

〈Original article〉

GreenTD 물질을 이용한 유해 적조 발생 종의 선택적 살조능 평가

이민지 · 신주용¹ · 김진호 · 임영균 · 조 훈² · 백승호*

한국해양과학기술원 위해성분석연구센터

¹제주국제고등학교

²조선대학교 생명화학고분자공학과

Selective Algicidal Effects of a Newly Developed GreenTD against Red Tide Harmful Alga

Minji Lee, Juyong Shin¹, Jin Ho Kim, Young Kyun Lim, Hoon Cho² and Seung Ho Baek*

Ecological Risk Research Divisions, KIOST, Geoje 53201, Republic of Korea

¹Jeju Campus, Korea International School, Jeju 63644, Republic of Korea

²Department of Biochemical & Polymer Engineering, Chosun University, Gwangju 61452, Republic of Korea

Abstract - Harmful algal blooms (HABs) are a serious problem for public health and fisheries industries, thus there exists a need to investigate the possible ways for effective control of HABs. In the present study, we investigated the algicidal effects of a newly developed GreenTD against the HABs (*Chattonella marina*, *Heterosigma akashiwo*, *Cochlodinium polykriokides*, and *Heterocapsa circularisquama*) and non-HABs (*Chaetoceros simplex*, *Skeletonema* sp. and *Tetraselmis* sp.), which is focused on the different population density and concentration gradients of algicidal substances. The time series viability of target alga was assessed based on the activity of Chl. *a* photosynthetic efficiency in terms of F_v/F_m , and *in vivo* fluorescence (FSU). Effective control of Raphidophyta, *C. marina* and *H. akashiwo* was achieved at a GreenTD concentration of $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$ and $0.2 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively, and regrowth of both the species was not observed even after 14 days. The inhibitory ratio of the dinoflagellate, *C. polykriokides* was more than 80% at $0.2 \mu\text{g L}^{-1}$ of GreenTD. *H. circularisquama* was constantly affected in the presence of $0.2 \mu\text{g L}^{-1}$ of GreenTD in the high- and low-population density experimental groups. On the other hand, diatoms, *C. simplex*, and *Skeletonema* sp. were not significantly affected even in the presence of $0.2 \mu\text{g L}^{-1}$ of GreenTD and exhibited re-growth activity with the passage of incubation time. In particular, green alga *Tetraselmis* sp. remained unaffected even in the presence of the highest concentration of GreenTD ($1.0 \mu\text{g L}^{-1}$), implying that non-HABs were not greatly influenced by the algicidal substances. As a result, the algicidal activity of GreenTD on the harmful and nonharmful algae was as follows: raphidophyte > dinoflagellates > diatoms > green alga. Consequently, our results indicate that inoculation of GreenTD substances into natural blooms at a threshold concentration ($0.2 \mu\text{g L}^{-1}$) can maximize the algicidal activity against HABs species. If we consider the dilution and diffusion rate in the field application, it is hypothesized that GreenTD will demonstrate economic efficiency, thus leading to effective control against the target HABs in the closed bay.

Keywords : algicidal effect, activity Chl. *a*, F_v/F_m , harmful algae, non-harmful algae

* Corresponding author: Seung Ho Baek, Tel. 055-639-8513,
Fax. 055-639-8509, E-mail. baeksh@kiost.ac.kr

서 론

연안해역은 다양한 미세조류가 출현하여 높은 종 다양성이 유지되며, 이는 해역의 항상성과 건강성에 중요한 역할을 한다 (Constanza 1992). 하지만, 호조건의 환경하에서 비정상적으로 특정 종이 증식하여 적조를 일으켜 양식 수산생물에 부정적인 영향을 미친다. 우리나라에서는 1970년대 일부 반폐쇄성 내만해역에서 간헐적으로 적조가 발생하였으나, 1980년대 이후 그 발생 건수가 급격히 증가하기 시작하였다. 이와 같은 적조현상은 생활하수 및 공장 산업용폐수가 연안해역으로 다량 유입되면서 생성되는 유기물 및 무기물의 영양염류에 의한 부영양화 현상이 결정적인 영향을 미쳤다. 특히 1990년대 이후에는 적조발생 빈도의 증가와 발생해역의 광역화는 물론 적조 원인 생물종도 규조류에서 편모조류로 바뀌는 양상을 보였고, 외편모조류의 대발생으로 인하여 수산업 피해액도 기하급수적으로 증가하고 있는 추세이다. 대표적인 종인 외편모조류 *Cochlodinium polykrikoides*는 1995년 우리나라 남해안 전해역에 걸쳐 대발생하여, 764억원의 수산피해를 초래하였다. 그 이후 매년 10~100억 규모의 수산양식생물의 피해를 입히고 있다 (Lee *et al.* 2013; Park *et al.* 2013). 홍미롭게도 2009년부터 2012년까지 적조가 발생하지 않아 수산생물의 피해액은 관찰되지 않았으나, 2013년도부터 재차 남해역뿐만 아니라 동해역까지 광범위하게 대발생하여 막대한 경제적 손실을 입혔다 (Baek *et al.* 2015a). 이러한 이유로, 우리나라에서는 *C. polykrikoides* 종의 적조 발생시 그 생물을 구제하고자 다양한 연구가 진행되어 왔다 (Jeong *et al.* 2000; Baek *et al.* 2012, 2013, 2014a, 2014b; Ebenezer *et al.* 2014).

현재 국내에서는 적조생물 *C. polykrikoides* 구제를 위해 현장에 적용하고 있는 유일한 방법으로는 황토를 살포하여 적조 원인 생물을 침강 및 흡착시켜 구제하고 있다. 하지만, 각 지역에 따른 황토 구성성분의 차이로 인하여 적조생물 구제효율은 0~90%로 크게 차이를 보이고 있다 (Baek *et al.* 2014b, 2017). 특히 분리배양된 *C. polykrikoides*의 배양주에서는 황토의 살조효과가 일정하게 나타났지만, 현장에서 발생한 *C. polykrikoides* 대상으로 평가한 결과 살조효과가 미미하였다 (Baek *et al.* 2014a). 자연 상태를 모사한 메소코즘 (Mesocosm) 실험에서 현장 적조생물 *C. polykrikoides*을 대상으로 황토를 살포하였을 때, 대상생물의 살조효과보다 오히려 증식촉진제 역할을 하는 것으로 파악되었다 (Baek *et al.* 2014a). 아울러, 황토는 해양 살포 후 해저로 침강되면, 저서생물 생태계에 부정적인 영향을 미칠 수 있다 (Shumway *et al.* 2003; Sengco and Anderson 2004). 특히, 구제효율의 신뢰성, 황토운반 및 살포에 따른 비용등과 관련하여 학계에

서는 황토사용에 대한 부정적인 인식이 팽배할 뿐만 아니라, 양식어민들 사이에서도 적조생물 살조효과에 대한 의구심이 증폭되고 있는 실정이다.

따라서, 정부에서는 적조발생으로 인한 수산피해를 최소화하기 위해, 국립수산물과학원에서 적조구제물질을 발굴하고자 기업체에서 개발된 200여 물질을 공모 및 평가하였다. 1차적으로 공모된 각 물질에 대하여 살포 비용과 원가를 고려하여 경제성이 있는 물질을 선정하였다. 2차적으로 각 물질에 대한 살조구제효율은 실험에서 적조배양생물을 대상으로 평가하였다. 3차적으로 구제효율이 우수하면서 친환경적인 물질을 대상으로 메소코즘에서 현장 적용성 평가를 수행하였다. 결과적으로, 생태계에 미치는 영향등을 고려하여, 최종적으로 미생물발효추출물, 황토혼합물, 도석혼합물, 이암분말혼합물 등 친환경 적조구제물질 4종을 적조구제물질 사용승인고시에 준하는 물질로 등록하였다. 하지만, 이들 물질 또한 *C. polykrikoides*의 분리배양주에서는 높은 살조효과를 보였으나, 현장적조생물 *C. polykrikoides*을 대상으로 메소코즘에서 평가한 결과, 살조효과가 미미한 수준으로 나타났다 (unpublished data).

본 연구에서는 적조생물 *C. polykrikoides*을 효과적으로 구제하기 위해서 (주)큐얼스에서 개발한 친환경 살조물질 GreenTD를 대상으로 구제 효율을 평가하였다. 현장 적용성 평가 수행하기 이전, 유해 미세조류와 무해 미세조류를 대상으로 선택성 살조여부를 평가하여, 잠재적 현장 적용 가능성을 고찰하고자 한다.

재료 및 방법

1. 살조물질준비

Thiazolidinedione 유도체 GreenTD의 물질을 조선대학교 응용화학소재실험실에서 개발하였고, (주)큐얼스에서 대량 생산 공정을 거친 물질을 제공받았다. 여기서 GreenTD 물질에 대한 화학 구조는 특허등록과 관련된 사항으로 제공할 수 없다. Baek *et al.* (2014a)의 보고에 의하면, Thiazolidinedione 유도체 TD49 (MW: 337.8)은 수용성이 낮아 100% 에탄올에 완전히 용해시킨 후 용매를 해수에 첨가하는 방법으로써 현장 적용에 적합하지 않다는 단점이 있었다. 이를 보완하기 위해서, 분말형태의 GreenTD를 개발하였고, 대량 생산을 가능하게 하여, 현장 적용에 용이하게 활용할 수 있도록 개선하였다. 본 물질은 여과 해수에 직접 녹여, 최종농도 5 g L⁻¹의 Stock solution을 만들어 아래에서 언급하는 다양한 살조효율 실험에 활용하였다.

2. 대상 미세조류의 배양

본 연구에서는 유해 및 무해 미세조류 7종을 대상으로 GreenTD에 대한 살조능 평가를 수행하였다. 유해 미세조류는 국내에서 종종 대증식하는 침편모조류 2종 (*Chattonella marina*, *Heterosigma akashiwo*), 와편모조류 2종 (*Cochlodinium polykrioides*, *Heterocapsa circularisquama*)으로 구성되었고 (Baek *et al.* 2014b), 무해 미세조류는 국내 연안에서 가장 흔히 출현되는 규조류 2종 (*Chaetoceros simplex*, *Skeletonema sp.*)을 선정하였고, 이와 함께 연안에 자주 출현하는 녹조류 1종 (*Tetraselmis sp.*)을 활용하였다 (Baek *et al.* 2014b, 2015b).

본 연구에 활용된 미세조류는 한국해양과학기술원 해양 시료도서관에서 분양받아 활용하였다. 분양받은 조류는 살조능 평가에 활용하기 이전 생물활성을 최대한 높이기 위해 f/2 배지가 첨가된 1 L 배양용기에 2주일간 배양하였다. 배양 조건은 온도 25°C 광량 60 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 광주기 12L:12D로 조절하였다. 생물 농도에 따른 GreenTD의 살조효과 여부를 파악하기 위해서, 고밀도와 저밀도 생물군으로 나누어 실험을 진행하였다. 고밀도 생물군은 높은 생물활성을 위해 동일한 조건에서 2주간 배양한 생물을 바로 사용하였고, 저밀도 실험군은 고밀도의 생물을 인공해수에 1/2~1/3로 희석하여 활용하였다.

3. 대상 미세조류의 살조효과 및 생리활성 평가

70 mL 시험관 ($\phi 22 \text{ mm} \times 200 \text{ mm}$; PYREX[®])에 각각의 배양된 생물을 50 mL를 접종한 후, GreenTD 최종농도가 0 (대조군), 0.05, 0.2, 0.5, 1.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ 이 되도록 농도구배를 두었다. 모든 실험은 3반복실험군 (triplicate)으로 진행되었다. GreenTD에 대한 최종 살조물질 농도는 사전에 다양한 평가를 거친 후 선정되었다. 유해 미세조류에 대한 효율적인 살조반응과 함께 무해 미세조류에 대한 전반적인 생물활성능을 평가하기 위해서 시간경과 (1 hr, 3 hrs, 24 hrs)에 따라서 Phyto-PAM (phytoplankton analyzer; PHYTO-ED, S/N: EDEF0139, Germany) 장비로 세포 내 활성을 측정하였다. PAM (pulse-amplitude modulation) 장비는 엽록소 내 전자 전달 및 에너지 손실 관계를 이용한 생물정량과 더불어 광합성 전자 전달율 (electron transport rate; ETR)에 의한 생물활성을 측정할 수 있었다. 따라서 본 장비로 각 파장별 (470 nm, 520 nm, 640 nm, 665 nm) 엽록소 형광을 산출하여, 엽록소 (Chlorophyll *a*), F_v/F_m (광합성 효율), 활성엽록소 (Active Chlorophyll *a*)를 다양한 조건에서 파악하였다. 특히 적조구제물질 사용승인에 관한 고시에 준하는 평가는 각 생물군에 대한 살조 후 생물 사멸유무와 함께 생물 개체수

를 판단해야 함으로, 초기와 24시간 경과후의 생물 개체수를 Sedgwick-Rafter chamber에 0.1~1 mL (생물 개체수에 근거함)을 분주하여, 광학현미경 하에서 생존 개체를 검경 및 계수하였다.

4. 대상 미세조류의 재성장 평가

마지막으로 살조된 유해 미세조류에 대한 재성장유무를 판단하기 위해서 GreenTD 첨가 후 2주동안 형광측정장비 (model 10-AU, Turner Designs Sunnyvale, CA, USA)를 활용하여 형광값 (*in vivo* fluorescence)을 측정하여 재성장 가능성을 평가하였다. 실험기간 동안 각 생물군에 대한 최적의 환경조건을 유지하기 위해, 앞서 언급한 사전 배양조건과 동일하게 유지시켜 배양을 수행하였다.

결과 및 토의

1. GreenTD 물질의 경제성

적조구제물질의 사용승인을 받는 조건은 양식 수산생물에 피해를 주지 않고, 해양생태계에도 부정적인 영향을 최소화하면서 대상생물만 선택적으로 살조하는 것이다. 따라서 적조구제물질은 해양에 잔류하지 않는 친환경적 소재와 함께, 운반 및 살포가 용이하여 경제성이 높은 것이 선정대상에 유리하다. 기 수행된 동일 연구 팀의 선행연구 (Baek *et al.* 2014b)에 의하면, Thiazolidinedione 유도체 (TD49)는 당뇨병 치료 보조제로 활용되고 있으며, 유해 적조생물을 선택적으로 살조하는 능력이 우수하였다. 따라서 본 물질 (GreenTD)에 대한 경제성을 파악하기 위해서, 황토와 TD49 물질을 예시로 비교하여 보았다. 2013년 적조생물이 대발생하여 황토를 대규모 살포하였으나, 효과적으로 적조생물을 제어하지 못하여 270억 규모의 수산양식업 피해를 입었다. 이때 적조생물을 제어하기 위해서 살포된 황토의 양은 228,000 t (구매 비용 34억)이며, 장비 운용 및 인건비 등 살포에 소진된 총 비용은 약 118억 정도로 파악되었다 (Baek *et al.* 2014b). 만약 같은 면적에서 살조효율을 고려하면, TD49 물질 4,750 kg을 현장에 살포하여야 하며, 생산단가는 약 60억으로 추정된다. 하지만, TD49 물질을 이용하기 위해서는 용매 추출, 운반 및 살포비용을 고려하여야 하며, 결과적으로는 황토보다는 경제성이 매우 낮을 것으로 판단되었다. 이와 같은 점을 보완하고자 (주)큐엘에서는 TD49 물질보다 원가를 1/10로 줄인 GreenTD 물질을 발굴하였고, 특히 용매 추출 없이, 현장해수에 희석하여 살포할 수 있는 현장적용 용이성이 강력한 장점이라고 할 수 있다. 따라서, 본 물질을

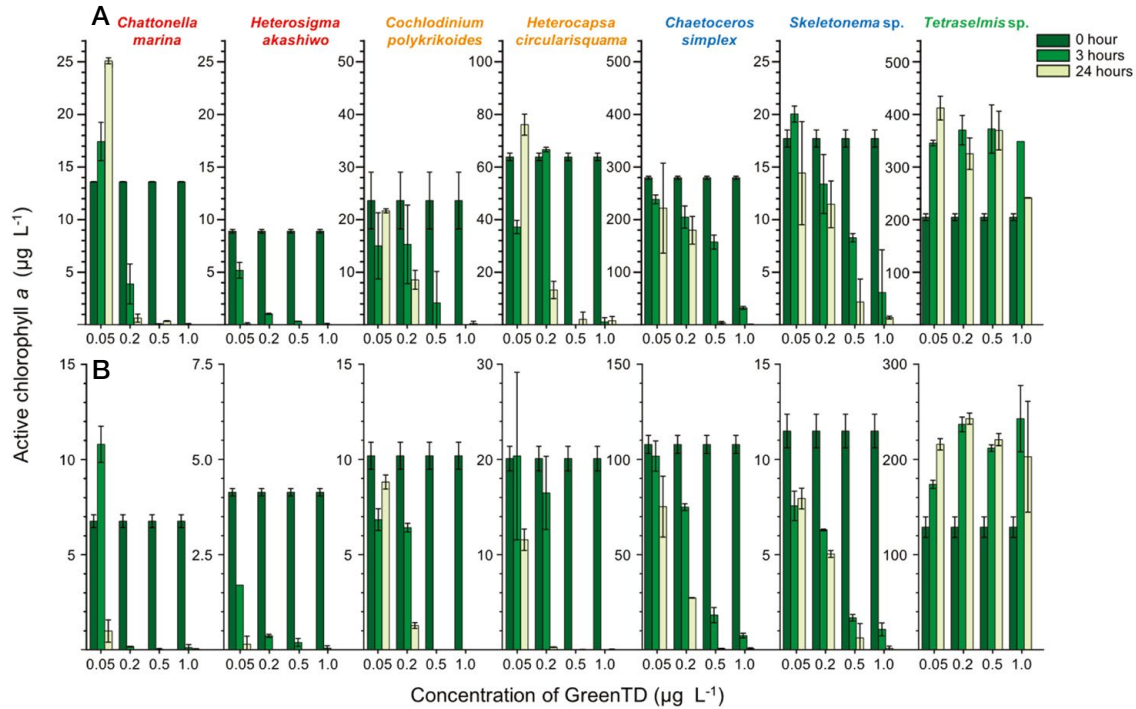


Fig. 1. Changes in the level of active chlorophyll-*a* in seven phytoplankton species for 24 hrs depending on different initial cell concentration (A: high and B: low) after GreenTD inoculation (0.05, 0.2, 0.5 and 1.0 $\mu\text{g L}^{-1}$).

현장 적용성 평가 전, 다양한 생물군과 함께 생물밀도(고밀도와 저밀도)에 따른 살조물질 구배실험이 실험실 규모에서 선행되어야 한다. 결과적으로 본 연구에서 활용한 GreenTD 물질은 황토대비 충분하게 경제성이 높을 것으로 판단된다. 특히, 선택적인 살조능을 고려하면, 적조생물을 효과적으로 제어할 수 있을 것으로 기대된다.

2. 유해성 및 비유해성종의 활성 평가

본 연구에서는 유해종 4종과 함께 무해종 3종을 대상으로, 2가지 생물농도 조건(고밀도, 저밀도)에서 생물활성에 대한 결과를 Fig. 1과 2에 나타내었다. 유해종과 무해종을 선택한 이유는 살조물질의 선택성 유무를 판단하기 위해서 선별되었다. 살조물질 현장 적용시, 무해종을 선택성 없이 살조하게 되면 생태계에 미치는 부정적인 영향을 클 것이며, 반대로 대상 유해종을 효율적으로 살조하지 못하면 살조처리의 의미를 부여할 수 없게 된다. 먼저, 유해종 침편모조류 *C. marina*의 Active Chl. *a* 값은 GreenTD 0.05 $\mu\text{g L}^{-1}$ 농도의 고밀도 실험군에서는 초기 $13.3 \pm 0.02 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서 24시간 후 $25.6 \pm 2.84 \mu\text{g L}^{-1}$ 로 크게 성장하였고(Fig. 1A), 저밀도 실험군에서 초기 $6.76 \pm 0.34 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서 24시간 경과후 1.0 ± 0.59

$\mu\text{g L}^{-1}$ 로 대부분 사멸하였다(Fig. 1B). 이는 저밀도 실험군에서는 낮은 GreenTD 농도에서 *C. marina*의 살조효과를 기대할 수 있지만, 고밀도 실험군에서 효과적으로 살조할 수 없을 것으로 판단된다. 반면, GreenTD 0.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ 농도에서 고밀도 실험군에서는 3시간 경과후 Active Chl. *a* 값이 $3.82 \pm 1.85 \mu\text{g L}^{-1}$ 로, 24시간 경과후에는 $0.64 \pm 0.38 \mu\text{g L}^{-1}$ 로 극히 낮게 나타났고, 저밀도 실험군에서는 3시간 경과후 극히 낮은 값을 보였다. GreenTD 0.5와 1.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ 농도에서는 저밀도와 고밀도생물과 관계 없이, 유사하게 시간의 경과와 더불어 낮은 Active Chl. *a*를 보였다. 즉 GreenTD 0.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ 이상의 농도에서는 3시간 이후 대부분의 *C. marina*는 광합성활성을 잃었다(Fig. 2). F_v/F_m 값 또한 고밀도 실험군에서 GreenTD 0.05 $\mu\text{g L}^{-1}$ 에서는 24시간 경과후에도 일정히 높은 값(0.60 ± 0.01)으로 초기 값과 유사하였으나(Fig. 1A), 저밀도에서는 초기 대비 48.1%로 줄어든 값을 기록하였다(Fig. 1B). GreenTD 살조농도에 따른 *C. marina*의 F_v/F_m 시간경과에 따른 변동폭은 Active Chl. *a*와 유사한 특성을 보였다. 유해종 침편모조류 *H. akashiwo*에 대한 고밀도와 저밀도 실험군의 Active Chl. *a* 값은 GreenTD 0.05 $\mu\text{g L}^{-1}$ 농도 적용 3시간 경과후 각각 $5.08 \pm 0.73 \mu\text{g L}^{-1}$ 과 $1.07 \pm 0.01 \mu\text{g L}^{-1}$ 로 나타났다(Fig. 1). 이는 *C. marina*에서 나타난 광합성활성 인

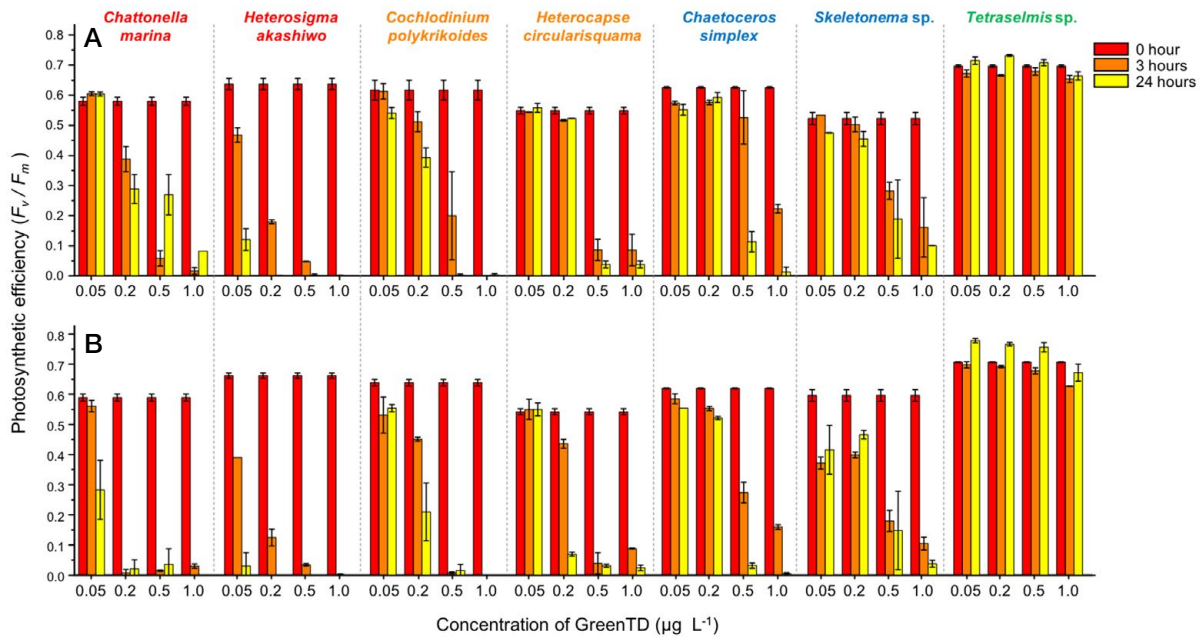


Fig. 2. Changes in F_v/F_m of seven phytoplankton species for 24 hrs depending on different initial cell concentration (A: high and B: low) after GreenTD inoculation (0.05, 0.2, 0.5 and 1.0 $\mu\text{g L}^{-1}$).

자와 유사한 경향을 보였다. 특히, *H. akashiwo*는 GreenTD 0.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ 에서 일정하게 광합성활성이 낮게 나타난 것으로 보아, *C. marina* 보다 조금 낮은 농도에서도 살조효과가 나타날 것으로 판단된다. 결과적으로 유해종에 속한 침편모조류 *C. marina*와 *H. akashiwo*는 각각 GreenTD 0.5와 0.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ 농도에서 80% 이상의 살조효과를 기대할 수 있을 것이며, 같은 침편모조류 중 세포체적과 생물밀도의 차이에 따라서도 살조효과가 상이한 차이를 보일 것으로 판단된다.

우리나라에서 수산양식생물에 가장 큰 피해를 입히는 적조생물 와편모조류 *C. polykrikoides*에 관해서 살펴보면, 살조물질 GreenTD 0.05 $\mu\text{g L}^{-1}$ 적용시, 고밀도 실험군의 Active Chl. *a* 값은 초기 $23.1 \pm 5.27 \mu\text{g L}^{-1}$ 로 관찰되었으나, 3시간 경과후 $14.7 \pm 6.14 \mu\text{g L}^{-1}$ 로 일정하게 감소하였고, 24시간 경과이후에는 $21.2 \pm 0.37 \mu\text{g L}^{-1}$ 로 다시 증가하는 양상을 보였다(Fig. 1A). 반면, 저밀도 실험군에서도 GreenTD 0.05 $\mu\text{g L}^{-1}$ 적용시 일정하게 높은 값을 보여, 활성염록소에 대하여 명확한 영향을 미치지 않았다(Fig. 1B). GreenTD 0.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ 농도에서는 *C. polykrikoides* 고밀도와 저밀도 실험군에서 24시간 경과후 각각 $8.39 \pm 1.48 \mu\text{g L}^{-1}$ 과 $1.28 \pm 0.15 \mu\text{g L}^{-1}$ 로 나타나, GreenTD 0.05 $\mu\text{g L}^{-1}$ 농도보다 극히 낮은 생물활성을 보여, 생물사멸에 일정하게 영향을 미치는 것으로 파악되었다. GreenTD 0.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ 이상의 농도에서는 3시간 경과후 광합성 활성에 관련된 Active Chl. *a*와 F_v/F_m 값이 현저

하게 떨어지는 양상을 보였고, 이는 앞서 언급한 침편모류 2종과 유사한 경향을 보였다(Fig. 2).

와편모조류 *Heterocapsa circularisquama*는 GreenTD 0.05 $\mu\text{g L}^{-1}$ 적용시, 고밀도 실험군에서 Active Chl. *a* 값은 초기 $119 \pm 3.11 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서 3시간 경과후 $66.1 \pm 3.83 \mu\text{g L}^{-1}$ 로 감소하였으나, 상기의 *C. polykrikoides* 실험군과 유사하게 24시간 경과후에는 $129 \pm 3.34 \mu\text{g L}^{-1}$ 로 재차 상승하는 경향을 보였다(Fig. 1A). GreenTD 0.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ 농도에서는 생물밀도와 관계 없이, 3시간 경과후에는 전혀 영향을 미치지 않았지만, 24시간 경과후에는 극히 낮은 값을 유지하였다. *Heterocapsa* sp.에 대한 F_v/F_m 값의 시간별 영향을 살펴보면, 고밀도 실험군에서 GreenTD 0.05와 0.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ 농도에서는 0.6 전후로 활성이 높게 나타난 반면, GreenTD 0.5와 1.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ 농도에서는 0.1 이하의 낮은 값을 유지하였다(Fig. 2A). 반면 저밀도 실험군에서는 GreenTD 0.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ 농도에서부터 일정하게 영향을 받는 것으로 파악되었다(Fig. 2B).

무해성 규조류 *C. simplex*와 *Skeletonema* sp.는 고밀도와 저밀도 실험군에서 GreenTD 0.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ 적용시 24시간 경과후에도 Active Chl. *a* 값이 초기 대비 *C. simplex*는 생물 밀도별 64.4%, 25.3%를 유지하였고, *Skeletonema* sp.는 각각 64.7%, 48.8%를 유지하였다(Fig. 1). 아울러 저밀도 실험군에서도 F_v/F_m 값이 0.52 ± 0.01 이상으로 초기 대비 10~20% 감소한 것으로 보아, 잠재적으로 활성을 지속적으로 유지하

고 있다는 것을 시사한다. 반면, GreenTD 0.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ 이상의 농도에서는 Active Chl. *a*와 F_v/F_m 이 초기 대비 약 20% 이하로 낮게 유지되었다.

무해성 녹조류 *Tetraselmis sp.*는 앞서 언급된 유해성 편모류 침편모조류와 와편모조류와는 전혀 다른 양상을 확인하였다. Active Chl. *a*값은 생물 고밀도와 저밀도와 관계없이 GreenTD 1.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ 에서도 높게 유지되었고, 24시간 경과후 생물 고밀도 실험군에서 $236 \pm 0.35 \mu\text{g L}^{-1}$ 로, 저밀도 실험군에서 $203 \pm 58.2 \mu\text{g L}^{-1}$ 로 초기값($125 \mu\text{g L}^{-1}$)보다 약 2배 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 1). 특히, F_v/F_m 에서도 1.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ 에서 고밀도 실험군에서 0.66 ± 0.01 로 나타났고, 저밀도 실험군에서 0.67 ± 0.03 로 매우 높게 관찰되었다(Fig. 2). 즉 본 실험에서 최고 GreenTD 농도에서도 일정하게 높은 값을 유지하는 것으로 보아, 무해성 조류 *Tetraselmis sp.*에는 크게 영향을 미치지 않은 것으로 판단된다.

미세조류의 성장 및 살조특성에 따라서 Active Chl. *a*은 F_v/F_m 값과 시간 경과에 따른 변화특성이 조금 다른 경향을 보였다. 이는 GreenTD 물질첨가 후 F_v/F_m 값은 세포가 사멸할 때 일시적으로 급격히 높아지는 경향이 있고, Active Chl. *a*가 살조물질 처리후 빠르게 반응하여 영향을 미친 실험군에서 급격하게 낮게 나타나는 경향은 미세조류별 세포 분해 기작과 연관성이 있을 것으로 사료된다. 즉, 살조물질 접촉 후 세포 내 물질이 침투되면, 특정 세포가 분해과정에서 세포막을 파괴하면서 세포 내 잔여 엽록소를 수주내 분산되어 엽록소가 일시적으로 높게 나타나는 경향이 있지만, 이는 24시간 이후부터 안정적인 값을 확인할 수 있었다. Phyto-PAM 장비를 이용한 형광측정법은 광계 II (PS II)에 대한 정보를 실시간으로 상세하게 제공 가능하여, PS II 손상으로 살조물질이 세포막으로 침투하여 세포 내 스트레스를 받았다는 첫 징후로 사용 될 수 있다(Küster and Altenburger 2007). Kim *et al.* (2012)에서도 *C. marina*, *H. akashiwo* 및 *C. polykrikoides*를 포함한 유해 미세조류의 성장억제는 PS II의 감소로 생물의 생사유무를 판단할 수 있었다. GreenTD 살조물질에 노출된 미세조류의 활성 감소는 생물제어효과와 일치하며, 이는 PS II에 대한 손상에 의한 세포용해가 중요한 살조기작으로 판단된다. 하지만, 명확한 근거를 제시하기 위해서는 추가적인 연구가 필요하다.

3. 유해성 및 비유해성종의 살조효율 평가

고밀도 및 저밀도 실험군과 GreenTD 살조물질농도별 시간에 따른 각 생물군의 생존 개체수의 변화를 Fig. 3에 나타내었다. 침편모조류 *C. marina*는 초기 $2.0 \times 10^3 \text{ cells mL}^{-1}$ 를 접종한 고밀도 실험군에서 24시간 경과후 GreenTD 0.05

$\mu\text{g L}^{-1}$ 농도에서 살조효율 6.3%로 낮게 관찰되었으나, 그 이상의 농도에서는 100%의 살조효과를 보였다(Fig. 3A). 반면, $1.0 \times 10^3 \text{ cells mL}^{-1}$ 로 저밀도 실험군에서는 GreenTD 0.05 $\mu\text{g L}^{-1}$ 농도에서도 96.8% 살조효율을 보였다. 침편모조류 *H. akashiwo*는 고밀도($9.1 \times 10^3 \text{ cells mL}^{-1}$) 실험군과 저밀도($4.6 \times 10^3 \text{ cells mL}^{-1}$) 실험군에서 GreenTD 0.05 $\mu\text{g L}^{-1}$ 농도에서조차 100%로 살조효과를 보여, 아주 효과적으로 생물을 제어할 수 있는 특성을 확인하였다(Fig. 3B). 와편모조류 *C. polykrikoides*는 GreenTD 0.05 $\mu\text{g L}^{-1}$ 에서, 고밀도 실험군($1.9 \times 10^3 \text{ cells mL}^{-1}$)과 저밀도($0.7 \times 10^3 \text{ cells mL}^{-1}$) 실험군에서 각각 20.5%, 14.8%의 살조효과를 관찰하였다. GreenTD 0.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ 농도에서는 고밀도 실험군에서도 80.8% 살조효율을 보였고, 그 이상의 GreenTD 농도에서는 100% 살조효과를 기록하였다(Fig. 3C). 와편모조류 *H. circularisquama*는 초기 개체수 $3.9 \times 10^4 \text{ cells mL}^{-1}$ 로 고밀도 실험군에서는 GreenTD 0.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ 농도에서 살조효율이 24.7%로 낮았고, 이는 같은 농도를 적용한 와편모조류 *C. polykrikoides*의 초기 개체수 밀도보다 10배 정도 높은 밀도를 접종하였기 때문으로 판단되며, 고밀도 와편모조류 기인 적조를 제어하기 위해서는 단계적으로 높은 농도의 GreenTD를 적용해야 한다는 것을 시사할 수 있다(Fig. 3D). 규조류인 *C. simplex*는 고밀도 실험군($3.5 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$)과 저밀도($2.1 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$)을 다른 유해종보다 10~100배 정도 높은 초기밀도를 접종하였으나, 본 종이 가지는 1세포당 세포 체적은 유해종 *C. polykrikoides*의 1/10수준에 머무는 것을 고려하면(Fig. 4), 세포 단위 체적당 초기 개체수 밀도에 대한 값은 합리적으로 접종하였다고 판단된다. 하지만, 무해성 규조류 2종은 GreenTD 0.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ 농도에서 치명적으로 영향을 받는 것으로 파악되었다. 무해성 녹조류 *Tetraselmis sp.*는 앞서 언급한 광합성활성 결과에서는 전혀 영향을 미치지 않았으나, 개체수는 초기 대비 약간 감소하였다. 즉 본 종은 GreenTD에 영향을 미치지 않을 것으로 판단된다(Fig. 3G).

또한, 살조효과 실험 과정에서 세포 사멸 사진을 Fig. 4에 나타내었다. 침편모조류 *C. marina*와 *H. akashiwo*는 물질접종 후 빠르게 세포가 터지는 양상을 보였고(Fig. 4A-D), 와편모조류 *C. polykrikoides*와 *H. circularisquama* 또한 유사한 양상을 확인할 수 있었다. 하지만 일부 *H. circularisquama*는 세포 파괴 없이 일정한 형태를 유지하는 것을 볼 수 있었다(Fig. 4E-H). 규조류 *C. simplex*와 *Skeletonema sp.*의 경우 규산질 세포벽이 파괴되지 않아 물질접종 후에도 특이적인 형태 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 4I-L). 특히, 녹조류 *Tetraselmis sp.*는 형태적인 변화는 보이지 않았고, GreenTD 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ 의 고농도 접종에도 불구하고, 여전히 빠르게 움직이

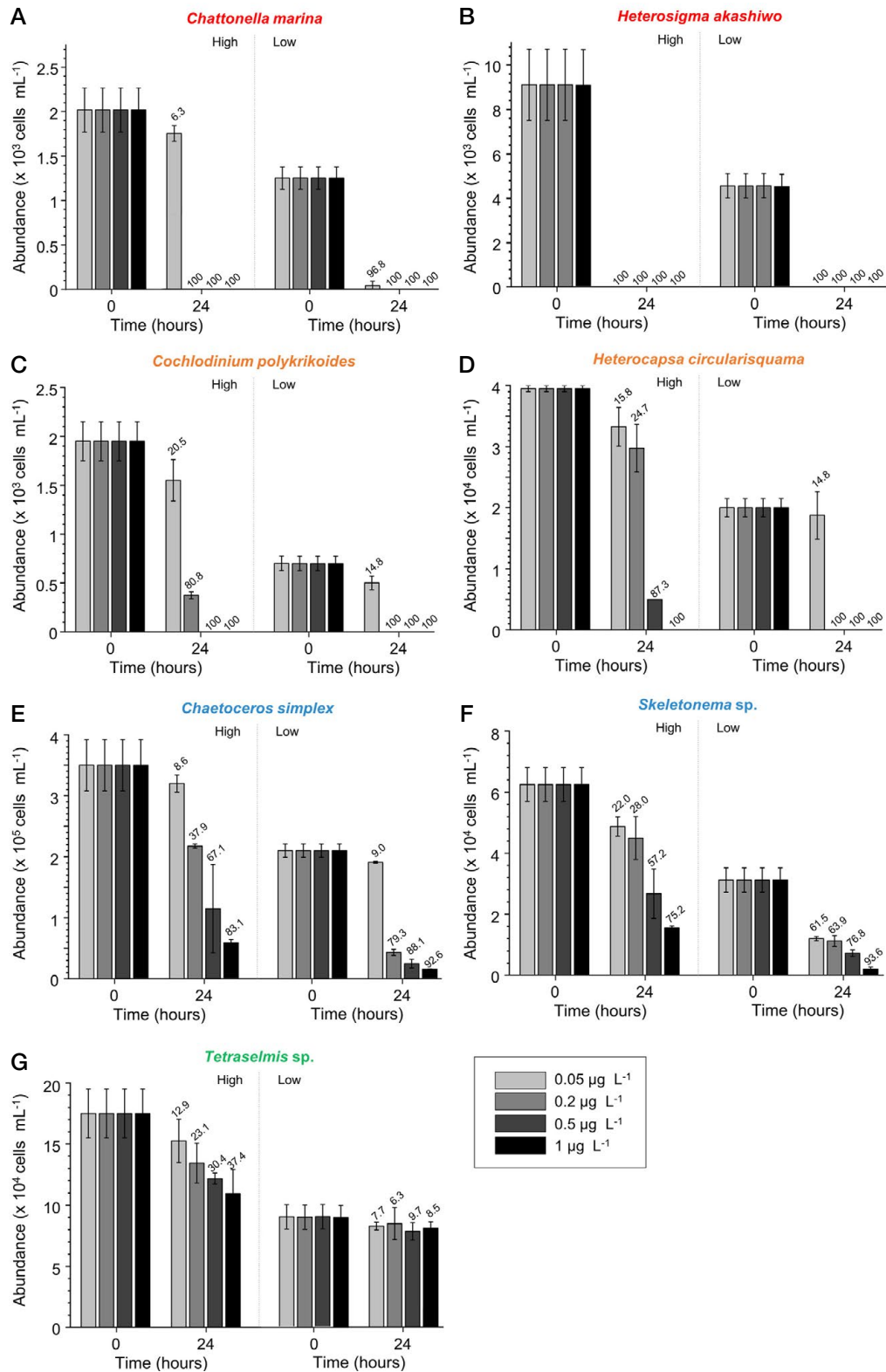


Fig. 3. Changes in cell abundances and algicidal rates of seven phytoplankton species (A: *Chattonella marina*, B: *Heterosigma akashiwo*, C: *Cochlodinium polykrikoides*, D: *Heterocapsa circularisquama*, E: *Chaetoceros simplex*, F: *Skeletonema sp.* and G: *Tetraselmis sp.*) after 24 hrs depending on different initial cell concentration after GreenTD inoculation (0.05, 0.2, 0.5 and 1.0 µg L⁻¹). Each algicidal rates are marked on each bar.

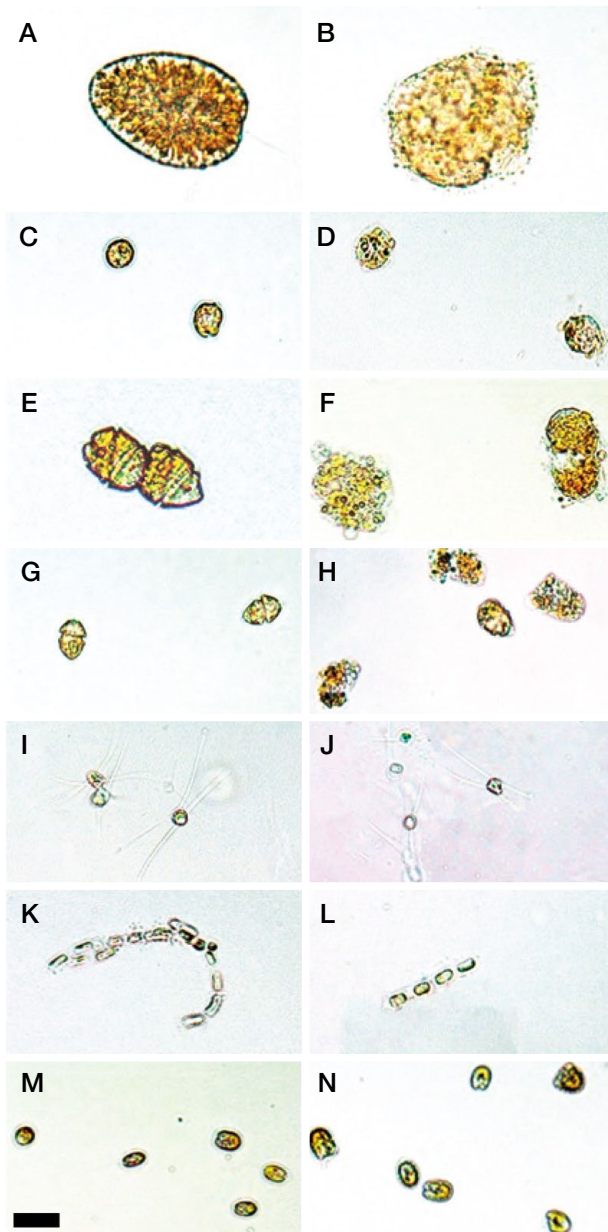


Fig. 4. Morphological characteristics of *Chattonella marina* (A, B), *Heterosigma akashiwo* (C, D), *Cochlodinium polykrioides* (E, F), *Heterocapsa circularisquama* (G, H), *Chaetoceros simplex* (I, J), *Skeletonema* sp. (K, L) and *Tetraselmis* sp. (M, N) in control (left panel), and GreenTD ($1 \mu\text{g L}^{-1}$; 24 hrs) inoculation (right panel). Scale bar is 20 μm , which is adapted in all panels.

는 개체를 확인하였으며(Fig. 4M, N), 이는 앞서 토의한 살조효율과 잘 일치한다. 결과적으로 유해 미세조류 침편모조류와 와편모조류는 살조물질의 첨가후 세포가 파괴되어 빠르게 분해되었고, 규조류와 녹조류의 세포파괴는 관찰되지 않았다.

4. 유해성 및 비유해성종의 재성장특성

앞서 언급한 Phyto-PAM 장비는 사전 준비단계 없이 해수를 바로 측정할 수 있어 살조물질에 대한 생물의 생사판별을 현미경 검경보다 빠르고 간편하게 적용가능하다. 하지만, 살조물질 적용후 생물이 파괴되면서 생성되는 일시적으로 엽록소 형광값을 높게 하는 단점은 있으나, Active Chl. *a* 과 F_v/F_m 값으로 살조효율을 정확하게 유추할 수 있다. 하지만 24시간 이후에는 파괴된 엽록소 형광값은 안정적으로 관찰할 수 있어, 10-AU 형광장비로 측정이 효율적으로 가능하다. 즉 Phyto-PAM 장비보다 시간이 1/10 수준으로 장기간 생물의 재성장애 따른 생물활성을 측정 가능하다. 따라서 본 연구에서도 미세조류의 재성장 유무를 지속적으로 관찰하기 위해서 10-AU 형광장비로 14일 동안 측정된 결과를 Fig. 5에 나타내었다. *C. marina*는 GreenTD $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$ 농도에서는 일정하게 형광값이 관찰되어 대조군과 유사한 경향을 보였으나, 나머지 농도에서는 재성장하는 특성이 관찰되지 않았다. *H. akashiwo*는 대조군에서는 일정하게 성장하였으나, 다른 모든 처리군에서는 재성장하지 않았다. Baek *et al.* (2014b)에서 *H. akashiwo*의 성장 단계 별 TD49 물질 접종 실험 결과에 따르면, 모든 성장 단계에서 $0.2 \mu\text{g L}^{-1}$ 의 높은 TD49 농도에도 불구하고 약 2주 이내에 *H. akashiwo* 재성장이 관찰되었다. 하지만, 본 실험에서는 $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$ 의 낮은 농도에서도 재성장이 관찰되지 않은 것으로 보아, GreenTD는 TD49 물질보다 살조효능이 더 우수한 것으로 판단된다. *C. polykrioides*는 대조구가 점진적으로 감소하는 경향이 있지만, Baek *et al.* (2014a)의 현장 실험에서도 본 종의 대조군은 고밀도로 유지된 이후 자연적인 사멸단계로 들어가게 된다. 실험구 중 GreenTD $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$ 농도의 고밀도 실험구에서 대조구와 유사하게 비교적 소폭의 형광값 감소를 보였다. 하지만, 시간 경과후 저농도의 물질접종에도 *C. polykrioides*는 대부분 사멸하였고 재성장하는 양상을 관찰할 수 없었다. 반면, 유해 와편모조류 *H. circularisquama*는 24시간 이내 80% 이상의 살조효율이 관찰된 실험군에서는 사멸하였지만, 그렇지 않은 실험군에서는 재성장하거나 일정한 개체수를 지속적으로 유지하는 것으로 나타났다. 이와 같은 양상은 Baek *et al.* (2014b)에서 TD49 물질 적용 시에도 유사하게 관찰되어, *Heterocapsa* 종은 종 특이적으로 살조물질에 대한 내성을 가지고 있는 것으로 파악되었다. 무해성 규조류 *C. simplex*, *Skeletonema* sp.와 더불어 녹조류 *Tetraselmis* sp.는 GreenTD $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$ 이상의 농도를 제외하면, 생물농도와 물질농도간 차이가 있지만 대부분 실험 시작 4일 경과후부터 재성장을 하였다. 즉, 무해 조류는 일정시간이 경과하면 생물의 재성장이 이루어 질 수 있어, 적

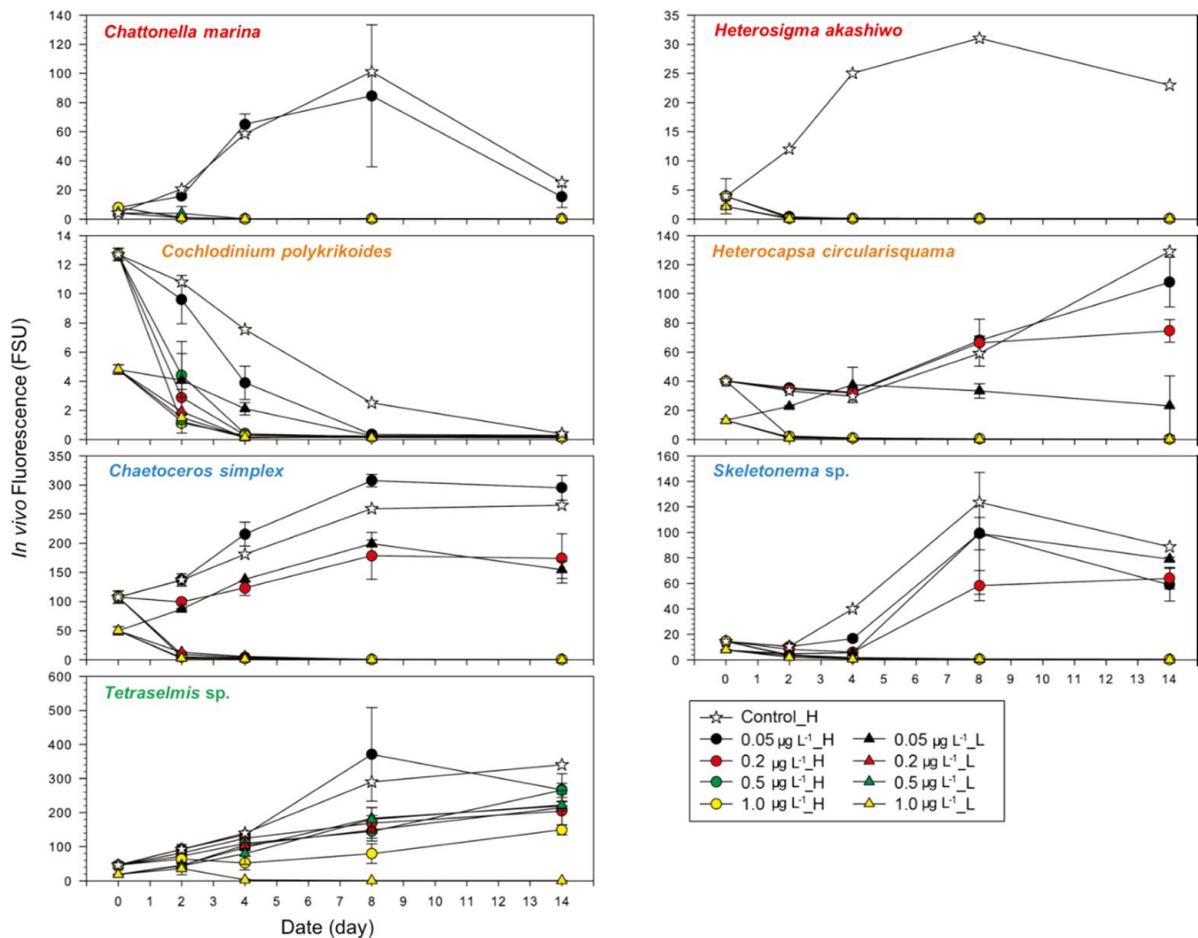


Fig. 5. Changes in *in vivo* fluorescence (FSU) values of seven phytoplankton species for 14 days depending on different initial cell concentration (round symbols: high; triangle symbols: low) after GreenTD inoculation (0.05, 0.2, 0.5 and 1.0 $\mu\text{g L}^{-1}$).

조생물 *C. polykrikoides*에 GreenTD 0.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ 을 적용할 경우, 대상생물은 제어할 수 있으면서 무해성 조류에는 크게 영향을 미치지 않을 것으로 판단된다. 지금까지 우리나라에서는 적조생물 *C. polykrikoides*, 일본에서는 *C. marina*을 방제하기 위해서 다양한 살조물질을 처리하는 실험이 많이 수행되었다. 살조세균 및 천적생물을 이용한 적조생물 구제방식은 주로 피식자-포식자 관계를 이용해 선택적으로 적조생물만 제어하는 친환경적인 방법으로, 선택성은 있으나 현장 적용을 위한 대량배양의 어려움과 희석 및 확산과 같은 현장의 다양한 변수 때문에 실제 현장적용에는 한계가 있다 (Fukami *et al.* 1991; Imai *et al.* 1991; Yoshinaga *et al.* 1995, 1997; Lee and Park 1998; Park *et al.* 1998). 본 연구팀이 개발한 GreenTD 물질은 다양한 조류에 대한 선택성은 기존의 TD49물질 (Baek *et al.* 2012, 2014a, 2014b)보다 미미하지만, 현장 적용시 편의성과 비용적 측면이 크게 강화되었다. 따라서 우리나라에서 발생하는 *C. polykrikoides* 적조와 일본 *C.*

marina 적조 방제에 이용하면, 수산양식생물의 피해를 줄일 수 있을 것으로 판단된다.

적 요

하계 우리나라 연안내만에서 빈번하게 발생하는 유해 적조생물 제어는 수산피해를 최소화하기 위한 중요한 국가적 현안문제이다. 본 연구에서는 Thiazolidinedione 유도체 물질인 GreenTD 농도 구배별로 유해 미세조류 4종 (*Chattonella marina*, *Heterosigma akashiwo*, *Cochlodinium polykrikoides*, *Heterocapsa circularisquama*)와 무해 미세조류 3종 (*Chaetoceros simplex*, *Skeletonema sp.*, *Tetraselmis sp.*)에 대해 생물 고밀도 실험군과 저밀도 실험군에서 살조물질 농도별 살조효율과 선택성을 조사하였다. 유해종에 속하는 침편모조류 *C. marina*와 *H. akashiwo*는 각각

GreenTD 0.5와 0.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ 농도에서 단시간에 확실한 효과를 보였으며, 14일 동안의 관찰에서도 재성장을 보이지 않았다. 적조생물 *C. polykrikoides*은 GreenTD 0.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ 이상의 농도에서 광합성활성이 현저하게 떨어졌고, 살조효율 역시 80% 이상으로 나타났다. 특히, GreenTD 0.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ 에서도 *C. polykrikoides*가 재성장하지 않은 것으로 보아, 본 물질은 *C. polykrikoides*에 대한 살조효과가 우수할 것으로 판단된다. *H. circularisquama*는 고밀도 실험군에서 GreenTD 0.5 $\mu\text{g L}^{-1}$, 저밀도 실험군에서는 GreenTD 0.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ 농도에서부터 일정하게 영향을 받는 것으로 파악되었다. 규조류 *C. simplex*와 *Skeletonema sp.*에 대해서는 생물농도가 고밀도일 때 GreenTD 0.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ 에서는 크게 영향을 받지 않았으며, 초기 일정한 영향을 받은 후 시간 경과와 더불어 재성장이 이루어졌다. 특히 녹조류 *Tetraselmis sp.*는 최고농도인 GreenTD 1.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ 에서도 일정하게 높은 값을 유지하였다. GreenTD 농도와 생물밀도에 따른 차이가 뚜렷하게 나타났으나, 전반적으로 살조물질의 효과는 침편모조류 > 와편모조류 > 규조류 > 녹조류 순으로 나타났다. 결과적으로 GreenTD 물질은 유해종에는 높은 살조능력이 있고, 무해종에는 일시적으로 광합성활성에 영향을 주지만, 시간의 경과에 따라 회복되는 것을 알 수 있다. 따라서, 적조생물 *C. polykrikoides* 제어하기 위해서는 고밀도 실험군에서 80.8%의 살조효과를 보인 GreenTD 0.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ 의 농도가 적절할 것으로 판단되며, 현장 적용시 일시적인 희석등을 고려하여 적정농도보다 높게 살포하면 일정하게 높은 살조효율을 가질 것이며, 이는 경제성을 고려하여 충분한 경쟁력이 있는 물질로 기대된다.

사 사

본 논문은 과학기술정보통신부 해양극지기초원천기술개발의 “해양유해미세조류 대발생/소멸기작 규명 및 제어기술 개발 사업 [NRF-2016M1A5A1027456]”과 “선택성이 높은 살조기술개발 사업 (PN67400)”의 지원을 받아 수행되었다.

REFERENCES

- Baek SH, MC Jang, MH Son, HM Joo, H Cho and YO Kim. 2012. Algicidal effects of a newly developed thiazolidinedione derivative TD49, on dinoflagellate *Akashiwo sanguinea*. Ocean Polar Res. 34:1-11.
- Baek SH, M Son, SW Bae, K Shin, DH Na, H Cho, M Yamaguchi, YO Kim and SW Kim. 2013. Algicidal activity of the thiazolidinedione derivative TD49 against the harmful dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* in a mesocosm enclosure. J. Appl. Phycol. 25:1555-1565.
- Baek SH, K Shin, M Son, SW Bae, H Cho, DH Na, YO Kim and SW Kim. 2014a. Algicidal effects of yellow clay and the thiazolidinedione derivative TD49 on the fish-killing dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* in microcosm experiments. J. Appl. Phycol. 26:2367-2378.
- Baek SH, M Son, SW Jung, DH Na, H Cho, M Yamaguchi, SW Kim and YO Kim. 2014b. Enhanced species-specific chemical control of harmful and non-harmful algal bloom species by the thiazolidinedione derivative TD49. J. Appl. Phycol. 26:311-321.
- Baek SH. 2015a. Short-term changes of microbial communities after control of *Cochlodinium polykrikoides* by yellow clay and chemical compound dosing in microcosm experiments. J. Korea Acad. Industr. Coop. Soc. 16:2971-2977.
- Baek SH, D Kim, M Son, SM Yun and YO Kim. 2015b. Seasonal distribution of phytoplankton assemblages and nutrient-enriched bioassays as indicators of nutrient limitation of phytoplankton growth in Gwangyang Bay, Korea. Estuar. Coast. Shelf Sci. 163:265-278.
- Baek SH, M Son, YO Kim, H Cho, M Lee, DH Na and SW Kim. 2017. Response of *Chattonella marina* (Raphidophyceae) and marine plankton to yellow clay and thiazolidinedione derivative TD49 in a mesocosm enclosure. J. Appl. Phycol. 29:285-296.
- Costanza R, BG Norton and BD Haskell. 1992. Ecosystem health: new goals for environmental management. Island Press. Washington, D.C. pp. 236-253.
- Ebenezer V, WA Lim and JS Ki. 2014. Effects of the algicides CuSO_4 and NaOCl on various physiological parameters in the harmful dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides*. J. Appl. Phycol. 26:2357-2365.
- Fukami K, T Nishijima, S Murata, S Doi and Y Hata. 1991. Distribution of bacteria influential on the development and the decay of *Gymnodinium nagasakiense* red tide and their effects on algal growth. Nippon Suisan Gakkaishi. 57:2321-2326.
- Imai I, Y Ishida, S Sawayama and Y Hata. 1991. Isolation of a marine gliding bacterium that kills *Chattonella antiqua* (Raphidophyceae). Nippon Suisan Gakkaishi. 57:1409.
- Jeong JH, HJ Jin, CH Sohn, KH Suh and YK Hong. 2000. Algicidal activity of the seaweed *Corallina pilulifera* against red tide microalgae. J. Appl. Phycol. 12:37-43.
- Kim YM, Y Wu, TU Duong, SG Jung, SW Kim, H Cho and ES Jin. 2012. Algicidal activity of thiazolidinediones derivatives against harmful algal blooming species. Mar. Biotechnol. 14:312-322.
- Küster A and R Altenburger. 2007. Development and validation

- of a new fluorescence-based bioassay for aquatic macrophyte species. *Chemosphere* 67:194–201.
- Lee WJ and YT Park. 1998. Isolation of marine bacteria killing red tide microalgae II. Isolation and algicidal properties of *Pseudomonas* sp. LG-2 possessing killing activity for dinoflagellate, *Prorocentrum micans*. *Korean J. Fish. Aquat. Sci.* 31:852–858.
- Lee CK, TG Park, YT Park and WA Lim. 2013. Monitoring and trends in harmful algal blooms and red tides in Korean coastal waters, with emphasis on *Cochlodinium polykrikoides*. *Harmful Algae* 30:3–14.
- Park YT, JB Park, SY Chung, BC Song, WA Lim, CH Kim and WJ Lee. 1998. Isolation of marine bacteria killing red tide microalgae I. Isolation and algicidal properties of *Micrococcus* sp. LG-1 possessing killing activity for harmful dinoflagellate, *Cochlodinium polykrikoides*. *Korean J. Fish. Aquat. Sci.* 31:767–773.
- Park TG, WA Lim, YT Park, CK Lee and HJ Jeong. 2013. Economic impact, management and mitigation of red tides in Korea. *Harmful Algae* 30:131–143.
- Sengco MR and DM Anderson. 2004. Controlling harmful algal blooms through clay flocculation. *J. Eukaryot. Microbiol.* 51:169–172.
- Shumway SE, DM Frank, LM Ewart and JE Ward. 2003. Effect of yellow loess on clearance rate in seven species of benthic, filter-feeding invertebrates. *Aquac. Res.* 34:1391–1402
- Yoshinaga I, T Kawai, T Takeuchi and Y Ishida. 1995. Distribution and fluctuation of bacteria inhibiting the growth of a marine red tide phytoplankton *Gymnodinium mikimotoi* in Tanabe Bay. *Fish. Sci.* 61:780–786.
- Yoshinaga I, T Kawai and Y Ishida. 1997. Analysis of algicidal ranges of the bacteria killing the marine dinoflagellate *Gymnodinium mikimotoi* isolated from Tanabe Bay. *Fish. Sci.* 63:94–98.

Received: 23 July 2018

Revised: 14 August 2018

Revision accepted: 17 August 2018