



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년05월17일

(11) 등록번호 10-2666417

(24) 등록일자 2024년05월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/18 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/1893 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0075309

(22) 출원일자 2023년06월13일

심사청구일자 2023년06월13일

(30) 우선권주장

1020230050112 2023년04월17일 대한민국(KR)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020220154155 A

Jin-Kyung Hong, et al. Flow cytometric monitoring of the bacterial phenotypic diversity in aquatic ecosystems. Journal of Microbiology (2021) Vol. 59, No. 10, pp879-885.*

Hannah R. Safford and Heather N. Bischel. Flow cytometry applications in water treatment, distribution, and reuse: A review. Water Research 151 (2019) pp110-133.

Ruben Props, et al. Water Research 145 (2018) pp73-82.

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

연세대학교 원주산학협력단

강원도 원주시 흥업면 연세대길 1

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

이태권

경기도 화성시 동탄지성로 42, 223동 502호

박준홍

서울특별시 강남구 선릉로 221, 304동 1002호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

위병갑

전체 청구항 수 : 총 4 항

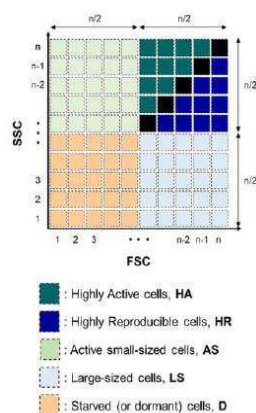
심사관 : 김동원

(54) 발명의 명칭 박테리아 표현형 기반 수생태 교란 평가 방법 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은, 박테리아 표현형 기반 수생태 교란 평가 방법 및 이의 용도에 관한 것으로서, 본 발명은 지하수 시료를 농축하고, 이를 유세포분석으로 분석하여, 세포 크기 및 복잡도에 따른 표현형으로 분류하였다. 또한, 분류된 표현형을 그룹화 하였으며, 지하수 시료에 따른 표현형의 차이를 확인하고, 이를 대조군과 비교하여, 지하수 세균총의 표현형의 차이에 따른 오염 정도나, 오염원을 유추할 수 있는 것을 확인하여, 지하수 생태 교란 평가에 이용할 수 있는 것을 확인하였다.

대표도 - 도4



(72) 발명자

홍진경

경기도 의정부시 외미로 64, 204동 1706호

김수빈

강원도 원주시 흥업면 세동길 13, 102동 1108호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1485019192

과제번호 ARQ202002002004

부처명 환경부

과제관리(전문)기관명 한국환경산업기술원

연구사업명 지중환경 오염정화 고도화

연구과제명 오염부지 및 현장 맞춤형 지중환경 미생물 활용원위치 정화기술 개발 및 실용화

기 여 율 1/1

과제수행기관명 연세대학교 산학협력단

연구기간 2020.05.01 ~ 2023.12.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

- 1) 수원(water source)으로부터 취득된 제 1 수체 시료를 여과하여 세포를 취득하는 단계;
- 2) 상기 1)단계의 수원과 동일한 수원으로부터 취득된 제 1 수체 시료의 1/50 부피를 갖는 제 2 수체 시료와 상기 1)단계에서 취득된 세포를 혼합하여 농축물을 생성하는 단계;
- 3) 상기 2)단계를 통해 생성된 농축물을 유세포분석으로 분석된 데이터를 기초로 전방 산란 채널(forward scatter channel, FSC), 측면 산란 채널(side scatter channel, SSC), 플루오레세인 이소티오시아네이트(fluorescein isothiocyanate, FITC) 및 피코에리트린(phycoerythrin, PE)의 형광 발현을 수치화하여, 수치화된 형광 발현 값이 10^3 초과하는 데이터를 선별하는 단계;
- 4) n개의 격자셀(grid cell)로 각각 이루어진 X좌표, Y좌표로 표현된 2차원 좌표평면상에 상기 3)단계에서 선별된 데이터가 표시되어 5개의 표현형 그룹 중 어느 하나의 그룹으로 위치하되, 상기 X좌표와 Y좌표는 하기 수학식 1의 값으로 이루어지며, 상기 5개의 표현형 그룹 각각은 하기의 수학식 2 내지 수학식 6 을 만족하는 표현형으로 그룹화 되는 단계; 및

[수학식 1]

$(X, Y) = (FSC, SSC);$

[수학식 2]

$(SSC > n/2) > (FSC > n/2);$

[수학식 3]

$(SSC > n/2) < (FSC > n/2);$

[수학식 4]

$(SSC > n/2) \cap (FSC < (n/2+1));$

[수학식 5]

$(SSC < (n/2+1)) \cap (FSC > (n/2+1));$ 및

[수학식 6]

$(SSC < (n/2+1)) \cap (FSC < (n/2+1));$

- 5) 상기 그룹화를 기초로 수체 시료의 생태 교란을 평가하는 단계;를 포함하는 수체 시료의 생태 교란 평가 방법으로서,

상기 단계 3)의 FSC의 수치화된 형광 발현 값은 세포 크기(size)인 것이고,

상기 단계 3)의 SSC의 수치화된 형광 발현 값은 세포 복잡도(complexity)인 것이며,

상기 단계 4)의 수학식 2를 만족하는 그룹은 높은 활성(highly active, HA) 표현형 그룹으로서, 세포 크기 및 세포 복잡도가 대조군의 기준치와 비교하여 증가된 유기 오염원에 노출되어 교란된 수생태의 표현형이고,

상기 수학식 3을 만족하는 그룹은 높은 재현성(highly reproducible, HR) 표현형 그룹으로서, 유기 오염 노출 및 세포 증식 후 오염원의 감소로 세포 복잡도가 대조군의 기준치와 비교하여 감소된 수생태의 표현형이며,

상기 수학식 4를 만족하는 그룹화는 활성형 작은-세포(active small-sized, AS) 표현형 그룹으로서, 무기 오염원 유입 후 세포 복잡도가 대조군의 기준치와 비교하여 증가된 무기 오염원에 노출되어 교란된 수생태의 표현형이고,

상기 수학식 5를 만족하는 그룹화는 대형(large-sized, LS) 표현형 그룹으로서, 유기 오염원에 의한 수생태 교란 후 교란이 정화된 수생태의 표현형이며,

상기 수학식 6을 만족하는 그룹화는 휴면(dormant or starved, D) 표현형 그룹으로서, 오염원 또는 교란에 노출되지 않은 수생태의 표현형인 것인, 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 단계 4) 이후에 상기 표현형 그룹으로부터, α -다양성 및 β -다양성을 분석하는 단계를 더 포함하는 것인, 방법.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 단계 4)의 n 수는 50 내지 3000인 것인, 방법.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

제 1항에 있어서,

상기 수원은 지하수(groundwater), 하천(river), 개울(brook), 호수(lake), 저수지(reservoir) 및 샘(spring)으로 이루어진 군에서 선택된 것인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은, 박테리아 표현형 기반 수생태 교란 평가 방법 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 지하수, 음용수, 농업 용수, 공업 용수 등의 수자원을 안전하고 효과적으로 관리하기 위하여, 수인성 미생물을 탐지하기 위한 모니터링 시스템이 요구되고 있다. 수인성 미생물의 세포 밀도나 분포는 공중 보건에 치명적인

위협이 될 수 있기에, 수중 미생물을 정확하게 특성화 하는 것이 중요하다. 현재 미국 인구의 90%가 고급 정제수를 공급받지 못하고 있는 실정이며, 매년 약 715만 명의 미국인이 오염수로 인한 질병으로 고통받고 있으며, 미국 의료 시스템 중 33억 달러의 비용이 수질 관리 및 이로 인한 질병 예방에 이용되고 있다. 분변성 대장균과 같은 지표 미생물 또는 수인성 미생물만을 이용하여 수질을 평가하면, 수질 오염을 유발하는 다른 위협 요소에 대한 정보를 놓칠 수 있으며, 의미 있는 정보를 도출하기 위해서는 전체 세균 군집을 분석하는 것이 필요하기에, 수질 관리에 대한 새로운 관점의 접근 방법이 요구되고 있으며, 이는 수생태에서 박테리아 군집에 대한 전반적인 정보를 얻을 수 있는 방법을 통해 달성될 수 있다.

[0003] 대부분의 국가에서 지표 미생물 및 수인성 미생물을 검출하기 위한 표준 방법으로, 비교적 간단하고 저렴하게 미생물을 검출할 수 있는 배양 기반 방법을 이용하고 있다. 그러나, 배양 기반 방법은 노동 집약적이고, 시간이 많이 걸리기 때문에, 현장의 온라인 모니터링 시스템에는 적합하지 않으며, 대부분의 수인성 미생물은 영양분이 제한된 물에서 생존이 가능하지만 배양할 수 없는 상태로 존재하기 때문에, 샘플링을 통한 배양 기반 분석은, 해당 수환경의 샘플 대표와 이질성을 나타낼 수 있어 특히 문제가 되며, 이는 필연적으로 낮은 검출 효율로 이어지게 된다. 중합효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction), 고처리량 시퀀싱(high-throughput sequencing) 및 올리고 기반 바이오센서(oligo-based biosensors)를 포함하는 분자생물학적 분석을 도입하려는 최근의 경향은 배양 기반 방법보다 수인성 미생물에 대하여, 빠르고 민감한 검출 방법으로 이어졌으며, 또한 16s rRNA, amoA 유전자의 프라이머 등을 이용하는 특정 프라이머 세트를 이용한 고처리량 시퀀싱은 수중 박테리아 커뮤니티에 대한 자세한 분류 및 다양성 정보를 제공할 수도 있다. 그러나, 이러한 분자생물학적 접근 방식의 발전에도, 샘플링 조건에 따른 분자 반응의 간섭, 분석 과정의 복잡성, 분석 비용 등의 요인으로, 자동화 또는 온라인 모니터링에 이를 적용하는 것에는 제한이 있다. 따라서, 기존 검출 방식의 한계를 극복할 수 있는 새로운 접근 방식이 필요하다.

[0004] 한편, 유세포분석(Flow cytometry, FCM)은 광 산란 거동(light scattering behavior) 및 형광(fluorescence)을 기반으로 세포 또는 입자의 물리적 화학적 특성을 확인할 수 있는 대체 기술이다. 광학 시술 및 검출기의 발전으로 지난 수십 년간, 감도 및 입자 크기 분해능과 같은 분석 기기의 성능과, 계산 용량 및 광학 안정성과 같은 분석 시스템의 견고성이 모두 향상되었으며, 이러한 기술적 향상으로, FCM은 임상 및 수질 평가 뿐만 아니라 식품의 미생물 오염에 대한 조기 진단에 적용되었다. FCM은 기존의 배양 기반 기술 및 분자 생물학적 분석과 비교하여, 높은 정밀도와 정확도로 결과를 제공할 수 있고, 측정 시간은 분단 10,000 개 이상의 이벤트(event) 또는 세포를 측정할 수 있어 기존의 방법들과 비교하여, 신속한 분석이 가능하다는 장점이 있다. FCM의 높은 정확도 및 대규모 측정 규모로 인하여, 물 재사용 시스템, 폐수 처리장 및 음용수 공급 네트워크에서 온라인 또는 자동 수질 평가와 관련된 분석 방법이 연구되어 있고 있다.

[0005] 이에, 본 발명자들은, FCM을 이용하여, 박테리아 군집의 표현형 정보를 획득하고, 이를 이용한 물 샘플의 미생물적 특성을 평가하여, 수생태 교란을 분석할 수 있는 것을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명의 목적은 1) 수원(water source)으로부터 수득된 제 1 수체 시료를 여과하여 세포를 취득하는 단계;
- [0007] 2) 상기 1)단계의 수원과 동일한 수원으로부터 수득되되 상기 제 1 수체 시료의 1/50 부피를 갖는 제 2 수체 시료와 상기 1)단계에서 취득된 세포를 혼합하여 농축물을 생성하는 단계
- [0008] 3) 상기 2)단계를 통해 생성된 농축물을 유세포분석으로 분석된 데이터를 기초로 전방 산란 채널(forward scatter channel, FSC), 측면 산란 채널(side scatter channel, SSC), 플루오레세인 이소티오시아네이트(fluorescein isothiocyanate, FITC) 및 피코에리트린(phycoerythrin, PE)의 값이 10^3 초과하는 데이터를 선별하는 단계;
- [0009] 4) n개의 격자셀(grid cell)로 각각 이루어진 X좌표, Y좌표로 표현된 2차원 좌표평면상에 상기 3)단계에서 선별된 데이터가 표시되어 5개의 그룹화 중 어느 하나의 그룹으로 위치하되, 상기 X좌표와 Y좌표는 하기 수학식 1의 값으로 이루어지며, 상기 5개의 그룹화 각각은 하기의 수학식2 내지 수학식 6 을 만족하는 그룹화단계; 및
- [0010] [수학식 1]
- [0011] $(X, Y) = (FSC, SSC)$;

- [0012] [수학식 2]
- [0013] $(SSC > n/2) > (FSC > n/2);$
- [0014] [수학식 3]
- [0015] $(SSC > n/2) < (FSC > n/2);$
- [0016] [수학식 4]
- [0017] $(SSC > n/2) \cap (FSC < (n/2+1));$
- [0018] [수학식 5]
- [0019] $(SSC < (n/2+1)) \cap (FSC > (n/2+1));$ 및
- [0020] [수학식 6]
- [0021] $(SSC < (n/2+1)) \cap (FSC < (n/2+1));$
- [0022] 5) 상기 그룹화된 정보를 기초로 수체 시료의 생태 교란을 평가하는 단계;를 포함하는 수체 시료의 생태 교란 평가 방법을 제공하는 것이다.
- 과제의 해결 수단**
- [0023] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 1) 수원(water source)으로부터 수득된 제 1 수체 시료를 여과하여 세포를 취득하는 단계;
- [0024] 2) 상기 1)단계의 수원과 동일한 수원으로부터 수득되되 상기 제 1 수체 시료의 1/50 부피를 갖는 제 2 수체 시료와 상기 1)단계에서 취득된 세포를 혼합하여 농축물을 생성하는 단계
- [0025] 3) 상기 2)단계를 통해 생성된 농축물을 유세포분석으로 분석된 데이터를 기초로 전방 산란 채널(forward scatter channel, FSC), 측면 산란 채널(side scatter channel, SSC), 플루오레세인 이소티오시아네이트(fluorescein isothiocyanate, FITC) 및 피코에리트린(phycoerythrin, PE)의 값이 10^3 초과하는 데이터를 선별하는 단계;
- [0026] 4) n개의 격자셀(grid cell)로 각각 이루어진 X좌표, Y좌표로 표현된 2차원 좌표평면상에 상기 3)단계에서 선별된 데이터가 표시되어 5개의 그룹화 중 어느 하나의 그룹으로 위치하되, 상기 X좌표와 Y좌표는 하기 수학식 1의 값으로 이루어지며, 상기 5개의 그룹화 각각은 하기의 수학식2 내지 수학식 6 을 만족하는 그룹화단계; 및
- [0027] [수학식 1]
- [0028] $(X,Y)=(FSC,SSC);$
- [0029] [수학식 2]
- [0030] $(SSC > n/2) > (FSC > n/2);$
- [0031] [수학식 3]
- [0032] $(SSC > n/2) < (FSC > n/2);$
- [0033] [수학식 4]
- [0034] $(SSC > n/2) \cap (FSC < (n/2+1));$
- [0035] [수학식 5]
- [0036] $(SSC < (n/2+1)) \cap (FSC > (n/2+1));$ 및
- [0037] [수학식 6]
- [0038] $(SSC < (n/2+1)) \cap (FSC < (n/2+1));$
- [0039] 5) 상기 그룹화된 정보를 기초로 수체 시료의 생태 교란을 평가하는 단계;를 포함하는 수체 시료의 생태 교란 평가 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0040] 본 발명은 지하수 시료를 농축하고, 이를 유세포분석으로 분석하여, 세포 크기 및 복잡도에 따른 표현형으로 분류하였다. 또한, 분류된 표현형을 그룹화 하였으며, 지하수 시료에 따른 표현형의 차이를 확인하고, 이를 대조군과 비교하여, 지하수 세균종의 표현형의 차이에 따른 오염 정도나, 오염원을 유추할 수 있는 것을 확인하여, 지하수 생태 교란 평가에 이용할 수 있는 것을 확인하여, 오염 지역의 지하수 생태 교란 정도를 신속하고, 유의하게 분별할 수 있어, 관련 산업에 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0041] 도 1은 본 발명의 세포 표현형 기반 지하수 생태 교란 평가 방법의 흐름도를 나타낸 것이다.
 도 2는 본 발명의 유세포분석 결과를 데이터화 하고, 데이터 가공 및 분석 방법을 도식화한 것이다.
 도 3은 본 발명의 세포 표현형 기반 지하수 생태 교란 방법 및 계통학적 분석 방법의 β -다양성 분석 결과를 비교한 도이다(A: 계통학적 분석, B: 표현형 기반 분석).
 도 4는 본 발명의 세포 표현형 기반 지하수 생태 교란 방법에서, 세포 크기 및 복잡성에 따른 격자 셀(grid cell) 내 표현형을 그룹화한 도이다.
 도 5는 건기 시즌의 표현형의 하위 그룹 및 풍부도를 이용하여 계산된 Bray-Curtis 거리를 기반의 계층적 클러스터를 나타낸 도이다.
 도 6 건기 시즌의 각 표현형의 양적 분포 히트맵을 나타낸 도이다.
 도 7은 건기 시즌의 계층적 클러스터 히트맵 데이터의, 각 군간 표현형 분포를 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0042] 이하 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예들을 상세히 설명한다. 이하의 설명에 있어, 당업자에게 주지 저명한 기술에 대해서는 그 상세한 설명을 생략할 수 있다. 또한, 본 발명을 설명함에 있어서, 관련된 공지 기능 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있다. 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다.

[0043] 따라서 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0045] 본 발명은 1) 수원(water source)으로부터 수득된 제 1 수체 시료를 여과하여 세포를 취득하는 단계;

[0046] 2) 상기 1)단계의 수원과 동일한 수원으로부터 수득되되 상기 제 1 수체 시료의 1/50 부피를 갖는 제 2 수체 시료와 상기 1)단계에서 취득된 세포를 혼합하여 농축물을 생성하는 단계;

[0047] 3) 상기 2)단계를 통해 생성된 농축물을 유세포분석으로 분석된 데이터를 기초로 전방 산란 채널(forward scatter channel, FSC), 측면 산란 채널(side scatter channel, SSC), 플루오레세인 이소티오시아네이트(fluorescein isothiocyanate, FITC) 및 피코에리트린(phycoerythrin, PE)의 값이 10^3 초과하는 데이터를 선별하는 단계;

[0048] 4) n개의 격자셀(grid cell)로 각각 이루어진 X좌표, Y좌표로 표현된 2차원 좌표평면상에 상기 3)단계에서 선별된 데이터가 표시되어 5개의 그룹화 중 어느 하나의 그룹으로 위치하되, 상기 X좌표와 Y좌표는 하기 수학적 1의 값으로 이루어지며, 상기 5개의 그룹화 각각은 하기의 수학적 2 내지 수학적 6 을 만족하는 그룹화단계; 및

[0049] [수학적 1]

[0050] $(X, Y) = (FSC, SSC)$

[0051] [수학적 2]

- [0052] $(SSC > n/2) > (FSC > n/2)$
- [0053] [수학식 3]
- [0054] $(SSC > n/2) < (FSC > n/2)$
- [0055] [수학식 4]
- [0056] $(SSC > n/2) \cap (FSC < (n/2+1))$
- [0057] [수학식 5]
- [0058] $(SSC < (n/2+1)) \cap (FSC > (n/2+1))$
- [0059] [수학식 6]
- [0060] $(SSC < (n/2+1)) \cap (FSC < (n/2+1))$
- [0061] 5) 상기 그룹화된 정보를 기초로 수체 시료의 생태 교란을 평가하는 단계;를 포함하는 수체 시료의 생태 교란 평가 방법을 제공한다.
- [0062] 본 발명의 "수원(water source)"은 물이 나오는 근원으로서, 분수령 또는 분수계 근처의 지하수 용출점이나 그 부근 일대와 같이 하천이 시작되는 지점, 또는 공공 식수 공급 및 우물에 물을 공급하는 수역을 뜻한다.
- [0063] 본 발명의 "농축물"은, 수원으로부터 수득된 제 1수체 시료 내 미생물을 여과하고, 이를 제 1수체 시료의 부피의 $1/n$ 부피를 가지는 동일한 수원에서 수득된 제 2수체 시료에 여과된 미생물을 재현탁하여, 제 1수체 시료와 비교하여 부피는 n 배 감소하였으나, 미생물 수는 유지 또는 증가된 농축물을 뜻하며, 본 발명의 일 실시예에서는 제 2수체 시료가, 제 1수체 시료와 대비하여, $1/50$ 배의 부피에서 재현탁하여, 50 배 농축하였으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0064] 본 발명의 "교란(disturbance)"은 군집 구조를 홀트리고, 가용자원, 물질 가용성 또는 물리적 환경을 변화시키는 사건을 의미한다. 교란은 생태 군집에서 발생 빈도 및 강도에 따라 다란 방식으로 군집에 영향을 줄 수 있다. 또한, 교란은 오염(contamination)을 뜻하기도 하며, 오염원에 따라 유기오염 또는 무기오염으로 분류할 수 있다. 유기오염은, 유기물인 세균, 바이러스, 기생 생물이나, 동식물 유래 유기물, 음식물, 배설물, 휘발성 물질과 같은 천연 유기물 또는, 의약품, 살충제, 플라스틱, 세제, 기름, 휘발유 등의 합성 유기물 등이 오염원으로 작용하여, 수생태를 교란시키는 것을 뜻한다. 반면, 무기오염은 유기물을 제외한, 수은, 카드뮴, 크롬 등의 중금속, 황산화물, 질소산화물, 염기, 염 또는 오존과 같은 무기 화합물, 우라늄, 세슘, 요오드, 라돈 등의 방사능 물질, 황사, 토사, 미세먼지, 초미세먼지 등의 입자성 물질과 같은 무기물이 오염원으로 작용하여 수생태를 교란시키는 것을 뜻한다.
- [0065] 본 발명의 "유세포분석(flow cytometry, FCM)"은 레이저(laser)를 기반으로 세포나 입자를 검출하는 분석 방법으로서, 유동적으로 흐르는 세포의 현탁액을 전자 검출기에 통과시켜 세포 크기, 모양 또는 형광성 등에 따라 선별하고 계수하여 관찰하는 분석방법이다.
- [0066] 본 발명의 "전방 산란 채널(forward scatter channel, FSC)"은 유세포분석에서, 세포를 일직선으로 투과하여 지나가는 레이저를 검출하는 채널로서, 세포를 통과하는 레이저로 세포의 크기 또는 직경과 관련된 정보를 검출하는 채널이다.
- [0067] 본 발명의 "측면 산란 채널(side scatter channel, SSC)"은 세포에 조사된 레이저가 수직(90°)로 산란되는 빛을 수집하는 채널로서, 세포의 핵 구조와, 과립(granule) 구조 등에 의하여 산란되는 레이저로부터, 세포의 복잡도(complexity)와 관련된 정보를 검출하는 채널이다.
- [0068] 본 발명의 "격자 셀(grid cell)"은 단일 값이나 속성을 가지는 단위 격자로, 셀(cell)이 모여서 하나의 커다란 격자(grid)나 이미지를 구성하는 것을 뜻한다.
- [0069] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 단계 4) 이후에 상기 표현형 그룹으로부터, α -다양성(α -diversity) 및 β -다양성(β -diversity)을 분석하는 단계를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [0070] 본 발명의 " α -다양성(α -diversity)"은 국지적 규모의 서식지 또는 시료와 같은 생태계에서 평균 종 다양성(mean species diversity)을 의미하며, 종 풍부도를 나타낸다. α -다양성은 생태계에서 생물종들 간의 개체 수에 관계없이 얼마나 다양한 종이 분포하는지 확인하는 지표이다.

- [0071] 본 발명의 " β -다양성(β -diversity)"은 종 조성이 다양한 환경 기율기에 따라, 얼마나 변하는지 그 정도를 나타내는 것으로서, 넓은 공간(region of interest)에 속한 작은 지점들 간의 종 구성이나 다양성의 차이를 나타내는 지표이다. β -다양성은 군집 간의 차이를 비교하여, 환경 변화에 따른 군집 변화를 예측하는데 이용하는 지표이다.
- [0072] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 단계 3)의 FSC로 검출되는 값은 세포 크기(size)인 것일 수 있다.
- [0073] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 단계 3)의 SSC로 검출되는 값은 세포 복잡도(complexity)인 것일 수 있다.
- [0074] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 단계 4)의 n 수는 50 내지 3000인 것일 수 있고, 바람직하게는 100 내지 2500인 것일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0075] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 단계 4)의 수학적 2를 만족하는 그룹화는 높은 활성(highly active, HA) 표현형 그룹인 것일 수 있다.
- [0076] 본 발명의 높은 활성 표현형 그룹은, 미생물 세포의 크기가 크고, 세포 내 복잡도가 증가되어 있는 표현형으로서, 미생물 증식 및 대사 활동이 활발한 상태를 반영함으로써, 유기 오염에 의한 수생태 교란의 지표가 되는 표현형 그룹인 것일 수 있다.
- [0077] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 단계 4)의 수학적 3을 만족하는 그룹화는 높은 재현성(highly reproducible, HR) 표현형 그룹인 것일 수 있다.
- [0078] 본 발명의 높은 재현성 표현형 그룹은, 미생물 세포의 크기는 크나, 크기값과 대비하여 세포 내 복잡도가 감소되고 있는 표현형으로서, 미생물 증식 후 수생태 내 유기 오염이 감소되어, 세포 대사가 감소된 표현형이고, 유기 오염에 의하여 미생물 증식이 증가한 후, 유기 오염원의 감소로 세포 대사가 감소하기 시작하는 표현형 그룹인 것일 수 있다.
- [0079] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 단계 4)의 수학적 4를 만족하는 그룹화는 활성형 작은-세포(active small-sized, AS) 표현형 그룹인 것일 수 있다.
- [0080] 본 발명의 활성형 작은-세포 표현형 그룹은, 세포 증식에는 영향을 주지 않으나, 세포 내 복잡도를 증가시킬 수 있는 오염원인 무기 오염에 의해 교란된 수생태의 표현형으로서, 무기 오염원의 유입으로, 세포 내 활발한 대사 활동만 유도된 표현형 그룹인 것일 수 있다.
- [0081] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 단계 4)의 수학적 5를 만족하는 그룹화는 대형(large-sized, LS) 표현형 그룹인 것일 수 있다.
- [0082] 본 발명의 대형 표현형 그룹은, 미생물 세포의 크기는 크나, 세포 내 복잡도가 안정된 표현형으로서, 유기 오염과 같은 미생물 증식 후 수생태의 기초 영양상태인 빈영양(oligotrophy) 상태로 복원됨으로서, 유기 오염원에 의한 교란이 정화가 진행된 표현형 그룹인 것일 수 있다.
- [0083] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 단계 4)의 수학적 6을 만족하는 그룹화는 휴면(dormant or starved, D) 표현형 그룹인 것일 수 있다.
- [0084] 본 발명의 휴면 표현형 그룹은, 수생태의 기초 영양상태인 빈영양 상태에서의 표현형으로서, 세포의 크기가 작고, 세포 내 복잡도가 낮은 수생태의 미생물 표현형이며, 어떠한 오염원에도 노출되지 않은 표현형 그룹인 것일 수 있다. 오염 혹은 교란에 노출되지 않은 지하수 환경의 70% 이상이 D와 같은 표현형을 가지는 것으로 알려져 있다.
- [0085] 본 발명의 상기 HA, HR, AS, LS 및 D 표현형은, 격자 셀의 사분면에 각각 위치할 수 있으며, 구체적인 그룹화는 도 4에 나타내었다.
- [0086] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 수원은 지하수(groundwater), 하천(river), 개울(brook), 호수(lake), 저수지(reservoir) 및 샘(spring)으로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있고, 바람직하게는 지하수이나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0088] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0090] <실시예 1> 수체 시료 준비

[0091] 본 발명의 미생물 표현형 기반의 수생태 교란을 평가하기 위하여, 수체 시료를 농축하여 준비하였다. 구체적으로, 지하수 샘플 내 미생물을 농축하기 위하여, 지하수 샘플 1 L를 수득하고, 이를 8 μ m 셀룰로오스 여과지로 사전 여과한 후, 0.25 μ m 혼합 셀룰로오스 에스테르(mixed cellulose ester, MCE) 여과지로, 진공 펌프를 이용하여 여과하였다. 그 후 여과지에 수집된 세포 샘플을 지하수 20 ml에 재현탁하여, 50배 세포 농축 샘플을 준비하였다.

[0093] <실시예 2> 유세포분석 및 표현형 다양성 분석 준비

[0094] <2-1> 세포 염색 및 유세포분석

[0095] 본 발명의 미생물 표현형 기반의 수생태 교란을 평가하기 위하여 50배 세포 농축 샘플을 유세포계측법(Flow cytometry, FCM)을 이용하여 분석하였다. 구체적으로 50배 세포 농축 샘플은 LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability 키트(Invitrogen, OR, USA)를 이용하여 암실에서 15분간 반응시켰다. 그 후 488nm의 파장을 방출하는 50mW 레이저, 2개의 광 산란 검출기 및 5개의 형광 검출기가 장착된 CytoFLEX 유세포 분석기(CytoFLEX V0-B3-R2, Beckman Coulter, CA, USA)를 이용하여 분석하였다. sheath buffer(Beckman coulter)는 본 발명의 FCM 용 캐리어 유체로 이용하였으며, 전방 산란 채널(forward scatter channel, FSC) 및 측면 산란 채널(side scatter channel, SSC)로부터의 플루오레세인 이소티오시아네이트(fluorescein isothiocyanate, FITC, 525/40 nm) 및 피코에리트린(phycoerythrin, PE, 585/42 nm) 형광 신호를 10 μ l/min 유속에서 1분 동안 기록하였고, FSC의 임계값은 8,000으로 수행하였다. FCM 결과로부터 FSC의 세포 크기 및 SSC의 핵형 등의 복잡도를 표현형으로 이용하였다. 신호 필터링(signal filtering), 노이즈 제거(denoising) 및 비닝(binning)을 포함하는 FCM 지문(fingerprinting) 획득은 하기 실시예 2-2 내지 2-4의 방법으로 수득하였다.

[0097] <2-2> 노이즈 제거(denoising)

[0098] 본 발명의 미생물 표현형 분석을 위하여, 노이즈를 제거하였다. 구체적으로, 상기 실시예 2-1에서 ".fcs" 형식으로 출력되는 FCM 결과를 R 패키지 "flowCore" 및 "biobase"를 사용하여 ".csv" 파일로 변환하였다. 그 후 $\{(FSC > 10^3) \cap (SSC > 10^3) \cap (FITC > 10^3) \cap (PE > 10^3)\}$ 기준을 만족하는 결과를 수집하였으며, 수집된 데이터를 노이즈 제거 프로세스(process)로 전환하였다. 노이즈 신호는, 환경 샘플의 분석에서 다양한 상황에 의하여 발생할 수 있으며, 부착 잔해조각(debris fragment), 세포 응집체(cell aggregate), 자가 형광 박테리아(self fluorescent generating bacteria)를 포함하는 입자들이 일반적인 노이즈에 해당되며, 본 발명에서는 실제 세포의 데이터만 수집하기 위하여, 데이터 세트에서 노이즈 신호를 제거하였다. 음성 대조군 샘플은, 오토클레이브(autoclave)로 멸균한 샘플과, 염색을 하지 않은 샘플로 준비하였다. 그 후 CytExpert program (ver. 2.4.0.28, Beckman coulter)을 이용하여 생성된 FCM 바이플롯(biplot)에서 음성 대조군의 이벤트(event)가 관찰된 FITC-PE biplot의 영역을 노이즈 영역(noise-area)로 지정하였다. 그 후 노이즈 영역을 제외한 x축 및 y축에 각각 FITC 및 PE 강도 값을 사용하여, 분산형 플롯(plot)을 생성하였다. 생성된 영역에서, 세포 이벤트가 관찰된 영역을 식별하고 R package인 alphahull을 이용하여 게이트(gate)화 하였다. SYTO9 및 PI 형광은 형광 강도의 비율에 따라 살아있는 세포(live cell)를 식별하였으며, 게이트 영역에서 관찰된 형광 강도 값을 live cell 데이터 세트로 추출하였다.

[0100] <2-3> 데이터 정규화 및 비닝(binning)

[0101] 서로 다른 표현형을 가지는 세포는 FCM 산점도에서 다른 위치에서 확인되었으며, 산점도에서 FCM 이벤트의 분포 패턴은 세포 표현형의 대표에 해당될 수 있기에, fixed-bin 방식을 이용하여, FSC-SSC 산점도를 40×40 개의 동일한 그리드셀(grid-cell)으로 분할하고, 각 grid-cell의 이벤트 빈도를 계수하였다. 각 grid-cell의 이벤트 빈도를 특징 표(feature table)로 요약하였다. 모든 데이터 분석 과정은 R (ver. 4.0.2, <http://www.R-project.org>)에서 수행하였으며, FCM 기반 표현형 다양성 스크립트(script)는 GitHub repository(<https://github.com/ecobiolab/FCM-based-phenotypicdiversity.git>)에 공시하였다.

[0103] <2-4> 표현형 알파 및 베타 다양성 기반 생태학적 평가

[0104] 표현형에 따른 아파 및 베타 다양성을 분석하여, 생태학적 평가에 이용하였다. 구체적으로 Shannon의 다양성 지수는 상기 실시예 2-3의 비닝(binning) 후 생성된 feature table과 R 패키지(package)인 비건(vegan)을 사용하여 계산되었다. 그 후 교란되지 않은 그룹과 교란된 그룹 간의 알파-다양성(α -diversity) 차이의 중요도는 R 패키지 ggpubr을 사용하여 계산된 Wilcoxon 부호 순위 테스트를 사용하여 평가하였다. 그 후 R 패키지의 stats

를 이용하여 주성분 분석(principal component analysis) plot을 이용하여, 샘플의 상호 관계를 확인하고 시각화 하였다. 각 PCA plot에서 그룹화(clustered) 각 그룹의 중요도는 비건(vegan) 패키지의 순열 다변량 분산 분석(permutational multivariate analysis of variance, PERMANOVA)을 이용하여 테스트 하였다. 생태의 교란은 각 PCA 플롯에서 교란되지 않은 샘플과 시험 대상 샘플까지의 pair-wise 거리를 기준으로 평가하였다.

[0106] <2-5> 교란에 따른 표현형 식별

[0107] FCM 지문을 표현형의 구조로 해석하기 위하여, $n \times n$ 그리드 셀(grid cell)을 표현형의 하위 커뮤니티(sub communitie)로 그룹화 하고, 각 그룹을 하기 표 1과 같이 지정하였다. 일반적인 지하수는, 미생물이 증식이 거의 이루어지지 않는 빈영양(oligotrophy)상태이기에, 하기 표현형 그룹에서 HA 그룹은 세포의 크기가 크고, 세포 복잡성이 높은 그룹으로서, 오염원에 의하여, 세포의 다양한 대사 활동이 활발한 그룹이다. HR 그룹은 세포의 크기가 크고, HA 그룹과 비교하여, 세포 복잡도는 다소 떨어진 그룹으로, 오염원에 의하여, 세포의 다양한 대사 활동이 증가한 후, 시간 경과에 따라 세포의 복잡도가 감소하여 오염원의 감소 또는 수생태의 안정화로 진행되는 그룹이며, 상기 HA 그룹 및 HR 그룹은, 오염원에 의하여 세포의 크기가 증가되는 바, 세포 증식과 관련된 오염원인, 유기 오염원에 의하여, 수생태 교란이 유도된 것으로 유추할 수 있다. AS 그룹은 세포의 크기는 작으나, 세포의 복잡도가 증가된 그룹으로서, 오염원의 유입으로 세포의 복잡도가 증가된 교란으로서, 세포의 증식과는 연관되어 있지 않는, 화학적 교란이 유도된 것으로 유추할 수 있다. LS 그룹은, 세포의 크기가 증가되어 있는 상태로, 오염원의 노출 후 시간 경과로, 오염원이 미생물에 의하여 대사된 후, 세포의 복잡도가 안정기에 들어간 그룹으로 유추할 수 있으며, D 그룹은, 세포의 크기 및 복잡도가 타 그룹에 비해 작은 값으로 측정되는 바, 오염원에 노출되지 않았거나, 오염원에 노출된 후 오랜 시간이 경과된 그룹, 빈영양 상태의 오염되지 않은 그룹으로 유추 할 수 있다. 실제 오염되지 않은 지하수의 미생물 표현형의 70% 이상이 D 그룹과 같은 표현형을 보이는 것으로 알려져 있다. 본 발명의 각 그룹화의 표현형 기준은 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0108]

그룹	표현형
높은 활성(highly active, HA)	$\{(SSC > n/2) > (FSC > n/2)\}$
높은 재현성(highly reproducible, HR)	$\{(SSC > n/2) < (FSC > n/2)\}$
활성형 작은-세포 (active small-sized, AS)	$\{(SSC > n/2) \cap (FSC < (n/2+1))\}$
대형(large-sized, LS)	$\{(SSC < (n/2+1)) \cap (FSC > n/2+1)\}$
휴면(dormant or starved, D)	$\{(SSC < (n/2+1)) \cap (FSC < (n/2+1))\}$

[0110]

그 후 표현형으로 그룹화된 표를 이용하여, Bray-Curtis 비유사성을 기반의 R 함수 hclust의 계층적 클러스터링(clustering)으로 지하수 미생물 군집의 표현형 구조를 비교하였다. 표현형에 따라 마이크로바이옴에서 오염 물질에 의하여 유발된 교란을 반영할 수 있는지 확인하기 위하여, 분석에서 결정된 표현형 클러스터에 오염 상태를 표시하였다. 그 후 교란된 샘플로 구성된 표현형 군집을 확인하고, R 패키지 indicpecies를 사용하여 지표종 분석(indicator species analysis)을 사용하여 교란된 지하수 마이크로바이옴과 교란되지 않은 지하수 미생물군집 사이의 주요 표현형의 차이를 확인하였다. 상기 실시예 1 내지 실시예 2의 과정의 전체적인 분석 과정을 도 1에 나타내었으며, FCM 데이터 분석 과정을 도 2에 나타내었다.

[0112] <실시예 3> 지하수 생태 교란에 대한 분류학적 평가

[0113]

건기(dry season) 지하수 샘플에서, 상기 실시예 1 및 실시예 2에 기재된 방법으로, 마이크로바이옴 생태 교란을 확인하였다. 대조군으로는 16s rRNA를 이용한 분자생물학적 분석 방법을 이용하였다. 구체적으로, 지하수 샘플은, 오염원인 퍼클로로에틸렌(perchloroethylene, PCE)에 노출된 contaminated 그룹(C, n=8), 오염원 주변부의 fringed 그룹(F, n=8), 지역 내 수공급원인 local background 그룹(B, n=4) 및 오염되지 않은 uncontaminated 그룹(G, n=27)으로 분류하여, 건기에 수집하였다. 수집된 지하수 샘플에서 16s rRNA 유전자에 대하여, 총 718,046개 및 품질 필터링된 439,935개의 리드(read)를 획득하였다. 그 후 건기 시점에 대하여 3,158개로 OTU를 이용하여 클러스터링 하였다. 그 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

Season	Index ^a	No. of features	G (n = 27)	C (n = 8)	F (n = 8)	B ^b (n = 4)	Significance ^c
Dry	Shannon	97% OTUs	3.2 (0.8)	3.4 (0.7)	4.0 (0.6)	3.3 (0.3)	0.11
		100 grid-cells	3.2 ^d (0.2)	3.4 (0.1)	3.4 (0.2)	3.2 (0.2)	0.02
		625 grid-cells	4.3 [*] (0.2)	4.7 [†] (0.2)	4.6 ^{*,†} (0.2)	4.4 ^{*,†} (0.2)	< 0.001
		1,600 grid-cells	5.1 [*] (0.3)	5.5 [†] (0.2)	5.4 [†] (0.2)	5.2 ^{*,†} (0.2)	< 0.001
		2,500 grid-cells	5.5 [*] (0.3)	5.9 [†] (0.2)	5.8 ^{*,†} (0.2)	5.6 ^{*,†} (0.2)	< 0.001

[0114]

[0116]

그 결과, 상기 표 2에 나타난 바와 같이, 건기에서의 OTUs에서 계산된 Shannon의 다양성이 F > C > B > G 순으로 나타났으나 각 그룹간에 유의적인 차이는 없었다.

[0118]

그러나, 본 발명의 FCM 분석을 이용한 표현형 기반의 평가에서, FCM 데이터로, 2,048개의 살아있는 세포의 표현형 특징을 각 시점의 샘플에서 확인하기 위하여, 그리드 셀 단위 크기를 100, 625, 1,600 및 2,500개로 선택하여 표현형의 다양성을 계산하고 비교한 결과, 건기에는 오염 요부와 관계없이 그리드 셀의 수가 증가하면, shannon 다양성이 증가하였으며, 100 개의 그리드 셀을 이용한 경우를 제외하면, 625, 1,600 및 2,500개의 그리드 셀을 이용한 그룹간 shannon 다양성의 차이가 유의적인 것을 확인하였다. 특히, 625, 1,600 및 2,500 그리드 셀에서 C 그룹과 G 그룹 사이의 shannon 다양성의 차이가 유의미하였고, F와 B의 다양성은 625와 2500 그리드 셀에서는 G 그룹과 유의적인 차이는 없었다. 그 중에서도 1,600 개의 그리드 셀을 이용하여 shannon 다양성을 분석하였을 때 각 그룹에 따라 유의적인 차이를 나타내었다.

[0120]

<실시예 4> 생태 교란에 대한 계통 발생 및 표현형 평가

[0121]

Bray-Curtis 거리 기반의 NMDS 플롯으로, 각 지하수 샘플이 계통 발생 및 표현형의 β 다양성을 통해 구별될 수 있는지 확인하였다. 건기에는, OTU의 NMDS 플롯에서 G 그룹과 오염된 그룹인 C, F 및 B가 명확하게 분리되었다(ANOSIM, R = 0.69 및 P < 0.05)(도 3a). FCM의 NMDS(ANOSIM, R = 0.29 및 P < 0.05)에서는 C 그룹 및 B와 G 샘플은 G 및 오염 그룹과 중첩되었다(도 3B). 그룹 내(intra) 및 그룹 간(inter) 비교에서는 OTU 거리는 FCM 거리보다 2배 높았으며, 그룹 내 거리의 큰차이로 인한 편향된 비교를 방지하기 위하여, 그룹 내 거리에 대한 그룹 간 및 그룹 내 거리 차이의 비율을 비교하였다. 그 결과, FCM-distances(14.5%, G-C; 25.3%, G-F; 및 7.1%, G-B)의 편차가 뚜렷하게 나타났으며, OTU-distances(7.3%, G-C; 7.8%, G-F; 5.7%, G-B)는 유의적인 차이가 없었다. OTU 거리 순서는 F > C > B로 일관적이지 않은 것을 확인하였다.

[0123]

<실시예 5> 퍼클로로에틸렌 교란 관련 세균 분류군 식별

[0124]

FCM 지문을 표현형의 특징으로 확인하고, 교란에 대한 반응 메커니즘과 연결하기 위하여 1,600개 FCM 그리드 셀을 표현형 단위로 분류하고(도 4) 셀 분포 패턴을 계층적 클러스터링을 이용하여 비교하였다. 건기에 0.2 distance를 컷오프(cutoff)로 사용하여 19개의 오염 지역 샘플과 3개의 G 그룹 샘플을 Dd1(교란 + 건기)로 지정하였다(도 5). 나머지 25개의 G 그룹 샘플과 4개의 오염된 샘플(C 2 지역, B 2 지역)은 Ud1, Ud2 및 Ud3로 클러스터링 하였다(Ud = 비-교란 + 건기)(도 5). Ud1, Ud2 및 Ud3는 각각 0.07 ± 0.04 및 0.10 ± 0.04의 평균 내 거리(intra-distance)로 밀집된 반면 Dd1의 내거리는 더 높았다.

[0126]

각 클러스터의 세포 표현형 구성은 히트맵으로 시각화 하였으며(도 6) Dd1의 셀이 HA(34.6 ± 7.4%), AS(26.7 ± 5.6%) 및 D(33.0 ± 8.5%)로 분포하는 것을 확인하였다(도 6). 한편, Ud1 및 Ud3 에서는 셀이 D(83.7 ± 5.1%, Ud1; 63.7 ± 6.0%, Ud3)에 밀집되었으며, Ud2에서는 예외적으로, 셀이 Ud1 및 Ud3와 비교하여, D에서의 밀집이 감소되어 있었다(23.4 ± 4.1%, HA, 10.2 ± 4.7%, AS, 48.2 ± 2.6%, D, 14.1 ± 5.0%, HR)(도 7). 표현형 클러스터와 무관하게, LS 하위 커뮤니티에서 세포의 5% 미만이 관찰되었으며, Dd1의 HA 및 AS 하위 커뮤니티는 Ud1 내지 Ud3 보다 현저히 증가되어 있는 것을 확인하였다. 대조적으로, Ud1 내지 Ud3의 D 하위 커뮤니티는 D1 보다 현저히 증가되어 있었다.

[0127]

지표종 분석 결과, 총 88개의 그리드 셀이 Dd1의 지표(indicator value > 0.5 and P < 0.05)로 확인되었으며,

Dd1의 93.2%는 HA(46 개) 또는 AS(36 개)에 속하고, 나머지 6개의 그리드 셀은 D에 속하는 것을 확인하였다(표 3). 건기의 교란되지 않은 클러스터 중에서 Ud1 및 Ud2에 대하여 각각 40개 및 16개의 그리드 셀이 지표(지표 값 > 0.5 및 $P < 0.05$)로 확인되었으나, Ud3에 대한 지표 그리드 셀은 확인되지 않았다. 그리드 셀을 나타내는 모든 Ud1은 HR(13 개), HA(2 개) 및 LS(1 개), 이를 포함하는 그리드 셀을 나타내는 D 및 Ud2에서 유래하였다(표 4).

표 3

Grid-cell	Phenotypic subcommunities	Indval ^a	Significance ^b	Grid-cell	Phenotypic subcommunities	Indval	Significance
F20S28	AS	0.71	0.001	F29S33	HA	0.65	0.001
F19S27	AS	0.7	0.001	F21S28	HA	0.64	0.001
F18S25	AS	0.68	0.001	F23S30	HA	0.64	0.002
F20S27	AS	0.68	0.001	F25S29	HA	0.63	0.001
F15S24	AS	0.67	0.001	F25S31	HA	0.63	0.001
F19S26	AS	0.66	0.001	F23S28	HA	0.62	0.001
F16S25	AS	0.65	0.001	F25S30	HA	0.62	0.001
F18S26	AS	0.64	0.001	F29S36	HA	0.62	0.004
F17S25	AS	0.63	0.001	F23S29	HA	0.61	0.001
F14S24	AS	0.62	0.001	F24S30	HA	0.61	0.001
F20S26	AS	0.59	0.001	F26S32	HA	0.61	0.001
F14S23	AS	0.58	0.001	F28S33	HA	0.61	0.001
F16S24	AS	0.58	0.001	F29S34	HA	0.61	0.002
F17S26	AS	0.58	0.001	F31S38	HA	0.61	0.003
F13S24	AS	0.58	0.002	F27S34	HA	0.6	0.004
F11S24	AS	0.58	0.003	F24S31	HA	0.6	0.007
F13S23	AS	0.57	0.001	F22S27	HA	0.59	0.001
F15S23	AS	0.57	0.001	F24S29	HA	0.59	0.001
F17S24	AS	0.57	0.001	F22S28	HA	0.58	0.001
F16S23	AS	0.56	0.001	F30S35	HA	0.58	0.001
F18S27	AS	0.55	0.001	F21S29	HA	0.58	0.005
F19S25	AS	0.53	0.001	F26S33	HA	0.58	0.006
F20S25	AS	0.53	0.001	F23S31	HA	0.58	0.038
F12S21	AS	0.53	0.002	F21S27	HA	0.57	0.001
F19S24	AS	0.52	0.001	F33S39	HA	0.57	0.003
F19S28	AS	0.52	0.001	F28S35	HA	0.57	0.01
F10S22	AS	0.52	0.005	F21S26	HA	0.56	0.001
F14S22	AS	0.51	0.001	F25S32	HA	0.56	0.005
F13S22	AS	0.51	0.001	F22S30	HA	0.56	0.034
F17S23	AS	0.51	0.001	F30S37	HA	0.55	0.009
F20S24	AS	0.51	0.001	F25S33	HA	0.54	0.011
F18S24	AS	0.5	0.001	F27S31	HA	0.53	0.001
F7S22	AS	0.5	0.003	F31S37	HA	0.53	0.002
F8S21	AS	0.5	0.003	F24S28	HA	0.52	0.001
F8S22	AS	0.5	0.003	F32S39	HA	0.52	0.004
F9S22	AS	0.5	0.005	F27S35	HA	0.52	0.012
F26S31	HA	0.71	0.001	F23S27	HA	0.51	0.001
F30S36	HA	0.7	0.001	F27S30	HA	0.51	0.001
F27S32	HA	0.69	0.001	F7S20	D	0.72	0.001
F27S33	HA	0.67	0.001	F9S19	D	0.67	0.001
F26S30	HA	0.66	0.001	F6S17	D	0.56	0.004
F28S34	HA	0.66	0.001	F7S18	D	0.56	0.004
F29S35	HA	0.66	0.001	F8S18	D	0.55	0.003
F22S29	HA	0.65	0.001	F8S20	D	0.54	0.004

[0128]

표 4

Grid-cell	Phenotypic subcommunities ^a	Indval ^b	Significance ^b	Grid-cell	Phenotypic subcommunities	Indval	Significance
F13S8	D	0.76	0.001	F24S22	HR	0.58	0.001
F12S8	D	0.74	0.001	F15S13	D	0.57	0.01
F12S6	D	0.72	0.001	F11S8	D	0.57	0.002
F13S9	D	0.71	0.001	F12S10	D	0.57	0.001
F14S10	D	0.7	0.002	F22S21	HR	0.57	0.001
F16S12	D	0.7	0.001	F11S11	D	0.56	0.005
F16S13	D	0.69	0.003	F9S10	D	0.56	0.004
F13S10	D	0.69	0.001	F10S7	D	0.56	0.001
F16S11	D	0.68	0.001	F11S10	D	0.55	0.005
F23S23	EQ	0.68	0.001	F10S11	D	0.55	0.004
F17S12	D	0.67	0.001	F25S24	HR	0.55	0.001
F13S7	D	0.66	0.001	F15S11	D	0.54	0.028
F11S7	D	0.65	0.002	F10S6	D	0.54	0.002
F11S6	D	0.65	0.001	F11S9	D	0.54	0.001
F17S14	D	0.65	0.001	F25S23	HR	0.54	0.002
F14S9	D	0.64	0.001	F10S12	D	0.53	0.005
F14S11	D	0.63	0.002	F25S22	HR	0.53	0.003
F23S22	HR	0.63	0.001	F15S10	D	0.52	0.012
F12S9	D	0.62	0.001	F10S10	D	0.52	0.005
F15S12	D	0.61	0.022	F22S22	EQ	0.52	0.001
F15S8	D	0.6	0.001	F24S21	HR	0.52	0.001
F23S24	HA	0.6	0.002	F21S20	LS	0.52	0.001
F24S23	HR	0.6	0.001	F11S5	D	0.51	0.004
F16S14	D	0.59	0.011	F23S21	HR	0.51	0.001
F12S7	D	0.59	0.005	F13S11	D	0.5	0.014
F24S24	EQ	0.59	0.001	F14S7	D	0.5	0.005
F15S9	D	0.58	0.007	F25S25	EQ	0.5	0.001
F14S8	D	0.58	0.003	F24S25	HA	0.5	0.001

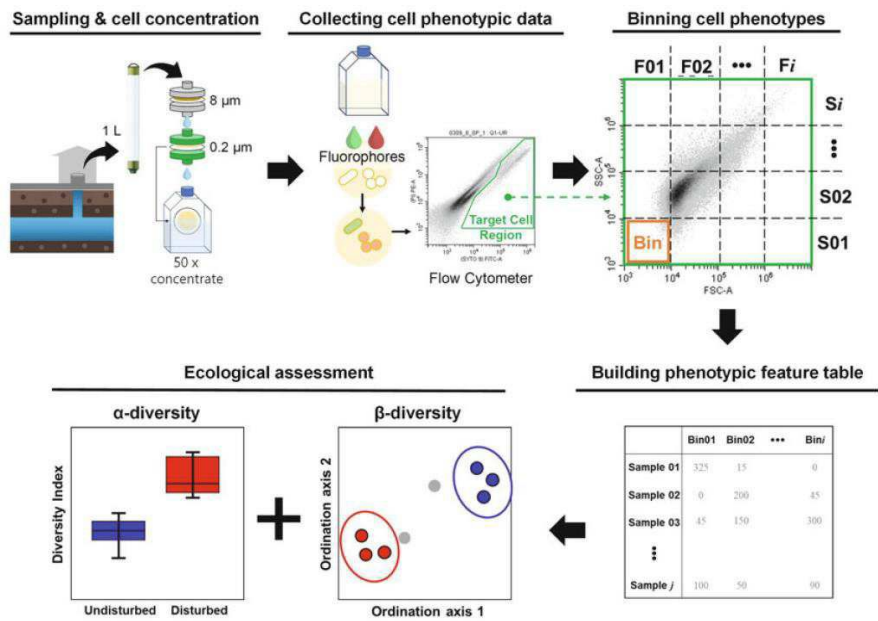
[0129]

[0131]

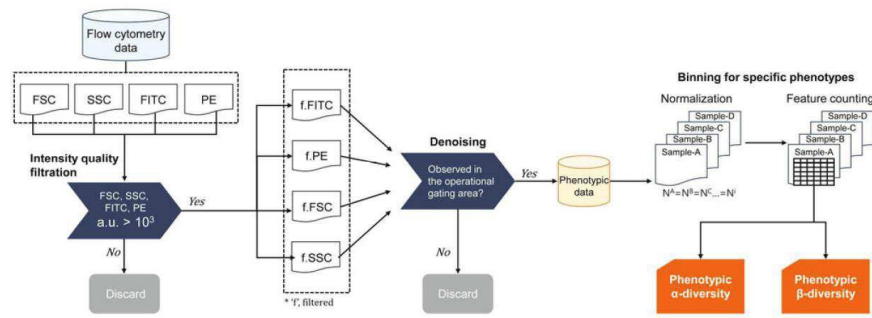
따라서, 본 발명은 지하수 시료를 농축하고, 이를 유세포분석적으로 분석하여, 세포 크기 및 복잡도에 따른 표현형으로 분류하였다. 또한, 분류된 표현형을 그룹화 하였으며, 지하수 시료에 따른 표현형의 차이를 확인하고, 이를 대조군과 비교하여, 지하수 세균총의 표현형의 차이에 따른 오염 정도나, 오염원을 유추할 수 있는 것을 확인하여, 지하수 생태 교란 평가에 이용할 수 있는 것을 확인하였다.

도면

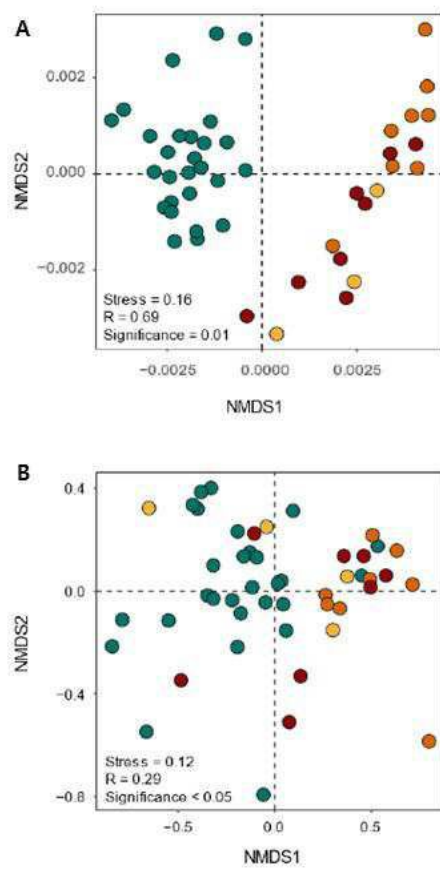
도면1



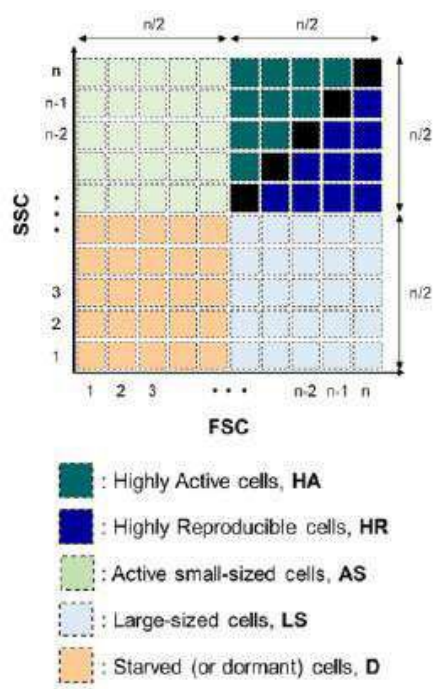
도면2



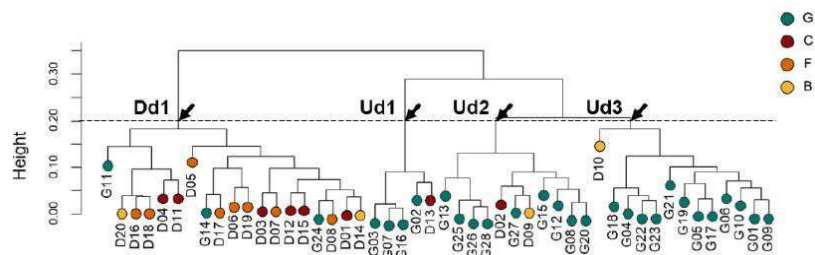
도면3



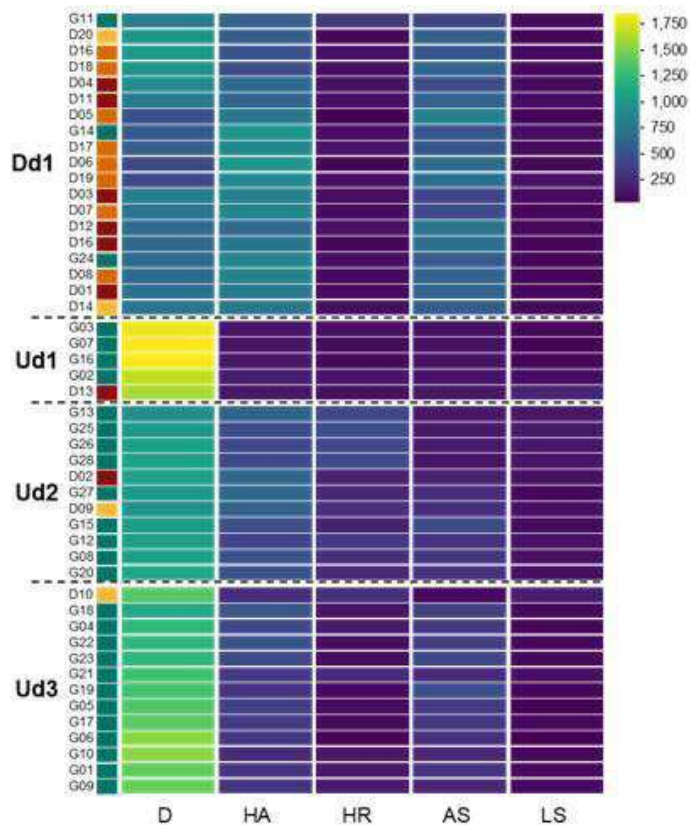
도면4



도면5



도면6



도면7

