(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0094499
(43) 공개일자 2024년06월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) *A01N 63/22* (2020.01)
A01P 1/00 (2006.01) *C04B 24/00* (2006.01)
C04B 40/06 (2006.01) *C12P 3/00* (2006.01)
C04B 103/00 (2006.01) *C12R 1/07* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/205 (2021.05)
A01N 63/22 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2022-0176821
(22) 출원일자 2022년12월16일
심사청구일자 2022년12월16일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
주식회사 허브콘
충청남도 천안시 서북구 불당36길 63,303-9호(불당동)
(72) 발명자
박우준
서울특별시 강남구 언주로 420 (역삼동, 역삼자이아파트) 101동 2105호
손용준
대구광역시 북구 팔거천동로 52 (구암동 칠곡미래타운) 101동 1401호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
위병갑

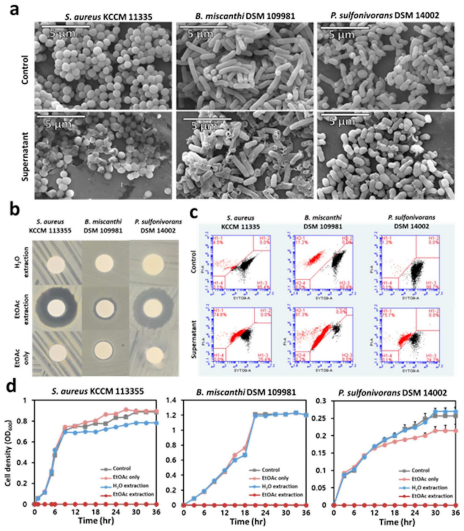
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **항세균능이 있는 바실러스 알티튜디니스 B6 균주 및 이를 포함하는 콘크리트 균열 보수용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 항세균능이 있는 바실러스 알티튜디니스 B6 균주 및 이를 포함하는 콘크리트 균열 보수용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 바실러스 알티튜디니스 B6 균주는 알칼리 내성, 포자 형성능을 가져 콘크리트 또는 시멘트 환경에서 적응력이 우수하고, 세포 외부에 탄산칼슘 침전을 일으켜 방해석 침전물을 형성하여 시멘트 또는 콘크리트 균열 보수용 조성물 또는 지반 강화용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 바실러스 알티튜디니스 B6 균주가 콘크리트 또는 시멘트 제조 시 혼화재로서 첨가되는 경우, 구조물 내부에 포자 상태로 존재하다가 콘크리트 또는 시멘트에 균열이 발생했을 때 활성화되어 균열 부위에 방해석 침전물을 축적시켜 균열을 충진함으로써 시멘트 또는 콘크리트의 사용수명을 연장시키는 효과가 있다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
A01P 1/00 (2021.08)
C04B 24/00 (2013.01)
C04B 40/0675 (2013.01)
C12P 3/00 (2013.01)
C04B 2103/0001 (2013.01)
C12R 2001/07 (2021.05)

(72) 발명자
민지현
인천광역시 서구 가정로 387 (신현동 신현이편한세상하늘채) 103동 1302호
장인동
경기도 광주시 광주대로105번길 14 - 10 (송정동) 5층
이종구
서울특별시 서초구 서초중앙로 188 아크로비스타 C동 810호
이광명
서울특별시 서초구 서초중앙로 188, B동 1702호 (서초동 아크로비스타)
박동철
경기도 수원시 영통구 센트럴타운로 76, 6118동 1301호 (이의동, 광교이편한세상아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1615012856
과제번호	158976
부처명	국토교통부
과제관리(전문)기관명	국토교통과학기술진흥원
연구사업명	건설기술연구
연구과제명	자기치유형 친환경 콘크리트 기술 개발 2단계
기 여 율	1/1
과제수행기관명	성균관대학교산학협력단
연구기간	2022.01.01 ~ 2022.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

항세균 활성 및 탄산칼슘 (calcium carbonate) 형성능을 갖는 바실러스 알티튜디니스 B6 (*Bacillus altitudinis* B6) 균주 (수탁번호 KACC 92466P).

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 항세균능은 스타필로코커스 (Staphylococcus) 속, 에쉬리키아 (Escherichia) 속 또는 슈다스로박터 (Pseudarthrobacter) 속 균주의 생장을 저해하는 것인, 바실러스 알티튜디니스 B6 (*Bacillus altitudinis* B6) 균주 (수탁번호 KACC 92466P).

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 항세균능은 바실러스 미스칸시 (*Bacillus miscanthi*)의 생장을 저해하는 것인, 바실러스 알티튜디니스 B6 (*Bacillus altitudinis* B6) 균주 (수탁번호 KACC 92466P).

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 균주는 비요소분해 메커니즘을 통해 탄산칼슘을 석출하는 것을 특징으로 하는, 바실러스 알티튜디니스 B6 (*Bacillus altitudinis* B6) 균주 (수탁번호 KACC 92466P).

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 균주는 세포 외부에 탄산칼슘 침전을 일으켜 방해석 침전물을 생성하는 것을 특징으로 하는, 바실러스 알티튜디니스 B6 (*Bacillus altitudinis* B6) 균주 (수탁번호 KACC 92466P).

청구항 6

바실러스 알티튜디니스 B6 (*Bacillus altitudinis* B6) 균주 (수탁번호 KACC 92466P)를 포함하는, 자기치유 혼화재.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 자기치유 혼화재는 방해석 침전물 (calcite precipitation)을 생성하여 콘크리트 또는 시멘트에 발생한 균열을 스스로 치유하는 것을 특징으로 하는, 자기치유 혼화재.

청구항 8

제6항의 콘크리트 또는 시멘트에 발생한 균열 자기치유 혼화재를 포함하는, 자기치유형 콘크리트 조성물.

청구항 9

바실러스 알티튜디니스 B6 (*Bacillus altitudinis* B6) 균주 (수탁번호 KACC 92466P), 이의 파쇄물, 이의 배양물, 상기 배양물의 농축액 및 상기 배양물의 건조물로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는, 콘크리트 또는 시멘트의 내구성 증진 및 균열 보수용 조성물.

청구항 10

바실러스 알티튜디니스 B6 (*Bacillus altitudinis* B6) 균주 (수탁번호 KACC 92466P), 이의 파쇄물, 이의 배양물, 상기 배양물의 농축액 및 상기 배양물의 건조물로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는, 지반 보수 또는 강화용 조성물.

청구항 11

바실러스 알티튜디니스 B6 (*Bacillus altitudinis* B6) 균주 (수탁번호 KACC 92466P)의 배양물을 시멘트 또는 콘크리트 구조물의 균열 부위에 도말하는 단계를 포함하는, 시멘트 또는 콘크리트 구조물의 균열 보수 방법.

청구항 12

바실러스 알티튜디니스 B6 (*Bacillus altitudinis* B6) 균주 (수탁번호 KACC 92466P)의 배양물을 시멘트 또는 콘크리트 구조물의 표면에 도말하는 단계를 포함하는 시멘트 또는 콘크리트 구조물의 내구성 증진 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 항세균능이 있는 바실러스 알티튜디니스 B6 균주 및 이를 포함하는 콘크리트 균열 보수용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 콘크리트는 지구상에서 가장 널리 사용되고 있는 재료로, 토목 및 건축, 플랜트에 이르기까지 대부분의 구조물은 콘크리트를 사용하여 건설되고 있다. 콘크리트는 타설이나 성형 후 일정 기간이 경과하면, 그 성능이 점차 저하하고 노후되므로 콘크리트 구조물은 항상 보수나 보강과 같은 일정한 유지관리 활동을 해야 한다. 콘크리트의 성능저하에 결정적 영향을 미치는 것이 콘크리트에 발생하는 균열 (crack)인데, 콘크리트에 균열 (crack)이 발생하면 콘크리트 내부에 유해한 외기나 수분, 화학 성분이 침투하여 콘크리트의 성능저하가 더욱 촉진된다. 나아가 콘크리트 내부에 침투한 수분, 염화물 이온 등에 의해 콘크리트 구조물 내부의 철근에 부식이 발생하여 추가적인 균열이 발생하거나 콘크리트가 탈락하는 현상이 일어나고, 또한 철근 부식에 의해 철근단면이 감소하여 성능이 저하됨으로써 종국에는 구조물이 붕괴하는 정도까지 이를 수 있다.

[0003] 콘크리트 구조물에 손상이 있으면 콘크리트 구조물의 성능이 설계 내용연수에 미치지 못하므로, 콘크리트 구조물의 유지관리를 위해 콘크리트 구조물의 시공시 균열을 제어할 수 있는 공법이나 다양한 방법의 보수공법을 도입할 필요가 있다. 균열제어공법은 균열발생을 저감할 수 있는 각종 섬유를 콘크리트에 혼입하여 타설하거나 와이어매시 (Wire mesh)를 콘크리트 구조물 내부에 설치하는 방법이고, 균열보수공법은 열화된 기존 콘크리트를 제거하고, 시멘트 재료에 고분자 수지 등을 혼입하여 물리성능 및 내구성, 작업성 등을 다소 향상시킨 폴리머

시멘트 모르타르를 충진하여 보수하는 방법이다.

[0004] 그런데 기존의 균열제어공법은 콘크리트 구조물에 발생하는 균열을 완벽히 방지하지 못하므로 추가적인 보수가 필요하여 근본적인 대책이 될 수 없다. 또한 균열보수공법은 보수된 부분도 추가적인 균열이 발생할 수 있어 지속적인 유지관리가 필요한 단점이 있으며, 특히 터널이나 지하구조물 같이 지표면 아래에 설치되는 콘크리트 구조물의 경우 지하수의 활동에 따라 균열부를 통해 누수 현상이 발생하여 이에 대해 보수공사를 진행할 경우 구조물의 지속적인 활용에 제약이 되고 막대한 공사기간과 비용이 발생하는 문제가 있다.

[0005] 이러한 문제를 해결하기 위해 미생물의 생화학적 반응으로 유도된 탄산칼슘 광물 형성 (MICP: microbially induced calcium carbonate precipitation)을 통한 친환경적인 콘크리트 균열 치유에 대한 연구가 집중되었다.

[0006] 미생물에 의해 유도되는 탄산칼슘 형성 (MICP; microbially induced calcium carbonate precipitation)은 자연계 도처에서 일어나는 현상으로 지구의 원소 순환에 일조하는 생지화학적 과정이다. 미생물은 pH 또는 용존무기탄소 (dissolved inorganic carbon; DIC) 농도를 높이는 대사과정을 통하여 주변에 칼슘이온이 존재 시 탄산칼슘 석출을 유도한다. 이러한 대사과정에는 광합성, 요소분해, 탈질화, 탈아미노 작용, 황산염 감소, 메탄 산화작용 등이 알려져 있다. 미생물의 세포막 또는 엑소폴리사카라이드 (EPS)는 핵형성점을 제공함으로써 미생물의 탄산칼슘 형성을 촉진한다. 미생물에 의한 탄산칼슘 형성은 최근 10년간 건축물의 보수, 토양 기반 강화, 탄소 고정, 석조물 문화유산 보존 및 중금속 흡착 등의 환경공학 분야에서 활발히 응용되고 있다. 특히 탄산칼슘형성 미생물은 자기치유콘크리트 기술에 활용됨으로써 콘크리트의 내구성을 증진시키고 균열을 보수하여 수명을 연장시킬 수 있다.

[0007] 탄산칼슘 석출 메커니즘 중 요소분해 대사는 요소 공급의 용이성으로 인하여 활발히 응용되고 있다. 요소분해능을 보유한 미생물은 주변 환경에 요소가 있을 때 유레이스 (urease)라는 요소분해효소를 활용하여 요소를 암모니아와 탄산으로 수화하여 탄산칼슘 형성에 적합한 환경을 조성한다. 그러나 요소분해과정에서 생성되는 대사물질인 암모니아는 장기적인 콘크리트 내구성을 저하시키며 환경유해물질 및 독성물질로 작용하여 사람에 의한 접촉이 많은 콘크리트 시설물에 바람직하지 못하다. 따라서 비요소분해 메커니즘을 활용하여 탄산칼슘을 형성하는 미생물에 대한 연구가 필수적이다. 또한, 콘크리트 내외 발생하는 균열을 통해 빗물과 같은 외부 물질에 의해 탄산염의 침투가 일어나 중성화가 진행되며, 이러한 상황이 장기간 진행될 시 병원성 미생물이 집락을 형성하여 인간의 건강에 직접적인 위험이 될 수 있다. 따라서 콘크리트 미세균열 치유 및 병원성 미생물 집락화를 방지하기 위해 환경 친화적인 방법을 고안할 필요가 있다.

[0008] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 친환경적으로 콘크리트에 적용하기 위해서 비요소성 및 항세균 활성이 있는 박테리아인 바실러스 알티튜디니스 B6 균주를 분리하고 동정했다. 탄산칼슘을 형성할 수 있는 바실러스 알티튜디니스 B6 균주의 배양액을 도포제로서 콘크리트에 사용하면 항세균 물질의 방출을 통해 균열 치유 과정에서 미세 균열을 빠른 시일 내에 밀봉하고 외부 세균에 의한 오염을 막을 수 있다. 특히, 콘크리트 내부 (pH 10-11)와 같은 알칼리성 조건에서 바실러스 알티튜디니스 B6 균주의 높은 생물막 형성은 모르타르 표면의 접착력을 향상시킬 수 있어 자가 치유 콘크리트에 대한 우수한 성능을 시사한다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2022-0069828호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 항세균 활성 및 탄산칼슘 (calcium carbonate) 형성능을 갖는 바실러스 알티튜디니스 B6 (*Bacillus altitudinis* B6) 균주 (수탁번호 KACC 92466P)를 제공하는 데 있다.

[0011] 또한, 본 발명의 다른 목적은 바실러스 알티튜디니스 B6 (*Bacillus altitudinis* B6) 균주 (수탁번호 KACC 92466P)를 포함하는 자기치유 혼화재를 제공하는 데 있다.

[0012] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 자기치유 혼화재를 포함하는 자기치유형 콘크리트를 제공하는 데 있다.

[0013] 또한, 본 발명의 다른 목적은 바실러스 알티튜디니스 B6 (*Bacillus altitudinis* B6) 균주 (수탁번호 KACC 92466P), 이의 파쇄물, 이의 배양물, 상기 배양물의 농축액 및 상기 배양물의 건조물로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 콘크리트 또는 시멘트의 내구성 증진 및 균열 보수용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0014] 또한, 본 발명의 다른 목적은 바실러스 알티튜디니스 B6 (*Bacillus altitudinis* B6) 균주 (수탁번호 KACC 92466P), 이의 파쇄물, 이의 배양물, 상기 배양물의 농축액 및 상기 배양물의 건조물로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 지반 보수 또는 강화용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0015] 또한, 본 발명의 다른 목적은 바실러스 알티튜디니스 B6 (*Bacillus altitudinis* B6) 균주 (수탁번호 KACC 92466P)를 이용한 시멘트 또는 콘크리트 구조물의 균열 보수 방법을 제공하는 데 있다.

[0016] 또한, 본 발명의 다른 목적은 바실러스 알티튜디니스 B6 (*Bacillus altitudinis* B6) 균주 (수탁번호 KACC 92466P)를 이용한 시멘트 또는 콘크리트 구조물의 내구성 증진 방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0017] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 항세균 활성 및 탄산칼슘 (calcium carbonate) 형성능을 갖는 바실러스 알티튜디니스 B6 (*Bacillus altitudinis* B6) 균주 (수탁번호 KACC 92466P)를 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은 바실러스 알티튜디니스 B6 (*Bacillus altitudinis* B6) 균주 (수탁번호 KACC 92466P)를 포함하는 자기치유 혼화재를 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 상기 자기치유 혼화재를 포함하는 자기치유형 콘크리트를 제공한다.

[0020] 또한, 본 발명은 바실러스 알티튜디니스 B6 (*Bacillus altitudinis* B6) 균주 (수탁번호 KACC 92466P), 이의 파쇄물, 이의 배양물, 상기 배양물의 농축액 및 상기 배양물의 건조물로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 콘크리트 또는 시멘트의 내구성 증진 및 균열 보수용 조성물을 제공한다.

[0021] 또한, 본 발명은 바실러스 알티튜디니스 B6 (*Bacillus altitudinis* B6) 균주 (수탁번호 KACC 92466P), 이의 파쇄물, 이의 배양물, 상기 배양물의 농축액 및 상기 배양물의 건조물로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 지반 보수 또는 강화용 조성물을 제공한다.

[0022] 또한, 본 발명은 바실러스 알티튜디니스 B6 (*Bacillus altitudinis* B6) 균주 (수탁번호 KACC 92466P)를 이용한 시멘트 또는 콘크리트 구조물의 균열 보수 방법을 제공한다.

[0023] 또한, 본 발명은 바실러스 알티튜디니스 B6 (*Bacillus altitudinis* B6) 균주 (수탁번호 KACC 92466P)를 이용한 시멘트 또는 콘크리트 구조물의 내구성 증진 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0024] 본 발명의 바실러스 알티튜디니스 B6 균주는 알칼리 내성, 포자 형성능을 가져 콘크리트 또는 시멘트 환경에서 적응력이 우수하고, 세포 외부에 탄산칼슘 침전을 일으켜 방해석 침전물을 형성하여 시멘트 또는 콘크리트 균열 보수용 조성물 또는 지반 강화용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 바실러스 알티튜디니스 B6 균주가 콘크리트 또는 시멘트 제조 시 혼화재로서 첨가되는 경우, 구조물 내부에 포자 상태로 존재하다가 콘크리트 또는 시멘트에 균열이 발생했을 때 활성화되어 균열 부위에 방해석 침전물을 축적시켜 균열을 충진함으로써 시멘트 또는 콘크리트의 사용수명을 연장시키는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 본 발명의 일실시예에 있어서, 토양에서 분리된 균주 샘플의 요소 분해 활성, 항세균 활성 및 알칼리 내성 확인 결과를 나타낸 도이다.

도 2는 본 발명의 일실시예에 있어서, B6 균주의 균주 동정 결과 및 포자 형성능 평가 결과를 나타낸 도이다.

도 3은 본 발명의 일실시예에 있어서, B6 균주의 생물막 형성 분석 및 EPS (exopolysaccharide) 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 4는 본 발명의 일실시예에 있어서, B6 균주의 상층액 가열 여부에 따른 항세균능 평가 결과를 나타낸 도이다.

도 5는 본 발명의 일실시예에 있어서, B6 균주의 배양물의 항세균능 평가 결과를 나타낸 도이다.

도 6은 본 발명의 일실시예에 있어서, 전장유전체 및 비교 유전체 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 7은 본 발명의 일실시예에 있어서, B6 균주 유래 물질의 HPLC 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 8은 본 발명의 일실시예에 있어서, B6 균주 배양액에 의한 모르타르 균열 치유율 분석 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현 예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허 청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0027] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어 (Terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시 예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 “포함”한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0028] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 '%'는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (w/w) %, 고체/액체는 (w/v) %, 그리고 액체/액체는 (v/v) %이다.

[0029] 이하, 본 발명에 대하여 보다 상세하게 설명하도록 한다.

[0031] 일 측면에서, 본 발명은 항세균 활성 및 탄산칼슘 (calcium carbonate) 형성능을 갖는 바실러스 알티튜디니스 B6 (*Bacillus altitudinis* B6) 균주 (수탁번호 KACC 92466P)에 관한 것이다.

[0032] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 항세균능은 스타필로코커스 (Staphylococcus) 속, 에쉬리키아 (Escherichia) 속 또는 슈다스로박터 (Pseudarthrobacter) 속 균주의 생장을 저해하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0033] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 항세균능은 바실러스 미스칸시 (*Bacillus miscanthi*)의 생장을 저해하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0034] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 균주는 비요소분해 메커니즘을 통해 탄산칼슘을 석출하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0035] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 균주는 세포 외부에 탄산칼슘 침전을 일으켜 방해석 침전물을 생성하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0036] 또한, 상기 균주는 다양한 형태의 미생물 담체에 고정시켜 사용될 수 있으며, 미생물 담체의 종류로는 melamine-based microcapsules, diatomaceous earth, polyurethane foam, silica gelpolyurethane 및 hydrogel이 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0037] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 균주는 내알칼리성 특징을 보유하고 있음을 확인하였다. 구체적으로, pH 11까지의 환경에서 생존 및 생장 가능하여 다양한 환경적 스트레스에 저항성을 보이는바, 고알칼리 환경인 콘크리트에 적용 가능성이 높으며, 콘크리트 구조물의 외부 균열은 물론 내부 균열의 보수에도 적용될 수 있다.

[0038] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 바실러스 알티튜디니스 B6 균주는 혼화재 형태로 콘크리트 제조단계에서 혼합하여 사용할 수 있으며, 상기 바실러스 알티튜디니스 B6 균주를 혼화재로 포함하는 콘크리트는 보수 작업 없이 스스로 균열을 치유하는 자기치유형 콘크리트로 사용될 수 있다.

[0040] 일 측면에서, 본 발명은 바실러스 알티튜디니스 B6 (*Bacillus altitudinis* B6) 균주 (수탁번호 KACC 92466P)를

포함하는 자기치유 혼화재에 관한 것이다.

[0041] 본 발명의 자기치유 혼화재는 상술한 바실러스 알티튜디니스 B6 (*Bacillus altitudinis* B6) 균주 (수탁번호 KACC 92466P)를 포함하기 때문에, 상술한 본 발명의 바실러스 알티튜디니스 B6 균주와 중복된 내용은 중복된 내용의 기재에 의한 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

[0042] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 자기치유 혼화재는 방해석 침전물 (calcite precipitation)을 생성하여 콘크리트 또는 시멘트에 발생한 균열을 스스로 치유하는 것일 수 있다.

[0043] 본 발명에서 사용되는 용어 "혼화재"는 콘크리트의 성질 개량을 위해 쓰이는 혼화 재료로서, 콘크리트 등에 특별한 성질을 주기 위해 반죽 혼합 또는 반죽 혼합 중에 가해지는 시멘트, 물, 골재, 섬유질재 이외의 재료를 총칭한다. 본 발명에서는 콘크리트 또는 시멘트에 자기치유 특성을 부여하기 위해 첨가되는 재료를 의미한다.

[0045] 일 측면에서, 본 발명은 상기 자기치유 혼화재를 포함하는 자기치유형 콘크리트 조성물에 관한 것이다.

[0046] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 자기치유형 콘크리트 조성물은 결합재와, 골재, 물, AE제, 미생물 배양액을 더 포함할 수 있다.

[0047] 또한, 상기 결합재로는 시멘트를 사용할 수 있지만, 이외에도 플라이애쉬, 바텀애쉬, 슬래그 등의 산업부산물을 사용 할 수도 있다. 상기 결합재와 물은 대략 1:1의 중량비로 혼합될 수 있다.

[0048] 또한, 상기 골재로는 모래를 사용할 수 있다. 상기 골재는 결합재와 거의 동일한 중량으로 혼합될 수 있다. 즉, 골재와 결합재는 대략 1:1의 중량비로 혼합될 수 있다.

[0049] 또한, AE제는 콘크리트 내에 다량의 미세 공극 (A)을 형성함으로써 미생물 배양액 내의 미생물 (M)이 생존할 수 있는 환경을 조성한다. 상기 AE제는 콘크리트 조성물의 결합재 (시멘트) 중량에 대해 0.3 ~ 1.0 중량%로 혼합되는 것이 바람직한데, AE제가 0.3 중량% 미만으로 혼입될 경우 공기 연행이 거의 되지 않아 공극 발생량이 미미하여 미생물 생존률이 현저히 저하되고, AE제가 1.0 중량%를 초과하게 되면 과다한 공극으로 인하여 콘크리트의 강도가 현저히 저하되는 단점이 발생한다. 따라서 AE제는 시멘트 중량에 대해 0.3 ~ 1.0 중량%, 더욱 바람직하기로 0.3 ~ 0.5 중량%로 혼합된다.

[0050] 본 발명에서 사용되는 용어 "자기치유형 콘크리트"란 콘크리트구조물에 균열이 발생할 경우 콘크리트 내부에 포함하고 있는 재료가 콘크리트에 침투된 물 (H_2O)과 반응하여 발생한 균열을 스스로 복원하고 치유 (Self Healing)하는 콘크리트를 말한다.

[0052] 일 측면에서, 본 발명은 바실러스 알티튜디니스 B6 (*Bacillus altitudinis* B6) 균주 (수탁번호 KACC 92466P), 이의 파쇄물, 이의 배양물, 상기 배양물의 농축액 및 상기 배양물의 건조물로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 콘크리트 또는 시멘트의 내구성 증진 또는 균열 보수용 조성물에 관한 것이다.

[0053] 본 발명의 콘크리트 또는 시멘트의 내구성 증진 또는 균열 보수용 조성물은 상술한 바실러스 알티튜디니스 B6 (*Bacillus altitudinis* B6) 균주 (수탁번호 KACC 92466P)를 포함하기 때문에, 상술한 본 발명의 바실러스 알티튜디니스 B6 균주와 중복된 내용은 중복된 내용의 기재에 의한 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

[0054] 상기 조성물을 시멘트 또는 콘크리트 구조물의 균열 부위에 처리하는 경우, 균열 부위가 미세할 경우 바실러스 알티튜디니스 B6 (*Bacillus altitudinis* B6) 균주 (수탁번호 KACC 92466P) 또는 그 배양액을 바로 처리하고, 균열 부위가 일정 크기 이상일 경우 상기 균주 혼합물 또는 그 배양액을 시멘트 모르타르에 투입한 후, 그 시멘트 모르타르를 시멘트 페이스트 또는 콘크리트 구조물의 균열 부위에 처리한다.

[0055] 상기 배양물이란 특정 미생물을 배양배지 또는 배양액에서 배양한 것을 의미하며, 배양물의 농축물도 포함한다. 상기 배양물은 상기 특정 미생물 또는 그의 부산물을 포함하는 것을 의미하고, 그 제형이 한정되지 아니하며, 일 예로 액체 또는 고체일 수 있다.

[0056] 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.

[0057] 상기 조성물의 pH는 조성물을 처리하는 콘크리트 환경에 따라서 용이하게 변경 가능하며, 바람직하게는 최대 pH 12 이하로 조성할 수 있다.

[0058] 상기 콘크리트 또는 시멘트의 내구성 증진 또는 균열 보수용 조성물 또는 시멘트 건축물 (콘크리트)의 강도 증진에 사용되는 첨가제, 또는 시멘트 건축물 (콘크리트)의 균열 보수에 사용되는 보수재 또는 충진재를 의미하는 것으로, 상기 바실러스 알티튜디니스 B6 (*Bacillus altitudinis* B6) 균주 (수탁번호 KACC 92466P) 또는 그 배양액에 의해 내구성 증진 또는 균열 보수 효과가 향상될 수 있다.

[0059] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 콘크리트 또는 시멘트란 콘크리트 구조물 또는 시멘트 구조물의 제조에 이용되는 조성물을 이용하고, 칼슘을 주성분으로 하는 자재를 의미하고, 상기 콘크리트는 시멘트, 물, 골재를 배합하여 제조된 시멘트 혼합물로서 시멘트 모르타르, 양생 전 레미콘 (ready-mixed concrete), 및 양생 후 콘크리트 구조물을 포함한다.

[0060] 본 발명에서 사용되는 용어 “균열”은 콘크리트 타설 후부터 응결이 종료할 때까지 발생하는 초기균열과 경화 후에 발생하는 균열을 모두 포함하고, 초기균열은 콘크리트 내에서의 불균등한 침하, 콘크리트 표면에서의 급격한 수분손실, 콘크리트 표면의 경화가 진행되는 동안 내부 콘크리트의 침하가 동시에 이루어짐에 의한 균열, 거푸집 변형에 따른 균열 및 진동, 재하에 의한 균열 등으로 나눌 수 있다. 콘크리트가 경화한 후에 발생하는 균열의 종류는 건조수축에 의한 균열, 알칼리골재반응, 이상물질의 혼입, 철근의 녹 등의 화학반응에 의하여 일어나는 균열, 열응력 등 콘크리트 내외의 온도차에 의하여 생기는 균열, 구조물의 형상, 배근상의 응력집중에 기인하는 균열, 하중과다 또는 과격한 기계진동에 의한 균열, 지진 충격 등의 우발사고에 의한 균열 등으로 구분할 수 있다.

[0061] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 내구성 증진 또는 균열 보수용 조성물은 시멘트 혼합물의 제조 시 특정 기능을 향상시키기 위해 첨가되는 조성물을 의미하는 것으로, 상기 바실러스 알티튜디니스 B6 (*Bacillus altitudinis* B6) 균주 (수탁번호 KACC 92466P) 또는 그 배양액 외에 다른 성분이 더 포함될 수 있다.

[0062] 상기 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 본 발명의 바실러스 알티튜디니스 B6 (*Bacillus altitudinis* B6) 균주 (수탁번호 KACC 92466P), 이의 파쇄물, 이의 배양물, 상기 배양물의 농축액 및 상기 배양물의 건조물로 이루어진 군에서 선택된 하나 를 0.001 내지 99.99 중량%, 바람직하게는 0.1 내지 99 중량%로 포함할 수 있고, 상기 조성물의 사용방법 및 사용목적에 따라 유효성분의 함량을 적절히 조절할 수 있다.

[0064] 일 측면에서, 본 발명은 바실러스 알티튜디니스 B6 (*Bacillus altitudinis* B6) 균주 (수탁번호 KACC 92466P), 이의 파쇄물, 이의 배양물, 상기 배양물의 농축액 및 상기 배양물의 건조물로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 지반 보수 또는 강화용 조성물에 관한 것이다.

[0065] 본 발명의 지반 보수 또는 강화용 조성물은 상술한 바실러스 알티튜디니스 B6 (*Bacillus altitudinis* B6) 균주 (수탁번호 KACC 92466P)를 포함하기 때문에, 상술한 본 발명의 바실러스 알티튜디니스 B6 균주와 중복된 내용은 중복된 내용의 기재에 의한 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

[0066] 상기 지반 보수 또는 강화용 조성물은 지반의 공극, 공동, 갈라진 틈 등이 채워져 연약지반을 강화시키고, 구조물의 입자를 견고화시켜 토양 또는 지반의 강도를 증진시킬 수 있다.

[0068] 일 측면에서, 본 발명은 바실러스 알티튜디니스 B6 (*Bacillus altitudinis* B6) 균주 (수탁번호 KACC 92466P)의 배양물을 시멘트 또는 콘크리트 구조물의 균열 부위에 도말하는 단계를 포함하는 시멘트 또는 콘크리트 구조물의 균열 보수 방법에 관한 것이다.

[0069] 본 발명의 일 실시예에서, 바실러스 알티튜디니스 B6 (*Bacillus altitudinis* B6) 균주 (수탁번호 KACC 92466P)의 배양물을 시멘트 또는 콘크리트 구조물에 처리하는 경우 상기 구조물에 처리된 균주가 형성하는 탄산칼슘에 의하여 구조물의 균열 등을 채우는데 사용될 수 있고, 이로써 균열이 충전되고, 구조물의 강도를 증진시킬 수 있다.

[0071] 일 측면에서, 본 발명은 바실러스 알티튜디니스 B6 (*Bacillus altitudinis* B6) 균주 (수탁번호 KACC 92466P)의 배양물을 시멘트 또는 콘크리트 구조물의 표면에 도말하는 단계를 포함하는 시멘트 또는 콘크리트 구조물의 내

구성 증진 방법에 관한 것이다.

[0072] 본 발명의 일 실시예에서, 바실러스 알티튜디니스 B6 (*Bacillus altitudinis* B6) 균주 (수탁번호 KACC 92466P)의 배양물을 토양에 처리하는 경우 상기 토양에 처리된 균주가 형성하는 탄산칼슘에 의하여 지반의 공극, 공동, 갈라진 틈 등이 채워져 연약지반을 강화시키고, 토양 입자를 견고화하는 효과를 통해서 토양 또는 지반의 강도를 증진시킬 수 있다.

[0074] 이하, 본 발명의 실시예를 첨부된 도면을 참고하여 보다 상세하게 설명하도록 한다. 그러나, 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐, 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아닐 것이다.

[0076] **<실시예 1> 항세균 자기치유 콘크리트 적용 균주의 분리 및 동정**

[0077] **1-1. 샘플 채취 및 배양**

[0078] 대부도 논 토양 샘플에서 탄산칼슘 석출 및 포자 형성능을 보유한 균주를 분리하기 위하여, 토양 시료 1g을 인산완충식염수 (pH 7.5)에 희석시킨 뒤 80℃에서 20분간 끓였다. 진핵 생물의 성장 억제를 위해 cycloheximide (1%)가 포함된 고알칼리성 Luria-Bertani (LB, pH 10.5) 평판배지에 시료를 도말한 뒤 48시간 동안 배양하였다.

[0080] **1-2. 비요소 활성 균주 선별**

[0081] 한편, 우레아제는 요소의 가수분해를 촉매하여 암모니아를 생성하는 효소로서, 우레아제 활성이 있는 균주는 암모니아를 생성하여 액체배지의 pH를 변화시키기 때문에 pH 지시약을 첨가함으로써 이를 가시적으로 확인할 수 있다. 따라서, 총 24개의 미생물 군집을 무작위로 선택하고, 요소 활성이 없는 균주를 선별하기 위해 우레아제 활성 시험 (urease activity assay)를 수행하였으며, Alkaline generation 균주를 선별하기 위해 동일한 시료를 BTB (bromothymol blue) 용액이 포함된 배지에 1 x 10^6/ml의 양으로 접종하여 색 변화를 관찰하였다. 그 결과, 우레아제 활성 시험 결과가 음성으로 나타난 시료 (도 1a 상단 빨간색 박스)들 중에서, A5, A6, A14, A16 및 B6 시료가 pH를 가장 많이 상승시키는 것으로 나타나 이를 후보 균주로 선별하였다 (도 1a 하단).

[0082] 선별된 후보 균주는 16S rRNA 동정 및 BOX-PCR 방법을 통해 중복 균주를 제거하여 A6, A16 및 B6 시료가 최종 후보 균주로 선별되었다.

[0084] **1-3. 항세균 활성 평가**

[0085] 상기 실시예 1-2를 통해 선별된 3종의 후보 균주에 대하여, 두 가지 임상 병원체인 *Staphylococcus aureus*와 *Escherichia coli*에 대한 항세균 활성을 평가하였다. 구체적으로, LB 평판 배지에 1x10^6 개/ml의 임상 병원체를 도말한 뒤에, 정지상까지 키운 최종 후보 균주 A6, A16 및 B6 시료를 10 μl 적하하여 호기 환경에서 24시간 동안 배양한 후 생장억제대 (inhibition zone)의 직경 (mm)을 측정하였다.

[0086] 그 결과, 도 1b에 나타낸 바와 같이 *Staphylococcus aureus*에 대한 생장억제대 (inhibition zone)의 직경 (mm)은 A6 시료에서 0.8 mm, A16 시료에서 0.7 mm, B6 시료에서 5.8 mm으로 나타났으며, *Escherichia coli*에 대한 생장억제대 (inhibition zone)의 직경 (mm)은 A6 시료에서 0.0 mm, A16 시료에서 0.0 mm, B6 시료에서 0.0 mm으로 나타났다. 따라서, 3종의 최종 후보 균주 중 항세균 활성이 가장 높은 B6 시료를 최종 선발하였다.

[0088] **1-4. 알칼리 내성 검증**

[0089] B6 균주의 알칼리 내성을 검증하기 위해, 다양한 pH 수준 (pH 7-12)의 LB 5ml 액체배지에 1 x 10^6/ml의 양으로 접종된 뒤 30℃, 200 rpm 조건에서 50시간 동안 배양하였다. 이후, 2시간 간격으로 UV/Vis spectrophotometer를 이용하여 Optical Density 600 (OD_{600})에서 세포 밀도 (cell density)를 측정하여 세포 생존율을 평가하였다.

[0090] 그 결과, 도 1c에 나타낸 바와 같이 B6 균주는 LB배지에서 pH 7 - 11까지 생장이 가능한 것으로 나타났다. 이러한 결과는 토양 시료에서 분리된 B6 균주가 알칼리 내성을 가진 균주로서, 강알칼리성인 콘크리트에서도 생존이 가능한 호알칼리성 미생물이라는 것을 의미한다.

[0092] **1-5. 탄산칼슘 형성능 확인**

[0093] pH 전극과 ICP-OES를 이용하여, B6 균주 배양 시 pH level과 calcium ion 농도 변화를 측정 하였다. 그 결과 도 1d에 나타낸 바와 같이 B6 균주의 배양 시간이 경과함에 따라 pH level이 6.0에서 7.0까지 증가하는 것을 확인하였으며, 반면에 calcium ion 농도는 2.5 x 10^3 ppm에서 0.5 x 10^3 ppm로 급격하게 감소하는 경향성을 확인하였다. 이러한 결과는 B6 균주가 탄산칼슘 형성이 가능하다는 것을 의미한다.

[0095] **1-6. 포자 형성능 확인**

[0096] B6 균주의 포자 형성 여부를 관찰하기 위해 B6 균주 세포 배양액 (1ml)을 채취한 후 광학현미경으로 관찰하였다. 탄산칼슘 침전물은 세포를 80℃에서 10분간 가열 용해한 후 마이크로웨이브에서 1분간 가열한 후 7800 rpm에서 15분간 원심분리하여 침전물을 추출한 뒤 침전시켰다. 침전물은 1.7ml 튜브에 회수하여 100% 에탄올로 현탁함으로써 탈수하였다. 완성된 시료는 알루미늄 스터브 (aluminium stub)에 올려 5시간 동안 건조한 뒤 Pt 코팅을 5분간 진행하였다. 코팅이 완료된 시료는 주사전자현미경 (scanning electron microscopy, SEM)을 통해 세포 주변에 탄산칼슘이 석출된 양상을 관찰하였다.

[0097] 도 2b는 B6 균주가 포자형성이 가능하다는 것을 현미경을 통해 관찰한 결과를 나타낸 도이며, 도 2c는 SEM을 이용하여 B6 균주의 포자형성을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

[0098] 그 결과, 도 2b, c에 나타낸 바와 같이 B6 균주를 LB (5 mL)에 24시간 배양 후 회수하여 현미경, SEM을 이용하여 포자형성이 가능하다는 것을 확인 하였다.

[0099] 박테리아 포자는 극도의 기계적, 화학적 스트레스에 견딜 수 있는 특수 셀 (세포)이며, 이 특수한 종류의 포자는 200년 이상 생존을 유지할 수 있으며, 상기 박테리아 포자는 공기와 물을 접촉하게 되면 활성화되는 것으로 알려져 있다.

[0100] 따라서, 이러한 결과는 B6 균주가 콘크리트 내에 혼입되는 경우 박테리아 포자를 형성함으로써 휴면 (dormant) 상태로 콘크리트 모체 내에 고착되어 콘크리트와 같은 극한의 환경에서도 오랫동안 생존이 가능하다는 것을 의미한다.

[0101] 또한, B6 균주가 세포 주변에 탄산칼슘을 석출하는 것을 확인하였으므로, B6 균주 콘크리트 내부에서 박테리아 포자 상태로 존재하다가 콘크리트 또는 시멘트에 어떤 균열이나 미세한 손상이 발생되면 공기와 물을 접촉하게 되고, 이를 통해 박테리아 포자가 휴면 상태를 벗어나 대사활동을 통한 방해석 침전 작용을 개시하여 균열을 충진한다는 것을 의미한다.

[0103] **1-7. B6 균주의 동정**

[0104] 16S rRNA 유전자를 기반으로 한 중합효소 연쇄반응 (94° C에서 90초, 94° C에서 45초, 58° C에서 60초, 72° C에서 45초, 마지막으로 10분 동안 72° C에서 DNA 신장)을 통해 유전체 염기서열을 획득하고, 상기 유전체 염기서열 및 MEGA-X 프로그램을 사용하여 16S rRNA 기반 근연종 계통수를 작성하였다.

[0105] 그 결과, 토양에서 분리된 B6 균주는 *Bacillus altitudinis* 균주와 유사성이 가장 높은 것으로 나타났다 (도 2a 참조). 본 발명의 미생물을 바실러스 알티튜디니스 B6 (*Bacillus altitudinis* B6)으로 명명하였으며, 한국미생물보존센터에 2022년 11월 03일자로 기탁하였다 (수탁번호 KACC 92466P).

[0107] **<실시예 2> 생물막 형성 분석 및 EPS (exopolysaccharide) 분석**

[0108] 바실러스 알티튜디니스 B6 균주 (수탁번호 KACC 92466P)를 220 rpm 조건에서 96구 배양판에 200 μl의 LB (pH7

- 11) 배지를 분주한 뒤 1 x 10^6/ml의 양으로 접종하여 6시간 및 9시간 동안 정지상태로 배양하였다. 생물막(biofilm) 형성을 확인하기 위해 생물막 시료는 Ruby biofilm matrix stain 염료로 염색하여 공초점 레이저 주사 현미경을 통해 관찰하였다. 또한 생물막의 정량화를 위하여 배양 후 생성된 생물막은 증류수로 씻어내고 0.1% (w/v) 크리스탈 바이올렛 (CV) 염료로 염색하였다. CV 염료에 부착된 생물막을 95% 에탄올에 용해시켜 흡광도 595 nm에서 측정하였다. 이어서, 바실러스 알티튜디니스 B6 균주의 배양액에서 EPS를 측정하기 위하여 PBS로 세척하고 흡광도 600 nm에서 세포 밀도를 측정한 뒤 congo-red 용액 (0.004%) 으로 30℃ 조건에서 15분간 염색하였다. 배양 후 30분간 14,000 rpm 으로 원심분리한 후 상층액만 수거하여 흡광도 490 nm를 측정하였다.

[0109] 도 3a는 공초점 레이저 주사현미경 관찰 결과를 나타낸 도이고, 도 3b는 생물막 형성 정도를 정량화하여 나타낸 그래프이며, 도 3c는 EPS (exopolysaccharide) 측정 결과를 나타낸 그래프이다.

[0110] 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이 B6 균주는 높은 pH 환경에서 바이오필름, EPS를 더 많이 형성하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 B6 균주가 고알칼리 및 염기 환경인 콘크리트 매트릭스 내에서 탄산칼슘 형성이 가능하다는 것을 의미한다.

[0112] **<실시예 3> 상층액 내 항세균 능력 검증**

[0113] 바실러스 알티튜디니스 B6 균주 (수탁번호 KACC 92466P)의 상등액에 포함된 배양산물의 항세균 효과를 검증하기 위하여 30℃, 200 rpm 조건에서 48시간 동안 배양하여 정지상에 도달시켰다. 배양 후 4℃에서 14,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 세포를 제거하였다. 수거한 상층액을 멸균 필터 (0.22 μm)로 여과시킨 뒤 LB 평판 배지에 도말하여 무세포 상태임을 확인하였다. 상층액은 단백질 정량 방법인 Bradford assay를 통해 3회 정량화 되었다. 무세포 상층액에서 항세균성 펩타이드의 열안정성을 시험하기 위해 90° C로 1시간 가열하였다. 끓인 상층액과 끓이지 않은 상층액은 500 μg/ml의 농도로 표적 박테리아 *Staphylococcus aureus* KCCM 11335, *Bacillus miscanthi* DSM 109981 또는 *Pseudarthrobacter sulfonivorans* DSM 14002가 1 x 10^6/ml의 양으로 도말된 LB 평판배지에 각각 적하하였다. 또한, 같은 농도의 상층액을 LB 배지와 1:1 비율로 조합하여 표적 박테리아 3종의 성장곡선을 측정하였다.

[0114] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이 바실러스 알티튜디니스 B6 균주의 상층액에 대하여 3종의 표적 박테리아 모두 상층액의 가열 여부와 관계없이 동일한 생장 저해 효과를 나타내었다.

[0116] 이어서, 상층액과 LB 배지로 조합된 용액에 표적 박테리아 *S. aureus* KCCM 11335, *B. miscanthi* DSM 109981 또는 *P. sulfonivorans* DSM 14002를 1 x 10^6/ml의 양으로 접종한 뒤에 100% 에탄올로 현탁하여 탈수한 뒤 알루미늄 스터브 (aluminium stub)에 올려 5시간 동안 건조한 후 Pt 코팅을 5분간 진행하였다. 또한, 상기와 같은 표적 박테리아 시료는 유세포 분석기 (Flow cytometry)를 사용하여 정량화하였다.

[0117] 상층액 내 존재하는 항세균성 물질을 에틸아세테이트로 추출한 뒤, 표적 박테리아가 1 x 10^6/ml의 양으로 도말된 LB 평판배지 위 8mm 디스크 페이퍼에 50 μg/ml 농도로 적하하였다. 같은 조건의 에틸아세테이트 추출 용액을 표적 박테리아가 2 x 10^6/ml의 양으로 접종되어있는 LB 배지와 1:1로 혼합하여 항세균능을 검증하였다.

[0118] 도 5a는 B6 균주 상등액을 표적 박테리아 (4종) 처리 시 사멸한 결과를 시각적으로 SEM을 이용해서 나타낸 도이고, 도 5b는 B6 균주 상등액을 H_2O와 Ethyl acetate로 추출한 용액을 처리하여 표적 박테리아의 생장 inhibition zone을 확인한 결과를 나타낸 도이며, 도 5c는 B6 균주 상등액을 표적 박테리아 (4종) 처리 시 Syto9과 PI를 이용하여 유세포 분석결과를 나타낸 도이고, 도 5d는 B6 균주 상등액을 H_2O와 Ethyl acetate로 추출한 용액을 처리하여 표적 박테리아 (4종)을 처리한 결과를 나타낸 그래프이다.

[0119] 그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이 B6 균주 상등액 및 Ethyl acetate 추출액을 표적 박테리아 (4종)에 처리 시 사멸하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 B6 균주의 상등액이 표적 박테리아 (4종)에 대해 항균능이 있음을 의미한다.

[0120] 따라서, 상기 B6 균주는 콘크리트 미세균열에 다른 균 (병원균)의 집락화를 막아 조금 더 효과적인 균열치유가 가능할 것으로 예상된다.

[0122] **<실시예 4> 전장유전체 및 비교 유전체 분석**

[0123] 바실러스 알티튜디니스 B6 균주 (수탁번호 KACC 92466P) 및 11종의 근연종의 유전체 DNA을 이용하여 안티스매쉬 (antiSMASH) 데이터베이스를 활용하여 2차 대사 산물 및 항균물질 생산 가능성을 분석하였다.

[0124] 그 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이 상동성 (identitiy) 30% 기준 총 10개의 이차대사산물을 만들 수 있는 것을 확인하였다. 상기 바실러스 알티튜디니스 B6 균주는 5개의 이차대사산물 (Bacillibactin, Fengycin, Thiocillin 1, Bacilysin, Lichenysin)을 생성할 수 있으며 상기 실시예 3의 결과와 종합해보면 티오실린 (Thiocillin 1)으로 인한 항세균능을 갖는 것으로 예상된다.

[0126] **<실시예 5> 바실러스 알티듀디니스 B6 균주 유래 물질의 HPLC 분석**

[0127] 바실러스 알티튜디니스 B6 균주 (수탁번호 KACC 92466P)와 비교 균주인 바실러스 세레우스를 LB 액체 배지 (500ml)에 각각 1 x 10^6/ml의 양으로 접종한 뒤 30℃, 200 rpm 조건에서 60시간동안 진탕 배양시켰다. 배양 후 각각의 무세포 상층액을 4℃, 7,800 rpm에서 원심 분리하여 수확한 뒤 동결건조기를 사용하여 수분을 제거하였다. 용매 A (증류수 + 0.1 % 트리플루오로아세트산) 와 용매 B (아세토니트릴 + 0.1 % 트리플루오로아세트산)을 1:1 비율로 혼합한 용액에 시료를 재현탁 한 뒤 불용성 물질을 제거하기 위해 0.45 μm 필터로 여과하였다. 필터 된 샘플 (100 μl)를 역상 고성능 액체 크로마토그래피 (reverse phase high-performance liquid chromatography, RP-HPLC/UV)로 350 nm에서 a INNO C18 컬럼 (4.6 x 250 mm, 5.0 μm, Youngjin Biochrom, Repubilic of Korea)을 사용하여 형성되는 피크를 분석하였다. 이동상은 용매 A와 용매 B를 gradient 조건으로 표 1에 나타나 있다.

[0128] 도 7a는 B6 균주 상등액의 HPLC/UV 분석 결과를 나타낸 그래프이고, 도 7b는 B6 균주 상등액 HPLC/UV 분석결과 1번 peak의 spectrum 결과를 나타낸 그래프이며, 도 7c는 비교 균주인 *Bacillus cereus* ATCC 14579 균주 상등액의 HPLC/UV 분석 결과를 나타낸 그래프이고, 도 7d는 *Bacillus cereus* ATCC 14579 균주 상등액 HPLC/UV 분석 결과 1번 peak의 spectrum 결과를 나타낸 그래프이다.

[0129] 그 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이 역상 고성능 액체 크로마토그래피 결과 확인된 11분에 검출된 1번 피크를 확인하였으며, 바실러스 세레우스 시료에도 같은 피크를 확인하였다. 11분에 검출된 스펙트럼 형태를 비교 한 결과 약 219 nm, 332 nm에서 형성되는 것을 확인하였다.

[0130] 이러한 결과는 B6 균주 상등액 내 *Bacillus cereus* ATCC 14579와 동일한 thiocillin1의 함유 가능성을 의미한다.

표 1

[0132]

시간 (분)	용매 A (%)	용매 B (%)
0	90	10
1	90	10
35	0	100
40	0	100
45	90	10

[0134] **<실시예 6> 바실러스 알티듀디니스 B6 균주 배양액에 의한 모르타르 균열 치유율 분석**

[0135] 1종 보통 포틀랜드 시멘트와 ISO 표준 모래, 수돗물을 사용하여 모르타르 시편을 제작하였다. 모르타르 배합비는 표 2에 나타내었다. 모르타르의 비빔은 KS L5109 방법대로 수행하였다. 모르타르 비빔 즉시 가로세로 40 mm, 높이 10 mm 크기의 주형 (mold)에 타설하여 균열 치유 실험을 위한 시편 (이하 치유시편)을 제작하였다, 치유시편은 타설 후 1일 뒤 탈형 하였고, 이후 25℃ 에서 수중 양생 하였다. 양생 28일차 치유시편에 0.3 mm 너비의 균열을 유도하였다. 모르타르 둘레는 파라필름 (parafilm)으로 감아 고정하였다. 상기 바실러스 알티튜디니스

B6 균주를 LB 액체 배지 (5 mL)에 1 x 10^6/ml의 양으로 접종한 뒤 30℃, 200 rpm 조건에서 24시간 동안 배양한 후, 바실러스 알티튜디니스 B6 균주의 배양액을 매일 모르타르 크랙에 1 ml씩 분주하여 도포제로서 치유율을 관찰 하였다. 최대 14일까지 치유양생을 진행하였고 치유 기간 동안 시편은 24시간 내 수돗물에 절반만 잠기게 두었다.

[0136] 바실러스 알티튜디니스 B6 균주 (수탁번호 KACC 92466P) 배양액을 처리 유무에 따른 균열 치유율을 비교한 결과는 도 8a, b에 나타내었다.

[0137] 그 결과, 바실러스 알티튜디니스 B6 균주의 배양액을 처리한 경우 모르타르 시편에서 균열이 빠르게 치유되는 것으로 나타났으며, 처리하지 않은 시편에서는 치유가 되지 않는 것을 확인할 수 있다. 모든 시편에서 조금씩이나마 탄산칼슘이 침적 되었으나, 바실러스 알티튜디니스 B6 균주의 배양액을 처리한 시편에서 가장 견고한 형태의 탄산칼슘이 형성되어 있는 것을 확인하였다.

표 2

[0139]

시멘트 (g)	모래 (g)	물 (g)
2.025	4.05	8.1

[0141] 이어서, SEM 촬영 및 EDX 분석을 진행하기 위해 균열 치유율 분석에 사용한 시편의 균열에 형성된 탄산칼슘을 회수하여 사용하였다. 모르타르 시편 균열 내 형성된 탈산칼슘을 1.7ml 튜브에 회수하였고, 튜브에 100% 에탄올을 현탁함으로써 탈수하였다. 이로써 완성된 시료는 알류미늄 스터브 (aluminium stub)에 올려 5시간 동안 건조하였다. SEM 촬영 직전에는 Pt 코팅을 5분간 진행하였다.

[0142] 그 결과, 도 8c-e에 나타낸 바와 같이 바실러스 알티튜디니스 B6 균주의 배양액을 처리한 시편의 경우 탄산칼슘과 바실러스 알티튜디니스 B6 균주가 관찰되었으나 (도 8d), 배양액을 처리하지 않은 reference 시편에서는 탄산칼슘이 관찰되지 않았다 (도 8c). 또한, 형성된 광물질이 칼슘 (Ca), 탄소 (C), 산소 (O)를 주성분으로 하는 탄산칼슘임을 EDX 분석을 통해 증명하였다 (도 8e).

[0144] 상기와 같은 결과를 종합해보면, 본 발명의 바실러스 알티튜디니스 B6 균주는 탄산칼슘 형성능, 항세균능 및 포자형성능을 가지는 호알칼리성 미생물로서, 박테리아 포자를 형성하여 강알칼리성인 콘크리트 내에서 오랜 시간 동안 생존이 가능하고, 대사활동을 통해 세포 외부에 탄산칼슘 침전을 일으켜 방해석 침전물을 생성함으로써 시멘트 또는 콘크리트 균열을 스스로 치유할 수 있다는 것을 의미한다.

[0145] 또한, 상기 바실러스 알티튜디니스 B6 균주는 방해석 침전물을 형성하여 콘크리트의 균열과 기공을 막아 궁극적으로는 콘크리트의 강도와 내구성을 향상시킬 수 있다.

[0147] 이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 구체적인 실시예를 상세하게 설명되었으나, 본 발명의 사상을 이해하는 당업자는 동일한 사상의 범위 내에서 다른 구성요소를 추가, 변경, 삭제 등을 통하여, 퇴보적인 다른 발명이나 본 발명 사상의 범위 내에 포함되는 다른 실시예를 용이하게 제안할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상술한 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구의 범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구의 범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

수탁번호

[0149]

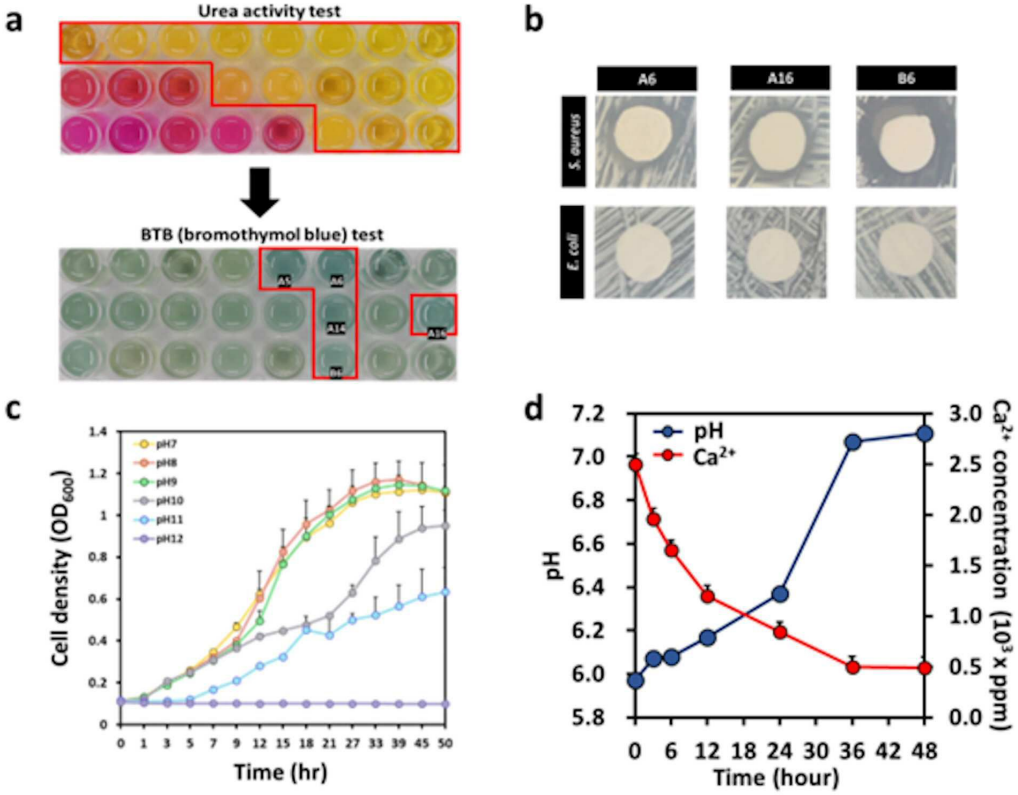
기탁기관명 : 농촌진흥청 국립농업과학원 미생물은행(KACC)

수탁번호 : KACC92466P

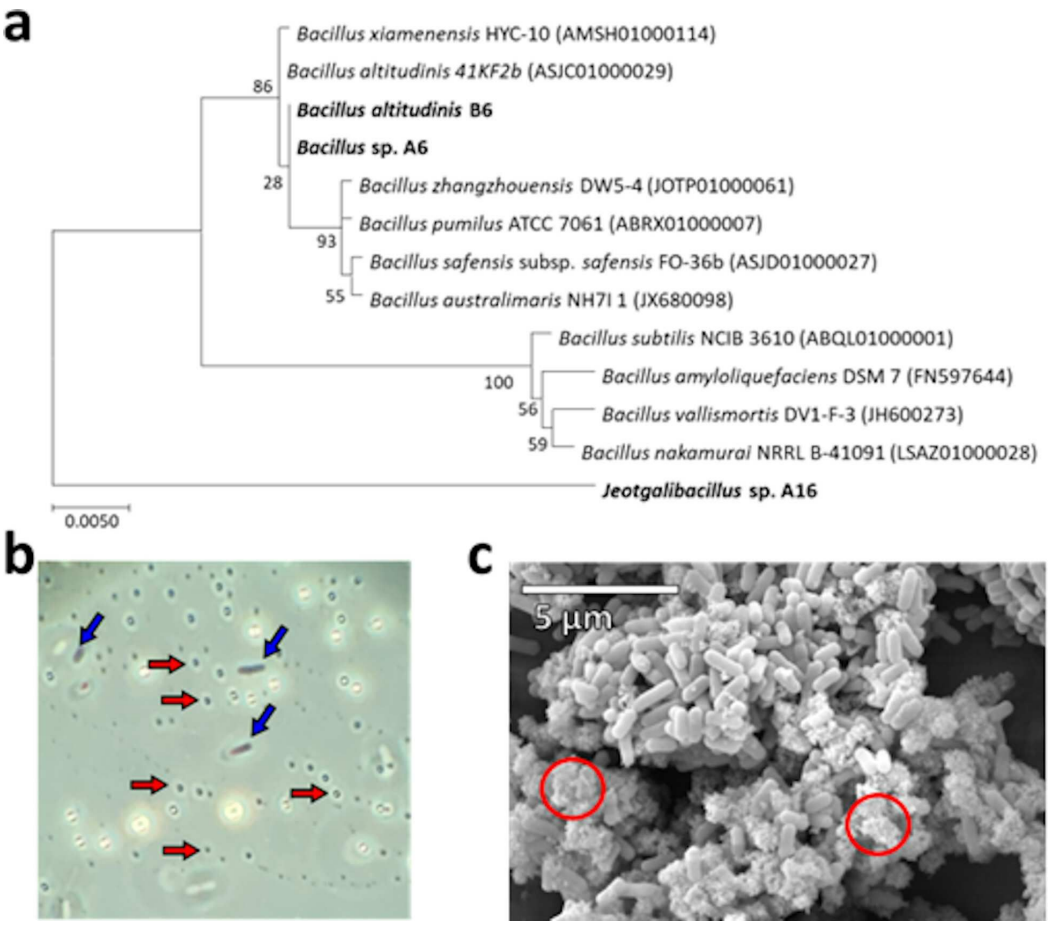
수탁일자 : 20221103

도면

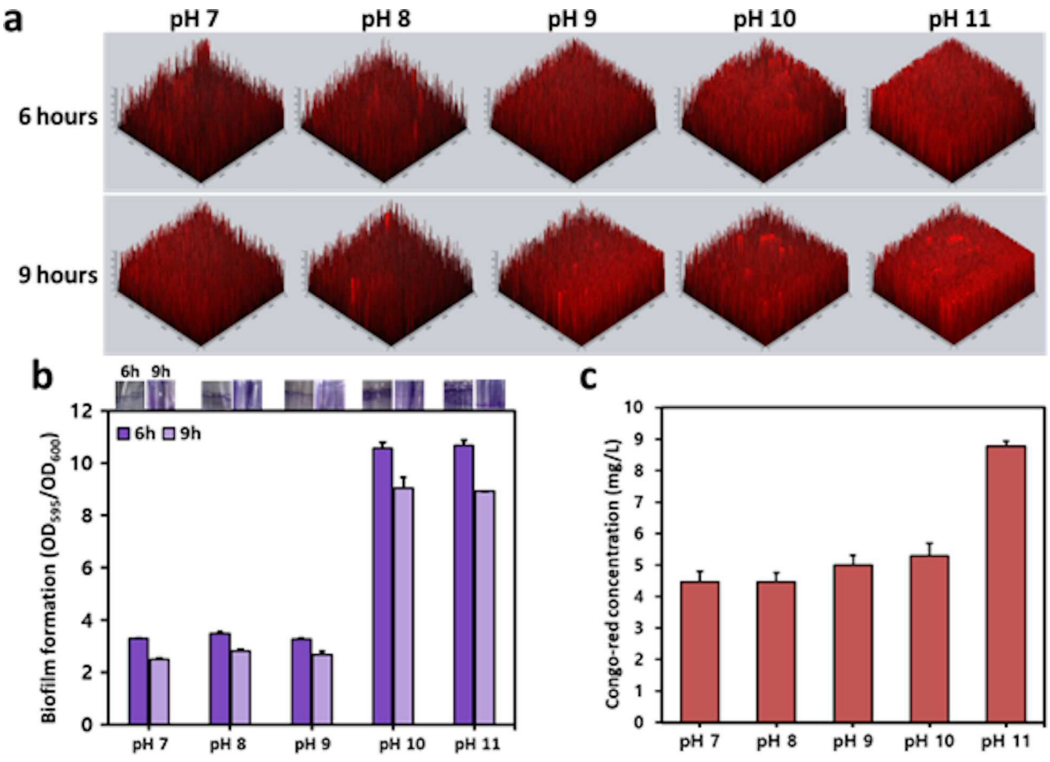
도면1



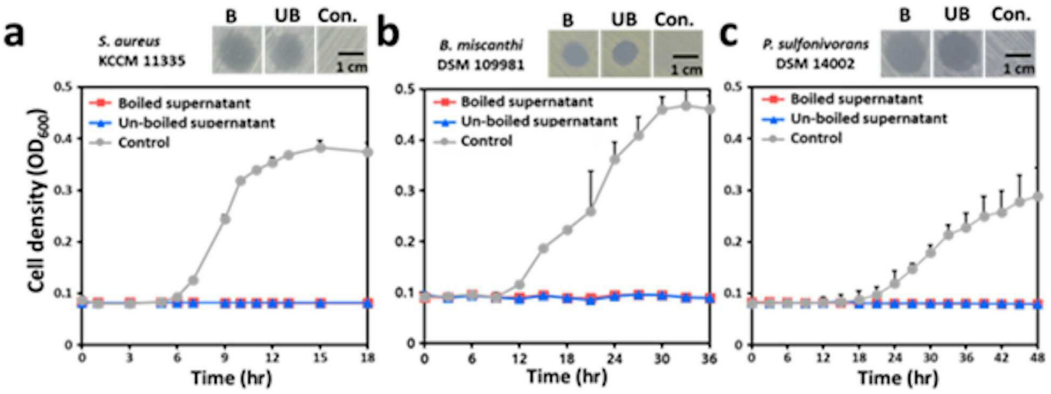
도면2


a
Bacillus xiamenensis HYC-10 (AMSH01000114)
Bacillus altitudinis 41KF2b (ASJC01000029)
Bacillus altitudinis B6
Bacillus sp. A6
Bacillus zhangzhouensis DW5-4 (JOTP01000061)
Bacillus pumilus ATCC 7061 (ABRX01000007)
Bacillus safensis subsp. safensis FO-36b (ASJD01000027)
Bacillus australimaris NH7l 1 (JX680098)
Bacillus subtilis NCIB 3610 (ABQL01000001)
Bacillus amyloliquefaciens DSM 7 (FN597644)
Bacillus vallismortis DV1-F-3 (JH600273)
Bacillus nakamurai NRRL B-41091 (LSAZ01000028)
Jeotgalibacillus sp. A16
86
28
93
55
100
56
59
0.0050
b
c
5 μm

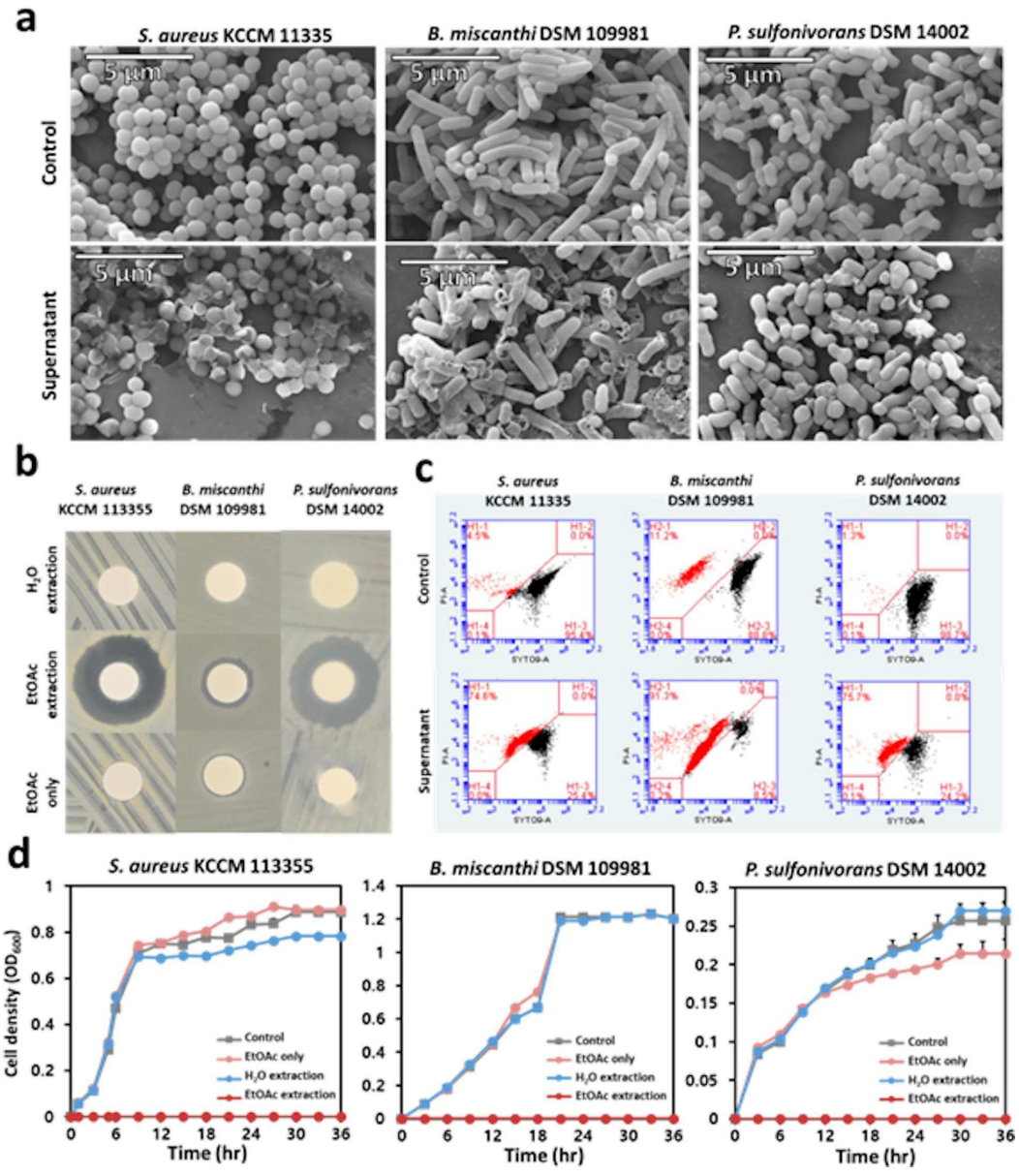
도면3


a
pH 7
pH 8
pH 9
pH 10
pH 11
6 hours
9 hours
b
6h 9h
6h 9h
Biofilm formation (OD595/OD600)
pH 7
pH 8
pH 9
pH 10
pH 11
c
Congo-red concentration (mg/L)
pH 7
pH 8
pH 9
pH 10
pH 11

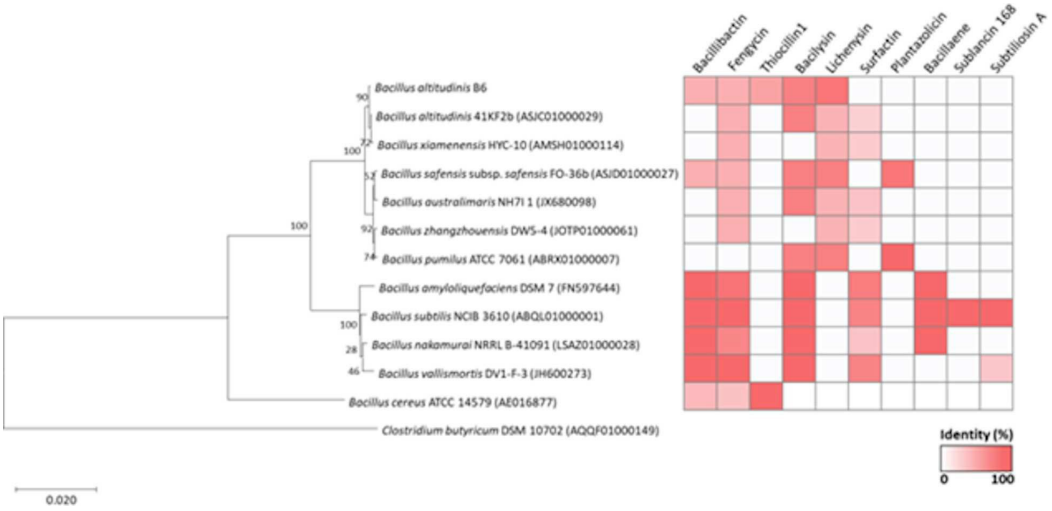
도면4


a
S. aureus
KCCM 11335
B
UB
Con.
1 cm
b
B. miscanthi
DSM 109981
c
P. sulfonivorans
DSM 14002
Boiled supernatant
Un-boiled supernatant
Control
Cell density (OD600)
Time (hr)

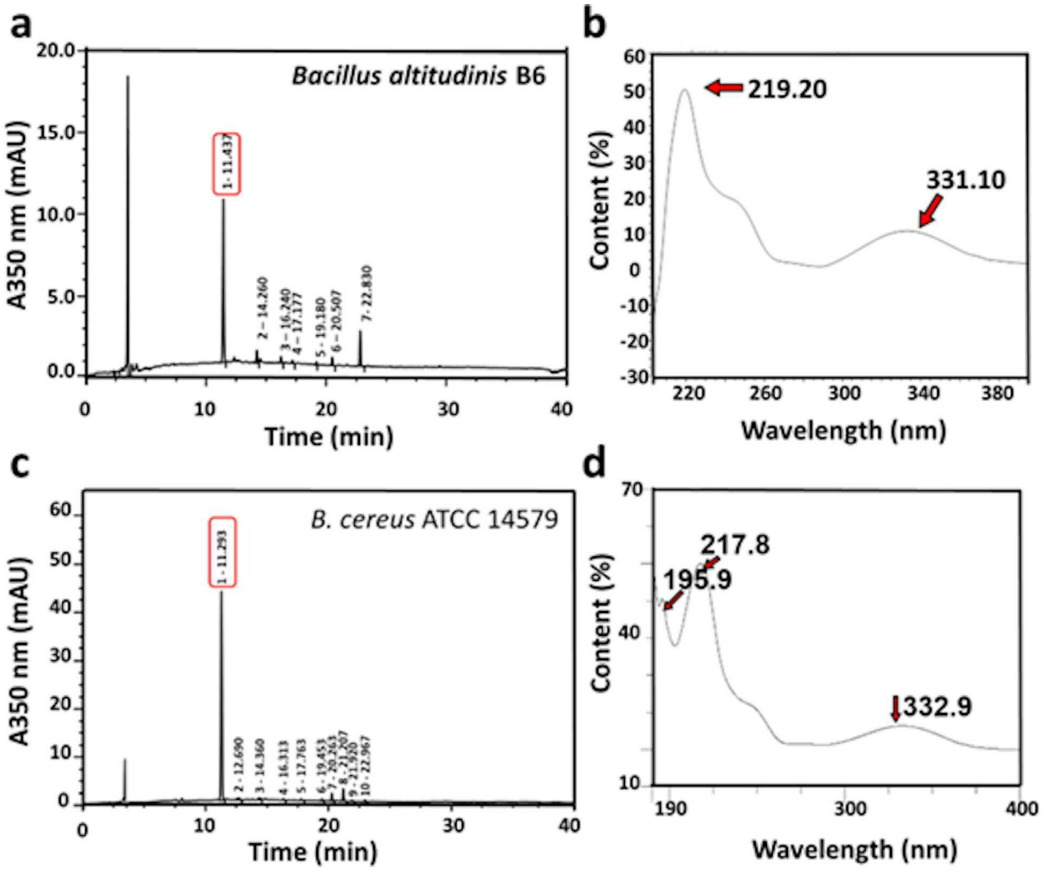
도면5


a
S. aureus KCCM 11335
B. miscanthi DSM 109981
P. sulfonivorans DSM 14002
Control
Supernatant
5 μm
b
S. aureus
KCCM 113355
B. miscanthi
DSM 109981
P. sulfonivorans
DSM 14002
H2O extraction
EtOAc extraction
EtOAc only
c
S. aureus
KCCM 11335
B. miscanthi
DSM 109981
P. sulfonivorans
DSM 14002
Control
Supernatant
d
S. aureus KCCM 113355
B. miscanthi DSM 109981
P. sulfonivorans DSM 14002
Cell density (OD600)
Time (hr)
Control
EtOAc only
H2O extraction
EtOAc extraction

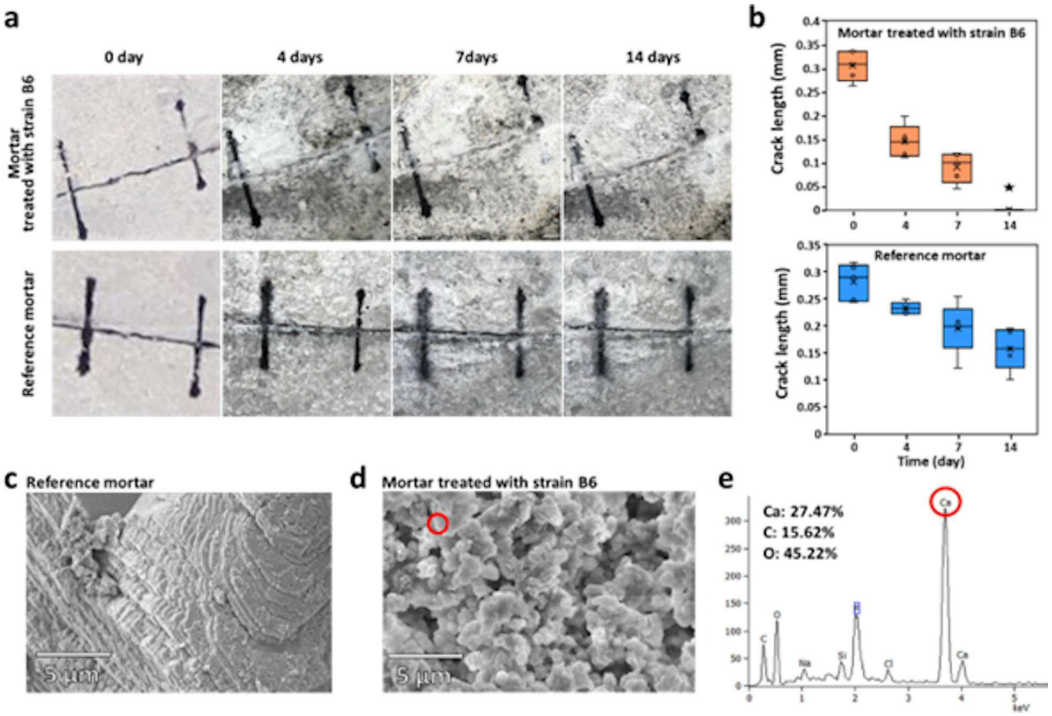
도면6


Bacillibactin
Fengycin
Thiocillin1
Bacilysin
Lichenysin
Surfactin
Plantazolicin
Bacillaene
Sublancin 168
Subtilosin A
Bacillus altitudinis B6
Bacillus altitudinis 41KF2b (ASJC01000029)
Bacillus xiamenensis HYC-10 (AMSH01000114)
Bacillus safensis subsp. safensis FO-36b (ASJD01000027)
Bacillus australimaris NH71 1 (JX680098)
Bacillus zhangzhouensis DWS-4 (JOTP01000061)
Bacillus pumilus ATCC 7061 (ABRX01000007)
Bacillus amyloliquefaciens DSM 7 (FN597644)
Bacillus subtilis NCIB 3610 (ABQL01000001)
Bacillus nakamurai NRRL B-41091 (LSAZ01000028)
Bacillus vallismortis DV1-F-3 (JH600273)
Bacillus cereus ATCC 14579 (AE016877)
Clostridium butyricum DSM 10702 (AQQF01000149)
0.020
Identity (%)
0
100

도면7


a
Bacillus altitudinis B6
A350 nm (mAU)
Time (min)
b
219.20
331.10
Content (%)
Wavelength (nm)
c
B. cereus ATCC 14579
A350 nm (mAU)
Time (min)
d
217.8
195.9
332.9
Content (%)
Wavelength (nm)

도면8


a
0 day
4 days
7days
14 days
Mortar treated with strain B6
Reference mortar
b
Mortar treated with strain B6
Crack length (mm)
Reference mortar
Time (day)
c
Reference mortar
5 μm
d
Mortar treated with strain B6
5 μm
e
Ca: 27.47%
C: 15.62%
O: 45.22%
keV