



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl. G01N 33/18 (2006.01)	(45) 공고일자 (11) 등록번호 (24) 등록일자	2006년12월05일 10-0653100 2006년11월27일
---	-------------------------------------	--

(21) 출원번호 (22) 출원일자 심사청구일자	10-2005-0101658 2005년10월27일 2005년10월27일	(65) 공개번호 (43) 공개일자
----------------------------------	---	------------------------

(73) 특허권자	인천대학교 산학협력단 인천 남구 도화동 177번지 인천대학교내
(72) 발명자	한태준 인천 남구 도화동 177 인천대학교 생물학과
(74) 대리인	고영희
(56) 선행기술조사문헌 US20040175782 A1 * 심사관에 의하여 인용된 문헌	논문

심사관 : 김정태

전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 파래를 이용한 수질 독성 평가 방법

(57) 요약

본 발명은 파래를 이용하여 중금속, 유기 독성물질, 음이온 독성 물질 또는 농약류 등의 독성 물질이나 기타 유해 물질의 독성도를 측정하는 방법을 제공한다. 보다 상세하게는 상기 방법은 측정용 용기에 샘플을 넣는 단계, 상기 용기에 파래를 투입하여 배양하는 단계, 및 상기 파래의 색상 변화를 영상 분석하여 생식율을 측정하는 단계를 포함한다.

대표도

도 2

특허청구의 범위

청구항 1.

측정용 용기에 샘플을 넣는 단계,

상기 용기에 파래를 투입하여 배양하는 단계, 및

상기 파래의 색상 변화를 영상 분석하여 생식율을 측정하는 단계
를 포함하는 수질 독성 평가 방법.

청구항 2.

제1항에 있어서, 상기 생식율은 전체 면적에 대하여 색상 변화를 보인 부분의 면적비로 계산되거나 색상 변화의 속도로 계산되는 것인 수질 독성 평가 방법.

청구항 3.

제1항에 있어서, 상기 파래는 9.7 내지 11.7 g/L 농도의 Na^+ , 1.43 내지 1.63 g/L 농도의 Mg^{2+} , 0.36 내지 0.46 g/L 농도의 Ca^{2+} , 0.31 내지 0.41 g/L 농도의 K^+ , 0.006 내지 0.008 g/L 농도의 Sr^{2+} , 18.1 내지 22.1 g/L 농도의 Cl^- , 0.43 내지 0.53 g/L 농도의 SO_4^{2-} , 0.013 내지 0.015 g/L 농도의 BO_3^- , 0.003 내지 0.005 g/L 농도의 CO_3^{2-} , 0.091 내지 0.111 g/L 농도의 KNO_3 , 및 0.016 내지 0.018 K_2HPO_4 을 포함하는 배양액에서 배양하는 것인 수질 독성 평가 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

[산업상 이용분야]

본 발명은 파래를 이용한 수질 독성 평가 방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 간편하고 경제성과 실용성이 우수하며, 독성 물질에 대하여 민감하고 신뢰성이 우수한 수질 독성 평가 방법에 관한 것이다.

[종래기술]

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

종래의 수계에 유입될 수 있는 독성 물질을 검출하는 방법으로 물리화화적인 방법과 생물학적인 방법이 있다. 상기 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) 등의 고가의 분석장비와 고도로 숙련된 분석요원이 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.

이러한 단점으로 인하여 생물학적인 방법이 생물을 이용한 방법으로 박테리아 등의 미생물의 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.

일반적으로 어류나 무척추 동물을 이용하는 경우에는 치사율, 움직임의 저해, 생물학적 특성 분석으로 판단하며, 미세조류를 이용하는 경우에는 성장저해로 측정한다. 물벼룩류(Daphnid)인 *Daphnia magna*와 *Ceriodaphnia dubia* 등은 환경 독

성 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.

수질 독성을 평가하는 방법은 간편하고 경제적이며, 신속하고 결과의 재현성이 있어야 하며, 독성 물질의 종류(유기물 또는 무기물, 친수성 또는 소수성 등)에 관계없이 정확하고 신뢰도가 높아야 한다. 따라서 이러한 요구 조건을 만족하는 수질 독성 평가 방법에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

상기 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로서, 본 발명의 목적은 간편하고 경제성과 실용성이 우수하며, 구리, 납, 아연, 카드뮴 등의 중금속, 유기 독성물질, 음이온 독성 물질 또는 농약류 등의 독성 물질이나 기타 유해 물질에 대하여 민감하고 신뢰성이 우수한 수질 독성 평가 방법을 제공하기 위한 것이다.

발명의 구성

본 발명은 상기한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 수질 독성 평가 방법은 측정용 용기에 샘플을 넣는 단계, 상기 용기에 파래를 투입하여 배양하는 단계, 및 상기 파래의 색상 변화를 영상 분석하여 생식율(Percent of Reproduction)을 측정하는 단계를 포함한다.

이하 본 발명을 상세하게 설명한다.

본 발명에서는 수질 오염을 유발할 수 있는 독성 물질이나 유해 물질을 파래를 이용하여 검출하는 방법이다. 파래는 바닷가에서 흔히 볼 수 있는 조류로서 그 종류에 있어서도 창자 파래(*U. intestinalis*), 납작 파래(*U. compressa*), 입파래(*U. linza*), 격자 파래(*U. clathrata*) 등 매우 다양하게 존재한다. 따라서 샘플 생물을 무한히 공급받을 수 있으며, 쉽게 생식 현상을 관찰할 수 있다는 장점이 있다.

도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 수질 독성 평가 공정을 개략적으로 도시한 도면이다. 먼저 측정용 용기에 오염 정도를 측정하고자 하는 샘플을 넣고, 상기 용기에 파래를 투입한 후 배양기에 넣고 배양한다. 측정하고자 하는 샘플은 해수뿐만 아니라 육지의 생활 오수나 공장 폐수도 가능하며, 이들은 파래가 생식할 수 있을 정도의 적절한 염도(25-35 ‰)를 가지도록 조절하는 것이 바람직하다.

파래의 배양 시 광조사량(Photon irradiance)은 $60-200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 바람직하게는 $80-100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 온도는 $15-25^\circ\text{C}$, 광주기는 12:12-16:8-h LD인 조건에서 5일 정도 배양하는 것이 바람직하다. 그러나 파래의 생식 정도 또는 샘플의 오염도에 따라 상기 조건은 대조군의 생식양상을 기준으로 다양하게 변경 가능함은 물론이다.

일정기간 배양한 파래가 생식을 하게 되면 파래의 색상 변화를 영상 분석하여 이를 신호화함으로써 수질 오염도를 측정한다. 파래는 오염되지 않는 환경에서는 생식이 신속하게 진행되어 색상 변화를 나타낸다. 도 2에 도시된 바와 같이, 오염이 안 된 바닷물에서는 처음에 연한 녹색을 띤 잎이 생식(reproduction)이 시작되면서 진한 갈색(dark olive)으로 변하고 최종적으로 흰색으로 바뀐다. 그러나 수질이 오염되어 있으면 생식력이 떨어져 그 색상 변화의 정도가 떨어진다. 도 2의 상단의 색상은 비교를 위해 함께 도시한 것이다.

따라서 본 발명에서는 샘플에서 일정기간 배양된 파래의 전체 면적에 대하여 색상 변화를 보인 부분의 면적비를 영상분석 장치를 사용하여 측정한다. 상기 면적비로부터 생식율을 계산함으로써 수질의 오염도를 평가한다. 또한 색상변화의 속도를 측정하여 생식율을 계산할 수도 있다. 시험에 사용되는 파래의 생체수는 다수 공급 가능하므로 실험결과를 이용하여 통계적인 분석도 가능하다.

기준에 알려진 다른 수질 탐지법의 시험 절차는 배지의 준비와 해조류의 세심한 관리 및 배양을 위해 고도의 전문적 배양 기술을 필요로 하고 나아가 책정된 종말점(endpoint)을 측정할 때도 전문적 지식이 없이는 종말점의 측정은 고사하고 종말점을 구분해내는 것 자체가 어렵다는 문제점을 안고 있는데 비하여 본 발명의 수질 독성 평가방법은 뚜렷한 색깔의 변화가 종말점이고 색깔 변화를 보인 면적을 영상현미경 하에서 측정하는 작업뿐이므로 매우 단순하다. 영상 현미경을 사용한 면적 측정 기술은 초보자의 경우에도 5-10분 내에 익힐 수 있는 단순한 기술이다.

본 발명에서는 측정에 사용되는 기구가 측정용 용기, 영상 현미경, 및 배양기 뿐이므로 수억 원의 기기와 값비싼 일회용 시약의 지속적인 소비를 필요로 하는 화학적 수질 독성 탐지법과는 비교할 수 없는 경비 절감을 할 수 있다는 점에서 경제성을 지닌다.

본 발명의 수질 독성 평가 방법은 하수 및 폐수오니를 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.

파래 시험법은 미국에서 독성 시험법에 가장 많이 사용하는 재료 중의 하나인 성게의 반응보다 민감하고, 다른 해조류와 비교할 때 유럽에서 제시한 홍조류 시험법에 비하여 약 2배 정도 높은 민감성을 나타낸다. 또한, 동일 독성물질에 대하여 전 세계적으로 독성시험법의 바이블처럼 사용되고 있는 Azur Environmental 사의 Microtox 시스템(박테리아의 발광 현상을 이용한 수질 독성 평가법)보다 2-7배 높은 민감성을 보인다.

파래는 전세계적으로 널리 분포하고 있으며 생식과정에 있어서도 모두 유사하기 때문에 자국의 파래를 이용하여 시스템화 시키기에 용이하다.

본 발명의 수질 독성 평가 방법은 측정용 샘플과 파래를 포함하는 배양기, 상기 파래의 색상을 촬영하기 위한 영상기기 및 상기 색상으로부터 파래의 생식율에 따라 독성을 평가하는 분석기를 포함하는 수질 독성 평가 시스템에 의하여 실시될 수 있다. 또한 색상이 변화된 파래의 모양을 촬영하여 이를 전송함으로써 분석하여 그 결과를 다시 반송하는 유비쿼터스 시스템에 의해서도 실시될 수 있다.

또한 파래는 강하고 왕성한 생식력을 가지고 있어 자주 대발생(번성)현상을 보여 국내외적으로 제거할 필요가 있다고 인식되고 있다. 이러한 성가신 해조류로 취급받고 있는 파래를 수질 독성 평가용 식물로 활용함으로써 파래의 제거 효과도 기대할 수 있다.

[실시예]

이하, 본 발명의 바람직한 실시예를 제시한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위하여 제시되는 것일 뿐 본 발명이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니며, 표1에 기재된 배양액을 구성하는 성분의 농도도 기재 농도에만 한정되는 것이 아니다. 다시 말하면, 9.7 내지 11.7 g/L 농도의 Na^+ , 1.43 내지 1.63 g/L 농도의 Mg^{2+} , 0.36 내지 0.46 g/L 농도의 Ca^{2+} , 0.31 내지 0.41 g/L 농도의 K^+ , 0.006 내지 0.008 g/L 농도의 Sr^{2+} , 18.1 내지 22.1 g/L 농도의 Cl^- , 0.43 내지 0.53 g/L 농도의 SO_4^{2-} , 0.013 내지 0.015 g/L 농도의 BO_3^- , 0.003 내지 0.005 g/L 농도의 CO_3^{2-} , 0.091 내지 0.111 g/L 농도의 KNO_3 , 및 0.016 내지 0.018 K_2HPO_4 을 포함하는 배양액에서 배양될 수 있다.

실시예 1

9군데의 산업폐수와 생활하수 처리시설에서 획득한 슬러지 용출액에 하기 표 1에 기재된 성분을 가지는 물(Standard AW)을 혼합하여 5가지의 농도로 구배화하여 각각 10ml 씩 취하여 직경 35mm의 Cell plate(6-well plate; 15 ml per each well)에 넣고 파래를 투입하였다. 상기 Cell plate에 파래의 일에서 취한 동전 모양의 원형 절편(직경 6 mm)을 상기 용기에 투입하여 정지(static) 배양하였다. 배양시 광원은 백색 형광등(Cool-white fluorescent)을 사용하고 측정 패러미터(Test endpoint)는 생식율(Sporulation)로 하였다. 배양조건은 하기 표 2와 같이 조절하였다.

[표 1]

성분	농도(g/L)	성분	농도(g/L)
Na^+	10.7	SO_4^{2-}	0.48
Mg^{2+}	1.53	BO_3^-	0.014
Ca^{2+}	0.41	CO_3^{2-}	0.004

K^+	0.36	KNO_3	0.101
Sr^{2+}	0.007	K_2HPO_4	0.017
Cl^-	20.1		

[표 2]

온도	$15 \pm 0.5 \text{ } ^\circ\text{C}$
염분(Salinity)	26-34 ‰
광조사(photon irradiance)	$80-100 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$
광주기	12:12 h LD

배양한 후에 파래의 색상 변화를 영상분석장치(주식회사 삼성, MV200)를 이용하여 생식율을 측정하였다. 도 2에서 보는 바와 같이 발육상태(Vegetative)의 파래는 연한 녹색을 띠지만 생식(reproduction)이 시작되면 진한 갈색(dark olive)으로 변하고 최종적으로 흰색으로 바뀐다. 이러한 기준에 입각해서 9 가지의 서로 다른 기원의 슬러지를 대상으로 EC50(생식율을 50% 감소시키는데 효과적인 농도)을 측정하여 하기 표 3에 기재하였다. 표 3에서 비교예는 동일한 샘플에 대하여 Azur Environmental 사의 Microtox 시스템을 사용하여 측정한 것이다.

[표 3]

No	슬러지 희석액	M비교예(Microtox)	실시예
1	산업폐수	22.31	9.15
2	축사폐수	34.78	10.60
3	가죽공장 폐수	44.02	13.45
4	생활하수	44.62	8.25
5	음식물 쓰레기	48.71	9.47
6	혼합 폐수	68.13	9.53
7	산업오수	76.50	6.78
8	filtration bed	78.41	15.00
9	Rural sewage	>100.00	13.96

상기 표 3에서 보는 바와 같이 본 발명에 따른 실시예가 비교예에 비하여 2-7 배 더 민감성이 우수함을 알 수 있다.

발명의 효과

본 발명의 수질 독성 평가 방법은 독성을 함유한 오수, 폐수 등의 유해성을 신속하고 민감하게 측정할 수 있다. 또한 독성 평가 방법이 간편하고 비용이 저렴하여 오수, 폐수의 처리 중에 발생될 수 있는 문제를 사전에 방지하는 데 유용하게 사용될 수 있으며, 원격지에서도 그 자료를 전송하여 분석 결과를 얻을 수 있으므로 공간에 제약을 받지 않고 수질의 독성을 평가할 수 있다.

본 발명의 단순한 변형 또는 변경은 모두 이 분야의 통상의 지식을 가진 자에 의하여 용이하게 실시될 수 있으며 이러한 변형이나 변경은 모두 본 발명의 영역에 포함되는 것으로 볼 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 수질 독성 평가 공정을 개략적으로 도시한 도면이다.

도 2는 파래의 생식에 따른 엽체의 색상 변화를 보인 사진이다.

도면

도면1



도면2

