

왕겨 메탄올 추출물을 이용한 독성 남조 *Microcystis aeruginosa*의 성장 억제

박명환 · 정일민¹ · 김백호 · 황순진*

(건국대학교 환경과학과, ¹응용생명과학과)

Growth Inhibition of Toxic Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*, Using Rice Hull Methanol-extracts. Park, Myung-Hwan, Ill-Min Chung¹, Baik-Ho Kim and Soon-Jin Hwang* (Department of Environmental Science; ¹Department of Applied Life Science, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea)

We examined the effects of crude and eight pure material (β -sitosterol, β -sitosterol- β -D-glucoside, 1-tetratriacontanol, hentriacontane, orizaterpenoid, stigmas-5-en-3 α 26-diacetate, stearic acid, myristic acid), extracted from rice hull, on growth inhibition of toxic cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa* NIER 10010. Strains of *M. aeruginosa* and *Daphnia magna*, obtained from the NIER (Korea) and BBE (Germany), were cultured in the CB medium with hard water. For all four treatment concentrations (1, 10, 100 and 1,000 $\mu\text{g L}^{-1}$) of the crude extract, the cell number of *M. aeruginosa* was reduced by 59~73% during the 7-day test period. Among eight kinds of pure extracts, β -sitosterol- β -D-glucoside, hentriacontane and orizaterpenoid (1,000 $\mu\text{g L}^{-1}$) exhibited relatively higher growth inhibition compared with other pure extracts. The mixture of three pure extracts (β -sitosterol- β -D-glucoside, hentriacontane and orizaterpenoid) showed the highest growth inhibition at 1,000 $\mu\text{g L}^{-1}$. Therefore, the synergistic effect was significantly highlighted by a mixture of the three pure extracts ($p < 0.05$). Under the condition of 1,000 $\mu\text{g L}^{-1}$ in the crude extracts, *D. magna* exhibited survival rate by >85% for 96 hours. In conclusion, the growth inhibition of *M. aeruginosa* was probably attributed to the synergistic effect of various compounds extracted from the rice hull.

Key words : algal inhibition, allelochemicals, *Microcystis aeruginosa*, rice hull, synergistic effect

서 론

지금까지 국내외의 여러 연구자들에 의해 조류 제어를 위한 다양한 연구들이 수행되었는데, 그 중 생물을 이용한 제어 방법은 친환경적이라는 장점으로 인해 이에 대한 연구가 최근까지 활발하게 진행되었다. 생물을 이용한 조류 제어 방법으로서의 살조미생물(Sigee *et al.*, 1999;

Choi *et al.*, 2005; Kang *et al.*, 2005), 수생식물(Nakai *et al.*, 2000), 섭식작용(Uye, 1986; Hwang *et al.*, 2004), 고등식물 등에서 유래하는 타감물질(allelochemicals)의 이용(Rice, 1984; Barrett *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2006) 등이 있었다. 이러한 여러 가지 생물을 이용한 제어방법 중 식물에서 유래한 화합물을 이용한 방법은 유해 조류뿐만 아니라 잡초와 해충에게까지 적용할 수 있는 천연물질로서 연구가 이루어졌으며, 기존의 농약을 대체하고자 생물

* Corresponding author: Tel: 02) 450-3748, Fax: 02) 456-5062, E-mail: sjhwang@konkuk.ac.kr

농약으로서 농업생태에 많이 응용되어 활발한 연구가 진행되었다(Rice, 1984; Chung *et al.*, 2001, 2007; 김, 2005). 생태계 내에서 어떠한 식물로부터 어떤 물질이 방출되어 다른 생물체의 생장에 영향을 주는 물질을 allelochemical이라고 한다(Rice, 1984). 이러한 물질은 대부분 식물이 생산하는 수용성 또는 휘발성의 2차 대사물질로서(Whittaker and Feeny, 1971), 식물체에 따라 그 종류와 양의 차이가 있지만, 육상식물의 경우 식물체의 거의 모든 부분에서 그 존재가 확인되고 있으며, 빗물, 이슬, 또는 안개에 의한 용탈, 휘발, 뿌리의 삼출, 낙엽의 축적 및 분해 등에 의해 환경으로 방출된다(Tukey, 1969). 또한 최근 allelochemical에 관한 연구 대상은 식물만을 한정하지 않고, 다른 여러 생물 상호간 작용으로 그 적용 대상을 확대하고 있다(이, 2000).

최근까지의 조류를 억제하는 화합물(allelochemicals)에 대한 외국의 선행연구들은 보릿짚, 수생식물, 참나무류 등 여러 종류의 식물체들을 대상으로 하였고, 이러한 식물체들의 allelochemicals에는 주로 페놀류 화합물을 보고하였으며(Pillinger *et al.*, 1994; Nakai *et al.*, 2000; Ball *et al.*, 2001), 국내의 선행연구에서는 육상식물과 수생식물, 벗짚 추출물이 남조 *Microcystis aeruginosa*의 생장을 억제하는 데 효과가 있음을 검증하였고, 이러한 식물체들의 allelochemicals 역시 주로 페놀류 화합물임을 보고하였다(임 등, 2002; 박, 2005). 최근 *Microcystis* sp.와 *Scenedesmus* sp. 같은 조류를 제어하는데 보릿짚 추출물(Ball *et al.*, 2001) 및 벗짚 추출물(박, 2005) 등이 보고되었다.

벗짚으로부터 방출되어지는 물질은 다른 식물들의 발아, 성장, 광합성, 호흡 및 물질대사를 제한시키는 천연제초제의 역할을 하며, 이러한 물질은 benzoic acid, ferulic acid, fumaric acid, *p*-coumaric acid, salicylic acid, syringic acid, vanillic acid 등과 같은 페놀류 화합물들이다(Rice, 1984; Inderjit *et al.*, 1995; Chung *et al.*, 2001). 또한 왕겨 추출물 역시 천연제초제로서의 역할을 하는 것으로 보고되었다(노 등, 2001; Chung *et al.*, 2007). 따라서 왕겨에 포함된 화합물들은 벗짚과 마찬가지로 *M. aeruginosa*의 생장을 억제하는 데 효과적일 것으로 예상된다.

우리나라의 주곡작물인 벼는 추수 후에 탈곡과 도정을 통해 벗짚, 왕겨, 쌀겨, 찌라기 등의 부산물이 발생되는데 벗짚은 정조(正租) 중량의 1~1.2배, 왕겨는 약 20%, 쌀겨는 10% 정도가 발생한다(국 등, 2001). 벗짚은 효과적인 조류 성장 억제능을 나타내는 천연재료이고(Park *et al.*, 2006), 벗짚과 함께 발생하는 농업부산물인 왕겨는

Table 1. Chemical compositions of CB medium.

Chemical	Content (mg)	
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	150	
KNO ₃	100	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	40	
β-disodium glycerophosphate	50	
Bicine	500	
Biotin	0.0001	
Vitamin B ₁₂	0.0001	
Thiamine hydrochloride	0.01	
PIV metals solution	3 mL	
	FeCl ₃ · 6H ₂ O	19.6
	MnCl ₂ · 4H ₂ O	3.6
PIV metals (in milligrams per 100 mL)	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	2.2
	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.4
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25
	Disodium EDTA · 2H ₂ O	100

*Total volume, 1 L; pH, 9.0

주변에서 손쉽게 구할 수 있는 풍부한 재료이다. 따라서 본 연구는 유해 남조 *M. aeruginosa*를 대상으로 효과적이고 천연적인 조류 제어용 소재를 탐색하기 위해 왕겨를 조사하였으며, 또한 왕겨 내에 포함된 여러 가지 물질 중 *M. aeruginosa*의 생장 억제에 효과적인 물질을 분석하였다.

재료 및 방법

1. 조류 및 물벼룩의 유지

실험에 이용된 남조 *Microcystis aeruginosa* (NIER 10010) strain은 국립환경과학원에서 분양 받아 사용하였다. 본 strain은 CB 배지(Table 1; Shirai *et al.*, 1989) 내에서 온도 25~28°C, 광도 100 μmol photons m⁻² s⁻¹ (14 h : 10 h LD cycle), 100 rpm 교반 조건에서 배양, 유지되었다. 계대 배양은 매 2주마다 새로운 배지 90 mL에 배양액 10 mL을 첨가하여 실시하였다. 담수산 물벼룩은 국제 표준종인 *Daphnia magna*를 독일 BBE (Biological Biophysical Engineering)사에서 분양 받아 사용하였다. 물벼룩 배양은 20-L 유리수조 내에 미국 EPA에서 제시한 경수(Table 2)를 제조하여 24시간 동안 폭기한 후, 온도 20°C, 광도 30 μmol photons m⁻² s⁻¹ (14 h : 10 h LD cycle) 조건에서 배양, 유지되었다. 물벼룩의 유지 먹이는 *Chlorella vulgaris* ((주)대상, 한국)에서 공급받아 이용하였고, 일주일 간격으로 배양수를 교체하였다.

Table 2. Chemical compositions of hard water (USEPA Water Quality Criterion).

Chemical	Content (mg)
NaHCO ₃	192
CaSO ₄ · 2H ₂ O	120
MgSO ₄	120
KCl	8

*Total volume, 1 L; pH, 7.6~8.0; hardness, 160~180; alkalinity, 110~120

Table 3. Eight pure compounds obtained from rice hull extract.

Code	Compound name
H/6	β-sitosterol
H/23/7	β-sitosterol-β-D-glucoside
H/5	1-tetatriacontanol
H/1	Hentriacontane
H/9	Orizaterpenoid
E/1/Ac	Stigmas-5-en-3α, 26-diacetate
KR/4	Stearic acid
KR/7/2	Myristic acid

2. 왕겨의 메탄올 추출

왕겨는 건국대학교 실습농장에서 재배된 일품벼(*Oryza sativa*)를 수확하여 얻었으며, 이를 다시 실험실에서 실온(25°C) 상태로 7일 동안 건조하여 분쇄기를 이용해 분말화하였다. 왕겨 분말 10 kg은 메탄올 용매 60 L에 침지시켜, 7일 동안 실온에서 용매 추출하였다. 7일 경과 후에는 여과지(Whatman No. 1)를 사용하여 여과하였고, 여과액은 진공증발기(N-1000, EYELA, Japan)를 사용하여 감압 농축시켜 최종적으로 150 g의 메탄올 추출물(crude extract)을 얻었다. 왕겨 추출물은 실험에 사용할 때까지 영하 20°C 상태에서 냉동 보관하였다.

3. 왕겨 메탄올 추출물 내 화합물 분리 및 동정

왕겨에 함유된 화합물을 유기용매가 갖는 극성을 활용하여 분획하기 위하여, 왕겨 메탄올 추출물(crude extract)을 증류수에 분산시켜 에틸아세테이트 용매를 가해 용매 분획하였고, 진공증발기를 이용해 감압 농축하여 에틸아세테이트 분획물을 얻었다. 이러한 분획물은 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 통해 다음과 같이 물질을 분리, 정제하였다. 1차 분획 용출용매는 hexan, 2~5차 용출용매는 hexan: 에틸아세테이트(9:1), 6~11차 분획 용출용매는 hexan: 에틸아세테이트(8:2), 12~15차 분획 용출용매는 hexan: 에틸아세테이트(7:3), 16~20차 분획 용출용매는 hexan: 에틸아세테이트(1:1), 21~22차 분획 용출용매는 에틸아세테이트, 23~28차 분획 용출용매는 에틸아세테이트: 메탄올(9.5:0.5), 29~32차 분획 용출용매는 에틸아세테이트: 메탄올(9:1), 33~34차 분획 용출용매는 에틸아세테이트: 메탄올(7:3), 35~40차 분획 용출용매는 메탄올을 사용해 물질을 용출시켜 분리, 정제하였다(Table 3). 수 차례의 과정을 반복하여 정제한 물질은 spectroscopic methods를 사용하여 구조동정을 하였다(Chung et al., 2007).

4. 왕겨 추출물 첨가에 따른 조류 및 물벼룩의 생장 변화

4. 왕겨 추출물 첨가에 따른 조류 및 물벼룩의 생장 변화

남조 *M. aeruginosa*에 대한 왕겨 추출물의 생장 억제 효과를 평가하기 위해 남조류가 빈번하게 발생하는 부영양화 수계인 일감호를 선정하여, 이곳에서 채수한 시료를 GF/C 유리섬유 여과지로 여과하여 배지로 사용하였다. 250 mL 삼각플라스크에 배양용 여과수 150 mL을 넣고, 각각의 삼각플라스크에는 이미 배양하여 대수기에 도달한 남조 *M. aeruginosa*를 약 1×10^6 cells mL⁻¹의 밀도가 되도록 접종하고, 처리구에는 왕겨 메탄올 추출물(crude extract)을 1, 10, 100, 1,000 μg L⁻¹의 농도로 각각 첨가하였다. 왕겨 메탄올 추출물에서 분리, 동정한 8가지 화합물(β-sitosterol, β-sitosterol-β-D-glucoside, 1-tetatriacontanol, hentriacontane, orizaterpenoid, stigmas-5-en-3α 26-diacetate, stearic acid, myristic acid)은 약 1×10^6 cells mL⁻¹의 밀도가 되도록 접종한 삼각플라스크에 1,000 μg L⁻¹의 농도로 첨가하여 생장 억제 효과를 조사하였다. 그리고 8가지 화합물 중 높은 생장 억제 효과를 나타낸 3가지의 화합물(β-sitosterol-β-D-glucoside, hentriacontane, orizaterpenoid)을 선택하여 1,000 μg L⁻¹의 농도에서 이들 화합물의 혼합 첨가에 따른 상승효과를 조사하였다. 조류배양 시료는 온도 25°C, 광도 100 μmol photons m⁻² s⁻¹ (14 h : 10 h LD cycle)의 조건에서 100 rpm으로 7~10일간 배양하였다. 배양기간 동안 시료를 분취하여 Lugol 용액으로 고정한 다음, 각각의 세포 수를 400배 이하의 광학현미경(Axioplan, Zeiss, Germany)에서 hemacytometer(Fuchs-Rosenthal, Paul Marienfeld GmbH & Co., Lauda-Königshofen, Germany)로 계수하였다. 또한 왕겨 메탄올 추출물(crude extract) 첨가에 따른 물벼룩(*D. magna*)의 생장 변화를 조사하기 위해 팔당호에서 채수한 시료를 GF/C 유리섬유 여과지로 여과하여 100 mL을 비이커(200 mL)에 담은 후, 대수기에 도달한 10개체의 *D. magna*를 각각의 여과수에 접종하였다. 이후 물벼

록에는 왕겨 메탄올 추출물을 $1,000 \mu\text{g L}^{-1}$ 의 농도로 첨가하여, 온도 20°C , 광도 $30 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (14 h : 10 h LD cycle) 조건에서 유지되었고, 24시간 간격으로 96 시간 동안 현존량 변화를 조사하였다.

5. 자료분석

조류의 성장 억제율은 Chung *et al.* (2001)의 공식을 변형하여 아래와 같이 계산하였다.

$$\text{성장 억제율 (\%)} = \frac{(\text{대조구} - \text{처리구})}{\text{대조구}} \times 100$$

그리고 각 실험구간 유의차 검정은 분산분석(ANOVA)에 의하여 $p\text{-value} < 0.05$ 의 유의수준으로 나타났다(SPSS, Inc., 2003).

결과 및 고찰

1. 추출물 첨가에 따른 남조

Microcystis aeruginosa 성장 변화

다양한 농도(1, 10, 100, $1,000 \mu\text{g L}^{-1}$)의 왕겨 메탄올 추출물(crude extract)을 유해 남조 *Microcystis aeruginosa*에 처리한 결과, 왕겨 추출물은 모든 농도에서 *M. aeruginosa*의 성장 억제에 효과적이었다. 총 7일간 배양하는 동안 대조구는 급격히 증가하는 성장 양상을 나타냈으나, 처리구에서는 완만하게 증가하는 성장 양상을 나타냈다(Fig. 1). 배양 3일 후 대조구의 세포수는 약 $10 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$ 로서 접종농도($1 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$)보다 약 10배 이상 성장했으나, 처리구의 세포수는 약 $5.5 \times 10^6 \sim 6.7 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$ 로서 접종농도보다 약 6배 이상 성장했다. 이후 대조구는 지속적인 성장을 통해 배양 7일 후에는 약 $16 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$ 의 세포수가 관찰된 반면에, 처리구의 경우에는 배양 3일 째의 세포수가 배양 7일 후까지 비슷하게 유지되며 약 $4.3 \times 10^6 \sim 6.5 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$ 의 세포수가 관찰되었다. 배양 7일 후 왕겨 메탄올 추출물의 농도에 따른 처리효과는 1, 10, 100, $1,000 \mu\text{g L}^{-1}$ 의 첨가농도에 비례하여 각각 약 59, 64, 69, 73%의 성장 억제를 나타냈다.

지금까지 국내외에서 연구된 여러 가지 결과들을 살펴보면, 보릿짚, 참나무, 소나무, 수생식물 등 수 많은 식물체를 이용하여 *M. aeruginosa*를 비롯한 몇몇 조류들의 성장을 억제한 사례가 보고되었다(Pillinger *et al.*, 1994; Barrett *et al.*, 1996; Ridge *et al.*, 1999; Nakai *et al.*, 2000; Ball *et al.*, 2001; 임 등, 2002; 박, 2005; Kim *et al.*, 2006).

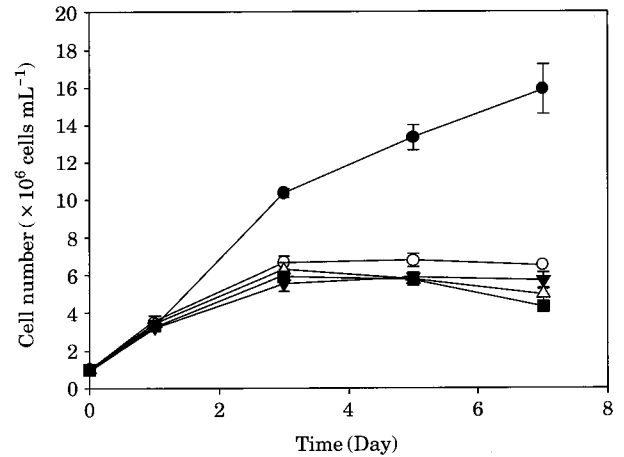


Fig. 1. Effects of crude extract (RHE) on the growth of *Microcystis aeruginosa* under the various concentrations. Data indicate the averages with SE (bars) of triplicate experiments (●, control; ○, $1 \mu\text{g L}^{-1}$; ▼, $10 \mu\text{g L}^{-1}$; △, $100 \mu\text{g L}^{-1}$; ■, $1,000 \mu\text{g L}^{-1}$).

본 연구에서 이용한 왕겨 추출물은 남조 *M. aeruginosa*의 성장 억제에 효과적이었다고, 모든 처리농도에서 *M. aeruginosa*의 세포수가 대조구와 비교하여 유의한 차이로 감소했으며, 이러한 결과는 이전에 벗짚 추출물을 이용하여 $10 \mu\text{g L}^{-1}$ 의 저농도에서도 *M. aeruginosa* (UTEX 2388 strain)를 성장 억제한 Park *et al.* (2006)의 결과와도 유사하였다. 육상 및 수생식물체에서 나오는 성장 억제 물질로서 페놀류 화합물이 주로 알려져 있으며, 이러한 것들에는 benzoic acid, ellagic acid, ferulic acid, gallic acid, pyrogallol, salicylic acid, syringic acid, tannic acid, vanillic acid 등 많은 물질이 보고되었다(Rice, 1984; Inderjit *et al.*, 1995; Nakai *et al.*, 2000; Chung *et al.*, 2001). 그러나 일반적으로 자연계로 방출되는 이러한 물질들의 농도는 실험실 조건에서 조류의 성장을 감소시킨다고 보고된 농도보다도 낮은 농도이다(Dedonder and Van Sumere, 1971; Newman and Barrett, 1993; Ridge and Pillinger, 1996). 따라서 식물체에서 유래하는 성장 억제 화합물들을 추출 후 농축하여 조류제어에 적용하는 것이 좀더 효과적일 것으로 판단된다.

왕겨 메탄올 추출물에서 분리, 정제한 8가지 화합물(β -sitosterol, β -sitosterol- β -D-glucoside, 1-tetratriacontanol, hentriacontane, orizaterpenoid, stigmas-5-en-3 α 26-diacetate, stearic acid, myristic acid)을 남조 *M. aeruginosa*에 $1,000 \mu\text{g L}^{-1}$ 의 농도로 처리하여 10일 동안 배양하였다. 실험 결과, 8가지 화합물 중 3가지의 화합물 β -sitosterol- β -D-glucoside, hentriacontane, orizaterpenoid는

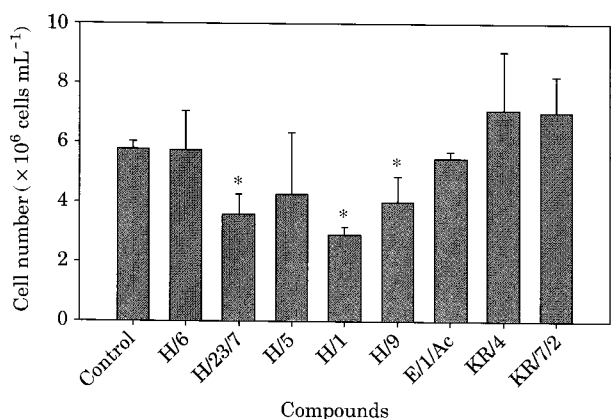


Fig. 2. Effects of eight pure compounds on the growth of *Microcystis aeruginosa* at 1,000 $\mu\text{g L}^{-1}$. An asterisk indicates significantly lower than the control at $p < 0.05$. Data indicate the averages with SE (bars) of triplicate experiments. Compound names are given in Table 3.

*M. aeruginosa*에 대해서 각각 38, 50, 31%의 생장 억제 효과를 보이며 유의한 차이를 나타냈다($p < 0.05$) (Fig. 2). 그러나 β -sitosterol, 1-tetratriacontanol, stigmatas-5-en-3 α 26-diacetate의 경우에는 낮은 생장 억제 효과를 보이며 유의한 차이를 나타내지 않았고, stearic acid와 myristic acid의 경우에는 오히려 *M. aeruginosa*의 생장이 촉진되는 양상을 나타냈다.

또한, *M. aeruginosa*에 대해서 유의한 생장 억제 효과를 나타낸 3가지의 화합물(β -sitosterol- β -D-glucoside, hentriacontane, orizaterpenoid)을 각각 조합하여 *M. aeruginosa*에 1,000 $\mu\text{g L}^{-1}$ 의 농도로 처리하여 10일 동안 배양하였다. 실험 결과, 단독 처리구에서는 6~18%, 두 가지 혼합 처리구에서는 6~22%의 생장 억제 효과를 보였으나, 이들 처리구간에 유의한 차이는 나타나지 않았다(Fig. 3). 그러나, 세 가지 혼합 처리구에서는 37%의 생장 억제 효과를 보이며 다른 처리구(단독 및 두 가지 혼합 처리구)들과 유의한 차이를 나타냈다($p < 0.05$). 또한 분리, 정제한 8가지 화합물 등 많은 화합물이 포함된 왕겨 메탄올 추출물(crude extract)을 첨가한 처리구에서 61%의 가장 높은 생장 억제 효과가 관찰되었다. 따라서 여러 가지 화합물의 혼합 처리는 생장 억제에 대한 상승 효과를 나타내는 것으로 판명되었다. 이러한 결과를 토대로, β -sitosterol- β -D-glucoside, hentriacontane, orizaterpenoid 등의 화합물을 포함하여 왕겨 메탄올 추출물(crude extract) 내의 다른 화합물들이 남조 *M. aeruginosa*의 생장 억제에 관여할 것으로 생각된다.

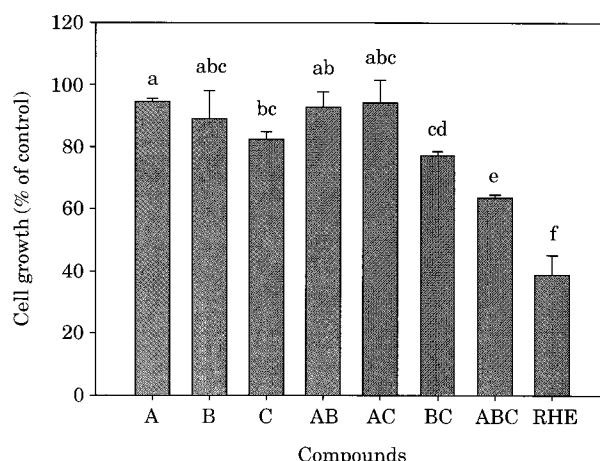


Fig. 3. Effects of three pure compounds and crude extract on the growth of *Microcystis aeruginosa* at 1,000 $\mu\text{g L}^{-1}$. Lowercase letters indicate significant differences at $p < 0.05$. Data indicate the averages with SE (bars) of triplicate experiments. A, H/23/7; B, H/1; C, H/9; RHE, crude extract.

Chung *et al.* (2007)의 연구에 따르면, *M. aeruginosa* (UTEX 2388 strain)의 생장을 억제하는 3가지 화합물을 왕겨 추출물에서 분리하였다. 이들이 보고한 3가지 화합물(14-methyl stigmast-9(11)-en-3 α -ol-3 β -D-glucopyranoside, cholest-11-en-3 β 6 β 7 α 22 β -tetraol-24-one-3 β -palmitoleate, momilactone A)과 본 연구에서 생장 억제 효과를 나타낸 3가지 화합물(β -sitosterol- β -D-glucoside, hentriacontane, orizaterpenoid) 등을 서로 혼합하여 처리를 했을 때, 남조 *M. aeruginosa*에 대한 생장 억제는 왕겨 메탄올 추출물(crude extract)의 처리에 근접한 억제 효과를 나타낼 것으로 추측된다. Rice *et al.* (1980)은 벵짚에서 추출된 5가지 화합물(ferulic, *p*-hydroxybenzoic, *p*-coumaric, *o*-hydroxyphenylacetic, vanillic acid)을 이용하여 남조 *Anabaena cylindrica*의 대한 생장 억제 효과를 보고하였다. 이들 화합물들 중 4가지는 *A. cylindrica*의 생장을 억제하였으며, 특히 5가지의 화합물들의 혼합은 *A. cylindrica*의 생장을 억제하는데 매우 효과적이었다. 이러한 연구 결과를 바탕으로, 조류의 생장 억제 효과를 나타내는 화합물들은 서로 혼합하여 작용하는 조건에서 상승효과를 나타내어 조류 제어에 더욱 효과적일 것으로 여겨진다. 또한 왕겨 메탄올 추출물(crude extract)이 1,000 $\mu\text{g L}^{-1}$ 의 농도보다 낮은 1~100 $\mu\text{g L}^{-1}$ 의 농도에서도 *M. aeruginosa*를 생장 억제한 결과와 Einhellig (1995)가 보고한 내용에 근거하여, 이들 화합물 가운데 어느 한 물질에 의한 억제 효과보다는 이들이 혼합됨에

따라 적은 농도로도 효과적인 억제력을 발휘할 수 있을 것으로 사료된다.

자연계에서 식물체로부터 방출되는 여러 가지 화합물들은 자신들의 성장을 자극하기도 하지만, 이러한 화합물들이 다른 생물들의 성장을 억제하거나 촉진하기도 한다 (Ebana *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2006). 본 연구결과에서 왕겨에 포함된 각각 다른 화합물들을 첨가함에 따라 *M. aeruginosa*의 성장반응은 억제와 촉진이 병행하여 나타났다으며, 몇몇 화합물들의 혼합처리에 따른 상승작용이 관찰되었다. 이전의 연구사례에서도 본 연구에서와 같이 식물체 (이식물수세미: ellagic acid, gallic acid, pyrogallol acid, (+)-catechin; 벗짚: benzoic acid, ferulic acid, fumaric acid, *p*-coumaric acid, salicylic acid, syringic acid, vanillic acid)에서 나오는 서로 다른 화합물들이 조류의 성장을 억제하거나 촉진하였고, 몇몇 화합물들의 혼합에 따른 상승효과를 나타낸 결과가 보고되었다 (Nakai *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2006). 또한 식물체 (둥글레)로부터의 L-2-azetidinecarboxylic acid가 약 0.1~10 μM 농도에서 여러 가지 조류의 성장에 대해 각기 다른 선택적인 반응을 나타낼 수 있음을 시사하였다 (Kim *et al.*, 2006). 이러한 식물체들로부터의 화합물에 의한 작용은 생태계에서 생물학적 제어의 역할을 할 수 있을 것이며, 또한 그들의 성장을 위한 생존전략의 일환으로 여겨진다.

2. 추출물 첨가에 따른 물벼룩의 성장 변화

왕겨 메탄올 추출물 (crude extract)을 1,000 $\mu\text{g L}^{-1}$ 의 농도로 물벼룩 (*Daphnia magna*)에 처리하여 물벼룩의

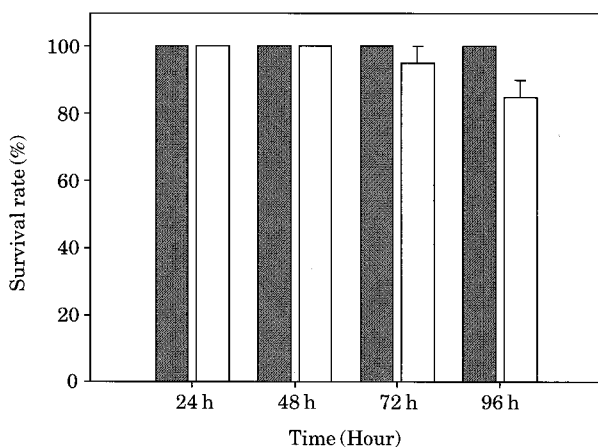


Fig. 4. The survival rate of *Daphnia magna* in crude extract (RHE) at 1,000 $\mu\text{g L}^{-1}$. Data indicate the averages with SE (bars) of duplicate experiments (■, control; □, RHE).

생존률 변화를 조사하였다. 실험 결과, 물벼룩은 24, 48시간 이후까지 100%, 72시간 이후까지 95%, 96시간 이후까지 85%의 높은 생존율을 보였다 (Fig. 4). 왕겨 메탄올 추출물 첨가가 물벼룩의 성장과 유영에 큰 영향을 주지 않은 것은 이러한 추출물에 의한 생태 독성이 거의 없음을 시사한다. 임 등 (2002)에 의한 식물체를 이용하는 조류 억제 효과 실험 중, 식물체 (애기마름, 잣잎, 솔잎, 은행잎)를 투여하여 96시간 동안 물벼룩 (*D. magna*)에 대한 생태 독성 시험을 한 결과, 조류 억제 효과를 나타낸 1g L^{-1} 농도에서 4가지 식물체 각각 물벼룩이 96시간 동안 100% 생존하였다. 이러한 선행 연구 결과와 본 연구 결과를 바탕으로 왕겨를 비롯한 식물체 추출물은 조류를 제어하는 농도에서는 다른 생물에게 생태적 영향이 크지 않을 것으로 사료된다.

대부분의 식물체는 여러 가지 화합물을 다량으로 함유하고 있는데, 이 물질이 얼마나 생산되고, 자연계 내에서 얼마 동안 잔류하는가에 대한 행적은 생태계 내의 독성 발현과 밀접한 관계가 있다. 만약 식물체에 함유한 화합물이 분해되지 않고 계속 축적되게 된다면 자연계는 독성물질로 가득 차게 될 것이다. 그러나 이들 물질은 자연계 내의 미생물 등에 의하여 쉽게 분해되는 것으로 알려져 있다 (Gary *et al.*, 1983; 김과 신, 2004). 또한, 조류 성장 억제를 위해 짚을 사용하였을 때 환경에 대한 영향이 없었고, 오히려 무척추동물의 개체수가 증가하여 물고기의 성장에 도움을 주었다는 보고 (Street, 1979)에 따라 왕겨 추출물의 생태 독성은 거의 없을 것으로 판단되지만, 좀더 세밀한 생태독성의 영향을 조사해 보아야 할 것으로 생각된다.

결론적으로, β -sitosterol- β -D-glucoside, hentriacontane, orizaterpenoid를 포함하는 왕겨 추출물은 유해 남조 *Microcystis aeruginosa*의 성장 억제에 효과적인 천연물질로 사료되며, 억제 활성은 추출물에 포함된 여러 가지 화합물들이 서로 복합적으로 작용하여 상승효과를 나타내는 것으로 추측된다. 또한 물벼룩 *Daphnia magna*의 생존에 별다른 영향을 미치지 않은 결과를 토대로 왕겨 추출물을 현장에 적용할 시에는 조류를 제외한 다른 수중생물에 대한 독성이 높지 않을 것으로 판단되며, 차후에는 왕겨 추출물의 유해 조류에 대한 선택적 제어 가능성에 대한 조사가 필요할 것으로 생각된다.

적 요

본 연구는 왕겨의 메탄올 추출물이 유해 남조 *Micro-*

cystis aeruginosa 생장에 미치는 영향 및 현장적용 가능성을 조사하였다. 실험에 사용한 왕겨 추출물은 미정제 추출물과 이를 다시 분획하여 분리, 정제한 후 얻은 β -sitosterol, β -sitosterol- β -D-glucoside, 1-tetratriacontanol, hentriacontane, orizaterpenoid, stigmas-5-en-3 α 26-diacetate, stearic acid, myristic acid 등 8가지의 순수화합물로서, 이들 추출물을 남조 세포에 처리하여 생장 변화를 조사하였다. 연구에 사용된 조류는 국립환경과학원에서 분양 받은 *M. aeruginosa* (NIER 10010)이고, 물벼룩은 독일 BBE사에서 분양 받은 *Daphnia magna*로서, 이들은 각각 CB배지와 경수를 이용하여 배양·유지되었다. 왕겨 메탄올 추출물을 1, 10, 100, 1,000 $\mu\text{g L}^{-1}$ 의 농도로 처리하여 조류 배양조건과 동일한 조건에서 일정시간 배양하였다. 실험결과, 왕겨 메탄올 추출물은 모든 처리구에서 7일 후 59~73%의 높은 생장 억제 효과를 나타내며 *M. aeruginosa*의 생장을 억제하였다. 한편, 8가지 물질을 *M. aeruginosa*에 1,000 $\mu\text{g L}^{-1}$ 농도로 처리한 실험에서는 3가지 물질(β -sitosterol- β -D-glucoside, hentriacontane, orizaterpenoid)에서 생장 억제 효과를 보였다. 또한 *M. aeruginosa*에 이들 3가지 물질을 조합하여 실험한 결과, 이들 3가지를 혼합한 처리구에서 생장 억제에 대한 유의한 상승효과를 나타냈다($p < 0.05$). 왕겨 메탄올 추출물의 현장적용 가능성을 파악하고자 1,000 $\mu\text{g L}^{-1}$ 의 추출물 농도에 물벼룩을 처리하여 실험한 결과, 96시간 후에 85%의 높은 생존율을 보였다. 결론적으로, 왕겨 추출물은 *M. aeruginosa*의 생장 억제에 효과적인 천연물질로서 조류 제어에 상승작용이 나타났으며, 현장 적용시 수중생물에 대한 독성은 높지 않을 것으로 판단되었다.

사 사

이 논문은 2006년 교육인적자원부의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (KRF-2006-351-D00026).

인 용 문 헌

국용인, 신지산, 권오도, 구자욱. 2001. 쌀겨 추출물에 의한 잡초발아 및 초기생장 억제 효과. 한국환경농학회지 **20**: 108-111.
 김길용, 신동현. 2004. Allelopathy 관련물질 증대를 위한 유전자 발현 조절. 한국잡초학회지 **24**: 1-6.
 김중범. 2005. 식물유래 2차 대사물질의 병충해 및 잡초 방제

효과. 한국응용생명화학회지 **48**: 1-15.
 노영덕, 백남인, 이민호. 2001. 왕겨로부터 천연제초활성물질의 분리, 동정. 한국잡초학회지 **21**: 49-57.
 박명환. 2005. 담수산 유해조류의 발생기작 및 조류 제어에 관한 연구. 한양대학교 대학원 박사학위논문. p. 194.
 이춘우. 2000. 일본의 allelopathy에 관한 최신 연구동향. 한국잡초학회지 **20**: 60-66.
 임병진, 김상훈, 전선우. 2002. 식물체를 이용한 조류억제 현장 적용성 실험. 육수지 **35**: 123-132.
 Ball, A.S., M. Williams, D. Vincent and J. Robinson. 2001. Algal growth control by a barley extract. *Biores. Technol.* **77**: 177-181.
 Barrett, P.R.F., J.C. Curnow and J.W. Littlejohn. 1996. The control of diatom and cyanobacterial blooms in reservoirs using barley straw. *Hydrobiologia* **340**: 307-311.
 Choi, H.J., B.H. Kim, J.D. Kim and M.S. Han. 2005. *Streptomyces neyagawaensis* as a control for the hazardous biomass of *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria) in eutrophic freshwaters. *Biol. Control* **33**: 335-343.
 Chung, I.M., J.K. Ahn and S.J. Yun. 2001. Assessment of allelopathic potential of barnyard grass (*Echinochloa Crus-galli*) on rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Crop Protection* **20**: 921-928.
 Chung, I.M., M. Ali, A. Ahmad, S.C. Chun, J.T. Kim, S. Sultana, J.S. Kim, S.K. Min and B.R. Seo. 2007. Steroidal constituents of rice (*Oryza sativa*) hulls with algicidal and herbicidal activity against blue-green algae and duckweed. *Phytochem. Anal.* **18**: 133-145.
 Dedonder, A. and C.F. Van Sumere. 1971. The effect of phenolics and related compounds on the growth and respiration of *Chlorella vulgaris*. *Z. Pflanzenphysiol.* **65**: 70-80.
 Ebana, K., W. Yan, R.H. Dilday, H. Namai and K. Okuno. 2001. Variation in the allelopathic effect of rice with water soluble extracts. *Agron. J.* **93**: 12-16.
 Einhellig, F.A. 1995. Allelopathy: current status and future goal. In Inderjit, Dakshini, K.M.M. and Einhellig, F.A. eds, Allelopathy: Organisms, Processes, and Applications. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 1-24.
 Gary, F.L., R.L. Crawford and T.K. Kirk. 1983. Degradation of phenolic compounds and ring cleavage of catechol by *Phanerochate chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**: 191-197.
 Hwang, S.J., H.S. Kim, J.K. Shin, J.M. Oh and D.S. Kong. 2004. Grazing effects of a freshwater bivalve (*Corbicula leana* PRIME) and large zooplankton on phytoplankton communities in two Korean lakes. *Hydrobiologia* **515**: 161-179.

- Inderjit, K.M.M. Dakshini and F.A. Einhellig. 1995. Allelopathy: Organisms, Processes, and Applications. ACS Symposium Series 582, American Chemical Society. Washington, DC.
- Kang, Y.H., J.D. Kim, B.H. Kim, D.S. Kong and M.S. Han. 2005. Isolation and characterization of a bio-agent antagonistic to diatom, *Stephanodiscus hantzschii*. *J. Appl. Microbiol.* **98**: 1030-1038.
- Kim, J.S., J.C. Kim, S. Lee, B.H. Lee and K.Y. Cho. 2006. Biological activity of L-2-azetidinecarboxylic acid, isolated from *Polygonatum odoratum* var. *pluriflorum*, against several algae. *Aquat. Bot.* **85**: 1-6.
- Nakai, S., Y. Inoue, M. Hosomi and A. Murakami. 2000. *Myriophyllum spicatum*-released allelopathic polyphenols inhibiting growth of blue-green algae *Microcystis aeruginosa*. *Wat. Res.* **34**: 3026-3032.
- Newman, J.R. and P.R.F. Barrett. 1993. Control of *Microcystis aeruginosa* by decomposing barley straw. *J. Aquat. Plant Manage.* **31**: 203-206.
- Park, M.H., M.S. Han, C.Y. Ahn, H.S. Kim, B.D. Yoon and H.M. Oh. 2006. Growth inhibition of bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* by rice straw extract. *Lett. Appl. Microbiol.* **43**: 307-312.
- Pillinger, J.M., J.A. Cooper and I. Ridge. 1994. Role of phenolic compounds in the antialgal activity of barley straw. *J. Chem. Ecol.* **20**: 1557-1569.
- Rice, E.L. 1984. Allelopathy. 2nd ed. Academic Press, Inc. Orlando, Florida.
- Rice, E.L., C.Y. Lin and C.Y. Huang. 1980. Effects of decay-ing rice straw on growth and nitrogen fixation of a bluegreen alga. *Bot. Bull. Acad. Sin.* **21**: 111-117.
- Ridge, I. and J.M. Pillinger. 1996. Towards understanding the nature of algal inhibitors from barley straw. *Hydrobiologia* **340**: 301-305.
- Ridge, I., J. Walters and M. Street. 1999. Algal growth control by terrestrial leaf litter: a realistic tool? *Hydrobiologia* **395/396**: 173-180.
- Shirai, M., K. Matumaru, A. Ohtake, Y. Takamura, T. Aida and M. Nakano. 1989. Development of a solid medium for growth and isolation of axenic *Microcystis* strains (cyanobacteria). *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 2569-2571.
- Sigeo, D.C., R. Glenn, M.J. Andrews, E.G. Bellinger, R.D. Butler, H.A.S. Epton and R.D. Hendry. 1999. Biological control of cyanobacteria: principles and possibilities. *Hydrobiologia* **395/396**: 161-172.
- Street, M. 1979. The importance of invertebrates and straw. *Game Conservancy Ann. Rew.* **11**: 34-38.
- Tukey, H.B., Jr. 1969. Implications of allelopathy in agricultural plant science. *Bot. Rev.* **35**: 1-16.
- Uye, A. 1986. Impact of copepod grazing on the red-tide flagellate *Chatonella antique*. *Mar. Biol.* **92**: 35-43.
- Whittaker, R.H. and P.P. Feeny. 1971. Allelochemicals: Chemical reactions between species. *Science* **171**: 757-770.

(Manuscript received 31 December 2007,
Revision accepted 4 February 2008)