

## 무기배지에서 메탄산화균의 분리배양과 COD 생성 및 탈질·탈인 특성 연구

김이태<sup>†</sup> · 배우근\* · 김광수 · 이희자

한국건설기술연구원 건설환경연구부 · \*한양대학교 건설환경시스템공학과

(2005년 9월 6일 접수, 2005년 11월 24일 채택)

### Isolation and Culture of Methanotrophs in Inorganic Medium and Characterization of COD Production, Nutrient Removal

I-Tae Kim<sup>†</sup> · Woo-Keun Bae\* · Kwang-Soo Kim · Hee-Ja Lee

Korea Institute of Construction Technology · \*Hanyang University Department of Civil & Environmental Systems Engineering

**ABSTRACT** : The objectives of this study were to isolate and culture methanotrophs and to apply them for biological removal of nitrogen and phosphorous. Methanotrophs (dominant species: *Methylomonas methanica*) were isolated from a landfill cover soil, cultured in a NMS medium, and analyzed to reveal their characteristics of growth and nutrient removal. The methanotrophs themselves can produce substantial amount of organic substances(as COD) including methanol, formaldehyde, and formate, as carbon sources required for denitrification. For instance, the production rate for methanol was 8 mg/L·hr. Moreover, the analysis of nitrogen and phosphorous in the sludge suggested that the methanotrophs assimilate nitrogen and phosphorous as growth substances.

**Key Words** : Methanotrophs, COD Production, MMO(Methane Monooxygenase)

**요약** : 본 연구는 메탄산화균을 분리·배양하여 생물학적 질소 및 인 제거에 응용하는데 있다. 수도권 매립지의 상부 토양으로부터 NMS (nitrate mineral salt solution)배지로 분리·배양된 메탄산화균을 이용하여 영양염 제거 및 성장특성을 분석하였다. 분리·배양된 메탄산화균은 탈질의 탄소원으로 사용될 수 있는 메탄올, 포름알데히드, 포름산으로 구성된 상당한 양의 유기물(COD 증가)을 생산하였다. 이때 메탄올의 생성속도는 8 mg/L·hr로 나타났다. 메탄산화균의 슬러지에 함유되어 있는 질소와 인의 함량을 볼 때 메탄산화균은 탈질에 필요한 탄소원 생성 뿐만 아니라 자체적으로 질소와 인을 성장기질로서 사용하는 것으로 나타났다.

**주제어** : 메탄산화균, COD 생성, MMO(methane monooxygenase)

## 1. 서론

메탄가스(CH<sub>4</sub>)는 탈질을 위한 탄소원으로 대안이 될 수 있다. 메탄가스는 독성이 없으며 하수나 슬러지의 혐기성 처리공정, 퇴비화, 매립지로부터 바이오가스로 생산된다. 실험실 조건의 반응조 실험 결과로부터 메탄 의존 탈질(methane-dependent denitrification)이 가능함을 확인 하였다.<sup>1,2)</sup> Werner와 Kayser<sup>3)</sup>는 호기성조건에서 메탄을 탈질의 탄소원으로 공급했을 때 질산염의 제거효율이 좋았으며, 탈질은 메탄산화균, 메틸화합물산화균의 생존과 깊은 관련이 있다는 사실을 밝혀냈다. 그러나 메탄산화균에 의한 단탄소 생성특성 및 이에 따른 질소제거특성이 구체적으로 규명되지 않았다.

따라서 본 연구에서는 메탄산화균의 분리 동정 및 이를 이용한 고농도의 질산염, 인산염 배지내에서 메탄산화균에 의한 단탄소 생성특성 및 인질소 제거특성을 관찰하여 향후

하수의 2차처리 공정에서의 영양염류 제거에 응용할 수 있는 방안을 모색하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 메탄산화균의 분리 및 배양

메탄산화균을 순수 배양하기 위하여 수도권 제1매립장에서 매립종료 3년~5년 정도 된 매립지점 최종 복토층중, 메탄산화가 활발하게 일어나는 지점이라 추측되는 깊이(15 cm)에서 토양을 채취하였다. 총 6개 지점(건조토양, 습윤토양)에서 시료를 채취하여 채취한 토양을 균일하게 혼합하고 50번 체로 쳐서 여러 개의 500 mL의 플라스크에 넣고 상부 공간에 메탄을 20% 주입하여 4°C에서 보관하고 실험에 사용하였다. 본 단계에서의 메탄산화균을 배양하기 위하여 사용한 액체배지는 NMS(nitrate minimal salt solution)로 그 구성성분은 Table 1과 같다.

4°C에서 보관한 정제된 토양시료 5 g을 Table 1의 NMS 배지용액 200 mL가 들어 있는 350 mL 플라스크에 넣고 실

<sup>†</sup> Corresponding author  
E-mail: itkim@kict.re.kr  
Tel: 031-910-0301

Fax: 031-910-0291

리콘 마개로 플라스크 입구를 막고 메탄가스를 주사기를 통하여 상부 150 mL의 공간에 20%(V/V) 넣은 후 파라필름으로 밀봉한 후 진탕 배양기에서 배양 하였다.

배양온도 30℃, 교반속도 250 rpm으로 하루동안 교반 배양한 후 10분간 침전시킨 상등액 100 mL를 다시 신선한 NMS 배지를 주입한 350 mL 플라스크에 넣고 상기와 같은 배양 과정을 4번 반복하였다. 최종적으로 배양된 메탄산화균을 4,000 rpm으로 원심분리 하여 그 고형물을 급속동결 건조시켜 이후의 실험에 활용 하였다.

160 mL serum bottle에 동결건조한 cell 0.25 g을 NMS 배지 50 mL(20 mM CuSO<sub>4</sub> 첨가)에 넣은 Cu NMS 배지와 CuSO<sub>4</sub>를 첨가하지 않은 NMS 배지로 나누어 실험을 진행하였다. 구리이온을 첨가한 메탄산화균은 메탄산화효소(methane monooxygenase, MMO)를 통해 메탄을 메탄올로 전환시키는데, 약 100종 이상의 균주가 보고되고 있으며 배양액내의 구리이온의 존재 유무에 따라 메탄산화효소(MMO; soluble MMO, particle MMO)의 세포내 위치가 바뀐다. 즉, 메탄산화균은 구리이온 존재시에 pMMO를 발현할 수 있는 것으로 알려져 있으며, sMMO를 활성화할 수 있는 메탄산화균은 구리가 없는 조건에서 자라는 II형 박테리아에서만 활성화 되는 것으로 밝혀졌다.<sup>5)</sup>

**Table 1.** Composition and concentration of stock solution for modified Higgins nitrate minimal salt solution<sup>4)</sup>

Chemicals	(g/L)
1. 100 × salt solution <sup>a)</sup>	
NaNO <sub>3</sub>	85
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	17
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	3.7
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.7
2. 100 × phosphate buffer solution <sup>b)</sup>	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	53
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	86
Adjust solution to pH 7.0	
3. 500 × Trace metal solution	
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.287
MnSO <sub>4</sub>	0.223
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.062
NaMoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.048
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.048
KI	0.083
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.25
1 mL of 1 mM H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> per liter of Trace metals	
4. 500 × Iron solution	
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	22.4
5 mL of 1 mM H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> per 100 mL of iron	

<sup>a)</sup> Culture medium was made as follows: Appropriate aliquots of concentrated solution 1-3 were added to the desired volume of double distilled water and the combined diluted mixture was sterilized by passage through a 0.22 μm membrane filter. Separate and filter sterile iron solution 4 was added aseptically to this mixture.

<sup>b)</sup> Each stock solution was stored at 4℃ after sterilization, except for the phosphate buffer which was stored at room temperature.

**Table 2.** Analytical methods

Item	Method
pH	pH meter(Thermo, 420A plus, USA)
DO	DO meter (YSI, inolab DO level 2)
mLVSS	Optical Density Method (λ = 660nm)
TOC	TOC Analyzer (Multi N/C 3000 analytik jena, German)
COD <sub>Cr</sub>	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> Closed Reflux, Titrimetric Method
CH <sub>4</sub>	Gas Chromatography (FID) HP 6890 plus, USA
CH <sub>3</sub> OH	Gas Chromatography (FID) HP 6890 plus, USA
Formaldehyde	High Performance Liquid Chromatography (Perkinelmer series 200 LC, USA)
Absorbance	UV-visible spectrophotometer (Shimazu, UV-1600, Japan)

메탄 주입량은 head space 공간 110 mL의 20%(V/V)인 22 mL의 공간에 메탄가스를 주입 후 진탕배양기에서 30℃, 150 rpm으로 24시간 마다 sampling 하여 메탄산화균의 특성을 분석하였다. 각 배지는 같은 조건으로 2set로 준비하여 실험의 오차를 최소화 하였다. 이러한 실험 방법으로 NMS 배지로 배양한 메탄산화균을 대상으로 배양특성을 관찰 하였다. 메탄산화균의 최적 성장조건인 온도 30℃, pH 중성부근에서 배양하며 세포성장, 메탄올, 포름알데히드, 포름산 형성에 따른 COD 변화, 총 유기탄소(TOC) 변화, 구리가 없는 조건에서 형성되는 sMMO(soluble methane monooxidase)의 변화, 배지내의 NO<sub>3</sub>-N, PO<sub>4</sub>-P, head space 상의 메탄 소모속도를 관찰하였다.

**2.2. 분석방법**

수질, 미생물 및 효소분석은 모두 환경오염 공정시험법(Korean standard methods), 미국 Standard Methods(19th ed.) 또는 EPA Methods(EPA Method 1613)에 준하여 실시하였고 각각의 분석항목과 방법은 Table 2에 요약하였다. 세포농도는 분광광도계를 이용, 파장 660 nm에서 흡광도를 측정하여 구하였다. -55℃에서 냉동건조(Ilshin lab., TFD5505, Korea)한 후 농도에 따라 일정량의 증류수를 첨가하고, 흡광도를 측정하여 검량선을 작성하였다.<sup>6)</sup> Headspace 가스분석은 TCD 칼럼이 장착되어 있는 GC-8A로 분석하였으며, 질소 및 인은 이온크로마토그래피를 이용하여 분석하였다.

용존성 메탄산화효소(sMMO)의 분석은 naphthalene oxidation assay<sup>7)</sup>을 이용하여 sMMO의 비활성도(specific activity)를 정량화 하였다. 이 방법은 나프탈렌이 sMMO와 반응하여 나프톨로 변환된 양을 정량화하여 비활성도를 측정하는 원리이다.

**3. 실험결과 및 고찰**

**3.1. 메탄산화균 배양 증식 특성**

매립지 토양을 NMS 액체배지에서 4회 반복 배양한 결과 초기의 현탁 토양입자가 모두 제거되었음에도 Fig. 1에서와

같이 미생물 농도는 오히려 증가하였다. 이는 메탄산화균의 증식에 기인한 것으로 판단되며, 미생물 농도는 초기 325 mg/L에서 최종 495 mg/L에 달하였다. 배양액의 TOC 농도는 초기 53.2 mg/L에서 96시간 후 252 mg/L, COD의 경우 초기 140 mg/L에서 380 mg/L(Fig. 2)로 크게 증가하였으며, pH의 경우 배양 초기조건 6.85에서 배양후 6.76로 동일하여 배양 중에 pH의 변화가 없었다. 이는 NMS 배지에 메탄 주입에 의해 메탄산화균이 배양 증식되었음을 입증하는 것이다. 전자현미경으로 7,500배로 확대하여 관찰한 결과(Fig. 3) 간균임을 알 수 있었다.

3.2. 메탄산화균의 동정

미생물은 DGGE(PCR amplified 16S rDNA-denaturing gradient gel electro-phoresis)<sup>8)</sup>에 의해 동정하였다. 본 연구에서도

이러한 DGGE 기법을 이용하여 각 반응기간 미생물 군집구조의 차이를 비교하고, 특정 밴드에 대해서는 염기서열과 계통분석을 통하여 구체적인 종을 확인하였다. 이상의 방법에 따라 16S rDNA 증폭을 통해 획득한 PCR 산물을 DGGE에 적용한 결과 총 8종류의 서로다른 band를 나타내었으며(Fig. 4) Table 3에서와 같이 2종의 *Methylomonas*(*Methylomonas methanica*, *Methylomonas sp. LW2*)가 확인 되었다.

Gel상에서 나타난 각각의 band의 intensity는 군집내에서의 특정 개체군의 상대적 풍부도를 나타내는 것으로 전체적으로 *Methylomonas* species가 우점종임을 확인 할 수 있어 메탄산화균이 효과적으로 분리 배양되었음을 DGGE 분석결

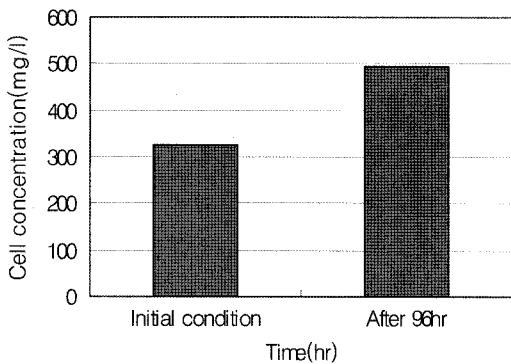


Fig. 1. Changes of cell concentration during culture.

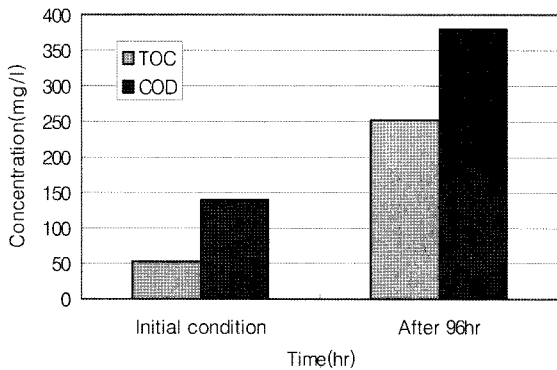


Fig. 2. Changes of TOC and COD concentration during culture.



Fig. 3. Micrograph of methanotrophs (Scanning electron microscope 7500X).

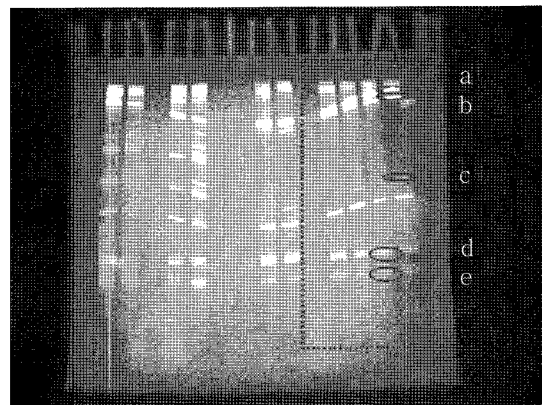


Fig. 4. DGGE profiles of 16S rDNA obtained by analyzing the Kimpo Landfill site.

Table 3. Sequence information for the DGGE band by analyzing Kimpo landfill site

	BAND a	BAND b	BAND d	BAND e
Domain	Bacteria	Bacteria	Bacteria	Bacteria
Division	Proteobacteria	Proteobacteria	Proteobacteria	Proteobacteria
Class	Gammaproteobacteria	Gammaproteobacteria	Alphaproteobacteria	Gammaproteobacteria
Order	Methylococcales	Methylococcales	Rhizobiales	Methylococcales
Family	Methylococcaceae	Methylococcaceae	Methylocystaceae	Methylococcaceae
Genus	Methylomonas	Methylomonas	Methylosinus	Methylomonas
Species	Methylomonas sp.	Methylomonas methanica	Methylomonas sp. LW2	Methylomonas methanica
Similarity	98.36%	99.09%	95.05%	98.23%

과로부터 재차 확인할 수 있었다. 한편 *Methylomonas methanica*는 구리 이온이 있는 조건에서 나타나는 Type I의 메탄산화균로 알려져 있으나<sup>9)</sup> 구리가 없는 조건에서 배양된 profile의 band에서도 우점종으로 존재함이 확인되었다.

이는 구리가 없는 조건에서도 Type I의 메탄산화균인 *Methylomonas methanica*가 활발히 생존할 수 있음을 시사하며 지금까지 sMMO는 Type II 박테리아에서만 발견되는 전형적인 효소로 알려져 있었으나 Ann 등<sup>10)</sup>은 워싱턴호수의 퇴적토 미생물군으로부터 16S ribosomal DNA 분석을 통해서 Type I 박테리아인 *Methylomonas* 속에서도 sMMO 발현하는 종이 발견되었다는 보고와도 일치한다.

3.3. 메탄산화균의 성장특성 및 영양물질 제거 특성

(1) 세포성장율, COD 생성속도, sMMO 발현특성 상관관계

Fig. 5는 NMS배지의 구리함유 여부에 따른 세포성장특성을 보인 것이다. 96시간 배양한 구리결핍배지에서 757.8 mg/L의 세포증식을 보인 반면 구리함유 배지는 629.3 mg/L로 상대적으로 적은 세포증식을 보여 주었다. 이 결과는 기 보고된 결과와 상반된다. 본 실험에서 구리를 함유하지 않는 배지가 더 높은 성장률을 보인 이유는 아마 사용된 메탄산화균의 초기 분리배양 조건이 구리가 없는 NMS 액체배지이었으며 이 때문에 pMMO 효소의 합성에 관여하는 유전자의 발현이 억제되었기 때문인 것으로 판단된다.

따라서 향후 구리가 함유된 배지에서 적용된 메탄산화균으로 재실험을 할 필요가 있다고 판단된다.

메탄산화효소(MMO) 환원력 공급 방법은 용존성 메탄산화효소(sMMO)의 경우 오직 NADH만을 환원체로 이용할 수 있지만 입자성 메탄산화효소(pMMO)는 메탄올을 포름알데히드로 산화시키는 효소인 메탄올 탈수소효소(methanol dehydrogenase, MDH)를 통해 환원력을 제공받을 수 있다고 알려지고 있으며<sup>9)</sup> 이러한 환원력 공급방식의 차이가 메탄산화균 성장율에 많은 영향을 준다는 이론을 Leak와 Dalton<sup>11)</sup>이 Type I 메탄산화균(*Methylococcus capsulatus*)의 연속 배양을 통해 제안하였다.

즉, pMMO 균체가 sMMO 균체에 비해 높은 성장율을 보인다는 것이다.

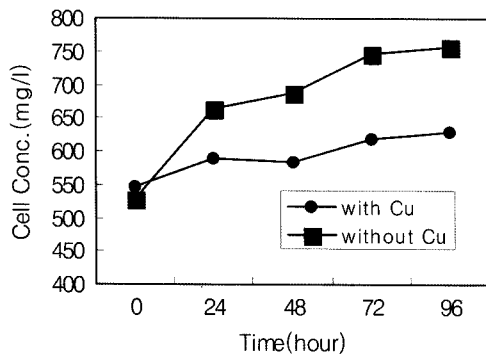


Fig. 5. Changes of cell concentration during the cultivation of methanotrophs in nitrate mineral salts medium(with 20 nmole and without CuSO<sub>4</sub>).

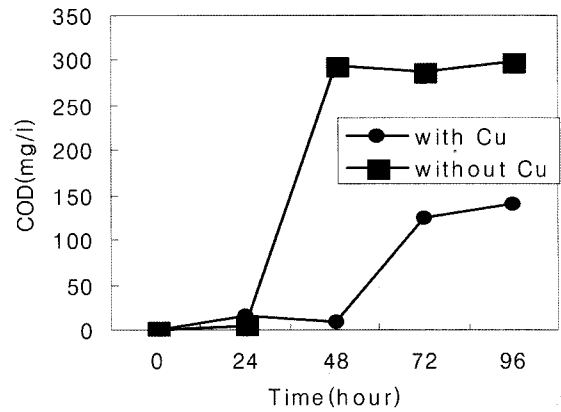


Fig. 6. Changes of COD concentration during the cultivation of methanotrophs in nitrate mineral salts medium(with 20 nmole and without CuSO<sub>4</sub>).

호기성조건에서 메탄산화균이 메탄을 분해하여 메탄올, 포름알데히드, 포르메이트와 같은 단탄소 중간 산물을 생성한다.

Fig. 6은 이들 단탄소 중간 산물이 축적되어 배양액 내의 COD가 상승하는 것을 보여주고 있다. 여기에서도 구리 결핍 NMS 액체배지에서의 COD생산량이 0.39 mg COD/mg MLSS로 구리함유 NMS 무기배지의 0.22 mg COD/mg MLSS 보다 높은 경향을 보였다.

보통의 메탄산화균은 구리농도가 0.25 μM 이상일 때 전혀 sMMO를 발현하지 못한다고 알려져 있는데<sup>12,13)</sup> 본 실험 결과에서도 구리를 함유한 배지에서는 sMMO가 전혀 발현되지 않음을 Fig. 7로부터 확인하였다.

Fig. 8에서 보면 세포수는 5일째까지도 지속적으로 성장하였으나 sMMO 비활성도는 초기 성장 지체기 때에 가장 높았다가 3일째 이후 더 이상의 COD가 증가하지 않으면서 sMMO의 발현율이 다소 낮아졌다.

세포성장특성과 sMMO 발현특성 변화는 Oldenhuis 등<sup>14)</sup>이 culture MMI과 strain Met1을 대상으로 실험한 결과와 동일한 경향을 보였는데, 이는 COD의 축적과 sMMO의 활성간에 상관성이 있음을 간접적으로 시사해 주는 것으로 판단된다.

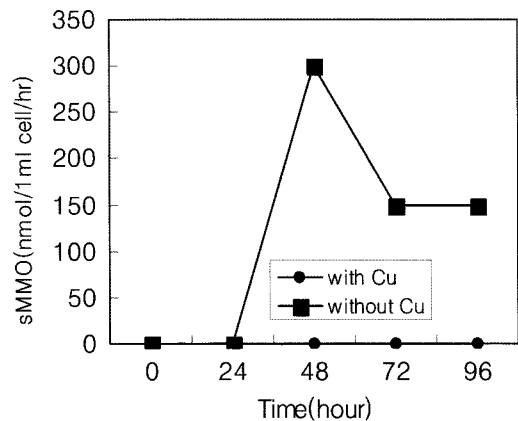


Fig. 7. Changes of sMMO activity during the cultivation of methanotrophs in nitrate mineral salts medium(with 20 nmole and without CuSO<sub>4</sub>).

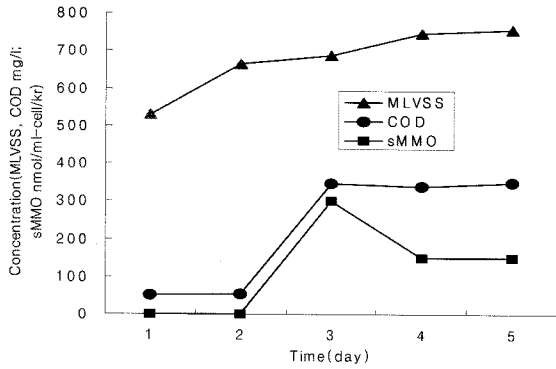


Fig. 8. Changes of cell, COD, sMMO concentration during the cultivation in nitrate mineral salts medium without  $\text{CuSO}_4$ .

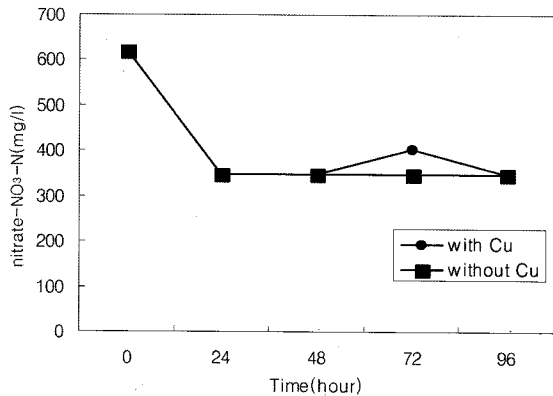


Fig. 9. Changes of nitrate concentration during the cultivation of methanotrophs in nitrate mineral salts medium (with and without  $\text{CuSO}_4(20 \text{ nmole})$ ).

(2) COD 생성과 메탄산화균의 탈질특성

한번 생성된 COD의 경우 sMMO 활성도 증가에 따라 급격히 증가하였다가 sMMO 활성도가 떨어져도 그 생성량이 줄어들지 않고 일정 수준을 유지함을 확인하였다. 이로부터 본 조건하에서의 탈질은 methylotrophs나 일부 미세무산소 영역에서 같이 존재하는 통상의 탈질균에 의한 COD를 탄소 원으로 하는 통상의 호기성탈질과정이 아닐 수도 있는 것으로 판단된다.

NMS 무기배양액은 메탄산화균 증식을 위해 최적 무기화합물로 조성된 액체 배양액이며 많은 양의 nitrate와 phosphate를 포함하고 있다. ( $\text{NaNO}_3$  0.85 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.53 g/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.86 g/L)

NMS 무기 배양액 자체에서의 nitrate와 phosphate의 제거 및 이용속도는 별도로 관측된 적이 없어 메탄산화균 성장에 따른 nitrate와 phosphate의 제거속도를 관측하였다. nitrate는 Fig. 9에서와 같이 구리가 있는 조건과 없는 조건 모두에서 최초 620 mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$ 에서 24시간 후 350 mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$ 로 크게 감소한 후 이후에는 더 이상의 감소가 없었으며 phosphate의 경우에도 Fig. 10에서 보면 최초 893 mg  $\text{PO}_4\text{-P/L}$ 에서 760 mg  $\text{PO}_4\text{-P/L}$ 와 750 mg  $\text{PO}_4\text{-P/L}$ 로 감소한 후 더 이상의 감소현상은 보이지 않았다. 이는 nitrate와 phosphate

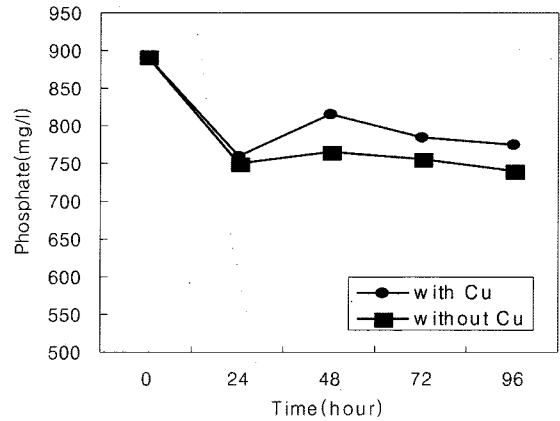


Fig. 10. Changes of phosphate concentration during the cultivation of methanotrophs in nitrate mineral salts medium (with and without  $\text{CuSO}_4(20 \text{ nmole})$ ).

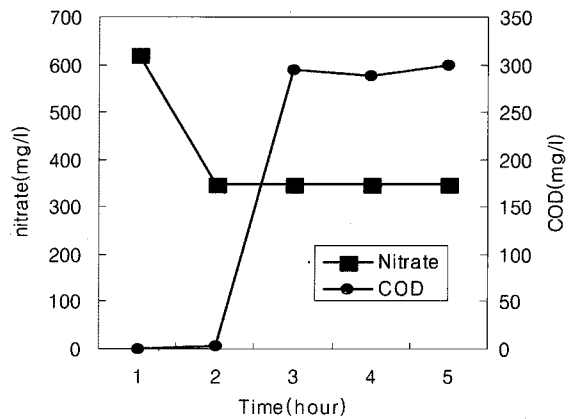


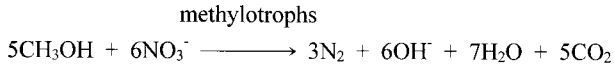
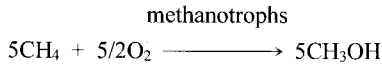
Fig. 11. Changes of COD and Nitrate concentration during the cultivation of methanotrophs in nitrate mineral salts medium.

를 이용하는 methylotrophs의 활동이 메탄올 등의 중간산물의 축적으로 인하여 저해되기 때문으로 분석되며 이는 Fig. 11의 COD생성과 nitrate 제거율을 동시에 비교한 결과로 설명되어진다.

이상의 메탄산화균의 증식 및 COD의 일정수준 증가에 따른 NMS medium내의 질소 및 인 성분의 더 이상의 감소가 되지 않는 원인은 메탄산화균자체가 질소 및 인을 기질로서 직접 섭취하는 특성이 있는데 MMO의 활성이 감소됨에 따라 메탄산화균의 질소 요구도가 감소되어 더 이상의 질소 및 인을 기질로 섭취하지 않는다고 유추할 수도 있으나 이에 대한 추가적인 연구가 더 필요하다. Anthony 등<sup>15)</sup>에 의하면 메탄산화균은 성장시 질소요구도 상대적으로 매우 높아 메탄으로부터 1몰의 탄소를 동화하기 위하여 0.25몰의 질소를 섭취한다는 사실을 확인하였다.

이 사실로부터 메탄의 이화작용에 따라 질소를 빨리 동화할 수 있는지에 대한 의문이 제기된다. 이에 대하여 Paul 등<sup>16)</sup>은 암모니아나 질산성질소와 같은 질소원이 없을 때에는 ntr(nitrogen regulatory) system이 nitrogenase system을 활성화시켜  $\text{NaDH}_2$ 를 질소고정에 쓰이도록 전환한다. 이는

다음의 식에서와 같이 통상적으로 알려진 생성된 메탄올을 methylophs와 통상의 denitrifier가 탄소원으로 이용하여 탈질을 수행하는 기작과 함께 메탄산화균에 의한 질소동화(assimilation)에 의하여 질소성분이 제거되는 두가지 기작이 동시에 이루어진다고 할 수 있다.



이에 대한 직접적인 증거로서 통상의 활성슬러지와 메탄산화균 슬러지 자체내의 질소 및 인 함량을 분석한 결과 활성슬러지내의 총질소 함량은 평균 5.6%를 보인 반면 메탄산화균 슬러지내에서는 8.35%로 활성슬러지 보다 높게 나타났다. 특히 총인 함량의 경우 활성슬러지의 경우 1.7%에 불과한 반면 메탄산화균 슬러지의 경우 7.7%로 활성슬러지에 비하여 매우 높게 나타났다. 이는 Trotsenko 등<sup>17)</sup>에 의하면, 세 종류의 메탄산화균을 연구한 결과 ATP(0.5 mM)가 낮음에도 불구하고 세포내 inorganic pyrophosphate(5 mM)가 높게 나타났다고 보고한 결과와 일치하여 활성슬러지 보다는 메탄산화균 슬러지에서 인 함량이 높음을 간접적으로 증명하는 것이다.

#### 4. 결론

1) 박테리아의 세포수를 증가에 따라 NMS배지 배양조건 하에서 메탄산화균의 메탄산화활동에 의하여 TOC 농도가 최초 53.2 mg/L에서 96시간 후 252 mg/L로, COD의 경우 초기 140 mg/L에서 380 mg/L로 크게 증가하였으며, 이는 상기의 분리배양 방법으로 메탄산화균이 농화 배양되었음을 입증한다.

2) 총 5종이 분리되었으며 그중, 유사지수가 95% 이상으로 매우 높고, *Methylomonas methanica*, *Methylomonas* sp. LW2 2종이 동정(identified)되었다. 또한 이들 Type I 메탄산화균의 일부는 지금까지 밝혀진 바와 달리, 구리이온의 존재여부에 관계없이 즉, 구리이온이 없는 조건에서도 높은 활성을 나타내었다.

3) NMS 무기배지내의 구리이온 존재유무에 따라 sMMO 발현특성이 확인하였고, 구리이온이 함유된 NMS 배지내에서 sMMO는 전혀 발현되지 않았으나 구리이온이 존재하지 않은 무기배지 내에서는 sMMO가 최대 300 mmol/mL cell · hr까지 발현되었다.

4) 메탄중간산물의 축적에 따라 methylophs의 활성이 저하되어 nitrate와 phosphate의 제거가 중단되었다. 이는 아마도 메탄산화균의 증식 및 COD의 일정수준 증가에 따른 NMS medium내의 질소 및 인 성분의 더 이상의 감소가 되지 않는 원인은 메탄산화균자체가 질소 및 인을 기질로서 직접섭취

하는 특성이 있는데 MMO의 활성이 감소됨에 따라 메탄산화균의 증식이 억제되어 더 이상의 질소 및 인을 기질로 섭취하지 않기 때문일 것 같다.

#### 참고문헌

1. Thalasso, F., Vallecillo, A., Garcia, D. E., and Polanco, F. F., "The use of CH<sub>4</sub> as a sole carbon source for wastewater denitrification," *Water Res.*, **31**(1), 55~60(1997).
2. Pajapakse, J. P., Scutt, J. E., "Denitrification with natural gas and various new growth media," *Water Res.*, **33**, 3723~3734(1999).
3. Werner, M. and Kayser, R., "Denitrification with biogas as external carbon source," *Water Sci. Technol.*, **23**, 701~708(1991).
4. Best, D. J. and Higgins, I. J., "Methane-oxidizing activity and membrane morphology in methanol-grown obligate methanotroph *Methylosinus trichosporium* OB3b," *J. Gen. Microbiol.*, **125**, 73~84(1981).
5. Dalton, H., "Methane oxidation by methanotrophs: physiological and mechanistic implications," In J. C. Murrell and H. Dalton (ed.), *Methane and methanol utilizers*. Plenum Press, New York, 85~114(1992).
6. Ana, B. and Dubravka, H., "Effect of growth conditions on the expression of soluble methane monooxygenase," *Food technol. Biotechnol.*, **39**(1) pp. 29~38(2001).
7. Brusseau, G. A., Tsien, H. C., Hanson, R. S., and Wackett, L. P., "Optimization of trichloroethylene oxidation by methanotrophs and the use of a colorimetric assay to detect soluble methane monooxygenase activity," *Biodegradation*, **1**, 19~29(1990).
8. Amin El NM, Hanson HS, Pettersson B, Petrini B, Von Stedin LV, "Identification of non-tuberculous mycobacteria: 16S rRNA gene sequence analysis vs. conventional methods," *Scand J Infect Dis*, **32**, 47~50(2000).
9. Hanson, R. S., Hanson, T. E., "Methanotrophic bacteria," *Microbiol. Rev.*, **60**, 439~471(1996).
10. Ann J. Auman, Sergei Stolyar, Andria M. Costello, and Mary E. Lidstrom, "Molecular characterization of methanotrophic isolates from freshwater lake sediment," *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**(12), 5259~5266(2000).
11. Leak, D. J., Stanley, S. H., and Dalton, H., "Microbial gas metabolism: mechanistic, metabolic and biotechnological aspects,"(R. K. Pool and C. S. Dow ed.), Chap 12, Academic Press, N.Y.(1985).
12. Tsien, H. C., Brusseau, G. A., Hanson, R. S., and Wackett, L. P., "Biodegradation of trichloroethylene by *Methylosinus trichosporium* OB3b," *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**(12), pp. 3155~3161(1989).

13. Strandberg, G. W., Donaldson, T. L., and Farr, L. L., "Degradation of trichloroethylene and trans-1,2-dichloroethylene by a methanotrophic consortium in a fixed film, packed-bed bioreactor," *Environ. Sci. Technol.*, **23**(11), 1422~1425(1989).
14. Oldenhuis, R., Vink, L. J. R., Janssen, D. B., and Witholt, B., "Degradation of chlorinated aliphatic hydrocarbon by *methylosinus trichosporium OB3b* expressing soluble methane monooxygenase," *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**(11), 2819~2826(1989).
15. Anthony, C., "The biochemistry of methylotrophs," Academic Press Ltd., London(1982).
16. Paul, L. E. Bodelier and Hendrikus, J. L., "Nitrogen as a regulatory factor of methane oxidation in soils and sediments," *Microbio. Ecolo.*, **47**, 265~277(2004).
17. Trotsenko, Y. A. and Shishkina, V. N., "Studies on phosphate metabolism in obligate methanotrophs," *FEMS Microbiol Letters*, **87**, Issues 3-4, 267~271(1990).