

## 멕시코 B 광산 슬러지에 존재하는 생물학적 광물화 미생물의 특성에 관한 연구

김준하 · 윤성열 · 박윤수 · 이재영\*

서울시립대학교 환경공학과

## Isolation and Identification of Bacteria Involved with Biomineralization at B Mine Sludge in Mexico

Joon-Ha Kim · Seong-Yeol Yun · Yoon Soo Park · Jai-Young Lee\*

Department of Environmental Engineering, The University of Seoul

### ABSTRACT

Microbial processes that bind heavy metals and form minerals are widespread, and they represent a basic aspect of biogeochemistry. Some microorganisms can crystallize minerals by secreting a specific enzyme. In particular, calcite (CaCO<sub>3</sub>) precipitation is an important part of biomineralization, and has been studied extensively because of its wide application in civil engineering technology. This process provides an effective way to stabilize heavy metals within a relatively stable crystal phase. In this study, biomineralization of calcite by three urea-hydrolyzing indigenous bacterial strains was investigated by microbiological analyses. Three bacterial strains were isolated from the sludge of B mine in Mexico and each bacterial strain was identified by the cellular fatty acid composition and 16S rRNA partial sequencing analysis. The results of the identification analysis showed that these strains were closest to *Sporosarcina pasteurii*, *Kurthia gibsonii*, and *Paenibacillus polymyxa*. We found that the optimum conditions for growth of these indigenous bacteria were 30–40°C and pH range of 7–8. Microbiological analyses showed the possibility that the bioaccumulated heavy metals ions were deposited around the cell as crystalline carbonate minerals under the optimum conditions. The findings of our study suggest that the indigenous bacterial strains play an important role in heavy metal immobilization.

**Key words :** Heavy metals, Calcite, Biomineralization, Indigenous bacterial strains, Heavy metal immobilization

### 1. 서 론

우리나라의 광업은 해방 이전까지 주로 일반광(금속 및 비금속광산)을 개발하였으며, 1950년대 국내 광물생산량이 수출품목의 약 70%를 차지할 만큼 큰 호황을 누렸다(Kim et al., 2011; Lee et al., 2013). 특히, 1960년대 이후부터 1980년대 중후반까지 석탄광 개발에 주력하였으나, 1980년 후반부터 급속한 경제발전으로 국민소득이 크게 증가됨에 따라 사회구조의 변화와 주거환경의 개선에 따른 석유, 가스 등의 청정연료를 선호하는 연료 소비 패턴의 변화를 가져오게 되었다. 이에 따라 환경오염에 관한 관심과 규제증진, 원석광물의 채굴깊이가 늘어남에 따

른 생산인건비의 상승, 부가가치의 감소, 저렴한 원가의 원료(광물) 수입 등으로 우리나라의 광업활동은 빠르게 위축되기 시작하였다(Kim et al., 2011; MOE, 2007).

광산개발업체들의 경영악화에 의한 광산의 휴·폐광은 폐광도, 광산폐기물(광미·폐광석), 채광 및 선광·제련 시설물 등의 기타 광산 활동 관련 시설물들의 방치를 야기했다(Chung et al., 2005). 특히, 광미 및 폐광석 등은 정화조치가 미흡한 상태로 방치되어 중금속을 함유한 갭내수 및 산성광산배수 방류, 유해성 침출수의 유출 등 다양한 광해를 유발시키고 있다(Chung et al., 2005; MOE, 2008). 특히, 중금속을 함유한 산성광산배수의 직접적인 유출과 폐광 이후 방치되어 있던 각종 화학약품

\*Corresponding author : leejy@uos.ac.kr

Received : 2017. 3. 20 Reviewed : 2017. 3. 30 Accepted : 2017. 4. 4

Discussion until : 2017. 6. 30

등으로 인접 수로 및 농경지 등의 토양, 지하수를 오염시키고 있으며, 광물찌꺼기의 비산으로 광산 주변지역 주민의 생활환경을 오염시키는 물론 주변에 집적되어 오염권을 확산시키고 있다(MOE, 2008). 최근 이러한 중금속 용출 저감을 위한 다양한 광해방지공법을 적용 중에 있으며, 특히, 국내뿐만 아니라 국외에서도 고형화/안정화 공법이 활발히 연구되고 있다(Jakubick et al., 2003; Singh and Pant 2006). 그러나, 대부분의 연구가 실험실 규모 또는 R&D 과제에 의한 오염토양의 고형화/안정화 현장 적용성을 검토한 결과이다.

생물학적 광물화(biomineralization) 현상은 미생물의 urease 반응에 의해 자연환경에서 생체 광물 생성작용의 결과로, 미생물 체내·외에  $\text{CaCO}_3$ 가 석출되는 반응을 의미한다. 최근 이러한 미생물의 생물학적 광물화에 관한 연구는 국내·외 연구자들에 의해서 진행되고 있다. 국내에서는 Kim et al.(2010)이 연약지반에 미생물을 투입 후 강도증진에 관한 연구를 하였으며, 국외에서는 Mitchell and Santamarina(2005)와 Dejong et al.(2010)이 미생물 크기와 대상 시료의 입경크기에 따라 현장 적용성을 검토하여 연약지반 강도증진에 대한 연구를 실시하였다. Lee 등(2015)은 환경부 GAIA project를 통해 토착미생물과 산업폐기물을 이용한 중금속 오염부지의 hybrid형 불용화제를 개발 중에 있으며, “중금속 오염토양 및 광미의 고결화를 위한 생물학적 미생물 및 이를 이용한 토양의 고결화 방법”과 “토양의 고결화를 위한 생물학적 광물화 미생물 및 이를 이용한 토양의 고결화 방법”이라는 미생물 불용화 관련 특허를 국내에 출원하였다(출원번호 제 10-2016-0061407호, 제 10-2016-0060753호, MOE, 2015).

본 연구는 멕시코에 소재한 B광산 슬러지에서 분리·동정한 생물학적 광물화 미생물의 토양 내 중금속 불용화 가능성을 도출하는데 목적이 있다.

## 2. 연구방법

### 2.1. 실험재료

본 연구대상인 B 광산은 멕시코 바하 캘리포니아 산타 로살리아(Santa Rosalia)에서 약 5 km 북쪽에 위치하고 있다. 갱내와 노천에서 채굴된 원광석은 마광하여 습식제련 플랜트에서 침출과 용매추출 공정 후 최종적으로 전기동을 생산한다. 본 광산의 가행년수는 2016년 기준 약 19년이며, 연간 전기동 생산규모는 약 5,100 ton이다. 침출 및 탈철 공정 후 CCD(Counter Current Decantation)에서 발생하는 슬러지는 중화과정 등을 거친 후 고액비 24%로 해수와 섞어 파이프라인(기울기 상향 3.4°)을 통해 약 4.5 km 거리의 광미적치장(TSF, Tailings Storage Facility)에 이송·적치한다(Fig. 1 (a)). B 광산은 구리(Cu), 코발트(Co), 아연(Zn) 및 망간(Mn) 등의 복합광의 형태이며, 총 매장량은 약 638,000,000 ton으로 추산된다.

본 연구에 사용한 슬러지시료는 멕시코 B 광산의 광미담 일원에서 채취하였다(Fig. 1 (b)). 생물학적 광물화(Biomineralization)가 가능한 토착미생물을 분리하기 위해 B광산 주변 세 지점에서 표면을 약 1~10 cm 정도 걷어낸 후 100~150 cm<sup>3</sup> core를 이용하여 각각 슬러지시료 1 개씩 채취하여 TNT, TSF, 및 Coquina로 명명하였다. TNT시료는 중화조(TNT, Tailing Neutralization Tank)에서 해수와 함께 배출되는 슬러지를 채취하였으며, TSF(Tailing Storage Facility)시료는 광미적치장에서 채취하였다. Coquina 시료는 중화조에서 슬러지 중화제로서 사용되고 있는 유기적 퇴적물이 고화된 석회암의 일종으로, 본 연구에서는 광산 근처에서 파쇄된 상태를 채취하였다.

채취한 시료는 밀봉 후 실험실로 옮겨 물리학적 특성을 조사하고, 미생물배양을 위한 시료를 제외한 나머지는 풍건하여 분석용 시료로 사용하였다. 각각의 슬러지시료는 그늘에서 풍건 후 분쇄하여 2 mm 표준체를 통과한 시료를 일반성분 분석용으로 사용하고, 0.15 mm(100 mesh) 체



(a) View of B mine tailing storage facility



(b) B mine sludge

Fig. 1. Sludge sampling area.

를 통과한 시료를 중금속 분석용으로 사용하였다.

**2.2. 토착미생물의 분리 · 동정**

토착미생물을 분리하기 위해 (Table 1)과 같이 Urea-CaCl<sub>2</sub> 액체배지를 만들어 슬러지시료 1 g을 각각 주입하여 30°C, 120 rpm 조건으로 48시간 배양하였다. 배양된 현탁액은 새로운 액체배지에 1 ml 씩 접종하는 방식으로 수회 계대배양을 실시하였다. 3개의 배양시료는 각각 Urea-CaCl<sub>2</sub> 고체배지로 옮겨 배양하고, 생성되는 colony 중 배양능이 가장 우수한 균주를 1종씩(TNT, TSF, Coquina) 분리하였다.

분리한 3종의 토착미생물의 균주명을 알기위해 지방산 분석(Cellular fatty acid composition) 및 PCR(Polymerase chain reaction)을 실시하였다.

지방산 분석 시 분석된 profile은 Sherlock MIS Software ver. 6.2를 사용하였다. Standard calibration 용액과의 비교에 의해 peak의 동정, retention time, peak의 면적, 면적 비율을 구하였다.

지방산 분석으로 동정이 어려운 경우, PCR을 사용하여 분석을 실시하였다(Thompson et al., 1994). 본 연구에서 대상균주의 chromosomal DNA를 Wizard genomic DNA purification kit(Promega, USA)를 이용하여 분리 후, 16S rRNA sequencing에 사용하는 universal primer 인 27F(5'-AGAGTTTGA TCATGGCTCAG-3')와 1492R (5'-GGATACCTTGTTACGACTT-3') primer를 사용하여 MyCycler Thermal Cycler system(Bio-Rad)을 이용해 PCR 증폭을 실시하였다. 증폭된 PCR 산물은 Wizard SV Gel and PCR clean-up system(Promega, USA)을 이용하여 정제하였다. 정제된 PCR 산물은 ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing kits(Applied Biosystems Co.)를 사용하여 ABI PRISM 3730XL Analyzer(96 capillary type) 를 통해 염기서열을 분석하였다. 분석 결과는 BLASTN 프로그램을 통해 GeneBank 의 ribosomal DNA sequence와 대조하였으며, sequence

**Table 1.** Composition of Urea-CaCl<sub>2</sub> agar plate (Stocks-Fischer et al., 1999)

Components	Amount (g/L)
Nutrient broth	3.0
NH <sub>4</sub> Cl	10.0
NaHCO <sub>3</sub>	2.12
Urea (CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> )	20.0
CaCl <sub>2</sub>	3.7
Agar	15.0

의 상동성은 Clustal X와 Mega 2 program을 이용하여 비교 · 분석하였다.

**2.3. 슬러지시료의 물리 · 화학적 특성 실험**

채취한 3개의 슬러지시료의 함수비, pH, 염도, 전기전도도 등 물리학적 특성시험과 중금속분석을 통한 화학적 특성시험을 실시하였다.

함수비는 KS F 2306에 의거하여 시험을 실시하였으며 (Phae and Oh 2002; Lee et al., 2007), 중금속분석을 통한 화학적 특성시험은 미국 EPA의 TCLP/SPLP 용출방법에 의거하여 실시하였다(USEPA Method 1311, 1988; USEPA Method 1312, 1994).

**2.4. 토착미생물의 물리 · 화학적 특성 시험**

동정된 균주들은 생장곡선, 생물학적 광물화 시험 등의 물리학적 특성 시험과 CaCl<sub>2</sub> 반응시험, urease 시험, 성장 시험(pH, 염도, 온도) 등의 화학적 특성시험을 실시하였다.

생장곡선(growth curve)은 분리한 균주 1 ml를 Urea-CaCl<sub>2</sub> 액체배지 100 ml에 접종하여 균일하게 섞은 후, 30°C, 120 rpm 조건으로 48시간 배양하면서 일정시간마다 배양액 1 m 씩 취해 접종하지 않은 Urea-CaCl<sub>2</sub> 배지로 영점보정 후 UV-spectrophotometer로 OD<sub>600</sub> 값을 측정하였다. 생물학적 광물화 시험은 Urea-CaCl<sub>2</sub> 고체배지에 균주를 배양하여 약 48시간 후 colony 주변의 생성물질을 광학현미경으로 광물의 크기 및 모양을 확인하였다. CaCl<sub>2</sub> 반응시험은 1 M CaCl<sub>2</sub> 용액 100 ml에 배양액 1 ml를 접종하여 흰색침전의 CaCO<sub>3</sub> 생성유무를 확인하였으며, urease의 생성을 알아보기 위해 CLO test kit(Kimberly-Clark)를 사용하였다. 분리된 균주들의 배양을 위한 최적 pH, 염도 및 온도를 알아보기 위해 pH의 경우 액체배지의 초기 pH를 각각 4, 5, 6, 7, 8, 및 9로 제조하였으며, 염도는 초기농도를 0, 1, 3 및 5%로 맞추었으며, 온도는 20, 30 및 40°C로 하였다. 제작된 액체배지는 각각 균주 1 ml 씩 접종 후 48시간 배양하면서 일정시간마다 배양액 1 m 씩 취해 UV-spectrophotometer를 사용하여 OD<sub>600</sub> 값을 측정하여 생장곡선의 변화를 분석하였다.

**3. 결과 및 고찰**

**3.1. 토착미생물의 분리 · 동정**

채취한 3개의 토착미생물 TNT, TSF 및 Coquina의 균주명을 알아보기 위해 지방산 및 PCR 분석을 통하여 동정하였다. 그 중, TNT에서 분리한 균주의 경우 지방산

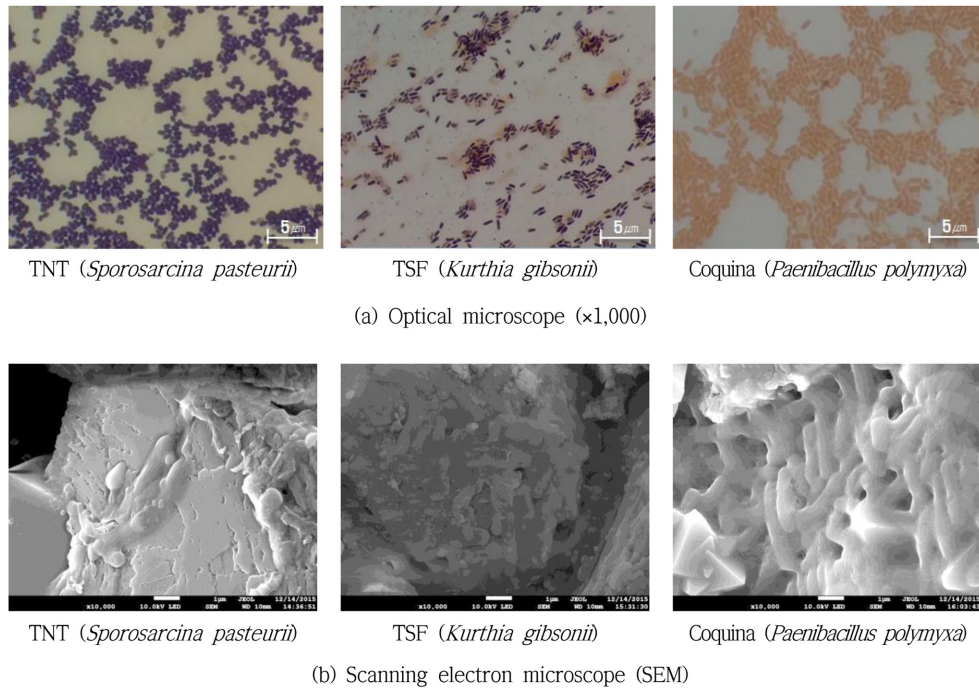


Fig. 2. Morphological analysis of cultured indigenous bacteria.

분석 내 Library로 대조가 어려워 PCR 분석을 진행하였다. 분석 결과 TNT, TSF 및 Coquina는 각각 *Sporosarcina pasteurii*, *Kurthia gibsonii*, *Paenibacillus polymyxa*와 유사도가 높은 것으로 분석되었다. 각 균주의 광학현미경 및 SEM 상에서의 형태 및 크기를 (Fig. 2)에 나타내었으며, TNT, TSF 및 Coquina 미생물의 결과는 (Fig. 3)에 나타내었다.

TNT에서 분리된 *Sporosarcina pasteurii*의 경우 생물학적 광물화 연구에 현재까지도 가장 많이 활용되는 균주로 1970년대부터 현재까지 꾸준히 연구되는 대표적인 MICP [Microbiologically Induced Calcite( $\text{CaCO}_3$ ) Precipitation] 미생물로 알려져 있다(Boquet et al., 1973; Ciurli et al., 1996; Achal et al., 2009; Sarda et al., 2009; Park and Kim, 2012; Park, 2014). 최근 국내에서는 *Sporosarcina pasteurii*의 생물학적 광물화에 미치는 영향 인자 및 특성을 알아보기 위한 연구를 진행하였으며(Seok and Kim, 2013), 미생물 혼합 모르타르에 적용한 사례도 보고되고 있다(Kim et al., 2012). 국외에서는 *Sporosarcina pasteurii*가 시멘트 기반 물질의 수화작용 및 압축강도에 미치는 영향을 보고하였으며(Zeynep et al., 2015), Mortensen et al.(2011)은 MICP 효율을 알아보기로 *Sporosarcina pasteurii*에 대한 토성종류, 염화암모늄농도 및 염도 등 여러 가지 환경적 요인을 연구하였다. *Sporosarcina*

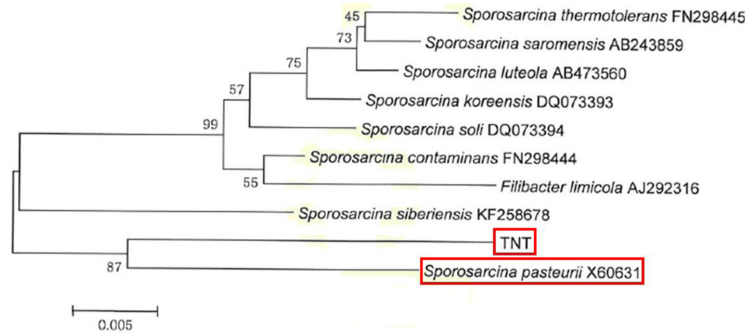
*pasteurii*는 생물학적 광물화 미생물 중 자연계에 널리 분포하고 있으며, 상용화되어있어 건축·토목 관련 연구에 활용되고 있다.

TSF에서 분리된 *Kurthia gibsonii*는 아직까지 MICP 미생물로 발표 또는 보고된 사례는 없다고 판단된다. *Paenibacillus polymyxa*는 2000년으로 접어들면서 시멘트 및 콘크리트의 강화를 위한 첨가제로 사용되는 미생물로 최근까지 건축 및 토목에서 소량 사용되고 있는 미생물로 보고되어 있다(Kawatra and Natarajan, 2001; Li et al., 2012; Park et al., 2014).

### 3.2. 슬러지시료의 물리학적 특성 시험

채취한 3개의 슬러지시료를 통하여 함수비, pH, 염도, 전기전도도 등의 물리학적 특성시험을 실시하였다. 각각의 시험값은 시료 당 3회 측정하여 평균을 산출하였다.

함수비, pH, 염도 및 전기전도도의 결과는 (Table 2)와 같다. 본 연구에 사용된 3개의 슬러지시료의 함수비의 범위는 2.36~18.61%로 나타났으며, pH는 6.09~8.75로 TNT시료는 약산성, TNT와 Coquina시료는 약 알칼리성에 가까운 값을 보였다. 염도의 경우 1.39~3.82%의 범위에 있었으며, 전기전도도의 평균값의 범위는 0.99~14.74  $\mu\text{S}/\text{cm}$ 로 분석되었다. 특히, TNT 시료의 경우, 해수와 함께 배출되는 상태를 채취하여 다른 시료보다 다소 높은 염도



(a) TNT (*Sporosarcina pasteurii*)

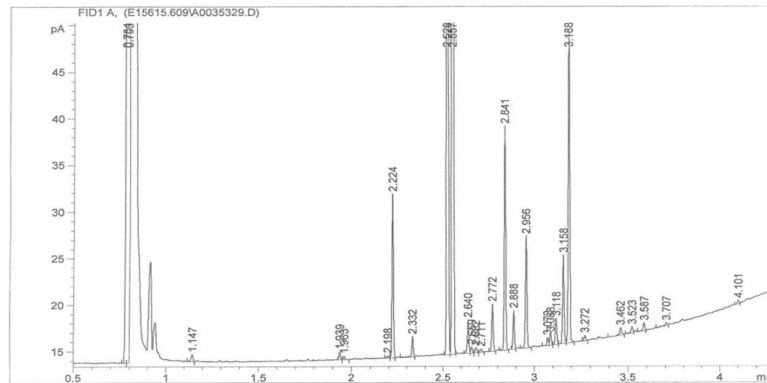
Volume: DATA File: E156156.09A Samp Ctr: 3 ID Number: 5329  
 Type: Samp Bottle: 2 Method: RTSBA6  
 Created: 6/15/2015 2:53:15 PM  
 Sample ID: **TSF**

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
0.7838	903719	0.005	----	6.5149			< min rt	
0.7931	5.724E+8	0.010	----	6.5736	SOLVENT PEAK		< min rt	
1.1469	1267	0.014	----	8.8134			< min rt	
1.9388	946	0.008	1.020	12.6241	13:0 iso	0.20	ECL deviates 0.001	Reference 0.016
1.9629	430	0.008	1.016	12.7139	13:0 anteiso	0.69	ECL deviates 0.000	Reference 0.014
2.1976	353	0.008	----	13.5381				
2.2236	18913	0.008	0.988	13.6270	14:0 iso	3.85	ECL deviates -0.001	Reference 0.009
2.3322	2637	0.009	0.979	13.9974	14:0	0.53	ECL deviates -0.003	Reference 0.006
2.5278	165942	0.009	0.965	14.6333	15:0 iso	33.03	ECL deviates 0.001	Reference 0.007
2.5567	204349	0.009	0.964	14.7272	15:0 anteiso	40.60	ECL deviates 0.002	Reference 0.008
2.6404	4277	0.009	----	14.9993	15:0		ECL deviates -0.001	
2.6590	782	0.008	----	15.0380				
2.6816	788	0.011	----	15.1297				
2.7108	522	0.009	----	15.2222				
2.7722	5825	0.009	0.952	15.4164	16:1 w/c alcohol	1.14	ECL deviates 0.002	
2.8406	27179	0.009	0.949	15.6331	16:0 iso	5.32	ECL deviates 0.000	Reference 0.002
2.8880	4760	0.009	0.947	15.7832	16:1 w/lc	0.93	ECL deviates 0.001	
2.9558	13879	0.009	0.945	15.9978	16:0	2.70	ECL deviates -0.002	Reference -0.001
3.0724	1060	0.010	----	16.3673				
3.0881	1382	0.009	0.940	16.4170	17:1 iso w/lc	0.27	ECL deviates 0.003	
3.1185	3326	0.009	0.939	16.5133	Sum In Feature 4	0.64	ECL deviates 0.001	17:1 anteiso B/iso I
3.1575	11316	0.009	0.938	16.6371	17:0 iso	2.19	ECL deviates 0.000	Reference -0.001
3.1881	39336	0.009	0.938	16.7338	17:0 anteiso	7.60	ECL deviates 0.001	Reference 0.000
3.2724	719	0.009	0.935	17.0009	17:0	0.14	ECL deviates 0.001	Reference -0.001
3.4617	1241	0.011	0.932	17.6027	18:3 w/c (6,9,12)	0.24	ECL deviates 0.003	
3.5225	1021	0.011	0.930	17.7960	18:1 w/c	0.20	ECL deviates 0.002	
3.5865	1127	0.011	0.929	17.9994	18:0	0.22	ECL deviates -0.001	Reference -0.005
3.7072	578	0.013	0.928	18.5928	18:0 10-methyl, TBSA	0.11	ECL deviates -0.002	
4.1013	436	0.007	----	19.6968				
----	3326	----	----	----	Summed Feature 4	0.64	17:1 iso / anteiso B	17:1 anteiso B/iso I

ECL Deviation: 0.002 Reference ECL Shift: 0.008 Number Reference Peaks: 12  
 Total Response: 508846 Total Named: 504906  
 Percent Named: 99.23% Total Amount: 485084

Matches:

Library	Sim Index	Entry Name
RTSBA6 6.21	0.629	<b>Kurthia gibsonii</b>
	0.501	Bacillus-megaterium-GC subgroup A



(b) TSF (*Kurthia gibsonii*)

Fig. 3. Identification of indigenous bacteria.

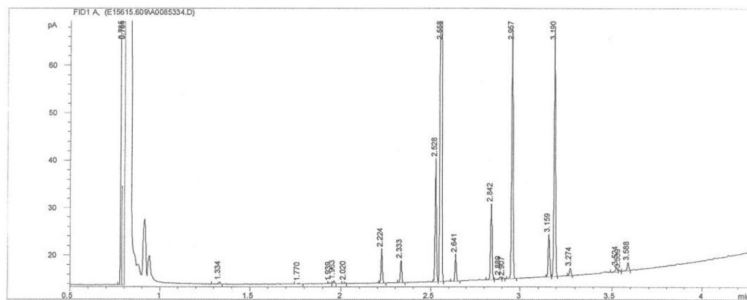
Volume: DATA File: E156156.09A Samp Ctr: 8 ID Number: 5334  
 Type: Samp Bottle: 7 Method: RTSBA6  
 Created: 6/15/2015 3:34:34 PM  
 Sample ID: **Coquina**

RT	Response	Arr/HI	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
0.7850	307240	0.005	----	6.5309		----	< min rt	
0.7942	5.175E+8	0.010	----	6.5892	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1.3341	875	0.012	1.149	9.9997	10:0	0.27	ECL deviates 0.000	Reference 0.017
1.7701	354	0.009	1.044	11.9985	12:0	0.10	ECL deviates -0.002	Reference 0.013
1.9388	323	0.008	1.020	12.6252	13:0 iso	0.09	ECL deviates 0.002	Reference 0.015
1.9631	720	0.009	1.016	12.7136	13:0 anteiso	0.20	ECL deviates 0.002	Reference 0.015
2.0202	396	0.009	---	12.9279		---		
2.2242	7969	0.009	0.988	13.6277	14:0 iso	2.12	ECL deviates 0.000	Reference 0.011
2.3331	5276	0.009	0.979	13.9979	14:0	1.39	ECL deviates -0.002	Reference 0.008
2.5281	28625	0.009	0.965	14.6311	15:0 iso	7.45	ECL deviates -0.001	Reference 0.008
2.5578	188873	0.009	0.964	14.7272	15:0 anteiso	49.04	ECL deviates 0.002	Reference 0.011
2.6414	6344	0.009	---	14.9987	15:0	---	ECL deviates -0.001	
2.8418	18189	0.009	0.949	15.6325	16:0 iso	4.65	ECL deviates -0.001	Reference 0.006
2.8891	794	0.011	0.947	15.7820	16:1 w/1c	0.20	ECL deviates 0.000	
2.9068	448	0.010	0.947	15.8382	Sum In Feature 3	0.11	ECL deviates -0.002	15:1 w7c/16:1 w6c
2.9573	59873	0.009	0.945	15.9978	16:0	15.24	ECL deviates -0.002	Reference 0.003
3.1588	10244	0.009	0.938	16.6364	17:0 iso	2.59	ECL deviates -0.001	Reference 0.003
3.1897	59694	0.009	0.938	16.7343	17:0 anteiso	15.08	ECL deviates 0.001	Reference 0.005
3.2740	1840	0.009	0.935	17.0014	17:0	0.46	ECL deviates 0.001	Reference 0.004
3.5243	1275	0.010	0.930	17.7977	18:1 w9c	0.32	ECL deviates 0.004	
3.5393	342	0.008	0.930	17.8454	Sum In Feature 8	0.09	ECL deviates -0.002	18:1 w7c
3.5878	2387	0.011	0.929	17.9997	18:0	0.60	ECL deviates 0.000	Reference -0.001
---	448	---	---	---	Summed Feature 3	0.11	16:1 w7c/16:1 w6c	15:1 w6c/16:1 w7c
---	342	---	---	---	Summed Feature 8	0.09	18:1 w7c	18:1 w6c

ECL Deviation: 0.002 Reference ECL Shift: 0.010 Number Reference Peaks: 14  
 Total Response: 388497 Total Named: 388101  
 Percent Named: 99.90% Total Amount: 371168

Matches:

Library	Sim Index	Entrv Name
RTSBA6 6.21	0.377	<b>Paenibacillus-polymyxa (Bacillus)</b>
	0.353	Cellulosimicrobium-cellulans-GC subgroup B (Cellulomonas-cartae)
	0.351	Cellulomonas-fimi-GC subgroup A
	0.327	Nesterenkonia-halobia (Micrococcus halobius)
	0.299	Paenibacillus-thiaminolyticus (Bacillus)
	0.256	Cellulomonas-gelida (some 48h)
	0.251	Paenibacillus-lautus
	0.237	Virgibacillus-pantothenicus (Bacillus)



(c) Coquina (*Paenibacillus polymyxa*)

Fig. 3. continued

Table 2. Physical test results of sludge samples

Sample	Moisture content (%)	pH	Salinity (%)	EC (μS/cm)
TNT	18.61	7.53	3.82	14.74
TSF	2.36	6.09	2.74	9.90
Coquina	2.78	8.75	1.39	0.99

와 전기전도도를 나타내었다.

3.3. 토착미생물의 물리학적 특성 시험

동정한 3종의 토착미생물을 통하여 생장곡선, 생물학적 광물화 시험 등의 물리학적 특성시험을 실시하였다. 생장

곡선 시험값은 시료당 3회를 측정하여 평균을 산출하였다. 생장곡선의 결과는 (Fig. 4)와 같다.

본 연구에 사용된 3종의 토착미생물은 배양기에서 30°C, 120 rpm 조건에서 약 5시간까지 유도기(lag phase)를 유지하면서 액체배지 내 환경에 적응하는 것으로 판단

되며, 7시간 이후부터 30시간까지 대수기(exponential phase)로서 급격히 OD<sub>600</sub> 값이 증가하는 결과를 나타내었다. 특히, 약 36시간 이후부터는 모든 토착미생물이 안정기(stationary phase)에 접어들어 OD<sub>600</sub> 값에 큰 변화가 없는 것을 확인하였다.

토착미생물의 생물학적 광물화 결정을 확인하기 위해 Urea-CaCl<sub>2</sub> 고체배지에 균주를 배양하여 약 48시간 후 colony를 포함한 주변 생성물질을 광학현미경 1000배율로 광물의 크기 및 모양을 확인한 결과 (Fig. 5)와 같이 다양한 형태의 광물을 형성하는 것으로 나타났다. *Sporosarcina pasteurii*의 경우, 타원형의 광물을 생성하며, 다른 균주보다 큰 2.0 mm 이상의 광물을 형성하였다. *Kurthia gibsonii*는 포도송이 형태의 광물을 형성하였으며, 크기는 0.2~0.5 mm를 나타내었다. *Paenibacillus polymyxa*의 결정은 육각형 및 원형의 형태를 보였으며, 약 1.5 mm의 크기를 보여, 토양분류 중 모래입자정도로 판단할 수 있다.

Urea-CaCl<sub>2</sub> 액체배지 내에서 TNT, TSF 및 Coquina 미생물에 의해 생성된 결정의 XRD 분석 결과를 (Fig. 6)에 나타내었다. 토착미생물이 생성한 결정에 대한 XRD

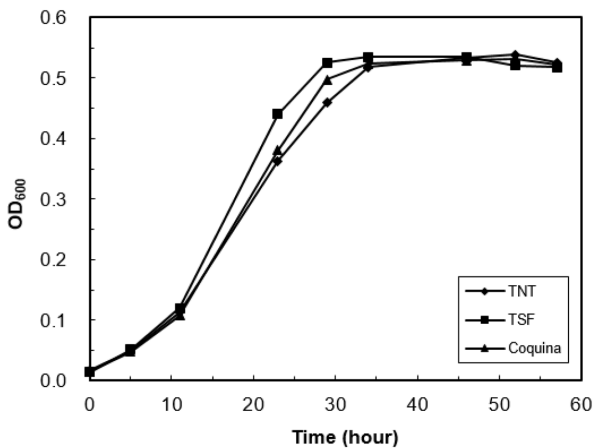


Fig. 4. Growth curve of the indigenous bacteria.

분석 결과, TNT, TSF, Coquina 토착미생물 모두 Calcite (CaCO<sub>3</sub>)의 생성을 확인하였다. Calcite 이외에 Urea-CaCl<sub>2</sub> 액체 배양액 내 함유물질로 인해 생성될 수 있는 Sal ammoniac(NH<sub>4</sub>Cl), Halite(NaCl) 등의 회절피크가 소량 확인되었다.

### 3.4. 토착미생물의 화학적 특성 시험

동정한 3종의 토착미생물을 통하여 CaCl<sub>2</sub> 반응시험, urease 시험, 내성시험(pH, 염도, 온도) 등의 화학적 특성 시험을 실시하였다.

#### 3.4.1. CaCl<sub>2</sub> 반응시험

CaCl<sub>2</sub> 반응시험은 일반적으로 0.25 mM CaCl<sub>2</sub> 용액을 사용하나, 빠른 시간 내에 흰색침전을 확인하기 위해 1 M CaCl<sub>2</sub> 용액 100 ml에 배양액 1 ml를 투입하여 흰색침전의 CaCO<sub>3</sub> 침전유무를 확인하였다. 실험 결과, 모든 균주가 1 M CaCl<sub>2</sub> 용액 투입 후 약 20분 경과하였을 때 흰색침전을 형성하였다(Fig. 7). 이러한 결과는 미생물 배양액에서 미생물이 urea를 분해하면서 생성한 탄산이온과 CaCl<sub>2</sub> 용액에서 생성된 칼슘 양이온이 결합하여 CaCO<sub>3</sub>를 형성한 것으로 판단된다.

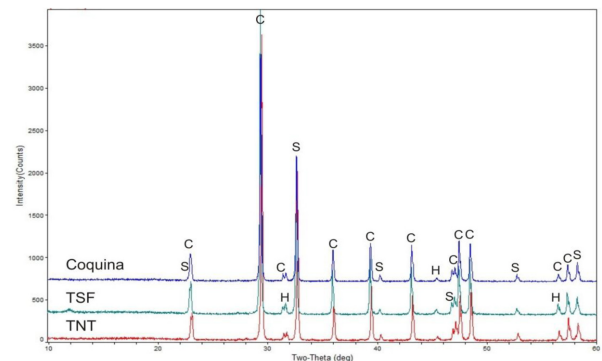
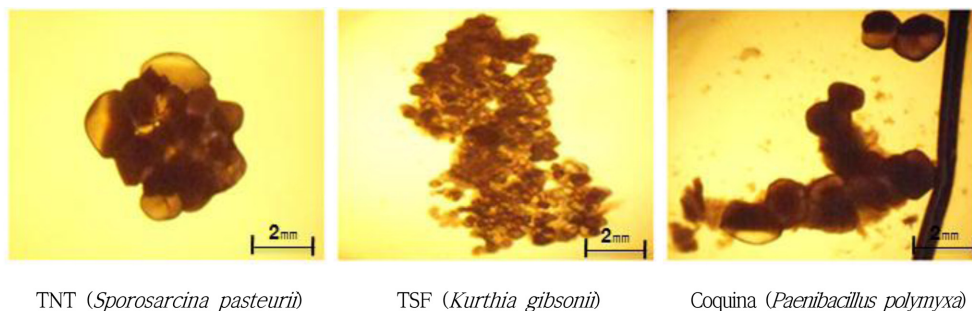


Fig. 6. Precipitation material analysis by XRD (C: Calcite, S: Sal ammoniac, H: Halite).



TNT (*Sporosarcina pasteurii*)

TSF (*Kurthia gibsonii*)

Coquina (*Paenibacillus polymyxa*)

Fig. 5. Morphological analysis of cultured biomineralized crystal formed by indigenous bacteria (×1,000).

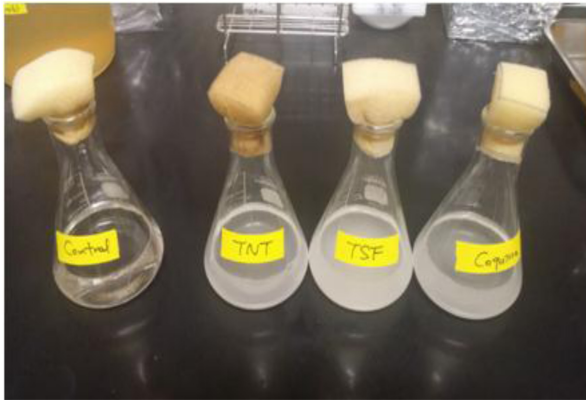


Fig. 7. CaCO<sub>3</sub> precipitation test by indigenous bacterial strains.



Fig. 8. Urease test by indigenous bacterial strains.

3.4.2. Urease 시험

CLO test kit를 사용하여 분리된 3종의 토착미생물이 urea 를 분해할 수 있는 효소의 생성유무를 알아본 결과, 모든 균주에서 CLO test kit 내 gel이 노란색에서 분홍색으로 바뀌는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 8). CLO test kit에는 플라스틱으로 제작된 슬라이드에 밀봉된 urea 분해효소를 확인할 수 있는 gel 이 담겨있다. Gel에는 urea, phenol red(pH 표시제), 완충제 및 정균제 등 Christensen's urea agar media 에 첨가되는 시약이 들어 있어 요소분해효소를 가지고 있는 균주의 활성을 촉진하여 색변화에 의한 urea 분해를 판단할 수 있다.

3.4.3. 내성시험

3.4.3.1. pH

분리된 균주들의 최적 pH를 알아보기 위해 Urea-CaCl<sub>2</sub> 액체배지의 초기 pH를 각각 4, 5, 6, 7, 8, 및 9로 제조하여, 각각 균주 1 ml 씩 접종 후 48시간 동안 배양하여 안정기의 OD<sub>600</sub> 값을 측정하였다. 측정값 중 가장 높은

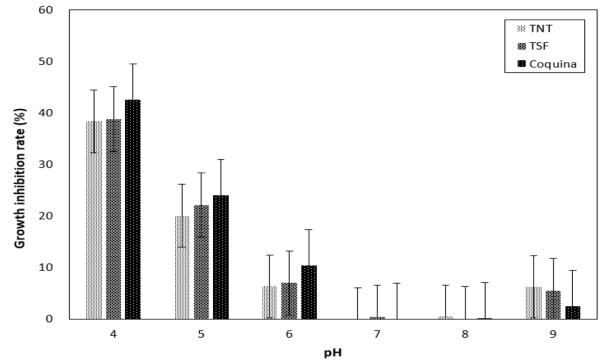


Fig. 9. Growth inhibition rate of indigenous bacterial strains by pH.

OD<sub>600</sub> 값을 성장성이 좋은 것으로 간주하여 나머지 값과 비교 후 pH에 대한 성장저해율을 (Fig. 9)에 나타내었다.

TNT(*Sporosarcina pasteurii*)의 경우 배양 48시간 후 안정기에서 pH 7과 8의 OD<sub>600</sub> 값이 0.52~0.53으로 분석되어 시료 중 가장 높게 나타났으며, 초기 pH가 낮아질수록 토착미생물의 성장저해율이 다소 증가하였다. 특히, pH 6과 pH 9의 OD<sub>600</sub> 결과값의 경우, pH 7과 비교하였을 때 약 6.26~6.32%의 성장저해율을 보였으나, pH가 산성으로 내려갈수록 미생물 성장저해가 최대 40%에 근접하는 것을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과는 TSF (*Kurthia gibsonii*)와 Coquina(*Paenibacillus polymyxa*)에서도 다소 비슷하게 나타났다.

일반적으로, 생물학적 광물화 미생물의 성장과 탄산칼슘의 침전은 pH에 의해 영향을 받는다. 특히, 생물학적 광물화를 위해 미생물이 분비하는 urease의 최적 활성 pH는 8.0이며, 그 이상이 되면 미생물의 성장 및 효소의 활성도가 감소하는 현상을 나타낸다(Stocks-Fischer et al., 1999; Gorospe et al., 2013). 이와 반대로 pH가 낮아지는 경우, urea 분해효소의 활성감소에 의해 탄산칼슘 등의 결정이 생성되기 보다는 수용액에 용해되는 경향이 증가하게 된다(Loewenthal and Marais, 1978).

3.4.3.2. 염도(Salinity)

분리된 균주들의 염도 내성을 알아보기 위해 Urea-CaCl<sub>2</sub> 액체배지의 초기농도를 0, 1, 3 및 5%로 제조하여, 각각 균주 1 ml 씩 접종 후 48시간 동안 배양하여 안정기의 OD<sub>600</sub> 값을 측정하였다. 측정값 중 가장 높은 OD<sub>600</sub> 값을 성장성이 좋은 것으로 간주하여 나머지 값과 비교 후 염도에 대한 성장저해율을 Fig. 10에 나타내었다.

TNT(*Sporosarcina pasteurii*)의 경우 배양 48시간 후 안정기에서 염도 0%의 OD<sub>600</sub> 값이 약 0.53으로 분석되



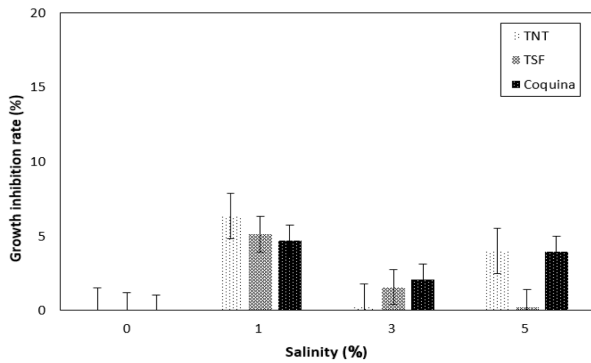


Fig. 10. Growth inhibition rate of indigenous bacterial strains by salinity.

어 시료 중 가장 높게 나타났으며, 나머지 시료들의 성장 저해율이 5% 부근에 근접하여 분석되었다. 나머지 두 균주도 이와 비슷한 경향성을 나타내었다. 이와 같은 경향성은 분리한 토착미생물의 성장에 염도가 큰 영향은 주지 못하는 것으로 판단되며, 토착미생물이 모두 바닷가와 인접해있는 장소에 적치되어 있는 슬러지에 존재하고 있었기 때문에, 환경적인 영향에 따른 염도의 내성이 있는 것으로 사료된다.

#### 3.4.3.2. 온도(Temperature)

분리된 균주들의 최적배양온도를 알아보기 위해 초기배양온도를 20, 30 및 40°C로 하여 각각 균주 1 ml 씩 접종 후 48시간 배양하여 안정기의 OD<sub>600</sub> 값을 측정하였다. 측정값 중 가장 높은 OD<sub>600</sub> 값을 성장성이 좋은 것으로 간주하여 나머지 값과 비교 후 온도에 대한 성장저해율을 (Fig. 11)에 나타내었다.

일반적으로, 미생물의 성장과 효소의 촉매 작용은 온도에 좌우된다. 대부분의 urease의 최적 온도 범위는 20~37°C로 알려져 있으나(Mitchell and Ferris, 2005; Okwadha and Li, 2010) 효소반응의 최적범위는 환경조건과 반응농도에 따라 달라지게 된다. Dhami et al. (2014)은 35°C에서 urease가 안정한 것을 발견했으며, 온도가 55°C로 상승할 경우 효소 활성이 약 47% 감소했다고 보고하였다.

TNT(*Sporosarcina pasteurii*)의 경우 배양 48시간 후 안정기에서 30°C의 OD<sub>600</sub> 값이 약 0.52로 분석되어 시료 중 가장 높게 나타났으며, 20°C와 40°C에서의 성장저해율이 각각 12.38%, 3.05%로 분석되었다. 따라서, TNT의 최적배양온도는 30°C로 추측되며, 20°C 이하의 온도에서는 미생물의 성장속도가 다소 낮아질 것으로 판단된다. TSF(*Kurthia gibsonii*)와 Coquina(*Paenibacillus poly-*

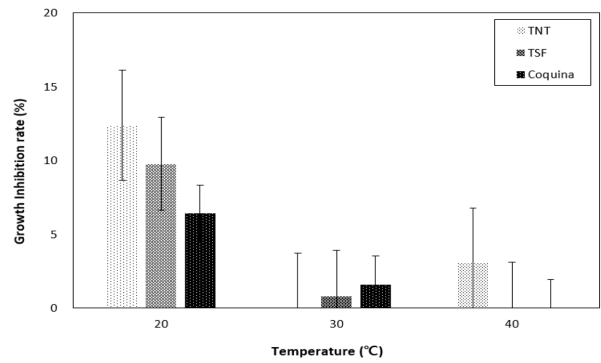


Fig. 11. Growth inhibition rate of indigenous bacterial strains by temperature.

*myxa*)의 경우, 40°C의 OD<sub>600</sub> 값이 가장 높게 나타났으나, 30°C에서의 성장저해율이 2% 미만이므로 최적배양온도는 30~40°C가 될 것으로 판단된다.

## 4. 결 론

본 연구에서는 멕시코 B광산에서 채취한 슬러지에서 동정한 생물학적 광물화 미생물의 물리·화학적 특성을 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 본 연구에 사용된 3개의 슬러지시료 TNT, TSF 및 Coquina에서 배양능이 우수한 단일균주를 각각 1종씩 분리하여 지방산 분석(Cellular fatty acid composition)과 PCR(Polymerase Chain Reaction)을 실시하였다. 시험 결과, TNT, TSF 및 Coquina의 토착미생물은 각각 *Sporosarcina pasteurii*, *Kurthia gibsonii*, *Paenibacillus polymyxa* 와 유사성이 높은 것으로 확인되었다.

2. 동정한 3종의 토착미생물은 배양기에서 약 5시간까지 유도기(lag phase)를 유지하였고, 배양 후 7시간부터 30시간까지 급격히 OD<sub>600</sub> 값이 증가하는 대수기(exponential phase)로 진입하였다. 약 36시간 이후, 모든 토착미생물이 안정기(stationary phase)에 접어들어 OD<sub>600</sub> 값에 큰 변화가 없으므로 배양 후 36시간 전후로 미생물의 생육이 안정화될 것으로 사료된다.

3. Urea-CaCl<sub>2</sub> 고체배지에 균주를 약 48시간 배양 후 colony 주변 생성물질을 확인한 결과, *Sporosarcina pasteurii*의 경우, 타원형의 광물을 생성하며, 타 균주보다 큰 지름 약 2.0 mm의 광물을 형성하여, 동일한 시간동안 더 효율적인 생물학적 광물화가 가능할 것으로 판단된다.

4. 동정한 3종의 토착미생물을 통하여 CaCl<sub>2</sub> 반응시험과 urease 시험을 실시한 결과, 모든 균주가 약 20분 경과하였을 때 흰색침전을 형성하였으며, CLO test kit 내

gel의 색이 노란색에서 분홍색으로 바뀌는 것을 확인할 수 있었다. 따라서, 토착미생물 자체적으로 urea를 가수분해할 수 있는 효소를 분비하여 탄산이온을 생성할 수 있을 것으로 사료된다.

5. 분리된 균주들의 pH, 염도 및 온도에 대한 내성시험을 한 결과, pH의 경우 모든 토착미생물이 안정기에서 pH 7과 8의 OD<sub>600</sub> 값이 가장 높게 측정되었다. 염도는 초기농도 5.0%까지 생장에는 큰 저해를 끼치지 못하며, 분리한 3 균주 모두 바닷가와 인접해있는 장소에 적치되어 있는 슬러지를 채취해 토착미생물을 분리하였으므로 염도에 대한 내성이 존재하는 것으로 판단된다. 모든 균주의 최적배양온도는 30~40°C로 추측되며, 20°C 이하의 온도에서는 미생물의 생장능력이 다소 낮아짐을 확인하였다.

6. 최종적으로, B광산의 슬러지시료에서 분리한 토착미생물은 자체적으로 생물학적 광물화를 유도할 수 있으며, urea를 분해하여 생성된 탄산이온을 통해 주변의 양이온을 포함한 중금속을 광물화할 수 있는 가능성을 가지고 있을 것으로 판단된다. 따라서, 이러한 생물학적 광물화 미생물을 추출하여 국내 폐금속광산의 중금속 오염토양의 불용화에 활용할 수 있다고 사료된다.

## 사 사

본 연구는 환경부의 토양지하수 오염방지기술 개발사업(2015000550007)에서 지원받았습니다.

## 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**(7), 981-988.
- 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.
- Chung, J.H., Kang, P.S., Kim, C.Y., Lee, K.S., Hwang, T.Y., Kim, G.T., Park, J.S., Park, S.Y., Kim, D.S., Lim, O.T., and Sakong, J., 2005, Blood Pb, urine Cd and health assessment of residents in the vicinity of abandoned mines in Gyeongsangbuk-do, *Korean J. Occup. Environ. Med.*, **17**(3), 225-237.
- Ciurli, S., Marzadori, C., Benini, S., Deiana S., and Gessa, C., 1996, Urease from the Soil Bacterium *Bacillus pasteurii* : Immobilization on Ca-polygalacturonate, *Soil Biol. Biochem.*, **28**(6), 811-817.
- Dhami, N.K., Reddy, M.S., and Mukherjee, A., 2014, Synergistic role of bacterial urease and carbonic anhydrase in carbonate mineralization, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **172**(5), 2552-2561.
- Dejong, J.T., Mortensen, B.M., Martinez, B.C., and Nelson, D.C., 2010, Bio-mediated soil improvement, *J. Ecol. Eng.*, **36**(2), 197-210.
- Gorospa, C.M., Han, S.H., Kim, S.G., Park, J.Y., Kang, C.H., Jeong, J.H., and So, J.S., 2013, Effects of different calcium salts on calcium carbonate crystal formation by *Sporosarcina pasteurii* KCTC 3558, *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **18**(5), 903-908.
- Jakubick, A., McKenna, G., and Robertson, A.M., 2003, Stabilisation of tailings deposits : International Experience, *Proceedings of Mining and the Environment III*, Sudbury, Ontario, Canada, p.1-9.
- Kawatra, S.K. and Natarajan, K.A., 2001, Mineral biotechnology: microbial aspects of mineral beneficiation, metal extraction, and environmental control, *Society for Mining, Metallurgy and Exploration, inc. (SME)*.
- Kim, D.H., Kim, H.C., and Park, K.H., 2010, Possibility of cementation of soft soil using Bacteria, *Korean Geotech. Soc. Fall National Conference*, Gyeonggi, Korea, p.379-391.
- Kim, S.H., Cho, Y.M., Choi, S.H., Kim, H.J., and Choi, J.W., 2011, The effect of exposure factors on the concentration of heavy metals in residents near abandoned metal mines, *J. Prev. Med. Public Health*, **44**(1), 41-47.
- Kim, S.T., Lee, C.J., Kim, H.J., and Lee, H.C., 2012, The influence of calcite nano material on microorganism mixed mortar, *J. Archit. Inst. Korea Struct. Constr.*, **28**(5), 77-85.
- Lee, J.D., Kim, T.D., Kim, S.G., and Kim, H.J., 2013, Study on the contamination characteristics of pollutants at various type of abandoned metal mines, *J. Soil. Groundwater Environ.*, **18**(3), 93-108.
- Lee, S., Kim, T.H., and Lee, J.H., 2007, Soil test method, Korea, *Goomibook*.
- Li, D., Nielsen, M.H., Lee, J.R.I., Frandsen, C., Banfield, J.F., and De Yoreo, J.J., 2012, Direction-specific interactions control crystal growth by oriented attachment, *Science*, **336**(6084), 1014-1018.
- Loewenthal, R.E. and Marais, G.V.R., 1978, Carbonate chemistry of aquatic systems: theory and application, **1**, *Ann Arbor Science*, Ann Arbor.
- MOE (Ministry of Environment), 2007, Residents health influence investigation of the abandoned metal mine.
- MOE (Ministry of Environment), 2008, Health assessment of residents in the vicinity of abandoned mines.
- MOE (Ministry of Environment), 2015, Development of hybrid immobilizing technology with indigenous bacteria and indus-

trial waste.

Mitchell, A.C. and Ferris, F.G., 2005, The coprecipitation of Sr into calcite precipitates induced by bacterial ureolysis in artificial groundwater : temperature and kinetics dependence, *Geochim. Cosmochim. Acta*, **69**(17), 4199-4210.

Mitchell, J.K. and Santamarina, J.C., 2005, Biological considerations in geotechnical engineering, *J. Geotech. Geoenviron. Eng.*, **131**(10), 1222-1233.

Mortensen, B.M., Haber, M.J., DeJong, J.T., Caslake, L.F., and Nelson, D.C., 2011, Effects of environmental factors on microbial induced calcium carbonate precipitation, *J. Appl. Microbiol.*, **111**(2), 338-349.

Okwadha, G.D.O. and Li, J., 2010, Optimum conditions for microbial carbonate precipitation, *Chemosphere*, **81**(9), 1143-1148.

Park, K.H. and Kim, D.H., 2012, Verification of calcium carbonate by cementation of silt and sand using bacteria, *J. Korean Geotech. Soc.*, **28**(6), 53-61.

Park, M.J., 2014, Characterization of urease-producing bacteria and stabilization of heavy metal, *J. Soil. Sci. Fertil.*, **47**(6), 391-397.

Park, S.J., Park, S.H., and Ghim, S.Y., 2014, The effects of *Paenibacillus polymyxa* E681 on antifungal and crack remediation of cement paste, *Curr. Microbiol.*, **69**(4), 412-416.

Phae, C.G. and Oh, J.M., 2002, Soil contamination measurement analysis, Korea, *Sinkwang-munhwasa*.

Sarda, D., Choonia, H.S., Sarode, D.D., and Lele, S.S., 2009, Biocalcification by *Bacillus pasteurii* urease: a novel application, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **36**(8), 1111-1115.

Seok, H.J. and Kim, C.G., 2013, Comparative assessment on indicating factor for biomineralization by *Bacillus* species, *J. Korean Soc. Environ. Eng.*, **35**(3), 179-191.

Singh, T.S. and Pant, K.K., 2006, Solidification/stabilization of arsenic containing solid wastes using Portland cement, fly ash and polymeric materials, *J. Hazard. Mater.*, **131**(1), 29-36.

Stocks-Fischer, S., Galinat, J.K., and Bang, S.S., 1999, Microbiological precipitation of CaCO<sub>3</sub>, *Soil Biol. Biochem.*, **31**(11), 1563-1571.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J., 1994, CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res.*, **22**(22), 4673-4680.

United States Environmental Protection Agency (USEPA) Method 1311, 1988, Toxicity Characteristic Leaching Procedure, SW-846 : Test Methods for Evaluating Solid Waste Physical/Chemical Methods United States Environmental Protection Agency (USEPA).

United States Environmental Protection Agency (USEPA) Method 1312, 1994, Synthetic Precipitation Leaching Procedure, SW-846 : Test Methods for Evaluating Solid Waste Physical/Chemical Methods United States Environmental Protection Agency (USEPA).

Zeynep, B.B., Mary, J.K., and Raissa, D.F., 2015, Biomineralized cement-based materials: Impact of inoculating vegetative bacterial cells on hydration and strength, *Cem. Concr. Res.*, **67**(9), 237-245.