

적조생물 *Cochlodinium polykrikoides*를 저해하는 *Micrococcus luteus* SY-13이 생산하는 살조물질의 특성과 해양생물에 미치는 영향

김민주 · 정성윤* · 차미선** · 이상준

부산대학교 미생물학과, *부산대학교 한국 Bio-IT 파운드리 센터, **서울대학교 기계항공공학부
(2008년 1월 15일 접수; 2008년 2월 12일 채택)

Characteristics of Algicide Produced by *Micrococcus luteus* SY-13 Inhibiting *Cochlodinium polykrikoides* and the Effects on Marine Organisms

Min-Ju Kim, Seong-Yun Jeong*, Misun Cha** and Sang-Joon Lee

Department of Microbiology, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

*Korea Bio-IT Foundry Center, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

**School of Mechanical and Aerospace Engineering, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

(Manuscript received 15 January, 2008; accepted 12 February, 2008)

Abstract

Algicidal bacterium was isolated from sea water during the declining period of *Cochlodinium polykrikoides* blooms and this bacterium had a significant algicidal activity against *C. polykrikoides*. In this study, algicidal bacterium was identified on the basis of biochemical and chemotaxonomic characteristics, and analysis of 16S rDNA sequences. The algicidal bacterium showed 98.6% homology with *Micrococcus luteus* ATCC 381^T. Therefore, this bacterium was designated *Micrococcus luteus* SY-13. The optimal culture conditions of the algicidal bacterium was 25°C, initial pH 8.0, and 3.0% NaCl concentration. *M. luteus* SY-13 is assumed to produce secondary metabolites which have algicidal activity. When 10% culture filtrate of this strain was applied to *C. polykrikoides* (1.0×10^4 cells/ml) cultures, over 98% of *C. polykrikoides* cells were destroyed within 6 hours. The culture filtrate of *M. luteus* SY-13 exhibited similar algicidal activity after heat-treatment at 121°C for 15 min. While algicidal activity remained in filtrates with pH adjusted to 8.0, loss of algicidal activity occurred when the pHs of filtrates were adjusted to over 9.0 or heat-treated at 121~180°C for 1 hour. *M. luteus* SY-13 showed significant algicidal activities against *C. polykrikoides* (98.9%) and a wide algicidal range against various harmful algal bloom (HAB) species. However, there was no algicidal effect on diatom and marine livefood organisms except *Isocrysis galbana*. These results suggest that *M. luteus* SY-13 could be a candidate for use in the control of HABs.

Key Words : Algicidal activity, Algicidal bacterium, *Cochlodinium polykrikoides*, *Micrococcus luteus* SY-13, Harmful algal blooms, Red tide

1. 서론

우리나라에서 유해성 적조생물의 한 종류인 *Cochlodinium polykrikoides*는 매년 광범위한 범위에

걸쳐 장기간 유해성 적조를 일으키고 있으며, 이에 대한 많은 연구들도 이루어져 오고 있다^{1~3)}. 이러한 유해성 적조가 발생했을 때 적조생물을 효과적으로 제거하기 위해 사용되는 방법으로는 물리적인 방법이나 화학살포제를 사용하는 화학적 방법 이외에 황토나 점토 살포법, 수산화마그네슘, 생석회 또는 조개껍질 가루나 제오라이트 등의 응집제나 첨가제를 사용하는 방법들이 많이 연구되어져 왔다. 그러나 실질적으로 적용되는 방법은 황토나 점토를 대량으로 살포하는 방법이 유일한 실정이다⁴⁾. 황토살포법의 경우, 우리나라에서 대량으로 황토를 살포하기 시작한 1996년부터 많은 연구자들이 황토살포법이 적조를 효과적으로 구제할 수 있으며 환경에도 나쁜 영향을 주지 않는다고 보고하였다^{5~7)}. 그러나 박 등^{4,8)}은 황토가 적조에 의한 피해를 줄이는데 크게 기여하지 못하며, 매우 낮은 농도로도 빛을 차단하고 미세한 황토 입자가 저서생물의 호흡기나 신진대사를 방해한다고 보고하였다. 실제로 황토가 살포되는 지역이 대부분 어민들에게 직접적인 피해를 주는 가두리 양식장이 있는 해역에 국한되어 있어 2차적 오염문제를 야기시킬 수 있다. 또한 장기간 반복적으로 황토가 살포된 지역을 조사한 결과, 해저에 황토가 1~30 cm 가량 쌓여 있었으며 그 주변은 황토가 살포되지 않은 지역과는 대조적으로 수초나 패류가 폐사하여 황무지로 변하여 저서 생태계가 파괴되었음이 보고되었다^{4,8)}.

따라서, 좀 더 효율적인 적조구제법을 찾고자 많은 연구자들이 다방면으로 연구하게 되었다. 해양에서 자연적인 적조의 발생과 소멸을 연구하던 연구자들은 적조의 자연적인 소멸이 단지 물리적, 화학적 요인에 의해서만 일어나는 것이 아니라는 것을 뒷받침하는 연구 결과들을 발표하였다. Yoshinaga⁹⁾와 Fukami 등¹⁰⁾이 적조의 자연적인 소멸 시 특정 세균군이 증가하며, 적조의 소멸에 그 세균군이 관여할 가능성이 있다고 보고한 바 있고, 이후 생물학적 방법 중 해양미생물을 이용한 방법이 2차적인 환경오염 문제를 최소화하며 효율적인 적조 방제법으로서의 역할을 할 것으로 기대되어 많은 연구자들이 연구를 수행하여 왔다^{11~15)}. 이러한 연구의 결과로 *C. polykrikoides*를 효과적으로 제어하는 살조물질인 Bacillamide¹⁶⁾를 생산하는 *Bacillus* sp.가 보고되었으

며, 또한 cyanobacteria 및 *Scenedesmus* 등 수화를 일으키는 조류를 죽이는 *Bacillus*^{17~18)} 종들도 보고되고 있다. 또한 와편모조류 및 침편모조류를 제어하는 *Cytophyga*^{19~20)}, 적조생물인 *Gymnodinium miki-motoi*를 저해하는 *Flavobacterium*²¹⁾ 이외에 *Micrococcus*^{22~25)}, *Pseudomonas*^{26,27)}, *Pseudoaltermonas*^{28~30)}, *Saprospira*³¹⁾ 등 많은 살조미생물들이 분리되어 그 생태적 특성과 유용성이 보고되었다.

본 연구는 살조미생물을 이용한 적조구제 대책의 일환으로, 2차적 환경오염이 적으며 살조활성이 우수한 살조미생물 *Micrococcus luteus* SY-13을 적조 발생해역에서 분리하여 *M. luteus* SY-13의 살조물질 생산 최적조건을 확립하고, 살조물질의 열안정성, pH 안정성을 조사하였으며 적조생물과 다른 해양생물에 미치는 영향 등을 조사함으로써 살조미생물 *M. luteus* SY-13의 생태적 특성과 적용 가능성을 검토하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 살조미생물의 분리

본 실험에 사용된 살조미생물은 남해 가막만에서 채취한 해수로부터 분리하였다. 시료로 사용한 해수는 2002년 9월 중순에 *C. polykrikoides*에 의한 적조가 발생하여 소멸되는 시점에 채수하여 살조미생물을 분리하기 위한 시료로 사용하였다.

*C. polykrikoides*에 대해서 살조활성을 가지고 있는 미생물을 분리하기 위하여 채취한 해수를 *C. polykrikoides*가 포함되어 있는 시험관에 각각 0.5 ml씩 접종하여 살조활성을 보이는지 시험하였다. 살조활성을 보이는 양성 시험관은 경시적으로 *C. polykrikoides*를 계수하여 살조활성을 측정하였으며, 살조미생물의 분리는 90% 이상의 살조활성을 보이는 양성 시험관의 배양액을 Marine broth 2216E (Difco) 배지에 평판배양법으로 25°C에서 1주일간 배양하여 출현하는 세균의 집락(colony)을 형태학적 특성에 따라 순수 분리하였다. 그리고 각각의 분리한 단일 colony를 다시 순수배양한 후 *C. polykrikoides*의 배양액이 있는 시험관에 접종하여 살조활성을 확인하고, 그 중 가장 살조활성이 뛰어난 colony를 균주로 선별하였다.

2.2. 살조미생물의 동정

분리된 살조미생물 중 최종 선정된 실험균주의 분류학적인 위치를 검토하기 위하여 Bergey's Manual³²⁾과 Macfaddin³³⁾의 방법을 참고하여 형태학적, 배양학적, 생화학적인 특성을 조사하였다. 또한, API kit (Biomérieux, France)를 이용하여 얻어진 생화학적 특성들을 APILAB 데이터베이스에 있는 분류군들의 생화학적 특성과 비교하여 1차적으로 분류학적 유사성을 검토하였으며, 16S rDNA 분석을 통하여 염기서열을 결정한 후, National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 GenBank 데이터베이스와 비교하여 동정 결과를 확인하였다.

2.3. 살조미생물의 살조물질 생산 최적조건

분리된 살조미생물의 살조물질 생산 최적조건을 조사하기 위하여 온도, pH, NaCl의 농도를 달리하여 배양한 후, 살조미생물의 성장에 따른 살조활성을 배양 시간별로 측정하였다. 살조미생물의 생육도는 분광광도계를 이용하여 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 살조미생물이 생산하는 살조물질의 활성을 측정하기 위하여 정지기까지 배양한 배양액을 4°C, 15,000 g에서 20분간 원심분리하여 균체를 제거하고, 얻어진 상등액을 다시 0.2 µm pore-size의 membrane filter로 여과하여 살조활성 측정에 사용하였다. 살조활성은 배양여과액을 대수증식기에 있는 *C. polykrikoides* (1.0×10^4 cells/ml)의 배양액에 10%가 되도록 접종하여 *C. polykrikoides*의 최적 배양조건에서 배양하여 6시간 후에 살조활성을 측정하였다. 살조활성은 살아있는 *C. polykrikoides*의 세포수를 광학 현미경 하에서 경시적으로 직접 계수하는 방법으로 측정하였으며, 다음과 같은 식으로 산출하였다. 이때, control로는 배양여과액 대신 동량의 Marine broth 2216E 배지를 첨가하였으며, 본 연구에서 모든 살조활성 실험은 3회의 반복 실험을 통하여 결과를 산출하였다.

$$\text{살조활성 (\%)} = \left[1 - \frac{\text{세균 배양여과액을 첨가한 시험구의 } C. \text{ polykrikoides의 세포수}}{\text{control의 } C. \text{ polykrikoides의 세포수}} \right] \times 100$$

살조활성 측정을 위해 사용한 *C. polykrikoides*는

국립수산과학원에서 분양받아 100 ml의 f/2-Si 배지가 들어있는 300 ml culture flask에서 온도 20°C, 광량 120 µEm⁻²s⁻¹, 광주기 12L:12D로 배양하였다.

2.4. 살조물질의 특성

2.4.1. 열 안정성

살조미생물이 생산하는 물질의 열 안정성을 조사하기 위하여, 살조물질 생산 최적조건에서 배양(25°C, pH 8.0, 3.0% NaCl)한 정지기 이후의 배양액을 채취하였다. 채취한 배양액은 4°C, 15,000 g에서 20분간 원심분리하여 균체를 제거하고, 얻어진 상등액을 다시 0.2 µm pore-size의 membrane filter로 여과하여 100°C 1시간, 121°C 15분 및 1시간, 135°C, 150°C 및 180°C에서 각각 1시간 동안 가열처리 하였다. 가열 처리한 배양여과액은 상온에서 1일간 방치한 후 상기와 동일한 방법으로 대수증식기의 *C. polykrikoides* (1.0×10^4 cells/ml)의 배양액에 10%가 되도록 접종하여 6시간 후 살조활성을 측정하였다. 이때 control은 가열처리하지 않은 배양여과액을 같은 조건으로 처리하여 사용하였다.

2.4.2. pH 안정성

살조미생물이 생산하는 살조물질의 pH 안정성을 조사하기 위하여 살조물질 생산 최적조건에서 배양(25°C, pH 8.0, 3.0% NaCl)한 배양여과액을 50 mM sodium acetate buffer (pH 2.0~5.0)와 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0~10.0)를 사용하여 pH를 2.0~10.0까지 조절하여 2시간 동안 방치하였다. 2시간 후 다시 pH를 8.0으로 조정하여 상기의 방법과 같이 대수증식기의 *C. polykrikoides* (1.0×10^4 cells/ml)의 배양액에 10%가 되도록 접종하여 살조활성을 측정하였다.

2.5. 해양생물에 미치는 영향

2.5.1. 다른 적조생물 및 먹이생물에 미치는 영향
살조미생물이 생산하는 살조물질이 *C. polykrikoides* 이외의 적조생물 및 먹이생물에 미치는 영향을 조사하기 위하여 7종의 와편모조류, 2종의 침편모조류, 4종의 규조류 및 양식장에서 치자어의 먹이로 이용하는 9종의 먹이생물을 대수증식기로 배양하여 살조미생물의 배양여과액이 미치는 영향을 조사하였다. 적조생물 9종 중, 와편모조류에 속하는

Akashiwo sanguinea, *Alexandrium catenella*, *Gymnodinium impudicum*, *Heterocapsa triquetra*, *Prorocentrum minimum*, *Prorocentrum micans*, *Scrippsiella trochoidea*와 침편모조류인 *Chattonella antiqua* 및 *Heterosigma akashiwo*는 100 ml의 f/2-Si 배지가 들어 있는 300 ml culture flask에서 온도 20°C, 광량 120 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$, 광주기 12L:12D로 대수증식기까지 배양하여 (1.0×10^4 cells/ml) 상기와 같은 방법으로 살조활성을 측정하였다. 그 이외의 규조류 및 먹이 생물들은 f/2배지에서 온도 20°C, 광량 20 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$, 광주기 12L:12D로 대수증식기까지 배양하여 사용하였으며, 살조활성은 Lee²⁹⁾의 방법에 따라 다음과 같이 측정하였다. 먼저 각각의 규조류 및 먹이 생물들을 최적 생육조건에서 대수증식기까지 배양한 후 0.8% f/2 agar plate에 algal lawn을 형성할 수 있도록 접종하였다. 그리고 살조미생물의 배양여과액을 미리 멸균하여 준비해 둔 8 mm 직경의 paper-disk에 50 μl 씩 접종하여 각각의 조류를 접종한 plate 위에 올려 두고 상기의 배양조건으로 algal lawn이 형성될 때 까지 배양하였다. 살조활성은 paper-disk 주변에 형성된 투명한 크기로 측정하였다.

본 실험에 사용한 조류 중 *Chattonella antiqua*와 *Heterosigma akashiwo*는 국립수산과학원에서 분양받아 사용하였으며, *A. sanguinea*, *G. impudicum*, *I. galbana*, *P. minimum*, *P. micans*, *S. costatum*는 남해 해양연구소에서, 그리고 *A. catenella*와 나머지 규조류 및 먹이생물들인 *Chaetoceros didymus*, *Chlorella ellipsoidea*, *Chlorella vulgaris*, *Navicula elegans*, *Nannochloris oculata*, *Nitzschia pungens*, *Oscillatoria angustissima*, *Pavlova gyraus*, *Phaeodactylum tri-cornutum*, *Skeletonema costatum*, *Tetraselmis suecica*, *Thalassiosira decipiens*는 한국해양미세조류은행에서 분양받아 사용하였다.

2.5.2. 미생물에 미치는 영향

본 살조미생물이 생산하는 살조물질이 미생물에 미치는 영향을 조사하기 위해 총 10종의 미생물과 효모, 곰팡이를 선정하여 저해활성을 측정하였다. 시험 균주는 *Aspergillus niger* IFO 4091, *Candida albicans* IFO 1385, *Escherichia coli* KCTC 2441, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Penicillium citrinum* CBS 139.45, *Proteus vulgaris* ATCC 13315,

Pseudomonas aeruginosa ATCC 10145, *Salmonella choleraesuis* ATCC 6994, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 및 *Trichophyton mentagrophytes* IFO 6202를 사용하였으며 실험방법은 paper-disk법을 사용하였다. 각각의 시험 균주들을 최적 조건에서 배양한 후 개체수가 10^5 cell/ml이 되도록 4 ml의 0.7% agar에 접종한 후 미리 균혀둔 최적 평판배지에 중층하여 균혔다. 그리고 살조미생물의 배양여과액을 50 μl 함유한 멸균된 0.8 mm paper-disk를 평판 위에 얹고 각각의 미생물의 최적 배양조건에서 배양한 후 paper-disk 주변에 형성된 생육 저해환의 직경을 측정하여 저해활성을 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 살조미생물의 분리 및 동정

시료로 사용한 해수로부터 서로 다른 colony 색과 형태를 가진 총 53종의 미생물이 분리 되었으며, 각각의 colony를 Marine broth 2216E 배지에서 순수 분리, 배양하여 *C. polykrikoides*에 대한 살조활성을 조사하여 가장 뛰어난 살조활성을 보이는 균주를 선정하였다. 선정된 균주의 동정을 위하여 배양학적, 형태학적 특성 및 API kit (Biomérieux, France)를 이용한 생화학적 특성을 조사하여 1차적으로 분류학적인 유사성을 검토하였다(Table 1). 본 균주는 그람 양성 세균으로서, 내생포자를 형성하지 않았고, Marine agar 2216E 배지에서 형성된 colony는 불투명한 노란색을 나타내었으며, SEM (Scanning electron microphotograph)으로 관찰시 0.93~0.99 μm 정도의 크기로 관찰되었다. 또한 catalase 양성으로 운동성이 없었으며, gelatin과 casein을 액화시키지 않았으며, glucose를 이용하여 성장하지만, 산은 생성하지 않았다. API kit Staph를 이용하여 동정한 결과, 실험균주는 *Micrococcus* sp.와 가장 유사하였으며, 보다 정확한 동정을 위하여 실험균주의 16S rDNA 염기서열을 분석한 후, NCBI GenBank에 등록된 유사 균주들과 유전자간의 상관성을 알아본 결과, *Micrococcus luteus* ATCC 381^T와 98.6%의 상동성을 나타내었다. 따라서 본 살조미생물을 *Micrococcus luteus* SY-13으로 명명하여 이후의 실험을 진행하였다.

해수에 존재하는 대표적 세균으로는 *Alcaligenes*, *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Hyphomicrobium*, *Pseudo-*

Table 1. Physiological and biochemical properties of *M. luteus* SY-13

Tests	Results	Tests	Results	Tests	Results
Colony color	Yellow	Acid produced from		Assimilation of	
surface	Smooth	D-Glucose	-	D-Glucose	+
elevation	Convex	D-Fructose	-	D-Mannose	+
Cell form	Coccus	Glycerol	-	Glycerol	-
Cell size	0.93~0.99 μm	D-Maltose	+	Ducitol	-
Motility	-	D-Lactose	-	Inositol	-
Spore formation	-	Melibiose	-	D-Mannitol	-
Gram stain	+	D-Sucrose	+	D-Sorbitol	-
Catalase	+	Trehalose	-	Amygdalin	-
Hydrolysis of	+	Inulin	-	Arbutin	-
Gelatin	-	D-Raffinose	-	Salicin	-
Starch	+	Glycogen	-	Inulin	-
Casein	-	Xylitol	-	D-Fucose	-
Esculin	-	D-Turanose	+	L-Fucose	-
Arginine dehydrolase	-	D-Fucose	-	D-Arabitol	-
Reduction of nitrates	-	D-Arabinose	-	L-Arabitol	-
Urease	-	D-Arabitol	-	Potassium gluconate	-

monas, *Spirillum*, *Vibrio* 및 방선균 등이 있고, 해저 퇴적물에는 *Desulfovibrio*나 *Methanogenium*과 같은 혐기성 세균들이 서식한다. 지금까지 많은 연구자들에 의해 분리된 다양한 종류의 살조미생물들이 알려져 있는데, 그 대부분이 해수에서 분리되었으며 해양성 미생물이 대부분을 차지하고 있다. 지금까지 알려진 대표적인 살조미생물들로는 *Bacillus*^{16~18)}, *Cytophyga*^{19~20)}, *Flavobacterium*²¹⁾, *Micrococcus*^{22~25)}, *Pseudomonas*^{26,27)}, *Pseudoaltermonas*^{28~30)}, *Saprospira*³¹⁾ 등이 대표적이다.

3.2. *M. luteus* SY-13의 살조물질 생산 최적조건

M. luteus SY-13의 배양조건에 따른 생육도를 Fig. 1에 나타내었다. 최적 생육온도는 25°C였으나, 20~

45°C 사이에서도 비교적 잘 성장 하는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 4°C에서는 거의 성장하지 못하였으며, 40°C 이상의 온도에서는 점점 성장이 저해되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1a). 이것은 *Micrococcus* sp.의 최적 생육온도가 일반적으로 25~37°C인 것과 일치하는 결과였다^{32,34)}. pH의 경우 pH 5.0~9.0 사이에서는 비교적 활발한 성장을 보였으며, pH 8.0에서 최대 생육도를 나타내었다. 그리고 pH 4.0 이하에서는 거의 성장을 하지 못하였으며, pH 10.0 이상에서도 성장률이 감소하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1b). NaCl 농도에 따라서는 3.0%에서 최대 성장을 나타냈으며 0~7.0%까지도 비교적 높은 성장률을 보였다(Fig. 1c). 8.0% 이상에서는 성장률이 감소하는 경향을 보였으나 비교적 넓은 범위의 염농도에

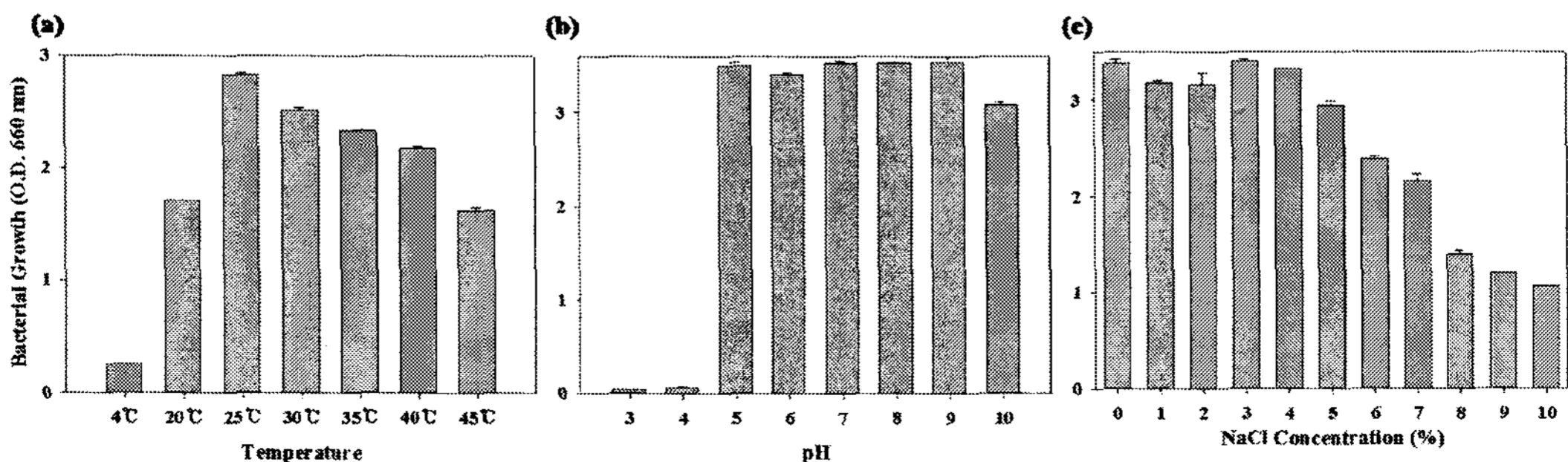


Fig. 1. Effects of temperature (a), initial pH (b), and NaCl concentration (c) on the growth of *M. luteus* SY-13.

서도 잘 성장할 수 있는 광염성 미생물로 판단된다. 따라서 본 *M. luteus* SY-13 균주는 해수나 고염도의 농도뿐만 아니라, 강우 직후의 낮은 염분농도에서나 담수 및 기수역에서도 잘 적응할 수 있을 것으로 판단된다. 이상의 실험 결과, *M. luteus* SY-13은 25°C, pH 8.0, 3.0% NaCl 농도에서 가장 높은 성장률을 보이는 것으로 나타났다.

M. luteus SY-13의 배양조건에 따른 살조물질 생산 최적조건을 Fig. 2에 나타내었다. *M. luteus* SY-13의 살조물질 생산 최적온도는 25°C로 98% 이상의 살조활성을 나타내었다. 20~35°C 사이에서도 90% 이상의 살조활성을 보였으며, 20°C와 40°C, 45°C에서도 70% 이상의 살조활성을 나타내었다. 그러나 본 균주의 성장이 거의 일어나지 않았던 4°C에서는 살조활성 또한 나타나지 않았다(Fig. 2a). 배지의 초기 pH의 변화에 따른 살조물질의 생산은 pH 8.0에서 최대로 나타났으며, pH 5.0~9.0 사이에서도 90% 이상의 살조활성을 나타내었다. 그러나 pH 10.0에서는 60% 정도의 살조활성을 나타내었고, pH 3.0과 pH 4.0에서는 낮은 살조활성을 나타내었다 (Fig. 2b). NaCl의 농도에 따른 살조활성은 3.0%에서 가장 높은 살조활성을 나타내었으며 0~5.0% 사이에서는 90% 이상의 살조활성을, 6.0~7.0%에서는 80% 이상의 살조활성을 나타내었다. 그러나 8.0% 이상의 NaCl 농도에서는 살조활성이 60% 이하로 감소하였고, 10.0%의 NaCl 농도에서는 40% 이하의 살조활성을 나타내었다(Fig. 2c). 따라서, 살조물질 생산 최적조건 또한 *M. luteus* SY-13의 최적 성장조건과 같은 25°C, pH 8.0, 3.0% NaCl 농도로 나타났다.

이상의 결과를 종합해 보면, *M. luteus* SY-13의 성장과 살조활성은 비례의 관계를 나타내는 것을 알 수 있었다. 즉, 균의 증식이 활발할수록 살조물질의 농도도 높아지는 것을 알 수 있었으며, 이러한 결과는 균의 성장과 살조활성을 살펴보았던 이전의 다른 연구들과 잘 일치하였다^{23,24}. 대부분의 적조 발생시기가 수온이 20~25°C 이상이고 염분농도가 2.5% 이상인 것을^{3,35} 고려해 볼 때, 본 살조미생물 *M. luteus* SY-13은 적조가 발생한 해양환경에서 적응성이 뛰어날 것으로 판단된다.

3.3. *M. luteus* SY-13의 성장단계에 따른 배양여과액의 살조활성

살조미생물 *M. luteus* SY-13의 최적 생육조건에서 성장곡선과 성장단계에 따른 배양여과액의 살조활성을 Fig. 3에 나타내었다. 25°C, pH 8.0, 3.0% NaCl 농도의 최적 성장조건에서 *M. luteus* SY-13은 약 60시간 배양 후 완전히 성장하여 정지기로 접어들었다. 성장 단계별로 살조활성을 살펴보았을 때, 세균의 수가 기하급수적으로 증가하는 대수증식기 중반에 접어들면서 급격히 살조활성이 증가하기 시작하여 균의 성장이 최대에 이르는 대수증식기 후반에 100%의 살조활성을 나타내었다. 이러한 살조활성은 정지기에도 계속 유지되었으며, 미생물의 자가분해가 일어나는 정지기 이후에도 살조활성이 감소하지 않는 것을 관찰할 수 있었다 (미제시). 이상의 결과, *M. luteus* SY-13이 생산하는 살조물질은 균의 증식이 활발하게 일어나는 대수증식기부터 생산되어지는 것으로 판단된다. 이러한 결과는 적조 생물인 *P. micans*에 대해 살조활성을 가지는

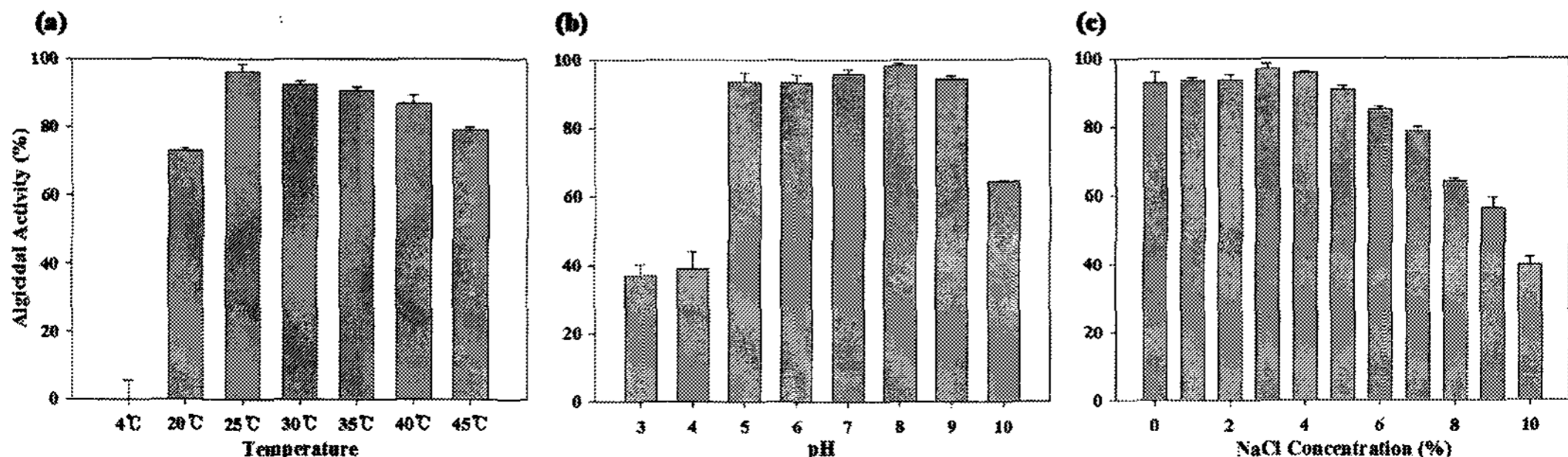


Fig. 2. Effects of temperature (a), initial pH (b), and NaCl concentration(c) on the production of algicidal compound of *M. luteus* SY-13 against *C. polykrikoides*.

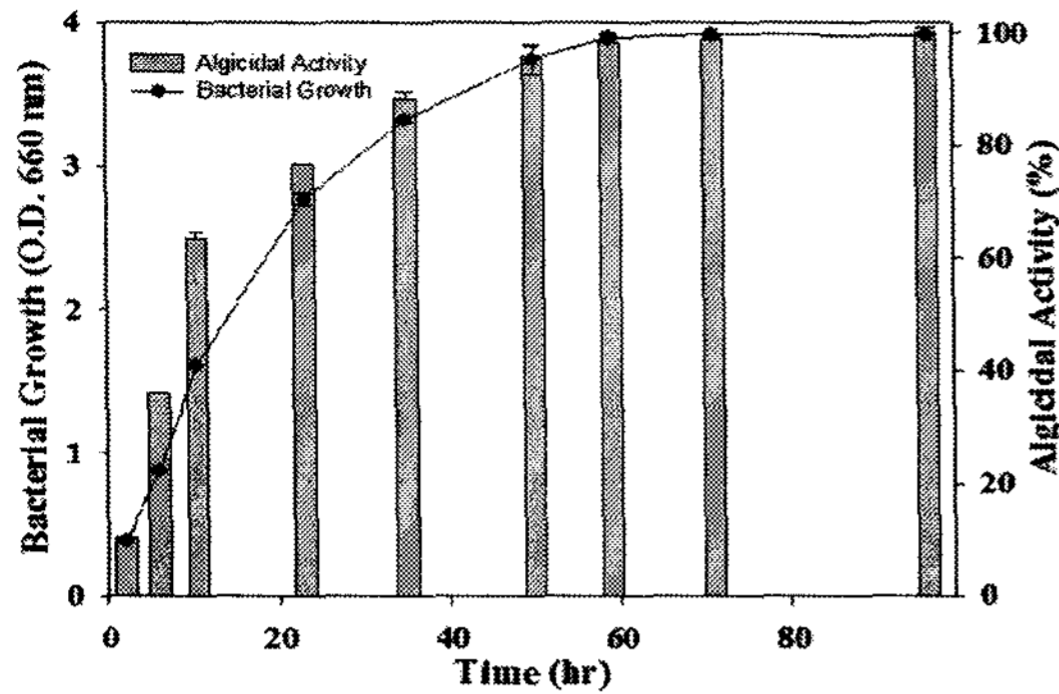


Fig. 3. Growth curve of *M. luteus* SY-13 at optimal culture conditions (25°C, pH 8.0, 3.0% NaCl) and algicidal activity of the culture filtrate of *M. luteus* SY-13 against *C. polykrikoides*.

Pseudomonas sp.에 대해 연구한 Lee와 Park²⁶⁾의 보고나 균의 생육과 살조물질의 생산이 비례하는 것을 보여준 Nakashima³⁶⁾의 보고와 일치하였다. 그러나 대수증식기에는 살조활성이 증가하다가 정지기 이후에는 살조활성이 감소하는 것으로 보고한 Jeong²³⁾과 Mu¹⁸⁾의 보고와는 상이한 것으로 보아 살조미생물이나 살조기작에 따라 균의 생육과 살조활성과의 상관관계는 차이가 있는 것으로 판단된다.

3.4. *M. luteus* SY-13이 생산하는 살조물질의 특성

3.4.1. 열안정성

M. luteus SY-13이 생산하는 살조물질의 열 안정성을 조사한 결과는 Fig. 4a에 나타내었다. 100°C에서 1시간, 121°C에서 15분간 열처리를 한 배양여과액의

경우 살조활성이 각각 97.9%와 98.7%로 (미제시) 열처리하지 않은 배양여과액의 살조활성 (98.9%)과 유의한 차이는 없었다. 그러나 121°C, 135°C, 150°C 및 180°C에서 1시간 동안 가열처리한 배양여과액의 경우 살조활성이 각각 88.4%, 81.2%, 78.8% 및 47.3%로 열처리하지 않은 배양여과액에 비해 살조활성이 감소하였다. 지금까지 알려진 많은 살조물질들 중, Lee^{29,38)}가 보고한 protease는 68°C에서 1시간의 열처리만으로도 살조활성을 잃는 것으로 보고되었다. 그러나 본 실험에서 사용한 균주인 *M. luteus* SY-13이 생산하는 살조물질과 같이 100°C 이상의 열처리에서도 활성을 잃지 않는 살조물질들도 다수 보고되어져 있다^{18,24,30,37)}. 반면 살조활성을 가지는 것으로 보고된 *Corallina pilulifera*의 추출액은 1시간동안의 열처리 과정이 특정 살조물질의 살조활성을 더욱 증가시켰다는 보고도 있다³⁷⁾. 따라서, *M. luteus* SY-13이 생산하는 살조물질은 내열성 물질이며 *M. luteus* SY-13의 살조기작이 protease와 같은 효소적인 작용은 아닌 것으로 판단된다.

3.4.2. pH 안정성

pH에 대한 안정성을 조사하기 위하여 *M. luteus* SY-13의 배양여과액을 pH 2.0~10.0까지 조절한 후 살조활성을 조사한 결과는 Fig. 4b에 나타내었다. *M. luteus* SY-13이 생산하는 살조물질은 pH의 변화에 대해서도 전반적으로 안정한 것으로 나타났다. pH 2.0~8.0의 경우 살조활성이 84% 이상으로 안정하였으나, 강알칼리 조건인 pH 9.0 이상의 조건에서

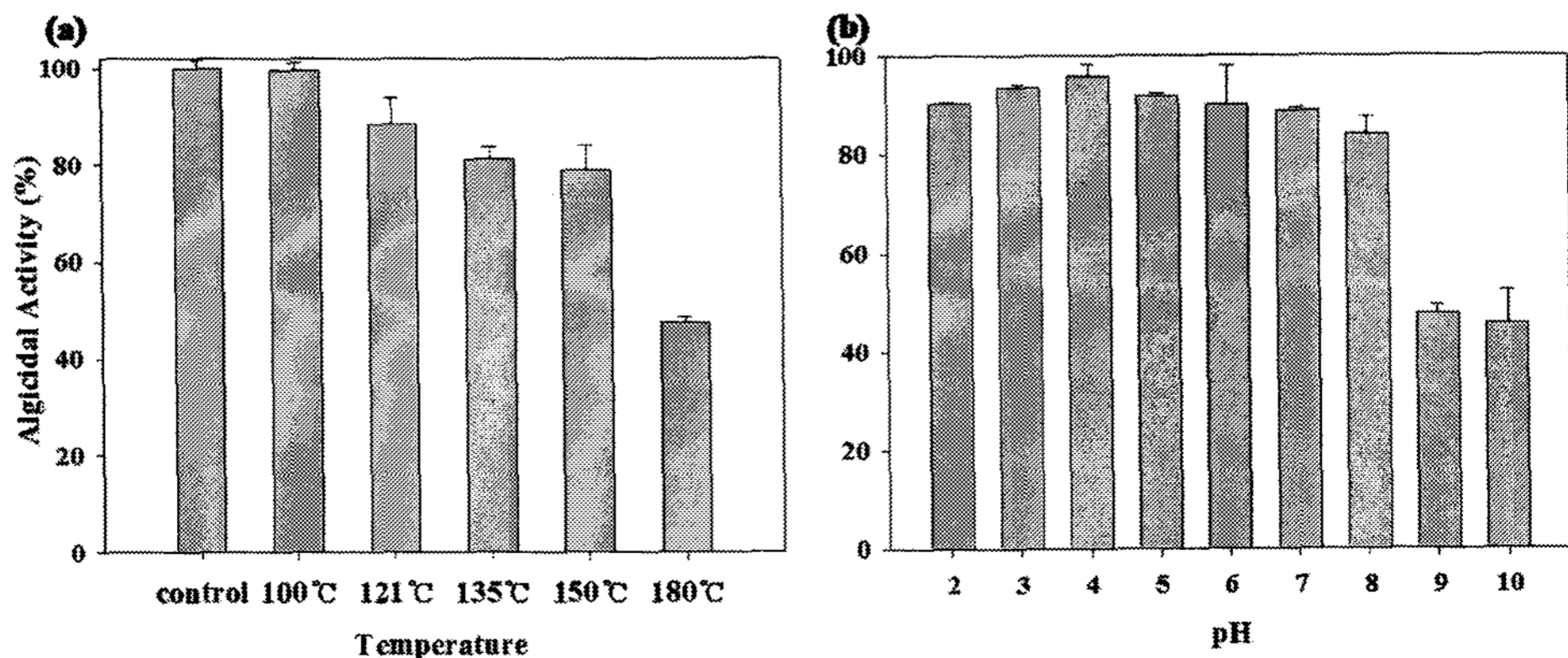


Fig. 4. The heat (a) and pH stability (b) of the culture filtrate of *M. luteus* SY-13 against *C. polykrikoides*. The heat-treated culture filtrate was heated at each temperature for 1 hour.

는 살조활성이 47.5% 이하로 현저히 감소하는 것을 알 수 있었다. 이것은 대부분의 살조물질들이 약산성이나 약알칼리에서 안정하고 강산성 조건에서 활성이 감소하는 것과는 상반되는 결과였다^{24,30}. 해수의 경우 일반적으로 약알칼리의 조건이므로 본 살조물질을 해양에 적용하는 것은 문제가 없을 것으로 판단된다.

3.5. 해양생물에 미치는 영향

3.5.1. 다른 적조생물 및 먹이생물에 미치는 영향

M. luteus SY-13이 *C. polykrikoides* 이외의 다른 적조생물들에 미치는 영향을 조사한 결과를 Table 2에 나타내었다. *M. luteus* SY-13의 배양여과액은 본 실험에서 사용한 7종의 와편모조류에 대해 모두 살조활성을 나타내었다. *A. sanguinea*의 경우 71.8%로 와편모조류중 가장 높은 살조활성이 나타났으며, 나머지 *A. catanella* 외 6종의 경우도 낮게는 19.7% (*P. minimum*)에서 48.2%(*S. trochoidea*)까지 종에 따라서 살조활성에 차이가 있었다. 침편모조류의 경우, 일본에서 대규모 수산피해를 일으키는 적조생물 *Chattonella antiqua*의 경우 91.8%로 매우 높은 살조활성이 나타났으며 *Heterosigma akashiwo*도 25.5%의 살조활성이 나타났다. 즉, *M. luteus* SY-13은 다양한 적조생물에 대해 살조활성을 보여 종특이성은 낮았지만 적조종에 따라 활성의 차이를 보였다.

그러나 *M. luteus* SY-13이 규조적조를 일으키는 규조류에 대해 미치는 영향을 조사한 결과, *C. didymus*, *N. pungens*, *S. costatum* 및 *T. decipiens*의 4종

Table 2. Algicidal effect of *M. luteus* SY-13 on the growth of dinophyceae and raphidophyceae causing harmful algal blooms

Species	Algicidal activity (%)
Dinophyceae	
<i>Akashiwo sanguinea</i>	71.8
<i>Alexandrium catanella</i>	20.8
<i>Gymnodinium impudicum</i>	44.3
<i>Heterocapsa triquetra</i>	33.3
<i>Prorocentrum minimum</i>	19.7
<i>Prorocentrum micans</i>	47.8
<i>Scrippsiella trochoidea</i>	48.2
Raphidophyceae	
<i>Chattonella antiqua</i>	91.8
<i>Heterosigma akashiwo</i>	25.5

모두 살조활성이 나타나지 않았으며(Table 3), 양식장에서 치·자어의 먹이생물로 이용되어지는 유익한 미세조류들인 *C. ellipsoidea* 외 7종의 먹이생물에도 아무런 영향을 미치지 않았다. 그러나 *I. galbana*의 경우는 24.8%의 비교적 약한 살조활성이 나타났다(Table 4).

Yoshinaga^{9,39}는 일반적으로 조류를 직접 공격하지 않고 세포외부로 살조물질을 분비하는 살조물질 분비형 미생물의 경우 종특이성이 높은 것으로 보고되고 있다. 그러나, 살조물질 분비형인 *M. luteus* SY-13의 경우 본 실험에서 *C. polykrikoides*와 같은 와편모조류에 대해 전반적으로 살조활성을 나타내었을 뿐만 아니라 침편모조류인 *Chattonella antiqua*와 *Heterosigma akashiwo*에도 살조활성을 나타내는 것으로 보아 살조물질 분비형임에도 불구하고 종특이성이 낮은 것으로 나타났다. 그러나 *M. luteus* SY-13은 유해성 적조생물들에게만 전반적으로 살

Table 3. Algicidal effect of *M. luteus* SY-13 on the growth of bacillariophyceae causing harmful algal blooms

Species	Algicidal activity
Bacillariophyceae	
<i>Chaetoceros didymus</i>	-
<i>Nitzschia pungens</i>	-
<i>Skeletonema costatum</i>	-
<i>Thalassiosira decipiens</i>	-

Table 4. Algicidal effect of *M. luteus* SY-13 on the growth of livefood organisms

Species	Algicidal activity
Bacillariophyceae	
<i>Navicula elegans</i>	-
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	-
Chlorophyceae	
<i>Chlorella ellipsoidea</i>	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	-
<i>Nannochloris oculata</i>	-
Cyanophyceae	
<i>Oscillatoria angustissima</i>	-
Haptophyceae	
<i>Isocrysis galbana</i>	+
<i>Pavlova gyraus</i>	-
Prasinophyceae	
<i>Tetraselmis suecica</i>	-

조활성을 나타내고, 규조류나 *I. galbana*를 제외한 다른 먹이생물에는 영향을 미치지 않으므로 실제 해양 생태계에 적용 시 큰 이점으로 작용할 것으로 판단된다.

3.5.2. 미생물에 미치는 영향

M. luteus SY-13의 배양여과액이 미생물들에 미치는 영향을 조사한 결과를 Table 5에 나타내었다. 본 실험은 *M. luteus* SY-13이 생산하는 물질이 자연계에 널리 분포하는 미생물들에 미치는 영향을 조사하기 위한 것으로 시험 균주로는 6종의 미생물과 1종의 효모 및 3종의 곰팡이를 선정하여 저해활성을 측정하였다. 그 결과 *M. luteus* SY-13은 *S. aureus* ATCC 6538 등의 미생물과 효모인 *C. albicans* IFO 1385 및 *P. citrinum* CBS 139.45 등의 곰팡이에 대해서 어떠한 증식 저해활성도 나타내지 않았다. 물론이 10종의 미생물들이 자연계에 존재하는 모든 미생물들을 대표할 수는 없으나 해양미생물로 잘 알려져 있는 *P. aeruginosa* ATCC 10145나 *S. choleraesuis* ATCC 6994에도 어떠한 영향도 미치지 않는 것으로 보아 실제 해양에 적용 시 2차적인 문제가 적을 것으로 판단된다. 즉, 살조미생물 *M. luteus* SY-13이 생산하는 살조물질을 직접 해양에 적용하더라도 생태계에 유익한 다른 미세조류들이나 해양 생태계의 생산자이자 분해자인 미생물들에 악영향

을 미치거나 생태계를 교란시키는 작용은 적을 것으로 판단된다. 그러나 보다 확실한 적용가능성과 안전성을 검토하기 위해서는 더 많은 해양생물들에 대한 연구가 선행되어야 할 것이다.

4. 결 론

해양 생태계나 양식 산업 그리고 해양자원 등에 막대한 피해를 입히는 적조를 2차 오염이 없는 보다 친환경적으로 제어하기 위해 적조발생 해역에서 살조미생물을 분리, 동정하였다. 그 결과 분리된 균주는 *M. luteus*로 동정되었으며, *M. luteus* ATCC 381^T와 98.6%의 상동성을 가지고 있었다. 따라서 본 살조미생물을 *M. luteus* SY-13으로 명명하였다. *M. luteus* SY-13은 균의 성장률이 높을수록 살조물질의 활성도 높아졌으며, 최적 배양조건 및 살조물질 생산 최적조건은 25°C, 초기 pH 8.0, 3.0% NaCl 농도였다. 온도의 경우 20~45°C 사이에서도 비교적 잘 성장 하였으며, pH의 경우 pH 5.0~9.0에서도 비교적 활발한 성장을 보였다. 그리고 NaCl 농도의 경우 0~7.0%까지도 비교적 높은 성장률을 보였다. *M. luteus* SY-13이 생산하는 살조물질은 100°C에서 1시간, 121°C에서 15분간의 열처리와 pH를 pH 2.0~8.0로 조절하였을 경우에도 살조활성이 안정하여 비교적 열과 pH에 대해 안정한 물질로 판단된다. 그러나 121°C~180°C 사이의 온도에서 1시간 동안 열처리를 하였을 경우나 강알칼리 조건인 pH 9.0 이상의 조건에서는 살조활성이 감소하는 것을 알 수 있었다. *M. luteus* SY-13이 최적 배양조건 (25°C, 초기 pH 8.0, 3.0% NaCl)에서 생산하는 살조물질은 대수증식기의 *C. polykrikoides* (1.0×10^4 cells/ml)에 10% 처리했을 때 6시간 만에 98% 이상의 살조활성을 나타내었다. 다른 적조생물들이나 규조류 및 먹이생물들에게 미치는 영향을 조사해 보았을 때, *M. luteus* SY-13은 유해성 적조를 일으키는 *C. polykrikoides*의 7종의 와편모조류와 *Chattonella antiqua*와 *Heterosigma akashiwo* 등 유해성 적조를 일으키는 미세조류에만 살조활성을 나타내었으며 *I. galbana* (24.8%)를 제외한 다른 먹이생물이나 규조적조를 일으키는 4종의 규조류에는 살조활성을 나타내지 않았다. 또한, *M. luteus* SY-13의 배양여과액은 실험한 미생물 균주

Table 5. Inhibition effect of the culture filtrate of *M. luteus* SY-13 on the growth of other microorganisms

Microorganisms	Inhibition effect
Gram positive bacteria	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	-
Gram negative bacteria	
<i>Escherichia coli</i> KCTC 2441	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	-
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145	-
<i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 6994	-
Yeast	
<i>Candida albicans</i> IFO 1385	-
Mold	
<i>Aspergillus niger</i> IFO 4091	-
<i>Penicillium citrinum</i> CBS 139.45	-
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> IFO 6202	-

10종에 대해 저해활성을 나타내지 않았다. 즉, 비교적 낮은 종특이성을 나타내었지만 종에 따라 살조활성이 차이가 나는 것을 알 수 있었고, 미생물에 미치는 영향은 적은 것으로 판단된다. 이에 따라, 본 실험에서는 해양으로부터 분리한 미생물인 *M. luteus* SY-13의 살조미생물로서의 높은 잠재적 이용 가능성을 확인하였다.

감사의 글

본 연구에 사용된 조류를 분양해 주신 국립수산과학원과 남해해양연구소, 그리고 한국해양미세조류은행에 감사의 말씀을 전합니다.

참고 문헌

- 1) Kim H. G., 1997, Recent harmful algal blooms and mitigation strategies in Korea, *Ocean Res.*, 19, 185-192.
- 2) Lee Y. S., 2006, Factors affecting outbreaks of high-density *Cochlodinium polykrikoides* red tides in the coastal seawaters around Yeosu and Tongyeong, Korea, *Mar. Pollut. Bull.*, 52, 1249-1259.
- 3) Lee Y. S., Lee S. Y., 2006, Factors affecting outbreaks of *Cochlodinium polykrikoides* blooms in the coastal areas of Korea, *Mar. Pollut. Bull.*, 52, 626-634.
- 4) 박치현, 이병호, 2006, 적조방제용 황토살포가 연안 저서생태계에 미치는 영향, *한국환경과학회지*, 11, 1035-1043.
- 5) 최희구, 김평중, 이원찬, 윤성중, 김학균, 이홍재, 1998, 황토의 유해성 적조생물 *Cochlodinium* 종의 제거 효과, *한국수산학회지*, 31, 109-113.
- 6) 윤종섭, 김승현, 윤조희, 2003, 황토살포에 의한 적조생물의 제거, *대한환경공학회지*, 25, 358-363.
- 7) 김성재, 2000, 적조생물의 구제-2. 황토에 의한 적조생물의 응집제거, *한국수산학회지*, 33, 455-462.
- 8) 박치현, 이병호, 2007, 적조방제용 황토살포의 양을 줄일 수 있는 첨가제에 대한 연구, *한국환경과학회지*, 16, 745-750.
- 9) Yoshinaga I., Kawai T., Takeuchi T., Ishida Y., 1995, Distribution and Fluctuation of bacteria inhibiting the growth of a marine red tide plankton *Gymnodinium mikimotoi* in Tanabe bay, *Fish. Sci.*, 61, 780-786.
- 10) Fukami K. T., Nishijima T., Hata Y., 1997, Stimulative and inhibitory effects of bacteria on the growth of microalgae, *Hydrobiologia*, 385, 185-191.
- 11) Imai I., Ishida Y., Sakaguchi K., Hata Y., 1995, Algicidal marine bacteria isolated from northern Hiroshima Bay, Japan. *Fish. Sci.*, 61, 628-636.
- 12) Fukami K., Sakaguchi K., Kanou M., Nishijima T., 1996, Effect of bacterial assemblages on the succession of blooming phytoplankton from *Skeletonema costatum* to *Heterosigma akashiwo*. In Harmful and toxic algal blooms ed. Yasumoto, T., Oshima, T., FuKuyo, Y., pp. 335 - 338, Paris: Intergovernmental Oceanographic commission of UNESCO.
- 13) Kim M. C., Yoshinaga I., Imai I., Nagasaki K., Itakura S., Ishida Y., 1998, A close relationship between algicidal bacteria and termination of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) bloom in Hiroshima Bay, Japan., *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 170, 25-32.
- 14) Uchida T., Toda S., Matsuyama Y., Yamaguchi M., Kotani Y., Honjo T., 1999, Interactions between the red tide dinoflagellates *Heterocapsa circularisquama* and *Gymnodinium mikimotoi* in laboratory culture, *J. Exp. Mar. Bio. and Ecol.*, 241, 285-299.
- 15) Kim D., Oda T., Muramatsu T., Kim D., Matsuyama Y., Honjo T., 2002, Possible factors responsible for the toxicity of *Cochlodinium polykrikoides*, a red tide phytoplankton, *Comp. Biochem. Physiol. C-Toxicol. Pharmacol.*, 132, 415-423.
- 16) Jeong S. Y., Ishida K., Ito Y., Okada S., Murakami M., 2003, Bacillamide, a novel algicide from the marine bacterium, *Bacillus* sp. SY-1, against the harmful dinoflagellate, *Cochlodinium polykrikoides*, *Tetrahedron Lett.*, 44, 8005-8007.
- 17) Ahn C. Y., Joung S. H., Jeon J. W., Kim H. S., Yoon B. D., Oh H. M., 2003, Selective control of cyanobacteria by surfactin-containing culture broth of *Bacillus subtilis* C1, *Biotechnol. Lett.*, 25, 1137-1142.
- 18) Mu R. M., Fan Z. Q., Pei H. Y., Yuan X. L., Liu S. X., Wang X. R., 2007, Isolation and algae-lysing characteristics of the algicidal bacterium B5, *Journal of Environmental Sciences*, 19, 1336-1340.
- 19) Doucette G. J., McGovern E. R., Babinchak J. A., 1999, Algicidal bacteria active against *Gymnodinium breve* (Dinophyceae). I. Bacterial isolation and characterization of killing activity, *J. Phycol.*, 35, 1447-1454.
- 20) Imai I., Sunahara T., Nishikawa T., Hori Y., Kondo R., Hiroshi S., 2001, Fluctuations of the red tide flagellates *Chattonella* spp. (Raphidophyceae) and the algicidal bacterium *Cytophaga* sp. in the Seto Inland Sea, Japan, *Marine biology*, 138, 1043-1049.
- 21) Adachi M., Fukami K., Kondo R., Nishijima T., 2002, Identification of marine algicidal *Flavobacterium* sp. 5N-3 using multiple probes and whole-cell hybridization, *Fish. Sci.*, 68, 713-720.

- 22) 박영태, 박지빈, 정성윤, 송병철, 임월애, 김창훈, 이원재, 1998, 적조생물 살조세균 탐색 I. 유해 적조생물 *Cochlodinium polykrikoides* 살조세균 *Micrococcus* sp. LG-1의 분리와 살조특성, 한국수산학회지, 31, 767-773.
- 23) 정성윤, 박영태, 이원재, 2000, 적조생물 살조세균 탐색, III. 유해성 적조생물 *Cochlodinium polykrikoides*에 대한 *Micrococcus* sp. LG-5의 살조효과, 한국수산학회지, 33, 331-338.
- 24) 정성윤, 박영태, 김무찬, 최석철, 성희경, 김재영, 김채운, 이원재, 2000, 적조생물 살조세균 탐색 IV. 살조세균 *Micrococcus* sp. LG-5가 생산하는 살조물질의 특성과 해양생물에 미치는 영향, 한국수산학회지, 33, 339-347.
- 25) Byun H. G., Jeong S. Y., Park Y. T., Lee W. J., Kim S. K., 2002, Algicidal activity of substance purified from marine bacteria metabolites against *Cochlodinium polykrikoides*, J. of Fish. Sci. Technol., 5, 150-155.
- 26) 이원재, 박영태, 1998, 적조생물 살조세균 탐색 II. 적조생물 *Prorocentrum micans* 살조 세균 *Pseudomonas* sp. LG-2의 분리와 살조특성, 한국수산학회지, 31, 852-858.
- 27) Wang X., Gong L., Liang S., Hana X., Zhua C., Li Y., 2005, Algicidal activity of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa*, Harmful Algae, 4, 433-443.
- 28) Lovejoy C., Bowman J. P., Hallegraeff G. M., 1998, Algicidal effects of a novel marine *Pseudoalteromonas* isolate (class Proteobacteria, gamma subdivision) on harmful algal bloom species of the genera *Chattonella*, *Gymnodinium*, and *Heterosigma*, Appl. Environ. Microbiol., 64, 2806-2813.
- 29) Lee S. O., Kato J., Takiguchi N., Kuroda A., Ikeda T., Mitsutani A., Ohtake H., 2000, Involvement of an extracellular protease in algicidal activity of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain A28, Appl. Environ. Microbiol., 66, 4334-4339.
- 30) Su J. Q., Yang X. Y., Zheng T. L., Tian Y., Jiao N. Z., Cai L. Z., Hong H. S., 2007, Isolation and characterization of a marine algicidal bacterium against the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*, Harmful Algae, 6, 799-810.
- 31) Furusawa G., Yoshikawa T., Yasuda A., Sakata T., 2003, Algicidal activity and gliding motility of *Saprospira* sp. SS98-5, Can.J. Microbiol., 49, 92-100.
- 32) Konkur M., 1986, Gram-positive cocci, In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2, ed. Holts, J. G., Sneath, P. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., The Williams & Wilkins, pp. 1004-1008.
- 33) MacFaddin T. F., 1984, Biochemical tests for identification of medical bacteria, Williams & Wilkins, pp. 36-308.
- 34) Wieser M., Denner E. B. M., Kämpfer P., Schumann P., Tindall B., Steiner U., Vybiral D., Lubitz W., Maszenan A. M., Patel B. K. C., Seviour R. J., Radax C., Bussel H. J., 2002, Emended descriptions of the genus *Micrococcus*, *Micrococcus luteus* (Cohn 1872) and *Micrococcus lylae* (Kloos *et al.* 1974), Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 52, 629-637.
- 35) 이창규, 이옥희, 이삼근, 2005, 한국연안에서 분리한 적조형성 미세조류 10종의 성장에 미치는 온도, 염분, 광도의 영향, 한국해양학회지, 10, 79-91.
- 36) Nakashima T., Miyazaki Y., Matsuyama Y., Muraoka W., Yamaguchi K., Oda T., 2006, Producing mechanism of an algicidal compound against red tide phytoplankton in a marine bacterium *γproteobacterium*, Appl. Microbiol. Biotechnol., 73, 684-690.
- 37) Jeong J. H., Jin H. J., Sohn C. H., Suh K. H., Hong Y. K., 2000, Algicidal activity of the seaweed *Corallina pilulifera* against red tide microalgae, J. Appl. Phycol., 12, 37-43.
- 38) Lee S. O., Kato J., Nakashima K., Kuroda A., Ikeda T., Takiguchi N., Ohtake H., 2002, Cloning and characterization of extracellular metal protease gene of the algicidal marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain A28, Biosci. Biotechnol. Biochem., 66, 1366-1369.
- 39) Yoshinaga I., Kawai T., Ishida Y., 1997, Analysis of algicidal ranges of the bacterial killing the marine dinoflagellate *Gymnodinium mikimotoi* isolated from Tanabe Bay, Wakayama Pref., Japan, Fish. Sci., 63, 94-98.