

Weed & Turfgrass Science was renamed from both formerly Korean Journal of Weed Science from Volume 32 (3), 2012, and formerly Korean Journal of Turfgrass Science from Volume 25 (1), 2011 and Asian Journal of Turfgrass Science from Volume 26 (2), 2012 which were launched by The Korean Society of Weed Science and The Turfgrass Society of Korea founded in 1981 and 1987, respectively.

## 미세조류에 대한 캐슈넛 오일의 살조활성특징과 상승효과를 가지는 혼합처리제 탐색

곽화숙 · 김보관 · 김진석\*

한국화학연구원 의약바이오연구본부 친환경신물질연구센터

## Algicidal Characteristics of Cashew Nut Oil against Microalgae and Development of its Mixtures with Synergistic Effects

Hwa Sook Kwak, Bo Gwan Kim, and Jin-Seog Kim\*

Research Center for Eco-Friendly New Materials, Bio & Drug Discovery Division, Korea Research Institute of Chemical Technology, Daejeon 34114, Korea

**ABSTRACT.** This study was conducted to investigate the algicidal characteristics of cashew nut oil (CNO) and to develop CNO mixtures with other compounds having synergistic effects on the growth inhibition against a blue-green alga, *Microcystis aeruginosa*. Among tested CNOs, CNO with higher anacardic acid contents (Ana-A) exhibited the best algicidal activity against *M. aeruginosa*. Ana-A showed broad algicidal spectrum with particular greater activity against blue-green algae than green algae. Ana-A showed the greatest activity against to *Oscillatoria tenuis* ( $IC_{50} = 0.19 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) among the tested blue-green algae and to *Chlorella vulgaris* ( $IC_{50} = 4.54 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) among the tested green algae, respectively. In a mixture experiment to evaluate a chemical interaction in *M. aeruginosa* control, Ana-A showed a strong synergistic effect with MSB and menadione, mild synergistic effect with citric acid, and additive effect with chrysophanol, copper sulfate and quinoclamine. Taken together, our results suggest that CNO containing higher anacardic acid can be used as an eco-friendly natural algicide for selective control of blue-green algae such as *M. aeruginosa* and *O. tenuis* through an optimization of application rate and in combination with synergists such as MSB and menadione.

**Key words:** Cashew nut oil, *Microcystis aeruginosa*, Natural algicide, *Oscillatoria tenuis*, Synergistic effect

Received on June 24, 2016; Revised on August 09, 2016; Accepted on August 30, 2016

\*Corresponding author: Phone) +82-42-860-7026, Fax) +82-42-861-4913; E-mail) jskim@kricr.re.kr

© 2016 The Korean Society of Weed Science and The Turfgrass Society of Korea

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## 서론

미세조류(Microalgae)는 호소, 하천, 저수지, 양어장, 정수장, 연못 등 특히 부영양화된 곳에서 독소 분비 및 불쾌한 맛(off-flavor) 물질 발생, 수질 저하, 수생생물의 폐사 등의 많은 문제를 야기시키는 바, 특히 국내에서는 여름철에 *Microcystis*속, *Oscillatoria*속, *Anabaena*속과 같은 남조류의 대량발생이 문제가 된다(Haider et al., 2003; Duke et al., 2002). 한편 논농사의 경우에도 시비 직후의 조류 대번식으로 인한 피해가 자주 발생하기도 하는데 대표적 피해 양상은 괴물 발생에 의한 직파 입모울 저하, 수온 저하, 양분

경합, 농용수 유출에 의한 하천 오염 등을 들 수 있다. 그동안 조류 대발생(algal bloom)의 효율적 관리를 위해 물리적, 화학적, 생물학적 접근이 다각도로 시도되어 왔다. 과거에는 모든 조류의 발생을 무조건 차단하거나 비선택적으로 제거, 사멸시키는 개념의 기술을 선호하였지만 앞으로는 산업경제의 활성화를 지속시키면서도 환경을 보호할 수 있는 기술 개발이 적극적으로 이루어져야 한다. 그렇기 때문에 앞으로는 환경친화적 저독성 물질을 탐색하여 유해조류를 선택적으로 제거하거나 조류 종간의 성장정도를 차별적으로 제어할 수 있는 기술의 개발이 더욱 필요할 것이다(Choi et al., 2009). 즉, 1) 상대적으로 분해가 용이할

것으로 여겨지는 천연물로부터 살조활성물질을 발굴하고, 2) 효능에 있어서 상승작용(synergism)을 가지는 화합물 조합을 탐색하여 혼합처리 함으로써 환경에 투입되는 화합물 절대량을 감소시키며, 3) 가능한 한 조류발생 초기에 처리함으로써 방제효율을 높일 뿐만 아니라 조류 사체로 인한 이차오염을 줄일 수 있는 처리기술의 개발 방향이 바람직하다.

최근 천연물 또는 저독성 생화학제를 이용하여 미세조류를 제어하는 연구가 활발히 진행되고 있으나(Schrader, 2003; Jancula and Marsalek, 2011), 아직까지 탐색된 종류가 제한적이며 일부 천연물은 활성이 약하거나 작용스펙트럼이 좁고 생산가격이 비싸다는 문제점이 있어 이를 극복하기 위한 연구가 지속적으로 필요한 상황이다. 본 연구팀은 천연물 살조제(natural algicide)를 탐색하던 중, 아나카디산(anacardic acids)을 함유하는 식물추출물이 *Microcystis aeruginosa*와 같은 유해 남조류에 대해 우수한 방제활성이 있음을 발견하였다. 아나카디산을 많이 함유하고있는 식물은 캐슈넛 종피(cashew nut shell), 은행 열매, *Ozoroa insignis* 수피 등으로 보고되고 있다(Shobha and Ravindranath, 1991; Rea et al., 2003). 그리고 아나카디산의 생리활성조사 연구 현황을 보면(Hamad and Mubofu, 2015), 세포독성(Rea et al., 2003), 항산화활성(Kubo et al., 2006), 항종양활성(Kubo et al., 1993), 항균 활성(Prithiviraj et al., 1997), 박테리아 활성 억제(Himejima and Kubo, 1991; Muroi and Kubo, 1993), 생물막 형성 억제활성(Choi et al., 2008; Chelikani et al., 2009), *Aphanomyces cochlioides* 유주자 용해(Begum et al., 2002), 모기 유충 및 사상충, 기타 해충 방제효과(Schultz et al., 2006), 달팽이와 같은 연체동물에 대한 활성(Sullivan et al., 1982) 등이 보고되었지만 유해조류의 선택적 방제에 관한 구체적인 연구는 시도되지 않았다. 따라서 본 연구에서는 아나카디산 고함유 추출물을 활용하여 살조활성 특징을 파악하고, 보다 효과적으로 유해조류를 제어할 수 있는 혼합제를 탐색하기 위해 제반 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 시험생물

본 실험에 사용된 조류는 한국생명공학연구원 생물자원 센터에서 분양받아 각각의 배지(*Spirulina*를 위해서는 SOT medium, *Microcystis aeruginosa* WREO11를 위해서는 BG11 medium을 사용하였으며 기타 조류는 Allen's medium을 사용), 온도 25°C, 광주기 14시간, 광도 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  조건에서 계대배양한 담수조류(녹조류 5종, 남조류 5종)를 사용하였다(Table 1).

**Table 1.** Fresh-water algae tested in this study.

Group	Scientific name (Abbreviation)
Green algae	<i>Botryococcus braunii</i> UTEX 572 (Bb 2)
	<i>Botryococcus braunii</i> UTEX 2441 (Bb 3)
	<i>Chlamydomonas</i> spp. (Cs)
	<i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 265 (Cv)
	<i>Scenedesmus</i> spp. (Ss)
Blue-green algae	<i>Anabaena affinis</i> (Af)
	<i>Microcystis aeruginosa</i> UTEX 2388 (MaU)
	<i>Microcystis aeruginosa</i> WREO11 (MaW)
	<i>Oscillatoria tenuis</i> UTEX1566 (Ot)
	<i>Spirulina platensis</i> (Sp)

### 공시화합물

캐슈넛 오일의 살조활성 평가를 위해서는 캐슈넛 껍질에서 추출하여 부분 정제된 혼합물 세 가지를 구입하여(KFI Corp., 한국) 공시하였으며 이들의 주요 성분 함량은 anacardic acid가 87.1% 함유된 혼합물 (Ana-A), anacardic acid 66.6%와 cardol 19.9%가 함유된 혼합물 (Ana-B), cardol 82.5%와 cardanol 9.8%가 함유된 혼합물 (Car-M)을 사용하였다. 그리고 선발된 캐슈넛 오일과 혼합제의 혼합처리 효과를 평가하기 위해 사용된 화합물은 menadione sodium bisulphite (MSB) (Sigma-Aldrich, 95% 순도), menadione (Sigma-Aldrich, 97% 순도), chrysophanol (Sigma-Aldrich, 99% 순도), citric acid (Sigma-Aldrich, 99.5% 순도), copper sulfate (Junsei, 96% 순도), quinoxaline (동부한농, 97.8% 순도)이었다.

### 화합물의 살조활성 평가

두 가지 내용의 실험을 수행하였다. 먼저 캐슈넛 오일 세 종류(Ana-A, Ana-B, Car-M)를 가지고 *M. aeruginosa*를 대상으로 살조활성을 비교해 보았다. 살조활성 평가는 아래와 같은 방법으로 수행하였으며, 최종결과는 3반복의 방제가 평균값  $\pm$  표준편차로 나타내었다. 그 후 가장 활성이 높았던 Ana-A를 가지고 녹조류 5종과 남조류 4종을 대상으로 살조활성 스펙트럼을 평가하였다. 살조활성 평가는 아래와 같은 방법으로 수행하였으며, 최종결과는 각 조류종별 Ana-A에 대한  $IC_{50}$ (50% 생장억제 농도)을 구하여 나타내든지 또는 처리농도별 3반복의 방제가 평균값  $\pm$  표준편차로 나타내었다.

기본적으로 살조활성 평가는 100 mL 유리 배양병에 10 mL의 배양액을 가지고 3반복으로 실시하였다. 시험 용액 조제는 캐슈넛 오일과 chrysophanol의 경우, Tween 20™(Junsei, Japan)이 0.1% 포함된 아세톤에 화합물을 용해시킨 후 동일 용매를 이용하여 여러 농도로 조제한 다음, 시험 조류가 담긴 각각의 배지에 10  $\mu\text{l mL}^{-1}$  양으로 처리하였다. 결국, 배양액내의 아세톤과 Tween 20의 최종 농도는 각각 1%

및 10 µg mL<sup>-1</sup>이었다. 배지에 접종된 조류 초기농도는 microplate reader (352type, Labsystems, Finland)를 이용하여 A670 nm = 0.05-0.08 내외로 조정하였으며, 약제 처리가 완료된 배양병은 온도 25°C, 광주기 14시간, 광도 40-60 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>에서 5-7일 배양한 후 약제의 효과를 검정하였다. 약제 처리효과(방제가) 평가는 기본적으로 흡광도 측정을 통해 실시하였다. *Chlorella vulgaris* (Cv), *Scenedesmus* spp (Ss), *Microcystis aeruginosa* (Ma)에 대한 약제처리 효과는 사전에 설정해 둔 흡광도-건물중 상관식(Kim et al., 2006)을 통해 대조구 대비 억제정도(%)로 나타내었지만 *Botryococcus braunii* (Bb), *Chlamydomonas* spp (Cs), *Spirulina pratensis* (Sp), *Anabaena affinis* (Af)에 대한 약제처리 효과(방제가)는 흡광도의 무처리 대비 억제정도(%)로서 나타내었다. 그러나 *Oscillatoria tenuis* (Ot)의 경우에는 세포가 뭉쳐 자라기 때문에 배양액의 흡광도 측정이 곤란하여 흡광도 대신에 배양조류로부터 엽록소를 추출하여 그 함량을 통해 생육정도를 분석하였다. 즉, 조류 배양액을 여과지(GF/F filter, 직경 47 mm)에 거른 다음 이를 에탄올 용매에 넣어 엽록소를 추출하고 분광광도계(Beckman Coulter DU 800 spectrophotometer)로 648.5, 664.6, 750 nm 파장에서 흡광도를 측정 후 정량식을 통해 엽록소 함량을 구한 다음(Nusch, 1980; Shin and Im, 2000), 대조군에 대한 엽록소 함량 감소정도를 구하여 약제처리 효과를 나타내었다.

**화합물간 상호작용성 평가**

*M. aeruginosa*에 대한 살조활성에 있어서 Ana-A와 상승작용을 가지는 화합물을 탐색하기 위하여 MSB를 비롯한 6가지 화합물을 가지고 화합물간 상호작용성 평가를 수행하였다. 각 화합물별로 활성을 나타내는 농도를 사전에 조사한 후, 활성 농도 범위 내에서 여러 가지 농도조합의 혼합물을 조제한 다음, 남조류 *M. aeruginosa*를 접종하여 위에 기술한 살조활성 평가방법을 통해 약제처리 효과를 조사하였다. 두 화합물간의 상호작용성은 콜비 방법(Colby, 1967)으로 아래 수식에 따라 평가하였다. 만일 혼합 처리에 의해 나타난 실제의 방제가(실측치, observed value)가 기대치(expected value) 보다 클 경우는 상승작용, 같을 경우는 상가작용, 작을 경우는 길항작용이 있는 것으로 나타내었다.

$$E = (X + Y) - XY/100$$

여기서 E는 기대치, X는 화합물 A의 p 농도에서의 억제%, Y는 화합물 B의 q 농도에서의 억제%를 나타낸다

**결과 및 고찰**

캐슈넛 오일 종류의 남조류 *M. aeruginosa*에 대한 살조활성

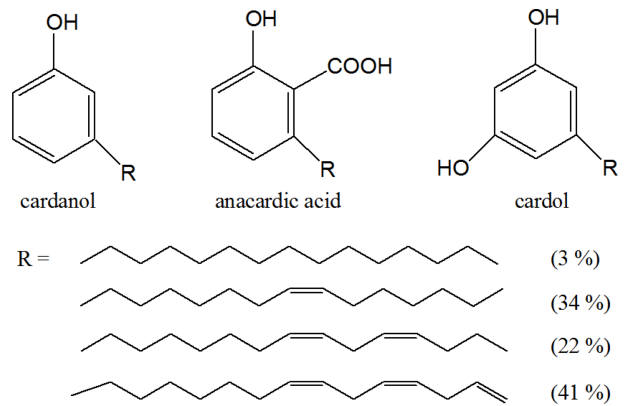


Fig. 1. Chemical structure of major constituents contained in cashew nut oil.

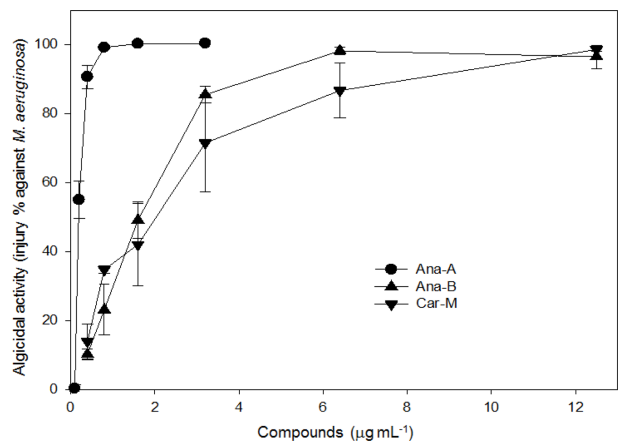


Fig. 2. The effect of three compounds prepared from cashew nut oil on the growth inhibition of *Microcystis aeruginosa* UTEX 2388. Ana-A: cashew nut oil containing 87.1% anacardic acid; Ana-B: cashew nut oil containing 66.6% anacardic acid and 19.9% cardol; Car-M: cashew nut oil containing 82.5% cardol and 9.8% cardanol. Vertical bars represent average ± standard deviation of three replicates.

캐슈넛 오일에는 anacardic acid, cardanol, cardol 등 여러 성분이 혼합되어 있을 뿐만 아니라 각각의 성분중에서도 약간씩 다른 화학구조의 측쇄 유사체가 혼재되어있고 하는데(Fig. 1), 주로 많이 함유되고 있는 성분은 anacardic acid이다(Hamad and Mubofu, 2015; Lubi and Thachil, 2000). 이들 성분의 상대적 함량에 따른 살조활성 비교를 위해 유해 남조류인 *Microcystis* 생장억제에 미치는 캐슈넛 오일의 효과를 조사하였다. 그 결과, Ana-A > Ana-B > Car-M 순으로 활성이 높은 것으로 나타나 anacardic acid가 살조활성을 나타내는 주요 성분임을 알 수 있었다(Fig. 2). 연구보고에 의하면 anacardic acid, cardanol, cardol 등을 중합하여 선박구조물이나 trap net 등의 표면에 피복하여 방오제로서 사용할 수 있다고 하였는데(Choi et al., 2008; Chelikani et al., 2009) 이러한 처리는 높은 살조활성을 구

현시하기 어렵기 때문에 가능한한 anacardic acid 함량이 높은 것을 선택하여 직접처리하여 사용하는 것이 좋을 것으로 생각된다.

### Ana-A의 살조활성 스펙트럼

Anacardic acid 함량이 80% 이상인 Ana-A를 가지고 몇 가지 녹조류 및 남조류 중간 살조활성 차이를 조사해 보았다. 그 결과 Ana-A에 대해 남조류는 녹조류보다 상대적으로 민감한 반응을 나타내어 Ana-A의 남조류에 대한 50% 생육억제농도(IC<sub>50</sub>)가 1.0 µg mL<sup>-1</sup> 이하였고, 녹조류에 대한 50% 생육억제농도는 4.5-9.8 µg mL<sup>-1</sup>로서(Table 3), 두 그룹 간의 선택성이 비교적 뚜렷한 특징을 나타내었다. 녹조류에 대한 살조활성을 중간 비교한 결과, 종간의 큰 차이가 없었지만 상대적으로 Cv가 민감한(IC<sub>50</sub> = 4.54 µg mL<sup>-1</sup>) 경향이였다. 아울러 남조류 종간의 활성 비교에 있어서는 Fig. 3에서 보는 바와 같이 Ot가 가장 민감하였고(IC<sub>50</sub> = 0.19 µg mL<sup>-1</sup>) 다음은 MaU 이었으며(IC<sub>50</sub> = 0.38 µg mL<sup>-1</sup>), Sp가 가장 둔감하였다(IC<sub>50</sub> = 1.0 µg mL<sup>-1</sup>)(Table 2). 따라서 Ana-A는 유해조류가 많이 포함된 남조류를 선택적으로 방제하는데 유용하게 활용될 수 있을 것으로 사료되며 특히 Ot와 MaU가 공시된 종들 중에서 가장 민감한 반응을 보여 Ana-A에 의해 방제가 잘 될 수 있는 종으로 판단되었다. *Microcystis*와 *Oscillatoria* 등은 봄-초여름에 우리나라 하천에서 가장 문제시 되는 대표적인 유해 남조류이며(Ahn et al., 2015), *Oscillatoria*는 논에서도 다른 미생물과 함께 괴불형성을 촉진시켜 벼의 입모을 저하를 초래하는 대표적인 조류이기도 하다(Lee et al., 1993). 따라서, 캐슈넛 오일을 이용하여 이들 남조류를 효과적이고 친환경적으로 방제할 수

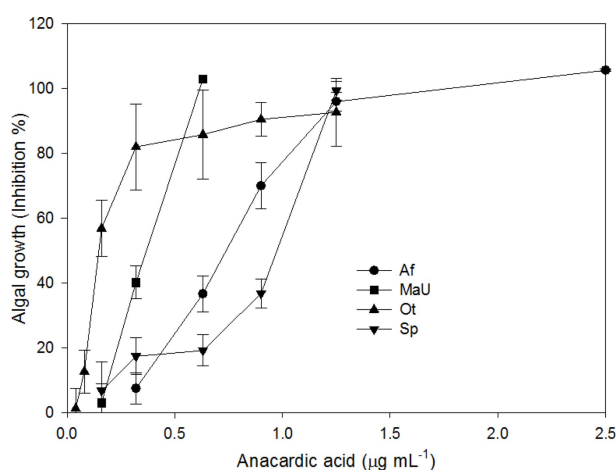


Fig. 3. Effects of anacardic acid on the growth inhibition of 4 species of freshwater blue-green algae. Af: *Abaena affinis*; MaU: *Microcystis aeruginosa* UTEX 2388; Ot: *Oscillatoria tenuis* UTEX1566; Sp: *Spirulina platensis*. Vertical bars represent average  $\pm$  standard deviation of three replicates.

Table 2. Effect of Ana-A on the growth inhibition of different algal species.

Group	Scientific name (Abbreviation)	IC <sub>50</sub> (µg mL <sup>-1</sup> ) <sup>z</sup>
Green algae	<i>Botryococcus braunii</i> UTEX 572 (Bb 2)	7.96
	<i>Botryococcus braunii</i> UTEX 2441 (Bb 3)	9.83
	<i>Chlamydomonas</i> spp. (Cs)	4.75
	<i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 265 (Cv)	4.54
	<i>Scenedesmus</i> spp. (Ss)	6.37
Blue-green algae	<i>Anabaena affinis</i> Lem (Af)	0.75
	<i>Microcystis aeruginosa</i> UTEX 2388 (MaU)	0.38
	<i>Oscillatoria tenuis</i> UTEX1566 (Ot)	0.19
	<i>Spirulina platensis</i> (Sp)	1.00

<sup>z</sup>Application rate (µg mL<sup>-1</sup>) inducing 50% growth inhibition of each alga.

Table 3. Interaction of Ana-A + MSB mixtures on the growth inhibition of *M. aeruginosa* UTEX 2388.

Conc. (µg mL <sup>-1</sup> )		Algicidal activity (%)		Interaction values (Obs-Exp) <sup>z</sup>
Anacardic acid	MSB	Observed values (Obs)	Expected values (Exp) <sup>y</sup>	
0.125	0.1	40.6	7.8	32.8
	0.15	58.8	18.0	40.8
	0.2	75.1	62.8	12.3
	0.3	78.0	65.8	12.2
0.1875	0.4	100.5	96.1	4.4
	0.1	45.9	17.9	28
	0.15	73.1	27.0	46.1
	0.2	87.7	66.9	20.8
0.25	0.3	85.2	69.6	15.6
	0.4	99.6	96.5	3.1
	0.15	92.2	44.2	48
	0.2	90.5	74.7	15.8
0.375	0.3	95.2	76.7	18.5
	0.4	101.3	97.4	3.9
	0.1	98.9	98.9	0
	0.15	102.9	99.0	3.9
0.4	0.2	99.7	99.5	0.2
	0.3	99.6	99.6	0
	0.3	99.6	99.6	0
	0.4	102.6	100.0	2.6

<sup>y</sup>Calculated by Colby's equation.

<sup>z</sup>Positive numbers, numbers near zero and negative numbers represent synergistic effect, additive effect and antagonistic effect, respectively.

있을 것으로 기대된다.

**M. aeruginosa 방제에 있어서 캐슈넛 오일과 상승작용을 가지는 혼합물 탐색**

수생태계에 처리되는 살조제는 물 환경에 부정적 영향을 크게 미치지 않는 범위 내에서 목적하는 유해조류를 방제하여야 하고, 살조제 투입량 자체도 가능한한 낮을수록 바람직하다. 이를 달성하기 위한 방안중의 하나가 상승작용을 가지는 화합물의 혼합처리이다. 화학적 생물방제의 경우 처리되는 화합물의 상호작용에 의해 상승작용을 발현하는 경우가 있기 때문에 이들 조합을 탐색하여 살조 후보물을 제조하면 살조제의 경제적 생산과 더불어 수생태계 보호 측면에서도 의의가 있을 것이다. 지금까지 anacardic acid와 상승작용을 가진다고 보고된 화합물은 메티실린(methicillin)으로서 이들의 혼합처리는 메티실린-저항성 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)의 방제에 효과가 있다

**Table 4.** Interaction of Ana-A + menadione mixtures on the growth inhibition of *M. aeruginosa* UTEX 2388.

Conc. ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )		Algicidal activity (%)		Interaction values (Obs-Exp) <sup>z</sup>
Anacardic acid	Menadione	Observed values (Obs)	Expected values (Exp) <sup>y</sup>	
0.125	0.05	60.0	22.8	37.2
	0.075	65.2	31.3	33.9
	0.1	78.0	46.7	31.3
	0.15	85.8	80.7	5.1
	0.2	99.2	96.4	2.8
0.1875	0.05	65.7	25.4	40.3
	0.075	68.4	33.6	34.8
	0.1	76.9	48.5	28.4
	0.15	97.6	81.4	16.2
	0.2	99.3	96.5	2.8
0.25	0.05	77.5	31.4	46.1
	0.075	79.3	38.9	40.4
	0.1	93	52.7	40.3
	0.15	98.7	82.9	15.8
	0.2	99.1	96.8	2.3
0.375	0.05	89.1	84.1	5
	0.075	101.6	85.8	15.8
	0.1	100.4	89.0	11.4
	0.15	100.6	96.0	4.6
	0.2	100.2	99.3	0.9

<sup>y</sup>Calculated by Colby's equation.

<sup>z</sup>Positive numbers, numbers near zero and negative numbers represent synergistic effect, additive effect and antagonistic effect, respectively.

고 하였다(Muroi et al., 2004). 그러나 미세조류를 대상으로 시도된 연구는 거의 없었다. 따라서 본 연구에서는 anacardic acid 고함유 추출물인 Ana-A와의 혼합처리를 통해 효능이 증진되는 화합물 조합을 탐색하고자 실험하였으며 추출물 Ana-A의 처리농도는 anacardic acid 함량을 기준으로 환산하여 표시하였다. 혼합처리 대상 화합물로는 향균 또는 살조활성이 있다고 보고된 MSB, menadione (Haghjou et al., 2014), citric acid (Dayan et al., 2009; Ozdemir, 2009), chrysophanol (Cantrell et al., 2007; Choi et al., 2004), copper sulfate (Jancula and Marsalek, 2011), quinoclamine (Aida et al., 2006) 등을 사용하였다.

Ana-A + MSB 혼합처리의 경우, 각 농도조합별로 얻어진 살조활성(실측치)과 콜비방법으로 계산하여 얻어진 기대치로부터 얻어진 상호작용성 지수는 Table 3에서와 같았으며 전반적으로 Ana-A + MSB의 혼합처리는 강한 상승작용을 나타내었다. 특히 혼합처리의 각 농도 조합 중 *M. aeruginosa* UTEX2388에 대한 우수한 방제 효과를 나타내는 조합은 anacardic acid 0.125~0.2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  + MSB 0.1~0.2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , anacardic acid 0.25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  + MSB 0.15~0.3  $\mu\text{g mL}^{-1}$ 이었다. 한편 anacardic acid + MSB 혼합물의 약제처리농도를

**Table 5.** Interaction of Ana-A + citric acid mixtures on the growth inhibition of *M. aeruginosa* WREO11.

Conc. ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )		Algicidal activity (%)		Inteaction values (Obs-Exp) <sup>z</sup>
Anacardic acid	Citric acid	Observed values (Obs)	Expected values (Exp) <sup>y</sup>	
0.037	10	25.0	23.3	1.7
	20	28.3	23.3	5.0
	30	56.7	41.2	15.5
0.11	40	100.0	73.2	26.8
	10	25.0	23.3	1.7
	20	56.7	23.3	33.4
0.33	30	68.3	41.2	27.1
	40	100.0	73.2	26.8
	10	51.7	46.7	5.0
1	20	58.3	46.7	11.6
	30	83.3	59.1	24.2
	40	100.0	81.3	18.7
	10	95.0	91.7	3.3
	20	95	91.7	3.3
	30	100.0	93.6	6.4
	40	100.0	97.1	2.9

<sup>y</sup>Calculated by Colby's equation.

<sup>z</sup>Positive numbers, numbers near zero and negative numbers represent synergistic effect, additive effect and antagonistic effect, respectively.



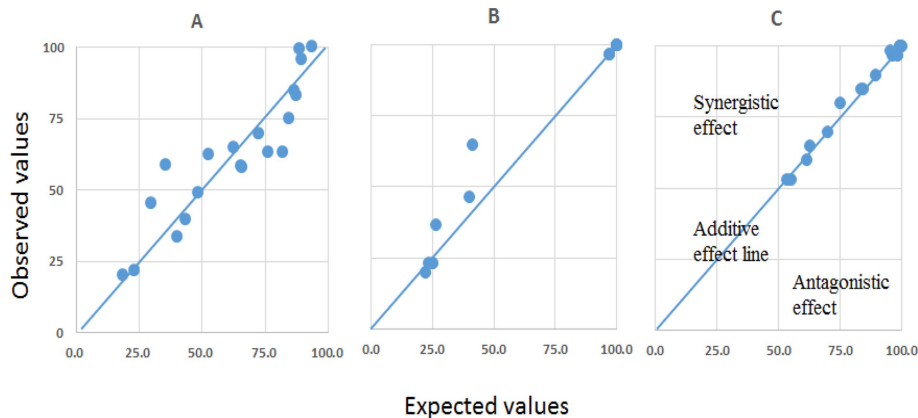


Fig. 4. Interaction of Ana-A + chrysophanol (A), Ana-A + copper sulfate (B) and Ana-A + quinoclamine (C) mixtures on the growth inhibition to *M. aeruginosa* (UTEX2388 at A, WREO11 at B and C).

고정시키고( $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), 두 약제의 혼합비율을 0:100%~100:0%로 서로 달리한 다른 실험에서는 혼합비율이 anacardic acid 40% + MSB 50%로부터 anacardic acid 90% + MSB 10% 범위일 때 *M. aeruginosa* UTEX2388에 대한 살조활성에 있어서 보다 뚜렷한 상승작용을 나타내었다(자료 미제시).

Ana-A + menadione 혼합처리의 경우도, Ana-A + MSB 혼합처리에서와 같이 *M. aeruginosa* UTEX2388 방제에 대해 강한 상승작용이 관찰되었다. 방제에 있어서 우수한 상승작용을 나타내는 조합은 anacardic acid  $0.125\sim 0.25 \mu\text{g mL}^{-1}$  + menadione  $0.05\sim 0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ 이었다(Table 4).

Ana-A + citric acid 혼합처리의 경우도, *M. aeruginosa* WREO11 방제에 대해 비교적 양호한 상승작용을 나타내었다. 상승작용이 가장 높게 나타난 조합은 anacardic acid  $0.04\sim 0.33 \mu\text{g mL}^{-1}$  + citric acid  $30\sim 40 \mu\text{g mL}^{-1}$ 이었다(Table 5).

한편 Ana-A + chrysophanol, Ana-A + copper sulfate, Ana-A + quinoclamine 혼합처리의 경우는 농도조합에 따라 미약한 길항 또는 상승작용이 보이기도 하지만 평균적으로 볼 때 상가적 작용을 나타낸다고 볼 수 있었다(Fig. 4). 이상의 결과를 볼 때 Ana-A 단독처리보다 살조활성을 증진시키고자 할 때에는, Ana-A에 menadione, MSB 또는 citric acid를 혼합처리 하는 것이 바람직 할 것으로 사료된다.

#### 캐슈넛 오일을 활용한 조류방제

미래사회에서는 보다 안전한 수자원 확보와 생태환경 보호가 특히 강조되고 있기 때문에 비점오염원의 관리가 보다 강화되어야 하며 농업용수 관리도 철저히 이루어져야 할 것이다. 따라서 이를 위한 적용기술들 중의 하나로서 앞으로는 문제시 되는 조류의 성장정도를 보다 정밀하게 제어할 수 있는 기술의 종합적 적용이 필요한 상황이다. 이러한 요구성에 부합되는 기술을 개발하려면 무엇보다 자연환경에서 유해조류의 밀도를 낮추는 것이 필요한데 이

를 위해서는 유해 조류를 보다 선택적으로 제어할 수 있는 화합물을 처리하는 것이 바람직하다. 이 때 사용되는 화합물의 경우에도 합성화합물보다는 상대적으로 분해가 용이할 것으로 여겨지는 천연물 또는 생화학제를 발굴하여 활용하고, 효능에 있어서 상승작용을 가지는 화합물 조합을 탐색하여 혼합처리 함으로써 환경에 투입되는 화합물 절대량을 감소시키는 기술의 활용이 요구된다. 이러한 차원에서 볼 때, 본 연구의 결과는 anacardic acid가 고함유된 캐슈넛 오일이 유해 남조류 방제용 조성물 중의 한 성분으로서 활용될 수 있음을 시사하며, 이들 캐슈넛 오일은 녹조류와 같은 유익한 조류에는 독성이 적으면서 남조류 등의 유해조류를 상대적으로 잘 방제할 수 있는 장점이 있어 식생을 크게 파괴하지 않는 범위에서 수생태계의 합리적 관리에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다. 또한 유용한 특정조류를 실내외에서 배양할 때에도 유해조류 오염에 의한 피해를 방지할 수 있어 조류 바이오매스를 보다 깨끗하게 생산하고자 할 때에도 일부 적용될 수 있을 것으로 여겨진다.

#### 요 약

본 연구에서는 캐슈넛 오일의 살조활성 특징을 파악하고, 유해조류를 보다 효과적으로 제어할 수 있는 혼합처리제를 개발하기 위하여 실시하였다. 공시된 시험 추출물중 anacardic acid 함량이 상대적으로 높은 Ana-A가 남조류 *M. aeruginosa*에 대한 살조활성이 가장 높았다. Ana-A는 전체적으로 녹조류보다는 남조류에 대해 더 높은 살조활성을 가지면서 폭넓은 살조활성스펙트럼을 보였다. Ana-A에 대한 남조류 중간 반응에 있어서는 *Oscillatoria tenuis* ( $IC_{50} = 0.19 \mu\text{g mL}^{-1}$ )가 가장 민감하였고, 녹조류 중에서는 *Chlorella vulgaris*가 상대적으로 가장 민감한 반응을 나타내었다( $IC_{50}$

= 4.54  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Ana-A와의 혼합처리를 통해 효능이 상승되는 화합물을 탐색한 결과, MSB와 menadione은 매우 강한 상승작용을, citric acid는 약간의 상승작용을, chrysophanol, copper sulfate, quinoelamine 등은 상가적 작용의 활성을 나타내었다. 종합적으로 볼 때, anacardic acid 고함유 캐슈넛 오일은 처리량의 최적화와 상승작용을 가지는 MSB 또는 menadione과 같은 화합물과의 혼합처리를 통해 *M. aeruginosa* 및 *O. tenuis*가 발생하는 현장의 선택적 제어를 위해 환경친화적인 살조제로서 유용하게 활용될 수 있을 것 같았다.

**주요어:** 캐슈넛 오일, 상승적 효과, 천연살조제, *Microcystis aeruginosa*, *Oscillatoria tenuis*.

## Acknowledgements

This study was carried out with the support of “Dissemination of R&D Results and Commercialization Program (Projet No. 2015001980001)” in the Korea Environmental Industry and Technology Institute.

## References

- Ahn, C.-Y., Lee, C.S., Choi, J.W., Lee, S. and Oh, H.-M. 2015. Global occurrence of harmful cyanobacterial blooms and N, P-limitation strategy for bloom control. *Kor. J. Environ. Biol.* 33(1):1-6. (In Korean)
- Aida, M., Ikeda, H., Itoh, K. and Usui, K. 2006. Effects of five rice herbicides on the growth of two threatened aquatic ferns. *Ecotox. Environ. Safe.* 63:463-468.
- Begum, P., Hashidoko, Y., Islam, Md.T., Ogawa, Y. and Tahara, S. 2002. Zoosporicidal activities of anacardic acids against *Aphanomyces cochlioides*. *Z. Naturforsch.* 57c:874-882.
- Cantrell, C.L., Mamonov, L.K., Ryabushkina, N., Kustova, T.S., Fischer, N.H., et al. 2007. Bioassay-guided isolation of anti-algal constituents from *Inula helenium* and *Limonium myrianthum*. *ARKIVOC* 7:65-75.
- Chelikani, R., Kim, Y.H., Yoon, D.Y. and Kim, D.S. 2009. Enzymatic polymerization of natural anacardic acid and antibiofouling effects of polyanacardic acid coatings. *Appl. Biochem. Biotech.* 157(2):263-277.
- Choi, G.J., Lee, S.W., Choi, Y.H., Jang, K.S., Kim, J.S., et al. 2004. Effects of chrysophanol, parietin, and nepodin of *Rumex crispus* on barley and cucumber powdery mildews. *Crop Prot.* 23(12):1215-1221.
- Choi, J.S., Hwang, H.J., Seo, B.R., Kim, J.D., Jang, H.W., et al. 2009. Isolation and identification of five sesquiterpene compounds having algicidal activity from medicinal plants. *Kor. J. Weed Sci.* 29(2):121-130. (In Korean)
- Choi, Y.H., Kim, J.C., Ahn, J.K., Ko, S.Y., Kim, D.H., et al. 2008. Anti-biofouling behavior of natural unsaturated hydrocarbon phenols impregnated in PDMS matrix. *J. Ind. Eng. Chem.* 14:292-296.
- Colby, S.R. 1967. Calculating synergistic and antagonistic responses of herbicide combinations. *Weeds* 15:20-22.
- Dayan, F.E., Cantrell, C.L. and Duke, S.O. 2009. Natural products in crop protection. *Bioorgan. Med. Chem.* 17(12):4022-4034.
- Duke, S.O., Dayan, F.E., Rimando, A.M., Schrader, K.K., Aliotta, G., et al. 2002. Chemicals from nature for weed management. *Weed Sci.* 50:138-151.
- Haghjoo, M.M., Colville, L. and Smirnoff, N. 2014. The induction of menadione stress tolerance in the marine microalga, *Dunaliella viridis*, through cold pretreatment and modulation of the ascorbate and glutathione pools. *Plant Physiol. Biochem.* 84:96-104.
- Haider, S., Naithani, V., Viswanathan, P.N. and Kakkar, P. 2003. Cyanobacterial toxins: a growing environmental concern. *Chemosphere* 52:1-21.
- Hamad, F.B. and Mubofu, E.B. 2015. Potential biological applications of bio-based anacardic acids and their derivatives. *Int. J. Mol. Sci.* 16:8569-8590.
- Himejima, M. and Kubo, I. 1991. Antibacterial agents from the cashew *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae) nut shell oil. *J. Agric. Food Chem.* 39:418-421.
- Jancula, D. and Marsalek, B. 2011. Critical review of actually available chemical compounds for prevention and management of cyanobacterial blooms. *Chemosphere* 85:1415-1422.
- Kim, J.S., Kim, J.C., Lee, S., Lee, B.H. and Cho, K.Y. 2006. Biological activity of L-2-azetidinedicarboxylic acid, isolated from *Polygonatum odoratum* var. *pluriflorum*, against several alga. *Aquat. Bot.* 85:1-6.
- Kubo, I., Masuoka, N., Ha, T.J. and Tsujimoto, K. 2006. Antioxidant activity of anacardic acids. *Food Chem.* 99:555-562.
- Kubo, I., Ochi, M., Vieira, P.C. and Komatsu, S. 1993. Antitumor agents from the cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice. *J. Agric. Food Chem.* 41:1012-1015.
- Lee, H.K., Park, J.E., Ryu, G.H., Lee, J.O. and Park, Y.S. 1993. Freshwater algae occurred in paddy rice fields. VI. Ecology of suspensible green algae and soil-flakes and their chemical control. *Kor. J. Weed Sci.* 13(2):96-103. (In Korean)
- Lubi, M.C. and Thachil, E.T. 2000. Cashew nut shell liquid (CNSL) -A versatile monomer for polymer synthesis. *Des. Monomers Polym.* 3:123-153.
- Muroi, H. and Kubo, I. 1993. Bactericidal activity of anacardic acids against *Streptococcus mutans* and their potentiation. *J. Agric.*

- Food Chem. 41:1780-1783.
- Muroi, H., Nihei, K., Tsujimoto, K. and Kubo, I. 2004. Synergistic effects of anacardic acids and methicillin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Bioorgan. Med. Chem. 12(3):583-587.
- Nusch, E.A. 1980. Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigment determination. Arch. Hydrobiol. Beih. (Ergebn. Limnol.) 14:14-36.
- Ozdemir, Z. 2009. Growth inhibition of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and *Pseudomonas syringae* pv. tomato by olive mill wastewaters and citric acid. J. Plant Pathol. 91(1):221-224.
- Prithiviraj, B., Manickam, M., Singh, U.P. and Ray, A.B. 1997. Antifungal activity of anacardic acid, a naturally occurring derivative of salicylic acid. Can. J. Bot. 75(1):207-211.
- Rea, A.I., Schmidt, J.M., Setzer, W.N., Sibanda, S., Taylor, C., et al. 2003. Cytotoxic activity of *Ozoroa insignis* from Zimbabwe. Fitoterapia 74:732-735.
- Schrader, K.K. 2003. Natural algicides for the control of cyanobacterial-related off-flavor in catfish aquaculture. ACS Symposium Series 848:195-208.
- Schultz, D.J., Olsen, C., Cobbs, G.A., Stolowich, N.J. and Parrott, M.M. 2006. Bioactivity of anacardic acid against Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) larvae. J. Agric. Food Chem. 54(20):7522-7529.
- Shobha, S.V. and Ravindranath, B. 1991. Supercritical carbon dioxide and solvent extraction of the phenolic lipids of cashew nut (*Anacardium occidentale*) shells. J. Agric. Food Chem. 39:2214-2217.
- Sin, J.-G. and Im, C.S. 2000. A study on the water quality simulation in the midstream and downstream of Geum-river. J. Kor. Water Resour. Assoc. 33(2):145-157. (In Korean)
- Sullivan, J.T., Richards, C.S., Lloyd, H.A. and Krishna, G. 1982. Anacardic acid: molluscicide in cashew nut shell liquid. Planta Med. 44(3):175-177.