

# *Chlorella* sp. MF1907의 광합성 활성에 미치는 다양한 종속영양 세균의 영향

노영진, 정소연\*, 김태관\*  
부산대학교 미생물학과

Received: September 7, 2020 / Revised: November 4, 2020 / Accepted: November 16, 2020

## Effects of Different Heterotrophic Bacteria on Phototrophic Activity of *Chlorella* sp. MF1907

Young Jin Noh, So-Yeon Jeong\*, and Tae Gwan Kim\*

Department of Microbiology, Pusan National University, Pusan 46241, Republic of Korea

Interactions between microalgae and heterotrophic bacteria are common in natural environments. This study investigated the effect of heterotrophic bacteria on the activity of the photosynthetic eukaryotic alga *Chlorella* sp. MF1907 when cocultured. A total of 31 heterotrophic bacterial isolates belonging to different genera were cocultured with MF1907. Interactions of the alga with *Agromyces*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas*, *Hyphomicrobium*, *Rhizobium*, and *Pseudomonas* were positive, while those with *Burkholderia*, *Paraburkholderia*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Streptomyces*, *Pedobacter*, *Mucilaginibacter*, *Fictibacillus*, *Tumebacillus*, *Sphingopyxis*, and *Erythrobacter* were negative ( $p < 0.05$ ). A turnover experiment demonstrating a switch from heterotrophic to autotrophic activity of MF1907 was performed using 16 isolates exhibiting apparent effects (positive, negative, or neutral). Compared with the results of the coculture experiment, eight isolates exhibited the same outcomes, while the others did not. Consistently, *Pseudomonas* and *Agromyces* showed a remarkable positive effect on MF1907 activity, and *Burkholderia*, *Streptomyces*, and *Erythrobacter* had a marked negative effect. Our results suggest that it may be possible to use the isolates for controlling populations of microalgae in natural and engineered environments.

**Keywords:** *Chlorella* sp., heterotrophic bacteria, interaction

## 서론

미세조류는 담수 및 해양 환경에서 서식하는 독립영양생물로서 매우 다양하며 대기 중 이산화탄소를 흡수하고, 광합성을 통해 유기물을 생성한다[1]. 미세조류는 단백질, 탄수화물 및 비타민 등이 풍부하여 식품, 의약품, 화장품, 동물 사료뿐만 아니라 폐수 처리, 환경 정화 등 여러 산업 분야에서 유망한 자원으로써 활용되고 있다[2, 3]. 최근에는 미세조류의 높은 지질 함량으로 바이오디젤 생산 부문에서 지속 가

능한 차세대 원료로써 주목받고 있으며[4], 환경 요인(abiotic factor)을 조절하여 미세조류의 바이오매스 및 지질 생산성 증대를 위한 연구가 활발히 수행되고 있다[5–7]. 하지만 미세조류의 성장 및 활성은 환경 요인뿐만 생물학적 요인(biotic factor)에 의해서도 영향을 받는다[8, 9].

미세조류는 다양한 환경에서 종속영양세균(heterotrophic bacteria)과 공존하며 이들의 상호작용이 미세조류의 성장 및 활성에 많은 영향을 미친다. 미세조류와 종속영양세균의 공생(symbiosis)은 미세조류의 바이오매스 및 지질 생산성을 향상시킨다고 보고된다[10]. 예를 들어, *Pseudomonas* sp., *Halomonas* sp., *Mesorhizobium* sp., *Marinobacter* sp., *Roseobacter* sp., *Microbacterium* sp. 등이 미세조류와 공생을 통해 미세조류의 성장에 영향을 미친다고 보고되었다[10–13]. 폐수처리 시스템에서 *Pseudomonas putida*는 대표적인 녹조류 *Chlorella vulgaris*의 영양분 흡수율을 증가시켰다[14]. 또한, 활성슬러지에서 분리된 *Enterobacter* sp.,

### \*Corresponding authors

S.-Y. Jeong

Tel: +82-51-510-3164, Fax: +82-51-514-1778

E-mail: jeongsy@pusan.ac.kr

T. G. Kim

Tel: +82-51-510-2268, Fax: +82-51-514-1778

E-mail: tkim@pusan.ac.kr

*Klebsiella* sp. 등은 *C. vulgaris*의 성장을 증대시켰으며, *C. vulgaris*와 각 박테리아의 컨소시엄은 폐수처리 시스템에서 질소, 인, COD를 효율적으로 제거하였다[15]. 종속영양세균이 미세조류에 미치는 긍정적인 효과(positive effect)는 미세조류의 바이오매스 및 유용 물질 생산을 증가시킬 수 있다. 반면에 일부 종속영양세균은 살조제(algicide)를 분비하여 미세조류의 성장을 억제하고 사멸에 이르게 한다[16, 17]. 예를 들어, *Streptomyces* sp.에 의해 생성되는 살조 물질이 *C. vulgaris*의 성장을 저해하였다[18]. 또한, 해수에서 분리된 *Halomonas* sp., *Marinobacter* sp., *Paracoccus* sp.와 황해 하구 토양에서 분리된 *Flavobacterium* sp., *Pseudoalteromonas* sp. 등이 살조 활성(algicidal activity)을 나타낸다고 보고되었다[19]. 이와 같이 종속영양세균이 미세조류에 미치는 부정적인 효과(negative effect)는 미세조류의 성장과 활성을 억제하고 제어할 수 있다.

미세조류와 공생하는 종속영양세균 종류는 서식하는 환경에 따라 다르며, 동일한 종일지라도 상호작용 특성이 변화할 수 있다. 따라서 여러 산업 분야에 미세조류의 활용과 응용 범위를 확대시키기 위해서는 더욱 다양한 종속영양세균의 특성 규명 및 이들 사이의 상호작용을 이해하는 것이 중요하다. 또한, 새로운 종속영양세균에 대한 특성 규명이 지속적으로 이루어져야 한다.

본 연구에서는 다양한 환경(자연 환경, 산업 시설 등)에서 미세조류와 종속영양세균 사이의 상호작용을 이해하고 종속영양세균의 다양성을 확보하기 위해 산림, 갯벌, 습지에서 샘플을 채취하여 종속영양세균을 분리하였으며, 갯벌 토양에서 혼합영양생물(mixotrophs) 특성을 가진 미세조류 *Chlorella* sp. MF1907를 분리하였다. MF1907과 서로 다른 속(genus)에 속하는 31종의 종속영양세균의 공배양(co-culture)을 통해 MF1907의 광합성 활성에 미치는 종속영양세균의 영향을 규명하였다.

## 재료 및 방법

### 종속영양세균 분리 및 동정

본 연구에서는 금정산(부산 금정구)의 산림 토양, 울포와 탐포(경남 거제시)의 갯벌 토양, 용화실못(충남 서천군)의 습지 토양을 채취하여 토양 및 해양 유래 종속영양세균을 분리하였다.

환경 샘플 1 g과 0.9% NaCl 용액 5 ml를 혼합하여 1시간 동안 200 rpm으로 교반한 후 1 ml의 상등액을 취하여  $10^{-6}$ 까지 연속 희석하였다. 희석액 120  $\mu$ l를 0.1 g·l<sup>-1</sup>의 R2A 고체 배지(MB cell, KisanBio Co., Ltd., Korea)에 분주한 후 평판 도말하고 30°C에서 배양하였다. 색, 모양, 투명도, 광택 유무, margin, elevation, ingrowing 여부를 판단하여 서로

다른 콜로니를 선별하였다. 선별된 콜로니를 1 g·l<sup>-1</sup>의 R2A 고체배지에서 3회에 걸쳐 계대배양을 수행하였으며 순수 콜로니를 획득하였다. 콜로니를 동정하기 위해 HiGene Genomic DNA prep kit (BIOFACT Co., Ltd., Korea)를 이용하여 DNA를 추출하였다. 16S rRNA 유전자를 증폭하기 위해 primer 341f (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3')와 907r (5'-CCGTCAATTCCTTTTRAGTTT-3')을 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR 증폭 산물은 MG PCR purification kit (Cancerrop Inc., Korea)을 이용하여 정제한 후, Macrogen (Korea)사에 의뢰하여 염기서열을 획득하였다. Clustal X 프로그램을 이용하여 상보적으로 일치하는 염기서열을 분석한 후, National Center for Biotechnology Information(NCBI)의 Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)에서 등록된 균주들과의 상동성을 비교하여 균을 동정하였다.

### 미세조류 분리 및 동정

미세조류는 탐포 갯벌 토양으로부터 분리하였으며, 분리 과정은 균 분리 및 동정에서 기술한 바와 동일하게 수행하였다. 미세조류는 R2A 고체 배지에서 녹색의 콜로니를 형성하였으며, 모양은 irregular, margin은 undulate, elevation은 flat의 형태학적 특성을 나타내었다. 순수 콜로니로부터 DNA를 추출하고 추출한 DNA를 template로 하여 PCR을 수행하였다. 18S rRNA 유전자와 ITS(internal transcribed spacer)의 partial sequence를 확인하여 미세조류를 동정하였다. 18S rRNA 유전자를 증폭하기 위해 primer 1132f (5'-AYTTRAAGDAATTGACGG-3')와 1423r(5'-GGGCAT YWCDGACCTGTT-3')을 사용하였으며, ITS 영역 증폭을 위해 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')과 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')를 사용하여 PCR을 수행하였다. 염기서열을 획득한 후 NCBI의 BLAST에서 등록된 정보와 비교한 결과 18S rRNA 유전자와 ITS 영역 모두에서 *Chlorella* sp.와 가장 높은 상동성을 나타냈으며, 본 연구에서는 *Chlorella* sp. MF1907로 명명하였다.

### 미세조류 및 종속영양세균 배양 조건

본 연구에서는 직접 분리한 미세조류 1종과 29종의 종속영양세균, 구입한 2종의 종속영양세균을 이용하여 실험을 수행하였다. MF1907은 독립영양조건하에 배양하기 위해 530 ml 혈청병(serum bottle)에 100 ml의 배지와 1 ml의 집종원을 분주한 후, 병 입구를 부틸 고무마개로 밀봉하였다. CO<sub>2</sub> 가스를 최종 농도 50,000 ppm이 되도록 주입하였으며, 광도 4,000 lux(24L:0D), 온도 30°C, 200 rpm 조건에서 배양하였다. 주기적으로 계대배양을 수행하여 MF1907의 순수 배양액 상태를 유도하였다. MF1907의 배지 조성은 다음과 같다[20]; KNO<sub>3</sub> 1000 mg·l<sup>-1</sup>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 250 mg·l<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub>·

7H<sub>2</sub>O 250 mg·l<sup>-1</sup>, NaCl 100 mg·l<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 10 mg·l<sup>-1</sup>, EDTA-NA 16 mg·l<sup>-1</sup>, Fe solution(FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2 mg·l<sup>-1</sup>), Trace mineral composition(H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 2.86 mg·l<sup>-1</sup>, MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 1.30 mg·l<sup>-1</sup>, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 3.20 mg·l<sup>-1</sup>, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 1.83 mg·l<sup>-1</sup>, NaMoO<sub>4</sub> 0.021 mg·l<sup>-1</sup>). 종속영양세균을 배양하기 위해 1 g·l<sup>-1</sup>의 R2A 배지를 사용하였으며 30°C, 200 rpm에서 배양하였다.

### ***Chlorella* sp. MF1907 활성 및 성장 특성**

MF1907의 활성과 성장 특성을 규명하기 위해 독립영양조건(autotrophic condition)과 종속영양조건(heterotrophic condition)에서 실험을 수행하였다. 각 영양 조건에서 MF1907의 CO<sub>2</sub> 동화 및 CO<sub>2</sub> 생성 활성을 분석하기 위해 MF1907의 농화배양액을 회수하여 원심분리 후 상등액을 제거하고 MF1907 배양 배지를 이용하여 현탁하였다. 배양액 1 ml을 유리 섬유 여과지(Glass microfiber filters GF5 grade, CHMLAB, Spain)에 감압 여과하고 105°C에서 2시간 동안 건조 후 건조 균체량(dry cell weight)을 측정하였다. MF1907의 배양액을 최종 농도 1 g·l<sup>-1</sup>로 희석시킨 후 110 ml 혈청병에 20 ml을 분주하였다. 독립영양조건에서는 CO<sub>2</sub>를 농도별(1, 3, 5, 7, 9%)로 주입하고, 광도 4,000 lux (24L:0D), 온도 30°C, 200 rpm에서 배양하였다. 종속영양조건에서는 1, 3, 5, 7, 9%의 CO<sub>2</sub> 농도에 상응하는 카본 농도로써 포도당(glucose)을 농도별(0.195, 0.586, 0.977, 1.368, 1.759 g·l<sup>-1</sup>)로 공급하고, 빛을 차단하여 30°C, 200 rpm에서 배양하였다. 주기적으로 혈청병 상부 가스를 0.3 ml 채취하여 가스 크로마토그래피를 이용해 CO<sub>2</sub> 농도를 측정하여 MF1907의 CO<sub>2</sub> 동화 및 CO<sub>2</sub> 생성 활성을 분석하였다.

MF1907의 성장 특성을 관찰하기 위해 배양액 농도를 680 nm의 파장에서 흡광도 0.01이 되도록 희석하였다. 각 영양 조건은 CO<sub>2</sub> 동화 및 CO<sub>2</sub> 생성 활성 분석 실험과 동일하게 진행하였으며, UV-1800 spectrophotometer(Shimadzu Corp., Japan)를 이용해서 680 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 MF1907의 성장 특성을 분석하였다.

### ***Chlorella* sp. MF1907과 종속영양세균의 공배양**

MF1907의 광합성 활성에 미치는 종속영양세균의 영향을 규명하기 위해 배양액 비율(1:9, 1:99)을 조절하여 총 세 번의 실험을 수행하였다. 첫번째 실험은 MF1907과 종속영양세균의 비율을 1:9로 혼합하여 수행하였다. MF1907과 종속영양세균의 농화배양액을 회수하여 원심분리 후 상등액을 제거하고 MF1907 배양 배지를 이용하여 현탁하였다. 각 배양액 1 ml을 유리 섬유 여과지(Glass microfiber filters GF5 grade)를 이용해 감압 여과하였다. 105°C에서 2시간 동안 건조 후 건조 균체량(dry cell weight)을 측정하였다. 각 배

양액은 최종 농도 0.1 g·l<sup>-1</sup>로 희석시킨 후 1:9 비율로 혼합하여 110 ml 혈청병에 20 ml을 분주하였으며, 대조군은 종속영양세균의 첨가없이 MF1907의 배지를 혼합하여 110 ml 혈청병에 20 ml을 분주하였다. 혈청병의 입구를 부틸 고무마개로 밀봉하고 CO<sub>2</sub> 가스를 최종 농도 50,000 ppm이 되도록 주입한 후, 광도 4,000 lux(24L:0D), 온도 30°C, 200 rpm 조건에서 배양하였다. 주기적으로 혈청병 상부 가스를 0.3 ml 채취하여 가스 크로마토 그래피를 이용해 CO<sub>2</sub> 농도를 측정하였다.

두 번째 실험은 1:9 비율의 실험 결과를 바탕으로 MF1907의 광합성 활성에 미치는 종속영양세균의 밀도 의존(density dependent)적 영향을 규명하기 위해 1:99 비율의 혼합 배양액을 제조하였다. 실험 조건은 첫번째 1:9 비율의 실험 과정과 모두 동일하며 각 배양액 농도를 0.01 g·l<sup>-1</sup>로 희석한 후 MF1907과 종속영양세균을 1:99 비율로 혼합하였다.

세 번째 실험에서는 혼합영양생물 특성을 가진 MF1907의 종속영양활성(heterotrophic activity)에서 독립영양활성(autotrophic activity)으로의 전환에 미치는 종속영양세균의 영향을 알아보려고 하였다. 첫 번째와 두 번째 실험 결과를 바탕으로 MF1907의 활성에 유의미한 영향을 미친 16종의 종속영양세균을 선택하였다. MF1907의 종속영양 배양을 위해 1 g·l<sup>-1</sup>의 R2A 배지를 사용하였으며, 30°C, 200 rpm 조건에서 배양하였다. 5일 동안 배양시킨 MF1907 배양액을 회수하여 원심 분리를 진행하고 상등액 제거 후 MF1907 배양 배지로 현탁하였다. 종속영양세균과 실험 준비 과정은 첫 번째 실험과 모두 동일하며 최종 농도 0.1 g·l<sup>-1</sup>로 희석시킨 배양액을 1:9 비율로 혼합하였다. 실험은 모든 조건에서 3반복으로 수행하였다.

CO<sub>2</sub> 농도는 가스 크로마토그래피(GC-2010 plus, Shimadzu)를 이용하여 측정하였다. 컬럼 Rt-Q-BOND(30 m × 0.53 mm × 20 μm, Restek, USA)와 열전도성 검출기(thermal conductivity detector)를 장착하였고, 분석조건은 오븐 온도 50°C, 주입부 100°C, 검출기 150°C로 설정하였다. 이동상 가스로 헬륨(유량 3 ml·min<sup>-1</sup>, 25 kPa 압력)을 사용하였다. 유리주사기(gas-tight syringe)를 이용하여 혈청병 상부 가스를 0.3 ml 채취하여 초기 CO<sub>2</sub> 주입 농도와 혈청병 내 잔류 농도를 측정하였다. CO<sub>2</sub> 동화 속도는 다음 식을 이용하여 계산하였다; CO<sub>2</sub> assimilation rate = (C<sub>t=0</sub> - C<sub>t</sub>)/Δt(C는 혈청병 내 상부 CO<sub>2</sub> mole 수). 대조군 대비 공배양의 CO<sub>2</sub> 동화 비율(CO<sub>2</sub> assimilation ratio)은 공배양의 CO<sub>2</sub> 동화 속도 값에서 대조군의 CO<sub>2</sub> 동화 속도 값을 나누어 계산하였다(Figs. 3-5). 대조군의 평균값(n = 3)을 1로 설정했으며 CO<sub>2</sub> 동화 비율이 1보다 크면 종속영양세균이 MF1907의 광합성 활성을 증가 시킴을 나타내며 1보다 작으면 종속영양세균이 MF1907의 광합성 활성을 저해함을 나타낸다.

## 결 과

### 미세조류 및 종속영양세균의 동정

환경샘플로부터 241종의 순수 콜로니를 분리하였으며, 형태학적으로 다른 특징을 보인 82종의 콜로니를 선별하여 염기서열을 분석한 결과, 서로 다른 속(genus)에 속하는 29종의 종속영양세균(heterotrophic bacteria)과 1종의 미세조류를 획득하였다(Table 1). 29종의 종속영양세균 중 14종 (*Agromyces*, *Microbacterium*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Pedobacter*, *Mucilaginibacter*, *Bacillus*, *Tumebacillus*,

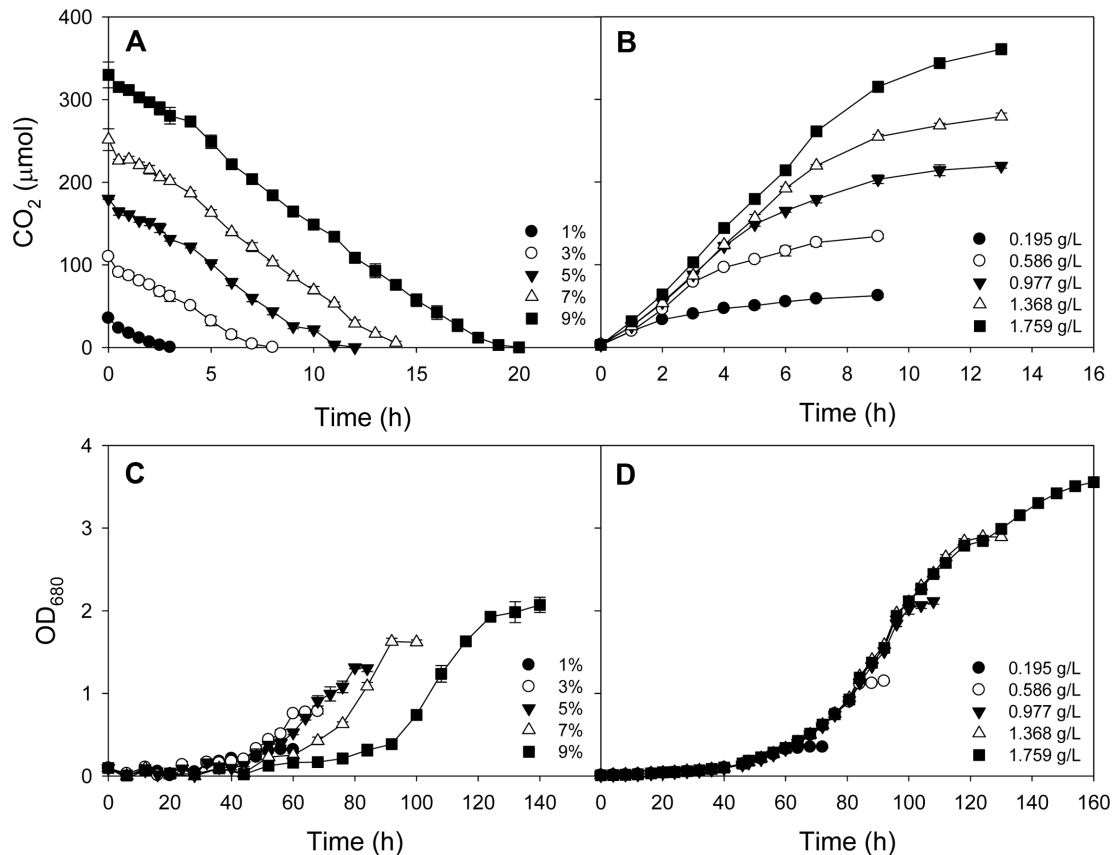
*Sphingopyxis*, *Novosphingobium*, *Hyphomicrobium*, *Burkholderia*, *Paraburkholderia*, *Dyella*)은 산림 토양에서 분리되었으며, 13종(*Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Mycolicibacterium*, *Micromonospora*, *Deinococcus*, *Fictibacillus*, *Sphingomonas*, *Erythrobacter*, *Microvirga*, *Rhizobium*, *Rhodobacter*, *Pseudomonas*)은 갯벌 토양에서 분리되었다. 2종(*Acinetobacter*, *Enterobacter*)은 습지 토양에서 분리되었으며 2종(*Escherichia*, *Staphylococcus*)은 한국생명공학연구원 생물자원센터(<https://kctc.kribb.re.kr>)에서 구입하여 총 31개의 종속영양세균을 획득하였다.

**Table 1. List of heterotrophic bacteria isolated from various environments.**

No.	Isolates	Closest match genus	Source	Effect <sup>a</sup>
1	FS01	<i>Agromyces</i> sp.	Forest soil	+
2	NM2	<i>Microbacterium</i> sp.	Soil	o
3	MF01	<i>Micrococcus</i> sp.	Mud flat	-
4	MF02	<i>Arthrobacter</i> sp.	Mud flat	-
5	MF03	<i>Mycobacterium</i> sp.	Mud flat	-
6	MF04	<i>Mycolicibacterium</i> sp.	Mud flat	o
7	FS03	<i>Rhodococcus</i> sp.	Forest soil	+
8	MF05	<i>Micromonospora</i> sp.	Mud flat	o
9	FS04	<i>Streptomyces</i> sp.	Forest soil	-
10	FS05	<i>Pedobacter</i> sp.	Forest soil	-
11	FS06	<i>Mucilaginibacter</i> sp.	Forest soil	-
12	MF06	<i>Deinococcus</i> sp.	Mud flat	o
13	FS07	<i>Bacillus</i> sp.	Forest soil	o
14	MF07	<i>Fictibacillus</i> sp.	Mud flat	-
15	FS08	<i>Tumebacillus</i> sp.	Forest soil	-
16	-	<i>Staphylococcus warneri</i>	KCTC <sup>b</sup>	o
17	NM1	<i>Sphingopyxis</i> sp.	Soil	-
18	MF08	<i>Sphingomonas</i> sp.	Mud flat	+
19	FS10	<i>Novosphingobium</i> sp.	Forest soil	o
20	MF09	<i>Erythrobacter</i> sp.	Mud flat	-
21	NM3	<i>Hyphomicrobium</i> sp.	Soil	+
22	MF10	<i>Microvirga</i> sp.	Mud flat	o
23	MF11	<i>Rhizobium</i> sp.	Mud flat	+
24	MF12	<i>Rhodobacter</i> sp.	Mud flat	o
25	FS12	<i>Burkholderia</i> sp.	Forest soil	-
26	FS13	<i>Paraburkholderia</i> sp.	Forest soil	-
27	YS01	<i>Acinetobacter</i> sp.	Wetland soil	o
28	MF13	<i>Pseudomonas</i> sp.	Mud flat	+
29	-	<i>Escherichia coli</i>	KCTC <sup>b</sup>	o
30	YS02	<i>Enterobacter</i> sp.	Wetland soil	o
31	FS14	<i>Dyella</i> sp.	Forest soil	o

<sup>a</sup>Effect of isolates on phototrophic activity of *Chlorella* sp. MF1907 at a ratio of 1:9. + positive effect; - negative effect; o neutral.

<sup>b</sup>The strain was purchased from the Korean Collection for Type Cultures (KCTC).



**Fig. 1. Activity and growth of *Chlorella* sp. MF1907 under phototrophic and heterotrophic conditions.** (A) CO<sub>2</sub> assimilation of MF1907 at different CO<sub>2</sub> concentrations; (B) CO<sub>2</sub> production of MF1907 at different glucose concentrations; (C) growth of MF1907 at different CO<sub>2</sub> concentrations; (D) growth of MF1907 at different glucose concentrations.

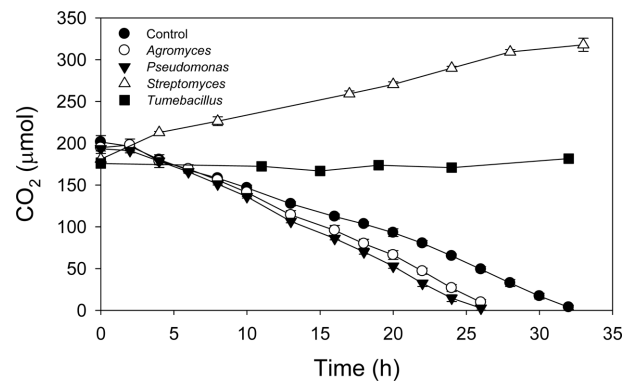
### *Chlorella* sp. MF1907의 활성 및 성장 특성

독립영양조건과 종속영양조건에서 MF1907의 활성 및 성장 특성을 분석하였다(Fig. 1). 두 조건 모두에서 MF1907은 성장이 가능하며 독립영양조건 보다 종속영양조건에서 더 높은 성장률을 보여주었다. 종속영양조건에서 포도당 농도별 0.195 g·l<sup>-1</sup>에서 OD<sub>680</sub> = 0.35 ± 0.01, 0.586 g·l<sup>-1</sup>에서 OD<sub>680</sub> = 1.15 ± 0.01, 0.977 g·l<sup>-1</sup>에서 OD<sub>680</sub> = 2.11 ± 0.03, 1.368 g·l<sup>-1</sup>에서 OD<sub>680</sub> = 2.89 ± 0.04, 1.759 g·l<sup>-1</sup>에서 OD<sub>680</sub> = 3.56 ± 0.02를 나타내었다. 독립영양조건에서 CO<sub>2</sub> 농도 1%에서 OD<sub>680</sub> = 0.32 ± 0.02, 3%에서 OD<sub>680</sub> = 0.78 ± 0.03, 5%에서 OD<sub>680</sub> = 1.30 ± 0.04, 7%에서 OD<sub>680</sub> = 1.62 ± 0.03, 9%에서 OD<sub>680</sub> = 2.07 ± 0.09를 나타내었다.

### *Chlorella* sp. MF1907의 광합성 활성에 미치는 4종의 종속영양세균의 영향

MF1907과 종속영양세균의 1:9 비율의 공배양 결과를 바탕으로 MF1907의 광합성 활성에 긍정적인 영향(positive effect)과 부정적인 영향(negative effect)을 미친 주요 4종을

선택하였다(Fig. 2). *Agromyces*와 *Pseudomonas*는 MF1907의 광합성 활성을 증가시켰다. 24시간 기준으로 MF1907과 *Agromyces*의 공배양에서 대조군 대비 31.65 ± 2.98 μmol의 CO<sub>2</sub>를 더 소모하였으며( $p < 0.05$ ), *Pseudomonas*와의 공배



**Fig. 2. CO<sub>2</sub> assimilations of co-cultures.** *Chlorella* sp. MF1907 and *Agromyces* sp. FS01, *Pseudomonas* sp. MF13, *Streptomyces* sp. FS04, or *Tumebacillus* sp. FS08 were mixed at a ratio of 1:9 (n = 3).

양에서 대조군 대비  $42.41 \pm 6.16 \mu\text{mol}$ 의  $\text{CO}_2$ 를 더 소모하였다( $p < 0.05$ ). 반면에 *Tumebacillus*와 *Streptomyces*는 MF1907의 광합성 활성을 저해하였다. MF1907과 *Tumebacillus*의 공배양에서 24시간 동안 대조군 대비  $\text{CO}_2$  동화가 일어나지 않았으며( $p < 0.05$ ), MF1907과 *Streptomyces*의 공배양에서  $108.92 \pm 1.98 \mu\text{mol}$ 의  $\text{CO}_2$ 가 추가 생성되는 결과를 나타내었다( $p < 0.05$ ).

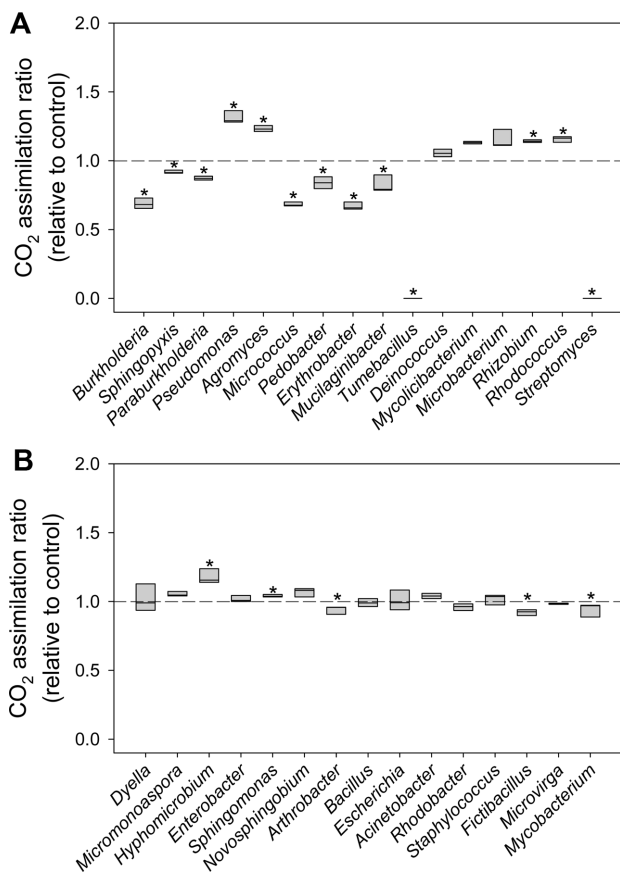
**Chlorella sp. MF1907의 광합성 활성에 미치는 종속영양세균의 영향(1:9 비율)**

1:9 비율의 공배양 조건에서 MF1907의 광합성 활성에 미치는 종속영양세균의 영향을 규명하였다(Fig. 3). 총 31종의 종속영양세균 중 6종(*Agromyces*(대조군 대비 1.23배), *Rhodococcus*(1.16배), *Sphingomonas*(1.04배), *Hyphomicrobium*(1.18배), *Rhizobium*(1.14배), *Pseudomonas*(1.31배))은 MF1907의 광합성 활성을 증가시켰다( $p < 0.05$ ). 12종(*Burkholderia*(대조군 대비 0.69배), *Paraburkholderia*(0.87배),

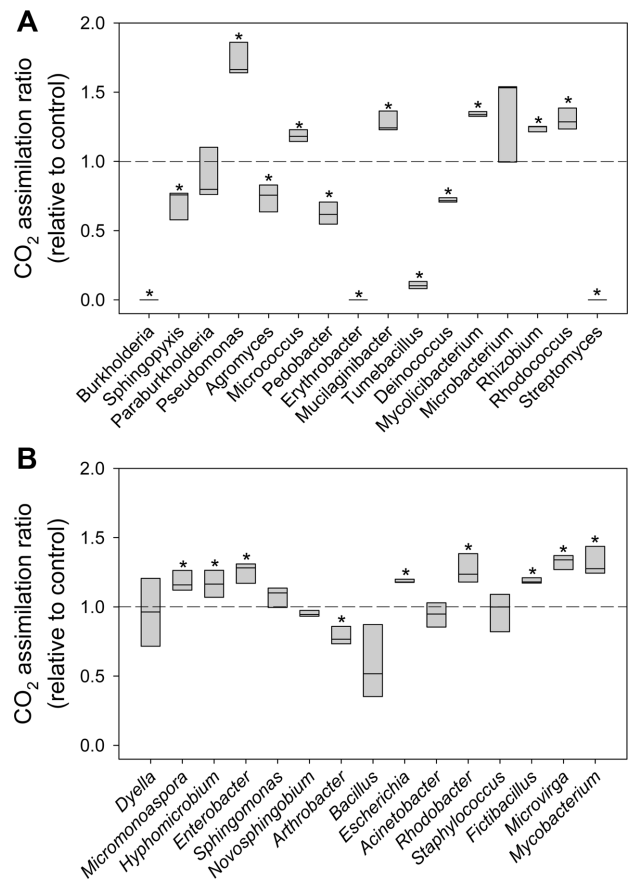
*Micrococcus*(0.68배), *Arthrobacter*(0.94배), *Mycobacterium*(0.94배), *Pedobacter*(0.84배), *Mucilaginibacter*(0.82배), *Fictibacillus*(0.92배), *Sphingopyxis*(0.92배), *Erythrobacter*(0.67배), *Streptomyces*, *Tumebacillus*)은 MF1907의 광합성 활성을 저해하였다( $p < 0.05$ ). *Streptomyces*와 *Tumebacillus*를 MF1907과 혼합한 각 공배양에서  $\text{CO}_2$ 가 추가 생성되었다. 13종(*Deinococcus*, *Microbacterium*, *Mycolicibacterium*, *Micromonospora*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Novosphingobium*, *Microvirga*, *Rhodobacter*, *Acinetobacter*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Dyella*)은 MF1907의 광합성 활성에 유의미한 영향을 미치지 않았다( $p > 0.05$ ).

**Chlorella sp. MF1907의 광합성 활성에 미치는 종속영양세균의 영향(1:99 비율)**

1:9 비율의 실험 결과를 바탕으로 MF1907의 광합성 활성에 미치는 종속영양세균의 밀도 의존(density dependent)적 영향을 규명하기 위해 1:99 비율의 공배양 조건에서 실험을 수행



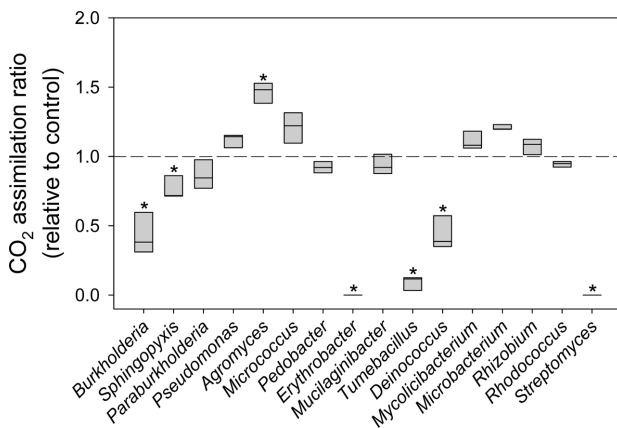
**Fig. 3. Comparison of  $\text{CO}_2$  assimilation ratios of 1:9 co-cultures (relative to control).** *Chlorella* sp. MF1907 was mixed with each bacterium at a ratio of 1:9 ( $n = 3$ ).



**Fig. 4. Comparison of  $\text{CO}_2$  assimilation ratios of 1:99 co-cultures (relative to control).** *Chlorella* sp. MF1907 was mixed with each bacterium at a ratio of 1:99 ( $n = 3$ ).

하였다(Fig. 4). 총 31종의 종속영양세균 중 14종(*Pseudomonas* (대조군 대비 1.72배), *Rhizobium*(1.24배), *Micromonospora* (1.18배), *Hyphomicrobium*(1.17배), *Rhodococcus*(1.30배), *Enterobacter*(1.25배), *Mycolicibacterium* (1.34배), *Escherichia* (1.19배), *Micrococcus*(1.18배), *Rhodobacter*(1.27배), *Fictibacillus*(1.19배), *Microvirga*(1.33배), *Mucilaginibacter* (1.28배), *Mycobacterium*(1.32배))은 MF1907의 광합성 활성을 증가시켰으며( $p < 0.05$ ), 9종(*Agromyces*(0.74배), *Deinococcus* (0.72배), *Sphingopyxis*(0.70배), *Arthrobacter*(0.79배), *Pedobacter*(0.62배), *Tumebacillus*(0.11배), *Burkholderia*, *Erythrobacter*, *Streptomyces*)은 MF1907의 광합성 활성을 저해하였다( $p < 0.05$ ). *Burkholderia*, *Erythrobacter*, *Streptomyces*를 MF1907과 혼합한 각 공배양에서는 CO<sub>2</sub>가 추가 생성되었다. 8종(*Dyella*, *Sphingomonas*, *Novosphingobium*, *Bacillus*, *Paraburkholderia*, *Acinetobacter*, *Microbacterium*, *Staphylococcus*)은 MF1907의 광합성 활성에 유의미한 영향을 미치지 않았다( $p > 0.05$ ).

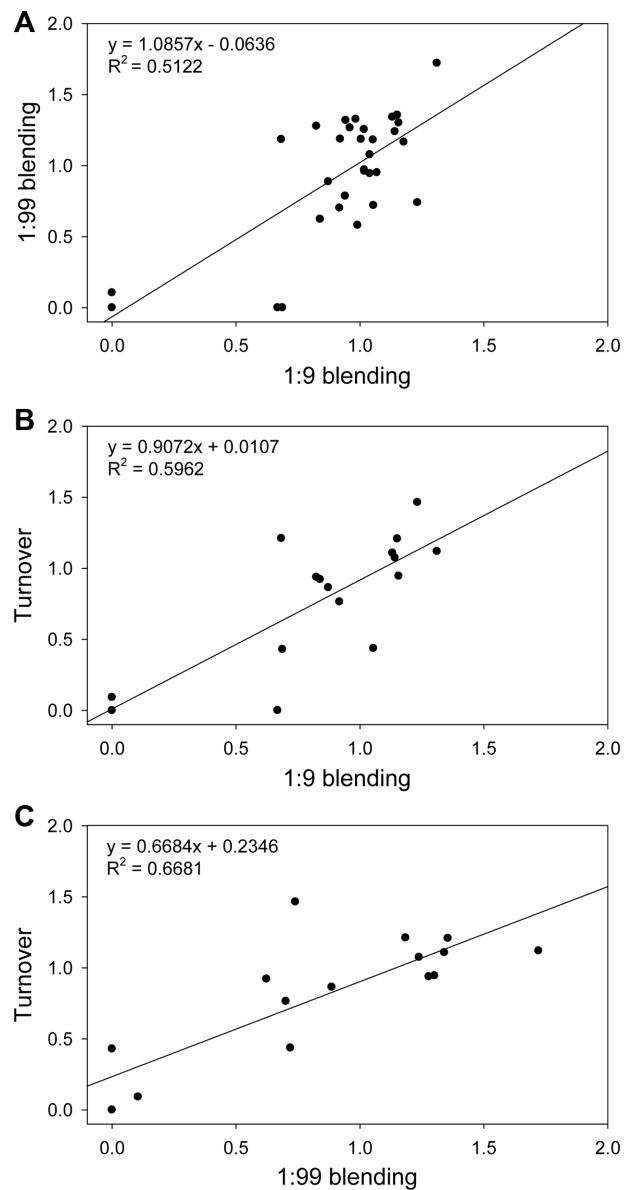
1:9 비율의 공배양 결과와 비교해서, MF1907의 광합성 활성에 유의미한 영향을 미치지 않았던 7종의 종속영양세균 중 6종(*Enterobacter*, *Escherichia*, *Mycolicibacterium*, *Rhodobacter*, *Micromonospora*, *Microvirga*)은 1:99 비율에서 MF1907의 광합성 활성을 증가시켰으며( $p < 0.05$ ), *Deinococcus*는 MF1907의 광합성 활성을 저해하였다( $p < 0.05$ ). 1:9 비율에서 MF1907의 활성을 증가시킨 *Sphingomonas*와 MF1907의 활성을 저해한 *Paraburkholderia*는 1:99 비율에서 유의미한 영향을 나타내지 않았다. 1:9 비율에서 MF1907의 활성을 증가시킨 *Agromyces*와 MF1907의 활성을 저해한 4종(*Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Fictibacillus*, *Mucilaginibacter*)은 1:99 비율에서 반대되는 결과를 보여주었다.



**Fig. 5. Comparison of CO<sub>2</sub> assimilation ratios of 1:9 co-cultures (relative to control) when *Chlorella* sp. MF1907 shifted from heterotrophy to autotrophy (turnover experiment).** MF1907 was mixed with each bacterium at a ratio of 1:9 (n = 3).

### *Chlorella* sp. MF1907의 활성 전환에 미치는 종속영양세균의 영향

MF1907과 종속영양세균의 공배양 결과를 바탕으로 16종의 종속영양세균을 선택하여 이들이 MF1907의 종속영양에서 독립영양으로의 활성 전환에 미치는 영향을 규명하였다(Fig. 5). 16종의 종속영양세균 중 *Agromyces*(대조군 대비 1.46배)는 MF1907의 종속영양에서 독립영양으로의 활성 전환을 증가시켰으며( $p < 0.05$ ), 6종(*Burkholderia*, *Sphingopyxis*, *Erythrobacter*, *Tumebacillus*, *Deinococcus*, *Streptomyces*)



**Fig. 6. Relationship among the effects of heterotrophic bacteria in 1:9, 1:99 and turnover experiments.** (A) 1:9 ratio vs. 1:99 ratio; (B) 1:9 ratio vs. turnover; and (C) 1:99 ratio vs. turnover.

은 MF1907의 활성 전환에 부정적인 영향을 미쳤다 ( $p < 0.05$ ). 나머지 9종(*Paraburkholderia*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Pedobacter*, *Mucilaginibacter*, *Mycolicibacterium*, *Microbacterium*, *Rhizobium*, *Rhodococcus*)은 MF1907의 활성 전환에 유의미한 영향을 미치지 않았다( $p > 0.05$ ).

1:9 비율의 공배양 실험 결과와 비교해서, MF1907의 광합성 활성을 증가시킨 3종(*Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodococcus*)과 MF1907의 광합성 활성을 저해한 4종(*Paraburkholderia*, *Micrococcus*, *Pedobacter*, *Mucilaginibacter*)은 MF1907의 활성 전환에 유의미한 영향을 미치지 않았으며, 공배양에서 유의미한 영향을 미치지 않았던 *Deinococcus*는 MF1907의 활성 전환을 저해하였다( $p < 0.05$ ).

총 3회 수행한 결과를 바탕으로 각 실험 결과 사이의 상관관계를 분석하였다(Fig. 6). 1:9와 1:99 비율 사이의 결과 값(Fig. 6A), 1:9 비율과 MF1907의 활성 전환 사이의 결과 값(Fig. 6B), 1:99 비율과 MF1907의 활성 전환 사이의 결과 값(Fig. 6C)은 모두 양의 상관관계(positive correlation)를 보여주었다.

## 고 찰

본 연구에서는 다양한 환경 샘플로부터 미생물을 분리하고 동정하였으며, 1종의 미세조류와 31종의 종속영양세균을 획득하였다(Table 1). *Chlorella* sp. MF1907은 독립영양조건과 종속영양조건 모두에서 성장이 가능하며(Fig. 1), *Chlorella* sp.의 혼합영양생물 특성은 다른 연구에서도 보고되고 있다[6, 21]. 본 연구에서는 실험 시작 140시간 경과 시점에 가장 높은  $\text{CO}_2$ (9%) 및 포도당( $1.759 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ) 농도에서 각각  $\text{OD}_{680} = 2.07 \pm 0.09$ ,  $\text{OD}_{680} = 3.30 \pm 0.04$ 를 나타냈으며 종속영양조건에서 1.5배 더 높은 성장률을 보여주었다. 이와 유사하게 *Chlorella protothecoides*는 독립영양조건보다 종속영양조건에서 더 많은 바이오매스를 생성한다고 보고되었다[21].

MF1907과 각 종속영양세균의 공배양을 통해 MF1907의 광합성 활성에 미치는 종속영양세균의 영향을 규명하였다. MF1907과 각각의 종속영양세균을 1:9 비율로 혼합하여, 종속영양세균이 MF1907의 광합성 활성에 미치는 영향을 관찰한 결과(Fig. 3), 31종 중 6종은 MF1907의 광합성 활성을 증가시켰으며( $p < 0.05$ ), 12종은 MF1907의 광합성 활성을 저해하였다( $p < 0.05$ ). 하지만 13종은 MF1907의 광합성 활성에 유의미한 영향을 미치지 않았다. 특히, *Agromyces*와 *Pseudomonas*는 MF1907의  $\text{CO}_2$  동화 속도( $\text{CO}_2$  assimilation rate)를 크게 증가시켰다( $p < 0.05$ ). *Agromyces*와 MF1907의 공배양에서  $\text{CO}_2$  동화 속도는  $350.0 \pm 6.2 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ 으로 대조군 대비 23.2% 증가하였다( $p < 0.05$ ). *Pseudomonas*와

MF1907의 공배양에서  $\text{CO}_2$  동화 속도는  $372.4 \pm 12.8 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ 를 나타냈으며, 대조군 대비 31.1% 증가하였다( $p < 0.05$ ). *Agromyces*와 *Pseudomonas*는 미세조류의 성장과 광합성 활성을 촉진하는 미생물로 관찰된다. 이와 유사하게 광독립영양조건에서 *Pseudomonas* sp.는 *C. vulgaris*의 바이오매스를 1.4배 증가시켰다[11]. 또한 다른 연구 결과에 따르면 *Pseudomonas composti*는 미세조류의 성장뿐만 아니라 지질 생성을 증가시켰다[22]. 따라서 *Pseudomonas*는 미세조류의 활성과 성장뿐만 아니라 지질 생성에도 영향을 미칠 수 있다. 반면에 *Erythrobacter*, *Streptomyces*, *Tumebacillus*는 MF1907의 광합성 활성을 강하게 저해하였다( $p < 0.05$ ). *Tumebacillus*와 MF1907의 공배양에서 대조군 대비  $\text{CO}_2$ 는 동화되지 않았으며( $p < 0.05$ ), *Streptomyces*와 MF1907의 공배양에서  $\text{CO}_2$ 가 추가 생성되었다. 다른 연구 결과에 따르면 *Streptomyces* sp.는 살조 작용을 하는 물질을 생성할 수 있으며[16, 17], 살조 활성(algicidal activity)을 나타낸다고 보고된다[23]. 또한, *Streptomyces* sp.는 항생물질인 streptomycin을 생성하며[24], 이 물질은 *C. vulgaris*의 성장을 저해하고 활성에도 영향을 미친다고 보고되었다[18, 25]. 따라서 본 연구에서 *Streptomyces*는 MF1907의 성장과 광합성 활성을 저해하는 살조 세균(algicidal bacterium)으로써 역할을 했을 것이다.

MF1907과 각 종속영양세균을 1:99 비율로 혼합하여, 종속영양세균이 MF1907의 광합성 활성에 미치는 영향을 관찰한 결과(Fig. 4), 1:9 비율의 공배양에서 MF1907의 광합성 활성에 유의미한 영향을 미치지 않았던 7종은 1:99 비율에서 유의미한 영향을 미쳤다. 이들은 농도가 높아지면 미세조류의 활성에 영향을 미칠 수 있음을 시사한다. 다른 연구 결과에 따르면 메탄산화세균과 종속영양세균의 공배양에서 종속영양세균의 농도가 높아질수록 메탄산화세균의 성장과 활성이 증가되었다[26]. 반대로 1:9 비율의 공배양에서 MF1907의 광합성 활성에 유의미한 영향을 미친 2종은 1:99 비율에서 MF1907의 광합성 활성에 영향을 주지 않았다. 그리고 5종의 종속영양세균은 1:9 비율과 1:99 비율의 공배양에서 상이한 결과를 나타내었다. 미세조류의 광합성 활성에 미치는 종속영양세균의 영향은 이들의 바이오매스 농도에 따라 달라질 것이라 추측된다.

MF1907의 종속영양에서 독립영양활성으로의 전환에 미치는 종속영양세균의 영향을 관찰한 결과(Fig. 5), 일부 종은 1:9 비율의 공배양 실험 결과와 상이한 결과를 나타내었다. MF1907의 광합성 활성을 증가시킨 3종(*Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodococcus*)과 MF1907의 광합성 활성을 저해한 4종(*Paraburkholderia*, *Micrococcus*, *Pedobacter*, *Mucilaginibacter*)은 MF1907의 활성 전환에 유의미한 영향을 미치지 않았으며, 공배양에서 유의미한 영향을 미치지 않



은 *Deinococcus*는 MF1907의 활성 전환을 저해하였다( $p < 0.05$ ). 공배양 실험과 활성 전환 실험에서 일부 종들의 상반되는 결과는 배양 조건에 따라 MF1907의 성장과 활성 특성이 달라졌으며, 이러한 변화가 종속영양세균과의 상호작용에 영향을 미쳤을 것이다. 다른 연구 결과에 따르면 *C. vulgaris*의 바이오매스 및 지질 생산성은 독립영양조건, 종속영양조건, 혼합영양조건에 따라 영향을 받았다[27]. 또한 폐수 처리 시스템에서 배양 조건은 *Chlorella sorokiniana*의 성장 및 유기물 제거 효율에 영향을 미쳤다[28].

본 연구에서는 MF1907의 광합성 활성과 MF1907의 종속영양에서 독립영양활성으로의 전환에 미치는 다양한 종속영양세균의 영향을 규명하였다. 특히, MF1907의 광합성 활성을 크게 증가시킨 *Agromyces*와 *Pseudomonas*는 미세조류의 바이오매스와 활성 증가를 위한 helper organism으로써의 역할을 할 수 있을 것이라 판단된다. 반면에, MF1907의 광합성 활성을 저해한 *Streptomyces*, *Erythrobacter*, *Tumebacillus*는 미세조류의 제어 및 억제를 위해 활용될 수 있음을 시사한다. 본 연구에서는 미세조류의 바이오매스를 향상 또는 제어하기 위한 종속영양세균의 이용 가능성을 제시하였다. 추후 연구에서 연속배양 시스템(continuous culture system)을 구축하고 미세조류와 종속영양세균의 개체군 역학(population dynamics) 분석을 통해 이들의 상호작용 특성을 규명하는 연구가 필요할 것이라 판단된다.

## 요약

다양한 환경에서 미세조류와 종속영양세균(heterotrophic bacteria) 사이의 상호작용은 일반적이다. 본 연구에서는 미세조류 *Chlorella* sp. MF1907와 서로 다른 속(genus)에 속하는 31종의 종속영양세균을 공배양(co-culture)하여 MF1907의 광합성 활성에 미치는 종속영양세균의 영향을 규명하였다. 6종의 종속영양세균(*Agromyces*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas*, *Hyphomicrobium*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*)은 MF1907의 광합성 활성을 증가시켰으며( $p < 0.05$ ), 12종의 종속영양세균(*Burkholderia*, *Paraburkholderia*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Streptomyces*, *Pedobacter*, *Mucilaginitabacter*, *Fictibacillus*, *Tumebacillus*, *Sphingopyxis*, *Erythrobacter*)은 MF1907의 광합성 활성을 저해하였다( $p < 0.05$ ). 종속영양세균 중 MF1907의 광합성 활성에 유의미한 효과(positive, negative, neutral)를 나타낸 16종을 선택하여 MF1907의 종속영양에서 독립영양으로의 활성 전환에 미치는 이들의 영향을 평가하였다. 8종의 종속영양세균은 공배양 결과와 동일하게 MF1907의 종속영양에서 독립영양으로의 활성 전환에 영향을 미쳤다. 하지만 나머지 8종

은 공배양 결과와 MF1907의 종속영양에서 독립영양으로의 활성 전환에 미치는 결과가 반대를 나타내었다. 공배양과 활성 전환 실험 모두에서 일관되게 *Pseudomonas*와 *Agromyces*는 MF1907의 광합성 활성을 강하게 증가시켰으며( $p < 0.05$ ), *Burkholderia*, *Streptomyces*, *Erythrobacter*는 MF1907의 광합성 활성을 강하게 저해하였다( $p < 0.05$ ). 본 연구 결과는 다양한 종속영양세균과 미세조류 사이의 상호작용 이해를 도모하고 종속영양세균을 활용하여 자연 환경과 공정 시스템에서 미세조류의 바이오매스를 조절할 수 있음을 시사한다.

## Acknowledgments

This study was supported by the basic science research program through the National Research Foundation of Korea funded by the Ministry of Education (2018R1D1A1B07048872).

## Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

## References

1. Metting F. 1996. Biodiversity and application of microalgae. *J. Ind. Microbiol.* **17**: 477-489.
2. Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A. 2006. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* **101**: 87-96.
3. Pulz O, Gross W. 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65**: 635-648.
4. Ahmad A, Yasin NM, Derek C, Lim J. 2011. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: a review. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **15**: 584-593.
5. Lv J-M, Cheng L-H, Xu X-H, Zhang L, Chen H-L. 2010. Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. *Bioresour. Technol.* **101**: 6797-6804.
6. Li T, Zheng Y, Yu L, Chen S. 2014. Mixotrophic cultivation of a *Chlorella sorokiniana* strain for enhanced biomass and lipid production. *Biomass Bioenerg.* **66**: 204-213.
7. Xie T, Sun Y, Du K, Liang B, Cheng R, Zhang Y. 2012. Optimization of heterotrophic cultivation of *Chlorella* sp. for oil production. *Bioresour. Technol.* **118**: 235-242.
8. Lee J, Cho D-H, Ramanan R, Kim B-H, Oh H-M, Kim H-S. 2013. Microalgae-associated bacteria play a key role in the flocculation of *Chlorella vulgaris*. *Bioresour. Technol.* **131**: 195-201.
9. Mouget J-L, Dakhama A, Lavoie MC, de la Noüe J. 1995. Algal growth enhancement by bacteria: is consumption of photosynthetic oxygen involved? *FEMS Microbiol. Ecol.* **18**: 35-43.
10. Yao S, Lyu S, An Y, Lu J, Gjermansen C, Schramm A. 2019. Microalgae-bacteria symbiosis in microalgal growth and biofuel production: a review. *J. Appl. Microbiol.* **126**: 359-368.

11. Guo Z, Tong YW. 2014. The interactions between *Chlorella vulgaris* and algal symbiotic bacteria under photoautotrophic and photoheterotrophic conditions. *J. Appl. Phycol.* **26**: 1483-1492.
12. Croft MT, Lawrence AD, Raux-Deery E, Warren MJ, Smith AG. 2005. Algae acquire vitamin B 12 through a symbiotic relationship with bacteria. *Nature* **438**: 90-93.
13. Kim H-J, Choi Y-K, Jeon HJ, Bhatia SK, Kim Y-H, Kim Y-G, *et al.* 2015. Growth promotion of *Chlorella vulgaris* by modification of nitrogen source composition with symbiotic bacteria, *Microbacterium* sp. HJ1. *Biomass Bioenerg.* **74**: 213-219.
14. Mujtaba G, Rizwan M, Lee K. 2017. Removal of nutrients and COD from wastewater using symbiotic co-culture of bacterium *Pseudomonas putida* and immobilized microalga *Chlorella vulgaris*. *J. Ind. Eng. Chem.* **49**: 145-151.
15. Gonçalves AL, Pires JC, Simões M. 2016. Wastewater polishing by consortia of *Chlorella vulgaris* and activated sludge native bacteria. *J. Clean. Prod.* **133**: 348-357.
16. Luo J, Wang Y, Tang S, Liang J, Lin W, Luo L. 2013. Isolation and identification of algicidal compound from *Streptomyces* and algicidal mechanism to *Microcystis aeruginosa*. *PLoS One* **8**: e76444.
17. Zhang B, Cai G, Wang H, Li D, Yang X, An X, *et al.* 2014. *Streptomyces alboflavus* RPS and its novel and high algicidal activity against harmful algal bloom species *Phaeocystis globosa*. *PLoS One* **9**: e92907.
18. Perales-Vela HV, García RV, Gómez-Juárez EA, Salcedo-Álvarez MO, Cañizares-Villanueva RO. 2016. Streptomycin affects the growth and photochemical activity of the alga *Chlorella vulgaris*. *Ecotox. Environ. Safe* **132**: 311-317.
19. Zheng N, Ding N, Gao P, Han M, Liu X, Wang J, *et al.* 2018. Diverse algicidal bacteria associated with harmful bloom-forming *Karenia mikimotoi* in estuarine soil and seawater. *Sci. Total Environ.* **631**: 1415-1420.
20. Mayo AW, Noike T. 1994. Effect of glucose loading on the growth behavior of *Chlorella vulgaris* and heterotrophic bacteria in mixed culture. *Water Res.* **28**: 1001-1008.
21. Heredia-Arroyo T, Wei W, Hu B. 2010. Oil accumulation via heterotrophic/mixotrophic *Chlorella protothecoides*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **162**: 1978-1995.
22. Berthold DE, Shetty KG, Jayachandran K, Laughinghouse IV HD, Gantar M. 2019. Enhancing algal biomass and lipid production through bacterial co-culture. *Biomass Bioenerg.* **122**: 280-289.
23. Somdee T, Sumalai N, Somdee A. 2013. A novel actinomycete *Streptomyces aurantiogriseus* with algicidal activity against the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *J. Appl. Phycol.* **25**: 1587-1594.
24. Waksman SA, Reilly HC, Johnstone DB. 1946. Isolation of streptomycin-producing strains of *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **52**: 393-397.
25. Qian H, Li J, Pan X, Sun Z, Ye C, Jin G, Fu Z. 2012. Effects of streptomycin on growth of algae *Chlorella vulgaris* and *Microcystis aeruginosa*. *Environ. Toxicol.* **27**: 229-237.
26. Jeong S-Y, Cho K-S, Kim TG. 2014. Density-dependent enhancement of methane oxidation activity and growth of *methylocystis* sp. by a non-methanotrophic bacterium *Sphingopyxis* sp. *Biotechnol. Rep.* **4**: 128-133.
27. Liang Y, Sarkany N, Cui Y. 2009. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnol. Lett.* **31**: 1043-1049.
28. Kim S, Park J-E, Cho Y-B, Hwang S-J. 2013. Growth rate, organic carbon and nutrient removal rates of *Chlorella sorokiniana* in autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions. *Biore-sour. Technol.* **144**: 8-13.