

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2011-0019065 (43) 공개일자 2011년02월25일
(51) Int. Cl. <i>G01N 33/18</i> (2006.01) <i>C12Q 1/02</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2009-0076636 (22) 출원일자 2009년08월19일 심사청구일자 2009년08월19일	(71) 출원인 인천대학교 산학협력단 인천광역시 연수구 송도동 12-1, 11, 12번지 (72) 발명자 한대준 인천광역시 연수구 송도동 9-31 웰카운티아파트 102동 1001호 공정애 인천광역시 연수구 송도동 3-40 풍림아이원아파트 608동 601호 (74) 대리인 특허법인우인	

전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 다시마목에 속하는 해조류 포자의 발아율을 이용한 수질 독성 평가 방법 및 수질 독성 평가 키트

(57) 요약

본 발명은 다시마목에 속하는 해조류 포자의 독성 물질에 대한 반응성을 이용한 수질 독성 평가 방법에 관한 것으로서, 본 발명의 수질 독성 평가 방법은 측정용 용기에 수체 샘플을 넣는 단계; 수체 샘플을 함유하는 측정용 용기에 다시마목에 속하는 해조류의 포자를 투입하는 단계; 측정용 용기에 투입된 포자를 배양하는 단계; 및 배양된 포자의 발아율을 측정하는 단계 또는 배양된 포자 중에서 발아된 포자의 발아관 성장속도를 측정하는 단계를 포함한다.

본 발명에 따른 다시마목에 속하는 해조류 포자의 독성 물질에 대한 반응성을 이용한 수질 독성 평가 방법은 24 시간 만에 수질 독성을 신속히 평가할 수 있고, 염소를 포함하거나 높은 염분 농도를 가진 수체 샘플의 독성 물질을 유효하게 측정할 수 있다. 특히, 수질 독성의 평가 기준으로 포자의 발아관 성장속도를 이용하는 경우 포자의 발아율을 이용하는 경우보다 독성 물질에 대한 반응 감응성을 향상시킬 수 있다. 또한, 파래는 아직까지 장기 보관법이 개발되지 않은 단계라 현재 14개월 이상 시험생물의 보관이 가능한 다시마 기법이 생태 독성 진단기법으로서 뿐만 아니라 키트화 하는 과정에서 매우 진보적인 기술이라고 할 수 있다.

대표도 - 도3



특허청구의 범위

청구항 1

측정용 용기에 수채 샘플을 넣는 단계;
수채 샘플을 함유하는 측정용 용기에 다시마목에 속하는 해조류의 포자를 투입하는 단계;
측정용 용기에 투입된 포자를 배양하는 단계; 및
배양된 포자의 발아율을 측정하는 단계;를 포함하는 수질 독성 평가 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 배양된 포자의 발아율은 배양된 포자 수에 대한 발아된 포자 수의 비로 계산되는 것을 특징으로 하는 수질 독성 평가 방법

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 발아된 포자 수는 빛을 집광하기 위한 콘덴서(Condenser)가 구비된 현미경을 이용하여 측정되는 것을 특징으로 하는 수질 독성 평가 방법.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 발아된 포자 수는 현미경의 콘덴서를 조절하여 배양된 포자 영상의 명도를 낮게 변환시켜 측정하는 것을 특징으로 하는 수질 독성 평가 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 측정용 용기에 수채 샘플을 넣는 단계에서의 수채 샘플은 25~45%의 염분 농도로 조정되는 것을 특징으로 하는 수질 독성 평가 방법.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 25~45%의 염분 농도로 조정된 수채 샘플은 25~45%의 염분 농도를 가진 인공 염수로 희석되어 적어도 5가지 이상의 농도로 구배화되는 것을 특징으로 하는 수질 독성 평가 방법.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 측정용 용기에 투입된 포자를 배양하는 단계는 암 상태에서 10~20℃의 온도로 배양하는 것을 특징으로 하는 수질 독성 평가 방법.

청구항 8

제 1항 내지 제 7항 중 어느 한 항에 있어서, 다시마과에 속하는 해조류는 감태(*Ecklonia cava*), 개다시마(*Kjellmaniella crassifolia*), 곰피(*Ecklonia stolonifera*), 미역(*Undaria pinnatifida*), 및 참다시마(*Laminaria japonica*)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 수질 독성 평가 방법.

청구항 9

다시마목에 속하는 해조류의 포자;

수체 샘플 및 해조류의 포자를 투입하고 해조류의 포자를 배양하기 위한 측정용 용기; 및

수체 샘플을 희석하기 위한 25~45%의 염분 농도를 가진 인공 염수;를 포함하는 수질 독성 평가 키트.

청구항 10

제 9항에 있어서, 카드뮴(Cd; Cadmium), 코발트(Co; Cobalt), 크롬(Cr; Chromium), 구리(Cu; Copper), 수은(Hg; Mercury), 니켈(Ni; Nickel), 납(Pb; Lead), 아연(Zn; Zinc), 아세톤(acetone), 클로로포름(Chloroform), 디메틸황산화물(DMSO; Dimethyl sulfoxide), 에틸알코올(Ethyl alcohol), 포르말린(formaldehyde), 메틸알코올(methanol), 및 페놀(Phenol)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 독성 물질을 25~45%의 염분 농도를 가진 인공 염수에 용해시켜 제조한 표준 독성 물질 용액을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 수질 독성 평가 키트.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 다시마목에 속하는 해조류 포자의 독성 물질에 대한 반응성을 이용한 수질 독성 평가 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 다시마목에 속하는 해조류 포자의 발아율 또는 발아관 성장속도를 이용한 수질 독성 평가 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 다시마목에 속하는 해조류 포자를 포함하는 수질 독성 평가 키트에 관한 것이다

배경기술

[0002] 최근, 환경문제의 하나로 거론되고 있는 수질 오염 문제를 개선하기 위한 방법으로, 수질을 개선하는 방법과 함께 하천 등지에서의 유해물질 누출 사고를 감시하는 방법에 대한 관심이 높아지고 있다.

[0003] 종래의 수계에 유입될 수 있는 독성 물질을 검출하는 방법으로 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), ICP-MS(inductively coupled plasma-mass spectroscopy) 등 고가의 분석장비와 고도로 숙련된 분석요원을 필요로 하며, 각각의 독성 물질에 따라 별도의 분석을 수행하여야 하는 문제가 있다. 또한 분석시간이 길고, 유입 독성 물질의 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] 이러한 단점으로 인하여 생물을 독성 물질의 바이오마커로 이용하는 생물학적인 방법이 등장하였는데, 생물학적인 방법으로는 박테리아 등의 미생물 대사 또는 효소를 이용하는 방법, 또는 어패류, 무척추 동물, 미세조류(microalgae) 또는 원생동물 등 진핵생물을 이용하는 방법이 있다. 미생물을 이용한 독성 조사 방법은 성장저해, 산소 소모율, 콜론(colony) 생성율, ATP 농도, 효소 활성도, 치사율(또는 생존율) 또는 생체 발광성 등을 측정하는 방법이다.

[0005] 일반적으로 어류나 무척추 동물을 이용하는 경우에는 치사율, 움직임의 저해, 생물학적 특성 분석으로 판단하며, 미세조류를 이용하는 경우에는 성장저해로 측정한다. 물벼룩류(Daphnia)인 *Daphnia magna*와 *Ceriodaphnia dubia* 등은 환경 독성 물질에 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 방법은 측정자의 전문성과 고가의 기기가 요구되며, 독성 물질에 따라 민감도에 차이가 많으며, 특히 실험생물을 배양하는 기반기술을 갖추지 않은 경우 생물의 사멸에 따른 대처방안이 모호하다는 문제점이 있다. 또한, 물벼룩은 염소에 매우 약해서, 염소를 미량으로 포함하는 방류수에 서도 모두 사멸하고, 이로 인해 염소의 독성을 판별할 수 없는 심각한 문제를 안고 있다.

[0006] 한편, 대한민국 등록특허 제10-0653100호 및 제10-0653101호는 파래의 포자 형성물을 이용하여 수질 독성을 평가하는 방법을 개시하고 있는데, 유의성 있는 파래의 포자 형성물을 판단하기 위해서는 적어도 96시간 이상 배양하여야 하므로, 수질 독성을 신속하게 판별하는데 한계가 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0007] 본 발명은 종래의 문제점을 해결하기 위한 것으로서, 본 발명의 일 목적은 염소를 포함하는 수체 샘플에 대해 안정적인 반응 민감성을 가지고, 높은 염분 농도를 가진 수체 샘플에서도 독성 물질에 대한 반응 민감성이 크며, 판별시간이 매우 짧은 수질 독성 평가 방법을 제공하는데에 있다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 금속 독성 물질 또는 휘발성 유기 화합물 독성 물질에 대해 향상된 반응 민감성을 가진 수질 독성 평가 방법을 제공하는데에 있다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명에 따른 수질 독성 평가 방법을 구현할 수 있는 수질 독성 평가 키트를 제공하는데에 있다.

과제 해결수단

[0010] 본 발명의 일 목적은 측정용 용기에 수체 샘플을 넣는 단계; 수체 샘플을 함유하는 측정용 용기에 다시마목에 속하는 해조류의 포자를 투입하는 단계; 측정용 용기에 투입된 포자를 배양하는 단계; 및 배양된 포자의 발아율을 측정하는 단계;를 포함하는 수질 독성 평가 방법을 제공함으로써 달성될 수 있고, 본 발명의 다른 목적은 측정용 용기에 수체 샘플을 넣는 단계; 수체 샘플을 함유하는 측정용 용기에 다시마목에 속하는 해조류의 포자를 투입하는 단계; 측정용 용기에 투입된 포자를 배양하는 단계; 및 배양된 포자 중에서 발아된 포자의 발아관 성장속도를 측정하는 단계;를 포함하는 수질 독성 평가 방법을 제공함으로써 달성될 수 있다.

[0011] 배양된 포자의 발아율은 배양된 포자 수에 대한 발아된 포자 수의 비로 계산되고, 발아된 포자의 발아관 성장속도는 발아된 포자의 발아관 평균 길이로 계산된다. 발아된 포자 수 또는 발아된 포자의 발아관 평균 길이는 빛을 집광하기 위한 콘덴서(Condenser)가 구비된 현미경을 이용하여 측정되는데, 현미경의 콘덴서를 조절하여 배양된 포자 영상의 명도를 낮게 변환시키면(구체적으로 포자의 이미지를 흰색에 가까운 색에서 검은색에 가까운 색으로 변환시키면) 쉽게 측정할 수 있다. 또한, 포자는 광 조사량에 상관없이 배양될 수 있고, 암 상태에서 10~20℃의 온도로 배양되는 것을 특징으로 한다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 다시마목에 속하는 해조류의 포자; 수체 샘플 및 해조류의 포자를 투입하고 해조류의 포자를 배양하기 위한 측정용 용기; 및 수체 샘플을 희석하기 위한 25~45%의 염분 농도를 가진 인공 염수;를 포함하는 수질 독성 평가 키트를 제공함으로써 달성될 수 있다. 본 발명에 따른 수질 독성 평가 키트는 단일 독성 물질을 25~45%의 염분 농도를 가진 인공 염수에 용해시켜 제조한 표준 독성 물질 용액을 더 포함할 수 있는데, 표준 독성 물질 용액은 수체 샘플의 수질 독성을 평가하기 전에 포자의 상태, 즉 독성 물질에 대한 반응 감응성 여부를 테스트하는데 이용될 수 있다.

효 과

[0013] 본 발명에 따른 다시마목에 속하는 해조류 포자의 독성 물질에 대한 반응성을 이용한 수질 독성 평가 방법은 포자의 발아가 24시간 만에 이루어지므로, 기존의 파래 포자의 형성물을 이용한 수질 독성 평가 방법에 비해 수질 독성을 신속히 평가할 수 있다. 아울러, 다시마목에 속하는 해조류의 포자는 물벼룩에 비해 독성 물질인 염소에 대한 안정성 및 반응 감응성이 뛰어나므로, 수질 평가 기준으로 다시마목에 속하는 해조류 포자의 발아율 또는 발아관 성장속도를 이용하는 경우 신뢰성 있고 정확한 수질 독성을 평가할 수 있다. 특히, 수질 독성 평가 기준으로 포자의 발아관 성장속도를 이용하는 경우 포자의 발아율을 이용하는 경우보다 독성 물질에 대한 반응 감응성을 향상시킬 수 있다. 시험생물의 장기보관 및 대량배양 그리고 제공의 항상성 등이 생태 독성 기법의 수준을 결정한다는 입장에서 볼 때 아직까지 장기보관법이 개발되지 않은 파래기법에 비하여 현재 14개월 이상 시험생물의 보관이 가능한 다시마 기법이 생태 독성 진단 기법으로서 뿐만 아니라 키트화 하는 과정에서 매우 진보적인 기술이라고 할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0014] 본 발명의 일 측면은 염소를 포함하는 수체 샘플에 대해 안정적인 반응 민감성을 가지고, 높은 염분 농도를 가진 수체 샘플에서도 독성 물질에 대한 반응 민감성이 크며, 판별시간이 매우 짧은 수질 독성 평가 방법에 관한 것으로서, 본 발명의 일 측면에 따른 수질 독성 평가 방법은 측정용 용기에 수체 샘플을 넣는 단계; 수체 샘플을 함유하는 측정용 용기에 다시마목에 속하는 해조류의 포자를 투입하는 단계; 측정용 용기에 투입된 포자를 배양하는 단계; 및 배양된 포자의 발아율을 측정하는 단계;를 포함한다. 또한, 본 발명의 다른 측면은 금속 독성 물질 또는 휘발성 유기 화합물 독성 물질에 대해 향상된 반응 민감성을 가진 수질 독성 평가 방법에 관한 것으로서, 본 발명의 다른 측면에 따른 수질 독성 평가 방법은 측정용 용기에 수체 샘플을 넣는 단계; 수체 샘플을 함유하는 측정용 용기에 다시마목에 속하는 해조류의 포자를 투입하는 단계; 측정용 용기에 투입된 포자를 배양하는 단계; 및 배양된 포자 중에서 발아된 포자의 발아관 성장속도를 측정하는 단계;를 포함한다. 이하, 본 발명에 따른 수질 독성 평가 방법을 구성요소별로 나누어 설명한다.

[0015] 수체 샘플

[0016] 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. 수체 샘플이 을 포함한다. 수체 샘플은 측정용 용기에 넣어지기 전에 다시마목에 속하는 해조류 포자의 원활한 배양을 위한 염분 농도인 15~55‰, 바람직하게는 25~45‰ 범위의 염분 농도를 가지도록 조정되는데, 일반적으로 해수로부터 채취한 수체 샘플은 상기의 염분 농도를 만족하므로 조정이 필요하지 않으나, 담수의 경우 염분 농도의 조정이 필요하다.

[0017] 최초의 수체 샘플(이하, 원수)은 15~55‰, 바람직하게는 25~45‰ 범위의 염분 농도로 가지도록 조정된 후 15~55‰, 바람직하게는 25~45‰ 범위의 염분 농도를 가진 인공 염수로 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 염수는 15~55‰, 바람직하게는 25~45‰ 범위의 염분 농도를 가지는 것이라면 크게 제한되지 않으며, 원수의 조정된 염분 농도와 동일한 염분 농도를 가지는 경우 원수를 쉽게 희석할 수 있다. 상기의 원수와 희석된 수체 샘플은 측정용 용기에 넣어지기 전에 다시마목에 속하는 해조류 포자의 원활한 배양을 위해 5~9, 바람직하게는 6~9의 pH를 가진다.

[0018] 본 발명에 있어서, 염분 농도가 조정된 원수 외에 희석된 4가지 이상의 수체 샘플을 배양액으로 하여 다시마목에 속하는 해조류 포자를 배양하는 경우 원수의 희석 농도에 따른 포자의 발아율 내지 성장속도를 구할 수 있고, 이를 기초로 수체 샘플의 수질 독성을 평가하는 경우보다 정확한 반수 유효 농도(포자의 발아율 내지 성장속도를 독성 물질을 포함하지 않는 대조군에서의 포자의 발아율 내지 성장속도보다 50% 감소시키는데 효과적인 농도로서 단일 독성 물질의 경우 특정 농도로 표시되고 미지의 원수의 경우 희석률로 표시됨; Half maximal effective concentration, EC₅₀) 내지 무영향 농도(포자의 발아율 내지 성장속도를 독성 물질을 포함하지 않는 대조군에서의 포자의 발아율 내지 성장속도와 유의적 차이가 없는 수준으로 유지시키는데 효과적인 농도로서 단일 독성 물질의 경우 특정 농도로 표시되고 미지의 원수의 경우 희석률로 표시됨; No Observed Effect Concentration, NOEC)를 평가할 수 있다.

[0019] 측정용 용기

[0020] 측정용 용기는 수체 샘플 및 해조류의 포자를 포함하고, 해조류의 포자를 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 바람직하는데, 1개의 웰에는 대조군으로서 독성 물질을 포함하지 않는 인공 염수를 넣고 포자를 배양하고, 나머지 5개의 웰에는 원수와 원수가 희석된 4개의 수체 샘플을 넣고 포자를 배양한다.

[0021] 다시마목에 속하는 해조류의 포자

[0022] 본 발명은 수질 독성의 평가를 위한 바이오마커로서 다시마목에 속하는 해조류의 포자를 이용하고, 보다 구체적으로 상기 포자의 발아율 내지 발아된 포자의 성장속도를 수질 독성의 평가 기준으로 사용한다. 다시마목에 속

하는 해조류 포자의 독성 물질에 대한 반응성을 이용한 수질 독성 평가 방법은 포자의 발아가 24시간 만에 이루어지므로, 기존의 파래 포자의 형성률을 이용한 수질 독성 평가 방법(파래 포자의 형성을 위해 최소한 96시간을 필요로 함)에 비해 수질 독성을 신속히 평가할 수 있다. 또한, 물벼룩을 바이오마커로 이용하는 다프니아법(Daphnia method)은 물벼룩이 미량의 염소를 포함하는 수체 샘플에서도 모두 사멸하므로 염소 독성을 평가할 수 없는 단점을 가지는 반면, 다시마과에 속하는 해조류의 포자는 독성 물질인 염소에 대한 안정성 및 반응 감응성이 뛰어나므로 본 발명에 따른 수질 독성 평가 방법은 염소 독성을 정확하게 평가할 수 있다. 특히, 수질 독성 평가 기준으로 발아된 포자의 발아관 생장속도를 이용하는 경우 포자의 발아율을 이용하는 경우보다 독성 물질에 대한 반응 감응성을 크게 향상시킬 수 있다.

[0023] 이하, 본 발명에 따른 다시마과에 속하는 해조류의 생활사와 파래의 생활사를 비교하여 본 발명의 특징을 보다 명확하게 설명한다.

[0024] (1) 파래의 생활사 및 이를 이용한 수질 독성 평가 방법

[0025] 파래의 생활사는 "① 포자체(파래)의 가장자리에서 포자형성(무성생식) 및 포자방출 ⇒ ② 방출된 포자가 배우체로 성장하고 배우체 가장자리에서 배우자 형성(유성생식) ⇒ ③ 암수배우자가 접합하여 접합자를 형성하고 접합자가 성장하여 포자체(파래) 형성"과 같은 단계를 거치는데, 파래의 포자 형성률을 이용한 기존의 수질 독성 평가 방법은 상기의 ① 단계를 이용한다. 보다 구체적으로 파래는 오염되지 않은 환경에서는 ① 단계의 생식(포자의 형성 및 방출)이 진행되어 잎이라 불리는 엽체의 색상 변화가 나타나는데, 처음에 연한 녹색을 띤 엽체가 생식(무성생식)이 시작되면서 진한 갈색(dark olive)으로 변하고 최종적으로 포자가 백색으로 바뀐다. 그러나, 오염되거나 또는 독성원이 함유된 수질에서는 생식력이 떨어져 그 색상 변화의 정도가 떨어진다. 이러한 원리에 근거하여 파래 잎을 독성원에 노출시킨 후에 잎(엽체)을 직접 육안 관찰하거나 또는 카메라로 이미지를 캡처하고, 여기에 눈금 돋보기를 이용하여 백색으로 색상 변화를 나타낸 엽체의 면적을 측정하여, 독성원이 포함되지 않은 대조군에서 나타난 백색 엽체의 면적과 비교하여 독성원의 독성 정도를 표시한다. 이때 파래의 포자 형성 및 방출을 위해서는 최소한 96시간이 필요하다.

[0026] (2) 다시마과에 속하는 해조류의 생활사

[0027] 다시마과에 속하는 해조류의 생활사는 "① 포자체(다시마)에 만들어진 자낭반에서 포자를 방출 ⇒ ② 방출된 포자가 배우체로 성장(발아 후 성장) ⇒ ③ 암수배우체로 각각 발달하여 암배우체는 알을 형성하고 수배우체는 배우자를 형성한 뒤 방출되고, 방출된 배우자가 암배우체에 형성된 알과 접합하여 접합자를 형성하고 접합자가 성장하여 포자체(다시마)로 발달"과 같은 단계를 거치는데, 본 발명에 따른 수질 독성 평가 방법은 상기의 ② 단계를 이용하는 것으로서 다시마 생활사에서 포자가 현미경으로만 관찰될 정도로 아주 작은 크기를 보이는 시기인 포자의 발아 및 성장 시기를 측정 파라미터 또는 종말점(End point)으로 사용한다. 다시마과에 속하는 해조류 포자의 발아 및 발아관의 생장은 약 24시간 만에 이루어지므로, 본 발명에 따른 수질 독성 평가 방법을 이용하는 경우 파래의 포자 형성 및 방출을 이용한 수질 독성 평가 방법을 이용하는 경우에 비해 수질 독성을 신속하게 평가할 수 있다.

[0028] 본 발명에 따른 수질 독성 평가 방법에 이용할 수 있는 해조류는 다시마과에 속하는 해조류의 생활사와 동일한 생활사를 가진 것이라면 크게 제한되지 않으며, 구체적으로 감태(*Ecklonia cava*), 개다시마(*Kjellmaniella crassifolia*), 곶피(*Ecklonia stolonifera*), 미역(*Undaria pinnatifida*), 또는 참다시마(*Laminaria japonica*)를 포함한다.

[0029] 포자의 배양

[0030] 다시마과에 속하는 해조류, 보다 구체적으로 참다시마(*Laminaria japonica*)의 포자는 암 상태에서 배양되는 것을 특징으로 한다. 파래를 포함한 일반적인 해조류는 배양되기 위해 적정의 광 조사량을 필요로 하는데, 본 발명에 따른 다시마과에 속하는 해조류 포자는 광 조사량의 유무에 관계없이 발아 및 발아관의 생장이 원활하게 이루어지므로, 배양 단계에서 광 조사량을 신경 쓸 필요가 없다.

[0031] 다시마과에 속하는 해조류 포자의 발아 및 발아관 성장을 위한 배양 온도는 5~25℃, 바람직하게는 10~20℃의 범위를 가진다. 특히, 발아관 성장을 위한 배양 온도는 보다 바람직하게는 15~20℃의 범위를 가진다.

[0032] 다시마과에 속하는 해조류 포자의 발아 및 발아관 성장을 위한 배양액의 pH는 5~9, 바람직하게는 6~9의 범위를 가진다. 또한, 배양액의 염분 농도는 15~55‰, 바람직하게는 25~45‰ 범위를 가진다. 특히, 발아관 성장을 위한

배양액의 pH는 보다 바람직하게는 35~45% 범위를 가진다.

[0033] 포자의 발아율 및 발아된 포자의 성장속도 측정

[0034] 다시마과에 속하는 성체 해조류로부터 방출된 포자는 운동성을 잃고 기질에 부착하게 되며, 그 후 포자의 일부 분에서 관이 형성되는데 이를 발아관(Germ tube)이라고 한다. 발아관은 길이 성장을 하고, 이 관을 따라 세포질이 발아관 끝으로 이동한다. 이때 포자에서 관이 형성되었을 때를 "발아(Germination)"라고 정의하고 관이 형성되어 있지 않으면 발아되지 않은 것으로 판단한다.

[0035] 다시마과에 속하는 해조류로의 포자를 약 24시간 배양하면, 포자의 발아 및 발아관의 생장이 이루어지고, 배양된 포자의 발아율은 배양된 포자 수에 대한 발아된 포자 수의 비로 계산되고, 발아된 포자의 발아관 성장속도는 발아된 포자의 발아관 평균 길이로 계산되는데, 상기의 계산 값을 독성 물질을 포함하지 않는 대조군에서 배양된 포자의 발아율 또는 발아관 평균 길이와 비교하여 수체 샘플의 독성을 평가할 수 있다. 이때 발아된 포자 수 또는 발아된 포자의 발아관 평균 길이는 영상 분석 장치를 이용하여 측정된다. 상기 영상 분석 장치는 빛을 집광하기 위한 콘덴서(Condenser)가 구비된 현미경인 것이 바람직한데, 현미경의 콘덴서를 조절하여 배양된 포자 영상의 명도를 낮게 변환시키는 경우(구체적으로 배양된 포자의 영상을 흰색에 가까운 색에서 검은색에 가까운 색으로 변환시키면) 쉽게 발아된 포자 수 또는 발아된 포자의 발아관 평균 길이를 측정할 수 있다.

[0036] 도 1은 배양되기 전의 다시마 포자의 영상과 독성 물질을 포함하지 않는 해수에 24시간 배양된 포자의 영상을 현미경의 콘덴서를 조절하기 전과 조절 후로 나타낸 것이다. 도 1에서 보이는 바와 같이 다시마 포자는 오염되지 않는 환경에서는 발아가 24시간 만에 신속하게 진행되어 형태 변화를 나타내는데, 구체적으로 원형의 포자에서 25 μ m 정도 길이의 실모양 형태를 가진 발아관이 형성된다. 그러나 독성 물질 등으로 오염된 환경에서는 발아 능력이 떨어지고 발아관 성장속도(발아관 길이)도 떨어진다. 한편, 다시마의 포자가 발아하면 흰색에 가까운 발아관을 형성하게 되고 현미경의 콘덴서를 조절하지 않는 경우 흰색에 가까운 영상으로 표시되어 포자의 발아 여부 및 발아관 길이를 관찰하는데 어려움이 발생할 수 있다. 이 경우 현미경의 콘덴서를 조절하여 배양된 포자의 영상을 흰색에 가까운 색에서 검은색에 가까운 색으로 변환시키면 쉽게 포자의 발아 여부 및 발아관 길이를 관찰할 수 있다.

[0037] 수질 독성의 평가

[0038] 수체 샘플의 수질 독성은 원수와 희석된 수체 샘플에서 배양된 포자의 발아율 또는 발아된 포자의 발아관 성장속도를 독성 물질을 포함하지 않는 대조군에서 배양된 포자의 발아율 또는 발아관 평균 길이와 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 포자의 발아관 성장속도를 이용하는 경우 포자의 발아율을 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 포자의 발아율 내지 성장속도를 독성 물질을 포함하지 않는 대조군에서의 포자의 발아율 내지 성장속도보다 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 포자의 발아율 내지 성장속도를 독성 물질을 포함하지 않는 대조군에서의 포자의 발아율 내지 성장속도와 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, 수질 독성 평가 방법의 결과가 반수 유효 농도로 표시되는 경우 반수 유효 농도의 크기와 커질수록 실제 수체 샘플의 독성은 작아지는 문제점이 발생하고, 이를 해결하기 위해 독성 단위(Toxic Unit, TU)를 다음과 같이 표시할 수 있다.

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

[0041] 도 2는 단일 독성 물질로서 구리(Cu)를 포함하는 독성 용액(초기 구리 농도는 0.4 mg/L임)과 이를 반수 희석법으로 희석한 독성 용액에 다시마의 포자를 24시간 배양 시킨 후(배양 조건은 35 %의 배양액, 15℃, 암 상태) 현미경으로 관찰한 영상을 나타낸 것이다. 도 2를 통해 단일 독성 물질을 포함하는 수체 샘플의 반수 유효 농도

내지 무영향 농도를 평가하는 방법을 설명하면 다음과 같다. 포자의 발아율을 수질 독성 평가의 기준으로 하는 경우 대조군(구리 농도가 0 mg/L), 초기 독성 용액, 희석된 4개의 독성 용액에서의 배양된 포자 수 및 발아된 포자 수를 각각 측정하고, 배양된 포자 수를 발아된 포자 수로 나눈 값의 백분율을 각 독성 용액에서의 발아율로 간주한다. 이때 일반적으로 대조군의 경우 발아율은 100%이다. 이후 각 독성 용액에서의 발아율 값과 대조군에서의 발아율 값을 통계 처리하여 대조군의 발아율 대비 50%의 발아율을 가지는 독성 용액의 구리 농도 값을 반수 유효 농도로 간주하고, 대조군의 발아율과 통계적으로 유의적 차이가 없는 발아율을 가지는 독성 용액의 최대 구리 농도 값을 무영향 농도로 간주한다. 한편, 발아된 포자의 생장속도를 수질 독성 평가의 기준으로 하는 경우, 대조군 및 각 독성 용액에서 배양된 포자 중 동일한 개수의 발아된 포자를 모집단으로 추출하고, 발아된 포자 수 대신 상기 모집단으로 추출된 발아 포자의 발아관 평균 길이를 측정하고 독성 용액에서의 발아관 평균 길이와 대조군에서의 평균 길이를 통계 처리하여 대조군의 평균 길이 대비 50%의 평균 길이를 가지는 독성 용액의 구리 농도 값을 반수 유효 농도로 간주하고, 대조군의 평균 길이와 통계적으로 유의적 차이가 없는 평균 길이를 가지는 독성 용액의 최대 구리 농도 값을 무영향 농도로 간주한다.

[0042] 본 발명에 따른 수질 독성 평가 방법의 용도

[0043] 본 발명의 수질 독성 평가 방법은 수체 샘플, 다시마의 포자, 및 배양기(측정용 용기)를 포함하는 수질 독성 평가 시스템에 의하여 실시될 수 있는데, 도 3에 도시된 바와 같이 배양된 다시마 포자의 모양을 촬영하여 이를 전송하고 분석하여 그 결과를 다시 반송하는 유비쿼터스 시스템(원격조정시스템)에 의해서도 실시될 수 있다. 본 발명의 수질 독성 평가 방법으로 평가할 수 있는 독성 물질로는 카드뮴(Cd; Cadmium), 코발트(Co; Cobalt), 크롬(Cr; Chromium), 구리(Cu; Copper), 수은(Hg; Mercury), 니켈(Ni; Nickel), 납(Pb; Lead), 아연(Zn; Zinc) 등과 같은 금속류의 독성물질, 아세톤(acetone), 클로로포름(Chloroform), 디메틸황산화물(DMSO; Dimethyl sulfoxide), 에틸알코올(Ethyl alcohol), 포르말린(formaldehyde), 메틸알코올(methanol), 페놀(Phenol) 등과 같은 휘발성 유기화합물(Volatile Organic Compound, VOC)류의 독성 물질을 포함한다.

[0044] 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.

[0045] 아울러 다시마는 전 세계적으로 널리 분포하고 있으며 발아과정에 있어서도 모두 유사하기 때문에 자국의 다시마를 이용하여 시스템화 시키기에 용이하며, 우리나라의 주요 양식 종인 다시마를 수질 독성 평가용 식물로 활용함으로써 양식산업 발전에 이바지 할 수 있다.

[0046] 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 다시마목에 속하는 해조류의 포자; 수체 샘플 및 해조류의 포자를 투입하고 해조류의 포자를 배양하기 위한 측정용 용기; 및 수체 샘플을 희석하기 위한 25~45%의 염분 농도를 가진 인공 염수; 를 포함한다. 또한, 본 발명에 따른 수질 독성 평가 키트는 카드뮴(Cd; Cadmium), 코발트(Co; Cobalt), 크롬(Cr; Chromium), 구리(Cu; Copper), 수은(Hg; Mercury), 니켈(Ni; Nickel), 납(Pb; Lead), 아연(Zn; Zinc), 아세톤(acetone), 클로로포름(Chloroform), 디메틸황산화물(DMSO; Dimethyl sulfoxide), 에틸알코올(Ethyl alcohol), 포르말린(formaldehyde), 메틸알코올(methanol), 및 페놀(Phenol)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 독성 물질을 25~45%의 염분 농도를 가진 인공 염수에 용해시켜 제조한 표준 독성 물질 용액을 더 포함할 수 있는데, 표준 독성 물질 용액은 수체 샘플의 수질 독성을 평가하기 전에 포자의 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 포자의 발아율 내지 발아관 평균 길이에 대한 데이터를 미리 확보하여 수질 독성 평가 키트와 함께 제공할 수 있다. 사용자는 구리 용액에 대한 포자의 발아율 내지 발아관 평균 길이를 측정하고 이를 미리 제공하는 데이터와 비교하여 포자가 독성 물질에 대해 정상적으로 반응하는 지 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.

[0047] 본 발명에 따른 수질 독성 평가 키트를 이용하여 다시마목에 속하는 해조류의 포자를 배양한 후, 포자의 발아

여부 및 발아관 평균 길이는 빛을 집광하기 위한 콘덴서(Condenser)가 구비된 현미경을 통해 측정할 수 있다. 아울러 상기 빛을 집광하기 위한 콘덴서(Condenser)가 구비된 현미경은 본 발명에 따른 수질 독성 평가 키트에 포함될 수 있다.

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.

1. 다시마 포자의 발아 및 발아관 성장 유도를 위한 최적 배양 조건 확립

(1) 다시마 포자의 준비

참다시마(*Laminaria japonica*)의 엽체에서 포자엽 부위를 잘라내어 키친타올로 표면에 부착된 착생물들을 닦아낸 다음, 엽체를 해수에 넣어 표면을 다시 한 번 세척하였다. 엽체 표면의 물기를 닦아낸 다음, 암 상태에서 12시간 보관한 후 엽체를 꺼내어 해수가 담긴 비이커에 넣어 운동성 포자의 방출을 유도하였다. 유도된 포자액을 20 ml의 인공 염수(OTT's artificial seawater)가 들어있는 페트리디쉬에 넣어 주었다. 이때 페트리디쉬 바닥에는 커버 글라스를 놓아 부착 기질로 삼았고, 항온 배양기에서 ($10 \pm 0.5^\circ\text{C}$) 암 상태로 1시간 동안 유지 배양하여 포자가 부착된 커버 글라스를 준비하였다.

표 1은 본 발명의 실시예에서 사용된 인공 염수인 OTT's 인공 해수에 포함되는 염의 성분과 그 농도를 나타낸 것으로서, OTT's 인공 해수는 35%의 염분 농도를 가진다.

표 1

염의 성분	농도(g/L)	염의 성분	농도(g/L)
NaCl	21.00	NaNO ₃	0.20
MgSO ₄ ·7H ₂ O	6.00	NaHCO ₃	0.20
MgCl ₂ ·6H ₂ O	5.00	H ₃ BO ₃	0.06
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.00	Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	0.01
KCl	0.80	Sr(NO ₃) ₂	0.03
NaBr	0.10	Na ₂ HPO ₄	0.02

(2) 다시마 포자의 배양

포자가 부착된 커버 글라스를 24웰 플레이트에 넣은 후, 뚜껑을 닫고 배양기에 옮겨 넣고, 다양한 광 조사량, 배양액의 pH, 배양액의 염분 농도 및 배양 온도 조건하에서 24시간 배양하였다. 배양이 끝난 후 영상분석장치(Visus image analysis, Ista-Video Test. Ltd., Russia)를 사용하여 각 커버 글라스에 부착된 포자의 발아율과 발아관 평균 길이를 측정하였다. 도 4는 다양한 배양 조건에서의 다시마 포자의 발아율을 나타낸 것이고, 도 5는 다양한 배양 조건에서의 다시마 포자의 발아관 평균 길이를 나타낸 것이다.

도 4 내지 도 5에 보이는 바와 같이 다시마 포자는 광 조사량의 유무에 관계없이 발아 및 발아관의 생장이 원활하게 이루어졌다. 다시마 포자의 발아 및 발아관 성장을 위한 배양 온도는 $5 \sim 25^\circ\text{C}$, 바람직하게는 $10 \sim 20^\circ\text{C}$ 의 범위이고, 특히, 발아관 성장을 위한 배양 온도는 보다 바람직하게는 $15 \sim 20^\circ\text{C}$ 의 범위를 보였다. 다시마 포자의 발아 및 발아관 성장을 위한 배양액의 pH는 5~9, 바람직하게는 6~9의 범위를 보였다. 또한, 배양액의 염분 농도는 15~55%, 바람직하게는 25~45% 범위이고, 특히, 발아관 성장을 위한 배양액의 pH는 보다 바람직하게는 35~45% 범위를 보였다.

2. 단일 금속류 독성 물질 용액의 수질 독성 평가

(1) 단일 금속류 독성 물질 용액의 준비

단일 금속류 독성 물질로 각각 카드뮴(초기 농도 20 mg/L), 구리(초기 농도 0.4 mg/L), 수은(초기 농도 0.4 mg

/L), 니켈(초기 농도 20 mg/L), 납(초기 농도 20 mg/L), 아연(초기 농도 20 mg/L)을 포함하는 독성 물질 용액(염분 농도는 35%임) 및 OTT's 인공 해수(염분 농도는 35%임)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 OTT's 인공 해수(염분 농도는 35%임)를 사용하였다.

(2) 다시마 포자의 배양

24웰 플레이트(총 2개의 24 웰 플레이트 사용)의 웰에 대조군 용액 및 독성 물질 용액을 넣고, 여기에 참다시마(*Laminaria japonica*)의 포자가 부착된 커버 글라스를 투입한 후 24웰 플레이트를 배양기에 옮겨 넣었다. 이후 암 상태 및 15℃의 온도에서 24시간 배양하였다.

(3) 다시마 포자의 발아율 및 발아관 평균 길이의 측정

영상분석장치(Visus image analysis, Ista-Video Test. Ltd., Russia)를 사용하여 총 500개의 배양된 포자를 선택하고 발아된 포자 수를 계수하여 대조군 용액 및 독성 용액에서의 발아율을 판정하였다. 또한, 발아관의 평균 길이는 발아된 포자 30개를 선택하고 각 포자의 발아관 시작부분부터 발아관 끝까지의 길이를 측정하고 이들의 평균값을 계산하여 판정하였다. 이때, 영상분석장치상의 광학 현미경에 구비된 콘텐서를 조절하여 배양된 포자의 영상을 흰색에서 검은색으로 변경하여 포자의 발아 여부 및 발아관의 길이를 관찰하였다.

도 6은 금속류의 독성 물질 농도에 따른 다시마 포자의 발아율을 나타낸 그래프이고, 도 7은 금속류의 독성 물질 농도에 따른 다시마 포자의 발아관 평균 길이를 나타낸 그래프이다. 도 6 내지 도 7에서 보이는 바와 같이 다시마 포자의 발아율 또는 다시마 포자의 발아관 평균 길이는 일정 범위에서 금속류 독성 물질의 농도와 선형 관계를 나타내었다.

(4) 다시마 포자의 발아율 및 발아관 평균 길이에 의한 단일 금속류 독성 물질의 수질 독성 판단

도 6 내지 도 7에 표시된 다시마 포자의 발아율 및 발아관 평균 길이를 기준으로 단일 금속류 독성 물질의 반수 유효 농도(EC₅₀) 내지 무영향 농도(NOEC)를 계산하고, 그 결과를 토대로 수질 독성 평가 기준을 다시마 포자의 발아율 내지 발아관 평균 길이로 하였을 때의 단일 금속류 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 2는 다시마 포자의 발아율 내지 발아관 평균 길이를 수질 독성 평가 기준으로 하였을 때의 단일 금속류 독성 물질의 반수 유효 농도(EC₅₀) 내지 무영향 농도(NOEC)를 나타낸 것이다.

표 2에서 나타나는 바와 같이 발아관 평균 길이를 수질 독성 평가 기준으로 하였을 때 단일 금속류 독성 물질에 대한 반응 민감성이 발아율을 수질 독성 평가 기준으로 하였을 때보다 약 2배 가량 높았고, 특히 아연에서는 반응 민감성 차이가 매우 현저하였다.

표 2

금속류 독성 물질	발아율 기준		발아관 평균 길이 기준	
	NOEC(mg/L)	EC ₅₀ (mg/L)	NOEC(mg/L)	EC ₅₀ (mg/L)
Cd	2.5	15.052	1.25	7.541
Cu	0.05	0.120	< 0.025	0.081
Hg	0.025	0.041	< 0.025	0.042
Ni	< 1.25	2.009	< 1.25	1.360
Pb	1.25	4.760	< 1.25	4.429
Zn	1.25	6.049	< 0.025	0.078

3. 단일 휘발성 유기화합물류 독성 물질 용액의 수질 독성 평가

[0070]

(1) 단일 휘발성 유기화합물류 독성 물질 용액의 준비

[0071]

단일 휘발성 유기화합물류 독성 물질로 각각 아세톤(초기 농도 80 ml/L), 클로로포름(초기 농도 1 ml/L), 디메틸황산화물(초기 농도 40 ml/L), 에틸알코올(초기 농도 80 ml/L), 메틸알코올(초기 농도 80 ml/L), 페놀(초기 농도 0.25 ml/L)을 포함하는 독성 물질 용액(염분 농도는 35%임) 및 OTT's 인공 해수(염분 농도는 35%임)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 OTT's 인공 해수(염분 농도는 35%임)를 사용하였다.

[0072]

(2) 다시마 포자의 배양

[0073]

24웰 플레이트(총 2개의 24 웰 플레이트 사용)의 웰에 대조군 용액 및 독성 물질 용액을 넣고, 여기에 참다시마(*Laminaria japonica*)의 포자가 부착된 커버 글라스를 투입한 후 24웰 플레이트를 배양기에 옮겨 넣었다. 이후 암 상태 및 15℃의 온도에서 24시간 배양하였다.

[0074]

(3) 다시마 포자의 발아율 및 발아관 평균 길이의 측정

[0075]

영상분석장치(Visus image analysis, Ista-Video Test. Ltd., Russia)를 사용하여 총 500개의 배양된 포자를 선택하고 발아된 포자 수를 계수하여 대조군 용액 및 독성 용액에서의 발아율을 판정하였다. 또한, 발아관의 평균 길이는 발아된 포자 30개를 선택하고 각 포자의 발아관 시작부분부터 발아관 끝까지의 길이를 측정하고 이들의 평균값을 계산하여 판정하였다. 이때, 영상분석장치상의 광학 현미경에 구비된 콘덴서를 조절하여 배양된 포자의 영상을 흰색에서 검은색으로 변경하여 포자의 발아 여부 및 발아관의 길이를 관찰하였다.

[0076]

도 8은 휘발성 유기화합물류의 독성 물질 농도에 따른 다시마 포자의 발아율을 나타낸 그래프이고, 도 9는 휘발성 유기화합물류의 독성 물질 농도에 따른 다시마 포자의 발아관 평균 길이를 나타낸 그래프이다. 도 8 내지 도 9에서 보이는 바와 같이 다시마 포자의 발아율 또는 다시마 포자의 발아관 평균 길이는 일정 범위에서 휘발성 유기화합물류 독성 물질의 농도와 선형 관계를 나타내었다.

[0077]

(4) 다시마 포자의 발아율 및 발아관 평균 길이에 의한 단일 휘발성 유기화합물류 독성 물질의 수질 독성 판단

[0078]

도 8 내지 도 9에 표시된 다시마 포자의 발아율 및 발아관 평균 길이를 기준으로 단일 휘발성 유기화합물류 독성 물질의 반수 유효 농도(EC₅₀) 내지 무영향 농도(NOEC)를 계산하고, 그 결과를 토대로 수질 독성 평가 기준을 다시마 포자의 발아율 내지 발아관 평균 길이로 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 다시마 포자의 발아율 내지 발아관 평균 길이를 수질 독성 평가 기준으로 하였을 때의 단일 휘발성 유기화합물류 독성 물질의 반수 유효 농도(EC₅₀) 내지 무영향 농도(NOEC)를 나타낸 것이다.

[0079]

표 3에서 나타나는 바와 같이 발아관 평균 길이를 수질 독성 평가 기준으로 하였을 때 단일 휘발성 유기화합물류 독성 물질에 대한 반응 민감성이 발아율을 수질 독성 평가 기준으로 하였을 때보다 약 2배 가량 높았다.

표 3

[0080]

유기 화합물류 독성 물질	발아율 기준		발아관 평균 길이 기준	
	NOEC(ml/L)	EC ₅₀ (ml/L)	NOEC(ml/L)	EC ₅₀ (ml/L)
Acetone	< 5	10.402	< 5	6.272
Chloroform	0.125	0.617	< 0.063	0.313
DMSO	2.5	21.705	2.5	11.649
Ethanol	< 5	5.240	< 5	2.974
Methanol	10	22.240	< 5	13.161
Phenol	0.0625	0.187	<0.016	0.081

[0081] **4. 염소를 독성 물질로 함유한 용액의 수질 독성 평가**

[0082] 깨끗한 하천 유입수 및 이를 미량의 염소 소독제로 처리한 방류수의 염분 농도를 35‰로 조정하였다. 이후, 유입수 용액 및 방류수 용액을 배양액으로 하고 단일 금속류 독성 물질 내지 단일 휘발성 유기물류 독성 물질에서와 같은 배양 조건으로 다시마 포자를 배양하였다. 또한, 비교예로 유입수 용액 및 방류수 용액의 수질 독성을 다프니아 법(Daphnia method)을 이용하여 측정하였다. 이때 대조군 용액으로는 독성 물질을 포함하지 않는 OTT's 인공 해수(염분 농도는 35‰임)를 사용하였다. 표 4는 초기 농도의 50%로 희석된 유입수 용액 및 방류수 용액에 배양된 다시마 포자의 발아율, 발아관 평균 길이 및 물벼룩(Daphnia)의 생존율을 대조군 용액에 배양된 다시마 포자의 발아율, 발아관 평균 길이 및 물벼룩(Daphnia)의 생존율로 나눈 백분율 값을 나타낸 것이다.

[0083] 표 4에서 나타나는 바와 같이 물벼룩은 미량의 염소 소독제를 포함하는 방류수에서 모두 사멸하여 물벼룩을 이용한 다프니아 법(Daphnia method)으로는 염소를 독성 물질로 포함하는 용액의 수질 독성을 측정할 수 없음을 알 수 있다. 반면, 다시마 포자는 염소 소독제에 매우 안정하여 본 발명의 수질 독성 평가 방법은 염소를 독성 물질로 포함하는 용액의 수질 독성을 측정하는데 적용될 수 있음을 알 수 있다.

표 4

수체 샘플 구분	물벼룩 생존율(%)	다시마 포자의 발아율 (%)	다시마 발아관 평균 길이 생장률(%)
유입수	100	100	100
방류수	0	100	100

[0085] **5. 파래의 포자 형성률, 다시마 포자의 발아율, 다시마 포자의 발아관 평균 길이를 기준으로 한 높은 염분 농도를 가진 수체 샘플의 수질 독성 평가**

[0086] 초기 염분 농도가 40‰인 산업 폐수 유입수(이하, 유입 원수) 및 이를 정화처리하여 초기 염분 농도가 32‰인 산업 폐수 방류수(이하, 방류 원수)를 준비하였다. OTT's 인공 해수(염분 농도는 35‰임)를 가지고 유입 원수 및 방류 원수를 원수 초기 농도의 50%, 25%, 12.5%, 및 6.25%로 희석하였다. 이후, 원수 및 희석된 원수들을 배양액으로 하여 단일 금속류 독성 물질 내지 단일 휘발성 유기물류 독성 물질에서와 같은 방법으로 다시마 포자를 배양하였다. 또한, 비교예로 원수 및 희석된 원수들을 배양액으로 하여 동전 모양의 구멍 갈파래 엽체를 배양하였다(배양조건 : 광 조사량은 $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$, 광 주기는 12:12h 명암 주기, 배양 온도는 15℃, 배양 시간은 96h). 배양된 구멍 갈파래 엽체의 포자 형성 및 방출률을 색깔 변화의 면적으로 측정하였다. 한편, 대조군 용액으로는 독성 물질을 포함하지 않는 OTT's 인공 해수(염분 농도는 35‰임)를 사용하였다. 표 5는 다시마 포자의 발아율, 발아관 평균 길이 및 파래의 포자 형성률을 기준으로 하여 측정한 유입 원수 및 방류 원수의 수질 독성 결과를 나타낸 것이다.

[0087] 표 5에서 나타나는 바와 같이 파래의 포자 형성률을 이용한 수질 독성 평가 방법을 적용하였을 때 유입 원수와 방류 원수 사이에 수질 차이가 없다는 판정을 내렸다. 반면, 다시마 포자의 발아율 내지 다시마 포자의 발아관 성장속도(평균 길이)를 이용한 본 발명의 수질 독성 평가 방법은 유입 원수와 방류 원수와의 독성 차이가 어느 정도 존재한다고 판정하여 파래기법에 비하여 보다 고감도의 분별력을 나타냈다.

표 5

원수 구분	원수 염분 농도(‰)	원수 pH	수질 독성 평가 기준	NOEC(%)	EC ₅₀ (%)	TU(독성 단위)
유입 원수	40	7.56	다시마 포자 발아율	< 6.25	32.50	3.08
			다시마 포자 발아관 평균 길이	< 6.25	21.24	4.71
			파래 포자 형성률	25	73.40	1.36

방류 원수	32	7.77	다시마 포자 발아율	6.25	70.87	1.41
			다시마 포자 발아관 평균 길이	50	71.94	1.39
			파래 포자 형성률	25	75.00	1.33

[0089] ※ 표 5에서 NOEC, EC₅₀ 은 "%"의 단위를 가지는데 이는 수체 샘플이 미지의 다수 독성 물질을 포함하고 있기 때문이며, 예를 들어 유입 원수의 EC₅₀ 값이 70%이면 유입 원수를 초기 농도의 70% 농도로 희석한 샘플에서 대조군의 포자 발아율 또는 포자 발아관 평균 길이의 50%에 해당하는 포자 발아율 또는 포자 발아관 평균 길이를 나타낸다.

도면의 간단한 설명

[0090] 도 1은 배양되기 전의 다시마 포자의 영상과 독성 물질을 포함하지 않는 해수에 24시간 배양된 포자의 영상을 현미경의 콘텐츠를 조절하기 전과 조절 후로 나타낸 것이고, 도 2는 단일 독성 물질로서 구리(Cu)를 포함하는 독성 용액(초기 구리 농도는 0.4 mg/L임)과 이를 반수 희석법으로 희석한 독성 용액에 다시마의 포자를 24시간 배양 시킨 후(배양 조건은 35 %의 배양액, 15℃, 암 상태) 현미경으로 관찰한 영상을 나타낸 것이다.

[0091] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 수질 독성 평가 방법을 개략적으로 도시한 도면이다.

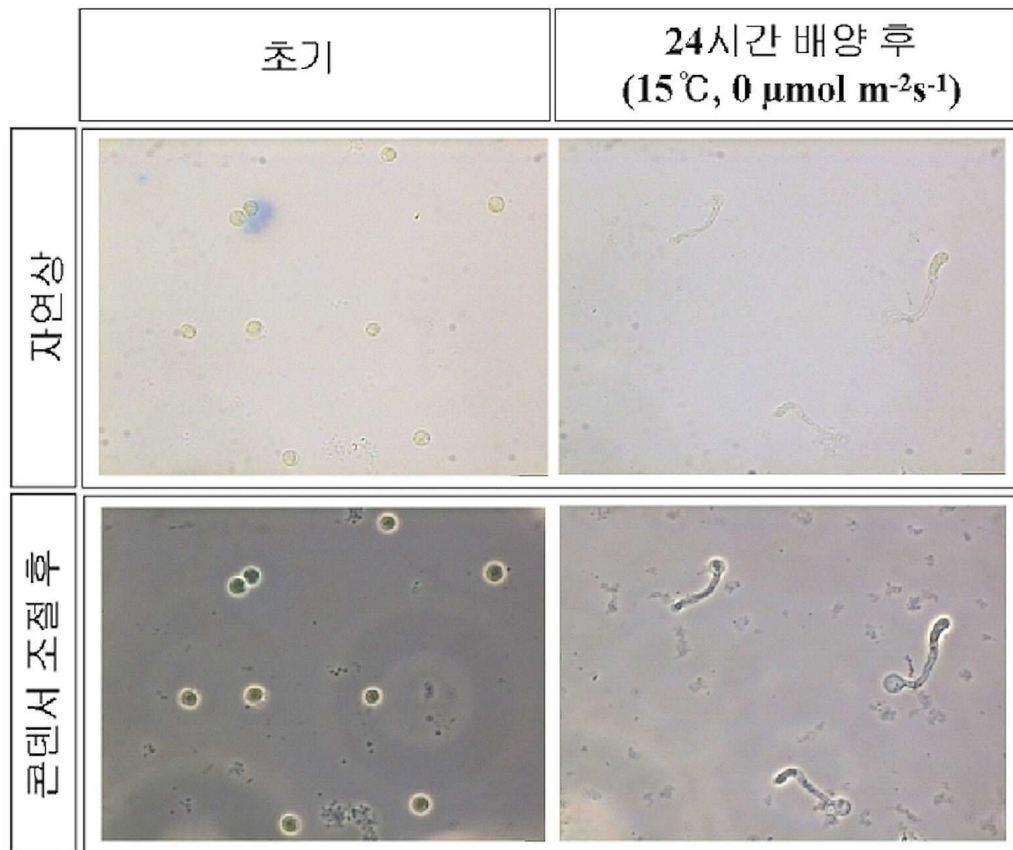
[0092] 도 4는 다양한 배양 조건에서의 다시마 포자의 발아율을 나타낸 것이고, 도 5는 다양한 배양 조건에서의 다시마 포자의 발아관 평균 길이를 나타낸 것이다.

[0093] 도 6은 금속류의 독성 물질 농도에 따른 다시마 포자의 발아율을 나타낸 그래프이고, 도 7은 금속류의 독성 물질 농도에 따른 다시마 포자의 발아관 평균 길이를 나타낸 그래프이다.

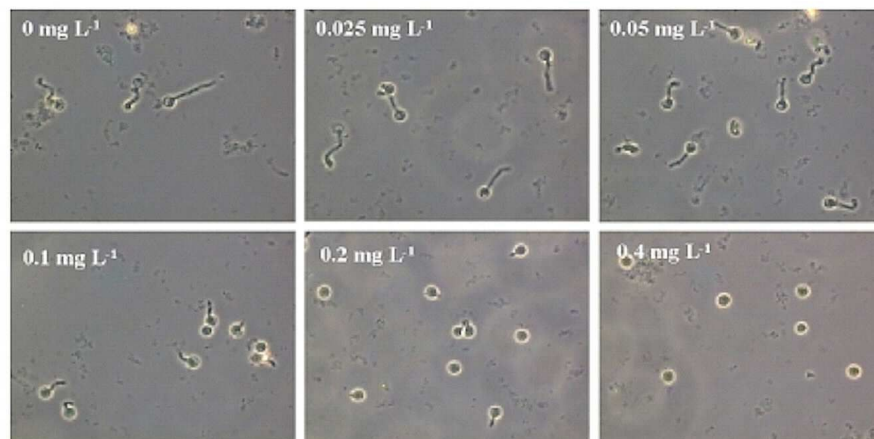
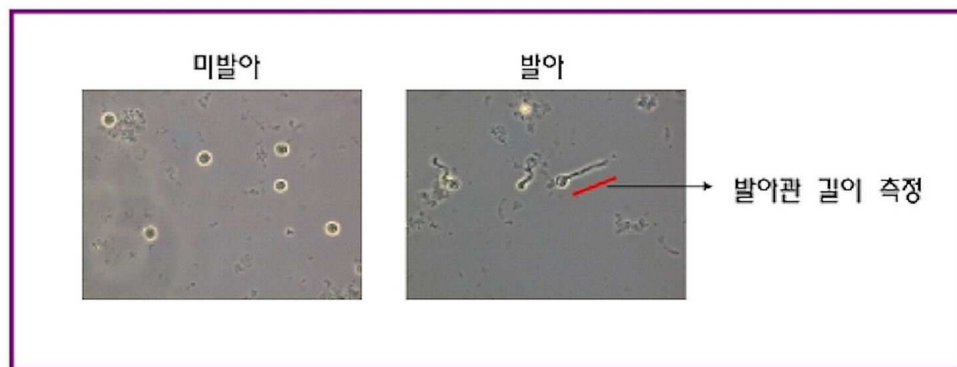
[0094] 도 8은 휘발성 유기화합물류의 독성 물질 농도에 따른 다시마 포자의 발아율을 나타낸 그래프이고, 도 9는 휘발성 유기화합물류의 독성 물질 농도에 따른 다시마 포자의 발아관 평균 길이를 나타낸 그래프이다.

도면

도면1



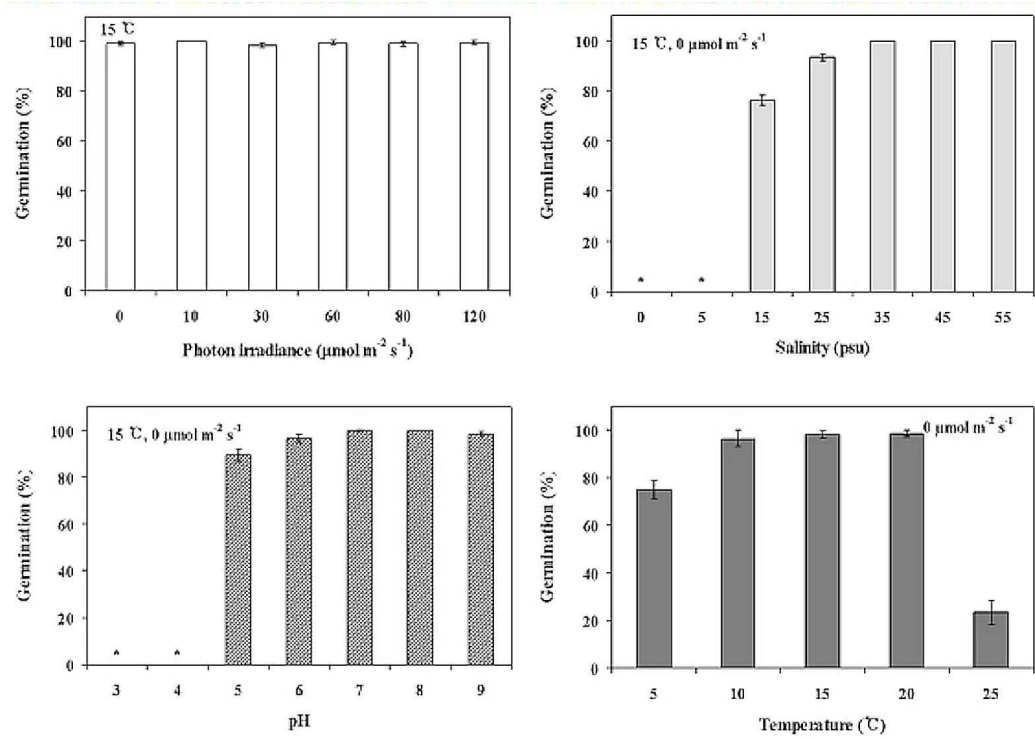
도면2



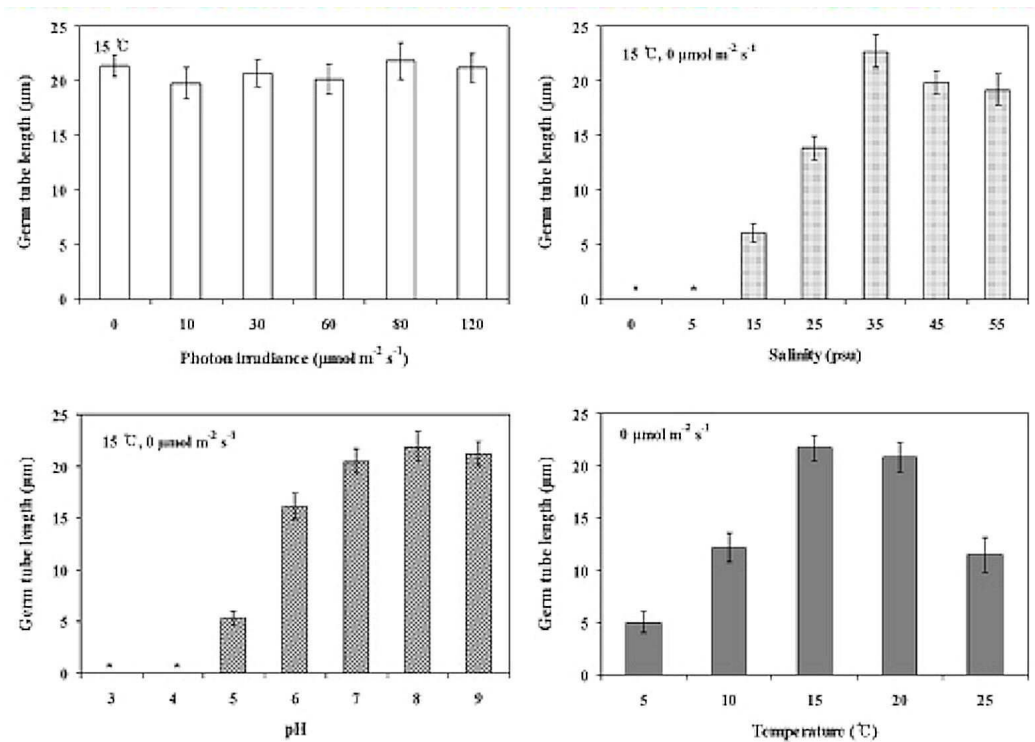
도면3



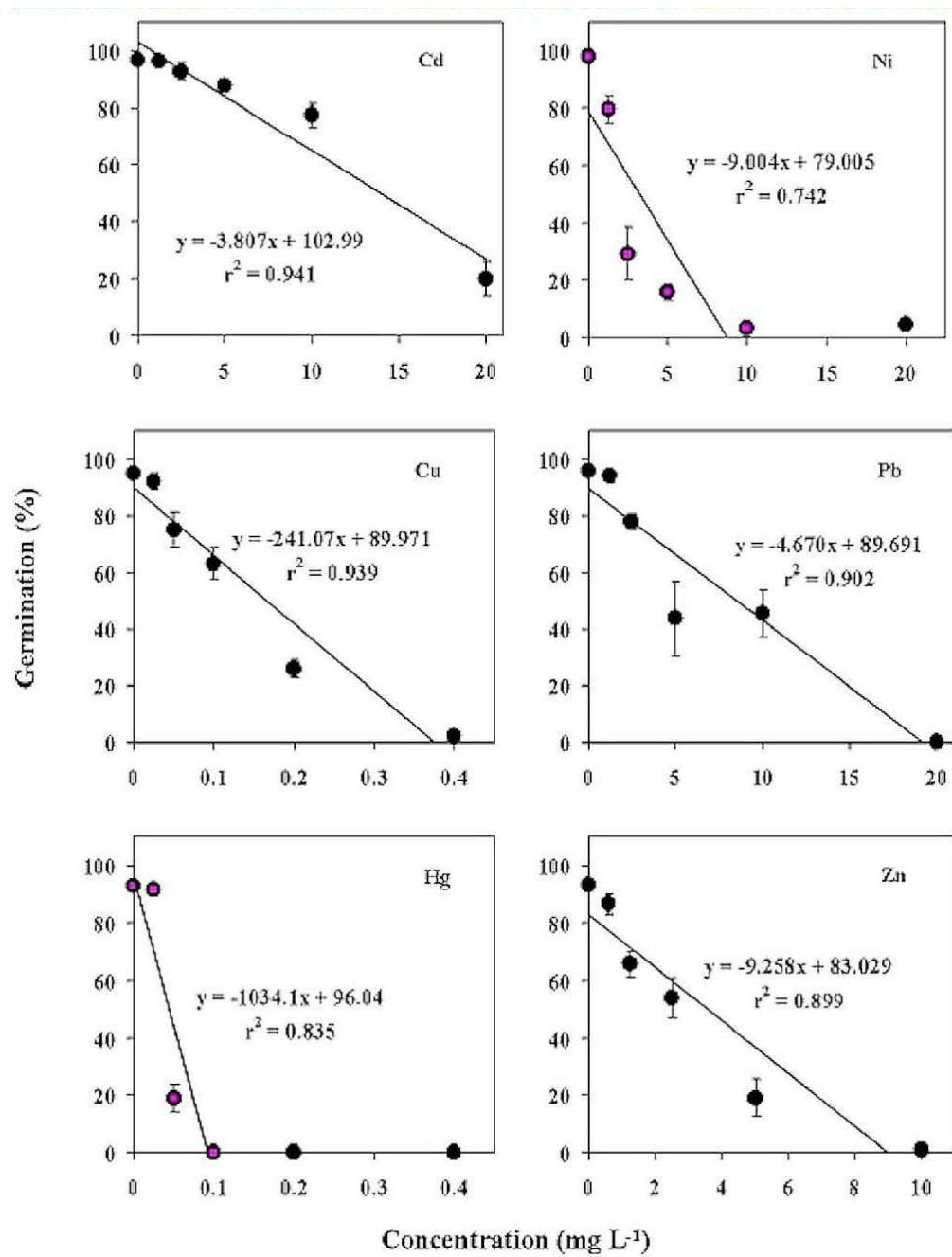
도면4



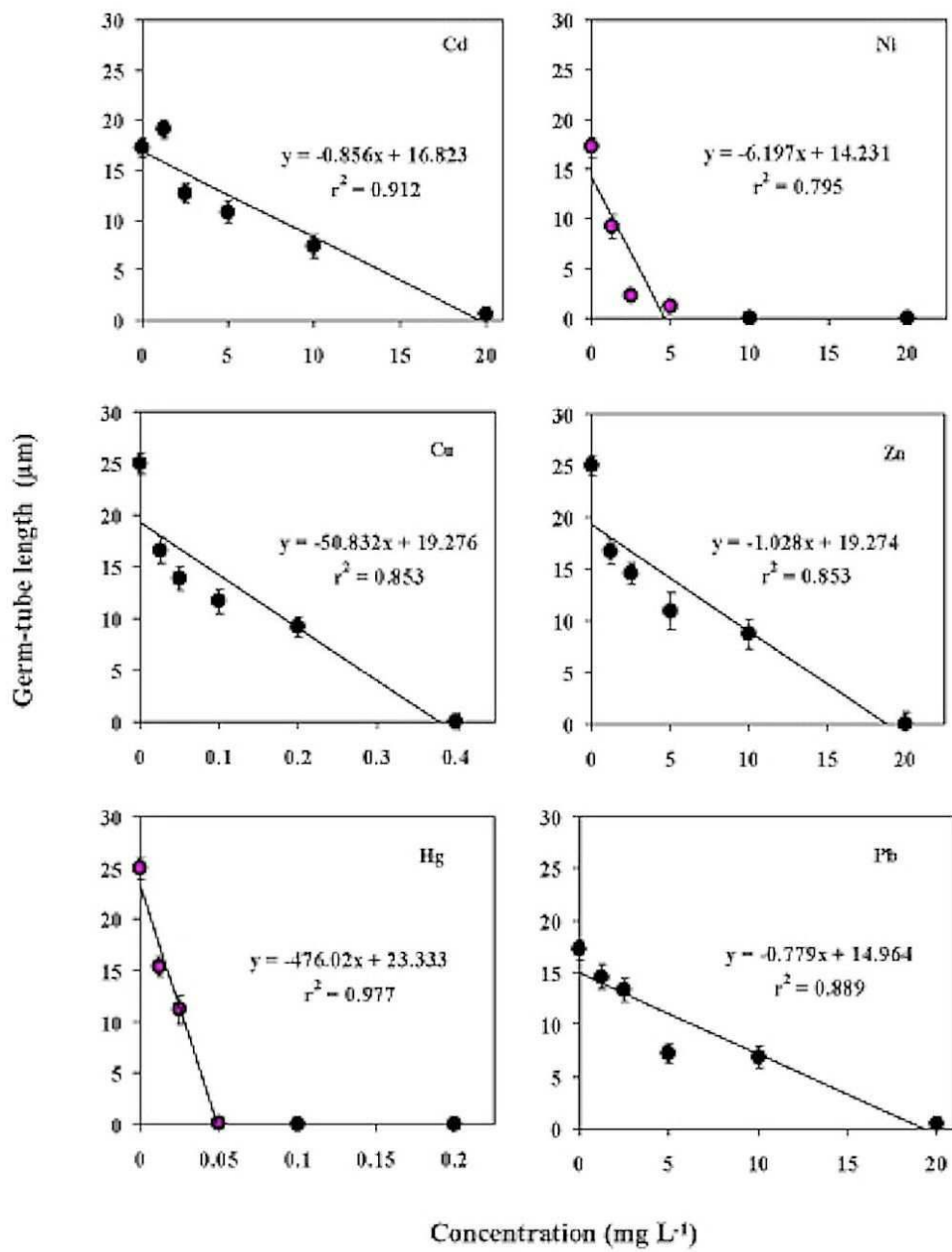
도면5



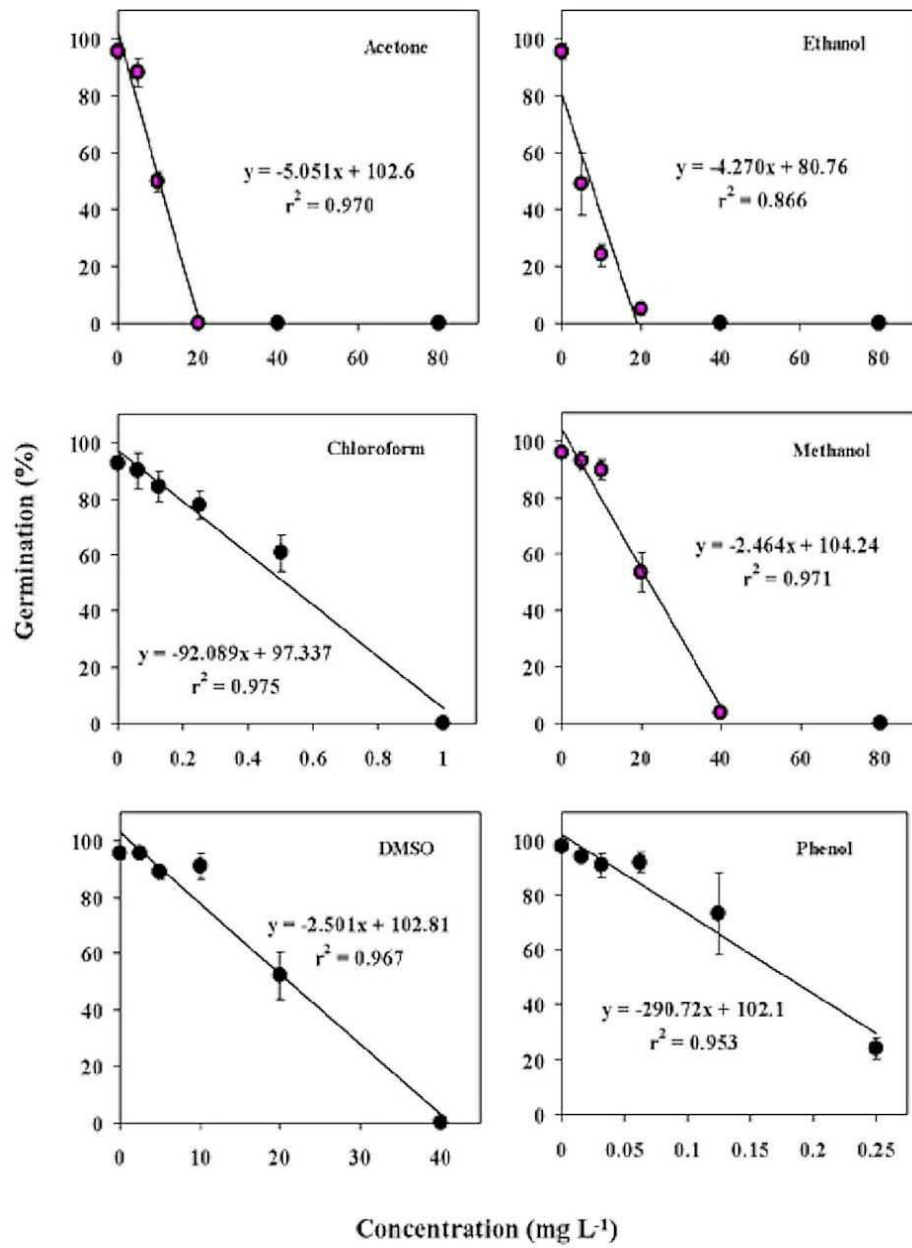
도면6



도면7



도면8



도면9

