(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0077575
(43) 공개일자 2015년07월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0165991
(22) 출원일자 2013년12월27일
심사청구일자 2013년12월27일

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)
(72) 발명자
강창호
인천광역시 서구 신현동 290-16 2층(염곡로 330-3)
소재성
서울 마포구 서강로 95, 104동 1601호 (창전동, 창전동삼성아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순웅

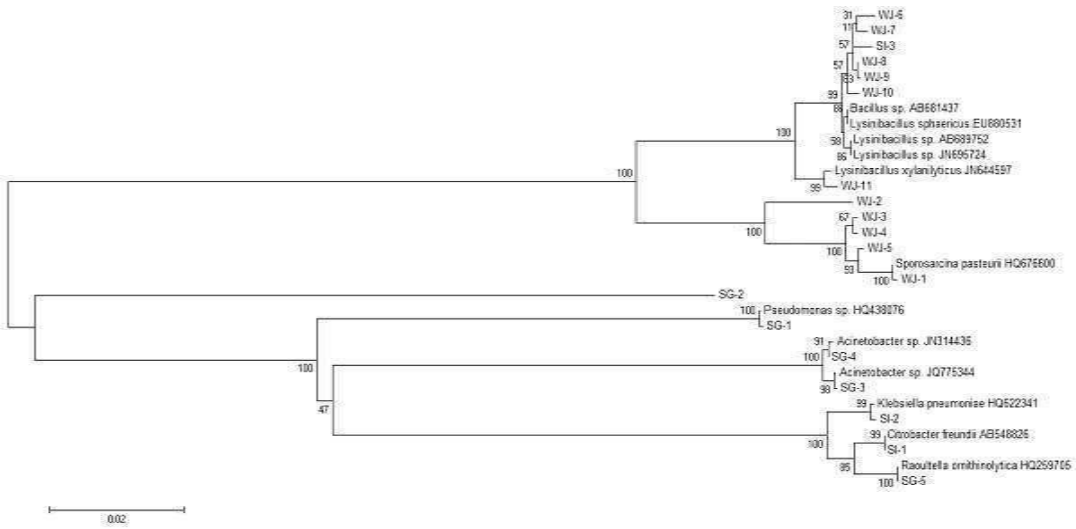
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **방사성 물질 처리능을 갖는 스포로사시나 파스테우리 및 이를 포함하는 방사성 물질 처리용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 방사성 물질 내성 및 처리 활성을 갖는 스포로사시나 파스테우리 WJ-2 균주(*Sporosarcina pasteurii* WJ-2)를 제공한다. 본 발명의 스포로사시나 파스테우리 WJ-2 균주는 방사성 물질에 대한 내성 및 방사성 물질 처리능을 가지고 있고, 특히 국내 지하수 환경과 유사한 pH 조건 하에서도 우수한 방사성 물질 처리 활성을 나타낼 수 있는 균학적 특성을 가지고 있으며, 스트론튬에 대한 내성이 우수하여 방사성 오염 지역의 토양 및 지하수 처리 등의 산업분야에 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

최재호

인천 남구 주안서로33번길 76-13, (도화동)

노준구

인천 남구 인하로67번길 32, 작은마을 406호 (용현동)

곽대영

전북 전주시 덕진구 인교3길 16, 302호 (우아동1가, 미주빌 B)

한상현

인천 남구 인하로 100, 3호관 209호 (용현동, 인하대학교)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2013054526
부처명	교육부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	기본연구
연구과제명	방사성 물질의 격리를 위한 미생물 생태공학적 연구
기 여 율	1/1
주관기관	인하대학교 산학협력단
연구기간	2013.09.01 ~ 2014.08.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

열 스트레스 내성, pH 스트레스 내성 및 방사성 물질 처리능을 갖는 스포로사시나 파스테우리 WJ-2 균주(*Sporosarcina pasteurii* WJ-2, KCTC 12523BP).

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 균주는 요소 분해 활성, 탄산칼슘 생성능 및 탄산스트론튬 생성능을 갖는 것인 스포로사시나 파스테우리 WJ-2 균주(*Sporosarcina pasteurii* WJ-2, KCTC 12523BP).

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 방사성 물질은 스트론튬(Sr)인 스포로사시나 파스테우리 WJ-2 균주(*Sporosarcina pasteurii* WJ-2, KCTC12523BP).

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 스트론튬(Sr)은 ^{90}Sr, ^{84}Sr, ^{86}Sr, ^{87}Sr, ^{88}Sr 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 스포로사시나 파스테우리 WJ-2 균주(*Sporosarcina pasteurii* WJ-2, KCTC12523BP).

청구항 5

제1항의 스포로사시나 파스테우리 WJ-2 균주(*Sporosarcina pasteurii* WJ-2, KCTC12523BP), 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 유효성분으로 포함하는 방사성 물질 처리용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 방사성 물질 처리용 조성물의 pH는 5.0 초과 내지 9.0 이하인 방사성 물질 처리용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 방사성 물질 내성 및 처리능을 갖는 미생물, 및 상기 미생물을 유효성분으로 포함하는 방사성 물질 처리용 조성물에 관한 발명이다.

배 경 기 술

[0002] 원자력의 이용은 비화석화 에너지로 온실가스 배출이 없고, 발전비용이 저렴하며, 발전 효율이 우수한 자원으로서 세계 각 국마다 기존 원전 정책의 확대 또는 재개, 신규 원정 도입을 추진하고 있다. 국내에서도 1958년 원자력법 시행 이후 현재 23기의 원자력 발전소를 운영하고 있으며 방사선 이용기관도 매년 10% 이상 증가하여 5천여 개를 넘어서고 있고, 세계 원전 10대 국가들 가운데 단위 면적당 핵 발전의 비중이 세계 1위를 차지하는 실정이다.

[0003] 이러한 원자력 에너지의 가장 큰 단점은 불가피한 방사성 물질의 누출이고, 방사성 물질이 인체에 노출되게 되면 각종 질병과 사망을 초래하기 때문에 사고 전 후로 예방 및 조치 마련이 시급한 실정이다. 이러한 방사성물

질 가운데 스트론튬(^{90}Sr)의 경우 29년의 긴 반감기를 가지고 있고, 토양, 대기 및 수중에서 다양한 형태로 존재한다. 인체에 들어오면 뼈에서 칼슘 대신 흡수되어 골육종과 백혈병을 일으키며 갑상선 기능 저하, 태아기형, 골수 말초혈관 및 흉선과 지라의 핵산대사 저해 등을 유발하는 방사성 물질이다. 최근 후크시마 사고 1년 이후 도쿄 전력에서 분석한 자료에도 스트론튬이 주위 시설 및 부근에서 다량으로 검출된 것을 확인하였다.

[0004] 이와 같은 방사성 물질에 의한 오염을 해결하기 위하여 물리적, 화학적, 생물학적 방법이 사용되고 있으나, 물리·화학적 방법을 통해서 시멘트 캡슐화(encapsulation) 과정을 거쳐 저장하게 되는데 많은 처리비용과 처리시설 공간의 확보 및 추가적인 오염이 발생하는 등의 한계점이 드러나고 있어, 최근 생물학적 방법이 대두되고 있다. 최근 탄산칼슘($CaCO_3$)과 방사성 물질과의 공침전을 통해서 방사성 물질을 격리화하는 다양한 연구가 진행되고 있고, 외국에서 탄산칼슘 형성능을 갖는 균주에 대한 보고가 있으나, 국내에서는 MICP(Microbially induced calcite precipitation)를 통한 방사성 물질 처리에 대한 연구가 미흡한 실정이다.

[0005] 본 발명자들은 국내의 환경에 적합한 탄산칼슘 형성 균주를 선별하여 MICP를 통한 방사성 물질 격리에 대하여 연구하던 중, 요소분해 활성, 탄산칼슘과 탄산스트론튬($SrCO_3$) 형성 활성이 우수하고, 열 스트레스 내성, pH 스트레스 내성 및 방사성 물질 처리능이 우수한 균주를 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 방사성 물질 내성 및 처리 활성을 갖는 미생물 및 이를 이용한 방사성 물질 처리용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 열 스트레스 내성, pH 스트레스 내성 및 방사성 물질 처리 활성을 갖는 스포로사시나 파스테우리 WJ-2 균주(*Sporosarcina pasteurii* WJ-2, KCTC12523BP)를 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 스포로사시나 파스테우리 WJ-2 균주(*Sporosarcina pasteurii* WJ-2, KCTC12523BP), 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 유효성분으로 포함하는 방사성 물질 처리용 조성물을 제공한다.

[0009] 이하, 본 발명에 대하여 보다 상세히 설명한다.

[0010] 본 발명은 본 발명은 열 스트레스 내성, pH 스트레스 내성, 방사성 물질 처리능을 갖는 스포로사시나 파스테우리 WJ-2 균주(*Sporosarcina pasteurii* WJ-2)를 제공한다.

[0011] 상기 균주는 요소 분해 활성, 탄산칼슘 생성능 및 탄산스트론튬 생성능을 가질 수 있다.

[0012] 본 발명에 있어서, 스포로사시나 파스테우리 WJ-2 균주는 석회암 지대와 중금속으로 오염된 탄광촌 지대의 토양에서 분리된 균주로, 막대 모양의 간균형태를 가진다.

[0013] 상기 스포로사시나 파스테우리 WJ-2 균주는 다른 공지의 균주보다 열 스트레스에 대한 내성 및 pH 스트레스에 대한 내성이 우수하고, pH 5.0 초과 내지 pH 9.0 미만의 환경에서 생존할 수 있으며, 스트론튬에 대한 내성을 갖고, 요소분해 활성 및 탄산칼슘 및 탄산스트론튬 생성능이 우수하다.

[0014] 16S rDNA 유전자 서열을 통하여 동정한 결과 스포로사시나 파스테우리와 99%의 상동성을 가져 스포로사시나 파스테우리로 동정되었다. 상기 스포로사시나 파스테우리 WJ-2 균주는 한국유전자은행(KCTC, korean collection for type cultures)에 2013년 12월 03일자로 기탁하여, 수탁번호 KCTC12523BP를 부여 받았다.

[0015] 상기 스포로사시나 파스테우리 WJ-2 균주는 통상의 배지에서 생육 가능하며, 일 예로 YE 배지에서 배양할 수 있다. 상기 배지는 특정 미생물을 배양하기 위하여 배양대상 즉 배양체가 되는 미생물이 필요로 하는 영양물질을 포함하는 것으로 특수한 목적을 위한 물질이 추가로 첨가되어 혼합된 것일 수 있다. 상기 배지는 배양기 또는 배양액이라고도 하며, 천연배지, 합성배지 또는 선택배지를 모두 포함하는 개념이다. 상기 스포로사시나 파스테

우리 WJ-2 균주는 통상의 배양방법에 따라 배양할 수 있다.

[0016] 본 발명에 있어서, 방사성 물질(radioactive material)은 방사선을 방출하는 성질을 갖는 원소를 의미하고, 핵연료물질, 사용 후 핵연료, 방사성 동위원소 및 원자핵분열 생성물을 모두 포함하며, 바람직하게는 스트론튬(Strontium, Sr) 일 수 있다.

[0017] 상기 스트론튬(Sr)은 원자번호 38번의 원소로, 알칼리 토금속에 속하며, 방사성 동위원소인 스트론튬-90(^{90}Sr)와 비방사성 스트론튬(^{84}Sr, ^{86}Sr, ^{87}Sr, ^{88}Sr) 모두 본 발명의 미생물에 의하여 처리될 수 있다.

[0018] 본 발명에 있어서 처리는 방사성물질에 대하여 화학적 작용을 일으키는 것을 모두 포함하는 의미이고, 일 예로 방사성 물질 이온을 다른 이온과 결합하여 고착화시키는 것을 의미한다.

[0019] 상기 스포로사시나 파스테우리 WJ-2 균주의 요소를 분해할 수 있는 요소분해효소(urease)의 작용으로 탄산염(CO_3^{2-})이온이 발생되고, 이 때 탄산염 이온은 세포벽 주위의 칼슘(Ca^{2+})과 결합하여 탄산칼슘($CaCO_3$)을 형성하고, 스트론튬의 존재 하에서 스트론튬 이온과도 결합하여 탄산스트론튬($SrCO_3$)을 형성하여, 방사성 오염원인 스트론튬을 침전 및 고착화하여 확산을 방지하고, 오염지역으로부터 격리시킬 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서 스포로사시나 파스테우리 WJ-2 균주의 탄산칼슘 및 탄산스트론튬 생성능을 X선 회절분석 및 정량 분석을 통해서 확인하였고, 따라서 상기 WJ-2 균주를 이용하여 방사성 물질 오염지역의 토양, 지하수 등의 오염원을 제거하는 토양 및 하수 처리, 환경 복원 분야에서 산업적으로 유용하게 이용될 수 있다.

[0020] 또한, 본 발명은 스포로사시나 파스테우리 WJ-2 균주(*Sporosarcina pasteurii* WJ-2, KCTC12523BP), 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 유효성분으로 포함하는 방사성 물질 처리용 조성물을 제공한다.

[0021] 상기 배양물이란 특정 미생물을 배양배지 또는 배양액에서 배양한 것을 의미하며, 배양물의 농축물도 포함한다. 상기 배양물은 상기 특정 미생물을 포함하는 것을 의미하고, 그 제형이 한정되지 아니하며, 일 예로 액체 또는 고체일 수 있다.

[0022] 상기 배지는 특성 미생물을 배양하기 위하여 배양대상 즉 배양체가 되는 미생물이 필요로 하는 영양물질을 포함하는 것으로 특수한 목적을 위한 물질이 추가로 첨가되어 혼합된 것일 수 있다. 상기 배지는 배양기 또는 배양액이라고도 하며, 천연배지, 합성배지 또는 선택배지를 모두 포함하는 개념이다.

[0023] 상기 방사성 물질 처리용 조성물은 pH 5.0 초과 내지 pH 9.0 이하, 바람직하게는 pH 7.0 내지 pH 9.0 인 것 일 수 있다. 조성물의 pH가 상기 범위를 만족하는 경우, 지하수의 pH와 본 발명의 균주가 활발한 활성을 나타내는 pH가 유사하여 방사성 물질을 위해 처리한 경우 pH에 의한 균주의 방사성 물질 처리능력이 저하되지 않고, 최적의 방사성 물질 처리 활성을 나타낼 수 있다.

[0024] 상기 방사성 물질 처리용 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 상기 스포로사시나 파스테우리 WJ-2 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 0.001 내지 99.99 중량%, 바람직하게는 0.1 내지 99 중량%로 포함할 수 있고, 상기 항진균 조성물의 사용방법 및 사용목적에 따라 유효성분의 함량을 적절히 조절할 수 있다.

발명의 효과

[0025] 본 발명의 스포로사시나 파스테우리 WJ-2 균주는 방사성 물질에 대한 내성 및 방사성 물질 처리능을 가지고 있고, 특히 국내 지하수 환경과 유사한 pH 조건 하에서도 우수한 방사성 물질 처리 활성을 나타낼 수 있는 균학적 특성을 가지고 있으며, 스트론튬에 대한 내성이 우수하여 방사성 오염 지역의 토양 및 지하수 처리 등의 산업분야에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 분리균주의 16S rRNA 유전자 염기서열을 기초로 나타낸 계통수이다. 상기 계통수에서 절대값(Numerical values)은 1000 리플리케이트(replicate)에 대한 부트스트랩 백분율(bootstrap percentile)을 나타낸다.

도 2는 분리균주 WJ-2의 열 스트레스 내성을 나타내는 그래프이다. 그래프의 가로축은 분리균주 WJ-2와 대조군

인 공시균주 KCTC3558을 나타내고, 그래프의 세로축은 균주의 생존률(%)을 나타낸다.

도 3는 분리균주 WJ-2의 pH 스트레스 내성을 나타내는 그래프이다. 그래프의 가로축은 분리균주 WJ-2와 대조군인 공시균주 KCTC3558을 나타내고, 그래프의 세로축은 균주의 생존률(%)을 나타낸다.

도 4는 19종의 분리균주의 특정 우레아제 활성을 나타내는 그래프이다. 그래프의 세로축은 우레아제 활성을 나타내는 것으로, 우레아제 활성 단위(U)는 고, 가로축은 19종의 분리균주 각각을 나타내는 것으로 1부터11까지 균주 WJ-1부터 WJ-11을 나타내고, 12부터 16까지 SG-1부터 SG-5, 17부터 19까지 SI-1부터SI-3을 나타낸다.

도 5는 투과성 테스트 과정을 간단히 나타낸 도이다. (a)는 플라스틱 피펫을 이용한 주사기형 컬럼을 나타내고, (b)는 모래슬러리를 팩킹한 컬럼을 나타내며, (c)는 세포 현탁액으로 컬럼을 통과시키는 것을 나타내며, (d)는 크리스탈 바이올렛을 팩킹된 모래위로 투입하고, 그 이동거리를 측정하는 과정을 나타낸 도이다.

도 6은 세포의 조건에 따른 투과성 테스트 결과를 나타내는 그래프로, 그래프의 가로축은 죽은 세포 처리군(dead cell)과 살아있는 세포 처리군(live cell)각각을 나타내고, 그래프의 세로축은 크리스탈 바이올렛(CV)의 이동거리(cm)을 나타낸다.

도 7은 세포의 조건에 따른 스트론튬 정화능에 대한 시험 결과를 나타내는 그래프로, 그래프의 가로축은 대조군(control)과, 죽은 세포 처리군(dead cell)과 살아있는 세포 처리군(live cell)각각을 나타내고, 그래프의 세로축은 스트론튬의 농도(mg/kg)를 나타낸다.

도 8은 균주에 의하여 생산된 생물학적 정화 산물의 X선 회절분석 결과를 나타내는 그래프로, C는 탄산칼슘($CaCO_3$), SrC는 탄산스트론튬(strontianite), V는 바테라이트(Vaterite) 그리고 Q는 수정(quartz)을 나타낸다.

도 9는 균주에 의하여 생산된 생물학적 정화 산물의 SEM 사진을 나타내는 도이다. A 및 B는 분리균주 WJ-2로 처리하지 실험군의 SEM 사진이고, C 및 D는 생물학적으로 고착화된(Bioconsolidated) 모래를 나타내는 것으로 모래 입자에 탄산칼슘($CaCO_3$)이 부착되어 있음을 확인할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 이하, 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다.

[0028] **실험예1. 균주의 분리 및 선별**

[0029] 요소분해효소 생산능을 가진 박테리아는 강원도에 폐고속도로, 인천의 승기천, 경기도의 옥구천, 군자천 및 정왕천의 토양에서 채취하여 본 연구에 사용하였다. 채취한 샘플은 소독한 배지병(media bottle, Pyrex)에 담아, 처리 전 6시간 이하로 10 ℃ 이하의 냉장상태에서 보관하였다. 하천에서 채취한 샘플은 연속적으로 희석하고, BPU 한천배지(3 g/L 육추출물(beef extract), 5 g/L 펩톤(peptone), 20 g/L 요소(urea), 100 ㎍/mL 시클로헥사미드(cycloheximide)를 포함하는 10 g/L 마이크로 한천(micro agar); pH: 9) 위에 펼쳐서 올려놓았다. 상기 배지는 30℃에서 2일 동안 배양되었고, 그 다음 우레아제(urease) 생산량을 측정하기 위하여, 콜로니들을 요소배지(urea broth)로 옮겼다. 분리된 배양체들(cultures)은 글리세롤(glycerol)을 20%(v/v)로 포함하는 YE 배지(효모추출물(yeast extract) 20 g/L; 황산암모늄(ammonium sulfate) 75 mM, pH 9)로 옮기고, -20 ℃에서 보관하였다.

[0030] BLAST 분석은 NCBI의 DNA 염기서열과 비교하는 방법으로 수행하였다. 염기서열은 PHYDIT(http://plaza.snu.ac.kr/~jchun/phydit/) 프로그램을 이용하여 서열을 정렬하였고, 상기 정리된 서열을 수정한 후에, MEGA 5.0 소프트웨어를 이용하여 인접-결합 방법(neighbor-joining method)에 따라 계통수(phylogenetic tree)를 작성하였다. 본 실험에서 확인한 16S rRNA 염기서열은 NCBI의 GenBank에 등록하였고, KC188670 및 KC211293에서 KC211310까지의 등록번호(accession numbers)를 부여받았다.

[0031] BPU 배지(시클로헥사미드(cycloheximide)를 100 μg/mL로 포함)로부터 68 개의 특이한 콜로니(colony) 형을 분리하였다. 이 중에서, 요소 한천 배지 상에 형성된 핑크색의 강도에 근거하여 우레아제 생산의 정성 분석을 통해서 19 종을 선택하였다. 16S rRNA 유전자 염기서열분석 결과를 이용하여, 19개의 분리종을 동정하였다.

[0032] 상기 각 분리종들은 16S rDNA 염기서열 분석을 통해서 동정되었고, 상기 분리 종 중에서 최종 선발된 WJ-2 균주에 대하여 BLAST 분석을 실시하여, 상기 WJ-2 균주가 스포로사시나 파스테우리(*Sporosarcina pasteurii*)와 99%(100% 범위)의 동일성을 나타내어, 스포로사시나 파스테우리(*Sporosarcina pasteurii*)로 확인 되었다. 따라서, 이를 WJ-2 균주라 명명하고, 한국생명공학연구원에 12월 03일자로 기탁하여 기탁번호 KCTC 12523BP를 부여받았다.

[0033] 또한, 도 1에 나타낸 바와 같이, 우레아제는 다양한 종류의 미생물에 존재하는 것으로 알려져 있다. 계통 발생의 분석에 의하여 상기 모든 분리종이 후벽균문(Firmicutes phylum)의 간균과(Bacillaceae family)에 속하는 것을 확인 하였다.

[0034] **실험예 2. 분리 균주의 균학적 성질 확인**

[0035] 분리 균주가 공지된 스포로사시나 파스테우리 균주와 관련하여서도 우수한 성질을 가짐을 확인하기 위하여, 분리 균주를 생물학적 정화에 사용하는 경우 야상의 토양환경에서 죽거나 그 활성을 잃지 않고 생존해야 하는 것인바, 공지 균주 중의 하나인 스포로사시나 파스테우리 KCTC3558과 비교하여 열과 pH 스트레스에 견디는 내성에 대한 실험을 실시하였다.

[0036] 공지 균주 *S. pasteurii* KCTC3558를 분양받아 준비하고, YE 배지에서 KCTC3558 균주와 분리 균주 WJ-2를 각각 배양하였다. 이 때 배양 온도를 40 ℃로 하였고, 상기 온도에서 균주의 생존률을 측정하여, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0037] 또한, 배양 배지의 pH를 8, 7, 6 및 5로 조절하면서 KCTC3558균주와 분리 균주 WJ-2를 각각 배양하였고, 이 때의 균주 생존률을 측정하여, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0038] 도 2에 나타낸 바와 같이, WJ-2 균주의 경우 40 ℃의 환경에서도 약 70 % 정도의 생존률을 가지나, 공지 균주인 KCTC3558의 경우 모두 사멸하였는바, WJ-2의 경우 열 스트레스에 대한 내성이 현저히 우수한 것을 확인 하였다.

[0039] 도 3에 나타낸 바와 같이, WJ-2 균주의 경우 pH 6에서도 80 % 이상의 생존률을 나타내었으나, KCTC3558의 경우 pH 7에서도 60 % 미만의 생존률을 가지고, pH 6에서는 모두 사멸한 것을 확인 하였다. 따라서 본 발명의 분리 균주의 경우 염기성 및 산성 환경에서도 생존할 수 있는 pH 내성이 현저히 우수한 것을 알 수 있고, 이에 의하여 다양한 야생의 토양 환경에 생물학적 정화를 위해 처리하여도 높은 안정성을 가짐을 확인할 수 있었다.

[0040] **실험예 3. 요소 분해 효소 활성능 확인**

[0041] 페놀-차아염소산염 분석법을 통해서 특정 우레아제 활성을 확인하였다. 인산 나트륨 완충액(0.1 M) 250 μM와 요소액(3 M) 500 μM를 미리 혼합하고, 여기에 박테리아 현탁액 250 μL를 첨가하였다. 상기 혼합액을 37 ℃에서 5 분 동안 배양하였다. 그 후, 페놀 니트로프루시드(phenol nitroprusside) 용액 2 mL를 염기성 차아염소산염 용액에 첨가하고, 50 ℃에서 10 분 동안 배양하였다. 배양 후에, 626 nm에서 흡광도를 측정하였다. 염화 암모늄(0-10 μM)을 표준(standard)으로 사용하였다. 우레아제 활성을 나타내는 단위는 1분 당 1 μM 요소의 가수분해를 촉진하는 효소의 양으로 정의하였다. 특정 우레아제 활성은 브래드포드법(Bradford assay)으로 측정된 전체 단백질과 표준 우레아제 활성으로 나누는 방법으로 계산하였다. 상기 계산한 특정 우레아제 활성 반응의 결과는 하기 도 4에 나타내었다.

[0042] 도 4에 나타낸 바와 같이, WJ-2 균주의 특정 우레아제 활성이 가장 우수한 것을 확인 하였고, 또한 WJ-1 내지 WJ-4 균주의 경우 WJ-5 내지 WJ-11, SG-1 내지 SG-5 및 SI-1 내지 SI-3과 비교하였을 때 2 배 정도의 우레아제 활성을 나타냄을 확인 하였다. 이에 따라 차후 실험에서는 WJ-2 균주를 이용하여 실험을 실시하였다.

[0043] **실험예 4. 투과성 테스트**

[0044] YE 배지에서 하룻밤 동안 배양한 세포를 수확하였고(6000 x g, 5 min), 두 번 세척한 후, 최종 OD_{600}이 1.0이 되도록 생리식염수(0.9% NaCl)에 재현탁하였다. 세포들은 각각 3 번의 처리를 거쳐 준비되었다. 세포를 121 ℃에서 20 분 동안 고압멸균(autoclave)하였다. 죽은 세포는 YE 배지 위에 플레이팅 하는 방법으로 확인하였다. 실험은 죽은세포 처리군과 생존세포 처리군으로 나누어 실시하였다.

[0045] 도 5에 나타낸 바와 같이, 멸균된 실리카 모래(200 g, 0.45 ~ 0.7 mm, 주문진 모래, 한국)를 53.3 mL의 염화칼슘/요소 용액과 혼합하여 모래슬러리를 제조하였다. 상기 제조한 모래슬러리 50g을 25 mL의 플라스틱 컬럼(Corning, USA)에 패킹하였다. 컬럼에 10ml의 세포 현탁액을 채우고, 10ml의 통과액을 컬럼에 다시 한번 채웠다. 상기 컬럼은 8시간 동안 칼슘 결정이 성장하도록 놔두었다. 반응 후에, 2 ml의 크리스탈 바이올렛(crystal violet)을 피펫으로 모래 컬럼에 넣었다. 투과 정도는 크리스탈 바이올렛의 이동 거리를 측정하는 방법으로 확인하였다. 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0046] 도 6에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 분리균주 WJ-2의 죽은세포 처리군의 크리스탈 바이올렛의 이동거리가 다른 분리균주와 비교하여 1.5 배 정도 긴 것을 확인하였다. 살아있는 균주의 경우 탄산칼슘 결정을 생산하여 모래의 공극을 막음으로써 크리스탈 바이올렛의 이동을 저해하게되어 이동 거리가 짧으나, 죽은세포를 처리하는 경우 탄산칼슘 결정을 생산하는 작용을 하지 않는바 이동거리가 상대적으로 길어지게 되는 것을 알 수 있고, 이를 통하여 본 발명의 분리균주의 경우 탄산칼슘 형성능이 우수한 것을 알 수 있었다.

[0047] **실험예 5. 스트론튬(Sr) 생물학적 정화(Bioremediation)**

[0048] 모래시료는 0.3 ~ 0.45 mm의 채로 거르고, 세척한 다음, 자연상태에서 건조하였고, 멸균한 후 실험에 사용하였다. WJ-2 배양체는 20 mL의 생리식염수(0.9% NaCl)에 현탁하고, 멸균한 모래 100 g과 혼합하였다. 모래현탁액의 pH는 8.5 였다. 죽었거나 살아있는 균주(bacteria)를 포함하고 있는 모래 슬러리를 50 mL의 플라스틱 주사기형 컬럼(Kovax-Syringe, Korea)에 팩킹하였다. 본 발명의 균주가 모래와 결합을 형성할 수 있도록 30분 동안 놓아두었다. 죽은 균주로 처리한 모래 슬러리를 대조군(control)으로 하여 실험을 수행하였다. 컬럼에 요소(40 g/L)와 염화칼슘 용액(25 g/L) 20mL를 한 번 넣었다. 최대 결정이 성장할 수 있도록 24시간 동안 놓아두었고, 물방울이 바깥으로 흐르도록 하였다. 넘친 물이 증발할 수 있도록 컬럼을 45 ℃에서 24시간 동안 건조하였다. 시퀘스트레이션(Sequestration)은 20 mL의 $SrCl_2.H_2O$(100 mg/L)가 컬럼을 통과하는데 걸리는 시간을 측정하는 방법으로 결정하였다. 비-방사성 스트론튬(non-radioactive Sr)과 방사성 스트론튬(radioactive Sr)은 동일한 화학원소를 가지고, 물리적 특성이 동일하므로, 방사성 오염을 최소화하기 위하여, 비-방사선 스트론튬을 실험에 사용하였다. 스트론튬은 용액 형태로 하여, 모래와 완전하게 혼합하였다. 실험은 실온에서 수행하였다. 용리액의 스트론튬의 농도는 유도결합 플라즈마 질량 분석법에 의하여 측정하였다(ELAN 6100, PerkinElmer, USA). 모든 실험은 3회 반복하여 실시하였고, 그 결과는 도 7에 나타내었다.

[0049] 도 7에 나타낸 바와같이, 처리된 모래의 잔여 용액의 스트론튬 분리율(sequestration rate)은 죽은 *S. pasteurii* WJ-2를 처리한 대조군의 경우 48% 이고, 살아있는 *S. pasteurii* WJ-2를 처리한 경우 84% 였다. 이러한 결과는 살아있는 WJ-2 균주를 처리한 경우에 대조군과 비교하여 모래에 남아있는 활성 스트론튬의 수준이 현저히 낮다는 것을 보여주며, 더욱이 본원 발명의 WJ-2 균주-유도 정화는 모래에서 스트론튬을 80% 이상 제거하는 우수한 스트론튬 제거 효과를 나타냄을 확인하였다. 이는 WJ-2 균주에 의하여 탄산칼슘(calcite)와 스트론튬이 공침전(co-precipitation)을 형성하고, 이는 다양한 토양환경에서 장기적으로 안정성을 나타내기 때문에 생물학적 정화에 있어서 매우 우수한 효과임을 알 수 있다.

[0050] **실험예 6. X-선 회절 분석 및 형성 광물질의 형태 확인(SEM)**

[0051] X-선 회절분석(XRD)은 탄산칼슘($CaCO_3$)의 결정 구조를 확인하기 위하여 사용하였다. 다른 칼슘염을 이용하여 제조해 놓은 탄산칼슘 샘플을 100 μL의 증류수에 현탁시켰다. 이 현탁액을 글라스에 올려놓고, 50 ℃의 오븐에서 건조하였다. 그 다음 샘플은 X-선 회절 분석기(DMAX-2500, Rigaku, Japan)를 이용하여 분석하였다. 그 결과

를 도 8에 나타내었다.

[0052] 또한, 변형된 SEM법을 이용하여 생산된 탄산칼슘 결정을 관찰하였다. 미리 얻어진 탄산칼슘 결정을 물에 넣어 혼합하고, 글라스에 떨어트린 다음, 50 ℃의 오븐에서 건조하였다. 완전히 건조된 후에, 샘플을 이온 스퍼터(ion sputter)에서 백금(platinum)으로 코팅하하고, 전계방사형 주사전자 현미경(field emission scanning electron microscope, Model: S-4300, Hitachi, Japan)을 이용하여 결정의 형태를 관찰하였다. 그 결과를 도 9에 나타내었다.

[0053] 도 8에 나타낸 바와 같이, XRD 스펙트럼은 생물학적 정화군의 시료에서 날카로운 피크를 나타내었고, 이와 비교하여 대조군-처리군 시료의 탄산칼슘 피크는 더 적었으며, 상기 스펙트럼에 의하여 탄산칼슘 결정은 침전된 탄산염 전체 중에서 가장 지배적인 광물임을 확인하였다. 대조군에서 탄산칼슘 피크는 실험하는 동안 무기 침전물의 영향을 받은 것으로 확인되었다. 탄산칼슘의 다른 결정질의 동질이상 광물(crystalline polymorphs) 또한 바테라이트(vaterite) 형으로 생물학적으로 정화된 모래에 존재하였다. 스트론튬(Sr)은 탄산칼슘(calcite)과 함께 공침전(co-precipitated) 탄산스트론튬($SrCO_3$)의 형태로 나타남을 피크를 통해서 확인 하였다.

[0054] 도 9에 나타낸 바와 같이, SEM을 이용하여 생물학적 광물화(biomineralization) 결과물을 추가적으로 관찰하였다. 입자 수준(particle level)에서 SEM으로 탄산칼슘의 부분적인 분포 사직을 찍었다. MICP는 입자-입자 접촉(particle-particle contacts)에 대하여 확실한 선호도를 갖는 것을 확인 하였다. 이는 본 발명의 균주에 의한 정화 및 공극수를 따라 흐르는 영양분에 대해 더 잘 접근할 수 있기 때문이다. 포화된 모래에서 입자-입자 접촉(particle-particle contacts) 구조는 훨씬 큰 반면에, 노출된 입자 표면 상의 탄산칼슘 결정은 그 두께가 10 mm 미만이다. 비포화 모래의 퍼콜레이션(Percolation)은 탄산칼슘 침전을 야기하였고, 거의 독점적으로 입자 접촉(particle contacts)에서 나타났다. 입자-입자 접촉(particle-particle contacts)의 분해(Degradation)는 전형적으로 탄산칼슘 구조를 통해서 발생하고, 탄산칼슘-실리카 인터페이스(calcite-silica interface)에서 발생하는 것은 아니다.

수탁번호

[0055]

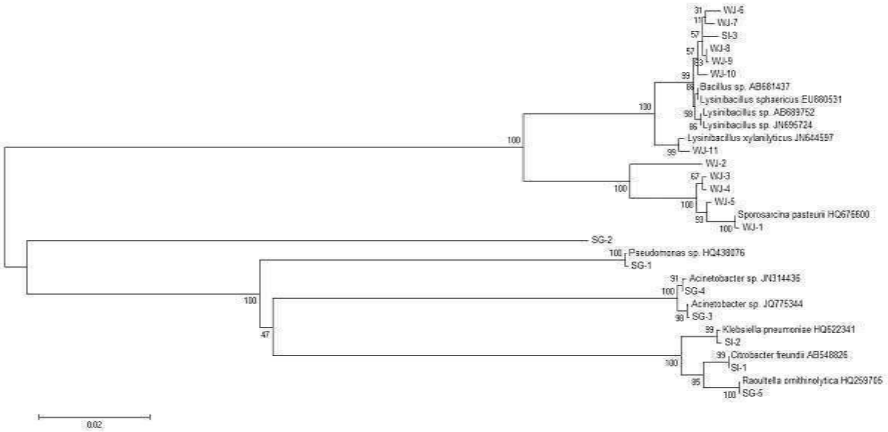
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC12523BP

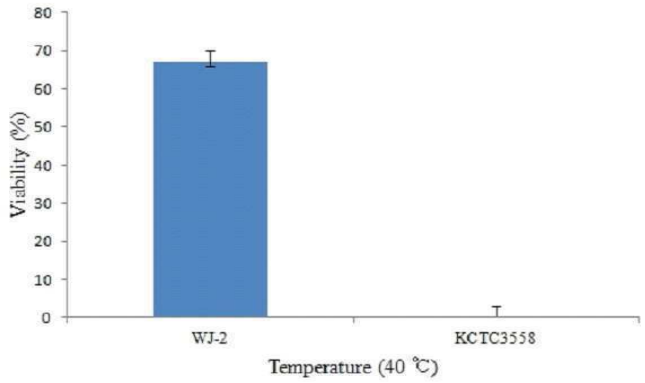
수탁일자 : 20131203

도면

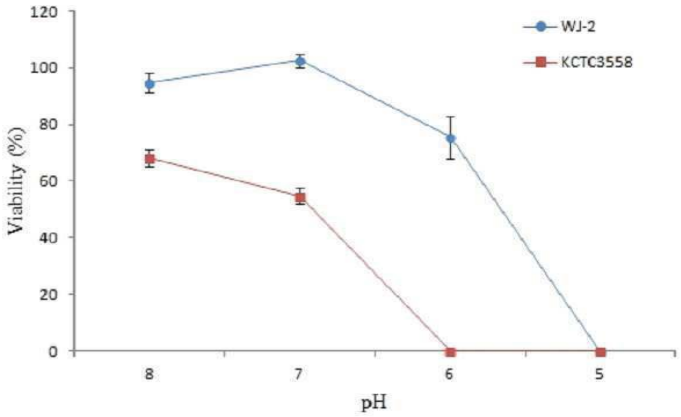
도면1



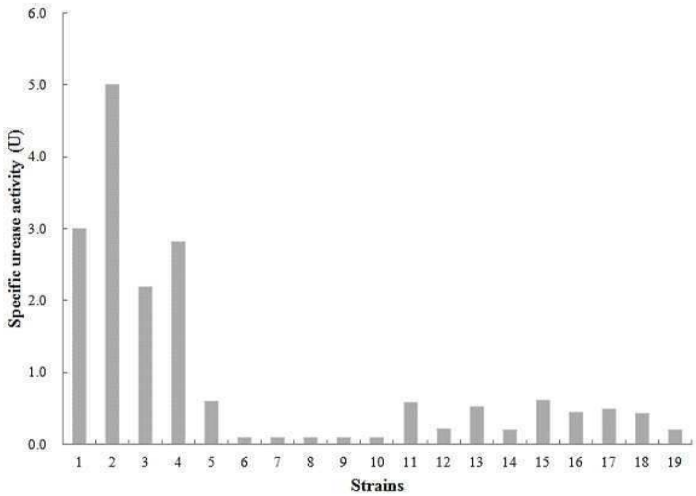
도면2


Viability (%)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
WJ-2
KCTC3558
Temperature (40 ℃)

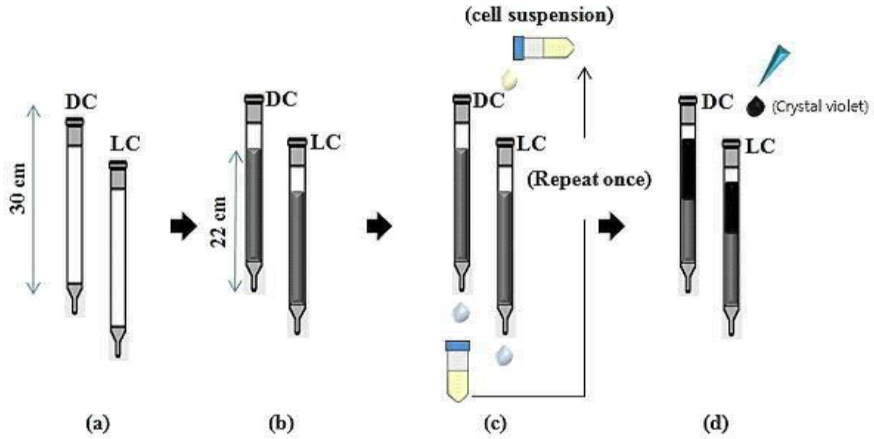
도면3


Viability (%)
120
100
80
60
40
20
0
WJ-2
KCTC3558
8
7
6
5
pH

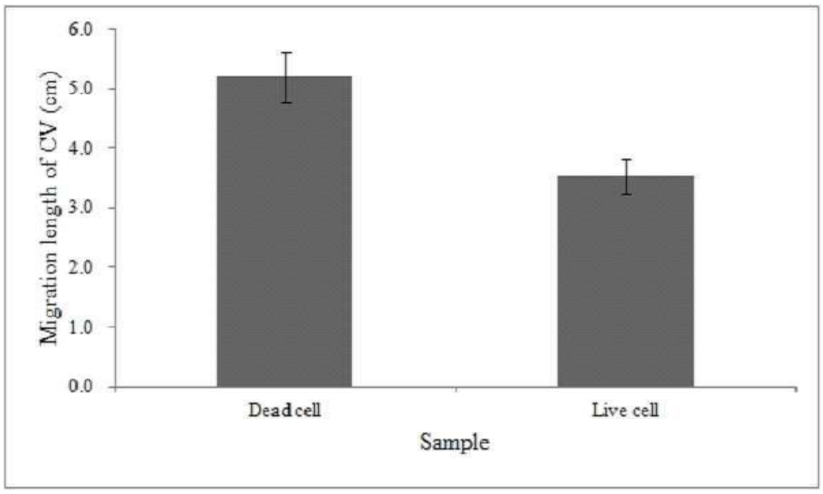
도면4


Specific urease activity (U)
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19
Strains

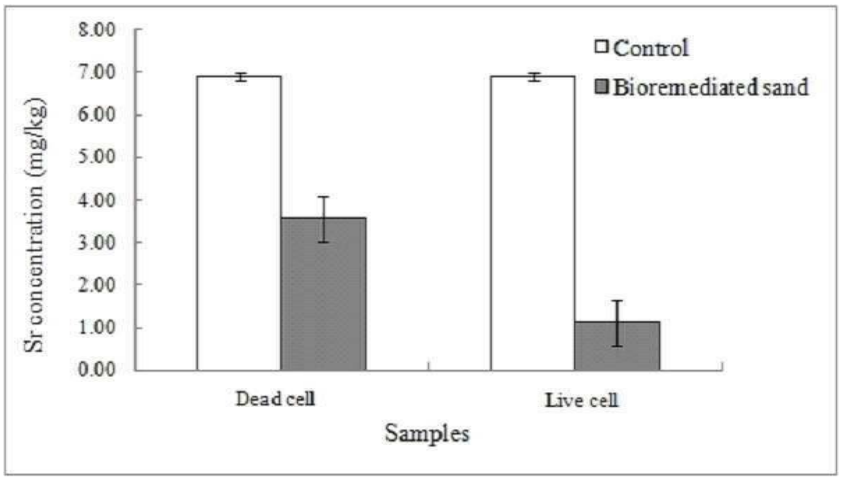
도면5


(cell suspension)
DC
LC
30 cm
22 cm
(Repeat once)
(Crystal violet)
(a)
(b)
(c)
(d)

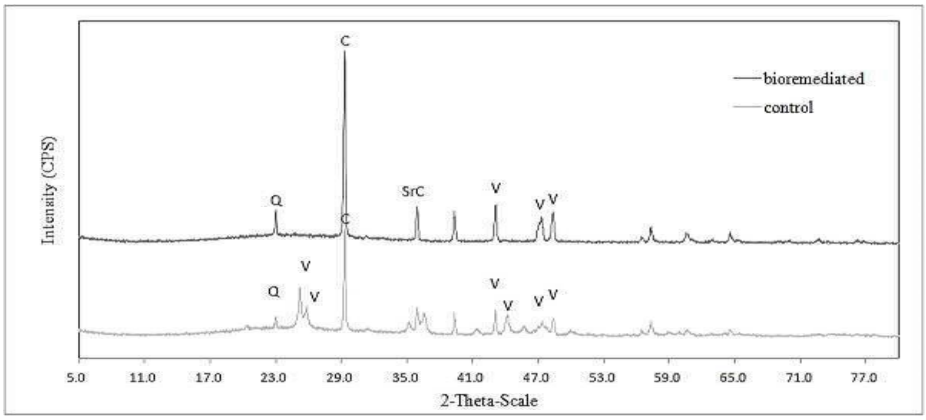
도면6


Migration length of CV (cm)
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
Dead cell
Live cell
Sample

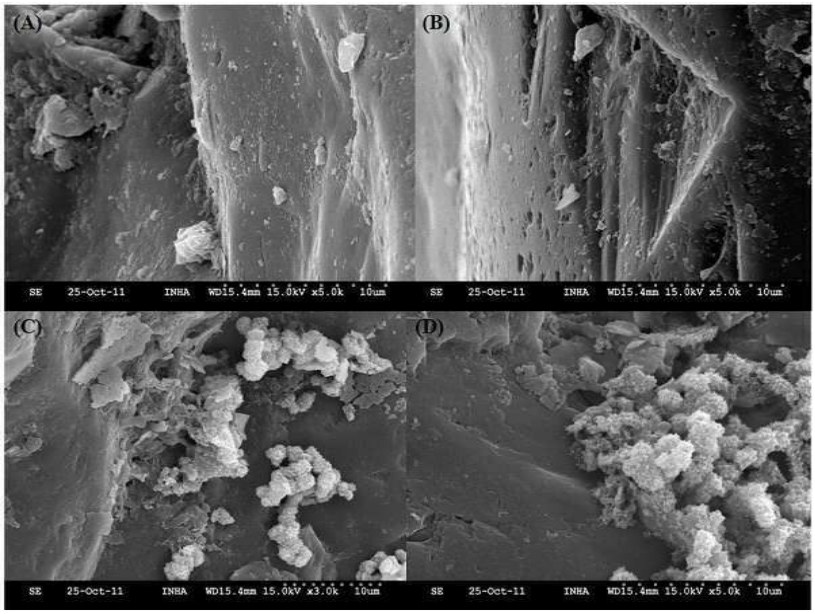
도면7


Sr concentration (mg/kg)
8.00
7.00
6.00
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
Control
Bioremediated sand
Dead cell
Live cell
Samples

도면8


bioremediated
control
Intensity (CPS)
2-Theta-Scale
5.0
11.0
17.0
23.0
29.0
35.0
41.0
47.0
53.0
59.0
65.0
71.0
77.0
C
Q
SrC
V

도면9


(A)
(B)
(C)
(D)