

적조와편모조 *Scrippsiella trochoidea*와 해양세균 *Pseudomonas* spp.의 동시배양시 지방산 조성의 변화

임월애 · 김학균* · 박주석* · 이원재

부산수산대학교 미생물학과

*국립수산진흥원

Changes of Fatty Acid Composition During Dispecific Culture of *Scrippsiella trochoidea* a Dinoflagellate and *Pseudomonas* spp. marine Bacteria

WOL-AE LIM, HAK-GYOON KIM*, JOO-SUCK PARK* AND WON-JAE LEE

Department of Microbiology, National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea

*National Fisheries Research and Development Agency, Kijang-up Yangsan-gun, Kyongsangnam-do 626-900, Korea

우리나라 남해 연안수역 특히 마산만에서 초봄인 3~4월에 와편모조류로서는 가장 빨리 적조를 일으키는 종인 *Scrippsiella trochoidea*와 해양생태계에서 분해와 물질순환에 중요한 역할을 하고 있는 해양세균과의 상호관계를 구명하기 위해서 마산만의 저니에서 분리한 *S. trochoidea*의 cyst를 받아서 배양하고 배양액에서 공존하는 세균을 분리하였다. 분리된 세균 중 우점종인 *Pseudomonas* spp.를 *S. trochoidea*와 함께 천연멸균해수에 투여한 후 지방산 조성의 변화를 분석하여 비교하였다. 그 결과 *S. trochoidea*의 경우에는 $C_{18:0}$, $C_{20:5}$, $C_{22:5}$ 등의 조성비가 증가하였고, *Pseudomonas* spp.의 경우는 $C_{16:1}$, $C_{16:0}$ 의 조성이 상대적으로 증가하였다. 특히 *S. trochoidea*와 *Pseudomonas* spp.의 동시 배양시 $C_{20:5}$ 과 $C_{18:0}$ 의 두 지방산은 *S. trochoidea*에서는 오히려 증가하였으나 *Pseudomonas* spp.에서는 오히려 감소되어, 이 두종의 지방산 대사과정이 서로 연관된다고 추정하였다.

Scrippsiella trochoidea is a dinoflagellate responsible for red tide in early spring in southern coastal water. Marine bacteria appear to exert critical roles on the development and decay of phytoplankton bloom in marine ecosystem. It is likely that marine bacteria, *Pseudomonas* spp., share some metabolic processes with *S. trochoidea*. To investigate interactions between *S. trochoidea* and *Pseudomonas* spp. directly, cysts of *S. trochoidea* isolated from the bottom mud in Masan Bay have been germinated and cultured. From the *S. trochoidea* cultured medium, we have isolated *Pseudomonas* spp., a dominant species. Both of *Pseudomonas* spp. and *S. trochoidea* have been simultaneously inoculated into the sterilized sea water and cultured to examine the change of fatty acids. The major fatty acids that showed increases in composition during the dispecific culture were $C_{18:0}$, $C_{20:5}$ and $C_{22:5}$ in *S. trochoidea*, and $C_{16:1}$ and $C_{16:0}$ in *Pseudomonas* spp. Especially, $C_{20:5}$ and $C_{18:0}$ were increased in *S. trochoidea* but decreased in *Pseudomonas* spp. These results strongly suggest that two species share some processes in their fatty acid metabolism.

서 론

우리나라 연안 해역은 부영양화로 인한 적조 발

생이 매년 주기적으로 반복되고 있다(Park and Kim, 1991). 이러한 적조생물들이 대량 번식하였을 때 이들은 거대한 biomass일뿐 아니라 여러가지 물질대사

산물들을 분비하여 2차적인 부영양화와 독화를 발생케하여 해양생태계에 커다란 해를 미치고 있다(Ignatides, 1973). 해양에 존재하는 이러한 유기물을 해양세균들이 무기화시켜 수계생태계의 재순환을 일으킨다(Chróst and Overbeck, 1990).

이 등 (1986, 1990)은 해양세균과 적조생물에 대한 연구보고에서 적조발생전, 적조발생중, 적조발생후에 따라 해양세균의 상에 변화가 있으며, 적조가 잘 발생하는 계절과 그렇지 않은 계절과도 세균 군집 조성에 큰 변화가 있다고 하였다. Kogure *et al.*(1982)은 식물플랑크톤이 분해되는 동안 식물플랑크톤에 부착한 세균상의 변화와 해수에서의 세균상의 변화를 조사해서 둘의 세균 조성 및 비율이 상당히 달랐다고 보고하였다. Fukami *et al.*(1992)은 적조생물의 성장을 저해하는 세균을 분리 동정하였는데, 적조생물의 종류에 따라 저해하는 세균도 각각 달라진다고 하였다. 그러나 실험실에서 적조생물의 cyst를 발아 배양시켜 세균상의 조사와 아울러 지방산 조성을 구명하여 상관관계를 밝힌 보고는 빈약한 수준이다.

본 연구는 우리나라 남해 연안수역, 특히 마산만에서 초봄인 3~4월에 외편모조류로서 가장 빨리 적조를 일으키는 종인 *Scrippsiella trochoidea*와 해양생태계에서 중요한 역할을 하고 있는 해양세균인 *Pseudomonas* spp.와의 상호관계를 구명하기 위해서 *S. trochoidea*의 배양액에 *Pseudomonas* spp.을 투여한 후 지방산 조성의 변화정도를 비교 분석한 결과이다.

재료 및 방법

국립수산진흥원의 1991년 12월 관측시 마산만(128°30'20"E, 34°10'10"N)의 저니(mud)를 채취하여 cyst를 분리, 발아시킨 후 유영세포를 멸균해수에 3~4회 세정 후 대량배양 시켰다(임 등, 1993). 본 실험은 F/2배지에서 2,000 lux, 14L:10D, 20°C 배양하였다. 세균상의 분리는 PPES-II배지(Taga, 1968)에 배양액 1 ml를 10진법으로 희석 접종한 후 20°C와 30°C에서 각각 배양하여 plate에 나타난 colony를 Shimidu *et al.*(1977), Shiba and Shimidu(1982), Mac Faddin(1984), James *et al.*(1989)에 의해 동정하였다.

지방산 분석은 藤野(1983)와 Hallegraef *et al.*(1991)의 방법을 개량하여 배양된 *S. trochoidea*와 분리된 *Pseudomonas* spp.의 지방산을 각각 분석하였다. 또한

Table 1. Operating Condition of Gas Chromatography.

Gas chromatography	Varian 3400
Column	FFAP, 2.5 mm×30 m
Carrier gas	N ₂
Split ratio	1/20
Column temperature	170~200°C, 1°C/min
Injector temperature	230°C
Detector temperature	250°C
Chart speed	0.5 cm/min
Detector	FID

1992년 5월에 마산만에서 채수한 해수를 멸균하여 이에 *S. trochoidea*와 *Pseudomonas* spp.를 동시에 첨가 배양 시키면서 대수기와 정지기 일 때의 시료를 각각 채취하여 지방산을 분석하였고, 시료 채취기간은 L cycle의 7시 정도에서 채취하였다. *S. trochoidea*의 경우는 여과 후 멸균해수로 3~4번 세정하여 부착세균을 제거하였다. 지방산의 분석은 먼저 각 시료를 농축시킨 후 chloroform:methanol(2:1, V:V)로 처리한 후 냉암소에서 12시간 방치한 후 다시 여과하여 잔여물과 여액을 분리하였다. Methanol:HCl:CHCl₂(10:1:1, V:V:V) 혼합용액을 가한 다음 수조에서 1시간 중탕 가열하여 methylation시켰다. 이 반응액을 분액깔대기에 이행하여 증류수와 석유ether층으로 이행시키고, 증류수로 수회 세정한 후, 무수Na₂SO₄로서 탈수하고 용매를 완전히 제거한 다음 분석에 사용하였다. 분석은 G.C.(Varian 3400)에 의해 Table 1의 조건하에서 행하였으며 지방산의 동정은 표준 지방산 methyl ester의 retention time과의 분석 결과를 비교하였다.

결과 및 고찰

*S. trochoidea*의 대수증식기일때 20°C에서 분리된 세균은 *Pseudomonas* spp.가 93.8%, *Moraxella* spp.가 6.2%를 차지했고, 30°C에서 분리된 세균상은 *Pseudomonas* spp.가 88.4%, *Moraxella* spp.가 5.2%, 그리고 *Flavobacterium* spp.가 6.3%를 차지했다(Fig 1). 또한 *S. trochoidea*의 정지기일 때 20°C에서 분리된 세균은 *Pseudomonas* spp.만이 나타났고, 30°C에서는 *Pseudomonas* spp.가 67.1%, *Moraxella* spp.는 32.2% 그리고 *Flavobacterium* spp.는 0.57%를 차지 했다. 분리된 세균 중 *Pseudomonas* spp.가 우점종임을 알 수 있

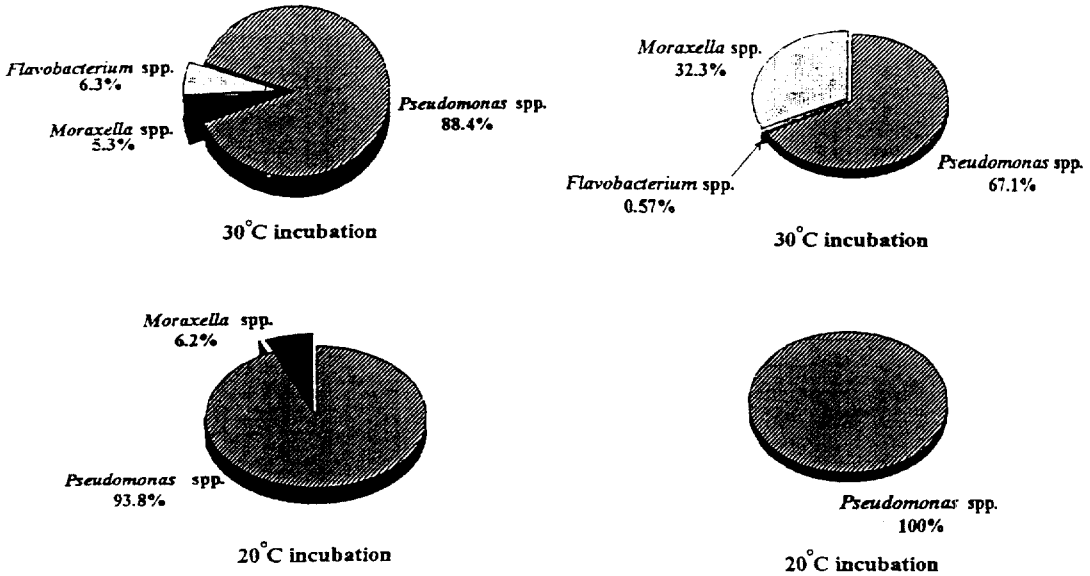


Fig. 1. Bacterial composition in log (left) and stationary (right) phase of *S. trochoidea* cultured at two different incubation temperature.

었다.

Fukami *et al.*(1981)는 식물플랑크톤이 분해되는 동안의 세균상의 변화를 밝혔는데 해수에 나타난 세균은 *Vibrio* sp., *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas* sp.의 순으로 나타났고, 플랑크톤에서 발견된 세균은 *Vibrio* sp., *Pseudomonas* sp.로 나타났다. 李 等(1986)은 해양에서 적조발생에 따른 해수중의 세균상의 변화를 관찰하였는데, 적조발생전의 세균상은 *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Flavobacterium* sp., *Moraxella* sp., *Vibrio* sp.순으로 나타났다. 그러나 적조발생 시에는 *Flavobacterium* sp., *Acinetobacter* sp., *Moraxella* sp., *Pseudomonas* sp., *Vibrio* sp.의 순으로 나타났고, 적조발생 후에는 *Flavobacterium* sp., *Vibrio* sp., *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas* sp.의 순으로 나타났다.

본 실험은 *S. trochoidea*의 군증식 과정에 따른 세균상의 변화를 관찰하였는데, 현장 실험결과인 이 등(1986)과 Fukami(1981)의 결과와 비교하면 세균상의 수는 다양하지 않지만 Fig. 1에서 보여주는 바와 같이 비슷한 우점종의 양상을 보여주고 있다. 특히 본 조사에서 우점종인 *Pseudomonas* spp.는 발육온도 범위가 넓고, 해양의 고유세균(固有細菌)으로 알려져 있다(多賀, 1974). 이들이 2×10^7 cell/ml일 때의 지방산 조성의 분석 결과는 Table 2와 같다. Table 2에

Table 2. Fatty acid composition of *Pseudomonas* spp.

Fatty acid	Composition (%)
14:0	6.16
14:1	1.44
16:0	22.13
16:1	27.41
18:0	4.26
18:1	17.59
18:2	0.65
18:3	0.02
20:0	0.02
20:2	4.81
20:4	0.02
20:5	14.10
22:1	0.02
22:2	0.34
22:6	1.03

의하면 C_{14:0}에서 C_{22:6}까지 분석되었는데 C_{16:1}이 27.41%로 가장 많고 다음이 C_{16:0}이 22.13%, C_{18:1}이 17.59%, C_{20:5}가 14.10%로 나타났다. 그러나 C_{18:3}, C_{20:0}나 C_{18:2}의 함량은 극히 적었다. James and Colwell(1973)은 해양세균 20종의 지방산을 분석하였는데 세균의 속(genus)에 따라 지방산의 구성비가 상당히 달라짐을 밝혔다. 그러나 각 세균의 주요지방산은 C_{16:0}, C_{16:1}, C_{18:1}로 나타났다. 이러한 결과는 본 실험과 일치함을

Table 3. Fatty acid composition of *Scippsiella trochoidea*.

Fatty acid	Composition (%)
14:0	11.30
14:1	3.23
16:0	33.91
16:1	3.93
18:0	16.36
18:1	7.53
18:2	3.12
18:3	0.86
20:0	2.15
20:2	1.29
20:4	0.65
20:5	0.81
22:0	5.27
22:1	5.27
22:2	1.08
22:6	3.23

보여준다.

L cycle의 7시에 채취한 *S. trochoidea*의 지방산 분석 결과를 Table 3(임 등, 1993)에 나타내었다. Table 3에서 분석된 결과를 보면 C_{16:0}이 33.91%로 가장 많고, 다음으로 C_{18:0}이 16.36%, C_{14:0}이 11.30%, C_{18:1}, C_{22:0}, C_{22:1}, C_{16:1}, C_{14:1}과 C_{22:6}이 각각 7.53, 5.27, 5.27, 3.93, 3.23, 3.23%로 각각 분석되었다. 특히 EPA(Eicososa Pentanoic Acid)인 C_{20:5}는 0.8%로 *Pseudomonas* spp.의 분석 결과와는 달리 극소량으로 나타났다. Ackman et al.(1964) 등이 규조류인 *Skeletonema costatum*의 지방산을 분석한 결과를 보면 C_{14:0}, C_{16:0}이 구성비가 32.7%, 21.0%로 가장 많았고, C₂₀ 이상은 C_{20:5} 13.8%, C_{22:1}은 1.7%로 나타났다. 또한 그는 와편모조류인 *Amphidinium carterii*의 지방산 분석 결과는 C_{16:0}이 36.0%로 가장 많은 구성비를 차지하고 있으며 C₂₀ 이상은 C_{20:5}, C_{22:6}이 7%와 26%로 높게 나타남을 밝혔다. Hallegraef et al.(1991)의 *Gymnodinium catenatum*의 지방산 분석 결과를 보면 Ackman et al. (1964)의 와편모조의 분석과 유사하게 C_{16:0}이 33%로 가장 높게 나타났으며 C_{16:1}도 30.1%로 높은 편에 속했고 C₂₀ 이상의 C_{20:5}와 C_{22:6}이 12%와 21.3%로 높게 나타났다. 그러나 C₂₀ 이상의 나머지 종류는 극미량으로 나타났다. 즉, 와편모조류의 체내에서 불포화 지방산이 넓게 분포하고 있음을 알 수 있었다.

*S. trochoidea*와 분리균의 우점종인 *Pseudomonas*

Table 4. Fatty acid species and composition in *S. trochoidea* and in *Pseudomonas* spp. in the log phase of the growth.

Fatty acid	Composition(%)	
	<i>S. trochoidea</i>	<i>Pseudomonas</i> spp.
14:0	7.15	4.63
14:1	—	1.21
16:0	0.04	24.43
16:1	10.33	43.84
18:0	4.48	0.77
18:1	1.98	23.85
18:2	0.26	—
18:3	0.13	—
20:0	0.26	0.54
20:2	1.15	—
20:4	0.26	—
20:5	53.29	0.22
22:0	4.06	0.22
22:1	—	—
22:2	0.04	0.29
22:5	6.40	—
22:6	—	—
Others	0.17	—

spp.의 지방산 조성간에 관계를 구명하기 위하여 *S. trochoidea*의 cyst를 발아시킨 후 멸균된 해수로 세척한 후 멸균해수에 유영시키면서 *Pseudomonas* spp. 10⁶ ml/ml되게 투여하여 *S. trochoidea*를 배양, 대수증식기일 때(*S. trochoidea*; 1000 cell/ml, *Pseudomonas* spp.; 2×10⁷ cell/ml)와 정지기일 때 (*S. trochoidea*; 3000 cell/ml, *Pseudomonas* spp.; 2.4×10⁷ cell/ml)를 구분 각각 지방산의 조성을 분석한 결과는 Table 4, 5와 같다. Table 4의 경우는 대수증식기일 때의 *S. trochoidea*의 체내 지방산 조성과 이때의 *Pseudomonas* spp.의 지방산 조성을 분석한 결과이다. *S. trochoidea*의 체내 지방산 조성은 C_{20:5}가 53.29%로 가장 많고 C_{16:1}이 10.33, C_{22:5}가 6.40, C_{18:0}이 4.48%로 나타났고 C_{14:1}, C_{22:1}과 C_{22:6}은 분석되지 않았다. 우점종인 *Pseudomonas* spp.의 지방산 조성을 보면 C_{16:0}이 24.43, C_{16:1}이 43.84, C_{18:1} 23.85, C_{14:0}이 4.63, C_{14:1}이 1.21%이고, C_{18:2}, C_{18:3}, C_{20:2}, C_{20:4}, C_{22:1}, C_{22:5}, C_{22:6} 등은 검출되지 않았다. 특히 EPA인 C_{20:5}의 경우 동시배양 전에는 14.10%이었고 동시배양 후에는 0.22%로 감소된 반면 *S. trochoidea*에는 동시배양 전에는 0.81%였고 동시배양 후에는 53.29%로 50배 이상이 증가되는 특징을 보여 주고 있다.

Table 5. Fatty acid species and compositions in *S. trochoidea* and in *Pseudomonas* spp. in the stationary phase of the growth.

Fatty acid	Composition(%)	
	<i>S. trochoidea</i>	<i>Pseudomonas</i> spp.
14:0	12.27	4.61
14:1	0.33	1.18
16:0	10.77	22.86
16:1	14.84	33.09
18:0	8.94	3.02
18:1	4.07	3.87
18:2	0.61	0.63
18:3	0.09	--
20:0	0.05	--
20:2	1.40	4.44
20:4	0.47	--
20:5	40.87	1.73
22:0	0.05	0.22
22:1	1.40	--
22:2	0.28	0.25
22:5	3.56	2.93
22:6	--	--

정지기 상태의 경우를 보면 Table 5와 같다. *S. trochoidea*의 정지기의 지방산 조성은 C_{20:5}가 40.87%로 가장 높은 구성비를 나타냈고, C_{16:1}, C_{16:0}, C_{14:0}이 그 다음으로 높은 구성비를 나타냈다. 이때의 *Pseudomonas* spp.의 지방산 조성은 C_{16:1}, C_{16:0}이 각각 33.09, 22.86%로 가장 높았고, C_{20:5}는 1.73%로 낮은 분포를 보였다. 그러나 C_{18:2}, C_{18:3}, C_{20:4}, C_{22:1}, C_{22:6}은 분석되지 않았다. 이상의 결과들은 대수기나 정지기에서 *S. trochoidea*와 *Pseudomonas* spp.의 지방산 조성이 변환된 것을 보여주고 있다. 이와 같이 배양중의 지방산 조성의 변화가 있는 *S. trochoidea*와 *Pseudomonas* spp.를 비교하면 Table 6과 같다. 여기서 특징있게 보여주는

것은 C_{20:5}, C_{22:1}, C_{22:6}의 불포화 지방산 변화이다. 특히 현저한 변화를 보여주는 C_{20:5}의 경우 세균에서 외편 보조의 이용으로 체내로 전환(conversion)되고 있음을 보여주고 있다. 또한 C_{16:1}과 C_{18:0}의 경우, 동시배양 후에 *S. trochoidea*에서는 계속 증가하였으며, C_{20:0}의 경우는 *S. trochoidea*에서는 감소하였으나 *Pseudomonas* spp.에서는 증가하였다. Erwin and Bloch(1963)는 섬모충류의 지질대사 경로에서 C_{18:1}이 상당량 이용되어 C_{20:0}로 전환된다고 보고하였다. 즉 세균의 경우는 C_{18:0}→C_{18:1}, 효모와 미세조류의 경우는 C_{18:0}→C_{18:1}→C_{18:2}→C_{18:3}로 변화되고, 섬모충류나 동물의 경우는 C_{18:0}→C_{18:1}→C_{18:2}→C_{18:3}→C_{20:0}로 생물체 내에서 전환하고 있다고 보고 하였다. 이상으로 본 실험에서 보여준 지방산 변화는 *S. trochoidea*와 *Pseudomonas* spp.의 동시배양시 *S. trochoidea*가 성장하는데 *Pseudomonas* spp.의 지방산이 중요한 영향을 미치고 있다고 생각된다.

참 고 문 헌

- Ackman, R. G., P. M. Jangaard, R. J. Hoyle and H. Brockerhoff. 1964. Origin of marine fatty acid: I. Analysis of the fatty acids produced by diatom *Skeletonema costatum*. J. fish. Res. BD. Canada. 21(4): 747-756.
- Chrost, R. J. and J. Overbeck. 1990. Aquatic microbial ecology. pp.190.
- Erwin, J. and K. Bloch. 1963. Lipid metabolism of ciliated protozoa Jour. Biol. Chem., 238: 1618-1624.
- Fukami, K., U. Simidu and N. Taga. 1981. Fluctuation of communities of heterotrophic bacteria during the decomposition process of phytoplakton. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 55: 171-184.
- Fukami, K., A. Yuzawa, and T. Nishijima. 1992. Isolation and properties of a bacterium inhibiting the growth of *Gymnodinium nagasakiense*. Nippon Suisan Gakkaishi 58(6): 1073-1077.

Table 6. Fatty acid conversion from *Pseudomonas* spp. to *S. trochoidea*.

Fatty acid	<i>S. trochoidea</i>			<i>Pseudomonas</i> spp.		
	before inoculation	after inoculation		before inoculation	after inoculation	
		L	S		L	S
16:1	3.93	10.33	14.84	27.41	43.84	33.09
18:0	16.36	4.48	8.97	4.26	0.77	3.02
20:0	2.15	0.26	0.05	0.02	0.54	--
20:5	0.81	53.29	40.87	14.10	0.02	1.73
22:1	5.27	--	1.40	0.02	--	--
22:6	3.27	--	--	1.03	--	--

*L: Log phase of *S. trochoidea*. *S: Stationary phase of *S. trochoidea*.

- Hallegraeff, G. M., P. D. Nichols, J. K. Volkman, S. I. Blackburn and D. A. Everitt. 1991. Pigments, fatty acids, and sterols of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. J. Phycol. 27: 591-599.
- Ignatides, L. 1973. Studies on the factors affecting the release of organic matter by *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve in field conditions. J. mar. biol. Au. U. K. 53: 923-935.
- James, D. O. and R. R. Colwell. 1973. Extractable lipids of gram-negative marine bacteria; Fatty-acid composition. Int. J. Syst. Bacteriol. 23(4): 442-458.
- James, T. S., B. Marvin, P. P. Norbent and G. H. John. 1989. Bergey's manuas of systematic Bacteriology. Vol. 3, Williams & Wilkins.
- Kogure, K., U. Simidu and N. Taga., 1982. Bacterial attachment to phytoplankton in sea water. J. Exp. mar. Biol. Ecol., 56: 197-204.
- MacFaddin, F. Jean, 1984. Biochemical tests for identification of medical bacteria. Willams & Wilkins. p. 36-308.
- Park, J.S. and H.G. Kim. 1991. Recent approches on red tide Korean and French seminar on red tide. pp. 159.
- Shiba, T. and U. Shimidu. 1982. *Erythro bacter longus* gen. nov., sp. nov. an aerobic bacterium which contains bacteriochlorophyll a. International J. Sysmatic bac. 32(2): 21-217.
- Shimidu, U., E. Kaneko and N. Taga. 1977. Microbial studies of Tokyo Bay. Microbial Ecol. 3: 173-191.
- Taga, N., 1968. Some ecological aspects of marine bacteria in the Kurosh current. Bull. Misaki. Biol. Kyoto Univ. 12: 50-76.
- 多賀 信夫. 1974. 海洋微生物. 海洋學講座 11, 多賀 信夫編, 東京大學出版社, p.51-53.
- 藤野安彦. 1983. 脂質分析法入門. p. 42-45.
- 이원재, 정희농, 강창근, 박희열. 1986. 부영양화해역의 환경 및 세균상. 한수지, 19(6): 586-592.
- 이원재, 김학균, 박영대, 성희경. 1990. 해양세균이 적조 형성 생물에 미치는 역할. 한수지, 23(4): 303-309.
- 임월애, 김학균, 이원재, 이삼석. 1993. 적조와편모조 *Scrippsiella trochoidea* 군중식에 미치는 환경요인과 지방산조성. 한수지, 26(2): 198-203.

Accepted August 25, 1993