

Research Article

Open Access

## *Alexandrium catenella*와 유해성 적조종에 대한 *Arthrobacter* sp. NH-3와 살조물질의 살조능

정성윤<sup>1</sup>, 정남호<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>대구가톨릭대학교 의생명과학과, <sup>2</sup>대구가톨릭대학교 제약산업공학과

### The Algicidal Activity of *Arthrobacter* sp. NH-3 and its Algicide against *Alexandrium catenella* and other Harmful Algal Bloom Species

Seong-Yun Jeong<sup>1</sup> and Nam Ho Jeong<sup>2\*</sup> (<sup>1</sup>Department of Biomedical Science, Catholic University of Daegu, Gyeongsan, 712-702, Korea, <sup>2</sup>Department of Pharmaceutical Science and Technology, Catholic University of Daegu, Gyeongsan, 712-702, Korea)

Received: 14 May 2015 / Revised: 21 May 2015 / Accepted: 4 June 2015

Copyright © 2015 The Korean Society of Environmental Agriculture

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

#### Abstract

**BACKGROUND:** The aim of this study was to isolate and identify algicidal bacterium that tends to kill the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*, and to determine the algicidal activity and algicidal range of algicide.

**METHODS AND RESULTS:** Among of algicidal bacteria isolated in this study, NH-3 isolate was the strongest algicidal activity against *A. catenella*. NH-3 isolate was identified on the basis of biochemical characteristics and analysis of 16S rRNA gene sequences. The NH-3 isolate showed over 99% homology with *Arthrobacter oxydans*, and was designated as *Arthrobacter* sp. NH-3. The optimal culture conditions were 25°C, initial pH 7.0, and 2.0% (w/v) NaCl concentration. The algicidal activity of *Arthrobacter* sp. NH-3 was significantly increased to maximum value in the late of logarithmic phase. *Arthrobacter* sp. NH-3 showed algicidal activity through indirect attack, which excreted active substance into the culture filtrate. When 10% culture filtrate of NH-3 was applied to *A. catenella*,

100% of algal cells were destroyed within 30 h. In addition, the algicidal activities were increased in dose and time dependent manners. The pure algicide was isolated from the ethyl acetate extract of the culture filtrate of NH-3 by using silica gel column chromatography and high performance liquid chromatography (HPLC). We investigated the algicidal activity of this algicide on the growth of harmful algal bloom (HAB) species, including *A. catenella*. As a result, it showed algicidal activity against several HAB species at a concentration of 100 µg/mL and had a relatively wide host range.

**CONCLUSION:** Taken together, our results suggest that *Arthrobacter* sp. NH-3 and its algicide could be a candidate for controlling of toxic and harmful algal blooms.

**Key words:** *Alexandrium catenella*, Algicidal activity, Algicide, *Arthrobacter* sp. NH-3, Harmful algal bloom species

#### 서론

해양생태계에서 외편모조류(dinoflagellates)는 harmful algal blooms (HABs)의 주요 원인이며, 많은 biotoxins들의 주요 생산자이다(Glibert *et al.*, 2005). 이러한 외편모조

\*Corresponding author: Nam Ho Jeong  
Phone: +82-53-850-2563; Fax: +82-53-850-3727;  
E-mail: syjeoung@cu.ac.kr

류들 중에서 *Alexandrium* 속 적조생물종들이 잠재적으로 신경성 독소들(neurotoxins)을 생산하고, 이러한 독소들(toxins)을 축적한 어패류를 섭취한 해양생물종과 심지어 인간에게까지 심각한 피해를 끼친다(May et al., 2010; Anderson et al., 2012). 특히 *Alexandrium catenella*는 paralytic shellfish poisoning (PSP)을 야기시키는 주요 원인종이다(Glibert et al., 2005). 이러한 이유로 전 세계적으로 많은 연구자들이 *A. catenella*에 대해 많은 연구를 하고 있다(Bravo et al., 2008; Toulza et al., 2010). 유독성 외편모조류인 *Alexandrium* 속은 전 세계적으로 30여종이 보고되고 있으며, 종에 따라 독성의 차이는 있지만 화학적으로 유사한 20여종의 신경성 독소를 생산한다. 특히 *A. catenella*가 생산하는 마비성 패독(PSP)은 saxitoxin (STX)과 gonyautoxin (GTX) 및 그 유도체들을 포함하는 신경성 독소로서 먹이연쇄 과정에서 농축되어 패류 양식 산업은 물론 식품위생 등에도 심각한 피해를 끼치고 있다(Kamikawa et al., 2007).

한국 연안에서 출현하는 적조생물종은 34종 이상이 보고되고 있는데, 산업화가 가속화된 1981년부터 *Alexandrium*, *Cochlodinium*, *Gymnodinium* 및 *Heterosigma* 속 등의 외편모조류가 우리나라의 주요 적조 원인생물로 출현하고 있다(Kim, 1997). *Alexandrium* 속의 유독종으로는 *A. tamarense*, *A. catenella* 및 *A. minutum* 등이 알려져 있고, 이중 우리나라에서는 진해만과 여수만에서 *A. tamarense*와 *A. catenella* 등이 출현하는 것으로 보고되고 있다(Kim, 1995; Kim and Kim, 2004; Lee et al., 2006).

최근 적조 피해를 최소화하기 위한 적조생물의 구제 또는 제거 방법에 대한 연구로서 해양미생물을 이용하는 환경친화적인 생물학적 방제 방법에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(Imai et al., 1993; Yoshinaga et al., 1995, 1997, 1998; Lovejoy et al., 1998; Park et al., 1998; Kim et al., 1999; Jeong et al., 2000, 2003; Mitsutani et al., 2001; Wang et al., 2005; Kim et al., 2009; Jeong et al., 2012). 그러나 지금까지 보고된 적조생물에 대한 살조미생물의 연구에 있어서 *A. tamarense*를 제어하는 미생물에 대한 연구(Wang et al., 2005, 2012; Su et al., 2007a, 2011)는 몇몇 연구자들에 의해 보고되고 있으나, *A. catenella*를 제어하는 미생물에 대한 연구(Jeong et al., 2012)는 전 세계적으로도 미진한 실정이다.

이에 본 연구에서는 우리나라 연안에서 적조 및 마비성 패독을 일으켜 문제시되고 있는 유독성 적조생물인 *A. catenella*에 대한 살조미생물을 분리, 동정하고, 분리균주가 생산하는 살조물질을 분리, 정제하여 살조능과 살조범위를 조사함으로써 환경친화적 적조 구제법 개발의 기초 자료를 제공하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 시료채취 및 살조미생물의 분리

해수 sampling 장소는 울진 연안 해역으로 표층해수를 Niskin 개량형 채수기인 MB 채수기를 이용하여 광구병으로

무균(180°C에서 2시간 건열 멸균)적으로 채수하였으며, 채수된 시료는 ice-box에 보관하여 3시간 이내에 연구실로 옮겨 실험하였다. 본 실험에 사용할 살조미생물을 분리하기 위해, 해수 시료를 십진희석법으로 희석하여 PPES-II (yeast extract 1 g, proteose peptone 1 g, polypeptone 2 g, soytone 1 g, 0.1% ferric citrate 10 mL, seawater 1 L, initial pH 7.6) 배지(Taga, 1968)에 평판도말법으로 도말하여 20°C에서 7일간 배양 후, 형성된 특징적인 형태의 colony를 모두 선별하여 순수분리 하였다. 이들 분리균주들의 *A. catenella*에 대한 살조능(algicidal activity)을 알아보기 위해 f/2-Si (Guillard and Ryther, 1962) 배지를 넣은 24 well microplate에 전배양한 *A. catenella* 배양액( $8.0 \times 10^3$  cells/mL) 0.9 mL씩을 각각 분주하고, PPES-II 액체배지에서 전배양한 분리균주들의 배양액( $10^3$ - $10^4$  cells/mL) 100  $\mu$ L를 접종하여 살조능을 가지는 균주들을 선별하였다.

### *A. catenella*의 무균 배양

본 연구에서 사용한 *A. catenella*는 한국미세조류은행으로부터 분양받았으며, 하기의 무균배양법으로 순수 분리하였고 배양조건은 온도 20°C, initial pH 8.2, 광량  $70 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ , 광주기 12 L:12 D의 조건으로 f/2-Si 배지에서 계대 배양하며 실험하였다. *A. catenella*를 순수분리 또는 무균배양(axenic culture or bacteria-free culture)하는 방법은 다음과 같다: Droop (1967), Fontana와 Haug (1982), Cottrell과 Suttle (1993), Su 등(2007b) 및 Jeoung 등(2012)의 방법을 응용하여 *A. catenella*를 무균배양 하였다. 즉, 한계희석법으로 전 배양한 *A. catenella* 세포들을 원심분리하여 집적하고 멸균된 신선한 f/2-Si배지로 3번 반복 수세한 후, lysozyme (0.5 mg/mL, 20°C, 10 min)과 sodium dodecyl sulfate (SDS, 0.25%, 20°C, 10 min)를 순서대로 첨가한 후 상기의 조건으로 3회 계대 배양하였다. 이 후 antibiotic complex (gentamycin, streptomycin, cephalothin: each 100  $\mu\text{g}$ /mL)에 노출시켜 3시간 정도 배양하여 세균과 곰팡이 등을 제거한 후, 다시 항생제를 첨가하지 않은 새로운 f/2-Si 배지에서 3회 계대 배양하였다. 이와 같은 조작을 수회 반복하여 얻은 무균 배양주를 무균 검사법에 의해 아래의 여러 가지 배지에서 오염 미생물이 검출되지 않는 것을 확인한 후 모든 실험에 사용하였다. 무균 검사에는 nutrient agar, PPES-II, ST<sup>10</sup> agar (저영양, 종속영양 세균용), YM agar (Yeast용), PDA (곰팡이용)를 사용하였다. 사용한 배지의 조성은 다음과 같다: nutrient agar (peptone 5 g, meat extract 3 g, NaCl 3 g, agar 15 g, distilled water 1 L, initial pH 7.0), ST<sup>10</sup> agar (tripticase peptone 0.5 g, yeast extract 0.05 g, agar 12 g, seawater 1 L), YM agar (glucose 10 g, peptone 5 g, yeast extract 3 g, malt extract 3 g, agar 20 g, distilled water 1 L, initial pH 6.2), PDA agar (potato 200 g, glucose 20 g, agar 20 g, distilled water 1 L, initial pH 5.6).

### 살조미생물의 동정

분리한 살조미생물의 형태 및 배양학적 특성을 조사하기 위해, 분리균주들을 PPES-II agar에 도말하여 20°C에서 48 시간동안 preculture시킨 후, 증식한 균주를 PPES-II broth가 20 mL 포함된 100 mL 삼각 플라스크에 접종하여 25°C, 200 rpm으로 24시간 배양하였다. 모든 실험은 대수증식기의 균주를 사용하였고, gram staining은 광학현미경(Zeiss Co. RMS 16)으로 검경하여 형태적 특징을 관찰하였다. 분리균주들의 생리 및 생화학적 특징은 MacFaddin (1980)과 Gerhardt 등(1981)의 방법을 준용하였다. 특히 분리한 살조미생물 균주 중 가장 살조능이 우수한 NH-3 균주는 산 생산 유무, 탄소원 확인 및 생산 효소의 확인을 위해 API 20NE와 API 32GN kits (Biomérieux, France)를 이용하였으며, 그 결과를 apiweb™ database (<http://apiweb.biomérieux.com>)를 참조하여 1차적으로 분류학적 유사성을 검토하여 속 level까지 동정하였다. 실험 방법과 결과 해석은 API kit 제조사에서 제공하는 사용설명서를 준용하였으며, 결과 판독은 25°C에서 24시간과 48시간 배양 후 관찰함으로써 판정하였다.

또한 보다 정확한 동정을 위하여 16S rRNA gene을 이용한 염기서열 분석을 행하였다(Dunbar *et al.*, 2000). 선별된 NH-3 균주를 PPES-II 배지에서 18시간 배양한 후, AccuPrep™ Genomic DNA extraction kit (Bioneer)를 사용하여 total genomic DNA를 추출하여 template로 사용하였다. 16S rRNA 유전자의 증폭에 이용된 primer쌍은 27F (5'-AGAGTTTGTATCMTGGCTCAG-3')와 1492R (5'-GTGGATCCGGYTACCTTGTACGACTT-3')을 사용하였다. 이때 forward primer의 5'에는 제한효소 EcoRI의 인식부위를, reverse primer의 5'에는 BamHI의 인식부위를 첨가하였다. PCR 반응은 AccuPower PCR Premix (Bioneer)를 사용하여 Minicycler (MJ Research, USA)로 실시하였다. 먼저 94°C에서 5분간 변성시킨 후, 94°C에서 1분, 61°C에서 1분, 72°C에서 1분씩 30회 반복하여 DNA를 증폭시키고, 마지막으로 72°C에서 5분간 extension시켜 PCR 반응을 종결시켰다. 정제된 16S rRNA gene의 PCR 반응물을 pGEM-T vector (Promega)에 ligation시켜 반응물을 미리 준비한 200 µL의 *Escherichia coli* XL1-blue 숙주세포에 형질전환 시킨 후 alkaline lysis 순수분리 방법(Sambrook *et al.*, 1989)으로 plasmid를 mini-prep하였다. 또한 Termination Sequencing Ready Reaction kit (Perkin Elmer, USA)와 ABI 377 genetic analyzer (Perkin Elmer, USA)를 이용하여 염기서열을 분석하고, CLUSTAL W software Ver. 1.7 (Thompson *et al.*, 1994)로 align하였다.

이와 같이 16S rRNA gene 분석을 통하여 염기서열을 결정한 후, National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 GenBank 데이터베이스(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) 및 Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu>)에서 가장 상동성이 높은 균주들과 염기

서열을 비교하여 계통 분석을 하였다. Kimura's two-parameter model (Kimura, 1980)로 진화 거리(evolutionary distance)를 측정하였고, 계통도는 MEGA 5 package (Tamura *et al.*, 2011)를 이용하여 neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987)로 작성하였고, 이때 Bootstrap은 1,000회 반복하여 분석하였다.

### 살조미생물 NH-3 균주의 성장단계별 살조능

살조미생물의 성장단계에 따른 살조능을 알아보기 위해 NH-3 균주를 PPES-II 액체배지에 접종하여 최적 조건(25°C, initial pH 7.0, 2.0% NaCl)에서 39시간 배양하면서 균의 증식에 따른 살조능을 조사하였다. 즉, 대수증식기로 배양한 *A. catenella* 배양액(8.0 x 10<sup>3</sup> cells/mL) 0.9 mL에 최적 조건에서 배양한 NH-3 균주 배양액을 각 3시간 간격으로 0.1 mL씩 접종하여 48시간 배양 후 살조능을 조사하였다. 이 때 control에는 균주 배양액 대신 동량의 PPES-II 배지를 넣어 주었다. 살조능은 *A. catenella*의 생존상태를 광학현미경하에서 관찰하여 48시간 후에 살아있는 *A. catenella* 세포수를 counting하는 bioassay법으로 측정하였으며 다음과 같이 구하였다: Algicidal activity (%) = {1 - (시료를 첨가한 test tube의 세포수/control의 세포수) X 100}.

### 균주 배양여과액 첨가 농도별 살조능

NH-3 균주가 생산하는 살조물질의 농도에 따른 살조능을 알아보기 위해, 균주 배양여과액의 첨가 농도에 따른 살조능을 조사하였다. 먼저 PPES-II 액체배지에서 최적조건(25°C, pH 7.0, NaCl 2.0%)으로 배양한 대수증식기 후기(27시간 배양)의 NH-3 균주의 배양액을 원심분리(3,000 x g, 10 min)하여 상등액을 0.2 µm pore size의 polycarbonate membrane filter로 여과하였다. *A. catenella* 배양액(8.0 x 10<sup>3</sup> cells/mL)에 균주 배양여과액을 각각 최종농도가 1, 3, 5 및 10%가 되도록 접종한 후, 상기의 *A. catenella*의 배양 조건으로 배양하며 매 6시간마다 살조능을 측정하였다. 배양액을 첨가하지 않고 계속 배양한 것을 control로 하였으며, 이 때 control에는 배양여과액 대신에 동량의 신선한 PPES-II 액체배지를 첨가하였으며, 3회 반복 실험을 통하여 결과를 산출하였다.

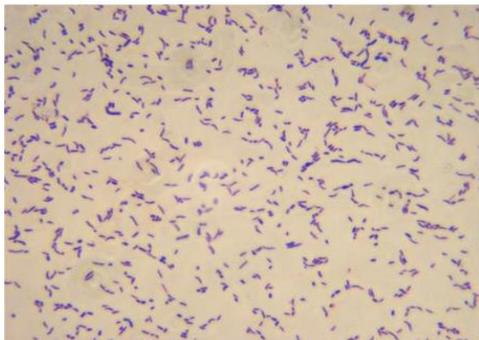
### 살조물질의 정제 및 살조특이성

NH-3 균주가 생산하는 살조물질을 분리, 정제하기 위하여 상기의 배양조건으로 20 L을 배양하여 배양여과액을 준비하였다. 배양여과액은 에틸아세테이트로 이층분해하여 추출하였으며, 에틸아세테이트 분액은 감압농축하여 -20°C에서 다음 실험 전까지 보관하였다. 이후 에틸아세테이트 추출물은 silica gel chromatography에 loading하여, 클로로포름과 메탄올로 용출하였다. 클로로포름-메탄올(9:1) fraction에서 우수한 살조활성이 확인되었으므로, 이 분획층을 preparative silica gel TLC (Kieselgel 60F254, 20 x 20 cm, Merck)에 loading하고 용매로서 클로로포름-메탄올(8:2)을 사용하였다.

**Table 1. Morphological, physiological, and biochemical characteristics of NH-3 isolate by conventional tests, API 20NE and API 32GN kits**

Tests	Results	Tests	Results
Colony color	Pale yellow (on PPES-II)	Utilization of	
Cell form	Rod	D-Glucose	+
Gram stain	+	D-Gluconate	+
Catalase	+	D-Glucosamine	-
Hydrolysis of		D-Maltose	+
Esulin	-	D-Arginine	-
Gelatin	-	D-Melibiose	+
Reduction of nitrates	-	D-Sucrose	+
Indole production	-	D-Arabinose	+
Growth at:		D-Sorbitol	-
Temperature	15-35°C	D-Mannitol	+
pH	6.0-9.0	D-Fructose	-
NaCl	0-5.0%	D-Mannose	-
Optimal growth at:		Acetate	+
Temperature	25°C	Citrate	-
pH	7.0	<i>N</i> -Acetylglucosamine	+
NaCl	2.0%	Xylose	-

+, Positive result or growth; -, Negative result or no growth.

**Fig. 1. The gram staining of NH-3 isolate.**

살조활성을 보인 prep-TLC 분획층을 preparative HPLC (Inertsil ODS-3, GL Sciences Inc., 10 × 250 mm, flow rate 2.0 mL/min, 35% MeOH, UV detector set at 210 nm)를 이용하여 최종적으로 순수한 살조물질(algicide)을 분리, 정제하였다.

이상의 결과로 얻은 순수분리 살조물질의 살조범위 또는 살조특이성을 조사하기 위하여 실험한 유해성 적조생물종(Harmful Algal Bloom Species)은 다음과 같다. *Chattonella marina*, *Cochlodinium polykrikoides*와 *Heterosigma akashiwo*는 NFRDI (National Fisheries Research & Development Institute, Republic of Korea)에서 분양받았으며, *Gymnodinium sanguineum*, *G. impudicum*, *Fibriocapsa japonica*, *Prorocentrum micans*,

*P. minimum*과 *Scrippsiella trochoidea*는 the South Sea Institute of KORDI (Korea Ocean Research & Development Institute, Republic of Korea)로부터 분양 받았다. NH-3 균주가 생산하는 살조물질의 살조특이성은 각각의 적조생물을 상기의 조건으로 배양하며, 살조물질의 최종 농도가 100 µg/mL이 되도록 첨가하여 12시간 후의 살조능을 측정함으로써 판단하였다.

## 결과 및 고찰

### 살조미생물의 분리 및 동정

울진 연안 해역의 해수로부터 서로 다른 colony색과 형태를 가진 100여개의 미생물 균주를 분리하였으며, 그 각각의 colony를 PPES-II 평판배지에서 순수분리하여 *A. catenella*에 대한 살조능을 조사하였다. 그 중 가장 뛰어난 살조능을 보인 NH-3 균주를 선정하여 배양학적, 형태학적 특성 및 API kits를 이용한 생화학적 특성을 조사하여 1차적으로 분류학적 유사성을 검토하였다. NH-3 균주는 Gram 양성, 간균(rods)으로(Fig. 1), PPES-II agar에서 옅은 노란색 colony를 형성하였다. 또한 catalase는 양성이었으며, esculin과 gelatin은 가수분해하지 않았고 nitrate 환원능은 없었다. 최적 배양조건은 25°C, pH 7.0, 2.0% NaCl 농도였으며, 10°C 이하와 37°C 이상, pH 5.0 이하와 10.0 이상 및 7.0% (w/v) 이상의 NaCl 농도에서는 증식하지 못 하였다. 또한 D-Glucose, D-Gluconate, D-Maltose, Melibiose, D-Sucrose, D-Arabinose, D-Mannitol, Acetate 및 *N*-Acetylglucosamine

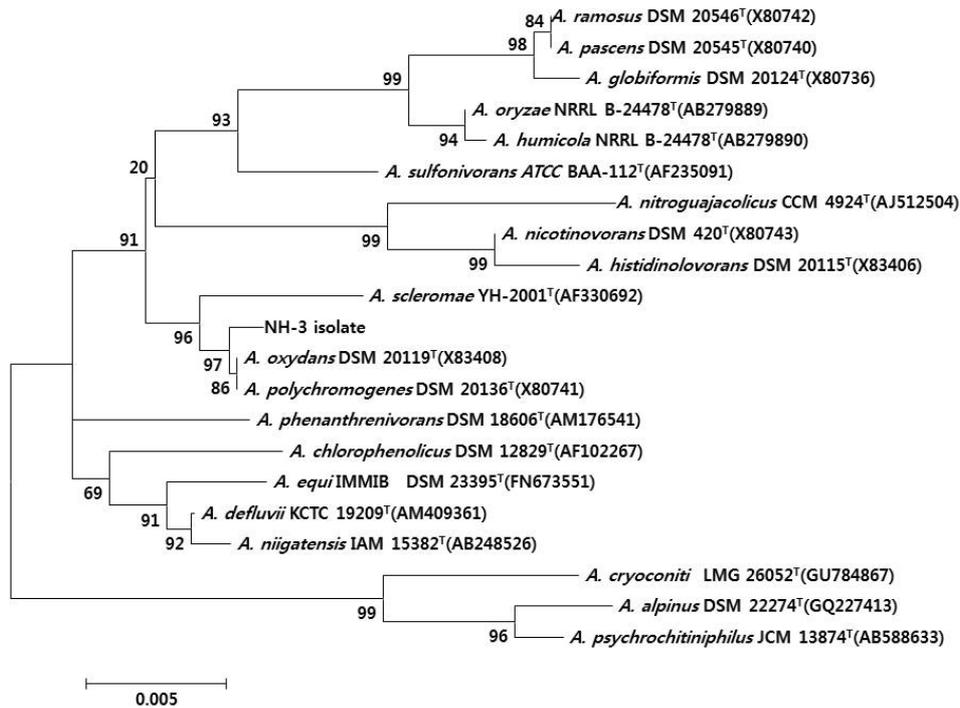


Fig. 2. Phylogenetic tree based on comparison of the 16S rRNA gene sequence indicating the position of NH-3 isolate. The phylogenetic tree was generated using the neighbor-joining method. Bootstrap values, expressed as percentages of 1,000 replications, are given at branching points. Bar shows five nucleotides substitutions per 1,000 nucleotides.

을 유일한 탄소원 및 에너지원으로 이용하였다(Table 1). 이상의 결과, 본 균주는 *Arthrobacter* 속과 가장 유사하였으며, 보다 정확한 동정을 위하여 16S rRNA gene 염기서열(1,418 bp)을 분석하여, NCBI GenBank와 RDP (Ribosomal Database Project)에 등록된 *Arthrobacter* 속 균주들과 유전자간의 상동성을 조사하였다. 그 결과, NH-3 균주는 *Arthrobacter polychromogenes* (DSM 20136: X80741) 및 *A. oxydans* (DSM 20119: X83408)와 가장 높은 상동성(99% 이상)을 나타내어(Fig. 2), 본 살조미생물을 *Arthrobacter* sp. NH-3로 명명하여 이후의 실험을 진행하였다. 또한 본 균주의 16S rDNA 염기서열은 GenBank database에 등록하여 accession No. KR921582를 부여받았다.

현재까지 보고된 적조생물을 제어하는 대표적인 살조미생물들로는 *Alteromonas* 속(Imai *et al.*, 1995), *Bacillus* 속(Jeong *et al.*, 2003), *Brachy bacterium* 속(Kim *et al.*, 2009), *Flavobacterium* 속(Yoshinaga *et al.*, 1995), *Micrococcus* 속(Park *et al.*, 1998; Jeong *et al.*, 2000), *Pseudomonas* 속(Wang *et al.*, 2005), *Pseudoalteromonas* 속(Lovejoy *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2000; Mitsutani *et al.*, 2001; Skerratt *et al.*, 2002; Su *et al.*, 2007a, 2011; Jeong *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012) 및 *Vibrio* 속(Wang *et al.*, 2012) 등이 보고되었으나, 적조생물을 제어하는 *Arthrobacter* 속 살조미생물에 대한 연구는 아직까지 보고된 적이 없다.

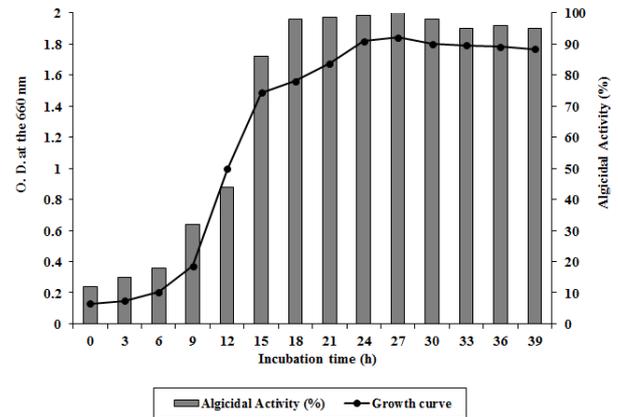
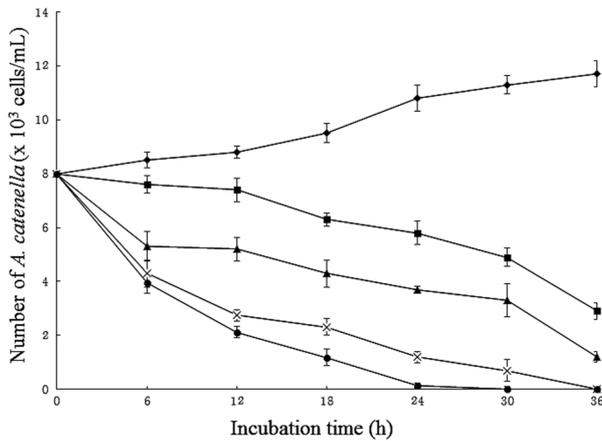


Fig. 3. Growth curve of *Arthrobacter* sp. NH-3 at optimal culture conditions (25°C, initial pH 7.0, 2.0% (w/v) NaCl) and algicidal activity of *Arthrobacter* sp. NH-3 against *Alexandrium catenella*. The algicidal activity indicates the percent of dead *A. catenella* after 48 h of treatment.

### *Arthrobacter* sp. NH-3의 성장단계별 살조능

*Arthrobacter* sp. NH-3은 6시간의 유도기를 거쳐 대수증식기에 접어들고 배양 30시간 이후에 서서히 정지기로 접어드는 성장곡선(growth curve)을 보였다(Fig. 3). 성장단계에 따른 살조능을 비교 실험한 결과 대수증식기 후기(18-27시간 배양), 정지기(30-39시간 배양), 대수증식기 중기(9-15시간 배양), 유도기(6시간 배양) 순으로 살조능이 높게 나타났



**Fig. 4.** Algicidal activity of the culture filtrate of *Arthrobacter* sp. NH-3 against *Alexandrium catenella* at various concentrations (◆, control; ■, 1%; ▲, 3%; ▽, 5%; ●, 10%). Control: same volumes of fresh PPES-II medium were added. Data are expressed as the mean±standard deviation from triplicate assays.

다. 즉, 유도기에는 *A. catenella*에 대한 살조능이 20% 이하로 낮게 나타났으나, 대수증식기 중기를 거치면서 활성이 급격히 증가하기 시작하여 32-86%의 살조능을 보이다가, 대수증식기 후기에 살조능이 96-100%로 최고조에 이르렀으며, 정지기에도 95% 이상의 살조능을 유지하였다(Fig. 3). 본 균주는 유도기에는 성장을 위해 살조물질과 같은 2차대사 산물을 거의 생산하지 않으나, 균수가 급격히 증가하는 대수증식기 중기부터 살조물질을 생산하기 시작하여 대수증식기 후기에 살조물질을 가장 많이 축적하는 것으로 판단된다. 또한 정지기에도 살조능이 급격히 감소하지 않는 것으로 보아 배양액속에 축적된 살조물질은 쉽게 분해되거나 영양물질로 재이용되는 않는 것으로 판단된다. 이러한 결과를 Jeong 등 (2012)이 발표한 *Pseudoalteromonas* sp. NH-12의 성장과정에 따른 살조능과 비교해 볼 때, 본 균주는 보다 빠른 성장과 우수한 살조능을 가지고 있는 것으로 판단된다. 또한 본 균주의 *A. catenella*에 대한 살조유형을 조사한 결과, 살조물질을 세포외로 분비하는 '살조인자 분비형'으로 확인되었다(자료 미제시). 더욱이 본 균주가 유독성 적조생물인 *A. catenella*와 접촉이 없는 상태에서도 살조물질을 적극적으로 생산하는 것으로 보아, 본 균주가 생산하는 살조물질은 살조특이성이 높지 않고 여러 적조생물에 대해 광범위하게 작용할 것을 시사한다.

#### *Arthrobacter* sp. NH-3의 배양여과액 농도별 살조능

*Arthrobacter* sp. NH-3은 살조물질을 세포내에 축적하지 않고, 세포외로 분비하는 '살조인자 분비형'으로 판단되므로, 본 균주가 생산하는 살조물질의 농도에 따른 살조능을 알아보기 위해, 균주 배양여과액의 첨가 농도(1, 3, 5 및 10%)에 따른 *A. catenella* ( $8.0 \times 10^3$  cells/mL)에 대한 살조능을 조사한 결과는 Fig. 4와 같다. NH-3의 배양여과액을 1%

가 되도록 첨가한 경우 12시간 후에 *A. catenella*의 개체수는  $7.4 \times 10^3$  cells/mL로 살조능은 약하였으나, 이후 개체수는 서서히 줄어들어 36시간 후에  $2.9 \times 10^3$  cells/mL로 줄어들었다. 또한 3%를 첨가한 경우 6시간 후에  $5.3 \times 10^3$  cells/mL로 급격한 개체수의 감소를 보였으나, 이후 점진적으로 하락하다가 36시간 후에  $2.2 \times 10^3$  cells/mL로 개체수가 줄어들었다. 특히 5%와 10%가 되게 첨가하였을 경우, 12시간 만에 개체수가  $2.7 \times 10^3$  cells/mL 이하로 급격히 떨어졌으며, 5%의 경우 36시간 만에 10%의 경우 30시간 만에 모든 *A. catenella*의 세포가 100% 사멸되었다. 즉, 배양여과액의 첨가량과 반응시간에 비례하여 *A. catenella*에 대한 살조능이 증가하는 경향을 보였다. *A. catenella*에 의한 적조 발생 시 대부분의 양식어류가 72시간 이내에 폐사하는 것을 고려할 때, 1% 첨가 시 36시간 이내에 적조 피해가 없는  $2.9 \times 10^3$  cells/mL 이하로 개체수가 줄어드는 결과는 적조피해를 저감할 가능성이 높은 상당히 고무적인 결과로 판단된다. 한편 최근 Yang 등(2014)은 *Joostella* sp. DH77-1이 2% 농도에서 *A. tamarense*를 24시간 후에 80% 살멸한다고 보고하였는데, 이는 *Arthrobacter* sp. NH-3보다 우수한 살조능을 보이고 있다.

#### 살조물질의 정제

*Arthrobacter* sp. NH-3이 생산하는 살조물질을 분리, 정제하기 위하여 PPES-II 배지에서 20 L을 배양한 후, 원심 분리 및 filtration을 통하여 얻은 배양여과액을 에틸아세테이트로 추출하여 1.68 g의 에틸아세테이트 추출물을 얻었다. 이 추출물을 silica gel chromatography를 행한 결과, 클로로포름-메탄올(9:1) fraction (130 mg)에서 우수한 살조활성이 확인되었다.

따라서 살조물질을 보다 더 정제하기 위하여, 용매로서 클로로포름-메탄올(8:2)을 사용하여 preparative silica gel TLC를 행하였다. 살조활성을 보인 prep-TLC 분획층(Rf value=0.70)을 preparative HPLC를 이용하여 최종적으로 살조물질 1.65 mg을 순수분리, 정제하였다. 본 물질은 아미노기를 가지는 방향족 화합물로서 현재 물질의 특성과 구조 결정을 위해 추가적인 실험을 진행 중이다.

지금까지 많은 살조미생물에 대한 연구가 보고되었지만, 대부분 살조미생물의 분리와 동정, 유독성 적조생물이 아닌 담수(fresh water)중 미세조류의 용조 현상(alga-lysing phenomenon)에 한정되어져 있다. 더욱이 살조미생물이 생산하는 살조물질(algicidal compounds, algicides)을 분리, 정제한 보고는 극히 드문 현실이다. 현재까지 보고된 살조물질에는 antibiotic-like substances (Nakashima et al., 2006), biosurfactants (Ahn et al., 2003; Wang et al., 2005), peptides (Imamura et al., 2000; Jeong et al., 2003), protease (Lee et al., 2000) 및 protein (Mitsutani et al., 2001; Wang et al., 2012) 등이 보고되고 있으나, 아직까지 살조물질들의 살조기작에 대한 연구는 미진한 실정이다.

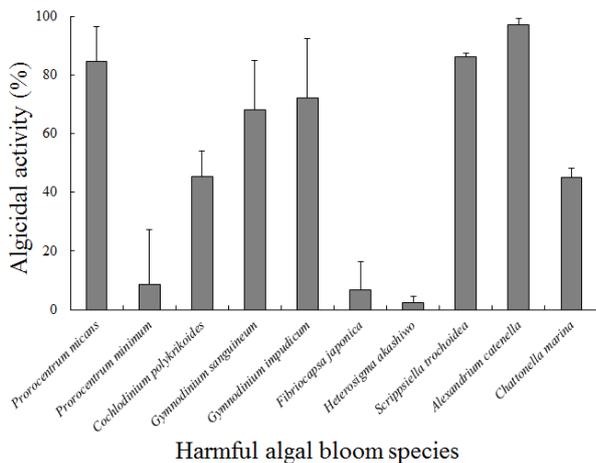


Fig. 5. The algicidal range of algicide derived from *Arthrobacter* sp. NH-3 against other harmful algal bloom species. The 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of algicide was added to each algal culture. The algicidal activity was evaluated after 12 h. Control: same volumes of methanol were added. Data are expressed as the mean $\pm$ standard deviation from triplicate assays.

#### 살조물질의 살조특이성

*Arthrobacter* sp. NH-3이 생산하는 살조물질의 살조범위 또는 살조특이성을 조사하기 위하여, 각각의 유해성 적조생물에 대한 영향을 조사한 결과는 다음과 같다(Fig. 5). 결과의 판정은 각각의 적조생물을 최적 배양 조건으로 배양한 후, 살조물질을 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 되도록 첨가하여 12시간 후의 살조능을 비교하였다. *A. catenella*는 배양 12시간 후에 97% 이상 사멸되어 가장 높은 살조능을 보였으며, *S. trochoidea*는 86% 이상, *P. micans*는 84% 이상 사멸되었다. 또한 *G. impudicum*과 *G. sanguineum*은 각각 72%와 68% 이상 사멸되었다. 반면 *C. polykrioides*와 *C. marina*는 둘 다 45% 이상만 사멸되었다. 그러나 *P. minimum*과 *F. japonica*에 대해서는 각각 8.6%와 6.7% 이하의 낮은 살조능을 보였으며, *H. akashiwo*에 대해서는 2.2% 이하로 거의 살조능을 보이지 않았다. 즉, *Arthrobacter* sp. NH-3이 생산하는 살조물질은 우리나라 연안에서 가장 피해를 많이 주는 적조생물인 *C. polykrioides*에 대해서는 45%의 중간 정도의 살조능을 보이나, 마비성 패독(PSP)을 생산하는 유독성 적조생물인 *A. catenella*에 대해서는 12시간 만에 97% 이상 사멸시키는 매우 높은 살조능을 보였다.

이상의 결과, *Arthrobacter* sp. NH-3이 생산하는 살조물질은 '살조인자 분비형'이면서도 살조범위는 넓어 살조특이성은 높지 않은 것으로 판단되나, *A. catenella*에 대해서는 매우 높은 살조능을 보였다. 반면 지금까지 보고된 '살조인자 분비형' 살조미생물들은 대부분 살조특이성이 높아(specific algicidal activity) 특정 적조생물에만 살조능을 보이고, '직접 공격형' 살조미생물들은 살조특이성이 낮아 광범위한 살조

활성(broad algicidal activity)을 보이는 것으로 보고되고 있다(Doucette, et. al., 1999; Jeong et al., 2000, 2003; Mitsutani et al., 2001; Mayali and Azam, 2004; Kim et al., 2009). 또한 대표적인 '살조인자 분비형' 살조미생물로는 *Alteromonas* 속, *Bacillus* 속, *Brachy bacterium* 속, *Flavobacterium* 속, *Micrococcus* 속, *Pseudoalteromonas* 속 및 *Pseudomonas* 속 등이 보고되고 있다(Jeong et al., 2000, 2003; Lee et al., 2000; Mitsutani et al., 2001; Skerratt et al., 2002; Mayali and Azam, 2004; Su et al., 2007a, 2011; Kim et al., 2009; Jeoung et al., 2012).

*Arthrobacter* sp. NH-3이 생산하는 살조물질의 적조생물에 대한 살조특이성을 자세히 살펴보면, 유각종이며 유영세포의 크기가 비교적 큰 적조생물(20  $\mu\text{m}$  이상)인 *A. catenella*, *S. trochoidea* 및 *P. micans*에 대해서는 84% 이상의 높은 살조능을 보였고, 유영세포의 크기가 비교적 크고 무각종인 *G. impudicum*, *G. sanguineum*, *C. polykrioides* 및 *C. marina*에 대해서는 45-72%의 중간 정도의 살조능을 보였다. 또한 무각종이면서 유영세포의 크기가 작은 적조생물(20  $\mu\text{m}$  이하)인 *P. minimum*과 *F. japonica*에 대해서는 6.7-8.6%의 낮은 살조능을 보였고, 특히 *H. akashiwo*에 대해서는 2.2% 이하의 살조능을 보여 거의 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다. 즉, 무각종보다는 유각종에 대해서 높은 살조능을 보였고, 비교적 크기가 작고 개체수의 증가 속도가 빠른 적조생물종에 대해서는 낮거나 살조능이 거의 없는 것으로 판단된다. 무각종은 껍질이 없는 형태(naked type) 또는 단순한 점액질로 덮혀 있는 상태이며, 유각종은 주로 섬유질 성분의 피각(theca)으로 덮혀 있는 갑주형 형태(armored type)이다. 상기의 결과가 나타나는 이유는 *Arthrobacter* sp. NH-3이 생산하는 살조물질이 유각종의 피각을 인식하고 녹이는 특성이 있거나 피각의 섬유질 성분이 살조물질을 유도하는 성질이 있을 것으로 유추되며, 무각종의 점액질은 살조물질이 인식하지 못 하거나 살조물질의 유도 또는 접합을 방해하는 성질이 있지 않을까 유추된다. 향후 살조물질의 구조를 결정하고, 이러한 현상이 나타나는 이유를 포함하여 살조 메커니즘을 밝힌다면 적조생물의 제어와 현장 적용성의 향상에 많은 도움이 될 것으로 판단된다.

#### 결론

전 세계적으로 적조 및 마비성 패독을 일으켜 문제시되고 있는 유독성 외편모조류인 *A. catenella*를 살조시키는 해양 미생물 NH-3 균주를 올린 연안 해역에서 분리, 동정하고 살조물질을 분리, 정제하여 살조 범위 및 살조능을 조사하였다. 본 균주는 API kits 및 16S rRNA gene 염기서열을 분석하여 계통분류를 행한 결과 *Arthrobacter* sp. NH-3으로 명명하였으며, 최적 배양조건은 25 $^{\circ}\text{C}$ , pH 7.0, 2.0% NaCl 농도였다. *Arthrobacter* sp. NH-3의 성장 단계별 살조능은 대수증식기 후기, 정지기, 대수증식기 중기, 유도기 순으로 높게 나타났다. 살조물질은 대수증식기 중기 이후에 활발히 생산되

기 시작하여 대수증식기 후기에 가장 고농도로 축적되었다. *Arthrobacter* sp. NH-3은 세포외로 물질을 분비하여 살조 시키는 ‘살조인자 분비형’으로 확인되었다. 또한 *Arthrobacter* sp. NH-3의 배양여과액을 5%와 10%가 되게 첨가하였을 경우, 12시간 만에 개체수가  $2.7 \times 10^3$  cells/mL 이하로 급격히 떨어졌으며, 5%의 경우 36시간 만에 10%의 경우 30시간 만에 모든 *A. catenella*의 세포가 100% 사멸되었다. 또한 본 균주를 20 L 배양하여 유기용매 추출, prep-TLC 및 prep-HPLC를 이용하여 살조물질 1.65 mg을 순수분리, 정제하였다. *Arthrobacter* sp. NH-3이 생산하는 살조물질을 100 µg/mL의 농도로 첨가하여 각종 유해성 적조생물들에 대한 살조범위를 조사한 결과, 첨가 12시간 후에 *A. catenella*는 97% 이상 사멸되었고 *S. trochoidea*, *P. micans*, *G. impudicum* 및 *G. sanguineum*은 최소 68% 이상 사멸되었다. 반면 *C. polykrikoides*와 *C. marina*는 45% 이상만 사멸되었다. 그러나 *P. minimum*과 *F. japonica*에 대해서는 각각 8.6%와 6.7% 이하의 낮은 살조능을 보였으며, *H. akashiwo*에 대해서는 2.2% 이하로 거의 살조능을 보이지 않았다. 이상의 결과, *Arthrobacter* sp. NH-3이 생산하는 살조물질은 ‘살조인자 분비형’이면서도 살조범위는 넓어 살조특이성은 높지 않은 것으로 판단되나, 마비성폐독을 생산하는 유독성 적조생물인 *A. catenella*에 대해서는 매우 높은 살조능을 보였다. 또한 본 균주가 생산하는 살조물질은 무각종보다는 유각종에 대해 높은 살조능을 보이는 특징이 관찰되었다. 이상의 연구결과를 토대로 살조물질의 구조를 규명하고 살조 메카니즘을 밝힌다면, 보다 효율적인 적조 구제법 개발에 좋은 기초 자료가 될 것이다.

### Acknowledgment

This work was supported by research grants from the Catholic University of Daegu in 2011 (20111325).

### References

- Ahn, C. Y., Joung, S. H., Jeon, J. W., Kim, H. S., Yoon, B. D., & Oh, H. M. (2003). Selective control of cyanobacteria by surfactin-containing culture broth of *Bacillus subtilis* C1. *Biotechnology Letters*, 25(14), 1137-1142.
- Anderson, D. M., Alpermann, T. J., Cembella, A. D., Collos, Y., Masseret, E., & Montresor, M. (2012). The globally distributed genus *Alexandrium* multifaceted roles in marine ecosystems and impacts on human health. *Harmful Algae*, 14, 10-35.
- Bravo, V. M., Maso, M., Figueroa, R. I., & Ramilo, I. (2008). *Alexandrium catenella* and *Alexandrium minutum* blooms in the Mediterranean Sea: toward the identification of ecological niches. *Harmful Algae*, 7(4), 515-522.
- Cottrell, M. T., & Suttle, C. A. (1993). Production of axenic cultures of *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae) using antibiotics. *Journal of Phycology*, 29(3), 385-387.
- Doucette, G. J., McGovern, E. R., & Babinchak, J. A. (1999). Algicidal bacteria active against *Gymnodinium breve* (Dinophyceae), I. Bacterial isolation and characterization of killing activity. *Journal of Phycology*, 35(6), 1447-1454.
- Droop, M. R. (1967). A procedure for routine purification of algae cultures with antibiotics. *British Phycological Bulletin*, 3(2), 295-297.
- Dunbar, J., Ticknor, L. O., & Kuske, C. R. (2000). Assessment of microbial diversity in four Southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(7), 2943-2950.
- Fontana, D. A., & Haug, A. (1982). Effects of sodium chloride of the plasma membrane of halotolerant *Dunaliella primoecta*: an electron spin resonance study. *Archives of Microbiology*, 131(3), 184-190.
- Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Costilow, R. N., Nester, E. W., Wood, W. A., Krieg, N. R., & Phillips, G. B. (1981). *Manual of method for general bacteriology*, pp. 135-154, 1st ed. American Society for Microbiology, Washington D.C., USA.
- Glibert, P. M., Anderson, D. M., Gentien, P., Graneli, E., & Sellner, K. G. (2005). The global complex phenomena of Harmful Algal Blooms. *Oceanography*, 18(2), 136-147.
- Guillard, R. R. L., & Ryther, J. H. (1962). Studies of marine planktonic diatoms. 1. *Cyclotella nana* (HUSTEDT) and *Detonula confervacea* (CLEVE) GRAN. *Canadian Journal of Microbiology*, 8(2), 229-239.
- Imai, I., Ishida, Y., & Hata, Y. (1993). Killing of marine phytoplankton by a gliding bacterium *Cytophaga* sp., isolated from the coastal sea of Japan. *Marine Biology*, 116(4), 527-532.
- Imai, I., Ishida, Y., Sakaguichi, K., & Hata, Y. (1995). Algicidal marine bacteria isolated from northern Hiroshima Bay, Japan. *Fisheries Science*, 61(4), 628-636.
- Imamura, N., Motoike, I., Noda, M., Adachi, K., Konno, A., & Fukami, H. (2000). Argimicin A, a novel anti-cyanobacterial compound produced by an algae-lysing bacterium. *Journal of Antibiotics*, 53(11), 1317-1319.
- Jeong, S. Y., Park, Y. T., & Lee, W. J. (2000). Isolation of marine bacteria killing red tide microalgae, III. Algicidal effects of marine bacterium, *Micrococcus* sp. LG-5 against the harmful dinoflagellate, *Cochlodinium*

- polykrikoides*. Journal of the Korean Fisheries Society, 33(4), 331-338.
- Jeong S. Y., Ishida, K., Ito, Y., Okada, S., & Murakami, M. (2003). Bacillamide, a novel algicide from the marine bacterium, *Bacillus* sp. SY-1, against the harmful dinoflagellate, *Cochlodinium polykrikoides*. Tetrahedron Letters, 44(43), 8005-8007.
- Jeoung, N. H., Son, H. J., & Jeong, S. Y. (2012). The algicidal activity of *Pseudoalteromonas* sp. NH-12 against the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*. Korean Journal of Environmental Agriculture, 31(2), 175-184.
- Kamikawa, R., Nagai, S., Hosoi-Tanabe, S., Itakura, S., Yamaguchi, M., Uchida, Y., Baba, T., & Sako, Y. (2007). Application of real-time PCR assay for detection and quantification of *Alexandrium tamarense* and *Alexandrium catenella* cysts from marine sediments. Harmful Algae, 6(3), 413-420.
- Kim, C. H. (1995). Paralytic shellfish toxin profiles of dinoflagellate *Alexandrium* species isolated from benthic cysts in Jinhae Bay, Korea. Journal of the Korean Fisheries Society, 28(3), 364-372.
- Kim, H. G. (1997). Recent harmful algal blooms and mitigation strategies in Korea. Ocean and Polar Research, 19(2), 185-192.
- Kim, M. C., Yu, H. S., Ok, M. S., Kim, C. H., & Chang, D. S. (1999). The activities and characteristics of algicidal bacteria in Chindong Bay. Journal of the Korean Fisheries Society, 32(3), 359-367.
- Kim, K. Y., & Kim, C. H. (2004). A molecular phylogenetic study on Korean *Alexandrium catenella* and *A. tamarense* isolates (Dinophyceae) based on the partial LSU rDNA sequence data. Journal of the Korean Society of Oceanography, 39(3), 163-171.
- Kim, Y. S., Jeong, S. Y., Lee, S. J., & Lee, W. J. (2009). Isolation and characteristics of *Brachybacterium* sp. SY-97 killing the harmful dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides*. Journal of Environmental Science International, 18(4), 435-443.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution, 16(2), 111-120.
- Lee, S. O., Kato, J., Takiguchi, N., Kuroda, A., Ikeda, T., Mitsutani, A., & Ohtake, H. (2000). Involvement of an extracellular protease in algicidal activity of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain A28. Applied and Environmental Microbiology, 66(10), 4334-4339.
- Lee, H. O., Lee, N. W., Katano, T., & Han, M. S. (2006). Growth characteristics for toxic marine dinoflagellate *Alexandrium catenella* isolated from Jinhae Bay, Korea. Korean Journal of Environmental Biology, 24(2), 147-154.
- Lovejoy, C., Bowman, J. P., & Hallegraef, G. M. (1998). Algicidal effects of a novel marine *Pseudoalteromonas* isolate (class Proteobacteria, gamma subdivision) on harmful algal bloom species of the genera *Chattonella*, *Gymnodinium*, and *Heterosigma*. Applied and Environmental Microbiology, 64(8), 2806-2813.
- MacFaddin, J. F. (1980). Biochemical tests for identification of medical bacteria, pp. 36-308, 2nd ed. Williams and Wilkins Co., Baltimore, USA.
- May, S. P., Burkholder, J. M., Shumway, S. E., Hégaret, H., Wikfors, G. H., & Frank, D. (2010). Effects of the toxic dinoflagellate *Alexandrium monilatum* on survival, grazing and behavioral response of three ecologically important bivalve molluscs. Harmful Algae, 9(3), 281-293.
- Mayali, X., & Azam, F. (2004). Algicidal bacteria in the sea and their impact on algal blooms. Journal of Eukaryotic Microbiology, 51, 139-144.
- Mitsutani, A., Yamasaki, I., Kitaguchi, H., Kato, J., Ueno, S., & Ishida, Y. (2001). Analysis of algicidal proteins of a diatom-lytic marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain A25 by two-dimensional electrophoresis. Phycologia, 40(3), 286-291.
- Nakashima, T., Miyazaki, Y., Matsuyama, Y., Muraoka, W., Yamaguchi, K., & Oda, T. (2006). Producing mechanism of an algicidal compound against red tide phytoplankton in a marine bacterium  $\gamma$ -proteobacterium. Applied Microbiology and Biotechnology, 73(3), 684-690.
- Park, Y. T., Park, J. B., Chung, S. Y., Song, B. C., Lim, W. A., Kim, C. H., & Lee, W. J. (1998). Isolation of marine bacteria killing red tide microalgae, 1. Isolation and algicidal properties of *Micrococcus* sp. LG possessing killing activity for harmful dinoflagellate, *Cochlodinium polykrikoides*. Journal of the Korean Fisheries Society, 31(5), 767-773.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution, 4(4), 406-425.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning, a laboratory manual, pp. 25-28, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, N.Y., USA.
- Skerratt, J. H., Bowman, J. P., Hallegraef, G. M.,

- James, S., & Nichols, P. D. (2002). Algicidal bacteria associated with blooms of a toxic dinoflagellate in a temperate Australian estuary. *Marine Ecology Progressive Series*, 244, 1-15.
- Su, J. Q., Yang, X. R., Zheng, T. L., Tian, Y., Jiao, N. Z., Cai, L. Z., & Hong, H. S. (2007a). Isolation and characterization of a marine algicidal bacterium against the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Harmful Algae*, 6(6), 799-810.
- Su, J. Q., Yang, X. R., Zheng, T. L., & Hong, H. S. (2007b). An efficient method to obtain axenic cultures of *Alexandrium tamarense*-a PSP-producing dinoflagellate. *Journal of Microbiological Methods*, 69(3), 425-430.
- Su, J. Q., Yang, X. R., Zhou, Y. Y., & Zheng, T. L. (2011). Marine bacteria antagonistic to the harmful algal bloom species *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae). *Biological Control*, 56(2), 132-138.
- Taga, N. (1968). Some ecological aspects of marine bacteria in the KuroShio current. *Bulletin of Misaki Marine Biology Institute of Kyoto University*, 12, 65-76.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), 2731-2739.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673-4680.
- Toulza, E., Shin, M. S., Blanc, G., Audic, S., Laabir, M., Collos, Y., Claverie, J. M., & Grzebyk, D. (2010). Gene expression in proliferating cells of the dinoflagellate *Alexandrium catenella* (Dinophyceae). *Applied and Environmental Microbiology*, 76(13), 4521-4529.
- Wang, X., Gong, L., Liang, S., Han, X., Zhu, C., & Li, Y. (2005). Algicidal activity of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Harmful Algae*, 4(2), 433-443.
- Wang, B., Yang, X., Lu, J., Zhou, Y., Su, J., Tian, Y., Zhang, J., Wang, G., & Zheng, T. (2012). A marine bacterium producing protein with algicidal activity against *Alexandrium tamarense*. *Harmful Algae*, 13, 83-88.
- Yang, X., Li, X., Zhou, Y., Zheng, W., Yu, C., & Zheng, T. (2014). Novel insights into the algicidal bacterium DH77-1 killing the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Science of the Total Environment*, 482-483, 116-124.
- Yoshinaga, I., Kawai, T., Takeuchi, T., & Ishida, Y. (1995). Distribution and fluctuation of bacteria inhibiting the growth of a marine red tide phytoplankton *Gymnodinium mikimotoi* in Tanabe Bay (Wakayama Pref., Japan). *Fisheries Science*, 61(5), 780-786.
- Yoshinaga, I., Kawai, T., & Ishida, Y. (1997). Analysis of algicidal ranges of the bacteria killing the marine dinoflagellate *Gymnodinium mikimotoi* isolated from Tanabe Bay, Wakayama Pref., Japan. *Fisheries Science*, 63(1), 94-98.
- Yoshinaga, I., Kim, M. C., Katanozaka, N., Imai, I., Uchia, A., & Ishia, Y. (1998). Population structure of algicidal marine bacteria targeting *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) through restriction fragment length polymorphism analysis of the bacterial 16S ribosomal RNA genes, during *H. akashiwo* red tide. *Marine Ecology Progressive Series*, 170, 33-44.