Korean J. Limnol. 37 (2) : 236～240 (2004)

겨울철 녹조발생 원인종 *Stephanodiscus hantzschii*의 생물학적제어를 위한 미소생물제재의 적용실험

김 백 호[1] · 강 윤 호[2] · 한 명 수[1,2,*]

(한양대학교 생명과학과[1], 환경과학과[2])

Potential in the Application for Biological Control of Winter Diatom Bloom Caused by *Stephanodiscus hantzschii*. ***Kim, Baik-Ho[1], Yoon-Ho Kang[2] and Myung-Soo Han[1,2,*] (Department of [1]Life science and [2]Environmental Science, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea)***

To examine the algicidal effect of co-treatment of biological control agent on centric diatom *Stephanodiscus hantzschii* in the filtered water, an endemic algicidal bacterium (*Pseudomonas putida*) and a heterotrich ciliate (*Stentor roselli*) were isolated from Pal' tang reservoir, Korea. Bacterial isolate and ciliate removed 98% and 80% of the diatom for 7 days of cultivation. Co-treatments of these two agents perfectly inhibited the diatom growth, compared to the single treatment of each agent. This synergistic interaction of the bacterium and ciliate could provide an effective tool in the biomanipulation to control the diatom bloom in freshwater lakes and streams.

Key words : algicidal bacteria, ciliate *Stentor roeseli*, diatom *Stephanodiscus hantzschii*, biological control

서 론

저온기나 갈수기에 소형원반 규조의 하나인 *Stephanodiscus hantzschii*의 대발생이 국내 주요 하천-낙동강 (조, 1995; 조 등, 1998; Ha *et al.*, 2002) 및 한강 (조 등, 1998; 이 등, 2002; 한 등, 2002; Han *et al.*, 2002; Hong *et al.*, 2002), 만경강 (Cho, 1995) 등- 에서 보고되고 있다. 이러한 조류대발생은 수자원의 확보및 관리에 많은 어려움을 주고 (Reynolds, 1985; Vincent, 1987), 대개 수중미생물에 의해 분해되는 과정에서 각종 유기물과 질소, 인 등의 무기염류가 용출되어 수계의 부영양화를 반복, 심화시킬 뿐 아니라, 용존산소 감소, 투명도 감소, 심한 악취를 발생하고(Oksiyuk, 1965; Sakevich, 1970; Kolmakov *et al.*, 2002), 정수장의 침전사를 막아 경제적 손실을 초래한다 (임 등, 2000; 이 등, 2001).

최근 담수의 조류대발생에 대한 생물학적 제어연구가 활발하게 진행되고 있다. 주요 생물제재로는 바이러스, 균류, 세균, actinomycetes, 원생생물 등 다양한 생물이 이용되고 있으나 (Sigee *et al.*, 1999), 주로 남조류(*Microcystis, Anabaena*)에 대한 연구가 대부분이다 (Sigee *et al.*, 1999; Jeong *et al.*, 2000; 김 등, 2004). 특히 하천 또는 하천형 호수에서 대발생하는 규조류에 대한 살조세균이나 섬모충을 이용한 생물학적 제어에 대한 연구는 보고된 바 없다.

본 연구는 저자들이 규조 *Stephanodiscus*에 대한 제어능을 확인한 두 생물제재-세균 *Pseudomonas putida* (Kang *et al.*, 2004), 섬모충 *Stentor roeseli* (김 등, 2004)를 각각 분리한 후, 이들의 단일 또는 혼합적용이 규조류의 생물학적 제어에 어느 정도 효과가 있는지 확인하기

* Corresponding author: Tel: +82-2-2290-1704, Fax: +82-2296-1741, E-mail: hanms@hanyang.ac.kr

위하여, 규조 *Stephanodiscus* 대발생지역의 표층수에서 분리한 살조세균과 섬모충을 이용한 단일 또는 혼합적용 실험을 통해 이들의 제어능을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 규조 *Stephanodiscus hantzschii* 배양

살조세균 분리를 위한 algal lawn제조에 사용된 조류는 소형 원반규조의 하나인 *Stephanodiscus hantzschii* UTCC 267로서, 캐나다 UTCC (University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria)에서 직접 분양받아 본 실험실에서 계속적으로 계대 배양하고 있다. 배양은 300 mL flask에 DM배지 150 mL (pH 7.0)을 넣고 고압 멸균한 후 *S. hantzschii* 배양액을 10% (약 10^5 cells mL^{-1}) 접종하여, 20°C, 12 : 12 (Light : Dark) cycle, 50 μmol m^{-2} s^{-1}의 광도로 조절된 배양기에서 배양하였다 (Table 1). 실험에 사용한 조류는 배양 10일째 지수성장기에 도달한 세포를 사용하였으며 이미 분리한 살조세균과 섬모충을 규조배양 플라스크에 투입한 후 시간의 경과에 따라 조류제어 효과를 관찰하였다. 생물량의 변화를 확인하기 위하여 도립현미경 400 배하에서 Sedgwick-Rafter Chamber를 이용하여 규조 세포수를 계수하였다.

2. 세균 및 섬모충 배양

살조세균 *Pseudomonas putida*의 분리는 2002년 3월 21일에 경기도 경안천 광동교 지점의 표층수를 이용하였다 (Kang *et al*., 2004). 세균 분리를 위해 100-mL flask에 50 mL NB (nutrient broth) 배지를 넣고, 습식멸균한 다음 분리한 세균을 조류배양액의 3%정도 (약 10^8 cells mL^{-1}) 접종시키고, 배양기(29°C, 120 rpm)에서 24시간 배양한 후 조류제어실험에 사용하였다 (Table 1). 섬모충 *Stentor roeseli*은 2002년 7월에 팔당호에서 분리하였다 (김 등, 20 04). 이들의 배양 및 유지를 위해 채집한 현장수를 GF/F 로 여과한 후 6 well 배양용기에 각각 5 mL씩 넣어 기본 배지로 사용하였다. 부착기질로서 well 당 protozoan pellet (Carolina, USA) 3 mg을 첨가하고 미세피펫를 이용하여 통기를 시켜주었다. 분리된 섬모충은 각 well당 10～50개체씩 넣고, 현장과 동일한 수온 20°C, 광도 2 μmol m^{-2} s^{-1}, 광주기 12L : 12D 를 유지하였다. 먹이로는 *Aphanothece* sp. 또는 판매용 *Chlorella*를 이용하였다. 조류제어 실험 이틀 전부터 먹이공급을 중지하였으며, 생물량의 변동은 도립현미경 50배율로 관찰하면서 계수하였다.

Table 1. Culture and sustaining condition of algae and bio-agents used in the study.

Organism	Temp. (°C)	Light intensity (μmol $m^{-2}s^{-1}$)	Medium	L : D Cycle	Prey
Stephanodiscus hantzschii	20	50	DM	12 : 12	
Pseudomonas putida	29	No illumination	NB	–	
Stentor roselii	20	2	Filtered water	12 : 12	*Aphanothece* sp.

DM: diatom media (University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria, UTCC)
NB: nutrient broth

3. 세균과 섬모충의 혼합적용

조류제어 실험은 규조 *Stephanodiscus* 배양조건과 동일하다. 먼저 DM 배지를 고압멸균하고 100 mL용 플라스크에 50 mL씩 분주하고, *Stephanodiscus hantzschii*를 접종하여, 지수성장단계에 이르렀을 때 각 실험군에 생물제재를 접종하여, 실험을 진행하였다. 세균의 단일 적용 실험은 대수기 세균을 배양중인 *Stephanodiscus*에 넣어 규조 및 세균의 밀도변화를 측정하였다. 섬모충의 제어실험 역시 전과 동일한 조건의 플라스크에 미세피펫을 이용하여 3개체/well 밀도로 접종하고, 도립현미경하에서 섬모충 및 조류밀도를 혈구계수기로 조사하였으며 실험에 투입하기 2일전부터 먹이 공급을 중지하였다. 두 생물의 혼합적용 실험은 단일적용 실험에서 사용하였던 동일밀도의 *Stephanodiscus*, 세균, 섬모충을 각각 이용하였으며, 실험조건 역시 단일적용 실험과 동일한 조건에서 실시하였다.

결 과

1. 세균의 규조제어능

대조군의 경우 배양 4일째부터 서서히 감소하였으나, 배양이 끝난 7일째에도 초기 접종밀도보다 다소 높은 1.5×10^6 cells mL^{-1} 수준을 보였다. 현장 여과수에서 배양중인 규조 *Stephanodiscus hantzschii*에 대한 세균 *Pseudomonas putida*의 살조효과는 세균 접종 2일째부터 나타나기 시작하여, 4일째부터는 급격하게 감소하여, 6일째부터는 98% 이상 제어하였다 (Fig. 1). 한편 세균밀도는 배양 3.5일째까지 서서히 증가하여 초기접종밀도의 170%

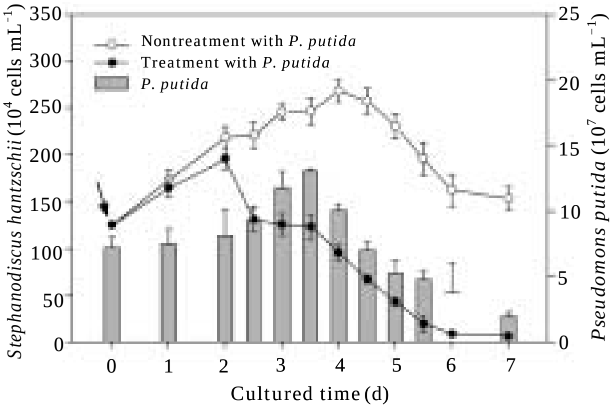

Fig. 1. The growth pattern of small centric diatom, *Stephanodiscus hantzschii*, against algicidal bacterium *Pseudomonas putida*, in filtered freshwater. Open and closed circles are the abundance of diatom in the absence or presence of bacterium, respectively. Histograms with oblique lines are biomass of algicidal bacterium. Arrow is the inoculation or treatment time of bio-agents.

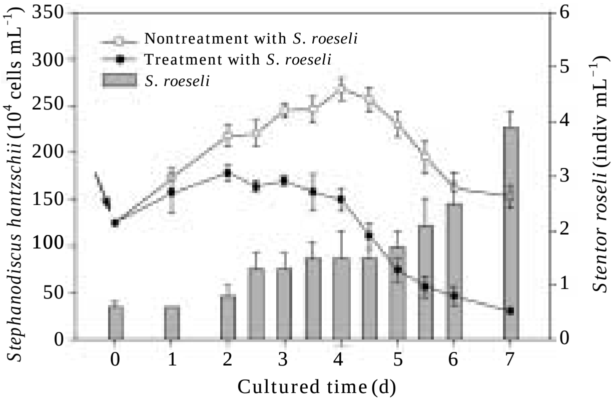

Fig. 2. The growth pattern of small centric diatom, *Stephanodiscus hantzschii*, against ciliate *Stentor roeseli* as predator in filtered freshwater. Open and closed circles are the abundance of diatom in the absence or presence of ciliate, respectively. Histograms with oblique lines are biomass of ciliate, *Stentor roeseli*. Arrow is the inoculation or treatment time of bio-agents.

에 도달하다가 배양 4일째부터는 급격하게 감소하여 배양 7일째에는 접종밀도의 약 25%만이 플라스크에 남았다. 이상의 결과를 종합해 보면, 대조군의 조류밀도는 서서히 감소하는 반면, 처리군의 규조나 처리한 세균의 밀도는 급격하게 감소하였다.

2. 섬모충의 규조제어능

섬모충의 살조효과는 세균보다는 다소 완만한 기울기를 나타났다. 특히 배양 7일째에도 규조는 완전히 사멸되지 않고 약 20% 정도는 그대로 남아 있었으며(Fig. 2), 특히 섬모충의 처리 초기에는 뚜렷한 감소를 보이지 않다가 배양 4일째부터 급격하게 감소하는 특징을 나타냈다. 한편 규조배양액에 처리된 섬모충은 배양 7일째까지 지속적인 밀도 증가를 보였는데, 실험종료일에 초기밀도의 5배 이상으로 증가하였다.

3. 세균과 섬모충의 혼합적용

두 생물제재 -살조세균 및 섬모충- 를 동시에 혼합 적용한 경우, 조류제어효과는 각각의 단일효과보다 뚜렷하게 증가하였는데 규조는 배양 2.5일째부터 급격하게 감소하여 5일째에는 플라스크내에서 발견되지 않았다 (Fig. 3). 이러한 두 생물제재의 혼합적용에 따른 조류제어의 상승효과는 각 생물제재들의 단일처리보다 빠르고 완벽한 처리라는 점에서 장점을 갖는다. 그러나 두 생물제재의 저밀도 (실험밀도의 1/2배)과 고밀도 (실험밀도의 2배)에서

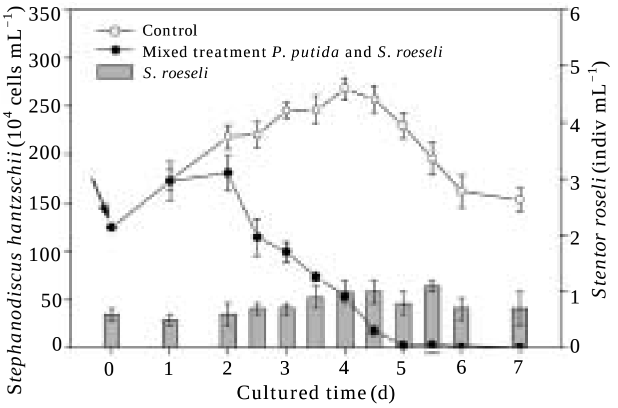

Fig. 3. Effects of redundancy by two biological agents (*Pseudomonas putida* and *Stentor roeseli*) on *Stephanodiscus hantzschii* in filtered freshwater. Open and closed circles are the abundance of diatom in the absence or presence of bacteria plus ciliate, respectively. Histograms with oblique lines are biomass of ciliate, *Stentor roeseli*. Arrow is the inoculation or treatment time of bio-agents.

는 세균의 단일적용보다 더 느리고 완벽하게 제어되지 않았다는 점에서 흥미로운 결과이다 (미발표자료). 한편, 살조세균과 동시에 혼합적용된 섬모충의 성장은 매우 낮았다 (5.5일째 17% 성장). 또한 섬모충의 성장은 살조세균과 규조가 동시에 혼합된 배양계의 경우, 7일 동안 성장 또는 감소하지 않고 거의 일정하게 유지되는 반면, 조류배양액에서는 배양 5일까지 서서히 증가하다가 그 이후 급격하

게 증가하여 배양 7일째에는 최고치 4 indiv mL^{-1}까지 성장을 보였다.

고 찰

수중생태계에서 생물밀도는 어느 특정종에 의해서만 제한되거나 영향을 받는 것보다, 복잡한 먹이관계에서 종들간의 상호관계에 의해 직간접적으로 결정된다 (Fukami *et al.*, 1997; Doucette *et al.*, 1999; Prieto *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2002). 특히 조류대발생의 원인종에 대한 생물제재로서 특정한 살조세균이나 천적생물에 의한 제어가 독립적으로 이루어질 지라도 수중내에서의 생물간의 상호관계를 고려하지 않고 적용한다는 건 매우 부정적인 결과를 얻기 쉽다. 본 실험에서 살조세균으로서 *Pseudomonas putida*와 섬모충 *S. roselli*는 독자적으로 배양조건에서 규조에 대한 강한 조류제어능을 보였다. 그러나 이들의 혼합적용은 단일 적용에 비해 보다 짧은 시간 내에 완전제어가 가능하다는 결과를 보여주고 있다(Fig. 3). 이러한 결과는 저자 등이 이미 보고한 (김 등, 2004) 독성남조 *Microcystis aeruginosa*의 제어실험과는 반대현상으로서, 종간 상호작용의 결과에 따라 상승 또는 억제효과를 나타냄으로 생물학적 조류제어를 위한 기반기술로서 충분히 활용될 것으로 판단된다.

본 실험에서 살조세균에 의한 조류의 사멸이 세균의 성장에 직접적인 요인으로 작용했는지 여부는 알 수 없다. 다만 섬모충과 세균을 동시에 적용한 실험에서 세균의 감소가 세균에 유용한 DOC의 양이 적었던지, 섬모충에 의해 섭식 영향을 받았을 것으로 사료된다. 이러한 결과는 추후 배양계내 DOC측정이나 섬모충과 세균과의 반응실험을 통하여 입증할 수 있으리라 판단된다. 다만 이들 관계가 현장생태계에서 섬모충에 의한 살조세균 감소로 말미암아 수중내 증가한 DOC를 이용한 다른 세균이나 조류의 성장을 유도함으로 생태계 교란인자로 작용할 위험성을 시사해 준다.

본 연구에서 규조제어를 위해 사용하였던 살조세균은 조류발생 하천의 표층수로부터 분리한 반면, 섬모충은 동일 하천의 가장자리 부근에 수생식물이 많이 분포하는 지점에서 분리하여 다소 물리적 서식조건의 차이가 있는 게 사실이다. 따라서 서로 다른 장소로부터 분리된 생물제재의 혼합적용으로 인하여 두 생물상호간은 물론 이들이 수중생태계의 교란인자로 작용할 가능성도 배제할 수 없다. 그러나 본 실험에 사용된 생물제재들이 출현한 지점은 장소에 관계없이 공히 규조 *Stephanodiscus*가 대발생하였으며, 따라서 이들의 상호관계로 인하여 수중생태계는 물론 상호간의 배타적 작용은 발생하지 않을 것으로 판단된다. 다만 현장적용에 있어서 생물제재의 혼합적용이 분리된 서식환경이 지리적, 생태적으로 크게 다른 장소일 경우 이들의 상호관계나 생태계에 미치는 영향등에 대한 추후 연구가 필요하다.

수생태계에 최소 생물요소–생산자, 소비자, 분해자–로 구성된 소형생태계를 이용한 연구는 대부분 독성물질의 생태계 구성인자간의 이동이나 축적에 대한 연구재료로서 사용되어 왔으나 최근에는 오염물질로 인한 생태계 교란을 최소화하기 위한 환경친화적 방법의 하나로서 각광을 받고 있다 (Sigee *et al.*, 1999; Matsui *et al.*, 2000). 지금까지 두 종류 또는 그 이상의 생물제재를 이용한 유기물 제거에 관한 연구는 비교적 활발하지만 (Nicolau *et al.*, 2001), 적조나 녹조를 제어하려는 시도는 극히 빈약한 편이다. 김 등(2004)은 유해성 남조 *Microcystis aeruginosa*제어를 위한 살조세균과 섬모충의 혼합적용에서 각각 살조능을 보인 두 생물제재를 혼합한 배양계에서 상호간에 배타작용을 보였으며, 이들의 혼합이 오히려 남조의 성장을 촉진한다는 새로운 사실을 밝혔다. 본 연구는 이와는 상반된 결과로서 특정조류가 대발생한 수계에서 이들을 분해하거나 섭식가능한 생물제재의 단일 적용만으로는 그 효과를 기대하기는 어려울 경우 적용가능성이 높을 것으로 예상되지만 반대로 다른 조류나 특정생물군의 대발생을 초래할 위험성 또한 내포하고 있다. 따라서 생물 상호간에 포식–피식관계가 성립된 소형생태계를 이용하여 조류를 제어하기 위해서는 조류대발생 수역내에 서식하는 생물제재의 분리 및 상호관계 연구나 생태계내 교란여부를 최소화할 수 있는 연구 등이 반드시 필요하다고 판단되었다.

적 요

국내에서 저온기에 하천 및 하천형 호수에서 대발생하는 소형원반 규조 *Stephanodiscus hantzschii* 제어를 위하여 팔당호 상류인 경안천 수역에서 세균 *Pseudomonas putida* 및 섬모충 *Stentor roeseli* 를 각각 분리하고, 이들의 단일 및 혼합적용시 조류제어효과를 조사하였다. 세균 단일처리군에서는 접종 7일만에 98%이상의 규조를 제거한 반면, 섬모충 단일 처리군에서는 약 80% 정도를 제어하였다. 두 생물제재를 혼합적용한 경우, 배양 5일만에 배양계내에서 더 이상 규조가 관찰되지 않았다. 이 결과는 살조세균과 섬모충의 두 생물재제 혼합적용이 규조 *Stephanodiscus hantzschii* 대발생을 제어하는데 매우 효과적이며 현장적용 가능성이 높다는 것을 제시한다.

사 사

본 연구는 국가지정연구실사업 (2000-N-NL-01-290)의 지원을 받아 수행하였음.

인 용 문 헌

김백호, 최희진, 한명수. 2004. 유해성 조류 *Microcystis aeruginosa*의 생물학적 제어를 위한 미소 생물제재의 적용실험. 한국육수학회지 **37**: 64-69.

이정호, 박종근, 김은정. 2002. 국내 주요 호수의 식물플랑크톤 종조성 및 영양단계 평가. 한국조류학회지 **17**: 275-281.

이철우, 강임석, 한승우, 이철우, 정철우, 이정호. 2001. 산화와 응집공정을 이용한 조류제거. 대한환경공학회지 **23**: 1527-1536.

임영성, 송원섭, 조주식, 이홍재, 허종수. 2000. 정수 처리 과정 중 응집 및 여과에 미치는 조류의 영향. 한국환경농학회지 **19**: 13-19.

조경제. 1995. 낙동강 담수규조 *Stephanodiscus hantzschii* f. tenuis와 *S. parvus* 의 미세구조. 한국조류학회지 **10**: 69-76.

조경제, 신재기, 곽승국, 이옥희. 1998. 담수산 *Stephanodiscus* 속 규조류의 오염지표성 평가. 한국육수학회지 **31**: 204-210.

한명수, 이후랑, 홍성수, 김영옥, 이 경, 최영길, 김세화, 유광일. 2002. 경안천(팔당호)과 토교저수지에서 식물플랑크톤의 크기별 현존량과 chlorophyll *a*의 계절 변동. 한국환경생물학회지 **20**: 91-99.

Doucette, G.J., E.R. McGovern and J.A. Babinchak. 1999. Algicidal bacteria active against *Gymnodinium breve* (Dinophyceae). I. Bacterial isolation and characterization of killing activity. *J. Phycol.* **35**: 1447-1454.

Fukami, K., T. Nishijima and Y. Ishida. 1997. Stimulative and inhibitory effects of bacteria on the growth of microalgae. *Hydrobiologia* **358**: 185-191.

Ha, K., M.H. Jang and G.J. Joo. 2002. Spatial and temporal dynamics of phytoplankton communities along a regulated river system, the Nakdong River, Korea. *Hydrobiologia* **470**: 235-245.

Han, M.S., Y.O. Kim, D.S. Yi and S.S. Hong. 2002. Species-specific productivity of *Cryptomonas ovata* (Cryptophyceae) in the Pal'tang reservoir, Korea. *J. Freshwater Ecol.* **17**: 521-529.

Hong, S.S., S.W. Bang, Y.O. Kim and M.S. Han. 2002. Effects of rainfall on the hydrological conditions and phytoplankton community structure in the riverine zone of the Pal'tang Reservoir, Korea. *J. Freshwater Ecol.* **17**: 507-519.

Jeong, J.H., H.J. Jin, C.H. Sohn, K.H. Suh and Y.K. Hong. 2000. Algicidal activity of the seaweed *Corallina pilulifera* against red tide microalgae. *J. Appl. Phycol.* **12**: 37-43.

Kang, Y.H., J.D. Kim, B.H. Kim, D. Kong and M.S. Han. 2004. Identification of bio-agent capable of controlling *Stephanodiscus hantzschii* blooms and its evaluation of algicidal activity. *J. Appl. Microbiol.* (Submitted)

Kolmakov, V.I., N.A. Gaevskii, E.A. Ivanova, O.P. Dubovskaya, I.V. Gribovskaya and E.S. Kravchuk. 2002. Comparative analysis of ecophysiological characteristics of *Stephanodiscus hantzschii* Grun. In the periods of its bloom in recreational water bodies. *Russian J. Ecol.* **33**: 97-103.

Matsui, K., S. Kono, A. Saeki, N. Ishii, M.G. Min and Z. Kawabata. 2000. Direct and indirect interactions for coexistence in a species-defined microcosm. *Hydrobiologia* **435**: 109-116.

Nicolau, A., N. Dias, M. Mota and N. Lima N. 2001. Trends in the use of protozoa in the assessment of wastewater treatment. *Res. Microbiol.* **152**: 621-630.

Oksiyuk, O.P. 1965. *Stephanodiscus hantzschii* Grun, as an aromatic organisms capable of giving fish smell to water. *Gidrobiol. Zh.* **1**: 50-53.

Prieto, L., J. Ruiz, F. Echevarria, C.M. Garcia, A. Bartual, J.A. Galvez, A. Corzo and D. Macias. 2002. Scales and processes in the aggregation of diatom blooms: high time resolution and wide size range records in a mesocosm study. *Deep-Sea Res.* **49**: 1233-1253.

Reynolds, D. 1985. The Ecology of Freshwater Pytoplankton. Cambridge Univ Press. 384 pp.

Sakevich, A.I. 1970. The discovering of methylamines in the culture of *Stephanodiscus hantzschii* Grun. *Gidrobiol. Zh.* **6**: 98-100.

Sigee, D.C., R. Glenn, M.J. Andrews, E.G. Bellinger, R.D. Butler, H.A.S. Epton and R.D. Hendry. 1999. Biological control of cyanobacteria: principles and possibilities. *Hydrobiologia* **395/396**: 161-172.

Suzuki, K., A. Tsuda, H. Kiyosawa, S. Takeda, J. Nishioka, T. Saino, M. Takahashi and C.S. Wong. 2002. Grazing impact of microzooplankton on a diatom bloom in a mesocosm as estimated by pigment-specific dilution technique. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **271**: 99-120.

Vincent, W.F. 1987. Dominance of blooming forming cyanobacteria (blue-green) in New Zealand. *J. Mar. Freshwater Res.* **21**: 361-542.

(Manuscript received 20 March 2004,
Revision accepted 12 June 2004)