Bacillus종의 생광물화에 미치는 영향 인자의 비교 평가

Comparative Assessment on Indicating Factor for Biomineralization by Bacillus Species

석희정 · 김창균*

Hee-Jeong Seok · Chang-Gyun Kim[†]

인하대학교 환경공학과

Department of Environmental Engineering, Inha University

(2013년 1월 15일 접수, 2013년 2월 27일 채택)

Abstract : This study was conducted to comparatively assess quantitative indicating factor for biomineralization characterizing CO₂ mineralization on three type of minerals (i.e., CaCl₂, MgCl₂, CaCl₂-MgCl₂) in an aqueous solution amended with *Bacillus pasteurii* or indigenous microorganisms for a S landfill cover soil. For given three types of minerals, NH₄⁺ (urease activity) was released at the highest of 88 mg/L for MgCl₂, then 85 mg/L for CaCl₂, and the lowest of 42 mg/L for CaCl₂-MgCl₂. CO₂ gas in the head space was completely removed after 12, 12, and 24 hr for CaCl₂, MgCl₂ and CaCl₂-MgCl₂, respectively. Ca²⁺ concentration in CaCl₂ solution was the quickest and the greatest decreased 92% for 12 hr whereas that in CaCl₂-MgCl₂ solution was lower at 85% for 36 hr. Mg²⁺ concentration in MgCl₂ was more efficiently decreased at 46% for 48 hr than that of CaCl₂-MgCl₂ solution of 38.5% for 72 hr. Regardless of types of minerals or their concentration, pH was changed from 5.5 to 9 by biomineralization being progressed. Microbial activity (OD₆₀₀) was also changed from 0 to 0.6. SEM images indicated that spheroidal and trapezoid shape crystal were formed, which were identified as of CaCO₃ (Calcite) and MgCO₃ (Magnesite) by X-ray diffraction. In the long run, NH₄⁺ (urease activity), CO₂ gas, OD₆₀₀, pH, Ca²⁺ and Mg²⁺ would be suitable for reasonable indicating factor in order to assess the degree of biomineralization efficiency.

Key Words : Biomineralization, CO₂ Conversion, *Bacillus Pasteurii*, Urease

요약 : 본 연구에서는 생광물화에 미치는 주요한 영향 인자의 파악 및 광물별 생광물화 특성을 알아보기 위하여 CaCl₂, MgCl₂, CaCl₂-MgCl₂ 수용액을 이용하여 bottle test를 진행하였으며, 대상 미생물은 생광물화 관련 미생물 중 *Bacillus pasteurii*와 S 매립지 복토재 내 토착 미생물을 이용하였다. 광물 종류별 실험을 진행한 결과, CaCl₂, MgCl₂, CaCl₂-MgCl₂에 대해 각각 85, 88, 42 mg/L의 암모늄(NH₄⁺)이온이 생성되었고 이산화탄소 가스가 각각 12, 12, 24시간 후에 검출되지 않았다. 수용액 내 Ca²⁺이 CaCl₂의 경우 12시간 후 92% 감소하였고 CaCl₂-MgCl₂의 경우 36시간 후 85% 감소하였다. 반면에 Mg²⁺은 MgCl₂의 경우 48시간 후 46% 감소하였고 CaCl₂-MgCl₂의 경우 72시간 후 38.5% 감소하였다. 이온 농도 또는 광물의 종류에 관계없이, pH의 경우 생광물화가 일어난 실험군에서만 pH 5.5에서 pH 9로 변하는 것을 볼 수 있었고 미생물 활성도(OD₆₀₀) 또한 0에서 0.6으로 증가했다. 실험 종료 후, 주사전자현미경(SEM) 사진을 촬영한 결과, 회전 타원체 모양의 결정체와 사다리꼴 모양의 결정체가 형성된 것을 확인할 수 있었으며, 이는 X-선 회절분석으로 확인된 CaCO₃ (Calcite)와 MgCO₃ (Magnesite)이었다. 본 연구 결과 urea를 이용한 생광물화능을 판단할 수 있는 영향인자로서 효소의 활성도, CO₂ gas 농도변화, OD₆₀₀, pH, 용액 내 칼슘(또는 마그네슘) 이온농도가 적합함을 확인하였다.

주제어 : 생광물화, CO₂ 전환, *Bacillus pasteurii*, urease

1. 서론

산업화시대 이후 화석연료의 급속한 사용량의 증가로 인하여 지구의 평균온도는 꾸준히 증가하였다.¹⁾ 1992년 6월 리우회의(유엔환경개발회의: UNCED)에서 ‘기후변화에 관한 기본협약’(UNFCCC: United Nations Framework Convention on Climate Change)이 체결되면서 지구온난화에 대한 관심이 증폭되었고 2005년 2월 교토의정서가 발효되면서 선진국을 중심으로 온실가스 감축 방안에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.²⁾ 온실가스(Greenhouse Gas : GHG)에는 이산화탄소(CO₂), 메탄(CH₄), 아산화질소(N₂O) 등이 포함된다. 이 중 이산화탄소는 온실효과에 대한 기여도가 가장 높으며 지구

온난화를 일으키는 대기 중의 온실가스 농도를 이산화탄소로 환산하면 약 450 CO₂ eq.ppm이며 그 중 이산화탄소가 차지하는 비율은 84% (380 ppm) 이상이다.^{3,4)} 생광물화(Biomineralization)는 생체 또는 자연계에서 광범위하게 이루어지고 있는 CO₂를 생물학적으로 무기광물로 변환하여 고정(capturing) 또는 전환(converting)하는 현상을 의미한다. 즉 *Bacillus species* 등의 미생물 대사작용을 이용하여 생화학적으로 이산화탄소를 탄산염(CaCO₃) 형태로 고정시킨다.⁵⁾

탄산염화 반응은 먼저 식 (1)~(3)과 같이 용액 내에 용해되어 있는 이산화탄소가 중탄산(bicarbonate)으로 전환되며 식 (4)~(5)반응을 통하여 탄산(carbonate)으로 해리된 후 Ca²⁺와 반응하여 CaCO₃로 침전한다.⁶⁻⁸⁾

[†] Corresponding author E-mail: cgk@inha.ac.kr Tel: 032-860-7561 Fax: 032-865-1425

자연에서 발생하는 탄산염화 과정은 매우 오랜 시간이 소요된다.⁹⁾ 그러나 미생물을 이용한 탄산염화 반응(Microbial Carbonate Precipitation)은 효소의 촉매 작용과 고정 매체 역할로 이산화탄소가 가역적 수화반응에 의하여 빠르게 광물화된다.¹⁰⁾ 생광물화 기술에는 다양한 미생물 종이 사용될 수 있으며,^{11,12)} 이러한 생광물화 기술에 적용 가능한 효소는 Urease,¹³⁻¹⁵⁾ Carbonic Anhydrase^{16,17)}와 같은 생체촉매가 널리 알려져 있다. 생체촉매를 이용한 생광물화는 이산화탄소를 포집하여 저장하는 공정 중에서 가장 안정적인 방법으로 CaCO_3 는 calcite와 aragonite의 구조로 생성된다.¹⁸⁾ 이러한 생체촉매 사용은 높은 반응성으로 인하여 나노 단위의 광물형성 및 신속한 광물화 반응에도 사용된다.¹⁸⁾

따라서 본 연구에서는 대기 중에 포함되어 있는 이산화탄소를 포집하기 위한 방안으로 생광물화 미생물을 이용하여 보다 환경적으로 안정하며, 상온, 상압에서 경제적으로 이산화탄소를 탄산염광물로 합성 제조하고자 하였다. 즉, 알칼리 금속을 함유하는 releaser를 이용하여 이산화탄소를 미생물에 의한 생광물화기작에 의하여 용이하게 광물화 할 수 있는 경제적이고 안정적인 전환에 대한 실험실 규모의 연구를 통하여 이산화탄소 생광물화의 영향인자를 비교 평가하고자 하였다. 이를 통하여 생광물화에 미치는 주요한 영향 인자의 파악 및 이산화탄소 제거 효율을 극대화하고자 하였다.

2. 실험재료 및 방법

2.1. 균주 및 배양 조건

2.1.1. *Bacillus pasteurii* (ATCC[®], 6453TM) 배양 방법

생광물화 관련 미생물인 *Bacillus pasteurii* (ATCC[®], 6453TM)를 미국 ATCC사로부터 구매하였다. 균주 구매 시 제공된 절차에 따라 $\text{NH}_4\text{-YE}$ medium을 조제하여 280 mL serum bottle (Wheaton)에 주입 후 균주를 접종하고 200 rpm의 shaking incubator (Vision, VS-8480)에 넣어 30℃에서 배양하였다. 이 때 배양액의 부피는 100 mL로 하였고 배지의 조성은 Yeast extract 20.0 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10.0 g/L, Tris buffer (pH 9.0) 15.7 g/L, Agar (if needed) 20.0 g/L이었다. 한편, 배양 용기 내 호기성 조건을 유지하기 위하여 인공 Air 가스 (O_2 21% + N_2 79%, v/v%)를 1.5 L/min의 유량으로 1분간 purging하였다. 이와 같이 배양된 균주를 생광물화 실험에 이용하였다.

2.1.2. 매립지 복토 유래 토착 미생물

매립지 복토층에 서식하는 토착 미생물 중 생광물화 관련 균주가 존재할 것으로 사료되어, 인천 S매립지 제 2매립장 중 슬러지고화도가 시험 포설된 3B block의 복토재 내 토착 미생물을 분리, 배양하여 실험 균종 중 하나로 이용하였다.

2.1.3. 매립지 복토 유래 토착 미생물 농화 배양 방법

10 g의 토양시료를 280 mL serum bottle (Wheaton)에 담긴 100 mL $\text{NH}_4\text{-YE}$ medium에 주입한 후 마개(Gray butyl stopper, Wheaton)로 밀폐하였다. 그 후 head space에는 호기성 균주를 위해 인공 Air 가스($\text{N}_2 : \text{O}_2 = 79\% : 21\%$, v/v%)를 1.5 L/min의 유량으로 1분간 주입하고 밀봉하여 30℃에서 200 rpm의 shaking incubator (Vision, VS-8480)에서 24 시간 배양하였다. 1차 배양 후 10분간 중력침강시켜(침강한 토양입자를 제외한) 상정액 10 mL를 피펫으로 취해 멸균한 $\text{NH}_4\text{-YE}$ medium 100 mL에 주입하여 1차 배양과 같은 조건으로 2차 배양하였다. 동일한 조건으로 3차까지 미생물을 농화 배양하였다. 농화배양된 토착 미생물은 3,000 rpm에서 15분간 원심분리(Hanil, HA-1000-3)한 후 상정액은 버리고 침전물만 밀봉하여 4℃ 냉장보관 하였으며, 실험 시작 전 24시간동안 $\text{NH}_4\text{-YE}$ medium에서 다시 배양하여 OD₆₀₀으로 미생물 활성도를 측정하여 미생물 존재여부를 확인한 후 사용하였다. 미생물 활성도 분석은 UV-spectrophotometer (Sincos S-3100)로 600 nm의 파장에서 흡광도(Optical Density, OD₆₀₀)를 측정하여 결정하였다.

2.1.4. 매립지 복토재 유래 토착 미생물의 종 분석 방법

매립지 복토 유래 토착 미생물의 종 분석을 위해 농화 배양된 토착 미생물을 16S rRNA gene cloning을 이용하여 종 분석을 실시하였다. 배지와 미생물 현탁액을 10~100 mL 취하여 3,000 rpm에서 15분간 원심분리(Hanil, HA-1000-3)하여 농축시켰으며 이 중 분리된 침전물은 미생물 균집분석을 위한 시료로 사용하였다. 침전물로부터 cell을 분리하기 위하여 FastPrep[®] Instrument (Q-Bio gene)를 이용해 Speed 4에서 5초간 bead beating하여 침전물 입자로부터 cell을 분리시켰다. 그 후 FastDNA[®] SPIN Kit (Bio101 system, Q-Bio gene)를 사용하여 침전물의 총 genomic DNA를 추출하였다. 추출한 총 genomic DNA에서 미생물 종을 확인하기 위하여 16S universal primer (27F-5'AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3' 및 1492R-5' TAC GCY TAC CTT GTT ACG ACT T 3')에 의한 PCR 증폭(PCR Machine, Techgene)을 수행하였다. PCR 증폭 산물을 대상으로 SolgTM Gel과 PCR Purification System (Solgent Co., Ltd.)을 사용하여 반응 후 잔류하는 primer-dimer를 제거하였다. PCR 증폭산물은 agarose gel에 loading하고 Power gel extraction kit (Dyne Bio Inc., Korea)를 사용하여 정제하였다. 정제된 증폭산물은 T-Blunt cloning vector (SolGent, Cat No. SOT01-K020)로 ligation시키고 숙주세포(host cell : E. coli XL1-Blue)로 형질 전환(Transformation)하였다. 그 후 X-Gal과 IPTG로 처리된

LB (Luria-Bertani) 배지에 형질전환 된 세포를 배양한 후 시료별로 10~20개의 균주와 접합된 콜로니를 Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System (Promega, USA)을 이용해 플라스미드를 회수하였다. 이어서, 1% agarose gel에 loading하여 plasmid와 PCR 산물이 조합된 시료만을 대상으로 16S rRNA 염기서열을 분석하였다. 미생물 염기서열은 NCBI (National Center for Biotechnology Information : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) Gene Bank에 등록된 데이터베이스와 비교하여 분석하였다. 이와 같이 도출된 미생물 종 별 염기서열 정보를 근거로 CLUSTALW (<http://clustalw.genomic.jp/>)를 이용하여 관련 미생물에 대한 계통수(phylogenetic tree)를 작성하고 미생물 종간 유근관계를 결정하였다.

2.2. 실험 장치 및 조건

*Bacillus pasteurii*와 복토 유래 토착 미생물을 이용하여 Bottle test 규모의 생광물화 실험을 진행하였다. 이 때 사용된 serum bottle (Wheaton)은 Fig. 1과 같이 준비하였다. 대조군(control)은 총 3가지로 미생물을 접종하지 않은 경우(control 1), 멸균된 미생물을 접종한 경우(control 2), 1% NaN_3 를 첨가한 경우(control 3)로 구분하여 실험을 진행하였고, 실험군(test)은 *B. pasteurii*를 주입한 경우(test 1), 양질토사 복토 유래 토착 미생물을 이용한 경우(test 2), 고화슬러지복토 유래 토착 미생물을 이용한 경우(test 3) 등 총 3가지를 대상으로 실험을 진행하였으며 실험조건은 Table 1과 같다. 대조군(control)의 경우 control 2는 멸균된 미생물도 생광물화 작용에 영향을 미친다는 문헌연구를 참고했고,¹⁹⁾ control 3은 NaN_3 가 물리적, 화학적으로 미생물의 표면의 활성을 억제시켜 미생물 자체 활성을 저해하는 물질로 잘 알려져 있다. 따라서 이와 같은 각각 상이한 대조군별 특성 평가도 동시에 수행하였다.

280 mL의 용량의 serum bottle에 NB-NaCl 배지 100 mL를 가하고 urea (20 g/L)와 각 용액(CaCl_2 , MgCl_2 , $\text{CaCl}_2\text{-MgCl}_2$)을 넣고 미생물 생장에 필요한 산소를 공급하기 위하여 인공 Air gas (O_2 21% + N_2 79%, v/v%)를 1.5 L/min의 유량으로 1분간 purging하였다. 그 후 미생물(OD_{600} , 0.8)과 4 mmol의 이산화탄소(CO_2 99.9%)를 주입한 후 shaking in-

Table 1. Experimental condition for bottle test using *Bacillus pasteurii*/ indigenous microorganism from the general cover soil and from the solidified sludge cover soil of a S landfill cover soil

	Ca	Ca	Ca	Mg	Ca + Mg
Incubation Time (hour)			72		
Incubation Temp. (°C)			30		
CO_2 (mmol)			4		
Urea (g/L)			20		
CaCl_2 sol. (mM)	25	50	75	-	12.5
MgCl_2 sol. (mM)	-	-	-	25	12.5

cubator에 넣어 30°C, 200 rpm을 유지하면서 실험을 수행하였다. NB-NaCl 배지의 조성은 Nutrient broth 8.0 g/L, NaCl 5.0 g/L이었다. 멸균 전 pH 6.5로 맞추고, urea와 각 용액은 0.2 μm 필터로 멸균해서 사용하였으며 실험대상 균주는 3,000 rpm에서 15분간 원심분리(Hanil, HA-1000-3)한 후 상정액은 버리고 침전물만 5% NaCl용액으로 두 번 세정 후 사용하였다.

2.3. 시료 분석

2.3.1. pH

pH 측정은 탁상용 pH meter (JENWAY 3510 pH METER)를 이용하여 Standard Methods에 따라 분석하였다.²⁰⁾

2.3.2. Bottle 내 가스 농도 분석

배양 시간에 따른 반응기 head space의 이산화탄소, 산소 및 질소의 농도를 분석하기 위하여 packed column (Alltech 403412-1417) 및 TCD가 장착된 가스 크로마토그래피(HP 6890 series GC system, U.S.A.)를 이용하였다. 이 때 온도 조건은 Inlet 110°C, Oven 50°C, 그리고 Detector 210°C이었다. 분석용 시료는 반응 용기의 head space로부터 GC 가스 분석용 syringe (HAMILTON, GASTIGHT® # 1002)를 이용하여 0.5 mL 분취하여 사용하였다.

2.3.3. 칼슘 이온 및 마그네슘 이온 분석

실험기간 동안 매 12시간마다 시료를 채취하여 시료 내 잔류하는 칼슘 이온 농도와 마그네슘 이온 농도를 Standard Methods에 따라 EDTA 적정방법을 이용하여 정량하였다.²⁰⁾ 마그네슘이온 농도는 칼슘과 마그네슘의 이온농도를 탄산칼슘 농도로 환산한 농도인 정도와 칼슘이온 농도의 차를 이용하여 결정하였다. 이를 위하여 분석대상 시료는 원심분리(eppendorf 541R, 13,000 × g, 3 min)한 후 상정액으로 하였다. 칼슘 이온 분석은 약 1~2 mL 샘플을 100 mL의 증류수로 희석 후, 5N NaOH를 사용하여 pH를 12~13으로 조정하였다. 그 후 Calcon (KANTO, 0.4% w/v solution in ethanol) 1mL와 Polyvinyl Alcohol Dispersing Agent (HACH®) 두 방울을 넣고 밝은 파란 종말점이 나타날 때까지 0.01N

Fig. 1. Schematics of bottle test for biomineralization.

EDTA로 적정하였다. 경도 분석은 약 1~2 mL 샘플을 100 mL의 증류수로 희석 후, ammonia 완충액을 사용하여 pH를 10으로 맞췄다. 그 후 0.1% Calmagite (Alfa Aesar) 1mL와 Eriochrome Black T solution (SAMCHUN) 두 방울을 넣고 밝은 파란 종말점이 나타날 때까지 0.01N EDTA로 적정하였다.

2.3.4. Urease activity (NH_4^+ 분석)

생광물화 시 urea의 가수분해에 의해 생성되는 암모늄이온(NH_4^+)의 농도를 매 12시간마다 이온전극법에 따라 분석하였다.²¹⁾ 이 때 시료는 원심분리(ependorf 541R, 13,000 × g, 3 min) 후 상정액을 대상으로 하였다. 암모늄이온(NH_4^+)의 농도는 Standard Methods²⁰⁾에 따라 ion-selective electrode (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 측정하였다.

2.3.5. X-선 회절분석 및 SEM 분석

실험 종료 후 CaCO_3 의 생성 여부를 알아보기 위해서 X-선 회절분석기(Bruker, D8 Advance)를 이용하여 시료를 분석하였다(2θ: 10°~80°, scan speed : 4°/min). 이를 위하여 실험 종료 후 시료를 상온에서 24시간 이상 건조하여 시료 내 수분을 제거하였다. 한편, 생성된 화합물의 형태 변화 및 결정 구조를 확인하기 위하여 전자주사현미경(Hitachi S-4200)을 사용하여 그 특성을 확인하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 농화 배양 후의 매립지 복토 유래 토착 미생물 종 분석 결과

배양된 미생물의 종 다양성을 확인하기 위해 양질토사복토와 고화슬러지복토 내의 미생물을 $\text{NH}_4\text{-YE}$ 배지에 농화배양(3차) 한 후 DNA를 추출하여 16S rRNA분석을 실시하였다. 양질토사복토 유래 토착 미생물의 종 분석 결과를 Fig. 2와 Table 2에 나타내었고 고화슬러지복토 유래 토착 미생물 종 분석 결과를 Fig. 3과 Table 3에 정리하였다. 양질토사복토 유래 토착 미생물의 colony 분석결과 총 10개의 colony 중 9개 colony가 Uncultured bacteria로 확인되었고, 1개의 colony는 *Clostridium sporogenes*와 근연관계에 있는 것으로 나타났다. 고화슬러지복토 유래 토착 미생물의 colony 분석결과 총 9개의 colony 중 8개 colony가 Uncultured bacteria로 확인되었고, 1개의 colony는 *Clostridium sporogenes*와 근연관계에 있는 것으로 분석되었다. *Clostridium sporogenes*는 *Clostridium botulinum*의 한 종류로서 호기성, 그람 양성균, 둥근 모양의 특징을 갖는 토양에서 흔하게 발견되는 종이다.²²⁾ 또한 A-5, A-6, A-9와 B-2, B-4, B-5가 *Bacillus* sp.와 근연관계를 가지고 있음을 확인할 수 있었다. 고화슬러지 유래 토착 미생물이 양질토사 유래 토착 미생물 보다 본 연구에 사용된 생광물화 균인 *Bacillus pasteurii*와 좀 더 유근관계에 있는 것을 알 수 있었다. 양질토사복토와 고화슬

Fig. 2. Phylogenetic tree of general cover soil of a S landfill.

Table 2. Identified species by 16S rRNA gene analysis from the enrichment with general cover soil of a S landfill

Sample	Closed microorganism (NCBI No.)	Identities	Gaps
A-1	Uncultured bacterium clone (VHW_D_R14)	1490/1496 (99%)	2/1496 (0%)
A-2	Clostridium sp. (CYP11)	1390/1513 (92%)	54/1513 (4%)
A-3	Uncultured bacterium clone (VHW_D_R14)	1287/1415 (91%)	11/1415 (1%)
A-4	Uncultured bacterium clone (VHW_D_R14)	1493/1501 (99%)	4/1501 (0%)
A-5	Uncultured bacterium clone (F132)	1180/1271 (93%)	27/1271 (2%)
A-6	Uncultured bacterium clone (VHW_D_R14)	1493/1497 (99%)	0/1497 (0%)
A-7	Uncultured organism clone (ctg_CGOGA21)	1465/1521 (96%)	10/1521 (1%)
A-8	Uncultured Tissierella sp. clone (LZNX114)	1449/1496 (97%)	4/1496 (0%)
A-9	Uncultured Tissierella sp. clone (LZNX114)	1445/1492 (97%)	1/1492 (0%)
A-10	Uncultured bacterium clone (A35_D28_L_B_C11)	1381/1514 (91%)	19/1514 (1%)

리지복토의 칼슘 함량을 측정해본 결과, 양질토사복토의 칼슘 함유량은 3.9%이고 고화슬리지복토의 칼슘 함유량은 7.2%로 고화슬리지복토의 칼슘함량이 양질토사복토에 비해 더 높았다. 따라서 고화슬리지복토와 같은 고농도의 칼슘을 함

Table 3. Identified species by 16S rRNA gene analysis from the enrichment with solidified sludge cover soil of a S landfill

Sample	Closed microorganism (NCBI No.)	Identities	Gaps
B-1	Uncultured bacterium clone (VHW_D_R14)	1494/1497 (99%)	0/1497 (0%)
B-2	Uncultured feedlot manure bacterium (B32)	1478/1491 (99%)	6/1491 (0%)
B-3	Uncultured feedlot manure bacterium (B32)	1355/1504 (90%)	32/1504 (2%)
B-4	Uncultured bacterium clone (VHW_D_R14)	1491/1500 (99%)	3/1500 (0%)
B-5	Uncultured bacterium clone (VHW_D_R14)	1493/1498 (99%)	1/1498 (0%)
B-6	Uncultured bacterium clone (VHW_D_R14)	1494/1499 (99%)	2/1499 (0%)
B-7	Uncultured feedlot manure bacterium (B32)	1480/1492 (99%)	5/1492 (0%)
B-8	Uncultured bacterium clone (VHW_D_R14)	1493/1498 (99%)	1/1498 (0%)
B-9	Clostridium hastiforme rm gene strain (DSM 5675)	1435/1501 (96%)	9/1501 (1%)

유한 경우가 생광물화와 관련된 근연종이 상대적으로 더 많이 존재한다는 것을 확인하였다.

3.2. Bottle test

광물 종류별(CaCl₂, MgCl₂, CaCl₂-MgCl₂) 각 농도를 25 mM,

Fig. 3. Phylogenetic tree of solidified sludge cover soil of a S landfill cover soil.

Fig. 4. Temporal variation of aqueous pH in the bottle test employing different types of minerals along with their concentrations ((a) 25 mM CaCl_2 , (b) 50 mM CaCl_2 , (c) 75 mM CaCl_2 , (d) 25 mM MgCl_2 , (e) 25 mM $\text{CaCl}_2\text{-MgCl}_2$).

50 mM, 및 75 mM까지 변화시키며 최적 생광물화능을 나타내는 농도를 bottle test를 통하여 결정하였다.

총 72시간의 배양시간 동안 12시간 간격으로 시료를 채취하여 pH 변화, NH_4^+ 이온의 농도 변화, Ca^{2+} 이온 농도 변화, Mg^{2+} 이온 농도 변화, 미생물 활성도(OD_{600}) 등을 측정하였다. 또한, serum bottle의 head space에 존재하는 가스를 채취하여 배양시간에 따른 CO_2 gas의 농도 변화를 관찰하였다.

배양시간에 따른 대상매체 광물의 종류와 농도변화에 대한 pH 변화를 Fig. 4에 나타내었다. 광물의 종류와 농도변화에 관계없이 pH의 경우 생광물화가 일어난 실험군에서만 pH 5.5에서 9까지 증가하는 것을 볼 수 있었다. 이는 urea

가 미생물의 효소작용에 의해 암모늄과 수산화이온으로 분해되어 수산화기의 농도가 증가하였기 때문으로 판단되었다. 미생물에 의해 야기되는 탄산칼슘 침전은 pH 8.3 ± 1.0 에서 시작해서 9.0에서 완료되므로¹⁹⁾ pH가 5.5로 변화없는 대조군(control 1, control 2, control 3)과 pH가 6~7 범위에 있는 양질토사복토 유래 토착 미생물(test 2)에서는 탄산칼슘 침전물이 관찰되지 않았다.

urea의 가수분해 산물인 암모늄이온(NH_4^+)의 농도는 urease activity를 알아보는 지표로서 사용된다.²³⁾ urea의 가수분해시 암모늄과 수산화이온이 동시에 동일 물 비로 분해되기 때문에 발생된 암모늄 농도가 높다는 것은 urease activity

Fig. 5. Temporal variation of aqueous NH_4^+ in the bottle test employing different types of minerals along with their concentrations ((a) 25 mM CaCl_2 , (b) 50 mM CaCl_2 , (c) 75 mM CaCl_2 , (d) 25 mM MgCl_2 , (e) 25 mM $\text{CaCl}_2\text{-MgCl}_2$).

가 높은 것을 의미하며 이 때 pH도 증가하게 된다. 배양시간에 따른 암모늄이온(NH_4^+)의 농도와 이산화탄소 가스 농도 변화를 각각 Fig. 5, 6에 나타내었다. CaCl_2 수용액의 농도 변화(25 mM, 50 mM, 75 mM) 실험에서, 25 mM일 경우 *Bacillus pasteurii*를 주입한 실험군(test 1)에서 85 mg/L의 암모늄이온(NH_4^+)이 생성되었고, 12시간 내에 이산화탄소 가스가 모두 head pace에서 제거되었다. 또한 50 mM 일 경우, 고화슬러지복토 유래 토착미생물을 주입한 실험군(test 3)에서 47.3 mg/L의 암모늄이온(NH_4^+)이 생성되었고, 36시간 내에 이산화탄소 가스가 모두 head pace에서 제거되었다. 반면 75 mM일 경우 *Bacillus pasteurii*와 고화슬러지

복토 유래 토착 미생물을 주입한 실험군(test 1, test 3)에서 각각 3.19, 29.5 mg/L의 암모늄이온(NH_4^+)이 생성되었으나 이산화탄소 가스 농도변화는 미미하였다. 이는 urea 분해에 의해 증가된 pH로 인해 용액 내 이산화탄소의 용해도가 높아졌기 때문에 생광물화도 동시에 촉진되었기 때문으로 판단되었다.²⁴⁾ 그러나 대조군과 test 2의 경우 그와 같은 양상의 변화를 볼 수 없었다.

Fig. 7은 배양시간에 따른 광물 종류와 농도에 대한 미생물 활동도(OD_{600}) 변화를 나타낸 것이다. 미생물 활동도의 경우 농도와 관계없이 대조군은 거의 활성을 띠지 않고 실험군은 증가하다 감소하는 것을 볼 수 있었다. 이는 실험군의

Fig. 6. Temporal variation of CO_2 gas from the head space in the bottle test employing different types of minerals along with their concentrations ((a) 25 mM CaCl_2 , (b) 50 mM CaCl_2 , (c) 75 mM CaCl_2 , (d) 25 mM MgCl_2 , (e) 25 mM $\text{CaCl}_2\text{-MgCl}_2$).

경우 배양 초기 미생물의 신진대사가 증가하다가 시간이 경과함에 따라 그 활성이 감소하였기 때문으로 여겨졌다.

배양시간에 따른 Ca^{2+} 농도와 Mg^{2+} 농도 변화를 각각 Fig. 8, Fig. 9에 나타내었다. Fig. 8에서 보는바와 같이 수용액 내 Ca^{2+} 농도의 경우 CaCl_2 를 생광물화 매체로 이용한 경우 12 시간 후 92%까지 감소하였으나 $\text{CaCl}_2\text{-MgCl}_2$ 의 경우 36 시간 후 85%까지 감소하여 그 반응시간 및 효율이 저하되는 것을 나타냈다. Fig. 9에 나타낸 바와 같이 Mg^{2+} 의 경우 MgCl_2 및 $\text{CaCl}_2\text{-MgCl}_2$ 을 반응매체로 이용한 경우 그 반응시간이 48시간까지 연장되더라도 각각 46% 및 38.5%의 낮은 감소율을 보였다. 따라서 해당 미생물의 생광물화 특성

이 사용하는 매체의 종류에 크게 영향을 받을 수 있었다. 즉 해당 미생물이 특정 알칼리금속의 생광물화에 더 선택적으로 작용함을 나타내는 것이다.²⁵⁾

미생물이 혼합되지 않은 대조군(control 1), 사멸시킨 미생물이 혼합된 대조군(control 2), 1% NaN_3 가 혼합된 대조군(control 3)과 양질토사복토 유래 토착 미생물을 이용한 실험군(test 2)에서는 생광물화 지표 인자가 배양시간에 따라 큰 변화가 없는 것으로 보아, 생광물화가 발생하지 않은 것으로 판단하였다.

광물 종류별 실험을 진행한 경우, CaCl_2 , MgCl_2 , $\text{CaCl}_2\text{-MgCl}_2$ 에 대해 각각 85, 88, 42 mg/L의 암모늄이온(NH_4^+)이

Fig. 7. Temporal variation of OD₆₀₀ in the bottle test employing different types of minerals along with their concentrations ((a) 25 mM CaCl₂, (b) 50 mM CaCl₂, (c) 75 mM CaCl₂, (d) 25 mM MgCl₂, (e) 25 mM CaCl₂-MgCl₂).

생성되었고 이 때 각각 12, 12, 24시간 후에 이산화탄소 가스가 head space에서 검출되지 않은 것으로 보아 주입된 CO₂ gas 모두 용액상의 시료에 흡수 또는 고체 매체에 고정된 것을 알 수 있었다. MgCl₂를 이용한 실험 결과, Mg²⁺이온 농도가 48시간 후 46%로 매우 낮은 효율로 제거되었다. 이는 생광물화에 의해 Mg²⁺이온이 제거된 것이 아니라 주입된 이산화탄소는 물에 용해되어 중탄산 이온으로 전환된 후 Mg²⁺이온과 반응하여 Mg(HCO₃)₂로 생성되기 때문에⁵⁾ 그 제거 농도가 칼슘이온만큼 높지는 않고 그 제거속도 또한 빠르지 않은 것을 확인할 수 있었다.

혼합 광물질(CaCl₂-MgCl₂)을 이용한 실험 결과, 단일 수용

액(CaCl₂, MgCl₂)과 pH변화는 비슷한 경향을 보였으나 Ca²⁺이온농도는 36시간 후 85%, Mg²⁺이온농도는 48시간 후 38.5%로 매우 낮은 효율로 감소하였다. Ca²⁺이온농도의 경우 단일 CaCl₂를 사용한 경우보다 낮은 제거효율과 긴 반응시간을 나타내었다. 이는 생광물화에 의한 탄산칼슘 침전 시 Mg²⁺이온이 공존할 경우, Mg²⁺분자가 탄산칼슘 결정 표면 위에 균일하지 않게 분포되어 CaCO₃결정 형성에 영향을 미치는 동시에 그 상층에 새로운 형태의 결정을 형성하기 때문에 CaCO₃ 성장이 더욱 저해되어 Ca²⁺이온의 감소속도가 느려진다고 보고된 것과 일치한다.²⁵⁾ 따라서 CaCl₂-MgCl₂ 혼합 수용액을 사용하는 것 보다 CaCl₂ 단일 수용액

Fig. 8. Temporal variation of aqueous Ca^{2+} in the bottle test employing different types of minerals along with their concentrations ((a) 25 mM CaCl_2 , (b) 50 mM CaCl_2 , (c) 75 mM CaCl_2 , (d) 25 mM $\text{CaCl}_2\text{-MgCl}_2$).

Fig. 9. Temporal variation of aqueous Mg^{2+} in the bottle test employing different types of minerals along with their concentrations ((a) 25 mM MgCl_2 , (b) 25 mM $\text{CaCl}_2\text{-MgCl}_2$).

이 생광물화 반응에 더 선택적으로 적합하다는 것을 알 수 있었다.

3.3. XRD 분석

실험 종료 후 생광물화에 의한 탄산염광물의 생성 가능성을 조사하기 위하여 X-선 회절분석(X-ray diffraction)을 수행하였다. X-선 회절분석은 실험 종료 후 시료를 상온에서 24시간 이상 건조시킨 후 분석하였다. 각 실험에 대한 XRD

분석 결과를 Fig. 10, 11에 나타내었다. X-선 회절분석 결과 25 mM CaCl_2 과 25 mM MgCl_2 의 경우 test 1과 test 3에서 각각 CaCO_3 (Calcite)와 MgCO_3 (Magnesite)가 검출되었다. 이는 *Bacillus pasteurii*와 고화슬러지복토 유래 토착 미생물에 의해 생광물화가 발생한 것임을 확인할 수 있었다. 그러나 50 mM CaCl_2 , 75 mM CaCl_2 , 25 mM $\text{CaCl}_2\text{-MgCl}_2$ 의 경우 test 1의 분석가용 시료량이 매우 미미(즉, 생성광물질의 양이 무시할 만큼 매우 작았음. 이는 생광물화 정도가 절대

Fig. 10. Results of XRD analysis (●: CaCO_3 , †: MgCO_3) ((a) with *Bacillus pasteurii*, (b) with indigenous microorganism in the solidified sludge cover soil (25 mM CaCl_2), (c) with *Bacillus pasteurii*, (d) with indigenous microorganism in the solidified sludge cover soil (25 mM MgCl_2)).

Fig. 11. Results of XRD analysis (●: CaCO_3 , †: MgCO_3) ((a) 50 mM CaCl_2 , (b) 75 mM CaCl_2 , (c) 25 mM CaCl_2 - MgCl_2 with indigenous microorganism in the solidified sludge cover soil).

Fig. 12. SEM image after biominingalization ((a) with *Bacillus pasteurii* (25 mM CaCl_2), (b) with indigenous microorganism in the solidified sludge cover soil (25 mM CaCl_2), (c) with *Bacillus pasteurii* (25 mM MgCl_2), (d) with indigenous microorganism in the solidified sludge cover soil (25 mM MgCl_2)).

Fig. 13. SEM image after biomaterialization ((a) 50 mM CaCl_2 , (b) 75 mM CaCl_2 , (c), (d) 25 mM $\text{CaCl}_2\text{-MgCl}_2$ with indigenous micro-organisms in the solidified sludge cover soil).

적으로 미미하거나 낮은 것을 의미함)하여 test 3만 분석을 수행할 수 있었다.

3.4. SEM 분석

생광물화 반응 전·후의 생성물의 형태학적 특성을 확인하기 위하여 실험 종료 후 주사전자현미경(Scanning Electron Microscope) 사진을 촬영하였다. SEM 분석 결과를 Fig. 12, 13에 나타내었다. XRD분석결과 마찬가지로 25 mM CaCl_2 와 25 mM MgCl_2 의 경우 test 1과 test 3로부터 모두 특정 결정 구조가 관찰되었으나 50 mM CaCl_2 , 75 mM CaCl_2 , 25 mM $\text{CaCl}_2\text{-MgCl}_2$ 의 경우 test 1의 분석가용 시료량이 극히 미미(3.3에 이유 언급)하여 test 3만 분석이 가능하였다. 생성된 결정체는 회전 타원체 모양인 결정체와 사다리꼴 모양인 결정체로 확인하였는데 이는 각각 X-선 회절분석으로 관찰된 CaCO_3 (Calcite)와 MgCO_3 (Magnesite)임을 확인할 수 있었다.^{25,26)}

4. 결론

본 연구에서는 대표적 온실가스인 이산화탄소를 저감하기 위하여 생광물화 관련 미생물인 *Bacillus pasteurii* 종과 복토재 내 토착 미생물을 분리하여 농도별(25 mM, 50 mM, 75 mM), 광물별(Ca, Mg, Ca-Mg)로 생광물화 실험을 수행하였다. 그 과정에서 생광물화에 지배적으로 영향을 미치는 실험인자를 비교평가 하고자 하였다.

1) 매립지 중간 복토재로 사용된 양질토사와 슬러지 고화토 중 미생물을 각각 추출 배양하여 생광물화 실험에 이용

하였는데 그 가운데 고화슬러지복토 유래 토착 미생물이 양질토사 유래 토착 미생물 보다 생광물화에 더 기여하는 것을 보였다.

2) 농도별로 CaCl_2 수용액을 사용한 경우, *Bacillus pasteurii*와 고화슬러지복토 유래 토착 미생물을 주입한 실험군(test 1, test 3)에서만 25 mM, 50 mM, 75 mM에서 각각 85, 47.3, 29.5 mg/L의 암모늄이온(NH_4^+)이 생성되었고 12, 36, 72시간 내에 이산화탄소 가스가 제거되었다.

3) 광물별 다른 이온을 사용한 실험의 경우, CaCl_2 , MgCl_2 , $\text{CaCl}_2\text{-MgCl}_2$ 에 대해 각각 85, 88, 42 mg/L의 암모늄이온(NH_4^+)이 생성되었고, 각각 이산화탄소 가스가 12, 12, 24시간 후에 검출되지 않은 것으로 보아 용액에 흡수 또는 생광물화(고정)된 것으로 판단된다.

4) 광물의 종류와 농도변화에 관계없이 pH의 경우 생광물화가 일어난 실험군에서만 pH 5.5에서 9까지 증가하는 것을 볼 수 있었다. 미생물 활성도(OD_{600})의 경우 대조군(control)은 거의 활성이 없었고 실험군(test)의 경우 배양초기 그 값이 증가하다 감소하는 경향을 보였다.

5) X-선 회절분석 및 SEM 사진 촬영 결과, 생광물화 미생물이나 Ca^{2+} 이온이 상대적으로 높은 농도로 함유된 고체 매체의 경우에서만 능면체가 회전 타원체 모양의 결정체와 사다리꼴 모양의 결정체인 CaCO_3 (Calcite)와 MgCO_3 (Magnesite)가 생성되었다.

6) 생광물화 반응중 이산화탄소 농도 변화와 영향인자를 비교평가 해 본 결과, 미생물을 혼합하지 않은 시료에서보다 미생물을 혼합한 시료에서 이산화탄소 감소량이 더 높았다. 따라서 생광물화반응의 기작을 이용하여 증장기적으로 지속적이며 경제적으로 대기 중 혹은 배기가스 중 이산화탄소를 생물학적으로 무기물인 광물질로 고효율로 안정하게

고정시키는 데 기여할 것으로 여겨진다. 또한 하수슬러지 고화처리를 통해 생산된 슬러지 고화물에 이산화탄소 고정 미생물을 접종하여 복토재로 활용한다면 슬러지 안정화 기간 동안 매립지 복토층에서 발생하는 이산화탄소와 같은 온실가스의 효율적인 저감을 기대할 수 있을 것이다.

사 사

본 연구는 한국연구재단의 2012년도 하반기 일반연구자지원사업 “알칼리금속 releaser를 이용한 CO₂ Biomineralization 고도화” 과제의 지원으로 수행되었습니다.

KSEE

참고문헌

- Kim, J., “Status and prospect of carbon dioxide storage technologies,” *KIC News*, **12**(2), 31~41(2009).
- Park, C. K., “Climate changes; Its impacts and our strategy to address it,” *J. Kor. Soc. Environ. Eng.*, **30**(12), 1179~1183 (2008).
- Wang, S. K., “Geological carbon sequestration: Now and after,” *KIC News*, **12**(2), 1~10(2009).
- Chae, G. T., Yun, S. T., Choi, B. Y. and Kim, K. J., Shevailer, M., “Geochemical concept and technical development of geological CO₂ sequestration for reduction CO₂,” *Econ. Environ. Geol.*, **38**(1), 1~2(2005).
- Min, D. H., “CO₂ biomineralization characteristics and its applicability for solidified sludge,” Master of science dissertation, Inha University, Incheon, Korea(2011).
- Bond, G. M., Stringer, J., Brandvold, D. K., Simsek, F. A., Medina, M. G. and Egeland, G., “Development of integrated system for biomimetic CO₂ sequestration using the enzyme carbonic anhydrase,” *Energy Fuels*, **15**(2), 309~316(2001).
- Mirjafari, P., Asghari, K. and Mahinpey, N., “Investigating the application of enzyme carbonic anhydrase for CO₂ sequestration purposes,” *Ind. Eng. Chem. Res.*, **46**(3), 921~926 (2007).
- Mari, V., Yoon, Y. I., Nam, S. C., Baek, I. H. and Jeong, S. K., “CO₂ conversion to CaCO₃ by immobilized carbonic anhydrase,” *KIC News*, **15**(2), 32~40(2012).
- Cacchio, P., Ercole, C., Cappuccio, G. and Lepidi, A., “Calcium carbonate precipitation by bacterial strains isolated from a limestone cave and from a loamy soil,” *Geomicrobiol. J.*, **20**(2), 85~98(2003).
- Whiffin, V. S., Van Paassen, L. A. and Harkes, M. P., “Microbial carbonate precipitation as a soil improvement technique,” *Geomicrobiol. J.*, **24**(5), 417~423(2007).
- Jansson, C. and Northen, T., “Calcifying cyanobacteria-the potential of biomineralization for carbon capture and storage,” *Curr. Opin. Biotechnol.*, **21**(3), 365~371(2010).
- Lian, B., Hu, Q., Chen, J., Ji, J. and Teng, H. H., “Carbonate biomineralization induced by soil bacterium *Bacillus megaterium*,” *Geochim. Cosmochim. Acta*, **70**(22), 5522~5535 (2006).
- Castanier, S., Metayer-Levrel, G. L. and Perthuisot, J. P., “Ca-carbonates precipitation and limestone genesis-the microbiogeologist point of view,” *Sedimentary Geol.*, **126**(1-4), 9~23 (1999).
- Al - Thawadi, S. M., “Ureolytic bacteria and calcium carbonate formation as a mechanism of strength enhancement of sand,” *J. Adv. Sci. Eng. Res.*, **1**(1), 98~114(2011).
- Jahns, T., “Ammonium/urea-dependent generation of a proton electrochemical potential and synthesis of ATP in *Bacillus pateruii*,” *J. Bacteriol.*, **178**(2), 403~409(1999).
- Li, W., Liu, L. P., Zhou, P. P., Cao, L., Yu, L. J. and Jiang, S. Y., “Calcite precipitation induced by bacteria and bacterially produced carbonic anhydrase,” *Curr. Sci.*, **100**(4), 502~509(2011).
- Achal, V. and Pan, X., “Characterization of urease and carbonic anhydrase producing bacteria and their role in calcite precipitation,” *Curr. Microbiol.*, **62**(3), 894~902(2011).
- Kim, D. H., “Study on the capture of carbon dioxide using biocatalysts,” Master of science dissertation, Korea University, Seoul, Korea(2011).
- Stocks-Fischer, S., Galinat, J. K., and Bang, S. S., “Microbiological precipitation of CaCO₃,” *Soil Biol. Biochem.*, **31**(11), 1563~1571(1999).
- Clesceri, L. S., Greenberg, A. E. and Eaton, A. D., Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20 ed., American Public Health Association: Washington D. C., (1998).
- Kwak, W. J., “Evaluation of nitrogen removal efficiency for low strength wastewater with ANAMMOX process,” Master of science dissertation, Inha University, Incheon, Korea (2012).
- Wikipedia, http://en.wikipedia.org/wiki/Clostridium_sporogenes, October(2011).
- Kandeler, E. and Gerber, H., “Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium,” *Biol. Fertil. Soils*, **6**(1), 68~72(1988).
- Mitchell, A. C., Dideriksen, K., Spangler, L. H., Cunningham, A. B. and Gerlach, R., “Microbially enhanced carbon capture and storage by mineral-trapping and solubility-trapping,” *Environ. Sci. Technol.*, **44**(13), 5270~5276(2010).
- Zhang, Y. and Dawe, R. A., “Influence of Mg²⁺ on the kinetics of calcite precipitation and calcite crystal morphology,” *Chem. Geol.*, **163**(1-4), 129~138(2000).
- Warren, L. A., Maurice, P. A., Parmar, N. and Ferris, F. G., “Microbially mediated calcium carbonate precipitation: Implications for interpreting calcite precipitation and for solid-phase capture of inorganic contaminants,” *Geomicrobiol. J.*, **18**(1), 93~115(2001).