

PD5) 유해적조생물 *Cochlodinium polykrikoides*를 살멸하는 *Brachy bacterium* sp. SY-97의 분리 및 특성

김윤숙*, 정성윤¹, 이대성, 이상준², 이원재

부경대학교 미생물학과, ¹부산대학교 한국 Bio-IT 파운드리 센터,
²부산대학교 미생물학과

1. 서 론

연안해역의 부영양화와 환경조건의 변화에 따라 적조 발생이 급격히 증가하여, 수산생물의 대량폐사 등을 일으켜 심각한 어업피해를 야기하고 있다. 적조생물 중 우리나라 연안에서 가장 큰 피해를 일으키는 *Cochlodinium polykrikoides*는 매년 대규모 적조를 유발시켜 크고 작은 피해를 일으키고 있다.

적조구제 물질의 안전성 문제가 대두되면서 최근에는 바이러스, 미생물, 원생동물 등을 이용하는 생물학적 처리방법에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다. 또한 미생물에 의한 적조구제는 대상 적조생물에 대한 특이성이 높아 다른 생물에 미치는 영향을 최소화할 수 있어 환경악화를 방지할 수 있는 장점이 있다.

본 연구에서는 우리나라 연안에서 적조를 일으키는 *C. polykrikoides*에 대한 적조를 구제하는 방법의 일환으로 살조미생물인 *Brachy bacterium* sp. SY-97을 분리하여 특성을 파악하고 *C. polykrikoides*에 대한 살조활성을 조사함으로써 살조미생물을 이용한 적조구제 방법의 기초 연구 자료를 마련하고자 하였다.

2. 재료 및 실험방법

2.1. 살조미생물의 분리

해수 샘플링은 2005년 8월 울진 연안의 적조발생해역에서 표층 해수를 Niskin 개량형 채수기인 MB채수기를 이용하여 멸균한 광구병으로 채취하였다. 미생물은 해수 시료를 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, 초기 pH 7.6) 평판 배지에 평판도말법으로 접종하여 25°C에서 7일간 배양한 후 분리된 colony를 선택하여 순수분리 하였다. 이들 분리균주를 PPES-II 액체배지에 접종하여 25°C에서 2일간 교반배양(200 rpm)하여 *C. polykrikoides* 배양액(1.2×10^4 cells/ml) 900 μ l에 분리균주 배양액 100 μ l를 접종하여 살조활성을 관찰하여 살조미생물을 분리하였다.

2.2. 분리균주의 동정

분리된 살조미생물 SY-97 균주의 분류학적 위치를 검토하기 위하여 MacFaddin과

Gerhardt 등의 방법을 참고하여 형태학적, 생화학적인 특성을 조사하여 1차적으로 분류학적 유사성을 검토하였다. 또한 보다 정확한 동정을 위하여 16S rRNA gene을 이용한 sequencing을 행하였다. 16S rDNA 분석을 통하여 염기서열을 결정된 후, National Center for Biotechnology Information(NCBI)의 GenBank 데이터베이스에서 가장 상동성이 높은 균주와 염기서열을 비교하였으며, MEGA 2.1 package를 이용하여 계통도를 그렸다.

2.3. 분리균주의 *C. polykrikoides*에 대한 살조 유형

본 실험에서 사용한 *C. polykrikoides*는 국립수산물과학원에서 분양받았으며, 순수분리는 Jeong et al.의 방법에 따랐다. 또한 *C. polykrikoides*는 f/2-Si 배지에서 온도 20°C, 광량 120 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$, 광주기 12L:12D로 배양하였다. 살조미생물 SY-97 균주의 *C. polykrikoides*에 대한 살조 유형을 조사하기 위하여 24 well microplate에 pore size 0.2 μm 의 Cell Culture Insert(FALCON, USA)를 삽입한 2조배양계를 이용하였다. Cell Culture Insert 내부에 f/2-Si 배지에서 전배양한 *C. polykrikoides* 배양액(1.2×10^4 cells/ml) 1 ml를 넣고, Cell Culture Insert 외부에는 f/2-Si 배지 1 ml를 넣었다. PPES-II 액체배지에서 배양한 SY-97의 균체(10^4 cells)를 멸균해수로 희석하여 Cell Culture Insert 외부에 1 ml를 넣은 것을 test well로 하였다. 또한 Cell Culture Insert 내부에 SY-97 균주의 균체를 첨가한 well을 positive control로 하였으며, Cell Culture Insert 내부에 SY-97 균주의 균체를 첨가하는 대신에 PPES-II 액체배지만을 첨가하여 배양한 well을 negative control로 하였다. 모든 well은 *C. polykrikoides*의 최적 배양조건에서 배양하여 48시간 후에 살조 유무를 관찰하여 살조 유형을 결정하였다. 이때 미생물 오염 여부는 Cell Culture Insert 내부의 배양액을 취해 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole) 염색 후 형광현미경(Olympus BX40)하에서 직접 관찰하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 살조미생물의 분리 및 동정

분리된 100여종의 미생물 중에서 *C. polykrikoides*와의 혼합배양에서 높은 살조력을 보이는 한 균주를 선별하였다. 선별된 SY-97 균주는 생화학적 테스트 결과와 16S rDNA 염기서열을 분석하여 NCBI GenBank에 등록된 균주들과 유전자간의 상동성을 조사한 결과, *Brachy bacterium paraconglomeratum*과 99% 이상의 가장 높은 상동성을 나타내었다. 따라서 이 균주를 *Brachy bacterium* sp. SY-97로 명명하여 이후의 실험을 진행하였다.

3.2. *Brachy bacterium* sp. SY-97의 살조 유형

Cell Culture Insert 내부에 *C. polykrikoides*와 *Brachy bacterium* sp. SY-97의 균체를 함께 접종한 positive control well에서는 *C. polykrikoides*가 사멸되었지만, 살조미생물 대신에 미생물 배지인 PPES-II 액체배지만을 접종한 negative control well에서는 *C. polykrikoides*가 사멸되지 않았다. *Brachy bacterium* sp. SY-97은 0.2 μm filter에 의해 *C. polykrikoides*와 격리된 상태인 test well에서도 *C. polykrikoides*를 살조시켰다. 따라서

Brachybacterium sp. SY-97은 살조물질을 세포외로 분비하는 살조인자 분비형으로 확인되었다.

3.3. *Brachybacterium* sp. SY-97의 배양여과액 농도별 살조활성

Brachybacterium sp. SY-97의 배양여과액 첨가 농도(1, 5, 10, 15%)에 따른 *C. polykrikoides*의 살조활성을 조사하였다. *Brachybacterium* sp. SY-97 배양여과액을 10, 15%가 되도록 첨가한 경우 *C. polykrikoides*의 개체수가 급격히 감소하였으며, 10%의 경우 15시간 후에 모두 살조되었고, 15%의 경우는 12시간 후에 100% 살조되었다. 5%의 경우 18시간 후에 90% 이상 살조 되었다. 즉, *Brachybacterium* sp. SY-97의 배양여과액의 양에 비례하여 살조활성이 증가하는 경향을 보였다. 또한 배양액을 넣었을 때와 거의 같은 살조활성을 나타내었다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때, *Brachybacterium* sp. SY-97은 살조물질을 생성하여 세포외로 분비하는 것으로 판단된다.

3.4. *C. polykrikoides*의 살조양상

*C. polykrikoides*에 살조미생물 *Brachybacterium* sp. SY-97의 배양여과액만을 *C. polykrikoides*에 접종시켰을 때 살조되는 과정을 광학현미경으로 관찰하였다. *C. polykrikoides*의 유영세포는 1시간 이내에 운동성을 상실하고 정지하였으며, 체인이 끊어진 후 2시간 이내에 점차 세포 선단의 일부 세포막이 확장되고 터져서, 세포 내용물이 유출된 후 시간이 지남에 따라 세포 내용물이 서서히 용해되어 소실되었다.

4. 요약

적조발생 해역인 울진 연안의 해수에서 분리한 100여종의 해양미생물 중 8 균주가 *C. polykrikoides*에 대해 살조활성을 나타내었으며, 이 중 살조활성이 가장 우수한 *Brachybacterium* sp. SY-97을 선별하였다. *Brachybacterium* sp. SY-97의 최적 배양조건은 30°C, pH 7.0, 2.0% NaCl 농도였다. *Brachybacterium* sp. SY-97은 *C. polykrikoides*를 살조시킨 후 생성되는 EOM을 이용하여 성장하며, 유도기를 거쳐 대수증식기에 살조물질을 활발히 생산하는 것으로 판단된다. 0.2 µm의 Cell Culture Insert를 삽입한 2조 배양계를 이용하여 *Brachybacterium* sp. SY-97의 살조 유형을 조사한 결과, *Brachybacterium* sp. SY-97은 0.2 µm filter에 의해 *C. polykrikoides*와 격리된 상태에서도 *C. polykrikoides*를 살조시켜 직접 공격형이 아니라 세포외로 물질을 분비하여 살조시키는 살조인자 분비형으로 밝혀졌다. *Brachybacterium* sp. SY-97의 배양여과액의 첨가 농도별 살조활성을 측정한 결과, 15%의 경우 *C. polykrikoides*의 개체수는 급격히 감소하여 12시간 후에 100% 살조되었고, 10%의 경우 15시간 후에 모두 살조되었고, 5%의 경우 18시간 후에 control에 비해 90% 이상 살조 되었다.

참 고 문 헌

Park Y. T., Park J. B., Chung S. Y., Song B. C., Lim W. A., Kim C. H., Lee W. J.,

- 1998, Isolation and algicidal properties of *Micrococcus* sp. LG-1 possessing killing activity for harmful Dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides*, J. Kor. Fish. Soc., 31, 767-773.
- 정성윤, 박영태, 이원재, 2000, 적조생물 살조세균 탐색, III. 유해성 적조생물 *Cochlodinium polykrikoides*에 대한 *Micrococcus* sp. LG-5의 살조효과, 한국수산학회지, 33, 331-338.
- Kim, M. C., Yoshinaga, I., Imai, I., Nagasaki, K., Itakura, S., Ishida, Y., 1998, A close relationship between algicidal bacteria and termination of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) bloom in Hiroshima Bay, Japan., Mar. Ecol. Prog. Ser., 170, 25-32.
- 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 *Cochlodinium polykrikoides*, Tetrahedron Lett., 44, 8005-8007.