

수화발생 저수지로부터 남조류 분해능을 가지는 미생물의 분리

신 규 철^{1,3} · 한 명 수^{1,2,3} · 최 영 길*^{1,3}¹한양대학교 자연과학대학 생명과학과, ²환경과학과, ³국가지정 불환경생태복원연구소

Isolation of the Microbes Having Cyanobacteria Lytic Activity from Blooming Reservoirs

Kyu-Chul Shin^{1,3}, Myung-Soo Han^{1,2,3} and Yong-Keel Choi*^{1,3}¹Department of Life Science and ²Environmental Science Hanyang University, Seoul 133-791, Korea,³National Research Laboratory for Water Environmental & Restoration

Abstract - We have from water samples of Kwalm, Dochang, and Mulwang reservoirs in Kyonggi-Do, where cyanobacteria blooming occurred. Isolated microbes which have lytic activity for cyanobacteria. Water samples were smeared on the *Anabaena cylindrica* lawn and incubated in light chamber at 28°C, under 3000 lux for 13 days. A fungus having cyanobacterial lytic activity was isolated from the samples of Dochang reservoir. The isolate was identified as *Cryptococcus laurentii* by Vitek system. From the culture of the isolate, four major extracellular protein bands (29, 35.2, 40.9, 51.1 kDa) have been detected and the 29 kDa protein band was more thickly appeared in the culture with cyanobacteria

Key words : Cyanobacteria, lytic activity, *Cryptococcus laurentii*, Extracellular protein

서 론

우리 나라와 같은 온대지방의 경우 하절기에 광량이 높고 수온이 상승하면 1차 생산자의 성장에 유리한 조건이 조성되어 조류의 대발생이 진행되는데 (Carmichael 1994) 특히 담수에서 발생하는 수화현상은 주로 남조류의 대량증식에 기인한다 (Brock 1985; Hermansky *et al.* 1990; Runnegar *et al.* 1991). 국내에서 보고된 수화현상은 신갈호, 대청호, 팔당호, 소양호 등의 대부분의 대형호수 뿐만 아니라, 소규모 저수지와 하천에서도 *Aphanizomenon*, *Anabaena*, *Anacystis*, *Microcystis*, *Oscillatoria*

등과 같은 남조류에 의한 수화현상이 보고되고 있다 (김 등 1996).

이러한 부영양화 및 수화발생을 억제하기 위해 세계 각국에서 여러 가지 방법들이 이용되고 있으나 대부분의 방법들은 기술적, 경제적 측면에서 많은 제약을 받고 있는 실정이다 (Dart and Stretton 1980; Jeffries and Mills 1990). 특히 황산동 (CuSO₄)이나 이산화염소 (ClO₂), 오존 (O₃), simazine과 같은 화학 물질들은 수화의 원인이 되는 조류에 특이적으로 작용하는 것이 아니므로 많은 무척추동물들과 1차 생산의 근간이 되는 모든 식물 플랑크톤들을 제거함으로써 수 생태계의 먹이 사슬을 파괴하고 어류에도 독성을 갖는 것으로 알려져 있다 (Reyssac and Pletkicisic 1990).

따라서 최근에는 화학 물질과 달리 2차적으로 생태계

* Corresponding author: Yong-Keel Choi, Tel. 02-2290-0952, Fax. 02-2293-9230, E-mail. ykchoi@hanyang.ac.kr

에 부수적인 피해를 일으키지 않는 생물학적 수화 억제 기법의 개발에 많은 관심이 모아지고 있으며 특히 미생물을 이용한 수환경내의 인, 질소 등의 영양염류의 제거나 수화원인생물의 제거에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다 (Kim and Choi 1994; 김 등 1996; 현과 최 1999).

본 연구에서는 생물학적 수화 억제에 활용할 수 있는 남조류 분해 미생물의 분리를 위해 남조류에 의한 수화가 발생한 과림, 도창, 물왕 저수지로부터 시료를 채수하여 남조류 분해 미생물의 분리를 시도하고 그 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 채수

2001년 7월 12일 남조류에 의한 수화현상이 심화된 경기도 소재의 과림, 도창, 물왕 저수지의 표층으로부터 멸균된 250 ml bottle을 이용하여 채수하였다 (Fig. 1). 채수한 시료는 4°C icebox에 보관하여 실험실로 운반하였다.

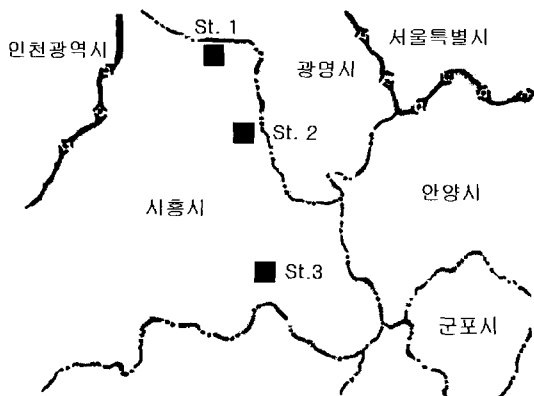


Fig. 1. Sampling site.

St. 1: Kawrim, St. 2: Dochang, St. 3: Mulwang

2. 남조류 분해능을 가지는 미생물의 분리

남조류 분해 미생물의 획득을 위해 double-layer agar method (Sakara *et al.* 1991)를 이용하여 BG-11 (Rippka 1988) 평판배지위에 *Anabaena cylindrica*로 algal lawn을 준비한다. Algal lawn은 대수생장기의 *Anabaena cylindrica*를 원심분리 (Beckman JA-21 rotor, 5,000 rpm, 4°C, 30분)하여 얻은 세포를 멸균된 2배 농축 BG-11배

지에 10^7 cell ml^{-1} 로 현탁하고, 1.2%의 agar를 포함하는 증류수를 멸균한 후 50°C까지 온도를 내리고 시험관에 각각 2 ml씩을 혼합한 후 미리 준비된 준비된 BG-11 평판 배지에 부어 수평판에서 굳히고 조류 배양기에서 1일 배양 후 사용한다. Algal lawn에 과림, 도창, 물왕 저수지의 sample을 100 μ l씩 접종 후 smearing하여 28°C 3,000 lux light chamber에서 배양하였다.

Algal lawn위에 halo zone을 형성하는 균체 colony를 분리 Potato Dextrose Broth (PDB) 배지에서 순수배양하였다.

3. 동정

분리된 균주를 PDB 배지에서 3회 계대 배양 후 Vitek system (KOMED)을 이용하여 동정하였다.

4. 성장 곡선

Test tube에 30 ml씩 PDB배지를 각각 분주 후 분리된 균주를 1 ml (3×10^3 cell ml^{-1})씩 접종하고 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18, 22, 26, 30일로 분리해서 배양하였다. 접종 후 2~30일까지 날짜별로 0.45 μ m Pore size membrane filter (Whatman)를 이용해서 sample을 각각 여과시켰다. Filter에 걸린 cell을 -20°C에서 4시간 동결시키고 Freeze dryer에서 동결 건조 시킨 후 Cell의 건조 중량을 측정하였다.

5. 분해효소의 확인

분리된 균체를 5% sucrose가 포함된 BG-11 (Rippka 1988) 액체배지에서 14일간 배양한 후 BG-11 액체배지에서 배양된 *Anabaena cylindrica* (10^7 cell ml^{-1})에 접종하여 7일간 혼합배양 하였다.

*Anabaena cylindrica*와 분리 균주의 순수배양 및 *Anabaena cylindrica*와 분리균주의 혼합배양액으로부터 각각 50 ml씩을 취하여 3,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 상등액을 획득하였다.

각각의 상등액 5 ml를 동결건조기 (FD5508, Ilshin engineering co., Korea)를 이용하여 건조시킨 후 200 μ l의 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 완충용액으로 현탁한 다음 SDS-PAGE를 이용하여 세포의 단백질을 분석하였다. 또한 남조류 분해 현상이 세포의 분비 단백질에 의한 것인지를 알아 보기 위하여 먼저 *Anabaena cylindrica*와 분리균주의 혼합배양한 상등액 2 l에 80% saturated ammonium sulfate를 넣고 24시간 동안 저어준 후 원심 분리 (20,000 \times g, 20 min, 4°C)하여 얻어진 침전물을 20

mM의 Tris-HCl (pH 7.5)에 현탁하여 dialysis tube (cellulose membrane, Sigma)에 넣고 2 l의 완충용액에 대하여 2회 투석하여 crude한 세포외단백질을 수획하였다. 이렇게 획득한 세포외 단백질을 *Anabaena cylindrical* lawn에 접종하여 hollow zone의 생성여부를 관찰하였다.

6. 남조류 분해능 측정

250 ml flask 6개에 각각 *Anabaena cylindrical*를 50 ml씩 분주해 넣고 28°C, 2000 lux인 진탕 배양기에서 24 시간 배양 후 3개의 flask에는 각각 대수 성장기의 *Cryptococcus laurentii*를 접종하고 나머지 3개의 flask에 대조군으로 *Cryptococcus laurentii*를 접종하지 않았다. 1, 2, 3, 5, 7, 9일째까지 Chlorophyll a를 추출하기 위해 4.7 diameters CF/C filter (Whatman)를 이용하여 각각을 5 ml씩 여과한 후 90% acetone이 30 ml 담겨져 있는 암병에 넣은 후 4°C에서 24시간동안 방치하여 Chlorophyll a를 추출하였다. 1 cm 석영 cell안에 pipette를 이용하여 상층액 1 ml 취하고 750, 644, 647, 630 nm의 파장으로 맞추어진 spectrophotometer (Hewlett Packard, Hp845X UV-Visible System, U.S.A.)를 이용하여 흡광도의 변화를 측정하였다. 흡광도의 단위 변환의 계산식은 다음과 같다(Parsons *et al.* 1984).

$$\text{Chlorophyll } a \text{의 값 } (\mu\text{g } l^{-1}) = C_a \times (v/V)$$

C_a Enumerated wavelength value

V : Filtering한 시수의 양(l)

v : 추출에 사용한 90% acetone의 양(ml)

결과 및 고찰

남조류에 의한 수확이 발생한 경기도 일원의 과립, 도창, 물왕 저수지로부터 채수된 시료를 *Anabaena cylindrical* lawn에 접종하여 13일간 배양한 결과 halo zone을 형성하는 균류를 분리하였다(Fig. 2).

분리된 균체는 Vitek system의 Yeast Biochemical Card (YBC)를 이용한 동정결과 *Cryptococcus laurentii*로 동정되었다(Table 1).

*Cryptococcus laurentii*의 성장 곡선을 측정한 결과 22 일째 대수성장기에 도달함을 관찰하였다(Fig. 3).

*Cryptococcus laurentii*의 세포외 분비 단백질에 의한 남조류 분해능의 확인을 위하여 crude extracellular protein을 *Anabaena cylindrical* lawn에 접종한 결과 접종 2일 후에 hollow zone을 형성함을 관찰하였다.

Table 1. Data sheet of Vitek Lab Report Manual

Type Yeast	Biochemical (YBC)				
Status	Final				
Elapsed time	48 hours				
Organism	<i>Cryptococcus laurentii</i>				
Bionumber	57777777				
GAL +	LAC -	SUC +	MLT +	CEL +	AMG +
XYL +	ARA +	TRE +	MLZ +	RAF +	NAG +
XLT +	DUL +	ADO +	DAL +	GLY +	SOR +
ERY +	MEL +	CYC +	GLU +	INO +	NIT +
2KD +	URE +	48H +			

98% *Cryptococcus laurentii*

GAL: Galactose, LAC: Lactose, SUC: Sucrose, MLT: Maltose, CEL: Cellobiose, AMG: Methyl-D-Glucoside, XYL: Xylose, ARA: Arabinose, TRE: Trehalose, MLZ: Melegitose, RAF: Raffinose, NAG: N-acethyl-D-glucosimine, XLT: Xylitol, DUL: Dulcitol, ADO: Adonitol, PAL: Palatinose, GLY: Glycerol, SoR: Sorbitol, ERY: Erythritol, MEL: Melibiose, CYC: Cycloheximide, GLU: Glucose, INO: Inositol, NIT: Nitrate, 2KD: 2-keto-D-glucuronate, URE: Urea medium

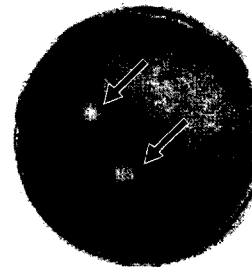


Fig. 2. Hollow zones that made by fungus having algal lytic activity.

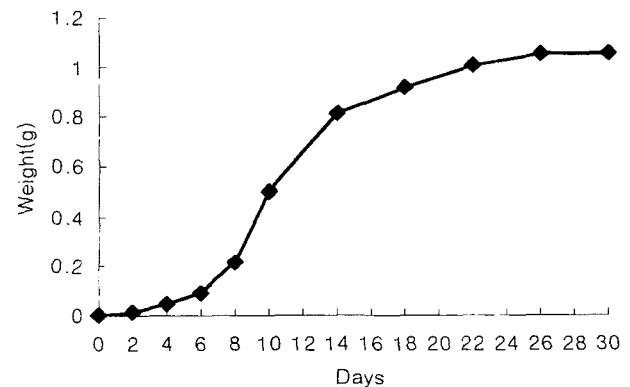


Fig. 3. Growth curve of *Cryptococcus laurentii*.

*Cryptococcus laurentii*의 세포외 분비 효소에 의한 남조류의 분해 가능성을 확인하기 위하여 5% sucross가 포함된 BG-11배지에서 7일간 배양 후 원심분리를 통

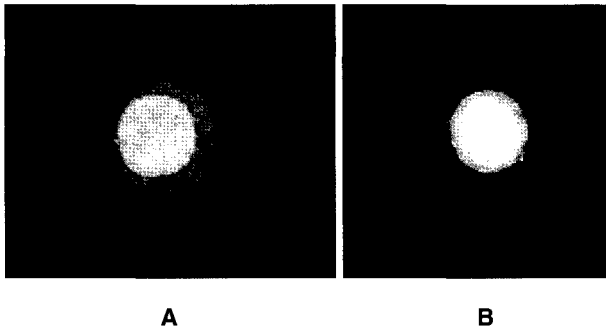


Fig. 4. Hollow zone that made by crude extracellular protein of *Cryptococcus laurentii*.
A: extracellular protein, B: 20 mM Tris-HCl (negative control)

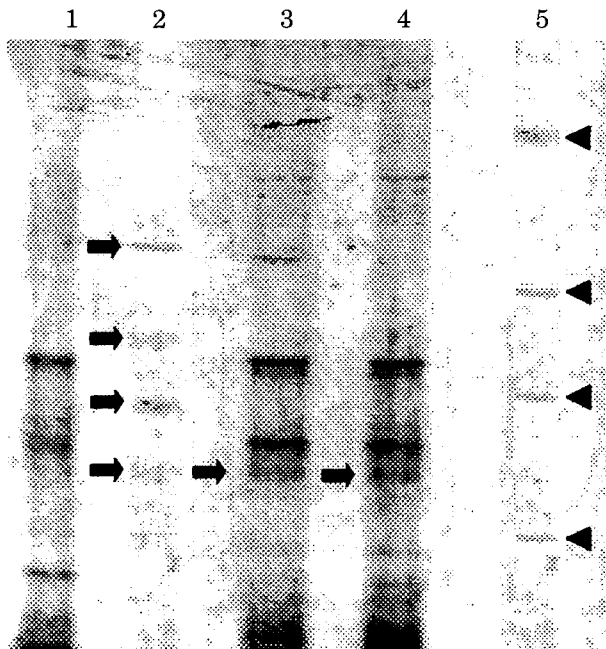


Fig. 5. SDS-PAGE patterns of ;
1: *Anabaena cylindrica*, 2: *Cryptococcus laurentii* (51.1, 40.9, 35.2, 29 kDa), 3 & 4: mixed cultured sample of *Anabaena cylindrica* and *Cryptococcus laurentii*, 5: Marker protein (66.2, 45, 35, 25 kDa)

하여 *Cryptococcus laurentii*의 cell을 제거하고 상등액을 SDS-PAGE를 한 결과 *Cryptococcus laurentii*는 29, 35.2, 40.9, 51.1 kDa 세포외 분비 단백질을 가지는 것이 확인되었다. 그 중 29 kDa의 분비 단백질은 *Anabaena cylindrica*와의 혼합배양시 band intensity가 단일배양시 보다 강하게 나타났다 (Fig. 4). 이를 통하여 *Cryptococcus laurentii*의 여러 세포외 분비 단백질 중 29 kDa의 단백질이 남조류 분해 작용에 관여하는 효소임을 확인

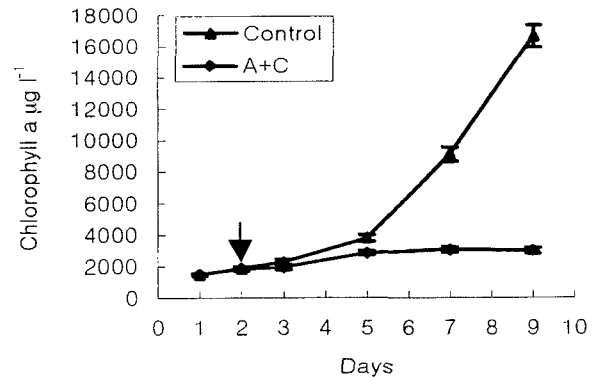


Fig. 6. Growth curves of *A. cylindrica* as measured by spectrophotometer, showing response following additions of *Cryptococcus laurentii*. Arrow means inoculation time of *Cryptococcus laurentii*.

할 수 있었다.

*Cryptococcus laurentii*의 남조류 분해정도를 알아 보기 위하여 대수성장기의 *Anabaena cylindrica* 배양액에 *Cryptococcus laurentii*를 접종하여 Chlorophyll a 양의 변화를 관찰한 결과 접종 4일째부터 대조군에 비하여 Chlorophyll a 양의 감소를 관찰할 수 있었고 접종 8일째에는 대조군에 비하여 Chlorophyll a 양이 20% 이하로 감소 함을 관찰하였다 (Fig. 5).

이상과 같이 남조류의 수화가 발생된 지역으로부터 남조류의 분해능을 가지는 미생물들을 분리하고 그 효소의 특성 및 기작을 밝힘으로서 남조류의 대발생을 생물학적 방법으로 조절하는데 활용될 수 있을 것이다.

적 요

남조류에 의한 수화가 발생한 과립, 도창, 물왕 저수지로부터 시료를 채수 하여 남조류 분해 균주의 분리를 시도하였다. BG-11배지에 *Anabaena cylindrica*를 double layer method를 이용하여 남조류 lawn을 만들어 각각의 시료를 100 µl씩 smearing하였다. 28°C 3,000 lux light chamber에서 13일간 배양하여 도창 저수지 시료를 접종한 *Anabaena cylindrica* lawn에서 남조류 분해능을 가지는 곰팡이를 분리하였다. 분리된 곰팡이의 동정은 Vitek system을 이용하여 수행하였으며, 그 결과 *Cryptococcus laurentii*로 동정 되었다. SDS-PAGE 결과 *Cryptococcus laurentii*는 4개 (29, 35.2, 40.9, 51.1 kDa)의 세포외 분비 단백질을 가지는 것으로 확인되었으며, *Anabaena cylindrica*와 혼합 배양시에는 특히 29 kDa의 단백질이 많이 분비되는 것을 확인하였다.

사 사

본 연구는 2000년도 한양대학교 교내연구비와 과학기술부 국가지정연구실 사업의 과제(2000-N-NL-01-C-290)에 의하여 수행됨.

인 용 문 헌

- 김철호, 김 민, 최영길. 1996. 남조류 수화의 미생물학적 제어. 국제생태학원리 응용심포지움. pp. 89-114. 강원대학교.
- 현성희, 최영길. 1999. *Penicillium oxalicum* (HCLF-34)으로부터 분비되는 *Anabaena cylindrica* 세포벽 분해효소의 특성. Korean J. Microbiol 35(3):231-236.
- Brock TD. 1985. A eutrophic lake-lake Mendota. Wisconsin. Springer-Verlag. New York.
- Carmichael WW. 1994. The toxins of cyanobacteria. Scientific American. 270:64-72.
- Dart RK and RJ Stretton. 1980. Microbiological aspects of pollution control. Fundamental Aspects of Pollution Control and Environmental Science 6. Elsevier. 41:952-956.
- Hermansky SJ, SN Wolff and SJ Stohs. 1990. Use of rifampin as an effective chemoprotectant and antidote against microcystin-LR toxicity. Pharmacol. 41:231-236.
- Jeffries M and D Mills. 1990. Freshwater Ecology. Principles and Applications. Belhavan Press, London.
- Kim M and YK Choi. 1994. A new *Synechococcus* cyanophage from a reservoir in korea. Virology. 204:338-342.
- Parsons RT, Y Maita and CM Lalli. 1984. A manual of chemical and biological methods for seawater analysis. 1st ed. Pergamon Press Ltd. Oxford.
- Reyssac SJ and M Pletikosic. 1990. Cyanobacteria in fish ponds. Aquaculture 88:1-20.
- Rippka R. 1988. Isolation and purification of cyanobacteria. Methods in enzymol. 167:3-27.
- Runnegar MTC, RG Terdes and IR Falconer. 1991. The uptake of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by isolated rat hepatocytes. Toxicol. 29:43-51.
- Sakata TY Fujita and H Yasumoto. 1991. Plaque formation by algicidal *Saprospira* sp. on a lawn of *Chaetoceros ceratosporum*. Nippon Suisan Gakkaishi. 57:1147-1152.

(Received 2 December 2001, accepted 28 February 2002)