세균에 의한 남조 *Anabaena cylindrica*의 분해에 대한 연구

김철호* · 권오섭¹ · 이진애¹

(진주산업대학교 미생물공학과, ¹인제대학교 환경시스템학부)

A Study on the Lysis of a Bluegreen Alga *Anabaena cylindrica* by a Bacterium

Chul-Ho Kim*, O-Seob Kwon¹ and Jin-Ae Lee¹

Department of Microbiological Engineering, Jinju National University, Jinju 660-758 and

¹Division of Environmental Science and Engineering, Inje University, Kimhae 621-749, Korea

A Gram (-), rod-shaped bacterium in size of $1.6\text{-}2.8 \times 0.4 \mu\text{m}$ was isolated from a eutrophic reservoir, which exhibited growth-inhibiting effect against a bluegreen alga (*Anabaena cylindrica*). This isolate showed positive reactions for catalase and oxidase, and optimal conditions of 35-40°C and pH 9.0. This isolate was designated AC-1 in this manuscript. In a mixed-culture of *A. cylindrica* and AC-1, their growth patterns were inversely correlated and the bluegreen algal vegetative cells completely disappeared within 24-36 hours. AC-1 showed similar lytic activity in natural water as in an artificial medium. The lytic activity of AC-1 was dependent on the photosynthetic activity of *A. cylindrica*. When observed under phase contrast microscope, the isolate lysed vegetative cells of *A. cylindrica* in scattered state in a liquid medium, whereas heterocysts have not been lysed.

Key Words: *Anabaena cylindrica*, bacteria, bluegreen alga, lysis

서 론

전세계적으로 부영양화된 담수 생태계에서는 수온이 상승함에 따라 식물플랑크톤성 조류에 의한 수화가 발생하고 있다(Reynolds and Walsby 1975; Ohtake *et al.* 1989). 특히 산소 발생형 광합성을 하는 남조류(bluegreen algae, 혹은 남조세균, cyanobacteria)는 우리나라와 같은 온대지역의 담수에서 하절기에 우점하는 대표적 수화 원인균으로, 수표면에 스컴(scums)을 형성하거나 수계의 산소 고갈, 종 다양성 감소, 불쾌한 이취미 발생, 야생동물 또는 수중생물의 생존 위협 등 생태학적 측면에서 뿐만 아니라 경제적 관점이나 보건학적 관점에서 심각한 문제를 초래하는 것을 알려져 있다(Carmichael 1994; Kiviranta *et al.* 1991). 또한 원활한 상수도 공급을 방해하고(Schreiter *et al.* 2001), 수산 양식에 막대한 피해를 초래하기도 하며(Walker and Higginbotham 2000),

인간의 생명을 위협하기도 한다(Carmichael 1994; Falconer 1994; Jochimsen *et al.* 1998).

따라서 남조류의 수화와 성장 조절은 인간의 경제활동이나 수상 레크레이션, 원활한 상수도 공급 등을 위하여 매우 중요하지만(Codd 2000; Lee 1989; Reyssac and Pletikisic 1990), 아직까지 수화 발생 지역에 황산동과 같은 광합성 억제제를 살포하는 방법 이외에는 적극적인 조절 방법이 없는 실정이다(Reyssac and Pletikisic 1990). 하지만 수계에 대한 화학물질의 살포는 경제적 부담이 크다는 것 이외에도 수계에 분포하는 다른 생물에 악영향을 미칠 수 있는 위험을 내포하고 있다(Lee 1989; Rinehart *et al.* 1994; Stewart and Daft 1977).

생물학적 처리는 수생태계의 혼란을 최소화할 수 있어 근래에 이르러 부영양화와 수화의 조절법으로 많은 관심을 끌고 있는 분야로서(Lee 1989), 남조류에 대한 길항력을 갖는 세균은 활성이 우수할 뿐만 아니라 광범위한 숙주에 대해 활성을 나타낸다는 점에서 이상적인 생물 조절인자로 알려져 있다(Daft *et al.* 1973; Reyssac and Pletikisic 1990).

*Corresponding author (chkim@jinju.ac.kr)

Table 1. Environmental factors of Nam River water used in this experiment

Factors	COD	T-N	NH ₄ ⁺ -N	T-P	PO ₄ ⁻ -P
Concentrations(ppm)	3.6	6.114	0.07	0.083	0.035

본 연구에서는 수생태계에서 수화의 주요 원인생물로 알려져 있는 *Anabaena cylindrica*의 생장을 억제하는 세균을 현상에서 분리하고, 분리세균의 남조류 분해 활성 특성을 측정함으로써 수생태계에서 남조류의 생장 조절자로서의 적용 가능한 세균을 확보하고자 하였다.

재료와 방법

남조류와 분리세균의 배양

남조류를 분해하는 세균을 분리하기 위한 숙주로는 *Anabaena cylindrica*를 이용하였는데, JM 배지에 접종하여 1,500 lux, 25 ± 1°C, 150 rpm의 조류배양기에서 배양하였다. 분리세균은 JM 배지에 casitone(Difco) 0.2%를 첨가한 JMC 배지(Daft and Stewart 1971; Mitsutani *et al.* 1987)에 접종하여 30°C 배양기에서 배양하였으며, 진탕배양은 200 rpm의 진탕 배양기에서 실시하였다.

Anabaena cylindrica 분해세균의 분리

남조류 분해세균은 *A. cylindrica* 배양층에 형성되는 plaques로부터 분리하였다(Daft *et al.* 1973; Shilo 1970). 한천 0.8%를 함유하는 5 ml의 JM 배지를 멸균하여 50°C 정도로 식히고, 최종 개체수가 10⁶ cells·ml⁻¹ 정도 되게 1 ml의 *A. cylindrica* 배양액과 수질 시료 1 ml를 첨가하여 미리 준비한 JM 한천 배지 위에 부어서 고루 펴 균했다. 이것을 조류 배양기에서 배양하면 5-10일 경과 후 초록색의 *A. cylindrica* 배양층에 투명대가 형성되었고, 백금이를 이용하여 투명대 중심으로부터 시료를 취하여 JMC 한천 배지에 계대배양하여 순수한 세균 균주를 분리하였다. 이러한 과정을 거쳐 분리한 세균 중에서 *A. cylindrica* 분해 활성이 뛰어난 균주를 선택하였다.

혼합배양액에서의 분리세균과 *Anabaena cylindrica*의 생장

대수증식기의 *A. cylindrica* 배양액을 원심분리(9,000 ×g, 15°C, 15 min)한 후 침전물을 JM 배지로 1회 세척하여 100 ml의 동일한 배지에 4.5 × 10⁶ cells·ml⁻¹ 되게 접종하였다. 대수증식기의 분리세균을 원심분리(9,000 ×g, 4°C, 10 min)하여 침전물을 JM 배지로 세척한 후 상기의 *A. cylindrica* 배지에 7.0 × 10⁵ cells·ml⁻¹이 되게 접종하였다. 이 배양액을 조류 배양기에서 배양하면서 일정시간 간격으로 시료를 취하여 *A. cylindrica* 세포수와 분리세균의 세포수를 측정하였다. *A.*

cylindrica 세포수는 혈구계수기를 이용하여 현미경 시야에서 계수하였으며, 분리세균은 JMC 배지에 도말접종하여 형성되는 콜로니를 계수하였다. 대조구로는 분리세균을 접종하지 않은 *A. cylindrica* 배양액을 이용하였다.

자연수에서의 분해활성

분리세균이 자연수에서도 *A. cylindrica* 분해활성을 나타내는지 확인하기 위하여 진주시 남강물을 GF/C 여과지로 여과하여 멸균한 후 *A. cylindrica*와 분리세균을 접종하여 조류배양기에서 배양하면서 일정시간 간격으로 *A. cylindrica*의 세포수 변화를 측정하였다. 사용한 남강물의 이화학적 요인은 Table 1과 같았다.

분해활성에 미치는 숙주의 광합성의 영향

자연수계에서 광합성 생물은 다른 생물의 생장에 많은 영향을 끼치는데, 본 실험에서는 숙주인 *A. cylindrica*의 광합성 활동이 분리세균의 남조류 분해능에 미치는 영향을 관찰하였다. JM 배지에서 대수생장기에 있는 *A. cylindrica*를 원심분리(9,000 ×g, 20°C, 10 min)하여 얻은 세포 침전물을 2회 세척한 후 동일 배지에 현탁하여 4개의 100 ml/JM 배지에 접종하였다. 이 중 2개의 배지는 aluminum foil로 싸서 빛을 차단하였으며, 다른 2개의 배지는 대조군으로 이용하였다. 각 2개의 배지 중 1개씩에 분리세균을 접종하여 배양하면서 일정시간 간격으로 *A. cylindrica*의 세포수를 측정하였다.

Anabaena cylindrica 분해현상의 현미경 관찰

분리세균이 *A. cylindrica* 세포를 분해하는 작용을 관찰하기 위하여 분리세균과 *A. cylindrica*를 혼합배양하여 약 6시간 경과 후 시료를 취하여 위상차현미경(Olympus BX50F-3)로 관찰하였다.

결 과

Anabaena cylindrica 분해세균의 분리

각종 시료를 처리한 *A. cylindrica* 배양층에는 3일 가량 후부터 플라크가 형성되기 시작하였으며, 300여 개의 plaques로부터 *A. cylindrica* 분해세균의 분리를 시도하였고, 이들 중 분해활성이 가장 우수한 세균을 선택하여 AC-1이라 명하였다. AC-1은 그람 음성의 막대형 세균으로 1.6-2.8 × 0.4 μm 정도였고, 카탈라제(catalase)와 옥시다제(oxidase) 양성 반응을

Fig. 1. Growth curves of AC-1 at different temperatures.

Fig. 2. Growth curves of AC-1 at different pH condition.

Fig. 3. Growth curves of *A. cylindrica* and AC-1 in a mixed-culture.

나타내었다. 또한 AC-1의 적정 생장 조건은 35–40°C, pH 9.0으로 나타났다(Figs 1, 2).

혼합배양시 AC-1의 *Anabaena cylindrica* 분해 활성

분리세균과 *A. cylindrica*를 혼합배양할 경우 두 미생물 군집은 서로 반비례적으로 성장하였으며, 12시간 경과 후에는 *A. cylindrica*의 영양세포 숫자가 44% 정도로 감소하였고, 24–36시간 후에는 완전히 소멸하였다(Fig. 3).

자연수에서의 분해활성

분리세균은 멸균한 남강물에서도 실험실 인공 배지(JM 배

Fig. 4. Lytic activity of AC-1 against *A. cylindrica* in Nam River water.

Fig. 5. Effect of cyanobacterial photosynthesis on the lytic activity of AC-1 against *A. cylindrica*.

지)에서와 유사한 활성을 나타내었다(Fig. 4). *A. cylindrica*와 AC-1 균주를 혼합배양했을 경우 12시간 경과 후에는 *A. cylindrica*의 영양세포 수가 36% 정도 줄었고, 24시간 경과 후에는 98% 정도 감소하는 것을 알 수 있었다.

광합성의 영향

빛이 있는 조건에서 AC-1은 *A. cylindrica*의 생장을 효율적으로 억제하는 반면, 빛이 없는 암소에서는 억제 효율이 매우 낮게 나타났다(Fig. 5). 이러한 결과로부터 분리세균의 남조류 분해능은 숙주인 *A. cylindrica*의 광합성 활성에 대해 의존적이라는 사실을 알 수 있다.

Anabaena cylindrica 분해현상의 현미경 관찰

AC-1 균주는 *A. cylindrica*와 독립적으로 배지 내에 산재된 상태에서 숙주인 *A. cylindrica*의 영양세포를 분해하는 것을 확인할 수 있었으며, 이 과정에서 이형세포(heterocyst)는 분해되지 않는다는 것을 알 수 있었다(Fig. 6).

Fig. 6. Microphotographs showing the lytic activity of AC-1 against *A. cylindrica*. A, Unimpaired *A. cylindrica* cells; B, *A. cylindrica* cells under lysis by AC-1; C, Heterocysts of *A. cylindrica* remained after lysis of vegetative cells.

고 찰

남조류는 우리나라와 같은 온대지방에서 하절기에 수자원의 이용에 막대한 지장을 초래하는 수화의 원인생물로 알려져 있으며, 이 중 *Anabaena* sp.는 이취미 물질 뿐만 아니라 간독소와 신경독소를 합성하는 것으로 알려져 있다(Sivonen et

al. 1990). 이러한 남조류에 의한 수화를 조절하기 위한 각종 연구들이 수행되어 왔으며, 생물학적 조절법 개발을 위한 일환으로 남조류의 성장을 억제하거나 분해하는 세균에 대한 연구가 다수 이루어졌다(Shilo 1970; Stewart and Brown 1971; Granhall and Berg 1972; Burnham et al. 1976; Stewart and Daft 1977; Martin et al. 1978; Sallal 1994; Yoshikawa et al. 2000). 하지만 이들 모든 연구는 실험실 수준에서 벗어나지 못했으며, 자연수계에 대한 적용 가능성에 대한 연구도 이루어진 바 없다. 본 연구에서는 자연수계에 대한 적용 가능한 남조류 분해세균을 분리하고자 하였으며, *A. cylindrica*를 효과적으로 분해하는 세균을 수 중 분리하였으며, 이들 중 AC-1 균주에 대한 연구 결과를 기록하였다.

본 연구에서 분리한 AC-1 균주는 JM 배지 내에서 *A. cylindrica*와 반비례적으로 성장하면서 24-36시간 이내에 *A. cylindrica*의 영양세포를 완전 사멸시킨다는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 기존에 국내에서 분리된 *Acinetobacter johnsonii*가 *A. cylindrica*의 영양세포를 완전 소멸시키는데 약 10일 정도가 걸린다는 결과와 비교할 경우 남조류 성장 억제가 매우 높다는 것을 알 수 있다(Kim and Han 2003). 또한 분리세균이 *A. cylindrica*와 반비례적으로 성장하는 것은 *A. cylindrica*가 분해되면서 분비되는 각종 영양원을 세균이 이용하여 성장하기 때문인 것으로 생각할 수 있다(Baldi et al. 1997; Hannen et al. 1999). 자연 생태계에서 수중 미생물은 남조류의 성장과 비례적으로 성장하는 것으로 알려져 있는데(Mitsutani et al. 1987; Daft et al. 1975; Stewart and Daft 1977), 남조류를 분해하는 세균의 경우에는 본 연구에서와 같이 숙주와 서로 반비례적인 성장을 한다는 점을 알 수 있었다.

AC-1 균주는 실험실에서 조제한 JM 배지에서 뿐만 아니라 자연수인 남강물에서도 *A. cylindrica*에 대한 높은 분해활성을 나타내었는데, 이러한 결과는 자연수계에 분포하는 세균이 수화의 조절 인자로서 중요한 역할을 한다는 사실을 뒷받침할 뿐만 아니라(Lee 1989), 자연에서 분리하여 실험실에서 배양한 균주도 자연수계에서 수화의 조절자로서의 역할을 훌륭히 수행할 수 있고, 따라서 세균 제재를 이용한 수화조절이 가능하다는 것을 확인할 수 있었다.

분리균주는 *A. cylindrica*를 분해하는데 있어서 숙주인 *A. cylindrica*의 광합성 작용에 대해 의존적이라는 사실을 확인하였다. 이전의 연구에서 분리한 *Moraxella* sp. CK-1의 경우는 숙주의 광합성에 의존적이긴 하였지만(Kim and Choi 1998), 빛이 없는 조건에서도 *A. cylindrica*의 성장을 어느 정도 억제한 반면 AC-1 균주는 암소에서 *A. cylindrica*의 성장 억제능을 거의 나타내지 않았다.

기존에 남조류의 성장을 억제하는 것으로 알려진 *Alcaligenes* sp.(Martin et al. 1978)와 *Flexibacter flexilis*(Gromov et

al. 1972) *Myxobacter* sp. (Daft and Stewart 1973; Daft et al. 1975; Shilo 1970) 등은 숙주세포에 부착한 상태에서만 분해 활성을 나타내었는데, AC-1 균주에 의한 *A. cylindrica*의 분해 현상을 위상차 현미경으로 관찰한 결과 분리세균이 숙주세포에 부착한 현상은 관찰되지 않았으며, 따라서 AC-1 균주는 *A. cylindrica*의 생장을 억제하거나 분해하는 물질을 세포 외부로 분비함으로써 활성을 나타내는 것으로 생각할 수 있다. 또한 *A. cylindrica*의 이형세포는 세균의 분해작용에 대해 내성을 보였는데, 이러한 현상은 영양세포와 이형세포의 세포벽 구성성분 차이(Dunn and Wolk 1970)에 기인한다고 생각한다.

이상의 결과에서 확인한 바와 같이 본 연구에서 분리한 AC-1 균주는 pH 9.0에서 잘 자라고, 인공의 영양염류가 첨가되지 않은 강물에서도 *A. cylindrica*의 생장을 효과적으로 억제할 뿐만 아니라, 세포외부로 *A. cylindrica*의 생장 억제물질을 분비한다는 점에서 수화의 세균학적 조절자로 응용할 수 있는 가능성이 높은 것으로 생각된다.

사 사

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(R01-2000-000-00068-0) 지원으로 수행되었음.

참고문헌

- Baldi F., Minacci A., Saliot A., Mejanelle L., Mozetic P., Turk V. and Malej A. 1997. Cell lysis and release of particulate polysaccharides in extensive marine mucilage assessed by lipid biomarkers and molecular probes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **153**: 45-57.
- Burnham J.C., Stetak T. and Locher G. 1976. Extracellular lysis of the blue-green alga *Phormidium luridum* by *Bdellovibrio bacteriovorus*. *J. Phycol.* **12**: 306-313.
- Carmichael W.W. 1994. The toxins of cyanobacteria. *Sci. Am.* **270**: 64-72.
- Codd G.A. 2000. Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control. *Ecol. Eng.* **16**: 51-60.
- Daft M.J., McCord S. and Stewart W.D.P. 1973. The occurrence of blue-green algae and lytic bacteria at a waterworks in Scotland. *Water Treat. Exam.* **22**: 114-124.
- Daft M.J., McCord S.B. and Stewart W.D.P. 1975. Ecological studies on algal-lysing bacteria in fresh waters. *Freshwater Biol.* **5**: 577-596.
- Daft M.J. and Stewart W.D.P. 1973. Light and electron microscope observations on algal lysis by bacterium CP-1. *New Phytol.* **72**: 799-808.
- Dunn J.H. and Wolk C.P. 1970. Composition of the cellular envelopes of *Anabaena cylindrica*. *J. Bacteriol.* **103**: 153-158.
- Falconer I.R. 1994. Health problems from exposure to cyanobacteria and proposed safety guidelines for drinking and recreational water. In: Codd G.A., Jefferies T.M., Keevil C.W. and Potter E. (eds.), *Detection Methods for Cyanobacterial Toxins*. The Royal Society for Chemistry, Cambridge. pp. 3-10.
- Granhall, V. and Berg B. 1972. Antimicrobial effects of *Cellvibrio* on blue-green algae. *Arch. Mikrobiol.* **84**: 234-242.
- Gromov B.V., Ivanov O.G., Mamkaeva K.A. and Avilova I.A. 1972. A flexibacter that lyses blue-green algae. *Microbiology* **41**: 952-956.
- van Hannen E.J., Zwart G., van Agterveld M.P., Gons H.J., Ebert J. and Laanbroek H.J. 1999. Changes in bacterial and eukaryotic community structure after mass lysis of filamentous cyanobacteria associated with viruses. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 795-801.
- Jochimsen E.M., Carmichael W.W., An J.S., Cardo D.M., Cookson S.T., Holmes C.E.M., Antunes M.D., de Melo Filho D.A., Lyra T.M., Barreto C.S.V., Azevedo S.M.D.O. and Jarvis W.R. 1998. Liver failure and death after exposure to microcystins at a haemodialysis center in Brazil. *Nes Engl. J. Med.* **338**: 873-878.
- Kim C.H. and Choi Y.K. 1998. The effect of environmental factors on the lytic activity of *Moraxella* sp. CK-1 against *Anabaena cylindrica*. *Korean J. Limnol.* **31**: 54-61.
- Kim J.C. and Han M.S. 2003. Identification of alga-lytic bacteria AK-07 and its enzyme activities associated with degradability of cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. *Korean J. Limnol.* **36**: 108-116.
- Kiviranta J., Sivonen K., Lahti K., Luukkainen R. and Helsinki S.I.N. 1991. Production and biodegradation of cyanobacterial toxins-a laboratory study. *Arch. Hydrobiol.* **121**: 281-294.
- Lee R.E. 1989. *Phycology*. 2nd ed. Cambridge University Press, New York. p. 55-101
- Martin E.L., Leach J.E. and Kuo K.J. 1978. Biological regulation of bloom-causing blue-green algae. In: Loutit M.W. and Miles J.A.R. (eds.), *Microbial Ecology*. Springer-Verlag, Berlin. pp. 62-67.
- Mitsutani A., Uchida A. and Ishida Y. 1987. Occurrence of blue-green algae and algal lytic bacteria in lake Biwa. *Bull. JSME* **2**: 21-28.
- Ohtake A., Shirai M., Aida T., Mori N., Harada K., Matsuura K., Suzuki M. and Nakano M. 1989. Toxicity of Microcystis species isolated from natural blooms and purification of the toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 3202-3207.
- Reynolds C.S. and Walsby A.E. 1975. Water-blooms. *Biol. Rev.* **50**: 437-481.
- Reyssac S.J. and Pletikoscic M. 1990. Cyanobacteria in fish ponds. *Aquaculture* **88**: 1-20.
- Rinehart K.L., Namikoshi M. and Choi B.W. 1994. Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (cyanobacteria). *J. Appl. Phycol.* **6**: 159-176.
- Sallal A.K.J. 1994. Lysis of cyanobacteria with *Flexibacter* spp. isolated from domestic sewage. *Microbios* **77**: 57-67.
- Schreiter P.P.-Y., Gillor O., Post A., Belkin S., Schmid R.D. and Bachmann T.T. 2001. Monitoring of phosphorus

- bioavailability in water by an immobilized luminescent cyanobacterial reporter strain. *Biosensors & Bioelectronics* **16**: 811-818.
- Shilo M. 1970. Lysis of blue-green algae by *Myxobacter*. *J. Bacteriol.* **104**: 453-461.
- Sivonen K., Niemelä S.I., Niemi R.M., Lepistö L., Luoma T.H. and Räsänen L.A. 1990. Toxic cyanobacteria (blue-green algae) in Finnish fresh and coastal waters. *Hydrobiologia* **190**: 267-275.
- Stewart J.R. and Brown R.M. 1971. Algicidal non-fruiting myxobacteria with high G+C ratios. *Arch. Mikrobiol.* **80**: 176-190.
- Stewart W.D.P. and Daft M.J. 1977. Microbial pathogens of cyanophycean blooms. In: Droop M.R. and Kannasch H.W. (eds.), *Advances in Aquatic Microbiology*. Academic Press, London. pp. 177-218.
- Walker H.L. and Higginbotham L.R. 2000. An aquatic bacterium that lyses cyanobacteria associated with off-flavor of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Biological Control* **18**: 71-78.
- Yoshikawa K., Adachi K., Nishijima M., Takadera T., Tamaki S., Harada K.-I., Mochida K. and Sano H. 2000. -Cyanoalanine production by marine bacteria on cyanide-free medium and its specific inhibitory activity toward cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 718-722.

Received 22 September 2003

Accepted 5 November 2003