

Research Article

Open Access

유독성 와편모류 *Alexandrium catenella*에 대한 *Pseudoalteromonas* sp. NH-12의 살조능

정남호,¹ 손홍주,² 정성윤^{3*}

¹대구가톨릭대학교 CU 인재학부, ²부산대학교 생명자원과학대학, ³대구가톨릭대학교 의생명과학과

The Algicidal Activity of *Pseudoalteromonas* sp. NH-12 against the Toxic Dinoflagellate *Alexandrium catenella*

Nam Ho Jeoung,¹ Hong-Joo Son² and Seong-Yun Jeong^{3*} (CU Leaders'College, Catholic University of Daegu, Gyeongsan, 712-702, Korea, ²College of Natural Resources and Life Science, Pusan National University, Miryang 627-706, Korea, ³Department of Biomedical Science, Catholic University of Daegu, Gyeongsan 712-702, Korea)

Received: 16 April 2012 / Accepted: 25 June 2012

© 2012 The Korean Society of Environmental Agriculture

Abstract

BACKGROUND: The aim of this study was to isolate and identify algicidal bacterium that tends to kill the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*, and to determine the algicidal activity.

METHODS AND RESULTS: Among of four algicidal bacteria isolated in this study, NH-12 isolate was the strongest algicidal activity against *A. catenella*. NH-12 isolate was identified on the basis of biochemical characteristics and analysis of 16S rRNA gene sequences. The isolate showed 97.67% homology with *Pseudoalteromonas prydzensis* ACAM 620^T (U85855), and was designated *Pseudoalteromonas* sp. NH-12. The optimal culture conditions of this isolate were 25°C, initial pH 8.0, and 3.0% (w/v) NaCl concentration. The algicidal activity of NH-12 was significantly increased to maximum value in the late of logarithmic phase of bacterial culture. As a result of 'cell culture insert' experiment, NH-12 is assumed to produce secondary metabolites, as an indirect attacker. When 10% culture filtrate of NH-12 was applied to *A. catenella*, over 99% of algal cells were destroyed within 24 h. In addition, the

killing effects were increased in dose and time dependent manners.

CONCLUSION(S): Taken together, our results suggest that *Pseudoalteromonas* sp. NH-12 could be a candidate for controlling of toxic algal blooms.

Key Words: *Alexandrium catenella*, Algicidal activity, *Pseudoalteromonas*, Red tide

서 론

우리나라 연안 해역에서 발생하는 유해성 적조는 해양환경의 오염으로 발생빈도와 기간이 늘어나고 있을 뿐만 아니라 그 영역이 확대되어 막대한 피해를 일으키는 사회·경제적 문제로 대두되고 있다. 적조는 해수 중 증식속진 물질의 과잉공급과 일사량, 수온 등 해양 환경이 적조생물의 성장조건에 알맞을 때 대량으로 번식하여 발생하는 현상으로서 (Kim *et al.*, 2006), 적조생물은 호흡 및 사체 분해 시 수중의 용존산소를 소비하여 수중의 다른 생물의 생존을 저해하며 (Kim *et al.*, 1997), 유해물질 및 독소를 분비하여 어패류를 폐사시키는 결과를 초래한다. 또한 적조생물의 일부는 어패류를 독화시키는 종이 있어, 이 독화된 패류를 사람이 섭취하면 마비성·설사성 중독을 일으켜 사람의 건강까지도 위협하고 있어 사회·경제적으로도 심각한 문제가 되고 있다 (Park *et al.*, 1998).

한국 연안에서 출현하는 적조생물은 34종 이상이 보고되

*교신저자(Corresponding author),

Phone: +82-53-850-3772; Fax: +82-53-850-3727;

E-mail: jsymicro@cu.ac.kr

고 있다. 1980년대까지는 *Chaetoceros*, *Skeletonema*, *Thalassiosira* 및 *Nitzschia* 속 등의 규조류가 주요 원인생물이었으나, 1981년부터 *Alexandrium*, *Cochlodinium*, *Gymnodinium* 및 *Heterosigma* 속 등의 편모조류가 주요 적조 원인생물로 나타나고 있다(Kim *et al.*, 1997). 특히 유독성 와편모류인 *Alexandrium* 속은 전 세계적으로 30여 종이 보고되고 있고, 일부 종은 독성은 다르지만 화학적으로 유사한 20여종의 신경성 독소(neurotoxins)를 생산한다. *Alexandrium* 속의 유독종으로는 *A. tamarense*, *A. catenella* 및 *A. minutum* 등이 알려져 있고, 이중 우리나라에서는 진해만과 여수만에서 *A. tamarense*와 *A. catenella* 등이 출현하는 것으로 보고되고 있다(Kim, 1995; Kim and Kim, 2004; Lee *et al.*, 2006). 특히 *A. catenella*는 1927년 San Francisco 부근에서 대발생하여 6명이 죽고 102명이 병에 걸린 사건의 원인종으로 밝혀졌으며, 또한 그 원인이 *A. catenella*가 생산하는 마비성 패독(PSP; Paralytic shellfish poisoning)임이 보고(Sommer and Meyer, 1937)되었다. 이후 *A. catenella*는 북반구에 널리 분포하고 있는 것으로 알려져 있으나, 최근에는 남반구인 남아프리카, 칠레(Cordova and Muller, 2002) 등지에서도 출현하여 문제가 되는 종이다. *A. catenella*가 생산하는 마비성 패독은 saxitoxin과 gonyautoxin 및 그 유도체들을 포함하는 신경성 독소로서(Kamikawa *et al.*, 2007), 먹이연쇄 과정에서 농축되어 패류 양식 산업은 물론 식품위생 등에 심각한 피해를 끼치고 있다.

적조의 피해를 최소화하기 위한 적조생물의 구제 또는 제거 방법의 일환으로 최근에 해양미생물 또는 바이러스를 이용한 생물학적 방제에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(Yoshinaga *et al.*, 1998; Park *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1999; Jeong *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005). 그러나 아직까지 적조를 효과적으로 방제하는 방법의 개발은 미진한 상황이다. 우리나라에서는 90년대 후반부터 '황토 살포법'을 실시해 오고 있다. 자연에서 산출되는 황토가 다른 방법에 비해 환경 친화적이라는 점을 중시하여 사용(Kim *et al.*, 2006)하고 있지만, 황토에 의한 2차 오염 또한 새로운 문제점으로 제기되고 있다. 적조 피해를 줄이기 위해서는 하수 처리 시설의 확충이나 가두리 양식장의 시설을 보다 환경 친화적으로 만들어 부영양화의 원인을 줄이는 것이 근본적인 해결책이겠지만, 이 또한 막대한 비용과 시간이 요구되는 현실이다. 이에 최근에는 적조 발생 해역에 존재하는 해양미생물을 이용하는 방법이 보다 안전하고 환경친화적인 적조 제어법으로 인식되어 많은 연구가 진행되고 있다. 또한 지금까지 보고된 적조생물에 대한 살조미생물의 연구에 있어서 *A. tamarense*를 제어하는 미생물(Su *et al.*, 2007a, 2011; Wang *et al.*, 2012)에 대한 연구는 비교적 많이 연구되었으나, *A. catenella*를 제어하는 미생물에 대한 연구는 전 세계적으로도 미진한 실정이다.

이에 본 연구에서는 해양환경에서 서식하고 있는 해양미생물을 이용하여 해양생태계에 미치는 영향을 최소한으로 하

면서 우리나라 연안에서 적조 및 마비성 패독을 일으켜 문제 시되고 있는 유독성 적조생물인 *A. catenella*에 대한 살조 효과를 밝혀 적조 구제법에 대한 기초 연구 자료를 마련하고자 한다.

재료 및 방법

시료채취 및 살조미생물의 분리

해수 sampling 장소는 우리나라에서 적조 발생이 가장 빈번한 해역 중의 하나인 마산만으로, 이 지역은 통합 창원시가 인접하고 내륙 깊숙이 발달한 내만으로서 남해안에서도 수질이 가장 나쁜 지역 중 하나이다. 특히 부도(Pudo) 수로 내측은 저염의 성층화된 수괴가 형성되는 지역으로 내만의 특성이 강하고, 부도 외측은 해양성 미세조류와 동물플랑크톤의 빈도가 높은 지역이다(Kwak *et al.*, 2001). 본 실험에서 해수 시료는 2010년 4월 마산만의 부도 내측 해역의 적조 발생해역에서 표층해수를 Niskin 개량형 채수기인 MB 채수기를 이용하여 광구병(180°C에서 2시간 건열 멸균)으로 무균적으로 채수하였으며, 채수된 시료는 ice-box에 보관하여 3시간 이내에 연구실로 옮겨 실험하였다. 살조미생물을 분리하기 위해 해수 시료를 십진희석법으로 희석하여 PPES-II (yeast extract 1 g, proteose peptone 1 g, polypeptone 2 g, soytone 1 g, 0.1% ferric citrate 10 mL, seawater 1 L, initial pH 7.6) 배지(Taga, 1968)에 평판도말법으로 도말하여 20°C에서 7일간 배양 후, 형성된 특징적인 형태의 colony를 모두 선별하여 순수분리 하였다. 이들 분리균주들의 *A. catenella*에 대한 살조능(algicidal activity)을 알아보기 위해 f/2-Si 배지를 포함한 24 well microplate에 전배양한 *A. catenella* 배양액(8.0 X 10³ cells/mL) 0.9 mL씩을 각각 분주하고, PPES-II 액체배지에서 전배양한 분리균주들의 배양액(10³-10⁴ cells/mL) 100 µL를 접종하여 살조능을 가지는 균주들을 선별하였다.

*A. catenella*의 무균 배양

본 연구에서 사용한 *A. catenella*는 한국미세조류은행으로부터 분양받았으며, 하기의 무균배양법으로 순수 분리하였고 배양조건은 온도 20°C, initial pH 8.2, 광량 70 µEm²s⁻¹, 광주기 12L:12D의 조건으로 f/2-Si (Guillard and Ryther, 1962) 배지에서 계대 배양하며 실험하였다. *A. catenella*를 순수분리 또는 무균배양(axenic culture or bacteria-free culture) 방법은 다음과 같다: Droop (1967), Fontana와 Haug (1982), Cottrell과 Suttle (1993) 및 Su 등(2007b)의 방법을 응용하여 *A. catenella*를 무균배양 하였다. 즉, 한계희석법으로 전 배양한 *A. catenella* 세포들을 원심분리하여 집적하고 멸균된 신선한 f/2-Si배지로 3번 반복 수세한 후, lysozyme (0.5 mg/mL, 20°C, 10 min)과 Sodium Dodecyl Sulfate (SDS, 0.25%, 20°C, 10 min)를 순서대로 첨가한 후 상기의 조건으로 2회 계대 배양하였

다. 이 후 antibiotic complex (gentamycin, streptomycin, cephalothin: each 100 µg/mL)에 노출시켜 3시간 정도 배양하여 세균과 곰팡이 등을 제거한 후, 다시 항생제를 첨가하지 않은 새로운 f/2-Si 배지에서 3회 계대 배양하였다. 이와 같은 조작을 수회 반복하여 얻은 무균 배양주를 무균 검사법에 의해 아래의 여러 가지 배지에서 오염 미생물이 검출되지 않는 것을 확인한 후 모든 실험에 사용하였다. 무균 검사에는 nutrient agar, PPES-II, ST¹⁰ agar (저영양, 중속 영양세균용), YM agar (Yeast용), PDA (곰팡이용)를 사용하였다. 사용한 배지의 조성은 다음과 같다: nutrient agar (peptone 5 g, meat extract 3 g, NaCl 3 g, agar 15 g, distilled water 1 L, initial pH 7.0), ST¹⁰ agar (tripticase peptone 0.5 g, yeast extract 0.05 g, agar 12 g, seawater 1 L), YM agar (glucose 10 g, peptone 5 g, yeast extract 3 g, malt extract 3 g, agar 20 g, distilled water 1 L, initial pH 6.2), PDA agar (potato 200 g, glucose 20 g, agar 20 g, distilled water 1 L, initial pH 5.6).

살조미생물의 동정

분리한 살조미생물 균주 중 가장 살조능이 우수한 NH-12 균주의 분류학적 위치를 검토하기 위하여 MacFaddin (1980)과 Gerhardt 등(1981)의 방법을 참고하여 형태 및 배양학적 특성을 파악하고, 생리 및 생화학적 특성은 API 20NE와 API ZYM kits (Biomérieux, France)를 이용하여 분석하였다. 그 결과를 apiwebTM database (<http://apiweb.biomérieux.com>)를 참조하여 1차적으로 분류학적 유사성을 검토하여 속 level까지 동정하였다. 또한 보다 정확한 동정을 위하여 16S rRNA gene을 이용한 염기서열 분석을 행하였다(Dunbar *et al.*, 2000). 선별된 NH-12 균주를 PPES-II 배지에서 18시간 배양한 후, AccuPrepTM Genomic DNA extraction kit (Bioneer)를 사용하여 total genomic DNA를 추출하여 template로 사용하였다. 16S rRNA 유전자의 증폭에 이용된 primer쌍은 27F (5'-AGAGTTTGTATCMTGGCTCAG-3')와 1492R (5'-GTGGATCCGGYTACCTTGTACGACTT-3')을 사용하였다. 이때 forward primer의 5'에는 제한효소 *EcoRI*의 인식 부위를, reverse primer의 5'에는 *Bam*HI의 인식 부위를 첨가하였다. PCR 반응은 AccuPower PCR Premix (Bioneer)를 사용하여 Minicycler (MJ Research, USA)로 실시하였다. 먼저 94°C에서 5분간 변성시킨 후, 94°C에서 1분, 61°C에서 1분, 72°C에서 1분씩 30회 반복하여 DNA를 증폭시키고, 마지막으로 72°C에서 5분간 extension시켜 PCR 반응을 종결시켰다. 정제된 16S rRNA gene의 PCR 반응물을 pGEM-T vector (Promega)에 ligation시켜 반응물을 미리 준비한 200 µL의 *Escherichia coli* XL1-blue 숙주세포에 형질전환 시킨 후 alkaline lysis 순수분리 방법(Sambrook *et al.*, 1989)으로 plasmid를 mini-prep하였다. 이와 같이 16S rRNA gene 분석을 통하여 염기서열을 결정된 후, National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 GenBank 데이터베이스

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) 및 Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu>)에서 가장 상동성이 높은 균주들과 염기서열을 비교하였으며, MEGA 5 package (Tamura *et al.*, 2011)를 이용하여 계통도를 작성하였다.

살조미생물 NH-12 균주의 성장단계별 살조능

살조미생물의 성장단계에 따른 살조능을 알아보기 위해 NH-12 균주를 PPES-II 액체배지에 접종하여 최적 조건(25°C, initial pH 8.0, 3.0% NaCl)에서 39시간 배양하면서 균의 증식에 따른 살조능을 조사하였다. 즉, 대수증식기로 배양한 *A. catenella* 배양액(8.0 × 10³ cells/mL) 0.9 mL에 최적 조건에서 배양한 NH-12 균주 배양액을 각 3시간 간격으로 0.1 mL씩 접종하여 48시간 배양 후 살조능을 조사하였다. 이 때 control에는 균주 배양액 대신 동량의 PPES-II 배지를 넣어 주었다. 살조능은 *A. catenella*의 생존상태를 광학현미경하에서 관찰하여 48시간 후에 살아있는 *A. catenella* 세포수를 counting하는 bioassay법으로 측정하였으며 다음과 같이 구하였다: Algicidal activity (%) = (1 - (시료를 첨가한 test tube의 세포수/control의 세포수) × 100).

*A. catenella*에 대한 살조 유형

살조미생물 NH-12 균주의 *A. catenella*에 대한 살조 유형을 조사하기 위하여 24 well microplate에 pore size 0.2 µL의 cell culture insert (FALCON, USA)를 삽입한 2조배양계를 이용하였다. Cell culture insert 내부에 f/2-Si 배지에서 전배양한 *A. catenella* 배양액(8.0 × 10³ cells/mL) 1 mL를 넣고, cell culture insert 외부에는 f/2-Si 배지 1 mL를 넣었다. PPES-II 액체배지에서 배양하여 원심분리(3,000×g, 10 min)한 NH-12의 균체(10⁴cells)를 멸균해수로 희석하여 cell culture insert 외부에 1 mL를 넣은 것을 test well로 하였다. 이때 cell culture insert 내부에 NH-12 균주의 균체를 첨가한 well을 positive control로 하였으며, cell culture insert 내부에 NH-12 균주의 균체를 첨가하는 대신에 PPES-II 액체배지만 첨가한 well을 negative control로 하였다. 모든 well은 *A. catenella*의 최적 배양조건에서 배양하여 48시간 후에 살조 유무를 관찰하여 살조 유형을 결정하였다. 미생물 오염 여부는 cell culture insert 내부의 배양액을 취해 DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Sigma) 염색(Porter and Freig, 1980)후, 형광현미경(Olympus BX40, Japan)하에서 직접 관찰하였다.

균주 배양여과액 첨가 농도별 살조능

NH-12 균주가 생산하는 살조물질의 농도에 따른 살조능을 알아보기 위해, 균주 배양여과액의 첨가 농도에 따른 살조능을 조사하였다. 먼저 PPES-II 액체배지에서 최적조건(25°C, pH 8.0, NaCl 3.0%)으로 배양한 대수증식기 후기(27시간 배양)의 NH-12 균주의 배양액을 원심분리(3,000×g,

10 min)하여 상등액을 0.2 µL pore size의 polycarbonate membrane filter로 여과하였다. *A. catenella* 배양액(8.0 x 10³ cells/mL)에 균주 배양여과액을 각각 1, 3, 5 및 10%가 되도록 접종한 후 20°C에서 배양하며 매 6시간마다 살조능을 측정하였다. 배양액을 첨가하지 않고 계속 배양한 것을 control로 하였으며, 이 때 control에는 배양여과액 대신에 동량의 신선한 PPES-II 액체배지를 첨가하였으며, 3회 반복 실험을 통하여 결과를 산출하였다.

결과 및 고찰

살조미생물의 분리 및 동정

마산만의 적조발생 해역의 해수로부터 서로 다른 colony 색과 형태를 가진 38개의 미생물 균주가 분리 되었으며, 각각의 colony를 PPES-II 평판배지에서 순수분리, 배양하여 *A. catenella*에 대한 살조능을 조사하여 4종의 살조미생물이 분리되었다. 그 중 가장 뛰어난 살조능을 보이는 NH-12 균주를 선정하여 배양학적, 형태학적 특성 및 API kits (API 20NE와 ZYM)를 이용한 생화학적 특성을 조사하여

1차적으로 분류학적 유사성을 검토하였다. NH-12 균주는 그람음성, 극성 편모를 가지는 간균으로 내생포자를 형성하지 않았고, PPES-II agar에서 옅은 노란색 colony를 형성하였다. 또한 catalase 양성으로 starch와 casein을 가수분해 하였으며, nitrates 환원능은 없었다. 최적 성장조건은 25°C, pH 8.0, 3.0% NaCl 농도였으며, 4°C 이하와 37°C 이상 및 11.0% (w/v) 이상의 NaCl 농도에서는 증식하지 못 하였다. 또한 D-Glucose, D-Maltose, Melibiose 및 Pyruvate를 유일한 탄소원 및 에너지원으로 이용하였다(Table 1). 이상의 결과, 본 균주는 *Pseudoalteromonas* 속과 가장 유사하였으며, 보다 정확한 동정을 위하여 16S rRNA gene 염기 서열(1,409 bp)을 분석하여, NCBI GenBank와 RDP (Ribosomal Database Project)에 등록된 *Pseudoalteromonas* 속 균주들과 유전자간의 상동성을 조사하였다. 그 결과, *Pseudoalteromonas prydzensis* ACAM 620^T (U85855) 및 *Pseudoalteromonas mariniglutinosa* KMM 3635^T (AJ507152)와 각각 97.67% 및 97.45%의 가장 높은 상동성을 나타내어(Fig. 1), 본 살조미생물을 *Pseudoalteromonas* sp. NH-12로 명명하여 이후의 실험을 진행하였다.

Table 1. Morphological, physiological, and biochemical characteristics of isolate NH-12 by conventional test, API 20NE and API ZYM tests

Tests	Results	Tests	Results
Colony color	Pale yellow (on PPES-II)	Utilization of	
surface	Smooth	D-Glucose	+
elevation	Convex	D-Galactose	-
Cell form	Rod	Glycerol	-
Cell size	0.7-1.8 µm	D-Maltose	+
Motility	+ (polar flagella)	D-Lactose	-
Endospore formation	-	Melibiose	+
Gram stain	-	D-Sucrose	-
Catalase	+	Trehalose	-
Growth at:		Sorbitol	-
Temperature	10-30°C	D-Mannitol	-
pH	6.0-9.0	Alginate	-
NaCl	0-10.0%	Acetate	-
Optimal growth at:		Citrate	-
Temperature	25°C	N-Acetylglucosamine	-
pH	8.0	Succinate	-
NaCl	3.0%	Pyruvate	+
Hydrolysis of		Xylose	-
Starch	+	D-Mannose	-
Casein	+	D-Fructose	-
Reduction of nitrates	-	D-Arabinose	-
Production of		L-Arginine	-
Chitinase	-	D-Glucosamine	-

Amylase	+	D-Gluconate	-
Alginase	+		
Agarase	-		
Caseinase	+		
DNase	+		

+, Positive result or growth; -, Negative result or no growth.

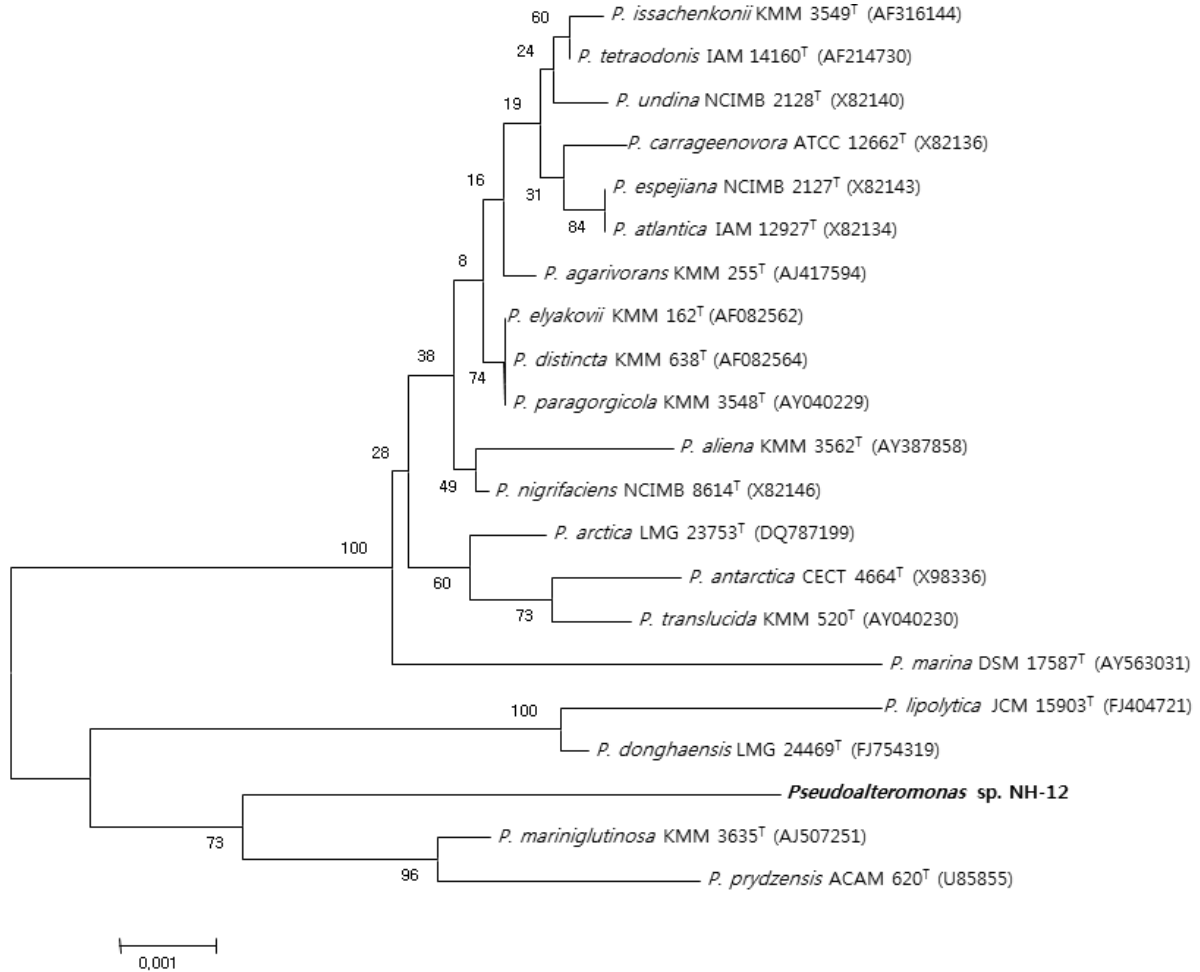


Fig. 1. Phylogenetic tree based on comparison of the 16S rRNA gene sequence indicating the position of isolate NH-12. The phylogenetic tree was generated using the neighbor-joining method. Bootstrap values, expressed as percentages of 1,000 replications, are given at branching points. Bar shows one nucleotide substitution per 1,000 nucleotides.

지금까지 많은 연구자들에 의해 분리된 다양한 종류의 살조 미생물들이 알려져 있는데, 그 대부분이 해수에서 분리된 해양성 미생물이다. 대표적인 살조미생물들로는 *Brachybacterium* 속(Kim et al., 2009), *Vibrio* 속(Wang et al., 2012), *Cytophaga* 속(Imai et al., 1993; Doucette et al., 1999), *Micrococcus* 속(Jeong et al., 2000), *Saprospira* 속(Sakata et al., 1991), *Flavobacterium* 속(Yoshinaga et al., 1995), *Alteromonas* 속(Imai et al., 1995) 및 *Pseudoalteromonas* 속(Lovejoy et al., 1998; Lee et al., 2000; Skerratt et al., 2002; Su et al., 2007a, 2011; Wang et al., 2012) 등이 있으며, 살조미

생물 중 가장 우점하는 대표적인 속은 본 연구에서 분리한 속과 같은 *Pseudoalteromonas* 속으로 보고되고 있다(Lovejoy et al., 1998; Yoshinaga et al., 1998; Lee et al., 2000).

***Pseudoalteromonas* sp. NH-12의 성장단계별 살조능**

Pseudoalteromonas sp. NH-12는 6시간의 유도기를 거쳐 대수증식기에 접어들고 배양 30시간 후에 정지기로 접어드는 성장곡선(growth curve)을 보였는데, 성장단계에 따른 살조능을 비교 실험한 결과 대수증식기 후기, 정지기, 대수증식기 중기, 유도기 순으로 살조능이 높게 나타났다(Fig. 2).

즉, 유도기(6시간 배양)에는 *A. catenella*에 대한 살조능이 18% 이하로 낮게 나타났으나, 대수증식기 중기(15-18시간 배양)를 거치면서 살조능이 급격히 증가하기 시작하여 대수증식기 후기(24-30 시간 배양)에 최고조에 올라 98-100%를 살조시켰으며, 정지기에도 94% 이상의 살조능을 나타내었다(Fig. 2). 본 균주는 유도기에는 성장을 위해 살조물질과 같은 2차대사산물을 거의 생산하지 않으나, 대수증식기 중기 이후에는 살조물질을 적극적으로 생성, 분비하기 시작하여 대수증식기 후기에 살조물질이 가장 많이 축적되는 것으로 판단되며, 정지기에도 살조능이 급격히 감소하지 않는 것으로 보아 미생물 배양액속에 축적되어 있는 살조물질은 쉽게 분해되지 않으며, 영양 고갈 상태에 들어선 본 균주에 의해 영양물질로 재이용되지 않는 것으로 판단된다. 또한 NH-12는 적조생물인 *A. catenella*가 배지 속에 존재하지 않는 미생물만의 순수배양 상태에서도 살조물질을 생산한다는 것을 알 수 있었으며, *A. catenella*의 세포를 인식하여 NH-12가 살조물질을 분비할 가능성은 낮은 것으로 판단된다.

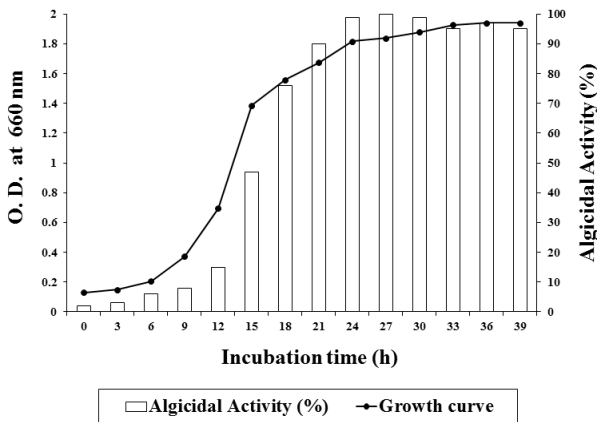


Fig. 2. Growth curve of *Pseudoalteromonas* sp. NH-12 at optimal culture conditions (25°C, initial pH 8.0, 3.0% (w/v) NaCl) and algicidal activity of *Pseudoalteromonas* sp. NH-12 against *Alexandrium catenella*. The algicidal activity indicates the percent of dead *A. catenella* after 48 h of treatment.

A. catenella에 대한 살조 유형

Pseudoalteromonas sp. NH-12가 *A. catenella*에 직접

부착하여 죽이는 ‘직접공격형’인지 세포외 물질을 분비하여 죽이는 ‘살조인자 분비형’인지를 조사한 결과는 Table 2와 같다. Cell culture insert 내부에 *A. catenella*와 NH-12를 함께 접종한 모든 positive control well에서는 *A. catenella*가 사멸되었지만, 살조미생물 대신에 미생물 배지인 PPES-II 액체배지만을 접종한 negative control well에서는 *A. catenella*가 사멸되지 않았다. NH-12는 0.2 µm filter에 의해 *A. catenella*와 격리된 상태인 test well에서도 *A. catenella*를 살조시켰다. 이때 cell culture insert 내부의 배양액을 취해, DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) 염색을 하여 형광현미경하에서 관찰하고, PPES-II 배지에 도말하여 배양하였으나, *Pseudoalteromonas* sp. NH-12는 검출되지 않았다. 따라서 NH-12는 살조물질을 세포외로 분비하는 ‘살조인자 분비형’으로 확인되었다.

지금까지 여러 연구자들에 의해 보고된 살조미생물은 적조생물 세포에 직접 부착 또는 접촉하여 살조하는 ‘직접 공격형’과 살조물질을 생산, 분비하여 2차 대사산물에 의해 적조생물을 살조시키는 ‘살조인자 분비형’으로 크게 나눌 수 있다 (Yoshinaga *et al.*, 1997; Lovejoy *et al.*, 1998; Doucette, *et al.*, 1999). 직접 공격형으로는 주로 활주세균인 *Cytophaga* 속 (Imai *et al.*, 1993)과 *Saprospira* 속 (Sakata *et al.*, 1991) 등이 있으며, 이 미생물들은 구조류 및 외편모류에 광범위하게 살조능을 가진다고 보고되고 있다. ‘살조인자 분비형’으로는 주로 *Brachy bacterium* 속, *Flavobacterium* 속, *Alteromonas* 속, *Micrococcus* 속, *Pseudomonas* 속 및 *Pseudoalteromonas* 속 등이 보고되고 있다 (Yoshinaga *et al.*, 1995; Jeong *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000; Mitsutani *et al.*, 2001; Skerratt *et al.*, 2002; Mayali and Azam, 2004; Su *et al.*, 2007a, 2011; Kim *et al.*, 2009). 지금까지 해양에서 분리된 살조미생물들의 살조 유형을 분석해보면 활주세균은 직접 공격형이 많았고, γ-Proteobacteria군 미생물과 진정세균에 속하는 미생물은 ‘살조인자 분비형’이 많은 경향을 보였으며, ‘직접 공격형’은 살조 특이성이 낮고, ‘살조인자 분비형’은 살조 특이성이 높은 경향을 보였다 (Mitsutani *et al.*, 2001; Yoshinaga *et al.*, 1997, 1998; Lovejoy *et al.*, 1998; Park *et al.*, 1998; Jeong *et al.*, 2000, 2003; Mayali and Azam, 2004; Kim *et al.*, 2009).

Table 2. Determination of algicidal type against *Alexandrium catenella* using cell culture insert by *Pseudoalteromonas* sp. NH-12

Negative control well	Positive control well	Test well
-	+	+

Initial cell densities of *Pseudoalteromonas* sp. NH-12 were 10⁴ cells/mL. Negative control well; *A. catenella* and fresh PPES-II medium inside. Positive control well; *A. catenella* and *Pseudoalteromonas* sp. NH-12 inside. Test well; *A. catenella* inside and *Pseudoalteromonas* sp. NH-12 outside. +; *A. catenella* cells inside cell culture insert were killed within 48 h. -; *A. catenella* cells inside cell culture insert were not killed within 48 h.

A. catenella의 살조 과정

*A. catenella*에 살조미생물 *Pseudoalteromonas* sp. NH-12의 세포배양액을 10%가 되게 접종하였을 때 살조되는 과정을 광학현미경 하에서 관찰하였다(Fig. 3). 전형적으로 4개 혹은 8개의 세포로 chain을 형성하는 *A. catenella* 유영세포는 살조미생물의 작용을 받아, 접종 후 1시간 이내에 모든 *A. catenella*의 chain이 끊어지면서 운동성을 상실하였고(Fig. 3A), 3시간 후에는 chain이 끊어진 각 단세포가 ecdysis 현상(탈각 현상)을 나타내기 시작하였으며(Fig. 3B), 6시간 후에는 거의 모든 세포들이 둥글게 부풀어 올라 팽윤상태를 형성하였다(Fig. 3C). 결국 18시간 뒤에는 거의 모든 세포가 세포막 기능 상실로 세포막이 파괴되고, 세포 내용물이 방출되어 사멸하게 되었다(Fig. 3D). 또한 한번 부풀어 오른 세포는 원래 상태로 돌아가지 않고, 24시간 후에 99% 이상 살조되었다.

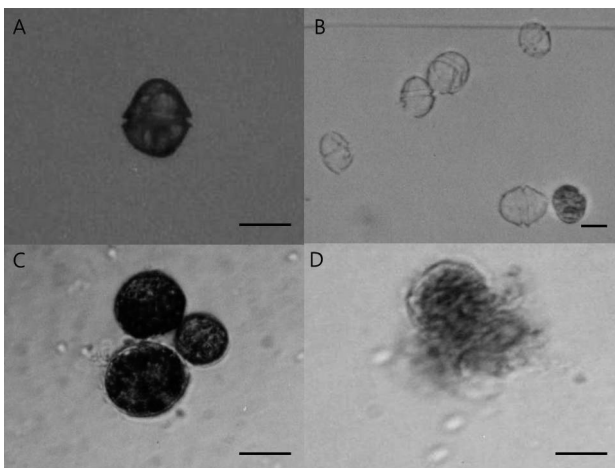


Fig. 3. Micrographs of algicidal process by the culture medium of *Pseudoalteromonas* sp. NH-12 against *Alexandrium catenella*. (A) Live cell of *A. catenella* and *A. catenella*'s cell stop swimming at first (after 1 h treatment), (B) Cell ecdysis of *A. catenella* (after 3 h), (C) Formation of swollen and round cells (after 6 h), (D) Disrupted cell and release of cellular components (after 18 h). Bar = 30 μ m.

NH-12의 배양여과액 농도별 살조능

상기의 2조배양계 실험의 결과, NH-12는 2차 대사산물을 세포외로 분비하여 EOM (excreted organic matter)으로 *A. catenella*를 살조시키는 '살조인자 분비형'으로 판단된다. 이에 NH-12가 생산하는 살조물질의 농도에 따른 살조능을 알아보기 위해, 균주 배양여과액의 첨가 농도(1, 3, 5 및 10%)에 따른 *A. catenella* (8.0×10^3 cells/mL)에 대한 살조능을 조사한 결과는 Fig. 4와 같다. NH-12의 배양여과액을 1%가 되도록 첨가한 경우 6시간 후에 *A. catenella*의 개체수는 7.6×10^3 cells/mL로 살조능은 약 하였으나, 이후 개체수는 서서히 줄어들어 36시간 후에 4.4×10^3 cells/mL가 되었다. 또한 5% 및 10%를 첨가한 경

우 6시간 후에 각각 4.3×10^3 및 3.95×10^3 cells/mL의 개체수를 보였다. 또한 5% 첨가의 경우 36시간 후에 100% 살조되었으며, 10%를 첨가한 경우 24시간 후에 99% 이상 살조되었다. 즉, *Pseudoalteromonas* sp. NH-12는 살조물질의 첨가량과 배양시간에 비례하여 *A. catenella*에 대한 살조능이 증가하는 경향을 보였다. 일반적으로 유각종의 적조생물이 무각종의 적조생물 보다 외부 환경의 급격한 변화에 잘 적응하고 내성을 가져 생존률이 높는데, 본 실험에서 NH-12는 각으로 보호되고 cyst (휴면포자)를 형성할 수 있는 유각종 적조생물인 *A. catenella*를 짧은 시간에 급격히 살조시키는 능력을 보여주었다. 이상의 결과와 Table 2의 결과를 종합하여 볼 때, *Pseudoalteromonas* sp. NH-12는 살조물질을 생성하여 세포외로 분비하는 것으로 판단된다.

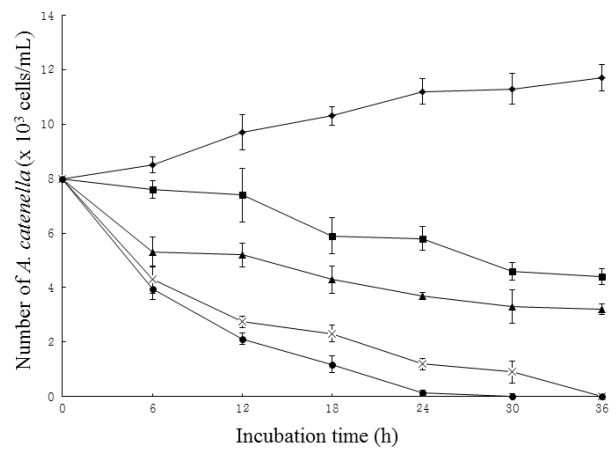


Fig. 4. Algicidal activity of the culture filtrate of *Pseudoalteromonas* sp. NH-12 against *Alexandrium catenella* at various concentrations (◆, control; ■, 1%; ▲, 3%; ×, 5%; ●, 10%). Control: same volumes of fresh PPES-II medium were added. Data are expressed as the mean±standard deviation from triplicate assays.

상술한 바와 같이 지금까지 연구 보고된 살조미생물 중 가장 우점하는 대표적인 속은 본 연구에서 분리한 속과 같은 *Pseudoalteromonas* 속이다. *Pseudoalteromonas* 속은 가장 큰 미생물 분류 group인 γ -Proteobacteria군에 속하며, *Pseudoalteromonas* 속 살조미생물들은 주로 '살조인자 분비형'으로 살조 특이성이 높아 특정 적조생물에만 살조능을 보이는 것으로 보고되고 있다(Yoshinaga *et al.*, 1997; Lovejoy *et al.*, 1998; Mitsutani *et al.*, 2001; Mayali and Azam, 2004). *Pseudoalteromonas* 속 살조미생물에 대한 최근의 연구결과를 살펴보면, Lee 등(2000)은 *Pseudoalteromonas* sp. strain A28이 extracellular serine protease를 세포외로 분비하여 적조생물을 살조시킨다고 보고하였고, Skerratt 등(2002)은 *Pseudoalteromonas* sp. ACEM4가 저분자의 극성 물질을 세포외로 분비하여 유독성 외편모류인 *Gymnodinium catenatum*을 살조시킨다고 보고하였다. 또한 '살조인자 분비형'으로 *A. tamarense*를 살

조시키는 *Pseudoalteromonas* strain SP31과 SP44에 관한 연구(Su *et al.*, 2011)도 최근에 보고되고 있다.

이상의 연구결과를 토대로 살조물질을 분리, 정제하고 그 구조를 규명하고 보다 효율적인 살조 메커니즘을 밝힌다면, 본 연구에서 분리한 살조미생물은 *A. catenella*의 적조 구제법 개발에 좋은 기초 자료로 활용될 수 있을 것이다. 그러나 무엇보다도 2차오염이 없는 환경친화적 적조 구제법 개발을 위해서는 해양생태계에 미치는 영향을 최소화할 수 있는 연구가 선행되어야 할 것이다. 또한 적조생물의 제어에 대한 연구뿐만 아니라, 유독성 적조생물이 생산하는 마비성 패독 등의 분해에 대한 후속 연구가 이루어진다면 적조 피해를 줄이는 연구에 도움이 될 것이라 판단된다.

요 약

우리나라뿐만 아니라 전 세계적으로 적조 및 마비성 패독을 일으켜 문제시되고 있는 유독성 외편모류인 *A. catenella*를 살조시키는 해양미생물 *Pseudoalteromonas* sp. NH-12를 마산만의 적조발생 해역에서 분리, 동정하고 그 특성과 살조능에 대해 연구함으로써 보다 환경 친화적인 적조 구제 기술 개발의 기초 자료를 제공하고자 하였다. 적조발생 해역인 마산만의 해수에서 분리한 38개의 해양미생물 균주 중 4종의 미생물이 *A. catenella*에 대해 살조능을 나타내었으며, 이 중 살조능이 가장 우수한 NH-12 균주를 선별하였다. 본 균주는 API kits 및 16S rRNA gene 염기서열을 분석하여 계통분류를 행한 결과 *Pseudoalteromonas* 속으로 분류되었으며, 최적 배양조건은 25°C, pH 8.0, 3.0% NaCl 농도였다. *Pseudoalteromonas* sp. NH-12의 성장 단계별 살조능은 대수증식기 후기, 정지기, 대수증식기 중기, 유도기 순으로 높게 나타났다. 살조물질은 대수증식기 중기 이후에 활발히 생산되기 시작하여 대수증식기 후기에 가장 고농도로 축적되는 것으로 판단된다. 2조 배양계를 이용한 살조 유형 조사에서 *Pseudoalteromonas* sp. NH-12는 격리된 상태에서 *A. catenella*를 살조시켜 '직접 공격형'이 아니라 세포외로 물질을 분비하여 살조시키는 '살조인자 분비형'으로 확인되었다. 또한 NH-12 균주 배양여과액을 5% 첨가하였을 때 36시간 후에 *A. catenella*는 100% 살조되었고, 10%를 첨가한 경우 24시간 후에 99% 이상 살조되었다.

감사의 글

This work was supported by research grants from the Catholic University of Daegu in 2010 (20104021).

참고문헌

Cordova, J.L., Muller, I., 2002. Use of PCR and partial sequencing of the large-subunit rRNA gene to identify *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) from the south of Chile, *Harmful Algae* 1, 343-350.

- Cottrell, M.T., Suttle, C.A., 1993. Production of axenic cultures of *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae) using antibiotics, *J. Phycol.* 29, 385-387.
- Doucette, G.J., McGovern, E.R., Babinchak, J.A., 1999. Algicidal bacteria active against *Gymnodinium breve* (Dinophyceae). I. Bacterial isolation and characterization of killing activity, *J. Phycol.* 35, 1447-1454.
- Droop, M.R., 1967. A procedure for routine purification of algae cultures with antibiotics, *Brit. Phycol. Bull.* 3, 295-297.
- Dunbar, J., Ticknor, L.O., Kuske, C.R., 2000. Assessment of microbial diversity in four Southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis, *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2943-2950.
- Fontana, D.A., Haug, A., 1982. Effects of sodium chloride of the plasma membrane of halotolerant *Dunaliella primoecta*: an electron spin resonance study, *Arch. Microbiol.* 131, 184-190.
- Gerhardt, P., Murray, R.G., Costilow, E.R.N., Nester, E.W., Wood, W.A., Krieg, N.R., Phillips, G.B., 1981. *Manual of method for general bacteriology*, pp. 135-154, 1st ed. American Society for Microbiology, Washington D.C., USA.
- Guillard, R.R.L., Ryther, J.H., 1962. Studies of marine planktonic diatoms. 1. *Cyclotella nana* (HUSTEDT), and *Detonula confervacea* (CLEVE) GRAN, *Can. J. Microbiol.* 8, 229-239.
- Imai, I., Ishida, Y., Hata, Y., 1993. Killing of marine phytoplankton by a gliding bacterium *Cytophaga* sp., isolated from the coastal sea of Japan, *Mar. Biol.* 116, 527-532.
- Imai, I., Ishida, Y., Sakaguichi, K., Hata, Y., 1995. algicidal marine bacteria isolated from northern Hiroshima bay, Japan, *Fisher. Sci.* 61, 628-636.
- Jeong S.Y., Ishida, K., Ito, Y., Okada, S., Murakami, M., 2003. Bacillamide, a novel algicide from the marine bacterium, *Bacillus* sp. SY-1, against the harmful dinoflagellate, *Cochlodinium polykrikoides*, *Tetra. Lett.* 44, 8005-8007.
- Jeong, S.Y., Park, Y.T., Lee, W.J., 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. Korean Fish. Soc.* 33, 331-338.
- Kamikawa, R., Nagai, S., Hosoi-Tanabe, S., Itakura, S., Yamaguchi, M., Uchida, Y., Baba, T., Sako, Y., 2007. Application of real-time PCR assay for

- detection and quantification of *Alexandrium tamarense* and *Alexandrium catenella* cysts from marine sediments, *Harmful Algae* 6, 413-420.
- Kim, C.H., 1995. Paralytic shellfish toxin profiles of dinoflagellate *Alexandrium* species isolated from benthic cysts in Jinhae Bay, Korea, *J. Korean Fish. Soc.* 28, 364-372.
- Kim, H.G., 1997. Recent harmful algal blooms and mitigation strategies in Korea, *Ocean Res.* 19, 185-192.
- Kim, K.Y., Kim, C.H., 2004. A molecular phylogenetic study on Korean *Alexandrium catenella* and *A. tamarense* isolates (Dinophyceae) based on the partial LSU rDNA sequence data, *Hangug Haeyang Haghoeji* 39, 163-171.
- Kim, M.C., Yu, H.S., Ok, M.S., Kim, C.H., Chang, D.S., 1999. The activities and characteristics of algicidal bacteria in Chindong Bay, *J. Korean Fish. Soc.* 32, 359-367.
- Kim, P.G., Park, M.E., Sung, K.Y., Jang, Y.N., 2006. A study of removal property of harmful algal blooms by Hwangto and oriental mineral medicines, *J. Miner. Soc. Korea* 19, 277-289.
- Kim, Y.S., Jeong, S.Y., Lee, S.J., Lee, W.J., 2009. Isolation and characteristics of *Brachy bacterium* sp. SY-97 killing the harmful dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides*, *J. Environ. Sci.* 18, 435-443.
- Kwak, S.K., Choi, M.Y., Cho, K.J., 2001. Distribution and occurrence frequency of red-tide causing flagellates in the Masan-Jinhae Bay, *Algae* 16, 315-323.
- Lee, H.O., Lee, N.W., Katano, T., Han, M.S., 2006. Growth characteristics for toxic marine dinoflagellate *Alexandrium catenella* isolated from Jinhae Bay, Korea, *Korean J. Environ. Biol.* 24, 147-154.
- Lee, S.O., Kato, J., Takiguchi, N., Kuroda, A., Ikeda, T., Mitsutani, A., Ohtake, H., 2000. Involvement of an extracellular protease in algicidal activity of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain A28, *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4334-4339.
- Lovejoy, C., Bowman, J.P., Hallegraef, G.M., 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, J.F., 1980. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*, pp. 36-308, 2nd ed. Williams and Wilkins Co., Baltimore, USA.
- Mayali, X., Azam, F., 2004. Algicidal bacteria in the sea and their impact on algal blooms, *J. Eukaryot. Microbiol.* 51, 139-144.
- Mitsutani, A., Yamasaki, I., Kitaguchi, H., Kato, J., Ueno, S., Ishida, Y., 2001. Analysis of algicidal proteins of a diatom-lytic marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain A25 by two-dimensional electrophoresis, *Phycologia* 40, 286-291.
- Park, Y.T., Park, J.B., Chung, S.Y., Song, B.C., Lim, W.A., Kim, C.H., Lee, W.J., 1998. Isolation of marine bacteria killing red tide microalgae, 1. Isolation and algicidal properties of *Micrococcus* sp. LG possessing killing activity for harmful dinoflagellate, *Cochlodinium polykrikoides*, *Bull. Korean Fish. Soc.* 31, 767-773.
- Porter, K.G., Feig, Y.S., 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora, *Limnol. Oceanogr.* 25, 943-848.
- Sakata, T., Fujita, Y., Yasumoto, H., 1991. Plaque formation by algicidal *Saprospira* sp. a lawn of *Chaetoceros ceratosporum*, *Nippon Suisan Gakkaishi* 56, 1147-1152.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular cloning, a laboratory manual*, pp. 25-28, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, N.Y., USA.
- Skerratt, J.H., Bowman, J.P., Hallegraef, G.M., James, S., Nichols, P.D., 2002. Algicidal bacteria associated with blooms of a toxic dinoflagellate in a temperate Australian estuary, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 244, 1-15.
- Sommer, H., Meyer, K.F., 1937. Paralytic shellfish poisoning, *Arch. Path.* 24, 560-598.
- Su, J.Q., Yang, X.R., Zheng, T.L., Tian, Y., Jiao, N.Z., Cai, L.Z., Hong, H.S., 2007a. Isolation and characterization of a marine algicidal bacterium against the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*, *Harmful Algae* 6, 799-810.
- Su, J.Q., Yang, X.R., Zheng, T.L., Hong, H.S., 2007b. An efficient method to obtain axenic cultures of *Alexandrium tamarense*-a PSP-producing dinoflagellate, *J. Microbiol. Meth.* 69, 425-430.
- Su, J.Q., Yang, X.R., Zhou, Y.Y., Zheng, T.L., 2011. Marine bacteria antagonistic to the harmful algal bloom species *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae), *Biol. Control* 56, 132-138.
- Taga, N., 1968. Some ecological aspects of marine bacteria in the KuroShio current, *Bull. Misaki Mar. Biol. Inst. Kyoto Univ.* 12, 65-76.

- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods, *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731-2739.
- Wang, B.X., Yang, X.R., Lu, J.L., Zhou, Y.A., Su, J.Q., Tian, Y., Zhang, J., Wang, G.H., Zheng, T.L., 2012. A marine bacterium producing protein with algicidal activity against *Alexandrium tamarense*, *Harmful Algae* 13, 83-88.
- Wang, X.L., Gong, L.Y., Liang, S.K., Han, X.R., Zhu, C.J., Li, Y.B., 2005. Algicidal activity of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa*, *Harmful Algae* 4, 433-443.
- Yoshinaga, I., Kawai, T., Ishida, Y., 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.
- Yoshinaga, I., Kawai, T., Takeuchi, T., Ishida, Y., 1995. 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., Kim, M.C., Katanozaka, N., Imai, I., Uchia, A., Ishia, Y., 1998. Population structure of algicidal marine bacteria targeting *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) through restriction fragment length polymorphism analysis of the bacterial 16S ribosomal RNA genes, during *H. akashiwo* red tide, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 170, 33-44.