

## 여러 가지 은나노 물질의 유해 남조 *Microcystis aeruginosa* 생장억제

박명환 · 김건희 · 이혁희<sup>1</sup> · 김진석<sup>2</sup> · 황순진\*

(건국대학교 환경과학과, <sup>1</sup>한국화학연구원 환경에너지센터,  
<sup>2</sup>한국화학연구원 신화학연구단)

Growth Inhibition of Toxic Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* by Various SNPs (Silver Nanoparticles). Park, Myung-Hwan, Keun-Hee Kim, Huk-Hee Lee<sup>1</sup>, Jin-Seog Kim<sup>2</sup> and Soon-Jin Hwang\* (Department of Environmental Science, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea; <sup>1</sup>Environment and Energy Research Center, Korea Research Institute of Chemical Technology (KRICT), Daejeon 305-600, Korea; <sup>2</sup>Advanced Chemical Technology Division, Korea Research Institute of Chemical Technology (KRICT), Daejeon 305-600, Korea)

The effect of various SNPs (silver nanoparticles) on the growth of *Microcystis aeruginosa* was investigated in laboratory and field experiment. Four SNPs, namely JS47N, JS47N-K2, JS47N/3-1 and JS47N/3-2 were used to this study. The Ag size, concentration and color of these solutions were about 20~40 nm, 200 mg L<sup>-1</sup> and brown, respectively. At 0.01 and 0.1 mg L<sup>-1</sup>, SNPs inhibited the growth of unicellular *M. aeruginosa* by 99.4% and 99.9%, respectively. However, SNPs of 1 mg L<sup>-1</sup> inhibited the growth of colonial *M. aeruginosa* by 98.5%, whereas the other three concentrations (0.001, 0.01 and 0.1 mg L<sup>-1</sup>) had little inhibitory effect. In experimental enclosures from eutrophic lake, cyanobacteria including *M. aeruginosa* were found to be more sensitive to the SNPs than green algae and diatoms. In conclusion, our study indicates that SNPs has a selective cyanocidal potential when used to *M. aeruginosa*. We believe that future studies need to test on various other organisms, and determine minimum concentration for field application.

**Key words :** cyanobacteria, selective algal control, SNPs (silver nanoparticles), unicellular and colonial *Microcystis aeruginosa*

### 서 론

우리나라 여러 수계에서 문제가 되고 있는 남조 대발생은 *Microcystis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Oscillatoria* 등이 주요한 원인생물이다. 더욱이, 이들의 대발생은 음용수의 이취미 발생 및 간독소나 신경독소의 생성으로 이어지고, 이에 따른 수중 내 다른 수생생물인 동, 식물플

랑크톤, 원생동물, 어류 (Penaloza *et al.*, 1990; DeMott *et al.*, 1991; Reinikainen *et al.*, 1994; Gross, 2003), 심지어 야생동물이나 가축 폐사 등에 치명적인 해를 주고, 사람의 건강까지 위협할 수 있다 (Kiviranta *et al.*, 1991; Shirai *et al.*, 1991).

따라서 지금까지 남조류를 비롯한 유해조류를 제어하기 위해 다양한 분야에서 수 많은 연구가 진행되었다 (박, 2005). 또한 조류제어에 이용된 염소나 황산동과 같은 유

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

해 화학물질보다 환경과 인체에 대한 해가 매우 적은 살조제 개발에 대한 관심이 더욱 증가되고 있다. 이러한 관점에서 *bionanotechnology*는 나노물질을 생물과의 접목을 통해 환경친화적인 기술로서 더욱 발전시키기 위해 새롭게 부각되었다 (Rai *et al.*, 2009). 나노물질은 1~100 nm 크기의 미립자로서, 나노기술은 이러한 크기의 물질을 새로이 제조하여 여러 과학기술분야에 응용함으로써 빠르게 성장하며 주목을 받고 있다 (Albrecht *et al.*, 2006). 나노물질에 이용되는 금속물질로는 금, 은, 구리, 아연, 마그네슘, 티타늄 등을 포함해 다양한 형태가 있는데, 그 중 은나노물질은 박테리아, 바이러스 및 다른 진핵미생물에 대한 항균작용이 가장 효과적인 것으로 알려져 있다 (Gong *et al.*, 2007; Rai *et al.*, 2009).

은 (silver)이 인체에 유해한 다른 금속과는 달리 인체에 대한 부작용이 거의 없어 여러 가지 식기나 수저 등 생활용품에 널리 사용되어 왔고, 뛰어난 살균작용으로 인해 이미 기원전 10세기 전부터 은으로 만든 용기에 물을 보관하여 음용수로 이용해 왔을 뿐만 아니라, 유럽과 여러 개발도상국에서도 음용수 처리를 위한 살균제로서 이용된 바 있다 (Butkus *et al.*, 2003). 또한 은이온이나 은화합물은 *Microcystis*를 포함한 조류에 대해서 살조능이 있으며, 구리, 니켈, 아연 등 다른 금속보다 낮은 농도에서도 살조능이 좋은 것으로 보고되었다 (Adamson and Sommerfeld, 1980; Kaplan *et al.*, 1998; Scragg and Bonnett, 2002; Lee *et al.*, 2005). 게다가 은나노물질, 은이온, 은콜로이드를 첨가하여 질화미생물의 생장억제에 대해서 각각 살펴본 결과, 은나노물질이 가장 좋은 효과를 나타낸 보고 (Choi *et al.*, 2008)를 통해 여러 형태의 은 화합물 중 은나노물질이 좀더 좋은 살조능을 가질 것으로 기대된다. 따라서 본 연구에서는 조류생장에 대한 은나노물질의 영향을 조사하기 위해 실내 실험 및 현장 enclosure 실험을 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 남조 *Microcystis aeruginosa* 배양

실험에 이용된 남조 중 unicellular strain은 미국 Texas 대학교의 *Microcystis aeruginosa* (UTEX 2388)를 사용하였으며, colonial strain은 건국대학교 일감호에서 분리한 *M. aeruginosa*를 사용하였다. 이들 strain들은 Allen 배지 (Allen, 1968) 내에서 온도 23°C, 광도 100  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (14 h : 10 h LD cycle), 100 rpm 교반 조건에

서 배양, 유지되었다. 계대 배양은 매 2주마다 새로운 배지 90 mL에 배양액 10 mL을 첨가하여 실시하였다.

## 2. SNPs (silver nanoparticles)의 제조

본 연구에 있어서 SNPs 제조는 기본적으로 수용성 silver nitrate 용액에 NaBH<sub>4</sub>, Tannic acid, TEMED의 환원제를 공급하여 환원반응을 통해 nano size의 수분산성 은 금속을 제조하였다. 각 종류별 제조방법은 다음과 같다.

### 1) JS47N 제조

500 mL 비이커에 증류수를 약 400 mL 공급한 후 AgNO<sub>3</sub> 0.1575 g을 측정하여 완전 용해시키고, stirring하면서 첨가된 AgNO<sub>3</sub>의 화학양론에 해당하는 양보다 과잉의 tannic acid 용액을 천천히 공급하여 AgNO<sub>3</sub>를 완전히 환원시켰다. 이 용액을 500 mL의 volumetric flask에 옮긴 후 상하로 격렬히 진탕하여 200 mg L<sup>-1</sup>의 SNPs 용액을 제조하였다.

### 2) JS47N-K2 제조

500 mL 비이커에 증류수를 약 400 mL 공급한 후 polyvinylpyrrolidone 0.25 g을 측정하여 완전 용해시키고, 분산제로서 Tween 20을 0.25 g 첨가하고, 은나노의 출발물질로 AgNO<sub>3</sub> 0.1575 g을 측정한 후 완전 용해시켰다. 아울러 SNPs를 제조하기 위한 환원제로 sodium borohydride (NaBH<sub>4</sub>) 0.078 g을 증류수 50 mL에 용해하고 이 용액을 stirring하면서 AgNO<sub>3</sub>가 포함된 수용액에 천천히 공급하여 AgNO<sub>3</sub>를 완전히 환원시켰다. 이 용액을 500 mL의 volumetric flask에 옮긴 후 상하로 격렬히 진탕하여 sodium borohydride에 의한 200 mg L<sup>-1</sup>의 SNPs 용액을 제조하였다.

### 3) JS47N/3-1 제조

500 mL 비이커에 증류수를 약 400 mL 공급한 후 AgNO<sub>3</sub> 0.1575 g을 측정하여 완전 용해시키고, stirring하면서 첨가된 AgNO<sub>3</sub>의 화학양론에 해당하는 양보다 과잉의 tannic acid 용액을 천천히 공급하여 AgNO<sub>3</sub>를 완전히 환원시켰다. 곧바로 1/10으로 희석된 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>의 용액을 천천히 적가하여 pH를 6.5로 맞추고, 이 용액을 500 mL의 volumetric flask에 옮긴 후 상하로 격렬히 진탕하여 200 mg L<sup>-1</sup>의 SNPs 용액을 제조하였다.

### 4) JS47N/3-2 제조

500 mL 비이커에 증류수를 약 400 mL 공급한 후 분산제인 Tween 20을 2.5 g 측정하여 혼합하고, AgNO<sub>3</sub> 0.1575 g을 측정하여 완전 용해시켰다. 별도로 환원제인 N,N,N',N'-

Tetramethylethylenediamine (TEMED) 0.3 mL를 5 mL의 증류수로 희석 혼합한 환원용액을 제조하고, AgNO<sub>3</sub>가 포함된 수용액에 천천히 적가하면서 90°C의 온도에서 1시간 동안 가열하여 출발물질인 AgNO<sub>3</sub>를 완전히 환원시켰다. 가열된 은나노 수용액을 대기 중에 방치하여 냉각을 시키고, 500 mL의 volumetric flask에 옮긴 후 상하로 격렬히 진탕하여 200 mg L<sup>-1</sup>의 SNPs 용액을 제조하였다.

**3. SNPs의 남조 *M. aeruginosa* 생장억제-실내실험**

남조 *M. aeruginosa*에 대한 SNPs의 생장억제 효과를 평가하기 위해 남조류가 빈번하게 발생하는 부영양화 수계인 건국대학교 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* (unicellular strain)를 약 0.6 × 10<sup>6</sup> cells mL<sup>-1</sup>의 밀도가 되도록 접종하고, 처리구에는 SNPs (JS47N)용액을 0.01, 0.1 mg L<sup>-1</sup>의 농도로 각각 첨가하여 생장억제 효과를 조사하였다. 또한, 일감호에서 채수하여 GF/C 유리섬유 여과지로 여과한 배양수 150 mL을 삼각플라스크(250 mL)에 넣고, 각각의 삼각플라스크에 대수기에 도달한 남조 *M. aeruginosa* (colonial strain)를 약 0.6 × 10<sup>6</sup> cells mL<sup>-1</sup>의 밀도가 되도록 접종하고, 처리구에는 SNPs (JS47N)를 0.001, 0.01, 0.1, 1 mg L<sup>-1</sup>의 농도로 각각 첨가하여 unicellular strain과의 생장억제 효과를 비교, 조사하였다. 그리고 여러 가지 농도 중 colonial strain에 가장 높은 생장억제 효과를 나타낸 1 mg L<sup>-1</sup>의 농도에서 두 가지 SNPs 용액 (JS47N, JS47N-K2)의 생장억제 효과와 시간 경과에 따른 생장억제의 지속 효과를 각각 비교, 조사하였다. 조류배양 시료는 온도 23°C, 광도 100 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (14 h : 10 h LD cycle)의 조건에서 100 rpm으로 7~8일간 배양하였다. 배양기간 동안 시료를 분취하여 Lugol 용액으로 고정된 다음, 각각의 세포 수를 200배 하의 광학현미경 (Axioplan, Zeiss, Germany)에서 hemacytometer (Fuchs-Rosenthal, Paul Marienfeld GmbH & Co., Lauda-Königshofen, Germany)로 계수하였다.

**4. SNPs의 남조 *M. aeruginosa* 생장억제-현장실험**

남조 *M. aeruginosa*가 빈번하게 발생하는 부영양화 수계인 건국대학교 일감호에 enclosure를 설치한 후, 2007년 9월 12일부터 22일까지 10일 동안 SNPs의 조류 억

제 효과를 조사하였다. 본 실험에서는 세 가지 SNPs 용액 (JS47N, JS47N/3-1, JS47N/3-2)을 2 mg L<sup>-1</sup>의 농도로 첨가하여 남조 *M. aeruginosa*를 비롯하여 수중에 존재하는 여러 조류에 대해서 이들 세 가지 SNPs 용액의 생장억제 효과를 비교하여, 현장적용 가능성을 평가하고자 하였다. 현장에 설치한 enclosure는 150 L (깊이 : 0.7 m, 직경 : 0.6 m) 규모의 불투명한 원통형 플라스틱 수조로 제작된 것을 사용했으며, 모든 실험구는 2반복으로 하였다.

**5. 물리, 화학 및 생물학적 요인 분석**

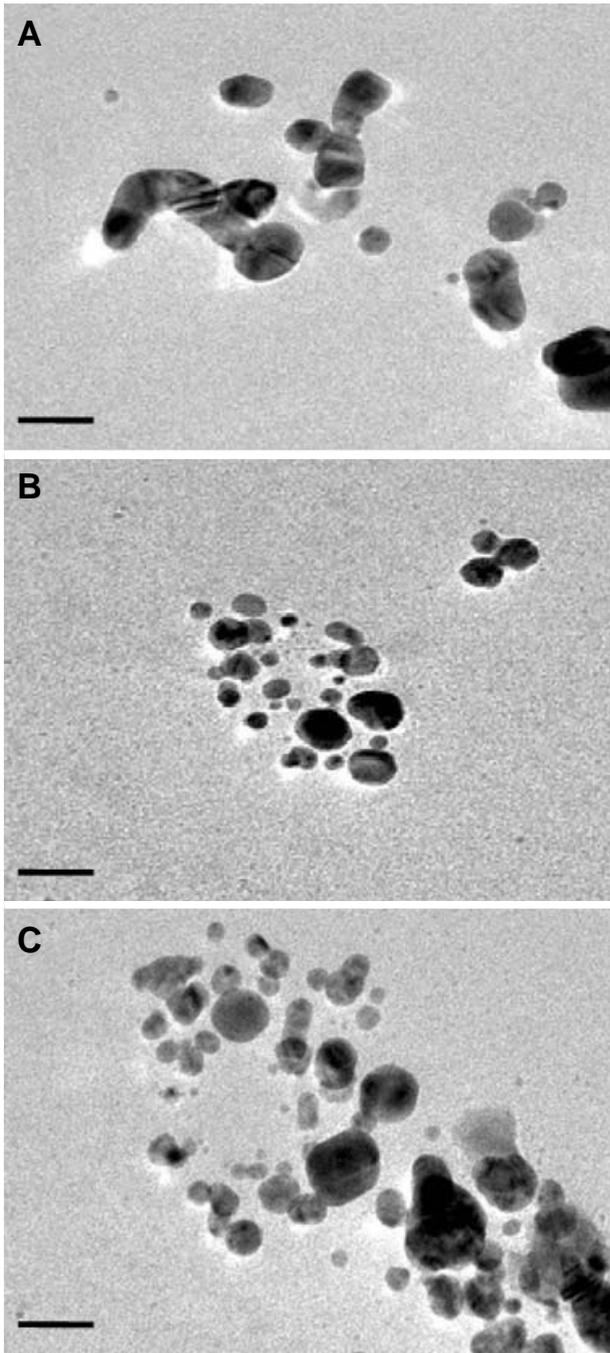
현장 enclosure 실험기간 동안 조류발생에 큰 영향을 미치는 기온, 일조시간, 강수량 등의 기상자료는 기상청 홈페이지로부터 파일 ([http://www.kma.go.kr/sfc/pdf/sfc\\_mon\\_200709.pdf](http://www.kma.go.kr/sfc/pdf/sfc_mon_200709.pdf))을 내려 받아 이용하였다. 수온 (WT), 용존산소 (DO), pH, 전기전도도 (EC) 등은 2~3일 간격으로 YSI (6920 MDS, USA)를 사용하여 직접 측정하였다. 총질소 (TN)와 총인 (TP)은 표층에서 약 20 cm 아래의 물을 채수한 즉시 실험실로 운반한 후 Standard methods (APHA, 1995)에 따라 분석하였다. 엽록소-a (Chl-a) 농도는 GF/F filter를 이용하여 여과한 시료에 90% 아세톤을 첨가하여 냉암소에서 24시간 추출한 후 흡광도를 측정하였으며, Lorenzen법 (1967)에 따라 계산하였다. 현장의 조류시료는 100 mL을 플라스틱용기에 담아 Lugol용액으로 고정하여 운반하였고, 실험실에서 균일하게 혼합시킨 후 Sedgwick-Rafter counting chamber를 이용하여 광학현미경 (Axiostar plus, ZEISS, Germany)하에서 계수하였다. 또한 조류의 생장억제 효율 (%)은 다음과 같이 계산되었다.

$$\text{Growth inhibition efficiency (\%)} = \frac{[(\text{control} - \text{treatment}) / \text{control}] \times 100}{}$$

**결과 및 고찰**

**1. SNPs 제조결과**

본 연구의 제조방법에 의해 제조된 SNPs 용액은 모두 갈색을 띠고 있어 나노화 되었음을 알 수 있었으며, 투과전자현미경 (TEM, TECNAI-G2, FEI Co.)으로 입자크기를 분석한 결과, JS47N은 대체적으로 입자들이 서로 엉키어 큰 입자를 이루고 있어 평균 40 nm의 크기를 나타내었고, 다른 SNPs 용액 (JS47N-K2, JS47N/3-1, JS47N/3-2)은 여러 크기의 입자가 관찰되기는 하였으나 평균 20 nm 내외 크기의 입자가 비교적 골고루 존재하는 특성

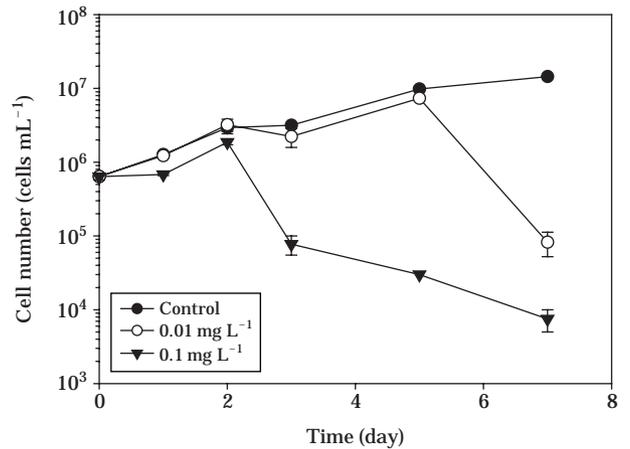


**Fig. 1.** TEM image of SNPs (silver nanoparticles) used in this work. Scale bars are 30 nm. A, JS47/N; B, JS47N-K2; C, JS47N/3-1.

을 나타내었다 (Fig. 1).

## 2. SNPs의 남조 *M. aeruginosa* 성장억제-실내실험

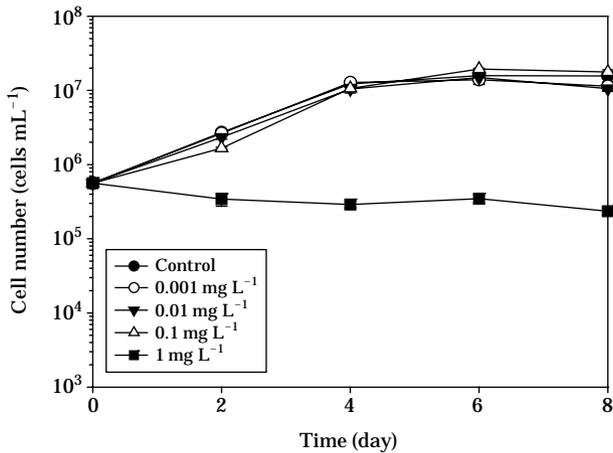
남조 *M. aeruginosa* (unicellular strain)에 SNPs (JS47N)



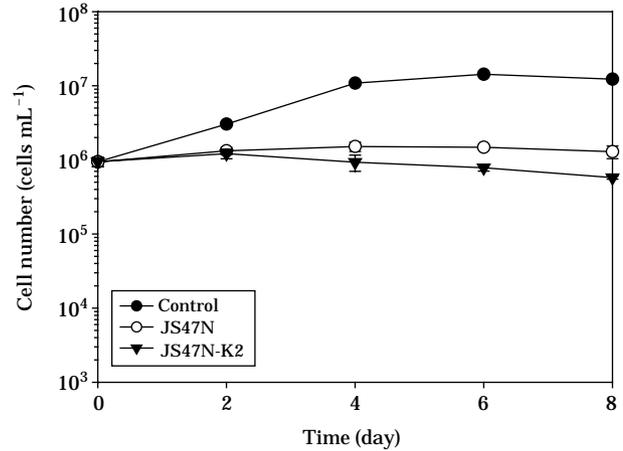
**Fig. 2.** Effects of SNPs (JS47/N) on the growth of unicellular *Microcystis aeruginosa* at concentrations of 0.01 and 0.1 mg L<sup>-1</sup>. Data are the averages with SE (bars) of triplicate experiments.

용액을 0.01, 0.1 mg L<sup>-1</sup>의 농도로 각각 첨가하여 성장억제 효과를 조사한 결과, SNPs 용액은 실험 7일 후 모든 농도에서 unicellular *M. aeruginosa*의 성장억제에 효과적이었다 (Fig. 2). 대조구는 실험 7일 후에  $14.4 \times 10^6$  cells mL<sup>-1</sup>의 세포수를 보이며 배양기간 동안 약 23배 이상 지속적으로 증가하는 성장 양상을 나타냈다. SNPs (JS47N) 용액을 0.01 mg L<sup>-1</sup>의 농도로 첨가한 처리구에서는 실험 5일까지 대조구와 비슷한 성장 양상을 나타냈으나, 실험 7일에는  $8.3 \times 10^4$  cells mL<sup>-1</sup>로서 세포수가 급격히 감소하는 양상을 나타냈다. 또한 0.1 mg L<sup>-1</sup>의 농도로 첨가한 처리구에서는 실험 2일까지 대조구와 비슷하게 증가하는 성장 양상을 나타냈으나, 실험 3일에는  $7.8 \times 10^4$  cells mL<sup>-1</sup>로서 세포수가 급격히 감소한 후, 실험 7일에는  $7.5 \times 10^3$  cells mL<sup>-1</sup>의 세포수를 나타냈다. 배양 7일 후 SNPs (JS47N) 용액의 처리효과는 첨가 농도 0.01, 0.1 mg L<sup>-1</sup> 각각 약 99.4, 99.9%의 성장억제 효과를 나타냈다.

남조 *M. aeruginosa* (colonial strain)에 여러 가지 농도 (0.001, 0.01, 0.1, 1 mg L<sup>-1</sup>)의 SNPs (JS47N) 용액을 처리한 결과, SNPs 용액을 1 mg L<sup>-1</sup>로 첨가한 농도에서 98.5%의 성장억제를 보이며 colonial *M. aeruginosa*의 성장억제에 효과적이었다 (Fig. 3). 총 8일간 배양을 하는 동안 대조구는 실험 8일 후에  $15.7 \times 10^6$  cells mL<sup>-1</sup>의 세포수를 보이며 약 27배 이상 지속적으로 증가하는 성장 양상을 나타냈다. SNPs (JS47N) 용액을 0.001, 0.01, 0.1 mg L<sup>-1</sup>의 농도로 첨가한 처리구는 실험 8일까지 대조구와 비슷하게 세포수가 증가하는 성장 양상을 나타냄에



**Fig. 3.** Effects of SNPs (JS47/N) on the growth of colonial *Microcystis aeruginosa* at concentrations of 0.001, 0.01, 0.1 and 1 mg L<sup>-1</sup>. Data are the averages with SE (bars) of triplicate experiments.



**Fig. 4.** Comparison of algicidal activity of two SNPs (JS47/N and JS47N-K2) on colonial *Microcystis aeruginosa* at concentrations of 1 mg L<sup>-1</sup>. Data are the averages with SE (bars) of triplicate experiments.

따라 0.1 mg L<sup>-1</sup> 이하의 처리 농도에서는 unicellular *M. aeruginosa*와 달리 colonial *M. aeruginosa*의 성장억제에 대한 효과가 거의 없는 것으로 나타났다. 또한 SNPs (JS47N) 용액 1 mg L<sup>-1</sup> 첨가에서 98.5%의 성장억제를 보였지만, 실험 8일 후 최종 세포 농도 (0.2 × 10<sup>6</sup> cells mL<sup>-1</sup>)가 초기의 colonial *M. aeruginosa* 접종 농도 (0.6 × 10<sup>6</sup> cells mL<sup>-1</sup>)와 비교하여 약 1/3 수준으로 줄어든 양상이 관찰됨에 따라, colonial *M. aeruginosa*는 unicellular *M. aeruginosa*에 비해 SNPs에 대한 내성이 좀더 있는 것으로 조사되었다. 또한 unicellular *M. aeruginosa*에 비해서 colonial *M. aeruginosa*를 억제하는데 0.1 mg L<sup>-1</sup>보다 높은 SNPs 처리농도가 요구되었다.

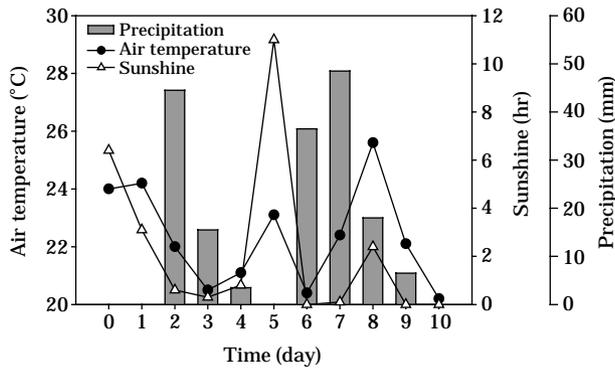
이렇게 colonial *M. aeruginosa*을 성장억제하는데 unicellular *M. aeruginosa*를 억제한 농도 (0.01, 0.1 mg L<sup>-1</sup>)보다 높은 SNPs가 요구된 주요 원인으로, 배양중인 unicellular *M. aeruginosa*의 경우 세포가 각각 독립적으로 떨어져 있지만, colonial *M. aeruginosa*는 세포들이 서로 뭉쳐있기 위한 다당류인 점질층 (mucilage)이 있기 때문이라고 제시되었다 (최 등, 2008). 이러한 점질층을 이용한 생존전략을 통해 단일세포로 외부 물질에 노출되는 것보다 군집 형성에 따른 두꺼운 점질층 막으로 세포를 보호하여 외부 물질에 대한 내성을 갖는다고 본다. 따라서 점질층을 갖고 있는 colonial *M. aeruginosa*가 unicellular *M. aeruginosa*에 비하여 높은 농도 (1 mg L<sup>-1</sup>)의 SNPs가 요구된 것이라고 사료된다. 그러나 세계보건기구 (WHO)의 기준에 따르면 음용수내 최대허용 은농도가 0.1 mg L<sup>-1</sup>로 제시되었고 (WHO, 2004), 또한 미국 환경보

**Table 1.** Comparison of algicidal activity in exposed times at 1 mg L<sup>-1</sup> of two SNPs (JS47N and JS47N-K2) on colonial *Microcystis aeruginosa*.

Days	Growth inhibition efficiency (%)	
	SNPs (JS47N)	SNPs (JS47N-K2)
14	93.47	95.28
21	72.65	72.79
28	75.49	76.52

호청 (EPA)의 2차 음용수 수질기준 (Secondary Drinking Water Standard) 역시 0.1 mg L<sup>-1</sup>로 규정됨에 따라 향후 0.1 mg L<sup>-1</sup> 이하의 농도로서 남조류 제어에 적용하는 방법에 대한 검토가 필요하다.

제조법을 달리한 두 가지 SNPs 용액 (JS47N, JS47N-K2)을 1 mg L<sup>-1</sup>의 농도로 colonial *M. aeruginosa*에 처리하여 성장억제 효과를 비교한 결과, 이들 SNPs 용액 간에는 colonial *M. aeruginosa*에 대한 성장억제에 큰 차이를 나타내지 않았다 (Fig. 4). 또한 이들 용액 (JS47N, JS47N-K2)을 1 mg L<sup>-1</sup>의 농도로 colonial *M. aeruginosa*에 처리하여 시간 경과에 따른 성장억제의 지속효과를 비교한 결과, 14일 후에 약 90% 이상, 21일과 28일 후에 약 70% 이상의 성장억제 효과를 각각 나타냈다 (Table 1). 시간 경과에 따라 처리 21, 28일 후의 억제 효과는 처리 14일 후의 억제 효과와 비교하여 공통적으로 약 20% 정도 감소되었으나, 두 가지 SNPs 용액 간에는 성장억제에 별다른 차이를 나타내지 않았으며, 이들 SNPs 용액은 성장억제에 대한 지속 효과가 1개월 이상 유지될 것으로



**Fig. 5.** Changes of temperature, sunshine duration and precipitation daily the period of enclosure experiment in Lake Il-gam.

판단되었다.

### 3. SNPs의 남조 *M. aeruginosa* 생장억제-현장실험

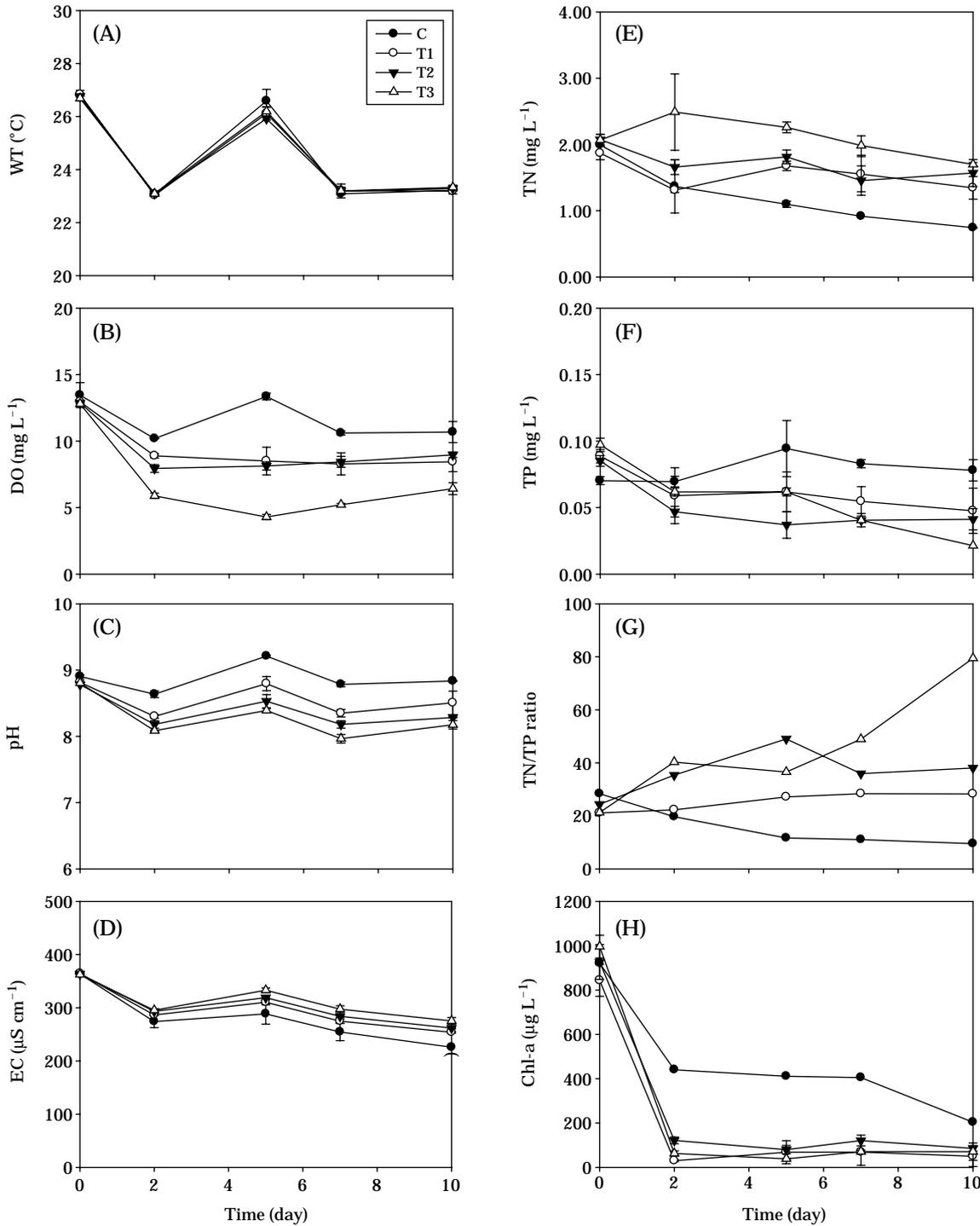
세 가지 SNPs 용액 (JS47N, JS47N/3-1, JS47N/3-2)을 2 mg L<sup>-1</sup>의 농도로 현장 enclosure에 처리하여 여러 환경 요인의 변화 및 출현 조류 양상을 비교, 조사하였다. 조사 기간 중 기온은 약 20.2~25.6°C, 강수량은 약 0~48.5 mm day<sup>-1</sup>, 일조시간은 0~11 hr day<sup>-1</sup>로 나타났으며, 7일 동안의 강수로 인해 비가 내린 날의 일조시간은 2 hr day<sup>-1</sup> 이하로서 매우 적은 편이었다 (Fig. 5). 실험 2, 6, 7 일에는 30 mm 이상, 실험 3, 4, 8, 9일에는 20 mm 이하의 강수량이 각각 기록되었다.

현장 enclosure내 물리, 화학 및 생물학적 요인을 조사한 결과, 기상변화에 따라 수온은 약 23.1~26.8°C로 변화했으나 각 실험구간 차이는 보이지 않았다 (Fig. 6A). 용존산소는 실험 2일 후부터 종료 시까지 대조구 (10.2~13.4 mg L<sup>-1</sup>)와 비교하여 모든 처리구 (4.3~9.0 mg L<sup>-1</sup>)에서 낮게 나타났는데, 처리구 1은 평균 9.4 mg L<sup>-1</sup>, 처리구 2는 평균 9.3 mg L<sup>-1</sup>, 처리구 3은 평균 6.9 mg L<sup>-1</sup>로서 처리구 3 (JS47N/3-2)에서 매우 두드러지게 감소했다 (Fig. 6B). pH 역시 대조구와 비교하여 모든 처리구에서 조금씩 감소했는데, 대조구, 처리구 1, 2, 3의 평균이 각각 8.9, 8.6, 8.4, 8.3으로 나타났다 (Fig. 6C). 처리구에서 용존산소와 pH의 감소는 SNPs의 첨가에 따른 조류생장억제에 의한 광합성 저해와 유기물 분해 때문으로 판단되는데, 물리, 화학, 생물학적인 다양한 조류 제어 방법을 이용하여 소형연못을 포함한 현장 enclosure실험 및 실내 microcosm실험시 처리구내에서 엽록소-a 농도 감소(조류 밀도 감소)와 아울러 용존산소와 pH의 감소가 국내외 선행연

구에서도 확인되었다 (Tucker *et al.*, 1983; 김 등, 2000; 박 등, 2001; Ahn *et al.*, 2003; Kaya *et al.*, 2005; 김 등, 2008). 전기전도도는 초기 364  $\mu\text{S cm}^{-1}$ 에서 실험 10일 후 대조구와 모든 처리구에서 226~276  $\mu\text{S cm}^{-1}$ 로 나타났으며, 대조구, 처리구 1, 2, 3이 각각 평균 281, 298, 304, 313  $\mu\text{S cm}^{-1}$ 로서 처리구에서 좀더 높은 전기전도도 값이 측정되었으나 그 차이는 크지 않았다 (Fig. 6D). 또한 SNPs의 첨가에 따른 전기전도도가 원수 및 음용수 허용치인 500  $\mu\text{S cm}^{-1}$  (DeZuane, 1997)의 범위 이내로서, SNPs에 의한 전기전도도의 급격한 상승은 거의 없을 것으로 사료된다.

총질소 농도를 보면, 대조구, 처리구 1, 2, 3이 각각 평균 1.2, 1.6, 1.7, 2.1 mg L<sup>-1</sup>로서 대조구보다 모든 처리구에서 높게 나타났으나, 실험 10일 후 각 처리구 간의 총질소 농도의 차이 (1.4~1.7 mg L<sup>-1</sup>)는 크지 않은 것으로 관찰되었다 (Fig. 6E). 또한 모든 실험구는 시간이 지날수록 총질소 농도가 감소하였는데, 특히 모든 처리구의 총질소 농도 감소는 대조구의 총질소 농도 감소보다 좀더 완만하게 진행되었으며, 이러한 현상은 SNPs의 제조시 함께 첨가된 질소성분 (AgNO<sub>3</sub>) 때문에 나타난 것으로 판단된다. 이에 비해 총인 농도는 모든 처리구에서 시간 경과에 따라 약간 감소하였으나, 대조구는 0, 2, 5, 7, 10일에 각각 0.07, 0.07, 0.09, 0.08, 0.08 mg L<sup>-1</sup>을 기록하며 중반 이후 실험 10일까지는 약간 증가하였다 (Fig. 6F). 그러나 총질소 농도의 경우와는 달리 SNPs의 첨가로 인해 처리구의 총인 농도가 대조구와 비교하여 상대적으로 높게 나타나지 않았다. TN/TP비는 처리구의 높은 총질소 농도 때문에 대조구와 비교하여 모든 처리구에서 높게 나타났는데, 대조구는 9~28, 처리구 1은 21~28, 처리구 2는 24~49, 처리구 3은 21~79로 각각 조사되었다 (Fig. 6G). 각 실험구별 평균 TN/TP비는 대조구, 처리구 1, 2, 3에서 각각 16, 25, 37, 45로서 대조구와 처리구 1을 제외한 처리구 2와 3에서 30 이상의 TN/TP비를 나타냈다. 일반적으로 증가하는 인 농도와 30 이하의 TN/TP비는 남조류가 잘 성장할 수 있는 주요 원인이 되는데, 처리구 2와 처리구 3에서 30 이상의 TN/TP비는 남조류 생장억제를 유도하는 하나의 요인이 될 수 있음을 시사한다 (Smith, 1983; Xie *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2007).

조류 생물량의 지표로 이용되는 엽록소-a 농도는 실험 시작시의 농도 (844~996  $\mu\text{g L}^{-1}$ )가 초기 2일째 기상조건의 영향 때문에 모든 실험구에서 엽록소-a 농도가 급격히 감소되었지만, 대조구 (440  $\mu\text{g L}^{-1}$ )와 비교한 처리구 (30~122  $\mu\text{g L}^{-1}$ )의 엽록소-a 농도가 약 1/14~1/4 수준으로 조사됨으로써 SNPs 첨가에 따른 조류 억제가 나타났



**Fig. 6.** Changes of WT (A), DO (B), pH (C), EC (D), TN (E), TP (F), TN/TP ratio (G) and Chl-a (H) daily the period of enclosure experiment in Lake Il-gam. Data are the averages with SE (bars) of duplicate experiments. WT, water temperature; DO, dissolved oxygen; EC, electronic conductivity; TN, total nitrogen; TP, total phosphorus; Chl-a, Chlorophyll-a.

다(Fig. 6H). 이후에는 각 처리구 간에 큰 차이가 없이 실험 종료시까지 엽록소-a 농도가 비교적 비슷하게 유지

되었다(5일, 39~80 μg L<sup>-1</sup>; 7일, 69~121 μg L<sup>-1</sup>; 10일, 58~75 μg L<sup>-1</sup>). 실험 10일 후 대조구와 각 처리구의 엽록

**Table 2.** Relative abundance of major phytoplankton groups in four enclosures after ten days.

Phytoplankton groups	Ratio of major phytoplankton groups (%)			
	C	T1	T2	T3
Cyanobacteria	79.9	17.2	6.1	29.8
Diatoms	13.9	55.9	13.6	27.0
Green algae	6.2	26.9	80.3	43.2

\*C, Control; T1, JS47N; T2, JS47N/3-1; T3, JS47N/3-2

소-a 농도 비교를 통한 조류의 성장억제 효율은 처리구 1, 2, 3 각각 75.4, 58.1, 65.2%로 나타났다. 이러한 억제 효과는 *Microcystis* 대발생 시기의 현장에서 채수한 scum 층 시료 (엽록소-a 농도, 1,500~1,900  $\mu\text{g L}^{-1}$ )에 은이온 수용액을 1 mg  $\text{L}^{-1}$ 와 3 mg  $\text{L}^{-1}$ 로 처리하여 각각 63, 64%의 조류 억제를 나타낸 최 등 (2008)의 결과와도 유사하였다. 최 등 (2008)은 남조류 대발생시 이를 제어하기 위한 은이온 농도는 1 mg  $\text{L}^{-1}$  이상이 필요할 것으로 예상했으며, 온도의 증가에 따라 은이온에 대한 *M. aeruginosa*의 내성이 증가함을 보고했다. 따라서 현장에서 SNPs를 이용한 조류 제어는 세계보건기구 (WHO)가 제시한 0.1 mg  $\text{L}^{-1}$  이하의 농도에서 처리하고자 할 때 수화발생 이전의 낮은 수온에서의 SNPs 처리가 보다 효과적인 제어를 나타낼 것으로 생각된다. 이러한 수화발생 이전 남조류의 초기 성장억제를 통해서 효과적인 제어를 하고자 한다면, 향후 처리시기 조절에 따른 SNPs의 조류제어 효과에 대한 조사가 필요하고, 또한 수화발생시 제어에 요구되는 1 mg  $\text{L}^{-1}$  이상의 SNPs 처리량을 낮출 수 있는 다각적인 방법에 대해서 좀더 조사해볼 필요성이 있다.

실험 10일 후 각 실험구의 엽록소-a 농도와 총조류 세포수는 거의 비슷한 양상을 나타냈으나, 조류의 분류군별 세포수 조성비 중 남조류가 차지하는 비율은 대조구보다 모든 처리구에서 현저히 감소한 양상을 보였고, 처리구별로 가장 우점한 분류군은 규조류 (처리구 1)와 녹조류 (처리구 2, 3)로 조사됨으로써 남조류에 대한 SNPs의 선택적 제어가 나타났다 (Table 2). 각 실험구의 주요 우점종으로서 남조류는 *Anabaena* sp., *Microcystis aeruginosa*, 규조류는 *Asterionella formosa*, *Aulacoseira italica*, *Fragillaria crotonensis*, *Synedra* spp., 녹조류는 *Ankistrodesmus* sp., *Pediastrum simplex*, *Scenedesmus quadricauda*, *Staurastrum* sp.이었다. 대조구에서 *M. aeruginosa*는 남조류의 대부분 (95% 이상)을 차지하였고, 대조구와 비교하여 SNPs 처리구는 남조에 대한 선택적 제어 특히, *M. aeruginosa*에 대한 억제가 매우 우수하였다. 이러한 현상

은 본 연구진이 실시한 실내 microcosm 실험을 통해서 SNPs가 녹조류 (*A. convolutes*, *S. quadricauda*)보다는 남조 *M. aeruginosa*에 좀더 강력한 성장억제를 나타내는 것을 확인하였다 (미발표 자료). 이전에도 은이 포함된 수영장용 살조제 Algaedyn을 수영장에 자주 출현하는 몇몇 조류에 노출시켜 살조능을 확인한 결과에서도 황록조류나 녹조류보다 남조류에 대한 활성이 더 크다고 보고한바 있다 (Adamson and Sommerfeld, 1980). 최근에 보고된 최 등 (2008)의 결과에 따르면, 남조 *M. aeruginosa*와 녹조 *Chlorella* sp.에 은이온 수용액을 처리했을 때 남조 *M. aeruginosa*가 은이온에 좀더 민감하게 반응한 것을 확인했으며, 녹조류보다 남조류가 은이온에 대하여 민감하게 반응을 한 것에 대해서 세포질 내에 chromosomal DNA가 노출되어 있는 남조류의 경우 은이온과 DNA가 쉽게 결합할 수 있기 때문이라고 제안하였다.

이러한 결과를 통해서 SNPs는 *M. aeruginosa*에 대해서 선택적 제어능이 있는 것으로 생각된다. 또한 현장 enclosure 실험에서 보여진 SNPs의 선택적 제어는 대표적 금속 살조제인 구리화합물을 소규모 연못에 처리했을 때, 대조구와 비교하여 처리구내의 남조류가 녹조류와 규조류에 비해 현저히 감소되었으며, 특히 처리구내에서 규조류보다는 녹조류가 더욱 우점한 결과와도 상당히 유사하였다 (Schrader, 2000). 흥미롭게도 몇몇 살조제를 이용한 남조류의 선택적 제어는 수중의 용존산소 및 pH의 감소와 연관 지어 생각해볼 수 있다. Tucker et al. (1983)은 제초제 simazine을 연못에 살포 후 처리구의 생물량 감소와 함께 용존산소와 pH의 감소가 보였고, 이에 따른 이산화탄소의 증가를 확인했다. 용존산소와 이산화탄소 농도 변화는 simazine의 첨가에 의해 조류를 포함한 수중식물이 사멸을 함에 따라 죽은 유기물이 분해되는 과정과 함께 발생된다. 이러한 이산화탄소 증가는 pH 감소와 밀접한 관련이 있다. 남조류 생장에 최적조건으로서의 pH 범위는 8.5~9.5라고 알려져 있는데, 대략 pH 9에서는  $\text{CO}_2$  형태보다  $\text{HCO}_3^-$  형태가 많아지며, pH가 감소할수록  $\text{CO}_2$  형태가 많아진다 (Eloff and Van der Westhuizen, 1981). 남조류는  $\text{HCO}_3^-$  형태를 선택적으로 이용함에 비해서 녹조류나 수생식물은 그렇지 못하고, 또한 여러 조류와 수생식물의 생장에는  $\text{CO}_2$ 가 풍부한 조건이 유리함에 비해서 남조류 생장에는 불리한 조건으로 작용한다 (Kaya et al., 2005). 따라서 본 연구에서의 SNPs는 이러한 여러 가지 화학적 조건들 (30 이상의 TN/TP비, 용존산소의 감소, pH의 감소) 및 은이온과 남조류 chromosomal DNA의 결합에 따른 성장억제 기작과 관련되어 녹조류와 규조류보다 남조류에 좀더 선택적인 살조능을 나타낸

것으로 판단된다. 향후에 구리 등을 포함한 다른 금속에 비해 수중 생태계에 대한 영향이 좀더 적을 것으로 생각되는 은을 이용한 살조제는 최소한의 투여농도(0.1 mg Ag L<sup>-1</sup> 이하)를 비롯해서 제조 및 투입방법을 더욱 개선하고, 투여시기(남조류 대발생 이전)를 잘 조절할 수 있다면 이를 이용하여 유해 남조류의 선택적 제어에 효과적으로 적용할 수 있을 것으로 판단된다. 이상의 연구 결과를 토대로 현재의 SNPs에 대한 보완사항과 개선점은 실내 실험과 더욱 큰 규모의 현장실험에서 본 연구진에 의한 다각적인 적용성 평가를 통해서 이루어질 것으로 본다.

적 요

여러 가지 은나노물질(SNPs)의 *M. aeruginosa* 생장에 대한 영향을 실내, 외 실험을 통해 조사하였다. 제조된 4 가지 SNPs는 농도 200 mg L<sup>-1</sup>, 입자크기 20~40 nm, 갈색 Ag로서의 수용액이었으며 이 용액들을 각각 실험에 사용하였다. SNPs는 unicellular *M. aeruginosa*에 대하여 0.01, 0.1 mg L<sup>-1</sup>의 첨가농도에서 각각 99.4%, 99.9%의 조류 생장억제 효과를 나타냈으며, colonial *M. aeruginosa*에 대하여는 여러 가지 농도 중 1 mg L<sup>-1</sup>의 농도에서 가장 높은 생장억제 효과(98.5%)를 나타냈다. 더욱이 부영양화한 현장에서 SNPs를 첨가한 enclosure 실험을 통해 *M. aeruginosa*에 대한 선택적 제어 가능성이 시사되었다. 본 연구를 통해서 향후 SNPs를 더욱 보완하면 *M. aeruginosa*를 비롯한 유해 남조의 선택적 제어에 좀더 효과적일 것으로 판단된다.

사 사

본 연구는 환경부 “차세대 핵심환경기술개발사업”(2007-06003-0020-1)으로 지원받은 과제임.

인 용 문 헌

김건희, 김백호, 박명환, 황순진. 2008. 담수패류(*Unio douglasiae*)와 침수식물(*Potamogeton crispus*)의 유해 남조 *Oscillatoria* sp. 생장억제 효과. 한국하천호수학회지 **41**: 68-76.  
 김백호, 최민규, 황수옥, 高村典子. 2000. 부영양호의 enclosure 내에서 어류의 밀도조절이 수질 및 플랑크톤 군집에 미치

는 영향. 한국육수학회지 **33**: 358-365.  
 박명환. 2005. 담수산 유해조류의 발생기작 및 조류 제어에 관한 연구. 한양대학교 대학원 박사학위논문. 194 pp.  
 박명환, 이석준, 윤병대, 오희목. 2001. 규산질다공체와 미생물 응집제의 녹조제어 효과. 환경생물 **19**: 129-135.  
 최강국, 이상훈, 배기서, 신재기, 오희목. 2008. 은이온 수용액의 *Microcystis* 생장억제 효과. 환경생물 **26**: 183-191.  
 Adamson, R.P. and M.R. Sommerfeld. 1980. Laboratory comparison of the effectiveness of several algicides on isolated swimming pool algae. *Applied and Environmental Microbiology* **39**: 348-353.  
 Ahn, C.Y., M.H. Park, S.H. Joung, H.S. Kim, K.Y. Jang and H.M. Oh. 2003. Growth inhibition of cyanobacteria by ultrasonic radiation: laboratory and enclosure studies. *Environmental Science and Technology* **37**: 3031-3037.  
 Albrecht, M.A., C.W. Evan and C.L. Raston. 2006. Green chemistry and the health implications of nanoparticles. *Green Chemistry* **8**: 417-432.  
 Allen, M.M. 1968. Simple conditions for the growth of unicellular blue-green algae on plates. *Journal of Phycology* **4**: 1-4.  
 APHA. 1995. Standard methods for the examination of water and wastewater. 19th ed. American Public Health Association, Washington, DC., USA.  
 Butkus, M.A., L. Edling and M.P. Labare. 2003. The efficacy of silver as a bactericidal agent: advantages, limitations and considerations for future use. *Journal of Water Supply: Research and Technology-AQUA* **52**: 407-416.  
 Choi, O., K.K. Deng, N.J. Kim, L. Ross Jr., R.Y. Surampallic and Z. Hu. 2008. The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Research* **42**: 3066-3074.  
 DeMott, W.R., Q.X. Zhang and W.W. Carmichael. 1991. Effects of toxic cyanobacteria and purified toxins on the survival and feeding of a copepod and three species of *Daphnia*. *Limnology and Oceanography* **36**: 1346-1357.  
 DeZuane, J. 1997. Handbook of Drinking Water Quality. An International Thomson Publing Company, New York.  
 Eloff, J.N. and A.J. Van der Westhuizer. 1981. The water environment: algal toxins and health. Plenum Press, New York.  
 Gong, P., H. Li, X. He, K. Wang, J. Hu, W. Tan, S. Zhang and X. Yang. 2007. Preparation and antibacterial activity of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ag nanoparticles. *Nanotechnology* **18**: 285604 (7pp).  
 Gross, E.M. 2003. Allelopathy of aquatic autotrophs. *Critical Reviews in Plant Sciences* **22**: 313-339.  
 Kaplan, D., N.T. Prakash and A. Abeliovich. 1998. Glutathione-induced recovery in *Chlorella* cells from metal

- toxicity. *Fresenius Environmental Bulletin* **7**: 153-159.
- Kaya, K., Y.D. Liu, Y.W. Shen, B.D. Xiao and T. Sano. 2005. Selective control of toxic *Microcystis* water blooms using lysine and malonic acid: an enclosure experiment. *Environmental Toxicology* **20**: 170-178.
- Kim, H.S., S.J. Hwang, J.K. Shin, K.G. An and C.G. Yoon. 2007. Effects of limiting nutrients and N : P ratios on the phytoplankton growth in a shallow hypertrophic reservoir. *Hydrobiologia* **581**: 255-267.
- Kiviranta, J., K. Sivonen, S.I. Niemela and K. Huovinen. 1991. Detection of toxicity of cyanobacteria by *Artemia salina* bioassay. *Environmental Toxicology and Water Quality* **6**: 423-436.
- Lee, D.Y., C. Fortin and P.G.C. Campbell. 2005. Contrasting effects of chloride on the toxicity of silver to two green algae, *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquatic Toxicology* **75**: 127-135.
- Lorenzen, C.J. 1967. Determination of chlorophyll and pheopigments: spectrophotometric equation. *Limnology and Oceanography* **12**: 343-346.
- Penaloza, R., M. Rojas, I. Vila and F. Zambrano. 1990. Toxicity of a soluble peptide from *Microcystis* sp. to zooplankton and fish. *Freshwater Biology* **24**: 233-240.
- Rai, M., A. Yadav and A. Gade. 2009. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances* **27**: 76-83.
- Reinikainen, M., M. Ketola and M. Walls. 1994. Effects of the concentrations of toxic *Microcystis aeruginosa* and an alternative food on the survival of *Daphnia pulex*. *Limnology and Oceanography* **39**: 424-432.
- Schrader, K.K. 2000. Evaluation of limnocostracans for studying the effects of phytotoxic compounds on plankton and water chemistry in aquaculture ponds. *Journal of the World Aquaculture Society* **31**: 403-415.
- Scragg, A.H. and C. Bonnett. 2002. Inhibition of microalgal growth by silver nitrate. *Biotechnology Letters* **24**: 169-172.
- Shirai, M., A. Ohtake, T. Sano, S. Matsumoto, T. Sakamoto, A. Sato, T. Aida, K. Harada, T. Shimada and M. Suzuki. 1991. Toxicity and toxins of natural blooms and isolated strains of *Microcystis* spp. (Cyanobacteria) and improved procedure for purification of cultures. *Applied and Environmental Microbiology* **57**: 1241-1245.
- Smith, V.H. 1983. Low nitrogen to phosphorus ratios favors dominance by blue-green algae in lake phytoplankton. *Science* **221**: 669-671.
- Tucker, C.S., R.L. Busch and S.W. Lloyd. 1983. Effects of simazine treatment on channel catfish production and water quality in ponds. *Journal of Aquatic Plant Management* **21**: 7-11.
- WHO. 2004. Guidelines for Drinking Water Quality. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Xie, L., P. Xie, S. Li, H. Tang and H. Liu. 2003. The low TN : TP ratio, a cause or a result of *Microcystis* blooms. *Water Research* **37**: 2073-2080.

(Manuscript received 6 January 2009,  
Revision accepted 10 February 2009)