

數種 硫黃還元菌株의 分離, 同定 및 그의 生理的 特性에 對하여

李 敏 載 · 吳 明 洙

(서울大學校 文理科大學 植物學科)

Isolation, Identification, and Physiological Characteristics of some Sulfur-Reducing Microbes

LEE, Min Jai, and Myung Soo OH

(Dept. of Botany, Seoul National University)

ABSTRACT

This work was designed to illustrate physiological effects on the elimination of sulfur and its compounds in petroleum using sulfur-reducing bacteria.

Desulfurizing bacteria were collected from sewage and soil at several areas in Seoul and Ulsan, Korea.

Seven species of sulfur-reducing microbes isolated were identified as : *Pseudomonas marginata*, *Ps. effusa*, *Ps. putrefaciens*, *Ps. pseudomonelli*, *Ps. xanthochlora*, *Ps. bowlesiae*, and *Ps. aeruginosa*.

And some experiments were performed to define the growing characteristics of the Pseudomonads and the results obtained are as follows:

- 1) Shaking culture method was more effective for the growth of the cells than stagnant culture.
- 2) Beef peptone medium was better for the growth than other media.
- 3) Cuprous chloride of 50 ppm and copper sulfate of 300 ppm treated, respectively, in the medium were effective for the growth.
- 4) Benzene or toluene of 5,000 ppm and petroleum ether of 50,000 ppm did not show remarkable inhibitory effects on the growth.

緒 論

石炭에 이어 現代 燃料의 主流를 이루는 石油은 科學의 발전으로 달마암아 化學工業의 原料로서 그 용도가 크게 開發되었고 人間生活의 거의 모든 면에서 이용되고 있다. 그러나 石油中에 含有된 硫黃成分이 石油과 함께 燃燒될 때 生成되는 亞黃酸가스는 大氣汚染의 主要 原因이 됨으로서 심각하게 社會問題化되고 있을 뿐만 아니라 機械設備의 腐食의 原因이 되고 있다.

지금까지의 諸 文獻에 依하면 石油內 硫黃成分을 除去함에 있어서 *Thiobacillus*

*thiooxidans*를 利用하는 方法이 效果의일이 報告되어 있다.

그런데 Strawinski(1950)는 硫黃還元菌 株를 使用하여 石油內의 硫黃成分의 除去를 試圖한 바 있으며, 이들 菌株의 生長條件의 一部를 記述히 놓고 있다(Strawinski, 1951).

이에 本 研究者는 硫黃還元菌株가 石油內에서 遊離된 狀態의 硫黃이나, mercaptane 그리고 *Thiobacillus thiooxidans*에 依해서 生成된 黃酸 等を 硫化水素로 變化시켜서 除去하는 方法이 可能하리라는 點을 고려하여 數種의 硫黃還元菌株를 分離同定하였으며 이들 菌種을 使用하여 그 生理的 特

性を 調査하고자 하였다.

그런데 이들 菌株들은 石油內에서의 生長이 可能하여야 하며 더우기 工業的 利用성을 고려할 때 이들 菌株의 大量增殖이 요구되고 있음은 사실이라 하겠다. 現在까지 微生物을 利用한 石油의 脫黃에 있어서 上述한 大量增殖外에 石油內 生長을 爲한 菌의 適應, 硫黃還元細菌에 의한 變異種의 기대 등의 연구는 아직 더욱 연구되어야 할 필요가 있는 과제들이다. 이에 필자는 본 연구에서 硫黃還元細菌을 利用한 原油의 脫硫黃研究의 一環으로 우선 原油構成物質의 一部인 芳香族 炭化水素, 즉 benzene, toluene, 및 petroleum ether 등에서의 菌의 生長 可能性 및 이에 따른 生長效果를 밝히고자 했으며 微量 重金屬 이온에 對한 生理的 영향, 菌의 大量增殖을 爲한 培地의 選定, 最適 生長 溫度 및 기타 生理的인 要因들을 구명코자 시도하였다.

材料 및 方法

1. 實驗材料

菌의 採取, 分離 및 同定을 위하여 下水, 土壤, 石油貯藏所 및 精油工場 등 5個 地點에서 試料 37點을 採取하여 供試하였다.

Table 1. Composition of different modia.

Medium Component	Medium A (Strawinski)	Medium B	Medium C	Medium D
Na ₂ HPO ₄ ·4H ₂ O	1gm	1gm		
K ₂ HPO ₄	2gm	2gm		
NH ₄ NO ₃	2gm	2gm		
MgCl ₂ ·4H ₂ O	0.25gm	0.25gm		
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.01gm	0.01gm		
CaCO ₃ ·2H ₂ O	0.01gm	0.01gm		
FeCl ₂	0.01gm	0.01gm		
Na ₂ S ₂ O ₃	10gm			
Petroleum Hydrocarbon		5-20%		
Yeast Extract			5 gm	
Beef				50 gm
Peptone				5 gm
Dist. water	1000ml	1000ml	1000ml	1000ml
Initial pH	7.0	7.0	6.6	6.8

菌의 分離는 土壤 1gm, 下水는 1ml를 各 各 滅菌蒸溜水 5ml에 넣고 흔든 後, 이 懸濁液을 寒天 培地 및 液體 培地에 各 各 接種하였다 (Table 1). 油類가 漏出된 土壤에서 採取한 下水 및 土壤은 5%의 石油을 混合하여 培地를 만들었다. 培養時의 溫度는 28°C를 維持하였고 分離된 菌의 同定은 Bergey's Manual (1957)을 主로 하고, Haynes (1951), Liston *et al.* (1963), Gaby (1955), Rhodes (1957), Hendrie *et al.* (1966) 및 Lysenko (1961)의 分離 同定方法을 參照하였다.

2. 選擇培地

菌의 分離를 위하여 사용한 選擇性 培地의 組成은 다음과 같다.

Na₂HPO₄·H₂O, 1gm; K₂HPO₄, 2gm; MgCl₂·6H₂O, 0.25gm; MnCl₂·4H₂O, 0.01gm; CaCO₃, 0.01gm; FeCl₂, 0.01gm; NH₄NO₃, 2gm; 증류수, 1,000ml; petroleum hydrocarbon, 5%; agar, 20gm; initial pH, 7.0; 培養溫度 28°C incubation, 5 days.

前述한 選擇培地를 使用하여 寒天培地를 만든 後 菌을 streak method에 따라 接種한 다음 28°C에서 3~5日間 培養시켜 單一 集落을 얻었다. 이 集落을 稀釋法에 따라 純粹 分離하였다.

3. 實驗方法

純粹分離한 菌株를 細胞學的 考察, 生長의 特性, 生化學的 試驗을 거쳐서 同定하였다. 이 同定方法은 다음과 같다.

가. 細胞形態

Gram 染色法에 의한 染色은 beef peptone agar 培地에서 10~24時間 자란 菌을 使用했으며 Yashima BYL-2 光學顯微鏡으로 觀察하였다. 確實한 菌의 形態를 알기 위해서 JEOL T-7型 電子顯微鏡을 使用했다. Beef agar 培地에서 10時間, 1日, 2日, 7日間 자란 菌을 白金耳로 따서 各 各 10ml의 증류수에 稀釋한 後 28°C에서 1時間 동안 培養한 다음 wax block 위에 한방울 滴下하고 이에 0.5% uranyl acetate를 同量 加하여 2分間 放置하여 negative staining을 하였다. 두께 20~30Å의 collodion

膜을 입힌 grid에 菌을 塗抹하여 40°C의 oven속에서 30分間 乾燥한後 加速電壓 25 KV로 JEOL T-7型 電子顯微鏡에 의한 관찰을 하였다.

나. 鞭毛染色

Fontana's silver-plating 技術의 變法을 使用하였다(Rhodes, 1958).

다. Slime과 capsule形成

Capsule과 細胞外 slime을 觀察하기 위하여 Novelli(1953)및 Rhodes의 方法을 使用하였다.

라. 生長特性

YE agar와 beef peptone agar를 사용하였다. 이들은 健全한 選擇培地보다는 훨씬 빠른 增殖을 하므로 實驗條件에 맞는 培地로서 使用하게 되었다.

아) 溫度 效果

-1, 1, 5, 12, 15, 25, 37, 42, 45, 48, 50°C 에서의 菌의 增殖度를 測定하였다.

바) 培養基의 initial pH의 效果

N-HCl과 N-NaOH를 사용하여 8.0, 7.0, 6.0, 5.5, 5.0, 4.5, 4.0으로 pH를 맞추었고 測定方法은 Beckman Model DU spectrophotometer를 써서 그 吸光度에 따른 菌體數를 計算 比較하였다.

사) NaCl 濃度の 效果

5ml의 培地에 6.5, 5.0, 4.0, 3.0, 2.5, 2.0%(w/v) NaCl을 添加하여 接種 培養하였다.

아) Potato slope에서의 生長

Mackie & McCartney(1953)에 의한 方法을 使用하여 만든 potato slope에 菌을 接種, 培養하였다. 그의 平板培地및 斜面培地에서의 生長, nutrient agar, potato dextrose agar 및 그 slant에서의 生長, beef peptone agar 및 그 slant에서의 生長, infusion broth에서의 生長, nutrient broth에서의 生長 등을 調査하였다.

나. 生化學的 試驗

아) Catalase 生成

24時間 자란 菌에다 3% H₂O₂를 加하여 bubble의 形成을 調査하였다.

바) Peptone에서 ammonium의 生成

Peptone water에 菌을 接種하여 5~7日間 배양한 後 Nessler's試藥을 滴下하여 ammonia 生成을 調査하였다.

사) Gelatin 加水分解

Nutrient gelatin에 接種한 後 4~8時間 자란 試驗管에 Acid-HgCl₂를 加해서 clear zone을 調査하였다.

다) Milk에 대한 作用

菌을 litmus milk(pH, 7.0)와 B.C.P. milk(pH, 7.0)에 接種하여 28°C에서 5~7日間 培養한 後 色の 變化 clotting, casein digestion과 dye reduction을 調査하였다.

라) Reductase 試驗

標準 methylene blue용액을 milk에 添加시켜 菌接種後 methylene blue의 色の 變化를 調査하였다.

마) Indole 試驗

1% peptone water에서 2~3日間 자란 培養液에 1ml의 xylyl을 添加한 後 Ehrlich's reagent를 5~6방울 떨어 뜨렸다.

바) Voges-Proskauer(V.P.)試驗

Barritts의 方法에서부터 研究 開發된 V.P. 試驗은 glucose phosphate 培地에서 1~2週日間 培養한 後 10% KOH溶液 5cc를 滴下하여 調査하였다.

사) Methyl-red 試驗

Glucose phosphate에서 3~4日間 培養後 0.04% methyl red alcohol溶液을 4~5滴을 滴下하여 調査하였다.

아) Nitrate의 nitrite로의 還元

Peptone培地(%(w/v): bacto peptone, 1.0; NaCl, 0.5; NaNO₃, 0.1; pH, 7.0)에 接種하여 3~5日間 培養後 Griess reagent를 滴下하여 調査하였다.

Nitrate가 還元되었는지를 調査하기 爲해서 zinc dust方法을 使用하였다.

바) Nitrite의 還元

Peptone培地에 0.002%의 NaNO₂를 添加하고, 菌을 接種한 後 6~8時間 後에 調査하였다.

나) Lipolytic activity

Rhodes(1959)가 사용한 Jones & Richard의 방법과 Bulder(1955)의 방법을 사용하였다. 培地의 組成은 다음과 같다. (% w/v) $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0.1; KCl , 0.02; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.02; yeast extract(oxid), 0.3; agar, 2.0; olive oil, 5.0; pH, 7.3), pH의 調整은 N-NaOH 를 사용하였으며 night blue의 base를 함유한 olive oil의 最終濃度は 1/15,000이었다.

1) H_2S 生成

Kligler's iron agar(oxid)培地과 lead acetate agar 培地 1.0%(w/v) sodium thiosulfate를 加한 培地에 接種하여 28°C에서 3~5日間 培養시킨 後 調査하였다.

m) Loeffler's serum의 液化

Bacto Loeffler blood serum 80gm을 1,000ml의 溫水(42°~45°C)에 녹인 後 15~20分間 遠心 分離한 다음 上澄液만 모아서 capped test tube에 넣어 15 lbs/in²에서 10分間 coagulation시키고(이때 autoclave內의 空氣를 뽑아내지 말고 水蒸氣와 空氣가 混合된 狀態) 다음에 autoclave內部를 完全히 水蒸氣로 채운 後 다시 15lbs/in²에서 15分間 滅菌하여 菌을 接種, 觀察하였다.

n) Peptone培地에서 炭水化物 利用度試驗

Peptone培地(%w/v), proteose peptone 1.0; NaCl 0.5; carbohydrate 1.0; bromothymol blue溶液 1/500, 1.2; pH 7.2)에 各種의 炭水化物을 添加하여 酸과 가스生成을 調査하였다. 使用된 炭水化物은 21가지로서, L-arabinose, dextrose, dextrin, dulcitol, D-fructose, galactose, inulin, lactose, maltose, mannitol, mannose, melibiose, pectin, raffinose, rhamnose, salicin D-sorbitol, sucrose, xylose, starch, trehalose 등이다.

o) 單一 添加 炭素源으로서의 炭水化物 利用度

앞에서 열거한 炭水化物을 使用하여 菌의 炭水化物 利用度を 調査하기 위하여 1.0, 0.5, 그리고 0.1%(w/v)의 전분을 包含한 배지 D(beef peptone agar)에 菌을 接種,

5日間 배양한 後 Gram's iodine 용액을 적하였다.

p) Huch & Leifson의 方法(Huch &

Leifson, 1953)에 따른 포도당 利用度

10ml의 basal peptone agar 배지에 1.0%(w/v)의 포도당 용액을 添加시켜 2개씩 쌍을 지어 接種하였다. 한쪽은 보통 方法과 같이 슝 마개를 使用하나 다른 한 쪽은 菌을 接種한 後 1cm 程度의 paraffin wax를 添加한 後 하였으며, 지시약으로는 bromothymol-blue를 使用하였다.

다음으로 分離, 同定된 菌의 大量增殖을 위하여 培地의 種類, 培地方法, 培養 容器量과 培地量에 따른 菌增殖效果를 檢討하였다. 培地 種類는 Table 1에 나타난 培地中에서 試驗하였으며 培養方法은 靜置培養과 振盪培養의 2가지 方法을 擇하였다. 振盪機는 reciprocal type(112 rev/min)을 使用하였으며 最適 pH 및 溫度下에서 實施되었다. 培地의 量은 容量의 4分の3, 2分の1, 3分1, 5分の 1等 4 種으로 나누어 實驗하였다.

增殖程度는 역시 DU spectrophotometer를 利用하였다,

生理藥劑濃도에 따른 呼吸量의 變化를 알기 위하여 培地 D에서 2日間 生長한 菌體를 수확하여 그 呼吸能을 檢壓法으로 測定하였는데, 이 때의 反應 chamber의 組成은 main chamber에 菌懸탁액 1ml를 M/15 인산완충액 1ml와 혼합하여 넣었고, center well에 20% KOH 0.2ml를 넣어 V_t 를 2.2로 하였으며 30°C에서 30分 간격으로 호흡량을 측정하였고, 가스는 空氣였다. 여기서 使用된 生理藥劑는 鹽化第1구리와 黃酸銅이었다.

또 分離, 同定된 硫黃還元菌들의 生長에 石油溜分이 미치는 影響을 檢討하기 위하여 benzene, toluene, petroleum ether 등을 濃度別로 培地에 添加한 後 菌을 接種하고 이들의 增殖率을 DU spectrophotometer를 利用하여 調査하였다.

結果 및 考察

石油內 硫黃의 脫黃效果를 높이기 위하여

Table 2. The data of morphological growth characters and biochemical tests of 7 kinds of sulfur-reducing bacteria (A)

Species No.	1	2	3	4	5	6	7
Characters							
Shape	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod
Size (μ)	0.5~0.6 0.8~1.8	0.5×1.5	0.6~0.8× 1.4~2.4	0.6~0.7 ×1.3~1.5	0.75~1.5 ×3.0	0.5~0.7× 1.2~1.6	0.5~0.6× 1.2~1.6
Number	Single	Single	Single or Pairs	Single	Single	Single, Pairs or Short Ch- ain	Single, Pairs & Short Chain
Flagella	1-4 Bi- polar flag- ella en- capsula- ted	One or three po- lar flag- ella	a polar flagellum	1-4 polar flagella	1-3 polar flagella	1-2 polar flagella	1-2 polar flagella
Gram Staining	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
Gelatin	Liquefy	Liquefied. A nonli- quefing variety is also found	Rapidly Liquefied, Stratiform liquefac- tion	Moderate Crateri- form Liquefac- tion	Slowly Liquefied	Liquefied	Rapidly Liquefied
Loeffler's Blood Serum	-	+	++	++	++	-	++
Nitrite production from Nitrates	-	++	-	-+	++	++	-
Indole Production	+	-	-	-	×	+	++
Hydrogen Sulfide	+	+	++	+	+	-	-
Methyl Red Test	-	-	-	-	-	-	-
Starch Hydrolyzed	×	×	×	-	×	-	-
Lipolytic	+	++	++	+	++	++	++
Temperature Relation	Opt:30- 33°C Max:40°C Min:8- 9°C	Opt:35°C Max:48°C No grow- th:50°C	Opt:30°C Max:40°C No grow- th:42°C	Opt:37°C but will grow re- adily at 42°C	Opt:27°C Max:44°C	Opt:27°C Max:40°C Min:-1°C	Opt:37°C good gro- wth at 42°C
Chemical Tolerance	pH4.6- 9.1 Opt:pH7.5 growth in 3.5% salt No grow- th in 5% salt	Opt:pH 7.2 Min:pH 5.0 pH range 5.5-8.0	Opt:pH 11.0 pH range 4.8-8.3	Opt:pH7.2 pH range 5.3-8.0 No grow- th in 5% salt	Opt:pH6.8 pH range 5.0-8.4 No grow- th 6.0% salt	Opt:pH7.2 pH range 4.5-8.6	Opt:7.0 pH range 5.3-8.5 No grow- th 6.5% salt
Aerobic	Aerobic	Aerobic	Aerobic facultative	Aerobic facultative	Aerobic	Aerobic	Aerobic facultative
Catalase	-	++	++	++	++	++	++
Ammonia formed	-	++	++	-	++	-	-
Nitrite Reduction	++	++	++	++	++	++	++
Reductase	++	++	++	-	++	++	++

++:Strong positive, +:Positive, ×:Weak Positive or uncertain, -:Negative

Table 4. The data of morphological growth characters and biochemical tests of 7

Species No. Characters	1	2	3
Pigment on Media	Green fluorescent pigment on Uschisky's medium	Pale salmon or grey brown	white-brown
Agar Colony	White circular smooth translucent Viscid with define margins at first thin but later thick and contoured surface wrinkled	Circular raised undulate smooth glistening butyrous translucent pale salmon color	Circular, entire convex, glistening, pale salmon color to reddish brown opaque butyrous
Agar Slant	Circular slightly raised translucent butyrous glistening grey or water color medium turning white blue	Luxuriant, glistening butyrous creamy slightly raised medium becomes white greenish fluorescent	Growth abundant filiform glistening thick, salmon pink color to reddish brown medium unchanged butyrous
Potato Dextrose Agar Colonies	Circular raised capitated with margins, entire light brown	Circular raised Amorphous butyrous white grey or water color old culture (light yellowish)	Circular, white cream color, butyrous entire, raised smooth, glistening
Beef Agar Slant	Circular, raised entire butyrous effused, grey or light green, medium changed light green	Circular raised Amorphous butyrous white yellow green filiform, medium turning green	Circular raised entire butyrous white yellow-blue filiform, medium turning grey or green
Beef Peptone Agar Colonies	Circular convex entire translucent butyrous, pale, salmon color, medium changed light green	Circular raised undulate, butyrous capitate with margin medium turning green pigment	Circular, raised entire butyrous glistening medium turning light green

Table 5. The data of morphological growth characters and biochemical tests

Species No. Characters	1	2	3
Nutrient Broth	Growth abundant Pellicle formation moderate turbidity viscid sediment	Fluorescent turbid viscid sediment medium becomes greenish fluorescent	Flocculent moderate turbid viscid sediment
Infusion Broth	White turbidity growth on test tube wall. viscid sediment	Yellow turbidity medium changed to yellow, surface green, viscid brown sediment	Ring or very thin pellicle. moderately to strongly turbid palverous sediment odor of must

kinds of sulfur-reducing bacteria (B)

4	5	6	7
Brown grey or water color	green fluorescent	Green fluorescent pigment in culture	Greenish pyocyanin pyorubin
Circular slightly raised, thick, opaque cream colored with irregular margin	Circular slightly raised entire butyrous, pale yellow	Circular or amoeboid flat to convex smooth glistening translucent border yellowish, moist viscid	Large spreading greyish with dark outer and translucent edge amorphous or surface wrinkled
Circular, raised undulate opaque beaded, irregular	Circular, slightly raised amorphous effused butyrous pale salmon yellowish	Filiform, Cohite yellowish raised smooth glistening beaded	Circular flat abundant, thin white glistening the medium turning green to dark black brown
Circular, raised irregular, butyrous light grey or water color	Circular raised entire translucent glistening butyrous white or water color	Circular raised amorphous butyrous glistening smooth yellow	Circular raised amorphous butyrous white
Circular, raised entire butyrous, beaded, white yellow-blue, medium changed light green or grey	Circular raised amorphous, butyrous effused white or water color medium turning grey-brown or green	Circular, convex entire glistening butyrous effused yellow medium not changed	Circular raised thin amorphous butyrous, beaded, grey or brown medium changed green
Circular, raised entire, butyrous glistening, light yellow medium changed yellow green	Circulate, raised undulate capitate with margin translucent butyrous glistening, pale salmon yellow, medium turning green	Punctiform, raised entire butyrous glistening yellow medium not changed	Circular raised butyrous grey or brown medium changed green fluorescent

of 7 kinds of sulfur-reducing bacteria (C)

4	5	6	7
Turbid with pellicle odor of must	Flocculent in Peptone water membranous moderate turbidity viscid sediment	Uniform turbidity throughout heavy viscous in old culture	Marked turbidity with thick pellicle and heavy sediment medium yellowish green to blue later brownish
Moderate clouding viscid sediment	Strong clouding in 24 hours white colony	Yellow ring formation growth on test tube wall medium changed brown heavy viscous sediment	pellicle, moderate turbidity viscid sediment, medium changed to yellow surface green

King's medium for 8hrs. Culture	Circular convex entire translucent butyrous, pale salmon or brown medium changed light green fluorescent	Circular, raised undulate, salmon color medium turning green	Light brown circular raised entire medium turning brown
Litmus Milk	At first slightly Acid, then alkaline casein digested	Alkaline, Coagulation and digestion Litmus reduced	Alkaline litmus reduction Peptonized odor of putrefaction
B.C.P. Milk	Alkaline Peptonization	Alkaline Peptonization curd formation	Alkaline Peptonization
Potato	Vigorous, brown color medium becoming brown	Abundant, creamy glistening brownish flesh colored growth	Echinulate, smooth, glistening viscous reddish brown

強力한 還元菌을 얻고자 下水 油分含有土壤에서 150種의 菌株을 순수 分離하였고 이들을 $Na_2S_2O_3$ 를 添加한 King's 배지와 lead acetate agar培地에 接種하여 硫化水素를 發生시키는 菌株 40種을 얻게 되었다. 이 菌株들에 대하여 各各 Hendrie & Shewan (1966)의 同定結果表에 依據 實驗한 結果 優秀한 脫黃能을 가진 7種의 菌株을 획득하였다. 이들 菌株들을 細胞學的으로 調查하고 生長特性和 生化學的 試驗을 實施한 結果는 Table 2, 3, 4 및 5에 나타낸 바와 같다. 이들 Table 2, 3, 4, 및 5에 있는 資料를 基礎로 하고 Bergey's manual(1957), Haynes(1951), Liston *et al.*(1961), Rhodes(1959), Hendrie & Shewan(1966) 등의 同定表를 對照된 參考하여 다음에 Table 6에 表示한바와 같이 *Pseudomonas*屬에 包含되어 있는 7種의 *Pseudomonad*을 同定하였으며 이들의 電子顯微鏡寫眞은 Fig. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 및 7과 같다.

M-D-①-1	4	<i>Ps. pseudomonelli</i>
M-D-①-1-①	5	<i>Ps. xanthochlora</i>
M-Mo-1	6	<i>Ps. bowlesiae</i>
M-Mo-1-S	7	<i>Ps. aeruginosa</i>

分離, 同定된 上記 硫黃還元菌의 大量增殖에 關한 實驗結果에 依하면, 酸度에 依해 큰 영향을 받고 있는 이 菌의 生長은 Table 2에 보인 바와 같이 대개 pH 5.5~8.0 사이에서 잘 이루어 지고 있는 것으로 밝혀졌는데 이는 Strawinski(1951)와 Rhodes(1958, 1959)의 결과와 거의 一致하는 것이다.

振盪培養과 容量量, 培養基의 量 및 種類에 따른 菌增殖의 效果는 Fig. 8, 9, 10, 및 11에 各各 表示되었다.

Table 6. The species of Pseudomonads identified.

Isolate	Strain No.	Species Name
M-K-②-1-t	1	<i>Pseudomonas marginata</i>
M-K-②-2	2	<i>Ps. effusa</i>
M-K-②-3	3	<i>Ps. putrefaciens</i>

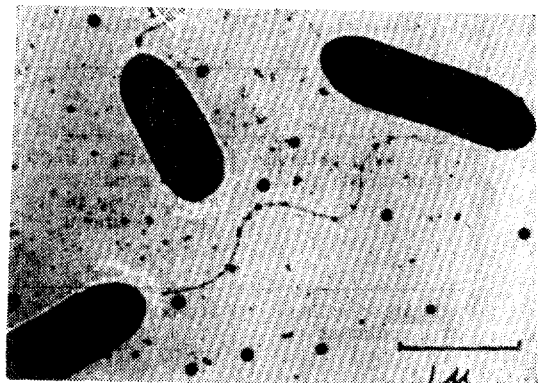


Fig. 1. Strain No. 1.

Round raised undulate grey color medium change dark brown or green	Round smooth raised entire salmon color later grey brown medium changed green	Round smooth raised entire, medium changed brown yellow brown	Round smooth raised entire grey or brown color butyrous medium changed deep green
Curdling with slowly developed acidity may be digested coagulated	At first slightly acid later alkaline Litmus reduction casein digested	Alkaline coagulation with a slow peptonization	Soft coagulation is formed with rapid Peptonization and reduction of litmus reaction alkaline
Alkaline Peptonized	Slightly alkaline Peptonization	Alkaline	Alkaline Peptonization
Vigorous, cream colored growth medium becoming brown	Abundantly yellow-brown medium becoming green	Circular raised amorphous glistening smooth yellow	Luxuriant, dirty brown, medium becoming dark green

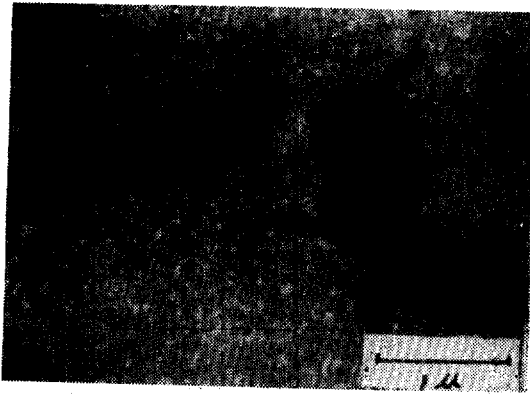


Fig. 2. Strain No. 2.

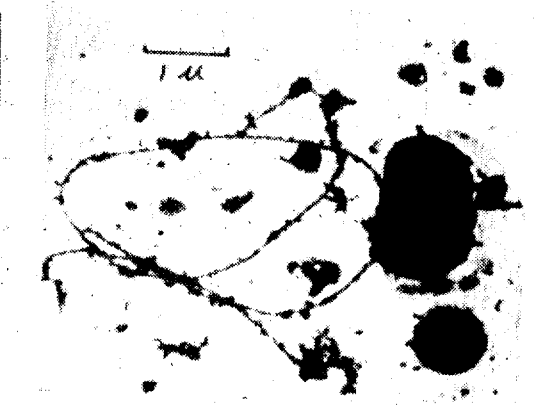


Fig. 3. Strain No. 3.



Fig. 4. Strain No. 4.



Fig. 5. Strain No. 5.

培地A에서의 振盪培養과 靜置培養의 効果는 前者가 後者보다 効果의 大을 Fig.8에서 알 수 있다. 이때 振盪培養은 reciprocal type 振盪器 (112 rev/min)를 使用하였

는데 *Thiobacillus*를 振盪培養조건하에서 더 나은 生長 效果를 얻은 結果(Lee, 1969)와 一致하였다. 또 容器의 量과 培地量에 따른 生長效果는 培地의 量이 容器量의 1/5

Table 3. Utility of carbohydrates in different *Pseudomonas* strains.

Carbohydrate	Strains						
	1	2	3	4	5	6	7
L-Arabinose	NA G	A G	A G	NA G	A NG	A NG	A NG
Dextrose	A NG	A G	A NG	A NG	A NG	A NG	A NG
Dextrin	—	—	—	—	—	—	—
Dulcitol	SA NG	SA NG	SA NG	SA NG	SA NG	SA NG	SA NG
D-Fructose	NA G	NA G	A NG	NA G	NA G	A NG	A NG
Galactose	A NG	A G	A G	A G	A NG	A NG	A NG
Inulin	NA G	NA	NA G	NA G	NA G	SA NG	SA NG
Lactose	A NG	NA	NA G	SA NG	NA G	A NG	SA NG
Maltose	NA G	NA G	A NG	A NG	A NG	A NG	A NG
Mannitol	NA G	NA G	NA G	AN G	A NG	SA NG	SA NG
Mannose	A G	A G	A G	A G	A NG	A NG	A NG
Melibiose	A G	A G	NA G	A G	A G	A NG	SA NG
Pectin	NA G	NA G	A G	A G	A G	A NG	NA G
Raffinose	—	—	—	—	—	—	—
Rhamnose	NA G	—	SA NG	SA NG	SA NG	A NG	SA NG
Salicin	NA G	SA NG	SA NG	SA NG	SA NG	A NG	A NG
D-Sorbitol	NA G	NA G	NA G	A NG	A NG	A NG	A NG
Sucrose	A G	NA G	NA G	A NG	NA G	SA NG	SA NG
Trehalose	NA G	NA G	NA G	NA G	NA G	SA NG	SA NG
Xylose	A G	A G	SA G	A G	A NG	A NG	A NG
Glycerin	A NG	SA G	NA G	NA G	N AG	SA G	SA G

A: Acid, G: Gas, SA; Slightly Acid, NA: No Acid, NG: No Gas, —: No Utilization

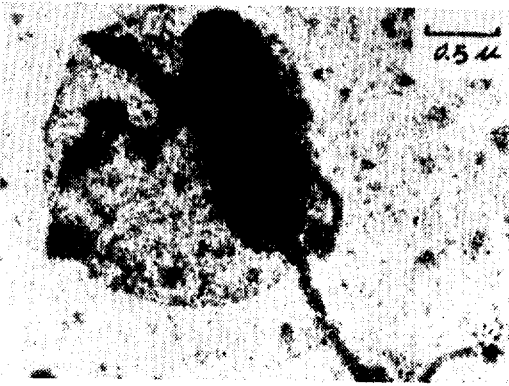


Fig. 6. Strain No. 6.

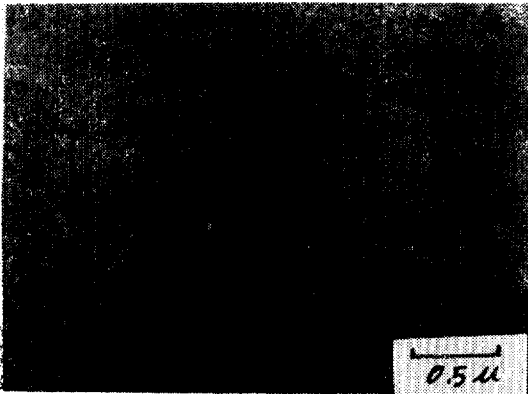


Fig. 7. Strain No. 7.

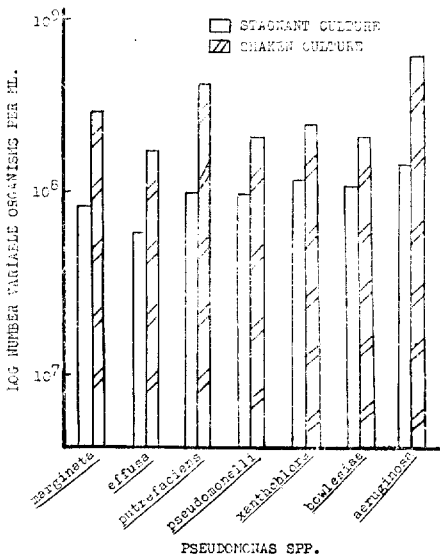


Fig. 8. Comparison of growth of *Pseudomonas* spp. in stagnant and shaken culture after 10 days.

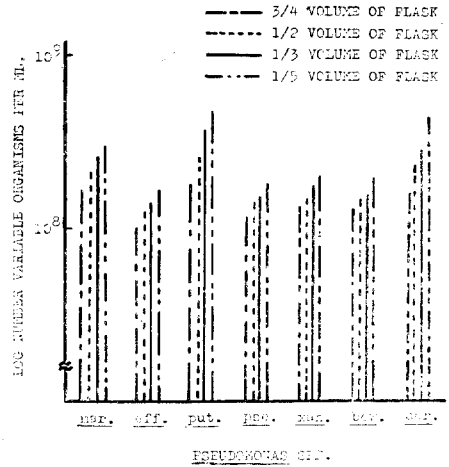


Fig. 9. Effects of volume of medium-A on the growth of *Pseudomonas* spp. with 10 day-culture of shaking.

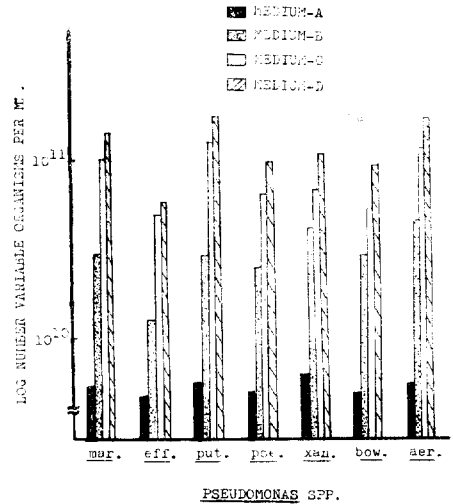


Fig. 10. Effects of several media on the growth of *Pseudomonas* spp. with 3 day-culture.

일 때가 가장 좋았던 것도 위의 진탕효과와 同一한 의미가 있으며 이는 *Pseudomonas* 가 강한 好氣性 菌種이기 때문인 것으로 思料된다(Fig. 9).

一般的으로 無機培地和 有機培地中에서 硫黃還元菌株들은 有機培地에서 강한 增殖力을 나타내고 있었으며 (Fig.10), 培地D에서

의 靜置培養의 效果를 調査한 結果 1日 靜置後 1日 振盪이 가장 效果가 큰 菌增殖을 나타냄을 알 수 있다(Fig.11).

微量重金屬이온이 菌의 生長에 미치는 影響에 對해서는 Strawnski(1953)와 Klausmeier(1957) 등이 報告한 바 있다. 一般의 으로 重金屬이온들이 高濃度에서 菌의 生長 沮害現像을 일으키는데 이는 菌이 가지고

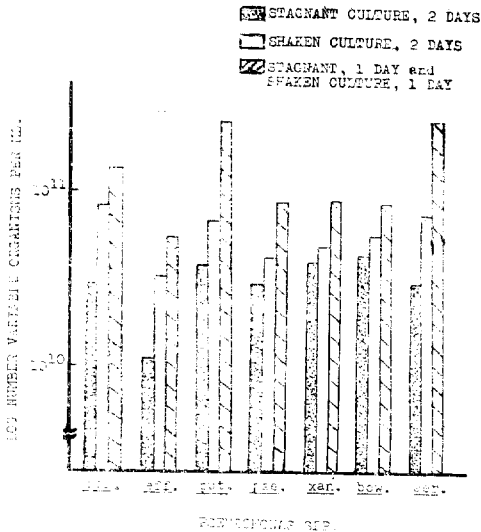


Fig. 11. Effects of culture methods on the growth of *Pseudomonas* spp. in Medium-D.

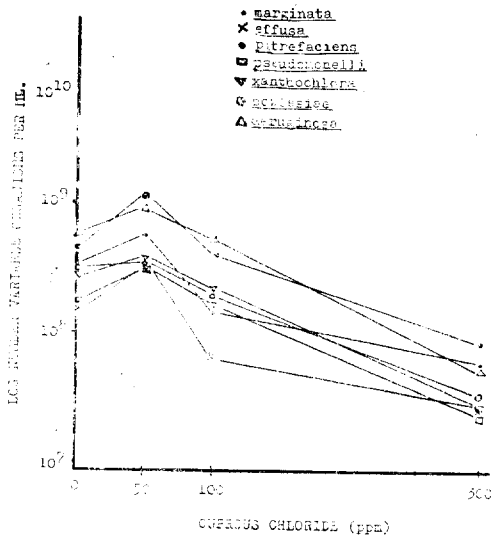


Fig. 12. Effect of cuprous chloride on the growth of *Pseudomonas* spp.

있는 酵素의 活性度를 減少시키고 酸化·還元電位差를 멀어뜨려 다른 榮養源의 分解能을 抑制시키는 結果라고 思料된다.

또 Starr(1946)에 依하면 구리이온이 10 ppm일 때가 가장 生長效果가 좋았다고 報告되어 있으나 本 實驗結果는 구리이온으로서 鹽化第1구리를 使用했을 때는 鹽化1구리 50ppm을 添加한 處理面에서 가장 生長이 좋았고(Fig.12, 13) 黃酸구리 使用時는 300 ppm에서 最高의 生長率을 나타내고 있다(Fig.14, 15).

구리, 水銀, 亞鉛, bismuth, 沃度 等の 微量金屬이온들은 硫黃還元細菌의 生長을 促進한다는 Strawnski(1951)의 結果와 一致하는 것이다.

石油內에 包含되어 있는 物質中의 하나인 芳香族 炭化水素와 petroleum ether가 菌增殖에 미치는 影響을 보인 實驗結果는 Fig. 16, 17 및 18에 各各 나타 내었다.

芳香族 炭化水素處理에 있어 benzene, toluene處理區는 共히 이들을 處理하지 않은 對照區보다 全般的으로 그 菌增殖에 沮害를 받게 하였고 benzene, toluene은 모두 10,000ppm 以上에서는 菌生長을 急激히 低下시켰으며 特히 50,000ppm에서는 그

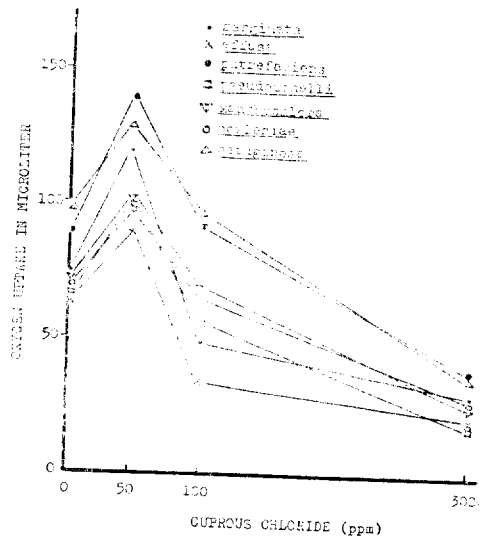


Fig. 13. Effect of cuprous chloride on the respiration of *Pseudomonas* spp.

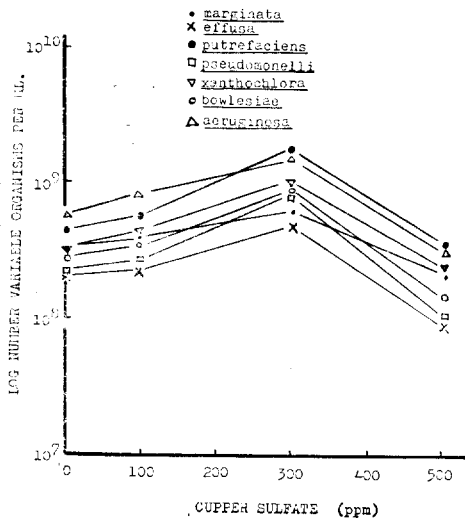


Fig. 14. Effect of copper sulfate on the growth of *Pseudomonas* spp.

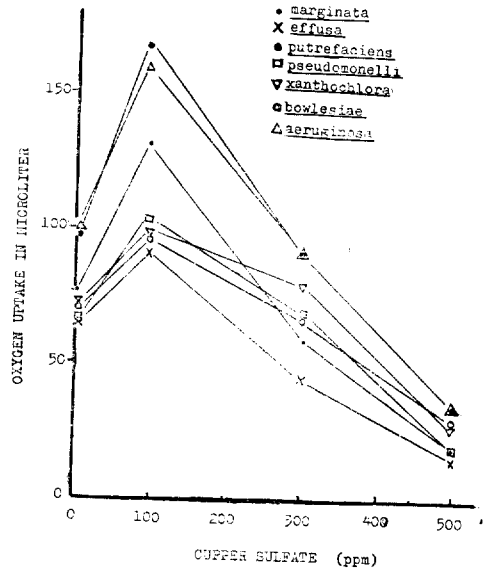


Fig. 15. Effect of copper sulfate on the respiration of *Pseudomonas* spp.

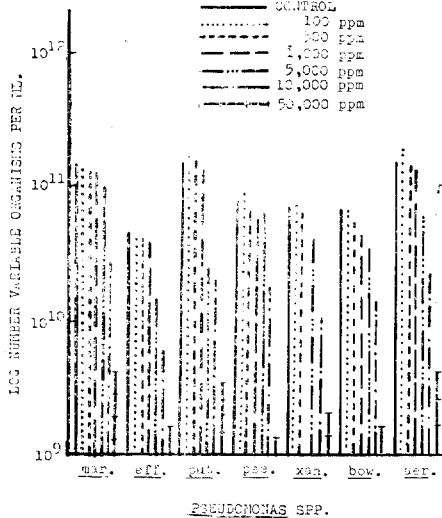


Fig. 16. Effects of benzene on the growth of *Pseudomonas* spp.

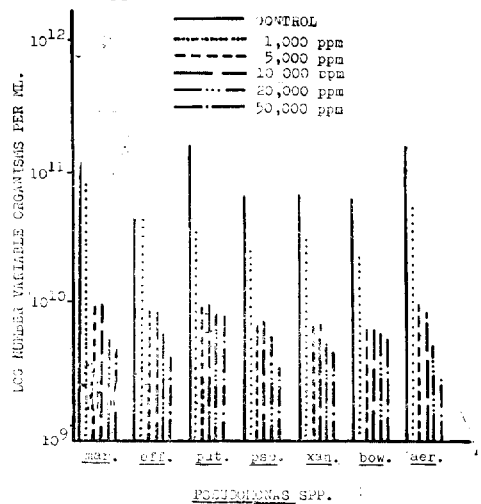


Fig. 17. Effects of toluene on the growth of *Pseudomonas* spp.

菌生長을 완전히 저지시키고 있음을 알 수 있다.

芳香族 炭化水素를 이용하는 石油微生物에 關해서는 *Nocardia*屬 및 soil mycelial (Park, 1965, 및 Bilal, 1965)이 benzene과 toluene을 各各 分解한다는 報告가 있으나 *Pseudomonas*가 benzene과 toluene을 利用한다는 報文은 찾아볼 수가 없었다. 그러나 芳香族 炭化水素中 benzene이나 tolu-

ene 等에 依해서는 生長阻害를 받으며 paraffin 系列의 化合物은 *Pseudomonas*에 依하여 利用되어 報告되어 있다 (Strawinski, 1950, 1951, 및 ZoBell, 1946, 1953).

本 實驗結果 (Fig. 16, 17)에 依하면 7種의 *Pseudomonas* 菌株들은 非處理區인 control보다 약간 낮은 生長率을 나타내고 있으나 原油中에 있는 benzene이나 toluene이 약 600~700ppm인 것으로 볼 때 原油에

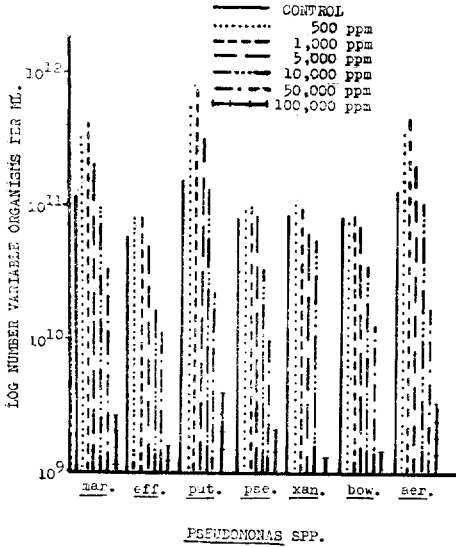


Fig. 18. Effect of petroleum ether on the growth of *Pseudomonas* spp.

의處理는 무방할 것으로 判斷되었다. Fig. 18의 結果에 依하면 原油中の 主要 油分인 petroleum ether을 處理한 區는 對照區보다 菌의 生長效果가 1,000ppm 以下의 濃度에서는 良好하였으며 50,000ppm 處理區

는 control에 比하여 약간의 沮害現像만이 있었고 그보다 많은 100,000ppm에서는 急激한 沮害度를 表示하고 있다.

*Pseudomonas*가 石油中の 脂肪族 炭化水素를 利用한다는 Strawinski(1951)와 Hiroshi Iizuka(1965) 등의 結果와 거의 一致하는 것으로 보아 菌분 分離 同定된 *Pseudomonas*들은 石油의 原油內에서 生長이 可能함을 알 수 있었다.

微生物을 利用한 石油脫黃을 實用化함에 있어서 解結하여야 할 問題點은 莫大한 石油處理를 위한 菌의 大量培養, 硫黃還元細菌의 石油內 生長能力 強化, 變性에 依한 脫黃能이 높은 菌의 확보, 菌生長에 必要한 炭素源으로서 石油炭水化合物의 消耗防止 및 石油性質의 變化, 培養條件이 判異한 酸化還元菌을 同時에 培養시키는 方法의 開發 및 菌의 生長에 따라 축적되는 中間生成物이 結果적으로 菌의 生長을 沮害할 수 있다는 事實에 立脚한 繼續적이고 効率的인 生成物의 除去方法 등이 앞으로 더욱 研究되어야 할 課題로 남아 있다.

摘 要

石油中 硫黃化合物을 還元할 수 있는 細菌을 分離하여 *Pseudomonas marginata*, *Ps. effusa*, *Ps. putrefaciens*, *Ps. pseudomonelli*, *Ps. xanthochlora*, *Ps. bowlesiae*, *Ps. aeruginosa* 등 7種의 *Pseudomonad*를 同定하였으며, 이들 同定된 菌에 對하여 效果적인 培養方法 및 石油內에서의 生長 可能性을 檢討하였다.

Strawinski의 無機培地에서는 靜置培養보다 振盪培養하는 方法이, 그리고 有機培地에서는 1日間 靜置培養後 1日間 振盪培養하는 方法이 菌增殖에 效果적이었고, 一定한 條件下에서는 培養 容器量에 對한 培地量을 5分の1로함이 가장 큰 生長率을 나타내었다.

微量 金屬이온으로서 鹽化第1구리와 黃酸銅을 處理한 結果 各各 50ppm 및 300ppm에서 菌의 生長을 促進하였으며, 石油의 成分인 benzene, toluene, petroleum ether가 이들 菌의 生長을 沮害하는 濃度 範圍는 各各 5,000ppm, 5,000ppm, 50,000ppm以內로 나타 남으로써, 이들 成分에 依하여서 상기한 菌은 原油에서의 生長에 沮害를 받지 않음을 알았다.

引 用 文 獻

1. Bilai, V.I., 1965. Petroleum hydrocarbon as the source of carbon for soil mycelial microscopic fungi. *Microbiol. Zh.Akad. Nauk. Ukr. RSR.* **27** : 10-30.
2. Breed, R.S., E.G.D. Murray, and N.R. Smith, 1957. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 7th ed.
3. Gaby, W.L., 1955. Taxonomic problems relating to the identification of species within the genus *Pseudomonas*. *Inst. Bull. Bact. Noman. & Taxon.* **5** : 153.
4. Haynes, W.C., 1951. *Pseudomonas aeruginosa*, its characterization and identification. *J. Gen. Microbiol.* **5** : 939.
5. Haynes, W.C., and L.J. Rhodes, 1962. Comparatory taxonomy of crystallogenic strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Ps. chlororaphis*. *J. Bacteriol.* **84** : 1080.
6. Handy, M.K., E.L. Sherrer, H.H. Weis-son, and W.D. Sheet, Microbiological factor in the treatment of phenolic waste.
7. Hendrie, M.S., and J.M. Shewan, 1966. The identification of certain *Pseudomonas* species.
8. Hugh, R., and E.Leifson, 1953. The taxonomic significance of fermentive versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **66** : 24.
9. Hugh, R., and E. Rhschenkow, 1961. *Pseudomonas maltophila*, an *Alcaligenes*-like species. *J. Gen. Microbiol.* **26** : 123.
10. Iizuka, H., and K. Komagato, 1964. Microbiological studies on petroleum and natural gas. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **10** (3), I, II.
11. Iizuka, H., and K. Komagato, 1965. Microflora of Higashiyama oil mining field. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **11**(1,2), IV, V, VI, and VII.
12. H., Okazaki, and N.Seto, 1969. A New sulfate-reducing bacterium isolated from Antarctica. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **15**:11-18.
13. Klausmeier, R.E., and R.J. Strawinski, 1957. Microbial oxidation of naphthalene. *J. Bacteriol.* **73** : 461.
14. Lee, M.J., *et al.*, 1969. Desulfurization of petroleum by microorganisms. *Tech. Res. Report, KOCO*.
15. Liston, J., and R.R. Cowell, 1961. Taxonomic relationships among the *Pseudomonads*. *J. Bacteriol.* **82** : 1-14.
16. Lysenko, O., 1961. *Pseudomonas*-an attempt at a general classification. *J. gen. Microbiol.* **25** : 379.
17. Novelli, A., 1953. New method of staining bacterial capsules in films and sections. *Experimentia* **9** : 34.
18. Park, Taiwan, 1965. Petroleum fermentation. *Progress in Chem. Chemical Industry* **5** : 246-253.
19. Rhodes, M.E., 1957. The preservation of *Pseudomonas* under mineral oil. *J. Appl. Bacteriol.* **20** : 108.
20. Rhodes, M.E., 1958. The cytology of *Pseudomonas* spp. as revealed by a silver plating staining method. *J. Gen. Microbiol.* **18**:639.
21. Rhodes, M.E., 1959. The characterization of *Pseudomonas fluorescens*. *J. Gen. Microbiol.* **21** : 221.
22. Sneath, P.H.A., 1957. Some thoughts on bacterial classification. *J. Gen. Microbiol.* **17** : 164.
23. Starr, M.P., 1946. Mineral nutritive requirements of the genus *Xanthomonas*. *J. Bacteriol.* **51** : 131.
24. Strawinski, R.J., 1950. Method of desulfurizing crude oil. U.S. Patent, No. 2,521,761.
25. Strawnski, R.J., 1951. Purification of substances by microbial action. U.S. Patent, No. 2,574,070.
26. Umbreit, W.W., R.H. Burris, and F. S-taffer, 1964. *Manometric technique*. 4th ed.

27. ZoBell, C.E., 1932. Zinc dust method. *J. Bacteriol.* **24** : 273.
28. ZoBell, C. E., 1946. *Petroleum Geol.* **30**:477.
29. ZoBell, C. E., 1946. Bacteriological Process for treatment of fluid-bearing earth formation. U.S. Patent, No. 2,413,278.
30. ZoBell, C.E.,1953 a. Process of removing sulfur from petroleum hydrocarbons and apparatus.U.S. Patent, No. 2,641,564.
31. ZoBell, C.E.,1953b. Recovery of hydrocarbons.U.S. Patent, No. 2,641,566.