

해양암석 분말과 곰팡이 배양액에 의한 적조생물 편조류의 구제효과

현성희¹ · 신현웅*

¹을지외과대학교 임상병리학과, 순천향대학교 자연과학대학

조류의 효과적인 제어방법 개발의 일환으로 해양암석분말의 효과를 보기 위하여 해양암석분말과 곰팡이 배양 상등액을 이용하여 해양조류 제거율을 조사하였다. 편조류인 *H. akashiwo*와 *P. minimum*는 해양암석 분말을 30 g/l의 농도로 살포한 실험군에서 높은 구제효과를 나타내었고, *P. oxalicum* (HCLF-34) 배양 상등액 살포는 5 mg/l 살포군에서도 구제효과를 나타내었다. 혼합 살포군에서도 배양 상등액 단독 살포군에서와 동등한 정도의 구제효과를 나타내었고, 완충용액 (pH 2.8)은 15 mg/l 살포군에서 60분 경과 후 75%의 구제효과를 나타내었으나, 전자현미경적 관찰에서는 암석분말과 배양 상등액 혼합 살포군, 배양 상등액 살포군, 암석분말 살포군 및 완충용액 살포군 순으로 세포의 파괴정도가 관찰되었다. 이러한 결과는 암석분말과 곰팡이 배양상등액이 해양에서 발생하는 편조류의 대발생을 조절할 수 있는 물질로 작용함을 시사한다.

Key words □ biodegradation, dinoflagellate, fungal supernatant, lysis, marine rock powder

적조현상은 부패성 유기 오염물질과 미량금속 및 중식축진물질이 풍부하게 용존되어 있고, 일사량, 수온, 염분 등 환경조건이 적당하면 플랑크톤이 대량번식하여 발생하며, 특히 바람이나 조류에 의하여 집적되면 고밀도 적조가 발생한다. 특히 생활하수가 다량유입되고 저층에 퇴적된 영양물질이 용출되는 곳으로서 폐쇄성의 내만이나 연안에서는 상습적으로 발생한다. 육상에서의 수질오염원 증가와 연안 어장으로부터 발생된 오염원이 인근 해역에 계속적으로 누적되어 반복적인 오염환(pollution ring)을 형성함으로써 해양 미세조류의 과발현을 유발하고 있다. 또한 적조 발생 미세조류의 종류도 무독성 종에서 유독성 종으로 변화되고 있으며 이에 따라 인근연안 수산업 피해액은 증가하고 어장이 황폐화되고 있는 실정이다(6, 17). 적조 발생의 주 원인생물은 *Heterosigma akashiwo*, *Chaetoceros didymus*, *Prorocentrum minimum*, *Thalassiosira decipiens*, *Kerenia mikimotoi*와 *Cochlodinium polykrikoides* 등으로서 한국과 일본을 비롯한 여러 나라에서 심각한 피해를 일으키는 것으로 알려져 있다(4, 5).

적조생물 구제법으로는 약품 살포법, 초음파 오존처리법, 점토 살포법, 천적 이용법 및 길항미생물 이용법 등이 알려져 있다. 현재까지 구제효율과 2차 오염원의 발생이 거의 없다는 장점으로 한국과 일본에서는 점토 살포법을 활용하고 있다(7, 9). 특히 한국에서는 점토 대신 황토를 적조 발생해역에 살포하여 적조생물 제거효과를 얻고 있다. 황토는 물 속에서 물분자와 화학적 흡착반응을 일으켜 입자 표면에 수산기가 부착되고 황토에 포함된 철과 물분자 사이에서 산-염기반응이 일어나 수중의 금속산화물 표면에는 수소이온의 농도 변화에 따라 산성을 나타내는 부분과

알칼리성을 나타내는 부분이 형성되어 적조생물과의 흡착력을 높여준다(3, 8, 12). 최근 황토의 흡착력을 높이기 위해 해수를 전기분해한 물에 황토를 풀어서 황토입자의 이온성을 높이고 입자의 크기를 50 μm 이하로 조절하여 그 효과를 극대화하는 방법이 연구되고 있다(3).

황토의 살포는 단기간에 적조를 구제하는데 유용한 방법으로 사용되고 있지만, 일부 연구자들에 의하면 황토 살포는 장기적으로 해양 생태계에 2차적인 오염원으로 영향을 주게 될 것을 우려하고 있다. 이러한 이유로 해외에서는 천적의 활용, 화학약품 처리법(phlorotannin, 2,4-dichlorophenol) 및 laser beam 등을 이용한 연구가 활발히 수행되고 있다(10, 11, 15). 이에 따라 본 연구에서는 이온성이 뛰어나고 철분 함유량이 높은 해양암석 분말과 육수에서 발생하는 녹조 억제물질로 연구중인 곰팡이의 2차 산물을 혼합하여 소량으로 적조를 구제하는 방법을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

편조류와 곰팡이의 배양

적조생물 *H. akashiwo*(KMCC D-6)와 *P. minimum* (KMCC D-1)는 부경대학교 해양 미세조류은행에서 분양받아 조도 2,500 lux, 온도 $20 \pm 2^\circ\text{C}$ 의 조건에서 F2 배지를 이용하여 배양하고 대수성장기에 도달하였을 때(약 6일) 실험에 사용하였다. 곰팡이는 본 연구자의 남조류(*Anabaena cylindrica*) 구제연구에서 분리동정한 *Penicillium oxalicum*(HCLF-34) 균주를 potato dextrose broth (PDB) 배지에 접종하여 25°C , 130 rpm 배양기에서 3일간 배양하여 배양액을 0.45 μm 와 0.22 μm 의 여과지에 연속적으로 여과한 배양 상등액을 사용하였다(13, 14). 해양암석 분말은 입자크기

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 041-530-1248, Fax: 041-530-1493
E-mail: hwshin@sch.ac.kr

50 μm 내외로 마쇄된 분말을 해양연구소로부터 제공받아 실험에 사용하였다.

편조류의 구제효과

100 ml 메스실린더에 대수성장기에 도달한 *H. akashiwo*와 *P. minimum*를 35-40 cells/ml로 준비하고 해양암석 분말 살포군은 10 g, 20 g, 30 g/l로 살포하고, 곰팡이 배양 상등액은 5 ml, 10 ml, 15 ml/l로 첨가하였다. 암석분말과 배양 상등액의 혼합 살포는 암석분말 10 g, 20 g, 30 g/l에 곰팡이 배양 상등액을 10 ml/l 씩 각각 첨가하였으며, 완충용액 살포군은 Briton-Robinson (pH 2.8) 완충용액(1)을 5 ml, 10 ml, 15 ml/l의 농도로 살포하였다. 살포 후 시간 경과에 따라 10, 20, 30분에 각각의 시료를 채취하여 40배율 현미경(Leica DME)으로 운동성이 있는 편조류의 수를 혈구계수기(hemocytometer)를 이용하여 계수하였다.

구제효과의 투과전자현미경적 관찰

해양암석 분말, 곰팡이 배양 상등액 살포군과 곰팡이 배양 상등액과 동일한 pH를 가지고 있는 Briton-Robinson (pH 2.8) 완충용액 살포군에서 *H. akashiwo*와 *P. minimum*의 현미경적 구조에 미치는 영향을 관찰하기 위해 각 실험군 G2의 30분 경과 실험군으로부터 1 ml 씩 채취하여 원심분리(10,000 g, 4°C, 10분)하여 1% glutaraldehyde가 첨가된 pH 7.2의 0.01M phosphate buffer로 4°C에서 24시간 동안 전 고정하고, 상기의 phosphate buffer로 3회 세척한 후 1% OsO₄로 4°C에서 2시간 동안 후 고정을 실시하였다. Phosphate buffer로 2회 세척 후 35% ethanol에서부터 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%(I), 100%(II)의 단계로 30분 씩 탈수하고, propylene oxide로 4°C에서 5분간 처리하여 pro-pylene oxide와 epon(812)을 1:3, 1:1, 3:1의 단계적 비율로 60°C에서 중합시켰다. 중합된 시료는 초박 절편기로 semisection하여 grid에 부착시켜 1% uranyl formate에서 16시간,

pH 12의 8 % lead citrate에서 1분간 염색시켜 투과 전자현미경(Hitachi H-600, Japan)으로 75kV의 전압을 사용하여 관찰하였다(12).

결과 및 고찰

편조류의 구제효과

*H. akashiwo*의 해양암석 분말 살포군에서는 살포 60분 후 점토나 황토의 살포실험보다 다소 낮은 약 50%의 제거효과를 나타내었고, 30 g/l 살포군에서는 60분 경과 후 약 60%의 제거효과를 나타내었다(Fig. 1a). *P. minimum* 해양암석 분말 살포군에서는 살포 60분 후 점토나 황토의 살포실험보다 다소 낮은 약 30%의 제거효과를 나타내었고, 30 g/l 살포군에서는 60분 경과 후 약 80%의 제거효과를 나타내었다(Fig. 2a). 1999년 해양수산부의 점토살포와 황토살포의 비교실험에서 점토는 살포 후 시간 경과에 따라 75-98%의 제거율을 나타내었고, 황토는 살포 10분 경과 후부터 90% 이상의 제거효율을 나타내어 점토보다 황토의 살포가 적조 발생 해양 미세조류의 제거에 효과적이라는 연구결과를 보고하였다(2). 본 연구에서 암석분말 살포가 30 g/l의 살포 최고 농도에서 60분 경과 후까지 약 60%의 제거효율을 나타내었으며 그 이유는 암석을 분말화하는 과정에서 일정 입자 크기 미만의 입자들로만 구성된 것이 아니라, 분말 제조과정에서 입자의 크기가 50 μm 이상의 커다란 암석 조각들이 포함되어 황토나 점토와 같이 살포 후 부유되어 적조 원인생물을 흡착시킬 수 있는 충분한 효율을 나타내지 못하고 일부 입자들이 살포 직후 침강하기 때문인 것으로 사료된다.

해양암석 분말과 *P. oxalium*(HCLF-34) 배양 상등액을 혼합하여 살포한 실험군에서 *H. akashiwo*는 암석분말의 살포량에 관계없이 살포 10분 경과 후 급속히 감소하여 98% 이상의 제거효율을 나타내었다(Fig. 1b). *P. minimum*는 암석분말의 살포량에 관

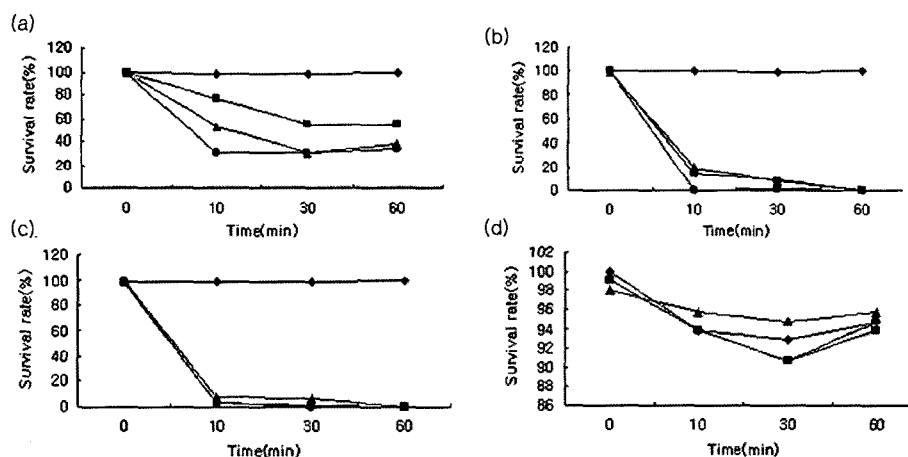


Fig. 1. Algicidal effects of marine rock powder and fungal supernatant on *H. akashiwo*. Algicidal effect was denoted as survival rate(%) by observing the motility of cultured *H. akashiwo*. (a) Marine rock powder, G1; Control, G2; 10 g/l, G3; 20 g/l, G4; 30 g/l, (b) Marine rock powder (MRP) + fungal supernatant, G1; Control, G2; 10 g + 10 ml/l, G3; 20 g + 10 ml/l, G4; 30 g + 10 ml/l, (c) Fungal supernatant, G1; Control, G2; 5 ml/l, G3; 10 ml/l, G4; 15 ml/l, (d) Briton-Robinson (pH 2.8), G1; Control, G1; 5 ml/l, G2; 10 ml/l, G3; 15 ml/l. G1: \blacklozenge , G2: \blacksquare , G3: \blacktriangle , G4: \bullet .

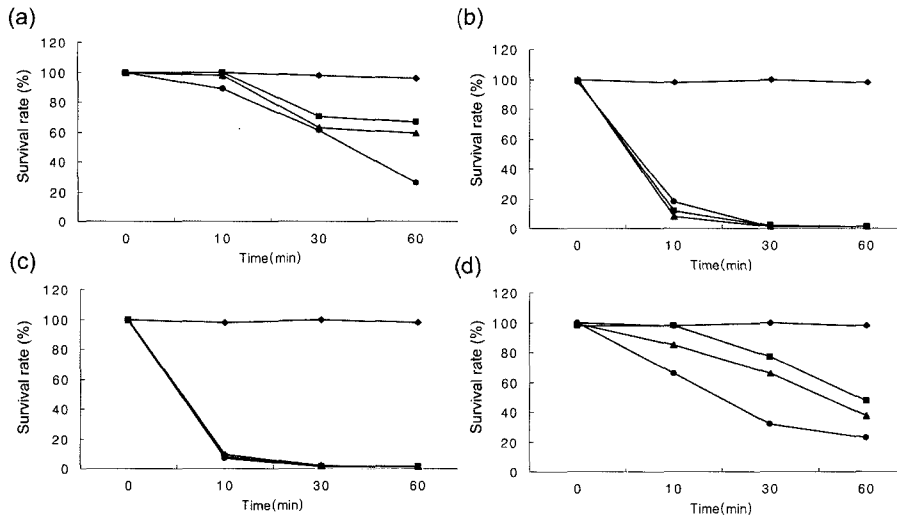


Fig. 2. Algicidal effects of marine rock powder and fungal supernatant on *Prorocentrum minimum*. Algicidal effect was denoted as survival rate(%) by observing the motility of cultured *Prorocentrum minimum*. (a) Marine rock powder, G1; Control, G2; 10 g/l, G3; 20 g/l, G4; 30 g/l, (b) Marine rock powder (MRP) + fungal supernatant, G1; Control, G2; 10 g + 10 ml/l, G3; 20 g + 10 ml/l, G4; 30 g + 10 ml/l, (c) Fungal supernatant, G1; Control, G2; 5 ml/l, G3; 10 ml/l, G4; 15 ml/l, (d) Briton-Robinson (pH 2.8), G1; Control, G1; 5 ml/l, G2; 10 ml/l, G3; 15 ml/l. G1: ◆, G2: ■, G3: ▲, G4: ●.

계없이 살포 10분 경과 후 급속히 감소하여 98% 이상의 제거효율을 나타내었다 (Fig. 2b). 본 연구자에 의해 분리 동정된 곰팡이의 배양 상등액은 2차 대사산물의 영향으로 pH가 2.8로 비교적 강산으로서 이전 녹조류에 대한 구제실험 결과(12, 13, 14)에서와 같이 낮은 pH와 대사산물 중 acid proteinase의 세포벽과 세포막의 용해작용으로 살포 직후 급격하게 운동성을 상실하고 세포가 파괴되는 과정이 연속적으로 진행되는 것으로 관찰되었다. *P. oxalium*(HCLF-34) 배양 상등액을 단독으로 살포한 실험군에서 *H. akashiwo*와 *P. minimum*는 암석분말과 혼합 살포한 결과와 동일하게 살포 10분 경과 후 2가지 편조류 모두 운동성이 상실되었다(Fig. 1c, 2c). 또한 5, 10, 15 ml/l의 농도로 살포한 처리군 모두에서 동일한 결과가 관찰되었으며 소량의 살포에서도 뛰어난 제거효율을 나타내었다. 이러한 결과로 암석분말과 곰팡이 배양 상등액의 제거효율은 배양 상등액의 낮은 pH와 2차 대사산물이 *H. akashiwo*와 *P. minimum*의 운동성 상실과 세포의 파괴에 주동적인 역할을 수행하고 암석분말은 부수적으로 그 영향을 향진시키며 흡착하여 침강시키는 역할을 하는 것으로 추측된다.

P. oxalium(HCLF-34) 배양 상등액의 낮은 pH가 *H. akashiwo*와 *P. minimum*의 운동성과 세포파괴에 미치는 영향을 확인하기 위해 Briton-Robinson (pH 2.8) 완충용액(1)을 제조하여 5 ml/l, 10 ml/l, 15 ml/l의 농도로 살포하였다. 5 ml/l, 10 ml/l 살포군에서 *H. akashiwo*는 살포 10분, 30분, 60분까지 경과 후에도 *H. akashiwo*의 활동성에는 전혀 변화가 일어나지 않았다(Fig. 1d). *P. minimum*는 5, 10 ml/l 살포군에서는 살포 10분 경과 후부터 서서히 작용하여 60분 경과 후에는 약 50%의 제거효율을 나타내었으며, 15 ml/l 살포군에서는 살포 직후부터 서서히 작용하여 30분과 60분 경과 후에는 동등한 수준의 약 75%의 제거효율을

나타내었다(Fig. 2d). 따라서 곰팡이 배양 상등액 처리군에서 나타난 결과는 첨가된 용액의 pH보다는 또 다른 곰팡이의 제 2차 대사산물의 작용으로 추정된다. 본 연구자의 다른 연구(13)에서 비교적 세포벽이 두꺼운 녹조류에서는 pH의 변화만으로 세포의 파괴를 일으키기 어려웠으나, 알칼리성을 갖는 해수에 강산의 용

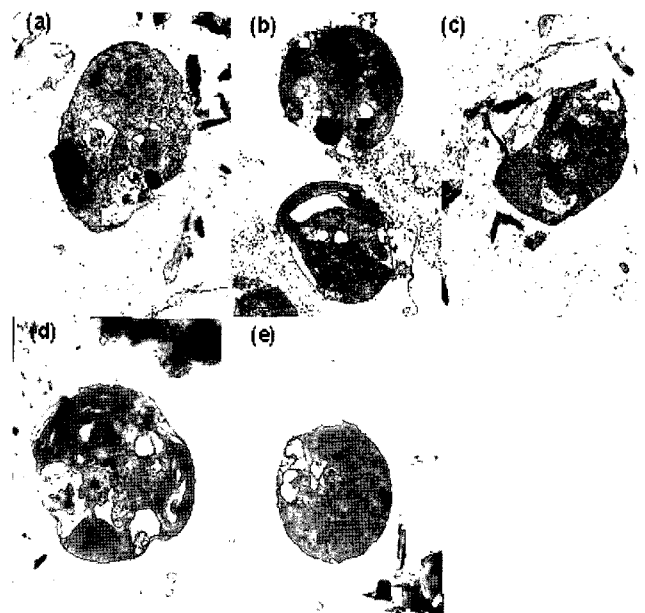


Fig. 3. Transmission electronmicrographs (30kV) of *H. akashiwo* after treatment of marine rock powder and fungal supernatant. (a) Control, (b) Marine rock powder (MRP) 10 g/l, 30min, (c) MRP (10 g/l) + fungal supernatant (10 ml/l), 30min, (d) Fungal supernatant 5 ml/l, 30min, (e) Briton-Robinson (pH 2.8) 5 ml/l, 30min.

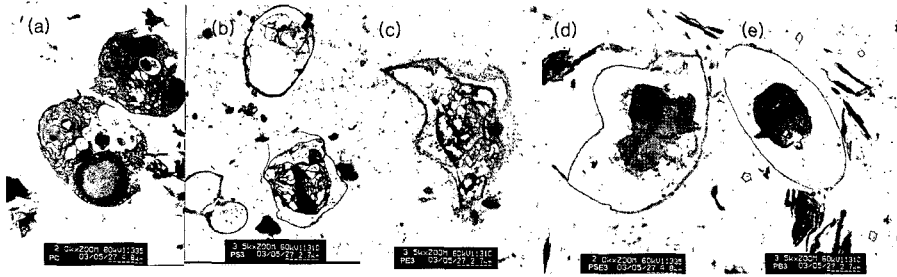


Fig. 4. Transmission electronmicrographs of *Proocentrum minimum* after treatment of marine rock powder and fungal supernatant. (a) Control, (b) Marine rock powder (MRP) 10 g/l, 30min, (c) MRP(10 g/l) + fungal supernatant(10 ml/l), 30min, (d) Fungal supernatant 5 ml/l, 30min, (e) Briton-Robinson (pH 2.8) 5 ml/l, 30min.

액을 첨가할 경우 해수의 pH를 변화시켜 해양 미세조류의 성장 조건 변화로 운동성을 상실하는 것으로 사료된다.

구제효과의 투과전자현미경적 관찰

대조군에서는 세포막, 핵, 소포체, 엽록체를 포함하여 잘 발달된 gas vesicle이 관찰되었다. 실험군에서는 모두 유사하게 세포의 위축, 핵의 변형, gas vesicle의 소실과 여러 개의 공포 또는 거대한 공포의 출현으로 전형적인 세포의 사멸과정이 관찰되었다(Fig. 3, 4). 특히 해양암석 분말 살포군에서 *H. akashiwo*와 *P. minimum*는 핵의 변형과 작은 공포들이 세포질에 출현하였다(Fig. 3b, 4b). 해양암석 분말과 곰팡이 배양 상등액의 혼합 살포군 및 Briton-Robinson (pH 2.8) 완충용액의 살포군에서는 공통적으로 핵의 위축, 세포내 소기관의 소실과 커다란 형태의 공포가 세포질 전체를 차지하고 있었다(Fig. 3c, 3e, 4c, 4e). 곰팡이 배양 상등액을 단독으로 살포한 실험군에서는 핵의 위축, 세포내 소기관의 소실, 작은 공포의 출현과 세포막의 위축을 동반하였다(Fig. 3d, 4d). 이러한 결과로부터 암석분말, 곰팡이 배양 상등액과 Briton-Robinson (pH 2.8) 완충용액이 *H. akashiwo*와 *P. minimum*의 운동성을 상실시키는 시간은 차이가 있으나, 세포괴사를 일으키는 작용은 모두 유사한 것으로 추측된다.

화약약품 살포의 또 다른 연구로 phlorotannin을 150 mg/l 이상 처리한 경우 살포 1시간 내에 *K. mikimotoi*와 *C. polykrikoides*를 약 99% 제거하는 것으로 보고되었으며(10) 2,4-dichlorophenol은 단독 살포에서는 제거효율이 낮고 glutathione 또는 glucose와 혼합 살포할 경우 구조류 제거에 효율적인 것으로 보고되었다(15, 16). 이와 같은 결과들로 미루어 볼 때 본 연구에서 사용한 *P. oxallicum*(HCLF-34)의 배양 상등액은 직접 상등액을 살포하는 방법보다는 2차 대사산물인 acid proteinase를 분리하여 살포하면 소량으로 적조생물의 제거를 극대화 할 수 있는 유용한 물질이 될 것이며, 유전자 변형방법을 이용하여 해양 미생물에 유전자를 삽입하여 이용하는 방법 등 그 활용 가능성이 높은 것으로 사료된다. 따라서 2차적인 해양 오염원으로 작용하게 되는 점토, 황토 및 암석분말의 사용을 줄이고, 곰팡이의 2차 대사산물과 같은 친환경적인 물질을 탐색하고 활용하는 것이 환경오염을 최소화하고 소량으로 적조생물을 효과적으로 구제할 수 있는 방법이라

사료된다.

감사의 글

이 논문은 2005학년도 순천향대학교 학술연구비 지원에 의하여 연구되었음.

참고문헌

1. 안용근. 1994. 효소단백질 정제법. 양서각, 35-53.
2. 최희구, 이필용, 윤성중, 이원찬, 배헌민. 1999. 황토와 점토류에 의한 *Cochlodinium polykrikoides* 적조생물 제거 및 영양염 흡착. 수진보고서, 57, 105-110.
3. Amon, R.M.W. and R. Benner. 1996. Bacterial utilization of different size classes of dissolved organic matter. *Limnol. Oceanogr.* 41, 41-51.
4. Kanavillil, N., H. Obika, T. Shinozaki, T. Ooie, A. Utsumi and T. Yano. 2003. Pulsed laser irradiation impact on two marine diatoms *Skeletonema costatum* and *Chaetoceros gracilis*. *Water Res.* 37, 2311-2316.
5. Kim, D.K., O. Tatsuya, M. Tsuyoshi, K. Daeil, M. Yukihiro and H. Tsuneo. 2002. Possible factors responsible for the toxicity of *Cochlodinium polykrikoides*, a red tide phytoplankton. *Comp. Biochem. Physiol.* 132B, 415-423.
6. Kim, H.G. 1998. Harmful algal blooms in Korean coastal waters focused on three fish-killing dinoflagellates. Proceeding of Korea-China joint symposium on harmful algal blooms. NFRDA 1-20.
7. Kim, H.G. 1987. Management and mitigation technique to diminish damage by red tide. *Proc. Symp. Red Tide Conserv. Coastal Environ.* 11, 5-228.
8. Kim, S.J. 1995. Flocculation of red tide organisms by using acidified oyster shell powder and yellow loess. *Abstract of RCOID*, 94.
9. Lovejoy, C., P.J. Bowman and M.G. Hallegraeff. 1998. Hallegraeff. algicidal effects of a novel marine *Pseudoalteromonas* isolate(Class *Proteobacteria*, gamma Subdivision) on harmful algal bloom species of the genera *Chattonella*, *Gymnodinium* and *Heterosigma*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 2806-2813.
10. Nagayama, K., S. Toshiyuki, F. Ken, H. Tuneo and N. Takashi. 2003. Algicidal effect of phlorotannins from the brown algae *Ecklonia kurome* on red tide microalgae. *Aquaculture* 218, 601-611.
11. Nandakumar, K., O. Hideki, S. Tatsuya, O. Toshihiko, U. Akihiro,

- and Y. Tetsuo. 2003. Pulsed laser irradiation impact on two marine diatoms *Skeletonema costatum* and *Chaetoceros gracilis*. *Water Res.* 37, 2311-2316.
12. Hyun, S.H., and Y.K. Choi. 1998. Lysis of *Anabaena cylindrica* by extracellular enzymes of *Penicillium oxalicum* (HCLF-34). *Korean J. Environ. Biol.* 16, 157-167.
13. Hyun, S.H., and Y.K. Choi. 1999. Characteristics of the cell wall lytic enzyme of *Anabaena cylindrica* from *Penicillium oxalicum* (HCLF-34). *J. Microbiol.* 3, 231-236.
14. Hyun, S.H., H. Lee, and Y.K. Choi. 2000. Isolation, purification and characterization of the lytic enzyme of *Anabaena cylindrica* by *Penicillium oxalicum*(HCLF-34). *J. Microbiol.* 36, 14-19.
15. Yang, S., R.S.S. Wu, and R.Y.V. Kong. 2002a. Biodegradation and enzymatic responses in the marine diatom *Skeletonema costatum* upon exposure to 2,4-dichlorophenol. *Aquat. Toxicol.* 59, 191-200.
16. Yang, S., R.S.S. Rudolf, and R.Y.V. Kong. 2002b. Physiological and cytological responses of the marine diatom *Skeletonema costatum* to 2,4-dichloro-phenol. *Aquat. Toxicol.* 60, 33-41.
17. Zheng, A., C. Min, Z. Xuehong, S. Haiwei, and Z. Lei. 2002. The effect of marine colloids on the growth of photosynthetic bacteria. *Mar. Pollut. Bull.* 45, 290-294.

(Received March 11, 2006/Accepted March 23, 2006)

ABSTRACT : Control Effect of Dinoflagellate Bloom by Powder of Marine Rock and Fungus Culture Supernatant

Sung-Hee Hyun¹ and Hyun-Woung Shin* (¹Department of Natural Science, Eulji University, Daejeon 301-832, Korea, Department of Marine Biotechnology, Soonchunhyang University, Chungnam 336-745, Korea)

To see effect of marine rock powder and fungal culture supernatant, we analyzed the biodegradation rates of harmful marine dinoflagellate, *Heterosigma akashiwo* and *Prorocentrum minimum* for developing the effective control methodology of algal bloom. Relatively low removal rates were observed in the treatment of marine rock powder or buffer solution alone. However, the lysis of *H. akashiwo* and *P. minimum* was enhanced in the combined treatments of marine rock powder with fungal supernatant. The effective concentration and exposure time of fungal supernatant for the lysis of *H. akashiwo* and *P. minimum* were 5 ml/l and 30 minutes, respectively. These results suggest that the fungal supernatant may be a biocontrol agent for the control of algal blooms in seawater.