

황 농도에 따른 *Acidithiobacillus thiooxidans*의 성장 특성

이은영¹ · 조경숙^{2*} · 류희욱³

¹수원대학교 환경공학과, ²이화여자대학교 환경공학과, ³송실대학교 환경·화학공학과

Growth Characteristics of *Acidithiobacillus thiooxidans* in Different Sulfur Concentrations. Lee, Eun Young¹, Kyung-Suk Cho^{2*}, and Hee Wook Ryu³. ¹Department of Environmental Engineering, University of Suwon, ²Department of Environmental Science and Engineering, Ewha Womans University, ³Department of Chemical and Environmental Engineering, Soong Sil University - The growth characteristics of sulfur-oxidizing bacteria, *Acidithiobacillus thiooxidans* AZ11, MET, and TAS were investigated in mineral salt media supplemented with elemental sulfur of 1~50 g L⁻¹. The sulfur oxidation rates of *A. thiooxidans* MET and TAS increased highly with increasing sulfur concentration up to 10 g L⁻¹, but the rates increased slowly in sulfur concentration over 10 g L⁻¹. *A. thiooxidans* AZ11 showed the parallel increase of sulfur oxidation rate until sulfur concentration increased up to 40 g L⁻¹. The maximum sulfur oxidation rates (V_{max}) of AZ11, MET and TAS were 1.88, 1.38 and 0.43 g S L⁻¹ d⁻¹, respectively. The maximum specific growth rates (μ_{max}) of AZ11, MET, and TAS were 0.33 d⁻¹, 0.30 d⁻¹ and 0.45 d⁻¹, respectively. Although MET and TAS couldn't grow at sulfate concentration of 40 g L⁻¹, AZ11 could grow in the presence of 58 g L⁻¹ sulfate, the final oxidation product of elemental sulfur.

Key words: Sulfur-oxidizing bacteria, *Acidithiobacillus thiooxidans*, sulfur oxidation rate, growth rate, sulfur concentration

황(sulfur)은 -2에서 +6의 안정된 원자기를 갖는 원소로 지각에 가장 풍부한 원소 중의 하나이다[1]. 황화합물의 생물 지구 화학적 순환에 있어서 가장 거대한 황의 저장소는 토양이나 퇴적물 속에 함유된 불용성 황화합물(주로 황화철)이다. 이 중의 일부가 화산활동이나 용탈작용에 의해 비교적 적은 양의 황화합물이 지구 생태계로 유입되고 있다[1]. 생물권에 유입된 황화합물은 황산화 미생물, 황산염 환원세균과 같은 특수한 미생물들의 산화 혹은 환원 작용에 의하여 생물권 내에서 활발하게 순환되고 있다[1]. 그런데, 산업혁명 이후 대량으로 화석연료와 광물들을 채광하여 사용함에 따라 황화합물의 저장소로부터 황화합물이 생물권내로 대량 유입되기 시작하면서 조화로운 생물지구화학적 순환이 깨어지지 시작하였고, 많은 환경문제들이 발생되고 있다. 대표적인 예로서 화석연료의 연소에 의한 아황산가스의 대량 방출과 이로 인한 산성비가 있다. 또한, 많은 양의 황산염을 포함한 광산배수에 의한 하천과 토양의 산성화로 인한 생태계의 파괴를 들 수 있다.

대부분의 미생물은 황화수소와 같은 황화합물의 독성 때문에 황화물(sulfide)의 형태로 직접적으로 이용하는 것이 불가능하다. 그러나 일부의 황산화세균은 황화합물을 산화

시켜주며 그 과정에서 에너지를 획득하고 이를 이용하여 대기 중의 이산화탄소를 고정하여 성장한다[2]. *Thiothrix*, *Beggiatoa*, *Hyphomicrobium* 등과 같은 화학독립영양 황산화세균은 황화합물의 산화를 통하여 유리황을 거쳐 황산을 생산한다[3-5]. *Chlorobium*, *Chromatium*, *Ectothiorhodospira*, *Rhodobacter* 등과 같은 광독립영양 황산화세균 역시 혐기적 환경에서 황화합물을 황(S⁰)으로 산화한다[6-9]. *Pseudomonas* sp., *Xanthomonas* sp.와 같은 종속영양세균에 의한 황화합물의 산화기작도 보고 되고 있다[10, 11]. 황산화세균에 의하여 이용될 수 있는 황화합물에는 황화수소(H₂S), 황(S⁰), thiosulfate(S₂O₃²⁻), methanethiol(CH₃SH), dimethyl sulfate (DMS), 및 dimethyl disulfide(DMDS) 등이 있다[2]. *Acidithiobacillus thiooxidans*는 호산성세균으로 낮은 pH에 내성이 있다고 알려져 있다. *A. ferrooxidans*와 *A. thiooxidans*는 알칼리화된 토양을 중화시키고, 무기염에서 염기와 금속을 용출시키거나, 석탄과 같은 화석 연료의 탈황 및 악취 가스의 제거에도 이용되고 있다.

본 연구팀은 황산화세균인 *A. thiooxidans* AZ11, MET, TAS를 분리하였는데, 이 중 *A. thiooxidans* AZ11은 고농도의 황산염에 내성을 지닌 세균으로, 매우 낮은 pH 조건에서도 생육이 가능하므로 고농도의 황화수소를 함유한 폐가스를 처리할 수 있는 균주이다[12], 또한, *A. thiooxidans* MET은 산성 조건 뿐만 아니라 중성조건에서 황산화능을 발휘하는 균주로, 중금속으로 오염된 슬러지로부터 중금속을 용출

*Corresponding author

Tel: 82-2-3277-2393, Fax: 82-2-3277-3275,
E-mail: kscho@ewha.ac.kr

하는데 사용될 수 있다[13]. *A. thiooxidans* TAS는 고농도의 ammonium sulfate($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)에 내성을 지닌 황산화세균으로, 황화수소를 황산염으로 생물학적으로 산화하여 제거하여, 암모니아를 황산염에 의해 화학적으로 ammonium sulfate로 중화시켜 제거함으로써 황화수소와 암모니아를 동시에 처리 가능한 탈취 균주로 이용할 수 있다[14].

이와같이 황산화세균을 이용한 대부분의 연구들은 탈취 및 생물제련의 효율을 높이기 위한 측면에서 수행되었기 때문에 환경조건 변화에 따른 황산화세균의 성장특성에 대한 다양한 정보가 부족하다. 따라서, 황산화세균을 다양한 목적으로 활용하는데 있어서 기질 농도에 따른 균주의 성장 속도와 황산화속도에 대한 속도론적 해석을 비교하는 것은 매우 중요한 일이다. 본 연구에서는 세 종류의 황산화세균인 *A. thiooxidans* AZ11, MET, TAS을 기질인 황 농도를 1-50 g L^{-1} 로 다양하게 첨가한 무기염배지에서의 성장 특성을 조사하여 향후 각각 균주의 산업적 활용에 필요한 정보를 도출하고자 하였다.

실험 재료 및 방법

균주 및 배지조성

실험에 사용한 균주는 탈취세균인 *A. thiooxidans* AZ11 (KCTC 8929P), *A. thiooxidans* MET(KCTC 8928P), 그리고 *A. thiooxidans* TAS(KCTC 8930P)이었다[12-14]. *A. thiooxidans* AZ11 및 TAS의 배양에는 SOB 배지를 사용하였고, MET의 배양에는 Modified Waksman(MW) 배지를 사용하였다. SOB 배지의 조성은 다음과 같다(g L^{-1}): $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 8.0; K_2HPO_4 , 2.0; KH_2PO_4 , 2.0; NH_4Cl , 0.4; $\text{MgCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01이며 pH를 7.0에서 7.2로 조절하였다. MW 배지의 조성은 다음과 같다(g/L): S^0 , 10.0; KH_2PO_4 , 3.0; NH_4Cl , 0.1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.3; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01이며 pH를 4.0-4.5로 조절하였다. 여기서, S^0 과 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 는 에너지원으로, NH_4Cl 은 환원된 형태의 질소원으로, K_2HPO_4 및 KH_2PO_4 는 인산염 완충제로, 그리고, $\text{MgCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 및 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 는 미량의 광물로서 이용되었다[15].

균주의 배양방법

SOB 배지 및 MW 배지를 200 mL 첨가한 삼각 플라스크를 121°C에서 약 15분간 고온·고압 멸균시킨 후, 여기에 3시간 이상 자외선 조사하여 멸균한 10 g L^{-1} 의 S^0 을 clean bench에서 주입하고 고체배지에서 성장한 *A. thiooxidans* AZ11, MET, TAS의 colony를 멸균된 삼각 플라스크에 접종하였다. 30°C의 교반배양기에서 180 rpm으로 5일 동안 전배양하였다. 대량배양하기 위하여 4 L의 SOB 배지를 10 L의 대량배양기에 넣고 앞서 언급한 방법대로 제조한 배지에 전배양액을 10% (v/v) 접종하여 필터에 의해 제한된 공

기를 불어넣어 주면서 30°C에서 7~10일 동안 배양하였다. 대량배양 한 배양액을 멸균한 원심분리관에 넣고 3,000 rpm에서 3분간 원심분리한 후, 미 산화 S^0 입자를 제거한 상등액을 또 다른 멸균된 원심분리관에 넣고 8,000 rpm에서 25분간 원심분리하여 균주만을 회수하였다. 회수된 균체를 각각 SOB 배지 및 MW 배지에 현탁하여 접종원으로 사용하였다.

황산화 특성

SOB와 MW 배지 성분에서 황성분($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 과 S^0)을 제외한 무기염 배지 200 mL을 멸균한 플라스크에 넣고, 자외선을 조사하여 멸균한 S^0 을 1, 3, 5, 7, 10, 20, 30, 40, 50 g L^{-1} 가 되도록 첨가하였다. 앞에서 서술한 방법으로 회수한 균체를 spectrophotometer를 이용하여 660 nm 파장에서 측정하였을 때 흡광도가 0.1 정도가 되도록 모든 조건에 대하여 동일한 농도의 균주를 접종해 주었다. 기질 농도에 따른 황산화속도 및 성장속도를 조사하기 위해, 24시간 간격으로 배양액을 5 mL씩 채취하여 pH, 흡광도 및 황산염의 농도 분석용으로 사용하였다. 배지의 pH는 pH meter(Orion pH meter model 420A, USA)를 이용하여 측정하였다. 균주의 배양 탁도는 spectrophotometer(Spectronics 20, USA)를 이용하여 660 nm에서 측정하였다. 측정된 탁도값과 건조세포중량과의 관계를 이용하여 탁도를 건조세포중량(dry cell weight; DCW)으로 환산하여 비교 분석하였다. 황산염은 IC-Pak™ Anion(4.6×50 mm) 컬럼을 장착한 이온 크로마토그래피(Waters 717 plus Autosampler가 장착된 Waters 510, USA)를 이용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

A. thiooxidans AZ11, MET 및 TAS의 성장특징

Thiobacillus spp. 중에서도 특히 *A. thiooxidans*는 S^0 을 에너지원으로 하여 그 표면에 부착하여 생존하지만, $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 를 기질로써 사용하기도 한다. 기질로써 S^0 을 사용하였을 때(식 (1))과 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 를 사용하였을 때(식 (2))의 미생물에 의한 이들의 분해 반응은 다음과 같다[17].



배지에 첨가된 기질인 S^0 (1~50 g L^{-1})의 농도별 황산화속도를 계산하여 Fig. 1(a)에 도시하였다. 실험결과를 해석하여, 기질 농도별 황산화 속도를 측정된 결과, 기질농도가 증가함에 따라 황산화 속도는 전반적으로 증가하는 경향을 나타내었다(Fig. 1(a)). *A. thiooxidans* MET와 TAS의 경우, 10 g L^{-1} 이하의 기질농도에서는 기질농도에 따라 황산화속도가 직선적으로 증가하였으나, 그 이상의 기질농도에서는 완만하게 증가하여 최대 각 1.37, 1.45 $\text{g S L}^{-1} \text{d}^{-1}$ 까지

증가하였다. 그러나, *A. thiooxidans* AZ11의 경우는 40 g L⁻¹이하의 기질농도에서는 기질농도가 증가함에 따라 황산화속도가 직선적으로 증가하였다. 기질농도가 20 g L⁻¹ 이하에서 MET와 TAS의 황산화속도가 AZ11의 그것보다 다소 높았지만, 기질농도가 20 g L⁻¹ 이상으로 증가하게 되면 AZ11의 황산화속도가 다른 두 균주의 황산화속도를 능가하여 최대 1.79 g S L⁻¹ d⁻¹까지 증가하였다. 즉, AZ11은 황산화반응의 최종산물인 황산염이 다른 두 균주에 비해 높아지는 환경에서도 비교적 높은 황산화 활성을 나타낼 수 있었다.

각각의 기질농도에서 각 균주의 비성장속도를 계산하여 Fig. 1(b)에 도시하였다. TAS의 경우, 5 g L⁻¹의 기질농도에서 0.43 d⁻¹의 최대성장속도를 나타내었고, 그 이상의 기질

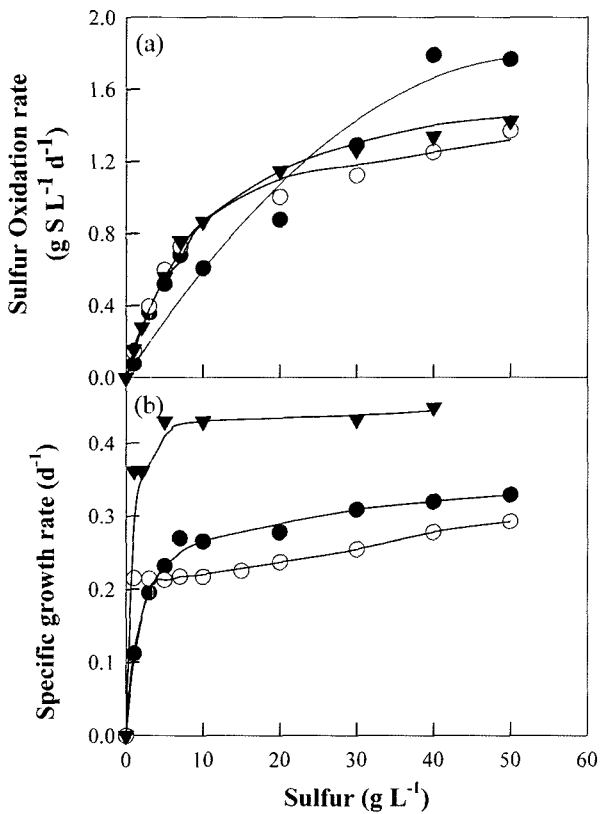


Fig. 1. Sulfur oxidation rates (a) and specific growth rates (b) of *A. thiooxidans* AZ11, MET and TAS in different concentrations of sulfur. ●, AZ11; ○, *A. MET*; ▼, TAS.

농도에서는 기질농도가 증가하여도 성장속도는 증가하지 않았다. 반면, AZ11과 MET는 기질농도가 증가함에 따라 성장속도가 아주 작은 비율로나마 증가하여 각각 0.33 d⁻¹과 0.30 d⁻¹까지 증가되는 것을 볼 수 있었다.

Fig. 1(a)과 Fig. 1(b)의 결과로부터 Michaelis-Menten 식과 Monod 식을 이용하여 최대황산화속도(V_{max})와 최대성장속도(μ_{max})를 구하여 Table 1에 제시하였다. V_{max} 값은 AZ11, MET, 및 TAS 순으로 높았다. 기질 친화도를 나타내는 상수인 K_m 값을 비교해보면, V_{max} 값이 1.88 g S L⁻¹ d⁻¹로 가장 높았던 AZ11의 경우가 K_m 값도 12.82 g L⁻¹로 세 균주 중 가장 높았다. 이는 기질이 20 g L⁻¹ 이하의 경우 다른 두 균주에 비해 AZ11이 약간 낮은 황산화 속도를 보이다가 그 이후에 높은 황산화 속도를 보인 결과와도 일치한다. 반면, TAS의 경우는 저농도의 기질이 존재해도 균주가 황산화능을 나타내기는 하지만, 황산화능이 그리 크지 못했다. 즉, 황산화능을 나타내기 위해 요구되는 기질의 농도가 낮다고 해서 꼭 높은 황산화능을 나타내는 것이 아니며, 반대로 요구되는 기질의 농도가 높다고 해서 꼭 황산화능이 낮다는 것을 의미하지는 않는다.

A. thiooxidans AZ11, MET 및 TAS의 μ_{max} 값을 비교한 결과, TAS, AZ11, MET 순으로 μ_{max} 값이 컸고, K_m 값은 그 반대의 순서로 컸다. 즉, 최대성장속도는 기질에 대한 균주의 친화도가 클수록(즉, K_m 값이 작을수록) 컸고, 반대로, 기질에 대한 균주의 친화도가 작을수록(즉, K_m 값이 클수록) 최대성장속도는 작았다. *A. thiooxidans* AZ11, MET 및 TAS의 최대성장속도는 각각 0.33, 0.30, 0.45 d⁻¹이었고, K_m 값은 각각 2.05, 4.36, 0.49 g L⁻¹이었다.

배양 시간별 비성장속도에 미치는 황산염의 영향

배지에 S⁰를 30 g L⁻¹ 첨가한 조건에서, 시간에 따라 배지에 축적된 각 황산염 농도별로 *A. thiooxidans* AZ11, MET 및 TAS의 비성장속도를 계산하여 Fig. 2에 도시하였다. AZ11의 경우, 배지 내에 축적된 황산염의 농도가 20에서 40 g L⁻¹로 증가하였음에도 불구하고 높은 비성장속도(0.039 d⁻¹)를 유지하였다. 또한, 황산염이 농도가 50 g L⁻¹를 초과하는 조건에서도 상대적으로 높은 비성장속도를 보였다. MET는 초기에 최대 비성장속도를 보이다가 황산염이 축적됨에 따라 비성장속도도 점차적으로 감소하여 축적된 황산염의 농도가 40 g L⁻¹에 도달하였을 때에는 생장이 완전히 저해를 받았

Table 1. Comparison of sulfur oxidation rate and specific growth rate.

Strain	Sulfur oxidation rate		Specific growth rate	
	Maximum sulfur oxidation rate (V_{max} , g-S L ⁻¹ d ⁻¹)	Saturation constant (K_m , g L ⁻¹)	Maximum specific growth rate (μ_{max} , d ⁻¹)	Saturation constant (K_m , g L ⁻¹)
AZ11	1.88	12.82	0.33	2.05
MET	1.38	8.56	0.30	4.36
TAS	0.43	0.23	0.45	0.49

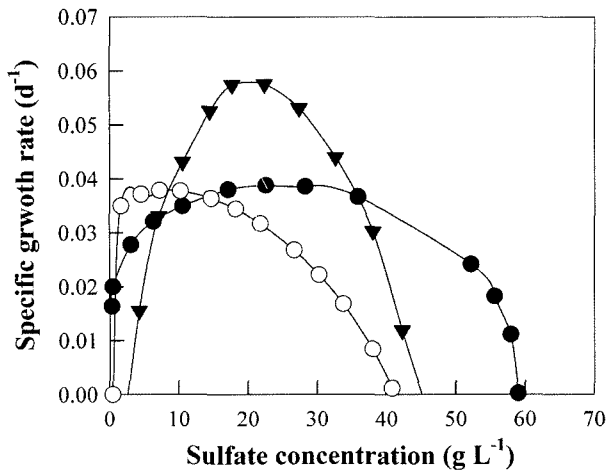


Fig. 2. Effect of sulfate concentrations on specific growth rates of *A. thiooxidans* AZ11, MET and TAS. ●, AZ11; ○, *A. MET*; ▼, TAS.

다. 반면, TAS의 경우, 황산염이 22 g L⁻¹까지 축적 되었을 때 비생장속도는 0.058 d⁻¹까지 증가하였으나, 황산염의 농도가 43 g L⁻¹ 조건에서는 생장이 불가능 하였다. 배지에 축적된 황산염에 의해 각 균주의 생장이 저해 받기 시작하는 황산염 농도는 AZ11이 23 g L⁻¹, TAS가 22 g L⁻¹, MET가 10 g L⁻¹ 이었다. 또한, 각 균주의 최대 생장이 50%로 저해될 때의 황산염 농도는 AZ11이 55 g L⁻¹, TAS가 39 g L⁻¹, MET가 32 g L⁻¹로, 황산염에 대한 내성은 AZ11이 가장 크고 MET가 가장 작은 것으로 평가되었다.

본 연구에서는 다양한 기질 농도에서의 각 균주의 생장특성을 비교함으로써 탈취 균주 및 생물제련에 이용되는 황산화 세균의 최적 균주 활성을 얻는데 필요한 정보를 얻을 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 차세대바이오환경기술연구센터(AEBRC, R11-2003-006)의 지원을 받아 수행하였으며, 이에 감사드립니다. 또한, 본 연구를 수행하는데 많은 도움을 준 이내윤 박사에게 감사드립니다.

REFERENCES

- Atlas, R. M. and R. Bartha. 1993. *Microbial ecology - Fundamentals and application* - pp. 323-599. 3rd ed. The Benjamin/Cummings publishing company, USA.
- Brock, T. D., D. W. Smith, and M. T. Madigan. 1984. *Biology of microorganisms*, pp. 209; 260; 433-434; 712-714. 4th ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, USA.
- Larkin, J. M. 1980. Isolation of *Thiotrix* in pure culture and

- observation of a filamentous epiphyte on *Thiotrix*. *Curr. Microbiol.* **4**: 144-158.
- Nelson, D. C. and H. W. Jannasch. 1983. Chemoautotrophic growth of a marine *Beggiatoa* sulfide-gradient cultures. *Arch. Microbiol.* **136**: 262-269.
- Zhang, L., M. Hirai, and M. Shoda. 1991. Removal characteristics of dimethyl sulfide, methanethiol and hydrogen sulfide by *Hyphomicrobium* sp. 155 isolated from peat biofilter. *J. Ferment. Bioeng.* **72**: 392-396.
- Steinmetz, M. A. and U. Fisher. 1982. Cytochromes of the green sulfur bacterium *Chlorobium vibrioforme f. thiosulfatophilum*. Purification, characterization and sulfur metabolism. *Arch. Microbiol.* **131**: 19-26.
- Gray, G. O. and J. G. Knaff. 1982. The role of a cytochrome *c*-552-cytochrome *c* complex in the oxidation sulfide in *Chromatium vinosum*. *Biochim. Biophys. Acta* **680**: 290-296.
- Then, J. and H. G. Truper. 1983. Sulfide oxidation in *Ectothiorhodospira abdelmalekii*. Evidence for the catalytic role of cytochrome *c*-551. *Arch. Microbiol.* **135**: 254-258.
- Brume, D. C. and H. G. Truper. 1986. Noncyclic electron transport in chromatophores from photolithotrophically grown *Rhodobacter sulfidophilus*. *Arch. Microbiol.* **145**: 295-301.
- Chung, Y. C., C. Huang, and C. P. Tseng. 1996. Biodegradation of hydrogen sulfide by a laboratory-scale immobilized *Pseudomonas putida* CH11 biofilter. *Biotechnol. Prog.* **12**: 773-778.
- Cho, K. S., M. Hirai, and M. Shoda. 1992. Degradation of hydrogen sulfide by *Xanthomonas* sp. strain DY44 isolated from peat. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1183-1189.
- Lee, E. Y., N. Y. Lee, K. S. Cho, and H. W. Ryu. 2006. Removal of hydrogen sulfide by sulfate-resistant *Acidithiobacillus thiooxidans* AZ11. *J. Biosci. Bioeng.* **101**: 309-314.
- Ryu, H.W., H. S. Moon, E. Y. Lee, K. S. Cho, and H. Choi. 2003. Bioremediation and biodegradation-leaching characteristics of heavy metals from sewage sludge by *Acidithiobacillus thiooxidans* MET. *J. Environ. Qual.* **32**: 751-759.
- Lee, E. Y., K. S. Cho, and H. W. Ryu. 2005. Simultaneous removal of H₂S and NH₃ in a biofilter inoculated with *Acidithiobacillus thiooxidans* TAS. *J. Biosci. Bioeng.* **99**: 611-615.
- Cadenhead, P. and K. L. Sublette. 1989. Oxidation of hydrogen sulfide by *Thiobacilli*. *Biotechnol. and Bioeng.* **35**: 1150-1154.
- Shule, M. L. and F. Kargi. 1992. *Bioprocess engineering - Basic concepts* -, pp. 61-67. Prentice Hall International Series, USA.
- Finster, K., W. Liesack, and B. Thamdrup. 1998. Elemental Sulfur and thiosulfate disproportionation by *Desulfocapsa sulfoexigens* sp. nov., an new anaerobic bacterium isolated from marine surface sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 119-125.

(Received Aug. 2, 2006/Accepted Oct. 1, 2006)