

해양세균, *Shewanella* sp. SR-14에 의한 규조류 *Chaetoceros calcitrans*의 증식저해 - 해양세균이 규조류의 지방산 조성변화에 미치는 영향 -

김지희⁺ · 윤호동 · 박희연 · 이희정 · 장동석*
국립수산과학원, *부경대학교 식품공학과

Growth Inhibition of Diatom, *Chaetoceros calcitrans* by Marine Bacteria, *Shewanella* sp. SR-14

- Effects of Marine Bacteria on the Changes of Fatty Acid Composition of Diatoms -

Ji Hoe KIM⁺, Ho Dong YOON, Hee Yun PARK, Hee Jung LEE and Dong Suck CHANG*

National Fisheries Research and Development Institute, Busan 619-902, Korea

*Department of Food Science and Technology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

In the previous reports, the authors isolated two strains of marine bacteria, *Shewanella* sp. SR-14, which has *Chaetoceros* sp. growth inhibition activity, and *Vibrio alginolyticus*, that did not affect growth of the alga. In the present study, fatty acid compositions of diatoms, *Chaetoceros calcitrans* and *Skeletonema costatum*, and marine bacteria, *Shewanella* sp. SR-14 and *V. alginolyticus*, were analyzed. Changes of fatty acid composition in the diatoms grown with the marine bacteria were also determined. Major fatty acids of *Shewanella* sp. SR-14 were 16:1n-7 (29.4%) and 16:0 (19.2%) during incubation in peptone broth at 20°C for 3 days. The compositions of *V. alginolyticus* detected were 16:0 (23.7%), 16:1n-7 (27.7%) and 18:1n-7 (21.0%). *C. calcitrans* consisted of 16:1n-7 (33.3%), 16:0 (27.1%) and 14:0 (12.1%). *S. costatum* mainly contained 16:1n-7 (28.9%), 16:0 (21.6%) and 20:5 (19.8%). When halves of cell numbers of *C. calcitrans* were moribund cells by *Shewanella* sp. SR-14, the *C. calcitrans* and *S. costatum* simultaneously cultured with the bacteria were harvested by filtration with GF/D glass microfibre filter. In the fatty acid composition of both diatoms, saturated fatty acid contents in both diatoms grown with *Shewanella* sp. SR-14 were decreased, but unsaturated fatty acid contents were increased. The differences were greater in *C. calcitrans* than those in *S. costatum*. During the growth of diatoms with *V. alginolyticus*, *C. calcitrans* showed increase of saturated fatty acid contents and decrease of unsaturated fatty acid contents; however, *S. costatum* did not show sharp difference in fatty acid content. In this study, *Shewanella* sp. SR-14, which showed growth inhibition activity against *C. calcitrans*, influenced on the changes of fatty acid contents in the diatom. It was suggested that increased unsaturated fatty acid was synergistically activated algal growth inhibition activity of *Shewanella* sp. SR-14.

Key words: *Shewanella* sp., *Vibrio alginolyticus*, Algal growth inhibition bacteria, Fatty acid, Diatom, *Chaetoceros calcitrans*, *Skeletonema costatum*

서 론

미세조류와 세균은 수계 생태계에서 수적으로 가장 많은 생물 군을 이루고 있으며 여러 가지 상호작용을 하면서 서식하고 있다. 세균이 미세조류에 미치는 여러 가지 영향 중 생육 저해활성을 이용한 적조 방제연구가 최근 활발히 진행되면서 다수의 미세조류 저해균이 보고되고 있다 (清水, 1991; 石田, 1994). 세균이 미세조류 생육에 미치는 저해기구는 직접적 공격과 대사산물에 의한 생육저해 등 2가지 유형이 알려져 있다 (今井, 1994). 이 중 대사산물에 의한 미세조류 저해균은 특정한 종에 대해서만 저해활성을 나타내는 경우가 많아 host range가 광범위한 직접적 공격형 세균보다 실제 적조방제를 위한 이용면에서는 이점이 있다. 그리고 세균이 생성하는 미세조류 생육저해 물질은 고분자물질인 단백질에서 분자량 109 Da 정도의 저분자 물질에 이르기까지 다양하다 (Baker and Herson, 1978; 吉永·石田, 1995; 深見·西島, 1994; Kim et al., 1999c).

전보에서 저자들은 규조류 *Chaetoceros* spp.의 생육을 저해하는 해양세균 *Shewanella* sp. (舊名 *Alteromonas* sp.) SR-14를 분리 하였으며, 이 균은 대사산물을 생성하여 그 생육을 저해하는 것으로 보고한 바 있다 (Kim et al., 1999a; 1999b; 1999c). 그런데 *Shewanella* sp. SR-14에 의한 *Chaetoceros calcitrans*의 생육저해는 대사산물 (배양여액)만을 사용한 경우보다 세균이 공존하는 경우에 그 활성이 훨씬 강하여 세균이 생성하는 저해물질 이외의 다른 미지의 기구가 관여하고 있을 가능성이 시사되었다 (Kim et al., 1999c; 2001a).

한편, 세균뿐만 아니라 특성의 미세조류가 다른 미세조류의 생육을 촉진하거나 혹은 저해하는 他感作用 (allelopathy)도 알려져 있는데, 이 때 생육저해에는 불포화지방산이 관여하는 것으로 다수 보고되어 있으나 (Arzul et al., 1995; Imada et al., 1992; Murata et al., 1989; 本城·淺川, 1992) 세균에 의한 세조류 생육저해에서 지방산 조성의 변화 및 그 역할은 거의 검토되지 못하였다.

본 연구는 *Shewanella* sp. SR-14에 의한 *Chaetoceros* spp. 생육저해에 대한 지방산의 영향을 알아보기 위한 연구의 일환으로 전보 (Kim et al., 1999a; 2001b)에서 분리한 미세조류 생육저해균

⁺Corresponding author: kimjh@nfrdi.re.kr

Shewanella sp. SR-14와 생육 저해활성이 없었던 *Vibrio alginolyticus*의 지방산 조성을 측정하고 이들 균과 규조류를 혼합배양하였을 때 *Shewanella* sp. SR-14에 감수성인 *C. calcitrans*와 비감수성인 *Skeletonema costatum*의 지방산 조성의 변화를 시험하였다.

재료 및 방법

시험균주, 미세조류 및 배지

시험균주 *Shewanella* sp. SR-14와 *V. alginolyticus*, 그리고 규조류 *C. calcitrans* CCMP 1315와 *S. costatum* CCMP 775는 전보 (Kim et al., 1999a; 2001b)와 같은 것을 사용하였다. 그리고 세균과 규조류 배양에 사용된 배지는 세균의 경우 peptone broth (Kim et al., 1999a)이었고, 미세조류의 경우에는 Conwy 배지 (Walne, 1979)이었다.

시험균과 미세조류의 배양조건과 회수

순수배양한 시험균의 지방산 조성분석을 위하여 *Shewanella* sp. SR-14와 *V. alginolyticus*는 peptone broth에서 20℃로 3일간 정치배양한 후 일부는 미세조류에 배양액에 접종하여 혼합배양하고, 나머지 세균 배양액은 오염되지 않게 하여 4℃에서 8,000 rpm으로 40분간 원심분리 (Kontron Inst., Model Centrikon T-324, Italy)하여 집균하였다. 집균한 균체는 멸균 생리식염수로 3회 세정한 후 일부는 peptone broth 배양 균체의 지방산 분석 시료로 하고, 나머지는 Conwy 배지에 다시 접종하여 미세조류 배양조건에서 24시간 배양한 후 동일 원심분리 조건으로 집균하여 Conwy 배지 배양 균체의 지방산 분석용 시료로 하였다 (Fig. 1).

시험 미세조류 *C. calcitrans*와 *S. costatum*은 Conwy 배지에서

대수기 (OD₇₅₀=약 0.10)까지 전배양한 후 오염되지 않게 원심분리 (8,000 rpm, 30분, 20℃)로 조체를 모은 후 각각 대조구와 두 개의 시험구로 구분한 새로운 Conwy 배지에 접종하였다. 두 개의 시험구에는 *Shewanella* sp. SR-14 또는 *V. alginolyticus* 균액을 최종균수가 약 10⁴ CFU/mL되도록 접종하고, 대조구에는 균액과 동량의 peptone broth를 주입하여 다시 배양하였다. 이 때 미세조류의 배양조건은 온도 21±1℃, 조도 약 4,000 lux, 광주기 12 Light : 12 Dark에서 정치배양하였다. 세균과 혼합배양한 경우의 지방산 분석을 위한 미세조류는 *Shewanella* sp. SR-14가 접종된 *C. calcitrans* 세포를 현미경으로 관찰하여 전체 조류세포수의 약 50%에서 세포 내용물이 소실되기 시작할 때 (24시간 후) 각 시험구 및 대조구의 조류를 여과 회수하였다. 즉, 미세조류 배양액은 450℃, 4시간 처리한 GF/D glass microfibre filter (Whatman)로 여과하여 조류세포를 회수하고, pore size 0.2 μm의 membrane filter로 여과한 후 멸균한 해수 300 mL로 세정하여 분석시료로 하여 동일 조건으로 배양 회수한 대조구 조류의 지방산 조성과의 비교하였다 (Fig. 1).

지방산 분석조건

시험균과 미세조류의 지질은 Folch et al. (1957) 및 藤野 (1980)의 방법을 개량하여 각 시료 (약 1 g)에 chloroform:methanol (2:1)을 10 mL 첨가하여 추출하였다. 추출된 지질은 H₂SO₄:toluene:methanol (1:10:20) 용매를 첨가하고 100℃에서 4시간 가열하여 methylation한 다음, hexane 층으로 이행시키고, hexane 층은 분취하여 증류수로 3회 세정한 다음 수분을 제거하고 농축하여 Table 1과 같은 조건으로 gas chromatography에 의해 지방산을 분석하였다. 시료의 지방산 조성은 지방산 표준 (Sigma)을

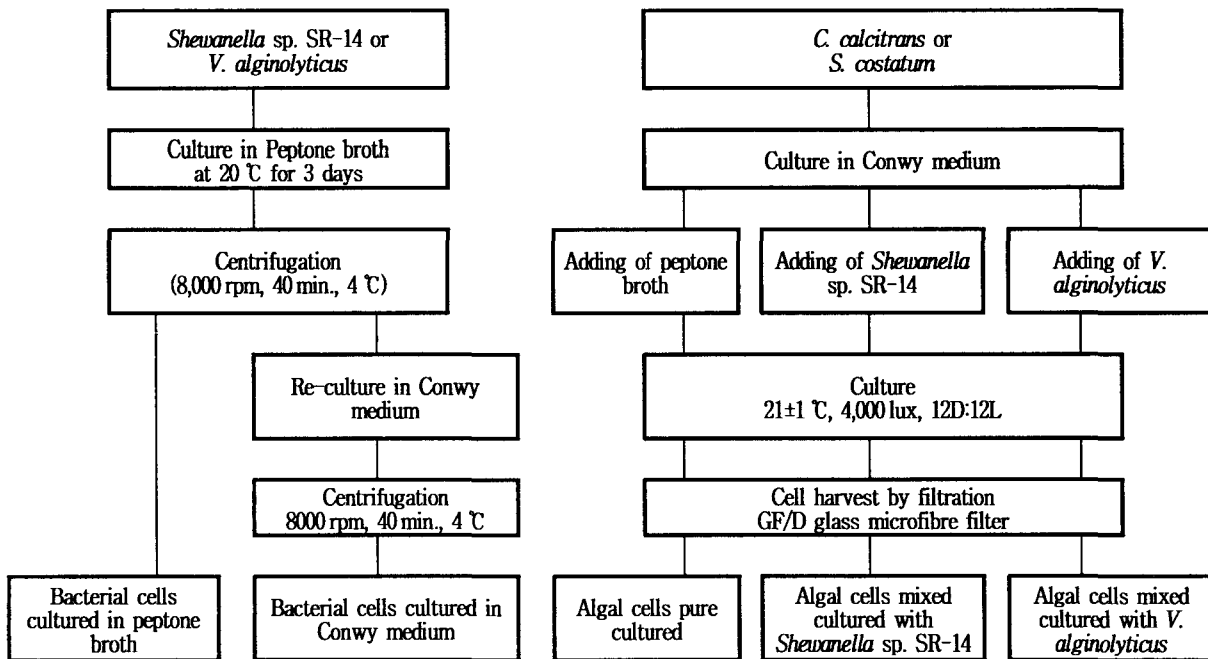


Fig. 1. Bacteria (left) and microalgal (right) culture procedures for fatty acid analysis.

Table 1. Operating condition of gas chromatography for fatty acid analysis

Gas chromatography	Hewlett Packard 5890 Series II
Column	HP-1, 25 m×0.32 mm ID, 0.17 μm
Packing	100% dimethyl-polysiloxane (gum)
Carrier gas	Helium (20 cm/sec.)
Column temperature	140°C (7 min.) to 240°C, 2°C/min.
Injector temperature	220°C, Split 100:1
Detector temperature	FID, 250°C

이용하여 각각의 상대 retention time을 비교하여 동정하고, 각각의 peak에 대한 면적을 백분율로 나타내었으며, 각 시료별로 3회 분석한 결과의 평균치로 나타내었다.

결 과

시험균 *Shewanella* sp. SR-14와 *V. alginolyticus*의 지방산 조성

Peptone broth에서 20°C, 3일간 배양한 *Shewanella* sp. SR-14와 *V. alginolyticus*의 지방산 조성, 이 균체를 Conwy 배지로 미세 조류 배양조건에서 24시간 재배양하였을 때의 지방산 조성의 변화를 Table 2에 나타내었다.

Peptone broth에서 배양한 *Shewanella* sp. SR-14의 지방산 조성은 포화지방산이 37.3%, 1가 불포화지방산이 51.6%, 다가 불포화지방산이 4.3%이었으며, 10% 이상을 차지한 주요 지방산은 16:1n-7 (29.4%)와 16:0 (19.2%)이었다. 한편, 동일조건에서 배양한 *V. alginolyticus*의 지방산 조성은 포화지방산이 38.0%, 1가 불포화지방산이 57.0% 다가 불포화지방산이 1.6%이었으며, 주요 지방산 중은 *Shewanella* sp. SR-14의 경우와 마찬가지로 16:0과 16:1n-7이 각각 23.7 및 27.7%로 높은 비율을 차지한 것은 같은 경향이었으나 18:1n-7이 21.0%를 차지한 점은 차이가 있었다. 전체적으로 보았을 때 두 시험균에서 지방산 조성의 차이는 *Shewanella* sp. SR-14가 *V. alginolyticus*보다 1가 불포화지방산의 비율은 약간 낮았으나 다가 불포화지방산의 비율은 역으로 약간 높게 나타났다.

한편, peptone broth에서 배양한 시험균을 Conwy 배지에서 재배양하였을 때 지방산 조성은 *Shewanella* sp. SR-14의 경우 포화지방산이 39.0%, 1가 불포화지방산이 48.9% 그리고 다가 불포화지방산이 2.9%이었으며, *V. alginolyticus*는 각각 39.3%, 54.1% 및 2.5%로 나타났다. 이러한 결과를 peptone broth에서 배양한 것과 비교하면 포화지방산과 1가 불포화지방산의 2% 내외 증감은 두 시험균에서 같은 경향이었으나 다가 불포화지방산은 *Shewanella* sp. SR-14의 경우 감소한 반면 *V. alginolyticus*의 경우 증가한 점은 차이가 있었다. 그리고 지방산 종류에 따라서는 *Shewanella* sp. SR-14의 경우 peptone broth에서 배양한 균체에 비하여 16:0과 16:1n-7의 비율이 약 5% 증가한 반면 24:1의 비율이 약 4% 감소하는 등 약간의 변화가 있었으나 *V. alginolyticus*의 경우는 큰 변화가 없었다.

Table 2. Fatty acid composition of *Shewanella* sp. SR-14 and *V. alginolyticus* cultured in peptone broth or Conwy medium (Area %)

Fatty acid	<i>Shewanella</i> sp. SR-14		<i>Vibrio alginolyticus</i>	
	Peptone broth	Conwy medium	Peptone broth	Conwy medium
Saturates				
10:0	0.20	0.29	0.14	trace
11:0	trace	0.15	trace	trace
12:0	2.71	5.01	2.38	1.99
13:0	0.33	0.25	0.10	0.11
14:0	2.74	1.82	5.00	5.29
15:0	1.23	1.44	1.57	1.77
16:0	19.23	24.49	23.68	24.78
17:0	1.62	2.03	2.08	2.12
18:0	4.84	2.43	2.26	1.79
19:0	0.20	0.55	0.62	1.32
20:0	0.13	0.45	trace	trace
22:0	trace	trace	trace	trace
24:0	3.96	0.10	trace	-
Sum	37.30	39.03	37.98	39.34
Monounsaturates				
14:1	trace	trace	trace	0.11
16:1n-7	29.35	34.85	27.74	29.27
16:1n-9	1.41	1.65	3.67	2.49
17:1	4.56	5.27	1.65	1.63
18:1n-7	3.72	0.42	21.04	18.36
18:1n-9	6.07	6.29	2.61	2.08
19:1	1.24	0.15	0.13	0.12
20:1	0.12	0.17	trace	trace
22:1	0.97	trace	trace	trace
24:1	4.13	trace	trace	-
Sum	51.61	48.94	56.96	54.08
Polyunsaturates				
18:2	0.27	0.27	trace	trace
18:3	1.58	1.94	0.98	1.92
20:2	0.26	0.24	trace	trace
20:4	trace	trace	0.12	0.12
20:5	0.19	trace	0.22	0.34
22:3	1.43	0.15	trace	trace
22:6	0.45	0.17	trace	trace
Sum	4.25	2.87	1.57	2.53
Unknown	6.84	9.16	3.49	4.05
Unsaturate/Saturate	1.50	1.33	1.54	1.48

trace, <0.1%.

시험 미세조류의 지방산 조성

C. calcitrans 및 *S. costatum*과 *Shewanella* sp. SR-14 혹은 *V. alginolyticus*를 각각 혼합배양하면서 *Shewanella* sp. SR-14와 혼합배양한 *C. calcitrans* 배양조체의 약 50%에서 내용물이 소실되기 시작할 때 각 시험조류의 지방산 조성을 순수배양한 경우와 비교하여 Table 3에 나타내었다.

1) 순수배양 미세조류의 지방산 조성

순수배양한 미세조류의 지방산 조성은 *C. calcitrans*의 경우 포

Table 3. Changes of fatty acid composition in *C. calcitrans* and *S. costatum* cultured with *Shewanella* sp. SR-14 and *V. alginolyticus* (Area %)

Fatty acid	<i>C. calcitrans</i>			<i>S. costatum</i>		
	Pure culture	Mixed culture		Pure culture	Mixed culture	
		<i>Shewanella</i> sp. SR-14	<i>V. alginolyticus</i>		<i>Shewanella</i> sp. SR-14	<i>V. alginolyticus</i>
Saturates						
10:0	0.21	0.46	0.18	0.12	0.26	0.20
11:0	trace	trace	trace	trace	trace	trace
12:0	0.10	2.19	0.12	trace	0.32	trace
13:0	trace	0.10	trace	0.11	trace	trace
14:0	12.14	5.77	12.56	3.44	3.74	4.16
15:0	0.82	0.80	0.83	0.18	0.27	0.22
16:0	27.13	18.29	29.94	21.61	17.05	22.75
17:0	trace	0.66	trace	trace	trace	trace
18:0	0.98	3.18	0.76	1.12	1.00	0.73
19:0	—	—	trace	—	0.13	—
20:0	0.12	0.22	0.12	0.12	0.14	trace
22:0	0.70	1.64	0.62	0.22	0.19	0.15
24:0	0.34	—	0.32	—	—	trace
Sum	42.65	33.35	45.53	27.03	23.23	28.55
Monounsaturates						
14:1	trace	trace	trace	—	—	—
16:1n-5	5.25	9.82	6.07	4.21	5.60	2.82
16:1n-7	33.28	26.10	32.67	28.85	28.58	30.94
16:1n-9	3.57	1.38	1.22	1.62	1.71	3.36
16:1n-11	1.28	3.68	1.19	1.06	1.13	0.62
17:1	trace	2.17	trace	trace	0.34	trace
18:1n-7	0.41	trace	0.30	2.03	0.94	1.93
18:1n-9	0.48	3.64	0.42	0.75	0.71	0.83
19:1	trace	0.30	trace	0.16	0.20	trace
20:1	0.11	0.11	0.13	0.30	0.23	0.17
22:1	trace	—	trace	0.52	0.56	0.56
24:1	—	—	trace	—	—	0.40
Sum	44.59	47.84	42.23	39.57	40.00	41.80
Polyunsaturates						
18:2	0.54	0.29	0.43	1.59	1.29	1.67
18:3	0.48	1.46	0.52	1.47	1.18	1.35
20:2	0.66	0.79	0.25	0.75	0.97	0.92
20:4	0.38	0.29	0.22	0.80	1.20	1.06
20:5	6.79	7.41	7.39	19.80	21.58	16.23
22:3	0.10	0.42	trace	0.25	0.13	0.11
22:6	1.06	1.76	0.99	0.33	0.21	0.11
Sum	10.01	12.42	9.89	24.99	26.56	21.45
Unknown	2.75	6.39	2.35	8.41	10.21	8.20
Unsaturate/Saturate	1.28	1.81	1.14	2.39	2.87	2.22

trace, <0.1%.

화지방산이 42.7%, 1가 불포화지방산이 44.6% 그리고 다가 불포화지방산이 10.0%이었으며, *S. costatum*은 각각 27.0%, 39.6% 그리고 25.0%로 *S. costatum*이 *C. calcitrans*에 비하여 다가 불포화지방산의 비율이 훨씬 높았다. 10% 이상을 차지하는 주요 지방산의 종류는 *C. calcitrans*의 경우 16:1n-7 (33.3%), 16:0 (27.1%)

및 14:0 (12.1%) 이었고, *S. costatum*은 16:1n-7 (28.9%), 16:0 (21.6%) 및 20:5 (19.8%)로 나타나 규조류에 있어서도 종에 따라 지방산 조성에 뚜렷한 차이가 있었다.

2) 세균과 혼합배양한 미세조류의 지방산 조성

세균과 혼합배양한 미세조류의 지방산 조성은 *Shewanella* sp. SR-14와 혼합배양하였을 때 *C. calcitrans*의 경우 포화지방산이 33.4%, 1가 불포화지방산이 47.8%, 다가 불포화지방산이 12.4%로 순수배양한 조체에 비하여 포화지방산의 비율은 감소하였으나 불포화지방산의 비율은 증가하였다. 이 때 포화지방산에 대한 불포화지방산의 비율이 순수배양한 조체에서는 1.28이었으나 혼합배양한 것에서는 1.81로 1.4배 증가하였다. 지방산 종류별로는 16:1n-7 (33.3 → 26.1%), 16:0 (27.1 → 18.3%) 및 14:0 (12.1 → 5.8%)이 순수배양에 비하여 큰 폭으로 감소하였고 그 외의 지방산 조성에는 약간의 증감이 있었다. *S. costatum*의 경우는 포화지방산이 23.2%, 1가 불포화지방산이 40.0% 그리고 다가 불포화지방산이 26.6%로 포화지방산에 대한 불포화지방산의 비율은 순수배양한 경우 2.39에서 혼합배양한 경우 2.87로 1.2배 증가하였으나 지방산 종류별로는 16:0이 약 5% 감소한 것을 제외하면 다른 지방산의 변동폭은 적었다.

한편, 시험 규조류를 *V. alginolyticus*와 혼합배양하였을 때의 지방산 조성은 *C. calcitrans*의 경우 포화지방산이 45.5%, 1가 불포화지방산이 42.2%, 다가 불포화지방산이 9.9%를 차지하여 순수배양한 조체와 약간의 차이를 나타내었으며, 포화지방산은 증가한 반면 불포화지방산은 감소하는 경향을 나타내었다. 그리고 *S. costatum*의 경우는 포화지방산이 28.6%, 1가 불포화지방산이 41.8% 그리고 다가 불포화지방산이 21.5%를 각각 차지하여 순수배양한 조체와 큰 차이를 보이지 않았다. 또한 *V. alginolyticus*와 혼합배양한 *C. calcitrans*와 *S. costatum* 조체의 포화지방산에 대한 불포화지방산의 비율은 각각 1.14와 2.22로, 순수배양한 경우 1.28과 2.39에 비하여 각각 약 0.1배의 비교적 적지만 감소를 나타내어 *Shewanella* sp. SR-14와 혼합배양한 경우와는 역의 경향이였다.

고 찰

세균의 지방산 조성은 균종에 따라 고유한 특징을 가지고 있어 동정 시에 중요한 지표가 되기도 한다. 본 실험에서 나타난 바와 같이 *V. alginolyticus* 등 Gram 음성의 해양세균에서는 16:0, 16:1 및 18:1이 공통적으로 많이 검출되는 것으로 보고되어 있다 (Oliver and Colwell, 1973). Bertone et al. (1996)은 해양세균에 대한 지방산조성 분석에서 *Alteromonas* sp.는 16:0이 18.5%, 16:1이 17.8% 그리고 18:1이 12.8%이었으며, *Vibrio* sp.는 각각 16.7%, 31.1% 및 19.5%를 차지하였다고 보고하여 본 실험에서 나타난 결과와 유사한 경향이였다. 그러나 Oliver and Colwell (1973)은 *V. alginolyticus*의 지방산 조성이 16:1이 50.0%, 16:0이 13.1% 그리고 18:1이 31.2%이었다고 보고하여 본 실험 결과와는 약간의 차이를 나타내었는데 이는 배지조성, 배양기간 등 시험조건에 의한 차이 때문인 것으로 사료된다.

세균과 마찬가지로 미세조류의 지방산 조성 또한 종에 따라 차이가 있으며, 동일한 종에 있어서도 배양온도, 배지, 배양기간, 조도 등 배양조건에 따라 다소의 차이가 있는 것으로 보고되어 있다 (Brown et al., 1996; Thompson et al., 1992). 본 연구에서 사용한 *C. calcitrans*와 *S. costatum*의 지방산 조성 또한 배양조건에 따라 차이가 있으나 주요한 지방산 종은 16:1n-7, 16:0, 14:0 및 20:5 이라고 보고되어 있으며 (Ackman et al., 1964; 1968; Fernandez-Reiriz et al., 1989), 본 연구의 결과도 같은 경향이였다.

한편, 지금까지 세균에 의한 미세조류 생육저해연구에서 세균이 생성하는 저해물질은 단백질과 같은 고분자물질부터 분자량 109 Da 정도의 저분자에 이르기까지 다양한 것으로 알려져 있으나 (Baker and Herson, 1978; 吉永 · 石田, 1995; 深見 · 西島, 1994) 지방산의 역할은 거의 알려져 있지 않다. 그런데 미세조류에서 유래하는 지방산이 다른 미세조류의 생육을 저해한다는 것이 다수 보고되어 있으며, 이러한 연구결과들을 종합하여 보면 지방산의 미세조류 저해활성은 지방산의 종류 및 대상 미세조류의 종에 따른 차이가 있으나 포화지방산은 거의 저해활성이 없고, 불포화 지방산이 저해활성을 가지며 특히 고도불포화지방산이 강한 것으로 알려져 있다 (Arzul et al., 1995; Imada et al., 1992; Uchida et al., 1988; 尾上, 1988; 本城 · 淺川, 1992).

본 연구에서는 먼저 미세조류 생육저해활성이 있는 세균과 그렇지 않은 세균, 그리고 이들 세균을 미세조류 생육저해가 나타나는 조건으로 배양하였을 때 지방산 조성이 어떻게 변하는지를 시험하였다. 시험균을 peptone broth에서 배양하였을 때 지방산 조성은 *C. calcitrans* 저해균인 *Shewanella* sp. SR-14는 조류생육저해활성이 없는 *V. alginolyticus*에 비하여 18:3, 22:3 등 고도불포화지방산의 비율이 다소 높았다. 그러나 이들 시험균을 Conwy 배지로 미세조류 배양조건에서 재배양하였을 때 이 지방산의 비율은 거의 비슷하게 되었고, 1가 불포화지방산의 비율은 오히려 *V. alginolyticus*가 더 높았다 (Table 2). 이러한 결과에서 세균 균체의 지방산 조성과 미세조류의 생육저해와는 뚜렷한 관련이 없는 것으로 사료된다.

한편, 전보 (Kim et al., 1999c)에서 *Shewanella* sp. SR-14의 *C. calcitrans* 생육저해 활성은 대사산물 (배양여액)보다 세균이 공존하는 경우 그 활성이 훨씬 강하여 세균이 생성하는 저해물질 뿐만 아니라 다른 미지의 기구가 관여하고 있을 가능성을 시사한 바 있다. 본 연구에서는 그 가능성의 하나로 지방산의 역할을 알아보고자 세균과 미세조류를 혼합배양하였을 때 지방산 조성의 변화를 측정하였다. 그 결과 조류 생육저해활성이 없었던 *V. alginolyticus*와 미세조류를 혼합배양하였을 때에는 조체의 불포화지방산 비율이 증가하지 않았으나 *C. calcitrans* 생육저해균인 *Shewanella* sp. SR-14와 혼합배양한 경우 조체의 지방산 조성에서 불포화지방산의 비율이 증가하였으며, 이 때 증가율은 이 균에 비감수성인 *S. costatum*보다 감수성인 *C. calcitrans*에서 다소 높았다 (Table 3). 그리고 전보 (Kim et al., 1999b; 1999c)에서 *Shewanella* sp. SR-14는 peptone broth에서 순수배양하면 25°C에서도 *C. calcitrans* 저해물질을 생성하였지만, Conwy 배지에서 *C. calcitrans*와 혼합배양하였을 때에는 온도에 따른 차이가 있어 10~20°C에서는 온도가

낮을수록 조류생육 저해활성이 강하였다. 그러나 25°C 이상에서는 세균의 증식은 활발하였음에도 조류의 생육에 영향을 끼치지 못하여 온도에 따른 미세조류의 생리기능의 변화가 시사되는 것으로 보고한 바 있다 (Kim et al., 1999b). 그런데 세균, 미세조류, 어류 등 모든 생물은 생육온도가 저하하면 생체막의 homeoviscosity를 유지하기 위하여 체내 불포화지방산의 비율이 증가하는 것으로 보고되어 있다 (Oliver and Colwell, 1973; Thompson et al., 1992; 竹内, 1991). 또한 본 시험에서 사용한 규조와 같은 종인 *S. costatum*은 자가 생육 저해물질인 불포화지방산 (15-hydroxyeicosapentaenoic acid)을 생성하기도 하는데, 이 지방산은 세포가 살아 있을 때에는 세포 내에 축적되어 있으나 조류가 사멸하면 세포 외로 급속히 유리된다고 보고되어 있다 (Imada et al., 1991). 그리고 이렇게 불포화지방산이 미세조류 생육저해 활성을 나타내는 것은 지방산의 자동산화에서 생성되는 free radical 때문이라는 보고도 있다 (Murata et al., 1989).

이상의 결과에서 *Shewanella* sp. SR-14에 의한 *C. calcitrans* 저해기구의 일부는 다음과 같이 추정되었다. 즉, 세균의 자극에 의하여 *C. calcitrans*의 지방산 조성에서 불포화지방산이 차지하는 비율이 높아지고, 그 일부는 위에서 나타난 바와 같이 사멸하면서 조체에서 유리되어 자동산화 등에 의하여 생성된 free radical이 세균이 생성하는 생육저해물질에 의한 조류의 생육저해와 더불어 상승효과를 나타낸 것으로 추정된다. 이 때 배양온도가 낮을수록 규조류에서 불포화지방산 비율이 높아져 생육저해가 더욱 촉진되는 것으로 추정할 수 있었는데 자세한 기구에 대해서는 보다 더 연구가 있어야 할 것으로 사료된다.

요 약

규조류 *C. calcitrans*와 *S. costatum*, 그리고 *Chaetoceros* spp. 생육저해 활성을 가지는 해양세균, *Shewanella* sp. SR-14와 그 저해활성이 없는 *V. alginolyticus*의 지방산 조성을 분석하고 이들 해양세균과 규조류를 각각 혼합배양하였을 때 규조류의 지방산 조성변화를 측정하였다.

Peptone broth에서 20°C, 3일간 배양한 *Shewanella* sp. SR-14의 주요 지방산 조성은 16:1n-7 (29.4%)과 16:0 (19.2%)이었으나, *V. alginolyticus*의 경우는 16:0 (23.7%), 16:1n-7 (27.7%) 및 18:1n-7 (21.0%)이었으며, 이들 세균을 Conwy 배지에서 재배양하였을 때 그 조성은 peptone broth에서 배양한 균체와 약간의 변화가 있었다.

순수배양한 미세조류의 주요 지방산은 *C. calcitrans*의 경우 16:1n-7 (33.3%), 16:0 (27.1%) 및 14:0 (12.1%) 이었고, *S. costatum*은 16:1n-7 (28.9%), 16:0 (21.6%) 및 20:5 (19.8%)이었다.

세균과 혼합배양한 규조류의 지방산 조성은 *Shewanella* sp. SR-14와 혼합배양한 경우 순수배양한 조체에 비하여 포화지방산의 비율은 감소하였으나 불포화지방산의 비율은 증가하였으며, 그 변동율은 *C. calcitrans*의 경우가 *S. costatum*보다 높았다. 그러나 *V. alginolyticus*와 혼합배양한 경우 *C. calcitrans*는 포화지방산이 증가한 반면 불포화지방산은 감소하는 경향을 나타내었고, *S. costatum*은

순수 배양한 조체와 큰 차이를 보이지 않았다. 그래서 *C. calcitrans*는 *Shewanella* sp. SR-14에 의하여 불포화지방산의 조성이 증가되고, 이러한 지방산은 이 균이 생성하는 조류증식 저해물질과 상승적으로 작용하여 더욱 조류의 증식이 억제되는 것으로 시사되었다.

감사의 글

본 연구는 국립수산물과학원 고유사업인 경상시험연구비로 수행된 결과의 일부이며, 연구비 지원에 감사 드립니다.

참 고 문 헌

- Ackman, R.G., P.M. Jangaard, R.J. Hoyle and H. Brockerhoff. 1964. Origin of marine fatty acids. I. Analysis of the fatty acids produced by the diatom *Skeletonema costatum*. J. Fish. Res. BD. Canada, 21, 747~756.
- Ackman, R.G., C.S. Tocher and J. McLachlan. 1968. Marine phytoplankton fatty acids. J. Fish. Res. BD. Canada, 25, 1603~1620.
- Arzul, G., P. Gentien, G. Bodennec, F. Toularastel, A. Youenou and M.P. Crassous. 1995. Comparison of toxic effects in *Gymnodinium* cf. *nagasakiense* polyunsaturated fatty acids. In *Harmful Marine Algal Blooms*. P. Lassus, G. Arzul, P. Gentien and C. Marcaillou, eds. Lavoisier, Paris, pp. 395~400.
- Baker, K.H. and D.S. Herson. 1978. Interactions between the diatom *Thalassiosira pseudonana* and a associated Pseudomonads in a mariculture system. Appl. Environ. Microbiol., 35, 791~796.
- Bertone, S., M. Giacomini, C. Ruggiero, C. Piccarolo and L. Calegari. 1996. Automated systems for identification of heterotrophic marine bacteria on the basis of their fatty acid composition. Appl. Environ. Microbiol., 62, 2122~2132.
- Brown, M.R., G.A. Dunstan, S.J. Norwood and K.A. Miller. 1996. Effects of harvest stage and light on the biochemical composition of the diatom *Thalassiosira pseudonana*. J. Phycol., 32, 64~73.
- Fernandez-Reiriz, M.J., A. Perez-Camacho, M.J. Ferreiro, J. Blanco, M. Planas, M.J. Campos and U. Labarta. 1989. Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. Aquaculture, 83, 17~37.
- Folch, J., M. Lees and G.H. Sloane Stanley. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem., 226, 497~509.
- Imada, N., K. Kobayashi, K. Tahara and Y. Oshima. 1991. Production of an autoinhibitor by *Skeletonema costatum* and its effect on the growth of other phytoplankton. Nippon Suisan Gakkaishi, 57, 2285~2290.
- Imada, N., K. Kobayashi, K. Isomura, H. Saito, S. Kimura, K. Tahara and Y. Oshima. 1992. Isolation and identification of an autoinhibitor produced by *Skeletonema costatum*. Nippon Suisan Gakkaishi, 58, 1687~1692.
- Kim, J.H., J.H. Park, Y.H. Song and D.S. Chang. 1999a. Isolation and characterization of the marine bacterium, *Alteromonas* sp. SR-14 inhibiting the growth of diatom, *Chaetoceros* species. J. Korean Fish. Soc., 32, 155~159 (in Korean).
- Kim, J.H., H.Y. Park, Y.C. Cho, M.H. Cho and D.S. Chang. 1999b. Growth inhibition of the diatom, *Chaetoceros calcitrans* by *Alteromonas* sp. SR-14. J. Korean. Fish. Soc., 32, 160~164 (in Korean).
- Kim, J.H., H.J. Lee, T.S. Lee, H.R. Kim, M.S. Lee and D.S. Chang. 1999c. Characteristics of the algal growth inhibition substances produced by *Alteromonas* sp. SR-14. J. Food Hyg. Safety, 14, 270~276 (in Korean).
- Kim, J.H., H.J. Lee, H.Y. Park, H.D. Yun, Y.C. Cho and D.S. Chang. 2001a. Growth inhibition of food-microalgae by the marine bacterium, *Shewanella* sp. SR-14. Bull. Nat'l. Fish. Res. Dev. Inst. Korea, 59, 177~185 (in Korean).
- Kim, J.H., H.Y. Park, T.S. Lee, S.H. Kim, J.H. Park and D.S. Chang. 2001b. Effect of *Vibrio alginolyticus* on the algicidal activity of *Shewanella* sp. SR-14. J. Korean. Fish. Soc., 34, 430~434 (in Korean).
- Murata, H., T. Sakai, M. Endo, A. Kuroki, M. Kimura and K. Kumada. 1989. Screening of removal agents of a red tide plankton *Chattonella marina* with special reference to the ability of the free radicals derived from the hydrogen peroxide and polyunsaturated fatty acids. Nippon Suisan Gakkaishi, 55, 1075~1082 (in Japanese).
- Oliver, J.D. and R.R. Colwell. 1973. Extractable lipids of Gram negative marine bacteria: Fatty acid composition. Int. J. Syst. Bacteriol., 23, 442~458.
- Thompson, P.A., M. Guo, P.T. Harrison and J.N.C. Whyte. 1992. Effects of variation in temperature. II. On the fatty acid composition of eight species of marine phytoplankton. J. Phycol., 28, 488~497.
- Uchida, A., A. Shimada and Y. Ishida. 1988. Antibacterial and anti-algal substances produced by the dinoflagellate *Peridinium bipes*. Nippon Suisan Gakkaishi, 54, 1941~1945.
- Walne, P.R. 1979. Culture of bivalve molluscs, 50 year's experience at Conwy. The Whitefriars Press Ltd., London, 189pp.
- 今井一郎. 1994. 細菌による海産真核微細藻類の殺滅. 防菌防微誌, 22, 485~491.
- 吉永郁生, 石田祐三郎. 1995. 田辺灣から分離した有害赤潮藻 *Gymnodinium mikimotoi* 殺滅細菌 E401株の分類學的性状およびその殺滅機作. 環境科学総合研究所年報, 14, 47~58.
- 藤野安彦. 1980. 生物化学実験法 (9). 脂質分析法入門, 學會出版センター, 東京, pp. 68~70.
- 尾上義夫. 1988. 赤潮生物の増殖阻害物質. In 生理活性天然物質, 紫田承二編. (株) 齒藥出版, 東京, pp. 123~129.
- 本城凡夫, 浅川牧夫. 1992. アレロパシー物質. In 海洋微生物の生物活性物質, 安元健編. 水産学シリーズ No. 79, 恒星社厚生閣, 東京, pp. 41~53.
- 石田祐三郎. 1994. 赤潮藻の微生物學的防除に関する現状と将来. In 赤潮と微生物 - 環境にやさしい微生物農薬を求めて, 石田祐三郎, 菅原庸編. 水産学シリーズ No. 99, 恒星社厚生閣, 東京, pp. 9~21.
- 深見公雄, 西島敏隆. 1994. *Gymnodinium* 殺滅細菌の生態. In 赤潮と微生物 - 環境にやさしい微生物農薬を求めて, 石田祐三郎, 菅原庸編. 水産学シリーズ No. 99, 恒星社厚生閣, 東京, pp. 46~56.
- 竹内俊郎. 1991. 魚類における必須脂肪酸要求の多様性. 化学と生物, 29, 571~580.
- 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. 256~280.

2002년 9월 16일 접수

2003년 1월 16일 수리