

남조류 분해세균 HY0210-AK1의 분리와 특성 및
Anabaena cylindrica 분해 활성

장은희¹·김정동·한명수*

한양대학교 생명과학과, ¹한양대학교 환경대학원

Isolation and Characterization of Alga-Lytic Bacterium HY0210-AK1
and Its Degradability of *Anabaena cylindrica*

Eun-Heui Jang¹, Jeong-Dong Kim and Myung-Soo Han*

Department of Life Science and ¹Graduate School of Environmental Science,
Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

Abstract - To isolate alga-lytic bacteria, a number of samples were collected from Lake of Sukchon and Pal'tang reservoir where cyanobacteria blooming occurred. HY0210-AK1, which exhibited high alga-lytic activity, was isolated using *Anabaena cylindrica* lawn. The morphological and biochemical characteristics of the isolate HY0210-AK1 were very similar to that of the genus *Rhizobium*. Taxonomic identification including 16S rDNA base sequencing and phylogenetic analysis indicated that the isolate HY0210-AK1 had a 99.1% homology in its 16S rDNA base sequence with *Sphingobium herbicidovorans*. *A. cylindrica* NIES-19 was susceptible to the alga-lytic bacterial attack. The growth-inhibiting effect of the bacterium was not different on *A. cylindrica* NIES-19 when *Sphingobium herbicidovorans* HY0210-AK1 was in the lag, exponential, and stationary growth phase, although the alga-lytic effect of *S. herbicidovorans* HY0210-AK1 that in stationary growth phase was somewhat pronounced at the first time of inoculation. When *S. herbicidovorans* HY0210-AK1 was inoculated with 1×10^8 CFU ml⁻¹ together with *A. cylindrica* NIES-19, the bacterium proliferated and caused algal lysis. *A. cylindrica* NIES-19 died when *S. herbicidovorans* HY0210-AK1 was added to the algal culture but not when only the filtrates from the bacterial culture was added. This suggests that extracellular substances are not responsible for inhibition of *A. cylindrica* NIES-19 and that algal lysis largely attributed to direct interaction between *S. herbicidovorans* HY0210-AK1 and *A. cylindrica* NIES-19. The alga-lytic bacterium HY0210-AK1 caused cell lysis and death of three strain of *Microcystis aeruginosa*, but revealed no alga-lytic effects on the *Stephanodiscus hantzschii*.

Key words : alga-lytic bacterium, *Sphingobium herbicidovorans*, *Anabaena cylindrica*

* Corresponding author: Myung-Soo Han, Tel. 02-2290-0956,
Fax. 02-2296-1741, E-mail. hanms@hanyang.ac.kr

서 론

산업의 급속한 발달로 공장폐수의 증가와 인구의 도시 집중화로 인한 생활폐수의 증가는 질소, 인 및 탄소 등을 함유한 오염물질이 하천, 호수, 저수지 등으로 유입되어 수계에 부영양화 현상을 급속히 진행시킴으로써 남조류의 대발생을 야기한다. 특히 *Anabaena* spp.와 같은 남조류의 대발생은 여름철에 호수나 저수지 등에서 전세계적으로 만연하고 있으며, 이러한 남조류의 대발생은 많은 문제들을 초래한다. 남조류는 독소물질과 이취미 등을 생성하며 (Carmaichael *et al.* 1994; Harada 1996) 식물플랑크톤, 동물플랑크톤, 원생동물 (Reinikainen 1995) 및 어류를 포함한 야생동물이나 가축에게 직접적인 피해를 일으키고 (Penalzoa *et al.* 1990; Shirai 1991), 정수장에서 응집침전과 여과장애 등을 초래하여 정수비용을 증가시키며, 또한 불쾌한 냄새를 유발하여 레크레이션 장소로서 수변의 가치를 저하시키는 등 경제적 손실을 야기시키고 있다 (Watanabe *et al.* 1989). 따라서, 남조류의 생장조절은 수자원확보 및 보전과 공중보건 측면에서 매우 중요하므로, 하천이나 호수 및 저수지 등에서 남조류의 대발생을 제어하기 위하여 여러 가지 방법들이 시도되었다. 호수나 저수지에 유입되는 영양염류를 조절함으로써 남조류의 성장에 필요한 영양염류를 제어하려는 시도는 불가능하였고, 황산동 (copper sulfate) 등 화학물질을 이용하여 남조류를 제거하려는 시도는 2차적인 환경오염을 유발하였다 (McGuire *et al.* 1984; Reyssac and Pletikisic 1990). 이러한 문제점들을 보완하기 위하여 남조류 생장억제 미생물을 이용한 생물학적 접근 방법들이 생태계의 변화를 최소화 할 수 있으므로, 남조류 생장을 억제하거나 분해하는 세균에 대한 관심이 집중되고 있다. 특히 *Anabaena* spp.는 질소 고정을 함으로써 미생물에 에너지원과 질소를 제공한다 (Fay 1992; Khan *et al.* 1994). 따라서, 남조류 세포 주변에는 다양한 미생물이 분포하며, 기생하거나 공생하는 미생물 중에는 남조류의 세포 생장을 억제하거나 분해하는 미생물이 존재하는 것으로 알려져 있다 (Reyssac and Pletikisic 1990; Kim *et al.* 1997).

본 연구에서는 수화 다발 지역인 석촌호수와 팔당호 등에서 시료를 채취하여 남조류 대발생의 원인종인 *Anabaena cylindrica*의 억제에 활용할 수 있는 남조류 분해 미생물을 분리, 동정하고, 남조류 분해 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 시료의 채취

2002년 6월에서 2002년 10월까지 남조류 대발생이 빈번히 발생하는 석촌호수와 팔당호에서 저니 (sediment)와 저층시료 및 표층수를 채취하여 멸균된 250 ml 병에 담아, 4°C icebox에 보관하여 실험실로 운반한 후, 남조류 분해 미생물 분리에 이용하였다.

2. 남조류의 배양 조건

본 연구에서 남조류 분해세균의 분리 및 분해 특성 조사를 위한 공시조류로는 일본환경연구소 (National Institute for Environmental Studies, Japan)에서 제공한 *Anabaena cylindrica* NIES-19를 사용하였다. *Anabaena cylindrica* NIES-19의 경우 질소 공급원이 없는 배지에서 생장하는 것으로 알려져 있어 (Cattenholz 1988), NaNO₃가 첨가되지 않은 MDM 배지 (KNO₂, 10 g; MgSO₄ · 7H₂O, 2.5 g; K₂HPO₄, 2.5 g; NaCl, 1.0 g; A5 Solution, 1 ml; Fe Solution 1 ml; per 1 l)를 사용하였다. A5 solution은 H₃BO₃, 0.286 g; MnSO₄ · 7H₂O, 0.25 g; ZnSO₄ · 7H₂O, 0.0222 g; CuSO₄ · 5H₂O, 0.0079 g; Na₂MoO₄ · 2H₂O; 0.0021 g을 100 ml 증류수에 용해하여 첨가하였으며, Fe solution으로는 FeSO₄ · 7H₂O, 0.2 g과 H₂SO₄, 0.026 ml를 100 ml 증류수에 용해하여 첨가하였다. 남조류 배양 조건은 26°C, 150 rpm의 조건에서 진탕 배양하였다.

3. 남조류 분해세균의 분리

남조류 분해 세균을 분리하기 위하여 *Anabaena cylindrica* NIES-19를 숙주로 하는 over-layer agar method (Sakata *et al.* 1991)를 이용하여 MDM 평판배지 위에 *Anabaena cylindrica*로 lawn을 준비하였다. 대수성장기의 *Anabaena cylindrica*를 4°C, 500 rpm 조건에서 30분간 원심 분리하여 얻은 세포를 최종농도 0.6~0.7%의 agar가 함유된 평판배지에 top-agar layer를 만들어, 조류배양기에서 1~2일간 배양 후, 석촌호수와 팔당호에서 채취한 시료를 100 µl씩 도말하여 26°C, 30 µ Es⁻¹ m⁻², 12D:12L 조건으로 11일간 배양 후, *Anabaena cylindrica* lawn에 halo zone를 형성하는 세균 colony를 선별하여, Nutrient agar (Difco; beef extract, 3.0 g; peptone, 5.0 g; agar, 15 g; distilled water 1,000 ml)에서 순수배양 하였다.

4. HY0210-AK1의 동정

분리한 균주 HY0210-AK1, 생리 생화학적 특성조사를 위하여, Gram 염색, 최적성장 온도 및 pH, oxidases 반응, motility, hemolysis 등 주요 특성은 Bergey's Manual of Systemic Bacteriology (1984)에 따라서 확인하였다. HY0210-AK1 genomic DNA preparation은 Murray and Thompson (1980)의 방법에 따라서 수행하였고, 16S rDNA를 증폭하기 위한 primer는 Weisburg *et al.* (1991)한 primer를 변형하여 사용하였으며, forward primer는 5'-GAGTTGGATCCTGGCTCAG-3', reverse primer는 5'-AAGGAGGGGATCCAGCC-3'이다. 16S rDNA 염기서열을 결정하기 위하여 cloned fragment는 automated DNA sequencer (Bionex, Seoul, Korea)에 의해서 결정하였다. 염기서열분석을 통하여 얻어진 HY0210-AK1의 염기서열은 CLUSTAL W software (Thompson *et al.* 1994)로 분석하였고, 계통수는 (phylogenetic tree)는 PHYLIP version 3.5 package (Felsenstein 1993)에서 neighbor-joining method (Saitou and Nei 1987)를 이용하여 작성하였다. 계통형 사이의 염기서열의 유사도는 DNADIST 매트릭스 (Juke and Cantor 1969)를 이용하였다.

5. HY0210-AK1의 남조류 분해 활성 측정

250 ml Erlenmeyer flask 3개에 각각 *Anabaena cylindrica* NIES-19를 45 ml씩 분주해 넣고, 26°C, 30 μ Es⁻¹ m⁻², 12D : 12L 조건으로 7일 동안 배양 후, 대수성장기의 HY0210-AK1를 5 ml 접종하였고, 나머지 1개의 flask는 멸균한 Nutrient broth를 5 ml 접종하여 대조구로서 사용하였다. 접종 후, 11일 동안 24시간 간격으로 동일한 시간에 각각의 처리구에서 2 ml를 취하여, 25 mm diameter GF/F filter (Whatman, England)을 이용하여 여과한 후 90% acetone 20 ml에 처리하여 암병에 넣은 후 4°C에 24시간 방치 후 chlorophyll a를 추출하였다. 추출된 chlorophyll a는 750, 644, 647, 630 nm에서 spectrophotometer (Hewlett Packard, Hp845 \times UV-Visible Sytem, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였으며, 광도의 단위 변환의 계산식은 다음과 같다 (Parsons *et al.* 1984).

Chlorophyll a의 값 (μ g l⁻¹) = Ca \times (Vb/Va)

Ca: Enumerated wavelength value

Vb: Filtering한 시수의 양 (l)

Va: 추출에 사용한 90% acetone의 양 (ml)

6. HY0210-AK1의 개체수 변화 조사

HY0210-AK1과 *Anabaena cylindrica* NIES-19의 혼합배양 후 세균의 변화를 측정하기 위하여 HY0210-AK1을 접종한 날로부터 11일 동안 24시간 간격으로 혼합 배양한 배지에서 1 ml를 취하여 9 ml의 0.85% 멸균 식염수와 잘 섞은 후 10진 희석법으로 희석하여 Nutrient agar 배지에 도말하였다. 30°C에서 24시간 배양 후에 colony 수를 계수하여 HY0210-AK1 개체수의 변화를 측정하였다.

7. HY0210-AK1의 성장 단계와 분해 활성

HY0210-AK1의 성장 단계에 따른 *Anabaena cylindrica* NIES-19에 대한 살조 활성을 조사하기 위하여 대수성장기의 *A. cylindrica* NIES-19 45 ml를 100 ml Erlenmeyer flask에 분주하여, 성장 지체기 (배양 30분 후), 대수 증식기 (배양 6시간)와 정체기 (배양 24시간 후)의 HY0210-AK1을 각각 5 ml씩 접종하였고, 대조구로는 멸균한 Nutrient broth를 5 ml를 접종하였다. 접종한 flask는 후 조류배양기에서 26°C, 30 μ Es⁻¹ m⁻², 12D : 12L 조건에서 배양하여, 11일 동안 24시간 간격으로 chlorophyll a의 변화를 측정하였다.

8. HY0210-AK1의 접종 농도와 분해 활성

대수성장기의 *A. cylindrica* NIES-19를 100 ml Erlenmeyer Flask에 45 ml씩 분주한 후, 분리세균 HY0210-AK1를 1 \times 10⁶, 1 \times 10⁷, 1 \times 10⁸ CFU ml⁻¹를 각각 5 ml를 접종한 후 조류 배양 조건에서 11일간 배양 하면서 24시간 간격으로 chlorophyll a의 변화를 측정하였다.

9. HY0210-AK1 세포 외 물질의 *Anabaena cylindrica* NIES-19 증식 저해

Nutrient broth 배지에서 HY0210-AK1를 24시간 배양한 후에 4°C에서 12,000 rpm 조건으로 15분 원심분리한 후 상등액을 취하여 YM-10 membrane filter (Millipore, exclusion size 1 kDa M.W. cut off)로 여과하여 사용하였다. 여과한 상등액을 10%, 50%, 90%를 대수성장기의 *A. cylindrica* NIES-19에 접종하였으며 증식저해 효과를 조사하였다. 대조구로는 여과한 배양액을 고압 멸균한 후, 각각 10%, 50%, 90%를 대수성장기의 *A. cylindrica* NIES-19에 접종하여 사용하였다.

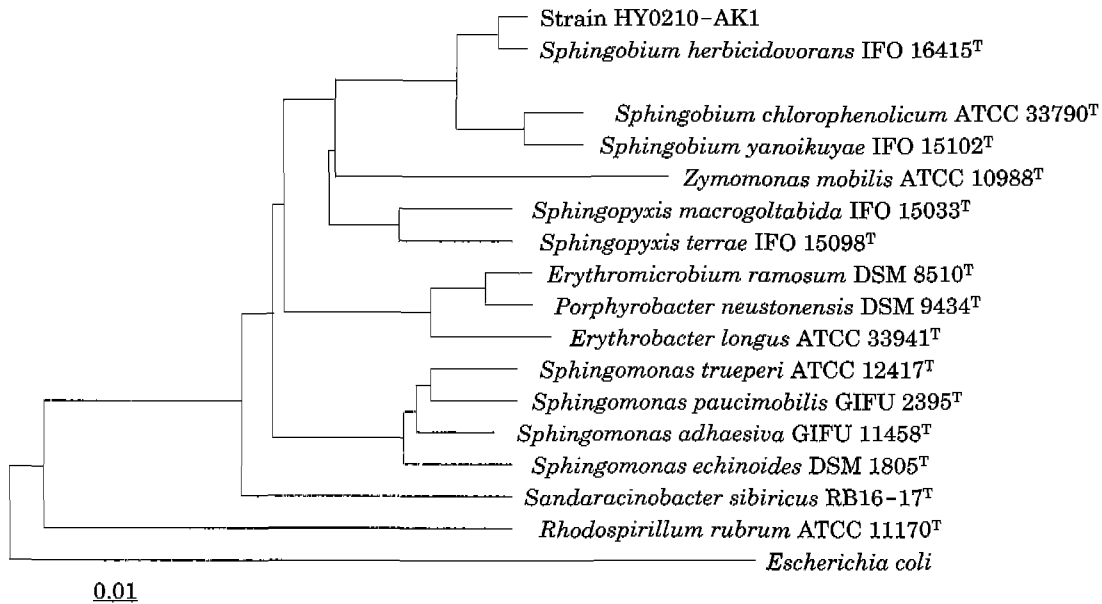


Fig. 1. Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences showing the positions of strain HY0210-AK1, the type strains of *Sphingobium* species and the representatives of some other related taxa. Scale bar represents 0.01 substitutions per nucleotide position.

10. HY0210-AK1의 살조 범위 조사

HY0210-AK1의 남조류 *Microcystis aeruginosa* NIES-44, *M. aeruginosa* NIES-88, *M. aeruginosa* NIES-298와 규조류 *Stephanodiscus hantzschii* UTCC-276, *S. hantzschii* CCAP 1079/4에 대한 증식저해 효과를 조사하였다. 각각의 조류가 대수성장기 일때, Nutrient broth에서 24시간 배양한 HY0210-AK1를 1×10^8 CFU ml⁻¹로 접종한 후 조류의 증식 저해효과를 조사하였다

결과 및 고찰

1. 남조류 분해 세균의 분리

남조류의 대발생하는 석촌호수 및 팔당호에서 채취한 저니, 저층시료 및 표층수를 *Anabaena cylindrica* NIES-19 lawn에 접종하여 11일간 배양한 결과 석촌호수에서 36개의 colony, 팔당호에서 64개의 colony가 분리되었으며, 그 중에서 남조류 저해 활성을 나타내는 20개의 colony를 선별하였고, *Anabaena cylindrica* NIES-19와 액체 혼합배양에서 가장 우수한 활성을 나타내는 HY0210-AK1를 선별하여 사용하였다 (data not shown).

2. HY0210-AK1의 형태 및 생화학적 특징과 동정

HY0210-AK의 형태적, 생화학적 특성은 Table 1에서 나타나 있으며, 그람 음성균이고, 30°C, pH 6 정도에서 최적의 생장을 보였으며, Kohn's gelatin와 tryptophane test에서는 양성반응을 보였다. 이상의 형태적 및 생화학적 결과에 의해서 HY0210-AK1은 *Rhizobium*속 및 관련 속 (allied genera)에 속하는 것으로 판단되었다. 분리 균주의 정확한 동정을 위하여 16S rDNA의 염기서열 분석과 CRUSTAL W program 및 PHYLIP program을 이용하여 HY0210-AK1의 분자 계통분석 결과를 Fig. 2에 보여주고 있다. HY0210-AK1은 *Sphingobium yanoikuyae* IFO 15102^T, *Zymomonas mobilis* ATCC 10988^T, *Sphingobium herbicidovorans* IFO 16415^T와 높은 유연관계를 보여주었으며, 특히 *Sphingobium herbicidovorans* IFO 16415^T와 99.1%의 가장 높은 연관성을 나타내어 (Table 2), HY0210-AK1을 *Sphingobium herbicidovorans* HY0210-AK1으로 명하였다.

Sphingobium herbicidovorans HY0210-AK1는 잠복기 (lag growth phase)가 매우 짧고, 대수성장기 (exponential growth phase)에서 정체기 (stationary growth phase)로 매우 빠르게 전환하는 양상을 나타내었다.

Table 1. Morphological and biochemical characteristic of isolate HY0210-AK1

Characteristics	HY0210-AK1
Cell shape	Short rod
Gram staining	-
Optimal temperature	30°C
Optimal pH	6
Pigment	Orange
Arginine	-
Oxidase	-
Motility	-
ONPG or IPTG	+
Lysine	-
Ornithine	-
Sodium citrate	-
Urea	-
Tryptophane	+
Creatine sodium pyruvate	+
Kohn's gelatin	+
Glucose	+
Mannitol	-
Inositol	-
Sorbitol	-
Rhamnose	-
Sucrose	-
Melibiose	-
Amygdain	-
Arabinose	-
Potassium nitrate	Reduction to N ₂ gas

3. *Sphingobium herbicidovorans* HY0210-AK1의 남조류 분해 활성

Sphingobium herbicidovorans HY0210-AK1의 *Anabaena cylindrica* NIES-19 분해정도를 알아보기 위해 *Sphingobium herbicidovorans* HY0210-AK1의 1×10^8

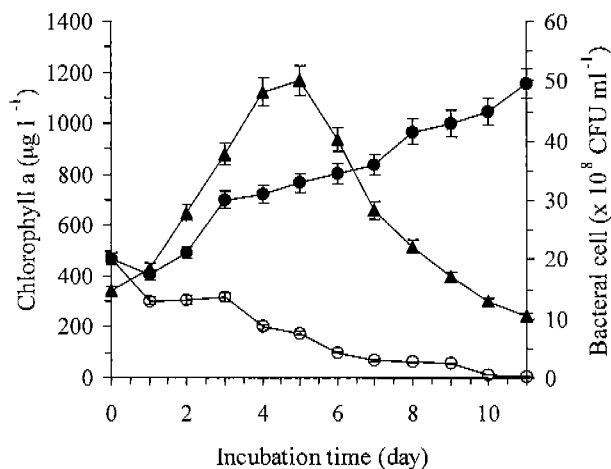


Fig. 2. Growth inhibition of *A. cylindrica* by *Sphingobium herbicidovorans* HY0210-AK1 and growth curves of *Sphingobium herbicidovorans* HY0210-AK1 in mixed-culture. Symbols are (●), growth of *A. cylindrica* treated with and Nutrient broth; (○), growth of *A. cylindrica* treated with *Sphingobium herbicidovorans* HY0210-AK1; (▲), bacterial cells of *Sphingobium herbicidovorans* HY0210-AK1.

CFU ml⁻¹를 대수성장기의 *Anabaena cylindrica* NIES-19에 접종한 후 혼합배양한 처리구와 HY-0210-AK1을 접종하지 않은 대조구의 chlorophyll a 값을 비교한 결과 혼합배양한 처리구에서는 접종 후 3일째에 chlorophyll a 값이 45%로 감소하였으며, 접종 후 9일째는 chlorophyll a 값이 5.8%로 감소하였으며 접종 후 11일째는 *A. cylindrica* NIES-19의 vegetative cell이 완전히 소멸함을 관찰할 수 있었다(Fig. 2). *Sphingobium herbicidovorans* HY0210-AK1의 개체수는 접종 후 5일째는 5×10^8

Table 2. Levels of 16S rDNA similarity for strain KEH 1-1, the type strains of *Sphingobium* species and the representatives of some other related taxa

Strain	% in Similarity:												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1. Strain HY0210-AK1													
2. <i>Sphingobium herbicidovorans</i> IFO 16415 ^T	99.1												
3. <i>Sphingobium yanoikuyae</i> IFO 15102 ^T	97.7	97.3											
4. <i>Zymomonas mobilis</i> ATCC 10988 ^T	98.1	97.4	98.9										
5. <i>Sphingopyxis macrogoltabida</i> IFO 15033 ^T	96.3	96.2	97.2	97.0									
6. <i>Erythromicrobium ramosum</i> DSM 8510 ^T	96.4	96.1	95.7	95.9	95.5								
7. <i>Porphyrobacter neustonensis</i> DSM 9434 ^T	96.3	96.5	96.2	96.2	95.4	95.7							
8. <i>Erythrobacter longus</i> ATCC 33941 ^T	92.3	91.4	92.1	92.1	92.1	92.9	92.4						
9. <i>Sphingomonas paucimobilis</i> GIFU 2395 ^T	93.2	92.8	92.6	92.8	93.4	93.8	93.3	95.9					
10. <i>Sphingomonas adhaesiva</i> GIFU 11458 ^T	90.4	90.3	90.6	90.5	90.6	91.6	91.3	91.1	90.9				
11. <i>Sandaracinobacter sibiricus</i> RB16-17 ^T	93.2	93.2	93.2	93.1	93.9	94.8	93.9	93.0	93.3	92.3			
12. <i>Rhodospirillum rubrum</i> ATCC 11170 ^T	93.9	93.4	93.6	93.9	92.9	93.1	93.7	91.7	91.2	90.2	93.3		
13. <i>Escherichia coli</i>	93.6	93.2	93.0	93.4	93.5	93.3	93.3	91.8	91.6	90.5	93.0	98.2	

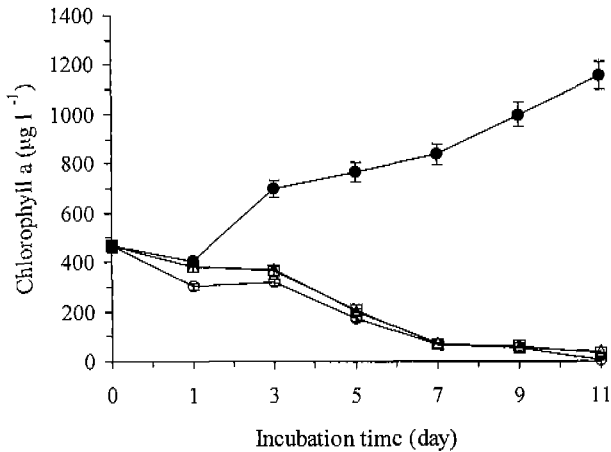


Fig. 3. Time course of the growth of *A. cylindrica* cultivated with *Sphingobium herbicidovorans* HY0210-AK1 at the different culture phases in MDM medium. Symbols are (●), growth of *A. cylindrica* treated with Nutrient broth; (□), growth of *A. cylindrica* treated with *Sphingobium herbicidovorans* HY0210-AK1 at lag growth phase; (△), *Sphingobium herbicidovorans* HY0210-AK1 at exponential growth phase; and (○), *Sphingobium herbicidovorans* HY0210-AK1 at stationary growth phase.

CFU ml⁻¹ 계속 증가하였으며 이후에 감소하여 1점종 후 11일째는 1 × 10⁸ CFU ml⁻¹로 감소함을 볼 수 있었다. 따라서 살조 세균의 농도가 1 × 10⁸ CFU ml⁻¹ 이상으로 유지된다면 살조 효과는 지속되는 것으로 사료된다.

4. *Sphingobium herbicidovorans* HY0210-AK1 성장단계와 분해 활성

대수성장기의 *A. cylindrica* NIES-19에 생장잠복기(30분 배양), 대수성장기(6시간 배양)와 정체기(24시간 배양)의 *Sphingobium herbicidovorans* HY0210-AK1를 접종하여 혼합배양 한 결과 잠복기, 대수성장기 및 정체기에 접종 한 처리구에서 모두 유사한 살조 경향을 나타내었다(Fig. 3). 접종 후 1일째는 HY0210-AK1를 잠복기나 대수 성장기에 접종하여 혼합 배양하였을 경우, chlorophyll a 값이 각각 3%, 5.7% 감소하였고, 정체기에 접종한 처리구에서는 chlorophyll a 값이 25%가 감소하였으나, 접종 7일 이후부터는 큰 차이를 확인할 수 없었다. 따라서 접종 초기에는 정체기의 *Sphingobium herbicidovorans* HY0210-AK1를 접종하는 것이 살조 효과가 뛰어난 것을 알 수 있었다. Manage *et al.* (2000)은 살조 세균 *Alcaligenes denitrificans*를 *Microcystis* spp.에 접종하였을 경우 *Microcystis viridis*와 *M. wesenbergii* 살조

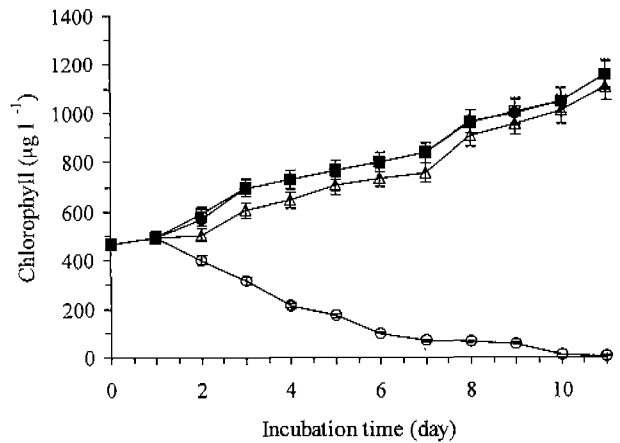


Fig. 4. Growth inhibition of *Anabaena cylindrica* NIES-19 with treatment of various concentrations of *Sphingobium herbicidovorans* HY0210-AK1. Symbols are (●) growth of *A. cylindrica* inoculated with Nutrient broth as control; (□), 1 × 10⁶ CFU ml⁻¹; (△), 1 × 10⁷ CFU ml⁻¹; and (○), 1 × 10⁸ CFU ml⁻¹ of *Sphingobium herbicidovorans* HY0210-AK1.

세균의 처리시기와 관계없이 유사한 살조 효과를 보였으나, *M. aeruginosa*는 잠복기에 있는 *A. denitrificans*를 접종하였을 때는 살조 효과가 없었으며 대수성장기와 정체기에 접어든 살조 세균을 처리 하였을 경우에는 살조 효과가 나타났다고 보고하였다. 따라서 살조 효과는 살조 세균의 성장시기와 남조류간에 종 특이적 현상이 관여하는 것으로 사료된다.

5. *Sphingobium herbicidovorans* HY0210-AK1 접종 농도와 분해 활성

Sphingobium herbicidovorans HY0210-AK1의 접종 농도에 대한 남조류의 분해정도를 알아보기 위해 정체기의 *Sphingobium herbicidovorans* HY0210-AK1를 24시간 배양 후 십진 희석법을 이용하여, 1 × 10⁶, 1 × 10⁷, 1 × 10⁸ CFU ml⁻¹를 각각 대수성장기의 *A. cylindrica* NIES-19에 접종하여 혼합 배양한 후 chlorophyll a 값을 비교, 조사한 결과는 Fig. 4와 같이 나타났고, 1 × 10⁸ CFU ml⁻¹를 접종 후 혼합배양한 처리구를 제외하고는 모두 대조구와 같은 성장을 보였으며, 남조류의 분해를 확인할 수 없었다. 따라서 *Sphingobium herbicidovorans* HY0210-AK1는 1 × 10⁸ CFU ml⁻¹ 이상의 농도로 처리하였을 때 살조 효과가 나타나는 것으로 여겨진다. *Alcaligenes denitrificans*는 1 × 10³ CFU ml⁻¹를 접종 시에도 살조 효과를 나타낸다고 보고하였으나(Manage *et*

al. 2000), 1×10^8 CFU ml⁻¹를 처리하는 *A. denitrificans* 가 1×10^8 CFU ml⁻¹까지 성장해야만 비로서 살조 효과를 나타내었다. 따라서 *Sphingobium herbicidovorans* HY0210-AK1는 비교적 살조 효과가 우수한 살조세균으로 여겨진다.

6. *Sphingobium herbicidovorans* HY0210-AK1의 세포 외 물질과 *Anabaena cylindrica* NIES-19 증식 저해

Sphingobium herbicidovorans HY0210-AK1와 *Anabaena cylindrica* NIES-19를 혼합 배양한 상등액을 membrane filter로 여과한 후 10%와 50%를 대수성장기의 *A. cylindrica* NIES-19에 접종하였으며 증식저해 효과를 조사한 결과 *A. cylindrica*의 성장 저해 효과는 확인할 수 없었고 90%를 접종하였을 경우에는 남조류의 성장 저해는 관찰할 수 있었으나 저해효과는 미미하였다(Fig. 5). 지금까지의 연구결과로 볼 때 *Sphingobium herbicidovorans* HY0210-AK1를 남조류와 함께 배양하였을 때는 살조 활성이 나타났으나, 배양여액을 처리하였을 경우에는 살조 효과를 관찰할 수 없었다. 따라서 *Sphingobium herbicidovorans* HY0210-AK1세포는 물질을 분비하여 *A. cylindrica* NIES-19를 분해하는 것이 아니라, 남조류를 직접 공격하여 분해하는 것으로 여겨진다. Daft and Stewart (1971)은 Myxobacteriales는 접종 후 20분 이내에 남조류를 분해하였으며, 어떤 세포 외 물질도 분비하지 않는 것으로 보고하였고, 분해관련 효소는 세균표면에 있다고 제안하였다. Shilo (1970), Baker and Herson (1978), Burnham et al. (1984)는 남조류를 직접 공격하는 것이 생태학적 측면에서 살조 세균에게 매우 유리하게 작용하는 것으로 보고하였다.

7. *Sphingobium herbicidovorans* HY0210-AK1의 살조 범위 조사

Sphingobium herbicidovorans HY0210-AK1의 살조 범위를 조사하기 위하여 *Microcystis aeruginosa* NIES-44, *M. aeruginosa* NIES-88, *M. aeruginosa* NIES-289과 *Stephanodiscus hantzschii* UTCC-276, *S. hantzschii* CCAP 1079/4에 대한 살조 효과를 액체 혼합배양과 algal lawn 방법으로 확인하였다. 각각의 조류는 순수 배양한 것을 사용하였으며, 접종 5일 후에 각각의 살조 효과를 조사하였다. 3종의 *Microcystis*는 모두 *Sphingobium herbicidovorans* HY0210-AK1의 공격에 감수성을 나타내었다. 살조 세균 HY0210-AK1를 *Microcystis*와 혼합 배양하였을 때, *Microcystis*는 서서히 탈색되고, 분

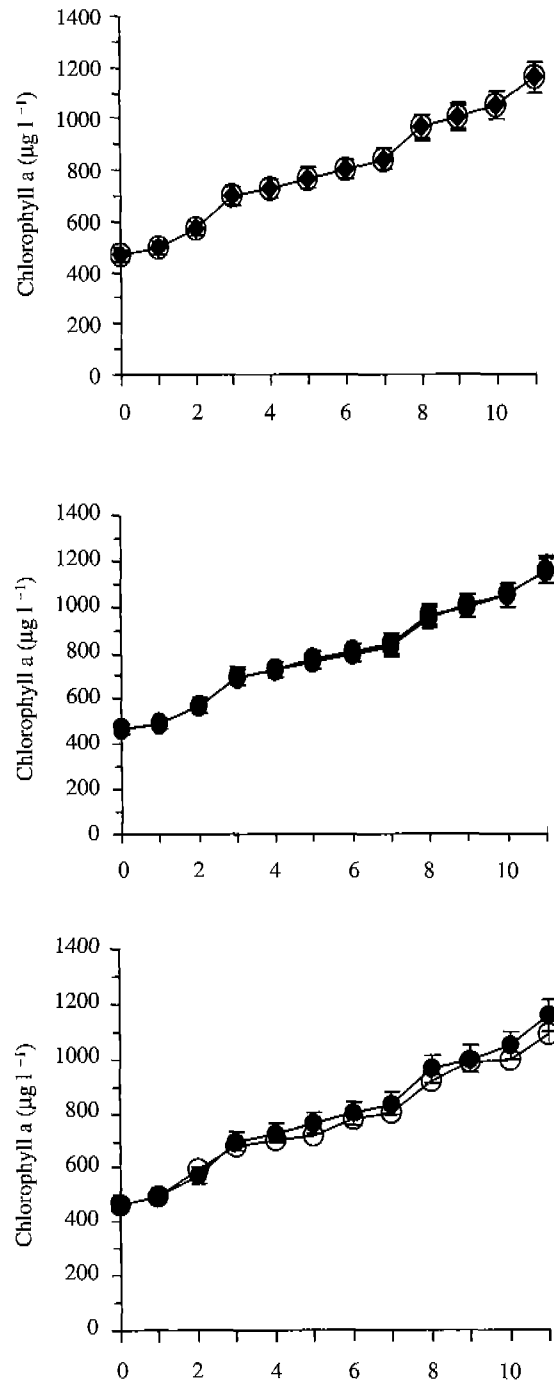


Fig. 5. Alga-lytic activity of filtrate from the culture in which *Anabaena cylindrica* NIES-19 was lysed by *Sphingobium herbicidovorans* HY0210-AK1. Symbols are (●), autoclaved culture filtrate as control; (○), with culture filtrate of *Sphingobium herbicidovorans* HY-0210-AK1.

해되었으며, 현미경 관찰로도 *Microcystis*의 세포가 완전히 소멸한 것을 확인할 수 있었다. 그러나 2종 *Steph-*

Table 3. Host susceptibility of alga-lytic bacterium *Sphingobium herbicidovorans* HY0210-AK1

Species	Susceptibility
<i>Microcystis aeruginosa</i> NIES-44	+
<i>Microcystis aeruginosa</i> NIES-88	+
<i>Microcystis aeruginosa</i> NIES-289	+
<i>Stephanodiscus hantzschii</i> UTCC-276	-
<i>Stephanodiscus hantzschii</i> CCAP 1079/4	-

+, susceptibility; -, non-susceptibility

*anodiscus*와 살조 세균을 혼합배양시, 어떤 변화도 관찰할 수 없었다. 따라서 살조 세균 *Sphingobium herbicidovorans* HY0210-AK1는 *Microcystis aeruginosa*와 *Anabaena cylindrica*를 분해하는 것으로 여겨지며, *Sphingobium herbicidovorans* HY0210-AK1는 남조류에 대해 넓은 살조 범위를 갖는 것으로 여겨진다. 이상과 같이 남조류의 수화 발생 지역에서부터 남조류 분해 활성을 지닌 살조 세균 *Sphingobium herbicidovorans* HY0210-AK1의 분해 특성과 살조 범위를 고려한다면, 현장의 *Microcystis* 대발생을 생물학적으로 제어하는데 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

적 요

남조류의 대발생이 자주 발생하는 석촌호수와 팔당호로부터 시료를 채취하여 남조류 분해세균의 분리를 시도하였다. MDM 배지 상에서 *Anabaena cylindrica*를 속주로 하는 over-layer method를 이용하여 *Anabaena cylindrica* lawn에서 남조류 분해 세균을 분리하여 HY0210-AK1으로 명명하였다. HY0210-AK1의 형태적, 생화학적 특성은 *Rhizobium*속과 유사하였으며, 16S rDNA 염기서열을 분석한 결과 *Sphingobium herbicidovorans* IFO 16415^T와 99.1%의 높은 유연관계를 보여 *Sphingobium herbicidovorans* HY0210-AK1로 동정하였다. 잠복기, 대수성장기, 정체기에 있는 *Sphingobium herbicidovorans* HY0210-AK1를 *Anabaena cylindrica* NIES-19와 혼합 배양하였을 때, 접종 초기에는 정체기의 *Sphingobium herbicidovorans* HY0210-AK1를 접종한 처리구에서 가장 좋은 살조 효과를 나타냈으나, 접종 7일 이후에는 커다란 차이를 보이지 않았다. 또한, *Sphingobium herbicidovorans* HY0210-AK1는 1×10^8 CFU ml⁻¹ 이상의 농도로 처리하였을 때, *Anabaena cylindrica* NIES-19가 완전히 분해되었다. *Sphingobium herbicidovorans* HY0210-AK1와 *Anabaena cylin-*

drica NIES-19를 혼합 배양한 상등액을 여과하여 접종하였을 때는 남조류 성장 저해 효과가 나타나지 않았다. 따라서 *Sphingobium herbicidovorans* HY0210-AK1는 *Anabaena cylindrica* NIES-19를 직접 공격하여 분해하는 것으로 사료된다. *Sphingobium herbicidovorans* HY0210-AK1는 *Microcystis aeruginosa*도 분해하였다.

사 사

본 연구는 21세기 프론티어 연구개발 사업, 수자원 지속적 확보기술개발 사업 과제(과제번호 5-9-1)에 의하여 수행되었음을 감사 드립니다.

참 고 문 헌

- Baker KH and DS Herson. 1978. Interactions between the diatom *Thalassiosira pseudomonanna* and an associated Pseudomonad in a mariculture system. *Appl. Environ. Microbiol.* 35:791-796.
- Burnham JC, SA Collart and MJ Daft. 1984. Myxococcal predation of the cyanobacterium *Phormidium luridum* in aqueous environments. *Arch Microbiol.* 137:220-225.
- Carmichael WW. 1994. The toxins of cyanobacteria. *Sci. Am.* 270:64-72.
- Castenholz RW. 1988. Culturing methods for cyanobacteria. *Methods Enzymol.* 167:68-92.
- Daft MJ and WD Stewart. 1971. Bacterial pathogens of freshwater blue-green algae. *New Phytol.* 70:819-829.
- Fay P. 1992. Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. *Microbiol. Rev.* 56:340-373.
- Felsenstein J. 1993. *PHYMLIP: Phylogenetic Inference Package*. Version 3.5. Seattle, University of Washington, DC, USA.
- Harada K-I. 1996. Chemistry and detection of microcystins. pp. 103-148. In *Toxic Microcystis* (Watanabe MF, K-I Harada, WW Carmichael and H Fujiki eds.). CRC Press, London.
- Juke TH and CR Cantor. 1969. Evolution of protein molecules. pp. 21-132. In *Mammalian protein metabolism* (Munro HN ed.). Academic Press, New York.
- Khan ZUM, ZUT Begum, R Mandal and MZ Hossain. 1994. Cyanobacteria in rice soils. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 10:296-298.
- Kim C-H, Y-K Choi and B-R Min. 1997. Lysis of *Anabaena cylindrica* (cyanobacterium) cell wall by extra-

- cellular enzyme of *Moraxella* sp. CK-1. Kor. J. Environ. Biol. 15:89-97.
- Krige NR and JG Holt. 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology (Vol. 1), Williams and Wilkins, Baltimore.
- Manage PM, Z Kawabata and S Nakano. 2000. Algicidal effect of the bacterium *Alcaligenes denitrificans* on *Microcystis* spp. Aquat. Microb. Ecol. 22:111-117.
- McGuire RM, JM Jones, EG Means, G Lzaguire and AE Reston. 1984. Controlling attached blue-green algae with copper sulfate. Res. Technol. 27:60-65.
- Murray MG and WF Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular-weight plant DNA. Nucleic Acid Res. 8: 4321-4325.
- Parsons RT, Y Matia and CM Lalli. 1984. A manual of chemical and biological methods for seawater analysis. 1st ed. Pergamon Press Ltd. Oxford.
- Penaloza R, M Rojas, I Vila and F Zambrano. 1990. Toxicology of a soluble peptide from *Microcystis* sp. to zooplankton and fish. Fresh water Biol. 24:233-240
- Reinikainen M, J Kiviranta, V Ulvi and MLN Paavola. 1995. Acute toxic effects of a novel cyanobacterial toxin on the crustaceans *Artemia salina* and *Daphnia pulex*. Arch. Hydrobiol. 133:61-69.
- Reyssac SJ and M Pletikosic. 1990. Cyanobacteria in fishponds. Aquaculture 88:1-20.
- Saitou N and M Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Bio. Evol. 4:406-425.
- Sakata T, Y Fujita and H Yasumoto. 1991. Plaque formation by algicidal *Saprospira* sp. on a lawn of *Chaetoceros ceratosporum*. Nippon Suisan Gakkaishi 57:1147-1152.
- Shilo M. 1970. Lysis of blue-green algae by myxobacter. J. Bacteriol. 104:453-461.
- Shirai M, A Ohtake, T Sano, S Matsumoto, T Sakamoto, A Sato, T Aida, K-I Harada, T Shimada, M Suzuki and M Nakano. 1991. Toxicity and toxins of natural blooms and isolated strains of *Microcystis* spp. (Cyanobacteria) and improved procedure for purification of culture. Appl. Environ. Microbiol. 57:1241-1245.
- Thompson IP, MJ Bailey and BP Rainey. 1994. Phenotypic techniques for identification of unusual aerobic photoautotrophic gram-negative Bacilli. J. Clin. Microbiol. 36:3674-3679.
- Watanabe MM, K Kaya and N Takamura. 1992. Fate of the toxic cyclic heptapeptides, the microcystins from blooms of *Microcystis* (Cyanobacteria) in a hypertrophic lake. J. Phycol. 28:761-767.
- Wiesburg W, SM Barns, DE Pelletier and DJ Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J. Bacteriol. 173:697-703.

Manuscript Received: February 26, 2003

Revision Accepted: March 6, 2003

Responsible Editorial Member: Wonchoel Lee
(Hanyang Univ.)