

특허증

CERTIFICATE OF PATENT



특 허

제 10-2865566 호

Patent Number

출원번호

제 10-2023-0033166 호

Application Number

출원일

2023년 03월 14일

Filing Date

등록일

2025년 09월 24일

Registration Date

발명의명칭

Title of the Invention

민물고기 세포의 증식 특성을 이용한 생태독성 평가방법

특허권자

Patentee

겐트대학교코리아 산학협력단(120171-*****)

인천광역시 연수구 송도문화로 119-5(송도동, 인천글로벌캠퍼스겐트대학교코리아)

발명자

Inventor

등록사항란에 기재

위의 발명은 「특허법」에 따라 특허원부에 등록되었음을 증명합니다.

This is to certify that, in accordance with the Patent Act, a patent for the invention has been registered at the Korean Intellectual Property Office.



특허청

Korean Intellectual
Property Office

2025년 09월 24일

특허청장

COMMISSIONER,

KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE



QR코드로 현재기준
등록사항을 확인하세요



김완기

등록사항

특 허 제 10-2865566 호
Patent Number

발명자 Inventors

박준태(750404-*****)

인천광역시 연수구 해송로 143, 101동 703호 (송도동, 송도웰카운티1단지)

이윤행(950308-*****)

서울특별시 동작구 여의대방로44길 10, 111동 801호 (대방동, 대림아파트)

박지윤(980820-*****)

인천광역시 연수구 아카데미로 119 (송도동)

한태준(600416-*****)

인천광역시 연수구 해송로30번길 20, 404동 2503호 (송도동, 송도 웰카운티 4단지)

박지혜(890416-*****)

인천광역시 연수구 송도과학로28번길 50, 1105호(송도동)

이호준(931120-*****)

인천광역시 연수구 송도국제대로 261, 211동 1002호 (송도동, 송도 더샵 센트럴시티)



등록특허 10-2865566



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년09월26일

(11) 등록번호 10-2865566

(24) 등록일자 2025년09월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/18 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/186 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0033166

(22) 출원일자 2023년03월14일

심사청구일자 2023년03월14일

(65) 공개번호 10-2024-0139316

(43) 공개일자 2024년09월23일

(56) 선행기술조사문헌

KR101974891 B1

KR102007480 B1

KR101365719 B1

John Pierce Wise Sr, et al. Silver nanospheres are cytotoxic and genotoxic to fish cells. Aquat Toxicol. 2010 April 1; 97(1): 34-41.*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

겐트대학교코리아 산학협력단

인천광역시 연수구 송도문화로 119-5(송도동, 인천글로벌캠퍼스겐트대학교코리아)

(72) 발명자

박준태

인천광역시 연수구 해송로 143, 101동 703호 (송도동, 송도웰카운티1단지)

이윤행

서울특별시 동작구 여의대방로44길 10, 111동 801호 (대방동, 대림아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

임상엽, 서부영, 박중민, 권정기, 이장주

전체 청구항 수 : 총 6 항

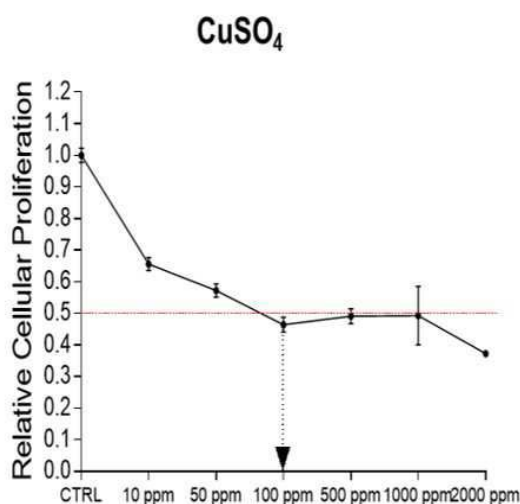
심사관 : 김동원

(54) 발명의 명칭 민물고기 세포의 증식 특성을 이용한 생태독성 평가방법

(57) 요약

본 발명의 일 예는 민물고기 세포의 증식 특성을 이용한 생태독성 평가방법을 제공한다. 본 발명의 일 예에 따른 생태독성 평가방법은 쉽게 제작할 수 있는 민물고기 세포주를 사용하고, 쉽게 측정할 수 있는 민물고기 세포의 증식 특성을 평가 지표로 이용하기 때문에 전체 프로세스가 간편하고 평가 시간도 약 4일 정도로 짧게 소요된다. 특히, 본 발명의 일 예에 따른 생태독성 평가방법은 민물고기가 서식하는 하천 생태계의 환경오염 수준을 정확하게 제공할 수 있고, 보편성을 가지기 때문에 상업화에 매우 유리하다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

박지윤

인천광역시 연수구 아카데미로 119 (송도동)

한태준

인천광역시 연수구 해송로30번길 20, 404동 2503호
(송도동, 송도 웰카운티 4단지)

박지혜

인천광역시 연수구 송도과학로28번길 50, 1105호(송도동)

이호준

인천광역시 연수구 송도국제대로 261, 211동 1002호 (송도동, 송도 더샵 센트럴시티)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1485018936
과제번호	ARQ202201522001
부처명	환경부
과제관리(전문)기관명	한국환경산업기술원
연구사업명	수생태계건강성확보기술개발사업
연구과제명	국내고유종 기반 하천호소수 생물영향평가 기술개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	젠트대학교코리아 산학협력단
연구기간	2022.04.01 ~ 2026.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

(a) 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포주를 어류세포 배양용 액체 배지와 함께 용기에 넣고 배양하여 용기 내부 벽에 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포를 부착시킨 후 어류세포 배양용 액체 배지를 제거하여 측정용 용기를 준비하는 제1단계; (b) 상기 측정용 용기에 오염된 샘플 및 어류세포 배양용 액체 배지를 포함하는 측정용 액체 샘플과, 오염된 샘플을 포함하지 않고 어류세포 배양용 액체 배지로 구성된 대조군용 액체 샘플을 각각 첨가하고 배양하는 제2단계; 및 (c) 배양이 완료된 후 살아있는 세포의 증식 특성을 측정하고, 오염된 샘플이 존재하는 조건에서 배양된 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포의 증식 특성과 오염된 샘플이 존재하지 않는 대조군에서 배양된 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포의 증식 특성을 비교하여 오염된 샘플의 독성 수준을 정량화하는 제3단계를 포함하는 생태독성 평가방법으로서,

상기 오염된 샘플은 오염된 토양, 오염수 또는 오염된 토양추출액에서 선택되고,

상기 증식 특성은 살이 있는 세포의 증식수 또는 살아있는 세포의 증식속도에서 선택되고,

상기 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포주는 하기의 단계들에 의해 제작되는 것을 특징으로 하는 생태독성 평가방법 :

(a1) 다져진 잉어(*Cyprinus carpio*) 조직을 튜브 형태의 용기에 옮기고, 콜라겐분해효소를 포함하는 액체 배지를 첨가하고 배양한 후, 콜라겐분해효소를 포함하지 않는 액체 배지를 첨가하고 방치하여 잉어(*Cyprinus carpio*) 조직을 가라앉히는 단계;

(a2) 상기 튜브 형태의 용기에서 가라앉은 조직을 제외한 상층액만을 새로운 튜브 형태의 용기로 옮기고 원심분리하여 세포 펠렛을 침전시키는 단계; 및

(a3) 상기 새로운 튜브 형태의 용기에서 상층액을 제거하고 세포 펠렛을 세척한 후 어류세포 배양용 액체 배지를 첨가하고 배양하여 세포를 성장시키고 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포주를 수득하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 생태독성은 중금속, 제초제, 계면활성제, 과불화화합물 및 염류화합물로 이루어진 군에서 선택되는 독성물질에 의해 유발되는 생태독성인 것을 특징으로 하는, 생태독성 평가방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 독성물질은 황산구리(CuSO_4), 중크롬산칼륨($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), SDS(Sodium dodecyl sulphate), PFOA(Perfluorooctanoic acid) 및 수산화나트륨(NaCl)으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 생태독성 평가방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 어류세포 배양용 액체 배지는 글루코스, 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS), 페니실린, 스트렙토마이신, L-글루타민 및 HEPES[N-(2-hydroxyethyl)-piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid]가 보충된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)인 것을 특징으로 하는 생태독성 평가방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 (b) 단계의 배양은 35~40℃의 온도, 7~8의 pH, 1~10%(w/v) CO_2 및 암 조건에서 이루어지

는 것을 특징으로 하는 생태독성 평가방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, (c) 단계의 정량화는 최소영향농도(EC_{10}) 또는 반수유효농도(Half maximal effective concentration, EC_{50})에 의해 표시되는 것을 특징으로 하는, 생태독성 평가방법.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 생태독성 평가방법에 관한 것으로서, 더 상세하게는 토양, 오염수 등과 같은 피오염물의 생태독성을 민물고기 세포의 증식 특성을 이용하여 평가하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 전 세계적인 산업화 및 환경에 대한 인식부재로 인하여 산업화에 사용된 [0002] 다양한 유해물질이 무분별하게 배출되어 토양 및 수질 오염을 가속화시켰다. 1차로 토양을 오염시킨 유해물질은 2차로 강, 하천, 지하수 등으로 흘러들거나 수계를 오염시키며, 기화되어 3차로 대기오염까지 야기하는 등 다양한 환경오염의 원인이 되었다. 따라서 산업화로 인한 오염 정도를 판단하고 이에 대한 대책을 강구하는 것이 중요한 화두로 떠오르고 있다.

[0003] 오염 정도를 분석하는 방법에는 오염물질의 화학적 총량을 분석하여 오염 정도를 평가하는 분석화학적 기법이 있다. 상기 분석화학적 기법은 오염 물질의 화학적 형태에 따른 위해성 평가에 한계가 있으며, 평가 대상 오염 물질 이외의 다른 독성물질의 존재 여부를 확인하기 어려운 문제점이 있다.

[0004] 최근에는 상기 분석화학적 기법의 문제점을 보완할 수 있는 생태위해성평가(Ecological Risk Assessment)기법이 주목받고 있다. 상기 생태위해성 평가는 유해인자에 의한 생태학적 악영향을 평가하는 것을 의미한다. 생태위해성평가 기법에는 생태독성측정 기술이 사용된다. 상기 생태독성측정 기술은 살아있는 생물체의 물리적, 생리 화학적 반응 인자의 변화를 측정하여 유해물질이 생물체에 미치는 영향을 평가한다. 유해물질에 대한 생태독성은 포유류, 어류, 무척추동물, 식물 등 생태계에 존재하는 수백만 종의 생물에게 적용된다. 그러나 수백만 종에 달하는 모든 생물에 대한 독성평가는 현실적으로 불가능하다. 따라서 경제협력개발기구(OECD), 미국 재료 시험 협회 (ASTM), 미국 환경보호청(USEPA)과 같은 국제기관에서는 많은 생물의 특징을 대변할 수 있는 생태독성 시험종을 선정하고 이에 대하여 독성평가를 수행하는 방법을 제안하였다. 상기 생태독성 시험종은 식물, 지렁이, 토기, 토양선충류, 조류, 미생물 등이다.

[0005] 생태독성에 대한 신속한 분석이 가능하다면 독성물질 유출에 대해 신속히 대응할 수 있을 것이다. 예를 들어, 유해물질이 다수 포함된 폐수를 배출하는 공장이 있다면 주변의 토양을 신속히 검사하여 폐수의 배출을 즉시 금지시키므로 더 이상의 오염을 방지할 수 있다. 그러나 상기 생태독성 시험종을 이용하는 생태독성측정 기술은 생물의 성장속도가 느려 결과를 확인하기까지 오랜 시간이 소요되는 단점이 있으며, 독성정도를 알려주는 지표인 독성종말점의 측정이 까다롭고 감도가 낮아, 반드시 실험실에 설치된 고가의 장비를 사용하여야 하는 단점이 있다. 예를 들어, 생태독성측정용 식물을 이용하는 경우, 급성독성 평가는 14일, 만성독성 평가는 21 내지 28일이 소요되며, 생태독성측정용 지렁이를 사용하는 경우, 급성독성 평가는 14일, 만성독성 평가는 56일이 소요된다.

[0006] 생물을 이용한 생태독성 평가방법과 관련하여, 대한민국 등록특허공보 제10-1974891호에는 조류(algae)를 배양하는 과정에서 발생하는 가스 생성량을 이용하여 피오염물의 생태독성을 측정하는 방법이 개시되어 있다. 또한, 대한민국 등록특허공보 제10-2007480호에는 혐기성 미생물을 배양하는 과정에서 발생하는 가스 생성량을 이용한

여 피오염물인 토양의 생태독성을 측정하는 방법이 개시되어 있다. 또한, 대한민국 등록특허공보 제10-1365719호에는 개구리밥과 식물의 뿌리생장을 이용한 수질독성 평가방법이 개시되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 종래의 기술적 배경하에서 도출된 것으로서, 본 발명의 목적은 민물고기 세포의 증식 특성을 이용하여 생태독성을 평가하는 방법을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명의 발명자들은 살아있는 잉어(*Cyprinus carpio*)로부터 잉어 세포주를 제작하고, 상기 잉어 세포주를 다양한 독성물질에 접촉시켜 배양한 후 살아있는 세포의 증식수(살아있는 세포의 증식속도로 전환이 가능함)를 측정하였고, 살아있는 세포의 증식수 또는 살아있는 세포의 증식속도를 생태독성 평가의 지표로 이용하는 경우 약 4일 내에 측정 샘플의 다양한 독성물질에 의한 생태독성을 신뢰성있게 평가할 수 있다는 점을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 예는 (a) 민물고기 세포주를 어류세포 배양용 액체 배지와 함께 용기에 넣고 배양하여 용기 내부 벽에 민물고기 세포를 부착시킨 후 어류세포 배양용 액체 배지를 제거하여 측정용 용기를 준비하는 제1단계; (b) 상기 측정용 용기에 피오염물 및 어류세포 배양용 액체 배지를 포함하는 측정용 액체 샘플을 첨가하고 배양하는 제2단계; 및 (c) 배양이 완료된 후 살아있는 세포의 증식수 또는 살아있는 세포의 증식속도를 측정하는 제3단계를 포함하는 생태독성 평가방법을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명의 일 예에 따른 생태독성 평가방법은 쉽게 제작할 수 있는 민물고기 세포주를 사용하고, 쉽게 측정할 수 있는 민물고기 세포의 증식 특성을 평가 지표로 이용하기 때문에 전체 프로세스가 간편하고 평가 시간도 약 4일 정도로 짧게 소요된다. 특히, 본 발명의 일 예에 따른 생태독성 평가방법은 민물고기가 서식하는 하천 생태계의 환경오염 수준을 정확하게 제공할 수 있고, 보편성을 가지기 때문에 상업화에 매우 유리하다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포를 단일 독성물질 표준용액에서 4일 동안 배양한 후, 독성물질인 황산구리(CuSO_4)의 농도에 따른 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포의 증식수 변화를 대조군(CTRL)에 대비하여 상대적으로 나타낸 것이다.

도 2는 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포를 단일 독성물질 표준용액에서 4일 동안 배양한 후, 독성물질인 중크롬산칼륨($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)의 농도에 따른 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포의 증식수 변화를 대조군(CTRL)에 대비하여 상대적으로 나타낸 것이다.

도 3은 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포를 단일 독성물질 표준용액에서 4일 동안 배양한 후, 독성물질인 아트라진(Atrazine)의 농도에 따른 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포의 증식수 변화를 대조군(CTRL)에 대비하여 상대적으로 나타낸 것이다.

도 4는 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포를 단일 독성물질 표준용액에서 4일 동안 배양한 후, 독성물질인 SDS(Sodium dodecyl sulphate)의 농도에 따른 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포의 증식수 변화를 대조군(CTRL)에 대비하여 상대적으로 나타낸 것이다.

도 5는 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포를 단일 독성물질 표준용액에서 4일 동안 배양한 후, 독성물질인 PFOA(Perfluorooctanoic acid)의 농도에 따른 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포의 증식수 변화를 대조군(CTRL)에 대비하여 상대적으로 나타낸 것이다.

도 6은 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포를 단일 독성물질 표준용액에서 4일 동안 배양한 후, 독성물질인 수산화나트륨(NaCl)의 농도에 따른 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포의 증식수 변화를 대조군(CTRL)에 대비하여 상대적으로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명한다.
- [0014] 본 발명은 민물고기 세포의 증식 특성을 이용한 생태독성 평가방법에 관한 것이다.
- [0015] 본 발명의 일 예에 따른 생태독성 평가방법은 (a) 민물고기 세포주를 어류세포 배양용 액체 배지와 함께 용기에 넣고 배양하여 용기 내부 벽에 민물고기 세포를 부착시킨 후 어류세포 배양용 액체 배지를 제거하여 측정용 용기를 준비하는 제1단계; (b) 상기 측정용 용기에 피오염물 및 어류세포 배양용 액체 배지를 포함하는 측정용 액체 샘플을 첨가하고 배양하는 제2단계; 및 (c) 배양이 완료된 후 살아있는 세포의 증식수 또는 살아있는 세포의 증식속도를 측정하는 제3단계를 포함한다. 이하, 본 발명의 일 예에 따른 생태독성 평가방법을 구성요소별로 나누어 설명한다.
- [0017] 민물고기 세포주
- [0018] 본 발명에서 생태독성을 평가하기 위해 사용하는 민물고기 세포주는 민물고기에서 분리되고 계대 배양하여도 그 형질이 유지되는 세포 집단이라면 그 종류가 크게 제한되지 않는다. 상기 민물고기는 그 세포주의 증식 특성이 다양한 독성물질에 대해 비교적 일관성 있는 경향을 보이는 것이라면 그 종류가 크게 제한되지 않으며, 예를 들어 잉어(*Cyprinus carpio*) 등에서 선택될 수 있다.
- [0019] 상기 민물고기 세포주는 (a1) 살아있는 민물고기를 잘게 다진 후 튜브 형태의 용기에 옮기고, 콜라겐분해효소를 포함하는 액체 배지를 첨가하고 배양한 후, 콜라겐분해효소를 포함하지 않는 액체 배지를 첨가하고 방치하여 민물고기 조직을 가라앉히는 단계; (a2) 상기 튜브 형태의 용기에서 가라앉은 조직을 제외한 상층액만을 새로운 튜브 형태의 용기로 옮기고 원심분리하여 세포 펠렛을 침전시키는 단계; 및 (a3) 상기 새로운 튜브 형태의 용기에서 상층액만을 제거하고 세포 펠렛을 세척한 후 어류세포 배양용 액체 배지를 첨가하고 배양하여 세포를 성장시키고 민물고기 세포주를 수득하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제작될 수 있다.
- [0020] 상기 민물고기 세포주를 제작하기 위해 사용되는 액체 배지는 세포 배양에 사용되는 통상적인 다양한 배지에서 선택될 수 있고, 예를 들어, 글루코스, 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS), 페니실린 및 스트렙토마이신이 보충된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)에서 선택될 수 있다. 또한, 상기 콜라겐분해효소를 포함하는 액체 배지는 세포 배양에 사용되는 통상적인 다양한 배지에 콜라겐분해효소가 보충된 배지로서 그 종류가 크게 제한되지 않으며, 예를 들어 글루코스, 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS), 페니실린, 스트렙토마이신, L-글루타민, HEPES[N-(2-hydroxyethyl)-piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid] 및 콜라겐분해효소 A(Collagenase A)가 보충된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)에서 선택될 수 있다. 또한, 상기 어류세포 배양용 액체 배지는 어류세포를 배양하기 위해 사용되는 통상적인 다양한 배지에서 선택될 수 있고, 예를 들어 글루코스, 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS), 페니실린, 스트렙토마이신, L-글루타민 및 HEPES[N-(2-hydroxyethyl)-piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid]가 보충된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)에서 선택될 수 있다.
- [0021] 상기 민물고기 세포주를 제작하는 방법에서 잘게 다져진 민물고기 조직에 콜라겐분해효소를 처리하면 민물고기 조직에 존재하는 콜라겐이 분해되어 서로 얽혀있는 조직들이 세포 수준으로 느슨하게 풀리고, 대부분의 세포들은 상층액에 부유된 상태로 존재하게 된다. 상기 민물고기 세포주를 제작하는 방법에서 (a1) 단계의 배양은 35~40℃의 온도, 소정의 진탕 조건(예를 들어 100~300 rpm) 및 CO₂가 존재하지 않는 조건에서 이루어지는 것이 바람직하다. 또한, 상기 민물고기 세포주를 제작하는 방법에서 (a3) 단계의 배양은 35~40℃의 온도 및 1~10%(w/v) CO₂ 조건에서 이루어지는 것이 바람직하다.
- [0023] 측정용 용기를 준비하는 제1단계
- [0024] 본 발명의 일 예에 따른 생태독성 평가방법에서 측정용 용기를 준비하는 제1단계는 민물고기 세포주를 어류세포 배양용 액체 배지와 함께 용기에 첨가하고 소정의 조건에서 양하여 용기 내부 벽에 민물고기 세포를 부착시킨 후 어류세포 배양용 액체 배지를 제거하는 것으로 구성된다. 상기 용기는 민물고기 세포주가 쉽게 부착할 수 있는 재질 및 형태를 가지는 것이라면 그 종류가 크게 제한되지 않으며, 예를 들어, 웰 플레이트(Well plate)가 있다. 또한, 상기 웰 플레이트는 적어도 6개 이상의 웰(Well)로 구성되는 것이 바람직한데, 1개의 웰에는 후술하는 제2단계에서 대조군으로 민물고기 세포의 증식을 저해하는 독성물질이 포함되지 않은 어류세포 배양용 액체 배지를 넣어 민물고기 세포를 배양하고, 나머지 5개의 웰에는 후술하는 제2단계에서 피오염물을 포함하는 측

정용 액체 샘플과 이의 희석된 액체 샘플을 넣어 민물고기 세포를 배양한다.

- [0025] 상기 제1단계에서 배양은 35~40℃의 온도 및 1~10%(w/v) CO₂ 조건에서 민물고기 세포가 용기 내부 벽, 바람직하게는 용기 하부 벽에 충분히 부착할 수 있는 시간 동안 이루어지는 것이 바람직하다.
- [0027] 민물고기 세포를 피오염물이 존재하는 상태에서 배양하는 제2단계
- [0028] 본 발명의 일 예에 따른 생태독성 평가방법에서 민물고기 세포를 피오염물이 존재하는 상태에서 배양하는 제2단계는 측정용 용기에 피오염물 및 어류세포 배양용 액체 배지를 포함하는 측정용 액체 샘플을 첨가하고 소정의 조건에서 배양하는 것으로 구성된다.
- [0029] 상기 피오염물은 생태독성 평가의 대상물을 의미하며, 오염된 현장의 토양, 오염수 또는 토양추출액 등 그 종류가 크게 제한되지 않는다. 또한, 상기 오염수는 물(water)이 주요 부피를 차지하는 피오염물로서, 해수, 하천, 호수, 폐수, 방류수, 슬러지 용출수, 토양 용출수, 퇴적토 용출수 등에서 채취한 수체 샘플을 포함한다.
- [0030] 상기 측정용 액체 샘플은 세포의 원활한 배양을 위해 피오염물을 어류세포 배양용 액체 배지와 혼합하여 제작된다. 또한, 피오염물과 어류세포 배양용 액체 배지를 혼합하여 제작한 최초의 측정용 액체 샘플은 어류세포 배양용 액체 배지로 희석되어 5가지 이상의 농도로 구배화된 후 측정용 용기에 첨가되는 것이 바람직하다. 예를 들어, 본 발명의 일 예에 따른 생태독성 평가방법이 수질독성을 평가하는 경우라면, 피오염물은 해수, 하천, 호수, 폐수, 방류수, 슬러지 용출수, 토양 용출수, 퇴적토 용출수 등에서 채취한 수체 샘플이고, 상기 최초의 수체 샘플(이하, 원수)은 어류세포 배양용 액체 배지로 희석되어 적어도 5가지 이상의 농도로 구배화된 후 측정용 용기에 첨가된다. 또한, 상기 측정용 액체 샘플은 바람직하게는 피오염물을 포함하지 않고 어류세포 배양용 액체 배지로 구성된 대조군을 더 포함할 수 있다. 후술하는 세포의 증식 특성을 측정하는 제3단계에서 피오염물이 존재하는 조건에서 민물고기 세포를 배양하는 실험군과 피오염물이 존재하지 않는 조건에서 민물고기 세포를 배양하는 대조군의 증식 특성을 측정하고, 실험군의 증식 특성을 대조군의 증식 특성에 대비되는 상대적인 값으로 환산하면 실험 환경에 크게 영향을 받지 않고 생태독성을 평가할 수 있다.
- [0031] 상기 제2단계에서 배양은 35~40℃의 온도, 7~8의 pH, 1~10%(w/v) CO₂ 및 암 조건에서 3일 내지 4일 동안 이루어지는 것이 바람직하다.
- [0033] 세포의 증식 특성을 측정하는 제3단계
- [0034] 본 발명의 일 예에 따른 생태독성 평가방법에서 세포의 증식 특성을 측정하는 제3단계는 상기 제2단계에서 배양이 완료된 후 살아있는 세포의 증식수 또는 살아있는 세포의 증식속도를 측정하는 것으로 구성된다. 상기 살아있는 세포의 증식수를 측정하는 방법은 공지된 다양한 방법에서 선택할 수 있고, 예를 들어 세포 염색법 등이 있다. 또한, 상기 살아있는 세포의 증식속도는 살아있는 세포의 증가수를 배양 기간으로 나누어 계산할 수 있다.
- [0035] 상기 살아있는 세포의 증식수 또는 살아있는 세포의 증식속도로부터 생태독성을 평가할 수 있다. 구체적으로 생태독성은 피오염물이 존재하는 조건에서 배양된 민물고기 세포의 증식 특성을 피오염물이 존재하지 않는 대조군에서 배양된 민물고기 세포의 증식 특성과 비교하여 평가될 수 있다. 이때, 생태독성에 대한 정량적인 값은 최소영향농도(EC₁₀) 또는 반수유효농도(Half maximal effective concentration, EC₅₀) 값으로 표시될 수 있다.
- [0036] 상기 최소영향농도(EC₁₀)는 피오염물을 포함하는 실험군에서 배양된 민물고기 세포의 증식 특성이 피오염물을 포함하지 않은 대조군에서 배양된 민물고기 세포의 증식 특성 대비 10% 낮은 값을 보였을 때의 측정용 액체 샘플 내의 피오염물 농도로 정의될 수 있다. 또한, 상기 반수유효농도(Half maximal effective concentration, EC₅₀)는 피오염물을 포함하는 실험군에서 배양된 민물고기 세포의 증식 특성이 피오염물을 포함하지 않은 대조군에서 배양된 민물고기 세포의 증식 특성 대비 50% 낮은 값을 보였을 때의 측정용 액체 샘플 내의 피오염물 농도로 정의될 수 있다. 상기 피오염물이 단일 독성물질인 경우 반수유효농도는 단일 독성물질의 특정 농도로 표시되고, 상기 피오염물이 다수의 독성물질을 포함하는 경우 반수유효농도는 피오염물의 희석률로 표시될 수 있다. 한편, 반수유효농도가 크기가 커질수록 피오염물의 독성은 상대적으로 작다는 것을 의미하기 때문에 피오염물의 독성은 하기의 식과 같이 독성 단위(Toxicity Unit, TU)로 표시될 수 있다.
- [0037]
$$TU = 100/\text{반수유효농도}$$
- [0039] 생태독성 평가방법의 활용

[0040] 본 발명의 일 예에 따른 방법으로 평가할 수 있는 생태독성, 즉 피오염물의 독성은 크게 제한되지 않으며, 예를 들어 중금속 독성, 제초제 독성, 계면활성제 독성, 과불화화합물 독성 또는 염류화합물 독성일 수 있다. 본 발명의 일 예에 따른 생태독성 평가방법으로 진단 가능한 독성물질은 그 종류가 크게 제한되지 않으며, 공지의 다양한 환경오염물질에서 선택될 수 있다. 본 발명의 일 예에 따른 생태독성 평가방법으로 진단 가능한 중금속 독성물질은 그 종류가 크게 제한되지 않으며, 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) 등에서 선택될 수 있다. 또한, 본 발명의 일 예에 따른 생태독성 평가방법으로 진단 가능한 제초제 독성물질은 그 종류가 크게 제한되지 않으며, 예를 들어 2,4-D(2,4-Dichlorophenoxyacetic acid), 2,4,5-T(2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid), 2,4-DP(Dichlorprop), MCPA(2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid), MCPP(methylchlorophenoxypropionic acid), MCPB[4-(4-Chloro-2-methylphenoxy)butanoic acid], 글리포세이트(Glyphosate), 글루포시네이트 암모늄(Glufosinate ammonium) 등과 같은 지방족 산제; 아미노피랄리드(Aminopyralid), 클로피랄리드(Clopyralid) 등과 같은 피리딘제; PCP(Pentachlorophenol) 등과 같은 페놀제; 프로파닐(Propanil), 뷰타클로르(Butachlor, 마세트), 알라클로르(라소) 등과 같은 아마이드제; 클로르프로파ם(chlorpropham), 펜다이메탈린(Pendimethalin), 싸이오벤카브(thiobencarb, 사단) 등과 같은 카바메이트제; 메타벤즈티아주론(methabenzthiazuron, 트리본닐) 등과 같은 요소제; 아트라진(Atrazine), 시마진(simazine) 등과 같은 트라이아진제; 파라콰트(Paraquat, 그라옥손) 등과 같은 비피리딜리움제; 브로마실(bromacil, 하이바엑스), 벤타존(bentazon, 바사그란) 등과 같은 유라실제; 다이캄바(Dicamba), 플루록시피르(Fluroxypyr), 이마자피르(imazapyr), 이마자픽(imazapic), 이마자목스(imazamox), 리누론(Linuron), 메톨아클로르(metolachlor), 피클로람(picloram) 등과 같은 유기제초제에서 선택될 수 있다. 또한, 본 발명의 일 예에 따른 생태독성 평가방법으로 진단 가능한 계면활성제 독성물질은 그 종류가 크게 제한되지 않으며, 예를 들어 SDS(Sodium dodecyl sulphate), SLES(sodium lauryl ether sulfate), PFOS(Perfluorooctanesulfonate) 등과 같은 음이온성 계면활성제; , BAC(benzalkonium chloride), BZE(benzethonium chloride), DODAB(dioctadecyldimethylammonium bromide) 등과 같은 양이온성 계면활성제; Triton X-100, Tween 80 등과 같은 비이온성 계면활성제 등에서 선택될 수 있다. 또한, 본 발명의 일 예에 따른 생태독성 평가방법으로 진단 가능한 과불화화합물 독성물질은 그 종류가 크게 제한되지 않으며, 예를 들어 PFOA(Perfluorooctanoic acid), PFOS(Perfluorooctanesulfonic acid) 등에서 선택될 수 있다. 또한, 본 발명의 일 예에 따른 생태독성 평가방법으로 진단 가능한 염류화합물 독성물질은 그 종류가 크게 제한되지 않으며, 예를 들어 염화나트륨, 염화칼륨 등에서 선택될 수 있다.

[0041] 본 발명의 일 예에 따른 생태독성 평가방법은 종래의 화학적 분석 방식에 의존한 생태독성 평가방법에 내재된 문제점 중 미지의 독성물질이 생태계(예를 들어 토양 또는 수체) 내에 투입되었을 때 그것을 탐지해낼 수 없고, 더 나아가 화학적 분석에 의한 결과 수치만을 가지고는 실제 생태계에 끼칠 수 있는 토양 오염 또는 수질 오염의 영향에 대해 전혀 예측할 수가 없다는 단점을 보완한 실용적인 기법이라고 할 수 있다.

[0042] 본 발명의 일 예에 따른 생태독성 평가방법은 생태독성 평가 키트로 제품화될 수 있다. 본 발명의 일 예에 따른 생태독성 평가 키트는 민물고기 세포주; 민물고기 세포 및 측정용 액체 샘플을 투입하고 배양하기 위한 측정용 용기; 피오염물을 현탁하거나 희석하기 위한 어류세포 배양용 액체 배지를 포함한다. 또한, 본 발명의 일 예에 따른 생태독성 평가 키트는 중금속 독성물질, 제초제 독성물질, 계면활성제 독성물질, 과불화화합물 독성물질 또는 염류화합물 독성물질에서 선택되는 표준 독성물질을 더 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 일 예에 따른 생태독성 평가 키트는 상기 표준 독성물질 대신 표준 독성물질을 어류세포 배양용 액체 배지에 용해시켜 제조한 독성물질 표준용액을 더 포함할 수 있다. 상기 표준 독성물질 또는 독성물질 표준용액은 피오염물의 생태독성을 평가하기 전에 민물고기 세포주의 상태, 즉 독성물질에 대한 반응 감응성 여부를 테스트하는데 이용될 수 있다. 구체적으로 독성물질 표준용액이 구리를 독성물질로 포함하는 용액인 경우, 다양한 농도의 구리 표준용액 및 독성물질이 포함되지 않은 대조군에서의 민물고기 세포주의 증식 특성에 대한 데이터를 미리 확보하여 생태독성 평가 키트와 함께 제공할 수 있다. 사용자는 구리 표준용액에 대한 민물고기 세포주의 증식 특성을 측정하고 이를 미리 제공하는 데이터와 비교하여 민물고기 세포주가 표준 독성물질에 대해 정상적으로 반응하는지 여부를 판단하고, 일정 범위(예를 들어, 본래 반응 감응성의 80% 이상)의 반응 감응성을 보이는 경우 미지의 피오염물에 대한 생태독성 평가를 진행할 수 있다.

[0044] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 구체적으로 설명한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명의 기술적 특징을 명확하게 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 권리범위를 한정하는 것은 아니다.

[0046] 1. 배지의 준비

- [0047] (1) 정상 배지(Normal media)
- [0048] 25 mM 농도의 글루코스가 함유된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)에 10%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS), 1%(w/v) 농도의 페니실린 및 1%(w/v) 농도의 스트렙토마이신을 보충하여 정상 배지(Normal media)를 준비하였다.
- [0050] (2) 어류용 배지(Fish media)
- [0051] 25 mM의 글루코스가 함유된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)에 20%(w/v) 농도의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS), 5%(w/v) 농도의 페니실린, 5% 농도의 스트렙토마이신, 1%(w/v) 농도의 L-글루타민 및 0.5%(w/v) 농도의 HEPES[N-(2-hydroxyethyl)-piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid]를 보충하여 어류용 배지(Fish media)를 준비하였다.
- [0053] (3) 콜라겐분해효소 배지(Collagenase media)
- [0054] 어류용 배지(Fish media)에 콜라겐분해효소 A(Collagenase A)를 2 mg/ml의 농도로 첨가하여 콜라겐분해효소 배지(Collagenase media)를 준비하였다.
- [0056] **2. 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포주의 제작**
- [0057] 살아있는 잉어(*Cyprinus carpio*)를 15%(w/w) 농도의 표백제 수용액으로 약 2분 동안 세척하고, 이후 70%(w/w) 농도의 에탄올 수용액으로 약 2분 동안 세척하고, 이후 5%(w/w) 농도의 페니실린/스트렙토마이신이 함유된 인산완충생리식염수(phosphate buffered saline, PBS)로 약 2분 동안 세척하였다. 상기 세척 과정을 2회 반복하였다. 이후, 세척된 잉어를 페트리디쉬에 옮긴 후 정상 배지(Normal media)를 소량 첨가하여 조직이 마르지 않게 한 후, 수술용 칼(Scalpel knife)로 5분 이상 잘게 다져주었다. 이후, 잘게 다져진 잉어 조직을 50 ml 용량의 코니칼 튜브(Conical tube)로 옮긴 후, 여기에 콜라겐분해효소 배지(Collagenase media) 15 ml를 첨가하였다. 이후, 코니칼 튜브(Conical tube)를 배양기에 넣고, 37℃의 온도, non-CO₂ 및 200 rpm의 조건으로 약 1 hr 동안 진탕배양하였다. 이후, 코니칼 튜브(Conical tube)를 약 1분 동안 볼텍싱(vortexing)하고, 정상 배지(Normal media)를 총 부피가 40 ml가 되게 채워준 후 약 10분 동안 실온(약 20±2℃)에 방치하여 조직을 가라앉혔다. 이후, 가라앉은 조직을 제외한 상층액만을 새로운 코니칼 튜브(Conical tube)에 옮겨준 후, 새로 옮긴 상층액을 800×g의 조건으로 2분 동안 원심분리하여 세포 펠렛을 침전시켰다. 이후, 새로운 코니칼 튜브(Conical tube)에서 세포 펠렛(cell pellet)을 제외한 상층액을 버리고, 5%(w/w) 농도의 페니실린/스트렙토마이신이 함유된 인산완충생리식염수(phosphate buffered saline, PBS)로 2번 반복하여 세척하였다. 이후, 플라스크에 세척된 세포 펠렛(cell pellet)을 옮기고 어류용 배지(Fish media)를 첨가하여 세포 펠렛(cell pellet)을 현탁한 후, 37℃의 온도 및 5%(w/v) CO₂ 조건의 배양기에서 2주 이상 배양하여 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포주를 제작하고, 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포주 배양액을 이후의 실험에 사용하였다.
- [0059] **3. 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포주의 증식 특성을 이용한 생태독성 평가**
- [0060] (1) 독성물질 표준용액의 제조
- [0061] 금속류 독성물질로 황산구리(CuSO₄), 중크롬산칼륨(K₂Cr₂O₇); 제초제 독성물질로 아트라진(Atrazine); 유기화합물 독성물질로 SDS(Sodium dodecyl sulphate); 과불화화합물 독성물질로 PFOA(Perfluorooctanoic acid); 염류 화합물 독성물질로 수산화나트륨(NaCl)을 각각 포함하는 단일 독성물질 표준용액을 제조하였다. 구체적으로 독성물질 각각을 어류용 배지(Fish media)에 미리 설정한 농도가 되게 첨가하고 용해시켜 다양한 농도의 단일 독성물질 표준용액을 제조하였다.
- [0063] (2) 생태독성 평가 및 결과
- [0064] 96-웰 플레이트에 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포주 배양액을 웰당 잉어 세포가 2,000개가 되게 분주하고 37℃의 온도 및 5%(w/v) CO₂ 조건의 배양기에서 1일 동안 배양하여 잉어 세포를 웰의 벽에 부착시켰다. 이후, 웰에서 배양액을 따라내고, 다양한 농도의 단일 독성물질 표준용액을 첨가한 후 37℃의 온도, 7.4의 pH, 5%(w/v) CO₂ 및 암 조건의 배양기에서 4일 동안 배양하였다. 또한, 대조군(Control)의 경우 웰에서 배양액을 따라내고, 단일 독성물질 표준용액 대신 어류용 배지(Fish media)를 첨가한 후 37℃의 온도 및 5%(w/v) CO₂ 조건에서 4일 동안 배양하였다. 배양이 완료된 후 96-웰 플레이트의 웰에서 배양액을 제거하고, 각 웰에 0.2%(w/v) 농도의 SDS(Sodium dodecyl sulphate) 수용액 50μl를 첨가하고 37℃의 온도, non-CO₂ 조건의 배양기에서 1 hr 동안 배

양하였다. 이후, 각 웰에 GelGreen® 염색 용액(증류수에 1:1,000의 농도로 희석된 용액임) 150 μ l를 첨가하고 VICTOR Multilabel Plate Reader로 살아있는 세포수를 측정하였다.

[0065] 도 1은 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포를 단일 독성물질 표준용액에서 4일 동안 배양한 후, 독성물질인 황산구리(CuSO_4)의 농도에 따른 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포의 증식수 변화를 대조군(CTRL)에 대비하여 상대적으로 나타낸 것이다. 도 2는 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포를 단일 독성물질 표준용액에서 4일 동안 배양한 후, 독성물질인 중크롬산칼륨($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)의 농도에 따른 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포의 증식수 변화를 대조군(CTRL)에 대비하여 상대적으로 나타낸 것이다. 도 3은 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포를 단일 독성물질 표준용액에서 4일 동안 배양한 후, 독성물질인 아트라진(Atrazine)의 농도에 따른 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포의 증식수 변화를 대조군(CTRL)에 대비하여 상대적으로 나타낸 것이다. 도 4는 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포를 단일 독성물질 표준용액에서 4일 동안 배양한 후, 독성물질인 SDS(Sodium dodecyl sulphate)의 농도에 따른 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포의 증식수 변화를 대조군(CTRL)에 대비하여 상대적으로 나타낸 것이다. 도 5는 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포를 단일 독성물질 표준용액에서 4일 동안 배양한 후, 독성물질인 PFOA(Perfluorooctanoic acid)의 농도에 따른 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포의 증식수 변화를 대조군(CTRL)에 대비하여 상대적으로 나타낸 것이다. 도 6은 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포를 단일 독성물질 표준용액에서 4일 동안 배양한 후, 독성물질인 수산화나트륨(NaCl)의 농도에 따른 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포의 증식수 변화를 대조군(CTRL)에 대비하여 상대적으로 나타낸 것이다.

[0066] 또한, 하기 표 1에 잉어 세포의 증식수를 생태독성 평가를 위한 파라미터로 사용하였을 때, 단일 독성물질 각각의 최소영향농도(EC_{10}) 및 반수유효농도(EC_{50})를 정리하였다.

표 1

독성물질	최소영향농도(EC_{10})	반수유효농도(EC_{50})
황산구리(CuSO_4)	2.903 mg/ ℓ	90,330 mg/ ℓ
중크롬산칼륨($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)	231 mg/ ℓ	4,250 mg/ ℓ
아트라진(Atrazine)	191 mg/ ℓ	5,469 mg/ ℓ
SDS(Sodium dodecyl sulphate)	55 mg/ ℓ	1,856 mg/ ℓ
PFOA(Perfluorooctanoic acid)	391 mg/ ℓ	2,343 mg/ ℓ
수산화나트륨(NaCl)	782 mg/ ℓ	27,958 mg/ ℓ

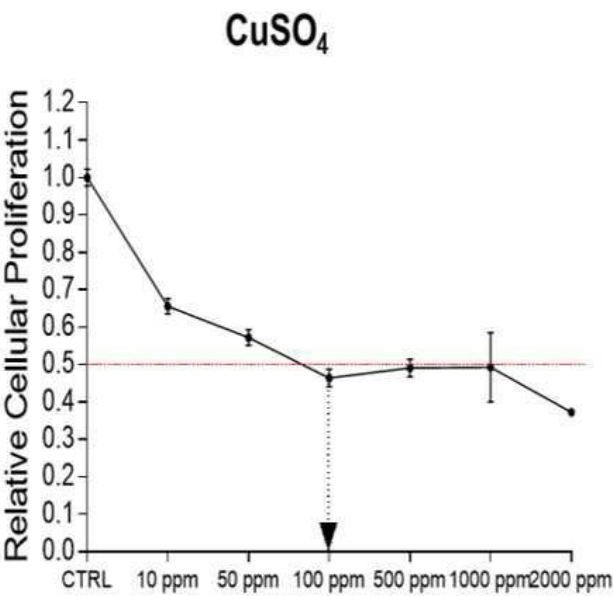
[0068] * 최소영향농도(EC_{10}) : 독성물질을 포함하지 않는 대조군에서 측정된 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포의 증식수를 기준으로 10% 낮은 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포의 증식수를 보이는 배양액의 독성물질 농도

[0070] * 반수유효농도(Half maximal effective concentration, EC_{50}) : 독성물질을 포함하지 않는 대조군에서 측정된 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포의 증식수를 기준으로 50% 낮은 잉어(*Cyprinus carpio*) 세포의 증식수를 보이는 배양액의 독성물질 농도

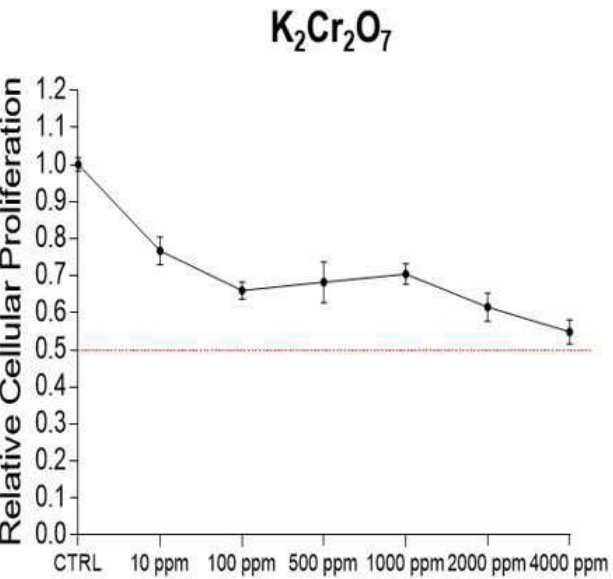
[0072] 이상에서와 같이 본 발명을 실시예를 통해 설명하였지만 본 발명이 반드시 여기에만 한정되는 것은 아니며 본 발명의 범주와 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양한 변형실시가 가능함은 물론이다. 따라서, 본 발명의 보호범위는 본 발명에 첨부된 특허청구의 범위에 속하는 모든 실시 형태를 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

도면

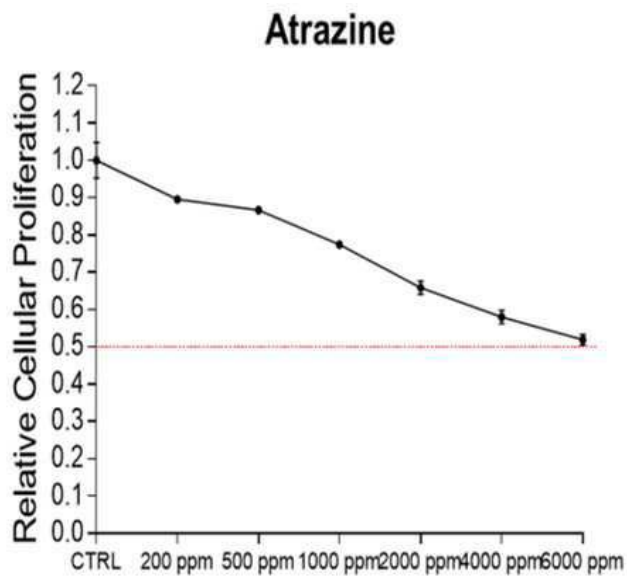
도면1



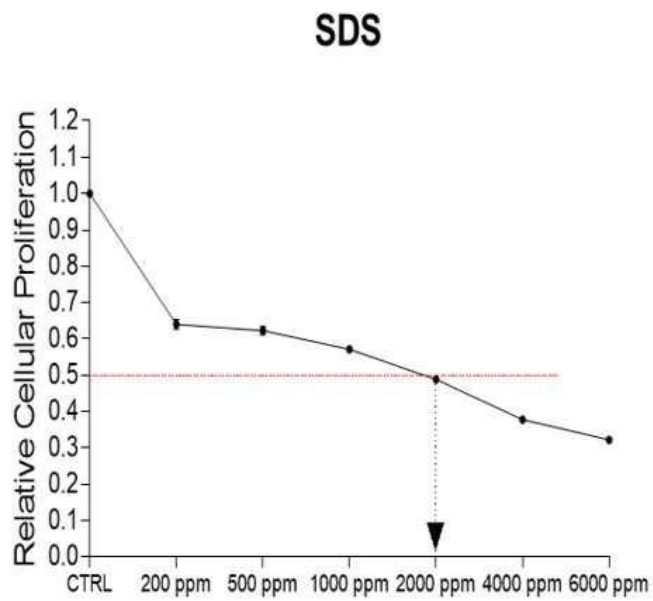
도면2



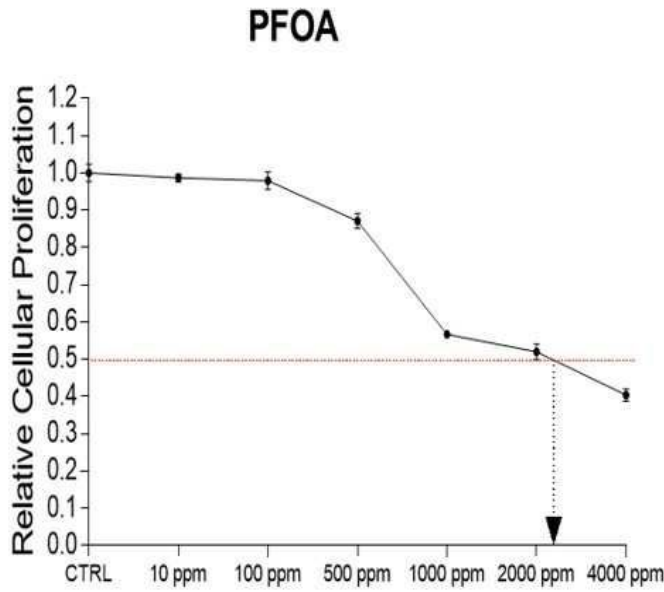
도면3



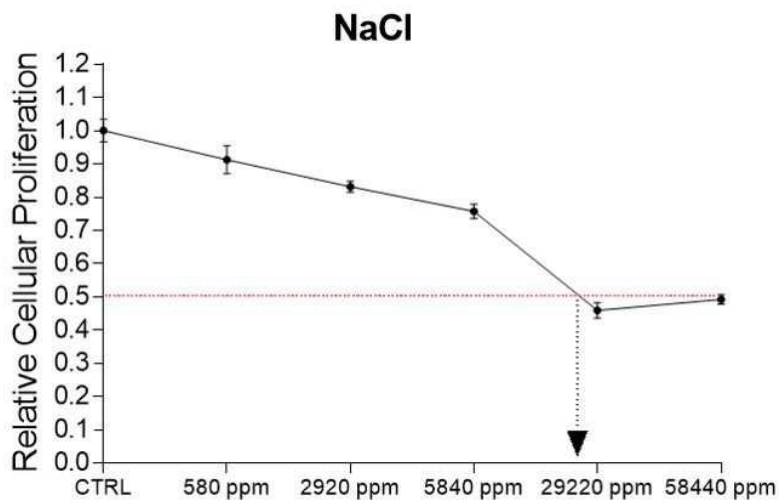
도면4



도면5



도면6



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 2

【변경전】

제1항에 있어서, 상기 생태독성은 중금속, 제초제, 계면활성제, 과불화화합물 및 염류화합물로 이루어진 군에서 선택되는 독성물질에 의해 유발되는 생태독성인 것을 특징으로 하는, 생태독성 평가방법.

【변경후】

제1항에 있어서, 상기 생태독성은 중금속, 제초제, 계면활성제, 과불화화합물 및 염류화합물로 이루어진 군에서 선택되는 독성물질에 의해 유발되는 생태독성인 것을 특징으로 하는, 생태독성 평가방법.

【직권보정 2】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 3

【변경전】

제1항에 있어서, 상기 독성물질은 황산구리(CuSO_4), 중크롬산칼륨($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), SDS(Sodium dodecyl sulphate), PFOA(Perfluorooctanoic acid) 및 수산화나트륨(NaCl)으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 생태 독성 평가방법.

【변경후】

제2항에 있어서, 상기 독성물질은 황산구리(CuSO_4), 중크롬산칼륨($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), SDS(Sodium dodecyl sulphate), PFOA(Perfluorooctanoic acid) 및 수산화나트륨(NaCl)으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 생태 독성 평가방법.