

폐탄광수에서 분리한 황화수소 분해 세균 *Thiobacillus* sp. IW.의 성장조건

차진명·박열·*이인화
조선대학교 자연과학대학 유전공학과, *조선대학교 환경학과

Effects of Cultivation Condition on Growth of the Hydrogen Sulfide-Degrading *Thiobacillus* sp. IW. Isolated from Waste Coal Mine Water

Jin-Myeong Cha, Yeol Park and *In-Wha Lee

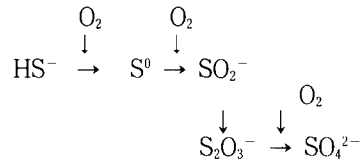
Department of Genetic Engineering, Chosun University, Kwangju 501-759, Korea
*Department of Environmental Science, Chosun University, Kwangju 501-759, Korea

ABSTRACT

A bacterium isolated from waste coal mine water around Hawsun had an ability for the degradation of hydrogen sulfide. The isolate was identified as *Thiobacillus* sp. IW. on the basis of its morphological, physiological and chemotaxonomical characteristics. The optimum pH and temperature were 7 and 30 °C, respectively. Growth occurred in a pH range of 3 to 9. Due to the sulfate accumulated in liquid medium, the pH decreased. As a consequence the cell growth was inhibited. Potassium nitrate and glutamic acid were utilized as a nitrogen source but urea and ammonium chloride not consumed. Denitrification occurred in a basal medium containing the glucose but did not in a basal medium containing the malate. The maximum specific growth rate of cell was 0.78h^{-1} and generation time was 0.9 hour. The cell productivity was $6.25\text{mg/l} \cdot \text{h}$ and the isolate grew logarithmically up to 18 hour. These results indicate that the isolate can be a suitable bacterium responsible for degradation of hydrogen sulfide as malodorous compounds.

서론

대기중으로 방출되는 황화합물인 황화수소, 메캅탄 등은 심한 악취와 환경오염을 일으키는 물질이다. 이들 물질에 대한 생물학적 처리법은 여러 가지 복합 악취를 동시에 제거할 수 있고(1), 제거 효율도 점차로 증가되고 있어 화학적 처리법의 대안으로서 관심을 끌고 있다(2, 3). 지금까지 황화수소 등의 악취가스 제거에 주로 이용되는 미생물로는 *Thiobacillus* species가 있다(4, 5). *Thiobacillus* sp.는 황화수소의 산화과정에서 생성된 에너지를 이용하여 성장하며 분해기작은 다음과 같다(6).



따라서 황화수소 등의 악취가스를 분해할 수 있는 *Thiobacillus* sp.의 기초적인 연구를 수행하거나 응용하기 위해서는 성장 속도가 빠른 다량의 균체를 회수하는 것이 무엇보다 중요하다(7-9). 즉 고농도의 균체를 대수성장기에 얻는 것이다. 일반적으로 이

균은 성장속도가 느리고 균체량도 아주 작아 보통 플라스크 배양에서 얻어진 균체량은 224mg/ℓ (8-11day)였으며(10, 11), CO₂를 풍부하게 공급하면서 에너지원으로 분말황을 사용하면 8일 동안에 700mg/ℓ 균체량을 얻을 수 있었다(12). 그러나 분말황을 에너지원으로 사용하여 균체량을 측정하는 것은 대단히 어렵기 때문에 주로 sodium thiosulfate를 에너지원으로 사용한다(10). 균의 성장은 에너지원으로 사용되는 sodium thiosulfate가 감소함에 따라 기질농도가 부족하여 대사가 억제된다(13, 14).

따라서 본 연구에서는 *Thiobacillus* sp. IW.의 최적 성장조건을 조사하기 위하여 sodium thiosulfate 농도를 변화시키면서 균체의 비성장속도와 성장곡선을 조사하였고, pH 및 온도 변화에 따른 균의 성장과 균체량도 측정하였다. Sulfate 및 thiosulfate의 농도를 측정하여 황화수소 등의 산화반응에 고정화 미생물로 응용할 수 있는 여러 가지 배양인자에 관한 기초자료를 얻고자 하였다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 배지

본 실험에 사용한 시료는 전남 화순 근교의 폐탄광수에서 채취한 하천수를 분리용 시료로 사용하였다. 균주 분리에 사용된 성장배지의 조성은 Cho 등(2, 17)이 사용한 배지 조성과 같다. 기본배지에 sodium thiosulfate(8g/ℓ)와 yeast extract(2g/ℓ)를 따로 분리하여 멸균하고 60℃에서 혼합하여 성장배지로 사용하였다. 분리방법은 시료를 성장배지 50ml에 접종하여 1주일간 30℃, 120rpm으로 진탕배양한 후 혼탁도가 증가한 배지를 다시 동일 조성의 새로운 성장배지에 접종하는 과정을 수차 반복하였다. 그 후 고체배지에 도말하여 수 차례 배양한 후 1개의 집락을 선별하여 사용하였다.

배양방법

균주 배양방법은 플라스크 배양과 발효조 배양을 사용하였다(12). 발효조 배양은 고체배지에 보관중인 균주 1백균이를 선별하여 액상 성장배지 250ml에 접종하고 30℃, 120rpm에서 3일간 배양한다. 그 후 5ℓ 발효조에 3ℓ 기본배지를 넣고 sodium thiosulfate(8g/ℓ)와 yeast extract(2g/ℓ)를 따로 분리, 멸균하여 혼합한 후 위에서 얻은 액상배지

0.5ml를 취하여 발효조에 접종하고 30℃, 200rpm으로 멸균 필터를 거친 공기를 1.5ℓ/min로 주입하면서 3일간 배양하였다. 발효조에는 교반기가 있어 교반이 가능하고 냉각수를 순환하게 하여 자동 온도 조절이 되도록 하였고, 이 성장배지를 취하여 원심 분리하여 얻은 균체를 4℃ 냉장고에 보관하면서 필요에 따라 접종배지로 사용하였다. 그리고 분리 균주는 고체배지에 배양한 후 4℃에서 보존하면서 3주마다 계대배양하였다.

균주 성장조건 및 특성

균주의 일반적인 특성은 고체배지에 배양하면서 조사하였다. 온도에 따른 균의 성장을 조사하고자 4℃~50℃ 사이의 적절한 간격을 조절하여 배양한 후 온도에 따른 균체성장을 비교하였고, pH 변화에 대한 성장을 알아 보고자 배양액을 멸균한 후 멸균한 2N-NaOH와 20%-HCl을 사용하여 배양액의 초기 pH를 3.0~9.0으로 조절하면서 균체 성장을 비교하였으며, sodium thiosulfate 농도에 따른 균의 성장을 조사하고자 기본배지에 sodium thiosulfate 농도를 2~40g/ℓ로 조절하고 yeast extract(2g/ℓ)를 첨가하여 균의 성장과 균의 성장에 따른 액상 성장배지의 thiosulfate와 sulfate 농도를 측정하였다.

건조 균체량 및 비증식속도

500ml 삼각 플라스크에 250ml 기본배지를 넣고 sodium thiosulfate(8g/ℓ), yeast extract(2g/ℓ)를 분리, 멸균하여 혼합한 후 성장배지에 접종하여 대수성장기에 있는 균을 취해 원심분리하여 회수된 균체를 80℃에서 무게가 변하지 않을 때까지 건조한 후의 양을 건조 균체량으로 하였다. 또한 비증식속도(μ)는 다음식으로 구하였다.

$$\text{비증식속도}(\mu) = \frac{\log \frac{A}{A_0}}{t - t_0}$$

A : 초기흡광도 A₀ : 말기흡광도
t : 초기배양시간 t₀ : 말기배양시간

분석방법

Thiosulfate 이온은 Kelly 등(14)의 방법으로 분석하였고, sulfate 이온은 5% BaCl₂ · 2 H₂O 용액 2ml에 시료 2ml를 혼합한 후 460nm에서 UV/VIS를 사용하여 분석하였다. 균체의 성장은 UV/VIS를 이용하여 660nm에서 흡광도를 조사하였다.

결과 및 고찰

균주의 분리 및 분리균의 특성

분리균주의 특성은 Table 1과 같다. 분리균은 간균이며 운동성을 가졌고, 포자를 형성하는 그람음성이며, 집락의 색깔은 진한 갈색으로 변화되어 세포 내에 황 성분이 축적하는 것으로 추측되어진다(16). Thiosulfate 배지와 영양배지에도 성장하였으며, 분리균주는 DNA의 G+C 함량이 65.0mol%을 나타내었고, 세포 내의 주요 지방산 조성 중 비수산화 지방산은 16:1+17_{cy}, 16:0과 수산화 지방산은 3-OH을 가지고 있었고, 통성 화학합성 영양을 하며, 호흡계 내의 ubiquinone system은 Q-9을 가지고 있었다. 이러한 특성을 Bergey's manual(16)과 Katayama-Fujimura(17) 등의 결과와 비교하여 *Thiobacillus*속의 한 균주임을 확인할 수 있었다.

온도의 영향

온도 변화에 따른 균주의 성장을 알아보기 위하여 고체배지와 액상배지의 pH를 7로 조절하여 각각의 온도에서 18시간 배양 후의 세포농도를 Fig. 1에 나타내었다. 4℃와 50℃에서 균은 성장하지 않았고, 25℃~45℃ 사이에서 성장이 우수하였다. 이는 Bergey's manual(16) 등의 결과와 비교해 보면 *Thiobacillus* species와 유사한 경향을 보였다(17, 18). 따라서 본 연구에서 분리한 균주의 최적 온도는 30℃였으며 비교적 넓은 온도 범위에서 성장하였다.

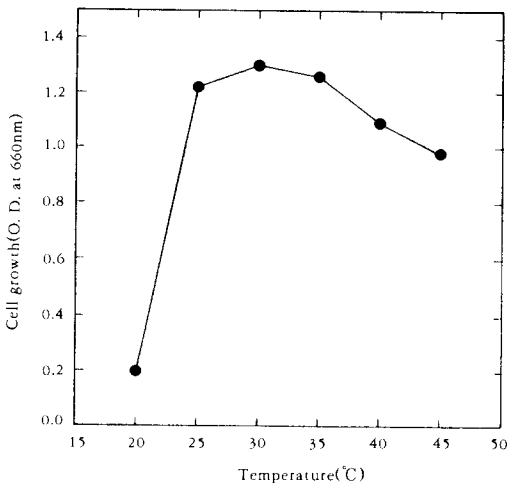


Fig. 1. Effects of temperature on the growth of *Thiobacillus* sp. IW.

Table 1. Characteristics of *Thiobacillus* sp. IW.

Character	<i>Thiobacillus</i> sp. IW.
Morphology	Rod
Colony size	0.3mm-0.9mm
Colony color	Dark brown with sulfur deposited
Motility	Positive
Gram-staining	Negative
Colony on thiosulfate agar plate	Positive
Colony on nutrient agar	Positive
Spore formation	Positive
Nitrate reduction	Positive
^b Denitrification with glucose	Positive
^c Denitrification with malate	Negative
Autotrophic growth with	
Elemental sulfur	Positive
Thiosulfate	Positive
Nitrogen source with	
Potassium nitrate	Positive
Ammonium chloride	Negative
Urea	Negative
Glutamic acid	Positive
Optimum pH	7
Maximum pH	9
Minimum pH	3
Optimum temperature	30℃
Maximum temperature	45℃
Minimum temperature	15℃
Growth at 50℃	Negative
Growth at 4℃	Negative
Ubiquinone system	Q-9
Guanine plus cytosine content of DNA	65.0mol%
^d Major cellular fatty acids	Non-hydroxy, 16:1+17 _{cy} , 16:0 Hydroxy, 3-OH 12:0 Unidentified branched fatty acid of C ₁₈
Nutritional requirement	facultative chemolithotroph

^a Determined in basal medium containing 0.8%(wt/vol) Na₂S₂O₃ and 0.2%(wt/vol) yeast extract (From reference 2, 3, 4).

^b Determined in basal medium containing 0.5%(wt/vol) glucose.

^c Determined in basal medium containing 0.5%(wt/vol) malate.

^d 16:1+17_{cy}(hexadecenoic acid plus cyclopropane of C₁₇), 16:0(hexadecanoic acid).

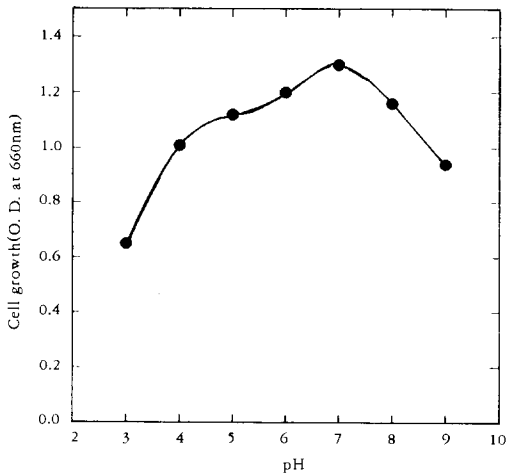


Fig. 2. Effects of pH on the growth of *Thiobacillus* sp. IW.

초기 pH의 영향

pH가 균주 성장에 미치는 영향을 알아보기 위하여 고체배지와 액상배지의 배양온도를 30°C를 유지하면서 pH를 2~9까지 변화시켜 최적 pH를 조사하였다. 각각의 pH에서 18시간 배양한 후 농도를 Fig. 2에 나타내었다. pH 3과 pH 9에도 성장하였으며, pH 6~8 사이에도 성장이 우수하였으며, 최적 pH는 7로 나타났다. Bergey's manual(16, 19) 등에 의하면 *Thiobacillus* species는 대부분 호산성균이며 일부 균주만 중성균을 나타내었으나(20), 본 연구에서 분리한 균주는 중성균이며 비교적 넓은 pH 범위에서 성장함을 보였다. 이는 앞으로 황화합물 등의 악취 제거 응용에 있어서 pH 변화에 상당히 안정된 균주로 사료되어진다.

유기물 동화

유기물 동화는 Table 2와 같다. 기본배지에 적절히 조절된 유기물을 첨가한 경우와 Sodium thiosulfate가 포함된 기본배지에 유기물을 첨가하여, 이들 배지의 유기물 동화를 보면 거의 유사한 경향을 보였다. 그러나 기본배지에 탄소원으로 glucose(5g/ℓ)가 첨가된 배지와 glucose(5g/ℓ)가 포함된 기본배지에 질소원을 첨가하였을 경우 균의 성장은 모두 확인되었으나, 탄소원으로 malate(5g/ℓ)가 포함된 기본배지에서는 균의 성장을 볼 수 없었고, malate(5g/ℓ)가 포함된 기본배지에 질소원을 첨가하였을 경우에도 균의 성장은 볼 수 없었다. 기본배

Table 2. Assimilation of organic compounds by *Thiobacillus* sp. IW.

Substrate	Basal medium + Substrate	Basal medium + Thiosulfate + Substrate
Arabinose	+	++
Citric acid	-	-
Sucrose	++	++
Gluconic acid	+	+++
D-glucose	++	++
Isoleucine	-	-
Leucine	-	-
Lactose	++	++
Oxalic acid	-	-
Serine	-	-
Phenyl alanine	--	-
Acetic acid	-	-
Methyl formate	-	-
Methanol	-	-
Pyruvic acid	--	-
Succinic acid	-	-
Glycerol	+	+
Lactate	+	-
Glucose	++	++
Proline	++	++
Maltose	++	++
Ribose	+++	+
Fructose	+++	+
Tryptophan	-	-
Glutamic acid	-	-

지에 potassium nitrate(1.1g/ℓ)와 glutamic acid(0.3g/ℓ)를 첨가하면 질소원으로 이용하지만, urea(0.3g/ℓ)나 ammonium chloride(0.6g/ℓ)는 질소원으로 이용하지 못하였다(7, 13). 이는 Katayama-Fujimura 등(16, 17)의 유기물 동화에 대한 영향과 유사하다.

성장곡선

Sodium thiosulfate(8g/ℓ)와 Yeast extract(2g/ℓ)가 포함된 액상배지에 0.2% 농도의 균을 발효조에 접종하여, 냉각수를 순환하게 하고 30°C, 200rpm으로 1.5ℓ/min의 멸균공기를 주입하면서 균의 성장속도를 살펴 보았다. 배양시간 3시간마다 흡광도를 측정하여 배양시간의 경과에 따른 균의 성장곡선을 Fig. 3에 나타내었다. 배양 10시간 후 대

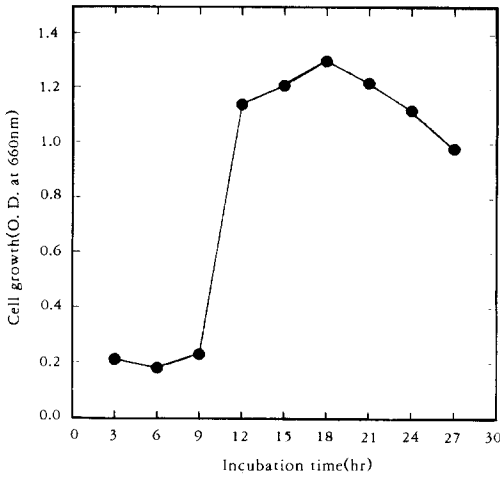


Fig. 3. Growth curve of *Thiobacillus* sp. IW.

수성장기에 이르고, 배양 18시간에 최대성장속도를 나타내었고, 배양 21시간 후 사멸기에 도달하였다. 일반적으로 *Thiobacillus* species는 성장이 느린 균주로 알려졌으나(6, 20), 본 연구에서 분리한 균주의 경우 성장속도가 빨라 각종 악취 제거 및 미생물 응용 측면에서 우수한 균주로 사료되어진다.

Sodium Thiosulfat 농도에 따른 균체의 성장

에너지원으로 사용된 sodium thiosulfate 농도에 따른 균의 성장곡선과 비증식속도를 조사하기 위하여 yeast extract(2g/l)을 포함한 기본배지에 sodium thiosulfate 농도를 2~40g/l로 조절하여 발효조의 배양조건 아래에서 배양액의 흡광도를 측정하여 조사하였다. Sodium thiosulfate 농도에 따른 성장곡선은 Fig. 4에 나타내었다. 대수성장기에 이르는 동안 thiosulfate 농도가 32mM 이하에서는 농도가 증가함에 따라 균의 성장은 증가하였지만, 32mM 이상에서는 thiosulfate 농도가 증가함에 따라 균의 성장이 감소되었다(4, 5). Thiosulfate 농도에 따른 균의 비증식속도를 Lineweaver-Burk plot한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 최대 비증식속도 $\mu_{max} = 0.78h^{-1}$ 이었으며, 세대시간은 0.9시간으로 나타났다.

균체의 성장에 따른 균체량과 Thiosulfate, Sulfate 농도 변화

균주의 성장곡선에 따른 균체량과 이때 에너지원으로 사용되는 thiosulfate와 sulfate 농도 변화를 Fig. 6에 나타내었다. 배양초기 thiosulfate 농도를

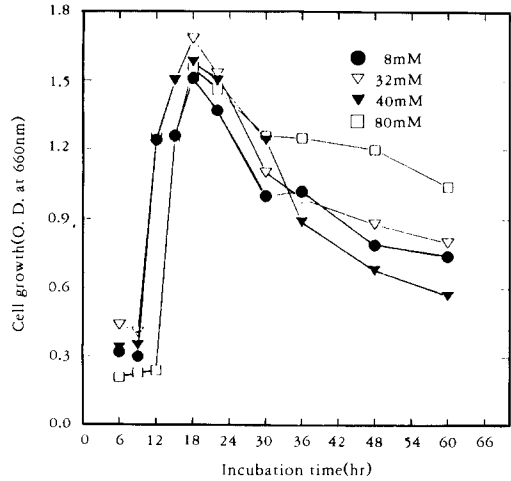


Fig. 4. Effects of various thiosulfate concentration on cell growth.

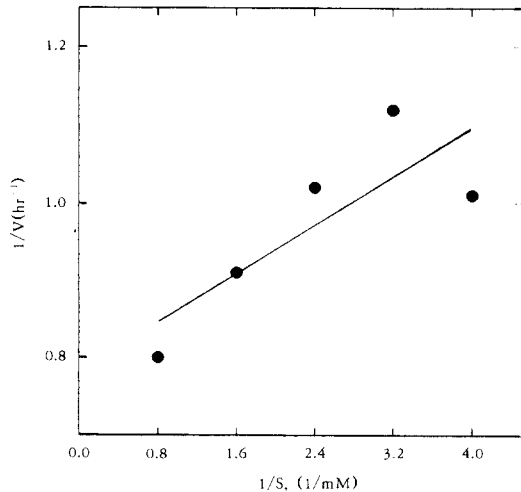


Fig. 5. Lineweaver-Burk plot of cell growth on thiosulfate concentration.

32mM로 하여 균의 성장을 측정한 결과 배양 18시간에 최대 균체량을 보였으며 이후 점차 사멸기에 도달하였다(5, 11). 그러므로 균주의 성장곡선이 최대에 도달한 후 에너지원으로 사용된 thiosulfate는 결핍되어 점차 감소하였고, sulfate 농도는 점차 증가하여 결국 배지 내에 축적된 sulfate 이온이 배지의 pH를 감소시켜 균의 성장을 억제하게 되었다. 위의 결과는 Hirai 등(8)이 발표한 것과 유사한 경향

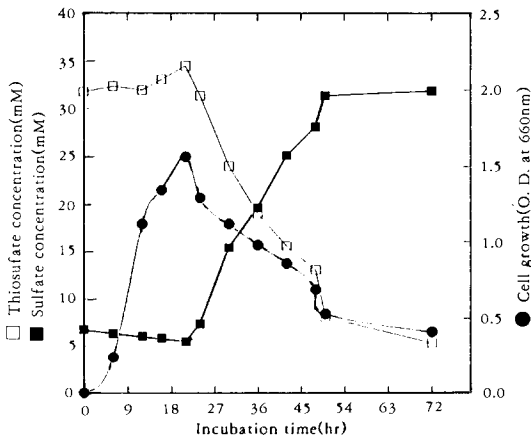


Fig. 6. Growth and thiosulfate oxidation by *Thiobacillus* sp. IW. Cultivation were carried out 30°C, pH 7, 200rpm, and 1.5ℓ /min O₂.

을 보였다.

건조균체량

Thiobacillus species는 성장속도가 느리고 균체량도 아주 작아 보통 플라스크 배양에서 얻어진 균체량은 224mg/ℓ (8-11day)였으며(10, 11), Imai 등(12)은 CO₂를 풍부하게 공급하면서 에너지원으로 분말황을 사용하면 8일 동안에 700mg/ℓ 균체량을 얻을 수 있었다. 그러나 분말황을 에너지원으로 사용하여 균체량을 측정하는 것은 대단히 어렵기 때문에 주로 sodium thiosulfate를 에너지원으로 사용한다(13). Thiosulfate 농도를 32mM로 하고 pH 7, 30°C에서 3일 동안 배양한 후 배양시간에 따른 건조 균체량을 Table 3에 나타냈다.

Table 3. Incubation time course of dry cell weight.

Incubation time	12hr	15hr	18hr	21hr	24hr	48hr	60hr
Dry cell weight	5.23mg/ℓ·h	5.92mg/ℓ·h	6.25mg/ℓ·h	6.01mg/ℓ·h	5.13mg/ℓ·h	4.63mg/ℓ·h	4.12mg/ℓ·h

건조 균체량은 18시간 후 112.5mg/ℓ을 회수하였고, 시간당 얻어진 균체량은 6.25mg였다. 배양 18시간 후 균의 성장은 점차로 감소하였고 균체량도 점차 감소하였다. 위의 결과는 현재까지 알려진 다

른 *Thiobacillus* species보다 균체량이 증가하여 앞으로 응용측면에서 우수한 균주로 사료되어진다.

요 약

황화수소 산화반응에 이용할 수 있는 균주를 전남 화순 근교의 폐탄광수에서 분리하였다. 분리균주는 형태적, 생리학적 및 화학합성 특징에 기준으로 보면 *Thiobacillus* sp. IW.로 동정되어진다. 분리된 균주의 최적 배양온도는 30°C였고, 최적 pH는 7이며, pH 3~pH 9 사이의 넓은 성장범위를 가지고 있었다. 액상배지에 측정된 sulfate 농도가 배지의 pH를 감소시켜 결국 균의 성장을 억제하는 작용을 하였다. 최대 비증식속도인 $\mu_{max}=0.78^{-1}$ 이었고, 세대시간은 0.9시간으로 나타났다. 분리균주는 질소원으로 potassium nitrate나 glutamic acid를 이용하였으나, urea나 ammonium chloride는 이용하지 못하였다. 기본배지에 첨가된 malate는 전혀 이용하지 못하였고, Sodium thiosulfate를 에너지원으로 이용하면 균체량은 6.25mg/ℓ·h였으며, 대수성장기는 18시간으로 나타났다. 이의 결과로 미루어 보아 분리균주는 황화수소 등의 악취 제거에 유용한 균주로 사료되어진다.

참고 문헌

1. I. N. Furusawa, I. Togashi, M. Hirai, M. Shoda and H. Kubota(1984), *J. Ferment. Technol.*, **62**, 589.
2. K. S. Cho, L. Zhang, M. Hirai and M. Shoda (1991), *J. Ferment. Bioeng.*, **71**, 44.
3. K. S. Cho, M. Hirai and M. Shoda(1991), *J. Ferment. Bioeng.*, **71**, 384.
4. R. G. Buter(1975), *Can. J. Microbiol.*, **21**, 2089.
5. K. S. Cho, M. Hirai and M. Shoda(1992), *J. Ferment. Bioeng.*, **73**, 46.
6. T. Mizoguchi, T. Sato and T. Okabe(1976), *J. Ferment. Technol.*, **54**, 181.
7. Y. K. Fujimura and H. Kuraishi(1980), *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **26**, 357.
8. M. Hirai, L. M. Zhang and M. Shoda(1991), *J. Ferment. Bioeng.*, **72**, 392.
9. J. J. Choi, M. Hirai and M. Shoda(1992), *Enviral. Sci.*, **5**, 163.

10. De Bont, J. A. M. Dijken and W. Harder (1981), *J. Gen. Microbiol.*, **127**, 315.
11. K. Hiroshi, I. Toshihiko, N. Kouji, K. Kajuo and A. Yoshifumi(1991), *J. Ferment. Bioeng.*, **72**, 36.
12. K. Imai and M. Okuzumi(1965), *Hakkokogaku.*, **43**, 1.
13. M. P. Silverman and D. G. Lundgren(1959), *J. Bacteriol.*, **72**, 642.
14. R. Tabita and D. G. Lundgren(1971), *J. Bacteriol.*, **108**, 328.
15. D. P. Kelly, L. A. Chambers and P. A. Trudinger(1969), *Anal. Chem.*, **41**, 898.
16. W. V. Vishniac(1974), Genus *Thiobacillus* in Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th 456-461. Edited by R. E. Buchanan and N. E. Gibbons. Baltimore : Williams and Wilkins.
17. Y. Katayama-Fujimura and H. Kuraishi (1980), *J. Gen. Appl., Microbiol.*, **26**, 357.
18. H. K. Nakamura, H. Miki and Y. Amano (1990), *J. Gen. Appl., Microbiol.*, **36**, 369.
19. Y. Katayama-Fujimura, N. Tsuzaki and H. Kuraishi(1982), *J. Gen. Microbiol.*, **128**, 1599.
20. A. D. Agate and W. Vishniac(1973), *Archiv fur Mikrobiologie.*, **89**, 225.