



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0001698
(43) 공개일자 2012년01월04일

(51) Int. Cl.

G01N 33/18 (2006.01) G01N 21/64 (2006.01)
C12N 5/04 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0117844(분할)

(22) 출원일자 2011년11월11일

심사청구일자 없음

(62) 원출원 특허 10-2010-0008100

원출원일자 2010년01월28일

심사청구일자 2010년01월28일

(71) 출원인

인천대학교 산학협력단

인천광역시 연수구 송도동 12-1, 11, 12번지

(72) 발명자

한대준

인천광역시 연수구 송도동 9-31 송도웰카운티 10
2동 1001호

박지숙

인천광역시 남구 주안8동 연홍아파트 2동 204호

(74) 대리인

특허법인우인

전체 청구항 수 : 총 6 항

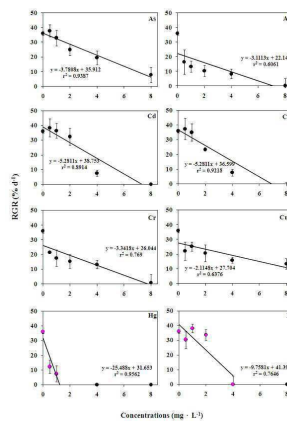
(54) 좁개구리밥의 성장 면적 변화율을 이용한 수질 독성 평가 방법

(57) 요약

본 발명의 수질 독성 평가 방법은 측정용 용기에 수체 샘플을 넣는 단계; 수체 샘플을 함유하는 측정용 용기에 좁개구리밥을 투입하는 단계; 측정용 용기에 투입된 좁개구리밥을 배양하는 단계; 및 배양이 완료된 좁개구리밥의 성장 면적 변화율 또는 엽록소 형광 특성을 측정하는 단계;를 포함한다.

본 발명에 따른 수질 독성 평가 방법은 좁개구리밥의 군체수 변화량이 아닌 좁개구리밥의 성장 면적 변화율 또는 엽록소 형광 특성(특히, 최대 전자 전달률)을 수질 독성 평가의 지표로 이용하기 때문에 수질 독성 판별 시간이 약 3일 정도 소요되고, 종래의 수질 독성 평가 시간(약 7일)보다 2배 이상 단축된다. 또한, 군체수 변화량 측정보다 성장 면적 변화율 또는 엽록소 형광 특성을 수질 독성 평가의 지표로 이용하기 때문에 측정하는 것이 보다 간편하고, 아울러 수질 독성원에 대한 높은 민감성을 가진다.

대표도 - 도5



특허청구의 범위

청구항 1

- (a) 측정용 용기에 수체 샘플을 넣는 단계;
- (b) 수체 샘플을 함유하는 측정용 용기에 좀개구리밥을 투입하는 단계;
- (c) 측정용 용기에 투입된 좀개구리밥을 배양하는 단계; 및
- (d) 배양이 완료된 좀개구리밥의 성장 면적 변화율을 측정하는 단계;를 포함하는 수질 독성 평가 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 수체 샘플은 스테인버그(Steinberg) 인공 배지로 희석되어 적어도 5가지 이상의 농도로 구배화된 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 수질 독성 평가 방법.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 수체 샘플은 반수 희석법에 의해 희석되는 것을 특징으로 하는 수질 독성 평가 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 수체 샘플은 0~2%의 염분 농도로 조정되는 것을 특징으로 하는 수질 독성 평가 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 수체 샘플은 5.5~7.5의 pH로 조정되는 것을 특징으로 하는 수질 독성 평가 방법.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 (c) 단계의 배양 조건은 광 조사량이 $30\sim150 \mu\text{mol photon/m}^2 \cdot \text{s}$ 이고 배양 온도가 $20\sim30^\circ\text{C}$ 인 것을 특징으로 하는 수질 독성 평가 방법.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 수질 독성 평가 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 좀개구리밥의 성장 면적 변화율 또는 형광 특성을 이용한 수질 독성 평가 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인류의 활동과 산업의 발달로 새롭고 잠재적인 위해성을 지닌 화학물질이 생산되고 수서 생태계로 유입되고 있다. 현대화학의 발전은 알려진 유용한 화학물의 생산량을 높이는데 기여했을 뿐만 아니라 매일 1200 여종 가량의 새로운 물질도 만들어내고 있다. 물질의 이동과 변환이 급속하게 일어나는 수서 생태계의 특성상, 이러한 독성물질에 대한 위해성을 평가하고 법적인 대처를 취하는 노력이 이루어지지 않는다면 매년 수천 종의 화학물질을 함유한 산업폐수와 도시하수에 의해서 위기에 처하게 될 위험성에 노출되어 있다.

- [0003] 하천 및 호소를 오염시키는 오염물질에는 산업체에서 유래하는 중금속과 VOCs, 농업용 제초제, 살충제 그리고 인구 밀집도시에서 방출되는 방대한 생활폐수에 함유된 질소와 인 화합물 등이 있는데 이러한 오염물질들에 의한 위해성을 평가하기 위해서 전통적으로 이화학적 방법이 사용되고 있다. 이화학적 방식이란 수체 내의 용존산소량 (DO), 생물화학적 산소요구량 (BOD), 화학적 산소요구량 (COD), 탁도, 전기전도도 및 pH등과 부영양화를 유발시키는 질산염과 인산염을 정량적으로 측정하거나 중금속을 분석하여 수질 오염 정도의 기준으로 삼는 방식을 지칭한다. 그러나, 이러한 방법은 장시간, 고비용, 전문기술 등을 필요로 한다는 단점과 함께 생물학적 이용성, 복합효과(상승 또는 길항 작용 등)와 나아가 생태학적 의미에 대한 정보를 제공해줄 수 없다.
- [0004] 이 같은 제약점을 극복하기 위해 국제적으로 수중 미생물, 조류 (algae), 수중 무척추 동물 및 수생 관속 식물 등 지표 생물을 이용한 오염 진단 방식에 대한 관심이 고조되어 최근 국제 사회에서 제정한 환경 규약을 보면 환경 독성을 평가하는데 있어서 지표 생물에 의한 독성평가 자료를 차용하고 있음을 알 수 있다. 이러한 지표 생물을 이용한 오염 진단방식은 종래에 생물체 내의 오염물질의 농도를 직접 측정하거나 서식처의 오염 등급별 서식종의 존재 여부로 판정하는 Bioindicator식 개념에서 현재는 생물 개체 또는 그 하위의 생물학적 조직 단위의 특성을 이용하여 오염물질을 진단하는 Biomonitor식 방법으로 진화하고 있다. 후자의 방법은 생물의 다양한 생리학적 변화를 통해 환경에 존재하는 단독 혹은 혼합 물질의 위해성을 정량화하거나 그 물질의 잠재적인 영향력을 평가할 수 있으므로 환경오염이 광역화되기 이전에 그 징후를 사전에 파악할 수 있고 생태학적 의미를 찾을 수 있다는 장점을 내포하고 있다.
- [0005] 과거 국제적으로 독성 연구에 사용되었던 생물종은 대부분의 경우 수서 척추동물 또는 무척추 동물이었지만 최근 들어 수서 생태계 내의 수생 식물의 역할이 부각되어 수생 식물을 이용한 독성 평가 방법에 대해 관심이 증가하고 있다. 수생 식물은 수중 생태계의 1차 생산자로서 동식물 플랑크톤, 무척추동물 및 어류의 서식처가 되며, 많은 유기물질을 흡수정화하는 능력을 갖고 있다.
- [0006] 특히 수생 식물 중 개구리밥은 수서 독성과 광독성 테스트 모델로 권장되고 있다. 개구리밥과(Lemnaceae)에 속하는 식물은 가장 작은 단자엽의 일년생 수생 식물로 논 물, 호수, 연못 등의 정수나 유속이 느린 물에 살며 물 표면에 떠서 살기도 하고, 물에 잠겨서 사는 것도 있다. 특히 좀개구리밥은 Lemnoideae와 Wolffioideae의 두 아과로 나뉘며 Lemnoideae에는 Spirodela와 Lemna의 두 속이 있고 Wolffioideae 아과에는 Wolffia, Wolffiaella, Wolffiaopsis 및 Pseudowolffia의 4속이 있어 세계적으로 60종이 분포하고 있는 것으로 알려져 있으며, 이미 화합물의 제조화성을 검정하거나 작용기작을 연구하는 생물재료로 매우 유용하게 활용되고 있다.
- [0007] 현재까지 ISO나 OECD에 등록된 종래의 개구리밥을 이용한 수질 독성 평가 방법을 살펴보면 개구리밥을 수체 샘플에 배양한 후 군체수 변화량을 측정하는 것으로 구성된다. 그러나, 종래의 개구리밥을 이용한 수질 독성 평가 방법은 유효한 군체수 변화량을 확보하기 위하여 배양 시간이 약 7일 정도 소요되고 독성원에 대한 민감성이 떨어지는 등의 문제점을 가지고 있으므로 여전히 개선되어야 할 필요가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명은 종래의 문제점을 해결하기 위하여 도출된 것으로서, 본 발명은 좀개구리밥의 생장 과정에서 나타나는 특성 중 생장 면적 변화율 또는 형광 특성을 수질 독성 평가의 지표로 이용하여 보다 간편하고 평가시 소요되는 시간이 현저히 단축되며 동시에 민감성이 높은 수질 독성 평가 방법을 제공하는데 그 목적이 있다.

과제의 해결 수단

- [0009] 본 발명의 상기 목적을 해결하기 위하여 본 발명은 (a) 측정용 용기에 수체 샘플을 넣는 단계; (b) 수체 샘플을 함유하는 측정용 용기에 좀개구리밥을 투입하는 단계; (c) 측정용 용기에 투입된 좀개구리밥을 배양하는 단계; 및 (d) 배양이 완료된 좀개구리밥의 생장 면적 변화율을 측정하는 단계;를 포함하는 수질 독성 평가 방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 (a) 측정용 용기에 수체 샘플을 넣는 단계; (b) 수체 샘플을 함유하는 측정용 용기에 좀개구리밥을 투입하는 단계; (c) 측정용 용기에 투입된 좀개구리밥을 배양하는 단계; 및 (e) 배양이 완료된 좀개구리밥의 엽록소 형광 특성을 측정하는 단계;를 포함하는 수질 독성 평가 방법을 제공한다. 이때, (e) 단계의 엽록소 형광 특성은 형광에 의해 검출되는 특성을 포함하며, 구체적으로 최대 전자 전달률(Maximum electron transfer rate)가 있다.
- [0010] 또한, 상기 (a) 단계의 수체 샘플은 바람직하게는 스테인버그(Steinberg) 인공 배지로 희석되어 적어도 5가지

이상의 농도로 구배화된 것을 포함한다. 이때 수체 샘플은 보다 바람직하게는 반수 희석법에 의해 일정 간격의 농도 구배로 희석되는 것을 특징으로 한다.

[0011] 또한, 상기 (a) 단계의 수체 샘플은 바람직하게는 0~2%의 염분 농도로 조정되는 것을 특징으로 한다. 상기의 염분 농도 범위에서 좁개구리밥을 배양하는 경우 보다 유의한 성장 면적 변화율 또는 엽록소 형광 특성을 얻을 수 있다.

[0012] 또한, (a) 단계의 수체 샘플은 바람직하게는 5.5~9.5의 pH로 조정되는 것을 특징으로 한다. 상기의 pH 범위에서 좁개구리밥을 배양하는 경우 보다 유의한 성장 면적 변화율 또는 엽록소 형광 특성을 얻을 수 있다.

[0013] 또한, (c) 단계의 배양 조건은 광 조사량이 30~150 $\mu\text{mol photon/m}^2 \cdot \text{s}$ 이고 배양 온도가 20~30℃인 것을 특징으로 한다. 상기의 배양 조건에서 좁개구리밥을 배양하는 경우 보다 유의한 성장 면적 변화율 또는 엽록소 형광 특성을 얻을 수 있다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에 따른 수질 독성 평가 방법은 좁개구리밥의 군체수 변화량이 아닌 좁개구리밥의 성장 면적 변화율 또는 엽록소 형광 특성(특히, 최대 전자 전달률)을 수질 독성 평가의 지표로 이용하기 때문에 수질 독성 판별 시간이 약 3일 정도 소요되고, 종래의 수질 독성 평가 시간(약 7일)보다 2배 이상 단축된다. 또한, 군체수 변화량 측정보다 성장 면적 변화율 또는 엽록소 형광 특성을 수질 독성 평가의 지표로 이용하기 때문에 측정하는 것이 보다 간편하고, 아울러 수질 독성원에 대한 높은 민감성을 가진다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 좁개구리밥 배양시 독성 물질을 포함하는 원수의 희석 배수에 따른 성장 면적의 변화를 나타낸 것이다 (도 1에서 100%는 원수 자체, 50%는 원수를 1/2 농도로 희석한 것, 25%는 원수를 1/4 농도로 희석한 것, 12.5%는 원수를 1/8 농도로 희석한 것, 6.25%는 원수를 1/16 농도로 희석한 것을 의미하고 control은 스테인버그 인공 배지만으로 배양한 대조군을 나타낸다.).

도 2는 좁개구리밥 배양시 독성 물질을 포함하는 원수의 희석 배수에 따른 엽록소 형광 특성을 나타낸 것이다 (도 2에서 맨 좌측부터 우측 방향으로 원수, 원수를 1/2 농도로 희석한 것, 원수를 1/4 농도로 희석한 것, 원수를 1/8 농도로 희석한 것, 원수를 1/16 농도로 희석한 것, 대조군을 나타낸다.).

도 3은 다양한 배양 조건에서의 좁개구리밥의 성장 면적 변화율을 나타낸 것이고, 도 4는 다양한 배양 조건에서의 좁개구리밥의 엽록소 형광 특성(최대 전자 전달률)을 나타낸 것이다.

도 5는 단일 금속류 독성 물질 농도에 따른 좁개구리밥의 성장 면적 변화율을 나타낸 것이고, 6은 단일 금속류 독성 물질 농도에 따른 좁개구리밥의 엽록소 형광 특성(최대 전자 전달률)을 나타낸 것이다.

도 7은 단일 휘발성 유기 화합물류 독성 물질 농도에 따른 좁개구리밥의 성장 면적 변화율을 나타낸 것이고, 도 8은 단일 휘발성 유기 화합물류의 독성 물질 농도에 따른 좁개구리밥의 엽록소 형광 특성(최대 전자 전달률)을 나타낸 것이다.

도 9는 단일 제초제 독성 물질인 DCMU[3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea] 농도에 따른 좁개구리밥의 성장 면적 변화율을 나타낸 것이고, 도 10은 단일 제초제 독성 물질인 DCMU[3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea] 농도에 따른 좁개구리밥의 엽록소 형광의 특성(최대 전자 전달률)을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 본 발명은 수체 샘플에 대해 간편하고, 판별 시간이 짧으며 독성 물질(금속 독성 물질, 휘발성 유기 화합물 독성 물질, 제초제, 살충제 등)에 대한 반응 민감성이 높은 수질 독성 평가 방법에 관한 것으로서, 본 발명에 따른 수질 독성 평가 방법은 본 발명의 수질 독성 평가 방법은 측정용 용기에 수체 샘플을 넣는 단계; 수체 샘플을 함유하는 측정용 용기에 좁개구리밥을 투입하는 단계; 측정용 용기에 투입된 좁개구리밥을 배양하는 단계; 및 배양이 완료된 좁개구리밥의 성장 면적 변화율 또는 엽록소 형광 특성을 측정하는 단계;를 포함한다. 이하, 본 발명에 따른 수질 독성 평가 방법을 구성요소별로 나누어 설명한다.

[0017] 수체 샘플

- [0018] 수체(water body) 샘플은 물이 주요 부피를 차지하는 물을 말하는 것으로서, 본 발명에 따른 수체 샘플은 해수, 하천, 호수, 폐수, 방류수, 오수, 슬러지 용출수, 토양 용출수, 퇴적토 용출수 등에서 채취한 샘플을 포함한다.
- [0019] 최초의 수체 샘플(이하, 원수)은 인공 배지로 희석되어 적어도 5가지 이상의 농도로 구배화된 후 측정용 용기에 넣어지는 것이 바람직하다. 사용되는 희석 방법은 크게 제한되지 않으며, 일 예로 반수 희석법[100%(원수 자체), 50%(원수의 1/2 농도로 희석한 것), 25%(원수의 1/4 농도로 희석한 것), 12.5%(원수의 1/8 농도로 희석한 것), 6.25%(원수의 1/16 농도로 희석한 것)]이 있다. 원수를 희석하기 위한 인공 배지는 좁개구리밥에 대한 독성 물질을 포함하지 않고 좁개구리밥의 배양과 양립할 수 있는 것이라면 그 종류가 크게 제한되지 않으며, 구체적으로 스테인버그(Steinberg) 인공 배지가 있다.
- [0020] 원수 및 인공 배지로 희석된 수체 샘플은 측정용 용기에 넣어지기 전에 좁개구리밥의 원활한 배양을 위해 0~5‰, 바람직하게는 0~2‰ 범위의 염분 농도를 가지도록 조정되고, pH는 4.5~9.5, 바람직하게는 5.5~7.5로 조정된다.
- [0021] 본 발명에 있어서, 염분 농도 및 pH가 조정된 원수 외에 희석된 4가지 이상의 수체 샘플을 배양액으로 하여 좁개구리밥을 배양하는 경우 원수의 희석 농도에 따른 좁개구리밥의 성장 면적 변화율 또는 엽록소 형광 특성(특히 최대 전자 전달률)을 구할 수 있고, 이를 기초로 수체 샘플의 수질 독성을 평가하는 경우 정확한 반수 유효 농도(독성 물질을 포함하지 않는 대조군에서의 좁개구리밥의 성장 면적 변화율 또는 엽록소 형광 특성보다 50% 감소된 성장 면적 변화율 또는 엽록소 형광 특성을 보이는 독성물질의 농도로서 단일 독성 물질의 경우 특정 농도로 표시되고 미지의 원수의 경우 희석률로 표시됨; Half maximal effective concentration, EC₅₀) 내지 무영향 농도(독성 물질을 포함하지 않는 대조군에서의 좁개구리밥의 성장 면적 변화율 또는 엽록소 형광 특성과 유의적 차이가 없는 수준으로 유지시키는 독성 물질의 농도로서 단일 독성 물질의 경우 특정 농도로 표시되고 미지의 원수의 경우 희석률로 표시됨; No Observed Effect Concentration, NOEC)를 평가할 수 있다.
- [0022] 측정용 용기
- [0023] 측정용 용기는 수체 샘플 및 좁개구리밥을 수용하고, 좁개구리밥을 배양하기 것으로서, 그 형태는 크게 제한되지 않으며, 일 예로 웰 플레이트(Well plate)가 있다. 웰 플레이트는 적어도 6개 이상의 웰(Well)로 구성되는 것이 바람직하네, 1개의 웰에는 대조군으로서 독성 물질을 포함하지 않는 인공 배지를 넣어 좁개구리밥을 배양하고, 나머지 5개의 웰에는 원수와 원수가 희석된 4개의 수체 샘플을 넣어 좁개구리밥을 배양한다.
- [0024] 좁개구리밥
- [0025] 좁개구리밥은 외떡잎식물 천남성목 개구리밥과의 여러해살이풀로서, 물 위에 떠서 자라는 수생 식물이다. 본 발명은 수질 독성의 평가를 위한 바이오마커로서 수생 식물에 속하는 좁개구리밥, 보다 구체적으로 좁개구리밥의 성장 면적 변화율 또는 엽록소 형광 특성(특히 최대 전자 전달률)을 이용한다. 좁개구리밥은 72시간 내에 성장 면적이 가시적으로 변하기 때문에 육안 관찰이 가능하고, 좁개구리밥의 엽록소 형광 특성인 최대 전자 전달률은 5분 이내에 신속하게 측정할 수 있다. 동일 시간 동안 배양시 수질 독성이 증가할수록 좁개구리밥의 성장 면적은 점점 감소하는 경향을 보이며, 엽록소 형광 특성은 자색에서 녹색, 황색, 적색으로 변화하는 경향을 보인다. 따라서, 수질 독성 평가 기준으로 좁개구리밥의 성장 면적 변화율 또는 엽록소 형광 특성을 이용하는 경우 신속하고 간편하게 수질 독성 판별이 가능하고, 특히 좁개구리밥의 엽록소 형광 특성(특히, 최대 전자 전달률)을 수질 독성 평가의 지표로 이용하는 경우, 성장 면적 변화율을 이용하는 경우보다 독성 물질에 대한 반응 감응성을 크게 향상시킬 수 있으며 동시에 형광과 같은 시각적 표시가 가능하다는 장점이 있다.
- [0026] 좁개구리밥의 배양
- [0027] 수생 식물에 속하는 좁개구리밥(*Lemna paucicostata*)의 성장을 위한 광 조사량은 바람직하게는 30~150 $\mu\text{mol photon/m}^2 \cdot \text{s}$ 이고 배양 온도는 바람직하게는 20~30℃이다. 또한, 배양액의 pH는 4.5~9.5, 바람직하게는 5.5~7.5 이고, 배양액의 염분 농도는 0~5‰, 바람직하게는 0~2‰ 이다. 상기의 배양 조건 및 배양액 특성에서 좁개구리밥을 배양하는 경우 보다 유의한 성장 면적 변화율 또는 엽록소 형광 특성을 얻을 수 있다.

[0028] 좁개구리밥의 생장

[0029] 면적 변화율 및 엽록소 형광 특성 측정

[0030] 수생 식물에 속하는 좁개구리밥을 약 72시간 배양하면, 생장에 따른 가시적인 면적 변화가 일어나고, 배양된 좁개구리밥의 생장 면적 변화율은 최초 배양시의 좁개구리밥 면적에 대한 배양 완료 후 좁개구리밥의 면적 증가분의 비로 계산될 수 있고 하기와 같은 다양한 식으로 나타낼 수 있다. 이때 배양액을 구성하는 수체 샘플의 독성이 너무 강하여 좁개구리밥의 색이 하얗게 변하는 백화 현상, 혹은 노랗게 변하는 황화 현상이 일어나는 경우 면적 측정 대상에서 제외한다.

수학식 1

$$\text{생장 면적 증가분}(\%) = \frac{\ln(B) - \ln(A)}{\text{배양일}} \times 100$$

[0031]

[0032] 수학식 1에서 A는 최초 배양시의 좁개구리밥 면적을 나타내고, B는 배양 완료 후 좁개구리밥의 면적을 나타낸다.

[0033] 수학식 1은 배양 완료 후 면적에서 최초 배양시 면적의 차이를 총 배양일로 나눈 뒤 100을 곱한 식으로, 그 값은 생장 면적 변화율과 동일하게 취급된다. 수학식 1에 의해 계산된 생장 면적 증가분 또는 생장 면적 변화율 값을 독성 물질을 포함하지 않는 대조군에서 배양된 좁개구리밥의 생장 면적 증가분 또는 생장 면적 변화율 값과 비교하여 수체 샘플의 독성을 평가할 수 있다. 이때, 좁개구리밥의 생장 면적 측정은 영상 분석 장치를 이용하여 측정된다.

[0034] 한편, 엽록소 형광 특성 측정은 72시간 동안 배양된 좁개구리밥을 암흑 상태에서 약 15분간 적응시킨 후, 형광 측정 장치를 이용하여 수행된다. 형광 측정 장치는 엽록소 형광 특성을 측정하는 것으로 최종 값은 형광 색상과 같이 가시적인 값으로 환산되어 표시될 수 있고, 또한, 전자 전달률(Electron Transfer Rate, ETR)과 같은 수치로 표시될 수도 있다. 일 예로 형광 측정 장치를 이용하여 식물의 광합성 작용으로 광 조사량이 증가함에 따른 전자 전달률의 변화를 측정하는 경우, 형광 측정 장치로 획득된 자료는 통계 프로그램에 입력하여 최대 전자 전달률(Maximum Electron Transfer Rate, ETRmax) 값으로 산출될 수 있다. 또한, 형광 측정 장치에 의해 획득된 값은 색상으로 환산되는 경우 시각적인 측정이 가능한데 이것은 형광 수치를 이미지화한 것으로 좁개구리밥의 건강 상태가 가장 양호한 경우를 1로 나타내고 좁개구리밥의 건강 상태가 가장 나쁜 경우를 0으로 나타낸 후 상기의 값을 색상으로 환산한 것이다. 이때 1은 자색으로 환산되고 0은 적색으로 환산된다. 그리고 1에서 0으로 변화됨에 따라 환산되는 색상은 자색→녹색→황색→적색으로 변화된다. 이러한 엽록소 형광 측정 장치는 광합성의 활성이 변화하는 것을 탐지하기 위해 제작된 것이며, 환경 스트레스 하에서 식물의 광합성 기구 활성을 신속하고 비파괴적인 방법으로 탐지할 수 있는 기구로 알려져 있다.

[0035] 도 1은 좁개구리밥 배양시 독성 물질을 포함하는 원수의 희석 배수에 따른 생장 면적의 변화를 나타낸 것이다 (도 1에서 100%는 원수 자체, 50%는 원수를 1/2 농도로 희석한 것, 25%는 원수를 1/4 농도로 희석한 것, 12.5%는 원수를 1/8 농도로 희석한 것, 6.25%는 원수를 1/16 농도로 희석한 것을 의미하고 control은 스테인버그 인공 배지만으로 배양한 대조군을 나타낸다.). 도 1에서 보이는 바와 같이 좁개구리밥은 독성 물질의 농도가 증가할수록 생장 면적이 감소하는 경향을 보인다.

[0036] 도 2는 좁개구리밥 배양시 독성 물질을 포함하는 원수의 희석 배수에 따른 엽록소 형광 특성을 나타낸 것이다 (도 2에서 맨 좌측부터 우측 방향으로 원수, 원수를 1/2 농도로 희석한 것, 원수를 1/4 농도로 희석한 것, 원수를 1/8 농도로 희석한 것, 원수를 1/16 농도로 희석한 것, 대조군을 나타낸다.) 도 2에서 세로축은 위로부터 아래 방향으로 배양 시간의 증가를 의미한다. 도 2에서 보이는 바와 같이 독성 물질을 포함하지 않는 대조군에서 배양된 좁개구리밥의 형광 이미지는 자색을 보이며, 독성 물질의 농도가 가장 높은 원수에서 배양된 좁개구리밥의 형광 이미지는 적색에 가깝다. 도 2에서 보이는 형광 이미지는 엽록소 형광 측정 장치로부터 획득한 수치(도 2의 맨 하단에서 0은 좁개구리밥의 건강 상태가 가장 나쁜 경우를 의미하며, 구체적으로 배양 환경의 독성 물질 농도가 상대적으로 높은 경우이다. 또한, 1은 좁개구리밥의 건강 상태가 가장 양호한 경우를 의미하며, 구체적

으로 배양 환경의 독성 물질 농도가 존재하지 않거나 좁개구리밥의 생장에 영향을 주지 않을 정도로 낮은 경우이다.)를 맨 하단의 컬러 바(Color bar)에 대응시키고 이를 색상으로 전환한 것이다.

[0037] 수질 독성의 평가

[0038] 수체 샘플의 수질 독성은 원수와 희석된 수체 샘플에서 배양된 좁개구리밥의 생장 면적 변화율 또는 엽록소 형광 특성(특히, 최대 전자 전달률)을 독성 물질을 포함하지 않는 대조군에서 배양된 좁개구리밥의 생장 면적 변화율 또는 엽록소 형광 특성(특히, 최대 전자 전달률)과 비교하여 평가되며, 구체적으로 반수 유효 농도(Half maximal effective concentration, EC₅₀) 내지 무영향 농도(No Observed Effect Concentration, NOEC) 값으로 표시된다. 이때, 수질 독성 평가 기준으로 좁개구리밥의 엽록소 형광 특성(특히, 최대 전자 전달률)을 이용하는 경우 좁개구리밥의 생장 면적 변화율을 이용하는 경우보다 독성 물질에 대한 반응 감응성이 향상되므로 보다 정확하게 수질 독성을 평가할 수 있다.

[0039] 반수 유효 농도(Half maximal effective concentration, EC₅₀)는 생장 면적 변화율 또는 엽록소 형광 특성(특히, 최대 전자 전달률)을 독성 물질을 포함하지 않는 대조군에서의 생장 면적 변화율 또는 엽록소 형광 특성(특히, 최대 전자 전달률)보다 50% 감소시키는데 효과적인 수체 샘플의 농도를 의미하는 것으로서, 단일 독성 물질을 포함하는 수체 샘플의 경우 단일 독성 물질의 특정 농도로 표시되고 다수의 독성 물질을 포함하는 미지의 원수의 경우 원수의 희석률로 표시된다. 무영향 농도는 생장 면적 변화율 또는 엽록소 형광 특성(특히, 최대 전자 전달률)을 독성 물질을 포함하지 않는 대조군에서의 생장 면적 변화율 또는 엽록소 형광 특성(특히, 최대 전자 전달률)과 유의적 차이가 없는 수준으로 유지시키는데 효과적인 수체 샘플의 농도를 의미하는 것으로서, 반수 유효 농도와 마찬가지로 단일 독성 물질을 포함하는 수체 샘플의 경우 특정 농도로 표시되고 다수의 독성 물질을 포함하는 미지의 원수의 경우 희석률로 표시된다. 한편, 반수 유효 농도의 크기와 커질수록 실제 수체 샘플의 독성은 상대적으로 작다는 것을 의미하기 때문에 반수 유효 농도를 실제 수체 샘플 독성으로 환산하기 위해 독성 단위(Toxic Unit, TU)을 다음과 같이 표시할 수 있다.

[0040] $TU = 100 / \text{반수 유효 농도}(\%)$

[0041] 본 발명에 따른 수질 독성 평가 방법의 용도

[0042] 본 발명의 수질 독성 평가 방법은 수체 샘플, 좁개구리밥, 및 배양기(측정용 용기)를 포함하는 수질 독성 평가 시스템에 의하여 실시될 수 있고, 추가적으로 배양된 좁개구리밥의 생장 면적 내지 엽록소 형광 특성을 측정하여 이를 전송하고 분석한 후 그 결과를 다시 반송하는 유비쿼터스 시스템(원격조정시스템)으로 구성될 수도 있다. 본 발명의 수질 독성 평가 방법으로 평가할 수 있는 독성 물질로는 은(Ag; Silver), 비소(As; Arsenic), 카드뮴(Cd; Cadmium), 코발트(Co; Cobalt), 크롬(Cr; Chromium), 구리(Cu; Copper), 수은(Hg; Mercury), 니켈(Ni; Nickel) 등과 같은 금속류의 독성물질, 아세톤(acetone), 아세트산(acetic acid), 클로로포름(Chloroform), 디메틸황산화물(DMSO; Dimethyl sulfoxide), 포르말린(formalin), 페놀(phenol), 톨루엔(toluene), 자일렌(xylene) 등과 같은 휘발성 유기화합물(Volatile Organic Compound, VOC)류의 독성 물질, 및 제초제(DCMU) 등을 포함한다.

[0043] 본 발명의 수질 독성 평가 방법은 하수 및 폐수 오니를 투척하기 전에 생태계에 부정적인 영향을 끼치지 않도록 하기 위해서 취해야할 오니 희석 배수를 신속하게 결정하는데도 유용하게 사용될 수 있다. 본 발명의 방법은 종래의 화학적 분석 방식에 의존한 수질 오염 측정법에 내재된 문제점 중 미지의 독성물질이 수체 내에 투입되었을 때 그것을 탐지해낼 수 없고, 더 나아가 화학적 분석에 의한 결과 수치만을 가지고는 실제 생태계에 끼칠 수 있는 수질 오염의 영향에 대해 전혀 예측할 수가 없다는 단점을 보완한 실용적인 기법이라고 할 수 있다.

[0044] 본 발명의 또 다른 측면은 본 발명에 따른 수질 독성 평가 방법을 구현할 수 있는 수질 독성 평가 키트에 관한 것으로서, 본 발명에 따른 수질 독성 평가 키트는 개구리밥; 수체 샘플 및 해조류의 포자를 투입하고 해조류의 포자를 배양하기 위한 측정용 용기; 및 수체 샘플을 희석하기 인공 배지; 를 포함한다. 또한, 본 발명에 따른 수질 독성 평가 키트는 은(Ag; Silver), 비소(As; Arsenic), 카드뮴(Cd; Cadmium), 코발트(Co; Cobalt), 크롬(Cr; Chromium), 구리(Cu; Copper), 수은(Hg; Mercury), 니켈(Ni; Nickel) 등과 같은 금속류의 독성물질, 아세톤(acetone), 아세트산(acetic acid), 클로로포름(Chloroform), 디메틸황산화물(DMSO; Dimethyl sulfoxide),

포름알린(formalin), 페놀(phenol), 톨루엔(toluene), 자일렌(xylene) 등과 같은 휘발성 유기화합물(Volatile Organic Compound, VOC)류의 독성 물질, 및 제초제(DCMU)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 독성 물질을 인공 배지에 용해시켜 제조한 표준 독성 물질 용액을 더 포함할 수 있는데, 표준 독성 물질 용액은 수체 샘플의 수질 독성을 평가하기 전에 좁개구리밥의 상태, 즉 독성 물질에 대한 반응 감응성 여부를 테스트하는데 이용될 수 있다. 구체적으로 본 발명에 따른 표준 독성 물질 용액이 구리를 독성 물질로 포함하는 용액인 경우, 다양한 구리 용액 및 대조군에서의 좁개구리밥의 성장 면적 변화를 내지 염록소 형광 특성(특히 최대 전자 전달률)에 대한 데이터를 미리 확보하여 수질 독성 평가 키트와 함께 제공할 수 있다. 사용자는 구리 용액에 대한 좁개구리밥의 성장 면적 변화를 내지 염록소 형광 특성(특히 최대 전자 전달률)을 측정하고 이를 미리 제공하는 데이터와 비교하여 좁개구리밥이 독성 물질에 대해 정상적으로 반응하는지 여부를 판단하고, 일정 범위(예를 들어, 본래 반응 감응성의 80% 이상)의 반응 감응성을 보이는 경우 미지의 수체 샘플에 대한 수질 독성 평가를 진행할 수 있다.

[0045] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다. 다만, 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 보다 명확하게 하기 위한 것일 뿐 본 발명의 보호범위를 제한하는 것은 아니다.

[0046] 1. 좁개구리밥의 최적 배양 조건 확립

[0047] (1) 좁개구리밥의 전처리 배양

[0048] 좁개구리밥(*Lemna paucicostata*)을 1.5L의 인공 배지를 담은 가로 25cm, 세로 10cm, 높이 15cm의 수조에 넣은 뒤 배양기로 옮겨 연속광 조건하에 20-30 $\mu\text{mol photon/m}^2 \cdot \text{s}$ 광 조사량 및 15~20℃의 온도 조건 하에서 정지 배양하였으며 pH는 6.5 이상으로 조정하였다. 이때, 인공 배지는 7일 간격으로 전량 교체해 주었다.

[0049] 표 1은 본 발명의 실시예에서 사용된 인공 배지인 스테인버그(Steinberg) 인공 배지에 포함되는 성분과 농도를 나타낸 것이다. 표 1에 나타나는 바와 같이 인공 배지는 총 5개의 스톡 용액(Stock solution)을 포함하며, 각각의 스톡 용액은 좁개구리의 배양에 필요한 무기 성분 내지 유기 성분을 포함하는 용액으로 구성된다.

표 1

스톡 용액 구분	스톡 용액을 구성하는 성분의 종류	스톡 용액내에서의 구성 성분의 농도(g/ℓ)	인공 배지 1리터당 스톡 용액이 차지하는 부피(ml)
I	KNO ₃	17.5	20
	K ₂ HPO ₄	4.5	
	KH ₂ PO ₄	0.63	
II	MgSO ₄ ·7H ₂ O	5	20
III	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	14.75	20
IV	H ₃ BO ₃	0.12	1
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.18	
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.044	
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.18	
V	FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.76	1
	Na ₂ -EDTA·2H ₂ O	1.5	

[0051] (2) 좁개구리밥의 배양

[0052] 초기 배양시의 면적을 측정한 후 좁개구리밥을 넣은 24웰 플레이트 뚜껑을 닫고 배양기에 옮겨 넣고, 다양한 광 조사량, 배양액의 pH, 배양액의 염분 농도 및 배양 온도 조건하에서 배양하였다. 72시간 배양이 끝난 후 영상 분석장치(Moticam 2000, Motic Instruments Inc., BC, Canada)를 사용하여 각 웰 내에 좁개구리밥의 성장 면적을 측정하였다. 도 3은 다양한 배양 조건에서의 좁개구리밥의 성장 면적 변화율을 나타낸 것이고, 도 4는 다양

한 배양 조건에서의 좁개구리밥의 엽록소 형광 특성(최대 전자 전달률)을 나타낸 것이다.

[0053] 좁개구리밥의 생장 면적 변화 내지 엽록소 형광 특성(특히 최대 전자 전달률)을 최대화하는 좁개구리밥의 최적 배양 조건을 살펴보면, 배양액은 염분 농도가 0~2‰, 바람직하게는 0~1‰이었고, pH는 4.5~9.5, 바람직하게는 5.5~7.5 이었고, 배양 조건은 광 조사량이 30~150 $\mu\text{mol photon/m}^2 \cdot \text{s}$, 바람직하게는 90~120 $\mu\text{mol photon/m}^2 \cdot \text{s}$ 이었고, 배양 온도는 20~30℃이었다.

[0054] 2. 단일 금속류 독성 물질 용액의 수질 독성 평가

[0055] (1) 단일 금속류 독성 물질 용액의 준비

[0056] 단일 금속류 독성 물질로 각각 은(초기 농도 8 mg/L), 수은(초기 농도 8 mg/L), 카드뮴(초기 농도 8 mg/L), 코발트(초기 농도 8 mg/L), 크롬(초기 농도 8 mg/L), 구리(초기 농도 8 mg/L), 수은(초기 농도 8 mg/L), 니켈(초기 농도 8 mg/L)을 포함하는 독성 물질 용액(pH 는 6.5로 조정함) 및 Steinberg 인공 배지(pH 는 6.5로 조정함)를 이용하여 반수 희석법으로 희석하여 초기 농도의 50%, 25%, 12.5%, 6.25%로 희석된 독성 물질 용액을 제조하고 이들 독성 물질 용액의 수질 독성을 평가하였다. 대조군 용액으로는 독성 물질을 포함하지 않는 Steinberg 인공 배지(pH 는 6.5로 조정함)를 사용하였다.

[0057] (2) 좁개구리밥의 배양

[0058] 24웰 플레이트의 웰에 대조군 용액 및 독성 물질 용액을 넣고, 여기에 좁개구리밥(*Lemna paucicostata*)를 넣은 후 24웰 플레이트를 배양기에 옮겨 넣었다. 이후 90 $\mu\text{mol photon/m}^2 \cdot \text{s}$ 광 조사량 상태 및 25℃의 온도에서 72 시간 배양하였다.

[0059] (3) 좁개구리밥의 생장 면적 변화율 내지 엽록소 형광 특성(최대 전자 전달률)의 측정

[0060] 영상분석장치(Moticam 2000, Motic Instruments Inc., BC, Canada)를 사용하여 초기 배양시 및 72시간 배양 후 좁개구리밥의 생장 면적을 측정하였다. 또한, 엽록소 형광 특성(최대 전자 전달률)은 좁개구리밥을 암흑 상태에서 15분간 적응시킨 후 형광 측정 장치(Imaging pulse-amplitude-modulated fluorometer; Imaging PAM; Walz Co., Erlangen, Germany)를 사용하여 측정하였다.

[0061] 도 5는 단일 금속류 독성 물질 농도에 따른 좁개구리밥의 생장 면적 변화율을 나타낸 것이고, 6은 단일 금속류 독성 물질 농도에 따른 좁개구리밥의 엽록소 형광 특성(최대 전자 전달률)을 나타낸 것이다. 도 5에서 세로축의 RGR(상대 생장 면적 변화율, %/d)는 상술한 수학적 식에 의해 계산된 값이고, 도 6에서 세로축의 ETRmax는 최대 전자 전달률을 나타낸 것이다. 도 5 내지 도 6에서 보이는 바와 같이 좁개구리밥의 생장 면적 변화율 내지 엽록소 형광 특성(최대 전자 전달률)은 일정 범위에서 금속류 독성 물질의 농도와 선형 관계를 나타내었다.

[0062] (4) 좁개구리밥의 생장 면적 변화율 내지 엽록소 형광 특성(최대 전자 전달률)에 의한 단일 금속류 독성 물질의 수질 독성 판단

[0063] 도 5 내지 도 6에 표시된 좁개구리밥의 생장 면적 변화율 내지 엽록소 형광 특성(최대 전자 전달률)을 기준으로 단일 금속류 독성 물질의 반수 유효 농도(EC₅₀) 내지 무영향 농도(NOEC)를 계산하고, 그 결과를 토대로 수질 독성 평가 기준을 좁개구리밥의 생장 면적 변화율 내지 엽록소 형광 특성(최대 전자 전달률)로 하였을 때의 단일 금속류 독성 물질에 대한 반응 민감성을 판단하였다. 이때 EC₅₀ 값은 점예측기법(point estimation technique)을 써서 계산하였고, NOEC 값은 Dunnett 과정과 같은 가설 검정 방법을 써서 계산하였다. 표 2는 좁개구리밥의 생장 면적 변화율 내지 엽록소 형광 특성(최대 전자 전달률)을 수질 독성 평가 기준으로 하였을 때의 단일 금속류 독성 물질의 반수 유효 농도(EC₅₀) 내지 무영향 농도(NOEC)를 나타낸 것이다.

표 2

금속류 독성 물질	생장 면적 변화율 기준		최대 전자 전달률 기준	
	NOEC(mg/L)	EC ₅₀ (mg/L)	NOEC(mg/L)	EC ₅₀ (mg/L)

As	2	4.1533	2	3.79
Ag	< 0.5	0.4594	< 0.5	0.25
Cd	2	3.1106	2	3.78
Co	1	2.6483	1	1.97
Cr	< 0.5	0.9516	< 0.5	1.08
Cu	< 0.5	3.1345	< 0.5	2.84
Hg	< 0.5	0.3798	< 0.5	0.3
Ni	2	2.9460	2	3.27

표 2에서 나타나는 바와 같이 엽록소 형광 특성(최대 전자 전달률)을 수질 독성 평가 기준으로 하였을 때 단일 금속류 독성 물질에 대한 반응 민감성이 면적 성장률을 수질 독성 평가 기준으로 하였을 때보다 높았다.

3. 단일 휘발성 유기화합물류 독성 물질 용액의 수질 독성 평가

(1) 단일 휘발성 유기화합물류 독성 물질 용액의 준비

단일 휘발성 유기화합물류 독성 물질로 각각 아세톤(초기 농도 80 ml/L), 아세트산(초기 농도 0.05 ml/L), 클로로포름(초기 농도 1 ml/L), 디메틸황산화물(초기 농도 40 ml/L), 포르말린(초기 농도 0.005 ml/L), 페놀(초기 농도 0.5 ml/L), 톨루엔(초기 농도 10 ml/L), 자일렌(초기 농도 10 ml/L)을 포함하는 독성 물질 용액(pH는6.5로 조정함) 및 Steinberg 인공 배지(pH는6.5로 조정함)를 이용하여 반수 희석법으로 희석하여 초기 농도의 50%, 25%, 12.5%, 6.25%로 희석된 독성 물질 용액을 제조하고 이들 독성 물질 용액의 수질 독성을 평가하였다. 대조군 용액으로는 독성 물질을 포함하지 않는 Steinberg 인공 배지(pH는6.5로 조정함)를 사용하였다.

(2) 좁개구리밥의 배양

24웰 플레이트의 웰에 대조군 용액 및 독성 물질 용액을 넣고, 여기에 좁개구리밥(*Lemna paucicostata*)를 넣은 후 24웰 플레이트를 배양기에 옮겨 넣었다. 이후 90 $\mu\text{mol photon/m}^2 \cdot \text{s}$ 광 조사량 상태 및 25℃의 온도에서 72시간 배양하였다.

(3) 좁개구리밥의 성장 면적 변화율 내지 엽록소 형광 특성(최대 전자 전달률)의 측정

영상분석장치(Moticam 2000, Motic Instruments Inc., BC, Canada)를 사용하여 초기 배양시 및 72시간 배양 후 좁개구리밥의 성장 면적을 측정하였다. 또한, 엽록소 형광 특성(최대 전자 전달률)은 좁개구리밥을 암흑 상태에서 15분간 적응시킨 후 형광 측정 장치(Imaging pulse-amplitude-modulated fluorometer; Imaging PAM; Walz Co., Erlangen, Germany)를 사용하여 측정하였다.

도 7은 단일 휘발성 유기 화합물류 독성 물질 농도에 따른 좁개구리밥의 성장 면적 변화율을 나타낸 것이고, 도 8은 단일 휘발성 유기 화합물류의 독성 물질 농도에 따른 좁개구리밥의 엽록소 형광 특성(최대 전자 전달률)을 나타낸 것이다. 도 7 내지 도 8에서 보이는 바와 같이 좁개구리밥의 성장 면적 변화율 내지 엽록소 형광 특성(최대 전자 전달률)은 일정 범위에서 휘발성 유기화합물류 독성 물질의 농도와 선형 관계를 나타내었다.

(4) 좁개구리밥의 성장 면적 변화율 내지 엽록소 형광 특성(최대 전자 전달률)에 의한 단일 휘발성 유기화합물류 독성 물질의 수질 독성 판단

도 7 내지 도 8에 표시된 좁개구리밥의 성장 면적 변화율 내지 엽록소 형광 특성(최대 전자 전달률)을 기준으로 단일 휘발성 유기화합물류 독성 물질의 반수 유효 농도(EC₅₀) 내지 무영향 농도(NOEC)를 계산하고, 그 결과를 토대로 수질 독성 평가 기준을 좁개구리밥의 성장 면적 변화율 내지 엽록소 형광 특성(최대 전자 전달률)로 하였을 때의 단일 휘발성 유기화합물류 독성 물질에 대한 반응 민감성을 판단하였다. 이때 EC₅₀ 값은 점예측기법(point estimation techniques)을 써서 계산하였고, NOEC 값은 Dunnett 과정과 같은 가설 검정 방법을 써서 계산하였다. 표 3은 좁개구리밥의 성장 면적 변화율 내지 엽록소 형광 특성(최대 전자 전달률)을 수질 독성 평가

기준으로 하였을 때의 단일 휘발성 유기화합물류 독성 물질의 반수 유효 농도(EC₅₀) 내지 무영향 농도(NOEC)를 나타낸 것이다.

표 3

휘발성 유기 화합물 류 독성 물질	생장 면적 변화율 기준		최대 전자 전달률 기준	
	NOEC(mg/L)	EC ₅₀ (mg/L)	NOEC(mg/L)	EC ₅₀ (mg/L)
Acetone	< 5	7.5049	< 5	4.772
Acetic acid	0.00625	0.0259	0.025	0.035
Chloroform	0.03125	0.3322	< 0.0625	0.0543
DMSO	2.5	15.295	10	18.920
Formalin	< 0.00125	0.0007	0.000625	0.00077
Phenol	0.03125	0.0797	< 0.03125	0.0324
Toluene	5	6.3152	0.625	> 10
Xylene	5	7.5797	< 5	7.928

표 3에서 나타나는 바와 같이 엽록소 형광 특성(최대 전자 전달률)을 수질 독성 평가 기준으로 하였을 때 단일 휘발성 유기화합물류 독성 물질에 대한 반응 민감성이 면적 성장률을 수질 독성 평가 기준으로 하였을 때보다 높았고, 특히 포르말린과 페놀에서는 반응 민감성 차이가 매우 현저하였다.

4. 단일 제초제 독성 물질 용액의 수질 독성 평가

(1) 단일 제초제 독성 물질 용액의 준비

단일 제초제 독성 물질로 DCMU[3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea](초기 농도 0.2 mg/L)을 포함하는 독성 물질 용액(pH는6.5로 조정하였으며 DCMU 용해는 Acetone 사용) 및 Steinberg 인공 배지(pH는6.5로 조정함)를 이용하여 반수 희석법으로 희석하여 초기 농도의 50%, 25%, 12.5%, 6.25%로 희석된 독성 물질 용액을 제조하고 이들 독성 물질 용액의 수질 독성을 평가하였다. 대조군 용액으로는 독성 물질을 포함하지 않는 Steinberg 인공 배지(pH는6.5로 조정함)를 사용하였다.

(2) 잠개구리밥의 배양

24웰 플레이트의 웰에 대조군 용액 및 독성 물질 용액을 넣고, 여기에 잠개구리밥(*Lemna paucicostata*)를 넣은 후 24웰 플레이트를 배양기에 옮겨 넣었다. 이후 90 $\mu\text{mol photon/m}^2 \cdot \text{s}$ 광 조사량 상태 및 25℃의 온도에서 72시간 배양하였다.

(3) 잠개구리밥의 생장 면적 변화율 내지 엽록소 형광 특성(최대 전자 전달률)의 측정

영상분석장치(Moticam 2000, Motic Instruments Inc., BC, Canada)를 사용하여 초기 배양시 및 72시간 배양 후 잠개구리밥의 생장 면적을 측정하였다. 또한, 엽록소 형광 특성(최대 전자 전달률)은 잠개구리밥을 암흑 상태에서 15분간 적응시킨 후 형광 측정 장치(Imaging pulse-amplitude-modulated fluorometer; Imaging PAM; Walz Co., Erlangen, Germany)를 사용하여 측정하였다.

도 9는 단일 제초제 독성 물질 농도에 따른 잠개구리밥의 생장 면적 변화율을 나타낸 것이고, 도 10은 단일 제초제 독성 물질 농도에 따른 잠개구리밥의 엽록소 형광 특성(최대 전자 전달률)을 나타낸 것이다. 도 9 내지 도 10에서 보이는 바와 같이 잠개구리밥의 생장 면적 변화율 내지 엽록소 형광 특성(최대 전자 전달률)은 일정 범위에서 제초제 독성 물질의 농도와 선형 관계를 나타내었다.

(4) 잠개구리밥의 생장 면적 변화율 내지 엽록소 형광 특성(최대 전자 전달률)에 의한 단일 제초제 독성 물질의 수질 독성 판단

도 9 내지 도 10에 표시된 잠개구리밥의 생장 면적 변화율 내지 엽록소 형광 특성(최대 전자 전달률)을 기준으

로 단일 제조제 독성 물질의 반수 유효 농도(EC_{50}) 내지 무영향 농도(NOEC)를 계산하고, 그 결과를 토대로 수질 독성 평가 기준을 좀개구리밥의 성장 면적 변화율 내지 엽록소 형광 특성(최대 전자 전달률)로 하였을 때의 단일 제조제 독성 물질에 대한 반응 민감성을 판단하였다. 이때 EC_{50} 값은 점예측기법(point estimation techniques)을 써서 계산하였고, NOEC 값은 Dunnett 과정과 같은 가설 검정 방법을 써서 계산하였다. 표 4는 좀개구리밥의 성장 면적 변화율 내지 엽록소 형광 특성(최대 전자 전달률)을 수질 독성 평가 기준으로 하였을 때의 단일 제조제 독성 물질의 반수 유효 농도(EC_{50}) 내지 무영향 농도(NOEC)를 나타낸 것이다.

표 4

제조제 독성 물질	성장 면적 변화율 기준		최대 전자 전달률 기준	
	NOEC (mg/L)	EC_{50} (mg/L)	NOEC (mg/L)	EC_{50} (mg/L)
DCMU	0.0125	0.0295	0.0125	0.0082

표 4에서 나타나는 바와 같이 엽록소 형광 특성(최대 전자 전달률)을 수질 독성 평가 기준으로 하였을 때 단일 제조제 독성 물질에 대한 반응 민감성이 성장 면적 변화율을 수질 독성 평가 기준으로 하였을 때보다 약 4배 높았다.

상기의 실시예에서는 비록 성분과 농도가 특정된 독성 물질에 의한 수질 독성을 평가하였으나, 미지의 독성 물질을 포함하는 수체 샘플에 변형되어 실시될 수 있고, 그때의 EC_{50} 값이나, NOEC 값을 통해 미지의 독성 물질이 수질에 미치는 영향을 파악할 수 있음은 본 발명의 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게는 자명하다 할 것이다. 또한, 수질 독성 평가의 기준으로 좀개구리밥의 성장 면적 자체를 이용하는 기술적 사상은 좀개구리밥의 성장 면적 변화율을 이용하는 기술적 사상의 균등 범위에 속함은 본 발명이 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다 할 것이며, 좀개구리의 성장 면적 자체를 이용하는 경우 대조군 배양에서의 성장 면적과 원수(원수 희석된 것 포함) 배양에서의 성장 면적 비를 이용하는 방법 등으로 구성될 수 있다.

부호의 설명

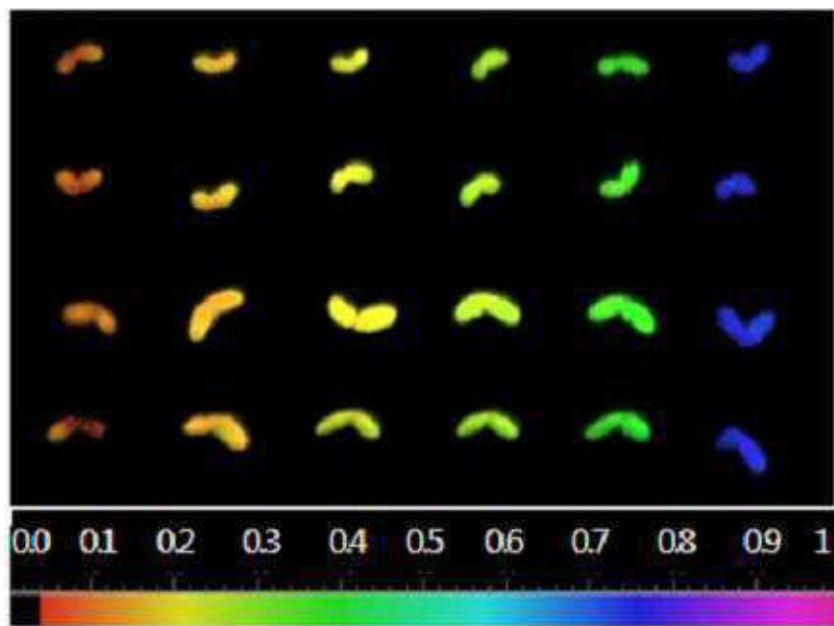
도 2의 맨 하단에 나타난 숫자는 형광 분석 장치로부터 얻은 값을 좀개구리밥의 건강 상태에 따라 수치화한 것으로 인 0부터 1은 좀개구리밥의 형광 특성을 수치화한 것으로서 숫자가 증가할수록 좀개구리밥의 건강 상태가 양호한 것을 의미하며, 0은 좀개구리밥의 건강 상태가 가장 나쁜 경우(구체적으로 배양 환경의 독성 물질 농도가 상대적으로 높은 경우이다.), 1은 좀개구리밥의 건강 상태가 가장 양호한 경우(구체적으로 배양 환경의 독성 물질 농도가 존재하지 않거나 좀개구리밥의 성장에 영향을 주지 않을 정도로 낮은 경우이다.)일 때의 형광 특성을 의미한다. 도 3 내지 도 10에서 세로축의 RGR(성장 면적 변화율, %/d)은 수학식 1에 의해 계산된 성장 면적 변화율을 의미하고, 도 6에서 세로축의 ETRmax는 최대 전자 전달률을 의미한다.

도면

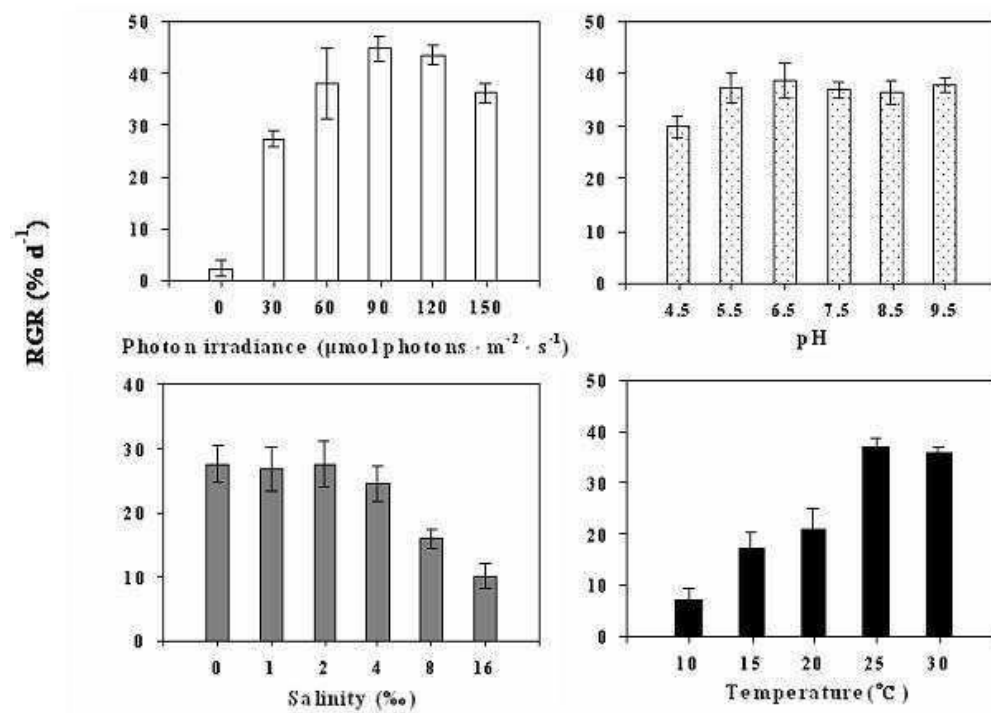
도면1



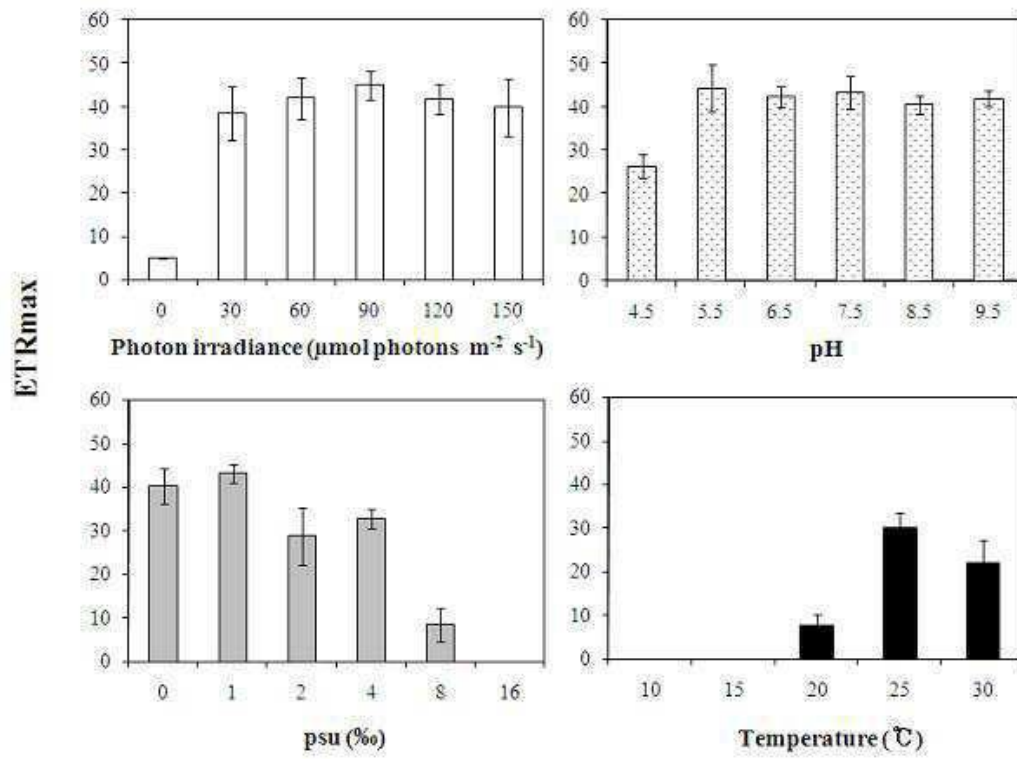
도면2



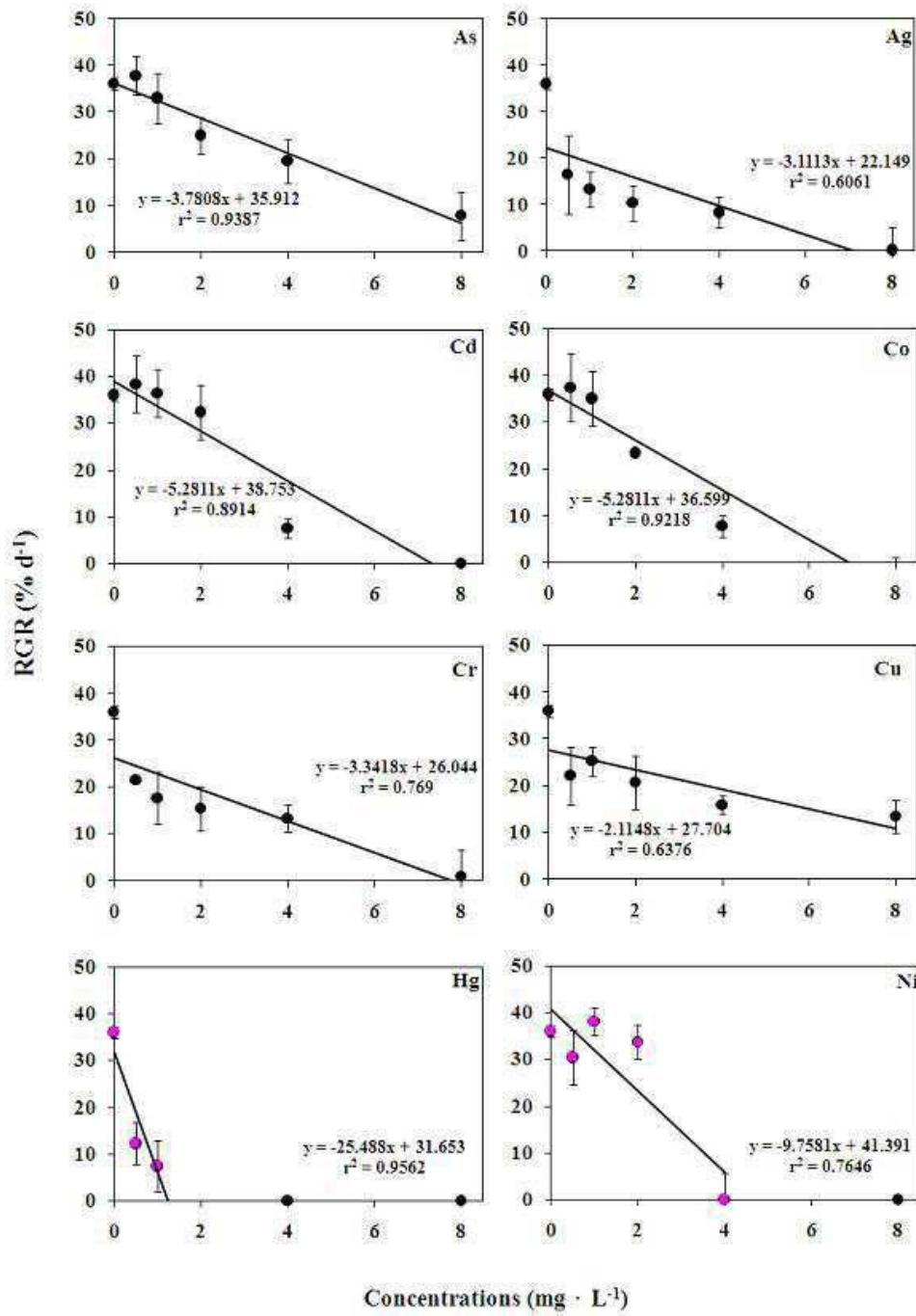
도면3



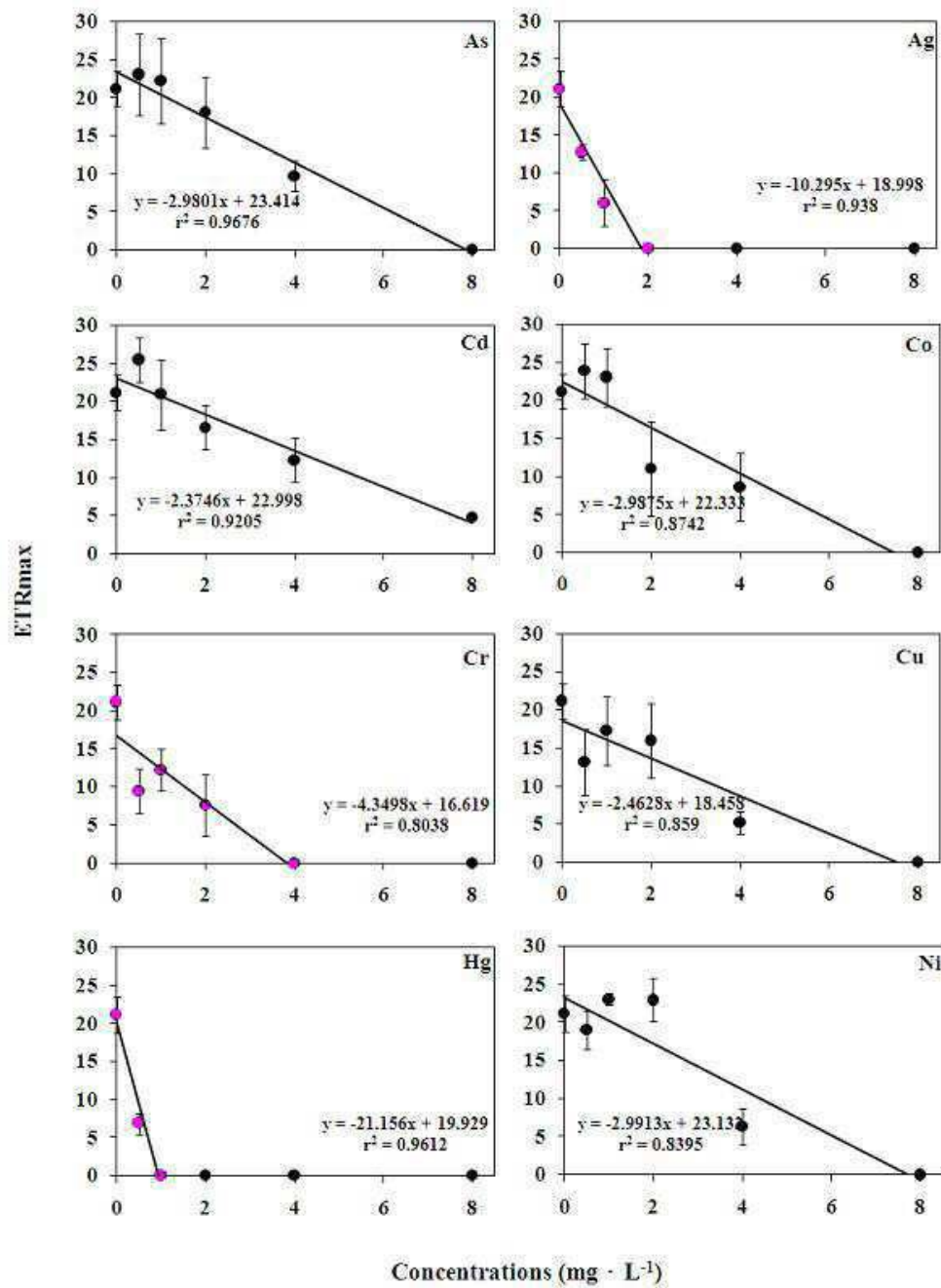
도면4



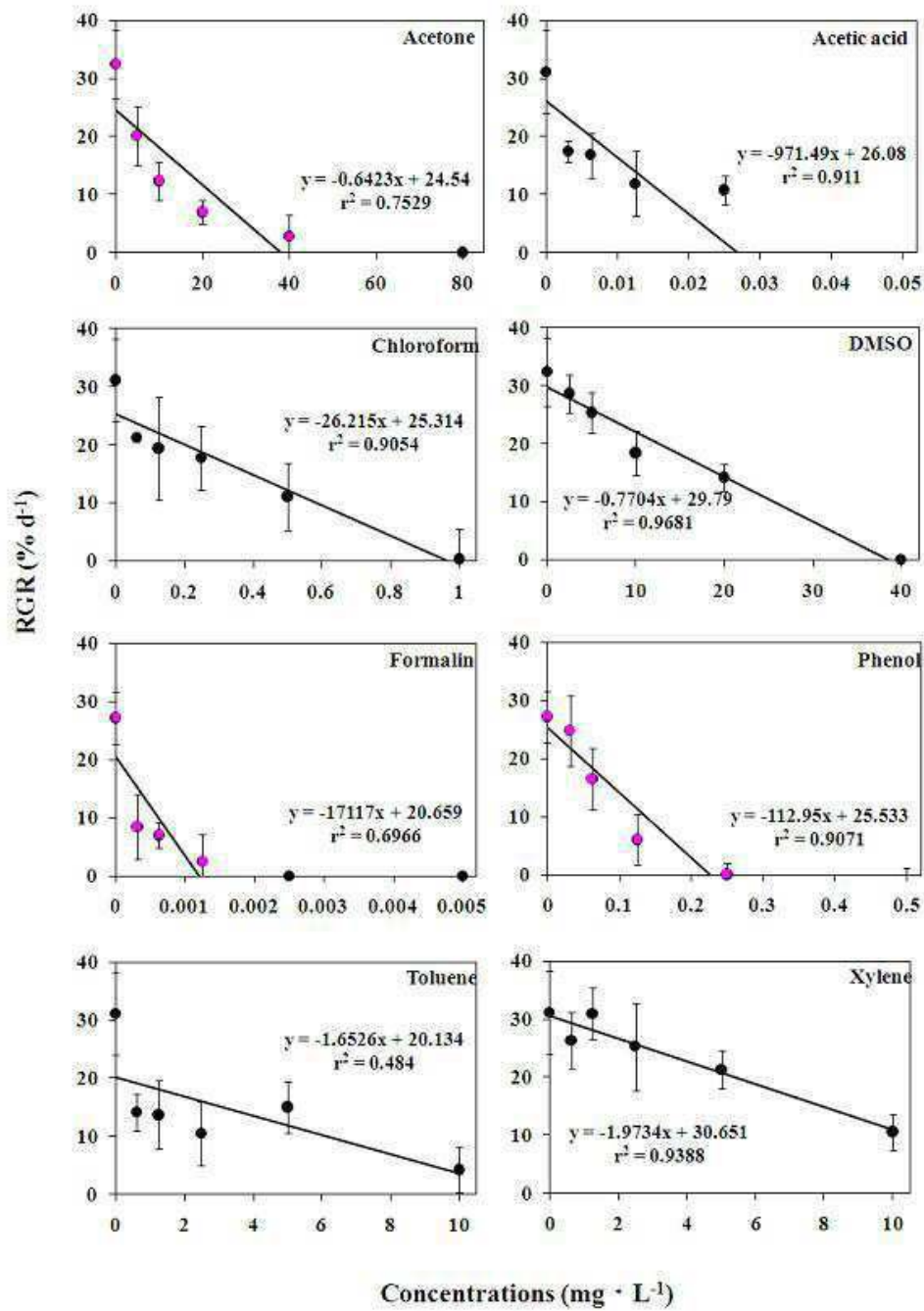
도면5



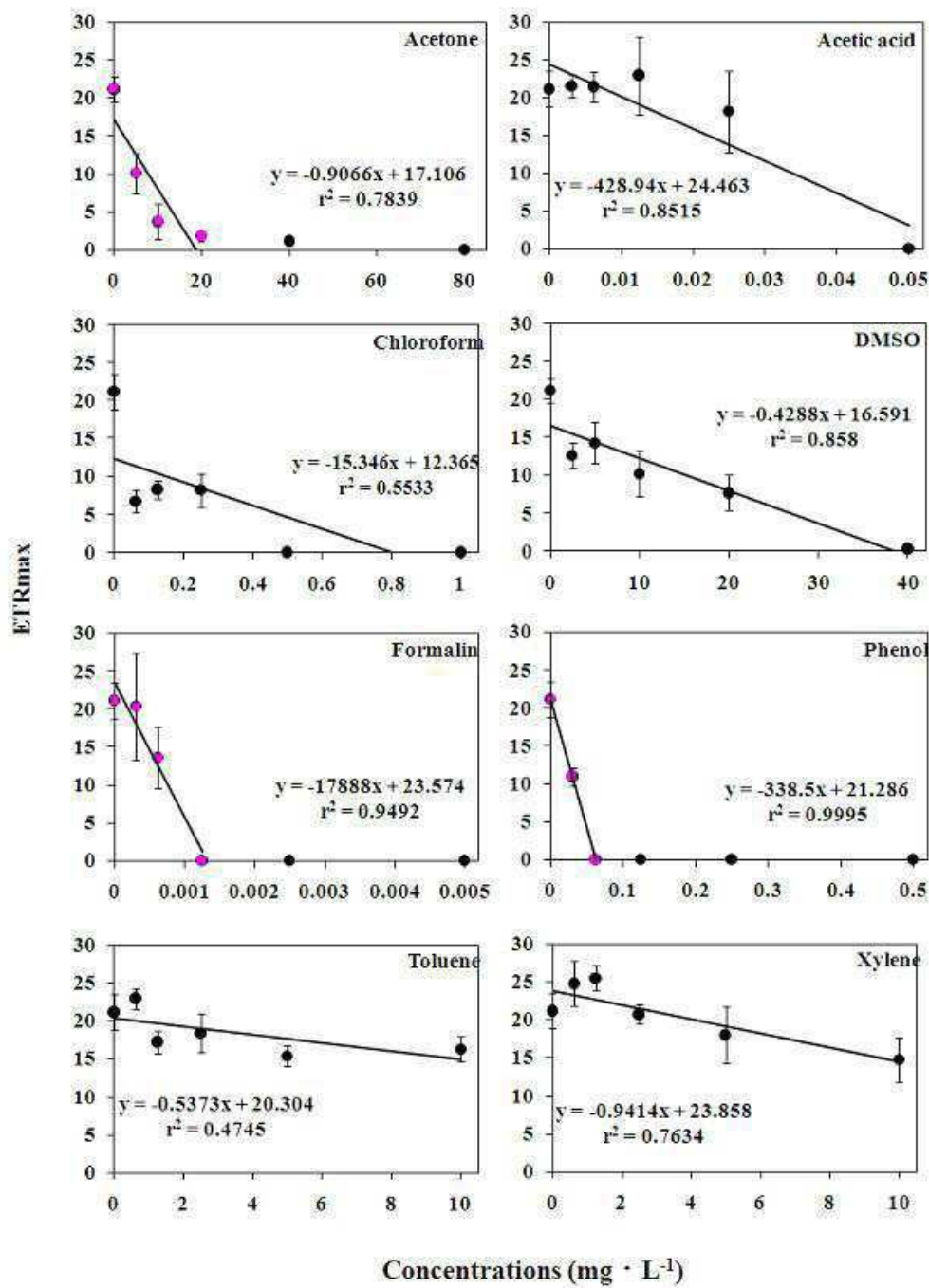
도면6



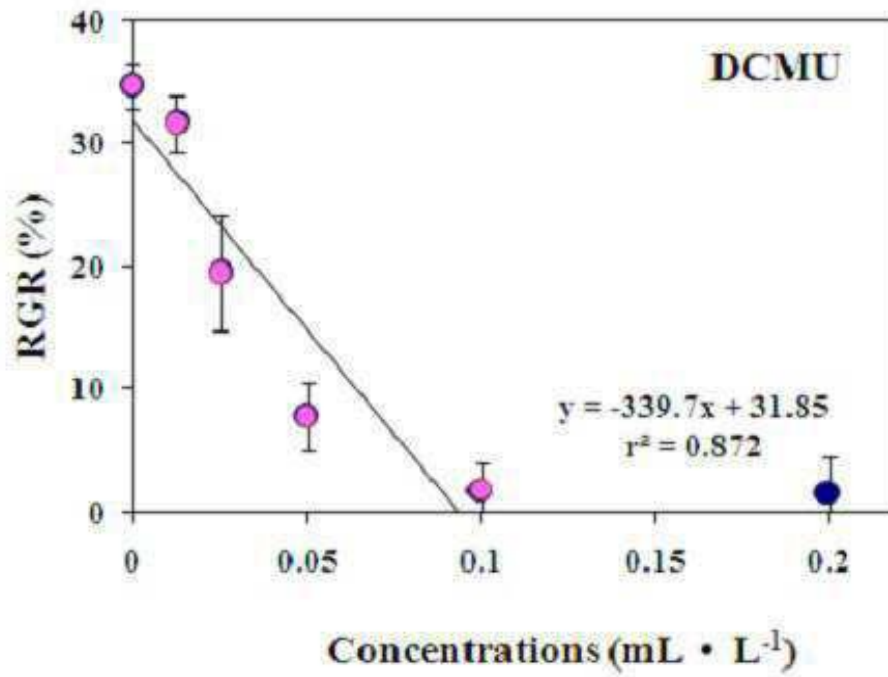
도면7



도면8



도면9



도면10

