

[Note]

해양미세조류의 무균배양을 위한 항생제의 종류 및 최적 농도

윤주연 · 허성범*

(부경대학교 양식학과 한국해양미세조류은행)

Antibiotics and Their Optimum Concentration for Axenic Culture of Marine Microalgae

Joo-Yeon Youn and Sung Bum Hur*

Korea Marine Microalgae Culture Center, Department of Aquaculture, Pukyong National University, Nam-gu, Busan 608-737, Korea

This study was to determine the extent of bacteria contamination and resistance to various antibiotics used commonly in microalgal culture. Seven different dose levels of chloramphenicol, dihydrostreptomycin sulphate, neomycin, penicillin G, streptomycin sulphate, penicillin G + streptomycin sulphate, and penicillin G + streptomycin sulphate + chloramphenicol were added to each culture of microalgae. The lethal effects on microalgae and bacteria were the highest in chloramphenicol and the lowest in penicillin G. The axenic culture of bacillariophyceae and dinophyceae was more difficult than that of chlorophyceae and haptophyceae because of their complicate external morphology. The efficient antibiotics and their concentrations for axenic cultures varied with microalgal species. The optimum quantity for antibiotic treatments were 2,000 ppm of dihydrostreptomycin for *Chlorella ellipsoidea*, neomycin 500 ppm of *Isochrysis galbana* and *Heterosigma ahashiwo*, chloramphenicol 500 ppm of *Cyclotella didymus*, and dihydrostreptomycin sulphate and neomycin 6,000 ppm of *Thalassiosira allenii*.

Key Words: antibiotics treatment, axenic culture, marine microalgae

서 론

해양미세조류의 순수배양은 조류학의 기초과학적 또는 산업적인 목적에서 많은 연구의 대상이 되어왔다. 미세조류는 여러 세포가 뭉쳐서 군체를 형성하거나 점액성 물질에 둘러싸여있는데 세포 외 점액성 물질에는 많은 세균이 부착되어 공존하고 있다. 이런 세포 외 점액성 물질에 부착되어 있는 공생세균들은 일반적인 고체배지 도말법으로는 쉽게 제거되지 않는 경우가 많다.

공생세균이 제거된 무균주의 경우 자연 상태 하에서 보유하고 있던 생리적인 특성을 소실하는 경우도 있고 (Watanabe *et al.* 1998), 또 공생세균은 미세조류에 CO₂와 무기영양염 및 vitamin원을 제공하기 때문에 미세조류 배양시 공생세균은 먹이공급원으로 간주되기도 한다 (Asher *et al.* 1982). 따라서 자연수계에서 분리, 보존되고 있는 많은 단세

포성 미세조류들이 균이 혼재한 배양(xenic culture) 상태로 보존되고 있는 것은 이런 이유에 기인한다. 일반적으로 대량 배양을 통한 먹이생물로의 활용이나 일반 생태학적 연구에서는 미세조류들의 배양만으로도 그 목적을 달성할 수 있으나, 일부 순수 생리학적 연구나 PCR 기술을 이용한 유전학적 연구 등에서는 세균이 배제된 무균주를 필요로 하고 있어 미세조류의 무균분리는 필수적이다.

미세조류의 무균분리를 위하여 원심분리(Hoshaw and Rosowski 1973; Reardon *et al.* 1979), 여과(Waterbury *et al.* 1986; Ki *et al.* 2006), 초음파(Shirai *et al.* 1989; Lim *et al.* 1992), 희석(Waterbury *et al.* 1986; Rippka *et al.* 2000), 자외선(Watanabe *et al.* 2000; Rappé *et al.* 2002) 등의 물리적 방법과 페놀(Carmichael and Gorham 1974; Olivier *et al.* 2003), potassium tellurite(Hoshaw and Rosowski 1973; Yurkov and Beatty 1998) 및 항생제(Yim and Lee 2004; Campa-Cordova *et al.* 2006) 등의 방법들이 사용되고 있으나 일반적으로 항생제 처리법이 가장 널리 이용되고 있다. 미세조류의 표면구조가 복잡하고 세포벽이 얇고 외부환경에

*Corresponding author (hurs@pknu.ac.kr)

Table 1. Microalgal species used for the study

Experiment	Species	Source of strain (KMMCC)	size \pm SD (μ m) (length, width)	
1	Bacillariophyceae	<i>Cyclotella choctawhatcheeana</i>	B-97	4.2 \pm 1.2
	Chlorophyceae	<i>Chlorella ellipsoidea</i>	C-20	1.9 \pm 0.6
	Cyanophyceae	<i>Spirulina maxima</i>	CY-23	9.2 \pm 1.0, 5.9 \pm 1.2
	Dinophyceae	<i>Prorocentrum minimum</i>	D-63	19.0 \pm 1.7, 13.2 \pm 1.0
	Haptophyceae	<i>Isochrysis galbana</i>	H-1	4.8 \pm 1.1, 3.4 \pm 0.5
	Raphidophyceae	<i>Heterosigma akashiwo</i>	RA-6	7.8 \pm 0.6, 4.5 \pm 0.8
2	Bacillariophyceae			
	Centrales	<i>Chaetoceros didymus</i>	B-199	10.5 \pm 0.6, 5.2 \pm 0.6
		<i>Skeletonema costatum</i>	B-24	5.0 \pm 0.6, 3.9 \pm 0.5
		<i>Thalassiosira allenii</i>	B-287	12.4 \pm 0.7, 6.6 \pm 0.7
	Pennales	<i>Amphiprora paludosa</i>	B-657	12.0 \pm 2.2, 6.3 \pm 1.0
		<i>Navicula incerta</i>	B-1	19.3 \pm 1.9, 4.4 \pm 0.7
<i>Pleurosigma angulatum</i>		B-315	58.5 \pm 5.4, 9.6 \pm 0.8	

KMMCC : Korea Marine Microalgae Culture Center.

에민한 종류의 경우 물리화학적인 방법을 병행하여 무균분리를 시도하나 여전히 순수배양은 어려운 실정이다.

따라서 본 연구는 다양한 미세조류를 취급하는 미세조류은행에서 간편하고 효율적인 순수분리 방법을 파악하고자 그룹별 미세조류의 항생제 내성의 특성을 파악하고자 하였다.

재료 및 방법

대상종은 한국해양미세조류은행에서 배양중인 12종을 대상으로 두실험으로 나누어 조사하였다(Table 1). 실험 1에서는 규조류(*Cyclotella choctawhatcheeana*), 녹조류(*Chlorella ellipsoidea*), 남조류(*Spirulina maxima*), 와편모조류(*Prorocentrum minimum*), 칩편모조류(*Isochrysis galbana*), 칩편모조(*Heterosigma akashiwo*)에서 대표적인 미세조류를 각각 1종씩 택하여 실험하였다. 실험 2에서는 규조류만을 대상으로 3종의 중심목(Centrales: *Chaetoceros didymus*, *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira allenii*)과 3종의 우상목(Pennales: *Amphiprora paludosa*, *Navicula incerta*, *Pleurosigma angulatum*)을 택하여 실험하였다. 이들 미세조류는 f/2 배지(Guillard and Ryther, 1962)에서 20°C, 60 μ mol photon m⁻² s⁻¹의 연속조명 조건으로 배양하여 대수기 상태의 세포를 실험에 사용하였다.

항생제는 chloramphenicol(23275, Fluka, Switzerland), dihydrostreptomycin sulphate(D-7253, Sigma, USA), neomycin(DB0366, BIO BASIC INC, Canada), penicillin G(31749.04, SERVA, Germany), streptomycin sulphate(35500.01, SERVA, Germany)를 사용하였고, 5가지 항생제 중 penicillin G와 streptomycin sulphate를 1:1로 혼합한 것

과 여기에 동량의 chloramphenicol를 혼합한 총 7가지의 항생제 용액으로 실험하였다. 각 항생제는 증류수 10 mL에 0.1 g씩을 칭량하여 녹였고 chloramphenicol은 95% ethanol에 녹여 준비하였다. 각 항생제 용액은 0.45 μ m membrane에서 여과한 후 멸균된 용기에 보관하여 사용하였다(Hoshaw and Rosowski 1973).

48-hole cell wall에 각 미세조류 배양액을 분주하고 7가지 항생제 용액이 500, 1,000, 2,000, 3,000, 4,000, 5,000, 6,000 ppm이 되도록 첨가한 후 20°C, 60 μ mol photon m⁻² s⁻¹의 연속조명으로 48시간 배양하였다. 48시간 후 bacteria의 생존 유무를 알아보기 위해 LDM 고체 배지(Starr 1978)에 접종하였고 미세조류의 생존 유무는 f/2 medium에 접종한 다음 5일 동안 도립현미경으로 성장여부를 관찰하였다.

결과 및 고찰

미세조류는 세포벽 혹은 frustule(돌말껍질)에 areola(그물눈)로 불리는 작은 구멍 등이 존재하고 세포 외에 점액성 물질을 분비하는데 많은 세균들이 이곳에 부착하여 공생한다. Parker(1982)와 Watanabe et al.(1998)은 남조류 *Microcystis*에 부착되어 있는 많은 세균들을 제거하기 위해서 물리적인 방법으로 원심분리와 agarose를 이용한 고체배지 도말법을 사용하였으나 몇 개체만이 순수분리 되었다. 이와 같이 원심분리와 같은 일반적인 물리적 방법으로는 미세조류와 함께 공생하는 많은 세균은 쉽게 제거되지 않는 경우가 많다. 따라서 물리적인 방법보다는 화학적인 방법이 더 유효할 수 있다. Yim and Lee(2004)는 chloramphenicol, ampicillin, neomycin, cephalosporin 등의 항생제처리와 원심분리를 통한 물리적 방법을 병행하여 *Gyrodinium*을 순수

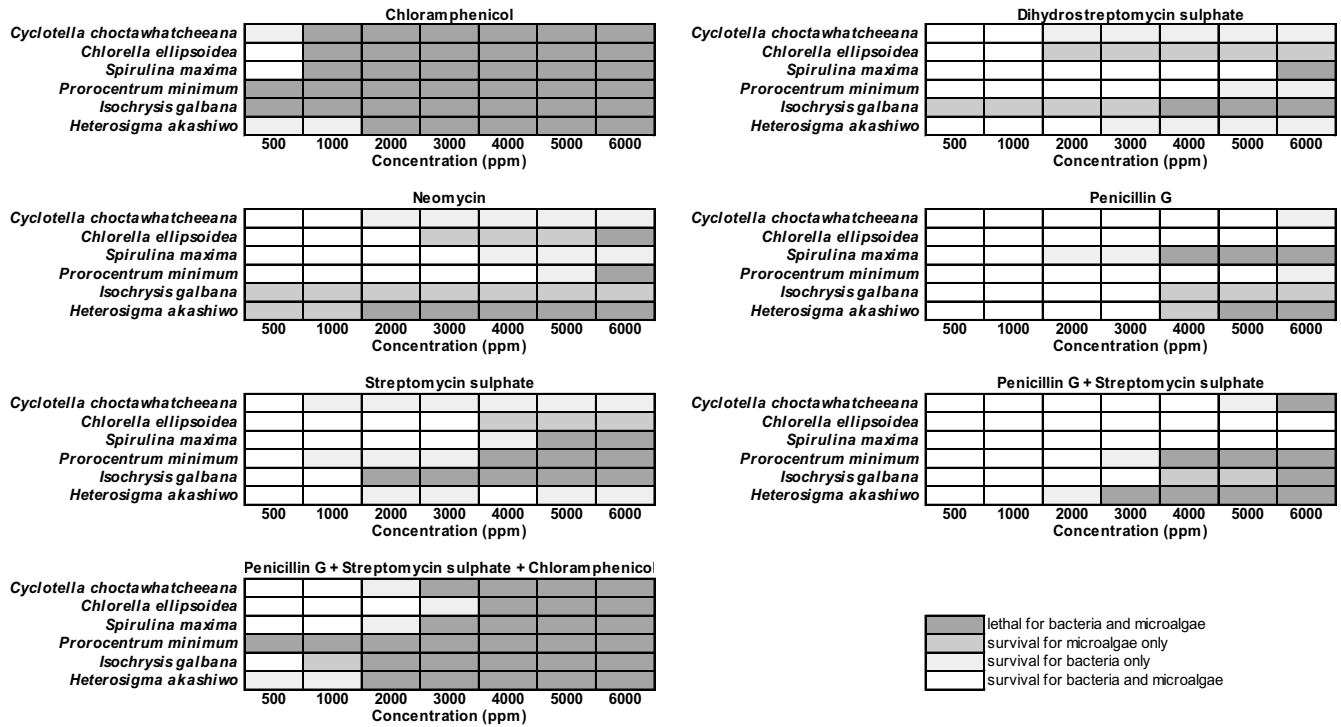


Fig. 1. Antibiotic sensitivity spectrum of bacterial contaminants in cultures of different microalgal species.

분리하였다. 또 Ki et al. (2006)은 *Alexandrium*과 *Peridinium*의 무균배양을 위하여 미세필터와 항생제를 이용하여 무균화하였으나 많은 시간과 까다로운 절차가 필요했다.

본 연구에서의 강(class)별로 대표적인 6종의 미세조류에 대한 5종류 단일 항생제 및 2종 또는 3종류의 혼합 항생제 처리에 대한 내성의 결과는 Fig. 1과 같다. Class별 미세조류 종은 항생제 종류에 따라 내성이 다르게 나타났다. 그러나 전체적으로 chloramphenicol은 모든 미세조류에서 가장 큰 치사효과를 보였고 penicillin G는 다른 항생제에 비하여 비교적 내성이 가장 높은 것으로 나타났다. 특히 외편모조 *P. minimum*와 칩편모조 *I. galbana*에서는 chloramphenicol 500 ppm의 가장 낮은 농도에서도 세균과 미세조류가 모두 사멸하였다.

Streptomycin sulphate와 dihydrostreptomycin sulphate는 서로 유사한 경향을 보였으나 streptomycin sulphate가 다소 더 강한 치사효과를 보였다. Neomycin은 dihydrostreptomycin sulphate보다는 높은 치사효과를 보였으나 streptomycin sulphate보다는 내성이 더 높은 것으로 나타났다. 그러나 칩편모조 *H. akashiwo*의 경우 neomycin은 streptomycin sulphate보다 더 치사 효과가 높은 것으로 나타났다.

Penicillin G와 streptomycin sulphate를 혼합한 것은 penicillin G 단독에 비해 녹조 *C. ellipsoidea*에서는 동일한 결과를 보였으나 남조 *S. maxima*에서는 penicillin G 단독에서

더 치사효과가 높았다. 그러나 그 외 4종의 미세조류는 penicillin G + streptomycin sulphate에서 치사효과는 더 높은 것으로 나타났다.

또 penicillin G + streptomycin sulphate + chloramphenicol을 혼합한 것은 penicillin G + streptomycin sulphate보다도 더 높은 치사효율을 보였다. 그러나 chloramphenicol 단독에 비하면 낮은 치사효율을 보였다.

Class별 6종 미세조류의 순수분리를 위한 적합한 항생제와 농도는 녹조 *C. ellipsoidea*는 dihydrostreptomycin sulphate 2,000–6,000 ppm, 칩편모조 *I. galbana*는 neomycin 500–6,000 ppm와 침편모조 *H. akashiwo*는 neomycin (500–1,000 ppm)으로 나타났다. 외편모조 *P. minimum*와 남조 *S. maxima*, 규조 *C. choctawhatcheana*는 다른 미세조류에 비하여 항생제에 민감한 반응을 보였다. 이들 종류의 경우 항생제에 대한 내성은 세균보다도 오히려 낮은 경향을 보였다. 이와 같은 현상은 이들 종류가 보유하고 있는 점액질이나 합입부분이 많은 외부형태적 특성으로, 세포벽이 두껍고 구형인 녹조 *C. ellipsoidea*나 외부형태가 단순한 칩편모조 *I. galbana*나 침편모조 *H. akashiwo* 등에 비하여 항생제 처리에 의한 순수분리가 더 까다로운 것으로 판단된다.

한편 순수분리가 가장 까다로웠던 규조류 6종을 중심목과 우상목으로 구분하여 항생제 처리한 결과는 Fig. 2와 같다. 항생제 별로의 규조류에 대한 치사효과는 앞서의 실험 결과와 같이 chloramphenicol에서 가장 높았고 내성은

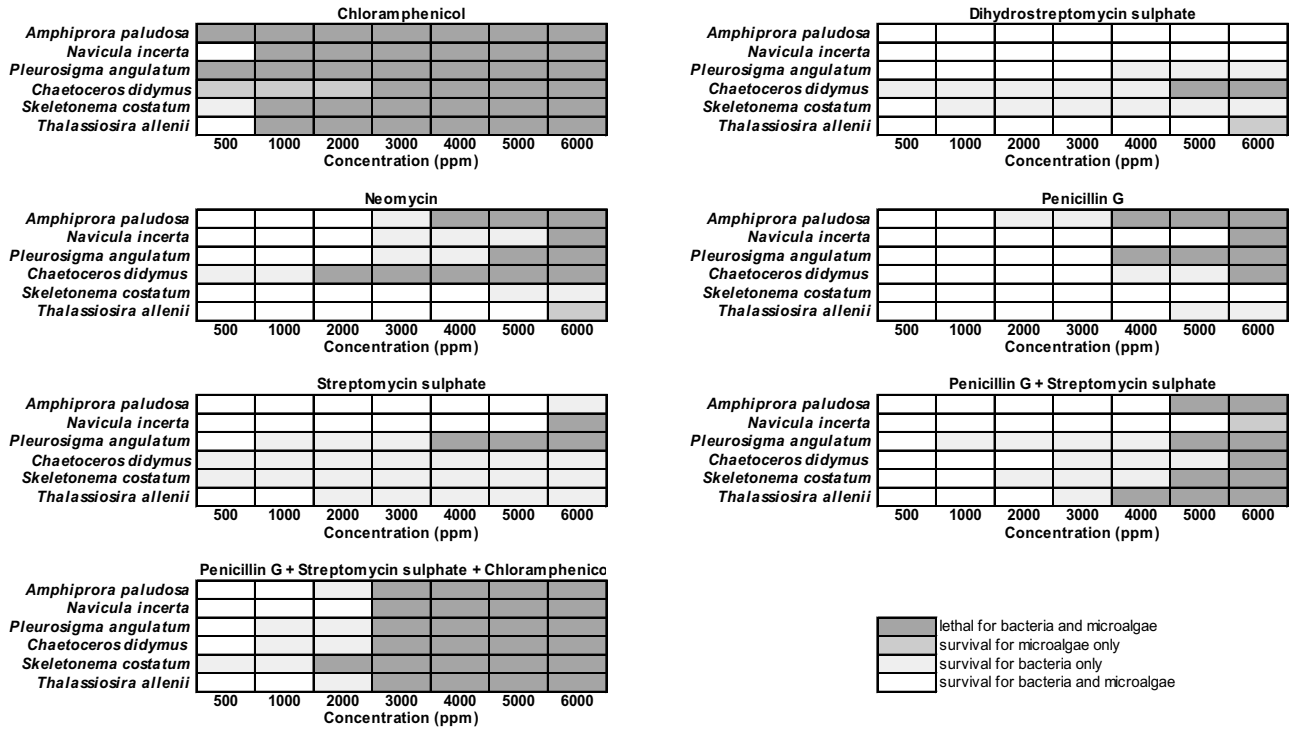


Fig. 2. Antibiotic sensitivity spectrum of bacterial contaminants in cultures of six species of bacillariphyceae.

dihydrostreptomycin sulphate에서 가장 높은 것으로 나타났다. 우상목 규조류는 중심목 규조류에 비하여 dihydrostreptomycin sulphate와 streptomycin sulphate에서 내성이 더 높은 경향인 반면, neomycin과 penicillin G에서는 중심목이 우상목보다 내성이 더 높은 경향을 보였다. 또 penicillin G + streptomycin sulphate는 이들 두 종류 항생제의 단독처리구에 비하여 치사효과가 더 높았고 penicillin G + streptomycin sulphate + chloramphenicol은 penicillin G + streptomycin sulphate에 비하여 더 높은 치사효과를 보였다.

같은 목(order)의 규조류에서도 종류에 따라 항생제 별로의 치사 효과는 다르게 나타났다. 우상목의 *A. paludosa*는 항생제로 dihydrostreptomycin를 사용하였을 때 6,000 ppm까지 세균이 생존하였으나 chloramphenicol에서는 500 ppm에서도 생존하지 않았다. *N. incerta*는 penicillin G + streptomycin sulphate 6,000 ppm에서 순수 분리되었으나 chloramphenicol을 제외한 대부분의 항생제에서는 내성을 보였다. *P. angulatum*은 대체적으로 모든 항생제에 약하게 나타났다. 또 중심목의 *C. didymus*는 다른 항생제에서는 모두 사멸하였으나 치사효과가 가장 높았던 chloramphenicol에서는 500-2,000 ppm에서 순수분리가 가능했던 점이 매우 특이했다. *T. allenii*는 dihydrostreptomycin sulphate와 neomycin의 6,000 ppm에서 순수분리가 가능하였다. *S. costatum*은 penicillin G에서 가장 높은 내성을 보였다.

규조류는 다른 종류에 비하여 세균만을 치사시킬 수 있는 항생제의 농도를 파악하기 어려웠다. 규조류의 순수분리가 다른 녹조나 착편모조 또는 침편모조 등에 비하여 까다로운 이유는 규조각의 외부구조가 많은 돌기와 구멍 등으로 형성되어 있기 때문으로 판단된다.

Cho et al. (2002)은 ampicillin, gentamycin, kanamycin, neomycin, streptomycin 5종을 혼합한 항생제가 착편모조 *I. galbana*의 무균화에 가장 효과적이라 하였다. 또 chloramphenicol의 최대 비 치사농도(maximum non-lethal concentration)와 최소 치사농도(minimum lethal concentration)은 각각 68 ppm과 340 ppm으로 streptomycin의 100 ppm과 800 ppm, 그리고 neomycin의 1,000 ppm과 6,000 ppm보다 치사효과가 높았다고 보고하였다. 본 연구결과를 이들의 결과와 비교해 볼 때 본 연구에서 사용한 chloramphenicol의 최저 농도 500 ppm은 *I. galbana*의 분리에 너무 높은 농도였으나 chloramphenicol, streptomycin, neomycin 3종류의 항생제가 *I. galbana*에 미치는 치사효과의 경향은 서로 유사하였다. 그러나 또 본 연구에서 neomycin의 경우 500-6,000 ppm의 넓은 농도의 범위에서 *I. galbana*가 순수 분리된 점은 최대 비 치사 농도가 1,000 ppm이라 보고한 이들의 결과와는 큰 차이를 보였다.

Campa-Cordova et al. (2006)은 *I. galbana*는 chloramphenicol, erythromycin의 농도에 크게 영향을 받지 않았지만 *C. gracilis*는 이들 항생제 농도에 따라 성장에 많은

영향을 받았다고 하였다. 이와 같은 결과는 본 연구에서 *I. galbana*가 chloramphenicol의 모든 실험농도에서 사멸하였고 *C. didymus*의 경우는 500-2,000 ppm의 농도에서 순수 분리되었던 결과와는 차이를 보였다. 이러한 차이는 대상 미세조류의 strain 또는 배양액의 유기물 정도에 따라서 같은 종류의 항생제에서도 치사효과가 달라질 수 있기 때문으로 해석할 수 있다.

본 연구결과 각 미세조류의 순수분리에 적당한 항생제의 종류와 최적농도는 *C. ellipsoidea*는 dihydrostreptomycin 2,000 ppm, *I. galbana*는 dihydrostreptomycin 또는 neomycin 500 ppm, *H. akashiwo*는 neomycin 500 ppm이었다. 또 *S. maxima*는 dihydrostreptomycin sulphate 5,000-6,000 ppm, *P. minimum*은 neomycin 4,000-5,000 ppm이 적합한 것으로 추정된다. 규조류의 경우, *C. didymus*는 chloramphenicol 500 ppm, *N. incerta*는 penicillin G + streptomycin 6,000 ppm, *T. allenii*는 dihydrostreptomycin sulphate 또는 neomycin 6,000 ppm이 가장 적합했다. 또 *A. paludosa*는 penicillin G + streptomycin sulphate 4,000-5,000 ppm, *S. costatum*은 dihydrostreptomycin sulphate 500-1,000 ppm에서 적합할 것으로 추정된다.

미세조류의 순수분리를 위해서는 항생제에 대한 미세조류의 내성도 중요하지만 세균의 사멸여부가 중요하다. 그러나 본 연구에서는 각 미세조류에 공생하였던 세균의 종류별 특성은 분석하지 못했다. 따라서 앞으로의 연구에서는 미세조류와 세균의 종류에 따른 항생제의 내성 또는 치사효과를 구체적으로 분석할 필요가 있다.

사 사

본 연구는 해양수산부에서 시행한 2002년도 수산특정연구 개발사업과제에 의해 수행된 연구결과이며 연구비를 지원해 주신 해양수산부에 심심한 사의를 표합니다.

참고문헌

- Asher A. and Spalding D.K. 1982. *Culture Centre of Algae and Protozoa List of Strains 1982*. Institute of Terrestrial Ecology, Cambridge.
- Campa-Cordova A.I., Luna-Gonzalez A., Ascencio F., Cortes-Jacinto E. and Caceres-Martinez C.J. 2006. Effects of chloramphenicol, erythromycin, and furazolidone on growth of *Isochrysis galbana* and *Chaetoceros gracilis*. *Aquaculture*. **260**: 145-150.
- Carmichael W.W. and Gorham P.R. 1974. An improved method for obtaining axenic clones of planktonic blue-green algae. *J. Phycol.* **10**: 238-240.
- Cho J.Y., Choi J.S., Kong I.S., Park S.I., Kerr R.G. and Hong Y.K. 2002. A procedure for axenic isolation of the marine microalga *Isochrysis galbana* from heavily contaminated mass cultures. *J. Appl. Phycol.* **14**: 385-390.
- Guillard R.R.L. and Ryther J.H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Can. J. Microbiol.* **8**: 229-239.
- Hoshaw R.W. and Rosowski J.R. 1973. Methods for microscopic algae. In: Stein J.R. (ed), *Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements*. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 56-64.
- Ki J.S., Cho S.Y. and Han M.S. 2006. Axenic Culture Method: A Filtration Technique to Produce Axenic Cultures of the Armoured Dinoflagellates. In: Hur S.B. (ed), *Culture and application of useful microalgal*. Life Science Publishing Co. pp. 131-147.
- Lim M., Ong B.L. and Wee Y.C. 1992. A method of obtaining axenic cultures of *Trentepohlia* spp. (Chlorophyta). *J. Phycol.* **28**: 567-569.
- Olivier S., Scragg A.H. and Morrison J. 2003. The effect of chlorophenols on the growth of *Chlorella* VT-1. *Enzyme Micro. Techno.* **32**: 837-842.
- Parker D.L. 1982. Improved procedures for the cloning and purification of *Microcystis* cultures (cyanophyta). *J. Phycol.* **18**: 471-477.
- Rappé M.S., Connon S.A., Vergin K.L. and Giovannoni S.J. 2002. Cultivation of the ubiquitous SAR 11 marine bacterioplankton clade. *Nature* **418**: 630-633.
- Reardon E.M., Price C.A. and Guillard R.R.L. 1979. Harvest of marine microalgae by centrifugation in density gradients of "Percoll," a modified silica sol. In: Reed E. (ed), *Methodological Surveys in Biochemistry*, Vol. 8. Ellis Norwood Publishing, Chichester, U.K., pp. 171-175.
- Rippka R., Coursin T., Hess W., Lichtlé C., Scanlan D.J., Palinska K.A., Iteman I., Partensky F., Houmard J. and Herdman M. 2000. *Prochlorococcus marinus* Chisholm et al. 1992 subsp. *pastoris* subsp. nov. strain PCC 9511, the first axenic chlorophyll a₂/b₂-containing cyanobacterium (Oxyphotobacteria). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 1833-1847.
- Shirai M., Matumaru K., Ohotake A., Takamura Y., Aida T. And Nakano M. 1989. Development of a solid medium for growth and isolation of axenic *Microcystis* strains (cyanobacteria). *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 2569-2571.
- Starr R.C. 1978. The culture collection of algae at the University of Texas at Austin. *J. Phycol.* **14**: 47-100.
- Watanabe M.M., Nakagawa M., Katagiri M., Aizawa K., Hiroki M. and Nozaki H. 1998. Purification of freshwater picoplanktonic cyanobacteria by pour-plating in 'ultra-low-gelling-temperature agarose.' *Phycol. Res.* **46**: 71-75.
- Watanabe M.M., Kawachi M., Hiroki M. and Kasai F. 2000. *NIES-Collection List of Strains Sixth Edition 2000 Microalgae and Protozoa*. Microbial Culture Collection, National Institute for Environmental Studies, Tsukuba.
- Waterbury J.B., Watson S.W., Valeis F.W. and Franks D.G. 1986. Biological and ecological characterization of the marine unicellular cyanobacterium *Synechococcus*. In: Platt T. and Li W.K.W. (eds). *Photosynthetic picoplankton*. *Can. Bull. Fish.*

Aquat. Sci. **214**: 71-120.

Yim J.H. and Lee H.K. 2004. Axenic culture of *Gyrodinium impudicum* strain KG03, a marine red-tide microalga that produces exopolysaccharide. *J. Microb.* **42**: 305-314.

Yurkov V.V and Beatty J.T. 1998. Aerobic anoxygenic

phototrophic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 695-724.

Received 25 June 2007

Accepted 11 September 2007