



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)



碩士學位論文

Bacillus sp. IS-2가 생산하는 대사산물의
생리활성 및 사료 내 첨가에 따른 양식 념
치의 면역반응과 병저항성에 미치는 영향

濟州大學校 大學院

海洋生命科學科

張 益 銖

2012 年 2 月

Bacillus sp. IS-2가 생산하는 대사산물의
생리활성 및 사료 내 첨가에 따른 양식 념
치의 면역반응과 병저항성에 미치는 영향

指導教授 許文洙

張益銖

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2012 年 2 月

左 旻 昔 의 理學 碩士 學位 論文 을 認准 함

審査委員長 김기영 (印)

委 員 정준범 (印)

委 員 허문수 (印)

濟州大學校 大學院

2012 年 2 月

Isolation and Cultural Characterization of
Antibacterial Substance Produced Bacterium,
Bacillus sp. IS-2 and Supplementation Infeed
on Immune Response, Disease resistance in
olive flounder, *Paralichthys olivaceus*

Ik-Soo Jang
(Supervised by professor Moon-Soo Heo)

A thesis submitted in partial fulfillment
of the requirement for the degree of
Master of Science

Department of Marine life science
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

February, 2012

목 차

목 차.....	i
List of Tables.....	iii
List of Figures.....	iv
Abstract.....	vi
I. 서 론.....	1
II. 재료 및 방법.....	4
2-1. Probiotic 균주의 분리 및 선정.....	4
2-1-1. 미생물의 분리	4
2-1-2. 분리균주의 항균활성 측정.....	6
2-1-3. 인공 위액 및 인공 담즙산에 대한 내성, 내염성, 내열성, 용혈성..	8
2-1-4. 공시균주의 선정.....	9
2-2. <i>Bacillus</i> sp. IS-2의 동정.....	10
2-2-1. 형태학적 특성.....	10
2-2-2. 생리학적 특성.....	10
2-2-3. 16S rRNA 염기서열 분석.....	11
2-3. 조건에 따른 <i>Bacillus</i> sp. IS-2의 생육과 항균활성 검토.....	12
2-3-1. 탄소원의 배지조성.....	12
2-3-2. 질소원의 배지조성.....	13
2-3-3. 무기염의 배지조성.....	13
2-3-4. 최적 pH, 온도에 따른 성장과 항균물질 생산.....	13
2-3-5. 배양시간에 따른 항균물질의 생산.....	14
2-3-6. 항균물질의 첨가에 따른 피검균 (<i>S. iniae</i>)의 세포형태 관찰.....	14
2-4. <i>Bacillus</i> sp. IS-2의 첨가에 따른 양식넙치의 면역반응과 병저항성	15
2-4-1. 실험어 사육관리.....	15
2-4-2. 실험사료 제작 및 투여방법.....	15
2-4-3. 성장도 조사 및 혈액학적 분석.....	16
2-4-4. Respiratory burst activity.....	16
2-4-5. 혈청의 lysozyme 활성.....	17
2-4-6. Phagocytosis activity.....	17
2-4-7. 어병세균에 의한 공격실험.....	18
2-4-8. 사료 첨가 내 사용된 공시 균주의 장내 확인	18
2-4-9. 통계처리.....	18

III. 결 과

3-1. Probiotic 균주의 분리 및 선정	19
3-1-1. 미생물의 분리	19
3-1-2. 분리균주의 항균활성 측정	20
3-1-3. 인공 위액 및 인공 담즙산에 대한 내성, 내염성, 내열성, 용혈성	22
3-1-4. 공시균주의 선정	23
3-2. <i>Bacillus</i> sp. IS-2의 동정	24
3-2-1. 배양학적, 형태학적 특성	24
3-2-2. 생리학적 특성	26
3-2-3. 16S rRNA 염기서열 분석	26
3-3. 조건에 따른 <i>Bacillus</i> sp. IS-2의 생육과 항균활성 검토	30
3-3-1. 탄소원의 영향	30
3-3-2. 질소원의 영향	32
3-3-3. 무기염의 영향	34
3-3-4. 최적 온도, pH의 따른 생육과 항균물질 생산	36
3-3-5. 배양시간에 따른 항균물질의 생산	38
3-3-6. 항균물질의 첨가에 따른 피검균 (<i>S. iniae</i>)의 세포형태 관찰	40
3-4. <i>Bacillus</i> sp. IS-2의 첨가에 따른 양식넙치의 면역반응과 병저항성	41
3-4-1. 성장도 조사	41
3-4-2. 혈액학적 분석	42
3-4-3. Respiratory burst activity	44
3-4-4. 혈청의 lysozyme 활성	46
3-4-5. Phagocytosis activity	48
3-4-6. 어병세균에 의한 공격실험	49
3-4-7. 사료 첨가 내 사용된 공시 균주의 장내 확인	50
IV. 요 약	52
V. 감사의 글	53
VI. 참고 문헌	54

List of tables

Table 1. List of strains used of antibacterial experiment	6
Table 2. Compositions of bacterial media	6
Table 3. Isolated strains and isolation condition.	19
Table 4. Antimicrobial activity of isolates	21
Table 5. Biochemical properties of isolates	22
Table 6. Physiological characteristic of Strain IS-2.	27
Table 7. Optimum medium compositions and culture conditions for antibiotic production by <i>Bacillus</i> sp. IS-2.	39
Table 8. Serum analysis of Olive flounder that was fed with <i>Bacillus</i> sp. IS-2-mixed and non-mixed control diet for 12 weeks	43

List of figures

Fig. 1. Scheme of isolation probiotics.	5
Fig. 2. Cultural characterization of Strain IS-2. Cells were grown at 30°C for 24 hours	25
Fig. 3. Scanning electron micrograph of Strain IS-2. Cells were grown at 30°C for 24 hours.	25
Fig. 4. Neighbour-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the position of strain IS-2 within the radiation of the genus <i>Bacillus</i> sp.	29
Fig 5. Effect of various carbon sources on cell growth and antibacterial activity of culture broth of the isolated <i>B. subtilis</i> sp. IS-2.	31
Fig 6. Effect of concentrations of soluble starch on cell growth and antibacterial activity of culture broth of the isolated <i>B. subtilis</i> IS-2.	31
Fig. 7. Effect of various nitrogen sources on cellgrowth and antibacterial activity of culture broth of isolated <i>Bacillus</i> sp. IS-2	33
Fig. 8. Effect of concentration of yeast extract plus NaNO ₃ (1:1) on cell growth and antibacterial activity of culture broth of the isolated <i>B. subtilis</i> IS-2.	33
Fig. 9. Effect of various inorganic salts on cellgrowth and antibacterial activity of the isolated <i>Bacillus</i> sp. IS-2.	35
Fig. 10. Effect of concentrations of NaCl on cell growth and antibacterial activity of culture broth of the isolated <i>Bacillus</i> sp. IS-2.	35
Fig. 11. Effect of temperature on cell growth and antibacterial activity of <i>Bacillus</i> sp. IS-2	37
Fig. 12. Effect of pH on cell growth and antibacterial activity of <i>Bacillus</i> sp. IS-2.	37
Fig. 13. Effect of culture time on cell growth and antibacterial activity of <i>B. subtilis</i> sp. IS-2.	39
Fig. 14. Scanning electron micrographs of <i>S. iniae</i> treated with strain IS-2 solvent extracts. A,B: Untreated, C,D: Treated	40
Fig. 15. Weight (g) of Olive flounder that was fed with probiotic and non-mixed control diet for 12 weeks and weithed every 2 weeks.	41
Fig. 16. NBT reduction of Olive flounder that was fed with <i>Bacillus</i> sp. IS-2 and non-mix control diet for 12 weeks	45
Fig. 17. Lysozyme activity in serum of Olive flounder that was fed with <i>Bacillus</i> sp. IS-2 and non-mix control diet for 12 weeks.	47
Fig. 18. Phagocytosis activity in serum of Olive flounder that was fed with <i>Bacillus</i> sp. IS-2 and non-mix control diet for 12 weeks.	48
Fig. 19. Cumulative mortality (%) after intraperitoneal injection of <i>Streptococcus iniae</i>	

e in Olive flounder. 49

Fig. 20. Detection of *Bacillus* sp. IS-2 in the intestines of *Bacillus* sp. IS-2 fed the control diet and *Bacillus* sp. IS-2 containing diets at 10^3 , 10^5 , and 10^7 colony-forming units(cfu)(kg diet)⁻¹ by gel electrophoresis of polymerase chain reaction products amplified using the specific primer pair, forward primer(27F): 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'reverseprimer(1492R): 5'-GGTTACCTTGT TACGACTT-3', of a specific open reading frame from the *Bacillus* sp. genome. 51

Abstract

The purpose of this experiment was to select useful probiotic strains with antibacterial activity and acid resistance against a broad range of bacteria causing fish diseases to prevent bacterial diseases of fishes or improve their immune system for the efficiency of farming industry.

Five kinds of strains extracted from Kimchi, salted farmed flatfish, and salted fishes were used to study their antibacterial activity, bile resistance, and acid resistance, and *Bacillus* sp. IS-2 was finally selected to examine their cultural, morphological, genetic, and physiological characteristics. In result of identification, *Bacillus* sp. IS-2 was identified as *Bacillus subtilis*, *Bacillus velzensis*, and *Bacillus amyloliquefaciens* and named *Bacillus* sp. IS-2. In result of reviewing the optimal culturing conditions for maximum production of antibacterial materials, the source of carbon was 1% soluble starch; the source of nitrogen was 0.5% malt extracts and 0.5% NaNO₃; the inorganic salt was 0.1% NaCl; the culturing temperature was 35°C; the initial pH of culture medium was 8; and the culturing time was 120 hours.

The strains were added to the feed in the concentration of 10³, 10⁵, and 10⁷ CFU/kg and 2% of fishes were given the feed twice a day (8 AM and 5 PM) for 12 weeks. In result of the nonspecific immune response study to examine Lysozyme activity, Phagocytosis activity, and respiratory burst every two weeks until the end of the study, all test samples showed greater activities than control samples and improved immune activity with *Bacillus* sp. IS-2. The mortality test performed by artificial infection using *S.iniae*, a pathogenic bacterium, after the completion of this study also showed over 55% greater survival rate in all test samples. In result of performing PCR using the universal primer to verify that the probiotic stays in the intestines

of the fishes, all test samples showed PCR product of 1465 bp. Based on the above findings, it was concluded that *Bacillus* sp. IS-2 in the feed improved farmed flatfish's immune system and resistance against diseases as the probiotic. Also, the physiological indicators discovered by this study would be useful for identifying the mechanisms of probiotics.

I. 서론

국내 양식산업의 대표적 품종인 넙치는 국립수산물과학원에서 1984년 인공종묘 생산기술을 개발한 이후, 1990년대 초반부터 본격적으로 생산되기 시작하였으며, 활어류 중 소비자 선호도가 가장 높은 어종이다. 연중 입식 및 출하가 가능한 고도의 양식기술 개발과 시설 규모화가 진전된 품목으로 현재 지식경제부에서 육성하고 있는 ‘세계일류상품’ 지정 품목이면서, 농림수산물식품부에서 추진하는 농수산업 분야 경쟁력 강화를 위한 5대 미래전략과제의 하나인 ‘품목별 대표조직 육성 정책’추진 품목 중 수산업을 대표하는 품목이다. 통계청의 자료에 따르면 2001년 수산물 생산량은 어업에서 1,991천톤 양식에서 655천 톤이 생산되었으며 2010년 생산량은 어업에서 1,724천톤, 양식에서 1,370천톤으로 지난 10년 동안 어업생산량은 줄어든 반면 양식 생산량은 100% 이상의 증가를 보이고 있다. (통계청 어업생산통계, 어류 양식현황 조사, 2010) 어업 생산량의 정체 또는 감소 현상은 환경오염과 어자원의 남획에 따른 것이기 때문에 현 수준 이상의 증가는 기대하기 어려운 실정임에도 불구하고 양식 생산량의 증가는 소득수준의 향상에 따라 저지방 고단백 건강 수산식품에 대한 수요의 증가와 생산성 기술이 향상함에 따라 매년 급증하고 있는 추세이다.

양식생산량의 증가는 국가별 소득수준의 향상에 따라 저지방 고단백 건강 수산식품에 대한 수요의 증가와 생산성 기술이 향상함에 따라 매년 급증하고 있는 추세이며 세계적으로 1인당 1년 동안 수산식품의 소비량은 1992년에 13.5 kg이었지만, 2002년에 16.0 kg으로 10년간 약 19% 증가하였으며, 2010년에는 17 kg으로 사상 최고치를 경신했으며 평균 동물성 단백질 섭취량의 최소한 15%를 담당하면서 30억명 이상에게 공급되고 있다고 밝혔다. (FAO, 2011)

이러한 넙치 양식 산업에 있어서 가장 문제가 되고 있는 것이 바로 어병으로 인한 질병 폐사량 증가이다. 넙치의 폐사는 단기적으로 생산원가를 가중 시킬 뿐 아니라, 장기적으로는 산업의 안정적 발전을 저해하는 요인으로 작용한다. 제주 양식넙치의 경우 폐사현황을 보면 2007년 3,869톤(생산량 2만825톤), 2008년 4,519톤(생산량 2만4천184톤), 2009년 4,427톤(생산량 2만6천24톤), 2010년 5,601(생산량

2만2천139톤)으로 해마다 증가하고 있으며, 연도별 폐사율은 2007~2008년 15.7%에서 2009년에는 14.5%로 낮아졌다가 지난해는 20.2%로 크게 높아졌다. 폐사로 인한 피해액은 2007년 320억원, 2008년 294억원, 2009년 376억원, 2010년 513억원으로 조사되었다. (제주어류양식수협과 해양수산연구원, 2011)

양식산업에 있어 어류의 질병예방 및 치료를 위한 가장 일반적인 방법에는 항생제 투여 등의 화학적인 방법과 백신요법이 있는데 (Newman, 1993; Eldar, 1995), 항생제 요법인 경우 오남용에 따른 내성균의 출현(Smith 등, 1994)과 체내잔류 (Karunasagar 등, 1994; Witte 등, 1999) 등 사회적, 생태적으로 심각한 문제를 유발하고 있어 그 사용이 규제되고 있는 실정이다(Aoki 등, 1990). 백신요법인 경우 양식어류는 균집을 대상으로 투여하고 주로 면역력이 약한 자치어를 대상으로 하기 때문에 백신투여가 매우 번거롭고 많은 인력이 필요한 실정이다. 또한 세균성 질병의 복합적인 감염에 따른 효과적인 백신의 개발이 없어 어병예방과 치료를 위한 대책으로서는 한계에 와 있다고 할 수 있다. 따라서 기존의 어병예방 및 치료의 문제점에 대한 대안책으로 친환경적인 Probiotic 요법에 대한 관심과 연구가 최근 많아지고 있다(Salminen 등, 1999)

Probiotics란 숙주동물의 장내균총(intestinal microbes)을 개선시킴으로써 숙주에게 유익한 영향을 주는 미생물 첨가제를 말한다(Fuller, 1989). Probiotics의 영향은 유익한 균주를 투여하거나 장내에 정착 시켰을 때 병원성 세균이 장내에 정착하고 증식하는 것을 억제시키고 유익세균의 성장하며 분비하는 여러 대사물질과 효소들에 의해 숙주동물의 소화를 증대시켜 준다.

Probiotics로서 많이 이용되어 온 미생물로는 *Lactobacillus* sp.(Ashenafi, 1991;Chateau 등, 1993; Gildberg 등, 1997), *Bacillus* sp(Sugita, 1998), *Vibrio alginolyticus*(Austin 등, 1995; Gatesoupe, 1989), *Carnobacterium* sp.(Joborn, 1997; Stoffels, 1992), 및 *Pseudomonas flourescense*(Gram 등, 1999) 등이 있으며, 그 중 가장 많이 연구되고 이용 되어온 미생물은 유산균(lactic acid bacteria, LAB)이다(Ringo 등, 1998; Conway, 1996).

Probiotics 균주로서 산업적으로 응용하기 위해 분리된 균주는 그람 음성, 양성 세균을 저해할 수 있는 넓은 항균 스펙트럼을 갖고 있어야 하며, probiotics의 지속적인 항균작용과 유익한 효과를 갖기 위해서는 pH가 낮은 위와 담즙 그리고 여러 가

지 소화효소 등의 환경 조건에서도 생존하여야 하며, 어병치료를 위한 항생제 투약 시기에도 생존하여야 한다. 즉, probiotics 균주가 갖추어야 할 또 다른 중요한 조건은 내산성 및 내담즙성을 갖고 있어야 한다는 점이다(Verschuere 등, 2000).

따라서 본 연구에서는 양식 생산성을 높이고 양식 환경 개선에 도움이 되며, 넙치 양식장 환경 개선용 생균제 균주를 개발하기 위해 넓은 항균 스펙트럼을 갖고 있으면서 pH 내성 및 열안정성, 내염성 등을 갖고 있는 probiotic 균주를 어류의 장내와 한국의 전통 발효식품 등에서 선별한 후, 생리 화학적, 배양학적, 형태학적인 특성을 조사하고 분리된 probiotics를 각기 다른 농도로 사료에 첨가하여 양식 현장에 사용하였을 때 나타나는 양식넙치의 면역 반응, 병 저항상을 조사하여 사료 첨가제로써의 응용성을 확인 하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

2-1. Probiotic 균주의 분리 및 선정

2-1-1. 미생물의 분리

생균제 후보균주를 분리하기 위하여 국내 전통발효 식품 및 식품원료인 김치, 젓갈, 메주, 된장, 질금 등으로부터 미생물을 분리하였다. 채취한 샘플은 생리식염수로 단계 희석하여 사용하였으며, 0~10%의 식염이 첨가된 Mann, Rogosa and Sharpe 배지 (MRS, Difco)에 희석액을 100 μ l 유리 도말봉으로 도말하고 25, 30, 35°C에서 48시간 배양하여 미생물을 분리하였다. 분리한 세균을 후보 생균제로 선발하기 위하여 인공위액 및 인공담즙산 내성조사, 병원성 미생물에 대한 항균성 조사, 열안정성 및 pH 내성조사 순으로 선발하였다(Fig. 1).

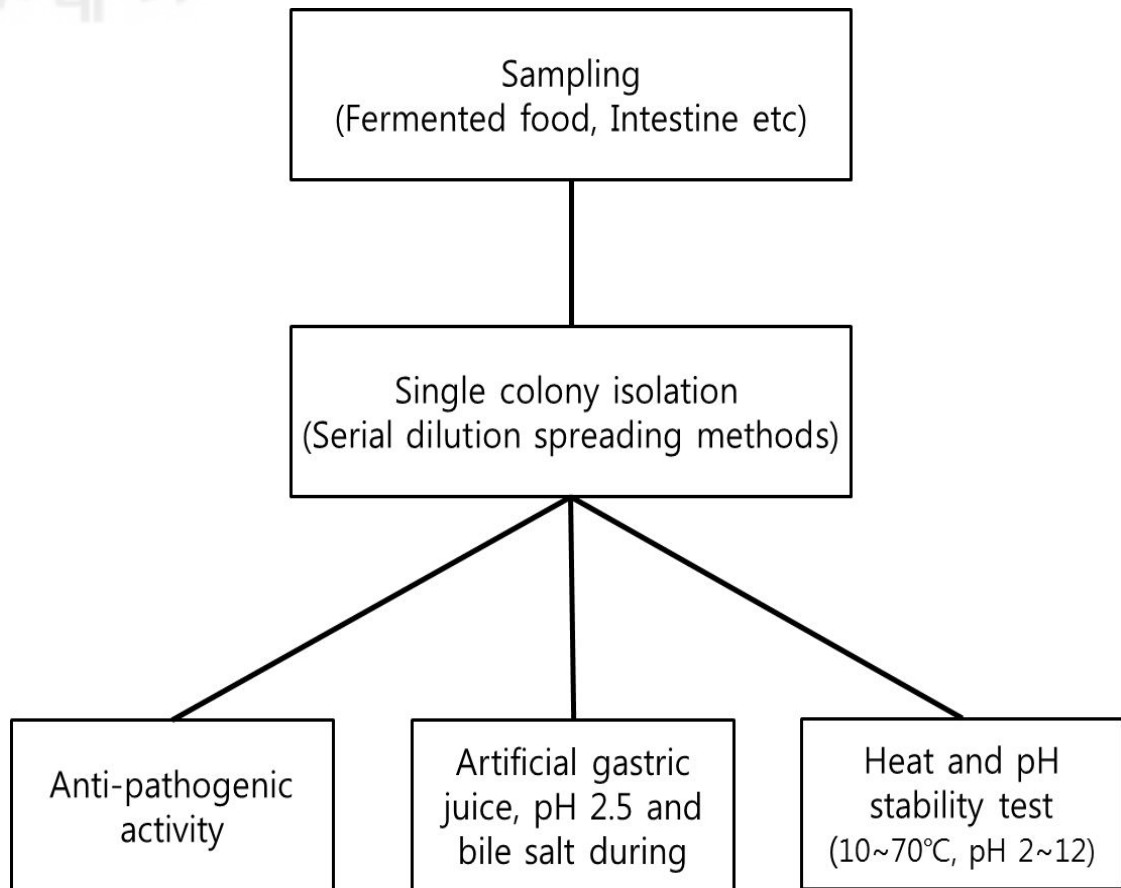


Fig. 1. Scheme of isolation probiotics.

2-1-2. 분리균주의 항균활성 측정

실험에 사용된 균주는 어류 질병 미생물로 한국유전자은행인 KCTC (Korean Collection for Type Culture) 또는 KCCM (Korean Culture Center of Microorganisms)에서 분양 받아(Table 1) -70℃ Deep freezer에서 보관 (50% glycerol 및 10% DMSO)하여 실험에 사용하였다. 생균제 후보 균주로 분리된 미생물과 분양 받은 미생물은 각각의 알맞은 배지에서 보관하였고(Table 2) 분리 균주가 생산하는 배양액의 병원성 세균에 대한 억제 효과를 조사 위한 항균활성 실험은 McFarland No. 0.5로 희석된 각각의 세균 현탁액을 멸균된 면봉을 사용하여 준비되어진 Muller Hitone Agar(MHA) plate에 골고루 도말하고, 건조 후 멸균된 paper disc (직경 8mm, Advantec, Japan)에 분리된 균주의 배양액 50 μ l을 접종하여 각 배양온도에 맞춰 24시간 배양하여 clear zone을 caliper로 측정하였다. caliper로 측정된 clear zone은 paper disc의 직경도 포함 하였다.

Table 1. List of strains used of antibacterial experiment

Bacteria name	Strain NO.
<i>Edwardsiella tarda</i>	KCTC 12267
<i>Streptococcus iniae</i>	KCTC 3657
<i>Vibrio alginolyticus</i>	KCCM 40513
<i>Vibrio anguillarum</i>	KCTC 2711
<i>Vibrio campbellii</i>	KCCM 40864
<i>Vibrio harvey</i>	KCCM 40866
<i>Vibrio furnisii</i>	KCCM 41679
<i>Vibrio salmonicida</i>	KCCM 41663
<i>Streptococcus parauberis</i>	KCTC 3651

Table 2. Compositions of bacterial media

Media	Comporiton (Per liter)	Remarks		
MRS Broth	Peptone	10g		
	Bacto beef extract	10g		
	Yeast extract	10g	Difco, USA	
	Dtrose			
NB (Nutrient Broth)	Tween 80	1g		
	Beef Extract	3g	Difco, USA	
Peptone	5g			
MB(Marine Broth)	Peptone	5g		
	Yeast Extract	1g		
	Ferric Citrate	0.1g		
	Sodium Chloride	19.45g		
	Magnesium Chloride	5.9g		
	Magnesium Sulfate	3.24g		
	Calcium Chloride	1.8g		
	Potassium Chloride	0.55g	Difco, USA	
	Sodium Bicarbonate	0.16g		
	Potassium Bromide	0.08g		
	Strontium Chloride	34mg		
	Boric Acid	22mg		
	Sodium Silicate	4mg		
	Sodium Fluoride	2.4mg		
Ammonium Nitrate	1.6mg			
Disodium Phosphate	8mg			
TSB (Tryptic Soy Broth)	Pancreatic Digest of Casein	15g		
	Papaic Digest of Soybean	5g		Difco, USA
	Sodium Chloride	15g		
BHIB (Brain Heart Infusion)	Calf Brains, Infusion from 200g	7.7g		
	Beef Heart, Infusion from 250g	9.8g		
	Proteose Peptone	10.0g	Difco, USA	
	Dextrose	2.0g		
	Sodium Chloride	5.0g		
	Disodium Phosphate	2.0g		
SS (Salmonella Shigella)	Beef Extract	5g		
	Pancreatic Digest of Casein	2.5g		
	Peptic Digest of Animal Tissue	2.5g		
	Lactose	10g		
	Bile Salts Mixture	8.5g		
	Sodium Citrate	8.5g	Difco, USA	
	Sodium Thiosulfate	8.5g		
	Ferric Citrate	1g		
	Neutral Red	0.025g		
	Agar	13.5g		
Briliant Green	0.330mg			

2-1-3. 인공 위액 및 인공 담즙산에 대한 내성, 내염성, 내열성, 용혈성

인공 위액에 대한 내성 조사는 분리된 각각의 미생물을 이용하여 0.005M sodium phosphate buffer를 HCl로 보정하여 만든 pH 2.0~7.0의 NB 배지에 각 균주 (10^8 cfu/ml)를 10배 희석하여 접종하여 30°C에 30분 방치한 후 NA에 도말하여 균수를 측정하여 생존율이 10배 이상 낮아지지 않는 것을 양성으로 판정하였다.

인공 담즙산에 대한 내성 조사는 분리된 각각의 미생물을 이용하여 1~3% bile salt가 포함된 NB 배지에 각 균주 (10^8 cfu/ml)를 10배 희석하여 접종하여 30°C에 30분 방치한 후 NA에 도말하여 균수를 측정하여 생존율이 10배 이상 낮아지지 않는 것을 양성으로 판정하였다.

내염성에 대한 조사는 분리된 각각의 미생물을 이용하여 0~50 ppt (part per thousand)의 NaCl이 포함된 NB 배지에 각 균주 (10^8 cfu/ml)를 10배 희석하여 접종하여 30°C에 30분 방치한 후 NA에 도말하여 균수를 측정하여 생존율이 10배 이상 낮아지지 않는 것을 양성으로 판정하였다.

내열성 조사는 각각의 미생물 (10^8 cfu/ml)을 saline에 10배 희석하여 접종한 다음 60°C 항온수조에 30분 방치한 후 NA에 도말하여 균수를 측정하여 생존율이 1/10 배 이하로 낮아지지 않는 것을 양성으로 판정하였다.

용혈인자(Hemolysin) 활성 조사는 면양 적혈구를 5% 첨가한 평판에(Hanil Komed, Korea) 균을 도말한 후 30°C에서 48시간 배양하였을 때 나타나는 용혈환의 유무로 확인하였다.

2-1-4. 공시균주의 선정

항균활성 및 위액과 담즙산에 대한 내성, 내염성, 내열성, 용혈성, 항생제 감수성 테스트를 통해 생균제가 가져야할 특성을 확인한 후 활성이 가장 뛰어난 *Bacillus* sp. IS-2 균주를 본 연구를 위해 선발하였다.

2-2. *Bacillus* sp. IS-2의 동정

2-2-1. 형태학적 특성

SEM (Scanning Electron Microphotography, JSM-6700JEOL Ltd.)을 통해 미생물의 형태학적 특성을 관찰하였다. 고체배지에 Membrain filter(Adventech)를 올려 그 위에 백금을 이용하여 균을 도말하였다. 균의 성장 특성에 따라 집락이 나타나기 이전에 전처리를 행하였다. 먼저 filter를 0.5× 0.5cm 되도록 절한 한 뒤, 2.5% glutaraldehyde 용액에 담구어 1시간 고정시킨다. 그 다음 1 M phosphate buffer로 2회 세척한다. 이를 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100%의 ethylalcohol로 각각 1시간동안 탈수시킨다. 탈수시킨 filter를 isoamylacetate와 100% EtOH가 1:1로 혼합된 용액에 1시간 담근 후, 100% isoamyl acetate 용액에 1시간 방치한다. 마지막으로 CO₂ gas를 이용해 건조시키고 백금을 처리하여 전자현미경으로 관찰하였다.

2-2-2. 생리학적 특성

공시균주의 동정을 위해 그람염색, catalase test, 포자유무, 운동성, 전자현미경 관찰 등 형태학적 특성을 관찰 하였고 당 발효능과 같은 생화학적 성상은 API 50CHB(Biomerieux, France)을 이용하여 분석법에 따라 시행하였다.

2-2-3. 16S rRNA 염기서열 분석

16S ribosomal RNA 분석은 Gnomonic DNA Extraction kit(Bioneer, Korea)를 사용하여 Chromosomal DNA를 분리한 후, Bacterial 16S rDNA universal primer를 이용하여 16S rDNA를 증폭시켰다. 합성된 oligonucleotides의 각각의 primer는 forward primer(27F): 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' reverse primer(1492R): 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'의 염기서열로 구성되었으며 각각의 0.5 μ M primer, 200 μ M deoxynucleoside triphosphate, Taq DNA polymerase(Bioneer, Korea) 3 μ l를 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응 조건은 94 $^{\circ}$ C에서 5분 pre-denaturation, 30cycle 동안 94 $^{\circ}$ C에서 45초 denaturation, 50 $^{\circ}$ C에서 45초 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 45초간 extension 하였으며, 다시 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 extension 하였다. 증폭된 PCR product는 ethidium bromide가 첨가된 상태에서 전기영동하여 1% agarose(promega CO., USA) gel에서 확인하였다. 이후 AccuprepTM PCR purification kit(Bioneer, Korea)을 이용하여 PCR product에 남아있는 primers, nucleotides, polymerase, salts를 제거하여 정제하고 30 μ l에 elution buffer(10mM Tris-Cl, pH 8.5)로 DNA를 elution하였다. 이를 ABI prismTM BigdyeTM terminator cycle sequencing Ready reaction kit V.3.1 (Fluorescent dye terminators method)와 ABI 3730XL capillary DNA sequencer를 사용하여 PCR product의 염기서열을 분석하였다. DNA 염기서열의 homology 분석은 BLAST online program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)를 이용하였다. 그 다음 ClustalW software를 사용하여 염기서열을 배열한 후 MEGA3 program (Ver 3.0)을 이용하여 phylogenetic tree를 작성하였다.

2-3. 조건에 따른 *Bacillus* sp. IS-2의 생육과 항균활성 검토

미생물의 최적 배지성분의 검토는 glucose 0.5%, yeast extract 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.02% 배지를 함유한 GY(glucose 0.5%, yeast extract 0.1%)배지를 사용하였다. 항균물질의 생산의 측정은 paper disc 확산법, agar spotted method 등 liquid culture method를 병행하여 실시하였다.

Liquid culture method는 피검균 배양액을 10 ml MHB(Difco, USA)에 2% 접종하고, 공시균주 배양액을 3500 rpm에서 15분간 한 후, 0.45 μm pore size filter(Adventec, USA)로 제균하였다. 이 배양 상등액을 다시 2% 첨가하여 25℃ 6시간 배양하고 피검균의 생육도를 660 nm에서 측정하여 다음과 같은 방법으로 저해율을 계산하였다.

$$\text{Inhibition rate(\%)} = (C_0 - C) / C_0 \times 100$$

(C₀: 대조구 O.D. ; C: 항균물질 처리 후 배양한 O.D.)

2-3-1. 탄소원의 배지조성

배지의 탄소원으로 GY배지에 glucose, sorbitol, mannitol, soluble starch, xylose, maltose, lactose, fructose, arbinose, raffinose, sucrose, rhamnose, mannose 및 galactose 등을 각각 1% 첨가하여 30℃, 150rpm으로 24시간 배양한 후 배양액의 탁도를 660 nm에서 측정하였으며 Liquid culture method를 시행하여 항균물질의 생산을 알아보았다. 대조구는 glucose가 첨가되지 않은 배지를 사용하였다.

2-3-2. 질소원의 배지조성

질소원은 NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 , NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$, malt extract, yeast extract, asparagine 및 peptone 등을 0.5% 첨가하여 30°C, 150rpm으로 24시간 배양 한 후 배양액의 탁도를 660 nm에서 측정하였으며 Liquid culture method를 시행하여 항균물질의 생산을 알아보았다. 대조구는 GY배지에서 yeast extract가 첨가되지 않은 배지를 사용하였다.

2-3-3. 무기염의 배지조성

무기염은 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaCl , $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 등을 0.1%첨가하여 30°C, 150rpm으로 24시간 배양한 후 배양액의 탁도를 660 nm에서 측정하였으며 Liquid culture method를 시행하여 항균물질의 생산을 알아보았다. 대조구는 GY배지에서 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 가 첨가되지 않은 배지를 사용하였다.

2-3-4. 최적 pH, 온도에 따른 성장과 항균물질 생산

공시균주의 최적 배양조건은 250 ml 삼각플라스크에 150 ml의 액체배지를 넣고 0.1 N HCl 과 0.1 N NaOH 용액으로 배지의 초기 pH를 4~9의 범위로 조적하여 121°C, 15분 동안 멸균하였다. 제조한 액체배지에 최종 선정균주의 전배양액을 1% 접종하고 30°C, 150 rpm에서 24시간 배양한 후, 660 nm에서 배양액의 탁도를 측정하였으며 항균물질 생산을 검토하였다. 최적 배양온도는 20~50°C의 범위에서 조건을 확인 하였으며, pH 영향은 최적 배양온도 방법과 동일하게 검토하였다.

2-3-5. 배양시간에 따른 항균물질의 생산

배양시간이 항균물질의 생산에 미치는 영향은 공시균주의 전배양액을 최적배지에 최적온도에 24시간 배양한 뒤, 6시간 간격으로 시료를 채취하여 4000 rpm에서 원심 분리하여 상등액을 0.45 μm pore size filter(Adventec, USA)로 여과하여 항균 활성 측정시료로 사용하였다. 측정법은 agar spotted method를 이용하였다. MHA(Difco)에 각 dbgoaltodafn을 50 μl 씩 접종하고 무균적으로 배지에 구멍을 내어 항균활성 측정시료를 100 μl 씩 떨어뜨려 30 $^{\circ}\text{C}$ 24시간 배양하여 투명환의 직경(mm)을 측정하였다.

2-3-6. 항균물질의 첨가에 따른 피검균 (*S. iniae*)의 세포형태 관찰

MHA (Difco, USA)에 *S. iniae* 균을 접종한 후 항균물질이 최대량 분비되는 배양 시간 후의 피검균의 세포형태 변화를 SEM으로 관찰하였다.

2-4. *Bacillus* sp. IS-2의 첨가에 따른 양식넙치의 면역반응과 병저항성

2-4-1. 실험어 사육관리

본 실험은 제주도 함덕리에 위치한 해양과환경연구소에서 수행하였고, 실험어로 사용된 넙치는 제주도 위미리에 위치한 (주)금강수산에서 분양을 받았다. 실험 시작 전에 사용한 넙치는 실험 환경에 적응시키기 위해 약 2주일 동안 기초사료를 공급하여 순치 시켰으며, 실험 시작 전 넙치의 평균 무게는 210 ± 13 g 이었다. 사육 수조는 1000L 원형수조를 사용하였고, 각 수조당 70마리씩 수용하였으며, 사육수량은 1일 3회 환수, 충분한 산소 공급을 위하여 통기 하였다. 실험 기간 중의 수온, 용존산소(dissolved oxygen, DO), pH, 염분을 매일 측정하였으며, YSI(YSI-556MPS)를 사용하였다. 실험 기간 중 사육 온도는 11.8-21°C, 염분은 33.64-35.01‰, pH는 7.97-8.45, DO는 6.78-9.26 이었다. 사료는 1일 2회 (오전 8시, 오후 5시) 어체 중의 2%씩 공급 하였으며, 실험 사육은 총 12주 동안 수행 하였다.

2-4-2. 실험사료 제작 및 투여방법

사료 제작을 위하여 시판하고 있는 넙치용 배합사료에 (조단백질 52%, 조지방 11%, 조섬유 3%, 조회분 14%, 인 2.7%, 칼슘 1.5%, Suhyup Co, KOREA) 대량 배양 된 분리균주인 *Bacillus* sp. IS-2(1×10^9 CFU/ml)을 각각 첨가하여 10^3 , 10^5 , 10^7 CFU/kg 실험 사료를 제작 하였다. 대조구에는 유용미생물을 첨가하지 않은 일반 사료를 투여 하였으며 실험이 시작 된 후부터 사료 투여는 1일 2회 (오전 8시, 오후 5시) 어체중의 2%씩 공급 하였으며, 실험 사육은 총 12주 동안 수행 하였다.

2-4-3. 성장도 조사 및 혈액학적 분석

실험어의 성장도 조사와 채혈은 2주 간격으로 실시하였으며, 혈액학적 성분 분석은 넙치는 실험이 종료되는 12주째까지 측정하였다. 성장도 조사와 함께 혈액성분 분석을 위하여 실험어를 채혈하기 전까지 약 24시간 동안 절식시켜 무작위 선발하여 미부정맥에서 혈액을 채혈하여, 자동 혈액 분석 장치 (Ch 100 plus, Daewang metitecq. Korea)를 이용하여 혈액분석을 실시하였다. 혈청 성분의 분석을 위하여 채혈한 혈액을 항응고제가 처리되지 않은 원심분리관에 넣고 실온에 30분간 방치한 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 냉장보관하면서 16시간 이내에 분석하였다. 혈청성분은 자동 혈액분석기를 사용하여 총단백질 (total protein), 당 (glucose), 인 (phosphorus), 총콜레스테롤 (Total cholesterol), 중성지방 (triglyceride; TG), HDL-C (high density cholesterol), LDL-C (low density cholesterol), 및 간지수인 AST (aspartate aminotransferase), ALT (alanine aminotransferase)를 분석 하였다. 혈액학적 성분 분석은 측정 24시간 전에 절식시킨 후 2-phenoxyethanol (Sigma. USA)로 마취시켜 측정하였다. 성장도 조사방법은 각 실험구에서 무작위로 10마리를 선발하여 실험어의 전장, 무게를 측정하여 평균을 내었다.

2-4-4. Respiratory burst activity

어류 식세포 작용을 알아보기 위하여 respiratory burst activity를 Anderson과 Siwicki (1996) 실험법에 따라 분석하였다. 실험어의 미부에서 채취한 전혈을 1.5ml 마이크로튜브에 넣고 0.2% NBT (Nitroblue tetrazolium, Sigma)를 전혈과 1:1로 되게하여 30분간 상온에서 반응시킨 후, 1ml dimethyl foramide를 넣고 반응을 정지시킨다. 그런 다음 2000 rpm에서 5분간 원심분리 한 후 상층액을 수거하여 540nm에서 micro-reader (Packard SpectrocountTM)로 흡광도 값을 측정한다. Blank는 dimethyl foramide로 하고, Control은 NBT시약을 사용하였다.

2-4-5. 혈청의 lysozyme 활성

체액성 면역 반응에 관여하는 인자로 라이소자임은 세균벽의 N-acetylmuramic acid와 N-acetylglucosamine사이의 베타-1,4결합을 분리하여 세균을 사멸시키는 효소로 그람양성균에 대한 항체 및 보체 활성을 증가 시켜주고, 식세포의 식작용을 증가시킨다. 실험 방법은 kumari와 Sahoo (2005) 방법에 따라 *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma)를 0.02 M sodium citrate buffer (pH 5.5)에 0.2 mg/ml가 되게하여 *M. lysodeikticus* solution을 만든다. 체표 점액을 채취하여 이 시료의 5배 되는 PBS에 넣고 균질화 한다음 12,000 x g에서 20분간 4℃에서 원심분리 후 상층액을 측정 시료로 사용하였다. 점액과 serum을 각각 15 μ l씩 96 well plate에 분주한 후 즉시 *M. lysodeikticus* solution을 150 μ l 넣고 450nm에서 흡광도를 측정한 후 24℃에서 5분 간격으로 흡광도를 측정하여 흡광도 값이 감소하기 직전의 값을 lysate time으로 정하여 흡광도 값을 얻어, Lysozyme의 활성 단위를 분당 0.0001의 흡광도 감소를 나타내는 효소의 양으로 정의하였다.

2-4-6. Phagocytosis activity

실험어에서 채취한 혈액에서 분리된 leucocyte을 이용하여 Seeley et al. 방법에 따라 실시 하였다. hitopaque 1.119 (Sigma)와 분리된 혈액 샘플을 1:1로 섞어 400g 30min 15℃의 조건으로 원심분리 해준 다음 분리 층을 파스퇴르 pipet을 이용하여 MNC 의 cell을 분리 한다. 1×HBSS (MNC의 3배)로 3회 washing 후, cell counting을 통해 계수 한 다음, Cong red 염색약으로 염색된 yeast cell을 20:1의 비율로 room temperature에서 1시간 반응을 하여 Phagocytosis를 유도 한다. 그 후 1 ml ice-cold HBSS와 1 ml histopaque (1.077)을 각각의 sample에 더해준 다음 850g 5분 동안 원심분리를 시켜 반응이 유도된 yeast cells를 분리하여 최종적으로 510nm의 흡광도 값을 이용하여 Phagocytosis를 수치화 하여 나타내었다. (Using trypsin-EDTA as a blank.)

2-4-7. 어병세균에 의한 공격실험

넙치의 항병력에 미치는 영향을 알아보기 위하여 현재 양식장에 발병 빈번도가 가장 높은 그람양성 세균인 *Streptococcus iniae* (KCTC 3657) 이용하여 공격실험을 실시하였다. 균액은 10^5 CFU/ml의 농도가 되도록 멸균 생리식염수에 현탁 한 후, 공격 실험용액으로 사용하였다. 공격실험은 사료투여 후 12주 후에 실시하였으며 대조구를 비롯하여 실험구에서 무작위로 30마리씩 선정하여 1ml 주사기를 이용하여 각 마리당 $200\mu\text{l}$ 씩 복당 주사한 후 20일 동안 누적 폐사율을 조사하였다.

2-4-8. 사료 첨가 내 사용된 공시 균주의 장내 확인

사료 첨가제로 사용된 *Bacillus* sp. IS-2의 장 내 생존을 확인하기 위해 실험이 종료 된 후, 각각의 실험구의 실험어 장을 분리 하여 MRS 배지에 16시간 동안 배양 후, $7,000 \times g$ 15 min. 4°C 의 조건으로 원심 분리 하여 균체를 수집하였다. 수집된 균체를 GnomiDNA Extraction kit (Bioneer, Korea)를 사용하여 Chromosomal DNA를 분리한 후, Universal primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. 합성된 oligonucleotides의 각각의 primer는 7F 5'-AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG -3' 1492R 5'-GGA TAC CTT GTT ACG ACT T -3'로 사용하였다.

2-4-9. 통계처리

해양연구소에서 사육한 넙치의 성장 및 분석 결과의 통계처리는 SPSS (SPSS INC., Version 12.0) program을 이용하여 독립 검정을 실시하여 t-test ($P < 0.05$)로 평균간의 유의성을 검정하였다. 결과 값은 평균값 \pm 표준편차 (mean \pm S.D)로 나타내었고 백분율 값은 arcsine 변형 값으로 계산하여 통계분석 하였다

III. 결과 및 고찰

3-1. Probiotic 균주의 분리 및 선정

3-1-1. 미생물의 분리

각종 발효 식품 및 어류의 장에서 분리한 균주는 총 5종을 1차 분리 하였다 (Table 3). 김치에서 2종이 분리되었으며, 젓갈에서 각각 1종, 넙치 어류의 장에서 2종이 분리되었다. 분리균주는 25 ~35℃의 배양온도에서 MRS agar에 생육속도가 빠르고 뚜렷한 단일 집락을 형성하였다.

Table 3. Isolated strains and isolation condition.

Strain Name	Isolation source	Isolate temperature	Isolate medium
IS-1	Kimchi	25℃	MRS (0%(v/v)NaCl)
IS-2	<i>Jeotgal</i> (Squid)	30℃	MRS (0%(v/v)NaCl)
IS-3	Kimchi	30℃	MRS (0%(v/v)NaCl)
IS-4	Flounder intestine	25℃	MRS (0%(v/v)NaCl)
IS-5	Flounder intestine	25℃	MRS (0%(v/v)NaCl)

3-1-2. 분리균주의 항균활성 측정

분리균주 중에서 skim milk 평판배지에서 명료하고 뚜렷한 투명환이 생성됨과 동시에 생육속도가 빠른 균주를 2차 분리하였다(Table 4). IS-2, IS-3, IS-4는 다른 균주에 비해 skim milk 배지에서 넓은 투명환과 빠른 생육을 보였으며, *S.inie*, *E.tarda*, *V.anguillarum* 등 7종의 어류 질병 유발 세균에 대하여 항균활성이 뛰어나 후보균주로 선택하였다. *V.alginolyticus* 와 *V.salmonicida*는 모든 분리균주에서 항균활성을 보이지 않았으며, IS-2와 IS-3은 7종의 병원균에 대한 항균활성이 높았다.

Skim milk 첨가배지에서 투명환이 뚜렷한 균주의 선별은 목적으로 하는 유해미생물의 균체 단백질을 용해시키는 역할을 조사하기 위함으로 투명환이 뚜렷하고 넓을수록 protease 활성이 높다고 할 수 있다. 따라서 공시균주 IS-2, IS-3, IS-4를 이용하여 사료 첨가 내 가능성을 확인 하였다.

Table 4 . Antimicrobial activity of isolates

Strains	Growth rate ¹⁾	Protease activity ²⁾	Inhibitory zone (mm)								
			P1 ³⁾	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
IS-1	+	+	-	3.8	-	-	3.1	4.5	-	-	4.5
IS-2	++	+++	5.5	10.2	-	10.4	6.7	4.6	2.2	-	8.9
IS-3	++	++	4.9	8.1	-	6.4	7.1	4.1	2.6	-	6.5
IS-4	++	++	6.3	9.6	-	5.5	4.5	4.2	-	-	5.5
IS-5	+	+	3.7	6.1	-	5.1	6.2	4.2	-	-	4.7

1)Growth rate: + slow, ++ medium, +++ fast. 2)Protease activity was expressed as the diameter of inhibition zone on skim milk agar : + 8~10 mm, ++ 10~12 mm, +++ 10~12 mm 3)Tested strains = P1: *Edwardsiella tarda* KCTC 12267 P2: *S.iniae* KCTC 3657 P3: *V.alginolyticus* KCCM 40513 P4: *V.anguillarum* KCTC 2711 P5: *V.campbellii* KCCM 40864 P6: *V.harvey* KCCM 40866 P7: *V.furnisii* KCCM 41679 P8: *V.salmonicida* KCCM 41663 P9: *S.parauberis* KCTC 3651

3-1-3. 인공 위액 및 인공 담즙산에 대한 내성, 내염성, 내열성, 용혈성

선정된 3개의 공시균주를 그람염색, Catalase, 성장세포 상태서의 60℃ 열안정성, hemolysin 생산성 여부, 인공위액 및 담즙산 내성, 내염성을 조사하였다(Table 5). 선발된 3종의 균주는 그람염색에서 양성, catalase 생산력에서 양성 반응을 보였고, 포자상태가 아닌 성장세포 상태에서도 60℃에서 30분간 처리하였을 때 미생물 함량이 Log 1이하로 감소되지 않는 열안정성을 보였다. 또한 1% 인공위액과 3% 담즙산에 대한 내성을 보였다. 양식어류와 사람에 대한 안전성을 확인하기 위하여 hemolysin 생산력을 조사하였는데 모두 음성반응을 보여 안정성을 입증하였다(Fig. 2). 분리균주의 항균활성, Protease 활성 및 사료 첨가 가능성을 확인 해 본 결과를 토대로 공시균주 IS-2를 본 연구의 대상으로 최종 선정하였다.

Table 5. Biochemical properties of isolates

Characteristics	IS-2	IS-3	IS-4
Source	<i>Jeotgal</i> (Squid)	Kimchi	Flounder intestine
Gram staining	+	+	+
Catalase activity	+	+	+
Heat stability(60℃)	+	+	+
Hemolysin activity	-	-	-
Bile tolerance(3%)	+	+	+
Artificial gastric juice tolerance(1%)	+	+	+
Salinity(50ppt)	+	+	+

3-1-4 공시균주의 선정

항균활성 및 위액과 담즙산에 대한 내성, 내염성, 내열성, 용혈성 테스트를 통해 생균제가 가져야할 특성을 확인한 후 활성이 가장 뛰어난 *Bacillus* sp. IS-2 균주를 본 연구를 위해 선발하였다.

3-2. *Bacillus* sp. IS-2의 동정

3-2-1. 배양학적, 형태학적 특성

공시균주 IS-2의 고체배지의 colony 성상을 Fig.2에 나타내었다. (A), (B)는 1.5% NaCl을 첨가한 MRS 배지에서 생육한 사진인데, 집락의 모양은 부정형(inregular)의 형태를 보였으며, 집락의 주변(margin)은 열편(lobate)형태를 보였다. 또한 집락의 가장자리가 불규칙하고 불룩 솟아 있었으며, 백금이를 취하였을 때 점성(viscosity)을 띄는 특성을 보였다. (C)는 skim milk 배지에 공시균주를 배양한 사진이며, (D)는 IS-2를 면양혈청배지에 도말한 그림으로 비용혈성을 나타내었다.

공시균주의 형태학적 특성은 30°C에서 MRS 배지에서 배양한 후 SEM을 통해 관찰하였다(Fig.3). 형태는 단간균의 형태를 보였으며, 길이는 1.5~3.5 μm 폭은 0.6~0.9 μm 로 나타났다. 또한 균주 세포벽 외부에 점질물질이 생성되는 특징을 볼 수 있었다.

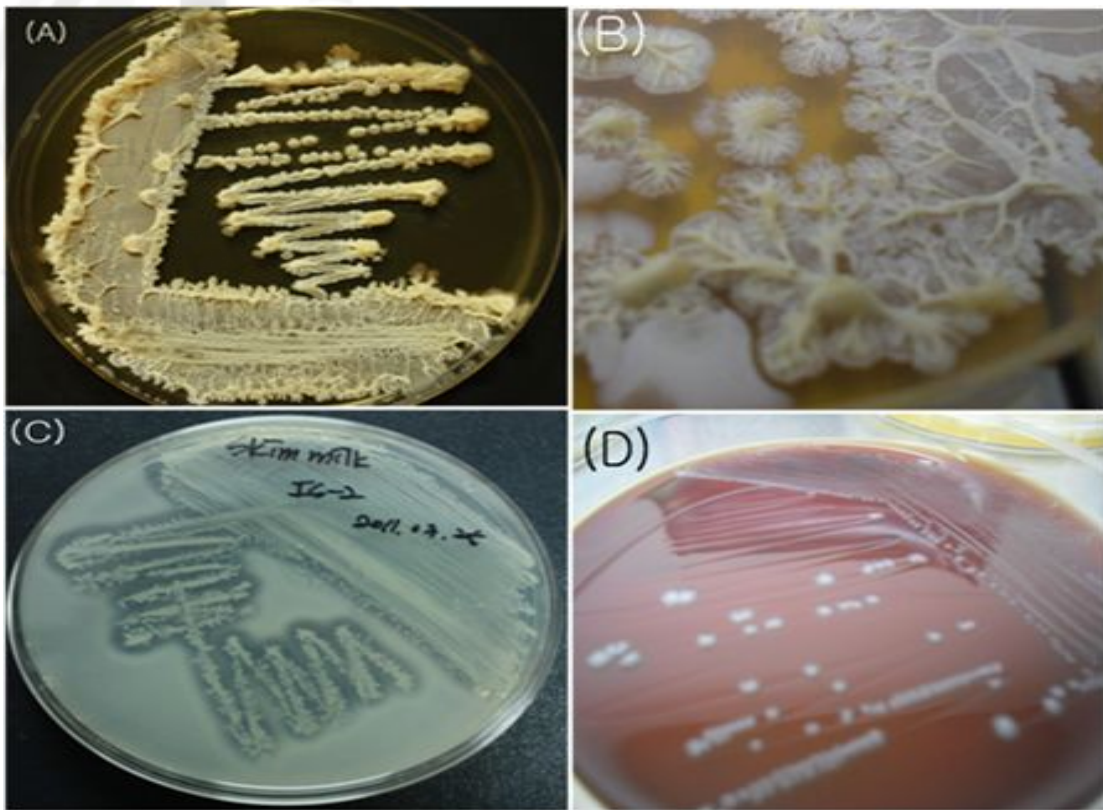


Fig. 2. Cultural characterization of Strain IS-2. Cells were grown at 30°C for 24 hours (A),(B) MRS agar (C) Skim milk agar (D) Blood plate agar

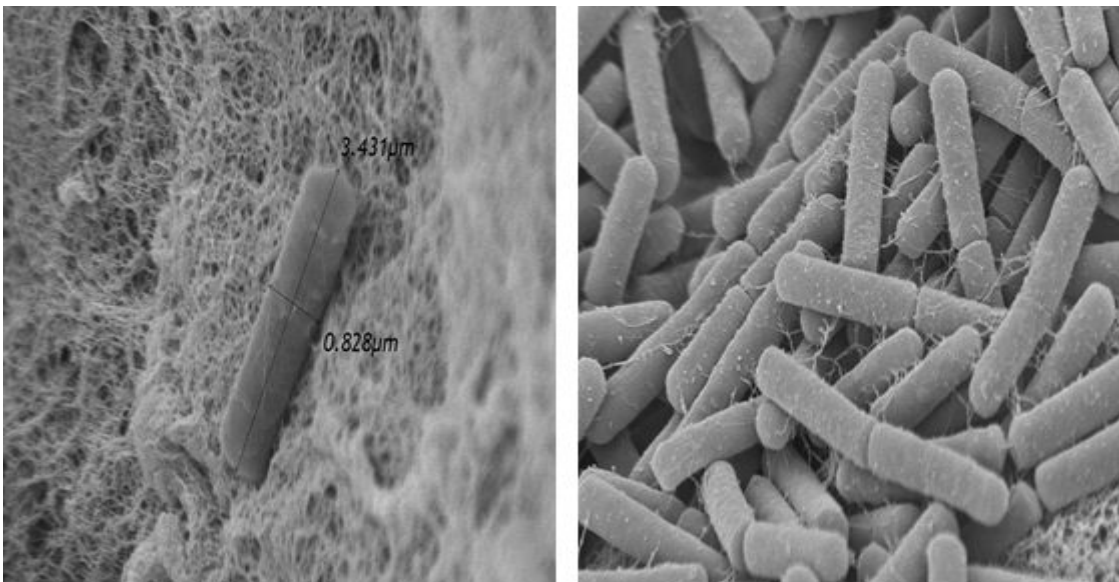


Fig. 3. Scanning electron micrograph of Strain IS-2. Cells were grown at 30°C for 24 hours.

3-2-2. 생리학적 특성

공시균주의 생리학적 특성을 검토한 결과는 Table 6과 같다. 생육온도의 범위는 20 ~ 45℃이었고, 생육 pH 범위는 6 ~ 10이었으며, 염농도 7%까지 생육이 가능하였다. 또한 미생물 동정용인 kit인 API 50CHB(Biomérieux, France)을 이용하여 실험 한 후 그 결과를 판독 하였다.

Table 6. Physiological characteristic of Strain IS-2.

No.	Test	Composants actifs	result (+/-)
0		Control	-
1	GLY	Glycerol	-
2	ERY	Erythritol	-
3	DARA	D-Arabinose	-
4	LARA	L-Arabinose	+
5	RIB	Ribose	+
6	DXYL	D-Xylose	-
7	LXYL	L-Xylose	-
8	ADO	Adonitol	-
9	MDX	β Methyl-D-xyloside	-
10	GAL	Galactose	+
11	GLU	Glucose	+
12	FRU	Fructose	+
13	MNE	Manose	+
14	SBE	Sorbose	-
15	RHA	Rhamnose	+
16	DUL	Dulcitol	-
17	INO	Inositol	-
18	MAN	Mannitol	+
19	SOR	Sorbitol	+
20	MDM	α Methyl-D-mannoside	-
21	MDG	α Methyl-D-glucoside	+
22	NAG	N Acetyl glucosamine	+
23	AMY	Amygdalin	+
24	ARB	Arbutin	+
25	ESC	Esculin	-
26	SAL	Salicin	+
27	CEL	Cellobiose	+
28	MAL	Maltose	+
29	LAC	Lactose	+
30	MEL	Melibiose	+
31	SAC	Sucrose	+
32	TRE	Trehalose	-
33	INU	Inulin	-
34	MLZ	Melezitose	-
35	RAF	Raffinose	-
36	AMD	Starch	-
37	GLYG	Glycogen	-
38	XLT	Xylitol	+
39	GEN	Gentiobiose	-
40	TUR	D-Turanose	-
41	LYX	D-Lyxose	-
42	TAG	D-Tagatose	+
43	DFUC	D-Fucose	-
44	LFUC	L-Fucose	-
45	DARL	D-Arabitol	-

3-2-3. 16S rRNA 염기서열 분석

공시균주 IS-2의 16S ribosomal RNA PCR 증폭을 통해 얻은 1399bp 염기서열을 NCBI (National Center Biotechnology Information)의 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)를 이용하여 분석한 결과 *Bacillus subtilis*, *Bacillus velzensis*, *Bacillus amyloliquefaciens*와 100% 상동성을 보였다. *Bacillus* 속에서 분리균(IS-2)과 가장 근연종으로 나타난 type strain(*Bacillus subtilis*, *Bacillus velzensis*, *Bacillus amyloliquefaciens*) 16S rRNA 염기서열과 *Bacillus*속의 type strain 16S rRNA 염기서열을 갖고 계통수를 작성하였다(Fig. 4). 결과적으로 분리된 *Bacillus* sp. IS-2는 위 균주와 동일종으로 판단 할 수 있다. 그러나 생리·생화학적 분석 결과를 두고 보았을 때 기존에 청국장에서 분리된 (B.H Bang et al., 2011) *B. subtilis* 와 생리-생화학적 결과를 두고 보았을 때 다른 특성을 나타내어 동일 균주라 부르기엔 어려움이 있을 것으로 사료된다. *Bacillus* 종을 동정하는데 있어 16S rRNA 염기서열만으로 크게 한계가 있기에 세포 지방산 분석 및 DNA-DNA hybridization의 추가실험을 통해 정확한 균의 동정을 할 필요가 있다고 사료된다.

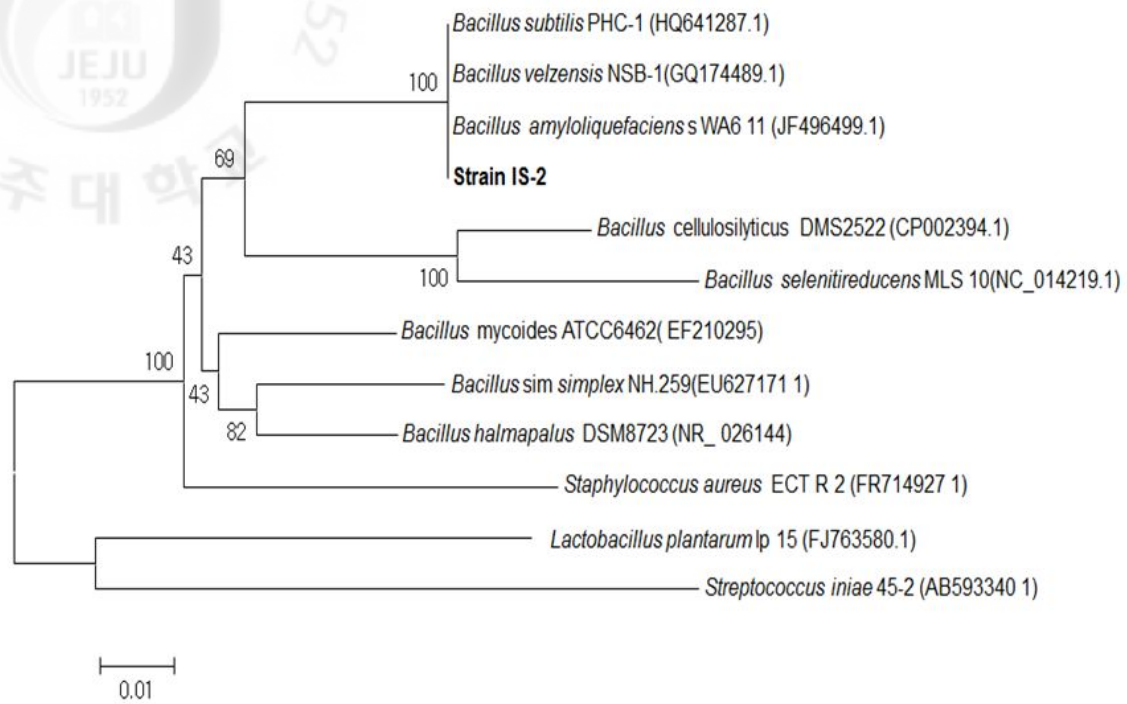


Fig. 4. Neighbour-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the position of strain IS-2 within the radiation of the genus *Bacillus*. Bootstrap percentage (from 1000 replications)>50% are shown at branch points. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position.

3-3. 조건에 따른 *Bacillus* sp. IS-2의 생육과 향균활성 검토

Bacillus sp. IS-2가 최적으로 분비할 수 있는 향균물질 생산을 위하여 요구되는 영양원을 탄소원, 질소원, 무기염으로 나누어서 균 생육과 향균활성을 측정하였다. 또한 최적 배양조건을 온도와 pH를 다르게 하여 균 생육과 향균활성을 검토하였다. 최적 배지성분 검토는 glucose 0.5%, yeast extract 0.1%, MgSO₇H₂O 0.02%를 함유한 GY배지를 사용하였다.

3-3-1. 탄소원의 영향

각종 배지성분은 향균물질생산에 중요한 것으로 알려져 있기 때문에 탄소원의 종류가 미생물의 생육에 미치는 영향을 조사하여 Fig.5에 나타내었으며 대조구는 GY 배지에 탄소원을 제외시킨 비지를 사용하였다.

Bacillus sp. IS-2는 탄소원 중에서 Soluble starch, Raffinose, Lactose 등의 첨가 순으로 잘 이용 하였으나 Fructose, Arbinose 등의 순서로 생육에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 그리고 *S.iniae* 에 대한 향균활성을 조사한 결과, Soluble starch, Mannose 및 Raffinose 등을 첨가한 시험구에서 높게 나타났다. 따라서 위의 결과로 *Bacillus* sp. IS-2의 향균활성은 균의 생육과 관계가 깊은 것으로 판단되었으며, 최종적으로 최적 탄소원은 Soluble starch로 결정하였다. *Bacillus* sp. IS-2의 생육 및 향균활성에 가장 효과적인 Soluble starch의 최적 첨가 농도를 검토한 결과 (Fig. 6) 1% 첨가가 균 생육이 높았으나 2~4%는 1%에 비해 미치지 못하였으며 5% 첨가구 역시 1%에 비해 큰 값을 나타내지 못하였다. 따라서 Soluble starch의 최적 첨가농도를 1%로 결정하였다.

기존에 보고에 의하면 (Jho et al, 1991) 탄소원으로 glucose가 첨가되었을 때 streptococcin A-FF22 생산이 증대되는 반면, streptococcin B-74628의 경우에는 감소하는 것으로 보아 향균물질은 미생물의 종류에 따라 최적 탄소원의 종류 또한 다양한 것으로 사료된다.

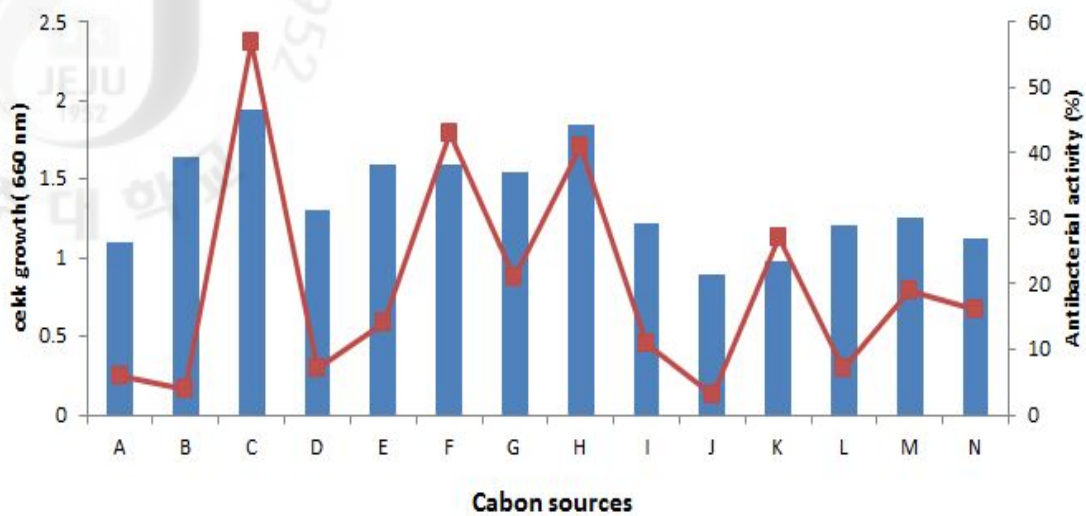


Fig 5. Effect of various carbon sources on cell growth and antibacterial activity of culture broth of the isolated *B. subtilis* sp. IS-2.
 A: Control, B: Lactose, C: Soluble starch, D: Sorbitol, E: Glucose, F: Mannose G: Maltose, H: Raffinose, I: Xylose, J: Fructose, K: Arbinose, L: Sucrose, M: Rhamnose, N: Galactose

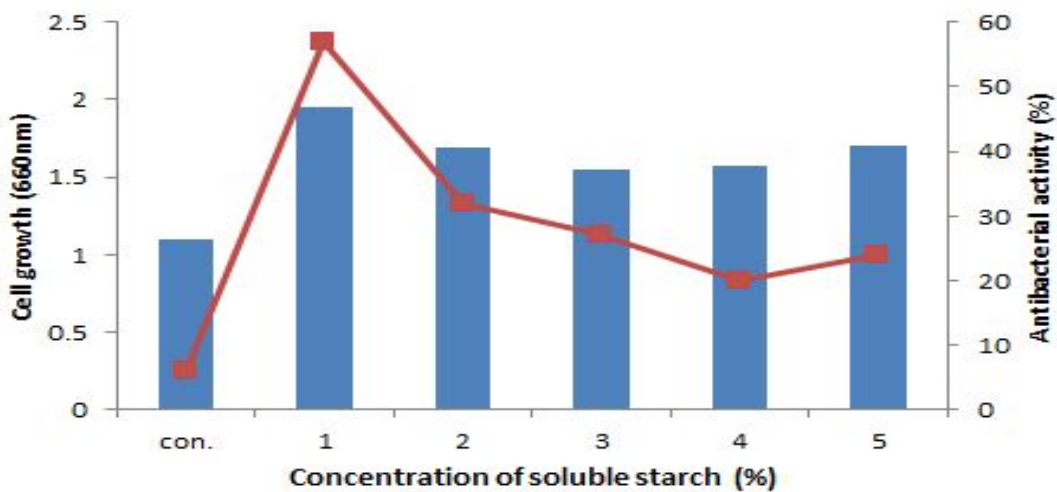


Fig 6. Effect of concentrations of soluble starch on cell growth and antibacterial activity of culture broth of the isolated *B. subtilis* IS-2.

3-3-2. 질소원의 영향

Bacillus sp. IS-2 균주의 생육에 미치는 질소원의 영향을 검토하여 Fig. 7에 나타내었다. 대조구는 GY배지에 1% soluble starch를 첨가하고 질소원을 제외한 배지를 사용하였다. 균주의 생육은 NaNO_3 , malt extract 첨가 순으로 성장이 높은 것을 확인하였으며, 항균활성은 대조구를 제외하고 모든 실험구에서 35~50%의 항균활성을 나타내었다. 질소원을 전혀 첨가하지 않은 대조구만 보았을 경우 탄소원을 제외한 대조구 배지에서 생육보다 낮은 생육을 보이고 있어 질소원 첨가가 *Bacillus* sp. IS-2의 생육에 중요한 역할을 한다고 생각된다. 실험구 중에서 비교하였을 경우 peptone 및 malt extract와 같은 유기질소원에서 대체적으로 높은 생육을 보였으며, malt extract는 45% 가까운 항균활성을 보였다. 또한 무기질소원은 NaNO_3 가 가장 높은 생육과 항균활성을 나타내었다. 따라서 유기질소원인 malt extract와 무기질소원인 NaNO_3 를 질소원으로 선정 하였으며, 질소원을 malt extract : NaNO_3 (1:1)비율로 첨가하여 최적농도를 조사하였다(Fig. 8). 그 결과 malt extract 및 NaNO_3 를 단독으로 첨가한 실험구보다 1% (0.5%+0.5%)로 혼합 첨가한 배지에서 더 높은 항균활성을 나타내었으며 균 생육 또한 양호한 것으로 조사되었다. 이상의 결과로 *Bacillus* sp. IS-2 균주를 배양할 때 질소원으로는 malt extract와 NaNO_3 를 각 각 0.5%씩 혼합하여 첨가하였다.

Chun등(2000)이 *B.alkalophilshaggy* JY-827균주로부터 Bacteriocin 생산조건을 검토할 때 KNO_3 를 포함한 무기질소원들 보다 yeastextract를 비롯한 유기질소원들이 효과적이라고 보고하였으며, Shomura 등(1983)은 *Micrommonospora* sp.SF-1927에 의한 항진균성 물질을 생산할 때 yeastextract가 가장 효과적이라고 보고하였다. Park 등(2007)과 Ryu 등(2007)이 발표한 논문에는 *Bacillus subtilis*의 질소원 단독첨가보다 두 종류의 혼합첨가가 균생육과 항균활성이 더 양호하다는 결과가 이루어져 본 연구의 질소원 혼합첨가가 더 효과적이라는 점과 일치한다.

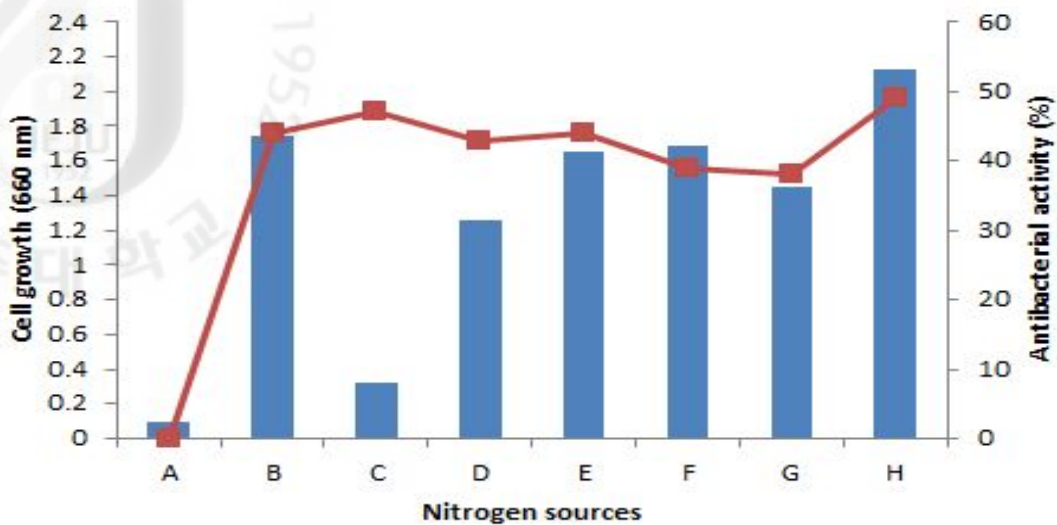


Fig. 7. Effect of various nitrogen sources on cell growth and antibacterial activity of culture broth of isolated *Bacillus* sp. IS-2

A: Control, B: Malt extract, C: Yeast extract, D: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, E: NH_4Cl F: NH_4NO_3 , G: Peptone, H: NaNO_3 .

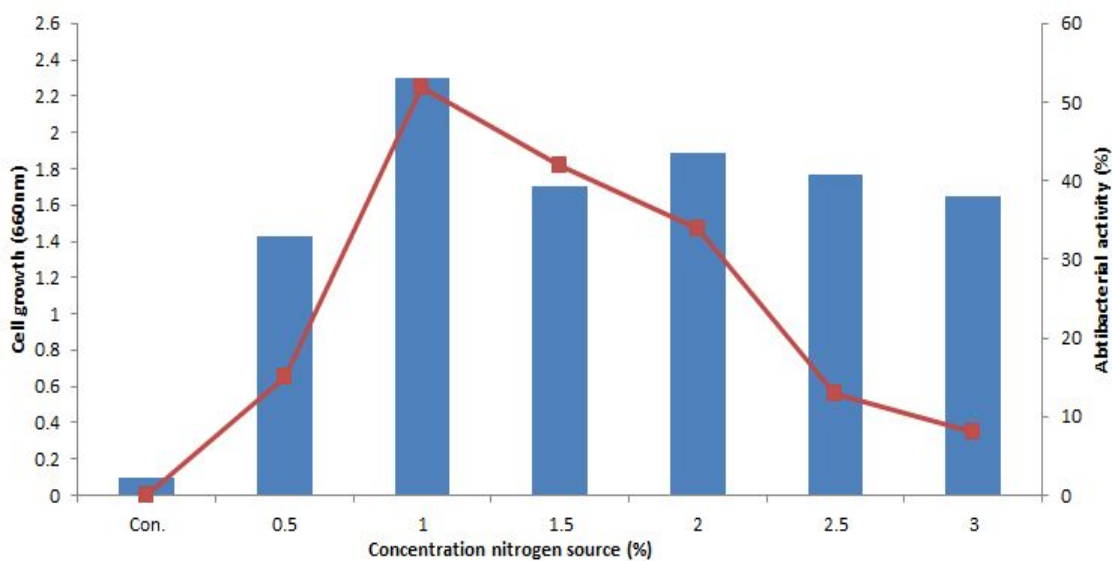


Fig. 8. Effect of concentration of yeast extract plus NaNO_3 (1:1) on cell growth and antibacterial activity of culture broth of the isolated *B. subtilis* IS-2.

3-3-3. 무기염의 영향.

무기염의 영향은 soluble starch 1% , malt extract 0.5% 및 NaNO_3 0.5%를 각각 첨가한 후 각종무기염의 농도를 0.1% 농도로 첨가하여 검토하였다(Fig. 9). 균 생육은 NaCl , KH_2PO_4 등을 첨가한 실험구 순으로 균주의 생육이 높았으며 $\text{CUSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 과 ZnCl_2 , 및 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 등의 금속염을 첨가한 실험구는 생육이 크게 억제 되었다. 또한 항균활성은 NaCl 이 가장 높은 활성을 나타내었으며, NaCl 을 제외한 모든 실험구에서는 Control에 반하여 낮은 활성을 나타내었다. 따라서 균주 생육과 항균활성이 양호했던 NaCl 을 *Bacillus* sp. IS-2의 무기염으로 선정하였으며, NaCl 의 각기 다른 비율을 첨가하여 최적농도를 검토하였다(Fig. 10). 그 결과 NaCl 를 첨가한 실험구 중 0.1% 첨가한 배지에서 가장 높은 항균활성과 생육을 나타내었다. 이상의 결과로 *Bacillus* sp. IS-2균주를 배양할 때 무기염으로는 NaCl 를 0.1%씩 첨가하였다.

Chun 등(2000)이 *B. alkalophilshaggy* JY-827 균주로부터 Bacteriocin 생산을 위한 배지의 무기염류를 조사한 결과, KH_2PO_4 를 사용하였을 때 우수한 성능을 보인 반면, $\text{BaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 를 제외한 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 및 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 등의 금속염 사용 시 생산능이 저하되었다는 보고와 유사하였다. Yoo등(1994)의 연구에도 KCl 을 첨가 하였을 때, 가장 양호한 결과를 보였으나 금속염 첨가에서는 그 생산능이 현격히 감소하였다고 보고하였다.

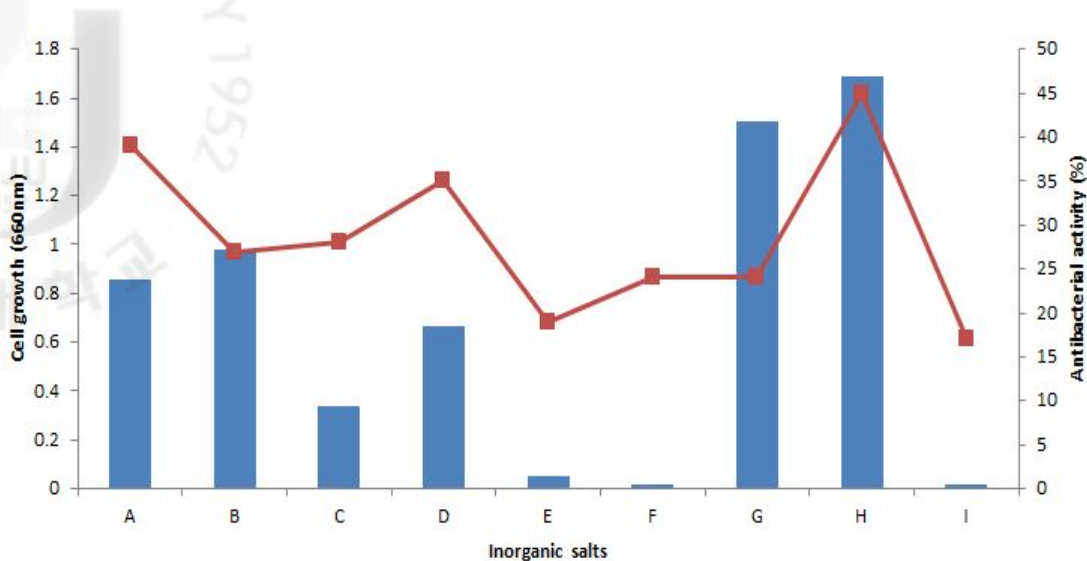


Fig. 9. Effect of various inorganic salts on cell growth and antibacterial activity of the isolated *Bacillus* sp. IS-2.

A: Control, B: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, C: $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, D: K_2HPO_4 , E: $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, F: $ZnCl_2$
 G: KH_2PO_4 , H: NaCl, I: $CoCl_2 \cdot 6H_2O$

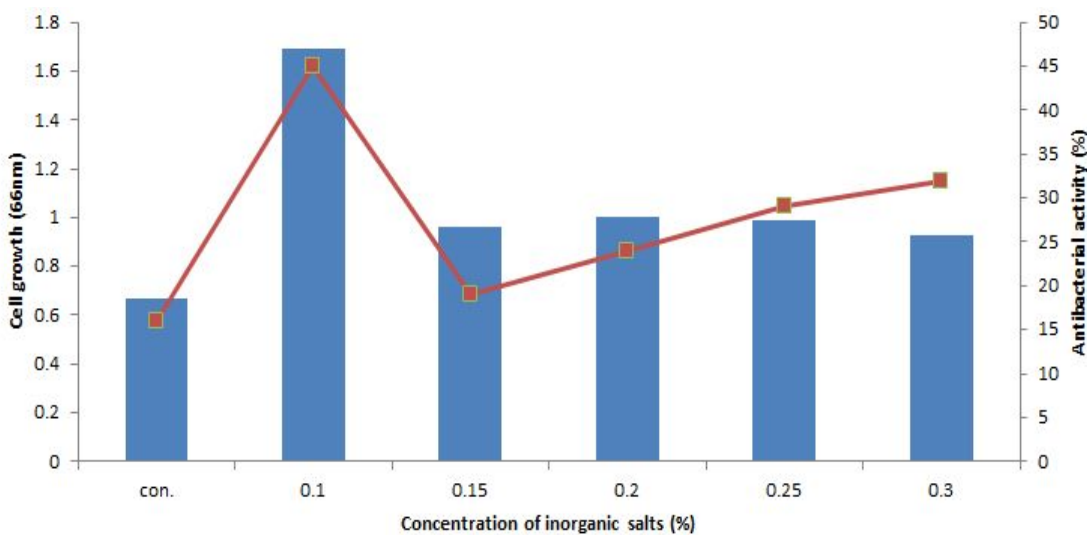


Fig. 10. Effect of concentrations of NaCl on cell growth and antibacterial activity of culture broth of the isolated *Bacillus* sp. IS-2.

3-3-4. 최적 온도, pH의 따른 생육과 향균물질 생산

배양온도가 *Bacillus* sp. IS-2의 생육 및 향균물질 생산에 미치는 영향을 검토하여 Fig. 11에 나타내었다. 배양온도를 15 ~ 40°C의 범위로 변환시키면서 배양한 결과 30 ~ 40°C 사이에서 생육이 왕성하였으며, 15, 20°C의 생육은 미비하였다. *Streptococcus iniae*에 대한 향균활성은 25 ~ 30°C범위에서 높게 나타났으나, 그에 반해 생육이 좋았던 40°C 실험구에서는 향균활성이 급격히 떨어지는 결과를 보였다. 따라서 *Bacillus* sp. IS-2가 생육하는데 최적온도를 35°C로 결정하였다. Shin 등(2000)은 *Bacillus* sp. 균주의 생육과 향생물질의 생산이 35°C에서 최대가 되었다는 보고가 있는데 본 연구에서 사용된 *Bacillus* sp. IS-2와 같은 결과를 나타내었다.

Bacillus sp. IS-2가 생육하는데 pH에 대한 영향을 조사하여 Fig. 12에 나타내었다. 배지의 pH를 4 ~ 10으로 조절하고 35°C에서 24시간 배양한 결과 pH 7~9의 범위에서 균 생육은 왕성하게 일어났지만, *S.iniae*에 대한 향균활성은 pH 8에서 높게 나타났다. 이 결과를 토대로 *Bacillus* sp. IS-2 균주의 생육 및 향균물질 생산을 위한 배지의 pH는 pH 8로 결정 하였다.

Joo 등 (2002)과 Jung 등(2003)은 각각 *Bacillus ehimensis*와 *Bacillus megaterium*이 초기 pH 8일 때 향생물질의 생산이 최대가 된다고 보고하여 본 실험 결과와 일치하는 경향을 나타내었다.

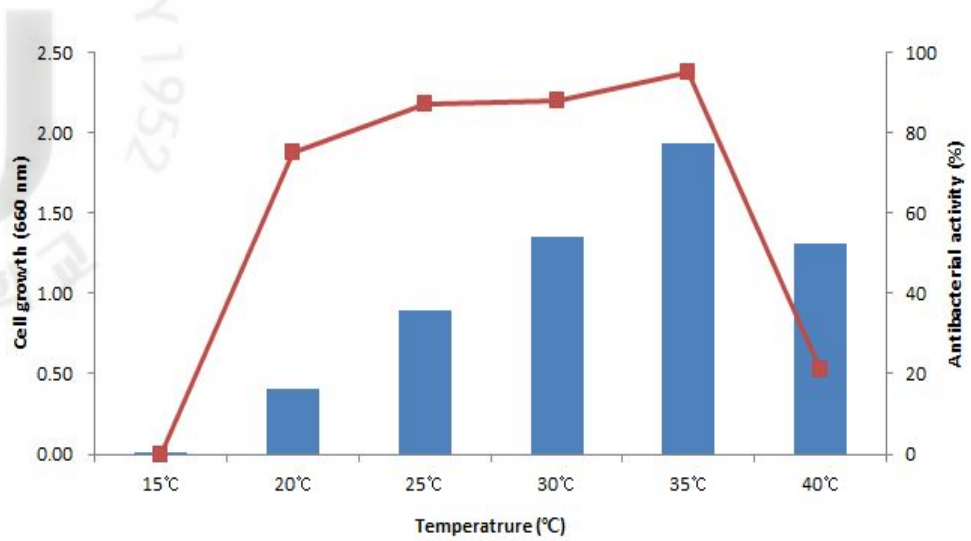


Fig. 11. Effect of temperature on cell growth and antibacterial activity of *Bacillus* sp. IS-2

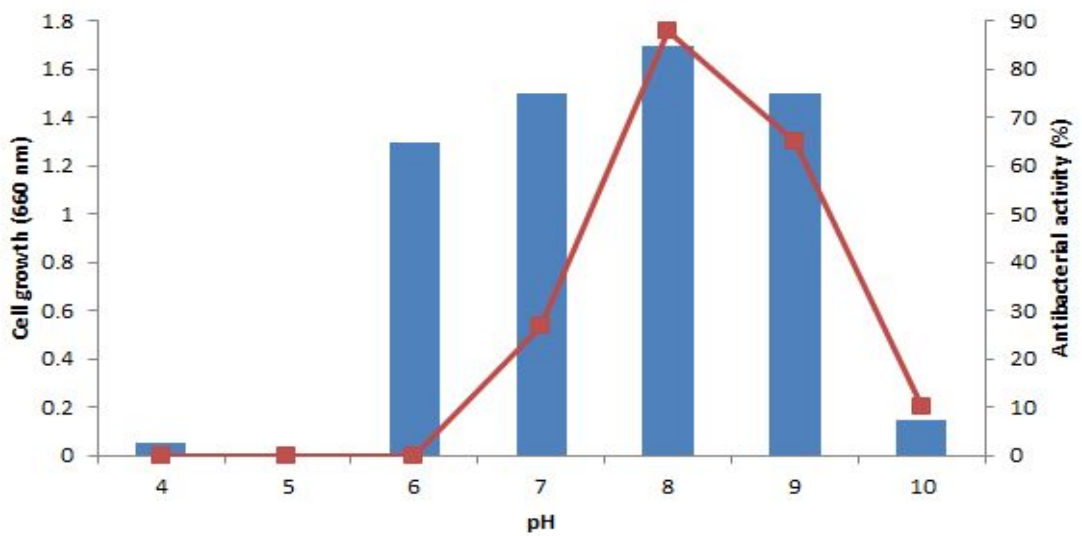


Fig. 12. Effect of pH on cell growth and antibacterial activity of *Bacillus* sp. IS-2.

3-3-5. 배양시간에 따른 향균물질의 생산

Bacillus sp. IS-2를 배양할 때 배양시간에 따른 균생육과 향균물질의 생산에 미치는 영향을 검토하여 Fig. 13에 나타내었다. 균생육은 120 시간까지 완만하게 증가하다가 균 생육이 더 이상 증가하지 않는 정지기를 보였다. *S. iniae*의 향균활성은 24시간이 지난 후부터 나타나기 시작하여 서서히 증가하다 120시간째부터 가장 높은 향균활성을 보였다. 이상의 결과를 바탕으로 균생육과 향균활성이 가장 높은 120시간을 *Bacillus* sp. IS-2의 배양시간으로 결정하였다.

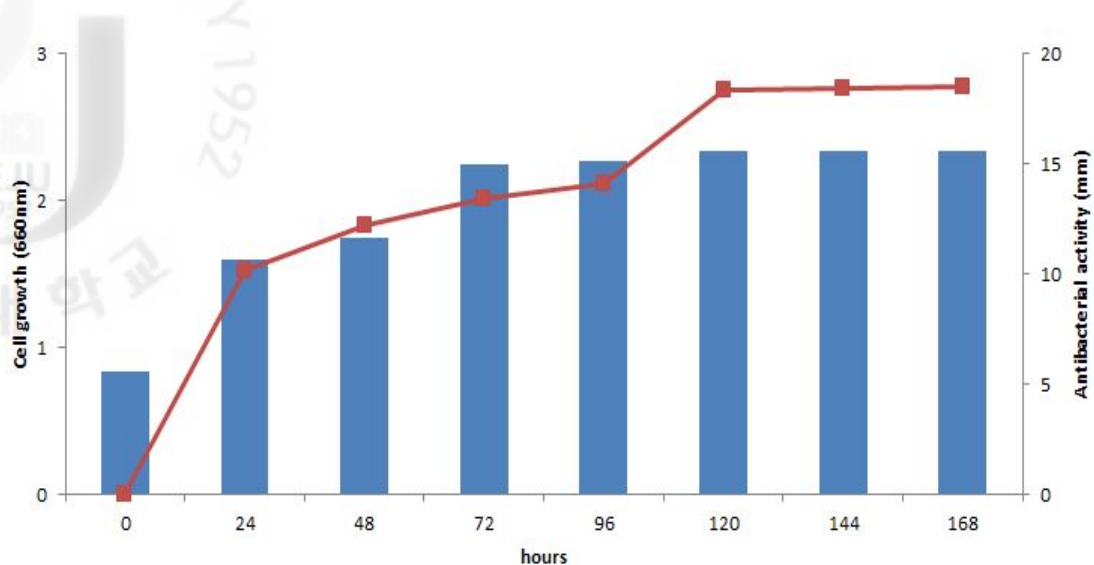


Fig. 13. Effect of culture time on cell growth and antibacterial activity of *B. subtilis* sp. IS-2.

Table 7. Optimum medium compositions and culture conditions for antibiotic production by *Bacillus* sp. IS-2.

Ingredient	Concentration (w/v, %)
Soluble starch	1
malt extract	0.5
NaNO ₃	0.5
NaCl	0.1
Temperature : 35°C, pH : 8.0, Culture time : 120 hours	

3-3-6. 항균물질의 첨가에 따른 피검균 (*S. iniae*)의 세포형태 관찰

SEM 사진을 통하여 공시균주의 항균물질이 *S. iniae*에 대한 항균성 기작을 알아본 결과 피검균의 세포벽이 붕괴되는 현상이 확인 되었다. (Fig. 14) 타연구에 의하면 Bacteriocin이 활성을 나타내기 위해서는 세포벽과의 반응이 필요하며, 여기에 관여하는 것이 세포표면에 존재하는 proteinous receptor라고 보고 하였다. (Montville and Bruno,1994;Van belkum et al.,1991) 즉 receptor와 결합하여 항균물질인 bacteriocin이 세포벽에 구멍을 형성하여 세포내 세포질의 용출을 유도 할 수 있다. 하지만 이 기작의 증명은 좀 더 많은 연구가 요구되며, TEM(Transmission electron microscope)를 이용하여 세포벽 파괴에 의한 세포질 용출 및 세포질 물질감소 등의 작용을 파악하여야 항균기작이 세포벽 파괴인지 세포내의 물질 합성 저해인지를 추측할 수 있다.

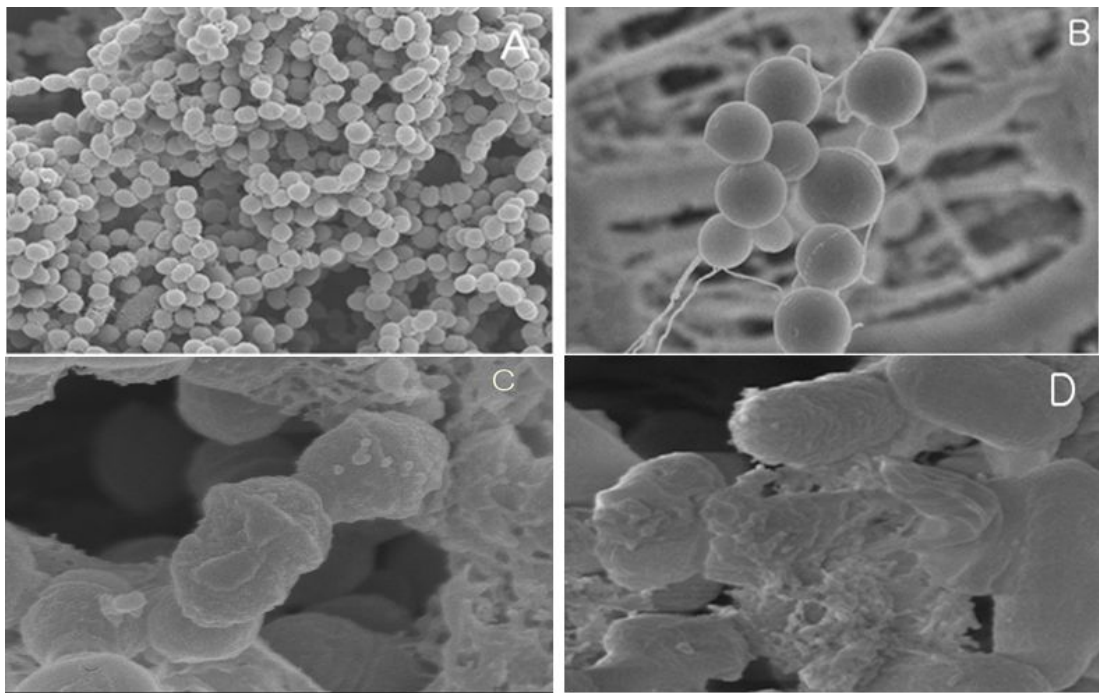


Fig. 14. Scanning electron micrographs of *S. iniae* treated with strain IS-2 solvent extracts. A,B: Untreated, C,D: Treated

3-4. *Bacillus* sp. IS-2의 첨가에 따른 양식넙치의 면역반응과 병저항성

3-4-1. 성장도 조사

12주 동안 각기 다른 농도의 Probiotic을 첨가한 실험구와 Probiotic을 첨가하지 않은 대조구의 양식 어류의 체중변화에 대한 결과를 Fig. 15에 나타내었다. 결과를 보면, Probiotic을 첨가한 사료를 급이한 넙치와 Probiotic을 첨가하지 않은 일반 사료를 급이한 넙치는 사육 8주 동안 비례적으로 성장하였다. 하지만 마지막 12주 성장 실험 후 최종 어체의 평균 무게를 측정한 결과 10^5 cfu/kg⁻¹를 첨가한 사료로 급이한 실험구에서 대조구에 비해 약 13%정도 높게 나타났다. 이와 같은 결과는 probiotic을 급이한 실험어구에서 대조구에 비해 소화능력의 향상으로 인한 체중의 증가가 되었다는 사실을 짐작할 수 있다.

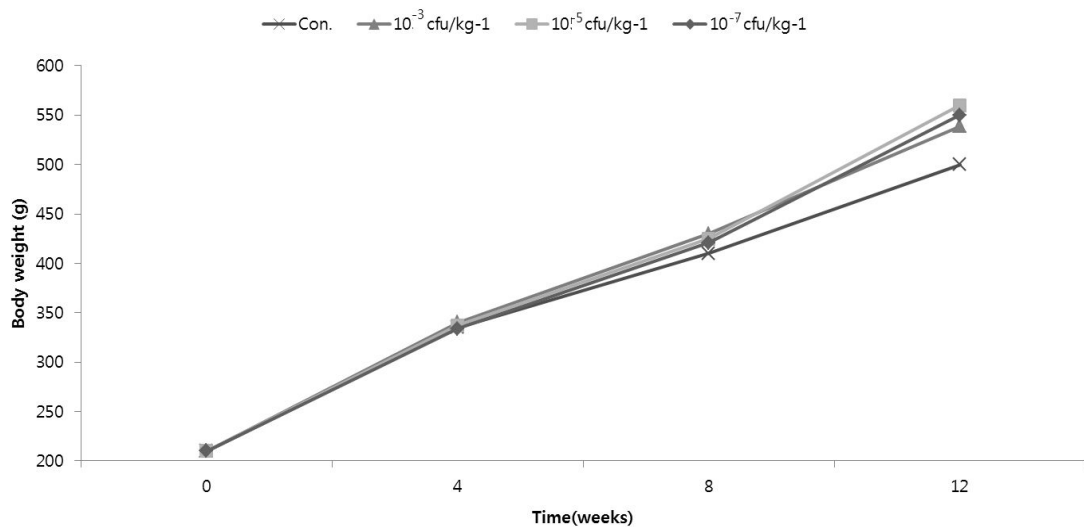


Fig. 15. Weight (g) of Olive flounder that was fed with probiotic and non-mixed control diet for 12 weeks and weighed every 2 weeks.

3-4-2. 혈액학적 분석

총 단백질은 혈청 내 존재하는 단백질을 의미하는 것으로. 영양부족, 만성 감염, 간경화, 신증후군, 만성 염증이 있으면 단백질량이 감소한다. AST (GOT)는 주로 심장과 간에 존재하는 효소로 신장, 골격근육에도 소량 존재하고 이 조직들이 각종 질병에 의해 파괴되면 혈액으로 유출되어 증가하게 된다. 급·만성 염증, 간염, 담낭염, 간경화가 있을 시에는 증가하고, ALT (GPT)는 AST와 유사 기능을 한다. 혈당 (glucose)은 생체의 에너지원으로 가장 중요한 물질로 식사나 당분 섭취 후에는 상당량 증가 후 2시간 이후에는 정상으로 돌아오며 당뇨가 있으면 증가한다. 콜레스테롤은 중성 지방과 함께 지방 성분으로 식생활과 관계가 깊고 드물기는 하지만 유전적인 지질 대사 이상 때문에 혈중 콜레스테롤이 높을 수 있다. 영양부족, 만성 간질환, 갑상선 항진증 등이 있으면 감소하고, 고혈압, 동맥경화, 당뇨병, 간기능 장애, 갑상선 기능장애 등이 일어나면 증가한다. 중성 지방의 경우는 신체 내 각종 지방 조직 주성분으로 체내의 에너지 저장과 관계가 있고 식생활과 관계가 깊고 오히려 콜레스테롤 보다 동맥경화의 원인으로 중요시 되며 상동맥경화증이 있으면 증가 한다. 인(Phosphorus)은 체내의 에너지 대사에 꼭 필요한 물질이며 신체 구성 성분으로써도 중요한 물질이다. 부갑상선 기능저하증이 나타나면 감소하고, 부갑상선기능항진증, 신부전증, 비타민 D 과다증이 있으면 증가한다. 헤모글로빈은 적혈구 속에 들어 있는 혈액소로 산소를 운반하는 역할로 헤모글로빈양이 부족하면 빈혈 등을 유발할 수 있다

본 실험의 실험구와 대조구의 혈액학적 분석결과를 Table 10에 나타내었다. 간독성을 나타내는 지표인 GPT 및 단백질 및 총콜레스테롤 함량은 실험구간에서 유의적인 차이가 나지 않았으며, 이는 체내의 장내에 흡수되는 생균제로 인한 독성이나 어체 내 문제가 발생하지 않는 것으로 사료 된다. 그러나 Glucose의 경우 실험이 종료된 시점에서 증가되는 변화를 확인할 수 있었는데 이는 수질악화 및 수온의 변화에 따른 스트레스 반응 때문이라 생각 되며 이러한 glucose의 증가경향은 참돔, striped bass, chinook salmon 등을 이용한 수온변화 연구를 통하여 보고되고 있다. (Ishioka, 1980; Barton and Schreck, 1987; Davis and parker, 1990)

Table 08. Serum analysis of Olive flounder that was fed with *Bacillus* sp. IS-2-mixed and non-mixed control diet for 12 weeks

Week	Group	GOT (U/L)	GPT (U/L)	TP (g/dL)	GLU (mg/dL)	TP (g/dL)	GLU (mg/dL)
0	Con.	21.5±2.5	24.3±0.5	4.2±0.2	21.9±2.0	4.2±0.2	20.1±2.0
	10 ³	16.8±1.5	22.1±0.9	3.2±0.1	27.2±1.9	3.2±0.1	23.2±1.9
	10 ⁵	21.5±2.2	19.4±2.1	2.9±0.2	33.0±4.3	2.9±0.2	22.0±4.3
	10 ⁷	22.6±1.7	17.5±3.6	4.1±0.4	32.1±0.6	4.1±0.4	19.1±0.6
12	Con.	19.5±1.5	34.5±0.1	2.3±0.3	98.2±4.5	2.3±0.3	26.2±4.5
	10 ³	16.2±2.3	61±0.9	3.8±0.3	101.1±2.4	3.8±0.3	27.1±2.4
	10 ⁵	14.0±1.9	55±2.9	4.1±0.4	88.2±1.4	4.1±0.4	25.2±1.4
	10 ⁷	21.6±3.6	58±3.4	3.9±0.1	71.6±3.6	3.9±0.1	29.6±3.6

3-4-3. Respiratory burst activity

어류에 있어 비특이적 면역반응이 얼마나 증대 되었는지를 가장 잘 반영할 수 있는 필수적인 척도로서 식세포활성 (phagocyte activity) 측정이 많이 사용된다. Professional phagocytes (granulocytes, monocytes, macrophage)의 호흡 급증은 $\cdot O_2^-$ 의 감소를 의미한다. 혈장과 phagosomal membranes에 있는 NADPH oxidase에 의해 O_2 가 $\cdot O_2^-$ 로 변한다. 이 후에 superoxide는 자연유발적인 효소로 hydrogen peroxide (H_2O_2), hypochlorous acid (HOCl), hydroxyl radical ($\cdot OH$), singlet oxygen (1O_2)등의 다른 종류의 ROS로 전환된다. 포유동물에서는 숙주방어에 있어 respiratory burst의 중요한 점은 NADPH oxidase의 결점에 의해 만성육아종을 앓는 사람은 NADPH 산화 효소가 없기 때문에 respiratory burst를 일으킬 수 없는 것으로 알려져 있다.

어류 식세포도 respiratory burst 반응을 할 수 있는 NADPH 산화효소의 활동 결과가 포유동물과 유사하게 나타났으며, respiratory burst는 어류 건강상태를 확인 할 수 있는 bioindicator 중 하나이다. 현재까지 식세포의 활성을 측정하기 위해 사용되어진 방법은 식균율의 변화, 화학주성 변화 및 호흡폭발의 변화 등이다. Respiratory burst란 식세포가 식작용 동안 혹은 다른 물질들에 의해서 자극받았을 때 산소 소비량이 증가함과 동시에 O_2^- , OH^- , H_2O_2 와 같은 산소라디칼 (reactive oxygen intermediates, ROIs)을 다량으로 방출하는 현상을 말하며, 이러한 ROIs는 병원체를 죽이는데 매우 중요한 역할을 한다 (Siwicki, 1994). 이러한 호흡폭발을 측정하는 방법으로 NBT법이 많이 사용되어져 왔으며, 최근 chemiluminescence (CL)법이 일부 사용되고 있다.

본 실험에서는 NBT법을 사용하였으며, 실험이 시작된 후부터 모든 실험구에서는 대조구보다 높은 값을 나타내었으며, 4주가 지나기 시작한 후 부터는 10^5 cfu/kg⁻¹ 실험구와 10^7 cfu/kg⁻¹에서 유의적으로 높은 값을 나타내었다(Fig. 16). 이러한 결과는 대하, 무지개송어, 터봇 및 유럽산 뱀장어에게 *Bacillus* spp. 및 *Saccharomyces cerevisiae*를 공급하였을 때 NBT 활성 값을 증가시킨다는 보고와 일치하며 (Deng-Yu Tseng et al., 2009; Anderson et al., 1979; Griffin, 1983; Olesen, 1991; RingØ et al., 1996; Austin, 1998; O'Sullivan,

1999; Chang and Liu, 2002; Jeong et al., 2006; Taoka et al., 2006) 이것은 어체 내에서 생균체가 어류의 면역체계를 직간접적으로 영향을 끼쳐, 이를 통해 산소 레디칼을 중화시키는 것으로 여겨지며, 이로 인해 식세포의 호흡폭팔시 발생하는 ROIs (reactive oxygen intermediates)의 생성에도 영향을 미친 것으로 사료된다.

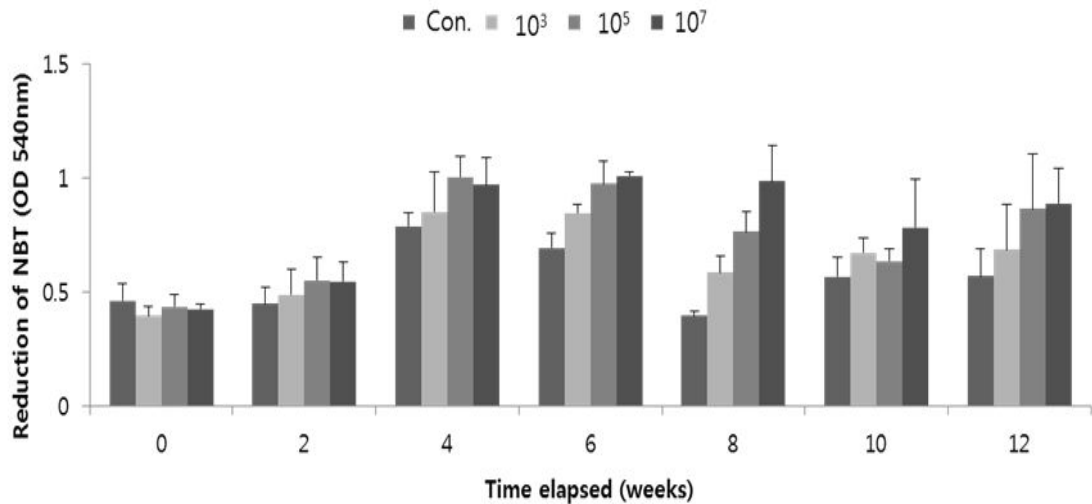


Fig. 16. NBT reduction of Olive flounder that was fed with *Bacillus* sp. IS-2 and non-mix control diet for 12 weeks

3-4-4. 혈청의 lysozyme 활성

아가미, 피부, 소화계, 생식 이노관 등은 박테리아, 곰팡이, 바이러스 및 원생 미생물에 대한 어류 감염의 초기 단계에서 방어를 한다. 이러한 표면들은 물리학적 장벽이면서 항 미생물 물질을 함유하고 배출한다. 점액과 배상세포에 있는 점액은 세 가지 방어 기작을 가진다. 첫째는 점액은 미생물의 껍질을 지속적으로 벗겨 미생물의 생성을 저지한다. 둘째, 미생물이 생성되었을 시 점액은 교차하여 장벽을 생성한다. 마지막으로 피부의 점액 및 다른 표면점막에는 항미생물 성질을 지니는 다양한 체액 요인이 함유되어 있다. 이런 것의 예로 lysozyme, complement, lectins, proteolytic enzyme 등이 있으며 최근에는 어류 점막에서 여러 가지 추가적인 방어 기작이 알려지고 있다. 아가미에 의한 NO 생성과 피부 단백질의 항미생물 펩타이드가 그 예이다. 라이소자임은 세균 벽의 N-acetylmuramic acid와 N-acetylglucosamine 사이의 β -1,4 결합을 분해하여 세균을 사멸시키는 효소이다. 라이소자임은 그람 양성균의 세포벽에는 직접작용하고, 그람 음성균에 대해서는 항체와 보체의 작용을 증가시켜준 후에 펩티도 글리칸 층을 분해시킨다. 본 실험 결과 *Bacillus* sp. IS-2 생균제를 첨가한 사료를 식이한 실험구가 대조구보다 더 높은 lysozyme 활성이 있는 것으로 나타났다 (Fig. 17). 실험이 종료된 시점에서는 10^5 cfu/kg⁻¹ 그룹의 실험구에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 이와 같은 결과는 *Bacillus subtilis* 와 *S. cerevisiae*를 양식 넙치 사료에 첨가 후 투여하여 lysozyme 활성 값이 증가했다는 결과와 유사하며, (Ramasamy harikrishnan et al., 2011) *S. cerevisiae* p13를 그루퍼 사료 내 각기 다른 농도로 투여하였을 시에 10^5 cfu/kg⁻¹ 실험구에서 가장 높은 lysozyme 활성 값을 확인하였다는 보고와도 일치 한다. (Chiu-hsial chiu et al., 2010)

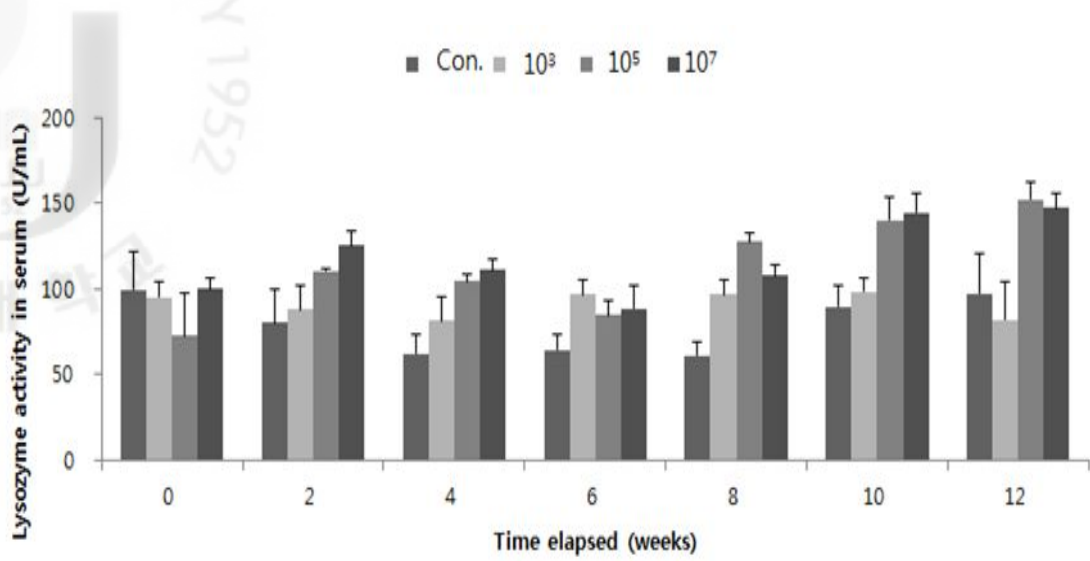


Fig. 17. Lysozyme activity in serum of Olive flounder that was fed with *Bacillus* sp. IS-2 and non-mix control diet for 12 weeks.

3-4-5. Phagocytosis activity

식세포 활성 측정 결과 실험 사료를 투여하기 시작 한 이후 모든 실험구에서는 대조구에 비해 높은 활성을 유지되었으며, 특히 10^5 cfu/kg⁻¹ 그룹에서는 8주차 때부터 다른 농도의 실험구에 비해 비교적 높은 활성을 확인 할 수 있었다. 이와 같은 결과는 이상의 실험결과로부터 probiotics를 사료 내 첨가하여 투여하는 것이 어류의 질병저항성에 중요한 역할을 하는 식세포 활성이 증가되는 것으로 확인 되었으며, 10^3 cfu/kg⁻¹ 이상의 농도로 첨가하는 것이 식세포 활성 증강에 있어서 높은 값을 나타내는 것을 확인하였다.

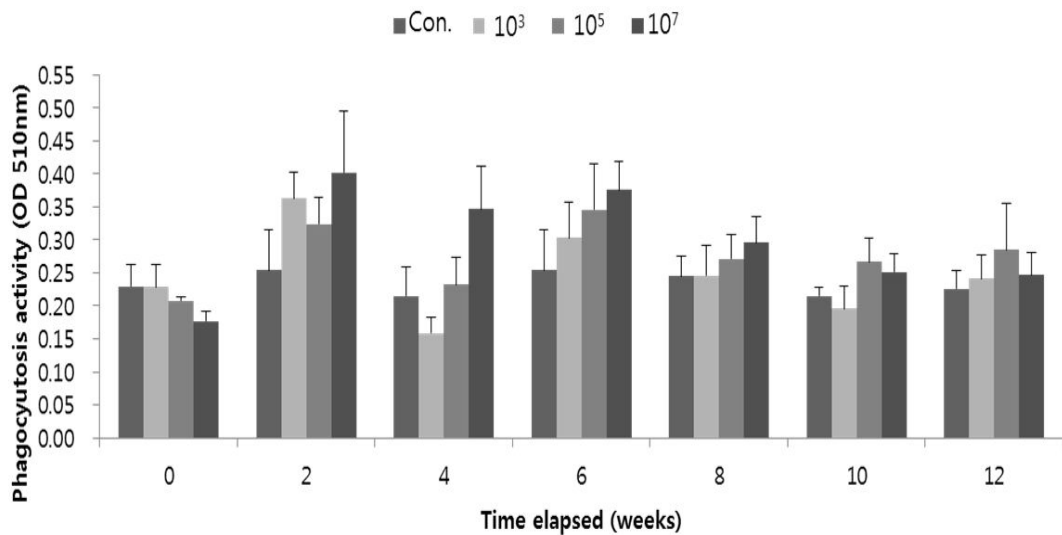


Fig. 18. Phagocytosis activity in serum of Olive flounder that was fed with *Bacillus* sp. IS-2 and non-mix control diet for 12 weeks.

3-4-6. 어병세균에 의한 공격실험

생균제를 첨가한 사료를 투여한 실험구와 대조구의 어병세균에 대한 공격실험의 결과를 Fig. 19.에 나타내었다. 10^5 CFU/ml의 농도로 조정된 *S. iniae* 모든 실험이 종료된 시기에 집중하여 20일 동안 누적 폐사율을 확인 하였는데 5일 째 부터 모든 실험구와 대조구에서 폐사가 시작되어 10^3 cfu/kg⁻¹ 실험구에서는 73%의 폐사율을 10^5 cfu/kg⁻¹ 실험구에서는 53%의 폐사율을 나타냈으며, 10^7 cfu/kg⁻¹ 실험구에서는 45%의 폐사율을 보여 Control에 비해 많게는 55% 이상의 높은 생존율을 보여 그간의 비특이적 면역 활성의 DATA를 뒷받침 하는 결과를 확인 하였다.

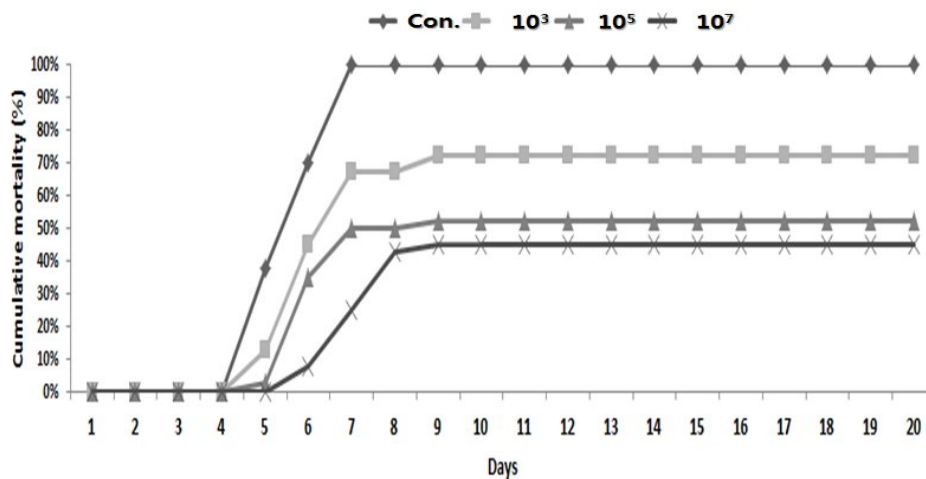


Fig. 19. Cumulative mortality (%) after intraperitoneal injection of *Streptococcus iniae* in Olive flounder.

3-4-7. 사료 첨가 내 사용된 공시 균주의 장내 확인

모든 실험이 종료된 후 Control 사료를 급여한 대조구와 각각의 실험사료를 급여한 실험구 내의 실험어 장을 분리하여 배양 된 균체를 DNA를 분리 한 후, 제작 된 detection primer를 이용한 PCR 결과를 Fig. 20.에 나타내었다. 일반사료를 투여한 Control를 제외한 모든 실험구에서 1465bp 의 PCR product를 확인할 수 있었다. 이는 사료를 통해 섭취된 실험 균주가 위와 같은 소화기관을 통하여 장 내에 도달하였음을 알려주는 결과 이며, probiotic으로 이용된 *Bacillus* sp. IS-2 실험 균주로 인한 비특이적 면역능 활성 증가 및 인위감염을 통한 폐사율 감소를 증명할 수 있는 결과라 사료 된다.

본 실험의 결과를 통해 *Bacillus* sp. IS-2 첨가 사료를 식이한 넙치의 비특이적 면역반응을 증가 시킨다는 것을 확인 할 수 있었다. 이는 미생물학적 활동에 의한 병원균에 대한 길항작용 및 면역자극 효과, 소화 흡수의 촉진 등과 같은 복합적인 작용에 의한 결과라 사료된다. 앞으로 Probiotic의 사료 내 첨가 투여는 급속한 양식업의 팽창과 더불어 고밀도 사육으로 인한 많은 어병 발생요인들에 대한 저항성을 향상 시킬 수 있을 것으로 판단된다.

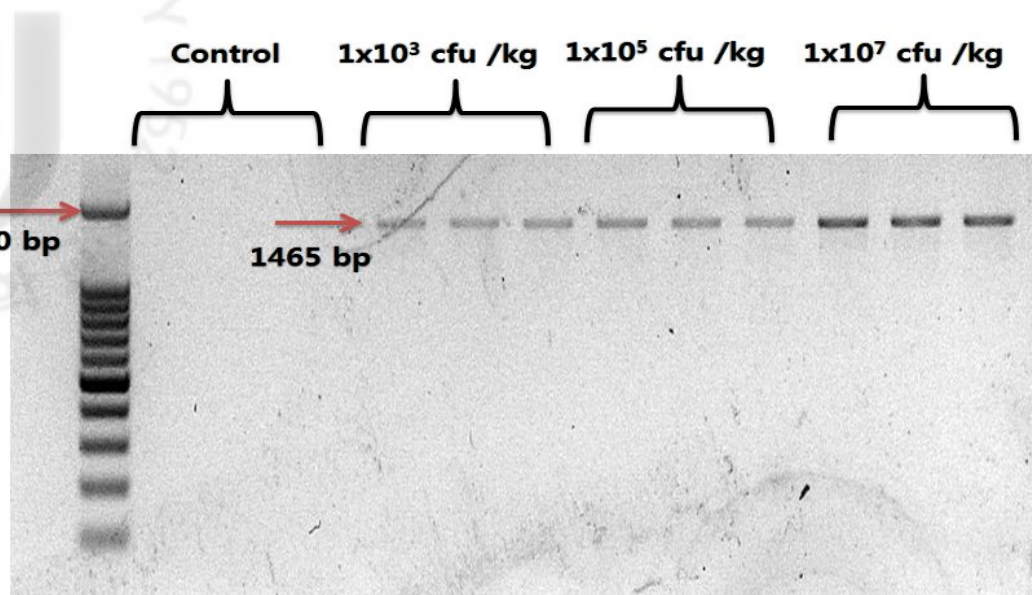


Fig. 20. Detection of *Bacillus* sp. IS-2 in the intestines of *Bacillus* sp. IS-2 fed the control diet and *Bacillus* sp. IS-2 containing diets at 10^3 , 10^5 , and 10^7 colony-forming units(cfu)(kg diet)⁻¹ by gel electrophoresis of polymerase chain reaction products amplified using the specific primer pair, forward primer(27F): 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' reverse primer(1492R): 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3', of a specific open reading frame from the *Bacillus* sp. genome.

IV. 요약

본 실험의 목적은 어류질병성 세균에 대한 넓은 항균활성 및 내산성을 갖고 있는 유용한 probiotic 후보균주를 선별하여 어류의 세균성 질병 예방 혹은 면역능을 강화시킴으로써 양식 산업의 효율성을 증대시키고자 한다.

5종의 후보 균주를 김치, 양식 넙치의 장 그리고 젓갈류 등에서 분리된 후보 균주를 이용하여 항균활성, 내담즙성, 내산성 등을 조사하여 최종적으로 *Bacillus* sp. IS-2를 선발하여 배양학적 특성, 형태학적 특성, 유전학적 특성, 생리학적 특성을 확인하였다. 공시균주 *Bacillus* sp. IS-2를 동정하여 본 결과 *Bacillus subtilis*, *Bacillus velzensis*, *Bacillus amyloliquefaciens* 로 동정이 되어 *Bacillus* sp. IS-2로 명명하였으며, 항균물질을 최대량 생산하기 위한 최적 배양조건을 검토한 결과 탄소원은 Soluble starch 1%, 질소원은 malt extract 0.5%, NaNO_3 0.5%, 무기염은 NaCl 0.1%로 조사되었고, 배양온도는 35°C, 배지의 초기 pH는 8, 배양시간은 120시간으로 조사되었다.

분리 균주를 사료 내 첨가하여 10^3 , 10^5 , 10^7 CFU/kg의 농도로 제작하여 1일 2회 (오전 8시, 오후 5시) 어체 중의 2%씩 총 12주 동안 투여하여 실험이 종료될 시점까지 2주의 간격으로 Lysozyme activity, Phagocytosis activity, Respiratory burst 와 같은 비특이적 면역반응 조사를 해본 결과 모든 실험구에서는 대조구보다 높은 활성을 확인하여 사료첨가제인 *Bacillus* sp. IS-2 로 인한 면역활성이 증가된 것을 확인 할 수 있었다. 실험이 종료된 시점에서 실시한 병원균인 *S.iniae*를 이용한 인위감염에 의한 폐사율 측정에서 역시 모든 실험구에서 대조구 보다 많게는 55% 이상의 높은 생존율을 보였다. 또한 probiotic를 급이한 어류 장 내에 정착 확인을 위해 universal primer를 이용하여 PCR를 수행한 결과 대조구를 제외한 모든 실험구에서 1465 bp 의 pcr product를 확인할 수가 있었다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 사료 내 첨가된 *Bacillus* sp. IS-2 인 probiotic가 양식 넙치의 면역능 향상과 어류 질병에 대한 저항성 증강에 효과가 있는 것으로 사료된다. 또한 향후 probiotics의 기작규명에 있어서도 본 연구결과의 생리학적 설정 지표가 유용하게 활용 될 수 있을 것이라 사료된다.

V. 감사의 글

이 논문이 완성될 수 있도록 많은 조언과 격려를 해 주신 허문수 교수님께 감사의 말씀을 올립니다. 그리고 학부생부터 지금까지 많은 관심과 가르침을 주신 이기완 교수님, 송춘복 교수님, 최광식 교수님, 전유진 교수님, 이경준 교수님, 이제희 교수님, 김기영 교수님, 정준범 교수님, 전유진 교수님, 이승현 교수님, 정석근 교수님께도 진심으로 감사의 마음을 드립니다. 제 영원한 큰 형님인 만철이형님, 멘토인 주상이형님 너무나 감사드립니다. 형님들이 없었더라면 대학원 생활은 꿈도 못 꿀 것이 었습니다. 이젠 직장인인 용재, 동민 못난 선배 만나서 고생만 하는 우리 실험실 식구인 동휘, 승현, 소현, 민선, 경미, 원용이와 인도에서와 항상 저에게 도움만 주는 Mr. hari 에게 이 글을 빌어 진심으로 감사의 인사를 드립니다.

그리고 대학생활 동안 항상 저를 동생처럼 아껴주었던 문휴형님, 상규형님, 석천이형, 영득이형, 상혁이형, 성명이형, 현기형과 제 동기들인 노숙자 창수, 승민, 준상이형님, 창희, 병훈이, 지훈이형, 혜미, 효원이, 창익이형, 지혁이형과 영원한 제 동기인 창영이에게 감사하단 말, 수고했다는 말 전합니다.

오늘날에 제가 있기까지 보살펴주시고, 걱정해주시고, 지켜봐주시는 사랑하는 아버지와 어머니 감사합니다. 이제 새로운 시작이라 생각하여 더욱 열심히 살겠습니다. 그리고 공부하느라 고생하는 우리 동생 소영이 사랑한다. 모자란 저에게 예쁜 딸은 주시고 항상 걱정만 하시는 장인어른, 장모님. 더욱더 열심히 살면서 행복한 가정의 남편 되겠습니다. 끝으로 10여년 동안 옆에서 항상 뒷바라지 해주고, 걱정해주고 사랑해 주는 내 와이프 수연이와 엄마 뱃속에서 세상 볼 날만 기다리고 있는 사랑하는 우리 딸 다인이에게 이 논문을 바칩니다.

VI. 참고 문헌

- Aoki, T., K. Tamaki. and T. Kitao. 1990. Spread of drug-resistant strains of *Streptococcus* sp. in yellowtail farms. 2nd Asian Fish. Forum, Tokyo, 17-22. 697-699.
- Arima, K., A. Kakinuma, and G. Tamura. 1968. Sufactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: Isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 31: 488-494
- Ashenafi, M. 1991. Growth of *Listeria monocytogenes* in fermenting tempeh made of various beans and its inhibition by *Lactobacillus plantarum*. *Food Microbiol.* 8: 303-310.
- Austin, B., L. F. Stuckey, P. A. W. Robertson, I. Effendi and D. R. W. Griffith. 1995. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *J. Fish Dis.* 18:93-96.
- Baeck, G. W., J. H. Kim, D. K. Gomez, and S. C. park, 2006. Isolation and characterization of *Streptococcus* sp. from diseased flounder (*Paralichthys olivaceus*) in jeju island. *J. Vet. Sci.*, 7:53-58
- Barefoot, S. F. and C. G. Nittle. 1993. Antibiosis revisited bacteriocin produced by dairy starter culture. *J. Dairy Sci.* 76: 2366
- Barefoot, S. F. and C. G. Nittle. 1993. Antibiosis revisited bacteriocin produced by dairy starter culture. *J. Dairy Sci.* 76 : 2366
- Bauer, A. W., W. M. Kirby, J. C. Sherris, M. Turck, 1996 Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J. Clin. Pathol.* 5(4):439-496

Bruno, M. E. C. and T. J. Montville. 1993. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3003-3010.

Chateau, N., I. Castellanos, and A. M. Deschamps. 1993. Distribution of pathogen inhibition in the *Lactobacillus* isolates of a commercial probiotic consortium. *J. Appl. Bacteriol.* 74: 36-40.

Chio, H. J., C. J. Cheigh, S. B. Kim, and Y. R. Pyun, 2000. Production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from Kimchi. *J. Appl. Microbiol.* 88 : 563-571

Choi, H. J., H. S. Lee., S. Her, D. H. Oh, and S. S. Yoon. 1999. Partial characterization and cloning of leuconocin J, a bacteriocin produced by *Leuconostoc* sp. J2 isolated from the Korean fermented vegetable Kimchi. *J. Appl. Microbiol.* 86: 175.

Chun, J. Y., I.H. Ryi, S. U. Lee, and K. S. Lee, 2000. purification and properties of anticaries microbial agent by *Bacillus alkalophilus* JY-827. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 28 : 270-278

Cirigliano, M. C. and G. M. Carman, 1984. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 48 : 747-750.

Collins, M. D. and G. R. Gibson. 1999. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *Am. J. Clin. Nutr.* 69(5): 1052-1057.

Conway, P. L., 1996. Development of intestinal microbiota. In: Mackie, R. I., B. A. White., R. E. Isaacson. Eds. *Gastrointestinal Microbiology*. Vol. 2.

Cooper, D. G., C. R. MacDonald, S. J. B. Duff, and N. Kosaric, 1981 Enhanced

production of Surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product Removal and Metal cation Additions. *Appl. Environ. Microbiol.* 42 : 408-412

Corsetti, A., M. Gobbetti, and E. Smacchi. 1996. Antimicrobial activity of sourdough lactic acid bacteria: isolation of a bacteriocinlike inhibitory substance from *Lactobacillus sanfrancisco* C57. *Food Microbiol.* 13: 447- 456.

Corsetti, A., M. Gobbetti, J. Rossi, and P. Damiani. 1998. Antimould activity of sour ough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50 : 253-256.

Deng-Yu, T., P. H. HO, S. Y. Huang and Chun-Hung Liu, 2008 Enhancement of iuumunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20. *Fish&shellfish immunology* 26(2) ; 339-344

Deziel, E., G. Papuette, R Villemuer, f. Lepine, and F, F, Bisailon, 1996 Biosurfactant production by asoil *Pseudimonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 : 1908-1912.

Eldar, A., O .Shapiro, Y. Bejerano, and H. Bercovier. 1995. Vaccination with whole cell vaccine and bacterial protein extract protects tilapia against *Streptococcus difficile* meningo encephalitis. *Vaccine.* 13: 867-870.

Fiechter, A. 1992. Biosurfactant: moving towards industrial application. *Trends Biotechnol.* 10 : 208-217.

Fuller, R.,. 1989. Probiotics in man and animal. *J. Appl. Bacteriol.* 66 : 365-378.

Gastrointestinal Microbes and Host Interactions. Chapman & Hall Microbiology

Series, Chapman & Hall, New York. 3-38.

Gatesoupe, F.J., T. Arakawa, and T. Watanabe. 1989. The effect of bacterial additives on the production rate and dietary value of rotifers as food for Japanese flounder, *Paralichthys oliaceus*. *Aquaculture*. 83: 39-44.

Georgiou, G., S. C. Lim, and M. M. Sharma. 1992. surface-active compounds from microorganisms. *Bio/technology* 10 : 60-65

Gildberg, A., H. Mikkelsen, E. Sandaker, and E. Ringo. 1997. Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod *Gadus morhua*. *Hydrobiologia*. 352: 279-285.

Gram, L., J. Melchiorson, B. Spanggaard, I. Huber, and T. F. Nielsen. 1999. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* strain AH2-a possible probiotic treatment of fish. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 969-973.

Harris, L. J., M. A. Daechsel, M. E. Stiles, and T. R. Klaenhammer. 1989. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 52: 384-387.

Heo, M. S., C. B. Song, J. H. Lee, I. K. Yeo, Y. J. Jeon, J. J. Lee, S. C. Chung, K.W. Lee, S Rho, K. S. Choi, and Y. D. Lee, 2001. Characteristics of *B-Streptococcus* spp. isolated in cultured flounder(*paralichthys olivaceus*) of jeju island. *J Korean Fish. Soc.* 34(4) :365-369.

Hiramoto, K. ,H. Johkoh, K. I. Sako, and K. Kikugawa, 1993. DNA breakingactivity of the carbon-centered radical generated from 2,2'-azobis(2-amidinopropane) hydrochloride (AAPH). *Free RadicalResearch and Communication*, 19:323-332

Hiraoka, A., T. Ano, and M. Shoda, 1992. Molecular cloning of a gene responsible for the biosynthesis of the lipopeptide antibiotics iturin and surfactin. *J. Ferment. Bioeng.* 74 : 323-326

Hiraoka, H., O. Asaka, T. Ano, and M. Shoda, 1992. Characterization of *Bacillus subtilis* RB14, coproducer of peptide antibiotics iturin A and surfactin. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 38:635-640.

Hyronimus, B., C. Le marrec, and M. C. Urdaci, 1998. Coagulin, a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Bacillus coagulans* I4. *J. Appl. Microbiol.* 85:42-50

Holck, A., L. Axelsson, S. E. Birkeland, T. Aukrust, and H. Bloom. 1992. Purification and amino acid sequence of sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sakei* LB 706. *J. Gen. Microbiol.* 138: 2715-2720.

Hugas, M., F. Pages, M. Garriga, and J. M. Monfort. 1998. Application of the bacteriocinogenic *Lactobacillus sakei* CTC494 to prevent growth of *Listeria monocytogenes* in fresh and cooked meat products packed with different atmospheres. *Food Microbiol.* 15(6): 539-650.

Hudault, S., V. Lievin, M. F. Bernet-Camard, and A. L. Servin. 1997. Antagonistic activity exerted in vitro and in vivo by *Lactobacillus casei* (strain GG) against *Salmonella typhimurium* C5 infection. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 513-518

Hwang K. A., J. R. Lee, S. J. Kim, Y. S. Kim, and H. J. Ahn, 1999. Surface-activity and environmental characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* JRT-4. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27(2):159-165

Jack, R. W., J. R. Tagg, and B. Ray. 1995. Bacteriocin of gram-positive bacteria.

Microbiol. Rev. 59 : 171-200.

Jay, J. M. 1982. Effect of a milk product, fermented by *Lactobacillus acidophilus* and with fructo-oligosaccharides added, on blood lipids in male volunteers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38:17-22

Jhon, W. M. and J. B. Mulders, 1991. Identification and characterization of the antibiotic nisin variant. *Eur. J. Biochem.*, 201:581-584.

Joborn, A., C. Olsson, A. Westerdahl, P. L. Conway, and S. Kjellberg. 1997. Colonization in the fish intestinal tract and production of inhibitory substances in intestinal mucus and faecal extracts by *Carnobacterium* sp. strain K. *J. Fish Dis.* 20: 383-392.

Joo, G. J., and J. H. Kim, Optimization of large scale culture conditions of *Bacillus ehimensis* YJ-37 antagonistic to vegetables Damping-off fungi. *Korean J. Life Sci.*, 2(3) : 242-249.

Jung, H. K. and S. D. Kim, Purification and Characterization of an antifungal antibiotic from *Bacillus megaterium* KL 39, a biocontrol agent of red-papperphytophthora blight disease. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 31(3) : 235-241.

Kang, K. H. 1996. Bioindustry. *Korean J. Appld. Microbial. Bioeng.* 9(3) : 41-67.

Kang, S. M., C. S. Lee, and Y. C. Kim, 1996. Isolation of biosurfactant-producing yeast *Rhodotorula* Sp. G-1 and the biosurfactant production. *Kor. J. Appl Microbiol. Biotechnol.* 24(2) : 185-190

Kang, J. H. and M. S. Lee. 1998. Mode of action of the bacteriocin from *Lactobacillus* sp. GM7311 against gram positive bacteria. *J. Korean Fish. Soc.*

31(4): 560-566.

Karunasagar, I., R. Pai, G. R. Malathi, and I. Karunasagar. 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture*. 128: 203-209.

Kim, S.A., Y.G. Lee, Y.L. Choi, C.W. Hwang, Y.K. Jeong, and W. H. Joo, 2007. Physiological characteristics of biosurfactant-producing *Bacillus subtilis* TBM 3101. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 50(1) : 12-17.

Kim, S. H., S. C. Lee, I. H. Park, J. S. Yoo, W. H. Joo, C. W. Hwang, and Y. L. Choi, 2005. Isolation and characterization of biosurfactant from *Bacillus atrophaeus* DYL-130. *J. Life Sci.* 15(5) : 679-684.

Kim, S. H., S. C. Lee, J. S. Yoo, W. H. Joo, S. Y. Chung, and Y. L. Choi, 2004. Characterization of oil-degradation biosurfactant produced by *Bacillus* sp. TBM40-3. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 47(2) : 170-175.

Klein, C., C. Kaletta, and K. D. Entian. 1993. Biosynthesis of the antibiotic subtilin is regulated by a histidine kinase/response regulator system. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:296-303.

Kluge, B., J. Vater, J. Salnikow, and K. Eckart. 1998. Studies on the biosynthesis of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *FEBS Lett.* 231 : 107-110

Klaenhammer T. R. 1988. Bacteriocin of lactic acid bacteria. *Biochem.* 70(3) : 337-349

Kratzschmar, J., M. Krause, and M. A. Marahiel, 1980. Gramicidin biosynthesis operon containing the structural genes *grsA* and *arsB* has an open reading frame

encoding a protein homologous to fatty acid thioesterases. J. Bacteriol. 171 : 5422-5429.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 277 : 680-685

Lee, C. H. and D. S. Ha, 1991. A streptococcal Disease of Cultured Flounder, *Paralichthys olivaceus*. J. Fish Pathol. 4 : 71-77.

Lee, D. K., J. I. Lee, C. I. Park, and S. I. Park, 2001. The study on the causal agent of Streptococcosis (*Lactococcus garvieae*), isolated from cultured marine fishes. J. Fish Pathol., 14(2) : 71-80.

Lee, S. B. and S. H. Choi, 2006. Isolation and identification of probiotic actobacillus isolates for calf meal supplements. Korean J. Food Sci. Ani. Resour. 26(1) : 106-112

Maget-Dana, R. and F. Peypoux. 1994. Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: biological and physicochemical properties. Toxicology. 87 : 151-174.

Mittenhuber. G., R. Weckermann, and M. A. Marahiel, 1989. Gene cluster containing the genes for tyrocidine synthetase 1 and 2 from *Bacillus brevis*; evidence for an operon. J. Bacteriol. 171 : 1881-1887

Montville, T. J. and M. E. C. Bruno. 1994. Evidence that dissipation of protein motive force is a common mechanism of action for bacteriocins and other antimicrobial proteins. Inter. J. Food Microbiol., 24 : 53-74.

Muller, H. E., 1995. Detection of hydrogen peroxide produced by microorganism

onABTS-peroxidase medium Zentralbl Bakterio. Microbiologie and Hygiene, 259 : 151-158

Nakano, M. M. and P. Zuber. 1990. Molecular biology of antibiotic production in *Bacillus*. *Biotechnol.* 10 : 223-240.

Nanjo, F., K. Goto, R. Seto, M. Suzuki, M. Sakai, and Y. Hara, 1996. Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1,-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radical Biology and Medicine*, 21 : 895-902.

Newman, S. G. 1993. Bacterial vaccines for fish. *Annu. Rev. Fish Dis.* 3: 145-185.

Nissen-Meyer, J., H. Holo, L. S. Havarstein, K. Sletten, and I. F. Nes. 1992. A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *J. Bacteriol.* 174: 5685-5692.

Olsson, J. C., A. Westerdahl, P. L. Conway, and S. Kjelleberg. 1992. Intestinal colonization potential of turbot *Scophthalmus maximus* and dab *Limanda limanda*-associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 551-556.

Park, S. K., Y. S. Cho, M. Y. Shon, S. W. Gal, and S. W. Lee, 2007. Isolation and cultural characterization of antibacterial substance producing microbes. *Korean J. Food Preserv.*, 14(2) : 194-200.

Piard, J. C. and M. Desmazeaud. 1992. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antibacterial substances. *Lait.* 72: 113-142.

Ramasamy harikrishnan., M. C Kim, J. S. Kim and M. S Heo, 2011. Immunomodulatory effect of probiotics enriched diets on *Uronema marinum*

infected olive flounder. *Fish & Shellfish immunology.*, 30(3) : 964-971

Ringo, E. and F. J. Gatesoupe. 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture.* 160: 177-203.

Roberts, M. S., L. K. Nakamura, and F. M. Cohan, 1996. *Bacillus vallismortis* sp. nov., a close relative of *Bacillus subtilis*, isolated from soil in Death Valley, California. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46(2) : 470-475.

Rosenquist, H. and A. Hansen. 1998. The antimicrobial effect of organic acids, ourdough and nisin against *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* isolated from wheat bread. *J. Appl. Microbiol.* 85: 621- 631.

Prapar, H. D. and R. P. Bird, 1984. *J. Agric. Food Chem.* 32 : 433

Ryu, H. S., M. Y. Shon, S. J. Cho, S. K. Park, and S. W. Lee, 2007. Characterization of antibacterial substance-producing *Bacillus subtilis* isolated from traditional Doenjang. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 50(2) : 87-94.

Salminen, S., A. C. Ouwehand, Y. Benno, and Y. K. Lee. 1999. probiotics: how should they be defined *Trends. Food Sci. Technol.* 10: 107-110.

Schillinger, U. and F. K. Lucke. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sakei* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1901-1906.

Shin Y. J., M. J. Jung, and Y. K. Jeong, 2000. Optimization of the production of a hermostable antifungal antibiotic. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, 15(6) :584-588.

Shomura, T., N. Nishizawa, M. Iwata, J. Yoshida, M. Ito, and S. Aman, 1983. Studies on a new nucleoside antibiotic, Dapiramycin. *J. Antibiot.*, 36 : 1300-130

Smith, P., M. P. Hiney, and O. B. Samuelsen. 1994. Bacterial resistance to antimicrobial agents used in fish farming: a critical evaluation of method and meaning. *Annu. Rev. Fish Dis.* 4: 273-313.

Song, J. K., J. H. Kim, and E. H. Kim, 2003. Comparison of RAPD profiles and phenotypical characters of Streptococcal strains. *J. FishPathol.*, 16(1) : 51-59.

Stoffels, G., I. F. Nes, and A. Gudmundsdottir. 1992. Isolation and properties of a bacteriocin-producing *Carnobacterium piscicola* isolated from fish. *J. Appl. Bacteriol.* 73: 309-316.

Suma. K., M. C. Misra, and M. C. Varadaraj. 1998. Plantaricin LP84, a broad spectrum heat-stable bacteriocin of *L. plantarum* NCIM 2084 produced in a simple glucose broth medium. *Int. J. Food Microbiol.* 40: 17-25

Sugita, H., Y. Hirose, N. Matsue, and Y. Degudri. 1998. Production of antibacterial substance by *Bacillus* spp. strain NM12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish. *Aquaculture.* 165: 269-280.

Tagg, G. R., A. S. Dajani, and L. W. Wannamarker. 1976. Bacteriocin of gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* 40 : 772-756.

Van Belkum, M. J., J. Kok, G. Venema, H. Holo, I. F. Nes, W. N. Konings and T. Abee. 1991. The bacteriocin lactococcin A specifically increases permeability of lactococcal cytoplasmic membranes in a voltage-independent, protein-mediated manner. *J. Bacteriol.*, 173(24), 7934-7941

Vanittanakom, N., W. Loettler, U. Koch, and G.Jung. 1986. Fengycin—a novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. *J. Antibiot.* 39 : 881-901.

Verschuere L., G. Rombaut, P. Sorgeloos and W. Verstraete. 2000. probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. & Molecular Biology Reviews*. 64: 655.

Witte, W., I. Klare, and G. Werner. 1999. Selective pressure by antibiotics as feed additives. *Infection*. 27: 35-38.

Woo, S. H., H. J. Kim, J. S. Lee, J. W. Kim, and S. I. Park, 2006. Pathogenicity and classification of streptococci isolated from cultured marine fishes. *J. Fish Pathol.* 19 : 17-33

Yoo, J. H., 1994 Studies on the antifungal antibiotic produced by *Bacillus* sp. SY-414. Kangwon National Univ.

Yoon, J. H., W. D. Lee, J. H. Kang, J. S. Lee, and M. S. Lee, 2003. Manufacture of Squid - Jeogalby the improved process. *J. Kor. Fish. Soc.* 36 : 333-339.

Yoon, S. H., J. B. Kim, Y. H. Lim, S. R. Hong, J. K. Song, S. S. Kim, S. W. Kwon, I. C. Park, S. J. Kim, Y. S. Yeo, and B. S. Koo. 2005. Isolation and Characterization of three kinds of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* JKK238 from Jeot-kal of korean traditional fermented fishes. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 33(4) : 295-301

국립수산진흥원 2000. 건강어류 생산을 위한 어병예방 및 치료대책