



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0089544
(43) 공개일자 2017년08월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/18 (2006.01) G01N 1/38 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/186 (2013.01)
G01N 1/38 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0009895
(22) 출원일자 2016년01월27일
심사청구일자 2016년01월27일

(71) 출원인
인천대학교 산학협력단
인천광역시 연수구 아카데미로 119 (송도동)
(72) 발명자
한대준
인천광역시 연수구 해송로30번길 20, 404동 2503호
박지혜
경기 부천시 원미구 수도로 206번길 65-20, 다동 B01호 (동삼아트빌라)
(74) 대리인
고영갑, 이성원, 권정기, 임상엽

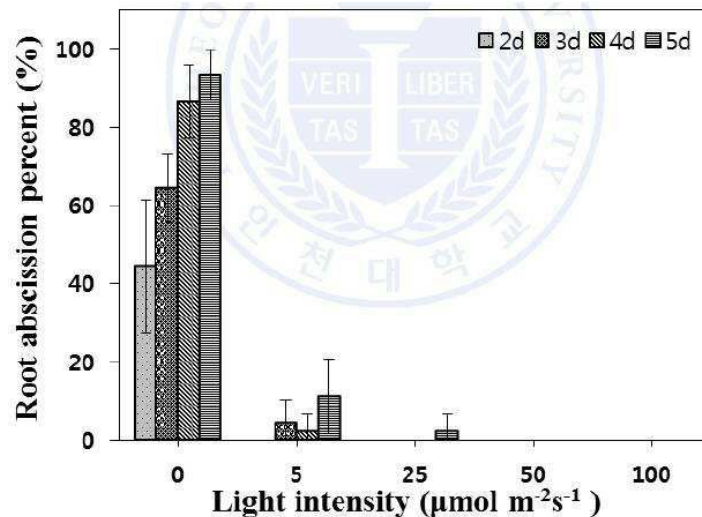
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 개구리밥과 식물의 뿌리 이탈을 이용한 수질 독성 평가 방법

(57) 요약

본 발명은 수체 샘플이 수용된 배양용 용기에 개구리밥과 식물을 투입하고 0(암 조건) 내지 $1 \mu\text{mol photon/m}^2 \cdot \text{s}$ 의 광 조사량 조건에서 배양하는 단계; 및 배양이 완료된 개구리밥과 식물의 뿌리 이탈수 또는 뿌리 이탈물을 측정하는 단계를 포함하는 수질 독성 평가 방법을 제공한다. 본 발명에 따른 수질 독성 평가 방법은 수질 독성 평가를 위한 파라미터로 개구리밥과 식물의 뿌리 이탈수 또는 뿌리 이탈물을 이용하고, 개구리밥과 식물을 뿌리 이탈을 촉진하는 조건에서 배양하기 때문에 소정의 이미지 분석장치 없이 육안으로 수질 독성 평가가 가능하고, 수질 독성 판별 시간이 약 2일 이내로 단축되고, 수질 독성원에 대한 높은 민감성을 가지며, 다양한 독성물질에 의한 수질 오염의 평가가 가능하다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 S2252500

부처명 중소기업청

연구관리전문기관 중소기업청

연구사업명 민관공동투자기술개발사업

연구과제명 마이크로 블루 테크닉 기반의 실시간 독성 모니터링 및 진단장치 개발

기 여 율 1/1

주관기관 주식회사 그린파이오니아

연구기간 2014.12.22 ~ 2017.12.21

명세서

청구범위

청구항 1

수체 샘플이 수용된 배양용 용기에 개구리밥과 식물을 투입하고 0(암 조건) 내지 $1 \mu\text{mol photon/m}^2 \cdot \text{s}$ 의 광 조사량 조건에서 배양하는 단계; 및

배양이 완료된 개구리밥과 식물의 뿌리 이탈수 또는 뿌리 이탈물을 측정하는 단계를 포함하는 수질 독성 평가 방법.

청구항 2

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

상기 희석 원수는 원수를 스테인버그 배지(Steinberg medium)로 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 개구리밥과 식물의 뿌리 이탈을 저해하는 독성 물질을 포함하지 않는 배양액을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 수질 독성 평가 방법.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 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)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 금속류인 것을 특징으로 하는 수질 독성 평가 방법.

청구항 6

제 4항에 있어서, 상기 대조군은 스테인버그 배지(Steinberg medium)인 것을 특징으로 하는 수질 독성 평가 방법.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 수체 샘플의 pH는 5~11인 것을 특징으로 하는 수질 독성 평가 방법.

청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 배양하는 단계의 배양 온도는 20~35℃인 것을 특징으로 하는 수질 독성 평가 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 수질 독성 평가 방법에 관한 것으로서, 더 상세하게는 개구리밥과 식물의 뿌리 이탈을 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 화학물질의 생산량을 높이는데 기여했을 뿐만 아니라 매일 1200 여종 가량의 새로운 물질도 만들어내고 있다. 물질의 이동과 변환이 급속하게 일어나는 수서 생태계의 특성상, 이러한 독성 물질에 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 제공할 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(*Lemnoideae*)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. 개구리밥과 식물은 개구리밥속(*Spirodela*), 쯤개구리밥속(*Lemna*), 쯤분개구리밥속(*Wolffia*), *Landoltia* 및 *Wolffiella* 등과 같은 5개의 속으로 나뉘고, 세계적으로 약 30종이 분포하고 있는 것으로 알려져 있다.

[0007] 현재까지 국제표준화기구(ISO), 미국 환경보호청(EPA), 및 경제협력개발기구(OECD)에 등록된 종래의 개구리밥을 이용한 수질 독성 평가 방법을 살펴보면 개구리밥을 수체 샘플에 배양한 후 잎의 수(frond number), 잎의 면적(frond area), 군체수(population growth rate), 습중량(fresh weight), 건중량(dry weight), 또는 색소 함량(pigment contents)의 변화량을 측정하는 것으로 구성된다. 그러나, 종래의 개구리밥을 이용한 수질 독성 평가 방법은 유효한 변화량을 확보하기 위하여 배양 시간이 약 7일 정도 소요되고 독성원에 대한 민감성이 떨어지는 등의 문제가 있으며, 이를 개선시켜야 할 필요가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 종래의 기술적 배경하에서 도출된 것으로서, 본 발명의 목적은 평가 시 소요되는 시간이 짧고 민감도

가 우수한 새로운 수질 독성 평가 방법을 제공하는데에 있다.

과제의 해결 수단

- [0009] 본 발명의 발명자들은 개구리밥과 식물의 다양한 특성을 이용한 수질 독성 평가 방법에 대해 지속적으로 연구를 해왔고, 생태 독성 평가를 위한 파라미터로 개구리밥과 식물의 뿌리 이탈수 또는 뿌리 이탈물을 이용하는 경우 생태 독성, 특히 수질 독성 평가 시 소요 시간이 짧고 민감도가 우수하며 다양한 독성물질에 대한 평가가 가능하다는 점을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.
- [0010] 상기 목적을 해결하기 위하여, 본 발명은 수체 샘플이 수용된 배양용 용기에 개구리밥과 식물을 투입하고 0(암 조건) 내지 $1 \mu\text{mol photon/m}^2 \cdot \text{s}$ 의 광 조사량 조건에서 배양하는 단계; 및 배양이 완료된 개구리밥과 식물의 뿌리 이탈수 또는 뿌리 이탈물을 측정하는 단계를 포함하는 수질 독성 평가 방법을 제공한다.
- [0011] 상기 수체 샘플은 바람직하게는 원수 및 희석 배수가 서로 다른 적어도 2개 이상의 희석 원수로 구성되고, 상기 희석 원수는 원수를 스테인버그 배지(Steinberg medium)로 희석하여 제조된다. 또한, 상기 수체 샘플은 바람직하게는 원수의 대조군으로 개구리밥과 식물의 뿌리 이탈을 저해하는 독성 물질을 포함하지 않는 배양액을 더 포함한다. 상기 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)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 금속류일 수 있다. 또한, 상기 대조군은 바람직하게는 스테인버그 배지(Steinberg medium)이다. 또한, 상기 수체 샘플의 pH는 5~11인 것이 바람직하다.
- [0012] 또한, 상기 배양하는 단계의 배양 온도는 20~35℃인 것이 바람직하다.

발명의 효과

- [0013] 본 발명에 따른 수질 독성 평가 방법은 수질 독성 평가를 위한 파라미터로 개구리밥과 식물의 뿌리 이탈수 또는 뿌리 이탈물을 이용하고, 개구리밥과 식물을 뿌리 이탈을 촉진하는 조건에서 배양하기 때문에 소정의 이미지 분석장치 없이 육안으로 수질 독성 평가가 가능하고, 수질 독성 판별 시간이 약 2일 이내로 단축되고, 수질 독성 원에 대한 높은 민감성을 가지며, 다양한 독성물질에 의한 수질 오염의 평가가 가능하다.

도면의 간단한 설명

- [0014] 도 1은 다양한 광 조사량 조건 하에서 배양일의 경과에 따른 쯔개구리밥속 식물의 뿌리 이탈률을 나타낸 것이다.
- 도 2는 다양한 배양 온도 조건 하에서 배양일의 경과에 따른 쯔개구리밥속 식물의 뿌리 이탈률을 나타낸 것이다. 도 2의 실험에서 배양시 광 조사 조건은 암 조건(광 조사량 : $0 \mu\text{mol photon/m}^2 \cdot \text{s}$) 이었고, 배양액의 pH는 약 7.0 이었다.
- 도 3은 다양한 pH 조건 하에서 배양일의 경과에 따른 쯔개구리밥속 식물의 뿌리 이탈률을 나타낸 것이다. 도 3의 실험에서 배양시 광 조사 조건은 암 조건(광 조사량 : $0 \mu\text{mol photon/m}^2 \cdot \text{s}$) 이었고, 배양 온도는 25℃ 이었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 본 발명은 판별 시간이 짧고, 조작이 간단하며, 다양한 독성물질에 대해 높은 민감성을 가지는 수질 독성 평가 방법에 관한 것으로서, 본 발명의 수질 독성 평가 방법은 수체 샘플이 수용된 배양용 용기에 개구리밥과 식물을 투입하고 소정의 광 조사량 조건에서 배양하는 단계; 및 배양이 완료된 개구리밥과 식물의 뿌리 이탈수 또는 뿌리 이탈물을 측정하는 단계를 포함한다. 이하, 본 발명에 따른 수질 독성 평가 방법을 구성요소별로 나누어 설명한다.

- [0017] 수체 샘플

- [0018] 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 포함

한다.

[0019] 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 개구리밥과 식물의 뿌리 이탈을 저해하는 독성 물질을 포함하지 않고 개구리밥과 식물의 배양과 양립할 수 있는 것이라면 그 종류가 크게 제한되지 않으며, 구체적으로 물, 스테인버그 배지(Steinberg medium), 호그랜드 배지(Hoagland's medium) 등이 있으며, 이 중 개구리밥과 식물의 원활한 배양을 고려할 때 스테인버그 배지(Steinberg medium)인 것이 바람직하다.

[0020] 또한, 수체 샘플은 바람직하게는 원수의 대조군으로 개구리밥과 식물의 뿌리 이탈을 저해하는 독성물질을 포함하지 않는 배양액을 더 포함한다. 상기 대조군을 구성하는 배양액은 공지된 다양한 액상 배지 등에서 선택될 수 있으며, 구체적으로 스테인버그 배지(Steinberg medium) 또는 호그랜드 배지(Hoagland's medium) 등이 있고, 이 중 개구리밥과 식물의 원활한 배양을 고려할 때 스테인버그 배지(Steinberg medium)인 것이 바람직하다. 상기 개구리밥과 식물의 뿌리 이탈을 저해하는 독성 물질은 예를 들어 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)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 금속류로 구성될 수 있다.

[0021] 또한, 상기 원수, 희석 원수들 또는 원수의 대조군 등을 포함하는 수체 샘플은 배양용 용기에 수용되기 전 또는 배양용 용기에 수용된 후, 개구리밥과 식물의 원활한 배양을 위해 pH가 소정의 범위로 조정되는 것이 바람직하다. 구체적으로 수체 샘플의 pH는 5~11로 조정되는 것이 바람직하고, 6~11로 조정되는 것이 더 바람직하다. 수체 샘플의 pH가 5 미만인 경우 배양 과정에서의 개구리밥과 식물의 뿌리 이탈은 배양액의 산도로 인한 개구리밥과 식물의 사멸에 기인한 것이어서 수질 독성 평가의 신뢰도를 떨어뜨릴 수 있다.

[0023] 배양용 용기

[0024] 배양용 용기는 수체 샘플 및 개구리밥과 식물을 수용하고, 이후 배양기에 넣어져 개구리밥과 식물을 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 개구리밥과 식물을 배양하고, 나머지 5개의 웰에는 원수와 4개의 희석 원수들을 넣어 개구리밥과 식물을 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 200ml 내지 100ml인 것이 바람직하다.

[0026] 개구리밥과 식물

[0027] 개구리밥과 식물은 천남성과의 하위 아과 식물로서, 세계에 널리 분포하며, 6속의 약 30종 가량이 알려져 있는데, 한국에는 개구리밥(*Spirodela polyrrhiza*)과 줄개구리밥(*Lemna paucicostata*) 2종이 자란다. 또한, 줄개구리밥속에 속하는 종으로는 *Lemna gibba*, *Lemna minor*, *Lemna minuta*, *Lemna trisulca*, *Lemna valdiviana*, *Lemna perpusilla* 등이 있다. 개구리밥과 식물은 전체가 엽상체(frond; 2~3 개로 길게 갈라진 잎), 연결사 및 뿌리의 3부분으로 이루어진다. 본 발명에서는 수질 독성의 평가를 위한 바이오마커로서 수생 식물에 속하는 개구리밥과 식물, 바람직하게는 줄개구리밥속에 속하는 *Lemna gibba*, *Lemna minor*, *Lemna paucicostata*를 이용한다.

[0029] 개구리밥과 식물의 배양

[0030] 개구리밥과 식물 및 수체 샘플을 함유하는 배양용 용기는 배양기에 옮겨지고, 이후 소정의 광 조사량 조건에서 개구리밥과 식물이 배양된다. 이때, 개구리밥과 식물의 배양 시간은 크게 제한되지 않으나 수질 독성 평가의 신뢰성을 확보하는 측면에서 적어도 24~72 hr인 것이 바람직하고, 36~60 hr인 것이 더 바람직하다. 또한, 개구리

밥과 식물의 배양시 광 조사량은 원활한 뿌리 이탈을 담보하는 관점에서 0(암 조건) 내지 $1 \mu\text{mol photon/m}^2 \cdot \text{s}$ 인 것이 바람직하고, 0(암 조건) 내지 $0.5 \mu\text{mol photon/m}^2 \cdot \text{s}$ 인 것이 더 바람직하며, 0(암 조건)~ $0.1 \mu\text{mol photon/m}^2 \cdot \text{s}$ 인 것이 가장 바람직하다. 개구리밥과 식물의 뿌리 이탈은 암 조건에서 원활하게 이루어지며, 개구리밥과 식물의 배양시 광 조사량이 $1 \mu\text{mol photon/m}^2 \cdot \text{s}$ 를 초과하는 경우 수체 샘플에 존재하는 독성 물질의 종류 및 양에 상관없이 개구리밥과 식물의 뿌리 이탈이 유의적인 수준으로 이루어지지 않아 수질 독성을 평가하기가 어렵게 된다. 또한, 개구리밥과 식물의 배양시 배양 온도는 원활한 뿌리 이탈을 담보하는 관점에서 20~35℃인 것이 바람직하고, 25~30℃인 것이 더 바람직하다. 다만, 개구리밥과 식물의 뿌리 이탈을 위한 최적 배양 조건(예를 들어 배양 시간, 광 조사량 및 배양 온도 등)은 개구리밥과 식물의 종류에 따라 다소 변경될 수 있다.

[0032] 개구리밥과 식물의 뿌리 이탈수 또는 뿌리 이탈률 측정 및 수질 독성 평가

[0033] 개구리밥과 식물을 수체 샘플이 담겨진 배양용 용기에 넣고 특정 배양 조건에서 약 48시간 동안 배양하면 수체 샘플 내 독성 물질의 종류 또는 함량에 따라 개구리밥과 식물의 뿌리 이탈수 또는 뿌리 이탈률이 달라진다. 배양이 완료된 후 개구리밥과 식물의 뿌리 이탈수를 측정하고 뿌리 이탈률은 다음과 같은 식으로 계산될 수 있다.

$$\text{뿌리 이탈률(\%)} = \frac{Ra \times 100}{Rt}$$

[0034]

[0035] 상기 식에서 Rt는 배양 전 배양용 용기에 담겨진 개구리밥과 식물의 전체 뿌리수를 나타내고, Ra는 배양 후 배양용 용기에 담겨진 개구리밥과 식물의 뿌리 이탈수를 나타낸다.

[0036] 수체 샘플의 수질 독성은 개구리밥과 식물의 뿌리 이탈수 또는 뿌리 이탈률을 이용하여 평가될 수 있다. 구체적으로, 수체 샘플의 수질 독성은 원수 및 희석 원수들에서 배양된 개구리밥과 식물의 뿌리 이탈수를 독성 물질을 포함하지 않는 대조군에서 배양된 개구리밥과 식물의 뿌리 이탈수와 비교하여 평가된다. 또한, 수체 샘플의 수질 독성은 원수 및 희석 원수들에서 배양된 개구리밥과 식물의 뿌리 이탈률을 독성 물질을 포함하지 않는 대조군에서 배양된 개구리밥과 식물의 뿌리 이탈률과 비교하여 평가된다. 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.

[0037] 반수 유효 농도(Half maximal effective concentration, EC_{50})는 개구리밥과 식물의 뿌리 이탈수 또는 뿌리 이탈률이 독성 물질을 포함하지 않는 대조군에서 배양된 개구리밥과 식물의 뿌리 이탈수 또는 뿌리 이탈률보다 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 개구리밥과 식물의 뿌리 이탈수 또는 뿌리 이탈률이 독성 물질을 포함하지 않는 대조군에서 배양된 개구리밥과 식물의 뿌리 이탈수 또는 뿌리 이탈률과 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.

$$TU = 100/\text{반수 유효 농도(\%)}$$

[0039] 또한, 수체 샘플의 독성은 다음과 같은 식으로도 평가할 수 있다.

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

[0040]

[0041] 상기 식에서 A는 실험군(독성원이 내포된 상태의 수체 샘플)에서의 개구리밥과 식물의 뿌리 이탈수 또는 뿌리 이탈률을 나타내고, B는 대조군(독성원이 없는 상태)에서의 개구리밥과 식물의 뿌리 이탈수 또는 뿌리 이탈률을 나타낸다.

[0043] 본 발명에 따른 수질 독성 평가 방법의 용도

[0044] 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 회석 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.

[0046] 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.

[0048] 1. 개구리밥과 식물의 뿌리 이탈을 위한 최적 배양 조건 확립

[0049] (1) 개구리밥과 식물의 전처리 배양

[0050] 개구리밥과 식물 중 좀개구리밥속 식물인 *Lemna minor*를 1.5L의 스테인버그 배지(Steinberg medium; pH는 7±0.2)가 담긴 가로 25cm, 세로 10cm, 높이 15cm의 수조에 넣은 뒤 배양기로 옮기고, 20-30 μmol photon/m²·s의 광 조사량으로 (광 주기는 24시간 연속광 조건임) 조사하면서 25℃의 온도에서 정지 배양하였다. 이때, 광원은 백색 형광등을 사용하였다. 외부와의 오염 방지를 위해 소조는 투명한 플라스틱 뚜껑으로 덮어주었고, 인공 배지인 스테인버그 배지(Steinberg medium; pH는 7±0.2)는 7일 간격으로 전량 교체해 주었다.

[0051] 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 개구리밥과 식물의 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/ℓ)
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	

[0054] (2) 개구리밥과 식물의 배양

- [0055] 전처리 배양된 쯔개구리밥속 식물 중에서 뿌리가 약 10mm 이상 자라고 2-3개의 엽상체(frond)와 1개의 뿌리를 가진 건강한 개체를 선별하였다. 선별된 개체들을 배양액이 수용된 6웰 플레이트에 웰 당 10개씩 넣고 웰의 뚜껑을 덮은 후 파라핀 필름으로 6웰 플레이트 주변을 감아 밀봉하였다. 이후, 다양한 광 조사량, 다양한 배양 온도 및 다양한 배양액의 pH 조건하에서 쯔개구리밥속 식물을 5일 동안 배양하였다. 이때, 배양액으로 스테인버그 배지(Steinberg medium; pH는 7 ± 0.2)를 사용하였고, 배양액의 pH는 1M HCl 수용액 또는 1M NaOH 수용액을 사용하여 조정하였다. 또한, 백색 형광등을 이용하여 소정의 광 조사량으로 조사하거나 알루미늄 호일을 이용하여 암 조건을 형성하였다. 이후, 배양일의 경과에 따른 쯔개구리밥속 식물의 뿌리 이탈수를 육안으로 측정하고 뿌리 이탈률을 계산하였다.
- [0056] 도 1은 다양한 광 조사량 조건 하에서 배양일의 경과에 따른 쯔개구리밥속 식물의 뿌리 이탈률을 나타낸 것이다. 도 1의 실험에서 광 주기는 24시간 연속광 조건이었고, 배양 온도는 25℃ 이었고 배양액의 pH는 약 7.0 이었다. 도 1에서 보이는 바와 같이 광 조사 조건이 암 조건인 경우, 즉 광 조사량이 $0 \mu\text{mol photon/m}^2 \cdot \text{s}$ 인 경우 쯔개구리밥속 식물의 뿌리 이탈률이 배양일에 비례하여 증가하였고, 배양 4일째에는 거의 90% 이상의 뿌리 이탈률을 보였다. 반면, 광 조사량이 매우 약한 경우(예를 들어, 광 조사량이 $5 \mu\text{mol photon/m}^2 \cdot \text{s}$ 인 경우)에도 쯔개구리밥속 식물의 뿌리 이탈률이 급격하게 감소하였고, 광 조사량이 $25 \mu\text{mol photon/m}^2 \cdot \text{s}$ 이상인 경우에는 배양 시간이 증가하여도 쯔개구리밥속 식물의 뿌리가 거의 이탈하지 않았다.
- [0057] 도 2는 다양한 배양 온도 조건 하에서 배양일의 경과에 따른 쯔개구리밥속 식물의 뿌리 이탈률을 나타낸 것이다. 도 2의 실험에서 배양시 광 조사 조건은 암 조건(광 조사량 : $0 \mu\text{mol photon/m}^2 \cdot \text{s}$) 이었고, 배양액의 pH는 약 7.0 이었다. 도 2에서 보이는 바와 같이 배양 온도가 15℃인 경우 배양 시간이 증가하여도 쯔개구리밥속 식물의 뿌리 이탈률은 크게 증가하지 않은 반면, 배양 온도가 25~30℃인 경우 배양 3일부터 쯔개구리밥속 식물의 뿌리 이탈률이 배양 시간에 비례하여 크게 증가하였다.
- [0058] 도 3은 다양한 pH 조건 하에서 배양일의 경과에 따른 쯔개구리밥속 식물의 뿌리 이탈률을 나타낸 것이다. 도 3의 실험에서 배양시 광 조사 조건은 암 조건(광 조사량 : $0 \mu\text{mol photon/m}^2 \cdot \text{s}$) 이었고, 배양 온도는 25℃ 이었다. 도 3에서 보이는 바와 같이 배양액의 pH가 3인 경우 배양 3일째까지 쯔개구리밥속 식물의 뿌리 이탈률이 가장 높게 나타났으나, 이는 배양액의 산도로 인해 쯔개구리밥속 식물이 사멸하였기 때문이다. 배양액의 pH가 5~11인 경우 배양 3일째에 거의 비슷한 뿌리 이탈률을 보였고, 배양 4일째에 pH가 7인 배양액에서 가장 높은 뿌리 이탈률을 보였다.
- [0059] 개구리밥과에 속하는 쯔개구리밥속 식물의 뿌리 이탈을 위한 최적 배양 조건은 광 조사의 경우 암 조건, 배양 온도는 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, pH는 7 ± 0.2 인 것으로 나타났다.

[0061] 2. 개구리밥과 식물의 뿌리 이탈률을 이용한 독성물질 표준 용액의 수질 독성 평가

[0062] (1) 독성물질 표준 용액의 준비

[0063] 단일 금속류 독성물질로 비소(As), 카드뮴(Cd), 6가 크롬(Cr^{6+}), 구리(Cu), 수은(Hg) 및 은(Ag)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 pH를 1M 염산 수용액이나 1M 수산화나트륨 수용액을 사용하여 7.0 ± 0.1 로 조정하였다.

[0065] (2) 독성물질 표준용액 상에서 쯔개구리밥속 식물의 배양

[0066] 전처리 배양된 쯔개구리밥속 식물 중에서 뿌리가 약 10mm 이상 자라고 2-3개의 엽상체(frond)와 1개의 뿌리를 가진 건강한 개체를 선별하였다. 이후, 6웰 플레이트의 웰에 대조군 용액(Steinberg 배지), 독성물질 표준용액 및 희석된 독성물질 표준용액을 각각 10ml씩 넣고, 여기에 선별한 개체를 웰 당 10개씩 넣고 웰의 뚜껑을 덮은 후 파라핀 필름으로 6웰 플레이트 주변을 감아 밀봉하였다. 이후, 6웰 플레이트를 배양기에 옮겨 넣고, 광 조사 가 차단된 암 조건 및 25℃의 온도에서 48hr 동안 배양하였다. 동일한 조건의 실험을 총 3회 반복하였다.

[0068] (3) 쯔개구리밥속 식물의 뿌리 이탈률 측정 및 단일 금속류 독성물질의 수질 독성 평가

[0069] 좁개구리밥속 식물의 배양 후 24hr 및 48hr가 경과하였을 때 좁개구리밥속 식물의 뿌리 이탈수를 육안으로 관찰하고 좁개구리밥속 식물의 뿌리 이탈률을 계산하였다. 이후, 좁개구리밥속 식물의 뿌리 이탈률을 기준으로 단일 금속류 독성물질 각각의 반수 유효 농도(EC_{50})를 점예측기법(point estimation techniques)을 사용하여 계산하였다. 하기 표 2는 좁개구리밥속 식물을 24hr 및 48hr 동안 배양한 후 좁개구리밥속 식물의 뿌리 이탈률을 기준으로 계산한 단일 금속류 독성물질 각각의 반수 유효 농도(EC_{50})이다.

표 2

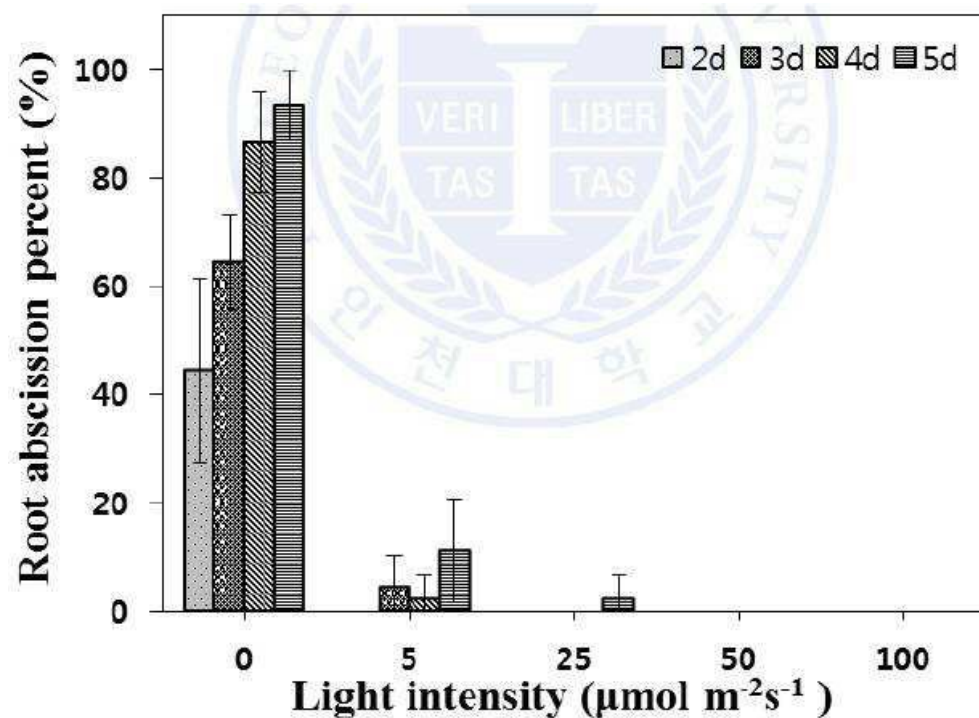
금속류 독성물질	배양 24hr 후 <i>Lemna minor</i> 뿌리 이탈률을 기준으로 한 EC_{50} (mg/L)	배양 48hr 후 <i>Lemna minor</i> 뿌리 이탈률을 기준으로 한 EC_{50} (mg/L)
AS	4.630	3.950
Cd	> 5	0.127
Cr^{6+}	> 5	2.419
Cu	0.106	0.125
Hg	0.098	0.070
Ag	0.043	0.018

[0071] 표 2에서 보이는 바와 같이 좁개구리밥속 식물의 뿌리 이탈률을 수질 독성 평가를 위한 기준 파라미터로 하였을 때 수질 독성 평가에 소요되는 시간은 크게 단축되고 단일 금속류 독성물질에 대한 반응 민감성은 매우 높은 것으로 나타났다.

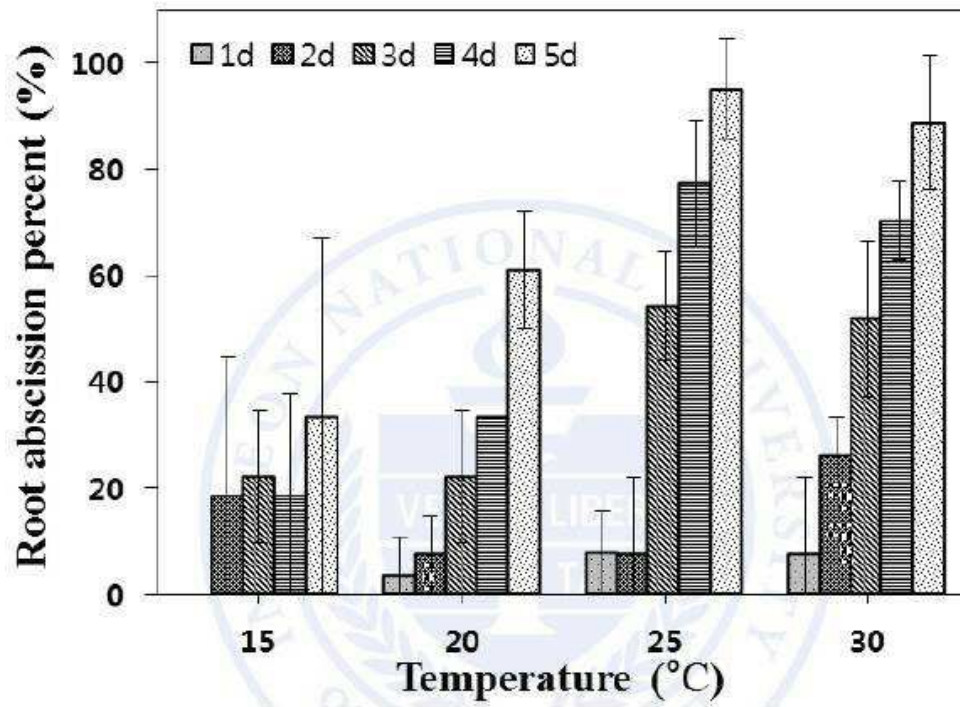
[0073] 이상에서와 같이 본 발명을 상기의 실시예를 통해 설명하였지만 본 발명이 반드시 여기에만 한정되는 것은 아니며 본 발명의 범주와 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양한 변형실시가 가능함은 물론이다. 따라서, 본 발명의 보호범위는 특정 실시 형태로 국한되는 것이 아니며, 본 발명에 첨부된 특허청구의 범위에 속하는 모든 실시 형태들을 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

도면

도면1



도면2



도면3

