



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0088267
(43) 공개일자 2011년08월03일

(51) Int. Cl.

G01N 33/18 (2006.01) G01N 33/00 (2006.01)
G01N 1/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0008098

(22) 출원일자 2010년01월28일

심사청구일자 2010년01월28일

(71) 출원인

인천대학교 산학협력단

인천광역시 연수구 송도동 12-1, 11, 12번지

(72) 발명자

한대준

인천광역시 연수구 송도동 9-31 웰카운티 102동 1001호

박아름

인천광역시 서구 가좌2동 30-2 진주아파트 1동 615호

윤정현

인천광역시 서구 가좌2동 30-2 진주아파트 1동 615호

(74) 대리인

특허법인우인

전체 청구항 수 : 총 6 항

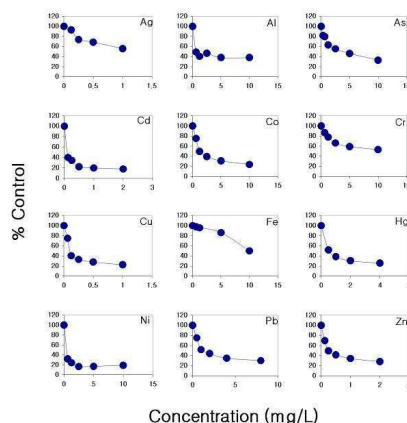
(54) 상추 씨앗의 뿌리 성장 길이 또는 뿌리 길이 성장률을 이용한 수질 독성 평가 방법

(57) 요약

본 발명의 수질 독성 평가 방법은 독성 물질을 포함하지 않는 배양액, 원수, 희석 배수가 서로 다른 적어도 4개 이상의 희석 원수로 이루어진 수체 샘플을 준비하는 단계; 적어도 6개 이상의 웰을 가지는 배양기에 수체 샘플을 넣는 단계; 수체 샘플을 함유하는 배양기에 상추 씨앗을 투입하는 단계; 배양기에 투입된 상추 씨앗을 배양하는 단계; 및 배양이 완료된 상추 씨앗의 뿌리 성장 길이 또는 뿌리 길이 성장률을 측정하는 단계;를 포함한다.

본 발명에 따른 수질 독성 평가 방법은 본 발명은 적어도 6개 이상의 웰을 가지는 평판 배양기 내에 대조군, 원수, 원수를 서로 다른 4개 이상의 농도로 희석한 원수 희석액을 상추 씨앗의 배양액으로 사용하기 때문에 한번의 수질 독성 평가 시 실험군 반복수를 증대시켜 실험의 객관성을 높일 수 있다. 또한, 필터 페이퍼를 사용하지 않고 상추 씨앗을 배양액 내에서 부유 배양시키기 때문에 평가 과정 중 독성 물질이 감소되어 수질 독성이 저평가 되는 것을 방지할 수 있고 뿌리 생장이 굴곡 형상이 아닌 직선 형상으로 발생하여 정확한 뿌리 성장 길이를 측정할 수 있다. 또한, 상추 씨앗의 뿌리 길이 성장에 최적인 배양 조건하에서 배양이 이루어지기 때문에 배양 시간이 2일 정도 밖에 소요되지 않아 평가 시간을 현저히 단축시킬 수 있다.

대표도 - 도7



특허청구의 범위

청구항 1

- (a) 독성 물질을 포함하지 않는 배양액, 원수, 희석 배수가 서로 다른 적어도 4개 이상의 희석 원수로 이루어진 수체 샘플을 준비하는 단계;
- (b) 적어도 6개 이상의 웰을 가지는 배양기에 수체 샘플을 넣는 단계;
- (c) 수체 샘플을 함유하는 배양기에 상추 씨앗을 투입하는 단계;
- (d) 배양기에 투입된 상추 씨앗을 배양하는 단계; 및
- (e) 배양이 완료된 상추 씨앗의 뿌리 성장 길이 또는 뿌리 길이 성장률을 측정하는 단계;를 포함하는 수질 독성 평가 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 희석 원수는 반수 희석법에 의해 제조되는 것을 특징으로 하는 수질 독성 평가 방법.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 (b) 단계의 수체 샘플은 염분 농도가 0~5‰로 조정되고, pH가 5~9로 조정되는 것을 특징으로 하는 수질 독성 평가 방법.

청구항 4

제 3항에 있어서, (d) 단계의 배양 조건은 광 조사량이 0~150 $\mu\text{mol photon/m}^2 \cdot \text{s}$ 이고 배양 온도가 15~25℃인 것을 특징으로 하는 수질 독성 평가 방법.

청구항 5

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 (a) 단계 이전에 표준 독성 용액에 상추 씨앗을 배양하여 상추 씨앗의 상태를 평가하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 수질 독성 평가 방법.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 표준 독성 용액은 은(Ag; Silver), 알루미늄, 비소(As; Arsenic), 카드뮴(Cd; Cadmium), 코발트(Co; Cobalt), 크롬(Cr; Chromium), 구리(Cu; Copper), 철, 수은(Hg; Mercury), 니켈(Ni; Nickel), 납, 및 아연으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나의 금속류 독성물질이 증류수에 용해된 것으로 구성되는 것을 특징으로 하는 수질 독성 평가 방법.

명세서

기술 분야

본 발명은 수질 독성 평가 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 상추 씨앗의 뿌리 성장 길이 또는 뿌리 길이 성장률을 이용한 수질 독성 평가 방법에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 산업의 고도화에 따라 다양한 수체에 포함된 독성 물질 및 유해 물질도 증가하여 예전에는 없던 피해가 발생하고 있다. 즉, 토양 오염, 수질 오염 등과 같은 환경오염으로 인하여 생태계가 점차로 파괴되어 인간의 생활환경에도 많은 영향을 끼치고 있다. 이에 따라 전 세계는 범국가적인 차원에서 환경과 관련된 규제를 한층 강화하여 수질 오염 등과 같은 환경오염을 줄이고자 노력하고 있다. 그러나, 관련 법규가 산업화로 인한 공장 등의 증가 속도를 따라가지 못하는 실정이다. 따라서, 관련 법규에 따라 수질 오염 등과 같은 환경오염을 간단히 검사하는 방법이 지속적으로 연구되고 있으나, 만족할만한 결과는 나오지 못했다.
- [0003] 생태 독성 평가 방법 가운데 생물검정법(bioassay)이 가장 보편적으로 이용되고 있는데, 이 방법은 생물을 유해 물질에 노출시켜 사망, 성장, 부화, 수정 등의 생물학적 반응 요소를 측정하여 그 독성을 평가하는 방법이다. 예컨대, 유해 물질을 수용액 상태로 하여 생물에 노출시킬 때 생물이 사망하거나 성장이 대조구(유해 물질을 첨가하지 않은 실험구)와 비교하여 큰 차이를 보일 경우 그 물질이 유해하다고 판정하는 것이다. 이와 같은 방법은 기존의 화학적 분석에 의한 개별 물질의 농도 측정에 의한 독성 평가(고가의 분석 장비와 고도로 숙련된 분석 요원이 필요하며, 분석 시간이 길며, 유입 독성 물질의 성분을 알 수 없는 경우에는 분석하기 어렵고, 샘플을 장거리로 이동시킬 경우에는 샘플 내 반응으로 성분 및 농도 변화가 유발될 우려가 있다는 문제점이 있음)보다는 좀 더 합리적이고 기능적인 측면을 고려했다는 점에서 보다 현실적인 독성 평가 방법이다. 이 방법에 따라 반수 치사 농도(LC₅₀), 반수 유효 농도(EC₅₀) 등을 산정하고, 이 수치의 비교에 따라 환경의 상대적 품질 및 물질의 독성을 비교평가하는 것이다.
- [0004] 생물검정법에 이용되는 생물은 종(種)의 유용성, 독성 물질에 대한 민감도 및 반응의 일관성, 환경 요인에 대한 내성 및 생태적 중요성 등을 고려하여 선정된다. 어류, 무척추 동물 또는 원생동물을 이용하는 방법은 측정자의 전문성과 고가의 기기가 요구되며, 독성 물질에 따라 민감도에 차이가 많으며, 특히 실험 생물을 배양하는 기반 기술을 갖추지 않은 경우에는 생물의 사멸에 따른 대처 방안이 묘연하다는 문제점이 있다. 현재 미국, 유럽 등에서 주로 이용되는 생물은 윤충류, 지각류, 어류, 저서성, 단각류 및 발광 미생물 등이다. 생물을 이용하여 수질 독성을 진단하는 방법은 이화학적 기기를 사용한 방법에 의한 결과 내용에 내포된 여러 가지 단점을 보완하기 위해 개발되는 것임에도 불구하고, 국제적으로 ISO, OECD에 지금까지 등록된 생태 독성 평가 기법들은 절차의 복잡성, 샘플 확보의 불안정성, 낮은 민감성, 사용 생물 분포 지역의 제약성, 고비용성, 시험 생물의 지속적인 배양과 공급 및 유지 관리의 어려움 등으로 인하여 보다 개선된 기법의 출현이 절대적으로 요구되고 있는 상황이다.
- [0005] 한편, 생태 독성 평가에 이용되는 생물 중 상추(*Lactuca sativa*)는 초롱꽃 목, 국화과로 식용으로 널리 재배하고 있어 풍부한 시료 획득이 가능하고, 실험실내에서의 배양 및 조작이 용이하여 다양한 환경 요인에 대한 생리 반응 연구에 편리한 종이라고 할 수 있다. 또한 상추는 일반 시중 종묘상 및 화원에서 여러 품종의 종묘를 쉽게 구입할 수 있어 재료 획득이 용이하며, 많은 양의 재료를 저렴한 가격에 구입할 수 있는 장점을 지니고 있다. 뿐만 아니라, 시료의 보관 및 유지가 편리하여 시험을 수행하는 과정이 수월하며 작은 공간에서도 시험이 가능하여 다량의 시료를 동시에 측정할 수 있다는 장점을 가지고 있다.
- [0006] 종래의 상추를 이용한 생태 독성 평가 방법 중 미국 환경청(US EPA)의 상추 생물검정시험법은 상추 씨앗의 발아(germination)와 뿌리 성장을 측정하는 것으로 이루어져 있고 도 1에서 보이는 바와 같이 페트리 접시(petridish) 안에 필터 페이퍼(일반적으로 와트만 여지)를 깔고 그 위에 배양액을 적신 후 상추 씨앗의 발아를 유도하고 발아를 내지 뿌리 성장 정도를 통해 생태 독성을 평가하는 기법이다. 그러나, 종래의 상추를 이용한 생태 독성 평가 방법은 필터 페이퍼에 의해 수체 샘플의 독성이 감소하는 현상이 발생하고 이로 인해 실제 독성보다 저평가되는 문제가 있다. 또한, 상추 씨앗의 발아 및 성장 시간이 약 5일 정도 소요되어 신속한 평가가 이루어지지 않는 문제가 있다. 또한 도 2에서 보이는 바와 같이 미국 환경청의 상추 생물검정시험법은 상추 씨앗의 뿌리가 굴곡 형상으로 성장하기 때문에 정확한 뿌리 성장을 측정하는데 한계가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명은 종래의 문제점을 해결하기 위하여 도출된 것으로서, 본 발명은 수질 독성 평가의 지표로서 상추 씨앗의 뿌리 성장 길이 또는 뿌리 길이 성장률을 이용하고, 한번의 실험시 실험군 반복수를 증가시키며, 상추 씨앗의 뿌리 길이 성장에 최적인 배양 조건을 확립함으로써 실험의 객관성을 높이고, 평가 과정 중 독성 물질이 감

소되어 수질 독성이 저평가 되는 것을 방지할 수 있고 뛰어난 민감성과 정확성을 가지며 독성 평가 기간을 현저하게 단축시킬 수 있는 수질 독성 평가 방법을 제공하는데 그 목적이 있다.

과제의 해결 수단

- [0008] 본 발명의 상기 목적을 해결하기 위하여 본 발명은 (a) 독성 물질을 포함하지 않는 배양액, 원수, 희석 배수가 서로 다른 적어도 4개 이상의 희석 원수로 이루어진 수체 샘플을 준비하는 단계; (b) 적어도 6개 이상의 웰을 가지는 배양기에 수체 샘플을 넣는 단계; (c) 수체 샘플을 함유하는 배양기에 상추 씨앗을 투입하는 단계; (d) 배양기에 투입된 상추 씨앗을 배양하는 단계; 및 (e) 배양이 완료된 상추 씨앗의 뿌리 생장 길이 또는 뿌리 길이 생장률을 측정하는 단계;를 포함하는 수질 독성 평가 방법을 제공한다.
- [0009] 이때, 상기 (a) 단계의 희석 원수는 바람직하게는 반수 희석법에 의해 제조되는 것을 특징으로 한다.
- [0010] 또한, 상기 (b) 단계의 수체 샘플은 바람직하게는 염분 농도가 0~5‰로 조정되고, pH가 5~9로 조정되는 것을 특징으로 한다.
- [0011] 또한, 상기 (d) 단계의 배양 조건은 광 조사량이 0~150 $\mu\text{mol photon/m}^2 \cdot \text{s}$ 이고 배양 온도가 15~25℃인 것을 특징으로 한다.
- [0012] 또한, 본 발명에 따른 수질 독성 평가 방법은 바람직하게는 (a) 단계 이전에 표준 독성 용액에 상추 씨앗을 배양하여 상추 씨앗의 상태를 평가하는 단계를 더 포함하고, 이때 표준 독성 용액은 은(Ag; Silver), 알루미늄, 비소(As; Arsenic), 카드뮴(Cd; Cadmium), 코발트(Co; Cobalt), 크롬(Cr; Chromium), 구리(Cu; Copper), 철, 수은(Hg; Mercury), 니켈(Ni; Nickel), 납, 및 아연으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나의 금속류 독성물질이 증류수에 용해된 것으로 구성된다.

발명의 효과

- [0013] 본 발명에 따른 수질 독성 평가 방법은 본 발명은 적어도 6개 이상의 웰을 가지는 평판 배양기 내에 대조군, 원수, 원수를 서로 다른 4개 이상의 농도로 희석한 원수 희석액을 상추 씨앗의 배양액으로 사용하기 때문에 한번의 수질 독성 평가 시 실험군 반복수를 증대시켜 실험의 객관성을 높일 수 있다. 또한, 필터 페이퍼를 사용하지 않고 상추 씨앗을 배양액 내에서 부유 배양시키기 때문에 평가 과정 중 독성 물질이 감소되어 수질 독성이 저평가 되는 것을 방지할 수 있고 뿌리 생장이 굴곡 형상이 아닌 직선 형상으로 발생하여 정확한 뿌리 생장 길이를 측정할 수 있다. 또한, 상추 씨앗의 뿌리 길이 생장에 최적인 배양 조건하에서 배양이 이루어지기 때문에 배양 시간이 2일 정도 밖에 소요되지 않아 평가 시간을 현저히 단축시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0014] 도 1은 미국 환경청(US EPA)의 상추 생물검정시험법의 구성을 나타낸 것이고, 도 2는 미국 환경청(US EPA)의 상추 생물검정시험법에 의해 배양된 상추 씨앗의 뿌리 생장 특성을 현미경으로 관찰한 영상이다.
- 도 3은 본 발명에 따른 수질 독성 평가 방법의 구성을 나타낸 것이고, 도 4는 본 발명에 따른 수질 독성 평가 방법에 의해 배양된 상추 씨앗의 뿌리 생장 특성을 현미경으로 관찰한 영상이다.
- 도 5는 다양한 배양 조건에서 배양된 상추 씨앗의 발아된 뿌리 생장 길이를 나타낸 그래프이다.
- 도 6은 단일 독성 물질로서 구리(Cu)를 포함하는 독성 수용액(초기 구리 농도는 1 mg/L임)과 이를 반수 희석법으로 희석한 독성 수용액에 의해 48시간 배양된 상추 씨앗의 뿌리 생장 특성을 현미경으로 관찰한 영상이다(배양 조건은 20℃, 암 상태).
- 도 7은 금속류의 독성 물질 농도에 따른 상추 씨앗의 뿌리 길이 생장율을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 본 발명은 수체 샘플에 대해 간편하고, 판별 시간이 짧으며 독성 물질에 의해 발휘되는 독성을 정확하게 평가할 수 있는 수질 독성 평가 방법에 관한 것으로서, 본 발명에 따른 수질 독성 평가 방법은 독성 물질을 포함하지 않는 배양액, 원수, 희석 배수가 서로 다른 적어도 4개 이상의 희석 원수로 이루어진 수체 샘플을 준비하는 단계; 적어도 6개 이상의 웰을 가지는 배양기에 수체 샘플을 넣는 단계; 수체 샘플을 함유하는 배양기에 상추 씨앗을 투입하는 단계; 배양기에 투입된 상추 씨앗을 배양하는 단계; 및 배양이 완료된 상추 씨앗의 뿌리 생장 길이 또는 뿌리 길이 생장률을 측정하는 단계;를 포함한다. 이하, 본 발명에 따른 수질 독성 평가 방법을 구성요

소별로 나누어 설명한다.

[0016] 수체 샘플

[0017] 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.

[0018] 최초의 수체 샘플(이하, 원수)은 증류수 등의 독성 물질을 포함하지 않는 액체를 이용하여 적어도 서로 다른 4가지 이상의 농도로 희석되는 것이 바람직하고, 상기와 같이 제조된 희석 원수들은 대조군, 원수 등과 함께 상추 씨앗을 배양하는 배양액으로 사용된다. 희석 원수를 제조하기 위해 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.

[0019] 대조군을 구성하는 독성 물질을 포함하지 않는 배양액은 상추 씨앗의 발아 및 뿌리 성장을 저해하지 않고 상추 씨앗과 양립할 수 있는 것이라면 그 종류가 크게 제한되지 않으며, 구체적으로 증류수가 있다.

[0020] 한편, 대조군, 원수 및 희석 원수로 구성된 수체 샘플은 상추 씨앗을 배양하기 전에 염분 농도가 0~5‰로 조정되고, pH가 5~9로 조정되는 것이 바람직하다. 상기의 염분 농도 및 pH에서 상추 씨앗의 발아 및 뿌리 생장이 원활히 이루어진다.

[0021] 본 발명에 있어서, 염분 농도 및 pH가 조정된 수체 샘플(대조군, 원수, 4개 이상의 희석 원수로 구성된다.)를 배양액으로 하여 상추 씨앗을 배양하는 경우 원수의 희석 농도에 따른 상추 씨앗의 뿌리 성장 길이 또는 뿌리 길이 성장률을 구할 수 있고, 이를 기초로 수체 샘플의 수질 독성을 평가하는 경우 정확한 반수 유효 농도(독성 물질을 포함하지 않는 대조군에서의 상추 씨앗의 뿌리 성장 길이 또는 뿌리 길이 성장률보다 50% 감소된 뿌리 성장 길이 또는 뿌리 길이 성장률을 보이는 독성물질의 농도로서 단일 독성 물질의 경우 특정 농도로 표시되고 미지의 원수의 경우 희석률로 표시됨; Half maximal effective concentration, EC_{50}) 내지 무영향 농도(독성 물질을 포함하지 않는 대조군에서의 상추 씨앗의 뿌리 성장 길이 또는 뿌리 길이 성장률과 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] 배양기

[0023] 본 발명에 따른 수질 독성 평가 방법에서 배양기는 적어도 6개 이상의 웰을 가지는 것이 바람직하다. 도 3은 본 발명에 따른 수질 독성 평가 방법의 구성을 나타낸 것이고 도 4는 본 발명에 따른 수질 독성 평가 방법에 의해 배양된 상추 씨앗의 뿌리 성장 특성을 현미경으로 관찰한 영상이다. 도 3에서 보이는 바와 같이 배양기로 6웰 평판 배양기를 사용하는 경우 1개의 웰에는 대조군으로서 독성 물질을 포함하지 않는 배양액을 넣어 상추 씨앗을 배양하고, 나머지 5개의 웰에는 원수와 원수가 희석된 4개의 수체 샘플을 넣어 상추 씨앗을 배양할 수 있다. 6개 이상의 웰을 가지는 배양기를 사용하는 경우 실험군 반복수를 증대시켜 실험의 객관성을 높임과 동시에 필터 페이퍼가 존재하지 않기 때문에 필터 페이퍼에 의한 독성 물질 감소를 방지할 수 있다. 또한, 부유 배양이 가능하여 도 4에서 보이는 바와 같이 상추 씨앗의 뿌리 생장이 굴곡이 아닌 직선 형상으로 이루어진다. 또한, 부유 배양시 필터 페이퍼 상에 배양하는 경우보다 상추 씨앗의 발아 정도 및 뿌리 성장 정도가 증가하여 48시간 후면 뿌리 성장 길이가 10mm 이상 되어 육안으로 확인이 가능하다.

[0024] 상추 씨앗

[0025] 본 발명은 수질 독성의 평가를 위한 바이오마커로서 상추 씨앗, 보다 구체적으로는 상추 씨앗의 발아시 뿌리 성장 길이 또는 뿌리 길이 성장률을 이용하는데, 상추 씨앗은 오염되거나 또는 독성원이 함유된 수질에서는 발아 정도 및 뿌리 성장력이 떨어지는 특성을 가진다. 상추 씨앗은 표면이 연회색빛을 띠고 잔 주름이 선명하고 장폭이 2.5mm 이상 되는 건강한 씨앗이 바람직하다. 상추 씨앗이 건강하지 않은 경우 발아 정도 및 뿌리 길이 성장 정도가 떨어져서 유의한 수질 독성 평가가 어려울 수 있기 때문이다.

[0026] 상추 씨앗의 배양

[0027] 상추 씨앗의 배양에 의한 발아 및 뿌리 생장이 최대로 이루어지기 위해서 배양시 광 조사량은 바람직하게는 $0\sim 150 \mu\text{mol photon/m}^2 \cdot \text{s}$, 더 바람직하게는 $10\sim 150 \mu\text{mol photon/m}^2 \cdot \text{s}$ 이고 배양 온도는 $15\sim 25^\circ\text{C}$, 더 바람직하게는 $20\sim 25^\circ\text{C}$ 이다. 또한, 배양액의 pH는 5~9, 더 바람직하게는 6~9이고 염분 농도는 바람직하게는 0~5%이다. 본 발명에 따른 수질 독성 평가 방법에서 상추 씨앗의 배양 시간은 약 48시간(2일) 정도이고, 이는 미국 환경청의 상추 수질 독성 평가 방법에 비해 72시간 정도 단축된 것이다.

[0028] 상추 씨앗의 뿌리 성장 길이 또는 뿌리 길이 성장률의 측정

[0029] 배양이 완료된 후 상추 씨앗의 뿌리 성장 길이는 눈금자를 이용하여 육안으로 측정할 수도 있고, 카메라와 같은 이미지 캡처를 구비하는 화상 분석 장치를 이용하여 측정할 수도 있다. 측정된 뿌리 성장 길이로부터 뿌리 길이 성장률은 다음과 같은 수학적 식 1로 계산될 수 있다.

수학적 식 1

$$\text{뿌리 길이 성장률}(\%) = \frac{B \times 100}{A}$$

[0030]

[0031] 여기서 A는 대조군(독성원이 없는 상태)에서의 상추 씨앗의 뿌리 성장 길이를 나타내고, B는 실험군(독성원이 내포된 상태의 수체 샘플)에서의 상추 씨앗의 뿌리 성장 길이를 나타낸다.

[0032] 수질 독성의 평가

[0033] 수체 샘플의 수질 독성은 상추 씨앗의 뿌리 성장 길이 자체를 이용하여 평가될 수도 있고, 뿌리 길이 성장률을 이용하여 평가될 수도 있다.

[0034] 뿌리 성장 길이 자체를 이용하여 평가하는 방법은 다음과 같다.

수학적 식 2

$$\text{수체 샘플의 독성}(\%) = \frac{(A-B) \times 100}{A}$$

[0035]

[0036] 여기서 A는 대조군(독성원이 없는 상태)에서의 상추 씨앗의 뿌리 성장 길이를 나타내고, B는 실험군(독성원이 내포된 상태의 수체 샘플)에서의 상추 씨앗의 뿌리 성장 길이를 나타낸다.

[0037] 또한, 수질 독성은 원수 및 희석 원수의 수체 샘플에서 배양된 상추 씨앗의 뿌리 성장 길이 또는 뿌리 길이 성장률을 독성 물질을 포함하지 않는 대조군에서 배양된 상추 씨앗의 뿌리 성장 길이 또는 뿌리 길이 성장률과 비교하여 평가되며, 구체적으로 반수 유효 농도(Half maximal effective concentration, EC_{50}) 내지 무영향 농도(No Observed Effect Concentration, NOEC) 값으로 표시된다.

[0038] 반수 유효 농도(Half maximal effective concentration, EC_{50})는 뿌리 성장 길이 또는 뿌리 길이 성장률을 독성 물질을 포함하지 않는 대조군에서의 뿌리 성장 길이 또는 뿌리 길이 성장률보다 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 뿌리 성장 길이 또는 뿌리 길이 성장률을 독성 물질을 포함하지 않는 대조군에서의 뿌리 성장 길이 또는 뿌리 길이 성장률과 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 물질

을 포함하는 미지의 원수의 경우 회석률로 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.

[0039] $TU = 100/\text{반수 유효 농도}(\%)$

[0040] 본 발명에 따른 수질 독성 평가 방법의 용도

[0041] 본 발명의 수질 독성 평가 방법으로 진단 가능한 독성 물질은 은(Ag; Silver), 알루미늄, 비소(As; Arsenic), 카드뮴(Cd; Cadmium), 코발트(Co; Cobalt), 크롬(Cr; Chromium), 구리(Cu; Copper), 철, 수은(Hg; Mercury), 니켈(Ni; Nickel), 납, 및 아연 등과 같은 중금속 류가 있다.

[0042] 본 발명의 수질 독성 평가 방법은 하수 및 폐수 오니를 투척하기 전에 생태계에 부정적인 영향을 끼치지 않도록 하기 위해서 취해야할 오니 회석 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.

[0043] 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 상추 씨앗; 수체 샘플 및 상추 씨앗을 투입하고 상추 씨앗을 배양하기 위한 배양기로서 적어도 6개 이상의 웰을 가지는 배양기; 및 수체 샘플을 회석하기 회석수; 를 포함한다. 또한, 본 발명에 따른 수질 독성 평가 키트는 은(Ag; Silver), 알루미늄, 비소(As; Arsenic), 카드뮴(Cd; Cadmium), 코발트(Co; Cobalt), 크롬(Cr; Chromium), 구리(Cu; Copper), 철, 수은(Hg; Mercury), 니켈(Ni; Nickel), 납, 및 아연으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나의 금속류 독성물질을 회석수에 용해시켜 제조한 표준 독성 물질 용액을 더 포함할 수 있는데, 표준 독성 물질 용액은 수체 샘플의 수질 독성을 평가하기 전에 상추 씨앗의 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 상추 씨앗의 뿌리 생장 길이 또는 뿌리 길이 생장률에 대한 데이터를 미리 확보하여 수질 독성 평가 키트와 함께 제공할 수 있다. 사용자는 구리 용액에 대한 상추 씨앗의 뿌리 생장 길이 또는 뿌리 길이 생장률을 측정하고 이를 미리 제공하는 데이터와 비교하여 상추 씨앗이 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.

[0044] 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.

[0045] 1. 상추씨의 최적 배양 조건 확립

[0046] 일반 화원, 종묘상에서 상품화되어 팔고 있는 유효기간이 2~3년인 상추 씨앗을 구입하였고 배양액으로 증류수를 사용하였다.

[0047] 6웰 평판 배양기의 각 웰에 배양액을 넣고 여기에 상추 씨앗을 투입한 후 다양한 광 조사량, 배양액의 pH, 배양액의 염분 농도 및 배양 온도 조건하에서 배양하였다. 48시간 배양이 끝난 후 상추 씨앗을 슬라이드 글라스에 올려놓고 영상분석장치(Visus image analysis, Ista-Video Test. Ltd., Russia)와 Motic image 프로그램을 사용하여 상추 씨앗의 뿌리 생장 길이를 측정하였다.

[0048] 도 5는 다양한 배양 조건에서의 상추 씨앗의 뿌리 생장 길이를 나타낸 것이다. 최적 배양 조건을 살펴보면, 배양액은 염분 농도가 0~5%, pH는 5~9, 바람직하게는 6~9 이었고, 배양 조건은 광 조사량이 0~150 $\mu\text{mol photon}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$, 바람직하게는 10~150 $\mu\text{mol photon}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ 이었고, 배양 온도는 15~25℃, 바람직하게는 20~25℃이었다.

[0049] **2. 단일 금속류 독성 물질 용액의 수질 독성 평가**

[0050] (1) 단일 금속류 독성 물질 용액의 준비

[0051] 단일 금속류 독성 물질로 증류수에 은(Ag; Silver), 알루미늄, 비소(As; Arsenic), 카드뮴(Cd; Cadmium), 코발트(Co; Cobalt), 크롬(Cr; Chromium), 구리(Cu; Copper), 철, 수은(Hg; Mercury), 니켈(Ni; Nickel), 납, 및 아연 에 카드뮴, 구리, 납 및 아연 모액을 첨가하고, 단일 금속류 독성 물질을 포함하는 원수를 제조하고, 원수를 반수 희석법으로 희석하여 초기 농도의 50%, 25%, 12.5%, 6.25%로 희석된 독성 물질 희석 원수를 제조하여 이들의 수질 독성을 평가하였다. 대조군 용액으로는 증류수를 사용하였다. 원수, 희석 원수, 대조군의 염분 농도는 0 ‰ 이었고, pH는 7.0으로 조정되었다.

[0052] (2) 상추 씨앗의 배양

[0053] 6웰 평판 배양기에 원수, 희석원수 및 대조군을 넣고 여기에 상추 씨앗을 넣은 후 48 시간 동안 배양하였다. 이때 배양 조건은 광 조사량이 $0 \mu\text{mol photon/m}^2 \cdot \text{s}$ (암 배양) 있었고 온도는 20℃이었다.

[0054] (3) 상추 씨앗의 뿌리 성장 길이 및 뿌리 길이 성장률의 측정

[0055] 48시간 배양이 끝난 후 상추 씨앗을 슬라이드 글라스에 올려놓고 영상분석장치 (Visus image analysis, Ista-Video Test. Ltd., Russia)와 Motic image 프로그램을 사용하여 상추 씨앗의 뿌리 성장 길이를 측정하였다.

[0056] 도 6은 단일 독성 물질로서 구리(Cu)를 포함하는 독성 수용액(초기 구리 농도는 1 mg/L임)과 이를 반수 희석법으로 희석한 독성 수용액에 의해 48시간 배양된 상추 씨앗의 뿌리 성장 특성을 현미경으로 관찰한 영상이다(배양 조건은 20℃, 암 상태). 도 7은 금속류의 독성 물질 농도에 따른 상추 씨앗의 뿌리 길이 성장율을 나타낸 그래프이다.

[0057] 도 6 내지 도 7에 도시된 결과로부터 선형보간법(linear interpolation method) 등의 다양한 통계 기법을 통해 독성 물질의 반수 유효 농도(EC₅₀) 내지 무영향 농도(NOEC)를 계산할 수 있다.

[0058] 상기의 실시예에서는 비록 성분과 농도가 특정된 독성 물질에 의한 수질 독성을 평가하였으나, 미지의 독성 물질을 포함하는 수체 샘플에 변형되어 실시될 수 있고, 그때의 EC₅₀ 값이나, NOEC 값을 통해 미지의 독성 물질이 수질에 미치는 영향을 파악할 수 있음은 본 발명의 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게는 자명하다 할 것이다.

부호의 설명

[0059] 도 7에서 세로축의 % control은 수학적 1에 의해 계산된 뿌리 길이 성장률을 나타낸다.

도면

도면1



도면2



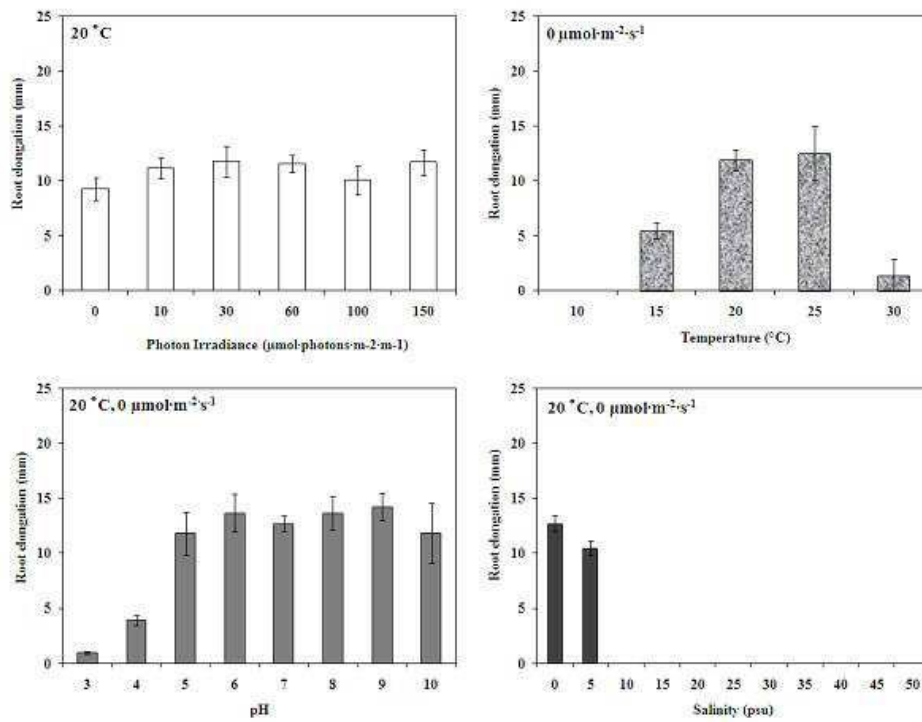
도면3



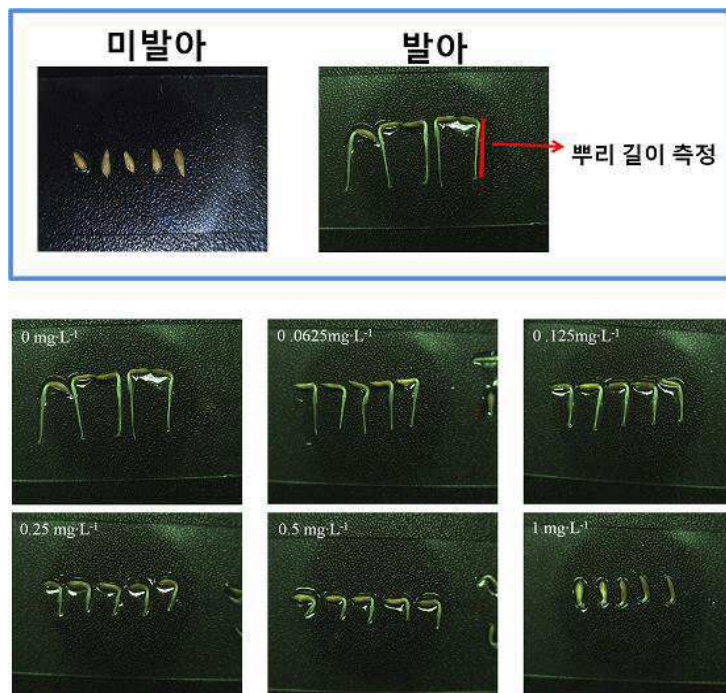
도면4



도면5



도면6



도면7

