



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2011년05월25일
(11) 등록번호 10-1036806
(24) 등록일자 2011년05월18일

(51) Int. Cl.

B09C 1/10 (2006.01) *C12N 1/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0123223

(22) 출원일자 2010년12월06일

심사청구일자 2010년12월06일

(56) 선행기술조사문헌

[Genebank accession number EU443097]2008 MAR, Zhang 외 5*

US7473546 B

[Korea Journal of Microbiol Biotechnolgy]

Vol.34, No.3, 2006, Pages 185-195

JP2007203146 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

이은영

서울 강남구 대치1동 선경아파트 1동 1408호

홍선화

경기 오산시 양산동 효성백년가약아파트 103동 1401호

조옥상

경기 수원시 영통구 영통2동 살구골 710동 302호

(72) 발명자

이은영

서울 강남구 대치1동 선경아파트 1동 1408호

조옥상

경기 수원시 영통구 영통2동 살구골 710동 302호
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김해중

전체 청구항 수 : 총 4 항

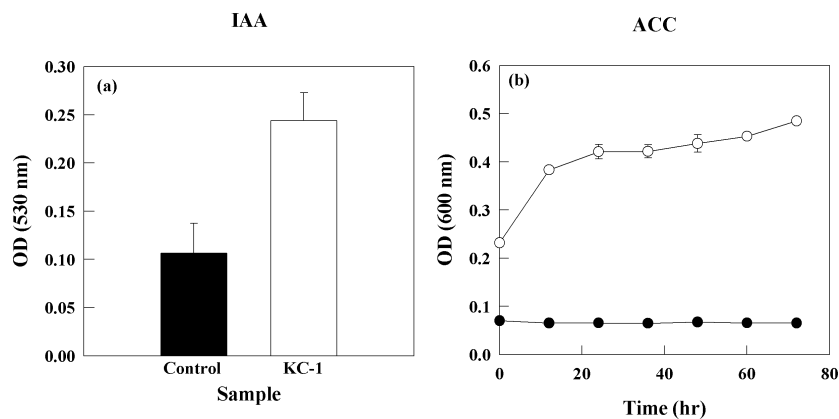
심사관 : 박수진

(54) 알카리지니어스 속 미생물, 이를 이용한 유류와 중금속 오염 토양 정화방법

(57) 요약

본 발명은 알카리지니어스(*Alcaligenes* sp.) 속 미생물, 이를 이용한 중금속 및 유류 오염토양 정화 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 식물성 호르몬인 인돌아세트산(IAA)의 생산능력과 식물의 스트레스성 물질인 에틸렌의 전구체인 아미노사이클로프로판 카복실레이트(1-aminocyclopropane-1-carboxylate(ACC)) 디아미나제(ACC deaminase)를 생성하는 신규 미생물 알카리지니어스(*Alcaligenes* sp.) KC-1 균주, 알카리지니어스(*Alcaligenes* sp.) 속 KC-1 균주를 이용하여 유류와 중금속으로 오염된 토양을 정화시키는 방법, 알카리지니어스(*Alcaligenes* sp.) 속 KC-1 균주를 식물과 함께 이용하여 유류와 중금속으로 오염된 토양을 정화시키는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

홍선화

경기 오산시 양산동 효성백년가약아파트 103동
1401호

신기철

인천광역시 부평구 삼산2동 서해그랑블아파트 509
동 1103호

특허청구의 범위

청구항 1

습지에서 분리한 알카리지니어스(*Alcaligenes* sp.) KC-1(KCTC11801BP) 균주.

청구항 2

청구항 1에 의한 알카리지니어스(*Alcaligenes* sp.) KC-1(KCTC11801BP) 균주를 유효성분으로 함유하는 미생물 제제.

청구항 3

청구항 1에 의한 알카리지니어스(*Alcaligenes* sp.) KC-1(KCTC11801BP) 균주를 이용하여 유류 및 중금속에 오염된 토양을 정화시키는 방법.

청구항 4

청구항 1에 의한 알카리지니어스(*Alcaligenes* sp.) KC-1(KCTC11801BP) 균주와 식물을 이용하여 유류 및 중금속에 오염된 토양을 정화시키는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 알카리지니어스(*Alcaligenes* sp.) 속 미생물, 이를 이용한 중금속 및 유류 오염토양 정화 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 식물성 호르몬인 인돌아세트산(IAA)의 생산능력과 식물의 스트레스성 물질인 에틸렌의 전구체인 아미노사이클로프로판 카복실레이트(1-aminocyclopropane-1-carboxylate(ACC)) 디아미나제(ACC deaminase)를 생성하는 신규 미생물 알카리지니어스(*Alcaligenes* sp.) KC-1 균주, 알카리지니어스(*Alcaligenes* sp.) 속 KC-1 균주를 이용하여 유류와 중금속으로 오염된 토양을 정화시키는 방법, 알카리지니어스(*Alcaligenes* sp.) 속 KC-1 균주를 식물과 함께 이용하여 유류와 중금속으로 오염된 토양을 정화시키는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 광석의 채련 및 정련과정 등 각종 산업활동 과정에서 배출된 유류와 중금속에 의한 토양 오염은 주요 환경문제로 대두되고 있다. 중금속과 유류로 오염된 토양을 정화하기 위해 미생물과 식물을 이용하는 생물정화방법은 경제적이고 환경친화적인 방법으로 최근 들어 상용화되고 있다. 유류 오염 토양 정화를 위해 이용될 수 있는 유류 분해 미생물로 *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Rhodococcus*, *Bacillus* 등이 있다. 또한, 유류 오염 토양 정화에 이용될 수 있는 식물로는 *Lolium multiflorum*, *Leguminosae*, *Poplar*, *Pinus densiflora*, *Festuca arundinacea*, *Zea mays* 등이 보고되고 있다.

[0003] 중금속은 그 자체가 분해 되는 것이 아니라 식물체 축적에 의해 토양으로부터 제거되기 때문에 근권의 발달은 중금속 제거가 매우 중요하다. 중금속 과축적 식물과 식물이 중금속을 잘 축적할 수 있게 돕는 미생물에 관한 연구가 많이 진행 되어 있다. 지금까지 연구된 중금속과축적식물(Metal-hyperaccumulator)은 국화과(Asteraceae), 십자화과(Brassicaceae), 석죽과(Caryophyllaceae), 사초과(Cyperaceae), 콩과(Fabaceae), 이나무과(Iacourtiaceae), 꿀풀과(Lamiaceae), 벼과(Poaceae), 그리고 제비꽃과(Violaceae)등이 있고, 중금속에 내성이 강한 미생물로는 *Bacillus* sp., *Pityrogramma calomelanos*, 그리고 *Serratia* sp., 등이 알려져 있다.

[0004] 현재까지 진행된 대부분의 연구는 유류나 중금속 단독으로 오염되었을 때 각 오염물질을 미생물이나 식물을 이용하여 제거하는 것에 관한 것이다. 유류와 중금속으로 오염된 토양은 한 종류의 오염물질로 오염된 토양보다 오염물질을 제거하는 것이 훨씬 어려워지는 경우가 많다. 따라서, 2종 이상의 오염물질로 오염된 토양정화에 대한 연구를 통해 관련 정보를 구축하는 것이 필요하다.

[0005] 또한, 지금까지의 연구들은 단순히 오염부지에 오염물질에 내성이 강한 식물을 파종하거나, 오염물질을 분해하는 미생물을 인공적으로 주입하여 정화하는데 국한되어 있었다. 하지만 이러한 정화방법은 오염물질을 제거하는데 효율이 높지 않다는 문제가 있다. 이러한 문제점을 보완하기 위해 최근에는 오염물질에 내성이 강하고, 중금속을 축적할 수 있는 식물에, 오염물질에 내성을 가지거나 분해할 수 있으면서, 동시에 식물의 성장을 촉진할 수 있는 미생물을 함께 접목한 rhizoremediation 기법이 이용되고 있다. 하지만 이러한 정화기법은 최근에 시작한 신 기술이기 때문에 이 정화기법에 이용할 수 있는 미생물이 극히 드물다. 따라서, 오염물질에 내성을 가지고 분해를 하는 동시에 식물의 성장을 촉진할 수 있는 미생물의 개발이 매우 시급하다.

[0006] 이에 본 발명가는 이러한 문제점을 해결하기 위해 연구한 결과, 습지에서 서식하는 갈대의 근권토양으로부터 식물성 호르몬인 인돌아세트산(IAA)의 생산능력과 식물의 스트레스성 물질인 에틸렌의 전구체인 아미노사이클로프로판 카복실레이트(1-aminocyclopropane-1-carboxylate(ACC)) 디아미나제(ACC deaminase)를 생성하는 신규 미생물 *Alcaligenes* sp. KC-1을 분리하고, 이 미생물이 식물의 성장을 촉진하는 동시에 유류를 분해하고, 중금속에 내성을 가지고 있다. 이 미생물에 옥수수과 강남콩을 이용한 mesocosm 실험을 통해 유류와 중금속으로 오염된 토양을 정화시킬 수 있다는 것을 확인함으로써 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은, 갈대의 근권토양으로부터 분리한 알카리지니어스 속 미생물을 제공하는 데 있다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은, 식물의 근권토양으로부터 유류와 중금속을 분해하거나, 내성이 있으며 동시에 식물 성장 촉진 능력이 있는 미생물을 분리하는 방법을 제공하는 데 있다.

[0009] 이 밖에도, 본 발명의 또 다른 목적은, 위의 미생물을 이용하여 유류와 중금속으로 오염된 토양을 정화하는 방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 습지에서 서식하는 갈대의 근권토양으로부터 식물성 호르몬인 인돌아세트산(IAA)의 생산능력과 식물의 스트레스성 물질인 에틸렌의 전구체인 아미노사이클로프로판 카복실레이트(1-aminocyclopropane-1-carboxylate(ACC)) 디아미나제(ACC deaminase)를 생성하는 신규 미생물 *Alcaligenes* sp. KC-1(KCTC11801BP)을 분리하여 달성할 수 있다.

발명의 효과

[0011] 본 발명에 따른 신규 미생물 알카리지니어스 속 KC-1(KCTC11801BP)은 중금속에 강한 내성을 가지며 동시에 유류를 분해할 수 있다. 또한, 알카리지니어스 속 KC-1은 식물의 성장을 촉진하는 동시에 유류를 분해하고, 중금속에 내성을 가지고 있으며, 식물을 이용한 중금속 및 유류로 오염된 토양을 정화할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0012] 도 1은 본 발명에 따른 알카리지니어스 속 미생물의 식물성장촉진능 평가에서 IAA생산능력과 ACC 디아민에이즈 합성능을 나타낸 그래프이다.
- 도 2는 본 발명에 따른 알카리지니어스 속 KC-1의 유류 분해능을 나타낸 그래프이다.
- 도 3a 내지 도 3e는 본 발명에 따른 알카리지니어스 속 KC-1의 중금속 내성 특성을 나타낸 그래프이다.
- 도 4는 본 발명에 따른 알카리지니어스 속 KC-1균주와 식물이 토양 속의 디젤을 제거하는데 미치는 영향에 관해 조사한 결과 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 본 발명은 습지에서 서식하는 갈대의 근권토양으로부터 식물성 호르몬인 인돌아세트산(IAA)의 생산능력과 식물의 스트레스성 물질인 에틸렌의 전구체인 아미노사이클로프로판 카복실레이트(1-aminocyclopropane-1-carboxylate(ACC)) 디아미나제(ACC deaminase)를 생성하는 신규 미생물 *Alcaligenes* sp. KC-1(KCTC11801BP)을 분리하여 달성할 수 있다.

[0014] 본 발명의 *Alcaligenes* sp. KC-1은 식물의 성장을 촉진하는 동시에 유류를 분해하고, 중금속에 내성을 가지고 있는데, 본 발명의 알카리지니어스 속 KC-1은 습지에서 서식하는 갈대에서 분리한 균주로 중금속에 강한 내성을 가지며 동시에 유류를 분해할 수 있는 특징을 가지고 있다.

[0015] 알카리지니어스 속 KC-1의 동정방법은 12곳의 습지에서 습지 토양과 갈대의 근권에서 시료를채취하고 Burk's, Congo Red 그리고 NFB 배지에 넣은 후 일주일간 농화배양한다. 농화배양은 모두 4번의 새 배지로의 계대배양을 진행하고, 고체배지에 도말을 한다. 배지의 종류에 따라서, Burk's Agar 배지에 도말한 균주의 경우 7일 동안 배양하고, Congo Agar 배지 그리고 NFB ager 배지에 도말한 균주는 3일 동안 배양한다. 배양된 균주는 색과 모양에 따라 분리되어 새 배지에 도말 하고, 각 colony의 식물성장 촉진 능력을 조사하기 위해 질소고정 능력, 인돌아세트산 생산능력, 카복실레이트(1-aminocyclopropane-1-carboxylate(ACC)) 디아미나제(ACC deaminase)를 생성, 그리고 사이드로포어 합성능력을 평가한다.

[0016] 위에서 평가한 식물성장 촉진 능력 중 2가지 이상 가지고 있는 균주를 대상으로 디젤의 분해능을 조사하고, 중금속에 내성이 있는지 조사한 후에 식물성장 촉진 능력이 있으며 동시에 오염물질을 분해 할 수 있는 미생물을 선별하여 16S rDNA를 분석하여 16S rDNA 부분 염기서열을 분석하고, 진뱅크에 있는 균주의 데이터베이스를 비교하여 분리한 균주를 동정한다.

[0017] 이하에서 본 발명의 내용을 실시예를 통하여 보다 구체적으로 설명한다.

[0018] <실시예>

[0019] 실시예 1 : 알카리지니어스 속 KC-1의 분리 및 동정

[0020] (1) 갈대의 뿌리와 근권토양에서의 균주 분리

[0021] 균주를 분리하기 위한 시료채취는 갈대 근권토양 그리고 식물이 서식하고 있는 호수물을 위주로 채취하였다. 12 곳에서 채취한 시료는 각각 250mL 삼각플라스크에 멸균수 90mL와 시료 10g을 넣은 후 혼합하여 진탕배양기에 15분간 배양하였으며, 진탕배양기는 30도, 180rpm으로 운전하였다. 15분간 진탕 배양된 시료 중 혼탁액 5mL를 분취하여 250mL 삼각플라스크에 넣은 후 50mL의 액체 배지(Burk's, Congo Red 그리고 NFB)에 넣은 후 일주일간 농화배양 하였다. 농화배양은 모두 4번의 새 배지로의 계대배양을 진행하였다. 배양액을 고체 배지에 도말하여 균주를 배양하였고, 배양된 균주는 색과 모양에 따라 분리되어 새 배지에 도말 하였고, 각 colony의 식물성장 촉진 능력을 평가하였다.

- [0022] (2) 분리한 균주의 식물성장 촉진 능력 평가
- [0023] ① 분리균주의 IAA(indole-3-acetic acid) 생산능 평가
- [0024] 분리한 균주 중 질소고정능력이 가장 우수한 균주를 대상으로 식물성 호르몬인 IAA(indole-3-acetic acid) 생산능을 다음과 같은 방법으로 평가하였고, 모든 실험은 3회 반복하였다. 균주를 각각 0.5mg/mL의 tryptophane을 첨가한 DF 배지 5mL에 접종하여 30℃에서 180rpm으로 5일간 배양하였다. DF 배지의 조성은 다음과 같다: (NH₄)₂SO₄ 2g; KH₂PO₄ 4g; Na₂HPO₄ · 12H₂O 15g; MgSO₄ · 7H₂O 0.2g; FeSO₄ · 7H₂O 1.0mg; B(as H₃BO₃) 10 μg; Mn(as MnSO₄ · H₂O) 11 μg; Zn(as ZnSO₄ · 7H₂O) 125 μg; Cu (as CuSO₄ · 5H₂O) 78 μg; Mo(as Na₂MoO₄ · 2H₂O) 17 μg; 증류수 1L. 균주를 배양 후, 배양액과 Salkowski's reagent (진한 H₂SO₄ 150mL; 증류수 250mL; 0.5M FeCl₃ · 6H₂O 7.5mL)를 1 : 2(v/v)의 비율로 섞은 후, 분홍색으로 발색되는 동안 상온에서 20분간 정치하였다. 발색되는 정도는 흡광도계(DR5000 UV-Visible Spectrophotometer, HACH, USA)를 이용하여 530nm에서 흡광도로 측정하였다.
- [0025] ② ACC(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) deaminase 활성
- [0026] ACC(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) deaminase 활성은 다음과 같은 방법으로 평가하였다(실험에 사용된 배지는(NH₄)₂SO₄ 대신 3mM의 ACC를 넣은 DF medium이다). 분리한 각각의 colony들을 배지에 접종하여 30℃에서 180 rpm으로 48시간 동안 배양하였다. 배양기간 동안 흡광도계를 이용하여 4시간마다 600nm에서 흡광도를 측정하였다. SPSS(12.0K)를 이용하여 균주를 접종하지 않은 대조군과 two sample t-test 유의차 분석을 수행하여 균주의 ACC 이용 능력을 평가하였다.
- [0027] ③ Siderophores 합성능
- [0028] 철은 식물의 성장에 필수 필요 요소로써 결핍되면 ethylene을 생성하게 하여 식물이 스트레스를 받는 환경을 만들게 된다. 이러한 철은 중성 및 혐기적인 조건의 토양에서는 난용성인 Fe(OH)₃로 존재하는데 저농도의 철을 대사에 이용하기 위해서 생물은 'siderophores' 라는 물질을 세포 밖으로 분비한다. Siderophores는 철과의 친화도가 높은 저분자의 철분 포획체이자 수송체로서, 토양에서 철과 결합한 후, 다시 체내로 흡수되며 생물에게 철을 공급하는 중요한 역할을 수행하는 물질이다. Siderophores 합성능은 chrom azurol S(CAS) blue agar plate assay 방법을 이용하였다. 1L의 CAS agar를 만드는 방법은 다음과 같다: (1) dark-blue dye solution as a siderophores indicator(60.5mg CAS를 50mL 증류수에 녹인 다음 iron(III) solution 10mL(1mM FeCl₃ · 6H₂O, 10mM HCl)과 40mL 증류수에 72.9mg HDTMA을 녹인 solution을 함께 첨가한 후, 멸균한다)와 (2) medium solution(750mL 증류수에 100mL 10×MM9 salts(60g/L Na₂HPO₄; 0.9g/L KH₂PO₄; 5g/L NaCl; 10g/L NH₄Cl) 15g agar, 30.24g PIPES 그리고 12.0g의 50%(w/w) NaOH를 넣고 멸균하여 50℃로 식힌 후, 30mL casamino acids(10%, w/v), 10mL glucose(20%, w/v), 1mL thiamine HCl(0.2%, w/v), 그리고 3mL L-tryptophane(1%, w/v)를 첨가한다)를 잘 섞은 후, petri dish에 30mL씩 균혀 blue agar plate를 만들었다. 각각의 미생물을 CAS agar plate에 접종하여 30℃에서 24시간 동안 배양하였으며, colony 주변에 orange halo가 형성되는 경우를 siderophores 합성 양성으로 평가하였다.
- [0029] (2) 알카리지니아스 속 KC-1의 동정
- [0030] 위에서 분리한 근권세균 중 식물성장 촉진 능력이 우수하며, 유류 및 중금속을 분해할 수 있는 미생물을 선별하여 동정하였다. 동정방법은 16S rDNA분석 방법을 이용하였다. 클로리는 BIO101 kit(FastDAN SPIN Kit for Soil, Q-BIO gene, USA)를 사용하여 genomic DNA를 추출한 후, 이 genomic DNA 시료를 template로 하여, RCR(polymerase chain reaction)을 수행하였다. PCR에 사용한 primer는 27f(5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AC-3')과 1492r(5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT-3')이었다. PCR 조건은 95도에서 5분 동안 pre-denaturation, 95도에서 30초 동안 denaturation 60도에서 30초 동안 annealing, 72도 30초 동안 extension을 28 cycling한 후

에 72도에서 5분 동안 final extension을 하였다.

[0031] 위의 방법으로 분석한 *Alcaligenes* sp. KC-1 균주의 16S rDNA 염기서열 분석 결과는 서열목록 1에 나타내었으며, 진뱅크에 있는 균주의 데이터베이스를 비교한 결과, 알카리지니어스 속으로 동정되었다. 따라서, 본 발명자들은 '*Alcaligenes* sp. KC-1' 균주로 명명하고, 한국생명공학연구원에 기탁하여 수탁번호 KCTC11801BP를 부여받았다.

[0032] 또한, 도 1에 도시된 바와 같이, 본 발명에 의한 *Alcaligenes* sp. KC-1(수탁번호 :KCTC11801BP) 균주는 식물성 장촉진능 평가에서 IAA생산능력과 ACC 디아민에이즈 합성능을 가지고 있음을 알 있다. 그러므로 본 균주는 식물의 뿌리의 성장을 향상시킬 수 있는 식물성 호르몬인 IAA생산능력이 있으며, 식물의 근권에 중금속과 같은 오염물질이 존재할 때 식물의 스트레스성 물질로 에틸렌을 분비하게 되는데 에틸렌의 전구체인 ACC를 디아민에이즈 할 수 있는 물질을 합성하여 식물을 중금속과 같은 스트레스로부터 보호해 줄 수 있기 때문에 본 발명은 오염토양을 식물로 정화할 때 식물의 성장을 촉진하여 오염토양의 정화효율을 증대할 것으로 기대된다.

[0033] 실시예 2 : 알카리지니어스 속 KC-1의 유류 분해능 실험

[0034] 분리한 균주는 10,000mg/L의 디젤이 첨가된 MSM 배지에 접종하여 30℃, 250 rpm의 배양기에서 3일간 진탕 배양하였다. 배양액의 잔류디젤농도를 gas chromatography를 이용하여 분석한 뒤 디젤 분해능을 확인하였다. MSM 배지의 조성은 MgSO₄ · 7H₂O 0.15g, CaCl₂ 0.01g, KH₂PO₄ 1.5g, Na₂HPO₄ · 12H₂O 9.0g, NH₄NO 3.0g, FeCl₃ 0.01g(pH 7.0~7.2) 및 증류수 1L 이다. 또한 잔류 TPH의 농도를 불꽃 이온화 검출기가 장착된 gas chromatography(5890 series, Hewlett Packard, USA)를 이용하여 분석하고 도 2에 나타내었다. GC 분석 조건은 오븐 온도가 초기 40℃에서 3분간 유지 후, 4℃/min으로 70℃까지 승온하고, 10℃/min으로 200℃까지 승온, 그리고 8℃/min으로 300℃까지 승온 한 후 15분간 유지하였다. 시료 주입부와 검출기 온도는 각각 300℃와 320℃이고, column 은 HP-5 capillary column(0.25mm×30m, 0.25µm)을 사용하였으며, carrier gas는 N₂를 사용하였다. 디젤의 농도가 0, 312.5, 625, 1,250, 10,000, 20,000, 그리고 40,000mg/L 로 하여 검량선을 작성한 후, 검량식으로 부터 TPH 농도를 환산하였다.

[0035] 도 2에 도시된 바와 같이, 위의 방법으로 실험을 수행한 결과 무기염배지에 유일탄소원으로 디젤을 10,000mg/L로 첨가하여 KC-1을 배양한 결과 배양 4일째가 되었을 때 디젤을 100%분해하였다. 이러한 결과는 본 연구에서 분리한 균주는 식물성장능을 가지는 동시에 유류를 분해할 수 있는 균주로 유류오염토양의 식물상 복원에 유용하게 쓰일 수 있음을 확인할 수 있다.

[0036] 실시예 3 : 알카리지니어스 속 KC-1의 중금속 내성 실험

[0037] 분리한 균주의 중금속 내성을 평가하기 위해 250mL 삼각플라스크에 LB-broth 배지를 100mL 만들어 균주를 중금속과 함께 접종한 후, 중금속이 포함된 배지에서의 균주 성장 여부를 가지고 평가하였다. 균주의 성장은 배양기간 동안 흡광광도계를 이용하여 3~12시간 간격으로 600nm에서 흡광도를 측정하였다. 평가한 중금속은 납, 구리, 카드뮴, 6가 크롬, 그리고 아연으로 각각 1000, 500, 30, 30, 그리고 2,000mg/L로 환경부에서 지정한 나 지역의 오염대책기준을 최대 농도로 하여 평가하여 도 3a 내지 도 3e에 나타내었다.

[0038] 도 3a 내지 도 3e에 나타난 바와 같이, 납은 농도가 0~1,000mg/L일 때 흡광도 값이 0.86~0.81로 납의 농도가 증가해도 KC-1의 성장은 크게 저해 받지 않았다. 6가 크롬은 0~30mg/L일 때 흡광도 값이 0.80~0.90으로 6가 크롬의 존재 여부가 KC-1의 성장을 저해시키지 않았다. 구리는 0, 100, 200, 300, 500mg/L의 농도에서 배양한 결과 흡광도 값이 각각 1.07, 1.05, 1.12, 1.11, 그리고 1.08로 구리의 농도가 증가하더라도 KC-1균주의 성장은 저해되지 않았다. 이러한 결과는 본 연구에서 분리한 KC-1이 식물의 성장 촉진 능력이 있는 동시에 유류를 분해하면서 중금속에 강한 내성을 가지고 있는 균주로 유류와 중금속으로 복합 오염된 토양의 정화에 매우 유용한 균주

로 이용될 것임을 의미한다.

[0039] 실시예 4 : 균주와 식물을 이용한 유류와 중금속 오염토양의 오염물질 정화 효율 확인

[0040] 분리한 균주와 식물을 이용한 유류 및 중금속 오염토양의 정화효율을 평가하였다. 실험을 수행하기 위해 유류로 오염이 되지 않는 지역의 토양 60kg을 채취하여, 실험실로 운반을 하였다. 운반된 60kg의 토양은 20kg과 40kg으로 나누었으며, 40kg의 토양에는 환경부에서 지정한 오염물질의 대책기준인 디젤 5,000mg/L, 구리 500mg/L의 농도가 되도록 4일간 서늘한 곳에 두고 하루에 한번씩 토양을 위아래로 섞어 주었다.

[0041] KC-1 균주는 6L의 D.W.에 LB(LB broth 200 g, Difco, USA)를 넣어 만든 배지에 30℃에서 3일 동안 배양하였다. 배양액은 10,000rpm에서 10분 동안 원심분리한 후 회수한 균주에 멸균수를 첨가하여 현탁한 후 다시 동일 조건으로 원심분리 하였다. 이 과정을 2차례 반복하여 균체를 세정해 주었다. 세정한 균체는 멸균수 50mL에 현탁한 후 이 균주 현탁액을 디젤로 오염된 20kg의 토양에 주입한 후, 충분히 혼합하였다.

[0042] 실험디자인은 비오염토양 20kg, 오염토양 20kg 그리고 오염물질로 오염시킨 토양 20kg에 균주를 주입한 토양을 각각 10kg씩 나누어 화분에 옮겨주어, 총 6개의 화분을 준비하였다. 이때 오염물질로 오염시킨 토양 20kg에 균주를 주입한 토양은 식물의 성장을 촉진하고, 구리에 내성을 가지며, 디젤을 분해할 수 있는 KC-1을 3.59 x 10⁸cfu/kg 이 되게 주입하였다. 6개의 화분 중3개의 화분에는 각각 10개의 강낭콩을 심었으며, 나머지 3개의 화분에는 각각 10개의 옥수수 씨앗을 심었다. 실험은 17일간 진행되었으며, 모든 화분은 온도가 20~25℃인 환경에서 재배하였다. 발아를 하기 전까지는 하루에 한번씩 충분한 양의 물을 주었고, 그 이후에는 2일에 한번씩 물을 주었다.

[0043] 재배 17일 후, 화분으로부터 식물을 조심스럽게 채취하고, 70℃ dry-oven에서 2일간 건조한 후, 줄기부와 뿌리부의 생체량을 측정하였다.

[0044] 토양시료는 화분 각각에서 채취하였고, 토양에 남아있는 잔류 TPH농도는 토양 5g을 테스트 튜브(test tube)에 넣고, hexane-acetone solution[1:1(v/v)]을 5 mL넣어 준 후 30℃, 200rpm의 교반기에서 30분간 교반하였다. 그 후 test tube를 실온에서 30분간 정치한 후 상등액을 채취하여 용매 속에 녹아있는 잔류 TPH의 농도를 가스 크로마토그래피(5890 series II, Hewlett Packard, USA)를 이용하여 분석하여 표 1 및 도 4에 나타내었다(도 4에서 I는 초기 토양의 디젤 농도, NC는 식물과 KC-1이 없는 토양의 디젤 농도, B는 강낭콩만 식재한 토양의 디젤 농도, B+R은 강낭콩과 KC-1이 함께 있는 토양의 디젤 농도, C는 옥수수만 식재한 토양의 디젤 농도, C+R은 옥수수와 KC-1이 함께 있는 토양의 디젤 농도를 의미한다).

[0045] 도 4의 그래프 및 표 1에서 표시된 바와 같이, KC-1균주와 식물이 토양 속의 디젤을 제거하는데 미치는 영향에 관해 조사한 결과, 식물과 KC-1균주가 없는 control에서의 TPH 농도는 5200.89mg-TPH/kg로, 17일의 짧은 재배 기간 동안에는 자연저감이 일어나지 않았다. 식물은 있지만 KC-1 균주가 없는 조건에서는 강낭콩은 TPH농도가 23.47 mg-TPH/kg이었고, 옥수수는 TPH농도가 969.35mg-TPH/kg으로 두 조건 다 90%, 이상의 정화율을 보였고 식물과 KC-1균주가 함께 존재하는 조건에서는 강낭콩은 0mg-TPH/kg, 옥수수는 245.02mg-TPH/kg으로 균주의 집중으로 인해 디젤의 제거가 향상되었다. 이러한 결과는 KC-1 균주가 두 가지의 식물성장 촉진 능력을 가지고 있으며, 토양에서는 디젤 분해능이 우수하기 때문에 중금속과 유류로 동시에 오염된 토양의 근권복원(rhizoremediation)을 할 때 그 효율을 증대시킬 수 있을 것이다.

표 1

	농도 (mg/L)	저감 효과 (%)
초기토양	4816.93 ± 825.74	
식물과 균주가 없는 토양	5200.89 ± 156.80	

강낭콩 식재, 균주 미 접종	23.47 ± 40.66	99.54
강낭콩 식재, 균주 접종	0.00 ± 0.00	100
옥수수 식재, 균주 미 접종	969.35 ± 286.43	81.36
옥수수 식재, 균주 접종	245.02 ± 46.47	95.28

수탁번호

[0047]

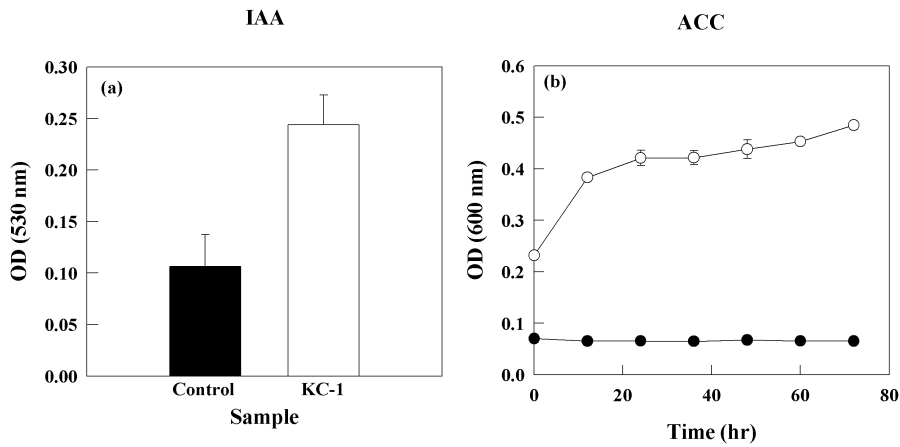
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC11801BP

수탁일자 : 20101101

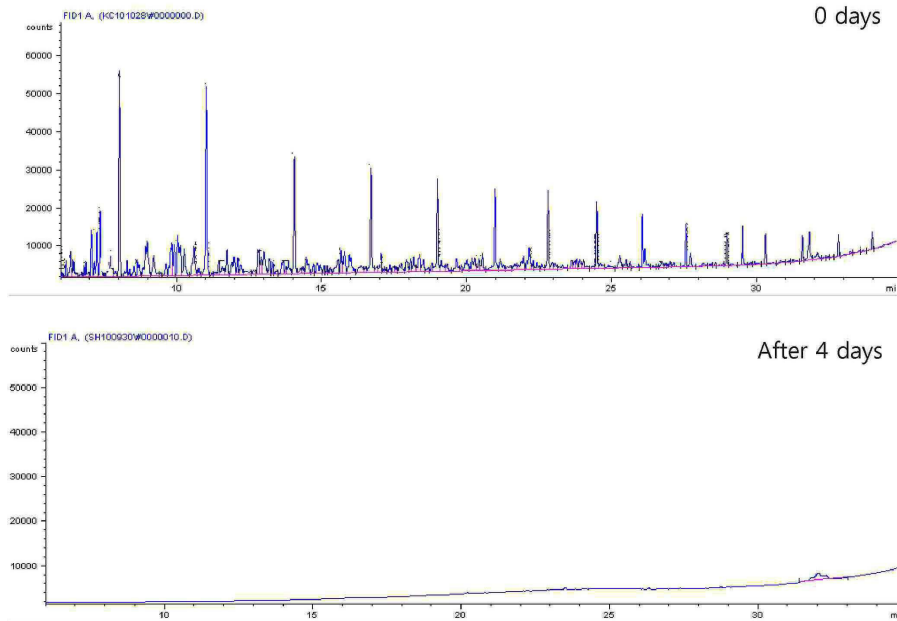
도면

도면1

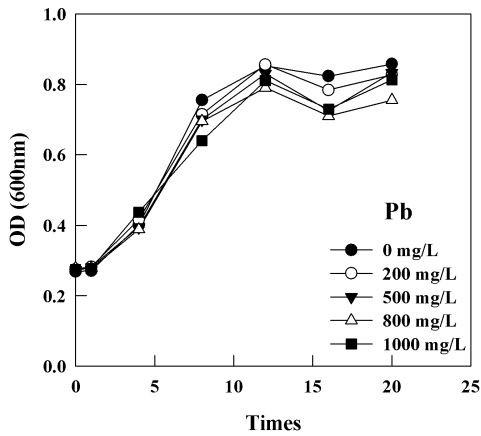


도면2

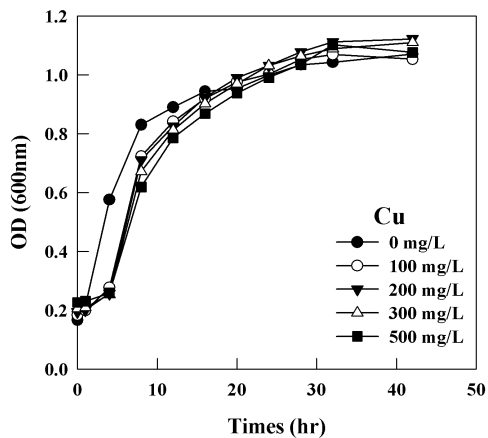
10000 mg-diesel/L-medium



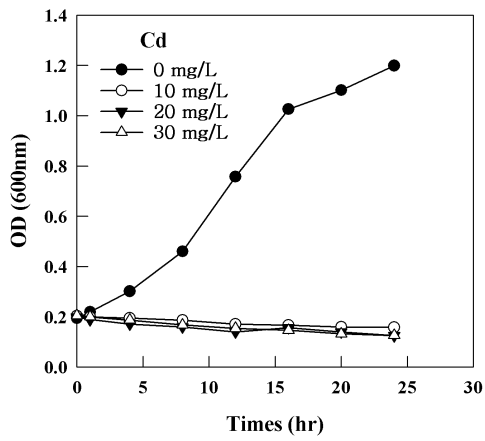
도면3a



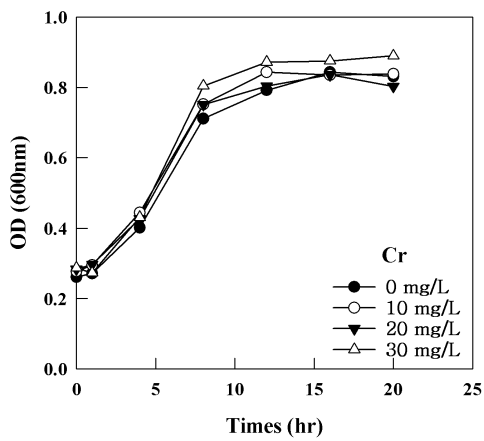
도면3b



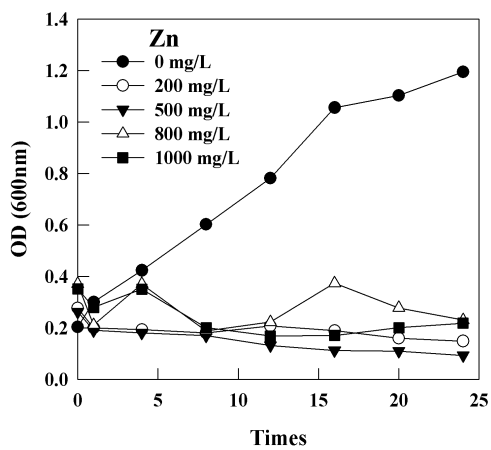
도면3c



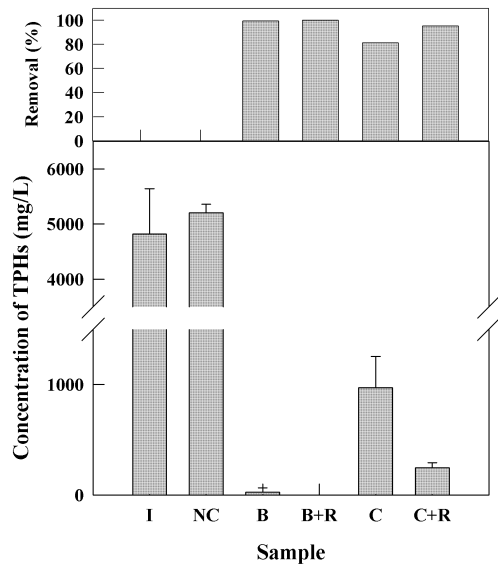
도면3d



도면3e



도면4



서열목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)