



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0124067
(43) 공개일자 2020년11월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12M 1/42 (2017.01) C12M 1/34 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12M 35/04 (2013.01)
C12M 41/38 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0047471
(22) 출원일자 2019년04월23일
심사청구일자 2019년04월23일

(71) 출원인
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
박준홍
서울특별시 강남구 선릉로 221, 304동 1002호(도곡동, 도곡렉슬아파트)
김지현
경기도 성남시 분당구 내정로 55, 321동 202호(정자동, 상록마을우성아파트)
이민주
서울특별시 동대문구 사가정로 65, 211동 1701호(전농동, 래미안크레시티아파트)
(74) 대리인
오위환, 나성곤, 정기택

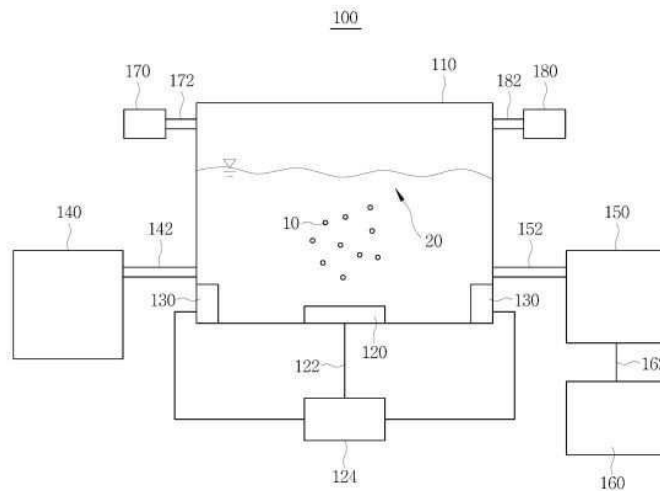
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 수환경 내 미생물 군집 제어 장치 및 방법

(57) 요약

본 발명은 수환경 내 미생물의 군집 내 특정 미생물의 활성 향상 또는 저하를 통제함으로써 미생물 군집을 제어하는 장치 및 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따르면, 비접촉식 방법(가칭 주파수)을 이용하여 수환경내 미생물, 특히 질산화 미생물의 활성을 높이거나 낮추어 수환경 내 미생물 군집의 조성을 조작할 수 있다. 또한, 소리를 이용하여 미생물 내의 유전자 발현을 제어할 수 있고, 다양한 미생물이 공존하고 있는 수중에서 소리를 통해 특정 미생물의 조성을 제어함으로써 미생물에 정보를 전달할 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2018R1A6A1A08025348
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	대학중점연구소지원사업
연구과제명	기후변화 적응형 사회기반시설 연구센터
기 여 율	1/1
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2018.06.01 ~ 2027.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

하나 이상의 미생물군이 포함된 수용액을 수용하는 미생물 반응기(110);

상기 미생물 반응기 일측에서 상기 미생물군이 포함된 수용액에 가청 주파수를 생성하는 주파수 발생기(130); 및

상기 가청 주파수에 의해 상기 수용액에 생성되는 진동을 미생물이 전달받아 생물막(biofilm)으로 진동을 발생시켜 상기 미생물의 조성 변화를 측정할 수 있는 미생물 분석기(160);로 구성되며,

상기 미생물의 조성 변화로 인해 상기 미생물의 유전자 발현 및 활성이 제어되어 미생물간의 상호작용 및 군집을 제어할 수 있는, 수환경 내 미생물 군집 제어 장치(100).

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 미생물의 유전자 발현은 미생물의 군집을 통해 미생물의 활성이 향상되거나 미생물의 활성이 저하되는 것인, 수환경 내 미생물 군집 제어 장치.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 미생물 군집 제어 장치는,

상기 주파수 발생기에서 발생하는 주파수를 측정하는 주파수 측정기(120) 및 상기 주파수 발생기에서 발생하는 주파수를 제어하는 주파수 조절기(124);를 더 포함하는, 수환경 내 미생물 군집 제어 장치.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 미생물 군집 제어 장치는,

상기 미생물의 활성 정도를 측정하기 위하여 상기 미생물군이 포함된 수용액을 수용하는 상기 미생물 반응기 내로 암모니아, 질산이온, 산소, 질소 및 이산화탄소로 구성되는 군으로부터 선택되는 1종 이상을 포함하는 기체를 공급하는 기체 공급부;를 포함하는, 수환경 내 미생물 군집 제어 장치.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 미생물 군집 제어 장치는,

상기 미생물 반응기에서 배출되는 수용액에 포함된 미생물의 특성을 분석하는 미생물 분석기를 더 포함하는, 수환경 내 미생물 군집 제어 장치.

청구항 6

수환경 내 미생물 군집 제어 방법에 있어서,

미생물군이 포함된 수용액을 수용하는 미생물 반응기 일측에서 상기 수용액으로 가청 주파수를 생성하는 가청 주파수 생성 단계[A];

상기 생성된 가청 주파수가 수용액을 통과하면서 수용액에 진동을 발생시켜 진동이 수환경 내 미생물에게 전달되는 진동 전달 단계[B]; 및

상기 진동을 전달받은 미생물이 생물막(biofilm)으로 진동을 발생시켜 수환경 내 다른 미생물과 상호작용하여 미생물 군집이 변화하는 미생물 군집 조작 단계[C];를 포함하는 수환경 내 미생물 군집 제어 방법.

청구항 7

제 6항에 있어서, 수환경 내 미생물 군집 제어 방법은,

상기 미생물의 군집 변화를 측정하는 미생물 군집 측정단계[D];

상기 발생하는 주파수를 측정하는 주파수 측정단계[E]; 및

상기 미생물 군집 측정 단계 및 주파수 측정단계에서 측정된 데이터에 따라 상기 발생하는 주파수를 제어하는 주파수 제어단계[F];를 더 포함하는 수환경 내 미생물 군집 제어 방법.

청구항 8

제 6항에 있어서, 수환경 내 미생물 군집 제어 방법은,

상기 수용액에 포함된 미생물의 특성을 분석하는 미생물 분석단계[G];를 더 포함하는 수환경 내 미생물 군집 제어 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 미생물 군집 제어 장치 및 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 수환경 내 미생물에 영향을 주는 주파수를 통해 특정 미생물의 활성을 조작하여 미생물 군집을 제어하는 장치 및 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 환경 내에는 다양한 미생물들이 공존하고 있으며 미생물 간의 정보교환이 화학적인 신호로 이루어지고 있다고 알려져 있다. 연구가 진행됨에 따라 물리적인 파동을 통해서 미생물 간의 정보교환이 이루어 질 수 있다고 제기 되고 있지만 가청 주파수에 의한 미생물 군집 조성 제어의 활용 가능성에 대한 연구가 미비한 실정이다.

[0003] Sound wave는 infrasound, audible sound, and ultra sound로 나눌 수 있다. 그중 진단 및 치료에 주로 사용되는 ultrasound의 생물학적 영향은 최근 수십 년 동안 광범위하게 조사 되었다. (Capella et al, 2013) 하지만 사람이 직접 들을 수 있는 가청음역대 소리의 미생물에 대한 생물학적 반응에 대한 기초 정보가 매우 부족하여 이에 대한 인체 및 환경에 대한 논의가 진전되고 있지 않다. 따라서 전자파에 따른 생명체의 반응과 이에 대한 과학적 기작 규명이 필요하다.

[0004] 미생물학적으로 박테리아의 cell to cell communication는 chemical signal을 주고받으면서 높은 셀 농도에서 일어난다. 이러한 화학 신호를 통한 통신에 집중되어 연구가 진행 되었지만, 이에 반해 물리적 신호(음파, 전자기파, 전류)에 대해서는 제한된 관심만 받았다. 이와 같은 물리적 신호는 대부분 미생물을 박멸하는 것을 목적으로 사용되었고, 공기가 밀폐되어 있는 공간에서만 사용하여야 한다는 문제점이 있었다.

[0005] 최근 독일에서 하수처리장의 활성 슬러지 공법 시 노래를 들려줌으로써 미생물의 활성을 높여 하수 처리의 효과를 높였다는 기사가 게재 되었지만 이에 대한 근거는 없다. 기존 연구들은 단일 순수 배양 미생물만을 다루고 있고 음파의 범위가 초음파에만 국한되어 있기 때문에 다양한 주파수와 다양한 미생물 군집에서 미생물의 조성 에 따른 변화에 대한 정보가 필요하다. 미생물마다 성장하는 주파수가 서로 다르며 특정 주파수에 따라 미생물의 성장 및 활성이 변화한다는 결과가 있으므로 가청 주파수에 따른 미생물의 조성 변화를 알아볼 필요가 있다.

[0006] 따라서 본 발명은 다양한 가청주파수에 따른 단일 배양 미생물 유전체의 유전자 발현에 대해 규명하고 다양한 가청주파수에 따른 수환경내 미생물 군집의 변화를 확인하려한다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) Gemma Reguera (2011), microbial conversations get physical, Trends in Microbiology, Vol.19, pp.105-152

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명은 다양한 미생물이 존재하는 수환경 내 미생물 군집 조작을 위하여 주파수를 이용한다. 다양한 주파수에 따른 단일 미생물 유전체의 gene expression을 규명하고 주파수에 의한 수환경 내 미생물의 반응을 확인하여 이를 활용한 수환경 내 미생물 군집을 제어하는 방법에 대하여 제공하고자 한다.
- [0009] 그 결과, *E-coli* (*Escherichia coli*)의 성장 속도에 가청 주파수가 미미한 영향을 주었으나, gene expression 상에서 큰 변화가 발생하였다. 이를 기반으로, 다양한 가청 주파수에 따른 수환경내 미생물 군집의 개체 구성원 조성 변화를 조사하였고, 폭기조 슬러지 미생물 군집에 가청 주파수를 들려주었을 때 질산화이온 생성에 변화가 있음을 확인하였다. 질산화이온 생성뿐만 아니라 암모니아 산화 박테리아와 질소 이온 산화 박테리아의 수가 주파수가 증가함에 따라 증가함을 확인하였다.
- [0010] 미생물 군집 조성의 변화를 order 단계에서 확인하였을 때도, 주파수 간의 군집의 차이가 컸으며, 특히, 10,000Hz에서 Pasteurellales order에서 많은 변화가 일어났다. 이러한 결과는 미생물이 가청 주파수에 의하여 반응 한다는 것을 시사하며 이를 기반으로 가청 주파수를 이용하여 미생물 군집을 조작하는 장치와 방법에 대해 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0011] 한편으로, 본 발명은
- [0012] 하나 이상의 미생물군이 포함된 수용액을 수용하는 미생물 반응기(110);
- [0013] 상기 미생물 반응기 일측에서 상기 미생물군이 포함된 수용액에 가청 주파수를 생성하는 주파수 발생기(130); 및
- [0014] 상기 가청 주파수에 의해 상기 수용액에 생성되는 진동을 미생물이 전달받아 생물막(biofilm)으로 진동을 발생시켜 상기 미생물의 조성 변화를 측정할 수 있는 미생물 분석기(160);로 구성되며,
- [0015] 상기 미생물의 조성 변화로 인해 상기 미생물의 유전자 발현 및 활성이 제어되어 미생물간의 상호작용 및 군집을 제어할 수 있는, 수환경 내 미생물 군집 제어 장치(100)를 제공하고자 한다.

발명의 효과

- [0016] 본 발명에 따르면, 비접촉식 방법(가청 주파수)을 이용하여 수환경내 미생물, 특히 질산화 미생물의 활성을 높이거나 낮추어 수환경 내 미생물 군집의 조성을 조작할 수 있다.
- [0017] 본 발명을 통해, 소리를 이용하여 미생물 내의 유전자 발현을 제어할 수 있고, 다양한 미생물이 공존하고 있는 수중에서 소리를 통해 특정 미생물의 조성을 제어함으로써 미생물에 정보를 전달할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0018] 도 1은 본 발명에 따른 수환경 내 미생물 군집 제어 장치를 나타낸 도면이다.
- 도 2는 본 발명에 따른 주파수 별 E-Coli OD 600 측정 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 3은 본 발명에 따른 주파수별 유전자 발현 변화를 나타낸 결과이다.
- 도 4는 본 발명에 따른 OD, COD, NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- 변화율을 나타낸 그래프이다.
- 도 5는 본 발명에 따른 질산화 미생물의 정량적인 양 변화를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.
- [0020] 먼저 본 발명의 바람직한 실시예에 따른 수환경 내 미생물 군집 제어 장치(100)의 구성에 대하여 설명하기로 한다(도 1 참조).

- [0022] 본 발명에 따른 수환경 내 미생물 군집 제어 장치(100)는,
- [0023] 하나 이상의 미생물군이 포함된 수용액을 수용하는 미생물 반응기(110);
- [0024] 상기 미생물 반응기 일측에서 상기 미생물군이 포함된 수용액에 가청 주파수를 생성하는 주파수 발생기(130); 및
- [0025] 상기 가청 주파수에 의해 상기 수용액에 생성되는 진동을 미생물이 전달받아 생물막(biofilm)으로 진동을 발생시켜 상기 미생물의 조성 변화를 측정할 수 있는 미생물 분석기(160);로 구성되며,
- [0026] 상기 미생물의 조성 변화로 인해 상기 미생물의 유전자 발현 및 활성이 제어되어 미생물간의 상호작용 및 군집을 제어할 수 있는 것을 특징으로 한다.
- [0027] 본 발명에 따른 미생물의 군집이란, 상기 생물막으로 전달되는 진동에 의해 미생물들이 서로 상호작용을 하고 이에 따라 미생물들의 조성이 변화하므로, 주파수에 따라 미생물들의 상호작용을 통제하여 미생물의 조성을 제어할 수 있음을 의미한다.
- [0028] 본 발명의 일 실시형태에 따른 수환경 내 미생물 군집 제어 장치(100)는 미생물 반응기(110), 주파수 측정기(120), 주파수 조절기(124), 주파수 발생기(130) 및 미생물 분석기(160)를 포함한다.
- [0029] 미생물 반응기(110)는 내부에 공간부가 형성되어 있는 통형상의 용기로 상기 공간부에는 하나 이상의 미생물(10) 군이 포함된 수용액(20)이 수용된다. 수용액(20)은 물(Water)로 이루어지는데 이외에도 미생물(10)이 생존 가능한 다양한 형태로 자유롭게 실시 가능하다.
- [0030] 수용액(20)은 외부의 수용액 유입 탱크(140)에서 수용액 유입관(142)을 통해 미생물 반응기(110) 내부로 유입되며 또한 미생물 반응기(110) 내부에 수용된 수용액(20)도 수용액 유출관(152)을 통해 외부의 수용액 유출 탱크(150)로 유출 가능하다.
- [0031] 그리고 수용액 유출 탱크(150)에는 수용액 유출 탱크(150)에 수용된 수용액에 포함된 미생물의 특성을 분석하기 위한 미생물 분석기(160)가 구비된다.
- [0032] 미생물 분석기(160)는 미생물의 생물, 물리 및 화학적 특성을 분석하기 위한 다양한 미생물 분석기가 적용될 수 있다.
- [0033] 다음으로 수환경 내 미생물 군집 제어 장치(100)는 주파수 측정기(120), 주파수 조절기(124) 및 주파수 발생기(130)를 포함한다.
- [0034] 주파수 발생기(130)는 미생물 반응기(110) 내로 가청 주파수를 생성하는 장치로 미생물 반응기(110) 내부에 설치될 수 있으며 또는 미생물 반응기(110) 외부에 설치될 수 있다.
- [0035] 주파수 발생기(130)가 미생물 반응기(110) 내부에 설치되는 경우 미생물 반응기(110) 내부로 외부의 소음 등이 유입되는 것을 방지하기 위하여 미생물 반응기(110) 외측에 방음부 또는 소음차단부를 설치하여 줄 수 있다.
- [0036] 주파수 발생기(130)는 사용자의 선택에 따라 하나 이상 자유롭게 설치가 가능하다.
- [0037] 다음으로 주파수 측정기(120)는 주파수 발생기(130)에서 발생하는 가청 주파수를 측정하는 측정수단이다.
- [0038] 다음으로 주파수 조절기(124)는 주파수 발생기(130)에서 발생하는 가청 주파수를 제어하는 제어수단으로 가청 주파수의 크기, 생성 빈도, 생성 시간 등을 제어한다.
- [0039] 주파수 조절기(124)는 주파수 측정기(120)에서 측정된 데이터를 기반으로 하여 주파수 조절이 가능하며 또한 미생물 반응기(110) 내에 수용된 수용액에 포함된 미생물(10)의 종류, 특성에 따라서 가청 주파수를 제어할 수 있다.
- [0040] 미생물 분석기(160)는 미생물 반응기(110) 내에 수용된 수용액에 포함된 미생물(10)의 미생물의 활성을 측정하는 측정수단이다.
- [0041] 도 1에 도시된 바와 같이, 본 발명에 따른 제어 장치(100)는 미생물(10)의 활성 정도를 측정하기 위하여 미생물군이 포함된 수용액(20)을 수용하는 미생물 반응기(110) 내에 암모니아, 질산이온, 산소, 질소, 이산화탄소 등으로 구성되는 군으로부터 선택되는 1종 이상을 포함하는 기체를 공급하는 기체 공급부(170) 및 기체 공급관(172)을 구비한다. 그리고 미생물 반응기(110) 내로 유입된 상기 기체를 외부로 배출하는 기체 배출부(180) 및

기체 배출관(182)을 구비한다.

- [0042] 미생물 반응기(110) 내로 유입되는 기체의 양, 속도는 측정하고자 하는 미생물의 종류, 특성에 따라 사용자가 자유롭게 제어 가능하다.
- [0043] 다음으로 수환경 내 미생물 군집 제어 장치(100)는 도 1에는 도시되지 않았지만 전력을 공급하기 위한 전력공급 수단, 미생물 반응기 내부 모니터링 수단 및 사용자가 주파수 제어데이터를 입력하거나 측정된 결과를 사용자에게 안내하는 사용자 인터페이스 수단을 추가로 구비하여 줄 수 있다.
- [0044] 또한 미생물 반응기(110) 내부의 온도를 제어하기 위한 온도조절수단을 구비하여 줄 수 있다.
- [0045] 본 발명의 바람직할 실시 예에 따른 수환경 내 미생물 군집 제어 장치(100)는 이와 같은 구성을 통하여 미생물의 활성 및 군집 제어를 용이하게 할 수 있는 효과가 있다.
- [0047] 이하에서는 이와 같은 수환경 내 미생물 군집 제어 장치(100)를 통한 수환경 내 미생물의 활성 및 군집 제어에 대하여 자세히 설명하기로 한다.
- [0048] 상기 미생물의 군집 조작용은 특정 미생물의 유전자 발현 정도의 차이를 통해 미생물의 활성을 조작하여 군집 조성을 제어하는 것을 말한다.
- [0049] 본 발명은 가청음을 이용하여 수중 미생물 군집 조성을 조작하고, 특정 미생물의 활성을 높이거나 낮출 수 있는 기술에 관한 것이다. 또한, 종래 많이 사용되던 초음파를 이용하는 것이 아닌 사람이 들을 수 있는 가청 주파수에 의한 미생물 생물막의 진동을 이용하여 미생물의 군집을 조작할 수 있다.
- [0050] 수환경 또는 수중에서는 소리 전달이 빠르기 때문에 미생물이 있는 수중에 소리를 발생시켜 미생물의 활성 및 군집을 용이하게 조작할 수 있다. 따라서, 본 발명은 소리를 발생시키는 장치 및 미생물이 성장하는 환경을 필수 구성요소로 한다.
- [0052] 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 상기 미생물은 서로 상호작용하면서 질산 이온을 생성하는데, 이때 생성되는 질산 이온의 양에 따라 수환경 내 미생물의 군집 변화를 판단할 수 있다. 상기 미생물의 활성은 질산 이온 대신 암모니아 이온을 통하여도 측정 가능하다.
- [0054] 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 상기 가청 주파수가 증가할수록 질산화 미생물의 활성이 증가한다. 이를 통해, 본 발명은 가청 주파수를 이용하여 미생물 군집을 제어할 수 있을 뿐만 아니라 질산화 미생물의 유전자 발현을 조작하여 성장시킬 수 있는 것을 특징으로 한다.
- [0056] 이하, 실시예에 의해 본 발명을 보다 구체적으로 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오직 본 발명을 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업자에게 있어서 자명하다.
- [0058] **실험예 1 : 다양한 가청 주파수에 따른 pure culture 미생물 유전체의 gene expression 규명**
- [0059] 본 발명에 사용된 방음 박스는 도 1과 같이 투명한 아크릴 박스로 제작하여 방음의 효과를 극대화시키기 위해 내부에 방음 스펀지와 고무판을 설치하였다. 미생물이 들어있는 튜브 속에 이어폰을 넣어 소리를 들려주었다. 실험 장치의 온도는 20~25℃로 상온과 일정하게 유지하였다.
- [0060] 본 발명에 사용된 미생물은 *Escherichia coli* K-12 이었으며, 50mL 튜브에 LB broth 10mL와 *E-coli* 0.05 ~ 0.1cell/mL를 넣어 성장시켰다. 주파수는 총 3가지로 0Hz, 1kHz, 10kHz를 데시벨은 80DB로 동일하게 사용하였다. 총 실험을 3번 반복하여 오차를 줄였다.
- [0061] *E-coli* 성장 배지에 대한 Optical Density(OD)를 1시간 마다 측정하여 총 8시간 동안 미생물의 성장을 관찰 하였다. 미생물의 성장을 확인하기 위하여 OD 값을 UV/VIS Spectrophotometer, Optizen POP BIO(Mecasys Co., Ltd, Korea)를 사용하여 측정하였다.

[0063] E-coli의 성장곡선을 그려본 결과, 같은 주파수에 따라서 비슷한 OD(Optical Density)값의 양상을 띄는 것을 확인할 수 있었다. 10kHz가 1kHz보다 더 빠른 속도로 성장을 한다는 것을 알 수 있었고, 0Hz 일 때 가장 낮은 성장 곡선을 보이고 있었다. 0Hz에서는 처음에 비해 8시간 후에 7.2배 증가하였고, 1kHz는 9.1배 증가하였으며, 10kHz는 10.2배 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 10kHz가 0Hz에 비해 약 1.4배 높은 성장률을 보인다는 것을 의미한다(도 2 참조).

[0064] 또한, 도 3을 참조로, 주파수에 따른 유전자 발현을 비교해 보았을 때 파란색으로 나타낸 부분은 10kHz, 빨간색으로 나타낸 부분은 0Hz, 초록색으로 나타낸 부분은 1kHz를 나타낸다. 이때 동일한 주파수 별로 같이 묶여 tree가 생긴다는 것을 확인할 수 있었고 이는 동일한 주파수 별로 비슷한 유전자 발현이 나타난다는 것을 의미한다. 특히 주파수가 증가할 수록 더 많은 수의 유전자가 변화한다는 것을 10kHz와 1kHz를 비교해보면 알 수 있었다.

[0065] 붉게 나타나는 부분이 유전자가 감소한 부분이고 파랗게 변한 부분이 유전자가 증가하는 부분이라는 것을 나타낸다. 따라서 0Hz와 10kHz는 유전자의 증가와 감소가 상반되는 값을 가진다는 것을 확인할 수 있었다.

[0067] 실험예 2 : 다양한 가칭 주파수에 따른 수환경내 미생물 군집의 변화

[0068] 장치는 상기 실험에서 사용한 장치를 그대로 사용하였으며 방음 박스에 Mifa사의 M1 블루투스 스피커를 중앙에 넣어 소리를 들려주며 박스는 20~25℃ 실온에 설치하였다. 주파수는 총 4가지로 0Hz, 1kHz, 10kHz, 15kHz, 데시벨은 80DB로 동일하게 사용하였다. 사용된 하수 슬러지는 서울 A 물재생센터 호기조에서 채취하여 사용하였으며 인공하수 생성조건은 표 1과 같다. 1000mL 삼각 플라스크에 600mL의 인공하수와 0.25cell/mL의 미생물을 넣어 시료를 제작하였다. 시료를 방음장치에 넣기 전 시료의 오염을 막고 호기성조건을 만들어주기 위하여 탈지면을 이용하여 플라스크 마개를 제작하였다. 미생물 성장은 총 12일을 했으며 4일마다 계대배양을 하여 실험을 진행하였다. 총 실험을 3번 반복하여 오차를 줄였다.

표 1

Component	Concentration (mg/L)	Component Con. (mg/L)
Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	100	COD ≒ 120 TN ≒ 35 TP ≒ 5
KH ₂ PO ₄	8	
K ₂ HPO ₄	18	
NH ₄ Cl	16	
Trace Solution	1 mL/L	

[0071] 주파수를 들려주면서 24시간 마다 시료를 채취하여 OD, COD, NH₄⁺, NO₃⁻, NO₂⁻의 값을 측정하였다. 미생물의 성장을 확인하기 위하여 OD 값을 UV/VIS Spectrophotometer, Optizen POP BIO(Mecasys Co., Ltd, Korea)를 사용하여 측정하였다. COD와 NH₄⁺ 값의 변화를 확인하기 위하여 각각 Digestion Solution for COD (HACH Co., Ltd, USA), High Range Ammonia REagent Set 2606945 (HACH Co., Ltd, USA)를 사용하여 측정하였다. NO₃⁻, NO₂⁻ 값의 변화를 확인하기 위하여 883 Basic IC plus (Metrohm Co., Ltd, USA)를 사용하여 측정하였다.

[0072] 주파수를 들려주기 전, 주파수를 들려준 후 4일, 8일, 12일 후의 시료 100mL를 필터링하여 DNA를 추출하였다. DNA를 추출하기 위해서 FastDNA SPIN Kit(MP biomedicals, santa Ana, CA, USA)를 사용하였으며 제조자의 protocol을 따라 추출하였다. 원심분리 후에 1g의 세포는 각각의 Lysing Matrix 튜브로 옮겼다. DNA 시료를 뽑은 양은 총 100이며 추출한 DNA의 농도와 순도는 ND-100 분광광도계 (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA)로 측정하였다. 뽑은 시료는 미생물의 군집과 다양성을 분석하는 T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms) (SolGent Co., Ltd., Daejeon, Korea)을 하는데 사용하였다.

[0073] 미생물의 다양성과 군집을 분석인 T-RFLP을 하기 위해서 박테리아 16S rRNA를 PCR(Polymerase Chain Reactio

n)을 이용하여 증폭시켰다. 16S rRNA의 박테리아를 증폭 시킬 때는 forward 프라이머 27f(5' -AGAGT TTGAT CATGG CTCAG-3')와 형광성의 FAM reverse 프라이머 1492r(5' -TACGG TTACC TTGTTA CGACTT)를 사용되었다 (Satamoto et al., 2003; Lee et al., 2010). PCR 반응 화합물의 구성요소는 아래 표 2와 같다.

표 2

Components	Volume(μ l) per reaction
PCR pre- mix	15
DNA sample	2
Forward primer	2.5
Reverse primer	2.5
Distilled water	8
Total	30

DNA 증폭은 C1000TM thermal Cyclor (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 통해 수행하였다. PCR 조건은 94℃ 5분, 35회간 94℃ 60초, 50℃ 60초, 72℃ 90초 반복, 마지막으로 72℃ 5분 시행하였다(Marchesi et al., 1998 Moeseneder et al., 1999). PCR 후에 증폭된 DNA는 전기영동을 통하여 확인하였고 QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen Helden, Germany)를 사용하여 정제하였다. 정제된 DNA는 Hha I 제한효소를 이용하여 37℃에서 4시간 동안 제한효소 처리하였다. 처리된 DNA 시료는 SolGent Co., Ltd.로 제출하여 T-RFLP 분석을 시행하였다. 분석결과를 통하여, Shannon Index(H), Richness(S), 그리고 Evenness(E)를 표 3의 식을 이용하여 계산하고, MICA3(mica.ibest.uidaho.deu/)를 이용하여 미생물 군집을 분석하였다.

표 3

Diversity	Equation	Reference
Shannon Index (H)	$\frac{2.3}{N} (N \log N - \sum n_i \log n_i)$	Ki et al., 2007
Richness (S)	S= number of RF peaks in T-RFLP capillary chromatography	Ki et al., 2007
Evenness (E)	$E = \frac{H}{\ln(S)}$	Ki et al., 2007

NH₄⁺, COD, OD 값에서는 주파수의 변화에 따른 차이가 10% 이내로 미미하여 주파수가 암모니아 이온, COD, 총 미생물 성장률에 영향을 미친다고 보기는 어렵다. 하지만 NO₃⁻, NO₂⁻의 경우, 주파수의 변화에 따른 차이가 크기 때문에 주파수에 따라서 질산화 이온의 생성량이 영향을 받는다고 판단할 수 있었다. 또한, 10kHz에서 NO₃⁻, NO₂⁻의 생성량이 매우 적은 편이며 반대로 15kHz에서 NO₃⁻, NO₂⁻의 생성량이 많은 것을 확인할 수 있었다(도 4 참조).

E-coli의 성장실험 결과, 주파수가 클수록 E-coli가 더 빠르게 성장하는 모습을 보였으며 이는 미생물이 가청 주파수에 영향을 받는다는 것을 의미한다. 또한, 유전자 발현 실험결과를 보았을 때, 단순히 주파수의 유무에만 차이가 존재하는 것이 아니라 주파수의 크기에 따라서도 많은 차이가 존재한다는 것을 알 수 있고, 이는 10kHz가 1kHz보다 0Hz와 차이가 난다는 것을 보고 확인할 수 있었다.

뿐만 아니라, 기능에 따라 변화한 유전자의 양이 상이하였는데 특히 생물학적 기능과 연관된 유기물 및 질소 제거 신진대사 유전자에 변화가 생겨 주파수가 생물학적 기능에 많은 영향을 미치며 질소제거에 영향을 미친다는 것을 알 수 있었다. 이 결과는 미생물 폭기조 시료로 한 실험에서도 확인 할 수 있는데 NO₃⁻, NO₂⁻의 생성율이

주파수에 따라 차이 많은 것을 보고 질산화 과정에 주파수가 영향을 미친다는 것을 알 수 있었다.

[0083] 다양성에 있어서 큰변화는 일어나지 않았으나 군집 변화에 있어서는 큰 변화를 나타내었다. 모든 시료에 대해서 Pasteurellales가 order level에서 우점하고 있었으며 10kHz 조건에서 다른 조건보다 군집 내에서 적은 비율로 나타나서 군집의 조성에서도 주파수가 큰 영향을 미친다는 것을 확인하였다.

[0085] 다음으로 본 발명의 바람직한 실시예에 따른 수환경 내 미생물 군집 제어 방법에 대하여 설명하면,

[0086] 수환경 내 미생물 군집 제어 방법은 미생물군이 포함된 수용액을 수용하는 미생물 반응기 일측에서 상기 수용액으로 가청 주파수를 생성하는 가청 주파수 생성 단계[A], 상기 생성된 가청 주파수가 수용액을 통과하면서 수용액에 진동을 발생시켜 진동이 수환경 내 미생물에게 전달되는 진동 전달 단계[B] 및 상기 진동을 전달받은 미생물이 생물막(biofilm)으로 진동을 발생시켜 수환경 내 다른 미생물과 상호작용하여 유전자 발현하는 유전자 발현 단계[C]를 포함한다.

[0087] 그리고 상기 수환경 내 미생물 군집 제어 방법은 상기 미생물의 유전자 발현 정도를 측정하는 유전자 발현 측정 단계[D], 상기 발생하는 주파수를 측정하는 주파수 측정단계[E] 및 상기 유전자 발현 측정 단계 및 주파수 측정 단계에서 측정된 데이터에 따라 상기 발생하는 주파수를 제어하는 주파수 제어단계[F]를 더 포함한다.

[0088] 그리고 수환경 내 미생물 군집 제어 방법은 상기 수용액에 포함된 미생물의 특성을 분석하는 미생물 분석단계[G]를 더 포함한다.

[0090] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 본 발명이 속한 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아님은 명백하다. 본 발명이 속한 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기 내용을 바탕으로 본 발명의 범주 내에서 다양한 응용 및 변형을 행하는 것이 가능할 것이다.

[0091] 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 특허청구범위와 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

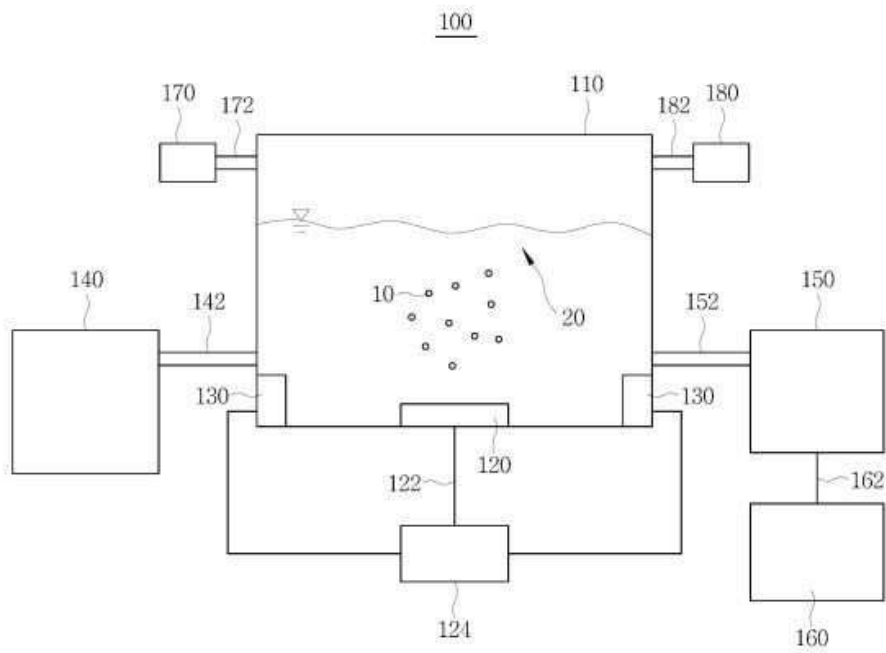
부호의 설명

[0092] 100: 미생물 군집 제어 장치 110: 미생물 반응기 120: 주파수 측정기

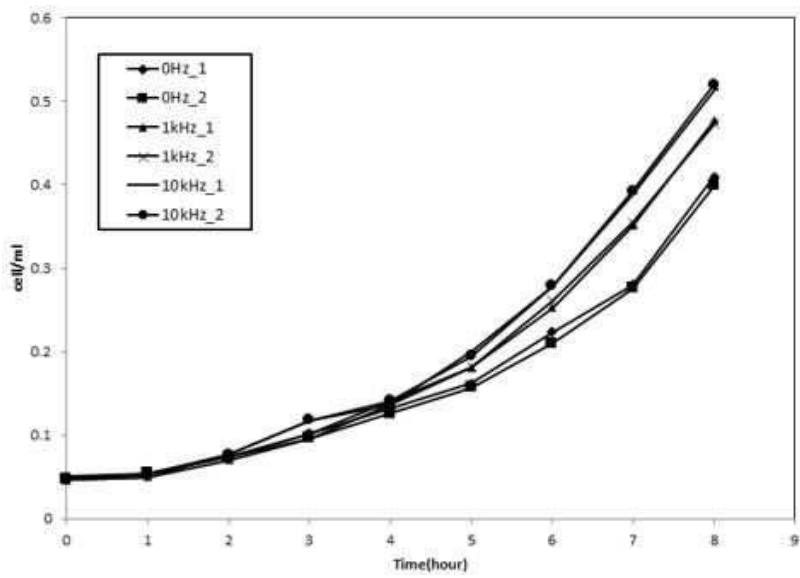
124: 주파수 조절기 130: 주파수 발생기 160: 미생물 분석기

도면

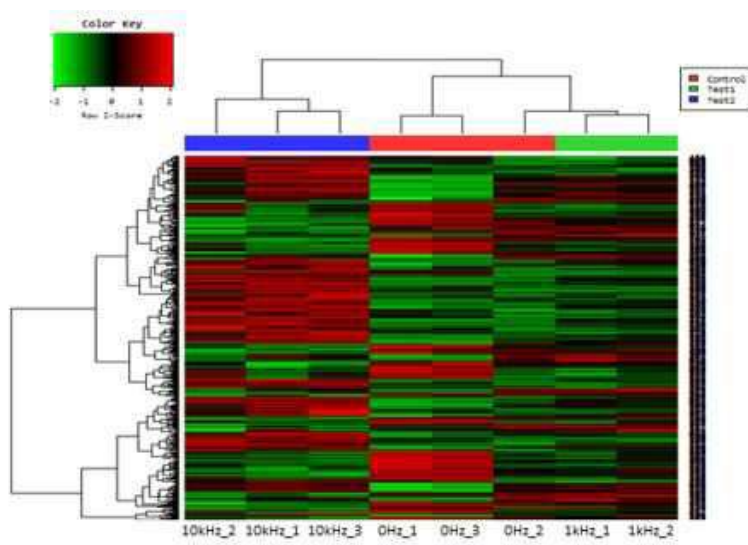
도면1



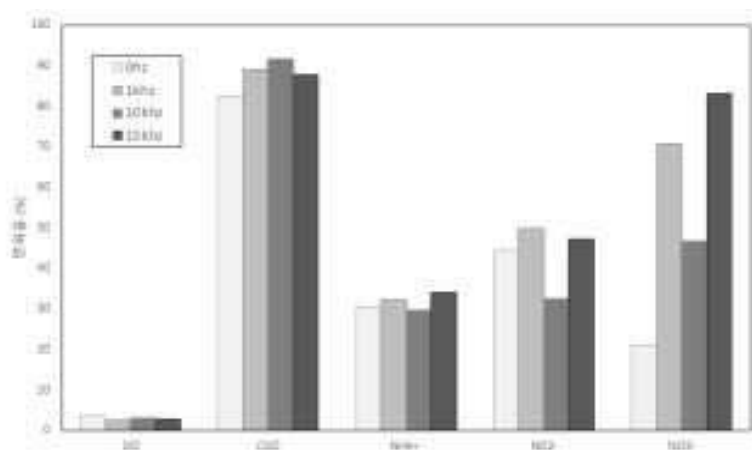
도면2



도면3



도면4



도면5

