(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0068666
(43) 공개일자 2017년06월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01) *C12Q 1/64* (2006.01)
G01N 33/24 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/689 (2013.01)
C12Q 1/64 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0174948
(22) 출원일자 2015년12월09일
심사청구일자 2015년12월09일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
손아정
서울특별시 용산구 새창로 70 113동 1103호 (도원동,삼성래미안아파트)
박재은
안양시 동안구 흥안대로223번길 19 (호계동 샘마을대우아파트) 104동 102호
(74) 대리인
손민

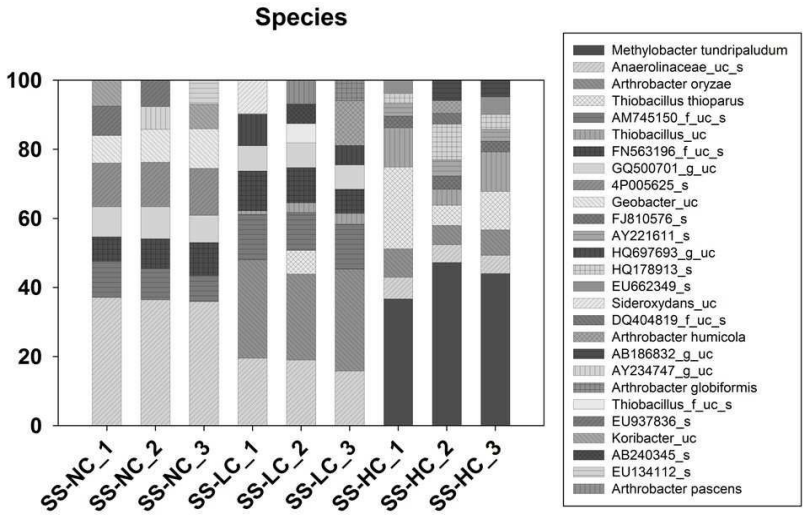
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **지표 미생물을 이용하여 토양내 중금속 오염을 확인하는 방법**

(57) 요 약

본 발명은 중금속 오염 수준의 증가에 따라 성장수준이 증가되는 중금속 오염 지표 미생물인 메틸로박터 툰드리팔루덤(*Methylobacter tundripaludum*) 균주를 검출할 수 있는 제제를 포함하는 토양내 중금속 오염 확인용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 토양내 중금속 오염 확인용 키트, 상기 조성물 또는 키트를 이용하여 토양내 중금속 오염을 확인하는 방법 및 상기 조성물 또는 키트를 이용하여 토양내 중금속 수준을 정량적으로 분석하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에서 제공하는 중금속 오염 지표 미생물을 사용하면, 토양내 중금속의 오염여부 뿐만 아니라 토양내 오염된 중금속의 수준을 정량적으로 분석할 수 있으므로, 토양내 중금속 오염의 효과적인 확인에 널리 활용될 수 있을 것이다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
G01N 33/24 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 G114 - 00056 - 04031
부처명 환경부
연구관리전문기관 한국환경산업기술원
연구사업명 환경기술개발사업 - 위탁과제
연구과제명 유전체학을 바탕으로 한 토양의 생태건강성 평가
기 여 율 1/1
주관기관 광주과학기술원
연구기간 2014.04.01 ~ 2016.03.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

중금속 오염 지표 미생물인 메틸로박터 툰드리팔루덤(*Methylobacter tundripaludum*) 균주의 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 토양내 중금속 오염 확인용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 제제는 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주 특이적인 유전자의 수준을 측정할 수 있는 프라이머 또는 프로브; 상기 특이적인 유전자로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정할 수 있는 항체 또는 앱타머; 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주의 16S rRNA의 서열을 정량적으로 분석하기 위한 프라이머 또는 프로브; 또는 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주의 게놈 DNA 서열을 정량적으로 분석하기 위한 파이로시퀀싱용 제제인 것인 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 중금속은 비소, 안티모니, 구리, 납, 철, 수은, 카드뮴, 크로뮴, 주석, 아연, 바륨, 비스무트, 니켈, 코발트, 망간, 바나듐 및 셀레늄으로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상의 금속인 것인 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주는 토양내 중금속의 수준이 증가할 수록 성장 및 증식수준이 증가하는 것인 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 토양내 중금속 오염 확인용 키트.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 키트는 중금속이 포함되어 있지 않은 대조군 토양시료, 중금속 오염 토양에서 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주의 성장수준을 나타내는 중금속 오염 인덱스 또는 이들의 조합을 추가로 포함하는 것인 키트.

청구항 7

중금속 오염여부를 확인하고자 하는 토양시료로부터 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주를 검출하는 단계를 포함하는, 토양내 중금속 오염을 확인하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 토양시료에서 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주가 검출되는 경우에는, 상기 토양시료에 중금속이 오염된 것으로 판정하는 것인 방법.

청구항 9

제7항에 있어서,

중금속 오염되지 않은 토양시료에서 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주의 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 10

(a) 중금속 오염여부를 확인하고자 하는 토양시료로부터 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주의 수준을 측정하는 단계; 및

(b) 상기 검출된 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주의 수준을 중금속 오염 토양에서 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주의 성장수준을 나타내는 인덱스와 비교하여, 토양시료에 오염된 중금속의 수준을 정량적으로 분석하는 단계를 포함하는,

토양내 중금속 수준을 정량적으로 분석하는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 중금속 오염 인덱스는 중금속을 농도 단계별로 포함하는 토양시료에 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주를 접종 및 배양한 후, 토양시료에 포함된 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주의 수준을 측정한 결과를 기록한 도표인 것인 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 지표 미생물을 이용하여 토양내 중금속 오염을 확인하는 방법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로 본 발명은 중금속 오염 수준의 증가에 따라 성장수준이 증가되는 중금속 오염 지표 미생물인 메틸로박터 툰드리팔루덤(*Methylobacter tundripaludum*) 균주를 검출할 수 있는 제제를 포함하는 토양내 중금속 오염 확인용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 토양내 중금속 오염 확인용 키트, 상기 조성물 또는 키트를 이용하여 토양내 중금속 오염을 확인하는 방법 및 상기 조성물 또는 키트를 이용하여 토양내 중금속 수준을 정량적으로 분석하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 광석의 제련 및 정련과정 등 각종 산업활동 과정에서 배출된 중금속에 의한 토양 오염은 주요 환경문제로 대두되고 있다. 대체로, 비소 및 중금속으로 오염된 토양은 산업단지, 폐광산 주변지역, 구 제련소 주변지역, 사격장 등에서 발견되고 있다. 토양에 오염된 중금속은 토양 입자 등에 강력하게 흡착하여 독성이 적은 물질로 분해되거나 안정화되지 않고 토양미생물에 흡수되어 토양미생물의 손상을 야기시킴으로써, 토양 생태계를 교란시킬 수 있다. 뿐만 아니라, 토양내 중금속은 식물을 통해 흡수되어 생태계로 유입된 후, 먹이사슬을 통해 생물체 내에 고농도로 축적되어 DNA 손상이나 암 등의 문제를 일으킬 수 있다.

[0003] 이같은 중금속에 의한 토양오염의 폐해를 방지하기 위한 방법을 개발하기 위하여 다양한 연구가 진행되고 있다. 예를 들어, 한국등록특허 제830703호에는 메틸로박테리움 속 (*Methylobacterium* sp.) 미생물, 이를 이용한 유기산 생산 방법, 중금속으로 오염된 토양의 정화 방법 및 식물 생장 촉진방법이 개시되어 있고, 한국공개특허 제2010-0050095호에는 네오사르토리아 속 미생물을 이용한 유류 또는 중금속 오염 토양 정화방법이 개시되어 있다. 그러나, 이같은 미생물을 사용하는 방법은 중금속의 오염수준이 비교적 낮은 토양에서 사용될 수 있고, 중금속의 오염수준이 심각한 토양에서는 별다른 효과를 나타내지 못한다는 단점이 있다. 즉, 중금속 흡착성 미생물은 증식속도가 대체로 낮은 수준이고, 상기 미생물 자체가 흡착하여 제거할 수 있는 중금속의 양은 매우 적기 때문에, 미생물을 이용하여 토양내 중금속을 제거하기 위해서는 장시간이 소요되기 때문에, 일정 수준 이상으로 중금속이 오염된 토양에서는 단시일 내에는 미생물처리에 의한 효과를 볼 수 없다는 것이다.

[0004] 이에 따라, 단시간내에 중금속에 의한 토양오염의 폐해를 방지하는 효과를 보기 위하여 통상적으로 사용되는 방법으로는, 중금속 오염 토양에 시멘트를 가하여 고정시킴으로써, 토양내 중금속이 토양 생태계내로 유입되는 것을 방지하는 방법이 사용되고 있다. 그러나, 이처럼 중금속 오염 토양을 고정시킨 후에도, 토양내 수분에 의하여 중금속이 용출될 수 있어, 이처럼 고정된 토양위에 새로운 토양을 가하여, 농지 또는 임업지역으로 활용함으로써, 용출되는 중금속을 식물을 통해 흡수시키는 방법이 사용되고 있다.

[0005] 이러한 방법을 사용할 경우에도, 시간의 경과에 따라 고정된 토양이 붕괴하면서 이에 포함된 중금속이 토양 생태계내로 유입될 수 있기 때문에, 오염지역의 중금속 수준을 지속적으로 확인하여야 하므로, 보다 효과적으로 토양내 중금속의 오염여부를 확인하는 방법의 개발이 필요한 실정이다.

[0006] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 보다 효과적으로 토양내 중금속의 오염여부를 확인하는 방법을 개발하고자 예의 연구노력한 결과, 메탄산화세균의 일종인 메틸로박터 툰드리팔루덤(*Methylobacter tundripaludum*) 균주를 신규한 중금속 오염 지표 미생물로서 사용할 경우, 토양내 중금속의 오염여부 뿐만 아니라, 토양내 중금속의 수준을 정량적으로 분석할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 하나의 목적은 중금속 오염 지표 미생물을 검출할 수 있는 제제를 포함하는 토양내 중금속 오염 확인용 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 토양내 중금속 오염 확인용 키트를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물 또는 키트를 이용하여 토양내 중금속 오염을 확인하는 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물 또는 키트를 이용하여 토양내 중금속 수준을 정량적으로 분석하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 토양 내 중금속에 의한 오염여부를 보다 용이하게 확인할 수 있는 방법을 개발하기 위하여 다양한 연구를 수행하던 중, 오염지표 미생물에 주목하게 되었다. 다양한 오염물질에 의하여 오염된 토양에서는 대부분의 미생물이 성장하지 못하지만, 일부 미생물은 오염물질을 이용하여 성장을 촉진시킬 수 있다고 알려져 있으며, 이를 오염지표 미생물이라고 한다. 본 발명자들은 중금속에 의하여 오염된 토양에서도 지표 미생물을 발굴할 수 있을 것으로 예상하였다. 이를 확인하기 위하여, 폐광산 중의 하나를 선정하고, 선정된 폐광산 지역 중에서 중금속 오염이 심한 지역을 추가로 선정한 다음, 선정된 지역의 지하 깊이별로 토양시료를 수득하고, 상기 수득한 토양시료로부터 토양미생물의 게놈 DNA를 수득하였다. 상기 수득한 각각의 게놈 DNA를 파이로시퀀싱 분석에 적용하여, 중금속오염수준이 증가함에 따라, 성장수준이 증가된 미생물을 선별하고, 상기 선별된 미생물 중에서 가장 성장수준이 높은 미생물을 선별한 결과, 메탄 산화세균의 일종인 메틸로박터 툰드리팔루덤(*Methylobacter tundripaludum*) 균주를 선발하였다.

[0012] 상기 선발된 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주는 토양의 중금속 오염수준이 증가할 수록 성장수준이 가장 높은 수준으로 증가하는 균주로 확인되었으므로, 상기 균주는 토양의 중금속 오염여부를 확인하는데 사용될 수 있을 것으로 예상되었다. 이처럼 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주를 중금속 토양오염의 지표 미생물로 사용하는 기술은

지금까지 전혀 개발되지 않았고, 본 발명자에 의하여 최초로 개발되었다.

[0013] 상술한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하나의 양태로서 중금속 오염 지표 미생물인 메틸로박터 툰드리팔루덤(*Methylobacter tundripaludum*) 균주의 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 토양내 중금속 오염 확인용 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명의 용어 "중금속(heavy metal)"이란, 비소, 안티모니, 구리, 납, 철, 수은, 카드뮴, 크로뮴, 주석, 아연, 바륨, 비스무트, 니켈, 코발트, 망간, 바나듐, 셀레늄 등 주기율표 상의 아래쪽에 주로 위치하고 있는 비중 4 이상의 무거운 금속원소를 의미한다.

[0015] 본 발명의 용어 "중금속 오염(heavy metal pollution)"이란, 중금속에 의하여 일어나는 대기오염, 수질오염, 토양오염, 식품오염 등을 총괄하는 표현을 의미한다. 이러한 중금속 오염은 대기환경, 수서환경, 토양환경 등에서 생태계를 교란시켜서 1차적인 오염피해를 유발시킬 뿐만 아니라, 이로 인하여 주변 생태계에도 영향을 미쳐서 2차적인 오염피해를 유발시킬 수도 있다. 대표적인 예로서, 수은으로 오염된 식자재로 제조된 식품에 의하여 발생된 미나마타병, 카드뮴으로 오염된 식자재로 제조된 식품에 의하여 발생된 이타이이타이병 등을 들 수 있다.

[0016] 본 발명의 용어 "중금속 오염 지표 미생물(marker microorganism of heavy metal pollution)"이란, 중금속 오염이 발생된 토양환경 또는 수서환경에서 중금속을 이용하여 성장 또는 증식할 수 있는 미생물을 의미한다.

[0017] 본 발명에 있어서, 상기 중금속 오염 지표 미생물로서 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주를 사용하였다.

[0018] 본 발명의 용어 "메틸로박터 툰드리팔루덤(*Methylobacter tundripaludum*) 균주"란, 메탄산화세균의 일종으로서, 그람음성균에 속하고, 간균형태이며, 이동성이 없고, 포자를 형성하지 않는 미생물을 의미한다. 상기 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주의 게놈 DNA 서열은 모두 분석된 것으로 알려져 있다.

[0019] 본 발명에 있어서, 상기 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주는 광산 주변의 중금속 오염 토양에서 중금속의 오염수준이 증가함에 따라 높은 수준으로 성장 및 증식하기 때문에, 중금속 오염 지표 미생물로 사용되었다.

[0020] 본 발명에서 제공하는 토양내 중금속 오염 확인용 조성물은 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주의 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는데, 상기 조성물에 포함된 제제를 사용하여 중금속의 오염여부를 확인하고자 하는 토양에서 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주의 수준을 측정함으로써, 상기 토양이 중금속에 의하여 오염되었는지의 여부를 확인하는데 사용될 수 있다.

[0021] 이때, 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주를 검출할 수 있는 제제는 토양시료에 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주가 수준을 측정하여, 상기 균주를 정량적으로 분석하는데 사용될 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주 특이적인 유전자의 수준을 측정할 수 있는 프라이머 또는 프로브 등이 될 수 있고; 상기 특이적인 유전자로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정할 수 있는 항체 또는 앱타머 등이 될 수 있으며; 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주의 16S rRNA의 서열을 정량적으로 분석하기 위한 프라이머 또는 프로브 등이 될 수 있고; 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주의 게놈 DNA 서열을 정량적으로 분석하기 위한 파이로시퀀싱용 제제 등이 될 수 있다.

[0022] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 폐광된 서성광산의 주변 토양을 대상으로 비소의 용출량, 비소 전함량 및 arrA 유전자의 수준을 측정하여, 중금속 오염 지역을 선정하고(도 1 및 2), 선정된 오염 지역의 토양을 분석하여 중금속 오염 지표미생물을 발굴한 결과(표 2, 표 3, 표 4, 도 3 및 도 4), 오염수준이 증가함에 따라 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주가 선택적으로 성장함을 확인하였다(표 5, 도 5 및 도 6).

[0023] 본 발명은 다른 하나의 양태로서 상기 조성물을 포함하는 토양내 중금속 오염 확인용 키트를 제공한다.

[0024] 본 발명의 키트는 상기 조성물을 이용하여 토양내 중금속 오염을 확인하는데 필요한 지표 미생물 배양에 사용되는 배양용기, 지표 미생물을 검출하는데 사용되는 검출수단, 토양내 지표 미생물을 추출하기 위한 완충액 등을 포함할 수 있다.

[0025] 아울러, 상기 키트는 상기 조성물을 이용하여 보다 효과적으로 토양내 중금속 오염을 확인하는데 사용될 수 있는 추가적인 구성요소를 포함할 수 있는데, 상기 구성요소로는 대조군 토양시료, 중금속 오염 인덱스 등이 될 수 있다.

[0026] 상기 대조군 토양시료는 중금속이 전혀 포함되어 있지 않은 토양시료로서, 목적하는 토양시료에서 검출된 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주의 수준을 비교하기 위한 대조군 시료로서 사용될 수 있다.

[0027] 상기 중금속 오염 인덱스는 중금속 오염 토양에서 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주의 성장수준을 나타내는 인덱스를 의미하는데, 상기 인덱스는 중금속을 농도 단계별로 포함하는 토양시료에 일정량의 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주를 접종한 후, 일정한 온도조건 및 시간 동안 배양한 다음, 토양시료에 포함된 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주의 수준을 측정한 결과를 기록한 도표로서, 목적하는 토양시료에 동일한 수준의 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주를 접종하고, 동일한 온도 및 시간조건으로 배양한 후, 얻어진 결과를 대조하여, 목적하는 토양시료에 포함된 중금속의 수준을 예측하는데 사용될 수 있다.

[0028] 본 발명은 또 다른 하나의 양태로서 상기 조성물 또는 키트를 사용하여 토양내 중금속 오염을 확인하는 방법을 제공한다.

[0029] 구체적으로, 본 발명에서 제공하는 토양내 중금속 오염을 확인하는 방법은 중금속 오염여부를 확인하고자 하는 토양시료로부터 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주를 검출하는 단계를 포함한다.

[0030] 상기 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주는 비소 등의 중금속이 오염된 토양에서 성장 또는 증식할 수 있고, 상기 중금속이 존재하지 않는 토양에서는 성장 또는 증식하지 않으므로, 상기 토양시료에서 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주가 검출된 경우에는 상기 토양시료가 중금속 오염된 것으로 판정할 수 있고, 상기 토양시료에서 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주가 검출되지 않은 경우에는 상기 토양시료가 중금속 오염되지 않은 것으로 판정할 수 있다.

[0031] 상기 방법은 중금속 오염되지 않은 토양시료에서 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주의 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0032] 상기 방법을 사용할 때, 토양시료는 지역적 특성, 토질특성에 의하여 그에 포함된 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주의 수준에 편차가 있을 수 있으므로, 상기 토양시료와 동일한 지역의 중금속 오염되지 않은 토양시료를 대조군 토양시료로 사용하여, 상기 대조군 토양시료와 목적하는 토양시료에서 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주의 검출여부를 확인하고 비교함으로써, 중금속 오염 여부를 보다 정확하게 확인할 수 있다.

[0033] 본 발명은 또 다른 하나의 양태로서 상기 조성물 또는 키트를 사용하여 토양내 중금속 수준을 정량적으로 분석하는 방법을 제공한다.

[0034] 구체적으로, 본 발명에서 제공하는 토양오염을 정량적으로 분석하는 방법은 (a) 중금속 오염여부를 확인하고자 하는 토양시료로부터 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주의 수준을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 검출된 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주의 수준을 중금속 오염 토양에서 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주의 성장수준을 나타내는 인덱스와 비교하여, 토양시료에 오염된 중금속의 수준을 정량적으로 분석하는 단계를 포함한다.

[0035] 상기 방법에 있어서, 상기 중금속 오염 토양에서 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주의 성장 또는 증식수준을 나타내는 인덱스(중금속 오염 인덱스)에는 토양내 중금속 오염수준별로 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주의 성장 또는 증식수준이 표시되어 있기 때문에, 목적하는 토양시료로부터 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주의 수준을 측정하고, 측정된 수준을 상기 인덱스와 비교함으로써, 목적하는 토양에 포함된 중금속 오염수준을 정량적으로 분석할 수 있다.

[0036] 본 발명은 또 다른 하나의 양태로서 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주를 포함하는 토양내 중금속 오염 확인용 조성물을 제공한다.

[0037] 상기 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주를 포함하는 조성물은 상기 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주를 중금속의 오염여부를 확인하고자 하는 토양에 접종하고 배양한 후, 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주의 증식여부를 확인함으로써, 상기 토양이 중금속에 의하여 오염되었는지의 여부를 확인하는데 사용될 수 있다.

[0038] 본 발명은 또 다른 하나의 양태로서 상기 조성물을 포함하는 토양내 중금속 오염 확인용 키트를 제공한다.

[0039] 본 발명의 키트는 상기 조성물을 이용하여 토양내 중금속 오염을 확인하는데 필요한 지표 미생물 배양에 사용되는 배양용기, 지표 미생물을 검출하는데 사용되는 검출수단, 토양내 지표 미생물을 추출하기 위한 완충액 등을 포함할 수 있다.

[0040] 아울러, 상기 키트는 상기 조성물을 이용하여 보다 효과적으로 토양내 중금속 오염을 확인하는데 사용될 수 있는 추가적인 구성요소를 포함할 수 있는데, 상기 구성요소로는 대조군 토양시료, 중금속 오염 인덱스 등이 될 수 있다.

[0041] 본 발명은 또 다른 하나의 양태로서 상기 조성물 또는 키트를 사용하여 토양내 중금속 오염을 확인하는 방법을

제공한다.

[0042] 구체적으로, 본 발명에서 제공하는 토양내 중금속 오염을 확인하는 방법은 (a) 중금속 오염여부를 확인하고자 하는 토양시료를 멸균하여, 멸균된 토양시료를 수득하는 단계; (b) 상기 수득한 멸균된 토양시료와 중금속이 포함되지 않은 대조군 토양시료에 각각 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주를 접종하고, 배양하는 단계; 및 (c) 배양이 종료된 후, 멸균된 토양시료와 대조군 토양시료에서 증식된 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주를 비교하는 단계를 포함할 수 있다.

[0043] 상기 방법에 있어서, 멸균된 토양시료에서 증식된 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주의 수준이 대조군 토양시료에서 증식된 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주의 수준에 비하여 유의하게 증가하지 않으면, 상기 멸균된 토양시료에 중금속이 오염되지 않은 것으로 판정할 수 있고; 상기 멸균된 토양시료에서 증식된 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주의 수준이 대조군 토양시료에서 증식된 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주의 수준에 비하여 유의하게 증가하면, 상기 멸균된 토양시료에 중금속이 오염된 것으로 판정할 수 있다.

[0044] 상기 방법은 여러 지역에서 유래된 다수의 토양시료를 대상으로 동시에 수행될 수 있으므로, 보다 효과적으로 토양의 중금속 오염여부를 확인하는데 사용될 수 있다.

[0045] 본 발명은 또 다른 하나의 양태로서 상기 조성물 또는 키트를 사용하여 토양내 중금속 수준을 정량적으로 분석하는 방법을 제공한다.

[0046] 구체적으로, 본 발명에서 제공하는 토양오염을 정량적으로 분석하는 방법은 (a) 중금속 오염여부를 확인하고자 하는 토양시료를 멸균하여, 멸균된 토양시료를 수득하는 단계; (b) 상기 멸균된 토양시료에 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주를 접종하고, 배양하는 단계; 및 (c) 배양결과를 중금속 오염 토양에서 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주의 성장수준을 나타내는 인덱스와 비교하여, 토양시료에 오염된 중금속의 수준을 정량적으로 분석하는 단계를 포함할 수 있다.

[0047] 상기 방법에 있어서, 상기 멸균된 토양시료에서 증시된 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주의 수준을 중금속 오염 토양에서 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주의 성장수준을 나타내는 인덱스(중금속 오염 인덱스)에 표시된 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주의 수준과 비교하여, 상기 토양시료에 포함된 중금속의 수준을 정량적으로 분석할 수 있다.

[0048] 상기 방법은 여려 지역에서 유래된 다수의 토양시료를 대상으로 동시에 수행될 수 있으므로, 정량적으로 분석결과와 토양시료의 지역을 교차분석하여, 전체 토양내 중금속 오염수준의 변화추이를 분석하는데 사용될 수 있다.

발명의 효과

[0049] 본 발명에서 제공하는 중금속 오염 지표 미생물을 사용하면, 토양내 중금속의 오염여부 뿐만 아니라 토양내 오염된 중금속의 수준을 정량적으로 분석할 수 있으므로, 토양내 중금속 오염의 효과적인 확인에 널리 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0050] 도 1은 토양시료에서 용출되는 3가 비소 및 5가 비소의 용출량을 토양의 깊이에 따라 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 2는 토양시료에 포함된 비소 전함량을 토양의 깊이에 따라 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 3은 토양시료에 포함된 각 미생물의 군집을 문(Phyla) 수준에서 분류한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 4는 토양시료에 포함된 각 미생물의 군집을 속(Genus) 수준에서 분류한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 5는 토양시료에 포함된 각 미생물의 군집을 종(Species) 수준에서 분류한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 6은 토양시료에 포함된 미생물 군집의 계통도(phylogenetic tree)이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0051] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0052] **실시예 1: 중금속 오염 토양의 선정**

[0053] 납과 아연을 채굴한 후, 폐광된 서성광산의 주변 토양을 대상으로 중금속 오염 지역을 선정하고, 표층으로부터 지하 10 내지 110cm의 토양시료를 채취한 다음, 상기 토양시료에 포함된 비소의 용출양 및 비소 전함량을 측정하고, 비소민감성 미생물에 특이적으로 존재하는 arrA 유전자의 함량을 측정하였다.

[0054] 먼저, 상기 토양시료를 물에 희석한 후, 여과하여 희석액을 수득하고, 상기 희석액에 포함된 3가 비소(As^{3+}) 및 5가 비소(As^{5+})의 함량을 측정하여, 상기 비소의 용출량을 산출하였다(도 1).

[0055] 도 1은 토양시료에서 용출되는 3가 비소 및 5가 비소의 용출량을 토양의 깊이에 따라 비교한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 1에서 보듯이, 3가 비소는 거의 검출되지 않았으나, 5가 비소는 지하 50cm 이하의 토양시료에서 높은 농도로 용출됨을 확인하였다.

[0056] 다음으로, 상기 토양시료에 포함된 비소 전함량을 측정하였다(도 2).

[0057] 도 2는 토양시료에 포함된 비소 전함량을 토양의 깊이에 따라 비교한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 2에서 보듯이, 지하 30cm까지는 비소가 검출되지 않았으나, 지하 50cm 이하의 토양에서는 약 100mg/kg 이상의 농도로 비소가 검출됨을 확인하였다.

[0058] 상기 도 1 및 2의 결과로부터, 상기 선정된 중금속 오염 지역으로부터 수득한 토양시료를, 중금속 오염 토양으로 사용할 수 있음을 알 수 있었다.

[0059] 이에, 상기 토양시료 중에서, 오염수준이 낮은 시료와 높은 시료에 포함된 중금속의 함량과 pH를 비교하였다(표 1). 이때, 오염수준이 낮은 시료로는 서성광산의 오염지역의 지하 40cm에서 얻어진 토양시료(SS-LC)를 사용하고, 오염수준이 높은 시료로는 서성광산의 오염지역의 지하 60cm에서 얻어진 토양시료(SS-HC)를 사용하였으며, 대조군으로는 서성광산의 비오염지역에서 얻어진 토양시료(SS-NC)를 사용하였다.

표 1

[0060] 오염토양에 포함된 중금속 수준(mg/kg, 전함량)

시료	SS-NC	SS-LC	SS-HC
비소	N.D	N.D	152
카드뮴	1.65	2.59	43.5
구리	22.9	83.9	394
납	22.6	153	8169
아연	47.7	135	4685
니켈	12.4	23.5	38.9
칼슘	696	6251	43451
철	22140	30392	77803
pH	6.20	7.05	8.70

[0061] 상기 표 1에서 보듯이, 대조군과 오염수준이 낮은 시료에 비하여, 오염수준이 높은 시료는 중금속의 함량이 현저하게 증가함을 확인하였다.

[0062] **실시예 2: 중금속 오염 지표미생물의 발굴**

[0063] 상기 실시예 1에서 수득한 각각의 토양시료 0.5 g을 Power soil DNA isolation kit (MO BIO Laboratories)에 적용하여 각 토양시료로부터 게놈 DNA를 추출하였다(표 2). 이때, 토양시료로는 SS-LC 및 SS-HC를 사용하고, 대조군으로는 SS-NC 및 오염지역의 표층토양에서 얻어진 토양시료(SS-PC)을 사용하였다.

표 2

[0064] 각 토양시료에서 추출된 게놈 DNA의 농도

	농도(ng/㎕)	A_{260}/A_{280}
SS-NC	36.398	1.91
SS-PC	44.624	1.918
SS-LC	33.329	2.047
SS-HC	5.863	2.055

[0065] 상기 추출된 각 게놈 DNA를 대상으로 파이로시퀀싱 분석을 3회 반복하여 수행하였으며, 이로부터 얻어진 데이터를 CLcommunity program에 적용하여 분석하였다(표 3).

표 3

[0066] 파이로시퀀싱 분석결과

Reference ID	Valid reads	OTUs	Chao1	Shannon	Goods Lib. Coverage
SS-NC_1	4178	2039	4306.66	7.24	0.7
SS-NC_2	4178	1990	4056.57	7.21	0.71
SS-NC_3	4178	2036	4052.64	7.24	0.7
SS-LC_1	4178	1875	3936.24	7.04	0.72
SS-LC_2	4178	1867	3802.04	6.97	0.72
SS-LC_3	4178	1906	4487.62	6.92	0.7
SS-HC_1	4178	1185	2453.67	5.98	0.83
SS-HC_2	4178	1248	2594.3	6.1	0.82
SS-HC_3	4178	1206	2640.01	6.05	0.83

[0067] 상기 표 3의 결과에 따라, 16S rRNA의 서열을 분석하여 문(Phyla) 수준에서 각 게놈 DNA에 해당하는 미생물의 군집결과를 분석하였다(도 3).

[0068] 도 3은 토양시료에 포함된 각 미생물의 군집을 문(Phyla) 수준에서 분류한 결과를 나타내는 그래프이다.

[0069] 이어, 상기 토양시료에 포함된 오염수준의 증가에 따른 문(Phyla) 수준에서 분류한 미생물의 증가/감소 추이를 분석하였다(표 4).

표 4

[0070] 오염수준의 증가에 따른 문(Phyla) 수준에서 분류한 미생물의 증가/감소 추이

명칭	SS-NC	SS-LC	SS-HC	증가/감소
Proteobacteria	33	36	53	증가
Chloroflexi	25	23	16	감소
Acidobacteria	16	8	5	감소
Actinobacteria	5	20	6	-
Gemmatimonadetes	2	1	4	-
Firmicutes	3	3	2	감소
Bacteroidetes	2	1	2	-
Nitrospirae	3	2	1	감소
Planctomycetes	2	0	1	-
Verrucomicrobia	2	0	1	-
Chlorobi	1	0	2	-
OD1	0	0	1	-
Cyanobacteria	0	0	2	-
ETC.	6	5	3	-

[0071] 상기 표 4에서 보듯이, 오염수준이 증가함에 따라 Proteobacteria는 증가하였고, Chloroflexi와 Acidobacteria는 감소함을 확인하였다.

[0072] 따라서, Proteobacteria는 오염도의 증가에 따라 선택적으로 생존하고, 오염도에 대한 저항성이 높은 수준인 것으로 분석되었다. 또한, Chloroflexi는 토양의 심도가 깊어지면서 빛의 투과율이 감소하기 때문에, 그의 비율이 감소하는 것으로 분석되었다. 끝으로, Acidobacteria는 일반 토양 미생물로 알려져 있으므로, 상기 미생물의 비율이 감소하는 것으로 부터, 토양의 생태건강성이 감소한다고 분석되었다.

[0073] 이에, 상기 표 4의 결과에 따라, Proteobacteria에 포함된 균주를 대상으로, 16S rRNA의 서열을 분석하여 속

(Genus) 수준에서 각 게놈 DNA에 해당하는 미생물의 군집결과를 분석하였다(도 4).

[0074] 도 4는 토양시료에 포함된 각 미생물의 군집을 속(Genus) 수준에서 분류한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 4에서 보듯이, 메틸로박터(Methylobacter) 속 미생물은 중금속에 오염되지 않은 토양(SS-NC) 및 중금속 함량이 낮은 토양(SS-LC)에서는 검출되지 않았으나, 중금속 함량이 높은 토양(SS-HC)에서는 높은 수준으로 포함됨을 확인하였다.

[0075] 따라서, 메틸로박터(Methylobacter) 속 미생물은 오염도의 증가에 따라 선택적으로 생존하고, 오염도에 대한 저항성이 높은 수준인 것으로 분석되었다.

[0076] 이에, 상기 도 4의 결과에 따라, 메틸로박터(Methylobacter) 속 미생물에 포함된 균주를 대상으로, 16S rRNA의 서열을 분석하여 종(Species) 수준에서 각 게놈 DNA에 해당하는 미생물의 군집결과를 분석하였다(도 5).

[0077] 도 5는 토양시료에 포함된 각 미생물의 군집을 종(Species) 수준에서 분류한 결과를 나타내는 그래프이다.

[0078] 이어, 상기 토양시료에 포함된 오염수준의 증가에 따른 종(Species) 수준에서 분류한 미생물의 증가/감소 추이를 분석하였다(표 5).

표 5

[0079] 오염수준의 증가에 따른 종(Species) 수준에서 분류한 미생물의 증가/감소 추이

명칭	SS-NC	SS-LC	SS-HC	증가/감소
Methylobacter tundripaludum	0	0	15	증가
Anaerolinaceae_uc_s	5	3	1	감소
Arthrobacteroryzae	0	8	2	-
AM745150_f_uc_s	1	0	0	감소
GQ396871_s	0	0	1	증가
Thiobacillusthioparus	0	2	2	증가
AY221611_s	0	0	1	증가
GQ500701_g_uc	0	1	0	-
FN563196_f_uc_s	2	0	0	감소
Lysobactergummosus	0	3	0	-
Geobacter_uc	1	0	0	감소
FJ810576_s	0	1	1	증가
AQWE_s	0	2	0	-
4P005625_s	2	0	0	감소
Anaeromyxobacter_uc	0	0	1	-
Afipiabroomeae	1	0	0	감소
EU937836_s	1	0	0	감소
HQ178913_s	0	0	1	증가
ETC.	87	80	74	-

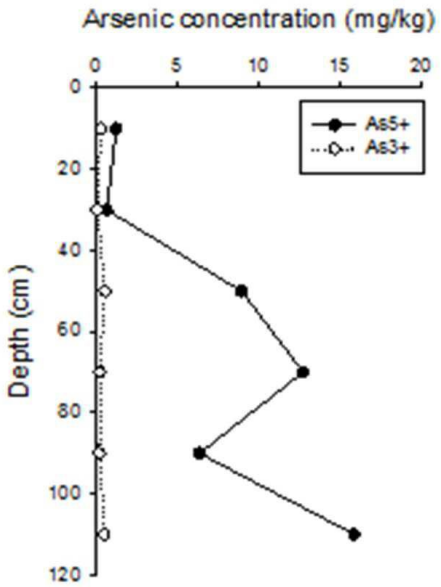
[0080] 상기 표 5에서 보듯이, 오염수준이 증가함에 따라 메틸로박터 툰드리팔루덤(*Methylobacter tundripaludum*) 균주가 선택적으로 성장함을 확인하였다. 상기 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주는 메탄산화세균으로 알려져 있는데, 메타노박틴(methanobactin)을 분비하여 주변환경에 존재하는 코발트, 철, 니켈, 납, 아연 등의 금속과 결합할 수 있다고 알려져 있다.

[0081] 따라서, 상기 메틸로박터 툰드리팔루덤 균주는 오염된 토양에 포함된 중금속을 이용하여 성장하는 것으로 분석되었다.

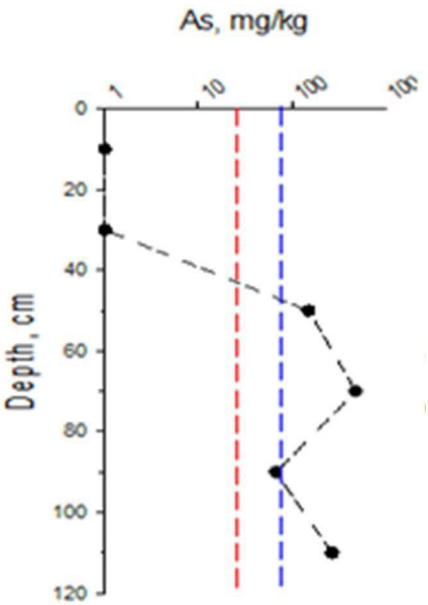
[0082] 상기 높은 수준의 오염도를 나타내는 토양(SS-HC) 시료에서 검출된 미생물 군집의 계통도(phylogenetic tree)를 도 6에 도시하였다. 도 6은 토양시료에 포함된 미생물 군집의 계통도(phylogenetic tree)이다. 도 6에서 보듯이, 높은 수준의 오염도를 나타내는 토양(SS-HC) 시료에서 검출된 미생물 군집에서 메틸로박터 툰드리팔루덤 종이 우점적으로 생장함을 확인하였다.

도면

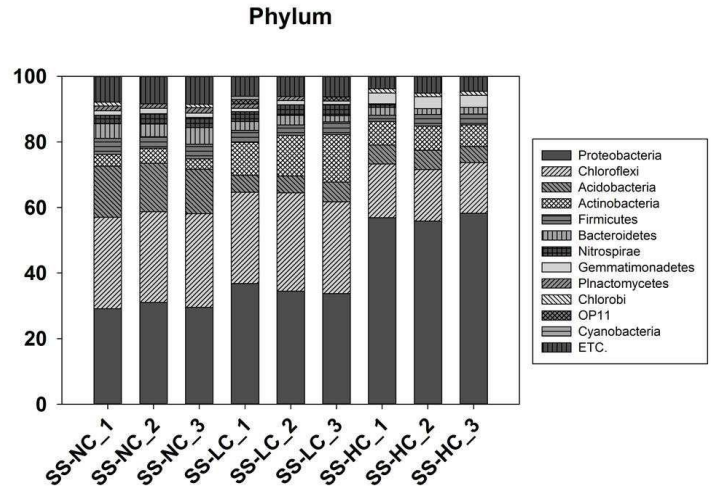
도면1


Arsenic concentration (mg/kg)
0
5
10
15
20
0
20
40
60
80
100
120
Depth (cm)
As5+
As3+

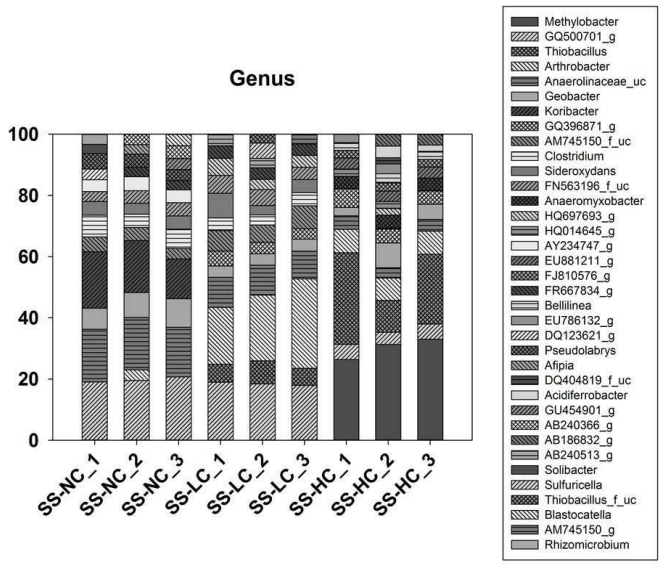
도면2


As, mg/kg
1
10
100
0
20
40
60
80
100
120
Depth, cm

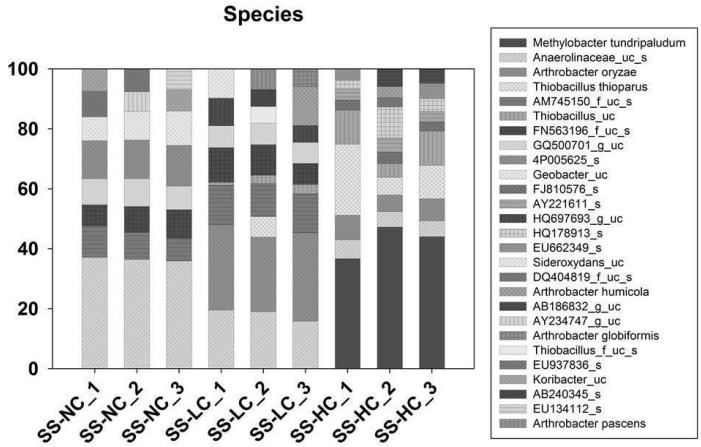
도면3


Phylum
100
80
60
40
20
0
SS-NC_1
SS-NC_2
SS-NC_3
SS-LC_1
SS-LC_2
SS-LC_3
SS-HC_1
SS-HC_2
SS-HC_3
Proteobacteria
Chloroflexi
Acidobacteria
Actinobacteria
Firmicutes
Bacteroidetes
Nitrospirae
Gemmatimonadetes
Plnactomycetes
Chlorobi
OP11
Cyanobacteria
ETC.

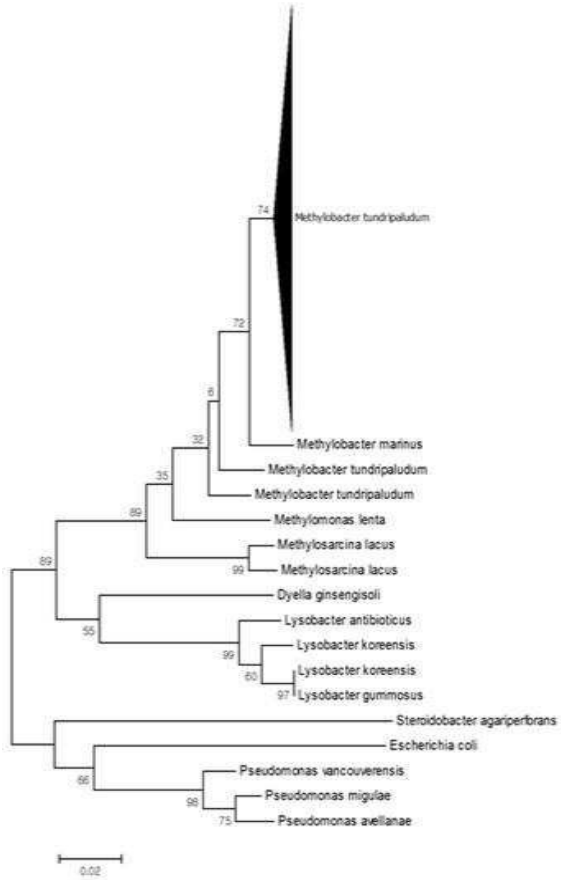
도면4


Genus
100
80
60
40
20
0
SS-NC_1
SS-NC_2
SS-NC_3
SS-LC_1
SS-LC_2
SS-LC_3
SS-HC_1
SS-HC_2
SS-HC_3
Methylobacter
GQ500701_g
Thiobacillus
Arthrobacter
Anaerolinaceae_uc
Geobacter
Koribacter
GQ396871_g
AM745150_f_uc
Clostridium
Sideroxydans
FN563196_f_uc
Anaeromyxobacter
HQ697693_g
HQ014645_g
AY234747_g
EU881211_g
FJ810576_g
FR667834_g
Bellilinea
EU786132_g
DQ123621_g
Pseudolabrys
Afipia
DQ404819_f_uc
Acidiferrobacter
GU454901_g
AB240366_g
AB186832_g
AB240513_g
Solibacter
Sulfuricella
Thiobacillus_f_uc
Blastocatella
AM745150_g
Rhizomicrobium

도면5


Species
100
80
60
40
20
0
SS-NC_1
SS-NC_2
SS-NC_3
SS-LC_1
SS-LC_2
SS-LC_3
SS-HC_1
SS-HC_2
SS-HC_3
Methylobacter tundripaludum
Anaerolinaceae_uc_s
Arthrobacter oryzae
Thiobacillus thioparus
AM745150_f_uc_s
Thiobacillus_uc
FN563196_f_uc_s
GQ500701_g_uc
4P005625_s
Geobacter_uc
FJ810576_s
AY221611_s
HQ697693_g_uc
HQ178913_s
EU662349_s
Sideroxydans_uc
DQ404819_f_uc_s
Arthrobacter humicola
AB186832_g_uc
AY234747_g_uc
Arthrobacter globiformis
Thiobacillus_f_uc_s
EU937836_s
Koribacter_uc
AB240345_s
EU134112_s
Arthrobacter pascens

도면6


74
Methylobacter tundripaludum
72
8
32
Methylobacter marinus
35
Methylobacter tundripaludum
89
Methylobacter tundripaludum
Methylomonas lenta
Methylosarcina lacus
89
99
Methylosarcina lacus
Dyella ginsengisoli
Lysobacter antibioticus
55
99
Lysobacter koreensis
60
Lysobacter koreensis
97
Lysobacter gummosus
Steroidobacter agariperforans
Escherichia coli
66
Pseudomonas vancouverensis
98
Pseudomonas migulae
75
Pseudomonas avellanae
0.02