

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2009-0081892 (43) 공개일자 2009년07월29일
(51) Int. Cl. <i>A01N 65/42</i> (2009.01) (21) 출원번호 10-2008-0008052 (22) 출원일자 2008년01월25일 심사청구일자 2008년01월25일	(71) 출원인 이화여자대학교 산학협력단 서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내 (72) 발명자 이인숙 서울 용산구 동부이촌동 한강대우아파트 106-103 김성현 서울 서초구 방배4동 811-17호 임혜원 서울 강남구 역삼동 660-21 (74) 대리인 특허법인다래	

전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 범부채 추출물을 이용한 돌피의 생장 촉진방법 및 이방법을 적용한 중금속 오염 토양의 정화방법

(57) 요약

본 발명은 범부채(*Belamcanda chinensis*) 추출물을 이용하여 돌피(*Echinochloa crusgalli*)의 생장을 촉진시키는 방법 및 이 방법을 적용하여 중금속으로 오염된 토양을 정화시키는 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 돌피가 생장하고 있는 토양에 범부채 추출물을 주입함으로써 돌피의 발아와 줄기 및 뿌리의 생장을 촉진시키는 방법, 및 이 방법을 중금속으로 오염된 토양에 적용함으로써 식물추출법(phytoextraction)에 의한 중금속 이동을 증진시키고, 종래의 물리적 또는 화학적 복원법과는 달리 2차 오염이 동반되지 않는, 중금속으로 오염된 토양을 정화시키는 방법에 관한 것이다.

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 S120507L0201004

부처명 산림청

연구사업명 임업기술연구개발사업

연구과제명 CO₂ 와 대기오염물질 증가가 식물생장과 조절에미치는 영향

주관기관 이화여자대학교

연구기간 2007년 04월 25일 ~ 2008년 04월 24일

특허청구의 범위

청구항 1

범부채(*Belamcanda chinensis*) 추출물을 이용하여 돌피(*Echinochloa crusgalli*)의 생장을 촉진시키는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 생장이 촉진되는 부위는 줄기 및 뿌리인 것을 특징으로 하는 돌피의 생장을 촉진시키는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 범부채 추출물은 범부채 뿌리의 추출물인 것을 특징으로 하는 돌피의 생장을 촉진시키는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 돌피가 서식하고 있는 토양에 범부채 추출물을 주입함으로써 수행되는 것을 특징으로 하는 돌피의 생장을 촉진시키는 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 방법을 적용하여 중금속으로 오염된 토양을 정화시키는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 중금속은 납 또는 카드뮴인 것을 특징으로 하는 중금속으로 오염된 토양을 정화시키는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- <1> 본 발명은 범부채(*Belamcanda chinensis*) 추출물을 이용하여 돌피의 발아와 뿌리 및 줄기의 생장을 촉진시키는 방법, 및 이 방법을 중금속으로 오염된 토양에 적용함으로써 식물추출법(phytoextraction)에 의한 중금속 이동을 증진시키고, 종래의 물리적 또는 화학적 복원법과는 달리 2차 오염이 동반되지 않는, 중금속으로 오염된 토양을 정화시키는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- <2> 산업 발전에 따른 다양한 화학물질들의 대량 생산과 무분별한 이용으로 자연환경에 미치는 오염문제가 점차 심각해지면서, 오염된 환경을 복원하기 위한 많은 기술들이 제안되어 왔다.
- <3> 현재 오염토양의 정화방법들은 크게 물리적·화학적 방법과 생물학적 방법으로 나눌 수 있는데, 물리적 방법으로는 반전심경, 객토, 배토, 삭토 등이 있고, 화학적 방법은 유해물질의 불용화, 흡착, 용탈, 세척 등을 들 수 있으며, 생물학적 방법으로는 미생물복원(bioremediation) 및 식물복원(phytoremediation) 기술 등을 들 수 있다.
- <4> 위의 물리적 방법 또는 화학적 방법은 현재까지 가장 빈번하게 이용되고 있으나, 막대한 자금과 노동력을 필요로 하고, 자연을 훼손시키며, 2차 오염을 유발한다는 단점을 보인다. 예를 들어, 오염물질의 처리 방법으로서 유독 화학 물질을 파내어 특수 매립지로 운반해 파묻어 버리는 방법은 운반용 트럭이나 구덩이를 파는 장비 등이 필요하고 매립지 조성에 비용이 많이 소요되며 무엇보다 환경 파괴적인 것이어서, 보다 경제적이면서 환경 친화적인 방법이 요구되어 왔다.
- <5> 이에 생물학적 방법인 미생물을 이용하는 미생물복원 및 식물을 이용하는 식물복원 기술은 태양에너지에 의해 가동되는 청정기술이라는 점과 환경교란을 최소화시키며, 현장 적용성이 높으며, 2차적 오염물질을 생산하지 않고, 심미적 안정감을 주며, 비용면에서 경제적이라는 다수의 장점이 있다.

- <6> 특히, 식물복원 기술 이용시 식물 뿌리의 추출물(이하, '삼출물'이라고도 함)은 식물 뿌리로 유해물질을 흡수하여 식물체의 조직 내로 수송하여 제거하기도 하지만, 또한 뿌리 주변의 미생물을 활성화시키고 미생물들의 대사 지질로도 이용되어 근권 미생물의 군집을 다양하게 하고 유해 물질의 분해능을 촉진시키는 역할을 함으로써 근권 미생물을 이용하는 미생물복원과 결부시켜 활용하는 것이 매우 효율적이라 할 수 있다.
- <7> 식물복원 기술 중에서, 특히 중금속으로 오염된 토양의 복원을 위해서는 축적 식물이 토양수에 용해된 중금속만을 흡수할 수 있으므로 중금속의 생물학적 이용성(bioavailability)이 복원 효율을 결정하는 중요한 제한 인자로 작용하게 된다. 지금까지 많은 연구자들은 중금속으로 오염된 토양에 오염물질에 대한 내성과 분해능이 있는 식물을 파종한 후 오염물질의 제거력을 조사하는 단편적인 연구만을 수행하여 왔다.
- <8> 또한, 식물의 중금속에 대한 생물학적유용성을 높이기 위해서 EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid), DTPA(diethylenetriaminepentaacetic acid) 등과 같은 인공 킬레이트제(chelate)를 주입하여 인위적으로 식물의 중금속 제거력을 향상시키는 간접적인 복원 기술에 국한되어 오고 있다. 인공 킬레이트제의 주입은 식물의 성장에 대한 저해가 매우 클 뿐만 아니라 주변을 오염시키므로 식물복원 기술을 적극적으로 이용하기에는 적절한 대안이 필요한 실정이다. 이에 비해 천연 킬레이트제의 이용방법은 식물이 잘 성장할 수 있도록 천연 성분을 공급하는 친환경적인 방법이다. 특히, 오염물 제거에 중요한 식물의 뿌리 발달을 촉진시키고 잎의 생육을 도와서 병충해에 대한 저항성을 증진시킨다.
- <9> 따라서, 식물의 천연물을 이용한 식물복원 기술 개발은 식물의 생육활성과 토양 복원 효율을 촉진시키고 근권의 높은 활성 유지를 위해 바람직하며, 이에 대한 기술 개발이 요구되는 실정이다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <10> 본 발명은 범부채 추출물을 이용하여 돌피의 성장을 촉진시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- <11> 또한, 본 발명은 상기 돌피의 성장을 촉진시키는 방법을 적용하여 중금속으로 오염된 토양을 정화시키는 방법을 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.

과제 해결수단

- <12> 이에 본 발명자들은 이러한 종래의 문제점을 해결하기 위하여 예의 연구를 거듭한 결과, 돌피가 성장하고 있는 토양에 범부채 추출물을 주입하는 경우 돌피의 생장이 촉진되는 것을 확인하였다. 또한, 중금속으로 오염된 토양에 범부채 추출물을 이용하여 돌피의 성장을 촉진시키는 경우, 돌피가 중금속을 흡수하여 지상부로 끌어올리는 중금속 이동을 향상시킬 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.
- <13> 따라서, 본 발명은 범부채 추출물을 이용하여 돌피의 성장을 촉진시키는 방법을 제공한다.
- <14> 상기 범부채 추출물은 범부채 뿌리의 추출물일 수 있다.
- <15> 상기 돌피의 성장을 촉진시키는 방법은 돌피가 서식하고 있는 토양에 범부채 추출물을 주입함으로써 수행될 수 있다.
- <16> 또한, 본 발명은 상기 돌피의 성장을 촉진시키는 방법을 적용하여 중금속으로 오염된 토양을 정화시키는 방법을 제공한다.

효 과

- <17> 상술한 바와 같이, 범부채 추출물은 돌피의 발아와 줄기 및 뿌리의 성장을 촉진시킨다.
- <18> 또한, 돌피는 중금속에 대한 내성을 가지므로, 중금속으로 오염된 토양에 돌피를 생장시키고, 상기 토양에 범부채 추출물을 주입함으로써 식물추출법(phytoextraction)에 의한 중금속 이동을 증진시켜, 중금속으로 오염된 토양을 정화(remediation)시킨다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <19> 본 발명은 범부채(*Belamcanda chinensis*) 추출물을 이용하여 돌피의 발아와 줄기 및 뿌리의 성장을 촉진시키는 방법, 및 이 방법을 중금속으로 오염된 토양에 적용함으로써 식물추출법(phytoextraction)에 의한 중금속 분해

능을 증진시키고, 종래의 물리적 또는 화학적 복원법과는 달리 2차 오염이 동반되지 않는, 중금속으로 오염된 토양을 정화시키는 방법에 관한 것이다.

- <20> 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.
- <21> 본 발명의 돌피의 성장을 촉진시키는 방법은 범부채 추출물을 이용하는 것을 특징으로 한다.
- <22> 돌피(*Echinochloa crusgalli*)는 외떡잎식물 벼목 화본과의 한해살이풀로서, 들에서 자라며, 높이는 30~90 cm이고, 잎은 선형으로 편평하다. 꽃은 7~8월에 피고, 뿌리는 수염뿌리를 많이 내며, 본 발명자의 실시예에서는 중금속에 대한 내성을 가진 식물로 나타났다.
- <23> 범부채(*Belamcanda chinensis*)는 외떡잎식물 백합목 붓꽃과의 여러해살이풀로서, 산지와 바닷가에서 자라며 높이는 50~100 cm이고, 잎은 어긋나고 칼 모양이며 좌우로 납작하고 2줄로 늘어선 모양이다. 꽃은 7~8월에 피는데 지름이 5~6 cm이며, 열매는 9~10월에 익으며, 뿌리와 줄기는 약으로 사용된다.
- <24> 범부채 추출물은 범부채 뿌리의 추출물로서, 삼출물이라고도 한다.
- <25> 상기 범부채 추출물은 범부채의 뿌리를 세절한 후 뿌리 100 g당 증류수 1 ℓ를 첨가하고, 상온에서 48시간 놓아둔 후에 추출하여 0.45 μm 실린지(syringe) 필터로 멸균시켜 제조할 수 있다.
- <26> 또한, 상기 범부채 추출물은 범부채 뿌리를 세절한 후 탄소수 1 내지 4의 저급알콜, 글리세린, 에틸아세테이트, 부틸렌글리콜, 프로필렌글리콜, 디클로로메탄 또는 이들의 혼합용매를 사용하여 열수 추출, 냉침 추출, 초음파 추출 또는 환류 냉각 추출 등의 추출방법에 의해 추출한 후, 추출액을 여과, 감압농축, 동결건조 또는 분사건조 등의 방법으로 제조할 수도 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- <27> 상기와 같은 범부채 추출물을 돌피가 성장하고 있는 토양에 주입함으로써 돌피의 성장을 촉진시킬 수 있다.
- <28> 본 발명의 중금속으로 오염된 토양을 정화시키는 방법은 돌피의 성장을 촉진시키는 방법을 적용하는 것을 특징으로 한다.
- <29> 보다 상세하게는, 중금속으로 오염된 토양에 중금속, 특히 납과 카드뮴에 대한 내성을 갖는 돌피의 종자를 발아 및 성장시키고, 상기 토양에 범부채 추출물을 킬레이트제로서 주입하여 돌피의 성장을 촉진시킴으로써 중금속으로 오염된 토양을 정화시키는 방법이다.
- <30> 본 발명의 실시예에서는, 이러한 돌피의 종자를 중금속으로 오염된 토양에서 발아 및 성장시키고 범부채 추출물을 주입하였을 때 납 처리농도에서 높은 발아율을 나타내고, 돌피의 줄기 및 뿌리의 길이성장 측정시 높은 납 처리농도에서도 우수한 성장률을 나타냄을 확인하였다. 또한, 4주간 중금속으로 오염 토양에서 배양시 토양의 납 농도도 저감시켜 우수한 납 제거력을 확인하였다.
- <31> 따라서, 중금속으로 오염된 토양에 돌피를 이용하여 식물복원시 범부채 추출물을 주입함으로써 중금속의 제거력을 증진시켜 토양의 정화력을 향상시킬 수 있다.
- <32> 또한, 이러한 돌피는 국내토착식물이므로 중금속으로 오염된 토양에 재배하더라도 국내 생태계를 교란시키는 문제점은 발생시키지 않는 장점이 있다.
- <33> 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시하나, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범주 및 기술사상 범위 내에서 다양한 변경 및 수정이 가능한 당업자에게 있어서 명백한 것이며, 이러한 변형 및 수정이 첨부된 특허청구범위에 속하는 것도 당연한 것이다.
- <34> [실시예 1] 범부채 추출물의 돌피의 성장 촉진 확인
- <35> 1-1) 식물 선정
- <36> 돌피의 성장을 촉진시키는 효과적인 식물 뿌리의 추출물(삼출물)을 선정하기 위하여 약용식물인 개미취, 왕호장근, 바위취, 삼백초, 둥글레, 옥잠화, 쪽, 참취, 약모밀, 노루오줌, 범부채 등 11종 식물을 사용하였다(표 1).

표 1

<37> 약용식물 목록(list)

학명	국문명	과	생활 형태
<i>Reynoutria sachalinensis</i>	왕호장근	마디풀과(Polygonaceae)	다년생
<i>Aster tataricus</i>	개미취	국화과(Compositae)	다년생
<i>Aster scaber</i>	참취	국화과(Compositae)	다년생
<i>Persicaria tinctorium</i>	쪽	마디풀과(Polygonaceae)	다년생
<i>Saxifraga stolonifera</i>	바위취	범의귀과(Saxifragaceae)	다년생
<i>Saururus chinensis</i>	삼백초	삼백초과(Saururaceae)	다년생
<i>Polygonatum odoratum var. pluriflorum</i>	둥글레	백합과(Liliaceae)	다년생
<i>Hosta plantaginea</i>	옥잠화	백합과(Liliaceae)	다년생
<i>Houttuynia cordata</i>	약모밀	삼백초과(Saururaceae)	다년생
<i>Astilbe chinensis var. davidii</i>	노루오줌	범의귀과(Saxifragaceae)	다년생
<i>Belamcanda chinensis</i>	범부채	백합과(Liliaceae)	다년생

<38> 1-2) 식물 추출물의 제조

<39> 상기 표 1의 각 식물의 뿌리 추출물은, 식물 뿌리 100 g당 증류수 1 ℓ를 첨가하고, 상온에서 48시간 동안 놓아 둔 후에 추출하였으며 0.45 μm 실린지(syringe) 필터로 멸균시켜 제조하였다. 이렇게 제조된 식물 추출물을 돌피의 종자 발아와 유식물 성장실험에 사용하였다.

<40> 1-3) 식물 스크리닝 : 종자 발아율 및 유식물 성장 촉진 정도 확인

<41> 돌피의 생장에 우수한 식물 추출물을 선정하기 위하여, 상기 11종의 식물 추출물을 그대로 사용하여 돌피의 종자 발아율 및 유식물의 줄기와 뿌리의 성장 촉진 정도를 하기의 방법으로 조사하였으며, 대조구로는 증류수를 사용하였다.

<42> 돌피 종자를 30%의 치아염소산나트륨과 70%의 에탄올 용액으로 소독한 후 증류수로 3회 세척하였으며, 여과지를 한 장 간 페트리디쉬(petridish)에 10립씩 파종하였다. 각 처리구의 페트리디쉬에 상기 11종의 식물 추출물 10 ml씩을 각각 처리하여 25 °C 방(room)에서 14일간 생장시킨 후 돌피의 발아율 및 유식물의 줄기와 뿌리의 길이 성장정도를 측정하였다. 모든 실험은 3회 반복으로 수행하고, 그 평균값으로 나타내었다.

<43> (가) 종자 발아율

<44> 먼저, 각 식물 추출물이 돌피 종자 발아에 미치는 영향을 보면(표 2), 범부채 추출물이 90%로 높은 발아율을 나타냈으며, 이를 제외한 다른 식물의 추출물은 돌피의 발아를 억제하는 것으로 나타났다.

표 2

<45> 각 식물 종의 추출물 처리에 따른 돌피의 발아율

식물 추출물	발아율(%)
대조구	83
왕호장근	50
개미취	33
참취	0
쪽	40
바위취	34
삼백초	44
둥글레	48
옥잠화	37
약모밀	37
노루오줌	57
범부채	90

<46> (나) 유식물의 줄기와 뿌리의 길이 생장

<47> 다음으로, 각 식물 추출물이 돌피 유식물의 줄기와 뿌리 생장에 미치는 영향을 보면(표 3), 범부채 추출물은 줄기의 생장 저해를 나타내지 않았으며, 노루오줌, 바위취 추출물도 줄기의 생장을 저해하지 않는 것으로 나타났다. 또한, 범부채 추출물은 뿌리의 생장을 촉진시켰으며, 이를 제외한 다른 식물의 추출물은 뿌리의 생장을 억제하는 것으로 나타났다.

표 3

<48> 각 식물 종의 추출물 처리에 따른 돌피의 줄기 및 뿌리의 길이생장

식물 추출물	줄기 길이(cm)	뿌리 길이(cm)
대조구	8.3±1.2	2.6±0.2
왕호장근	5.2±1.2	2.6±0.6
개미취	0.1±0.04	0.1±0.04
참취	-	-
쪽	4.9±1.3	1.8±0.1
바위취	6.8±1.8	0.8±0.04
삼백초	5.0±0.7	2.5±0.5
둥글레	3.1±0.9	1.0±0.04
옥잠화	1.5±0.5	0.1±0.04
약모밀	6.4±1.5	2.4±0.5
노루오줌	7.5±1.2	1.9±0.2
범부채	8.5±1.2	3.9±0.2

<49> 상기 표 2 및 표 3에서 살펴본 바와 같이, 각 식물 추출물 중 범부채 추출물이 돌피의 종자 발아율과 유식물의 줄기 및 뿌리의 길이 생장을 촉진함을 알 수 있었다.

<50> [실시예 2] 돌피의 생장 촉진을 이용한 중금속 오염 토양의 정화 확인

<51> 2-1) 중금속으로 오염된 토양에서 돌피의 생장 촉진 확인

<52> 이화여자대학교 야산에서 자연토양을 채취한 후 2 mm 체로 쳐서 사용하였다. 채취한 토양에 각각 구리(Cu) 100, 카드뮴(Cd) 40, 납(Pb) 600 mg/kg 농도로 오염시키고, 오염된 토양 1 kg을 화분에 담은 뒤, 돌피 종자를 10개씩 심었다. 이를 25 °C, 상대습도 60%로 유지되는 생장실에서 명과 암조건을 각각 16시간과 8시간으로 조절하여 3주간 배양한 후, 돌피의 발아상태를 확인하였다. 이때, 대조구로는 채취한 토양 그대로를 사용하였다.

<53> 돌피의 발아 후 범부채 추출물을 토양에 주입한 화분과 주입하지 않은 화분에서의 각 유식물의 줄기(지상부) 및 뿌리의 길이 생장정도를 측정하였다. 모든 실험은 3회 반복으로 수행하고, 그 평균값을 계산하여 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

<54> 중금속 오염 토양에서 범부채 추출물의 처리에 따른 돌피의 줄기 및 뿌리 생장

	줄기 길이(cm)	뿌리 길이(cm)
대조구	30.8±9.7	18.8±5.2
대조구+범부채 추출물	33±1.7	19.5±2.5
Cu	17±1.7	13.0±1.0
Cu+범부채 추출물	19±2.8	13.0±5.7
Cd	11.3±2.3	15.3±3.8
Cd+범부채 추출물	10.0±1.0	10.7±5.7
Pb	28.0±2.0	18±2.6
Pb+범부채 추출물	36.3±5.5	20.0±1.0

- <55> 상기 표 4의 결과를 보면, 중금속에 노출시 유식물의 줄기와 뿌리의 길이 생장은 대체로 감소된 것을 알 수 있었다. 뿌리의 길이 생장은 범부채 추출물 주입 유무에 따라 유의적인 차이를 보이지 않은 반면, 줄기의 길이 생장은 범부채 추출물 주입시 약간 증가된 것으로 나타났다. 특히, 납(Pb)으로 오염된 토양에 노출시 범부채 추출물이 돌피의 줄기(지상부) 길이를 약 30% 증가시킨 것으로 나타났다. 이를 통하여 범부채 추출물이 돌피의 납(Pb)에 의한 성장 저해를 감소시키는 것을 확인하였다.
- <56> **2-2) 범부채 추출물 처리에 따른 토양의 물리화학적 성질 변화 확인**
- <57> 토양에서 중금속의 생물학적 이용성(bioavailability)에 영향을 주는 인자를 알아보기 위해, 초기 토양의 토양 함수량, 유기물 함량, pH, 용수량 및 양이온 치환 용량의 변화를 살펴보았다. 또한, 토양을 각각 구리(Cu) 100, 카드뮴(Cd) 40, 납(Pb) 600 mg/kg 농도로 오염시키고, 여기에 범부채 추출물의 주입 유무에 따라 유식물 4주 재배 후 토양 함수량, 유기물 함량, pH 및 미생물활성도의 변화를 살펴보았다. 이때, 대조구로는 초기 토양을 사용하였다.
- <58> 토양을 채집하여 돌, 자갈, 식물뿌리 등을 제거하고, 이를 2 mm 체로 친 다음 측정에 사용하였다.
- <59> - 토양 함수량(Moisture content, MC) : 토양 5 g을 110 °C 건조기에서 항량이 될 때까지 건조한 후 건조량당 백분율로 계산하였다.
- <60> - 유기물 함량(Organic matter, OM) : 토양 5 g을 110 °C 건조기에서 항량이 될 때까지 건조하고, 건조된 토양을 700 °C 회화로에서 1시간 동안 작열한 후 건조량당 백분율로 계산하였다.
- <61> - pH : 토양 5 g에 증류수 25 mL를 넣고 혼합한 뒤, 30분간 정치한 후 pH 측정기를 이용하여 측정하였다.
- <62> - 용수량(Water holding capacity, WHC) : 깔대기 속에 글래스울 0.5 g을 집어넣고 토양 50 g과 물 50 mL를 첨가하여 30분간 정치한 후 토양에 함유된 최대 용수량을 측정하였다.
- <63> - 양이온 치환 용량(Cation exchange capacity, CEC) : 건조된 토양 5 g에 아세트산나트륨(sodium acetate)을 이용하여 나트륨 이온을 과잉으로 흡착시킨 다음, 용액 중에 남아있는 나트륨 이온을 이소프로필알콜(isopropyl alcohol)로 세척한 후 암모늄 이온으로 탈착시켜 나트륨 이온의 농도를 EPA method 9081에 의거하여 분석하였다. 이때, 이온의 농도는 원자흡수분광광도계(atomic absorbance spectrophotometer, AAS)를 이용하여 측정하였다.
- <64> - 미생물활성도(Dehydrogenase activity, DHA) : 탈수소효소 활성을 측정하여 분석하였고, 이에 DHA 분석에 널리 사용되는 TTC(2,3,5-Triphenyl-2H-tetrazolium chloride) 분석 방법을 이용하여 측정하였다. 상세하게는, 각 토양 3 g에 3% TTC 용액 1 mL와 멸균수 2.5 mL를 주입하고 37 °C에서 24시간 배양한 후 메탄올을 첨가하여 TTC-포마잔(formazan)을 추출하였다. 추출액은 와트만 #2 여과지를 이용하여 여과시킨 후 스펙트로포토미터를 이용하여 485 nm 파장에서 TTC-포마잔을 비색법으로 정량하였다. 흡광계수는 포마잔으로 만든 표준 곡선에 따라 $\mu\text{g/mL}$ 로 계산하였고, 이 값을 다시 $\mu\text{g/kg}$ 토양으로 환산하였다.
- <65> 중금속으로 오염되지 않은 초기 토양에서 측정한 토양 함수량(MC), 유기물 함량(OM) 및 pH 등을 하기 표 5에 나타내었고, 중금속으로 오염된 토양에서의 유식물 4주 재배 후 측정한 MC, OM, pH 및 DHA를 하기 표 6에 나타내었다.

표 5

- <66> 초기 토양의 물리화학적 성질

	측정값
모래(sand) 함량(%)	54.2
미사(silt) 함량(%)	30.9
점토(clay) 함량(%)	15.0
토성	사양토(sandy loam)
pH(1:5)	5.01±0.08
MC(%)	17.2±0.9
OM(%)	5.4±1.1
WHC(g/g)	0.56
CEC(meq/kg)	10.2±0.02

표 6

유식물 4주 재배 후 토양의 물리화학적 성질

		토양	MC(%)	OM(%)	pH(1:5)	DHA(mg/kg)
범부채 추출물 처리	대조구	순토양 (bulk)	2.6±0.7	2.9±0.5	5.6±0.05	26.6±6.9
		식물근권 (rhizosphere)	6.3±0.4	3.3±0.6	5.8±0.05	47.1±2.0
	Cu	순토양	2.2±0.1	2.7±0.1	5.4±0.05	26.6±11.3
		식물근권	6.1±0.1	2.8±0.7	5.5±0.2	29.5±5.5
	Cd	순토양	4.2±0.2	2.1±0.7	5.1±0.1	18.1±2.6
		식물근권	7.3±0.8	2.4±0.4	5.2±0.1	20.1±7.0
	Pb	순토양	2.9±1.0	3.2±0.1	5.1±0.2	27.2±5.5
		식물근권	2.3±0.9	3.3±0.1	5.1±0.1	27.8±6.4
범부채 추출물 무처리	대조구	순토양	2.9±0.5	2.8±0.3	5.5±0.2	35.7±3.4
		식물근권	3.1±0.4	2.7±0.0	5.6±0.1	31.2±6.4
	Cu	순토양	5.8±0.3	3.6±1.2	5.1±0.06	15.3±3.4
		식물근권	4.9±0.4	2.3±0.8	5.5±0.2	58.4±6.9
	Cd	순토양	3.9±0.2	3.4±0.8	5.1±0.01	27.2±4.5
		식물근권	7.2±0.2	4.0±0.7	5.1±0.1	60.7±27.3
	Pb	순토양	2.6±1.6	3.3±0.1	5.4±0.6	20.4±7.4
		식물근권	3.2±0.4	3.3	6.1±0.4	38.5±9.4

상기 표 5 및 6의 결과를 보면, 초기 토양은 사양토이고, pH는 약 5.0으로 약산성이었다. 초기 토양과 비교하여, 유식물 4주 재배후 측정된 유기물 함량(OM)은 중금속으로 오염된 토양에서는 약간 감소하였다. 그러나, 납(Pb)에 노출시킨 식물의 근권 토양에서는 유기물 함량이 높게 나타났는데, 이는 식물의 근권 활동으로 인해 토양의 유기물 함량이 증가한 것임을 알 수 있었다. 또한, 범부채 추출물의 영향으로 토양의 MC와 pH가 약간 증가한 것을 알 수 있었다.

2-3) 범부채 추출물 처리에 따른 중금속 생물학적 이용성 증진 확인

범부채 추출물이 천연 킬레이트제로서 중금속 생물학적 이용성을 촉진시키는 것을 알아보기 위해, 각각 구리(Cu) 100, 카드뮴(Cd) 40, 납(Pb) 600 mg/kg 농도로 오염된 토양에 돌피를 4주간 재배한 후 돌피의 근권 토양 내 총 중금속 농도를 하기와 같은 방법으로 분석하고, 그 결과를 하기 표 7에 나타내었다.

- 토양의 중금속 분석 : 풍건토양 0.5 g에 왕수(aqua regia, 65% HCl 1.8 ml + 37% HNO₃ 0.6 ml) 2.4 ml를 가한 후 가열하여 시료를 산 분해하고, 증류수 10 ml로 희석하여 여과지(Watman No. 44)로 여과하였다. 여과된 시료를 원자흡수분광광도계(AAS analysis 100, Perkin Elmer, USA)로 측정하였다. 토양 중금속 방법의 신뢰도는 캐나다의 CNRC(National Research Council of Canada)에서 공인된 표준물질인 MESS-2(Marine Sediment)의 분석을 통해 확인하였으며 대조(blank) 시료도 같은 방법으로 분석하였다. 이때, 대조구로는 중금속으로 오염되고, 돌피를 심지 않은 토양을 사용하였다.

표 7

범부채 추출물의 주입에 따른 토양의 중금속의 총함량, 치환성 및 가용성 중금속 함량의 변화

중금속	시간	처리구	중금속 함량(mg/kg)		
			총중금속	치환성 중금속	가용성 중금속
Cd	초기	토양	2±0.9	-	-
		Cd 토양(대조구)	42.2±6.1	5.4±0.4	1.3±0.1
	4주후	Cd 토양+돌피	32.9±7.9	10.6±0.5	-
		Cd 토양+돌피 +범부채 추출물	18.3±8.4	12.2±0.2	-

Cu	초기	토양	29.8	4±0.2	0.3
		Cu 토양(대조구)	91.6±11.8	17.9±2.6	0.5±0.1
	4주후	Cu 토양+돌피	74.6±1.0	3.4±0.3	-
		Cu 토양+돌피 +범부채 추출물	63±13.4	14.5±2.1	-
Pb	초기	토양	-	-	-
		Pb 토양(대조구)	582±15	95.4±7.1	-
	4주후	Pb 토양+돌피	555±41	43.6±5.6	1.1±0.1
		Pb 토양+돌피 +범부채 추출물	488.2±2	15.5±0.8	0.7±0.1

<73> 상기 표 7의 결과를 보면, 대조구와 비교하여 돌피를 재배한 경우 전반적으로 총 중금속 농도가 낮게 나타났으며, 범부채 추출물을 주입한 경우 총 중금속 농도가 더욱 낮게 나타난 것을 알 수 있었다. 특히, 납(Pb)과 카드뮴(Cd)으로 오염된 토양에 범부채 추출물을 주입하는 경우 돌피의 중금속 저감 효과가 우수한 것을 확인할 수 있었다. 또한, 중금속으로 오염된 토양에 범부채 추출물을 주입하는 경우 토양에 존재하는 중금속을 치환성(exchangeable)로 변형시키는 것을 알 수 있었다. 이는 식물의 유기산이 토양의 중금속 결합형태를 변형시키는 것으로부터 야기된다는 것을 알 수 있었다.

<74> 다음으로, 범부채 추출물의 주입에 따른 돌피의 중금속 축적량을 알아보기 위해, 상기에서 4주간 재배한 돌피의 줄기와 뿌리에서의 중금속 농도를 하기와 같은 방법으로 분석하고, 그 결과를 하기 표 8에 나타내었다.

<75> - 식물체의 중금속 분석 : 돌피를 증류수로 깨끗이 씻은 후 줄기, 뿌리로 나눈 후 60 ℃ 건조기에서 항량이 될 때까지 건조하였다. 건조된 시료 0.5 g에 37% HNO₃ 5 ml를 가하여 마이크로웨이브(microwave)에서 분해시킨 후, 10 ml로 희석하여 Flame-AAS를 이용하여 중금속의 농도를 측정하였다. 중금속 분석 방법의 신뢰도는 일본의 NIES(National Institute for Environmental Studies)에서 공인된 표준물질인 No.10-c(Rice Flour)의 분석을 통해 확인하였다.

표 8

<76> 범부채 추출물 처리에 따른 돌피의 중금속 축적량

구분	중금속 함량(μg/g)					
	Cd		Cu		Pb	
	줄기	뿌리	줄기	뿌리	줄기	뿌리
돌피	6.6±0.6	13.6±0.1	7.0±2.9	26.2±5.2	73.1±3.8	172.1±38.1
돌피+ 범부채 추출물	27.2±2.7	26.7±7.9	31±2.6	37.4±1.2	254.4±104.3	375.8±60.9

<77> 상기 표 8의 결과를 보면, 범부채 추출물을 주입하여 돌피를 재배한 경우 돌피의 줄기 및 뿌리에서의 중금속 농도가 높게 나타난 것을 알 수 있었다. 특히, 납(Pb)의 농도는 돌피의 줄기에서 71%, 뿌리에서 54% 정도 크게 증가하였으며, 카드뮴(Cd)의 농도는 돌피의 줄기에서 76%, 뿌리에서 49% 정도 크게 증가하였음을 알 수 있었다. 이를 통하여, 범부채 추출물이 돌피의 성장과 함께 중금속 이동력을 증진시키는 것을 확인할 수 있었다.