

교육학석사 학위논문

유해성 침편모조류 *Chattonella marina*에 대한  
*Bacillus* sp. C-4의 살조 효과



2007년 8월

부경대학교 교육대학원

생물교육전공

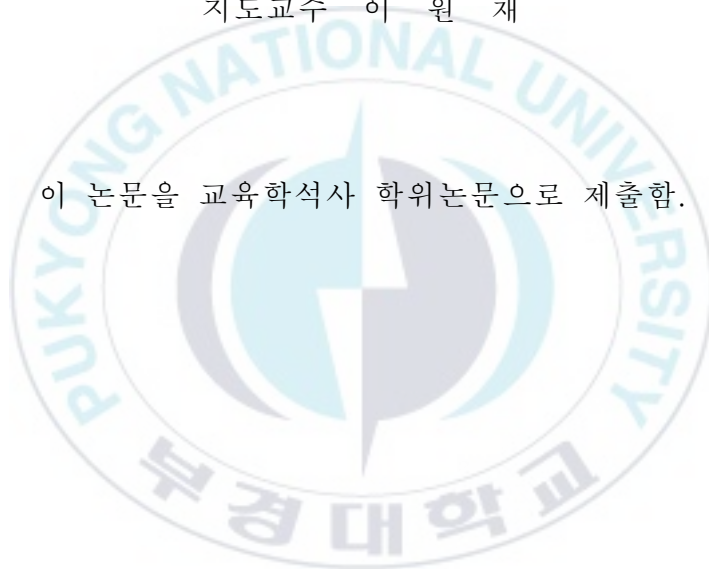
김수정

교육학석사 학위논문

유해성 침편모조류 *Chattonella marina*에 대한  
*Bacillus sp. C-4*의 살조 효과

지도교수 이 원 재

이 논문을 교육학석사 학위논문으로 제출함.



2007년 8월

부경대학교 교육대학원

생물교육전공

김수정

# 김수정의 교육학석사 학위논문을 인준함

2007년 8월 --일



주 심	이학박사	김 영 태	인
위 원	이학박사	이 명 속	인
위 원	농학박사	이 원 재	인

# 목차

Abstract	1
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 시료채취	4
2. 살조세균 분리	4
3. <i>Chattonella marina</i> 의 배양	4
4. 살조세균 동정	9
4.1. 형태적, 생화학적 test	9
4.2. 16s rRNA Gene Sequencing 분석	9
4.2.1. 시료로부터 total genomic DNA 분리	10
4.2.2. Primers 합성	10
4.2.3. PCR 반응	11
4.2.4. DNA 절편 정제 (Elution)	11
4.2.5. Ligation	12
4.2.6. Competent bacterial cell 준비	12
4.2.7. Transformation	12
4.2.8. Plasmid DNA mini-prep	13
5. 살조세균의 최적 증식조건과 성장곡선	13
6. <i>Chattonella marina</i> 에 대한 살조유형	13
7. 살조효과 측정	15
7.1. 살조율 측정	15
7.2. 살조세균의 성장단계에 따른 살조효과	16
7.3. 살조세균의 군수에 따른 살조효과	16

7.3. 배양여과액 농도에 따른 살조효과	16
8. 살조물질의 특성	16
8.1. 열 안정성	16
8.2. pH안정성	17
III. 결과 및 고찰	18
1. 살조세균 분리	18
2. 살조세균 동정	18
3. <i>Bacillus</i> sp. C-4의 최적 증식조건과 성장곡선	24
3.1. <i>Bacillus</i> sp. C-4의 최적 증식조건	24
3.2. <i>Bacillus</i> sp. C-4의 성장곡선	28
4. 살조유형	28
5. 살조효과	31
5.1. 성장 단계에 따른 살조효과	31
5.2. 균수에 따른 살조효과	32
5.3. 배양 여과액 농도에 따른 살조효과	32
6. <i>Chattonella marina</i> 의 살조과정	36
7. 살조물질의 특성	39
7.1. 열 안정성	39
7.2. pH 안정성	39
IV. 요약	42
V. 감사의 글	44
VI. 참고문헌	45

# **The Algicidal Effect of Bacteria, *Bacillus* sp. C-4 Against the Harmful Algae *Chattonella marina* (Raphidophyceae)**

Su-jeong Kim

Graduate School of Education  
Pukyong National University

## **Abstract**

In order to isolate the bioactive compounds exhibiting algicidal effects from the marine bacterium *Chattonella marina*, seawater was collected from the coastal water at Ulsan from June to October 2006. A total of 100 strains were isolated from the seawater samples. Seawater was filtered with the mesh having a 0.2  $\mu\text{m}$ . The mixed culture of *C. marina* was grown in f/2-Si medium and we successfully isolated bacteria which show a remarkable algicidal effects against *C. marina*. One strain of marine bacteria, showing strong algicidal activity for *C. marina*, was isolated by Cell Culture Insert. This microorganisms were tested by examining its morphological, biochemical properties. Also we have analyzed 16S rRNA gene sequencing for identification. Isolated strain was tentatively identified to be *Bacillus* sp. and designated as *Bacillus* sp. C-4.

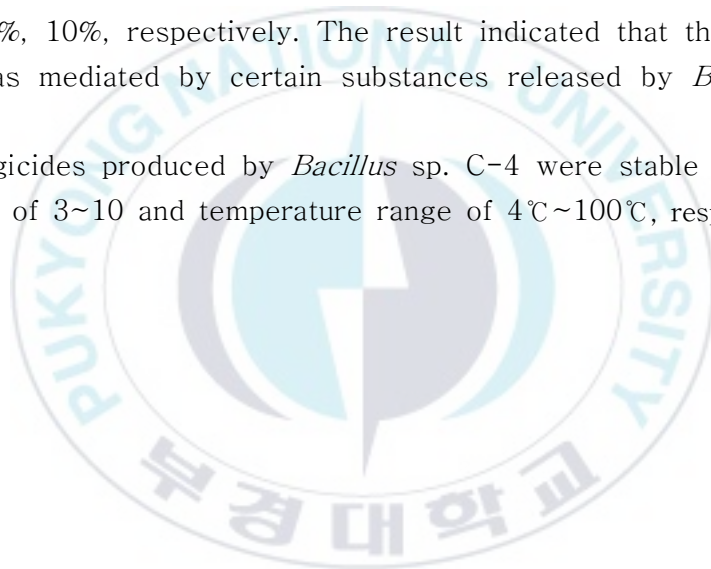
The optimum culture conditions of *Bacillus* sp. C-4 for growth and production of algicide against *C. marina* were initial pH 7, 3% NaCl and 200 rpm agitation at 30°C. And *Bacillus* sp. C-4 relatively grew in conditions which were 20 ~ 50°C, pH 5 ~ 9, NaCl 0 ~ 7%.

Algicidal activity of *Bacillus* sp. C-4 against *C. marina* was 99% at late log phase, 84% at early log phase, 60% at stationary,

respectively.

In cell densities, *C. marina*  $0.7 \times 10^3$  cells/ml was decreased to less than  $0.3 \times 10^3$  cells/mL within 18 hours after incubation of  $10^2$  *Bacillus* sp. C-4. *C. marina* were reduced by half within 6 hours after incubation of  $10^3$  *Bacillus* sp. C-4. In addition, the killing effects were increased in accordance with bacterial cell densities. Especially, the filtrate of algicidal bacterium culture (pore size, 0.1  $\mu$ m) revealed a dramatic effect in which *C. marina* were decreased to less than 50 cells/ml of culture within 42 hrs, 30 hrs, 25 hrs after incubations of the culture filtrate with the addition of concentration of 1%, 5%, 10%, respectively. The result indicated that the algicidal effect was mediated by certain substances released by *Bacillus* sp. C-4.

The algicides produced by *Bacillus* sp. C-4 were stable within the pH range of 3~10 and temperature range of 4°C~100°C, respectively.



# I. 서론

산업발달과 인구증가로 인한 연안해역의 부영영화는 범지구적인 현상이며, 이와 관련한 유해·유독 플랑크톤의 대발생(Harmful Algae Blooms, HABs)은 해양생태계 및 인류 건강에 상당한 위협을 주고 있다(Anderson, 1989; Hallegraeff, 1993). HABs 유해종인 침편모조류 *Chattonella marina* (Subrahmanyn)는 *Chattonella antiqua*와 함께 brevetoxins (BTX)계와 유사한 지용성 신경독을 생산하는 종으로(Onoue *et al.*, 1990; Ahmed *et al.*, 1995) 어류의 섭이와 호흡 시 유리지방산(free fatty acids)과 활성산소(reactive oxygen species)에 의한 지질 과산화작용으로 삼투압 장애를 불러 일으켜 어류를 폐사시킨다(Shimada *et al.*, 1983, Oda *et al.*, 1992, Marshall *et al.*, 2003, Tang *et al.*, 2005). 이와 같이 어류에 치명적일 수 있는 *C. marina*에 의한 적조는 인도 Malabar 연안에서 처음으로 발생하여 어류의 집단 폐사를 일으켰고(Subrahmanyan, 1954) 그 후 *C. marina*를 비롯한 *Chattonella*속은 일본의 부영양화된 내만해역을 중심으로 적조를 형성하여 막대한 수산피해를 발생시키고 있으며 (Imai *et al.*, 1986; Okaichi, 1989; Yamaguchi *et al.*, 1991; Hiroshi *et al.*, 2005), 이외에도 중국, 동아시아, 호주, 미국, 남부 브라질 그리고 네덜란드 등 범지구적인 출현양상과 대발생이 보고되고 있다(Tseng *et al.*, 1993; Obedrecht and Abreu, 1995; Vrieling *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2006). 이에 따라 최근, UNESCO 산하의 IOC에서는 *C. marina*를 국제적인 협력관리 및 주시대상 종에 해당하는 유해·유독 조류로 분류하고 있다.

Hara *et al.*(1994)에 따르면, 세계적으로 *Chattonella*속은 현재 *C. marina*를 비롯하여 *C. antiqua*, *C. globosa*, *C. minima*, *C. ovata*, *C. subsalsa* 및 *C. verruculosa* 등 7종이 보고되고 있다. 이 중 *C. marina*를 비롯해 *C. antiqua*, *C. globosa* 및 *C. ovata* 등 4종이 한국 연안에서 출현하고 있다고 보고되었다(Kim *et al.*, 2005). 우리나라에서의 *Chattonella*속에 대한 기록은 1983년 진동만에서 *Chattonella* 속에 의한 첫 적조가 보고 되었으나 (Park *et al.*, 1988) 적조에 의한 어패류의 폐사 등의 수산피해 기록은 없었다. 이후 *Chattonella*속 출현과 관련한 기록은 보이지 않다가, 2004년 이후 남해와 서



해를 중심으로 재차 출현이 확대·증가되는 양상을 나타내었다(Kim *et al.*, 2005). 특히 2005년 하계 한국 남서해역인 장흥연안과 완도 신지도 및 고흥 거금도 해역을 중심으로 *C. antiqua*가 고밀도로 출현(최대 850 cells/mL)하여 *Cochlodinium polykrikoides*와 함께 장기간에 걸친 혼합적조를 형성하였고, 2006년 하계 역시 *Chattonella* 속이 서해 태안군 안면도 일원에서 고밀도로 출현하여 (최대 3,000 cells/mL) 관련 수산업 종사자와 연구자들을 긴장시키고 있다.

자연 생태계에서 적조의 발생에서 소멸에 이르는 과정을 관찰해 보면 그 소멸 기간이 2~3일 사이에 급격히 일어나는 특징이 있으며, 이와 같은 현상은 물리·화학적으로 설명되어지지 않고 생물학적인 측면, 즉 바이러스 감염, 세균 및 균류, 다른 조류와의 경쟁, 동물 플랑크톤에 의한 포식 등이 적조 소멸에 관여하고 있다는 가능성이 보여지며, 적조의 소멸기에 원인생물을 사멸하는 세균군이 증가하는 현상(Fukami *et al.*, 1991; Yoshinaga *et al.*, 1995b)이 보고되었다. 또한 최근에는 단백질 합성저해제, 세균의 세포벽 저해제 및 세포막에 작용을 하는 항생제들을 사용하여 적조생물의 생존에 대한 연구도 보고되고 있다(Seo *et al.*, 2003).

한편, 미세조류가 증식 또는 분해되는 과정에서 배출하는 유기물(excreted organic matter, EOM)은 해양생태계에서 무시할 수 없는 양이며 (Mague *et al.*, 1980), 이들 유기물 중에는 세균의 증식촉진 혹은 항균물질이 함유되어 세균군집의 동태에 영향을 미치기도 하며, 마찬가지로 세균도 분해자로서의 역할 뿐만 아니라 미세조류의 증식 촉진 또는 저해물질을 분비하여 미세조류의 천이에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Cole, 1982). 최근, 해양환경에 서식하고 있는 이들 살조 세균을 응용하여, 농업분야에서 실용화 단계에 접어들고 있는 미생물농약과 같이, 환경친화적인 적조 방제법을 개발하려는 노력이 대두되고 있다(Ishida *et al.*, 1997). 이러한 관점에서 적조 생물을 사멸시키거나 증식을 저해하는 다양한 살조 세균이 연안 해역에 존재하고 있음이 여러 연구자들에 의해 밝혀지고 있다(Ishio *et al.*, 1989; Sakata *et al.*, 1991; Fukami *et al.*, 1992; Mitsutami *et al.*, 1992; Imai *et al.*, 1993, 1995; Yoshinaga *et al.*, 1995 a; Park *et al.*, 1998). 그러나 자연계에서 살조 세균의 동태 및 적조 조류의 소장과 살조 세균의 상호관계에 관한 연구는 극히 일부의 결과가 보고(Yoshinaga *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1998)되어 있을 뿐이다.

현재까지의 적조 생물의 구제 및 제거법으로는 화학 약품 살포법(Steidinger,

1983; Ryu *et al.*, 1998; Koji *et al.*, 1998), 황토 및 고분자 응집제 이용법 (Na *et al.*, 1996; Choi *et al.*, 1998) 등의 물리적, 화학적 방법이 연구되었고, 해양세균 및 바이러스의 살조 효과를 이용한 생물학적 방제에 대한 연구도 활발히 진행되고 있다 (Ishio *et al.*, 1989; Sakata *et al.*, 1991; Fukami *et al.*, 1992; Imai *et al.*, 1993; Yoshinaga 1998; Park *et al.*, 1998).

그 중 해양세균을 이용한 적조 방제에 관한 연구들을 살펴보면, 적조생물을 저해 혹은 사멸시키는 해양세균을 분리하여 생태학적 특징과 저해물질에 관한 보고로써 Sakata *et al.*(1991)이 *Chaetoceros ceratosporum*을 Imai *et al.*(1991)이 *Chaetoceros ceratosporum*을 Mitsutani *et al.*(1992)이 *Skeletonema costatum*을 Fukami *et al.*(1992)이 *Gymnodinium nagasakiense*을 Yoshinaga *et al.* (1997a)이 *Gymnodinium mikimotoi*를 사멸시키는 해양세균을 분리하였으며, 현장해수에서 적조생물과 살조세균의 동태에 관한 연구로는 Fukami *et al.*(1991), Yoshinaga *et al.*(1995b) 및 Kim *et al.*(1998)이 bioassay법을 이용하여 각각 *Chaetoceros ceratosporum*, *Chaetoceros mikimotoi*, *Heterosigma akashiwo* 등의 살조세균의 동태를 조사·보고하였다. 저해기작에 관한 연구에는 구체적으로 살조세균이 생산하는 대사산물로 적조생물을 살조시키는 기작으로 Ishio *et al.*(1989), Fukami *et al.*(1992) 등이 저분자량의 내열성 물질을 직접 분비함으로써 조류를 사멸시키는 *Pseudomonas aeruginosa*(Dakhama *et al.*, 1993)에 관한 연구가 보고되었으며, 직접 세균이 적조생물에 접촉하여 살조시키는 기작으로는 활주세균인 *Saprospira* sp.(Sakata 1990, 1991), *Cytophaga* sp. (Fukami *et al.*, 1992)에 대한 연구가 보고되었다. 이와 같이 해양미생물을 이용한 적조 방제 대책의 일환으로 외국에서는 살조세균에 관하여 많은 연구가 진행되어 조류를 사멸시키는 해양세균은 적조발생을 조절하는 중요한 행위자로서 적조의 급격한 소멸의 대책방법으로 이용될 수 있다고 제시된 바 있다.

따라서 본 논문은 적조대책의 일환으로, 해양환경에서 서식하고 있는 미생물을 이용하여 자연 생태조화형·환경친화적인 적조 방제법을 개발하려는 목적으로 적조 주요 원인 생물인 *Chattonella* 속을 살조시키는 세균을 분리하여 유해성 적조생물과의 상호관계를 파악하였으며, 우수한 살조능을 가진 살조세균의 살조 활성과 살조 기작, 살조 특이성을 연구함으로써 2차 오염이 없는 자연 생태조화형·환경 친화적인 적조 방제 기술의 기초 자료를 제공하여 적조로 인한 수산업의 피해를 줄이는 데 기여하고자 하였다.

# I. 재료 및 방법

## 1. 시료 채취

2006년 6월부터 10월까지 울진연안해역에서 해수 시료를 채취하였다 (Fig. 1). 세균 분리용 시료는 Niskin 개량형 채수기를 이용하여 180℃에서 2시간 건열 멸균한 광구병에 무균적으로 채수하였으며, 채수된 시료는 Ice-box에 보관하여 연구실로 옮겨 실험을 하였다.

## 2. 살조세균 분리

울진 연안 지역에서 채집한 모든 시료를 Fig. 2의 방법과 같이 pH 7.6으로 조절된 PPES-II (Taga, 1968) (Table 1) 평판배지에 십진법으로 희석하여 평판도말법(Buck and Cleverdon, 1960)으로 접종하여 25℃에서 1주일간 배양한 후 나타난 colony 중에서 특징적인 형태를 나타내는 colony를 모두 선별하여 순수분리 하였다. 분리한 각각의 colony의 *Chattonella marina*에 대한 살조능을 알아보기 위해 24 well microplate에 F/2-Si 배지에서 전배양한 *C. marina* 배양액( $10^3 \sim 10^4$  cells/ml) 1ml씩을 각각 분주하고 PPES-II 액체배지에서 전배양한 해양세균 배양액( $5 \times 10^3$  cells/ml)을 접종하여 *C. marina*에 대한 살조능이 가장 우수한 균주를 선별하였다.

## 3. *Chattonella marina*의 배양

실험에 사용한 *Chattonella marina*는 미세조류은행으로부터 분양받았다. *C. marina*의 배양은 25℃, pH 8.2, 6,000 lux의 조건으로(Noh *et al.*, 2006) f/2-Si배지(Guillard and Ryther, 1962; Guillard, 1975) (Table 1)를 사용하여 배양하였다.

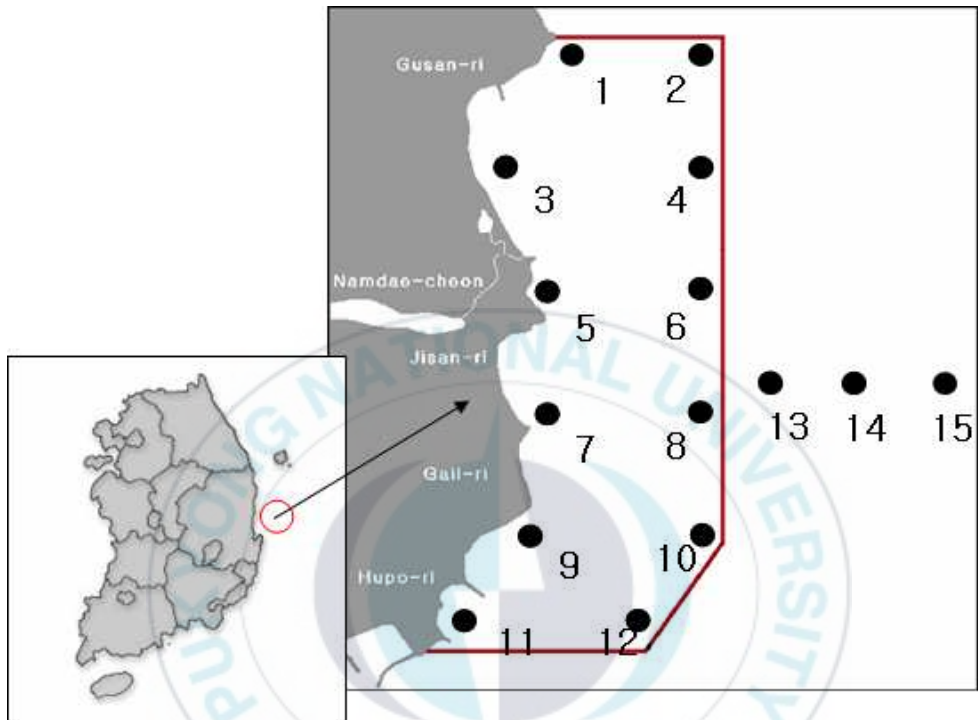


Fig. 1. Location of sampling stations in Uljin, Korea.

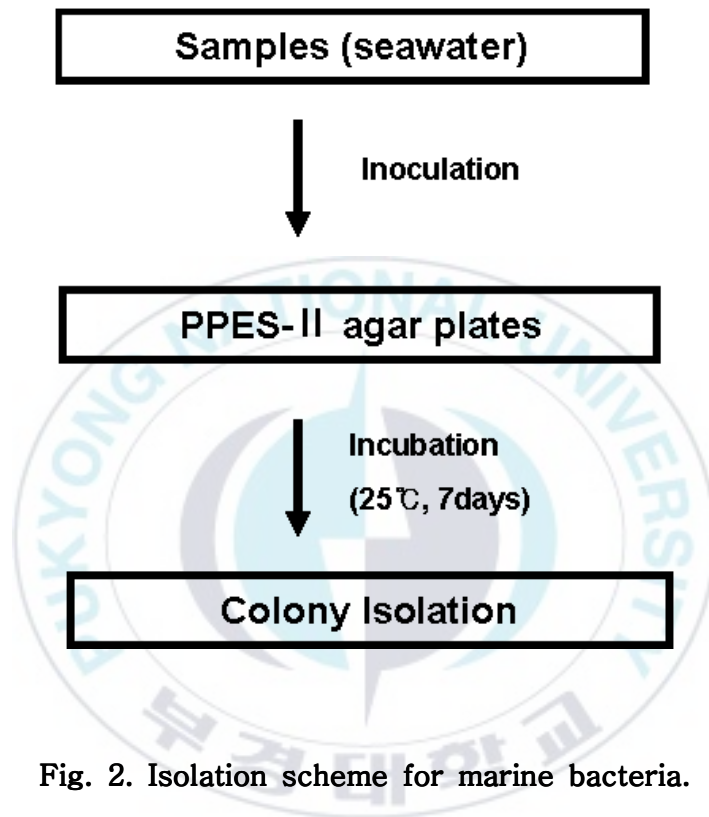


Fig. 2. Isolation scheme for marine bacteria.

**Table 1. 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)**

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

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

**(Guillard and Ryther, 1962 ; Guillard, 1975)**



*C. marina*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 배양하여 세균과 곰팡이 등을 제거한 후, 다시 항생제를 첨가하지 않은 새로운 f/2-Si 배지에서 계대배양하였다. 이와 같은 조작을 수회 반복하여 얻은 무균배양주를 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  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이였으며, 무균 검사에는 Nutrient Agar, PPES-II, STIO(저영양, 종속영양세균용 배지), YM Agar(Yeast용 배지), SDA(곰팡이용 배지)를 사용하였다.

## 4. 살조세균 동정

### 4.1. 형태적, 생화학적 test

선별한 살조세균을 형태적 특성을 알아보기 위해 선별한 살조세균을 PPES-II agar 사면배지에 접종하여 25°C에서 48시간동안 preculture시킨 후, 증식한 세균을 PPES-II broth가 20ml 포함된 100ml 삼각 플라스크에 접종하였고, shaking incubator에서 25°C, 200rpm으로 24시간 배양하였다. 대수증식기의 배양액을 사용하여 Microbiological Applications(Benson, 1990)의 방법으로 Gram staining을 수행하였으며 광학현미경(Zeiss Co. RMS 16)으로 검경하였고, 형태적인 특징을 관찰하였다. 분리균의 생화학적 특징을 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



선별된 살조세균의 동정을 위하여 선별된 균주의 16S rRNA gene sequencing 분석을 수행하였다.

#### 4.2.1. 세균으로부터 *total genomic DNA* 분리

AccuPrep™ Genomic DNA extraction kit(Bioneer)를 사용하여 total genomic DNA를 추출하였다. AccuPrep™ Genomic DNA extraction kit(Bioneer)를 이용한 bacterial genomic DNA 추출 방법은 다음과 같다. 멸균된 1.5 ml tube에 배양액 1 ml의 시료를 넣고 14,000 rpm에서 2분간 원심분리하여 침전시킨 다음, pellet을 취하여 200  $\mu$ l의 lysis buffer를 첨가하였다. 여기에 20  $\mu$ l의 proteinase K를 첨가하여 잘 혼합한 후, 56°C에서 1시간 반응시켰다. Cell이 완전히 lysis되고 나면 짧게 spin-down한 후, 200  $\mu$ l의 Binding buffer를 시료에 넣고 60°C에서 10분간 반응시켰다. 반응이 끝난 tube에 100  $\mu$ 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  $\mu$ l의 Washing buffer 1을 넣고 8,000 rpm에서 1분간 원심분리하고 여기에 500  $\mu$ 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  $\mu$ 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.

#### 4.2.2. 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

#### 4.2.3. PCR 반응

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

#### 4.2.4. DNA 절편 정제

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  $\mu$ l를 넣고 50°C에서 5분간 gel을 녹였다. gel이 완전히 녹은 것을 확인한 후, glass milk 8  $\mu$ 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  $\mu$ l를 넣고 pipetting으로 씻고, 5초간 centrifuge하여 pellet를 취하였으며 씻어내는 과정을 2회 하였다. 남아있는 alcohol을 날려버리기 위해 vacuum에서 5-10분간 방치하였다. 이를 다시 45°C에서 3분간 방치하고 나서 3차 증류수를 20  $\mu$ l를 넣고 섞어준 후, 14,000 rpm에서 1분간 centrifuge하여 상등액을 취하였다. 상등액 1  $\mu$ l을 취하여 1% agarose gel에서 전기영동하여 band를 확인하였다.

#### 4.2.5. Ligation

정제된 16S rDNA의 PCR 반응물을 pGEM-T vector(Promega)에 연결하였다. DNA 3  $\mu$ l, T vector 1  $\mu$ l, ligase 1  $\mu$ l, buffer(2X) 5  $\mu$ l를 사용하여 volume을 10  $\mu$ l로 맞춘 후에 상온에서 2시간 반응시켰다.

#### 4.2.6. Competent bacterial cell의 준비

LB agar 배지에 키운 *E. coli* XL-1 Blue를 3 ml의 LB 액체배지에 접종하여 37°C에서 하룻밤 진탕배양하고, 이를 다시 10 ml coning tube에 4 ml의 LB 액체배지에 재접종하여 37°C에서 하룻밤 배양하였다. 배양된 균의 1 ml를 취하고 5000 rpm에서 5분간 centrifuge하여 상등액을 버리고, 침전된 세포들을 4°C로 냉각된 800  $\mu$ l의 CaCl<sub>2</sub>(50 mM)를 넣고 ice에서 20분간 resuspension 하였다. 이를 다시 5000 rpm에서 3분간 centrifuge하여 상등액을 버리고, 200  $\mu$ l의 CaCl<sub>2</sub>(50 mM)를 넣고 resuspension하여 사용하였다.

#### 4.2.7. Transformation

10  $\mu$ l의 ligation 반응물을 미리 준비한 200  $\mu$ l의 XL1-blue competent cell과 혼합하여 ice에 30분간 방치한 후, 42°C에서 90초간 heat shock를 주고 재빨리 ice에서 5분간 방치하였다. 이를 LB배지 800  $\mu$ l를 첨가하여 37°C에서 45분 동안 진탕배양하였다. 이를 다시 5000 rpm에서 3분간 centrifuge하여 상등액을 버리고 LB 배지 200  $\mu$ l를 넣어 resuspension 하였다. 이를 Amp가 첨가된 Mackonkey agar 배지에 도말하여 37°C 배양기에 18시간 배양한 다음, 4°C에 두어 색깔이 확실해지면 white colony만을 선택하여

LB(Amp+) broth에 접종하여 plasmid를 mini-prep 하였다.

#### 4.2.8. Plasmid DNA mini-prep.

Plasmid DNA는 alkaline lysis mini-prep방법(Sambrook, 1989)으로 분리하고 제한효소로 잘라 삽입된 DNA 절편을 확인하였다. 확인된 plasmid는 RNase를 처리하고 phenol : chloroform 정제과정을 거쳐 OD<sub>260</sub>에서 농도를 측정 한 다음 염기서열 분석에 사용하였다.

### 5. 살조세균의 최적증식조건과 성장곡선

최종 선별된 균주의 성장에 미치는 최적 온도, pH, NaCl 농도를 측정하였다. 온도는 4, 10, 20, 25, 30, 37, 50℃, pH는 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0으로 NaCl 농도는 0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 10.0%로 조정하고 PPES-II 배지에서 전배양한 살조세균의 배양액을 취하여 새로운 PPES-II 배지에 각각 접종하여 18시간 배양 후 균의 증식을 분광광도계(Shimadzu UV-160)를 이용하여 660nm에서 흡광도를 조사하였다. 각 대상 실험구를 제외한 모든 배양조건은 25℃, pH 7.0, 3.0% NaCl, 200rpm으로 하였다.

성장곡선은 조사된 최적 배양조건으로 PPES-II 액체배지에 접종하여 암 환경에서 교반(180rpm)배양하면서 매 3시간마다 660nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 6. *Chattonella marina* 에 대한 살조 유형

살조세균의 *C. marina* 에 대한 살조 유형을 조사하기 위하여 24 well microplate에 pore size 0.2  $\mu$ m의 Cell Culture Insert(FALCON, USA)를 삽입한 2조배양계(Fig. 3)를 이용하였다.

Cell Culture Insert 내부에 f/2-Si 배지에서 전배양한 *C. marina* 배양액 ( $1.2 \times 10^3$  cell/ml) 1ml를 넣고, Cell Culture Insert 외부에는 f/2-Si 배지

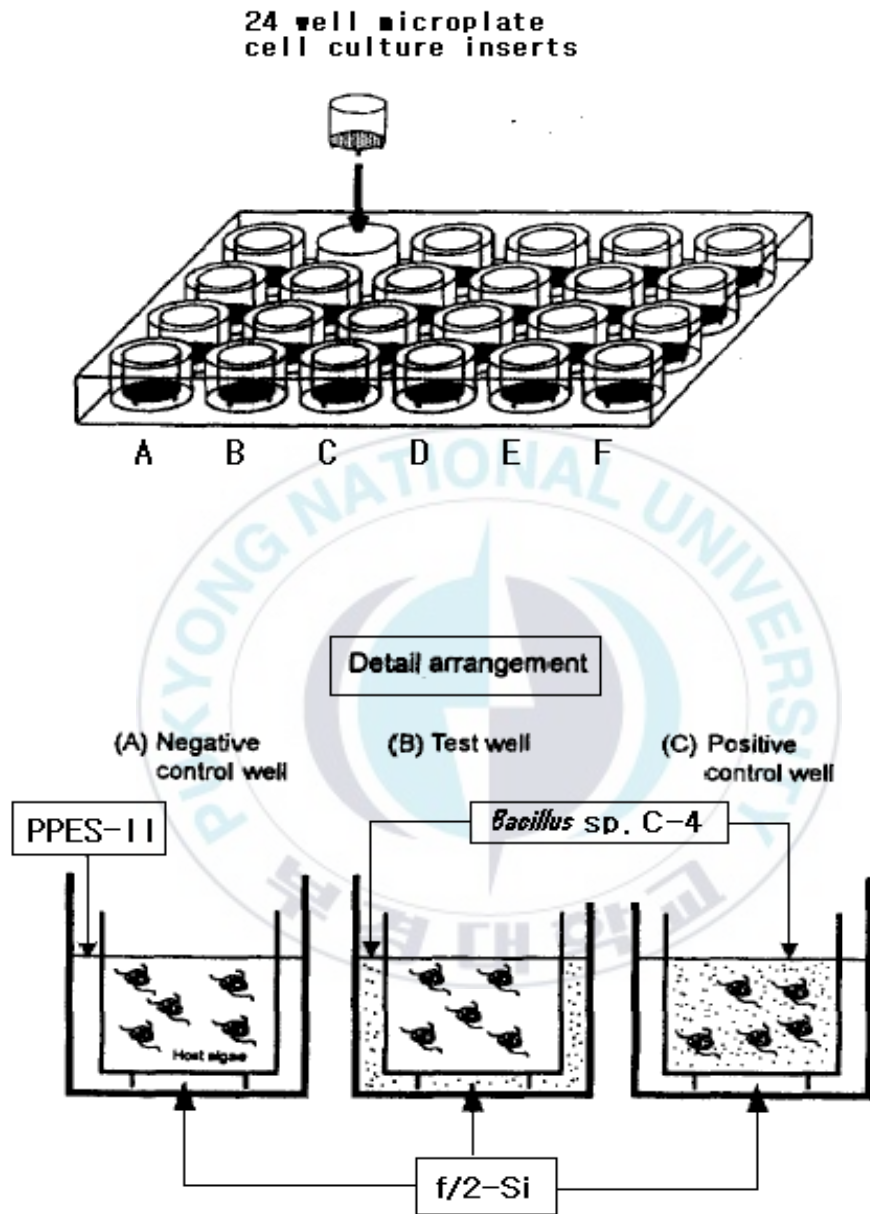


Fig. 3. Cell culture insert for study algalicidal type.

1 ml를 넣었다. PPES-II 액체배지에서 전 배양한 살조세균( $10^3$  cell/ml) 1 ml를 Cell Culture Insert 외부에 넣은 것을 test well로 하고, cell culture 내부에 살조세균을 첨가한 well을 positive control로 하였다. 그리고 Cell Culture Insert 내부에 살조세균을 첨가하는 대신에 PPES-II 액체배지만을 첨가하여 negative control로 하였다. 모든 well은 *C. marina*의 배양 조건 (25°C, 6,000lux)에서 배양하였다. 이때 Cell Culture Insert 내부의 세균 오염 여부는 Cell Culture Insert 내부의 배양액을 취해 DAPI(4', 6-diamidino-2-phenylindole)염색 후 형광현미경(Olympus BX40)하에서 직접 관찰하였다(Porter and Feig, 1980).

## 7. 살조효과 측정

### 7.1. 살조율 측정

25°C에서 PPES -II 액체배지에 18시간 배양한 대수증식기에 있는 살조세균 배양액을 f/2-Si 배지에서 9일 정도 배양하여 가장 활성이 좋을 때인 대수증식기에 있는 *C. marina* 배양액( $1.2 \times 10^3$  cell/ml)에 1%가 되도록 접종하거나 또는 최적조건으로 배양한 살조세균 배양액을 원심분리(8,000×g, 10min)하여 상등액을 pore size 0.1 μm polycarbonate membrane filter로 여과한 후 *C. marina* 배양액( $1.2 \times 10^3$  cell/ml)에 1%가 되도록 접종하여 25°C, 6,000lux 의 조건하에서 배양하여 살조력을 측정하였다. 배양액을 첨가하지 않고 계속 배양한 것을 control로 하였으며, 이 때 control에는 배양액 대신 동량의 f/2-Si 배지를 넣어 주었다. 살조력은 *C. marina*의 생존상태를 광학현미경하에서 관찰하여 48시간 후에 살아있는 *C. marina* 세포수를 counting하는 bioassay법으로 측정하였으며 아래와 같이 구하였다(Jeong *et al.* 1999).

$$\text{Algicidal activity(\%)} = \left(1 - \frac{tc}{cc}\right) \times 100$$

( tc : cell number of test tube, cc : cell number of control )



## 7.2. 살조세균의 성장단계에 따른 살조효과

살조세균의 성장단계 살조활성을 알아보기 위하여 살조세균을 PPES-II 액체배지에 접종하여 최적 조건에서 일정 시간 배양하면서 균의 증식과 살조활성을 실험하였다. 즉, 대수증식기의 활성이 높은 *C. marina* 배양액( $1.2 \times 10^3$  cells/ml) 100ml에 PPES-II 액체배지에서 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36시간 배양한 *Bacillus* sp. C-4 배양액을 각각 1ml씩 접종하여 48시간 배양 후 살조력(Algicidal activity)을 조사하였다.

## 7.3. 살조세균의 균수에 따른 살조효과

f/2-Si 배지에서 배양시킨 대수증식기의 *C. marina* 배양액( $0.7 \times 10^2$  cells/ml)에 살조세균의 초기 세균밀도가  $10^2$ 과  $10^3$  cell/ml이 되도록 접종하여 *C. marina*에 대한 살조효과와 *C. marina*의 생존개체수 변화를 측정하였다. 살조세균을 접종하지 않고 f/2-Si 배지만을 넣어준 *C. marina* 배양액을 control로 하였다.

## 7.4. 배양여과액 농도에 따른 살조효과

살조세균의 배양 여과액 농도에 따른 살조효과를 조사하기 위하여 PPES-II 액체배지에서 대수증식기의 살조세균을 원심분리(8,000 rpm)후 상등액을 취하여 멸균된 0.1  $\mu$ m polycarbonate filter로 여과한 여과액을 *C. marina*( $0.7 \times 10^2$  cells/ml)의 배양액에 각각 1, 5, 10%의 농도로 첨가하여 *C. marina*에 대한 살조효과를 조사하였다. 이 때 control에는 f/2-Si 배지를 1, 5, 10%가 되도록 첨가하였다.

## 8. 살조 물질의 특성 조사

### 8.1. 열 안전성

살조세균이 생산하는 물질의 열 안정성을 알아보기 위해서, PPES-II 액체배지에서 배양한 대수증식기의 살조세균 배양액을 원심분리(8,000rpm) 후 상등액을 취하여 멸균된 0.1  $\mu$ m polycarbonate membrane filter로 여과한 여과액을 4, 20, 30, 40, 60, 870, 100 $^{\circ}$ C에서 한 시간 처리 후, 대수증식기의 *C. marina*( $1.2 \times 10^3$  cell/ml)에 5%가 되도록 첨가하여 시간에 따른 살조효과를 조사하였다. 이 때 control에는 f/2-Si 배지를 위와 같은 조건으로 5%가 되도록 첨가하였다.

## 8.2. pH 안정성

살조세균이 생산하는 물질의 pH 안정성을 알아보기 위해서, 최적조건에서 배양한 살조 세균 배양 여과액의 pH를 3, 4, 5, 8, 9, 10으로 조절하여 24시간 동안 실온에 정치한 후 다시 pH를 8.0으로 조절하여 살조력을 측정하였다. 이 때 50mM sodium phosphate buffer(pH 2.0 ~ 5.0)와 50mM sodium phosphate butter(pH 6.0 ~ 13.0)를 사용하여 조정하였다. 이를 대수증식기의 *C. marina*( $1.2 \times 10^3$  cell/ml)에 5%가 되도록 첨가하여 시간에 따른 살조효과를 조사하였다. 이 때 control에는 f/2-Si 배지를 위와 같은 조건으로 5%가 되도록 첨가하였다.



### Ⅲ. 결과 및 고찰

#### 1. 살조세균 분리

본 연구에서는 울진 근해에서 채수한 해수를 pH 7.6으로 조절된 PPES-II 평판배지에 십진법으로 희석하여 평판도말법으로 접종하여 20℃에서 1주일간 배양한 후 나타난 colony 중 특징적인 형태를 나타내는 100여종의 colony를 선별하였다. 이들 선별된 해양미생물들 중에서 *C. marina*에 대한 살조능을 보이는 균주를 5종 분리하였고 이 중 가장 살조능이 뛰어난 균주 1종을 선택하였고 이를 C-4라고 임시 명명하였다.

#### 2. 살조세균 동정

선별된 C-4는 그람 양성 간균(Fig. 4)이며 생화학 test를 수행한 결과는 Table 3과 같다. 즉, Fructose, ramnose, galactose, mannose, mannitol, sucrose, glucose, salicine, maltose, sorbitol, adonitol, arginine, lysine, ornithine, citrate, oxidase, catalase 반응에서 양성을 나타내었으나 xylose, inositol, lactose, arabinose 등에는 음성을 나타내었다.

보다 정확한 동정을 위해 16S rRNA gene sequencing 분석을 통한 분자생물학적 동정을 실시하였다. Moyer 등(1994)에 의해 고안된 degenerate primer를 사용하여 PCR 반응물을 제작하였다. 이를 PCR한 후, 1% agarose gel에서 16S rRNA gene의 크기인 약 1.4kb의 band를 확인할 수 있었다. 선별한 균주에 대한 염기 서열 결과를 Genbank의 16S rRNA gene database에서 분석하여 가장 상동성이 높은 균주의 염기서열과 비교하여 나타낸 결과는 Fig. 5와 같았다. 분리된 균주는 *Bacillus atrophaeus*(ATCC 51189; EF188847)와 가장 유사한 상동성으로 99.7%의 상동성을 보였으며 *B. mojavensis*(IFO15718; AB021191)와는 99.3%의 상동성을 나타내었다. 또한 분석한 염기서열을 이미 밝혀진 균주의 염기서열과 비교하여 MEGA 2.1 package를 사용하여 계통도를 나타낸 결과는 Fig. 6과 같다.

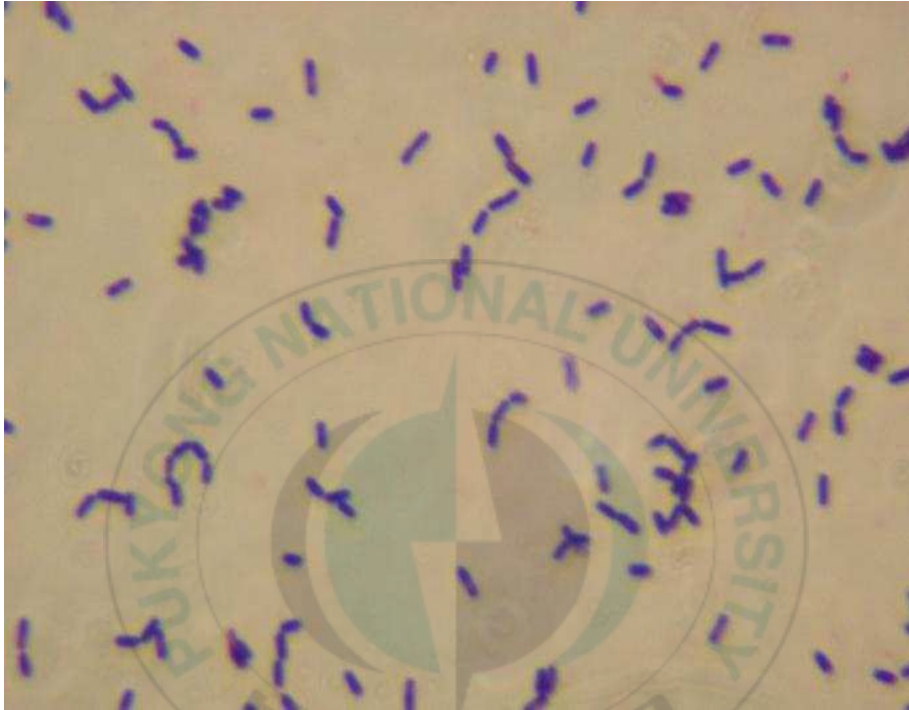


Fig. 4. Gram staining of *Bacillus* sp. C-4( × 1,000).

**Table 3. Biological and physiological characteristics of *Bacillus* sp. C-4**

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	K/K
Glucose	+	O/F	+/-
Salicin	+	Oxidase	+
Maltose	+	Catalase	+
Sorbitol	+		

*Bacillus* sp.C-4 --AGAATCTTAG-ACATGCAAGTCGAGCGAACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAG 57  
*B. atrophaeus* CGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAG 60  
 \* \* \* \* \*

*Bacillus* sp.C-4 CGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAA 117  
*B. atrophaeus* CGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAA 120  
 \* \* \* \* \*

*Bacillus* sp.C-4 ACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTGTTGAATCGCATGGTTCAAACATAAAAAGGTGGCTTC 177  
*B. atrophaeus* ACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTGTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAAGGTGGCTTC 180  
 \* \* \* \* \*

*Bacillus* sp.C-4 GGCTACCACCTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACC 237  
*B. atrophaeus* GGCTACCACCTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACC 240  
 \* \* \* \* \*

*Bacillus* sp.C-4 AAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG 297  
*B. atrophaeus* AAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG 300  
 \* \* \* \* \*

*Bacillus* sp.C-4 CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGG 357  
*B. atrophaeus* CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGG 360  
 \* \* \* \* \*

*Bacillus* sp.C-4 AGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAA 417  
*B. atrophaeus* AGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAA 420  
 \* \* \* \* \*

*Bacillus* sp.C-4 CAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAAC 477  
*B. atrophaeus* CAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAAC 480  
 \* \* \* \* \*

*Bacillus* sp.C-4 TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAATACGTAGGTG-CAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGT 536  
*B. atrophaeus* TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAATACGTAGGTG-CAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGT 540  
 \* \* \* \* \*

*Bacillus* sp.C-4 AAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGG 596  
*B. atrophaeus* AAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGG 600  
 \* \* \* \* \*

*Bacillus* sp.C-4 GTCATTGGAACCTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGG 656  
*B. atrophaeus* GTCATTGGAACCTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGG 660  
 \* \* \* \* \*

*Bacillus* sp.C-4 TGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGCGACTCTCTGCTGTGTAAGT 716  
*B. atrophaeus* TGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGCGACTCTCTGCTGTGTAAGT 720  
 \* \* \* \* \*

*Bacillus* sp.C-4 GACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCC 776  
*B. atrophaeus* GACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCC 780  
 \* \* \* \* \*

*Bacillus* sp.C-4 GTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTCCGCCCTTAGTGTGACGCTAACGCAT 836  
*B. atrophaeus* GTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTCCGCCCTTAGTGTGACGCTAACGCAT 840  
 \* \* \* \* \*

*Bacillus* sp.C-4 TAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGATTGACGGGGG 896  
*B. atrophaeus* TAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGATTGACGGGGG 900  
 \* \* \* \* \*

*Bacillus* sp.C-4 CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTC 956  
*B. atrophaeus* CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTC 960  
 \* \* \* \* \*

```

Bacillus sp.C-4      TTGACATCCTCTGACAACCCCTAGAGATAGGGCTTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTG 1016
B. atrophaeus      TTGACATCCTCTGACACCCCTAGAGATAGGGCTTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTG 1020
*****

Bacillus sp.C-4      GTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGAACGAGCGCA 1076
B. atrophaeus      GTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGAACGAGCGCA 1080
*****

Bacillus sp.C-4      ACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTAGGCACCTCTAAGGTGACTGCCGGGACAAA 1136
B. atrophaeus      ACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTAGGCACCTCTAAGGTGACTGCCGGTACAAA 1140
*****

Bacillus sp.C-4      CCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCTAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACAG 1196
B. atrophaeus      CCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCTAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACAG 1200
*****

Bacillus sp.C-4      TGCTACAATGGACAGAACAAGGGCAGCGAGACCGGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATC 1256
B. atrophaeus      TGCTACAATGGACAGAACAAGGGCAGCGAGACCGGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATC 1260
*****

Bacillus sp.C-4      TGTTCCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGTAGTAAT 1316
B. atrophaeus      TGTTCCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGTAGTAAT 1320
*****

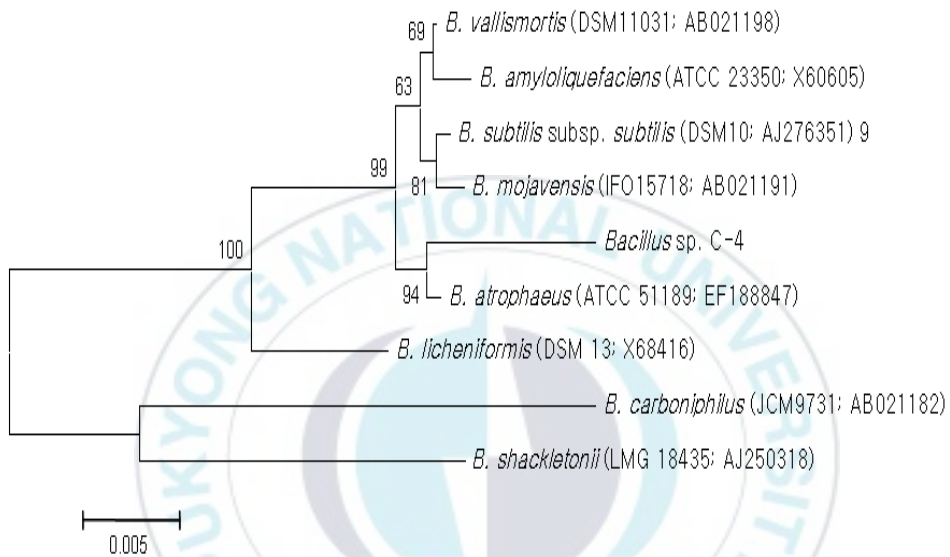
Bacillus sp.C-4      CGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACAC 1376
B. atrophaeus      CGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACAC 1380
*****

Bacillus sp.C-4      CACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAGCCAGCCCGGAAG 1436
B. atrophaeus      CACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAGCCAGCCCGGAAG 1440
*****

Bacillus sp.C-4      GTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAACCGGATCCAC 1484
B. atrophaeus      GTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAAGCCG----- 1481
*****

```

Fig. 5. Alignment 16S rRNA gene sequences of *Bacillus atrophaeus* (ATCC 51189; EF 188847) and *Bacillus* sp. C-4.



**Fig. 6.** Phylogenetic tree of *Bacillus* sp. C-4.

이상의 내용을 분석한 결과 분리된 균주는 *Bacillus*속에 포함되는 것을 알 수 있었으며 따라서 C-4 균주를 *Bacillus* sp. C-4라고 최종적으로 명명하였다.

### 3. *Bacillus* sp. C-4의 최적 증식조건과 성장곡선

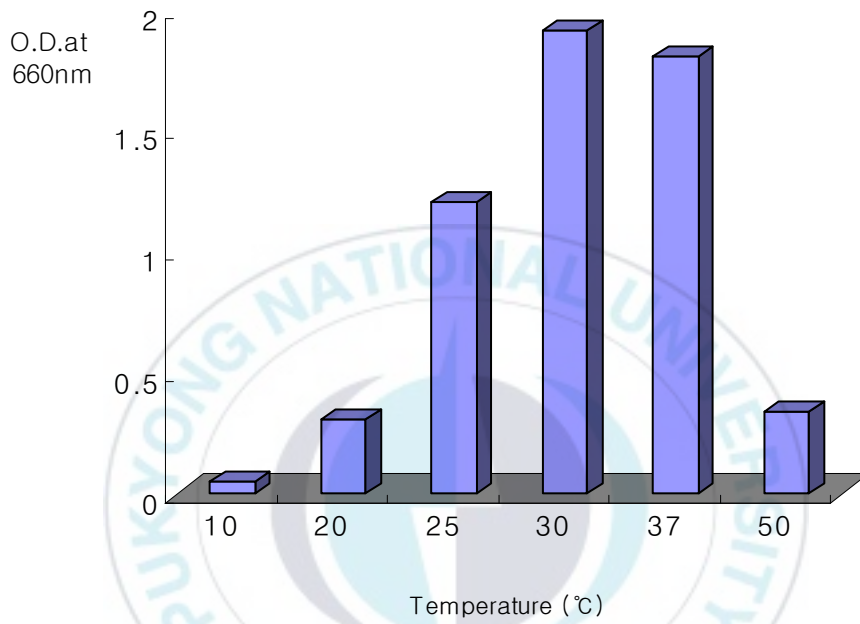
#### 3.1. *Bacillus* sp. C-4의 최적 증식조건

PPES-II 배지에서 전배양한 *Bacillus* sp. C-4 의 배양액을 1ml씩 취하여 새로운 PPES-II 배지에 접종하여 각 온도구간을 4, 10, 20, 25, 30, 37, 50°C로 설정하여 18시간 배양한 후 660nm에서 흡광도를 조사한 결과를 Fig. 7에 나타내었다. 이때의 배양조건은 pH 7.0, 3.0% NaCl, 200rpm으로 교반 배양하였다. *Bacillus* sp. C-4 의 최적 온도는 30°C였으며, 20~50°C에서 증식이 가능하였으나, 10°C 이하에서는 증식이 원활하지 못했다.

PPES-II 배지에서 전배양한 *Bacillus* sp. C-4 의 배양액을 1ml씩 취하여 pH를 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0으로 설정한 새로운 PPES-II 배지에 접종하여 18시간 배양한 후 균의 증식을 660nm에서 흡광도를 조사한 결과를 Fig. 8에 나타내었다. 이때의 배양 조건은 온도 30°C, 3.0% NaCl, 200rpm으로 교반배양하였다. *Bacillus* sp. C-4 는 pH 7.0에서 가장 증식이 잘되었으며, pH 4.0~10.0에서 증식이 가능하였다.

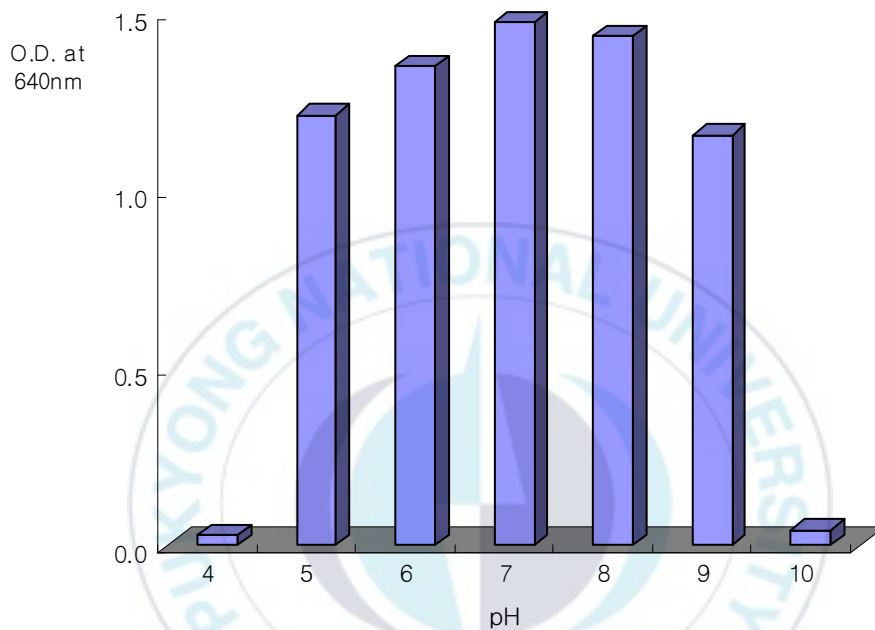
PPES-II 배지에서 전배양한 *Bacillus* sp. C-4 의 배양액을 1ml씩 취하여 NaCl를 0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 10.0으로 조절한 새로운 PPES-II 배지에 접종하여 18시간 배양한 후 660nm에서 흡광도를 조사한 결과를 Fig. 9에 나타내었다. 이때의 배양 조건은 온도 30°C, pH 7.0, 200rpm으로 교반배양하였다. *Bacillus* sp. C-4 는 2.0% NaCl 농도에서 최대 성장능을 보였으며, 0~10.0%까지 상당히 넓은 범위에서도 성장이 가능하여 담수뿐만 아니라 고염농도에서도 견디는 광염성 세균으로 해양 환경에 적응력이 높을 것으로 사료된다.



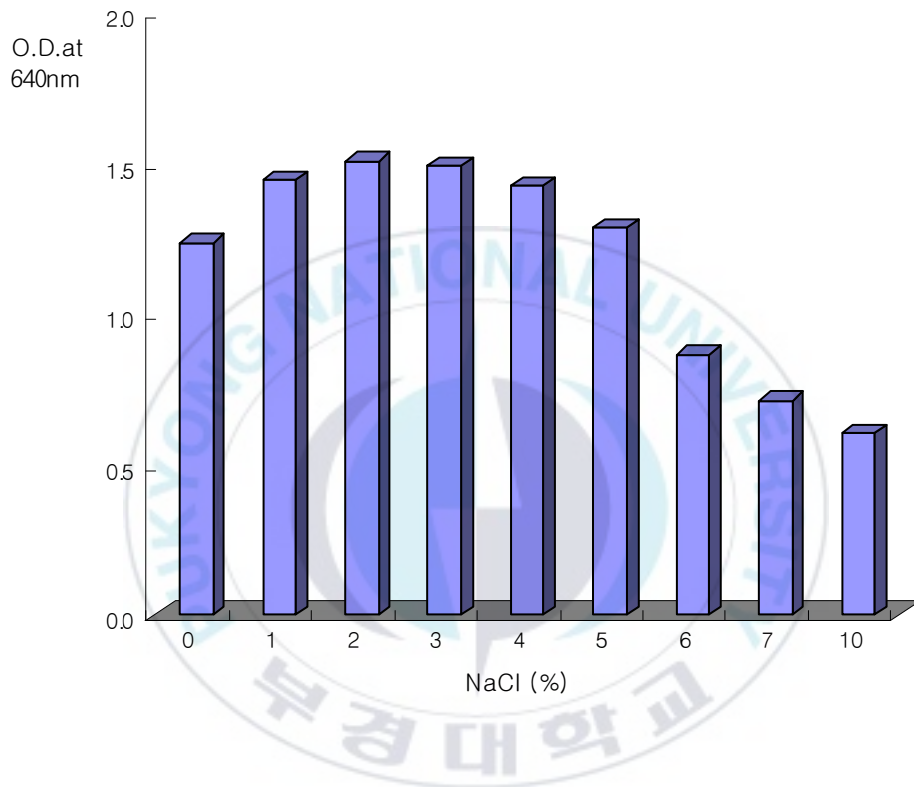


**Fig. 7.** Effects of temperature on the growth of *Bacillus* sp. C-4 after 24hours incubation in PPES-II medium(pH 7, 3% NaCl, 200rpm).





**Fig. 8.** Effects of pH on the growth of *Bacillus* sp. C-4 after 24hours incubation in PPES-II medium(30°C, 3% NaCl, 200rpm).



**Fig. 9.** Effects of NaCl on the growth of *Bacillus* sp. C-4 after 24hours incubation in PPES-II medium(30°C, pH 7, 200rpm).

### 3.2. *Bacillus* sp. C-4의 성장 곡선

이상의 실험 결과, *Bacillus* sp. C-4 는 30°C, pH 7.0 2.0% NaCl농도에서 200rpm으로 교반배양시 가장 높은 성장률을 보였다. 따라서 위의 최적조건 하에서 *Bacillus* sp. C-4 의 성장 곡선을 알아보았다. 최적 조건에서 *Bacillus* sp. C-4 는 6시간 정도의 유도기를 거친 후 대수증식기로 접어들어, 20시간 후 완전히 성장하여 서서히 정지기로 접어들었다(Fig. 10).

## 4. 살조 유형

*Bacillus* sp. C-4가 적조 생물에 직접 부착하여 죽이는 직접 공격형인지를 살조인자 분비형인지를 실험한 결과를 Table 5에 나타내었다. Cell Culture Insert 내부에 *C. marina*와 *Bacillus* sp. C-4를 함께 접종한 positive control well에서는 *C. marina*가 사멸되었지만, *Bacillus* sp. C-4 배양액 대신에 세균 배지인 PPES-II 액체배지만을 접종한 negative control well에서는 *C. marina*가 사멸되지 않았고 *Bacillus* sp. C-4가 0.2  $\mu$ m filter에 의해 *Chatonella* sp.와 격리된 상태인 test well에서도 *Chatonella* sp.를 살조시켰다. test well의 cell culture insert 내부의 배양액을 취해 DAPI(4', 6-diamidino-2-phenyl-indole) 염색 후 형광현미경하에서 관찰하였으나 *Bacillus* sp. C-4 는 검출되지 않았다. 따라서 *Bacillus* sp. C-4 는 살조 물질을 세포외로 분비하는 살조인자분비형으로 확인되었다.

지금까지 여러 연구자들에 의해 보고된 살조세균은 조류 세포에 직접 부착 또는 접촉하여 살조하는 직접 공격형과 살조 물질을 생산, 분비하여 대사산물에 의해 적조생물을 살조시키는 살조인자 분비형으로 크게 나눌 수 있다. 직접공격형으로는 주로 활주세균인 *Cytophaga*속(Imai *et al.*, 1991, 1993; Mitsutani *et al.*, 1992)과 역시 활주세균인 *Saprospira*속(Sakata *et al.*, 1991; Sakata and Yasumoto, 1991)등이 있으며, 이 세균들은 규조류 및 와편모조류에 광범위하게 살조활성을 가진다. 살조인자 분비형으로는 주로 진정세균인 *Flavobacterium* 속, *Alteromonas* 속과 *Pseudomonas* 속 등이 보고되어 있다(Fukami *et al.*, 1992; Mitsutani *et al.*, 1992; Yoshinaga *et*

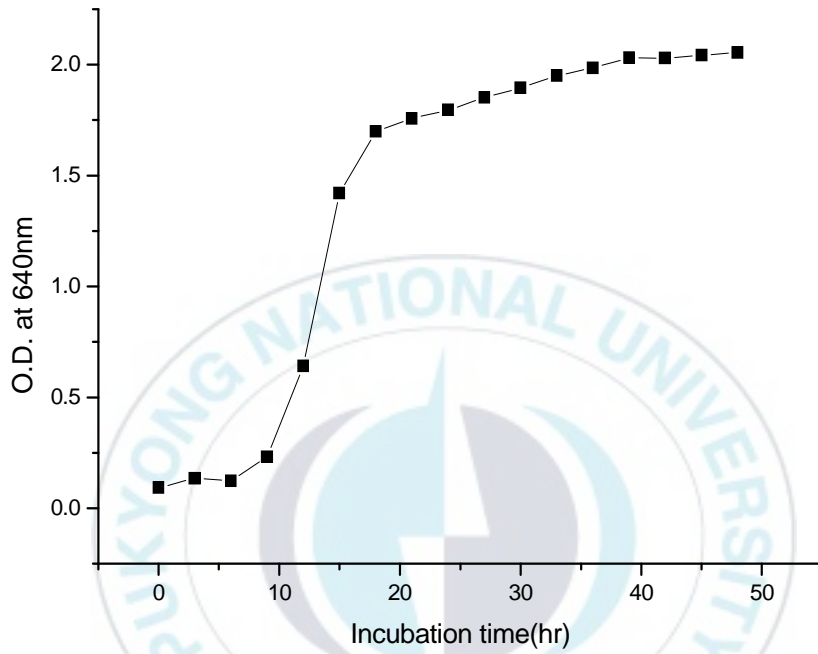


Fig. 10. Time course on the growth of *Bacillus* sp. C-4 at optimum culture conditions(30°C, pH 7, 2% NaCl, 200rpm) in PPES-II medium.

Table 5. Death of *C. marina* inside Cell Culture Insert by *Bacillus* sp. C-4

(A) Negative control well	(B) Positive control well	(C) Test well
-	+	+

*al.*, 1995a). 지금까지 해양에서 분리된 살조세균들의 살조 유형을 분석해보면 활주세균은 직접공격형이 많았고,  $\gamma$  - Proteobacteria군 세균과 진정 세균에 속하는 세균은 살조인자 분비형이 많은 경향을 보였으며, 직접공격형은 살조 특이성이 낮고, 살조인자 분비형은 살조특이성이 높은 영향을 보였다.(Ishio *et al.*, 1989; Imai *et al.*, 1991, 1993, 1995; Mitsutani *et al.*, 1992, 1993; Yoshinaga *et al.*, 1995a; Kim *et al.*, 1998).

## 5. 살조효과

### 5. 1. *Bacillus* sp. C-4 의 성장단계에 따른 살조효과

*Bacillus* sp. C-4의 성장단계에 따른 살조활성을 알아보기 위하여 *Bacillus* sp. C-4를 PPES-II 액체배지에 접종하여 최적 조건에서 일정 시간 배양하면서 균의 증식과 살조효과를 실험하였다. 즉, 대수증식기의 활성이 높은 *C. marina* 배양액( $1.2 \times 10^3$  cells/ml) 100ml에 PPES-II 액체배지에서 3시간 간격으로 36시간까지 배양한 *Bacillus* sp. C-4 배양액을 각각 1ml 씩 접종하여 48시간 배양 후 살조효과를 조사하였다. *Bacillus* sp. C-4의 성장 단계에 따른 살조력은 대수증식기 후기, 대수증식기 전기, 정지기, 유도기 순으로 높게 나타났다. 대수증식기 후기의 *Bacillus* sp. C-4는 *C. marina*를 99% 살조시켰으며, 대수증식기 전기에는 84%, 정지기에는 60% 살조력을 보였지만 유도기때에는 10%이하의 살조력을 보였다(Fig. 11). 즉, *Bacillus* sp. C-4 는 유도기를 거쳐 대수증식기 초기에 살조 물질을 생성, 분비하기 시작하여 대수증식기 후기에 살조력이 최대에 도달한 후 정지기에 약간 감소하였다.

### 5. 2. *Bacillus* sp. C-4의 균수에 따른 살조효과

f/2-Si 배지에서 배양시킨 대수증식기의 *C. marina* 배양액( $0.7 \times 10^3$  cells/ml)에 *Bacillus* sp. C-4를 초기 세균밀도가  $10^2$  cells/ml과  $10^3$  cells/ml이 되도록 접종하여 *C. marina* 생존개체수 변화를 측정한 결과를 Fig. 12에

나타내었다. 초기 세균 밀도가  $10^2$  cells/ml이 되도록 접종한 후, 약 18시간 후 *C. marina*의 세포수가 급격히 감소하기 시작하여 48시간 후에는  $0.3 \times 10^2$  cells/ml 이하로 감소하였으며,  $10^3$  cells/ml가 되도록 접종한 경우 접종 직후부터 급격히 세포수가 감소하기 시작하여 30시간 후에  $0.2 \times 10^1$  cells/ml 이하로 급격히 감소하였다. *Bacillus* sp. C-4 를 접종하지 않고 f/2-Si 배지만을 넣어준 *C. marina*가 48시간 후에  $1.2 \times 10^3$  cells/ml까지 증식하였다.

이와 유사한 결과는 Fukami *et al.*(1992)이 *Gymnodinium mikimotoi* 적조 소멸기에 천연해수에서 분리한 *G. mikimotoi*를 살조시키는 *Flavobacterium* sp. 5N-3(살조인자 분비형 균주)가 있다. 이 균주는 *G. mikimotoi* 로 분비된 EOC(extracellular organic carbon)로 성장하여  $10^3$ cells/ml 까지 증식하였으며, 미세조류 배양용 무기배지에서는 증식하지 못하지만 미세조류와 혼합 배양액에서는 증식이 가능하다고 보고되었다. 그러나, *Cytophaga* sp.는 무기배지에서도 증식이 가능하다는 보고(Imai *et al.*, 1993; Mitsutani *et al.*, 1992)도 있어 균종에 따라 생리, 생태가 다른 것으로 사료된다.

### 5.3. *Bacillus* sp. C-4 배양여과액 농도에 따른 살조 효과

*Bacillus* sp. C-4가 생산하는 물질의 농도에 따른 살조효과를 조사하기 위하여, PPES-II 액체배지에서 대수증식기 후기의 *Bacillus* sp. C-4를 8,000 rpm에서 원심분리한 후 상등액을 취하여 멸균된  $0.2 \mu\text{m}$ 로 여과하여 농도를 달리하여 *C. marina*( $0.7 \times 10^2$  cells/ml)에 첨가한 후 나타난 살조효과를 Fig. 13에 나타내었다. 이 때 control에는 f/2-Si 배지를 첨가하였다. 배양여과액을 첨가한 후 18시간 후의 *C. marina*의 개체수는 control에 비해 10%에서는 88%가 사멸되었으며, 5%에서는 82%가, 1%에서는 74%가 사멸되었다.

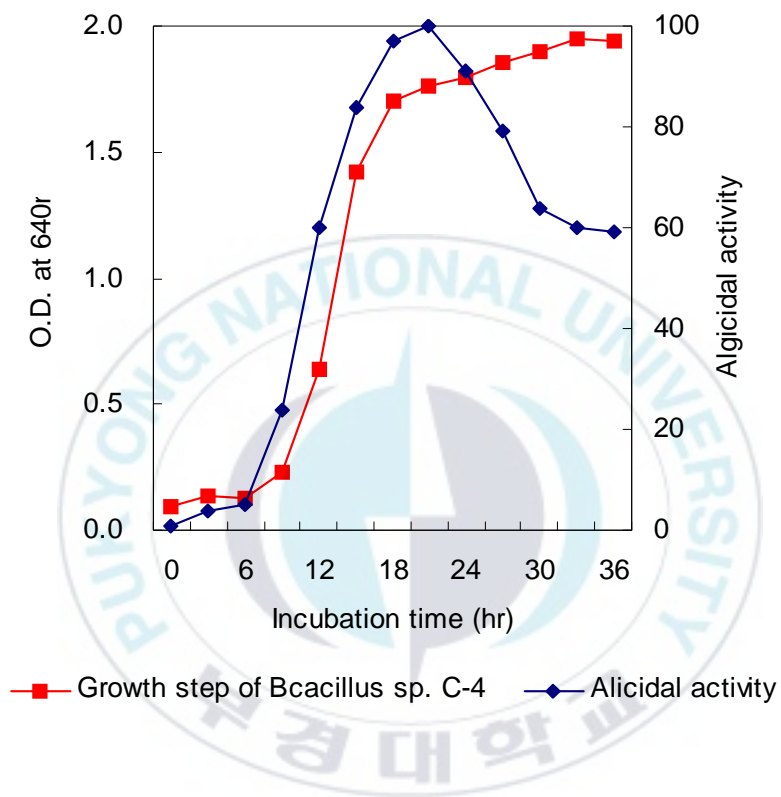


Fig. 11. Alicidal activity *Bacillus* sp. C-4 against *C. marina* by growth step of *Bacillus* sp. C-4.



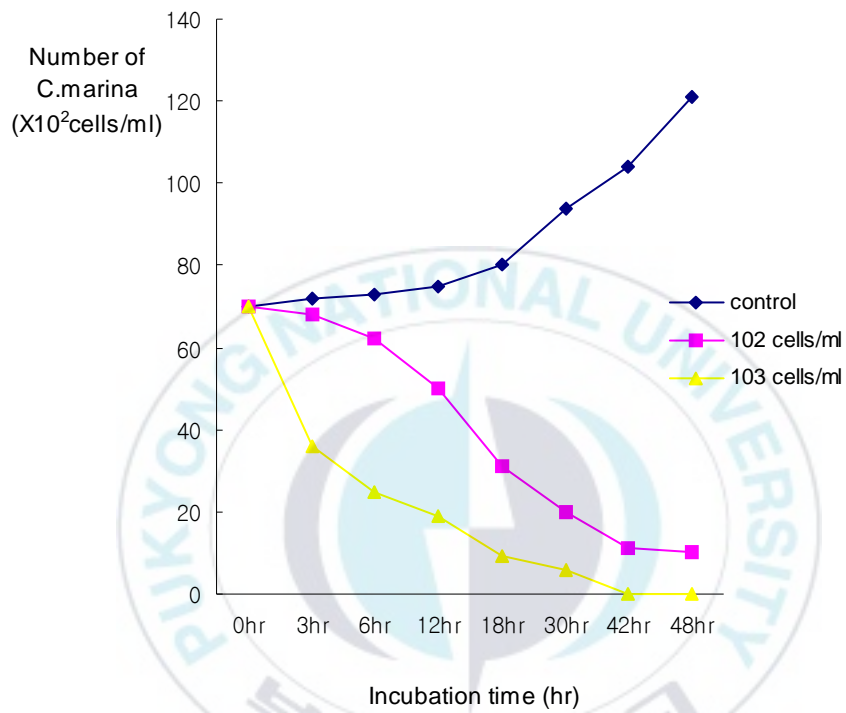


Fig. 12. Algicidal activity *Bacillus* sp. C-4 against *C. marina* by different cell densities(with centrifuge) of *Bacillus* sp. C-4.

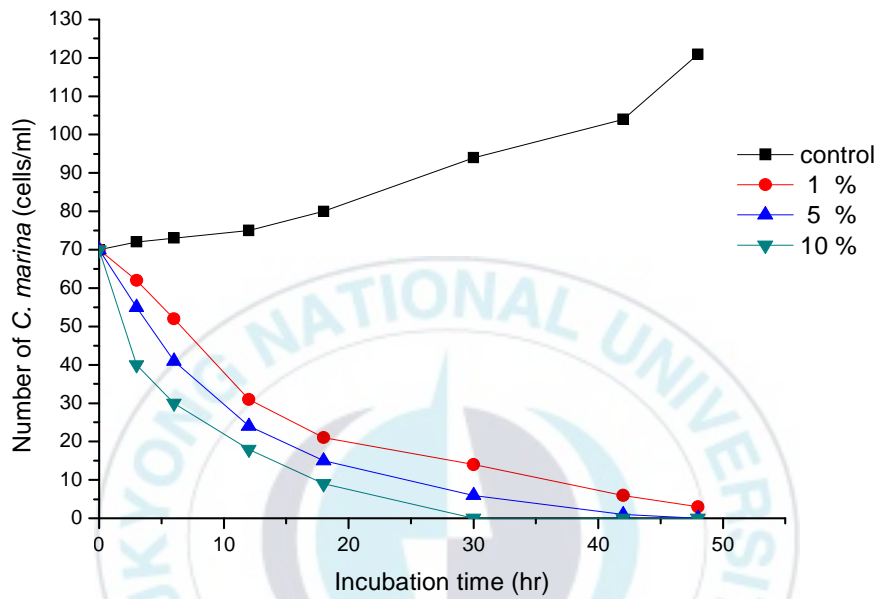


Fig. 13. Algicidal activity *Bacillus* sp. C-4 against *C. marina* by culture filtrate at different volumes of *Bacillus* sp. C-4.

*C. marina*의 개체수가 적조주의보가 해제되는 50 cells/ml 이하로 개체수가 감소되는데 걸리는 시간은 1%는 42시간, 5%는 30시간이 걸렸으며, 10%에서는 25시간이 걸려 모든 개체수가 사멸하였다. 즉, *Bacillus* sp. C-4의 배양 여과액의 양에 비례하여 살조효과가 증가하는 경향을 보였으며, 이것은 배양액을 넣었을 때와 유사한 양상으로 세균 균체 자체 또는 세포내 살조물질의 영향은 극히 미미한 것으로 판단되고, *Bacillus* sp. C-4는 *C. marina*를 살조시키는 물질을 생성하여 세포외로 분비하는 것으로 사료된다.

## 6. *Chattonella marina*의 살조 과정

*C. marina*에 살조세균 *Bacillus* sp. C-4를 접종하였을 때 살조되는 과정을 광학 현미경 하에서 관찰하였다(Fig. 14). 세포 고유의 형태인 세포막으로 구획되어진 *C. marina*(Fig. 14-A) 살조세균의 작용을 받아, 접종 후 10분 이내에 운동성을 상실하고 세포막의 일부가 유실되면서 세포질의 물질이 한 쪽으로 치우치거나 세포질 물질의 형태가 흐릿해지고(Fig. 14-B), 갑자기 파열되어 핵과 색소체등의 세포 내용물이 밖으로 유출되었다(Fig. 14-C). *Bacillus* sp. C-4는 *Chattonella* sp.를 직접 공격하지 않고 세포의 분비물로 *Chattonella* sp.를 파열시킨 후(Fig. 14-C), 파쇄된 적조 조체로부터 나온 유기물을 분해하였다. 이때 핵 또한 부풀어 오르면서 얽어지면서 서서히 사라지고 세포막은 완전히 lysis되었다(Fig. 14-D, E, F).

한편 *Bacillus* sp. C-4의 배양 여과액만을 *C. marina*에 접종시켰을 때의 살조과정은 균 배양액을 넣었을 때와 유사하였다(Fig. 15). *C. marina* 유영세포(Fig. 15-A)는 운동성을 상실(Fig. 15-B)하고 정지한 후, 세포 선단의 일부 세포막이 파쇄되어(Fig. 15-C) 세포 내용물이 유출된 후 시간이 지남에 따라 세포 내용물이 서서히 용해되어 소실되었다(Fig. 15-D, E, F).

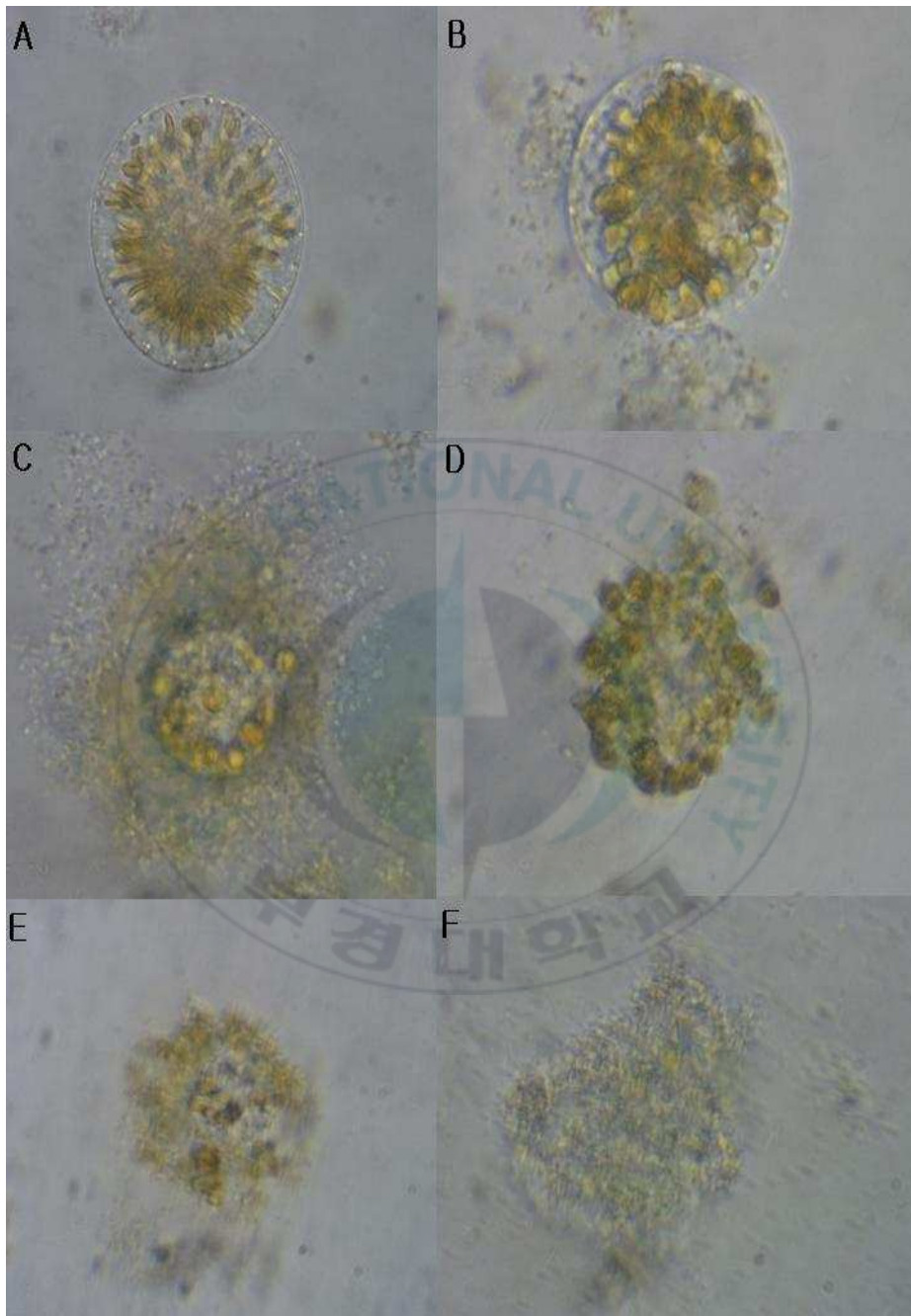


Fig. 14. Algicidal process by cells of *Bacillus* sp. C-4 against *C. marina*. (A) Control, (B)After 1hr, (C)After 2hr, (D)After 3hr, (E)After 6hr, (F)After 12hr.

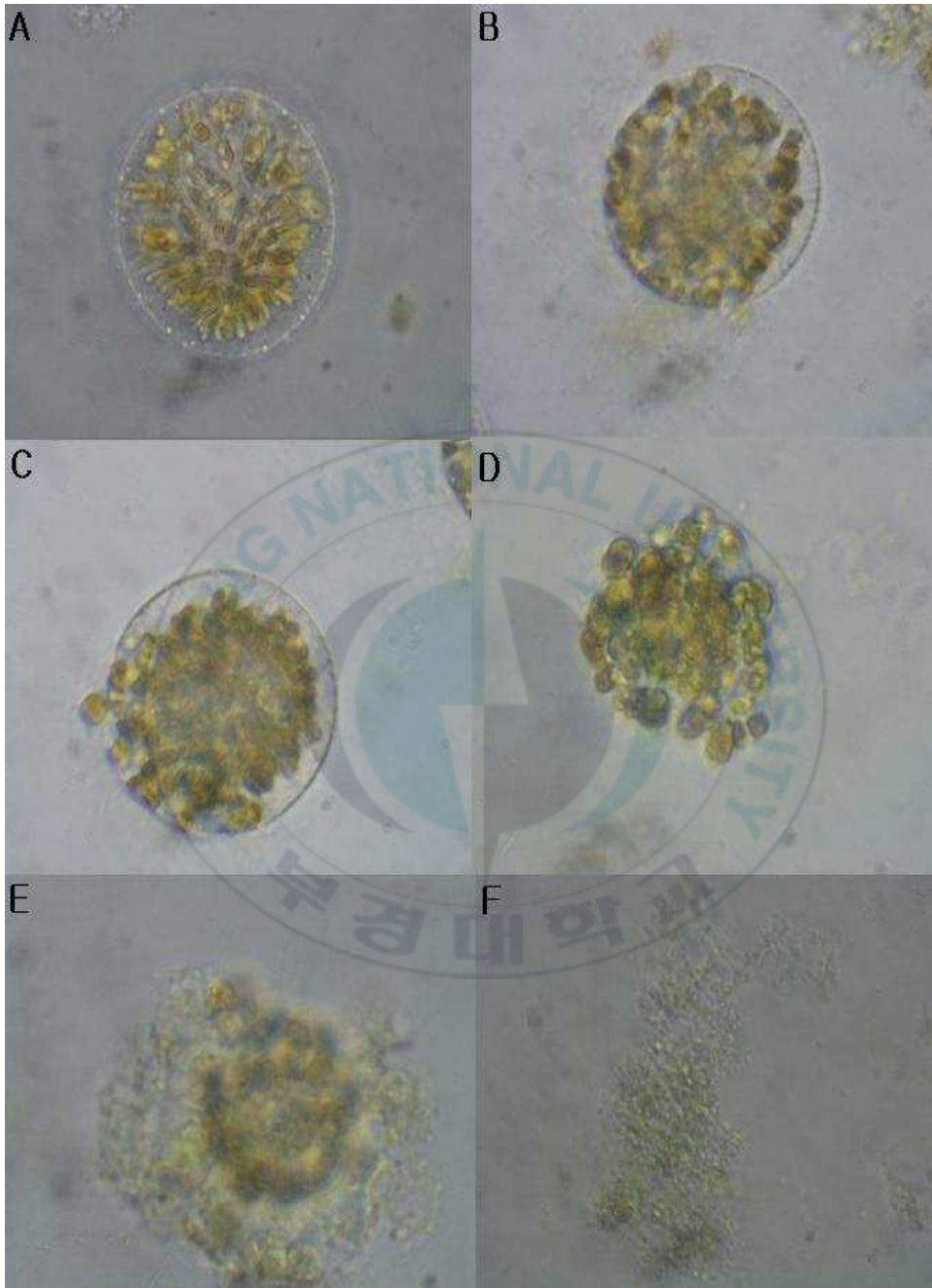


Fig. 15. Algicidal process by culture filtrate of *Bacillus* sp. C-4 against *C. marina*. (A) Control, (B)After 1hr, (C)After 2hr, (D)After 3hr, (E)After 6hr, (F)After 12hr

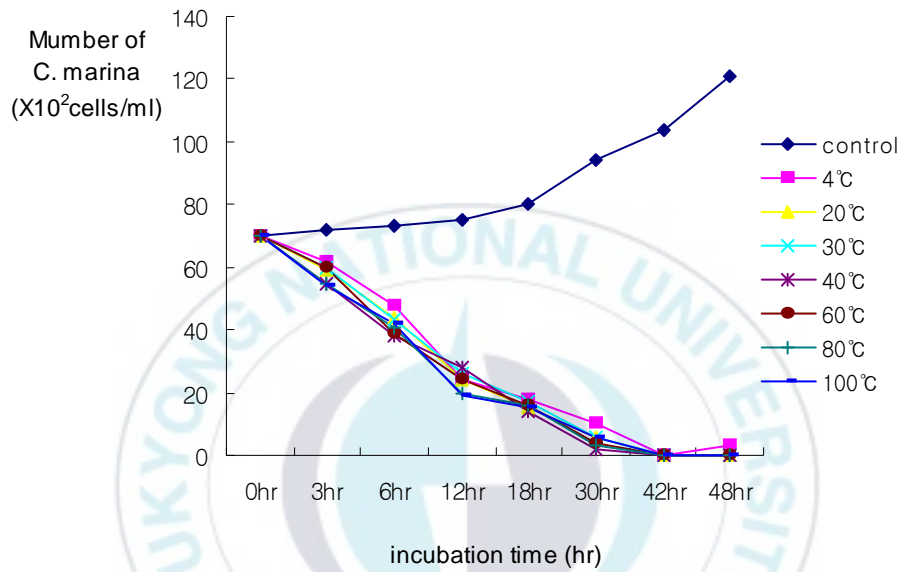
## 7. 살조물질의 특성

### 7.1. 열 안정성

*Bacillus* sp. C-4 가 생산하는 물질의 열 안정성을 알아본 결과를 Fig. 16에 나타내었다. 각 4, 20, 30, 40, 60, 80, 100℃의 온도별로 처리한 살조물질을 최종 농도가 5%가 되게 첨가하였을 때 *C. marina*의 개체수는 급격히 감소하여 6시간 경과 후 control에 비해 50% 정도가 살조되었다. 이것은 배양 여과액을 넣어주었을 때와 거의 같은 살조능이었다. 이처럼 100℃에서 1시간 처리한 후에도 살조 활성이 안정되게 나타나서 *Bacillus* sp. C-4 가 생산, 분비하는 살조 물질은 열에 굉장히 안정한 물질로 사료된다.

### 7.2. pH 안정성

*Bacillus* sp. C-4가 생산하는 살조물질의 pH안정성을 조사한 결과를 Fig.17에 나타내었다. 각 pH 3, 4, 5, 8, 9, 10에서 살조력이 90%이상으로 대단히 안정하였으며, 즉, pH 3~10에서 살조 활성이 안정되었다. 이러한 특성은 해양 생태계에 적용 가능한 잇점이 될 것이다.



**Fig.16. The heat stability of the first culture filtrate *Bacillus* sp. C-4 at different volumes on the growth of *C. marina*.**



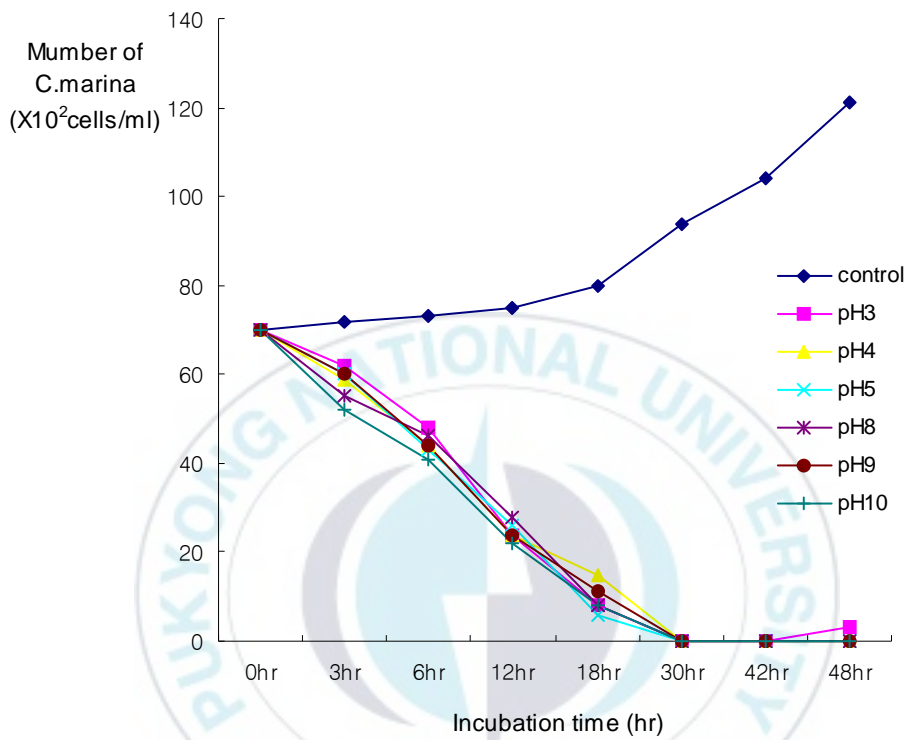


Fig. 17. pH Stability of cell-free culture broth of *Bacillus* sp. C-4. The algicidal activity indicates lysed *C. marina* after 48 hours of treatment.



## IV. 요약

최근 적조발생의 유독성 생물인 *Chattonella marina*를 살조시키는 해양 세균 *Bacillus* sp. C-4를 올진 해역에서 분리하여 그 특성과 살조효과에 대해 연구하고, 이 살조세균이 해양 생태계에 미치는 영향을 조사함으로써 자연 생태조화형, 환경 친화적 적조 방제 기술 개발의 기초 자료를 제공하고 자 연구한 결과는 다음과 같다.

1. 올진 해수 중의 살조세균을 100여종 분리하였으며, 이 중 *C. marina*에 대한 살조력이 가장 우수한 균주를 1종 선별하였고, 생화학 test와 16S rRNA gene sequencer, analysis를 통해 *Bacillus* sp. C-4로 명명하였다.

2. *Bacillus* sp. C-4의 최적 배양조건은 30℃, 3% NaCl, pH 7.0이었다. 이 살조세균은 최적 조건에서 9시간 정도의 유도기를 거친 후 대수증식기로 접어들어, 20시간 후 완전히 성장하여 서서히 정지기로 접어들었다.

2. 0.2  $\mu\text{m}$ 의 Cell Culture Insert를 삽입한 2조 배양계를 이용하여 *Bacillus* sp. C-4 의 살조 유형을 조사한 결과, *Bacillus* sp. C-4 는 0.2  $\mu\text{m}$  filter에 의해 *C. marina*와 격리된 상태에서도 *C. marina*를 살조시키므로 세포외로 물질을 분비하여 살조시키는 살조인자 분비형으로 밝혀졌다.

3. *C. marina*( $1.2 \times 10^2$  cells/ml)에 대한 *Bacillus* sp. C-4 의 성장 단계에 따른 살조력은 대수증식기의 후기, 대수증식기 전기, 정지기, 유도기순으로 나타났다. *Bacillus* sp. C-4 는 유도기를 거쳐 대수증식기 초기에 살조 물질을 생성, 분비하기 시작하여 대수증식기 후기에 살조력이 최대에 도달한 후 정지기에 약간 감소하였다.

4. *Bacillus* sp. C-4 의 균수에 따른 살조 효과는 초기 세균 밀도가  $10^2$  cell/ml이 되도록 접종한 후, 약 18시간 후 *C. marina*의 세포수가 50% 반감하여  $31 \times 10^2$  cells/ml로 줄어들었으며 48시간 후에는  $0.3 \times 10^2$  cells/ml 이

하로 감소하였다.  $10^3$  cell/ml이 되도록 접종한 경우에는 접종 직후부터 급격히 세포수가 감소하기 시작하여 18시간 후에  $9 \times 10^2$  cell/ml 이하로 급격히 감소하였으며 42시간 후에는 완전히 소멸하였다.

5. *Bacillus* sp. C-4 의 배양 여과액의 최종농도가 1%, 5%, 10%가 되도록 첨가한 경우, 18시간 후의 *C. marina*의 개체수는 control에 비해 10%에서는 88%가 사멸되었으며, 5%에서는 82%가, 1%에서는 74%가 사멸되었다. *C. marina*의 개체수가 적조주의보가 해제되는 50 cells/ml 이하로 개체수가 감소되는데 걸리는 시간은 1%는 42시간, 5%는 30시간이 걸렸으며, 10%에서는 25시간이 걸려 모든 개체수가 사멸하였다.

6. *C. marina*는 살조세균의 작용을 받아, 접종 후 10분 이내에 운동성을 상실하고 세포막의 일부가 유실되면서 세포질의 물질이 한 쪽으로 치우치거나 세포질 물질의 형태가 흐릿해지고 갑자기 파열되어 세포 내용물이 밖으로 유출되었다. *Bacillus* sp. C-4 는 *Chatonella* sp.를 직접 공격하지 않고 세포의 분비물로 *Chatonella* sp.를 파열시킨 후, 파쇄된 적조 조체로부터 나온 유기물을 분해하였다.

7. 살조물질을 4, 20, 30, 40, 60, 80, 100 각 온도별로 1hr 처리하고, pH 3, 4, 5, 8, 9, 10의 각 pH별로 1hr 처리 후 *C. marina*에 대한 살조력을 측정할 결과, 배양여과액을 넣었을 때와 동일한 결과를 보여 이 물질은 열과 pH에 안정한 것으로 사료된다.

## V. 감사의 글

“자신이 이루고자 하는 일이 시련과 역경에 부딪쳐 그르치게 되면 보통 사람들은 절망하게 된다. 그러나 이것은 시련이지 실패가 아니다. 내가 살아 있고 건강할 한 나에게 시련은 있을지언정 실패는 없다”

논문이 드디어 결실을 맺고 한 권의 책으로 나오게 되어 더할 나위 없이 기쁩니다. 그 동안 어려움도 있었고 힘든 순간도 있었지만 그 때마다 저에게 힘이 되고 도움을 주신 많은 분들이 있었기에 논문의 마지막 장에 지금 이렇게 글을 올릴 수 있게 되었다고 생각합니다. 좁은 지면에 그 분들을 일일이 열거하면서 감사의 마음을 전하지는 못하겠지만 이 모든 것이 결코 저 혼자 힘만으로 된 것이 아니었음을 고백하지 않을 수 없습니다.

먼저 저를 바른 학문의 길로 인도하고자 많은 관심과 격려로 늘 따뜻하게 지도해 주시고 애정 어린 충고를 아끼지 않으신 저의 지도교수님이신 이원재 교수님께 진심으로 감사드립니다. 바른 길로 갈 수 있는 자세와 지혜를 교수님께 배웠습니다. 바쁘신 와중에도 논문을 정성껏 다듬어 주시고 논문 수정의 수고를 아끼지 않으신 이명숙 교수님과 김영태 교수님께도 감사드리며, 아울러 제 논문의 관심을 가지고 지도편달해주신 김진상 교수님, 이훈구 교수님, 송영환 교수님, 최태진 교수님, 김군도 교수님께도 감사의 말을 전합니다.

많은 시간을 함께했던 해양미생물 실험실 가족 여러분들께 진심으로 고마운 마음을 전합니다. 실험과정에서 많은 도움을 주시고 아낌없는 조언을 해 주신 선배님들, 이대성, 김운숙, 장동욱, 지근호 선생님 그리고 밤늦게까지 때론 밤을 세우며 함께 실험하면서 함께 학문의 뜻을 펼친 진희씨, 혜리씨, 귀찮고 굶은일 마다않고 도와준 영주, 고은이, 여러가지로 많이 양해해주며 도움주신 서용배 선생님, 생화학방 식구들 그리고 바이러스방 식구들 등 7호관 3, 4 층의 모든 미생물학과 실험실 식구들에게 감사의 마음을 전합니다. 넉넉한 농담으로 저를 격려해주었던 동기들과 환한 얼굴로 언제나 미소를 아끼지 않은 후배님들에게도 감사의 말을 전합니다. 저를 아끼고 힘이 되어준 지인들에게도 고맙다는 말을 전하고 싶습니다. 그리고, 언제나 저를 믿어주시는 사랑하는 어머님과 가족들에게 이 조그만 결실을 바칩니다. 마지막으로 이 모든 영광을 언제나 저와 함께 하시는 하나님께 바칩니다.

## VI. 참고 문헌

- Ahmed, M.D., O. Arakawa and Y. Onoue. 1995. Toxicity of cultured *Chattonella marina*. In Harmful Marine Algal Blooms. Lassue, P., G. Arzul, E. Erard, P. Gentien and C. Marcaillou, eds. Lavoisier, New York, 499~504
- Anderson, M.D., 1989. Physiology and bloom dynamics of toxic Alexandrium species, with emphasis on life cycle transitions. In : Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms. Anderson, D.M., A.D. Cambella and G.M. Hallegraeff, eds. Springer, Berlin, 29~48
- Buck, J.D. and R.C. Cleverdon. 1960. The spread plate as a method for enumeration of marine bacteria. Limnol. Oceanogr., 5, 75~80.
- Benson, H.J. 1990. Microbiological Applications ; A Laboratory Manual in General Microbiology, 5th ed. Wm. C. Brown Publishers.
- Choi, H.G., Kim, D.J., Lee, W.C., Yun, S.J., Kim, H.G. and H.J. Lee. 1998. Removal efficiency of *Cochlodinium polykrikoides*, by yellow loess. J. Korean Fish. Soc., 31, 109~113.
- Cole, J.J. 1982. Interaction between bacteria and algae in aquatic ecosystems. Ann. Rev. Ecol. Syst, 13, 291~314.
- Cottrell M.T. and C.A. Suttle. 1993. Production of axenic cultures of *Micromonas pusilla*(Prasinophyceae) using antibiotics. J. Phyco., 28, 385~387.
- Dkhama, A., J. de la Noüe and M.C. Lavoie. 1993. Isolation and

- Identification of antialgal substances produced by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Appl. Phytoplank., 5, 297~306.
- Droop, M.R., 1967. A procedure for routine purification of algal cultures with antibiotics. Br. Phycol. Bull. 3: 295~297
- Fontana, D.A. and A. Haug. 1982. Effects of sodium chloride of the plasma membrane of halotolerant *Dunaliella primoecta* : an electron spin resonance study. Arch. Microbiol., 131, 184~190
- 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 algal 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.
- Gerhardt, P., R.G. Murray, E., R.N. Costilow, E.W. Nester, W.A. Wood, N.R. Krieg, and G.B. Phillips. 1981. Manual of method for general bacteriology. American Society for Microbiology. Washington D.C.
- Guillard, R.R.L. and J.H. Ryther. 1962. Studies 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.
- Hara, Y., K. Doi and M. Chihara. 1994. Four new species of *Chattonella* (Raphidophyceae, Chromophyta) from Japan. Jpn. J. Phycol., 42, 40

7~420.

Hallegraeff, G. M. 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia*, 32, 79~99

Hiroshi, S., H. Okada, I. Imai and T. Yoshida. 2005. High toxicity of the novel bloom forming species *Chattonella ovata* (Raphidophyceae) to cultured fish. *Harm. Algae*, 4, 783~787.

Imai, I., K. Itoh and M. Kamizono. 1986. Distribution of dormant cells of *Chattonella* (Raphidophyceae) and occurrence of summer red tide in sou-Nada, western Seto Inland Sea. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 52, 1665~1671.

Imai, I., Y. Ishida, S. Sawayama and Y. Hata. 1991. Isolation of a marine gliding bacterium that kills *Chattonella 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., Y. Ishida, K. Sakaguichi and Y. Hata. 1995. Algicidal marine bacteria isolated from northern Hieoshima bay, Japan. *Fisher. Sci.*, 61(4), 628~636.

Ishida, Y., I. Yoshinaga. M.C. Kim and A. Uchida. 1997. Possibility of bacterial control of harmful algal blooms. In *Progress in Microbial Ecology*. 495~500

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., 205~208.
- Jeong S.Y., Park Y.T. and Lee W.J. 1999. Isolation of marine bacteria killing red tide microalgae. *J. Korean Fish. Soc.* 33(4), 331~338.
- Kim, D.I., I.H. Noh and Yoon. 2005. *Chattonella* spp. (Raphidophyceae), a novel species responsible for the potentially harmful algal blooms in Korean coastal waters. Proc. KOSMEE Fall Annual Meeting, 127~131.
- Kim, M.C., I. Yoshinaga, I. Imai, K. Nagasaki, S. Itakura, A. Uchida and Y. Ishida. 1998. A close relationship between algicidal bacteria and termination of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) blooms in Hiroshima Bay, Japan. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 170, 25~32.
- Kim, M.C., I. Yoshinaga, I. Imai, K. Nagasaki, S. Itakura and Y. Ishida. 1998. A close relationship between algicidal bacteria and termination of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) bloom in Hiroshima Bay, Japan. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 170, 25~32.
- Koji, K., Yuki, M. and Naganuma, J. 1998. Removal of biofouling and red tide algae by Triosyn. Abstract of 2nd Meeting for Japan Marine biotechnology. 89.
- MacFaddin, T.F. 1984. Biochemical tests for identification of medical bacteria. Williams & Wilkins, 36~308.
- Mague, T.H., E. Friberg, D.J. Hughes, I. Morris. 1980. Extracellular release of carbon by marine phytoplankton: A physiological approach. *Limnol. Oceanogr.*, 25, 262~279.
- Marshall, J.A., P.D. Nichols, B. Hamilton, R.J. Lewis and G.M.

- Hallegraeff. 2003. Ichthyotoxicity of *Chattonella marina* (Raphidophyceae) to damselfish (*Acanthochromis polycaanthus*): the synergetic role of reactive oxygen species and free fatty acids. *Harm. Algae*, 2, 273~281.
- Mitsutani, A., K. Takasue, M. Kirita and Y. Ishida. 1992. Lysis of *Skeletonema costatum* by *Cytophaga* sp. isolated from the coastal water of the Ariaka sea. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58(11), 2159~2169.
- Mitsutani, A. and K. Takesue. 1993. Purification and properties of protease from a cyanobacteria-lytic bacterium *Lysobacter* sp. LB-1. *J. Shimonoseki Univ. Fisher.*, 41(2), 65-75 (in Japanese).
- Na, G.H., Choi, W.J. and Y.Y. Chun. 1996. A study on red tide control with loess suspension. *Kor. J. Aquacult.* 9. 239~245.
- Noh H.Y., Yoon Y.H., Kim D.I. and S.J. Oh. 2006. Effect of water temperature, salinity and irradiance on the growth of the harmful algae *Chattonella marina* (Subrahmanyn) Hara et Chihara (Raphidophyceae) isolated from Gamak bay, Korea, *J. Korean Fish Soc.*, 39(6), 487~494
- Obedrecht, C. and P.C. Abreu. 1995. Raphidophycean in southern Brazil. *Harm. Algae News*, 12/13, 4.
- Oda, T., A. Ishimatsu, S. Shimada, S. Takeshita and T. Muramatsu. 1992. Oxygen-radical-mediated toxic effects of the red tide flagellate *Chattonella marina* on *Vibrio alginolyticus*. *Mar. Biol.*, 112, 505~509.
- Okaichi, T. 1989. Red tide problems in Seto Inland Sea, Japan. In : *Environmental Science and Toxicology*. Okaichi, T., D.M. Anderson, t. Nemoto, eds. *Red tides : Biology*, Elsevier, New York, 137~142.



- Onoue, Y., M.S. Haq and K. Nozawa. 1990. Separation of neurotoxin from *Chattonella marina*. Nippon Suisan Gakkaishi, 56, 695
- Park, J.S., H.G. Kim and S.K. Lee. 1988. Red tide occurrence and succession of its causative organisms in Jinhae Bay. Bull. Fish. Res. Dev. Agency, Korea, 41, 1~26.
- Park, Y.T., J.B. Park, S.Y. chung, B.C. Song, W.A. Lim, C.H. Kim and W.J. Lee. 1998. Isolation of marine bacteria killing red tide microalgae. I. Isolation and algicidal properties of *Micrococcus* sp. LG-1 possessing killing activity for harmful dinoflagellate, *Cochlodinium polikrilodes*. J. Korean Fish. Soc., 31(5), 767~773 (in Korean).
- Porter, K.G. and Y.S. Feig. 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. Limnol. Oceanogr., 25, 943~948.
- Ryu, H.Y., Shim, J.H., Bang, J.D. and Lee, C. 1998. Experimental chemical treatment for the control of dinoflagellate, *Cochlodinium polykrikoides* in the land-based culture of olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Kor. J. Aquacult. 11. 285~294.
- Sakata, T. 1990. Occurrence of marine of marine *Saprospira* sp. possessing algicidal activity for diatoms. Nippon Suisan Gakkaishi, 56, 1165.
- Sakata, T. and H. Yasumoto. 1991. Colony formation by algicidal *saprospira* sp. on marine agar plates. Nippon Suisan Gakkaishi, 57(11), 2139~2143.
- Sakata, T., Y. Fujita and H. Yasumoto.. 1991. Plaques formation by algicidal *Saprospira* sp. on a lawn of *Chaetoceros ceratosporum*.

- Nippon Suisa Gakkaishi, 57, 1147~1152.
- Sambrook, J. Fritsch, E.F. and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning, A laboratory Manual. 2nd ed. p.1: 25~28. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Seo J.K., Kim C.H., Bae Y.J., Moon H.S., Kim K.Y., Park H.Y., Yoon H.D., Kim C.H., Byun D.S., Hong W.K. and N.G. Park. 2003. The algicidal effect of antimicrobial peptide, Mastroparan B. J. Fish Pathol, 16(3) : 193~201
- Shimada, M., T.H. Murakami, T. Imahayashi, H.S. Ozaki, T. Toyoshima and T. Okaichi. 1983. Effect of sea bloom, *Chattonella antiqua*, on gill primary lamellae of the young yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. Acta Histochem Cytochem., 16, 232~144.
- Steidinger, K.A. 1983. A re-evaluation of toxic dinoflagellate biology and ecology. Prog. Phycol. Res. 2. 147~188.
- Subrahmanyam, R. 1954. On the life-history and ecology of *Hornellia marina* gen. et sp. nov., (Chloromonadineae), causing green discoloration of the sea and mortality among marine organisms off the Malabar Coast. Indian J. Fish., 1, 182~203.
- Taga, N. 1968. Some ecological aspects of marine bacteria in the Kuroshio current. Bull. Misaki Mar. Biol. Kyoto Univ., 12, 50~76.
- Tang, J.Y., D.M. Anderson and D.W.T. Au. 2005. Hydrogen peroxide is not the cause of fish kills associated with *Chattonella marina*: Cytological and physiological evidence. Aqua. Toxicol., 72, 251~360.
- Tseng, C.K., M.J. Zhou and J.Z. Zou. 1993. Toxic phytoplankton studies in China. In : Toxic phytoplankton blooms in the Sea. Smayda, T.J.

- and Y. Shimizu, eds. Elsevier, New York, 347~352.
- Vrieling, E.G., R.P.T. Koeman, K. Nagasaki, Y. Ishida, L., Peperzak, W.W.C. Gieskes and M. Veenhuis. 1995. *Chattonell* and *Fibrocapsa* (Raphidophyceae) L First observation of, potentially harmful, red tide organisms in Dutch coastal waters. Netherl. J. Sea Res., 33, 183~191.
- Yamaguchi, M., I. Imai and T. Honjo. 1991. Effect of temperature, salinity and irradiance on the growth of the noxious red tide flagellate *Chattonella antiqua* and *C. marina* (Raphidophyceae). Nippon Suisan Gakkaishi, 57, 1227~1284.
- Yoshinaga, I., T. Kawai and Y. Ishida. 1995a. Lysis of *Gymnodinium nagasakiense* by marine bacteria. In *Harmful marine algal Blooms*. P. Lassus, G. Arzul, E.E. Denn, P. Gentien and C.M. Baut, eds., Lavoisier, Paris, 687~692.
- Yoshinaga, I., T. Kawai, T. Takeuchi and Y. Ishida. 1995b. Distribution and fluctuation of bacteria inhibiting the growth of a marine red tide phytoplankton *Gymnodinium mikimotoi* in Tanabe Bay (Wakatama Pref., Japan). Fisher. Sci., 61(5), 780~786.
- Yoshinaga, I., T. Kawai and Y. Ishida. 1997a. Analysis of algicidal ranges of the bacteria killing the marine dinoflagellate *Gymnodinium mikimotoi* isolated from Tanabe Bay Wakayama Pref., Japan. Fisher. Sci., 63(1), 94~98.
- Yoshinaga, I., M.C. Kim, N. Katanozaka, I. Imai, A. Uchida, Y. Ishida. 1998. Population structure of algicidal marine bacteria targeting the red tide forming alga *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae), determined by restriction fragment length polymorphism analysis of the bacterial 16S ribosomal RNA genes. Mar. Ecol. Prog. Ser., 170, 33~44.

Zhang, Y., F.X. Fu, E. Whereat, J.J. Coyne and D.A. Hutchins. 2006. Bottom-up controls on a mixed species HAB assemblage: A comparison of sympatric *Chattonella subsalsa* and *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) isolates from the Delaware Inland Bays, USA. HARM. Algae, 5, 310~320.

