P425

Algicidal Effect of Glycolipid on Dinoflagellate

백 숭 학, 이 성 규, †김 은 기
인하대학교 생물공학과 생물환경소재연구실
TEL (032) 872-2978, FAX (032) 875-0827, E-mail beaksa@netsgo.com

Abstract

GL, a glycolipid type produced from yeast, inhibited the growth of bacteria and fungi. Algicidal effect by GL against dinoflagellate was motility stop and lysis. When over 10 μg/ml showed strong algicidal effect. GL attached to the algal body directly.

서론

적조 현상은 바다에서 특정 미세조류 특히 식물성 플랑크톤이 대량 발생하여 생기는 현상으로 적색 미세조류로 인하여 바다색이 붉은색으로 변한다. 해양생태계에서 식물플랑크톤 군집은 주로 규조류와 와편모조류가 우점하며, 기초 생산자로서 중요한 위치를 차지한다.

적조 구제방법으로 적조생물을 흡착하여 제거시키는 효과를 보여주는 황토살포가 실행되었다(1). 그러나 이 방법은 수괴에 현탁물질을 제공하여 현탁유기물을 퇴적층으로 이동시키므로 수질 및 해양 저서생물등에 영향을 주는 살포후의 2차 오염이 우려된다. 적조의 발생과 소멸과정에는 물리·화학적 요인을 포함하여 생물학적 요인이 작용하며, 해양세균은 적조소멸에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 국외에서는 적조대책의 일환으로 살조세균에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 일본의 수산청은 적조생물 살조세균을 이용하는 적조대책 기술개발에 관한 연구를 보고하였다.

생태학적 특징과 저해물질에 관한 보고로 Sakata et al. (1991)은 *Chaetoceros ceratosprum*, Imai et al. (1991)은 *Chattonella antiqua*, Mitsutani et al. (1992)은 *Skeletonema costatum*, Yoshinaga et al. (1997)은 *Gymnodinium mikimotoir* 그리고 Kim (1998)은 *Heterosigma akashiwo*를 사멸시키는 해양세균을 분리하였으며, Sawayama et al. (1991, 1993)은 *Alexandrium catenella*의 접합저해물질을 정제 분석하였다. 저해기작에 관한 연구로서는 살조세균이 생산한 대사산물로 적조 생물을 살조시키는 기작 (Isho et al., 1989; Fukami et al., 1992), 활주세균인 *Saprospira sp.* (Sakata 1990, 1991)와 *Cytophaga sp.* (Imai et al., 1991, 1993; Mitsitani et al., 1988)와 같이 직접 세균이 적조생물에 접촉하여 살조시키는 기작 또는 적조생물의 접합을 저해시키는 기작 (Sawayama et al., 1990, 1993)이 보고되었다.

본 연구에서는 효과적인 적조 저해를 위해 yeast를 통하여 생산이 되는 미생물 생리활성물질(GL)을 이용하였다.

재료 및 방법

사용 균주

본 실험에 사용한 적조 플랑크톤은 *Cochlodinium polykrikoidea*로 국립수산진흥원에서 분양받은것으로 실험에 이용된 미세조류는 모두 무균 배양주였다.

배지 조성

해수는 경기만에서 채수한 해수를 GF/F, 0.2㎛ polycarbonate로 여과하여 배양조건과 같은 온도인 21℃, 염분도 31‰로 조절한 후 Sigma F/2배지를 첨가하였다(2).

배양 조건

*C. polykrikoides*는 F/2 배지 에서 온도는 20±1℃, 조도 2000 ~ 3000lux(3), 광주기 12 Light : 12 Dark로 정치배양하였다.

살조 효과

대수증식기에 달한 각각의 와편모조류 배양액을 분주하고, GL의 각 농도 구간을 설정하여 첨가한 후, 1시간동안 상기의 조건에서 배양하였다. 살조 활성은 각 시간별로 계수 하였으며, 광학 현미경(Olympus BX41)을 통하여 적조생물에 상태를 관찰하였다. Algicidal activity는 살아있는 적조생물 세포수를 계수하는하는 bioassay법으로 측정하였고 다음과 같은 식으로 계산하였다(4).

$$Algicidal\ Activity\ (\%) = (1 - \frac{X}{X_0}) \times 100$$

X_0 : 초기의 움직이는 적조생물의 cell 수

X : 반응 후 움직이는 적조생물의 cell 수

성장 측정

*C. polykrikoides*를 F/2 배지에 접종하여 상기의 조건에서 생육시켰고, 배양액을 1ml 취하여 Lugol 용액을 이용하여 고정시킨 후 광학 현미경하에서 개체수를 측정하였다.

통계

모든 실험은 3회 반복하여 얻은 평균값을 취했다.

결과 및 고찰

운동성 저해

*C. polykrikoides*에 GL을 첨가하고 20±1℃에서 혼합배양하였을 때 농도에 따른 와편모조류 운동성 저해 활성을 Table 1에 나타내었다. 그 결과 저농도에서 GL이 와편모조류를 저해할 수 있는 것으로 나왔다. 즉 GL의 농도별 처리에 의한 50% 운동성이 멈추는 시간 (MT_{50})이 *S. trochoidea*는 5㎍/ml에서 5분 이내에, *P. minimum* 및 *H. akashiwo*는 30㎍/ml에서, *C. polykrikoides*는 20㎍/ml에서 5분 전후로 조사되었다.

증식 저해

GL을 와편모조류의 배양액에 농도별로 첨가하였을 때 와편모조류의 개체수의 변화를 Fig. 1에 나타내었다. GL의 최종농도가 5㎍/ml이 되도록 첨가하였을 경우 와편모조류의 개체수가 급격히 감소하여, 2일 경과 후 control에 비해 *S. trochoidea, P. minimum, H. akashiwo*는 100% 살조가 되었으며, *C. polykrikoides*는 약 80%가 살조되었다. 1㎍/ml의 경우 대부분이 일시적인 생장저해를 보이는 것으로 나타났으며, 이러한 개체수의 감소로 GL에 의한 lysis 효과를 추정하였다.

침전 효과

GL의 농도에 의한 *C. polykrikoides*의 운동성 상실과 lysis에 의한 살조 효과를 측정하기

위하여 높이 90cm, 지름10cm의 메스실린더에 *C. polykrikoides*를 약 500cells/ml의 밀도로 접종하였다. 그 결과 Fig. 2와 같이 Control은 저층부와 상층부에 *C. polykrikoides*의 개체수가 균일하게 분포되어 있는 반면, 10㎍/ml이상을 첨가하였을 경우는 2시간 이내에 급격한 개체수의 감소가 나타나며, 20시간 이후에는 모든 *C. polykrikoides*가 lysis 되었다. 또한 2시간 이내에 저층부의 의 개체수 밀도가 급격히 증가하는 것은 운동성 상실에 의한 침전효과로 인한 것으로 판단되어 진다. 반면 최종농도가 5㎍/ml가 되게 첨가하였을 경우는 약간의 lysis 및 운동성 상실에 의해 저층부의 개체수 밀도가 증가된 것으로 나타났다. Table 2는 *S. trochoidea, P. minimum, H. akashiwo*의 3종에 대하여 *C. polykrikoides*와 동일한 실험으로 조사한 결과로서, *C. polykrikoides*와 같은 살조 효과를 보여 주었다.

살조 유형

GL이 *C. polykrikoides*를 살조시키는 과정을 광학 현미경 하에서 관찰하였다(Fig. 3). 연쇄군체를 형성한 유형세포는 GL의 작용을 받아 5분 이내에 운동성을 상실하고 연쇄군체의 각 단세포가 팽창하여 고유의 형태를 상실하여 구형으로 변하면서 temporary cyst를 형성한 후, 조체 세포벽의 일부가 갑자기 파괴되었다.. Jeong et al. (2000)은 *Micrococcus* sp. LG-5 균주를 접종하였을 때 *C. polykrikoides*의 운동성이 정지하고 *Micrococcus* sp. LG-5의 분비물질이 세포벽을 팽창시켜 조체 세포벽을 파괴한다고 비슷한 경향의 결과를 보고한 바 있다.

요약

Yeast유래의 미생물 생리활성물질(GL)에 대한 살조특성은 다음과 같다.

C. polykrikoides 및 3종의 와편모조류에 대한 운동성 저해는 MT_{50}은 *S. trochoidea*는 5㎍/ml에서 5분 이내에, *P. minimum* 및 *H. akashiwo*는 30㎍/ml에서, *C. polykrikoides*는 20㎍/ml에서 5분 전후로 나타났으며, 이로 인해 저농도에서 와편모조류의 저해가 가능했다. 와편모조류의 사멸효과는 최종농도 10㎍/ml이상에서 와편모조류의 대부분의 살조가 나타났으며, 살조유형을 조사한 결과, GL이 와편모조류의 세포벽을 직접적으로 공격함으로써 세포벽의 파괴를 야기함을 알 수가 있었다.

참고문헌

(1) Hee Gu Choi, p. J. K., Won Chan Lee, Seoung Jong Yun, Hak Gyoon Kim and Hung Jae Lee (1998) Removal Efficiency of *Cochlodinium Polykrikoides* by Yellow Loess. J. Korean Fish. Soc., **31**(1): 109-113.

(2) Guillard, R. R. L. and J. H. Ryther. (1962) Studies on marine planktonic diatoms. I *Cyclotella nana* (Hustedt) and *Detonula confervaceae* (Cleve). Can. J. Microbiol., 8, 229-239.

(3) Grzebyk D.and. Berland B. (1996) Influences of temperature, slinity and irradiance on growth of *prorocentrum minimum* (Dinophyceae) from the me Mediterranean Sea. J. Plankton Res., 18(10): 1837-1849.

(4) Park Keun Young, M. R. K. and S. K. K. (1999) Isolation and Characterization of Algicidal Bactria KY1. J. Korean Fish. Soc, 32(4): 452-457.

Table 1. MT_{50} of dinoflagellate by GL treatment

Concentration (μg/ml) dinoflagellates	5	10	20	30	40
S. trochoidea	5min	5min	3min	1min	30sec
P. minimum	-	-	30min	5min	30sec
H. akashiwo	-	-	-	5min	30sec
C. polykrikoides	-	15min	3min	30sec	30sec

- : not reach to 50% motility stop

Table 2. Tubing effect of GL on the growth of 3 species of dinoflagellate

Concentration (μg/ml) dinoflagellates	0	5	10	20
S. trochoidea	-	negative	positive	postive
P. minimum	-	negative	positive	positive
H. akashiwo	-	negative	positive	positive

- : no degrease of cell densities
Negative : little degrease of cell densities
Positive : complete lysis of dinoflagellate

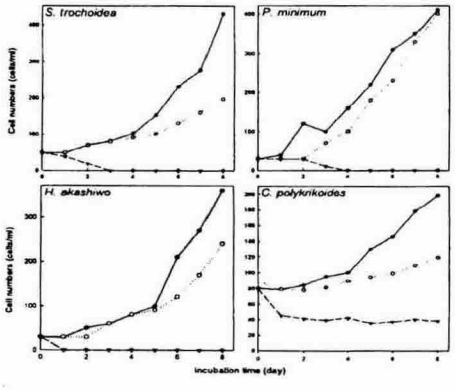

Fig. 1. Effect of the GL at different concentrations on the growth of dinoflagellates (-●-, control; -○-, 1μg/ml; -▼-, 5μg/ml)

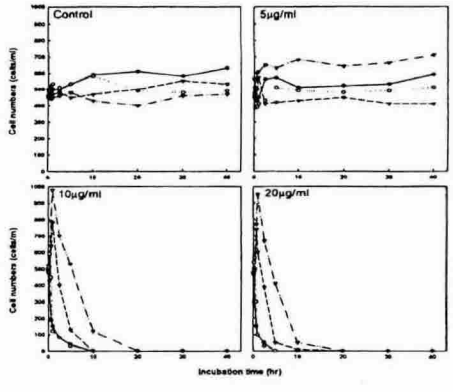

Fig. 2 Tubing test of GL against *C. polykrikoides* by the different concentrations (-●-, 5cm; -○-, 30cm; -▼-, 60cm; -▽-, 90cm)

Fig. 3. Monographs of sequential algicidal process GL against *C. polykrikoides*. (*C. polykrikoides*'s cells stop swimming at first. GL attach to the algal body directly. A part of algal body was swelled and become spherical in shape. Finally, algal cells bursted.)