

부영양화 수역에서의 Cyanophage의 분리와 동정

김민 · 최영길

한양대학교 자연과학대학 생물학과, 서울대학교 분자미생물학 연구센터

경기도 의왕시에 위치한 백운 저수지에서 분리된 cyanobacteria인 *Synechococcus* sp.로부터 한 종의 cyanophage를 분리하여 ultrafiltration, differential centrifugation과 sucrose density gradient centrifugation을 이용하여 정제하였다. 분리된 cyanophage는 transmission electron microscope (TEM)를 이용하여 100,000배로 관찰한 결과 직경이 89 nm인 isometric head와 tail의 전체 길이가 111 nm의 contractile tail을 가진 phage로서 *Myoviridae*에 속함을 알 수 있었다. 생화학적 특징으로는 20~40°C와 pH 5~10에서 50% 이상의 안정성을 유지하며 30°C와 pH 9에서 최고의 infectivity를 나타내었다.

KEY WORDS □ *Synechococcus* sp., cyanophage, *Myoviridae*.

Safferman에 의해 1963년 처음 발견되어(8) 연구되어 온 cyanophage는 수계에 널리 분포하는 남조류를 특이적으로 공격하며 phycovirus, algovirus, blue-green algal virus라고도 불리운다. Cyanophage는 형태적으로 bacteriophage와 매우 유사하나 지금까지 알려졌은 바에 의하면 모두가 lineal double stranded DNA를 유전자로 보유하며 넓은 범위의 pH, 이온 농도와 염분도에 분포한다고 밝혀져 있다(5).

Cyanophage는 남조류에 의한 수화현상의 이상적인 생물학적 제어자로서 제안되어 왔으며 대부분 cyanophage의 호염기성 때문에 높은 염기적 조건에서의 virus particle 안정성 연구나 숙주인 남조류의 분류체계를 정립하는데 유용할 것이라고 알려져 왔다. 또한 남조류는 고등식물과는 달리 단순한 원핵생물인 동시에 식물과 유사한 광합성을 수행하므로 alga-cyanophage system이 viral infection 하에서 식물 광합성을 연구하는 model로서 뿐만 아니라(5) cyanophage가 chlorinated water에 매우 저항성이 강하고 특히 waste water에 편재하는 특성 때문에 수질오염이나 disinfection indicator로서, 혹은 phototoxic agents에 대한 indicator species로도 유용하다고 알려져 있다(3, 4).

그러나 현재 국내에서의 cyanophage에 관한 연구는 전무한 실정이고, 국외에서 연구되고 있는 cyanophage는 *Lyngbya*, *Phormidium*, *Plectonema*를 숙주로 하는 LPP-1, 2를 비롯해서 불과 수종(AS-1, N-1, S-1, SM-1, 2, AC-1)에 지나지 않으므로(2, 3) 본 연구에서는 국내의 부영양화된 한 호소에서 cyanophage를 분리, 동정하고자 하였다.

재료 및 방법

Cyanophage의 분리

백운 저수지에서 분리한 *Synechococcus* sp.를 대상으로 enrichment procedure(9)를 이용하였다. 여기에 쓰인 시료는 Whatman No.2 filter paper로 1차 여과시킨 후 0.45 μ m pore size의 cellulose acetate membrane을 통해 2차 여과시켜 deca-strength medium BG-11(7) 10 ml와 exponential phase의 host culture 10 ml에 시료 80 ml를 첨가시켰다. 이 배양액을 약 40 μ mol S⁻¹m⁻²의 조도로 30°C에서 3주간 배양한 후 9,500 g, 4°C에서 30분간 원심분리하여 얻은 상등액에 0.2%의 chloroform을 첨가하여 crude lysate로 사용하였다. Virus의 유무는 surface plating method(6)를 사용하여 확인하였으며 그에 대한 control로는 동일 배지에 0.2% chloroform이 첨가된 액체를 사용하였다.

Cyanophage의 순수정제

Crude lysate 12~20 l를 Amicon XM-300을 이용하여 10배 농축시키고 16,000 g에서 2시간 원심분리한 후 80,000 g에서 40분간 sucrose density gradient centrifugation을 시행하였으며 전체적인 scheme은 Fig. 1과 같다.

Cyanophage의 분류, 동정

상기와 같이 순수정제된 phage solution 한방울을 formvar로 입혀진 grid에 떨어뜨리고 1분 후에 filter paper로 여액을 제거하여 4% uranyl acetate (pH 4.5)를 grid가 완전히 마르기 전에 가한 후 다시 filter paper로 여분의 염색액을 제거하여 Hitach-600 transmission electron microscope(TEM)하에서 관

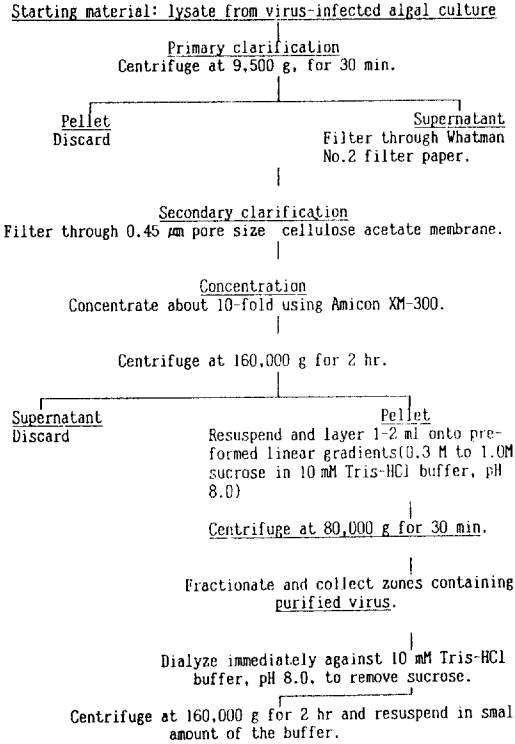


Fig. 1. Flow diagram of purification procedure for cyanophages.



Fig. 2. *Synechococcus* sp. isolated from Baekwoon reservoir. Stained with acridine orange and photographed with fluorescent microscope. Bar represents 10 μm.

찰하여 형태적 특성에 따라 분류 동정하였다(10).
생화학적 안정성
 1 ml의 lysate가 담긴 tube들을 20°C와 60°C 사이의 일정온도로 유지되는 항온조에 1시간 동안 방치시킨 후 상온에서 식혀 assay하였다. 또한 pH 2에서 pH 13으로 맞추어진 9 ml의 각각의 액체배지에 1

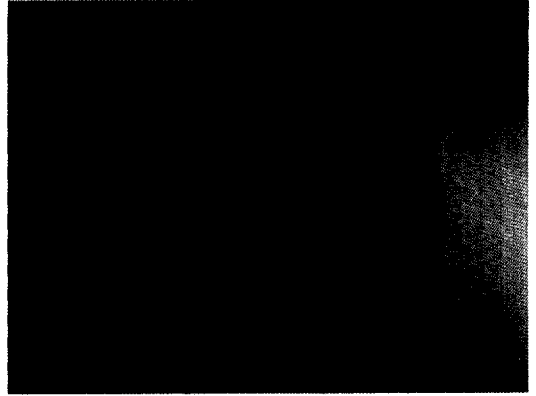


Fig. 3. Viral plaques on lawns of *Synechococcus* sp.

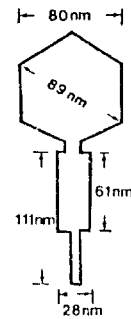


Fig. 4. Electron micrograph of the *Synechococcus* sp. cyanophage negatively stained with 4% uranyl acetate and its diagrammatic representation. Bar represents 20 nm.

m/씩의 lysate를 첨가하여 1시간 방치시킨 후 100배 희석하여 assay하였다(1).

결과 및 고찰

Cyanophage의 분리

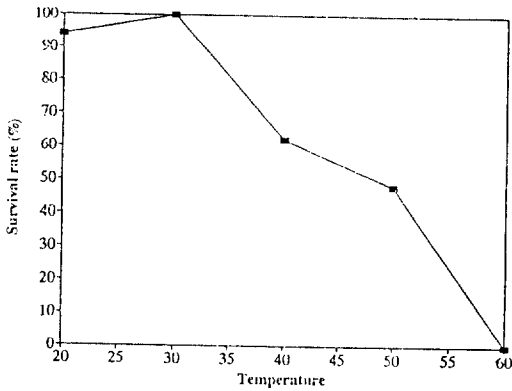


Fig. 5. Percentage survivors of the isolated cyanophage after exposure to various temperatures for 60 minutes.

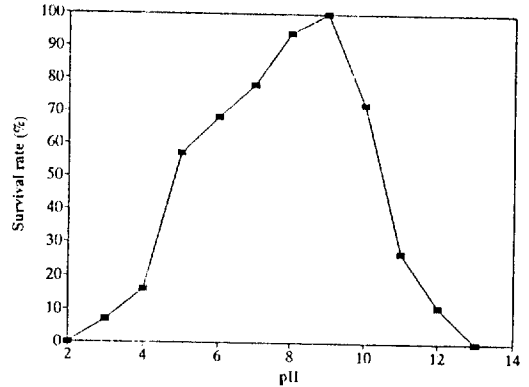


Fig. 6. Percentage survivors of the isolated cyanophage after exposure to various pH levels at 30°C for 60 minutes.

백운 저수지에서 분리한 *Synechococcus* sp.(Fig. 2)를 대상으로 한 종류의 cyanophage를 분리, 확인하였다(Fig. 3).

Cyanophage의 분류, 동정

Sucrose density gradient centrifugation에 의해 정제된 cyanophage를 TEM을 이용하여 100,000배로 관찰한 결과 isometric head와 contractile tail을 가진 phage임을 알 수 있었다. Head의 직경은 89 nm이고 tail의 전체 길이는 111 nm이었으며 tail이 수축된 상태에서 central tube를 바깥쪽으로 싸고 있는 sheath는 61 nm이었다(Fig. 4). 이로써 neck에 의해 central tube와 contractile sheath로 구성되는 길다란 tail이 head로부터 분리되는 특징을 가지는 *Myoviridae*(10)에 속하는 것으로 판단된다. 그러나 *Myoviridae*의 대표종인 AS-1과 비교하였을 때 phage particle 안정성을 위하여 Mg^{+2} 를 필요로 하지 않는 특성은 동일하나 짧은 tail pin이 40 nm 폭의 base plate에 부착되어 있는 형태를 가지는 AS-1과는 차이를 보이며 분리된 cyanophage가 AS-1의 숙주인 *Synechococcus cedrorum*에는 감염성이 없는 것으로 보아 지금까지 밝혀진 바 없는 새로운 *Synechococcus* sp. cyanophage로 판단된다.

생화학적 안정성

분리된 cyanophage의 생화학적 특성을 고찰하기 위하여 20°C와 60°C, pH 2와 13의 범위에서 1시간씩 방치한 후 assay를 한 결과 20°C와 40°C, pH 5에서 pH 10 사이의 범위에서 50% 이상의 안정성을 나타내었으며 30°C와 pH 9에서 가장 높은 infectivity를 보여주었다(Fig. 5, 6). 이 결과는 약 50°C~60°C까지도 높은 감염도를 유지하는 bacteriophage와는 많은 차이를 나타내는 것이며 pH 안정성 또한 bacteriophage는 pH 5~8에서 안정한(9) 반면 분리된 cyanophage가 염기적 조건하에서 안정하며 넓은 범위의 pH에서 활성을 유지할 수 있다는 것은 여태까지

분리된 cyanophage의 결과들과 유사한 양상일 뿐만 아니라 부영양화된 호수수의 높은 알칼리성에 내성을 가지는 숙주세포에 기생하는 cyanophage의 생태적 특성을 시사한다.

따라서 본 연구에서 분리된 cyanophage는 국내에서는 처음으로 분리되었을 뿐만 아니라 tail의 세부적 형태에 있어서 기존에 발견된 *Myoviridae*에 속하는 종류와는 상이하므로 국외에서 연구되고 있는 불과 몇종 안되는 cyanophage의 범위를 넓혀 줄 것으로 예상된다. 또한 이들의 친염기적인 생화학적 특성이 부영양화된 호수의 생태적 특성을 나타냄에 따라 본 연구에서 분리된 cyanophage는 부영양화된 호수의 수화현상 억제를 위한 alga-cyanophage system 연구에 일조할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 말

본 연구는 1992년도 과학재단 우수연구센터 연구비 지원에 의해서 수행되었음.

참고 문헌

1. Ackerman, H.-W., A. Audurier, L. Berthiaume, L.A. Jones, J.A. Mayo, and A.K. Vidaver, 1978. Guidelines for bacteriophage characterization. *Adv. Virus Res.*, **23**, 1-24.
2. Brown, R.M., Jr., 1972. Algal viruses. *Adv. Virus Res.*, **17**, 243-277.
3. Cannon, R.E., 1987. Cyanophage ecology, P. 245. In S.M. Goyal, C.P. Gerba, and G. Bitton (ed.), *Phage Ecology*. John Wiley and Sons.
4. Mallison III, S.M. and R.E. Cannon, 1984. Effects of pesticides on cyanobacterium *Plectonema boryanum* and cyanophage LPP-1. *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**, 910-914.

5. **Padan, E. and M. Shilo**, 1973. Cyanophages-viruses attacking blue-green algae. *Bacteriol. Rev.*, **37**, 342-370.
6. **Philips, E.J., R.L. Monegue and F.J. Aldridge**, 1990. Cyanophages which impact bloom-forming cyanobacteria. *J. Aquat. Plant Manage.*, **28**, 92-97.
7. **Rippka, R., J.B. Waterbury, and R.Y. Stanier**, 1981. Isolation and purification of cyanobacteria: some general principles, P. 212. In M. Starr et al.(ed.), *The Prokaryotes*. Springer-verlag.
8. **Safferman, R.S. and M.-E. Morris**, 1963. Algal Virus: isolation. *Science*, **140**, 679-680.
9. **Safferman, R.S. and M.-E. Morris**, 1964. Control of algae with viruses. *J. AWWA.*, **56**, 1217-1224.
10. **Safferman, R.S., R.E. Cannon, P.R. Desjardins, B. V. Gromov, R. Haselkorn, L.A. Sherman, and M. Shilo**, 1983. Classification and nomenclature of viruses of cyanobacteria. *Interviol.*, **19**, 61-66.

(Received November 11, 1992)

(Accepted December 9, 1992)

ABSTRACT: Isolation and Identification of Cyanophage from Eutrophic Water

Kim, Min and Yong-Keel Choi (Department of biology, Hanyang University, Research Center for Molecular Microbiology, Seoul National University)

Synechococcus sp. cyanophage was isolated from Baekwoon reservoir located in Kyonggi-Do. The cyanophage was purified by employing ultrafiltration, differential centrifugation, and sucrose density gradient centrifugation. Electron microscopic observation indicated that the sizes of its isometric head and contractile tail are 89 nm and 111 nm, respectively, which means that the isolated cyanophage is included in the group, *Myoviridae*. The cyanophage maintained the stability of more than 50 percent from 20°C to 40°C and from pH 5 to 8, and had the maximal infectivity at 30°C and pH 9 implying its ecological significance.