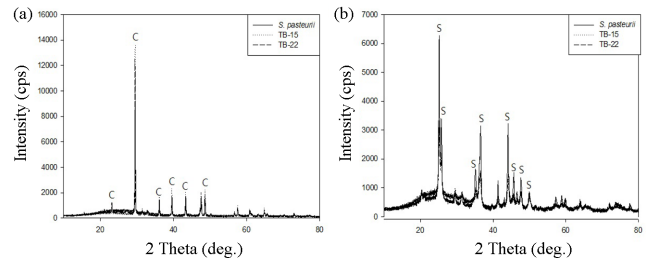


Fig. 2. XRD spectra confirming biomineralization products induced by TB-15, TB-22 and *S. pasteurii* (C, calcite; S, strontianite).

스트론튬의 공침전을 확인하기 위해 요소 분해 시 생성되는 탄산염 이온 ( $\text{CO}_3^{2-}$ )이 칼슘 이온 ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 또는 스트론튬 이온 ( $\text{Sr}^{2+}$ )과의 결합을 통해 형성되는 calcite ( $\text{CaCO}_3$ )와 strontianite ( $\text{SrCO}_3$ )를 X-선 회절 분석으로 측정하였으며, 대조균 및 분리균주 (TB-15, TB-22) 모두 탄산칼슘과  $\text{SrCO}_3$ 의 peaks를 확인할 수 있었다 (Fig. 2).

#### 3.4. 탄산칼슘과 $\text{SrCO}_3$ 정량 측정

대조균 및 분리 균주가 생성하는 탄산칼슘과  $\text{SrCO}_3$ 의 양을 측정된 결과, 탄산칼슘의 경우 대조균은 19.0 mg/mL, 분리 균주인 TB-15와 TB-22는 각각 7.8, 10.3 mg/mL을 생성하였으며 (Fig. 3(a)),  $\text{SrCO}_3$ 의 경우 대조균은 22.5 mg/mL, TB-15와 TB-22는 각각 13.5, 15.4 mg/mL을 생성하였다 (Fig. 3(b)). TB-15와 TB-22의 요소 분해 활성도는 대조균에 비해 각각 21.5%, 30.8%의 요소 분해 활성도를 보였지만, 탄산칼슘과  $\text{SrCO}_3$ 의 정량 측정 결과, 대조균에 비해 탄산칼슘은 각각 40.5%, 54.4%,  $\text{SrCO}_3$ 는 각각 60.21%, 68.49%의 수치를 확인할 수 있었다. 이를 통해 탄산칼슘과  $\text{SrCO}_3$  형성에 있어서 정량적인 측면에서는 요소 분해 활성 측정 결과와 비교하였을 때, 다소 차이가 있음을 확인할 수 있었다. 이는 미생물이 MICP에 의해 생성하는 탄산칼슘은 요소 분해 효소뿐만 아니라 미생물의 CA (carbonic anhydrase) 및 첨가 해준 calcium source의 부분적인 과포화 [15] 등에 의해 영향을 받아 이와 같은 결과를 나타낸 것이라 사료된다.

#### 3.5. 스트레스에 대한 생장을 비교

추후 적용하게 될 국내의 토양이나 지하수 환경에 맞추어 다양한 환경 스트레스 실험을 하였다. 국내 지하수의 연평균 pH의 범위는 약 6~8의 약산성 및 중성으로 그 범위가 다양하

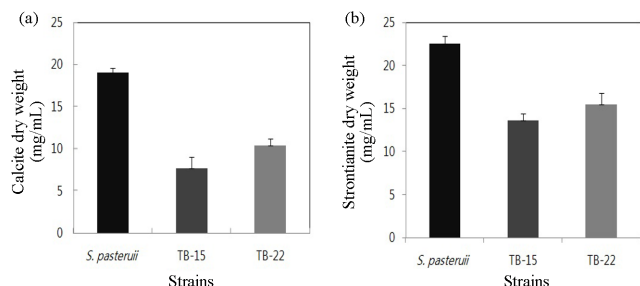


Fig. 3. Quantitative analysis of  $\text{CaCO}_3$  (a) and  $\text{SrCO}_3$  (b).

며 영양요소 또한 매우 열악한 환경을 유지하고 있다 [16]. 따라서 토양과 지하수 범위의 pH를 고려한 실험을 수행하였으며, 열악한 영양상태의 환경조건에 대비하여 기아 조건에서의 생존율을 대조군과 비교하였다. 추가적으로 오염원인 스트론튬의 농도가 각 미생물의 생존에 어떠한 영향을 미치는지 확인하였다. Fig. 4(a)를 보면, 20 mM 스트론튬 농도에서 대조군과 분리 균주 모두 성장 저해를 받지만, 생존율이 10%인 대조군에 비해 TB-22의 경우 대조군보다 20% 높은 생존율을 보였다. 이를 통해 분리균주가 스트론튬에 대한 내성이 높다는 확인할 수 있다. pH 별 생존율의 경우 대조군은 pH 8.0 이하에서부터 저해를 받기 시작했지만, TB-15, TB-22의 경우 pH 6.0 범위에서도 생존율의 변화가 없었다 (Fig. 4(b)). 기아 조건에서는 대조군은 3일 후에 모두 사멸하였지만 TB-15, TB-22의 경우 7일 후에도 4~8%의 생존율을 보여 영양 조건이 제한된 환경에서의 적용 가능성을 확인하였다 (Fig. 4(c)).

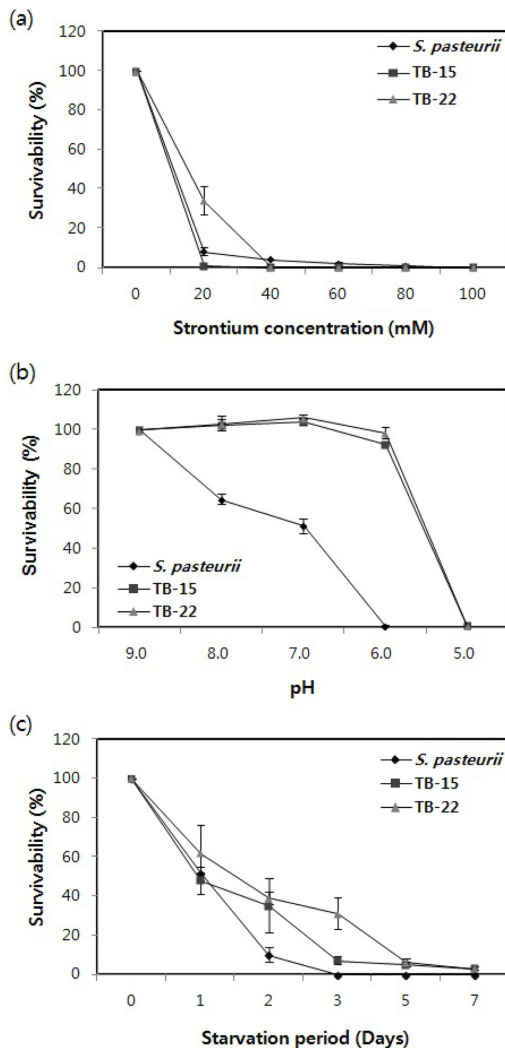


Fig. 4. Effect of strontium concentration, pH, and starvation on the survivability of TB-15, TB-22 and *S. pasteurii*.

#### 4. 결론

본 연구에서는 방사성 물질인 스트론튬을 격리화하기 위해 열악한 환경으로부터 요소 분해 활성 미생물들을 분리·동정한 후, 요소 분해 활성과 탄산칼슘, SrCO<sub>3</sub>의 정성·정량 측정, 다양한 환경 스트레스 조건에서의 생존율을 비교하였다. 분리한 TB-15와 TB-22 균주 모두 요소를 분해하여 탄산칼슘을 형성하는 것을 확인하였으며 다른 분리 균주에 비해 높은 요소 분해 활성과 탄산칼슘과 SrCO<sub>3</sub>의 형성량을 보여주었다. 대조군인 *S. pasteurii* KCTC 3558의 경우 높은 요소 분해 능력을 보이지만 분리 균주에 비해 다양한 환경 스트레스에 대해 낮은 생존율을 보였다. 우선 스트론튬의 농도 20 mM 이상에서 TB-22는 대조군보다 20% 높은 생존율을 보였으며, pH 6 범위에서도 대조군은 사멸하였으나, 분리 균주는 모두 생존함을 확인하였다. 또한 TB-15, TB-22는 기아 조건에서도 대조군이 사멸한 3일 이후에도 생존하였으며, 7일 후에도 약 4~9% 정도의 생존율을 보여주었다. 이는 향후 적용하게 될 국내의 토양이나 지하수 환경에서 본 연구를 통해 분리한 균주 (TB-15, TB-22)의 적용 가능성을 시사하였다. 추후 TB-15, TB-22를 이용하여 다양한 컬럼 및 실험실 규모의 실험을 통하여 스트론튬 뿐만 아니라 다양한 방사성 물질에 대한 격리화 연구와 현장에서도 적용 할 수 있는 기초 연구를 진행 할 것이다.

#### 사사

이 논문은 2011년도 정부 (교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임 (NRF-2011-0025 229).

#### REFERENCES

- Choi, B. D. (2010) Neoliberal energy policy and the limits to green growth. *Korean J. Geogr. Soc.* 45: 26-48.
- Chen, J. P. (1997) Batch and continuous adsorption of strontium by plant root tissues. *Bioresour. Technol.* 60: 185-189.
- Chung, M. H. and O. J. Tu (1994) A study on effect of electric field for carcinogenesis of strontium 90. *Korean J. Environ. Health Soc.* 20: 61-77.
- Fujita, Y., G. D. Redden, J. C. Ingram, M. M. Cortez, F. G. Ferris, and R. W. Smith (2004) Strontium incorporation into calcite by bacterial ureolysis. *Geochim. Cosmochim. Ac.* 68: 3261-3270.
- Bachmeier, K. L., A. E. Williams, J. R. Warrington, and S. S. Bang (2002) Urease activity in microbiologically-induced calcite precipitation. *J. Biotechnol.* 93: 171-181.
- Chunxiang, Q., W. Jianyun, W. Ruixing, and C. Liang (2009) Corrosion protection of cement-based building materials by surface deposition of CaCO<sub>3</sub> by *Bacillus pasteurii*. *Mater. Sci. Eng. C.* 29: 1273-1280.

7. Stocks-Fisher, S., J. K. Galinat, and S. S. Bang (1999) Microbiological precipitation of  $\text{CaCO}_3$ . *Soil Biol. Biochem.* 31: 1563-1571.
8. Achal, V., X. Pan, and D. Zhang (2012) Bioremediation of strontium (Sr) contaminated aquifer quartz sand based on carbonate precipitation induced by Sr resistant *Halomonas* sp. *Chemosphere.* 89: 764-768.
9. Natarajan, K. R. (1995) Kinetic study of the enzyme urease from *Dolichosbiflorus*. *J. Chem. Educ.* 72: 556-557.
10. 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.
11. Han, S. H., J. C. Lee, S. S. Jang, and P. G. Kim (2004) Composted sewage sludge can improve the physiological properties of *Betula schmidtii* grown in tailings. *J. Plant Biol.* 47: 99-104.
12. Han, S. H., S. K. Kim, C. H. Kang, J. Y. Park, J. H. Jeong, and J. S. So (2012) Environmental stress response of calcite forming bacteria isolated from concrete pavement. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 27: 268-272.
13. Ahmed, I., A. Yokota, A. Yamazoe, and T. Fujiwara (2007) Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 1117-1125.
14. Fujita, Y., J. L. Taylor, L. M. Wendt, D. W. Reed, and R. W. Smith (2010) Evaluating the potential of native ureolytic microbes to remediate a  $^{90}\text{Sr}$  contaminated environment. *Environ. Sci. Technol.* 44: 7652-7658.
15. Achal, V., and X. Pan (2011) Characterization of urease and carbonic anhydrase producing bacteria and their role in calcite precipitation. *Curr. Microbiol.* 62: 894-902.
16. Ministry of Environment of Korea. <https://sgis.nier.go.kr>. (2013).