

農畜産 廢棄物 處理를 爲한 低溫耐性 메탄 生成菌의 특성에 關한 研究

III. 低溫耐性 Methanogens의 分離

鄭光溶* · 金才正** · Lacy Daniels***

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

III. Isolation of Low Temperature Tolerant Methanogens

Kwang-Yong Jung*, Jai-Joung Kim** and Lacy Daniels***

Abstract

This study was conducted to investigate the biochemical properties of isolated bacteria, low temperature tolerant methanogens which were selected for use as inoculum for anaerobic fermentation of agricultural and livestock wasted at low temperature. The results, obtained were summarized as follows:

Low temperature tolerant methanogens were isolated from the samples which showed the high methanogenesis rate by enrichment culture at low temperature in methanol medium. These methanogens, *Methanobacterium* M-251 and *Methanobacterium* M-253 were isolated from swampy sediment at latitude 56.9°, *Methanosarcina mazei* M-372 from lake sediment IV at latitude 55.0° N, and *Methanobacterium formicicum* M-375 from tidal land soil at latitude 37.0° N, respectively.

The isolated anaerobic bacteria could not use sugars as carbon sources. The optimum pH value for the growth of M-251 and M-375 was 6.8, but those for M-253 and M-372 6.5

*농촌진흥청 농업과학기술원(Agricultural Science & Technology Institute, RDA, Suwon 441-707, Korea)

**충북대학교 농과대학(College of Agriculture, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea)

***Department of Microbiology University of Iowa, Iowa city, IA 52242, USA)

and 7.0, respectively. The minimum growth temperature of isolated, M-251 and M-253 were 8°C and the optimum temperature 30°C, while the minimum of M-392 and M-395 were 13°C and the optimum 37°C. The growth rate of isolates at 17.5°C were lower by 32-50% than that of 30°C. The isolated *Methanobacterium* strains such as M-251, M-253, and M-375 have lower cell yield, 0.38-1.21g/1M CH₄ than 1.14-1.51g/1M CH₄ of *Methanosarcina mazei* M-372.

緒 言

溫度는 嫌氣醱酵에 있어서 가장 重要한 要因의 하나이며 農畜產 廢棄物의 처리는 크게 中溫醱酵(20~45°C)와 高溫醱酵(50~60°C)로 구분할 수 있다.¹⁾ 家畜 廢棄物의 嫌氣醱酵에는 주로 中溫醱酵가 活用되고 있으나 우리나라의 冬季와 같은 低溫期에는 醱酵液溫이 낮아져 醱酵效率이 떨어진다.²⁾ Meynell³⁾은 醱酵液溫이 15°C 이하로 되면 가스 發生量은 급격히 減少되고 10°C 以下에서는 嫌氣醱酵가 不可能하다고 하였다. 低溫期 醱酵效率 增進을 위해 Park 등⁴⁾은 原料의 稀釋水를 太陽熱로 加溫시켰으며, 朱 등⁵⁾은 醱酵중에서 生成되는 가스의 一部를 醱酵槽 加溫에 使用하였고, 金 등⁶⁾은 微生物 固定板을 이용하여 醱酵槽내의 菌密度를 增加시키려 하였으나 低溫性 嫌氣醱酵에 대한 研究는 아직 定立되어 있지 않다.^{7,8,9)} 物理的인 方法에 의한 低溫期 醱酵效率 增進에는 限界가 있어서⁵⁾ 松山(미발표 '86), 小山(미발표 '86) 등은 低溫性 메탄菌의 分離를 시도하였으나 分離하지 못하였으며, 低溫 嫌氣醱酵에 관한 研究는 最近 日本의 Matsuyama 등¹⁰⁾이 發表한 生鮮 加工廢棄物에 대한 研究가 있으며 이는 低溫에 純化시킨 嫌氣母液이 既存 嫌氣醱酵 母液보다 5°C와 15°C에서 가스 發生量을 높일 수 있었다고 報告하였다.

低溫菌 또는 低溫性菌에 關한 研究는 주로 Gount¹¹⁾, Morita¹²⁾가 遂行 하였으며, 이들은 주로 飲食物의 腐敗原因 究明 또는 低溫性菌의 生態에 目的을 두고 研究하였는데 低溫菌(psychrophilic)과 低溫性菌(psychrotrophic)은 0°C에서 生育할 수

있는 微生物을 意味한다고 하였으며, 最高 生育溫度는 20°C 이하인 菌을 Psychrophilic 그리고 20°C 또는 그 이상인 菌을 Psychrotrophic이라 正義하였다. Gount¹¹⁾은 低溫菌이 低溫에 生育할 수 있는 것은 細胞膜 內에 不飽和 脂肪酸 比率이 中溫菌보다 높으며 蛋白質의 構造가 低溫에 適應할 수 있는 造成을 갖기 때문이라 하였으며, McGibbon 등¹³⁾은 *Micrococcus sryogilus*의 溫度變化에 따른 인지질(phospholipid)構造 觀察試驗에서 溫度變化에 따라 그 構造가 敏感하게 反應함을 觀察하고 C₁₈/C₁₆의 比가 낮을수록 저온에 견딜 수 있음을 究明하였다. 最近까지 分離된 메탄菌 중에는 低溫菌 또는 低溫性菌은 없으며 海底 堆積物에서 分離된 *Methanogenium cariaci*와 *maricinigri*, *Methanolobus tindarius*, *Methanolobus vucani*, *Methanococcoidea methylen*, 그리고 *Methanolobus endosymbiosus* 등이 비교적 저온인 10~15°C의 최저 생육온도를 갖고 있으며 20~37°C의 生育適溫을 나타내는 中溫菌들이나^{6,14,15)} 그 이외의 메탄菌들은 醱酵槽나 수중 堆積物에서 주로 分離되는 菌株들로서 바다에서 分離된 메탄菌보다 높은 生育溫度를 要求하고 있다.^{16,17,18,19)} 低溫性 메탄菌에 관한 報告는 아직 없으나 低溫 메탄 生成作用에 관하여는 Svensson²⁰⁾ Matsuyama 등¹⁰⁾이 報告하고 있어 低溫耐性 메탄 生成菌株의 活用 可能性을 배제하지 않고 있다.

따라서 本 研究는 低溫期의 嫌氣醱酵 效率을 增進시켜 低溫耐性 메탄 生成菌의 探索과 分離 利用에 目的을 두고 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 分布를 파악하고 이중 活

성이 높은 메탄 생성균을 분리하여菌學의 성질을 調査하는 한편 低溫에서 이들 菌의 활성을 조사 연구하고자 하였다.

材料 및 方法

低溫耐性 메탄生成菌 分離를 위한 分離源은 전보^{21,22)}와 같은 시료를 이용하였다. 菌 분리에 사용한 배지는 Methanol배지로서 그 조성은 다음과 같다. 증류수 1l에 Methanol 3.0ml, Sodium acetate 0.4 g, KH₂PO₄ 0.2 g, K₂HPO₄ 0.4 g, NH₄Cl 0.5 g, MgCl₂·6H₂O 0.1 g, CaCl₂·2H₂O 0.08 g, NaCl 0.6 g, Vitamin mixture 10.0 ml, Trace mineral sol. 10ml, Resazurin 2.0ml, Na₂S·9H₂O 2.0mM, pH 6.7 (Na₂CO₃이용)를 첨가하여 조제하였다. 이때 사용한 Vitamin 또는 Trace mineral 조성은 전보^{21,22)}와 같다. 시험중의 모든 배지는 살균전에 Na₂S·9H₂O를 최종 농도가 2.0mM이 되도록 조절하였으며 산화환원 지시약은 resazurin을 사용하였다. 배지의 pH는 CO₂+N₂ gas를 주입하면서 Na₂CO₃를 소량씩 첨가하여 목적하는 pH를 조절하였다. 균분리를 위한 기본조작은 전보²²⁾와 같으며 roll tube 제작에는 한천대신에 1.0% gelrite¹¹⁾을, gas는 H₂+CO₂(80:20, v/v)를 이용하였다.

비교시험에 사용한 균주 *Methanospirillum hungatei*는 아이오와 대학으로부터 분양받아 사용하였고 배지의 조제와 배양은 Ferry²⁵⁾ 등이 사용한 방법에 따랐다.

균주 생육량 측정은 27ml들이 혐기성 배양튜브에 배지를 5 ml씩 분주한 후 전보²²⁾와 같이 혐기배지를 조제하고 분리균주를 0.5 ml씩 접종하여 배양한 후 비색계 파장 600 nm에서 측정하였다.

메탄菌의 分離와 生化學的 特性檢定 試驗에는 培地內에 항상 streptomycin과 vancomycin을 最終濃도가 50 µg/ml가 되도록 添加하여 다른 微生物에 의한 汚染을 防止시켰다. 菌株의 同定을 위한 形態的 및 生化學的 特性 檢定은 Holde-

man등²³⁾의 Anaerobic Laboratory Manual과 古駕²⁴⁾의 방법에 준하여 遂行하였다.

電子 顯微鏡 촬영은 無機培地에 1주일간 培養한 후 8,000rpm에 15분간 원심분리하고 phosphate buffer(0.2M, pH 7.0)로 3회 세척한 다음 clostridia와 동일한 방법²²⁾으로 檢鏡하였다.

메탄菌의 蛋白質 분석은 Belay 등^{26,27)}, Daniels 등²⁸⁾이 사용하고 있는 Lowry法을 사용하였다. 가스 分析은 Shimadzu GC 6-A와 Shimadzu GC 9-A를 사용하여 전보²²⁾와 같이 分析하였다.

結果 및 考察

低溫耐性 메탄菌의 分離源도 clostridia의 分離源과 같았으며 methanol 培地를 사용하였다. 系代培養에 使用한 溫度는 8°C와 13°C이었으며 2차 系代培養에서 항은 48일 후 CH₄ 發生量은 68.7~252nmoles/ml로서 cellulose培地(4,098 n moles/ml)보다 낮았으며 더구나 3차 系代培養에서는 5.8~16.6 n/moles/ml로 繼續 系代培養이 不可能하였다. 따라서 培養溫度를 20°C로 높여 分離를 위한 系代培養을 1년간 繼續하였다. 系代 培養중에 탁도(600 nm)가 20°C에서 0.5 이상 되는데 요하는 시간이 7~10일이 될 때 메탄菌 純粹分離를 위한 roll tube를 만들어 메탄菌을 分離하였다. 分離에 使用한 培地는 한천 대신에 gelrite를 넣은 methanol培地를 利用한 roll tube를 만들어 메탄菌을 分離하였다. Roll tube에 자란 colony는 液體 methanol 培地에 이식하고 20°C에서 탁도가 0.3~0.5(600 nm)가 될 때 다시 roll tube하여 3회에 걸쳐 再分離하였다. 分離菌株는 다시 13°C에 培養시켜 生育이 양호한 菌株 4種을 最終 選拔하여 形態的 및 培養的 特性을 調査하여 同定하고 그 이외는 一般試驗을 遂行하였다. 分離菌株들은 늪지 堆積物(Canada, 56.9°N)에서 M-251, M-253, 호수 堆積物 IV(Canada, 55.0°N)에서 M-372 그리고 갯벌흙II(Korea, 37°N)에서 M-375가 각각 分離되었으며 이들을 古駕²⁴⁾의

同定法에 準하여 檢討한 結果 M-251, M-253은 *Methanobacterium* sp., M-372는 *Methanosarcina mazei*, 그리고 M-375는 *Methanobacterium formicum*으로 각각 同定되었다(Table 1).

M-251은 yeast extract 添加에 의하여 生育이 촉진되었고 M-372는 基質 이용성이 넓어 $H_2 + CO_2$ (80 : 20, v/v)가스, acetate, methanol, methylamine을 이용할 수 있으며, M-375는 $H_2 + CO_2$ 가스와 formate를 CH_4 生成基質로 이용하였고, M-251, M-253은 $H_2 + CO_2$ 가스만을 生育과 CH_4 의 生成基質로 이용할 수 있었다. M-372는 液體培地에 자랄 때 큰 다발을 形成 하는 特性이 있어서 탁도 測定에 의한 生育量調査가 不可能하므로 CH_4 또는 細胞 乾物重을 調査하였다.

分離된 4菌株 모두 糖 分解能은 없었으며, 適正 pH는 M-251과 M-375는 6.8이었고 M-253은 그보다 낮은 6.5이었으며 M-372는 7.0에서 生育이 좋아서 既存 메탄菌들의 pH 範圍와 類似하였다(그림 1a-b). M-251과 M-253의 分離源이었던 試料의 pH는 6.8이었고 分離菌株의 適正 pH는 6.8과 6.5로서 類似하였으며, M-372가 分離된 試料의 pH는 6.8로서 M-372의 7.0과도 비슷한 傾向이었다. 그러나 M-375는 7.0에서 生育이 좋아서 分離試料의 pH 7.7보다 다소 낮은 것으로 나타났다. 分離된 대부분의 메탄菌들은 pH 6.5~7.0 範圍를 좋아하는 것으로 알려져 있으나 強酸性 條件에서 棲息하는 메탄菌들도 있으며²⁰⁾ *Methanobacterium alcaliphilium*의 生育에 適合한 pH는 8.3~9.3으로 알려져 있고²⁹⁾ Boone 등³⁰⁾도 pH가 높은 호수 堆積物에서 5種의 好알칼리성 메탄菌을 分離한 바 있어서 菌株의 適正 pH는 棲息地의 pH와 類似함을 나타내고 있다.

最適 生育溫度는 그림 2에서 보는 바와 같이 M-251, M-253은 30°C이었으며, M-372, M-375는 37°C이었다. 最低 生育溫度는 M-251, M-253은 8°C로 나타났으며 그 외 菌들은 13°C이었다. 分離菌株들 중에서 50°C에서 生育이 可能하였던 菌株는 國內試料에서 分離된 M-375뿐이었다.

Balch¹⁴⁾, 古駕²⁴⁾, Robinson³¹⁾ Whitman 등³²⁾에 의하면 *Methanosarcina*屬은 基質 이용성이 多様한 것으로 알려져 있는데 本 試驗에서 分離된 M-372도 formate를 除外한 모든 基質을 이용할 뿐만 아니라 液體培地에서 生育할 때는 불규칙한 다발을 形成하여 形態적으로 *Methanosarcina*(Ms)를 닮았으나, Robinson³¹⁾은 Ms. *Mazei*는 成長期 細胞일때 100 μ m-數mm 크기의 다발을 形成한 후 쇠퇴기에는 形成되었던 다발이 풀린다고 하였다. 그러나 M-372는 쇠퇴기에도 다발이 풀리지 않아 Ms. *mazei*와 동일종이 아닌 것으로 생각된다. 또한 M-375는 formate로부터 메탄을 生成하는 것은 *Methanobacterium formicum*과 닮았으나 生育 溫度範圍에서 差異를 보이고 있다.

M-251과 M-253은 形態나 培養의 特性이 서로 비슷하나 M-251은 yeast extract 添加에 의하여 生育이 促進되는 반면에 M-253은 그 影響을 받지 않았으며 *Methanobacterium*屬에서 $H_2 + CO_2$ (80 : 20, v/v)가스만을 基質로 이용하는 菌은 廢棄物 醱酵槽에서 分離된 *Methanobacterium bryantii*²⁴⁾와 진흙에서 分離된 *Methanobacterium uliginosum*이 있으나 生育 溫度가 本 試驗 菌株들과 각기 상이하였다.

國內 試料에서 分離된 M-375를 除外한 3菌株는 年중 地溫이 15°C 이상되는 期間이 1個月 未滿인 亞寒帶 地域으로부터 分離된 菌株들이나 分離菌株들이 결코 처해 본 바 없는 30°C 또는 37°C에서 生育適溫을 나타내고 있으며, 이는 Zeikus 등³²⁾이 美國 Mandota호수 堆積物에 대한 生態試驗 결과와 같은 傾向을 보이고 있다. 그러나 既存의 메탄菌 중에서는 海底에서 分離된 *Methanogenium cariaci*와 *maricinigri*가 生育適溫이 20~25°C로 밝혀진 唯一한 低溫耐性 菌株이며 그 외도 15°C부근의 最低 生育溫度를 나타내는 海洋種들이 있으나 모두 37~82°C의 生育適溫을 나타내고 있다.^{15,24,33)} 陸地에서 分離되는 메탄菌들은 모두 20~40°C의 生育範圍를 나타내고 있는데^{16,18)} 生育適溫이 30°C이고 最低 生育溫度가

Table 1. Morphological and biochemical characteristics of methanogens.

Characteristics	Strains			
	M-251	M-253	M-372	M-375
Gram stain reaction	+	+	±	+
Cell type	rod	rod	coccus	rod
Motility	-	-	-	-
Filaments	-	-	-	-
Large aggregate			+	
Lysis by SDS	+	+	-	+
Methanogenic substrate				
H ₂ +CO ₂	+	+	+	+
Formate	-	-	-	+
Acetate	-	-	+	-
Methanol	-	-	+	-
Methylamine	-	-	+	-
Growth stimulator				
Yeast extract	+	-	-	-
Growth temperature(°C)				
Minimum	8-13	8-13	13	13
Optimum	25-30	25-30	30-37	30-37
Nitrogen source	NH ₄ -N	NH ₄ -N	NH ₄ -N	NH ₄ -N
Growth requirement	none	none	none	none
Optimum pH	6.75	6.50	7.00	6.75
Acid produced from sugars	none	none	none	none
Name proposed	<i>Methanobacterium</i> sp. M-251 <i>Methanobacterium</i> sp. M-253 <i>Methanosarcina mazei</i> M-372 <i>Methanobacterium formicicum</i> M-375.			

8~13°C인 메탄균주가 陸地에서 分離된 것은 本試驗의 亞寒帶 地域에서 分離된 M-251, M-253, M-372 등이 처음으로 생각된다. Svensson²⁰도 Sweden의 산성 peat에서 低溫耐性菌의 存在를 확인은 하였으나 分離하지 못하였으며, 小山(미발표), 松山(미발표) 등도 低溫 馴化培養에는 成功하였으나 分離에는 失敗하였다고 하였다.

分離 菌株들을 比較的 低溫인 17.5°C와 각 菌株 固有의 生育適溫에서 生育特性을 調査한 結果는 表 2와 같다. 生育量(600 nm에서의 흡광도)은 溫度가 낮을 때 전반적으로 32~50% 낮았고, 이때 蛋白質 含量도 生育량과 類似한 傾向을 나타냈으며 菌體 生産量은 전반적으로 *Methanobacterium*屬인 M-251, M-253, M-375는 1M의 CH₄

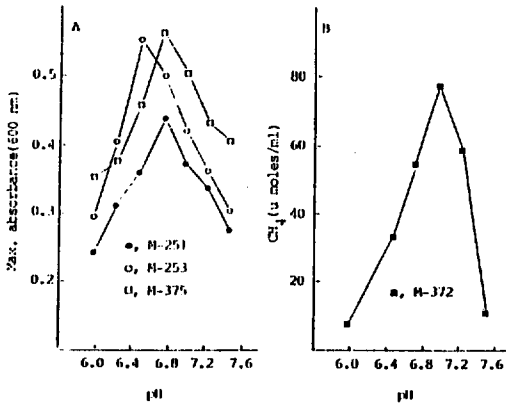


Fig. 1. Effect of pH on growth of methanogen isolates. Max. absorbance at 600 nm was determined when the most rapid culture reached the stationary phase. Methane producing rate was determined at 5 days after incubation.

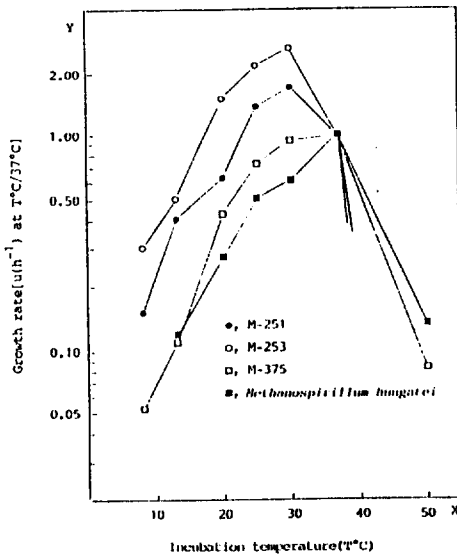


Fig. 2. Relative growth rates of methanogens at different temperatures. The values on the y axis are a ratio calculated from specific growth rate at a given temperature divided by the specific growth rate at 37°C.

生成에 필요한 細胞 乾物重이 0.38~1.21g 이었고 *Methanosarcina*속인 M-372는 1.14~1.51g으로서 *Methanosarcina*속의 菌體 生産量이 다른 메탄 菌屬보다 높다고 한 報告들과 一致하고 있다.²⁷⁾ Belay 등²⁷⁾ Ragagopal 등³⁴⁾이 菌體 生産量은 메탄 菌의 生育이 억제되는 生育 조건에서 낮아진다고 하였으나, 本 試驗에서는 菌體 生産량이 오히려 低溫에서 높아 이들의 報告와 잘 一致되지 않았다. 이는 低溫에서 生育할 때 適溫에서보다 細菌의 生育은 30~50%가 減少되나 CH₄ 生成은 그보다 더 큰 汎害를 받기 때문에 생각된다. 이는 표 3의 CH₄ 生成량이 低溫일 때 현저히 減少되는 점으로도 이해되며, 低溫에서는 同量의 CH₄ 生成에 高溫에서 보다 더 많은 菌密度를 要求함을 알 수 있다. 메탄 菌에 대한 溫度別 CH₄ 發生量을 測定한 成績은 現在까지 報告되고 있지 않으며, 自然狀態의 堆積物이나 土壤을 對象으로 한 研究들이 있을 뿐이다.^{20,35)}

Br-CoM은 2-mercaptoethanesulfonate(Coenzyme M [HSCoM])의 誘導體로 特異的 메탄 菌 汎害劑로 알려져 있는 成分으로 Sparing 등³⁶⁾이 *Methanobacterium*,을 包含한 3種의 메탄 菌과 一般 細菌들에 대한 Br-CoM 25mM을 각각 處理하였을 때 Methanogenic archaeobacteria만을 特異적으로 汎害하는 것이 확인된 이후 메탄 菌 分離에 有用하게 쓰이고 있다.

Br-CoM은 메탄 菌만을 特異적으로 汎害하는 汎害劑로 알려져 있으며^{36,37,38)} 抗生劑는 一般 細菌의 汎害劑이다.^{39,40)} 分離 菌株들의 生育과 메탄 醱酵에 미치는 이들 두가지 汎害劑의 影響을 調査한 結果 표 3에서 보는 바와 같이 25 mM의 Br-CoM 處理로 CH₄ 生成은 거의 100% 汎害되었고, 100μg/ml의 抗生劑 處理에 의해서는 M-253과 M-375는 거의 影響을 받지 않았으나 M-251은 生育이 약 42% 汎害되었으며, M-372는 74%의 CH₄ 生成이 抑制되었다. 菌株간에 抗生劑에 의한 汎害 程度가 다르게 나타났는데 이는

Table 2. Growth characteristics of methanogens in pure cultures.

Isolates	Temp. (°C)	Max. absorbance	Protein ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Yield ¹		Methanogenesis ² (μ moles/min/mg)
				(g dry cell weight/mol CH ₄)		
M-251	17.5	0.30	25.7	1.21		0.68
	30.0	0.49	51.3	0.38		3.54
M-253	17.5	0.38	29.4	0.76		0.62
	30.0	0.56	52.3	0.54		1.94
M-372	17.5	ND	26.5	1.51		0.78
	37.0	ND	74.0	1.14		1.74
M-375	17.5	0.28	25.8	0.98		0.24
	37.0	0.56	44.5	0.43		1.00

¹ Max. absorbance at the wavelength at 600 nm was measured at the end of log phase. Yield was calculated from the difference of protein concentration divided by that of methane concentration at the end of log phase. It was assumed that proteins comprise 50% of cell dry weight.

² The rate of methanogenesis, during the logarithmic phase of growth, was amount of methane per mg protein.

ND : Non detected

Table 3. Effect of two inhibitors on the growth of methanogens

(CH₄ μ moles/ml)

Inhibitors	Isolates							
	M-251		M-253		M-372	M-375		
	A ¹	CH ₄	A	CH ₄	CH ₄	A	CH ₄	
Control	0.50	525	0.47	679	449	0.55	654	
Br-CoM ²	0.10	0.9	0.06	1.1	0.4	0.06	0.4	
Antibiotics ³	0.29	431	0.44	768	116	0.51	616	

The growth rate and methanogenesis rate were measured from 5 day-culture.

¹ Absorbance at 600 nm

² Bromoethanesulfonate(25 mM)

³ Streptomycin and vancomycin(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

Huse 등¹⁶⁾, Pate¹⁹⁾, Jones 등⁴¹⁾도 streptomycin과 vancomycin을 *Methanotrix*屬, *Methanococcus*屬에 處理하여 각 種간에 그 反應이 각기 달라서 菌株에 따라 抗生劑 耐성이 상이함을 報告한 바 있다. 本 試驗에서 分離된 菌株들은 Br-CoM에 의해 汎毒되고 streptomycin과 Vancomycin 100 µg/ml씩의 混合處理로서 影響을 받지 않거나 生育과 CH₄ 生育이 可能하여 순수 메탄균으로 판단된다.

적 요

農畜產 廢棄物의 嫌氣的 處理工程에 적용하기 위하여 亞寒帶 지역으로부터 分離한 Methanogen의 生化學的 特性을 조사한 결과는 다음과 같다.

低溫에서도 메탄生成량이 많았던 늪지 堆積物 (Canada, 56.9° N)에서 分離된 菌은 *Methanobacterium* M-251, *Methanobacterium* M-253, 湖水 堆積物 IV(Canada, 55.0° N)에서 分離된 菌은 *Methanosarcina mazei* M-372, 갯벌흙 II(Korea, 37.0° N)에서 分離된 菌은 *Methanobacterium formicicum* M-375로 각각 동정되었다. 分離된 4종의 메탄균은 당분해능은 없으며 적정 pH는 M-251, M-375는 6.8, M-253은 6.5, 그리고 M-372는 7.0이었다. 最適 生育溫度는 M-251과 M-253은 30°C 이었고 M-272와 M-375는 37°C이었다. 最低 生育溫度는 M-251, M-253은 8°C이었고, M-372, M-375는 13°C이었다. 分離菌株의 生育량은 30°C에 비하여 17.5°C에서 培養할 때 32~50% 정도 낮았다. M-251, M-253, M-375의 菌體 生産량은 0.38~1.21 g/1M CH₄ 범위 이었으며 M-372는 1.14~1.51 g/CH₄범위이었다.

參考文獻

1. Mah, R.A., M.R.Smith(1981). The methanogenic bacteria, in "The procarיות" Springer

Verlag, Berlin Heidelberg, New York, P.948-977.

2. Hill, D.T., D.T. Yung, and R.A. Nordstedt, (1981) Continuously expanding anaerobic digestion - a technology for the small animal producer. Transactions of the ASAE., p.731-736.

3. Meynell, P.J.(1976). Planning a digester, CTT Series No. 2, Prism Press. 9 : 98-102.

4. Park, Y.D., N.J. Park, and J.H. Lim(1979). A feasibility study of village scale biogas plant during the winter season. The Res. Report, ORD., 21 : 53-60.

5. 朱永熙, 林在炫, 禹基大, 朴永大(1988). 畜產 農家型 嫌氣醱酵施設 開發에 關한 研究. 農試論文集(土壤肥料篇). 30(2) : 69-73.

6. 김성필, 정광용, 주영희, 박영대(1987). 메탄균 고정판을 이용한 가스 발생량 증대에 관한 연구, 농시논문집. 29(1) : 196-205.

7. 木田 建次, 西普 一郎(1986). アコル蒸溜廢液のエネルギー轉換-新しい廢水處理システムの檢討. 醱酵工學. 64(3) : 215-218.

8. 西尾尚道(1986). 메탄生成菌의 增殖特性とえの機能の利用. 醱酵工學. 64(3) : 181-196.

9. 馬島 剛, 川三雄, 野村 忠士(1986). 多孔性セラミックスを充いた嫌氣性處理裝置の 高濃度食品ガロセス廢水處理への適用. 醱酵工學. 64(3) : 218-220.

10. Matsuyama, H. and K. Izumi(1988). Psychrophilic methane fermentation of excess sludge by enrichment culture. J. Ferment. Technol., 66(2) : 229-233.

11. Gount, A.M.(1986). Psychrophilic and psychrotrophic microorganisms. Experientia. 42 : 1192-1197.

12. Morita, R.Y.(1975). Psychrophilic bacteria. Bacteriol. Review. 39(2) : 144-167.

13. McGibbon, L., and N.J. Russell(1985). Turnover of phospholipids in the psychrotrophic bacterium during adaptation to changes in growth temperature. General Microbiol., 131 : 2293-2302.

14. Balch, W. E., G.E. Fox., S.J. Magrum., C.R. Woese., and R.S. Wolfe.(1979). Methanogens:

- Reevaluation of a unique biological group. Microbiol. Review, **43** : 260-296.
15. König, H., and K.O. Stetter.(1982). Isolation and characterization of *Methanobus tindarius*, sp. nov., a coccoid methanogen growing only on methanol and methylamines. Zbl. Bakt. Hyg., Abt. Orig. C3., p. 478-490.
 16. Huse, B.A., K.Wuhrmann, and A.J.B. Zehnder.(1982). *Methanotherix soehngenii* gen nov. sp. nov., a new acetotrophic nohydrogen-oxidizing methane bacterium. Arch. Microbiol., **132** : 1-9.
 17. König, A., and K.O. Stetter(1989). Archaeobacteria, in Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 3. Willims and Wilkins, 2171-2216.
 18. Mah, r.A., M.R.Smith, and L. Baresi(1978). Studies on acetate-fermenting strain of *Methanosarcina*. Appl. Environ. Microbiol., **35** : 1174-1184.
 19. Patel, G.B.(1984). Characterization and nutritional properties of *Methanotherix concilli* sp. nov., a mesophilic, aceticlastic methanogens. Can. J. Microbiol., **30** : 1383-1396.
 20. 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) : 389-294.
 21. 鄭光溶, 金才正(1993). 農畜産 廢棄物 處理를 위한 低溫 耐性 메탄 生成菌의 特性에 관한 研究. I. 低溫條件에서 試料別 메탄 生成機作 研究. 韓國環境農學會誌, **12**(1) : 41-49.
 22. 鄭光溶, 金才正(1993). 農畜産 廢棄物 處理를 위한 低溫 耐性 메탄 生成菌의 特性에 관한 研究. II. 低溫耐性 Clostridia의 分離. 韓國環境農學會誌. **13**(3) : 311-320.
 23. Holdeman, L.V., E.P. Cato. and W.E.C. Moore(1977). Anaerobic laboratory manual 4 th Edition. Virginia polytechnic Institute and State University Blacksburg, Virginia 24061.
 24. 古駕 梁介, 森井 幸(1986). 메탄生成菌의 分 流と生化學. 醱酵工學 **64**(2) : 115-137.
 25. Ferry, J.G., Wolfe, .S.(1977). Nutritional and biochemical chracterization of *Methanospirillum hungatei*. Appl. Environ. Microbiol., **35** : 1174-1184.
 26. Belay, N., and L. Daniels(1987). Production of ethane, ethylene, and acetylene from halogenated hydrocarbons by methanogenic bacteria. Appl. Environ. Microbiol., **53**(7) : 1604-1610.
 27. Belay, N., R. Sparling, B.S. Choi., M. Roberts, J. E. Roberts and L. Daniels(1988). Physiological and 15N-NMR analysis of molecular nitrogen fixation by *Methanococcus thermolithptrophicus*, *Methanobacterium brianii* and *Methanosprillum hungatei*. Biochemica. Biophysica. Acta., **971** : 233-245.
 28. Daniels, L., N.Belay, and B.S. Rajagopal(1986). Assimilatory reduction of sulfate and sulfite by methanogenic bacteria. Appl. Environ. Microbiol., **51**(4) : 703-709.
 29. Worakit, S., D.R. Boone et al.(1986). *Methanobacterium alcaliphilium* sp. nov., an H₂ utilizing methanogen that grows at high pH values. Int. J. Syst. Bacteriol., **36**(3) : 380-382..
 30. Boone, D.R., S. Worakit, I.M. Mathrani, and R.A. Mah.(1986). Alkaliphilic methanogens from high pH lake sediments. System. Appl. Microbiol., **7** : 230-234.
 31. Robinson, P.W., H.C. Aldrich, S.F. Hurst, and A.S. Bleiweis. (19). Roll of the cell surface of *Methanosarcina mazei* in cell aggregation. Appl. Environ. Microbiol., **49**(2) : 321-327.
 32. Zeikus, J.G., and M.R. Winfrey(1976). Temperature limitation of methanogenesis in aquatic sediments. Appl. Environ. Microbiol., **31**(1) : 99-107.
 33. Whitman, W.B.(1985). Methanogenic bacteria. in "The Bacteria", Volume VIII, Academic Press, Inc., New York, (19) 3-85.
 34. Ragagopal, B.S., N. Belay, and L. Daniels (1988). Isolation and characterization of methanogenic bacteria from rice paddies. FEMS Microbiol. Ecol., **35** : 153-158.
 35. Matens, C.S., and R.A. Berner.(1974). Me-

- thane production in the intestinal waters of sulfate-depleted marine sediments. Science, **185** : 1167-1169.
36. Sparling, R.P., and L.Daniels(1987). The specificity of growth inhibition of methanogenic bacteria by bromoethanesulfonate. Can. J. Microbiol., **33** : 1132-1136.
37. Smith, M.R., and R.A. Mah(1981). 2-Bromoethanesulfonate: A selective agent for isolating resistant *Methanosarcina* mutants. Current Microbiol., **6** : 321-326.
38. Smith, M.R.(1983). Reversal of 2-bromoethanesulfonate inhibition of methanogenesis in *Methanosarcina* sp. J.Bacteriol., **156**(2) : 516-523.
39. Bock, A., and O. Kandoer(1985). Antibiotic sensitivity of archaeobacteria, in "The bacteria", Vol.8, Academic press inc. ISBN 0-12-207208-5, p.525-543.
40. Zinder, S.H., and B.A. Mah(1979). Isolation and characterization of a thermophilic strain of *Methanosarcina* unable to use $H_2 + CO_2$ for methanogenesis. Appl. Environ. Microbiol., **38**(5) : 996-1008.
41. Jones, W.J. M.J.B. Paynter, and R. Gupta (1983). Characterization of *Methanococcus maripaludis* sp. nov., a new methanogen isolated from salt marsh sediment. Arch. Microbiol., **135** : 91-97.