



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0123616
(43) 공개일자 2014년10월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
B01D 53/34 (2006.01) A61L 9/00 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0039064
(22) 출원일자 2013년04월10일
심사청구일자 2014년03월13일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
조경숙
서울 서초구 동광로1길 87, (방배동)
김태관
서울 강북구 인수봉로72길 4, 101동 807호 (수유동, 극동아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
손민

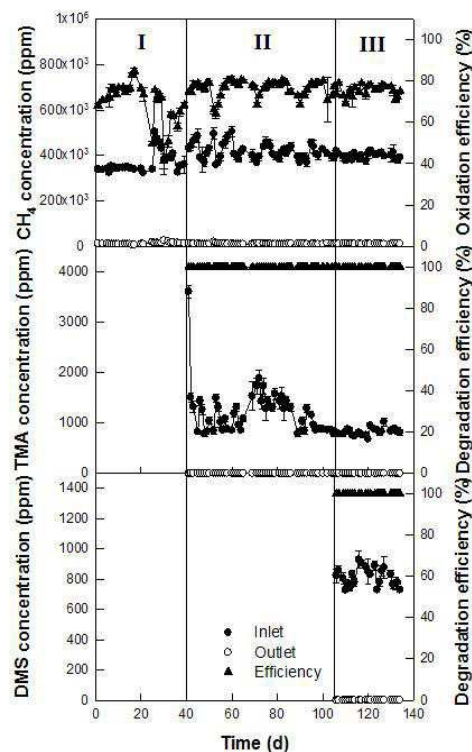
전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) 발명의 명칭 메탄산화세균을 포함하는 오염물질 제거용 조성물 및 그의 용도

(57) 요약

본 발명은 둘 이상의 메탄산화세균이 접종된 펠라이트, 토버몰라이트 또는 이들의 조합을 포함하는 오염물질 제거용 조성물, 상기 조성물을 이용하여 비이산화탄소성 온실가스, 악취 및 휘발성유기화합물을 동시에 제거하는 방법, 상기 조성물을 포함하는 바이오필터, 상기 조성물을 포함하는 바이오커버 및 상기 바이오필터 또는 바이오커버를 이용하여 비이산화탄소성 온실가스, 악취 및 휘발성유기화합물을 동시에 제거하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도10



(72) 발명자

류희욱

서울 서초구 동광로1길 87, (방배동)

문경은

인천 부평구 부흥로 246, 30동 1301호 (부평동, 동아2단지아파트)

정소연

경기 고양시 일산서구 일현로 140, 112동 202호 (탄현동, 큰마을대림현대아파트)

윤정희

서울특별시 마포구 염리동 마포자이아파트 101호 1101호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2008-0060089

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 원천기술(특정연구)개발사업-국가지정연구실사업

연구과제명 메타게놈 정보 활용 non-CO2 온실가스 및 악취 동시 저감 기술

기 여 율 1/1

주관기관 이화여자대학교

연구기간 2008.06.01 ~ 2013.05.31

특허청구의 범위

청구항 1

메탄산화세균이 접종된 펄라이트, 토버몰라이트 또는 이들의 조합을 포함하는 오염물질 제거용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 메탄산화세균은 *Methylocystis* 속 미생물, *Methylosarcina* 속 미생물, *Methylocaldum* 속 미생물, *Sphingomonas* 속 미생물 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 메탄산화세균은 *Methylocystis* 속 미생물 및 *Sphingomonas* 속 미생물의 혼합균주인 것인 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 메탄산화세균은 *Methylocystis* sp. M6 균주와 *Sphingomonas* sp. MD2 균주의 혼합균주인 것인 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

오염물질은 비이산화탄소성 온실가스, 악취성 물질, 휘발성유기화합물(VOC) 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

비메탄산화세균을 추가로 포함하는 것인 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

비메탄산화세균은 *Sphingopyxis* 속 미생물인 것인 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서,

비메탄산화세균은 *Sphingopyxis* sp. NMD인 것인 조성물.

청구항 9

제6항에 있어서,

메탄산화세균과 비메탄산화세균의 비율은 9.9:0.1 내지 5:5(세균수)인 것인 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서,

활성탄을 추가로 포함하는 것인 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 오염물질 제거용 조성물을 오염물질의 발생원에 가하는 단계를 포함하는, 오염물질의 제거방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

비이산화탄소성 온실가스, 악취 및 휘발성유기화합물을 동시에 제거하는 것인 방법.

청구항 13

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 오염물질 제거용 조성물을 포함하는 바이오필터.

청구항 14

제13항의 바이오필터를 포함하는 바이오커버.

청구항 15

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 오염물질 제거용 조성물을 포함하는 바이오필터 또는 상기 바이오필터를 포함하는 바이오커버를 오염물질이 존재하는 장소에 설치하는 단계를 포함하는 오염물질의 제거방법.

청구항 16

메탄산화세균과 비메탄산화세균을 포함하는 오염물질 제거용 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 메탄산화세균은 *Methylocystis* 속 미생물, *Methylosarcina* 속 미생물, *Methylocaldum* 속 미생물, *Sphingomonas* 속 미생물 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 메탄산화세균은 *Methylocystis* 속 미생물 및 *Sphingomonas* 속 미생물의 혼합균주인 것인 조성물.

청구항 19

제17항에 있어서,

상기 메탄산화세균은 *Methylocystis* sp. M6 균주와 *Sphingomonas* sp. MD2 균주의 혼합균주인 것인 조성물.

청구항 20

제16항에 있어서,

비메탄산화세균은 *Sphingopyxis* 속 미생물인 것인 조성물.

청구항 21

제20항에 있어서,

비메탄산화세균은 *Sphingopyxis* sp. NMD인 것인 조성물.

청구항 22

제16항에 있어서,

메탄산화세균과 비메탄산화세균의 비율은 9.9:0.1 내지 5:5(세균수)인 것인 조성물.

청구항 23

제16항 내지 제22항 중 어느 한 항의 조성물을 오염물질의 발생원에 가하는 단계를 포함하는, 오염물질의 제거 방법.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 메탄산화세균을 포함하는 오염물질 제거용 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 둘 이상의 메탄산화세균이 접종된 펠라이트, 토버몰라이트 또는 이들의 조합을 포함하는 오염물질 제거용 조성물, 메탄산화세균과 비메탄산화세균을 포함하는 오염물질 제거용 조성물, 상기 각 조성물을 이용하여 비이산화탄소성 온실가스, 악취 및 휘발성유기화합물을 동시에 제거하는 방법, 상기 조성물을 포함하는 바이오필터, 상기 조성물을 포함하는 바이오커버 및 상기 바이오필터 또는 바이오커버를 이용하여 비이산화탄소성 온실가스, 악취 및 휘발성유기화합물을 동시에 제거하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

혐기성 조건하에서는 유기물은 미생물에 의해 분해되어 메탄과 이산화탄소로 최종분해되며, 이러한 분해과정에

서 황화수소, 메틸메르캅탄, 황화메틸, 암모니아, 아민, 지방산 등의 악취물질이 발생하므로, 매립지, 음식물 쓰레기 처리시설, 혐기성 소화조 등과 같은 유기성 폐기물 처리시설 및 공정, 축사 등은 메탄과 악취가 동시에 배출되는 대표적인 시설로 알려져 있다.

[0003] 특히, 매립지는 메탄과 악취가 동시에 배출되는 가장 대표적인 시설로, 현재 전국에 227개소(환경부 자원순환국, 2007)가 있으며 총 매립가능 면적과 매립용량은 각각 29,213,000m² 및 379,416,000m³이다. 이들 매립지의 매립가스 처리현황을 살펴보면, 매립가스를 포집하여 고농도 메탄을 자원화할 수 있는 설비를 갖춘 매립지는 전체의 4%(10개소)에 불과하고, 대부분의 매립지(199개소, 89%)에서 매립가스는 대기 중으로 확산되고 있는 실정이다. 이러한 매립지는 주요한 인위적 메탄 발생원으로, 전 세계적으로 매립지로부터 메탄 발생량은 54 Tg/y로 추정되고 있다. 영국의 경우, 매립지의 메탄 발생량(1993)은 1~2 Tg/y로, 인위적 메탄 발생량의 25-33% 정도 차지하는 것으로 분석되고, 미국의 경우도 매립지의 메탄 발생량은 인위적 메탄발생량의 35% 정도 차지하는 것으로 분석되며, 우리나라의 경우도 약 37% 차지하는 것으로 추정되고 있으며, 이들 매립지에서의 메탄 발생 속도는 약 10,000 mg CH₄ /m³/d 정도로 추정되고 있다.

[0004] 한편, 메탄은 전 지구적 기후변화를 초래하는 온실가스 중의 하나로, 이산화탄소에 이어 그 기여도가 2번째이며, 대기 중 메탄 농도는 산업혁명 이전에는 700ppb이었으나 현재는 1745 ppb로 급격하게 증가하고 있다. 메탄은 적외선 흡수 능력이 이산화탄소보다 23배 강하기 때문에 온실 효과에 대한 영향이 매우 크므로, 메탄은 가장 중요한 비이산화탄소 온실가스이며, 특히, 다른 온실가스와는 달리 메탄의 경우 폐기물 처리분야가 주요 발생원으로 비중을 차지하고 있다.

[0005] 기후변화협약(1992년) 이후 우리나라를 비롯한 많은 나라에서 온실가스 저감을 위한 정책을 도입하여 시행하고 있으며, 기 배출된 온실가스의 회수 및 저감기술에 대한 연구개발도 적극적으로 추진되고 있음. 우리나라의 연간 탄소배출량은 59,000만톤 CO₂이고, 메탄의 연간배출량은 1.36 Tg(이산화탄소로 환산시 7,600만톤에 해당)으로 온실가스 총배출량의 약 13%를 차지하는 것으로 확인되었다(이중 매립지에서 배출되는 메탄량은 약 0.5 Tg/y으로 총 메탄 발생량의 약 37%임).

[0006] 매립지와 같은 폐기물 처리시설(공정)에서 발생하는 메탄저감기술개발을 통해 기후변화협약 대응기술을 확보하고 이를 통해 탄소배출권 확보 필요성이 대두되고 있음에도 불구하고, 현재까지 개발된 폐기물 분야에서 발생하는 메탄저감과 관련된 대표적인 기존 기술은 매립가스 포집 및 자원화 기술에 불과하며, 더욱이 상기 기술은 불량매립지 및 메탄이 저농도가 배출되는 경우 적용이 곤란하는 단점이 있었다.

[0007] 현재, 매립지, 음식물 쓰레기처리시설, 축산폐기물 처리시설 등과 같은 유기성 폐기물 처리시설에서는 메탄과 동시에 배출되는 악취(휘발성유기화합물(VOC) 포함)가 민원을 야기하는 주요 원인이 되고, 2006년 생활기초시설에 대한 악취 민원 중 이들 유기성 폐기물 처리시설에 대한 악취 민원이 60%를 차지하며, 유기성 폐기물 처리시설에 대한 악취 민원 중 32%는 매립지 악취와 관련된 것으로 조사되었다.

[0008] 매립지 등과 같은 유기성 폐기물 처리시설(공정)에 대한 악취 관리는 악취 측정과 모니터링 중심으로 수행되었고, 악취제어대책으로는 탈취제 살포 등 소극적인 대응만 이루어지고 있다. 향후, 매립지, 분뇨/가축분뇨 처리시설, 기타 유기성 폐기물 처리시설 등과 같은 공공환경시설에 대한 악취배출시설 설치 신고가 의무화될 예정이므로 이들 시설에 대한 보다 근본적인 악취 저감이 필요하다. 악취 저감 효율이 우수한 기능한 복토재 활용, crack이 발생한 부분에 on-site 바이오필터 설치, 매립가스 포집공에 이동식 바이오필터 설치 등 여러 가지 악취저감 기술 적용이 제안되고 있지만, 악취저감 투자대비 낮은 비용편익으로 인해 근본적이면서 적극적인 악취저감기술이 적용되지 못하고 있다. 특히, 매립지 등과 같이 비이산화탄소 온실가스(메탄), 악취와 VOC를 동시에 배출되는 발생원에 대해서는 이들을 별도로 관리하는 것보다는 통합 관리할 필요성이 있으나, 아직까지는 이들을 통합적으로 관리할 수 있는 방법이 개발되지 않고 있는 실정이다.

[0009] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 비이산화탄소성 온실가스, 악취 및 휘발성유기화합물이 동시에 배출되는 발생원으로부터 이들을 통합적으로 제거할 수 있는 방법을 개발하고자 예의 연구노력한 결과, 둘 이상의 메탄산화세균을 접종된 토버몰라이트를 포함하는 조성물을 이용할 경우, 비이산화탄소성 온실가스, 악취 및 휘발성유기화합물을 동시에 제거할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명의 하나의 목적은 둘 이상의 메탄산화세균이 접종된 펄라이트, 토버몰라이트 또는 이들의 조합을 포함하는 오염물질 제거용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물을 이용하여 비이산화탄소성 온실가스, 악취 및 휘발성유기화합물을 동시에 제거하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 메탄산화세균과 비메탄산화세균을 포함하는 오염물질 제거용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 이용하여 비이산화탄소성 온실가스, 악취 및 휘발성유기화합물을 동시에 제거하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 바이오필터를 제공하는 것이다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 바이오커버를 제공하는 것이다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 바이오필터 또는 바이오커버를 이용하여 비이산화탄소성 온실가스, 악취 및 휘발성유기화합물을 동시에 제거하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0017] 상술한 본 발명의 목적을 달성하기 위한 일 실시양태로서, 본 발명은 둘 이상의 메탄산화세균이 접종된 펄라이트, 토버몰라이트 또는 이들의 조합을 포함하는 오염물질 제거용 조성물 및 상기 조성물을 이용하여 비이산화탄소성 온실가스, 악취 및 휘발성유기화합물을 동시에 제거하는 방법을 제공한다.
- [0018] 본 발명의 용어 "메탄산화세균(methane-oxidizing bacteria)"이란, 메탄영양세균(methanotroph)이라고도 하고, 메틸영양세균(methylotroph) 중에서 메탄만을 유일한 탄소원 및 에너지원으로 이용할 수 있는 미생물을 의미하는데, 세포에서 외부의 메탄을 흡수하여 CH_3OH , HCHO , HCOOH 및 CO_2 로 순차적으로 변화시켜서 메탄을 이산화탄소로 완전히 산화시킴을 통하여 ATP를 획득할 수 있다. 본 발명의 목적상 상기 메탄산화세균은 펄라이트 또는 토버몰라이트에 접종되어 메탄 이외에도 추가적인 오염물질의 제거에 사용되는데, 이를 위하여는 서로다른 오염물질 제거효과를 나타내는 메탄산화세균을 단독으로 사용하거나 둘 이상의 메탄산화세균을 혼합하여 사용할 수 있다. 예를 들어, 바람직하게는 *Methylocystis* 속 미생물, *Methylosarcina* 속 미생물, *Methylocaldum* 속 미생물, *Sphingomonas* 속 미생물 등을 단독으로 또는 혼합하여 사용할 수 있고, 보다 바람직하게는 메탄 이외에도 에틸벤젠과 자일렌과 같은 monoaromatic hydrocarbon 계열의 휘발성 유기화합물(VOC)을 산화시킬 수 있는 *Methylocystis* 속 미생물 및 메탄산화와 함께 대표적인 황화계 악취물질의 하나인 황화메틸(DMS)을 동시에 분해할 수 있는 *Sphingomonas* 속 미생물을 혼합하여 사용할 수 있으며, 가장 바람직하게는 *Methylocystis* sp. M6 균주와 *Sphingomonas* sp. MD2 균주를 혼합하여 사용할 수 있으나, 펄라이트 또는 토버몰라이트에 접종되어 오염물질을 동시에 제거할 수 있는 효과를 나타내는 한 메탄산화세균이 특별히 이에 제한되지는 않는다.
- [0019] 본 발명의 용어 "펄라이트(perlite)"란, 화산석으로 된 원석(진주석)을 1200℃로 소성하여 제조되고, 비중 0.2, 공극률 90%, 열전도율 0.09kcal/mh·c인 물질을 의미한다. 본 발명의 목적상 상기 펄라이트는 메탄산화세균을 접종하는 고정화 담체로서 사용되거나 또는 배지에 추가되어, 메탄산화세균을 활성화시켜서 메탄산화 효율을 증가시키는 효과를 나타낼 수 있다.
- [0020] 본 발명의 용어 "토버몰라이트(tobermolite)"란, 실리카(SiO_2)와 칼슘이 수열반응에 의하여 생성되고, 높은 강도를 가지는 안정된 규산 칼슘 수화물($5\text{CaO} \cdot 6\text{SiO}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)을 의미하는데, 다공성의 가볍고 견고한 결정상을 가지며, CaO/SiO_2 몰비가 0.5~1.5인 경우 가장 효과적으로 생성된다. 본 발명의 목적상 상기 토버몰라이트는 메탄산화세균을 접종하는 고정화 담체로서 사용되거나 또는 배지에 추가되어, 비메탄산화세균의 오염시에도 메탄산화세균의 증식을 촉진시키는 효과를 나타낼 수 있다.

- [0021] 상기 펄라이트 또는 토버몰라이트에 메탄산화세균을 접종하는 방법은 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 건조된 펄라이트 또는 토버몰라이트에 메탄산화세균을 포함하는 접종원을 가지고 건조시키는 방법을 사용할 수 있고, 보다 바람직하게는 메탄산화세균의 접종원(지렁이 분변토, 매립지 복토 토양, 습지 토양 등)을 물에 현탁시켜 현탁액을 수득하고, 상기 현탁액을 일정시간 동안 정치시켜 중력침강 시킨 후, 상등액을 수득하며, 상기 상등액을 건조된 고정화 담체에 가하고 건조시킴으로써, 메탄산화세균을 접종할 수 있다.
- [0022] 본 발명의 용어 "고정화 담체"란, 미생물을 이용한 산업에 사용하기 위하여 미생물을 고정화시키는 기질을 의미하는데, 상기 기질은 목적 미생물을 고농도로 고정화할 수 있고, 복수의 공극을 포함하며, 상기 공극들이 서로 연장되어 형성된 망상 구조의 네트워크 유로(reticulated network of flow channels)가 형성될 수 있고, 탄성 및 압축강도 등의 기계적 강도가 충분하여 산업적 사용에 적합한 내구성을 갖는다. 본 발명의 목적상 상기 고정화 담체는 펄라이트, 토버몰라이트 또는 이들의 조합을 포함하여 메탄산화세균이 접종될 수 있는 담체가 될 수 있는데, 이때, 펄라이트 또는 토버몰라이트의 함량은 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 10 내지 90%, 보다 바람직하게는 50 내지 90%, 가장 바람직하게는 80 내지 90%가 될 수 있으나, 메탄산화세균의 고정화 및 배양에 사용될 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지는 않는다.
- [0023] 본 발명의 용어 "오염물질"이란, 매립지, 음식물 쓰레기 처리시설, 혐기성 소화조 등과 같은 유기성 폐기물 처리시설, 공장, 축사 등에서 발생하는 메탄과 같은 비이산화탄소성 온실가스; 황화수소, 메틸메르캅탄, 황화메틸, 암모니아, 아민, 지방산 등의 악취성 물질; 에틸벤젠, 자일렌 등의 휘발성유기화합물(VOC) 등을 의미한다.
- [0024] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 혼합균주와 펄라이트(perlite)를 포함하는 조성물은 메탄산화세균 단독에 비하여 우수한 효율로 메탄, 악취성 물질 및 VOC와 같은 오염물질을 제거할 수 있어, 이들 오염물질이 동시에 발생하는 매립지나 습지에 적용할 수 있는 것으로 확인되었고(도 1 내지 도 3), 펄라이트를 담체로 적용할 경우, 메탄산화세균의 활발한 활성을 위한 서식지를 제공하며 메탄산화 효율을 증가시킬 수 있으며(도 4), 비메탄산화세균의 오염으로 인하여 메탄산화세균의 메탄산화활성이 저하된 경우, 토버몰라이트의 첨가에 의하여 메탄산화세균의 증식이 촉진되고, 결과적으로는 메탄산화활성이 단기간에 신속하게 회복 될 수 있음을 알 수 있었다(도 7 및 도 8).
- [0025] 한편, 본 발명의 조성물은 메탄산화세균의 메탄산화 속도를 향상시키기 위하여, 비메탄산화세균을 추가로 포함할 수도 있다. 이때, 상기 비메탄산화세균은 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 *Sphingopyxis* 속 미생물을 사용할 수 있고, 보다 바람직하게는 *Sphingopyxis* sp. NMD를 사용할 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물에 포함된 상기 메탄산화세균과 비메탄산화세균의 비율은 특별히 이에 제한되지 않으나, 세균수를 기준으로 하여 바람직하게는 9.9:0.1 내지 5:5, 보다 바람직하게는 9.5:0.5 내지 8:2, 가장 바람직하게는 9:1이 될 수 있다.
- [0026] 한편, 본 발명의 조성물은 메탄산화세균의 활성을 지속적으로 유지시키기 위하여, 활성탄을 추가로 포함할 수도 있다. 이때, 활성탄의 함량은 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 조성물 부피를 기준으로 0.1 내지 1g/ml, 보다 바람직하게는 조성물 부피를 기준으로 0.3 내지 0.7g/ml, 가장 바람직하게는 0.5g/ml이 될 수 있다.
- [0027] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 활성탄을 가할 경우에는, starvation 조건하에서도 메탄산화세균이 메탄산화활성을 그대로 유지할 수 있음을 알 수 있었다(도 6).
- [0028] 상술한 바와 같이, 본 발명의 오염물질 제거용 조성물을 비이산화탄소성 온실가스, 악취, 휘발성유기화합물 등의 오염물질의 발생원에 가할 경우, 상기 온실가스, 악취, 휘발성유기화합물 등의 오염물질을 동시에 제거할 수 있다.
- [0029] 따라서, 본 발명은 오염물질 발생원에 상기 오염물질 제거용 조성물을 가하는 단계를 포함하는 비이산화탄소성 온실가스, 악취 및 휘발성유기화합물을 동시에 제거하는 방법을 제공한다.

- [0030] 본 발명의 목적을 달성하기 위한 다른 실시양태로서, 본 발명은 메탄산화세균과 비메탄산화세균을 포함하는 오염물질 제거용 조성물 및 상기 조성물을 오염물질의 발생원에 가하는 단계를 포함하는 오염물질의 제거방법을 제공한다. 이때, 메탄산화세균, 비메탄산화세균 및 상기 조성물에 포함되는 메탄산화세균과 비메탄산화세균의 비율은 전술한 바와 동일하다. 또한, 펠라이트, 토버몰라이트, 활성탄 등을 추가로 포함할 수 있는데, 이들에 대한 것 역시 전술한 바와 동일하다.
- [0031] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 메탄산화세균에 비메탄산화세균을 혼합함으로써, 메탄산화세균의 메탄산화 속도를 향상시킬 수 있음을 알 수 있었다(도 5).
- [0032] 상술한 본 발명의 목적을 달성하기 위한 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 바이오필터 또는 바이오커버를 제공한다.
- [0033] 본 발명의 바이오필터는 바이오필터에 주입되는 오염물질을 제거하기 위해 메탄산화세균이 접종된 펠라이트, 토버몰라이트 또는 이들의 조합을 포함하는 조성물이 구비된 충전부(packing section)를 포함한다. 이때, 상기 충전부에 포함된 펠라이트, 토버몰라이트 또는 이들의 조합은 이들 이외의 다른 구성성분을 추가로 포함할 수도 있는데, 예를 들어, 매립지 토양, 지렁이 분변토 등의 구성성분을 추가로 포함할 수 있다. 또한, 메탄산화세균의 메탄산화활성을 향상시키기 위하여, 비메탄산화세균을 추가로 포함할 수도 있는데, 상기 메탄산화세균과 비메탄산화세균의 비율은 상술한 바와 동일하다.
- [0034] 아울러, 상기 바이오필터의 오염물질 제거효과를 보다 향상시키기 위하여 상기 충전부 이외에, 가스공급부(blower), 살수시스템(watering system), 드레인저장부(drainage container) 등의 구성요소를 추가로 포함할 수도 있다. 예를 들어, 상기 가스공급부는 오염물질이 발생하는 장소로부터 오염물질을 흡입하여 바이오필터에 공급하는 장치이고; 순환시스템은 순환용 펌프, 살수장치 등으로 구성되어, 바이오필터를 운전하는 동안 충전부의 건조를 방지하고 메탄산화세균 활성 유지를 위해, 수분함량을 70% 이상 유지하도록 수분을 공급하는 장치이며; 드레인저장부는 상기 살수 시스템에서 공급되었으나 충전부에서 사용되지 않은 여분의 수분을 저장하고, 상기 살수 시스템으로 수분을 공급하며, 메탄산화세균의 성장에 필요한 각종 영양성분을 상기 수분에 공급할 수 있는 장치가 될 수 있으나, 이들 각 장치의 구성 및 추가적으로 포함되는 장치는 본 발명의 바이오필터가 오염물질 제거효과를 나타내는 한, 특별히 이에 제한되지 않는다.
- [0035] 한편, 본 발명의 바이오커버는 오염물질이 발생하는 장소에서 실질적으로 오염물질을 제거하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 오염물질의 발생량이 적어 오염물질 포집시설을 설치하기에는 경제적으로 타당성이 맞지 않는 소규모 매립지나 매립 종료 후 어느 정도 시간이 소요되어 자원화하기에는 너무 낮은 농도로 오염물질이 배출되는 매립지의 환기구 또는 가스배출구에 본 발명의 바이오커버를 장착시켜서 상기 매립지로부터 발생하는 오염물질을 제거할 수 있다.
- [0036] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 지름 8cm, 높이 50cm의 충전부(부피 2.5 L)와 지름 8cm, 높이 15cm의 환기부, 그리고 지름 8cm, 높이 5cm의 가스 주입부로 구성된 실험실 규모 바이오커버를 PVC 재질로 제작하였다(도 9). 또한, 상기 바이오커버에 메탄 및 악취성 물질(테트라메틸암모늄(TMA) 또는 황화메틸(DMS))을 가하고 장기간 동안 운영한 결과, 메탄을 단독으로 가한 경우에는 제거효율이 $59.8 \pm 9.4\%$ 이고; 메탄과 TMA를 혼합하여 가한 경우에는 메탄 제거효율이 $74.2 \pm 4.2\%$, TMA 제거효율은 100% 이며; 메탄, TMA 및 DMS를 혼합하여 가한 경우에는 메탄 제거효율이 $70.7 \pm 2.5\%$, TMA 및 DMS 제거효율은 100% 임을 확인하였다(도 10).
- [0037] 아울러, 상기 바이오커버에는 오염물질 제거효과를 보다 향상시킬 수 있도록 상술한 바이오필터 시스템에 포함되는 가스공급부, 살수시스템, 드레인저장부 등을 추가로 포함할 수도 있으나, 이들 추가적인 구성요소는 특별

히 이에 제한되지 않는다.

[0038] 상술한 본 발명의 목적을 달성하기 위한 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 바이오필터 또는 바이오커버를 이용하여 오염물질을 제거하는 방법을 제공한다. 구체적으로, 본 발명의 오염물질을 제거하는 방법은 상기 바이오필터 또는 바이오커버를 오염물질이 존재하는 장소에 설치하는 단계를 포함한다. 이때, 오염물질이 존재하는 장소는 특별히 이에 제한되지 않으나, 매립지 등이 될 수 있다.

발명의 효과

[0039] 본 발명의 오염물질 제거용 조성물을 이용하면, 비이산화탄소성 온실가스, 악취, 휘발성유기화합물 등의 다양한 오염물질을 동시에 제거할 수 있으므로, 각종 오염물질이 발생하는 매립지 등의 효과적인 환경개선에 널리 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0040] 도 1은 메탄 및 VOC인 에틸벤젠, m-자일렌 및 p-자일렌과 악취물질 DMS의 공존 조건에서 *Methylocystis* sp. M6 균주에 의한 이들 화합물의 분해 특성을 조사한 결과를 나타낸다.

도 2는 *Sphingomonas* sp. MD2의 메탄, VOCs 및 DMS 분해 특성을 나타낸다.

도 3은 *Methylocystis* sp. M6와 *Sphingomonas* sp. MD2의 혼합균주와 펠라이트를 첨가한 조건에서의 메탄, VOC 및 악취 분해 특성을 나타낸다.

도 4는 메탄산화세균의 메탄 분해활성에 미치는 펠라이트의 효과를 나타내는데, 도 4a는 대조군(펠라이트 미첨가)과 펠라이트를 첨가한 경우 메탄 주입 시 시간에 따른 메탄 농도의 변화를 나타내고, 도 4b는 펠라이트를 담체로 적용한 경우와 대조군의 메탄 산화속도를 비교한 결과를 나타내며, 도 4c는 메탄산화세균의 메탄산화 유전자 중 하나인 *pmoA* gene을 표적으로하는 qRT-PCR을 수행하여 메탄산화세균 수를 측정된 결과를 나타낸다.

도 5는 메탄산화세균의 메탄산화속도에 미치는 비메탄산화세균의 효과를 나타낸다.

도 6은 starvation 상태의 메탄산화세균이 나타내는 메탄산화활성에 미치는 활성탄의 효과를 나타내는데, 도 6a는 활성탄을 가하지 않은 경우를 나타내고, 도 6b는 활성탄을 가한 경우를 나타낸다.

도 7은 메탄산화세균의 메탄산화활성에 미치는 토버몰라이트의 효과를 나타낸다.

도 8은 메탄산화세균의 증식에 미치는 토버몰라이트의 효과를 나타낸다.

도 9는 바이오커버의 구성을 나타내는 개략도이다.

도 10은 운전 조건에 따른 바이오커버의 inlet과 outlet에서의 메탄, TMA 그리고 DMS의 농도와 제거율을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0041] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0042] 실시예 1: 미생물 군집 기능 다양화 기술

[0043] 공지된 바에 의하면, 매립지 토양에서 분리된 메탄산화능화배양액으로부터 메탄을 산화할 수 있는 *Methylocystis* sp. M6 균주는 메탄 이외에도 6개의 탄화수소 화합물을 이용할 수 있으며, 특히 에틸벤젠과 자일렌과 같은 monoaromatic hydrocarbon 계열의 휘발성 유기화합물(VOC)을 산화시킬 수 있다. 또한, 순수분리된 *Sphingomonas* sp. MD2 균주는 메탄산화와 함께 대표적인 황화계 악취물질의 하나인 황화메틸(DMS)를 동시에 분

해할 수 있다고 알려져 있다. 이에, 상기 두 균주를 혼합하고 이들 활성을 촉진하는 무생물적 인자를 동시를 적용할 경우, 메탄 분해와 함께 VOC와 악취물질을 동시에 분해함과 동시에 분해 속도를 향상시킬 수 있는지의 여부를 확인하고자 하였다.

[0044] 구체적으로, M6, MD2 균주 및 M6+MD2 혼합균에 의한 메탄, 악취 및 VOC 분해능을 평가하기 위해, 600 mL 혈청병에 NMS 배지를 20 mL 씩 첨가하고, M6, MD2 혹은 M6와 MD2를 동시에 접종하고 펠라이트를 10 g 첨가한 후 부틸 고무마개로 밀봉하였다. NMS 배지 조성은 다음과 같다; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L, KNO_3 5 g/L, KH_2PO_4 1.36 g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.585 g/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.75 g/L, Trace element solution($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 200 mg/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mg/L, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 3 mg/L, H_3BO_3 30 mg/L, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mg/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 mg/L, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2 mg/L, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3 mg/L). 고무마개로 밀봉한 혈청병에 메탄과 DMS를 각각 60 mM 및 45 μM 주입하고, 에틸벤젠, m-자일렌 및 p-자일렌(monoaromatic hydrocarbon 계열의 VOCs)을 각각 1 μM 씩 주입한 후, 30°C에서 200 rpm으로 진탕배양하면서 메탄, VOC, 및 DMS 농도를 측정하였다(도 1, 도 2 및 도 3). 도 1은 메탄 및 VOC인 에틸벤젠, m-자일렌 및 p-자일렌과 악취물질 DMS의 공존 조건에서 *Methylocystis sp.* M6 균주에 의한 이들 화합물의 분해 특성을 조사한 결과를 나타내고, 도 2는 *Sphingomonas sp.* MD2의 메탄, VOCs 및 DMS 분해 특성을 나타내며, 도 3은 *Methylocystis sp.* M6와 *Sphingomonas sp.* MD2의 혼합균주와 펠라이트를 첨가한 조건에서의 메탄, VOC 및 악취 분해 특성을 나타낸다.

[0045] 도 1에서 보듯이, M6 균주는 메탄을 분해함과 동시에 에틸벤젠과 m-자일렌 및 p-자일렌도 분해할 수 있었으나, DMS는 분해할 수 없었다. 또한, 도 2에서 보듯이, MD2 균주는 메탄과 DMS도 함께 분해할 수 있었으나, 에틸벤젠, m-자일렌 및 p-자일렌의 분해는 분해할 수 없었다. 끝으로, 도 3에서 보듯이, 혼합균주는 메탄을 매우 효율적으로 분해할 수 있고, 에틸벤젠, m-자일렌 및 p-자일렌도 분해 할 수 있으며, DMS도 매우 빠르게 분해할 수 있었다. 즉, M6와 MD2 단일균주들의 혼합물에 펠라이트를 첨가할 경우, 메탄과 VOCs 및 악취물질인 DMS를 동시에 분해할 수 있음이 확인됨에 따라 균집의 기능이 향상되는 결과를 얻을 수 있었다.

[0046] 따라서, 혼합균주와 펠라이트를 포함하는 조성물은 메탄과 VOCs 및 악취성 황화합물이 동시에 발생하는 매립지나 습지에 적용할 수 있는 우수한 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

[0047] 실시예 2: 무생물학적 인자 조절을 통한 메탄 분해능 향상

[0048] 메탄산화세균에 무생물학적 인자의 하나인 펠라이트를 첨가할 경우, 메탄산화세균의 메탄 분해활성에 영향을 미치는지의 여부를 확인하고자 하였다.

[0049] 구체적으로, 펠라이트(평균입경 크기: 4~5 mm) 담체를 수돗물로 세척한 후 3차 증류수로 마지막 세척하고 나서 105°C 오븐에서 24시간 건조시켜 준비하였다. 메탄산화세균 혼합균주를 NMS 배지에서 유일 탄소원으로 메탄가스 5%(v/v)를 주입하여 농화배양 하였다. M6 균주 배양액 3 mL, NMS 배지 17 mL을 혼합하여 만든 20 mL의 접종원 용액에 10 g 펠라이트 담체를 넣어 담체 표면에 미생물이 부착되도록 하였다. 멸균한 600 mL 혈청병에 여과지를 넣고 접종원-NMS 배지 20 mL을 분주한 후 상기의 방법으로 준비한 담체를 넣었다. 대조균은 펠라이트 첨가 없이 접종원-NMS 배지만 20 mL을 분주하고, 담체의 총 부피는 30 mL로 하였다. 이렇게 준비한 담체-접종원-NMS 배지 혼합물을 혈청병에 넣고, 고무마개로 밀봉한 후 탄소원으로 메탄가스(99.9%)를 최종농도가 10%(v/v) 되도록 주입해 주었다. 혈청병은 빛에 대한 영향을 차단하기 위해서 30°C 배양기 안에서 정치 배양하였다. 배양하면서 혈청병 상부 가스를 0.3 mL 채취하여 가스 크로마토그래피로 메탄의 농도를 측정하였다. 혈청병 상부의 메탄농도가 5000 ppm이하로 떨어지면 혈청병의 고무마개를 열어 공기를 치환해 주었다. 다시 혈청병을 고무마개로 밀봉하고 메탄을 10%(v/v) 농도가 되도록 재주입해 주는 과정을 3회 반복하였다. 모든 실험은 3회 반복하여 수행하였다.

[0050] 메탄농도는 FID (Flame Ionization detector)가 장착된 가스 크로마토그래피(Agilent 6850N)로 측정하였다. 분석 조건은 Supelcowax column (30 m x 0.32 mm x 0.25 μm)을 장착하였고, 오븐 온도 100°C, 주입부 온도 230°C, 검출기 온도 230°C에서 수행하였다. 유리주사기(gas-tight syringe)를 이용해서 혈청병 상부 가스를 0.3 mL 채취하여 메탄 주입농도와 혈청병 내 잔류농도를 측정하였다. 담체 첨가 시 메탄산화세균의 활성과 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 qRT-PCR을 수행하여 메탄산화세균을 정량·정성적으로 분석하였다. DNA추출과 qRT-PCR(Quantitative real time polymerase chain reaction)을 수행하기 위해 담체에 부착된 세균은 담체와 0.9 %

NaCl 용액을 섞어 초음파 처리하여 세균을 분리해 낸 후 Kit를 사용해 DNA를 추출하였다. 추출한 DNA를 주형으로 하여 pmoA-specific primer A189f(5'-GGNGACTGGGACTTCTGG-3', 서열번호 1)와 mb661r(5'-CCGGMGCAACGTCYTTACC-3', 서열번호 2)을 이용하여 메탄산화세균을 검출하였다(95℃ 3분 pre-denaturation, 40cycle(95℃ 15초, 55℃ 30초, 72℃ 30초) 및 82℃ 30초 final extension)(도 4). 도 4는 메탄산화세균의 메탄 분해활성에 미치는 펄라이트의 효과를 나타내는데, 도 4a는 대조군(펄라이트 미첨가)과 펄라이트를 첨가한 경우 메탄 주입 시 시간에 따른 메탄 농도의 변화를 나타내고, 도 4b는 펄라이트를 담체로 적용한 경우와 대조군의 메탄 산화속도를 비교한 결과를 나타내며, 도 4c는 메탄산화세균의 메탄산화 유전자 중 하나인 pmoA gene을 표적으로 qRT-PCR을 수행하여 메탄산화세균 수를 측정된 결과를 나타낸다.

[0051] 도 4a에서 보듯이, 대조군에서는 초기 메탄 주입 후 10%(v/v) 메탄을 모두 분해하는데 12일 이상이 소요된 반면, 펄라이트를 담체로 사용한 조건에서는 약 5일 만에 메탄이 산화됨을 확인하였다. 또한, 도 4b에서 보듯이, 담체를 적용하지 않은 대조군의 메탄 산화속도 9.54 ± 0.82 mmol/L/d와 비교해서 펄라이트를 담체로 사용한 경우 메탄 산화속도는 33.27 ± 0.41 mmol/L/d를 나타내어 3배 이상 증가함을 확인하였다. 끝으로, 도 4c에서 보듯이, 펄라이트를 적용한 경우, 유전자 카피수는 $6.5 \times 10^6 \pm 5.6 \times 10^6$ 으로 대조군의 $7.4 \times 10^4 \pm 3.2 \times 10^4$ 와 비교해 약 100배 많은 수를 나타냄을 확인하였다.

[0052] 따라서, 펄라이트를 담체로 적용할 경우, 메탄산화세균의 활발한 활성을 위한 서식지를 제공하며 메탄산화 효율을 증가시킬 수 있음을 알 수 있었다.

[0053] 실시예 3: 생물학적 인자 조절을 통한 메탄 분해능 향상

[0054] 메탄산화세균에 비메탄산화세균을 혼합할 경우, 메탄산화세균의 메탄 분해활성에 영향을 미치는지의 여부를 확인하고자 하였다.

[0055] 구체적으로, *Methylocystis* sp. M6은 NMS 배지에서 유일 탄소원으로 메탄가스 5%(v/v)를 주입하여 농화배양하였고, 비메탄산화세균(*sphingopyxis* sp. NMD)은 R2A 배지(Proteose peptone 0.5 g/L, Casamino acids 0.5 g/L, Yeast extract 0.5 g/L, Dextrose 0.5 g/L, Soluble starch 0.5 g/L, Dipotassium phosphate 0.3 g/L, Magnesium sulfate 7H₂O 0.05 g/L, Sodium pyruvate, 0.3 g/L)에서 배양하였다.. 이어, 세포계수기(Hemocytometer)와 현미경을 사용하여 M6와 NMD 균주를 세균수를 기준으로 9:1의 비율로 혼합하고, 이를 120 mL 혈청병에 10 mL씩 분주하였다. 대조군으로 M6 균주만을 접종한 조건의 실험을 함께 수행하였다. 각각의 혈청병을 고무마개로 밀봉하고 메탄 최종농도를 50,000ppm이 되도록 주입하였다. 혈청병을 30℃, 180rpm에서 배양하면서 혈청병 상부 가스를 0.3 mL 채취하여 가스 크로마토그래피로 메탄 농도를 측정하였다. 혈청병 상부의 메탄농도가 1000 ppm이하로 떨어지면 혈청병의 고무마개를 열어 클린 벤치 내에서 공기를 치환해 주었다. 다시 혈청병을 고무마개로 밀봉하고 메탄을 5%(v/v) 농도가 되도록 재주입해 주는 과정을 3회 반복하였다. 모든 실험은 5반복으로 수행하였다. 메탄농도는 FID(Flame Ionization detector)가 장착된 가스 크로마토그래피(Agilent 6850N)로 측정하였다. 분석 조건은 Supelcowax column(30 m x 0.32 mm x 0.25 μm)을 장착하였고, 오븐 온도 100℃, 주입부 온도 230℃, 검출기 온도 230℃에서 수행하였다. 유리주사기(gas-tight syringe)를 이용해서 혈청병 상부 가스를 0.3 mL 채취하여 메탄 주입농도와 혈청병 내 잔류농도를 측정하고, 메탄산화 속도를 계산하였다(도 5). 도 5는 메탄산화세균의 메탄산화속도에 미치는 비메탄산화세균의 효과를 나타낸다. 도 5에서 보듯이, M6만 접종한 대조군과 비교하여, NMD를 첨가할 경우에는 메탄 주입 횟수가 증가할 수록 메탄산화 속도가 증가함을 확인하였다.

[0056] 따라서, 메탄산화세균에 비메탄산화세균을 혼합함으로써, 메탄산화세균의 메탄산화 속도를 향상시킬 수 있음을 알 수 있었다.

[0057] 실시예 4: 메탄산화활성에 미치는 활성탄의 효과

[0058] 메탄 산화세균은 제한된 기질(메탄, 메탄올, 포름알데히드)을 이용하는 미생물이기 때문에 영양이 공급되지 않는 starvation 상태에서도 생존성을 유지하는 특성을 반드시 필요로 한다. 특히, 산업 현장에서는 기계 고장,

휴가 등에 의한 단기 또는 장기간의 shut-down이 발생하는 경우가 존재하기 때문에 메탄 산화세균의 공학적 이용시에도 starvation 상태에서도 생존성을 유지하는 특성을 갖고있는지의 여부를 확인하는 것이 반드시 필요한데, 이러한 특성에 활성탄이 영향을 미칠 수 있는지의 여부를 확인하고자 하였다.

[0059] 구체적으로, 메탄 산화세균 군집을 얻기 위해 다음과 같이 농화배양을 수행하였다. 600 mL 혈청병에 토양(가평 매립지 토양) 8 g(습중량)를 넣고 NMS 배지 20 mL을 첨가한 후 고무마개로 밀봉하였다. 밀봉된 혈청병에 유일 탄소원으로 메탄가스(99%, Dong-A gases, Seoul, Korea)를 주사기를 이용하여 채취한 후, 최종농도가 50,000 ppm이 되도록 주입하였다. 혈청병은 30℃, 175 rpm에서 배양하면서, 정기적으로 메탄 농도를 측정하여 주입된 메탄이 검출 한계점(10 ppm) 이하로 떨어지면, 클린벤치 안에서 혈청병의 고무마개를 열어 1 시간 동안 혈청병 내부의 공기를 치환하여 주었다. 공기 치환 후 고무마개를 닫고 메탄을 동일한 농도로 주입하였다. 이러한 방법으로 40여 회 메탄가스를 재주입해서 농화배양액을 확보하였다. 농화배양하는 동안에 질소와 인의 고갈에 따른 미생물 컨소시움의 메탄 산화 저해를 막기 위해 재배양 2 회 수행 때마다 질소와 인 농축액을 각각 1 mL씩 넣어 주었다. 질소 농축액은 KNO₃ 2 g을 100 mL의 증류수에, 인 농축액은 KH₂PO₄ 0.52 g과 Na₂HPO₄·12H₂O 1.65 g을 100 mL의 증류수에 넣어 제조하였다. 이러한 방법으로 메탄가스를 주입해 주면서 농화배양을 수행하였다. 그런 다음, 12일간 배양한 농화배양액을 600 mL 혈청병에 20 mL를 넣고 활성탄을 5 g 첨가한 후 고무마개로 밀봉하였다. 대조군으로 활성탄을 첨가하지 않은 실험도 함께 수행하였다. 각각의 혈청병을 30℃, 175 rpm에서 메탄 없이 배양하면서 배양 시간이 0, 10, 20일이 지나서 클린벤치 안에서 혈청병의 고무마개를 열어 1 시간 동안 혈청병 내부의 공기를 치환하여 주었다. 공기 치환 후 고무마개를 닫고 메탄을 최종농도가 50,000 ppm이 되도록 주입하였다. 그 후, 혈청병을 30℃, 175 rpm에서 배양하면서, 정기적으로 메탄 농도를 측정하였다(도 6). 도 6은 starvation 상태의 메탄산화세균이 나타내는 메탄산화활성에 미치는 활성탄의 효과를 나타내는데, 도 6a는 활성탄을 가하지 않은 경우를 나타내고, 도 6b는 활성탄을 가한 경우를 나타낸다. 도 6a에서 보듯이, 활성탄이 첨가되지 않은 배양액의 메탄 산화 속도는 starvation 시간이 0, 10, 20일이 지남에 따라 $1,0694 \pm 58, 806 \pm 12, 501 \pm 17 \mu\text{mol/g-VSS}^{-1}\text{h}^{-1}$ 로 감소한 반면, 도 6b에서 보듯이, 활성탄을 첨가한 배양액은 starvation 시간이 0, 10, 20일이 지남에 따라 메탄 산화속도가 $1,090 \pm 72, 1,118 \pm 33, 1,080 \pm 62 \mu\text{mol/g-VSS}^{-1}\text{h}^{-1}$ 로 변화되지 않음을 확인하였다.

[0060] 따라서, 활성탄을 가할 경우에는, starvation 조건하에서도 메탄산화세균이 메탄산화활성을 그대로 유지할 수 있음을 알 수 있었다.

[0061] **실시예 5: 메탄산화세균의 군집활성에 미치는 토버몰라이트의 효과**

[0062] 환경조건에 유기물의 농도가 높은 경우에는 메탄산화세균이 우점종인 군집에 비메탄산화세균이 증식하게 되어, 메탄산화세균과 비메탄산화세균이 혼합증식하게 되며, 이같은 경우에는 메탄산화세균의 메탄산화활성이 오히려 증가함을 실시예 3의 결과로부터 확인하였다. 그러나, 비메탄산화세균이 과다하게 증식하면 메탄산화세균이 상대적으로 감소되어 메탄산화활성 역시 감소하게 되고, 나중에는 비메탄산화세균의 과다 증식으로 인하여 메탄 산화 능력이 심각하게 저하될 수 있다. 이처럼, 비메탄산화세균이 과다하게 증식된 군집에 토버몰라이트를 첨가할 경우, 메탄산화세균의 증식을 촉진할 수 있는지의 여부를 확인하고자 하였다.

[0063] 구체적으로, 메탄 산화 농화배양액을 얻기 위한 접종원으로 공주 매립지와 가평 매립지의 토양을 각각 채취하였다. 메탄 산화세균 군집을 얻기 위해 다음과 같이 농화배양을 수행하였다. 600 mL 혈청병에 토양(습토) 8 g를 넣고 NMS 배지 20 mL을 첨가한 후 고무마개로 밀봉하였다. 밀봉된 혈청병에 유일 탄소원으로 메탄가스(99%, Dong-A gases, Seoul, Korea)를 주사기를 이용하여 채취한 후, 최종농도가 50,000 ppm이 되도록 주입하였다. 혈청병은 30℃, 175 rpm에서 배양하면서, 정기적으로 메탄 농도를 측정하여 주입된 메탄이 검출 한계점(10 ppm) 이하로 떨어지면, 클린벤치 안에서 혈청병의 고무마개를 열어 1 시간 동안 혈청병 내부의 공기를 치환하여 주었다. 공기 치환 후 고무마개를 닫고 메탄을 동일한 농도로 주입하였다. 이러한 방법으로 40여 회 메탄가스를 재주입해서 농화배양액을 확보하였다. 농화배양하는 동안에 질소와 인의 고갈에 따른 메탄 산화세균 군집의 메탄 산화 저해를 막기 위해 재배양 2 회 수행 때마다 질소와 인 농축액을 각각 1 mL씩 넣어주었다. 질소 농축액은 KNO₃ 2 g을 100 mL의 증류수에, 인 농축액은 KH₂PO₄ 0.52 g과 Na₂HPO₄·12H₂O 1.65 g을 100 mL의 증류수에 넣어 제조하였다. 이러한 방법으로 메탄가스를 주입해 주면서 농화배양을 수행하여 메탄산화능을 가진 2종류의 메탄 산화세균 군집(공주 콘소시움 및 가평 콘소시움)을 각각 수득하였다.

[0064] 상기 얻어진 2종의 메탄 산화세균 군집에 각각 메탄을 공급하지 않고 R2A 배지에서 10일간 배양하여 메탄산화 활성을 완전히 소실시켰다. 메탄산화 활성이 소실된 배양물을 NMS 배지로 3회 세정하여 메탄 산화세균 균체를 수득하고, 상기 세정된 균체에 NMS 배지 20 mL을 가하여 균체현탁액을 수득하였다.

[0065] 한편, 멸균한 600 mL 혈청병에 여과지를 넣고 NMS 배지 20 mL을 분주한 후, 상기 수득한 각각의 균체현탁액을 넣은 대조군과, 상기 균체현탁액에 토버몰라이트를 10 g 넣어 토버몰라이트 표면에 상기 균체가 부착되도록 한 균체와 토버몰라이트 복합체를 넣은 실험군을 각각 준비하였다. 상기 대조군과 실험군 각각의 혈청병을 고무마개로 밀봉한 후 탄소원으로 메탄가스(99.9%)를 최종농도가 10%(v/v) 되도록 주입해 주었다. 혈청병은 빛에 대한 영향을 차단하기 위해서 30℃ 배양기 안에서 정치 배양하였다. 배양하면서 혈청병 상부 가스를 0.3 mL 채취하여 가스 크로마토그래피로 메탄의 농도를 측정하였다. 혈청병 상부의 메탄농도가 5000 ppm이하로 떨어지면 혈청병의 고무마개를 열어 공기를 치환해 주었다. 다시 혈청병을 고무마개로 밀봉하고 메탄을 10%(v/v) 농도가 되도록 재주입해 주는 과정을 5회 반복하였다(도 7). 도 7은 메탄산화세균의 메탄산화활성에 미치는 토버몰라이트의 효과를 나타내는 것으로서, 도 7의 (a)는 공주 콘소시움을 접종한 대조군과 실험군에서 측정된 메탄산화활성을 나타내고, 도 7의 (b)는 가평 콘소시움을 접종한 대조군과 실험군에서 측정된 메탄산화활성을 나타낸다. 도 7에서 보듯이, 2종류의 메탄 산화세균 군집(공주 콘소시움 및 가평 콘소시움) 모두에서 메탄산화활성은 대조군에서는 16.4 ± 0.5 mmol/L/d 까지 회복된 반면, 실험군에서는 29.0 ± 0.9 mmol/L/d 까지 회복되어, 대조군보다 실험군에서 메탄산화활성이 현저하게 증가함을 확인할 수 있었다.

[0066] 한편, 가평 콘소시움을 접종한 대조군과 실험군으로부터 다음과 같이 DNA를 추출하여 메탄산화세균을 정량 분석하였다: DNA추출을 수행하기 위해 담체에 부착된 세균은 담체와 0.9 % NaCl용액을 섞어 Q500 ultrasonic processor (Qsonica LLC, Newton, USA)를 사용해서 세균을 담체로부터 분리해 낸 후 NucleoSpin Soil kit (Macherey-Nagel GmbH, Duren, Germany)를 사용해 DNA를 추출하였다. 추출한 DNA를 주형로 하여 서열번호 1 및 2의 프라이머를 이용하여 메탄산화세균을 검출하였다. 메탄산화세균 정량을 위해 다음과 같은 조건으로 qRT-PCR을 수행하였다(95℃ 3분 pre-denaturation, 40 cycle(95℃ 15, 55℃ 30초, 72℃ 30초) 및 82℃ 30초 final extension). 총 박테리아를 qRT-PCR을 통해 정량하였다(95℃ 3분 pre-denaturation, 40 cycle(95℃ 15, 50℃ 30초, 72℃ 30초) 및 82℃ 30초 final extension)(도 8). 도 8은 메탄산화세균의 증식에 미치는 토버몰라이트의 효과를 나타낸다. 도 8에서 보듯이, 토버몰라이트를 첨가하지 않는 대조군의 메탄산화세균 수는 $5.3 \times 10^6 \pm 3.6 \times 10^6$ pmoA gene copy number/bottle이었으나, 토버몰라이트를 첨가했을 시 $4.7 \times 10^7 \pm 2.9 \times 10^7$ pmoA gene copy number/bottle로 증가함을 확인하였다.

[0067] 따라서, 비메탄산화세균의 오염으로 인하여 메탄산화세균의 메탄산화활성이 저하된 경우, 토버몰라이트의 첨가에 의하여 메탄산화세균의 증식이 촉진되고, 결과적으로는 메탄산화활성이 단기간에 신속하게 회복 될 수 있음을 알 수 있었다

[0068] 실시예 6: 바이오커버를 이용한 온실가스, 악취 및 VOC 제거

[0069] 지름 8cm, 높이 50cm의 충전부(부피 2.5L)와 지름 8cm, 높이 15cm의 환기부, 그리고 지름 8cm, 높이 5cm의 가스 주입부로 구성된 실험실 규모 바이오커버를 PVC 재질로 제작하였다(도 9). 도 9는 바이오커버의 구성을 나타내는 개략도이다.

[0070] 바이오커버 하단의 가스 주입부는 난석(expanded perlite, 직경 5-10 mm)으로 채워 주입되는 가스가 균일하게 섞이도록 하였으며, 바이오커버가 건조되는 것을 방지하기 위해 가스를 가습기에 통과시킨 후 바이오커버에 공급하였다. 또한, 메탄/이산화탄소 가스는 2:3(v/v)으로 합성된 것으로 서울특수가스(Korea)에서 구입하여 사용하였으며, 5 mL · min⁻¹(공간 속도 0.12/h)의 유량으로 바이오커버에 공급하였다. TMA와 DMS는 500 ml의 미디어 병에 각각 TMA(Sigma, USA)와 DMS (Sigma, USA)를 넣고, 200 ml의 물과 50 ml의 corn oil을 넣어준 뒤 메탄의 inlet에 연결하여 휘발시켜 주입하였다. TMA와 DMS의 평균 공급 농도는 각각 약 1,100 그리고 800 ppm이 되도록 조절하였다. 바이오커버 상단 환기부는 공기를 20 mL/min의 유량으로 계속적으로 주입하여 매립지 토양과 접해 있는 대기 상태를 모사하였다. 각 가스의 유량은 가스 유량계(Air flow meter, Dwyer, USA; methane flow

meter, Kofloc, Japan)를 이용하여 조절하였다. 아울러, 바이오커버의 충전 물질 중 토버몰라이트 (JawooBio, Korea)로 직경이 3-8 mm인 것으로 구입하여 사용하였다. 지렁이 분변토는 난지 물재생센터에서 채취하였으며, 가평 매립지 토양은 표면층에서 약 30cm를 파낸 뒤 채취하여, 2-mm mesh를 이용하여 체를 쳤다. 각 물질은 사용하기 전까지 실온에서 보관하였다. 토버몰라이트와 매립지 토양, 지렁이 분변토는 최종적으로 각각의 비율을 2:1:1(w/w/w)로 하여 섞어서 충전하였다. 이렇게 준비한 충전재에 *Methylocystis* sp. M6 균주와 *Sphingomonas* sp. MD2 균주 배양액을 각각 200 ml씩 접종하였다.

[0071] 끝으로, 가스 샘플은 바이오커버의 inlet과 outlet의 샘플링 포트로부터 500 μ l 가스 채취용 실린지를 이용하여 300 μ l씩 채취하여 분석하였으며, 모든 분석은 3회 반복수행 하였다. 메탄, TMA 그리고 DMS의 농도 분석은 FID(flame ionization detector)와 wax column(30 m x 0.320 mm x 25 μ m, Supelco, USA)이 장착된 Gas chromatography(GC, 6850N, Agilent, USA)를 이용하였으며, 분석 조건은 oven, injector 및 detector의 온도가 각각 40, 200 및 250 $^{\circ}$ C인 조건으로 수행하였다.

[0072] 상기 제작된 바이오커버를 이용하여 134일 동안 메탄 및 악취물질을 동시공급하여 각 물질 별 제거효율을 확인 하였다(도 10). 도 10은 운전 조건에 따른 바이오커버의 inlet과 outlet에서의 메탄, TMA 그리고 DMS의 농도와 제거 효율을 나타낸다.

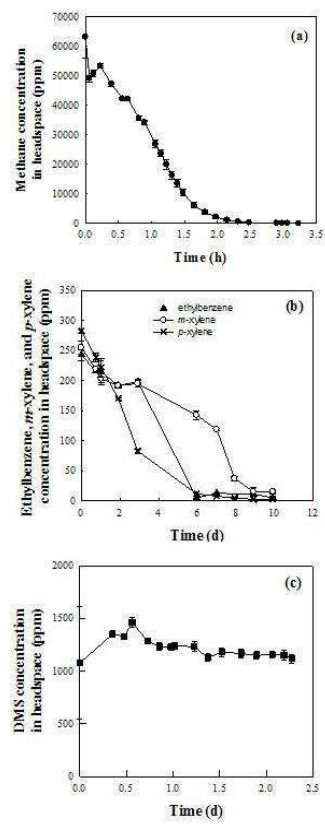
[0073] Run I은 메탄을 단일로 주입하는 조건으로, 1-39일(총 39일) 동안 운영하였다. 이 기간의 메탄 유입량이 337.8 $\pm$ 44.6 g/m³/d 일 때, 메탄 제거 용량은 220.4 $\pm$ 34.5 g/m³/d 이었고, 메탄 제거 효율은 59.8 $\pm$ 9.4% 이었다.

[0074] Run II는 메탄과 TMA를 동시에 주입하는 조건으로, 41-105일(총 65일) 동안 운영하였다. 이 때의 메탄 유입량, 메탄 제거 용량 및 메탄 제거 효율은 각각 383.5 $\pm$ 32.4 g/m³/d, 273.6 $\pm$ 15.4g/m³/d 및 74.2 $\pm$ 4.2%이었다. TMA는 주입 당일을 제외하고 700-2,000 ppm(평균 1,212 $\pm$ 454 ppm)의 농도로 주입되었으며, 전량 제거됨을 확인하였다.

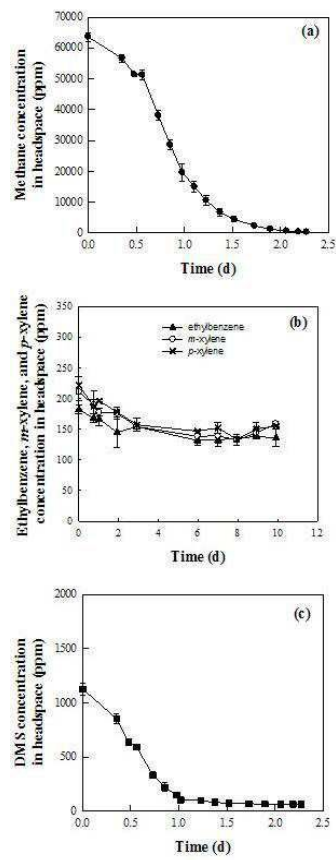
[0075] Run III는 메탄, TMA 그리고 DMS를 동시에 주입하는 조건으로 운영하였다. 운전 기간은 106-134일(총 29일)으로, 이때 메탄 유입량, 메탄 제거 용량 및 메탄 제거 효율은 각각 367.2 $\pm$ 12.2 g/m³/d, 260.9 $\pm$ 9.3g/m³/d 및 70.7 $\pm$ 2.5%이었다. TMA와 DMS는 각각 700-1,000ppm(평균 826 $\pm$ 76ppm) 및 700-900ppm(평균 814 $\pm$ 64 ppm)의 농도로 주입되었으며, 운전 기간 동안 전량 제거되었다.

도면

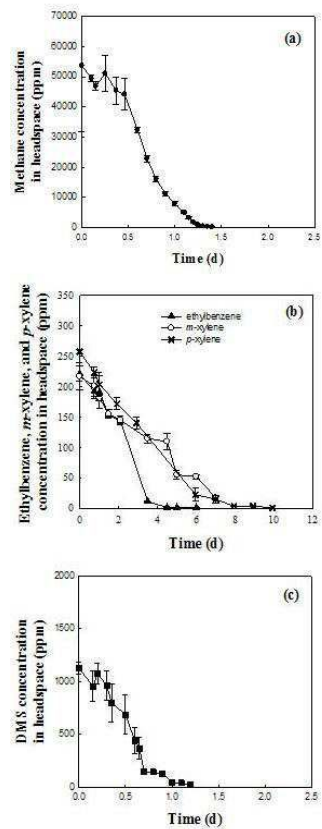
도면1



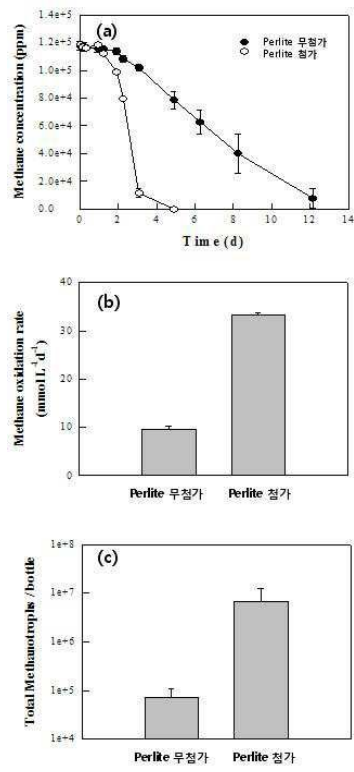
도면2



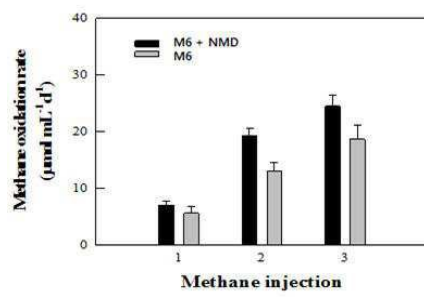
도면3



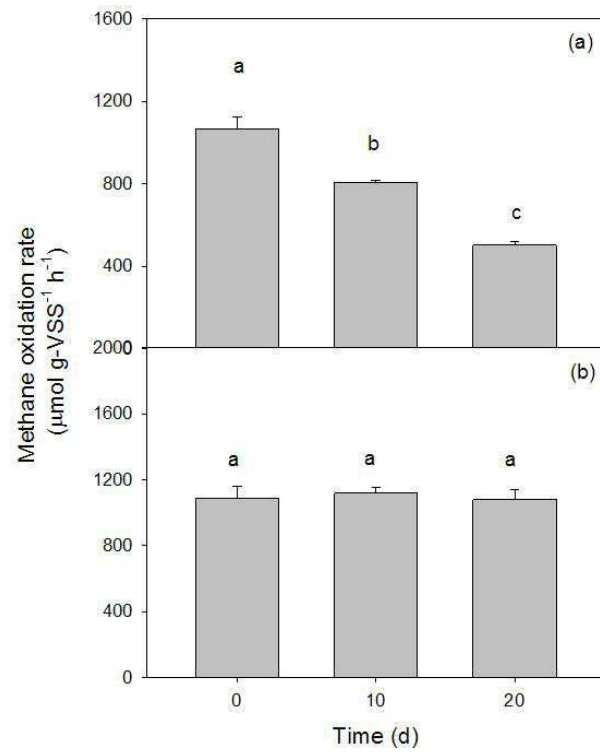
도면4



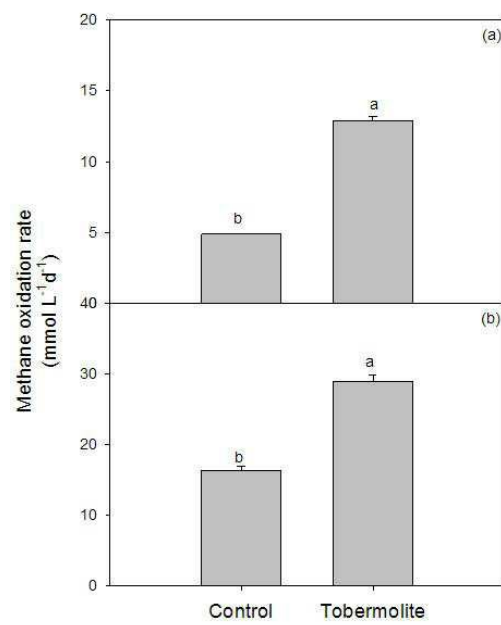
도면5



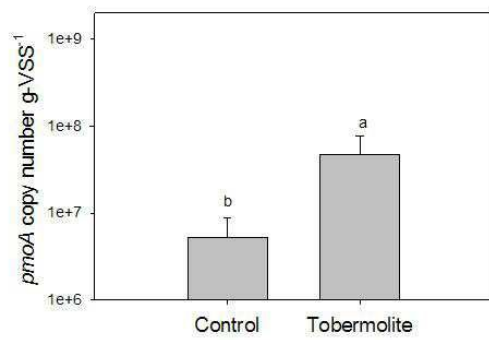
도면6



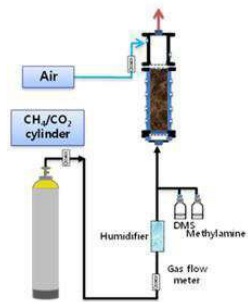
도면7



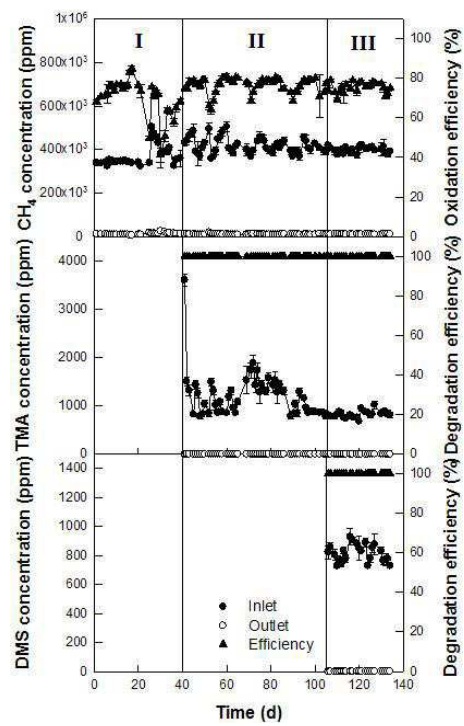
도면8



도면9



도면10



서열 목록

<110>	Ewha University-Industry Collaboration Foundation	
<120>	Composition for removing pollutant comprising methanotrophs and uses thereof	
<130>	PA130220/KR	
<160>	2	
<170>	Kopatent In 2.0	
<210>	1	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	A189f primer	
<400>	1	
	ggngactggg acttctgg	18
<210>	2	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	mb661r primer	
<400>	2	
	ccggmgcaac gtcyttacc	19