

農畜産 廢棄物 處理를 爲한 低溫耐性 메탄 生成菌의 特性에 關한 研究

1. 低溫條件에서 試料別 메탄 生成機作 研究

鄭光溶* · 金才正**

Study on Low Temperature Tolerant Methane-Producing Bacteria for the Treatment of Agricultural and Livestock Wastes

1. Methanogenesis in Soils and Sediments at Low Temperature

Kwang-Yong Jung*, Jai-Joung Kim**

Abstract

The Study was conducted to develop the low temperature tolerant methane-producing bacteria(LTTB) and to increase the efficiency of anaerobic fermentation for the treatment of agricultural and livestock wastes at low temperature. The samples were collected from muddy soil, water logged sediment, organic layer and anaerobic sludge at three latitudes, 34.8~37.4 °N(Korea), 41.4 °N(USA) and 54.5~56.9 °N(Canada). They were used for determination of the methanogenesis rates for isolation and identification of the LTTB.

The methanogenesis rate of samples at low temperature were higher in the cellulose medium than methanol medium. The methanogenesis rate in the samples of subarctic region were 15~19 moles/ml during 30 days at low temperature(8 °C), whereas not detected in the samples of temperate region. The methanogenesis rate in the enrichment culture of subarctic samples were inhibited by the 40 µg/ml of streptomycin + vancomycin or ampicillin + oleandomycin which were not effect to the methanogens. An inhabitation of high temperature tolerant methane producing bacteria was identified in the samples of temperate region, whereas that of the LTTB growing at 8~13°C was identified in the subarctic region.

* 農村振興廳 農業技術研究所
Agricultural Sciences Institute, R.D.A. Suwon, Korea
** 忠北大學校 農科大學
College of Agriculture, Chungbuk National University

緒 言

農畜産 廢棄物 처리를 위한 嫌氣 醱酵施設은 시설비 및 운영비가 低廉하여 선진각국이나 熱帶地域에서는 오래 전부터 家畜糞尿 處理에 활용하고 있으며 附隨的으로 발생되는 가스를 代替 에너지로 이용할 수 있는 長點이 있다.¹⁾ 廢棄物の 嫌氣性 處理 效率은 메탄 生成菌 活性과 密接한 관련이 있어서 生産된 가스중의 CH_4 濃도와 발생량으로 醱酵效率을 豫測할 수 있다.²⁾ 嫌氣 醱酵槽에서 분리되는 메탄菌들은 주로 中溫性菌이므로 $20^\circ C$ 이하에서는 그 활성이 급격히 낮아지므로 저온기에는 嫌氣 醱酵施設의 稼動에 어려움이 있어 이를 克服하기 위해 低溫에서도 활성을 갖는 메탄 生成菌株의 개발이 요구되고 있다.³⁾

Whitmen⁴⁾ Ziekus⁵⁾는 現在까지 分離된 메탄菌들은 주로 高溫性菌과 中溫性菌들이라 하였고, Koyama⁶⁾, Matsuyama 등³⁾, Svensson⁷⁾은 低溫에서도 CH_4 가 生成됨을 확인하고 低溫性 메탄菌이 있음을 주장하였으나 分離는 이루지 못하였다고 하였다. 最近 Svensson⁷⁾은 亞寒帶 地域의 Peat층에 存在하는 메탄 生成菌의 集積培養(enrichment culture)을 위해 acetate를 添加하였을 때 $20^\circ C$ 에서, 그리고 $H_2 + CO_2$ 가스를 添加하였을 때는 $28^\circ C$ 에서 각각 CH_4 生成量이 最大에 달함을 究明하고 比較的 低溫에 生育하는 메탄菌이 存在함을 確認하였다. 現在까지 分離된 메탄菌중에서 生育適溫이 $30^\circ C$ 이하인 菌株는 海底 堆積物에서 分離된 *Methanogenium cariaci*와 *Methanogenium maricinigri*가 있을 뿐이다.⁴⁾

따라서 本研究은 低溫期の 嫌氣醱酵 效率을 增進코저 低溫耐性 메탄 生成菌의 深索과 分離 利用에 目的을 두고 우리나라 中部 地域과 美國의 中北部 地域 그리고 캐나다 中北部(亞寒帶) 地域을 對象으로 메탄菌이 存在하리라 생각되는 場所에서 寒冷期에 試料를 採取하여 低溫耐性 메탄 生成菌의 分佈를 파악하고 이중 活性이 높은 메탄 生成菌株를 分離하여 菌學的 性질을 調査하는 한편 低溫에서 이들 菌의 COD, BOD, VS 등의 汚染源 分解 정도와 메탄가스 發生量 등을 究明하였다.

材料 및 方法

1. 試料 採取地點 및 採取方法

우리나라에서 採取한 試料는 京畿, 忠南, 全北 및 全南地域의 논土壤, 호수 堆積物, 河川 堆積物, 有機性 廢棄物, 갯벌등에서 2~4 월경에 採取하였고 試料 採取地點의 溫度는 $3.5 \sim 13^\circ C$ 範圍로 낮았다. 亞寒帶 地域의 試料는 캐나다 Manitoba 州 北緯 $54.6 \sim 56.9$ 度 地域의 寒冷地方(地溫이 $15^\circ C$ 가 넘는 날이 15일 未滿)에서, 採取地點의 溫度는 $1.2 \sim 5.8^\circ C$ 範圍인 10월 초순에 森林 地域의 有機物層, 호수 堆積物, 늪지대 堆積物, 진흙등에서 採取하였다. 美國의 試料는 Iowa 州 北緯 45 度 地域에서 11월 初旬에 水溫이 $6.8^\circ C$ 인 河川 堆積物을 채취하였다. 試料채취방법은 플라스틱 試료용기 또는 試료 채취용 파이프를 採取하였다. 實驗室에 運搬된 試料는 試驗前까지 $3^\circ C$ 冷藏室에 保存하면서 實驗에 使用하였다. 採取 試料의 種類와 生理化學的 特性은 表 1과 같다.

試料 自體의 가스 發生量 測定은 250ml 삼각 후라스크에 採取한 試料 50g을 넣고 蒸溜水 20ml를 채운 후 후라스크를 고무마개로 막고 $13^\circ C$ 恒溫器에서 2주일간 醱酵시켰다. 이 期間에 發生되는 총 가스량은 매일 가스 測定用 주사기로 測定하였다.

2. 溫度 및 基質의 種類別 메탄 生成量 測定

本 試驗에 使用된 培地는 Laube 등⁸⁾의 Cellulose 培地와 Pine 등⁹⁾의 methanol 培地를 사용하였다. 1ℓ 삼각 후라스크에 調製된 培地를 넣고 $N_2 + CO_2$ 가스를 飽和 시키면서 Na_2CO_3 로 pH를 6.7로 調節하였다. pH가 調節된 培地는 500ml 들이 血清容器에 150ml 씩 분주하고 고무 마개와 aluminium seal(Wheaton Scientific, No. 224187)로 密封한 후 methanol 培地는 $H_2 + CO_2$ (80:20, v/v)가스, cellulose 培地는 $N_2 + CO_2$ (80:20, v/v) 가스를 이용하여 嫌氣性菌 操作을 위해 特別히 製作한 嫌氣裝置에서 嫌氣培地를 만들었다. 嫌氣가스 bombe와 眞空펌프에 연결된 가지가 여러개 달린 가스 噴射管에 培地가 분주된 容器를 連結하고 5분간 眞空펌프로 容器내의 가스를 뽑아내고 30초간 嫌氣가스를 注入하는 操作을 3회 以上하고, 容器내 嫌氣가스 壓力이 7 psi가 되도록 유지한후 培地 内에는 還元劑인 $Na_2S \cdot 9H_2O$ 를 最終濃도가 2 mM이 되도록 주사기로 嫌氣狀態에서 注入

Table 1. General description of samples

No	Samples	Temp. (°C)	Moist. (%)	pH	OM (%)	CH ₄ ¹	C.A. ²
1.	Poorly drained soil I (Korea, 37.4 °N)	3.5	67	5.50	4.01	13	±
2.	Tidal land soil (Korea, 37.0 °N)	5.1	60	7.45	2.37	56	+
3.	Lake sediment I (Korea, 37.4 °N)	5.0	69	6.86	5.20	5	-
4.	Lake sediment II (Korea, 35.0 °N)	6.3	62	6.50	4.36	25	±
5.	River soil (Korea, 35.0 °N)	6.5	61	6.50	3.46	3	-
6.	Paddy soil I (Korea, 34.8 °N)	5.5	55	6.36	3.20	20	±
7.	Municipal waste water(Korea, 34.7 °N)	5.6	68	7.00	6.56	2	-
8.	River sediment I (Korea, 35.9 °N)	6.7	66	6.69	4.15	119	+
9.	Poorly drained soil II (Korea, 35.9 °N)	5.8	61	6.00	3.16	63	+
10.	Muddy soil I (Korea, 36.8 °N)	4.7	62	5.40	4.36	60	+
11.	Tidal land soil II (Korea, 37.0 °N)	5.8	57	7.70	3.07	155	+
12.	Muddy soil II (Korea, 36.8 °N)	7.5	64	6.56	3.17	40	+
13.	Paddy soil II (Korea, 37.1 °N)	6.3	57	6.61	3.01	77	+
14.	Tidal land soil III (Korea, 37.6 °N)	4.8	62	7.55	4.77	151	+
15.	Anaerobic sludge (Korea, 37.4 °N)	13.0	97	7.05	4.00	120	+
16.	Forest organic layer (Canada, 55.8 °N)	1.2	58	5.88	43.39	10	±
17.	Forest soil I (Canada, 55.7 °N)	1.8	23	5.61	20.30	15	-
18.	Lake sediment III (Canada, 55.8 °N)	2.0	62	8.30	5.58	8	-
19.	Swampy organic layer I (Canada, 56.6 °N)	1.5	85	4.90	85.28	240	±
20.	Forest soil II (Canada, 56.9 °N)	3.0	60	5.01	37.46	10	-
21.	Swampy sediment (Canada, 56.9 °N)	5.0	83	6.80	22.92	1168	+
22.	Swampy organic layer II (Canada, 56.9 °N)	5.0	93	5.54	79.79	580	+
23.	Forest soil III (Canada, 56.9 °N)	3.0	12	4.48	6.22	1	-
24.	Lake sediment IV (Canada, 55.0 °N)	2.0	36	6.82	3.04	960	±
25.	Muddy Soil II (Canada, 55.4 °N)	5.4	59	6.94	15.79	400	+
26.	Muddy soil IV (Canada, 54.5 °N)	6.0	30	8.10	7.12	420	±
27.	Swampy organic layer III (Canada, 54.6 °N)	5.0	66	6.28	25.81	120	+
28.	Muddy soil V (Canada, 54.6 °N)	5.4	69	7.41	80.88	40	+
29.	Organic soil (Canada, 54.7 °N)	5.8	79	5.37	80.54	10	-
30.	River sediment II (USA, 41.4 °N)	6.8	37	7.54	6.11	125	±

¹ Methane producing rate at 13°C (ml/50 g-samples/2-weeks)² Cellulase activity

°N : the north latitude

하였다. 주사기 내부에 있는 微量의 酸素는 anaerobic water를 利用하여 제거 시켰다.

培地 種類別 CH₄發生量 測定은 cellulose와 methanol 培地를 이용 하였다. Cellulose 培地는 嫌氣 glove bag 내에서 2.5ml의 자연상태 試料를 57ml 血清容器(Bellico Glass)에 주사기로 注入한 후 고무마개(Bellico Glass, aluminium seal rubber stopper No.2048-11800)와

aluminium seal(Wheaton Scientific No. 224183)로 密封 하였다. 그 다음 試料가 든 容器는 미리 준비한 cellulose 培地 20ml를 滅菌된 30ml 들이 주사기로 容器마다 20ml씩 注入하였다. 培地 注入이 끝난 후 容器는 위와 같이 가 지가 여러개 달린 嫌氣裝置에 連結하여 N₂+CO₂ (80:20, v/v)가스로 3분간 容器내의 가스를 불어내고 最終 가 스壓力이 매 3日 間隔으로 N₂+CO₂ 가스를 20 psi로 再

注入시켰다. Methanol培地는 5.0ml의 試料를 위와같은 방법으로 250 ml 들이 血清容器(Wheaton Scientific, No. 223950)에 注入한 후 고무마개를하고 30 mm aluminium seal(Wheaton Scientific, No.224187)로 密封 하였다. Methanol 培地에 사용한 가스는 $H_2+CO_2(80:20,v/v)$ 로서 가스의 置換과 壓力 및 恒溫方法은 cellulose 培地와 同一하게 하였다.

溫度別 試料의 가스 發生量 測定은 嫌氣 glove bag 내에서 試料 1ml를 試驗管(Bellco Glass, aluminium seal tubes No.2048-00510)에 上記의 같이 넣은 후에 密封하고 別도 준비한 cellulose와 methanol 培地를 10ml 씩 주사기로 注入하였다. 培地가 注入된 후에 cellulose 培地는 $N_2+CO_2(80:20, v/v)$ 가스 그리고 methanol 培地는 $H_2+CO_2(80:20, v/v)$ 가스로 加壓한 후 3, 8, 13, 20, 25, 30, 37 및 50℃에서 30일간 醱酵시켰다. 試驗管내의 壓力은 매 3일 간격으로 20 psi로 再注入 하였다. 이상의 모든 조작은 2 반복으로 수행 하였다.

3. 메탄 菌群의 特性調査

늪지 堆積物(Canada, 56.9 °N)에서 얻은 混合 菌株에 대한 抗生劑의 影響을 檢討하기 위하여는 methanol 培地에 streptomycin, vancomycin, ampicillin, oleandomycin 을 40 µg/ml로 使用하였으며, 母菌接種 직전에 membrane filter(0.22 µm)를 이용하여 無菌狀態로 注入하였다. 이상의 모든 操作은 앞에서 言及한 嫌氣培養法에 準하여 실시 하였다.

4. 分析方法

水分 含量은 105℃에서 1일간 乾燥한 후 減少된 水分量을 測定하였다. pH는 水分이 많은 試料는 現場에서 직접 측정하고, 現場에서 測定 할 수 없는 試料는 實驗室에서 測定 하였다. 試料중의 有機物 含量은 Tyurins 法¹⁰⁾에 準하였으나 有機物이 많은 試料는 Standard methods¹¹⁾에 따랐다. 試料의 cellulase 活性度는 試料 2ml 물 27ml 試驗管에 넣고 蒸溜水 5ml 와 whatman No. 1 여과지를 1×6cm로 잘라 넣은후 密封하고 $N_2+CO_2(80:20,v/v)$ 가스로 置換한 후 20℃ 恒溫器에서 2주일간 保存하여 濾過紙가 崩壞된것은 +, 崩壞되지 않은

것은 -로 표시 하였다.

가스 分析은 Shimadzu GC 6-A 와 Shimadzu GC 9-A를 사용 하였으며 分析條件은 아래와 같다. Column은 porapak R을 충전한 stainless column(3mm × 1m)을 이용하였고 detector는 flame ionization detector 이었으며 detector 溫度는 100℃, column 溫度는 50℃로 설정 하였다. Hydrogen, Air, Helium의 流速은 각각 70, 500, 60 ml / min.으로 調節 하였다.

結果 및 考察

각 試料의 特性은 表 1과 같이 각기 달라 pH가 4.5~8.1, 有機物含量이 2.4~85.3%로서 큰 차이가 있었다. 採取 당시의 溫度는 嫌氣 醱酵液(Korea, 37.4 °N)의 13℃를 除外하고는 10℃ 以下로 낮았다. 또한 水分 含量도 土壤試料는 一般的으로 낮은 반면 늪지 試料들은 有機物을 多量 含有하므로 水分含量도 높아 12~97%로 多樣하였다.

試料 50g를 2주일간 13℃에 恒溫한 결과 가스 發生量도 1-1168ml로 試料別 큰 差異가 있었다. 또한 cellulase 活性이 높았던 試料에서 CH_4 의 生成量도 높았고 cellulase 活性이 觀察되지 않았던 試料들은 CH_4 의 活性이 없는 점으로 보아 메탄菌은 일반細菌과 共生關係에 있음을 알 수 있다.¹²⁾ Cellulase 活性은 높으나 가스發生量이 낮은 試料는 cellulose 分解菌은 存在하나 메탄菌群의 缺如에 基因된 것으로 생각된다. 또한 試料중의 水分含量은 가스 發生量과 큰 關聯이 없으나 가스 發生量이 높았던 5개 試料(NO.21,22,24,25,26)의 水分含量은 35% 以上 이므로 메탄菌의 棲息에 必要한 還元條件을 유지하기 위하여 水分은 絶對的으로 必要한 要因임을 暗示하고 있다.¹³⁾

表 1에서 가스 發生量이 가장 높았던 亞寒帶地域인 캐나다 中北部 北緯 56度 地域의 湖水 堆積物과 국내 시료인 嫌氣 醱酵槽 廢液을 選擇하여 cellulose 培地와 methanol 培地를 利用하여 8℃와 13℃에서 30일간 CH_4 發生量을 調査한 成績은 그림 1과 같다. 試料를 8℃에 培養하였을때 cellulose 培地에서 亞寒帶地域의

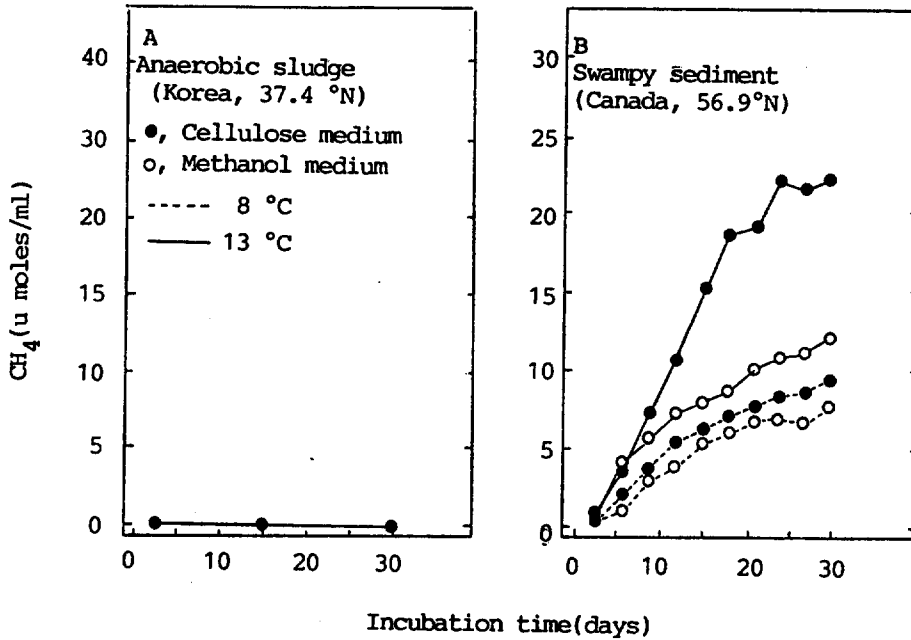


Fig 1. Methanogenesis by enrichment culture inoculated with various samples. Cellulose medium was under a N_2+CO_2 (80:20,v/v) gas phase, and methanol medium was under a H_2+CO_2 (80:20,v/v)

늪지 堆積物(Canada, 56.9 °N)이 18.6 μ moles/ml 이었 으며 methanol 培地에서도 동일 試料에서 15.4 μ moles/ml로서 10°C 以下의 낮은 溫度인 메탄 醱酵 限界溫度¹⁴⁾ 以下에棲息하는 菌株의 生態가 確認되었다. 國內 試料인 메탄 醱酵液(Korea, 37.4 °N)은 8°C 또는 13°C에서도 메탄菌의 活性이 없었으며 全般的으로 低溫에서의 CH_4 發生은 亞寒帶 地域인 캐나다의 늪지 堆積物(56.9 °N)에서 높았다.

앞에서 試驗한 30개 試料중 4개 試料에 대하여 3~ 50°C 範圍에서 溫度別 CH_4 發生量을 10일 間隔으로 調査한 結果는 그림 2와 같다. 國內 試料인 排水 不良 壤土 II (Korea, 35.9 °N)은 cellulose 培地에서는 30일, 37°C 에서만 약간의 CH_4 가 檢出되어 嫌氣醱酵에서 메탄菌에 基質을 제공하는 纖維素 이용, 酸 生成菌이 存在하지 않는것은 Laube 등⁸⁾ 의 보고와 일치되었으며, methanol 培地에서는 50°C, 30일에 약 660 μ moles/ml 에 달해 高溫菌이 存在함을 암시하고 있으며, 嫌氣 醱酵液(Korea, 37.4 °N)도 cellulose 培地에서 恒溫 10, 20일

후, 50°C에서 가스 發生量이 가장 많았고 30일 후에는 37°C에서 각각 높았다. 그러나 methanol 培地에서의 絶對 CH_4 發生量이 cellulose 培地보다 많았을 뿐만 아니라 50°C에서 각각 높은 것으로 보아 高溫性 메탄菌이 있음을 알 수 있다.

亞寒帶地域 試料인 늪지 堆積物 (Canada, 56.9 °N)은 cellulose 培地에서 恒溫 10, 20, 30일 후에 다같이 37°C에서 CH_4 生成量이 높았으나 3 時期 다같이 25°C와 37°C에서 特徵的인 두 개의 CH_4 peak를 나타내 生育溫度가 상이한 두 菌群이 있음을 알 수 있다. 그러나 methanol 培地에서 10일 후에는 37°C, 20일 후에는 30°C, 그리고 30일 후에는 25°C에서 각각 CH_4 發生量이 높아서 最大 CH_4 生成點이 時期別로 바뀌고 있다.

亞寒帶와 溫帶의 中間 地域인 美國 Iowa 試料은 37°C에서 最大 CH_4 가 生成될 뿐 아니라 國內 試料보다 最低 CH_4 生成溫度도 더 낮았으며, 캐나다 試料은 50°C에서 國內 또는 美國 試料과 같이 CH_4 生成이 안되며 Iowa 試料보다 最低 CH_4 生成溫度가 더 낮았다.

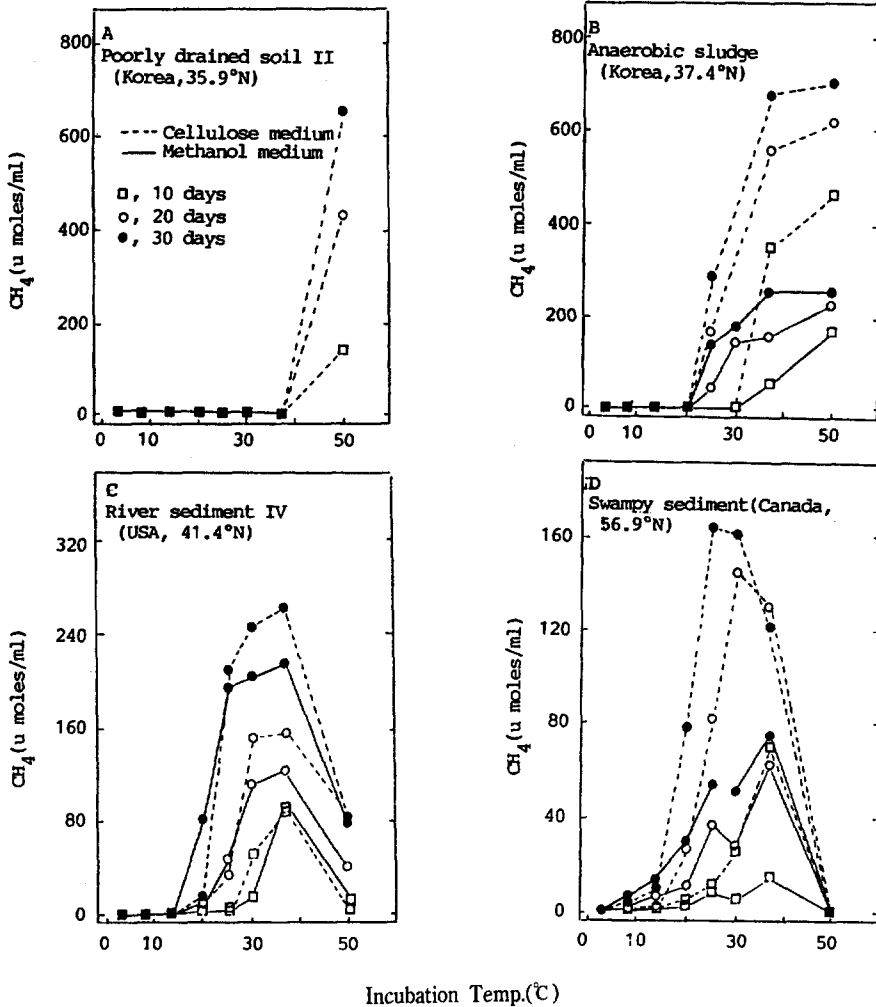


Fig 2. The effect of temperature on methanogenesis in cellulose or methanol enrichment culture inoculated with various samples. Cellulose medium was under a N₂+CO₂ (80:20,v/v) gas phase, and methanol medium was under a H₂+CO₂ (80:20,v/v)

특히 늪지 퇴적물(Canada, 56.9 °N)은 25℃와 37℃ 두 개의 peak를 나타내고 있어自然界에서 메탄균은 棲息地에 따라 生育溫度 範圍가 상이함을 알수 있다. Svensson⁷⁾도 亞寒帶 地域에서 低溫에 적응하여 生育溫度가 既存의 메탄균보다 낮은 메탄균이 있음을 확인한 바 있다. 本 研究 에서도 Svensson⁷⁾의 報告와 같이 캐나다 試料는 年中 地溫이 15℃를 넘는 期間이 15일

미만인 地域의 試料를 對象으로 하였기 때문에 試料중에는 低溫에 馴化된 菌이 包含되어 있기 때문에 生 각된다.

그림 3에는 北緯 56度 地點인 캐나다 Manitoba 州 늪지 堆積物, 41度 地點인 Iowa 河川 堆積物 II, 그리고 國內의 37度 地點인 메탄 醱酵槽의 醱酵液의 溫度別 CH₄ 發生 量을 相對 활성치로 나타냈다. 相對 活性는 37℃를 基

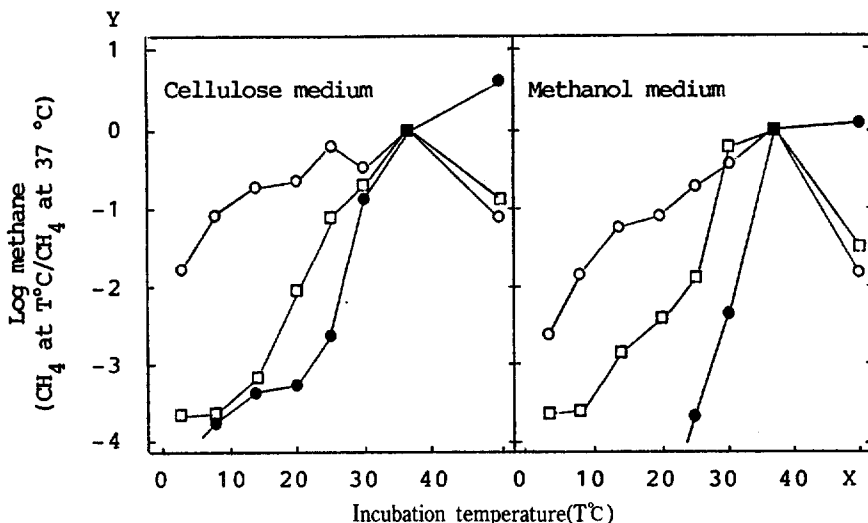


Fig 3. Relative activity of enrichment culture to produce methane at different temperatures. The values on the Y axis are a ratio calculated from amount of methane produced at a given temperature divided by the amount of methane produced at 37°C. Anaerobic sludge(Korea, 37.4 °N), ●; River sediment II (USA, 41.4 °N), □; Swampy sediment (Canada, 56.9 °N), ○.

準으로 계산 하였으며, cellulose 培地에서 3°C CH₄ 發 生量을 比較해 보면 늪지 堆積物(Canada, 56.9 °N)은 37°C의 CH₄ 發 生量보다 63배, 河川 堆積物 II(USA, 41.4 °N)은 4,641 배 그리고 메탄 醱酵液(Korea, 37.4 °N) 은 42,613 배가 낮았으며, Methanol 培地에서는 413, 4,421 및 88,270 배가 각각 낮았다. 반대로 37°C와 50°C 의 差異를 보면 50°C, cellulose 培地에서는 늪지 堆積物 (Canada, 56.9 °N)은 14.7 배, 河川 堆積物 II (USA, 41.4 °N)은 6.8배가 37°C 보다 낮았고 methanol 培地는 70배와 33배가 각각 낮아 亞寒帶 地域의 試料는 高溫에서 相對活性이 낮으나 低溫에서는 높게 나타나고 있다. 그 結果 溫帶地域인 北緯 37度 地域의 國內 試料는 50°C가 37°C 보다 cellulose 培地에서는 3.23 배 그리고 methanol 培地에서는 1.3배가 각각 높았다.

늪지 堆積物 (Canada, 56.9 °N)에서 分離한 메탄 生 成菌群에 대한 抗生劑 耐性を 檢定한 結果는 그림 4와 같았다. 檢定後 6일까지는 抗生劑에 의한 메탄菌의 生育 沮害가 나타나지 않았으나 8일 이후 부터는 沮害되어 14 일차에는 streptomycin + vancomycin 處理로 67%

그리고 ampicillin + oleandomycin 處理로는 57%가 각각 沮害 되었다. 本 試驗에 사용한 抗生劑들은 메탄菌의 選擇培養에 사용되는 抗生劑들로서 메탄菌의 細胞膜 脂質構造의 特異性 때문에 메탄菌의 生育은 沮害하지 않는 成分으로 알려져 있으며⁵⁾ Belay 등⁶⁾ Bock 등⁵⁾ 은 抗生劑를 메탄菌 分離를 위한 選擇培養에 이용할 수 있다고 하여 메탄菌의 生育이 抗生劑에 의해 沮害되지 않음을 報告한바 있다. 그러나 本 試驗에서는 40μg/ml 의 抗生劑 처리에 의해 57~67%의 CH₄生成이 抑制되어 메탄 生成菌群내에 抗生劑에 영향을 받는 메탄 生成菌이 있음을 암시 하고있다.

亞寒帶 地域(Canada, 54.5~56.9 °N)의 試料에는 10°C 이하 또는 10°C 부근의 實驗室 조건에서 많은량의 CH₄ 가 檢出 되었으며 (그림 1), 3°C 의 低溫에서도 그 量은 적으나 測定이 가능한 量의 CH₄가 生成 되었다. 반대로 北緯 41 度의 美國 Iowa 試料로 부터는 3°C 또는 8°C 에서 캐나다의 亞寒帶 試料보다 훨씬 적은 量의 CH₄가 檢出 되었다. 北緯 34.8~37.4 度의 國內試料로 부터는 10°C 부근의 低溫에서 CH₄가 檢出되지 않았으며, 20°C

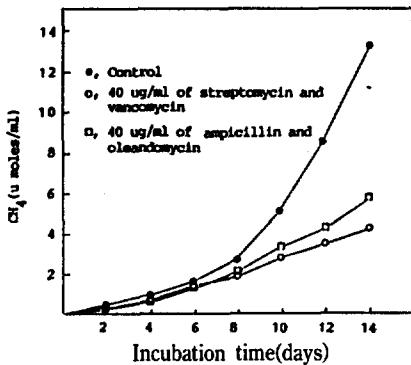


Fig 4. Effect of antibiotics on methanogenesis rate of enrichment culture of swampy sediment (Canada, 56.9 °N). Medium was methanol and temperature was at 13°C.

에서도 30일간 극히 微量의 CH₄만이 檢出 되었다. 특히 高溫性 嫌氣醱酵 溫度 範圍인 50°C 근처에서 國內試料는 전반적으로 CH₄의 生成이 旺盛하였던 반면에 캐나다의 亞寒帶 地域의 試料는 50°C에서 극히 微量의 CH₄가 檢出되었고, 미국의 Iowa 試料는 이들의 중간적 성질을 띠고 있어서 地域間的 差異가 뚜렷이 나타났다(그림 2). 本 試驗 結果들을 Svensson⁷⁾의 報告와 比較할때 메탄 生成菌은 自然環境에 馴化되어 棲息 할 수 있다는 假定을 可能하게 하며, 이는 Svensson⁷⁾도 言及한 바 있다. 한편 그림 3을 Svensson⁷⁾의 研究結果와 比較하면 北緯 37 度의 國內 試料 中에는 50°C 에 生育하는 高溫菌, 北緯 41~57度(USA and Canada) 地域에는 37°C 의 中溫菌 그리고 北緯 68度 (Sweden) 地域에는 24~28°C 의 比較的 低溫에 生育하는 메탄 生成菌의 存在가 確因되고 있다. 이는 Koyama⁶⁾, Zeikus 등¹⁷⁾의 報告에 의해서도 確認되고 있으며, Zeikus 등¹⁷⁾은 美國에 위치한 호수 堆積物에서 生育適溫이 35~40°C 사이인 메탄菌의 存在를 報告한바 있고, Koyama⁶⁾는 일본의 논 土壤은 40°C 이상에서 메탄의 活性이 높았다고 하여 地域間 메탄 生成菌의 生育溫度가 다를을 알 수 있다.

試驗에 사용한 基質의 종류에 따라서도 차이가 커서 低溫인 13°C 이하에는 methanol 培地 보다 cellulose 培地에서 CH₄ 發生量이 높는데 이는 CH₄ 生成에 既存 메탄菌의 탄소원인 methanol, acetate, H₂+CO₂ 이외의

다른 營養源을 요구하거나 또는 메탄菌이 아닌 일반 嫌氣細菌에 의한 CH₄ 生成作用에 基因된 Stetter 등¹⁸⁾, Matens 등¹⁹⁾의 연구결과와 같았다. 따라서 캐나다의 늪지 堆積物(Canada, 56.9 °N)을 methanol 培地에 數回 集積 培養한후 일반細菌의 生育을 阻害하며^{15, 20)} 메탄 菌에는 影響을 주지 않는 抗生劑를 處理하고 13°C에 培養시킨 결과 CH₄의 生成이 현저히 抑制되는 점으로 보아 低溫에서는 메탄菌 이외에 일반細菌들에 의한 CH₄ 生成도 크게 寄與된다고 생각된다. 低溫菌(psychrophilic) 또는 低溫性菌(psychrotrophic)에 관한 研究는 주로 일반細菌들을 대상으로 遂行된 것들이며^{20, 22)} 低溫 또는 低溫性 메탄菌에 관한 研究는 몇몇 研究者들에 의해 試圖된바 있으나 (小山, 미발표; 松山, 미발표; 鄭, 미발표) 現在까지 報告된바 없는 實定이다.

摘 要

本 研究는 低溫期의 農畜產 廢棄物 처리를 위한 嫌氣醱酵 效率을 增進코저 低溫에 耐性을 갖는 메탄 生成菌株를 開發하여 醱酵 母菌으로 이용하려 하였다. 試驗에 사용한 試料는 北緯 34.8~37.4 度의 國內, 北緯 41.4 度 地域인 美國의 中北部 및 北緯 54.5~56.9 度의 캐나다 亞寒帶 地域의 土壤, 늪지 堆積物, 水中 堆積物 및 有機物 堆積層 등을 採取하여 사용하였다. 採取된 試料는 低溫 條件에서 메탄 生成量의 測定, 低溫耐性 메탄 生成菌의 生態의 特性을 調査하였으며 그 結果는 다음과 같다.

1. 低溫에서 메탄 生成量은 Cellulose 培地가 Methanol 培地보다 더 높았다.
2. 低溫(8°C)에서의 CH₄ 發生量은 亞寒帶 地域 늪지 堆積物에서 30일 동안에 15~19 μ moles/ml 로 높았으나 溫帶地域 試料에서는 檢出되지 않았다.
3. 亞寒帶 地域 試料(캐나다, 54.5 °N)의 집적 培養液에 메탄 生成菌에 影響을 주지 않는 40 μg/ml의 Streptomycin + Vancomycin 또는 Ampicillin + Oleandomycin 처리로 CH₄ 生成量이 57~67% 抑制되었다.
4. 溫帶地域 試料에는 高溫에 耐性을 갖고 있는 메탄 生成菌株가 있으며, 亞寒帶 地域의 試料에는 高溫

性菌이 存在하지 않는 반면에 8~13°C 의 低溫에 耐性を 갖는 메탄 生成菌株의 존재를 확인할 수 있었다.

引用文獻

1. Hashimoto, A. G. 1983. Commercialization of anaerobic digestion technology in the united states of america, in "Third international symposium anaerobic digestion." Evans and Faultner. Incorporated Watertown. Massachusetts USA., 437~447.
2. 鄭光溶, 朱永熙, 金才正. 1989. 뱃짚의 嫌氣分解에 關여하는 纖維素 分解菌과 메탄生成菌相 및 그 分解生成物에 關한 研究. 韓土肥誌. 22(4):323~328.
3. Matsuyama, H., and K. Izumi. 1988. Psychrophilic methane fermentation of excess sludge by enrichment culture. J. Ferment. Technol., 66(2): 229~233.
4. Whitman, W.B. 1985. Methanogenic bacteria. in "The Bacteria", Volume VIII, Academic Press, Inc., New York, 3~85.
5. Zeikus, J.G. 1980. Chemical and fuel production by anaerobic bacteria. Ann. Rev. Microbiol., 34: 423~64.
6. Koyama, T., 1963. Gaseous metabolism in lake sediments and paddy soils and the production of atmospheric methane and hydrogen. J. Geophysic. Research. 68(13): 3971~3973.
7. Svensson, B.H. 1984. Different temperature optima for methane formation when enrichment from acid peat are supplemented with acetate or hydrogen. Appl. Environ. Microbiol., 48(2): 389~394.
8. Laube, U. M., and S.M. Martin. 1981. Conversion of cellulose to methane and carbon dioxide by tri-culture of *lulyticus*, *Desulfovibrio* sp. and *Methanosarcina barkeri*. Appl. Environ. Microbiol., 42(3): 413~420.
9. Pine, M.J., and W. Vishniac. 1957. The methane fermentation of acetate and methanol. J. Bacteriol., 30: 736~742.
10. 土壤養分測定法委員會編. 1976. 土壤養分分析法. 養賢堂. 120~124.
11. American Public Health Association, INC. 1977. Standard methods for the examination of water and waste water.
12. Khan, A.W., T.M. Trottier, G.R. Patel, and S.M. Martin. 1979. Nutrient requirement for the degradation of cellulose to methane by a mixed population of anaerobes. J. Gen. Microbiol., 112: 365~372.
13. Kiene, R.P., and D.G. Capone. 1985. Degassing of pore water methane during sediment incubations. Appl. Environ. Microbiol., 49(1): 143~147.
14. Meynell, P.J., 1976. Planning a digester, CTT Series No. 2, Prism Press. 9:98~102.
15. Bock, A., and O. Kandoer. 1985. Antibiotic sensitivity of archaeobacteria, in "The bacteria", Vol. 8, Academic press inc. ISBN 0-12-307208-5, 525~543.
16. Belay, N., R. Johnson, B.S. Rajagopal, E. C. Macario, and L. Daniels. 1988. Methanogenic bacteria from human dental poaque. Appl. Environ. Microbiol., 54(2):600~603.
17. Zeikus, J.G. and M.R. Winfrey. 1976. Temperature limitation of methanogenesis in aquatic sediments. Appl. Environ. Microbiol., 31(1):99~107.
18. Stetter, K.O., G. Lauerer, and M. Thomm. 1987. Isolation of extremely thermophilic sulfate reducers : Evidence for a novel branch of archaeobacteria. Science. 236:822~824.
19. Matens, C.S., and R. A. Berner. 1974. Methane production in the intestinal waters of sulfate-depleted marine sediments. Science, 185:1167~1169.
20. Zeikus, J.G. 1977. The biology of methanogenic bacteria. Bacteriol. Review. 41: 514~541.
21. Morita, R.Y. 1975. Psychrophilic bacteria. Bacteriol. Review. 39(2) : 144~167.
22. Sinclair, N.A., and J.L. Stokes. 1964. Isolation of obligatly psychrophilic bacteria. J. Bacteriol., 87(3): 562~565.