



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2017년 2월

석사학위 논문

벼 재배지 시료로부터 분리한
Methylobionas sp. SM-4 의 특성

조선대학교 대학원

신재생에너지융합학과

박 성 민

벼 재배지 시료로부터 분리한
Methylomonas sp. SM-4 의 특성

Isolation and characterization of a methane-oxidizing
bacterium, *Methylomonas* sp. SM-4 from rice paddy field

2017년 2월 24일

조선대학교 대학원

신재생에너지융합학과

박 성 민

벼 재배지 시료로부터 분리한
Methylomonas sp. SM-4 의 특성

지도교수 김 시 욱

이 논문을 석사학위 신청 논문으로 제출함

2016년 10월

조선대학교 대학원

신재생에너지융합학과

박 성 민

박성민의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 이 성 행 (인)

위 원 조선대학교 교수 김 시 욱 (인)

위 원 조선대학교 교수 이 현 화 (인)

2016년 11월

조선대학교 대학원

목 차

I . 서 론	1
A. Methanotrophic bacteria 정의	1
B. Methanotrophic bacteria의 발견	1
C. 분류학적인 측면에서의 Methanotrophic bacteria	3
D. 연구배경 및 목적	4
II . 균주의 분리 및 동정	9
A. 실험 재료 및 방법	9
1. 실험재료	9
2. 실험방법	9
(a) 기본 배지의 조성	9
(b) 균주 분리 방법	9
3. 분리 균주의 특성 조사.....	10
(a) 형태학적 특징	10
(b) 배양학적 특징	10
(c) 배양 최적 조건	10
1) 배양 온도의 영향	10
2) 배양액의 pH 영향	10
3) 질소원의 영향	13
4) 균체 성장 속도	13
(d) 생리학적 및 생화학적 특성	14
1) 세포벽 염색	14
2) Catalase 활성 측정	14
3) Oxidase 활성 측정	14

4) Urease 활성 측정	14
5) Antibiotic diffusion assay	15
6) 에너지와 탄소원으로 이용할 수 있는 기질의 범위	15
7) 구리 농도에 따른 영향	15
(e) 분자생물학적인 특성	16
1) 16S rDNA 염기서열 분석	16
III. 실험 결과	17
A. 실험균주의 분리 및 특성	17
1. 우수 균주의 분리	17
2. 분리 균주의 특징	17
(a) 형태 및 배양학적 특징	17
(b) 생리 및 생화학적 특징	18
(c) 이용가능한 기질의 범위	18
3. 분리 균주의 최적 배양 조건	23
(a) 배양온도의 영향	23
(b) 배양액의 pH 영향	23
(c) 질소원의 영향	23
(d) 구리 농도에 따른 영향	23
(e) 균의 비성장 속도(specific growth rate) 및 세대시간(generation time)	27
4. 분자생물학적 특징	27
(a) 16S rDNA 염기서열 분석	27
IV. 고찰	31

V. 결 론 32

VI. 참고문헌 34

List of Tables

Table 1. Characteristics of type I , type II , and type X methanotrophic bacteria.	8
Table 2. Composition and concentration of stock solution for Higgins nitrate minimal salt medium.	11
Table 3. Morphological and biochemical properties of the isolate.	20
Table 4. Antibiotic sensitivity test of the isolate.	21
Table 5. Carbon source utilizing test.	22
Table 6. Nitrogen source utilizing test.	25

List of Figures

Fig. 1. Pathways for the oxidation of methane and assimilation of formaldehyde.	2
Fig. 2. Mixed gas injection technique for the cultivation of methanotrophic bacteria.	12
Fig. 3. Morphology of the isolate was determined by scanning electron microscopy.	19
Fig. 4. Effect of pH on the growth of the isolate.	24
Fig. 5. Effect of copper concentration on the growth of the isolate.	26
Fig. 6. Growth curve of the isolate.	28
Fig. 7. 16S rDNA sequence of the isolate.	29
Fig. 8. Phylogenetic analysis of the 16S rDNA sequence of the strain SM-4 was compared with other strain. Genbank accession numbers are given in parentheses.	30

ABSTRACT

Isolation and characterization of a methane-oxidizing bacterium, *Methylomonas* sp. SM-4, from rice paddy field.

Sung Min Park

Advisor: Prof. Si Wouk Kim, Ph.D

Dept. of Renewable Energy Convergence

Graduate School of Chosun University

A methane-oxidizing bacterium was isolated from rice paddy field soil sample in Jeollanam-do province, Korea, and characterized. The isolate was gram-negative, pink-orange pigmented and short rod ($1.1\sim 1.2 \times 1.6\sim 1.9 \mu\text{m}$). The strain utilized methane and methanol as sole carbon and energy sources. It had an ability to grow at pH range of 5~8 with an optimum pH 7 and an optimum growth temperature of 30°C. Furthermore, the isolate could use KNO_3 , ammonium amidosulfate, yeast extract, L-alanine, L-glutamine, L-glutamic acid and DL-asparagine as a nitrogen source. The strain had antibiotic resistance towards polymyxin B but was negative to streptomycin, kanamycin, ampicillin, chloramphenicol and rifampicin. It was catalase and urease negative but observed to be oxidase positive. The isolate required copper concentration for their growth up to concentration range of 2 ~ 25 μM with an optimum of 10 μM . Phylogenetic analysis based on 16S rDNA sequences indicated that the strain formed a tight phylogenetic lineage with *Methylomonas* DH-1 with a value of 99.3% gene sequence similarity. So, we named the isolate an *Methylomonas* sp. SM-4.

I. 서론

A. Methanotrophic bacteria 정의

Methanotrophic bacteria는 methylotrophic bacteria라는 세균 그룹의 하위그룹에 속하는 집단이다. Methylotrophic bacteria는 호기성 박테리아로, methane, methanol, methylated amines, halomethane, 그리고 황을 포함하는 methylation된 유기화합물 등의 일원자탄소를 탄소원과 에너지원으로 이용하여 살아가는 세균집단이다. 하지만 methylotrophic bacteria 중에서 단일 탄소원과 에너지원으로 유일하게 methane만을 사용하는 세균 집단을 methanotrophic bacteria (메탄산화세균) 또는 methane-oxidizing bacteria (메탄산화세균)으로 정의한다. 이 집단은 methane을 methanol, formaldehyde, formate 그리고 최종적으로 CO₂로 산화시킨다. 이 과정에서 중간 대사산물인 formaldehyde (HCHO)를 세포 구성물질로 동화(ribulose monophosphate pathway or serine pathway)한다. 또한 다음 중간산물인 formate를 산화시켜 NADH를 생성한 다음, 다시 methane을 산화시킬 수 있는 환원력을 제공한다 (Fig. 1).^[1, 2]

B. Methanotrophic bacteria의 발견

Methanotrophic bacteria는 1906년 Söhngen에 의해 처음으로 methane을 산화하는 균주 (methane-oxidizing bacteria)가 분리되면서 알려지게 되었다.^[3] 그리고 methanotrophic bacteria는 1970년 Whittenbury 연구팀에 의해 100여 종의 균주가 새롭게 분리 동정되면서부터 연구가 활발하게 진행되었다. 뒤이어 산소와 methane이 존재하는 곳이면 어느 곳이든 methanotrophic bacteria가 광범위하게 분포되어 있는 것이 밝혀졌고, methanotrophic bacteria의 분리는 더욱 활발하게 진행되었다.

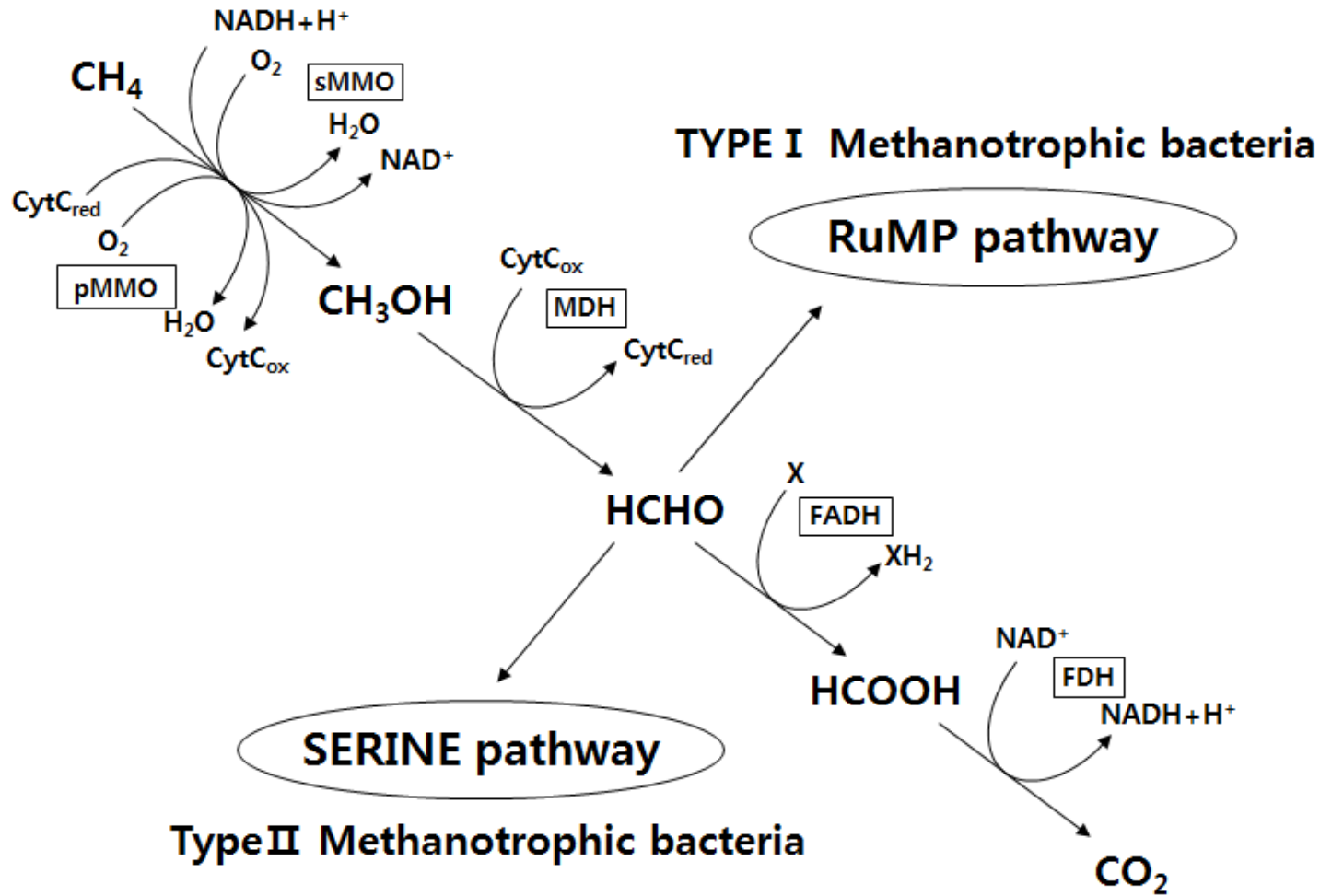


Fig.1. Pathways for the oxidation of methane and assimilation of formaldehyde. Abbreviations: CytC, cytochrome c;

FADH, formaldehyde dehydrogenase; FDH, formate dehydrogenase.^[2]

C. 분류학적인 측면에서의 methanotrophic bacteria

Methanotrophic bacteria는 1906년에 처음으로 Söhngen에 의해 알려졌으나, 1970년에 Whittenbury와 그의 동료에 의해 100여종의 새로운 균주가 분리 되면서 분류학적으로 나뉘게 되었다. 분리된 균주는 형태, intracytoplasmic membrane의 구조, resting stage에서의 형태 변화, 계통학적인 특징 등에 의해 5가지 그룹 즉, *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylococcus*, *Methylocystis*, 와 *Methylosinus*로 나뉘면서 구체화 되었다. Methanotrophic bacteria는 크게 type I, type II, 그리고 type X로 나뉘게 되며, *Methylomonas* 종과 *Methylobacter* 종은 type I, *Methylosinus* 종과 *Methylocystis* 종은 type II, *Methylococcus* 종은 type X에 속한다 (Table 1).^[4-8] Type X는 type I과 매우 유사한 특징을 가지고 있지만 type X는 type I과는 달리 Calvin-Benson cycle의 serine pathway를 사용하며 ribulose bisphosphate carboxylase로 불리는 효소가 낮은 농도로 존재한다. 그리고 type I은 formaldehyde 동화작용의 첫번째 경로로 ribulose monophosphate (RuMP) pathway를 사용한다는 것이 type X와 구별된다.^[9-11] 또한 type X methanotrophic bacteria는 type I, type II methanotrophic bacteria에 비해 비교적 높은 온도에서 성장할 수 있다. 그리고 1993년 Bowman의 연구팀은 Whittenbury팀과는 다르게 DNA-DNA hybridization, 수치학적인 분류학적 진화관계, phospholipid fatty acid (PLFA)의 구성성분, 유전적 진화관계와 genomic physicochemical properties 등을 연구하여 각각의 종들을 분류하고, 분류된 종들 간의 유연관계를 파악함으로써 더욱 세부적으로 분류하였다. 그리고 새로 분리된 몇 가지의 균주를 포함한 136여종의 methanotrophic bacteria의 약 124개의 표현형들을 비교하였다.^[12] 이들은 type I methanotrophic bacteria 종간에 세 가지의 유사한 cluster를 가지고 있는 것을 알아냈고, *Methylococcus*, *Methylomonas*, *Methylobacter*와 *Methylomicrobium* 등은 *Methylococcaceae* family(과, 科)에 속한다고 제안하였다.^[12, 13] 그리고 type I에 속하는 종들 간에서도 특징들이 다르다는 것을 밝혀

냈으며, type II에 속하는 종들 (*Methylocystis*와 *Methylosinus*)도 마찬가지로 종들 간의 특징이 다르다는 것을 밝혀냈다.

D. 연구배경 및 목적

Methane은 지구온난화의 주범인 온실가스 (CO_2 , N_2O , HFCs, CH_4 등)로 지구온난화지수 (global warming potential, GWPs)로 비교하면 단위 체적당 CO_2 에 비해 21배로 지구온난화에 미치는 영향이 크다.^[14] 따라서 methane의 대기 중 방출을 억제할 필요가 있다. Methane은 전 세계적으로 매장량이 $70\sim 230 \times 10^{12} \text{ m}^3$ 으로 추정된다. 그러나 매년 상당 부분이 석탄이나 원유를 채취 할 때 나오는 부산물로 취급되어 대기 중으로 그냥 방출되거나 아무런 의미도 없이 태워지고 있는 실정이다. 현재 연료로 사용되고 있는 methane은 액화 천연가스 (liquefied natural gas, LNG) 형태이며 생산지에서 부피를 줄인 후에 소비지로 운반 되는 것이 보통인데 이러한 방법은 비용이 많이 들 뿐만 아니라 상당한 폭발위험을 내포하고 있다. 따라서 methane을 methanol로 전환하여 운반하는 것이 연료의 취급면에서 큰 도움이 된다.^[15]

지금까지 화학제품 중 생산규모가 가장 큰 ethylene, propylene은 주로 석유를 통해 생산되었으나, 최근에는 methanol의 전환을 통한 생산이 가능해지고 있다. 이러한 기술은 주변 제품에 머물던 methanol이 화학 산업의 주류 분야로 진입하고 있음을 의미한다.^[16] Methanol은 gasoline을 대신하여 자동차 연료로 사용할 수 있는 청정 액체연료이면서, gasoline 옥탄가 상승제로 사용되는 MTBE (methyl tertiarybutyl ether)를 비롯하여 olefin, ethylene, propylene 등 여러가지 화학물질의 합성 전구체로도 용도가 크다. Methanol의 제조원료는 methane, shale oil, 석탄, 납사, 중유 등이 될 수 있다. 이중 methane은 값이 싸기 때문에 methanol 전환에 사용된다면 매우 중요한 자원이 될 수 있다.

Methane을 methanol로 전환하는 방법은 물리화학적 방법과 생물학적인 방법이 있다. 물리화학적 방법은 methane에 적은 양의 산소를 공급하여 산화시키는 부분산화반응 (partial oxidation)과 수증기와 methane을 고온, 고압에서 반응시

키는 증기개질반응 통해 methanol 합성에 필요한 합성가스 (syn gas)를 생산하고 이렇게 생산된 CO₂와 H₂를 반응시켜 흡열반응에 의해 methanol로 합성한다. 물리화학적 methanol 생산 방법은 고온과 고압이 필요하여 많은 비용이 소요되고, 또한 에너지 효율이 낮은 단점을 갖는 반면에 생물학적 전환방법은 methanotrophic bacteria (메탄산화세균)를 이용하여 상온, 상압에서 methane을 methanol로 전환시킨다. 따라서 methanotrophic bacteria를 이용한 생물학적 전환공정이 물리화학적 공정보다 경제적인 비용과 위험성을 배제할 수 있다는 장점이 있다.^[17]

Methanotrophic bacteria는 methane monooxygenase (MMO)라 불리는 효소를 이용하여 Figure 1 와 같은 방법으로 methane을 최종적으로 CO₂와 H₂O로 분해한다. MMO는 particulate MMO, 와 soluble MMO (pMMO, sMMO)의 두 형태로 존재한다. sMMO는 type II, type X methanotrophic bacteria에서 발견되며, pMMO는 알려진 모든 methanotrophic bacteria에서 발견된다. pMMO는 구리이온이 존재할 때 세포막에서 생성되고, 반대로 sMMO는 구리가 없거나 고갈된 상태에서 세포질 내에서 생성된다. 이 sMMO와 pMMO는 활성 부위에 존재하고 있는 금속이온이 다를 뿐만 아니라 촉매의 반응특성, 기질의 특이성, 저해제 종류 등에 있어 많은 차이를 보이는 것으로 보고되고 있다.^[18, 19]

Methanotrophic bacteria는 일련의 산화과정을 거쳐 methane을 최종적으로 CO₂와 H₂O로 분해하기 때문에 중간 대사산물인 methanol을 생산하기 위해서는 다음의 두 가지 사항이 중요하다. 첫 번째는 methanol을 기질로 이용하는 MDH (methanol dehydrogenase)의 활성을 제거하는 것과 두 번째로 MMO에 지속적으로 NADH를 공급하여 methanol을 생산하는 것이다. MDH의 활성을 저해하는 물질은 지금까지 보고된 바로는 cyclopropanol이나 cyclopropane, 또는 고농도의 인산염이 효과적이다. 여기서 인산염은 균체 내에 다른 효소들이 미치는 영향과 저해 정도 조절의 용이성 등을 고려해 보면 다른 저해제보다 우수한 것으로 알려져 있다.^[19] Methanotrophic bacteria는 한 분자의 methane이 methanol로 전환되려면 반드시 한 분자의 NADH가 필요한데 균체 성장시 정상적인 대사과정에서는

산화의 마지막 단계를 담당하는 FDH (formate dehydrogenase)가 NADH를 공급하지만 만일 MDH의 활성이 제거되어 methanol 이후의 대사가 완전히 중단된다면 인위적인 방법으로 반응액 안에 formate를 연속적으로 공급하여야 한다. 또는 MDH의 활성을 부분적으로만 제거시켜서 세포 내에 methanol 중 일부가 계속 formate으로 전환될 수 있도록 할 수 있는데 이러한 경우 methane으로부터 생산되는 methanol이 감소하게 된다.^[20]

Methanotrophic bacteria를 이용한 methanol 생산의 시도는 몇몇 논문에서 보고되고 있다. Metha 등은 *Methylosinus trichosporium* 0B3b를 이용하여, 고정화 세포와 세포 현탁액의 회분식 및 연속식 생산 공정에서의 methanol 합성에 대한 기본적인 동력학을 검토하였다.^[21] 이들이 확립한 고정화 세포의 최적조건에서 최대 methanol 생성속도는 $267 \mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{hr}$ 이었고, 세포 현탁액을 이용하였을 때의 최대 methanol 생성속도는 $6 \mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{hr}$ 였으며, 이 속도를 72시간 이상 유지할 수 있었다. 한편 Tang과 Patras는 *Methylobacterium organophilum*을 이용하였는데 methanol 생성속도는 저해제 농도에 매우 민감하며, 온도나 pH 등의 환경적인 요인에 크게 의존하였다.^[22] Shimoda 등은 *M. trichosporium* 0B3b를 cyclopropane으로 처리한 후 methane, ethane, propane, 그리고 butane으로부터 methanol, ethanol, propanol, butanol의 생산과정을 연구하였다.^[23]

위의 연구들은 methanol 합성에 있어서 methanotrophic bacteria의 이용 가능성을 보여 주었지만, 균체의 배양조건, MMO의 생성위치, MMO 생성의 최적화, methanol 생성에 관련된 효소의 동력학적인 거동 등을 구체적으로 설명하기에는 미흡함이 많다.

본 연구에서는 전라남도 지역의 농지, 습지 및 가축 배설물로부터 3종의 methanotrophic bacteria를 분리하여 그 중 가장 생장이 뛰어난 균주를 선택하여 그람 염색과 SEM (scanning electron microscope)를 통한 형태학적 특성, 한천고체배지에서의 배양학적 특성, Harold의 Microbiological Applications에 기술된 방법을 통한 생리·생화학적 특성, 16S rDNA 분석을 통한 분자생물학적 특성 등을 조사하고 다른 methanotrophic bacteria 간의 분자생물학적 유연관계

를 분석하였다. 그리고 온도, pH, 탄소원, 질소원, 구리이온의 농도 등을 달리 하여 최적성장조건을 파악하였다.

Table 1. Characteristics of type I, type II, and type X methanotrophic bacteria.

Characteristic	Type I	Type II	Type X
Cell morphology	Short rods, usually occur singly; some cocci or elipsoids	Crescent-shaped rods, rods, pear-shaped cells, sometimes occur in rosettes	Cocci, often found as pairs
G+C content of DNA (mol%)	49-60	62-67	59-65
Membrane arrangement			
Bundles of vesicular disks	Yes	No	Yes
Paired membranes aligned to periphery of cells	No	Yes	No
Nitrogen fixation	No	Yes	Yes
Resting stages formed			
Exospores	No	Some strains	No
Cysts	Some strains	Some strains	Some strains
RuMP pathway present	Yes	No	Yes
Serine pathway present	No	Yes	Some strains
Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase present	No	No	Yes
Proteobacterial subdivision	Gamma	Alpha	Gamma

II. 균주의 분리 및 동정

A. 실험 재료 및 방법

1. 실험재료

Methanotrophic bacteria를 분리하기 위하여 전남 지역의 버 재배지, 습지 및 가축 배설물로부터 시료를 채취하여 분리용 시료로 사용하였다.

2. 실험방법

(a) 기본 배지의 조성

기존에 알려진 methanotrophic bacteria의 배양액인 Higgins의 Nitrate Minimal Salt (NMS) medium을 변경하여 사용하였다 (Table 2).^[17]

(b) 균주 분리 방법

Methanotrophic bacteria는 methane만을 탄소 및 에너지원으로 이용하기 때문에 다음과 같은 방법으로 실험을 하였다. 채취한 토양 및 배설물 시료 1 g을 200 mL의 NMS 배지에 시료 2 g을 접종하였으며, 입구 부분은 제작한 실리콘 마개를 이용하여 밀봉한 다음 methane gas를 주입하였고, 30°C, 180rpm 조건으로 배양하였다. Methane gas 주입은 air와 methane 비율을 6:4 (v/v)로 조정된 후 0.2 µm 공극 크기를 가진 air filter를 중간에 끼운 다음 gas를 주입하였다. 처음 시료를 접종한 배양액은 2주일 동안 배양한 후, 7일 간격으로 새로운 NMS 배지에 1% (v/v)의 농도로 배양액을 접종하여 동일하게 제작한 bottle에서 세 번 계대 배양하였다 (Fig. 2).

최종 계대 배양한 배양액 1 mL을 취하여 NMS 한천고체배지 (agar 1.5%, w/v)위에 각각 10^{-1} ~ 10^{-6} 으로 각각 연속 희석하여 평판도말 하였다. 도말한 고체배지는 gas-tight sealed box에 넣고 vacuum pump를 이용하여 공기를 제거 후 methane을 주입하였고, 1

일 간격으로 methane을 교환하여 주었다. 3주간 배양을 하면서 1일 간격으로 콜로니의 형성여부를 관찰하였고 형성된 콜로니들을 확인 후 새로운 NMS 한천고체배지에 접종하여 1~2주일 더 배양을 한 후 콜로니가 균일하게 생성되고, 광학현미경으로 관찰하여 균체가 동일하면 순수 분리된 것으로 간주하였다.

3. 분리균주의 특성 조사

(a) 형태학적 특징

분리된 균주의 형태 및 크기는 균주를 7일 간 액체배양 한 다음 그람 염색 방법을 이용하여 형태와 크기를 판별하였다. 좀 더 정확한 크기나 모양을 관찰하기 위하여 SEM (scanning electron microscope, JSM-7500F+EDS, Oxford, UK)을 이용하여 판별하였다.

(b) 배양학적 특징

분리된 균주의 배양학적 특징은 NMS 고체 및 액체배지에서 자란 콜로니의 모양, 크기 및 색깔 등을 관찰하였다.

(c) 배양 최적 조건

1) 배양 온도의 영향

분리된 균주의 최적 성장 온도를 검토하기 위해 균주 분리 방법에서 언급한 배양방법과 동일한 실험 방법에 온도만 달리하여 25 ~ 35 °C까지 5°C씩 간격을 두어 7일간 배양하였다.

2) 배양액의 pH 영향

분리된 균주의 최적 pH를 검토하기 위해 균주 분리 방법에서 언급한 배양방법과 동일한 실험 방법에 pH만 달리 하여 pH 5 ~ 10 사이에서 각각 pH 1 씩 간격을 두고 7일간 배양하여 균체의 dry weight를 측정하였다.

Table 2. Composition and concentration of stock solution for Higgins nitrate minimal salt medium.

1. Salt solution	<i>g/ ℓ</i>
NaNO ₃	0.85
K ₂ SO ₄	0.17
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.037
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.007
2. Phosphate buffer solution	<i>g/ ℓ</i>
KH ₂ PO ₄	0.53
Na ₂ HPO ₄	0.86
Adjust solution to pH 7.0	
3. Trace metal solution	<i>mg/ ℓ</i>
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.514
MnSO ₄ · 7H ₂ O	0.446
H ₃ BO ₃	0.124
NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0.096
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.096
KI	0.166
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.5
1 ml of 1mM H ₂ SO ₄ per liter of trace metal solution	
4. Iron solution	<i>mg/ ℓ</i>
FeSO ₄ · 7H ₂ O	44.8
5 ml of 1mM H ₂ SO ₄ per 100 ml of iron solution	

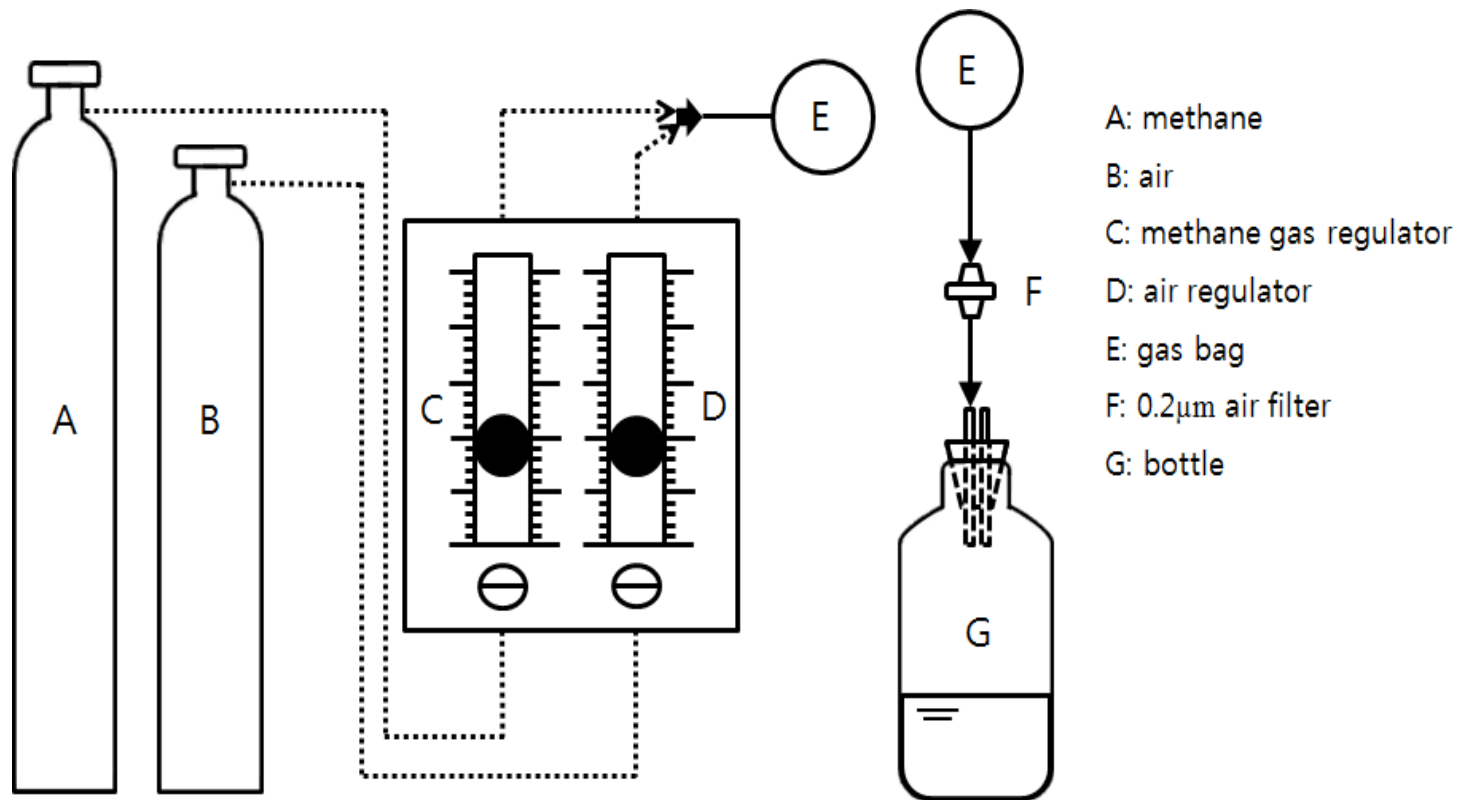


Fig. 2. Mixed gas injection technique for the cultivation of methanotrophic bacteria.

3) 질소원의 영향

분리된 균주의 배양에 사용되는 기본 NMS 배지의 질소원으로 포함 되어 있는 NaNO_3 이외에 다른 질소원들을 이용할 수 있는지 알아보기 위해 NaNO_3 대신 다른 질소원들을 이용하였다. 멸균된 NMS 액체배지를 50 ml 용량의 vial에 10 ml을 넣고, 미리 배양된 분리균주 1% (v/v) 접종하고 butyl rubber stopper로 밀봉한 후, air와 methane 비율을 6:4로 하여 2 μm 공극크기를 가진 filter를 syringe에 끼워서 vial 내부의 gas를 치환하였다. Shaking incubator 30°C, 180rpm에서 7일 배양 후 혼탁도에 따라 질소원 이용 여부를 조사하였다. NaNO_3 는 사용하는 NMS 배지에 포함 되어 있기 때문에 대조군으로 사용하였으며, 질소원의 농도는 0.1% (w/v)으로 조절하여 사용하였다. 사용한 질소원은 Table 6과 같다.

4) 균체 성장 속도

균체 성장 속도는 50 ml vial 28개에 NMS 배지 10 ml을 각각 넣고 균체를 접종 시킨 뒤 shaking incubator 30°C, 180rpm으로 7일 동안 12시간 간격으로 vial을 2개씩 수거하여 dry weight을 측정하였고, 균체의 비성장속도 (specific growth rate) 및 세대 시간 (generation time)은 다음 식을 이용하여 구하였다.^[24]

$$\text{Specific growth rate } (\mu) = \frac{(\ln A - \ln A_0)}{t - t_0}$$

$$\text{Generation time (G)} = \frac{0.639}{\mu}$$

A_0 : 초기 건조중량

A : 말기 건조중량

t_0 : 초기 배양시간

t : 말기 배양시간

(d) 생리학적 및 생화학적 특성

생리학적 및 생화학적 특성의 조사는 Harold의 Microbiological Applications에 기술된 방법들을 참조하여 수행하였다.^[25]

1) 세포벽 염색

분리된 균주의 세포벽 구조는 Burke의 그람 염색법에 의해 분리균주를 염색한 후 광학현미경의 1000 X 배율로 관찰하였으며, 균체가 보라색 또는 붉은색으로 염색되었는지 관찰하였다.^[26, 27]

2) Catalase 활성 측정

분리된 균주의 Catalase 활성은 균주를 plate에 배양하여 1개의 콜로니를 멸균된 백금으로 채취하여 slide glass에 옮긴 후 hydrogen peroxide 3% (v/v)를 몇 방울 가하고, 5분 이내에 기포가 발생하는지에 따라서 결정하였다. Catalase 활성은 기포가 생기면 positive, 기포가 생기지 않으면 negative로 표기하였다.

3) Oxidase 활성 측정

분리된 균주의 Oxidase 활성 측정은 tetramethyl-*p*-phenylenediamine 1% (w/v) 용액을 만들어 사용하였으며, 실험 방법은 미리 배양한 균주 plate에 tetramethyl-*p*-phenylenediamine 1% (w/v) 용액을 가하여 30초 이내에 콜로니가 어두운 보라색으로 변하면 positive, 변화가 없으면 negative로 결정하였다.

4) Urease 활성 측정

분리된 균주의 Urease 활성 측정은 urea broth(Stuart's)에 20 ml test tube에 5 ml 을 넣고 미리 배양된 분리균주 1% (v/v)를 접종시켜 5일간 배양하였으며, 배양액의 색이 pink-red로 변하면 positive, 변화가 없으면 negative로 결정하였다.

5) Antibiotic diffusion assay

항생제 배지에 성장 배양액을 취해 평판배지에 멸균된 백금으로 획선도말 하여 gas-tight sealed box에 넣고 incubator 30°C에서 7일간 배양하였으며, 1일에 1번씩 확인하고 colony 생성 여부로 항생제에 대한 감수성을 판단하였다. 실험에 사용한 항생제는 총 6종으로 종류는 다음과 같다; Streptomycin, kanamycin, ampicillin, polymyxin B, chloramphenicol, rifampicin.

6) 탄소원과 에너지로 이용할 수 있는 기질의 범위

여러 가지 탄소원이 첨가된 NMS 액체배지를 50 ml의 용량을 가진 vial에 10 ml을 넣고 butyl rubber stopper로 밀봉 후 미리 배양된 분리균주를 100 μ l 접종하여 7일 동안 배양하였으며, 이후 혼탁도에 따라 기질 이용 여부를 조사하였고, methane이 포함되어 있는 배지에 균을 접종시킨 것을 대조군으로 사용하였다.

본 실험은 에너지 및 탄소원으로 이용된 탄소원의 농도를 고체는 0.2% (w/v)를 사용하였고, 휘발성 탄소원은 배지를 멸균한 후 0.2 μ m의 공극 크기를 가진 syringe filter를 이용하여 여과 한 후 0.2% (v/v) 접종 하였다. 사용한 탄소원은 Table 5 와 같다.

7) 구리 농도에 따른 영향

분리된 균주의 생장에 구리이온이 미치는 영향에 대해 알아보기 위해 50 ml vial에 NMS 배지 10 ml을 넣고 $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 이용하여 구리 농도를 각각 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 45 그리고 60 μ M로 각각 조절하여 첨가한 후 성장도를 조사하였다. Methane은 주사기를 이용하여 30 ml을 주입하고, 30°C, 180rpm에서 7일간 배양 하였다.

(e) 분자생물학적인 특성

1) 16S rDNA 염기서열 분석

분리된 균주의 유전학적 특성을 확인하기 위하여 16S rDNA의 염기서열 분석을 수행하였다. 선별된 균주의 genomic DNA를 template DNA로 사용하였다. Genomic DNA추출은 선별된 균주를 NMS 배지에서 배양온도 30°C에서 7일 동안 배양하여 cell pellet 을 확보하여 사용하였다. Cell pellet에서의 균체 추출 과정은 멸균된 증류수로 두 번 세척하고 10 ml의 resuspension solution (50 mM glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl 그리고 pH 8.0)에 재현탁 하였다. 여기에 1 ml의 lysozyme용액 (50 mg/ml)과 0.5 ml RNase (2 mg/ml) 및 0.1 ml proteinase K (50 mg/ml)을 첨가하여 37°C에서 1 시간 방치한 다음 0.6 ml의 10% SDS solution을 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 방치 하였다. 반응액에 1 ml의 mercaptoethanol을 가한 후 반응액의 0.5배에 해당하는 3M sodium acetate solution (pH 5.2)을 가하여 반응액에 동일량의 chloroform을 처리하였다. 이후 15,000 × g에서 30분간 원심분리하여 상등액을 취하였고, 이렇게 얻은 상등액에 0.6배에 해당하는 iso-propanol을 가한 후 chromosomal DNA pellet을 회수하여 70% ethanol로 세척한 다음 60°C에서 건조하였다. 3 ml의 TE buffer (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA)에 녹여 실험에 사용하였다. 16S rDNA 염기서열을 Polymerase Chain Reaction (PCR)으로 증폭시켰다. PCR에 사용한 universal primer set은 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 1492R (5'-GTTTACCTTGTTACGACTT-3')이다. Denaturation, annealing, extension은 각각 95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 2분의 조건으로 30 cycles 수행하였다.^[28] PCR product를 DNA purification kit (QIAGEN Inc.,)로 정제한 후, Macrogen Co.에 의뢰하여 sequencing 하였다. 16S rDNA 염기서열은 NCBI GenBank network service의 BLAST program을 이용하여 data검색을 하였다.^[29]

III. 실험 결과

A. 실험균주의 분리 및 특성

1. 우수 균주의 분리

전남 지역의 논, 늪지, 퇴비, 축산분뇨 등의 지역 50여 곳에서 시료를 채취하여 methanotrophic bacteria의 분리에 이용하였다. 액체배지에서 세 번 계대배양 하고 NMS 한천고체배지에 접종하여 관찰하면서 생성된 콜로니를 날짜 별로 확인하며 7일간 배양 후 새로운 한천고체배지에 계대배양 하였다. 콜로니는 2일 후부터 형성 되었고, 5일 후에는 모든 콜로니가 형성 되었다. 한천고체배지에 나타난 형태가 다른 모든 콜로니를 각각 세 번 계대배양한 후 최종적으로 콜로니가 균일하게 형성 되면 그람 염색을 실시하여 광학현미경으로 관찰하였다. 순수 분리된 균주는 사면배지에 접종하여 4°C 냉장실에 보관하였다. 콜로니의 모양과 색깔 및 성장 속도가 다른 3종의 균 (white, pink, orange)을 분리하였다. 순수 분리된 균주 3가지를 NMS 액체배지에 7일간 배양한 뒤 건조 균체량이 가장 우수한 orange색 균주를 실험에 사용하였다.

2. 분리 균주의 특징

(a) 형태 및 배양학적 특징

분리된 균주의 형태 및 배양학적 특징은 Table 3 와 같다. 분리된 균주는 그람 음성이며, 타원형 보다는 짧은 막대형에 가까웠고 크기는 $1.1\sim 1.2 \times 1.6\sim 1.9 \mu\text{m}$ 이며 짝을 이루지 않고 거의 한 개씩 존재하였다 (Fig. 3). 고체 배양시 콜로니는 5일 후에 형성 되었으며, 콜로니는 오렌지색을 나타냈다. 액체배지에서도 균체는 오렌지색을 띠었으며, 덩어리를 형성하면서 성장하였다.

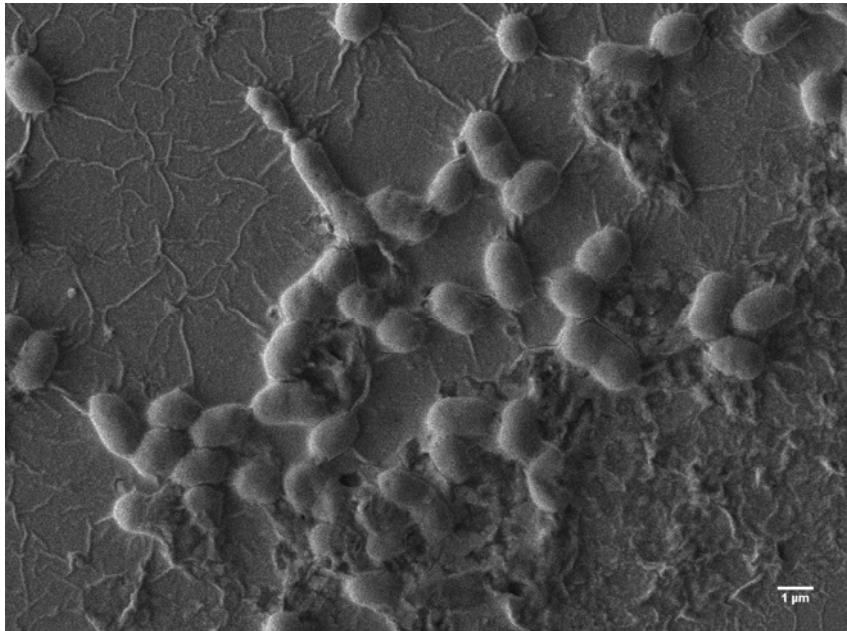
(b) 생리 및 생화학적 특징

분리된 균주의 생리·생화학적인 특성은 Table 3 와 같다. 분리된 균주는 catalase 의 활성은 없었으나, oxidase 활성은 나타났다. 분리된 균주의 항생제 감수성 실험에서 polymyxin B에는 내성을 가지나, 나머지 항생제에 대해서는 민감하게 반응하였다 (Table 4).

(c) 이용 가능한 탄소원의 범위

분리된 균주가 이용할 수 있는 탄소원은 Table 5 와 같다. NMS 액체배지에 여러 가지의 탄소원을 첨가하여 실험하여 이용가능성을 조사하였다. 분리된 균주는 탄소 및 에너지원으로 첨가된 유기물 중 methanol 0.1%(w/v)만을 이용하였고 실험에 사용된 다른 탄소원들은 이용하지 않았다.

(A)



(B)

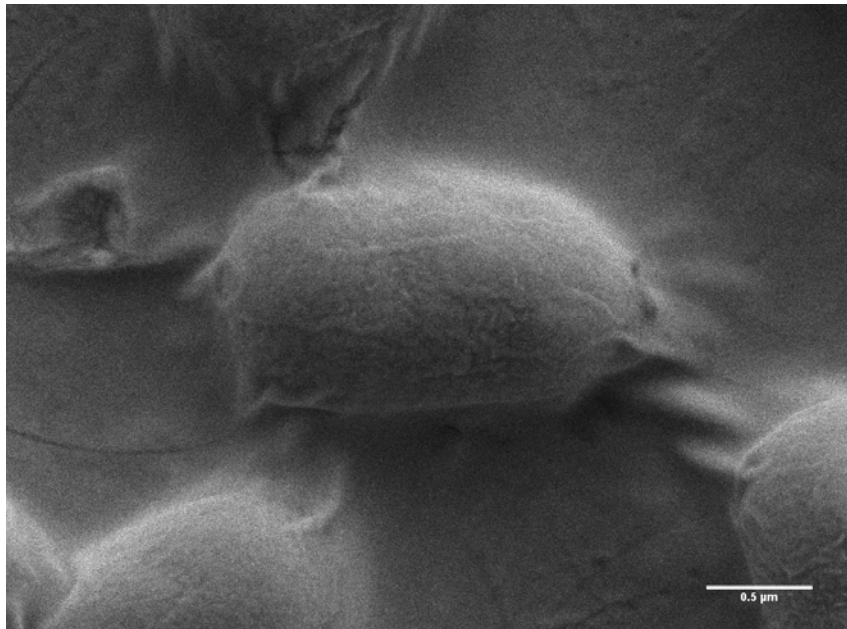


Fig. 3. Morphology of the isolate was determined by scanning electron microscopy.

Table 3. Morphological and biochemical properties of the isolate

Characteristics	The isolate
Morphology	Short-rod
Gram reaction	Negative
Size	1.1~1.2 × 1.6~1.9 μm
Colony color	Orange
Oxidase	Positive
Catalase	Negative
Urease	Negative
Growth temperature (optimal)	25~35°C (30°C)
Optimal Cu^{2+} concentration	10 μM
Antibiotic resistance	polymyxin B
Growth pH range (optimal)	5~8 (7)
Specific growth rate (μ)	0.046 hr^{-1}
Generation time (G)	15.13 hr

Table 4. Antibiotic sensitivity test of the isolate

Antibiotics	concentration	Sensitivity*
Streptomycin	100 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$	S
Kanamycin	50 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$	S
Ampicillin	50 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$	S
Polymyxin B	100 unit/ $\text{m}\ell$	R
Chloramphenicol	35 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$	S
Rifampicin	100 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$	S

*: S, sensitive ; R, resistant

Table 5. Carbon source utilizing test

Carbon	Utilization*
Methane (control)	+
Ethanol	-
Methanol	+
Glucose	-
Monomethylamine	-
Formaldehyde	-
Acetate	-
Citrate	-
Malate	-
Succinate	-
D-xylose	-

*:+, used ; -, not used

Carbon source concentration : 0.2% (w/v or v/v)

3. 분리 균주의 최적 배양 조건

(a) 배양온도의 영향

분리된 균주의 최적 배양온도를 알아보기 위해 25, 30, 35℃로 맞추어 7일간 배양하였다. 분리균주는 30℃에서 가장 잘 성장 하였고, 25, 35℃에서는 생장에 저해를 받았다.

(b) 배양액의 pH 영향

분리된 균주의 pH에 대한 영향에 대한 결과는 Figure 4 와 같다. 분리된 균주는 pH 영역 5~6.0까지는 생장에 저해를 받았으나 7~8.0까지는 생장이 잘 되었고, pH 9.0 이상에서는 자라지 못하였다. 성장 최적 pH는 7.0이었다.

(c) 질소원의 영향

분리된 균주가 이용할 수 있는 질소원에 대한 결과는 Table 4 와 같다. 분리된 균주는 무기 질소원으로는 ammonium amidosulfate, potassium nitrate를 이용할 수 있었고, 유기 질소원으로는 yeast extract, L-alanine, L-glutamine, L-glutamic acid, DL-asparagine을 이용할 수 있었으나 실험에 사용된 다른 질소원들은 이용하지 못하였다.

(d) 구리 농도에 따른 영향

배양액 내의 구리 농도의 영향에 따른 결과는 Figure 5 와 같다. 분리된 균주는 10 μM 구리 농도에서 생장이 가장 좋았으나 25 μM 이상일 경우 생장에 저해를 받았다.

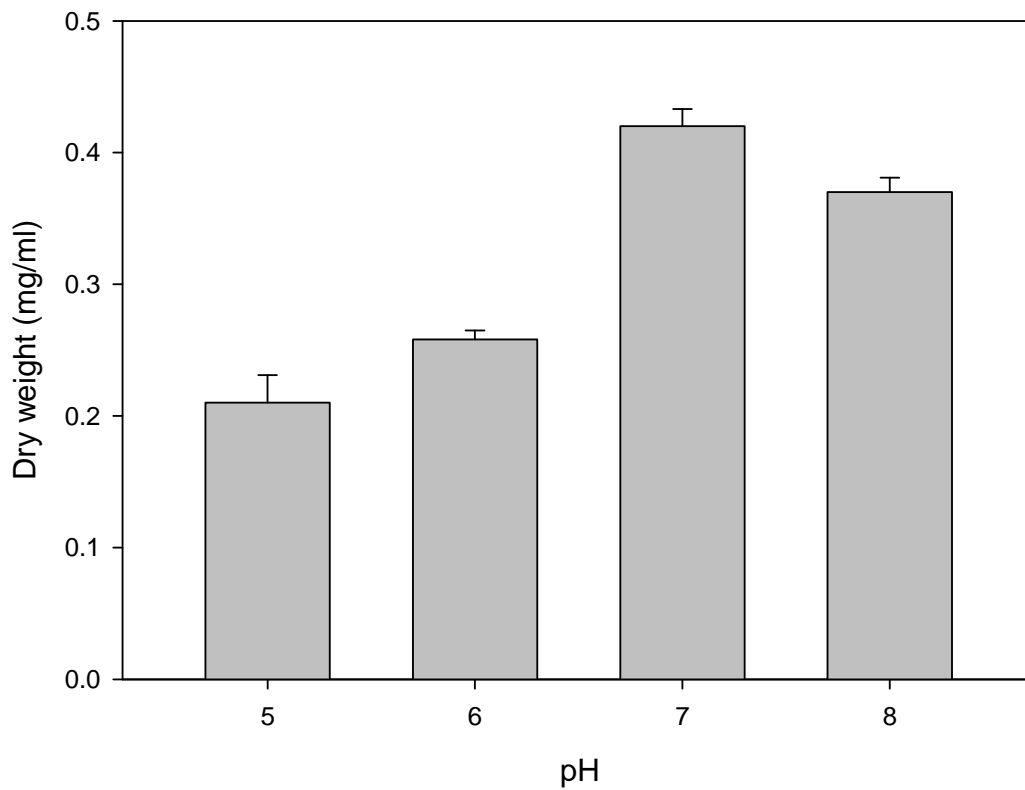


Fig. 4. Effect of pH on the growth of the isolate.

Table 6. Nitrogen source utilizing test

	Nitrogen source	Utilization*
Inorganic compounds	Ammoniummolybdate	-
	Ammonium amidosulfate	+
	Ammonium vanadate	-
	Ammonium dihydrogen phosphate	-
	Potassium nitrate	+
Organic compounds	Formamide	-
	Glycine	-
	Urea	-
	Yeast extract	+
	Ammonium oxalate	-
	L-alanine	+
	L-glutamine	+
	L-glutamic acid	+
	L-tryptophan	-
	DL-asparagine	+
Casitone	-	

*:+, used ; -, not used

Nitrogen source concentration : 0.1% (w/v)

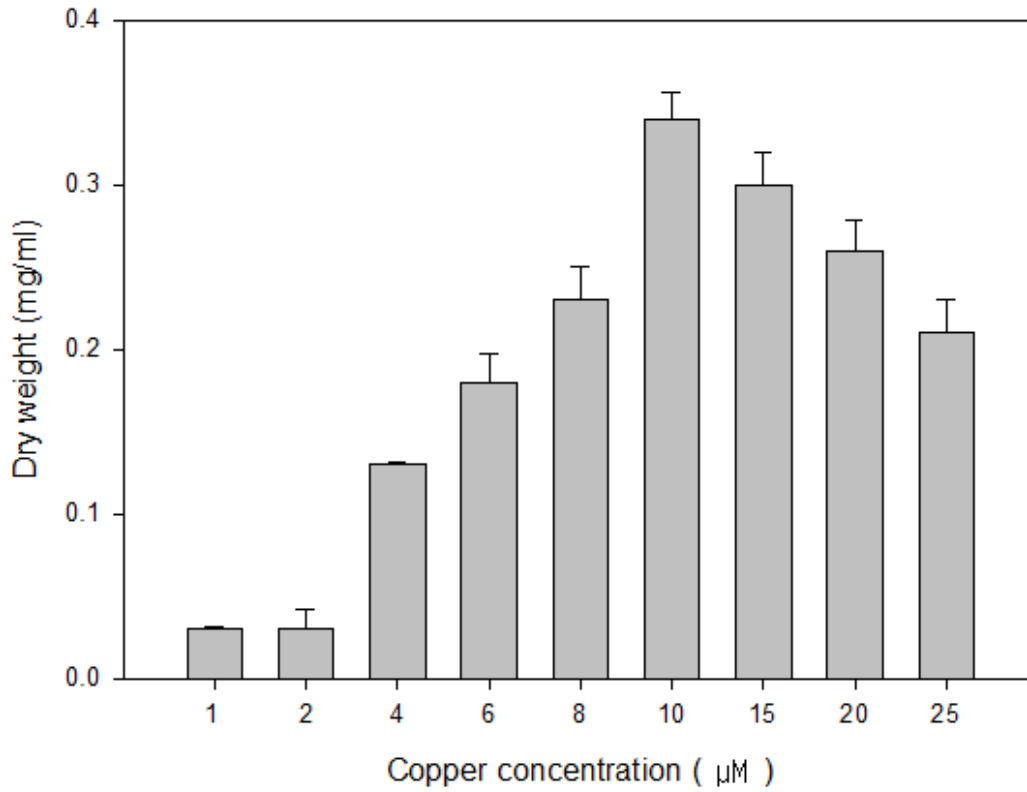


Fig. 5. Effect of copper concentration on the growth of the isolate.

(e) 균의 비성장 속도(specific growth rate) 및 세대시간(generation time)

28개의 50 ml vial에 air와 methane을 6:4 (v/v)의 비율로 조절하여 공급하면서 액체 배양을 통한 균체의 성장속도를 살펴보았다. 성장곡선은 Figure 6 와 같으며 12시간 간격으로 2개의 vial을 수거하여 dry weight를 측정하였다. 접종 24시간 후부터 자라기 시작하여 대수 증식기를 거쳐 96시간 후 정지기에 도달하였다. 최적 비성장속도 (μ_{max})는 0.046 hr^{-1} 이었고, 세대시간(G)는 15.13 hr 이었다.

5. 분자생물학적 특징

(a) 16S rDNA 염기서열 분석

균주 분류는 과거 Bergey's manual을 기초로 한 형태학적, 생화학적 특징을 이용하여 분류·동정하였지만 분류 속(genus)내 종(species)을 결정하기 위해 최근에는 16S rDNA 염기서열분석 방법이 활발하게 이용되고 있다. 선별된 균주의 정확한 분류 동정을 하기 위해서 16S rDNA 상동성을 분석하였다. 16S rDNA universal primer로 {27F-16S Forward (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 1492R-16S Reverse (5'-GTTTACCTTGTACGACTT-3')}를 제작하여 PCR (Polymerase Chain Reaction)을 수행한 결과 1,448 bp의 DNA 중합절편을 얻었다. 이 PCR product를 Macrogen Co.,Ltd.에 의뢰하여 16S rDNA sequence결과를 얻을 수 있었다 (fig. 7). 얻어진 유전자 염기서열은 NCBI (National Center for Biotechnology Information)에서 제공하는 BLAST program을 이용하여 유전자 상동성 검색을 실시하였다. 그 결과 선별된 균주는 *Methylmonas* sp. DH-1과 *Methylomonas koyamae* 균주의 16SrDNA와 각각 99.3%와 99.4%의 유사성을 나타냈다 (Fig. 8). 따라서 분리균주를 *Methylomonas* sp. SM-4로 명명하였다.

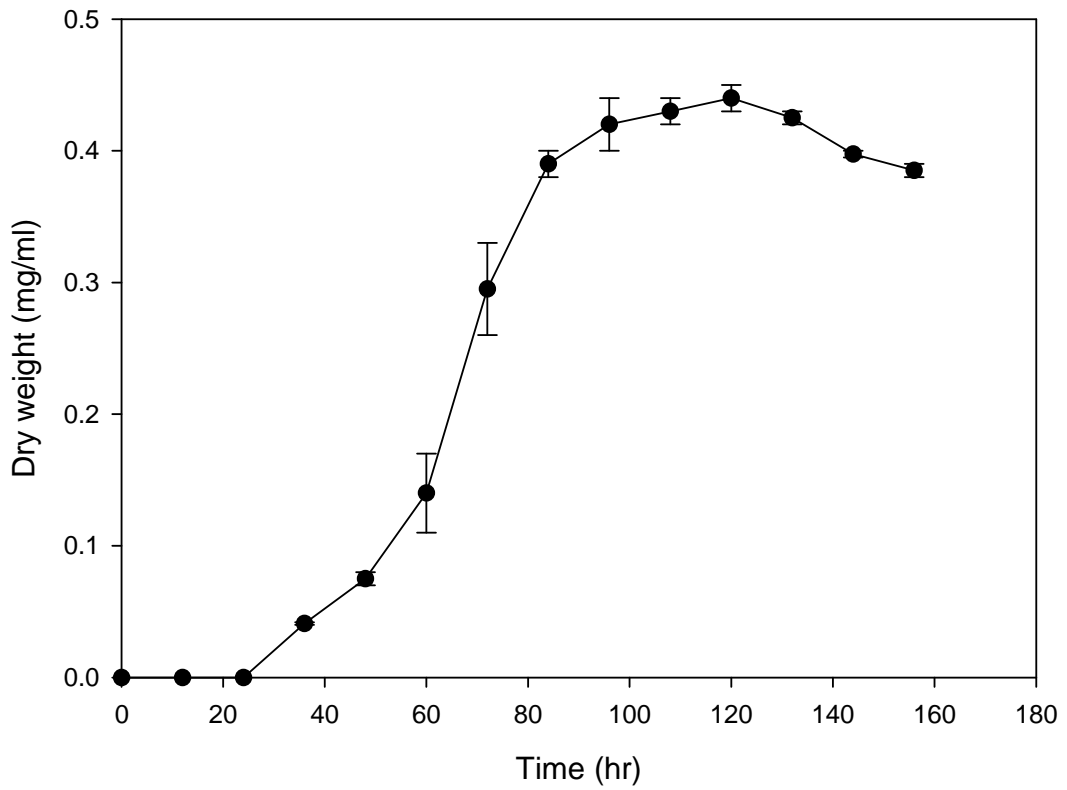


Fig. 6. Growth curve of the isolate

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGCT
 GATAAGGTGCTTGCACCTTTGATGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGCATAGGAATCTGCCTAT
 TAGTGGGGGACAACGTGGGGAAACTCACGCTAATACCGCATAACGATCTACGGATGAAAGCA
 GGGGACCTTCGGGCCTTGCCTAATAGATGAGCCTATGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAA
 AGGCCTACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTG
 AGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAG
 CCTGATCCAGCAATAACCGGTGTGTGAAGAAGGCCTGAGGGTTGTAAGCACTTCAATGGG
 AAGGAATACCTATCGGTTAATACCCGGTAGACTGACATTACCCATAACAAGAAGCACCGGCTAA
 CTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATAACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGCGTA
 AAGCGTGCGTAGGCGGTGATTTAAGTCAGATGTGAAAGCCCCGGGCTTAACCTGGGAAGTGC
 ATTTGATACTGGGTCACTAGAGTTGAGTAGAGGAGAGTGAATTTAGGTGTAGCGGTGAAA
 TCGGTAGAGATCTGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGACTCAAAGTACGCT
 GAGGTACGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGA
 TGCAACTAACTGTTGGTTCCTAAAGAACTTAGTAGTGAGCTAACGTATTAAGTTGACCGC
 CTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAGTCAAATGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGG
 TGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTACCCTTGACATCCTCGGAA
 CTTGTCAGAGATGACTTGGTGCCTTCGGGAACCGAGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCA
 GCTCGTGTGTAAGTGTGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTATCCTTAGTTGCCA
 GCGAGTCATGTCGGGAAGTCTAGGGAGACTGCCGGTGATAAACCAGGAGGAAGGTGGGGAC
 GACGTCAAGTCATCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCCGGTACAG
 AGGGCAGCGAAACCGTGAGGTCAAGCAAATCCCACAAAGCCGGTCCCAGTCCGGATTGCAG
 TCTGCAACTCGACTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGAATGCCGCGGTGA
 ATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGT
 AGGTAGTTTAACTTCGGGAGGGCGCTTACCACTTTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTA
 ACAAGGTAACC

Fig. 7. 16S rDNA sequence of the isolate

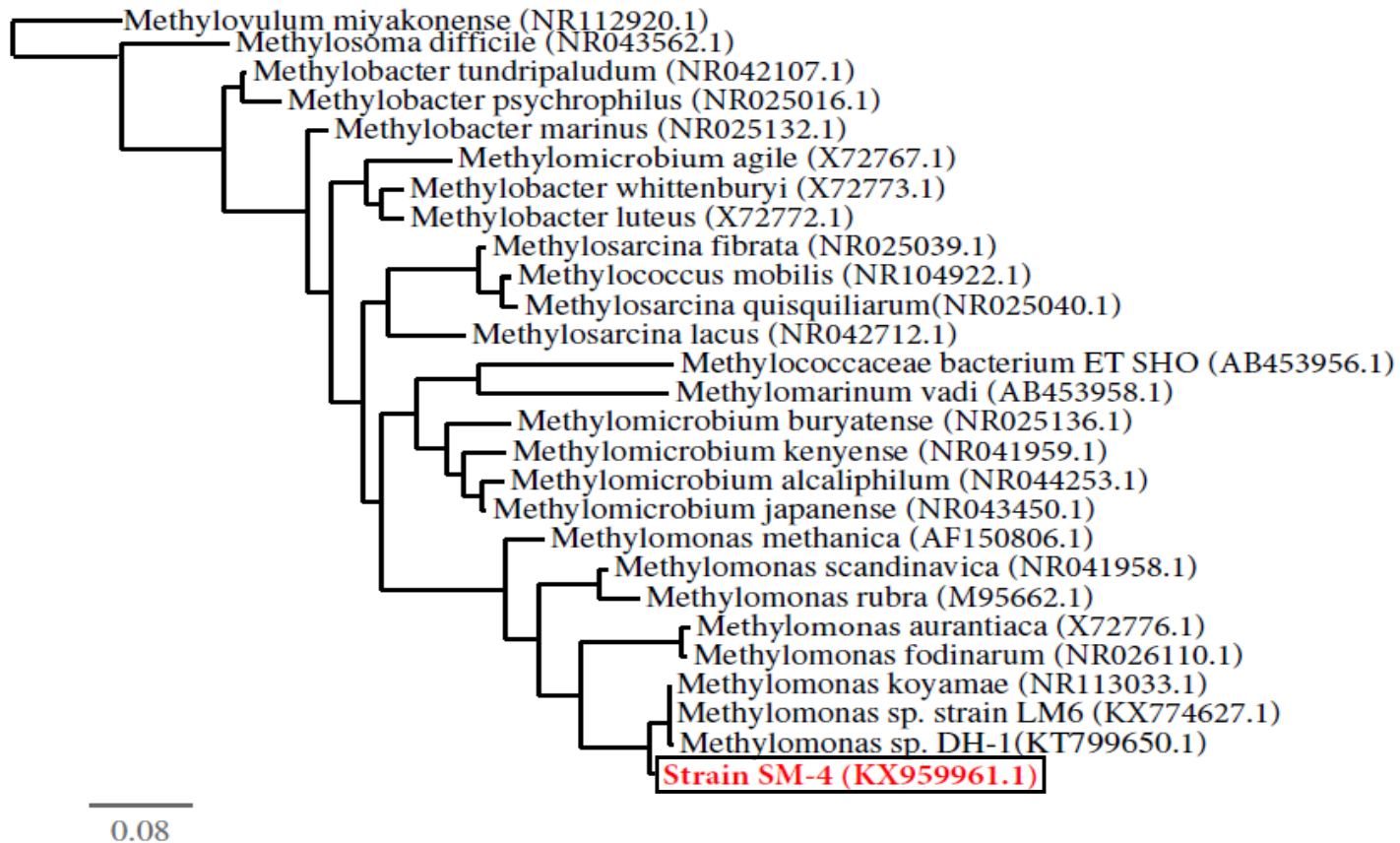


Fig. 8. Phylogenetic analysis of the 16S rDNA sequence of the strain SM-4 was compared with other strain. Genbank accession numbers are given in parentheses.

IV. 고찰

전남 일대의 논, 늪지, 두엄, 퇴비 등에서 methane만을 탄소원과 에너지원으로 사용하는 균주를 분리하여 생리학적, 형태학적, 배양학적 특성을 조사하였다.

본 실험에서 사용한 균주는 논외 토양시료에서 분리되었다. 균주 분리는 액체 상태에서 3번 계대배양을 한 후 NMS 한천고체배지에 접종하였다. 새롭게 생성되는 콜로니들을 새로운 NMS 한천고체배지에 각각 계대배양 하였다. 1~3일 사이에 형성된 콜로니들은 대부분 methanotrophic bacteria가 아닌 경우가 많았고, methane의 유무와 상관 없이 일시적으로 형성되었다가 더 이상 콜로니 크기가 커지지 않았다. 4~7일 사이에 형성된 콜로니들은 대부분 methanotrophic bacteria인 경우가 많았으며 methane이 없으면 더 이상 콜로니 크기가 커지지 못하였다. 이처럼 methanotrophic bacteria의 대부분의 생장이 느리게 되는 것은 resting stage가 되었을 때 exospore나 cyst의 형태로 바뀌기 때문인 것으로 사료된다 (Table 1). 실제 실험에서 사용된 균체를 4℃에 보관 후 다시 활성화 시키는데 7일 이상의 시간이 소요된 것을 확인하였다.

분리균주는 탄소 및 에너지원으로써 methane만을 사용하는 obligate methanotrophic bacteria이었고, 다른 methanotrophic bacteria와 마찬가지로 methanol도 사용할 수 있었으며, 다른 균주와 특이한 점은 액체 배양시 접종 후 4~5일이 되었을 때 균체가 덩어리가 형성되면서 생장한다는 것이다. 16S rRNA 유전자 염기서열 분석 결과 분리된 균주는 *Methylobacterium* sp.였고, *Methylobacterium* sp. DH-1 와 *Methylobacterium koyamae* 에 대해 각각 99.3%와 99.4%의 유사성을 보였다. 분리 균주의 정확한 분류를 위해서 ubiquinone system, intracytoplasmic structure, DNA의 G+C 함량 등의 추가적인 연구가 필요하다.

V. 결론

1. 전남 일대의 벼 재배지, 늪지, 두엄, 퇴비 등의 지역 50여 곳에서 채취한 시료를 이용하여 3번의 순수분리를 통해 가장 성장속도가 빠르며 다량의 균체를 생성하는 균주를 벼 재배지에서 분리하였다. 형태학적 특징으로 그람 음성, short-rod 형태를 가지고 있었고, 세균의 크기는 $1.1\sim 1.2 \times 1.6\sim 1.9 \mu\text{m}$ 였으며, NMS 고체한천배지와 액체배지 내에서 주황색을 띠며 자랐고 고체한천배지에서의 콜로니 크기는 1~2 mm였다.
2. 분리된 균주는 단순 확산방식, shaking incubator 30°C에서 180rpm으로 진탕양하였고, 이때 최적 비성장속도 (μ_{max})는 0.046 hr^{-1} 이었고, 세대시간 (G)는 15.13 hr이었다.
3. 분리된 균주의 배양 최적 온도는 30°C였으며 이보다 낮은 25°C나 높은 35°C에서는 생장에 저해를 받았다. 배양최적 pH는 7.0이었고, pH가 5.0, 6.0 그리고 8.0일 경우 생장에 저해를 받았으며 pH 9.0 이상에서는 자라지 못하였다. 탄소 및 에너지원으로 사용할 수 있는 탄소원은 다른 obligate methanotrophic bacteria와 같이 methane과 methanol만 사용할 수 있었다.
4. 분리된 균주의 생리화학적 특성 분석결과 catalase는 활성을 보였고, oxidase와 urease의 활성은 보이지 않았다. 실험에 사용된 항생제에서는 polymyxin B에서만 내성을 보였다.
5. 분리된 균주는 무기 질소원으로는 ammonium amidosulfate, potassium nitrate를 사용하였고, 유기질소원으로는 yeast extract, L-alanine, L-glutamine, L-glutamic acid, DL-asparagine을 사용하였다.
6. 분리된 균주는 구리이온이 첨가되지 않을 때 보다 농도가 높아질수록 균체의 생장은 좋아졌고 $10 \mu\text{M}$ 에서 가장 좋았으며, $25 \mu\text{M}$ 을 초과 할 경우 생장에 저해를 받았다.
7. 분리된 균주의 16S rDNA 염기서열 분석 결과 type I methanotrophic bacteria인 *Methylobomonas* sp. 였고, *Methylobomonas* sp. DH-1와 *Methylobomonas koyamae*에 대해 각

각 99.3%와 99.4%의 유사성을 보였다. 따라서 분리 균주를 *Methylomonas* sp. SM-4로 명명하였다.

VI. 참고문헌

1. Anthony, C. (1982). The biochemistry of methylotrophs. *Academic Press Ltd.* London.
2. Richard S. Hanson, and Thomas E. Hanson. (1996). "Methanotrophic Bacteria." *MICROBIOLOGICAL REVIEWS*, p. 439-471.
3. Shöngen, N.L. (1906). "Über bakterien, welche methan ab kohlenstoffnahrung and energiequelle gebrauchen. *Parasitenkd. Infectionskr.*" Abt. 2. (15):513-517.
4. Gal'chenko, V. F., and L. V. Andreev. (1984). Taxonomy of obligate methylotroph s.p. In R. L. Crawford and R. S. Hanson (ed.), *Microbial growth on C1 compounds*. American Society for Microbiology, Washington, D.C. p. 269-281.
5. Green, P. N. (1992). Taxonomy of methylotrophic bacteria, In J. C. Murrell and D. P. Kelley (ed.), *Microbial growth on C1 compounds*. Intercept Press, Ltd., Andover, United Kingdom. p. 23-84.
6. Hanson, R. S., A. I. Netrusov, and K. Tsuji. (1991). The obligate methanotrophic bacteria *Methylococcus*, *Methylomonas*, *Methylosinus* and related bacteria. In A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K. H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes*. Springer-Verlag, New York. p. 2350-2365.
7. Whittenbury, R., and H. Dalton. (1981). The methylotrophic bacteria. In M. P. Starr, H. Stolph, H. G. Trüper, A. Balows, and H. G. Schlegel (ed.), *The prokaryotes*. Springer-Verlag KG, Berlin. p. 849-952.
8. Whittenbury, R., and N. R. Krieg. (1984). *Methylococcaceae* fam. nov., In N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore. p. 256-262.

9. Whittenbury, R. Dalton, H. starr, M.P. Stolph, H. Truger, H.G. Balows, A. and Schleifer, H.G. (1981). *The prokaryotes: The methylotrophic bacteria*. Springer-Verlag KG. Berlin. pp. 894-902.
10. Whittenbury, R. and Kreig, N.R. (1984). *Bergey's manual of systematic bacteriology: methylococcaceae* fam. nov.. vol. 1., The williams & Wilkins Co. Baltimore. pp. 256-262.
11. Whittenbury, R. (1981). *Microbial growth on C₁ compounds: The interrelationship of autotrophiy and methylotrophy as seen in Methylococcus capsulatus*(Bath). Heyden London. pp. 181-190.
12. Bowman, J.P. Sly, L.I. Nichols, P.D. and Hayward, A.C. (1993). "Revised taxonomy of the methanotrophs: Description of *Methylobacter* gen. nov., emendation of *methylococcus*, validation of *methylosinus* and *methylocystis* species, and proposal that the family *methylococcaceae* includes only the group I methanotrophs." *int. J. Syst. Bacteriol.* (43): 735-753.
13. Bowman, J.P. sly, L.I and stackerbrandt, E. (1995). "The phylogenetic position of the family *Methylococcaceae*." *Int. J. Syst. Bacteriol.* (45) : 182-185.
14. IPCC (1997) "Revised 1996 IPCC Guidelines-3" , 1.33~1.35.
15. Park, S. and Choo, S.Y. (1993). "production of Methanol by resting cells of *Methylosinus trchosporium* OB3b expressing soluble methane monooxygenase." *Appl, Environ. Microbiol.* 55: 2819-2826.
16. 홍정기. (2007), "석유 시대를 여는 메탄올" , LG주간경제, p.28-30.
17. Kim, H.G. (2002). "Isolation and Characterization of an obligate Methane-Oxidizing Bacterium" , p.5-6.
18. Bowman, J.P. Skerttratt, J.H. Nichols, P.D. and Sly. L.I. (1991). "Phospholipid fatty acid and lipopolysaccharide fatty acid signature lipids in methane-utilizing bacteria.: *FEMS Microbiol. Ecol.* (85): 15-22.

19. Higgins, I.J. and Quayle, J.R. (1970). "Oxygenation of methane by methane grown *Pseudomonas methanica* and *methanomonas methanoxidans*." *Biochem. J.* (118): 201-208.
20. Park, S.H. (1993). "Production of methanol by resting cells of *methylosinus trichosporium* 0B3b." *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* (8): 341-350.
21. Metha, P.K. Mishra, S. and Ghose, T.K. (1991). "Methanol biosynthesis by covalently immobilized cells of *Methylosinus trichosporium* 0B3b: Batch and continuous studies." *Biotechnol. Bioeng.* 37: 551-556.
22. Patras, L.E. and Tang, A. (1988). Abstracts of the 88th Annual Meeting of the American Society for Microbiology. p. 270.
23. Shimoda, M.S. and Okura. I. (1989). Abstract of international Chemical Congress of Pacific Basin Society, Abstract No. Bios. pp.04-307.
24. Drew, S.W. (1981). Liquid culture, In manual of methods of general bacteriology. *ASM*. Washington D. C. pp. 411-423.
25. Harold, T. B. (1994). *Microbiological Application*, sixth edition. *part* (3): 47-82, *part* (8): 143-189.
26. Burke, Victor. (1921). The Gram stain in the diagnosis of chronic gonorrhea. *jour. Amer. Med. Assoc.* (77): 1020.
27. Burke, Victor. (1922) Notes on the Gram stain with description of a new method. *Jour. Bact.* (7): 159-182.
28. 김효윤. (2006). "국내 토양에서 분리한 *Paenibacillus polymyxa* DY5균주가 생산하는 항진균 물질에 관한 연구." 국내박사학위논문, 안동대학교 대학원.
29. Saitou, N., Nei, M. (1987). "The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees." *Molecular Biology and Evolution* 4 (4):406-42.