

Characterization of Urease-Producing Bacteria Isolated from Heavy Metal Contaminated Mine Soil

Min-Jeong Park^{1,2}, Min-Ho Yoon², and In-Hyun Nam^{1*}

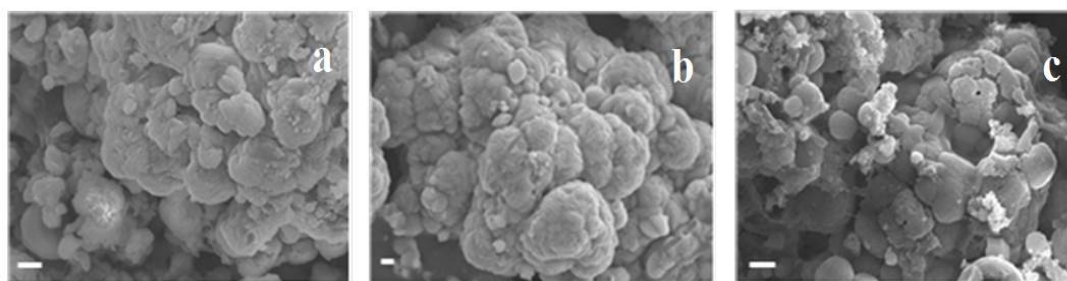
¹Geologic Environment Division, Korea Institute of Geoscience and Mineral Resources (KIGAM), Daejeon, 305-350, Korea

²Department of Bio Environmental Chemistry, Chungnam National University, 305-764, Korea

(Received: December 5 2014, Revised: December 24 2014, Accepted: December 25 2014)

Acid mine drainage occurrence is a serious environmental problem by mining industry; it usually contain high levels of metal ions, such as iron, copper, zinc, aluminum, and manganese, as well as metalloids of which arsenic is generally of greatest concern. It causes mine impacted soil pollution with mining and smelting activities, fossil fuel combustion, and waste disposal. In the present study, three bacterial strains capable of producing urease were isolated by selective enrichment of heavy metal contaminated soils from a mine-impacted area. All isolated bacterial strains were identified *Sporosarcina pasteurii* with more than 98% of similarity, therefore they were named *Sporosarcina* sp. KM-01, KM-07, and KM-12. The heavy metals detected from the collected mine soils containing bacterial isolates as Mn (170.50 mg kg⁻¹), As (114.05 mg kg⁻¹), Zn (92.07 mg kg⁻¹), Cu (62.44 mg kg⁻¹), and Pb (40.29 mg kg⁻¹). The KM-01, KM-07, and KM-12 strains were shown to be able to precipitate calcium carbonate using urea as a energy source that was amended with calcium chloride. SEM-EDS analyses showed that calcium carbonate was successfully produced and increased with time. To confirm the calcium carbonate precipitation ability, urease activity and precipitate weight were also measured and compared. These results demonstrate that all isolated bacterial strains could potentially be used in the bioremediation of acidic soil contaminated by heavy metals by mining activity.

Key words: Heavy metal contamination, Urease, Calcium carbonate precipitation, Bioremediation



Element	Weight(%)	Atomic(%)	Element	Weight(%)	Atomic(%)	Element	Weight(%)	Atomic(%)
C K	8.53	14.95	C K	10.91	18.14	C K	12.54	19.88
O K	46.80	61.59	O K	50.04	62.42	O K	53.91	64.18
Ca K	44.67	23.46	Ca K	39.04	19.44	Ca K	33.55	15.94
Totals	100		Totals	100		Totals	100	

Results of precipitated CaCO₃ by *Sporosarcina* sp. KM-01(a), KM-07(b), and KM-12(c).

*Corresponding author : Phone: +82428683164, Fax: +82428683414, E-mail: nih@kigam.re.kr

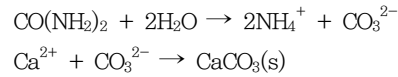
§Acknowledgement: This subject is supported by Korea Ministry of Environment (MOE) as “GAIA program” (Project No. 2013-000550003).

Introduction

국내에 산재해 있는 폐광산지역은 채광, 선광, 제련과정 등의 광산활동 후 적절한 환경오염 처리가 되지 않고 장기간 방치되어 주변 토양의 중금속 오염 또는 산성배수에 의해 침출수가 유출되거나 광산폐기물의 유실 및 그로부터 발생한 분진의 분산, 집중 호우나 강풍에 의한 하부 침식 등으로 지속적인 오염 확산이 이루어지고 있다 (Jung et al., 2001; Lee et al., 2004). 전국적으로 존재하는 휴/폐광산은 금, 은, 동으로 대표되는 광산 개발에 의한 비소 오염과 금속 광산의 특징에 따라 Cd, Cu, Pb, Al 등의 오염도가 높은 것으로 평가되고, 주변의 토양오염도는 대략 50% 수준의 광산이 우려기준을 초과한다 (Jung and Jung, 2006). 이렇게 오염된 토양을 복원하기 위해 토양 안정화제로 석회석 (CaCO₃), 소석회 (Ca(OH)₂) 등과 같은 알칼리 재료와 Fe, Al, Mn 등의 금속산화물, 점토, 인산염, 퇴비, 산업부산물, Red mud (적토), 슬러지 (alum sludge) 등을 활용한 산성토양 중화 및 개량을 위한 연구가 진행되어왔다 (Kang et al., 2011; Yun et al., 2011). 이 중에서 탄산염 광물은 산화작용에 의한 산성화 반응에 대해 완충효과를 가질 수 있어 pH를 증가시키고 금속이온들을 산화물 또는 수산화물 형태로 침전시켜 제거하여 중금속 안정화에 효과적인 물질로 알려져 있다 (Ahn, 2000).

토양에 존재하는 일부 미생물은 요소와 칼슘원 등이 주어지는 적합한 환경일 경우, Urease (요소분해효소)를 유도하여 그 주변에 탄산칼슘과 같은 광물질을 생성하게 되는데, 미생물 대사활동에 의해 요소를 가수분해하여 얻어지는 탄산염 이온과 염화칼슘 등의 칼슘원으로부터 탄산칼슘을 침전시키는 MICP (Microbially Induced Calcite Precipitation) 과정이다 (DeJong et al., 2006; Kawasaki et al., 2010; Mitchell and Santamarina, 2005; Terajima et al., 2009; Van Paassen et al., 2010; Whiffin et al., 2007). Urease는 일부 미생물과 식물에서 발견되고 있으며, 특히 박테리아 Urease는 자연에서 질소화합물의 환경적 변환에 주요역할을 담당한다. 이 역할에는 인체와 동물의 질병원인, 반추동물의 질소대사 및 영양, 농경지의 질소순환 등을 포함한다 (Min and Lee, 2007). 박테리아에서 보고된 Urease 유전자는 구조적 배열이 매우 유사한 형태의 7개 이상의 유전자로 구성되어 있다. Urease는 구조단백질 (UreA, UreB 및 UreC)과 보조단백질 (UreD, UreE, UreF 및 UreG)로 나뉜다. 구조단백질은 효소활성에 중심역할을 담당하며 보조단백질은 구조단백질에 Ni²⁺를 운반 및 조립을 담당한다 (Kim et al., 2009). 일반적으로 박테리아 urease는 200~250 kD의 분자량을 나타낸다 (Min, 2001). 요소는 Urease에 의해 가수분해되어 2 mole의 암모늄 이온과 1 mole의 탄산이온을 생성하는 생물학적 촉매 효소로서, 생성된 암모니아는 주변의 pH를 상승

시켜 탄산칼슘 생성에 적합한 환경을 조성해준다 (Chung, 1998; Muynck et al., 2010). 이 반응에서 생성된 탄산이온과 적절한 칼슘원이 공급되면 다음과 같이 탄산칼슘의 침전이 이루어진다.



또한, Urease는 시멘트나 토양의 고결 작용을 유도하는 것으로 알려져 있어서 토양 박테리아의 하나인 *Sporosarcina pasteurii*의 urease는 요소 분해로 만들어진 탄산이온을 이용하여 불용성의 탄산칼슘을 생성하고 침전을 유도하며, 이러한 미생물 및 식물 등의 Urease를 활용하여 탄산칼슘의 침전을 유도할 경우, 약화된 지반을 친환경적으로 매우거나 고결시켜 지반의 강도 증가 및 투수계수 저하로 인한 오염물질의 차단과 같은 효과를 기대할 수도 있다 (Lee and Park, 2012; Park et al., 2011).

따라서, 본 연구에서는 폐광산 지역 토양 내에 존재하는 중금속 등의 오염물질을 안정화시켜 그로부터 발생하는 침출수 내 중금속 농도 저감에 도움이 되는 Urease 활성을 갖는 박테리아 분리를 목적으로 Urease 활성이 강한 균주를 선별하여 이들의 미생물학적 특성과 생화학적 활성을 조사 및 관찰하였다.

Materials and Methods

균주의 분리 동정 및 생육도 확인 박테리아 균주 분리를 위해 부산에 위치한 폐금속광산 갯구 주변 토양 30 g을 멸균된 Falcon tube에 채취하였다. 본 실험에서 Urease 생성 박테리아를 분리 및 동정하기 위해 배지는 Urea배지 (2% Yeast extract, 1% NH₄Cl, 0.3% NaCl, 2% Urea)를 사용하였고, 고체배지로는 1.5% Agar를 함유한 Urea 배지를 사용하였다 (Muynck et al., 2010). 채취한 시료들로부터 Urease를 생성하는 균주를 분리하기 위해 99 mL Urea 액체 배지에 채취 토양을 1 g을 넣어 Shaking incubator (160 rpm, 28°C)에서 48시간 동안 현탁 하였고, 현탁액을 20 mM Phosphate buffer (pH 7.0)로 희석하여 Urea 고체배지에 도말한 후 28°C에서 24시간 정치 배양하였다. 약 20 종의 다양한 집락을 Urea 고체배지에 접종한 후 균주를 각각 순수 분리 하였다. 이 중에서 Urease의 Activity를 가지는 균주들을 순수 분리하여 얻은 colony를 16S rRNA 유전자의 염기서열을 분석하였다. 이때 primer는 518F (5'-CCA GCA GCC GCG GTA ATA CG-3')와 800R (5'-TAC CAG GGT ATC TAA TCC-3')을 사용하였고, 분석된 염기서열은 The National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) algorithm을 통해 Gene Bank database

와 비교하여 분리된 미생물을 동정하였다. 분석된 16S rRNA gene 염기서열은 Bioedit (Ver. 7.0)을 이용해 정렬하였고, Phylogenetic analysis에 사용한 16S rRNA gene sequence는 NCBI data base에 근거하였으며, Phylogenetic tree는 MEGA (Ver. 6.0) 프로그램을 이용하여 neighbor-joining method를 사용하여 1,000번의 bootstrap analysis를 진행하여 미생물의 종 유연성 분석을 하였다. 또한, 분리균주의 생육도를 확인하기 위하여 Urea 액체배지 100 mL에 전배양한 균을 5 µL 접종하여 Shaking incubator (28°C, 160 rpm)에서 진탕 배양하였다. 배양 동안에 0, 4, 8, 12, 24, 30, 36, 48, 60, 72 시간 배양액을 1 mL 취하여 분광광도계 (DR/4000U spectro-photometer, HACH)로 600 nm에서 흡광도를 측정하였다.

균주 분리토양 특성 및 오염도 분석 균주 분리를 위해 채취한 광산지역 토양 내 중금속 오염농도를 확인하기 위하여 왕수추출법을 통한 토양 내 중금속 함량을 측정하였다. 중금속함량을 확인하기 위한 실험에는 건조하여 2 mm 체거름한 토양을 사용하였다. 250 mL 반응용기에 토양 3 g, 35% HCl 21 mL, 70% HNO₃ 7 mL을 가한 후 흡수용기에 0.5 M HNO₃ 15 mL을 첨가하고 흡수용기와 환류냉각관을 반응용기에 연결시켜 유기물이 천천히 산화되도록 2시간 동안 상태를 유지시키고, 온도를 서서히 올려 환류조건에 도달하도록 하여 2시간동안 상태를 유지시키고, 분해가 끝나면 반응용기를 냉각시켰다. 흡수용기 내 내용물을 환류냉각관을 통하여 반응용기에 첨가하였는데 흡수용기와 환류냉각관을 0.5 M HNO₃으로 세척하여 반응용기에 넣었다. Whatman No. 40 여과지로 100 mL 부피플라스크에 여과하고 불용성 잔류물을 여과지 위에서 최소량의 0.5M HNO₃을 이용하여 세척한 후 0.5M HNO₃으로 100 mL까지 채워 냉장보관 하였다. 이렇게 준비된 분석시료는 증류수를 이용하여 희석한 후 ICP-AES (Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometer, ULTIMA2, Horiba)로 분석하였다. 균주 분리를 위해 사용한 토양의 특성 분석을 실시하였다. 50 mL 원심분리 튜브에 토양 4 g과 3차 증류수 40 mL를 첨가하여 150 rpm에서 6시간동안 진탕하였다. 반응 후, 3분간 2000 rpm으로 원심분리하였고, 상등액을 0.45 µm membrane filter를 이용하여 여과한 용액을 얻어 pH/COND METER (D-54, Horiba)를 사용하여 pH와 EC (Electric Conductivity)를 측정하였다.

분리균주의 Urease 활성 측정 분리한 박테리아 균주들의 Urease 활성을 측정하기 위해 Urea 액체배지 100 mL에 전배양한 균을 접종하여 28°C에서 160 rpm으로 72시간 동안 진탕 배양하였다. 균체는 10분간 원심분리 (4°C, 7,000 x g)하여 얻었으며, Pellet washing을 50 mM sodium phosphate (pH 7.5)로 2회 실시한 후 Lysis buffer (50 mM sodium

phosphate-1 mM EDTA, pH 7.5)로 균체를 현탁하였다. 현탁한 균체를 Sonicator (Analog Sonifier Model-450, BRANSON)로 Output control 3, Duty cycle 70으로 설정하여 10분간 균체를 파괴하였다. 파괴한 균체를 20분간 원심분리 (4°C, 10,000 x g)하여 얻은 상등액을 Urease 활성 측정용 반응액으로 사용하였다. Urease 활성측정을 위한 암모니아 함량의 분석은 Weatherburn의 indophenol법을 사용하였는데 (Burbank et. al., 2012; Weatherburn, 1967), 암모니아가 phenol-hypochlorite와 반응하여 생성된 indophenol이 나타나는 발색정도를 630 nm에서 흡광도를 측정하였다. Urease 반응은 10 mM Urea solution 3 mL과 반응액 10 µL를 첨가하여 섞어준 후 30°C에서 5분간 반응 시켰다. 효소반응액에 2 mL phenol-nitro-prusside와 2 mL alkaline hypochlorite를 첨가하여 60°C에 10분간 증탕하여 반응을 중지한 후에 630 nm에서 흡광도를 측정하였다. Urease 활성도는 준비된 NH₄Cl 희석 용액으로부터 얻어진 표준곡선을 통하여 정량 분석하였다. Urease 활성의 1 unit은 urea를 기질로 하여 매 분당 1 µmol의 urea를 가수 분해 하는데 필요한 효소의 양으로 정의하였다.

CaCO₃ 생성능 확인 분리 균주들에 의해 생성된 CaCO₃ 침전물의 확인을 위해 Urea 액체배지 400 mL에 전배양액 1 mL을 접종하여 28°C에서 160 rpm 진탕 배양하였다. 시간 별로 침전물 생성량을 비교하기 위하여 배양 12시간마다 총 96시간 동안 배양액 25 mL을 회수하여 10분간 원심분리하여 상등액을 제거하였다(4°C, 12,000 x g). 이때 얻은 균체와 침전물을 50°C Dry oven에서 24시간 건조하여 보관 후, 꺼내어서 무게를 측정하였다. 생성된 CaCO₃ 침전물의 형태학적인 확인을 위하여 전자현미경 SEM (Scanning Electron Microscope, JSM-7000F, Jeol) 및 EDS (Energy Dispersive Spectrometer) 분석을 실시하였다. 각 시료를 완전히 상기한 바와 같이 건조 시킨 후 0.5 cm cube pieces로 제작하고 Platinum sputter 코팅을 통해 관찰하였다.

Results and Discussion

Urease 활성 균주의 분리 및 동정 중금속으로 오염된 폐금속광산 주변 토양으로부터 Urease 생성 균주를 분리하기 위하여 Urea 액체 및 고체 배지에 접종, 배양한 후 5 단계의 Selective enrichment를 통해 나타난 집락을 순수 분리하였다. 총 12개의 집락을 순수 분리하여 16S rRNA 유전자의 염기서열을 분석하였다. 분리균주의 16S rRNA 유전자의 염기서열을 blast를 통하여 상동성을 검색한 결과, *Sporosarcina* sp. 7종, *Virgibacillus* sp. 2종, *Bacillus* spp. 3종으로 확인되었다. 12개 균주 중 성장속도가 빠르고 상대적으로 양호한 CaCO₃ 생성능을 나타낸 3개 균주를 선택하여 각각 *Sporosarcina* sp. KM-01, *Sporosarcina* sp. KM-07, *Sporosarcina* sp. KM-12

균주로 명명하였다. 선택된 균주들을 10회 계대배양 한 후 다시 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석한 결과, 각 균주는 *Sporosarcina pasteurii* 균주와 각각 98.87% (KM-01), 99.67% (KM-07), 99.21% (KM-12) 의 상동성을 나타내었다. 이들 3개 균주에 대한 phylogenetic Tree를 작성한 결과를 Fig. 1에 나타내었으며, 3개 균주 모두 *Sporosarcina paseurii*와 상동성이 높게 나타났고, *Sporosarcina siberiensis* 균주와의 유연성도 높은 것으로 나타났다. 기존 연구에서 CaCO₃ 생성능을 가지는 균주들은 주로 중금속 혹은 유기물 등 오염물질이 없는 일반 토양에서 주로 분리가 되었으나 (Mitchell and Muynck et al., 2010; Santamarina 2005; Terajima et al. 2009; Whiffin et al. 2007), 본 연구에서 분리된 박테리아 균주들은 강산성 및 고농도의 중금속으로 오염된 토양에서 분리 및 생존을 확인함으로써 장기간 방치된 다양한 유/무기 물질들과 계속되는 풍화 작용에 의해 특이적 생존 및 진화가 이루어졌음을 예상할 수 있으며, 토양 미생물의 다양성을 보여주는 예라고 할 수 있다.

균주 분리토양 특성 및 오염도 분석 채취한 폐광산 지역 토양 내 중금속 오염도를 확인하기 위해 채취한 토양 시료를 전처리 후, ICP-AES 분석을 통해 중금속에 대한 정성 및 정량 분석을 수행하였다. 그 결과 수 종의 중금속들이 검출 되었는데, 비교적 높은 농도로 분류되는 10 mg kg⁻¹을 초과하는 종들은 Mn (170.50 mg kg⁻¹), As (114.05 mg kg⁻¹), Zn (92.07 mg kg⁻¹), Cu (62.44 mg kg⁻¹), Pb (40. mg kg⁻¹) 등이었다 (Table 1). 상기한 모든 중금속 종이 모두 40 mg kg⁻¹을 상회하는 농도로 극심한 중금속 오염 토양임을 확인할 수 있었고, 특히 Mn 과 As 등의 경우에는 100 mg kg⁻¹을 초과하여 고농도의 오염도를 나타내는 전형적인 폐광산 광산 토양임을 알 수 있다. 본 분석 결과와 같이 휴폐광산 지역 내 토양은 As의 오염이 두드러지는 경우가 많으며, 제련 등의 과정에서 발생하는 광미가 유실되고 갭내수 등의 유출로 Mn, Zn, Pb, Cu, Cd 등의 중금속으로 오염되어 있는 경우가 발생한다 (Jung and Jung, 2006; Kim, 2010; Nam et al., 2012). 따라서, 본 연구에서 분리한 Urease 활

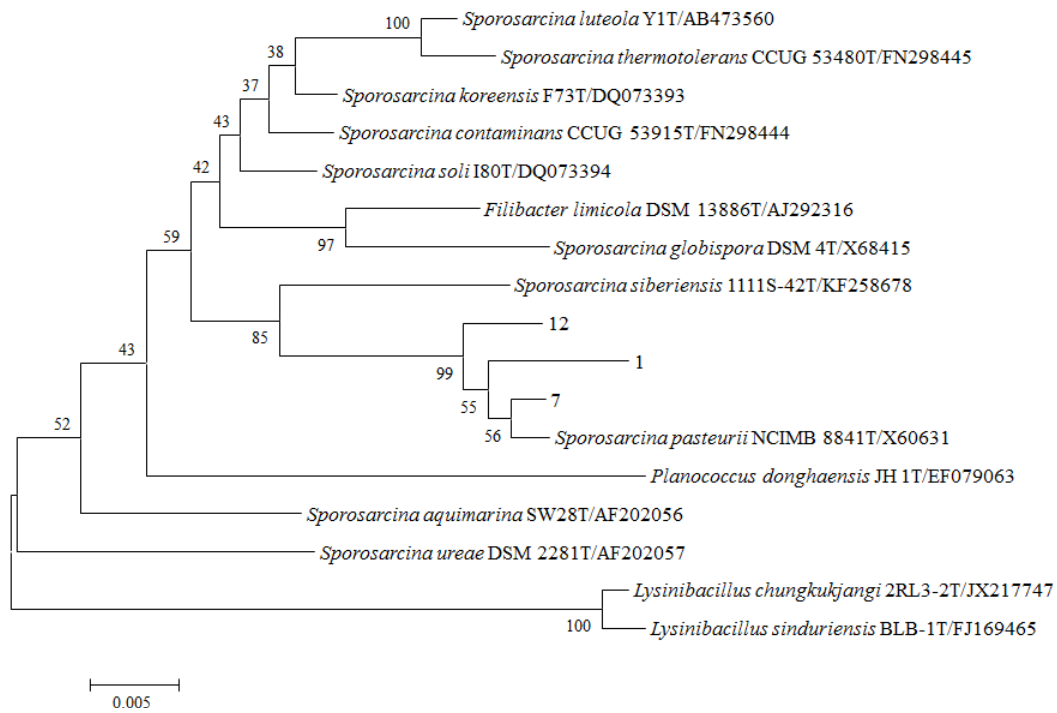


Fig. 1. Phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequences for three bacterial isolates capable of producing urease from heavy metal contaminated mine soil. 1, strain KM-01; 7, strain KM-07; 12, strain KM-12.

Table 1. Metal concentrations and chemical properties in the heavy metal contaminated mine soil containing bacterial isolates used in this study.

Metal concentration					pH	EC [†] μS cm ⁻¹
mg kg ⁻¹						
Mn	As	Zn	Cu	Pb		
170.50	114.05	92.07	62.44	40.29	2.66	1,175

[†]EC: Electric Conductivity

성 균주들은 탄산칼슘 침전능 뿐만 아니라 여러 중금속에 대한 내성도 가지고 있을 것으로 예상할 수 있어서 향후 이와 같은 형태의 오염 토양 복원 시 다양한 분야로 확대 적용할 수 있는 가능성을 가지고 있다. 토양의 특성분석을 위하여 pH와 EC를 측정하였다. 그 결과 토양의 pH가 2.66 으로 강산성 토양임을 확인 할 수 있었다 (Table 1). 또한, EC 측정 결과 (Table 1) 우리나라 농경지보다는 더 높은 값을 나타내어 광화된 상태의 토양임을 알 수 있었다. pH와 EC 측정 결과 균주 분리 실험에 사용한 토양이 비교적 극한환경의 토양임을 확인할 수 있었다.

분리균주의 생육도 확인 *Sporosarcina* sp. KM-01, KM-07, KM-12 균주 등 본 연구에서 분리한 3개 균주의 성장속도의 차이 및 특징을 확인하기 위하여 생육도 확인 실험을 진행하였다. 그 결과 접종 후 8시간 배양까지는 균주 별 성장속도의 차이가 나타나지 않았으나, 12시간 배양 후에는 KM-01 균주가 KM-07, KM-12 균주 대비 보다 빠른 성장 속도를 나타내었고 이후에도 꾸준한 성장을 유지하였다. 반면에, KM-07 균주의 경우에는 KM-01 균주 혹은 KM-12 균주 보다는 성장속도가 다소 느리지만 꾸준한 Cell turbidity 값의 증가를 나타내었다 (Fig. 2). 또한, 본 생육도 확인 실험에서 모든 균주에 대해 전 배양을 통해 접종을 하여 Lag phase가 짧게 빠르게 성장하는 것을 볼 수 있었는데, 이를 실제 오염 지역에 응용 연구 시에 이와 같은 특징을 적용하면 중금속 안정화 혹은 지반 안정화에 빠른 효과를 기대할 수 있을 것으로 판단된다. 균주 별 생육은 Fig. 2에 나타낸 바와 같이 접종 후 72시간까지 꾸준히 유지되는 경향을 보이며, 이들의 성장곡선이 감소하는 시간에 반복 접종 등을 통해 해당

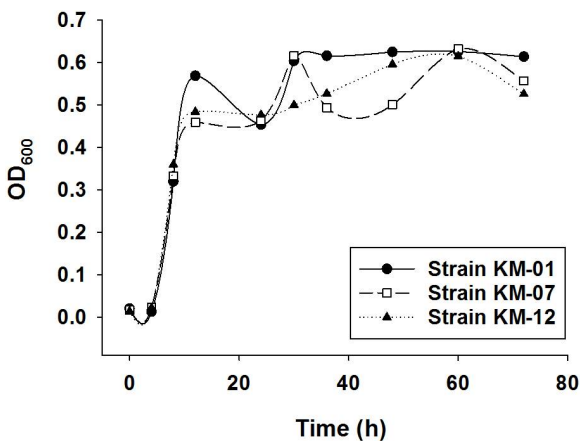


Fig. 2. Growth of urease producing bacteria *Sporosarcina* sp. KM-01, KM-07, and KM-12 isolated from heavy metal contaminated mine soil with time. All bacterial isolates were well grown in the urea based media accompanying with the increase of cell turbidity. Values are the average of three independent measurements. OD₆₀₀ represent optical density value at 600 nm.

활성을 장기간 유지 및 효율을 증대할 수 있을 것으로 기대한다 (Nam et al., 2008).

분리균주의 Urease 활성 측정 폐광산지역 토양으로부터 분리한 박테리아 균주들이 실제로 생화학적 효소 Urease 활성을 갖는지의 여부를 직접적으로 확인하기 위해 분리한 *Sporosarcina* sp. KM-01, KM-07, KM-12 균주들과 비교 균으로 표준 균주 *Sporosarcina pasteurii* KCTC3558 균주를 분양 받아 각각 Crude enzyme extract를 추출하여 Urease 활성을 Weatherburn의 indophenol법을 사용하여 암모니아 함량을 측정 및 비교하였다. 그 결과, Fig. 3에 나타낸 바와 같이 분리한 균주들의 활성을 나타내는 암모니아 농도가 KM-01 (0.70 mM), KM-07 (0.64 mM), KM-12 (0.53 mM) 등으로 측정이 되었고, 양성 대조균으로 비교한 표준 균주 *Sporosarcina pasteurii* KCTC3558의 경우에는 0.72 mM로 분리한 균주들과 유사한 값의 정도를 나타내었다. 특히, KM-01 균주의 경우에는 비교 균주 *Sporosarcina pasteurii* KCTC3558와 거의 동등한 수준의 활성을 나타내어 상기한 성장곡선 실험 결과와 동일한 경향으로 분리한 균주들 중 가장 높은 활성을 나타내었다. 이는 분리한 균주들이 표준 균주와 비교했을 때에도 성장의 경향성 및 Urease 활성도 등의 결과와 일치하며, 매우 활성도가 높은 균주임을 확인할 수 있었다.

CaCO₃ 생성능 확인 폐광산 지역에서 분리한 균주의 CaCO₃ 침전을 위하여 Urea배지에 염화칼슘 (Calcium Chloride, CaCl₂)를 첨가하여 균을 배양하였다. 균주로부터 생성되는 Urease에 의해 생성된 CaCO₃을 전자현미경 (SEM) 및 EDS 원소 분석 등을 통해 확인하였고 (Fig. 4), SEM-EDS 분석

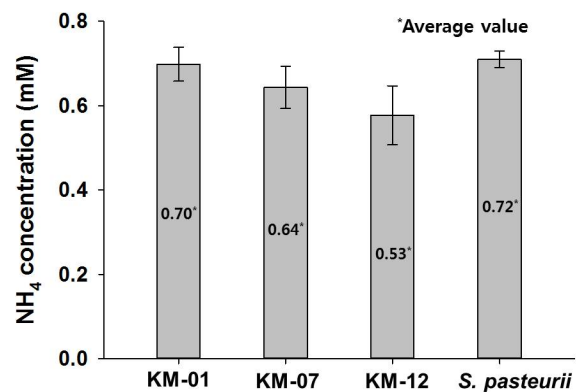


Fig. 3. Urease activity assay results in reaction suspension after 72 hours incubation. A unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme required to liberate 1 μmol of ammonia in 1 min under the test conditions. Data represent mean values from three independent experiments. *S. pasteurii* represent *Sporosarcina pasteurii*.

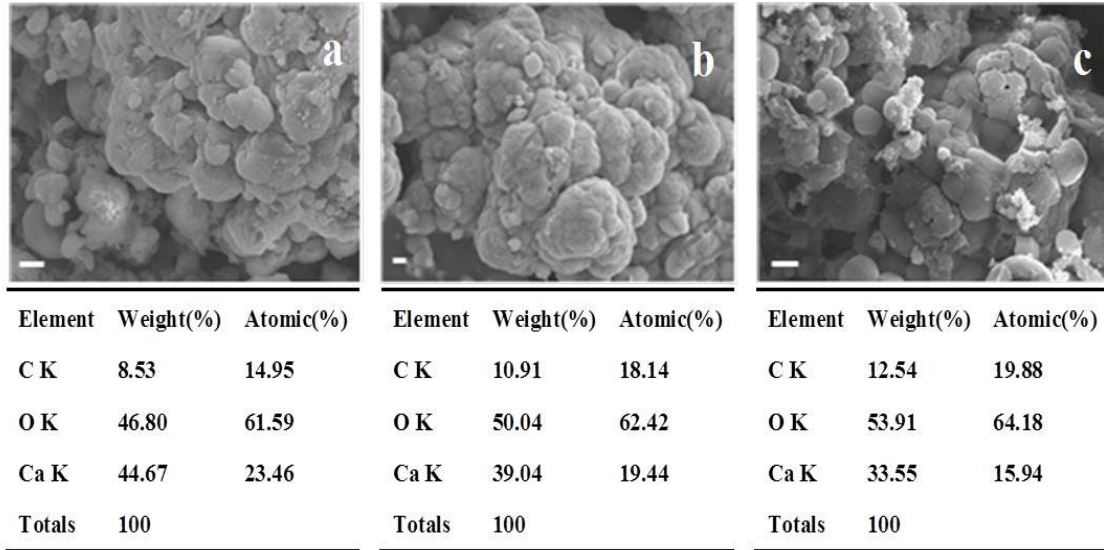


Fig. 4. Scanning Electron Microscope (SEM) and Energy Dispersive Spectrometer (EDS) analytical results of precipitated CaCO₃ by *Sporosarcina* sp. KM-01 (a), KM-07 (b), and KM-12 (c). All data were obtained after incubation of samples for 48 h (bar, 1 μm).

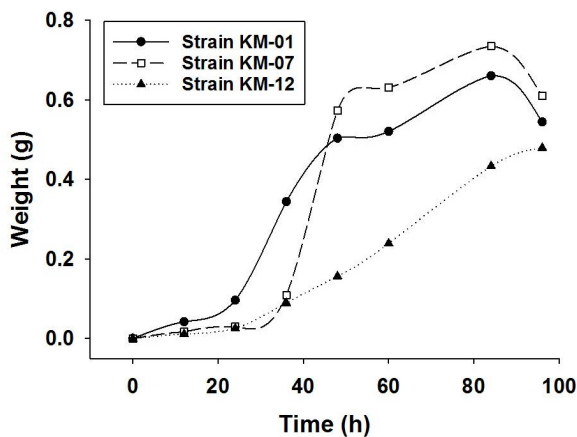


Fig. 5. Time course of weight of precipitated CaCO₃ by *Sporosarcina* sp. KM-01, KM-07, and KM-12. The values represent the mean of three independent experiments.

한 시료 침전물을 대상으로 해당 무게를 측정하여 3개 균주 모두에서 시간이 지남에 따라 증가하는 경향을 나타내었다 (Fig. 5). CaCO₃ 침전 확인을 위해 실시한 SEM-EDS 결과에서 볼 수 있듯이 각 균주 배양 후에 C, O, Ca로만 이루어진 침전물을 확인할 수 있었고 형태학적으로 CaCO₃ 침전을 관찰할 수 있었다. KM-01 균주는 24시간이 지나면서 침전물 생성량이 급격하게 늘었고, KM-07 균주는 36시간이 되었을 때 침전물의 양이 증가하는 경향을 나타내었다. 반면에, KM-12 균주의 경우에는 KM-01 및 KM-07 균주와 달리 침전물이 급격하게 증가하는 시점이 없이 꾸준하게 침전물 양이 늘어남을 확인하였다. 이를 각 균주의 성장곡선 (Fig. 2) 및 Urease 활성 측정 결과 (Fig. 3)과 비교하면, KM-01 균주의 활성이 해당 조건에서 가장 활발하게 나타난 것을 확인할 수 있다. 또한, 96시간 이후에 침전물의 양이 감소

하는 것은 배지에 첨가된 칼슘원 및 영양의 고갈로 인해 균주들의 Urease 활성 감소로 인한 것으로 예측된다. 따라서, 고농도의 중금속으로 오염된 폐광산 지역 토양에서 분리한 3개의 균주가 칼슘원으로 사용한 CaCl₂와 Urease 작용에 의하여 CaCO₃ 침전물을 생성할 수 있음을 확인하였다. 본 연구에서 분리한 박테리아 균주들의 활성을 활용하여 향후 중금속으로 오염된 휴/폐광산 지역 등의 토양 복원에 생화학적 반응을 적용한 복원 연구에 유용하게 활용되기를 기대한다.

Conclusions

중금속으로 오염된 폐광산 지역 토양으로부터 Urease 활성을 가지는 박테리아 3종을 분리하여 동정한 결과 *Sporosarcina pasteurii* 균주와 98.87% (KM-01), 99.67% (KM-07), 99.21% (KM-12)의 16S rRNA gene 상동성을 나타내어 각각 *Sporosarcina* sp. KM-02, KM-07, KM-12로 명명하였다. 분리한 박테리아들의 Urease 가수분해 반응과 칼슘원 염화칼슘 첨가로 유도하여 CaCO₃을 침전시켜 침전물 생성을 SEM-EDS 분석으로 확인하였다. 미생물을 분리한 토양을 왕수추출법과 ICP-AES 분석을 통해 중금속함량을 확인한 결과, Mn (170.50 mg kg⁻¹), As (114.05 mg kg⁻¹), Zn (92.07 mg kg⁻¹), Cu (62.44 mg kg⁻¹), Pb (40.29 mg kg⁻¹) 등의 다양한 중금속이 높은 농도로 존재함을 알 수 있었다. 분리한 3개 균주의 Urease 활성은 KM-01균주가 가장 활성이 높았으며 표준 균주인 *Sporosarcina pasteurii* KCTC3558균주와 비교 실험에서도 유사한 활성도를 나타내었다. 또한, 배지에 칼슘원을 첨가하여 배양하였을 때 KM-01 균주는 24시간, KM-07 균주는 36시간 후에 급격히 CaCO₃ 침전물을 생성함을 확인

하였고, KM-12 균주는 급격한 증가없이 CaCO_3 침전물이 꾸준히 생성됨을 확인하였다. 본 연구결과는 중금속 오염토양에서 분리한 박테리아 균주들의 Urease 활성을 확인하여 향후 폐광산지역 등의 중금속오염 토양에 적용하여 CaCO_3 침전물 생성을 유도함으로써 토양의 중금속 오염 저감, 생태독성 감소, 토양 강도의 증가 등의 효과를 기대할 수 있다.

References

- Ahn, J.S. 2000. Environmental contamination of arsenic and heavy metals by past Au-Ag mining activities and design of containment system for mine wastes. Ph.D. Thesis. Seoul National University. p. 1.
- Burbank, M.B., T.J. Weaver, B.C. Williams, and R.L. Crawford. 2012. Urease activity of ureolytic bacteria isolated from six soils in which calcite was precipitated by indigenous bacteria. *Geomicrobiol. J.* 29(4):389-395.
- Chung, S.B., H.Y. Choi, B.S. Min, S.J. Park, J.Y. Lee, and K.W. Choi. 1998. Urease activity of *Streptococcus salivarius*. *J. Korean Acad. Conserv. Dent.* 23(1):43-53.
- DeJong, J.T., M.B. Fritzges, and K. Nüslein. 2006. Microbially induced cementation to control sand response to undrained shear. *J. Geotech. Geoenviron. Eng.* 132(11): 1381-1392.
- Jung, M.C. and M.Y. Jung. 2006. Evaluation and management method of environmental contamination from abandoned metal mines in Korea. *J. Korean Soc. Geosystem Eng.* 43(5):383-394.
- Jung, M.C., J.S. Ahn, and H.T. Chon. 2001. Environmental contamination and sequential extraction of trace elements from mine wastes around various metalliferous mines in Korea. *Geosystem Eng.* 4:50-53.
- Kang, S.H., J.Y. Ahn, K.Y. Whang, J.Y. Seo, J.G. Kim, H. Song, S.B. Yim, and I. Hwang. 2011. Stabilization of heavy metal-contaminated mine tailings using phosphate fertilizers and red mud. *J. Soil Groundwater Env.* 16(5):31-41.
- Kawasaki, S., S. Ogata, N. Hiroyoshi, M. Tsunekawa, K. Kaneko, and R. Terajima. 2010. Effect of temperature on precipitation of calcium carbonate using soil microorganisms. *J. Japan Soc. Eng. Geol.* 51(1):10-18.
- Kim, J. 2010. Heavy metal concentrations in soils and crops in the Poongwon mine area. *J. Korean Geoenviron. Soc.* 11:5-11.
- Kim, K.J., A.R. No, and K.S. Park. 2009. Isolation and identification of urease-positive *Photobacterium* sp. Strain HA-2 from Sea Water. *Kor. J. Fish Aquat. Sci.* 42(6):531-536.
- Lee, M.N. and H.D. Park. 2012. Isolation and characterization of acidophilic yeasts producing urease from Korean traditional *Nuruk*. *Korean J. Food Preserv.* 19(2):308-314.
- Lee, P.K., H.Y. Jo, and S.J. Youm. 2004. Geochemical approaches for investigation and assessment of heavy metal contamination in abandoned mine sites. *Econ. Environ. Geol.* 37:35-48.
- Min, S.H. 2001. Purification and characterization of *Staphylococcus epidermidis* urease. Master's Thesis. Catholic University of Daegu. p. 4.
- Min, S.H., and M.H. Lee. 2007. Purification and characterization of the *Staphylococcus epidermidis* Urease. *J. Life Sci.* 17(4):581-586.
- Mitchell, J.K. and J.C. Santamarina. 2005. Biological considerations in geotechnical engineering. *J. Geotech. Geoenviron. Eng.* 131(10):1222-1233.
- Muynck, W.D., N.D. Belie, and W. Verstraete. 2010. Microbial carbonate precipitation in construction materials: a review. *Ecol. Eng.* 36:118-136.
- Nam, I.H., J.G. Kim, and C.M. Chon. 2012. Heavy metal effects on the biodegradation of fluorene by *Sphingobacterium* sp. KM-02 in liquid medium. *J. Soil Groundwater Env.* 17(6): 82-91.
- Nam, I.H., Y.M. Kim, K. Murugesan, J.R. Jeon, Y.Y. Chang, and Y.S. Chang. 2008. Bioremediation of PCDD/Fs-contaminated municipal solid waste incinerator fly ash by a potent microbial biocatalyst. *J. Hazard. Mater.* 157:114-121.
- Park, S.S., W.J. Kim, and J.C. Lee. 2011. Effect of biomineralization on the strength of cemented sands. *J. Korean Geotech. Soc.* 27(5):75-84.
- Terajima, R., S. Shimada, T. Oyama, and S. Kawasaki. 2009. Fundamental study of siliceous biogrout for eco-friendly soil improvement. *J. Japan Soc. Civil Eng. C.* 65(1):120-130.
- Van Paassen, L.A., R. Ghose, T.J.M. van der Linden, W.R.L. van der Star, and M.C.M. van Loosdrecht. 2010. Quantifying biomediated ground improvement by ureolysis: large-scale biogrout experiment. *J. Geotech. Geoenviron. Eng.* 136(12):1721-1728.
- Whiffin, V.S., L.A. van Paassen, and M.P. Harkes. 2007. Microbial carbonate precipitation as a soil improvement technique. *Geomicrobiol. J.* 24:417-423
- Weatherburn, M. W. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem.* 39:971-974.
- Yun, S.W., S.I. Kang, H.G. Jin, H.J. Kim, Y.C. Lim, J.M. Yi, and C. Yu. 2011. An investigation of treatment effects of limestone and steel refining slag for stabilization of arsenic and heavy metal in the farmland soils nearby abandoned metal mine. *Korean J. Soil Sci. Fert.* 44(5):734-744.