

미세조류와 로티퍼를 이용한 멀티모달 생태독성 분석시스템

김형식* · 신상훈** · 최훈*** · 강원수**** · 이문진***** · 서성규*****†

* 고려대학교 전자·정보공학과 석박사통합과정, ** 고려대학교 전자·정보공학과 연구교수,

*** 선박해양플랜트연구소 연구원, **** 선박해양플랜트연구소 책임연구원,

***** 선박해양플랜트연구소 영년직 책임연구원, ***** 고려대학교 전자·정보공학과 교수

Multi-modal Eco-toxicity Analyzer Using Microalgae and Rotifer

Hyungsik Kim* · Sanghoon Shin** · Hoon Choi*** · Wonsoo Kang**** · Moonjin Lee***** · Sungkyu Seo*****†

* Integrated M.S./Ph.D. student, Department of Electronics and Information Engineering, Korea University, Sejong 30019, Republic of Korea

** Research professor, Department of Electronics and Information Engineering, Korea University, Sejong 30019, Republic of Korea

*** Researcher, Korea Research Institute of Ships & Ocean Engineering, Daejeon 34103, Republic of Korea

**** Principal Researcher, Korea Research Institute of Ships & Ocean Engineering, Daejeon 34103, Republic of Korea

***** Tenured Principal Researcher, Korea Research Institute of Ships & Ocean Engineering, Daejeon 34103, Republic of Korea

***** Professor, Department of Electronics and Information Engineering, Korea University, Sejong 30019, Republic of Korea

요약 : 산업과 기술의 발전으로 인해 수계로의 화학물질 배출이 증가하고, 이로 인해 환경오염과 인체 건강에 부정적인 영향을 미치는 위험이 더욱 증가하였다. 따라서, 수질을 종합적으로 평가할 수 있는 생태독성평가의 중요성이 강조되고 있다. 본 연구에서는 렌즈프리 그림자 이미징 기술을 활용한 Cellytics 플랫폼을 소개하며, 화학물질에 의한 로티퍼(*Brachionus plicatilis*)와 미세조류(*Dunaliella tertiolecta*)의 생물학적 변화를 신속하게 측정하고 독성을 분석하는 기법을 제안한다. 이를 위해 로티퍼와 미세조류를 톨루엔에 각각 1분과 5분 동안 노출한 뒤, Cellytics를 이용하여 로티퍼의 이동성과 미세조류의 형태 변화를 측정하여 독성을 평가하였다. 로티퍼의 이동성과 미세조류의 형태변화는 모두 110.4 mg/L의 농도에서 대조군과 유의미한 차이를 나타내며($p < 0.05$), 이는 로티퍼의 생존율로 분석한 톨루엔의 LC50(552 mg/L)보다 낮은 농도였다. 본 연구에 따르면, 로티퍼와 미세조류를 전통적인 방식으로 최소 수 일 간 배양하여 얻을 수 있는 생태독성평가 결과를 매우 짧은 시간(5분 이내)에 분석하고, 두 생물의 독성평가 결과를 신속하게 제공하여 현장에서 활용 가능한 신뢰성 높은 정보를 제공할 수 있음을 보여준다. 이는 독성평가를 이용하는 다양한 연구의 활용에 기여할 수 있으며, 환경보호 및 인체 건강 관련 정책 수립에 도움이 될 것으로 기대된다.

핵심용어 : 브루키오누스 필리카틸리스, 듀넬리아 텀티오렉타, 생태독성평가, 렌즈프리 그림자 이미징 기술, 톨루엔

Abstract : The advancement of industry and technology has led to an increase in the discharge of chemical substances into aquatic ecosystems, resulting in an amplified risk of environmental pollution and negative impacts on human health. Consequently, the importance of comprehensive ecological toxicity assessments for evaluating water quality is being emphasized. This study introduces the Cellytics platform, that uses lens-free shadow imaging technology, and proposes a technique for rapidly measuring and analyzing the biological changes and toxicity induced by chemicals in rotifer (*Brachionus plicatilis*) and microalgae (*Dunaliella tertiolecta*). To achieve this, rotifer and microalgae were exposed to toluene for 1 and 5 min, respectively, and their mobility and morphological changes were measured using Cellytics to assess toxicity. The mobility of rotifer and the morphological changes in microalgae showed significant differences compared with those of the control groups at a concentration 110.4 mg/L ($p < 0.05$). These concentrations were lower than the toluene LC50 (552 mg/L) determined through rotifer survival analysis. According to this study, the results of ecological toxicity assessments for rotifer and microalgae could be analyzed in a considerably short time (within 5 min) compared to the traditional approach of culturing them for at least several days. This provides rapidly accessible and highly reliable information that could be used in the field. This contribution is expected to benefit various research applications relying on toxicity assessments and assist in the formulation of policies related to environmental protection and human health.

Key Words : *Brachionus plicatilis*, *Dunaliella tertiolecta*, Eco-toxicity assessment, Lens-free shadow imaging technology, Toluene

* First Author : oruino@korea.ac.kr, 044-860-1783

† Corresponding Author : sseo@korea.ac.kr, 044-860-1427

1. 서 론

지난 수십 년간의 산업과 기술의 발전으로 인해 새로운 화학물질의 등록과 유통이 증가하고 있다. 이로 인해 화학물질의 다양성과 사용량도 증가하고 있으며, 이러한 추세는 폐수 및 화학물질이 사업장이나 배출시설로부터 수계로 방출되어 환경오염과 인체 건강에 악영향을 미치는 위험성을 증대시키고 있다(Lapworth et al., 2012). 화학물질이 수계로 방출되어 발생하는 오염 문제는 화학적 분석만으로는 모든 독성을 충분히 평가하고 효과적으로 제어하기 어려운 점에 비추어 볼 때 물질뿐만 아니라 화학물질의 복합적인 생물체에 대한 작용의 위해성을 평가하는 생태독성평가가 수질평가의 중요한 방법으로 부상하고 있다(Ankley et al., 2010).

생태독성평가는 화학물질이 생물에 미치는 영향을 분석하는 기법으로, 화학적 분석만으로 파악하기 어려운 미지의 물질이나 다양한 화학물질의 조합으로 인한 독성증가와 상호작용을 종합적으로 평가할 수 있다(Sanderson and Solomon, 2009). 식물플랑크톤(미세조류), 동물플랑크톤(로티퍼, 물벼룩), 어류, 갑각류 등 다양한 생물종들이 평가에 활용되며, 생존율, 치사율, 성장률, 부화율 등의 변화를 통해 수계 내 존재하는 독성을 평가한다. 하지만 일반적으로 평가에 활용되는 독성지표는 독성에 의한 변화를 하루(24h) 이상 관찰해야 하고, 로티퍼와 미세조류 같이 육안으로 관찰하기 어려운 생물은 현미경을 이용하여 측정해야 하므로 상당한 인력과 시간이 소요는 단점이 존재한다(Li et al., 2020; Walsh, 1988; Zhang et al., 2017; Gissi et al., 2013). 이러한 이유로 생태독성평가는 현장에서 신속하게 수행하기 어려워 독성으로 인한 생물의 민감한 변화를 효과적으로 관찰하기 위한 새로운 기술의 확립이 필요하다.

렌즈프리 그림자 이미징 기술(Lens-free Shadow Imaging Technology, LSIT)은 디지털 인라인 홀로그램(Digital Inline Hologram, DIH)의 일종으로 특정한 파장의 빛이 분석대상을 통과할 때 발생하는 빛의 속도 지연을 파동 간섭 패턴으로 촬영하여 세포나 입자의 다양한 정보를 얻을 수 있는 기술이다(Roy et al., 2017). 이 기술은 고가의 광학렌즈나 현미경 없이 광원(LED)과 CMOS 이미지 센서로 그림자 이미징(홀로그램)을 획득할 수 있어서 경제적이고, 소형화된 플랫폼으로 제작할 수 있다(Seo et al., 2018; Shin et al., 2023). 또한, LSIT는 많은 개체를 한 번에 측정하기 때문에 시간과 인력을 효율적으로 절약할 수 있으며, 세포 개수, 크기, 활성도, 형태 등 다양한 생물의 변화와 특성을 데이터화하여 정밀하게 생물을 분석할 수 있다.

이에 본 연구에서는 LSIT 기술이 적용된 전용 플랫폼인 Cellytics를 활용하여 로티퍼와 미세조류의 화학물질에 의한

민감한 반응 변화를 신속하게 측정하고 독성을 평가할 수 있는 기법을 제안한다. 실험은 로티퍼(*Brachionus plicatilis*)와 미세조류(*Dunaliella tertiolecta*)를 톨루엔에 각각 1분과 5분 동안 노출하고, 각 생물의 이동성과 형태변화를 측정하고 분석하였다. 그 결과, 다양한 톨루엔 농도에 노출된 로티퍼와 미세조류는 이동성과 형태변화를 나타냈으며, 이를 수치화하여 대조군과 실험군 간의 통계적인 차이가 발생함을 확인하였다. 더불어, 두 생물의 생태독성평가 결과는 하나의 플랫폼에서 단시간 내에 결과를 제공함으로써 독성평가 결과의 신뢰성을 향상하고, 현장에서의 활용 가능성을 입증하였다.

2. 연구 재료 및 방법

2.1 시험생물

본 연구에서는 국제 생태독성평가 시험법의 표준 시험종으로 인정받은 로티퍼(*Brachionus plicatilis*)와 미세조류(*Dunaliella tertiolecta*)를 사용하였으며(Golding and Wilcock, 1998), 로티퍼와 미세조류는 각각 Microbiotest(Belgium)와 Culture Collection of Algae and Protozoa(CCAP; Scotland, UK)에서 구매하였다. 실험에 사용한 로티퍼는 ROTOXKIT M protocol(MicroBioTests Inc., Belgium)을 준수하여 ASPM medium(MicroBioTests Inc., Belgium)에서 Cysts를 정체로 부화시켜 이용하였다. 그리고 미세조류는 형광등 조명 아래에서 온도는 20-21 °C, 광량은 6,500 - 7,250 lux, 염분은 35 ppt의 조건에서 계대 배양한 후 실험에 이용하였다. 배양 및 실험에 사용한 모든 해수는 0.45 µm와 0.25 µm 크기의 필터(Cat No. 7184 - 004; Whatman, Maidstone, UK)로 여과시킨 후 사용하였다.

2.2 화학물질

본 실험에 사용된 화학물질은 산업 및 일상생활에서 널리 사용되지만, 생식독성 및 신경독성과 같은 높은 위험성을 가지고 있는 톨루엔(Toluene)을 선정하였다. 톨루엔은 불용성 액체로 물에 잘 녹지 않기 때문에 디메틸 설폭사이드(Dimethyl Sulfoxide, DMSO)와 혼합하여 실험에 사용하였으며, 두 물질은 모두 삼천화학(Seoul, Korea)에서 구매하였다.

2.3 측정 장비 및 방법

본 실험의 측정 장비는 렌즈 프리 그림자 이미징 기술(LSIT)이 탑재된 Cellytics를 사용하였다. LSIT는 LED 광원과 마이크로 편광에 의해 생성되는 가간섭성 빛이 특정 개체를 회절하고 투과하며 발생하는 그림자 패턴(홀로그램)을 이미지 센서로 기록하여 특징을 분석하는 방법으로(Mudanyali et al., 2009), Cellytics에 사용된 광원은 475±5 nm의 파장을 가지는 LED(LB W5SM-FZHX-35, Osram, Munich, Germany)이고, 300 µm

미세조류와 로티퍼를 이용한 멀티모달 생태독성 분석시스템

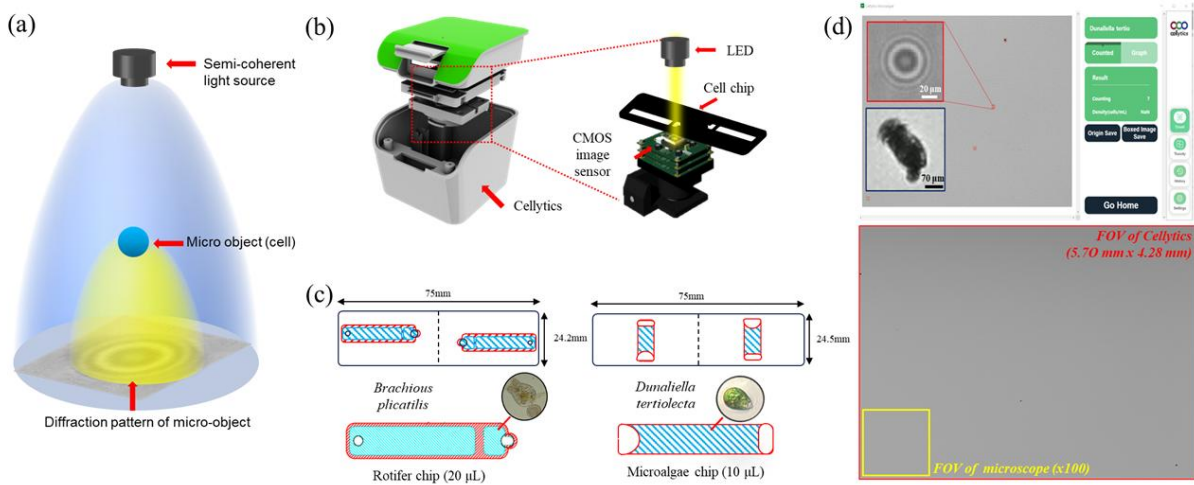


Fig. 1. (a) Schematic diagram of Lens-free shadow imaging technology, (b) The 'cellytics' platform with key components: LED light source, CMOS image sensor, and cell chip, (c) Schematic diagrams of the Rotifer chip and Microalgae chip, (d) Screen capture of the 'cellytics' software interface showing the detected micro-object and its magnified view, compared against the FOV of conventional microscopy.

지름을 가지는 핀홀이 LED 앞에 부착되어 있다. 그리고 이미지를 기록하는 센서는 CMOS 이미지 센서(MT9P031112STM-DP, ON Semiconductor, Phoenix, USA)이고, 0.1 μm 앞에 측정을 위한 전용 분석 칩이 배치되어 있다. 전용 칩은 각 생물들의 변화 분석을 최적화하기 위해 PC와 PMMA로 2 가지의 전용 세포 칩이 제작되었다. 첫 번째로, 로티퍼 칩은 75 mm 가로와 24.4 mm 세로로 20 μL 의 부피로 로티퍼의 이동성을 분석할 수 있는 수조 모양으로 제작되었다. 두 번째로, 미세조류 칩은 75 mm 가로와 24.2 mm 세로 크기로 10 μL 의 부피를 갖추어 많은 미세조류의 개체수를 분석할 수 있도록 제작되었다. 최종적으로 Cellytics와 전용칩을 활용하여 현미경(x100 배)으로 촬영한 영역보다 20배 정도 큰 촬영영역에서 독성에 의한 생물의 변화를 측정하였으며, 촬영된 영상과 이미지는 개발된 소프트웨어와 파이썬을 사용하여 분석하였다 (Fig. 1).

2.4 생태독성평가 실험 및 분석 방법

본 연구에서는 3개의 생태독성평가 실험을 수행하였다. 첫 번째는 로티퍼를 이용한 표준 독성평가 방법으로 24시간 독성에 노출한 후의 로티퍼의 생존율을 측정하였다. 이 실험은 로티퍼를 대조군을 포함한 화학물질의 6개의 농도에 노출한 후 생존율을 현미경으로 관찰했으며, 얻어진 생존율 데이터를 기반으로 반수치사농도(Lethal Concentration 50, LC50)를 분석하였다. 두 번째는 첫 번째 실험에서 도출한 LC50 값을 참고하여, 다양한 농도의 화학물질에 1분 동안 노출된 로티퍼의 이동성 변화를 2분간 측정하여 독성을 평가하였다. 이동

성 변화는 Cellytics를 사용하여 동영상으로 기록하였고, 실험군과 대조군 간의 이동성 변화를 분석하였다. 마지막으로 세 번째는 여러 농도의 화학물질에 5분간 노출된 미세조류의 형태변화를 Cellytics로 측정하였고, 실험군과 대조군 간의 미세조류의 형태를 그림자 파라미터를 활용하여 비교 분석한 뒤에 화학물질의 독성을 평가하였다.

2.4.1 로티퍼의 생존율을 이용한 전통적 생태독성평가 실험

생존율을 이용한 생태독성평가 실험에서 톨루엔의 농도를 대조군을 포함한 6개의 농도(0 mg/L, 276 mg/L, 552 mg/L, 1,656 mg/L, 2,760 mg/L, 5,520 mg/L)로 설정하여 실험을 수행하였다. 로티퍼의 생존율은 24-well plates (Nuncunclon Delta Surface, Nunc, Roskilde, Denmark)에 4회의 반복구조로 6개의 톨루엔 농도를 배치하고, 로티퍼를 5마리씩 투입한 후에 측정하였다. 각 농도의 시료는 24시간 동안 암흑 상태(0 lux)로 배양된 후, 살아남은 로티퍼를 광학 현미경으로 관찰하여 생존율을 측정하고, 통계적으로 LC50을 분석하였다.

2.4.2 로티퍼의 이동성을 이용한 새로운 생태독성평가 실험

로티퍼의 이동성을 이용한 생태독성평가는 다양한 농도의 톨루엔에 1분간 노출 시킨 후 Cellytics로 이동성을 2분 동안 촬영하여 독성을 분석하였다. 하나의 시료에는 5마리의 로티퍼가 투입되었으며, 각 톨루엔의 농도는 대조군을 포함하고 5~6개의 실험군으로 나누어 3회 반복구조로 실험을 진행하였다. 총 3회의 실험을 통해 17개 농도(0 mg/L, 22.08 mg/L, 44.16 mg/L, 66.25 mg/L, 88.82 mg/L, 110.4 mg/L, 220.8 mg/L,

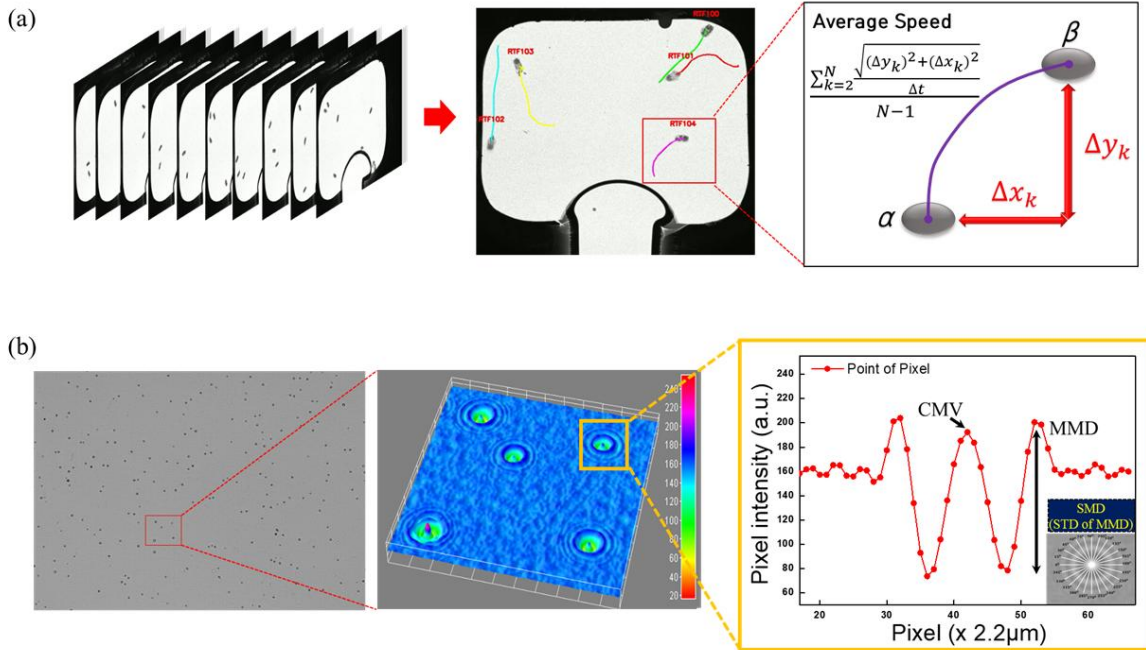


Fig. 2. (a) Motility analysis methods of rotifer, (b) Morphology analysis methods of microalgae.

331.2 mg/L, 441.6 mg/L, 552 mg/L, 1,104 mg/L, 2,208 mg/L, 3,312 mg/L, 4,416 mg/L, 5,520 mg/L, 11,040 mg/L, 16,560 mg/L, 22,080 mg/L)에 대한 로티퍼의 이동성을 분석하였으며, 이동성 변화는 Cellytics로 14 FPS의 동영상을 추출하여 분석하였다. 각 개체의 탐지와 x, y 좌표의 픽셀 변화는 아래 공식을 사용하여 평균속력으로 변환하여 이동성을 분석하는 데 사용하였다(Fig. 2a). 최종적으로, 대조군과 실험군 간의 평균속력을 비교하고 유의미한 변화의 차이인지를 통계적으로 분석하였다.

$$\sum_{K=2}^N \frac{\sqrt{(\Delta y_k)^2 + (\Delta x_k)^2}}{\Delta t} \quad (1)$$

2.4.3 미세조류의 형태변화를 이용한 생태독성평가 실험

미세조류(*Dunaliella tertiolecta*)의 형태변화를 이용한 생태독성평가 실험에서는 대조군을 포함한 6개의 농도를 3회 반복구조로 선정하여 실험을 수행하였다. 미세조류는 6개의 툴루엔 농도로 구성된 시료에 5분간 노출되었으며, 독성노출에 의한 각 개체의 변화를 Cellytics를 사용하여 촬영하였다. 촬영된 이미지 내의 개체들은 자체 개발한 그림자 이미지 파라미터인 Central Maximum Value(CMV)를 활용하여 죽은 미세조류를 구분하였고, Maxima, to Minima Distance(MMD)의 표준편차로 개발한 그림자 파라미터인 Standard deviation of

MMD(SMD) 사용하여 개체의 형태변화를 분석하였다(Fig. 2b). SMD는 두 번째와 세 번째 원형 원 사이의 밝기 차이와 관련성이 있으며, 그림자 파라미터의 최대값에서 최소값까지의 거리(MMD)에 대한 15° 간격의 24개의 구역 값들의 표준편차로 표현된다. SMD 값이 작을수록 미세조류의 형태가 원형에 가까우며 클수록 타원형에 가깝다는 것을 나타낸다. 마지막으로 대조군과 실험군과의 원형 변화 비율을 비교하여 유의미한 변화 여부를 통계적으로 분석하였다.

2.5 통계 분석

본 연구에서 수행한 생태독성평가의 측정 결과는 One-way analysis of variance(ANOVA)를 활용하여 대조군과 실험군 간의 유의한 차이를 평가하였다. 통계 분석은 Statistical Analysis System(SAS, Institute Inc., Cary, NC, USA) 프로그램을 이용했으며, 모든 데이터는 등분산성을 검증하기 위해 Levene's test를 사용하고, 유의한 차이를 검증하기 위해 사후분석인 Dunnett's test를 이용하였다(Dunnett, 1955).

3. 결과

3.1 로티퍼

3.1.1 생존율을 이용한 툴루엔의 독성평가

로티퍼의 생존율을 이용한 툴루엔의 독성평가는 두 가지의 단계를 거쳐 Fig. 3a와 같은 시험 조건으로 분석하였다.

첫 번째로, 로티퍼를 부화시키기 위한 과정을 진행하였다. 부화 과정은 온도 25 °C, 광량 4,000 Lux, 염분 20 ppt의 환경에서 24~26 시간 동안 배양기를 이용하여 이루어졌다. 이 과정에서는 로티퍼가 60~70% 이상 부화한 경우에만 다음 단계인 실험에 사용하였다. 두 번째로, 부화한 로티퍼를 톨루엔에 노출한 후 생존율을 측정하였다. 생존율 측정은 6개의 톨루엔 농도에 로티퍼를 24시간 동안 노출한 후 각 농도에 생존해 있는 로티퍼를 현미경으로 관찰하였다. 이 과정에서는 온도 25 °C, 광량 0 Lux, 염분 35 ppt의 조건에서 수행되었다. 최종적으로, 6개의 농도에 생존해 있는 로티퍼의 생존율은 95 % (0 mg/L), 57.5 % (276 mg/L), 47.5 % (552 mg/L), 40 % (1,656 mg/L), 37.5 % (2,760 mg/L), 30 % (5,520 mg/L)로 기록되었으며, 통계 분석을 수행하여 LC50 값이 572 mg/L로 도출되었다(Fig. 3b).

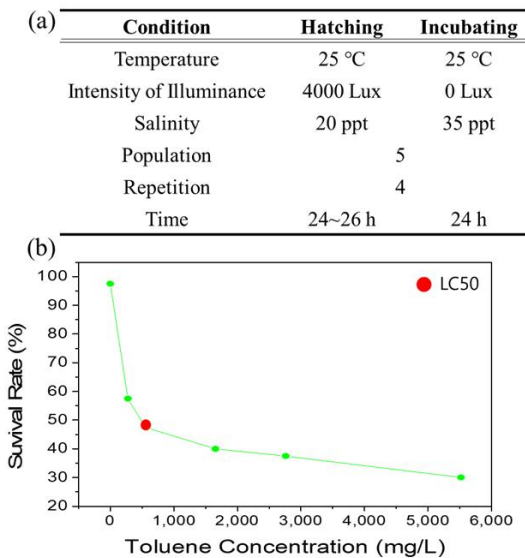


Fig. 3. (a) Condition of rotifer experiments, (b) result of acute toxicity assessment for rotifer.

3.1.2 이동성(평균속력) 변화를 이용한 톨루엔의 독성평가

Fig. 4a는 톨루엔의 농도에 따른 로티퍼의 이동성(평균속력)을 측정한 그래프이다. 본 실험의 로티퍼는 생존율 측정을 위한 부화 과정을 동일하게 수행하여 실험에 사용했으며, 3회 실험을 통해 총 18개의 톨루엔 농도(0 mg/L, 22.08 mg/L, 44.16 mg/L, 66.25 mg/L, 88.82 mg/L, 110.4 mg/L, 220.8 mg/L, 331.2 mg/L, 441.6 mg/L, 552 mg/L, 1,104 mg/L, 2,208 mg/L, 3,312 mg/L, 4,416 mg/L, 5,520 mg/L, 11,040 mg/L, 16,560 mg/L, 22,080 mg/L)에 대한 평균속력의 변화를 비교하였다.

3회 수행한 대조군(0 mg/L)의 평균속력은 정규성을 가져 모두 통합했으며, 0 mg/L에서부터 22,080 mg/L까지의 평균속

력은 각각 750.70 μm/s, 804.10 μm/s, 831.74 μm/s, 845.36 μm/s, 866.11 μm/s, 852.47 μm/s, 836.34 μm/s, 839.42 μm/s, 788.9 μm/s, 799.9 μm/s, 797.78 μm/s, 793.78 μm/s, 754.64 μm/s, 775.62 μm/s, 414.99 μm/s, 115.87 μm/s, 165.84 μm/s, 72.57 μm/s로 측정되었다. 그 결과, 22.08 mg/L ~ 4,416 mg/L 농도에서는 대조군에 비해 평균속력이 높은 모습을 보이며, 5,520 mg/L 이상의 농도에서는 대조군에 비해 확연하게 평균속력이 낮아지는 모습을 보였다. Fig. 4b는 대조군과 실험군들 사이의 평균속력 변화율을 보여준다. 실험에 사용된 톨루엔의 농도와 변화율은 각각 22.08 mg/L: 1.69%, 44.16 mg/L: 5.23%, 66.25 mg/L: 6.94%, 88.82 mg/L: 9.56%, 110.4 mg/L: 20.24%, 220.8 mg/L: 17.96%, 331.2 mg/L: 18.39%, 441.6 mg/L: 11.12%, 552 mg/L: 12.83%, 1,104 mg/L: 18.42%, 2,208 mg/L: 19.42%, 3,312 mg/L: 13.53%, 4,416 mg/L: 16.69%, 5,520 mg/L: -28.72%, 11,040 mg/L: -80.09%, 16,560 mg/L: -71.49%, 22,080 mg/L: -87.53%로 나타났으며, 22.08 mg/L에서 110.4 mg/L 농도까지 평균속력의 변화는 선형적으로 증가하는 모습을 보였다. 대조군과 평균속력

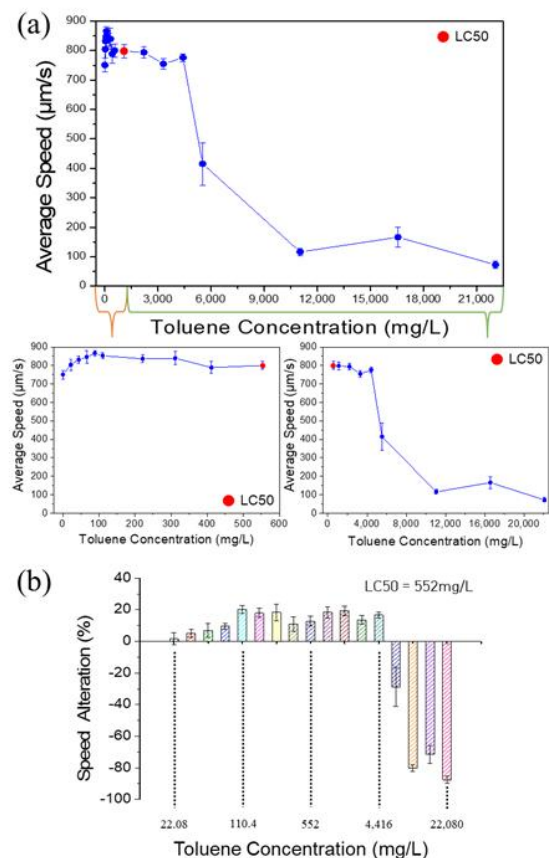


Fig. 4. Eco-toxicity assessment using rotifer: (a) Movement speed of rotifer throughout the experiment, (b) Speed alteration of rotifer for each concentration level.

의 변화율이 가장 큰 차이를 보이는 농도는 110.4 mg/L였으며, 20.24% 증가하였다. 실험값들은 모두 SAS를 이용해 대조군과 실험군 간의 통계 분석을 진행하였고, 등분산성 검정인 Levene's Test에서 각 시행의 등분산성은 모두 만족하였다(11,040 mg/L 이상은 제외). 그리고 대조군 대비 평균속력의 유의미한 변화는 Dunnett's test를 통해 결과를 도출하여 생존율로 분석한 LC50 (552 mg/L)보다 낮은 농도인 110.4 mg/L에서 유의미한 속력 변화가 있었다($p < 0.05$).

3.2 미세조류의 형태변화를 이용한 톨루엔의 독성평가

*D. tertiolecta*는 스트레스나 독성에 반응하여 형태변화가 발생한다. 그림 Fig. 5a는 톨루엔에 의한 *D. tertiolecta*의 모습의 변화를 현미경과 Cellytics로 촬영한 이미지 비교한 모습을 보여준다. 톨루엔의 농도 증가는 미세조류의 형태가 타원에서 원형의 모습으로 변화하며, 그림자 파라미터 SMD가 작아지는 모습을 보인다. 이를 통해 6개의 톨루엔 농도에 5분간 노출된 *D. tertiolecta*의 형태를 Cellytics로 측정하고 변화를 확인하였다. 그 결과, 0 mg/L, 110.4 mg/L, 220.8 mg/L, 331.2 mg/L, 441.6 mg/L, 552 mg/L, 2,560 mg/L에서 시료의 SMD 평균값이 6.83, 6.22, 6.51, 6.34, 6.31, 6.40, 6.32로 변화하였으며, 이는 대조군에 비해 8.9%, 4.7%, 7.2%, 7.6%, 6.3%, 7.5% 작아지는 수치를 기록하였다(Fig. 5b). 그리고 확보한 미세조류의 SMD 데이터 값들은 Levene's test를 통하여 정규

성을 검증하여($p > 0.05$), One-way ANOVA을 통해 집단 간 유의미한 차이가 있는 것을 확인하였다($p < 0.05$). 최종적으로 사후검정인 Dunnett's test를 통해 대조군과 실험군을 비교하였고, 110.4 mg/L를 포함한 모든 구간에서 통계적으로 유의미한 형태변화가 있는 것을 확인하였다($p < 0.05$).

4. 결론

수계의 오염물질이 생물에게 미치는 영향을 정확하고 신속하게 평가하는 것은 수생환경과 인간의 건강을 보호하는데 매우 중요한 일이다. 하지만 표준화된 생태독성평가는 많은 시간과 인력이 필요할 뿐만 아니라 현장에서의 신속한 결과도출에 한계를 가지고 있다. 이에 본 연구에서는 Cellytics라는 자체 개발 플랫폼에서 로티퍼(*B. plicatilis*)와 미세조류(*D. tertiolecta*)의 민감한 생물학적 변화를 즉각적으로 측정하여 신속한 생태독성 평가를 진행할 수 있는 기법을 제시하였다. 이를 통해 표준화된 로티퍼를 이용한 톨루엔의 독성평가(24h) 결과인 LC50 값(572 mg/L)보다 낮은 농도(110.4 mg/L)에서 로티퍼의 이동성 변화를 이용하여 5분 이내에 독성평가가 가능함을 확인하였다. 그리고 톨루엔에 의한 미세조류의 형태변화도 5분 이내에 110.4 mg/L에서 독성 분석에 의한 유의한 차이($p < 0.05$)가 발생함을 확인되었다. 이러한 결과들에 비추어 볼 때 로티퍼와 미세조류를 이용하여 현장에서 신속하게 생태독성평가가 가능할 수 있음을 실험적으로 입증하였고, 단일 종이 아닌 2종 이상의 결과를 함께 도출함으로써 신뢰성 높은 정보를 제공할 수 있었다. 본 기술은 추가적인 연구와 심층적인 분석을 통해 현장에서 즉각적으로 사용 가능한 생태독성평가의 정확성을 높이고 안전하고 지속 가능한 환경관리 방안을 제시하는데 기여할 것으로 기대된다.

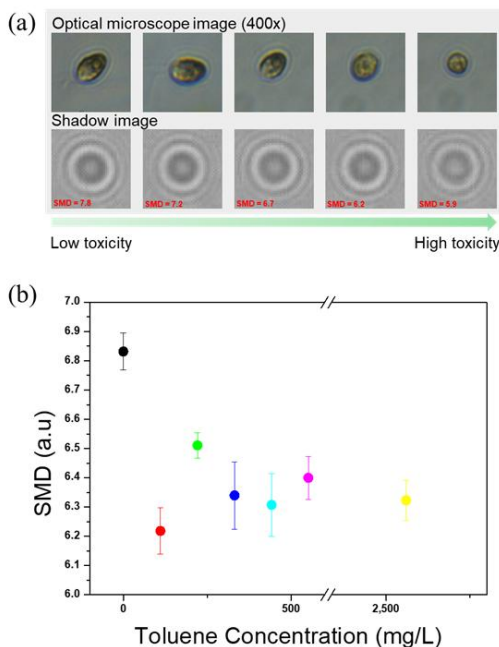


Fig. 5. Eco-toxicity evaluation with microalgae : (a) microalgae morphological changes in response to toxic exposure, (b) shadow parameter change in response toxic exposure.

감사의 글

이 논문은 2023년도 해양수산부 재원으로 해양수산과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 연구이다(RS-2021-KS211535, 해양 위험유해물질(HNS) 배출 등 관리기술 개발사업, 해양 산업시설 배출 위험유해물질 영향평가 및 관리기술 개발).

References

- [1] Ankley, G. T., R. S. Bennett, R. J. Erickson, D. J. Hoff, M. W. Hornung, R. D. Johnson, D. R. Mount, J. W. Nichols, C. L. Russom, P. K. Schmieder, J. A. Serrano, J. E. Tietge, and D. L. Villeneuve(2010), Adverse outcome pathways: A conceptual

framework to support ecotoxicology research and risk assessment, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 29(3), pp 730-741

ionic liquids with different alkyl-chain lengths and anions on zebrafish (*Danio rerio*), *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 140, pp. 235-240.

- [2] Dunnett, W. C.(1955), A Multiple Comparison Procedure for Comparing Several Treatments with a Control, *Journal of the American Statistical Association*, Vol. 50, pp. 1096-1121.
- [3] Gissi, F., M. T. Binet, and M. S. Adams(2013), Acute toxicity testing with the tropical marine copepod *Acartia sinjiensis*: Optimisation and application, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 97, pp. 86-93.
- [4] Golding, L. and B. Wilcock(1998), *Standard Methods for Whole Effluent Toxicity Testing: Development and Application*, NIWA Rep. Minist. Environ, Wellington, New Zealand.
- [5] Lapworth, D. J., N. Baran, M. E. Stuart, R. S. Ward(2012), Emerging organic contaminants in groundwater: A review of sources, fate and occurrence. *Environ. Pollute*, Vol. 163, pp. 287-303.
- [6] Li, X., X. Wang, M. Xu, Y. Jiang, T. Yan, and X. Wang(2020), Progress on the usage of the rotifer *Brachionus plicatilis* in marine ecotoxicology: A review, *Aquatic Toxicology*, Vol. 229, 105678
- [7] Mudanyali, O., A. Erlinger, S. Seo, T. -W. Su, D. Tseng, and A. Ozcan(2009), Lensless On-chip Imaging of Cells Provides a New Tool for High-throughput Cell-Biology and Medical Diagnostics, *Journal of Visualized Experiments*, Vol. 34, e1650.
- [8] Roy, M., D. Seo, S. Oh, J. -W. Yang, and S. Seo(2017), A review of recent progress in lens-free imaging and sensing, *Biosensors. Bioeletron*, 88, pp. 130-143.
- [9] Sanderson, H. and K. Solomon(2009), Contaminants of emerging concern challenge ecotoxicology. *Environ Toxicol Chem*, Vol. 28, pp. 1359-1360.
- [10] Seo, D, S. Oh, M. Lee, Y. Hwang, and S. Seo(2018), A Field-Portable Cell Analyzer without a Microscope and Reagents, *Sensors*, Vol. 18(1), 85.
- [11] Shin, S., S. Oh, D. Seo, S. Kumar, A. Lee, S. Lee, Y. Kim, M. Lee, and S. Seo(2023), Field-portable seawater toxicity monitoring platform using lens-free shadow imaging technology, *Water Research*, Vol. 230, 119585
- [12] Walsh, G. E.(1988), Principles of toxicity testing with marine unicellular algae, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 7, pp. 979-987.
- [13] Zhang, C., L. Zhu, J. Wang, J. Wang, T. Zhou, Y. Xu, and C. Cheng(2017), The acute toxic effects of imidazolium-based

Received : 2023. 09. 20.

Revised : 2023. 10. 26.

Accepted : 2023. 10. 27.