

토양 Methanotrophs에 의한 Trichloroethylene(TCE)의 분해에 대한 연구

폐기물공학팀

전은미 · 배일상 · 김은숙 · 강미혜 · 정권 · 유병태

Biodegradation of Trichloroethylene by Methanotrophs in Soil Enrichments

Waste Engineering Team

**Eun-mi Jeon, Il-sang Bae, Eun-sook Kim,
Mi-hye Kang, Kweon Jung, and Byung-tae Yu**

Abstract

Trichloroethylene(TCE) is a persistent VOC (volatile organic compound) contaminant that infiltrates soil and ground water from improper disposal of dry cleaning agents, degreasing solvent, and paint stripper. TCE is also suspect of being carcinogenic and mutagenic. Among various remediation methods, in situ bioremediation method to degrade TCE by increasing the indigenous methanotrophic population found in the soil has gained popularity because of its removal efficiency and easy to biostimulate methanotrophs. But there are a lot of factors to influence on TCE removal capacity by them. So we carried out the experiment of TCE degradation by methanotrophs enriched from sediments in order to figure out the interaction of TCE and methane for enzymes, the effect of formate on the degradation of TCE, and the effects of several chemical factors, such as formate, TCE and Cu, on methane consumption rate and TCE removal capacity. The results were as follows, 1) Competition for the active site on MMO between methane and TCE was shown. 2) The addition of formate as reducing agent resulted in increasing the removal rate of TCE but above 20mM, more increasing of degradation of TCE was not observed. 3) The consumption rate of methane seemed to be influenced by Cu, TCE and formate. 4) The different condition of incubation of methanotrophs led to the different removal capacity of TCE by methanotrophs(ratio of mg of TCE degraded to mg of VSS).

Key words : biodegradation, trichloroethylene, methanotrophs, soil

서론

Trichloroethylene(TCE)은 금속에 함유된 그리스를 제거할 때 주로 사용되며 접착제, 페인트 제거제, 수정

액 및 얼룩제거제에도 들어 있는 무색의 액체 용매이다. 제조나 사용과정 및 폐기과정 중에 환경에 유입되며 물에 대한 용해도가 낮아 대기 중으로 쉽게 휘발되어 공기를 오염시키나 일단 지하수에 유입되면 생물학적분해가

어려워 장기간 환경에 잔류한다. 토양에 유입된 경우에는 토양입자에 흡착하므로 지표수보다 더 오랜 기간 머물게 된다. TCE는 오염된 지하수나 공기를 통하여 노출되기 쉬우며 특히 TCE로 오염된 유해 폐기물 매립 지역에서는 휘발된 고농도의 TCE에 영향을 받을 수 있다. 미국 EPA(Environmental Protection Agency)에 의하면 1,430개의 National Priorities List Site들 중 852곳에서 TCE가 검출되었다. 우리나라의 경우 2002년도 1월부터 토양환경기준에 TCE가 추가되어 TCE 오염지역이 밝혀진다면 TCE로 오염된 토양의 처리가 필요할 것으로 예상된다. 환경부가 실시한 2000년도 수질 조사의 결과 오염우심지역 중 기준을 초과한 104개 지점 중 TCE는 46곳에서 초과되어 약 50%이상을 차지하였으며 특히 금속세정제 등을 사용하는 공단지역과 금속광산지역 34곳이 기준초과지점으로 나타났다.

현재 TCE로 오염된 지하수와 토양의 처리는 soil venting, air stripping, carbon adsorption, pump-and-treat법을 사용하고 있으나 TCE는 물보다 무겁고 잘 녹지 않으므로 제거효율이 그리 만족스럽지 않다. 이들 방법들이 단순히 TCE를 다른 곳으로 이동시키는 데에 반하여 생물학적인 복원은 TCE를 분해시키기 때문에 현장에서 TCE로 오염된 지하수와 토양을 제거하는 효과적인 방법으로 제시되고 있다. 현장에서의 성공적인 생물학적복원(in situ bioremediation)은 오염된 곳의 미생물에 TCE 분해능력에 좌우된다. 이미 ammonium, aromatic hydrocarbons(toluene, phenol, alkylbenzene, 및 biphenyl), methane, 다른 알칸이나 알켄을 이용하여 생육한 미생물은 TCE를 분해할 수 있다고 알려져 있다. 특히 methane을 이용하여 성장하는 methane-oxidizing bacteria(methanotroph)는 생물학적복원분야에서 phenol 등보다 유해성이 훨씬 적고, TCE를 cometabolism하는 능력이 뛰어나므로 많은 연구가 이루어져 왔다. 이들은 methane을 methanol로 산화할 때에 methane monooxygenase(MMO)라고 알려진 효소를 이용한다. 이 효소는 기질특이성이 적어서 인공화합물질을 포함하여 많은 수의 화합물을 분해하므로 생물학적복원에 이용할 수 있는 가능성이 매우 높다.

MMOs는 두 개의 환원가(reducing equivalent)를 이용하여 O-O bond를 깨뜨린 후 한 개의 산소원자는 H₂O를 형성하고, 다른 하나는 methane에 주입되어

methanol이 형성된다. MMOs는 두 개의 형태가 있는데, 하나는 soluble MMOs(sMMO)이고 다른 하나는 particulate MMOs(pMMO)이다. 보고에 의하면 모든 Methanotrophic bacteria는 pMMO를 형성할 수 있으나 sMMO는 Type II와 일부 Type I이 생성할 수 있으며 이것은 배지내의 구리농도에 의존한다. sMMO는 pMMO를 포함한 다른 oxygenase보다 기질 특이성의 범위가 더 넓다. 그러나 pMMO를 이용하는 methanotrophs가 훨씬 성장률이 높으며 methane에 대한 친화력도 높다. 이는 sMMO가 촉매하는 반응은 전자공여체로서 NADH+H⁺가 사용되는 반면에, pMMO는 더 높은 전위의 전자공여체를 사용하기 때문이다. methane을 기질로 이용한 경우에 환원된 NAD⁺가 종종 성장을 제한할 때가 많다. 일부 methanotroph에 의한 sMMO의 합성은 구리가 부족한 환경에서 생존하기 위한 기작으로 판단된다. Methanotroph에 의한 TCE cometabolism의 효율을 증가시키기 위해서 필요한 것은 NAD⁺를 환원시키는 환원체이다. 이것이 sMMO가 촉매하는데 필요한 NADH를 공급할 수 있게 하기 때문이다.

TCE에 오염된 토양이나 지하수를 효과적으로 처리하기 위해서 methanotroph을 이용할 때, 가장 효과적인 TCE 분해능력을 발위하도록 미생물의 활성을 증진할 필요가 있다. methanotroph의 성장에는 여러 요인들이 영향을 끼치는 것으로 알려져 있다. 본연구에서는 TCE와 methane과의 기질 경쟁 환원체로 첨가하는 formate가 TCE 분해율에 미치는 최적활성조건을 얻기 위한 목적으로 Cu, formate, TCE 등이 methane 소비율에 미치는 영향과 배양 후 TCE 분해능력을 분석하였다.

재료 및 방법

1. 시료 토양

영등포구의 하수도 준설토를 이용하여 Methanotrophs를 증균하였다. 토양의 pH측정은 풍건시킨 토양을 2mm체로 친 후에 토양과 증류수의 비를 1:10으로 하여 1분간 magnetic bar로 교반시킨후 1시간 동안 정치시키고 다시 교반 후 상등액의 pH를 측정하였다. 유기물함량은 공정시험법에 의하여 측정하였다. 토양의 건조는 105 °C에서 24시간 건조하였으며 600

℃에서 4시간 건조하였다. 측정된 pH는 7.9, 수분함량은 15.8%, 유기물함량은 3.8%이었다. 토양 중의 Cu의 농도는 0.0818 mg/g이었다.

2. Methanotrophs의 토양내 증균

1) 증균실험

전체 부피가 1400mL인 flask에 NMS 배지 150mL을 넣고 토양을 15g을 넣는다. 고무로 막은 후 이곳에 설치한 관을 통하여 air를 30% 빼낸 후 다시 CH₄를 30% 주사기로 주입하였다. Shaking incubator(JEIO tech. SI-900R)에서 270 rpm 30℃로 배양하였다. 3일간 배양한 후 다른 flask에 transfer한 후에 동일한 환경조건을 맞추어 배양하였다. 전체 배양일 5일 후에 NMS 배지에 탁도가 나타나기 시작하였으며 7일정도 후에는 A600이 1에 가까운 탁도를 나타낼 정도로 Methane Oxidizing Bacteria가 enrichment되었다. 4일에 한번씩 새로운 배지로 옮겼으며 실험은 A₆₀₀이 0.5가 되도록 배지로 희석하여 사용하였다.

2) 탁도(A₆₀₀)와 휘발성고형물

미생물성장을 측정하기 위해서 미생물 부유물의 탁도와 headspace의 methane의 양을 측정하여서 모니터링하였다. 탁도는 spectrophotometer(Beckman DU-65)로 600nm에서의 흡광도(A₆₀₀)를 측정하였다. 그 결과 탁도(A₆₀₀)와 건조미생물질량(휘발성고형물, Volatile Suspended Solids(VSS))과의 사이에는 상관성을 나타내었다. VSS는 105℃에서 밤새 건조시킨 후의 무게와 550℃에서 2시간동안 강열 후의 무게차이를 구하여 측정하였다. 이 두 파라미터는 선형의 상관관계를 나타내었다. VSS는 600nm에서 흡광도를 측정하여 환산한 값이다.

3. Methane이 TCE 분해에 미치는 영향

Methane이 TCE와 공존할 때에 TCE분해에 미치는 영향을 알아보기로 25mL vial에 A₆₀₀이 0.5인 methanotroph증식배지를 채운 후, TCE의 농도가 1 ppm이 되도록 TCE포화용액을 주입하여 마개를 닫고 손으로 30초간 흔든 다음 초기 TCE 농도를 측정한 후 0℃, 270rpm으로 shaking 배양하였다. 12시간 후 및 60시간 후의 TCE 농도를 측정하였다.

4. Formate가 TCE 분해에 미치는 영향

TCE 농도와 환원체 formate 농도에 의한 TCE 분해에 미치는 영향을 알아보기 위해서 다음과 같은 실험을 하였다. 대수증식기(A₆₀₀=0.6~0.7)의 미생물을 일정량 취하여 NMS medium(Table 1) 으로 A₆₀₀이 0.5가 되도록 희석한 후 25mL vial에 5mL을 채운 후 formate 농도가 0, 10, 20, 50, 100 mM이 되도록, 준비한 formate 용액을 일정량 주입하였다. 그 후 TCE포화용액을 주입하여 TCE의 농도가 1 ppm, 10ppm이 되도록 조정된 후 마개를 닫고 손으로 30초간 흔든 다음 300 μ l의 headspace를 취하여 GC로 분석하여 초기 TCE 농도를 측정하였다. 이것을 30℃, 270rpm으로 shaking 배양하였다. (JEIO TECH SI-900R, shaking incubator). 12시간 후 및 36시간 후의 TCE 농도를 측정하였다.

5. Formate, Cu 및 TCE가 Methanotroph에 미치는 영향

Formate와 Cu 및 TCE가 Methane분해에 미치는 영향을 알아보기로 다음과 같은 실험을 행하였다. NMS medium으로 A₆₀₀이 0.2가 되도록 희석한 후, 이 액 12mL를 취하여 25mL vial에 옮긴 후 pure methane(99%, Supelco) 3mL을 주입하였다. 손으로 30초간 세게 흔든 다음에 첫 번째 headspace sampling을 한 후 30℃, 270rpm에서 배양하면서 6시간, 18시간, 24시간 후에 methane을 측정하였다. vial에 주사기로 6mL의 공기를 주입한 후 60시간 후에 다시 headspace gas중 methane을 측정하였다. 위의 각 조건에 따라 84시간동안 배양한 vial의 탁도를 측정하여 미리 구한 환산식에 의해서 VSS를 구한 후 분해된 methane(mg)당 새로 생성된 VSS(mg)을 구하였다.

6. 시 약

1) TCE 포화용액

TCE는 물에 잘 섞이지 않으므로 TCE stock solution은 다음과 같이 조제하였다. 25mL vial에 pure TCE(Supelco)를 1mL을 첨가하여 증류수로 채운다. 이 vial을 Teflon-faced septum이 있는 마개로 막은 후 1분간 흔들어 준다. 24시간 이상 방치한 후 두 개의 phase를 분리한다. 조제한 TCE 포화용액의 농도는 평균 1300 mg/L이었다.

2) NMS(Nitrate Mineral Salts) Medium

Table 1. Composition of NMS medium

Chemicals	Medium 1L 당
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.0 g
KNO ₃	1.0 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	0.717 g
KH ₂ PO ₄	0.272 g
CaCl ₂ · 6H ₂ O	0.2 g
Ferric ammonium EDTA	4.0 mg
Trace element solution	0.5 mL

Methanotrophs의 배양에는 NMS Medium을 사용하였으며 그 조성은 Table 1에 나타나 있다. 증류수에 표 1에 있는 물질들을 녹인 후에 pH 6.8로 맞추었다. 이것을 tube와 flask에 나눈 후에 15 min간 15 psi pressure-121℃에서 고압증기 멸균하였다. 사용된 배지에는 Cu가 없으므로 이 배지를 이용하여 성장한 미생물은 기본적으로 sMMO를 생성하는 미생물만이 자랄 수 있다고 판단할 수 있다.

3) 처리제 및 기타시약

Reducing agent (Formic acid)는 Sodium salt(CH₂ONa, Janssen)를 증류수에 용해하여 사용하였으며 구리이온은 Copper(II) Chloride 2H₂O (Shinyo Chemicals Co.)을 용해하여 사용하였다.

7. 분석방법

1) Methane 분석

Methane의 분석은 Hemilton-gas tight syringe로 30 μl를 취해서 GC로 분석하였다. 사용된 GC는 Hewlett Packard 5890이며 사용된 column은 DB-1 capillary column(J&W Scientific Co.), 30m×0.250mm이었으며, injector는 50℃, oven 80℃, FID detector의 온도는 250℃이다. methane의 standard curve는 일정량의 methane(99.0%, Supelco)을 vial 주입하여 구하였으며 각 실험시 vial에 NMS 배지에 methane을 동일한 조건으로 배양한 후 측정하였다. 휘발성 손실은 5% 이내였다.

2) TCE 분석

TCE의 분석은 Hemilton-gas tight syringe로 300 μl를 취해서 GC로 분석하였다. 사용된 GC는 Shimadzu GC-17A이며 사용된 column은 DB-Wax(J&W Scientific Co.), 30m×0.250mm이었으며, injector는 250℃, oven 80℃, ECD detector의 온

도는 300℃이었다. TCE의 표준곡선은 농도를 구한 TCE 포화용액을 각 vial에 일정량씩 주입하여 구하였으며 30초간 손으로 흔든 후에 측정하였다. 실험시 vial에 NMS 배지에 TCE를 동일한 조건으로 첨가 배양한 후 휘발성 손실을 측정하였으며 휘발성 손실은 5% 이내였다.

결과 및 고찰

1. Methane이 TCE 분해에 미치는 영향

Methane이 TCE와 공존할 때는 동일한 효소에 대한 경쟁으로 인해서 영향을 주는 것으로 나타났으며 그 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 12시간 경과 후 methane을 주입하지 않은 vial의 TCE 분해율이 3배정도 높았다. 그러나 36시간이 지난 후에는 메탄을 주입한 vial과 주입하지 않은 vial과는 10%정도의 차이만을 나타내었다. 이는 초기에는 TCE가 효소(MMO)의 특정활성자리에 대해서 Methane과 경쟁으로 인하여 분해율이 낮았으나 시간이 지나감에 따라 그 영향이 감소하는 것을 알 수 있다.

2. Formate가 TCE 분해에 미치는 영향

Methanotrophs에 의해서 TCE가 cometabolism이 되기 위해서는 환원체인 formate가 필요하다.

Fig. 2를 보면 formate를 첨가하지 않을 때보다 formate를 첨가한 경우 TCE 제거효율이 높았으나 20mM이상인 경우 formate농도가 증가하여도 TCE 분해효율은 증가하지 않는 것으로 나타났다. 이는 일정농도 범위내에서 Reducing agent로 formate를 첨가하면 TCE의 분해효율을 증가시키는 것을 의미하나.

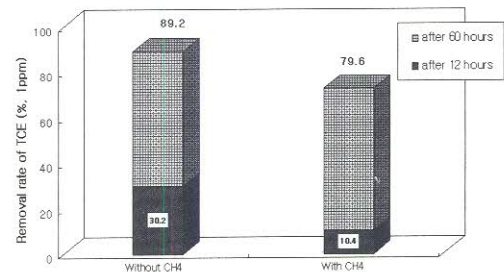


Fig. 1. Effects of methane on degradation of TCE by methanotrophs

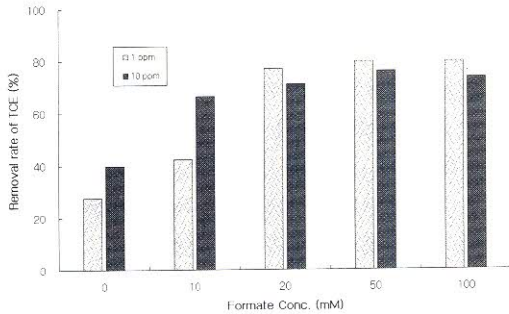


Fig. 2. Effects of formate on degradation of TCE by methanotrophs after 36 hours of incubation

sMMO에 의해서 TCE가 산화되는 반응은 NADH가 환원체로 필요하다. 산화된 NADH는 methane이 산화되어야만 다시 환원된 형태로 반응에 가담할 수 있으나 TCE의 산화로는 생성되지 않는다. 그러므로 외부에서 환원에너지가 공급되어야 하며, 환원체의 대표적인 것이 formate이다. formate가 TCE 산화효율을 증가시키는 것을 볼 때 이 분해반응은 sMMO에 의한 것임을 추정할 수 있다.

3. Formate, Cu 및 TCE가 Methanotroph에 미치는 영향

Fig. 3은 TCE, Cu 및 formate가 methane 소비속도에 미치는 영향을 나타낸 것이다. Fig. 3에서 볼 수 있듯이 TCE(10 ppm)는 영향을 거의 미치지 않는 것으로 보이나 Cu의 경우는 초기에 소비를 둔화시키는 것으로 나타났다. 그러나 18시간이 지난 후에는 소비속도가 급속히 증가하였다. 이번 실험에 사용된 NMS 배지는 Cu가 포함되지 않아서 sMMO를 생성할 수 있는 Type II,

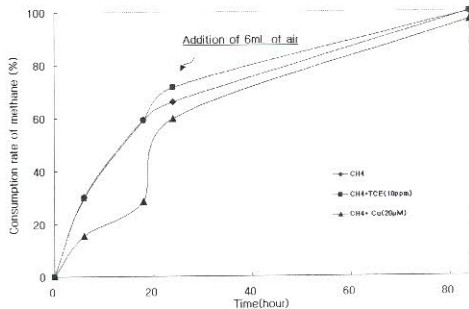


Fig. 3. Effects of TCE & Cu on the consumption of methane by methanotrophs

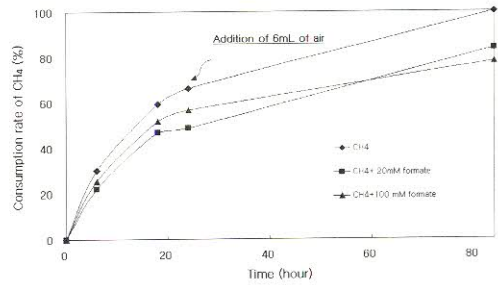


Fig. 4. Effects of the formate on consumption of methane by methanotrophs

X만이 배양된 것으로 가정할 수 있으며 Cu가 이들 methanotroph의 methane 소비에 영향을 미칠 것으로 추정된다.

Fig. 4는 Formate가 methanotrophs의 methane 소비에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 전체적으로 formate는 methanotrophs의 methane 소비속도를 둔화시키는 것으로 나타났다. 또한 배양 24시간까지는 formate 농도가 100mM일 때보다 20mM일 때 오히려 methane 소비속도가 감소되었으나 이후로는 100mM보다 빠르게 소비되었다.

Table 2는 각 조건아래에서 배양한 후 탁도를 측정하여 단위 VSS(mg) 및 소비된 methane량(mg)당 새로 생성된 세포(g)를 구한 결과이다. Cu가 20µM 조건에서는 methane만 주어진 조건에서보다 세포 생성량이 약 절반이었으며, formate가 100 mM일 때는 큰 차이가

Table 2. The Production of VSS with consumption of methane

Conditions	No addition	20mM formate	100mM formate	TCE (10ppm)	Cu (20 µM)
production *	3.14	6.05	3.54	3.84	1.48

* unit: mg of produced VSS/ mg of VSS at first/ mg of consumed methane

Table 3. TCE degradation by methanotrophs after incubated under different conditions

Conditions	No addition	20mM formate	100mM formate	TCE (10ppm)	Cu (20 µM)
Removal rate (%) of TCE after 20 hours	80.4	39.8	55.4	39.6	41.6

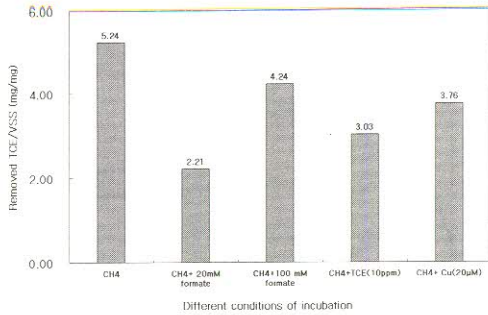


Fig. 5. Removal capacities of TCE by methanotrophs incubated under different conditions

없으나 20mM일 때는 두 배 이상으로 세포가 증가한 것으로 나타났다.

다양한 조건에서 배양한 methanotrophs의 TCE 분해능력을 알아보기 위해서 추가실험을 행한 결과를 Table 3과 Fig. 5에 나타내었다. Table 3은 전체적으로 소비된 TCE 제거효율을 나타낸 것이고 Fig. 5는 미생물 mg(as VSS)당 분해된 methane의 양(mg)으로 환산하여 나타낸 것이다. 실험결과는 methane만으로 배양한 경우가 TCE 제거율이 가장 높았으며, 그 다음으로 100 mM formate 첨가한 것, Cu를 첨가한 경우의 순으로 TCE 제거율이 높았다. 특히 20 mM의 formate 조건에서 배양된 미생물은 TCE 분해능력이 가장 낮은 것으로 나타났다.

Table 2과 3의 결과를 같이 고려하면, 비록 20mM의 formate를 첨가한 경우 미생물량(VSS)은 증가하지만 실제로 TCE 제거능력은 감소한다고 볼 수 있으며 methane만으로 배양한 경우가 조사한 실험 조건 중에서 가장 TCE 분해능력이 좋은 것을 알 수 있었다.

Formate가 20mM일 때 소비된 methane 당 가장 많은 미생물(VSS)이 증가하였으나, 실제 TCE 분해능력은 가장 낮은 것으로 나타났다. 이것은 formate가 methane과 함께 존재하면 methane 대신 성장기질로서는 작용하지 않지만 methane이 cell material로 전환되도록 도와주는 것으로 추정할 수 있다.

결 론

준설토에 서식하는 Methanotrophs를 증균배양하고

이들에 의한 TCE 분해에 관한 실험을 행한 결과는 다음과 같다.

1. Methane과 TCE가 같이 존재하는 경우에는 효소에 대한 경쟁반응으로 TCE 분해율이 감소하였다.
2. 환원제인 formate를 첨가하였을 때 TCE의 제거율은 증가되었으나, 일정 농도 범위 이상이 넘으면 더 이상 분해율은 증가되지 않았다.
3. Methanotroph가 methane을 소비하는 데에는 다양한 요인이 영향을 줄 수 있는 것으로 나타났다. 즉Cu와 formate는 methane 소비율을 감소시키나, TCE(10ppm)는 methane 소비율에는 큰 영향을 주지 않았다.
4. Methanotroph의 배양조건이 TCE 분해능력에 큰 영향을 미치며 methane만으로 배양한 세균군이 TCE 분해능력이 가장 높았고, formate첨가의 경우는 cell production rate는 증가시키나 실질적인 TCE 분해능력을 감소하였다.

참고문헌

1. Kung-Hui Chu and Lisa Alvarez-Cohen: Effect of Nitrogen Source on Growth and Trichloroethylene Degradation by Methane-Oxidizing Bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, 64:3451-3457,(1998)
2. Kung-Hui Chu and Lisa Alvarez-Cohen: Evaluation of Toxic Effects of Aeration and Trichloroethylene Oxidation on Methanotrophic Bacteria Grown with Different Nitrogen Source, *Applied and Environmental Microbiology*, 65:766-772(1999)
3. Sonny Lontoh and Jeremy D.semrau: Methane and Trichloroethylene Degradation by *Methylosinus trichosporium* OB3b expressing particulate Methane Monooxygenase, *Applied and Environmental Microbiology*, 64:1106-1114(1998)
4. Peter Adrians and Dunja Grbic-Galic : Cometabolic Transformation of Mono-and Dichlorobiphenyls and Chlorohydroxyphenyls

- by Methanotrophic Groundwater Isolates, Environmental Science and Technology, 28:1325-1330(1994)
5. B. N. Moran and W. J. Hickey: Trichloroethylene Biodegradation by Mesophilic and Psychrophilic Ammonia Oxidizers and Methanotrophs in Groundwater Microcosms, Applied and Environmental Microbiology, 63:3866-3871(1997)
 6. M. Margaret Fogel, and Arthur R. Taddeo: Biodegradation of Chlorinated Ethenes by a Methane-Utilizing Mixed Culture, Applied and Environmental Microbiology, 51:720-724(1986)
 7. Rocco L. Mancinelli, Annu. Rev: The Regulation of Methane Oxidation in Soil, Microbiol, 49: 581-605(1995)
 8. Roelof Oldenhuis, and Johannes Y. Oedzes: Kinetics of Chlorinated Hydrocarbon Degradation by *Methylosinus trichosporium* OB3b and Toxicity of Trichloroethylene, Applied and Environmental Microbiology, 57:7-14(1991)
 9. Richard S. Hanson, and Thomas E. Hanson: Methanotrophic Bacteria, Microbiological Reviews, 60:439-471(1996)
 10. Ronald M. Atlas, Handbook of Microbiological Media, second edition, CRC press, 1014 (1997)
 11. 동화기술, 공정시험법, 폐기물
 12. ASTDR(Agency for Toxic Substances and Disease Registry), Tox FAQs for Trichloroethylen, 1997, (<http://www.astdr.cdc.gov/tfacts19.html>)
 13. EPA(Envrionmental Protection Agency), Trichloroethylene, 1997(<http://www.epa.gov/ttn/atw/hfthef/tri-ethy.html>)
 14. <http://www.hort.agri.umn.edu/h5015/99fpapers/tlusty.htm>
 15. 환경부, 환경통계연감, 제14호, 2001