

규조류 *Chaetoceros* sp. 증식 저해균 *Alteromonas* sp. SR-14의 분리 및 특성

김지회 · 박정흠 · 송영환* · 장동석**
국립수산진흥원, *부경대학교 미생물학과, **부경대학교 식품공학과

Isolation and Characterization of the Marine Bacterium, *Alteromonas* sp. SR-14 Inhibiting the Growth of Diatom, *Chaetoceros* Species

Ji Hoe KIM, Jeong Heum PARK, Young Hwan SONG* and Dong Suck CHANG**
National Fisheries Research and Development Institute, Pusan 619-900, Korea
*Department of Microbiology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea
**Department of Food Science and Technology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

Marine bacteria inhibiting the growth of the diatom, *Chaetoceros calcitrans* were screened from seawater samples collected at south coast of Korea in 1996. Six strains were isolated from those samples. Among them, a bacterium SR-14 strain had the strongest inhibition activity against the alga. The selected SR-14 strain was identified as an *Alteromonas* sp. (supposed to be *Alteromonas colwelliana*) according to its biochemical results.

Alteromonas sp. SR-14 was able to grow in raw seawater, aged seawater, Conwy medium for culture of microalgae and *C. calcitrans* culture filtrate.

The host ranges of *Alteromonas* sp. SR-14 were *C. calcitrans*, *C. muclleri* and *C. negracile* among 10 species of diatom. All of the *Chaetoceros* spp. tested were inhibited by the *Alteromonas* sp. SR-14, however, the growth of the other genera in Bacillariophyceae was not inhibited.

Key words: *Alteromonas* sp., algicidal activity, *Chaetoceros* sp.

서 론

수계 생태계에서 미세조류와 세균은 수적으로 가장 많은 생물 군을 이루고 있으며 여러 가지 상호작용을 하면서 서식하고 있다. 미세조류의 생육에 미치는 세균의 영향은 영양분의 재생, 내부공생, 증식촉진 또는 저해물질의 생성, 직접적인 먹이제공 등, 직·간접적인 수단으로 미세조류의 증식을 촉진하거나 저해한다고 알려져 있다(清水, 1991).

세균에 의한 미세조류 증식 저해는 호소 등 담수에서 water bloom을 형성하는 남조류의 증식 저해균에 관하여 비교적 오래 전부터 연구가 진행되어 왔고, 남조 bloom의 소멸에 기여하는 많은 세균이 보고되어 있다(山本, 1986).

한편, Fukami et al. (1991)은 해양 생태계에서도 세균이 미세조류의 우점종 천이에 영향을 미친다고 보고하였고, 미세조류 증식을 저해하는 세균이 다수 보고되고 있어(Fukami et al., 1992; Imai et al., 1995; Sakata et al., 1991; Yoshinaga et al., 1995) 해양 생태계에서도 담수에서의와 같이 세균이 적조의 발생 및 소멸 과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다.

지금까지 해양 미세조류 증식 저해균에 관한 대부분의 연구는 편모조류 증식 저해균에 집중되어 왔다. 그러나 통상 무독한 적조 생물로 알려져 있는 규조류 *Chaetoceros* sp.의 특정한 종은 적조 발생시 어류 등에 직·간접적으로 피해를 끼치는 것으로 보고되고 있는데(Rensel, 1993; Tester and Mahoney, 1995), 이러한 규조류 증식 저해균에 관한 연구는 거의 없는 실정이다.

본 연구에서는 우리 나라 연안에서 *Chaetoceros* sp.에 대하여 증식 저해활성이 있는 균주를 검색하였다. 분리된 균주 중 조류 증식 저해활성이 가장 강한 균주를 선정하여 이 균의 생화학적

특성을 조사하였으며 증식 저해활성을 나타내는 규조류 종에 대하여 실험한 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 균주 분리용 해수

미세조류 증식 저해균주 분리용 해수는 1996년 7월에서 9월 사이에 우리 나라 남해안 6개소에서 채취하였다(Fig. 1).

2. 미세조류

실험에 제공된 규조류 10종은 미국의 Provasoli Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton (CCMP)에서 분양받아 국립수산진흥원 양식과에서 보존하고 있는 것으로 Douglas and Bates (1992) 및 Sakata et al. (1991) 등의 방법에 따라 항생제와 한계희석법으로 처리한 후 nutrient agar, YM agar 및 marine agar 2216 등에서 오염 미생물이 검출되지 않는 것을 확인하고 실험에 사용하였다.

3. 미세조류 증식 저해균의 분리·동정

미세조류 증식 저해균을 분리하기 위한 해수는 미세조류 등을 제거하기 위하여 GF/C glass microfiber filter (Whatman)로 여과한 후 peptone agar 배지(peptone, 0.5 g; yeast extract, 0.05 g; agar, 12 g; 해수, 900 ml; 증류수 100 ml)에 도말하고 20°C, 2주간 배양하여 독립 colony를 분리하였다. 각 분리균주는 peptone broth에서 20°C, 3일간 배양한 후, Conwy 배지(Walne, 1979)에 약 10⁴ cells/ml의 농도로 *C. calcitrans*를 현탁한 액 5 ml에 균액을 0.1 ml 접

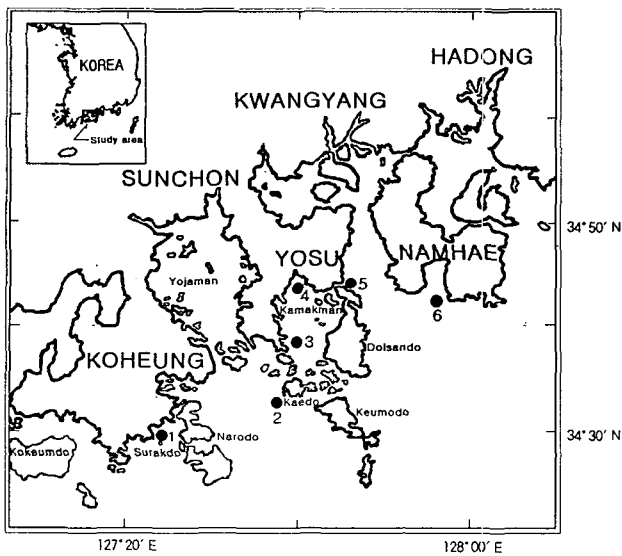


Fig. 1. Location of sampling sites in south coast of Korea.

중하고 조류 배양조건에서 배양하면서 조류의 증식 여부를 육안으로 확인하여 대조구에 비하여 증식을 지연시키는 집종균주를 조류의 증식 저해활성이 있는 것으로 판정하였다. 이 때 대조구에는 peptone broth를 0.1 ml 첨가하였다. 시험균을 접종한 미세조류는 온도 $21 \pm 1^\circ\text{C}$, 조도 약 4,000lux, 광주기 12 Light : 12 Dark로 정치배양하였다.

분리균은 Baumann et al. (1984), Gauthier and Breittmayer (1992) 그리고 清水 (1991) 등의 방법에 준하여 동정하였다.

4. 해수, Conwy 배지 및 조류 배양액에서의 세균 증식시험 해수와 미세조류 배양용 배지 및 *C. calcitrans* 배양액에서 분리균의 증식시험은 생해수, 채취 후 pore size $0.8 \mu\text{m}$ 의 membrane filter로 여과하여 20°C 압소에서 2개월간 저장한 숙성해수, 미세조류 배양용 Conwy 배지 그리고 *C. calcitrans* 배양액 ($\text{OD}_{750} = 0.136$)을 사용하였다. 시험에 사용한 각 용액은 pore size $0.2 \mu\text{m}$ 의 membrane filter로 여과 제균한 다음 최소균수가 약 10^2 CFU/ml 되도록 접종하고 25°C 에서 배양하면서 배양기간에 따른 생균수의 변화를 측정하였다. 생균수는 시료를 peptone agar 평판에 도말하여 25°C , 3일간 배양한 후 colony forming unit (CFU)/ml로 나타내었다.

5. 분리균에 의한 규조류 증식저해

규조류 종류별 분리균의 증식 저해활성은 혼합배양법으로 측정하였다. 즉, 대수 증식기의 시험 규조류를 Conwy 배지에 약 10^4 cells/ml 되도록 접종하고 시험구에는 peptone broth에서 20°C , 3일간 배양한 균액을 약 10^4 CFU/ml 되도록, 대조구에는 peptone broth를 각각 첨가한 후 10일간 배양하였다. 각 조류 배양액은 Douglas and Bates (1992)의 방법에 따라 750 nm에서 흡광도를 측정하여 시험구의 흡광도가 대조구보다 1/10 이하로 낮은 것을 증식 저해능이 있는 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

규조류 증식 저해균의 분리·동정

1) 균의 분리

남해안 6개소에서 채취한 해수를 peptone agar 평판배지에 도말·배양하고 독립 colony를 각 지점별로 20개 이상씩, 총 234개의 균주를 무작위로 분리하였다. 이들 각각의 분리균을 *C. calcitrans*와 혼합배양하였을 때 각 시료에서 규조류 증식 저해균의 검색결과를 Table 1에 나타내었다.

규조류 증식 저해균은 전남 고흥군 수락도 부근 해수에서 3개, 가막만과 여수항에서 *Chaetoceros* spp. 적조 발생시 채취한 해수에서 1개 및 2개의 균주가 각각 검출되었고, 그 외 지역의 해수에서는 검출되지 않았다. 검출된 6개 균주의 *C. calcitrans* 증식 저해활성은 수락도 인근 해수에서 분리한 SR-14 균주 접종구는 12일간 배양 후에도 조류의 증식이 나타나지 않았으나 나머지 5개 균주 접종구에서는 대조구에 비하여 조류의 증식이 다소 지연되었지만 10일 이내에 조류가 증식하여 SR-14의 활성이 가장 강하였으며 실험균주로 선정하였다.

2) 분리균의 세균학적 특성 및 동정

분리된 조류 증식 저해균 SR-14의 세균학적 특성은 Table 2에 나타내었다. SR-14는 Gram 음성 간균으로 oxidase, catalase 양성 이었고, 극모성의 편모로 운동성이 활발하였으며 gelatinase의 활성은 약하였으나 starch와 casein 분해활성은 강하였다. 증식에 해수를 요구하였고 증류수 또는 증류수에 NaCl을 3% 첨가한 brain heart infusion (BHI) broth에서는 증식하지 못하여 다른 생육인자가 있을 것으로 사료되었다. 또한 peptone broth에 각종 당을 0.5% 첨가하여 20°C , 7일간 배양하였을 때 당의 발효에 의한 뚜렷한 pH 저하는 확인되지 않았다.

이상의 특성에서 SR-14 균은 *Alteromonas* sp.의 일반적인 특성과 일치하였고 (Baumann et al., 1984; 清水, 1991), 균체 색소와 당 발효 특성 등에서 *Alteromonas colwelliana*로 추정되었으나 3% NaCl을 첨가한 BHI broth에서 증식능, casein 분해활성 등에

Table 1. Screening results of bacteria, in seawater collected from south coast of Korea, that are inhibiting the growth of *Chaetoceros calcitrans*

Station No. ¹⁾	Collected area	Collected date	Screening result (a/b) ²⁾	Remarks
1	Surakdo	July 26, 1996	3/54	Normal state
2	Kaedo	July 23, 1996	0/32	<i>Ceratium furca</i> bloom (860 cells/ml)
3	Kamakman	Aug 6, 1996	0/25	Normal state
4	Kamakman	Sept 6, 1996	1/41	<i>Chaetoceros</i> spp. bloom (2,600 cells/ml)
5	Yosu harbor	July 26, 1996	2/47	<i>Chaetoceros</i> spp. bloom (2,000 cells/ml)
6	Namhaedo	Sept 8, 1996	0/35	<i>Cochlodinium polykrikoides</i> bloom (1,500 cells/ml)

¹⁾ Station numbers are shown in Figure 1.

²⁾ a, number of algae growth inhibiting bacteria; b, number of isolated strains on peptone agar plate.

Table 2. Biochemical characteristics of the isolated strain SR-14

Test items	Character	Test items	Character
Gram stain	-	Acid production from	
Shape	curved rod	Cellobiose	-
Oxidase	+	Dextrose	-
Catalase	+	Dulcitol	-
Motility	+	Galactose	-
O/F test	-	Inositol	-
Flagella	polar	Lactose	-
Cell pigment	blackish-brown	Mannitol	-
Arginine	-	Salicine	-
Lysine	-	Sucrose	-
Ornithine	-	Trehalose	-
Hydrolysis of:		Growth at 4°C	no growth
Alginat	-	35°C	no growth
Casein	+	Growth at 3% NaCl in BHI broth	no growth
Gelatin	weak	Demand of seawater for growth	+
Starch	+	Growth on marine agar 2216	+

서 약간의 차이를 보였으며 그 외의 특성은 유사한 경향이였다 (Gauthier and Breittmayer, 1992). 따라서 이 균주는 *Alteromonas* sp. SR-14로 명명하였다.

해수, Conwy 배지 및 *C. calcitrans* 배양여액에서 균의 증식 생해수, 숙성해수, 미세조류 배양용 Conwy 배지 및 *C. calcitrans* 배양여액에 *Alteromonas* sp. SR-14를 접종하고 25°C에서 배양하였을 때 배양기간에 따른 균수변화를 Fig. 2에 나타내었다.

최초균수를 2.5×10^2 CFU/ml 접종하였을 때 *Alteromonas* sp. SR-14는 생해수, 숙성해수 및 *C. calcitrans* 배양여액에서는 1일 후 10^6 CFU/ml 이상으로 증식하였고 그 후에는 점차 감소하는 경향을 나타내었다. Conwy 배지에서는 2일 후에 10^6 CFU/ml 이상 증식하였고 그 후에는 비교적 일정한 균수를 유지하였다. *Alteromonas* sp. SR-14는 유기물이 거의 없는 숙성해수에서도 잘 증식하는 것으로 보아 일반적인 해양조건에서 증식할 수 있을 것으로 생각되었다.

규조류 종에 따른 *Alteromonas* sp. SR-14의 증식저해

Alteromonas sp. SR-14와 시험 미세조류를 혼합배양하여 규조류 종에 따른 host range를 측정된 결과를 Table 3에 나타내었다.

Alteromonas sp. SR-14는 10종의 규조류 중 *C. calcitrans*, *C. muclleri* 및 *C. negracile* 등의 *Chaetoceros* spp.에 대해서만 증식 저해활성이 있었고 그 외의 규조류에 대해서는 증식을 저해하지 못하였다.

해양에서 적조방제를 위하여 미생물을 이용할 경우 목적으로 하는 미세조류에 대해서만 증식 저해활성을 나타내고 다른 미세조류에 대해서는 될 수 있는 한 영향을 미치지 않는 것이 좋을 것으로 생각된다. 따라서 본 실험에서 분리한 *Alteromonas* sp. SR-14는 *Chaetoceros* spp.에 대해서만 증식 저해활성을 나타내어 우리 나라 연안수역에서 적조를 형성하는 것으로 보고된 (김 등,

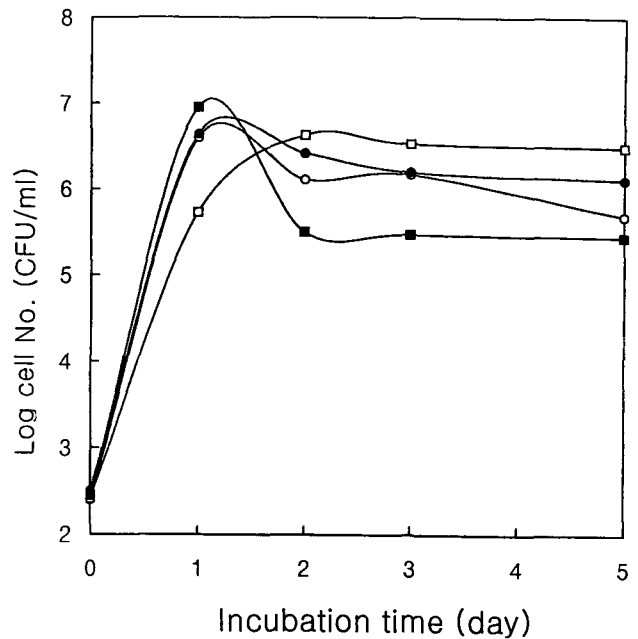


Fig. 2. Comparison of growth curves of *Alteromonas* sp. SR-14 at 25°C by the culture condition. All the solution used were filtered with 0.2 μm membrane filter. -○-, raw seawater; -●-, aged seawater; -□-, Conwy medium; -■-, culture filtrate of *Chaetoceros calcitrans* cultured for 7 days.

Table 3. Host ranges of *Alteromonas* sp. SR-14

Host diatom	Inhibitory activity
<i>Achnanthes brevipes</i> CCMP 100	-
<i>Chaetoceros calcitrans</i> CCMP 1315	+
<i>Chaetoceros muclleri</i> CCMP 1316	+
<i>Chaetoceros negracile</i> CCMP 1318	+
<i>Cyclotella cryptica</i> CCMP 333	-
<i>Leptocylindrus danicus</i> CCMP 470	-
<i>Navicula incerta</i> CCMP 542	-
<i>Navicula pelliculosa</i> CCMP 543	-
<i>Skeletonema costatum</i> CCMP 775	-
<i>Thalassiosira weissflogii</i> CCMP 1047	-

1997) *Chaetoceros* spp. 적조방제에도 상당히 유용할 것으로 사료된다.

미세조류의 사멸과정

대수기의 *C. calcitrans* 배양액에 *Alteromonas* sp. SR-14를 약 10^4 CFU/ml 되도록 접종하고 조류 배양조건에서 배양하면서 조류 사멸과정을 현미경 (Olympus, model BW50F-3)으로 관찰한 결과를 Fig. 3에 나타내었다.

균을 접종한 *C. calcitrans*는 일부 protoplast가 출현하여 용해되는 경우도 있었으나 대부분의 경우 세포 내용물이 서서히 용해되어 결국 극히 일부만 남고 소실되어 Imai et al. (1995) 및 滿谷 (1996) 등이 보고한 규조류 사멸과정과 유사하였다.

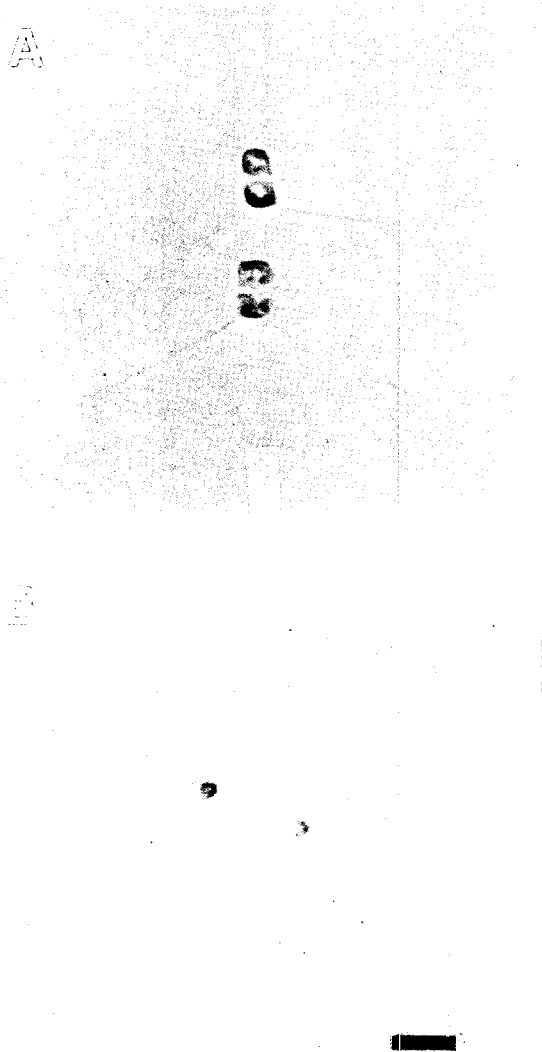


Fig. 3. Microscopic observations of algicidal process by *Alteromonas* sp. SR-14 against *Chaetoceros calcitrans*. Plate A, normal vegetative cells; Plate B, moribund cells after 1 day culture with *Alteromonas* sp. SR-14. Bar=10 μ m.

요 약

일반적으로 규조류는 무독한 적조생물로 알려져 있으나, *Chaetoceros* spp.의 특정한 종은 적조를 형성할 경우 수산생물에 직·간접적인 영향을 미치기도 한다. 본 연구는 해양 세균을 이용하여 규조류 *Chaetoceros* spp. 적조의 방제기술 개발을 위한 목적의 일환으로 우리 나라 연안에서 *Chaetoceros calcitrans* 증식 저해균을 검색·분리하였으며 분리균의 세균학적 특성과 각종 규조류의 증식에 미치는 영향을 조사하였다.

1. *C. calcitrans*에 대해서 증식 저해활성이 강한 균을 검색·분리한 결과 *Alteromonas* sp.로 동정되었으며, 이 균을 *Alteromonas* sp. SR-14로 명명하였다.

2. *Alteromonas* sp. SR-14는 생해수, 숙성해수, 무기염 배지 및 미세조류 *C. calcitrans* 배양여액에서 증식할 수 있었다.

3. *Alteromonas* sp. SR-14는 *C. calcitrans*, *C. muclleri* 및 *C. negracile* 등에 대해서만 증식 저해활성이 있었다.

4. *Alteromonas* sp. SR-14에 의한 *C. calcitrans*의 사멸과정은 대부분의 경우 외형을 그대로 유지하면서 세포 내용물만 서서히 소실되었고, 부분적으로는 protoplast도 출현하였다가 용해되는 경우도 있었다.

사 사

본 연구의 일부는 부경대학교 해양산업개발연구소의 지원에 의하여 수행되었음을 밝힙니다.

참 고 문 헌

- Baumann, P., M.J. Gauthier and L. Baumann. 1984. Genus *Alteromonas*. In "Bergey's manual of systematic bacteriology" Vol. 1, ed. by N.R. Krieg and J.G. Holt, Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 343~352.
- Douglas, D.J. and S.S. Bates. 1992. Production of domoic acid, a neurotoxic amino acid, by an axenic culture of the marine diatom *Nitzschia pungens* f. *multiseriis* Hasle. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 49, 85~90.
- Fukami, K., T. Nishijima, H. Murata, S. Doi and Y. Hata. 1991. Distribution of bacteria influential on the development and the decay of *Gymnodinium nagasakiense* red tide and their effects on algal growth. Nippon Suisan Gakkaishi, 57, 2321~2326.
- Fukami, K., A. Yuzawa, T. Nishijima and Y. Hata. 1992. Isolation and properties of a bacterium inhibiting the growth of *Gymnodinium nagasakiense*. Nippon Suisan Gakkaishi, 58, 1073~1077.
- Gauthier, M.J. and V.A. Breittmayer. 1992. The genera *Alteromonas* and *Marinomonas*. in "The Prokaryotes" ed. by A. Balows, H.G. Truper, M. Dworkin, W. Harder and K.H. Schleifer, Springer-Verlag, New York, pp. 3046~3070.
- Imai, I., Y. Ishida, K. Sakaguchi and Y. Hata. 1995. Algicidal marine bacteria isolated from northern Hiroshima bay, Japan. Fisheries Sci., 61, 628~636.
- Rensel, J.E. 1993. Severe blood hypoxia of atlantic salmon (*Salmo salar*) exposed to the marine diatom *Chaetoceros concavicornis*. in "Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea" ed. by T.J. Smayda and Y. Shimizu, Elsevier Science Publishers B.V., pp. 625~630.
- Sakata, T., Y. Fujita and H. Yasumoto. 1991. Plaque formation by algicidal *Saprospira* sp. on a lawn of *Chaetoceros ceratosporum*. Nippon Suisan Gakkaishi, 57, 1147~1152.
- Tester, P.A. and B. Mahoney. 1995. Implication of the diatom, *Chaetoceros convolutus*, in the death of red king crabs, *Paralithodes camtschatica*, Captains bay, Unalaska Island, Alaska. in "Harmful Marine Algal Blooms" ed. by P. Lassus, G. Arzul, E. Erard, P. Gentien and C. Marcaillou, Lavoisier Publishing, Paris, pp. 95~100.

- Walne, P.R. 1979. Culture of bivalve molluscs, 50 year's experience at Conwy. The Whitefriars Press Ltd., London, pp. 189.
- Yoshinaga, I., T. Kawai, T. Takeuchi and Y. Ishida. 1995. Distribution and fluctuation of bacteria inhibiting the growth of a marine red tide phytoplankton *Gymnodinium mikimotoi* in Tanabe bay (Wakayama Pref. Japan). Fisheries Sci., 61, 780~786.
- 김학균, 이삼근, 안경호, 윤성화, 이필용, 이창규, 조은섭, 김정배, 최희구, 김평중. 1997. 한국연안의 적조. 國立水産振興院(부산), pp. 292.
- 満谷淳. 1996. 滑走細菌による硅藻溶解の機作とバイオコントロールの試み. 平成7年度 海洋微生物活用技術開発試験報告書, pp. 53~66.
- 山本鎔子. 1986. 藻のパゾジーン. "藻類の生態" (秋山 優, 有賀祐勝, 坂本 充, 横浜康繼 編), 内田老鶴圃(東京), pp. 439~504.
- 清水潮. 1991. 海洋微生物とバイオテクノロジー. 技報堂出版(東京), pp. 1~24, 256~280.

1998년 11월 14일 접수

1999년 2월 20일 수리