Korean J. Plant Res. 29(5):574-578(2016)
http://dx.doi.org/10.7732/kjpr.2016.29.5.574

Print ISSN 1226-3591
Online ISSN 2287-8203

Original Research Article

초미세버블이 종자발아에 미치는 영향

황민섭[1], 오승훈[1], 이정일[1], 한정우[2], 김종민[1]*

[1]중앙대학교 기계공학부, [2]용인한국외국어대학교 부설고등학교

Effect of Nanobubbles on the Seed Germination

Min sub Hwang[1], Seung Hoon Oh[1], Jung Il Lee[1], Joung Woo Han[2] and Jong-Min Kim[1]*

[1]School of Mechanical Engineering, Chung-Ang University, Seoul 06974, Korea
[2]Hankuk Academy of Foreign Studies, Gyeonggi-do, Yongin 17035, Korea

Abstract - For the last few decades, much research has been tried to improve crop's characteristics such as crop yield, quality, seeding period and environmental adaptability. In this paper, the effect of nanobubbles on the germination rate of barley seed is experimentally investigated. The air nanobubble was generated in water by gas-liquid mixing method. The results were shown that the mean diameter and concentration of nanobubble fabricated in DI water are 133 ㎚ and 8.59×10^8 particles/㎖, respectively. Also, the seed germination rate for the nanobubble water was approximately 40 % higher than that of pure water.

Key words - Nanobubble, Air gas, Barley seed, *Hordeum vulgare* L., Germination test

서 언

식량 부족 현상은 인류가 해결해야 할 중요 과제 중 하나다. 국제연합식량농업기구(FAO)의 발표에 따르면 2014~16년 사이 전 세계적으로 영양부족에 시달리는 인구수는 7.8억 명으로 세계 식량 정상회의(World Food Summit)가 목표로 했던 5.15억 명을 크게 웃도는 수치다(Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2015). 더하여, 계속되는 인구 성장으로 인해 세계 인구수가 2050년에는 91억 명으로 늘어날 것이며, 전 세계 인구에게 필요한 열량을 공급하기 위해서는 식량 생산량이 70% 이상 증가해야 할 것으로 예측된다(Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2009). 그러나 다양한 종류의 식량 자원이 존재함에도 불구하고 곡물류의 식용 작물이 사람이 섭취하는 열량의 약 50% 차지하는 현실을 고려했을 때(Bewley, 1997), 지속적으로 증가하는 식량 수요를 충족시키기 위해서는 작물 생산량의 확대가 요구되고 있는 실정이다.

따라서, 많은 연구자들이 곡물류 식용 작물의 수확량, 품질, 파종 시기, 환경 적응력 등을 향상시키기 위한 연구를 수행하고 있다. Briatia *et al.* (2012)은 메밀종의 성장속도와 해양심층수 간의 관계를 연구해 해양심층수가 메밀종의 발아속도 향상에 긍정적 영향을 준다는 것을 밝혀냈다. 여섯줄보리(*Hordeum vulgare* L.)는 종자에 따라 여름이나 가을에 수확 가능한 식량 작물로써 직접 섭취하거나 가축의 사료로 사용되고 있으며(Baik and Ullrich, 2008), 현재까지 보리의 수확량이나 품질을 개선시키기 위한 다양한 연구가 진행되고 있다(Magnusdottir *et al.*, 2013). Gubler *et al.* (2008)은 발아 과정 중 노출되는 빛의 파장 길이를 달리 하는 실험을 진행하였다. 발아된 종자들을 RT-PCR기법을 사용하여 분석해 노출되는 빛의 종류에 따라 특정 유전 형질의 발현량에 차이가 있고, 유전형질의 발현량 차이가 발아속도에 영향을 준다는 결론을 얻었다. 또한, Högy *et al.* (2013)은 재배지의 지중 온도와 강수량과 같은 환경인자들을 조정하며 보리 재배 실험을 진행한 뒤, 획득한 수확량의 차이를 분석하여 강수량보다는 지중 온도의 상승이 보리의 수확량에 더 중요한 인자로 작용함을 밝혔다. 그러나 앞서 언급한 방식들의 경우 실험적인 환경에서 소규모로 적용하는 데는 문제가 없으나 대규모의 외부 농경지에서 재배되는 보리에 직접적으로, 단기간에 적용하기에는 시간적, 경제적 문제점이 있어 사용하기

*교신저자 : 0326kjm@cau.ac.kr
Tel. +82-2-820-5278

ⓒ 본 학회지의 저작권은 (사)한국자원식물학회지에 있으며, 이의 무단전재나 복제를 금합니다.
This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

힘들다는 단점이 있다.

한편, 최근 들어, 초미세버블이 가지는 독특한 물리적 특성을 다양한 분야에 적용하여 잠재적 응용 분야를 밝히는 것에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다(Chen *et al.*, 2009; Park and Kurata, 2009; Ebina *et al.*, 2013). Chen *et al.* (2009)은 세척제에 대한 초미세버블의 효과를 밝히기 위해 스테인리스에 전기를 가해 초미세버블을 생성시켰으며, 스테인리스 표면의 BSA (Bovine serum albumin) 흡착 유무를 평가하여 그 효과를 검토하였다. 저자들은 스테인리스 표면의 BSA 흡착 유무를 평가하기 위한 방법으로 AFM (Atomic force microscope)을 사용하였으며, 전기-화학적으로 생성된 초미세버블이 스테인리스 표면에 대한 BSA 흡착을 방해하고 세정 효과를 향상시킬 수 있음을 보고하였다.

한편, Park and Kurata (2009)는 상추의 수경 배양중 미세버블을 주입한 실험을 진행하였으며, 배양 결과 미세버블은 용존산소 농도와 관계없이 식물의 성장속도를 증가시킬 수 있다고 보고한 바 있다. 이와 비슷하게 Ebina *et al.* (2013)은 초미세버블을 먹인 쥐와 그렇지 않은 쥐를 이용해 초미세버블이 동물 성장에 미치는 효과를 실험하였다. 저자들은 산소 초미세버블을 마시며 자란 쥐들이 일반 물을 마신 쥐들보다 빠르게 성장함을 확인하였으며, 이로부터 산소 초미세버블이 동물의 성장에 긍정적 작용을 한다는 결론을 내렸다. 이렇듯 초미세버블이 생명체의 생리현상에 긍정적인 영향을 미칠 수 있다는 현상이 거듭 보고되고 있음에도 불구하고, 아직까지 관련 현상에 대한 명확한 메커니즘이 밝혀지지 않고 있다.

따라서, 본 연구에서는 증류수 내에 기-액 혼합 방법을 이용해 초미세버블을 생성하고, 생성된 초미세버블 혼합 증류수가 보리종자의 발아 특성에 미치는 영향을 살펴보았다.

재료 및 방법

초미세버블의 생성

초미세버블이 보리종자의 발아 특성에 미치는 영향을 살펴보기 위해, 3차 증류수와 초미세버블을 생성시킨 3차 증류수를 사용하였다. 초미세버블 혼합 3차 증류수는 공기와 증류수가 담긴 용기를 혼합하는 기-액 혼합 장치를 통해 생성되었다. 본 연구에서는 40 ㎖ 바이알(Wheaton, USA)에 3차 증류수 20 ㎖를 넣고, 상온에서 2 시간 동안 초미세버블을 생성하였다. 또한 nanoparticle tracking analysis (NTA) 기법(NanoSight LM10-HSBFT14 with 405 ㎚ blue laser, Quantum Design Korea, Korea)을 통해 생성된 초미세버블의 직경과 개체수를 측정하였다. NTA 기법에서는 초미세버블에 레이저를 조사하여 Brownian motion에 의해 움직이는 초미세버블을 가시화하고, CCD 카메라로 영상을 녹화하였다. 결과적으로 획득한 영상으로부터 초미세버블의 확산 계수, D_t를 측정하고, 이를 Stokes-Einstein 공식 (식 1)에 대입하여 초미세버블의 반지름을 계산하였다.

$$D_t = \frac{K_B T}{6\pi\eta r} \quad (1)$$

여기서, K_B는 Boltzmann 상수, T는 온도 그리고 η는 액체의 점성을 나타낸다.

발아실험

본 연구에서는, 초미세버블이 종자의 발아에 미치는 영향을 조사하기 위해, 여섯줄보리종자를 사용하였다. 여섯줄보리의 품종명은 혜강 겉보리이며 파성이 Ⅱ인 춘파형 겉보리이다. 보리종자는 국립식량과학원에서 제공받았으며, 변색되거나 도정작업 중 흠결이 발생한 종자를 제외하고, 일정한 크기의 종자들을 선별하였다.

보리종자 발아실험을 진행하기에 앞서, 용존산소 농도 측정기(InLab 605 O2- sensor, 메틀러 토레도 코리아, 한국)를 사용하여 초미세버블 혼합 증류수의 용존산소 농도와 3차 증류수의 용존산소 농도가 8 ㎎/L로 일치하는 것을 확인하였다. 또한, 종자를 50개씩 선별해 두 그룹으로 나누어 3반복으로 시험하였고, 각 그룹의 보리종자를 스펀지 위에 고정하였다. 이 후, 한 그룹은 초미세버블 혼합 증류수(40 ㎖)에 침지시켰으며, 다른 그룹은 3차 증류수(40 ㎖)에 침지시켰다. 보리종자를 침지시킨 후, 12 시간마다 20 ㎖의 초미세버블 혼합 증류수와 3차 증류수를 보충하여 종자가 마르는 것을 방지하였다. 침지법에서는 수분이 종자의 외피를 뚫고 내부로 침투하는데 12 시간 걸리는 관계로(Yu *et al.*, 2014), 발아 여부 관찰은 침지시키고 12 시간 이후부터 6 시간 간격으로 진행하였다. 또한, 종자의 발아 여부는 유근의 존재가 육안으로 확인하여 그 길이를 측정할 수 있는 종자를 발아한 것으로 판별하였다(Rusan *et al.*, 2014). 마지막으로 보리종자가 침지된 물의 온도는 보리종자 발아실험이 종료될 때까지 20℃로 일정하게 유지하였다.

결과 및 고찰

초미세버블의 입도

초미세버블 생성 직후 초미세버블의 입도 측정 결과를 Fig. 1에 나타내었다. Fig. 1(a)의 검은 배경은 증류수를 나타내며, 흰점은 초미세버블을 나타낸다. Fig. 1(b)는 초미세버블의 크기 분포를 나타내며, 초미세버블의 평균 직경은 133 ㎚, 개체수는 8.59×10^8 particles/㎖였으며, 3차 증류수 내에 나노크기의 입자가 존재하지 않는 사실을 고려했을 때, 기-액 혼합 장치를 통해, 초미세버블이 안정적으로 생성되었음을 알 수 있다.

생성한 초미세버블을 상온, 상압의 환경에서 36 시간 동안 방치한 뒤, 획득한 입도 분석 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 초미세버블의 평균 직경은 144 ㎚, 개체수는 1 ㎖당 5.89×10^8 particles/㎖로 나타났다. 이로부터, 생성된 초미세버블은, 보리종자 발아실험이 진행되는 36 시간 동안, 완전히 사라지지 않고 안정적으로 존재하고 있음을 알 수 있었다.

초미세버블의 존재와 안정성은 초미세버블의 높은 내압 때문에 오랜 기간 동안 논란이 되어 왔다. Young-Laplace 방정식(식 2)에 의하면 초미세버블의 극히 작은 직경으로 인해 버블의 내압은 상압에 비해 매우 크다는 것을 알 수 있었다.

$$P_i = P_a + \frac{2\sigma}{r} \quad (2)$$

여기서, P_i, P_a, σ, r은 차례대로 초미세버블의 압력, 대기압, 액체의 표면장력, 초미세버블의 반지름을 나타낸다. 초미세버블의 직경이 133 ㎚일 때 버블의 내압은 약 2.3 MPa로 상압의 약 20배에 해당한다. 따라서 초미세버블은 큰 내압으로 인해 상

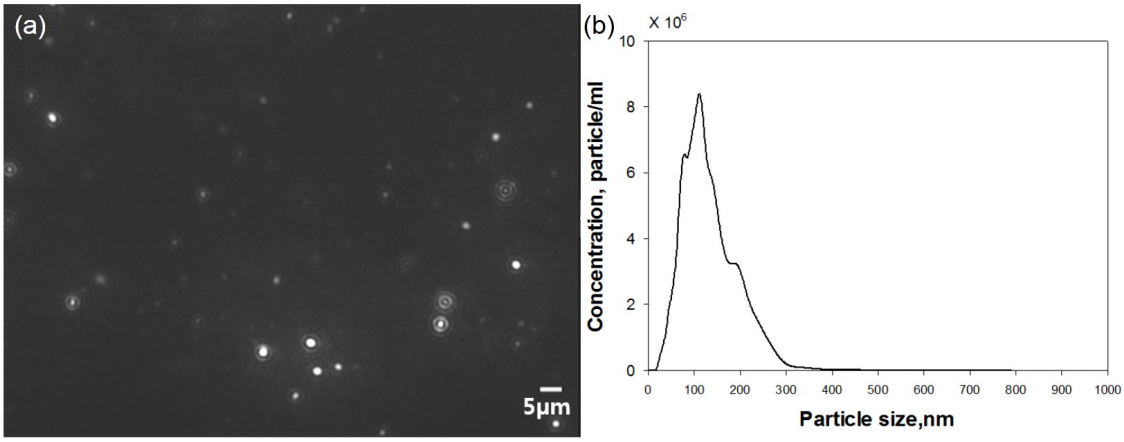

Fig. 1. Size measurement of particle-just after generation (a) Image of nanobubbles (b) Size distribution of nanobubble.

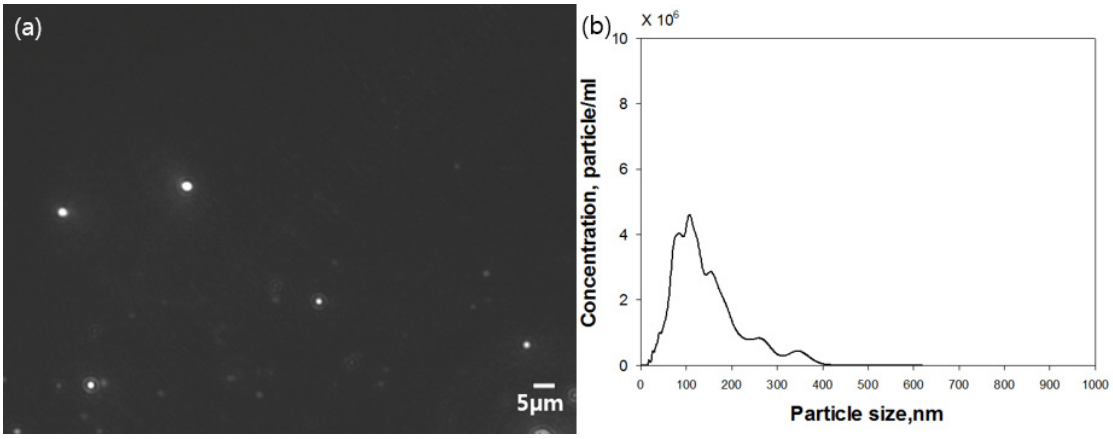

Fig. 2. Size measurement of particle-after 36 hours. (a) Image of nanobubbles, (b) Size distribution of nanobubbles.

압 하에서 안정하게 존재할 수 없다. 그러나 초미세버블은 강한 수소결합(Ohgaki *et al.*, 2010), 용매의 높은 초기 용존 농도(Ushikubo *et al.*, 2010), 뭉쳐있는 초미세버블에 의한 확산 방어막(Weijs *et al.*, 2012)과 같은 인자들에 의해 안정하게 존재할 수 있다. 이러한 인자들은 초미세버블을 구성하는 기체가 주변 액체로 확산되는 것과 인접한 초미세버블들이 서로 충돌 및 융합하는 것을 억제하고, 초미세버블의 높은 내압에 대한 동적 균형을 제공함으로써 초미세버블이 물속에서 오랜 기간 동안 안정하게 존재할 수 있게 해준다.

초미세버블이 발아에 미치는 영향

초미세버블 혼합 증류수와 일반 증류수를 사용한 보리종자의 발아실험 결과를 Fig. 3에 나타나있으며, 보리종자의 발아율은 식 3을 이용하여 계산하였다.

$$\text{발아율}=(\text{발아된 종자 수}/\text{전체 종자수})\times 100\% \quad (3)$$

Fig. 3에서 나타난 바와 같이 시간이 경과함에 따라 보리종자의 발아율이 증가함을 알 수 있다. 초미세버블 혼합 증류수와 일반 증류수의 발아율을 살펴보면, 초미세버블 함유 증류수의 경우에서 일반 증류수보다 더 높은 발아율을 나타내는 것을 알 수 있다. 초미세버블 혼합 증류수의 경우, 일반 증류수에 비해 처리 18 시간 경과 후에는 초미세버블 혼합 증류수 처리에서 30.66%, 일반 증류수 처리에서 15.33%로 약 2배 정도 높은 발아율을 보였다. 또한 36 시간 경과 후에는 초미세버블 혼합 증류수와 일반 증류수에서 각각 85.33%, 56.66% 의 발아율을 보여 초미세버블은 보리종자의 초기 발아과정에서 큰 영향을 미침을 알 수 있다.

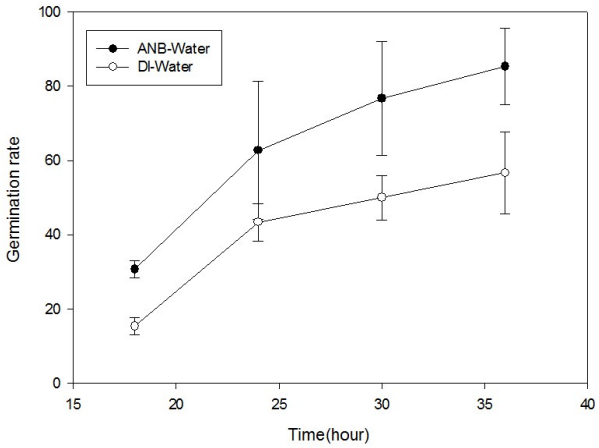

Fig. 3. Germination rate of barley seed dipped in nanobubble water compared to distilled water.

실험 결과의 정확한 분석을 위해 각 측정 시간대 별로 일원배치 분산분석을 실시하였다. 일원배치분산분석 결과 24 시간을 제외한 나머지 결과에서 p값이 유의수준인 0.05보다 낮게 나타남을 확인할 수 있었다. 이는 초미세버블의 존재가 보리종자의 발아 속도 향상에 유효한 효과를 미치고 있음을 의미한다.

세부적인 시간대별 초미세버블과 보리종자의 발아간의 관계를 비교하면 18 시간 전후의 유의성이 실험 기간 중 가장 높은 수치(p=0.001)로 나타났으나 바로 다음 측정 시간대인 24 시간에서는 가장 낮은 유의성(p=0.157)을 보임을 알 수 있다. 이후, 시간이 경과할수록 유의성을 회복하는 경향을 확인할 수 있으며, 30 시간(p=0.0481), 36 시간(p=0.030)에는 $p<0.05$ 범위내로 측정되어 초미세버블이 보리종자의 발아 속도 향상과 연관되어 있음을 나타낸다. 이러한 결과들로부터 초미세버블의 존재는 보리종자의 발아초기 단계에서 종자의 발아속도와 깊은 상관관계를 가짐을 알 수 있다. 그러므로 본 실험 결과들로부터, 초미세버블이 일으키는 생명체(상추, 쥐 등)의 성장 촉진은 조직(또는 기관) 단계에서 일어남을 예상 할 수 있다(Ebina *et al.*, 2013).

보리종자 발아율과 관련하여, Liu *et al.* (2013)에 의해 초미세버블이 보리종자의 발아율을 증가시킨다는 결과가 보고된 바 있다. 저자들은 초미세버블에 의해 발아율이 15-20% 정도 향상됨을 보여주었다. 또한, NMR을 이용하여 초미세버블이 형성된 물의 mobility는 그렇지 않은 물에 비해 높음을 확인하였으며, 이러한 사실이 생명체의 생리 활동을 향상시키는데 기여할 것이라고 결론지었다. 또한 초미세버블 혼합 증류수에는 일반 증류수보다 많은 활성산소가 존재하며, 과농도의 활성산소는 식물 성장에 부정적 영향을 주지만 초미세버블의 활성산소 농도는 종자의 발아속도의 향상에 도움을 준다는 사실이 발표된 바 있다(Liu *et al.*, 2014). 그러나 아직까지 초미세버블이 종자의 발아 메커니즘에 미치는 영향에 대해 명확하게 알려진 바가 없어 관련 분야에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

적 요

지속적으로 증가하는 식량 수요를 충족시키기 위해 작물 생산량의 확대가 요구되고 있는 실정이다. 따라서 많은 연구자들이 다양한 관점에서 곡물류 식용 작물의 수확량, 품질, 파종 시기, 환경 적응력 등을 향상시키기 위한 연구를 수행하고 있다.

본 연구에서는 초미세버블이 보리종자의 발아에 미치는 영향에 대해 살펴보았다. 증류수 내에 생성된 초미세버블의 평균 직경과 개체수는 각각 133 ㎚, 8.59×10^8 particles/㎖였으며, 초미세버블 혼합 증류수는 일반 증류수에 비해 보리종자 발아율을 향상시킬 수 있음을 확인하였다.

사 사

이 논문은 2016년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(2014R1A2A2A01007164).

References

Baik, B.K. and S.E. Ullrich. 2008. Barley for food: characteristics, improvement, and renewed interest. J. Cereal Sci. 48(2): 233-242.

Bewley, J.D. 1997. Seed germination and dormancy. Plant Cell 9:1055-1066.

Briatia, Xoxiong., S.K. Hong, I.J. Sung, K.J. Chang, B.J. Park and C.H. Park. 2012. Effect of deep sea water on seed germination, photoperiod and temperature on the growth and flowering of buckwheat species. Korean J. Plant Res. 25(3):323-328.

Chen, H., H. Mao, L. Wu, J. Zhang, Y. Dong, Z. Wu and J. Hu. 2009. Defouling and cleaning using nanobubbles on stainless steel. Biofouling 25(4):353-357.

Ebina, K., K. Shi, M. Hirao, J. Hashimoto, Y. Kawato, S. Kaneshiro and H. Yoshikawa. 2013. Oxygen and air nanobubble water solution promote the growth of plants, fishes, and mice. PLoS One 8(6):e65339.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2009. How to feed the world in 2050. Retrieved 28 Sep. 2016 from http://www.fao.org/.

_____. 2015. The state of food insecurity in the world 2015. Retrieved 28 Sep. 2016 from http://www.fao.org/.

Gubler, F., T. Hughes, P. Waterhouse and J. Jacobsen. 2008. Regulation of dormancy in barley by blue light and after-ripening: effects on abscisic acid and gibberellin metabolism. Plant Physiol. 147(2):886-896.

Högy, P., C. Poll, S. Marhan, E. Kandeler and A. Fangmeier. 2013. Impacts of temperature increase and change in precipitation pattern on crop yield and yield quality of barley. Food Chem. 136(3):1470-1477.

Liu, S., Y. Kawagoe, Y. Makino and S. Oshita. 2013. Effects of nanobubbles on the physicochemical properties of water: The basis for peculiar properties of water containing nanobubbles. Chem. Eng. Sci. 93:250-256.

____, S. Oshita and Y. Makino. 2014. Reactive oxygen species induced by water containing nano-bubbles and its role in the improvement of barley seed germination. 4th Micro and Nano Flows Conference, United Kingdom. pp. 1-8.

Magnusdottir, A., H. Vidarsson, J.M. Björnsson and B.L. Örvar. 2013. Barley grains for the production of endotoxin-free growth factors. Trends Biotechnol. 31(10):572-580.

Ohgaki, K., N.Q, Khanh, Y. Joden, A. Tsuji and T. Nakagawa. 2010. Physicochemical approach to nanobubble solutions. Chem. Eng. Sci. 65(3):1296-1300.

Park, J.S. and K. Kurata. 2009. Application of microbubbles to hydroponics solution promotes lettuce growth. Horttechnology 19(1):212-215.

Rusan, M.J., A.A. Albalasmeh, S. Zuraiqi and M. Bashabsheh. 2015. Evaluation of phytotoxicity effect of olive mill wastewater treated by different technologies on seed germination of barley (*Hordeum vulgare* L.). Environ. Sci. Pollut. Res. 22(12):9127-9135.

Ushikubo, F.Y., T. Furukawa, R. Nakagawa, M. Enari, Y. Makino, Y. Kawagoe and S. Oshita. 2010. Evidence of the existence and the stability of nano-bubbles in water. Colloid Surf. A-Physicochem. Eng. Asp. 361(1):31-37.

Weijs, J.H., J.R. Seddon and D. Lohse. 2012. Diffusive shielding stabilizes bulk nanobubble clusters. Chemphyschem 13(8):2197-2204.

Yu, Y., G. Guo, D. Lv, Y. Hu, J. Li, X. Li and Y. Yan. 2014. Transcriptome analysis during seed germination of elite Chinese bread wheat cultivar Jimai 20. BMC Plant Biol. 14(1):20.

(Received 8 August 2016 ; Revised 29 September 2016 ; Accepted 6 October 2016)