

# Assessment of Bio-corrosive Effect and Determination of Controlling Targets among Microflora for Application of Multi-functional CFB on Cement Structure

Jong-Myong Park, Sung-Jin Park and Sa-Youl Ghim\*

School of Life Sciences, Institute for Microorganisms, and Research Institute for Ulleungdo & Dokdo Islands, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

Received November 4, 2014 / Revised November 29, 2014 / Accepted December 7, 2014

The use of calcite-forming bacteria (CFB) in crack remediation and durability improvements in construction materials creates a permanent and environmentally-friendly material. Therefore, research into this type of application is stimulating interdisciplinary studies between microbiology and architectural engineering. However, the mechanisms giving rise to these materials are dependent on calcite precipitation by the metabolism of the CFB, which raises concerns about possible hazards to cement-based construction due to microbial metabolic acid production. The aim of this study was to determine target microorganisms that possibly can have bio-corrosive effects on cement mortar and to assess multi-functional CFBs for their safe application to cement structures. The chalky test was first used to evaluate the  $\text{CaCO}_3$  solubilization feature of construction sites by fungi, yeast, bacterial strains. Not all bacterial strains are able to solubilize  $\text{CaCO}_3$ , but *C. sphaerospermum* KNUC253 or *P. prolifica* KNUC263 showed  $\text{CaCO}_3$  solubilization activity. Therefore, these two strains were identified as target microorganisms that require control in cement structures. The registered patented strains *Bacillus aryabhathi* KNUC205, *Arthrobacter nicotianae* KNUC2100, *B. thuringiensis* KNUC2103 and *Stenotrophomonas maltophilia* KNUC2106, reported as multifunctional CFB (fungal growth inhibition, crack remediation, and water permeability reduction of cement surfaces) and isolated from Dokdo or construction site were unable to solubilize  $\text{CaCO}_3$ . Notably, *B. aryabhathi* KNUC205 and *A. nicotianae* KNUC2100 could not hydrolyze cellulose or protein, which can be the major constituent macromolecules of internal materials for buildings. These results show that several reported multi-functional CFB can be applied to cement structures or diverse building environments without corrosive or bio-deteriorative risks.

**Key words** : Bio-deterioration,  $\text{CaCO}_3$  solubilization, cement mortar, calcite-forming bacteria (CFB), microbially induced  $\text{CaCO}_3$  precipitation (MICP)

## 서 론

현재까지 다양한 미생물에 의한 탄산칼슘형성작용(MICP, microbially induced  $\text{CaCO}_3$  precipitation) 기작이 밝혀져 왔으며, 탄산칼슘형성세균(CFB, calcite-forming bacteria)을 콘크리트 건축물에 응용하는 것에 대해서 국내외적으로 연구가 꾸준히 이루어지고 있다[1, 3, 5, 8, 9, 11, 12, 15, 18-21, 27-28, 30, 33, 34]. 이러한 CFB를 시멘트 모르타르 양생 시 혼입하였을 때 콘크리트 압축강도를 증진시킬 수 있다는 보고가 있었고[8, 19, 20], 표면균열(surface crack)이 진행 중인 노화 건축물에 접충했을 때 그들의 생장 및 calcite crystal 형성으로 인해 균열이 복구되는 등의 효과가 보고되었다. 그러한 이유로 해

외에서는 문화재 보존에 이용되고 있으며, 기능성 단일 균주를 칼슘이온이 포함된 최적배지와 함께 건축물에 접충했을 때 우점적으로 증식하여 그들의 대사로 인한 calcite crystal 형성으로 균열 심부로부터 완전히 수복되는 효과를 가지는 것으로 보고되었다[12, 19, 21, 33, 34]. 이와 별개로 미생물의 대사 및 생장에 의한 건축물 생물열화를 막기 위해 azole, carbamate, zeolite, zeolite carbon, silver 및 copper 등 유·무기 항 미생물 재제를 시멘트 양생 시 혼입하는 등에 관한 연구가 수행되어 왔다[4, 7, 26].

이처럼 시멘트 내구성 증진을 위해 표면균열 복구 및 생물열화성(microbiological deterioration) 진균의 증식 억제에 관한 연구는 각각 독자적으로 수행되었으나, 최근 국내에서 시멘트 표면에서 균열 보수(crack remediation), 수분 침투력 감소(water permeability reduction) 및 생물열화 유발 진균의 증식억제 효과(fungal growth inhibition on cement surface)를 동시에 가진 다기능성 탄산칼슘 형성세균이 보고되었으며, 건축공학적 시험법을 통해 그 효능이 검증되었다[17, 21].

그러나 이들 연구에 따르면, 방제대상으로 사용된 건축물 유래 공시진균들이 그들의 색소형성으로 인해 건축물 표면의

### \*Corresponding author

Tel : +82-53-950-5374, Fax : +82-53-955-5522

E-mail : ghimsa@knu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

미학적 문제만 야기한다고만 보고되었을 뿐, 시멘트 모르타르(cement mortar) 성분에 대한 부식유발 가능성에 관한 연구는 미흡하다. 진균 균사의 발달생장에 의한 물리적 스트레스(Physical distortion) 및 산 형성은 인공 건축물 표면이나 건축 소재 부식 및 퇴화의 원인이 된다[2, 6, 10, 32]. 또한 이들 진균에 대해 시멘트 구조물 표면에서 증식억제 효능을 가진 것으로 보고된 CFB들이 그들의 대사 시 산 형성으로 건설 및 건축에 널리 사용되는 시멘트 조성에 미칠 수 있는 부식성은 조사된 바가 없다. 일부 세균은 대사의 결과로써 bacillic acid, nitrous acids, nitric acid, sulfuric acid 등 시멘트 혹은 자연암석을 부식시킬 수 있는 다양한 종류의 유기산 및 무기산을 형성할 수 있다[6]. 그와 같은 이유로 CFB를 시멘트 건축물의 표면에 적용했을 시 진균생장 억제, 균열복구 및 내구성 증진 보다는 오히려 이들의 증식으로 인해 산을 형성하여 시멘트 모르타르 주성분인  $\text{CaCO}_3$ 를 용해하거나, 콘크리트 구조물에 내구성(endurance)을 부여하는 가장 큰 요인인 시멘트 자체 강 알칼리성을 이들이 중화시켜 건축물 수명단축 등의 부작용을 초래할 수 있다는 추측이 지속 제기되어 왔다.

그러나 이에 대한 실험적 증명은 현재 해외의 문화재 보존과학(conservative science) 분야에서만 연구되었을 뿐, CFB의 건축공학 적용부분에 대해서는 그 연구가 미흡하다. 따라서 이번 연구에서는 문화재 등 해외 보존과학분야에서 널리 사용되는 실험기법을 사용하여 다양한 종류의 건축물 분리 미생물 및 다기능성 CFB의 시멘트 성분에 대한 부식능 유무를 고찰하였다. 이를 위해 첫째, 탄산칼슘( $\text{CaCO}_3$ , calcium carbonate)이 주요 성분인 시멘트 모르타르 기반 콘크리트 건축물(concrete structure)에서 분리 보고된 다양한 곰팡이, 세균, 효모에 대하여 산 형성으로 인한  $\text{CaCO}_3$  가용화능 시험인 chalky test를 실시하여 장기간 배양시 어떠한 미생물이 생물열화 유발 가능성이 있는지 시험하였다[32]. 이를 통해 시멘트 구조물의 생물열화를 막기 위한 방제대상 미생물의 종류를 결정할 수 있었다. 둘째, 최근까지 시멘트 균열보수 및 건축물 표면 곰팡이 증식 억제효과를 가지는 것으로 보고된 자연계 및 인공건축물 유래 CFB들에 대해 동일 시험을 실시하여 산 형성에 의한 시멘트 조성에 대한 열화 가능성을 고찰하였다. 이와 더불어, 건축내장재를 구성하는 일부 주성분 고분자 물질에 대해 CFB의 생물학적 효소활성을 확인하여 시멘트 이외의 여타 건축내장재에 대해서도 부식 가능성이 있는지 시험하였다.

## 재료 및 방법

### 실험균주 및 재료

실험에 사용된 균주들은 다음과 같다. 양성 대조균으로 산의 형성으로 시멘트 모르타르의 주 성분인  $\text{CaCO}_3$ 를 용해시키는 것으로 보고된 *Aspergillus niger* KCTC6906을 한국생명공학연구원 생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures,

KCTC)에서 분양받아 사용하였으며, 건축물에서 순수분리 되었다고 보고된 건축물 정주 미생물(normal microflora) 균주들을 실험균으로 하였다. 건축물 정주 세균으로는 *Rhodococcus erythropolis* KNUC201, *R. erythropolis* KNUC202, *Burkholderia glathei* KNUC203, *R. erythropolis* KNUC204, *Bacillus aryabhathi* KNUC205 를 사용하였다[17]. 또한 정주 진균으로는 이들과 동일 건축물에서 분리된 효모 2개 균주 *Pseudozyma prolifica* KNUC263, *Aureobasidium pullulans* KNUC264 및 균사형 진균 12개 균주 *Tritirachium* sp. KNUC251, *Cladosporium cladosporioides* KNUC252, *C. sphaerospermum* KNUC253, *C. cladosporioides* KNUC254, *Cladosporium* sp. KNUC255, *Alternaria tenuissima* KNUC256, *A. tenuissima* KNUC257, *Cladosporium* sp. KNUC258, *Penicillium* sp. KNUC259, *Penicillium* sp. KNUC260, *Pestalotopsis cocculi* KNUC261, *Elsinoaceae* sp. KNUC262 를 실험균으로 하였다[17].

### 건축물 분리 미생물의 배양 및 $\text{CaCO}_3$ solubilization

건축물 분리 세균, 곰팡이 및 효모 균주들의  $\text{CaCO}_3$  가용화 여부를 시험하기 위해 chalky test를 실시하였다. 미생물이 배지상의 탄소원을 이용해 대사를 할 경우 대사의 결과로 인한 산의 형성 및 한천배지 상 축적을 통해 콜로니 주변부의  $\text{CaCO}_3$ 를 용해시켜 그 활성대(clear zone)로 시멘트 조성에 대한 부식여부를 판단할 수 있다. 그러나 본 정성시험을 통해 가용성이 없다고 판정될 경우 시멘트 콘크리트 환경 적용 시 부식가능성이 없다고 판단한다[32].

이를 위해  $\text{CaCO}_3$  및 탄소원이 풍부하게 함유된 배지인  $\text{CaCO}_3$  solubilization test agar (glucose 10.0 g, purified calcium carbonate 5.0 g, agar powder 15.0 g, distilled water 1 l) 배지를 사용하였다[32]. 고온가압멸균 후 제조된 배지를 70°C까지 냉각시키고, petri-dish 분주 시  $\text{CaCO}_3$ 의 침강을 막기 위해 잘 흔들어 주었다.

실험에 사용될 건축물 분리 효모들은 전배양을 위해 YMB (yeast malt broth, Difco, USA) 한천배지 상에 도말하여 25°C 암실에서 계대배양한 후, 집락을 취하여 5 ml YMB 액체배지에 접종하고 25°C에서 180 rpm으로 24시간 동안 진탕배양을 실시하였다[18, 22]. 분리된 건축물 정주 세균의 경우 전배양을 위해 TSB (tryptic soy broth, Difco, USA) 한천배지 상에 희석도말하여 30°C에서 계대배양한 후, 집락을 취하여 5 ml TSB (tryptic soy broth, Difco, USA) 액체배지에 접종하고 30°C에서 180 rpm으로 16시간 동안 진탕배양을 실시하였다. 전배양(pre-culture)된 효모 및 세균들은 화염멸균된 백금이를 배양액에 담구어 일부를 취한 후 chalky test를 위한  $\text{CaCO}_3$  solubilization test agar에 천자하여 접종하였다. 건축물 분리 균사형 진균(filamentous fungi)들 및 양성 대조균으로 사용된 *A. niger* KCTC6906은 PDB (potato dextrose broth, Difco, USA) 한천배지상에서 계대배양 하여 25°C 암소에서 2~3주간 배양

한 후, 콜로니 가장자리의 fresh한 agar block을 균일한 크기 (0.5×0.5 mm)로 취하여 CaCO<sub>3</sub> solubilization test agar 상에 접종하였다. 접종된 세균들의 경우 30℃ 암실에서, 효모 및 곰팡이 균주들은 빛이 투과되지 않도록 호일을 씌워 25℃에서 30일간 배양하였으며, 각각의 시험은 3회씩 실시되었다. 배양 후 배지상의 CaCO<sub>3</sub>가 용해되어 콜로니 주변부에 clear zone이 형성되면 CaCO<sub>3</sub> 가용화능이 있는 것으로, 형성되지 않으면 가용화능이 없는 것으로 각각 판단하였다[32]. 대사에 의한 CaCO<sub>3</sub> 가용화를 판단하는 과정에서 장기간 배양시 세균 및 진균의 생존여부를 주기적 계대배양을 실시하면서 확인하였다.

#### 항진균 활성 가진 CFB의 CaCO<sub>3</sub> solubilization

시멘트 구조물 표면에서 미학적 문제를 야기하는 진균의 성장 및 발아를 억제하며, 균열을 보수할 수 있다고 보고된 CFB가 산의 형성으로 시멘트 조성을 열화 시킬 수 있는지 위와 동일한 방법으로 탄산칼슘 가용화 시험을 통해 확인하였다 [17, 22-25]. 시험 균주들로는 대한민국 독도의 자생식물 근권 토양에서 분리되었으며, 시멘트 모르타르 표면상에서 정상적으로 calcite crystal formation 및 성장을 통해 균열을 보수하고, 건축물 유래 진균 성장 억제능이 검증된 특허균주 *Arthro-bacter nicotinae* KNUC2100, *Bacillus thuringiensis* KNUC2103, *Stenotrophomonas maltophilia* KNUC2106을 대상으로 실시되었다. 동일한 활성을 가진 균주로 건축물에서 분리된 특허균주 *Bacillus aryabhathi* KNUC205은 위의 단계에서 시험이 실시되었다.

#### 다기능성 CFB의 생물열화적 효소 시험

시멘트 구조물에 CFB를 적용시켰을 때 여타의 건축 내부소재에 악영향 없이 건축물 기본 뼈대인 시멘트 내구성만을 높일 수 있는지에 대해 보존과학에서 널리 사용되는 시험법인 cellulase 및 protease activity 를 biodegradative plate assays를 통해 그 가능성을 확인하였다[14, 16, 29]. 일반적으로 산업 응용 목적으로 고분자물질 분해능을 가진 미생물을 분리하고자 할 경우 plate assay에서 정성적 활성이 확인된 균주에 대해 정량적 활성도를 평가하지만, 본 연구에서는 이와 반대로 건축내장재 구성물질 분해능이 없는 균주를 탐색하고자 하였으므로 plate assay만을 실시하여 활성이 없는 균주를 결정하고자 하였다. 건축환경에의 적용을 위해서는 정성적 시험에서 고분자물질 분해활성이 없는 것으로 나타나야 한다. 이러한 정성평가 방식은 해외 보존과학 연구분야에서 건축물에 정주하는 미생물이 건축물을 구성하는 다양한 고분자 물질에 대한 생물열화적 영향을 평가하는 시험법으로 사용되고 있다[29, 32]. 이러한 plate assay를 통해 건축환경을 구성하는 다양한 소재에 대해 CFB의 영향을 추측할 수 있다. 건축물에서 분리한 세균의 cellulase 활성시험을 위해 고온·가압멸균된 1/10 TSB 한천배지를 기본배지로 한 carboxyl-methyl cellulose

(CM-cellulose 2.50 g, tryptic soy broth 1.5 g, agar powder 5.0 g, distilled water 0.5 l) 고체배지를 사용하였다. 시험 대상 CFB들의 전배양을 위해 TSB (tryptic soy broth, Difco, USA) 한천배지 상에 희석도말하여 30℃에서 계대배양한 후, 집락을 취하여 5 ml TSB (tryptic soy broth, Difco, USA) 액체배지에 접종하고 30℃에서 180 rpm으로 16시간 동안 진탕배양을 실시하였다. 화염멸균된 백금이를 이용해 대상 균주들의 전배양액을 취한 후 CM-cellulose 배지 상에 천자하여 30℃에서 48시간 동안 배양하였다. 배양 후 Cellulase 활성을 확인하기 위해 0.22 µm filter (Millipore, Ireland)로 멸균된 0.2% congo-red solution (Sigma-Aldrich Co., USA) 및 0.5M NaCl을 사용하여 pour-plate assay를 실시하였다. 이를 위해 배양 후 Q-tip을 이용해 세균 집락을 배지 표면에서 완전히 제거하고, 0.2% congo-red solution 10 ml를 plate 상에 분주하여 밀봉 후 30분간 10 rpm으로 교반하였다. 배지에 흡수되고 남은 congo-red solution을 버리고 다시 0.5 M NaCl 용액 10 ml를 분주한 후 세척하였으며, 동일 과정을 3~4회 반복하였다 [31]. 콜로니 주변부 clear zone이 형성되는 것을 cellulase 활성을 가진 것으로, 형성되지 않는 것을 활성을 가지지 않은 것으로 각각 판정하였다. 그와 별개로 균주의 protease 활성시험을 위해 탈지유 고체배지(skim milk 5.0 g, bacto tryptone 10.0 g, yeast extract 5.0 g, NaCl 5.0 g, Bacto agar 15.0 g, distilled water 1 l)를 사용하였고, 위와 동일한 방법으로 전배양을 거친 균주들을 skim milk 배지에 접종 후 30℃에서 48시간 동안 배양하였다. 배지 주변으로 clear zone이 형성되는 경우 protease 활성을 가진 것으로, 형성되지 않는 경우 활성을 가지지 않은 것으로 각각 판정하였다[13].

## 결과 및 고찰

#### 건축물 분리 미생물의 배양 및 CaCO<sub>3</sub> solubilization

분리 보고된 건축물 정주 세균인 KNUC201, KNUC202, KNUC203, KNUC204, KNUC205등 5종 모두 clear zone이 형성되지 않아 시멘트 주요 성분인 CaCO<sub>3</sub>에 대한 가용화 능이 없는 것으로 나타났으나 동일 건축물에서 분리된 근사성 진균 중 중 주요 균주인 *C. sphaerospermum* KNUC253의 경우 콜로니 주변부에서 CaCO<sub>3</sub>를 용해하여 clear zone이 관찰되었다 (Table 1). 이들은 분리원인 도시 터널에서 가장 광범위하게 분포하는 진균으로 보고되었고, 미학적 문제를 유발한다고 알려졌다[17]. 동시에 터널에서 광범위하게 정주하는 효모인 *P. prolifica* KNUC263가 CaCO<sub>3</sub>를 용해하여 clear zone을 형성하였으며, *A. pullulans* KNUC264의 경우 형성하지 못하였다. 따라서 건축물의 각 미생물 별 건축물에 미치는 영향은 같은 효모 속이라고 하더라도 분류학적 위치에 따라 시멘트 조성에 대한 위해성이 다른 것으로 나타났으며, 그 위해성은 곰팡이, 효모, 세균별로 상이 하다. 실제로 이들 진균이 CaCO<sub>3</sub>를 가용

Table 1. CaCO<sub>3</sub> solubilization and Biodegradative plate assays of microorganisms or multifunctional CFB

Isolation sites	Microorganisms	Strain name	CaCO <sub>3</sub> solubilization <sup>1)</sup>	Cellulase activity <sup>2)</sup>	Protease activity <sup>3)</sup>
City Tunnel	Fungal isolates	<i>Tritirachium</i> sp. KNUC251	-		
		<i>Cladosporium cladosporioides</i> KNUC252	-		
		<i>Cladosporium sphaerospermum</i> KNUC253	+		
		<i>Cladosporium cladosporioides</i> KNUC254	-		
		<i>Cladosporium</i> sp. KNUC255	+		
		<i>Alternaria tenuissima</i> KNUC256	-	ND	ND
		<i>Alternaria tenuissima</i> KNUC257	-		
		<i>Cladosporium</i> sp. KNUC258	-		
		<i>Penicillium</i> sp.KNUC259	-		
		<i>Penicillium</i> sp.KNUC260	-		
	<i>Pestalotiopsis cocculi</i> KNUC261	-			
	<i>Elsinoaceae</i> sp. KNUC262	-			
	Yeast isolates	<i>Pseudozyma prolifica</i> KNUC263	+	ND	ND
		<i>Aureobasidium pullulans</i> KNUC264	-		
	Bacterial isolates	<i>Rhodococcus erythropolis</i> KNUC201	-		
<i>Rhodococcus erythropolis</i> KNUC202		-			
<i>Burkholderia glathei</i> KNUC203		-	ND	ND	
<i>Rhodococcus erythropolis</i> KNUC204		-			
<i>Bacillus aryabhatti</i> KNUC205		-	-	-	
Dokdo islands	Bacterial isolates	<i>Arthrobacter nicotianae</i> KNUC2100	-	-	-
		<i>Bacillus thuringiensis</i> KNUC2103	-	+	+
		<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> KNUC2106	-	-	+

<sup>1)</sup>Symbols: +, Positive (Solubilize CaCO<sub>3</sub>); -, Negative (Cannot Solubilize CaCO<sub>3</sub>).  
<sup>2)</sup>Symbols: +, Positive (show cellulase activity); -, Negative (no cellulase activity); ND, no data.  
<sup>3)</sup>Symbols: +, Positive (show protease activity); -, Negative (no protease activity); ND, no data.

화하는 것을 볼 때 세균보다는 곰팡이 및 효모와 같은 진균이 시멘트 모르타르 기반 콘크리트 건축물에서 증식하며 생물열화 유발 가능성이 높음을 알 수 있었다. 건축물의 미학적, 생물열화적 피해를 막기 위하여 이러한 위해성을 가진 균사형 진균 *C. sphaerospermum* KNUC253 및 효모 균주 *P. prolifica* KNUC263을 방제할 필요성이 있다.

특히 CFB의 항곰팡이 활성 및 시멘트 표면 곰팡이 생장 억제에 관한 연구는 지속되었으나 효모에 대한 항진균 활성 연구는 이루어 지지 않아 이에 대한 연구도 필요할 것으로 사료된다. 이와 별개로, 질소원이 부족한 배지인 nitrogen free broth, 빈영양/저삼투압성 배지인 R<sub>2</sub>A media에서 배양할 경우 혹은 고영양 효모 배지인 yeast malt broth 등에서 장기간 배양할 경우 위균사(pseudo-hyphae)를 형성하는 것으로 알려진 *P. prolifica* KNUC263의 경우 질소원이 결핍된 CaCO<sub>3</sub> solubilization test agar상에서도 균사형의 생장을 보였다(data not shown) [17]. 분열(dividing) 혹은 출아(budding)로서 증식하는 효모는 영양분이 부족한 열악한 환경에서 위균사를 형성하는 것으로 알려져 있으며 *P. prolifica* KNUC263가 위균사의 생활환을 보이는 것은 분리장소인 건축물의 열악한 환경과 연관되어 있을 것으로 생각된다. chalky test agar에서 산의

형성 만이 CaCO<sub>3</sub>를 가용화 시킴을 감안할 때, 효모 위균사 또한 곰팡이 균사와 동일한 메커니즘으로 시멘트 구조물표면 CaCO<sub>3</sub>를 가용화 하여 열화를 유발할 수 있다고 추측된다.

**항진균 활성 가진 CFB의 CaCO<sub>3</sub> solubilization**

건축물에서 분리된 다기능성 CFB인 *B. aryabhatti* KNUC 205가 CaCO<sub>3</sub> 가용화에 의한 clear zone이 형성되지 않아 시멘트 모르타르 기반 건축환경에 적용했을 때 산 형성으로 인한 시멘트 모르타르 성분에 대한 열화 가능성은 없을 것으로 판단된다(Table 1). 또한 자연계에서 분리되어 시멘트 표면 오염 진균의 생장억제효과를 가지면서 표면균열을 수복한다고 보고된 특허균주 *A. nicotianae* KNUC2100, *B. thuringiensis* KNUC2103, *S. maltophilia* KNUC210에 대하여 위와 동일한 조건으로 CaCO<sub>3</sub> solubilization assay를 실시한 결과 세 균주 모두 clear zone이 형성되지 않아 CaCO<sub>3</sub>가용화능이 없는 것으로 판단된다. 위의 실험 균주들을 시멘트 건축환경에 적용할 경우 산의 형성으로 인한 시멘트 모르타르에 대한 위해 가능성은 낮을 것으로 평가된다(Table 1). 또한 선행연구에서 방제대상 균주로 설정된 *C. sphaerospermum* KNUC253에 대해 시멘트 표면에서 증식억제 효과가 보고되었으므로, 실제 건축

환경에 적용 시 시멘트 조성에 대한 열화없이 성공적으로 방제대상 미생물을 억제할 것으로 예상된다. 그러나 건축소재의 퇴색(discoloration)을 유발한다고 널리 알려졌으며, 본 연구에서도 방제대상 균주로 밝혀진 *P. prolifica* KNUC263에 대한 CFB의 증식억제효과는 연구된 사례가 없어 후행 연구가 필요하다.

#### 항진균 활성가진 CFB의 생물열화적 효소 시험

시멘트 모르타르 기반 콘크리트 건축물에서 곰팡이 증식억제 및 균열보수 효과를 갖는 것으로 알려진 CFB 들 중 특히 *B. aryabhathi* KNUC205, *A. nicotianae* KNUC2100의 경우 두 균주 모두 bio-degradative assay 상 clear zone을 형성하지 않아 cellulase와 protease 활성을 가지지 않는 것으로 나타났다(Table 1). 시멘트 표면에서 균열을 복구하고 곰팡이 증식을 억제하는 이들 항진균 CFB가 CaCO<sub>3</sub>를 가용화 시키지 않으며, 건축소재를 구성하는 몇가지 고분자 물질에 대한 생물학적 열화시험에 활성을 가지지 않음을 보여 다양한 건축소재로 구성된 시멘트 콘크리트 건축물에 대한 활용 가능성을 보여주었다.

#### 감사의 글

이 논문은 2014년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임[No. NRF-2010-0015142].

#### References

- Achal, V., Mukherjee, A., Basu, P. C. and Reddy, M. S. 2009. Strain improvement of *Sporosarcina pasteurii* for enhanced urease and calcite production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 981-988.
- Ascaso, C., Wierchos, J. and Castello, R. 1998. Study of the biogenic weathering of calcereous litharenite stones caused by lichen and endolithic microorganisms. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **42**, 29-38.
- Boquet, E., Boronat, A. and Ramos-Cormenzana, A. 1973. Production of calcite (calcium carbonate) crystals by soil bacteria is a general phenomenon. *Nature* **246**, 527-529.
- Muynck, W. D., Belle, N. D. and Verstraete, W. 2010. Antimicrobial mortar surface for the improvement of hygienic conditions. *J. Appl. Microbiol.* **108**, 62-72.
- Muynck, W. D., Belie, N. D. and Verstraete, W. 2010. Microbial carbonate precipitation in construction materials: a review. *Ecol. Eng.* **36**, 118-136.
- Diakumaku, E., Gorbushin, A. A., Krumbein, W. E., Panina, L. and Soukharjevski, S. 1995. Black fungi in marble and limestones-an aesthetical, chemical and physical problem for the conservation of monuments. *Sci. Total Environ.* **167**, 295-304.
- Do, J. G., Song, H., So, H. S. and Soh, Y. S. 2005. Antifungal effects of cement mortar with two types of organic antifungal agents. *Cem. Concr. Res.* **35**, 371-376.
- Ghosh, P., Mandal, S., Chattopadhyay, B. D. and Pal, S. 2005. Use of microorganism to improve the strength of cement mortar. *Cem. Concr. Res.* **35**, 1980-1983.
- Ghosh, S., Biswas, M., Chattopadhyay, B. D. and Mandal, S. 2009. Microbial activity on the microstructure of bacteria modified mortar. *Cem. Concr. Comp.* **31**, 93-98.
- Gu, J. D., Ford, T. E., Berke, N. S. and Mitchell, R. 1998. Biodeterioration of concrete by the fungus *Fusarium*. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **41**, 101-109.
- Hammes, F., Boon, N., Villiers, J. D., Verstraete, W. and Siciliano, S. D. 2003. Strain-specific ureolytic microbial calcium carbonate precipitation. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 4901-4909.
- Jonkers, H. M., Thijssen, A., Muyzer, G., Copuroglu, O. and Schlangena, E. 2010. Application of bacteria as self-healing agent for the development of sustainable concrete. *Ecol. Eng.* **36**, 230-235.
- Min, S. G., Kim, J. H., Kim, T. W. and Kim, K. N. 2003. Isolation and identification of protease producing bacteria in kimchi. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **35**, 666-670.
- Nica, D., Davis, J. L., Kirby, L., Zuo, G. and Roberts, D. J. 2000. Isolation and characterization of microorganisms involved in the biodeterioration of concrete in sewers. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **46**, 61-68.
- Nolan, E., Basheer, P. A. M. and Long, A. E. 1995. Effects of three durability enhancing products on some physical properties of near surface concrete. *Constr. Build. Mater.* **9**, 267-272.
- Pangallo, D., Chovanová, K., Simonovicová, A. and Ferianc, P. 2009. Investigation of microbial community isolated from indoor artworks and air environment: identification, biodegradative abilities, and DNA typing. *Can. J. Microbiol.* **55**, 277-287.
- Park, J. M., Park, S. J. and Ghim, S. Y. 2011. Isolation of fungal deteriogens inducing aesthetical problems and anti-fungal calcite forming bacteria from the tunnel and their characteristics. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 287-293.
- Park, S. J., Lee, N. Y., Kim, W. J. and Ghim, S. Y. 2010. Application of bacteria isolated from Dokdo for improving compressive strength and crack remediation of cement-sand mortar. *J. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 782-788.
- Park, S. J., Park, Y. M., Chun, W. Y., Kim, W. J. and Ghim, S. Y. 2010. Calcite-forming bacteria for compressive strength improvement in mortar. *J. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 782-788.
- Park, S. J., Park, J. M., Kim, W. J. and Ghim, S. Y. 2012. Application of *Bacillus subtilis* 168 as a multifunctional agent for improvement of the durability of cement mortar. *J. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 1568-1574.
- Park, J. M., Park, S. J., Kim, W. J. and Ghim, S. Y. 2012. Application of antifungal CFB to increase the durability of cement mortar. *J. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 1015-1020.
- Park, J. M., Park, S. J. and Ghim, S. Y. 2012. *Arthrobacter nicotianae* KNUC2100 and a cement additive for durability

- improvement and crack repairing of cement paste or concrete containing the same. Korea patent 10-2012-0027945.
23. Park, J. M., Park, S. J. and Ghim, S. Y. 2012. *Bacillus aryabhatai* KNUC205 and a cement additive for durability improvement and crack repairing of cement paste or concrete containing the same. Korea patent 10-2012-0019787.
  24. Park, J. M., Park, S. J. and Ghim, S. Y. 2012. *Bacillus thuringiensis* KNUC2103 and a cement additive for durability improvement and crack repairing of cement paste or concrete containing the same. Korea patent 10-2012-0027951.
  25. Park, J. M., Park, S. J. and Ghim, S. Y. 2012. *Stenotrophomonas maltophilia* KNUC2106 and a cement additive for durability improvement and crack repairing of cement paste or concrete containing the same. Korea patent 10-2012-0027940.
  26. Park, S. K., Kim, J. H. J., Nam, J. W., Phan, H. D. and Kim, J. K. 2009. Development of anti-fungal mortar and concrete using Zeolite and Zeocarbon microcapsules. *Cem. Concr. Compo.* **31**, 447-453.
  27. Ramacjandran, S. K., Ramakrishnan, V. and Bang, S. S. 2001. Remediation of concrete using microorganism. *ACI Mater.* **98**, 3-9.
  28. Schultze-Lam, S., Fortin, D., Davis, B. S. and Beveridge, T. J. 1996. Mineralization of bacterial surfaces. *Chem. Geol.* **132**, 171-181.
  29. Sofia, B., Lavin, P., Perdomo, I., Saravia, S. G. D. and Guiamet, P. 2012. Determination of indoor air quality in archives and biodeterioration of the documentary heritage. *ISRN Microbiol.* **10**, 1-10
  30. Stocks-Fischer, S., Galinat, J. K. and Bang, S. S. 1999. Microbiological precipitation of CaCO<sub>3</sub>. *Soil Biol. Biochem.* **31**, 1563-1571.
  31. Teather, R. M. and Wood, P. J. 1982. Use of Congo red polysaccharide interactions complex formation between Congo red and polysaccharide in detection and assay of polysaccharide hydrolases. *Meth. Enzymol.* **160**, 59-74.
  32. Warscheid, Th. and Braams, J. 2010. Biodeterioration of stone: a review. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **46**, 343-368.
  33. Tiano, P., Biagiotti, L. and Mastromei, G. 1999. Bacterial bio-mediated calcite precipitation for monumental stones conservation: methods of evaluation. *J. Microbiol. Methods* **36**, 139-145.
  34. Tittelboom, K. V., Belie, N. D., Muynck, W. D. and Verstraete, W. 2010. Use of bacteria to repair cracks in concrete. *Cem. Concr. Res.* **40**, 157-166.

## 초록 : 다기능 탄산칼슘 형성세균의 시멘트 건축물 적용위한 부식능 평가 및 건축물 정주미생물 중 방제 대상 결정

박종명 · 박성진 · 김사열\*

(경북대학교 생명과학부 · 경북대학교 미생물연구소 · 경북대학교 울릉도 독도연구소)

탄산칼슘 형성세균에 의한 건축물 균열보수 및 그들의 내구성 증진은 기존 화학제에 비해 친환경적이며, 영구적이라는 측면에서 그들의 응용에 대한 연구는 중요한 위치를 차지하고 있다. 그러나 균열복구 기전이 세균의 대사예 의한 calcite crystal 형성과정에서 기인되는 것으로, 대사과정 중 산 형성으로 시멘트 기반 콘크리트 건축물에 대한 위해 가능성 논란이 지속 제기되었다. 따라서 본 연구는 시멘트 모르타르에 대한 생물학적 부식능이 있는 방제대상 미생물을 결정하고 시멘트 콘크리트 건축물에서의 안전한 적용을 위한 다기능성 탄산칼슘 형성세균을 평가하기 위해 수행되었다. 이를 위해 첫째, 건축물에서 분리된 균사형 진균, 효모, 세균 균주들을 대상으로 chalky test를 실시하여 CaCO<sub>3</sub>에 대한 가용화능을 평가하였다. 그 결과 건축물에서 분리된 세균 균주의 경우 가용화 능이 없는 것으로 평가되었으며, *C. sphaerospermum* KNUC253 및 *P. prolifica* KNUC263 균주가 CaCO<sub>3</sub>에 대한 가용화 활성을 보여, 시멘트 기반 건축물 표면에서 방제되어야 균주로 판단된다. 둘째, 독도 토양 및 건축물에서 분리되어 시멘트 표면 진균생장 억제효과, 시멘트 표면균열을 수복 및 수분 침투력 감소효과가 보고된 특허등록 균주 *A. nictianae* KNUC2100, *B. thuringiensis* KNUC2103, *S. maltophilia* KNUC2100 및 *B. aryabhatai* KNUC205들이 CaCO<sub>3</sub>을 가용화하지 않음을 볼 때 산 형성으로 인한 시멘트 모르타르 주성분인 CaCO<sub>3</sub>에 대한 위해는 없을 것으로 평가된다. 이에 더하여 그들 중 *B. aryabhatai* KNUC205, *A. nictianae* KNUC2100의 경우 건축소재 열화가 능력의 판단근거로 널리 활용되고 있는 bio-degradative assay 에서 다양한 고분자물질 구성요소에 대해 활성을 나타내지 않아 다양한 건축환경에 대해 활용 가능성을 보여주었다.