(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0018212
(43) 공개일자 2018년02월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C02F 11/04 (2006.01) *C02F 1/72* (2006.01)
C02F 11/14 (2006.01) *C02F 3/28* (2006.01)
C12M 1/06 (2006.01) *C12N 1/20* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C02F 11/04 (2013.01)
C02F 1/72 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0103306
(22) 출원일자 2016년08월12일
심사청구일자 2016년08월12일

(71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
이창수
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
백가현
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
김자애
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(74) 대리인
유미특허법인

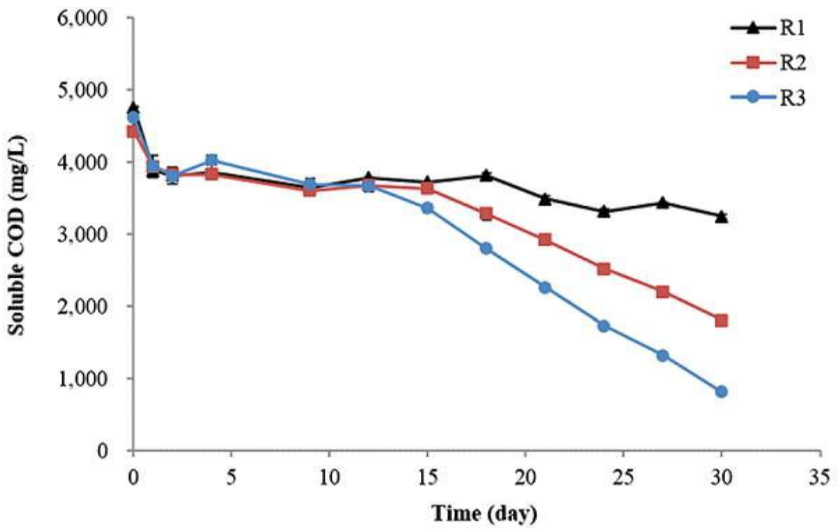
전체 청구항 수 : 총 22 항

(54) 발명의 명칭 **철 산화물을 이용한 유기 폐기물 처리 방법 및 처리 장치**

(57) 요 약

유기 폐기물에 철 산화물을 첨가하여 철 산화물-메탄 생성 미생물 복합체를 형성하는 것을 특징으로 하는 유기 폐기물 처리 방법, 철 산화물-메탄 생성 미생물 복합체, 및 유기 폐기물 처리 장치에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C02F 11/14 (2013.01)
C02F 3/2866 (2013.01)
C02F 3/2893 (2013.01)
C12M 27/02 (2013.01)
C12N 1/20 (2013.01)
Y02W 10/12 (2015.05)
Y02W 10/23 (2015.05)
Y02W 30/47 (2015.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2014R1A1A1002329
부처명 교육과학기술부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 신진연구사업
연구과제명 혐기성 미생물 군집 내 철환원균 활성 증대를 통한 유기성폐기물 바이오가스화
기 여 율 1/1
주관기관 울산과학기술원
연구기간 2015.05.01 ~ 2016.04.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

(1) 유기 폐기물에 철 산화물을 첨가하여 혐기적 소화 반응을 수행하는 단계, 및

(2) 얻어진 혐기적 소화 반응물 내의 혐기성 메탄 생성 미생물 표면에 상기 철 산화물이 결합된 철 산화물-메탄 생성 미생물 복합체를 형성하는 단계

를 포함하는, 유기 폐기물 처리 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 철 산화물은 철 옥시하이드록사이드 (ferric oxyhydroxide; FeOOH), 마그네타이드 (Fe_3O_4), 또는 이들의 혼합물인, 유기 폐기물 처리 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 혐기성 메탄 생성 미생물은 *Methanosaeta* 속, *Methanobacteriales* 속, *Methanomicrobiales* 속, *Methanosarcinales* 속, *Trichococcus* 속, *Clostridium* 속, *Parabacteroides* 속, *Acinetobacter* 속, *Bacteriodetes* 속, *Petrimonas* 속, *Saccharofermentans* 속, *Rhodopseudomonas* 속, *Syntrophobacter* 속, 및 *Chloroflexi* 속 미생물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 유기 폐기물 처리 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 혐기성 메탄 생성 미생물은 서열번호 11 내지 24 중에서 선택된 16S rRNA의 특징을 갖는 미생물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 유기 폐기물 처리 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 철 산화물-메탄 생성 미생물 복합체 내의 철 산화물은 이온화되지 않은 상태인, 유기 폐기물 처리 방법.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 철 산화물-메탄 생성 미생물 복합체를 형성하는 단계 (2) 이후에, 상기 형성된 철 산화물-메탄 생성 미생물 복합체를 회수하는 단계 (3)을 추가로 포함하는, 유기 폐기물 처리 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 철 산화물-메탄 생성 미생물 복합체를 회수하는 단계는 자력을 이용하여 수행되는 것인, 유기 폐기물 처리 방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 회수하는 단계 (3) 이후에, 상기 회수된 철 산화물-메탄 생성 미생물 복합체를 단계 (1)의 철 산화물의 전부 또는 일부를 대체하여 첨가하는 단계 (4)를 포함하고, 단계 (1) 내지 (4)를 반복 수행하는 것을 특징으로 하는, 유기 폐기물 처리 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 철 산화물-메탄 생성 미생물 복합체의 회수는 자력을 이용하여 수행되는 것인, 유기 폐기물 처리 방법.

청구항 10

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 혐기성 메탄 생성 미생물을 첨가하는 단계를 추가로 포함하는, 유기 폐기물 처리 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 혐기성 메탄 생성 미생물은 *Methanosaeta* 속, *Methanobacteriales* 속, *Methanomicrobiales* 속, *Methanosarcinales* 속, *Trichococcus* 속, *Clostridium* 속, *Parabacteroides* 속, *Acinetobacter* 속, *Bacteriodetes* 속, *Petrimonas* 속, *Saccharofermentans* 속, *Rhodopseudomonas* 속, *Syntrophobacter* 속, 및 *Chloroflexi* 속 미생물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 유기 폐기물 처리 방법.

청구항 12

철 산화물과 메탄 생성 미생물을 포함하고, 상기 메탄 생성 미생물의 표면에 상기 철 산화물이 결합된 형태인, 철 산화물-메탄 생성 미생물 복합체.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 철 산화물은 철 옥시하이드록사이드 (ferric oxyhydroxide; FeOOH), 마그네타이드 (Fe_3O_4), 또는 이들의 혼합물인, 철 산화물-메탄 생성 미생물 복합체.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 메탄 생성 미생물은 *Methanosaeta* 속, *Methanobacteriales* 속, *Methanomicrobiales* 속, *Methanosarcinales* 속, *Trichococcus* 속, *Clostridium* 속, *Parabacteroides* 속, *Acinetobacter* 속, *Bacteriodetes* 속, *Petrimonas* 속, *Saccharofermentans* 속, *Rhodopseudomonas* 속, *Syntrophobacter* 속, 및 *Chloroflexi* 속 미생물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 철 산화물-메탄 생성 미생물 복합체.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 메탄 생성 미생물은 서열번호 11 내지 24 중에서 선택된 16S rRNA의 특징을 갖는 미생물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 철 산화물-메탄 생성 미생물 복합체.

청구항 16

제12항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 철 산화물-메탄 생성 미생물 복합체 내의 철 산화물은 이온화되지 않은 상태인, 철 산화물-메탄 생성 미생물 복합체.

청구항 17

혐기적 소화 반응조 및

자성 물질을 포함하는 철 산화물 트랩

을 포함하는, 유기 폐기물 처리 장치.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 혐기적 소화 반응조는 교반 장치를 포함하는 것인, 유기 폐기물 처리 장치.

청구항 19

제17항에 있어서, 상기 자성 물질은 자석 및 전자석으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 유기 폐기물 처리 장치.

청구항 20

제17항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 자성 물질을 포함하는 철 산화물 트랩은 상기 반응조와 일체형인, 유기 폐기물 처리 장치.

청구항 21

제19항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 자성 물질을 포함하는 철 산화물 트랩은 상기 반응조와 분리된 것인, 유기 폐기물 처리 장치.

청구항 22

서열번호 11 내지 24 중에서 선택된 16S rRNA의 특징을 갖는 메탄 생성 미생물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 유기 폐기물에 철 산화물을 첨가하여 철 산화물-메탄 생성 미생물 복합체를 형성하는 것을 특징으로 하는 유기 폐기물 처리 방법, 철 산화물-메탄 생성 미생물 복합체, 및 유기 폐기물 처리 장치를 제공한다.

배 경 기 술

[0002] 혐기적 소화 (Anaerobic digestion; AD)는 유기 오염물질을 메탄과 같은 유용한 에너지 매체 (energy carrier)로 변환시킬 수 있어서 최근의 에너지 문제 및 환경 문제를 대처할 수 있는 대안 기술로 여겨지고 있다. 혐기적 소화는 고강도 유기 폐기물 및 폐수 처리에 널리 적용되고 있으며, 미래 에너지 안전성 및 유지가능성 (sustainability)에 중요한 역할을 할 것으로 기대된다. 이와 같은 잠재력에도 불구하고, 혐기적 소화는 느린 반응 속도 때문에 몇 가지 기술적 한계를 갖는다. 이러한 한계는 주로 메탄생성 경로 (methanogenic pathway)에 관여하는 혐기성 미생물의 느린 성장 속도에 기인한다.

[0003] 상기 한계는 호기적 처리와 비교하여 현저하게 긴 정체 기간(retention time) 및 낮은 유기물 제거 속도 등을 포함한다. 이러한 한계를 극복하고 혐기적 소화 기술의 실효성을 개선하기 위한 많은 노력과 시도가 있어 왔다. 이러한 노력과 시도는 통상적으로 공정 설계 및 운전의 경험적 변조에 의존하여 왔으나, 최근 들어, 미생물 군집 (microbial community) 수준에서의 이해의 필요성이 대두되고 있다. 생물학적 공정이 관련된 미생물들의 조화된 활성에 의존함을 고려하면, 미생물 군집 조성이 공정 성능에 중요한 영향을 미칠 것이라고 예견된다.

[0004] 혐기적 소화는 가수분해 (hydrolytic), 발효 (fermentative), 아세테이트 생성 (acetogenic), 메탄 생성 (methanogenic) 등과 같은 다양한 대사 작용과 관련된 복합 미생물 컨소시엄들(complex microbial consortia)에 의하여 수행되는 다단계 공정이다. 전자 수용체로 3가 철이온 (ferric iron)을 사용하여 광범위한 스펙트럼의 유기 물질을 산화시키는 철-환원 박테리아 (Iron-reducing bacteria; IRBs)이 혐기적 환경에 일반적으로 존재하고 iron cycling에 중요한 역할을 한다. 혐기적 소화에서 직접적으로 관여하지 않음에도 불구하고, IRBs는 전체적인 혐기적 소화의 성능에 긍정적이거나 부정적인 영향을 미친다. 메탄 생성 (Methanogenesis) and 3가 철이온 환원은 메탄의 주요 전구물질인 아세테이트와 수소 (H_2)에 대하여 직접적으로 경쟁하고, 후자 (3가 철이온 환원)이 전자 공여체에 대한 threshold가 낮기 때문에 열역학적으로 보다 유리하다. 상이한 3가 철이온 화합물 (결정형 또는 무정형)을 첨가시 다양한 환경에서의 혐기적 소화에 대하여 부정적인 영향이 있거나 영향이 없는 것으로 알려져 있다.

[0005] 혐기적 소화를 통한 보다 효율적인 폐기물 처리 기술의 개발이 요구된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 일 예는 유기 폐기물에 철 산화물을 첨가하여 혐기적 소화 반응을 수행하는 단계, 및 얻어진 혐기적 소화 반응물 내의 혐기성 메탄 생성 미생물 표면에 상기 철 산화물이 결합된 철 산화물-메탄 생성 미생물 복합체를 형성하는 단계를 포함하는, 유기 폐기물 처리 방법이 제공된다.

[0007] 다른 예는 철 산화물과 메탄 생성 미생물을 포함하고, 상기 메탄 생성 미생물의 표면에 상기 철 산화물이 결합된 형태인, 철 산화물-메탄 생성 미생물 복합체를 제공한다.

[0008] 다른 예는 반응기 및 자성 물질을 포함하는 철 산화물 트랩을 포함하는, 유기 폐기물 처리 장치를 제공한다.

[0009] 다른 예는 서열번호 11 내지 24 중에서 선택된 16S rRNA의 특징을 갖는 신규한 메탄 생성 미생물을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 명세서에서 생물학적 촉진 수정 (biostimulation amendments)이 산 생성 (acidogenesis) 단계 및 메탄 생성 (methanogenesis) 단계에서의 반응 과정에 어떠한 영향을 미치는지 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0011] 유기 폐기물 처리시의 철 산화물과 같은 전도성 물질의 투입은 혐기적 소화 환경에서 미생물 간의 전자 전달 (direct inter-species electron transfer; DIET)을 촉진하고, 이로 인하여 바이오가스화 효율을 향상시킬 수 있다는 이점을 갖는다. 본 명세서에서는 실폐수(유가공폐수, 하수슬러지)에 적용하여 향상효과를 확인하였다.

[0012] 바이오가스화 효율 향상을 목적으로 철 산화물을 비롯한 금속 산화물을 투입하는 기존 방법들은 산화물이 해리되어 생성된 금속 이온을 미생물들이 생장에 이용하도록 하는 것으로, 혐기적 소화 조건에서 미량원소가 부족한 환경이 흔히 형성되기 때문에 금속이온 보충 효과와 관련된 것들인 반면, 본 발명은 이와는 근본적으로 다른 'electric syntrophy' 기작(유기물을 분해하여 전자를 외부로 방출하는 미생물의 작용으로 생성된 전자가 다른 미생물에게 전달되어 환원반응에 이용되는 생물학적 공생관계)에 바탕을 두고 있는 것을 특징으로 한다. 이 때, 철 산화물 미세분말은 이온화되거나 다른 형태로 전환되지 않으며 전자전달의 속도/효율을 높여 반응의 효율을 개선하는 목적으로 활용될 수 있는 것을 특징으로 한다.

[0013] 본 발명에서 제공되는 철 산화물과 같은 자성 전도체는 자력을 이용하여 회수/재활용이 가능하기 때문에 계속적인 비용 투입을 지양하고 경제성을 높일 수 있다는 이점이 있다. 상기 자성 전도체의 회수는 혐기적 소화 단계를 거친 유출수에서 회수하거나, 혐기적 소화가 일어나는 반응조 하단에 자력을 가하여 (예컨대 (전)자석을 설치), 필요 시에 자력을 생성하여 철 산화물을 트랩하는 방법 등도 적용 가능하다.

[0014] 본 명세서에서 철 산화물 (예컨대, 미세 분말 형태)을 첨가하여 유기 폐기물의 혐기적 소화를 수행하는 경우, 철 산화물 미세분말이 미생물 세포들의 표면에 붙어있는 형태로 유지되며 (도 14, 16, 18 및 20 참조), 이를 통하여 미생물들 간의 전자 전달 촉진은 물론 일종의 담체와 유사한 기능도 발휘할 수 있다는 이점이 있다. 즉, 앞서 설명한 바와 같이 자력을 이용하여 철 산화물을 회수/재활용할 경우, 철 산화물에 부착된 미생물들도 함께 트랩되어 반송됨으로써 반응기 내 미생물 농도를 지속적으로 높게 유지할 수 있다. 이는 혐기적 소화를 매개하는 미생물의 개체수(또는 바이오매스)가 높게 유지되는 것을 의미하며, 직접적인 바이오가스화 공정 속도 향상으로 이어질 수 있다.

[0015] 이하 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

[0016] 본 명세서에서, 유기 폐기물은 유기물을 포함하는 모든 종류의 폐기물 (고형 폐기물 및 폐수를 모두 포함하는 개념임)을 의미하는 것으로, 예컨대, 생활 하수, 농축산 폐수, 유가공 폐수 (예컨대, 유장 (whey) 등), 음식물 쓰레기, 음폐수 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 폐기물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0017] 본 발명의 일 예는 혐기적 소화에 의한 유기 폐기물의 처리 방법을 제공한다. 상기 유기 폐기물 처리 방법은,

[0018] (1) 유기 폐기물에 철 산화물을 첨가하여 혐기적 소화 반응을 수행하는 단계, 및

[0019] (2) 얻어진 혐기적 소화 반응물 내의 혐기성 메탄 생성 미생물 표면에 상기 철 산화물이 결합된 철 산화물-메탄 생성 미생물 복합체를 형성하는 단계

[0020] 를 포함하는 것일 수 있다.

[0021] 상기 유기 폐기물 처리 방법은 회분식, 연속식, 또는 연속회분식으로 수행될 수 있다. 상기 유기 폐기물 처리 방법에 있어서, 상기 철 산화물은 1회 또는 2회 이상 처리될 수 있으며, 처리 회수 및 1회 처리량은 유기 폐기물의 종류, 양 등을 고려하여 적절하게 조절할 수 있다.

[0022] 상기 철 산화물은 철 옥시하이드록사이드 (ferric oxyhydroxide; FeOOH), 마그네타이드 (Fe_3O_4), 또는 이들의 혼합물일 수 있다.

[0023] 상기 혐기성 메탄 생성 미생물은, 혐기성 메탄 생성 및 관련 전자전달 기작에 관여하는 미생물로서, *Methanosaeta* 속, *Methanobacteriales* 속, *Methanomicrobiales* 속, *Methanosarcinales* 속 등을 포함하는 고세균 및 *Trichococcus* 속, *Clostridium* 속, *Parabacteroides* 속, *Acinetobacter* 속, *Bacteriodetes* 속, *Petrimonas* 속, *Saccharofermentans* 속, *Rhodopseudomonas* 속, *Syntrophobacter* 속, *Chloroflexi* 속 등을 포

함하는 박테리아로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 혐기성 메탄 생성 미생물은 유기 폐기물에 철 산화물을 첨가하여 혐기적 소화 수행한 반응물에 존재하는 미생물 군집에 존재하는 미생물이다. 일 예에서, 상기 혐기성 메탄 생성 미생물은 서열번호 11 내지 24 중에서 선택된 16S rRNA의 특징을 갖는 미생물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있다.

[0024] 앞서 설명한 바와 같이, 상기 혐기성 메탄 생성 미생물은 electric syntrophy 활성을 갖는 것일 수 있다.

[0025] 상기 혐기성 소화 반응은 유기 폐기물에 통상적으로 사용되는 혐기성 식종 슬러지를 첨가함으로써 수행되는 것일 수 있다. 상기 혐기성 식종 슬러지는 통상적으로 얻어지는 도시 하수, 농축산 폐수, 유가공 폐수 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 처리하는 혐기소화조에서 채취한 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0026] 상기 유기 폐기물 처리 방법은, 상기 형성된 철 산화물-메탄 생성 미생물 복합체 내의 철 산화물이 이온화되지 않은 상태로 유지되는 것을 특징으로 한다. 따라서, 상기 철 산화물-메탄 생성 미생물 복합체를 회수하여 상기 단계 (1)의 혐기적 소화 과정에 철 산화물의 전부 또는 일부를 대체하여 첨가하여 재활용이 가능하다는 이점을 갖는다.

[0027] 따라서, 상기 유기 폐기물 처리 방법은 상기 철 산화물-메탄 생성 미생물 복합체를 형성하는 단계 (2) 이후에, 상기 형성된 철 산화물-메탄 생성 미생물 복합체를 회수하는 단계 (3)을 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0028] 또한, 상기 유기 폐기물 처리 방법은 상기 회수하는 단계 (3) 이후에, 상기 회수된 철 산화물-메탄 생성 미생물 복합체를 단계 (1)의 철 산화물의 전부 또는 일부를 대체하여 첨가하는 단계 (4)를 포함하고, 단계 (1) 내지 (4)를 반복 수행하는 것일 수 있다.

[0029] 상기 회수하는 단계 (3)은 혐기적 소화 단계를 거친 유출수로부터 회수하거나, 혐기적 소화가 일어나는 반응조 하단에 자력을 가하여 (예컨대 (전)자석을 설치), 필요 시에 자력을 생성하여 철 산화물을 포획함으로써 수행될 수 있다.

[0030] 상기 철 산화물-메탄 생성 미생물 복합체는 철 산화물의 전도성에 의하여 자력을 이용하여 용이하게 회수 가능하다. 상기 자력을 이용한 회수는 자석 (예컨대, 네모디뮴 자석 등), 전자석 등으로 이루어진 군에서 선택된 자성 물질을 이용하여 수행 가능하다.

[0031] 유기 폐기물 처리시 철 산화물을 처리하여 혐기적 소화를 수행하는 경우, 메탄 생성량이 현저하게 증가하는 이점 (도 2 참조)뿐 아니라, 앞서 설명한 바와 같이, 철 산화물과 반응물 내의 메탄 생성 미생물과 결합한 철 산화물-메탄 생성 미생물 복합체 형성에 의하여 용이한 회수 및 재활용이 가능하다는 이점이 있으므로, 유기 폐기물 처리시 상기 메탄 생성 미생물을 추가로 첨가하면 혐기적 소화 반응물에 메탄 생성 미생물이 존재하지 않거나 적은 양으로 존재하는 경우에도 상기 유리한 효과를 얻을 수 있다.

[0032] 따라서, 상기 유기 폐기물 처리 방법은 혐기성 메탄 생성 미생물을 첨가하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 혐기성 메탄 생성 미생물을 첨가하는 단계는 상기 단계 (1) 내지 (4) 중 어느 단계에 수행되어도 무방하다.

[0033] 상기 혐기성 메탄 생성 미생물은 *Methanosaeta*속 고세균 및 *Trichococcus*속 박테리아로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0034] 상기 유기 폐기물 처리 방법에 있어서, 철 산화물의 처리량은 유기 폐기물과 철 산화물의 혼합물 전체 농도를 기준으로 철 농도가 0.1 내지 100mM, 1 내지 80mM, 5 내지 50mM, 10 내지 30mM, 2mM 내지 100mM, 2mM 내지 80mM, 2mM 내지 50mM, 2mM 내지 30mM, 또는 2mM 내지 20mM이 되도록 하는 양일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0035] 상기 혐기적 소화는 30 내지 40, 32 내지 40, 34 내지 40, 30 내지 38, 32 내지 38, 34 내지 38, 30 내지 36, 32 내지 36, 또는 34 내지 36, 예컨대, 약 35, 및 pH 5 이상 또는 pH 6 이상 (예컨대, pH 5 내지 pH 14, pH 5 내지 pH 12, pH 5 내지 pH 10, pH 5 내지 pH 8, pH 6 내지 pH 14, pH 6 내지 pH 12, pH 6 내지 pH 10, pH 6 내지 pH 8, 예컨대, 약 pH 7)의 조건 하에서 수행되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0036] 다른 예는 철 산화물과 혐기적 메탄 생성 미생물을 포함하고, 상기 메탄 생성 미생물의 표면에 상기 철 산화물이 결합된 형태인, 철 산화물-메탄 생성 미생물 복합체를 제공한다. 상기 철 산화물 및 혐기적 메탄 생성 미생물은 앞서 설명한 바와 같다. 상기 철 산화물-메탄 생성 미생물 복합체 내의 철 산화물은 이온화되지 않은 상태인 것을 특징으로 한다.

[0037] 다른 예는

[0038] (i) 혐기적 소화 반응조 및

[0039] (ii) 자성 물질을 포함하는 철 산화물 트랩

[0040] 을 포함하는, 유기 폐기물 처리 장치를 제공한다.

[0041] 상기 유기 폐기물 처리 장치는 회분식, 연속식, 또는 연속 회분식 장치일 수 있다.

[0042] 상기 혐기적 소화 반응조는 통상적인 교반 장치를 포함하는 것일 수 있으며, 이 경우 상기 혐기적 소화 반응조에서 일어나는 혐기적 소화는 진탕 배양에 의하여 수행되는 것일 수 있다.

[0043] 상기 자성 물질은 철 산화물-메탄 생성 미생물 복합체를 회수하기 위한 것으로, 자석, 전자석 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

[0044] 상기 자성 물질을 포함하는 철 산화물 트랩은 상기 반응조와 일체형으로 존재하거나 (도 35 참조), 반응조와 분리되어 존재하는 분리형 (도 36 참조)일 수 있다.

[0045] 도 35은 유기 폐기물과 철 산화물이 투입되는 혐기적 소화 반응조와 (전)자석을 포함하는 철 산화물 트랩이 일체형으로 구성된 일체형 유기 폐기물 처리 장치를 모식적으로 보여준다. 이 때, 혐기적 소화 반응시에는 자력을 끄고 (off), 철 산화물이 충분히 현탁된 조건에서 미생물들의 반응을 도와(electric syntrophy) 유기물 바이오가스화 공정의 반응속도 및 효율 향상시키고, 폐기물 배출시 자력을 켜고 (on), 철 속산화물을 자력에 의해 바닥/벽면 등에 포획 (trap)시키고 (소화 여액에 연속적으로 재투입함), 처리된 소화 여액(digestate)을 외부로 배출시키면서 진행할 수 있다. 이러한 사이클을 반복하여 철 산화물의 유실 없이(또는 이를 최소화하며) 연속식으로 공정을 운전할 수 있다.

[0046] 도 36은 유기 폐기물과 철 산화물이 투입되는 혐기적 소화 반응조와 (전)자석을 포함하는 철 산화물 트랩이 서류 분리되어 존재하는 분리형 유기 폐기물 처리 장치를 모식적으로 보여준다. 이 때, 혐기적 소화 반응 및 폐기물 배출시 자력의 on/off 교차 없이 반응기에서 배출된 소화 여액에서 연속적으로 철 산화물을 회수하여 반응기로 재투입하여 활용할 수 있다. 철 산화물의 회수는 별도의 회수조를 설치하거나, 회수조 없이 유출 관로의 유속을 낮게 조절 (관로 폭을 부분적으로 넓히는 등)한 상태에서 자력을 이용하여 회수하는 방법도 가능하다.

[0047] 다른 예는 신규한 혐기적 메탄 생성 미생물을 제공한다. 상기 혐기적 메탄 생성 미생물은 KP241962.1, KP241963.1, KP241964.1, KP241965.1, KP241966.1, KP241967.1, KP241968.1, KP241969.1, KP241970.1, 및 KP241975.1로 이루어진 군에서 선택된 16S rRNA의 특징을 갖는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0048] 유기 폐기물의 혐기적 소화를 통한 처리 방법에 있어서, 철 산화물을 처리함으로써, 메탄 생성 효율을 증진시킬 뿐 아니라, 철 산화물이 혐기적 소화 반응물에 존재하는 혐기 메탄 생성 미생물의 표면에 결합하여 복합체를 형성함으로써 철 산화물이 이온화되지 않고 온전하게 존재하여 자력을 이용하여 용이하게 회수 및 재활용 가능하여 추가적 철 산화물 투입 없이 유기 폐기물 처리가 가능하다는 이점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0049] 도 1은 각 반응기에서의 가용성 CDO 제거율을 잔존 가용성 COD 농도로 보여주는 그래프이다.

도 2는 각 반응기에서의 바이오가스 (수소 및 메탄)의 생산량 (축적량으로 표시)을 보여주는 그래프이다.

도 3은 총 VFA 농도 및 각 지방산 (아세테이트, 프로피오네이트, 부티레이트) 농도를 COD equivalent로 나타낸 그래프이다 (A: R1 반응기의 결과, B: R2 반응기의 결과, C: R3 반응기의 결과).

도 4는 반응 9일째의 각 반응기 내의 총 VFA 중의 아세테이트, 프로피오네이트 및 부티레이트의 축적 농도를 나타낸 그래프이다.

도 5는 각 반응조로부터 얻어진 샘플의 16s rRNA 유전자의 DGGE 결과를 보여주는 사진이다.

도 6은 각 반응조로부터 얻어진 샘플 내 존재하는 박테리아 군집의 클러스터 계통수 (cluster dendrogram)이다.

도 7은 시험 기간 동안 분석된 박테리아 군집 구조들 간의 관련성을 보여주는 그래프이다.

도 8은 Real-time PCR에 의하여 결정된 *Methanosaeta* 및 *Trichococcus*의 16S rRNA 유전자 농도를 나타낸 그래프이다.

도 9는 마그네타이트 입자의 SEM 사진이다.

도 10은 RC 및 RM 반응기에서의 시험 단계에 따른 가용성 화학적 산소 요구량 (sCOD) 변화를 보여주는 그래프이다.

도 11은 RC 및 RM 반응기에서의 시험 단계에 따른 휘발성 지방산 (Volatile fatty acids; VFAs; C_2-C_7) 농도 변화를 보여주는 그래프이다.

도 12은 RC 및 RM 반응기에서의 시험 단계에 따른 아세트산 농도 변화를 보여주는 그래프이다.

도 13은 RC 및 RM 반응기에서의 시험 단계에 따른 가용성 프로피온산 농도 변화를 보여주는 그래프이다.

도 14는 RC 반응기의 181일째 샘플에서 얻어진 SEM 분석 결과를 보여주는 이미지이다.

도 15는 RC 반응기의 181일째 샘플에서 얻어진 EDX 분석 결과를 보여주는 그래프이다.

도 16은 RC 반응기의 272일째 샘플에서 얻어진 SEM 분석 결과를 보여주는 이미지이다.

도 17은 RC 반응기의 272일째 샘플에서 얻어진 EDX 분석 결과를 보여주는 그래프이다.

도 18은 RM 반응기의 181일째 샘플에서 얻어진 SEM 분석 결과를 보여주는 이미지이다.

도 19는 RM 반응기의 181일째 샘플에서 얻어진 EDX 분석 결과를 보여주는 그래프이다.

도 20은 RM 반응기의 272일째 샘플에서 얻어진 SEM 분석 결과를 보여주는 이미지이다.

도 21은 RM 반응기의 272일째 샘플에서 얻어진 EDX 분석 결과를 보여주는 그래프이다.

도 22는 RC 반응기의 샘플에 대한 XRD 결과를 보여주는 그래프이다 (검은 선: 샘플로부터 얻어진 결과; 붉은 선: 순수한 마그네타이트로부터 얻어진 결과).

도 23은 RM 반응기의 샘플에 대한 XRD 결과를 보여주는 그래프이다 (검은 선: 샘플로부터 얻어진 결과; 붉은 선: 순수한 마그네타이트로부터 얻어진 결과).

도 24는 각 반응기의 샘플로부터 얻어진 고세균 16S rRNA 유전자 DGGE fingerprints 결과를 보여준다.

도 25는 각 반응기의 샘플로부터 얻어진 박테리아 16S rRNA 유전자 DGGE fingerprints 결과를 보여준다.

도 26은 고세균의 DFFE 프로파일을 기초로 얻어진 클러스터 계통수를 보여준다.

도 27은 고세균의 DFFE 프로파일을 기초로 얻어진 NMS 플롯을 보여준다.

도 28은 박테리아의 DFFE 프로파일을 기초로 얻어진 클러스터 계통수를 보여준다.

도 29는 박테리아의 DFFE 프로파일을 기초로 얻어진 NMS 플롯을 보여준다.

도 30은 16S rRNA 유전자 정량 결과에 기초한 총 메탄생성 미생물 개체군 (methanogen population) 변화를 나타낸 그래프이다.

도 31은 16S rRNA 유전자 정량 결과에 기초한 각 메탄생성 미생물군의 절대량을 나타낸 그래프이다.

도 32는 16S rRNA 유전자 정량 결과에 기초한 각 메탄생성 미생물군의 상대량을 나타낸 그래프이다.

도 33은 RC 반응기 및 RM 반응기를 연속적으로 운전하면서 379일째에 자석을 이용하여 마그네타이트를 회수하면서 측정한 가용성 COD 농도를 나타낸 그래프이다.

도 34는 RM 반응기의 378일 이후의 모든 기간의 샘플에서 자석으로 마그네타이트를 회수하는 모습을 보여주는 사진이다.

도 35은 일체형 폐기물 처리 장치의 일 예를 예시적으로 보여주는 모식도이다.

도 36은 분리형 폐기물 처리 장치의 일 예를 예시적으로 보여주는 모식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0050] 이하 본 발명의 이해를 돕기 위해 바람직한 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 이에 한정되는 것은 아니다.

[0052] **I. 회분식 반응기 시험**

[0053] **참고예 1: 회분식 혐기적 반응기(Anaerobic reactors)의 준비**

[0054] 작업 용량이 2L인 3개의 완전 혼합 탱크 반응기 (각각 R1, R2, 및 R3로 칭함)에서 치즈 생산시 생기는 부산물인 유장(whey)을 회분식 (batch mode)으로 30일 동안 혐기적 처리하였다. 유장은 높은 organic strength와 생분해성 때문에 주로 혐기적 소화에 의하여 처리된다.

[0055] 사용된 유장 기질과 접종물 (inoculum; 혐기성 식종 슬러지 (seed sludge); 부산 도시 하수처리장에서 얻어진 슬러지)의 종류와 물리화학적 특성을 아래의 표 1에 정리하였다

표 1

[0056]

Parameter	Unit	Anaerobic sludge	Whey
Total COD	mg/L	16,968 (93)[a]	4941 (221)
Soluble COD	mg/L	1035 (42)	4226 (108)
Total solids	mg/L	19,900 (141)	5750 (71)
Total volatile solids	mg/L	11,500 (71)	5250 (71)
Total suspended solids	mg/L	17,600 (566)	1000 (283)
Volatile suspended solids	mg/L	11,200 (566)	600 (283)

[a] Standard deviations are in parentheses

[0057] 기질 내의 대부분의 유기 물질은 수용성 형태로 존재하고, 그렇기 때문에 미생물에 대하여 보다 용이하게 사용될 수 있다. 본 실시예에서 기질로 사용된 유장은 낙농 회사 (Samik Dairy and Food Co., Ltd., South Korea)로부터 입수하였다.

[0058] 각 반응기를 화학적 산소 요구량 (chemical oxygen demand; COD)이 5 g/L인 유장 희석물로 채우고, 부산 (South Korea)의 도시 하수로부터 얻은 혐기성 슬러지를 접종하였다 (접종 비율 (seeding ratio): 1%(v/v)). 반응기 R2와 R3에 철 옥시하이드록사이드 (ferric oxyhydroxide; FeOOH; R2) 분말과 마그네타이드 (Fe_3O_4; R3) 분말을 넣어 각 반응기의 최종 철 (Fe) 농도가 각각 20 mM이 되도록 하였다. heating tape가 부착된 자동 조절기를 사용하여 반응기 운전 온도를 35±2로 유지하고, 반응기의 pH는 pH 조절기를 사용하고 3N NaOH 용액을 첨가하여 7.0 이상이 되도록 하였다. 각 반응기는 통상적인 방법으로 샘플링되고 물리화학적 파라미터를 모니터링하였다.

[0059] **참고예 2: DNA 추출**

[0060] 제조자 사용설명에 따라서 자동 핵산 추출기 (ExiProgen, Bioneer, Daejeon, South Korea)를 이용하여 미생물 군집 DNA를 반응기 샘플로부터 정제하였다. 1mL 분량의 샘플을 1.5-mL microtube에서 13,000xg 속도로 3분 동안 원심분리하고, 얻어진 펠렛화된 바이오매스를 증류수로 세척한 후, 원심분리 (13,000xg, 1 min)하고, 900 uL의 양으로 따르고, 재현탁 (up to 1 mL in distilled water)하여, 세포 파편과 그 외 불순물을 제거하였다. 재현탁물 중 200 uL를 취하여 ExiProgen Bacteria Genomic DNA Kit (Bioneer)를 장착한 추출기에 로딩하고 DNA를 추출 및 정제하였다. 정제된 DNA를 DNase-free elution buffer solution (200 uL)에서 용출시키고, 사용시까지 -20에서 저장하였다.

[0061] **참고예 3: 분자 핑거프린팅 및 서열 분석**

[0062] 미생물 군집 구조를 분석하기 위한 분자 핑거프린팅 기법 (molecular fingerprinting method)에 주로 사용되는 DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis)를 사용하여 반응기 내의 고세균 (archaea) 및 박테리아 (bacteria) 군집 구조를 분석하였다. DGGE 분석을 위하여, ARC787F/1059R과 BAC338F/805R 프라이머 세트(Yu et al., BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, VOL. 89, NO. 6, MARCH 20, 2005 참조)를 각각 이용하는 중합효소 연쇄 반응 (quantitative real-time polymerase chain reaction; qRT-PCR)에 의하여 고세균 및 박테리아의 16S ribosomal RNA (rRNA) 유전자 단편을 각각 준비하였다.

[0063] 상기 사용된 프라이머를 아래의 표 2에 정리하였다:

표 2

[0064]

프라이머 (F: forward primer; R: reverse primer)	Target group	Sequence (5'3')	서열번호
ARC787F	Archaea	ATTAG ATACC CSBGT AGTCC	1
ARC1059R		GCCAT GCACC WCCTC T	2
BAC338F	Bacteria	ACTCC TACGG GAGGC AG	3
BAC805R		GACTA CCAGG GTATC TAATC C	4

[0065] 40-base gas chromatograph (GC) clamp (CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG; 서열번호 5)를 forward primer (즉, ARC787F 및 BAC338F) 각각의 5'-말단에 첨가하여 겔 상에서의 보다 우수한 amplicon 분리 효율과 안정적인 용융 거동을 나타내도록 하였다.

[0066] 상기 PCR은 다음의 조건 하에서 수행하였다:

[0067] initial denaturation at 94 for 10 min;

[0068] 20 cycles of denaturation at 94 for 30 s, annealing at 65 to 55 for 30 s (decreasing the temperature by 0.5 /cycle), and extension at 72 for 30 s;

[0069] an additional 25 cycles of 94 for 30 s, 55 for 30 s, and 72 for 30 s; 및

[0070] further extension at 72 for 7 min.

[0071] 상기와 같이 얻어진 PCR 단편(20 uL)을 8%(w/v) 폴리아크릴아마이드 겔에 로딩하였다 (denaturant gradient: 고세균의 DGGE run 경우 35 내지 65%(v/v); 박테리아의 DGGE run 경우 20 내지 60%(v/v); 100%(v/v) denaturant은 7 M 우레아 및 40%(v/v) 포름아마이드를 포함함).

[0072] 전기영동을 D-code system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)에서 16시간 동안 80V 하에서 진행하였다. DGGE 겔을 SYBR Safe dye (Molecular Probe, Eugene, OR)로 염색하고 Safe Imager Blue-Light Transilluminator (Invitrogen, USA)를 사용하여 470 nm에서 스캐닝하여 밴드 패턴을 가시화시켰다. 측정하고자 하는 밴드를 겔로부터 잘라내서 멸균수 40 uL에 용출시켰다. 각 용출물을 2 uL씩 분량하여 앞서 DGGE 분석에서 사용한 것과 동일한 서열의 GC clamp를 포함하지 않는 프라이머 세트를 사용하여 다시 증폭시켰다. 얻어진 PCR 산물을 겔-정제하고 (Gel/PCR purification mini kit, Favorgen, Taiwan), 클로닝하고 (pGEM-T Easy, Progema, USA), 서열분석 하였다 (Macrogen Sequencing Service, South Korea).

[0073] 이와 같이 얻어진 서열 정보를 GenBank와 Ribosomal Database Project (RDP) 데이터베이스 (http://rdp.cme.msu.edu/) 의 정보와 비교하였다. 80%의 bootstrap confidence threshold에서 RDP 분류기를 사용하여 분류하였다. 본 시험에서 회수된 모든 뉴클레오타이드 서열을 GenBank database: KP241962 내지 KP241975에 기탁하였다 (구체적 염기서열은 실시예 3의 표 5 참조).

[0074] **참고예 4: DGGE 핑거프린팅의 클러스터 분석 (cluster analysis) 및 좌표 결정 (ordination)**

[0075] 고세균 및 박테리아 각각의 DGGE fingerprint 결과를 모든 레인에서 DGGE 밴드가 존재하는 경우 '1', 존재하지 않는 경우 '0'으로 기록하여, 2차원 행렬 (binary matrix)을 구축하였다. 클러스터 분석은 상기 얻어진 행렬 상에서 비가중 평균결합법 (unweighted pair group method with arithmetic means; UPGMA) 알고리즘을 사용하

여 수행하여 분석된 군집 구조 간의 관련성을 측정하였다. PAST 3.03 software를 사용하여 클러스터 계통수 (cluster dendrogram)를 구축하였다 (Hammer O, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST: Palaeontological statistics software package for education and data analysis. Palaeontol Electron 4:1-9 참조).

[0076] 생태학적 군집 데이터 (ecological community data)에 대한 가장 효율적인 좌표 결정 (ordination) 방법 중 하나인 비계량 다차원척도법 (Non-metric multidimensional scaling; NMS; McCune B, Grace JB (2002), Analysis of Ecological Communities, Vol. 2; MjM Software Design, Glenden Beach, OR, USA)를 사용하여 각 반응기에서의 시간에 따른 고세균 또는 박테리아 군집 구조의 변화를 가시화하였다. NMS를 이용하여 복합 데이터 (예컨대, DGGE 레인의 밴드 프로파일)을 저차원 공간 (low-dimensional space) 내의 한 점(point)에 압축하여 NMS 플롯(plot) 내의 두 개의 점 사이의 거리가 대응하는 데이터 세트 사이의 차이 (dissimilarity)를 반영하도록 하였다. NMS 계산은 PC-ORD software 5.0 (MjM software, Gleneden Beach, OR, USA)를 사용하여 수행하였다. UPGMA 클러스터링 및 NMS는 모두 군집 데이터에 대하여 일반적으로 권고되는 Sorensen distance measure (McCune and Grace 2002)를 사용하여 수행하였다.

[0077] **참고예 5: Real-time Polymerase Chain Reaction**

[0078] 상기 반응기로부터 *Methanosaeta* 16S rRNA 유전자 및 *Trichococcus* 16S rRNA 유전자의 농축물을 얻었다. 이를 위하여, 상기 두 표적 미생물 탐지에 가장 널리 사용되는 프라이머 세트를 사용하여 real-time PCR를 수행하였으며, 이 때 사용된 프라이머 세트를 아래의 표 3에 정리하였다:

표 3

[0079]

프라이머 (F: forward primer; R: reverse primer)	Target microbes	Sequence (5'3')	서열번호	참조문헌
Mst702F	*Methanosaetaceae*	TAATC CTYGA RGGAC CACCA	6	Yu et al., Biotechnol Bioeng 89:670-679 (2005)
Mst862R		CCTAC GGCAC CRACM AC	7	
TaqMan probe		ACGGC AAGGG ACGAA AGCTA GG	8	
Trich555F	*Trichococcus*	GTCTTGACATCCTTTGACAAT	9	VandeWalle et al., Environ Microbiol 14:2538-2552 (2012)
Trich2723R		TTGACCTCGCGGTCTTGCT	10	

[0080] Real-time PCR 증폭은 Quantstudio 12K Flex system (Life Technologies, Singapore)을 사용하여 수행하였다.

[0081] *Methanosaeta* 검출용 반응 혼합물 (20 uL)을 Thunderbird Probe qPCR mix (Toyobo, Osaka, Japan)을 사용하여 준비하였다: 프리믹스 (PCR 반응을 연속적으로 이어가기 위한 구성성분인 DNA polymerase, dNTPs, 및 buffer가 1회 분량씩 동결 건조된 제품; Toyobo, 도쿄, 일본) 10 uL, TaqMan probe 2 uL (최종 농도: 200 nM), 각 프라이머 1 uL (최종 농도: 500 nM), PCR 등급수 (PCR-grade water) 4, uL 및 주형 DNA 2 uL.

[0082] SYBR Green I chemistry를 기반으로 하는 *Trichococcus* 검출을 위하여, Thunderbird SYBR qPCR mix (Toyobo)를 사용하여 반응 혼합물을 준비하였다: 프리믹스 10 uL, 각 프라이머 1 uL (최종 농도: 500 nM), PCR 등급수 7 uL, 및 주형 DNA 1 uL.

[0083] 두 타겟 서열을 2단계 열처리 과정에서 증폭시켰다: 95에서 10분 동안 전변성(pre-denaturation) 후, 95에서 15초 및 60에서 1분 처리를 40cycles 수행.

[0084] 증폭 사이클 후에 용융곡선 분석 (0.05 /s의 경사도로 60에서 95까지 승온)에 의하여 모든 *Trichococcus* runs의 증폭 특이성 (amplification specificity)을 체크하였다.

[0085] *Methanosaeta*용 정량 표준 곡선 (quantitative standard curve)은 표준 주형 (standard template)으로서 표준 플라스미드 (standard plasmids)의 등분자 혼합물 (equimolar mixture)을 사용하여 생성하였다 (Kim J, Lee S, Lee C (2013), Comparative study of changes in reaction profile and microbial community structure in two anaerobic repeated-batch reactors started up with different seed sludges. Bioresour technol 129:495-505 참조). 상기 표준 주형의 10-배 연속 희석물 (10^2-10^8 copies/ uL)을 준비하고 상기 Mst 프라이머

세트를 사용하는 real-time PCR에 의하여 분석하였다. 상기 표준 희석물들로부터 결정된 교차점 (crossing point; CP) 수치들을 이들의 대응되는 주형의 초기 카피 농도의 logarithm에 대하여 플로팅하였다. 미지의 샘플 내의 표적 서열 농도는 상기 얻어진 플롯의 선형 회귀 분석선 (linear regression line)에 대하여 정량화하였다.

[0086] *Trichococcus* 표준 곡선은 앞서 설명한 *Methanosaeta*용 정량 표준 곡선 준비에서와 동일한 표준 플라스미드를 표준 주형으로 사용하여 상기와 동일한 방법으로 준비하였다. 표준 플라스미드는 R3 반응기로부터 12일째에 얻은 샘플로부터 Trich-프라이머 세트를 사용하여 PCR 증폭된 표적 서열을 GEM-T Easy vector (Promega, Madison, WI, USA)에 클로닝하여 구축하였다.

[0087] 상기 두 개의 표준 곡선 (*Methanosaeta* 표준 곡선 및 *Trichococcus* 표준 곡선)에서 모두 광범위한 dynamic range (r^2>0.999; over six or more log units)가 관찰되었다: Mst 프라이머 세트의 경우 $8.6x10^1$ ~ $8.6x10^7$ copies/uL 및 Trich 프라이머 세트의 경우 $8.7x10^1$ ~ $8.7x10^8$ copies/uL.

[0088] 각각의 DNA 샘플은 2회 분석하고, 얻어진 real-time PCR 데이터를 Quantstudio 12K Flex Software ver. 1.2 (Life Technologies)을 사용하여 처리하였다.

[0089] **참고예 6: 분석 방법**

[0090] 화학적 산소 요구량 (COD)은 HS-COD-MR kit (HUMAS, Daejeon, Korea)를 사용하여 분광광도분석법 (spectrophotometric analysis)으로 측정하였다. Solids는 "Standard method for the examination of water and wastewater (APHA-AWWA-WEF. 2005)"에 제시된 프로토콜에 따라서 측정하였다. 휘발성 지방산 (Volatile fatty acids; VFAs; C_2-C_7)은 불꽃 이온화 검출기 (flame ionization detector)가 장착된 가스 크로마토그래프 (7820A, Agilent, Palo Alto, CA, USA) 및 Innowax column (Agilent)를 사용하여 측정하였다. 열전도도 검출기 (thermal conductivity detector)가 장착된 가스 크로마토그래프 (7820A, Agilent, Palo Alto, CA, USA)와 ShinCarbon ST column (Restek, Bellefonte, PA)을 사용하여 바이오가스 (수소 및 메탄) 조성을 분석하였다. 가용성 COD 및 VFA 분석은 멤브레인 필터 (pore size: 0.45um)를 통하여 여과시킨 샘플을 사용하여 수행하였다. 모든 분석은 적어도 2회 이상 수행하였다. 바이오가스 부피는 수분 대체법 (water displacement)으로 측정하고, 표준 온도 및 압력 (STP; 0 및 1atm)으로 변환시켰다.

[0091] **실시예 1: 각 반응기 별 혐기적 소화 효율 시험**

[0092] 참고예 1에서 준비된 3개의 반응기 (R1, R2 및 R3)에 대하여 30일 간의 회분식 운전 (batch operation) 동안의 다양한 반응 양상을 시험하였다.

[0093] 참고예 6에 기재된 방법으로 각 반응기의 화학적 산소 요구량 (COD)과 바이오가스를 측정하여 그 결과를 도 1 (가용성 COD removal) 및 도 2 (바이오가스 생산)에 각각 나타내었다. 도 1은 각 반응기에서의 30일 간의 batch operation 동안의 가용성 CDO 제거율을 잔존 가용성 COD 농도로 보여주는 그래프이고, 도 2는 각 반응기에서의 30일 간의 batch operation 동안의 바이오가스 (수소 및 메탄)의 생산량 (축적량으로 표시)을 보여주는 그래프이다. 도 1 및 도 2에 나타난 바와 같이, 모든 반응기에서 잔존 가용성 COD (residual-soluble COD; sCOD) 농도는 초기 2일 인큐베이션 동안 수소 생성 즉시 급격하게 감소한 후 12일째까지 약 3.7 g/L의 일정한 수준을 유지하였으나, 그 후 각 반응기별로 상이한 가용성 COD 제거율을 나타내어 30일째에는 R3는 82.5%, R2는 59.3% 및 R3는 31.9%의 sCOD 제거 효율을 각각 나타내었다. 이와 상응하여, 동기간 동안의 메탄의 생성량 (축적농도) 역시 R3 반응기에서 가장 높고, R2 반응기에서도 비교적 높으며, R1 반응기에서 가장 낮게 나타났다 (R3: 2529 mL), R2: 1730 mL, R1: 577 mL).

[0094] 이와 같은 유기물 제거율 차이는 휘발성 지방산 (VFA) 양상과 관련성을 나타내었다. 이를 확인하기 위하여, 참고예 6에 기재된 방법으로 각 반응기의 총 VFA (tVFA) 농도 및 각 지방산 (아세테이트, 프로피오네이트, 부티레이트)를 측정하여 도 3에 나타내었다. 도 3은 총 VFA 농도 및 각 지방산 (아세테이트, 프로피오네이트, 부티레이트) 농도를 COD equivalent로 나타낸 그래프로서, A는 R1 반응기의 결과, B는 R2 반응기의 결과, C는 R3 반응기의 결과를 각각 나타낸다. 도 3에 나타난 바와 같이, 모든 반응기에서 초기 며칠 (약 5일) 동안 총 VFA 수준이 약 4 g COD/L까지 축적되었으며, 가용성 COD 결과에서와 유사하게, 30일째에 반응기에 잔존하는 총 VFA 수준은 R3 반응기에서 가장 낮고 R2 반응기에서도 비교적 낮으며, R1 반응기에서 가장 낮게 나타났다 (R3: 0.8 g COD/L, R2: 1.8 g COD/L, R1: 3.7 g COD/L). 총 VFA 수준이 낮다는 것은 총 VFA의 소비량이 많다는 것을 의미하므로, 상기 결과는 R3와 R2 반응기에서의 총 VFA 소비량이 많음을 보여준다. 이러한 결과는 각각의 지방산

(아세테이트, 프로피오네이트 및 부티레이트)에서도 유사하게 나타났다.

[0095] 총 VFA를 구성하는 각 지방산 조성을 알아보기 위하여, 9일째의 각 반응기 내의 총 VFA 중의 아세테이트, 프로피오네이트 및 부티레이트의 축적 농도를 측정하여 도 4에 나타내었다. 도 4에 기재된 "%"는 "%(w/v)"를 나타낸다. 도 4에 나타난 바와 같이, 아세테이트, 프로피오네이트 및 부티레이트와 같은 지방산이 주요한 산생성물(acidogenic products)인 것을 알 수 있다.

[0096] 상기 도 1 내지 4에 나타난 결과들은 철 산화물 (ferric oxides)이 첨가된 반응기 R2 및 R3에서의 유기물 제거율 및 메탄 생성률이 철 산화물이 첨가되지 않은 반응기 R1과 비교하여 현저하게 증가하고, 모든 반응기에서 아세테이트, 프로피오네이트 및 부티레이트와 같은 지방산이 주요한 산생성물임을 보여준다. 도 3에 나타난 30일째의 각 지방산 분해 양상을 보면, R3 반응기에서는 아세테이트와 부티레이트가 모두 완전하게 분해되었고(도 3의 C 참조), R2 반응기에서는 부티레이트가 완전하게 분해되었지만 다른 지방산의 분해가 다소 지연되었으며(도 3의 B 참조), R1 반응기에서는 3가지 지방산이 모두 완전히 분해되지 않고 분해가 지연되었다 (도 3의 A 참조).

[0097] 1몰의 부티레이트는 2몰의 아세테이트로 영양공생학적(syntrophical)으로 분해되며, 추가적으로, 메탄생성(methanogenesis)을 통하여 메탄(CH_4)과 이산화탄소(CO_2)로 변환된다. 아세테이트 소비의 지연 (특히 R1 반응기)은 아세트산으로부터의 메탄 생산 활성 (aceticlastic methanogenic activity)이 상기 반응기 시스템 내의 방출된 아세테이트를 효율적으로 처리하기에 충분하지 않음을 나타낸다. 반면, R2 및 R3 반응기에서의 신속하고 보다 효율적인 아세테이트의 안정화는 철 산화물 (R2: FeOOH; R3: Fe_3O_4)이 aceticlastic methanogenesis에 긍정적 영향을 미친다는 것을 반영한다.

[0098] 도 2에 나타난 바와 같이, 메탄 축적 생성량 양상과는 상반되게, 수소 축적 생성량이 R1 반응기에서 R2 및 R3 반응기 보다 높게 나타났으며 (R1: 1068 mL, R2: 835 mL, R3: 661 mL), 이러한 결과는 도 4의 9일째 VFA 조성 결과와 함께, 철 산화물 첨가에 따른 영향에 의하여 각 반응기에서의 산생성 발효 경로 (acidogenic fermentation pathways)가 다양함을 보여준다. 도 3 및 도 4는 철 산화물이 첨가된 반응기 (R2 및 R3)와 철 산화물이 첨가되지 않은 대조군 반응기 (R1) 간의 산 생성 양상이 상이함을 보여준다. 예컨대, 도 4에 나타난 바와 같이, 아세테이트의 경우, 모든 반응기에서 VFA들 중에서 가장 많은 비율을 차지하지만, 9일째의 전체 VFA에 대한 아세트산의 구체적인 비율은 각 반응기별로 상당히 다르게 나타났다: R1에서는 37.7%(w/v), R2에서는 50.3%(w/v), R3에서는 55.1%(w/v).

[0099] 또한, 각 반응기는 다음과 같은 다양한 프로피오네이트/아세테이트 비율 및 부티레이트/아세테이트 비율을 나타내었다:

[0100] 프로피오네이트/아세테이트 비율: 0.53 in R1, 0.19 in R2, 및 0.23 in R3; 부티레이트/아세테이트 비율: 0.91 in R1, 0.64 in R2, 및 0.45 in R3.

[0101] 상기 결과와 도 2의 결과를 종합하면, 부티르산 형태 (butyric-type)의 발효물이 생물학적 수소 (biohydrogen) 생성에 유리하므로, 부티레이트/아세테이트 비율이 높을수록 수소 생성률에 유리한 효과를 나타냄을 알 수 있다. 이러한 부티레이트/아세테이트 비율 변화는 반응기 내의 미생물 군집의 대사적 특성을 변화시킬 수 있다. R2 및 R3 반응기에서 철 산화물의 첨가에 의하여 아세트산 형태 발효물 방향으로의 대사 이동이 유도될 것으로 예측된다. 철 산화물 첨가된 반응기에서의 낮은 수소 생성은 철 환원시 수소가 전자 공여자로서 소비된 것이 부분적인 원인이 될 것으로 여겨진다.

[0102] **실시예 2: 바이오가스로서의 에너지 회수 시험**

[0103] 도 2에서 확인되는 바와 같이, 모든 반응기에서 2일째에 수소 생성이 종료되었으며, 상기 수소 생성 종료 시점 이전부터 모든 반응기에서의 바이오가스는 대부분 수소로 구성되었고 (2일 전후의 바이오가스 내 수소 비율 ≥ 90%(v/v)), 그 이후에 메탄 함량이 각 반응기별로 상이한 지연 기간을 두고 증가하였다. 30일째의 메탄 축적 생성량은 R3, R2, 및 R1 반응기 순서였으며, 이러한 결과는 철 산화물이 첨가된 반응기에서의 산 생성 동안의 비교적 장쇄 휘발성 지방산 (longer-chain VFA)의 낮은 발효 효율과 높은 아세테이트 생성률에 기인한다 (도 3 및 4 참조). 아세테이트가 다른 장쇄 휘발성 지방산 (VFA)과 비교하여 메탄생성 과정에 있어서 유리한 기질이므로, 높은 아세테이트/다른 VFA 비율에 의하여 높은 메탄 생성률이 나타날 수 있다. 메탄 생성(methanogenesis) 양상을 상기 실시예 1에서 각각의 반응기로부터 얻어진 축적 메탄 생성 데이터를 다음의 변형된 Gompertz 방정식 (식 1)에 대입하여 측정하였다 ("Lay J-J, Li Y-Y, Noike T (1998), Developments of

bacterial population and methanogenic activity in a laboratory-scale landfill bioreactor, Water Res 32:3673-3679" 참조).

[0104]
$$M(t) = P \cdot \exp\left[-\exp\left\{\frac{R_m \cdot e}{P}(\lambda - t) + 1\right\}\right] \quad \text{(식 1)}$$

[0105] 상기 식 1에서, M(t)은 시간 t에서의 메탄의 축적 생산량 (mL)이고, P는 메탄 생성 포텐셜 (mL), Rm은 1일 최대 메탄 생성량 (mL/d), λ은 지연위상 길이(lag phase length; day), t는 인큐베이션 시간 (day)을 각각 나타낸다.

[0106] 도 2의 각 반응기에서 얻어진 결과를 상기 변형된 식 1에 대입하여 얻어진 결과를 아래의 표 4에 나타내었다:

표 4

[0107]

Parameter	Unit	R1	R2	R3
Maximum methane potential (*P*)	mL	1139.3	2490.4	3944.6
Methane production rate (*Rm*)	mL/d	55.3	150.6	167.7
Lag phase (λ)	Day	19.5	17.8	14.1

[0108] 상기 표 4에서와 같이, 예측된 P와 Rm 값은 R2 (>2-fold)와 R3 (>3-fold)에서 R1보다 현저히 높았으며, 지연 시간은 R2 및 R3에서 R1보다 짧게 예측되었다.

[0109] 이러한 결과는, 앞선 실시예 1에서 보여진 결과에 부합하여, 철 산화물 첨가에 의하여 메탄생성 속도 및 수율 측면에서 모두 유리한 효과가 나타남을 보여준다. 시험 기간 동안의 수소와 메탄이 총합으로서의 총 에너지 생산량 (STP 조건 하에서 net heating value 기준으로 계산)은 각각 32.2kJ (R1), 71.0kJ(R2), 및 97.7kJ(R3)이었다. 이러한 결과는 철 산화물 첨가된 반응기에서의 높은 메탄 생산량과 수소 (10.8 kJ/L)보다 높은 메탄의 발열량(35.8 kJ/L)에 기인한다.

[0110] 각 반응기의 바이오가스로서의 COD 회수율을 제거되는 기질 COD에 대한 생성된 수소 및 메탄의 COD 등가량 (equivalent)의 총 합의 차이를 계산하여 시험하였다. COD 회수율은 R2 및 R3 반응기 모두에서 거의 100%에 가깝게 얻어졌으며, R1 반응기에서는 이보다 낮은 79%로 얻어졌다. 이러한 결과는 수소와 메탄의 생성량이 R2 및 R3 반응기 내의 절대적으로 우세한 electron sink로서 역할을 하는 반면, R1 반응기에서는 substantial fraction이 다른 대사 역할을 함을 보여준다.

[0111] **실시예 3: DGGE 분석 및 계통발생학적 분류**

[0112] DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis) 및 추가적 계통발생학적 분석을 수행하여 시험된 반응기 내의 고세균 및 박테리아 군집 구조의 특징을 분석하였다.

[0113] 상기 참고예 1에서 준비된 각 반응기에서 1일, 12일 및 30일째에 얻어진 샘플과 식종 슬러지에 대하여 30일 operation 동안의 군집 구조 변화를 모니터링하였다. 참고예 2 및 참고예 3에 기재된 방법에 따라서 각 샘플에서 얻어진 16s rRNA 유전자의 DGGE 결과를 도 5에 나타내었다. 도 5에서 A는 고세균 (archaea) 16s rRNA 유전자에 대한 결과이고 B는 박테리아 (bacteria) 16s rRNA 유전자에 대한 결과를 보여준다.

[0114] DGGE 겔로부터 2개의 고세균 (WA1 및 WA2)과 12개의 박테리아 (WB1 내지 WB12) 밴드를 추출하고 서열분석하여 계통발생학적으로 분류하였다 (GenBank database: KP241962 내지 KP241975).

[0115] 상기 얻어진 서열 분석 결과를 표 5에 나타내었다:

표 5

[0116] 유장을 철 산화물 첨가 처리한 혐기적 회분식 반응기에서 분리된 16S rRNA 서열 정보

Accession No.	설명	서열	서열번호
KP241962.1	Uncultured bacterium clone WB1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (443 bases).	actcctacgg gaggcagcag tggggaatat tgcacaatgg gggaaaccct gatgcagcaa cgccgcgtga gtgatgaagg ccttcgggtt gtaaagctct gtccttgggg acgataatga cggtacccaa ggaggaagcc acggctaact acgtgccagc agccgcggta atacgtaggt ggcaagcgtt gtccggattt actgggcgta aagggagcgt aggtggatat ttaagtggga tgtgaaatac tcgggcttaa cctgggtgct gcattccaaa ctggatatct agagtgcagg agaggaaagt agaattccta gtgtagcggt gaaatgcgta gagattagga agaataccag tggcgaaggc gactttctgg actgtaactg acactgaggc tcgaaagcgt ggggagcaaa caggattaga taccctggta gtc	11
KP241963.1	Uncultured bacterium clone WB2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (443 bases)	actcctacgg gaggcagcag tggggaatat tgcgcaatgg gggaaaccct gatgcagcaa cgccgcgtga gtgatgacgg tcttcggatt gtaaagctct gtcttcaggg acgataatga cggtacctga ggaggaagcc acggctaact acgtgccagc agccgcggta atacgtaggt ggcgagcgtt gtccggattt actgggcgta aagggagcgt aggcggattt ttaagtgaga tgtgaaatac ccgggctcaa cttgggtgct gcatttcaaa ctggaagtct agagtgcagg agaggagagt ggaattccta gtgtagcggt gaaatacgta gagattagga agaacaccag tggcgaaggc gactctctgg actgtaactg acgctgaggc tcgaaagcgt ggggagcaaa caggattaga taccctggta gtc	12
KP241964.1	Uncultured bacterium clone WB3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (463 bases)	actcctacgg gaggcagcag tgaggaatat tggtcaatgg gcgagagcct gaaccagcca agtcgcgtga aggaagaagg atctatggtt cgtaaacttc ttttgcaggg gaataaagtg cgggacgtgt cctgttttgt atgtaccctg agaataagga tcggctaact ccgtgccagc agccgcggta atacggagga tccgagcgtt atccggattt attgggttta aagggtgcgt aggtggtttt ataagtcagc ggtgaaagtt tgcagcttaa ctgtaaaaat gccgttgaaa ctgtaagact tgagtgtaaa tgaggtaggc ggaatgcgtg gtgtagcggt gaaatgcata gatatcacgc agaactccga ttgcgaaggc agcttactaa gctacaactg acactgaagc acgaaagcgt ggggatcaaa caggattaga taccctggta gtc	13
KP241965.1	Uncultured bacterium clone WB4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (443 bases)	actcctacgg gaggcagcag tggggaatat tgcacaatgg gggaaaccct gatgcagcaa cgccgcgtga gtgatgacgg tcttcggatt gtaaagctct gtcttcaggg acgataatga cggtacctga ggaggaagcc acggctaact acgtgccagc agccgcggta atacgtaggt ggcaagcgtt gtccggattt actgggcgta aagggagcgt aggtggatat ttaagtggga tgtgaaatac tcgggcttaa cctgagtgct gcattccaaa ctggatatct agagtgcagg agaggaaagt agaattccta gtgtagcggt gaaatgcgta gagattagga agaataccag tggcgaaggc gactttctgg actgtaactg acactgaggc tcgaaagcgt ggggagcaaa caggattaga taccctggta gtc	14
KP241966.1	Uncultured bacterium clone WB5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (445 bases)	actcctacgg gaggcagcag tggggaatat tgcgcaatgg gggaaaccct gacgcagcaa cgccgcgtga atgatgaagg tcttcggatc gtaaagttct atcagcaggg atgaattttt gacagtacct gactaagaag ccccggctaa ctacgtgcca gcagccgcgg taatacgtag ggggcaagcg ttatccggat ttactgggtg taaagggtgc gtagccggaa aagtaagtca gatgtgaaag cccgaagctc aacttcggga ctgcatttga aactactttt ctagagtgta ggagaggaaa gtggaattcc tagtgtagcg gtgaaatgcg tagagattag gaggaacacc agtggcgaag gcgactttct ggactataac tgacggtgag gcacgaaagc gtggggagca aacaggatta gataccctgg tagtc	15

KP241967.1	Uncultured bacterium clone WB6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (469 bases)	actcctacgg gaggcagcag tggggaatat tggacaatgg ggggaaccct gatccagcca tgccgcgtgt gtgaagaagg cctttttggtt gtaaagcact ttaagcgagg aggaggctct cttggttaat acctaagaag agtggacgtt actcgcagaa taagcaccgg ctaactctgt gccagcagcc gcggtaatac agagggtgcg agcgttaatc ggatttactg ggcgtaaagc gcgcgtaggt ggctaattaa gtcaaatgtg aaatccccga gcttaacttg ggaattgcat ttgatactgg ttggctagag tatgggagag gatggtagaa ttccaggtgt agcggtgaaa tgcgtagaga tctggaggaa taccgatggc gaaggcagcc atctggccta atactgacac tgaggtgcgt aagcatgggg agcaaacagg attagatacc ctggtagtc	16
KP241968.1	Uncultured bacterium clone WB7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (468 bases)	actcctacgg gaggcagcag tggggaatat tggacaatgg ggggaaccct gatccagcca tgccgcgtgt gtgaagaagg cctttttggtt gtaaagcact ttaagcgagg aggaggctct cttggttaat acctaagaag agtggacgtt actcgcagaa taagcaccgg ctaactctgt gccagcagcc gcggtaatac agagggtgcg agcgttaatc ggatttactg ggcgtaaagc gcgcgtaggt ggctaattaa gtcaaatgtg aaatccccga gcttaacttg ggaattgcat tcgatactgg ttggctagag tatgggagag gatggtagaa ttccaggtgt agcggtgaaa tgcgtagaga tctggaggaa taccgatggc gaaggcagcc atctggccta atactgacac tgaggtgcga aagcatgggg agcaaacagg attagatacc ctggtagt	17
KP241969.1	Uncultured bacterium clone WB8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (443 bases)	actcctacgg gaggcagcag tggggaatat tgcacaatgg gggaaaccct gatgcagcaa cgccgcgtga gtgatgacgg ccttcgggtt gtaaagctct gtcttcaggg acgataatga cggtacctga ggaggaagcc acggctaact acgtgccagc agccgcggta atacgtaggt ggcaagcgtt gtccggattt actgggcgta aagggagcgt aggcggactt ttaagtgaga tgtgaaatac ccgggcttaa cctgggtgct gcatttcaaa ctggaagtct agagtgcagg agaggagaat ggaattccta gtgtagcggt gaaatgcgta gagattagga agaacaccag tggcgaaggc gattctctgg actgtaactg acgctgaggc tcgaaagcgt ggggagcaaa caggattaga taccctggta gtc	18
KP241970.1	Uncultured bacterium clone WB9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (468 bases)	actcctacgg gaggcagcag tggggaatat tggacaatgg ggggaaccct gatccagcca tgccgcgtgt gtgaagaagg cctttttggtt gtaaagcact ttaagtgggg aggaggctta cctggttaat acctaggata agtggacgtt acccacagaa taagcaccgg ctaactctgt gccagcagcc gcggtaatac agagggtgcg agcgttaatc ggatttactg ggcgtaaagc gcgcgtaggt ggttaattaa gtcaaatgtg aaatccccga gcttaacttg ggaattgcat tcgatactgg ttagctagag tatgggagag gatggtagaa ttccaggtgt agcggtgaaa tgcgtagaga tctggaggaa taccgatggc gaaggcagcc atctggccta atactgacac tgaggtgcga aagcatgggg agcaaacagg attagatacc ctggtagt	19
KP241971.1	Uncultured bacterium clone WB10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (443 bases)	actcctacgg gaggcagcag tggggaatat tgcacaatgg gggaaaccct gatgcagcaa cgccgcgtga gtgatgaagg ttttcggatc gtaaagctct gtcttcaggg acgataatga cggtacctga ggaggaagcc acggctaact acgtgccagc agccgcggta atacgtaggt ggcgagcgtt gtccggattt actgggcgta aagggagcgt aggcggattt ttaagtgaga tgtgaaatac ccgggctcaa cttgggtgct gcatttcaaa ctggaagtct agagtgcagg agaggagagt ggaattccta gtgtagcggt gaaatgcgta gagattagga agaacaccag tggcgaaggc gactctctgg actgtaactg acgctgaggc tcgaaagcgt ggggagcaaa caggattaga taccctggta gtc	20
KP241972.1	Uncultured bacterium clone WB11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (443 bases)	actcctacgg gaggcagcag tggggaatat tgcacaatgg gggaaaccct gatgcagcaa cgccgcgtga gtgatgaagg ccttcgggtt gtaaagctct gtctttgggg acgataatga cggtacccaa ggaggaagcc acggctaact acgtgccagc agccgcggta atacgtaggt ggcaagcgtt gtccggattt actgggcgta aaggatgcgt aggcggattt ttaagtggga tgtgaaattc cgaggctcaa cctcggcgct gcattccaaa ctggaagtct agagtgcggg agaggaaagt ggaattccta gtgtagcggt gaaatgcgta gagattagga agaacaccag tggcgaaggc gactttctgg accgtaactg acgctgatgc atgaaagcgt ggggagcaaa caggattaga taccctggta gtc	21

KP241973.1	Uncultured bacterium clone WB12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (468 bases)	actcctacgg gaggcagcag tagggaatct tccgcaatgg acgaaagtct gacggagcaa cgccgcgtga gtgaagaagg ttttcggatc gtaaaactct gttgtcagag aagaacaagt tggagagtaa ctgctccagc cttgacggta tctgaccaga aagccacggc taactacgtg ccagcagccg cggtaatacg taggtggcaa gcgttgtccg gatttattgg gcgtaaagcg agcgcaggcg gttccttaag tctgatgtga aagcccacgg ctcaaccgtg gaaggtcatt ggaaactggg gaacttgagt gcagaagagg agagtggaat tccatgtgta gcggtgaaat gcgtagatat atggaggaac accagtggcg aaggcgactc tctggtctgt aactgacgct gaggctcgaa agcgtgggga gcaaacagga ttagataccc tggtagtc	22
KP241974.1	Uncultured bacterium clone WA1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (271 bases)	attagatacc cgggtagtcc tagccgtaaa cgatactcgc taggtgtcgg ccacggtgcg accgttgtcg gtgccgtagg gaagccgtga agcgagccac ctgggaagta cggccgcaag gctgaaactt aaaggaattg gcgggggagc accacaacgg gtggagcttg cggtttaatt ggattcaacg ccggaaatct taccgggacc gacagcaata tgaaggccag gctgaagact ttgccggatt agctgagagg tggtgcatgg c	23
KP241975.1	Uncultured bacterium clone WA2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (271 bases)	attagatacc cgggtagtcc tagccgtaaa cgatactcgc taggtgtcgg ccacggtgcg accgttgtcg gtgccgtagg gaagccgtga agcgagccac ctgggaagta cggccgcaag gctgaaactt aaaggaattg gcgggggagc accacaacgg gtggagcttg cggtttaatt ggattcaacg ccggaaatct taccgggacc gacagcaata tgaaggccag gctgaagact ttgccggatt agctgagagg aggtgcatgg c	24

[0117] 또한, 상기 얻어진 계통발생학적 분류 결과를 표 6에 나타내었다:

표 6

[0118]

Band	Closest relative	Accession number	Similarity (%)	Classification[a]
Archaea				
WA1	*Methanosaeta concilii*	NR102903	100	Genus *Methanosaeta*
WA2	*M. concilii*	NR102903	99.6	Genus *Methanosaeta*
Bacteria				
WB1	*Clostridium butyricum*	KF611983	99.1	Genus *Clostridium*
	Clostridium saccharobutylicum	GU060306	98.6	
WB2	*Clostridium sartagoforme*	KF611989	99.1	Genus *Clostridium*
	Clostridium tertium	JX267105	98.9	
WB3	*Parabacteroides chartae*	NR109439	99.1	Genus *Parabacteroides*
	Macellibacteroides fermentans	HQ020488	99.1	
WB4	*Clostridium beijerinckii*	KF746386	99.8	Genus *Clostridium*
	C. saccharobutylicum	CP006721	99.8	
	C. butyricum	AB647330	99.8	
WB5	*Bacterium enrichment culture clone HY35*	JX473590	98.4	Order *Clostridiales*
	Uncultured bacterium clone FB1_6A	JX296075	97.0	
WB6	*Acinetobacter junii*	JF915345	99.4	Genus *Acinetobacter*
	Acinetobacter seohaensis	DQ518593	98.7	
WB7	*A. junii*	JF915345	99.8	Genus *Acinetobacter*
	A. seohaensis	DQ518593	99.1	
WB8	*Clostridium quinii*	NR026149	99.3	Genus *Clostridium*
	Clostridium cellulovorans	KF528156	98.9	
WB9	*A. seohaensis*	NR115299	99.8	Genus *Acinetobacter*

	Acinetobacter sp. SAL_13	FJ482069	99.6	
WB10	*Clostridium chauvoei*	KF372578	100	Genus *Clostridium*
	Clostridium sp. T28_4	JQ739656	100	
	C. tertium	JX267105	100	
WB11	*Uncultured bacterium clone GAH72_115*	JQ640370	100	Genus *Clostridium*
	Uncultured microorganism clone YLB20	KC841524	100	
WB12	*Trichococcus pasteurii*	KF387711	100	Genus *Trichococcus*
	Trichococcus flocculiformis	NR042060	100	
	Trichococcus collinsii	EF111215	100	

[0119] ([a]: The lowest rank assigned by RDP (Ribosomal Database Project) classifier at an 80 % confidence threshold)

[0120] 표 6에 나타난 바와 같이, 얻어진 고세균 (archaeal) 및 박테리아 (bacterial) rRNA 서열들은 모두 공지의 메탄생성 species 중 가장 가까운 species와 97% 이상의 서열 상동성을 나타내었다. WA1 및 WA2는 모두 *Methanosaeta concilii*와 서열 상동성이 높은 것으로 나타났고 모든 레인에서 우세 메탄 생성 밴드로서 검출되었으며, 이는 모든 반응기에서의 메탄생성에 있어서 aceticlastic pathway가 주요 경로임을 의미한다. 이들 밴드는 R2 및 R3 반응기로부터 얻어진 30일째 샘플에서 현저하게 높은 밴드 강도를 나타내었다. 이러한 결과는 *Methanosaeta* species들이 혐기적 소화 시스템에서 낮은 잔존 VFA 수준으로 우세한 메탄생성 미생물 (methanogen) 군집임을 보여준다.

[0121] 12개의 박테리아 서열 중 10개의 서열이 3개의 phyla, 즉 *Firmicutes* (WB1, WB2, WB4, WB8, WB10, 및 WB12), *Proteobacteria* (WB6 및 WB9), 및 *Bacteroidetes* (WB3)에 속하는 것으로 분류되었다. 6개의 *Firmicutes* 서열 (WB1, WB2, WB4, WB8, WB10, 및 WB11)은 혐기적 발효 과정에서 많이 관찰되는 혐기성 genus *Clostridium*로 분류되었다. *Clostridium* species는 다양한 대사 활성을 가지며 광범위한 유기물 기질을 사용하여 상이한 유기산과 수소를 생성할 수 있다. 본 시험에서 *Clostridium*-관련 밴드가 모든 반응기에서 수소 생성을 수반하는 산생성(acidogenesis)이 일어나는 초기에 관찰되었다. *Clostridium* 서열 대부분은 saccharolytic species로 분류되고, 반응기 내 Clostridium 박테리아 개체군(population)은 초기 operation period 동안 탄수화물 (주로 락토오스)의 빠른 발효에 역할을 하는 것으로 여겨진다.

[0122] WB3는 *Macellibacteroides fermentans* 및 *Parabacteroides chartae*와 99.1%의 높은 서열 상동성을 나타냈다. 상기 두 species는 모두 락토오스를 포함하는 탄수화물을 발효시켜서 유기산으로 변환시킨다. 16S rRNA 유전자 서열 정보를 기초로 한 *M. fermentans*와 *P. chartae* 간 구별은 이들 두 species의 높은 서열 상동성 때문에 쉽지 않다. WB3는 RDP (http://rdp.cme.msu.edu/) 분류 기준에 의하여 80%의 confidence threshold로 분류한 결과 genus *Parabacteroides*로 분류되었다.

[0123] WB6, WB7, 및 WB9는 모두 혐기성 박테리아인 *Acinetobacter*속으로 분류되었다. 반응기 내 *Acinetobacter*-관련 박테리아 개체군은 혐기적 소화 작용에 기능적 역할을 하는 것으로 여겨진다. WB12는 발효성 *Trichococcus*속으로 분류되었으며, 상기 박테리아는 다양한 당과 폴리사카라이드를 사용하여 대사하는 것으로 알려져 있다. *Trichococcus pasteurii*은 anoxic/anaerobic 조건 하에서 금속-환원능을 갖는다. *T. pasteurii*는 trench slurry에서의 microbial U(VI) 및 Fe(III) 환원 및 미생물 연료 전지에서의 microbial Cr(VI) 환원에서 성장률이 높아진다. 따라서, R2 및 R3 반응기에서의 WB12의 우세한 존재는 대응 Trichococcus-관련 박테리아 개체군이 전기활성이고 철 산화물의 기능에 직접적으로 수반됨을 의미한다고 할 수 있다. WB5는 order *Clostridiales*로 분류되었으며, 이 밴드에 해당하는 관련 박테리아 개체군이 유기물 기질의 발효에 관여함을 나타낸다.

[0124] **실시예 4: 미생물 군집 구조 (Microbial community structure)**

[0125] 도 5에서와 같이, *Methanosaeta*-관련 밴드 (WA1 및 WA2)의 강도가 시간 및 반응기 종류 (철 산화물 종류 및 처리 여부)에 따라서 달라지지만, 참고예 4의 방법으로 측정된 고세균 (Archaeal) 밴드 패턴에서는 큰 차이가 없었다 (Sorensen distance (DS) < 0.15). 반면, bacterial DGGE 패턴은 시간과 반응기 종류에 따라서 뚜렷한 차이를 보였다 (DS < 0.55). 이러한 결과는 군집 구조 내에서, 고세균 (즉, methanogens)보다 박테리아 (즉,

acidogens)에 대하여 보다 큰 차이를 보임과 박테리아 군집 구조 내의 차이가 반응기 내이 메탄생성 미생물 군집 구조의 진화에 대하여 거의 영향이 없음을 의미한다. 이러한 특징은 혐기적 소화 환경에서의 메탄생성 미생물의 산생성 미생물보다 낮은 다양성 및 동역학적 특성 때문이며, 이는 주로 메탄생성 미생물의 제한된 기질 스펙트럼에 기인한다.

[0126] 참고예 4에 기재된 클러스터 계통수 (cluster dendrogram) 구축 방법에 의하여 얻어진 클러스터 계통수를 도 6에 나타내었다. 도 6은 분석된 박테리아 군집 구조들 간의 관련성을 보여준다. 도 6에서 각 데이터 포인트는 반응기 이름과 샘플 채취 시점 (일)으로 표시하였다.

[0127] 도 6에서 나타난 바와 같이, R2 및 R3 반응기의 박테리아 군집 구조는 R1 반응기의 박테리아 군집 구조와 계통수 상에서 떨어져서 위치하였으며, 이러한 결과는 도 3 및 4에 나타난 산 생성 양상과 부합하며, 반응기 내 미생물 군집의 대사 경로가 첨가된 철 산화물 (R2: FeOOH, R3: Fe_3O_4)의 영향에 의하여 변화됨을 뒷받침한다.

[0128] 각 반응기에서의 박테리아 군집 구조의 시간 변화에 따른 방향 및 규모를 비-계량 다차원척도법 (NMS) 분석에 의하여 가시화시켰다. NMS는 참고예 4에 기재된 방법에 의하여 수행하였다. 이에 의하여 얻어진 NMS plot을 도 7에 나타내었다. 도 7은 시험 기간 동안 분석된 박테리아 군집 구조들 간의 관련성을 보여준다. 도 7에서, 각 데이터 포인트는 반응기 이름과 샘플 채취 시점 (일)으로 표시하였으며, 화살표는 각 반응기에서의 시간대별 군집 구조 이동을 보여준다. 처음 2개의 좌표 축은 분석된 군집 구조 데이터의 총 편차 71.0 % (r^2 = 0.710) 및 18.1 % (r^2 = 0.181)를 각각 나타내며, 따라서, 데이터의 89.1 % (cumulative r2 = 0.891)의 variability는 2차원 플롯에 의하여 설명될 수 있다.

[0129] 도 6 및 7에서와 같이, 상기 클러스터 분석에서와 같이, 3개의 반응기의 군집 양상은 처음에는 가까운 거리에 클러스터링되지만 반응이 진행되면서 관련성이 점점 멀어진다. 식종 박테리아 군집 구조 (seed bacterial community structure)는 NMS 플롯에서 우측 하단에 위치하며, 모든 반응기에서 시간이 지남에 따라서 좌측 상단 방향으로 이동하였다. 대조군 반응기 (R1) 및 철 산화물 처리 반응기 (R2 및 R3) 내의 박테리아 군집들은 12일 이후에 뚜렷하게 다른 방향으로 진화하고, 회분식 테스트 결과로 대조군 반응기의 군집 양상은 R2 및 R3의 군집 양상으로부터 떨어져서 위치한다.

[0130] **실시예 5: 미생물 정량**

[0131] 참고예 5에 기재된 Real-time PCR 분석에 의하여 각 반응기의 *Methanosaeta* 및 *Trichococcus* 미생물을 정량하였다. 상기 얻어진 정량 결과를 도 8에 나타내었다. 도 8은 Real-time PCR에 의하여 결정된 *Methanosaeta* 및 *Trichococcus*의 16S rRNA 유전자 농도를 보여준다. 샘플 채취 시기(일)를 괄호에 나타내었다. 도 8에 나타난 바와 같이, operation period 동안 모든 반응기에서 *Methanosaeta* 및 *Trichococcus* 모두 16S rRNA 농도 $>10^6$ copies/mL으로 존재한다. 모든 반응기는 *Methanosaeta* 농도가 시간에 따라서 지속적으로 증가하였다. 철 산화물 처리된 반응기 (특히, 마그네타이트 처리된 R3 반응기)에서 보다 큰 폭의 증가가 관찰되었다. 30일째에서, R2 및 R3 반응기 내의 *Methanosaeta* 16S rRNA 유전자 농도는 R1과 비교하여 각각 약 5.1배 및 약 16.4배 높게 나타났으며, 이러한 결과는 R3 반응기 내에서 보다 안정화된 혐기적 소화 환경을 반영한다. 철 산화물 처리된 반응기 내의 *Trichococcus* 16S rRNA 유전자 농도가 R1보다 현격하게 높게 나타났다. 30일 회분식 인큐베이션 이후의 R2 및 R3 반응기에서의 *Trichococcus* 16S rRNA 유전자 농도는 R1 반응기와 비교하여 각각 약 2.9 배 및 약 10.4 배 높게 나타났다. 이러한 결과는 (반)도성 철 산화물 처리에 의하여 혐기적 소화 시스템 내에 *Methanosaeta* 및 *Trichococcus*이 번성하기에 유리한 환경이 조성될 수 있음을 보여준다.

[0132] **II. 연속식 반응기 시험**

[0133] **참고예 7: 연속식 혐기적 반응기의 준비**

[0134] 운전 용량이 2 L인 두 개의 혐기적 연속교반식 생물반응기 (continuously stirred tank reactors; CSTRs) (각각 RC 및 RM으로 명명함)에서 기질로서 유장(cheese whey)을 사용하여 376일동안 운전시켰다. 초기에, 각 반응기에 동일한 부피의 유장 (diluted to 5 g/L as soluble chemical oxygen demand [COD]) 및 오니(sewage sludge)를 처리하는 바이오가스 플랜트에서 얻은 혐기성 슬러지(seeding 6 ratio, 50% [v/v])를 넣어주었다. 상기 시드 슬러지 및 유장 기질의 물리화학적 특성을 아래의 표 7에 나타내었다:

표 7

Parameter	Unit	Anaerobic sludge	Cheese whey
Total COD	mg/L	13,356 (84)[a]	5,114 (9)
Soluble COD	mg/L	620 (47)	4,845 (37)
Total solids	mg/L	17,000 (236)	5,550 (71)
Total volatile solids	mg/L	10,167 (236)	4,950 (71)
Total suspended solids	mg/L	14,500 (236)	250 (71)
Volatile suspended solids	mg/L	9,333 (0)	100 (0)
C	%	–[b]	35.3 (0.3)
H	%	–	7.3 (0.1)
O	%	–	45.8 (0.5)
N	%	–	1.5 (0)
S	%	–	0.2 (0)

[a] Standard deviations are in parentheses.

[b] Not measured.

[0135]

[0136] 유장 기질의 soluble-to-total COD 비율은 약 94.7% 정도로 높은 반면, volatile-to-total-solids ratio는 89.2% 정도였다. 이는 유장 기질이 유기물 함량이 높고 유기물의 대부분이 수용성임을 나타낸다. 유장은 미생물 성장에 필요한 필수 영양분의 대부분을 포함하고 첨가제 처리 없이 혐기적으로 처리 가능하기 때문에 본 시험에서 기질로서 채택되었다. 반응기를 처음 5일 동안은 회분식(batch mode)으로 운전시키고, 그 후에는 연속식 (continuous mode)으로 전환시켰다. RM 반응기에 마그네타이트(particle size, 100-700 nm; 도 9)를 최종 Fe 농도가 20 mM가 되도록 넣어주고; RC 반응기에는 아무런 처리를 하지 않고 대조군으로 사용하였다.

[0137] 시험 기간은, 운전 조건(operating condition)에 따라서, RC 반응기의 경우 6 단계 (PC1 to 6)로, RM 반응기의 경우 4단계 (PM1 to 4)로 각각 나누어 시험하였다. 각 단계의 수행 기간 및 운전 조건을 아래의 표 8 및 표 9에 나타내었다:

표 8

	RC					
Phase	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6
Period (day)	6–71	72–111	112–145	146–181	182–218	219–376
HRT (day)	25	20	B[a]	20	B	20
Magnetite addition	No	No	No	No	Yes	Yes
MPR (mL/d)[b]	102.4	58.8	–[c]	43.7	–	133.4
CH_4 content (%)	76.8	84.7	–	77.5	–	66.5
SCOD removal (%)	99.0	71.9	–	67.3	–	99.3
Y_M (L/g CODr)[d]	0.267	0.169	–	0.128	–	0.277

[a] B, batch operation with interrupted feeding.

[b] MPR, methane production rate.

[c] Not applicable.

[d] Y_M, methane yield.

[0138]

표 9

	RM			
Phase	PM1	PM2	PM3	PM4
Period (day)	6–71	72–111	112–119	120–376
HRT (day)	25	20	B	20
Magnetite addition	Yes	Yes	Yes	Yes
MPR (mL/d)[b]	89.4	72.2	–	127.4
CH_4 content (%)	78.0	81.0	–	64.5
SCOD removal (%)	98.8	80.8	–	99.3
Y_M (L/g CODr)[d]	0.233	0.185	–	0.265

[a] B, batch operation with interrupted feeding.

[b] MPR, methane production rate.

[c] Not applicable.

[d] Y_M, methane yield.

[0139]

[0140] 두 개의 반응기는 시험 내내 35 ± 2℃의 mesophilic temperature 및 약 pH 7.0의 조건 하에 두었다.

[0141] **참고예 8: 주사 전자 현미경 관찰**

[0142] 181일 및 272일째에 각 반응기에서 얻어진 혼합 용액 (mixed liquor)을 주사전자현미경 (scanning electron microscopy; SEM) 및 에너지 분산 X-선 분광분석법 (energy-dispersive X-ray spectroscopy; EDX)으로 관찰하여 digestate의 표면 형태적 특성을 분석하였다. 혼합액 (20 mL)을 1,900 g에서 10분간 원심분리한 후, 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)로 3회 세척하였다. 그 후, 얻어진 펠렛을 4℃에서 4시간 동안 2.5%(w/v) glutaraldehyde를 함유하는 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)에 고정시킨 후, 각 단계에서 연속적 에탄올 탈수 (serial ethanol dehydration; 50vol%, 70vol%, 90vol% 및 100vol%)를 15분간 수행하고 풍건 (air drying)시켰다. 상기 준비된 표본을 carbon tape를 사용하여 SEM stubs 상에 마운팅시키고, 플라티늄으로 스퍼터-코팅 (sputter-coated) 후, EDX 분광계를 장착한 field-emission SEM system (NanoSEM 230, FEI, USA)으로 관찰하였다.

[0143] **실시예 6: 마그네타이트 첨가에 따른 혐기적 소화 효율 시험**

[0144] 참고예 7에서 준비된 2개의 반응기 (RC 및 RM)에 대하여 376일동안의 운전 동안의 다양한 반응 양상을 시험하였다.

[0145] 참고예 6에 기재된 방법으로 각 반응기의 가용성 화학적 산소 요구량 (sCOD), 및 sCOD의 잔존 농도에 대한 휘발성 지방산 (Volatile fatty acids; VFAs; C_2-C_7) 농도, 아세트산 농도, 및 프로피온산 농도를 측정하여, 그 결과를 도 10 (가용성 COD), 도 11 (총 VFAs 농도), 도 12 (아세트산 농도), 및 도 13 (프로피온산 농도)에 각각 나타내었다.

[0146] 도 10에서 확인되는 바와 같이, 두 반응기 모두에서, 회분식 운전 개시 5일간 sCOD가 70% 이상 급격하게 감소하였으며, HRT(hydraulic retention time; 수리학적 체류시간)이 25일 (즉, PC1 및 PM1)인 경우에서 연속식 운전

동안 100 mg/L (>98% sCOD removal) 이하로 안정화되었다. 이들 반응기들이 기질 제거 및 메탄 생성 측면에서 비교적 우수한 성능을 나타냈기 때문에, HRT을 20일로 줄여서 hydraulic stress를 증가시켰다 (즉, PC2 및 PM2; 상기 표 8 및 표 9 참조). 두 반응기 모두에서 HRT를 감소시킨 경우 대부분이 프로피온산의 sCOD의 즉각적인 축적에 더하여 메탄 생성의 현저한 감소가 관찰되었다.

[0147] VFAs의 축적, 특히 프로피온산의 축적은 산생성(acidogenesis)과 메탄생성 간 불균형의 신호이며, 시스템 실패를 야기할 수 있다. 두 반응기 모두 107일째에 약 9의 높은 프로피온산:아세트산 비율을 나타냈으며, 이는 공정이 매우 불균형 상태에 있음을 보여준다 (propionic to acetic acid ratio > 1.4인 경우 불균형으로 판단). 80일째의 잔존 NH_4^+-N 농도가 검출한계인 1 mg/L보다 낮게 측정된 것으로 보아, 질소원 부족이 공정 저하의 원인이었던 것으로 보인다. 84일째부터 반응기들에 100 mg NH_4Cl/L (26 mg NH_4^+-N/L)를 보정한 피딩(feedign)을 수행하였다. RM 반응기에서 축적률이 뚜렷하게 감소하였음에도, 잔존 VFA 수준은 두 반응기 모두에서 증가하였다. NH_4Cl의 보정된 농도는 104일째부터 두 배가 되었다 (52 mg NH_4^+-N/L). sCOD 축적은 RC 반응기에서 유지되었으나 (1,569 mg/L on day 107), RM 반응기에서는 중단되었다 (915 mg/L on day 107). 두 반응기 모두에 112일째부터 restoration을 위하여 interrupted feeding을 수행하였다.

[0148] RM 반응기의 sCOD 농도는 1주일 내에 (i.e., PM3) 100 mg/L 아래로 떨어졌으며, 119일째에 continuous feeding을 재개하고 시험 종료시(i.e., PM4)까지 지속시켰다. sCOD은, PM1 내의 steady-state level과 비교하여, PM4 초기 동안 어느 정도 높은 수준으로 유지되었지만 (250-350 mg/L), 161일째부터 NH_4Cl의 보정된 농도를 400 mg/L (105 mg NH_4^+-N/L)까지 증가시킨 후 sCOD는 100 mg/L 아래로 서서히 감소하였다. 그러나, RC 반응기의 경우 interrupted feeding시에 안정화 (<100 mg sCOD/L)되기까지 34일이 소요되었다 (i.e., PC3). 146일째에 continuous feeding을 재개한 후 RC 반응기 내의 sCOD가 급속하게 축적되어, 161일째부터 NH_4Cl amendment이 400 mg/L까지 증가함에도 불구하고, 181일째(i.e., PC4)에 >2,000 mg/L에 도달하였다. 161일 이후에 잔존 NH_4^+-N 농도는 50-100 mg/L 정도로 유지되었으며, 이는 반응기 내 NH_4^+-N 농도가 40-70 mg/L 이상 되어야 메탄생성 활성의 감소를 막을 수 있다는 연구 결과에 부합하는 수치이다. 따라서, 161일 째 이후부터의 RC와 RM에서 나타나는 상이한 반응은, 질소원 문제가 아닌 마그네타이트의 첨가에만 기인한다.

[0149] PC4에서 VFAs (Volatile fatty acids)의 빌드-업(build-up) 동안 아세트산 및 프로피온산이 동시에 축적되었으며, 181일째의 잔존 가용성 COD (sCOD; residual sCOD)는 각각 45.2% 및 48.4%로 측정되었다. 반면, PC2에서의 sCOD 축적은 주로 프로피온산에 의하여 유발되었다 (89.4% on day 107). 이러한 결과는 syntrophic propionate oxidation뿐 아니라 산 생성 수반 메탄생성 (aceticlastic methanogenesis) 활성이 PC4에서 제한됨을 보여준다. 한편, RM에서는 PM3 동안 단속적 피딩 (interrupted feeding)에 의하여 회복된 후 공정 불균형 (process imbalance)을 거치지 않고, 시험 마지막까지 매우 안정적으로 운전하였다. 이러한 결과는 마그네타이트가 VFAs의 안정화에 유리한 효과를 나타내며, 이를 통하여 바이오가스를 생산함을 제안한다 (표 8 및 표 9 참조).

[0150] RC 반응기는 182일째 (즉, PC5)에 단속적 피딩 및 RM과 동량 (20 mM Fe)의 마그네타이트를 보충하는 또 다른 라운드로 진행되어, 마그네타이트의 바이오메탄생성에 미치는 영향을 확인하였다. 축적된 VFAs는 회분식 배양 37일 후에 완전히 분해되었으며, PC5의 sCOD 분해율 (57.4 mg/L·d)은 PC3 (48.1 mg/L·d)과 비교하여 현저하게 높았다. 219일째(즉, PC6)부터 연속적 피딩(continuous feeding)을 재개한 후, 잔존 sCOD는 25일 동안 726 mg/L까지 증가하였으며, 그 후 2.5개월동안 서서히 감소하여 100 mg/L 이하가 되었다. 아세트산이 축적된 주성분이었으며 (up to 92.1% of the residual sCOD), 프로피온산 수준은 이 기간동안 매우 낮았다 (≤120 mg/L). 이러한 결과는 마그네타이트-매개 DIET (Cruz Viggi et al., 2014 참조)에 의한 syntrophic propionate oxidation의 증가 때문이다. 또 다른 가능성은 반응기의 대사 특성이 마그네타이트 존재 하에서 propionic-type 발효보다는 acetic-type 발효 쪽으로 전환하였기 때문인 것으로 볼 수 있다. 프로피온산의 혐기적 소화가 열역학적으로 불리하고 ($G^{\circ\prime}$ = +76.1kJ/mol) 수소-생성 프로피오네이트 산화제와 수소 소모자 (hydrogen consumers) 간 잘 균형잡힌 syntrophy이 존재하는 경우에만 발생한다는 것을 감안하면, 두 경우 모두 안정적이고 효율적인 메탄생성에 유리하다.

[0151] RC 반응기의 안정화 (sCOD < 100 mg/L) 후, 상기 반응기들을 HRT의 또 다른 3개의 턴오버로 운전시켜 마그네타이트의 효과가 장기간 지속되는지 시험하였다. 시험의 마지막 2개월 동안, 두 반응기 모두 정상 상태(steady

state)에 도달하고 메탄 생성률과 비교하여 완벽한 sCOD 제거 (<50 mg의 잔존 sCOD/L)에 도달하였다 (도 10 내지 13 및 표 8 및 9).

[0152] RC 반응기 및 RM 반응기에서의 정상 상태 (steady-state) 메탄 수율 (즉, 제거된 기질 COD 당 메탄 생성량; L CH4/g CODr)은 각각 0.277 및 0.265 L/g CODr이었다. 이러한 수치는 이론적 메탄 생성 수율 0.350 L/g CODr보다 낮은 것이지만, 이는 기질이 메탄 생성 (i.e., catabolic flux)뿐 아니라 세포 성장 (i.e., anabolic flux)에도 사용되기 때문이다. 본 시험 결과는 20mM Fe 마그네타이트 처리에 의하여 반응기 성능의 robustness뿐 아니라 공정 불균형을 치유하는 데에도 우수한 효과가 있음을 보여준다.

[0153] **실시예 7: 마그네타이트의 관찰 (Fate of magnetite)**

[0154] 각 반응기의 소화물 (digestate) 샘플에 대하여 참고예 8에 따라서 SEM-EDX 분석한 결과를 도 14 내지 도 21에 나타내었다. 도 14는 RC 반응기의 181일째 샘플에서 얻어진 SEM 분석 결과를 보여주는 이미지이고, 도 15는 RC 반응기의 181일째 샘플에서 얻어진 EDX 분석 결과를 보여주는 그래프이고, 도 16은 RC 반응기의 272일째 샘플에서 얻어진 SEM 분석 결과를 보여주는 이미지이고, 도 17은 RC 반응기의 272일째 샘플에서 얻어진 EDX 분석 결과를 보여주는 그래프이고, 도 18은 RM 반응기의 181일째 샘플에서 얻어진 SEM 분석 결과를 보여주는 이미지이고, 도 19는 RM 반응기의 181일째 샘플에서 얻어진 EDX 분석 결과를 보여주는 그래프이고, 도 20은 RM 반응기의 272일째 샘플에서 얻어진 SEM 분석 결과를 보여주는 이미지이고, 도 21은 RM 반응기의 272일째 샘플에서 얻어진 EDX 분석 결과를 보여주는 그래프이다.

[0155] RC 반응기의 181일째 샘플 (마그네타이트 첨가 전)에서는 세포 표면이 깨끗하고 매끄러운 것을 확인할 수 있는 반면 (도 14 참조); RC 반응기의 272일째의 샘플 (under magnetite supplementation)에서는 세포 표면에 부착된 불규칙한 형태의 미세입자의 응집체를 갖는 전혀 다른 형태가 관찰되었다 (도 16 참조). 처음부터 마그네타이트가 첨가된 RM 반응기의 샘플들 (181일째 및 272일째)은 RC 반응기의 272일째의 샘플에서의 형태와 유사한 형태를 나타내었다 (도 18 및 도 20 참조). EDX 스펙트럼에 있어서, RC 반응기의 181일째 샘플은 세포 표면에 C, N, 및 O (즉, 유기 성분들)을 포함하는 반면, 다른 샘플들은 세포 표면에 Fe을 포함하는 것으로 관찰되었다.

[0156] 시험 마지막에 각 반응기에서 얻어진 샘플(digestates)에 대하여 x-선 회절(XRD) 분석 (High Power XRD; DMAX2500, RIGAKU, Japan)을 수행하여 첨가된 마그네타이트의 잔류 형태를 조사하여, 그 결과를 도 22 및 도 23에 나타내었다. 도 22는 RC 반응기의 샘플에 대한 XRD 결과 (Intensity (count per sec; CPS)로 나타냄)를 보여주고, 도 23은 RM 반응기의 샘플에 대한 XRD 결과를 보여준다 (각각의 샘플의 결과는 검은 선으로 나타냄). 도 22 및 도 23에서 붉은색 선은 순수한 마그네타이트의 XRD 결과를 나타낸다.

[0157] 도 22 및 도 23에 보여지는 바와 같이, 두 반응기에서 얻어진 샘플의 XRD 피크 패턴은 순수한 마그네타이트의 피크 패턴과 일치하였으며, 이러한 결과는 시험 동안 마그네타이트에 화학적 변화가 일어나지 않았음을 의미한다. 이러한 결과는 반응기에 첨가된 마그네타이트가 미생물 세포 표면에 부착하여 응집체 구조를 형성하며, 그 전도성으로 세포 연결을 매개함을 제안한다. 마그네타이트에서 방출된 Fe(III)이 산소결핍 조건 (i.e., dissimilatory Fe[III] reduction) 하에서 Fe(II)/Fe(III) 산화환원 사이클링을 통하여 세포외 전자 이동을 위한 전자의 셔틀을 수행할 수 있다. 그러나, Fe(II) 농도는 PC6 및 PM4 동안 1 mg/L 보다 낮게 유지되었으며, 미생물의 Fe(III) 환원 및/또는 Fe(III)의 nutritional effect가 메탄생성 (메탄생성 미생물esis) 증가에 기여하지 않을 것으로 여겨진다. 따라서, 전도성 마그네타이트 입자를 통한 DIET가 메탄 생성 촉진 및 공정 안정성 증진의 주요한 메커니즘이라고 결론지을 수 있다.

[0158] **실시예 8: DGGE 밴드 분석 및 계통발생학적 분류**

[0159] 시험 단계마다의 RC 반응기 및 RM 반응기 내의 미생물 군집 구조의 다양성을 조사하기 위하여 참고예 3의 방법 및 프라이머 서열을 참조하여 DGGE((Denaturing gradient gel electrophoresis)를 수행하였다. 각 반응기로부터 6개의 DNA 샘플을 준비하고 (days 62, 149, 181, 216, 296, & 376), 시드 슬러지로부터 얻은 샘플에 대하여 평행적으로 분석하였다.

[0160] 상기 얻어진 DGGE 결과를 도 24 및 도 25에 나타내었다. 도 24는 각 반응기의 샘플로부터 얻어진 고세균 16S rRNA 유전자 DGGE fingerprints 결과이며, 도 25는 각 반응기의 샘플로부터 얻어진 박테리아 16S rRNA 유전자 DGGE fingerprints 결과를 보여준다.

[0161] 7개의 고세균 16S rRNA 유전자 서열 (WWA1 to WWA7)이 겔로부터 회수되었고, 3개의 메탄생성 미생물 종류

(order), 즉 *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales*, 및 *Methanosarcinales*로 분류되었다 (표 10 참조):

표 10

[0162] Phylogenetic affiliation of Archaeal 16S rRNA gene sequences retrieved from DGGE bands

Band	Closest relative	Accession number	Similarity (%)	Classification[a]
WWA1	Uncultured archaeon clone LB12C11	JX110159	100	*Methanomassiliicoccus*
	Uncultured archaeon clone GDIC2IK01EWX39	JF527479	99.2	
	Candidatus Methanoplasma termitum strain MpT1	CP010070	96.9	
WWA2	*Methanospirillum hungatei*	NR_074177	99.6	*Methanospirillum*
	Methanospirillum stamsii	NR_117705	99.6	
	Methanospirillum psychrodurum	NR_133782	99.2	
WWA3	*Methanolinea mesophila*	NR_112799	97.2	*Methanomicrobiales*
	Uncultured archaeon clone Annu5	HM630578	97.2	
WWA4	*Methanosaeta concilii*	KM408635	100	*Methanosaeta*
WWA5	*Methanolinea tarda*	NR_028163	98.0	*Methanomicrobiales*
	Methanolinea mesophila	NR_112799	97.7	
	Methanoculleus receptaculi	NR_043961	97.3	
WWA6	*Methanosaeta harundinacea*	KM408632	99.2	*Methanosaeta*
	Methanosaeta pelagica	NR_113571	97.7	
WWA7	*Methanobacterium beijingense*	NR_028202	99.6	*Methanobacterium*
	Methanobacterium sp. SMA-27	KJ432636	97.7	

[0163] (a: The lowest rank assigned by RDP Classifier at an 80% confidence threshold)

[0164] 7개 서열 중 6개의 서열이 알려진 aceticlastic (WWA4 and 6) 및 hydrogenotrophic (WWA2, 3, 5, and 7) 메탄생성 미생물 종과 밀접한 관련성 (서열 상동성이 높음을 의미, 이하 동일)이 있었다 (97% 이상의 서열 상동성).

[0165] WWA1는 uncultured clones (accession nos. JX110159 및 JF527479)와 서열 상동성이 높게 나타났다. 이 서열은 RDP Classifier에 의하여 최근 발견된 hydrogenotrophic genus인 *Methanomassiliicoccus* (습지 및 동물 배설물을 포함하여 다양한 혐기 환경에서 생존함)로 분류되었다. Given that WWA1가 RC 반응기에서의 216일째 샘플에만 관찰되는 것을 감안하면, VFAs의 신속한 분해로부터 공급되는 수소와 마그네타이트 첨가에 의하여 촉진된 electric syntrophy가 함께 작용하여 PC5 동안 WWA1에 해당하는 메탄생성 미생물의 성장을 촉진시킨다.

[0166] WWA2, WWA3 및 WWA5는 order Methanomicrobiales에 속하고 메탄생성 미생물ic 공정에 자주 발생하는 *Methanospirillum*, *Methanolinea*, 및/또는 *Methanoculleus* species와 한 부류로 분류되었다. WWA2 및 WWA3는 RC 반응기보다 RM 반응기에서 보다 강력한 밴드 세기로 나타났으며, WWA3는 특히 RC 반응기에서 마그네타이트 첨가 후 가시화되는 밴드에 나타났다. 이러한 결과는 이들 밴드에 상응하는 hydrogenotrophic 메탄생성 미생물s가 마그네타이트가 원조하는 DIET (magnetite-aided DIET)를 통하여 syntrophy에 수반됨을 의미한다.

[0167] WWA4는 모든 레인에서 우세한 밴드로 검출되었으며, 잔존 VFAs 농도가 낮은 안정적 조건 하에서 성장하는 것으로 알려진 aceticlastic species 중 하나인 *Methanosaeta concilii*에 대하여 100% 서열 상동성을 나타내었다. RC 반응기가 아세트산 및 프로피온산의 축적과 함께 심각한 불균형을 거치는 PC4 동안의 181일째 샘플에서 상기 균주 해당 밴드의 세기는 현격하게 낮아졌다. 또 다른 *Methanosaeta*-관련 밴드인 WWA6는 모든 레인에서 WWA4보다 약한 강도로 나타났다. WWA7는 order Methanobacteriales에 속하는 Methanobacterium species와 밀접한 관련성을 갖는 것으로 확인되었다.

[0168] 박테리아 DGGE 분석은 archaeal 보다 복잡하고 역동적인 밴드 패턴을 나타낸다. 이러한 차이점은acidogen과 비교하여 메탄생성 미생물의 제한된 기질 범위와 관련 있다. 총 12개의 박테리아 밴드 (WWB1 to 12)를 시퀀싱하고, 이 중에서 6개 (WWB2, 5, 6, 7, 8, 및 9)를 genus 수준에서 분류하였다 (표 11).

표 11

[0169]

Band	Closest relative	Accession number	Similarity (%)	Classification[a]
WWB1	Uncultured bacterium clone CloningB8D06	AB998023	100	Bacteriodetes
	Uncultured bacterium clone GBL1-02	KM046958	100	
	Uncultured bacterium clone GB2	KJ679865	100	
	Uncultured bacterium clone MR3	DQ661705	100	
WWB2	*Parabacteroides chartae*	NR_109439	100	Parabacteroides
	Macellibacteroides fermentans	NR_117913	99.6	
	Bacteroides sp. W7	FJ862827	99.3	
WWB3	Uncultured bacterium clone UB2	KF803571	99.8	Bacteriodetes
	Uncultured bacterium clone LA86	FJ799150	99.8	
	Uncultured bacterium clone paintanode52	KC597203	99.5	
WWB4	Uncultured bacterium clone MISEQ01_89_000000000-A647M_1_1107_2246_12378	KP348423	100	Bacteriodetes
	Uncultured bacterium clone MFC-GIST450	EU704659	99.8	
	Uncultured bacterium clone MFC-GIST14	EU704544	99.5	
WWB5	*Parabacteroides chartae*	NR_109439	99.8	Parabacteroides
	Macellibacteroides fermentans	NR_117913	99.8	
	Bacteroides sp. W7	FJ862827	99.3	
WWB6	*Petrimonas sulfuriphila*	NR_042987	100	Petrimonas
	Petrimonas sulfuriphila	KT183420	99.5	
WWB7	Uncultured bacterium clone W-16S-34	HM445961	100	Saccharofermentans
	Uncultured bacterium clone ANAER_V1_5G	KC110305	99.8	
	Uncultured bacterium clone R3B10L	GQ423908	99.8	
	Uncultured bacterium clone Wcon1_O11	JX491538	96.7	
WWB8	Rhodopseudomonas faecalis	KT180200	100	Rhodopseudomonas
	Rhodopseudomonas palustris	KT824854	100	
	Rhodopseudomonas sp. JFANr	HQ693554	99.8	
	Rhodopseudomonas oryzae	AB241410	99.8	
WWB9	Syntrophobacter pfennigii	NR_026232	97.6	Syntrophobacter
	Uncultured bacterium clone KB-1	AY780561	99.6	
WWB10	Uncultured bacterium clone KIST-JJY029	EF654698	99.1	Bacteria
	Uncultured bacterium clone QEDS1CF05	CU921570	98.8	
	Uncultured bacterium clone B074	HG007954	97.9	
WWB11	Uncultured bacterium clone BLB06	AB248628	99.8	Bacteria
	Uncultured bacterium clone MADSa78	AB669261	99.5	

WWB12	Uncultured bacterium clone ORSFAM_	EF393281	99.3	Chloroflexi
	Uncultured bacterium clone SB1B_8F_c12	KC713023	98.4	

[0170] ([a]: The lowest rank assigned by RDP Classifier at an 80% confidence threshold.)

[0171] WWB2 및 WWB5는 genus Parabacteroides로 분류되었으며, *Parabacteroides chartae*와 *Macellibacteroides fermentans* 모두와 높은 서열 상동성을 나타내었다. 이들 species는 다양한 종류의 당을 발효시켜서 아세트산, 부티르산, 락트산 등의 유기산을 생산하는 것으로 알려져 있다. 상기 밴드는 또한 글루코오스, 효모 추출물 및 소듐락테이트를 전자 도너로 사용하여 Fe(III)를 환원시킬 수 있는 Fe(Ⅲ)-환원 발효균 (Fe(Ⅲ)-reducing fermentative bacterium; accession no. FJ862827)와도 밀접한 관련성이 있다. 이러한 현상은 WWB2 및 WWB5에 상응하는 Parabacteroides-관련 개체군 (populations)이 VFAs와 같은 acidogenic 산물을 전자방출적으로 (exoelectrogenically) 산화시킬 수 있음을 제안한다.

[0172] 반응기 운전 후 RM 반응기 내에서 지배적 세기를 갖는 WWB2는, 다른 레인과 비교하여 매우 약한 신호를 내거나 신호를 거의 내지 않지만, PM4 (days 216, 296, 및 376) 동안 안정화되었다.

[0173] 반대로, WWB5는 모든 레인에서 검출되었으며, RC 샘플에서 보다 강한 세기를 나타내었다. 따라서, WWB2에 상응하는 박테리아는 시험 반응기 내에서 전기적 영양공생(electric syntrophy)에 수반되는 반면, WWB5로부터 추론되는 박테리아는 유장의 당을 발효하는데 있어서 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

[0174] WWB6 및 WWB7는 각각 fermentative genera Petrimonas 및 Saccharofermentans로 할당하였다. 이들 genera는 중온성 (mesophilic)이고 다양한 당을 발효시켜서 아세트산 등의 유기산 및 H_2/CO_2를 생산한다. 이들 밴드에 상응하는 개체군은 유장의 acidogenic fermentation에 수반된다. 주목할만한 점은 WWB7 또한 미생물 연료 전지 (microbial fuel cell)의 anode biofilm으로부터 얻은 uncultured clone (accession no. JX491538)와 96.7%의 상당한 서열 상동성을 공유한다는 것이다. 이러한 상동성은 WWB7-관련 박테리아가 전기적으로 활성이 있음 (electroactive)을 의미한다. 이러한 가능성은 RM 반응기에서 약 216일째의 2개의 주요한 밴드인 WWB2 및 WWB7 간의 우세적 전환을 시간에 따른 우세 전자방출 개체군 (exoelectrogenic population)의 전이의 결과로서 설명할 수 있다.

[0175] WWB8은 metabolic versatility의 특징을 갖는 genus Rhodopseudomonas로 분류하였다. 이 자색 비황 박테리아 (purple nonsulfur bacterium)는 다음의 4개의 상이한 대사 모드를 전환함으로써 호기적 및 혐기적으로 생장 가능하다: 광자가영양성(photoautotrophic), 광종속영향성(photoheterotrophic), 화학자가영향성(chemoautotrophic), 및 화학종속영향성(chemoheterotrophic). WWB8은 PC2 및 PC4 동안 축적된 잔류 VFAs가 안정화되는 149일 및 216째에 관찰된다. 이는 상기 밴드에 상응하는 개체군이 VFAs 특히 프로피온산 또는 분해 산물의 분해를 담당함을 제안한다.

[0176] WWB9는 hydrogenotrophic 메탄생성 미생물과 같은 수소-소모 파트너 (hydrogen-consuming partners)와 협력하여 프로피오네이트를 아세테이트로 산화시키는 genus Syntrophobacter로 분류하였다. HRT 후 WWB9의 지속적인 출현은, 불균형 조건 하에 있는 RC 반응기의 181일째 샘플을 제외하고, 두 반응기 모두에서 20일로 단축되었다. 이는 상기 밴드에 상응하는 박테리아가 syntrophic 프로피오네이트 산화를 담당하여 공정 불균형을 봉쇄시킴을 제안한다.

[0177] 나머지 밴드 서열 중에서, 4개 서열 (WWB1, WWB3, WWB4, 및 WWB12)을 phylum level로 분류하고, 다른 2개 서열 (WWB10 and 11)은 phylum level로도 분류하지 못하였다 (Table 4). WWB1, WWB3, 및 WWB4은 상이한 폐기물을 처리하는 혐기적 digester들로부터 얻어진 uncultured clone들과 밀접한 관련성이 있고 혐기적 소화 환경 (AD environments)에서 흔히 관찰되는 phylum Bacteriodetes로 분류하였다. WWB4는 magnetite 첨가 후 RC 반응기의 안정화에 따라서 WWB3이 쇠퇴하는 동안 출현한다.

[0178] 추정 발효균 (putatively fermentative bacteria) 간의 우세한 전환은 마그네타이트 첨가에 의하여 유발되는 환경 변화와 관련이 있다. WWB4는 혐기성 슬러지가 접종된 상이한 bioelectrochemical system들로부터 얻어진 몇몇 several uncultured clone들과 밀접한 관련성이 있다. 이는 상기 밴드에 상응하는 개체군이 전기적으로 활성(electroactive)임을 의미한다. 이러한 현상은 이 박테리아가 실험적 반응기 내에서 전기적 영양공생 (electric syntrophy)에 관여하고 마그네타이트 첨가 하에서 잘 성장함을 제안한다.

[0179] WWB12은 혐기적 소화 과정에서 많이 발생하는 phylum *Chloroflexi*로 분류하였다. *Chloroflexi* 세균이 전자방출(exoelectrogenic) 활성을 가지고, WWB12이 PC6 및 PM4의 후반기 (days 296 및 376)에 출현하므로, 상기 밴드에 상응하는 *Chloroflexi*-관련 세균은 반응기 군집(community) 내에서 DIET에 관여한다고 볼 수 있다.

[0180] WWB10 및 WWB11는 혐기적 처리 공정에서 얻어진 uncultured clones와 밀접한 관련성이 있는 것으로 확인되었다.

[0181] **실시예 9: 고세균 및 박테리아 군집 구조**

[0182] 참고예 4의 방법을 참조하여, 고세균 및 박테리아의 DGGE 양상에 기초하여 클러스터 계통수 (cluster dendrograms) 및 비-계량 다차원척도 (NMS) 플롯을 구축하여 도 26 내지 도 29에 나타내었다.

[0183] 도 26은 고세균의 DFFE 프로파일을 기초로 얻어진 클러스터 계통수를 나타내고, 도 27은 고세균의 DFFE 프로파일을 기초로 얻어진 NMS 플롯을 나타내며, 도 28은 박테리아의 DFFE 프로파일을 기초로 얻어진 클러스터 계통수를 나타내고, 도 29는 박테리아의 DFFE 프로파일을 기초로 얻어진 NMS 플롯을 나타낸다.

[0184] 고세균 및 박테리아의 NMS 플롯에서 ordination axes에 대한 cumulative r^2은 각각 0.892 및 0.789였으며, 이는 고세균 및 박테리아 군집 데이터에서 각각 총 variance의 89.2% 및 78.9%가 NMS ordination 결과에 의하여 설명될 수 있음을 의미한다. 두 반응기의 day-62 프로파일이 가깝게 관련되어 있는 것(Sorensen distance (Ds) < 0.04)을 제외하고, RM 반응기의 고세균 군집 프로파일은 RC 프로파일로부터 분리되어 클러스터링되었다. 고세균 NMS ordination에 의하여 RC 반응기 프로파일과 RM 반응기 프로파일 간의 명확한 divergence와 동일한 클러스터링 패턴이 관찰된다 (도 26 및 도 27 참조). 이러한 결과는 RC 반응기 및 RM 반응기 내의 고세균 군집 구조가 시험 기간 동안 매우 다른 방식으로 전개됨을 보여준다.

[0185] RC 반응기의 day-181 샘플의 프로파일은 다른 프로파일과 멀리 떨어져서 위치하였다. 이러한 배치는, PC 단계 동안의 심각한 불균형 이후의, Methanosaeta-관련 개체군 (WWA4 및 WWA6) 및 Methanobacterium-관련 개체군 (WWA7)과 같은 다수의 메탄생성 개체군 (methanogen populations) (i.e., DGGE band intensity) 에서의 가시적 변화를 반영하는 것이라고 할 수 있다.

[0186] NMS 플롯에서, 연속하는 두 지점 사이에서 가장 큰 급등 (jump; 즉, 가장 현저한 변화)이 관찰되는 곳은 RC 반응기의 181일째 및 216일째 사이와 RM 반응기의 62일째 및 149일째 사이에서이다. 이들 급등은 마그네타이트 첨가가 RC 반응기 내의 고세균 군집 구조에서의 가장 현저한 변화를 유발하는 한편, 이러한 과정은 RM 반응기 내의 HRT의 20일로의 감소에 뒤이어 반전된다. 이러한 결과는 마그네타이트 첨가가 혐기적 소화 고세균 군집의 진화 (evolution)에 현저한 영향을 미침을 보여준다.

[0187] 박테리아 클러스터 분석은 고세균 클러수터 계통수와 유사한 클러스터 패턴을 보여주며, RM 반응기 및 RC 반응기의 박테리아 군집 프로파일은 대체적으로 분리되어 나타난다 (도 28 및 도 29). RC 반응기의 376일째의 profile은 RM 반응기의 376일째의 프로파일과 가증 가깝게 연관되어 있으며, 다른 RM 프로파일과 함께 하나의 클러스터에 그룹핑되었다. 동일한 수렴 패턴(converging pattern)이 NMS 플롯에 나타났다. 반응기 성능 프로파일과 운전 조건이 주어지면 (Fig. 1 and Table 2), 이 패턴은 마그네타이트 (RM 반응기에서는 시험 개시(time 0)부터 첨가; RC 반응기에서는 181일째부터 첨가)의 영향과 관련있고 두 반응기 모두에서의 매우 안정한 처리와도 관련 있다(i.e., substrate-limited environment). NMS 플롯은 RC 반응기 및 RM 반응기 모두에서의 박테리아 군집 구조가 62일째와 149일째 사이에서 현저한 변화를 나타냄을 보여준다. 이러한 변화는 HRT 감소 이후의 공정 불균형과 관련 있다. RC 반응기 내의 박테리아 군집 구조는 376일째까지 역학적으로 변화하는 한편, RM 반응기 내의 박테리아 군집 구조는 이후에 상당한 변화가 거의 없이 비교적 안정적으로 유지된다. 이러한 결과는 RC 반응기가, 예컨대 반복된 VFA build-up, 단속적 피딩 (interrupted feeding), 및 마그네타이트 첨가와 관련하여, RM 반응기보다 심한 변화 (fluctuations)를 겪는다는 사실에 부합한다. 특히, 181일째부터 RC 반응기에 마그네타이트 첨가 시에, 두 개의 시험 반응기 내의 박테리아 군집 구조는 시간이 지남에 따라서 서서히 가깝게 관련되게 되는데, 이는 마그네타이트가 혐기적 소화 공정에서 박테리아 군집의 진화 (development)에 상당한 영향을 가짐을 제안한다. 전반적으로 이러한 결과는 고세균 군집 구조와 박테리아 군집 구조 모두 RC 반응기와 RM 반응기 간 명백하게 상이한 방향으로 진화되고, 군집 구조 전환이 반응기 환경에서의 변화와 높은 상관관계가 있음을 보여준다.

[0189] **실시예 10: 메탄생성 미생물 (methanogen) 군집 조성의 정량 분석**

[0190] 참고예 5에 기재된 방법을 참조하여, 시험 반응기 내의 메탄생성 미생물 군집 조성의 변화를 타겟 메탄생성 미

생물군의 16s rRNA 양을 측정하였으며, 이에 기초하여 분석하였다.

[0191] 이 때 사용된 프라이머 서열 정보를 아래의 표 12에 나타내었다:

표 12

[0192]

미생물		프라이머 서열	서열번호
Methanobacteriales	MBT857F	CGWAG GGAAG CTGTT AAGT	25
	MBT1196R	TACCG TCGTC CACTC CTT	26
Methanomicrobiales	MMB282F	ATCGR TACGG GTTGT GGG	27
	MMB832R	CACCT AACGC RCATH GTTTA C	28
Methanosarcinaceae	Msc380F	GAAAC CGYGA TAAGG GGA	29
	Msc828R	TAGCG ARCAT CGTTT ACG	30
Methanosaetaceae	Mst702F	TAATC CTYGA RGGAC CACCA	31
	Mst862R	CCTAC GGCAC CRACM AC	32

[0193] 상기 얻어진 결과를 도 30 내지 도 32에 나타내었다.

[0194] 도 30은 16S rRNA 유전자 정량 결과에 기초한 총 메탄생성 미생물 개체군 (methanogen population) 변화를 나타낸 그래프이고, 도 31은 16S rRNA 유전자 정량 결과에 기초한 각 메탄생성 미생물군의 절대량을 나타낸 그래프이고, 도 32는 16S rRNA 유전자 정량 결과에 기초한 각 메탄생성 미생물군의 상대량을 나타낸 그래프이다.

[0195] 총 메탄생성 미생물 개체군 (MET; 모든 타겟 메탄생성 미생물군에서 측정된 16S rRNA 유전자 농도의 총합)은, RC 반응기의 181일째 샘플 (2.7×10^7 copies/mL)을 제외하고, 약 10^8 copies/mL로 매우 일정하게 유지되었다. MET의 확실한 저하의 주된 원인은 낮은 아세트산 농도에서 통상 잘 자라는 균주인 *Methanosaetaceae*의 급격한 감소이다. 낮은 MET은 RC 반응기에서 약 181일째에서의 VFA 축적과 함께 공정 불균형의 효과를 반영한다.

[0196] 시드 슬러지 및 두 반응기의 62일째 샘플 내의 메탄생성 미생물 군집에서는 *Methanosaetaceae*가 압도적으로 우세하다 (>96% of MET). 이러한 결과는 이들 패밀리의 일원이 안정적인 혐기적 소화 시스템 내의 우세한 메탄생성 미생물군을 형성한다는 전반적인 이해와 부합한다. 두 반응기 모두에서 군집 조성이 상당히 변화하여 이후 시험기간에 걸쳐서 hydrogenotrophic 메탄생성 미생물의 비율이 현저하게 증가하였다. Hydrogenotrophs, 특히 Methanobacteriales의 62일과 149일 사이에서의 현격한 증가 (>12-fold)는 축적된 프로피온산의 분해로부터 생성된 수소 및, 특히 RM 반응기 내에서, DIET에 의하여 뒷받침될 수 있다. 이러한 잠재적 공동영양 관련성 (syntrophic relation)은 *Syntrophobacter*-관련 미생물 (WWB9)과 *Methanobacterium*-관련 미생물 (WWA7)을 주요 공동영양 파트너로서 수반할 것으로 보인다. hydrogenotrophic 메탄생성 미생물, 특히 Methanomicrobiales의 양은 RM 샘플에서 일반적으로 많았다. 이는 마그네타이트가 DIET를 통하여 syntrophic VFA degraders와의 전기적 연결 (electric connections)에 의하여 상기 균들의 성장을 촉진시킴을 제안한다.

[0197] DIET에 있어서, *Methanobacteriales* (예컨대, *Methanobacterium*; WWA7)와 *Methanomicrobiales* (예컨대, *Methanospirillum* 및 *Methanolinea*; WWA2, WWA3, 및 WWA5)와의 연관성이 있다. 상기 두 개의 hydrogenotrophic order의 상대량은 62일째에 <1%로부터 376일째에 9.3% (RC 반응기; 1.7×10^7 copies/mL; 절대농도로는 1.7배 증가) 및 5.9% (RM 반응기; 1.9×10^7 copies/mL; 절대농도로는 3.5배 증가)까지 증가하였다.

[0198] RC 반응기의 181일째 샘플을 제외하고, 두 반응기 모두에서 실험 내내 Methanosaetaceae이 가장 우세한 메탄생성 미생물군(61.7%- 97.8% of MET)이었다. 이러한 결과는 고세균에서의 DGGE 결과 (우세한 *Methanosaeta*-관련 밴드가 181일째에서 현저하게 감소한 강도를 나타냄)과 부합한다. 이들 패밀리는 일반적으로 철저하게 aceticlastic하고 이산화탄소를 메탄으로 환원시킬 수 없는 것으로 알려져 있다. 그러나, 본 시험 결과는 Methanosaeta가 시험 반응기에서 aceticlastic pathways뿐 아니라 DIET-매개 CO2-환원에 의한 메탄 생성을 수행함을 제안한다.

[0199] 모든 반응기 샘플에서, *Methanosarcinaceae*은 메탄생성 미생물 군집에서 적은 비율(<0.6% of MET)을 차지하였다. 이와 같이 다양한 대사활성을 갖는 패밀리는 알려진 바에 따르면 *Methanosaetaceae*보다 우세하고 높은 아세트산 농도에서 aceticlastic 메탄생성을 독점한다는 것을 감안하면, RC 반응기의 216일 및 296일째의 제한된 *Methanosarcinaceae*의 양은 예외적이라고 할 수 있다.

[0200] 특히 아세트산이 높은 수준으로 축적되는 경우, 아세트산의 일부가 aceticlastic 메탄생성 미생물에 의하여 메

탄으로 변환되지 않고 아세테이트-산화 박테리아에 의하여 산화된다. hydrogenotrophic 메탄생성과 관련된 공동영양성 아세테이트 산화 (Syntrophic acetate oxidation)가 종종 중요한 메탄생성 루트이고, 가끔 이러한 산화가 직접적 aceticlastic pathway보다 도움이 될 수 있다. 아세테이트 산화는 또한 DIET를 통하여 전자방출적으로 전자를 메탄생성 미생물에 전달하며, 이를 통하여 전기적 공동영양 (electric syntrophy)이 뒷받침된다. 전체적인 결과는 반응기의 군집들이 마그네타이트 보충 하에서 fermenters, 메탄생성 미생물, 및 exoelectrogens 간의 안정한 3자 syntrophic interaction을 형성함을 뒷받침한다.

[0201] **실시예 11: 반응기에서의 마그네타이트 회수 효율 시험**

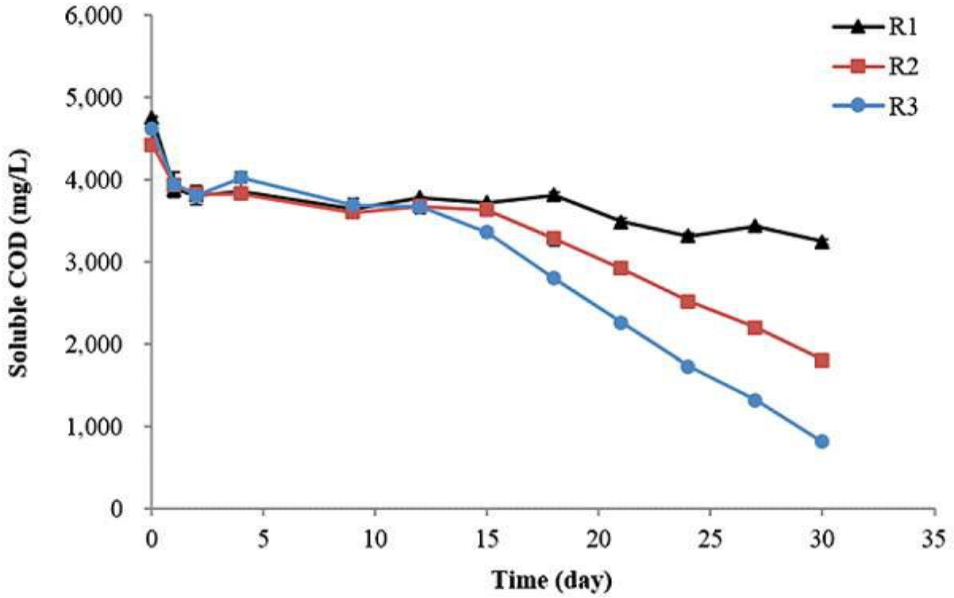
[0202] RC 반응기 및 RM 반응기를 연속적으로 운전하면서 379일째부터 자석을 이용하여 마그네타이트를 회수하면서 가용성 COD 농도 변화를 측정하여 도 33에 나타내었다. 또한 RM 반응기의 378일 이후의 각 기간의 샘플에서 자석을 이용하여 마그네타이트를 회수하는 모습을 도 34에 나타내었다.

[0203] 도 33에서, 379일째부터 RM 반응기의 유출수로부터 자석을 이용하여 마그네타이트를 회수 및 재활용하였고, RC 반응기는 이전 phase와 동일하게 20mM의 마그네타이트를 연속적으로 첨가한 실험을 진행하였다. 130일이 넘는 기간 동안 RM의 바이오가스 생성 및 유기물 제거 효율은 떨어지지 않고 RC와 비슷한 수준을 유지하였다. 이는 본 기술을 활용하면, 마그네타이트의 지속적인 첨가 없이도 높은 혐기 소화 효율 유지가 가능하다는 것을 보여주는 것이다. 마그네타이트의 긍정적인 효과를 재확인하기 위해, 509일째부터 RC 반응기의 마그네타이트 첨가를 중단하고, 4번의 HRT 기간이 지나자, 유기물이 분해되지 못하고 쌓이며 바이오가스가 생성량이 줄어드는 현상이 관찰되었는데. 이는 적절한 농도 이상의 마그네타이트 첨가가 고효율 혐기 소화에 긍정적인 영향을 미치고 있음을 재확인시켜주는 결과이다.

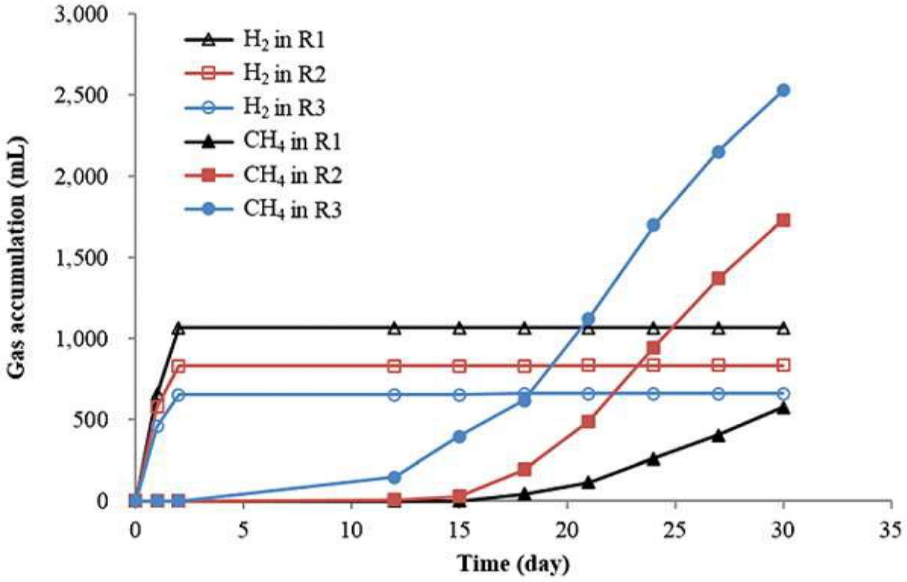
[0204] 도 34은 379일째부터 RM 반응기에 적용되었던 마그네타이트의 회수/재이용 과정을 모식적으로 보여주는 사진이다. 유출수를 반응기로부터 샘플링 한 뒤, 네오디뮴 자석을 대고 일정 시간이 흐르면 마그네타이트가 자력에 의해 회수되는데, 이 때, 마그네타이트에 결합되어 있던 혐기 미생물들이 함께 회수되기 때문에, 반응기 내부에 마그네타이트와 함께 미생물의 농도를 유지시키는 데에도 도움이 된다.

도면

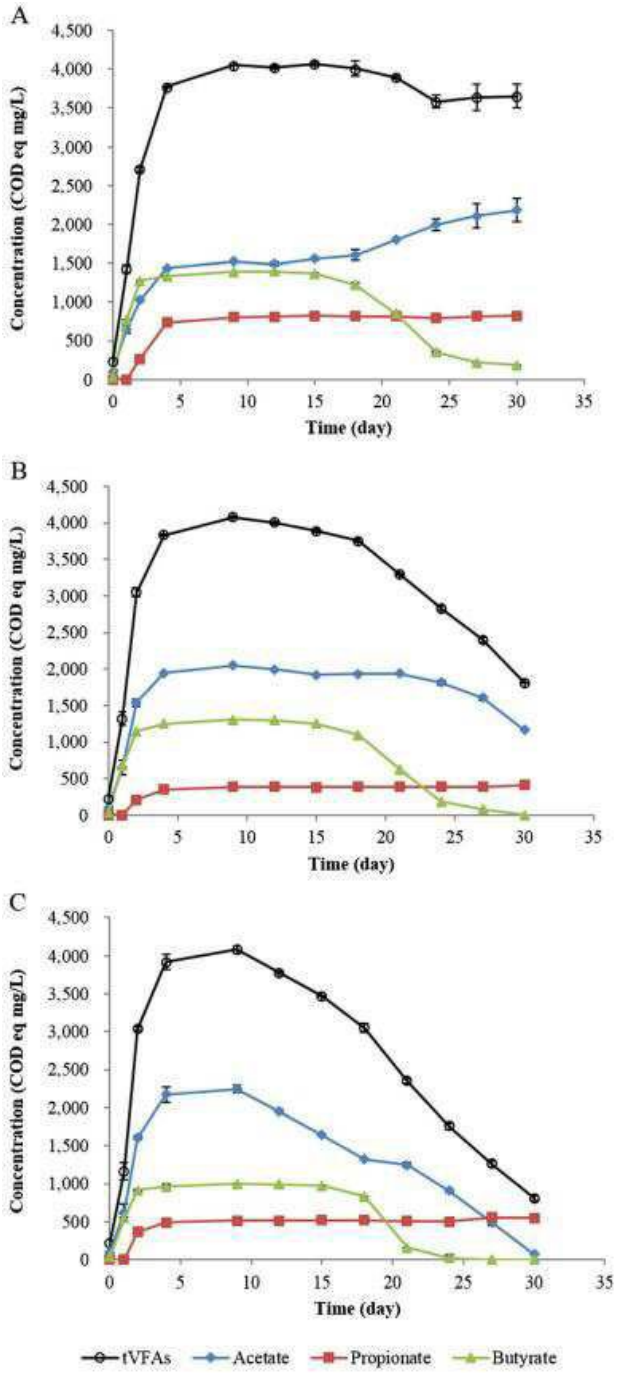
도면1



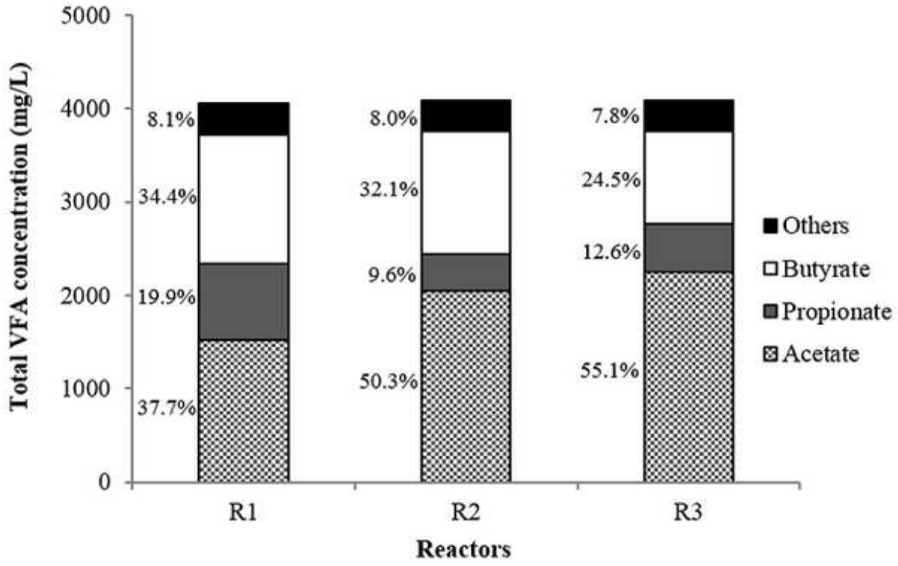
도면2


3,000
2,500
2,000
1,500
1,000
500
0
Gas accumulation (mL)
0
5
10
15
20
25
30
35
Time (day)
H2 in R1
H2 in R2
H2 in R3
CH4 in R1
CH4 in R2
CH4 in R3

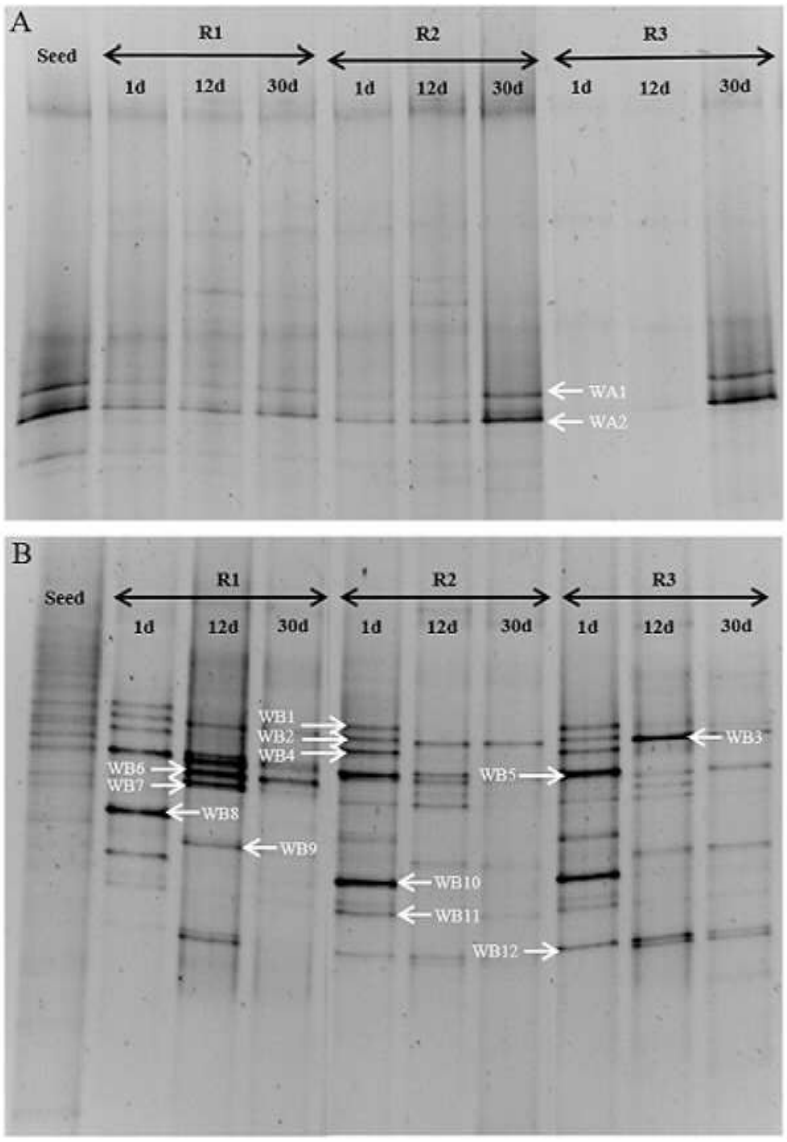
도면3


A
B
C
Concentration (COD eq mg/L)
Time (day)
tVFAs
Acetate
Propionate
Butyrate

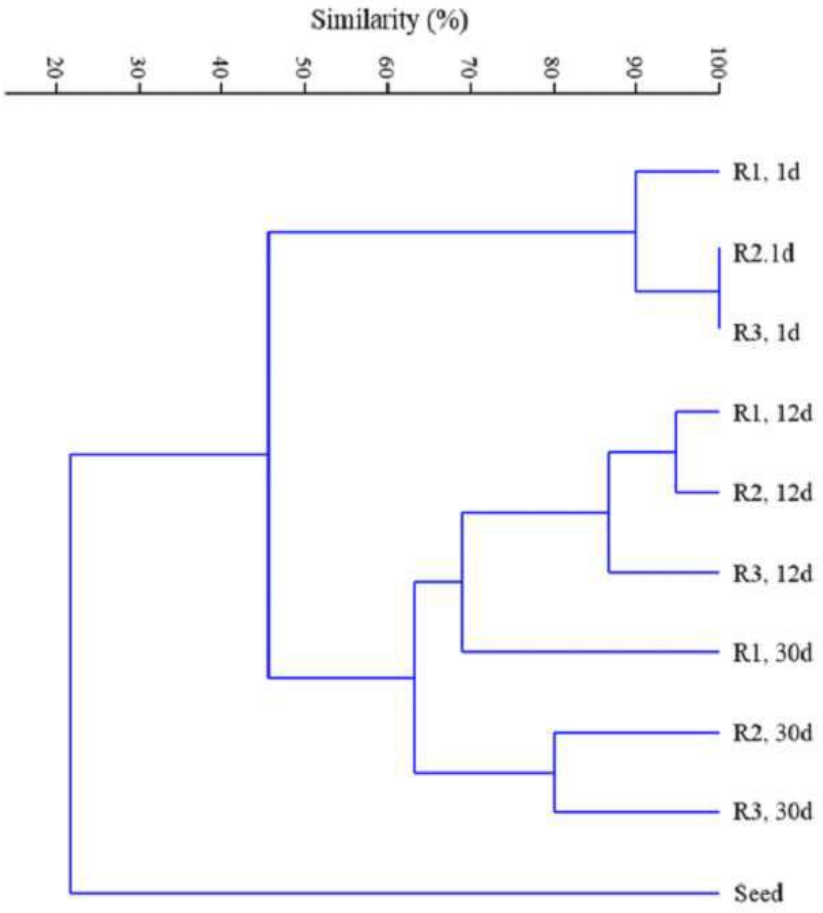
도면4


Total VFA concentration (mg/L)
5000
4000
3000
2000
1000
0
8.1%
34.4%
19.9%
37.7%
8.0%
32.1%
9.6%
50.3%
7.8%
24.5%
12.6%
55.1%
Others
Butyrate
Propionate
Acetate
R1
R2
R3
Reactors

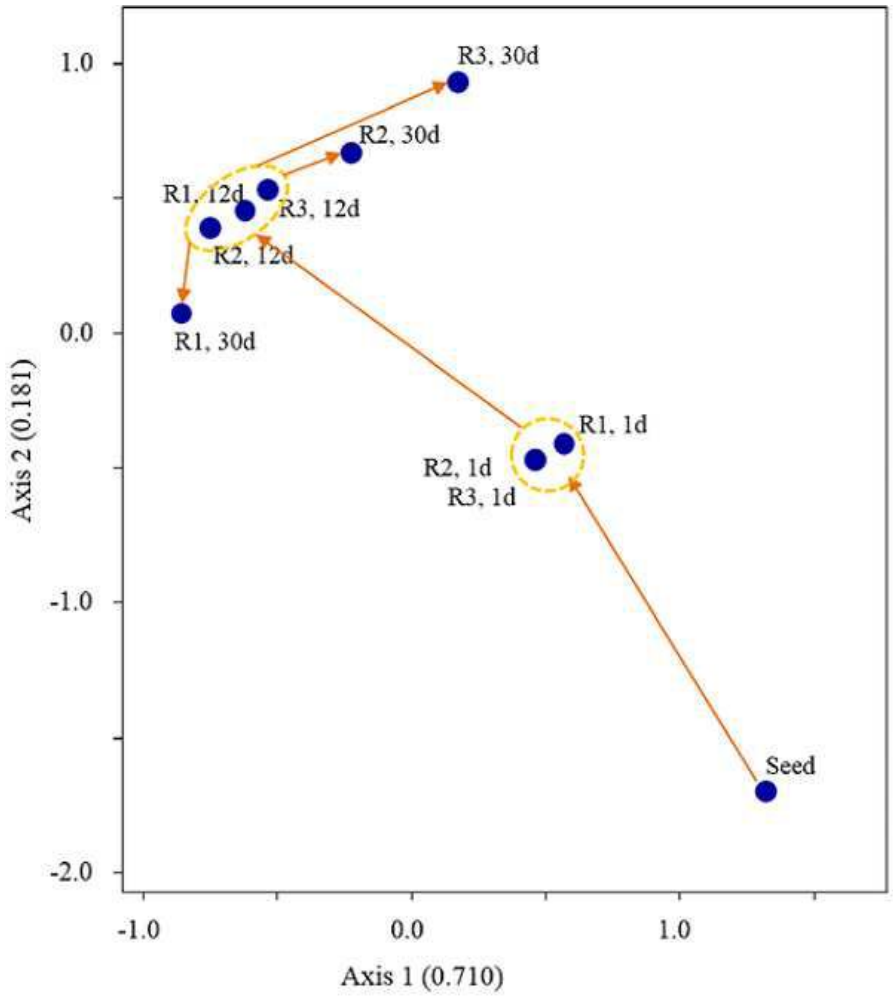
도면5


A
Seed
R1
R2
R3
1d
12d
30d
WA1
WA2
B
WB1
WB2
WB3
WB4
WB5
WB6
WB7
WB8
WB9
WB10
WB11
WB12

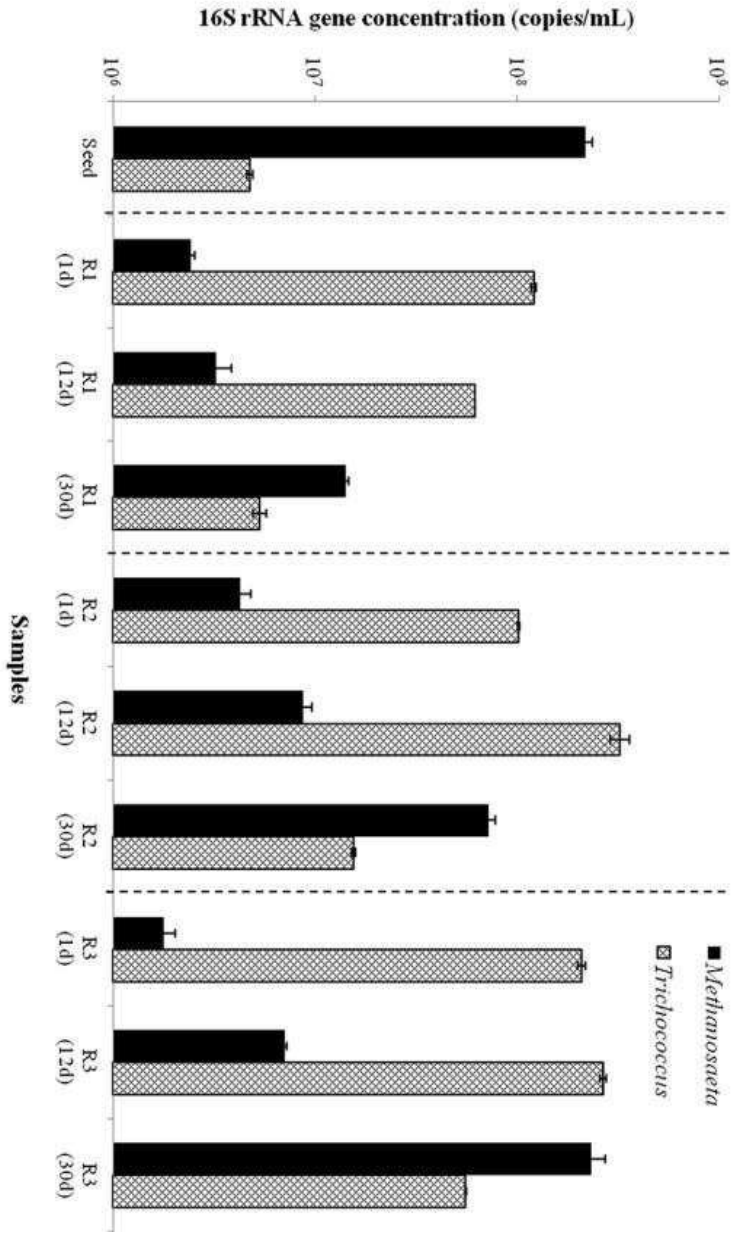
도면6


Similarity (%)
20
30
40
50
60
70
80
90
100
R1, 1d
R2.1d
R3, 1d
R1, 12d
R2, 12d
R3, 12d
R1, 30d
R2, 30d
R3, 30d
Seed

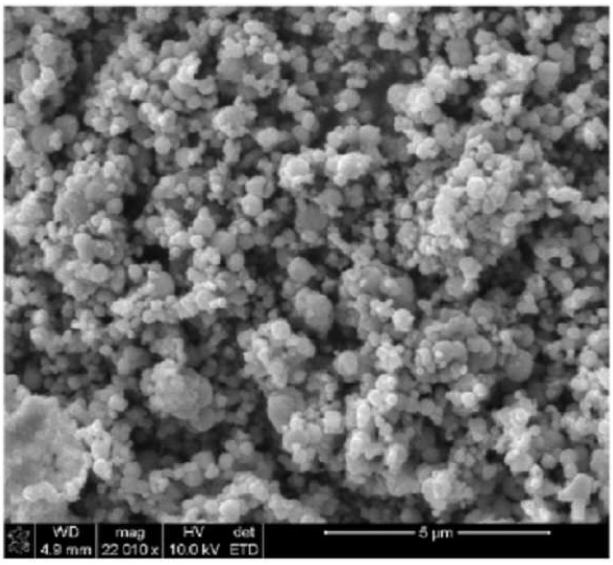
도면7


R3, 30d
R2, 30d
R1, 12d
R3, 12d
R2, 12d
R1, 30d
R1, 1d
R2, 1d
R3, 1d
Seed
1.0
0.0
-1.0
-2.0
Axis 2 (0.181)
-1.0
0.0
1.0
Axis 1 (0.710)

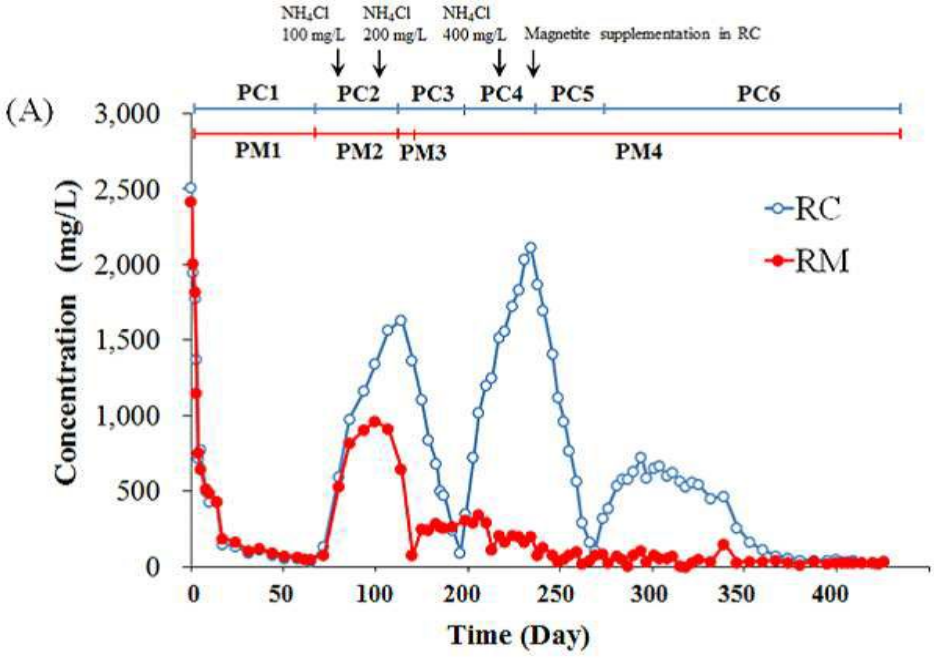
도면8


16S rRNA gene concentration (copies/mL)
10^6
10^7
10^8
10^9
Seed
R1 (1d)
R1 (12d)
R1 (30d)
R2 (1d)
R2 (12d)
R2 (30d)
R3 (1d)
R3 (12d)
R3 (30d)
Samples
Methanosaeta
Trichococcus

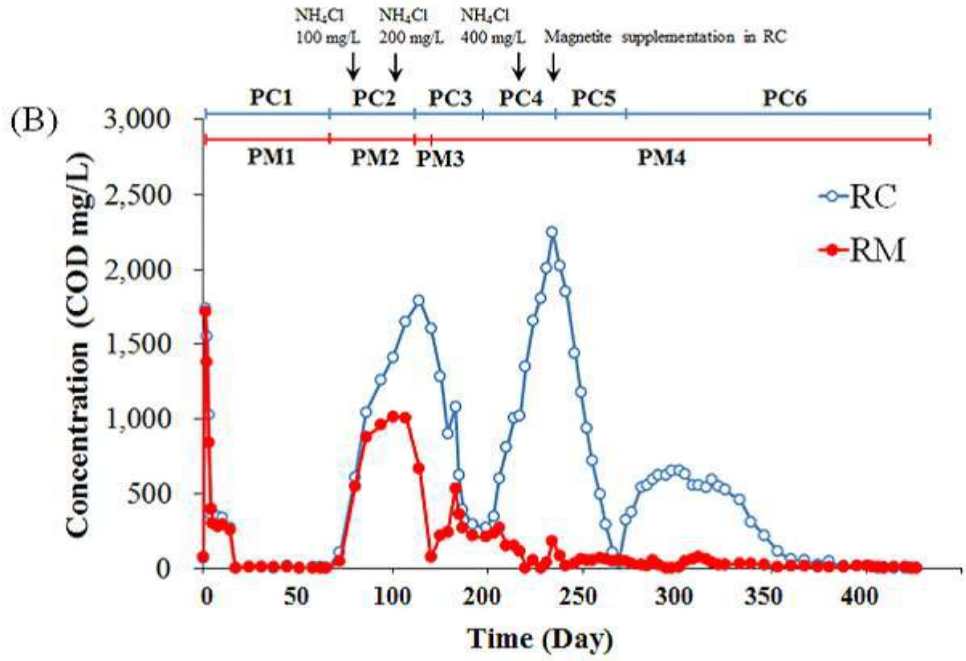
도면9


WD
4.9 mm
mag
22.010 x
HV
10.0 kV
det
ETD
5 µm

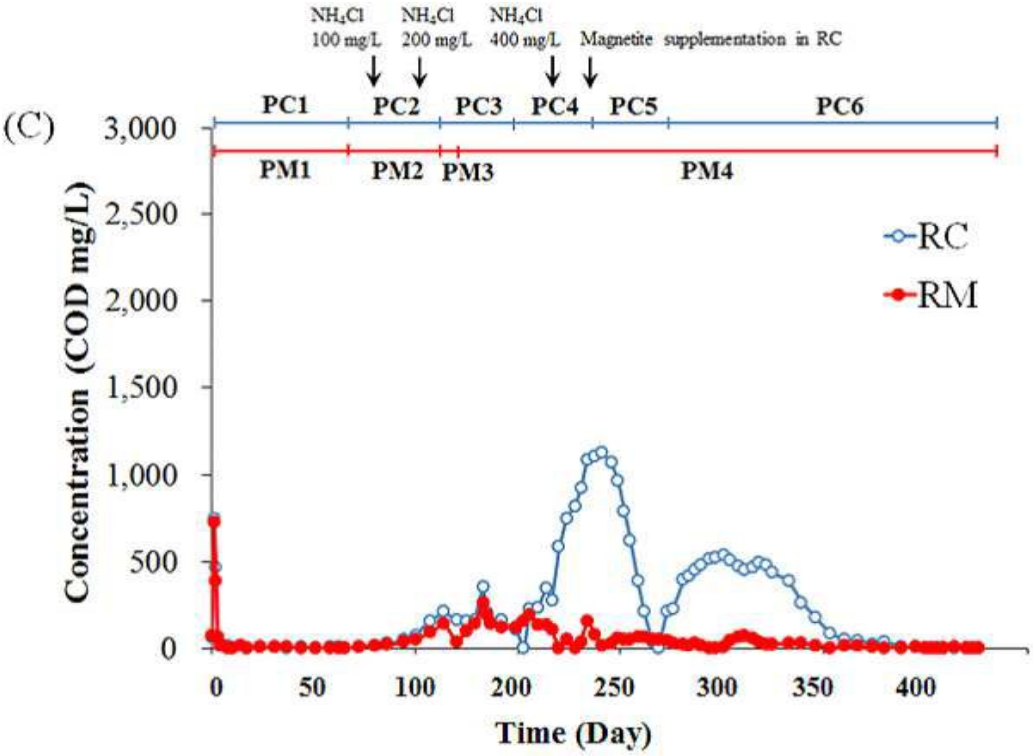
도면10


NH4Cl
100 mg/L
NH4Cl
200 mg/L
NH4Cl
400 mg/L
Magnetite supplementation in RC
(A)
PC1
PC2
PC3
PC4
PC5
PC6
PM1
PM2
PM3
PM4
RC
RM
Concentration (mg/L)
3,000
2,500
2,000
1,500
1,000
500
0
0
50
100
200
250
300
350
400
Time (Day)

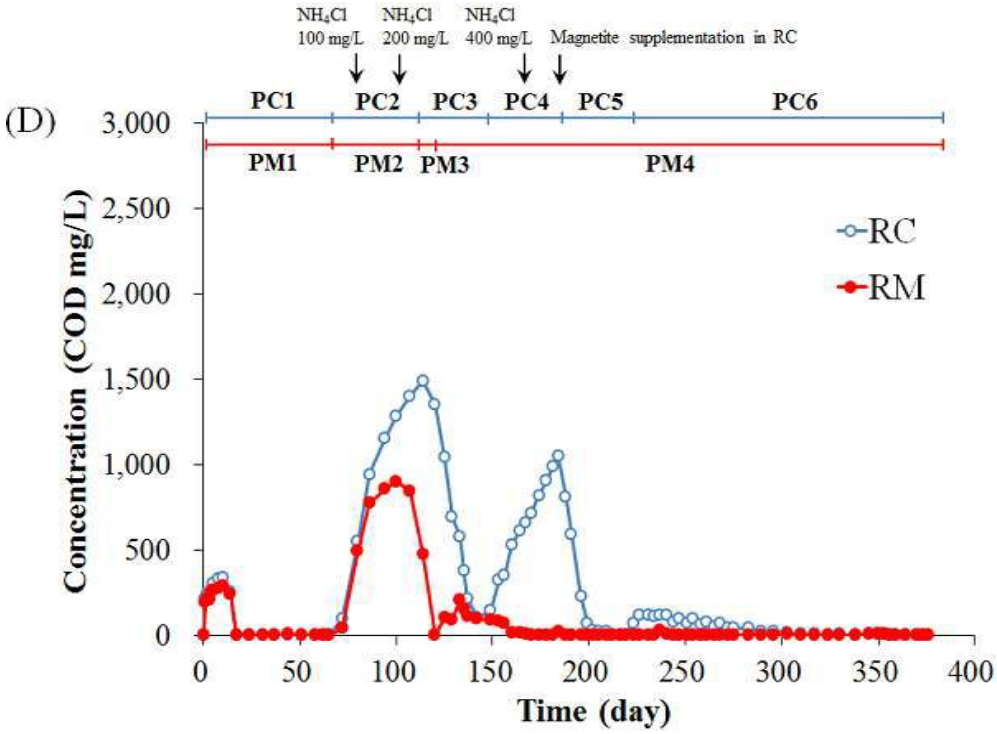
도면11


NH4Cl 100 mg/L
NH4Cl 200 mg/L
NH4Cl 400 mg/L
Magnetite supplementation in RC
PC1
PC2
PC3
PC4
PC5
PC6
PM1
PM2
PM3
PM4
(B)
Concentration (COD mg/L)
Time (Day)
RC
RM

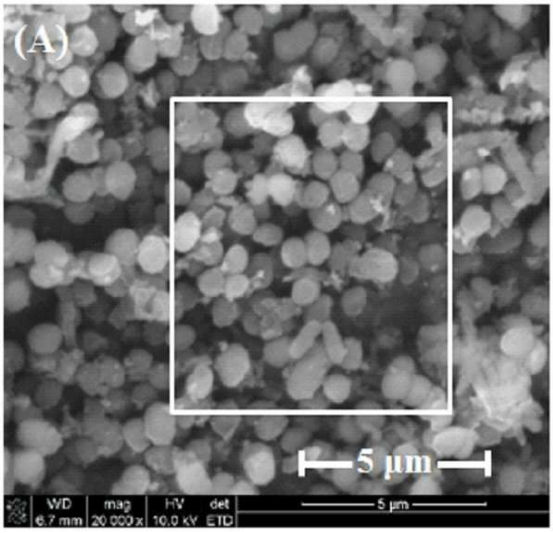
도면12


NH4Cl 100 mg/L
NH4Cl 200 mg/L
NH4Cl 400 mg/L
Magnetite supplementation in RC
PC1
PC2
PC3
PC4
PC5
PC6
PM1
PM2
PM3
PM4
(C)
Concentration (COD mg/L)
Time (Day)
RC
RM

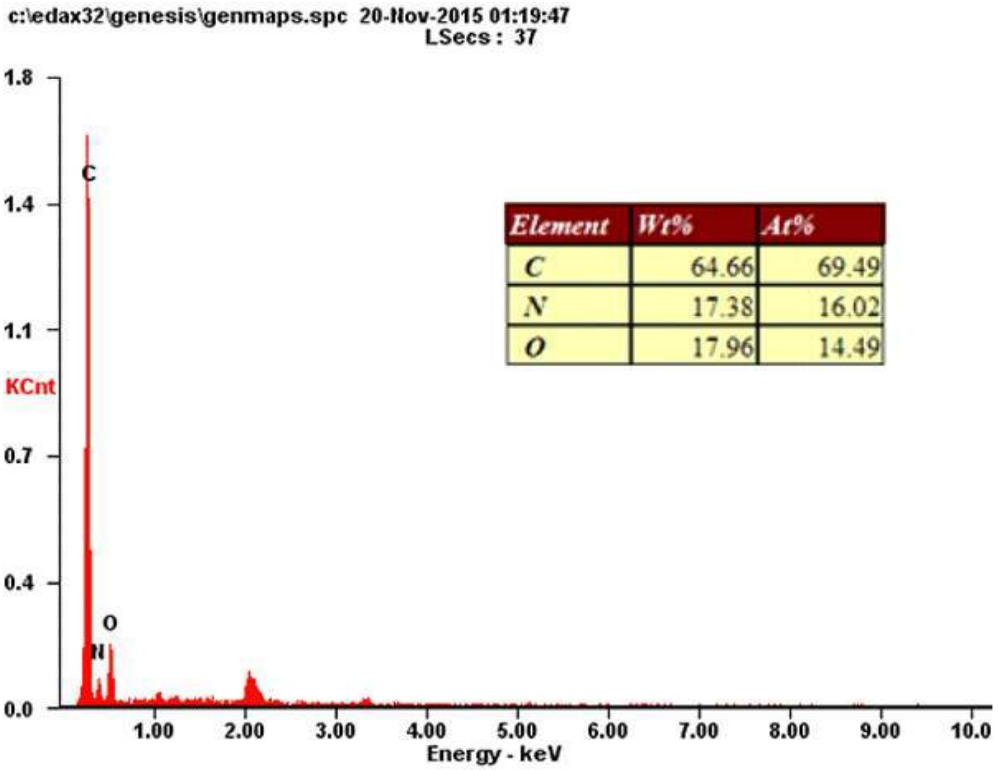
도면13


NH4Cl 100 mg/L
NH4Cl 200 mg/L
NH4Cl 400 mg/L
Magnetite supplementation in RC
(D)
PC1
PC2
PC3
PC4
PC5
PC6
PM1
PM2
PM3
PM4
RC
RM
Concentration (COD mg/L)
Time (day)
3,000
2,500
2,000
1,500
1,000
500
0
0
50
100
150
200
250
300
350
400

도면14

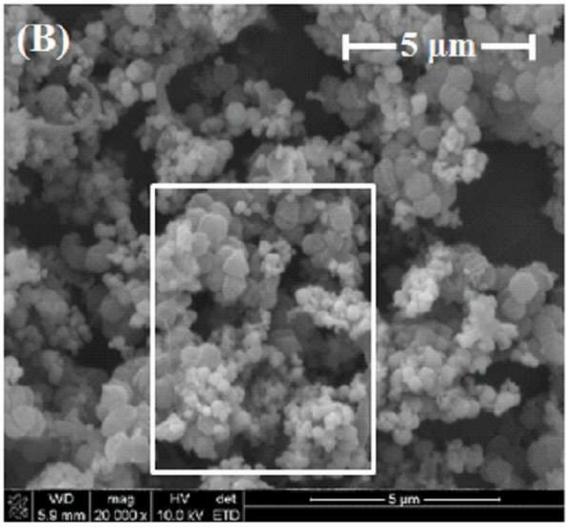

(A)
5 μm

도면15

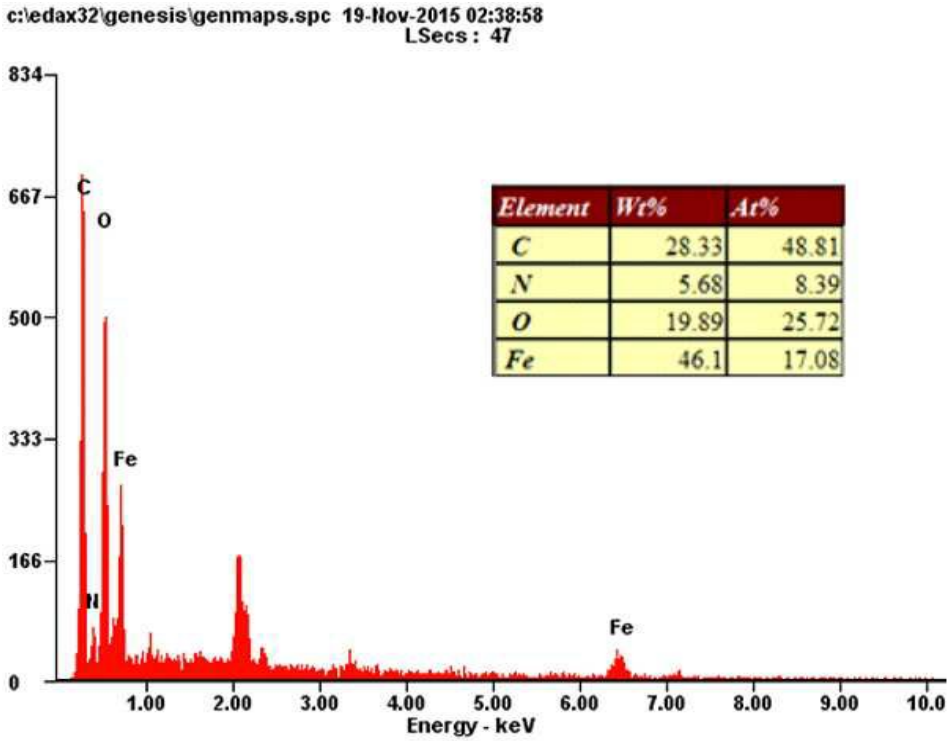


Element	Wt%	At%
C	64.66	69.49
N	17.38	16.02
O	17.96	14.49

도면16

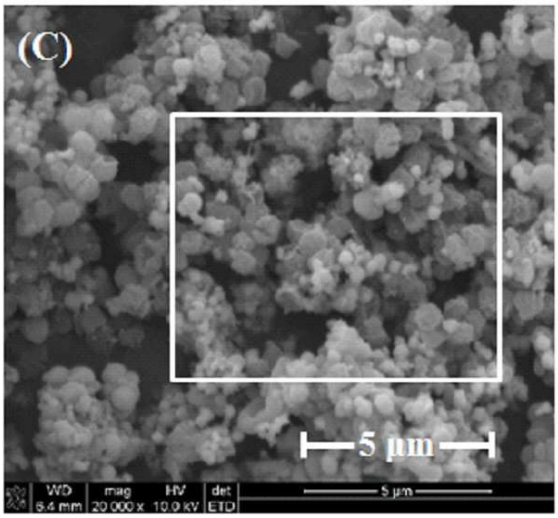


도면17

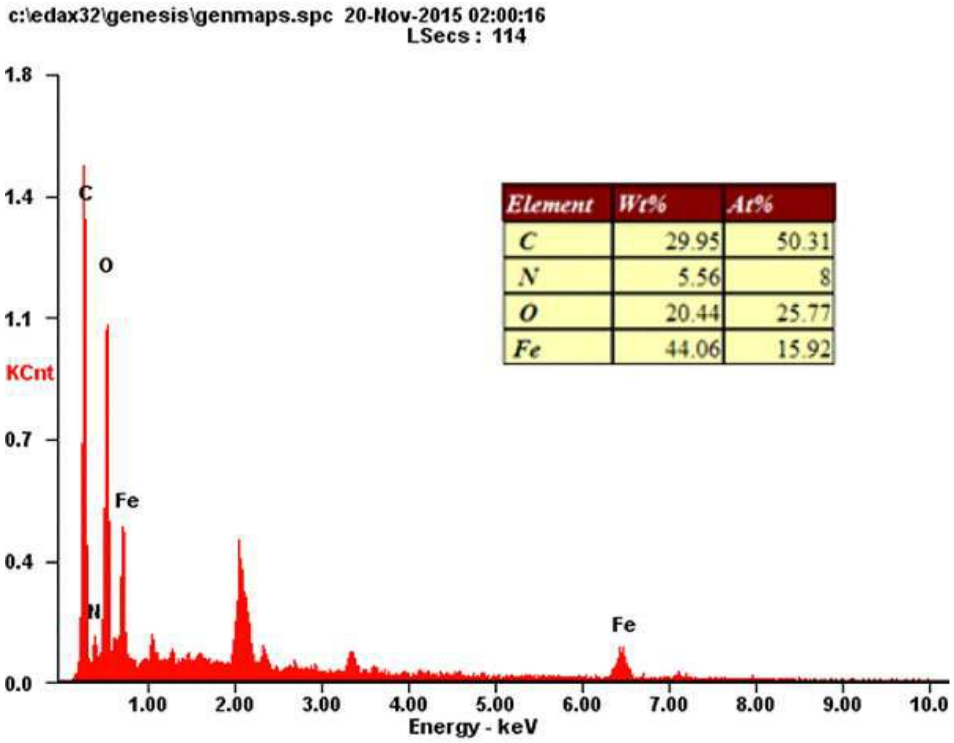


Element	Wt%	At%
C	28.33	48.81
N	5.68	8.39
O	19.89	25.72
Fe	46.1	17.08

도면18

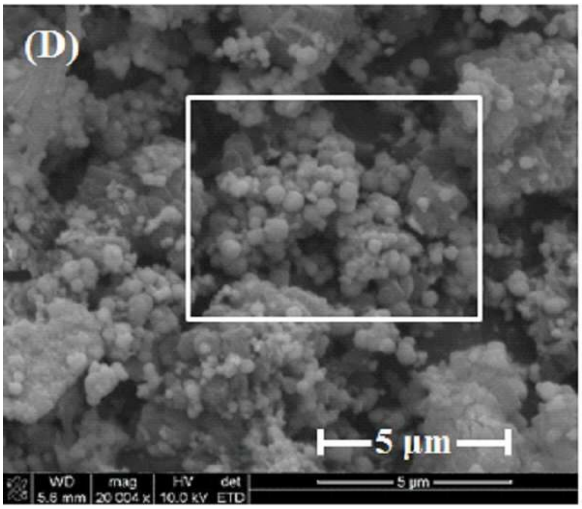


도면19

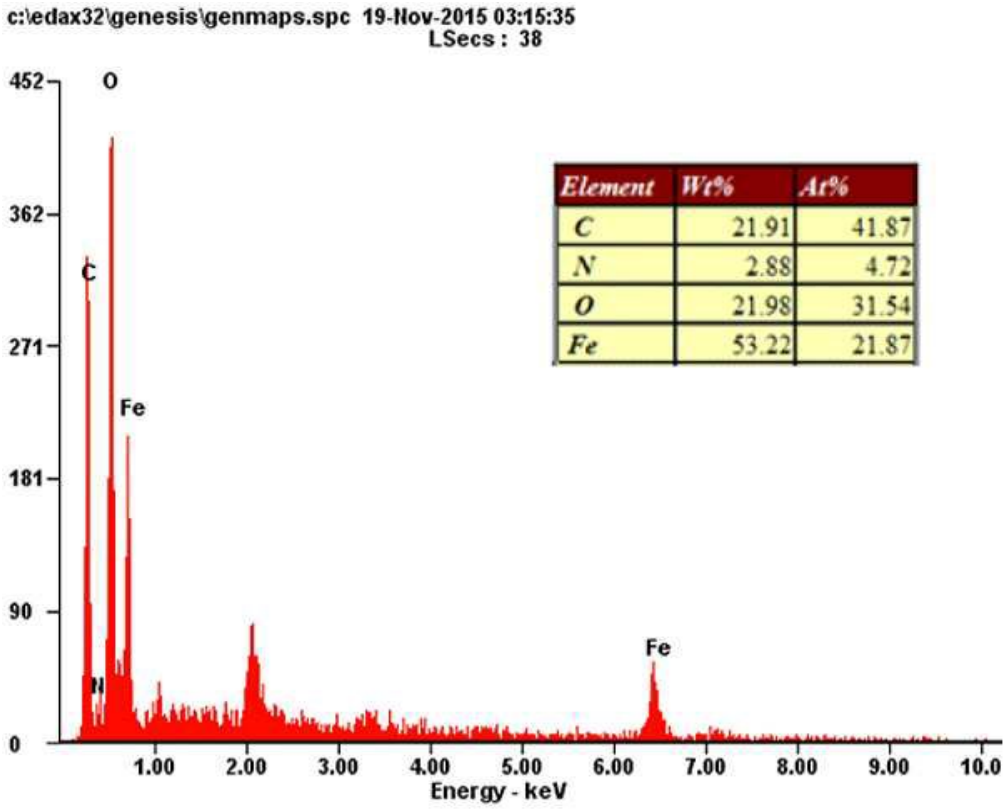


Element	Wt%	At%
C	29.95	50.31
N	5.56	8
O	20.44	25.77
Fe	44.06	15.92

도면20

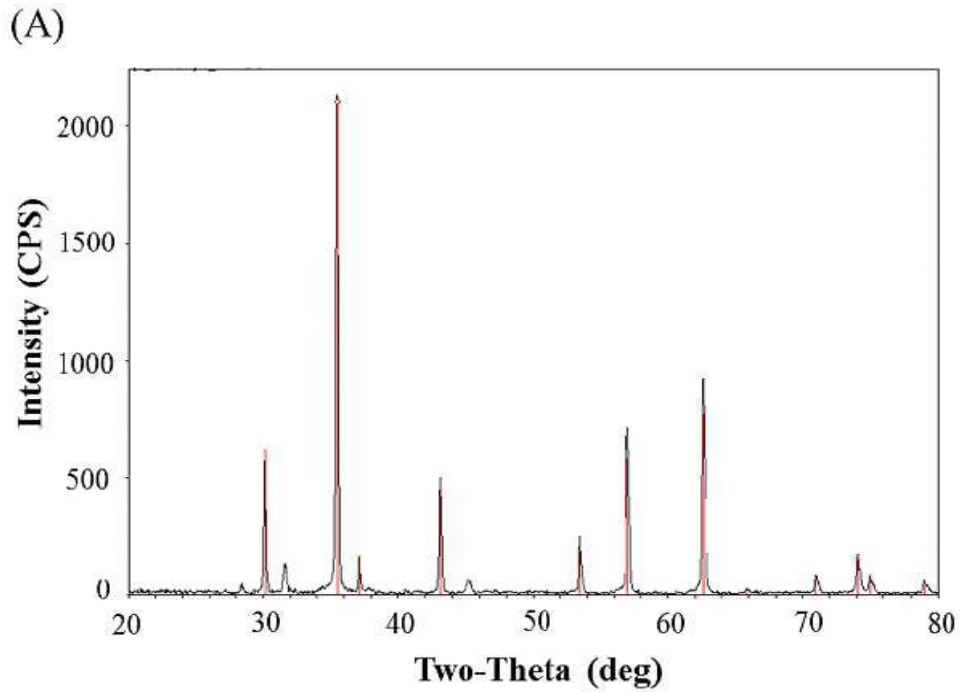


도면21

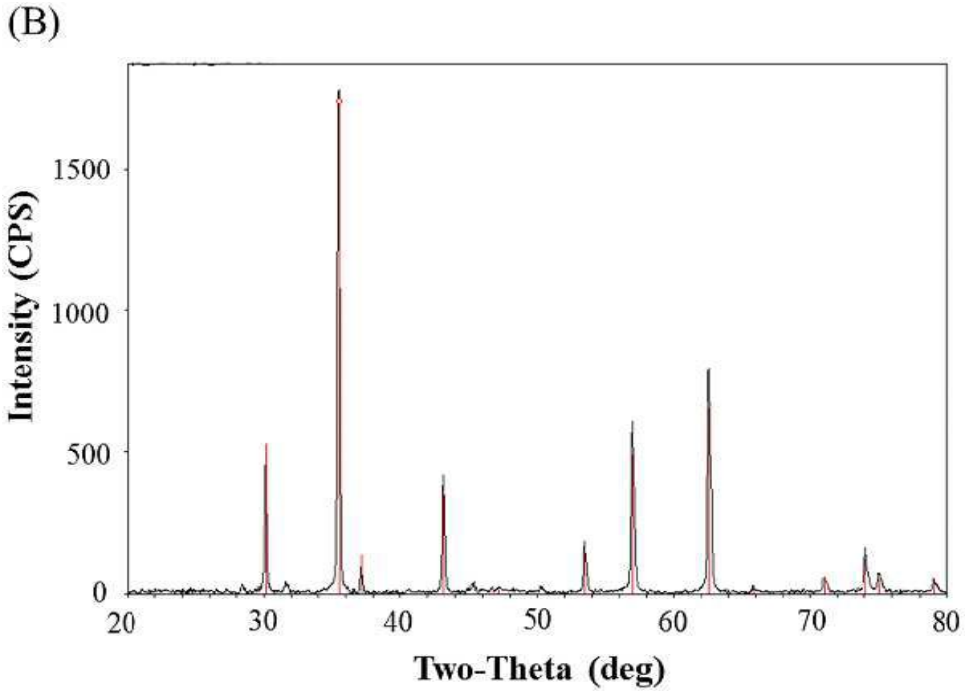


Element	Wt%	At%
C	21.91	41.87
N	2.88	4.72
O	21.98	31.54
Fe	53.22	21.87

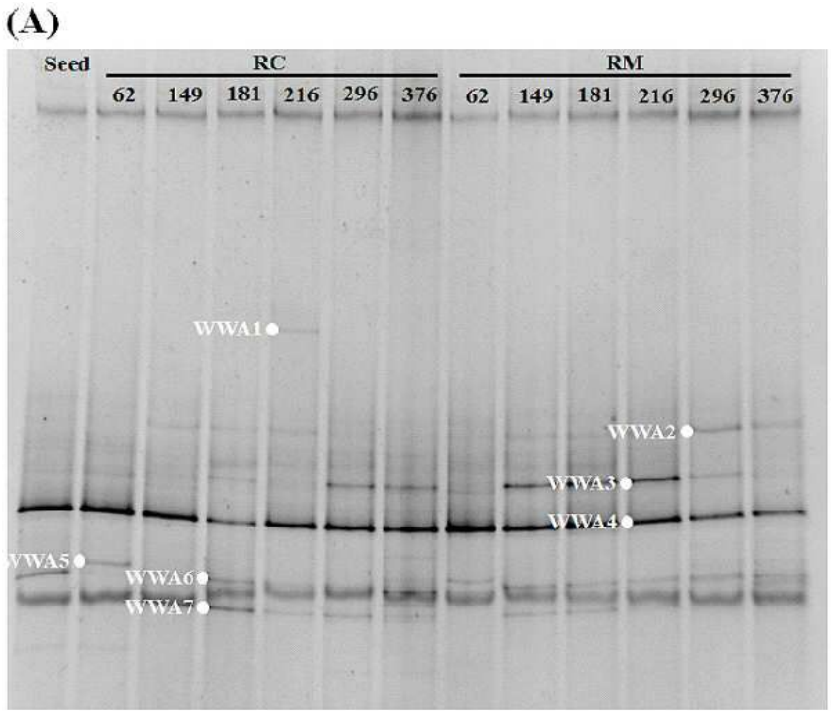
도면22



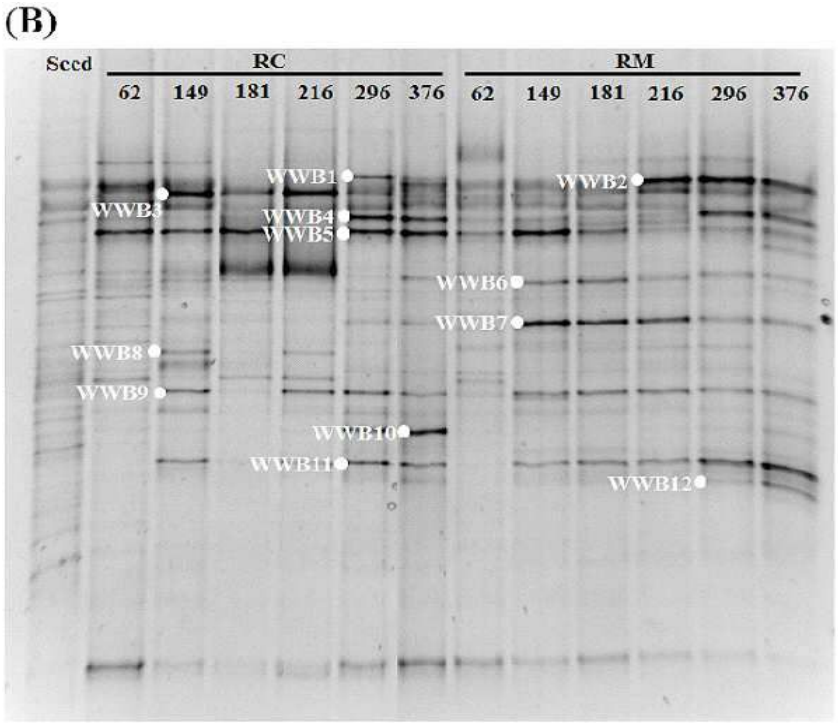
도면23


(B)
Intensity (CPS)
1500
1000
500
0
20
30
40
50
60
70
80
Two-Theta (deg)

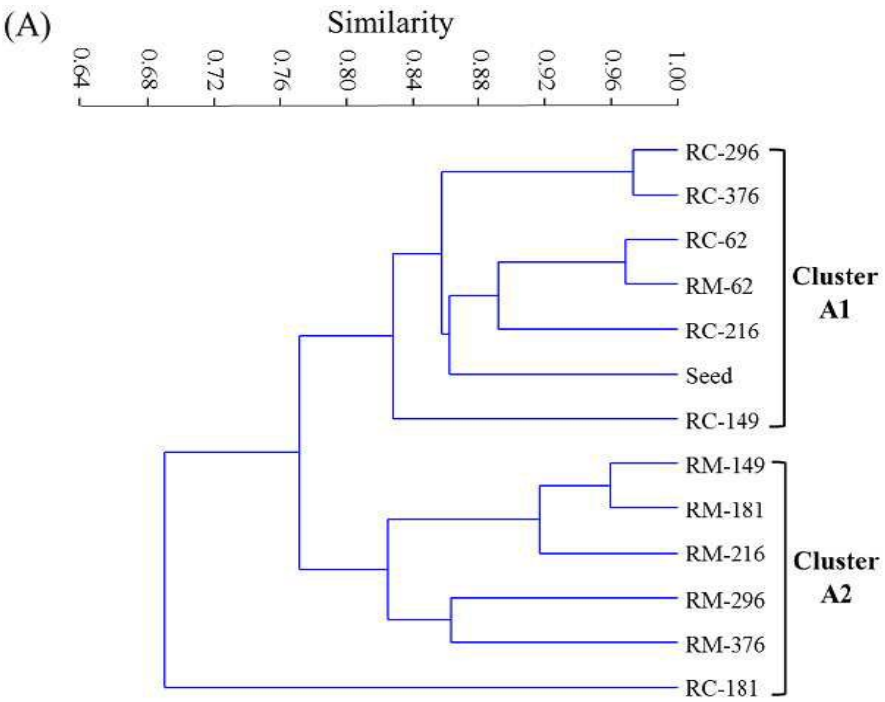
도면24


(A)
Seed
RC
RM
62
149
181
216
296
376
62
149
181
216
296
376
WWA1
WWA2
WWA3
WWA4
WWA5
WWA6
WWA7

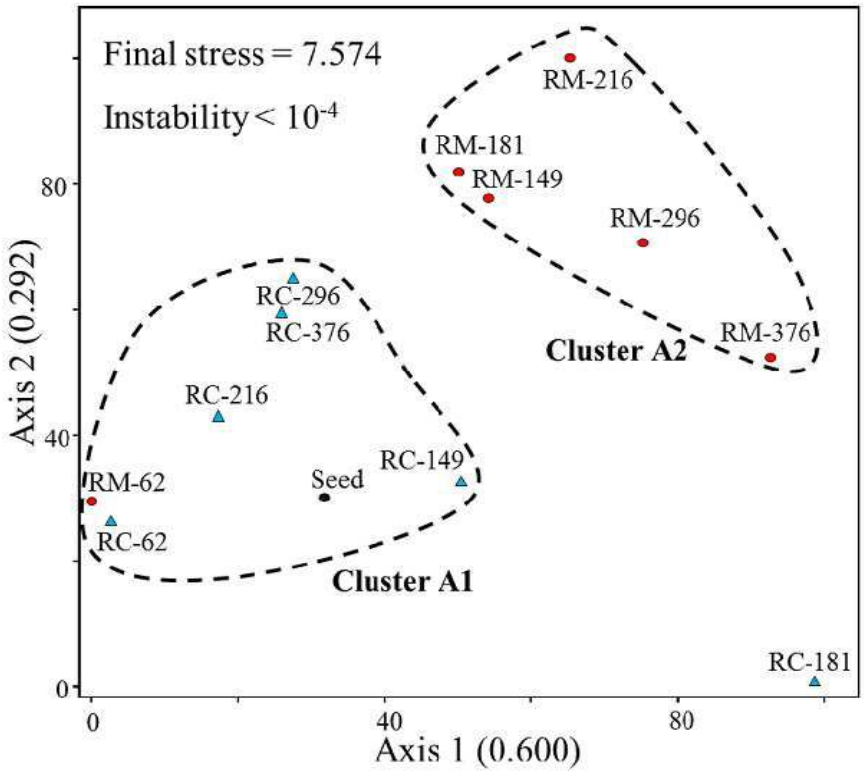
도면25


(B)
Seed
RC
RM
62
149
181
216
296
376
62
149
181
216
296
376
WWB1
WWB2
WWB3
WWB4
WWB5
WWB6
WWB7
WWB8
WWB9
WWB10
WWB11
WWB12

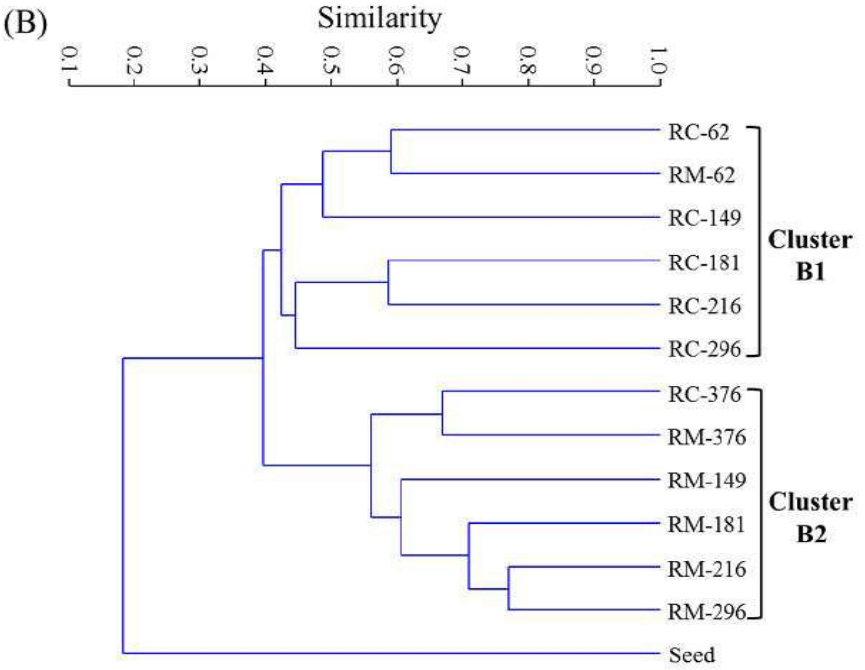
도면26


(A)
Similarity
0.64
0.68
0.72
0.76
0.80
0.84
0.88
0.92
0.96
1.00
RC-296
RC-376
RC-62
RM-62
RC-216
Seed
RC-149
RM-149
RM-181
RM-216
RM-296
RM-376
RC-181
Cluster A1
Cluster A2

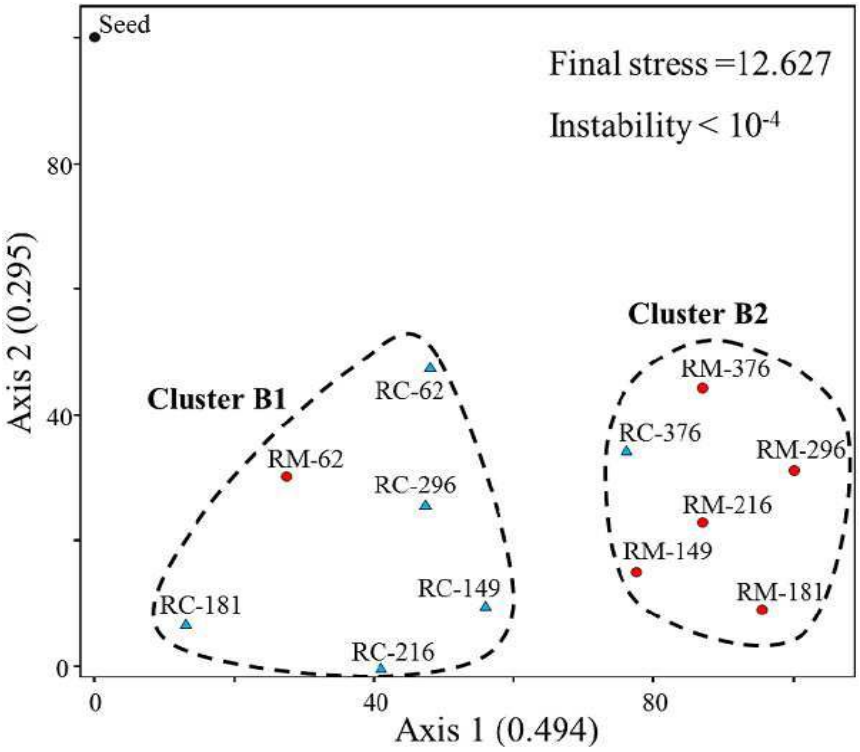
도면27


Final stress = 7.574
Instability < 10^{-4}
RM-216
RM-181
RM-149
RM-296
RC-296
RC-376
RM-376
Cluster A2
RC-216
RC-149
RM-62
Seed
RC-62
Cluster A1
RC-181
Axis 2 (0.292)
Axis 1 (0.600)
0
40
80

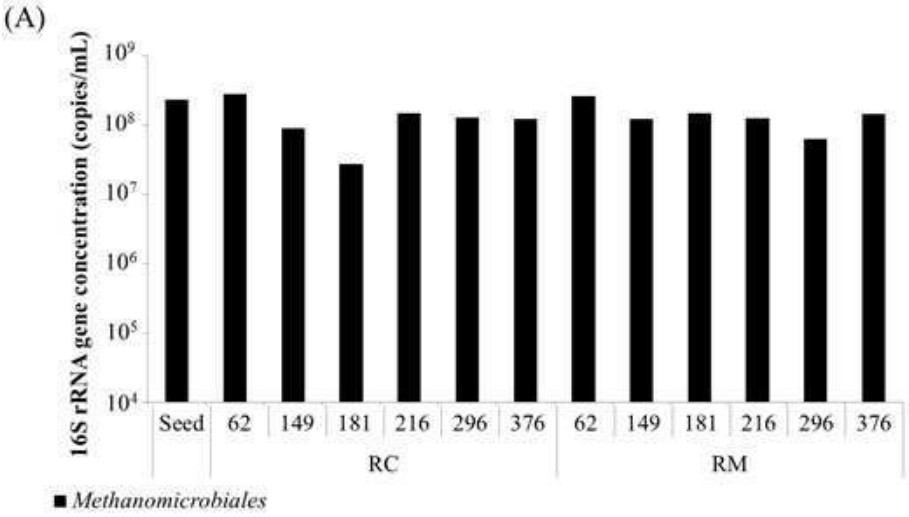
도면28


(B)
Similarity
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
0.8
0.9
1.0
RC-62
RM-62
RC-149
RC-181
RC-216
RC-296
Cluster B1
RC-376
RM-376
RM-149
RM-181
RM-216
RM-296
Cluster B2
Seed

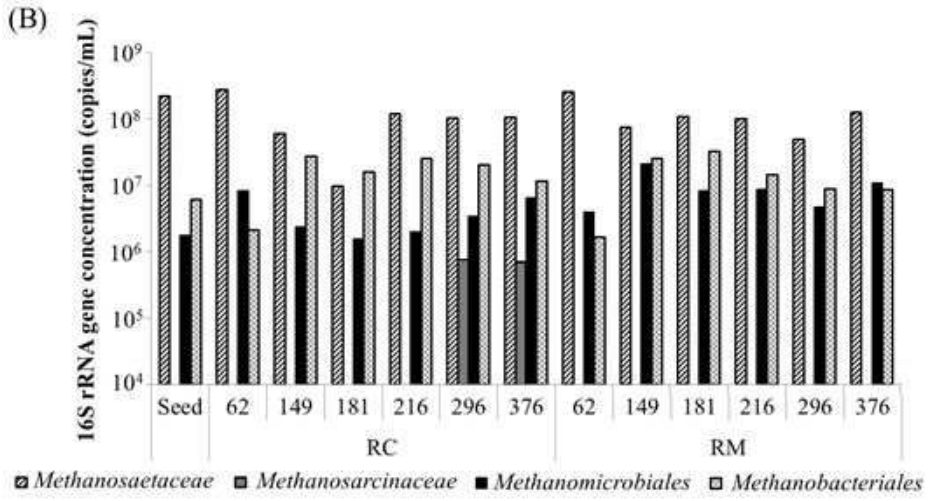
도면29


Seed
Final stress =12.627
Instability < 10-4
Cluster B1
Cluster B2
RC-62
RM-62
RC-296
RC-181
RC-149
RC-216
RM-376
RC-376
RM-296
RM-216
RM-149
RM-181
Axis 2 (0.295)
Axis 1 (0.494)
0
40
80

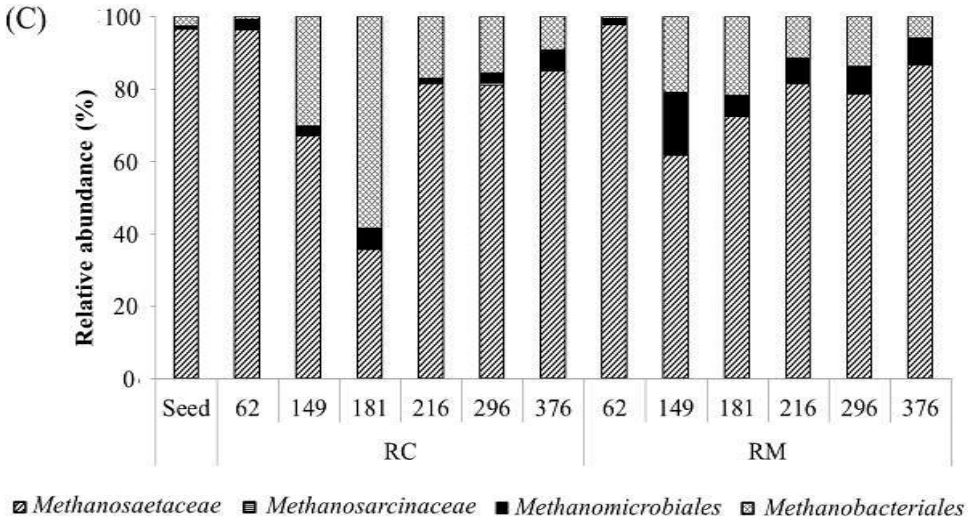
도면30


(A)
16S rRNA gene concentration (copies/mL)
Seed
62
149
181
216
296
376
RC
RM
Methanomicrobiales

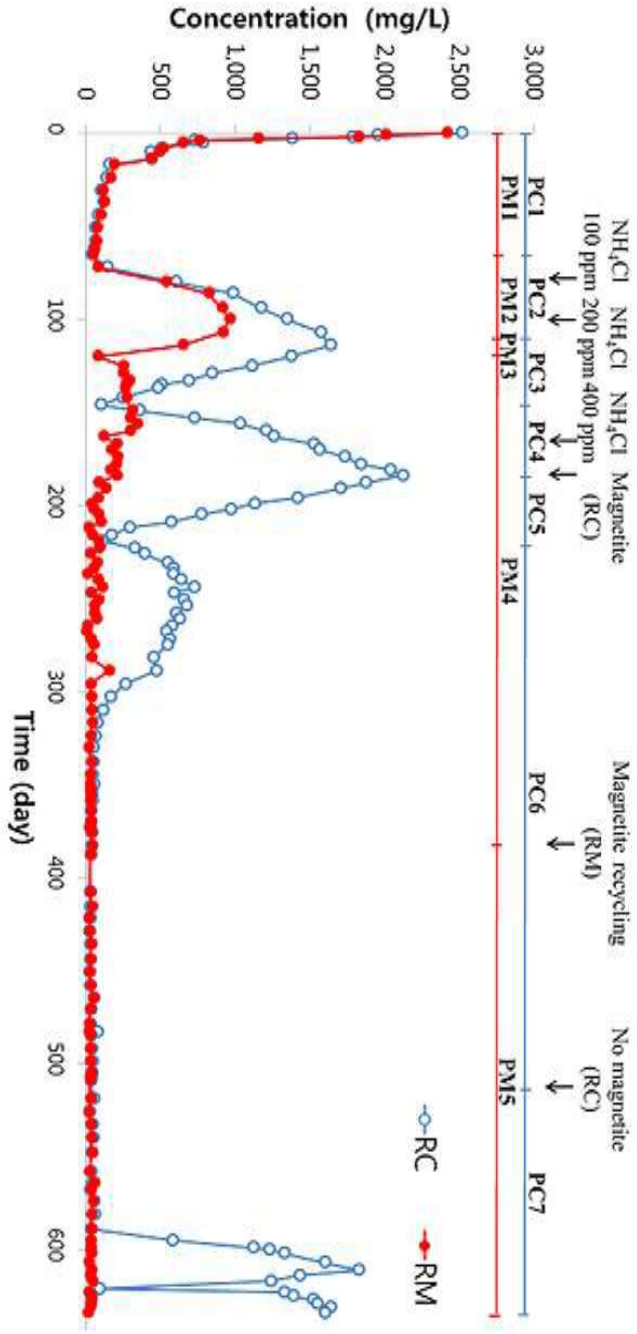
도면31


(B)
16S rRNA gene concentration (copies/mL)
10^9
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
Seed
62
149
181
216
296
376
62
149
181
216
296
376
RC
RM
Methanosaetaceae
Methanosarcinaceae
Methanomicrobiales
Methanobacteriales

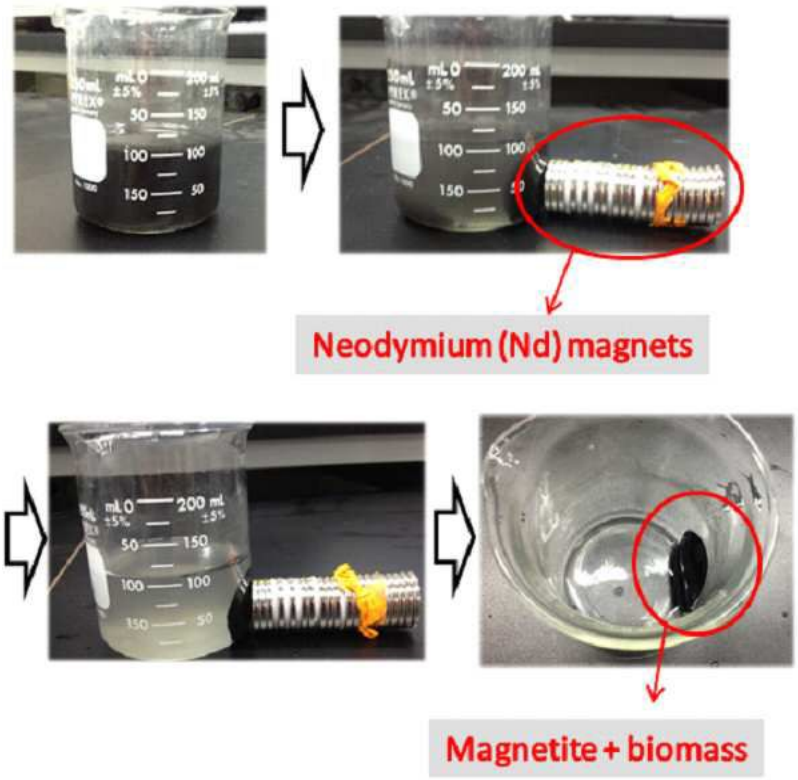
도면32


(C)
Relative abundance (%)
100
80
60
40
20
0
Seed
62
149
181
216
296
376
62
149
181
216
296
376
RC
RM
Methanosaetaceae
Methanosarcinaceae
Methanomicrobiales
Methanobacteriales

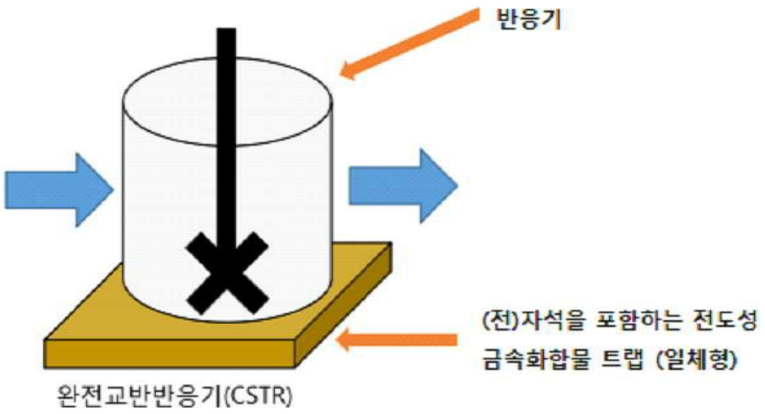
도면33


Concentration (mg/L)
0
500
1,000
1,500
2,000
2,500
3,000
Time (day)
0
100
200
300
400
500
600
NH4Cl
100 ppm
NH4Cl
200 ppm
NH4Cl
400 ppm
Magnetite
(RC)
Magnetite recycling
(RM)
No magnetite
(RC)
PC1
PC2
PC3
PC4
PC5
PC6
PC7
PM1
PM2
PM3
PM4
PM5
RC
RM

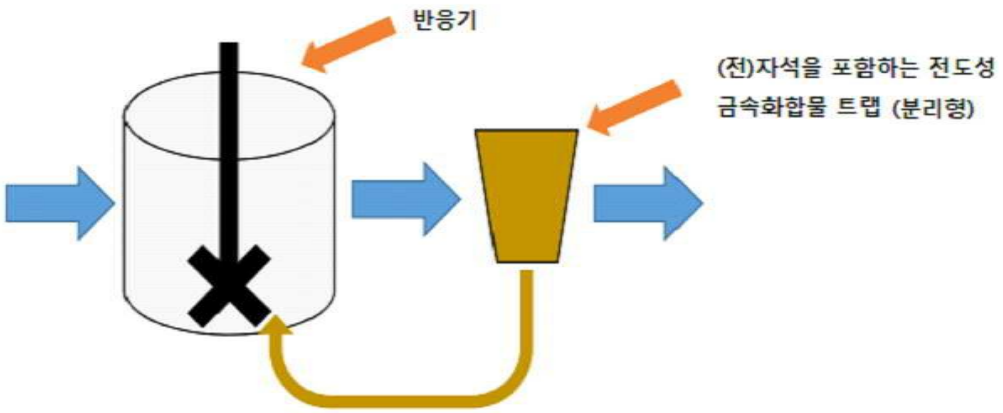
도면34


Neodymium (Nd) magnets
Magnetite + biomass

도면35


반응기
(전)자석을 포함하는 전도성
금속화합물 트랩 (일체형)
완전교반반응기(CSTR)

도면36



서 열 목 록

<110> UNIST(ULSAN NATIONAL INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY)

<120> Method and Device for Treating Organic Waste Using Iron Oxide

<130> DPP20160415KR

<160> 32

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ARC787F

<400> 1

attagatacc csbgtagtcc 20

<210> 2

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ARC1059R

<400> 2

gccatgcacc wcctct 16

<210> 3

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BAC338F

<400> 3

actcctacgg gaggcag 17

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BAC805R

<400> 4

gactaccagg gtatctaatc c 21

<210> 5

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 40-base gas chromatograph (GC) clamp

<400> 5

cgcccgccgc gcgcggcggg cggggcgggg gcacggggg 39

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mst702F

<400> 6

taatcctyga rggaccacca 20

<210> 7

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mst862R

<400> 7

cctacggcac cracmac 17

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TaqMan probe

<400> 8

acggcaaggg acgaaagcta gg 22

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Trich555F

<400> 9

gtcttgacat cctttgacaa t 21

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Trich2723R

<400> 10

ttgacctcgc ggtcttgct 19

<210> 11

<211> 443

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KP241962.1

<400> 11

actcctacgg gaggcagcag tggggaatat tgcacaatgg gggaaaccct gatgcagcaa 60

cgccgcgtga gtgatgaagg ccttcgggtt gtaaagctct gtccttgggg acgataatga 120

cggtacccaa ggaggaagcc acggctaact acgtgccagc agccgcggta atacgtaggt 180

ggcaagcgtt gtccggattt actgggcgta aagggagcgt aggtggatat ttaagtggga 240

tgtgaaatac tcgggcttaa cctgggtgct gcattccaaa ctggatatct agagtgcagg 300

agaggaaagt agaattccta gtgtagcggt gaaatgcgta gagattagga agaataccag 360

tggcgaaggc gactttctgg actgtaactg acactgaggc tcgaaagcgt ggggagcaaa 420

caggattaga taccctggta gtc 443

<210> 12

<211> 443

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KP241963.1

<400> 12

actcctacgg gaggcagcag tggggaatat tgcgcaatgg gggaaaccct gatgcagcaa 60

cgccgcgtga gtgatgacgg tcttcggatt gtaaagctct gtcttcaggg acgataatga 120

cggtacctga ggaggaagcc acggctaact acgtgccagc agccgcggta atacgtaggt 180

ggcgagcgtt gtccggattt actgggcgta aagggagcgt aggcggattt ttaagtgaga 240

tgtgaaatac ccgggctcaa cttgggtgct gcatttcaaa ctggaagtct agagtgcagg 300

agaggagagt ggaattccta gtgtagcggt gaaatacgta gagattagga agaacaccag 360

tggcgaaggc gactctctgg actgtaactg acgctgaggc tcgaaagcgt ggggagcaaa 420

caggattaga taccctggta gtc 443

<210> 13

<211> 463

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KP241964.1

<400> 13

actcctacgg gaggcagcag tgaggaatat tggtcaatgg gcgagagcct gaaccagcca 60

agtcgcgtga aggaagaagg atctatggtt cgtaaacttc ttttgcaggg gaataaagtg 120

cgggacgtgt cctgttttgt atgtaccctg agaataagga tcggctaact ccgtgccagc 180

agccgcggta atacggagga tccgagcgtt atccggattt attgggttta aagggtgcgt 240

aggtggtttt ataagtcagc ggtgaaagtt tgcagcttaa ctgtaaaaat gccgttgaaa 300

ctgtaagact tgagtgtaaa tgaggtaggc ggaatgcgtg gtgtagcggt gaaatgcata 360

gatatcacgc agaactccga ttgcgaaggc agcttactaa gctacaactg acactgaagc 420

acgaaagcgt ggggatcaaa caggattaga taccctggta gtc 463

<210> 14

<211> 443

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KP241965.1

<400> 14

actcctacgg gaggcagcag tggggaatat tgcacaatgg gggaaaccct gatgcagcaa 60

cgccgcgtga gtgatgacgg tcttcggatt gtaaagctct gtcttcaggg acgataatga 120

cggtacctga ggaggaagcc acggctaact acgtgccagc agccgcggta atacgtaggt 180

ggcaagcgtt gtccggattt actgggcgta aagggagcgt aggtggatat ttaagtggga 240

tgtgaaatac tcgggcttaa cctgagtgct gcattccaaa ctggatatct agagtgcagg 300

agaggaaagt agaattccta gtgtagcggt gaaatgcgta gagattagga agaataccag 360

tggcgaaggc gactttctgg actgtaactg acactgaggc tcgaaagcgt ggggagcaaa 420

caggattaga taccctggta gtc 443

<210> 15

<211> 445

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KP241966.1

<400> 15

actcctacgg gaggcagcag tggggaatat tgcgcaatgg gggaaaccct gacgcagcaa 60

cgccgcgtga atgatgaagg tcttcggatc gtaaagttct atcagcaggg atgaattttt 120

gacagtacct gactaagaag ccccggctaa ctacgtgcca gcagccgcgg taatacgtag 180

ggggcaagcg ttatccggat ttactgggtg taaagggtgc gtagccggaa aagtaagtca 240

gatgtgaaag cccgaagctc aacttcggga ctgcatttga aactactttt ctagagtgta 300

ggagaggaaa gtggaattcc tagtgtagcg gtgaaatgcg tagagattag gaggaacacc 360

agtggcgaag gcgactttct ggactataac tgacggtgag gcacgaaagc gtggggagca 420

aacaggatta gataccctgg tagtc 445

<210> 16

<211> 469

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KP241967.1

<400> 16

actcctacgg gaggcagcag tggggaatat tggacaatgg ggggaaccct gatccagcca 60

tgccgcgtgt gtgaagaagg ccttttggtt gtaaagcact ttaagcgagg aggaggctct 120

cttggttaat acctaagaag agtggacgtt actcgcagaa taagcaccgg ctaactctgt 180

gccagcagcc gcggtaatac agagggtgcg agcgttaatc ggatttactg ggcgtaaagc 240

gcgcgtaggt ggctaattaa gtcaaatgtg aaatccccga gcttaacttg ggaattgcat 300

ttgatactgg ttggctagag tatgggagag gatggtagaa ttccaggtgt agcggtgaaa 360

tgcgtagaga tctggaggaa taccgatggc gaaggcagcc atctggccta atactgacac 420

tgaggtgcgt aagcatgggg agcaaacagg attagatacc ctggtagtc 469

<210> 17

<211> 468

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KP241968.1

<400> 17

actcctacgg gaggcagcag tggggaatat tggacaatgg ggggaaccct gatccagcca 60

tgccgcgtgt gtgaagaagg ccttttggtt gtaaagcact ttaagcgagg aggaggctct 120

cttggttaat acctaagaag agtggacgtt actcgcagaa taagcaccgg ctaactctgt 180

gccagcagcc gcggtaatac agagggtgcg agcgttaatc ggatttactg ggcgtaaagc 240

gcgcgtaggt ggctaattaa gtcaaatgtg aaatccccga gcttaacttg ggaattgcat 300

tcgatactgg ttggctagag tatgggagag gatggtagaa ttccaggtgt agcggtgaaa 360

tgcgtagaga tctggaggaa taccgatggc gaaggcagcc atctggccta atactgacac 420

tgaggtgcga aagcatgggg agcaaacagg attagatacc ctggtagt 468

<210> 18

<211> 443

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KP241969.1

<400> 18

actcctacgg gaggcagcag tggggaatat tgcacaatgg gggaaaccct gatgcagcaa 60

cgccgcgtga gtgatgacgg ccttcgggtt gtaaagctct gtcttcaggg acgataatga 120

cggtacctga ggaggaagcc acggctaact acgtgccagc agccgcggta atacgtaggt 180

ggcaagcgtt gtccggattt actgggcgta aagggagcgt aggcggactt ttaagtgaga 240

tgtgaaatac ccgggcttaa cctgggtgct gcatttcaaa ctggaagtct agagtgcagg 300

agaggagaat ggaattccta gtgtagcggt gaaatgcgta gagattagga agaacaccag 360

tggcgaaggc gattctctgg actgtaactg acgctgaggc tcgaaagcgt ggggagcaaa 420

caggattaga taccctggta gtc 443

<210> 19

<211> 468

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KP241970.1

<400> 19

actcctacgg gaggcagcag tggggaatat tggacaatgg ggggaaccct gatccagcca 60

tgccgcgtgt gtgaagaagg ccttttggtt gtaaagcact ttaagtgggg aggaggctta 120

cctggttaat acctaggata agtggacgtt acccacagaa taagcaccgg ctaactctgt 180

gccagcagcc gcggtaatac agagggtgcg agcgttaatc ggatttactg ggcgtaaagc 240

gcgcgtaggt ggttaattaa gtcaaatgtg aaatccccga gcttaacttg ggaattgcat 300

tcgatactgg ttagctagag tatgggagag gatggtagaa ttccaggtgt agcggtgaaa 360

tgcgtagaga tctggaggaa taccgatggc gaaggcagcc atctggccta atactgacac 420

tgaggtgcga aagcatgggg agcaaacagg attagatacc ctggtagt 468

<210> 20

<211> 443

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KP241971.1

<400> 20

actcctacgg gaggcagcag tggggaatat tgcacaatgg gggaaaccct gatgcagcaa 60

cgccgcgtga gtgatgaagg ttttcggatc gtaaagctct gtcttcaggg acgataatga 120

cggtacctga ggaggaagcc acggctaact acgtgccagc agccgcggta atacgtaggt 180

ggcgagcgtt gtccggattt actgggcgta aagggagcgt aggcggattt ttaagtgaga 240

tgtgaaatac ccgggctcaa cttgggtgct gcatttcaaa ctggaagtct agagtgcagg 300

agaggagagt ggaattccta gtgtagcggt gaaatgcgta gagattagga agaacaccag 360

tggcgaaggc gactctctgg actgtaactg acgctgaggc tcgaaagcgt ggggagcaaa 420

caggattaga taccctggta gtc 443

<210> 21

<211> 443

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KP241972.1

<400> 21

actcctacgg gaggcagcag tggggaatat tgcacaatgg gggaaaccct gatgcagcaa 60

cgccgcgtga gtgatgaagg ccttcgggtt gtaaagctct gtctttgggg acgataatga 120

cggtacccaa ggaggaagcc acggctaact acgtgccagc agccgcggta atacgtaggt 180

ggcaagcgtt gtccggattt actgggcgta aaggatgcgt aggcggattt ttaagtggga 240

tgtgaaattc cgaggctcaa cctcggcgct gcattccaaa ctggaagtct agagtgcggg 300

agaggaaagt ggaattccta gtgtagcggt gaaatgcgta gagattagga agaacaccag 360

tggcgaaggc gactttctgg accgtaactg acgctgatgc atgaaagcgt ggggagcaaa 420

caggattaga taccctggta gtc 443

<210> 22

<211> 468

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KP241973.1

<400> 22

actcctacgg gaggcagcag tagggaatct tccgcaatgg acgaaagtct gacggagcaa 60

cgccgcgtga gtgaagaagg ttttcggatc gtaaaactct gttgtcagag aagaacaagt 120

tggagagtaa ctgctccagc cttgacggta tctgaccaga aagccacggc taactacgtg 180

ccagcagccg cggtaatacg taggtggcaa gcgttgtccg gatttattgg gcgtaaagcg 240

agcgcaggcg gttccttaag tctgatgtga aagcccacgg ctcaaccgtg gaaggtcatt 300

ggaaactggg gaacttgagt gcagaagagg agagtggaat tccatgtgta gcggtgaaat 360

gcgtagatat atggaggaac accagtggcg aaggcgactc tctggtctgt aactgacgct 420

gaggctcgaa agcgtgggga gcaaacagga ttagataccc tggtagtc 468

<210> 23

<211> 271

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KP241974.1

<400> 23

attagatacc cgggtagtcc tagccgtaaa cgatactcgc taggtgtcgg ccacggtgcg 60

accgttgtcg gtgccgtagg gaagccgtga agcgagccac ctgggaagta cggccgcaag 120

gctgaaactt aaaggaattg gcgggggagc accacaacgg gtggagcttg cggtttaatt 180

ggattcaacg ccggaaatct taccgggacc gacagcaata tgaaggccag gctgaagact 240

ttgccggatt agctgagagg tggtgcatgg c 271

<210> 24

<211> 271

<212> DNA

<213

> Artificial Sequence

<220><223> KP241975.1

<400> 24

attagatacc cgggtagtcc tagccgtaaa cgatactcgc taggtgtcgg ccacggtgcg 60

accgttgtcg gtgccgtagg gaagccgtga agcgagccac ctgggaagta cggccgcaag 120

gctgaaactt aaaggaattg gcgggggagc accacaacgg gtggagcttg cggtttaatt 180

ggattcaacg ccggaaatct taccgggacc gacagcaata tgaaggccag gctgaagact 240

ttgccggatt agctgagagg aggtgcatgg c 271

<210> 25

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MBT857F

<400> 25

cgwagggaag ctgttaagt 19

<210> 26

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MBT1196R

<400> 26

taccgtcgtc cactcctt 18

<210> 27

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MMB282F

<400> 27

atcgrtacgg gttgtggg 18

<210> 28

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MMB832R

<400> 28

cacctaacgc rcathgttta c 21

<210> 29

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Msc380F

<400> 29

gaaaccgyga taagggga 18

<210> 30

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Msc828R

<400> 30

tagcgarcat cgtttacg 18

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mst702F

<400> 31

taatcctyga rggaccacca 20

<210> 32

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mst862R

<400> 32

cctacggcac cracmac 17