

순응화법에 의한 *Acidithiobacillus ferrooxidans*의 류산내성제고에 관한 연구

최성호, 리광옥, 리종식

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《과학자, 기술자들은 현실에 튼튼히 발을 붙이고 사회주의건설의 실천이 제기하는 문제들을 연구대상으로 삼고 과학연구사업을 진행하여야 하며 연구성과를 생산에 도입하는 데서 나서는 과학기술적문제들을 책임적으로 풀어야 합니다.》(《김정일선집》 증보판 제15권 492페이지)

*Acidithiobacillus ferrooxidans*는 미생물에 의한 유가금속침출에서는 일반적으로 기본생 산균주로 리용되는 세균이다.[1, 3] *A. ferrooxidans*는 광석산화과정에 류화물을 산화하여 류산을 생성한다.

*A. ferrooxidans*를 리용한 유가금속침출공정에서는 일반적으로 침출제로 류산을 리용한다.[4, 5] 이러한 침출환경에서 *A. ferrooxidans*를 유가금속침출에 보다 효과적으로, 안전하게 리용하기 위하여서는 높은 농도의 류산에 순응시키는 문제가 제기된다. *A. ferrooxidans*의 최적pH는 2.5 근방인데 이보다 pH가 낮아지면(매질의 산도가 높아지면) *A. ferrooxidans*의 증식이 억제된다.

이로부터 우리는 *A. ferrooxidans*를 높은 농도의 류산에 순응시키기 위한 연구를 하였다.

재료 및 방법

균주로는 우리가 육종한 *A. ferrooxidans*를 리용하였으며 배지로는 표준9k배지(류산제2철 4.43%, 류안 0.3%, 류산마그네시움 0.05%, 1수소린산칼리움 0.05%, 소금 0.001%)를 리용하였다.

*A. ferrooxidans*의 배양은 통기교반형배양기(종균접종량 10%, 온도 25°C, 통기량 1)에서 하였으며 배양상태는 배양액속의 기질(Fe^{2+})과 생성물(Fe^{3+})의 농도, 균체수를 측정하여 평가하였다.

높은 농도의 류산에 대한 순응화는 해당한 농도의 류산이 포함되어있는 배지에서 초기의 배양특성이 유지될 때까지 계대배양을 계속하는 방법으로 하였다.

Fe^{2+} 및 Fe^{3+} 농도는 선행연구[2]에 준하여 측정하였다.

결과 및 논의

높은 농도의 류산을 첨가한 배지에서 *A. ferrooxidans*의 배양특성 먼저 우리는 높은 농도의 류산을 첨가한 배지에서 *A. ferrooxidans*의 배양특성을 조사하였다. 이때 류산첨가농도는 예비 실험결과에 기초하여 3g/L이상(3, 5, 7, 10g/L)으로 하였다.

류산첨가농도 3, 5g/L일 때 *A. ferrooxidans*의 배양특성은 그림 1과 같다.

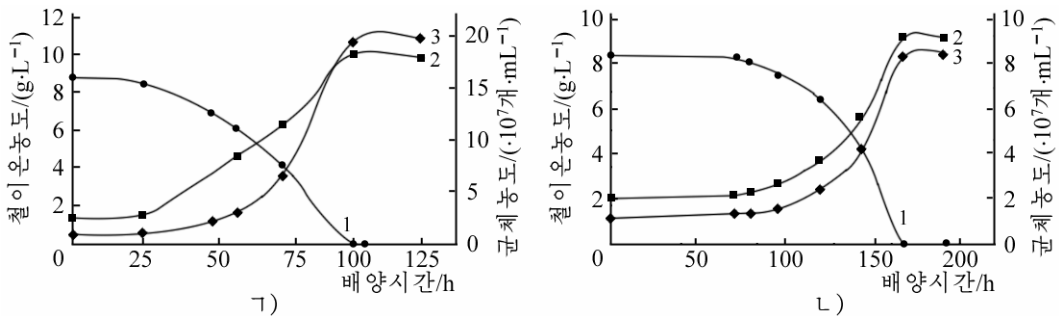


그림 1. 류산첨가농도 3, 5g/L에서 *A. ferrooxidans*-330의 배양특성

1), 2)는 류산농도가 각각 3, 5g/L인 경우; 1- Fe^{2+} 농도, 2- Fe^{3+} 농도, 3-균체농도

그림 1에서 보는바와 같이 류산을 3, 5g/L되게 첨가한 9k배지에서 *A. ferrooxidans*의 배양이 각각 120, 168h만에 끝났다. 이것은 높은 농도의 류산에 의하여 *A. ferrooxidans*의 증식이 억제되었기때문이며 그것은 배양곡선에서 유도기가 길어진것(류산농도 3, 5g/L에서 각각 50, 100h정도)으로 나타났다.

또한 높은 농도의 류산에 의하여 *A. ferrooxidans*의 증식이 억제되는 현상은 류산첨가농도가 높아질수록 균체농도가 낮아진것으로도 나타났는데(3g/L에서 2×10^8 개/mL, 5g/L에서 8×10^7 개/mL) 이것은 *A. ferrooxidans*가 불리한 환경에 있을수록 그것을 극복하는데 많은 에너지를 소비된다는 선행연구결과[4]와도 일치하는것이다. 즉 *A. ferrooxidans*의 배양과정에 기질(Fe^{2+})을 산화시켜 얻은 에너지가 증식에 불리한 환경을 극복하는데 리용된것으로 하여 균체증식에 리용되는 에너지가 그만큼 적어졌기때문이다.

류산농도가 7, 10g/L일 때에도 균배양시간은 각각 210, 282h로서 *A. ferrooxidans*의 증식이 억제되는 현상이 나타났다.(실험자료는 제시하지 않음)

높은 농도의 류산을 첨가한 배지에서 *A. ferrooxidans*의 순응화 높은 농도의 류산을 포함한 9k배지에서 계대배양을 계속하면서 *A. ferrooxidans*의 순응화특성을 조사하였다. 계대배양은 배양액속의 기질(Fe^{2+})이 80~90%정도 산화되었을 때 계대하여주어 미생물의 활성을 대수증식기상태로 유지하여주는 방법으로 하였으며 *A. ferrooxidans*의 순응화정도는 기질산화가 끝나는 시간(배양이 끝나는 시간)으로 판정하였다.

류산농도 3, 5g/L일 때 *A. ferrooxidans*의 순응화정도를 조사한 결과는 그림 2와 같다.

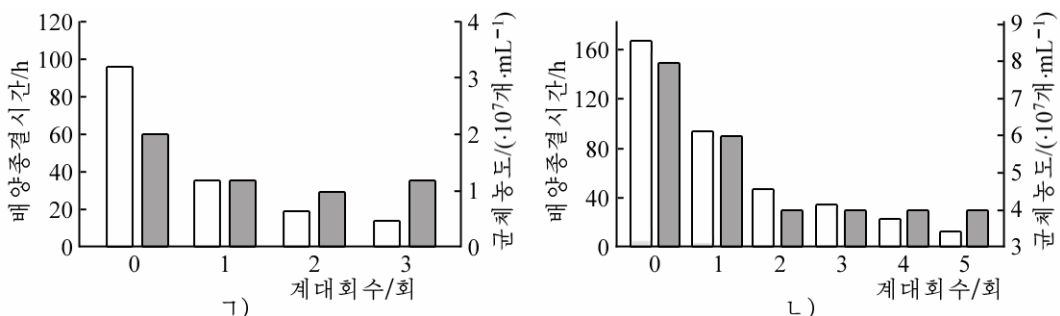


그림 2. 류산농도 3, 5g/L에서 *A. ferrooxidans*의 순응화

1), 2)는 류산농도가 각각 3, 5g/L인 경우; □ 배양시간, ■ 균체농도

그림 2에서 보는바와 같이 해당한 농도의 류산을 첨가한 배지에서 계대배양을 계속한 결과 *A. ferrooxidans*의 배양시간이 짧아졌는데 이것은 *A. ferrooxidans*가 높은 농도의 류산에 순응화된 결과이다. 최종적으로 *A. ferrooxidans*의 배양종결시간은 류산첨가농도 3, 5g/L에서 각각 16h정도로 짧아졌다.(류산첨가농도 7g/L이상에서는 배양시간이 100h이하로 줄어들지 않았으므로 순응화시험구에서 제외시켰다.)

한편 순응화과정에 균체농도의 변화를 보면 계대배양 3차이상에서 일정한 값으로 유지(3g/L에서 1.2×10^8 개/mL, 5g/L에서 3.6×10^7 개/mL)되었으며 류산첨가농도에 따르는 경향성은 위에서와 같았다.

순응화된 *A. ferrooxidans*의 배양특성을 순응화시키지 않았을 때와 비교한 결과는 그림 3과 같다.

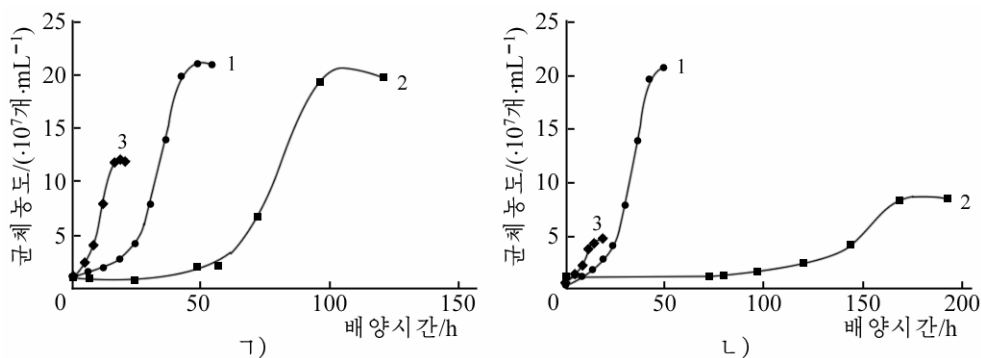


그림 3. 높은 농도의 류산에 순응화된 *A. ferrooxidans*의 배양특성

ㄱ), ㄴ)는 류산농도가 각각 3, 5g/L인 경우, 1—출발균, 2—류산을 첨가한 배지에서 출발균의 배양특성, 3—류산을 첨가한 배지에서 순응화된 균의 배양특성

높은 농도의 류산을 첨가한 배지에 순응화된 *A. ferrooxidans*의 계대안정성 및 균주보존특성 다음으로 우리는 순응화된 *A. ferrooxidans*의 계대안정성 및 균주보존특성을 조사하였다.

먼저 해당한 농도의 류산이 포함된 9k배지에서 계대를 계속하면서 순응화된 *A. ferrooxidans*의 배양특성변화를 보았다.(표 1) 이때 *A. ferrooxidans*의 배양특성은 기질산화가 완전히 끝나는 시간(배양이 끝나는 시간)으로 평가하였다.

표 1에서 보는바와 같이 류산농도 3, 5g/L에 순응화된 *A. ferrooxidans*를 100차이상 계대하여도 균의 배양특성이 안정하게 유지되었다.

다음으로 우리는 배양액상태의 종균을 보관(4°C)하면서 순응화된 균주의 보존특성을 조사하였다.(표 2)

표 1. 높은 농도의 류산에 순응화된 *A. ferrooxidans*의 계대회수에 따르는 배양시간(h)의 변화

류산농도 (g·L ⁻¹)	계대회수/회					
	20	40	60	80	100	120
3	16	16	16	16	16	16
5	16	16	16	16	16	16

표 2. 높은 농도의 류산에 순응화된 *A. ferrooxidans*의 보관기일에 따르는 배양시간(h)의 변화

류산농도 (g·L ⁻¹)	보관기일/d				
	3	6	20	40	60
3	16	16	16	16	16
5	96	168	168	168	168

표 2에서 보는바와 같이 류산농도 3g/L에 순응화된 균주는 60일이후에도 배양특성이 유지되었으나 5g/L에 순응화된 균주는 배양특성이 유지되지 않았다. 이것은 류산농도 5g/L에 순응화된 *A. ferrooxidans*를 리용하기 위하여서는 균주의 특성을 보존하기 위한 방법이 해결되어야 한다는것을 보여준다.

이상의 결과로부터 높은 농도(3g/L)의 류산에 순응화된 *A. ferrooxidans*를 얻었으며 배양시간과 균체농도로 보아 현실리용가능성이 충분하다고 생각한다.

맺 는 말

높은 농도의 류산을 첨가한 배지에서 순응화를 진행한 결과 류산농도 3g/L에 순응화된 *A. ferrooxidans*균주를 얻었다.

3g/L의 류산에 순응화된 *A. ferrooxidans*의 배양시간은 16h, 균체농도는 1.2×10^8 개/mL였다.

참 고 문 헌

- [1] M. Renata et al.; Polish Journal of Microbiology, 55, 3, 203, 2006.
- [2] Maria Teresa M. Novo et al.; Antonie van Leeuwenhoek, 77, 187, 2000.
- [3] L. G. Leduc et al.; World Journal of Microbiology & Biotechnology, 13, 453, 1997.
- [4] M. Nemati et al.; Biochemical Engineering Journal, 1, 171, 1998.
- [5] Jorge Valdés et al.; BMC Genomics, 9, 597, 2008.

주체104(2015)년 12월 5일 원고접수

Enhancement of Sulfuric Acid Resistance of *Acidithiobacillus ferrooxidans* by Adaptation

Choe Song Ho, Ri Kwang Ok and Ri Jong Sik

By adaptation to sulfuric acid, *A. ferrooxidans* got resistance of 3g/L sulfuric acid.

Incubation time of adapted *A. ferrooxidans* is 16h, final cell density of incubation is 1.2×10^8 pieces/mL.

Key words: *Acidithiobacillus ferrooxidans*, adaptation