

황화수소 산화세균인 새로운 *Thiobacillus* sp. 의 분리 및 특성

차진명¹ · 이인화*

조선대학교 자연과학대학 ¹유전공학과, 환경학과

황화수소 산화세균인 *Thiobacillus* sp.를 전남 화순의 폐탄광수에서 분리하였다. 분리된 균주는 그람음성의 운동성이 있고, 포자를 형성하는 간균이었으며, 환원된 무기 황화합물을 산화하여 에너지원으로 사용하는 호기성 통성 화학합성 영양균이었다. 분리균주는 thiosulfate를 첨가한 기본배지에서 유기물을 동화하며 성장하였고, 에너지원으로 사용된 thiosulfate는 32 mM 이상의 농도에서는 오히려 기질억제 인자로 작용하여 균의 성장을 억제하였다. 최적 thiosulfate 농도는 32 mM이었다. DNA의 G+C 함량은 65.0 mol%이고, 세포내 주요 지방산중 비수산화 지방산은 16:1+7_ω, 16:0과 수산화 지방산은 3-OH 12:0을 가지며, C₁₈의 미동경 가지형의 지방산도 포함하고 있었다. Ubiquinone system은 Q-9을 가지고 있었다. 위와 같은 생리생화학적 특성 결과로부터, 본 분리균주는 *Thiobacillus* sp. iw.의 새로운 종으로 판단하였다.

KEY WORDS □ *Thiobacillus* sp., hydrogen sulfide, aerobically facultative chemolithotroph, thiosulfate, substrate inhibitor

수질 및 대기오염을 일으키는 악취가스의 일종인 황화수소를 산화시킬 수 있는 세균 *Thiobacillus* sp.는 Bergey's manual에 의하면 다음과 같은 특성을 지니고 있다(1, 7, 8, 21, 25). 이들은 그람음성의 간균으로 운동성과 비운동성 및 편모를 가지며, 포자를 형성하지 않고 탄소원으로는 CO₂을 이용하며, sulfide를 sulfate로 산화함으로써 발생하는 에너지를 에너지원으로 이용하는 화학합성 영양 세균이다. 이들 가운데 절대 화학합성 영양세균들은 기질이 제한되어 있어 한정된 미량의 유기화합물만을 동화한다(7, 8, 22). 반면에 통성 화학합성 영양세균은 생리, 생화학적 특성이 다양하여 독립영양, 종속영양 방법으로, 또는 무기화합물이나 유기화합물을 동시에 에너지원 및 탄소원으로 이용하는 혼성영양 방법으로도 자랄 수 있다(18, 25). 따라서 *Thiobacillus* sp.는 환원된 황화합물을 산화함으로써 발생하는 에너지를 에너지원으로 이용하는 화학합성 영양세균 중 하나이며, 기질이 부족할 경우에는 화학합성 영양적으로 자랄 수 없다. *Thiobacillus* sp.는 최종 전자 수용체로서 산소를 이용하는 호기성균이 대부분이며, 몇몇 균들은 nitrite를 nitrate로 산화하는 탈질화도 수행한다(15). *Thiobacillus* sp.들은 영양요구성, 호흡계내 ubiquinone system, 세포내의 지방산 조성, DNA의 G+C 함량 및 생리적 특성에 따라 *Thiobacillus* sp.를 3가지로 분류하기도 한다(6, 15, 16, 17, 18). 첫째로 ubiquinone 10을 가지고 있는 통성 화학합성 영양세균은 18:1+19_ω의 비수산화 지방산과 3-OH 10:0의

수산화 지방산을 함유하며, DNA의 G+C 함량은 67.0~67.9 mol%이다. 둘째로 ubiquinone 8을 가지고 있는 절대 화학합성 영양세균은 16:0, 16:1+17_ω, 18:1+19_ω을 가지는 비수산화 지방산과 3-OH 10:0, 3-OH 12:0 수산화 지방산을 함유하며, DNA의 G+C 함량은 65.0 mol%를 나타낸다. 셋째로 ubiquinone 10을 가지면서 수산화 지방산이 검지되지 않는 것과 ubiquinone 9를 함유하고 16:0, 16:1+17_ω, 18:1+19_ω 비수산화 지방산과 3-OH 10:0, 3-OH 12:0의 수산화 지방산을 가지면서 DNA의 G+C 함량이 65±3 mol%인 종류로 분류하였다. *Thiobacillus* sp.는 성장하기 위해 에너지원으로 원소 형태의 황, thiocyanate 및 sodium thiosulfate 등을 이용하나 원소 형태의 황을 에너지원으로 사용할 경우 실험 진행중 균체량 등의 측정이 어렵기 때문에 주로 sodium thiosulfate을 에너지원으로 사용하여 실험하는 것으로 알려져 있다(10).

따라서 본 연구에서는 전남 화순 근교의 폐탄광, 폐탄광수 및 마늘뿌리에서 분리한 *Thiobacillus* sp.들을 대상으로 생리, 생화학적 특성과, DNA의 염기조성인 G+C 함량 및 세포의 지방산조성, ubiquinone system 등을 조사하여 동정하였다. 분리동정된 *Thiobacillus* sp. 특성을 재조명하는 한편, 이들 균주가 기초응용 측면에서 유용하게 이용될 수 있는지 여부를 가리기 위해 에너지원으로 사용된 sodium thiosulfate 농도에 따른 균의 비성장 속도를 조사하였다.

재료 및 방법

균주의 분리

실험균주는 전남 화순 근교의 폐탄광, 폐탄광수 및 마늘 뿌리에서 채취한 토양과 하천시료에서 분리하였으며 (6), 비교 균주로는 *Thiobacillus thiooxidans* (KTCC 2505)를 사용하였다. 기본배지 조성은 중류수 1000 ml에 NH₄Cl 0.05%, K₂HPO₄ 0.40%, KH₂PO₄ 0.40%, MgSO₄ 0.08%, EDTA 0.05%, ZnSO₄ 0.022%, CaCl₂ 0.005%, MnCl₂ 0.001%, FeSO₄ 0.005%, (NH₄)₂MoO₇ 0.0001%, CuSO₄ 0.001%, CoCl₂ 0.001%가 되도록 조정하였고 pH는 멸균한 2N-NaOH와 20% HCl를 사용하여 조절하였다 (3, 4, 5). 시료를 500 ml 삼각플라스크에 넣고 기본배지에 0.8% sodium thiosulfate와 0.2% yeast extract를 혼합한 후 균주를 접종하여 30°C, 120 rpm으로 1주일간 진탕 배양한 후 한천배지위에 평판도말 하고 이때 나타난 집락중 크기가 0.5 mm 이상으로 성장속도가 빠른 균주를 선택하여 3회 계속 계대 배양을 반복하면서 순수분리하였고 (8, 11, 12, 22), 이 균주를 냉장실

(4°C)에 보관하면서 3주마다 계대 배양하면서 접종 배지로 사용하였다.

균주의 동정 및 특성

분리균주의 형태적 특성은 그람 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다. 배양학적 특징은 한천배지에 자란 집락의 크기, 모양 및 색깔 등을 관찰하였고 운동성은 반유동 고체배지에 stab culture하여 검사하였으며 영양한천배지에서 성장유무를 관찰하였다 (7, 14, 22, 25). 기본배지에 1.0% 원소 형태의 황, 0.01% thiocyanate 및 0.8% sodium thiosulfate를 따로 분리 멸균한 후 혼합하여 에너지원에 따른 균의 성장유무를 측정하였다 (10). 0.2% yeast extract를 포함한 기본배지에 sodium thiosulfate 농도를 조절하여 (10, 21) 균의 비성장속도를 조사하였다. 접종액의 최종농도를 2%로 하고 기본배지에서 성장한 집락의 크기와 기본배지에 유기물이 첨가된 배지의 집락의 크기를 비교하여 유기물 동화 유무를 조사하였다 (12, 15, 23).

Ubiquinone system

분리균주를 발효조에서 30°C, 200 rpm으로 3일

Table 1. Characteristic of *Thiobacillus* sp. *iw*.

Character	<i>Thiobacillus</i> sp. <i>iw</i> ^a	<i>Thiobacillus perometabolis</i> ^b	<i>Thiobacillus novellus</i> ^c
Cell morphology	rod	rod	rod
Colony size	0.3 mm~1.0 mm	0.3 mm~1.0 mm	0.1 mm~0.8
Spore formation	+	-	-
Gram reaction	-	-	-
Flagella	+	+	-
Nitrate reduction	+	-	-
Assimilation of			
Elemental sulfur	w ^d	+	-
Thiocyanate	w	-	-
Nutrient agar	+	-	-
Optimum temperature	30°C	35~37°C	25~30°C
Optimum pH	7.0	5.5~6.0	7.0
Hydrolysis of gelatin	+	-	-
Guanine plus cytosine			
Content of DNA	65.0 mol%	65.0 mol%	67.3 mol%
Ubiquinone system	Q-9	Q-8	Q-10
Major fatty acids ^e			
Non-hydroxylated fatty acid	16 : 1+17 _n , 16 : 0	16 : 0, 16 : 1+17 _n , 18 : 1+19 _n	18 : 1+19 _n
Hydroxylated fatty acid	3-OH 12 : 0	3-OH 10 : 0, 3-OH 12 : 0	ND ^f
Nutritional requirement	facultative chemolithotroph	facultative chemolithotroph	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 from reference 16; ^c from reference 17; ^d weakly positive; ^e 16 : 1+17_n (hexadecenoic acid plus cyclopropane of C₁₇), 16 : 0 (hexadecanoic acid), 18 : 1+19_n (octadecenoic acid plus cyclopropane of C₁₉); ^f not detected.

동안 배양하여 원심분리로 모아서 멸균수로 세척하여 냉동 건조하였다. Ubiquinone은 Katayama-Fujimura (15, 16, 17, 18) 등의 방법에 따라 추출하고 정제하였다. 추출물은 박층 크로마토그래피법 (HPTLC, 10×10 cm, Merck)에 적용하여, 아세톤: 물 (80:20)로 혼합된 용매에 15분 동안 전개하여 얻은 크로마토그래프로 ubiquinone을 결정하였다.

세포내 지방산조성

세포내의 지방산은 Katayama-Fujimura (15, 16) 등의 방법으로 추출하고, 세포내 지방산인 methyl ester는 FID가 장착된 Shimadzu GC-14A로 분석하였다. 주입 및 검출 온도는 205°C, 분리관 온도는 185°C로 유지하고, 운반가스인 질소 가스는 30 ml/min로 주입하였다. 지방산은 각각의 methyl ester의 상대적인 이상정체 시간과 비교하여 동정하였고, 지방산의 조성은 전체 피크 면적에서 각 피크 면적 비율로 측정하였다.

DNA의 염기 조성

DNA는 Marmur 방법에 따라 분리하고 정제하였다 (14, 15, 17, 19). 평균 G+C 함량은 Tamaoka (24) 등의 방법에 따라 Shimadzu사의 HPLC로 측정하였다. HPLC는 L-3000 검출기 (Hitachi)와 D-2000 integrator (Hitachi)를 사용하였으며, cosmo-sili packed colum RP-18 (4.6×15 cm, Nacal tesque)를 사용하여 실시하였다. 표준 DNA는 Yamasa사 (Japan) 제품을 사용하였다.

결과 및 고찰

분리균주의 동정 및 생리, 생화학적 특성

기본배지에 0.8% sodium thiosulfate와 0.2% yeast extract를 포함한 액체배지에 폐탄광수, 폐탄광 및 마늘뿌리에서 분리한 균주를 액체배지에서 3회 연속 계대배양한 후 이 중 OD₆₀₀가 1.65 이상 배지의 균주를 선별하여 한천배지에 도말하고, 이 중 집락의 크기가 0.5 mm 이상으로 성장한 한개의 집락만을 선별한 결과 폐탄광수에서 분리한 균주중 하나이었으며, 이 균주를 본 연구의 실험균주로 사용하였다. 분리균주의 특성은 Table 1과 같다. 분리균주는 그람음성균이며 포자를 형성하는 간균으로 Fig. 1의 (a), (b)로 나타냈다 (1, 14, 21). 또한 편모가 있는 운동성 균주로 집락의 크기는 0.3~0.9 mm이며, 가장 바깥부위는 옅은 갈색이며 중심부로 갈수록 진한 갈색을 띠게 되어 집락의 중심부는 아주 진한 갈색을 띤다 (21, 22). Bergey's manual에 의하면 *Thiobacillus novellus*와 *Thiobacillus vestitus*의 경우만 영양한천배지에서 성장함을 보고 하였는데, 본 연구에서 분리한 균주에서도 영양한천 배지에서 성장함을 볼 수 있었다 (25). 분리균주는 주된 에너지원으로 thiosulfate를 이용하였으며 원소 형태의 황과 thiocyanate도 느리게 산화하는 통성 화학합성 영양을 하였다 (14, 20, 22).

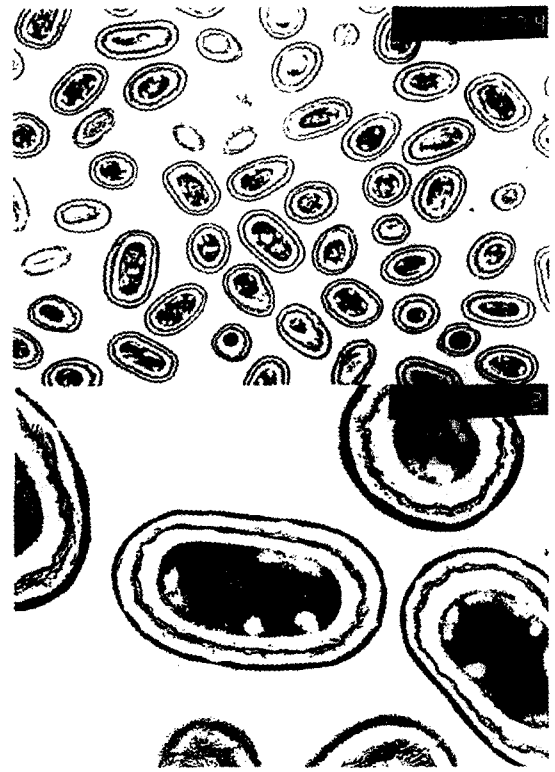


Fig. 1. Transmission electron micrograph of *Thiobacillus sp. iw.*, gram-negative rod (a) and formation of spore (b).

Katayama-Fujimura 등에 의하면 *Thiobacillus sp.*는 절대 화학합성 영양과 통성 화학합성 영양으로 성장함을 보고 하였다 (7, 14, 15, 16, 17). 유기물 동화는 Table 2와 같다. 기본배지에 기질을 첨가하였을 때와 sodium thiosulfate를 포함한 기본배지에 기질을 첨가하였을 때 유기물 동화능력을 보면 거의 비슷한 경향을 보였다. 즉, 분리균주는 arabinose, sucrose, gluconic acid, lactose, glycerol, lactate, glucose, proline, maltose, ribose, fructose 등은 이용하였지만, citric acid, isoleucine, leucine, oxalic acid, serine, phenyl alanine, acetic acid, methyl formate, methanol, pyruvic acid, succinic acid, tryptophan, glutamic acid 등은 이용하지 못하였다. 또한 기본배지에 gluconic acid가 첨가된 배지보다는 sodium thiosulfate를 포함한 기본배지에 gluconic acid를 첨가한 배지에서 균의 성장이 더 활발하였다. 그러나 에너지원을 포함한 기본배지에 fructose나 ribose를 첨가한 경우 균의 성장은 오히려 억제되었고, 에너지원을 포함한 기본배지에 lactate를 첨가한 경우에는 균은 성장하지 않았다 (23).

Table 2. Assimilation of organic compounds by *Thiobacillus* sp. iw.^{a,b}, *Thiobacillus perometabolis*^c and *Thiobacillus novellus*^d.

Substrate	<i>Thiobacillus</i> sp. iw. ^a	<i>Thiobacillus</i> sp. iw. ^b	<i>T. perometabolis</i>	<i>Thiobacillus novellus</i> ^d
Arabinose	+	+	-	+
Citric acid	-	-	w	+
Sucrose	+	+	-	w
Gluconic acid	+	+	w	+
D-glucose	+	+	-	+
Isoleucine	-	-	-	-
Leucine	-	-	-	-
Lactose	+	+	-	-
Oxalic acid	-	-	-	+
Serine	-	-	-	w
Phenyl alanine	-	-	-	w
Acetic acid	-	-	-	+
Methyl formate	-	-	-	+
Methanol	-	-	-	w
Pyruvic acid	-	-	-	+
Succinic acid	-	-	-	+
Glycerol	+	+	w	+
Lactate	+	-	-	+
Glucose	+	+	-	+
Proline	+	+	+	+
Maltose	+	+	-	w
Ribose	+	+	-	+
Fructose	+	+	-	+
Tryptophan	-	-	-	-
Glutamic acid	-	-	-	+

^a Determined in basal medium containing substrate. ^b determined in basal medium containing 0.8% (wt/vol) Na₂S₂O₃ and substrate; ^c from reference 16; ^d from reference 17; w weakly positive.

Ubiquinone system

본 연구에서 분리한 *Thiobacillus* sp.는 통성 화학합성 영양을 하며 호흡계내 ubiquinone system은 Q-9로 나타났다. Jackson (14)등과 Katayama-Fujimura (16, 17)등은 *Thiobacillus* sp.를 ubiquinone의 기준에 따라 분류하였다. 즉 Q-10은 통성 화학합성 영양을 하며 Q-8은 대부분 절대 화학합성 영양을 하나 일부 균주는 통성 화학합성 영양도 한다. 그러나 *Thiobacillus* sp. 중 *Thiobacillus trautweinil*와 일부 *Thiobacillus rubellus*는 Q-9를 가지고 있는 것으로 보고되었다 (14, 16, 17, 18).

DNA의 염기조성

본 연구에서 분리한 균주인 *Thiobacillus* sp.의 G+C 함량은 65.0 mol%을 보여, *Thiobacillus* sp.의 DNA 염기조성과 유사하였다. 일반적으로 *Thiobacillus* sp.의 DNA 염기조성인 G+C 함량은 51~68 mol%을 보인다 (14, 15, 16, 17, 24). 즉 Q-10을 가지고 있는 균주의 G+C 함량은 63~68 mol%이고 mol%이다. 그러나 Q-9인 *Thiobacillus trautweinil*의 G+C 함량은 66.0 mol%이며, *Thiobacillus rubellus*는 65±3 mol%로 보고 되었다.

세포내 지방산 조성

본 연구에서 분리한 균주의 주된 비수산화 지방산은 16:1+17_{...}, 16:0. 수산화 지방산은 3-OH 12:0의 형태이고 C₁₁의 경우 미동정 branched fatty acid도 검출되었다. 분리균주의 세포내 지방산 조성을 Table 3에 나타냈다. 그람음성 균주는 대부분의 경우, 2와 3 수산화 지방산(2, 3-OH)을 가지며 (7, 11, 12, 14, 17), Q-9를 함유한 *Thiobacillus trautweinil*의 주된 비수산화 지방산은 18:1+19_{cyc}, 16:1+17_{cyc}, 16:0 형태이고, 수산화 지방산은 3-OH 10:0과 3-OH 12:0로 보고 되었다 (15, 16, 17). 즉 ubiquinone system, DNA의 G+C 함량, 세포의 지방산 조성 및 생리 생화학적 특성 결과로 보아, 본 연구에서 분리한 균주인 *Thiobacillus* sp.의 경우 통성 화학합성 영양을 하며 ubiquinone은 Q-9, GC 함량은 65.0 mol% 그리고 지방산 조성은 16:1+17_{...}, 16:0, 3-OH 12:0 가지고 있기 때문에 새로운 황화수소 산화세균인 *Thiobacillus* sp. iw.로 명명하였다.

Sodium thiosulfate 농도영향

기본배지에 0.2% yeast extract를 넣고 sodium thiosulfate 농도를 8~160 mM로 조절하여 균체의

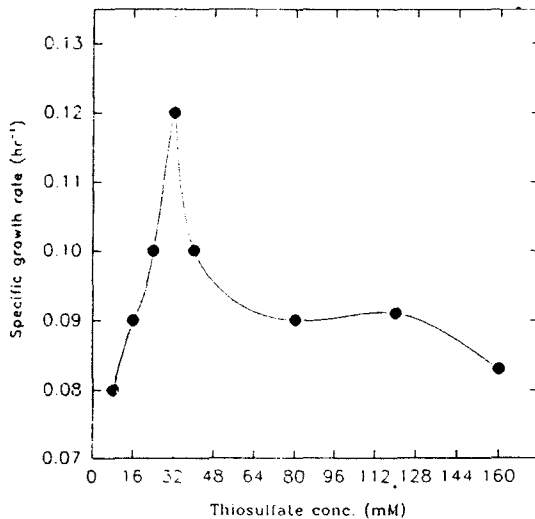
Table 3. Cellular fatty acid composition of *Thiobacillus* sp. iw.

Fatty acid composition ^a	% fatty acids
3-OH 12:0	8.92
3-OH 14:0	tr ^b
12:0	2.71
14:0	tr
15:0	tr
16:0	9.07
X ^c	9.25
16:1+17:...	68.06
16:0	9.07

^a In fatty acid designations, the first number indicates the number of carbon atom and the second the number of double bond; ... cyclopropane fatty acid; 3-OH, β -hydroxy fatty acid.

^b Trace amounts (less than 1%).

^c Unidentified C₁₆ branched fatty acid.

**Fig. 2.** Effects of thiosulfate concentration on the initial specific growth rate at pH 7, 30°C.

비성장 속도를 측정하였다(10). Sodium thiosulfate 농도에 따른 균의 비성장 속도는 Fig. 2와 같다. 이 균주는 sodium thiosulfate 농도가 32 mM 이하에서는 농도가 증가함에 따라 균의 성장은 증가하는 반면, 32 mM 이상에서는 농도가 증가할 수록 균의 성장은 억제되었다. 즉, 32 mM 이상에서는 기질이 억제인자로 작용하여 균주의 성장을 억제하였다. 따라서 이 균의 sodium thiosulfate 농도에 따른 균의 성장 영향은 Hiroshi(10, 17) 등과 Nakamura(21)

등이 발표한 연구결과와 유사하며 최적 농도는 32 mM로 나타났다. *Thiobacillus* sp.의 성장속도는 다른 균주에 비교하여 일반적으로 느리나 본 연구에서 분리한 *Thiobacillus* sp. iw.는 성장속도가 빨라 황화수소 산화반응에 이용할 수 있는 유용한 균주인 것으로 사료되어 진다.

참 고 문 헌

1. Agate, A.D. and W. Vishniac, 1973. Characterization of *Thiobacillus* species by gas-liquid chromatography of cellular fatty acids. *Archiv fur Mikrobiologie*. **80**, 225-267.
2. Buter, R.G., 1975. Pyruvate inhibition of carbon dioxide fixation of the strict chemolithotroph *Thiobacillus thiooxidans*. *Can. J. Microbiol.* **21**, 2089-2093.
3. Cho, K.S., L. Zhang., M. Hirai, and M. Shoda, 1991. Removal characteristics of hydrogen sulfide and methanethiol by *Thiobacillus* sp. isolated from peat in biological deodorization. *J. Ferment. and Bioeng.* **71**, 44-49.
4. Cho, K.S., M. Hirai, and M. Shoda, 1991. Degradation characteristics of hydrogen sulfide, methanethiol, dimethyl sulfide and dimethyl disulfide by *Thiobacillus thioparus* DW44 isolated from peat biofilter. *J. Ferment. and Bioeng.* **71**, 384-389.
5. Cho, K.S., M. Hirai, and M. Shoda, 1992. Enhanced removal efficiency of malodorous gases in a pilot-scale peat biofilter inoculated with *Thiobacillus thioparus* DW44. *J. Ferment. and Bioeng.* **73**, 46-50.
6. Furusawa, I.N., Togashi, M. Hirai, M. Shoda, and H. Kubota, 1984. Removal of hydrogen sulfide by a biofilter with fibrous peat. *J. Ferment. Technol.* **62**, 589-594.
7. Fujimura, Y.K. and H. Kuraishi, 1980. Characterization of *Thiobacillus novellus* and its thiosulfate oxidation. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **26**, 357-367.
8. Gerhardt, P., R.G.E. Murray, R.N. Costilow, E.W. Nester., W.A. Wood, N.R. Krieg, and G.B. Phillips, 1981. Manual of methods for general bacteriology. ASM. Washington.
9. Hirai, M., L.M. Zhang, and M. Shoda, 1991. Removal characteristics of dimethyl sulfide, methanethiol and hydrogen sulfide by *Hyphomicrobium* sp. 155 isolated from peat biofilter. *J. Ferment. and Bioeng.* **72**, 392-396.
10. Hiroshi, K., N. Toshihiko, K. Kouji, K. Kajuo, and A. Yoshifumi, 1991. High density cultivation of *Thiobacillus thiooxidans* S3 in a fermentor with cross-flow filtration. *J. Ferment. and Bioeng.* **72**, 36-40.
11. Hutchinson, M., K.I., Johnstone, and D. White,

1966. Taxonomy of the acidophilic *Thiobacilli*. *J. Gen. Microbiol.* **44**, 373-381.
12. Hutchinson, M., K.I. Johnstone, and D. White, 1969. Taxonomy of the genus *Thiobacillus* the outcome of numerical taxonomy applied to the group as a whole. *J. Gen. Microbiol.* **57**, 397-410.
 13. Imai, K. and M. Okuzumi, 1965. Studies on the biochemistry of *Thiobacillus*. (iv) growth and energy efficiency of *Thiobacillus thiooxidans* (part III) (in Japan). *Hakkokogaku.* **43**, 1-9.
 14. Jackson, J.F., D.J.W. Moriarty, and D.J.D. Nicholas, 1968. Deoxyribonucleic acid base composition and taxonomy of *Thiobacilli* and some nitrifying bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **53**, 53-60.
 15. Katayama-Fujimura, Y., N. Tsuzaki, and H. Kuraishi, 1982. Ubiquinone, fatty acid DNA base composition determination as a guide to the taxonomy of the genus *Thiobacillus*. *J. Gen. Microbiol.* **128**, 1599-1611.
 16. Katayama-Fujimura, Y. and H. Kuraishi, 1980. Characteristics of *Thiobacillus novellus* and its thiosulfate oxidation. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **26**, 357-367.
 17. Katayama, Y., I. Kawashida, N. Tsuzaki, and H. Kuraishi, 1983. Reidentification of *Thiobacillus perometabolis* ATCC 7793 and *Thiobacillus* sp. strain A2 with reference to a new species, *Thiobacillus rapidescens* sp. nov. *J. Syst. Appl. Bacteriol.* July, 532-538.
 18. Katayama-Fujimura, Y., N. Tsuzaki, A. Hirata, and H. Kuraishi, 1984. Polyhedral inclusion bodies (carboxysomes) in *Thiobacillus* species with reference to the taxonomy of genes *Thiobacillus*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **30**, 211-222.
 19. Marmur, J., 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* **3**, 208-218.
 20. Mizoguchi, T., T. Sato, and T. Okabe, 1976. New sulfur-oxidizing bacteria capable of growing heterotrophically, *Thiobacillus rubellus* sp. nov. and *Thiobacillus delicatus* sp. nov. *J. Ferment. Technol.* **54**, 181-191.
 21. Nakamura H.K., Miki and Y. Amano, 1990. Cell growth and accumulation of *Thiobacillus thiooxidans* S3 in a pH-controlled thiosulfate medium. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **36**, 369-376.
 22. Silverman, M.P. and D.G. Lundgren, 1959. Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans* I. an improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields. *J. Bacteriol.* **72**, 642-647.
 23. Tabita, R. and D.G. Lundgren, 1971. Utilization of glucose and the effect of organic compounds on the chemolithotroph *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* **108**, 328-333.
 24. Tamaoka, J. and K. Komagata, 1984. Determination of DNA base composition by reversed phase high performance liquid chromatography. *FEMS Microbiol. Lett.* **25**, 125-128.
 25. Staley, J.J., M.P. Bryant, N. Pfennig, and J.G. Holt, 1989. Bergey's manual of systematic Bacteriology. Vol. 3. Williams and Wilkins. Baltimore.

(Received April 25, 1994)

(Accepted June 13, 1994)

ABSTRACT: Isolation and Characterization of a New Hydrogen Sulfide-Oxidizing Bacterium *Thiobacillus* sp.

Cha, Jin-Myeong¹ and In-Wha Lee* (¹Department of Genetic Engineering, and Department of Environmental Science, Chosun University, Kwangju 501-759, Korea)

A new hydrogen sulfide-oxidation bacterium, *Thiobacillus* sp. was isolated from waste coal mine water around Hawsun in Chunnam province. The isolate was motile gram-negative rod shape, formed spore and grew up to be aerobically facultative chemolithotroph by using energy released from the oxidation of reduced inorganic sulfur compounds. It could assimilate various kinds of organic compounds and grew well upon thiosulfate-supplemented basal medium. To the level of 32 mM in thiosulfate concentration, thiosulfate in itself was utilized as energy source for growth. However, from those of the higher concentration than 32 mM, thiosulfate functioned specifically as the substrate inhibitor rather than as the energy source. It was found that the optimum thiosulfate concentration for growth was 32 mM. The G+C content of the DNA was 65.0 mol%. The isolate had 16:1+17_{...}, 16:0 as their major non-hydroxylated cellular fatty acids, 3-OH 12:0 as a hydroxylated fatty acid and also contained unidentified C₁₈ branched fatty acid. The ubiquinone system in the respiratory chain was Q-9. Based on the physiological and biochemical characteristics, the isolate was assigned to a novel species of the genus *Thiobacillus* sp. *iw*.