



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2014년02월10일  
 (11) 등록번호 10-1361767  
 (24) 등록일자 2014년01월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12Q 1/06* (2006.01) *C12M 1/34* (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2011-0073220  
 (22) 출원일자 2011년07월22일  
 심사청구일자 2011년07월22일  
 (65) 공개번호 10-2013-0011806  
 (43) 공개일자 2013년01월30일  
 (56) 선행기술조사문헌  
 US7948632 B2  
 Aquatic Microbial Ecology, Vol. 25, No. 3,  
 Pages 247-258 (2001.)

(73) 특허권자  
 한국기초과학지원연구원  
 대전광역시 유성구 과학로 169-148 (어은동)  
 (72) 발명자  
 유승민  
 대전광역시 유성구 과학로 113  
 석동찬  
 대전광역시 유성구 과학로 113  
 (뒷면에 계속)  
 (74) 대리인  
 한양특허법인

전체 청구항 수 : 총 6 항

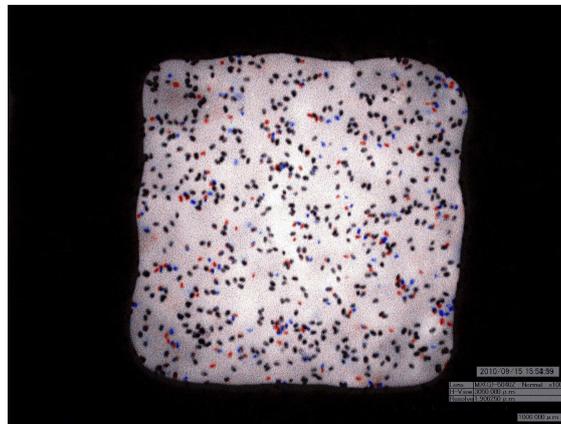
심사관 : 김남경

(54) 발명의 명칭 **활동성 미생물의 수 측정방법**

**(57) 요약**

본 발명은 활동성 미생물의 수 측정방법에 관한 것이다.

**대표도** - 도1c



(72) 발명자

**노태협**

대전광역시 유성구 과학로 113

**이봉주**

대전광역시 유성구 과학로 113

**이상주**

대전광역시 유성구 과학로 113

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

활동성 미생물의 수 측정방법에 있어서,

- a) 샘플을 채취하여 슬라이드 글라스에 도포하고 커버글라스를 덮는 단계;
- b) 상기 a)단계에서 얻어진 샘플에 대하여 현미경 사진을 두 장 찍는 단계; 및
- c) 두 장의 사진을 컴퓨터의 이미지 프로그램을 이용하거나 위치변화 감지 프로그램을 이용하여 위치변화가 있는 것은 살아있는 것으로 위치변화가 없는 것은 죽어있는 것으로 간주하는 단계를 포함하며,

상기 위치변화 감지 프로그램 이용방법은 먼저 두 장의 사진을 놓고 픽셀의 색을 인지하여 각 장의 미생물 위치 및 수를 센 후 두 장 사진을 비교하여 미생물의 위치 변화를 확인하는 원리를 이용하는 것을 특징으로 하는 활동성 미생물의 수 측정방법.

**청구항 2**

제 1항에 있어서, 상기 컴퓨터의 이미지 프로그램 이용 방법은 사진 두 장을 시차를 두고 찍어 이미지프로그램에서 사진을 서로 다른 두 색으로 염색을 하고, 이 두 사진을 이미지프로그램에서 겹쳐보면 다른 위치에 있는 것은 원래의 색을 가질 것이고, 같은 위치에 있는 것은 두 색의 혼합 색을 가지는 것을 통하여 죽은 미생물과 살아있는 미생물을 구별하는 것을 특징으로 하는 활동성 미생물의 수 측정방법.

**청구항 3**

제 2항에 있어서, 상기 서로 다른 두 색은 적색과 청색이며, 혼합 색은 흑색인 것을 특징으로 하는 활동성 미생물의 수 측정방법.

**청구항 4**

제 1항 또는 제2항에 있어서, 상기 컴퓨터의 이미지 프로그램은 포토샵인 것을 특징으로 하는 활동성 미생물의 수 측정방법.

**청구항 5**

제 1항에 있어서, 상기 샘플은 10 $\mu$ l에서 1mL인 것을 특징으로 하는 활동성 미생물의 수 측정방법.

**청구항 6**

제 1항에 있어서, 상기 사진 촬영은 1초~1시간 간격인 것을 특징으로 하는 활동성 미생물의 수 측정방법.

**청구항 7**

삭제

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 활동성 미생물의 수 측정방법에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 검체(檢體)에 포함되는 세균을 측정하는 방법으로, 검체를 단계적으로 희석하여 각각을 한천 배지에 일정량 도포하고, 24시간 정도 배양하여, 파생한 콜로니(colony)수를 눈으로 보고 계산하는 것으로 세균수를 측정하는 방법이 있었다. 그러나 이 방법에서는 검체를 단계적으로 희석하는 작업이 필요한 점이나, 24시간 정도 배양하는 것이 필요한 점 등의 문제점이 있었다.

[0003] 또한 선박평형수 처리 기준 중 하나인 10~50 $\mu$ m 의 미생물 개체수를 측정하는 방법으로 400배 현미경에 1mL의 샘

플을 떨어뜨리고 육안으로 관찰하여 움직이는 생물은 살아있는 종으로 안 움직이는 생물은 죽은 종으로 간주하는데, 실제로는 육안관찰이 힘들고 계수하는데도 어려움이 있다. 또한, 계수하는데 시간이 많이 걸리기 때문에 현실적으로 선박평형수를 방류할 때, 제대로 된 측정 후에 방류하기는 어려운 실정이다.

[0004] 이외에 균수 측정 방법과 관련된 선행특허로는 대한민국 특허 공개번호 제 10-2007-0027577호에 기재된 '균수 측정 방법, 균수 측정 장치 및 이 장치에 이용되는 셀'에는 균수 측정방법으로 단계 (a)에서 단계 (d)까지의 공정을 구비하고 있다. 우선, 단계 (a)에서, 소정의 균종(예를 들면, 대장균 또는 대장균군)을 포함하는 측정 대상의 시료(검체)를 소정의 배지(예를 들면, 특정 효소 기질 배지법에 이용되는 배지)에 첨가한다. 단계 (b)에서, 소정의 온도 하에서, 또한 소정의 정전압에서, 산소 전극을 이용하여, 시료를 첨가한 배지에 흐르는 전류값을 측정한다. 단계 (c)에서, 단계 (b)에서의 측정을 개시한 후에, 일단 감소한 전류값이, 그 후 상승하여 소정의 역치를 넘을 때까지의 소요 시간을 측정한다. 단계 (d)에서, 소요 시간에 기초하여, 시료에 포함되어 있던 균종의 초기 균수를 산출'하는 내용이 기재되어 있다.

[0005] 또 다른 선행특허인 일본국 공개특허공보 특개2000-287699호 공보에는 산소 전극법을 이용한 세균수 측정방법이 기재되어 있는데 이것은 액체 배지 중에 포함되는 용존 산소의 농도가 높을수록, 많은 전류가 측정된다. 검체에 포함되는 세균은 호흡을 하는 것에 의하여, 액체 배지 중의 용존 산소를 소비한다. 이 세균의 호흡에 의한 용존 산소 농도의 저하에 수반하여, 산소 전극에 흐르는 전류도 저하하게 된다. 또한, 용존 산소의 소비량은, 검체에 포함되는 초기 세균수에 의존한다. 즉, 초기 세균수가 많으면 많을수록, 소비되는 산소량은 많아지고 용존 산소 농도의 저하도 빨라진다. 용존 산소 농도가 단시간에 저하하면, 측정되는 전류값도 단시간에 저하한다. 즉, 미지의 초기 세균수의 검체를 포함하는 액체 배지에 흐르는 전류가 소정의 역치까지 감소할 때까지의 소요 시간을 구하여, 이 소요 시간에 대응하는 초기 균수를 특정할 수 있다. 이상에 의하여, 산소 전극법에서는, 초기 균수를 단시간에 또한 정확하게 측정할 수 있다.

[0006] 한편 현재 10~50um 크기의 미생물로는 Tetracelmis 라는 미세조류가 대표종으로 선정되어 있다. 이 미생물은 길이가 10, 폭이 2um 정도 되는 종으로 움직임이 매우 활발하다. 현미경 관찰로 이 미생물을 측정하는 것은 매우 어렵다. 측정이 어려운 또하나의 이유는 1mL의 샘플을 슬라이드 글라스에 도포하고 커버글라스를 씌우는데, 샘플 액체의 높이가 약 1mm 정도 된다. 미생물은 활성이 있어서 액체의 위에 있기도 하고 아래에 있기도 한다. 현미경으로 관찰하는 경우 초점이 한군데에 맞추어져 있다 보니 대부분의 경우 나타났다가 사라지는 문제가 있어서 미세조류의 측정에 대한 정확한 방법이 필요하다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0007] 본 발명은 상기의 문제점을 해결하고 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 활동성 미생물의 수 측정방법을 제공하는 것이다.

**과제의 해결 수단**

[0008] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 활동성 미생물의 수 측정방법에 있어서,

[0009] a) 샘플을 채취하여 슬라이드 글라스에 도포하고 커버글라스를 덮는 단계;

[0010] b) 상기 a)단계에서 얻어진 샘플에 대하여 현미경 사진을 두 장 찍는 단계; 및

[0011] c) 두 장의 사진을 컴퓨터의 이미지 프로그램을 이용하거나 위치변화 감지 프로그램을 이용하여 위치변화가 있는 것은 살아있는 것으로 위치변화가 없는 것은 죽어있는 것으로 간주하는 단계를 포함하는 활동성 미생물의 수 측정방법을 제공한다.

[0012] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 컴퓨터의 이미지 프로그램 이용 방법은 사진 두 장을 시차를 두고 찍어 이미지프로그램에서 사진을 서로 다른 두 색으로 염색을 하고, 이 두 사진을 이미지프로그램에서 겹쳐보면 다른 위치에 있는 것은 원래의 색을 가질 것이고, 같은 위치에 있는 것은 두 색의 혼합 색을 가지는 것을 통하여 죽은 미생물과 살아있는 미생물을 구별하는 것이 바람직하고,

[0013] 다른 일 구현예에 있어서, 상기 서로 다른 두 색은 적색과 청색이며, 혼합 색은 흑색인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0014] 또 본 발명의 또 다른 일 구현예에 있어서, 상기 컴퓨터의 이미지 프로그램은 포토샵인 것이 바람직하나 이에

한정되지 아니한다.

- [0015] 본 발명의 다른 실시예에 있어서, 상기 샘플은 10 $\mu$ l에서 1mL인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 실시예에 있어서, 상기 사진 촬영은 1초~1시간 간격인 것이 바람직하고, 5초~10초 간격인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0017] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 위치변화 감지 프로그램 이용 방법은 먼저 두 장의 사진을 놓고 픽셀의 색을 인지하여 각 장의 미생물 위치 및 수를 센 후 두 장 사진을 비교하여 미생물의 위치 변화를 확인하는 원리를 이용한 것을 특징으로 하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0018] 이하 본 발명을 설명한다.
- [0019] 이에 본 발명에서는 일정량(예를 들어 1mL)의 샘플을 얇게 도포하여 일정시간 간격(예를 들어 10초 단위)으로 현미경에서 사진을 찍어 그 위치의 변화를 관찰하여 살아있는 종과 죽어있는 종을 판별하고자 한다.

**발명의 효과**

- [0020] 본 발명의 통하여 알 수 있는 바와 같이, 본 발명의 방법을 통하여 활동성 균주의 수를 효과적으로 계수할 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0021] 도 1은 컴퓨터의 이미지 프로그램을 이용하여 미생물의 수를 측정하기 위한 방법을 설명한다. 도 1과 같이, 사진 두 장을 시차를 두고 찍어 이미지프로그램(예, 포토샵)에서 하나는 빨간색, 하나는 파란색으로 염색을 하고(도 1 a와 b), 이 두 사진을 이미지프로그램에서 겹쳐보면 같은 위치에 있는 것은 검정색(빨강과 파랑을 합치면 검정색이 됨)이 되고 다른 위치에 있는 것은 빨강과 파랑의 원래 색을 가지고 있게 된다(도 1 c).  
 도 2의 사진은 10 $\mu$ l 샘플을 이용하여 측정한 사진들을 나타낸다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

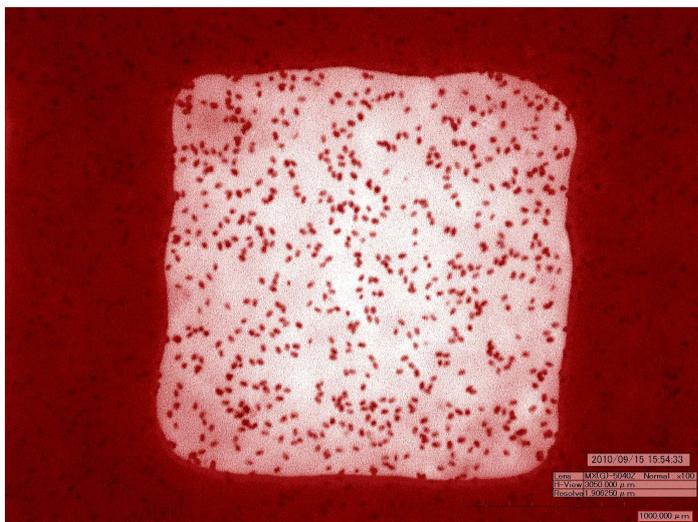
- [0022] 이하 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0023] 본 발명의 측정방법은 다음과 같다.
- [0024] 1) 샘플을 얇게 도포하기 위해 샘플을 채취하여 슬라이드 글라스에 도포하고 커버글라스를 씌운다.
- [0025] 2) 현미경 사진을 약 5~10초 간격으로 두 장 찍는다.
- [0026] 3) 두 장을 비교하여 위치변화가 있는 것은 살아있는 것으로 위치변화가 없는 것은 죽어있는 것으로 간주한다.
- [0027] 더욱 상세한 설명은 하기와 같다.
- [0028] 위치변화를 사진으로 관찰하는 방법에는 두가지 방법이 있다. 하나는 컴퓨터의 이미지 프로그램을 이용하여 사진에 색을 입혀 개체수를 세는 방법과 프로그램을 만들어 측정하는 방법이 그것이다.
- [0029] 먼저 컴퓨터의 이미지 프로그램 이용법은 도 1과 같이, 사진 두 장을 시차를 두고 찍어 이미지프로그램(예, 포토샵)에서 하나는 빨간색, 하나는 파란색으로 염색을 한다(도 1 a와 b).
- [0030] 이 두 사진을 이미지프로그램에서 겹쳐보면 같은 위치에 있는 것은 검정색(빨강과 파랑을 합치면 검정색이 됨)이 되고 다른 위치에 있는 것은 빨강과 파랑의 원래 색을 가지고 있게 된다(도 1 c).
- [0031] 이를 세어보아 빨강이 a개, 파랑이 b개, 검정이 c개 세어졌다면 살아있는 것은

[0032] 
$$\frac{a+b}{2}$$
 개, 죽어있는 것은 c 개이므로, 생존율은  $\frac{a+b}{a+b+2c} \times 100\%$  ,

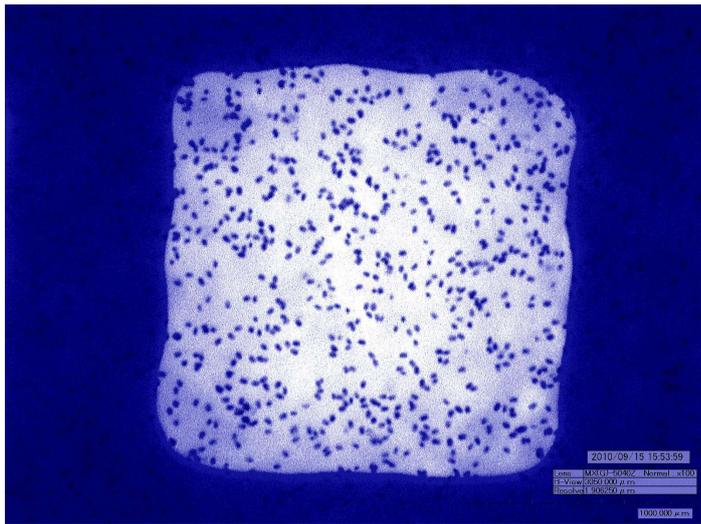
- [0033] 사멸율은  $\frac{2c}{a+b+2c} \times 100\%$  로 결정한다.
- [0034] 다음으로 위치변화 감지 프로그램의 개발을 개발하여 이를 이용하는 방법에 대해서 설명하면,
- [0035] 먼저 두 장의 사진을 놓고 픽셀의 색을 인지하여 각 장의 미생물 위치 및 개수를 센다. 그 후 두 장의 비교하여 미생물의 위치 변화를 확인하면 살아있는 종과 죽어있는 종을 셀 수 있다.
- [0036] 하기의 순서는 해당 프로그램 사용법이다.
- [0037] -OpenCV-2.1.0-win32-vs2008.exe 를 실행한다.
- [0038] -Install Option에서 'Add OpenCV to the system PATH for all users'를 선택해서 설치해야 한다는 점만 주의
- [0039] -다른 것들은 디폴트대로 설치하면 된다.
- [0040] - dotnetfx35setup.exe를 클릭 하시어 디폴트 데로 install하면 된다.
- [0041] - Cell 폴더안에 Cell.exe파일을 클릭하여,
- [0042] 첫 번째 파일 열기 버튼을 눌러 원본 사진을 선택하고, 두번째 파일 열기 버튼을 눌러 나중 사진을 선택하면 된다.
- [0043] 이 후에 옆에 있는 'Analyze' 버튼을 누르면 오른쪽의 텍스트 창에 총 세포수와 움직이지 않은 세포수가 나온다.
- [0044] 한편, 선박 평형수 규정에서는 1mL을 요구하고 있다. 이를 슬라이드 글라스에 도포하면 샘플액의 높이 때문에 초점이 잘 맞지 않는 문제가 있을 수 있다. 여러 차례의 실험결과 10uL를 도포하고 슬라이드 글라스로 덮으면 초점이 전체높이에서 모두 측정이 된다.
- [0045] 도 2의 사진은 10uL 샘플을 이용하여 측정한 것이다.

**도면**

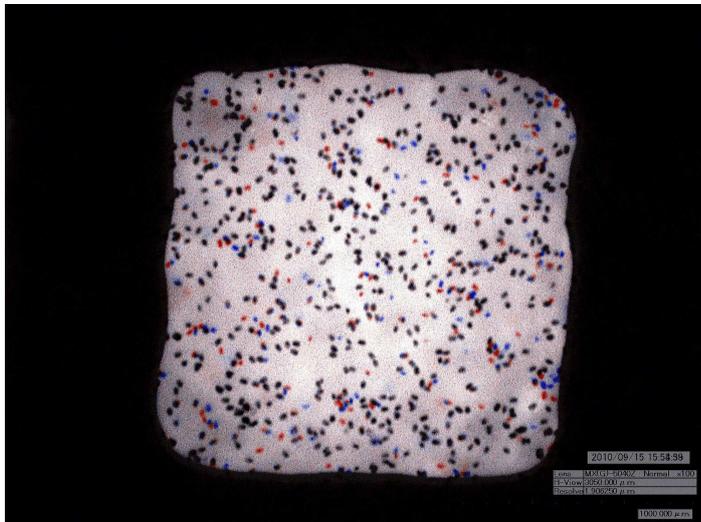
**도면1a**



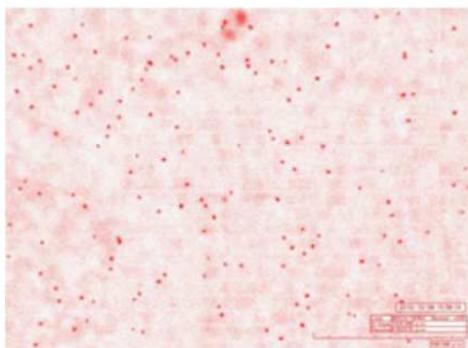
도면1b



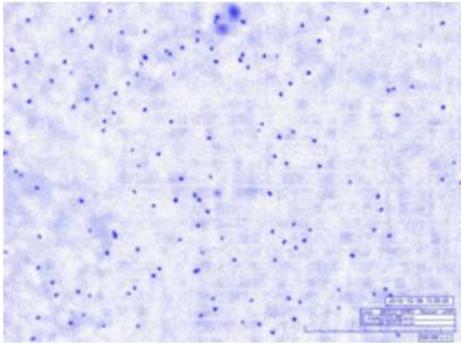
도면1c



도면2a



도면2b



도면2c

