



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0041091
(43) 공개일자 2012년04월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01N 3/00 (2006.01) G01N 33/18 (2006.01)
C12Q 1/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0004815
(22) 출원일자 2011년01월18일
심사청구일자 2011년01월18일
(30) 우선권주장
1020100102410 2010년10월20일 대한민국(KR)

(71) 출원인
인천대학교 산학협력단
인천광역시 연수구 아카데미로 119, 11호 12 (송도동)
(72) 발명자
한태준
인천광역시 연수구 해송로 143, 송도웰카운티 10 2동 1001호 (송도동)
한영석
인천광역시 연수구 해돋이로84번길 10, 풍림아원 608동 601호 (송도동)
황자혜
인천광역시 동구 석수로27번길 6-1 (만석동)
(74) 대리인
특허법인우인

전체 청구항 수 : 총 10 항

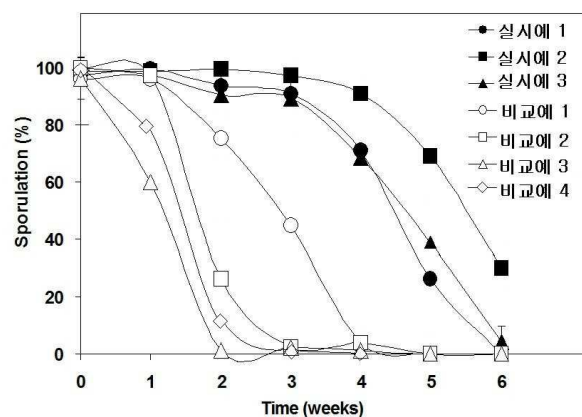
(54) 발명의 명칭 수질 독성 평가의 바이오마커로 사용되는 파래의 보관 용액 및 파래의 보관 방법

(57) 요약

본 발명은 히드라조산(hydrazonic acid)의 알칼리 금속염을 25~45%의 염분 농도를 가진 염수에 용해시켜 형성한 용액으로서, 상기 용액 내에서 히드라조산(hydrazonic acid)의 알칼리 금속염의 농도가 0.01~1 ppb인 것을 특징으로 하는 파래의 보관 용액을 제공한다. 또한, 본 발명은 수질 독성 평가의 바이오마커로 사용되는 파래를 보관하기 위한 방법으로서, (a) 파래를 준비하는 단계; 및 (b) 상기 준비된 파래를 파래의 보관 용액이 수용된 용기에 넣고 0~10℃의 냉장 조건에서 보관하는 단계;를 포함하는 파래의 보관 방법을 제공한다.

본 발명에 따른 파래의 보관 용액을 이용하여 파래를 보관하는 경우 종래의 보관 방법과 달리 일정 세기 범위의 광 조사량, 공기 발생기 및 배양액의 교환 등을 필요로 하지 않으므로 시험생물인 파래를 지속적으로 유지 배양하는데 드는 경제적인 비용과 인력난을 해소할 수 있는 장점이 있다. 또한, 수질 독성 평가자들이 희망하는 날짜에 언제든지 실험이 가능하므로 시간 절약의 효과가 있다. 결과적으로 이미 개발된 파래를 이용한 수질 독성의 평가 방법에 대한 활용도를 높일 수 있다.

대표도 - 도2



특허청구의 범위

청구항 1

히드라조산(hydrazonic acid)의 알칼리 금속염을 25~45%의 염분 농도를 가진 염수에 용해시켜 형성한 용액으로서,

상기 용액 내에서 히드라조산의 알칼리 금속염의 농도가 0.01~1 ppb인 것을 특징으로 하는 파래의 보관 용액.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 히드라조산의 알칼리 금속염은 아지드화 나트륨(sodium azide)인 것을 특징으로 하는 파래의 보관 용액.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 염수는 염으로서 염화나트륨(NaCl), 황산마그네슘(MgSO₄), 염화마그네슘(MgCl₂), 염화칼슘(CaCl₂), 염화칼륨(KCl), 브로민화나트륨, 질산나트륨(NaNO₃), 탄산수소나트륨(NaHCO₃), 붕산(H₃BO₃), 규산나트륨(Na₂SiO₃), 질산스트론튬[Sr(NO₃)₂], 및 인산수소이나트륨(Na₂HPO₄)을 포함하는 것을 특징으로 하는 파래의 보관 용액.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 염수는 인공 해수인 것을 특징으로 하는 파래의 보관 용액.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 인공 해수는 OTT's 인공 해수(OTT's artificial seawater)인 것을 특징으로 하는 파래의 보관 용액.

청구항 6

수질 독성 평가의 바이오마커로 사용되는 파래를 보관하기 위한 방법으로서,

(a) 파래를 준비하는 단계; 및

(b) 상기 준비된 파래를 제 1항 내지 제 6 항 중 어느 한 항의 보관 용액이 수용된 용기에 넣고 0~10℃의 냉장 조건에서 보관하는 단계;를 포함하는 파래의 보관 방법.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 (a) 단계의 파래는 구멍 갈파래(*Ulva pertusa*)인 것을 특징으로 하는 파래의 보관 방법.

청구항 8

제 6항에 있어서, 상기 (a) 단계의 파래는 원형으로 절편된 형태인 것을 특징으로 하는 파래의 보관 방법.

청구항 9

제 6항에 있어서, 상기 (a) 단계의 파래는 엽체 부위인 것을 특징으로 하는 파래의 보관 방법.

청구항 10

제 6항에 있어서, 상기 (b) 단계의 보관 기간은 4주 이하인 것을 특징으로 하는 파래의 보관 방법.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 수질 독성 평가의 바이오마커로 사용되는 파래의 보관 용액 및 파래의 보관 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 특정 농도 범위의 히드라조산(hydrazonic acid)의 알칼리 금속염을 포함하는 파래의 보관 용액 및 상기 보관 용액을 파래에 처리하는 것을 특징으로 하는 파래의 보관 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[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. 수계에 유입될 수 있는 독성 물질을 검출하는 방법으로 일반적으로 물리화화적인 방법과 생물을 독성 물질의 바이오마커로 이용하는 생물학적인 방법이 있는데, 이 중 물리화화적인 방법은 고가의 이화학적 장비를 이용하는 등의 내재적 단점들이 존재하고, 이를 보완하기 위해 생물학적 독성 측정 기법 및 장치에 대한 개발이 요구되었으며, 특히 생물학적 독성 측정 기법 및 장치의 핵심이라 할 수 있는 생물종에 대한 연구가 활발해지고 있다. 그러나 기 개발된 생물 종은 시험생물 분포 지역의 제약성, 시험생물의 지속적인 배양과 공급 및 유지관리의 어려움 등의 이유로 보다 개선된 기법의 생물종 보관 방법을 절대적으로 요구하고 있는 상황이다.

[0003] 한편, 생물학적 수질 독성 측정 기법에 사용되는 생물종 중 파래는 서식 환경이 다양하고, 샘플 확보 및 배양이 용이하다는 장점을 가지며, 이와 관련하여 대한민국 등록특허 제10-0653100호 및 제10-0653101호에는 파래의 포자 형성물을 이용하여 수질 독성을 평가하는 방법이 개시되어 있다. 그러나, 파래를 수질 독성 측정에 이용하기 위한 보관 방법을 살펴보면, 30~200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ 의 광 조사량(photon irradiance) 및 10℃의 온도 조건에서 공기 발생기를 사용하여 24시간 유동시키면서 48시간 주기로 배양액을 전량 교환해야 하는 번거로움이 있었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명은 종래의 문제점을 해결하기 위해 도출된 것으로서, 본 발명의 목적은 배양액 교환과 공기 발생기의 사용을 필요로 하지 않으면서 동시에 수질의 독성 물질에 안정적이고 재연성 있게 반응할 수 있는 상태로 파래를 보관할 수 있는 파래의 보관 용액을 제공하는데에 있다.

[0005] 본 발명의 다른 목적은 파래의 보관 용액을 이용하여 파래를 수질 독성 평가에 이용할 수 있는 상태로 보관하는 방법을 제공하는데에 있다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명의 발명자들은 파래에 다양한 생리활성 억제제 들을 선별하고, 이들이 파래의 보관 시 미치는 영향을 연구한 결과, 파래에 특정 농도 범위의 히드라조산(hydrazonic acid)의 알칼리 금속염을 처리하여 보관하는 경우 파래가 수질의 독성 물질에 안정적이고 재연성 있게 반응한다는 사실을 발견하고, 본 발명을 완성하였다.

[0007] 본 발명의 상기 목적을 해결하기 위하여, 본 발명은 히드라조산(hydrazonic acid)의 알칼리 금속염을 25~45%의

염분 농도를 가진 염수에 용해시켜 형성한 용액으로서, 상기 용액 내에서 히드라조산(hydrazonic acid)의 알칼리 금속염의 농도가 0.01~1 ppb인 것을 특징으로 하는 파래의 보관 용액을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명의 상기 다른 목적을 해결하기 위하여, 본 발명은 수질 독성 평가의 바이오마커로 사용되는 파래를 보관하기 위한 방법으로서, (a) 파래를 준비하는 단계; 및 (b) 상기 준비된 파래를 전술한 파래의 보관 용액이 수용된 용기에 넣고 0~10℃의 냉장 조건에서 보관하는 단계;를 포함하는 파래의 보관 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0009] 본 발명에 따른 파래의 보관 용액을 이용하여 파래를 보관하는 경우 종래의 보관 방법과 달리 일정 세기 범위의 광 조사량, 공기 발생기 및 배양액의 교환 등을 필요로 하지 않으므로 시험생물인 파래를 지속적으로 유지 배양하는데 드는 경제적인 비용과 인력난을 해소할 수 있는 장점이 있다. 또한, 수질 독성 평가자들이 희망하는 날짜에 언제든지 실험이 가능하므로 시간 절약의 효과가 있다. 결과적으로 이미 개발된 파래를 이용한 수질 독성의 평가 방법에 대한 활용도를 높일 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1은 원형 절편 형태의 파래를 플라스틱 보관 용기에 보관한 상태를 나타낸 사진이다.

도 2는 파래의 보관 조건에 따른 포자 형성률의 변화를 나타낸 그래프이다.

도 3은 0.1 ppb의 아지드화 나트륨 용액에 4주간 보관된 파래와 대조군으로 보관없이 바로 사용한 파래의 구리 표준 독성 용액에 대한 독성 반응 결과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명한다.

[0012] 파래의 보관 용액

[0013] 본 발명에 따른 파래의 보관 용액은 히드라조산(hydrazonic acid, HN_3)의 알칼리 금속염을 염수에 용해시켜 형성한 용액이다.

[0014] 본 발명에 따른 파래의 보관 용액의 일 구성요소인 히드라조산(hydrazonic acid)의 알칼리 금속염은 일반적으로 생리활성을 억제하는 것으로 알려져 있으며, 본 발명에서 사용되는 히드라조산(hydrazonic acid)의 알칼리 금속염은 아지드화 리튬(lithium azide, LiN_3), 아지드화 나트륨(sodium azide, NaN_3), 아지드화 칼륨(potassium azide, KN_3) 등 그 종류가 크게 제한되지 않으나, 파래의 서식 환경 및 염수 성분과의 적합성을 고려할 때 아지드화 나트륨(sodium azide, NaN_3)인 것이 바람직하다. 본 발명에 따른 파래의 보관 용액에서 히드라조산(hydrazonic acid, HN_3)의 알칼리 금속염은 0.01~1 ppb(parts per billion)의 농도, 바람직하게는 0.05~0.5 ppb의 농도, 가장 바람직하게는 0.05~0.2 ppb의 농도로 제한되는데, 히드라조산(hydrazonic acid, HN_3)의 알칼리 금속염의 농도가 0.01 ppb 미만이면 히드라조산(hydrazonic acid, HN_3)의 알칼리 금속염의 첨가에 따른 효과가 미비하고, 1 ppb를 초과하면 히드라조산(hydrazonic acid, HN_3)의 알칼리 금속염의 독성에 의해 파래에 손상을 주기 때문이다.

[0015] 본 발명에 따른 파래의 보관 용액의 일 구성요소인 염수는 25~45%의 염분 농도, 바람직하게는 30~40%의 염분 농도를 가지는데, 파래의 보관 용액이 파래의 서식 환경과 유사한 염분 환경을 가져야 파래를 본래 상태로 유지시키는데 적당하다. 또한, 염수는 바람직하게는 염으로서 염화나트륨(NaCl), 황산마그네슘(MgSO_4), 염화마그네슘(MgCl_2), 염화칼슘(CaCl_2), 염화칼륨(KCl), 브로민화나트륨, 질산나트륨(NaNO_3), 탄산수소나트륨(NaHCO_3), 붕산(H_3BO_3), 규산나트륨(Na_2SiO_3), 질산스트론튬($\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$), 및 인산수소이소나트륨(Na_2HPO_4)을 포함한다. 본 발명에서 사용되는 염수로 오염되지 않은 해수를 사용할 수도 있고, 바람직하게는 인공 해수를 사용할 수도 있다. 인공 해수(人工海水, artificial seawater)는 해수성분을 분석하여, 다량의 무기성분의 비율과 농도에 대한 동일

한 비율로 재편성된 염류용액을 말한다. 본 발명에서는 인공 해수로 공지된 다양한 상업적 제품을 사용할 수 있고, 그 종류가 크게 제한되는 것은 아니며, 이중 OTT's 인공 해수(OTT's artificial seawater)가 파래의 보관을 위해 바람직하다.

[0016] 파래의 보관 방법

[0017] 본 발명에 따른 파래의 보관 방법은 파래를 수질 독성의 평가에 사용시 바이오마커로 작용할 수 있도록 그 생식 기능을 유지시키는 것을 특징으로 하는데, 구체적으로 (a) 파래를 준비하는 단계; 및 (b) 상기 준비된 파래를 전술한 보관 용액이 수용된 용기에 넣고 0~10℃, 바람직하게는 2~6℃의 냉장 조건에서 보관하는 단계;를 포함한다.

[0018] 본 발명에서 수질 독성의 평가시 바이오마커로 사용되는 파래(*Ulva*)는 그 종류가 크게 제한되지 않으며, 예를 들어 창자파래(*Ulva intestinalis*), 납작파래(*Ulva compressa*), 잎파래(*Ulva linza*), 가시파래(*Ulva prolifera*), 격자파래(*Ulva clathrata*), 갈파래(*Ulva lactuca*), 구멍 갈파래(*Ulva pertusa*) 등이 있으며, 이중 구멍 갈파래(*Ulva pertusa*)가 독성 물질에 대한 민감성 측면에서 바람직하다. 또한, 실제 수질 독성 평가시 파래는 잎에 해당하는 엽체 부위가 이용되며 포자 형성물의 측정을 용이하게 하기 위해 원형, 사각형 등 특정 형태로 절편된 형태로 절단되는데, 보관 후 특정 형태로 절단하는 번거로움을 피하고 보관을 보다 쉽게 위해 상기 (a) 단계에서 원형으로 절편된 형태를 가지는 것이 바람직하다.

[0019] 본 발명에 따른 파래의 보관 방법에서 파래의 보관 기간은 크게 제한되지 않으나, 파래가 수질 독성의 평가시 신뢰성 있는 바이오마커로 사용되기 위해서는 일반적으로 채취한 최초 상태에서 발취되는 포자 형성물의 80% 이상에 해당하는 포자 형성물을 발취하여야 하므로 상기 (b) 단계의 보관 기간은 4주 이하, 바람직하게는 3주 이하인 것을 특징으로 한다. 본 발명에 따른 파래의 보관 방법으로 파래를 3주 동안 보관하는 경우 파래는 본래 포자 형성물의 90% 이상에 해당하는 포자 형성물을 발취할 수 있다.

[0020] 보관된 파래를 이용한 수질 독성 평가 방법

[0021] 파래를 바이오마커로 사용하여 수질의 독성을 평가하는 방법을 이해하기 위해서는 먼저 파래의 생활사를 살펴볼 필요가 있다. 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 형성물을 이용한 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 변화하고 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.

[0022] 수체 샘플의 수질 독성은 원수와 희석된 수체 샘플에서 배양된 파래의 포자 형성물을 독성 물질을 포함하지 않는 대조 용액에서 배양된 파래의 포자 형성물과 비교하여 평가되며, 구체적으로 유효 포자 형성 저해 농도(median sporulation inhibition concentration, EC₅₀) 내지 무영향 농도(No Observed Effect Concentration, NOEC) 값으로 표시된다. 유효 포자 형성 저해 농도(median sporulation inhibition concentration, EC₅₀)는 독성 물질을 포함하지 않는 대조 용액에서의 포자 형성물보다 50% 감소한 포자 형성물을 보이는 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 희석물로 표시된다. 무영향 농도는 독성 물질을 포함하지 않는 대조 용액에서의 포자 형성물과 유의적 차이가 없는 수준의 포자 형성물을 보이는 수체 샘플의 농도를 의미하는 것으로서, 유효 포자 형성 저해 농도와 마찬가지로 단일 독성 물질을 포함하는 수체 샘플의 경우 특정 농도로 표시되고 다수의 독성 물질을 포함하는 미지의 원수의 경우 희석물로 표시된다.

[0023] 이하, 하기의 실시예를 참조하여 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다. 다만, 본 발명의 보호범위가 하기의 실

시에에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0024] 표 1은 본 발명의 하기 제조예, 실시예 및 비교예 등에서 사용된 인공 염수인 OTT's 인공 해수(OTT's artificial seawater)에 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

1. 파래 보관 용액의 제조

[0027] 제조예 1.

[0028] OTT's 인공 해수에 아지드화 나트륨(sodium azide)을 0.01 ppb(parts per billion)의 농도가 되도록 용해시켜 파래 보관 용액을 제조하였다.

[0029] 제조예 2.

[0030] OTT's 인공 해수에 아지드화 나트륨(sodium azide)을 0.1 ppb의 농도가 되도록 용해시켜 파래 보관 용액을 제조하였다.

[0031] 제조예 3.

[0032] OTT's 인공 해수에 아지드화 나트륨(sodium azide)을 1.0 ppb의 농도가 되도록 용해시켜 파래 보관 용액을 제조하였다.

[0033] 비교 제조예 1.

[0034] OTT's 인공 해수에 아지드화 나트륨(sodium azide)을 10.0 ppb의 농도가 되도록 용해시켜 파래 보관 용액을 제조하였다.

[0035] 비교 제조예 2.

[0036] OTT's 인공 해수에 아지드화 나트륨(sodium azide)을 100.0 ppb의 농도가 되도록 용해시켜 파래 보관 용액을 제조하였다.

[0037] 비교 제조예 3.

[0038] OTT's 인공 해수에 아지드화 나트륨(sodium azide)을 1000.0 ppb의 농도가 되도록 용해시켜 파래 보관 용액을 제조하였다.

[0039] **2. 파래의 보관 및 보관 조건에 따른 파래의 포자 형성을 변화**

[0040] (1) 파래의 보관

[0041] 실시예 1.

[0042] 대한민국 안인(Ahnin) 근해에서 구멍 갈파래(*Ulva pertusa* Kjellman)를 수집하고, 구멍 갈파래의 엽체(잎)를 지름 4mm의 동전 모양으로 절단하여 원형 절편 형태로 만들었다. 이후, 제조예 1에서 제조한 파래 보관 용액 15ml가 수용된 플라스틱 보관 용기에 원형 절편 형태의 파래 24개를 넣고 4℃의 냉장 조건에서 6주간 보관하였다. 도 1은 원형 절편 형태의 파래를 플라스틱 보관 용기에 보관한 상태를 나타낸 사진이다.

[0043] 실시예 2.

[0044] 파래 보관 용액으로 제조예 2에서 제조한 파래 보관 용액을 사용한 점을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 파래를 보관하였다.

[0045] 실시예 3.

[0046] 파래 보관 용액으로 제조예 3에서 제조한 파래 보관 용액을 사용한 점을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 파래를 보관하였다.

[0047] 비교예 1.

[0048] 파래 보관 용액으로 비교 제조예 1에서 제조한 파래 보관 용액을 사용한 점을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 파래를 보관하였다.

[0049] 비교예 2.

[0050] 파래 보관 용액으로 비교 제조예 2에서 제조한 파래 보관 용액을 사용한 점을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 파래를 보관하였다.

[0051] 비교예 3.

[0052] 파래 보관 용액으로 비교 제조예 3에서 제조한 파래 보관 용액을 사용한 점을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 파래를 보관하였다.

[0053] 비교예 4.

[0054] 파래 보관 용액으로 아지드화 나트륨(sodium azide)을 포함하지 않은 OTT's 인공 해수 자체를 사용한 점을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 파래를 보관하였다.

[0055] (2) 파래의 포자 형성률(Sporulation) 측정

[0056] 실시예 1 내지 3 및 비교예 1 내지 4에서와 같이 6주간 파래를 보관하면서 일 주일 단위로 파래를 꺼내어 파래의 포자 형성을 유도하고, 파래의 포자 형성률을 측정하였다. 먼저 보관 용기에서 파래를 꺼내어 OTT's 인공 해수가 수용된 24-웰 평판기(24-well plate)에 넣고 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ 의 광 조사량(photon irradiance), 12:12h의 명암 주기, 및 15℃의 온도 조건에서 96시간 동안 배양하여 파래의 포자 형성을 유도하였다.

[0057] 파래의 포자 형성 여부는 파래 엽체의 색의 변화로 알 수 있는데, 정상적인 엽체는 녹색을 띠는 반면, 포자 형성이 진행됨에 따라 점진적으로 황색, 갈색, 흰색을 나타낸다. 이렇게 색이 변화된 부분을 포자 형성 면적으로

간주한다.

[0058] 영상분석장치(모델명 : MW-200; 제조사 : Samsung Co., Korea)를 이용하여 배양이 완료된 파래 엽체의 전체 면적과 이중 색이 변화된 포자 형성 면적을 측정한다. 도 2는 파래의 보관 조건에 따른 포자 형성률의 변화를 나타낸 그래프이다. 도 2에서 보이는 바와 같이 OTT's 인공 해수 또는 아지드화 나트륨(sodium azide)의 농도가 10~1000 ppb인 보관 용액에 파래를 보관하는 경우 보관 기간이 경과함에 따라 파래의 포자 형성률이 급격하게 감소하였으며, 4주의 보관 기간이 경과한 이후에는 포자가 거의 형성되지 않았다. 반면, 아지드화 나트륨(sodium azide)의 농도가 0.01~1.0 ppb인 보관 용액에 파래를 보관하는 경우 3주의 보관 기간이 경과한 후 약 90% 이상의 포자 형성률을 나타내었고, 4주의 보관 기간이 경과한 후에도 약 80% 이상의 포자 형성률을 나타내었다. 특히, 아지드화 나트륨(sodium azide)의 농도가 0.1 ppb인 보관 용액에 파래를 보관하는 경우에는 4주의 보관 기간이 경과한 후에도 90% 이상의 높은 포자 형성률을 나타내었다.

[0059] 3. 보관된 파래의 수질 독성 평가에 대한 바이오마커로서의 안정성 및 재연성 여부

[0060] 본 발명의 보관 용액 및 보관 방법으로 보관된 파래가 독성 물질을 포함하는 수체 샘플의 독성을 평가하기 위한 바이오마커로서 안정성 및 재연성을 가지는지 여부를 알아보았다. 이때, 독성 물질을 포함하는 수체 샘플로는 구리 표준 독성 용액을 사용하였다. 구리 독성 물질 용액(초기 농도 0.4 mg/L, 염분 농도는 35‰)을 OTT's 인공 해수(염분 농도는 35‰)로 반수 희석하여 구리 농도가 각각 0.4 mg/L, 0.2 mg/L, 0.1 mg/L, 0.05 mg/L, 0.025 mg/L인 구리 표준 독성 용액을 준비하였다. 또한, OTT's 인공 해수를 독성 물질을 포함하지 않는 표준 용액으로 사용하였다.

[0061] 먼저, 24-웰 평판기(24-well plate)에 준비된 표준 용액들을 넣고, 이후 상기 실시예 2에서 4주간 보관한 파래를 꺼내어 표준 용액들이 수용된 24-웰 평판기(24-well plate)에 넣은 후, 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ 의 광 조사량(photon irradiance), 12:12h의 명암 주기, 및 15℃의 온도 조건에서 96시간 동안 배양하여 파래의 포자 형성을 유도하였다. 이후, 영상분석장치(모델명 : MW-200; 제조사 : Samsung Co., Korea)를 이용하여 배양이 완료된 파래의 포자 형성률을 측정하였다.

[0062] 대조군으로 대한민국 안인(Ahnin) 근해에서 바로 채취한 구멍 갈파래(*Ulva pertusa* Kjellman)의 엽체를 사용하였고, 전술한 방법과 동일한 방법으로 파래의 포자 형성을 유도하고 파래의 포자 형성률을 측정하였다.

[0063] 도 3은 0.1 ppb의 아지드화 나트륨 용액에 4주간 보관된 파래와 대조군으로 보관없이 바로 사용한 파래의 구리 표준 독성 용액에 대한 독성 반응 결과를 나타낸 그래프이다. 도 3에서 보이는 바와 같이 본 발명의 보관 방법으로 보관한 파래와 보관없이 바로 사용한 파래는 구리 표준 독성 용액의 구리 농도에 관계없이 거의 동일한 포자 형성률을 나타내었다. 또한, 유효 포자 형성 저해 농도(EC_{50} , median sporulation inhibition concentration)의 경우 본 발명의 보관 방법으로 보관한 파래로 측정한 값과 보관없이 바로 사용한 파래로 측정한 값은 각각 0.088 mg Cu/l, 0.103 mg Cu/l로 나타났다. 본 발명의 보관 방법으로 보관한 파래와 보관없이 바로 사용한 파래의 구리 독성 물질에 대한 독성 반응 결과는 통계적으로 유의적인 차이가 없었으며, 본 발명의 보관 방법으로 보관한 파래는 수질 독성 평가에 대한 바이오마커로서의 안정성 및 재연성을 가지는 것으로 판명되었다.

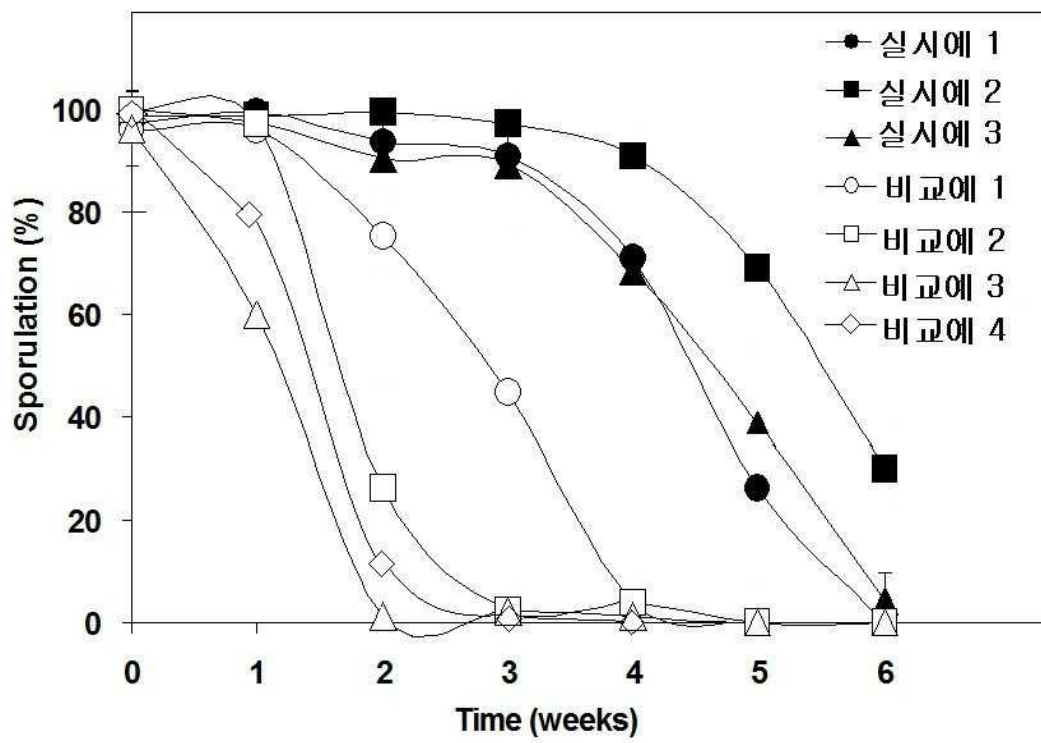
[0064] 이상에서와 같이 본 발명을 상기의 실시예를 통해 설명하였지만 본 발명이 반드시 여기에만 한정되는 것은 아니며 본 발명의 범주와 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양한 변형실시가 가능함은 물론이다. 또한, 본 발명의 본질적인 범주를 벗어나지 않고서도 많은 변형을 실시하여 특정 상황 및 재료를 본 발명의 교시내용에 채용할 수 있다. 따라서, 본 발명의 보호범위는 본 발명을 실시하는데 계획된 최상의 양식으로서 개시된 특정 실시태양으로 국한되는 것이 아니며, 본 발명에 첨부된 특허청구의 범위에 속하는 모든 실시태양을 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

도면

도면1



도면2



도면3

