



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.
C12N 1/20 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0056594
(43) 공개일자 2007년06월04일

(21) 출원번호 10-2005-0115488
(22) 출원일자 2005년11월30일
심사청구일자 2005년11월30일

(71) 출원인 인하대학교 산학협력단
인천 남구 용현동 253 인하대학교

(72) 발명자 이철균
서울 서초구 반포본동 주공아파트 91동 402호
김정동
서울 노원구 하계2동 270 우성아파트 110동 1103호
김법민
충남 부여군 규암면 신리 226번지

(74) 대리인 이원희

전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 슈도모나스 속 미생물을 이용한 헤테로시그마 속 편모조류를 억제하는 방법

(57) 요약

본 발명은 슈도모나스(*Pseudomonas*) 속 미생물을 이용한 헤테로시그마(*Heterosigma*) 속 편모조류 억제 방법에 관한 것으로서, 구체적으로는 우리나라에서 적조 현상을 일으키는 유해 조류 중 편모조류, 더 바람직하게는 헤테로시그마 속을 억제할 수 있는 슈도모나스 플루오레신스 균주 HAK-13 과 이를 이용하여 편모조류를 억제하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 슈도모나스 플루오레신스(*Pseudomonas fluorescens*) HAK-13 균주 및 이의 배양물은 편모조류에 대한 살조 능력을 나타내므로, 편모조류에 의한 적조 현상을 제어하는데 유용하게 사용될 수 있다.

대표도

도 1

특허청구의 범위

청구항 1.

슈도모나스 속 미생물을 이용한 헤테로시그마 속 편모조류 억제 방법.

청구항 2.

제 1항에 있어서,

- 1) 헤테로시그마 속 편모조류 억제능을 갖는 슈도모나스 속 미생물을 선별하는 단계;
- 2) 단계 1)의 슈도모나스 속 미생물을 배양하여 배양물을 획득하는 단계;
- 3) 단계 2)의 배양물을 적조 발생 해역에 살포하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 3.

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 슈도모나스 속 미생물은 슈도모나스 플루오레신스(*Pseudomonas fluorescens*) 인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4.

제 3항에 있어서, 슈도모나스 플루오레신스(*Pseudomonas fluorescens*)는 슈도모나스 플루오레신스 HAK-13인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5.

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 헤테로시그마 속 편모조류는 헤테로시그마 아카시오(*Heterosigma akashiwo*)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6.

제 2항 또는 제 4항에 있어서, 단계 2)의 배양 방법은 영양한천배지(Nutrient agar)에서 18~35℃의 배양온도, 1~5 일간 배양조건으로 배양하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7.

슈도모나스 플루오레신스(*Pseudomonas fluorescens*) HAK-13 (수탁번호 : KFCC-11354P).

청구항 8.

슈도모나스 속 미생물 또는 이의 배양물을 유효 성분으로 포함하는 살조제(殺藻劑).

청구항 9.

제 8항에 있어서, 슈도모나스 속 미생물은 슈도모나스 플루오레신스(*Pseudomonas fluorescens*) 인 살조제.

청구항 10.

제 8항 또는 제 9항에 있어서, 슈도모나스 플루오레신스 HAK-13인 살조제.

청구항 11.

제 8에 있어서, 슈도모나스 속 미생물 또는 배양물에 증량제·영양제, 천연다당류, 광물질 또는 계면활성제를 하나 이상 포함하는 것을 특징으로 하는 살조제.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 슈도모나스 속 미생물을 이용한 헤테로시그마 속 편모조류 억제 방법에 관한 것이다.

적조(red tide) 현상이란 해양 미생물(동물·식물 플랑크톤, 원생동물, 박테리아)의 폭발적 증식으로 인해 해수가 변색되고, 해양 생물들이 피해를 입는 현상을 말한다. 적조 현상을 일으키는 원인 생물은 식물 플랑크톤으로 규조류(diatom), 편모조류(dinoflagellate), 남조류(blue-green algae), 미세조류(microalgae) 등과 섬모충류 등으로 우리나라에서 발견된 것만도 50여 종이나 된다. 플랑크톤의 종류에 따라 바닷물의 색깔은 적색으로 국한되지 않고 다갈색, 청색, 백색 등으로 나타나기도 한다.

우리나라와 같은 온대지방의 해수 생태계에서는 부영양화가 되면 풍부한 영양분을 바탕으로 하여 하절기에 수층이 형성되고(stratification), 광량이 높아지며, 긴 장마와 수온이 상승함에 따라 1차 생산자인 식물 플랑크톤의 생장에 유리한 환경이 조성되면서 조류의 대발생이 진행된다. 특히, 우리나라 연안에서 적조 현상을 일으키는 종들 중 어류나 패류를 직접 치사시키는 독성 물질을 생산하는 종은 코클로디니움(*Cochlodinium*) 속(屬), 짐노디니움(*Gymnodinium*) 속, 지로디니움(*Gyrodinium*) 속, 헤테로시그마(*Heterosigma*) 속 등 편모조류(dinoflagellate)에 속하는 종이다.

우리나라에서 적조 현상을 일으키는 생물들을 계절별로 살펴보면, 봄철에는 스켈레토네마(*Skeletonema*) 속, 케토세로스(*Chaetoceros*) 속에 속하는 규조류 등이 있고, 초여름에는 헤테로시그마(*Heterosigma*) 속, 프로로센트룸(*Prorocentrum*) 속의 소형 편모조류 등이 있으며, 늦은 여름철에서 가을철까지는 대형의 세라티움(*Ceratium*) 속, 짐노디니움(*Gymnodinium*) 속, 코클로디니움(*Cochlodinium*) 속의 편모조류가 있다. 연도별로는 1995년부터 남해안과 동해 남부해역에서 코클로디니움 폴리크리코이테스(*Cochlodinium polykrikoides*) 종이 상습적으로 적조 현상을 일으키고 있다.

일례로, 초여름 부영양화 수계에서 헤테로시그마(*Heterosigma*) 속 편모조류가 남해안 인근 해역으로부터 인천, 울산, 여수 등 전 연안으로 확대되어 대발생이 일어난 바 있으며, 특히 1995년 이후 매년 남해안과 남동해안에서 발생하고 있는 편모조류에 의한 적조 현상은 양식어장에 큰 피해를 끼쳐 많은 관심을 불러일으킨 바 있다.

편모조류의 대발생을 나타내는 적조 현상은 하기와 같은 피해를 초래한다;

- 1) 대발생이 일어난 편모조류가 먹이사슬의 상층에 속하는 다른 해양생물 등에 의해 이용됨으로써, 미생물에 의해 분해되는 과정에서 각종 유기물과 질소 인 등의 무기염류가 용출되어 수계의 부영양화를 반복 심화시킨다;
- 2) 적조가 발생하면 수중의 용존 산소가 결핍되어 질식사하거나 적조 생물이 생산하는 독소 또는 2차적으로 생긴 황화수소, 메탄가스, 암모니아 등 유독성물질에 의하여 어류와 패류를 치사시킨다;
- 3) 생산성이 감소되어 어장 가치가 떨어진다.

특히, 우리나라의 경우 편모조류가 대량 번식하기 시작한 시기는 1980년대로 이때 처음으로 편모조류를 분리하였으며 1991년부터 새로운 유독성 적조 및 어패류 폐사가 대량 보고되고 있다. 이 후 우리나라 연안의 여수, 남해, 통영, 마산 등 연안의 어류양식장에서 코클로디니움(*Cochlodinium*)에 의한 유해적조가 발생하여 수산피해를 일으켰으며 1995년 이후부터는 동해 남부까지 수산 피해가 확산되었다.

또한, 우리나라 연안 여름철과 가을철에 서해 일부를 포함한 모든 연안에서도 편모조류에 의한 적조가 대발생하고 있다. 우리나라 연안 대부분의 유해성 적조는 8월에 시작하는데, 표층 수온이 23~26℃, 남해안 해역에서 발생, 인근 해역으로 확산되면서 9월 초·중순에 절정을 이루다 10월에는 대부분 소멸하는 것으로 알려져 있다. 그러나 장마가 끝나고 기온이 상승할 경우에는 일조일수가 증가하여 적조가 일찍 발생할 수도 있다. 특히, 강한 일사량과 함께 해수 이동이 적은 해역에서는 유해성 적조생물인 편모조류가 고밀도로 집적될 것으로 보여 양식 어민의 대규모 피해가 발생하고, 또한 적조 기간에 수시로 비가 내릴 경우 염분 농도에 따라 연안과 외해를 교차하여 적조가 심화되는 국지적인 고밀도 현상이 나타나기도 한다. 따라서, 부영양화의 조절 및 편모조류의 생장조절에 대한 연구는 공중위생 및 해양자원의 원활한 이용을 위하여 시급한 과제이다.

적조는 상술한 바와 같이 조류(algae)에 의해 일어나기 때문에, 통상의 항생물질 등에 의해 조절할 수는 없다. 더불어, 해양 생태계의 부영양화 및 적조 발생을 방지하기 위한 대부분의 방법들은 기술적, 경제적 측면에서 제약이 많이 있다. 지금까지 알려진 적조 원인 생물의 제거 방법은 화학약품 살포법, 초음파 및 오존처리법, 해면회수 및 침강법, 황토살포법 등이 있다.

화학약품 살포법은 황산구리(CuSO_4), 이산화염소(ClO_2), 시마진(Simazine) 등을 살포하는 방법으로서 과거부터 이용되어 왔는데, 그 중 비용이 가장 저렴하여 널리 이용되는 황산구리는 유해성 편모조류에만 특이적(specific)이지 않아 적조원인 생물 외에 다른 해양생물에까지 영향을 끼쳐, 수중의 다른 생물에 대한 독성 및 부식의 측면에서 문제를 일으킬 수 있으며, 또한 상기 황산구리는 일시적 효과만 나타나기 때문에 반복 사용해야 하며, 조류의 적조 발생시 수반되는 높은 알칼리성 환경 조건하에서는 황산구리가 불안정해지기 때문에 많은 양을 처리하여야 하므로 비경제적이라는 단점이 있다.

초음파 처리법은 초음파(160~400kHz)로 적조원인생물의 세포를 파괴하는 방법이고, 오존처리법은 적조 발생 수역에 고압의 오존을 투입하여 적조로 인한 독성을 중화시키는 방법으로, 두 방법 모두 실용화단계에는 이르지 못하고 있다.

해면회수 및 침강법은 원심분리기, 응집분조, 혼합조 및 가압부상조로 구성된 가압부상분리장치를 이용하여 기포를 발생시켜 적조 생물을 흡착, 부상시키고 해표면에서 회수하는 방법으로 우리나라에서 널리 사용하고 있다.

황토살포법은 황토(계면활성점토(Montmorillonite))를 해수 중에 살포하여 적조생물을 흡착 침강시키고, 황토속의 알루미늄 이온이 적조원인 생물의 세포를 파괴시키는 성질을 이용한 방법으로 우리나라에서 널리 사용하고 있다. 그러나, 해수 중에 황토를 살포하면 부유물질이 증가되어 어류 양식장과 저층에 정착생물이 살고 있는 어장에서는 어류 아가미 폐쇄로 호흡 장애 등 생물에 영향을 미칠 수 있으므로 주의가 요한다. 더불어, 황토는 적조생물을 바다 밑으로 가라앉혀 죽이므로 바다 속에 2차 오염을 유발할 것으로 여겨진다. 또한, 현재까지 우리나라 연안에 출현한 코클로디니움과 같은 적조생물은 몸에 껍질이 없고 끈적끈적한 점액질 성분이 있어 황토가 흡착효과를 발휘하지만 헤테로시그마(*Heterosigma*) 속 등 다른 종류에는 껍질이 있어 황토 살포가 소용이 없다.

적조현상을 제어하기 위한 또 다른 방법으로 많은 생물학적인 방법들이 시도되고 있으며, 따라서 편모조류에 의한 적조 현상에 박테리아의 역할이 중요하게 부각되고 있다. 특히, 천적인 동물성 플랑크톤과 해양 세균을 이용하거나 유해 내지 유독성 적조생물과 영양 경쟁 관계에 있으면서 비교적 해가 덜한 적조의 종을 인위적으로 유발시켜 영양염류의 소비를 촉진시키는 방법등 적조 발생과 번식을 억제하는 생물학적 방법 연구에 관심을 기울이고 있다.

생물학적 방법을 통한 편모조류 생장조절에 대한 연구는 국내의 경우 해양 코클로디니움(*Cocholdinium*)에 관한 살조 세균을 분리한 예가 있을 뿐, 해양 편모조류인 헤테로시그마(*Heterosigma*)에 대한 살조 세균을 분리한 예는 아직 없다.

이에, 본 발명자들은 오염된 해안의 환경생태 복원 방안을 모색하기 위하여 해양생태계에서 편모조류의 생장을 억제하는 기능이 우수한 세균을 자연생태계로부터 분리하여 생물제제를 개발하고자 연구한 결과, 슈도모나스 속 미생물이 편모조류에 뛰어난 살조능력을 갖는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 우리나라 바다 생태에 적합한 편모조류 억제능을 가지는 균주인 슈도모나스 플루오레신스(*Pseudomonas fluorescens*) HAK-13 균주 및 상기 균주를 이용한 유해 조류인 헤테로시그마 속 편모조류 억제 방법을 제공하는 것이다. 본 발명의 또 다른 목적은 상기 균주 또는 그 배양물을 포함하는 편모조류 억제용 살조제(殺藻劑)를 제공하는 것이다.

발명의 구성

본 발명은 슈도모나스 속 미생물을 이용한 헤테로시그마 속 편모조류 억제 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 슈도모나스 플루오레신스(*Pseudomonas fluorescens*) HAK-13 균주를 제공한다.

또한, 본 발명은 슈도모나스 속 미생물 또는 이의 배양물을 유효 성분으로 포함하는 살조제(殺藻劑)를 제공한다.

이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.

본 발명은 슈도모나스 속 미생물을 이용한 헤테로시그마 속 편모조류 억제 방법을 제공한다.

상기 슈도모나스 속 미생물은 남해 마산만과 동해 울산만의 표층수 및 서해 인천 연안 갯벌 토양으로부터 분리하였으며, 채취한 시료를 헤테로시그마 아카시오 D-075 균주와 공동 배양하여 이를 억제하는 활성을 나타내는 것을 선별하였다.

최종적으로 시료에서 분리한 70여종의 박테리아 중 살조능력이 가장 우수한 균주를 분리한 후 PCR 반응으로 16S rDNA 염기서열을 획득하였고(도 4 참조), 이를 NCBI(National center for biotechnology information)의 Genbank 사이트에서 블라스트 서치(blast search)를 통해 분석한 결과, 슈도모나스 플루오레신스(*Pseudomonas fluorescens*) PC37 (accession number DQ 178234) 균주와 99.9% 상동성을 나타냄을 확인하였다.

따라서, 본 발명의 상기 슈도모나스 속 미생물은 슈도모나스 플루오레신스(*Pseudomonas fluorescens*) 인 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 슈도모나스 플루오레신스 HAK-13이다.

상기 방법은

- 1) 헤테로시그마 속 편모조류 억제능을 갖는 슈도모나스 속 미생물을 선별하는 단계;
- 2) 단계 1)의 슈도모나스 속 미생물을 배양하여 배양물을 획득하는 단계;
- 3) 단계 2)의 배양물을 적조 발생 해역에 살포하는 단계를 포함하는 것이 바람직하다.

상기 단계 1)에서 선별된 슈도모나스 플루오레신스 HAK-13 균주는 영양 한천 배지(Nutrient agar; 0.8% (w/v) Nutrient broth, 1.5% agar powder)에서 18~35℃의 배양온도, 1~5 일간 배양조건으로 배양하는 것이 바람직하다.

상기에서 선별된 슈도모나스 플루오레신스 HAK-13 균주를 대수성장단계의 헤테로시그마 아카시오(*Heterosigma akashiwo*) D-075 배양액에 접종한 결과, 접종 12 시간 후에 헤테로시그마 아카시오 D-075 균주의 세포의 성장이 급격히 저해되어 90% 이상의 세포수가 감소하였고 접종 48 시간 만에 완전 사멸하였다(도 1 참조).

또한, 슈도모나스 플루오레신스 HAK-13 균주 처리 실험군과 미처리 대조군을 육안으로 관찰하였을 때, 슈도모나스 플루오레신스 미처리 대조군(도 2의 A 참조)은 붉은 갈색으로 헤테로시그마 아카시오 D-075 균주가 대량 번식된 상태를 보여주며, 슈도모나스 플루오레신스 처리군의 플라스크는 맑아져 헤테로시그마 아카시오 D-075 균주가 완전히 분해되었음을 확인하였다(도 2의 B 참조).

아울러, 슈도모나스 플루오레신스 HAK-13 균주 미처리 대조군과 처리군을 현미경상에서 비교시 시간에 따라 헤테로시그마 아카시오(*Heterosigma akashiwo*) D-075 균주의 세포가 분해되었음을 확인하므로써(도 3참조), 슈도모나스 플루오레신스 HAK-13 균주가 강력한 살조능력을 가짐을 확인하였다.

또한, 본 발명은 헤테로시그마 속 억제능을 가지는 슈도모나스 플루오레신스(*Pseudomonas fluorescens*) HAK-13 균주를 제공한다.

상기에 의해 분리·동정한 슈도모나스 플루오레신스 HAK-13 균주는 2005년 9월 5일자로 한국 미생물 보존센터에 기탁되어 있다(수탁번호: KFCC-11354P).

아울러, 본 발명은 슈도모나스 속 미생물 또는 이의 배양물을 유효 성분으로 포함하는 살조제(殺藻劑)를 제공한다. 상기 슈도모나스 속 미생물은 슈도모나스 플루오레신스(*Pseudomonas fluorescens*)이며, 더욱 바람직하게는 슈도모나스 플루오레신스 HAK-13이다.

본 발명의 살조제에 이용된 슈도모나스 플루오레신스는 편모조류에 대한 억제능력을 갖고 있으므로, 상기 균주를 이용하는 살조제는 편모조류 대발생에 의한 적조현상을 방제하는데 유용하게 사용될 수 있다. 본 발명의 살조제는 편모조류에 대한 방제 효과를 나타내며, 구체적으로 헤테로시그마 속에 대해 방제효과를 나타낸다. 상기에서 헤테로시그마 속은 헤테로시그마 아카시오이다.

본 발명의 미생물을 살조제로서 첨가할 경우 상기 미생물 또는 미생물 배양물이 포함된 채로 제조될 수 있고, 장기간 보존을 위해 별도로 보관하였다가 사용직전에 혼합하여 사용할 수도 있다. 상기 미생물을 장기간 보존하기 위해 별도로 공급되는 경우에는 10% 글리세롤 저장 용액에 -70°C 이하로 얼려 보존하거나 동결 건조한 후 4°C 에서 보존하여 사용할 수 있다.

본 발명의 살조제는 상기 슈도모나스 속 미생물 또는 배양물에 증량제·영양제, 천연다당류, 광물질 또는 계면활성제를 첨가, 혼합하여 여러 가지 형태, 구체적으로 수화제, 액제 또는 유제의 형태로 제조될 수 있다.

미생물제제의 제조 과정은 미생물 종류에 따라 상이하지만 일반적으로 미생물제제 생산에 이용되는 균은 24-48시간 정도 순수하게 액체 배양하여 활성이 가장 높을 때 균체를 회수한다. 배양액 자체를 이용하여 이들의 활성이 떨어지지 않도록 불활성화 보호제나 미량요소를 첨가하면 액상의 제품이 되고 광물질 자재나 토탄, 쌀겨와 같은 유기물에 흡착시키면 분말 또는 과립상의 제품이 생산된다. 고체 배지에 배양한 후 이를 건조하고 분쇄하여 일정한 수분이 유지되도록 조절하는 경우도 있으며 생산된 모든 제품에 대해서는 균의 밀도, 순수성, 병원균의 혼입여부를 정밀하게 검사한 후 포장하게 된다.

상기에서 증량제·영양제로는 콩가루, 쌀가루, 밀가루, 젤라틴, 콜라겐, 유당, 전분, 텍스트린, 포도당, 스킴밀크(skim milk), 카세인, 알부민, 피브리노겐, 엘라스틴, 셀룰로스, 셀룰로스 유도체로 이루어진 균으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상을 사용할 수 있으며, 상기에서 천연다당류로는 잔탄검, 구아검, 아라비아검, 아가, 카라기나 및 알긴산소다로 구성되는 균으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상을 사용할 수 있으며, 상기에서 광물질로는 Na_2CO_3 , NaHCO_3 , CaCO_3 , CuSO_4 ,

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 또는 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 황토, 세라믹, 알긴산염 또는 규조토, 제올라이트, 화이트카본 등의 광물질 담체

(carrier)로 구성된 균으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상을 사용할 수 있으며, 상기에서 계면활성제로는 폴리카복실레이트, 소듐 리그노설포네이트, 칼슘 리그노설포네이트, 소듐 다이알킬 설포석시네이트, 소듐 알킬 아릴 설포네이트, 폴리옥시에틸렌 알킬 페닐 에테르, 폴리옥시에틸렌 알킬 아릴 폴리머, 폴리옥시알킬은 알킬 페닐 에테르, 폴리옥시에틸렌 노닐 페닐 에테르, 소듐 설포네이트 나프탈렌 포름알데히드, 트리톤X 100 및 트윈 80으로 이루어진 균으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상을 사용할 수 있다.

또한, 본 발명의 입제는 미생물에 계면활성제, 비활성 담체, 보존제, 습윤제, 공급촉진제, 유인제, 캡슐화제, 결합제, 유화제 및 완충제, 부형제(excipient), 희석제(diluent) 또는 각종 첨가제로 이루어진 균으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상을 추가로 첨가하여 제조될 수 있다.

또한, 본 발명의 살조제는 액체형 미생물 전달매체 1 ml 당 슈도모나스 플루오레신스를 1×10^2 세포 이상 포함하는 것이 바람직하며, $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^{11}$ 세포/ml로 포함하는 것이 바람직하고, $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^8$ 세포/ml로 포함하는 것이 더욱 바람직하다.

이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나, 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1> 시료 채취 및 균주 분리

<1-1> 시료 채취

2004년 07월 09-11일 남해 마산만, 울산만 및 서해 인천 연안에서 표층수를 직접 수면 30cm 이내에서 10 L를 채취한 후 50 μm 플랑크톤 네트(net)로 여과하여 입구가 넓은 폴리에틸렌 병에 담았으며, 갯벌토양은 토양 코어 시료 채취기(Soil sampler)를 이용하여 표토(1-15cm) 또는 필요에 따라 일정 깊이 이하의 토양시료 500 g을 채집하여 폴리에틸렌 봉지에

넣은 다음, 이를 아이스박스에 보관하여 실험실로 12시간 이내에 운반하였다. 미리 준비된 헤테로시그마 론(*Heterosigma lawn*)에 표층수 시료는 0.2 ml을, 갯벌 토양의 경우 시료 5 g과 멸균수 45 ml를 섞어 28-30 °C에서 20-40 분간 배양 후, 배양액을 거름 여과지(Whatman NO.1)로 여과하여 그 여과액을 시료로 사용하였다.

<1-2> 유해 조류 배양

F/2 배지(0.084 mM NaNO₃, 0.004 mM NaH₂PO₄-H₂O, 0.011 mM Na₂SiO₃-9 H₂O, 0.01 mM FeCl₃-6 H₂O, 0.01 mM Na₂EDTA-2 H₂O, 0.04 μM CuSO₄-5 H₂O, 0.03 μM Na₂MoO₄-2 H₂O, 0.08 μM ZnSO₄-7 H₂O, 0.05 μM CoCl₂-6 H₂O, 0.9 μM MnCl₂-4 H₂O, 0.0001 μM Vitamin B12, 0.002 μM Biotin, 0.03 μM Thiamine HCl, 해수 1000 ml)와 동량의 2% 용융 한천을 고온고압습식멸균(121 °C, 15 min)한 후 50~60 °C까지 식혀 섞은 후 페트리디쉬(petri-dish)에 부어 굳혀서 F/2 고체 배지(bottom layer)를 만들었다. 대수성장기의 헤테로시그마 아카시오(*Heterosigma akashiwo*)를 85,000 rpm에서 원심분리하여 상등액은 버리고 펠렛(pellet)에 55 °C 멸균한 F/2 배지(2×)와 동량의 2% 한천 용융액을 더하여 현탁하여 준비한 F/2 고체 배지(bottom layer)에 얇게 부어 론(lawn)을 만들었다.

<1-3> 균주 분리

상기 실시예 1-2에 의해 생성된 헤테로시그마 아카시오 론(lawn)에 시료 0.2 ml을 각각 접종 후 헤테로시그마 아카시오(*Heterosigma akashiwo*) 배양 조건인 20°C, L : D = 12 : 12 사이클, 50 μE m⁻²s⁻¹의 광량의 조건에서 15 일간 배양하면서 육안으로 관찰하였을 때, 론 위에서 투명대(clear zone)가 형성되는 플레이트(plate)를 선발하였다.

선발된 플레이트(plate)에서 루프(loop)를 이용해 투명대 부분을 살짝 긁어낸 후 새로운 영양 한천 배지(Nutrient agar; 0.8% (w/v) Nutrient broth, 1.5% agar powder)에 접종하여 28-30°C, 암(Dark) 상태로 2 일간 배양하였다. 상기에서 잘 형성된 균총을 분리하여, 20°C, L : D = 12 : 12 사이클, 50 μE m⁻²s⁻¹의 광량의 조건에서 배양한지 10일된 대수성장단계의 헤테로시그마 아카시오(*Heterosigma akashiwo*) D-075 배양액(f/2 배지; 0.084 mM NaNO₃, 0.004 mM NaH₂PO₄-H₂O, 0.011 mM Na₂SiO₃-9H₂O, 0.01 mM FeCl₃-6 H₂O, 0.01 mM Na₂EDTA-2 H₂O, 0.04 μM CuSO₄-5 H₂O, 0.03 μM Na₂MoO₄-2 H₂O, 0.08 μM ZnSO₄-7 H₂O, 0.05 μM CoCl₂-6 H₂O, 0.9 μM MnCl₂-4 H₂O, 0.0001 μM Vitamin B12, 0.002 μM Biotin, 0.03 μM Thiamine HCl, 해수 1000 ml) 150 ml에 최종 농도 1 × 10⁴ 개 세포/ml의 농도로 접종하였다. 접종 후 6 시간 단위로 광학현미경(BX-50, Olympus, Japan)하에서 헤모사이토미터(Haemocytometer, REICHERT)를 이용해 세균의 수를 계수하였다.

그 결과, 접종 12 시간 후에 헤테로시그마 아카시오 D-075 균주의 세포의 성장이 급격히 저해되어 90% 이상의 세포수가 감소하였고 접종 48 시간 만에 완전 사멸하였다. 슈도모나스 플루오레신스 HAK-13 균주의 강력한 살조 능력을 확인할 수 있었다(도 1). 또한, 슈도모나스 플루오레신스 HAK-13 균주 접종 12시간 후에 슈도모나스 플루오레신스 미처리 대조군(도 2의 A)은 붉은 갈색으로 헤테로시그마 아카시오 D-075 균주가 대량 번식된 상태를 보여주며, 슈도모나스 플루오레신스 처리군의 플라스크는 맑은 흰색을 나타내어 모든 헤테로시그마 아카시오 D-075 균주가 완전히 분해되었음을 나타낸다(도 2의 B). 아울러, 슈도모나스 플루오레신스 HAK-13 균주 미처리 대조군(도 3의 A), 슈도모나스 플루오레신스 HAK-13 균주 접종 4시간 후 헤테로시그마 아카시오 D-075 균주(도 3의 B) 및 슈도모나스 플루오레신스 HAK-13 균주 접종 12 시간 후 헤테로시그마 아카시오 D-075 균주(도 3의 C)를 광학현미경으로 관찰한 결과 헤테로시그마 아카시오(*Heterosigma akashiwo*) D-075 균주의 세포가 완전히 분해되었음을 확인하였다.

<실시예 2> 살조 세균 HAK-13 균주의 동정

상기 조류 분해 활성을 갖는 균주를 동정하기 위하여 균주의 16S rDNA를 분리하여 염기서열을 분석하였다(도 4).

상기 균주의 배양액으로부터 DNeasy Plant Mini Kit(Qiagen, Germany)를 사용하여 게놈 DNA를 추출하였다. 그런 다음, 서열번호 2 및 서열번호 3으로 기재되는 프라이머를 이용해 PCR(중합효소 연쇄 반응)을 수행하여 16S rDNA를 얻었다. 그 염기서열 및 PCR 수행조건은 하기과 같다.

프라이머:

primer 1 : 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'(서열번호 2)

primer 2 : 5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3'(서열번호 3)

PCR 반응물:

계놈 DNA 1 μ l

primer 1 (100 pmol) 2 μ l

primer 2 (100 pmol) 2 μ l

10mM dNTP 믹스 2 μ l

10×Han-OMNI PCR 완충액 5 μ l

Taq DNA 중합효소(Genenmed, Korea) 0.2 μ l

dH₂O 37.8 μ l

총 50 μ l

PCR 반응 조건 (25 회 반복):

초기변성과정 95 °C, 3 분

변성과정 94 °C, 40 초

어닐링과정 67 °C, 1 분

연장(중합)과정 72 °C, 1 분

최종 연장과정 72 °C, 4 분

저장 4 °C

상기 PCR 수행으로 획득한 DNA를 염기서열 분석(sequencing)을 통해 서열을 확인한 후, 이를 NCBI(National center for biotechnology information)의 Genbank 사이트에서 분석한 결과, 슈도모나스 플루오레신스(*Pseudomonas fluorescens*) PC37 균주와 99.9% 상동성을 나타내어, 본 발명의 분리 균주를 "슈도모나스 플루오레신스(*Pseudomonas fluorescens*) HAK-13" 이라 명명하였다(수탁번호: KFCC-11354P).

<제제예 1> 미생물제제(살조제)의 제조

<1-1> 수화제의 제조

본 발명자들은 상기 실시예에서 헤테로시그마 속 억제능을 확인한 슈도모나스 속 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 미생물제제(살조제)를 제조하기 위해 안정적인 제제화를 목적으로 분상으로서 물에 희석하였을 때 수화되는 수화제를 제조하였다. 구체적으로, 수화제는 슈도모나스 속 미생물을 배양한 배지를 건조한 후 계면활성제 및 증량제를 첨가하여 분쇄하였다. 즉, 원분을 70°C의 건조기 내에서 2시간가량 건조하여 분쇄하였다. 그런 다음 조분쇄물, 계면활성제 및 증량제를 골고루 섞어 혼합하였다. 상기 혼합물을 제트-오-밀(Jet-O-mill, Aljet)을 통과시켜 분쇄하고 분쇄분은 수화성을 검사한 후 수화제 형태의 미생물 제제를 제조하였다.

<1-2> 입제의 제조

본 발명자들은 슈도모나스 속 균주를 이용한 미생물 제제의 안정적인 제제화를 목적으로 입상으로 원상태대로 사용할 수 있는 입제를 제조하였다. 구체적으로, 입제는 원분을 70℃의 건조기 내에서 2시간가량 건조하고 제트-오-밀(Jet-O-mill, Aljet)을 통과시켜 분쇄한 다음, 미생물 분쇄분, 계면활성제, 증량제·영양제 및 봉해제를 분쇄분 50%, 폴리카르복실레이트 3%, 소듐 리그노설포네이트 3%, 소듐 다이알킬 설포석시네이트 1%, 전분 10%, 벤토나이트 20% 및 탈크 13%로 혼합한 다음 혼합분의 전체 분체량의 35% 정도로 가수하고 반죽하였다. 반죽이 끝난 후 조립기를 이용하여 입제화(지름 1mm, 길이 1-5mm)하고 70℃의 건조기 내에서 2시간 가량 건조하였다. 건조물은 16-30 메쉬(mesh) 체를 통과시켜 분체를 제거한 후 입제를 제조하였다.

<1-3> 캡슐의 제조

본 발명자들은 슈도모나스 속 균주를 이용한 미생물 제제의 안정적인 제제화를 목적으로 캡슐을 제조하고자 하였다. 구체적으로, 콩가루 11%, 녹두 6%, 쌀가루 4%, 감자 전분 4%, 호밀가루 4% 및 황토 3%를 섞어 121℃에서 20분간 가압멸균한 다음 식기 전에 다시 완전히 섞어 찬물에서 냉각시켰다. 교반기(d=5cm, 200rpm 이상)에서 10분 이상 완전히 섞어준 후, 교반이 계속되는 상태에서 첨가제와 상기 미생물 균주를 넣고 완전히 섞어 미생물 캡슐을 제조하였다.

발명의 효과

이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 슈도모나스 플루오레신스(*Pseudomonas fluorescens*) HAK-13 균주는 유해성 편모조류인 헤테로시그마(*Heterosigma*)에 대한 살조 능력을 나타내므로, 편모조류에 의한 적조 현상을 제어하는데 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 배양 후 10일된 대수 성장 단계의 해수 유해 조류 헤테로시그마 아카시오(*Heterosigma akashiwo*) D-075 균주에 슈도모나스 플루오레신스(*Pseudomonas fluorescens*) HAK-13 균주를 처리한 군과 처리하지 않은 군(대조군)을 매 12시간 단위로 측정한 그래프이고,

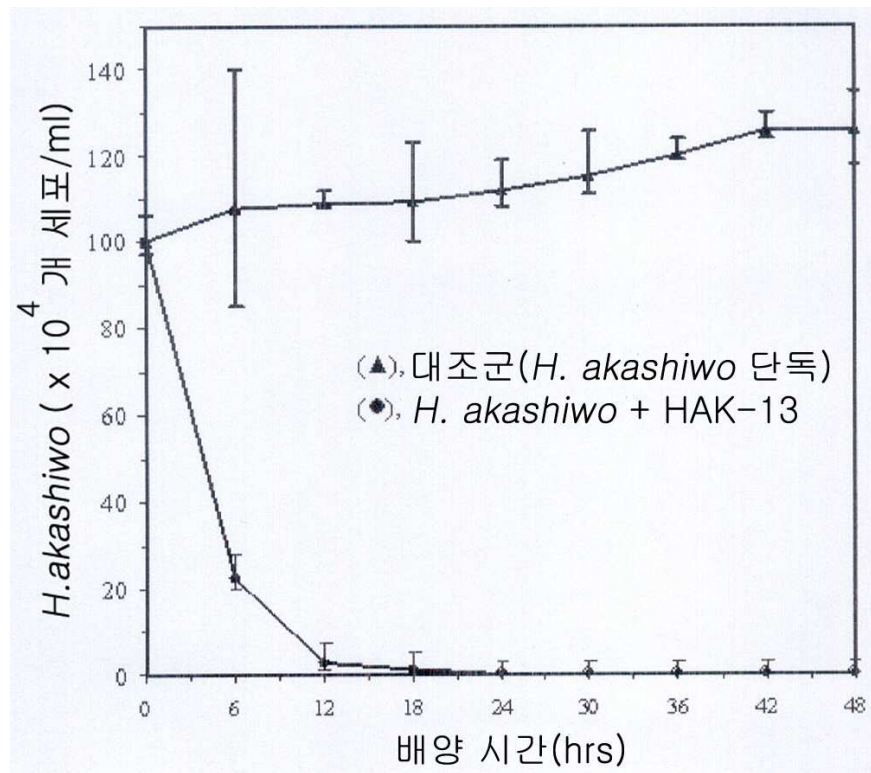
도 2는 배양 후 10일된 대수 성장 단계의 해수 유해 조류 헤테로시그마 아카시오(*Heterosigma akashiwo*) D-075 균주에 슈도모나스 플루오레신스(*Pseudomonas fluorescens*) HAK-13 균주를 처리(**B**)한지 12시간 후 미처리 대조군(**A**)과 비교한 사진이고,

도 3은 헤테로시그마 아카시오(*Heterosigma akashiwo*) D-075 균주 (**A**)와 상기 균주에 슈도모나스 플루오레신스(*Pseudomonas fluorescens*) HAK-13 균주를 접종 4 시간(**B**) 및 12 시간(**C**) 후, 광학현미경으로 관찰한 사진이며,

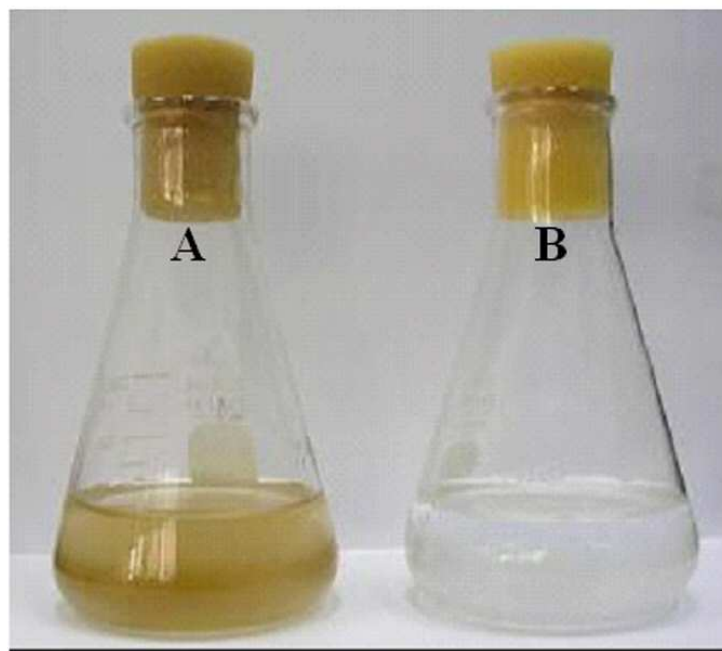
도 4는 16S rDNA 서열 분석을 통한 HAK-13 균주의 서열 및 그의 동정 결과를 나타낸 것이다.

도면

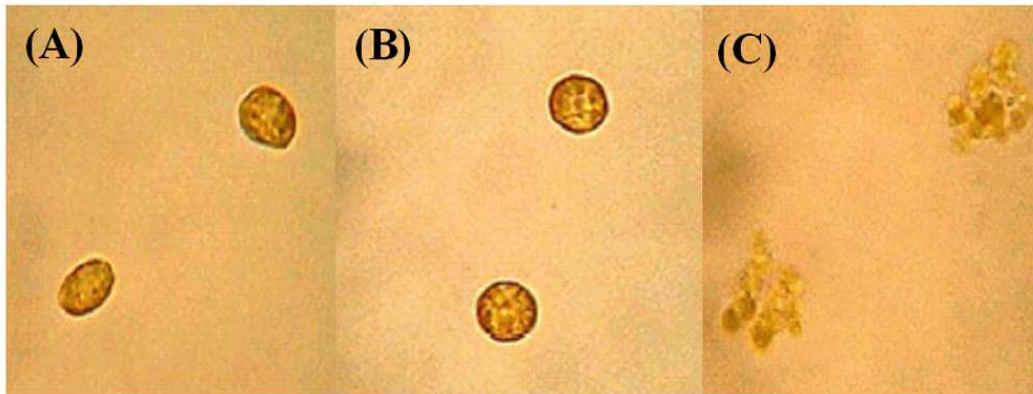
도면1



도면2



도면3



도면4

```

attgaacgct ggcggcaggc ctaacacatg caagtcgagc ggtagagaga agcttgcttc   60
tcttgagagc ggcggacggg tgagtaatgc ctaggaatct gcctggtagt gggggataac   120
gttcggaac ggacgctaata accgcatacg tcctacggga gaaagcaggg gaccttcggg   180
ccttgcgcta tcagatgagc ctaggtcgga ttagctagtt ggtgaggtaa tggtccacca   240
aggcgacgat ccgtaactgg tctgagagga tgatcagtca cactggaact gagacacggt   300
ccagactcct acgggaggca gcagtgggga atattggaca atgggcgaaa gcctgatcca   360
gccatgccgc gtgtgtgaag aaggtcttcg gattgtaaag cactttaagt tgggaggaag   420
ggcagttacc taatacgtga ttgttttgac gttaccgaca gaataagcac cggttaactc   480
tgtgccagca gccgcggtaa tacagagggt gcaagcgta atcggaatta ctgggcgtaa   540
agcgcgcgta ggtggttagt taagttggat gtgaaatccc cgggctcaac ctgggaactg   600
cattcaaaac tgactgacta gagtatggta gaggttggtg gaatttcctg tgtagcgggtg   660
aaatgcgtag atataggaag gaacaccagt ggcaaggcg accacctgga ctgatactga   720
cactgagggt cgaaagcgtg gggagcaaac aggattagat accctggtag tccacgccgt   780
aaacgatgtc aactagccgt tgggagcctt gagctcttag tggcgagct aacgcattaa   840
gttgaccgcc tggggagtac ggccgcaagg ttaaaactca aatgaattga cgggggcccg   900
cacaagcggg ggagcatgtg gtttaattcg aagcaacgcg aagaacctta ccaggccttg   960
acatccaatg aactttctag agatagattg gtgccttcgg gaacattgag acagggtgctg 1020
cggagggaagg tgggatgac gtcaagtcac catggccctt acggcctggg ctacacacgt 1200
gctacaatgg tcggtacaga ggggtgccaa gccgcgagggt ggagctaata ccagaaaacc 1260
gatcgtagtc cggatcgag tctgcaactc gactgcgtga agtcggaata gctagtaata 1320
gcgaatcaga atgtcgggt gaatacgttc ccgggccttg tacacaccgc ccgtcacacc 1380
atgggagtggt gttgcaccag aagtagctag tctaaccctc ggggggacgg ttaccacggt 1440
gtgattcatg cctggggtga agtcgtaaca aggtagccgt aggggaacct gcggctggat 1500
ctcctcctta                                     1510

```

서열목록

<110> Inha University

<120> Method to control dinoflagellate of Heterosigma sp. by microorganism of Pseudomonas sp.

<130> 5p-10-41

<160> 3

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 1510

<212> DNA

<213> 16S ribosomal DNA gene of Pseudomonas fluorescens HAK-13 strain

<400> 1

attgaacgct ggcggcaggg ctaacacatg caagtcgagc ggtagagaga agcttgcttc	60
tcttgagagc ggcggacggg tgagtaatgc ctaggaatct gcctggtagt gggggataac	120
gttcggaaac ggacgctaata accgcatacg tcctacggga gaaagcaggg gaccttcggg	180
ccttgcgcta tcagatgagc ctaggtcgga ttagctagtt ggtgaggtaa tggctcacca	240
aggcgacgat ccgtaactgg tctgagagga tgatcagtca cactggaact gagacacggg	300
ccagactcct acgggaggga gcagtgggga atattggaca atgggcgaaa gcctgatcca	360
gccatgccgc gtgtgtgaag aaggtcttcg gattgtaaag cactttaagt tgggaggaag	420
ggcagttacc taatacgtga ttgttttgac gttaccgaca gaataagcac cggctaactc	480
tgtgccagca gccgcggtaa tacagagggg gcaagcgtaa atcggaatta ctgggcgtaa	540
agcgcgcgta ggtgggttagt taagttggat gtgaaatccc cgggctcaac ctgggaactg	600
cattcaaaac tgactgacta gagtatggta gaggggtggg gaatttcctg tgtagcgggtg	660
aaatgcgtag atataggaag gaacaccagt ggcgaaggcg accacctgga ctgatactga	720
cactgaggtg cgaaagcgtg gggagcaaac aggattagat accctggtag tccacgccgt	780
aaacgatgtc aactagccgt tgggagcctt gagctcttag tggcgagct aacgcattaa	840
gttgaccgcc tggggagtag gccgcgaagg ttaaaactca aatgaattga cgggggcccc	900
cacaagcggg ggagcatgtg gtttaattcg aagcaacgag aagaacctta ccaggccttg	960
acatccaatg aactttctag agatagattg gtgccttcgg gaacattgag acaggtgctg	1020
catggctgtc gtcagctcgt gtcgtgagat gttgggttaa gtcccgtaac gagcgcaacc	1080

cttgcctta gttaccagca cgttatggtg ggcactctaa ggagactgcc ggtgacaaac	1140
cggaggaagg tggggatgac gtcaagtcac catggccctt acggcctggg ctacacacgt	1200
gctacaatgg tcggtacaga gggttgcca ggcgcgaggt ggagctaata ccagaaaacc	1260
gatcgtagtc cggatcgtag tctgcaactc gactgcgtga agtcggaata gctagtaata	1320
gcgaatcaga atgtcgcggt gaatacgttc ccgggccttg tacacaccgc ccgtcacacc	1380
atgggagtg gttgcaccag aagtagctag tctaaccctt ggggggacgg ttaccacggt	1440
gtgattcatg cctgggggtga agtcgtaaca aggtagccgt aggggaacct gcggctggat	1500
ctcctcctta	1510

<210> 2
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> universal primer 1 for Pseudomonas fluorescens 16S rDNA gene

<400> 2	
gagtttgatc ctggctcag	19

<210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> universal primer 2 for Pseudomonas fluorescens 16S rDNA gene

<400> 3	
agaaaggagg tgatccagcc	20