

Anabaena cylindrica 분해세균의 분리 및 동정

홍업^{1,3} · 신규철^{1,3} · 김민성^{1,3} · 한명수^{1,2,3} · 최영길^{1,3*}

¹한양대학교 자연과학대학 생명과학과, ²환경과학과, ³국가지정 물환경생태복원연구실

남조류 분해세균을 분리하기 위하여 도창, 팔당 저수지와 석촌 호수로부터 저층시료를 채취하였다. *Anabaena cylindrica* lawn에 각각의 시료를 도말한 후 11일간 배양하였고 석촌 시료를 접종한 *Anabaena cylindrica* lawn에서 *Anabaena cylindrica*에 분해능을 가지는 세균을 분리하였다. 분해능 확인은 남조류와 분해세균을 혼합한 후 *chlorophyll a* 값의 측정과 분리세균의 cell counting 방법으로 확인하였고, 세포의 물질이 *Anabaena cylindrica*를 분해하는 것을 확인하였다. 분리균주는 16S rDNA 염기서열 분석과 형태학적, 생리학적 특징을 기초로 하여 동정하였다. 분리균주의 16S rDNA 염기서열을 기초로한 분자계통학적 분석을 통하여 *Bacillus* 속에 포함하는 계통학적 그룹에 속한다는 것을 확인하였고, *Bacillus* sp. CHS1으로 명하였다.

Key words □ 16S rDNA, *Anabaena cylindrica*, *Bacillus* sp.

수계 생태계의 부영양화란 식물플랑크톤 성장의 제한 영양소 (growth-limiting factor)인 인산염과 질산염의 유입이 증가함으로써 수계의 1차 생산력이 증가하는 현상을 말하며, 대부분의 호수에서는 인산염이 제한영양소로 작용하는 경우가 많다(9). 즉, 부영양화는 수화 현상, 물의 이치미, 어류의 폐사 등과 같은 여러 가지 부작용의 결과를 나타내는 원인으로서 무기 영양염류 물질의 유입 뿐 만 아니라 상류로부터 기원하는 퇴사 및 유기물질의 유입도 부영양화의 요인으로 포함되어진다. 부영양화의 가장 현저한 결과 중 남조류의 수화 현상은 온대지역 호수에서 여름과 가을에 영양염 유입의 증가와 물리화학적 요인, 특히 수온 상승 및 높은 광 강도의 상승작용에 의해 매년 비슷한 시기에 계속적으로 나타나고 있다(7). 수화를 형성하는 남조류 중 독소를 유발하는 남조류의 50%가 치명적인 독소를 합성하기 때문에(16) 어류를 포함한 수계의 다른 생물뿐 아니라 그 물을 이용하는 가축에도 직접적인 피해를 일으키는 독성물질을 분비하고, 정수장의 여과 장애와 불쾌한 맛과 냄새를 유발하여 정수비용을 증가시키고 레크레이션 장소로서의 가치를 저하시키는 등 경제적 손실을 야기시키고 있다(6,12,24).

특히, 남조류 중 일부 종들은 수중에 질소 농도가 낮은 경우에도 대기로부터 질소를 고정할 수 있는 능력이 있다. 대표적인 수화 원인 조류인 *Anabaena*나 *Aphanizomenon* 종 등은 heterocyst라는 특수 세포를 가지고 공기 중의 질소를 유기질소로 고정할 수 있는 능력을 가지고 있다. 따라서 질소원이 부족한 환경에서 다른 조류는 증식할 수 없지만 질소고정능을 가진 남조류의 경우 공기 중의 질소를 고정하는 계속 증식함으로써 해서 다른 조류에 비해 우점할 수 있다(1). Schindler (21)는 질소가 결핍될 때

질소 고정능력이 있는 남조류가 우점하게 된다고 보고 하였다. *Anabaena* sp.는 질소고정작용을 하므로 질소가 고갈된 수역에서 다른 종에 비해 성장에 유리한 조건을 가지게 되며, *A. cylindrica*는 질소고정능이 우수한 사상형의 남조류 종으로 알려져 있다(8).

본 연구에서는 질소가 결핍된 지역에서의 수화 발생 원인종인 *A. cylindrica*의 제어를 위하여 생물학적 조절인자인 남조류 분해세균의 분리 및 동정과 특성 연구를 시도하였다.

재료 및 방법

시료의 채취

남조류 분해세균을 분리하기 위하여 도창, 팔당 저수지와 석촌 호수로부터 저층시료를 채취하였다.

남조류의 배양조건

본 연구에서 사용된 남조류 분해세균의 분리 및 분해활성 관찰을 위한 숙주로는 일본 동경대 부설 IAM (Institute of Applied Microbiology) culture collection에서 제공한 *Anabaena cylindrica*를 사용하였고, *Anabaena cylindrica*의 경우 질소공급원이 없는 배지에서 생장이 더 잘 이루어지는 것으로 알려져 있어 (2) BG-11배지(NaNO₃ 1.5 g, K₂HPO₄ 0.04 g, MgSO₄·7H₂O 0.075 g, CaCl₂ 0.036 g, Na₂CO₃ 0.02 g, Disodium EDTA 0.001 g, Citric acid 0.006 g, Ferric ammonium citrate 0.006 g, Micronutrients 1 ml/l D.W.)를 변형한 BG-110 (NaNO₃가 첨가되지 않은 BG-11배지)를 사용하였다. 미량영양소(Micronutrients)는 H₃BO₄ 2.86 g, MnCl₂·4H₂O 1.81 g, ZnSO₄·7H₂O 0.22 g, CuSO₄·5H₂O 0.08 g, NaMoO₄·2H₂O 0.39 g, Co(NO₃)₂·H₂O 0.049 g을 1 l의 증류수에 용해하여 첨가하였다. 남조류의 배양은

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 02-2290-0952, Fax: 02-2293-9230
E-mail: ykchoi@hanyang.ac.kr

28°C, 3000 lux, 150 rpm의 조건에서 진탕 배양하였다.

남조류 분해세균의 분리

남조류 분해세균을 획득하기 위해 *Anabaena cylindrica*를 숙주로 하는 double-layer agar method (18)를 이용하여 BG-110 평판 배지위에 *Anabaena cylindrica* lawn을 준비하였다. *Anabaena cylindrica* lawn에 각각의 시료를 100 µl씩 도말하여 28°C 3000 lux light chamber에서 11일 배양한 후 *Anabaena cylindrica* lawn에 형성되는 세균 colony중 투명대를 형성하는 것을 선별하여 agar를 1.8% 첨가한 LB (Tryptone 10 g, Yeast extract 5 g, NaCl 10 g/l D.W.) 배지에서 순수배양 하였다. 21 종의 균주를 분리하였고 *Anabaena cylindrica* lawn에 각 분리 균주를 백금이를 이용하여 접종하고 colony 주변에 투명대를 형성하는지의 여부를 관찰한 후 이중 분해능이 우수한 세균 한종을 분리하였다.

분리균주의 동정

CHS1 genomic DNA preparation은 Murray와 Thompson의 방법(14)을 변형하여 수행하였고, 16S rDNA를 증폭하기 위한 primer는 Weisburg 등(25)이 제안한 primer를 변형하여 사용하였다. Primer의 염기서열은 forward primer가 5'-GAGTTGGA-TCTGCTCAG-3', reverse primer는 5'-AAGGAGGGATCC-AGCC-3'이다. PCR 반응은 PCR buffer (100 mM Tris · HCl(pH 8.85), 250 mM KCl, 50 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgSO₄; Roche, Mannheim, Germany)에, 각각의 10 mM deoxynucleoside triphosphate (MBI Fermentas, USA)와 10 pmol의 primer를 각각 첨가하고, 20 ng DNA template, 2.5 U Pwo polymerase (Roche, Mannheim, Germany)를 첨가하여 최종 PCR 반응물을 50 µl로 제조하여 TaKaRa PCR Thermal Cycler MP (TaKaRa, Shiga, Japan)로 수행하였다.

첫 번째 반응은 95°C에서 3 분 동안 DNA를 변성시키고, 각 단계에서는 94°C에서 40 초, 67°C 1 분, 72°C 1 분 동안 DNA를 증폭하는 반응을 35 회 시행하였고 마지막으로 72°C에서 4 분 동안 DNA를 증폭한 후 4°C에서 보관하였다. PCR 증폭산물은 QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 purify하였다. PCR 증폭산물은 pBluescript II SK vector에 cloning 하였고, ligated DNA fragment는 DH 5αTM com-petent cell (Gibco BRL, Gaithersburg, USA)에 형질전환 하였다. 16S rDNA 염기서열을 결정하기 위해서 cloned fragment는 automated DNA sequencer (Bionex, Seoul, Korea)에 의해서 염기서열 분석을 수행하였다. 염기서열분석을 통하여 얻은 CHS1의 염기서열은 Blast network service를 이용하여 EMBL/GeneBank database의 염기서열과 비교함으로써 계통분류학적 유연관계를 분석하였다. 먼저, CLUSTAL W software (23)를 사용하여 서열을 배열하였고, 계통수(phylogenetic tree)는 PHYLIP version 3.5 package (4)에서 neighbor-joining method (19)를 이용하는 program인 NEIGH-BOR를 사용하여 작성하였다. 계통형 사이의 염기서열 유사도는 Jukes-Cantor distance 공식(10)의 역 공식인 DNADIST 매트릭스를 이용하였다.

또한, CHS1의 형태학적, 생리학적 특성을 조사하여 동정 결과를 확인하였다. 생리학적 특성은 Bergey's manual of systematic bacteriology (11)에 따라 확인하였다.

분리세균의 남조류 분해 활성도

250 ml flask 3 개에 각각 *Anabaena cylindrica*를 50 ml씩 분주해 넣고 28°C, 3000 lux인 진탕 배양기에서 24 시간 배양 후 3 개의 flask에는 각각 대수 성장기의 CHS1을 5 ml 접종하고 나머지 1개의 flask에 대조군으로 CHS1을 접종하지 않았다. 1, 2, 3, 5, 7, 9 일째까지 *chlorophyll a*를 추출하기 위해 4.7 cm diameters GF/C filter (Whatman, England)를 이용하여 각각을 5 ml씩 여과한 후 90% acetone이 30 ml 담겨져 있는 암병에 넣은 후 4°C에서 24 시간동안 방치하여 *chlorophyll a*를 추출하고 750, 644, 647, 630 nm의 파장에서 spectrophotometer (Hewlett Packard, Hp845X UV-Visible System, USA)를 이용하여 측정하였다(15).

세포외 물질의 남조류 분해능 측정

LB 배지에서 배양액을 CHS 1을 대수성장기까지 배양한 후 원심분리 (7,000×g, 20 min, 4°C, Beckman JA-10)한 다음, YM-10 membrane filter (Millipore, exclusion size 10,000 Da M.W cut off)를 가지는 Amicon ultrafiltration장치로 농축하였다. 이 농축액을 다시 원심분리(7,000×g, 20 min, 4°C, Beckman JA-21)하여 상층액만 분리하였다. 이 상층액을 4°C에서 Ammonium sulfate를 0-80%첨가 한 뒤 30 분이 지난 뒤 원심분리(14,000×g, 25 min, 4°C, Beckman JA-21)하여 상층액과 침전물을 분리하여 Ammonium sulfate로 얻어진 침전물을 20 mM Tris · HCl (pH 8.0) 완충용액으로 현탁하고 동일 완충용액 2 l에서 삼투하여 Ammonium sulfate를 제거 하였다. 이 농축한 세포외 물질을 대수성장기의 남조류에 접종하여 정해진 시간별로 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이와 함께 *Anabaena cylindrica* lawn위에 지름 5 mm 크기의 paper disc를 올려놓고 세포외 물질을 10 µl접종하고 disc주변에 투명대 형성 여부를 관찰하였다.

결과 및 고찰

남조류 분해 세균의 분리

남조류에 의한 수화가 발생하는 도창, 팔당 저수지와 석촌 호수로부터 채취된 저층시료를 *A. cylindrica* lawn에 접종하고 11 일간 배양한 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 *A. cylindrica* lawn에 여러개의 투명대가 형성하는 것을 확인 할 수 있었고, 이들 중 *A. cylindrica*에 대한 분해능을 측정하여 가장 분해능이 우수하다고 판단되는 균주 한종을 선택하였고 동정이 이루어지기 전까지 CHS1으로 명하였다.

분리 세균의 동정

분리 균주의 동정을 위하여 16S rDNA의 염기서열분석과 CRUSTAL W program과 PHYLIP program을 사용하여 수행하

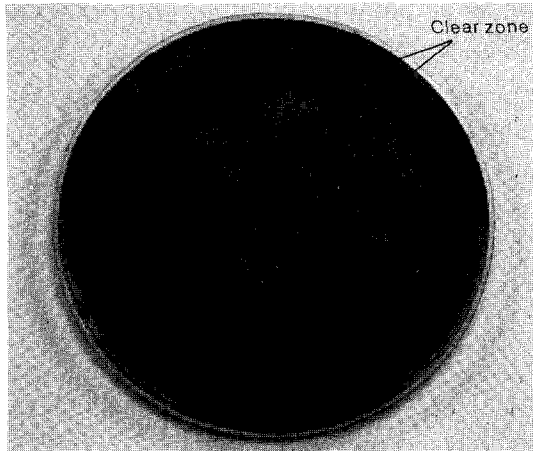


Fig. 1. Clear zones that made by microbes having algicidal activity.

였다. 16S rDNA 염기서열을 기초로한 분자계통학적 분석에서 분리 균주 CHS1은 Fig. 2에서 보는 바와 같이 *Bacillus* 속에 포함하는 계통학적 그룹에 속하며 특히, *Bacillus pumilus*와 97.4% 일치하여 가장 높은 유연관계를 보여주었다(Table 1). Drancourt 등(3)에 의하면 종 수준의 동정으로서 99%이상의 유사도를 가지며, 속 수준까지의 동정은 97%이상의 유사도를 가져야 한다고 보고되어 있다. 하지만 아직 16S rDNA 염기서열을 기초로하여 세균 동정에 관여하는 염기서열 유사도 비교의 기준은 아직 정해진 것은 아니다(5). CHS1의 형태학적 및 생리학적 특성은 Table 2에서 나타나있으며, 37°C, pH 7.0에서 최적의 성장을 보였고, 그람 양성균이고 catalase와 oxidase test에서는 양성반응을

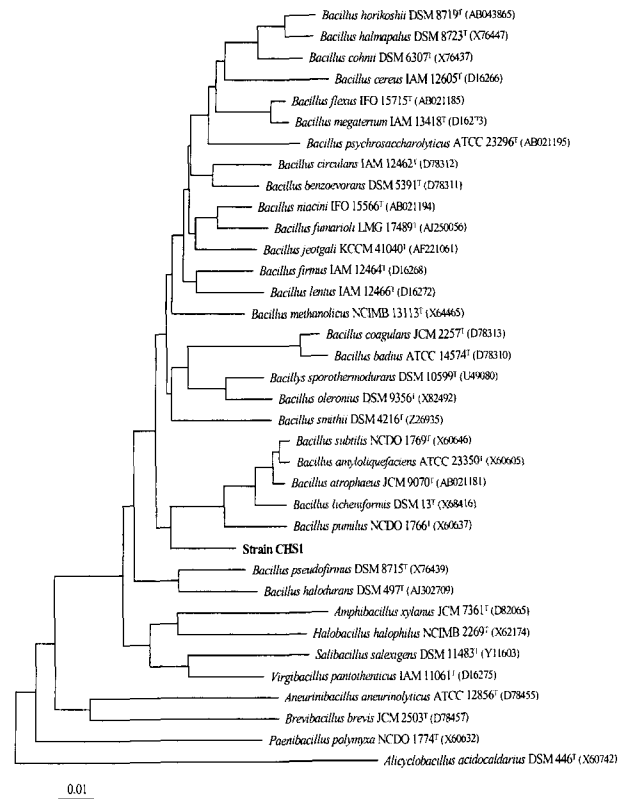


Fig. 2. Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences showing the positions of strain CHS1, the type strains of some *Bacillus* species and the representatives of some other related taxa. Scale bar represents 0.01 substitution per nucleotide position.

Table 1. Levels of 16S rDNA sequence similarity for strain CHS1, the type strains of some *Bacillus* species and representatives of some other related taxa

	% Similarity in :																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
1 Strain CHS1																			
2 <i>Bacillus subtilis</i> NCDO 1769T	94.7																		
3 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ATCC 23350T	95.0	99.4																	
4 <i>Bacillus atrophaeus</i> JCM 9070T	94.9	99.3	99.4																
5 <i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13T	94.9	98.2	98.2	98.3															
6 <i>Bacillus pumilus</i> NCDO 1766T	97.4	97.1	97.1	97.4	96.3														
7 <i>Bacillus cohnii</i> DSM 6307T	95.6	94.0	94.0	94.6	94.3	94.7													
8 <i>Bacillus megaterium</i> IAM 13418T	94.9	93.9	93.8	93.7	93.5	94.5	95.7												
9 <i>Bacillus circulans</i> IAM 12462T	94.8	93.5	93.6	93.3	93.8	93.8	95.3	95.6											
10 <i>Bacillus fumarioli</i> LMG 17489T	94.5	93.6	93.6	93.4	93.5	93.3	94.6	94.3	96.0										
11 <i>Bacillus firmus</i> IAM 12464T	95.5	94.9	94.9	95.1	95.4	94.9	94.7	95.2	96.4	95.5									
12 <i>Bacillus coagulans</i> JCM 2257T	93.5	93.0	92.8	93.1	92.9	92.1	92.6	92.7	92.3	93.0	92.3								
13 <i>Bacillus oleronius</i> DSM 9356T	94.2	94.9	94.8	95.2	95.0	94.3	93.5	93.2	93.9	94.0	95.5	94.4							
14 <i>Bacillus halodurans</i> DSM 497T	94.1	94.0	94.1	94.3	94.6	93.5	93.8	92.7	92.6	92.8	93.9	92.2	93.8						
15 <i>Halobacillus halophilus</i> NCIMB 2269T	92.3	91.7	91.6	91.5	91.6	91.7	91.4	90.8	92.1	92.8	92.8	90.6	92.5	92.5					
16 <i>Virgibacillus pantothenicus</i> IAM 11061T	93.2	93.2	93.5	93.5	93.4	92.9	92.4	92.4	93.2	92.4	93.2	91.2	93.1	92.9	94.0				
17 <i>Brevibacillus brevis</i> JCM 2503T	89.2	88.9	88.8	88.7	88.9	88.3	89.3	88.9	88.1	89.4	88.7	88.5	89.5	89.5	88.3	88.4			
18 <i>Paenibacillus polymyxa</i> NCDO 1774T	88.8	88.3	88.3	87.9	88.2	88.9	89.3	89.2	89.2	89.2	89.0	87.8	88.1	88.5	87.8	88.4	88.3		
19 <i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> DSM 446T	85.8	84.2	84.5	84.8	85.2	84.6	85.2	84.5	85.3	85.8	84.4	84.6	84.3	86.1	84.6	82.7	85.1	85.5	

Table 2. Morphological and physiological properties of the strain CHS1

Characteristics	Strain CHS1
Morphological	
Gram stain	+
Shape	Rod
Motility	+
Physiological	
Catalase	+
Oxidase	+
Carbohydrates	
amygdaline	+
arabinose	-
cellobiose	-
esculine	+
fructose	+
galactose	+
glucose	+
lactose	-
maltose	+
mannitol	-
mannose	+
melezitose	-
melibiose	+
raffinose	+
rhamnose	-
ribose	-
salicine	+
sorbitol	-
trehalose	+
xylose	-

보였다. 이상의 결과에 의해서 분리 균주 CHS1은 *Bacillus* sp. CHS1 으로 명하였다.

남조류의 분해 활성도 측정

CHS1의 남조류 분해정도를 알아보기 위해 대수성장기의 배양액에 대수성장기의 CHS1을 접종한 혼합 배양군과 CHS1을 접종하지 않은 대조군과의 chlorophyll a 값을 비교한 결과 혼합 배양군에서 접종 1일째에 대조군에 비하여 20%대로 chlorophyll a 값이 감소함을 보였고, 접종 7일째에는 대조군에 비하여 0.4% 대로 감소함을 보였다(Fig. 3).

세포외 물질의 남조류 분해 활성

분리 균주를 대수성장기까지 배양하여 세포를 제외하고 농축 된 세포외 물질을 살아 있는 *A. cylindrica*에 접종하여 분해능을

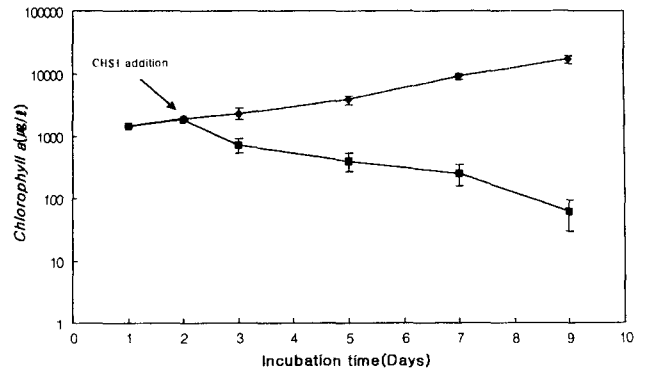


Fig. 3. Growth curves of *A. cylindrica* as measured by spectrophotometer, showing response after additions of CHS1. □, Negative control without *Bacillus* sp. CHS1 inoculation; ◆, Mixed culture of *A. cylindrica* and *Bacillus* sp. CHS1.

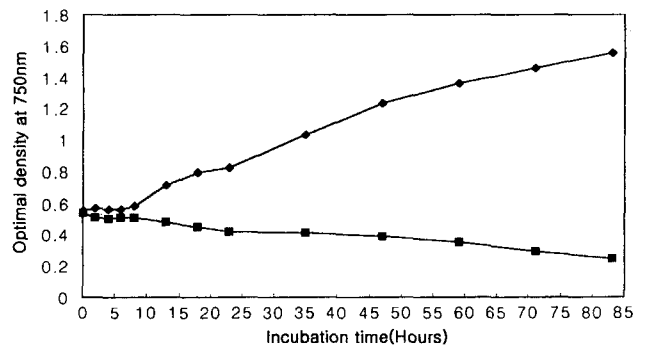


Fig. 4. Lytic activity of extracellular materials of *Bacillus* sp. CHS1 against *A. cylindrica*. ◆, Negative control without extracellular materials inoculation; ◆, Mixed culture of *A. cylindrica* and extracellular materials.

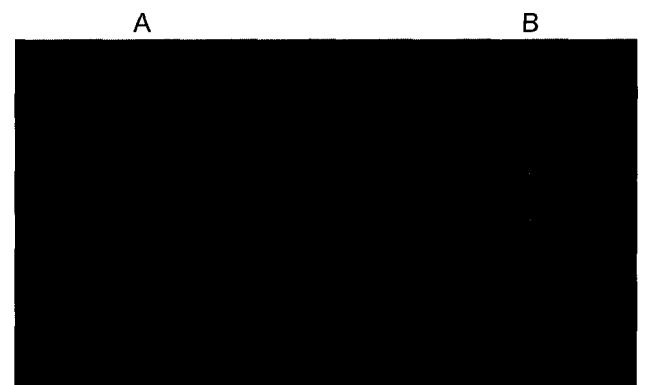


Fig. 5. Zone of clearing around paper discs showing algicidal activity in *Anabaena cylindrica* lawn. A, Extracellular material; B, D.W.

측정한 결과는 Fig. 4와 같이 나타났다. 세포외 물질을 접종하지 않은 대조군과 탁도를 비교시에도 세포외 물질을 접종한 *A. cylindrica*가 대조군에 비하여 탁도의 감소가 분명하게 나타난 것을 확인하였다. *A. cylindrica* lawn위에 paper disc를 놓고 세포외 물질 접종 실험에서는 24 시간 내에 paper disc 주변에 투명대가 형성되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 5). *Bacillus* sp.의 세포외

물질은 남조류 중에서 특히, *Anabaena*와 *Microcystis*를 분해하고, *Bacillus* sp.가 분비하는 남조류 분해 산물은 isoamyl alcohol (3-methyl-1-butanol)이라고 알려져 있다(17,26,27). 본 연구에서는 *Bacillus* sp. CHS1이 이런 물질을 분비하여 *A. cylindrica*를 분해하는지는 아직 확인 되지 않았다. 그러나 이 세포외 물질은 기존에 밝혀진 *Streptomyces* sp. (13)에 의해서 분비되는 세포외 물질에 의한 생장 억제나 *Flexibacter flexilis* (20)의해서 분비되는 lysozyme 계통의 효소가 남조류의 세포벽을 분해하는 것이 아니라 단순히 생장을 억제 시켰지만, *Bacillus* sp. CHS1은 *A. cylindrica*의 세포들을 완전히 용균시킴으로써 남조류에 분해 활성도가 더 높다고 판단된다.

따라서 본 연구 이후로 계속 진행되어야 할 과제는 분리한 *Bacillus* sp. CHS1이 어떤 물질을 분비하며, 어떠한 기작을 통해 *A. cylindrica*를 분해하지에 관한 연구가 진행되어야 할 것이다. 이와 같이 본 연구에서 분리한 *Bacillus* sp. CHS1은 남조류의 수화 발생하는 지역 중 질소가 고갈된 수역에서 발생하는 남조류에 분해능을 가지는 세균을 분리하고 분해능 실험을 통해 남조류의 대발생을 생물학적 방법으로 조절하는데 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부 국가지정연구실 사업의 과제(2001-NL-01-C-290)에 의하여 수행됨.

참고문헌

1. 경기개발연구원. 2001. 녹조제어 사례에 기초한 녹조방지 사업의 적용 방안, 연구보고서. 2001-18.
2. Castenholz. R.W. 1988. Culturing methods for cyanobacteria. *Methods Enzymol.* 167, 68-92.
3. Drancourt, M., C. Bottel, A. Carliz, R. Martelin, J.P. Gayral, and D. Raoult. 2000. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J. Clin. Microbiol.* 38, 3623-3630.
4. Felsenstein, J. 1993. PHYLIP: Phylogenetic Inference Package, version 3.5. Seattle: University of Washington.
5. Fox, G.E., J.D. Wisotzkey, and P. Jurtschuk, Jr. 1992. How close is close; 16S rDNA sequence identity may not be sufficient may not be sufficient to guarantee species identity. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42, 166-170.
6. Fulton, R.S. and H.W. Paerl. Toxic and inhibitory effects of the blue-green algae *Microcystis aeruginosa* on herbivorous zooplankton. *J. Plankton Research.* 9, 837-855.
7. Home, A.J. and C.R. Goldman. 1994. Limnology. 2nd ed., MacGraw-Hill, Inc. New York.
8. Herdman, M. 1988. Cellular differentiation: Akinetes. *Methods in Enzymology.* 167, 222-232.
9. Jeffries, M. and D. Mills. 1990. Freshwater Ecology. Principles

- and Applications. Belhaven Press, London.
10. Juke, T.H. and C.R. Cantor. 1969. Evolution of protein molecules, p.21-132. In H.N. Munro(ed.), Mammalian protein metabolism. Academic Press, New York, N.Y.
 11. Krige. N.R. and J.G. Holt. 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology (Vol. 1), Williams and Williams and Willkins, Baltimore.
 12. Lawton, L.A. and G.A. Godd. 1991. Cyanobacteria (Blue-Green algal) toxins and their significance in U.K. and European waters. *J. Inst. Wat. and Env. Manag.* 5, 460-465.
 13. Martin, E.L., J.E. Leach and K.J. Kuo. 1978. Biological regulation of bloom-causing blue, algae, p. 62-67. In M.W. Loutit and J.A.R. Miles (ed), Microbial Ecology. Springer-Verlag, Berlin.
 14. Murray, M.G. and W.F. Thompsom. 1980. Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. *Nucleic Acid Res.* 8, 4321-4325.
 15. Parsons R.T., Y. Maita and C.M. Lalli. 1984. A manual of chemical and biological methods for seawater analysis. 1st ed. Pergamon Press Ltd. Oxford.
 16. Rapala, J., K. Lahti, K. Sivonen and S. I. Nlemela. 1994. Biodegradability and adsorption on lake sediments of cyanobacterial Hepatotoxins and anatoxin-a. *Lett. Appl. Microbiol.* 19, 423-428.
 17. Reim, R.L., M.S. Shane and R.E. Cannon. 1974. The characterisation of *Bacillus* capable of blue-green bacterial activity. *Can. J. Microbiol.* 20, 981-986.
 18. 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.
 19. Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstruction phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
 20. Sallal, A.K.J. 1994. Lysis of cyanobacteria with *Flexibacter* sp. isolated from domestic sewage. *Microbios.* 77, 57-67.
 21. Schindler, D.W. 1977. Evolution of phosphorus limitation in lake. *Science* 195, 260-262.
 22. Tang. Y.W., N.L. Ellis, M.K. Hopkins, Smith D.E., Dodge, and D.H. Persing. 1998. Composition of phenotypic and genotypic techniques for identification of unusual aerobic photoic gram-negative bacilli. *J. Clin. Microbiol.* 36, 3674-3679.
 23. Thompson, I.P., M.J. Bailey, and B.P. Rainey. 1994. Phenotypic and genotypic diversity of fluorescent pseudomonads isolated from the phyllosphere of field-grown sugar beet. *Mol. Ecol.* 6, 613-614.
 24. Watanabe, Y., M.F. Watanabe, and M. Watanabe. 1986. Strong probability of lethal toxicity in the blue-green alga *Microcystis viridis lemmermanni*. *J. Phycol.* 22, 552-556.
 25. Weisburg, W., S.M. Barns, D.E. Pelletier, and D.J. Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173, 697-703.
 26. Wright, S.J. and R.J. Thompson. 1985. *Bacillus* volatiles antagonise cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 30, 263-267.
 27. Wright, S.J., C.J. Linton, R.A. Edwards and E. Drury. 1991. Isoamyl alcohol (3-methyl-1-butanol), a volatile anticyanobacterial and phytotoxic product of some *Bacillus* sp. *Lett. appl. Microbiol.* 13, 130-132.

(Received February 18, 2002/Accepted June 5, 2002)

ABSTRACT: Isolation and Identification of Bacteria Lysing *Anabaena cylindrica*

Yup Hong^{1,3}, Kyu-Chul Shin^{1,3}, Min-Seong Kim^{1,3}, Myung-Soo Han^{1,2,3} and Yong-Keel Choi^{1,3*} (¹Department of Life Science and ²Environmental Science, ³Hanyang University, National Research Laboratory for Water Environmental & Restoration, Seoul 133-791, Korea)

To isolate the bacteria lysing cyanobacteria, the sediment samples were collected from Dochang and Pal'tang Reservoir and Seokchon Lake. Each sample was smeared on the *Anabaena cylindrica* lawn and incubated in light chamber for 11 days. Bacteria having cyanobacteria-lysing activity were isolated from the samples of Seokchon reservoir. Confirmation of cyanobacteria-lysing activity was carried out to measure *chlorophyll a* and bacterial cell counting in mixed culture of *Anabaena cylindrica* and bacteria. Lysis was detected when extra-cellular materials was added to the *Anabaena cylindrica* culture. The isolate was identified by analysis based on 16S rDNA sequence and morphological and physiological properties. The bacterial strain was taxonomically studied by the phylogenetic analysis based on 16S rDNA sequence. This strain was identified as a member of the genus *Bacillus* and designated as *Bacillus* sp. CHS1.