

적조생물 살조세균 탐색

III. 유해성 적조생물 *Cochlodinium polykrikoides*에 대한 *Micrococcus* sp. LG-5의 살조 효과

정성윤 · 박영태* · 이원재
부경대학교 미생물학과, *부경대학교 해양과학공동연구소

Isolation of Marine Bacteria Killing Red Tide Microalgae

III. Algicidal Effects of Marine Bacterium, *Micrococcus* sp. LG-5 against the Harmful Dinoflagellate, *Cochlodinium polykrikoides*

Seong-Youn JEONG, Young-Tae PARK* and Won-Jae LEE

Department of Microbiology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

*Korea Inter-University Institute of Ocean Science, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

The algicidal effects of marine bacteria were investigated and a strain, which had the strongest algicidal activity against the harmful dinoflagellate, *Cochlodinium polykrikoides* was selected. The bacterium was isolated in seawater during the period of blooming of *C. polykrikoides* in Masan Bay. This algicidal bacterium was identified as *Micrococcus* sp. LG-5 by means of morphological and biochemical tests. The optimal culture conditions of *Micrococcus* sp. LG-5 were 25°C, pH 7.0 and 3.0% NaCl concentration. The algicidal activity of *Micrococcus* sp. LG-5 was significantly increased to maximum value in the late of logarithmic phase of cell culture. In addition, the culture filtrate (pore size, 0.1 μm) of *Micrococcus* sp. LG-5 showed strong algicidal effects. The cell numbers of *C. polykrikoides* were decreased from 1.2×10⁴ cells/ml to less than 2×10³ cells/ml within 3, 6, 30 hours at the concentrations of culture filtrate 10%, 5% and 1%, respectively. These results indicated that the algicidal effect was mediated by certain substances released from *Micrococcus* sp. LG-5.

Key words: Red tide, *Cochlodinium polykrikoides*, Algicidal bacteria, *Micrococcus* sp. LG-5, Algicidal activity

서 론

1995년에 *Cochlodinium polykrikoides*에 의한 고밀도 적조가 남해안에서 동남해안까지 장기간에 걸쳐 발생하여 연안 수산어장, 양식업에 막대한 피해를 입힌 바 있다 (Kim et al., 1997). 이를 계기로 우리 나라 연안에서 그간 발생한 적조의 실태를 재조명하고 적조 원인생물의 환경 생리 및 발생 원인 등을 철저히 규명하여 생태계에 미치는 영향을 최소한으로 하면서도 효과적인 적조 방제대책이 절실히 요구되고 있다.

자연 생태계에서 적조의 발생에서 소멸에 이르는 과정을 관찰해 보면 그 소멸 기간이 2~3일 사이에 급격히 일어나는 특징이 있으며, 이와 같은 현상은 물리·화학적 요인만으로는 설명되어지지 않고 (深見·西島, 1994), 생물학적인 측면, 즉 바이러스 감염, 세균 및 균류의 영향, 다른 조류와의 경쟁, 동물 플랑크톤에 의한 포식 등이 적조 소멸에 관여하고 있을 가능성이 있으며, 적조 소멸기에 원인생물을 사멸시키는 세균군이 증가한다고 Yoshinaga et al. (1995a) 및 Fukami et al. (1997)이 보고하였다. 또한 국내에서도 Park et al. (1998)과 Kim et al. (1999)이 현장해역의 살조세균이 적조 발생 및 소멸에 깊이 관여한다고 보고하였다.

해양세균에 의한 식물 플랑크톤 저해에 관한 연구로서는 국외에서는 Stewart and Brown (1969), Baker and Herson (1978) 및 Ishio et al. (1987) 등의 보고가 있는 후, Yoshinaga et al. (1995a), Kim et al. (1998) 및 Imai et al. (1998a)이 bioassay법을 이용하여

각각 *Gymnodinium mikimotoi*, *Heterosigma akashiwo* 및 *Heterocapsa circularisquama*와 살조세균과의 동태를 조사 보고하였다. 이와 같이 살조세균이 적조 소멸에 중요한 역할을 할 것이라 기대되어 적조방제 대책의 일환으로 살조세균에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.

따라서 본 연구는 적조구제 대책의 일환으로, 적조다발해역인 마산만에서 분리한 *C. polykrikoides*에 대한 살조활성이 우수하고 다른 적조생물에도 광범위하게 영향을 미치는 *Micrococcus* sp. LG-5를 분리, 동정하여 그 생리·생태적 특성과 살조활성, 살조기작을 연구한 결과이다.

재료 및 방법

1. *C. polykrikoides*의 순수분리 및 최적 배양조건

*C. polykrikoides*는 1996년 9월 마산만의 해수에서 분리하여 capillary pipette법과 한계희석법으로 처리한 배양주를 Droop (1967)과 Cottrell and Suttle (1993)의 방법을 응용하여 antibiotic complex (ampicillin, 100 μg/ml; streptomycin, 10 μg/ml; chloramphenicol, 10 μg/ml; penicillin G, 10 μg/ml; neomycin, 50 μg/ml; gentamicin, 50 μg/ml; kanamycin, 10 μg/ml; nystatin, 1.5 μg/ml)에 12 시간 노출시켜 세균 등을 제거한 후, 다시 항생제를 첨가하지 않은 새로운 f/2-Si 배지 (Guillard and Ryther, 1962)에서 계대배양 하

였다. 이러한 무균배양주를 무균 검사법에 의해 오염 미생물이 검출되지 않는 것을 확인한 후 모든 실험에 사용하였다. *C. polykirkoides*의 최적 배양조건은 온도, 염농도, pH, 광량에 대해서 조사하였고, 일간 성장률 (specific growth rate: SGR)은 Stein (1973)의 방법에 따라 증식속도가 대수증식기에 도달했을 때의 세포밀도를 계수하여 산출하였다.

2. 우수 살조세균 선별 및 동정

*C. polykirkoides*를 사멸시키는 살조세균 110 균주를 1996년 6~10월에 걸쳐 마산만에서 분리하여 그 중에서 살조활성이 뛰어난 12 균주를 선별하여 7종의 적조생물에 대한 살조범위를 조사하였다. 살조세균의 동정은 Simidu et al. (1977)과 MacFaddin (1984)의 방법과 API kit system (Analytab Products Inc., N.Y.) 및 ID 32 staph (BioMeriux Co., France)의 분석 결과를 Kocur (1986)에 따라 동정하였다.

3. 살조세균 *Micrococcus* sp. LG-5의 살조효과

3-1. *Micrococcus* sp. LG-5의 최적 성장조건과 성장단계에 따른 살조효과

살조세균 *Micrococcus* sp. LG-5의 성장에 미치는 최적 온도, pH, NaCl 농도는, 각 구간별로 PPES-II 액체배지 (Taga, 1968)에서 배양하여 균의 증식을 분광광도계 (Shimadzu, model UV-160)를 이용하여 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 PPES-II 액체배지에서 대수증식기로 배양한 *Micrococcus* sp. LG-5를 새로운 PPES-II 액체배지에 최종농도가 10^4 cells/ml가 되도록 접종하여 흡광도를 측정하였으며, 각 대상 실험구를 제외한 모든 배양 조건은 최적 배양조건인 25°C, pH 7.0, 3.0% NaCl 농도로 설정하였다. 또한 최적조건에서의 살조세균 *Micrococcus* sp. LG-5의 증식 정도를 조사하였으며, 성장단계별 배양여과액의 살조활성 (algicidal activity)을 알아보기 위하여 성장단계별 (유도기, 대수증식기 초기, 대수증식기 후기, 정지기)로 살조세균 배양액을 원심분리 (8,000×g, 4°C, 10 min)하여 상등액을 pore size 0.1 µm polycarbonate membrane filter로 여과한 후, 대수증식기의 *C. polykirkoides* 배양액 (1.2×10^4 cells/ml) 100 ml에 각 배양여과액을 20 ml씩 접종하여 *C. polykirkoides*의 최적 배양조건 (20°C, 광주기 14 L:10D, 광량 $140 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$)에서 3시간 배양 후 살조활성을 조사하였다. 살조활성은 *C. polykirkoides*의 생존상태를 광학현미경 하에서 관찰하여 3시간 후에 살아있는 *C. polykirkoides* 세포수를 계수하는 bioassay법으로 측정하였으며 아래의 식으로 계산하였다. 이 때 control에는 세균 배양여과액 대신 동량의 PPES-II 액체배지를 넣어 주었다.

Algicidal activity (%)

$$= \left(1 - \frac{\text{세균 배양여과액을 첨가한 시험구의 } C. \text{ polykirkoides의 세포수}}{\text{Control의 } C. \text{ polykirkoides의 세포수}} \right) \times 100$$

3-2. *C. polykirkoides*에 대한 *Micrococcus* sp. LG-5의 살조유형

Micrococcus sp. LG-5의 *C. polykirkoides*에 대한 살조유형을 조사하기 위하여 24 well microplate에 pore size 0.4 µm의 cell culture insert (FALCON, USA)를 삽입한 2조배양계를 이용하였다. cell culture insert 내부에 f/2-Si 배지에서 전배양한 *C. polykirkoides* (1.2×10^4 cells/ml) 1 ml를 넣고, cell culture insert 외부에는 f/2-Si 배지 1 ml를 넣었다. Test well에는 PPES-II 액체배지에서 배양한 살조세균을 원심분리하여 모든 균체를 멸균해수로 희석하여 cell culture insert 외부에 최종농도가 10^5 cells/ml이 되도록 접종하였다. 그리고 cell culture insert 내부에 살조세균을 첨가한 well을 positive control로, cell culture insert 내·외부에 살조세균을 첨가하지 않은 well을 negative control로 하였다. 모든 well은 *C. polykirkoides*의 배양조건에서 배양하여 48시간 후에 살조유무를 확인하였다.

3-3. *Micrococcus* sp. LG-5 배양여과액의 살조효과

Micrococcus sp. LG-5가 생산하는 물질에 의한 살조효과를 조사하기 위하여, PPES-II 액체배지에서 최적조건으로 18시간 배양한 살조세균 배양액 ($\text{OD}_{660}=1.8$)을 원심분리 (8,000×g, 4°C, 10 min)하여 상등액을 pore size 0.1 µm filter로 여과하였다. 대수증식기의 *C. polykirkoides* (1.2×10^4 cells/ml) 100 ml에 여과액의 첨가농도가 1, 5, 10%가 되게 하여 상기의 *C. polykirkoides* 배양조건에서 배양하여 살조효과를 측정하였다. Control에는 PPES-II 액체배지를 1, 5, 10%가 되게 첨가하였다.

3-4. *Micrococcus* sp. LG-5의 균체만 접종했을 때의 살조효과

대수증식기 후기의 *Micrococcus* sp. LG-5 배양액 ($\text{OD}_{660}=1.8$)을 원심분리 (2,500×g, 4°C, 20 min)로 집균한 후 f/2-Si 배지로 3회 수세하고, 대수증식기의 *C. polykirkoides* 배양액 (1.2×10^4 cells/ml) 100 ml에 수확된 균체의 최종 농도가 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 cells/ml가 되도록 접종한 후, 상기의 *C. polykirkoides* 배양조건으로 배양하여 살조효과를 조사하였다.

결과 및 고찰

1. *C. polykirkoides*의 최적 배양조건과 일간 성장률

*C. polykirkoides*의 최적 성장조건은 온도 20°C, 염분 34‰, pH 8.2, 광량 $140 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ 이었으며, 일간 성장률 SGR (/day)은 0.483이었고, 최고 밀도는 2.78×10^4 cells/ml였다.

2. 살조세균의 분리 및 살조특이성

조사기간중 살조세균 110 균주가 분리되었으며, *Micrococcus* spp. (33.2%), *Pseudomonas* spp. (24.7%), *Alteromonas* spp. (17.4%), *Flavobacterium* spp. (11.3%), *Aeromonas* spp. (6.2%), *Vibrio* spp. (4.1%) 순으로 우점하였다. 분리된 살조세균 중 *C. polykirkoides*에 대한 살조활성이 뛰어난 12 균주를 선별하여 7종의 적조생물에 대한 살조범위를 조사한 결과를 Table 1에 나타내었다. *Micrococcus* sp. LG-5는 *Prorocentrum minimum*과 *Scripps-*

Table 1. Algicidal range of *C. polykrikoides*-algicidal bacteria isolated from Masan Bay

| Species | Red tide microorganisms | | | | | | |
|------------------------------|------------------------------|-------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| | <i>Alexandrium tamarense</i> | <i>C. polykrikoides</i> | <i>Gymnodinium catenatum</i> | <i>Heterocapsa triquetra</i> | <i>Heterosigma akashiwo</i> | <i>Prorocentrum minimum</i> | <i>Scrippsiella trochoidea</i> |
| <i>Micrococcus</i> sp. LG-5 | +++ | +++ | ++ | ++ | +++ | +/- | +/- |
| <i>Micrococcus</i> sp. LG-7 | +/- | ++ | + | +/- | +/- | +/- | +/- |
| <i>Micrococcus</i> sp. LG-10 | +/- | ++ | + | +/- | +/- | +/- | +/- |
| <i>Pseudomonas</i> sp. LG-12 | ++ | ++ | + | +/- | ++ | +/- | +/- |
| <i>Pseudomonas</i> sp. LG-17 | + | ++ | +/- | +/- | +/- | +/- | +/- |
| <i>Pseudomonas</i> sp. LG-18 | +/- | ++ | + | +/- | + | +/- | +/- |
| <i>Pseudomonas</i> sp. LG-63 | +/- | ++ | + | +/- | +/- | + | +/- |
| <i>Pseudomonas</i> sp. LG-68 | + | ++ | + | +/- | ++ | +/- | + |
| <i>Vibrio</i> sp. LG-82 | +/- | ++ | + | +/- | +/- | +/- | +/- |
| <i>Vibrio</i> sp. LG-99 | + | ++ | + | +/- | +/- | +/- | +/- |
| <i>Vibrio</i> sp. LG-103 | +/- | ++ | +/- | +/- | +/- | +/- | +/- |
| <i>Vibrio</i> sp. LG-108 | ++ | ++ | ++ | + | +/- | + | + |

Algicidal activity in each was determined after 48 hours of inoculation.

+++ , >90% death rate; ++ , >70% death rate; + , >50% death rate; +/- , no effect.

*siella trochoidea*를 제외한 5종의 적조생물에 대해 광범위한 살조활성을 보였으며, 특히 *C. polykrikoides*에 대해 가장 높은 살조활성을 보였다. 또한 *Pseudomonas* sp. LG-68은 *Heterocapsa triquetra*와 *P. minimum*을 제외한 5종의 적조생물에 살조활성을 보였고, *Vibrio* sp. LG-108은 *H. akashiwo*를 제외한 6종의 적조생물에 대해 광범위한 살조활성을 보였다. *Vibrio* sp. LG-103은 *C. polykrikoides*를 제외한 6종의 적조생물에 대해 살조활성이 없어 살조특이성이 높았다. 선별된 12개의 균주 중 *C. polykrikoides*에 대해 가장 높은 살조활성을 보이고 적조생물에 광범위하게 영향을 미친 *Micrococcus* sp. LG-5 균주를 선택하여 그 형태 및 생화학적 특성을 조사한 결과를 Table 2에 나타내었다. 이 세균은 Gram 양성, 구균으로 황색색소를 생성하고 운동성이 없으며, Catalase 양성, Oxidase 음성, O/F Glucose test에서 oxidative, Arginine Dihydrolase 음성, Bacitracin (0.04 U) 감수성 검사에 감수성, Lysostaphin (200 µg/ml)에 내성을 나타내어 *Micrococcus*속으로 동정되어 *Micrococcus* sp. LG-5로 명명하였다. 또한 이 균주는 10% NaCl 농도에서도 성장이 가능하였으나 4°C에서는 증식하지 못하였다.

지금까지 알려진 살조세균으로는 *Alteromonas*속 (Sawayama et al., 1993; Imai et al., 1995; Nagai and Imai, 1997), *Cytophaga*속 (Stewart and Brown, 1969; Mitsutani et al., 1992; Imai et al., 1998 b), *Flavobacterium*속 (Fukami et al., 1992; Yoshinaga et al., 1995 b), *Micrococcus*속 (Park et al., 1998), *Pseudoalteromonas*속 (Lovejoy et al., 1998), *Pseudomonas*속 (Baker and Herson, 1978; Lee and Park, 1998), *Saprospira*속 (Sakata and Yasumoto, 1991) 및 *Vibrio*속 (Ishio et al., 1987) 등으로 많은 종들이 보고되고 있다.

3. *Micrococcus* sp. LG-5의 살조효과

3-1. *Micrococcus* sp. LG-5의 최적 성장조건과 성장단계에 따른 살조효과

Table 2. Biological and physiological characteristics of *Micrococcus* sp. LG-5

| Tests | Result | Tests | Result |
|------------------------------------|-----------|--------------------------|--------|
| Pigment | yellow | Mannitol | - |
| Cell form | cocci | Rafinose | - |
| Gram stain | + | Ribose | - |
| Motility | - | Cellobiose | - |
| Flagella | - | Nitrate Reduction | - |
| Oxidase | - | VP Acetoin Production | + |
| Catalase | + | β-Galactosidase | - |
| O/F glucose | oxidative | Fructose | + |
| Lysostaphin resistance (200 µg/ml) | - | Mannose | - |
| Bacitracin (0.04 U) | + | NOVO biocin resistance | - |
| Growth at 4°C | no growth | Sucrose Fermentation | - |
| Growth at 40°C | growth | Turiose Fermentation | - |
| Growth at 0% NaCl | growth | Arabinose Fermentation | - |
| Growth at 5% NaCl | growth | N-Acetyl-Glucosamine | - |
| Growth at 10% NaCl | growth | Fermentation | - |
| Urease | - | Arginine Arylamidase | - |
| Arginine Dihydrolase | - | Alkaline Phosphatase | + |
| Ornithine Decarboxylase | - | Pyroglutonyl Arylamidase | + |
| Esculin Hydrolysis | - | β-Glucuronidase | - |
| Melibiose | - | Maltose | - |
| D-xylose | - | Lactose | - |
| Trehalose | - | | |

Micrococcus sp. LG-5의 최적 배양조건을 Fig. 1에 나타내었다. 최적 온도는 25°C였으며, 10~40°C에서 증식이 가능하였으나, 5°C 이하에서는 증식하지 못하였다 (Fig. 1-A). pH에 따라서는 pH 7.0에서 가장 증식이 잘되었으며, pH 6.0~10.0에서 증식이 가능하였고 pH 4.0에서도 약한 증식을 보였다 (Fig. 1-B). 또한 NaCl 농도에 따라서는 3.0% NaCl 농도에서 최대 성장을 보였으며, 0~10.0%까지 상당히 넓은 범위에서도 성장이 가능하여 담수뿐만 아니라 고염농도에서도 견디는 광염성 세균으로 담수 유입이 많은

연안 해양 환경에 적응력이 높을 것으로 판단된다 (Fig. 1-C). 이상의 실험 결과, *Micrococcus* sp. LG-5는 25°C, pH 7.0, 3.0% NaCl 농도에서 가장 높은 성장률을 보였다.

Micrococcus sp. LG-5의 성장곡선과 성장단계에 따른 배양여과액의 살조활성은 Fig. 2에 나타내었다. 최적 조건에서 *Micrococcus* sp. LG-5는 3시간 정도의 유도기를 거친 후 대수증식기로 접어들어 20시간 후 완전히 성장하여 서서히 정지기로 접어들었다. 성장단계에 따른 살조활성은 대수증식기 후기에 정지기에 80% 이상으로 높게 나타났다. 대수증식기 후기에는 *C. polykirkoides*를

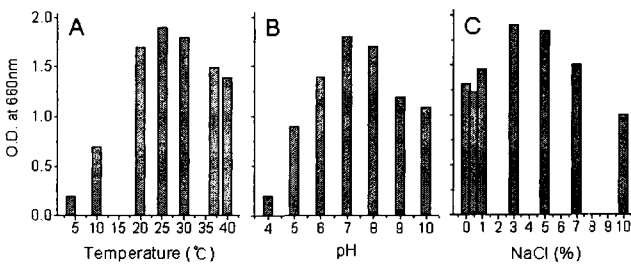


Fig. 1. Effects of temperature, initial pH and NaCl concentrations on the growth of *Micrococcus* sp. LG-5 after 24 hours incubation in PPES-II medium.

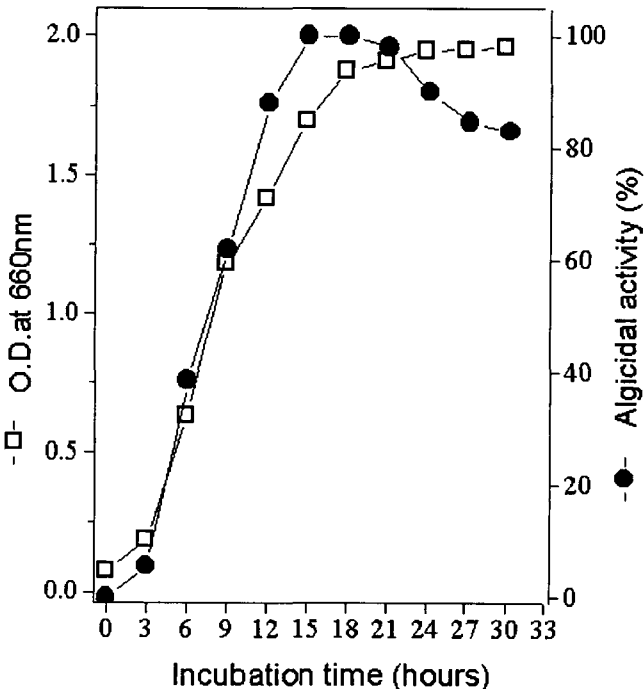


Fig. 2. Growth curve of *Micrococcus* sp. LG-5 at optimal culture conditions (25°C, initial pH 7.0, 3.0% NaCl) and algicidal activity of the culture filtrate collected at different growth phase of *Micrococcus* sp. LG-5 against *C. polykirkoides*. The algicidal activity indicates the percent of lysed *C. polykirkoides* after 3 hours of incubation.

100% 살조시켰으며, 정지기에는 82~92%, 대수증식기 중기에는 40~80% 정도의 살조활성을 보였지만 유도기때에는 5% 이하의 살조활성을 보였다. 즉, *Micrococcus* sp. LG-5는 유도기를 거쳐 균의 성장이 빠른 대수증식기에 살조물질을 생성, 분비하기 시작하여 대수증식기 후기에 살조활성이 최대에 도달한 후 정지기에 약간 감소하였다. Lee and Park (1998)은 *Pseudomonas* sp. LG-2의 성장단계에 따른 배양여과액의 살조효과를 조사한 결과 유도기일 때는 *Proocentrum micans*에 대해 큰 영향을 미치지 않았으나 대수증식기일 때는 개체수를 1/2로 감소시켰고 정지기일 때는 개체수를 급격히 감소시켜 배양 3일 후 대부분 사멸시켰다고 보고하여 살조물질의 생성시기는 살조세균에 따라 차이가 있는 것으로 사료된다.

3-2. *C. polykirkoides*에 대한 *Micrococcus* sp. LG-5의 살조유형

Micrococcus sp. LG-5가 적조생물에 직접 부착하여 죽이는 직접공격형인지 세포의 물질을 분비하여 죽이는 살조물질 분비형인지를 조사한 결과를 Table 3에 나타내었다. Cell culture insert 내부에 *C. polykirkoides*와 *Micrococcus* sp. LG-5를 함께 접종한 모든 positive control well에서는 *C. polykirkoides*가 사멸되었지만, 살조세균을 접종하지 않은 negative control well에서는 *C. polykirkoides*가 사멸되지 않았다. 0.4 μm filter에 의해 *Micrococcus* sp. LG-5가 *C. polykirkoides*와 격리된 상태인 test well에서도 *C. polykirkoides*가 사멸되어서, *Micrococcus* sp. LG-5는 살조물질을 세포외로 분비하는 것으로 나타났다.

지금까지 여러 연구자들에 의해 보고된 저해기작에 관한 연구를 살펴보면, 조류 세포에 직접 부착 또는 접촉하여 살조시키는 직접공격형과 살조물질을 생산, 분비하여 적조생물을 살조시키는 살조물질 분비형으로 크게 나눌 수 있다 (石田, 1994). 직접공격형으로는 주로 활주세균인 *Cytophaga*속 (Mitsutani et al., 1992)과 *Saprospira*속 (Sakata and Yasumoto, 1991)이 있으며 이러한 세균은 규조류 및 와편모조류에 광범위한 살조활성을 보여주었다. 살조물

Table 3. Determination of algicidal type against *C. polykirkoides* using cell culture insert by *Micrococcus* sp. LG-5

| (A) | (B) | (C) |
|-----------------------|-----------------------|-----------|
| Negative control well | Positive control well | Test well |
| - | + | + |

Initial cell densities of *Micrococcus* sp. LG-5 were 10⁵ cells/ml. Negative control well; *C. polykirkoides* inside. Positive control well; *C. polykirkoides* and *Micrococcus* sp. LG-5 inside. Test well; *C. polykirkoides* inside and *Micrococcus* sp. LG-5 outside. +; *C. polykirkoides* cells inside cell culture insert were killed within 48 hours. -; *C. polykirkoides* cells inside cell culture insert were not killed within 48 hours.

질 분비형으로는 주로 진정세균인 *Acinetobacter*속, *Alcaligenes*속, *Alteromonas*속, *Flavobacterium*속 및 *Pseudomonas*속 등이 보고되었다 (Mitsutani et al., 1992; Dakhama et al., 1993; 満谷, 1994; Yoshinaga et al., 1995b). 지금까지 해양에서 분리된 살조세균들의 살조유형을 분석해보면 활주세균은 직접공격형이 많았고, γ -*Proteobacteria*군 세균과 진정세균에 속하는 세균은 살조물질 분비형이 많은 경향을 보였으며, 직접공격형은 살조특이성이 낮고, 살조물질 분비형은 살조특이성이 높은 경향을 보여주었다 (Mitsutani et al., 1992; Kim et al., 1998). 그러나 진정세균이면서도 직접공격의 유형을 보여주는 *Flavobacterium*속 (Fukami et al., 1992) 및 *Alteromonas*속 (Imai et al., 1995)의 살조세균에 관한 연구도 보고되고 있다. 본 연구에서 분리한 *Micrococcus* sp. LG-5는 살조물질을 분비하여 적조생물을 사멸시켰으나 살조특이성은 낮게 나타났다.

3-3. *Micrococcus* sp. LG-5 배양여과액의 살조효과

Micrococcus sp. LG-5의 배양여과액을 *C. polykrikoides*의 배양액에 농도별로 첨가하였을 때 *C. polykrikoides*의 개체수의 변화를 Fig. 3에 나타내었다. 세균 배양여과액의 최종농도가 5%, 10%가 되도록 첨가한 경우 *C. polykrikoides*의 개체수가 급격히 감소하여 3시간 경과 후에 control에 비해 각각 30%와 85% 정도가 살조되

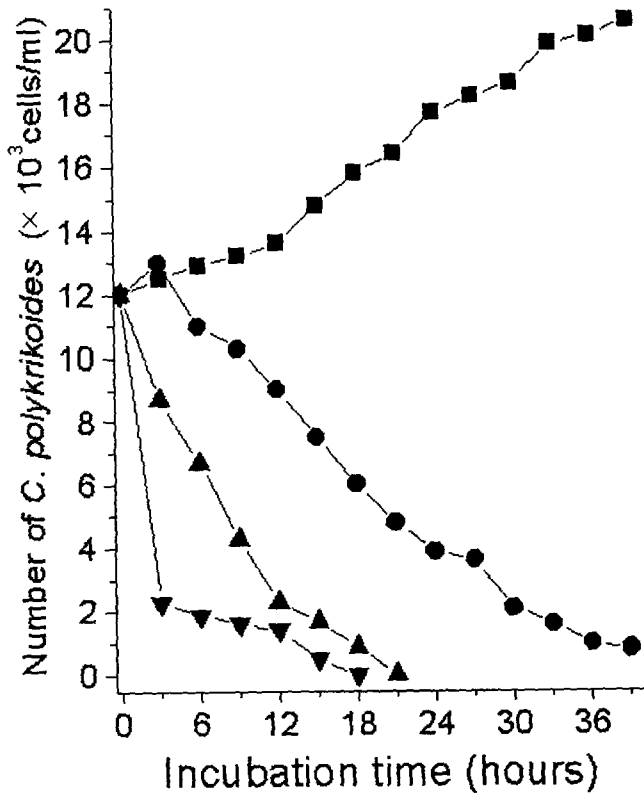


Fig. 3. Effect of the culture filtrate of *Micrococcus* sp. LG-5 at different concentrations on the growth of *C. polykrikoides*. —■—; control, —●—; 1%, —▲—; 5%, —▼—; 10%

었으며, 10%의 경우 18시간 후에, 5%의 경우 21시간 후에 모두 100% 살조되었다. 1%가 되게 첨가했을 경우 30시간 후에는 90% 이상 살조되었다. 즉, *Micrococcus* sp. LG-5의 배양여과액의 양에 비례하여 살조효과가 증가하는 경향을 보였으며, 배양여과액 중에 *C. polykrikoides*를 사멸시키는 살조물질이 존재함을 알 수가 있었다. Fukami et al. (1992)은 살조세균 *Flavobacterium* sp. 5N-3 균주의 배양여과액을 25%로 접종했을 때 *Gymnodinium nagasakiense*에 대해 살조활성이 없었으나 50%로 접종했을 때는 강한 살조활성을 나타내었으며 이것은 *Flavobacterium* sp. 5N-3 균주가 방출하는 어떤 화학물질에 기인한다고 보고하였다.

3-4. *Micrococcus* sp. LG-5의 균체만 접종했을 때의 살조효과

Micrococcus sp. LG-5의 균체만을 *C. polykrikoides* 배양액 (1.2 × 10⁴ cells/ml)에 최종농도가 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶ cells/ml가 되도록 접종하였을 때 *C. polykrikoides* 개체수의 변화를 Fig. 4에 나타내었다. 시험균의 살조활성은 그 농도가 높을수록 강하였다. 그러나 배양액을 접종한 경우보다는 살조시간이 다소 지연되었는데 이러한 것은 균체의 분비 살조물질이 없기 때문으로 사료된다. Kim et al. (1999)은 H519S5-4 균주, H605S5-15 균주 및 H605S5-22 균주를 10⁶ cells/ml로 접종했을 때 *Gymnodinium catenatum*과 *H. akashiwo*에 대해 24시간 이내에 형광광도값이 절반으로 감소되었으며 모든 살조세균은 10⁶ cells/ml를 접종했을 경우가 10³ cells/ml

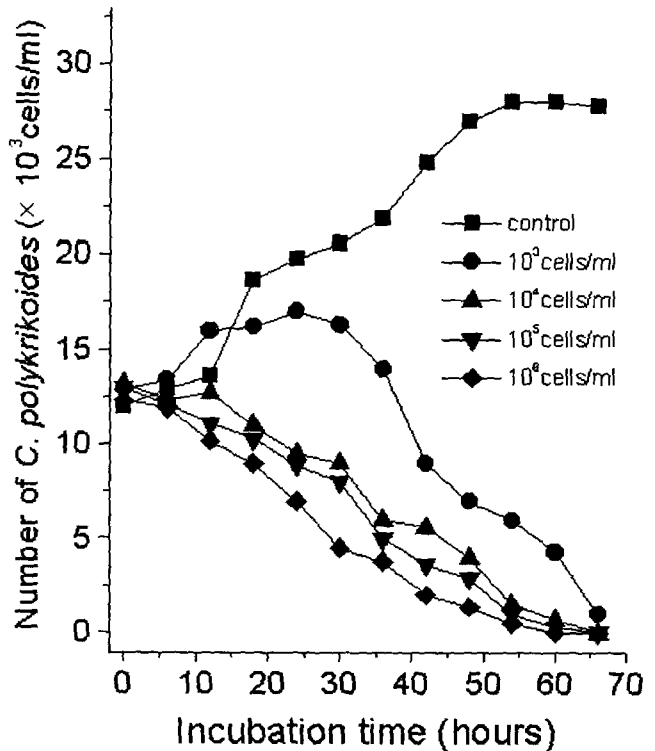


Fig. 4. Algalicidal effect of *Micrococcus* sp. LG-5 against *C. polykrikoides* by the different cell densities.

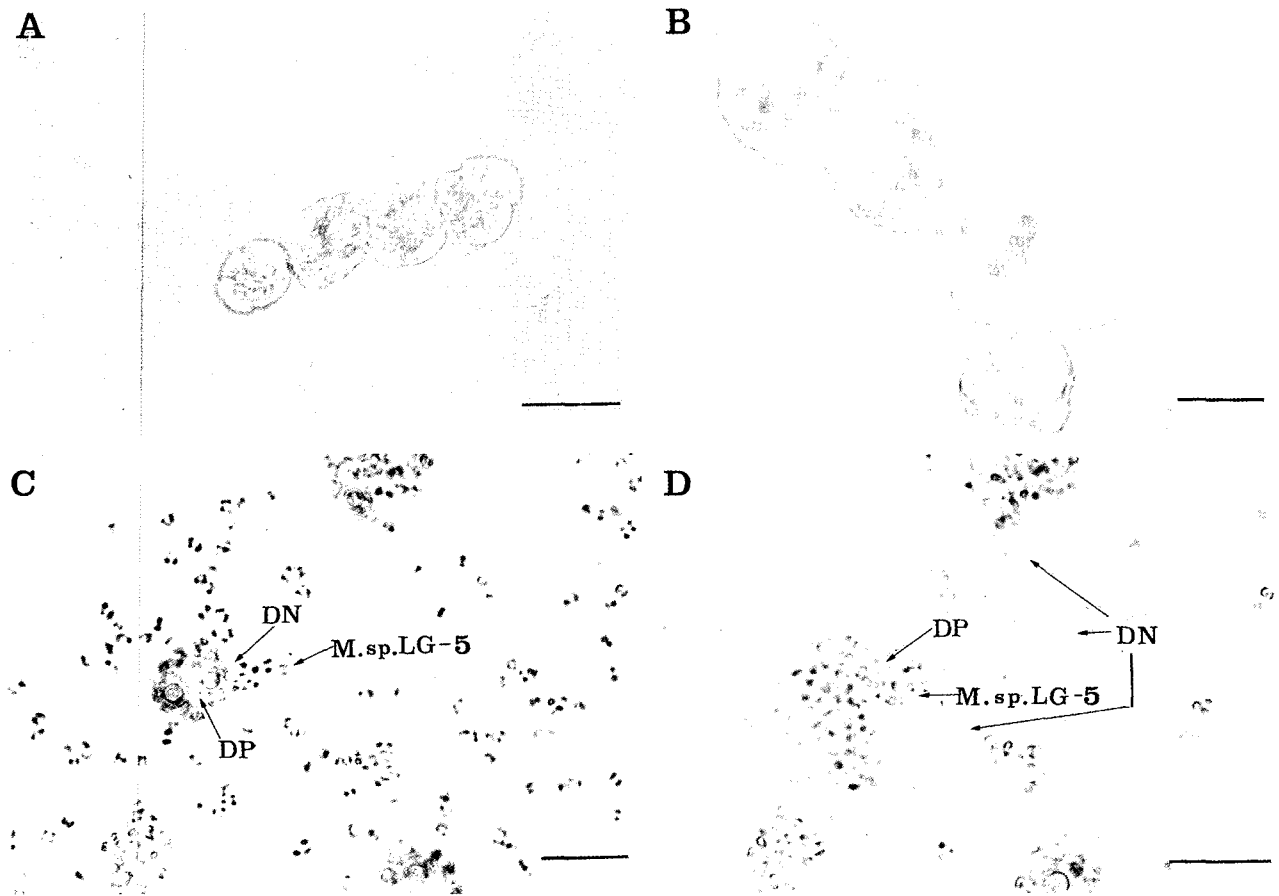


Fig. 5. Monographs of sequential algicidal process by *Micrococcus* sp. LG-5 against *C. polykrikoides*. (A) *C. polykrikoides*'s cells stop swimming at first. (B) *Micrococcus* sp. LG-5 cells do not attach to the algal body directly. A part of algal body was swelled and become spherical in shape, protoplasm was separated from the damaged cell wall region. (C, D) Finally, after algal cells burst, *Micrococcus* sp. LG-5 swarmed around degraded protoplasm and decomposed it. Note that the nuclei and protoplasm are degraded. DN, degraded nucleus; DP, degraded protoplasm; *M. sp. LG-5*, *Micrococcus* sp. LG-5. Scale bar=30 μ m.

를 집중했을 경우보다 높은 살조활성을 나타내었다고 보고하였다. 이상의 결과 (Table 3, Fig. 3, 4)를 종합해볼 때, *Micrococcus* sp. LG-5는 *C. polykrikoides*를 살조시키는 물질을 생성하여 세포외로 분비하여 적조생물을 사멸시키는 것으로 사료된다.

또한 *Micrococcus* sp. LG-5가 *C. polykrikoides*를 살조시키는 과정을 광학현미경 하에서 관찰하였다 (Fig. 5). 연쇄군체를 형성한 유영세포는 *Micrococcus* sp. LG-5의 작용을 받아, 접종 후 30 분 이내에 운동성을 상실하고 (Fig. 5-A) 연쇄군체의 각 단세포가 팽창하여 고유의 형태를 상실하여 구형으로 변하면서 temporary cyst를 형성한 후, 조체 세포벽의 일부가 부풀어 오르면서 (Fig. 5-B) 갑자기 파열되어 핵과 색소체 등의 세포 내용물이 밖으로 유출되었다. *Micrococcus* sp. LG-5는 *C. polykrikoides*를 직접 공격하지 않고 세포의 분비물로 *C. polykrikoides*를 파열시킨 후 (Fig. 5-C), 적조 조체로부터 나온 세포 파쇄물을 분해하였다. 이때 세포밖으로 유출된 핵도 부풀어올라 얽어지면서 서서히 사라졌다 (Fig. 5-D).

요 약

최근 남해안 적조의 주요 원인생물인 *C. polykrikoides*를 살조시키는 해양세균을 마산만의 적조발생 해역에서 분리, 동정하고 살조범위를 조사하였다. 분리 균주 중 살조활성이 우수한 *Micrococcus* sp. LG-5의 성장 특성과 살조효과에 대해 조사하여 해양 미생물을 이용한 자연생태 조화형, 환경 친화적 적조방제 기술 개발의 기초 자료를 제공하고자 연구한 결과를 요약하면 다음과 같다.

살조세균 *Micrococcus* sp. LG-5의 최적 성장조건은 25°C, NaCl 3.0%, pH 7.0이었으며, *C. polykrikoides* (1.2×10^4 cells/ml)에 대한 *Micrococcus* sp. LG-5의 성장단계에 따른 배양여과액의 살조활성은 대수증식기 후기 및 정지기에 강하였다. 대수증식기에는 *C. polykrikoides*를 100%, 정지기에는 82~92%, 대수증식기 중기에는 40~80%, 유도기에는 5% 이하의 살조활성을 보여 *Micrococcus* sp. LG-5는 유도기를 거쳐 대수증식기에 살조물질을 활발

히 생산하는 것으로 밝혀졌다. 또한 0.4 μm 의 cell culture insert를 삽입한 2조배양계를 이용하여 *Micrococcus* sp. LG-5의 살조유형을 조사한 결과, *Micrococcus* sp. LG-5는 0.4 μm filter에 의해 *C. polykirkoides*와 격리된 상태에서도 *C. polykirkoides*를 살조시켜, 세포외로 물질을 분비하여 살조시키는 살조물질 분비형으로 밝혀졌다. 또한 *Micrococcus* sp. LG-5의 배양여과액의 최종농도가 5%, 10%가 되도록 첨가한 경우, *C. polykirkoides*의 개체수는 급격히 감소하여 3시간 경과 후에 control에 비해 각각 30%와 85% 정도가 살조되었으며, 1%의 경우, 30시간 후에 90% 이상 살조되었다. 즉, *Micrococcus* sp. LG-5의 배양여과액의 양에 비례하여 살조효과가 증가하는 경향을 보였으며, 배양여과액 중에 *C. polykirkoides*를 사멸시키는 살조물질이 존재함을 알 수가 있었다.

감사의 글

본 연구의 수행 중에 많은 도움을 주신 부경대학교 미생물학과 해양미생물 실험실원들에게 깊이 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Baker, K.H. and D.S. Herson. 1978. Interactions between the diatom *Thalassiosira pseudonanna* and an associated pseudomonad in a mariculture system. *Appl. Environ. Microbiol.*, 35, 791~796.
- Cottrell, M.T. and C.A. Suttle. 1993. Production of axenic cultures of *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae) using antibiotics. *J. Phycol.*, 29, 385~387.
- Dakhama, A., J. de la Noüe and M.C. Lavoie. 1993. Isolation and identification of antialgal substances produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Appl. Phytoplankt.*, 5, 297~306.
- Droop, M.R. 1967. A procedure for routine purification of algal cultures with antibiotics. *Brit. Phycol. Bull.*, 3, 295~297.
- Fukami, K., A. Yuzawa, T. Nishijima and Y. Hata. 1992. Isolation and properties of a bacterium inhibiting the growth of *Gymnodinium nagasakiense*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58, 1073~1077.
- Fukami, K., T. Nishijima and Y. Ishida. 1997. Stimulative and inhibitory effects of bacteria on the growth of microalgae. *Hydrobiologia*, 358, 185~191.
- Guillard, R.R.L. and J.H. Ryther. 1962. Studies of marine planktonic diatoms I. *Cyclotella nana* HUSTEDT and *Detonula confervacea* (CLEVE) GRAN. *Can. J. Microbiol.*, 8, 229~239.
- Imai, I., Y. Ishida, K. Sakaguichi and Y. Hata. 1995. Algicidal marine bacteria isolated from northern Hiroshima Bay, Japan. *Fisher. Sci.*, 61, 628~636.
- Imai, I., S. Nagagiri, K. Nagai, K. Nagasaki, S. Itakura and M. Yamaguchi. 1998a. Fluctuations of algicidal microorganisms against the harmful dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* in Ago Bay, Mie Prefecture, Japan. *Bull. Nansei Natl. Fish. Res. Inst.*, 31, 53~61 (in Japanese).
- Imai, I., M.C. Kim, K. Nagasaki, S. Itakura and Y. Ishida. 1998b. Detection and enumeration of microorganisms that are lethal to harmful phytoplankton in coastal waters. *Plankton Biol. Ecol.*, 45, 19~29.
- Ishio, S., T. Nishimoto and H. Nakagawa. 1987. Distribution of dinoflagellate growth inhibitor in sediment in Arika and Hakata Bays. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53, 773~787.
- Kim, H.G., S.G. Lee, K.H. An, S.H. Youn, P.Y. Lee, C.K. Lee, E.S. Cho, J.B. Kim, H.G. Choi and P.J. Kim. 1997. Recent red tides in Korean coastal waters. *NFRDI*, 280p (in Korean).
- Kim, M.C., I. Yoshinaga, I. Imai, K. Nagasaki, S. Itakura and Y. Ishida. 1998. A close relationship between algicidal bacteria and termination of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) bloom in Hiroshima Bay, Japan. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 170, 25~32.
- Kim, M.C., H.S. Yu, M.S. Ok, C.H. Kim and D.S. Chang. 1999. The activities and characteristics of algicidal bacteria in Chindong Bay. *J. Kor. Fish. Soc.*, 32, 359~367 (in Korean).
- Kocur, M. 1986. Gram-positive Cocci. In *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 2 ed. by J.G. Holtz, P.A. Sneath, N. S. Mair and M.E. Sharpe, eds., Williams & Wilkins, pp. 1004~1008.
- Lee, W.J. and Y.T. 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*. *J. Kor. Fish. Soc.*, 31, 852~858 (in Korean).
- Lovejoy, C., J.P. Bowman and G.M. Hallegraeff. 1998. Algicidal effects of a novel marine *Pseudoalteromonas* isolate (Class *Proteobacteria*, gamma subdivision) on harmful algal bloom species of the genera *Chattonella*, *Gymnodinium* and *Heterosigma*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 2806~2813.
- MacFaddin, T.F. 1984. Biochemical tests for identification of medical bacteria. Williams & Wilkins, pp. 36~308.
- Mitsutani, A., K. Takasue, M. Kirita and Y. Ishida. 1992. Lysis of *Skeletonema costatum* by *Cytophaga* sp. isolated from the coastal water of the Ariake Sea. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58, 2159~2169.
- Nagai, S. and I. Imai. 1997. Killing of a giant diatom *Coscinodiscus wailesii* Gran by a marine bacterium *Alteromonas* sp. isolated from the Seto Inland Sea of Japan. In *Harmful algae*. B. Reguera, J. Blanco, M. Fernandez and T. Wyatt, eds., IOC of UNESCO, pp. 402~405.
- Park, Y.T., J.B. Park, S.Y. Chung, B.C. Song, W.A. Lim, C.H. Kim and W.J. 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, *Cohlodinium polikriloides*. *J. Kor. Fish. Soc.*, 31, 767~773 (in Korean).
- Sakata, T. and H. Yasumoto. 1991. Colony formation by algicidal *Saprospira* sp. on marine agar plates. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57, 2139~2143.
- Sawayama, S., Y. Sako and Y. Ishida. 1993. New inhibitor for mating reaction of *Alexandrium catenella* produced by marine *Alteromonas* sp.. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 59, 291~294.
- Simidu, U., E. Kaneko and N. Taga. 1977. Microbiological studies of Tokyo Bay. *Microb. Ecol.*, 3, 173~191.
- Stein, J.R. 1973. *Handbook of Phycological Methods-19: Division rates*. Cambridge Univ. Press, pp. 289~311.
- Stewart, J.R. and R.M. Brown. 1969. *Cytophaga* that kills or lyses algae. *Science*, 164, 1523~1524.
- Taga, N. 1968. Some ecological aspects of marine bacteria in the

- Kuroshio current. Bull. Misaki Mar. Biol. Kyoto Univ., 12, 50~76.
- Yoshinaga, I., T. Kawai, T. Takeuchi and Y. Ishida. 1995a. Distribution and fluctuation of bacteria inhibiting the growth of a marine red tide phytoplankton *Gymnodinium mikimotoi* in Tanabe Bay (Wakayama Pref., Japan). Fisher. Sci., 61, 780~786.
- Yoshinaga, I., T. Kawai and Y. Ishida. 1995b. Lysis of *Gymnodinium nagasakiense* by marine bacteria. In *Harmful Marine Algal Blooms*. P. Lassus, G. Arzul, E.E. Denn, P. Gentien and C.M. Baut, eds., Lavoisier, Paris, pp. 687~692.
- 深見公雄・西島敏隆. 1994. *Gymnodinium*死滅細菌の生態. “赤潮と微生物-環境にやさしい微生物農薬を求めて” 石田祐三郎・菅原庸(編). 水産学シリーズ 99, 恒星社厚生閣, pp. 46~56.
- 石田祐三郎. 1994. 赤潮藻の微生物學的防除に關する現状と將來. “赤潮と微生物-環境にやさしい微生物農薬を求めて” 石田祐三郎・菅原庸(編). 水産学シリーズ 99, 恒星社厚生閣, pp. 9~21.
- 滿谷 淳. 1994. 有明海における細菌相調査およびBioassay試験による赤潮關與細菌の檢索. 平成5年度赤潮對策技術開發試驗報告書 『マリンバイオテクノロジーによる赤潮被害防止技術開發試驗』. 水産廳. pp. 9~20.

2000년 5월 13일 접수

2000년 7월 18일 수리