

조류기인 유기물질의 제브라피쉬에 대한 뇌파측정기반 독성평가

오세현^a · 장형준^b · 조윤철^{c,†}

대전대학교 토목환경공학과

Electroencephalography (EEG) based Toxicity Test of Algae Organic Matter on Zebrafish

Oh Sehyun^a · Jang hyeongjun^b · Cho Yunchul^{c,†}

Department of Civil and Environmental Engineering, Daejeon University
(Received 20 April 2023, Revised 17 May 2023, Accepted 23 May 2023)

Abstract

Harmful algae blooms have become a serious environmental problem in major river basins in Korea. They are known to produce various algal organic matters (AOMs) including intracellular organic matters (IOMs) and extracellular organic matters (EOMs). Generally AOMs cannot be easily removed by coagulation/flocculation process in conventional drinking water plants. AOMs produced by blue-green algae also include various toxins such as Microcystins, Anatoxin-a, and Saxitoxin known to have harmful effects on living organisms in aquatic environment. In this study, toxic effects of EOMs produced by three different algae species (*Microcystis sp.*, *Anabaena sp.*, and *Oscillatoria sp.*) on zebrafish were investigated using electroencephalography (EEG) recording method, a technology for recording brain activity. Electroencephalographic changes in zebrafish revealed that a low EOM had a negative effect on zebrafish compared to both *Anabaena sp.* and *Oscillatoria sp.* at 30 ppm EOM exposures. This result might be due to Microcystins present in EOMs produced by *Microcystis sp.* As a result of power spectrum density analysis, exposure to EOMs produced by *Microcystis sp.* caused a state of vigilance in zebrafish. This EEG based toxicity test can be used to examine effects of harmful materials at low levels on living organisms in an aquatic system.

Key words : Algal organic matter (AOM), Electroencephalography, Toxicity, Water treatment process

^a 석사과정(M.S. student), tpgus010120@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0007-7232-5209>

^b 학사과정(Undergraduate student), janghyeoungjun@naver.com, <https://orcid.org/0009-0007-1890-3960>

^{c†} Corresponding author, 교수(Professor), ycho@dj.ac.kr, <https://orcid.org/0000-0002-7011-8907>

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.

1. Introduction

급속한 기후변화에 따른 국내 주요 수계 내 부영양화가 가속화되고 있으며, 녹조현상에 따른 유해 남조류의 발생이 심각한 실정이다(Lee et al., 2011). 이러한 남조류의 대변성은 조류기인 독성물질과 소독부산물의 전구물질인 조류기인 유기물질(algal organic matter, AOM)의 증가로 이어질 수 있다. AOM은 세포 외 유기물질(extracellular organic matter, EOM)과 세포 내 유기물질(intracellular organic matter, IOM)로 이뤄져있으며, 친수성 물질과 유기질소를 함유하고 있다. AOM의 주요 구성성분은 nucleic acids, protein, glycolic acid, polysaccharides 등이며, 이중 polysaccharides과 같은 친수성 물질은 응집에 의해 잘 분해되지 않아 정수처리 공정에서 응집장해를 발생시킨다(Paralkar and Edzwald, 1996). 일반적으로 수중의 휴믹성분물질은 소독공정시에 염소소독 부산물을 형성하는 대표적인 전구물질로 알려져 있고, AOM 또한 염소소독과정 중 염소소독부산물을 형성한다고 알려져 있다. AOM이 함유된 상수원수를 소독처리시 세포벽의 파괴로 인해 세포 내부의 구성 물질들이 용출되어 수중의 잔류염소와 반응하여 트리할로메탄(THMS)과 같은 소독부산물의 생성될 수 있다(Hong, 2018). 주요 조류기인 독성물질은 Microcystis-LR, Microcystis-LA, Anatoxin-a, Nodularin, Saxitoxin, Cylindrospermopsin 등이 있다. 그 중 가장 흔하게 발견되는 Microcystin은 그 종류가 약 80종 이상 발견되었으며(Lee and Shin, 2017), 5~6월말에 소량으로 검출되나 점진적으로 그 농도가 높아지고 조류 대변성시기에는 지속적으로 검출되는 것으로 알려져 있다. Anatoxin-a는 신경독소 물질로 알려져 있으며, 주로 *Aphanizomenon flosaquae* 및 *Oscillatoria sp.*에서 주로 발생하는 하는 것으로 보고되고 있다(Wang, 2022).

AOM 제거방법에 관한 다양한 연구가 수행되었는데, 철(III) 응집제 주입량이 50mg/L 이상인 경우에 약 30%이상 제거효율이 보였으나, 응집제가 저농도로 주입될 경우, 제거효율이 상당히 낮아지는 경향이 나타났다(Park et al., 2005). 오존 고도산화공법 적용에 따른 조류기인 유기물질 제거효율을 보면 2-MIB은 약 35%의 제거 효능을 보였고, Geosmin, Microcystin-LR은 약 60~70%의 높은 제거효능을 보였다(Kim and Park, 2019) 또한, UV/응집 공정은 조류(*Microcystis sp.* 및 *cyclotella sp.*)와 이러한 조류로부터 기인한 유기물질을 효과적으로 제거할 수 있다고 보고되었다(Dai et al., 2020). 한편, 제브라피쉬를 이용하여 Microcystin-LR의 독성평가에 대한 연구사례를 보면 Microcystin-LR는 염소농도가 1ppm이상인 상태에서 15분 정도 접촉 시 치사율이 약 90% 이상 되었고, Microcystin-LR로부터 기인한 DBP에 노출시켰을 경우, 제브라피쉬의 인지능이 저하된다고 보고되었다(Yoon et al., 2020). 또한 Oberemm et al. (1997)에 연구에서는 0.5, 5, 50 μ g/L에서의 Microcystin-LR에서 배양한 제브라피쉬 배아에서는 배아에 직접적인 영향은 없었지만, 미리 노출된 유충을 사육하였을 때 성장률이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 한편, 뇌파(Electroencephalography, EEG)검

사기법은 의·공학적 연구에서 약물 스크리닝 및 신경계 질환 등의 인간 질병에 대한 연구에서 많이 활용되어 왔다. 예를 들어, 수면 장애 및 신경학적 장애를 판단하기 위해 뇌파 검사기법이 적용되고 있다(Levitas-Djerbi and Appelbaum 2017). 최근 간질에 대한 신종 항경련제(ASD)의 효과를 검증하기 위하여 제브라피쉬를 실험모델로 하여 뇌파검사기법을 적용되기도 했다(Hwang et al., 2020).

이와 같이 지금까지 AOM에 대한 연구들은 주로 특성조사 또는 처리 방법에 초점을 맞추어 진행되었고, AOM에 의한 수생태 건강성 및 생물종에 독성관련 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 조류기인 유기물질이 수생 동물의 신경세포에 미치는 영향을 파악하기 위해 AOM에 대한 농도 급성독성평가방식이 아닌 저농도 조건하에서 수생 생물종에 신경세포 영향을 파악하고자 제브라피쉬 치어를 대상으로 뇌파검사 기반으로 뇌 활동에 따른 전류 변화를 측정함으로써 인지능 평가를 수행하였다.

2. Materials and Methods

2.1 조류 배양 및 조류기인 유기물질 특성조사

국내 주요수계에서 빈번하게 검출되는 세가지 조류종(*Microcystis sp.*, *Anabaena sp.*, 및 *Oscillatoria sp.*)을 선정하여 배양을 진행하였다. *Microcystis sp.*는 국립낙동강생물자원관에서 *Anabaena sp.*와 *Oscillatoria sp.*는 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)에서 분양받아 조류 배양을 진행하였다. 조류는 실험실 규모의 조류배양시스템을 구축하여 배양하였으며, Table 1과 같은 조건에서 배양하였다. 배양은 총 5주간 진행하였으며, 각 조류별 정체기(stationary phase, 배양 시작 후 3~4 주) 기간에 배양 시스템에서 조류배양액을 채취하였다. EOM은 조류배양액에서 일정량을 분취한 후 원심분리기에서 5000rpm으로 15분간 원심 분리 후 상등액을 GF/C filter(wattman)로 여과를 진행한 후 추출하였다.

Table 1. Algae culture conditions

Environmental Factor	Condition
Algae seed : BG-11	1:10
pH	7.5 - 8.5
Lux	3000 - 5000
Dark cycle	12L : 12D
Temperature	27 $^{\circ}$ C
Axenic/Xenic	Xenic

2.2 제브라피쉬 배양

조류기인 유기물질에 의한 수생태계 내 생물종의 위해성 평가를 위해 제브라피쉬를 실험모델로 선정하였다. 제브라피쉬는 인간 유전자와의 유사성이 70% 이상이고(Howe et al., 2013), 배아가 투명하여 광학현미경으로 뇌, 눈, 간 등의 장기를 쉽게 확인할 수 있다는 장점도 있다(Ali et al., 2011). 또한, 생식 주기가 짧아 다양한 유기오염물질과 독성 중금속

등의 대한 수질오염 독성실험에서 동물 모델로써 자주 활용되어 있다(Dai et al., 2014). 제브라피쉬의 사육조건은 Table 2에 정리하였다. 제브라피쉬를 어항에서 사육시키기 전 일정량의 수돗물을 약 2일간 수중 폭기하여 수중에 잔존하는 염소를 제거하였으며, 온도는 약 28℃를 유지시키며 사육하였다. 또한 안정적인 뇌파 측정을 위해 별도의 방음 공간에서 실험을 진행하였으며 측정시간동안 외부 소음을 최대한 차단시켰다.

Table 2. Zebrafish breeding conditions

Environmental Factor	Condition
Water temperature	28℃
pH	6.5 - 8.5
NH ₃	<0.02 ppm
O ₂	8-11 ppm
CO ₂	< 15 ppm
NO ₂	< 0.5 ppm

2.3 EEG recording 기법 적용

전기생물학적 측정방법인 EEG는 뇌파를 통해 뇌 기능을 직접적으로 측정하는 진단기법으로(Lee, Lee et al., 2020), 본 연구에서는 EOM 노출에 대한 제브라피쉬의 뇌파변화를 측정하였다. 화학물질이 제브라피쉬에 노출되어 독성을 유도하는 경우, 정상상태의 뇌파 진폭보다 비이상적인 진폭을 보이는 현상인 발작성 뇌파(ictal-like discharge events)현상이라고 하며, 이때 발생한 발작성 뇌파 변화정도를 독성 영향에 대한 정량적 지표로 사용하였다. 제브라피쉬 치어의 EOM에

대한 뇌파변화를 확인하기 위한 EEG 실험방법은 다음과 같다. EOM을 노출시킨 치어를 측정용 주사바늘(size : 18)을 사용하여 EEG recording 챔버(chamber) 내에 주입하였다(Fig. 1). 이후 제브라피쉬 치어의 뇌파는 침습적 전극을 이용하여 10분 동안 측정하였으며(Afrikanova et al., 2013), 전 자신호분석기(MP36, Biopac Systems, Inc.)를 이용하여 EEG 자료를 수집하여 발작 파형(waveform)을 분석하였다. 한편, 사용된 EOM 용액은 각 조류별로 채취한 EOM을 이용하여 0.3, 3, 그리고 30ppm으로 EOM 용액을 제조하여 제브라피쉬 치어에게 노출시켰다.

3. Results and Discussion

3.1 조류기인 유기물질의 특성

Microcystis sp., *Anabaena sp.*, 및 *Oscillatoria sp.*의 정제기에서 추출한 EOM에 대한 특성분석은 Table 3에 정리하였다. 세 가지 조류종의 EOM 농도에 대한 Total organic carbon (TOC)값은 각각 48.57ppm, 41.04ppm, 33.68ppm으로 측정되었으며 *Microcystis sp.*의 측정값이 가장 높았다. UV254의 경우 1.154, 0.511, 0.702순으로 각각 측정되었으며, SUVA측정은 2.37, 1.25, 2.08순으로 각각 측정되었다. *Microcystis sp.*의 SUVA값이 정제기에서 높은 값이 측정되었는데 이는 방향족 유기화합물과 고분자량 유기화합물 등의 함량이 다른 두 조류종보다 높은 것으로 판단한다(Chen et al., 2017). 또한 XAD 수치분획을 실험한 결과 전체적으로 세 조류종의 EOM은 친수성 물질로 구성되어있는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2). EOM이 주로 지방산 및 기타 유기산으로 구성되어 있어 높은 친수성 비율을 나타내는 것으로 보이며 이는 다른 문헌 값들과 유사하였다(Cardozo et al., 2007; Nguyen et al., 2005; Zhang et al., 2011).

Table 3. Characteristics of EOM produced by three different algae species

Phase	Algae	TOC (ppm)	UV254	SUVA
Stationary phase	Microcystis	48.57	1.154	2.37
	Anabaena	41.04	0.511	1.25
	Oscillatoria	33.68	0.702	2.08

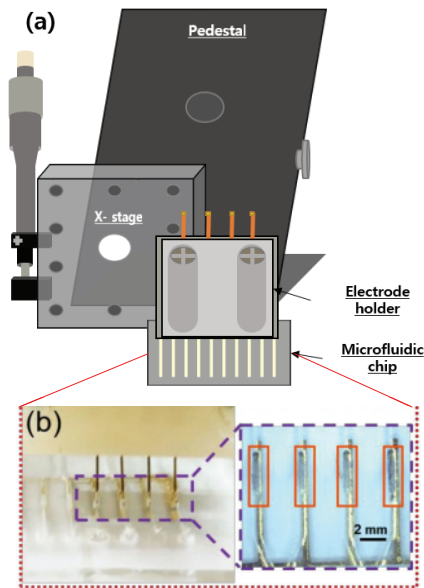


Fig. 1. Photograph of electroencephalogram (EEG) recording setup. (a) Whole experimental setup, and (b) Magnified view of needle electrodes that penetrate PDMS membrane of microfluidic channels containing zebrafish (Lee et al., 2020).

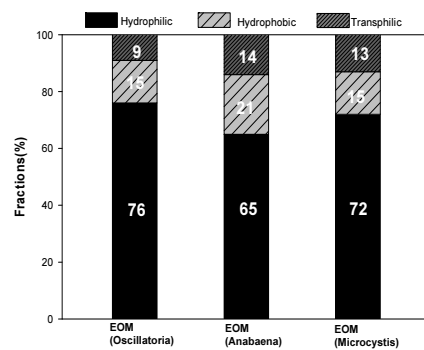


Fig. 2. Comparison of HPO, TPH, and HPI fractions of AOMs produced by three different algae species.

3.2 발작유사뇌파건수(ictal-like discharge events)의 평균횟수

제브라피쉬 치어에서의 발작유사뇌파건수(ictal-like discharge events)의 평균횟수(nr/20min)분석은 *Microcystis sp.*, *Anabaena sp.*, 및 *Oscillatoria sp.*에서 각각 추출한 EOM에 노출시킨 후 4days-post-fertilization(dpf)에서 EEG 측정을 진행하였다(Fig. 3). 평균횟수는 EEG의 반복적 실험에서 제브라피쉬 치어에서 발작성 뇌파가 관찰된 횟수의 평균값을 의미하며, 발작성 뇌파가 유의하게 발생했는지를 판단하기 위한 정량적 지표로 사용되었다. 이를 통해 제브라피쉬 치어에서 EOM 농도 변화 및 특정 조류종의 EOM에 따라 전기·생리학적 영향을 파악하고자 하였다. 세 개의 조류종(*Microcystis sp.*, *Anabaena sp.*, 및 *Oscillatoria sp.*)으로부터 기인된 EOM을 초기 농도 3ppm으로 하여 노출실험을 한 결과 대조군(control)과 비교하였을 때 발작유사뇌파건수는 차이가 거의 없었다. 다만, *Microcystis sp.*의 EOM에 노출시킨 경우 발작유사뇌파건수가 1.375 ± 2.263 로 측정되었는데, 통계학적으로 유의미한 차이를 보이지 않았다. 한편, 세 개의 조류종(*Microcystis sp.*, *Anabaena sp.*, 및 *Oscillatoria sp.*)으로부터 기인된 EOM을 초기 농도 30ppm으로 하여 노출실험을 한 결과, 3ppm으로 노출했을 때도 마찬가지로 발작유사뇌파건수는 거의 발생하지 않았다.

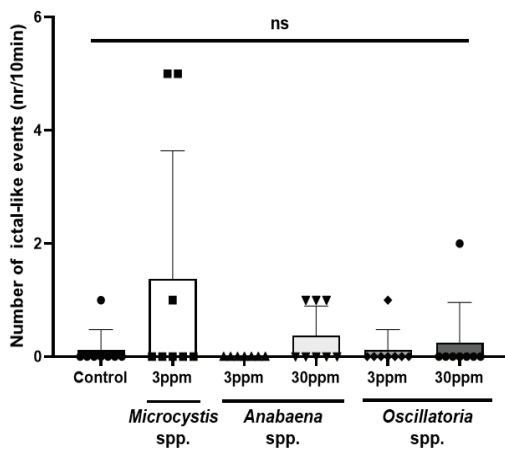


Fig. 3. Average duration of ictal-like discharge events in zebrafish larvae after 96h exposure to different EOM concentrations (mg/L as TOC : 0.3 ppm, 3 ppm, and 30 ppm) produced by three different algae species.

3.3 발작유사뇌파건수의 누적지속시간

제브라피쉬 치어에서의 발작유사뇌파건수(ictal-like discharge events)의 누적지속시간 (s/20min)분석은 *Microcystis sp.*, *Anabaena sp.*, 및 *Oscillatoria sp.*에서 각각 추출한 EOM에 노출시킨 후 4days-post-fertilization(dpf)에서 EEG 측정을 진행하고, 대조군과 비교하였다(Fig. 4). 누적지속시간은 각 개체의 실험이 진행된 기간(10분)동안 발작성 뇌파가 관찰된 모든 시간의 합으로 발작성 뇌파의 정량적 지표로 사용되었

으며, 발작성 뇌파의 발생이 유의한 결과인지 확인하기 위한 방법이다. 이를 통해 EOM 농도 변화 및 특정 종에서 추출한 EOM에 따라 발작성 뇌파의 누적지속시간의 변화를 파악하고자 하였다. 3개의 조류종(*Microcystis sp.*, *Anabaena sp.*, 및 *Oscillatoria sp.*)으로부터 기인된 EOM을 초기 농도 3ppm으로 하여 노출실험을 한 결과 대조군(평균값: 0.054 ± 0.153)과 비교한 경우 발작유사뇌파건수의 누적지속시간은 대조군보다 통계적으로 유의미한 차이를 나타내지는 못했다. 한편, *Anabaena sp.*의 30ppm EOM에 노출시킨 경우, 3ppm에 노출시킨 경우보다 상대적으로 발작유사뇌파건수 누적지속시간이 $0.698s/20min \pm 1.233$ 정도 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

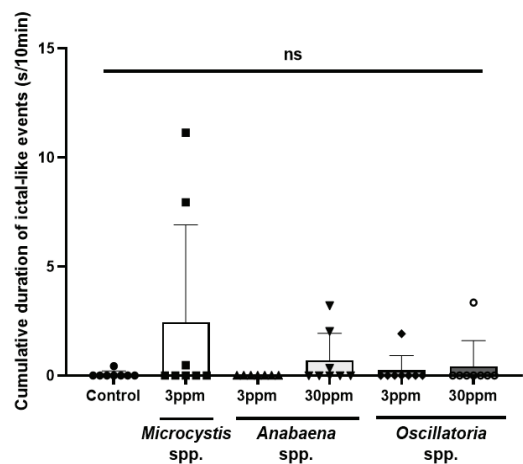


Fig. 4. Cumulative duration of ictal-like discharge events in zebrafish larvae after 96h exposure to different EOM concentrations (mg/L as TOC : 0.3 ppm, 3 ppm, and 30 ppm) produced by three different algae species.

3.4 발작유사뇌파건수의 평균지속시간

제브라피쉬 치어에서의 발작유사뇌파건수의 평균지속시간 (s/20min) 분석은 *Microcystis sp.*, *Anabaena sp.*, *Oscillatoria sp.*의 EOM을 각각 노출시킨 후 4dpf에서 EEG 측정을 진행하였다(Fig. 5). 평균지속시간의 의미는 각 개체의 발작성 뇌파가 지속된 평균적인 시간을 의미하며 발작성 뇌파의 정량적 지표로서, 이를 통해 EOM 농도 변화 및 특정 종에서 추출한 EOM에 따라 수생물종에 미치는 독성 및 위해성을 평가하는 기법으로 활용하고자 하였다. 3개의 조류종(*Microcystis sp.*, *Anabaena sp.*, 및 *Oscillatoria sp.*)으로부터 기인된 EOM을 초기 농도 3ppm으로 하여 노출실험을 한 결과 대조군(평균값: 0.054 ± 0.153)과 비교하였을 때 발작유사뇌파건수의 평균지속시간은 전체적으로 대조군보다 통계적으로 유의미한 차이를 나타내지는 못했다. 또한 농도를 30ppm으로 증가시킨 *Anabaena sp.*, *Oscillatoria sp.*의 경우 3ppm의 EOM에 노출시킨 경우의 평균지속시간과 별 차이가 없는 것을 확인할 수 있었다.

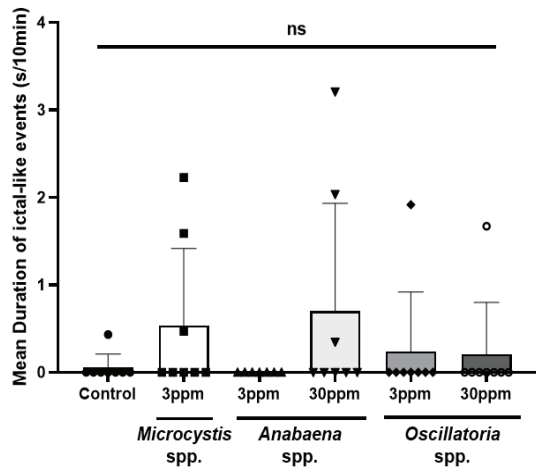


Fig. 5. Mean duration of ictal-like discharge events in zebrafish larvae after 96h exposure to different EOM concentrations (mg/L as TOC : 0.3 ppm, 3 ppm, and 30 ppm) produced by three different algae species.

3.5 신호 파워 스펙트럼 밀도

EEG recording 후 신호 파워 스펙트럼 밀도(Power spectrum density)을 분석하였다. 대조군(Control) 대비 실험군에서의 Absolute 또는 Relative power spectrum의 차이는 log2(mean of experimental group/mean of Control group) 값을 히트맵(heat map)을 활용해 시각적으로 나타내었다(Fig. 6). 대조군(Control) 대비 실험군의 Absolute 또는 Relative power spectrum의 비교는 t-test를 수행하여 Heat map 내의 *로 표기하였다. 세 가지 조류종의 EOM으로 처리하였을 때와 대조군(Control)과 비교한 결과, 전반적으로 저주파의 relative power (Slow Oscillation, Delta band)의 감소와 고주파의 relative power(Alpha, Beta, Gamma band)의 증가를 확인했다. 이때의 델타파(Delta band)는 EEG 평가에서 가장 낮은 주파수 영역인 1-4Hz에 해당하며, 주로 뇌 진동으로 구성되어 있다. 델타파는 주로 항상성 휴식 상태 및 수면 또는 공

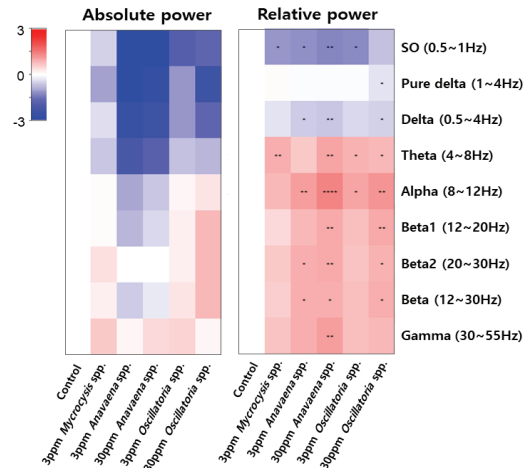


Fig. 6. Heat map representing color-coded relative power spectrum in zebrafish larvae after 96h exposure to different EOM concentrations (mg/L as TOC: 0.3 ppm, 3 ppm, and 30 ppm) produced by three different algae species.

항발작 및 지속적인 통증 중에도 증가한다. 이러한 델타파의 감소는 수면 부족으로 이어진다(Knyazev, 2012). 알파파(Alpha band)는 EEG 평가에서 8-13Hz에 해당하는 주파수 영역이며, 알파파는 휴식 및 의식 상태를 반영하여 그 신호가 변화한다. 또한 베타파(Beta band)는 13-30Hz에 해당하는 주파수 영역이며, 극도로 긴장된 상태나 흥분으로 인해 증가하는 주파수영역이다(Hamid et al., 2010). 감마파(Gamma band)는 30-100Hz에 해당하며, 감정 처리와 관련된 영역을 담당하며 극도로 긴장된 상태에서 방출되는 고 진동수의 뇌파에 해당한다(Oathes et al., 2008). 따라서 고주파의 relative power가 증가했다는 실험결과로부터 AOM의 노출 영향에 의해 제브라피쉬가 극도의 긴장상태를 유발되었다는 것을 확인할 수 있다. Fig. 6에 나타난 것처럼 *Anabaena sp.*와 *Oscillatoria sp.* 노출 시 농도에 따라 뇌파 변화의 차이가 증가함을 확인할 수 있었다(Table 4 and 5). 따라서 3종의 조

Table 4. Mean of absolute power spectrum in zebrafish larvae after 96h exposure to different EOM concentrations (mg/L as TOC : 0.3 ppm, 3 ppm, and 30 ppm) produced by three different algae species

Frequency (Hz)	Mean of absolute power spectral density (X107 μ V ² /Hz)					
	Control	Microcystis sp.	Anabaena sp.		Oscillatoria sp.	
		3ppm	3ppm	30ppm	3ppm	30ppm
Slow Oscillation (0.5~1Hz)	11.056	7.880	0.816	1.151	2.822	3.199
Pure Delta (1~4Hz)	17.709	8.557	2.046	2.656	8.026	3.145
Delta (0.5~4Hz)	21.568	16.438	3.500	3.808	9.665	6.345
Theta (4~8Hz)	2.434	1.550	0.538	0.666	1.517	1.411
Alpha (8~12Hz)	0.634	0.672	0.313	0.414	0.714	0.794
Beta1 (12~20Hz)	0.672	0.723	0.383	0.485	0.768	1.164
Beta2 (20~30Hz)	0.374	0.498	0.372	0.374	0.425	0.643
Beta (12~30Hz)	1.046	1.222	0.694	0.859	1.304	1.807
Gamma (30~55Hz)	0.275	0.432	0.303	0.371	0.390	0.311

Table 5. Mean of relative power spectrum in zebrafish larvae after 96h exposure to different EOM concentrations (mg/L as TOC : 0.3 ppm, 3 ppm, and 30 ppm) produced by three different algae species

Frequency (Hz)	Mean of absolute power spectral density (X107 $\mu\text{V}^2/\text{Hz}$)					
	Control	<i>Microcystis sp.</i>	<i>Anabaena sp.</i>		<i>Oscillatoria sp.</i>	
		3ppm	3ppm	30ppm	3ppm	30ppm
Slow Oscillation (0.5~1Hz)	37.175	16.719	15.721	14.500	15.433	23.242
Pure Delta (1~4Hz)	33.048	35.635	31.232	31.631	31.620	26.495
Delta (0.5~4Hz)	72.055	58.213	47.620	46.132	52.313	49.738
Theta (4~8Hz)	6.937	13.454	10.580	14.318	12.619	12.270
Alpha (8~12Hz)	3.507	6.171	7.591	9.457	7.247	8.332
Beta1 (12~20Hz)	5.218	7.260	9.262	10.308	8.786	10.227
Beta2 (20~30Hz)	3.577	5.539	6.758	7.239	5.779	6.642
Beta (12~30Hz)	8.795	12.800	16.729	16.987	14.565	16.869
Gamma (30~55Hz)	3.087	4.963	5.911	6.713	5.155	5.332

류에서 추출한 EOM이 발작 독성을 유의하게 유도하지는 않았으나, EOM이 제브라피쉬 뇌파에 영향을 주어 저주파 감소와 더불어 고주파 증가를 유도한 것으로 판단된다. 이러한 결과는 해양조류에서 발생하는 조류기인 독소물질인 Domoic acid(DA)에 노출된 대상생물 중 필리핀원숭이에 대한 EEG 분석결과와 유사하였다(Petroff et al., 2020).

4. Conclusion

조류기인 유기물질이 수생 생물종의 신경세포에 미치는 영향을 파악하기 위한 본 실험에서는 수생생물종 실험모델로 적합한 제브라피쉬를 활용하여 다음과 같은 결론을 도출하였다.

- 1) *Microcystis sp.*, *Anabaena sp.*, 및 *Oscillatoria sp.*의 정체기(stationary phase)에서 EOM을 추출하여 기본 수질 특성을 파악한 결과 *Microcystis sp.*의 경우 방향족 유기물질, 부식산 및 고분자량 유기화합물 등의 함유량이 많아 SUVA 값이 높았다. 또한 XAD 수치분획 결과 세 조류종은 대부분 친수성성분물질로 이루어져 있었으며, 상대적으로 소수성 물질이 낮은 것을 확인할 수 있었다.
- 2) *Microcystis sp.*으로부터 기인된 EOM을 초기 농도 3ppm으로 하여 노출실험을 한 결과 대조군과 비교하였을 때 다른 두 종의 EOM에 비해 발작유사뇌파건수(ictal-like discharge events)의 발생횟수가 더 많은 것을 확인할 수 있었다. 이는 동일한 농도(3ppm)에서 세 종의 EOM을 노출시켰을 때 *Microcystis sp.*의 경우가 다른 두 종의 경우보다 독성발작 유발 가능성이 더 큰 것으로 판단된다. 또한 다른 두 종의 EOM의 경우 초기 농도를 30ppm으로 농도를 증가시켰음에도 불구하고 발작유사뇌파건수는 거의 발생하지 않거나 유의미하게 증가하지 않았다.
- 3) Relative power spectral density (PSD)결과 대조군(control)과 *Microcystis sp.*, *Anabaena sp.*, 및 *Oscillatoria*

sp. 3종의 EOM을 비교한 결과 조류기인 유기물질에 의한 뇌파변화를 확인할 수 있었다. 세 종 모두 전반적으로 저주파의 Relative power(Slow Oscillation, Delta band)의 감소와 고주파의 Relative power(Alpha, Beta, Gamma band)의 증가가 나타났고 특히 *Anabaena sp.*와 *Oscillatoria sp.*의 경우 EOM의 농도를 증가시켰을 때 이에 따른 뇌파 변화차이가 커지는 것을 확인할 수 있었다.

종합적으로 조류기인 유기물질에 노출된 치어는 전반적으로 유의미한 뇌파 변화가 이루어지는 것을 확인할 수 있었다. 그 중 *Microcystis sp.*의 경우 더 높은 발작독성을 유발할 가능성을 가진 것으로 판단된다. 이에 추가적으로 30ppm에서의 *Microcystis sp.*의 EOM을 조제하여 발작독성 및 Relative power spectral density (PSD)을 측정해야하며, *Anabaena sp.*과 *Oscillatoria sp.*의 농도를 더 증가시키는 등의 추가적인 연구를 수행하여 조류기인 유기물질이 수생 생물종 및 기타 여러 생물의 뇌파 및 독성발작에 미치는 영향에 대해 더 연구할 필요가 있다.

Acknowledgement

본 연구는 2022년 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구(NO. NRF-2022R1F1A1074684)입니다, 그리고 EEG 분석에 도움을 주신 제펫(Daegu, Korea)에 감사드립니다.

References

- Afrikanova, T., Serruys, A. S. K., Buenafe, O. E. M., Clinckers, R., Smolders, I., de Witte, P. A. M., Crawford, A. D., and Esguerra, C. V. (2013). Validation of the zebrafish pentylenetetrazol seizure model: Locomotor versus electrographic responses to Antiepileptic Drugs, *PLoS ONE*,

- 8(1), 54166.
- Ali, S., Champagne, D. L., Spink, H. P., and Richardson, M. K. (2011). Zebrafish embryos and larvae: A new generation of disease models and drug screens, *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 93(2), 115-133.
- Cardozo, K. H. M., Guaratin, T., Barros, M. P., Falcao, V. R., Tonon, A. P., and Lopes, N. P. (2007). Metabolites from algae with economical impact, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 146(1-2), 60 - 78.
- Chen, J., Gao, N., Li, L., Zhu, M., Yang, J., and Lu, X. (2017). Disinfection by-product formation during chlor(am)ination of algal organic matters (AOM) extracted from microcystis aeruginosa: Effect of growth phases, aom and bromide concentration, *Environmental Science and Pollution Research*, 24(9), 1-10.
- Dai, R., Xiong, Y., Ma, Y., and Tang, T. (2020). Algae removal performance of UV-radiation-enhanced coagulation for two representative algal species, *Science of The Total Environment*, 745, 141013.
- Dai, Y. J., Jia, Y. F., Chen, N., Bian, W. P., Li, Q. K., Ma, Y. B., Chen, Y. L., and Pei, D. S. (2014). Zebrafish as a model system to study toxicology, *Environment Toxicology and Chemistry*, 33(1), 11-17.
- Hamid, N. H. A., Sulaiman, N., Aris, S. A. M., Murat, Z. H., and Taib, M. N. (2010). Evaluation of human stress using EEG Power Spectrum, *2010 6th International Colloquium on Signal Processing & its Applications*, Malacca, Malaysia, 1-4.
- Hong, M. H. (2018). *Characteristics of chlorination byproducts formation by microcystis sp. and coelastrum sp. of Hoeya reservoir*, Master's Thesis, Pusan National University, Busan, Korea [Korean Literature]
- Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J. E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M., Churcher, C., Scott, C., Barrett, J. C., Koch, R., Rauch, G.-J., White, S., Chow, W., Kilian, B., Quintais, L. T., Guerra-Assunção, J. A., Zhou, Y., Gu, Y., Yen, J., Vogel, J.-H., Eyre, T., Redmond, S., Banerjee, R., Chi, J., Fu, B., Langley, E., Maguire, S. F., Laird, G. K., Lloyd, D., Kenyon, E., Donaldson, S., Sehra, H., Almeida-King, J., Loveland, J., Trevanion, S., Jones, M., Quail, M., Dave Willey, D., Hunt, A., Burton, J., Sims, S., McLay, K., Plumb, B., Davis, J., Clee, C., Oliver, K., Clark, R., Riddle, C., Elliot, D., Threadgold, G., Harden, G., Ware, D., Begum, S., Mortimore, B., Kerry, G., Heath, P., Phillimore, B., Tracey, A., Corby, N., Dunn, M., Johnson, C., Wood, J., Clark, S., Pelan, S., Griffiths, G., Smith, M., Glithero, R., Howden, P., Barker, N., Lloyd, C., Stevens, C., Harley, J., Holt, K., Panagiotidis, G., Lovell, J., Beasley, H., Henderson, C., Gordon, D., Auger, K., Wright, D., Collins, J., Raisen, C., Dyer, L., Leung, K., Robertson, L., Ambridge, K., Leongamornlert, D., McGuire, S., Gildershorp, R., Griffiths, C., Manthavadi, D., Nichol, S., Barker, G., Whitehead, S., Kay, M., Brown, J., Murnane, C., Gray, E., Humphries, M., Sycamore, N., Barker, D., Saunders, D., Wallis, J., Babbage, A., Hammond, S., Mashreghi-Mohammadi, M., Barr, L., Martin, S., Wray, P., Ellington, A., Matthews, N., Ellwood, M., Woodmansey, R., Clark, G., Cooper, J. D., Tromans, A., Grafham, D., Skuce, C., Pandian, R., Andrews, R., Harrison, E., Kimberley, A., Garnett, J., Fosker, N., Hall, R., Garner, P., Kelly, D., Bird, C., Palmer, S., Gehring, I., Berger, A., Dooley, C. M., Ersan-Uru'n, Z., Eser, C., Geiger, H., Geisler, M., Karotki, L., Kirn, A., Konantz, J., Konantz, M., Oberlander, M., Rudolph-Geiger, S., Teucke, M., Lanz, C., Raddatz, G., Osoegawa, K., Zhu, B., Rapp, A., Widaa, S., Langford, C., Yang, F., Schuster, S. C., Carter, N. P., Harrow, J., Ning, Z., Herrero, J., Searle, S. M. J., Enright, A., Geisler, R., Plasterk, R. H. A., Lee, C., Westerfield, M., de Jong, P. J., Zon, L. I., Postlethwait, J. H., Nuslein-Volhard, C., Hubbard, T. J. P., Crollius, H. R., Rogers, J., and Stemple, D. L. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome, *Nature*, 496, 498-503.
- Hwang, K. S., Kan, H. M., Kim, S. S., Chae, J. S., Yang, J. Y., Shin, D. S., Ahn, S. H., Ahn, J. H., Cho, J. H., Jang, I. S., Shin, J. Y., Joo, J. Y., Kim, C. H., and Bae, M. A. (2020). Efficacy and pharmacokinetics evaluation of 4-(2-chloro-4-fluorobenzyl)-3-(2-thienyl)-1,2,4-oxadiazol-5 (4H)-one (GM-90432) as an anti-seizure agent, *Neurochemistry International*, 141, 104870.
- Kim, H. and Park, C. (2019). A Study on the removal of harmful compounds as algae by advanced oxidation processes, *Proceedings of the 2019 Spring Co-Conference of the Korean Society on Water Environment and Korean Society of Water and Wastewater*, Korean Society on Water Environment and Korean Society of Water and Wastewater, 216-217. [Korean Literature]
- Knyazev, G. G. (2012). EEG delta oscillations as a correlate of basic homeostatic and motivational processes, *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 36(1), 677-695.
- Lee, I. J., Lee, C. G., Heo, S. N., and Lee, J. W. (2011). Analysis of anatoxin-a in aqueous and cyanobacterial samples from Korean lakes by liquid chromatography with fluorescence detection, *Analytical Science and Technology*, 24(3), 225-230. [Korean Literature]
- Lee, J. H. and Shin, G. A. (2017). Quantitative risk assessment of the adverse effects due to exposure to Cyanobacteria toxin (Microcystin-LR) through drinking water in the Nakdong river watershed, *Journal of Environmental Science International*, The Korean Environmental Sciences Society, 26(3), 345-362. [Korean Literature]
- Lee, Y. H., Lee, K. J., Jang, J. W., Lee, S. I., and Kim, S. H. (2020). An EEG system to detect brain signals from multiple adult zebrafish, *Biosensors and Bioelectronics* 164, 112315.
- Lee, Y. H., Seo, H. W., Lee, K. J., Jang, J. W., and Kim, S. H. (2020). A Microfluidic system for stable and continuous EEG monitoring from multiple larval zebrafish, *Sensors*,

- 20(20), 5903.
- Levitas-Djerbi, T. and Appelbaum, L. (2017). Modeling sleep and neuropsychiatric disorders in zebrafish, *Current Opinion in Neurobiology*, 44, 89-93.
- Nguyen, M. L., Westerhoff, P., Baker, L., Hu, Q., Esparza-Soto, M., and Sommerfeld, M. (2005). Characteristics and reactivity of algae-produced dissolved organic carbon, *Journal of Environmental Engineering*, 131(11), 1574 - 1582.
- Oathes, D. J., Ray, W. J., Yamasaki, A. S., Borkovec, T. D., Castonguay, L. G., Newman, M. G., and Nitschke, J. (2008). Worry, generalized anxiety disorder, and emotion: Evidence from the EEG gamma band, *Biological Psychology*, 79(2), 165-170.
- Oberemm, A., Fastner, J., and Steinberg, C. E. W. (1997). Effects of microcystin-LR and cyanobacterial crude extracts on embryo-larval development of zebrafish (*Danio rerio*), *Water Research*, 31(11), 2918-2921.
- Paralkar, A. and Edzwald, J. K. (1996). Effect of ozone on EOM and coagulation, *Journal American Water Works Association*, 88, 143-154.
- Park, S. J., Cha I. K., and Yoon, T. I. (2005). Removal of Algogenic organic matter in drinking water treatment process, *Journal of Korean Society of Environmental Engineers*, 27(4), 377-384. [Korean Literature]
- Petroff, R., Murias, M., Grant, K.S., Crouthamel, B., McKain, N. Shum, S., Jing, J., Isoherranen, N., and Burbacher, T. M. (2020). Power spectrum analysis of EEG in a translational nonhuman primate model after chronic exposure to low levels of the common marine neurotoxin, domoic acid, *NeuroToxicology*, 80, 124-129.
- Wang, J. (2022). *Characteristics of algae-derived organic matter and its role in formation of disinfection by-products*, Master's Thesis, Daejeon University, Daejeon, Korea. [Korean Literature]
- Yoon, H. J., Lim, Y. S., Maeng, S. K., Hong, Y. S., Byun, S. K., Kim, H. C., Kim, B. S., and Kim, S. P. (2020). Impact of DBPs on the fate of zebrafish: Behavioral and lipid profile changes, *Membrane and Water Treatment*, 11(6), 391-398.
- Zhang, Y., Tian, J. Y., Nan, J., Gao, S. S., Liang, H., Wang, M. L., and Li, G. B. (2011). Effect of PAC addition on immersed ultrafiltration for the treatment of algal-rich water, *Journal of Hazardous Materials*, 186(2-3), 1415-1424.