

적조생물, *Cochlodinium polykrikoides*와 *Gymnodinium sanguieum*의 사멸에 있어 암모니아염의 효과

손 재 학*

신라대학교, 해양바이오전공 Marine-Bio 기능성물질 산업화지원센터

Received May 18, 2005 / Accepted July 18, 2005

The Effects of Ammonium Ion and Salts on the Killing of Red Tides Organism; *Cochlodinium polykrikoides* and *Gymnodinium sanguieum*. Jae Hak Sohn*. Major in Marine Biotechnology, Silla University, Busan 617-736, Korea, Marine Biotechnology Center for Bio-Functional Material Industries – Cell-free culture broth of marine halophilic bacterium, *Kordia algicida* was shown to possess specific algicidal ability against red tide organism, *Cochlodinium polykrikoides*. Physiochemical characteristics of algicidal material originated in the bacterial culture broth were analyzed that its molecular weight was estimated to a 3,000 dalton and it was stable in heat and pH treatment. The algicidal fraction against *C. polykrikoides* obtained from gel permeable chromatography contained high concentration of ammonium ion as analyzed by ICP/Mass spectrum. *C. polykrikoides* by the fraction was quickly lysed within 1 min. It was shown that the effective concentration for algicide against *C. polykrikoides* was over 1 mM of ammonium chloride. On the other hand, other metal ions presented in the algicidal fraction showed no algicidal effect against *C. polykrikoides*. In addition, ammonium ion exhibited species-specific killing spectrum for two species of red tide organisms, *C. polykrikoides* and *Gymnodinium sanguieum*. Therefore, further researches on the killing mechanism against *C. polykrikoides* exerted by ammonium ion, and subsequent development of replaceable algicidal materials will perform to provide useful tools for the control of red tide.

Key words – Red tide, Algicide, Ammonium ion, *Cochlodinium polykrikoides*, *Kordia algicida*

해양성 편모조류인 *Cochlodinium polykrikoides*는 1995년 이후 한국연안에서 매년 대규모의 적조가 발생시켜 수산양식 산업에 심각한 피해를 일으켜 경제적인 피해 못지않게 사회적인 문제를 야기하고 있다. *C. polykrikoides*에 의한 적조발생의 물리·화학적 기작은 아직 명확하게 밝혀져 있지 않으며 발생된 적조를 제어하는 방법 또한 적용하는데 어려움이 따르고 있다. 그러므로 유독성 적조의 발생으로 인한 피해를 최소화하기 위한 적조방제기술의 개발이 절실히 요구된다.

적조방제방법은 적조발생의 원인을 제한하는 간접적인 방법과 발생한 적조생물을 제거하는 직접적인 방법을 들 수 있다. 또한 직접적인 방법으로는 크게 물리화학적 방법과 생물학적인 방법을 들 수 있다. 물리화학적 방법은 화학약품을 이용한 적조생물의 사멸, 점토 및 고분자 응집제 등을 이용한 흡착 침강방법 그리고 적조제거기를 통한 적조생물의 제거방법 등이 있다. 화학약품으로는 구리나 클로라이드를 이용한 조류제어 방법은 폐수처리 및 수영장등 제한된 장소에서만 사용하고 있다. 그러나 해양환경에 적용하기 위한 어려운 문제를 가지고 있어 현재 우리나라에서는 황토를 이용한 흡착·침강법이 실제 현장에서 사용되고 있다[1].

생물학적방법은 식물플랑크톤과의 천적관계를 이용한 동물플랑크톤의 적용방법을 들 수 있으며 현장적용을 위한 연

구가 진행 중이다. 또 다른 적용 가능한 생물학적 방법으로 미생물을 들 수 있다. 생태계에서 식물플랑크톤과 미생물은 다양한 형태의 상호작용, 즉 기생, 경쟁, 공생 및 공존을 통하여 서로에게 이로운 또는 해로운 영향을 끼친다[3]. Fluki 등 [6]과 Kim 등[11]은 적조의 발생과 소멸에 있어 미생물이 중요한 인자로 작용하며 특히 소멸기간동안 미생물이 중요한 역할을 담당하고 있음을 지적하였다. 실질적으로 적조가 발생된 해역으로부터 다양한 종의 살조세균[5,7,8,9,10,12,15], 살조 virus [13,14,18]가 분리되었고 적조생물에 대한 사멸 특성들이 보고 된 바 있다. 그러므로 미생물로부터 유래된 algicide나 적조제어 미생물 또는 virus는 유독성 적조의 발생을 조절하기 위한 유용한 도구로 평가되고 있다.

본 보고에서는 *Cochlodinium polykrikoides*에 대한 살조능력을 나타내는 살조세균인 *Kordia algicida*의 살조물질 특성연구를 통하여 1차적인 살조물질이 세포외로 배설된 암모니아로부터 야기되었음을 알 수 있었으며 적조생물(*Cochlodinium polykrikoides*와 *Gymnodinium sanguieum*)에 미치는 염류의 살조효과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

살조미생물(Algicidal bacterium), 적조생물 및 배지

살조세균인 *Kordia algicida*는 적조발생해역인 마산만의 표층수로부터 분리하였으며 적조생물에 대한 종 특이적인 사

*Corresponding author

Tel : +82-51-999-5629, Fax : +82-51-999-5687

E-mail : jhsohn@silla.ac.kr

멸 능력을 가지고 있었다(Table 1). 살조세균의 배양은 ZoBell 2216E [19] 배지를 이용하였으며 25°C, 150 rpm의 조건에서 진탕배양하였다. 적조생물인 *Cochlodinium polykrikoides*, *Gymnodinium sanguineum* 및 *Skeletonema costatum*의 성장을 위한 배지는 F/2배지[17]를 이용하였으며 20°C, 3000~5000 Lux., Light:Dark (L:D, 12h:12h)주기의 조건을 갖춘 광배양기 (Vision Co.)에서 배양하였다.

살조활성(Algicidal activity, %)

살조활성의 측정은 *Cochlodinium polykrikoides*를 대상으로 측정하였다. 초기 500~600 cells/ml 농도가 되도록 100 ml culture flask에 30 ml을 접종하여 2~3 일, 20°C, 5,000 Lux. 조건에서 배양하여 1,500 cells/ml로 성장된 조류세포를 이용하였다. 96 well plate에 10 µl 시료를 첨가한 후 각 well에 1,500 cells/ml로 성장된 *Cochlodinium polykrikoides* 배양액을 각 100 µl씩 첨가하였다. 대조구는 시료대신에 멸균된 Zobell 2216E 액체배지 또는 증류수를 첨가하였으며 5회 반복회수로 하였다. 혼합된 96 well plate는 2시간동안 조류 배양기(20°C, 5,000 Lux.)에 배양한 후 각 well에 2% Rugol's Iodine용액을 100 µl씩 첨가하여 조류를 고정한다. 조류의 계수는 도립현미경(Ziess, x100) 하에서 정상세포를 계수하였다. 살조활성능(%)은 다음의 식에 의해 계산되었다.

$$\text{살조 활성능(Algicidal activity, \%)} \dots\dots\dots (\text{식 } 1) \\ = [1 - (\text{시료 첨가구의 세포 수}/\text{대조구의 세포 수})] \times 100$$

살조물질의 특성

살조물질의 특성조사에 사용한 배양액은 500 ml 용량의

Baffle flask에 ZoBell 2216E액체배지 200 ml에 *Kordia algicida*를 접종하여 25°C, 150 rpm에서 24시간 진탕배양한 후 원심분리(4°C, 16,000×g, 10 min)하여 배양상층액과 세포를 분리하였다. 배양상층액은 멸균된 0.2 µm 여과지로 여과한 후 실험에 이용하였고 세포는 4°C에서 ultrasonicator (Sonic & materials Inc., Vibra Cell model VC375, USA)를 이용하여 1분간(Microtip, 150w, %duty cycle 50) 5회 반복하여 세포를 파괴한 후 원심분리를 통하여 얻어진 상층액을 0.2 µm 여과지로 여과한 후 실험에 이용하였다.

열안정성은 cell-free 배양액과 세포파쇄 상층액을 끓는 물(약 95°C)에 5분, 10분, 30분간 처리한 후 급냉하여 살조활성을 측정하였다. pH 안전성은 cell-free 배양액과 세포파쇄 상층액은 HCl과 NaOH를 이용하여 pH를 2, 7, 10으로 조절하여 24시간 동안 실온에 정치한 후 다시 pH를 8.0로 조절하여 살조활성능을 측정하였다. 분자량에 따른 활성능은 배양액과 세포 파쇄액을 대상으로 100 kDa, 10 kDa 및 3 kDa 여과막(Amicon사)을 이용하여 단계별로 여과된 배양액을 대상으로 살조 활성능을 측정하였다.

물질분리

살조물질의 분획 및 분자량유추는 다음과 같이 실시하였다. 분획을 위한 농축액은 5 l Jar fermenter를 이용하여 3 l의 배양액을 얻었으며 감압농축기를 이용하여 40°C에서 수분을 완전히 제거하였다. 증발잔류물질로부터 살조물질을 분리하기 위하여 증발잔류물질과 MeOH을 1대 3의 비율(v/v)로 혼합, 정치한 후 MeOH층만을 감압·농축하여 시료로 사용하기 전까지 -70°C에서 보관하였다. 농축과정 중 생성된 잔류 염분은 여과지와 원심분리(4°C, 10,000×g, 10 min)방법에 의

Table 1. Algicidal spectrum of *Kordia algicida* by co-cultivation

Class	Taxon	Medium	Strain	Algicidal Effects	Source and History
Bacillariophyceae	<i>Thalassiosira</i> sp.	F/2	KORDI-1	+	This study
	<i>Skeletonema costatum</i>	F/2	KORDI-4	+	This study
	<i>Chaetoceros glycolis</i>	F/2	KMCC-B23	-	J.H. Lee; Nacdong estuary
Raphidophyceae	<i>Heterosigma akashiwo</i> (Hada) Hada	F/2	NIES-10	+	M.M. Watanabe; Marima-Nada, Seto Inland sea, Japan
Dinophyceae	<i>Heterocapsa triestrum</i> Stein	F/2	NIES-235	-	S. Yoshimatsu; Marima-Nada, Seto Inland sea, Japan
	<i>Prorocentrum micans</i>	F/2	KORDI-14	-	This study
	<i>Gymnodinium</i> sp. A8	F/2	KORDI-12	-	This study
	<i>Gymnodinium</i> sp. A9	F/2	KORDI-13	-	This study
	<i>Gym. mikimotoi</i>	F/2	KORDI-10	-	This study
	<i>Gym. sanguineum</i>	F/2	KORDI-11	-	This study
	<i>Cochlodinium polykrikoides</i>	F/2	KORDI-8	+	This study
Cyanobacteria	<i>Microcystis aeruginosa</i>	F/2	KMCC-C13	-	Y.J. Kim; Chung-Mu Harbor
Chlorophyceae	<i>Chlorella vulgaris</i>	SK	KMCC-FC1	-	UTEX 259

UTEX; University of Texas, USA, KMCC; Korea Marine Microalgae Culture Collection, NIES; National Institute for Environmental Studies, Japan.

하여 제거하였다. 추출된 물질로부터 분자량별 분획을 얻기 위하여 gel permeable chromatography (Resin; Bio-rad P2, column; 10×1,200 mm, flow rate; 0.1 ml/min, fraction vol; 1 ml/tube)를 통하여 분획물을 얻었다. 분자량 유추를 위해 사용된 molecular marker는 glucose (MW 180), sucrose (MW 342), raffinose (MW 504), vitamin B₁₂ (MW 1,350)이 사용되었으며 당의 검출은 환원당 정량방법[4]을, vitamin B₁₂는 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 분획물을 대상으로 *Cochlodinium polykrikoides*에 대한 살조활성능(%)과 암모니아 이온의 농도를 측정하였다. 또한 살조활성능을 갖는 분획물의 잔존염류 분석은 ICP/MS를 이용하였다.

살조활성에 미치는 Salts의 효과

염류의 농축에 따른 *Cochlodinium polykrikoides*의 살조효과를 비교하기 위하여 다음과 같이 수행하였다. 실험에 사용된 염류는 해수의 주된 구성성분인 11가지(NH₃, Mg, Ca, Na, K, Li, Al, Mn, Fe, Co, Zn)를 대상으로 1 μM~1,000 mM까지 농도를 조절하여 염류의 농축에 따른 적조생물의 영향을 조사하였다.

멸균된 48-well plate에 이온 당 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 250, 500, 1000 mM까지 농도를 조절하여 첨가하였으며 *C. polykrikoides*의 세포는 well당 1,000 cells/ml이 되도록 조절하여 첨가하였다. 또한 각각의 염류농도는 신뢰성을 확보하기 위하여 3개의 반복수를 갖도록 하였다. 세포의 형태적인 변화는 조류배양기에서 배양하며 일정시간 간격으로 도립현미경 하에서 관찰하였다. 형태적 변화의 관찰기준은 세포의 운동성감소, 사슬의 해리, 세포의 확장, 세포의 파괴정도를 기록하였다. 또한 *C. polykrikoides* 이외에 *Gymnodinium sanguineum* 및 *Skeletonema costatum*을 대상으로 5가지 이온(NH₃, Mg, Ca, Na, K)에 의한 살조 및 성장제한 효과를 상기에 기술된 방법에 따라 조사하였다.

화학분석

별도의 시험에서 암모니아 이온의 분석은 Phenate 방법[2]을 이용하였으며 MeOH 추출물과 GPC 활성 분획물의 ICP/MS (Perkinelmer Co.) 분석은 한국수도시험연구원에 의뢰하여 수행하였다.

결과 및 고찰

***Kordia algicida* 배양액에 의한 살조특성**

살조세균으로 분리된 *Kordia algicida*[16]는 적조발생해역인 마산만의 표층수에서 분리하였다. 적조생물과 미생물을 함께 배양하였을 때 *K. algicida*는 적조생물에 대한 종 특이적인 살조능력을 나타내었으며(Table 1) 분류학적 특성조사에 의하여 신속 신종으로 명명되었다[16].

균체가 제거된 *K. algicida*의 배양액을 *Cochlodinium poly-*

*krikoides*의 배양액내에 접종하였을 때 2시간이내에 대부분의 세포를 사멸시켰다(Fig. 1). 시간의 경과에 따른 *C. polykrikoides*의 사멸과정은 초기에 세포내 기관의 파괴와 함께 세포가 팽창되었으며 이후 사슬의 분리와 함께 세포가 용혈되는 현상을 관찰할 수 있었다. 이와 반대로 배양액으로 사용된 ZoBell 2216E 액체배지가 첨가된 대조구에서는 사멸현상이 관찰되지 않았다. 이는 적조생물을 특이적으로 사멸시키는 물질이 살조세균으로부터 생성되었음을 의미한다. *Gymnodinium sanguineum*은 미생물과의 공조배양동안 성장의 제한 및 사멸현상이 관찰되지 않았으나(Table 1) Zobell 2216E배지에서 배양된 *K. algicida*의 배양여과액은 *C. polykrikoides*와 동일한 과정을 통하여 사멸되었음을 확인하였다. 미생물배양여액을 이용한 편모조류의 사멸과정은 Lovejoy 등[12]이 보고한 *Gymnodinium*의 사멸과정과 일치하였다. 살조원인물질은 *Pseudoalteromonas* sp.가 생산하는 것으로 아직 물질의 동정 및 특성에 대하여 명확히 밝혀진 바 없다.

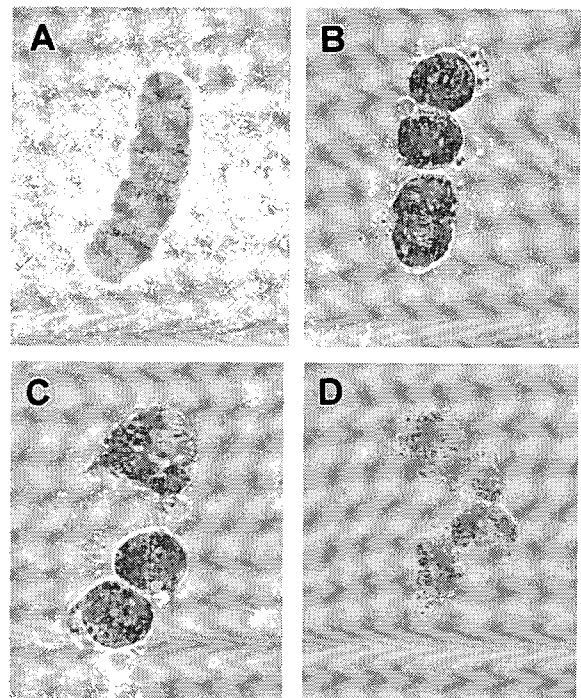


Fig. 1. Lytic effect of *Cochlodinium polykrikoides* by the treatment of the cell-free culture broth of *Kordia algicida* or ammonium ion (>1 mM).

A: Normal cell, B: cell exhibited swelling with disintegration of chain within 30 sec after the treatment in *C. polykrikoides* cultures to 10% cell-free culture broth of *K. algicida*, C: separation of chloroplasts from the cell wall region (after 1 min), D: lysed cell debris (after 10 min). Culture broth of *K. algicida* was gained by centrifugation (10,000×g, 10 min) after shaking incubation for 24 hr at 25°C. Cell-free culture broth used for these test was passed through the sterilized syringe filter (0.2 μ m pore-size).

살조물질의 물리·화학적 특성

살조물질의 물리·화학적 특성을 조사하여 Table 2에 요약하였다. 살조물질의 분자량 유추실험은 초여과막을 이용하여 여과한 여과액을 이용하여 *C. polykrikoides*에 대한 살조활성능을 특정하였다. 그 결과 100 kDa, 10 kDa 그리고 3 kDa의 여과액에서 90%이상의 강한 살조활성을 나타내어 살조물질은 3 kDa이하의 분자량을 갖는 것으로 유추할 수 있다. 배양여과액은 끓는 물에서 5~30분간 열처리 하여도 지속적인 살조활성을 나타내 열에 안정함을 알 수 있었다. 또한 배양여과액의 pH를 2, 7, 10으로 조정하여 1일간 정치한 후 배양종류시의 pH인 8.0으로 조정하여 살조활성을 조사한 결과 알칼리보다 산성 pH에서 살조효과가 다소 감소함을 관찰하였다. 결과적으로 *K. algicida*가 생성하는 세포의 물질은 물리·화학적 변화에 다소 안정한 저분자량의 물질임을 유추할 수 있었다. 저분자량을 갖는 살조물질은 현재까지 보고된 적이 없으며 다만 *Clamidomonas reinhardtii*의 mating을 저해하는 물질이 *Bacillus brevis* strain NT4가 생산하는 oligopeptide인 MINT-1 (754 dalton)로 보고 된 바 있다[15].

살조물질의 분리 및 염류에 의한 살조 특성

살조물질을 분리하기 위하여 3 l의 배양여액을 감압·농축하여 수분을 제거한 후 메탄올로 추출·농축하여 얻어진 시료를 대상으로 gel permeable chromatography를 수행하였으며 분획물을 대상으로 살조활성능을 측정하였다. 그 결과 Fig. 2에서와 같이 활성물질이 농축되었음을 알 수 있었으며 분자량을 유추한 결과 180 Da인 glucose보다 크기가 작은 것으로 판단되었다(자료 미제시). 살조물질의 분자량 크기가 너무 작아 활성분획물을 대상으로 ICP/MS를 이용한 분석결과 고농도의 ammonium ion이 검출되었으며 그 외 Mg, Na, Ca, K 및 Li이 검출되었다(Table 3). 따라서 검출된 이온을 대상으로 살조활성능을 조사한 결과 편모조류인 *C. polykrikoides*는 10 mM의 NH_4Cl 농도에서 30분 이내에 모두 용혈되었으며 0.1 mM의 농도에서는 세포가 swellen되어 성장을

Table 2. Physio-chemical characteristics of *Kordia algicida* culture broth

Types of treatment		Algicidal activity (%)
Filtrate by molecular sieve	0.2 μ m	91.2
	100 kDa	90.8
	10 kDa	92.2
	3 kDa	92.9
Heat treatment	5 min	93.2
	10 min	95.3
	30 min	95.1
pH treatment	pH 2	77.0
	pH 7	84.0
	pH 10	92.0

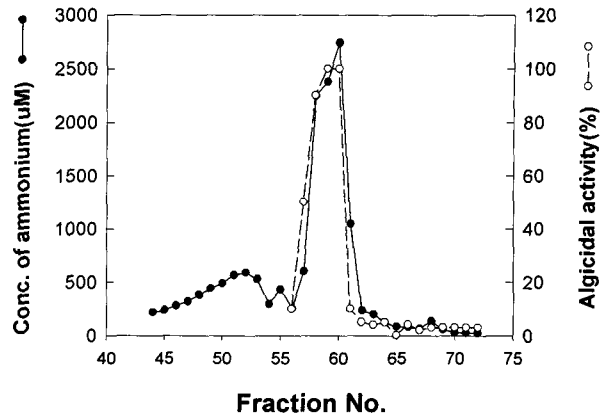


Fig. 2. Changes of algicidal activity (% a solid line) and ammonium ion (a broken line) during gel permeable chromatography using MeOH extract of *Kordia algicida* culture broth.

하지 못하였다. 반면에 0.01 mM의 NH_4Cl 을 공급하였을 경우 조류의 성장은 영향을 받지 않았다(Table 4). 그 외 염류가 살조에 미치는 효과를 조사한 결과 동일 농축액에서 *C. polykrikoides*의 성장제한 및 사멸효과는 나타나지 않았다. 결과적으로 적조생물인 *C. polykrikoides*의 급격한 사멸은 살조세균인 *K. algicida*의 배양기간 동안 세포외로 생성된 고농도의 암모니아 이온의 효과로 결론을 지었다. Stein [17]은 NH_4Cl 을 질소원으로 공급할 경우 많은 종의 식물플랑크톤에게 독성을 나타내며 조류성장을 위해 0.1 mM 이하의 농도로 공급해야 함을 지적한 바 있으며 이는 본 실험의 결과와 일치하고 있다. 암모니아 이온으로 전환이 가능한 NH_4Cl , $(NH_4)_2SO_4$ 는 동일한 살조활성을 나타내었으나 요소(urea)의 형태로 첨가하였을 때는 살조활성에는 영향을 미치지 않아 이온화되었을 경우 살조활성을 나타내는 것으로 사료된다.

Cochlodinium polykrikoides 이외에 살조범위 내에 포함된 *G. sanguinum* 역시 동일농도에서 살조활성을 나타내었다. 반면 *Skeletonema costatum*의 경우 100 mM에서도 살조활성을 나타내지 않아 세포외물질에 의한 살조활성은 외편모조류인 두 종에 한정됨을 알 수 있었다(Table 5). 적조생물과 살조세균인 *K. algicida*를 혼합 배양하였을 때 살조범위는 *C. polykrikoides*를 포함하여 *S. costatum*, *Thalassira* sp. *Heterosigma akashiwo*로 알려져 있어 적조생물의 사멸에 미치는 인자가 서로 다름을 알 수 있다(Table 1).

결과적으로 최근 국내에서 수산양식어류의 피해를 일으키는 적조생물인 *C. polykrikoides*와 *G. sanguinum*은 살조세균인 *Kordia algicida*로부터 생성된 암모니아 이온에 의해 단시간 내에 신속히 사멸된다는 사실을 알 수 있었다. 그러나 *K. algicida*가 직접적으로 사멸하는 *S. costatum*, *Thalassira* sp. *H. akashiwo*는 암모니아에 의한 영향을 받지 않아 종 특이적인 적조생물의 제어가 가능할 것으로 판단된다. 암모니아 이

Table 3. Concentration of cations in MeOH extracts of *Kordia algicida* culture broth and algicidal fractions of gel permeable chromatography determined by ICP/MS

	NH ₃	Mg	Na	Ca	K	Li
MeOH extracts (mM) ¹	125.35	175.6	5.9	0.92	1.9	-
Algicidal fraction (mM) ²	59.0	155	62	1.27	1.2	0.48

¹Cell-free culture broth of *Kordia algicida* extracted by MeOH after eliminated water with evaporation

²Active fraction gained from Gel permeable chromatography using MeOH extracts

Table 4. Relation between the salts and its concentration affecting on the killing of *Cochlodinium polykrikoides*

Components	Concentrations (mM)								
	>1000	500	200	100	10	1	0.1	0.01	0.001
NH ₃	NT	NT	NT	+++ ¹	+++	++ ²	+ ³	- ⁴	-
Mg	NT	+++	+	-	-	NT	NT	NT	NT
Ca	NT	+++	+++	++	-	-	NT	NT	NT
Na	+	-	-	-	NT	NT	NT	NT	NT
K	NT	+++	+	-	-	NT	NT	NT	NT

¹Algal cells were completely lysed within 2 to 6 hr after treatments.

²Algal cells lysed within 6 to 12 hr after treatments.

³Algal cells were swelled or lysed during 4 days after treatments.

⁴Algal cells were no effects during 4 days after treatments.

NT; not test

Table 5. Effective concentration of salts inducing the complete killing of algae within 12h after treatment.

Algal species	Components (mM)				
	NH ₃	Mg	Ca	Na	K
Sea water	0.01	53	10	540	10
<i>Cochlodinium polykrikoides</i>	>1	500	250	>1,000	500
<i>Gymnodinium sanguineum</i>	>1	500	50	NT	500
<i>Skeletonema costatum</i>	>100	500	100	NT	250

NT ; not test

온의 경우 해양 및 담수 환경에서 부영양화의 주요한 인자로 알려져 있으며 어류 역시 고농도에서는 생리적 제한을 야기하므로 긴급을 요하는 경우 외에는 사용을 제한할 수밖에 없다. 따라서 향후 적조생물인 *C. polykrikoides*로부터 양식피해를 최소화하고 청정 환경을 보전하기 위해서는 암모니아 이온에 의한 적조생물의 사멸기작 규명을 통하여 대체물질의 개발을 위한 연구가 진행되어야 할 것으로 판단된다.

감사의 글

본 실험을 위해 지원해주신 한국해양연구원 해양바이오신소재연구소장인 김상진 박사님께 감사를 드립니다.

참고 문헌

1. 최희구, 김평중, 이원찬, 윤성중, 김학균, 이홍재. 1998. 황토의 유해성 적조생물 *Cochlodinium* 종의 제거효과. *한국수산과학*

회지 31, 109~113.

2. APHA. 1992. Standard methods for the examination of water and wastewater, pp. 374-532, 18th eds. APAH, New York.

3. Cole, J. J. 1982. Interaction between bacteria and algae in aquatic ecosystems. *A. Rev. Ecol. Syst.* 13, 291-314.

4. Berfeld, P. 1955. p 149, In Colowick, S. P. and N. O. Kaplan (eds.), *Methods in Enzymology* Vol. 1, Academic press Inc., New York.

5. Fukami, K., A. Yuzawa, T. Nishijima and Y. Hata. 1992. Isolation of properties of a bacterium inhibiting the growth of *Gymnodinium nagasakiense*. *Nippon Suisan Gakk.* 58, 1073-1077.

6. Furuki, M. and M. Kobayashi. 1991. Interaction between *Chattonella* and bacteria and prevention of this red tide. *Marine Pollution Bull.* 23, 189-193.

7. Imai, I., Y. Ishida and Y. Hata. 1993. Killing of marine phytoplankton by a gliding bacterium *Cytophaga* sp. isolated from the coastal sea of Japan. *Mar. Biol.* 116, 527-532.

8. Imai, I., Y. Ishida, K. Sakaguchi and Y. Hata. 1995. Algicidal marine bacteria isolated from Northern Hiroshima Bay, *Japan Fisheries Science* 61, 628-636.

9. Kato, J., J. Amie, Y. Murata, A. Kuroda, A. Mitsutani and H. Ohtake. 1998. Development of a genetic transformation system for an alga-lysing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2061-2064.

10. Kawano, Y., Y. Nagawa, H. Nakanishi, H. Nakajima, M. Matsuo and T. Higashihara. 1997. Production of thiotropocin by a marine bacterium, *Caulobacter* sp. and its antimicrobial activities. *J. Mar. Biotechnol.* 5, 225-229.

11. Kim, M-C., I. Yoshinaga, I. Imai, K. Nagasaki, S. Itakura and Y. Ishida. 1998. A close relationship between algicidal

- bacteria and termination of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) blooms in Hiroshima Bay, Japan. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **170**, 25-32.
12. Lovejoy, C., J. P. Bowman and G. M. Hallegraeff. 1998. Algicidal effect a novel marine *Pseudoalteromonas* isolate (Class *Proteobacteria*, Gamma subdivision) on harmful algal bloom species of the general *Chattonella*, *Gymnodinium*, and *Heterosigma*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 2806-2813.
 13. Nagasaki, K., M. Ando, I. Imai, S. Itakura and Y. Ishida. 1994. Virus-like particles in *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae): a possible red tide disintegration mechanism. *Mar. Biol.* **119**, 307-312.
 14. Nakasaki, K., K. Tarutani and M. Yamaguchi. 1999. Growth characteristics of *Heterosigma akashiwo* virus and its possible use as a microbiological agent for red tide control. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 898-902.
 15. Sawayama, S., Y. Sako and Y. Ishida. 1993. New inhibitor for mating reaction of *Alexandrium catenella* produced by marine *Alteromonas* sp. *Nippon Suisan Gakkaishi.* **59**, 291-294.
 16. Sohn, J. H., J. H. Lee, H. Yi, J. Chun, K. S. Bae, T-Y. Ahn, and S-J. Kim. 2004. *Kordia algicida* gen nov., sp. nov., an algicidal bacterium isolated from red tide. *Int J. Syst Evol Bacteriol.* **54**, 675-680.
 17. Stein, J. R. 1973. Handbook of phycological methods; culture methods and growth measurements, Cambridge University Press.
 18. Suttle, C. A., A. M. Chan and M. T. Cottrel. 1990. Infection of phytoplankton by viruses and reduction of primary productivity. *Nature* **347**, 467-469.
 19. Zobell, C. E. 1946. Marine microbiology. Chronica Botanica Co., Waltham, Mass.