

## 유해적조생물 *Cochlodinium polykrikoides*를 살멸하는 *Brachy bacterium* sp. SY-97의 분리 및 특성

김윤숙 · 정성윤\* · 이상준\*\* · 이원재

부경대학교 미생물학과, \*국제인삼약초연구소, \*\*부산대학교 미생물학과  
(2008년 10월 22일 접수; 2008년 12월 17일 수정; 2009년 2월 25일 채택)

### Isolation and Characteristics of *Brachy bacterium* sp. SY-97 Killing the Harmful Dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides*

Yun-Sook Kim, Seong-Yun Jeong\*, Sang-Joon Lee\*\* and Won-Jae Lee

Department of Microbiology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

\*International Ginseng & Medical Plant Research Institute, Geumsan 312-701, Korea

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

(Manuscript received 22 October, 2008; revised 17 December, 2008; accepted 25 February, 2009)

#### Abstract

A bacterial strain SY-97 that showed algicidal activity against *Cochlodinium polykrikoides* was isolated from coastal water of Uljin (eastern coast of Korea) in August, 2005. The isolated strain was identified as *Brachy bacterium* sp. by morphological and biological tests, and analysis of 16S rDNA sequence. The optimal culture conditions for the growth of strain SY-97 were 30°C, initial pH 7.0, and salinity 2.0%. From the result of cell culture insert experiment, *Brachy bacterium* sp. SY-97 is assumed to produce secondary metabolites which have algicidal activity. When 10% culture filtrate of this strain was applied to *C. polykrikoides* ( $1.2 \times 10^4$  cells/ml) cultures, 100% of *C. polykrikoides* cells was destroyed within 15 hours. The released algicides were heat-tolerant to 100°C and stable in pH 6.0~10.0. These results suggest that *Brachy bacterium* sp. SY-97 is potentially useful for controlling outbreaks of *C. polykrikoides*.

**Key Words :** Algicidal bacterium, Algicidal activity, *Cochlodinium polykrikoides*, *Brachy bacterium*

#### 1. 서 론

연안해역의 부영양화와 환경조건의 변화에 따라 적조 발생이 급격히 증가하여, 수산생물의 대량폐사 등을 일으켜 심각한 어업피해를 야기하고 있다<sup>1)</sup>. 특히 적조생물 중 우리나라 연안에서 가장 큰 피해를 일으키는 *Cochlodinium polykrikoides*는 매년 대규

모 적조를 유발시켜 크고 작은 피해를 일으키고 있다<sup>2,3)</sup>.

현재 유해성 적조가 발생하였을 때 효과적으로 적조생물을 구제하기 위해 황토나 점토를 살포하고 있다<sup>4)</sup>. 그러나 이러한 방법은 저서생물의 호흡이나 신진대사를 방해하는 2차적 문제를 야기시킬 수 있다<sup>5)</sup>. 이외에도 황산구리, 과산화수소, 트리오신 같은 화학제도 짧은 시간 안에 효과적으로 적조를 구제한다고 보고되고 있으나<sup>6)</sup> 생태계에 있어서 그들의 사용은 잠재적인 위험성을 가지고 있다<sup>7)</sup>. 이와

Corresponding Author : Seong-Yun Jeong, International Ginseng & Medical Plant Research Institute, Geumsan 312-701, Korea  
Phone: +82-51-510-3402  
E-mail: jsymicro@dreamwiz.com

같이 적조구제 물질의 안전성 문제가 대두되면서 최근에는 바이러스<sup>8)</sup>, 미생물<sup>9)</sup>, 원생동물<sup>10)</sup> 등을 이용하는 생물학적 처리방법에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다<sup>11)</sup>. 또한 미생물에 의한 적조구제는 대상 적조생물에 대한 특이성이 높아 다른 생물에 미치는 영향을 최소화할 수 있어 환경악화를 방지할 수 있는 장점이 있다<sup>7)</sup>. 미세조류와 세균은 공생 관계를 이루지만 영양결핍과 같은 환경에서는 그 관계가 공생에서 경쟁관계로 바뀌게 되어 미세조류를 죽인다는 가설은 살조미생물의 존재가 해양 미세조류를 죽인다는 최근 20년간의 보고와 잘 일치한다. 이러한 미생물과 미세조류 사이의 관계에 관한 연구에서 유해한 적조생물을 죽이거나 억제하는 미생물들의 분리가 이루어졌다. 해양 살조미생물은 주로 *Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides* (CFB) 그룹과 *Pseudoalteromonas*와 *Alteromonas* (phylum  $\gamma$ -Proteobacteria) 속의 미생물로 분류되어 진다<sup>12)</sup>. 대부분의 경우 이들 살조미생물은 적조 소멸기에 개체수가 증가되며, 조류 특이성을 가진다<sup>13-15)</sup>.

본 연구에서는 우리나라 연안에서 적조를 일으키는 *C. polykrikoides*에 대한 적조를 구제하는 방법의 일환으로 살조미생물인 *Brachy bacterium* sp. SY-97을 분리하여 특성을 파악하고 *C. polykrikoides*에 대한 살조활성을 조사함으로써 살조미생물을 이용한 적조 구제 방법의 기초 자료를 마련하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 살조미생물의 분리

해수 샘플링은 2005년 8월 울진 연안의 적조발생 해역에서 표층 해수를 Niskin 개량형 채수기인 MB 채수기를 이용하여 멸균한 광구병으로 채취하였다. 채수한 시료는 ice-box에 보관하여 연구실로 옮겨 실험에 사용하였다. 미생물은 해수 시료를 PPES-II (yeast extract 1 g, proteose peptone 1 g, polypeptone 2 g, soytone 1 g, 0.1% ferric citrate 10 ml, seawater 1 L, 초기 pH 7.6) 평판 배지<sup>16)</sup>에 평판도말법으로 접종하여 25°C에서 7일간 배양한 후 분리된 colony를 선택하여 순수분리 하였다. 이들 분리균주를 PPES-II 액체배지에 접종하여 25°C에서 2일간 교반배양 (200 rpm)하여 *C. polykrikoides* 배양액( $1.2 \times 10^4$  cells/

ml) 900  $\mu$ l에 분리균주 배양액 100  $\mu$ l를 접종하여 살조활성을 관찰하여 살조미생물을 분리하였다.

### 2.2. 분리균주의 동정

분리된 살조미생물 SY-97 균주의 분류학적 위치를 검토하기 위하여 MacFaddin<sup>17)</sup>과 Gerhardt 등<sup>18)</sup>의 방법을 참고하여 형태학적, 생화학적인 특성을 조사하여 1차적으로 분류학적 유사성을 검토하였다. Gram staining은 Benson의 방법<sup>19)</sup>으로 염색하여 광학현미경(Zeiss Co., RMS 16)으로 검경하였다.

또한 보다 정확한 동정을 위하여 16S rRNA gene을 이용한 sequencing을 행하였다<sup>20)</sup>. AccuPrep™ Genomic DNA extraction kit (Bioneer)를 사용하여 total genomic DNA를 추출하여 template로 사용하였다. 16S rRNA 유전자의 증폭에 이용된 primer쌍은 forward primer (5'-AGAATTCINANACATGCAAGTCGAICG-3')와 Reverse primer (5'-GTGGATCCGGYTACCTTGT TACGACTT-3')를 사용하였다<sup>21)</sup>. PCR 반응은 AccuPower PCR Premix(Bioneer)를 사용하여 Minicycler (MJ Research, USA)로 PCR 반응을 실시하였다. 정제된 16S rDNA의 PCR 반응물을 pGEM-T vector (Promega)에 ligation시켜 반응물을 미리 준비한 200  $\mu$ l의 XL1-blue competent cell에 transformation시킨 후 alkaline lysis mini-prep 방법<sup>22)</sup>으로 plasmid를 mini-prep하였다. 이와 같이 16S rDNA 분석을 통하여 염기서열을 결정한 후, National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 GenBank 데이터베이스에서 가장 상동성이 높은 균주와 염기서열을 비교하였으며, MEGA 2.1 package<sup>23)</sup>를 이용하여 계통도를 그렸다.

### 2.3. 분리균주의 최적 성장조건

살조미생물 SY-97 균주의 생육에 미치는 최적 온도, pH, NaCl 농도는 각 구간별로 PPES-II 액체배지에서 전배양한 초기배양액을 각각의 배지에 1%로 접종하여 25°C에서 배양한 후, 660 nm에서 흡광도를 측정하여 최적 성장조건을 구하였다. 이 때 각 대상 실험구를 제외한 모든 배양조건은 최적 배양조건인 30°C, pH 7.0, NaCl 2.0% 농도로 설정하였다. 또한 분리균주의 성장곡선을 구하기 위하여 PPES-II 액체배지에 최적 배양조건으로 접종하여, 암환경에서 교반배양하면서 3시간 간격으로 흡광도를

측정하였다. 이때 3회 반복 실험을 통하여 결과를 산출하였다.

#### 2.4. 분리균주의 *C. polykrikoides*에 대한 살조 유형

본 실험에서 사용한 *C. polykrikoides*는 국립수산 과학원에서 분양받았으며, 순수분리는 정 등<sup>24)</sup>의 방법에 따랐다. 또한 *C. polykrikoides*는 f/2-Si 배지에서 온도 20°C, 광량 120  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ , 광주기 12L : 12D로 배양하였다. 살조미생물 SY-97 균주의 *C. polykrikoides*에 대한 살조 유형을 조사하기 위하여 24 well microplate에 pore size 0.2  $\mu\text{m}$ 의 cell culture insert (FALCON, USA)를 삽입한 2조배양계를 이용하였다. Cell culture insert 내부에 f/2-Si 배지에서 전배양한 *C. polykrikoides* 배양액( $1.2 \times 10^4$  cells/ml) 1 ml를 넣고, cell culture insert 외부에는 f/2-Si 배지 1 ml를 넣었다. PPES-II 액체배지에서 배양한 SY-97의 균체( $10^4$  cells)를 멸균해수로 희석하여 cell culture insert 외부에 1 ml를 넣은 것을 test well로 하였다. 이때 cell culture insert 내부에 SY-97 균주의 균체를 첨가한 well을 positive control로 하였으며, cell culture insert 내부에 SY-97 균주의 균체를 첨가하는 대신에 PPES-II 액체배지만을 첨가하여 배양한 well을 negative control로 하였다. 모든 well은 *C. polykrikoides*의 최적 배양조건에서 배양하여 48시간 후에 살조 유무를 관찰하여 살조 유형을 결정하였다. 미생물 오염 여부는 cell culture insert 내부의 배양액을 취해 DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 염색<sup>25)</sup> 후 형광 현미경(Olympus BX40)하에서 직접 관찰하였다.

#### 2.5. 분리균주의 배양여과액 농도별 살조활성

분리균주의 배양여과액의 첨가 농도별에 따른 살조활성을 알아보기 위하여 최적조건(30°C, pH 7.0, NaCl 2.0%)으로 배양한 SY-97 균주의 배양액을 원심분리(8,000  $\times$  g, 10 min)하여 상등액을 0.2  $\mu\text{m}$  pore size의 membrane filter로 여과하였다. *C. polykrikoides* 배양액( $1.2 \times 10^4$  cells/ml)에 균주 배양여과액을 1, 5, 10, 15%가 되도록 접종한 후 20°C에서 배양하여 매 3시간마다 살조활성을 측정하였다. 살조활성은 *C. polykrikoides*의 생존상태를 광학현미경 하에서 관찰하여 살아있는 *C. polykrikoides* 세포수를 직접 계수하였다. 이 때 control에는 배양여과액 대신에 동량의 신선한 PPES-II 액체배지를 첨가하

였으며, 3회 반복 실험을 통하여 결과를 산출하였다.

### 2.6. 살조물질의 특성

#### 2.6.1. 열 안정성

SY-97 균주가 생산하는 물질의 열 안정성을 알아보기 위해서, 최적조건에서 배양한 SY-97의 배양액을 원심분리(8,000  $\times$  g, 10 min)한 후, 상등액을 취하여 pore size 0.2  $\mu\text{m}$  polycarbonate membrane filter로 여과한 여과액을 4, 10, 20, 30, 50, 70, 100°C에서 1시간 방치한 후, *C. polykrikoides* ( $1.2 \times 10^4$  cells/ml) 배양액에 15%가 되도록 접종하여 15시간 후에 살조활성을 측정하였다. 이 때 control에는 배양여과액 대신에 동량의 신선한 PPES-II 액체배지를 첨가하였다. 살조활성은 다음의 식으로 산출하였으며, 3회 반복 실험을 통하여 결과를 산출하였다.

Algicidal activity (%) = (1 - 살조미생물 배양여과액을 첨가한 시험구의 *C. polykrikoides*의 세포 수 / control의 *C. polykrikoides*의 세포 수)  $\times$  100

#### 2.6.2. pH 안정성

SY-97 균주가 생산하는 물질의 pH 안정성을 알아보기 위해서, 최적조건에서 배양한 SY-97 균주의 배양여과액의 pH를 4.0~10.0으로 조절하여 24시간 동안 실온에 정지한 후, 다시 pH를 8.0으로 조절하여 살조활성을 측정하였다. 이때 pH는 50 mM sodium acetate buffer (pH 4.0~5.0)와 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0~10.0)를 사용하여 조정하였다. 이 때 control에는 각각의 pH에 따라서 배양여과액을 포함하지 않은 buffer 용액을 첨가하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 살조미생물의 분리 및 동정

분리된 100여개의 해양미생물 균주 중에서 *C. polykrikoides*와의 혼합배양에서 높은 살조력을 보인 균주를 선별하였다. 선별된 SY-97 균주는 Gram 양성, 구균(Fig. 1)으로 PPES-II 평판배지에서 노란색의 콜로니를 형성하였다. 형태학적 및 생화학적 특성을 조사한 결과는 Table 1에 나타내었다. SY-97 균주는 운동성은 없었으며, oxidase test는 음성, catalase test는 양성이었으며, Nitrate 환원능이 있었다. 또한 D-Mannose로부터 산을 생성하였으나, D-Fructose, L-Rhamnose, Sucrose, DL-Lactose로부터는 산을 생

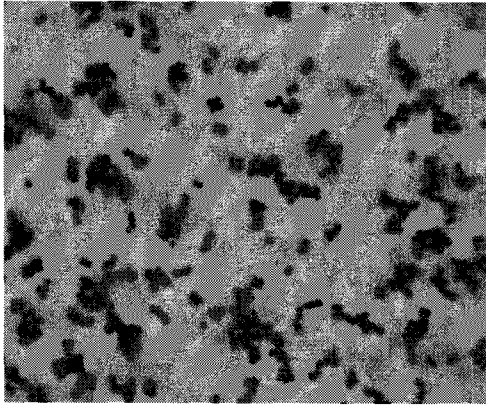


Fig 1. Gram staining of strain SY-97.

성하지 못 하였다. 보다 정확한 동정을 위하여 16S rDNA 염기서열을 분석하여 NCBI GenBank에 등록된 균주들과 유전자간의 상동성을 조사한 결과, *Brachybacterium conglomeratum* (AY167842)과 99% 이상의 가장 높은 상동성을 나타내었다(Fig. 2). 따라서 이 균주를 *Brachybacterium* sp. SY-97로 명명하여 이후의 실험을 진행하였다.

지금까지 알려진 살조미생물로는 *Vibrio*<sup>26)</sup>, *Cytophaga*<sup>27)</sup>, *Saprosira*<sup>28)</sup>, *Flavobacterium*<sup>29)</sup>, *Alteromonas*<sup>9)</sup>, *Bacillus*<sup>30-32)</sup>, *Pseudomonas*<sup>11,33)</sup>, *Pseudoalteromonas*<sup>34)</sup>, *Micrococcus*<sup>35)</sup> 속 등이 있으며, *Brachybacterium* 속의 살조미생물은 지금까지 분리, 보고된 바가 없다.

### 3.2. *Brachybacterium* sp. SY-97의 최적 생장조건

*Brachybacterium* sp. SY-97의 배양조건에 따른 생육도를 Fig. 3에 나타내었다. 생육 최적온도는 30°C 이고 20~37°C에서 잘 증식하였으나, 4°C에서는 증

Table 1. Morphological and biochemical characteristics of strain SY-97

Contents	Strain SY-97
Color	yellow
Cell shape	coccus
Gram staining	+
Motility	-
O/F test	+/-
Oxidase	-
Catalase	+
Indole production	-
Nitrate reduction	+
Hydrolysis of	
Casein	+
Starch	-
Gelatin	+
Acid production from	
D-Fructose	-
L-Rhamnose	-
D-Mannose	+
Sucrose	-
DL-Lactose	-

+, Positive result or growth; -, Negative result or no growth.

식하지 못하였다. pH의 경우 7.0에서 가장 증식이 잘 되었으며 pH 6.0~10.0에서 증식이 가능하였으나, pH 5.0 이하에서는 거의 증식하지 못하였다. 염농도의 경우 2.0% NaCl 농도에서 최대 생육을 보였으며, 1~5%까지 상당히 넓은 범위에서 잘 성장하였다. 그 외 0%와 6~10%에서도 생장은 느리지만 생존이 가능하였다. 따라서 살조미생물 *Brachybacterium* sp. SY-97은 담수뿐만 아니라 고염농도에서도 견디는 광염성 미생물로 해양환경에 적응력이 높고, 담수 및 기수역에서도 잘 적응할 수 있을 것으로 판단된다. 이상의 실험 결과, *Brachybacterium* sp. SY-97은

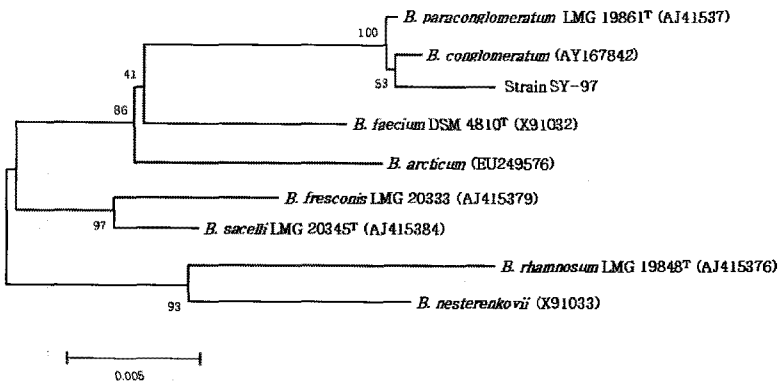


Fig. 2. Phylogenetic tree based on comparison of the 16S rRNA gene sequence indicating the position of strain SY-97. The phylogenetic tree was generated using the neighbor-joining method. Bootstrap values, expressed as percentages of 1000 replications, are given at branching points.

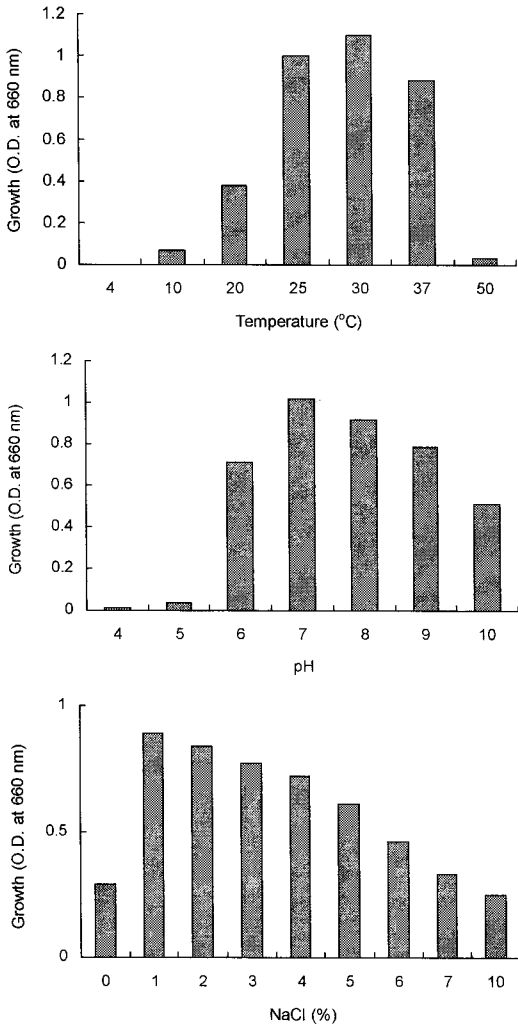


Fig. 3. Effects of temperature, initial pH, and NaCl concentrations on the growth of *Brachybacterium* sp. SY-97 after 24 hours incubation in PPES-II medium.

온도 30°C, pH 7.0, 2.0% NaCl 농도에서 200 rpm으로 교반배양 시 가장 높은 성장률을 보였다. 최적 조건에서 *Brachybacterium* sp. SY-97은 9시간 정도의 유도기를 거친 후 대수증식기로 접어들어, 39시간 후 서서히 사멸기로 접어들어 해양미생물로서는 빠른 성장을 보였다(Fig. 4).

### 3.3. *Brachybacterium* sp. SY-97의 살조 유형

*Brachybacterium* sp. SY-97이 *C. polykrikoides*에 직접 부착하여 죽이는 ‘직접 공격형’인지 세포외 물질

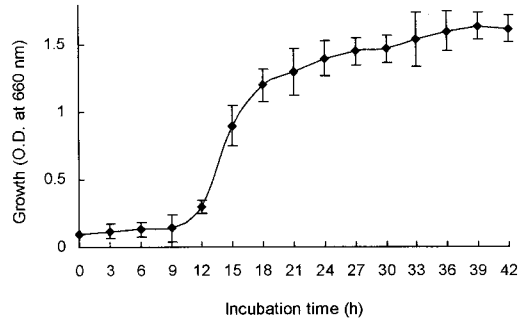


Fig. 4. Growth curve of *Brachybacterium* sp. SY-97 at optimal culture conditions (30°C, pH 7.0, and NaCl 2.0%). Data are expressed as the mean±standard deviation from triplicate assays.

을 분비하는 ‘살조인자 분비형’인지를 조사한 결과를 Table 1에 나타내었다. Cell culture insert 내부에 *C. polykrikoides*와 *Brachybacterium* sp. SY-97의 균체를 함께 접종한 positive control well에서는 *C. polykrikoides*가 사멸되었지만, 살조미생물 대신에 미생물 배지인 PPES-II 액체배지만을 접종한 negative control well에서는 *C. polykrikoides*가 사멸되지 않았다. *Brachybacterium* sp. SY-97은 0.2 μm filter에 의해 *C. polykrikoides*와 격리된 상태인 test well에서도 *C. polykrikoides*를 살조시켰다. 따라서 *Brachybacterium* sp. SY-97은 살조물질을 세포외로 분비하는 ‘살조인자 분비형’으로 확인되었다.

지금까지 여러 연구자들에 의해 보고된 살조미생물은 적조생물 세포에 직접 부착 또는 접촉하여 살조하는 ‘직접 공격형’과, 살조물질을 생산, 분비하여 대사물질에 의해 적조생물을 살조시키는 ‘살조인자 분비형’으로 크게 나눌 수 있다. ‘직접 공격형’으로는 주로 활주세균인 *Cytophaga* 속<sup>27)</sup>과 *Saprospira* 속<sup>28)</sup> 등이 있으며, 이러한 미생물들은 규조류 및 와편모조류에 광범위한 살조활성을 가진다. ‘살조인자 분비형’으로는 주로 진정세균인 *Flavobacterium* 속, *Alteromonas* 속과 *Pseudomonas* 속 등이 보고되었다<sup>29,36)</sup>. 지금까지 해양에서 분리된 살조미생물들의 살조 유형을 분석해보면 활주세균은 ‘직접 공격형’이 많았고, γ-Proteobacteria군 세균과 진정세균에 속하는 세균은 ‘살조인자 분비형’이 많은 경향을 보였으며, ‘직접공격형’은 살조 특이성이 낮고 ‘살조인자 분비형’은 살조 특이성이 높은 경향을 보였다<sup>9,27,36)</sup>.

### 3.4. *Brachyacterium* sp. SY-97의 배양여과액 농도별 살조활성

*Brachyacterium* sp. SY-97의 성장단계에 따른 살조활성은 대수증식기, 사멸기, 유도기 순으로 높게 나타났다(미제시). 대수증식기에는 *C. polykrikoides*를 24시간 후에 100% 살조시켰으며, 사멸기에는 80% 정도의 살조활성을 보였지만 유도기 때에는 5% 이하의 살조활성을 보였다. 대수증식기에도 후기로 갈수록 살조활성이 증가했다. 즉, *Brachyacterium* sp. SY-97은 유도기를 거쳐 대수증식기 초기에 살조물질을 생성, 분비하기 시작하여 대수증식기 후기에 살조활성이 최대에 도달한 후 사멸기에 약간 감소하였다. 따라서 균의 성장과 함께 생성, 분비되는 살조물질의 양도 증가하는 것으로 판단되며, 이는 균의 성장과 살조물질의 생산량이 비례한다는 Nakashima 등<sup>37)</sup>의 보고와 잘 일치한다.

*Brachyacterium* sp. SY-97의 배양여과액 첨가 농도(1, 5, 10, 15%)에 따른 *C. polykrikoides*의 살조활성을 Fig. 5에 나타내었다. *Brachyacterium* sp. SY-97 배양여과액을 10, 15%가 되도록 첨가한 경우 *C. polykrikoides*의 개체수가 급격히 감소하였으며, 15%의 경우는 12시간 후에 100% 살조되었고, 10%의 경우 15시간 후에 100% 살조되었고, 5%의 경우 18시간 후에 90% 이상 살조되었고, 1%의 경우 18시간 후에 80% 이상 살조되었다. 즉, *Brachyacterium*

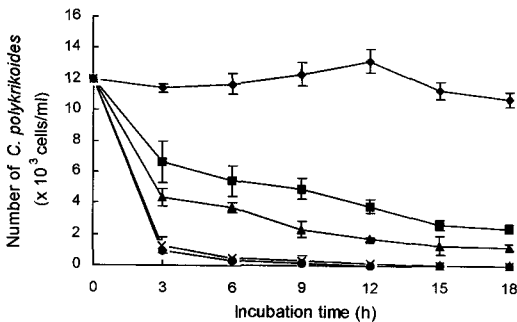


Fig. 5. Algicidal activity of the culture filtrate of *Brachyacterium* sp. SY-97 against *C. polykrikoides* at various concentrations (◆, control; ■, 1% (10  $\mu$ l); ▲, 5% (50  $\mu$ l); ×, 10% (100  $\mu$ l); ●, 15% (150  $\mu$ l)). control: same volumes of fresh PPES-II medium were added. Data are expressed as the mean±standard deviation from triplicate assays.

sp. SY-97의 배양여과액의 양에 비례하여 살조활성이 증가하는 경향을 보였다. 또한 배양액을 넣었을 때와 거의 같은 살조활성을 나타내어, Table 2의 결과와 종합하여 볼 때, *Brachyacterium* sp. SY-97은 살조물질을 생성하여 세포외로 분비하는 것으로 판단된다.

### 3.5. *C. polykrikoides*의 살조양상

*C. polykrikoides*의 배양액에 *Brachyacterium* sp. SY-97의 배양여과액을 최종 농도가 10%되게 접종시켰을 때 살조되는 과정을 광학현미경으로 관찰한 사진을 Fig. 6에 나타내었다. *C. polykrikoides*의 유영세포는 1시간 이내에 운동성을 상실하고 정지하였으며, 체인이 끊어진 후 2시간 이내에 점차 세포 선단의 일부 세포막이 확장되고 터져서, 세포 내용물이 유출된 후, 시간이 지남에 따라 세포 내용물이 서서히 용해되어 소실되었다.

### 3.6. 살조물질의 특성

#### 3.6.1. 열 안정성

*Brachyacterium* sp. SY-97이 생산하는 물질의 열안정성을 조사한 결과를 Fig. 7A에 나타내었다. 살조물질은 4°C에서 가장 안정하였으며 100°C까지 비교적 안정한 결과를 나타내었다. 따라서 *Brachyacterium* sp. SY-97이 생산, 분비하는 살조물질은 열에 안정한 내열성 물질로 판단된다. 지금까지 보고된 살조

Table 2. Determination of algicidal type against *C. polykrikoides* using cell culture insert by *Brachyacterium* sp. SY-97

Negative control well	Positive control well	Test well
-	+	+

Initial cell densities of *Brachyacterium* sp. SY-97 were 10<sup>4</sup> cells/ml.

Negative control well; *C. polykrikoides* and fresh PPES-II medium inside.

Positive control well; *C. polykrikoides* and *Brachyacterium* sp. SY-97 inside.

Test well; *C. polykrikoides* inside and *Brachyacterium* sp. SY-97 outside.

+; *C. polykrikoides* cells inside cell culture insert were killed within 48 hours.

-; *C. polykrikoides* cells inside cell culture insert were not killed within 48 hours.

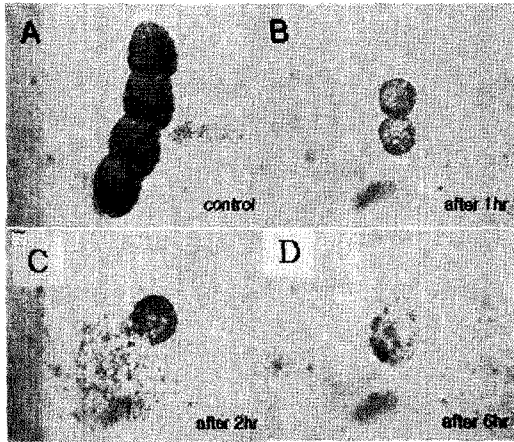


Fig. 6. Monographs of the lysing process of *C. polykrikoides* treated with 10% culture filtrate of *Brachy bacterium* sp. SY-97. (A) Live cells of *C. polykrikoides*, (B) Stopping of cell swimming, (C), (D) Burst cell of *C. polykrikoides*.

미생물은 종이 다양하고 각기 다른 특성을 가지기 때문에 살조물질을 분리, 정제하여 그 특성을 밝힌 보고는 많지 않다<sup>38)</sup>. 지금까지 밝혀진 살조물질로는 protease<sup>34,39)</sup>, peptides<sup>40)</sup>, biosurfactants<sup>30,33)</sup>, antibiotic-like substances<sup>41)</sup>, bacillamide<sup>31)</sup>, phlorotannins<sup>42)</sup> 등이 있으며, 일부 살조물질은 열에 내열성을 가지거나 안정성을 보였다<sup>35,38)</sup>. 그중 Lee<sup>34)</sup>가 보고한 protease는 68℃에서 1시간 처리에도 살조활성을 잃어 열에 안정성이 없었다. *Brachy bacterium* sp. SY-97이 생산하는 살조물질은 100℃까지 열에 안정한 살조활성을 보여 protease와 같은 효소나 단백질성 물질은 아닌 것으로 판단된다.

### 3.6.2. pH 안정성

*Brachy bacterium* sp. SY-97이 생산하는 살조물질의 pH 안정성을 조사한 결과를 Fig. 7B에 나타내었다. pH 6.0~8.0에서 100%의 활조활성을 나타내었고, pH 9.0~10.0에서 살조활성이 90% 이상으로 대단히 안정하였으나, pH 5.0 이하에서는 살조활성이 점차 감소하였다. 즉, 살조물질은 약산성과 알칼리에서 살조활성이 안정되었고, 산성에서 다소 살조활성이 떨어졌다. 이는 대부분의 살조물질들이 약산성이나 약알칼리에서 안정하고 강산성 조건에서 활성이 감소하는 것과 일치하는 결과이다<sup>15,35)</sup>. 해양

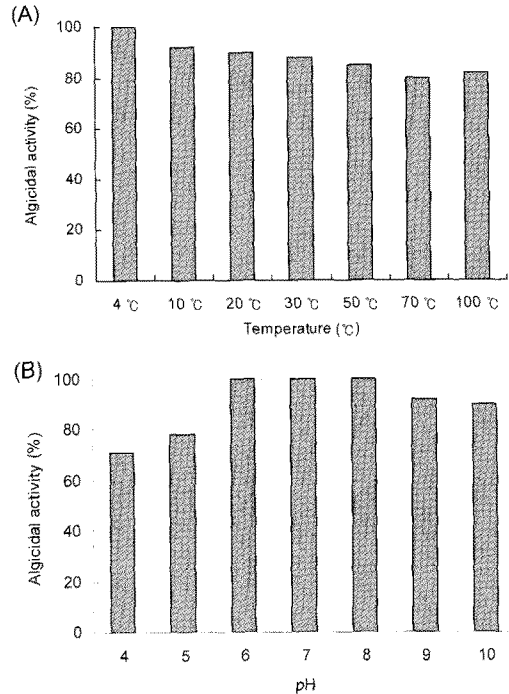


Fig. 7. The thermal (A) and pH stability (B) of the culture filtrate of *Brachy bacterium* sp. SY-97 against *C. polykrikoides*. For thermal stability, the culture filtrate was incubated or heated at an indicated temperature for 1 hour. For pH stability, the culture filtrate was suspended in 50 mM sodium acetate buffer for the range of pH 4 to 5 and 50 mM sodium phosphate buffer for pH 6 to 10, and then kept in each buffer for 24 hours.

의 경우 약알칼리의 조건이므로 이러한 특성은 해양생태계에 보다 적용 가능한 이점이 될 것으로 판단된다.

## 4. 결론

최근 남해안 적조의 주요 원인생물인 *C. polykrikoides*를 살조시키는 SY-97 균주를 옮긴 연안의 적조발생해역에서 분리하여 동정하고 그 특성과 살조활성에 대해 연구함으로써 자연 생태 조화형, 환경 친화적 적조방제 기술 개발의 기초 자료를 제공하고자 연구한 결과는 다음과 같다.

1) 적조발생 해역인 옮긴 연안의 해수에서 분리한 100여개의 해양미생물 균주 중 8 균주가 *C. poly-*

*krikoides*에 대해 살조활성을 나타내었으며, 이 중 살조활성이 가장 우수한 SY-97 균주를 선별하였다. 본 균주는 16S rDNA 염기서열을 분석한 결과 *Brachybacterium* 속으로 분류되었으며, 최적 배양조건은 30°C, pH 7.0, 2.0% NaCl 농도였다.

2) 0.2  $\mu\text{m}$ 의 Cell Culture Insert를 삽입한 2조 배양체를 이용하여 *Brachybacterium* sp. SY-97의 살조 유형을 조사한 결과, *Brachybacterium* sp. SY-97은 0.2  $\mu\text{m}$  filter에 의해 *C. polykrikoides*와 격리된 상태에서도 *C. polykrikoides*를 살조시켜 ‘직접 공격형’이 아니라 세포외로 물질을 분비하여 살조시키는 ‘살조인자 분비형’으로 밝혀졌다.

3) *Brachybacterium* sp. SY-97의 배양여과액의 첨가 농도별 살조활성을 측정한 결과, 15%의 경우 *C. polykrikoides*의 개체수는 급격히 감소하여 12시간 후에 100% 살조되었고, 10%의 경우 15시간 후에 100% 살조되었고, 5%와 1%의 경우 18시간 후에 각각 90%와 80% 이상 살조 되었다.

4) *Brachybacterium* sp. SY-97이 생산하는 살조물질의 열 안정성을 실험한 결과, 4°C에서 가장 안정하였으며 100°C까지 비교적 안정한 결과를 나타내었다. 또한 살조물질의 pH 안정성을 조사한 결과, pH 6.0~8.0에서 100%의 활조활성을 나타내었고, pH 9.0~10.0에서 살조활성이 90% 이상으로 대단히 안정하였으나, pH 5.0 이하에서는 살조활성이 점차 감소하였다.

## 참고 문헌

- Hallgraeff G. M., 1993, A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia*, 32, 79-99.
- Kim H. G., 1997, Recent harmful algal blooms and mitigation strategies in Korea, *Ocean Res.*, 19, 185-192.
- 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.
- Sun X. X., Choi J. K., Kim E. K., 2004, A preliminary study on the mechanism of harmful algal bloom mitigation by use of sophorolipid treatment, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 304, 35-49.
- Bricelj V. M., Malouf R. E., 1984, Influence of algal and suspended sediment concentrations on the feeding physiology of the hard clam *Mercenaria mercenaria*, *Mar. Biol.*, 84, 155-165.
- Ryu H. Y., Shim J. M., Bang J. D., Lee C., 1998, Experimental chemical treatments for the control of dinoflagellate, *Cochlodinium polykrikoides* in the land-based culture of olive flounder *Paralichthys olivaceus*, *Kor. J. Aquacult.*, 11, 285-294.
- 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.
- Garry R. T., Hearing P., Cosper E. M., 1998, Characterization of a lytic virus infectious to the bloom-forming microalga *Aureococcus anophagefferens* (Pelagophyceae), *J. Phycol.*, 34, 616-621.
- Imai I., Ishida Y., Sakaguchi K., Hata Y., 1995, Algicidal marine-bacteria isolated from northern Hiroshima Bay, Japan, *Fish. Sci.*, 61, 628-636.
- Sigee D. C., Glenn R., Andrews M. J., Bellinger E. G., Butler R. D., Epton H. A. S., Hendry R. D., 1999, Biological control of *Cyanobacteria*: principles and possibilities, *Hydrobiologia*, 396, 161-172.
- Kim J. D., Kim B., Lee C. G., 2007, Alga-lytic of *Pseudomonas fluorescens* against the red tide causing marine alga *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae), *Biological Control*, 41, 296-303.
- Mayali X., Azam F., 2004, Algicidal bacteria in the sea and their impact on algal blooms, *J. Eukaryot. Microbiol.*, 51, 139-144.
- 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.
- Amaro A. M., Fuentes M. S., Ogalde S. R., Venegas J. A., Suarez-Isla B. A., 2005, Identification and characterization of potentially algal-lytic marine bacteria strongly associated with the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*, *J. Eukaryot. Microbiol.*, 52, 191-200.
- 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.
- Taga N., 1968, Some ecological aspects of marine bacteria in the Kuroshio current, *Bull. Misaki Mar. Biol. Kyoto Univ.*, 12, 65-76.
- MacFaddin J. F., 1980, *Biochemical tests for identification of medical bacteria*, 2nd ed., Williams and Wilkins Co., Baltimore, 36-308.
- Gerhardt P., Murray R. G., Costilow E. R. N., Nester



- E. W., Wood W. A., Krieg N. R., Phillips G. B., 1981, Manual of method for general bacteriology, 1st ed., Am. Soc. Microbiol., Washington D. C., 135-154.
- 19) Benson H. J., 1990, Microbiological applications; A laboratory manual in general microbiology, 5th ed., Wm. C. Brown Publishers, 40-134.
- 20) Dunbar J., Ticknor L. O., Kuske C. R., 2000, Assessment of microbial diversity in four southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis, Appl. Environ. Microbiol., 66, 2943-2950.
- 21) Moyer C. L., Dobbs F. C., Karl D. M., 1994, Estimation of diversity and community structure through RFLP distribution analysis of bacterial 16S rRNA genes from a microbial mat at an active, hydrothermal vent, Loihi Seamount, Hawaii, Appl. Environ. Microbiol., 60, 871-879.
- 22) Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T., 1989, Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 25-28.
- 23) Kumar S., Tamura K., Jakobsen I. B., Nei M., 2001, MEGA2: Molecular evolutionary genetics analysis software, Bioinformatics, 17, 1244-1245.
- 24) Jeong S. Y., Park Y. T., Lee W. J., 2000, Isolation of marine bacteria killing red tide microalgae. III. Algicidal effects of marine bacterium, *Micrococcus* sp. LG-5 against the harmful dinoflagellate, *Cochlodinium polykrikoides*, J. Kor. Fish. Soc., 33, 331-338.
- 25) Porter K. G., Feig Y. S., 1980, The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora, Limnol. Oceanogr., 25, 943-948.
- 26) Ishio S., Nishimoto T., Nakagawa H., 1987, Distribution of dinoflagellate growth inhibitor in sediment in Arika and Hakata Bays, Nippon Suisan Gakkaishi, 53, 773-787.
- 27) Imai I., Ishida Y., Hata Y., 1993, Killing of marine phytoplankton by a gliding bacterium *Cytophaga* sp., isolated from the coastal sea of Japan, Mar. Biol., 116, 527-532.
- 28) Sakata T., 1990, Occurrence of marine *Saprospira* sp. possessing algicidal activity for diatoms, Nippon Suisan Gakkaishi, 56, 1165.
- 29) Fukami K., Yuzawa A., Nishijima T., Hata Y., 1992, Isolation and properties of a bacterium inhibiting the growth of *Gymnodinium nagasakiense*, Nippon Suisan Gakkaishi, 58, 1073-1077.
- 30) 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.
- 31) 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*, Tet. Lett., 44, 8005-8007.
- 32) 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, J. Environ. Sci., 19, 1336-1340.
- 33) Wang X. L., Gong L. Y., Liang S. K., Han X. R., Zhu C. J., Li Y. B., 2005, Algicidal activity of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa*, Harmful Algae, 4, 433-443.
- 34) 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.
- 35) Jeong S. Y., Park Y. T., Kim M. C., Choi S. C., Seong H. K., Kim J. Y., Kim T. U., Lee W. J., 2000, Isolation of marine bacteria killing red tide microalgae. IV. Characteristics of algicidal substances produced from *Micrococcus* sp. LG-5 and the effects on marine organisms, J. Kor. Fish. Soc., 33, 339-347.
- 36) Yoshinaga I., Kawai T., Takeuchi T., Ishida Y., 1995, Distribution and fluctuation of bacteria inhibiting the growth of a marine red tide phytoplankton *Gymnodinium mikimotoi* in Tanabe Bay (Wakayama Pref., Japan), Fish. Sci., 61, 780-786.
- 37) 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  $\gamma$ -proteobacterium, Appl. Microbiol. Biotechnol., 73, 684-690.
- 38) Skerratt J. H., Bowman J. P., Hallegraeff G. M., James S., Nichols P. D., 2002, Algicidal bacteria associated with blooms of a toxic dinoflagellate in a temperate Australian estuary, Mar. Ecol. Prog. Ser., 244, 1-15.
- 39) 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.
- 40) Imamura N., Motoike I., Noda M., Adachi K., Konno A., Fukami H., 2000, Argimicin A, a novel anti-cyanobacterial compound produced by an algae-lysing bacterium, J. Antibiot., 53, 1317-1319.
- 41) Dakhama A., Noüe J. D. L., Lavoie M. C., 1993, Isolation and identification of antialgal substances produced by *Pseudomonas aeruginosa*, J. Appl. Phycol., 5, 297-306.
- 42) Nagayama K., Shibata T., Fujimoto K., Honjo T., Nakamura T., 2003, Algicidal effect of phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome* on red tide microalgae, Aquacult., 218, 601-611.