



저작자표시-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권으로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

교 육 학 석 사 학 위 논 문

유해성 적조생물 *Cochlodinium polykrikoides*에
대한 *Brachybacterium* sp. KB-1의 살조 효과



2007년 8월

부 경 대 학 교 교 육 대 학 원

생 물 교 육 전 공

장 혜 리

교육학 석사 학위 논문

유해성 적조생물 *Cochlodinium polykrikoides*에
대한 *Brachy bacterium* sp. KB-1의 살조 효과

지도교수 이 원 재

이 논문을 교육학석사 학위논문으로 제출함.

2007년 8월

부 경 대 학 교 교 육 대 학 원

생 물 교 육 전 공

장 혜 리

장혜리의 교육학석사 학위논문을 인준함

2007년 8월



주 심 : 이학박사 김 군 도 (인)

위 원 : 이학박사 이 명 속 (인)

위 원 : 농학박사 이 원 재 (인)

목 차

Abstract	iii
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	3
1. 시료채취	3
2. 살조세균의 분리	3
3. <i>Cochlodinium polykrikoides</i> 의 배양	3
4. 살조세균의 동정	6
4.1. 형태학적, 생화학적 특성	6
4.2. 16S rRNA gene sequencing 분석	6
4.2.1. Primers 합성	9
4.2.2. PCR 반응	10
4.2.3. DNA 절편 정제	10
4.2.4. Ligation	10
4.2.5. Competent bacterial cell의 준비	11
4.2.6. Transformation	11
4.2.7. Plasmid DNA mini-prep.	11
5. <i>Brachy bacterium</i> sp. KB-1의 최적 증식조건과 성장곡선	12
6. <i>Cochlodinium polykrikoides</i> 에 대한 살조 유형	12
7. 살조 효과 측정	15
7.1. 살조력(Algicidal activity)	15
7.2. 배양여과액 농도에 따른 살조 효과	15
8. 살조 물질의 특성 조사	16

8.1. 열 안정성	16
8.2. pH 안정성	16
III. 결과 및 고찰	17
1. 살조세균 분리	17
2. 살조세균 동정	17
3. <i>Brachybacterium</i> sp. KB-1의 최적 증식조건	23
3.1. 최적 온도	23
3.2. 최적 pH	23
3.3. 최적 NaCl 농도	23
4. <i>Brachybacterium</i> sp. KB-1의 최적 성장곡선	28
5. 살조유형	28
6. 배양여과액의 의한 살조 효과	31
7. <i>Brachybacterium</i> sp. KB-1의 살조 과정	31
8. 세포외 분비 살조물질의 특성	33
8.1. 열 안정성	33
8.2. pH 안정성	33
IV. 요 약	36
V. 감사의 글	37
VI. 참고문헌	38

*The algicidal activity of Brachybacterium sp.
KB-1 against Cochlodinium polykrikoides*

Hye-Lee Jang

Department of Microbiology, Graduate School,
Pukyong National University

Abstract

In this study, I have investigated the distributions and algicidal effects of marine bacteria that tend to kill the red tide microalgae, *Cochlodinium polykrikoides*. *C. polykrikoides* was the most dominant species in September and several bacteria that showed the algicidal effect on the growth of *C. polykrikoides* was detected from the same samples of sea water in September. Using the method of biochemical analysis, a algicidal bacterium was identified as *Brachybacterium* sp. KB-1.

To summarize, *C. polykrikoides*-algicidal bacteria were detected at 10^2 to 10^3 cells/ml of seawater samples during the survey period, and the bloom was observed in September by containing 4.8×10^3 cells/ml. It appears, however, that the number of these bacteria is decreased (2.0×10^2 cells/ml) in October.

A total of 100 strains were isolated from seawater samples and seawater filter(pore size, 0.8 μm) containing mixed culture of *C. polykrikoides*. in which the mixed culture was grown in f/2-Si medium. As results, I have successfully isolated *Brachybacterium* sp. KB-1 which shows a remarkable algicidal effects against *C. polykrikoides*.

1.2×10^2 cells/ml of *C. polykrikoides* were decreased to less than 3×10^2 cells/ml within 24 hours after inoculation of *Brachybacterium* sp. KB-1 into *C. polykrikoides*. In addition, the killing effects were increased in accordance with bacterial cell densities inoculated in a dose dependent manner. Especially, the filtrate of algicidal bacterium culture (pore size, 0.1 μm) revealed a dramatic effect in which *C. polykrikoides* were decreased to less than 2×10^2 cells/ml of culture within 3hrs, 6hrs, 30hrs after inoculation of the culture filtrate with concentration of 5%, 10%, 15%, respectively. The result indicated that the algicidal effect was mediated by a certain substance released by *Brachybacterium* sp. KB-1.

I. 서론

연안해역의 부영양화 진행과 환경조건의 변화에 따라 적조의 발생건수는 급격히 증가하고 있고, 수산생물의 대량폐사 및 유독화 등을 일으켜 심각한 어업피해를 야기하고 있다(Hallegraeff, 1993).

지금까지 알려진 적조생물 구제 및 제어방법에는 화학 약품 살포, 황토 및 고분자 응집제 이용법 등 물리·화학적 처리법이 연구되어 왔으나 이러한 적조 방제법은 대부분 비용이 많이 들고 2차 오염 문제를 일으킬 수 있다. 반면, 미생물에 의한 적조구제는 대상 적조생물에 대한 특이성이 높아 다른 생물에 미치는 영향을 최소화할 수 있어 환경악화를 방지할 수 있는 장점이 있다(Jeong, 2000). 해양세균을 이용한 적조 방제에 관한 연구로는 Stewart and Brown(1969, 1971)이 담수에서 식물플랑크톤을 저해하는 세균을 분리 보고하였고, 일본에서는 Ishio *et al.*(1989)이 연구 보고하였다. 적조생물을 저해 혹은 사멸시키는 해양세균을 분리하여 생태학적 특징을 알아보고 저해물질에 관한 보고로, Sakata *et al.*(1991)은 *Chaetoceros ceratosporum*, Imai *et al.*(1991)은 *Chattonella antiqua*, Mitsutani *et al.*(1992)은 *Skeletonema costatum*, Fukami *et al.*(1992)은 *Gymnodinium nagasakiense*, Yoshinaga *et al.*(1997a)은 *Gymnodinium mikimotoi*를 사멸시키는 해양세균을 분리하였다. 또한 현장해수에서 적조생물과 살조세균의 동태에 관한 연구로는 Fukami *et al.*(1991), Yoshinaga *et al.*(1995b) 및 Kim *et al.*(1998)이 bioassay법을 이용하여 각각 *Gymnodinium nagasakiense*, *Gymnodinium mikimotoi* 및 *Heterosigma akashiwo*와 살조세균의 동태를 조사 보고하였다. 저해기작에 관한 연구로서 살조세균이 생산하는 대사산물로 적조생물을 살조시키는 기작에 대해 Ishio *et al.*(1989), Fukami *et al.*(1992)의 보고가 있고, 저분자량의 내열성 물질을 직접 분비함으로써 조류를 사멸시키는 *Pseudomonas aeruginosa* (Dakhama *et al.* 1993)에 관한 연구가 보고되어 있으며, 직접 세균이 적조생물에 접촉하여 살조시키는 기작으로는 활주세균인 *Saprospira* sp. (Sakata 1990, 1991), *Cytophaga* sp. (Imai *et al.*, 1991, 1993; Mitsutani *et al.*, 1987), *Flavobacterium* sp. (Fukami *et al.*, 1992)에 대한 연구가 보고되어 있다. 또한 적조생물의 접합을 저해시키는 기작으로는 *Alexandrium catenella*의 접합저해 물질의 정제 및 분석 (Sawayama *et al.*, 1990, 1991, 1993a, b)등이 있다. 이와 같이 해양미생물을 이용한 적조방제 대책의 일환으로 외국에서는 살조세균에 관하여 많은 연구가 진행되어 조류

를 사멸시키는 해양세균은 적조발생을 조절하는 중요한 행위자로서 적조의 급격한 소멸의 대책방법으로 이용될수 있다고 제시하였다.

따라서 본 연구에서는 우리나라 연안에서 적조를 일으키는 *C. polykrikoides*에 의한 적조를 구제하는 방법의 일환으로 살조세균을 분리하여 *C. polykrikoides*에 대한 살조 효과를 밝힘으로서 살조세균을 이용한 적조 구제 방법의 기초 연구 자료를 마련하고자 하였다.



II. 재료 및 방법

1. 시료채취

시료는 2006년 6월부터 10월까지 울진 근해에서 15개의 정점 (Fig. 1)을 대상으로 각 정점의 표층수를 Niskin 개량형 채수기인 MB채수기를 이용하여 180℃에서 2시간 건열멸균한 광구병으로 채취하였다. 채수한 시료는 ice-box에 보관하여 연구실로 옮겨 실험에 사용하였다.

2. 살조세균 분리

울진 연안 지역에서 채집한 모든 시료를 Table 2의 방법과 같이 pH 7.6으로 조절된 PPES-II (Taga, 1968) 평판배지에 십진법으로 희석하여 평판도말법 (Buck and Cleverdon, 1960)으로 접종하여 20℃에서 1주일간 배양한 후 나타난 colony 중에서 특징적인 형태를 나타내는 colony를 모두 선별하여 순수분리 하였다. 분리한 각각의 colony의 *C. polykrikoides*에 대한 살조능을 알아보기 위해 24 well microplate에 F/2-Si 배지에서 전배양한 *C. polykrikoides* 배양액 ($10^3 \sim 10^4$ cells/ml) 1 ml씩을 각각 분주하고 PPES-II 액체배지에서 전배양한 해양세균 배양액 (5.0×10^3 cells/ml)을 접종하여 *C. polykrikoides*에 대한 살조능이 가장 우수한 균주를 선별하였다.

3. *Cochlodinium polykrikoides*의 배양

실험에 사용한 *C. polykrikoides*는 미세조류은행으로부터 분양받았다. *C. polykrikoides*의 배양은 25℃, pH 8.2, 6,000 lux의 조건으로 (Noh *et al.*, 2006) f/2-Si 배지 (Guillard and Ryther, 1962; Guillard, 1975)는 Table 1를 사용하여 배양하였다. *C. polykrikoides*를 순수분리, 또는 무균배양 (axenic culture or bacteria-free culture)하기 위하여 Droop (1967), Fontana and Haug (1982) 및 Cottrell and Suttle (1993)의 방법을 응용하여 아래에 열거한 antibiotic complex에 노출시켜 12시간 정도

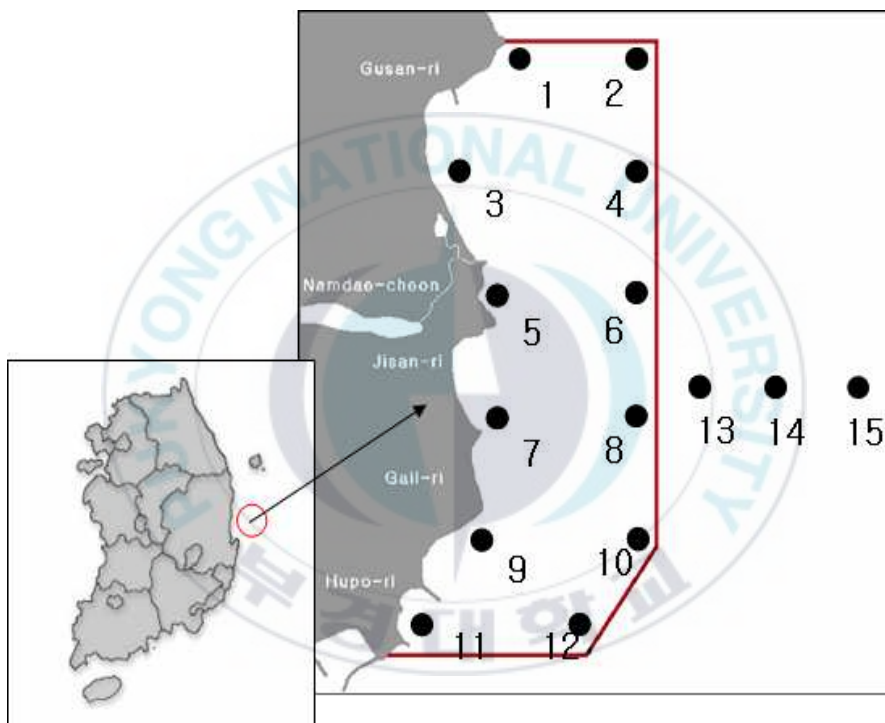


Fig 1. Location of sampling stations in Uljin Korea.

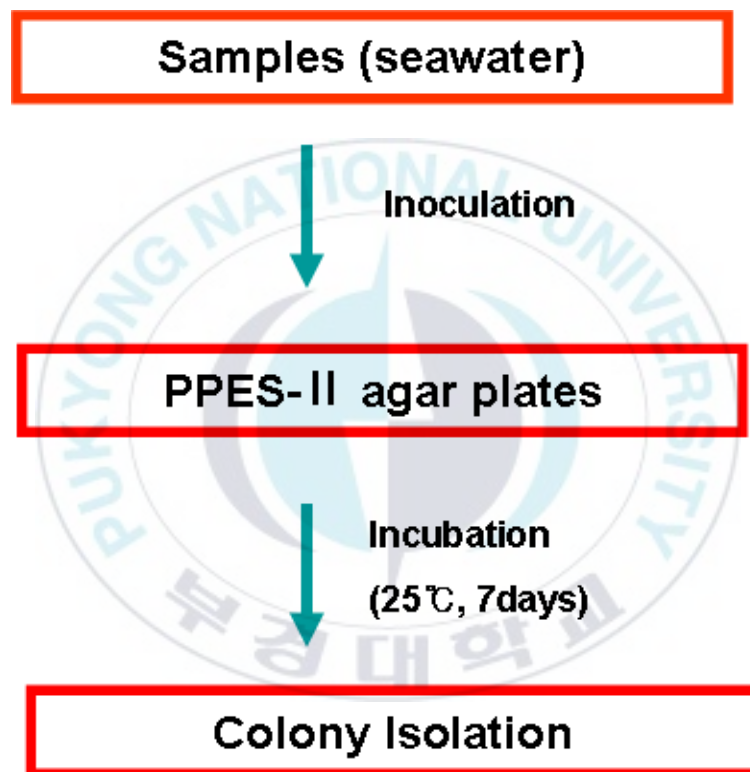


Fig 2. Isolation scheme for marine bacteria.

배양하여 세균과 곰팡이 등을 제거한 후, 다시 항생제를 첨가하지 않은 새로운 f/2-Si 배지에서 계대배양하였다. 이와 같은 조작을 수회 반복하여 얻은 무균 배양주를 무균 검사법에 의해 아래의 여러 가지 배지에서 오염 미생물이 검출되지 않는 것을 확인한 후 모든 실험에 사용하였다. 사용한 antibiotic complex의 종류와 사용량은 Ampicillin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Streptomycin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Chloramphenicol 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Penicillin G 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Neomycin 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Gentamycin 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Kanamycin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Nystain 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$,이었으며, 무균 검사에는 Nutrient Agar, PPES-II, STIO (저영양, 중속영양세균용 배지), YM Agar (Yeast용 배지), SDA (곰팡이용 배지)를 사용하였다.

4. 살조세균 동정

4.1. 형태학적, 생화학적 특성

분리된 세균을 PPES-II 액체배지가 10 ml 포함된 50 ml cornical tube에 접종하였고, shaking incubator (20℃)에서 200 rpm으로 24시간 배양하였다. 대수증식기의 배양액을 Gram staining에 사용하였고, 광학현미경 (Zeiss Co. RMS 16)으로 검경하여 형태적인 특징을 살펴보았다. 분리된 살조 세균의 생화학적 특성을 알아보기 위한 실험은 “Manual of methods for general bacteriology” (Gerhardt *et al.*, 1981)와 “Biochemical tests for identification of medical bacteria” (MacFaddin, 1980)의 방법에 준하여 수행하였다.

4.2. 16S rRNA gene sequencing 분석

AccuPrepTM Genomic DNA extraction kit (Bioneer)를 사용하여 total bacterial genomic DNA를 아래의 방법으로 추출하였다. 멸균된 1.5 ml tube에 배양액 1 ml의 시료를 넣고 14,000 rpm에서 2분간 원심분리하여 침전시킨 다음, pellet을 취하여 200 μl 의 lysis buffer를 첨가하였다. 여기에 20 μl 의 proteinase K를 첨가하여 잘 혼합한 후, 56℃에서 1시간 반응시켰다. Cell이 완전히 lysis되고 나면 짧게

Table 1. The composition of enrichment f/2-Si medium

Major nutrients	NaNO ₃	75mg
	NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	5mg
Trace metals	Na ₂ EDTA	4.36mg
	FeCl ₃ 6H ₂ O	3.15mg
	CuSO ₄ 5H ₂ O	0.01mg
	ZnSO ₄ 5H ₂ O	0.022mg
	CoCl ₂ 6H ₂ O	0.01mg
	MnCl ₂ 4H ₂ O	0.18mg
	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.006mg
Vitamins	Thiamin HCl	0.1mg
	Biotin	0.5μg
	B ₁₂	0.5μg
Sterilized sea water		1000ml

(Guillard and Ryther, 1962 ; Guillard, 1975)

Table 2. The composition of PPES-II medium

Polypeptone	2.0g
Bacto Soytone	1.0g
Proteose Peptone No.3	1.0g
Bacto Yeast Extract	1.0g
Ferric Citrate (0.1%)	10.0ml
Bacto Agar	15.0g
Seawater	1000ml
Final pH	7.6±0.2

(Taga, 1968)

spin-down한 후, 200 μ l의 Binding buffer를 시료에 넣고 60°C에서 10분간 반응시켰다. 반응이 끝난 tube에 100 μ l의 isopropanol을 넣고 5초 정도 가볍게 vortex하여 섞어준 다음 10초 정도 spin down하였다. 시료를 2 ml collection tube에 결합시킨 binding column에 옮긴 후, 8,000 rpm에서 1분간 원심 분리하였다. 500 μ l의 Washing buffer 1을 넣고 8,000 rpm에서 1분간 원심분리하고 여기에 500 μ l의 Washing buffer 2를 tube에 넣고 8,000 rpm에서 1분 동안 원심 분리하였다. Binding column을 1.5 ml collection tube에 옮긴 후 70°C water bath에서 미리 데운 elution buffer 200 μ l를 넣고 5분간 상온에 방치한 후 8,000 rpm에서 1분 동안 원심 분리하여 elution하였다. 이를 1% agarose gel에 전기영동하여 genomic DNA를 확인하였고, PCR 반응의 주형으로 사용하였다.

4.2.1. Primers 합성

16S rRNA 유전자의 증폭에 이용된 primer쌍은 Moyer 등 (1994)에 의해 고안된 것을 사용하였다. 이들 primer쌍은 eubacteria의 16S rRNA 유전자에서 잘 보존된 부분의 염기들로서 *Escherichia coli* 16S rRNA의 49-68, 1510-1492 위치에 해당되는 degenerate primer들로 만들어졌다. 추가로 forward primer의 5'에는 제한효소 *EcoRI*의 인식부위를 첨가하였고, reverse primer의 5'에는 *BamHI*의 인식부위를 첨가하였다.

Forward primer :

5' AGAATTCTNANACATGCAAGTCGAICG 3' (27-mer)

Reverse primer :

5' GTGGATCCGGYTACCTTGTTACGACTT 3' (27-mer)

N : degenerate including 4 nucleotides

Y : degenerate including pyrimidines

4.2.2. PCR 반응

PCR 반응은 AccuPower PCR Premix (Bioneer)를 사용하여 실시하였다. PCR 반응물의 조성은 10 pmol forward primer 3 μ l, 10 pmol reverse primer 3 μ l, template DNA 3 μ l, 3차 멸균 증류수 41 μ l를 첨가하여 50 μ l의 반응 혼합물을 만들어 잘 혼합하여 반응을 진행시켰다. PCR 운행은 Minicycler (MJ Research, U.S.A)에서 실시하였다. 처음 94℃에서 5분간 변성시킨 후, 94℃에서 30초, 62℃에서 30초, 72℃에서 1분씩 35회 반복하여 DNA를 증폭시키고, 마지막으로 72℃에서 7분간 extension time을 주어 PCR 반응을 종결시켰다. 이를 1% agarose gel에 전기영동하여 DNA를 확인하였다.

4.2.3. DNA 절편 정제 (Elution)

PCR 반응물을 1% agarose gel, 0.5×TBE buffer (0.045 M Tris-borate, 0.001 M EDTA)에서 전기영동하여 band를 확인한 후, 확인된 band를 잘라내어 1.5 ml microcentrifuge tube에 넣었다. 여기에 6 M NaI (6 M sodium Iodine) 600 μ l를 넣고 50℃에서 5분간 gel을 녹였다. gel이 완전히 녹은 것을 확인한 후, glass milk 8 μ l를 넣고 rotator에서 20분간 반응시켰다. 이를 다시 14,000 rpm에서 5초간 centrifuge하고 pellet을 취하였다. Washing solution (1 M NaCl 40 ml, 1 M Tris-Cl 4 ml, 0.5 M EDTA 2 ml, 3차 증류수 54 ml) 500 μ l를 넣고 pipetting으로 씻고, 5초간 centrifuge하여 pellet를 취하였으며 씻어내는 과정을 2회 하였다. 남아있는 alcohol을 날려버리기 위해 vacuum에서 5-10분간 방치하였다. 이를 다시 45℃에서 3분간 방치하고 나서 3차 증류수를 20 μ l를 넣고 섞어준 후, 14,000 rpm에서 1분간 centrifuge하여 상등액을 취하였다. 상등액 1 μ l을 취하여 1% agarose gel에서 전기영동하여 band를 확인하였다.

4.2.4. Ligation

정제된 16S rDNA의 PCR 반응물을 pGEM-T vector (Promega)에 연결하였다.

DNA 3 μl , T vector 1 μl , ligase 1 μl , buffer (2X) 5 μl 를 사용하여 전체 volume을 10 μl 로 맞춘 후에 상온에서 2시간 반응시켰다.

4.2.5. *Competent bacterial cell*의 준비

LB agar 배지에 키운 *E. coli* XL-1 Blue를 3 ml의 LB 액체배지에 접종하여 37°C에서 하룻밤 진탕배양하고, 이를 다시 10 ml corning tube에 4 ml의 LB 액체배지에 재접종하여 37°C에서 하룻밤 배양하였다. 배양된 균의 1 ml를 취하고 5,000 rpm에서 5분간 centrifuge하여 상등액을 버리고, 침전된 세포들을 4°C로 냉각된 800 μl 의 CaCl_2 (50 mM)를 넣고 ice에서 20분간 resuspension 하였다. 이를 다시 5,000 rpm에서 3분간 centrifuge하여 상등액을 버리고, 200 μl 의 CaCl_2 (50 mM)를 넣고 resuspension하여 사용하였다.

4.2.6 *Transformation*

10 μl 의 ligation 반응물을 미리 준비한 200 μl 의 XL1-blue competent cell과 혼합하여 ice에 30분간 방치한 후, 42°C에서 90초간 heat shock를 주고 재빨리 ice에서 5분간 방치하였다. 이를 LB 배지 800 μl 를 첨가하여 37°C에서 45분 동안 진탕배양하였다. 이를 다시 5,000 rpm에서 3분간 centrifuge하여 상등액을 버리고 LB 배지 200 μl 를 넣어 resuspension 하였다. 이를 ampicillin이 첨가된 Mackonkey agar 배지에 도말하여 37°C 배양기에 18시간 배양한 다음, 4°C에 두어 색깔이 확실해지면 white colony만을 선택하여 LB (ampicillin+) broth에 접종하여 plasmid를 mini-prep 하였다.

4.2.7. *Plasmid DNA mini-prep.*

Plasmid DNA는 alkaline lysis mini-prep방법 (Sambrook, 1989)으로 분리하고 제한 효소로 잘라 삽입된 DNA 절편을 확인하였다. 확인된 plasmid는 RNase를 처리하고 phenol : chloroform 정제과정을 거쳐 OD₂₆₀에서 농도를 측정한 다음 염기서열 분석에 사용하였다.

5. 살조세균의 최적 증식조건과 성장곡선

최종 선별된 균주의 성장에 미치는 최적 온도, pH, NaCl 농도를 측정하였다. 온도는 4, 10, 20, 25, 30, 37, 50℃로, pH는 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0으로, NaCl 농도는 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10%로 조정 한 PPES-Ⅱ 배지에 전배양한 살조세균의 배양액을 1 ml을 각각 접종하였다. 24시간 배양 후 균의 증식을 분광광도계(Shimadzu UV-160)를 이용하여 640nm에서 흡광도를 조사하였다. 각 대상 실험구를 제외한 모든 배양조건은 최적 배양조건인 25℃, pH 7.0, 2.0% NaCl, 200 rpm으로 하였다.

성장조건은 조사된 최적 배양조건으로 PPES-Ⅱ 액체배지에 접종하여 암환경에서 교반(200 rpm)배양하면서 매 3시간마다 640nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. *Cochlodinium polykrikoides*에 대한 살조 유형

살조세균 *Brachy bacterium* sp. KB-1의 *C. polykrikoides*에 대한 살조 유형을 조사하기 위하여 24 well microplate에 pore size 0.2 μ m의 Cell Culture Insert (FALCON, USA)를 삽입한 2조배양계를 이용하였다(Fig 3, 4). Cell Culture Insert 내부에 f/2-Si 배지에서 전배양한 *C. polykrikoides* 배양액(1.2×10^4 cell/ml) 1ml를 넣고, Cell Culture Insert 외부에는 f/2-Si 배지 1ml를 넣었다. PPES-Ⅱ 액체배지에서 전배양한 *Brachy bacterium* sp. KB-1(10^4 cell/ml) 1ml를 Cell Culture Insert 외부에 넣은 것을 test well로 하고, Cell Culture Insert 내부에 *Brachy bacterium* sp. KB-1를 첨가한 well을 positive control로 하였다. 그리고 Cell Culture Insert 내부에 *Brachy bacterium* sp. KB-1를 첨가하는 대신에 PPES-Ⅱ 액체배지만을 첨가하여 배양한 well을 negative control로 하여 모든 well을 *C. polykrikoides* 배양조건 (배양온도 20℃)에서 배양하였다. 이때 Cell Culture Insert 내부의 오염여부는 Cell Culture Insert 내부의 배양액을 취해 DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 염색후 형광현미경(Olympus BX40)하에서 직접 관찰하였다(Porter and Feig, 1980).

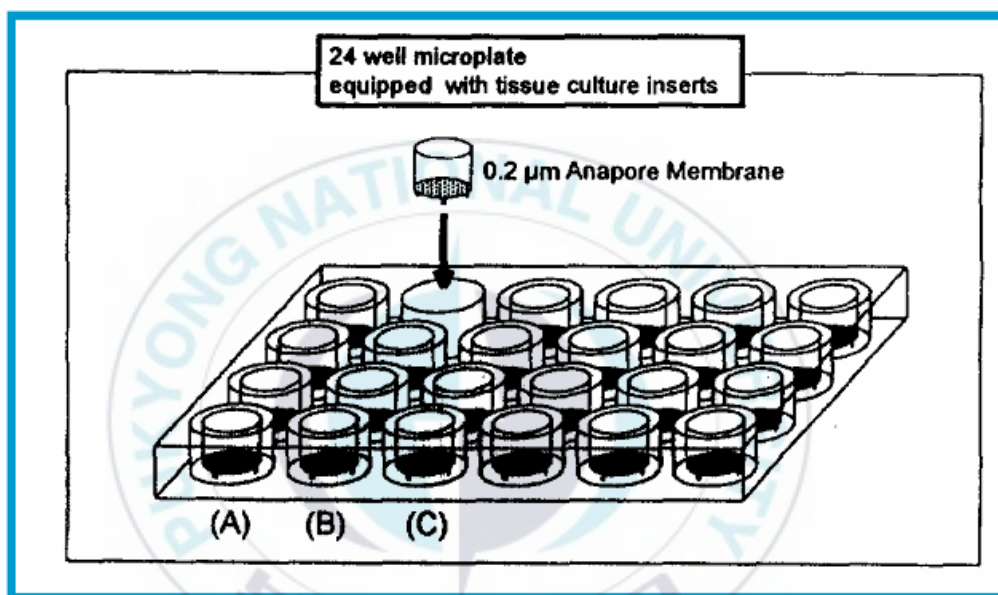


Fig 3 . Experimental procedure for determination of algicidal activity by killing bacteria against *C. polykikoides*, using in Cell Culture Inserts.

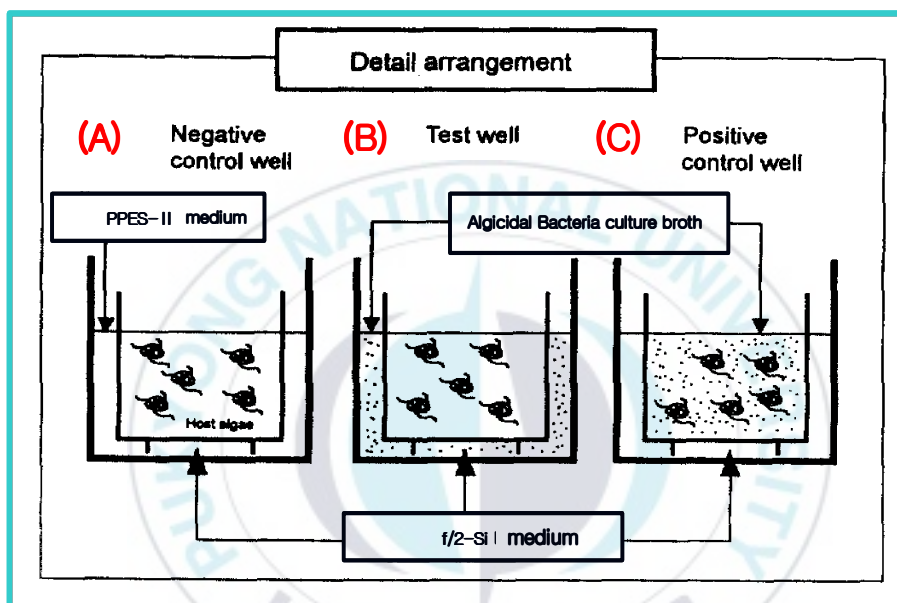


Fig 4 . Experimental procedure for determination of algicidal activity by killing bacteria against *C. polykikoides*, using in Cell Culture Inserts.

7. 살조효과 측정

7.1. 살조력(Algicidal activity)

25℃에서 PPES-II 액체배지에 18시간 배양한 대수증식기에 있는 *Brachy bacterium* sp. KB-1 배양액을 f/2-Si 배지에서 9일 정도 배양하여 가장 활성이 좋을 때인 대수증식기에 있는 *C. polykrikoides* 배양액(1.2×10^4 cell/ml)에 1%가 되도록 접종하거나 또는 최적조건으로 배양한 *Brachy bacterium* sp. KB-1 배양액을 원심분리(8,000 × g, 10 min)하여 상등액을 pore size 0.2μm polycarbonate membrane filter로 여과한 후 *C. polykrikoides* 배양액(1.2×10^4 cell/ml)에 1%가 되도록 접종하여 배양온도 20℃의 조건하에서 배양하여 살조력을 측정하였다. 살조력은 *C. polykrikoides*의 생존상태를 광학현미경하에서 관찰하여 48시간 후에 살아있는 *C. polykrikoides* 세포수를 counting 하는 bioassay법으로 측정하였으며 다음 식으로 계산하였다. 시료액을 첨가하지 않고 계속 배양한 것을 control로 하였으며, 이 때 control에는 시료액 대신 동량의 f/2-Si 배지를 넣어 주었다.

Algicidal activity(%)

$$= (1 - \text{시료에 첨가된 세포수/control의 세포수}) \times 100$$

7.2. 배양여과액 농도에 따른 살조효과

살조세균이 생산하는 물질에 의한 살조효과를 조사하기 위하여, PPES-II 액체배지에서 대수증식기 후기의 살조세균을 원심분리(8,000 rpm)후 상등액을 취하여 멸균된 0.1 μm *C. polykrikoides* (7×10^2 cells/ml)의 살조효과를 조사하였다. 이 때 control에는 f/2-Si 배지를 1, 5, 10%가 되도록 첨가하였다.

8. 살조 물질의 특성 조사

8.1. 열 안정성

Brachybacterium sp. KB-1이 생산하는 물질의 열 안정성을 알아보기 위해서, PPES-II 액체배지에서 배양한 대수증식기 후기의 *Brachybacterium* sp. KB-1 배양액을 원심분리($8,000 \times g$, 10 min)후 상등액을 취하여 멸균된 pore size $0.2\mu m$ polycarbonate membrane filter로 여과한 여과액을 4, 10, 20, 30, 50, 70, $100^{\circ}C$ 에 1시간 방치한 후 대수증식기의 *C. polykrikoides*(1.2×10^4 cell/ml) 100 ml에 첨가하여 시간에 따른 살조 효과를 조사하였다.

8.2. pH 안정성

Brachybacterium sp. KB-1이 생산하는 물질의 pH 안정성을 알아보기 위해 최적조건에서 배양한 *Brachybacterium* sp. KB-1 배양 여과액의 pH를 4.0 ~ 10.0으로 조절하여 24시간 동안 실온에 정치한 후 pH를 7.0으로 조절하여 살조력을 측정하였다. 이때 pH는 50mM Sodium acetate buffer(pH 2.0 ~ 5.0)와 50 mM Sodium phosphate buffer (pH 6.0~13.0)를 사용하여 조정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 살조세균 분리

본 연구에서는 울진 근해에서 채수한 해수를 pH 7.6으로 조절된 PPES-II 평판배지에 십진법으로 희석하여 평판도발법으로 접종하여 20℃에서 1주일간 배양한 후 나타난 colony 중 특징적인 형태를 나타내는 100여종의 colony를 선별하였다. 이들 선별된 해양미생물들 중에서 *C. polykrikoides*와의 혼합 배양액에서 분리한 우점종 중 가장 살조능이 뛰어난 균주를 선택하였다.

2. 살조 세균 동정

선별된 KB-1은 Gram 양성 구균(Fig. 5)이며, 16S rRNA 유전자 분석을 통해 얻은 염기서열을 분석한 결과 *Brachybacterium* 속으로 분류되어 이 분리균주를 *Brachybacterium* sp. KB-1으로 명명하였다. *Brachybacterium* sp. KB-1의 염기서열을 토대로 계통분류학적 유연관계를 추정하여 계통수 (Fig. 6)로 나타내었다.

지금까지 알려진 살조 세균으로는 *Vivrio* sp. (Ishio *et al.*, 1987, 1989), *Cytophaga* sp. (Imai *et al.*, 1991, 1993; Mitsutani *et al.*, 1992), *Saprospira* sp. (Sakata *et al.*, 1991; Sakata and Yasumoto, 1991), *Flavobacterium* sp. (Fukami *et al.*, 1992; Yoshima *et al.* 1995), *Alteromonas* sp. (Imai *et al.* 1995)등이 보고되었으며 Nagasaki *et al.* (1994, 1999)은 virus-like particles (VLPs)가 *Heterosigma akashiwo*에 미치는 살조 작용에 대해서 보고하였다.

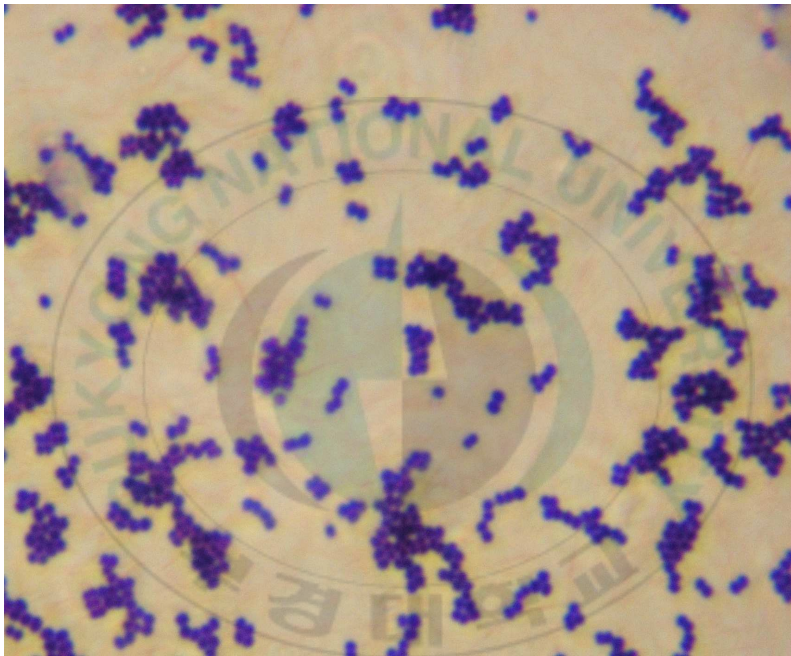


Fig 5. Gram staining of Brachybacterium sp. KB-1 (×1000).

Table 3. Biological and physiological characteristics of algicidal bacteria.

Test items	Results	Test items	Results
Gram stain	+	Adonitol	–
Xylose	+	Arabinose	+
Fructose	+	Arginine	+
Rhamnose	+	Lysine	+
Galactose	+	Ornithine	+
Inositol	(–)	MR	–
Mannose	+	VP	–
Mannitol	–	Indole	–
Sucrose	+	Citrate	+
Lactose	–	KIA	A/A
Glucose (Gas)	+(–)	O/F	+/+
Salicin	+	Oxidase	+
Maltose	+	Catalase	+
Sorbitol	+		

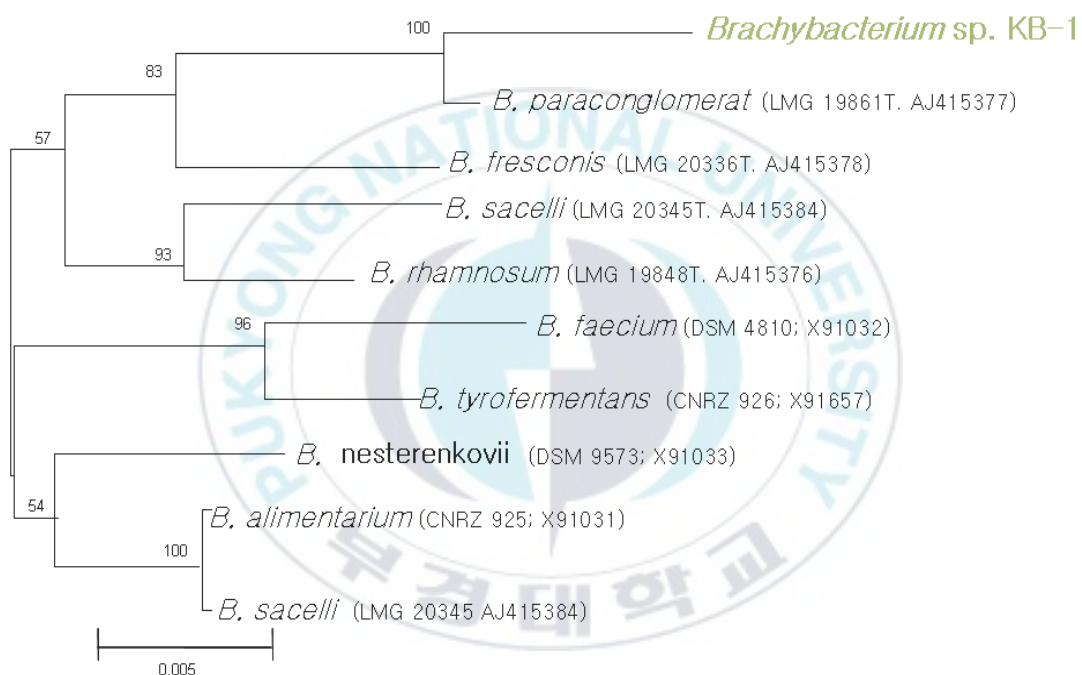


Fig 6. Phylogenetic tree of *Brachybacterium* sp. KB-1.

Brachybacterium sp. KB-1 -----AGAATTCT-AATACATGCAAGTCGAGCGATGACGGTGGTCTTGAC 46
B. paraconglomerat GACGAACGCTGGCGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGACGGTGGTCTTGAC 60
 * * * * *

Brachybacterium sp. KB-1 CGCCTGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTCCACTTCGGGAT 106
B. paraconglomerat CGCCTGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTCCACTTCGGGAT 120

Brachybacterium sp. KB-1 AACCTCGGGAAATCGTGGCTAATACCGGATATGAGCACTCATCGCATGGTGGGTGTGGA 166
B. paraconglomerat AACCTCGGGAAATCGTGGCTAATACCGGATATGAGCACTCATCGCATGGTGGGTGTGGA 180

Brachybacterium sp. KB-1 AAGATTTATCGGTGGGGATGGACTCGCGCCTATCAGTTTGTGGTGGGTGATGGCTC 226
B. paraconglomerat AAGATTTATCGGTGGGGATGGACTCGCGCCTATCAGTTTGTGGTGGGTGATGGCTC 240

Brachybacterium sp. KB-1 ACCAAGACGATGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGCCACACTGGGACTGAGACA 286
B. paraconglomerat ACCAAGACGATGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGCCACACTGGGACTGAGACA 300

Brachybacterium sp. KB-1 CGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGA 346
B. paraconglomerat CGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGA 360

Brachybacterium sp. KB-1 TGCAGCGACGCCGCTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCCCTTTTCAGTAGGGAA 406
B. paraconglomerat TGCAGCGACGCCGCTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCCCTTTTCAGTAGGGAA 420

Brachybacterium sp. KB-1 GAAGCGAGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG 466
B. paraconglomerat GAAGCGAGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG 480

Brachybacterium sp. KB-1 GTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGAAATTATTGGGCGTAAGAGCTTGTAGGTGGC 526
B. paraconglomerat GTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGAAATTATTGGGCGTAAGAGCTTGTAGGTGGC 540

Brachybacterium sp. KB-1 TTGTCGCTGTGCCGTGAAACCCGAGGCTCAACCTCGGGCGTGCAGTGGGTACGGGCAG 586
B. paraconglomerat TTGTCGCTGTGCCGTGAAACCCGAGGCTCAACCTCGGGCGTGCAGTGGGTACGGGCAG 600

Brachybacterium sp. KB-1 GCTAGAGTGTGGTAGGGGAGACTGGAACCTCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCA 646
B. paraconglomerat GCTAGAGTGTGGTAGGGGAGACTGGAACCTCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCA 660

Brachybacterium sp. KB-1 GGAAGAACCCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCCATTACTGACACTGAGAAGCGAAAG 706
B. paraconglomerat GGAAGAACCCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCCATTACTGACACTGAGAAGCGAAAG 720

Brachybacterium sp. KB-1 CATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGTTGGGCACTAG 766
B. paraconglomerat CATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGTTGGGCACTAG 780

Brachybacterium sp. KB-1 GTGTGGGGACATTCCACGTTTTCCGCGCGTAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGG 826
B. paraconglomerat GTGTGGGGACATTCCACGTTTTCCGCGCGTAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGG 840

Brachybacterium sp. KB-1 GAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAGCGCGGAG 886
B. paraconglomerat GAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAGCGCGGAG 900

Brachybacterium sp. KB-1 CATGCTGATTAAATCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGTACTGGACG 946
B. paraconglomerat CATGCTGATTAAATCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGTACTGGACG 960

Brachybacterium sp. KB-1 GCTGCAGAGATGTGGCTTTCTTTGGACTGGTGCACAGGTGGTGCATGGTGTCTGTCAGCT 1006
B. paraconglomerat GCTGCAGAGATGTGGCTTTCTTTGGACTGGTGCACAGGTGGTGCATGGTGTCTGTCAGCT 1020

Brachybacterium sp. KB-1 CGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCTATGTTGCCA 1066
B. paraconglomerat CGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCTATGTTGCCA 1080

Brachybacterium sp. KB-1 GCACGTAATGGTGGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGAC 1126
B. paraconglomerat GCACGTAATGGTGGGGACTCATAGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGAC 1140

Brachybacterium sp. KB-1 GACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTTCAAGCATGCTACAATGGTCGGTAC 1186
B. paraconglomerat GACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTTCAAGCATGCTACAATGGTCGGTAC 1200

Brachybacterium sp. KB-1 AATGGGTTGCGAAACTGTGAGGTGGAGCGAATCCCAAAAGCCGCCCTCAGTTCGGATTG 1246
B. paraconglomerat AATGGGTTGCGAAACTGTGAGGTGGAGCGAATCCCAAAAGCCGCCCTCAGTTCGGATTG 1260

Brachybacterium sp. KB-1 GGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTG 1306
B. paraconglomerat GGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTG 1320

Brachybacterium sp. KB-1 CGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCTGTCAAGTCACGAAAGTCGGTAACA 1366
B. paraconglomerat CGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCTGTCAAGTCACGAAAGTCGGTAACA 1380

Brachybacterium sp. KB-1 CCCGAAGCCAGTGGCCCATCCTCGTGAGGGAGCTGTGCAAGGTGGGATCGGTGATTGGGA 1426
B. paraconglomerat CCCGAAGCCAGTGGCCCATCCTCGTGAGGGAGCTGTGCAAGGTGGGATCGGTGATTGGGA 1440

Brachybacterium sp. KB-1 CTAAG-TCGTAACAAGGTAACCGGATCCAC-- 1455
B. paraconglomerat CTAAGGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAG 1472

Fig 7. Alignment of 16S rRNA gene sequences alignmented from *Brachybacterium* sp. KB-1 and *Brachybacterium paraconglomerat*.

3. *Brachybacterium* sp. KB-1의 최적 증식조건

3.1. 최적 온도

PPES-II 배지에서 전배양한 *Brachybacterium* sp. KB-1의 배양액을 1 ml씩 취하여 새로운 PPES-II 배지에 접종하여 각 온도구간을 4, 10, 20, 25, 30, 37, 50℃로 설정하여 이 때의 배양조건은 pH 7.0, 2% NaCl, 200 rpm으로 24시간 배양한 후 640nm에서 흡광도를 조사한 결과를 Fig. 8에 나타내었다. *Brachybacterium* sp. KB-1의 최적온도는 30℃였으며, 20 ~ 37℃에서 증식이 가능하였으나, 4℃ 이하에서는 증식하지 못했다.

3.2. 최적 pH

PPES-II 배지에서 전배양한 *Brachybacterium* sp. KB-1의 배양액을 1 ml씩 취하여 pH를 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0으로 설정한 새로운 PPES-II 배지에 접종하여 24시간 배양한 후 균의 증식을 640nm에서 흡광도를 조사한 결과를 Fig. 9에 나타내었다. *Brachybacterium* sp. KB-1는 pH 7.0에서 가장 증식이 잘 되었으며, pH 6.0 ~ 10.0에서 증식이 가능하였고 pH 4.0 이하에서는 증식하지 못하였다.

3.3. 최적 NaCl 농도

PPES-II 배지에서 전배양한 *Brachybacterium* sp. KB-1의 배양액을 1ml씩 취하여 NaCl 농도를 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10으로 조절한 새로운 PPES-II 배지에 접종하여 24시간 배양한 후 균의 증식을 640nm에서 흡광도를 조사한 결과를 Fig. 10에 나타내었다. *Brachybacterium* sp. KB-1는 2% NaCl 농도에서 최대 성장능을 보였으며, 0 ~ 10% 까지 상당히 넓은 범위에서도 성장이 가능하여 담수뿐만 아니라 고염농도에서도 견디는 광염성 세균으로 해양환경에 적응력이 높을 것으로 사료된다.

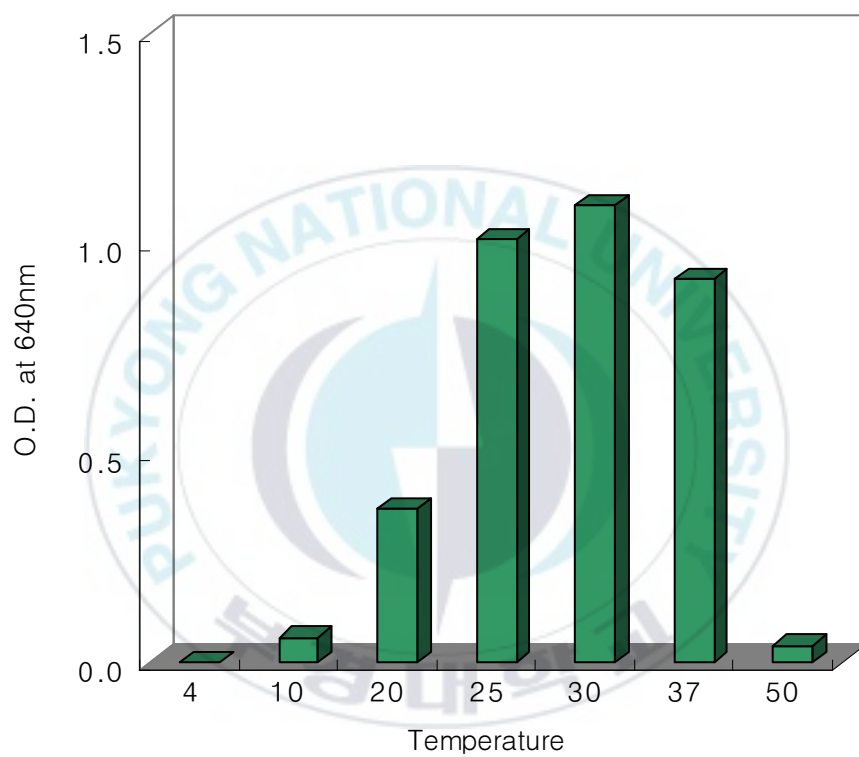


Fig 8. Effects of temperature on the growth of Brachybacterium sp. KB-1 in PPES-II medium.

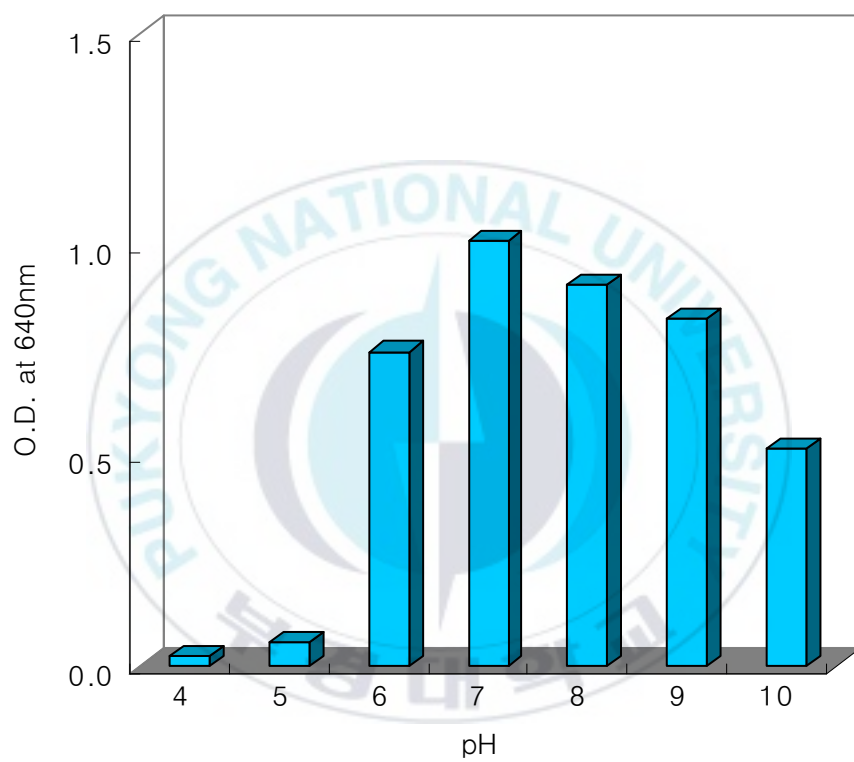


Fig 9. Effects of initial pH on the growth of Brachybacterium sp. KB-1 in PPES-II medium.

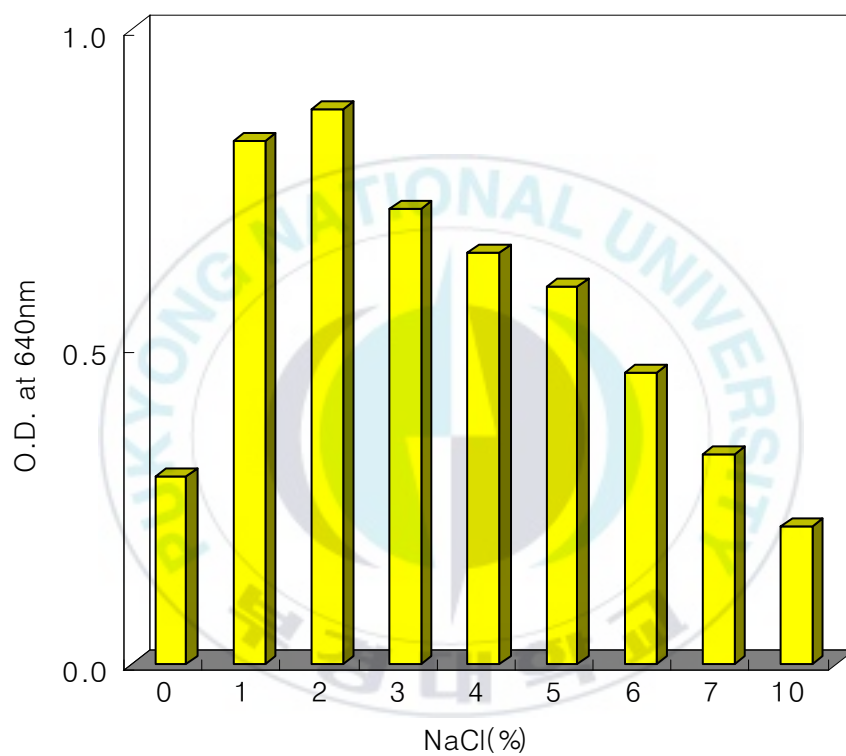


Fig 10. Effects of NaCl concentration on the growth of Brachybacterium sp. KB-1 in PPES-II medium.

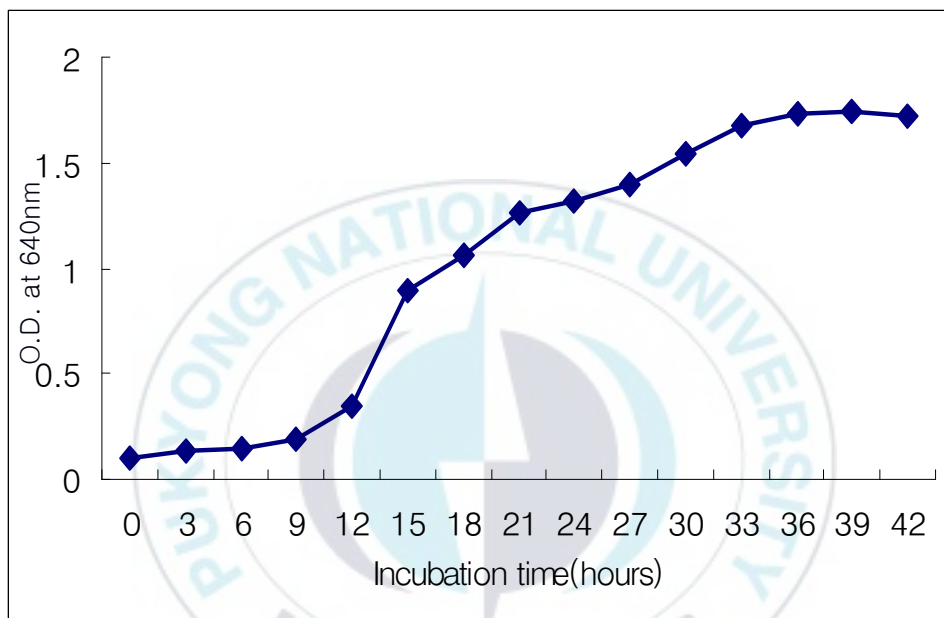


Fig 11. Growth curve of Brachybacterium sp. KB-1 at optimum culture condition (30°C, pH 7.0, 2% NaCl, 200 rpm).

4. *Brachy bacterium* sp. KB-1의 최적 성장곡선

이상의 실험 결과에 의해 결정된 최적 증식 조건을 적용하여 3시간 간격으로 생육도를 측정 한 결과를 Fig. 11에 나타내었다. *Brachy bacterium* sp. KB-1은 온도 25℃, pH 7.0, 2% NaCl 농도에서 200 rpm으로 교반배양시 가장 높은 성장률을 보였다. 최적조건에서 *Brachy bacterium* sp. KB-1은 9시간 정도의 유도기를 거친 후 대수증식기로 접어들어, 36시간 후 완전히 성장하여 서서히 정지기로 접어들었다.

5. 살조유형

Brachy bacterium sp. KB-1이 적조 생물에 직접 부착하여 죽이는 직접 공격형인지 물질을 분비하여 죽이는 살조인자 분비형인지 실험하여 Table 3에 나타내었다. Cell Culture Insert 내부에 *C. polykrikoides* 배양액과 *Brachy bacterium* sp. KB-1를 함께 접종한 모든 positive control well에서는 *C. polykrikoides*가 사멸되었지만, 살조세균 배양액 대신에 세균 배지인 PPES-II 액체배지만을 접종한 모든 negative control well에서는 *C. polykrikoides*가 사멸되지 않았다. *Brachy bacterium* sp. KB-1은 0.2 μ m Cell Culture Insert에 의해 *C. polykrikoides*와 격리된 상태인 test well에서도 *C. polykrikoides*를 살조시켰다. 따라서 *Brachy bacterium* sp. KB-1은 살조물질을 세포외로 분비하는 살조인자 분비형으로 사료된다.

지금까지 여러 연구자들에 의해 보고된 살조세균은 조류 세포에 직접 부착 또는 접촉하여 살조하는 직접 공격형과 살조 물질을 생산, 분비하여 대사물질에 의해 적조생물을 살조시키는 살조인자 분비형으로 크게 나눌 수 있다. 직접공격형으로는 주로 활주세균인 *Cytophaga* sp. (Imai *et al.*, 1993; Mitsutani *et al.*, 1992)과 역시 활주세균인 *Saprospira* sp. (Sakata *et al.*, 1991; Sakata and Yasumoto, 1991)등이 있으며, 이 세균들은 규조류 및 와편모조류에 광범위하게 살조활성을 가진다. 살조인자 분비형으로는 주로 진정세균인 *Flavobacterium* sp. *Alteromonas* sp.과 *Pseudomonas* sp. 등이 보고되었다 (Fukami *et al.*, 1992; Mitsutami *et al.*, 1992; Yoshinaga *et al.*, 1995a). 지금까지 해양에서 분리된 살조세균들의 살조 유형을 분석해보면 활주세균은 직접 공격형이 많았고, γ -Proteobacteria군 세균과 진정세균에 속하는 세균은 살조인자 분비형이 많은 경향을 보였으며, 직접 공격형은 살조특이성이 낮고 살조인자 분비형은 살

Table 4. Death of C. polykikoides inside Cell Culture Insert by Brachybacterium sp. KB-1

(A)	(B)	(C)
<i>Negative control well</i>	<i>Positive control well</i>	<i>Test well</i>
–	+	+

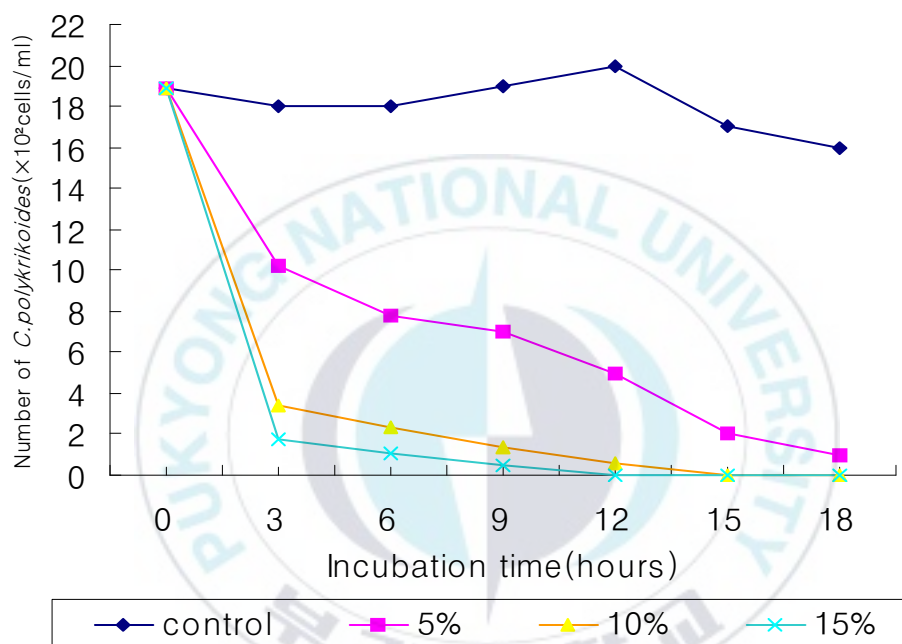


Fig. 12. Algicidal activity of *Bacillus* sp. KB-1 against *C. polykrikoides* by culture filtrate at different volumes of *Brachy bacterium* sp. KB-1.

조특이성이 높은 경향을 보였다 (Imai *et al.*, 1989; Imai *et al.*, 1991, 1993, 1995; Mitsutani *et al.*, 1992, 1994; Yoshivaga *et al.*, 1995a; Kim *et al.*, 1998).

6. 배양여과액에 의한 살조 효과

Brachybacterium sp. KB-1이 생산하는 물질에 의한 살조효과를 조사하기 위하여, PPES-II 액체배지에서 대수증식기 후기의 *Brachybacterium* sp. KB-1를 원심분리 ($8,000 \times g$, 10 min)후 상등액을 취하여 멸균된 $0.2 \mu m$ polycarbonate membrane filter로 여과한 여과액의 첨가농도 (5, 10, 15, 20%)에 따른 *C. polykrikoides* (1.2×10^4 cell/ml)의 살조효과를 Fig. 12에 나타내었다.

Brachybacterium sp. KB-1 배양여과액의 최종농도가 10, 15%가 되도록 첨가한 경우 3시간 경과 후에 *C. polykrikoides*의 개체수가 급격히 감소하여 10%의 경우 15시간 후에, 15%의 경우 12시간 후에 100% 살조되었다. 5%가 되게 첨가했을 경우에는 이보다는 오래 걸렸지만 18시간 후에 90% 이상 살조되었다. 즉, *Brachybacterium* sp. KB-1의 배양 여과액의 양에 비례하여 살조 효과가 증가하는 경향을 보였으며, 이것은 배양액을 넣었을 때와 유사한 양상으로 세균 군체 자체 또는 세포내 살조물질의 영향은 극히 미미한 것으로 판단되고, 앞서 살조 유형에서 살펴 본 바대로 *Brachybacterium* sp. KB-1는 *C. polykrikoides*를 살조시키는 물질을 생성하여 세포외로 분비하는 것으로 사료된다.

7. *Cochlodinium polykrikoides*의 살조 과정

*C. polykrikoides*에 살조세균 *Brachybacterium* sp. KB-1 배양 여과액을 접종하였을 때 살조되는 과정을 위상차현미경 하에서 관찰하여 Fig. 13에 나타내었다. 연쇄군체를 형성한 유영세포는 살조세균의 작용을 받아 접종 후 1시간 이내에 운동성을 상실하고, 연쇄군체의 각 단세포가 팽창하여 고유의 형태를 상실하여 구형으로 변하면서 temporary cyst를 형성한 후 적조 세포벽의 일부가 부풀어 오르면서 갑자기 파열되어 핵과 색소체 등의 세포 내용물이 밖으로 유출되었다. 이때 핵 또한 부풀어 오르면서 얽어지고 서서히 사라졌다.

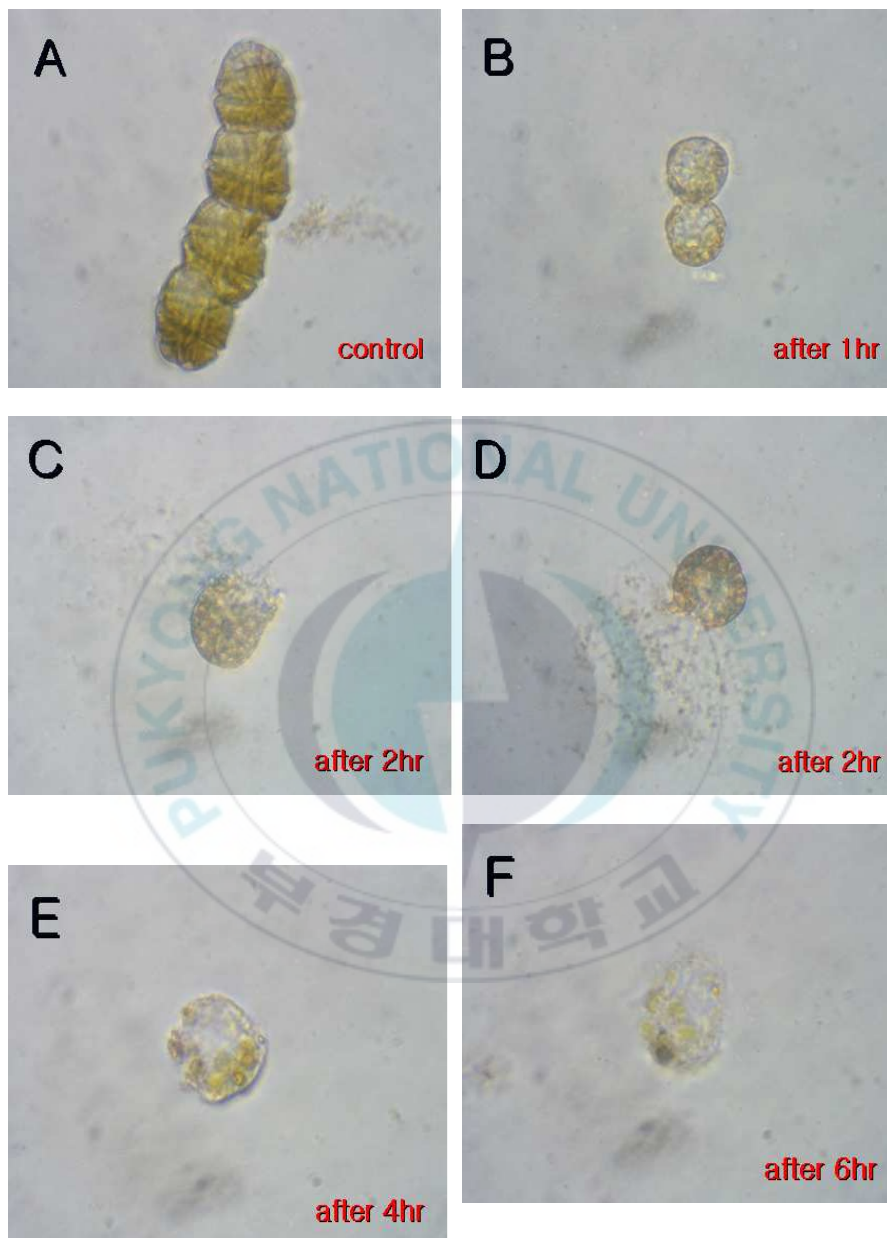


Fig 13. Monographs of killing process of cell-free culture of Brachybacterium sp. KB-1 against C. polykrikoides. (A) Live cells of C. polykrikoides (B) Stopping of cell swimming. (C, D) Burst cell of C. polykrikoides.(E ,F) Lysis cell of C. polykrikoides.

8. 세포외 분비 살조물질의 특성

8.1. 열 안정성

Brachybacterium sp. KB-1가 생산하는 물질의 열 안정성을 알아본 결과를 Fig. 14에 나타내었다. 최종농도가 5%가 되게 조절 후 *C. polykrikoides*를 첨가하여 3시간 후에 관찰한 결과, *C. polykrikoides*의 개체수는 급격히 감소하여 control로 볼 수 있는 4℃ 때 비해 다른 온도 때의 살조활성과 큰 차이를 보이지 않았으며 70℃, 100℃ 같은 높은 온도에서도 안정된 살조활성을 보이는 것으로 보아 *Brachybacterium* sp. KB-1가 생산, 분비하는 살조 물질은 열에 안정된 내열성 물질로 사료된다.

8.2. pH 안정성

Brachybacterium sp. KB-1가 생산하는 살조물질의 pH 안정성을 조사한 결과를 Fig. 15에 나타내었다. pH 6.0 ~ 8.0에서 살조력이 100%로 대단히 안정하였으며, pH 9.0 ~ 10.0에서도 90% 이상의 살조력을 보였다. 그러나 pH 4.0에서 살조력이 떨어져 algicidal activity가 68%로 감소하였다. 즉, 살조물질은 약산성과 알카리에서 살조 활성이 안정되었으며 산성에서 다소 살조 활성이 떨어지는 것으로 나타났다.

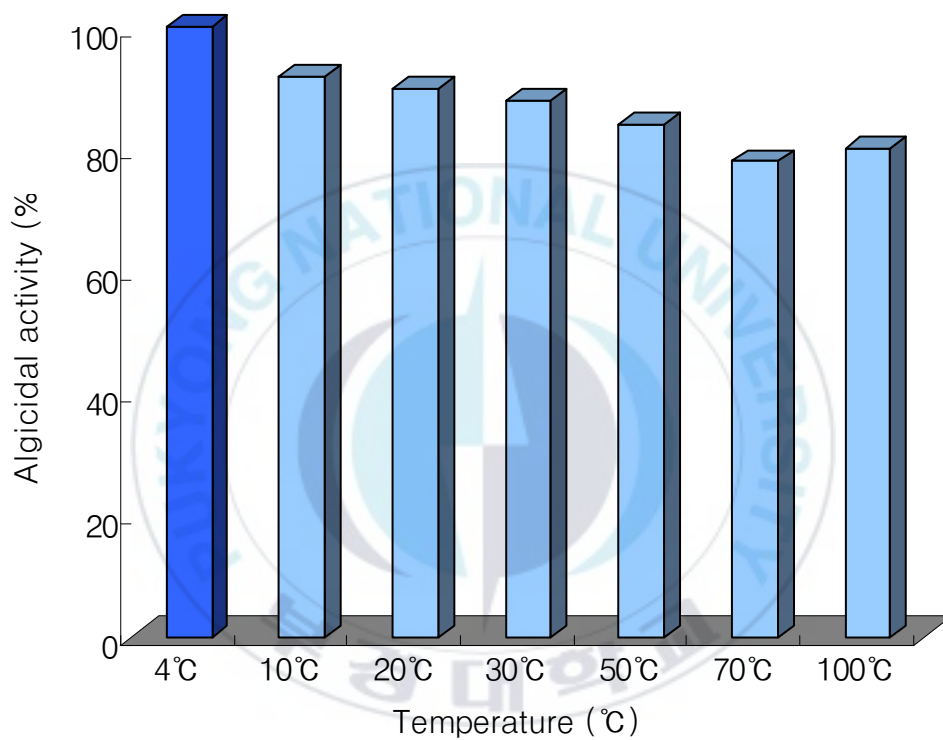


Fig 14. The algicidal activity of the culture of Brachybacterium sp. KB-1 against C. polykrikoides and heat stability of the culture filtrate. The algicidal activity indicates the percent of dead C. polykrikoides.

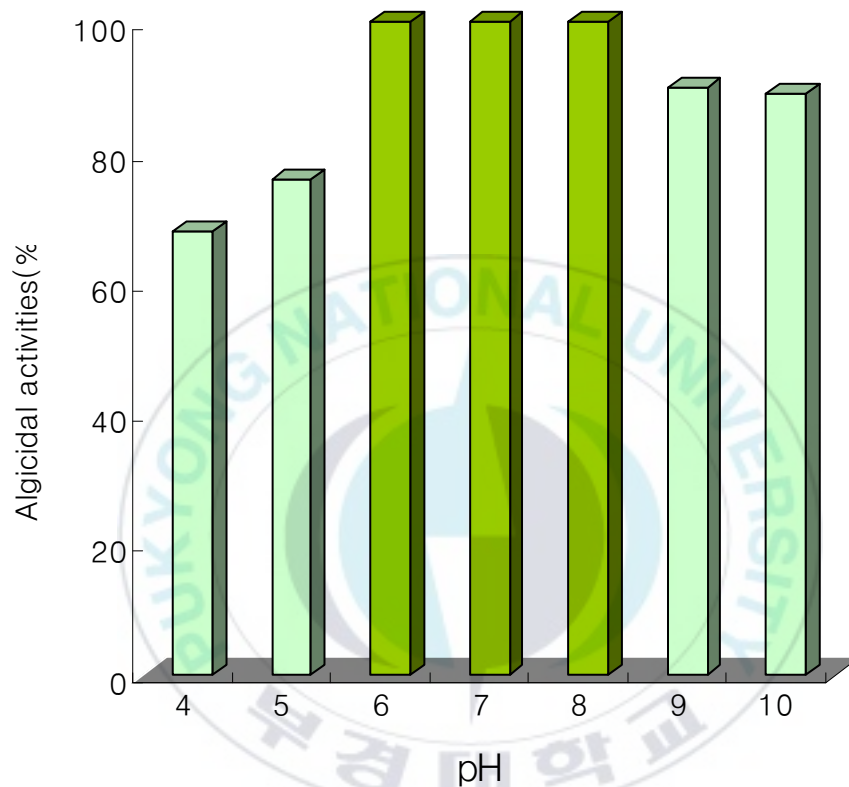


Fig 15. pH stability of the culture filtrate of Brachybacterium sp. KB-1 against C. polykrikoides.

IV. 요약

우리나라 적조의 주요 원인생물인 *Cochlodinium polykrikoides*를 살조시키는 해양세균 *Brachybacterium* sp. KB-1를 울진연안에서 분리하여 동정하고 그 특성과 살조효과에 대해 연구하여, 분리한 살조세균이 해양 생태계에 미치는 영향을 조사함으로써 환경친화적 적조 방제 기술 개발의 기초 자료를 제공하고자 연구한 결과는 다음과 같다.

1. 울진 연안 지역에서 *C. polykrikoides*에 대한 살조능이 가장 우수한 *Brachybacterium* sp. KB-1를 선별하였다. *Brachybacterium* sp. KB-1의 최적 배양조건은 30℃, 2% NaCl, pH 7.0 이었다.
2. 0.1 μm 의 Cell Culture Insert를 삽입한 2조 배양계를 이용하여 *Brachybacterium* sp. KB-1의 살조 유형을 조사한 결과, *Brachybacterium* sp. KB-1는 0.1 μm filter에 의해 *C. polykrikoides*와 격리된 상태에서도 *C. polykrikoides*를 살조시켜 직접 공격형이 아니라 세포외로 물질을 분비하여 살조시키는 살조인자 분비형으로 밝혀졌다.
3. *Brachybacterium* sp. KB-1의 배양 여과액의 최종농도가 10%, 15%가 되도록 첨가한 경우, *C. polykrikoides*의 개체수는 급격히 감소하여 3시간 경과 후에 control에 비해 10%일 때는 15시간 후, 15%일 때는 12시간 후에 100%로 살조되었으며 5%일 때는 이보다는 오래 걸렸지만 18시간 후에 90%이상이 살조되었다.
4. 대사산물의 열 안정성을 실험한 결과 3시간 후 100%로 살조된 4℃일 때와 비교하였을 때 큰 차이가 나지 않고 70℃, 100℃ 같은 높은 온도에서도 살조활성이 높은 것으로 보아 *Brachybacterium* sp. KB-1가 분비하는 살조물질은 열에 안정된 내열성 물질로 사료된다. 또한 대사산물의 pH 안정성은 pH 6.0 ~ 8.0에서 100%의 살조력을 보였다.

V. 감사의 글

입학할 때가 엇그제 같은데 벌써 2년 반이라는 세월이 흘렀습니다. 어렵고 힘든 순간마다 저에게 많은 힘이 되어주시고 격려를 아끼지 않으셨던 많은 분들이 있었기에 제가 여기까지 올 수 있었다고 생각합니다. 그 고마운 마음을 표현하기에는 이 짧은 글로는 부족한 것 같습니다. 고마우신 분도 많고, 걱정을 끼쳐드린 분도 많고.. 제가 이 논문을 쓰기까지 도움을 주신 분들에 대한 고마운 마음과 아직도 부족함이 많은 죄송스러운 마음을 적어봅니다.

학부과정에서부터 석사 논문이 이렇게 완성되기까지 부족한 저를 끊임없는 이해와 사랑으로 지도, 편달을 해주신 이원재 교수님께 머리 숙여 감사드립니다. 한편으로는 아직도 너무나 부족한 부분이 많아 송구스럽기도 합니다.

부족한 논문을 정성껏 다듬어 주시고 논문수정의 수고를 아끼지 않으신 이명숙 교수님과 김군도 교수님께 감사드리며 학문의 바른길을 제시해 주신 김진상 교수님, 이훈구 교수님, 송영환 교수님, 김영태 교수님, 최태진 교수님께도 깊은 감사를 드립니다.

이 논문이 있기까지 도움과 격려를 아끼지 않으시고 밤이 늦도록 실험에 도움을 주시고 함께 의논해 주셨던 별나라 왕자 대성 쌤, 개그맨 동욱 쌤, 얼짱 동안 윤숙 언니, 학부 때부터 절친했던(?) 근호 선배, 귀찮고 께은일 마다않고 자기 일처럼 도와준 착한 강냉이 영주, 귀염둥이 고은이, 힘든 실험 가운데서도 전혀 싫은 내색 없이 동거동락하면서 서로에게 힘이 된 크리스탈 언니와 멋진 내 동기 지니 (드더 우리 졸업한다♡ 합격을 향하여 열공!), 그리고 7호관 3, 4층을 오가며 실험할 때 많이 가르쳐주시고 도와주신 용배 쌤과 생화학방 식구들, 바이러스방 식구들 그 외 미생물학과 대학원생 분들과 실험실에 계신 모든 분들께도 감사의 말씀을 전합니다.

마지막으로 오늘의 제가 있기까지 저를 지켜봐주시고 격려해 주신 아버지, 새벽마다 눈물로 기도하신 어머니, 하나밖에 없는 내 동생 훈이에게 이 조그마한 결실을 바칩니다. 끝으로 모든 영광 하나님께 드립니다.

VI. 참 고 문 헌

- 김무찬, 유홍식, 옥미선, 김창훈, 장동석. 1999. 진동만의 살조세균의 동태와 살조 특성. J. Korean Fish Soc., 32(2), 359~367
- Afi, L., P. Metzger, C. Largeau, J. connan, C. Berkaloﬀ and .Rousseau. B. 1996. Bacterial degradation of green microalgae : Incubation of *Chlorella emersonii* and *Chlorella vulgaris* with *Pseudomonas oleovorans* and *Flavobacterium aquatile*. Org. Geochem, 25(1/2), 117~130.
- Babinchak, J.A., E.R. McGovern and G.J. Doucette. 1997. Isolation and characterization of the bacterial flora associated with PSP-related dinoflagellate species. In *Harmful algae*. B. Reguera, J. Blanco, M. Fernandez and T. Wyatt, eds., IOC of UNESCO, pp. 410~413.
- Baker, K.H. and D.S herson. 1978. Interactions between the diam *Thallasiosira pseudonanna* and an associated pseudomonad in a mariculture system. Appl. Environ. Microbiol. Environ. Microbiol., 35, 791~796.
- Buck, J.D. and R.C. Cleverdon. 1960. The spread plate as a method for enumeration of marine bacteria. Limnol. Oceanogr., 5, 75~80.
- Clttrell M.T. and C.A. Suttle. 1993. Production of axenic cultures of *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae) using antibiotics. J. Phyco., 28, 385~387.
- Cole, J.J. 1982. Interactions between bacteria and algae in aquatic ecosyems. Ann. Rev. Ecol., 13, 291~314.
- Connell, L. and R.A. Cattolico. 1996. Fragile algae: axenic culture of field-collected samples of *Heterosigma carterae*. Mar. Biol., 125, 421~426.
- Cottrell, M.T. and C.A. Suttle. 1993. Production of axenic cultures of *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae) using antibiotics. J. Phycol., 29, 385~387.
- Dkhama, A., J. de la Noë and M.C. Lavoie. 1993. Isolation and Identification of antialgal substances produced by *Pseudommnas aeruginosa*. J. Appl. Phytoplank., 5, 297~306.
- DeLong, E.F., D.G. Franks and A.L. Alldredge. 1993. Phylogenetic diversity of aggregate-attached vs. free-living marine bacterial assemblages. Limnol. Oceanogr., 38(5), 924~934.
- Donner, G. and W. Reichardt. 1991. Phytoplankton : bacteria relationshop and incidence of vibrios in brackish coastal waters. Kieler Meeresforsch. Sonderh., 8, 278~283.

- Doucette, G.J. and C.L. Powell. 1998. Algal-bacterial interactions : Can they determine the PSP-related toxicity of dinoflagellates. In *Harmful algae*. B. Reguera, J. Blanco, M. Fernandez and T. Wyatt, eds., IOC of UNESCO, pp. 406~409.
- Drebes, G. and E. Schnepf. 1998. *Gyrodinium undulans* Hulburt, a marine dinoflagellate feeding on the bloom-forming diatom *Odontella aurita*, and on copepod and rotifer eggs. *Helgoländer Meeresunters*, 52, 1~14.
- Droop, M.R. 1967. A procedure for routine purification of cultures with antibiotics. *Brit. Phycol. Bull.* 3, 295~297.
- Faust, M.A. 1997. Mixotrophy in Tropical Benthic Dinoflagellates. In *Harmful algae*. B. Reguera, J. Blanco, M. Fernandez and T. Wyatt, eds., IOC of UNESCO, pp. 390~393.
- Ferguson, R.L., E.N. Buckley and A.V. Palumbo. 1984. Response of marine bacterioplankton to differential filtration and confinement. *Appl. Environ. Microbiol.*, 48, 49~55.
- Fukami, K., U. Shimika and N. Taga. 1981. Fluctuation of the communities of heterotrophic bacteria during the decomposition process of phytoplankton. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 55, 171~184.
- Fontana, D.A. and A. Haug. 1982. Effects of sodium chloride on the plasma membrane of halotolerant *Dunaliella primoecta* : an electron spin resonance study. *Arch. Microbiol.*, 131, 184~190.
- Fukami, K., U. Shimika and N. Taga. 1985. Microbial decomposition of phyto and zooplankton in seawater. II. Change in the bacterial community. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 21, 7~13.
- Fukami, K., T. Nishijima, H. Murata, S. Doi and Y. Hata. 1991. Distribution of bacteria influential on the development and the decay of *Gymnodinium nagasakiense* red tide and their effects on growth. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57(12), 2321~2326.
- Fukami, K., A. Yuzawa, T. Nishijima and Y. Hata. 1992. Isolation and properties of a bacterium inhibiting the growth of *Gymnodinium nagasakiense*. *Nippon suisan Gakkaishi*, 58(6), 1073~1077.
- Fukami K., K. Sakaguchi, M. Kanou and T. Nishijima. 1996. Effect of bacterial assemblages on the succession of blooming phytoplankton from *Skeletonema costatum* to *heterosigma akashiwo*. In *Harmful and Toxic Algal Blooms*. T. Yasumoto, Y. Oshima and Y. Fukuyo, eds., IOC of UNESCO. pp. 335~338.

- Fukami, K., T. Nishijima and Y. Ishida. 1997. stimulative and inhibitory effects of bacteria on the growth of microalgae. *Hydrobiologia*, 358, 185~191.
- Fukuyo, Y., H. Takyama, J.S. Park, K.H. An and J.M. Shim. 1995. Noxious dinoflagellate bloom of an undescribed species of *Gyrodinium* in Chungmu coastal waters, Korea. In *harmful marine algal blooms*. P. Lassus, G. Arzul, E.E. D'Enn, P. Gentien and C.M. Baut, eds., Lavoisier, Paris, pp. 59~63.
- Guillard, R.R.L. and J.H. Ryther. 1962. Studeies of marine planktonic diatoms 1. *Cyclotella nana* HUSTEDT, and *Detonula confervacea*(CLEVE) GRAN. Can. J. Microbiol., 8, 229~239.
- Guillard, R.R.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In *culture of marine invertebrate animals*. W.L. Smith and M.H. Chanley, eds., Plenum Press, New York, pp. 29~60.
- Handa, S., J. Hiromi and N. Uchida. 1998. Algicidal effect of autolysate of jellyfish *Aurelia aurita* on new type red-tide flagellate *Heterrocapsa circularisquama*. Nippon suisan Gakkaishi, 64(1), 123~124 (in japanese).
- Hansen. P.J, 1991. Quantitative importance and trophic role of heterophhic dinoflagellates in a coastal pelagial food web. Mar. Ecol. Prog. Ser., 73, 253~261.
- Hansen, P.J. 1995. Growth and grazing response of a ciliate feeding on the red tide dinoflagellate *Gyrodinium aureolum* in monoculture and in mixture with a non-toxic alga. Mar. Ecol. Prog. Ser., 121, 65~72.
- Hoshaw, R.W. and J.R. Rosowski. 1979. Methods for microscpic algae. In *Handbook of phycological methods - culture methods and growth measurements*. stein, J.R., ed., Cambridge Univ. Press, London, pp. 53~68.
- Imada, N., K. Kobayashi, 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(9), 1687~1692.
- Imai, I., Y. Ishida, S. Sawayama and Y. Hata. 1991. Isolation of a marine gliding bacterium that kills *Cattonella antiqua*(Raphidophyceae). Nippon Suisan Gakkaishi, 57, 1409.
- 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.
- Imai, I. and M. Yamaguchi. 1994. A simple technique for establishing axenic cultures of phytoflagellates. Bull. Japan. Soc. Microb. Ecol., 9, 15~17.

- Imai, I., Y. Ishida, K. Sakaguichi and Y. Hata. 1995. Algicidal marine bacteria isolated from northern Hiroshima bay, Japan. *Fisher. Sci.*, 61(4), 628~636.
- Imai, I., M.C. Kim, K. Nagasaki, S. Itakura and Y. Ishida. 1998a. Detection and enumeration of microorganisms that are lethal to harmful phytoplankton in coastal water. *Planton Biol. Ecol.*, 45(1), 19~29.
- Imai, I., S. Nagagiri, K. Nagai, K. Nagasaki, S. Itakura and M. Yamaguchi. 1998b. fluctuations of algicidal microorganisms against the harmful dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* in Ago Bay, Mie Prefecture. Japan. *Natl. Fish. Res. Inst.*, 31, 53~61.
- Ishida, Y., K. Fukami, M. Eguchi and I. Yshinaga. 1989. Strategies for growth of oligotrophic bacteria in the pelagic environment. In *Recent advances in microbial ecology*. T. Hattori, Y. Ishida, Y. Maruyama, R.Y. Morita and A. Uchida, eds., Japanese Scientific Society Press, Tokyo, pp. 89~93.
- Ishio, S., T. Nishimoto and H. Nakagawa. 1987. Distribution of dinoflagellate growth inhibitor in sediment in Ariake and Hakata Bays. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53, 773~787.
- Ishio, S., R.E. Mangidan, M. Kuwahara and H. Nakagawa. 1989. A bacterium hostile to flagellates: identification of species and characters. In *Red tides: Biology, Environmental Science and Toxicology*, Okaichi, D., M. Anderson and T. Nemoto, eds., Elsevier Sci. Publ., N.Y., pp205~208.
- Ithoh, K. and I. Imai. 1986. Grazing on *Chattonella marina* and production of fecal pellets by copepods. *Bull. Nansei Reg. Fish. Res. Lab.*, 20, 115~126 (in Japanese).
- Iwamoto, N., I. Imai and S. Uye. 1994. Seasonal fluctuation in abundance of bacteria, heterotrophic nanoflagellates, autotrophic nanoflagellates and nanodiatoms in Hiroshima Bay, the Inland Sea of Japan. *Bull. Plankton Soc. Japan*, 41(1), 31~42.
- Kamiyama, T. 1997. Growth and grazing response of tintinnid ciliates feeding on the toxic dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama*. *Mar. Biol.*, 128, 509~515.
- Kim, C.H., Y. Sako and Y. Ishida. 1993. Variation of toxin production and composition in axenic cultures of *Alexandrium catenella* and *A. Tamarense*. *Nippon Suisan Gakkaichi*, 59(4), 633~639.
- Kim, M.C. 1998. Molecular ecological studies on algicidal bacteria during the *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) red tide. Ph. D. Thesis. Kyoto Univ. 98 p.

- 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* (Rephudophyceae) bloom in Hiroshima Bay, Japan. Mar. Ecol. Prog. Ser., 170, 25~32.
- Kim, M.C., H.S. Yu, M.S. Ok, C.H. Kim and D.S. Chang. 1999. The activities and characteristics of algicidal bacteria in Chindong Bay. J. Korean Fish. Soc., 32(3), 359~367.
- Koch, A.L. 1994. Growth measurement. In *Methods for general and molecular biotechnology*. A., Soc. Microbiol., Washington, pp. 248~277.
- Kocur, M. 1986. Gram-positive Cocci. In *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. Vol. 2 ed. by J.G. Holt, P.A. Sneath, N.S. Mair and M.E. Sharpe, eds., Williams & Wilkins, pp. 1004~1008.
- Kocur, M., W.E. Kloos and K.H. Schleifer. 1992. The genus *Micrococcus*. In *The Prokaryotes*. 2nd ed., A. Balows, H.G. Truper, M. Dworkin, W. Harder and K.H. Schleifer, eds., Springer-Verlag, New York, pp. 1300~1311.
- Kogure, K., U. Simika and N. Taga. 1982. Bacterial attachment to phytoplankton in sea water. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 56, 197~204.
- Lee, W.J. and Y.T. Park. 1998. Isolation of marine bacteria killing red tide microalgae. II. Isolation and algicidal properties of *Pseudomonas* sp. LG-2 possessing killing activity for dinoflagellate, *Prorocentrum micans*. J. Korean Fish. Soc., 31(6), 852~858.
- Lovejoy, C., J.P. Bowman and G.M. Hallegraeff. 1998. Algicidal effects of a novel marine *Pseudoalteromonas* isolated (Class *Proteobacteria*, gamma subdivision) on harmful algal bloom species of the genera *Cattonella* and *Heterosigma*. Appl. Environ. Microbiol., 64(8), 2806~2813.
- MacFaddin, T.F. 1984. Biochemical tests for identification of medical bacteria. Williams & Wilkins, pp. 36~38.