

## 황산화 세균 *Thiobacillus* sp. UIW-6 변이주의 성장 최적화

신승용 · 강선철\*

대구대학교 생명공학과

(2006년 6월 13일 접수, 2006년 6월 23일 수리)

**Optimization of Mutant Strain of the Sulfur-Oxidizing Bacteria, *Thiobacillus* sp. UIW-6**  
Seung-Yong Shin and Sun-Chul Kang\* (Department of Biotechnology, Daegu University, Gyeongsan 712-714, Korea)

**ABSTRACT:** To reducing offensive odor form compost, UIW-6 mutant obtained by UV treatment from sulfur-oxidizing bacteria, *Thiobacillus* sp. IW. The UIW-6 mutant was found 1.6 times faster in growth than the parent strain on thiosulfate medium (TM) at 36 h after incubation. Initial pH, temperature and agitation for the optimum growth of UIW-6 were 6.5, 35°C and 200 rpm, respectively. The UIW-6 mutant growth was two times higher than parent strain at 6 h culture in TM liquid medium containing 50 mM sodium thiosulfate. The UIW-6 mutant used fructose and sucrose as carbon sources and yeast extract > tryptone > peptone as nitrogen ones. It was found that the growth of UIW-6 was increased in addition of 0.2% yeast extract.

**Key Words:** *Thiobacillus* sp. IW, UV-B, sodium thiosulfate, odor removal

### 서 론

악취를 발생시키는 황화합물은 황화수소( $H_2S$ ), 메틸메르캅탄( $CH_3SH$ , R-SH), 황화메틸( $CH_3SCH_3$ , DMS), 이황화메틸( $C_2H_5SSC_2H_5$ , DMDS) 등으로 후각 감지 값이 낮고 배출량도 많아 대표적인 악취물질로 알려져 있다. 특히, 황화수소는 저농도에서도 독성, 부식성 및 다량의 산소가 필요하며 불쾌감과 더불어, 무엇보다 유독가스의 지표가 된다는 점 때문에 대기 중으로 배출량은 엄격한 규제가 요구되고 있다<sup>1)</sup>.

근래에 국내의 많은 축산단지에서도 축산폐기물의 퇴비화를 이용한 비료공장 건설이 진행되어 상업적으로 가동되고 있다. 그러나 퇴비화 공정은 대부분 단순한 약적식 공정을 채택함으로써 발효의 지연에 따른 악취발생 및 생산성 감소라는 문제가 발생한다. 따라서 가축분뇨가 환경에 미치는 영향과 집약적인 축산 폐기물의 처리는 물론 세계적으로 첨예의 관심사가 되고 있다<sup>2,3)</sup>.

악취를 제거하는 방법은 크게 물리적, 화학적 및 생물학적 처리법으로 분류된다. 물리적 처리법은 다른 방법과 비교해서 장치 비용이 높고, 화학적 처리법은 과도한 약품소모로 인

한 2차 오염을 일으킬 수 있으며 운전비용이 많이 든다는 단점이 있다. 따라서 최근에는 악취가스 처리의 대안으로 다른 기술과 비교할 때 처리비용이 비교적 적게 들고, 복합악취를 동시에 제거할 수 있으며, 제거 효율도 점차 증가하고 있는 생물학적 처리 방법에 대한 관심이 증가하고 있는 추세이다<sup>4,5)</sup>.

악취가스를 처리하는 생물학적 방법은 크게 생물막, 생물가스 세정탑 및 살수여상의 세 가지로 분류하였다. 일본에서는 미생물을 직접 배양하여 악취물질을 제거하고 있으며 scale-up된 충전층 반응기를 하수처리장에 설치하여 운전하고 있다<sup>6)</sup>.

따라서 본 연구에서는 퇴비화 공정 중에 발생하는 황화합물 악취문제를 해소하기 위하여 돌연변이를 통한 악취제거 미생물 균주를 개발하고 최적 성장조건을 조사하여, 바이오필터에 이를 응용하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 반응배지 및 균주배양

황화수소 돌연변이체 균주 제조에는 *Thiobacillus* sp. IW 균주(이하 임의로 IW로 명명)를 사용하였고, 사용된 기본배지의 조성은 다음과 같다. 종류수 1000 ml를 기준으로,  $NH_4Cl$  0.5,  $KH_2PO_4$  4.0,  $K_2HPO_4$  4.0,  $MgSO_4$  0.8,  $Na_2 \cdot EDTA$

\*연락처:

Tel: +82-53-850-6553 Fax: +82-53-850-6559  
E-mail: sckang@daegu.ac.kr

0.5, ZnSO<sub>4</sub> 0.22, CaCl<sub>2</sub> 0.05, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.01, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> 0.01, CuSO<sub>4</sub> 0.01, CoCl<sub>2</sub> 0.01, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O 8.0, yeast extract 2 g을 넣은 후 pH를 6.5로 조정하여 사용하였다(이하 임의로 TM으로 명명). 고체배지의 경우에 1.5% agar를 첨가하였으며, 멸균은 121°C에서 15분간 가압처리하였다. 고체배지는 30°C의 배양기에 넣어 배양하였고, 1주일 이상 장기간 배양할 때에는 수분증발로 인한 수분활성도 감소를 방지하고자 고체배지의 둘레를 *para film*으로 밀봉하여 배양하였다. 또한 액체배지는 100 ml 삼각플라스크에 20 ml의 액체배지를 넣고 30°C에서 150~200 rpm으로 진탕배양하였다. 또한 최적 배지조성을 얻기 위하여 실험목적에 따라 배지성분을 가감하였다.

### 돌연변이주의 분리

변이주는 UV lamp의 504 nm 파장을 변이원(mutagen)으로 사용하여 5초, 10초, 20초, 40초, 1분, 2분, 3분의 조건으로 공시균에 처리하였다<sup>7)</sup>. 공시균주를 TM 액체배지에서 18시간 배양하고, 균의 농도를 10<sup>6</sup> ml<sup>-1</sup>으로 희석한 다음 고체배지에 1 ml씩 분주하고 20 cm의 높이에서 0~3분 동안 다양한 시간별로 UV를 조사하였다. UV를 처리한 현탁액을 TM 고체배지에 도말하고 30°C에서 배양하면서 출현한 콜로니들 중에서 성장이 양호한 콜로니를 선발하여 동일배지에 옮겨고 30°C에서 배양 후 보관하였다.

### 황화합물의 제거특성 조사

공시균주와 변이주의 황화합물 제거효과를 시험하기 위하여 sodium thiosulfate를 Sigma사(U.S.A.)에서 구입하여 TM 액체배지에 첨가하여 사용하였다.

### 선발된 돌연변이체 균주의 배양특성 조사

선발된 돌연변이 균주의 황화수소 제거효과에 미치는 yeast extract, peptone, tryptone등과 같은 질소원의 영향을 조사하기 위해, 50 mM sodium thiosulfate를 함유하고 있는 배지에 질소원을 첨가한 후 균주의 성장정도를 조사하였다. 또한 균주의 황화수소 제거효과에 미치는 탄소원 종류의 영향을 조사하기 위해, 배지에 glucose, sucrose, fructose를 첨가한 후 성장정도를 조사하였다. 배양온도, pH 및 회전속도 등과 같은 균주의 물리화학적 배양특성을 조사하였다.

### 미생물 생육도의 측정

액체배지에서 배양 중인 균의 생육도 측정은 배양액 1 ml을 채취하여 660 nm에서 측정된 흡광도를 균체량으로 하였다.

## 결과 및 고찰

### 변이주의 분리

변이주를 제조하기 위해 균의 현탁액에 0~3분 동안 다양

한 시간으로 UV를 조사하고, 처리한 다음 적정 고체배지에 도말 후 배양하였다. 배양 후 출현한 콜로니들 중에서 모균주에 비하여 콜로니의 크기가 큰 것들을 적정 배지로 옮겨 30°C에서 배양 후 보관하면서 실험에 사용한 결과, UV 처리주들 중에서 30~40초간 UV를 조사한 고체배지에서 얻은 콜로니의 크기가 비교적 큰 것을 분리하였으며, 이것을 UIW-6로 명명하였다(Fig. 1).

분리한 변이주 UIW-6의 성장특성을 조사한 결과 변이주 UIW-6의 성장속도는 배양 후 6시간째에 공시균주 *Thiobacillus* sp. IW보다 2배정도 빨랐으며, 배양을 계속할수록 증가하여 36시간째에 변이주 UIW-6의 성장속도는 공시균주 IW보다 1.6배 빨랐다(Fig. 2). 또한 24시간째에 변이주 UIW-6의 콜로니 색깔은 공시균주 IW에 비해서 더 짙게 나타났다(Fig. 1). 이상의 결과처럼 고체배지에서 콜로니의 크기가 쉽게 증가되면, 바이오필터 내부에 충전된 고체수지에서도 균의 확산이 쉽고 빨라 균의 생존을 뿐만 아니라 바이오필터의 효율도 더욱 증가될 수 있을 것으로 생각된다.

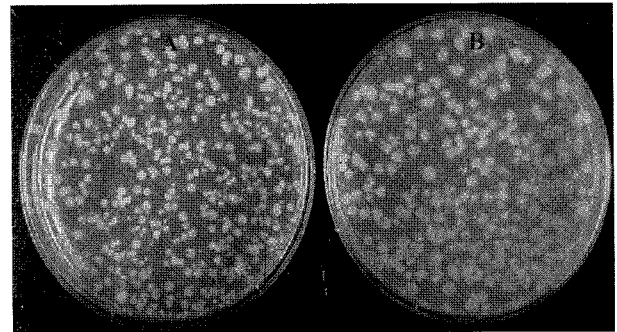


Fig. 1. Mutated bacteria on Thiosulfate-agar Medium after 24 h at 30°C. A; *Thiobacillus* sp. IW, B; the mutant strain UIW-6.

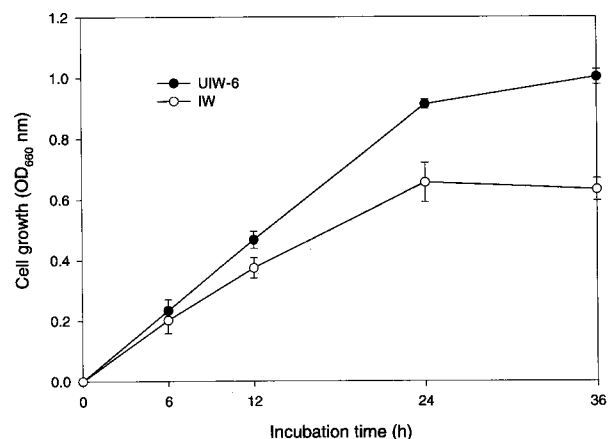


Fig. 2. Cell growth of the mutant strain UIW-6 at pH 6.5, 30°C and 150 rpm, respectively.

**변이주 UIW-6 생육에 대한 pH와 온도 영향**

pH 변화에 따른 변이주 UIW-6의 성장을 알아보기 위해 2N-NaOH와 20%-HCl로 pH를 조절하여 배양한 결과를 Fig. 3에 나타냈다. 변이주 UIW-6 세포성장은 pH가 중성 부근인 6.5~7.0에서 증식이 우수하게 나타났고, 최적배양 pH는 6.5이었다. 공시균주 IW와 변이주간의 pH 변화에 따른 배양특성의 차이는 발견되지 않았다. 그러나 배지의 pH가 약산성에 가까울수록 세포성장에 적응하는 유도기가 길어지고 있음을 알 수 있었다. 일반적으로 *Thiobacillus*종은 산성에 비교적 우수한 균주로 알려져 있으나, 본 연구에서 사용된 변이주 UIW-6는 pH에 적응성이 비교적 넓은 pH 범위에서 안정된 성장이 진행되므로 앞으로 산업 현장에서의 응용 가능성이 높을 것으로 기대된다. 따라서 변이주 UIW-6를 생물학적 약취제거 반응기에 적용할 경우 장치의 부식도 줄일 수 있을 것으로 판단된다.

또한 온도의 영향을 알아보고자 30°C, 35°C, 40°C에서 24시간 배양 후의 변이주 UIW-6의 성장은 Fig. 4와 같다.

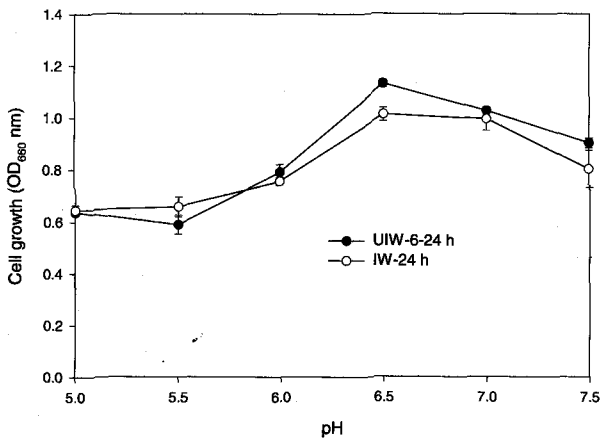


Fig. 3. Effect of pH on cell growth of UIW-6 strain at 30°C and 200 rpm, respectively.

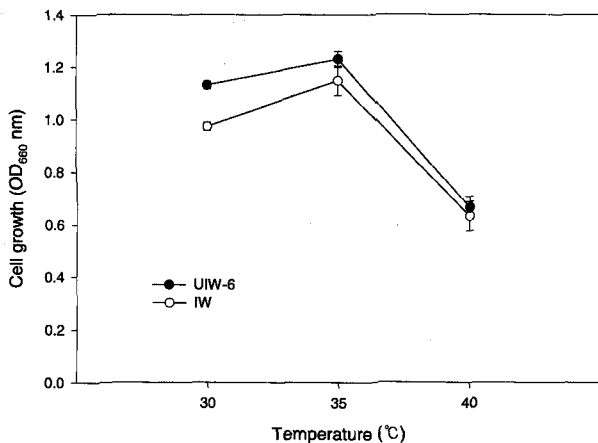


Fig. 4. Effect of temperature on cell growth of UIW-6 strain at 200 rpm.

변이주 UIW-6의 최적 성장 온도는 35°C이고 30~40°C에서 비교적 성장이 우수한 중온 균임을 알 수 있다. 황산화 세균은 일반적으로 배양 최적 온도가 30°C인 중온균으로 알려져 있는데<sup>8,9)</sup>, 본 연구에서 사용한 변이주 UIW-6는 비교적 온도 범위가 넓은 성장 범위를 가지고 있으므로 앞으로 산업적 응용 가능성이 있는 균주로 판단된다.

**황화합물 농도의 영향**

황화수소는 화학적으로 높은 유독성과 액체배지상에서 미생물 배양이 불가능할 정도의 낮은 잔류성 문제가 있기 때문에 어렵게 배지를 조제한다고 해도 배양도구로써 역할을 할 수가 없고, 더욱이 황은 불용성이고 열처리로 인한 영감현상 때문에 변이주 개발에 중요한 수단이 되는 고체배지의 조제가 불가능하다. 이러한 문제점들을 다소 극복할 수 있는 황화합물인 sodium thiosulfate는 물에 쉽게 용해되고 휘발성도 없기 때문에 액체배지 뿐만 아니라 고체배지의 조제에도 전혀 문제가 없다. 따라서 변이주 UIW-6의 에너지원으로 황화합물인 sodium thiosulfate를 사용하여 25~100 mM의 농도에서 24시간 배양하면서 성장정도를 조사한 결과, 변이주 UIW-6는 배양 후 6시간째에 50 mM 농도에서 성장정도가 공시균주 IW보다 2배정도 높은 것으로 나타났으며 농도가 높을수록 성장이 빨랐다(Fig. 5).

**탄소원 및 질소원의 이용성**

UIW-6 변이주의 성장에 미치는 탄소원 및 질소원의 영향은, 탄소원과 질소원을 첨가하지 않았을 때 변이주 UIW-6의 성장은 공시균주 IW보다 2배 정도 높은 것을 확인할 수 있었다. 변이주 UIW-6는 sucrose와 glucose 등과 같은 당 성분보다는 yeast extract나 tryptone과 같은 질소계 유기화합물을 첨가해 줌으로써 높은 성장속도를 얻을 수 있었다 (Fig. 6, 7). 변이주 UIW-6는 탄소원인 fructose와 sucrose를 잘 이용하는 것으로 나타났다. 그리고 공시균주 IW는 sucrose

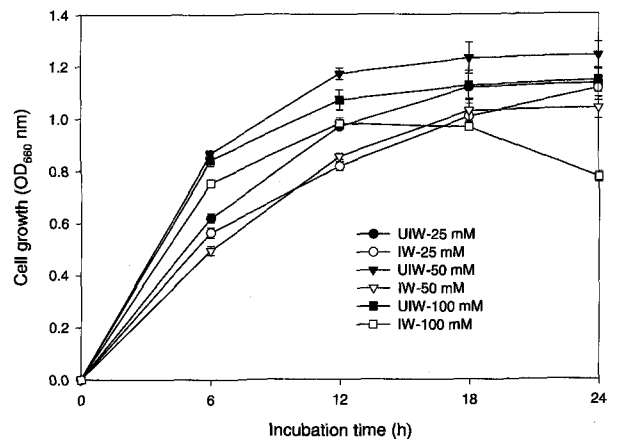


Fig. 5. Effect of sodium thiosulfate on cell growth of UIW-6 strain at 30°C and 200 rpm, respectively.

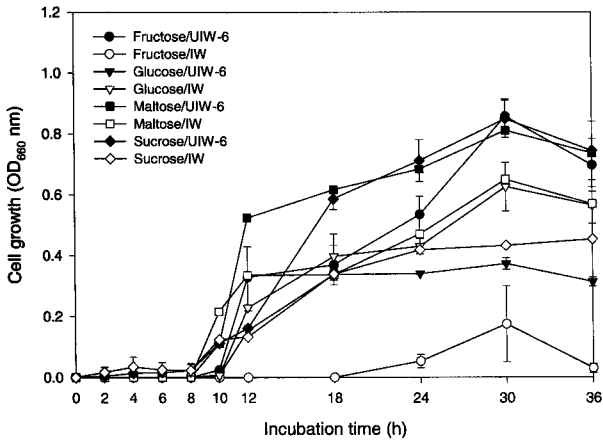


Fig. 6. Effect of 2.0% (W/V) carbon sources on cell growth of UIW-6 strain at 30°C and 200 rpm, respectively.

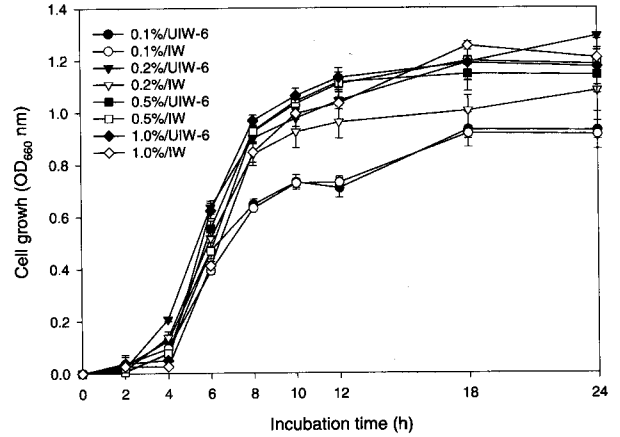


Fig. 8. Effect of yeast extract on cell growth of UIW-6 strain at 30°C and 200 rpm, respectively.

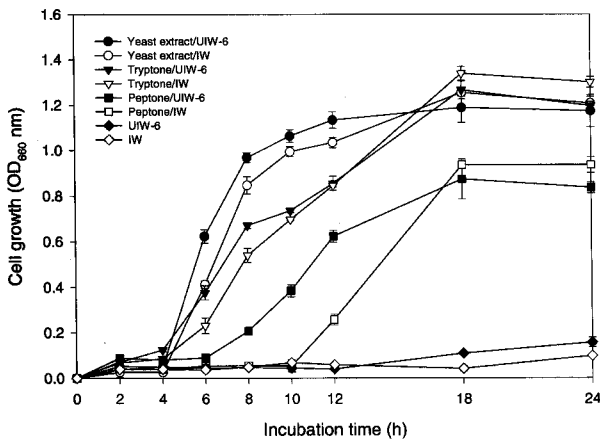


Fig. 7. Effect of 1.0% (W/V) nitrogen sources on cell growth of UIW-6 strain at 30°C and 200 rpm, respectively.

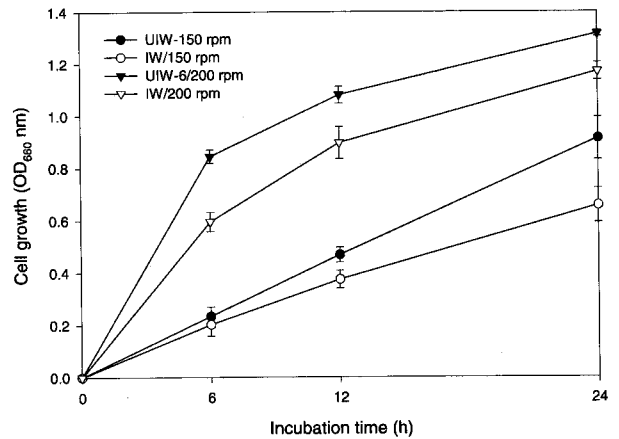


Fig. 9. Effect of agitation on cell growth of UIW-6 strain at 30°C.

를 이용하지 못하였지만 변이주 UIW-6보다 glucose를 잘 이용하는 것으로 나타나 변이주 UIW-6는 공시균주 IW와는 다른 균주로 확인되었다(Fig. 6). 또한 변이주 UIW-6의 첨가 질소원 이용률은 yeast extract > tryptone > peptone 순이었다(Fig. 7). Fig. 8은 이용정도가 높은 yeast extract의 농도에 따른 변이주 UIW-6의 성장정도를 나타낸 것으로 yeast extract의 농도가 0.2%에서 가장 양호한 성장정도를 보여주었으며 농도가 높을수록 성장이 증가하였다. 그러나 0.5% 이상이 되면 배양 후 균의 성장이 지연되는 것을 확인할 수 있었다.

#### 배양기 회전속도에 따른 배양특성 조사

배양기의 회전속도에 따른 균의 성장 정도를 조사하기 위해 회전속도를 150, 200 rpm으로 조절하고 24시간 동안 배양하면서 성장정도를 조사하였다. 회전속도가 높을수록 성장 정도가 공시균주 IW보다 빨랐으며 변이주 UIW-6는 200 rpm에서 성장이 가장 양호한 것으로 나타났다(Fig. 9).

#### 요 약

황 화합물 약취를 제거하기 위하여 UV-B를 돌연변이원으로 처리한 후 공시균주 *Thiobacillus* sp. IW보다 성장속도가 빠른 변이주 UIW-6를 분리하여 최적성장 조건을 조사하였다. 변이주 UIW-6의 특성을 조사한 결과 최적조건은 pH 6.5, 배양온도는 35°C이었으며, 회전속도는 200 rpm 이었다. 황 화합물인 sodium thiosulfate 농도가 50 mM에서 변이주 UIW-6는 6시간째에 공시균주 IW보다 성장정도가 2배 더 빨랐다. 변이주 UIW-6의 성장 최적 탄소원은 fructose와 sucrose였으며 질소원은 yeast extract > tryptone > peptone 순으로 이용하였다. 변이주 UIW-6는 공시균주로 사용한 IW보다 성장이 빨라 황 화합물 약취 제거에 효과적으로 이용할 수 있는 유용한 변이주로 판단되어진다.

## 감사의 글

본 연구는 농림부 농림기술개발사업의 지원에 의해 이루어진 것임으로 연구비 지원에 감사드립니다.

## 참고문헌

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. Hong, S. S. and Lee, N. H. (1993) Growth of *Spirulina platensis* in effluents from wastewater treatment plant of pig farm, *J. Microbiol. Biotechnol.* 3, 19-23.
3. Manios, T. (2004), The composting potential of different organic solid wastes: experience from the island of Crete, *Environ. Int.* 29, 1079-1089.
4. Cho, K. S., Hirai, M. and Shoda, M. (1992) Enhanced removability of odorous sulfur containing gases by mixed cultures of purified bacteria from peat biofilters, *J. Ferment. and Bioeng.* 73, 219-224.
5. Lee, S. K. and Shoda, M. (1989) Biological deodorization using activated carbon fabric as a carrier of microorganisms, *J. Ferment. and Bioeng.* 68, 437-442.
6. Cha, J. M. and Lee, I. W. (1995) Removal of hydrogen sulfide by immobilized *Thiobacillus* sp. IW. on polyvinylpyridine in a bubble column reactor, *J. KSEE.* 17, 145-155.
7. Wehner, J. and Horneck, G. (1995) Effects of vacuum UV and UVC radiation on dry *E. coli* plasmid pUC19. I. Inactivation, *lacZ* mutation induction and strand breaks, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 28, 77-85.
8. Cha, J. M., Park, Y. and Lee, I. W. (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.
9. Kwon, K. H., Cha, W. S., Go, H. C., Lee, K. Y., Park, D. H. and Cha, J. M. (2004) Optimization of the sulfur-oxidizing bacteria, *Thiobacillus novellus* SRM, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* 18, 443-447.