

## 다양한 환경에서의 탄산칼슘 생성 균주 분리 및 특성 연구

김용경, 강창호, 오수지, 소재성\*

# Isolation and Characterization of Calcite Forming Bacteria from Various Environments in Korea

YongGyeong Kim, Chang-Ho Kang, Soo Ji Oh, and Jae-Seong So\*

접수: 2014년 3월 27일 / 게재승인: 2014년 9월 24일  
© 2014 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

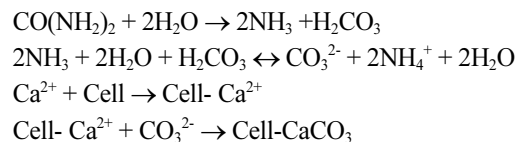
**Abstract:** Microbially induced calcite precipitation is a naturally occurring biological process in which microbes produce calcite on the surface of the microorganisms by urease activity. In order to collect calcite forming bacteria (CFB) in Korea, we isolated 343 putative CFB strains from various environments over three year period (2011~2013) and selected 100 CFB strains. Average of calcite productivity was 10.56 mg/mL. And average of ammonium concentration by urease activity was 8.00  $\mu$ M. Two useful CFB strains of the others were analyzed by 16S rRNA and identified as *Sporosarcina* sp. and *Viridibacillus arenosi*. The CFB strains presented in this study are indigenous microorganisms in Korea and they are expected to be applicable to a variety of environments in the country.

**Keywords:** Microbially induced calcite precipitation (MICP), Calcite, Urease, Isolation

### 1. INTRODUCTION

미생물의 calcite 생성 작용 (Microbially induced calcite precipitation, MICP)은 일반적으로 자연환경에서 생체광물생성작용 (Biomineralization)과 urease 반응에 의해 발생하는 결과로, 미생물의 표면에 탄산칼슘 (calcite,  $\text{CaCO}_3$ )이 석출되는 반응

이다 [1]. 미생물의 세포막은 (-)전하를 띠며, 주위 환경에서  $\text{Ca}^{2+}$ 를 포함한 다양한 (+)양이온을 유인하여 자신의 세포막에  $\text{CaCO}_3$ 를 생성시키게 되는데 이러한 반응은 urease라는 효소분해효소에 의해 유도된다. Urease는 효소를 가수분해하여 암모니아와 탄산이온을 생성하는 촉매 효소로서 생성된 암모니아는 주변의 pH를 상승시켜 탄산칼슘 생성에 유리한 환경을 만든다 [1]. 미생물 표면에 발생하는 탄산칼슘 석출에 대한 생화학적인 메커니즘은 다음과 같다 [2,3].



자연에 존재하는 효소는 미생물의 urease에 의해 분해되어  $\text{NH}_3$ 와  $\text{H}_2\text{CO}_3$ 를 생성한다. 생성된  $2\text{NH}_3$ 와  $\text{H}_2\text{CO}_3$ 는 물에서 분해되어 탄산이온 및 암모늄 이온을 형성하게 되며 이때 형성된 탄산이온은 미생물의 세포막에 붙은 칼슘이온과 반응하여 탄산칼슘을 생성하게 된다. MICP 능력이 있는 미생물들은 환경정화 및 건축자재 개발의 생물학적 응용방법으로 대두되고 있으며 물리적, 화학적 방법들과는 달리 추가적인 환경오염 등의 문제가 발생하지 않아 최근 생물학적 응용법으로 떠오르고 있다. 미생물의 세포막 표면에 양이온을 유인하는 반응을 이용하여 다양한 중금속 이온, 방사성 핵종 등을 저장화시키는 연구 [4,5]와, 시멘트 및 건축자재 등에 미생물을 혼합시켜 자재의 내구성을 높이는 연구 [3,6] 등이 대표적이다.

다양한 분야에서 탄산칼슘 생성 미생물이 대두되고 있지만 외국에 비해 국내에서의 연구는 미흡한 실정이다. 또한 미생

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

물의 현장 적용 부분에 있어서 외국의 자연 환경 조건과 국내의 환경 조건은 다르므로 외국에서 진행된 연구들을 국내 환경에 그대로 도입시키는 것은 무리가 있다. 따라서 MICP를 이용한 환경정화 및 국내 환경에 맞는 건축자재 개발을 위해서는 국내 토착 미생물의 발굴과 특성 연구가 시급히 필요하다.

본 연구는 탄산칼슘 생성 균주를 분리하기 위하여 2011년부터 2013년까지 강원도 태백 내 탄광촌, 석회암 지대의 토양 및 국내 폐광산 지역의 토양 시료로부터 국내 환경에 적용 가능한 다양한 탄산칼슘 생성 균주를 확보하였다. 또한 각 균주들의 탄산칼슘 생성량 및 urease 활성을 측정하여, 이 중 탄산칼슘 생성 능력이 뛰어난 균주를 선별하여 실제 응용을 위한 기반을 마련하였다.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. 배지 및 시약

탄산칼슘 생성 미생물의 선택 배지, 탄산칼슘 생성량 측정 및 urease 활성 측정을 위한 배지는 Kang과 Choi의 연구 [7,8]에서 사용한 방법을 이용하였다. BPU 배지 (beef extract 3 g/L, peptone 5 g/L, urea 20 g/L)를 각 pH 7, pH 9로 조정하여 사용하였으며 배양 후 탄산칼슘 생성을 유도하는 과정에는 0.2  $\mu\text{m}$  필터를 이용하여 여과 처리한  $\text{CaCl}_2$  solution (350 mM)을 사용하였다. 배양 배지로는 YA 배지 (yeast extract 20 g/L, ammonium sulfate 10 g/L)를 pH 7, pH 9로 맞춰 사용하였고, urease 활성 측정은 phosphate buffer (PBS;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.1 g/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  26.6 g/L, pH 9.0, 1 mM EDTA), urea solution (3 M urea), phenol-nitroprusside solution ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$  43.9 mL/L,  $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]2\text{H}_2\text{O}$  60 mg/L), hydrochlorite solution ( $\text{NaOH}$  20 g/L, 8%  $\text{NaOCl}$  46.8 g/L)를 사용하였다.

### 2.2. 미생물의 분리

시료의 채취는 2011년도부터 2013년까지 3년간 부산과 강원도 영월, 태백, 원주 내 탄광촌, 석회암지대의 토양시료를 채취하여 멸균용기에 담아 냉장 상태로 운반하였다. 채취한 토양 시료는 PBS에 10배 희석한 후 24시간 동안 30°C에서 배양하였다. 단일 집락을 얻기 위해 배양액을 다시 PBS에 10배 희석 후 100  $\mu\text{L}$ 를 취해 BPU 한천배지에 분산 도말하여 30°C, 72시간 동안 배양하였다. 형태가 다른 집락 위주로 다시 YA 한천배지에 계대하여 단일 집락을 획득하고 이를 25% glycerol stock으로 만들어 -70°C에 보존하였다.

1차로 분리된 미생물은 요소분해 활성이 있는 균주만을 분리하기 위하여 BPU 액체 배지에 30°C, 200 rpm으로 72시간 배양한 후 배양액에  $\text{CaCl}_2$  solution (350 mM)을 첨가 후 침전 반응을 확인하여 2차 선별을 하였고, 선별된 균주들을 대상으로 탄산칼슘 생성 및 요소분해 활성을 정량측정하였다.

### 2.3. 탄산칼슘 생성 및 요소 분해 활성 측정

탄산칼슘 생성 및 urease 활성 측정은 이전 본 연구팀 [7,8]에

서 사용한 방법을 변형하여 실험하였다. 탄산칼슘 생성량을 측정하기 위해 대조군 및 분리한 균주들을 5 mL BPU 액체배지에 30°C, 200 rpm으로 72시간 배양한 뒤, 원심분리하여 상등액을 500  $\mu\text{L}$  취해 0.2  $\mu\text{m}$  여과 처리한  $\text{CaCl}_2$  solution (350 mM)을 첨가한 뒤 원심분리 (12,300 $\times$ g, 5 min)하였다. 상등액을 제거한 침전물을 얻고, 침전물을 60°C에서 72시간 건조시켜 건조 중량을 측정하였다.

Urease 활성 측정은 urea를 넣은 배지에서 균이 자라는 동안 생성되는 암모늄 이온 (ammonium ion)의 농도를 측정하여 urease 활성을 간접적으로 측정하였다. 5 mL YA 액체 배지에 1차 선별된 균주들을 30°C, 200 rpm으로 18시간 동안 전배양한 후, 다시 5 mL YA 액체 배지에 10% (v/v) 접종하여 같은 조건으로 8시간 본배양 하였다. 본배양이 끝난 균주들을 원심분리기 (VS-550, Vision Scientific Co, Korea)를 이용하여 2,400 $\times$ g, 10분간 원심 분리하여 상등액을 제거하고 준비한 PBS를 이용하여 2회 세척한 후, 분광광도계 (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)를 이용하여  $\text{OD}_{600}=0.1$ 이 되도록 희석하였다. 희석한 균주 250  $\mu\text{L}$ , 500  $\mu\text{L}$ 의 urea solution (3 M), 250  $\mu\text{L}$ 의 PBS용액을 넣고 30°C, 72시간 반응시켰다. 반응물에 phenolnitroprusside solution과 hydrochlorite solution을 각 2 mL씩 첨가하여 60°C, 40분 반응시킨 후 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도를 0.1 mM-1 M의  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 로 설정된 표준선을 통해 생성된 암모늄 이온의 농도를 계산하였다.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1. 요소 분해 박테리아 선별

2011년부터 2013년까지 3년간 총 343점의 균주를 분리하였고, 분리한 균주들은 25% glycerol stock으로 만들어 -70°C 상태로 보관하면서 본 연구에 사용하였다. 분리한 균주 343점 중 탄산칼슘을 생성하는 균은 총 100점이었고, 연도별로 보면 2011년도 16점 (28.57%), 2012년 55점 (32.54%), 2013년

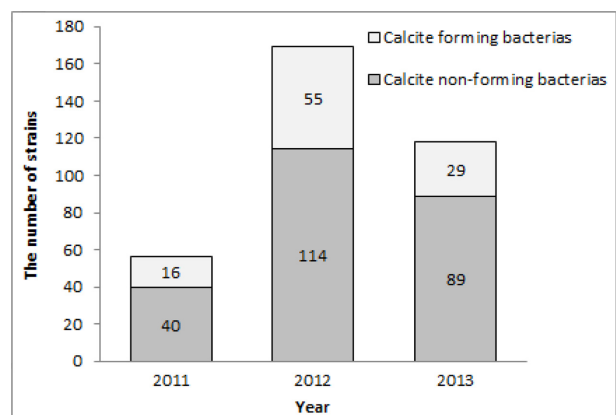


Fig. 1. The number of calcite forming bacteria (CFB) strains from putative CFB strains in each year.

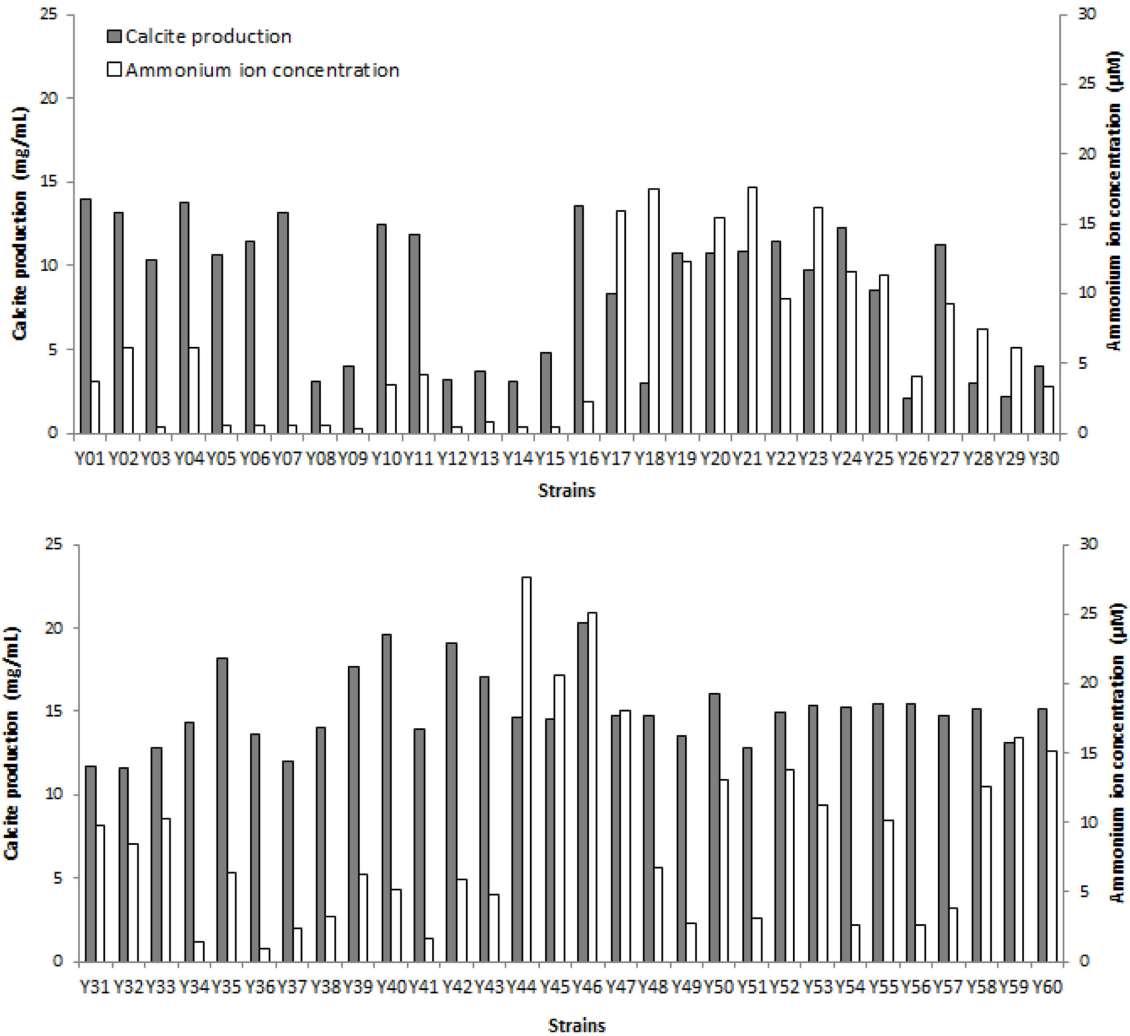


Fig. 2. Calcite productivity and ammonium ion concentration in pH 9.

29점 (24.57%)의 탄산칼슘 생성 균주를 분리·선별하였다 (Fig. 2).

**3.2. 탄산칼슘 정량 및 urease 활성 측정**

탄산칼슘 생성 균주의 탄산칼슘 정량 결과와 urease 활성의 측정 결과는 Fig. 2, 3와 같다. 본 연구에서 분리한 탄산칼슘 생성 균주의 평균 생성량은 10.56 mg/L이고, urease 활성을 나타내는 암모늄이온 농도의 평균은 8.00 µM이었다. 탄산칼슘 생성량이 높은 균주로는 Y35, Y40, Y42, Y46, Y99로 평균 생성량은 19.43 mg/mL이며, 생성된 암모늄 이온 농도가 높은 균주로는 Y44, Y45, Y46, Y97, Y100으로 평균 25.24 µM이었다. 공시균주인 *Sporosarcina pasteurii* KCTC 3558의 경우 탄산칼슘 생성량은 pH 7에서 16.8 mg/mL, pH 9에서 17.7 mg/mL 였고 urease 활성을 나타내는 암모늄이온 농도는 pH 7, 9에서 12.5 µM로 본 연구에서 분리한 탄산칼슘 생성 균주의 활성이 공시균주보다 우수한 것을 확인할 수 있었다.

탄산칼슘 생성량과 urease 활성이 높았던 Y99 균주와 Y

100균주의 16S ribosomal RNA 분석 결과, Y99 균주는 *Sporosarcina* sp., Y100 균주는 *Viridibacillus arenosi*임을 확인하였다 (Fig. 4).

연구 결과를 살펴보면 Y46 균주를 제외하면 탄산칼슘 정량 결과와 urease 활성 측정 결과가 비례하지 않음을 확인할 수 있었다. 이는 미생물이 MICP 작용에 의해 생성하는 탄산칼슘이 urease 뿐만 아니라 보유한 탄산무수화효소 (carbonic anhydrase) 및 첨가해준 calcium source의 부분적인 과포화 [9], 배양액의 pH [10] 등의 요소가 탄산칼슘 생성에 영향을 미쳐 이와 같은 결과를 나타낸 것으로 사료된다.

**3.3. pH에 따른 탄산칼슘 생성 및 urease 활성 측정**

Bioconsolidation 및 중금속 저감화에 미생물을 이용하기 위해서는 다양한 환경조건에 살아남으며 탄산칼슘 생성 작용을 할 수 있는 미생물 자원을 확보해야 한다. MICP작용을 이용하여 토양 및 지하수에 적용할 경우 중성의 환경에 살아남아 탄산칼슘을 생성하는 균주가 필요하다. 또한 bioconsoli-

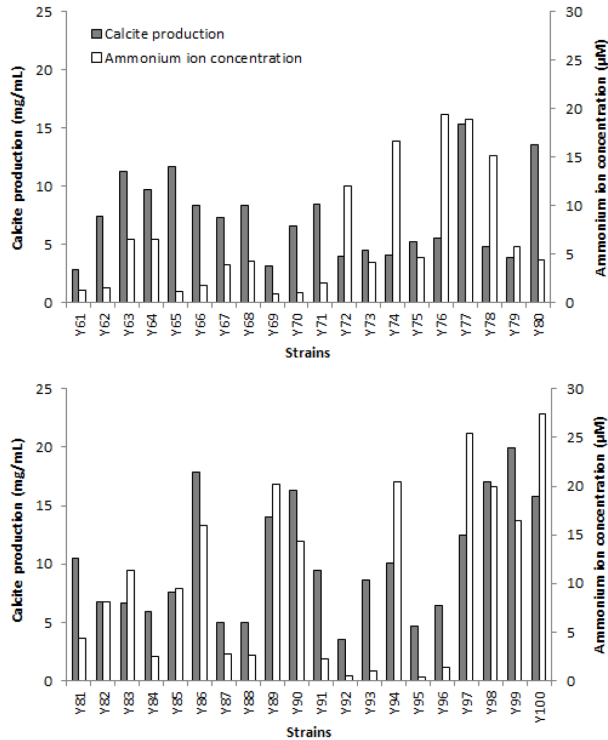


Fig. 3. Calcite productivity and ammonium ion concentration in pH 7.

ation을 이용하여 콘크리트와 시멘트 등에 적용할 경우 주변 환경은 강한 알칼리성이기 때문에 [11] 높은 pH에도 강한 균주가 필요하다. 이러한 이유로 본 연구에서는 지난 3년간 pH 7과 pH 9 두 종류로 나누어 미생물을 분리하였고 그 결과 pH 7에서 분리한 211개 균주 중 40점 (18.95%), pH 9에서 분리한 132점 균주 중 60점 (45.45%)의 탄산칼슘 생성 균주를 선별하였다. 환경에서 분리한 균주는 pH 9에 비해 pH 7에서 더 많지만, 이중 탄산칼슘을 생성하는 균주의 비율은 pH 9에서 더 많았다. pH 9에서 분리한 미생물의 경우 탄산칼슘 생

성량과 생성된 암모늄 이온 농도는 평균 11.77 mg/mL, 7.69 µM이고, pH 7에서 분리한 미생물의 경우 평균 8.74 mg/mL, 8.48 µM이었다. pH 7에서 분리한 균주의 경우 urease 활성은 pH 9 분리 균주들에 비해 높지만 탄산칼슘 생성량이 낮은 것을 볼 수 있는데, Stocks-Fischer 의 연구결과 [10]에 의하면, pH가 낮을 경우 형성된 H<sup>+</sup>이온에 의해 탄산칼슘 생성에 이용되는 CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>이온이 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 이온으로 변화될 수 있지만 높은 pH에서는 OH<sup>-</sup>이온이 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>이온과 반응하여 CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>이온과 H<sub>2</sub>O를 생성해 탄산칼슘 생성이 용이하다고 알려져 있다. 본 연구에서, Y99번 균주의 경우 pH 9 뿐만 아니라 pH 7 조건에서도 20 mg/mL 의 탄산칼슘 생성량을 확인할 수 있었으며, 이는 공시균주인 *S. pasteurii* KCTC3558과 비교하여도 높은 탄산칼슘 생성량인 것을 확인할 수 있었다. Fadwa와 Han의 연구 [12,13]에 따르면 환경에서 분리한 균이 다양한 스트레스에 강할 뿐만 아니라 탄산칼슘 생성량도 높다는 결과가 있다. 본 연구를 통해 분리·선별된 균주 또한 적용 환경에서 분리한 균이기에 환경 스트레스에 강하게 살아남을 것으로 예상된다.

4. CONCLUSION

본 연구는 다양한 환경으로부터 탄산칼슘 생성 미생물을 분리하여 중금속, 방사성 물질의 저감화 및 bioconsolidation 등의 다양한 분야에 적용될 수 있는 잠재적 유용 미생물의 선별을 목적으로 지난 3년간 탄산칼슘 생성 균주를 분리하기 위하여 국내 다양한 환경에서 균주를 확보하고, 이 중 탄산칼슘 생성 능력이 있는 균주를 선별하였다. 본 연구에서 선별한 100점 균주의 탄산칼슘 생성량 평균은 10.56 mg/mL, urease 활성에 의한 암모늄 이온 농도는 평균 8.00 µM이었다. 본 연구를 통해 분리한 균주들은 국내 토착 균주로 국내의 다양한 환경에 적용 가능할 것으로 판단되며, 분리 균주들은 향후 MICP 응용분야의 연구기반 미생물 소재자원으로 활용될 수 있을 것이라 기대된다.

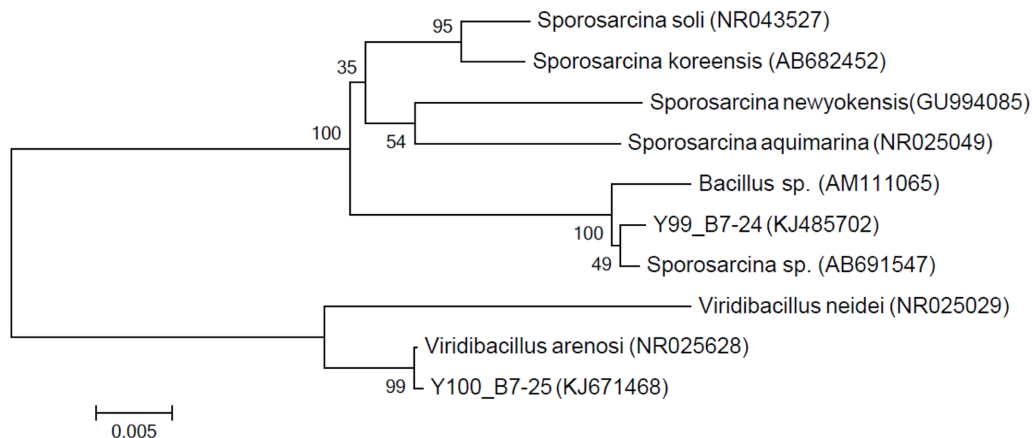


Fig. 4. Phylogenetic tree of calcite forming bacteria Y99, Y100.

## Acknowledgements

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

## REFERENCES

1. Muynek, W. D., N. D. Belie, and W. Verstraete (2010) Microbial carbonate precipitation in construction materials: a review. *Ecol. Eng.* 36: 118-136.
2. Dhama, N. K., M. S. Reddy, and A. Mukherjee (2013) Biomineralization of calcium carbonates and their engineered applications: a review. *Front Microbiol.* 4: 1-13.
3. Kim, W. J., S. Y. Ghim, S. J. Park, K. J. Choi, and W. Y. Chun (2010) Development of self-repairing smart concrete using microbologically induced calcite precipitation. *Korea concrete institute* 22: 547-557.
4. Fujita, Y., G. D. Redden, J. C. Ingram, M. M. Cortez, F. G. Ferris, and R. W. Smith (2004) Strontium incorporation into calcite generated by bacterial ureolysis. *Geochim. Cosmochim. Acta* 68: 3261-3270.
5. 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.
6. Bang, Sookie S. and V. Ramakrishnan (2001) Microbiologically-enhanced crack remediation (MECR). *Proceedings of the International Symposium on Industrial Application of Microbial Genomes*. Daegu, Korea, 3-13.
7. Kang, C. H., S. H. Han, Y. J. Shin, S. J. Oh, and J. S. So (2013) Bioremediation of Cd by microbially induced calcite precipitation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 172: 2907-2915.
8. Choi, J. H., C. H. Kang, S. H. Han, D. Y. Kwak, S. J. Oh, and J. S. So (2013) Isolation and characterization of ureolytic bacteria for biosequestration of strontium. *KSBB J.* 28: 165-169.
9. 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.
10. Stocks-Fischer, S., J. K. Galinat, and S. S. Bang (1999) Microbiological precipitation of  $\text{CaCO}_3$ . *Soil Biol. Biochem.* 31: 1563-1571.
11. 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.
12. Jroundi, F., P. Gmez-Suaga, C. Jimenez-Lopez, M. T. Gonzalez-Muoz, and M. A. Fernandez-vivas (2012) Stone-isolated carbonatogenic bacteria as inoculants in bioconsolidation treatments for historical limestone. *Sci. Total Environ.* 425: 89-98.
13. 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. *KSBB J.* 27: 268-272.