

*Microcystis aeruginosa*에 대한 *Lactobacillus graminis*의 성장 억제능, microcystin 분해 및 살조 물질의 특성

주재형^{1,†} · 박범수^{1,2,†} · 이은선¹ · 강윤호^{1,3} · 한명수^{1,*}

¹한양대학교 생명과학과, 현소속: ²텍사스대학교 해양과학연구소, ³원주지방환경청 측정분석과

Inhibition of Growth and Microcystin Toxicity, and Characterization of Algicidal Substances from *Lactobacillus graminis* against *Microcystis aeruginosa*. Joo, Jae-Hyoung^{1,†} (0000-0001-5720-8716), Bum Soo Park^{1,2,†} (0000-0002-5441-6779), Eun-Seon Lee¹ (0000-0001-5925-0387), Yoon-Ho Kang^{1,3} (0000-0001-8475-3031) and Myung-Soo Han^{1,*} (0000-0001-7100-5835) (¹Department of Life Science, Hanyang University, Seoul 18855, Republic of Korea; Present address: ²Marine Science Institute, University of Texas at Austin, Port Aransas, TX78373, USA; ³Monitoring and Analysis Division, Wonju Regional Environmental Office, Wonju 26461, Republic of Korea)

Abstract For several decades, lactic acid bacterium (*Lactobacillus graminis*: LAB) has been generally recognized as safe. To develop the pan-environmental bio-control agent, algicidal activity of the live LAB cell and its culture filtrate (CF) was examined against *Microcystis aeruginosa*. LAB cells perfectly lysed *M. aeruginosa* within 3 days, while the CF had a less effect than the live cells, approximately 78% inhibition of algal growth during a same culture period. The concentration of microcystin in alone culture of *M. aeruginosa* was $7.1 \mu\text{g L}^{-1}$, but gradually increased and leach $158.5 \mu\text{g L}^{-1}$ on 10 days. However, LAB cells clearly decreased the microcystin by $10.3 \mu\text{g L}^{-1}$ in the same period, approximately 93.5%. CF of LAB showed a strong algicidal activity over 75% between pH 2-7, 91.3% by the treatment of proteinase K, 87.8% by below 3 kDa in particle size, and 75.3% by heat treatment, respectively. Of five solvents, fractions of CF passed through solvents diethyl ether and ethyl acetate showed an obvious algicidal activity in the algal-lawn test. Among 5 fractions purified by silica-gel TLC plate, two spots showed a most strong removal activity on *M. aeruginosa*. Another analysis of GC indicate that CF contained six representative fatty acids. Even though most of these substance have been known as an anti-algal substance against *M. aeruginosa*, oleic acid is the most effective. These results suggested that the culture filtrate or specific substances, like a fatty acids, in comparison with live *L. graminis* can be a successful and eco-friendly agent to control *Microcystis* bloom.

Key words: lactic acid bacteria, *Lactobacillus*, algicidal bacteria, *Microcystis aeruginosa*, eco-friendly mitigation

서 론

[†]These authors contributed equally as co-first authors.
Manuscript received 21 July 2016, revised 27 September 2016,
revision accepted 29 September 2016
* Corresponding author: Tel: +82-2-2220-0956, Fax: +82-2-2296-1741,
E-mail: hanms@hanyang.ac.kr

남조 *Microcystis aeruginosa*는 부영양 호수나 하천 등에서 나타나는 유해 조류 대발생 (Harmful algal bloom)의 주요한 원인생물로 환경적, 경제적, 공중보건 측면에서 심각

한 문제를 야기시킨다. 이들의 대발생은 미관상의 불쾌감, 음용수의 이취미 발생으로 인한 수자원 확보와 관리의 어려움뿐만 아니라, 간독소 microcystin의 생성으로 인하여 야생동물과 가축에 치명적인 해를 주고, 사람의 건강까지 위협한다(Kiviranta *et al.*, 1993; Oberholster, 2004; Kang *et al.*, 2012).

유해 조류에 의한 피해를 막고자 물리학적, 화학적, 생물학적 기술을 이용한 유해 조류 제어 기술 등이 개발되었으나, 수생식물, 미소생물, 동물플랑크톤, 어패류와 같은 생물 조절인자를 수체에 적용시켜 유기물의 분해와 산화, 생물의 섭식과 분해를 통해 제어하는 생물학적 제어 방법이 가장 친환경적인 제어 방법으로 알려져 있다(Kitchell, 1992; Beklioglu *et al.*, 2003). 그중에서, 살조세균을 이용한 제어 기법이 많이 연구되었으며, 실험실 내에서 높은 살조 효과를 입증하였다(Shilo, 1970; Yamamoto *et al.*, 1998; Manage *et al.*, 2000; Choi *et al.*, 2005; Kang *et al.*, 2008; Jung *et al.*, 2010). 그러나, 이러한 생물학적 제어 방법은 실험실 수준의 제한된 공간에서의 검증된 효과가 대규모 수체에 적용된 사례가 전무하며, 다른 기술에 비해 제어 효과가 나타나기까지 상대적으로 오랜 시간이 필요하고, 도입생물의 현장에서의 유지가 힘들며, 비경제적이라는 단점이 있다(Sigee *et al.*, 1999; Choi *et al.*, 2005; Gumbo *et al.*, 2008; Kang *et al.*, 2012). 특히, 대부분의 살조세균은 병원성 세균으로서, 이와 같이 살조세균 또는 그 유래 물질을 현장에 적용할 때 여타생물에 대한 병원성 문제가 발생한다. 또한 살조세균의 현장 적용은 다양한 배양조건 및 적용 시기, 농도에 따라 그 효율이 매우 다르게 나타나며, 조류 제어 효과를 높이기 위해 과량의 미생물을 주입함으로써 균체에 의한 2차적인 교란이 발생할 수 있다(Choi *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2005). 더불어, 배양에 사용한 질소·인의 함량이 높은 배지가 오히려 조류의 성장을 더욱 촉진시키는 결과를 가져올 수 있다(Kim and Lee, 2007). 이러한 문제점을 해결하고 현장에서 친환경적이며 효율적으로 조류를 제어하기 위해서는 살조세균이 조류의 표면에 접촉하여 세포를 용해시키는 직접 공격형 (cell to cell contact) 기작이 아닌 그들이 체외로 분비하는 물질을 적용하는 간접형 제어 기작의 활용이 필요하다(Sigee *et al.*, 1999; Kim and Lee, 2007).

따라서 본 연구에서는 안정성이 검증되었으며 다양한 대사산물을 분비하여 여러 분야에 활용되고 있는 유산균 (Lactic acid bacteria)을 활용하여 친환경적인 기술을 개발하고자 하였다. 유산균은 비병원성이고, 비침입적이며, 비전이적이기 때문에 인체에 무해하여 1988년부터 미국식품의약국 FDA (Food and Drug Administration)에서 승인한,

식품에 첨가하여도 안전한 물질들의 목록인 GRAS (generally recognized as safe)로 분류되는 안전한 균주이다(U.S FDA, 1988; Cho *et al.*, 2005). 또한, 유산균은 기능성 생균제 (probiotics)로써 가장 주목되고 있는 유익균이며, 그들이 생산하는 비타민 (Vitamin), 올리고당 (Oligosaccharides), 유기산 (Organic acid), 지방산 (Fatty acid), 과산화수소 (Hydrogen peroxide) 등을 비롯한 대사산물의 다양한 생리적 기능이 보고되었다(Klaenhammer, 1988; Holzapfel *et al.*, 1995; Sanders and Huisin't Veld, 1999; Lavermicocca *et al.*, 2000). 더구나 최근 유산균을 이용한 유해 조류 제어 기술이 연구되고 있다(Kang *et al.*, 2016). 그러나, 현재까지는 실험실 수준의 실험이며, 안전한 균주 역시 생균 자체의 현장 적용은 보건의학적인 관점에서는 부담스러운 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 유산균의 살조 효과 입증과 추가적으로 보다 안전하며 효과적인 현장 적용을 위하여 유산균으로부터 추출된 물질의 살조 효과에 대하여 연구하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험생물의 배양

실험 조류인 남조 *M. aeruginosa* (NIES-298)는 일본 국립환경연구소 NIES (the National Institute for Environment Studie, Japan)로부터 분양받았으며, *Microcystis* sp. (HYK 0906-B3)는 국내 대청호 (Daecheong reservoir)에서 직접 분리하였다. 조류 배양은 CB 배지 (Cyanobacteria medium) (Kasai *et al.*, 2004)를 이용하였으며, 25°C, 50 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 12 : 12 (light : dark) cycle의 조건으로 batch culture 하여 2주간 배양 후 그 일부를 새로운 CB 배지에 옮겨 유지하였다.

실험에 사용한 유산균 *L. graminis* (KCTC-3542)는 한국미생물자원센터 (Korean Collection for Type Cultures, South Korea)로부터 분양받았으며, 배지는 *Lactobacillus* 최적 성장 배지인 MRS broth (deMan *et al.*, 1960)를 이용하였다. 배양은 36°C, 암조건, 300 rpm으로 교반배양하였다. 살조세균의 동결보존을 위하여 MRS agar plate에 배양한 단일 콜로니 (single colony)를 25% glycerol이 포함된 MRS 배지에 옮겨 -80°C에서 냉동 보관하였다.

2. *Lactobacillus graminis*의 *Microcystis aeruginosa* 살조 효과

*L. graminis*는 동결보존한 stock으로부터 MRS 1.5% agar

평판 배지에 선조접종 (streaking)하여 얻은 단일 콜로니 (single colony)를 5 mL *Lactobacilli* MRS broth를 이용하여 36°C, 300 rpm 압조건으로 24시간 액체 배양하였다. 이후, 12,000 rpm, 10분 동안 원심분리하여 상등액 제거 후, 숙주 조류의 성장 배지인 멸균된 CB 배지로 2번 세척하고 1×10^8 cells mL⁻¹ (OD₆₀₀ = 1.5)로 조절하였다. 대상 조류인 *M. aeruginosa*는 CB 배지에서 7일간 25°C, 50 μmol photons m⁻² s⁻¹, 12 : 12 (light : dark) cycle, 정치조건으로 배양한 후 새로운 CB 배지로 교체한 후 혈구계산기 (haemocytometer)로 계수하여 1.0×10^5 cells mL⁻¹의 밀도를 조절하였다. *L. graminis* (1×10^8 cells mL⁻¹) 0.5 mL를 4.5 mL의 *M. aeruginosa* (1.0×10^5 cells mL⁻¹)가 준비된 6 well-plate (SPL)에 접종 후 0, 1, 3, 5, 7, 10일째에 광학현미경 (Zeiss Axioplan, Germany) 하에서 혈구계산기를 사용하여 *Microcystis* 세포수를 계수하였다 (Humphries, 1979). 세포의 감소율 (reduction ratio), 즉 유산균 *L. graminis*의 살조 활성 (%)은 아래의 식을 사용하여 계산하였다.

$$\text{살조능 (\%)} = (1 - T_t/C_t) \times 100$$

T: 처리구의 조류세포 밀도

C: 대조구의 조류세포 밀도

t: 배양시간

*Microcystis*에 대한 살조 효과 평가시 *L. graminis*의 세포 변화를 관찰하기 위해 0, 1, 3, 5, 7, 10일째에 각 측정일마다 100 μL 분취 후 glutaraldehyde를 이용하여 최종 농도 2%로 고정하였다. 분취한 100 μL의 시료는 900 μL의 멸균된 증류수로 희석 후 DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole)로 염색하여 black polycarbonate membrane filter (0.2 μm pore size)로 filtering 후 형광현미경 (Olympus BX51, ×1,000 magnification)에서 계수하였다.

3. *Lactobacillus graminis*의 microcystin 분해능

*L. graminis*의 microcystin 억제능을 평가하기 위해 살조 효과 평가 수행과 동시에 Microcystins의 농도를 측정하였다. Microcystins 농도는 Microcystins-DM ELISA Kit (abraxic, England)로 측정하였다 (Rivasseau and Hennion, 1999). 각 측정일에 100 μL 분취하여 12,000 rpm, 10분 동안 2회 원심분리 하여 세포를 제거한 후 멸균증류수로 900 μL로 희석 측정하였다. Microcystins의 항체가 고정된 microtiter plate well에 시료, microcystin 표준물질 (0, 0.15, 0.40, 1.0, 2.0, 5.0 ppb)을 각각 100 μL씩 분주한 후 multi-channel pipette을 사용하여 enzyme conjugate solution을 50 μL씩 첨가하였다. 이후에 antibody solution (monoclonal

anti-Microcystins)을 50 μL씩 첨가한 후 well 밖으로 새지 않도록 parafilm으로 밀봉하여 30초간 고르게 혼합한 후 (Tecan Sunrise, Switzerland) 90분 동안 실온에서 반응시켰다. 반응이 끝난 후 well 안에 반응용액을 제거한 후 250 μL 1× washing buffer solution으로 3회 세척하였다. 이후에 150 μL의 color solution (tetramethylbenzidine, TMB)을 첨가하여 20분간 반응시킨 후 100 μL의 stop solution을 첨가하여 반응을 종료하고 450 nm에서 흡광도를 측정한다 (Tecan Sunrise, Switzerland) 후 정량하였다.

추가적으로 *M. aeruginosa* NIES-298 배양액에서 세포 밖으로 분비된 용존성 microcystin의 분해능을 알아보기 위해서 *L. graminis*를 *M. aeruginosa* 배양액에 단일 배양하였을 때 microcystin을 측정하였다. CB 배지에서 *M. aeruginosa* NIES-298 1×10^8 cells mL⁻¹까지 배양한 배양액을 4000 rpm, 20분 동안 원심분리를 2회 한 후 membrane filter (0.2 μm pore size)로 여과하여 여액을 확보하였다. 유산균 *L. graminis*은 5 mL의 *Lactobacillus* MRS broth에서 36°C, 300 rpm 압조건으로 24시간 교반배양한 후 12,000 rpm, 10분 동안 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 멸균된 숙주 조류의 성장 배지인 CB 배지로 2번 세척하고 1×10^8 cells mL⁻¹ (OD₆₀₀ = 1.5)로 조절하였다. 보정된 0.5 mL의 *L. graminis* (1×10^7 cells mL⁻¹)를 4.5 mL의 *M. aeruginosa* NIES-298 배양액이 준비된 6 well-plate에 접종한 후 조류 배양조건에서 배양하여 0, 1, 3, 5, 7일째에 microcystins 농도를 측정하였다.

4. *Lactobacillus graminis* 배양액의 살조능

*L. graminis*에 의한 살조 효과가 조류와의 직접적인 접촉에 의한 것인지 매개를 통한 것인지 알아보기 위해서 살조세균과 숙주 조류의 혼합 배양액 (co-culture filtrate)의 살조 효과를 측정하였다. 숙주 조류의 성장 배지인 CB 배지로 2번 세척한 0.5 mL의 *L. graminis* 1×10^8 cells mL⁻¹ (OD₆₀₀ = 1.5)를 4.5 mL의 *M. aeruginosa* (1.0×10^5 cells mL⁻¹)가 준비된 6 well-plate에 접종한 후 숙주 조류 배양 조건에서 배양하여 90% 이상의 살조 효과를 확인한 혼합 배양액을 12,000 rpm, 10분 동안 원심분리하여 상등액을 얻은 후 membrane filter (0.45 μm pore size)로 여과하였다. 혼합 배양액의 살조 효과를 알아보기 위해서 1 mL의 배양액을 4 mL의 *M. aeruginosa* (1.0×10^5 cells mL⁻¹)가 준비된 6 well-plate에 접종한 후 0, 1, 3, 5, 7 그리고 10일째에 광학현미경 (Zeiss Axioplan, Germany) 하에서 혈구계산기를 사용하여 숙주 조류의 세포수를 육안으로 직접 계수하여 숙주 조류세포의 감소율 (reduction ratio) 식을 이용하

여 계산해 주었다.

5. 살조 물질의 특성 분석

*L. graminis*로부터 유래된 살조 물질의 화학적 특성을 확인하기 위해 다양한 pH 조건 조절 후 살조 효과를 확인하였다. 배양여액을 각각 pH 2, pH 7, pH 12로 보정하여 1 시간 동안 상온에서 정치시킨 후 접종을 위해 pH 2와 pH 12 용액을 pH 7로 보정하였다. 또한, 살조 물질의 분자량을 추정하기 위해서 3 kDa molecular cut-off membranes (Amicon Ultra, Milipore, USA) 하에서 4000 rpm, 30분 동안 원심분리하여 3 kDa 이상과 이하의 분획을 확보하여 살조 효과를 평가하였다. 또한, 살조 물질의 단백질성 물질 여부 확인을 위해 배양여액에 Proteinase K 처리를 하였다. 배양여액의 단백질을 Bradford method (Kruger, 1994)를 사용하여 정량한 결과 ($0.26 \mu\text{g mL}^{-1}$)를 바탕으로 1 mL의 배양여액에 1 μL Proteinase-K solution (QIAGEN)을 첨가하여 고르게 섞어준 후 37°C에서 6시간 동안 반응시켰다. 배양여액의 단백질 농도는 bovine serum albumin (Amersham-Pharmacia Biotech, USA) 표준용액으로 정량하였다. 추가적으로 살조 물질의 열 안정성을 평가하기 위해 배양여액을 121°C로 15분간 열처리 한 후 상온에 정치하여 온도를 낮춰 살조 효과를 평가하였다.

6. 살조 물질의 추출 및 정제

배양여액으로 분비된 물질들 중에서 살조 물질을 탐색하기 위한 첫 번째 단계로 배양여액을 5개 (petroleum ether, diethyl ether (DEE), chloroform, ethyl acetate (EA), n-butanol)의 유기용매로 추출하였다. *L. graminis* 단일 배양여액은 유산균 최적 성장 배지인 MRS broth 3 L에서 배양 후 6000 rpm, 40분간 원심분리하고 membrane filter (0.2 μm pore size)로 여과하여 확보하였다. 이 분획을 300 mL로 농축시킨 후 동량의 유기용매로 분액 깔대기에서 3분간 혼합한 후 24시간 동안 정치시켜 유기용매 추출층과 배양여액층으로 나누었다. 각각의 분획은 추출에 사용한 용매를 모두 휘발시킨 후 2 mL의 Methanol로 녹여 보관하였다. 각 분획은 1.5% agar가 포함된 *Microcytis algal lawn*의 멸균된 paper disc에 20 μL 씩 접종하여 조류 배양조건에서 배양하면서 투명대를 관찰하여 조류 제어 효과가 있는 분획을 선별하였다.

살조 물질의 정제를 위해서 얇은 막 크로마토그래피 (Thin layer chromatography)를 수행하였다. 유기용매에서 조류 제어 효과가 있었던 분획을 TLC aluminium plate (Silica gel 60F254, Merk)에 10 μL 씩 나누어 여러 차례 점

적한 뒤 전개조에서 Chloroform : Methanol (10 : 1) 용매로 15 cm 전개시킨 뒤 건조하여 254 nm의 UV 하에서 분리된 분획을 확인하였다. 각 분획의 TLC aluminium plate를 분리하여 1.5% agar가 포함된 CB 배지로 구성된 bottom agar와 0.85% agar가 포함된 *M. aeruginosa* (1×10^7 cells mL^{-1}) top agar 사이에 접종하고 조류 배양조건에서 배양하면서 투명대를 관찰하였다.

7. 살조 물질의 성분 분석

유기산은 고성능 액체크로마토그래피 (High performance liquid chromatography)로 분석하였다. Waters 515 pump (Milford, MA, USA)와 PL Hi-plex H column (4.6 \times 300 mm)을 사용하였으며, 이동상으로는 5 mM Sulfuric acid를 0.6 mL min^{-1} 유속으로 흘려주었으며 oven 온도는 55°C로 유지하였다. 정량은 oxalic acid, citric acid, malic acid, succinic acid, formic acid, acetic acid, lactic acid 혼합 표준물질과의 retention times 비교를 통하여 측정하였다.

지방산의 기기 분석은 가스 크로마토그래피 (Gas Chromatography)로 수행하였다. HP6890N GC-FID와 SupelcoTM SP-2560 column을 사용하였으며, carrier gas로는 helium을 이용하였다. 초기 Oven 온도는 140°C에서 5분, 이후에 240°C까지 1분당 3°C의 속도로 승온시켰다. 정량은 fatty acid (SupelcoTM 37 Component FAME Mix) 표준물질과의 retention times 비교를 통하여 측정하였다.

8. 분리된 살조 물질의 살조 효과

살조 활성을 평가할 지방산은 모두 Sigma-Aldrich사에서 구매하였으며 살조 물질의 농도는 기기분석에서 검출된 지방산의 농도와 동일하게 DMSO (dimethyl sulfoxide) 용매를 이용하여 조절하여 사용하였다. Lauric acid (C12:0) 3.22 mg L^{-1} , myristic acid (C14:0) 3.08 mg L^{-1} , palmitic acid (C16:0) 16.57 mg L^{-1} , stearic acid (C18:0) 4.32 mg L^{-1} , oleic acid (C18:1) 15.29 mg L^{-1} , linoleic acid (C18:2) 12.7 mg L^{-1} 로 각각 조절하였고, 남조 *M. aeruginosa* 배양액에 9 : 1로 접종하여 최종 농도가 10배 희석되어 검출된 농도와 동일하도록 맞춰주었다. 각각의 지방산을 모두 혼합한 Combination 분획은 검출된 농도로 조절된 각각의 용액을 동량씩 첨가하여 제조하였다. *M. aeruginosa* (1×10^5 cells mL^{-1}) 180 μL 에 각각의 지방산을 20 μL 씩 넣어 조류 배양조건에서 2일간 배양하면서 혈구계산기를 사용하여 세포수를 육안으로 직접 계수하여 숙주 조류세포의 감소율 (reduction ratio) 식을 이용하여 계산하였다.

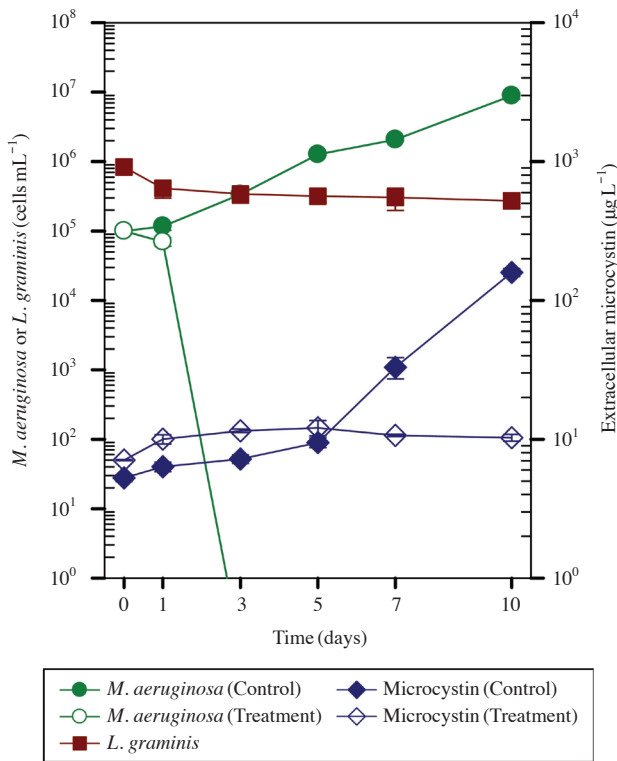


Fig. 1. Change in microcystins, cell densities of *Microcystis aeruginosa* NIES-298 and *Lactobacillus graminis* KCTC-3542 at the mixed culture of *Microcystis aeruginosa* NIES-298 and *Lactobacillus graminis* KCTC-3542. ●: cell densities of *Microcystis aeruginosa* in mono-culture, ○: cell densities of *Microcystis aeruginosa* in mixed culture with *Lactobacillus graminis*, ■: cell densities of *Lactobacillus graminis* in mixed culture ◆: microcystin concentration in mono-culture, ◇: microcystin concentration in mixed culture with *Lactobacillus graminis*.

결 과

1. *Lactobacillus graminis*의 *M. aeruginosa* 살조 효과

*L. graminis*를 처리하지 않은 대조구에서는 초기 1.0×10^5 cells mL⁻¹의 밀도에서 점진적으로 증가하여 10일차 8.8×10^6 cells mL⁻¹까지 증가하였다. 그러나, 1×10^5 cells mL⁻¹의 *M. aeruginosa*에 8.4×10^5 cells mL⁻¹의 *L. graminis*를 접종한 처리구에서는 3일 이내에 *M. aeruginosa* 세포를 100% 제어하는 높은 살조 효과를 확인할 수 있었다. 또한, *L. graminis*의 세포밀도는 실험 마지막 날인 10일째에 2.7×10^5 cells mL⁻¹로 초기 접종밀도와 비교하여 큰 증가나 감소 없이 10^5 cells mL⁻¹ 이상을 유지하는 것을 확인하였다 (Fig. 1).

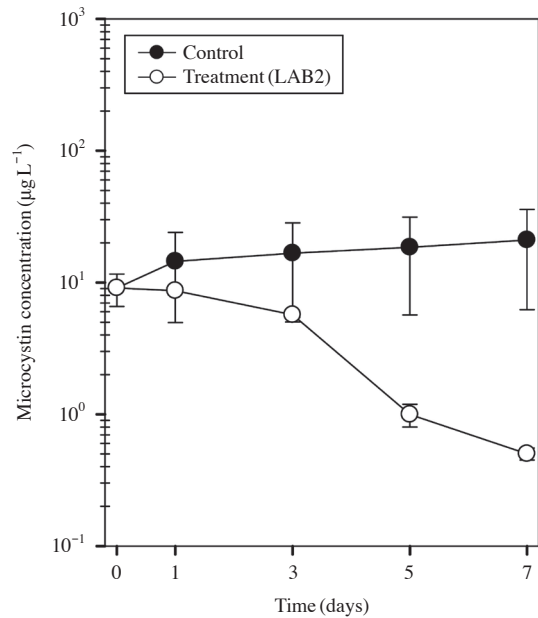


Fig. 2. Change of dissolved microcystin concentrations after inoculating *Lactobacillus graminis* KCTC-3542 in the *Microcystis aeruginosa* NIES-298 culture filtrate.

2. *Lactobacillus graminis*의 microcystin 억제효과

*L. graminis*의 microcystin 분해능을 확인하기 위해 *M. aeruginosa* 배양액에 *L. graminis*를 접종한 후 10일 동안 microcystin 농도 변화를 측정하였다. *M. aeruginosa*만을 배양한 대조구에서는 0일째 $5.2 \mu\text{g L}^{-1}$ 의 농도에서 10일째에 $159.5 \mu\text{g L}^{-1}$ 까지 증가하여 높은 농도의 microcystin이 측정되었으나, 동일 조건에서 *M. aeruginosa*에 유산균 *L. graminis*를 접종한 처리구 내 용존성 microcystin 농도는 초기 $7.1 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서 5일째 $12.1 \mu\text{g L}^{-1}$ 로 증가하였으나 5일째 이후에 다시 감소하여 $10.3 \mu\text{g L}^{-1}$ 으로 측정되었다 (Fig. 1). 10일 동안 계속 증가한 대조구의 microcystin의 농도와 비교하여 *L. graminis*를 접종한 처리구에서 93.5%의 microcystin 제어능을 보였다.

M. aeruginosa 세포로부터 용출되어 수계내 존재하는 microcystin만의 제어능을 확인하기 위하여 *M. aeruginosa* 배양액에 *L. graminis*를 접종 후 용존성 microcystin을 측정된 결과, 초기 microcystin 농도 $9.1 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서 $21 \mu\text{g L}^{-1}$ 까지 증가하는 대조구과 비교하여 *L. graminis*를 접종한 처리구에서는 $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$ 까지 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2).

3. *Lactobacillus graminis* 배양액의 살조 효과

*L. graminis*로부터 용출된 물질의 살조 효과를 평가하

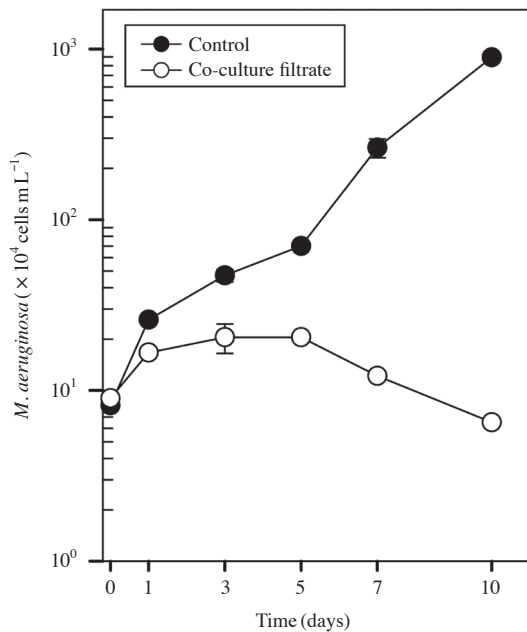


Fig. 3. Change in densities of *Microcystis aeruginosa* in inoculated of co-culture filtrate mixed with *M. aeruginosa* and *Lactobacillus graminis* KCTC 3542 for 10 days.

기 위해 *L. graminis*와 *M. aeruginosa* 혼합 배양여액 (co-culture filtrate)의 살조 활성을 측정하였다. 대조구는 초기 *M. aeruginosa* 세포수가 1×10^5 cells mL⁻¹에서 10일차 8.9×10^6 cells mL⁻¹까지 지속적으로 증가하였다. 그러나, *M. aeruginosa*에 혼합 배양여액을 20% 접종한 처리구에서는 점진적으로 감소하여 10일차 6×10^4 cells mL⁻¹ 세포수로 감소하여, 대조구 대비 99%의 높은 살조 활성을 확인할 수 있었다 (Fig. 3).

4. *Lactobacillus graminis* 유래 살조 물질의 화학적 특성

*L. graminis*의 배양여액의 살조 효과 결과를 기반으로 배양여액으로 분비된 조류 억제 물질의 화학적 특성을 알아보고자, *M. aeruginosa*에 *L. graminis*를 접종하여 90% 이상의 살조 효과를 보인 혼합 배양여액에 다양한 조건으로 처리를 한 후 살조 활성 여부를 관찰하였다. 배양여액을 각각 pH 2, pH 7, pH 12이 되도록 조절하여 조류 억제능을 측정할 결과, 살조 활성이 각각 75.3%, 85.4%, 50.9%로 산성과 중성 pH에서 비교적 안정적으로 살조 활성이 유지되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 4). 살조 물질의 열 안정성을 평가하기 위하여 배양여액에 열처리 후 살조 활성을 평가한 결과 75.3%의 살조 활성을 나타내었다 (Fig. 5). 또한 살조 물질이 단백질성 물질인지 비단백질성 물질을 평가하기 위해서 proteinase K를 처리한 후 살조

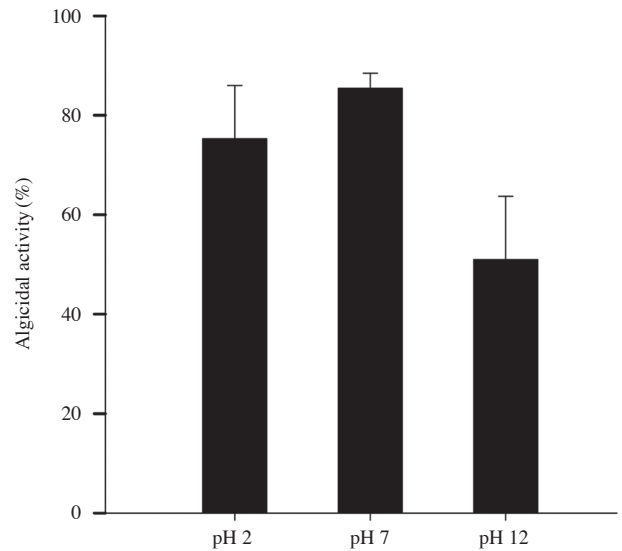


Fig. 4. Algicidal activity on *Microcystis aeruginosa* under variation pH values after 2 day. The co-culture filtrate mixed with *Lactobacillus graminis* KCTC 3542 and *M. aeruginosa*, the filtrate was adjusted with 1 M NaOH, 1 M HCl.

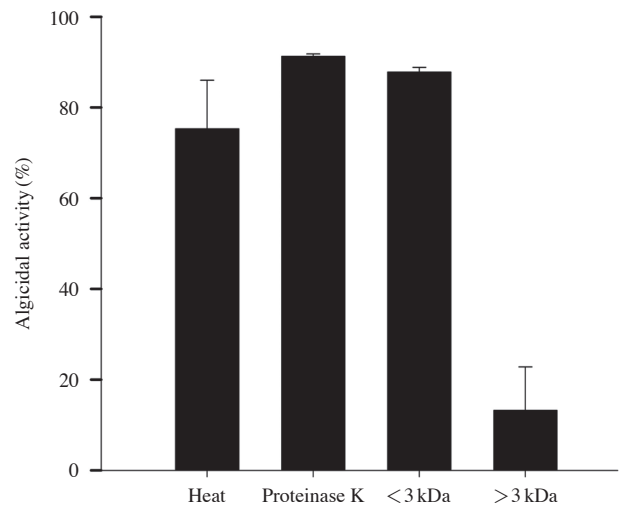


Fig. 5. Algicidal activity on *Microcystis aeruginosa* under various conditions after 2 day. The co-culture filtrate mixed with *Lactobacillus graminis* KCTC 3542 and *M. aeruginosa*. The co-culture filtrate treated with heat (121°C, 15 min), treated with Proteinase K and used to cut off the components of filtrate with the molecular weights of 3 kDa.

활성을 평가한 결과 91.3%의 높은 살조 활성이 확인되었으며 물질의 분자량을 알아보기 위해 배양여액을 분자량 3 kDa의 membrane filter로 분획을 나누어 각각 살조 활성을 평가한 결과, 13.2%의 낮은 살조 활성을 보인 >3 kDa 분획에 비해 <3 kDa의 분획에서는 87.3%의 높은 살조 활성

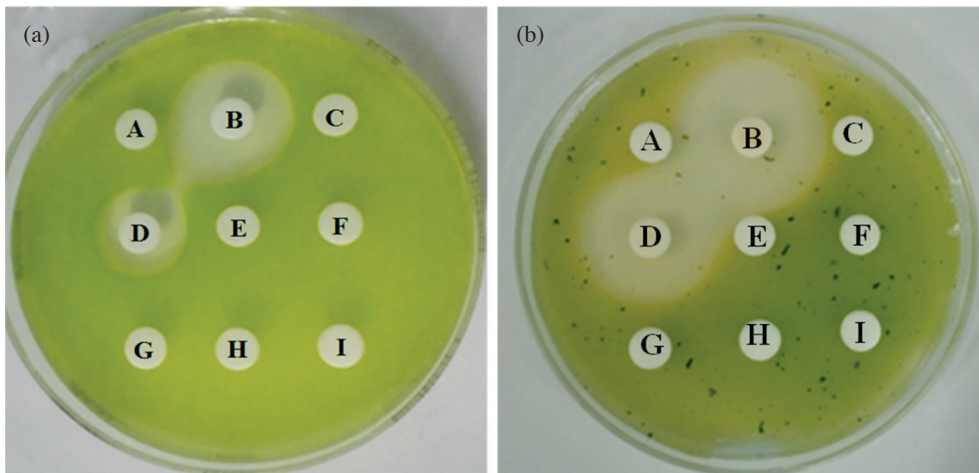


Fig. 6. Growth inhibition of the fractionated of the different solvent extract parts from the LAB2 culture filtrate against (a) *Microcystis aeruginosa* NIES 298 and (b) *Microcystis* sp. HYK0906 B3 after 2 days. (A) petroleum ether extract, (B) diethyl ether extract, (C) chloroform extract, (D) ethyl acetate extract, (E) n-butanol extract, (F) water extract, (G) control (MetOH), (H) control (diethyl ether), (I) control (ethyl acetate).

이 관찰되었다(Fig. 5).

5. 살조 물질의 추출 및 정제

살조 물질의 추출을 위해서 극성이 다른 5가지 유기용매로 살조세균 배양여액을 순차적으로 추출하였다. 각각의 용매로 추출된 분획의 *M. aeruginosa* NIES-298에 대한 살조 활성평가 결과 지방질 물질의 추출에 쓰이는 diethyl ether 용매와 대표적인 극성용매이며(Chen, 2004; Ni *et al.*, 2011), lactone, flavones 등 약 알칼리 물질들을 추출할 때 사용되는 용매인 ethyl acetate 용매로 추출한 2개의 분획에서 살조 효과를 확인할 수 있었다. 또한 국내에서 직접 분리한 *Microcystis* sp. HYK0906-B3에서도 diethyl ether와 ethyl acetate의 용매에서 동일한 살조 효과를 확인하였다(Fig. 6).

살조 물질의 정제를 위하여 살조 활성을 보인 두 용매의 추출 분획을 얇은 막 크로마토그래피 TLC (Thin layer chromatography)로 정제하였다. TLC 결과 diethyl ether 용매 추출물에서는 DEE-I (Rf 0.7)와 DEE-II (0.4) 2개의 분획으로 분리되었으며 ethyl acetate 분획에서는 EA-I (0.4), EA-II (0.2), EA-III (0.02)의 3개 분획으로 분리되었다. 각각의 분획으로 *M. aeruginosa*에 대해서 살조 활성을 평가해본 결과 DEE-I와 EA-I에서 살조 활성을 확인하였다(Fig. 7).

6. 살조 물질의 유기산함량 분석

HPLC (High performance liquid chromatography)를 사용

하여 살조 물질의 유기산을 분석결과 DEE-I와 EA-I 모두 lactic acid와 acetic acid 2개의 유기산이 검출되었다(Fig. 8). GC-FID (Gas Chromatography Flame Ionization Detection)를 통해 DEE-I와 EA-I 분획의 지방산(C4~C24) 37종을 분석한 결과 DEE-I 분획에서는 6개의 지방산이 검출되었으며, 그 결과 포화지방산인 lauric acid (C12:0)가 0.322 mg L⁻¹, myristic acid (C14:0)가 0.308 mg L⁻¹, palmitic acid (C16:0)가 1.657 mg L⁻¹, stearic acid (C18:0)가 0.432 mg L⁻¹, oleic acid (C18:1)가 1.529 mg L⁻¹, linoleic acid (C18:2)가 1.27 mg L⁻¹로 검출되었다(Table 1). EA-I 분획은 37종의 지방산 중에서 5개의 지방산이 검출되었으며 그 주요 성분은 포화지방산인 myristic acid (C14:0)가 0.333 mg L⁻¹, palmitic acid (C16:0)가 0.681 mg L⁻¹, stearic acid (C18:0)가 0.343 mg L⁻¹, oleic acid (C18:1)가 1.9 mg L⁻¹, linoleic acid (C18:2)가 1.919 mg L⁻¹이었다(Table 1). 검출된 각 지방산의 살조능을 평가해본 결과 stearic acid, oleic acid, linoleic acid에서 50.5%, 79.7%, 34.4%의 살조능이 관찰되었으며 각각의 지방산을 검출된 비율로 혼합한 Combination 분획에서는 살조 효과가 90.7%로 가장 높았다(Fig. 9).

고 찰

최근 *M. aeruginosa*와 microcystin을 동시에 제어 가능한 살조세균 *Ochrobactrum* sp.가 보고되었으나(Ruimin *et al.*, 2011) 이 또한 식물 *Allium triquetrum*을 감염시켜 병원

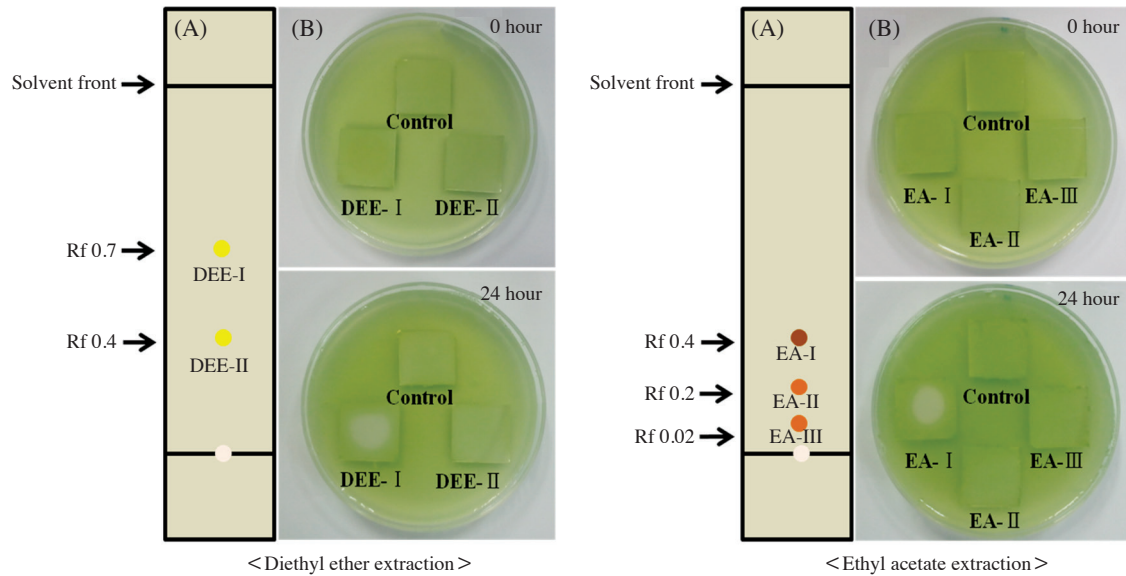


Fig. 7. TLC pattern and the algicidal activity of each spot. (A) Developed with Chloroform : Methanol (10 : 1) and UV absorption spot at 254 nm (B) algicidal activity against *Microcystis aeruginosa*. DEE-I: Diethyl ether extracts (Rf 0.7), DEE-II: Diethyl ether extracts (Rf 0.4), EA-I: Ethyl acetate extracts (Rf 0.4), EA-II: Ethyl acetate extracts (Rf 0.2), EA-III: Ethyl acetate extracts (Rf 0.02).

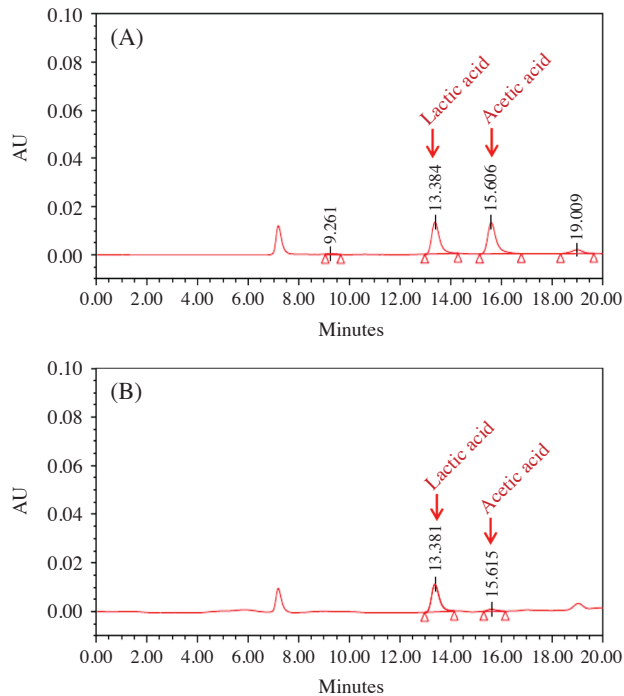


Fig. 8. HPLC chromatogram of organic acid from (A) DEE-I of diethyl ether extracts and (B) EA-I of ethyl acetate extracts.

성을 나타내는 종으로 알려져 있다. 본 연구에서는 GRAS (generally recognized as safe)로서 안전성이 검증된 유산균 *L. graminis*의 살조 효과뿐만 아니라 대조구과 비교하

Table 1. Fatty acid composition of two organic solvent extracts from *Lactobacillus graminis* KCTC 3542 mono culture filtrate (mg L^{-1}).

	Lipid No.	DEE-I	EA-I
Lauric acid	C12:0	0.322	nd
Myristic acid	C14:0	0.308	0.333
Palmitic acid	C16:0	1.657	0.681
Stearic acid	C18:0	0.432	0.343
Oleic acid	C18:1	1.529	1.9
Linoleic acid	C18:2	1.27	1.919

nd: not detected

여 93.5%의 microcystin 제어능을 확인함으로써 살조세균의 병원성 문제를 해소하였다. *L. graminis*의 접종 후 용존성 microcystin은 초기 $7.0 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서 5일차 $12.1 \mu\text{g L}^{-1}$ 까지 증가한 후 감소하는 경향을 보였다. 초기에 microcystin의 농도가 증가하는 것은 *L. graminis* 접종에 의한 살조 효과 때문에 microcystin이 세포 밖으로 용출되었을 것으로 판단된다. 이와 관련하여 살조세균의 살조 효과로 인해 수계로 노출된 microcystin이 수생태계 내에서 심각한 교란 작용을 할 것이라는 보고가 있다(Kim *et al.*, 2005). 본 연구에서는 살조 효과에 의해 배양액으로 용출된 용존성 microcystin을 유산균이 억제하는 것을 확인함으로써 이러한 문제점을 해결하였다. 또한 이때 *L. graminis*의 세포밀도는 실험 마지막 날까지 큰 변화없이 $10^5 \text{ cells mL}^{-1}$ 로 유지되었다. 조류성장 배지에서 2일 이내에 사멸한 유산균의

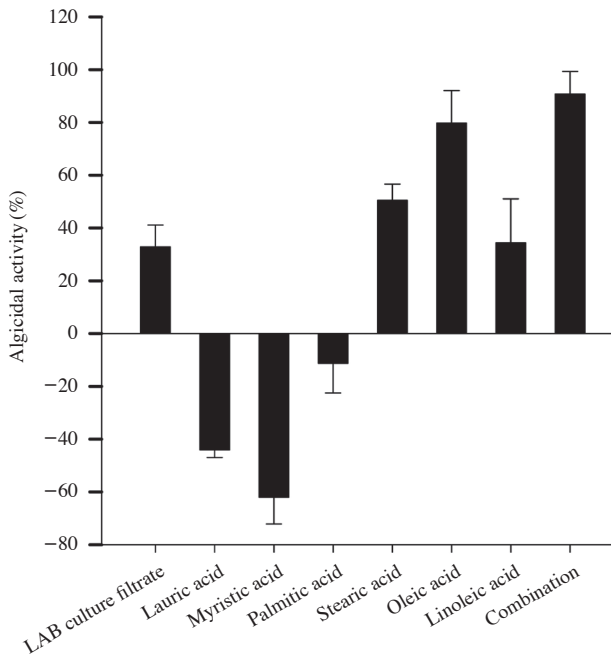


Fig. 9. Algicidal activity of *Lactobacillus graminis* and various kinds of fatty acids against *Microcystis aeruginosa*. The treated dose of fatty acids for Lauric acid (C12:0) 0.322 mg L⁻¹, Myristic acid (C14:0) 0.308 mg L⁻¹, Palmitic acid (C16:0) 1.657 mg L⁻¹, Stearic acid (C18:0) 0.432 mg L⁻¹, Oleic acid (C18:1) 1.529 mg L⁻¹, Linoleic acid (C18:2) 1.27 mg L⁻¹.

대조구와 비교하여, microcystin 이 존재하는 배지 내에서 유산균이 사멸하지 않고 유지된 것은 7종의 아미노산(D-alanine(Ala), D-glutamic acid(Glu), N-methyldehydroalanine (M-dha), D-methylaspartic acid, 3-amino-9-methoxy-10-phenyl-2,3,8,-trimethyldeca-4,6-dienoic acid(Adda)) 그리고 성분에 의해 변화되는 두 개의 L-amino acids으로 구성된 microcystin을 탄소와 질소원으로 소비하였기 때문인 것으로 사료되나 정확한 기작에 대하여 추후 연구가 필요하다(Pyo and Shin, 2000; Saitou *et al.*, 2003; Roegner *et al.*, 2014). 또한, microcystin 초기 농도가 9.1 µg L⁻¹인 *M. aeruginosa*의 배양여액에 *L. graminis*를 접종한 처리구에서는 0.5 µg L⁻¹의 농도까지 감소하는 것을 확인하였다. 이는 WHO 먹는 물 기준인 1 µg L⁻¹ (WHO, 2004) 이하의 낮은 농도로서, 수자원 확보의 문제해결에 긍정적으로 활용 가능할 것으로 판단된다.

본 연구에서는 유산균 생균뿐만 아니라 배양여액에서도 살조능을 확인함으로써 유산균이 체외로 분비한 대사산물이 살조능과 관련이 있을 것으로 판단하였다. 기존 연구에서 유산균 중 *Lactobacillus*속에 포함되는 종들이 분비하

는 유용물질들은 benzoic acid (MW: 122.1), 5-methyl-2,4-imidazolidinedione (methylhydantoin, MW: 114), phenyllactic acid (MW: 166), cyclo(L-Phe-L-Pro) (MW: 244), hydroxy fatty acids (MW: 188~244) (Niku-Paavola *et al.*, 1999; Sjögren *et al.*, 2003) 등이 보고되었다. 특히, 항균, 항진균 성 활성을 갖고 있어 의학과 식품산업에서 활용되며 모두 분자량 1,000 이하의 저분자 물질이라는 특징이 있다. 유해 남조류 *Microcystis*에 대해서 살조 효과를 갖는 *L. graminis* 균이 분비하는 살조 물질 탐색 결과, 3 kDa 이하의 비단백질성 저분자 물질이 살조와 관련이 있는 것으로 확인되었으며, 열에 강하고 산성과 중성 pH에서도 살조 효과가 유지되는 것을 확인하였다. 또한, *L. graminis*로부터 분비된 살조 물질을 추출하기 위해서 극성이 다른 5개의 유기용매로 추출한 결과, 극성이 서로 다른 diethyl ether와 ethyl acetate에서 추출되었다. Diethyl ether와 ethyl acetate 용매에서 추출된 물질의 살조 효과를 확인함으로써, 유산균 배양액에서 살조 효과를 나타내는 물질이 적어도 2개 이상이거나, 지용성의 특성을 갖는 물질일 것으로 판단하였다 (Ishida *et al.*, 2009).

지방산은 유산균이 분비하는 유용물질 중 하나로써 조류 세포의 세포막에 손상을 주어 항 조류효과가 있다고 보고되었다. Linoleic acid와 linolenic acid는 *Chlorella pyrenoidosa*와 *Heterosigma akashiwo* (Ikawa, 1997; Alamsjah *et al.*, 2005; Wu, 2006), oleic acid는 *C. vulgaris*, *Monoraphidium contortum* (Wu, 2006), palmitic acid, stearic acid, arachidic는 *H. akashiwo*, behenic은 *C. marina*에 (Alamsjah *et al.*, 2007) 살조 효과가 있음이 밝혀졌다. 본 연구에서의 대상 조류인 *M. aeruginosa*에 대한 지방산 살조 효과에 대한 연구는 2005년 Nakai에 의해서 연구되었으며 nonanoic acid가 남조류 *Myriophyllum spicatum*에 대하여 살조 효과가 있는 것으로 보고되었다(Nakai *et al.*, 2005). 본 연구 결과, *L. graminis*로부터 분비된 물질의 추출과 정제를 통해 지방산(stearic acid, oleic acid, linoleic acid)이 살조 효과를 나타내는 것을 알 수 있었다(Fig. 9). 특히 oleic acid에서 79.9%의 높은 살조 효과가 관찰되었으며, 각각의 지방산을 혼합한 Combination 분획에서 90.6%로 가장 높은 살조 효과를 나타내었다(Fig. 9). 따라서 유산균 *L. graminis* 배양액 중에서 지방산 성분인 oleic acid가 *M. aeruginosa*에 대한 살조 효과와 관련이 있는 것으로 판단하였다. 유산균 배양여액의 조추출물보다 높은 살조 활성을 나타내는 것으로 보아 순수 정제된 지방산을 접종하였을 때 살조 활성이 개선되는 것을 확인할 수 있었다. 그러나, 다양한 지방산이 혼합되어 있는 Combination 분획에서 가장 높은 살조 효과를 보이는 것으로 보아 Oleic acid 단독으로 효과

를 내는 것이 아닌 stearic acid, linoleic acid와 혼재되어서 또는 검출되지 않은 미지의 물질과 함께 혼재되어 높은 살조 효과를 보인 것으로 추정되며 이와 관련된 추후 연구가 필요하다고 사료된다.

본 연구는 유해 남조 *Microcystis*종에 대하여 유산균 *L. graminis* KCTC-3542의 살조 효과를 확인하였으며, 동시에 간독소로 작용하는 microcystin을 억제하는 유용한 세균임을 입증하였다. 이러한 효과는 생균뿐만 아니라 유산균 배양여액에서도 살조 효과를 확인하였으며, 친환경적 제어를 위하여 유산균 배양여액으로부터 살조 관련 물질을 탐색하였다. 그 결과 지방산 성분인 stearic acid, oleic acid, linoleic acid가 살조 활성을 나타내는 것을 확인하였으며 그중에 oleic acid가 높은 살조 효과를 나타내어 살조 활성과 밀접한 관련이 있는 물질임을 알 수 있었다. 또한 이들 성분은 혼재되어 있을 때 더욱 높은 효과를 나타내었다. 유산균은 미국식품의약국 FDA(Food and Drug Administration)에서 승인한, 식품에 첨가하여도 안전한 물질들의 목록인 GRAS (generally recognized as safe)로 분류되는 안전한 균주이다. 비록, *L. graminis* 균주로부터 추출한 물질을 이용한 녹조 제어 기술은 기존의 개발된 황토와 같은 응집제, 화학물질에 비해 경제적인 효율을 다소 떨어질 수 있지만, 보건학적으로 안전하며 환경친화적인 측면에서 더욱 많은 이점을 가지고 있다. 따라서, 유용미생물 유산균으로부터 유래된 지방산의 단일 또는 적절한 혼합을 통하여 *Microcystis* 대발생을 친환경적으로 제어할 수 있을 것이다. 또한, 현재보다 *L. graminis*균의 경제적인 대량배양 기술 및 추출 기술이 추가 개발된다면, 실제 저수지 및 호소 등 다양한 수계 적용이 가능할 것이며, 매년 발생하는 유해 남조류 *M. aeruginosa*에 의한 녹조 현상을 친환경적으로 제어하는 기술로 사용될 것이다.

사 사

본 연구는 한강수계관리위원회의 환경기초조사사업(유해 남조류의 Ecotype(생태형) 판별을 통한 녹조 발생의 근원지 규명 및 소멸 시기 예측 기법 연구)의 지원으로 이루어졌습니다.

REFERENCES

Alamsjah, M.A., S. Hirao, F. Ishibashi and Y. Fujita. 2005. Isolation and structure determination of algicidal compounds

from *Ulva fasciata*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **69**: 2186-2192.

Alamsjah, M.A., S. Hirao, F. Ishibashi, T. Oda and Y. Fujita. 2007. Algicidal activity of polyunsaturated fatty acids derived from *Ulva fasciata* and *U. pertusa* (Ulvaceae, Chlorophyta) on phytoplankton. *Journal of Applied Phycology* **20**: 263-270.

Beklioglu, M., O. Ince and I. Tuzun. 2003. Restoration of the eutrophic Lake Eymir, Turkey, by biomanipulation after a major external nutrient control I. *Hydrobiologia* **489**: 93-105.

Chen, Y. 2004. The Constituents of Phytochemistry. Beijing: Chemical Industry Press.

Cho, H.J., H.G. Choi, J.A. Kim and Y.-K. Oh. 2005. Lactic acid bacteria as oral antigen protein carriers. *Journal of Korean Pharmaceutical Sciences* **35**: 75-80.

Choi, H.-J., B.-H. Kim, J.D. Kim and M.-S. Han. 2005. *Streptomyces neyagawaensis* as a control for the hazardous biomass of *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria) in eutrophic freshwaters. *Biological Control* **33**: 332-343.

DeMan, J., C.M. Rogosa and E. Sharpe. 1960. A medium for the cultivation of Lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology* **23**: 130-135.

Gumbo, R.J., G. Ross and E.T. Cloete. 2008. Biological control of *Microcystis* dominated harmful algal blooms. *African Journal of Biotechnology* **7**: 4765-4773.

Holzappel, W.H., R. Geisen and U. Schillinger. 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology* **24**: 343-362.

Humphries, S.E. and F. Widjaja. 1979. A simple method for separating cells of *Microcystis aeruginosa* for counting. *British Phycological Journal* **14**(4): 313-316.

Ikawa, M., J.J. Sasner and J.F. Haney. 1997. Inhibition of *Chlorella* growth by degradation and related products of linoleic and linolenic acids and the possible significance of polyunsaturated fatty acids in phytoplankton ecology. *Hydrobiologia* **356**: 143-148.

Ishida, B.K. and M.H. Chapman. 2009. Carotenoid extraction from plants using a novel, environmentally friendly solvent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**(3): 1051-1059.

Jung, S.W., Y.H. Kang, T. Katano, B.H. Kim, S.Y. Cho, J.H. Lee and M.S. Han. 2010. Testing addition of *Pseudomonas fluorescens* HYK0210-SK09 to mitigate blooms of the diatom *Stephanodiscus hantzschii* in small-and large-scale mesocosms. *Journal of Applied Phycology* **22**(4): 409-419.

Kang, Y.H., C.S. Park and M.S. Han. 2012. *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14 a useful bacterium capable of lysing *Microcystis aeruginosa* cells and degrading microcystins. *Journal of Applied Phycology* **24**(6): 1517-1525.

Kang, Y.H., S.K. Kang, C.S. Park, J.H. Joo, J.W. Lee and M.S.

- Han. 2016. Use of lactic acid bacteria as a biological agent against the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae*. *Journal of Applied Phycology* **28**(3): 1747-1757.
- Kang, Y.H., S.W. Jung, J.H. Joo and M.S. Han. 2012. Use of immobilized algicidal bacteria to control natural freshwater diatom blooms. *Hydrobiologia* **683**(1): 151-162.
- Kang, Y.-K., S.-Y. Cho, Y.-H. Kang, T. Katano, E.-S. Jin, D.-S. Kong and M.-S. Han. 2008. Isolation, identification and characterization of algicidal bacteria against *Stephanodiscus hantzschii* and *Peridinium bipes* for the control of freshwater winter algal blooms. *Journal of Applied Phycology* **20**: 375-386.
- Kasai, F., M. Kawachi, M. Erata and M.M. Watanabe. 2004. NIES-collection list of strains seventh edition 2004 microalgae and protozoa. In: Microbial Culture Collection (Yoshitaka, T. ed.). Environmental Research Center Press, Tsukuba, 257.
- Kim, B.-H., S.-W. Jung, J.-K. Seo, M.-Y. Suh and M.-S. Han. 2005. Effects of biological control agent algicidal bacterium on the phytoplankton community and microcystin-LR contents in a mesocosm experiment. *Korean Journal of Limnology* **38**(2): 261-270.
- Kim, J.D. and C.G. Lee. 2007. Purification and characterization of extracellular β -glucosidase from *Sinorhizobium kostiense* AFK-13 and its algal lytic effect on *Anabaena flosaquae*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **17**: 745-752.
- Kiviranta, J., K. Sivonen, S.I. Sivonen and K. Huovinen. 1991. Detection of toxicity of cyanobacteria by *Artemia salina* bioassay. *Environmental Toxicology* **6**: 423-436.
- Klaenhammer, T.R. 1988. Bacteriocine of lactic acid bacteria. *Biocheime* **70**: 337-349.
- Kruger, N.J. 1994. The Bradford method for protein quantitation. Basic protein and peptide protocols, 9-15.
- Lavermicocca, P., F. Valerio, A. Evidente, S. Lazzaroni, A. Corsetti and M. Gobetti. 2000. Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 4084-4090.
- Manage, P.M., Z. Kawabata and S. Nakano. 2000. Algicidal effect of the bacterium *Alcaligenes denitrificans* on *Microcystis* spp. *Aquatic Microbial Ecology* **22**: 111-117.
- Ni, L.X., X.Y. Hao, S.Y. Li, S.J. Chen, G.X. Ren and L. Zhu. 2011. Inhibitory effects of the extracts with different solvents from three compositae plants on cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Science China Chemistry* **54**: 1123-1129.
- Niku-Paavola, M.L., A. Laitila, T. Mattila-Sandholm and A. Haikara. 1999. New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology* **86**: 29-35.
- Oberholster, P.J., A.M. Botha and J.U. Grobbelaar. 2004. *Microcystis aeruginosa*: source of toxic microcystins in drinking water. *African Journal of Biotechnology* **3**: 159-168.
- Rivasseau, C. and M. Hennion. 1999. Potential of immunoextraction coupled to analytical and bioanalytical methods (liquid chromatography, ELISA kit and phosphatase inhibition test) for an improved environmental monitoring of cyanobacterial toxins. *Analytica Chimica Acta* **399**: 75-87.
- Roegner, A.F., B. Brena, G. González-Sapienza and B. Puschner. 2014. Microcystins in potable surface waters: toxic effects and removal strategies. *Journal of applied Toxicology* **34**(5): 441-457.
- Ruimin, M., M. Guixia, S. Cuizhen and J. Jingjing. 2011. Inhibition of *Microcystis aeruginosa* and microcystin-LR with one algicidal bacterium isolated from a eutrophic lake. *African Journal of Biotechnology* **11**: 460-465.
- Sanders, M.E. and J. Huis in't Veld. 1999. Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues. *Antonie van Leeuwenhoek* **76**: 293-315.
- Shilo, M. 1970. Lysis of Blue-Green Algae by Myxobacter. *Journal of Bacteriology* **104**: 453-461.
- Sigee, D.C., R. Glenn, M.J. Andrews, E.G. Bellinger, R.D. Butler, H.A.S. Epton and R.D. Hendry. 1999. Biological control of cyanobacteria: principles and possibilities. *Hydrobiologia* **395**: 161-172.
- Sjögren, J., J. Magnusson, A. Broberg, J. Schnürer and L. Kenne. 2003. Antifungal 3-hydroxy fatty acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 7554-7557.
- U.S. Food and Drug Administration (FDA). 1988. Nisin preparation: affirmation of GRAS status as direct human food ingredient. *Federal Register* **53**: 11247-11251.
- WHO. 2004. Guidelines for Drinking Water Quality. World Health Organization, Switzerland.
- Wu, J.-T., Y.-R. Chiang, W.-Y. Huang and W.-N. Jane. 2006. Cytotoxic effects of free fatty acids on phytoplankton algae and cyanobacteria. *Aquatic Toxicology* **80**: 338-345.
- Yamamoto, Y., T. Kouchiwa, Y. Hodoki, K. Hotta, H. Uchida and K.-I. Harada. 1998. Distribution and identification of Actinomycetes lysing cyanobacteria in a eutrophic lake. *Journal of Applied Phycology* **10**: 391-397.