

Thiobacillus sp. IW의 고정화특성에 관한 연구

*김 성 미 · *오 광 중 · †김 동 욱

인제대학교 공과대학 화학공학과, *부산대학교 공과대학 환경공학과

The Immobilization Characteristics of *Thiobacillus* sp. IW

Sung Mi Kim*, Kwang Jung Oh*, and Donguk Kim†

Department of Chemical Engineering, Inje University, Kimhae, Kyongnam 621-749, Korea

*Department of Environmental Engineering, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

ABSTRACT

Immobilization characteristics of *Thiobacillus* sp. IW which oxidizes sulfur compound was studied to use the bacterium in odor controlling equipment for the future. The optimum growth conditions for *Thiobacillus* sp. IW were pH7, 30°C and the generation time was 38min, which was extremely fast compared with other sulfur oxidizing bacteria. Optimum growth conditions in activated carbon as a carrier was pH5, 35°C and those in bioceramics was pH 7~8, 35°C. Cell growth immobilized in bioceramics was more stable in pH, temperature change than that immobilized in activated carbon and total number of cells in bioceramics were also higher. Based on these results, the bioceramics is thought to be better carrier in immobilization of *Thiobacillus* sp. IW.

서 론

석유정제공장, 하수처리장, 축산농가 등에서는 심한 악취가 발생하는데, 이 악취중 대부분은 황합유화합물로 구성되어 있다. 이들 화합물 중에서도 황화수소(H_2S), 메틸메르캅탄(CH_3SH), 황화메틸($(CH_3)_2S$), 이황화메틸($(CH_3)_2S_2$) 등은 후각감지값이 낮고 배출량도 많아 대표적인 악취물질로 알려져 있다(1). 최근 일본등 선진국에서는 기존의 물리적, 화학적 악취처리 대신 미생물을 이용한 악취처리가 활발하게 연구되어지고 있다(2, 3).

환원된 황화합물에서 유기, 무기 영양 적으로 자랄 수 있는 다양한 미생물 그룹들이 지구 상에 존재

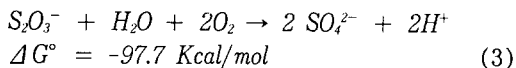
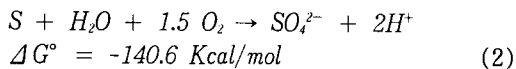
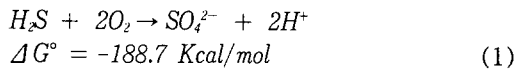
하는데 이들은 황성분을 산화하여 생장에 필요한 에너지를 얻는 특성이 있다. 황산화 세균중 *Thiobacillus*, *Thiosphaera*, *Thiomicrospira*, *Thermothrix*, *Beggiatoa*, *Sulfolobus*의 6종류가 주로 배양되어져 왔는데 이들 중에서 다양한 황화합물을 기질로 사용하고 넓은 pH, 온도 범위에서 성장하여 가장 널리 사용되는 bacteria는 *Thiobacillus* species에 속하는 균들이다(4). *Thiobacillus* species는 gram 양성균이며, 주편모를 가진 간균(polar flagellated rods)으로 주로 토양, 온천수 등에서 발견되어지며, 많은 수는 전자공여체로 ferrous iron을 사용하여 무기영양적으로도 성장이 가능하고 여러 황화합물을 에너지원으로 이용하며 일부는 공기중의 CO_2 를 고정화하여 탄소원으로 이용 성장할 수 있다(5). 25°C의 표준조건에서 황산화균이 황화합물을 기질로 사용하는 반응

† Corresponding Author

Table 1. Composition of *Thiobacillus* sp. IW Medium.

composition	(g/L)
Na ₂ S ₂ O ₃	8.0
NH ₄ Cl	0.5
K ₂ HPO ₄	4.0
KH ₂ PO ₄	4.0
MgSO ₄	0.8
Na ₂ EDTA	0.5
ZnSO ₄	0.22
CaCl ₂	0.05
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.01
FeSO ₄	0.05
(NH ₄) ₂ Mo ₇ O ₂₄	0.01
CuSO ₄	0.01
CoCl ₂	0.01
Yeast extract	2.0
Deionized Water	1000ml

식은 다음과 같다.



Thiobacillus species 균들은 크게 pH 2~5에서 잘 성장하는 산성균과 pH 6~8에서 잘 성장하는 중성균으로 나누어진다. 대표적인 산성균으로는 *T. thiooxidans*, *T. ferrooxidans* 등이 있으며, 석탄의 탈황, 폐수 처리 등에 이용된다(6, 7). 그러나 기체상의 황화합물 처리를 위해서는 column의 사용이 불가피한데 강산에서의 성장 조건으로 인해 column의 재질, 폐수 처리 등 여러 면에서 많은 문제점을 보인다. 중성균으로는 *T. thioparus*, *T. denitrificans* 등이 있다(5).

황 함유 악취가스의 효과적이고, 경제적인 처리를 위해서는 상온과 중성 pH에서 최적성장을 보이며, 빠른 성장속도를 가진 균의 선택이 무엇보다 중요한데, 위의 조건을 충족하기 위해 여러 황산화균을 검토한 결과 차진명 등(8)이 분리한 *Thiobacillus* sp. IW를 선택하였다. 균주를 효과적으로 사용하기 위해서는 균주의 손실을 줄이고, 안정적인 악취처리를

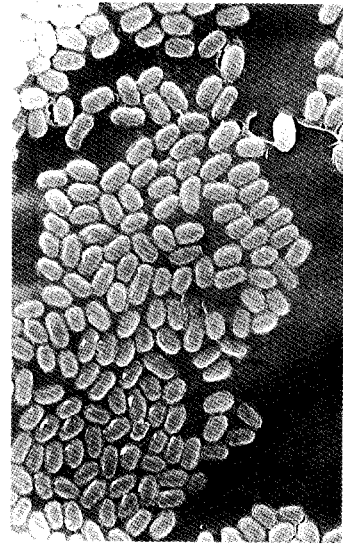


Fig. 1. SEM photograph of *Thiobacillus* sp. IW immobilized in bioceramics(x3000).

가능하게하는 미생물의 고정화(immobilization)가 필요하다. 따라서 본 연구에서는 효과적인 악취처리 장치의 개발을 위한 기초자료로서 *Thiobacillus* sp. IW의 pH, 온도 및 배양시간에 따른 성장을 조사하였으며, 황성탄과 bioceramics에 대한 균의 고정화 특성을 조사하였고, 최적성장조건을 구하였으며 종합적으로 두 담체의 성능을 비교하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

본 연구에서는 황산화균으로 *Thiobacillus* sp. IW를 선택하였는데 이균은 전남화순 근교의 폐탄광수에서 차진명 등(9)에 의해 분리되었으며, 균의 성장을 위한 배지는 Na₂S₂O₃를 주 기질로 하고, 미량금속과 yeast extract가 포함된 배지로 Table 1에 주어져 있다. 황산화균은 분해 결과 H⁺ 생성하므로 배지의 pH를 낮추어주는 경향이 있어서 배지에 KH₂PO₄ 등을 사용하여 pH의 변화에 대한 완충역할을 강화하였다. 배지의 pH는 멸균후 2N NaOH와 36%의 HCl 용액을 사용하여 조절하였다.

고정화 담체

고정화담체로는 황성탄(12/20mesh(D_p=0.84~1.68mm), 밀도=1.37g/cm³, surface area=936m²

/g, total pore area=97.7m²/g, fixed carbone 91.4%)과 bioceramics(12/20mesh, 밀도=2.56g/cm³)가 사용되었다. 활성탄은 미세한 pore가 전체표면에 걸쳐 광범위하게 존재하고 있고 쉽게 구할 수 있어서 효소, 미생물고정화에 널리 사용되어지고 있으며(10), 해양성균식의 일종인 bioceramics는 최근 새로운 담체로 미생물고정화에 시도되어지고 있다(11). 담체는 건조 후 플라스크 내에서 멸균하여 사용하였다. Bioceramics에 고정화된 *Thiobacillus* sp. IW의 전자현미경사진이 Fig. 1에 나타나있는데, 균이 담체표면에 adsorption된 것으로 보인다.

최적성장조건 측정

Thiobacillus sp. IW의 종균배양은 pH 7, 30°C 조건의 100mL 액상배지에서 24시간 동안 120rpm에서 진탕배양하여 균을 활성화시킨 후 그 중 1mL를 취하여 온도 20~35°C, pH 4~9에 있는 99mL의 액상배지에 첨가하였다. 18시간 동안 진탕배양한 후 용액 2ml를 취하여 spectrophotometer(UV-1601PC, Shimadzu, Japan)를 이용, 660nm에서 액상의 흡광도(Optical Density)를 측정, 최적성장조건을 구하였다. 또한 최적성장온도 및 pH에서 60시간 동안 일정시간 간격으로 액상의 흡광도를 측정하여 시간에 따른 균의 성장을 관찰하였다. S₂O₃²⁻을 산화하여 생성되어진 SO₄²⁻의 농도는 액상용액과 BaCl₂·H₂O용액을 절반씩 혼합하여 460nm에서 흡광도를 측정하였고(12), 황산용액을 이용하여 calibration curve를 작성하여 얻어졌다. 각 조건의 용액에서 흡광도를 측정하고 또한 pour plate법(13)을 이용한 균체의 수를 측정하여 calibration curve를 작성하였으며, 이를 사용하여 최적성장조건에서의 비성장속도(specific growth rate, μ), 세대시간(generation time)(10)을 구하였다.

고정화 균수측정

고형배지에 도달된 *Thiobacillus* sp. IW로부터 1백금이 하여 pH 7, 30°C 조건의100ml 액상배지에서 24시간 동안 진탕배양하여 균을 활성화시킨 후 이중 1mL를 취하여 각 조건에서 고정화담체 7.5g이 함유된 99mL의 액상배지에 접종한다. 24시간 동안 진탕배양한 후 용액 내에 존재하는 균수와 담체에 고정화된 균수를 측정하기 위해 다음과 같은 실험을 한다. 용액내의 균수는 배지 상등액중 1mL를 취하여 0.9% NaCl로 10²~10⁶배로 희석하여 pour plate법을 사용, 측정하였다. 담체에 고정화된

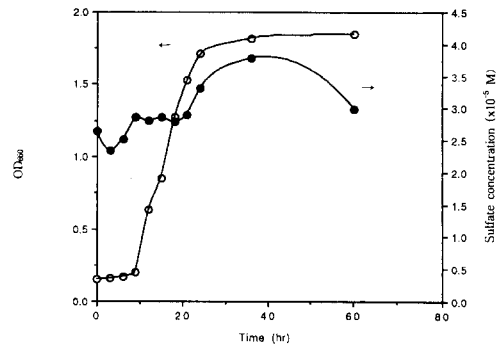


Fig. 2. Effect of cultivation time on *Thiobacillus* sp. IW growth at pH 7, 30°C. ○ *Thiobacillus* sp. IW growth, ● concentration of SO₄²⁻.

균수는 flask에서 용액을 완전히 제거한 후 담체에 0.9% NaCl 50mL를 첨가하여 15분 동안 다시 진탕배양하여 균들을 담체에서 제거하고 용액중 1mL를 취하여 10²~10⁶배로 희석하여 pour plate법을 사용 측정하였다. 0.9% NaCl로 세척 후 담체표면의 전자현미경사진을 보면 대부분의 균들이 담체에서 떨어져 나간 것을 확인 할 수 있었다. 각 pH, 온도, 배양시간의 조건에서 실험을 반복하여 1개의 data는 4개 이상의 sample의 평균값으로 얻어졌다.

결과 및 고찰

PH의 변화에 대한 *Thiobacillus* sp. IW의 액상배양시 성장특성을 조사한 결과 최적성장 pH는 7이었고 산성환경에서 성장이 비교적 양호하였으며 알칼리 환경에서는 성장이 급격히 감소하였다. 배양전과 24시간, 48시간 배양후의 용액의 pH를 측정한 결과 pH의 변화는 거의 없었는데 이는 배지의 강력한 완충작용에 기인한다고 사료된다(11). *Thiobacillus* sp. IW의 최적성장온도는 30~35°C이었으며 온도가 낮아질수록 균의 성장이 급격히 감소되는 것이 관찰되었다. pH와 온도의 변화에 대한 성장특성은 대체로 차진명(9) 등과 유사한 결과를 보여주었다.

660nm에서의 흡광도를 측정하여 얻어진 배양시간에 따른 균의 성장이 Fig. 2에 나타나있다. 대수성장기는 배양시작 후 9~24시간이며 이후 정정기를 보여주었고, S₂O₃²⁻ 산화결과 생성된 SO₄²⁻의 농도는 대수성장기의 끝부분에서 주로 증가하였으며, 이후 균의 성장이 저해됨에 따라 SO₄²⁻의 농도가 감

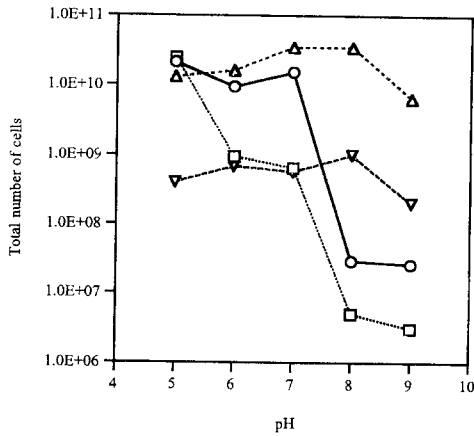


Fig. 3. Effect of pH on immobilization of *Thiobacillus* sp. IW at 30°C, 24 hours. —○— cells in activated carbon solution, ···□··· cells immobilized in activated carbon, ---△--- cells in bioceramics solution, ---▽--- cells immobilized in bioceramics.

소함을 볼 수 있다. Fig. 2와 흡광도를 생균수와 비교한 calibration curve로부터 *Thiobacillus* sp. IW는 30°C와 pH 7에서 대수성장기에 $1.1h^{-1}$ 의 비성장속도와 38분의 세대시간을 나타내었다.

30°C, 24시간 배양에서 pH 변화에 따른 고정화된 균수와 용액내의 균수변화가 Fig. 3에 나타나 있다. 액상의 균수는 용액 100mL에 포함된 균수를 나타내며, 고정화된 균수는 담체 7.5g에 함유된 균수를 의미한다. 따라서 전체의 균수는 양자의 합으로 구할 수 있다. Bioceramics를 담체로 사용할 경우 용액 내와 고정화된 담체에서의 균수변화가 활성탄의 경우보다 pH에 대해 보다 안정적이었으며, 활성탄을 사용하였을 경우 고정화된 균수는 액상배양과는 달리 pH가 낮은 산성용액에서 더 증가하였다. 총균수에 있어서는 pH 5를 제외하면 담체로 bioceramics를 사용하였을 경우 활성탄보다 균수가 증가하였으며, 용액이 알칼리로 갈수록 이런 현상은 더욱 두드러졌다. 이와 관련하여 Gruder 등(14)은 석탄에서 세균발육을 억제하는 유기물의 유출가능성을 보고하였으므로 이와 유사한 현상이 활성탄에서 발생할 가능성이 있다.

PH 7, 24시간 배양에서 온도의 변화에 대한 고정화된 균수와 용액내의 균수변화는 Fig. 4에 나타나 있는데 bioceramics의 경우 온도변화에 대한 균수의

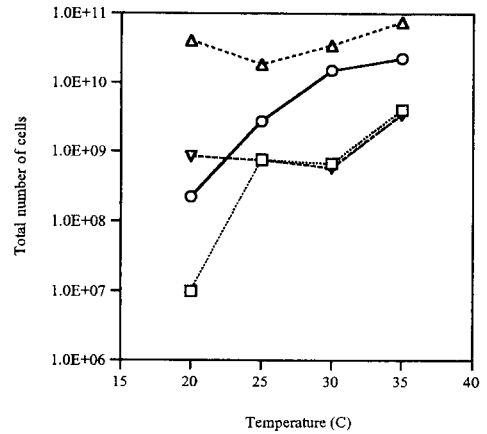


Fig. 4. Effect of temperature on immobilization of *Thiobacillus* sp. IW at pH 7, 24 hours. —○— cells in activated carbon solution, ···□··· cells immobilized in activated carbon, ---△--- cells in bioceramics solution, ---▽--- cells immobilized in bioceramics.

변화는 활성탄보다 안정적이었으며, 온도가 35°C에서 가장 많은 균수를 나타내었다. 활성탄의 경우 온도가 증가하면 고정화된 균수와 용액내의 균수는 증가하였다. 또한 전체균수에 있어서도 bioceramics를 담체로 사용할 경우 활성탄에서보다 많았다. Fig. 3, Fig. 4로부터 활성탄을 담체로 사용할 경우 최적성장조건은 pH5, 35°C이고, bioceramics를 담체로 사용할 경우 최적성장조건이 pH 7~8, 35°C로 액상 배양시와는 약간 다른 성장조건을 보여주었다. pH 7, 30°C에서 배양시간의 변화에 따른 균성장은 Fig. 5에 나타나 있는데 배양시간이 24시간에서 증가할수록 활성탄의 경우 균의 성장은 정체내지 감소하였으나, bioceramics의 경우 고정화된 균수와 용액내의 균수는 점차 증가하였다.

PH 5~9, 온도 20~35°C 조건에서 전체균중 담체에 고정화된 평균분율은 활성탄의 경우 15%였고, bioceramics는 3.2%였다. 이는 대부분의 조건에서 bioceramics에 고정화된 균수가 활성탄에 고정화된 균수에 비해 비슷하거나 많았지만 용액내에 존재하는 균수가 bioceramics 쪽에서 큰 폭으로 증가한데서 비롯된 것이다. 또한 활성탄은 미세한 pore가 많이 존재하여 상대적으로 흡착율이 큰 점도 작용한 것으로 사료된다.

전체적으로 볼 때 bioceramics는 활성탄에 비해

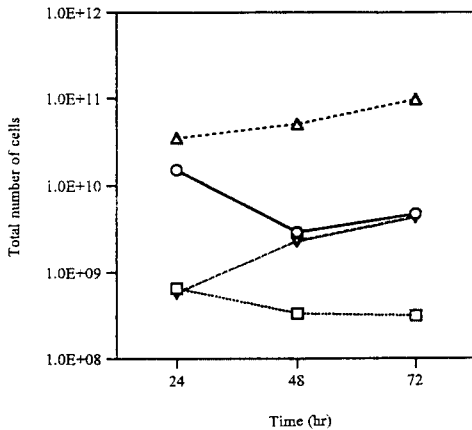


Fig. 5. Effect of cultivation time on immobilization of *Thiobacillus* sp. IW at pH 7, 30°C.

—○— cells in activated carbon solution,
 ···□··· cells immobilized in activated carbon,
 ---△--- cells in bioceramics solution,
 ---▽--- cells immobilized in bioceramics.

pH, 온도의 변화에 대해 보다 안정적이었고, 총균수가 대체로 많았으며, 배양시간에 따른 균의 성장도 원활하였다. 따라서 *Thiobacillus* sp. IW를 사용한 황함유 악취 제거장치의 제작시 환경의 급격한 변화 등을 고려하면 성능면에서는 고정담체로 bioceramics가 보다 적합한 것으로 사료된다.

요 약

황산화박테리아인 *Thiobacillus* sp. IW를 사용한 황함유악취 제거장치를 제작하기 위한 기초자료로서 균의 최적성장조건, 활성탄과 bioceramics에서의 고정화특성을 조사하였다. *Thiobacillus* sp. IW는 최적성장조건이 pH 7, 30°C이고, 이때 세대시간이 38분으로 다른 황산화균에 비해 아주 빠른 성장속도를 보여주었다. 균의 최적성장조건은 활성탄을 담체로 사용할 경우 pH 5, 35°C였으며, bioceramic의 경우 pH 7~8, 35°C로 액상배양시와는 상이한 성장조건을 보여주었다. pH, 온도의 변화에 대한 균의 성장

은 활성탄보다 bioceramics에서 보다 안정적이었고, 총균수도 많았다. 전체적으로 균의 성장속도면에서는 bioceramics가 활성탄보다 우수한 담체로 사료된다.

감 사

본 연구는 한국과학재단의 핵심전문과제연구비(과제번호: 961-1106-039-2)에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 양성봉, 이성화(1994), 악취의 성분분석, 91, 동화기술, 서울.
2. 金川貴博(1993), 月刊 下水道, 16(2), 9.
3. 大越芳男(1993), 月刊 下水道, 16(2), 16.
4. R. Y. Stanier, J. L. Ingraham, M. L. Wheelis, and P. R. Painter(1986), 5th ed., 385, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N. J.
5. T. D. Brock and M. T. Madigan(1992), Biology of Microorganisms, 6th ed., 712, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N. J.
6. R. T. Espejo and P. Romero(1987), *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 1907.
7. 류희욱(1996), 한국생물공학회지, **11**(2), 238.
8. 차진명(1993), 석사학위논문, 유전자과학과, 조선대학교.
9. 차진명, 박열, 이인화(1994), 한국생물공학회지, **9**(3), 287.
10. J. E. Bailey and D. F. Ollis(1986), *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2nd ed., 382, McGraw-Hill, N. Y.
11. 김성미(1996), 석사학위논문, 환경공학과, 부산대학교.
12. R. Tabita and D. G. Lundgren(1971), *J. Bacteriol.*, **108**, 328.
13. 전흥기(1989), 미생물실험, 22, 세문사, 서울.
14. S. Gruder and F. Genchev(1979), *Acad. Bulg. Sci.*, **32**, 353.