대한위생학회지. 제19권 제2호(2004)
Korean J. Sanitation. Vol. 19, No. 2, pp.23~29(2004)

살조세균과 초식성 섭식자의 혼합배양에 의한 녹조제어효과

김백호 · 가순규 · 한명수
한양대학교 생명과학과

Effects of Predator Addition to the Algicidal Bacterium in Controlling Diatom *Stephanodiscus hantzschii* Dominating the Eutrophic Pal'tang Reservoir, Korea

Baik-Ho Kim · Soon-Kyu Ka · Myung-Soo Han
Department of Life Science, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

Abstract

An algicidal effect of endemic algicidal bacterium (*Pseudomonas putida*) and rotifer zooplankton (*Brachionus calyciflorus*) on diatom *Stephanodiscus hantzschii* were examined in the filtered water, and were compared with those of bacterium plus ciliate. Bacteria removed as 80% of the diatom within 3.5 days, while ciliate and zooplankton suppressed 57% and 40% of diatom during the same period, respectively. Mixed treatment of bacteria plus ciliate removed as 54% of diatoms, while that of bacteria plus zooplankton decreased as 85%. Although single bacteria and mixed treatment of bacteria plus zooplankton quickly decreased the diatom in the initial of experiment, bacteria plus ciliate perfectly removed the diatom in culture flask within 5.5 days of the study. On the other hand, other single and mixed -treatments did not clear the diatom during the same period, and over 10% of them still remain in culture flask. Predator biomass in the presence of algicidal bacteria showed the growth patterns; zooplankton gradually decreased, and ciliate sustained over 0.5 cells/ml. These results indicated that the addition of ciliate to the algicidal bacterium in controlling the diatom *Stephanodiscus hantzschii* is more effective than that of zooplankton. Therefore, this synergistic interaction relationship between the bacterium and ciliate play an important role in the bio-manipulation using bio-agents to control the diatomal bloom in freshwater lakes and streams.

Keywords : Algicidal bacterium, ciliate *Stentor roeselii*, zooplankton *Brachinous calyciflorus*, mixed treatment, filtered water

Ⅰ. 서 론

오늘날 널리 이용되고 있는 조류제어 화학물질로는 황산동, 이산화염소, 오존, Simazine 등이 있다[1]. 이중 가장 많이 사용되는 황산동은 규조류를 포함한 다양한 수중생물들을 (세균, 편모충 등) 동시에 제거하고 심지어 어류에게까지 독성을 나타냄으로서 현장에 직접 살포시 심각하게 생태계를

Table 1. Culture and sustaining condition of algae and bio-agents used in the study

Organism	Temp (℃)	Light Intensity (μM photons m^{-2} s^{-1})	Medium	L:DCycle (hrs)	Prey
Stephanodiscus hantzschii	15	40	DM	12:12	
Pseudomonas putida	40	No	FW	-	
B. calyciflorus	20	40	FW	12:12	*Chlorella*™
Stentor roeselii	20	2	FW	12:12	*Aphanothece* sp.

* DM : diatom media (UTCC: University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria), FW: Filtered water

교란한다[2]. 이러한 화학물질의 이용은 반복적인 사용이 불가피하고, 많은 양의 화학물질이 수중내 축적함으로서 비경제적이고 최종적으로 인간의 건강에도 큰 위험요소로 작용할 수 있다[3].

최근 한강 및 낙동강 수계에서 겨울철에는 원반규조 *Stephanodiscus hantzschii, Cyclotella meneghiana, Cyclostephanos* sp.가 대발생하고 있으며[4,5,6], 이 중 *S. hantzschii*는 저온기 동안 전체 조류현존량의 60~90%를 차지하였다[4]. 이러한 규조 대발생은 이,취미를 발생하여 정수과정에 부정적으로 작용함으로서 효율적인 수자원 확보 및 이용에 어려움을 주고 있다 [7,8,9,10,11]. 특히 한강에서는 여름철에는 *Microcystis aeruginosa, Anabaena* sp. *Cryptomonas ovata, Rhodomonas* sp., *Scenedemsus quadricauda, Eudorina elegans* 등의 다른 조류 밀도가 높기 때문에 연중 조류발생으로 수자원의 관리에 어려움을 겪고 있다[5].

지금까지 알려진 담수조류제어를 위한 생물제재로서 virus, bacteria, fungi, protozoa, zooplankton, fish 등이 알려져 왔으며[12,13,14], 이들은 주로 남조 *Microcystis, Anabaena*를 대상으로 하는 연구가 대부분이고[14,15,16], 규조나 기타 조류에 대한 연구는 매우 빈약한 편이다. 국내에서는 남조류 생장억제 곰팡이[17], 적조생물 살조세균[4,18]에 대한 연구를 비롯하여 최근에는 담수 하천이나 하천형 호수에서 대발생하는 남조와 규조류의 살조세균 탐색에 대한 연구가 활발하다[15,19,20]. 이러한 선행연구들에 따르면, 조류종이나 생물제재의 종류에 따라 조류제어효과에 큰 차이를 보였는데, 1) 조류제어능을 갖는 생물제재의 단독처리보다는 혼합적용이 상승효과(synergistic effect) 또는 억제효과 (antagonistic effect)를 보였으며, 2) 단독처리보다는 혼합적용시 수중생태계에 미치는 영향이 적은 것으로 나타났다. 따라서 조류제어를 위한 다양한 생물제재의 개발 못지않게 생물제재들간의 상호관계를 고려한 혼합적용에 대한 연구가 필요할 것으로 사료되었다.

따라서 본 연구는 국내 하천 및 호수에서 저온기 동안 대발생하는 규조 *Stephanodiscus hantzschii* 제어를 목적으로 규조를 현장여과수로 배양하면서, 동일 수계에서 분리한 세균, 섬모충, 동물플랑크톤 등의 단일 또는 혼합배양하면서 이들의 조류제어 효과를 비교 검토하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

2.1 규조배양

실험에 사용된 규조는 *Stephanodiscus hantzschii* UTCC 267를 공시재료로 사용하였다. 배양은 300-ml 플라스크에 DM 배지 150-ml (pH 7.0)을 넣고 고압멸균하고, *S. hantzschii*을 10 % 접종하여, 20℃, 12:12 (Light:Dark) cycle, 50 mol $m^{-2}s^{-1}$ 로 조절된 배양기에서 배양하였다 (Table 1). 생물량의 변동은 도립현미경 (Axiovert, Zeiss) X 400 하에서 Sedgewick-Rafter counting chamber를 이용하여 계수하였다.

2.2 세균, 섬모충, 동물플랑크톤 배양

살조세균 *Pseudomonas putida*는 2002년 3월 21일에 경기도 경안천 광동교 지점의 표층수를 이용하여 분리하였다. 배양은 100-ml 플라스크에

50-ml NB (nutrient broth) 배지를 넣고 고압멸균한 후, 3%정도 접종시켜 배양기 (29℃, 120 rpm)에서 24시간 배양한 후 제어실험에 사용하였다[19].

섬모충 *Stentor roeselii*은 2002년 7월에 팔당호에서 분리하였다. 배양은 채집한 현장수를 GF/F로 여과한 후 6 well 배양용기에 각각 5-ml 씩 넣어 기본배지로 사용하여, 부착기질로서 각각의 well에 protozoan pellet (Carolina) 3-mg을 첨가하고 미세피펫으로 간헐적으로 통기하여 주었다. 섬모충은 각 well에 10~50개체씩 넣고, 현장과 동일한 수온 20℃, 광도 2 mol s^{-1} m^{-2}, 광주기12L:12D를 유지하였다. 먹이로는 남조 *Aphanothece* sp. 또는 시판용 *Chlorella*를 이용하였다. 조류제어 실험 이틀 전부터 굶겼고, 생물량의 변동은 도립현미경 X 50 배율로 관찰하면서 계수하였다[20].

동물플랑크톤 rotifer는 강릉대학교에서 분양받은 *Brachinous calyciflorus*로서 실험에는 빠른 성장을 하는 clone를 분리하기 위해 female을 10일 동안 20-ml 의 시험관에서 각각 배양한 후, 성장률이 가장 높은 clone를 선택하였다. 선택된 clone은 28℃에서 5 L 배양수에 먹이로 담수산 농축 *Chlorella*™를 이용하여 배양하였다. 실험에 사용된 배양수는 2~3일간 활성탄 등으로 탈염시킨 수돗물을 이용하였고, 동물플랑크톤 역시 내구란이 없는 것을 대상으로 실험 시작 2일 전부터 먹이를 공급하지 않았다.

2.3 조류제어

조류제어 실험은 규조 *S. hantzschii* 배양조건과 동일하다. 먼저 DM 배지를 고압멸균하고 100-ml 용 플라스크에 50-ml 씩 분주한 후, 대수성장단계에 도달한 *S. hantzschii* (1.3 X 10^5 cells ml^{-1}, 0시간) 배양액 (대조구 1, 2, 3, 처리구)에 각 생물제재를 넣어 실험을 진행하였다. 세균 단일적용 실험은 대수기 세균을 배양중인 *S. hantzschii*에 처리 후 규조 및 세균의 밀도변화를 측정하였다. 섬모충 역시 전과 동일한 조건의 플라스크에 3개체/well 밀도로 접종하고, 도립현미경하에서 섬모충 및 조류밀도를 계수하였으며 동물은 실험에 투입하기 2일전부터 굶겼다. 두 생물의 혼합적용 실험은 단일적용 실험에서 사용하였던 동일밀도의 *Stephanodiscus hantzschii*, 세균, 섬모충, 동물플랑크톤을 각각 이용하였으며, 동일한 배양조건에서 실시하였다. 규조 *S. hantzschii*의 계수는 hemocytometer 를 이용해 위상차 현미경 (Axiolab, Zeiss) 400 배율로 관찰하면서 계수하였다.

Ⅲ. 결 과

배양 원반규조 *Stephanodiscus hantzschii*에 살조세균 *Pseudomonas putida*를 단독으로 처리할 경우, 3.5일만에규조의 80% 정도가 감소하였다 (Fig. 1A). 같은 기간동안 동일조건의 규조에 동물플랑크톤만 단독 처리하였을 경우, 약 40%가 제어되었다 (Fig. 1B). 한편 세균과 동물플랑크톤을 혼합하여 적용하였을 경우, 약 85%정도의 제어효과를 나타냈다 (Fig. 1C). 한편, 규조배양액에 섬모충 *Stentor roselii*를 단독 또는 세균과 혼합적용시, 각각 57%, 54%의 제어효과를 나타냈다 (Fig. 1D, 1E). 이상의 결과로부터, 생물제재의 단독처리에서 동물플랑크톤이 비록 섬모충보다 낮은 조류제어능을 보였으나 세균의 혼합적용에 있어서 섬모충보다 더 높은 제어능을 보임을 알 수 있었다. 이는 동일 살조세균이 서로 다른 생물제재에 대한 상호작용에 의해 규조제어에 대한 상승 또는 억제 효과를 보인 것으로 판단된다.

실험동안 섬모충과 세균혼합군 은 배양 5.5일이후100% 규조제어를 였다. 반면, 세균, 동물플랑크톤, 섬모충의 단독처리는 어느 것도 배양액내 규조를 완전하게 제어하지는 못하였다. 그러나 배양시작후 조류제어효과는 세균 단독처리군과 세균과 동물플랑크톤 혼합군에서 가장 빠르게 나타났다.

한편 배양 7일 동안 5개 처리군의 제어효과를 비교하여 보면, 섬모충 단독군 (10일째) 및 섬모충과 세균 혼합군은 비록 배양 초기에는 빠른 제어를 보이지 않았으나 최종적으로는 완벽한 규조제어를 보였다. 이에 비해 동물플랑크톤의 경우, 섬모충보다 빠른 제어능을 보였으며 세균의 혼합시 더욱 빠르게 효과가 나타났으나 실험종료까지 완벽하게 제어되지는 않았다.

실험기간동안 규조 단독군 또는 규조와 세균혼

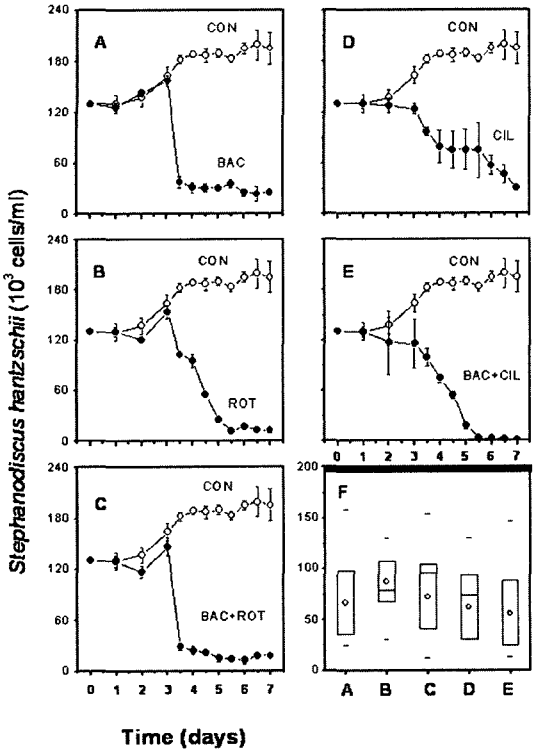

Fig. 1. Comparison of the algicidal effect of the single or combination treatment of bacteria, ciliate and zooplankton in filtered natural freshwater.
A : Algicidal bacteria *(Pseudomonas putida)*
B : rotifer (*Brachinous calyciflorus*)
C : bacteria (BAC) plus rotifer (ROT)
D : ciliate (*Stentor rosellii*)
E : bacteria plus ciliate (CIL). Open circle and closed circle (A~E) were control (CON) and treatment of bio-agent.
F : Comparison in antialgal effects of bacteriaum, ciliates, zooplankton, and The bold x axis in Fig. 1F means that the maximum value in control group.

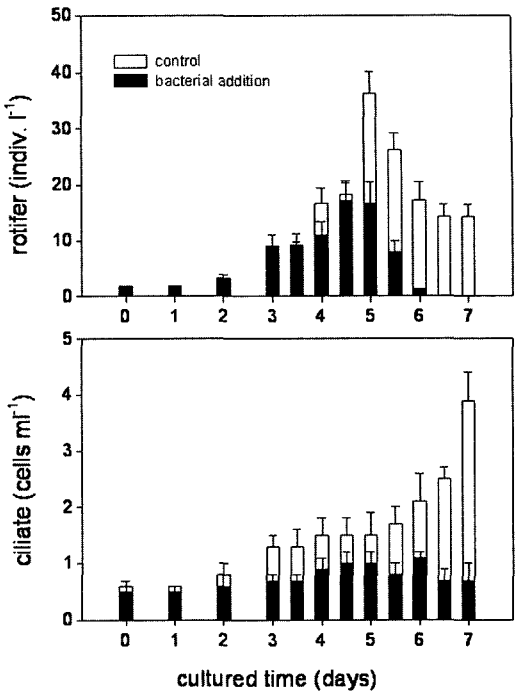

Fig. 2. Effect of bacterial addition on the growth of rotifer and ciliate in diatom-containing filtered natural freshwater.

합군에서 천적생물들의 성장패턴은 서로 차이를 보였다 (Fig. 2). 동물플랑크톤의 경우, 규조 및 세균 혼합군에서는 동일하게 배양 4일째까지 서서히 증가하다가 배양 5일이후부터 세균이 포함된 실험군에서 급격히 감소한 반면, 규조만 존재하는 배양액에서는 서서히 감소하는 특징을 보였다. 이에 반해, 섬모충은 세균이 없는 배양액에서는 지속적으로 증가하는 반면, 세균이 포함된 배양군에서는 배양종료까지 거의 일정한 수준 (0.5 cells ml^{-1})을 유지하였다.

Ⅳ. 고 찰

살조세균 *Pseudomonas putida*를 이용한 규조 *Stephanodiscus hantzschii* 제어는 처리 3일부터 뚜렷하게 나타났다. 조류에 대한 제어효과는 처리한 세균의 밀도에 크게 의존하지 않았으나 선행연구 등과 유사하였다[19,20]. 또한 세균의 조류에 대한 제어반응은 동물플랑크톤 및 섬모충보다 빠르게 나타났으나 단독처리시 배양액내 조류세포가 완벽하게 제거되지 않았다. 본 실험에서 서로 다른 생물제재의 규조제어능에 대한 상대적인 차이는 크게 의미가 없으나 생물제재의 단독처리시 조류제어 반응시간은 대략 세균 > 동물플랑크톤 > 섬모

충의 순이었다.

한편 세균에 동물플랑크톤과 섬모충에 각각 혼합 적용했을 경우 제어효과는 생물제재에 따라 다소 차이를 보였다. 세균과 동물플랑크톤을 혼합처리한 경우, 혼합에 따른 제어효과는 크게 증가하거나 감소하지 않았으며, 시간이 경과하여도 배양계내 조류를 완벽하게 제거하지 못하였다. 이에 반해 세균에 섬모충을 혼합 처리한 실험구는 실험 5.5일부터 배양계내 조류세포가 거의 관찰되지 않았다. 결국 세균의 존재하에서 두 생물제재의 혼합투입은 각 생물제재의 단독처리보다 더 효과적인 조류제어를 보였으며, 특히 섬모충의 혼합적용이 동물플랑크톤보다 효과적임을 확인하였다. 이 결과는 녹조의 생물학적 제어에 좋은 기초자료로 제공될 것으로 사료된다.

조류제어를 위한 생물제재의 이용에 대한 연구는 비교적 많은 편이지만[14,21], 소형 원반규조 *Stephanodiscus hantzschii*에 대한 제어능을 갖는 두 생물제재를 동시에 처리한 사례는 비교적 드물다[19]. 본 실험에서 두 생물제재를 혼합처리한 결과는 단독처리보다 효과적인 조류제어효과(synergistic effect)를 나타냈다. 이는 남조 *Microcystis aeruginosa*를 제어하는 세균 *Streptomyces*와 섬모충 *Stentor roeselii* 혼합처리한 결과[20]와는 상반된 것으로서, 결국 두 종류이상의 생물제재의 혼합적용은 조류나 생물제재의 종류에 따라 제어촉진 또는 억제현상을 나타낸다는 사실을 알 수 있었다. 다만, 본 실험에 사용하였던 동물플랑크톤 *Brachinous calyciflorus*는 저온기 규조 *Stephanodiscus hantzschii*에는 효과적인 반면, 하절기에 번성하는 남조 *M. aeruginosa*에는 오히려 성장이 억제되거나 사멸되는 특성을 보이기 때문에(김. 미발표) 하절기 녹조제어를 위한 다양한 천적생물 개발 및 생물제재간의 상호관계에 대한 연구가 필요하다.

최근 국내외적으로 조류대발생을 제어하기 위한 물리적 화학적 노력이 활발하게 시도되고 있다[22,23]. 그러나 이러한 방법들은 많은 비용과 2차 처리 등을 요구하며, 궁극적으로 호수나 하천의 지속가능한 관리방안은 되기 어렵다. 뿐만 아니라 본 연구와 같이 조류의 생물학적제어[14,19,20,21] 역시 물리, 화학적 제어방법들의 최종적인 대안이 될 수 없다. 본 연구의 결과가 1) 규모가 비교적 큰 호수나 하천 생태계에 실제 적용가능한 것인지, 2) 수중생태계에 어떠한 영향을 미칠 것인지, 3) 생물제재의 재현성 및 효과 검증 등에 대한 연구가 절대적으로 필요하다. 또한 녹조가 발생하는 수역이 대부분 정부나 지방자치단체에 의해 상수원보호 구역으로 지정되어 있어 개발된 각종 기술이 현장에 직접 적용하기 어려운 국내 환경을 고려한다면 관련기관 및 주민들의 새로운 인식변화가 요구된다. 따라서 수자원의 개발이나 안정적 확보를 위한 대형 댐이나 하천 건설 못지않게 현재 부영양호수나 하천 등에서 조류대발생으로 인하여 실질적으로 사용하기 어려운 수자원의 가치 재창출을 위한 조류제어 기술개발을 위한 경제적 제도적 지원이 필요하다 하겠다.

Ⅴ. 결 론

국내 하천 및 호소에서 대발생하는 규조 *Stephanodiscus hantzschii*를 제어하기 위하여, 살조세균과 초식성섭식자를 동시에 이용하여 그 제어효과를 확인하였다.

1. 세균단독 처리시 3.5일동안에 규조의 80%를제거하였으며, 섬모충은 57%, 동물플랑크톤은 40%가 각각 제어하였다.
2. 세균과 동물플랑크톤을 혼합 적용한 경우, 약 85% 정도의 제어효과를 나타냈으며, 섬모충과 혼합한 경우는 54%의 제어효과를 나타냈다.
3. 그러나 세균과 섬모충 혼합의 경우는 배양 5.5일째 100% 규조제어를 나타낸 반면 세균과 동물플랑크톤 혼합군은 배양액 내 규조를 완전히 제어하지 못하였다.

따라서 본 연구는 생물제재의 적절한 혼합을 통하여 규조대발생을 제어하려는 biomanipulation 연구에 중요한 기초자료로 제공될 것으로 판단되었다.

참 고 문 헌

1. Reyssac, S. J. and M. Pletikosic. 1990. Cyanobacteria in fish ponds. *Aquaculture*. 88: 1-20.

2. Jeong JH, Jin HJ, Sohn CH, Suh KH, Hong YK. 2000a. Algicidal activity of the seaweed *Corallina pilulifera* against red tide microalgae. *J Appl Phycol* 12: 37-43.
3. Lee CW, Jung CW, Han SW, Kang LS, Lee JH. 2001. The removal of algae by oxidation and coagulation process. *J KSEE* 23: 1527-1536.
4. Cho, K.J., J.K. Shin, S.K. Kwak and O.H. Lee. 1998. Diatom genus *Stephanodiscus* as eutrophication indicator for water quality assessment. *Kor. J. Environ. Biol.* 31: 204-210.
5. Hong, S.S., S.W. Bang and M.S. Han. 2002. Effects of rainfall on the hydrological conditions and phytoplankton community structure in the riverine zone of the Pal'tang reservoir, Korea. *J Freshwater Ecol* 17: 507-519.
6. Ha, K., M.H. Jang and G.J. Joo. 2002. Spatial and temporal dynamics of phytoplankton communities along a regulated river system, the Nakdong river, Korea. *Hydrobiologia* 470:237-245
7. Reynolds D. 1985. The ecology of freshwater phytoplankton. Cambridge Univ. Press. 384 p
8. Vincent WF. 1987. Dominance of blooming forming cyanobacteria (blue-green algae). *New Zea J Mar Freshwater Res* 21: 361-542
9. Kolmakov VI, Gaevskii NA, Ivanova EA, Dubovskaya OP, Gribovskaya IV, Kravchuk ES. 2002. Comparative analysis of ecophysiological characteristics of *Stephanodiscus hantzschii* Grunow. In the periods of it's bloom in recreational water bodies. *Russian J Ecol* 33: 97-103.
10. Oksiyuk OP. 1965. *Stephanodiscus hantzschii* Grunow. As an aromatic organisms capable of giving fish smell to water. *Gidrobiol Zh* 1: 50-53.
11. Lim YS, Song WS, Cho JS, Lee H-J, Heo JS. 2000. The effect of algae on coagulation and filtration of water treatment process. *Korean J Environ Agricul* 19: 13-19.
12. Drewes Milligan KL, Cosper EM. 1994. Isolation of virus capable of lysing the brown tide microalga *Aurecoccus anophagefferens*. *Science*. 266: 805-806.
13. Garry RT, Hearing P, Cosper EM. 1998. Characterization of a lytic virus infectious to the bloom-forming microalga *Aureococcus anophagefferens* (Pelagophyceae). *J. Phycol.* 34: 616-621.
14. Sigee DC, Glenn R, Andrews MJ, Bellinger EG, Butler RD, Epton HAS, Hendry RD. 1999. Biological control of cyanobacteria: principles and possibilities. *Hydrobiologia* 395/396: 161-172.
15. Jang EH, Kim JD and Han MS.. 2003. Isolation and Characterization of algal-lytic bacterium HY0210-AK1 and its degradability of *Anabaena cylindrica*. *Kor. J Environ Biol* 21: 194-202.
16. Song S.H., K.C. Shin, M.-S. Han and Y.K. Choi. 2003. The effect of L-lysine on growth inhibition of Microcystis sp. *Kor. J Environ Biol.* 21:216-221
17. Hyun, S.H., J.Y. Soung and Y.K. Choi. 1997. Isolation and Identification of Fungi that Inhibiting the Growth of Cyanobacteria. *Kor. J. Environ. Biol.* 15:185~193.
18. Jeong SY, Park YT, Kim MC, Choi SC, Seong HK, Kim JY, Kim TU and Lee WJ. 2000b. Isolation of Marine Bacteria Killing Red Tide Microalgae - 4. Characteristics of Algicidal Substances , Produced from *Micrococcus* sp. LG - 5 and the Effects on Marine Organisms. *J. Korean. Fish. Soc.* 33: 339-347.
19. Kim BH, Choi HJ, Han MS. 2004a. Potential in the application for biological control of harmful algal bloom caused by *Microcystis*

aeruginosa. *Kor. J. Limnol.*37: 64~69.

20. Kim BH, Kang YH, Han MS. 2004b. Potential in the application for biological control of winter diatom bloom caused by *Stephanodiscus hantzschii*. *Kor. J. Limnol.* 37 : 236~240.
21. Matsui K, Kono S, Saeki A, Ishii N, Min MG, Kawabata Z. 2000. Direct and indirect interactions for coexistence in a species-defined microcosm. *Hydrobiologia* 435:109-116.
22. Nicolau, A, Dias N, Mota M, Lima N. 2001. Trends in the use of protozoa in the assessment of wastewater treatment. *Res Microbiol* 152: 621-630
23. Søndergaard, M., J.P. Jensen , and E. Jeppesen. 2003. Role of sediment and internal loading of phosphorus in shallow lakes. *Hydrobiologia* 506-509: 135-145.