(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년06월16일
(11) 등록번호 10-1528580
(24) 등록일자 2015년06월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/18 (2006.01) *C12Q 1/02* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0034722
(22) 출원일자 2014년03월25일
심사청구일자 2014년03월25일
(56) 선행기술조사문헌
KR101365719 B1
KR1020130083172 A
논문명1
KR101084760 B1

(73) 특허권자
주식회사 그린파이오니아
인천광역시 연수구 갯벌로 169, 201호 (송도동, 인천대학교 미래관)
인천대학교 산학협력단
인천광역시 연수구 아카데미로 119, 11호 12 (송도동)
(72) 발명자
한태준
인천광역시 연수구 해송로 143, 404동 2503호(송도동, 송도웰카운티1단지아파트)
박지혜
경기 부천시 원미구 수도로 206번길 65-20 다동 B01호
(74) 대리인
고영갑, 권정기, 임상엽

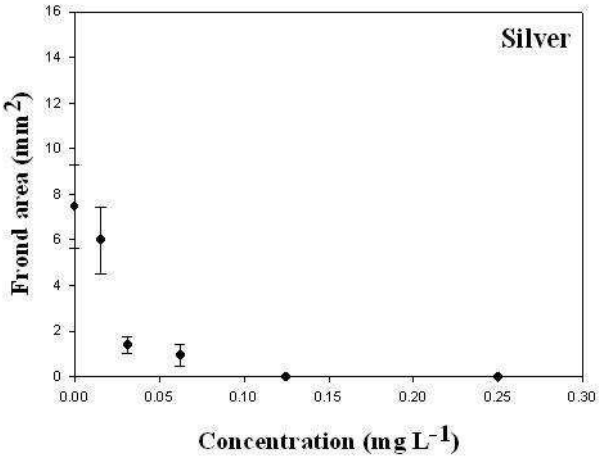
전체 청구항 수 : 총 12 항 심사관 : 김도헌

(54) 발명의 명칭 **잠아로부터 발아된 개구리밥의 엽상체 면적을 이용한 수질 독성 평가 방법**

(57) 요 약

본 발명은 (a) 배양용 용기에 수체 샘플을 넣는 단계; (b) 수체 샘플을 함유하는 배양용 용기에 개구리밥으로부터 분리된 잠아를 투입하는 단계; (c) 배양용 용기에 투입된 잠아를 배양하여 발아시키는 단계; 및 (d) 잠아의 발아에 의해 형성된 개구리밥의 엽상체 면적을 측정하는 단계를 포함하는 수질 독성 평가 방법을 제공한다. 본 발명에 따른 수질 독성 평가 방법은 수질 독성 평가를 위한 지표 물질로 개구리밥의 엽상체로부터 분리된 휴면상태의 잠아를 이용하고, 수질 독성 평가를 위한 파라미터로 잠아의 발아에 의해 형성된 개구리밥의 엽상체 면적을 이용하기 때문에 수질 독성 판별 시간이 약 3일 정도만 소요되고, 수질 독성원에 대한 높은 민감성을 가지며, 다양한 독성물질에 의한 수질 오염의 평가가 가능하다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	401-111-001
부처명	환경부
연구관리전문기관	한국환경산업기술원
연구사업명	차세대 에코이노베이션 기술개발사업
연구과제명	수생태 독성 진단용 키트 개발
기 여 율	1/1
주관기관	주식회사 그린파이오니아
연구기간	2011.05.01 ~ 2014.03.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

(a) 배양용 용기에 수체 샘플을 넣는 단계;

(b) 수체 샘플을 함유하는 배양용 용기에 개구리밥으로부터 분리된 잠아를 투입하는 단계;

(c) 배양용 용기에 투입된 잠아를 배양하여 발아시키는 단계; 및

(d) 잠아의 발아에 의해 형성된 개구리밥의 엽상체 면적을 측정하는 단계를 포함하는 수질 독성 평가 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서 상기 (a) 단계의 수체 샘플은 원수 및 희석 배수가 서로 다른 적어도 2개 이상의 희석 원수로 구성되고,

상기 희석 원수는 원수를 개구리밥으로부터 분리된 잠아의 배양용 배지로 희석하여 제조된 것을 특징으로 하는 수질 독성 평가 방법.

청구항 3

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

청구항 4

제 2항에 있어서, 상기 수체 샘플은 원수의 대조군으로 개구리밥으로부터 분리된 잠아의 배양용 배지를 더 포함하고,

상기 배지는 잠아의 발아를 저해하는 독성물질을 포함하지 않는 것을 특징으로 하는 수질 독성 평가 방법.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 독성물질은 은(Ag; Silver), 알루미늄, 비소(As; Arsenic), 카드뮴(Cd; Cadmium), 코발트(Co; Cobalt), 크롬(Cr; Chromium), 구리(Cu; Copper), 철(Fe; Iron), 수은(Hg; Mercury), 니켈(Ni; Nickel), 납(Pb; Lead), 아연(Zn; Zinc), 아세톤(acetone), 클로로포름(Chloroform), 디메틸황산화물(DMSO; Dimethyl sulfoxide), 에틸알코올(Ethylalcohol), 포르말린 (formaldehyde), 메틸알코올(methanol) 및 페놀(Phenol)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상으로 구성되는 것을 특징으로 하는 수질 독성 평가 방법.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 수체 샘플은 pH가 5~8로 조정되는 것을 특징으로 하는 수질 독성 평가 방법.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 (b) 단계의 개구리밥으로부터 분리된 잠아는 휴면 상태에 있는 것을 특징으로 하는 수질 독성 평가 방법.

청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 (b) 단계의 개구리밥으로부터 분리된 잠아는 냉장 조건에서 적어도 2개월 이상 보관된 것을 특징으로 하는 수질 독성 평가 방법.

청구항 9

제 1항에 있어서, 상기 (c) 단계의 배양시 배양 온도는 15~35℃이고, 광 조사량은 50~150 μmol photon/㎡·s 이고, 배양 시간은 2~4일인 것을 특징으로 하는 수질 독성 평가 방법.

청구항 10

개구리밥으로부터 분리된 휴면상태의 잠아를 포함하는 수질 독성 평가 키트.

청구항 11

제 10항에 있어서, 상기 키트는 잠아 배양용 용기, 수체 샘플 희석용 인공 배지 또는 독성물질 표준용액을 더 포함하고,

상기 독성물질은 잠아의 발아를 저해하는 물질로서, 은(Ag; Silver), 알루미늄, 비소(As; Arsenic), 카드뮴(Cd; Cadmium), 코발트(Co; Cobalt), 크롬(Cr; Chromium), 구리(Cu; Copper), 철(Fe; Iron), 수은(Hg; Mercury), 니켈(Ni; Nickel), 납(Pb; Lead), 아연(Zn; Zinc), 아세톤(acetone), 클로로포름(Chloroform), 디메틸황산화물(DMSO; Dimethyl sulfoxide), 에틸알코올(Ethylalcohol), 포르말린 (formaldehyde), 메틸알코올(methanol) 및 페놀(Phenol)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상으로 구성되는 것을 특징으로 하는 수질 독성 평가 키트.

청구항 12

제 11항에 있어서, 상기 수체 샘플 희석용 인공 배지는 스테인버그 배지(Steinberg's medium) 또는 호그랜드 배지(Hoagland's medium)인 것을 특징으로 하는 수질 독성 평가 키트.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 개구리밥의 잠아를 이용한 생태 독성 형가 방법 등에 관한 것으로서, 더 상세하게는 잠아로부터 발아된 개구리밥의 엽상체 면적 또는 잠아로부터 발아된 개구리밥의 뿌리 길이를 이용한 수질 독성 평가 방법 등에 관한 것이다.

배 경 기 술

[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 물리화학적인 방법과 생물학적인 방법이 있다. 물리화학적 방법으로는 가스 크로마토그래피(GC)법, 유도결합 플라즈마(inductively coupled plasma)를 이용하는 방법 등이 있다. 그러나 이러한

방법은 GC-MS(gas chromatography-mass spectroscopy), ICPMS(inductively coupled plasma-mass spectroscopy) 등 고가의 분석장비와 고도로 숙련된 분석요원을 필요로 하며, 각각의 독성물질에 따라 별도의 분석을 수행하여야 하는 문제가 있다. 또한 분석시간이 길고, 유입 독성물질의 성분을 알 수 없는 경우에는 분석하기 어려운 문제가 있으며, 시료를 장거리로 이동시킬 경우 시료 내 반응으로 성분 및 농도 변화가 유발될 수 있다는 문제점이 있다.

[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] 일반적으로 어류나 무척추 동물을 이용하는 경우에는 치사율, 움직임의 저해, 생물학적 특성 분석으로 판단하며, 미세조류를 이용하는 경우에는 성장저해로 측정한다. 물벼룩류(Daphnia)인 Daphnia magma와 Ceriodaphnia dubia 등은 환경 독성물질에 매우 민감하고 기르기 용이하며, 수명이 짧고 생체가 작으며, 많은 생체 수를 실험에 사용할 수 있어 통계적 분석이 가능하므로 대표적 실험생물로 이용되고 있다. 그러나 이러한 어류, 무척추 동물 또는 원생동물을 이용하는 수질 독성 평가 방법은 측정자의 전문성과 고가의 기기가 요구되고, 장시간이 소요되며, 민감도가 높지 않다는 문제가 있다.

[0006] 과거 국제적으로 독성 연구에 사용되었던 생물종은 대부분의 경우 수서 척추동물 또는 무척추 동물이었지만 최근 들어 수서 생태계 내의 수생식물의 역할이 부각되어 수생식물을 이용한 독성 평가 방법에 대해 관심이 증가하고 있다. 수생식물은 수중 생태계의 1차 생산자로서 동식물 플랑크톤, 무척추동물 및 어류의 서식처가 되며, 많은 유기물질을 흡수정화하는 능력을 갖고 있다. 수생식물(hydrophytes)은 식물체의 여러 기관이 서식환경에 알맞게 변형되어 형태적으로 다양해지는 유연성을 지닌다. 일부 수생식물의 경우, 이들이 처한 특수한 수중환경에 적응하여 생존하기 위해 뿌리, 줄기, 잎 등의 기관을 형성하지 않는 매우 축소된 식물체로의 구조 변형이 일어난다.

[0007] 식물체가 극도로 축소된 개구리밥(*Spirodela polyhriza*)은 식물체 전체가 엽상체, 연결사, 뿌리의 3부분으로 이루어진 아주 작은 개체로 발달한다(Lee, 1996). 이들은 5~8 mm 크기의 부엽성 수생식물로 엽상체(frond)로 영양번식(reproductive reproduction)을 하여 식물체가 수일이내에 2배가 되는 매우 빠른 속도로 개체를 증식시킨다(Landolt, 1986; Appenroth, 2003). 수생식물이 생활환을 마칠 때에는 육상식물에서와 같이 종자를 형성하거나, 혹은 생장이 정지된 상태를 유지할 수 있는 특수한 구조를 형성하여 동절기 휴면상태에 들어간다. 다년생 초본식물인 개구리밥은 휴면구조로 겨울눈의 일종인 잠아(turion)를 형성하여 겨울철 휴면상태를 유지한다. 생장기간 동안 엽상체는 빠른 분열로 그 수를 늘리며 개체를 증식시켜 식물체 용적의 대부분을 차지하게 된다. 이러한 엽상체는 기온이 내려가기 시작하면 영양번식을 멈추고 엽육조직 내부에 잠아원기(turion primordium)를 형성한다(Kwak & Kim, 2008). 이후 잠아는 모엽상체(mother frond)에서 분리되어 물 밑에 가라 앉아 월동하고 다음 해 기온이 상승하기 시작하면 수면 위로 부상하여 새로운 식물체로 발달하는 생활환을 반복한다. 이들의 잠아에서는 휴면기 이후 기온상승으로 보호조직(vegetative sheath) 및 잠아 엽육조직 내에 싸여 있던 엽상체 원기(frond primordium)가 발아하여 엽상체가 기원한다. 기온하강 시 휴면상태를 유지하도록 하는 개구리밥 잠아의 이러한 특성으로 수생식물의 휴면 구조 형성 및 발달과정 추적 연구에 대표적인 모델시스템 종으로 제안된바 있다(Smart, 1996). 엽상체, 연결사 및 뿌리로만 구성된 매우 축소된 개구리밥의 식물체는 잠아 및 엽상체 원기를 엽상체 및 잠아조직 내에 미리 형성하여 휴면기 이후 신속하게 생장을 재개하거나 생장기에서 휴면상태로 바로 진입할 수 있는 구조적 특징을 지녀 축소된 식물체의 생활환 순환에 중요한 역할을 한다(Newton et al., 1978; Sibasaki & Oda, 1979; Kim & Kim, 2000; Reimann et al., 2007; Kwak & Kim, 2008).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 이러한 배경하에 도출된 것으로서, 본 발명의 일 목적은 개구리밥의 엽상체로부터 분리된 잠아의 발

아 특성을 이용한 신규 수질 독성 평가 방법을 제공하는데에 있다.

[0009] 또한, 본 발명의 다른 목적은 신규 수질 독성 평가 키트를 제공하는데에 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명의 발명자들은 생태 독성 평가를 위한 지표 물질로 개구리밥의 엽상체로부터 분리된 휴면상태의 잠아를 이용하고, 생태 독성 평가를 위한 파라미터로 잠아의 발아에 의해 형성된 개구리밥의 엽상체 면적 또는 뿌리 길이를 이용하는 경우 생태 독성, 특히 수질 독성 평가 시 소요 시간이 짧고 민감도가 우수하며 다양한 독성물질에 대한 평가가 가능하다는 점을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[0011] 본 발명의 일 목적을 해결하기 위하여, 본 발명은 (a) 배양용 용기에 수체 샘플을 넣는 단계; (b) 수체 샘플을 함유하는 배양용 용기에 개구리밥으로부터 분리된 잠아를 투입하는 단계; (c) 배양용 용기에 투입된 잠아를 배양하여 발아시키는 단계; 및 (d) 잠아의 발아에 의해 형성된 개구리밥의 엽상체 면적 또는 잠아의 발아에 의해 형성된 개구리밥의 뿌리 길이를 측정하는 단계를 포함하는 수질 독성 평가 방법을 제공한다. 이때, 상기 (a) 단계의 수체 샘플은 원수 및 희석 배수가 서로 다른 적어도 2개 이상의 희석 원수로 구성되고, 상기 희석 원수는 원수를 개구리밥으로부터 분리된 잠아의 배양용 배지, 예를 들어 스테인버그 배지(Steinberg's medium) 또는 호그랜드 배지(Hoagland's medium)로 희석하여 제조되는 것이 바람직하다. 또한, 상기 희석 원수는 반수 희석법에 의해 희석되는 것이 바람직하다. 또한, 상기 수체 샘플은 원수의 대조군으로 개구리밥으로부터 분리된 잠아의 배양용 배지, 예를 들어 스테인버그 배지(Steinberg's medium) 또는 호그랜드 배지(Hoagland's medium)를 더 포함하고, 상기 잠아의 배양용 배지는 바람직하게는 잠아의 발아를 저해하는 독성물질을 포함하지 않는 것이다. 또한, 상기 독성물질은 은(Ag; Silver), 알루미늄, 비소(As; Arsenic), 카드뮴(Cd; Cadmium), 코발트(Co; Cobalt), 크롬(Cr; Chromium), 구리(Cu; Copper), 철(Fe; Iron), 수은(Hg; Mercury), 니켈(Ni; Nickel), 납(Pb; Lead), 아연(Zn; Zinc), 아세톤(acetone), 클로로포름(Chloroform), 디메틸황산화물(DMSO; Dimethyl sulfoxide), 에틸알코올(Ethylalcohol), 포르말린 (formaldehyde), 메틸알코올(methanol) 및 페놀(Phenol)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상으로 구성될 수 있다. 또한, 상기 (a) 단계의 수체 샘플은 pH가 5~8로 조정되는 것이 바람직하다. 또한, 상기 (b) 단계의 개구리밥으로부터 분리된 잠아는 바람직하게는 휴면 상태에 있는 것이다. 또한, 상기 (b) 단계의 개구리밥으로부터 분리된 잠아는 바람직하게는 냉장 조건에서 적어도 2개월 이상 보관된 것이다. 또한, 상기 (c) 단계의 배양시 배양 온도는 15~35℃이고, 광 조사량은 50~150 μmol photon/m^2·s 이고, 배양 시간은 2~4일인 것이 바람직하다.

[0012] 본 발명의 다른 목적을 해결하기 위하여, 본 발명은 개구리밥으로부터 분리된 휴면상태의 잠아를 포함하는 수질 독성 평가 키트를 제공한다. 이때, 상기 키트는 바람직하게는 잠아 배양용 용기, 수체 샘플 희석용 인공 배지 또는 독성물질 표준용액을 더 포함할 수 있다. 상기 표준 독성물질은 잠아의 발아를 저해하는 물질로서, 은(Ag; Silver), 알루미늄, 비소(As; Arsenic), 카드뮴(Cd; Cadmium), 코발트(Co; Cobalt), 크롬(Cr; Chromium), 구리(Cu; Copper), 철(Fe; Iron), 수은(Hg; Mercury), 니켈(Ni; Nickel), 납(Pb; Lead), 아연(Zn; Zinc), 아세톤(acetone), 클로로포름(Chloroform), 디메틸황산화물(DMSO; Dimethyl sulfoxide), 에틸알코올(Ethylalcohol), 포르말린 (formaldehyde), 메틸알코올(methanol) 및 페놀(Phenol)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상으로 구성될 수 있다. 또한, 상기 수체 샘플 희석용 인공 배지는 바람직하게는 스테인버그 배지(Steinberg's medium) 또는 호그랜드 배지(Hoagland's medium)이다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따른 수질 독성 평가 방법은 수질 독성 평가를 위한 지표 물질로 개구리밥의 엽상체로부터 분리된 휴면상태의 잠아를 이용하고, 수질 독성 평가를 위한 파라미터로 잠아의 발아에 의해 형성된 개구리밥의 엽상체 면적 또는 뿌리 길이를 이용하기 때문에 수질 독성 판별 시간이 약 3일 정도만 소요되고, 수질 독성원에 대한 높은 민감성을 가지며, 다양한 독성물질에 의한 수질 오염의 평가가 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 독성물질인 은의 농도에 따른 잠아의 발아에 의해 형성된 개구리밥의 자엽상체 면적 변화를 나타낸 것이고, 도 2는 독성물질인 카드뮴의 농도에 따른 잠아의 발아에 의해 형성된 개구리밥의 자엽상체 면적 변화를 나타낸 것이고, 도 3은 독성물질인 크롬의 농도에 따른 잠아의 발아에 의해 형성된 개구리밥의 자엽상체 면적 변화를 나타낸 것이고, 도 4는 독성물질인 구리의 농도에 따른 잠아의 발아에 의해 형성된 개구리밥의 자엽상체

면적 변화를 나타낸 것이고, 도 5는 독성물질인 수은의 농도에 따른 잠아의 발아에 의해 형성된 개구리밥의 자엽상체 면적 변화를 나타낸 것이다.

도 6은 독성물질인 은의 농도에 따른 잠아의 발아에 의해 형성된 개구리밥의 뿌리 길이 변화를 나타낸 것이고, 도 7은 독성물질인 카드뮴의 농도에 따른 잠아의 발아에 의해 형성된 개구리밥의 뿌리 길이 변화를 나타낸 것이고, 도 8은 독성물질인 크롬의 농도에 따른 잠아의 발아에 의해 형성된 개구리밥의 뿌리 길이 변화를 나타낸 것이고, 도 9는 독성물질인 구리의 농도에 따른 잠아의 발아에 의해 형성된 개구리밥의 뿌리 길이 변화를 나타낸 것이고, 도 10은 독성물질인 수은의 농도에 따른 잠아의 발아에 의해 형성된 개구리밥의 뿌리 길이 변화를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 본 발명의 일 측면은 판별 시간이 짧고, 조작이 간단하며, 다양한 독성물질에 대해 높은 민감성을 가지는 수질 독성 평가 방법에 관한 것으로서, 본 발명의 수질 독성 평가 방법은 배양용 용기에 수체 샘플을 넣는 단계; 수체 샘플을 함유하는 배양용 용기에 개구리밥으로부터 분리된 잠아를 투입하는 단계; 배양용 용기에 투입된 잠아를 배양하여 발아시키는 단계; 및 잠아의 발아에 의해 형성된 개구리밥의 엽상체 면적 또는 개구리밥의 뿌리 길이를 측정하는 단계를 포함한다. 이하, 본 발명에 따른 수질 독성 평가 방법을 구성요소별로 나누어 설명한다.

[0016] <u>수체 샘플</u>

[0017] 수체(water body) 샘플은 물이 주요 부피를 차지하는 샘플을 말하는 것으로서, 본 발명에 따른 수체 샘플은 해수, 하천, 호수, 폐수, 방류수, 오수, 슬러지 용출수, 토양 용출수, 퇴적토 용출수 등에서 채취한 샘플을 포함한다.

[0018] 최초의 수체 샘플(이하, 원수)은 원수 이외에 원수를 인공 배지나 물과 같이 독성물질을 포함하지 않는 액체로 희석하여 적어도 2가지 이상, 바람직하게는 4가지 이상의 농도로 구배화시킨 희석 원수들로 구성되는 것이 바람직하다. 이때, 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 액체는 개구리밥으로부터 분리된 잠아의 발아를 저해하는 독성물질을 포함하지 않으면서 개구리밥으로부터 분리된 잠아의 배양과 양립할 수 있는 것이라면 그 종류가 크게 제한되지 않으며, 구체적으로 물, 개구리밥으로부터 분리된 잠아의 배양에 사용되는 배지 등이 있다. 개구리밥으로부터 분리된 잠아의 배양에 사용되는 배지는 공지된 다양한 배지 등에서 선택되는 등, 그 종류가 크게 제한되지 않으며, 일 예로 개구리밥으로부터 분리된 잠아의 원활한 배양 및 발아를 고려할 때 스테인버그 배지(Steinberg's medium) 또는 호그랜드 배지(Hoagland's medium)인 것이 바람직하다.

[0019] 또한, 수체 샘플은 바람직하게는 원수의 대조군으로 개구리밥으로부터 분리된 잠아의 배양에 사용되는 배지를 더 포함할 수 있는데, 상기 배지는 개구리밥으로부터 분리된 잠아의 발아를 저해하는 독성물질을 포함하지 않는 것 바람직하다. 상기 개구리밥으로부터 분리된 잠아의 발아를 저해하는 독성물질은 그 종류가 크게 제한되지 않으며, 예를 들어 은(Ag; Silver), 알루미늄, 비소(As; Arsenic), 카드뮴(Cd; Cadmium), 코발트(Co; Cobalt), 크롬(Cr; Chromium), 구리(Cu; Copper), 철(Fe; Iron), 수은(Hg; Mercury), 니켈(Ni; Nickel), 납(Pb; Lead), 아연(Zn; Zinc), 아세톤(acetone), 클로로포름(Chloroform), 디메틸황산화물(DMSO; Dimethyl sulfoxide), 에틸알코올(Ethylalcohol), 포르말린 (formaldehyde), 메틸알코올(methanol) 및 페놀(Phenol)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 있다. 상기 대조군을 구성하는 개구리밥으로부터 분리된 잠아의 배양용 배지는 공지된 다양한 배지 등에서 선택되는 등, 그 종류가 크게 제한되지 않으며, 일 예로 개구리밥으로부터 분리된 잠아의 원활한 배양 및 발아를 고려할 때 스테인버그 배지(Steinberg's medium) 또는 호그랜드 배지(Hoagland's medium)인 것이 바람직하다.

[0020] 또한, 상기 원수, 희석 원수들 또는 원수의 대조군 등을 포함하는 수체 샘플은 배양용 용기에 넣어지기 전 또는 배양용 용기에 넣어진 후, 개구리밥으로부터 분리된 잠아의 원활한 배양 및 발아를 고려할 때 필요한 경우 pH가 5~8, 바람직하게는 6~8이 되도록 조정되는 것이 바람직하다.

[0021] <u>배양용 용기</u>

[0022] 배양용 용기는 수체 샘플 및 개구리밥으로부터 분리된 잠아를 수용하고, 이후 배양기에 넣어져 잠아를 배양하기 위한 것으로서, 그 형태는 크게 제한되지 않으며, 일 예로 웰 플레이트(Well plate), 삼각플라스크(Erlenmeyer flask) 등이 있다. 웰 플레이트는 적어도 6개 이상의 웰(Well)을 포함하는 것이 바람직한데, 1개의 웰에는 대조군으로서 독성물질을 포함하지 않는 인공 배지를 넣어 잠아를 배양하고, 나머지 5개의 웰에는 원수와 4개의 희석 원수들을 넣어 잠아를 배양한다. 또한, 웰 플레이트는 다양한 원수들의 수질 독성을 한번에 평가할 수 있는 측면을 고려할 때 더 바람직하게는 12개 이상의 웰, 가장 바람직하게는 24개 이상의 웰을 포함하는 것이 바람직하다. 삼각플라스크의 크기는 크게 제한 되지는 않으나 200㎖ 내지 100㎖인 것이 바람직하다.

[0023] 개구리밥으로부터 분리된 잠아

[0024] 본 발명에 따른 수질 독성 평가 방법은 평가 지표 물질로 개구리밥으로부터 분리된 잠아를 이용한다. 이때, 상기 잠아는 구체적으로 개구리밥의 모엽상체에서 분리된 것이다. 본 발명에서 모엽상체는 잠아의 발아에 의해 형성된 개구리밥의 자엽상체에 대한 상대적인 개념이다. 본 발명에서 사용되는 개구리밥의 모엽상체에서 분리된 잠아는 휴면 상태를 유지하도록 냉장 조건(예를 들어 0~5℃)에서 보관되는 것이 바람직하다. 또한, 잠아는 일반적으로 냉장 조건과 같은 저온에서 보관될 때 원활한 발아를 위해 일정 시간의 경과를 필요로 한다. 본 발명에 따른 수질 독성 평가 방법은 개구리밥으로부터 분리된 잠아의 발아를 유도한 후 나타나는 다양한 특성을 수질 평가를 위한 파라미터로 이용하는바, 본 발명에서 사용되는 개구리밥으로부터 분리된 잠아는 냉장 조건에서 적어도 2개월 이상 보관된 것이 바람직하고, 2개월 이상 내지 6개월 이하로 보관된 것이 더 바람직하다.

[0025] 개구리밥으로부터 분리된 잠아의 배양

[0026] 개구리밥으로부터 분리된 잠아 및 수체 샘플을 함유하는 배양용 용기는 배양기에 옮겨지고, 이후 소정 시간 동안 잠아가 배양된다. 이때, 배양 시간은 크게 제한되지 않으나 수질 독성 평가의 신뢰성을 확보하는 측면에서 적어도 2일 이상인 것이 바람직하고, 2~4일인 것이 더 바람직하며, 3~4일인 것이 가장 바람직하다. 또한, 개구리밥으로부터 분리된 잠아의 배양시 광 조사량은 50~150 μmol photon/㎡·s 인 것이 바람직하고, 75~150 μmol photon/㎡·s 인 것이 더 바람직하며, 90~120 μmol photon/㎡·s 인 것이 가장 바람직하다. 또한, 개구리밥으로부터 분리된 잠아의 배양시 배양 온도는 15~35℃인 것이 바람직하고, 20~30℃인 것이 더 바람직하다.

[0027] 잠아의 발아에 의해 형성된 개구리밥의 엽상체 면적 또는 뿌리 길이 측정

[0028] 개구리밥으로부터 분리된 잠아를 수체 샘플이 담겨진 배양용 용기에 넣고 전술한 특정 배양 조건에서 약 72시간 동안 배양하면 잠아가 발아되면서 개구리밥의 자엽상체가 형성되고 뿌리가 생장한다. 배양이 완료된 후 잠아의 발아에 의해 형성된 개구리밥의 엽상체 면적 또는 뿌리 길이를 측정하고, 이로부터 수질 독성을 평가할 수 있다. 구체적으로, 수질 독성은 원수 및 희석 원수들에서 배양된 잠아의 발아에 의해 형성된 개구리밥의 자엽상체 면적을 독성 물질을 포함하지 않는 대조군에서 배양된 잠아의 발아에 의해 형성된 개구리밥의 자엽상체 면적과 비교하여 평가된다. 또한, 수질 독성은 원수 및 희석 원수들에서 배양된 잠아의 발아에 의해 형성된 개구리밥의 뿌리 생장 길이를 독성 물질을 포함하지 않는 대조군에서 배양된 잠아의 발아에 의해 형성된 개구리밥의 뿌리 생장 길이와 비교하여 평가될 수도 있다. 이때, 수질 독성에 대한 정량적인 값은 반수 유효 농도(Half maximal effective concentration, EC_{50}) 내지 무영향 농도(No Observed Effect Concentration, NOEC) 값으로 표시된다.

[0029] 반수 유효 농도(Half maximal effective concentration, EC_{50})는 잠아의 발아에 의해 형성된 개구리밥의 자엽상체 면적 또는 뿌리 생장 길이가 독성 물질을 포함하지 않는 대조군에서 배양된 잠아의 발아에 의해 형성된 개구리밥의 자엽상체 면적 또는 뿌리 생장 길이보다 50% 감소하는 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 잠아의 발아에 의해 형성된 개구리밥의 자엽상체 면적 또는 뿌리 생장 길이가 독성 물질을 포함하지 않는 대조군에서 배양된 잠아의 발아에 의해 형성된 개구리밥의 자엽상체 면적 또는 뿌리 생장 길이와 유의적 차이가 없는 수준으로 유지되는 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.

[0030] TU = 100/반수 유효 농도(%)

[0031] 본 발명에 따른 수질 독성 평가 방법의 용도

[0032] 본 발명의 수질 독성 평가 방법으로 진단 가능한 독성 물질은 은(Ag; Silver), 알루미늄(Al; Aluminum), 비소(As; Arsenic), 카드뮴(Cd; Cadmium), 코발트(Co; Cobalt), 크롬(Cr; Chromium), 구리(Cu; Copper), 철(Fe; Iron), 수은(Hg; Mercury), 니켈(Ni; Nickel), 납(Pb; Lead), 및 아연(Zn; Zinc) 등과 같은 중금속 류가 있다. 또한, 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 독성 물질이 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.

[0033] 본 발명의 또 다른 측면은 판별 시간이 짧고, 조작이 간단하며, 다양한 독성물질에 대해 높은 민감성을 가지는 수질 독성 평가 방법을 구현할 수 있는 수질 독성 평가 키트에 관한 것으로서, 본 발명에 따른 수질 독성 평가 키트는 개구리밥으로부터 분리된 휴면상태의 잠아를 포함한다. 또한, 본 발명에 따른 수질 독성 평가 키트는 바람직하게는 잠아 배양용 용기, 수체 샘플 희석용 인공 배지 또는 독성물질 표준용액을 더 포함할 수 있다. 상기 잠아 배양용 용기는 수체 샘플 및 개구리밥으로부터 분리된 휴면상태의 잠아를 수용하고 잠아를 배양하기 위한 용기로서, 일 예로 웰 플레이트(Well plate), 삼각플라스크(Erlenmeyer flask) 등이 있다. 또한, 상기 수체 샘플 희석용 인공 배지는 원수로부터 희석 원수들을 제조하기 위해 사용되는 희석수로서, 일 예로 스테인버그 배지(Steinberg's medium) 또는 호그랜드 배지(Hoagland's medium) 등이 있다. 또한, 상기 독성물질 표준용액은 개구리밥으로부터 분리된 잠아의 발아를 저해하는 물질을 미리 설정된 농도가 되게 제조한 것이다. 본 발명에서 개구리밥으로부터 분리된 잠아의 발아를 저해하는 독성물질로는 은(Ag; Silver), 알루미늄, 비소(As; Arsenic), 카드뮴(Cd; Cadmium), 코발트(Co; Cobalt), 크롬(Cr; Chromium), 구리(Cu; Copper), 철(Fe; Iron), 수은(Hg; Mercury), 니켈(Ni; Nickel), 납(Pb; Lead), 아연(Zn; Zinc), 아세톤(acetone), 클로로포름(Chloroform), 디메틸황산화물(DMSO; Dimethyl sulfoxide), 에틸알코올(Ethylalcohol), 포르말린 (formaldehyde), 메틸알코올(methanol) 또는 페놀(Phenol) 등이 있고, 독성물질 표준용액은 이들로부터 선택되는 1종 이상을 포함할 수 있다. 상기 독성물질 표준용액은 수체 샘플의 수질 독성을 평가하기 전에 개구리밥으로부터 분리된 잠아의 상태, 즉 독성물질에 대한 반응 감응성 여부를 테스트하는데 이용될 수 있다. 구체적으로 본 발명에 따른 독성물질 표준용액이 구리를 독성물질로 포함하는 용액인 경우, 다양한 구리 용액 및 대조군에서의 잠아의 발아에 의해 형성된 개구리밥의 엽상체 면적 또는 뿌리 생장 길이에 대한 데이터를 미리 확보한 후 이를 수질 독성 평가 키트와 함께 제공할 수 있다. 사용자는 구리 용액에 대해 잠아의 발아에 의해 형성된 개구리밥의 엽상체 면적 또는 뿌리 생장 길이를 측정하고 이를 미리 제공된 데이터와 비교하여 개구리밥으로부터 분리된 잠아가 독성물질에 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.

[0034] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다. 다만, 하기의 실시예는 본 발명의 기술적 특징을 명확하게 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 보호범위를 제한하는 것은 아니다.

[0035] **1. 스테인버그 배지(Steinberg medium)**

[0036] 표 1은 본 발명의 실시예에서 사용된 인공 배지인 스테인버그 배지에 포함되는 성분과 농도를 나타낸 것이다. 표 1에 나타나는 바와 같이 인공 배지는 총 5개의 스톡 용액(Stock solution)을 포함하며, 각각의 스톡 용액은 개구리밥의 배양에 필요한 무기 성분 내지 유기 성분을 포함하는 용액으로 구성된다. 또한, 스테인버그 배지의 pH는 7±0.2 수준이다.

표 1

[0037]

스톡 용액 구분	스톡 용액을 구성하는 성분의 종류	스톡 용액내에서의 구성 성분의 농도(g/ℓ)	인공 배지 1리터당 스톡 용액이 차지하는 부피(mℓ/ℓ)
I	KNO_3	17.5	20
	K_2HPO_4	4.5	
	KH_2PO_4	0.63	
II	$MgSO_47H_2O$	5	20
III	$Ca(NO_3)_24H_2O$	14.75	20
IV	H_3BO_3	0.12	1
	$ZnSO_47H_2O$	0.18	
	$Na_2MoO_42H_2O$	0.044	
	$MnCl_24H_2O$	0.18	
V	$FeCl_36H_2O$	0.76	1
	Na_2-EDTA$2H_2O$	1.5	

[0038] 2. 독성물질 표준용액의 제조

[0039] 단일 금속류 독성물질로 각각 은(Ag), 카드뮴(Cd), 크롬(Cr), 구리(Cu) 및 수은(Hg)을 각각 포함하는 독성물질 표준용액을 준비하였다. 또한, 독성물질 표준용액을 반수 희석법에 의해 Steinberg 배지로 희석하여 초기 농도의 50%, 25%, 12.5%, 6.25%로 희석된 독성물질 표준용액을 준비하였다. 이때, 독성물질 표준용액 및 희석된 독성물질 표준용액의 pH는 1M 염산용액이나 1M 수산화나트륨 용액을 사용하여 7±0.2로 조정한 것이다.

[0040] 3. 독성물질 표준용액 상에서 개구리밥으로부터 분리된 잠아의 배양

[0041] 24웰 플레이트의 웰에 대조군 용액, 독성물질 표준용액 및 희석된 독성물질 표준용액을 각각 3mℓ씩 넣고, 여기에 개구리밥으로부터 분리된 잠아를 웰 당 1개씩 넣었다. 이때, 잠아는 성숙한 국내산 개구리밥 개체의 모엽상체에서 분리된 것을 채취한 후 빛을 차단한 조건에서 약 2개월 이상 4℃에서 냉장보관한 것을 사용하였다. 이후, 웰의 뚜껑을 덮고 파라필름으로 웰 주변을 감아 밀봉하였다. 이후, 24웰 플레이트를 배양기에 옮겨 넣고, 90~100 μmol photon/㎡·s의 광 조사량(광 주기는 24시간 연속광 조건임) 및 25℃의 온도에서 72시간 동안 배양하였다. 동일한 조건의 실험을 총 3회 반복하였다.

[0042] 4. 잠아의 발아에 의해 형성된 개구리밥의 엽상체 면적 및 뿌리 생장 길이 측정

[0043] 배양 개시 후 약 48시간이 경과하면 잠아가 표면으로 떠오르고 72시간이 경과하면 잠아의 발아에 의해 개구리밥의 자엽상체가 형성되고 뿌리가 생장한다. 배양 개시 후 72시간이 경과하였을 때 각 웰에서 발아된 잠아를 꺼낸 후 슬라이드 글라스 위에 올려놓고 사진을 촬영하였다. 이후, 영상분석 프로그램을 이용하여 촬영한 사진 속의 개구리밥 자엽상체 면적 및 뿌리 생장 길이를 측정하였다.

[0044] 도 1은 독성물질인 은의 농도에 따른 잠아의 발아에 의해 형성된 개구리밥의 자엽상체 면적 변화를 나타낸 것이고, 도 2는 독성물질인 카드뮴의 농도에 따른 잠아의 발아에 의해 형성된 개구리밥의 자엽상체 면적 변화를 나타낸 것이고, 도 3은 독성물질인 크롬의 농도에 따른 잠아의 발아에 의해 형성된 개구리밥의 자엽상체 면적 변화를 나타낸 것이고, 도 4는 독성물질인 구리의 농도에 따른 잠아의 발아에 의해 형성된 개구리밥의 자엽상체 면적 변화를 나타낸 것이고, 도 5는 독성물질인 수은의 농도에 따른 잠아의 발아에 의해 형성된 개구리밥의 자엽상체 면적 변화를 나타낸 것이다.

[0045] 또한, 도 6은 독성물질인 은의 농도에 따른 잠아의 발아에 의해 형성된 개구리밥의 뿌리 길이 변화를 나타낸 것이고, 도 7은 독성물질인 카드뮴의 농도에 따른 잠아의 발아에 의해 형성된 개구리밥의 뿌리 길이 변화를 나타낸 것이고, 도 8은 독성물질인 크롬의 농도에 따른 잠아의 발아에 의해 형성된 개구리밥의 뿌리 길이 변화를 나타낸 것이고, 도 9는 독성물질인 구리의 농도에 따른 잠아의 발아에 의해 형성된 개구리밥의 뿌리 길이 변화를

나타낸 것이고, 도 10은 독성물질인 수은의 농도에 따른 잠아의 발아에 의해 형성된 개구리밥의 뿌리 길이 변화를 나타낸 것이다.

[0046] 5. 단일 금속류 독성물질의 수질 독성 평가

[0047] 도 1 내지 도 5에 도시된 독성물질의 농도에 따른 잠아의 발아에 의해 형성된 개구리밥의 자엽상체 면적 변화 또는 도 6 내지 도 10에 도시된 독성물질의 농도에 따른 잠아의 발아에 의해 형성된 개구리밥의 뿌리 길이 변화로부터 단일 금속류 독성물질 각각의 반수 유효 농도(EC_{50}) 내지 무영향 농도(NOEC)를 계산하였다. 이때 EC_{50} 값은 점예측기법(point estimation techniques)을 써서 계산하였고, NOEC 값은 Dunnett 과정과 같은 가설 검정 방법을 써서 계산하였다.

[0048] 표 2는 잠아의 발아에 의해 형성된 개구리밥의 자엽상체 면적과 잠아의 발아에 의해 형성된 개구리밥의 뿌리 길이를 수질 독성 평가를 위한 기준 파라미터로 준으로 하였을 때의 단일 금속류 독성물질 각각의 반수 유효 농도(EC_{50}) 내지 무영향 농도(NOEC)를 나타낸 것이다.

표 2

[0049]

금속류 독성물질	잠아의 발아에 의해 형성된 개구리밥 자엽상체 면적 기준		잠아의 발아에 의해 형성된 개구리밥 뿌리 길이 기준	
	NOEC(㎍/L)	EC_{50}(㎍/L)	NOEC(㎍/L)	EC_{50}(㎍/L)
Ag	15.6	23.2	15.6	23.4
Cd	125.0	204.9	31.3	121.9
Cr	312.5	507.1	156.3	219.2
Cu	125.0	630.2	125.0	365.4
Hg	31.3	92.8	31.3	109.1

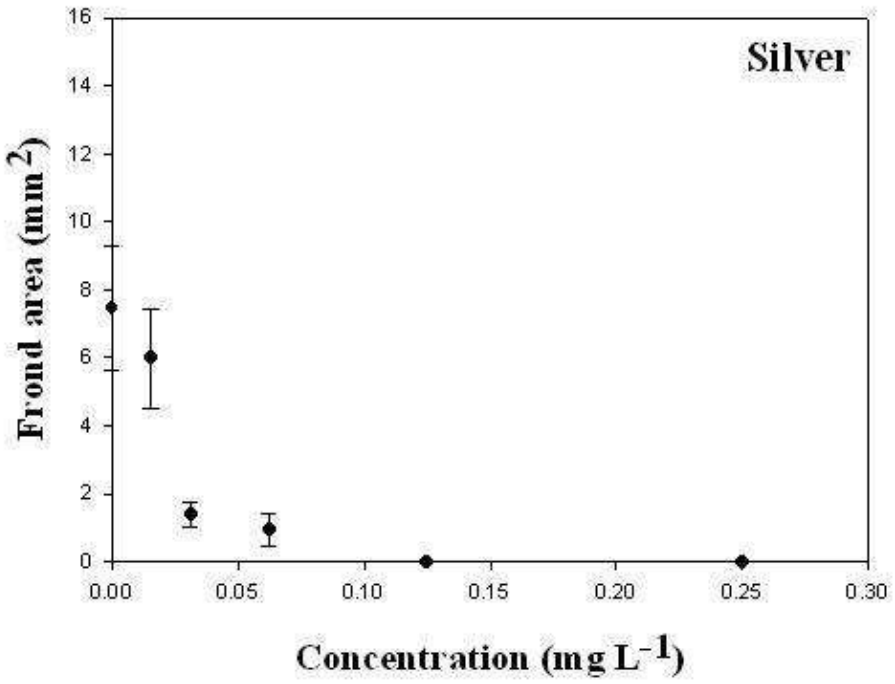
[0050] 표 2에서 보이는 바와 같이 잠아의 발아에 의해 형성된 개구리밥의 뿌리 길이를 수질 독성 평가를 위한 기준 파라미터로 하였을 때 잠아의 발아에 의해 형성된 개구리밥의 자엽상체 면적을 최대 양자수율(Fv/Fm)을 수질 독성 평가를 위한 기준 파라미터로 하였을 때보다 단일 금속류 독성물질에 대해 반응 민감성이 높은 것으로 나타났다.

[0051] 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.

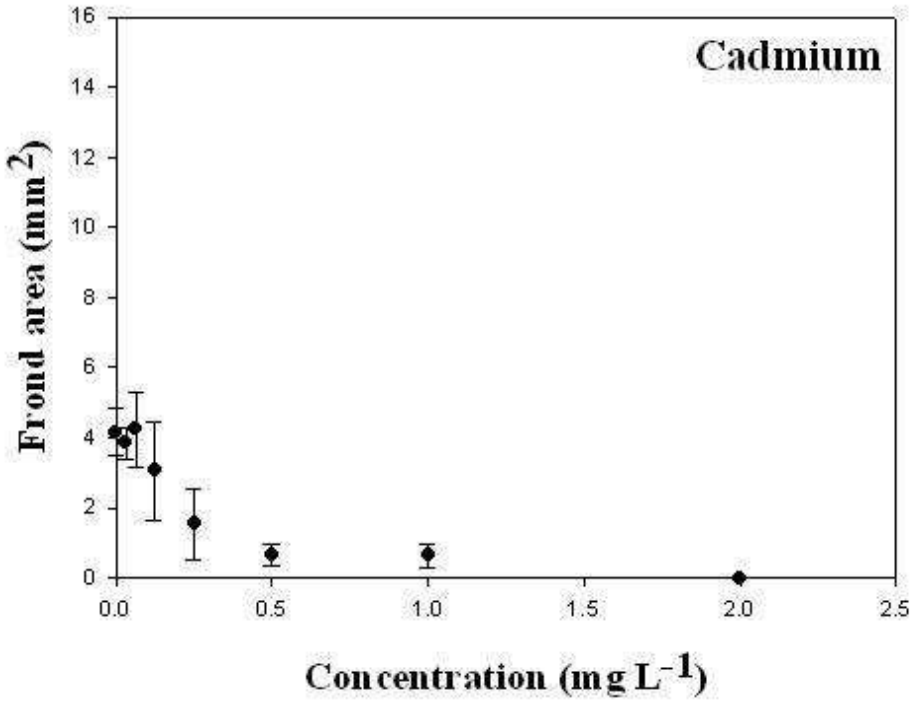
[0052] 이상에서와 같이 본 발명을 상기의 실시예를 통해 설명하였지만 본 발명이 반드시 여기에만 한정되는 것은 아니며 본 발명의 범주와 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양한 변형실시가 가능함은 물론이다. 따라서, 본 발명의 보호범위는 특정 실시 형태로 국한되는 것이 아니며, 본 발명에 첨부된 특허청구의 범위에 속하는 모든 실시 형태들을 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

도면

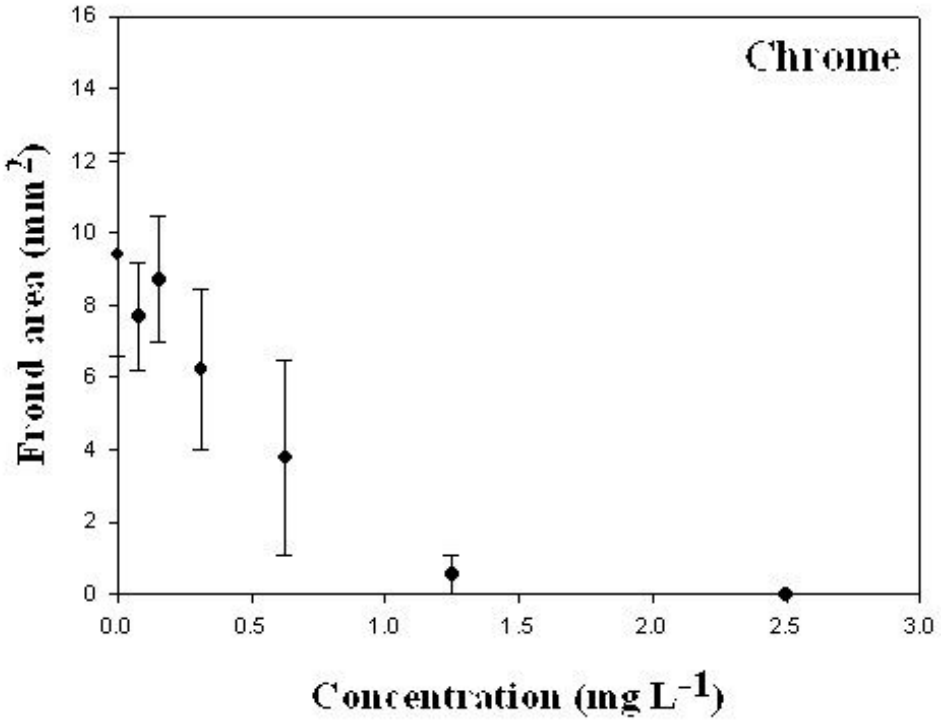
도면1


Silver
Frond area (mm^2)
Concentration (mg L^{-1})
0
2
4
6
8
10
12
14
16
0.00
0.05
0.10
0.15
0.20
0.25
0.30

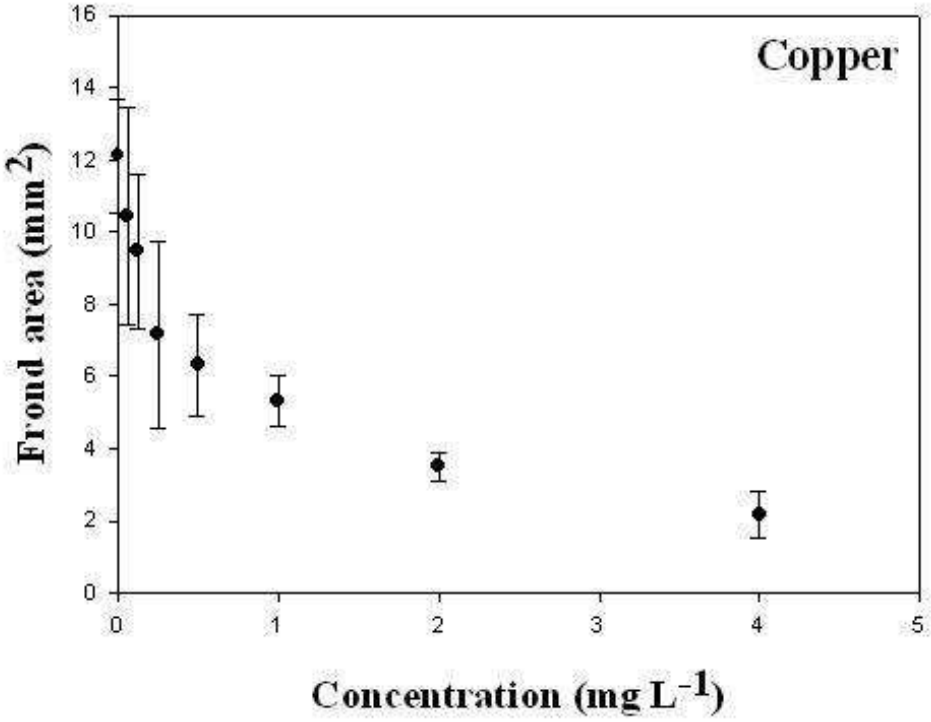
도면2


Cadmium
Frond area (mm^2)
Concentration (mg L^{-1})
0
2
4
6
8
10
12
14
16
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5

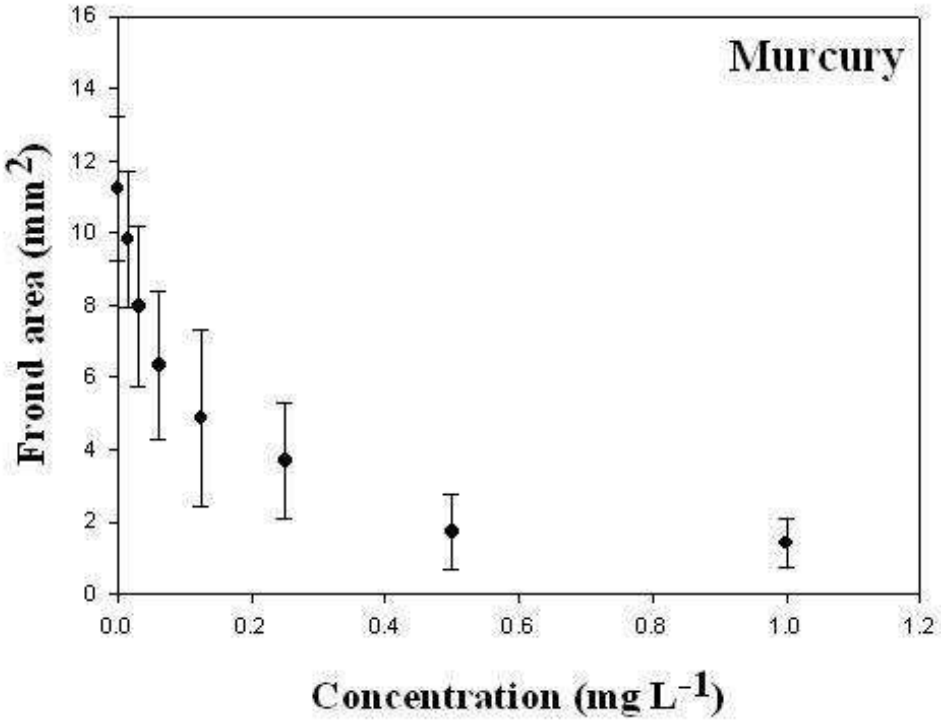
도면3


Chrome
Frond area (mm^2)
Concentration (mg L^{-1})
0
2
4
6
8
10
12
14
16
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0

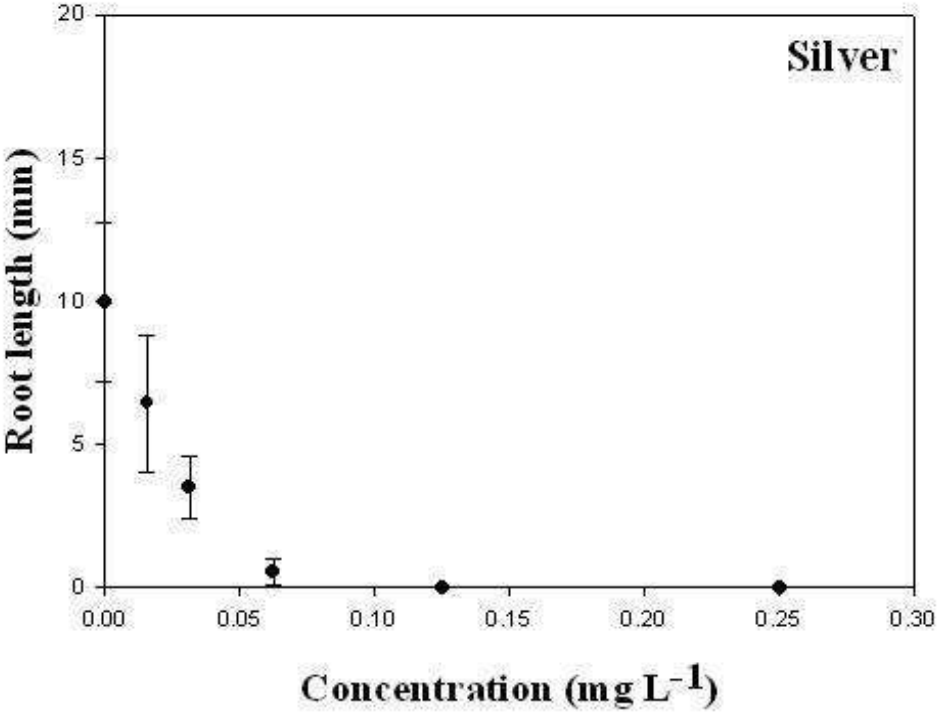
도면4


Copper
Frond area (mm^2)
Concentration (mg L^{-1})
0
2
4
6
8
10
12
14
16
0
1
2
3
4
5

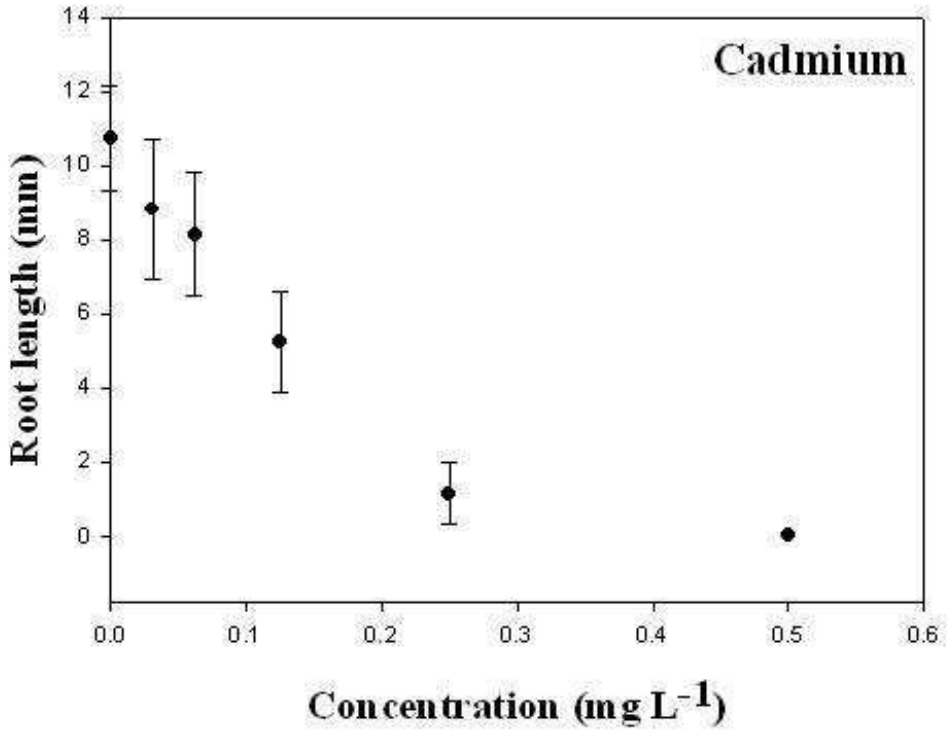
도면5


Murcury
Frond area (mm2)
Concentration (mg L-1)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2

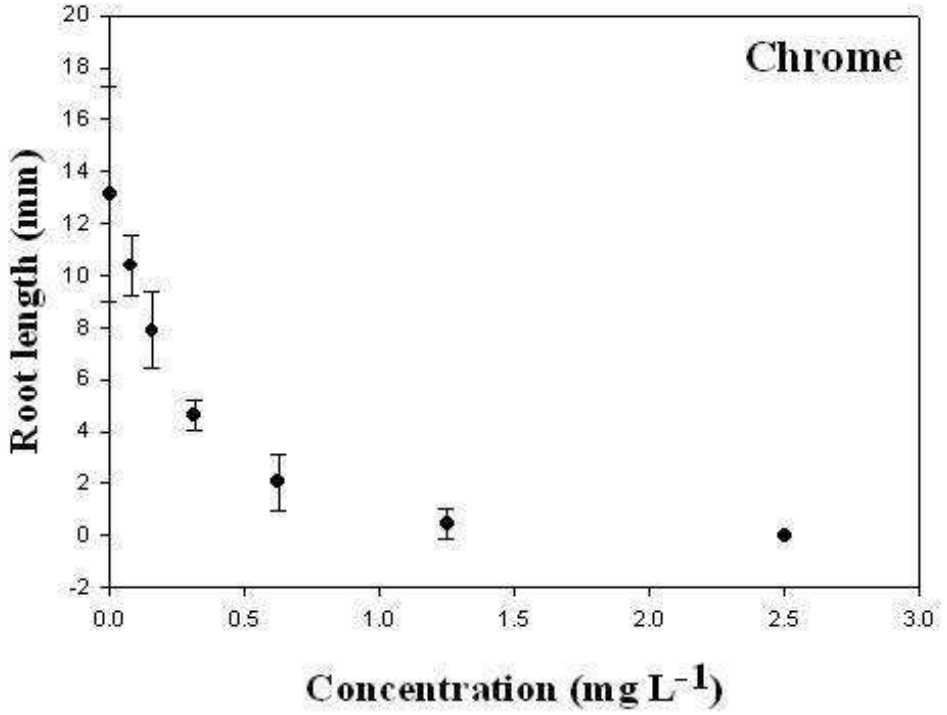
도면6


Silver
Root length (mm)
Concentration (mg L-1)
0
5
10
15
20
0.00
0.05
0.10
0.15
0.20
0.25
0.30

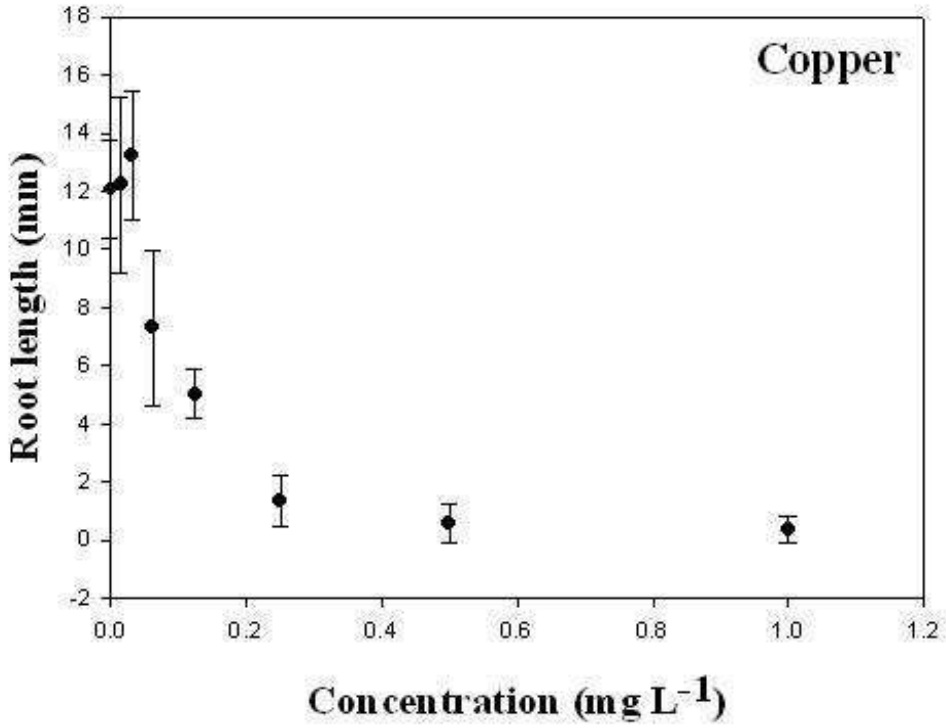
도면7


Cadmium
Root length (mm)
Concentration (mg L-1)
14
12
10
8
6
4
2
0
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6

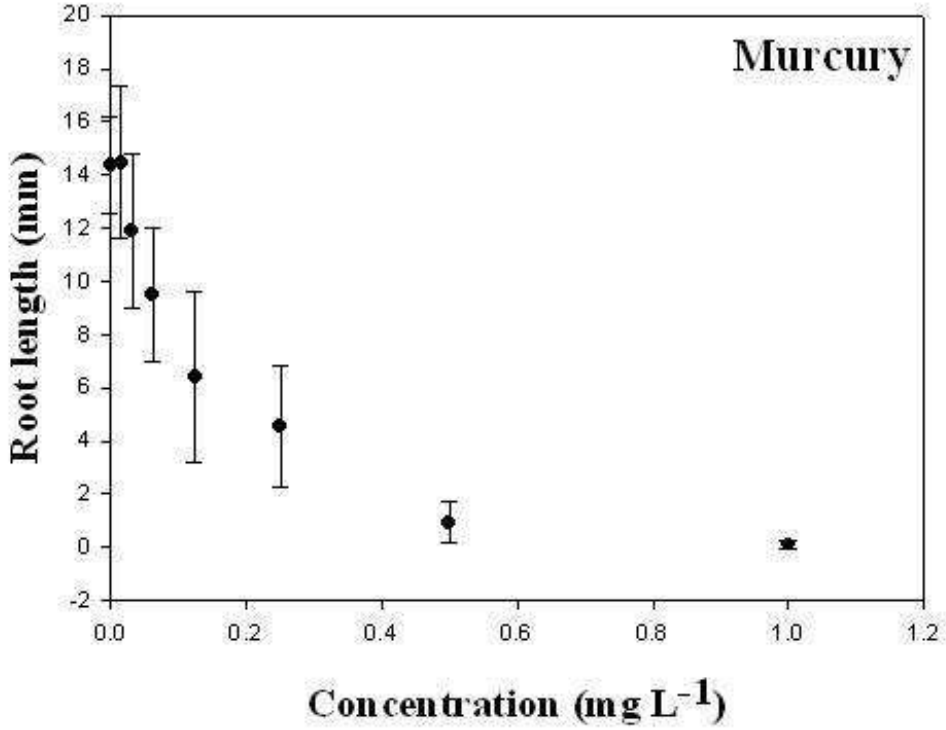
도면8


Chrome
Root length (mm)
Concentration (mg L-1)
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
-2
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0

도면9



도면10



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】
【보정항목】청구범위
【보정세부항목】청구항 제2항
【변경전】
제 1항에 있어서, 제 1항에 있어서,
【변경후】
제 1항에 있어서