

콘크리트 포장에서 분리한 *Lysinibacillus sphaericus* WJ-8의 포자 형성과 환경 스트레스 반응

한상현¹, 강창호¹, 신유진¹, 염우성², 정진훈², 소재성^{1*}

Sporulation of *Lysinibacillus sphaericus* WJ-8 Isolated from Concrete Pavement and Response to Environmental Stresses

Sang-Hyun Han¹, Chang-Ho Kang¹, Yu Jin Shin¹, Woo Sung Yeom², Jin Hoon Jeong², and Jae-Seong So^{1*}

접수: 2013년 5월 20일 / 게재승인: 2013년 12월 17일
© 2014 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Calcite forming bacteria (CFB) have been received increasing attention as a novel and environmental friendly strategy for the healing of concrete crack. Among the CFB, spore forming bacteria were proposed to overcome concrete condition (high pH, hydration heat, deicer). In this study, *Lysinibacillus sphaericus* WJ-8 (WJ-8) isolated from concrete pavement was characterized. The WJ-8 was able to precipitate calcite at 10 mg/mL. When observed by scanning electron microscopy, WJ-8 showed spore formation and maximum spore yield was approximately 97.9%. Also response of spores against various environment stresses was examined. Approximately 83~97% of spores maintained their survivability at each three conditions (60°C, 3 M NaCl and pH 12).

Keywords: Calcite forming bacteria, *Lysinibacillus sphaericus*, Calcite, Spore, Stress test

1. INTRODUCTION

콘크리트는 널리 사용되는 건설재료 중 하나이지만, 잦은 미세균열과 수분 및 기타 화학물질의 침투로 인한 균열 확장으로 구조물의 내구도 및 수명에 있어 치명적인 결함이 존재한다 [1,2]. 이와 같은 콘크리트 문제점을 해결하기 위해 혼화제, 에폭시 등을 사용하지만 지속적인 사용이 필요하고 환경에 부정적인 영향을 주기 때문에 문제시되고 있다. 이에 대한 방안으로 최근 탄산칼슘형성 미생물을 콘크리트에 적용하여 균열보수, 압축강도증진, 투수성 감소 등의 효과를 보이는 연구가 진행되고 있다 [3-5]. 그러나 콘크리트의 고알칼리 환경 (pH 12), 수화열 (50~60°C), 삼투압 (제설제) 등으로 탄산칼슘형성 미생물이 제한적으로 적용되고 있으며 이를 극복하기 위해 탄산칼슘형성 미생물 중 포자 형성 능력을 보유한 미생물이 연구되고 있다 [6].

포자 형성 미생물은 그람 양성 미생물에서 그람 음성 미생물까지 다양하게 존재하고 있으며 [7] 이들이 형성한 포자는 열, 방사선, 화학물질 등 다양한 스트레스에 대한 내성을 보여 [8] 생물 분해, 복합 소화 효소, 비료제, 길항적 살균제 및 살충제 등 다양한 분야에 쓰이고 있다 [9].

본 연구에서는 한국형 기후에 맞는 콘크리트 적용을 위해 국내 지역의 콘크리트 도로에서 탄산칼슘형성 미생물을 분리하였다. 그 후 정성 및 정량적으로 탄산칼슘형성을 확인하였고 90% 이상의 포자 형성률을 유도하여 다양한 환경 스트레스에 대한 생존률 확인을 통해 분리 미생물의 콘크리트 적용 가능성을 보였다.

¹인하대학교 생물공학과
¹Department 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

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

2. MATERIALS AND METHOD

2.1. 배지, 시약 및 기기

본 실험에서 완충 및 희석 용액으로 Phosphate buffer (NaH_2PO_4 : 0.10 g/L, Na_2HPO_4 : 26.61 g/L, 1 mM EDTA; pH 9.0)가 사용되었다. 탄산칼슘형성 미생물의 선별을 위해 BPU 배지 (Beef extract: 3 g/L, Peptone: 5 g/L, Urea: 20 g/L; pH 9.0) [10]가 사용되었으며 배양 배지로는 변형된 YA 배지 (Yeast: 20 g/L, Ammonium sulfate: 9.9 g/L; pH 9.0) [11]가 사용되었다. 또한 Sasaki 등의 배지 [12]를 일부 변형한 modified sporulating (MS) 배지 ($\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 0.02 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0.2 g/L, MgCl_2 : 1.02 g/L, KH_2PO_4 : 0.5 g/L, Yeast extract: 10 g/L; pH 7.0)가 포자형성 배지로 사용하였다. 침전된 탄산칼슘 및 미생물 수거를 위해 원심분리기 (VS-550, Vision Scientific Co., LTD, Bucheon, Korea)가 사용되었고, 미생물의 초기 균체 수 설정을 위해 분광광도계 (Utrospec 2000, Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

2.2. 미생물 분리

강원도 원주 내 만종분기점 부근 제7지구대 전방의 광장 영업소 콘크리트 도로 현장에서 도로 중앙, 방벽, 배수구 등 도로와 도로 주변에서 콘크리트 시료를 채취하여 미생물을 분리하였다. 분리 미생물을 BPU 액체 배지에 접종하였으며 28°C, 200 rpm, 48시간 배양한 후 배양액을 0.2 μm syringe filter로 여과하였다. 여과액 1 mL에 100 μL 의 100 mM CaCl_2 를 첨가하여 탄산칼슘의 침전반응을 통해 1차 선별하였다. 선별된 미생물은 25% glycerol stock으로 만들어 -70°C에서 보관하였으며 16S rRNA gene sequencing으로 미생물을 동정하였다. 동정 및 sequence 결과를 토대로 PHYDIT ([http://plaza/snu.ac.kr/~jchun/phydit/](http://plaza.snu.ac.kr/~jchun/phydit/)) 프로그램을 이용하여 계통수를 작성하였다.

2.3. 탄산칼슘 형성 확인

선별된 미생물이 탄산칼슘을 형성하는지 확인하기 위해, 분리 미생물들을 BPU액체 배지에 접종하여 28°C, 200 rpm, 48시간 동안 배양한 후 0.2 μm syringe filter로 여과하였다. 여과액 500 μL 와 500 μL 의 여과 멸균된 350 mM CaCl_2 수용액을 반응시켜 백색 침전 형성을 확인한 후 원심 분리 (16179 \times g, 5 min)를 통해 침전물을 얻었다. 침전물을 50°C, 24시간 동안 건조시킨 후 X-선 회절 분석기 (DMAX-2500, Rigaku, Tokyo, Japan)를 이용하여 10~90°에서 2 θ 간격으로 측정하였다. 탄산칼슘을 정량적으로 측정하기 위해 선별된 미생물을 BPU액체 배지에 28°C, 200 rpm으로 배양하였다. 0시간부터 24시간까지는 3시간 단위로 배양액을 채취하였으며 그 이후로는 48, 72, 96시간에 각각 배양액을 채취하였다. 그 후 채취한 배양액을 0.2 μm syringe filter로 여과하였다. 여과액 500 μL 에 500 μL 의 여과 멸균된 350 mM CaCl_2 수용액을 첨가하여 침전반응을 유도하였으며 원심 분리 (16179 \times g, 5 min)를 통해 침전물을 획득하였다. 획득한 침전물을 50°C, 24시간

동안 건조시켜 중량을 측정하였다.

2.4. 포자 형성 확인

분리된 탄산칼슘형성 미생물을 5 mL YA 배지에 접종하여 28°C, 200 rpm, 24시간 동안 전 배양하였으며, 전배양이 완료된 후 배양액을 5 mL YA 배지에 10% 접종하여 8시간 본 배양하였다. 본배양액 500 μL 를 50 mL의 MS 액체 배지에 접종하여 28°C, 200 rpm, 96시간 동안 배양하였다. 배양 중 24시간 단위로 배양액을 채취하여 YA 한천 배지에 도말 후 총균체 수 (영양세포+포자)를 확인하였고, 채취한 배양액을 포자 계수를 위해 80°C, 15분 동안 열처리하여 영양세포를 제거한 후 YA 한천 배지에 도말하였다. 도말된 YA 한천 배지를 28°C, 24시간 배양하여 CFU (Colony Forming Unit)를 측정하였으며 다음과 같이 포자형성률을 계산하였다 (포자형성률 (%) = 열처리 후 CFU/열처리 전 CFU \times 100 (%)). 또한 수집한 포자를 1% glutaraldehyde (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) 용액에 4°C, 24시간 동안 고정화 과정을 거친 후, 에탄올에 탈수시켜 전계방출형 주사전자현미경 (field emission scanning electron microscope, S-4300, Hitach, Tokyo, Japan)을 이용하여 포자를 관찰하였다 (15 kV \times 6.00 K, 5.0 μm scale).

2.5 포자의 환경 스트레스 (온도, pH, NaCl)에 대한 생존률 실험

포자의 스트레스 저항성을 분석하기 위해 온도 (40°C, 50°C, 60°C), pH (9, 10, 11, 12, 13), NaCl (1, 2, 3 M)의 조건에 대한 생존률을 비교 분석하였다. 48시간 동안 MS액체 배지에 배양된 미생물을 원심분리 (4045 \times g, 5 min) 후 Phosphate buffer로 세척하여 OD_{600} =1.0이 되도록 현탁하였다. 그 후 80°C, 15분 동안 열을 가하여 YA 한천 배지에 도말한 후 초기 포자를 계수하였다. pH와 염분 스트레스 실험을 위해, 선별된 포자를 해당 스트레스 조건의 Phosphate buffer에 10% 접종하여 28°C, 48시간 동안 정치배양하였다. 배양 후 배양액 200 μL 를 YA 고체 배지에 분산 도말하였으며, 도말된 YA고체 배지를 28°C, 24시간 동안 배양하여 CFU (Colony Forming Unit)를 측정하여 포자의 생존률을 계산하였다. 온도 스트레스 실험을 위해, 선별된 포자를 Phosphate buffer에 10% 접종하여 40°C, 50°C, 60°C에서 각각 48시간 동안 정치배양하였다. 48시간 배양 후, 배양액 200 μL 를 YA 고체 배지에 분산 도말하였으며, 도말된 YA 고체 배지를 28°C, 24시간 동안 배양하여 CFU (Colony Forming Unit) 측정으로 생존률을 계산하였다. 포자생존률은 다음과 같이 계산하였다 (포자생존률 (%) = 접종 후 CFU/접종 전 CFU \times 100 (%)). 대조군으로서 MS 액체 배지에 24시간 동안 배양된 영양 세포가 사용되었으며, 위와 동일한 조건으로 OD_{600} =1.0이 되도록 현탁하였고 열처리 (80°C, 15분) 없이 스트레스 조건들을 가하였다. 대조군인 영양 세포의 생존률은 다음과 같이 계산하였다 (영양 세포 생존률 (%) = 접종 후 CFU/접종 전 CFU \times 100 (%)).

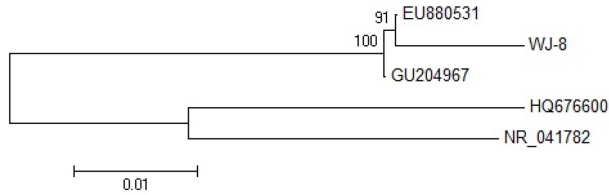


Fig. 1. Neighbor-joining tree based on bacterial 16S rRNA gene sequence. WJ-8, isolated strain was compared with sequences available from the GenBank database (EU880531, *Lysinibacillus sphaericus*; GU204967, *Lysinibacillus sphaericus*; HQ676600, *Sporosarcina pasteurii*; NR_041782, *Sporosarcina ureae*).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. 미생물 분리 및 탄산칼슘 형성 확인

도로의 중앙부, 방벽, 중앙 분리대 등에서 콘크리트 시료를 채취하여 20여 개의 단일 콜로니를 얻었고, 이 중 1개의 콜로니로부터 탄산칼슘을 형성하는 것을 확인하였다. 탄산칼슘을 형성하는 콜로니의 16S rRNA gene sequencing 결과, *Lysinibacillus sphaericus*로 동정 (Fig. 1)되어 *Lysinibacillus sphaericus* WJ-8 (WJ-8)로 명명하였고 National Center of Biotechnology Information으로부터 accession number KC211298을 부여받았다. De Muynck 등의 연구 [4]에서 *L. sphaericus*는 탄산칼슘을 형성하며, 콘크리트 표면 적용을 통해 투수성 감소 역할을 한다고 보고되어있다.

3.2. 탄산칼슘 형성 확인

WJ-8이 BPU에서 배양된 후 탄산칼슘을 형성하는지 정성, 정량적으로 확인하였다. X-선 회절분석을 통한 탄산칼슘의 정성적 확인 결과를 통하여 Fig. 2a와 같이 탄산칼슘과 그 이성질체인 미량의 바테라이트가 형성됨을 확인하였다. Gorospe 등의 연구 [13]를 통해 본 실험에서 미생물에 의해 형성된 탄산칼슘이 기존의 탄산칼슘 형성 미생물에 의해 형성된 탄산칼슘과 동일한 물질임을 알 수 있었다. 또한 추후 콘크리트 적용을 위해, WJ-8이 배양 기간에 따라 생성하는 탄산칼슘을 정량적으로 확인하였다. 배양 초기에는 생성되지 않았던 탄산칼슘이 6시간에는 2.3 mg/mL의 탄산칼슘이 생성되었으며, 48시간 이후에는 탄산칼슘이 최대 10.0 mg/mL 형성됨을 알 수 있었다 (Fig. 2b).

3.3. 포자 형성 확인

WJ-8을 MS 배지에 배양하여 포자형성을 비교 분석하였다. 24시간에는 총 균체 (영양 세포 + 포자) 수가 5.13×10^8 CFU/mL로 관찰된 반면 포자 수는 관찰되지 않아 24시간에는 영양세포만이 존재함을 확인할 수 있었다. 48시간에는 총 균체 수와 포자 수는 각각 4.80×10^8 CFU/mL와 4.79×10^8 CFU/mL로 97.9%의 포자형성률을 보였다 (Fig. 3a). 그리고 24시간에 비해 3.3×10^7 CFU/mL만큼 균체 수가 감소한 것은 포자가 되지 않은 대부분의 영양 세포가 사멸되어 감소된 총 균체 수를

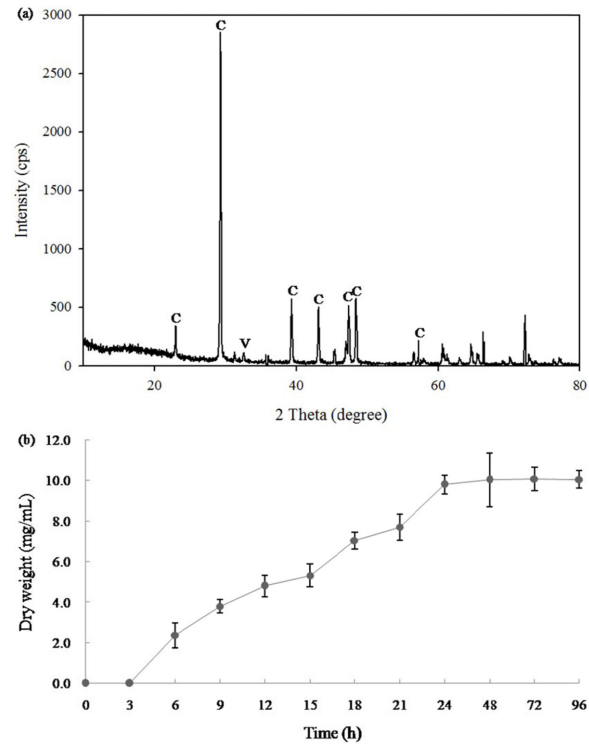


Fig. 2. X-ray diffraction of the calcite produced by *L. sphaericus* WJ-8 (C: calcite, V: vaterite) (a), Rate of calcite formation by *L. sphaericus* WJ-8 (b). Error bars show standard deviation (n=3).

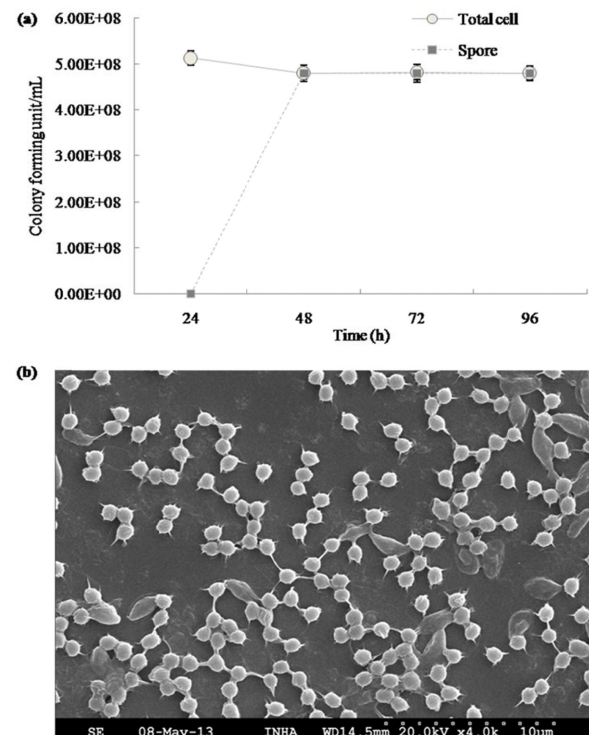


Fig. 3. Time course of total cell number (○-○) and spore number (■-■) (a), and scanning electron microscope photographs of *L. sphaericus* WJ-8 cultured in sporulating media broth at 28°C for 2 days (b).

보인 것으로 사료된다. 이는 Kim 등의 포자 형성미생물의 장기 배양 [14]과 Sasaki 등의 포자 형성에 영향을 주는 배지 조건 [12]에 관련된 연구에서 배지 조성 및 배양 기간이 포자 형성뿐만 아니라 포자 형성률에도 영향을 미침을 알 수 있었다. 형성된 포자를 형태학적으로 확인하기 위해 주사전자현미경으로 관찰하였다. Fig. 3b에서 매끈한 표면의 구형 포자가 대부분 존재하며 중간에 부속기와 외막이 나타나있음을 보아 WJ-8이 MS 배지에 의해 대부분 포자를 형성함을 알 수 있었다.

3.4. 포자의 환경 스트레스 (온도, pH, 염분)에 대한 생존률 실험

분리한 미생물을 콘크리트에 적용하기 위해 콘크리트 환경 스트레스인 열, pH, 염분에 대한 생존률을 실험하였다. 50°C와 60°C에서 포자의 열 스트레스에 대한 생존률이 84~97%로 매우 높은 생존률을 보였다 (Fig. 4a). 이 결과는 형성된 포자가 콘크리트의 수화열 (50~60°C)을 견딜 수 있음을 의미하기 때문에 포자의 콘크리트 적용 가능성을 보였다. 반면 영양 세포인 경우 50°C와 60°C에서 대부분 사멸함을 보여 영양 세포의 콘크리트 적용이 부적절함을 보였다. 해양환경 적용 및 NaCl 계열 제설제 노출 [15]과 같이 높은 삼투압 조건에서의 적용을 위해 삼투압 스트레스 조건 (1~3 M NaCl)에 미생물을 노출시켰다. 그 결과 포자는 모든 조건에서 87~95%로 매우 높은 생존률을 보였으나, 영양세포인 경우, 2 M과 3 M NaCl의 조건에서 생존률이 급감함을 알 수 있었다 (Fig. 4b). 이 결과는 콘크리트 적용 시 포자가 해양환경이나 NaCl

계열 제설제에 노출되어도 높은 생존률을 유지할 수 있음을 보였다. Fig. 4c에서 염기 조건 (pH 9~12)에 대한 생존률을 확인한 결과 영양 세포와 포자 모두 각각 82~91%와 84~97%의 생존률을 보였다. 이는 분리원이 고알칼리성인 콘크리트이기 때문에 영양 세포 자체가 pH 12에 대한 저항성을 보유함을 알 수 있으며, 영양 세포와 포자 모두 시멘트의 최저 염기성인 pH 12에서 생존 가능성을 보였다. 그러나 pH 13에서는 영양 세포는 대부분 사멸하였고, 포자인 경우 30~40%의 생존률을 보였다 (Fig. 4c). 이는 포자를 형성한 미생물이 강염기 조건인 콘크리트 (pH 12~13)에의 적용 가능성을 보이며 완벽한 적용을 위해 sol-gel과 같은 미생물을 보호하는 방법이 필요할 것으로 사료된다. 위와 같은 포자의 콘크리트 환경 조건에 대한 생존률은 기존 연구와 비교했을 때 우수함을 알 수 있다. 기존의 선행연구 [16]에서 분리된 미생물들이 24시간만에 55°C, pH 11, 1.5 M NaCl에서 모두 사멸한 반면 본 연구에서 분리 미생물로부터 생성된 포자는 더 긴 스트레스 처리시간인 48시간에서도 60°C, pH 12, 3 M NaCl에서 83~97% 생존함을 알 수 있어 콘크리트에 대한 포자의 적용이 필수적이라 볼 수 있다.

4. CONCLUSION

본 연구에서 콘크리트 내 미생물 적용을 위해, 콘크리트에서 미생물을 분리하여 탄산칼슘과 포자 형성을 확인하였고, 포자에 대한 환경 stress에 대한 생존률을 비교 분석하였다.

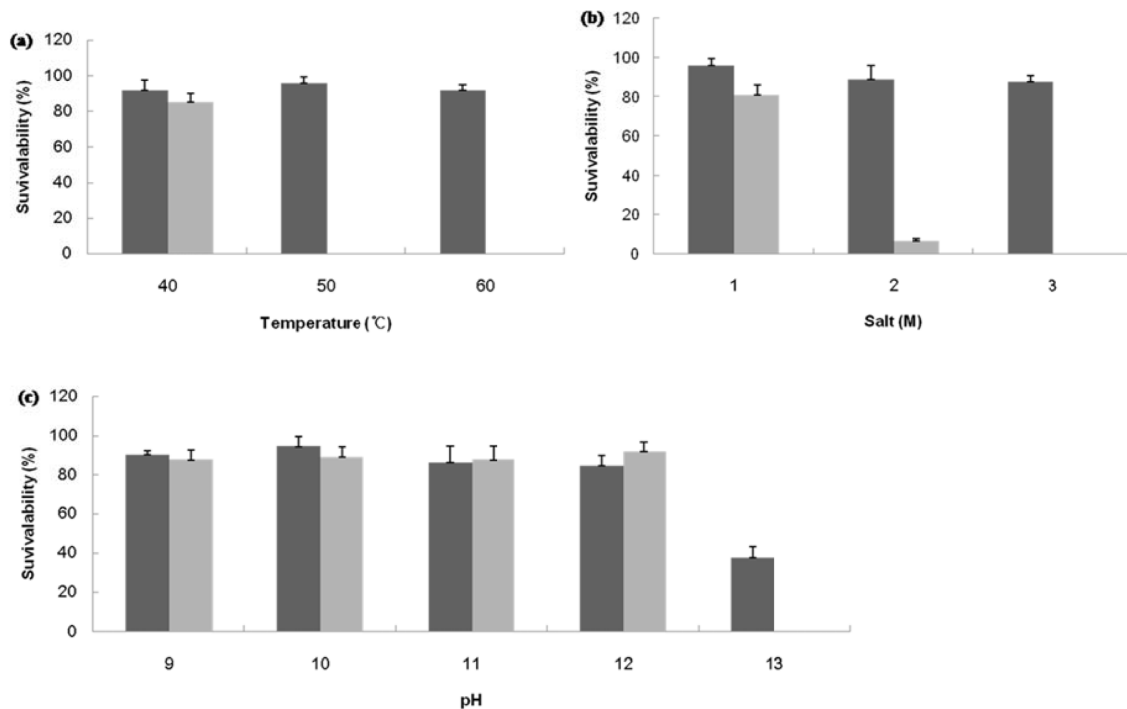


Fig. 4. Spore survivability of *L. sphaericus* WJ-8 exposed to a range of temperature (a), salt (b) and pH concentration (c). Filled bars and open bars represent spores and vegetative cells, respectively. Error bars show standard deviation (n=3).

콘크리트로부터 20여 개의 단일클로니를 분리하였고, 이 중 1개의 클로니로부터 탄산칼슘이 형성됨을 확인하였으며 16S rRNA gene sequencing 결과 *L. sphaericus* WJ-8로 동정되었다. 또한 WJ-8이 약 10 mg/mL의 탄산칼슘을 형성하였고, 포자 형성 배지를 이용하여 포자 형성률이 97.9%임을 알 수 있었으며 형태학적으로 포자를 형성함을 확인할 수 있었다. 추후 콘크리트 적용을 위한 환경 스트레스 실험 결과, 형성된 포자가 기본적인 콘크리트 조건에서 높은 저항성을 보였다. 이는 시멘트의 수화열에 해당되는 60°C, 제설제 조건에 해당되는 3 M NaCl, 콘크리트의 최저 pH 12와 같은 조건에서 83~97%의 생존률을 보여 콘크리트 적용 가능성을 보였다. 반면 강알칼리성 (pH 13) 조건에서 포자만이 30~40%의 부분적인 생존률을 보여 sol-gel과 같은 미생물의 보호 기법이 필요할 것을 보였다. 추후, 분리 미생물의 포자를 sol-gel화시켜 생존능력을 최대화 할 것이며, 콘크리트 적용을 통해 강도 증진과 같은 효과를 보일 계획이다.

Acknowledgements

이 논문은 2011년도 정부 (교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임 (NRF-2011-0025229).

REFERENCES

1. Cho, Y. J. (2009) Concrete Technology at an the Era of Green Growth. *Kor. Concr. Inst.* 21: 22-27.
2. Jonkers, H. M. (2007) Self healing concrete: a biological approach. In *Self healing materials - An alternative approach to 20 centuries of materials science* (ed. S. van der Zwaag), pp. 195-204. Springer, the Netherlands.
3. Van Tittelboom K., N. De Belie, W. De Muynck, and W. Verstraete. (2010) Use of bacteria to repair cracks in concrete. *Cem. Conc. Res.* 40: 157-166.
4. 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.
5. Dick, J., W. De Windt, B. De Graef, H. Saveyn, P. Van der Mee-ren, N. De Belie, W. Verstraete (2006) Bio-deposition of a calcium carbonate layer on degraded limestone by *Bacillus* species. *Bio-degradation* 17: 357-367.
6. De Muynck, W., N. De Belie, and W. Verstraete (2010) Microbial carbonate precipitation in construction materials: A review. *Ecol. Eng.* 36: 118-136.
7. Nicholson, W. L., N. Munakata, G. Horneck, H. F. Melosh, and P. Setlow (2000) Resistance of *Bacillus* Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 548-572.
8. Madigan, M. T., J. M. Martinko, and J. Parker (2003) Brock biology of microorganisms. 10th ed., pp. 95. Pearson Education, Inc.: Upper Saddle River, NJ, USA.
9. Abel-Santos, E (editor) (2012) Bacterial Spores: Current Research and Applications. pp. 6. Caister Academic Press. Norfolk, UK.
10. 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.
11. Stocks-Fisher, S., J. K. Galinat, and S. S. Bang (1999) Microbiologica precipitation of CaCO₃. *Soil Biol. Biochem.* 31: 1563-1571.
12. Sasaki, K., S. Jiaviriyaboonya, and P. L. Rogers (1998) Enhancement of sporulation and crystal toxin production by cornsteep liquor feeding during intermittent fed-batch culture of *Bacillus sphaericus* 2362. *Biotechnol. Lett.* 20: 165-168.
13. Gorospe, C. M., S. H. Han, S. G. Kim, J. Y. Park, C. H. Kang, J. H. Jeong, and J. S. So (2013) Effects of different calcium salts on calcium carbonate crystal formation by *Sporosarcina pasteurii* KCTC 3558. *Biotechnol. Bioproc. Eng.* 18: 903-908.
14. Kim, S. J., J. H. Jung, H. M. Tahk, S. Y. Baek, and S. Y. Lee (2009) Effect of factors on the sporulation of *Bacillus cereus* and their thermal resistance. *J. Food Hyg. Safety* 24: 256-261.
15. Hopkins, G. R., S. S. French, and E. D. Brodie Jr (2013) Increased frequency and severity of developmental deformities in rough-skinned newt (*Taricha granulosa*) embryos exposed to road deicing salts (NaCl & MgCl₂). *Environ. Poll.* 173: 264-269.
16. 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.