Korean Journal of Microbiology (2015) Vol. 51, No. 1, pp. 7-13
DOI http://dx.doi.org/10.7845/kjm.2015.4080
Copyright ⓒ 2015, The Microbiological Society of Korea
pISSN 0440-2413
eISSN 2383-9902

보 문

*Microcystis aeruginosa*에 대한 hydrotrope-combined copper의 생장억제 및 독성 평가

박세근[1] · 지준구[1] · 장희정[2] · 김영관[3] · 오영숙[4] · 최성찬[1]*

[1]한림대학교 환경생명공학과, [2]㈜소프트아쿠아, [3]강원대학교 환경공학과, [4]명지대학교 환경에너지공학과

Growth inhibition of hydrotrope-combined copper against *Microcystis aeruginosa* and evaluation of its toxicity

Se-Keun Park[1], Jun-Gu Ji[1], Hee Jung Jang[2], Yeong-Kwan Kim[3], Young-Sook Oh[4], and Sung-Chan Choi[1]*

[1]*Department of Environmental Science & Biotechnology, Hallym University, Chuncheon 200-702, Republic of Korea*
[2]*Softaqua Inc., Suwon 440-825, Republic of Korea*
[3]*Department of Environmental Engineering, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Republic of Korea*
[4]*Department of Environmental Engineering & Energy, Myongji University, Yongin 449-728, Republic of Korea*

(Received November 20, 2014; Accepted February 16, 2015)

ABSTRACT: Hydrotrope-combined copper (HCC) is a copper (Cu^{2+})-based algicide, which is combined with a hydrotrope that keeps copper ion in solution to improve performance. This study assessed the growth inhibition effect of HCC against *Microcystis aeruginosa* which is one of the most common toxic cyanobacterium in eutrophic freshwater environment. Various HCC doses, ranging from 5.5 to 550 μg/L as Cu^{2+}, were applied to either BG-11 or 1/4 diluted medium with low- or high-inoculum density of *M. aeruginosa*. Growth inhibition was monitored based on a decrease in chlorophyll-a content in culture medium during the incubation. Results showed that HCC significantly inhibited the growth of *M. aeruginosa* in a dose-dependent manner. In case of 1/4 diluted BG-11 medium, HCC dose as low as 5.5 μg Cu^{2+}/L completely inhibited the production of chlorophyll-a by *M. aeruginosa*. It was found that HCC did not induce any significant release of microcystin-LR from *M. aeruginosa*. Acute toxicity of HCC was tested using *Daphnia magna*, and the 24-h EC_{50} value was 0.30 mg/L as Cu^{2+} which was much higher than the actual inhibition dose. Ames test was performed using *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TA100, and HCC showed no increase in the number of revertant colonies. The result suggested that HCC does not have any mutagenic potential in the aquatic environment. In addition, no genotoxic effect of HCC was also confirmed based on the SOS ChromoTest using *Escherichia coli* PQ37. Therefore, HCC could be used as a relatively safe and effective pre- and post-treatment agent to control hazardous algal blooming in aquatic environments.

Key words: *Microcystis aeruginosa*, algicide, Ames test, microcystin, toxicity

최근 우리나라 기후 및 수환경의 변화 등으로 인해 주요 상수원에서 조류(algae)의 대번식 현상이 빈번해지고 조류주의보 및 경보 발생일수가 증가하고 있는 실정이다. 조류는 수생태계에서 1차 생산자로서 에너지 생산, 물질순환 등 중요한 역할을 담당하고 있지만, 개체수가 비정상적으로 증가하게 되면 수중의 산소고갈, pH 상승, 이취미 발생 및 시각적 불쾌감을 유발할 뿐만 아니라 먹이 연쇄관계에 있는 수생생물에게도 피해를 입힌다(Stumpf *et al*., 2009; Hudnell, 2010; Lewitus *et al*., 2012; Lee *et al*., 2013). 또한 상수원으로 사용하는 수계에 조류가 대량 증식할 경우 정수처리공정에서 응집제 사용량 증가, 응집플록의 침전능 저하, 여과지 폐색 및 역세척 주기 단축 등의 문제를 유발한다(Jun *et al*., 2001; Choi *et al*., 2006; Ma *et al*., 2007; Joh *et al*., 2011).

황산구리($CuSO_4$ 또는 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$)는 조류 제거를 위해 흔히 사용되고 있는 생장억제제(algicide) 중 하나이다. 생리활성 물질인 구리는 조류를 포함한 대부분의 생물에 필수적인

***For correspondence.** E-mail: scchoi@hallym.ac.kr;
Tel.: +82-33-248-2151; Fax: +82-33-242-9300

미량 영양물질로서, 특히 광합성 과정에서 전자 전달체로 작용하는 plastocyanin의 주요 구성성분이다(Barón *et al*., 1995). 구리는 조류내 효소 시스템의 정상적인 기능을 위해 필수적이지만 과량의 구리는 조류의 광합성과 질소대사를 방해하거나 세포 용적의 변화와 용해(lysis)를 유발하는 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다(García-Villada *et al*., 2004; Johnson *et al*., 2007). 이러한 구리의 독성 효과에 기초한 황산구리의 사용은 1900년대 초에 처음으로 시작되었으며, 호소나 저수지 등에서 조류 제거를 위해 사용되고 있다. 그러나 황산구리는 pH 또는 알칼리도가 높은 조건에서 용해도가 급격히 낮아져 침전물을 형성하게 됨으로써(Raman and Cook, 1988; Flemming and Trevors, 1989) 생장억제 효과가 감소하여 추가적 투여를 필요로 하며, 높은 농도의 칼슘 경도 또한 구리의 독성 효과를 방해하기도 한다(Flemming and Trevors, 1989; Wurts and Perschbacher, 1994). 이러한 영향 때문에 조류 제어에 필요한 충분한 구리 농도를 유지하기 위해서는 과량의 황산구리를 투여하는 것이 불가피할 수 있으며, 이에 수반되어 인간을 포함한 비표적 생물에 부정적 영향을 줄 수 있다.

본 연구에서는 일정한 정도의 용존성 구리 이온(Cu^{2+}) 농도를 지속적으로 유지할 수 있도록 친수성 작용기를 결합시켜 만든 hydrotrope-combined copper (HCC)를 대상으로 남조세균 *Microcystis aeruginosa*에 대한 생장저해 효과와 더불어 HCC의 생태독성, 돌연변이원성 및 유전독성을 각각 평가하여 대번식 수계를 대상으로 사전방지제 또는 사후 수처리제로서의 가능성을 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

Hydrotrope-combined copper (HCC)

본 실험에서 사용한 조류생장 억제제 hydrotrope-combined copper (HCC)는 친수성 작용기인 ET-3000에 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$를 20% (w/v)가 되도록 첨가하여 제조되었다(US EPA Registration No. 64962-1; Earth Sciences Laboratories Inc.). HCC는 조류의 대번식으로 인해 유발되는 알칼리성 수계 환경(pH 8.1)에서 기존의 황산구리에 비해 3.7배 정도 침전에 대한 저항성을 지니고 있다. HCC 용액내 구리이온의 함량은 5% (w/v)에 해당하며 유도결합 플라즈마 분광광도계(ICP-OES, ICAP 6300, Thermo)로 측정 확인하였다.

조류배양 및 생장억제

생장억제 대상 생물은 미생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures)로부터 분양 받은 남조세균 *Microcystis aeruginosa* (KCTC AG30009)가 사용되었으며 배양은 BG-11 배지를 사용하였다(1.5 g $NaNO_3$, 40 mg K_2HPO_4, 75 mg $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 36 mg $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 6 mg $C_6H_8O_7$, 6 mg $(NH_4)_3Fe(C_6H_5O_7)_2$, 1 mg EDTA-2Na, 20 mg Na_2CO_3, 2.86 mg H_3BO_3, 1.86 mg $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0.22 mg $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.39 mg $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 0.08 mg $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.05 mg $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ per L DW, pH 7.1±0.1). *M. aeruginosa*의 배양은 25°C, 2,100 lux, 14:10 시간 (Light:Dark) cycle 조건에서 이루어졌으며, 2주마다 새로운 배지에 사전배양액을 10% 수준으로 접종하여 계대배양을 수행하였다.

Table 1. Corresponding Cu^{2+} concentrations with respect to the various HCC (hydrotrope-combined copper) doses prepared from a $1:10^4$ dilution of the original one

HCC dose (%, v/v)	Cu^{2+} (μg/L)
0.1	5.5
1.0	55.0
2.0	110.0
5.0	275.0
10.0	550.0

남조세균 *M. aeruginosa*에 대한 조류생장 억제제 HCC의 생장억제 효과를 평가하기 위해 screw-capped tube (26×200 mm)에 BG-11 배지와 *M. aeruginosa* 배양액을 총 부피가 20 ml이 되도록 넣은 후 준비해 놓은 HCC 용액을 첨가하였다. 실험에 사용한 HCC 용액은 $1/10^4$으로 희석한 HCC를 stock으로 제조한 다음 0.1-10% (v/v) 범위에서 첨가하였다(Table 1). 이후 10일 동안 진탕 배양하면서 2일 간격으로 *M. aeruginosa*의 생장을 chlorophyll-a (Chl-a)의 양으로 측정하였다. Chl-a의 측정은 Standard Methods (Eaton *et al*., 2005)에 준하여 acetone (9+1) 추출을 거친 후 663, 645, 630, 750 nm에서 시료의 흡광도를 측정한 후 다음의 계산식에 따라 수행하였다.

$$Chlorophyll-a\left(\frac{mg}{dm^3}\right) = \frac{(11.64 \cdot X1 - 2.16 \cdot X2 - 0.10 \cdot X3) \cdot V_{extract}}{V_{sample}}$$

여기서 $X1 = A_{663} - A_{750}$, $X2 = A_{645} - A_{750}$, $X3 = A_{630} - A_{750}$

Microcystin-LR 독소의 용출 및 분석

조류생장 억제제 HCC를 이용하여 *M. aeruginosa*를 처리할 때 세포 용해로 인한 microcystin-LR 독소의 용출 가능성을 알

아보고자 하였다. 이를 위하여 위에서 서술한 10일간의 생장억제 실험 완료 후 각 시험관의 시료를 실험군으로 준비하였으며, 비교를 위한 양성 대조군으로는 bead beater (BioSpec Products, Inc.)를 사용하여 물리적인 microcystin-LR 독소의 용출을 유도하였다. Bead beater의 작동은 배양액 대비 50% (v/v) 수준으로 glass bead (직경 0.1 mm, BioSpec Products)를 첨가한 상태에서 4,800 rpm으로 각각 3분과 1분의 작동/정지 cycle을 3회 반복하여 수행하였다. 음성 대조군은 HCC 첨가와 bead beater처리를 하지 않은 상태에서 용출되는 microcystin-LR 독소를 확인하였다.

배양액에 용출된 microcystin-LR 독소는 Microcystins-ADDA ELISA Plate Kit (Abraxis, LLC.)를 사용하여 검출하였다. 이 실험 kit는 수중에 존재하는 microcystins와 nodularins를 정량적으로 매우 민감하게 검출할 수 있는 면역학적 방법으로서 특정 항체가 대상 독성물질을 인지하는 원리에 기초한다(Fischer *et al*., 2001). Microcystin-LR 독소의 분석은 0.1–5 μg/L 범위에서 제조사의 protocol에 따라 수행하였다(www.abraxiskits.com).

물벼룩을 이용한 급성독성 평가

Daphtoxkit F™ (MicroBioTests, Inc.)와 $1/10^5$로 희석한 HCC 시료를 이용하여 물벼룩에 대한 HCC의 급성독성을 평가하였다. Daphtoxkit F™은 OECD (2004) 표준시험법에 따라 시험생물로 *Daphnia magna*를 이용하여 시험 시작 24시간 후 *D. magna*의 유영저해 및 사망 개체수를 조사하고 반수 영향농도(median effective concentration, EC_{50})를 Probit 분석으로 산출하였다. EC_{50} (%)은 시험생물의 50%가 유영저해를 일으키는 시험수 중 시료의 함유율(%)이며, 얻어진 EC_{50} (%)을 이용하여 생태 독성값(toxic unit, TU)을 계산하였다:

$$TU = \frac{1}{EC_{50}} \times 100$$

시험 물벼룩의 민감도와 실험절차의 전반적인 신뢰성을 검증하기 위하여 potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$)를 사용하여 표준독성시험을 수행한 결과, 24-h EC_{50} 값이 1.91 mg/L로 ISO에서 정한 범위(ISO, 1996)인 0.6–2.1 mg/L 내에 있는 것을 확인하였다.

HCC의 돌연변이원성(mutagenicity) 시험

돌연변이원성 시험은 Ames test를 개량한 pre-incubation 방법(Maron and Ames, 1983)으로 수행하였으며, 시험을 위한 균주로 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TA100 (hisG46, rfa, △uvrB)을 사용하였다. 균주는 Oxoid Nutrient Broth No. 2에서 overnight 배양하여 대수기(약 10^8 cells/ml) 상태에 이르도록 한 다음, 세균 배양액 0.1 ml, HCC 희석시료 (10^{-3}–10^{-6}) 0.1 ml, sodium phosphate 완충용액(pH 7.2) 0.5 ml을 혼합하여 37°C에서 30분간 진탕 배양하였다. 계속해서 top agar 2.5 ml을 넣고 혼합한 후 미리 준비한 minimal glucose agar plate에 부어 고화시킨 다음 37°C에서 48시간 동안 배양하여 발생한 복귀 돌연변이 집락(*his*$^+$ revertant colony)을 계수하였다. 음성 대조군과 양성 대조군 실험은 HCC 시료 대신 DMSO 0.1 ml과 sodium azide (NaN_3) 0.1 ml을 각각 변이원으로 사용하였다. TA100 균주는 본 실험에 앞서 histidine과 biotin 요구성, 그리고 ampicillin 내성을 미리 확인 검증하였다.

HCC의 유전독성 시험

조류생장 억제제 HCC에 대한 유전독성 시험은 SOS Chromo Test (SOS-ChromoTest Kit, EBPI)에 준하여 수행하였으며 *Escherichia coli* PQ37 균주를 사용하였다. *E. coli* PQ37은 *lacZ* 유전자(ß-galactosidase 합성에 관여)와 *sifA* SOS operon (세포분열 억제에 관여)이 융합된 돌연변이 종이다(Lantzsch and Gebel, 1997). 시험을 위해 PQ37을 LB (Luria-Bertani) 배지(10 g tryptone, 5 g yeast extract, 10 g NaCl, 20 mg ampicillin, per L DW)에 접종하고 37°C에서 OD_{600} 값이 0.05–0.06에 이를 때까지 진탕 배양하였다. 얻어진 균주 배양액 100 μl를 각 농도 별로 준비한 HCC 시료와 양성 대조물질(변이원)인 4-nitroquinoline-1-oxide (4-NQO)를 10 μl씩을 미리 분주하여 둔 96-we11 microplate의 각 well에 분주하고 37°C에서 120분간 배양하면서 SOS 반응을 유도하였다. 반응 후 ß-galactosidase의 활성 측정을 위해 *O*-nitrophenyl-ß-D-galactopyranoside (ONPG) 용액 100 μl씩을 첨가하고 발색(푸른색) 정도를 확인하였다. SOS ChromoTest를 위한 HCC 시료는 $1/10^3$로 희석한 HCC를 stock으로 제조한 다음 $1/10^6$까지 희석(1,000–0.001 mg/L)하여 사용하였다. 양성 대조물질인 4-NQO의 경우 10 mg/L인 stock을 이용해 1/64까지 희석(10–0.3125 mg/L)하여 사용하였다.

결과 및 고찰

HCC에 의한 *M. aeruginosa*의 생장 억제

본 실험에서는 남조세균 *M. aeruginosa*를 접종한 BG-11 액

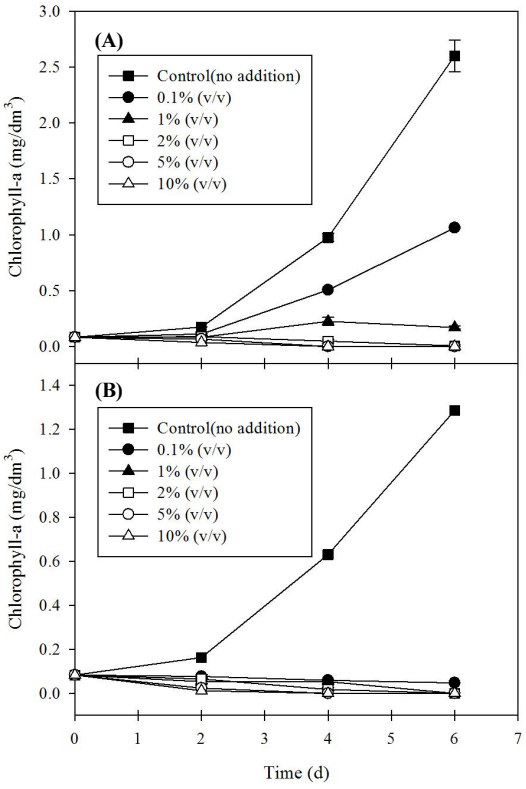

Fig. 1. Effects of HCC (hydrotrope-combined copper) on the growth of *M. aeruginosa* in either (A) BG-11 or (B) four-fold diluted BG-11 medium. Stock HCC solution, which was prepared from a 1:10^4 dilution of the original one, was dosed at 0.1−10% (v/v).

체배지에서 HCC 첨가량에 따른 *M. aeruginosa*의 생장저해를 평가하였다(Fig. 1). 이때 조류생장 억제제 HCC는 1/10^4으로 희석한 stock 용액을 배지에 0.1−10% (v/v) 범위로 첨가하였으며, 배양액에서의 Cu^{2+} 농도로 환산하면 5.5−550 μg/L에 해당한다. HCC를 첨가하지 않은 대조군에서는 Chl-a 농도가 6일 경과 후 2.6 mg/dm^3까지 지속적으로 증가하였지만, HCC를 0.1% (v/v) 수준으로 첨가한 실험군에서는 대조군보다 현저히 낮은 수준으로 증가하였다(Fig. 1A). 특히 HCC를 2−10% (v/v) 수준으로 첨가한 실험군에서는 Chl-a 농도가 검출한계 수준까지 감소하여 *M. aeruginosa*의 생장이 100% 저해되는 것으로 나타났다. 이러한 효과는 1/4로 희석한 BG-11 액체배지에서 생장시켰을 때 더욱 뚜렷하게 나타나서 0.1% 수준의 HCC 첨가만으로도 생장을 100% 억제할 수 있었다(Fig. 1B). 따라서 HCC를 첨가한 액체배지에서는 2가지 효과, 즉 영양원에 의한 생장 부진과 생장 억제제에 의한 저해효과가 동시에 존재한다고 할 수 있다. 이때 *M. aeruginosa*의 생장에 필요한 영양소의 함량이 상대적으로 낮은 조건일수록 생장 억제제에 의한 저해효과가 영양소에 의한 효과를 크게 압도한다고 해석

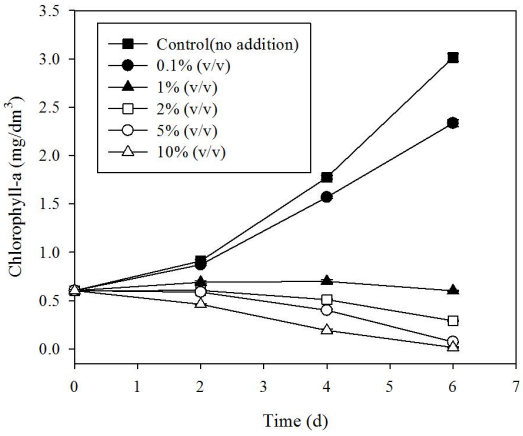

Fig. 2. Effects of HCC on the growth of *M. aeruginosa* in BG-11 medium containing high-inoculum density. Stock HCC solution, which was prepared from a 1:10^4 dilution of the original one, was dosed at 0.1−10% (v/v).

할 수 있다.

Fig. 2는 *M. aeruginosa*의 접종 농도를 약 7배 정도 증가시킨 BG-11 액체배지에서 HCC 첨가량에 따른 *M. aeruginosa*의 생장저해를 평가한 결과이다. 초기 세포 밀도가 상대적으로 높은 조건임에도 불구하고 저해효과는 높게 나타났다. 특히 액체배지에 2−10% (v/v) 수준으로 첨가된 HCC는 Chl-a의 점진적인 감소 추세로 볼 때 단순한 생장 억제가 아니라 세포의 사멸을 유도한 것으로 판단된다(Fig. 2). 하지만 *M. aeruginosa*의 세포 밀도가 상대적으로 낮은 조건에서 관찰된 HCC의 저해효과와 비교해 볼 때(Fig. 1A), 세포 밀도가 상대적으로 높은 조건에서 효과적 생장억제를 유도하기 위해서는 HCC의 투입량이 비례적으로 증가되어야 할 것으로 보인다.

Microcystin 유출 가능성 평가

남조세균이 생산하는 독소는 간독소(hepatotoxin)와 신경독소(neurotoxin)로 구분되며, 가장 흔하게 나타나는 독소는 간독소인 microcystin이다. Microcystin은 7개의 아미노산으로 구성된 수용성 cyclic peptide로서 동물성 플랑크톤, 어류, 고등동물의 간에 손상을 주는 것으로 알려져 있다(Codd and Poon, 1988; Neilan *et al*., 1999). 세계보건기구(WHO)는 microcystin 중에서 leucine (L)과 arginine (R)을 함유한 microcystin-LR 독소의 음용수 최대 허용농도를 1.0 μg/L로 정하고 있다. 일부 문헌에서 황산구리와 같은 물질을 이용하여 *M. aeruginosa*를 처리할 때 세포 내에 존재하는 microcystin이 밖으로 용출되어 원하지 않는 결과를 초래할 수 있는 것으로 보고되었다(Kenefick *et al*., 1993; Jones and Orr, 1994;

Table 2. Effects of HCC (hydrotrope-combined copper) on the release of microcystin-LR from *M. aeruginosa*

Test samples	Microcystin-LR (μg/L)
Stock HCC[a], 0.1-10% (v/v)	< DL[b]
Negative control (no treatment)	< DL
Positive control (bead beater treatment)	0.181

[a] Prepared from a $1:10^4$ dilution of the original HCC
[b] Detection limit (0.10 μg/L)

Zhou *et al*., 2013). 따라서 본 연구에서는 HCC가 세포로부터 microcystin-LR 독소를 유의한 수준으로 용출시키는지 확인할 필요가 있었다. HCC를 이용한 실험군에서는 $1/10^4$로 희석한 stock HCC를 0.1−10% (v/v) 범위로 첨가하였고, 양성 대조군에서는 bead beater를 사용하여 물리적으로 microcystin-LR 독소의 용출을 유도하였다. Table 2에서 나타낸 바와 같이 *M. aeruginosa* 세포를 물리적으로 파쇄한 양성 대조군에서 검출된 microcystin-LR 독소의 농도는 0.181 μg/L이었으나, bead beater와 HCC를 사용하지 않은 음성 대조군 뿐만 아니라 0.1−10% (v/v) 수준으로 HCC를 첨가한 액체배지에서 측정된 microcystin-LR 독소의 농도는 모두 검출한계(0.10 μg/L) 미만이었다. 따라서 생장 억제 성분으로 구리의 독성에 기초하고 있는 HCC는 남조세균의 생장을 억제하는 유효 첨가농도(0.1−1.0%)에서 뿐만 아니라 그 이상의 농도(~10%)에서도 유의한 수준으로 독소를 용출시키지 않으므로 안전하게 사용될 수 있을 것으로 평가된다.

물벼룩에 대한 HCC의 급성독성

물벼룩 *D. magna*를 이용하여 조류생장 억제제 HCC의 24시간 급성독성(acute toxicity) 시험을 수행하였다. 급성독성 시험에는 HCC를 $1/10^5$로 희석한 시험시료를 사용하였으며, 시험시료의 35% 정도를 함유한 시료에서 *D. magna*가 50%의 유영저해(EC_{50})를 받는 것으로 측정되었다(Fig. 3). 이때 얻어진 EC_{50} (%)으로부터 계산된 TU (Toxic Unit) 값은 2.86이었다. TU를 이용한 급성독성 정도를 분류한 Persoone 등(2003)에 따르면 1 < TU < 10 범위에 있는 경우 Class III에 해당하는 급성독성이다.

Fig. 3의 *D. magna*에 대한 HCC의 급성독성 시험에서 50% 유영저해를 일으킨 시료에 함유된 구리의 측정 농도는 약 0.30 mg/L이었다. *D. magna*에 대한 황산구리의 급성독성을 보고한 문헌에서 EC_{50}을 나타내는 Cu 농도는 약 0.24 mg/L로서 (Merck, 2001; Kovács *et al*., 2012) HCC에 포함된 Cu의 EC_{50} 값이 문헌에서 보고되고 있는 값과 유사한 수준이라는 것을 확인할 수 있다. 비록 급성독성 정도는 황산구리와 유사하지만 HCC는 매우 낮은 농도(5.5 μg/L)에서 유효한 생장 억제를 유도할 수 있으므로(Fig. 1) 상대적으로 안전하게 활용될 수 있을 것이다.

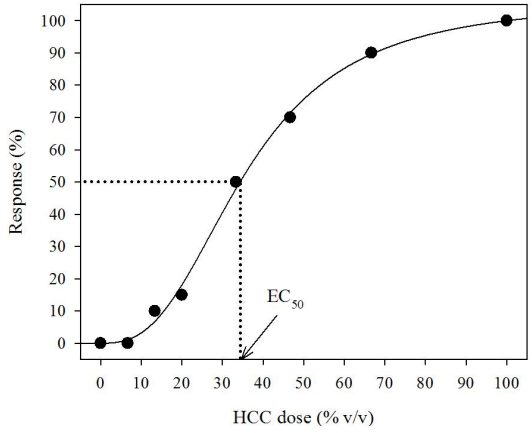

Fig. 3. Acute toxicity (24-h EC_{50}) of HCC sample on *Daphnia magna*. HCC was prepared from a $1:10^5$ dilution of the original one.

Table 3. Mutagenicity test of HCC (hydrotrope-combined copper) using *S. enterica* serovar Typhimurium TA100

Samples	Revertant (CFU/plate)
DMSO[a]	165 ± 20
NaN_3[b]	3,080 ± 56
$1:10^3$ HCC	149 ± 2
$1:10^4$ HCC	135 ± 5
$1:10^5$ HCC	142 ± 9
$1:10^6$ HCC	172 ± 1

[a] Negative control
[b] Positive control

HCC의 돌연변이원성 평가

조류생장 억제제 HCC를 $1/10^3$에서 $1/10^6$까지 희석한 시료를 첨가하였을 때(0.1 ml/plate) *S. enterica* serovar Typhimurium TA100에 대한 복귀돌연변이 집락수를 계수한 결과를 Table 3에 나타냈다. *Salmonella* 균주를 이용한 복귀돌연변이 시험은 시험용 균주의 염색체상에 염기쌍 치환이나 frame shift 변이를 일으키는 화학물질에 의해 유발되는 his^-로부터 his^+로의 복귀변이를 검출하는 방법으로서 돌연변이원성의 판정은 음성 대조군 복귀돌연변이 집락수의 2배 이상인 경우를 양성으로 판정한다(Maron and Ames, 1983). 본 실험에서 NaN_3를 사용한 양성 대조군의 복귀돌연변이 집락수는 DMSO를 사용한 음성 대조군보다 약 19배 정도 증가하여 강한 돌연변이원성을

나타냈으나, HCC는 모든 시료에서 음성 대조군과 유사한 수준의 복귀돌연변이 집락수를 나타내었다(Table 3). 따라서 유의할 만한 복귀돌연변이 증가를 나타내지 않은 HCC는 돌연변이원성이 없는 것으로 판단된다.

HCC의 유전독성 시험

SOS ChromoTest는 *E. coli* PQ37을 유전독성물질에 노출시키면 DNA 복제가 저해되어 유도되는 SOS response 중 전사가 유도되는 한 유전자에 융합된 lacZ reporter 유전자의 기질분해반응을 이용하는 방법이다(Quillardet and Hofnung, 1985; Lantzsch and Gebel, 1997). SOS 반응이 유도되었음을 나타내는 ß-galactosidase의 활성도는 ONPG 기질을 이용한 발색법으로 확인할 수 있다. SOS ChromoTest는 DNA에 손상을 주는 유전독성물질의 평가에 편리하게 이용될 뿐만 아니라 아미노산 등 외적 요인의 방해를 받지 않는 특징을 갖고 있다(Quillardet and Hofnung, 1985).

Fig. 4는 HCC와 4-NQO (양성 대조군)의 유전독성을 평가하기 위해 수행한 SOS ChromoTest의 결과로서, 4-NQO로 처리한 경우 농도에 따른 발색 정도의 차이와 함께 최소 농도인 약 0.3 mg/L의 농도에서도 유전독성을 유발하는 것으로 나타났다. 그러나 HCC의 경우 시험에 적용한 stock 용액을 비롯한 모든 희석시료에서 유의한 수준의 발색이 나타나지 않음을 확인하였다(Fig. 4). 이러한 결과는 HCC가 수계환경에 투입되어도 유전독성물질로 작용할 가능성이 매우 낮다는 것을 의미한다.

이상의 결과로부터 쉽게 침전되는 기존 구리 기반 조류억제제의 한계를 개선한 HCC가 상습적으로 조류 대번식이 발생하는 수계에서 사전 또는 사후처리제로서 유용하게 쓰일 수 있을 것으로 기대된다. 또한 HCC는 여러 측면에서 살펴 본 독성시험의 결과 유효농도 수준 또는 이를 훨씬 상회하는 농도 수준에서 유의한 독성효과를 유발하지 않으므로 비교적 안전하게 사용될 수 있을 것으로 평가된다.

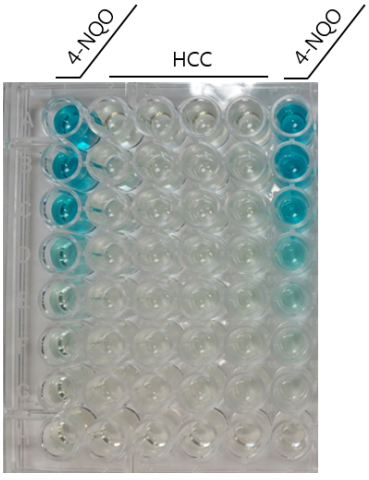

Fig. 4. Genotoxicity of HCC (1,000 − 0.001 μl/L) and 4-nitroquinoline-1-oxide (4-NQO; 10 − 0.3125 μg/ml) tested using SOS ChromoTest Kit. Samples were added from high (top row) to low (bottom row) doses.

적 요

Hydrotrope-combined copper (HCC)는 구리의 용존성을 유지하기 위해 황산구리와 친수성 작용기를 결합시켜 제조한 구리 이온(Cu^{2+}) 기반의 조류생장 억제제이다. 본 연구는 부영양성 담수에 분포하는 대표적인 남조세균 *Microcystis aeruginosa*에 대한 HCC의 생장 저해효과를 평가하였다. 이를 위하여 *M. aeruginosa*의 접종 농도 또는 생장배지인 BG-11의 희석 정도를 달리하면서 구리 이온 농도 기준 5.5–550 μg/L의 범위에서 HCC를 첨가하고 생장저해효과를 chlorophyll-a 농도의 변화로 측정하였다. HCC는 *M. aeruginosa*의 생장을 현저히 저해하였으며 특히 1/4로 희석한 BG-11 액체배지에서는 구리 이온의 농도로 환산했을 때 5.5 μg/L가 되는 HCC 첨가만으로도 생장을 완전히 억제하는 것으로 나타났다. HCC의 첨가로 인해 세포로부터 microcystin-LR 독소가 용출되는지 확인한 실험에서 HCC는 *M. aeruginosa*의 생장을 억제하는 유효 농도뿐만 아니라 그 이상의 농도(550 μg/L)에서도 독소를 용출시키지 않는 것으로 확인되었다. 한편 물벼룩(*Daphnia magna*)에 대한 HCC의 급성독성시험에서 50% 유영저해를 일으킨 시료에 함유된 구리의 농도는 약 0.30 mg/L로서 생장억제 유효농도를 훨씬 상회하였다. 추가로 HCC의 돌연변이원성과 유전독성을 평가하기 위해서 수행한 Ames test 및 SOS ChromoTest에서도 HCC는 *M. aeruginosa*의 생장억제 유효농도를 상회하는 농도 수준에서도 독성물질로 작용하지 않는 것으로 나타났다. 이상의 결과로부터 기존 구리 기반 조류생장 억제제의 한계를 개선한 HCC가 상습적으로 조류 대번식이 발생하는 수계에서 사전 또는 사후처리제로서 비교적 안전하고 유용하게 쓰일 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 말

이 연구는 2013년 강원녹색환경지원센터에서 시행한 환경기술연구개발사업의 지원(과제번호 13-4-30-33)으로 수행되

었습니다. 저자 일동은 돌연변이원성 평가 균주를 제공해 준 충북대 이동훈 교수에게 감사 드립니다.

References

Barón, M., Arellano, J.B., and Gorgé, J.L. 1995. Copper and photosystem II: a controversial relationship. *Physiol. Plant* **94**, 174−180.

Choi, S.K., Lee, J.Y., Kwon, D.Y., and Cho, K.J. 2006. Settling characteristics of problem algae in the water treatment process. *Water Sci. Technol.* **53**, 113−119.

Codd, G.A. and Poon, G.K. 1988. Cyanobacterial toxins, pp. 283−296. *In* Rogers, L.J. and Gallon, J.R. (eds), Biochemistry of the Algae and Cyanobacteria. Clarendon Press, Oxford.

Eaton, A.D., Clesceri, L.S., Rice, E.W., Greenberg, A.E., and Franson, M.A.H. 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st ed. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, Washington, D.C., USA.

Fischer, W.J., Garthwaite, I., Miles, C.O., Ross, K.M., Aggen, J.B., Chamberlin, A.R., Towers, N.R., and Dietrich, D.R. 2001. Congener-independent immunoassay for microcystins and nodularins. *Environ. Sci. Technol.* **35**, 4849−4856.

Flemming, C.A. and Trevors, J.T. 1989. Copper toxicity and chemistry in the environment: a review. *Water Air Soil Poll.* **44**, 143−158.

García-Villada, L., Rico, M., Altamirano, M., Sánchez-Martín, L., López-Rodas, V., and Costas, E. 2004. Occurrence of copper resistant mutants in the toxic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*: characterisation and future implications in the use of copper sulphate as algaecide. *Water Res.* **38**, 2207−2213.

Hudnell, H.K. 2010. The state of U.S. freshwater harmful algal blooms assessments, policy and legislation. *Toxicon* **55**, 1024−1034.

International Organization for Standardization. 1996. Water quality-determination of the inhibition of mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) − acute toxicity test. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

Joh, G., Choi, Y.S., Shin, J.K., and Lee, J. 2011. Problematic algae in the sedimentation and filtration process of water treatment plants. *J. Water Suppl. Res. Technol. AQUA* **60**, 219−230.

Johnson, H.L., Stauber, J.L., Adams, M.S., and Jolley, D.F. 2007. Copper and zinc tolerance of two tropical microalgae after copper acclimation. *Environ. Toxicol.* **22**, 234−244.

Jones, G.J. and Orr, P.T. 1994. Release and degradation of microcystin following algicide treatment of a *Microcystis aeruginosa* bloom in a recreational lake, as determined by HPLC and protein phosphatase inhibition assay. *Water Res.* **28**, 871−876.

Jun, H.B., Lee, Y.J., Lee, B.D., and Knappe, D.R.U. 2001. Effectiveness of coagulants and coagulant aids for the removal of filter-clogging *Synedra*. *J. Water Suppl. Res. Technol. AQUA* **50**, 135−148.

Kenefick, S.L., Hrudey, S.E., Peterson, H.G., and Prepas, E.E. 1993. Toxin release from *Microcystis aeruginosa* after chemical treatment. *Water Sci. Technol.* **27**, 433−440.

Kovács, A., Abdel-Hameid, N.A., Ács, A., Ferincz, Á., and Kováts, N. 2012. A novel protocol for assessing aquatic pollution, based on the feeding inhibition of *Daphnia magna*. *Knowl. Managt. Aquatic Ecosyst.* **404**, 07.

Lantzsch, H. and Gebel, T. 1997. Genotoxicity of selected metal compounds in the SOS chromotest. *Mutat. Res.* **389**, 191−197.

Lee, C.S., Ahn, C.Y., La, H.J., Lee, S., and Oh, H.M. 2013. Technical and strategic approach for the control of cyanobacterial bloom in fresh waters. *Korean J. Environ. Biol.* **31**, 233−242.

Lewitus, A.J., Horner, R.A., Caron, D.A., Garcia-Mendoza, E., Hickey, B.M., Hunter, M., Huppert, D.D., Kudela, R.M., Langlois, G.W., Largier, J.L., *et al.* 2012. Harmful algal blooms along the North American west coast region: history, trends, causes, and impacts. *Harmful Algae* **19**, 133−159.

Ma, J., Lei, G., and Fang, J. 2007. Effect of algae species population structure on their removal by coagulation and filtration processes-a case study. *J. Water Suppl. Res. Technol. AQUA* **56**, 41−54.

Maron, D.M. and Ames, B.N. 1983. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res.* **113**, 173−215.

Merck, Inc. 2001. Copper (II) sulfate pentahydrate very fine crystals. Safety data sheet. pp. 1−6.

Neilan, B.A., Dittmann, E., Rouhiainen, L., Bass, R.A., Schaub, V., Sivonen, K., and Börner, T. 1999. Nonribosomal peptide synthesis and toxigenicity of cyanobacteria. *J. Bacteriol.* **181**, 4089−4097.

Organization for Economic Co-operation and Development. 2004. Test no. 202. *Daphnia* sp. acute immobilization test. *In* OECD (ed.), Guidelines for Testing Chemicals, Section 2: Effects on Biotic Systems. OECD Publishing, Paris, France.

Persoone, G., Marsalek, B., Blinova, I., Törökne, A., Zarina, D., Manusadzianas, L., Nalecz-Jawecki, G., Tofan, L., Stepanova, N., Tothova, L., *et al.* 2003. A practical and user-friendly toxicity classification system with microbiotests for natural waters and wastewaters. *Environ. Toxicol.* **18**, 395−402.

Quillardet, P. and Hofnung, M. 1985. The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. *Mutat. Res.* **147**, 65−78.

Raman, R.K. and Cook, B.C. 1988. Guidelines for applying copper sulfate as an algicide: Lake Loami field study. ILENR/RE-WR-88/19. Illinois Dept. of Energy and Natural Resources, Springfield, IL.

Stumpf, R.P., Tomlinson, M.C., Calkins, J.A., Kirkpatrick, B., Fisher, K., Nierenberg, K., Currier, R., and Wynne, T.T. 2009. Skill assessment for an operational algal bloom forecast system. *J. Mar. Syst.* **76**, 151−161.

Wurts, W.A. and Perschbacher, P.W. 1994. Effects of bicarbonate alkalinity and calcium on the acute toxicity of copper to juvenile channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture* **125**, 73−79.

Zhou, S., Shao, Y., Gao, N., Deng, Y., Qiao, J., Ou, H., and Deng, J. 2013. Effects of different algaecides on the photosynthetic capacity, cell integrity and microcystin-LR release of *Microcystis aeruginosa*. *Sci. Total Environ.* **463-464**, 111−119.