

## 적조생물 살조세균 탐색

### IV. 살조세균 *Micrococcus* sp. LG-5가 생산하는 살조물질의 특성과 해양생물에 미치는 영향

정성윤 · 박영태\* · 김무찬\*\* · 최석철\*\*\* · 성희경\*\*\*\*  
 김재영\*\*\* · 김태운\*\*\* · 이원재  
 부경대학교 미생물학과, \*부경대학교 해양과학공동연구소  
 \*\*부경대학교 해양산업개발연구소, \*\*\*부산가톨릭대학 임상병리학과  
 \*\*\*\*인제대학교 부산백병원 임상병리과

## Isolation of Marine Bacteria Killing Red Tide Microalgae

### IV. Characteristics of Algicidal Substances, Produced from *Micrococcus* sp. LG-5 and the Effects on Marine Organisms

Seong-Youn JEONG, Young-Tae PARK\*, Mu-Chan KIM\*\*, Seok-Cheol CHOI\*\*\*  
 Hee-Kyung SEONG\*\*\*\*, Jai-Young KIM\*\*\*, Tae-Un KIM\*\*\* 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

\*\*Research Center for Ocean Industrial Development(RCOID), Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

\*\*\*Department of Clinical Laboratory Science, Pusan Catholic University, Pusan 609-757, Korea

\*\*\*\*Department of Clinical Pathology, Pusan Paik Hospital, Inje University, Pusan 614-735, Korea

An algicidal bacterium, *Micrococcus* sp. LG-5 against the harmful dinoflagellate, *Cochlodinium polykrikoides* was isolated. The optimal conditions for the highest algicidal activity of bacterial culture filtrate showed in the range of 20~30°C, at pH 7.0 and 3.0% of NaCl concentration. In addition, IC<sub>50</sub> (mean of 50% inhibitory concentration) of the culture filtrate against *C. polykrikoides* after incubation of 5 days was 0.482%. To investigate heat and pH stability of the culture filtrate of *Micrococcus* sp. LG-5, the culture filtrate (pore size, 0.1 μm) was heated to 121°C for 15 min and adjusted pH from 2.0 to 10.0. There were no significant changes in algicidal activity by heat treatment and the pH change between pH 5.0 and 10.0. The algicidal substances produced from *Micrococcus* sp. LG-5 were mainly detected in the fraction of 10,000~1,000 MWCO (molecular weight cut-off). The culture filtrate of *Micrococcus* sp. LG-5 showed antimicrobial activity against *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Vibrio alginolyticus*, but did not show against *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *V. cholerae* and *V. parahaemolyticus*. The culture filtrate of *Micrococcus* sp. LG-5 was examined against 16 phytoplankton species and showed the algicidal activity against *Alexandrium tamarense*, *Eutreptiella gymnastica*, *Gymnodinium catenatum*, *G. mikimotoi*, *G. sanguineum*, *Gyrodinium impudicum*, *Heterocapsa triquetra*, *Heterosigma akashiwo*, *Prorocentrum micans* and *Pyraminonas* sp.. However no algicidal effects of *Micrococcus* sp. LG-5 were observed against *Chlamydomonas* sp., *Cylindrotheca closterium*, *P. minimum*, *P. triestimum*, *Pseudonitzschia* sp. and *Scrippsiella trochoidea*. On the other hand, algicidal activity on the tested marine-livestock was not detected except for *Isochrysis galbana*. In addition, physiological responses of cultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) exposed to 1 and 10% of the culture filtrate of *Micrococcus* sp. LG-5 were measured. There were no clear changes in AST, GGT, creatinine, urea, total cholesterol, total protein, albumine, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, and Cl<sup>-</sup>. These results indicate that olive flounders were not affected when they were exposed to the culture filtrate of *Micrococcus* sp. LG-5.

Key words: Red tide, *Cochlodinium polykrikoides*, Algicidal bacteria, *Micrococcus* sp. LG-5, Algicidal substances, *Paralichthys olivaceus*, Physiological responses

## 서 론

지금까지 알려진 적조생물 구제 및 제어방법에는 화학약품 살포, 초음파 및 오존 처리 등 물리, 화학적 처리법이 연구되어 왔으나 이러한 적조 방제법은 대부분 비용이 많이 들고 2차 오염문제를 야기시킬 우려가 있기 때문에 생물학적 적조 방제법이 주목받기 시작하였고, 특히 최근 농업분야에서 실용단계에 접어들고 있는 미생물 농약 (bioremediator)의 연구방법을 적조 방제에 응용하려는 연구가 시작되고 있다 (石田, 1994). 해양미생물을 이용한 환경 친화적 적조 방제법 개발을 위해서는 분리된 살조세균들

의 생리, 생태적 특성과 현장에서의 살조세균의 동태파악과 구제 효과에 대하여 연구되어야 한다. 그러나 무엇보다도 이러한 살조세균을 이용한 적조 방제법의 실용화를 위해서는 현장에 응용하기에 앞서 살조기작 및 살조물질의 특성과 해양생물에 미치는 영향을 조사하는 안전성시험이 선행되어야 할 것이다.

해양미생물을 이용하는 적조 방제법을 개발하기 위해 살조세균이 생산하는 살조물질에 대한 연구가 여러 연구자들에 의해 진행되고 있다. Baker and Herson (1978)은 *Thalassiosira pseudonana*에 공존하는 세균이 단백질을 분비하여 살조시킨다고 보고하였으며, Mitsutani and Takesue (1993)는 cyanobacteria-lytic 세균

인 *Lysobacter* sp. LB-1이 분자량 약 32,000인 protease를 생산한다고 보고하였고, 滿谷 (1999)은 A25 균주가 생산하는 protease가 *Skeletonema costatum*을 살조시켜 *S. costatum*의 자기용해물질을 유도한다고 보고하였다. 그러나 국내외로 살조물질이 해양생물에 미치는 영향에 대한 보고는 전무한 상태이다.

본 연구는 해양 생태계에 미치는 영향을 최소화하는 2차 오염이 없는 자연상태 조화형, 환경 친화적 적조 방제기술 개발을 위한 연구로서, 살조세균 *Micrococcus* sp. LG-5가 생산하는 살조물질의 생성 최적조건과 특성을 조사하였고 해양생물에 미치는 영향을 알아보기 위하여 해양세균과 적조생물 및 먹이생물을 포함하는 미세조류와 양식 넙치에 미치는 생리학적 영향을 조사한 결과이다.

## 재료 및 방법

### 1. 공시 살조세균

실험에 사용한 살조세균 *Micrococcus* sp. LG-5는 전보 (Jeong et al., 2000)에서와 같이 PPES-II 배지 (Taga, 1968)에서 최적 조건으로 배양하여 사용하였다.

### 2. 미세조류의 분리 및 배양

실험에 사용한 17종의 적조생물 중 *C. polykrikoides* 등 7종은 마산만의 적조 발생해역에서 현장 채집을 통하여 수집하였으며, 그 외의 10종은 1997년과 1999년 사이에 미륵도, 사량도, 가덕도, 낙동강 하구 및 광안리에서 채집하였다. 7종의 먹이생물은 CCMP (Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton)에서 분양받아 순수 분리하여 f/2-Si 배지 (Guillard and Ryther, 1962)에서 계대배양하여 사용하였다. 적조생물의 분류는 Kofoid and Swezy (1921), Shim (1994)과 Fukuyo et al. (1997)을 참조하여 분류하였다. 실험에 사용한 미세조류는 모두 무균배양주로, 온도 20°C, 광량 80~140  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ , 광주기 14L : 10D로 배양하였다.

### 3. 살조물질 생성 최적조건

*Micrococcus* sp. LG-5의 살조물질 생성 최적조건을 조사하기 위하여 온도, pH, NaCl 농도를 달리하여 *Micrococcus* sp. LG-5를 배양하였다. 각 대상 실험구를 제외한 모든 배양조건은 최적 배양 조건인 25°C, pH 7.0, 3.0% NaCl 농도로 설정하였다. 각각의 조건으로 배양한 배양액을 원심분리 (8,000×g, 4°C, 10 min)하여 그 상등액을 pore size 0.1  $\mu\text{m}$  polycarbonate membrane filter로 여과한 배양여과액을 대수증식기에 있는 *C. polykrikoides* ( $1.2 \times 10^4$  cells/ml)의 배양 시험용기 (Tissue Culture Flasks, FALCON 사)에 20%가 되도록 접종하여 조류 배양조건에서 배양 후 3시간 후에 살조활성 (algicidal activity)을 측정하여 살조물질의 활성 정도를 조사하였다. 살조활성은 *C. polykrikoides*의 생존상태를 광학 현미경 하에서 관찰하여 3시간 후에 살아있는 *C. polykrikoides* 세포수를 계수하는 bioassay법으로 측정하였으며 다음 식으로 계산하였다. 이 때 control에는 배양여과액 대신 동량의 PPES-II 액체배지를 넣어 주었다.

### Algicidal activity (%)

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

## 4. 살조 물질의 특성

### 4-1. *Micrococcus* sp. LG-5 배양여과액의 IC<sub>50</sub>값 측정

최적조건에서 18시간 배양한 *Micrococcus* sp. LG-5 배양액 (OD<sub>660</sub>=1.8)을 원심분리 (8,000×g, 4°C, 10 min)하여 상등액을 멸균된 pore size 0.1  $\mu\text{m}$  filter로 여과하였다. 이 여과액을 *C. polykrikoides*에 0~1.0%까지 0.02% 간격으로 넣어서 *C. polykrikoides*의 일간 성장률 (specific growth rate: SGR)에 대한 IC<sub>50</sub> (mean of 50% inhibitory concentration)값을 측정하였으며 IC<sub>50</sub> 값은 5일간 측정하였다.

### 4-2. 열 안정성

*Micrococcus* sp. LG-5가 생산하는 물질의 열 안정성을 알아보기 위하여, PPES-II 액체배지에서 배양한 대수증식기 후기의 *Micrococcus* sp. LG-5 배양액 (OD<sub>660</sub>=1.8)을 원심분리 (8,000×g, 4°C, 10 min)후 상등액을 취하여 멸균된 0.1  $\mu\text{m}$  filter로 여과한 배양여과액을 121°C에서 15분간 가열처리하였다. 가열처리한 여과액을 첨가농도 (1, 5, 10%)가 다르게 하여 대수증식기의 *C. polykrikoides* ( $1.2 \times 10^4$  cells/ml) 100ml에 첨가하여 12시간 간격으로 살조활성을 측정하였다. 또한 열처리하지 않은 배양여과액도 같은 조건으로 실험하여 열처리한 배양여과액과 비교하였다. 이 때 control에는 PPES-II 액체배지를 위와 같은 조건으로 1, 5, 10%가 되게 첨가하였다.

### 4-3. pH 안정성

*Micrococcus* sp. LG-5가 생산하는 물질의 pH 안정성을 알아보기 위하여, 최적조건에서 배양한 *Micrococcus* sp. LG-5 배양여과액의 pH를 50 mM sodium acetate buffer (pH 2.0~5.0)와 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0~10.0)를 사용하여 pH 2.0~10.0으로 조절하여 24시간 동안 실온에 정치한 후 다시 pH를 8.0으로 조절하여 살조활성을 측정하였다. 살조활성의 측정은 *C. polykrikoides* ( $1.2 \times 10^4$  cells/ml)의 배양 시험관에 각각의 pH로 조절된 배양여과액을 1%가 되도록 접종하여 조류 배양조건에서 배양 후 48시간 후에 측정하였다. 이 때 control에는 각각의 pH에 따라서 배양여과액을 포함하지 않는 buffer 용액을 첨가하였다.

## 5. 한외여과 분획별 살조활성

*Micrococcus* sp. LG-5와 *C. polykrikoides*를 20°C, 광주기 14L : 10D, 광량 140  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ 의 조건하에서 혼합배양하여 *C. polykrikoides*가 완전히 사멸된 배양액을 원심분리 (8,000×g, 4°C, 10 min)하여 상등액을 0.1  $\mu\text{m}$  filter로 여과한 후 한외여과막 장치 (ultrafiltration membrane system) (Amicon Inc., USA)로 한외여과하였다. 즉 MWCO (molecular weight cut-off)가 >10,000인 여과막으로 3배 농축한 후 10,000 MWCO의 여과막을 통과한 여액을

1,000 MWCO의 여과막으로 3배 농축하여 <1,000, 1,000~10,000, >10,000의 3개의획분으로 분획하였다. 분획한 각 획분은 원상태 또는 121°C에서 15분간 가열처리한 다음 *C. polykrikoides* 배양액 (1.2×10<sup>4</sup> cells/ml)에 1%가 되도록 첨가 후, 상기의 조류 배양조건에서 배양하여 48시간 후에 각 분자량별 살조활성을 측정하였다. 이 때 control에는 시료액 대신 동량의 PPES-II 액체배지를 첨가하였다. 또한 이 때 살조활성은 *C. polykrikoides*의 일간 성장률에 대한 IC<sub>50</sub> 값으로도 측정하였으며 IC<sub>50</sub> 값은 5일간 측정하였다.

6. 해양생물에 미치는 영향

6-1. 해양세균에 미치는 영향

최적조건에서 BHI 액체배지에 18시간 전배양한 10종의 시험균주를 10<sup>5</sup> cells/ml가 되도록 4 ml의 BHI 고체배지 (0.7% agar)에 접종한 다음 미리 BHI 고체배지 (1.5% agar)를 부어 굳힌 평판 (φ, 90 mm)에 겹쳐 붓고, *Micrococcus* sp. LG-5의 배양여과액 25 μl를 함유한 disc (φ, 8 mm, TPYO)를 평판 위에 얹어 30°C에서 18시간 배양한 후 disc주위에 형성된 생육 저해환의 직경을 측정하였다. 생육 저해환의 직경이 5 mm 이상인 경우를 positive로 판정하였다.

6-2. 미세조류에 미치는 영향

*Micrococcus* sp. LG-5가 해양 미세조류에 미치는 영향을 조사하기 위하여 16종의 적조생물과 양식장에서 치·자어의 먹이로 사용하는 7종의 먹이생물을 대수증식기로 배양하여 *Micrococcus* sp. LG-5의 배양여과액을 10%가 되도록 집중시켜 상기의 *C. polykrikoides* 배양조건에서 배양하여 경시적으로 살조유무를 관찰하였다. 본 실험에 사용된 대상 적조생물은 6강 12속 16종으로 모두 무균배양주를 사용하였으며 *C. polykrikoides*에 대한 *Micrococcus* sp. LG-5의 배양여과액의 IC<sub>50</sub> 값이 0.482%인 것을 고려하여 배양여과액의 접종농도를 10%로 설정하였다.

6-3. 양식 넙치에 미치는 생리학적 영향

6-3-1. 실험 조건

넙치 양식장에서 사육중인 건강한 넙치를 실험수조에 무작위로 30마리씩 세 그룹 (control, 1% 투여군, 10% 투여군)으로 나누어 예비사육하여 안정시킨 다음 *Micrococcus* sp. LG-5의 배양여과액을 1%, 10%가 되도록 접종하여 양식 넙치에 미치는 급성기 생리적 변화를 조사하였다. *C. polykrikoides*에 대한 *Micrococcus* sp. LG-5의 배양여과액의 IC<sub>50</sub> 값이 0.482%인 것을 고려하여 배양여과액의 접종 농도를 1%와 10%로 설정하였다. 이때 수온은 20 ± 1 °C, pH 7.8~8.2, 염분 32.3~33.4‰, 용존산소 7.5~7.8 mg/l였으며 산소발생기를 사용하여 지속적으로 산소를 공급하였으며 실험어류는 평균체중 800 ± 45 g, 체장 35 ± 3.4 cm로서 그룹간에 유의한 차이는 없었다.

6-3-2. 혈액 채취 및 생화학적 분석

각 실험 그룹당 무작위로 5마리씩 선택하여 마취없이 1분 이내에 모든 실험어류의 미병부의 혈관으로부터 2~3 ml의 혈액을 채취하였다. 채혈 즉시 검체를 혈청분리용 진공 튜브에 넣어 원심분

리 (8,000×g, 4°C, 5 min)시킨 뒤 혈청내 생화학적 성분을 분석하였다. *Micrococcus* sp. LG-5의 배양여과액에 대한 양식 넙치의 생리학적 반응을 평가하기 위해 혈청 1 ml를 이용해서 aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), gamma glutamyl transferase (GGT), Creatinine, Urea, 중성지방 (Triglyceride), Total cholesterol, 글루코스, 총단백질 (Total protein), 알부민, 전해질 (Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>) 등의 생화학적 성분을 분석하였다. 각 항목의 분석은 표준분석 Kit (주, 중외제약)를 이용하여 Autoanalyzer 900S (Automated Clinical Chemistry Analyzer Co., Germany)로 분석하였다.

6-3-3. 통계처리

모든 자료의 분석 및 통계처리는 SAS (version 6.03)를 이용하였다. 우선 분산분석 (ANOVA)을 실시하여 그룹간 차이에 대한 통계적 비교검정을 실시하였고, 이 과정에서 각 그룹 사이에 통계적 유의한 차이가 인정되는 경우 (p<0.05) Duncan's test로 대비검정하여 control에 대해 두 실험군 (1%와 10% 투여군) 각각의 의미있는 차이가 있는지, 그리고 두 실험군 사이에도 유의한 차이가 있는지를 확인하였다. 모든 자료들은 평균값 ± 표준오차로 표시하였고 P<0.05일때 통계적 유의성을 인정하였다.

결과 및 고찰

1. *Micrococcus* sp. LG-5의 살조물질 생성 최적조건

*Micrococcus* sp. LG-5의 배양조건에 따른 살조물질의 생성을 Fig. 1에 나타내었다. *Micrococcus* sp. LG-5의 살조물질 생성 최적온도를 조사한 결과 20~30°C에서 배양했을 때 살조활성이 100%로 최대 활성을 나타내었으며, 40°C까지 85% 이상의 활성을 유지하였다. 그러나, 온도가 내려갈수록 살조활성이 감소하여 10°C에서는 36%, 5°C 배양액에서는 살조활성이 거의 없었다 (Fig. 1-A). 또한 pH에 따른 살조물질의 생성능은 pH 6.0~9.0에서 살조활성이 뛰어났으며 특히 pH 7.0에서 100%의 살조활성을 나타내었다. 그러나 pH 10.0에서는 68%, pH 5.0에서는 48%의 살조활성을 나타내었으며 pH 4.0에서도 살조물질이 생산되었으나 살조활성은 20% 이하로 감소하였다 (Fig. 1-B). 그리고 염농도에 따른 살조

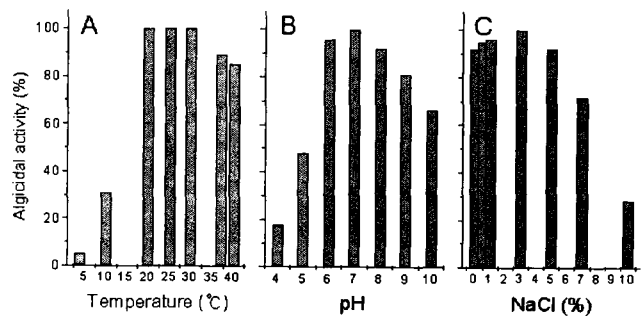


Fig. 1. Effects of temperature, initial pH and NaCl concentrations on algicidal activity of *Micrococcus* sp. LG-5. Algicidal activity against *C. polykrikoides* was measured after 3 hours.

물질의 생성은 NaCl 3.0% 농도에서 100%의 살조활성을, NaCl 0~5.0%에서 90% 이상의 높은 살조활성을 보였다. 7.0% 이상에서 살조활성이 감소하기 시작하여 72%의 살조활성을 10.0%에서는 28%의 살조활성을 보였다 (Fig. 1-C).

이상의 결과를 전보 (Jeong et al., 2000)의 온도, pH, NaCl 농도에 따른 *Micrococcus* sp. LG-5의 균 증식과 비교해보면, 대체로 균 증식이 활발할수록 살조활성도 증가하였으나 pH 6.0과 9.0에서는 균의 증식에 비해 살조활성이 상대적으로 높게 나타났으며 NaCl 0~1.0% 농도에서는 균증식보다 살조물질 생산이 높았고 NaCl 7.0~10.0% 농도에서는 균증식에 비해 살조활성이 상대적으로 낮았다. 특히 연안해역의 염분농도 변화범위 내에서는 균 증식에 비해 살조활성이 높게 나타남으로서 *Micrococcus* sp. LG-5는 해수 및 기수역에서의 적응성이 높을 것으로 판단된다.

2. 세포외 분비 살조물질의 특성

2-1. *Micrococcus* sp. LG-5 배양여과액의 IC<sub>50</sub> 값

*Micrococcus* sp. LG-5 배양여과액을 낮은 농도로 처리하였을 때의 성장 저해효과를 알아본 결과 0.1% 첨가하였을 때에도 성장 저해효과가 나타났으며, *C. polykrikoides*의 일간 성장률을 5일 후에 50% 감소시키는데 필요한 세포외 분비 살조물질의 농도인 IC<sub>50</sub> 값은 0.482%로 나타났다 (Fig. 2).

2-2. 열 안정성

*Micrococcus* sp. LG-5가 생산하는 물질의 열 안정성을 조사한

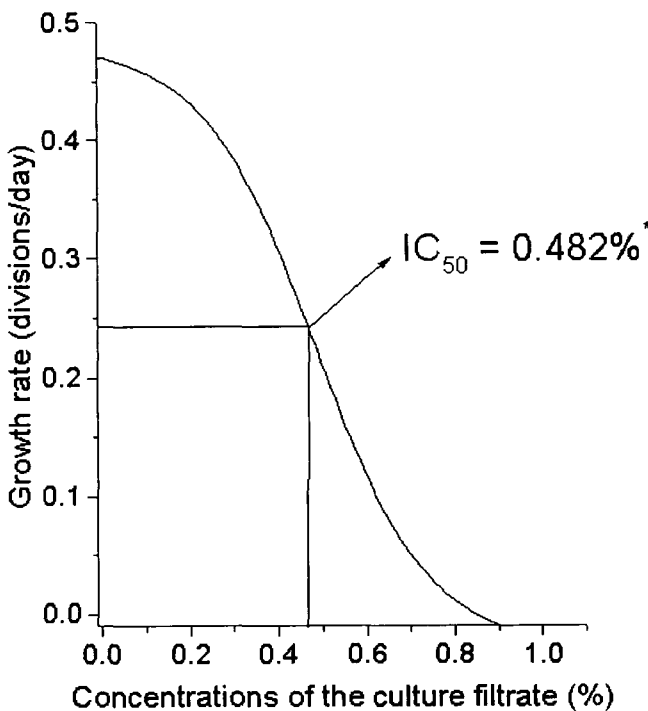


Fig. 2. The inhibition of *C. polykrikoides* by the culture filtrate of *Micrococcus* sp. LG-5.

\*IC<sub>50</sub>; mean of 50% inhibitory concentration. IC<sub>50</sub> was measured after 5 days.

결과를 Table 1에 나타내었다. 열처리한 배양여과액을 최종농도가 1%가 되게 첨가하였을 경우 12시간 후에 31.4%, 24시간 후 79.7%, 36시간 후 94.6%의 살조활성을 보였고 5%, 10%의 경우 각각 36시간, 24시간 후에 100% 살조되었으며, 열처리하지 않은 배양여과액을 넣었을 때와 비교해볼 때 살조활성에 유의한 차이는 없었다. 따라서 *Micrococcus* sp. LG-5의 배양여과액은 121°C에서 15분간 가열처리한 후에도 살조활성이 저하되지 않아 *Micrococcus* sp. LG-5가 생산, 분비하는 살조물질은 열에 매우 안정한 내열성 물질로 사료된다.

Table 1. The algicidal activities of the culture filtrate of *Micrococcus* sp. LG-5 against *C. polykrikoides* and heat stability of the culture filtrate

|                               |     | Algicidal activity (%)* |        |        |        |
|-------------------------------|-----|-------------------------|--------|--------|--------|
| Inoculation                   |     | Incubation time         |        |        |        |
|                               |     | 12 hrs                  | 24 hrs | 36 hrs | 48 hrs |
| Intact culture filtrate       | 1%  | 33.9                    | 78.1   | 95.3   | 100    |
|                               | 5%  | 83.1                    | 100    | 100    | 100    |
|                               | 10% | 99.2                    | 100    | 100    | 100    |
| Heat-treated culture filtrate | 1%  | 31.4                    | 79.7   | 94.6   | 100    |
|                               | 5%  | 75.1                    | 96.6   | 100    | 100    |
|                               | 10% | 92.7                    | 100    | 100    | 100    |

The heat-treated culture filtrate was autoclaved at 121°C for 15 min.

\*The algicidal activity indicates the percent of lysed *C. polykrikoides*.

2-3. pH 안정성

*Micrococcus* sp. LG-5가 생산하는 살조물질의 pH 안정성은 pH 5.0~10.0 사이에서 살조활성이 85% 이상으로 안정하였으며, 특히 pH 6.0~8.0에서 거의 100%의 살조활성을 보였다. 그러나, pH 4.0 이하에서는 살조활성이 점차 감소하여 pH 2.0에서는 24.8%로 감소하였다 (Table 2). 즉, 살조물질은 약산성과 알칼리성에서 살조활성이 안정하였으나 산성에서 다소 떨어지는 것으로 나타났다. 이러한 특성은 *Micrococcus* sp. LG-5가 생산하는 살조물질을 해양에 적용시 약알칼리의 해양 환경에 보다 적용 가능한 장점이 될 것으로 판단된다.

Table 2. pH stability of the culture filtrate of *Micrococcus* sp. LG-5 against *C. polykrikoides*

|                         | pH   |      |      |      |     |      |      |      |      |
|-------------------------|------|------|------|------|-----|------|------|------|------|
|                         | 2.0  | 3.0  | 4.0  | 5.0  | 6.0 | 7.0  | 8.0  | 9.0  | 10.0 |
| Algicidal activity (%)* | 24.8 | 40.3 | 66.4 | 92.5 | 100 | 98.7 | 98.4 | 91.2 | 86.3 |

\*The algicidal activity indicates the percent of lysed *C. polykrikoides* after incubation of 48 hours.

3. 한외여과 분획별 살조활성

*Micrococcus* sp. LG-5 배양액을 *C. polykrikoides* 배양액에 1%

가 되도록 집중하여 혼합배양한 후, *C. polykrikoides*가 완전히 사멸된 배양액을 원심분리 (8,000×g, 4°C, 10 min)하여 그 상등액을 0.1 μm filter로 여과하여 그 여과액을 한외여과에 의해 분자량 10,000 이상, 10,000~1,000 및 1,000 이하의 3개의획분으로 분획, 농축한 농축액의 살조활성을 측정한 결과를 Table 3에 나타내었다.

**Table 3. The algicidal activities of the fractionated culture filtrate of *C. polykrikoides*-*Micrococcus* sp. LG-5 cocultivation against *C. polykrikoides***

|                        | Culture filtrate |             |                   |             |             |             |
|------------------------|------------------|-------------|-------------------|-------------|-------------|-------------|
|                        | >10,000 MWCO     |             | 10,000~1,000 MWCO |             | <1,000 MWCO |             |
|                        | Intact           | Auto-claved | Intact            | Auto-claved | Intact      | Auto-claved |
| Algicidal activity (%) | ++               | ++          | ++                | ++          | +           | +           |
| IC <sub>50</sub> (%)   | 0.431            | 0.384       | 0.321             | 0.328       | 3.216       | 3.463       |

The culture filtrate was concentrated and fractionated after *C. polykrikoides* cells were killed completely by *Micrococcus* sp. LG-5.

++, strong inhibition (>90% death rate);

+, inhibition (>70% death rate)

IC<sub>50</sub>; mean of 50% inhibitory concentration, IC<sub>50</sub> was measured after 5 days.

분획 3개 모두 살조활성이 있었으며, 각 분획 대부분 열에 대하여 안정하였다. 즉, 분자량 10,000 이상과 10,000~1,000에서는 원상태 및 열처리했을 때 모두 90% 이상의 높은 살조활성을 보였으며, 분자량 1,000 이하에서는 원상태 및 열처리했을 때 모두 70% 이상의 살조활성을 보였으나 상대적으로 살조활성이 낮았다. 각 분획별 IC<sub>50</sub> 값을 비교해 보면, 분자량 10,000 이상과 10,000~1,000에서는 IC<sub>50</sub> 값이 0.321~0.431%의 범위로 낮은 농도에서도 *C. polykrikoides*에 대해 성장 저해능을 보였고, 열처리했을 때와 열처리하지 않았을 때 IC<sub>50</sub> 값에 유의한 차이가 없었다. 분자량 1,000 이하에서는 IC<sub>50</sub> 값이 열처리하지 않았을 때 3.216%, 열처리했을 때 3.463%로 나타나 상대적으로 성장 저해능이 낮았으며, 열처리에 의한 유의한 차이가 보이지 않았다. 이상의 실험 결과, *Micrococcus* sp. LG-5가 생산하는 살조물질은 한 가지 인자가 아닌 분자량이 다른 여러 인자의 복합물질로 각 인자 혹은 복합물질이 열에 안정한 내열성 물질로 판단되며 앞으로 살조물질과 살조기작에 대한 보다 구체적인 연구가 필요하다고 생각한다.

살조물질에 관한 연구로 Sawayama et al. (1993)은 *Alexandrium catenella*의 접합저해 물질이 700 kDa 이상의 단백질이라 밝혔고, 深見 · 西島 (1994)는 *Flavobacterium* sp. 5N-3 균주가 분자량 100 이하의 극성이 강한 친수성 염기성물질인 아민류를 분비하여 *Gymnodinium mikimotoi* (= *G. nagasakiense*)를 살조시킨다고 보고하였다. 또한 Yoshinaga et al. (1995)은 분자량 10,000 이상의 이열성의 고분자 살조물질을 세포 외로 분비하여 *G. mikimotoi*를 살조시키는 *Flavobacterium* sp. E401 균주 ( $\gamma$ -Proteobac-

terial subgroup)에 대해 보고하였으며 Papke et al. (1997)은 cyanobacterium, *Fischerella muscicola*로부터 fischerellin B라는 새로운 살조물질을 분리, 보고하였으며 吉永 · 石田 (1999)은 *G. mikimotoi* 살조세균 (GMKB)이 생산하는 살조물질이 분자량 64 kDa의 당단백질을 밝혔는데 이 고분자의 살조물질 이외에 미지의 저분자의 살조물질이 완전한 살조를 위해서 필요하다고 보고하였다. 이상의 연구결과에서 알 수 있듯이 각각의 살조세균들이 생산하는 살조물질은 다양하고 그 분자량도 세균종에 따라 차이가 많은 것으로 사료된다.

**4. *Micrococcus* sp. LG-5가 해양생물에 미치는 영향**

**4-1. 해양세균에 미치는 영향**

해양생태계에서 분해자로서 중요한 역할을 하는 해양세균에 *Micrococcus* sp. LG-5의 살조물질을 포함하는 배양여액이 미치는 영향을 조사한 것으로, 10종의 해양세균을 대상으로 *Micrococcus* sp. LG-5의 항균력을 disc 확산법으로 검사한 결과를 Table 4에 나타내었다. *Micrococcus* sp. LG-5는 *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* 및 *Vibrio alginolyticus*에 대해서는 항균력을 보였으나, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *V. cholerae* 및 *V. parahaemolyticus*에 대해서는 전혀 항균력을 보이지 않았다. 따라서 *Micrococcus* sp. LG-5가 생성하는 살조물질은 각각의 해양세균에 대하여 미치는 영향이 다음을 알 수가 있었다.

**4-2. 미세조류에 미치는 영향**

**4-2-1. 적조생물에 미치는 영향**

*Micrococcus* sp. LG-5가 16종의 적조생물에 미치는 영향을 Table 5에 나타내었다. *Alexandrium tamarense*, *Eutreptiella gymnostica*, *Gyrodinium impudicum*, *Heterosigma akashiwo* 및 *Prorocentrum micans*에 대해서 90% 이상의 살조활성을 보였으며,

**Table 4. Inhibitory spectrum of the culture filtrate of *Micrococcus* sp. LG-5 to other bacteria determined by paper disc ( $\phi$ ; 8 mm) plate method**

| Bacteria                                 | Inhibition zones* |
|--|-------------------|
| Gram Positive Bacteria                   |                   |
| <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212  | ++                |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923  | -                 |
| Gram Negative Bacteria                   |                   |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922       | +                 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883  | +                 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | -                 |
| <i>P. fluorescens</i> ATCC 17513         | -                 |
| <i>Salmonella typhi</i> KCTC 2424        | -                 |
| <i>Vibrio alginolyticus</i> ATCC 17749   | +                 |
| <i>V. cholerae</i> ATCC 25872            | -                 |
| <i>V. parahaemolyticus</i> KCTC 2471     | -                 |

\*Diameter of clear zone (mm) formed around disc.

-, no inhibition zone; +, below 10 mm; ++, 11~20 mm.

**Table 5. Algicidal effect of *Micrococcus* sp. LG-5 on the growth of 16 species of red tide-causing microalgae**

| Species                         | Algicidal activity |
|---------------------------------|--------------------|
| <b>Dinophyceae</b>              |                    |
| <i>Alexandrium tamarense</i>    | +++                |
| <i>Gymnodinium catenatum</i>    | ++                 |
| <i>G. mikimotoi</i>             | ++                 |
| <i>G. sanguineum</i>            | ++                 |
| <i>Gyrodinium impudicum</i>     | +++                |
| <i>Heterocapsa triquetra</i>    | ++                 |
| <i>Prorocentrum micans</i>      | +++                |
| <i>P. minimum</i>               | +/-                |
| <i>P. triestimum</i>            | +/-                |
| <i>Scrippsiella trochoidea</i>  | +/-                |
| <b>Raphidophyceae</b>           |                    |
| <i>Heterosigma akashiwo</i>     | +++                |
| <b>Bacillariophyceae</b>        |                    |
| <i>Cylindrotheca closterium</i> | --                 |
| <i>Pseudonitzschia</i> sp.      | --                 |
| <b>Euglenophyceae</b>           |                    |
| <i>Eutreptiella gymnastica</i>  | +++                |
| <b>Prasinophyceae</b>           |                    |
| <i>Pyramimonas</i> sp.          | +                  |
| <b>Chlorophyceae</b>            |                    |
| <i>Chlamydomonas</i> sp.        | +/-                |

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

+++ , strong inhibition (>90% death rate);

++ , inhibition (>70% death rate);

+ , weak inhibition (>50% death rate);

+/- , no inhibition; -- , strong promotion.

*Gymnodinium catenatum*, *G. mikimotoi*, *G. sanguineum* 및 *Heterocapsa triquetra*에 대해서는 약 70%, *Pyramimonas* sp.에 대해서는 50% 정도의 살조활성을 보였다. 그러나, *Chlamydomonas* sp., *P. minimum*, *P. triestimum* 및 *Scrippsiella trochoidea*는 control과 비슷한 성장을 보였고, *Cylindrotheca closterium*과 *Pseudonitzschia* sp.에 대해서는 전혀 살조활성을 나타내지 못하고 오히려 성장을 촉진시켰다.

*Cytophaga* sp. J18/M01은 *S. trochoidea*를 제외한 10종의 미세조류를 살조시켰고 (Imai et al., 1993), Yoshinaga et al. (1997)은 *G. mikimotoi*를 살조시키는 28종의 해양세균을 분리하였는데 대부분의 살조세균은 구조류인 *S. costatum*, *Ditylum brightwellii*와 *Thalassiosira* sp.에 대해서는 살조활성을 보이지 않았다. 또한 Lo-vejov et al. (1998)이 분리한 *Pseudoalteromonas*속 균주는 *Chattonella marina*, *G. catenatum*과 *H. akashiwo*는 살조시켰지만 *Chroomonas* sp., *Skeletonema* sp.와 *Oscillatoria* sp.는 살조시키지 못하였다고 보고하였다. 이러한 종 특이성은 각각의 살조세균들이 해양환경에서 종 특이적으로 미세조류 군집에 영향을 미친다는 것을 시사한다.

지금까지 보고된 연구에 의하면 직접 공격형 살조세균은 주로

다양한 적조생물에 대하여 살조활성을 나타내며 (종 특이성이 낮음), 대부분의 살조물질 분비형 살조세균은 특정의 적조생물에만 살조활성을 나타내어 종 특이성이 높다고 보고 (Imai et al., 1993; Yoshinaga et al., 1995)되고 있지만, 살조세균 *Micrococcus* sp. LG-5는 살조물질 분비형 살조세균임에도 다양한 적조생물에 살조효과를 나타내어 종 특이성은 상대적으로 낮았다. 이와 같은 원인으로서는 첫째, 살조물질에는 고분자 및 저분자 물질이 있고, 분자량이 다른 여러 subunit들이 단독 혹은 복합적으로 작용할 가능성이 있으며, 둘째, 각각의 적조생물은 각 살조물질에 대해 저항력의 차이가 있을 가능성도 배제할 수 없다. 이러한 것을 명확히 밝히기 위해서는 각 살조세균들의 살조기작과 살조물질의 구조와 특성 및 각 해양 미세조류의 세포막 구성 성분과 생리·생화학적 반응 메카니즘 및 분자 세포생물학적인 많은 연구가 필요하다.

#### 4-2-2. 치·자어의 먹이 생물에 미치는 영향

*Micrococcus* sp. LG-5가 해양 미세조류에 미치는 영향을 조사하기 위하여 양식장에서 치·자어의 먹이로 사용하는 7종의 먹이 생물에 대해서 실험한 결과, *Isochrysis galbana*는 *Micrococcus* sp. LG-5에 의해서 성장이 둔화되었으나, *Chlorella* sp.와 *Nannochloris* sp.는 성장에 별다른 영향을 받지 않았고, *Pavlova lutheri*와 *Tetraselmis suecica*는 오히려 성장이 촉진되었으며, 특히 *Navicula* sp.와 *Phaeodactylum tricorutum*은 control보다 30% 이상 성장이 촉진되었다 (Table 6). 즉, *Micrococcus* sp. LG-5는 *I. galbana*를 제외하고 실험한 모든 먹이생물에 별다른 영향이 없거나 오히려 성장을 촉진시켜 본 살조물질을 적조 발생해역에 적용시 유용 양식 먹이생물에 미치는 영향은 적을 것으로 판단된다.

#### 4-3. 양식 넙치에 미치는 생리학적 영향

어류가 스트레스를 받으면 대사, 성장, 면역 및 번식력에 변화가 생길 수 있다. 어류에 미치는 주된 스트레스의 요인으로는 handling, confinement, 수송 및 약제투여 등의 인위적 요인과 수질, 수온 및 염분 등의 환경적 요인을 들 수가 있다. 즉 어류는 스트레스나 주변 환경변화에 의해 체내대사 및 생리 상태가 변하여 체내 항상성이 붕괴될 수가 있다 (Pickering, 1992). 따라서 본 실험은 적조 방제를 위한 목적으로 살조물질을 포함하는 *Micrococcus* sp. LG-5의 배양여과액을 양식장에 적용시 살조물질 투여에

**Table 6. Algicidal range of *Micrococcus* sp. LG-5 on the growth of 7 species of marine-livefood**

| Species                                  | Algicidal activity |
|--|--------------------|
| <i>Chlorella</i> sp. CCMP 1124           | +/-                |
| <i>Isochrysis galbana</i> CCMP 1323      | +                  |
| <i>Nannochloris</i> sp. CCMP 1122        | +/-                |
| <i>Navicula</i> sp. CCMP 545             | --                 |
| <i>Pavlova lutheri</i> CCMP 1325         | -                  |
| <i>Phaeodactylum tricorutum</i> CCMP 633 | --                 |
| <i>Tetraselmis suecica</i> CCMP 906      | -                  |

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

+, inhibition; +/-, no inhibition; -, weak promotion;

--, strong promotion.

의한 스트레스 및 환경변화에 따른 양식 넙치의 급성기 생리 반응을 조사한 것이다.

배양여액을 넙치 사육수에 10%까지 투여하였을 때 실험 어류 중 뚜렷한 이상증세를 보이거나 사망한 경우는 전혀 없었으며 *Micrococcus* sp. LG-5의 배양여과액에 대한 양식 넙치의 생리학적 반응은 Table 7에 나타내었다. AST와 GGT의 경우 세 그룹간에 유의한 차이가 없었으나 ( $p>0.05$ ), ALT의 경우 control ( $54.38 \pm 12.50$  U/L)에 비해 1% 투여군 ( $74.93 \pm 4.86$  U/L)과 10% 투여군 ( $73.19 \pm 7.80$  U/L)이 약간 높았다 ( $p<0.05$ ). Creatinine과 Urea의 경우 세 그룹간에 특별한 차이가 인정되지 않았으며 ( $p>0.05$ ), 중성지방과 총콜레스테롤, 총단백질, 알부민, 전해질 ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Cl^-$ ) 역시 세 그룹간에 통계적 차이가 없었다 ( $p>0.05$ ). 그러나 글루코스의 경우 control ( $17.53 \pm 3.83$  mg/dL)에 비해 1% 투여군 ( $40.48 \pm 3.15$  mg/dL)은 유의하게 높았고 ( $p<0.05$ ), 10% 투여군 ( $24.59 \pm 1.26$  mg/dL)은 차이가 없었다 ( $p>0.05$ ).

생화학적 분석 항목 중 AST, ALT 및 GGT는 간 기능장애나 손상이 있을 때 그 수치가 상승하는 간기능 지표로서 어체가 건강할 때는 혈중 활성이 낮다가 조직이 비정상적이거나 병적 증상이 나타날 때 세포 외로 방출되어 혈중 활성이 높아지므로 환경 오염의 원인이 되는 조직 손상을 인지하는 어류질병의 진단에 널리 이용되고 있다. 본 결과에서 *Micrococcus* sp. LG-5 배양여과액을 투여한 1%와 10% 투여군의 ALT 수치가 control 보다 유의

한 상승이 있었지만 다른 간기능 지표인 AST와 GGT의 결과들이 control과 유의한 차이가 없는 것으로 보아 *Micrococcus* sp. LG-5의 배양여과액에 의한 넙치의 간기능 손상으로는 판단되지 않는다. 뿐만 아니라 신장기능 지표 (Creatinine, Urea)와 주요 전해질 성분 ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Cl^-$ ) 역시 세 그룹간에 의미있는 차이가 없으므로 투여한 *Micrococcus* sp. LG-5의 배양여과액이 양식 넙치에 있어서 어떤 비 생리화적이고 손상적인 효과를 일으키지는 않을 것으로 판단된다. 급성 스트레스로 인해 다량으로 생산되는 젖산은 글루코스 생합성 경로를 통해 글루코스로 재생되며 글루코스는 스트레스가 주어지면 혈중 농도가 증가하기 때문에 스트레스와 대사의 지표로 이용되고 있다 (Ishioka, 1980; Olsen et al., 1995). 본 실험에서 글루코스 농도는 1% 투여군이 control과 유의한 차이가 있었으나 10% 투여군은 유의한 차이가 없었고, 1% 투여군 중 1마리의 넙치가 다른 나머지 개체들보다 상대적으로 높은 글루코스 농도 ( $62.68$  mg/dL)를 보임으로써 1% 투여군의 평균 글루코스 농도 증가의 원인이 되었기 때문에 이는 개체에 따른 차이로 의심된다. 그러나 이와 같은 일부 개체간의 차이가 왜 일어나는지 현재의 연구 결과만으로는 알 수 없었고 향후 이 부분에 대해 심도있는 연구를 통한 규명이 필요하리라 생각된다. 또한 어체는 급성 스트레스를 받으면 전해질 농도조절에 혼란이 일어나며 총단백질량이 감소한다고 보고되고 있다 (Robertson et al., 1988; Ishioka, 1980). 또한 알부민 농도변화는 최근 환경오염 지표로 사용되고 있고 장관의 조직학적 변화로 장관의 흡수장애를 들 수 있으며 일반적으로 오염물질에 의해 감소하는 것으로 알려져 있다 (Ito and Murata, 1990). 본 실험에서는 전해질 ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Cl^-$ ), 총단백질량 및 알부민은 비교적 안정상태를 보여주었다.

따라서 양식 넙치에 미치는 *Micrococcus* sp. LG-5 배양여과액의 생리학적 영향을 평가해 볼 때 어떤 비 생리화적이고 손상적인 유해한 영향은 미치지 않을 것으로 판단된다. 급후 *Micrococcus* sp. LG-5 배양여과액의 지속적 투여가 양식 어류에 미치는 생리적 변화와 호르몬, 면역력 및 삼투압 조절 등의 변화에 대한 보다 심도있는 연구와 더불어 현장 연구 (*in situ*)가 필요하다고 생각된다.

이상의 연구 결과 살조세균 *Micrococcus* sp. LG-5는 해양세균, 치·자어의 먹이생물 및 양식 넙치에 유해한 생리적 영향은 일으키지 않을 것으로 판단되며 *Micrococcus* sp. LG-5는 적조 발생 해역에 우점하는 해양세균이기 때문에 해양생태계에 미치는 영향은 우려할 정도가 아닐 것이며, 현장 적용성도 뛰어난 것으로 판단된다. 또한 적조생물에 대한 살조활성이 강하여 살조물질이 규명된다면 적조발생 억제에 더욱 가깝게 접근할 수 있을 것이다. 그리고 현장 응용성의 문제도 적조 pre-monitoring 기술개발을 위해서 적조생물의 DNA probe 개발을 통한 적조발생 예측기술의 확립과 살조세균의 분자식별을 위한 DNA probe 또는 형광 *in situ* hybridization (FISH)법의 개발을 통한 현장에서의 살조세균의 동태 파악이 가능하다면 적어도 반폐쇄 내만의 가두리 양식장에서는 적조로 인한 경제적인 피해를 줄일 수 있을 것이다. 이와 같이 살조세균을 이용하여 2차 오염이 없는 자연생태 조화형, 환경 친화적 적조방제 기술의 개발을 위해서는 앞으로 해양생태계에

Table 7. Physiological responses of *Paralichthys olivaceus* exposed to the culture filtrate of *Micrococcus* sp. LG-5

| Parameter                 | Control      | Culture filtrate          |              |
|---------------------------|--------------|---------------------------|--------------|
|                           |              | 1%                        | 10%          |
| AST (U/L)                 | 4.17± 0.60   | 4.92± 1.05                | 3.64± 0.10   |
| ALT (U/L)                 | 54.38±12.50  | 74.93± 4.86*              | 73.19± 7.80* |
| GGT (U/L)                 | 2.31± 0.85   | 2.54± 0.59                | 2.79± 0.26   |
| Creatinine (mg/dL)        | 0.32± 0.08   | 0.25± 0.01                | 0.31± 0.01   |
| Urea (mg/dL)              | 3.70± 0.22   | 3.78± 0.23                | 4.41± 0.37   |
| Triglyceride (mg/dL)      | 142.19±46.90 | 160.95±38.10 <sup>+</sup> | 136.65±19.42 |
| Total cholesterol (mg/dL) | 531.93±44.92 | 499.10±51.37              | 531.56±26.63 |
| Glucose (mg/dL)           | 17.53± 3.83  | 40.48± 3.15* <sup>+</sup> | 24.59± 1.26  |
| Total protein (g/dL)      | 5.47± 0.82   | 4.66± 0.47                | 4.77± 0.51   |
| Albumine (g/dL)           | 2.79± 0.38   | 2.52± 0.01                | 2.63± 0.04   |
| Mg <sup>2+</sup> (mg/dL)  | 4.46± 0.20   | 4.20± 0.30                | 4.70± 0.12   |
| Ca <sup>2+</sup> (mg/dL)  | 13.55± 2.03  | 12.67± 1.04               | 12.64± 0.82  |
| Na <sup>+</sup> (mM/L)    | 178.25±15.10 | 167.50±21.30              | 169.50±21.43 |
| K <sup>+</sup> (mM/L)     | 4.13± 0.90   | 5.15± 0.60                | 5.30± 0.13   |
| Cl <sup>-</sup> (mM/L)    | 151.75±15.7  | 146.5 ±21.30              | 141.45±25.24 |

All data was expressed as mean ± SD.

\*;  $p<0.05$ , as compared to control.

<sup>+</sup>;  $p<0.05$ , as compared to 10% group.

Legend: AST, aspartate aminotransferase;

ALT, alanine aminotransferase;

GGT, gamma glutamyl transferase.

존재하고 있는 살조세균의 적조발생 및 소멸환경에 따른 개체군 변동의 추이를 예상 가능하도록 그 생리에 대한 연구를 충분히 하고, 살조세균의 살조 유전자 해명과 유전자 조합에 의한 균주 개량 및 생산조건의 최적화, 살조물질의 정제, 특성 조사, 구조분석 및 물질대사 과정 조절을 통한 대량생산, 생산물 회수를 증대시키는 공정기술의 개량, 살조기작의 해명과 더불어 현장에서의 응용 방법을 개발하면 적조방제 및 환경보전에 지대한 기여를 할 것이다. 그러나, 적조방제 기술개발을 위하여 생물 공학적 기법으로 살조물질을 개발하는 것도 중요하지만 이러한 경우 살조세균의 현장 투여가 해양생태계에 미치는 영향평가가 선행되어야 할 것이다.

## 요 약

적조생물을 살조시키는 해양세균 *Micrococcus* sp. LG-5가 생산하는 세포의 분비 살조물질의 최적 생성조건, 살조물질의 특성과 한외여과 분획별 살조활성 및 해양생물에 미치는 영향을 조사함으로써 자연생태 조화형, 환경 친화적 적조방제 기술개발의 기초 자료를 제공하고자 연구한 결과를 요약하면 다음과 같다.

*Micrococcus* sp. LG-5의 살조물질 생성 최적온도는 20~30°C로 살조활성이 100%였으며, 살조물질 생성 최적 pH는 7.0, 최적 염 농도는 3.0%였다. 또한 세포의 분비 살조물질의 IC<sub>50</sub> 값은 0.482%였다. 세포의 분비 살조물질의 열 안정성을 실험한 결과, 열처리한 배양여과액 1% 첨가시 12시간 후에 31.4%, 24시간 후 79.7%, 36시간 후 94.6%의 살조활성을 보였고 5%, 10%의 경우 각각 36시간, 24시간 후에 100% 살조되었으며, 열처리하지 않은 배양여과액을 넣었을 때와 비교해볼 때 살조력에 유의한 차이는 없었다. 이와 같이 *Micrococcus* sp. LG-5가 생산, 분비하는 살조물질은 열에 안정한 내열성 물질로 판단된다. 또한 대사산물의 pH 안정성은 pH 6.0~8.0에서 거의 100%의 살조활성을 보였으며 pH 5.0~10.0에서 살조활성이 85% 이상으로 나타나 살조물질은 약산성과 알칼리에서 살조활성이 안정하였다. 또한 한외여과의 결과, 분자량 >10,000, 10,000~1,000, <1,000의 3개의 분획 모두 살조활성이 있었으며, 각 분획 모두 열에 대단히 안정하였다. 각 분획별 IC<sub>50</sub> 값은 분자량 1,000 이상에서 강한 살조활성이 나타났으며 분자량 1,000 이하에서는 상대적으로 낮은 살조활성을 보였다.

*Micrococcus* sp. LG-5가 해양세균에 미치는 영향은 *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae* 및 *V. alginolyticus*에 대해서는 항균력을 보였으나, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *S. typhi*, *S. aureus*, *V. cholerae* 및 *V. parahaemolyticus*에 대해서는 전혀 항균력을 보이지 않았다. 그리고 적조생물에 미치는 영향은 *A. tamarensis*, *E. gymnastica*, *G. catenatum*, *G. mikimotoi*, *G. sanguineum*, *G. impudicum*, *H. triquetra*, *H. akashiwo*, *P. micans*와 *Pyramimonas* sp.에 대해서는 살조활성을 보였으나 *Chlamydomonas* sp., *C. closterium*, *P. minimum*, *P. triestimum*, *Pseudonitzschia* sp.와 *S. trochoidea*에 대해서는 살조활성을 보이지 않았다. 즉, 적조생물에 따라 살조활성이 다양하게 나타나 종 특이성이 낮았다. 먹이생물에 미치는 영향은 *I. galbana*를 제외하고 실험한 모든 먹이생물에

별다른 영향이 없거나 오히려 성장을 촉진시켰고, 또한 살조세균 배양여과액을 넙치 사육수에 10%까지 투여하였을 때 양식 넙치에 미치는 유해한 생리학적 영향은 없었다. 이상의 연구 결과 살조세균 *Micrococcus* sp. LG-5의 배양여과액은 조사된 적조생물을 제외한 해양세균, 치·자어의 먹이생물 및 양식 넙치에 유해한 영향은 미치지 않을 것으로 판단된다.

## 감사의 글

본 연구를 수행하는데 있어 현장 시설을 사용할 수 있도록 협조해 주신 남정수산 김형백님께 심심한 사의를 표합니다.

## 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.
- Fukuyo, Y., H. Inouye and H. Takayama. 1997. Division dinophyta. In *An Illustrated Guide to Marine Plankton in Japan*. M. Chihara and M. Murano, eds., Tokai Univ. Press, Japan, pp. 31~126 (in Japanese).
- Guillard, R.R.L. and J.H. Ryther. 1962. Studies of marine planktonic diatoms 1. *Cyclotella nana* HUSTEDT and *Detonula confervacea* (CLEVE) GRAN. *Can. J. Microbiol.*, 8, 229~239.
- Imai, I., Y. Ishida and Y. Hata. 1993. Killing of marine phytoplankton by a gliding bacterium *Cytophaga* sp., isolated from the coastal sea of Japan. *Mar. Biol.*, 116, 527~532.
- Ishioaka, H. 1980. Stress reactions in the marine fish-I. Stress reactions induced by temperature change. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 46, 523~532 (in Japanese).
- Ito, Y. and T. Murata. 1990. Changes in glucose, protein contents and enzyme activities of serum in carp administered orally with PCB. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 46, 465~468.
- Jeong, S.Y., Y.T. Park and W.J. Lee. 2000. Isolation of marine bacteria killing red tide microalgae. III. Algicidal effects of marine bacterium, *Micrococcus* sp. LG-5 against the harmful dinoflagellate, *Cochlodinium polykrikoides*. *J. Kor. Fish. Soc.*, in press (in Korean).
- Kofoid, C.A. and O. Swezy. 1921. The free-living unarmoured dinoflagellata. *Mem. of Univ. Calif.*, 5, 562 p.
- Lovejoy, C., J.P. Bowman and G.M. Hallegraef. 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.
- Mitsutani, A. and K. Takesue. 1993. Purification and properties of a protease from a cyanobacteria-lytic bacterium *Lysobacter* sp. LB-1. *J. Shimonoseki Univ. Fisher.*, 41, 65~75 (in Japanese).
- Olsen, Y.A., I.E. Einarsdottir and K.J. Nissen. 1995. Metomidate anaesthesia in Atlantic salmon, *Salmo salar*, prevents plasma cortisol increase during stress. *Aquaculture*, 134, 155~168.
- Papke, U., E.M. Gross and W. Fracke. 1997. Isolation, identification and determination of the absolute configuration of fischerellin B. A new algicide from the freshwater, cyanobacterium *Fischerella*



- muscolica* (Thuret). Tetrahedron Lett., 38, 379~382.
- Pickering, A.D. 1992. Rainbow trout husbandry: management of the stress response. *Aquaculture*, 100, 125~139.
- Robertson, L., P. Thomas and C.R. Arnold. 1988. Plasma cortisol and secondary stress responses of cultured red drum (*Sciaenops cellatus*) to several transportation procedure. *Aquaculture*, 68, 115~130.
- Sawayama, S., Y. Sako and Y. Ishida. 1993. New inhibitor for mating reaction of *Alexandrium catenella* produced by marine *Alteromonas* sp.. *Nippon Suisan Gakkaish*, 59, 291~294.
- Shim, J.H. 1994. Illustrated encyclopedia of fauna and flora of Korea. vol. 34 marine phytoplankton. Ministry of education, pp. 349~419 (in Korean).
- 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 and Y. Ishida. 1995. 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.
- 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 Wakayama Pref., Japan. *Fisher. Sci.*, 63, 94~98.
- 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藥を求めて” 石田祐三郎・菅原庸(編). 水産學シリーズ 99. 恒星社厚生閣, pp. 9~21.
- 滿谷 淳. 1999. 2~5 滑走細菌による珪藻溶解の機作とバイオコントロールの試み. 平成9年度海洋微生物活用技術開發試驗報告書. pp. 61~72.
- 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藥を求めて” 石田祐三郎・菅原庸(編). 水産學シリーズ 99. 恒星社厚生閣, pp. 46~56.
- 吉永郁生・石田祐三郎. 1999. 赤潮渦鞭毛藻 *Gymnodinium mikimotoi* 殺藻細菌の作用機作の解明-G. *mikimotoi* 殺藻物質(GMK)の精製-. 平成9年度海洋微生物活用技術開發試驗報告書. pp. 44~50.

---

2000년 5월 13일 접수

2000년 7월 18일 수리