

*Thiobacillus ferrooxidans*의 분리 및 육종에 관한 연구

리광옥, 리종식, 조철만

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《생물공학, 화학을 발전시키는것은 인민들의 먹고 입는 문제를 비롯하여 인민생활을 높이는데서 매우 중요한 의의를 가집니다.》(《김정일선집》 증보판 제15권 487페이지)

우리는 유가금속침출에 널리 리용되고있는 철산화세균 *Thiobacillus ferrooxidans*를 분리하고 γ -선(^{60}Co) 및 자외선육종으로 균주의 철산화속도를 높이기 위한 연구를 하였다.

균주의 철산화속도는 여러가지 유용광물로부터의 유가금속의 침출효율과 직접 관계되는 중요한 인자이다.[1, 2]

재료 및 방법

재료 균주분리원으로는 광산갱수를 리용하였다.

균분리를 위한 9K액체배지의 조성은 다음과 같다.

I용액($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.0g, KCl 0.1g, K_2HPO_4 0.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.01g, H_2O 700mL, pH 2.5)과 II용액($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 14.78% 용액 300mL)

I용액은 101.3kPa(1기압)에서 20min간 고압멸균하고 II용액은 려과멸균하여 리용하기 직전에 혼합한다.

시험균의 배양과 동정 9K액체배지에 갱수시료를 5% 되게 접종하고 30℃에서 200r/min의 속도로 5~7일정도 진탕배양하였다. 철산화세균의 작용으로 인하여 2가철이 3가철로 산화되어 생긴 붉은색을 띤 배양액을 각이하게 희석하여 9K평판배지(9K액체배지, 우무 2%)에 50 μL 씩 도말하였다. 30℃에서 10~15일동안 배양한 다음 자란 균무지들을 선택하였다. 균주의 동정은 선행연구자료[3]에 기초하여 진행하였다.

γ -선포임처리 γ -선포임장치(《ГАММА-УСТАНОВКА ИССЛЕДОВАТЕЛЬ》)에서 서로 다른 선량을 쏘이는 방법으로 진행하였다.

자외선포임처리 무균함안에 설치한 자외선등(《FL15T8 GL》)으로 각이한 거리에서 서로 다른 시간동안 쏘이는 방법으로 진행하였다.

자외선포임후 빛수복효과를 방지하기 위하여 암조건에서 24h동안 방치하였다가 9K평판배지에 도말하였다. 자란 독립균무지들에 대하여 9K액체배지에서 3~5일동안 종균배양(활성화배양)을 하고 1% 되게 종균접종(같은 균체수로 접종)하여 본배양을 진행하였다.

균주의 활성평가 대수생장기의 일정한 구간에서 산화속도를 측정하여 평가하였다.

2가철과 3가철함량은 선행방법[4]에 기초하여 측정하였다.

결과 및 논의

1) *T. ferrooxidans*의 분리 및 분리균주의 형태배양학적특징

선택배지에서 분리한 120개의 균주들의 철산화속도를 비교하여 철산화속도가 가장 빠른 균주를 선택하였다. 그 분리균주의 형태배양학적특징은 *Thiobacillus ferrooxidans*와 일치하였으므로 우리는 분리균주를 *Thiobacillus ferrooxidans* 820으로 명명하였다.

2) *T. ferrooxidans* 820의 산화속도에 미치는 몇가지 선에너지의 영향

γ -선의 영향 γ -선조임장치에서 서로 다른 선량으로 γ -선을 쬔 때 세포의 생존률을 조사한 결과는 표 1과 같다.

표 1에서 보는바와 같이 γ -선의 쬔임세기가 증가함에 따라 균주의 생존률은 급격히 낮아졌지만 산화속도가 10%이상 높아진 양성변이균주의 출현빈도는 점차 높아진다. 특히 8~9kGy의 쬔임세기에서 양성변이균주의 출현빈도는 26%이상으로서 비교적 높았다. 이로부터

표 1. γ -선쬔임세기에 따르는 균주의 생존률과 양성변이률

쬔임세기 /kGy	초기세균수 /(CFU·mL ⁻¹)	살아남은 세균수 /(CFU·mL ⁻¹)	생존률 /%	양성변이률 /%
0	$4.2 \cdot 10^7$	$4.2 \cdot 10^7$	100	0
5	"	$6.5 \cdot 10^5$	1.55	5.6
7	"	$1.2 \cdot 10^4$	$2.8 \cdot 10^{-2}$	11.4
8	"	$3.6 \cdot 10^3$	$8.6 \cdot 10^{-3}$	26.7
9	"	$0.5 \cdot 10^2$	$1.2 \cdot 10^{-4}$	30.2
11	"	—	—	—

우리는 양성변이균주를 선발하는데 적합한 쬔임선량구간을 9kGy으로 정하였다.

우리는 이 조건에서 출발균에 비하여 철산화속도가 2.1배 높아진 변이균주(*T. ferrooxidans* 820-1)를 선발하였다. 이 변이균주는 철산화속도를 제외하고 출발균과 형태학적 및 생리학적특징에서 큰 변화가 없었다.

자외선의 영향 γ -선과 마찬가지로 양성변이에 적합한 자외선쬔임조건도 해당 균주마다 차이난다. 따라서 우리는 γ -선육종을 거친 *T. ferrooxidans* 820-1에 대하여 30W 자외

선등을 리용하여 쬔임거리와 쬔임시간에 따르는 생존률과 양성변이률을 검토하였다.(표 2, 3)

표 2. 자외선쬔임거리에 따르는 균주의 생존률과 양성변이률

쬔임거리 /cm	초기세균수 /(CFU·mL ⁻¹)	살아남은 세균수 /(CFU·mL ⁻¹)	생존률 /%	양성변이률 /%
15	$4.2 \cdot 10^7$	$4.2 \cdot 10^4$	0.1	12.6
20	"	$2.5 \cdot 10^5$	0.6	15.4
25	"	$3.8 \cdot 10^5$	0.9	13.8
30	"	$5.5 \cdot 10^5$	1.3	9.1

표 2에서 보는바와 같이 쬔임거리가 짧아질수록 생존률은 낮아졌으며 양성변이률은 쬔임거리 20cm에서 15.4%로서 가장 높았다. 따라서 이 균주의 자외선쬔

임에 적합한 쬔임거리를 20cm로 정하였다.

표 3에서 보는바와 같이 쬔임거리 20cm에서 자외선쬔임시간이 늘어남에 따라 생존률은 급격히 줄어들었으며 양성변이률은 쬔임시간 16min에서 19.5%로서 가장 높았다. 이로부터 이 균주의 자외선쬔임에 적합한 쬔임시간을 16min으로 정하였다. 결국 이 균주의 자외선쬔임에 적합한 조건은 30W 세기로 20cm 거리에서 16min간 처리하는것이다.

표 3. 자외선조임시간에 따른 균주의 생존률과 양성변이율

조임시간 /min	초기세균수 /(CFU·mL ⁻¹)	살아남은 세균수 /(CFU·mL ⁻¹)	생존률 /%	양성변이율 /%
4	4.2×10^7	$2.5 \cdot 10^5$	0.6	15.4
8	"	$8.4 \cdot 10^4$	0.2	16.9
16	"	$3.6 \cdot 10^4$	$8.6 \cdot 10^{-2}$	19.5
32	"	$1.2 \cdot 10^4$	$2.9 \cdot 10^{-2}$	8.2

우리는 이 조건에서 출발균에 비하여 철산화속도가 1.4배 높아진 변이균주(*T. ferrooxidans* 820-2)를 선발하였다.

철산화속도가 가장 빨라진 균주들은 표 4와 같다.

표 4에서 보는바와 같이 변

이균주의 철산화속도는 출발균에 비하여 γ -선육종으로 2.1배, 자외선육종으로 1.4배, 총체적으로 2.9배 높다.

표 4. γ -선 및 자외선육종에 의하여 양성변이된 균주들의 산화속도

균주	산화속도 /(mg·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	증가률/배
출발균(<i>T. ferrooxidans</i> 820)	47.69 ± 1.21	1.0
γ -선육종(<i>T. ferrooxidans</i> 820-1)	100.15 ± 0.98	2.1
자외선육종(<i>T. ferrooxidans</i> 820-2)	138.33 ± 1.16	2.9

맺 는 말

1) 갱수로부터 *Thiobacillus ferrooxidans*를 분리하고 γ -선 및 자외선육종에 의하여 철산화속도가 출발균주에 비하여 2.9배 높아진 *Thiobacillus ferrooxidans* 820-2균주를 육종하였다.

2) *Thiobacillus ferrooxidans*의 철산화속도를 높이는데 적합한 γ -선조임세기는 80~95kGy이며 자외선등세기 30W에서 조임거리 20cm, 조임시간 16min이다.

참 고 문 헌

- [1] T. Das et al.; World Journal of Microbiology & Biotechnology, 14, 297, 1998.
- [2] L.G. Leduc et al.; World Journal of Microbiology & Biotechnology, 13, 453, 1997.
- [3] D. J. Brenner et al.; Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Springer, 764~769, 2005.
- [4] M. T. M. Novo et al.; Antonie van Leeuwenhoek, 77, 187, 2000.

주체103(2014)년 10월 5일 원고접수

Isolation and Breeding of *Thiobacillus ferrooxidans*

Ri Kwang Ok, Ri Jong Sik and Jo Chol Man

We have isolated *Thiobacillus ferrooxidans* from water of pit and bred *Thiobacillus ferrooxidans* 820-2 strain, the oxidation rate of which is 2.9 times higher than that of the original strain by γ -ray and UV.

The intensity of γ -ray suitable to increase the oxidation rate of *T. ferrooxidans* is 85~95kGy and when the intensity of UV lamp is 30W, the irradiation distance is 20cm and the irradiation time is 16min.

Key words: *Thiobacillus ferrooxidans*, UV ray