

## 황 산화 세균인 *Thiobacillus novellus* SRM 성장 최적화

† 권규혁 · 차월석 · <sup>1</sup>고한철 · <sup>1,2</sup>이광연 · <sup>2</sup>박돈희 · <sup>3</sup>차진명  
조선대학교 화학공학과, <sup>1</sup>동아인재대학,  
<sup>2</sup>전남대학교 응용화학공학부, <sup>3</sup>비앤이테크(주)  
(접수 : 2003. 8. 11. 게재승인 : 2003. 12. 26.)

### Optimization of the Sulfur-oxidizing Bacteria, *Thiobacillus novellus* SRM

Kyu-Hyuk Kwun,† Wol-Suk Cha, Han-Chul Go<sup>1</sup>, Kwang-Youn Lee<sup>1,2</sup>, Don-Hee Park<sup>2</sup>, Jin-Myeong Cha<sup>3</sup>  
Department of Chemical Engineering, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea  
<sup>1</sup>Dong-A College, Yeongam-gun, Chonnam, 526-872, Korea  
<sup>2</sup>Faculty of Applied Chemical Engineering, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea  
<sup>3</sup>B & E Tech Co., Ltd., Business Incubation Center, Gwangju University, Gwangju 503-703, Korea  
(Received : 2003. 8. 11. Accepted : 2003. 12. 26.)

The microorganism was isolated from the night soil treatment plant for the removal of sulfur compounds. The growth conditions of the sulfur-oxidizing bacteria were investigated and the isolate characterized as *Thiobacillus novellus* SRM. The optimal pH of *Thiobacillus novellus* SRM on cell growth was pH 7.0 and the optimal temperature was 30°C and the optimal air flow rate was 1 vvm, respectively. As a results of cell growth from the Monod plot, the specific growth rate was 0.032 hr<sup>-1</sup>, V<sub>max</sub> was 1.43 hr<sup>-1</sup> and K<sub>m</sub> was 0.32, respectively. The thiosulfate oxidation by *Thiobacillus novellus* SRM was made of sulfate ion. The sulfate ion reduced pH and decreased cell growth.

**Key Words :** *Thiobacillus novellus* SRM, thiosulfate oxidation, sulfate ion

### 서 론

악취를 발생시키는 황화합물은 황화수소 (H<sub>2</sub>S), 메틸메틸캅탄 (CH<sub>3</sub>SH, R-SH), 황화메틸 (CH<sub>3</sub>SCH<sub>3</sub>, DMS), 이황화메틸 (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>SSC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, DMDS) 등으로 후각 감지 값이 낮고 배출량도 많아 대표적인 악취물질로 알려져 있다. 특히, 황화수소는 저농도에서도 독성, 부식성 및 다량의 산소가 필요하며 불쾌감, 무엇보다 유독가스의 지표가 된다는 점 때문에 대기 중으로 배출량은 엄격한 규제가 요구되고 있다(1).

악취를 처리하는 방법은 크게 물리적, 화학적 및 생물학적 처리법으로 분류된다. 물리적 처리법은 다른 방법과 비교해서 장치 비용이 비교적 많이 들고, 화학적 처리법은 과도한 약품소모로 인한 2차 오염을 일으킬 수 있고 운전비용이 많

이 든다는 단점이 있다. 따라서 최근에는 악취가스 처리의 대안으로 다른 기술과 비교할 때 처리비용이 비교적 적게 들고, 복합악취를 동시에 제거할 수 있고, 제거 효율도 점차 증가하고 있는 생물학적 처리 방법에 대한 관심이 증가하고 있는 추세이다(2, 3).

생물학적 방법에 의한 악취 제거에 관한 연구는 하수처리장에서 발생하는 황화수소 제거로부터 시작되었고, 생물막을 이용한 황화수소 제거에 대한 연구와 폐수처리장에서는 토양막 장치를 이용하여 악취가스 제거 등도 수행되어 왔다. 악취가스를 처리하는 생물학적 방법은 크게 생물막, 생물가스 세정탑 및 살수여상의 세 가지로 분류하였다. 일본에서는 미생물을 집적 배양하여 악취물질을 제거하고 있으며 scale-up 된 충전층 반응기를 하수처리장에 설치하여 운전하고 있다(4). 가장 이상적인 탈취 방법은 법적 규제 이하로 악취물질을 배출하도록 공정을 개선하거나 완전히 새로운 청정기술(clean technology)을 개발하는 것이다.

따라서 본 연구에서는 황 화합물 악취를 제거하기 위해서는 환경오염을 최소화하는 측면에서 볼 때 생태계 평형을 유

† Corresponding Author : Department of Chemical Engineering,  
Chosun University, Gwangju 501-759, Korea  
Tel : +82-62-230-7210, Fax : +82-62-230-7866  
E-mail : khkwun@mail.chosun.ac.kr

지하면서 엔트로피를 증가시키는 황산화 세균을 분뇨처리장에서 분리하여 thiosulfate ( $S_2O_3^{2-}$ )를 에너지원으로 하여 증식하는 황산화 세균의 최적 성장조건을 조사하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 반응배지 및 균주배양

실험균주는 분뇨처리장내 탈취시설의 액상 및 고상 슬러지를 분리원으로 사용하였고, 사용된 기본배지의 조성은 다음과 같다 (g/l). 증류수 1000 mL,  $K_2HPO_4$  4.0,  $KH_2PO_4$  4.0,  $NH_4Cl$  0.5,  $MgSO_4$  0.8,  $Na_2EDTA$  0.5,  $ZnSO_4$  0.22,  $CaCl_2$  0.05,  $MnCl_2$  0.01,  $FeSO_4$  0.001,  $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$  0.01,  $CuSO_4$  0.01,  $Na_2S_2O_3$  8.0, yeast extract 0.02에 pH를 7로 조정하여 사용하였다. 전 배양은 한천을 제외한 기본배지 1 L에 종균 1 백급이를 접종하고 30°C에서 48시간 진탕배양하여 원심분리한 후 0.85%의 생리식염수 100 mL에 접종하여 4°C cold chamber (KMC-1302L, Vision Scientific, Korea)에 보관하면서 필요시 전배양액으로 사용하였다. 발효조 (KF-5L, Kobiotech Co., Korea) 배양은 3 L 기본배지를 넣고 0.8% thiosulfate와 0.2% yeast extract를 따로 분리, 멸균하여 혼합한 후 위에서 얻은 전배양액 3 mL (0.1%)를 취하여 발효조에 접종하고 30°C, 150 rpm으로 멸균 필터를 거친 공기를 1 vvm으로 주입하면서 배양하였다. 발효조에는 교반기가 있어 교반이 가능하고 냉각수를 순환하게 하여 자동 온도조절이 되도록 하였고, 이 성장배지를 취하여 원심분리하여 얻은 균체를 4°C 냉장실에 보관하여 고정화할 때 균주로 사용하였다.

### 분리 균주의 동정

분리균주의 형태적 특징은 그람 염색하여 광학 현미경으로 관찰하였고, 배양학적 특징은 영양고체 배지에서, 운동성은 반유동 고체 배지에서 stab culture하여 조사하였다. 분리균주의 동정은 Bergey's manual of systematic bacteriology(5)와 Manual for the identification of medical bacteria(6)에 준하여 수행하였다. 생리적 및 생화학적 특성으로 유기물 동화유무는 기본배지에 적절한 기질을 첨가하여 조사하였다. 접종액의 최적농도는 0.1% (v/v)로 하여 균의 유기물 동화 유무를 조사하였다. 또한 기본배지에 평판 도말한 colony 크기와 기본배지에 기질이 첨가된 배지의 colony 크기를 비교하여 유기물 동화 유무를 최종 확인하였다. 분리균주를 30°C에서 3일간 150 rpm으로 배양하고 coenzyme Q는 Yamada 등(6)의 방법에 따라서 추출하고 정제하였다. DNA 염기조성 (G + C 함량)은 Tamaok와 Komagata(7)의 방법에 따라 분리하고 정제하였다.

### 미생물 성장동력학 계수 산출

미생물 성장 특성은 발효조 배양기에서 배양하면서 배양시간 3시간마다 660 nm에서 optical density를 측정하였으며, 구해진 값을 Michaelis-Menten 식에 대입하여 황산화 세균의 growth kinetics를 구하고 이를 Monod 식으로 직선화하여 suspended mixed culture에서의 생물학적 인자를 실험적으로 도출하였고, 미생물의 비증식 속도식은 다음과 같다(8, 9).

$$V = \frac{V_{max} \cdot S}{K_m + S}$$

여기서 S : 기질 (mg/L),  $K_m$  : Michaelis 상수

V : 비증식속도 ( $hr^{-1}$ ),  $V_{max}$  : 최대비증식속도 ( $hr^{-1}$ )

### Thiosulfate 이온 분석

Thiosulfate 농도는 IC500의 Ion Chromatography (Yokokawa-Hokushin Electric Co., Japan)와 Kelly(10) 방법을 병행하여 사용하였고, sulfate 농도는 10%  $BaCl_2 \cdot 2H_2O$  용액 2 ml에 반응용액 2 ml를 취하여 혼합한 후 UV/VIS spectrophotometer를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 이용하여 분석하였고, 흡광도 분석에는 3차 증류수를 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### 균주의 분리

황산화 세균을 분리하기 위하여 0.8% thiosulfate를 기본배지에 첨가하여 3차례에 걸쳐 새로운 배지에 계대배양하면서 고체배지와 액체배지에서 상대적으로 성장이 우수한 균주를 1차로 분리하였다. 1차로 분리된 균주를 다시 액체배지에서 배양하여 세포생장이 빠르고 thiosulfate 이용이 우수한 colony 1개를 최종 선발하여 SRM으로 나타내었다. 분리균주의 형태·생리적 및 생화학적 특성을 조사한 결과를 Table 1에 나타내었다. SRM은 gram 음성 간균의 호기성 세균이며, 운동성을 지니고 있었다. Catalase가 양성이며 oxidase 음성, glucose에서는 산을 형성하며, 탄수화물 이용가능성은 glucose와 lactose는 이용하나 maltose와 sucrose는 이용하지 못하였다. Citrate는 이용하였고 nitrate는 이용하지 못하였으며, 세포 성장에 대해서는 urease, arginine, ornithine, 그리고 lysine에는 양성 반응을 보였다. 최적 pH와 배양온도는 pH 7.0과 30°C로 나타났으며 4°C에서는 성장하지 못했으며 42°C에서는 약간의 성장을 보였다. Methyl red 반응에서는 양성 Voges-Proskauer 반응과 indole test에서는 음성반응을 보였다. Coenzyme Q는 ubiquinone Q-10이고 DNA의 G+C 함량은 67.2%이며 지방산 조성중 비수화지방산은  $C_{18:1} + C_{19:0}$ 이며 수화지방산은 3-OH  $C_{10:0}$ 로 나타났다. SRM의 생리·생화학적 특성과 균주의 Coenzyme, DNA 함량 및 지방산조성에 따라 분리균주를 Bergey's manual of systematic bacteriology(5)와 Manual for the identification of medical bacteria(6)에 비교해 본 결과 *Thiobacillus novellus* 판명되었다(12). *Thiobacillus novellus*는 coenzyme Q는 ubiquinone Q-10이고, DNA의 G+C 함량은 67.3~68.4%에 속하고 지방산 조성도 본 연구에서 분리한 균주와 일치하여 *Thiobacillus novellus* 판명하여 분리균주인 SRM은 *Thiobacillus novellus* SRM으로 최종 명명하고 이용하였다.

### *Thiobacillus novellus* SRM의 pH와 온도 영향

발효조에서 배양액 3 L, 온도 30°C, 통기량 1 vvm의 조건에서 pH 변화에 따른 *Thiobacillus novellus* SRM 균주 성장을 알아보기 위해 2N-NaOH와 20%-HCl로 pH를 조절하여 배양한 결과를 Fig. 1에 나타냈다. *Thiobacillus novellus* SRM

세포성장은 pH가 중성 부근인 7에서 증식이 우수하게 나타났고, 세포성장 최적 pH는 7이었다. 그러나 배지의 pH가 약 산성이나 약알칼리에 가까울수록 세포증식에 적응하는 유도가 길어지고 있음을 알 수 있었다. 일반적으로 *Thiobacillus* 종은 산성에 비교적 성장이 우수한 균주로 알려져 있으나, 본 연구에서 사용된 *Thiobacillus novellus* SRM은 pH에 적응성이 비교적 넓은 pH 범위에서 성장이 안정하므로 앞으로 산업 현장에서의 응용 가능성을 많은 것임을 보여주고 있다 (12, 14). 따라서 *Thiobacillus novellus* SRM을 생물학적 악취 제거 반응기에 적용할 경우 pH 7의 액상배지를 사용할 수 있으므로 장치의 부식도 줄일 수 있을 것으로 생각된다.

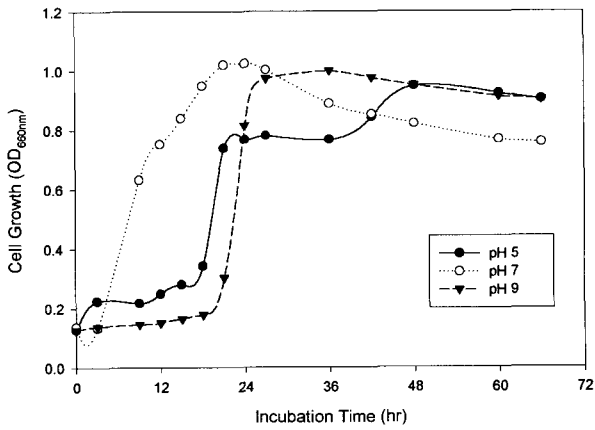


Figure 1. Effect of pH on cell growth of *Thiobacillus novellus* SRM at 30°C, 150 rpm and 1.0 vvm, respectively.

또한 온도의 영향을 알아보하고자 25°C, 30°C, 35°C에서 *Thiobacillus novellus* SRM 균주의 성장은 Fig. 2와 같다. 균주의 최적 성장 온도는 30°C이고 25~35°C에서 비교적 성장이 우수한 증은 균임을 알 수 있다. 황 산화 세균은 일반적으로 배양 최적 온도가 30°C인 중온균으로 알려져 있는데 (14), 본 연구에서 사용한 *Thiobacillus novellus* SRM은 비교적 온도 범위가 넓은 성장 범위를 가지고 있으므로 앞으로 산업적 응용 가능성이 있는 균주로 생각된다.

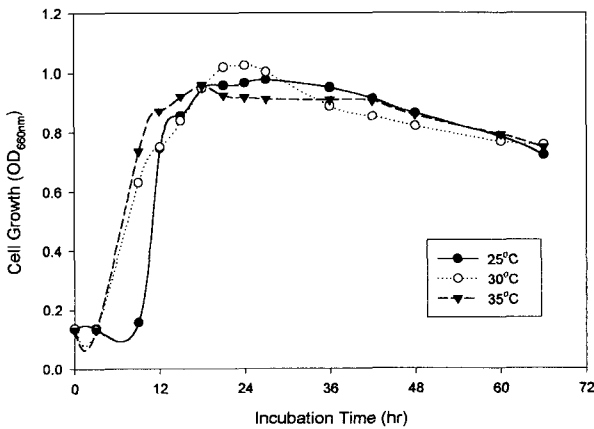


Figure 2. Effect of temperature on cell growth of *Thiobacillus novellus* SRM at pH 7, 150 rpm and 1.0 vvm, respectively.

Table 1. Morphological, physiological and biochemical characteristics of the isolate

Characteristics	Strains	The isolate
<b>Morphological characteristics</b>		
shape		short rods
cell size(μm)		0.3~0.7×0.8~1.
motility		+
gram stain		-
spore stain		-
<b>Cultural characteristics</b>		
optimum pH		7.0
optimum temperature (°C)		30
growth at 4°C		-
growth at 42°C		-
growth on thiosulfate		+
growth on FeS		+
<b>Biochemical characteristics</b>		
glucose (acid)		-
aerobic growth		+
anaerobic growth		+
hydrolysis of gelatin		+
hydrolysis of starch		+
catalase test		-
oxidase test		+
citrate test		-
nitrate reduction test		+
indole test		-
methyl red test		-
Voges-Proskauer test		+
H <sub>2</sub> S production		-
urease		K/A
arginine		+
ornithine		+
lysine		+
<b>Glycolysis test</b>		
glucose		+
maltose		-
sucrose		-
lactose		-
Quinone		+
G + C mol %		Q-10
Major fatty acid		67.2%
non-hydroxylated fatty acid		C <sub>18:1</sub> + 19:yc
hydroxylated fatty acid		3-OH C <sub>10:0</sub>

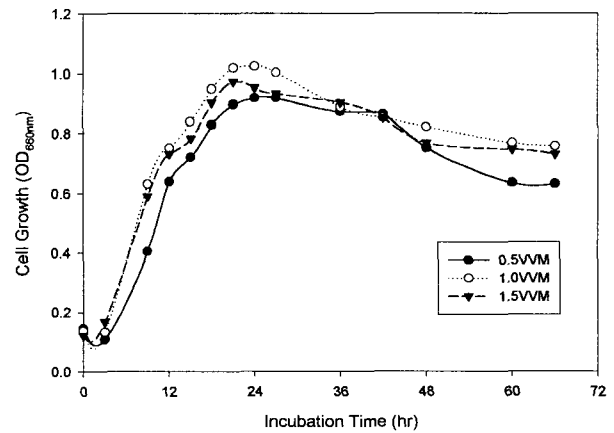


Figure 3. Effect of air flow rate on cell growth of *Thiobacillus novellus* SRM at pH 7, 30°C, 150 rpm, respectively.

**Thiobacillus novellus SRM의 공기 주입량 영향**

발효조에서 30℃, pH 7 조건으로 *Thiobacillus novellus* SRM의 공기 주입량에 대한 영향을 알아보기 위해 0.5 vvm, 1.0 vvm, 1.5 vvm으로 유지하면서 균주 성장을 Fig. 3에 나타내었다. 공기 주입량에 대한 균주 성장은 지수증식기에 들어가는 시간이 각각 배양 후 6시간, 최대 성장은 배양 후 23시간으로 거의 비슷함을 알 수 있었다. 최대 성장에서의 균주의 건조 균체량 값은 0.5 vvm에서 295 mg/L, 1.0 vvm에서는 344 mg/L, 1.5 vvm에서는 312 mg/L로 나타났다. 세포성장에서 공기 주입량의 영향은 1.0 vvm보다 성장에 필요한 산소량이 부족한 0.5 vvm에서 지수성장기에 들어가는 적응 시간이 길었으며, 과량의 산소가 주입된 1.5 vvm에서도 적응 시간이 1.0 vvm보다 길었기 때문에 최적 공기 주입량은 1.0 vvm으로 확정하였다. 따라서 앞으로 대량의 세포증식이 필요한 산업적 응용에 있어서 산소전달도 중요한 변수가 될 것으로 사료된다.

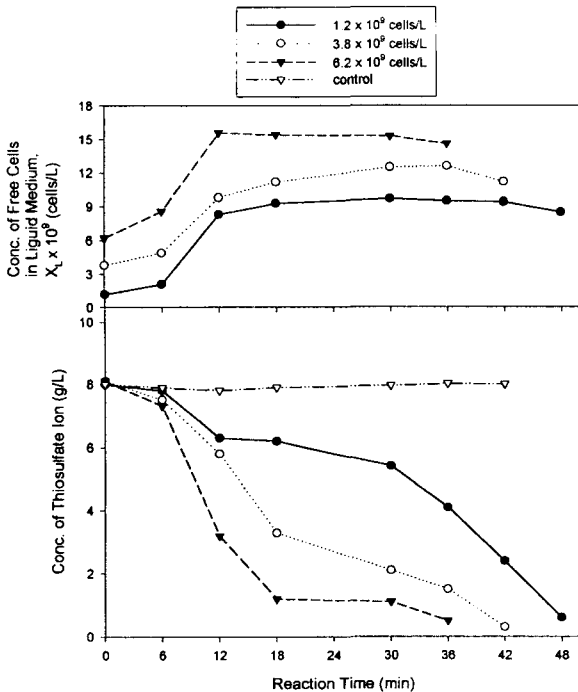


Figure 4. Batch growth of *Thiobacillus novellus* SRM and oxidation of thiosulfate ion at different initial free cell concentration.

**Thiobacillus novellus SRM 성장 특성**

황 화합물 제거 반응 메커니즘을 규명하기 위하여 온도 30℃, pH 7, 통기량 1.0 vvm의 배양기 조건에서 thiosulfate가 포함된 배양에서 배양시간에 따른 균주 성장 특성과 thiosulfate의 농도 변화를 조사하여 Fig. 4에 나타내었다. 전체적인 세포성장 특성은 일반적인 미생물과 유사하였고 배양 2일 이후 정상기가 계속 유지되었다. Cha 등(12)이 이전에 발표한 논문에서 따르면 *Thiobacillus novellus* SRM의 황 화합물 악취가스 제거능을 알아보기 위하여 기본배지에 Thiosulfate (S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>)를 첨가하여 배양한 결과, *Thiobacillus novellus* SRM은 에너지원으로 사용한 S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>를 산화하여 S<sub>4</sub>O<sub>6</sub><sup>2-</sup>를 생성하고, 다시 S<sub>4</sub>O<sub>6</sub><sup>2-</sup>로부터 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>를 생성시키는 메커니즘을 보여 주었고, 배양액의 pH는 반응시간이 지남

에 따라 점차 낮아졌는데 이는 반응이 진행됨에 따라 에너지원으로 사용한 thiosulfate가 산화되면서 생성된 반응 산화물의 영향으로 생각된다(12, 13). 즉, 배양시간이 지남에 따라 thiosulfate가 감소하는 경향은 황 산화 세균인 *Thiobacillus novellus* SRM이 thiosulfate를 에너지원으로 이용하면서 sulfate를 생성하므로 반응배지 내의 pH는 감소하는 것으로 생각된다.

미생물 증식과 thiosulfate 농도에 따른 증식곡선을 기초로 하여 균주의 최대 비증식 속도를 실험적으로 도출하기 위해 Michaelis-Menten 방정식을 도입하여 Monod 식으로 직선화하면 다음과 같은 형태의 식이 된다. 이때 1/S와 1/V의 직선의 기울기와 Y절편으로부터 V<sub>max</sub>와 K<sub>m</sub>을 구할 수 있었다.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}}$$

이 때 thiosulfate의 농도에 따른 균의 비증식속도를 직선화한 결과를 그래프상의 Y절편으로부터 구한 미생물의 최대 비증식 속도는 0.032hr<sup>-1</sup>, V<sub>max</sub>는 1.83 hr<sup>-1</sup>가 되고 이 때 K<sub>m</sub>은 0.42였다. 여기서 황화수소를 에너지원으로 사용하여 건조 균체량을 측정하는 것은 어렵기 때문에 thiosulfate를 에너지원으로 사용하였으며, 균의 증식은 에너지원으로 사용되는 thiosulfate가 감소함에 따라 기질농도가 부족하여 대사가 억제되었다. 즉, 균주 농도가 성장 배지 내에서 세포 성장에 미치는 영향은 대략 24시간에 종료되었고, 성장속도는 거의 비슷하였는데, 이는 종속영양 미생물인 *Thiobacillus novellus* SRM이 지수성장시 배지 내 yeast extract를 탄소 및 에너지원으로 하여 잘 성장하며 별도의 에너지원으로 thiosulfate를 필요로 하지 않는다는 것을 뜻한다(14, 15).

일반적으로 기상의 황화수소 제거에 주로 사용되는 균주인 *Thiobacillus* 종의 증식속도는 비교적 느리나, 본 연구에서 사용한 황 산화 세균은 증식속도가 빨라 기상의 황 화합물 악취 제거에 이용할 수 있는 유용한 균주로 판단되어진다.

**요 약**

황 화합물 악취를 제거하기 위하여 분뇨처리장에서 황 산화 세균을 분리하여 최적성장 조건을 조사하였다. 분뇨처리장에서 1차로 분리한 균주의 생리·생화학적 특성 등을 비교한 결과 *Thiobacillus novellus* SRM으로 명명하였고, 최적 pH와 배양온도는 pH 7.0과 30℃이며, 균주의 공기 주입량은 1.0 vvm이었다. 균주농도에 따른 균의 비증식 속도를 직선화한 결과 미생물의 최대 비 증식속도는 0.032 hr<sup>-1</sup>, V<sub>max</sub>는 1.83h<sup>-1</sup>이 되고, K<sub>m</sub>은 0.42였다. *Thiobacillus* 종의 증식속도는 비교적 느리나, 본 연구에서 사용한 *Thiobacillus novellus* SRM은 증식속도가 빨라 기상의 황 화합물 악취 제거에 이용할 수 있는 유용한 균주로 판단되어진다.

**감 사**

본 연구는 2000년도 조선대학교 학술연구진흥사업비로 추진되었습니다. 연구비 지원에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. American Public Health Association (1995), American Water Works Association and Water Environment Federation. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 19th ed., APHA, Washington, DC. USA.
2. Cho, K. S., M. Hirai, and M. Shoda (1992), Enhanced removability of odorous sulfur containing gases by mixed cultures of purified bacteria from peat biofilters, *J. Ferment. Bioeng.* **73**, 219-224.
3. Lee, S. K. and M. Shoda (1989), Biological deodorization using activated carbon fabric as a carrier of microorganisms, *J. Ferment. and Bioeng.* **68**, 437-442.
4. Cha, J. M. and I. W. Lee (1995), Removal of hydrogen sulfide by immobilized *Thiobacillus* sp. IW. on polyvinylpyridine in a bubble column reactor, *J. KSEE.* **17**, 145-155.
5. Krieg, N. R. and J. G. Holt (1984), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, The William Willkins Co., Baltimore.
6. Cowan, N. R. and K. J. Steel (1974), *Manual for the Identification of Medical Bacteria*, Cambridge University Press, London.
7. Yamada, Y., I. Ohishi, and K. Kondo (1983), The coenzyme Q system in strains of some yeasts and yeast-like fungi, *J. Gen. Appl. Microbiol.* **29**, 51-57.
8. Tamaoka, J. and K. Komugata (1984), Determination of DNA base composition by reversed-phase HPLC, *FEMS Microbiol. Lett.* **25**, 125-129.
9. Mannebeck, H. (1992), Covering manure storing tanks to control odour, *In odour prevention and control of organic sludge and livestock farming*, V. C. Neilsen, J. H. Voorburg, and P. L. Hermite, Eds., p88, Elsevier Applied Science Pub., London.
10. Bohn, H. (1992), Consider biofiltration for decontamination gases, *Chem. Eng. Prog.* **88**, 35-40.
11. Kelly, D. P., L. A. Chambers, and P. A. Trudinger (1969), Cyanolysis and spectrophotometric estimation of trithionate in mixture with thiosulfate and tetrathionate, *Anal. Chem.* **41**, 898-901.
12. Cha, J. M., W. S. Cha, and J. H. Lee (1999), Removal of organo-sulphur odour compounds by *Thiobacillus novellus* SRM sulphur-oxidizing microorganisms, *Proc. Biochem.* **34**, 659-665.
13. Fujimura, Y. K. and H. Kuraishi (1980), Characterization of *Thiobacillus novellus* and its thiosulfate oxidation, *J. Gen. Appl. Microbiol.* **26**, 357-367.
14. Cha, J. M., Y. Park, and I. W. Lee (1994), Effects of cultivation condition on growth of hydrogen sulfide-degradating *Thiobacillus* sp. IW. isolated from waste coal mine water, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **9**, 287-293.
15. Cha, J. M. and I. W. Lee (1994), Isolation and characterization of a new hydrogen sulfide-oxidizing bacterium *Thiobacillus* sp., *Kor. J. Microbiol.* **32**, 252-257.