

http://dx.doi.org/10.7846/JKOSMEE.2016.19.4.341 ISSN 2288-0089(Print) / ISSN 2288-081X(Online)

한국해양환경 · 에너지학회지 J. Korean Soc. Mar. Environ. Energy Vol. 19, No. 4, 341-348, November 2016

Original Article

렌즈프리 그림자 이미징 기술을 이용한 실시간 미세조류 응집현상 분석법

서동민¹.* · 오상우^{1,2,*} · 동단단³ · 이재우^{3,†} · 서성규^{1,†} ¹고려대학교 전자·정보공학과 ²선박해양플랜트연구소 해양안전연구부 ³고려대학교 환경시스템공학과

Real-time Micro-algae Flocculation Analysis Method Based on Lens-free Shadow Imaging Technique (LSIT)

Dongmin Seo^{1,*}, Sangwoo Oh^{1,2,*}, Dandan Dong³, Jae Woo Lee^{3,†} and Sungkyu Seo^{1,†}

¹Department of Electronics and Information Engineering, Korea University, Sejong 30019, Korea ²Maritime Safety Research Division, Korea Research Institute of Ships & Ocean Engineering, Daejeon 34103, Korea ³Department of Environmental Engineering, Korea University, Sejong 30019, Korea

요 약

미세조류는 대체에너지를 위한 생물자원 중 하나로 다양한 분야에서 관련된 연구가 활발히 진행되고 있다. 미세조류의 상태를 분석하기 위한 방법으로는 계수법, 스크리닝법, 응집법 등이 사용되고 있는데, 이 중 응집법은 적조 제거제 연 구, 미세조류 자원화 연구 등에 효과적으로 이용되고 있다. 미세조류의 응집 상태 분석에는 현재 분광광도법이 주로 사 용되고 있는데, 이는 미세조류의 응집 상태를 광학밀도 계측을 통해 분석하는 방법으로 미세조류 계수법에 비해 소요 되는 분석 시간은 작지만, 측정 결과의 오차가 상대적으로 큰 단점을 갖고 있다. 본 논문에서는 이러한 단점을 개선하 기 위해서 렌즈프리 그림자 이미징 기술을 이용하여 미세조류의 응집 현상을 실시간으로 분석하는 방법을 제안한다. 본 연구에서는 렌즈프리 그림자 이미지를 이용하여 단일 미세조류의 측정과 응집 미세조류 측정이 동시에 가능함을 현미 경 이미지와의 비교를 통해 입중하였다. 또한, 해당 기술을 기반으로 미세조류의 응집 현상을 정량적으로 분석할 수 있는 세 가지의 그림자 파라미터(플록들의 개수, 플록들의 유효면적 및 최대크기 플록의 면적)를 제안하였다. 각 파라미터의 유효성은 응집 효율이 다른 응집제를 이용한 실험을 통해 시간에 따른 미세조류의 응집상태를 실시간으로 분석하여 입 증할 수 있음을 확인하였다.

Abstract – Micro-algae, one of the biological resources for alternative energy, has been heavily studied. Among various methods to analyze the status of the micro-algae including counting, screening, and flocculation, the flocculation approach has been widely accepted in many critical applications such as red tide removal study or microalgae resource study. To characterize the flocculation status of the micro-alga. A traditional optical modality, i.e., photospectrometry, measuring the optical density of the flocs has been frequently employed. While this traditional optical method needs shorter time than the counting method in flocculation status analysis, it has relatively lower detection accuracy. To address this issue, a novel real-time micro-algae flocculation analysis method based on the lens-free shadow imaging technique (LSIT) is introduced. Both single cell detection and floc detection are simultaneously available with a proposed lens-free shadow image, confirmed by comparing the results with optical microscope images. And three shadow parameters, e.g., number of flocs, effective area of flocs, and maximum size of floc, enabling quantification of the flocculation phenomenon of micro-alga, are firstly demonstrated in this article. The efficacy of each shadow parameter is verified with the real-time flocculation monitoring experiments using custom developed cohesive agents.

Keywords: Lensfree shadow imaging technique(렌즈프리 그림자 이미징 기술), Micro-algae(미세조류), Flocculation(응집), Jar test(자테스트), Floc analyzer(응집분석기)

[†]Corresponding author: sseo@korea.ac.kr, jaewoo@korea.ac.kr

^{*}These authors contributed equally to this study.

1.서 론

미세조류는 미래의 중요한 대체에너지의 하나로 큰 주목을 받고 있으며, 특히 에너지, 화학, 환경분야를 중심으로 미세조류의 자원 화 연구가 활발히 진행되고 있다(Promdaen et al.[2014]; Spolaore et al. [2006]). 근래에는 담수종에 국한되었던 미세조류 자원화 연 구가 해수종 미세조류로 확대되면서 관련분야의 연구저변이 점차 확대되고 있는 추세이다(Vandamme et al.[2011]). 미세조류 분석 법은 미세조류를 연구하기 위한 기본 수단으로 특히 미세조류의 자 원화 연구에 있어서는 미세조류의 형태와 양을 정량적으로 분석하는 절차가 필요하다. 미세조류를 분석하는 방법으로는 계수법, 스크리 닝법, 응집법 등이 있다. 첫째, 미세조류 계수법은 Sedgwick-Rafeter(SR) 챔버(Woelkerling et al.[1976]), 헤모사이토미터(Aruoja et al.[2009]), 혹은 플로우사이토미터(Franklin et al.[2001]) 등을 사 용하여 미세조류의 개체수 변화를 측정하는 방법이다. 이 측정법은 성장저해검정(Moreno-Garrido et al.[2000]), 선박평형수 평가시험 (Holm et al. [2008]) 및 녹·적조 예측 기술(Stumpf et al. [2009]; Johnk et al. [2008])에 주로 사용된다. 둘째, 미세조류 스크리닝법은 플라 즈몬 공명장치(Lee et al.[2012]), 수질측정기(Reddy[1981]) 및 GC/ MS(Patil et al. [2011])를 사용하여 미세조류의 상태 및 부산물을 측 정하는 방법이다. 이 측정법은 바이오 디젤 연구(Mata et al.[2010]), 바이오 케미컬 연구(Williams and Laurens[2010]) 및 이산화탄소 전환 균주 연구(Wang et al. [2008])에 사용된다. 셋째, 미세조류 응 집법은 분광광도계(Das et al.[2016]) 및 응집분석기(Li et al.[2014]) 를 사용하여 응집물의 크기 및 개수를 측정하는 방법이다. 이 측정 법은 적조 제거제 연구(Lee et al.[2013]; Sengco et al.[2004]) 및 미세조류 수확 방법 연구(Jakob et al.[2016])에 사용된다.

이상의 측정법들 중 미세조류 응집법은 적조 제거제 연구 및 미 세조류 수확 연구에 중요하게 활용되지만, 여전히 분광광도계라는 전통적인 광학 측정 방법에 의존한다(Tassinari *et al.*[2015]). 분광 광도계는 광학밀도(Optical density)를 이용해 시료의 농도를 측정 하는 기기이다. 이 기기는 직접적인 계수법에 비해 분석 시간을 단 축할 수 있지만, 그 측정의 정확도는 상대적으로 낮아(Shin *et al.* [2015]; Usov *et al.*[2001]) 2014년 국내 녹조 예측 시스템인 조류 경보제에서도 분광광도계를 이용한 측정방법이 제외되었다. 더욱 이 수 시간 동안 지속적으로 시료를 측정해야 하기 때문에, 측정 시 간과 노동력 소모가 클 뿐 아니라, 플록의 상태를 실시간으로 확인 할 수 없는 단점을 가지고 있다. 이를 개선하기 위해 광원 조사에 의한 빛의 반사 정도를 전기적 신호로 검출하는 응집분석기가 개 발되어 상용화 되어 있지만, 불순물이 많이 함유되어있는 해양 생 태계에선 그 활용성이 크게 제한된다.

렌즈프리 그림자 이미징 기술(lens-free shadow imaging technique, LSIT)은 타켓 세포나 미세입자 등이 가지는 고유의 회절패턴 혹은 그림자 이미지를 Complementary Metal Oxide Semi-conductor (CMOS) 또는 Charge Coupled Device(CCD) 이미지 센서 등의 광 전자소자를 이용하여 획득하고, 실시간으로 분석하여 타켓 물질의



Fig. 1. (a) Principle of lens-free shadow imaging technique (LSIT), (b) example of LSIT image, and (c) its 3D digital expression.

상태 정보를 분석하는 기술이다(Fig. 1). 특히, 혈액 및 동물 세포 계수(Seo *et al.*[2008]; Stybayeva *et al.*[2010]), 동물 세포 활성도 분석(Jin *et al.*[2012]), 혈색소 농도 검출(Kim *et al.*[2011]), 세균막 농도 검출(Kwak *et al.*[2014]), 병원성 세균 농도 검출(Lee *et al.* [2014]) 등에서 그 효용성을 입증하였다. 이 기술은 시스템을 구성 할 때 현미경 등에서 사용되는 고가의 광학 렌즈가 필요하지 않음 으로, 저가의 측정 장비로 개발 가능한 장점을 가지고 있다. 또한 렌즈 없이, 저가의 Light Emission Diode(LED)와 CMOS 이미지 센서 만으로 시스템을 구현하기 때문에 넓은 시계(Field Of View, FOV)를 확보할 수 있다(Ozcan and Demirci[2007]). 통상 5백만화 소 1장의 CMOS 이미지 센서 그립자 이미지로 100배 배율의 현미 경 기준 50배에 해당하는 시계를 확보할 수 있으므로 고처리량의 측정 기술이다(Roy *et al.*[2015]).

본 연구는 렌즈프리 그림자 이미징 기술 기반의 미세조류 모니 터링 플랫폼을 제안한다. 이를 통해 단일 미세조류 및 응집 미세조 류의 실시간 분석을 현미경 매칭 이미지와의 비교를 통해 입증한 다. 본 플랫폼을 이용하면 별도의 배율 조정이나 초점을 맞추는 과 정 없이 단일 미세조류와 응집 미세조류를 동시에 분석할 수 있다. 또한, 천연 응집제를 사용해 미세조류의 응집실험을 진행하며, 실 시간으로 미세조류의 이미지를 확보하고 분석 가능함을 보인다. 특히, 자체 개발한 미세조류 분석 프로그램을 사용하여 플록들의 개수, 플록들의 유효면적, 최대크기 플록의 면적을 정량적으로 분 석하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 실험 구성

Fig. 2는 미세조류의 플록 형성 과정을 실시간으로 분석하기 위해 고안된 실험장치 구성도이다. 제안된 실험장치는 자테스터(JT-M6c,



Fig. 2. Schematic diagram of the proposed system enabling online floc monitoring.

대한과학, 대한민국), 플라스틱 칩(Ibidi, 독일), 연동 펌프, 렌즈프리 그 림자 이미징 시스템으로 구성되어있다. 자테스터는 유리비커 내의 분석 시료를 지정된 시간과 속도로 교반하는 역할을 한다. 자테스 터에 사용된 유리비커는 동일한 위치에서 시료를 채취할 수 있도 록 유리관이 접합되어 있으며, 이 유리관은 실리콘 튜브(MasterFlex, Cole-Parmer, 미국)를 통해서 플라스틱 칩의 유입구(inlet)와 연결 된다. 플라스틱 칩의 다른 한쪽 연결부인 배출구(outlet)는 연동 펌 프(peristaltic pump)를 거쳐 폐기물 비커까지 실리콘 튜브로 연결 되어 있다. 연동 펌프가 작동하면 자테스터의 유리비커 안에서 교 반된 미세조류 시료가 플라스틱 칩으로 유입된다. 플라스틱 칩의 상부에는 LED 광원과 하부에는 CMOS 이미지 센서(Edmund optics, 미국)가 설치되어 있어, 플라스틱 칩에 유입된 미세조류 시 료의 그림자 이미지를 획득할 수 있다. CMOS 이미지 센서로 촬영 된 그림자 이미지는 컴퓨터로 전송되어, 본 연구팀이 자체적으로 제작한 플록 자동분석 프로그램을 통해서 분석된다.

2.2 재료 준비

실험에 사용된 미세조류(*Scenedesmus* sp.)는 Korea Marine Microalgae Culture Center에서 공급받았다. 미세조류 성장을 위해 사용되는 배지는 1.0 L 증류수에 NaNO₃, MgSO₄·7H₂O, CaCl₂·2H₂O, K₂HPO₄, EDTANa₂, Ammonium Fe III citrate, Citric acid, NaCO₃을 10 ml씩 넣고, 1.0 ml의 Micronutrient solution을 넣어 제작된다. Micronutrient solution은 1.0 L 증류수에 61 mg의 H₃BO₃, 169 mg의 MnCl₂·4H₂O, 287 mg의 ZnSO₄·7H₂O, 12.5 mg의 Na₂MoO₄·2H₂O, 2.5 mg의 CuSO₄·5H₂O, 5.0 mg의 Co(NO₃)₂·6H₂O를 넣어 제작된다. 미세조류는 삼각플라스크에 담겨 배양온도 20 °C, 회전수는 20 rpm의 조건으로 진탕배양기를 통해서 배양된다.

실험에 사용된 응집제(Extracellular Polymeric Substances, EPS)는 활성 슬러지를 가공해서 얻을 수 있다. 활성 슬러지는 충청북도에 소재하고 있는 오송 하수처리장에서 연속배치반응기(Sequencing Batch Reactor, SBR) 공법으로 처리된 하수에서 확보했다. EPS는 미세조류를 응집할 수 있는 천연 생물응집제로, Soluble EPS(S-EPS), Loosely Bound EPS(LB-EPS), 그리고 Tightly Bound EPS(TB-EPS)로 구분된다. 활성 슬러지에서 EPS를 얻기 위해서는 원심분리, 서스 펜션, 가열의 과정을 반복한다. 활성 슬러지를 원심분리기에 넣고 15 분간 4,000 g으로 원심분리하며, 상등액은 따로 보관하고 슬러 지 펫릿은 활성 슬러지 배지를 넣고 서스펜션한다. 서스펜션 된 시 료는 가열 중탕기에 넣고 50 ℃에서 1 분 동안 중탕방식으로 가열 한다.

가열이 끝난 시료는 다시 원심분리 과정을 거치게 된다. 처음 원 심분리 후 얻어지는 상등액에는 S-EPS, 두 번째 원심분리 후 얻어 지는 상등액에는 LB-EPS, 세 번째 원심분리 후 얻어지는 상등액 에는 TB-EPS가 포함되어 있다. 서스펜션에 사용되는 활성 슬러지 배지는 1.0 L의 증류수에 0.5 g의 glucose, 0.4 g의 peptone, 0.2 g의 NH₃Cl, 0.045 g의 K₂HPO₄, 0.03 g의 CaCl₂·2H₂O, 0.05 g의 MgSo₄·7H₂O, 0.02 g의 FeSo₄·7H₂O와 1 ml의 Trace Metal Solution을 넣어 제작 한다. Trace Metal Solution은 1.0 L의 증류수에 H₃BO₃, MnSO₄·H₂O, (NH₄)6Mo₇O₂·4H₂O, ZnCl₂, CuCl₂, AlCl₃, NiCl₂을 0.05 g씩 넣고, 0.05 mg의 CoCl₂·6H₂O을 넣어 제작한다.

2.3 실험 방법

미세조류의 응집현상을 분석하기 위하여 자테스터(Jar Tester)를 이용한 응집 실험을 설계하였다. 자테스터 내부에 500 mL 부피의 유리비커를 위치시키고, 미세조류와 응집제가 포함된 시료 200 mL를 유리비커에 주입한다. 자테스터를 작동시켜, 시료를 100 rpm의 속 도로 2 분 동안 교반한 후, 20 rpm의 속도로 20 분 동안 교반한다. 시 료 주입부터 교반과정까지 시료를 6번 채취하여 실시간으로 플록의 상태를 분석하였다. 모든 실험은 실온에서 진행되었다.

3. 결과 및 고찰

본 연구에서 궁극적으로 목표로 하고 있는 미세조류의 응접 현 상을 렌즈프리 그림자 이미지 기술을 이용하여 실시간으로 분석하 기 위한 사전 단계로, 단일 미세조류를 해당 방법을 통해서 측정이 가능함을 확인하는 실험을 진행하였다, 단일 미세조류를 관찰하기 위해서는 일반적으로 현미경을 이용한 분석방법이 사용되므로, 본 연구팀은 동일한 영역의 미세조류를 렌즈프리 그림자 이미징 기술 과 현미경을 이용하여 획득한 각각의 이미지들의 유사성을 비교하 였다.

이를 위해 Fig. 3(a)의 왼쪽 그림과 같이, 단일 미세조류 시료의 그림자 이미지를 촬영하고, 일부 영역을 확대하여 동일한 영역에 해당되는 현미경 이미지를 비교하였다. 영역 1과 영역 2를 400배 의 현미경으로 촬영한 이미지에는 세 개의 미세조류를 확인할 수 있으며, 영역 1과 영역 2를 확대한 그림자 이미지 역시 세 개의 그 림자 이미지를 확인할 수 있다. 두 이미지를 비교하면 미세조류의 그림자 이미지가 나타난 위치에 정확하게 미세조류의 현미경 이미 지가 위치하고 있음을 확인할 수 있다. 이를 통해 그림자 이미지로 단일 미세조류를 측정할 수 있음을 알 수 있다.

두 번째로 단일 미세조류들이 응집된 상태를 그림자 이미지를 통 해서 관찰할 수 있는 가능성을 확인하기 위해서, Fig. 3(b)와 같이 단일 미세조류들이 응집되어 플록이 형성된 미세조류의 그림자 이 미지와 현미경 이미지를 비교하였다. Fig. 3(b)의 왼쪽 그림에 해당



Fig. 3. Whole frame LSIT image for microalgae and magnified regions-of-interest with matching standard optical micrographs. (a) single microalgae condition, (b) flocculated micro algae condition.

되는 그림자 이미지의 영역 3을 50배 현미경으로 촬영한 현미경 이 미지에서는 3개의 거대 플록을 확인할 수 있으며, 영역 3을 확대한 그림자 이미지 역시 3개의 거대 플록 이미지를 확인할 수 있다. 이 들을 비교해 보았을 때, 두 이미지에서 볼 수 있는 플록의 위치와 형태는 서로 유사하므로, 이를 통해 그림자 이미지로 플록이 형성 된 미세조류를 측정할 수 있음을 알 수 있다. 이와 같이, 미세조류의 그림자 이미지와 현미경 이미지의 비교실험을 통해서, 렌즈프리 그 림자 이미징 기술로 단일 미세조류부터 응집되어 플록이 형성된 미 세조류까지 별도의 배율 변화 없이 측정이 가능함을 확인하였다.

세 번째로 본 연구에서 최종 목표로 하고 있는 렌즈프리 그림자 이미징 기술을이용하여 실시간 변화하는 미세조류의 응집 현상을 측정하기 위하여, 시간에 따라 응집 현상이 진행되는 미세조류를 그림자 이미지로 촬영하는 실험을 진행하였다. 응집 현상이 진행되는 미세조류의 그림자 이미지는 22 분간 총 5회 촬영하였으며(0 분, 2 분, 7 분, 12 분, 22 분), 미세조류의 응집을 위해서 천연 생물응집 제인 TB-EPS를 사용하였다.

Fig. 4(a)는 응집제를 투입하지 않은 미세조류 시료(버퍼액 투입, 대조군)와 TB-EPS 응집제를 투여한 미세조류 시료(TB-EPS 투입, 실 험군)를 시간 변화에 따라 촬영한 그림자 이미지이다. 촬영된 대조 군 이미지에서는 시간이 지남에 따라 육안으로 구분이 어려운 작

은 미세조류 플록들이 형성되는 것을 볼 수 있다. 반면 촬영된 실 험군 이미지에서는 시간이 지남에 따라 육안으로도 확인하기 쉬운 큰 미세조류 플록들이 형성되는 것을 확인할 수 있다. 이를 통해 TB-EPS가 미세조류의 응집 실험에서 응집제로 유용함을 알 수 있 다. 육안으로 확인된 미세조류의 응집 현상의 정도를 정량적으로 분석하기 위해서 본 연구에서는 그림자 이미지를 이용한 미세조류 응집 분석 프로그램을 제작하였다. 미세조류 응집 분석 프로그램은 상용 계산프로그램인 Matlab[®](MathWorks[®], 미국)의 영상분석라이 브러리를 이용하여 제작되었다. 미세조류 응집 분석 프로그램은 그 림자 이미지에 포함된 플록을 검출하는 역할을 한다. 플록 검출은 단일 미세조류의 그림자 이미지가 두 개 이상 중첩된 위치를 플록 으로 인식하여 플록의 테두리를 붉은색으로 표시한다. 플록 분석은 검출된 플록들의 개수(Number of flocs)와 검출된 플록들의 영역 (붉게 표시된 테두리), 내부의 픽셀 수(유효면적, effective area of flocs), 그리고 검출된 플록 중 가장 큰 플록의 픽셀 수(최대크기 플 록의 면적, maximum size of floc)의 결과를 보여준다.

Fig. 4(b)는 실험군 시료의 초기(0 분) 그림자 이미지다. 해당 그 림자 이미지를 미세조류 응집 분석 프로그램을 통해 플록 분석을 진행한 결과, 검출된 플록들의 개수는 14개, 검출된 플록들의 유효 면적은 3,595 픽셀이며, 최대 플록의 면적은 472 픽셀이라는 것을



Fig. 4. Comparison between microalgae detection results. (a) Comparison between control sample and TB-EPS treated sample, (b) Whole frame LSIT image at t=0, (c) Same image at t=22 min.

확인할 수 있다.

Fig. 4(c)는 22 분의 응접 과정 후 촬영된 실험군 시료의 그림자 이미지이다. 미세조류 응접 분석 프로그램의 플록 분석을 통해 검 출된 플록의 개수는 52개, 검출된 플록들의 유효 면적은 124,312 픽셀이며, 최대 크기의 플록의 면적은 14,279 픽셀임을 알 수 있다. 해당 실험을 통해서 그림자 이미징 기술로 미세조류 응집 현상을 실시간으로 촬영하고, 촬영된 그림자 이미지를 프로그램으로 통해 정량적으로 분석이 가능함을 확인하였다. 특히 플록 분석의 결과값은 세 가지의 분석 결과들(플록들의 개수, 플록들의 유효면적 및 최대 크기 플록의 면적)을 제공함으로 해당 파라미터들을 통해서 미세 조류의 응집 정도를 분석할 수 있다.

마지막으로 앞선 실험을 통해 미세조류의 플록 분석 가능성이 입 중된 렌즈프리 그림자 이미지를 이용한 미세조류 분석 프로그램을 이용하여 3종의 응집제에 따라 서로 다르게 변화하는 미세조류 플 록 응집 현상의 차이점을 분석하는 실험을 진행하였다. 해당 실험에 사용된 응집제는 S-EPS, LB-EPS, TB-EPS이며, 실험은 급속교반 전(0분) 1번, 급속교반 후(2분) 1번, 완속 교반 중 4번(7분, 12분, 17 분, 22분)으로, 총 22분 동안 6번의 그림자 이미지를 실시간으로 측정하여 플록의 변화를 확인하는 방법으로 진행되었다. 응집제의 투입 여부와 응집제에 따라서 플록 생성에 영향을 미치는 정도를 확인하기 위해서, 시간대별로 촬영한 6개의 그림자 이미지를 이용 하여 앞서 설명한 미세조류 분석 프로그램을 통해 세 가지 파라미 터(플록들의 개수, 플록들의 유효면적 및 최대크기 플록의 면적)의 시간에 따른 변화량을 분석하는 방법으로 실험을 진행하였다.

Fig. 5(a)는 미세조류 시료에 응집제를 투입하지 않은 경우와 3 종의 응집제를 투입한 경우, 시간에 따라 변화하는 미세조류의 응 집 현상을 렌즈프리 그림자 이미지의 미세조류 분석 파라리터 중 하나인 최대 크기를 갖는 플록의 면적값으로 표현한 그래프이다. 해당 그래프를 살펴보면 LB-EPS를 투여한 시료에서 최대 크기를 갖는 폴록의 면적이 시간이 지남에 따라서 가장 크게 증가하며, 응 집제를 넣지 않은 대조군 시료에서의 시간에 따른 최대 크기 플록 면적의 변화량이 가장 작은 것을 확인할 수 있다. S-EPS를 투여한 시료의 시간에 따른 변화량은 대조군 시료의 경우보다 3배 이상 크 지만, 대조군 시료와 유사하게 전체적인 변화량은 작은 것을 확인 할 수 있다. 반면, TB-EPS를 투여한 시료의 최대 크기 플록 면적의 변 화량은 LB-EPS를 투여한 시료의 경우에 비해 절반이지만, S-EPS를 투여한 시료의 경우에 비해서는 4배 이상 큰 것을 알 수 있다. 이를 통 해 LB-EPS가 다른 두 가지의 응집제들에 비해서 면적이 가장 큰 플록을 형성시키는 효율이 가장 크다는 것을 미세조류 그림자 이 미지의 최대 크기 플록의 면적값 비교를 통해서 정량적으로 분석 할 수 있다.

Fig. 5(b)는 미세조류가 응집되어 형성된 플록들의 유효 면적의



Fig. 5. Results of floc analysis parameters. (a) The maximum size of floc of microalgae by flocculation at different time, (b) The effective area of flocs of microalgae formed by flocculation at different time, (c) The number of flocs of microalgae by flocculation at different time.

변화를 시간에 따라 나타낸 그래프이다. 해당 결과를 보면 응접 실 험을 마친 22 분 후의 S-EPS를 투여한 시료의 유효 면적은 42,511 픽셀로 대조군 시료의 값인 36,813 픽셀보다는 크지만 차이가 크지 않은 것을 알 수 있다. 반면 LB-EPS를 투여한 시료의 22 분 후의 플록 유효 면적은 102,518 픽셀로 대조군 시료와 S-EPS를 투여한 시료의 경우와 비교하여, 2배 이상의 변화폭을 보인다. TB-EPS를 투여한 시료의 22 분 후 플록 유효 면적은 124,312 픽셀로 다른 조 건의 시료들의 경우에 비해 가장 큰 값을 보이며, 측정한 지 12 분 이 지난 시점부터 LB-EPS를 투여한 시료보다 유효 면적이 커지는 것을 확인할 수 있다. Fig. 5(c)는 3종의 응접제를 투입하여 시간에 따라 변화하는 미 세조류 플록의 수를 나타낸 그래프이다. 해당 실험 결과를 보면 대 조군 시료나 S-EPS를 투여한 시료의 경우, 응집 실험이 진행되는 동안 전체적으로 플록의 수가 증가하는 경향을 갖는 것을 볼 수 있 다. 반면 플록 분석 파라미터인 최대 크기의 플록 면적과 플록들의 유효 면적에서 시간에 따라 큰 증가추세를 보였던 LB-EPS와 TB-EPS를 투여한 시료들은 각각 2 분, 12 분 후부터 플록 수가 감소 하는 것을 확인할 수 있다.

앞서 제안된 세 가지 플록 분석 방법을 종합적으로 해석해보면, 플록의 수가 일정시간 증가한 후 감소 추세를 보이는 시료는 최대 크기를 갖는 플록의 면적과 플록들의 유효면적의 증가 폭이 클 것 으로 예상할 수 있다. 이는 단일 미세조류들이 반응 초기에는 크기 가 작은 플록을 형성하고 시간이 지남에 따라서 작은 플록들이 서 로 응접하면서 점차적으로는 하나의 거대한 플록을 형성하기 때문 이다. 초반에 생성된 작은 플록들로 인해서 플록의 수가 증가하지 만 시간이 지남에 따라서 그 플록들이 서로 응집되어 전체의 플록 숫자는 감소하고, 최대 반응기에 도달할 경우 플록의 숫자는 작지 만 단일 플록의 크기는 크고 유효 면적이 큰 플록이 형성된다는 의 미이다. 반면, 플록 수가 지속적으로 증가 추세를 보이는 시료는 최 대 크기의 플록 면적과 플록들의 유효 면적의 증가 폭이 작을 것이 라 예상할 수 있으며, 이는 해당 미세조류는 아직 거대 플록으로 성 장할 수 있는 조건이 갖추어 있지 않음으로 해석할 수 있다.

이런 분석들을 토대로, 미세조류에 적용되는 응집제의 영향을 실 시간으로 유추해 볼 수 있다. 이는 침전 속도로 응집제의 성능을 평 가하는 기존의 측정 분석 방법들에 비하여, 응집제가 미세조류에 미치는 영향력에 대한 다양한 정보를 줄 수 있을 것이라 판단된다.

4. 결 론

본 논문에서는 렌즈프리 그림자 이미징 기술을 이용하여 미세조 류의 응집 현상을 실시간으로 분석할 수 있음을 실험을 통해서 확 인하였다. 우선 렌즈프리 그림자 이미지를 이용하여 단일 미세조류의 측정과 응집 미세조류 측정이 동시에 가능함을 현미경 이미지와의 비교를 통해 입증하였다. 또한 본 연구팀이 개발한 미세조류 분석 프로그램을 통하여 미세조류의 응집 현상을 정량적으로 분석할 수 있는 세 가지의 파라미터(플록들의 개수, 플록들의 유효 면적, 최 대 크기 플록의 면적)를 제안하였다. 해당 파라미터의 유효성을 입 증하기 위해서 응집 효율이 다른 응집제인 S-EPS, LB-EPS, TB-EPS를 이용하여 시간에 따라 다른 응집 현상을 보이는 미세조류의 응집 상태를 제안한 파라미터들을 이용하여 분석하였다. 해당 실험 결과를 통해서 본 연구에서 제안한 미세조류 분석 파라미터들이 응 집된 미세조류의 상태를 대표적으로 나타낼 수 있음을 확인하였다. 상기한 연구결과들을 통해서 렌즈프리 그림자 이미징 기술을 이용 하여 미세조류 응집 현상을 실시간으로 분석이 가능함을 증명하였 으며, 이를 통해서 제안한 방법이 새로운 미세조류 분석 기술로 적 용할 수 있을 것이라 기대한다.

후 기

이 논문은 2016년도 한국해양과학기술원 부설 선박해양플랜트 연구소 출연금 재원으로 수행된 해양 유출유 현장 모니터링 기술 개발 연구의 결과임(PES2240).

References

- Aruoja, V., Dubourguier, H.-C., Kasemets, K. and Kahru, A., 2009, "Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae Pseudokirchneriella subcapitata", Sci. Total Environ., Vol. 407, No. 4, 1461-1468.
- [2] Das, P., Thaher, M. I., Hakim, M. A. Q. M. A., Al-Jabri, H. M. S.J. and Alghasal, G. S. H.S., 2016, "Microalgae harvesting by pH adjusted coagulation-flocculation, recycling of the coagulant and the growth media", Bioresour. Technol., Vol. 216, 824-829.
- [3] Franklin, N. M., Stauber, J. L. and Lim, R. P., 2001, "Development of flow cytometry-based algal bioassays for assessing toxicity of copper in natural waters", Environ. Toxicol. Chem., Vol. 20, No. 1, 160-170.
- [4] Holm, E. R., Stamper, D. M., Brizzolara, R. A., Barnes, L., Deamer, N. and Burkholder, J. M., 2008, "Sonication of bacteria, phytoplankton and zooplankton: application to treatment of ballast water", Mar. Pollut. Bull., Vol. 56, No. 6, 1201-1208.
- [5] Jakob, G, Stephens, E., Feller, R., Oey, M., Hankamer, B. and Ross, I. L., 2016, "Triggered exocytosis of the protozoan tetrahymena as a source of bioflocculation and a controllable dewatering method for efficient harvest of microalgal cultures", Algal Res., Vol. 13, 148-158.
- [6] Jin, G, Yoo, I.-H., Pack, S. P., Yang, J.-W., Ha, U.-H., Paek, S.-H. and Seo, S., 2012, "Lens-free shadow image based high-throughput continuous cell monitoring technique", Biosens. Bioelectron., Vol. 38, No. 1, 126-131.
- [7] Johnk, K. D., Huisman, J., Sharples, J., Sommeijer, B., Visser, P. M. and Stroom, J. M., 2008, "Summer heatwaves promote blooms of harmful cyanobacteria", Glob. Change Biol., Vol. 14, No. 3, 495-512.
- [8] Kim, D.-S., Choi, J.-H., Nam, M.-H., Yang, J.-W., Pak, J. J. and Seo, S., 2011, "LED and CMOS image sensor based hemoglobin concentration measurement technique", Sens. Actuators, B, Vol. 157, 103-109.
- [9] Kwak, Y. H., Lee, J., Lee, J., Kwak, S. H., Oh, S., Paek, S.-H., Ha, U.-H. and Seo, S., 2014, "A simple and low-cost biofilm quantification method using LED and CMOS image sensor", J. Microbiol. Methods, Vol. 107, 150-156.
- [10] Lee, E. J., Ahn, K.-Y., Lee, J.-H., Park, J.-S., Song, J.-A., Sim, S. J., Lee, E. B., Cha, Y. J. and Lee, J., 2012, "A novel bioassay platform using ferritin-based nanoprobe hydrogel", Adv. Mater., Vol. 24, No. 35, 4739-4744.
- [11] Lee, J., Kwak, Y. H., Paek, S.-H., Han, S. and Seo, S., 2014,

"CMOS image sensor-based ELISA detector using lens-free shadow imaging platform", Sens. Actuators, B, Vol. 196, 511-517.

- [12] Lee, Y.-C., Jin, E.S., Jung, S. W., Kim, Y.-M., Chang, K. S., Yang, J.-W., Kim, S.-W., Kim, Y.-O. and Shin, H.-J., 2013, "Utilizing the algicidal activity of aminoclay as a practical treatment for toxic red tides", Sci. Rep., Vol. 3, No. 1292, 1-8.
- [13] Li, M., Zhu, W. and Gao, L., 2014, "Analysis of cell concentration, volume concentration, and colony size of microcystis via laser particle analyzer", Environ. Manage., Vol. 53, No. 5, 947-958.
- [14] Mata, T. M., Martins, A. A. and Caetano, N. S., 2010, "Microalgae for biodiesel production and other applications: a review", Renewable Sustainable Energy Rev., Vol. 14, No. 1, 217-232.
- [15] Moreno-Garrido, I., Lubian, L. M. and Soares, A. M. V. M., 2000, "Influence of cellular density on determination of EC50 in microalgal growth inhibition tests", Ecotoxicol. Environ. Saf., Vol. 47, No. 2, 112-116.
- [16] Ozcan, A. and Demirci, U., 2007, "Ultra wide-field lens-free monitoring of cells on-chip", Lab Chip, Vol. 8, No. 1, 98-106.
- [17] Patil, P. D., Gude, V. G., Mannarswamy, A., Deng, S., Cooke, P., Munson-McGee, S., Rhodes, I., Lammers, P. and Nirmalakhandan, N., 2011, "Optimization of direct conversion of wet algae to biodiesel under supercritical methanol conditions", Bioresour. Technol., Vol. 102, No. 1, 118-122.
- [18] Promdaen, S., Wattuya, P. and Sanevas, N., 2014, "Automated microalgae image classification", Procedia Comput. Sci., Vol. 29, 1981-1992.
- [19] Reddy, K. R., 1981, "Diel variations of certain physico-chemical parameters of water in selected aquatic systems", Hydrobiologia, Vol. 85, No. 3, 201-207.
- [20] Roy, M., Seo, D., Oh, C.-H., Nam, M.-H., Kim, Y. J. and Seo, S., 2015, "Low-cost telemedicine device performing cell and particle size measurement based on lens-free shadow imaging technology", Biosens. Bioelectron., Vol. 67, 715-723.
- [21] Sengco, M. R. and Anderson, D. M., 2004, "Controlling harmful algal blooms through clay flocculation", J. Eukaryor. Microbiol., Vol. 51, No. 2, 169-172.
- [22] Seo, S., Su, T.-W., Tseng, D. K., Erlinger, A. and Ozcan, A., 2008, "Lensfree holographic imaging for on-chip cytometry and diagnostics", Lab Chip, Vol. 9, No. 6, 777-787.
- [23] Shin, Y.-H, Barnett, J. Z., Song, E., Gutierrez-Wing, M. T., Rusch, K. A. and Choi, J.-W., 2015, "A portable fluorescent sensor for on-site detection of microalgae", Microelectron. Eng., Vol. 144, 6-11.
- [24] Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. and Isambert, A., 2006, "Commercial applications of microalgae", J. Biosci. Bioeng., Vol. 101, No. 2, 87-96.
- [25] Stumplf, R. P., Tomlinson, M. C., Calkins, J. A., Kirkpatrick, B., Fisher, K., Nierenberg, K., Currier, R. and Wynne, T. T., 2009, "Skill assessment for an operational algal bloom forecast system", J. Marine Syst., Vol. 76, No. 1-2, 151-161.
- [26] Stybayeva, G., Mudanyali, O., Seo, S., Silangcruz, J., Macal, M.,

Ramanculov, E., Dandekar, S., Erlinger, A., Ozcan, A. and Revzin, A., 2010, "Lensfree holographic imaging of antibody microarrays for high-throughput detection of leukocyte numbers and function", Anal. Chem., Vol. 82, No. 9, 3736-3744.

- [27] Tassinari, B., Conaghan, S., Freeland, B. and Marison, I. W., 2015, "Application of turbidity meters for the quantitative analysis of flocculation in a jar test apparatus", J. Environ. Eng., Vol. 149, No. 9, 04015015-1-04015015-8.
- [28] Usov, A. I., Smirnova, G. P. and Klochkova, N. G. 2001, "Polysaccharides of Algae: 55. polysaccharide composition of several brown algae from kamchatka", Russ. J. Bioorg. Chem., Vol. 27, No. 6, 444-448.
- [29] Vandamme, D., Pontes, S. C. V., Goiris, K., Foubert, I., Pinoy, L. J. J. and Muylaert, K., 2011, "Evaluation of electro-coagulationflocculation for harvesting marine and freshwater microalgae", Biotechnol. Bioeng., Vol. 108, No. 10, 2320-2329.

- [30] Wang, B., Li, Y., Wu, N. and Lan, C. Q., 2008, "CO2 bio-mitigation using microalgae", Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol. 79, No. 5, 707-718.
- [31] Williams, P. J. I. B. and Laurens, L. M. L., 2010, "Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: review & analysis of the biochemistry, energetics & economics", Energy Environ. Sci., Vol. 3, No. 5, 554-590.
- [32] Woelkerling, W. J., Kowal, R. R. and Gough, S. B., 1976, "Sedgwick-rafter cell counts: a procedural analysis", Hydrobiologia, Vol. 48, No. 2, 95-107.

Received 15 November 2016 Revised 18 November 2016 Accepted 21 November 2016