creative commons
COMMONS DEED

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

dCollection

碩士學位論文

마늘 및 유산균 복합제 첨가 사료가 넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 비 특이적 면역반응에 미치는 영향

濟州大學校 産業大學院

海 洋 生 物 工 學 科

金 柄 勳

2021年 8月

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

마늘 및 유산균 복합제 첨가 사료가 넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 비 특이적 면역반응에 미치는 영향

指導敎授 鄭 焌 範

金 柄 勳

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2021年 6月

金 柄 勳의 理學碩士 學位論文을 認准함

審査委員長 여 인 규 (印)

委 員 정 준 범 (印)

委 員 전 려 진 (印)

濟州大學校 産業大學院

2021年 6月

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Effects of Dietary Supplementation of Garlic and Probiotics Combination on Nonspecific Immune Responses of Olive Flounder(*Paralichthys olivaceus*)

BYEONG HUN KIM
(Supervised by professor Joon Bum Jeong)

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

Department of Marine Biotechnology
GRADUATE SCHOOL OF INDUSTRY
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

June, 2021

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

목 차

목 차 ····· i

Abstract ····· iii

LIST OF FIGURES ····· v

LIST OF TABLES ····· vii

Ⅰ. 서 론 ····· 1

Ⅱ. 재료 및 방법 ····· 3

1. 생균보조제 첨가 사료 적용 실험 ····· 3

1.1. 넙치에 대한 급이 실험 ····· 3

1.2. Disc diffusion 방법을 이용한 항균 효과 분석 ····· 5

1.3. 혈액 생리학적 분석 ····· 5

1.4. 공격실험 ····· 6

2. 마늘 및 생균보조제 첨가 사료 적용 실험 ····· 8

2.1. 넙치에 대한 급이 실험 ····· 8

2.2. Disc diffusion 방법을 이용한 항균 효과 분석 ····· 9

2.3. 혈액 생리학적 분석 ····· 9

2.4. 공격실험 ····· 9

Ⅲ. 결 과 ····· 12

1. 생균보조제 첨가 사료 적용 실험 ····· 12

1.1. Disc diffusion 방법을 이용한 항균 효과 분석 ····· 12

1.2. 혈액 생리학적 분석 ····· 13

1.3. 공격실험 ····· 14

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

2. 마늘 및 생균보조제 첨가 사료 적용 실험 ·····20
2.1. Disc diffusion 방법을 이용한 항균 효과 분석 ·····20
2.2. 혈액 생리학적 분석 ·····22
2.3. 공격실험 ·····23

Ⅳ. 고 찰 ·····31

Ⅴ. 요 약 ·····36

참고 문헌 ·····39

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Abstract

In the case of olive flounder aquaculture in Jeju, it has been important to produce safe and healthy fish because diseases increased caused by increased temperature and increased water temperature due to climate change, the burden of using antibiotics was charged, and the demand for eco-friendly aquaculture olive flounders(*Paralichthys olivaceus*) was raised. This study experimented and analyzed effects of feed additives with garlic and mixture lactic acid bacteria on nonspecific immune response of olive flounders(*P. olivaceus*), and it could drive the following conclusions.

1. This study supposed that the feed additives could improve disease resistance against *S. parauberis, V. harveyi, and E. tarda* by including mixture lactic acid bacteria and garlic powder with strong antioxidant function and active oxygen removal function and enhancing the nonspecific immune responses.

2. In the experiment of the garlic and the mixture lactic acid bacteria, this study made olive flounders(*P. olivaceus*) infected by *S. parauberis and V. harveyi*. The relative survival rate was 40% or higher compared to the control group, and it had a high antibacterial effect. As a result, this study expects that garlic and mixture lactic acid bacteria would help reduce the use of synthetic antibiotics, which has been a problem recently, and can be used as feed additives to increase the immunity of olive flounders(*P. olivaceus*).

3. In the experiment of the garlic and the mixture lactic acid bacteria, when the water temperature was high, the antibacterial effect did not occur evidently on *E. tarda*. It is because the *E. tarda* has a high pathogenicity compared to other bacterial species. This study suggests

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

further studies are needed on the relationship between the antibacterial effect on *E. tarda* and the water temperature in the future.

4. As a result of measuring the efficiency of the feed including the mixture lactic acid bacteria, this study found that it was helpful for the growth of olive flounders(*P. olivaceus*) and its feed efficiency was also improved by about 7-12%. This study did not perform the efficiency of the feed additives including garlic and multiple lactic acid bacteria.

5. This study found that the feed additives, including the multiple lactic acid bacteria, which has antioxidant effects and active oxygen removal function, and the garlic, which has an antibacterial effect, would be helpful for nonspecific immune responses against *S. parauberis and V. harveyi* bacteria of aquaculture olive flounders(*P. olivaceus*). It verified that the feed additives can be used as natural feed additives.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

LIST OF FIGURES

Fig. 1. Cumulative Mortality of Each Group (A) and Feed Efficiency (B). ·····4
Fig. 2. A Tank used for the Fish Infection Experiment in Jeju National University. ····10
Fig. 3. Disc-1, Mixture Lactic Acid Bacteria Stock Solution. ·····12
Fig. 4. Cumulative Mortality Rates of *P. olivaceus* in Experimental Group A (Liquid-type Probiotic), Group B (Powder-type Probiotic) and Control Group (Commercial Mixture Feed) inoculated with *S. parauberis* into Abdominal Cavity. ·····15
Fig. 5. Cumulative Mortality Rates of *P. olivaceus* in Experimental Group A (Liquid-type Probiotic), Group B (Powder-type Probiotic) and Control Group (Commercial Mixture Feed) inoculated with *V.hareyi* into Abdominal Cavity. ·····16
Fig. 6. Cumulative Mortality Rates of *P. olivaceus* in Experimental Group A (Liquid-type Probiotic), Group B (Powder-type Probiotic) and Control Group (Commercial Mixture Feed) inoculated with *E. tarda* into Abdominal Cavity. ·····16
Fig. 7. External Symptoms of Bacterial Infection of *P. olivaceus* that Died during the Artificial Infection Experiment. ·····17
Fig. 8. Each Bacterial Culture Result of *P. olivaceus* that Died during the Artificial Infection Experiment. ·····18
Fig. 9. PCR Analysis of Strains Isolated from Death *P. olivaceus* of Each Group after inoculating *S. parauberi* into Abdominal Cavity (220 bp). ·····19
Fig. 10. PCR Analysis of Strains Isolated from Death *P. olivaceus* of Each Group after inoculating *E. tarda* into Abdominal Cavity (416 bp). ·····19
Fig. 11. Antibacterial Experiment Results using Disk Diffusion Method. ·····21
Fig. 12. Cumulative Mortality Rates of *P. olivaceus* in Experimental Group (Garlic and Mixture Lactic Acid Bacteria) and Positive Control (Commercial Mixture Feed), inoculated with *S. parauberis* into Abdominal Cavity and Negative Control Group inoculated with PBS into Abdominal Cavity. ·····25
Fig. 13. Cumulative Mortality Rates of *P. olivaceus* in Experimental Group (Garlic

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

and Mixture Lactic Acid Bacteria) and Positive Control (Commercial Mixture Feed), inoculated with *V. harveyi* into Abdominal Cavity and Negative Control Group inoculated with PBS into Abdominal Cavity. ·····25

Fig. 14. Cumulative Mortality Rates of *P. olivaceus* in Experimental Group (Garlic and Mixture Lactic Acid Bacteria) and Positive Control (Commercial Mixture Feed), inoculated with *E. tarda* into Abdominal Cavity and Negative Control Group inoculated with PBS into Abdominal Cavity. ·····26

Fig. 15. External Symptoms of Bacterial Infection of Death *P. olivaceus* during the Artificial Infection Experiment Period. ·····27

Fig. 16. Each Bacterial Culture Result of *P. olivaceus* that Died during the Artificial Infection Experiment. ·····28

Fig. 17. PCR Analysis of Strains Isolated from Death *P. olivaceus* of Each Group after inoculating *S. parauberi* into Abdominal Cavity (220 bp). ·····29

Fig. 18. PCR Analysis of Strains Isolated from Death *P. olivaceus* of Each Group after inoculating *E. tarda* into Abdominal Cavity (416 bp). ·····29

Fig. 19. PCR Analysis of Strains Isolated from Death *P. olivaceus* of Each Group after inoculating *V. harveyi* into Abdominal Cavity (601 bp). ·····30

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

LIST OF TABLES

Table 1. Measurement of Related Numerical Values for Cumulative Mortality Rate and Feed efficiency of Each Group ·····3
Table 2. Primer Sets used for PCR Analysis ·····7
Table 3. PCR Analysis Conditions ·····7
Table 4. General Feed Composition ·····8
Table 5. Primer Sets used for PCR Analysis ·····11
Table 6. PCR Analysis Conditions ·····11
Table 7. Blood Physiology Analysis of *P. olivaceus* having Probiotic-added Feed for 2 months ·····13
Table 8. Blood Physiology Analysis of *P. olivaceus* having Probiotic-added Feed for 2 months (Average) ·····14
Table 9. Length of Stoppage in Antibacterial Experiment using Disc Diffusion Method ·····20
Table 10. Blood Physiology Analysis of *P. olivaceus* having Feed with Garlic and Mixture Lactic Acid Bacteria ·····22
Table 11. Blood Physiology Analysis of *P. olivaceus* having Feed with Garlic and Mixture Lactic Acid Bacteria (Average) ·····23
Table 12. Comparison of the results of the artificial infection experiment on the feed additive with mixture lactic acid bacteria ·····32
Table 13. Comparison of the results of the artificial infection experiment on the feed additives with garlic and mixture lactic acid bacteria ·····34

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Ⅰ. 서 론

제주지역 넙치 양식 생산량은 2018년에는 22,169톤으로 전국 넙치 양식 생산량 37,238톤 대비 59.5%를 차지하고 있으며, 생산금액은 2018년 기준 전국 4,854억 원 대비 2,781억 원으로 56.1%의 비중을 차지하고 있다. 그러나 최근에는 새로운 질병 발생으로 인한 폐사량은 매년 증가하여 2018년에는 9,251톤으로 높게 나타났으며, 예기치 못한 연어와 방어 등 경쟁 수산물의 수입 증가로 넙치 소비가 침체되면서 양식업체의 경영 악화를 초래하고 있는 것으로 나타났다(제주 연구원, 2019).

특히, 국내 양식산업이 발달함에 따라 수익을 위한 고밀도 밀식 등 인위적인 환경으로 인한 양식어류의 스트레스 증가와 면역력 감소로 질병이 증가할 수밖에 없는 문제점들이 발생하였다(Kwon and Jung, 2012). 이에 따라 양식어류의 면역력 저하와 질병 감염이 증가함에 따라 항생제 사용 빈도수가 증가하고 있다(Smith et al., 1994; Kim et al., 2014). 이러한 문제를 해결하기 위해 많은 국가에서 항생제 사용을 금지하거나 그 사용량과 식품에서의 잔류 허용량 규제가 더욱 엄격해지고 있으며, 최대 잔류허용기준(MRL, maximum residue level)을 설정하여 규제하고 있다. 최근에는 항생제 내성 세균에 대한 문제도 제기되면서 항생제 사용의 법적인 규제가 이루어지고 있다(Vanbelle, 1989). 이에 따라 항생제 대체방안으로 부작용이 없는 천연물질을 사료 첨가제로 개발하여 양식 어류의 면역력 및 건강을 증진시키기 위한 양식산업의 기능적 브랜드화가 시도되고 있고(Kim et al., 2006), 사료 첨가제 산업은 가격 경쟁력, 원료 수급력, 효과적인 공급망, 기능성, 위생적 축산물에 대한 소비자의 요구에 따라 다양한 제품과 맞춤형 제품의 개발이 필요하다(Lee, 2014).

이러한 환경변화에 따라 천연물질 사료첨가제 연구가 다양하게 진행됐으며, 주요 연구결과를 살펴보면 톳·감태 1:1 비율 혼합물이 비특이적 면역반응에 어떠한 영향을 주는지 알아보기 위한 연구에서는 톳·감태 혼합물에 포함된 생리활성 물질이 항산화 효과를 증진하여 넙치의 비특이적 면역반응을 증강시켜 *Edwardsiella tarda*에 대한 질병 저항성을 향상한 것으로 나타났다(Kim et al.,

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

2009). 그리고 기능성 첨가제 연구에서 푸코이단은 항 스트레스 효과, 콜레스테롤 저하작용이나 항 종양 작용을 하는 것으로 보고되었고(Brunner et al., 1998; Del Bigio et al., 1999; Piao et al., 2004), 글루칸은 0.1% 미만을 첨가시 성장과 사료의 효율 증진, 질병 저항성에 좋은 효과가 있는 것으로 보고되었다(Kim et al., 2006). 또한 고체 유황, 푸코이단, 글루칸을 넙치 치어 사료에 첨가한 실험에서 푸코이단 0.4%는 성장과 면역 효과가 우수한 것으로 나타났다 (Kim et al., 2013). 해양 규조인 *Melosire nummuloides*와 여기서 분리한 바이오 실리카를 이용하여 양식 넙치 (*Paralichthys olivaceus*) 사료로 공급한 결과 규조 2% 첨가 시 성장과 면역활성에 높은 효과가 있는 것으로 나타났고, 바이오 실리카에서도 성장과 면역 활성에 효과가 있는 것으로 나타났다(Noh, 2021). 그리고 한약재 추출물을 기질로 한 유산균 배양액을 양식 넙치(P. olivaceus)와 돌돔에 사료로 공급한 연구결과, lysozyme 활성은 넙치는 8주부터 실험구가 대조구보다 높은 활성을 보이고, 돌돔은 실험 12주에 대조구보다 약 3배 높은 활성을 보였다. 세균 공격 실험에서는 넙치의 복강에 *Vibrio anguillarum*을 투여하였을 시, 실험구가 대조구에 비해 18%, *Streptococcus iniae*를 투여하였을 시, 실험구가 23% 높은 생존율을 보였다. 돌돔의 경우, *V. anguillarum*의 투여결과 대조구의 비해 17%, *S. iniae*의 투여결과 대조구의 비해 16% 높은 생존율을 나타냈다(Jhon, 2009). 항균 효과를 가진 천연물질 중 오래전부터 이용되어 온 마늘은 특히, 많은 연구가 있었다. 마늘 냄새와 맛을 내는 성분인 allicin, 신진대사를 촉진시키는 scordinine, 그리고 항암효과와 혈전 생성을 억제하는 ajoene 등이 대표적인 성분이며, 마늘은 항바이러스, 면역력 증강, 간 기능 회복, 항암효과 등이 알려져 있다(Song et al., 2001; Nakagawa et al., 2001; Kim et al., 2002; Kyung et al., 2006).

본 연구에서는 마늘 및 유산균 복합제 첨가 사료가 넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 주요 세균성 병원체인 *Edwardsiella tarda*, *Streptococcus parauberis* 및 *Vibrio harveyi*에 대한 비특이적 면역반응에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 생균보조제 첨가 사료 적용 실험

1.1. 넙치에 대한 급이 실험

실험대상 넙치(*P. olivaceus*)는 해심 수산(제주특별자치도 제주시 한림읍 수원리 967-9)에서 분양을 받아서 본 실험에 사용하였다.

실험기간 동안 총 14개의 수조에 사료 조건을 다르게 하여 먹이를 급이하였고, 1개의 수조당 넙치 10,000마리로 어류 개체 수를 맞춰 주었다.

사료 조건은 A실험군은 일반사료와 복합 유산균(액상) 2% 혼합하여 4개 수조, B실험군은 일반사료와 복합 유산균(분말) 2% 혼합하여 9개 수조, 대조군은 1개 수조에 일반사료를 급이하였다.

누적 폐사율 및 성장률 분석을 위해 생균보조제 첨가 사료 실험에 대한 총마리수, 총 폐사량, 누적 폐사율 등은 아래의 표에 제시하였다(Table 1).

Table 1. Measurement of Related Numerical Values for Cumulative Mortality Rate and Feed efficiency of Each Group

항목	대조구	복합 유산균 액상	복합 유산균 분말
총마리수	10,000 마리	10,000 마리	10,000 마리
총폐사량	1770 마리	1038 마리	691 마리
누적폐사율	17.7 %	10.4 %	6.9 %
평균체중 (2019.01.01.)	71 g	71 g	71 g
평균체중 (2019.03.01.)	145 g	175 g	165 g
평균 증체량 (2019.01.01.~2019.03.01.)	74 g	104 g	94 g
평균 사료급여량 (2019.01.01.~2019.03.01.)	231 g	264 g	213 g
사료효율	32 %	39.4 %	44.1 %

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

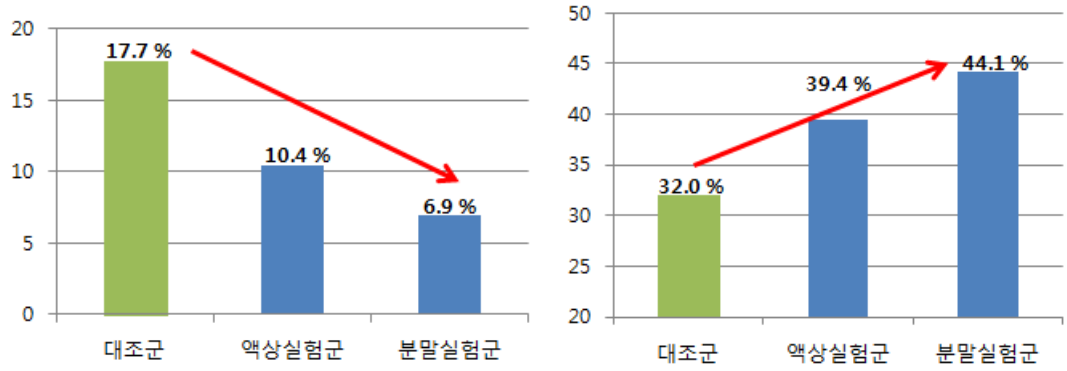


Fig. 1. Cumulative Mortality of Each Group (A) and Feed Efficiency (B).

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

1.2. Disc diffusion 방법을 이용한 항균 효과 분석

복합 유산균의 *in vitro*상에서의 항균 효과를 분석하기 위하여, disc diffusion 방법을 이용하였다. 복합 유산균을 멸균증류수를 사용하여 1/2씩 단계 희석하여 paper disc에 50㎕씩 각각 첨가한 후 자연 건조했으며, 비교 실험을 위하여 시판 중인 A사의 유산균 제품을 구입하여 동일한 방법으로 disc를 제작하였다.

양식넙치에서 주요한 세균성 질병 원인체인 *E. tarda, S. parauberis* 및 *Vibrio* sp. 등 3종에 대한 50개의 병원성 세균은 $1X10^7$ cfu/mL의 농도로 희석시켜 Mueller Hinton Agar (MH agar, Difco)에 도말한 후 disc를 놓고 25℃에서 18~20시간 배양한 후 저지대를 측정하여 효능 여부를 판단하였다. 효능 비교를 위하여 수산용 항생제 4종 (Oxytetracycline, Ciprofloxacin, Ampicilline 및 Oxolin acid)의 disc를 각각 사용하였다.

1.3. 혈액 생리학적 분석

복합 유산균의 생균제가 첨가된 사료 급이 실험을 2개월간 진행시킨 넙치양식장에서 복합 유산균 액상형 생균제를 첨가한 사료를 먹인 A 실험구, 복합 유산균 분말형 생균제를 첨가한 사료를 먹인 B 실험구, 그리고 일반 시판 배합사료를 먹인 대조구로부터 각각 80마리씩 무작위로 선택하여, 해수를 넣은 폴리에틸렌 비닐에 담고 산소를 주입한 후, 실험을 위하여 제주대학교로 운반하였다.

운반된 실험어는 각각의 A 실험구, B 실험구 및 대조구로부터 넙치 3마리씩을 무작위로 선택하였고, 각 어류의 미부정맥을 통하여 heparin 처리 주사기를 사용하여 혈액을 채취하였다.

채취한 혈액은 12,000 rpm에서 3분간 원심 분리하여 혈장을 분리하였고, 분리된 혈장은 저온 상태에서 혈액생화학분석기(Vettest, IDEXX Lab.)를 사용하여 각 혈액 분석 항목을 측정하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

1.4. 공격실험

복합 유산균의 생균제가 첨가된 사료 급이 실험이 진행되고 있는 넙치양식장에서 복합 유산균 액상형 생균제를 첨가한 사료를 먹인 A 실험구, 복합 유산균 분말형 생균제를 첨가한 사료를 먹인 B 실험구, 그리고 일반 시판 배합사료를 먹인 대조구로부터 각각 80마리씩 무작위로 선택하여, 해수를 넣은 폴리에틸렌 비닐에 담고 산소를 주입한 후, 실험을 위하여 제주대학교로 운반하였다.

운반된 실험어는 각 group별로 4개의 수조에 15마리씩 나누어 넣어주었고, 20±1℃의 수온에서 5일간 순치시킨 후, 세균 감염실험에 사용하였다.

생균제 첨가 사료를 급이 시켰을 때 넙치의 항균력에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 넙치의 주요 세균성 병원체인 *E. tarda, S. parauberis* 및 *V. harveyi*를 각각 PBS로 1 x 10^5 cfu/mL이 되도록 현탁하여, 각 group별로 넙치의 복강에 100㎕씩 접종하였다.

수온은 20±1℃를 유지시켰고, 매일 1회씩 해수를 교환해주며 39일간 누적 폐사를 관찰하였으며, 공격실험 기간 동안 폐사한 넙치는 외부 증상을 관찰한 후, 세균 배양 및 PCR 분석을 통하여 접종한 균이 재검출 되는지를 확인하였다. PCR 분석 시 사용된 primer sets와 PCR 조건은 다음과 같다(Table 2 & 3).

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Table 2. Primer Sets used for PCR Analysis

Primer	Oligonucleotide sequence (5' to 3' direction)	target	Expected sizes	Reference
pSP-F	TCCAGTCTTTCGACCTTCTT	*S. parauberis*	220 bp	Woo et al., 2006
pSP-R	CAAAGAGATGTTCGGCTTG			
VH-4F	GTGATGAAGAAGCTTATCGCGATT	*V. harveyi*	601 bp	Kim et al., 2015
VH-7R	CGCCTTCTTCAGTTAACGCAGGA			
E-1	CGGTAAAGTTGAGTTTACGGGTG	*E. tarda*	415 bp	Sakai et al., 2007
E-2	TGTAACCGTGTTGGCGTAAG			

Table 3. PCR Analysis Conditions

Target	PCR Condition	Expected sizes	Reference
S. parauberis	95℃ 5min pre-denaturation, 95℃ 1min denaturation[1], 55℃ 1min annealing[1], 72℃ 1min extension[1], 72℃ 7min post-extension ([1] = 1 set x 33 cycles)	220 bp	Woo et al., 2006
V. harveyi	94℃ 5min pre-denaturation, 94℃ 30sec denaturation[2], 60℃ 30sec annealing[2], 72℃ 30sec extension[2], 72℃ 10min post-extension ([2] = 1 set x 25 cycles)	601 bp	Kim et al., 2015
E. tarda	95℃ 2min pre-denaturation, 95℃ 20sec denaturation[3], 55℃ 20sec annealing[3], 72℃ 1min extension[3], 72℃ 7min post-extension ([3] = 1 set x 30 cycles)	415 bp	Sakai et al., 2007

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

2. 마늘 및 생균보조제 첨가 사료 적용 실험

2.1. 넙치에 대한 급이 실험

제주대학교 해양과학연구소에서 넙치(*P. olivaceus*)를 사용한 실험을 3주간 실시하였다.

실험기간 동안 총 2개의 원형수조에 사료 조건을 달리하여 먹이를 급이하였고, 1개의 수조당 넙치 100마리로 어류개체수를 맞춰 주었다. 사료 조건 설정은 대조구는 일반사료(Table 4)를 급여하고, 실험군은 일반사료와 마늘 및 복합유산균(분말형)을 2% 혼합하였다. 그리고 양식환경은 실험기간 동안 수온은 일평균 24.7±1.9℃로 유지되게 하였다.

Table 4. General Feed Composition

Ingredients	% (DM)
Crude protein (%, DM)	62
Crude lipid (%, DM)	12
Crude ash (%, DM)	3
Crude fiber (%, DM)	17
Calcium (%, DM)	3.3
Phosphorus (%, DM)	2.7

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

2.2. Disc diffusion 방법을 이용한 항균 효과 분석

마늘 및 복합 유산균을 멸균증류수를 사용하여 1/2씩 단계 희석하여 50㎕ paper disk에 떨어뜨려 자연건조시켰으며, 이것을 이용하여 agar spotted method를 이용하여 Disc diffusion을 실시하였다.

균주로는 양식넙치에 대표적으로 발병하는 3종(*E. tarda, S. parauberis, Vibrio* sp.)의 어병세균 11 균주에 대하여 $1x10^6$ cfu/mL 농도로 희석하여 저지대를 확인하였다.

2.3. 혈액 생리학적 분석

마늘 및 복합 유산균을 첨가한 사료 급이 실험을 3주간 진행시킨 제주대학교 해양과학연구소에서 마늘 및 복합 유산균을 첨가한 사료를 먹인 실험구, 일반 시판 배합사료를 먹인 대조구에서 각각 넙치 9마리씩을 무작위로 선별하여 마취하지 않은 상태로 미부정맥을 통하여 heparin 처리 주사기를 사용하여 혈액을 채취하였다.

채취한 혈액은 혈액생리학적 분석을 위해 임의로 3마리의 혈액을 1개의 샘플로 처리하여 사용하였고, 채취한 혈액은 12,000 rpm에서 3분간 원심 분리하여 혈장을 분리하였고, 분리된 혈장은 저온상태에서 혈액생화학분석기(Vettest, IDEXX Lab.)를 사용하여 각 혈액 분석 항목을 측정하였다.

2.4. 공격실험

마늘 및 복합 유산균을 첨가한 실험이 진행되고 있는 제주대학교 해양과학연구소에서 마늘 및 복합 유산균을 첨가한 사료를 먹인 실험구, 일반사료를 먹인 대조구에서 각각 100마리씩 무작위로 선택하여 해수를 넣은 폴리에틸렌 비닐에 담고 산소를 주입한 후, 실험을 위하여 제주대학교 어류감염실로 운반하였다.

운반된 실험어는 실험을 위하여 각 group별로 4개의 수조에 20마리씩 선별하여 나누어준 뒤(Fig. 2), 26±0.5℃의 수온에서 3일간 순치시킨 후, 세균감염실험에 사용하였다.

마늘 및 복합 유산균 첨가사료를 급이시켰을 때 넙치의 항균력에 미치는

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

영향을 조사하기 위하여, 넙치의 주요 세균성 병원체인 *E. tarda, S. parauberis* 및 *V. harveyi*를 각각 PBS로 1 x 10^5 cfu/mL이 되도록 현탁하여, 각 group별로 넙치의 복강에 100㎕씩 접종하였다. 음성대조구로서 PBS를 넙치의 복강에 100㎕씩 접종하였다. 수온은 26±0.5℃를 유지시켰고, 매일 1회씩 해수를 교환해주며 21일간 누적폐사를 관찰하였다.

공격실험 기간 동안 폐사한 넙치는 외부증상을 관찰한 후, 세균 배양 및 PCR 분석을 통하여 접종한 균이 재검출되는지를 확인하였다.

PCR 분석 시 사용된 primer sets와 PCR 조건은 다음과 같다(Table 5 & 6).

상대생존율 (relative percentage survival, RPS)

= {1−(실험구의 누적 폐사율/대조구의 누적 폐사율)} × 100

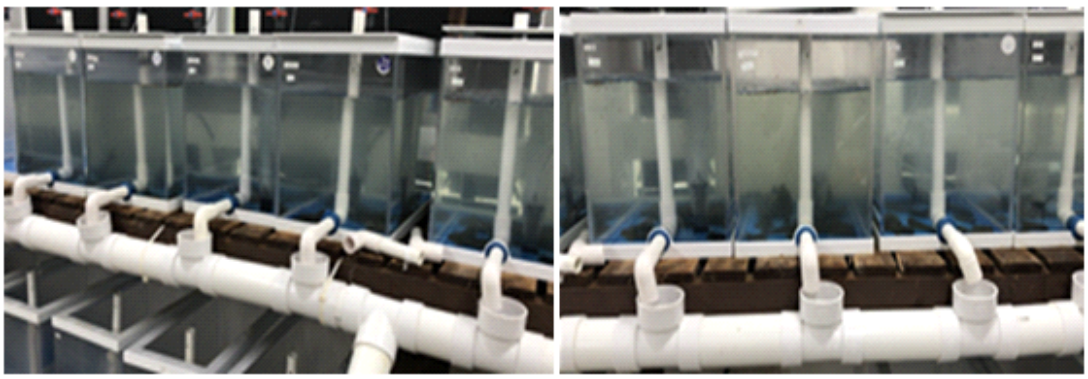


Fig. 2. A Tank used for the Fish Infection Experiment in Jeju National University

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Table 5. Primer Sets used for PCR Analysis

Primer	Oligonucleotide sequence (5' to 3' direction)	target	Expected sizes	Reference
pSP-F	TCCAGTCTTTCGACCTTCTT	*S. parauberis*	220 bp	Woo et al., 2006
pSP-R	CAAAGAGATGTTCGGCTTG			
VH-4F	GTGATGAAGAAGCTTATCGCGATT	*V. harveyi*	601 bp	Kim et al., 2015
VH-7R	CGCCTTCTTCAGTTAACGCAGGA			
E-1	CGGTAAAGTTGAGTTTACGGGTG	*E. tarda*	415 bp	Sakai et al., 2007
E-2	TGTAACCGTGTTGGCGTAAG			

Table 6. PCR Analysis Conditions

Target	PCR Condition	Expected sizes	Reference
S. parauberis	95℃ 5min pre-denaturation, 95℃ 1min denaturation[1], 55℃ 1min annealing[1], 72℃ 1min extension[1], 72℃ 7min post-extension ([1] = 1 set x 33 cycle)	220 bp	Woo et al., 2006
V. harveyi	94℃ 5min pre-denaturation, 94℃ 30sec denaturation[2], 60℃ 30sec annealing[2], 72℃ 30sec extension[2], 72℃ 10min post-extension ([2] = 1 set x 25 cycle)	601 bp	Kim et al., 2015
E. tarda	95℃ 2min pre-denaturation, 95℃ 20sec denaturation[3], 55℃ 20sec annealing[3], 72℃ 1min extension[3], 72℃ 7min post-extension ([3] = 1 set x 30 cycle)	415 bp	Sakai et al., 2007

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Ⅲ. 결 과

1. 생균보조제 첨가 사료 적용 실험

1.1. Disc diffusion 방법을 이용한 항균 효과 분석

대조구로 사용한 수산용 항생제 4종에 대해서는 적용한 세균 isolate에 따라 각각 다양한 크기의 저지대가 발생하는 것을 확인하였다 (Fig. 3).

복합 유산균 및 시판중인 A사 유산균 제품의 경우, 모든 disc diffusion 실험에서 저지대가 생성되지 않는 것을 확인하였다 (Fig. 3).

대조구로 사용한 수산용 항생제에서는 다양한 크기의 저지대가 발생하였지만, 복합 유산균 및 시판 중인 A사 유산균 제품 모두 저지대가 발생하지 않는 것으로 보아 복합 유산균과 시판 중인 A사 유산균 제품 모두 실험에 사용하였던 *E. tarda, S. parauberis* 및 *Vibrio* sp. 등 3종에 대한 50개의 병원성 세균에 대하여 항균효과가 보이지 않았다.

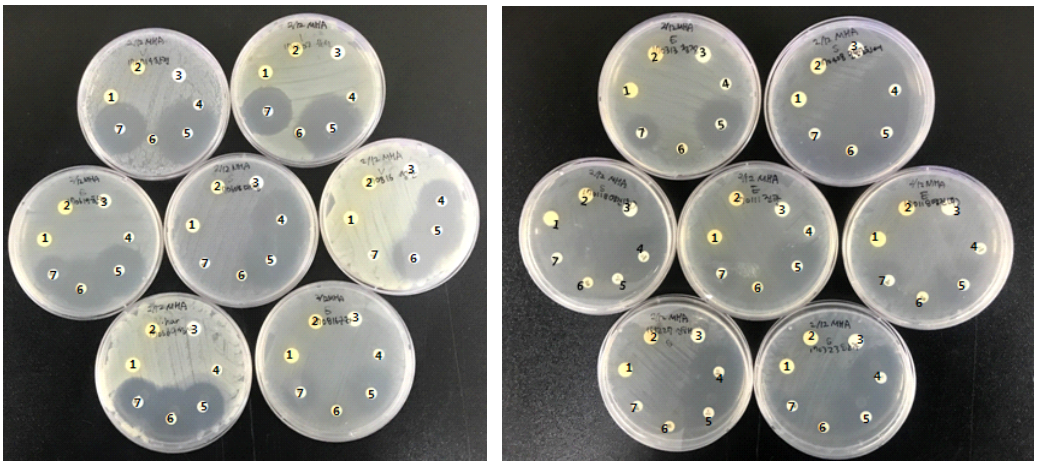


Fig. 3. Disc-1, Mixture Lactic Acid Bacteria Stock Solution.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

1.2. 혈액 생리학적 분석

복합 유산균 액상형 생균제를 첨가한 사료를 먹인 A 실험구, 복합 유산균 분말형 생균제를 첨가한 사료를 먹인 B 실험구, 그리고 일반 시판 배합사료를 먹인 대조구 사이에 8종류의 항목(ALB, Ca, CHOL, CREA, PHOS, TBIL, TP 및 GLoB)에 대한 혈액 분석을 실시한 결과, 대조구에 비해 실험구에서 유의적인 차이가 나타나지 않았다(Table 7 & 8).

이 결과로 볼 때, 복합 유산균 액상형 및 분말형 사료첨가제를 먹인 넙치에서는 혈액생리학적인 부작용이 나타나지 않는 것으로 판단되며, 넙치의 사료첨가제로서 안전하다는 것이 확인되었다.

Table 7. Blood Physiology Analysis of *P. olivaceus* having Probiotic-added Feed for 2 months

항목	대조구			A 실험구 (마늘 및 복합 유산균 액상)			B 실험구 (마늘 및 복합 유산균 분말)		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
ALB	1.3g/dL	1.2g/dL	1.5g/dL	1.4g/dL	1.4g/dL	1.3g/dL	0.9g/dL	1.4g/dL	1.5g/dL
Ca	12.5 mg/dL	11.9 mg/dL	12.5 mg/dL	12.5 mg/dL	12 mg/dL	11.8 mg/dL	12.6 mg/dL	12.4 mg/dL	11.9 mg/dL
CHOL	121 mg/dL	100 mg/dL	162 mg/dL	178 mg/dL	152 mg/dL	121 mg/dL	121 mg/dL	138 mg/dL	114 mg/dL
CREA	0mg/dL	0mg/dL	0mg/dL	0mg/dL	0mg/dL	0mg/dL	0mg/dL	0mg/dL	0mg/dL
PHOS	13.6 mg/dL	13.1 mg/dL	11.7 mg/dL	11.7 mg/dL	9mg/dL	9.1 mg/dL	10.7 mg/dL	12 mg/dL	9.8 mg/dL
TBIL	0.1 mg/dL	0.1 mg/dL	0.1 mg/dL	0.2 mg/dL	0.1m g/dL	0.1 mg/dL	0.1 mg/dL	0.2 mg/dL	0.1 mg/dL
TP	5.2g/dL	4.9g/dL	5.8g/dL	5.4g/dL	5.3g/dL	5.1g/dL	4.9g/dL	5.6g/dL	5.3g/dL
GLoB	3.9g/dL	3.6g/dL	4.3g/dL	4.0g/dL	3.9g/dL	3.7g/dL	4.1g/dL	4.1g/dL	3.8g/dL

* ALB;Albumin, Ca;Calcium, CHOL;Cholesterol, CREA;Creatinine, PHOS;Inorganic phosphate, TBIL;Total bilirubin, TP;Total protein, GLOB;Globulin.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Table 8. Blood Physiology Analysis of *P. olivaceus* having Probiotic-added Feed for 2 months (Average)

항목	대조구	A 실험구 (마늘 및 복합 유산균 액상)	A 실험구 (마늘 및 복합 유산균 분말)
ALB	1.3±0.2g/dL	1.4±0.1g/dL	1.3±0.3g/dL
Ca	12.3±0.3mg/dL	12.1±0.4mg/dL	12.3±0.4mg/dL
CHOL	127.7±31.5mg/dL	150.3±28.5mg/dL	124.3±12.3mg/dL
CREA	0.0±0.0mg/dL	0.0±0.0mg/dL	0.0±0.0mg/dL
PHOS	12.8±1.0mg/dL	9.9±1.5mg/dL	10.8±1.1mg/dL
TBIL	0.1±0.0mg/dL	0.1±0.1mg/dL	0.1±0.1mg/dL
TP	5.3±0.5g/dL	5.3±0.2g/dL	5.3±0.4g/dL
GLoB	3.9±0.4g/dL	3.9±0.2g/dL	4.0±0.2g/dL

* ALB;Albumin, Ca;Calcium, CHOL;Cholesterol, CREA;Creatinine, PHOS;Inorganic phosphate, TBIL;Total bilirubin, TP;Total protein, GLOB;Globulin.

1.3. 공격실험

*S. parauberis*를 사용하여 감염시킨 경우, 생균제를 첨가하지 않은 대조구에서는 감염 후 39일째까지 100%의 누적 폐사율을 보였으며, A 실험구(액상형 생균제) 및 B 실험구(분말형 생균제)에서는 각각 73% 및 87%의 누적 폐사율을 나타냈다(Fig. 4).

*V. harveyi*를 사용하여 감염시킨 경우, 대조구, A 실험구 및 B 실험구에서는 실험 종료 시까지 각각 80%, 73% 및 87%의 누적 폐사율을 보였다(Fig. 5).

*E. tarda*를 사용하여 감염시킨 경우, 대조구, A 실험구 및 B 실험구에서는 실험 종료 시까지 각각 67%, 53% 및 60%의 누적 폐사율을 보였다(Fig. 6).

공격실험 기간 동안 폐사한 넙치는 외부증상 관찰을 통하여 접종한 세균의

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

감염증상이 나타나는지를 확인하였고(Fig. 7), 세균 배양 및 PCR 분석을 실시하여 접종한 세균이 다시 검출되는지를 모두 확인하였다(Fig. 8, 9, 10).

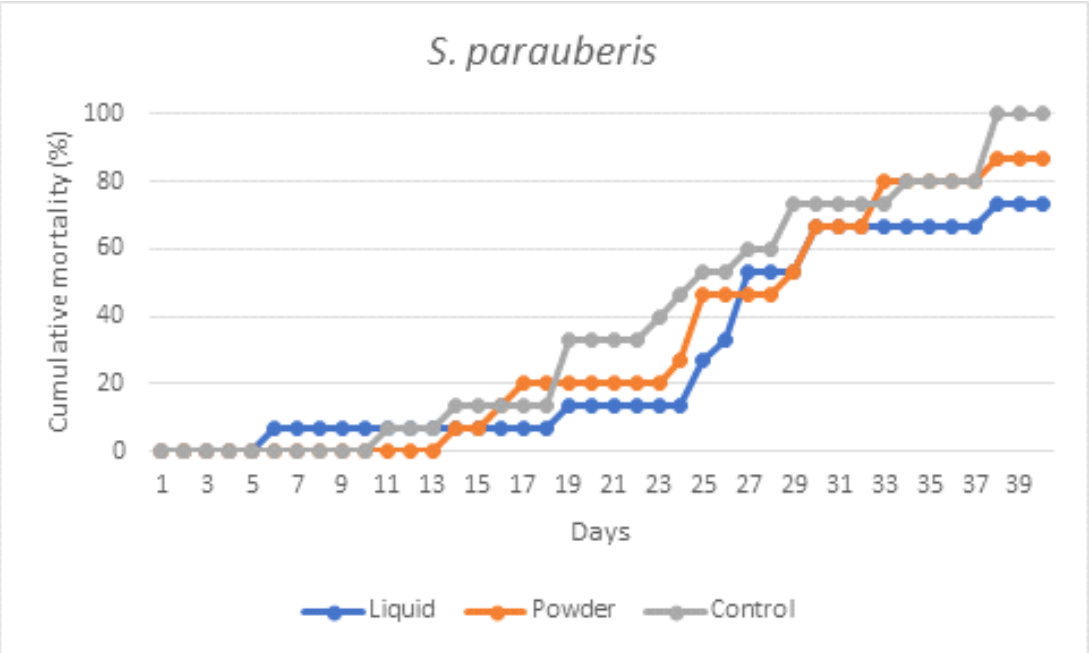


Fig. 4. Cumulative Mortality Rates of *P. olivaceus* in Experimental Group A (Liquid-type Probiotic), Group B (Powder-type Probiotic) and Control Group (Commercial Mixture Feed) inoculated with *S. parauberis* into Abdominal Cavity.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

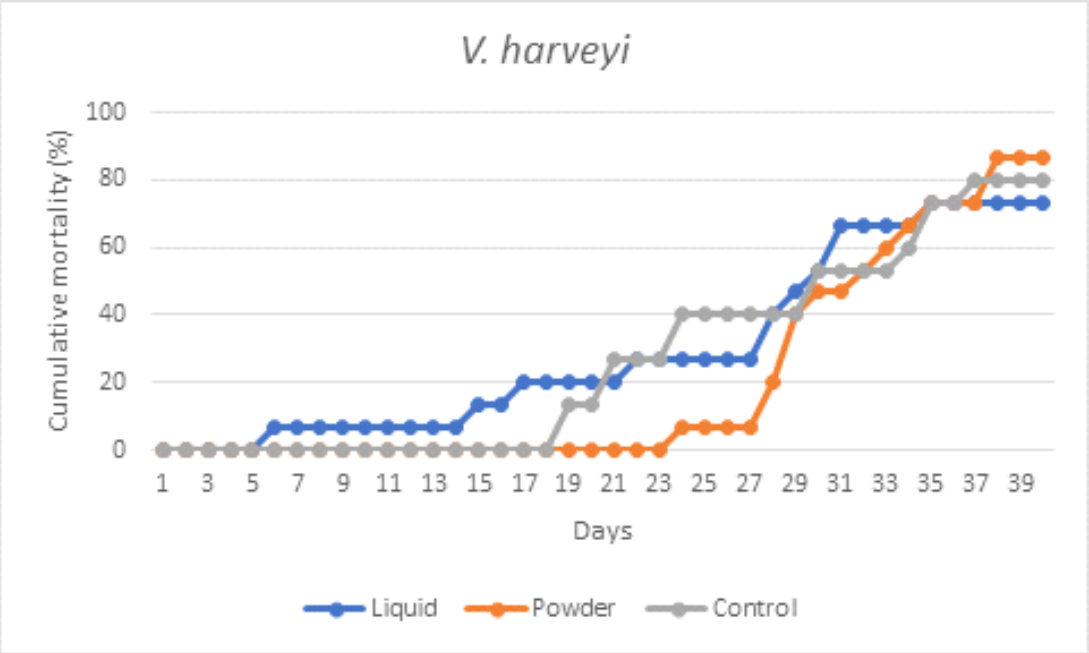


Fig. 5. Cumulative Mortality Rates of *P. olivaceus* in Experimental Group A (Liquid-type Probiotic), Group B (Powder-type Probiotic) and Control Group (Commercial Mixture Feed) inoculated with *V.hareyi* into Abdominal Cavity.

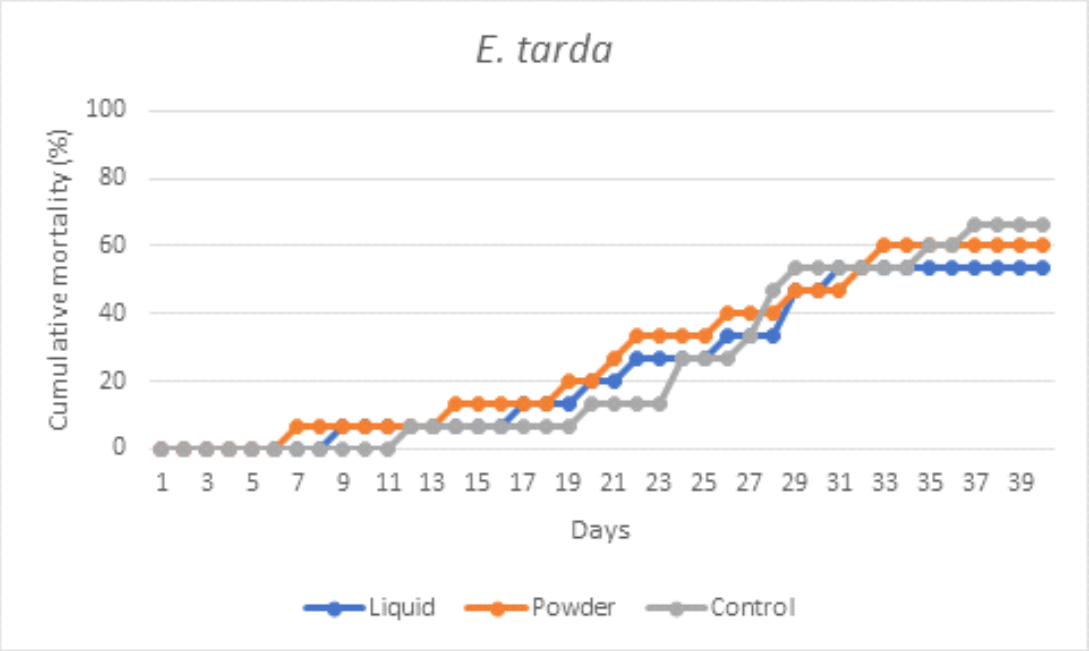
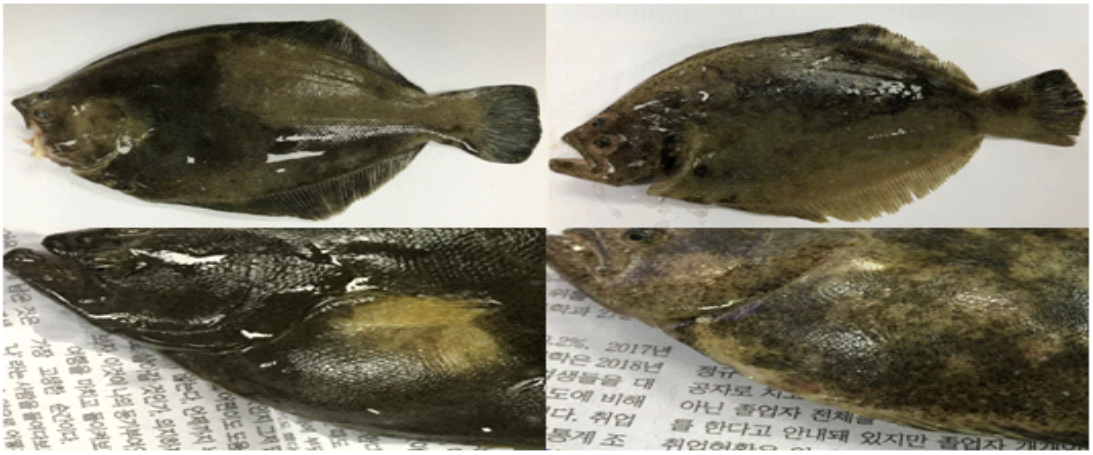


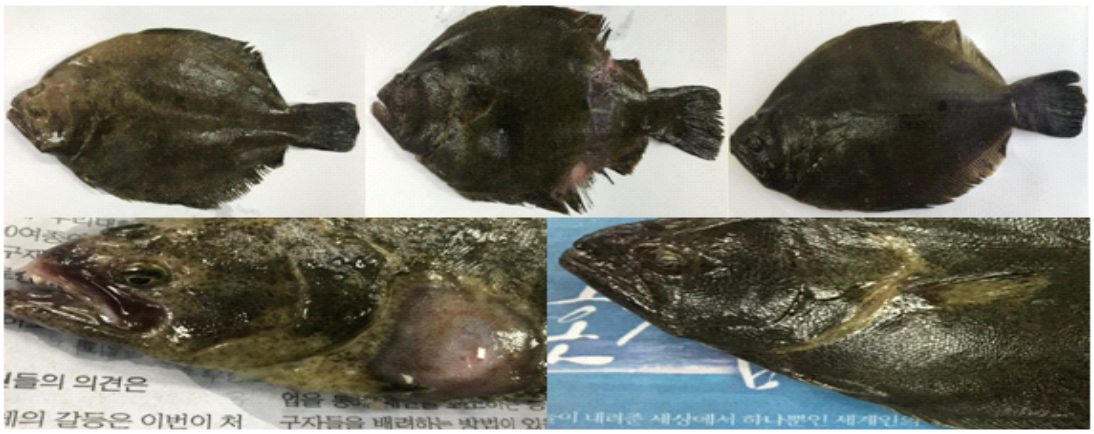
Fig. 6. Cumulative Mortality Rates of *P. olivaceus* in Experimental Group A (Liquid-type Probiotic), Group B (Powder-type Probiotic) and Control Group (Commercial Mixture Feed) inoculated with *E. tarda* into Abdominal Cavity.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

(A)



(B)



(C)

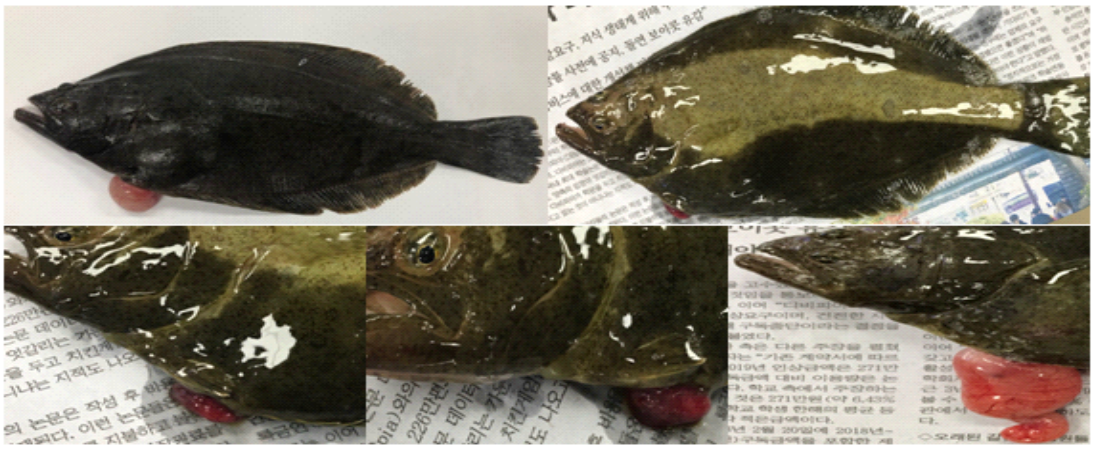
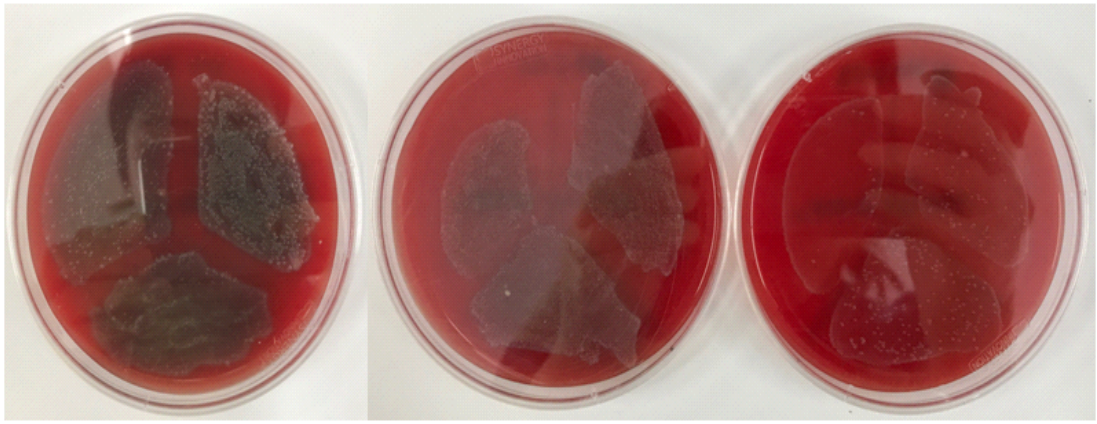


Fig. 7. External Symptoms of Bacterial Infection of *P. olivaceus* that Died during the Artificial Infection Experiment.

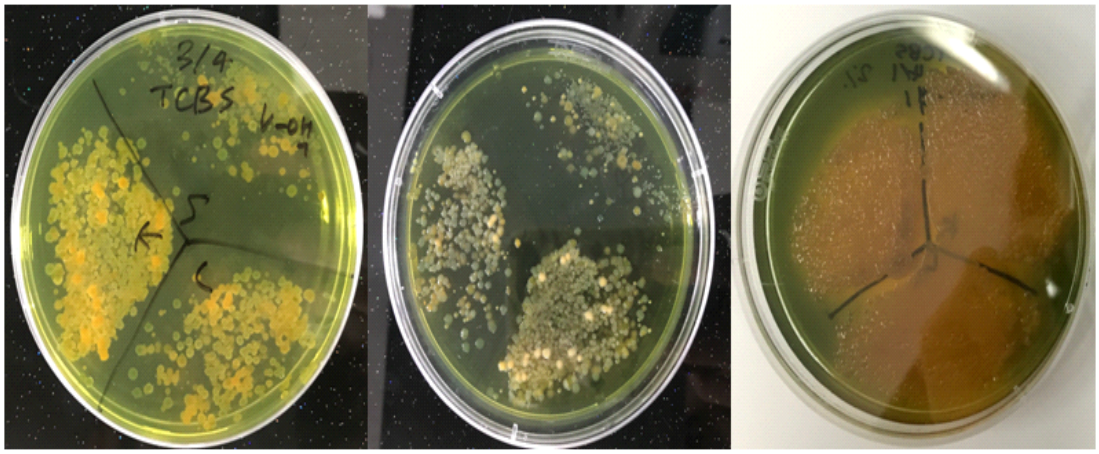
(A) Dead Fish of Group Infected by *S. parauberis*, (B) Dead Fish of Group Infected by *V. harveyi*, (C) Dead Fish of Group Infected by *E. tarda*.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

(A)



(B)



(C)

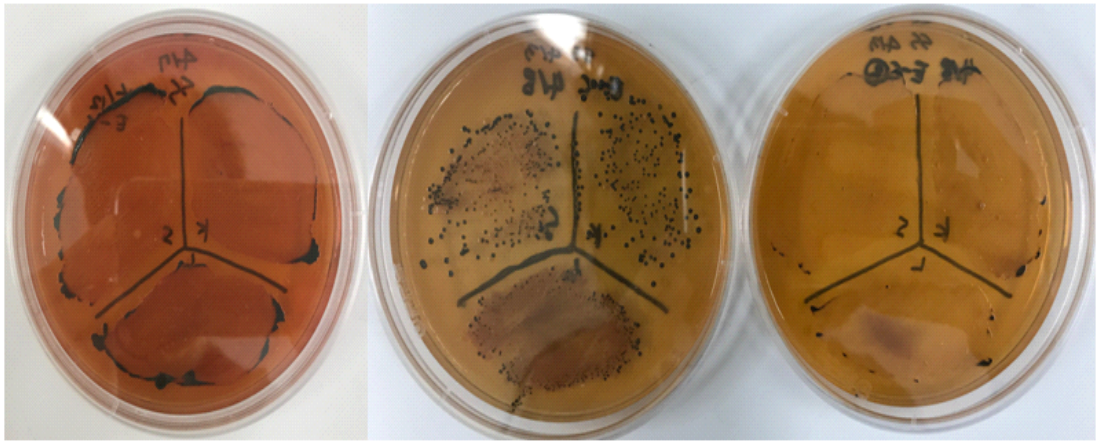


Fig. 8. Each Bacterial Culture Result of *P. olivaceus* that Died during the Artificial Infection Experiment.

(A) Dead Fish of Group Infected by *S. parauberis*, (B) Dead Fish of Group Infected by *V. harveyi*, (C) Dead Fish of Group Infected by *E. tarda*.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

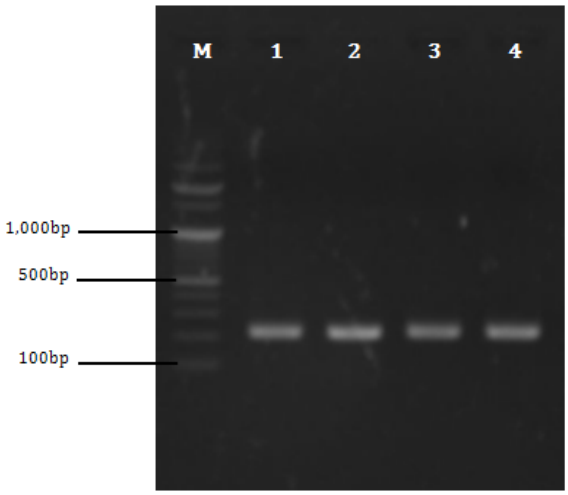


Fig. 9. PCR Analysis of Strains Isolated from Death *P. olivaceus* of Each Group after inoculating *S. parauberi* into Abdominal Cavity (220 bp).
Lane 1; A group (Mixture Lactic Acid Bacteria-Liquid Type), Lane 2; B group (Mixture Lactic Acid Bacteria-Powder Type), Lane 3&4; Control Group), M; 100 bp DNA ladder.

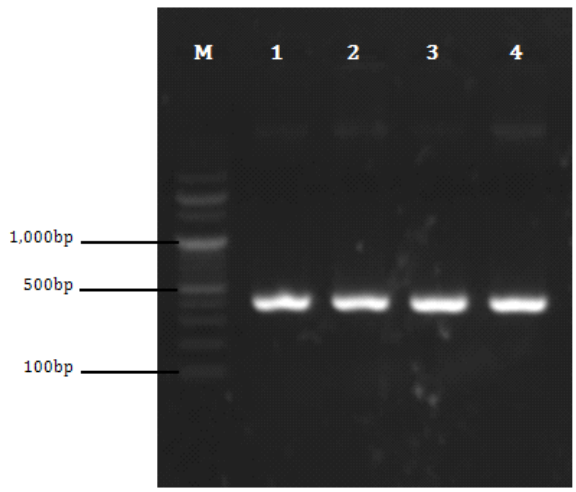


Fig. 10. PCR Analysis of Strains Isolated from Death *P. olivaceus* of Each Group after inoculating *E. tarda* into Abdominal Cavity (416 bp).
Lane 1; A group (Mixture Lactic Acid Bacteria-Liquid Type), Lane 2; B group (Mixture Lactic Acid Bacteria-Powder Type), Lane 3&4; Control Group), M; 100 bp DNA ladder.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

2. 마늘 및 생균보조제 첨가 사료 적용 실험

2.1. Disc diffusion 방법을 이용한 항균 효과 분석

항균실험 결과 마늘 및 복합 유산균을 멸균증류수를 사용하여 1/2씩 단계 희석한 disc에서 다음과 같은 저지대가 관찰되었고(Table 9, Fig. 11), 실험에 사용된 11균주 중 9균주에 대하여 항균활성을 가지는 것으로 나타났다.

Table 9. Length of Stoppage in Antibacterial Experiment using Disc Diffusion Method

(단위:mm)

Bacteria	원 액	2^{-1}	2^{-2}	2^{-3}	2^{-4}	2^{-5}
S. parauberis-1	13	13	R	R	R	R
S. parauberis-2	14	R	R	R	R	R
S. parauberis-3	R	R	R	R	R	R
S. parauberis-4	14	10	R	R	R	R
S. parauberis-5	12	R	R	R	R	R
V. harveyi-1	12	R	R	R	R	R
V. scophtalmi	18	17	18	18	17	10
V. anginolyticus	R	R	R	R	R	R
V. harveyi-2	20	20	20	18	16	14
E. tarda-1	23	18	18	18	18	17
E. tarda-2	32	29	20	14	R	R

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

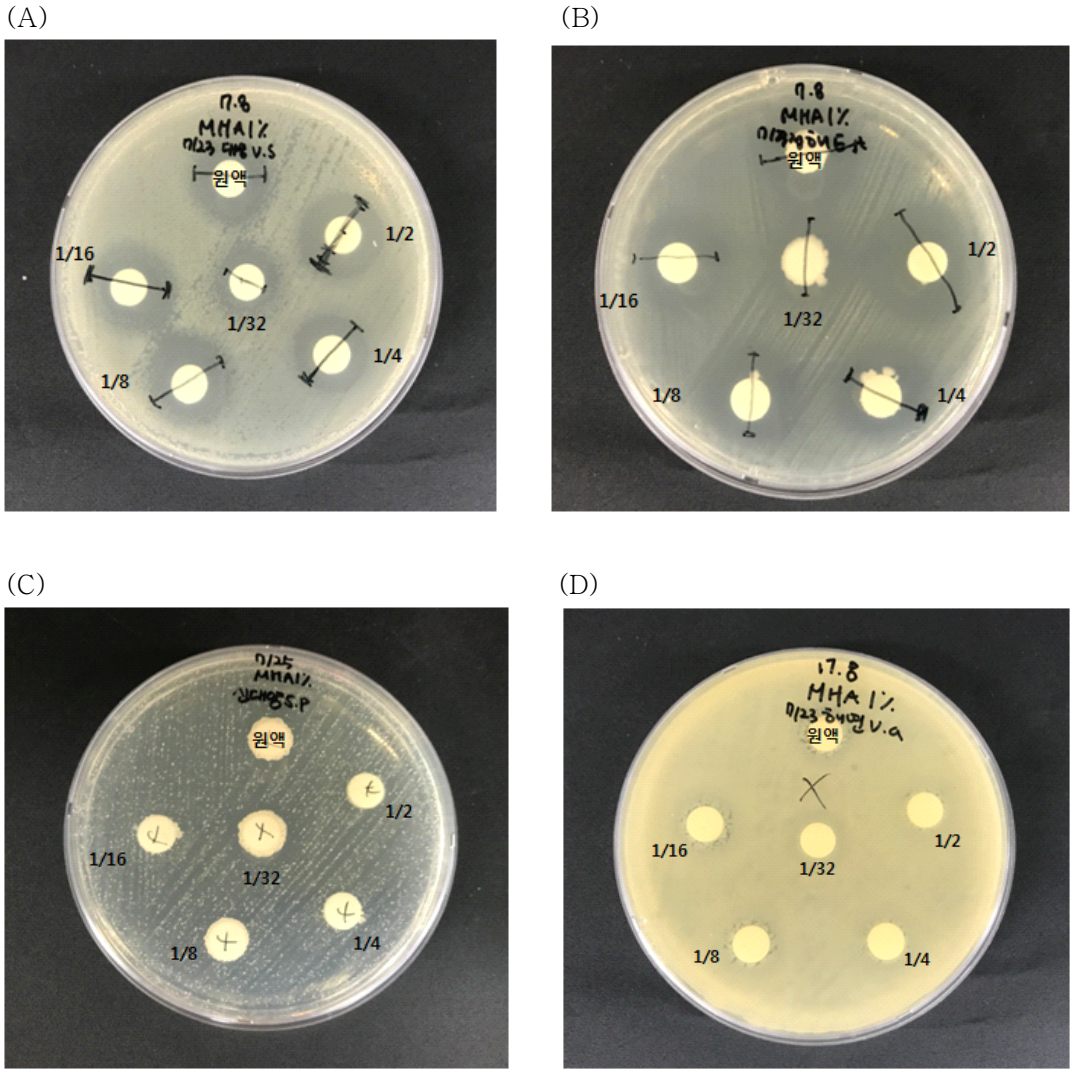


Fig. 11. Antibacterial Experiment Results using Disk Diffusion Method

(A) *V. scophtalmi*, (B) *E. tarda* (C) *S. parauberis*, (D) *V. anginolyticus*.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

2.2. 혈액 생리학적 분석

마늘 및 복합 유산균을 첨가한 사료를 급이한 실험구, 일반 시판 배합사료를 급이한 대조구 사이에 8종류의 항목(ALB, Ca, CHOL, CREA, PHOS, TBIL, TP 및 GLoB)에 대한 혈액 분석을 실시한 결과, 대조구에 비해 실험구에서 유의적 차이가 나타나지 않았다(Table 10, 11).

이 결과로 볼 때, 마늘 및 복합 유산균을 첨가하여 먹인 넙치에서는 혈액 생리학적으로 부작용이 나타나지 않는 것으로 판단되며 넙치의 사료첨가제로서 안전하다는 것이 확인되었다.

Table 10. Blood Physiology Analysis of *P. olivaceus* having Feed with Garlic and Mixture Lactic Acid Bacteria

항목	대조구			마늘 및 복합 유산균		
	1	2	3	1	2	3
ALB	0.0g/dL	0.0g/dL	0.0g/dL	0.0g/dL	0.2g/dL	0.0g/dL
Ca	11.8mg/dL	10.6mg/dL	10.8mg/dL	13.6mg/dL	13.5mg/dL	12.5mg/dL
CHOL	105mg/dL	92mg/dL	69mg/dL	96mg/dL	76mg/dL	63mg/dL
CREA	0.0mg/dL	0.0mg/dL	0.0mg/dL	0.0mg/dL	0.0mg/dL	0.0mg/dL
PHOS	13.5mg/dL	10.9mg/dL	9.0mg/dL	9.7mg/dL	12.7mg/dL	8.6mg/dL
TBIL	0.3mg/dL	0.3mg/dL	0.3mg/dL	0.3mg/dL	0.3mg/dL	0.3mg/dL
TP	1.3g/dL	1.4g/dL	1.0g/dL	1.6g/dL	2.1g/dL	1.1g/dL
GLoB	1.3g/dL	1.4g/dL	1.0g/dL	1.6g/dL	2.0g/dL	1.1g/dL

* ALB;Albumin, Ca;Calcium, CHOL;Cholesterol, CREA;Creatinine, PHOS;Inorganic phosphate, TBIL;Total bilirubin, TP;Total protein, GLOB;Globulin.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Table 11. Blood Physiology Analysis of *P. olivaceus* having Feed with Garlic and Mixture Lactic Acid Bacteria (Average)

항목	대조구	마늘 및 복합 유산균
ALB	0.0±0.0g/dL	0.1±0.1g/dL
Ca	11.1±0.5mg/dL	13.2±0.5mg/dL
CHOL	88.7±14.9mg/dL	78.3±13.6mg/dL
CREA	0.0±0.0mg/dL	0.0±0.0mg/dL
PHOS	11.1±1.8mg/dL	10.3±1.7mg/dL
TBIL	0.3±0.0mg/dL	0.3±0.0mg/dL
TP	1.2±0.2g/dL	1.6±0.4g/dL
GLoB	1.2±0.2g/dL	1.6±0.4g/dL

* ALB;Albumin, Ca;Calcium, CHOL;Cholesterol, CREA;Creatinine, PHOS;Inorganic phosphate, TBIL;Total bilirubin, TP;Total protein, GLOB;Globulin.

2.3. 공격실험

*S. parauberis*를 사용하여 감염시킨 경우, 마늘 및 복합 유산균을 첨가하지 않은 대조구에서는 감염 후 19일째 100%의 누적 폐사율을 보였으며, 실험구에서는 실험이 종료되는 21일째까지 60%의 누적 폐사율을 나타내었다(Fig. 12).

*V. harveyi*를 사용하여 감염시킨 경우, 마늘 및 복합 유산균을 첨가하지 않은 대조구에서는 감염 후 10일째 첫 폐사어가 발생하였고, 감염 후 21일째까지 90%의 누적 폐사율을 보였으며, 실험구에서는 감염 후 21일째까지 50%의 누적 폐사율을 나타내었다(Fig. 13).

*E. tarda*를 사용하여 감염시킨 경우, 마늘 및 복합 유산균을 첨가하지 않은 대조구에서는 감염 후 6일째 첫 폐사어가 발생하였고, 11일째 100%의 누적 폐사율을 보였으며, 실험구에서는 감염 후 13일째 모두 폐사하였다(Fig. 14).

PBS를 복강주사한 음성대조구에서는 폐사가 나타나지 않았다.

공격실험 기간 동안 폐사한 넙치는 외부증상 관찰을 통하여 접종한 세균의

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

감염증상이 나타나는지를 확인하였고(Fig. 15), 세균 배양 및 PCR 분석을 실시하여 접종한 세균이 다시 검출되는지를 모두 확인하였다 (Fig. 16, 17, 18, 19).

Gram(+) 세균인 *S. parauberis*를 사용하여 넙치에 감염시킨 경우, 상대생존율은 40%이었고, Gram(−) 세균인 *V. harveyi*를 사용한 경우, 상대생존율은 44%이었으며, 또 다른 Gram(−) 세균인 *E. tarda*를 사용한 경우, 대조구와 동일하게 실험구에서도 100% 폐사한 것으로 나타났다.

이전의 첫 번째 공격실험 결과보다 모든 실험구에서 폐사가 전체적으로 빠르게 진행되었으며, 이것은 26±0.5℃의 높은 수온 환경에서 실험했기 때문인 것으로 판단된다.

또한, *S. parauberis*와 *V. harveyi*를 사용하여 감염시킨 경우, 대조구에 비해 상대생존율이 40% 이상으로 높은 항균효과를 나타내었지만, *E. tarda*에서 항균효과가 낮게 나타났던 이유는 높은 수온 환경뿐만 아니라, 해당 균주의 병원성이 실험에 사용된 다른 세균 종에 비해서 매우 높았기 때문인 것으로 사료된다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

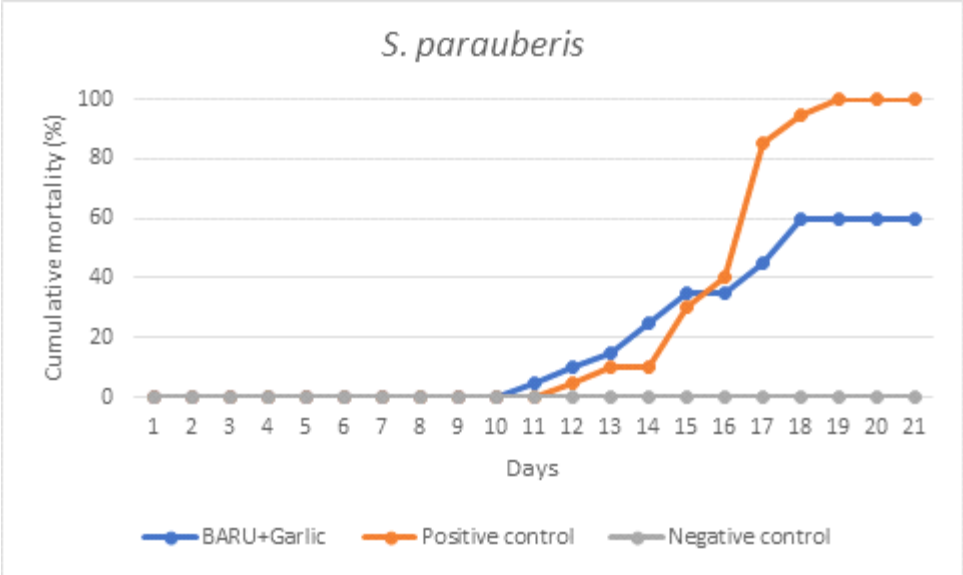


Fig. 12. Cumulative Mortality Rates of *P. olivaceus* in Experimental Group (Garlic and Mixture Lactic Acid Bacteria) and Positive Control (Commercial Mixture Feed), inoculated with *S. parauberis* into Abdominal Cavity and Negative Control Group inoculated with PBS into Abdominal Cavity.

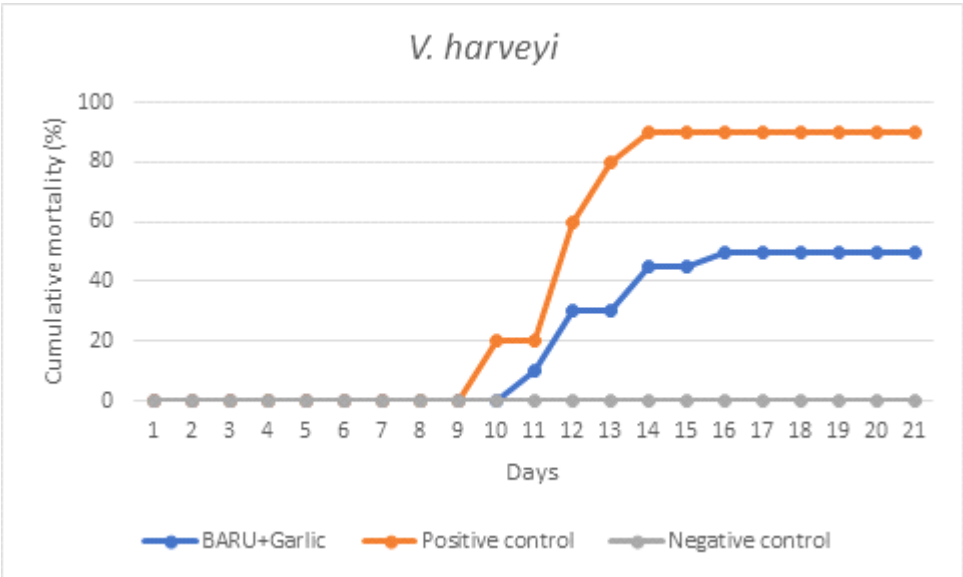


Fig. 13. Cumulative Mortality Rates of *P. olivaceus* in Experimental Group (Garlic and Mixture Lactic Acid Bacteria) and Positive Control (Commercial Mixture Feed), inoculated with *V. harveyi* into Abdominal

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Cavity and Negative Control Group inoculated with PBS into Abdominal Cavity.

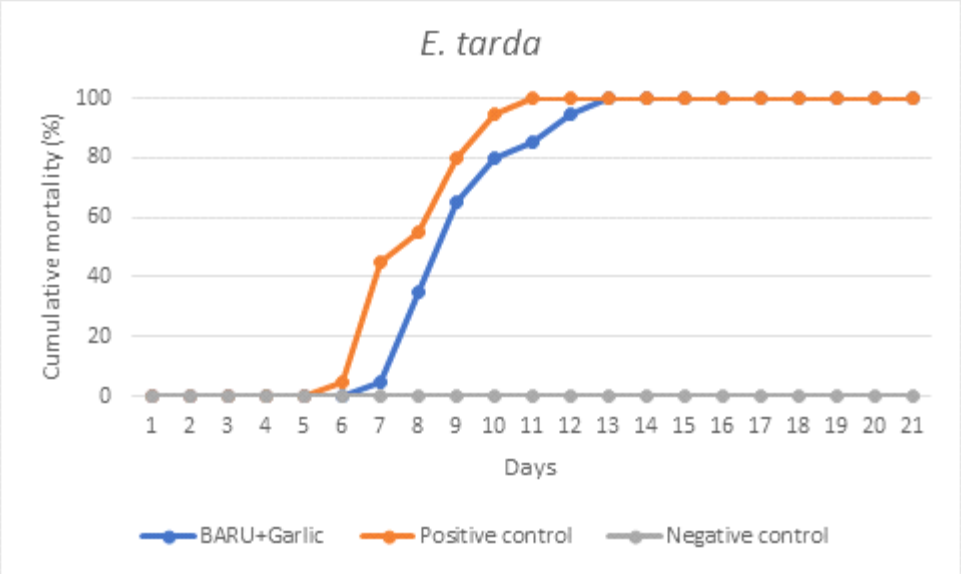
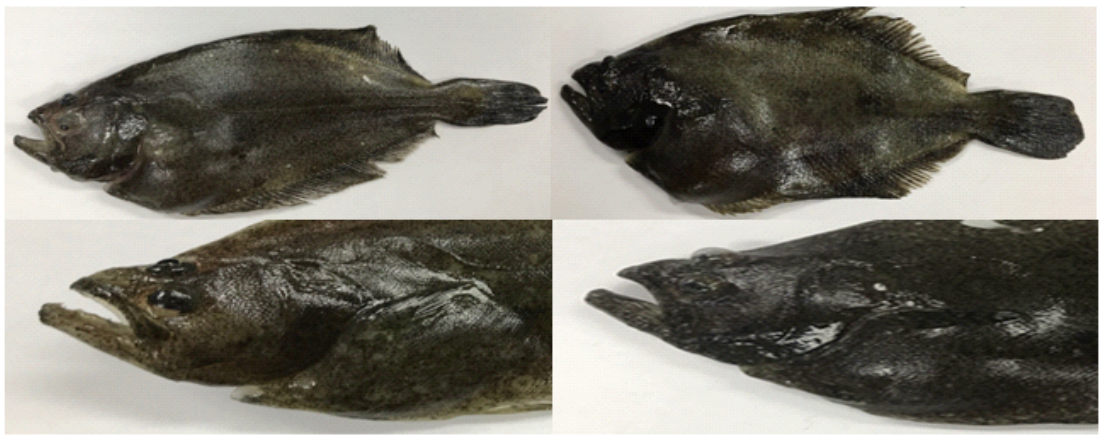


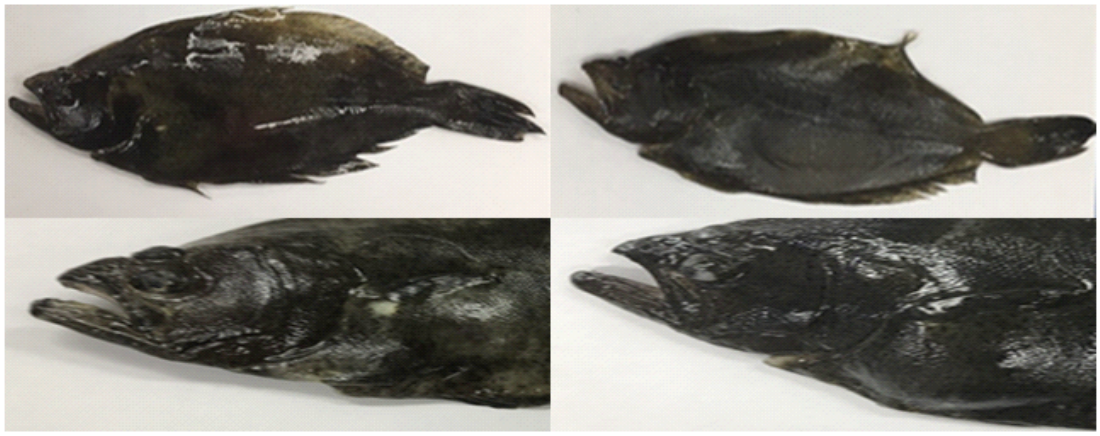
Fig. 14. Cumulative Mortality Rates of *P. olivaceus* in Experimental Group (Garlic and Mixture Lactic Acid Bacteria) and Positive Control (Commercial Mixture Feed), inoculated with *E. tarda* into Abdominal Cavity and Negative Control Group inoculated with PBS into Abdominal Cavity.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

(A)



(B)



(C)

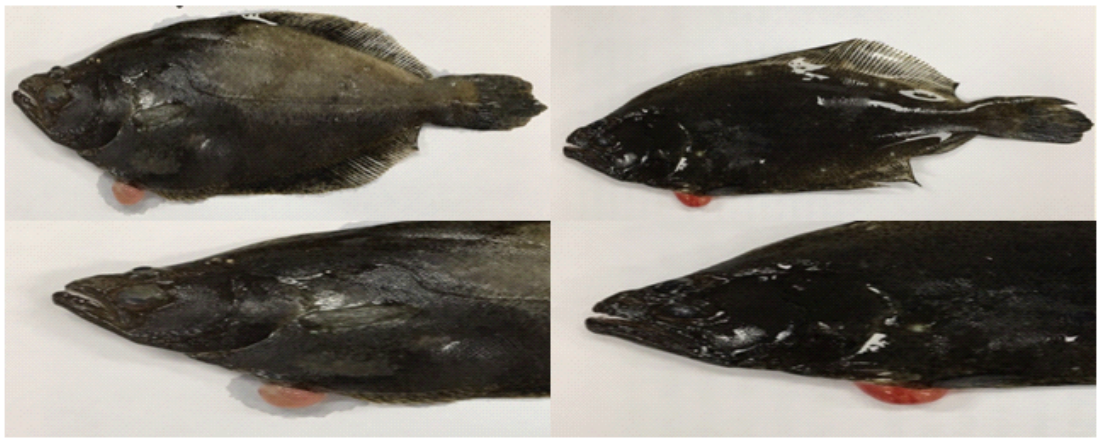
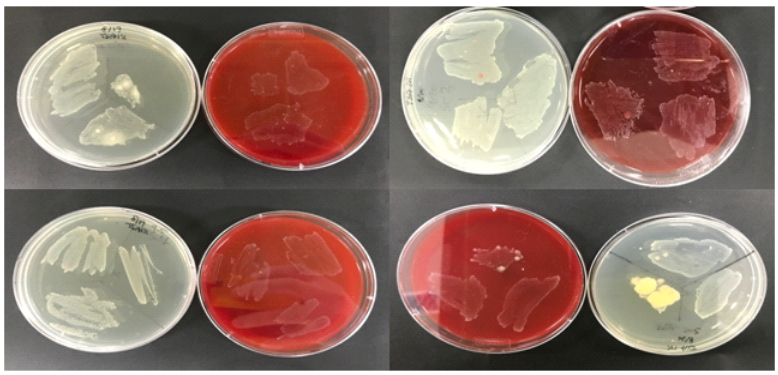


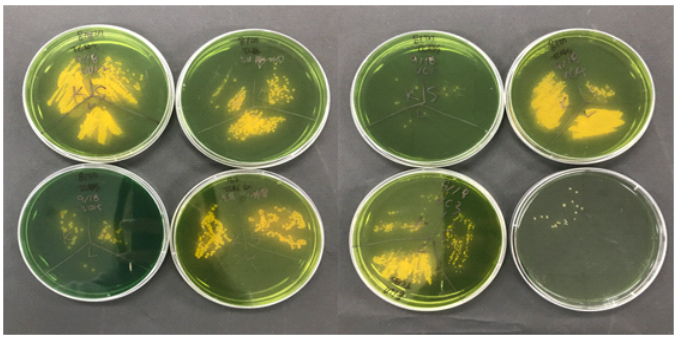
Fig. 15. External Symptoms of Bacterial Infection of Death *P. olivaceus* during the Artificial Infection Experiment Period. (A) Dead Fish of Group Infected by *S. parauberis*, (B) Dead Fish of Group Infected by *V. harveyi*, (C) Dead Fish of Group Infected by *E. tarda*.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

(A)



(B)



(C)

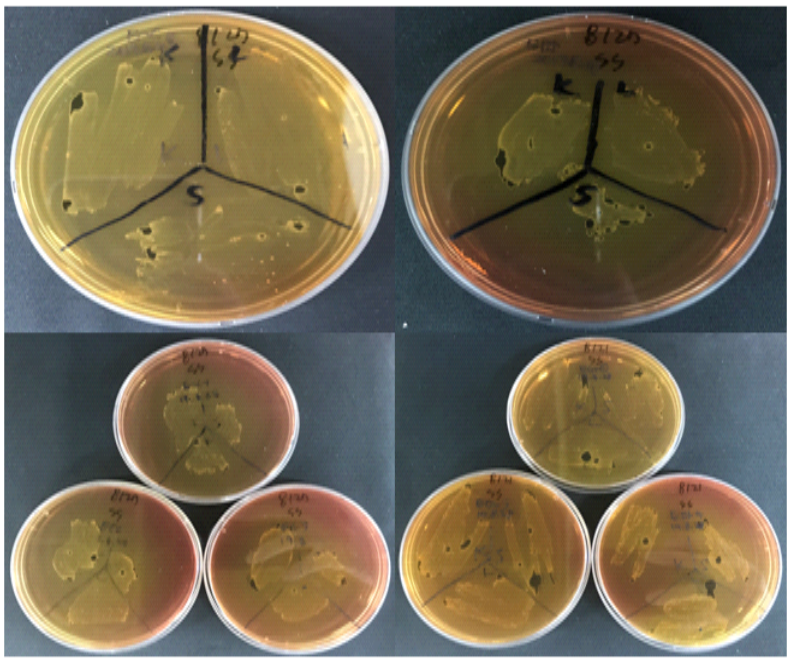


Fig. 16. Each Bacterial Culture Result of *P. olivaceus* that Died during the Artificial Infection Experiment. (A) Dead Fish of Group Infected by *S. parauberis*, (B) Dead Fish of Group Infected by *V. harveyi*, (C) Dead Fish of Group Infected by *E. tarda*.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

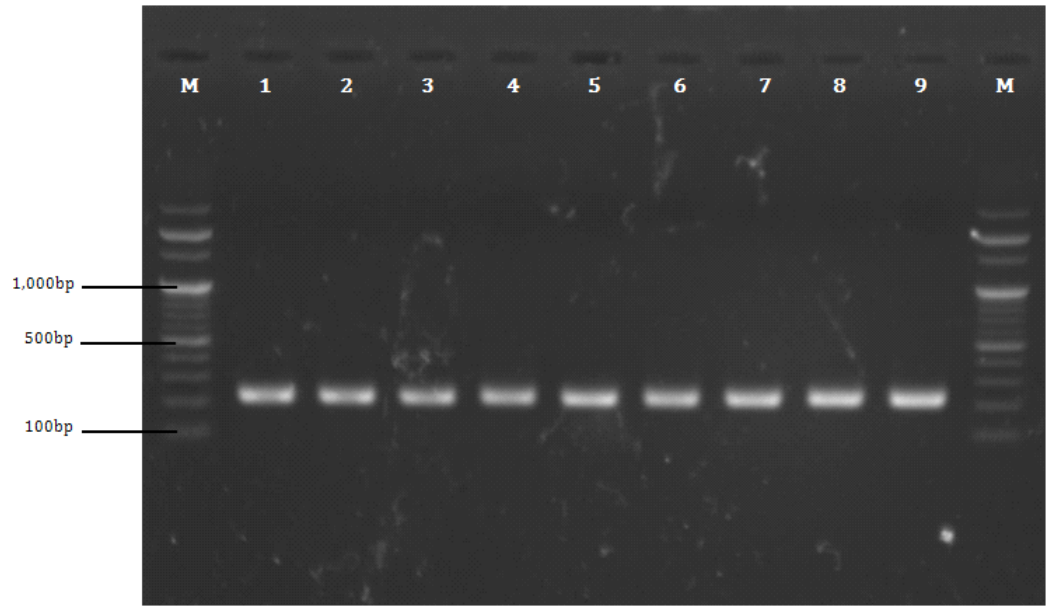


Fig. 17. PCR Analysis of Strains Isolated from Death *P. olivaceus* of Each Group after inoculating *S. parauberi* into Abdominal Cavity (220 bp). Lane 1-4; Dead Fish of Experimental Group, Lane 5-8; Dead Fish of Control Group, Lane 9; Positive Control, M; 100bp DNA ladder.

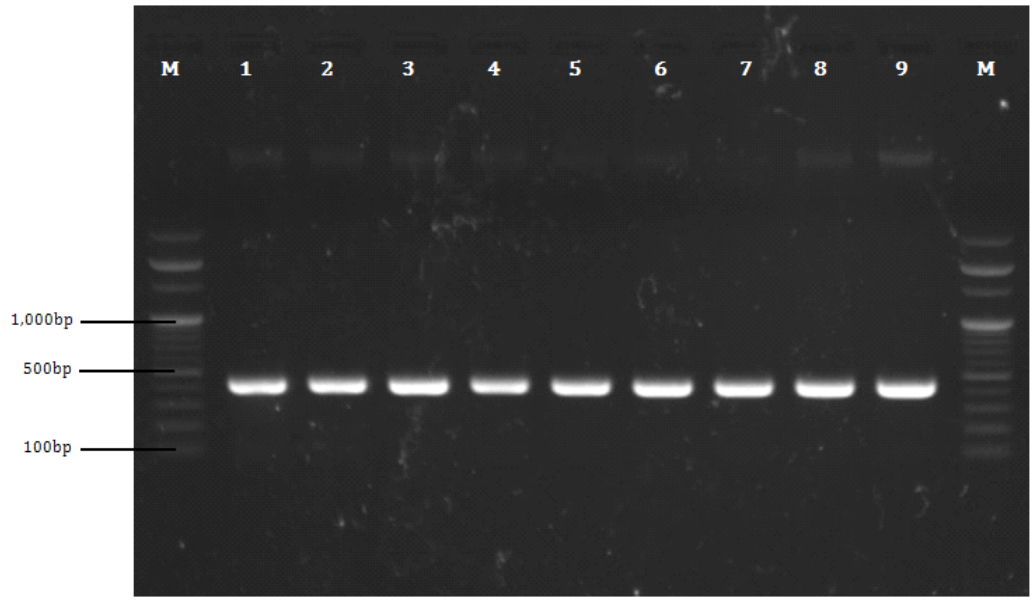


Fig. 18. PCR Analysis of Strains Isolated from Death *P. olivaceus* of Each Group after inoculating *E. tarda* into Abdominal Cavity (416 bp). Lane 1-4; Dead Fish of Experimental Group, Lane 5-8; Dead Fish of Control Group, Lane 9; Positive Control, M; 100bp DNA ladder.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

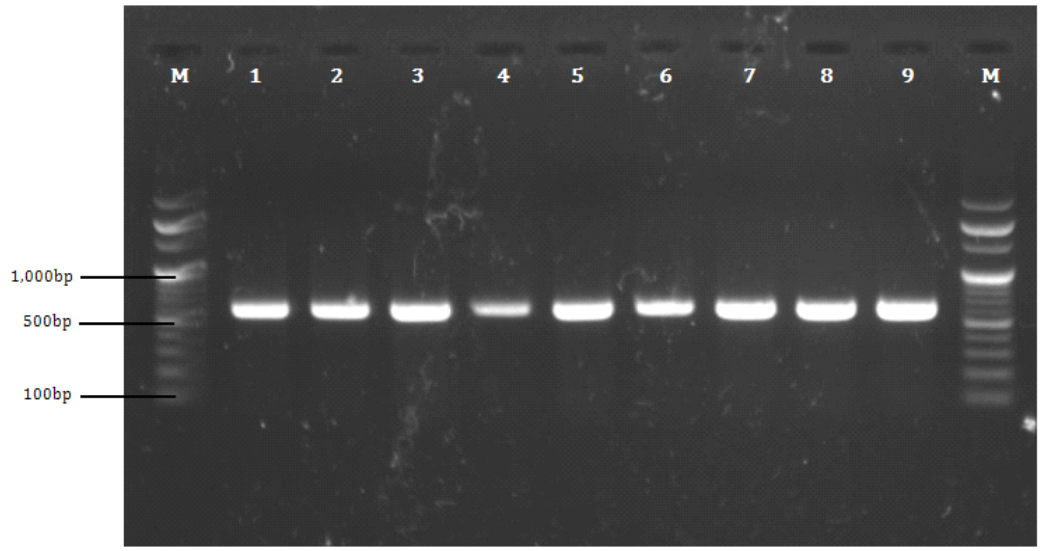


Fig. 19. PCR Analysis of Strains Isolated from Death *P. olivaceus* of Each Group after inoculating *V. harveyi* into Abdominal Cavity (601 bp). Lane 1-4; Dead Fish of Experimental Group, Lane 5-8; Dead Fish of Control Group, Lane 9; Positive Control, M; 100bp DNA ladder.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Ⅳ. 고 찰

제주는 1980년대 염지하수 개발 성공으로 연중 수온이 17~18℃ 유지가 가능한 육상 양식장 시설이 가능해져 넙치 양식산업은 제주의 중요한 1차 산업으로 지속적으로 성장해 왔다.

그러나 밀식 및 수온 상승 등 환경변화로 인해 넙치는 *E. tarda, S. parauberis* 및 *Vibrio* sp. 등으로 인한 질병으로 폐사가 증가하면서 경제적 손실이 늘고 있다. 이로 인해 넙치의 생산량과 질병이 증가함에 따라 항생제 사용도 증가할 수밖에 없어 항생제 오남용으로 인한 위험성은 지속적으로 대두되고 있다(Son et al., 2009; Yoon et al., 2012; Romero et al., 2012).

이러한 문제를 개선하기 위해 천연물질을 사료첨가제를 활용하여 넙치의 면역력을 높여 질병에 대한 저항성을 높이기 위한 연구들이 다양하게 진행되고 있다. 특히, 보건의료분야 연구에서는 병원성 세균에 대한 항균 효과 연구에서 마늘이 많이 이용되어 왔다. 병원성 세균에 대한 생마늘 추출물은 *E. faecalis*(ATCC 29212)와 *P. aeruginosa*(ATCC 27853)에는 대조 항생제인 Ampicillin 10 ㎍과 유사한 항균효과가 있었고, *S. aureus(ATCC 25923)*와 *E. coli*(ATCC 25922)에서는 Ampicillin 10 ㎍보다 감수성이 높게 나타나 마늘 추출물이 보건의료분야에서 세균에 대한 항균효과가 있는 것으로 나타났다(Moon & Yook, 2014).

마늘을 활용한 양식분야 연구에서는 마늘 추출물을 어류 복강투여 및 경구투여했을 경우, 어류의 식세포 활성(Jφrgensen et al., 1993a), 라이소자임(Engstad et al., 1992; Jφrgensen et al., 1993b)등 다양한 면역력 증강을 통해 폐사를 감소시켜 결국 생산성이 향상된다는 결과가 있었다(Chen and Ainsworth, 1992). 이러한 항균효과는 선천적인 비특이적인 면역반응으로 나타나며, 즉각적이면서 비선택적으로 일어나기 때문에 병원균에 대항하기 위해 빠르게 반응하는 것으로 알려져 있다(Smith & Lumsden, 1983).

따라서 본 연구에서는 액상형, 분말형 복합 유산균 2%를 첨가 사료로 급이시켰을 때, 마늘과 복합 유산균 2%를 첨가 사료로 급이시켰을 때 넙치의 항균력에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 넙치의 주요 세균성 병원체인 *Edwardsiella*

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

tarda, *Streptococcus parauberis* 및 *Vibrio harveyi*를 대상으로 항균효과가 있는 지 실험하였다.

복합 유산균 생균제만 첨가된 사료를 급이했을 때 혈액생리학적 분석 결과 대조구 사이에 8종류의 항목(ALB, Ca, CHOL, CREA, PHOS, TBIL, TP 및 GLoB)에 대한 혈액 분석을 실시한 결과, 대조구에 비해 실험구에서 유의적인 차이는 나타나지 않았으며, 이것은 혈액 생리학적인 부작용은 나타나지 않는다는 것으로 판단된다.

공격실험 결과 *S. parauberis*를 감염시킨 경우, 생균제를 첨가하지 않은 대조구에서는 감염 후 39일째까지 100%의 누적 폐사율을 보였으며, A 실험구(액상형 생균제) 및 B 실험구(분말형 생균제)에서는 각각 73% 및 87%의 누적 폐사율을 보였다<Table 12>. *V. harveyi*를 사용하여 감염시킨 경우, 대조구, A 실험구 및 B 실험구에서는 실험 종료 시까지 각각 80%, 73% 및 87%의 누적 폐사율을 보였고, *E. tarda*를 사용하여 감염시킨 경우, 대조구, A 실험구 및 B 실험구에서는 실험 종료 시까지 각각 67%, 53% 및 60%의 누적 폐사율을 보여 *E. tarda*에 대한 항균효과가 조금 더 좋은 것으로 나타났다.

Table 12. Comparison of the results of the artificial infection experiment on the feed additive with mixture lactic acid bacteria

감염균	실험구	누적폐사율(감염후 일수)
S. parauberis	대조구	100%(39일째)
	A 실험구 (액상형 생균제)	73% (39일째)
	B 실험구 (분말형 생균제)	87%(39일째)
V. harveyi	대조구	80%(실험 종료시)
	A 실험구 (액상형 생균제)	73%(실험 종료시)
	B 실험구 (분말형 생균제)	87%(실험 종료시)
E. tarda	대조구	67%(실험종료시)
	A 실험구 (액상형 생균제)	53%(실험종료시)
	B 실험구 (분말형 생균제)	60%(실험종료시)

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

앞서 실험에서 뚜렷한 항균효과가 나타나지 않아 마늘(1%)을 첨가한 복합 유산균 분말형(2%) 사료를 같은 세균을 대상으로 실험한 결과 11균주 중 9 균주에서 항균활성을 보였으며, 혈액 생리학적 분석에서 앞선 실험과 마찬가지로 유의적인 차이는 없었다. 공격실험에서는 *S. parauberis*를 감염시킨 경우, 마늘 복합 유산균을 첨가하지 않은 대조구에서는 감염 후 19일째 100%의 누적 폐사율을 보였으며, 실험구에서는 실험이 종료되는 21일째까지 60%의 누적 폐사율을 나타내었다<Table 13>. *V. harveyi*를 감염시킨 경우, 마늘 복합 유산균을 첨가하지 않은 대조구에서는 감염 후 10일째 첫 폐사어가 발생하였고, 감염 후 21일째까지 90%의 누적 폐사율을 보였으며, 실험구에서는 감염 후 21일째까지 50%의 누적 폐사율을 나타내었다. E. tarda를 감염시킨 경우, 마늘 복합 유산균을 첨가하지 않은 대조구에서는 감염 후 6일째 첫 폐사어가 발생하였고, 11일째 100%의 누적 폐사율을 보였으며, 실험구에서는 감염 후 13일째 모두 폐사하였다. 첫 번째 공격실험과 두 번째 공격실험은 처음 생균보조제만 급이했을때의 수온은 20±1℃, 마늘 복합 유산균을 급이했을 때는 26±0.5℃의 높은 수온 환경에서 진행되어 모든 실험구에서 폐사가 빠르게 진행된 것으로 판단된다.

특히, *S. parauberis*와 *V. harveyi*를 사용하여 감염시킨 경우, 대조구에 비해 상대생존율이 40% 이상으로 높은 항균효과를 나타내었지만, *E. tarda*에서 항균효과가 낮게 나타난 이유는 높은 수온 환경뿐만 아니라, 해당 균주의 병원성이 실험에 사용된 다른 세균 종에 비해서 매우 강했기 때문인 것으로 사료된다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Table 13. Comparison of the results of the artificial infection experiment on the feed additives with garlic and mixture lactic acid bacteria

감염균	실험구	누적폐사율(감염후 일수)
S. parauberis	대조구	100%(19일째)
	실험구	60%(21일째, 실험종료시)
V. harveyi	대조구	90%(21일째, 실험종료시)
	실험구	50%(21일째, 실험종료시)
E. tarda	대조구	100%(11일째)
	실험구	100%(13일째)

앞서 실험에서 마늘이 첨가된 마늘 및 복합 유산균 분말형 2%를 사료에 첨가하여 같은 세균을 대상으로 실험한 결과 11균주 중 9 균주에서 항균활성을 보였으며, 혈액생리학적 분석에서 앞선 실험과 마찬가지로 유의적인 차이는 없었다.

공격실험에서는 *S. parauberis*를 사용하여 감염시킨 경우, 마늘 및 복합 유산균을 첨가하지 않은 대조구에서는 감염 후 19일째 100%의 누적 폐사율을 보였으며, 실험구에서는 실험이 종료되는 21일째까지 60%의 누적 폐사율을 나타내었다.

*V. harveyi*를 사용하여 감염시킨 경우, 마늘 및 복합 유산균을 첨가하지 않은 대조구에서는 감염 후 10일째 첫 폐사어가 발생하였고, 감염 후 21일째까지 90%의 누적 폐사율을 보였으며, 실험구에서는 감염 후 21일째까지 50%의 누적 폐사율을 나타내었다. E. tarda를 사용하여 감염시킨 경우, 마늘 및 복합 유산균을 첨가하지 않은 대조구에서는 감염 후 6일째 첫 폐사어가 발생하였고, 11일째 100%의 누적 폐사율을 보였으며, 실험구에서는 감염 후 13일째 모두 폐사하였다. 첫 번째 공격실험과 두 번째 공격실험은 처음 생균보조제만 급이했을때의 수온은 20±1℃, 마늘 복합 유산균을 급이했을 때는 26±0.5℃의 높은 수온 환경에서 진행되어 모든 실험구에서 폐사가 빠르게 진행된 것으로 판단된다.

특히, *S. parauberis*와 *V. harveyi*를 사용하여 감염시킨 경우, 대조구에 비해

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

상대 생존율이 40% 이상으로 높은 항균효과를 나타내었지만, *E. tarda*에서 항균효과가 낮게 나타난 이유는 높은 수온 환경뿐만 아니라, 해당 균주의 병원성이 실험에 사용된 다른 세균 종에 비해서 매우 강했기 때문인 것으로 사료된다.

본 연구에서는 넙치에게 급여되는 사료에 마늘과 복합 유산균(2%)을 첨가하여 어류의 세균성 감염을 효과적으로 방지하고, 자연스럽게 항생제 사용을 줄여 항생제 내성균 증가를 억제하여 친환경 양식 방법에 의해 안전성이 높은 건강한 어류를 생산함으로써 고품종 친환경 양식 넙치를 생산 가능할 것으로 판단된다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Ⅴ. 요 약

본 연구에서는 넙치를 대상으로 복합 유산균 2%(액상형, 분말형)를 첨가 사료로 급이시켰을 때와 마늘(1%) 및 복합 유산균(2%)을 첨가 사료로 급이시켰을 때 넙치의 비 특이적 면역반응에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

건강한 넙치를 대상으로 액상 복합 유산균 2%를 혼합한 사료와 분말 복합 유산균 2%를 혼합한 사료를 2개월간 급이 했을 때 누적 폐사율은 대조구 17.7%, 액상 복합 유산균 실험군은 10.4%, 분말 복합 유산균 실험군은 6.9%로 나타났다. 평균 증체량은 대조구는 74g, 액상 복합 유산균 실험군은 104g, 분말 복합 유산균 실험군은 94g으로 각각 30g과 20g이 증가하여 성장에 효과가 있는 것으로 나타났다.

복합 유산균의 항균효과 분석을 위해 Disc diffusion 방법을 이용한 항균효과를 분석한 결과 복합 유산균의 항균효과는 나타나지 않았으며, 혈액 생리학적 분석에서 8종류의 항목(ALB, Ca, CHOL, CREA, PHOS, TBIL, TP 및 GLoB)에 대한 혈액 분석을 실시한 결과 유의적인 차이가 없어 부작용이 없는 것으로 판단되고, 넙치의 첨가사료로서 안전한 것으로 확인되었다. 공격실험에서는 넙치의 주요 세균성 병원체인 *Streptococcus parauberis (S. parauberis)* 및 *Vibrio harveyi (V. harveyi), Edwardsiella tarda (E. tarda)*를 각각 PBS로 1 x 10^5 cfu/mL이 되도록 현탁하여, 각 group별로 넙치의 복강에 100㎕씩 접종한 결과 *S. parauberis*를 사용하여 감염시킨 경우 액상형 복합 유산균은 27%, 분말형 복합 유산균은 13%의 누적 폐사율 감소를 보였다. *V. harveyi*를 사용하여 감염시킨 경우 액상형 복합 유산균은 7% 감소, 분말형 복합 유산균은 7% 증가하였고, *E. tarda*를 사용하여 감염시킨 경우 액상형 복합 유산균은 14%, 분말 복합 유산균은 7%의 누적 폐사율 감소가 있었으나 효과는 크지 않은 것으로 판단된다. 폐사한 넙치는 감염증상을 확인하였고, 비장, 신장, 간 조직을 채취하여 세균 배양 및 PCR 분석을 실시하여 접종한 세균이 다시 검출되는지 모두 확인한 결과 정확하게 일치하는 것으로 나타났다.

앞선 실험에서 복합 유산균이 넙치의 성장에는 효과가 있는 것으로 나타났으

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

나 항균효과 실험에서는 효과가 뚜렷하게 나타나지 않아, 마늘이 병원성 세균에 대한 항균효과가 있어(Moon & Yook) 마늘 1%를 혼합하여 실험을 다시 실시하였다. Disc diffusion 방법을 이용하여 양식 넙치에 대표적으로 발병하는 3종(*E. tarda, S. parauberis, Vibrio* sp.)의 어병세균 11 균주에 대하여 $1x10^6$ cfu/mL 농도로 희석하여 저지대를 확인하여 항균 효과를 분석한 결과 9 균주에 대하여 항균활성을 나타냈다. 혈액 생리학적 분석에서 8종류의 항목(ALB, Ca, CHOL, CREA, PHOS, TBIL, TP 및 GLoB)에 대한 혈액 분석을 실시한 결과, 대조구에 비해 실험구에서 유의적 차이가 나타나지 부작용이 나타나지 않는 것으로 판단된다. 공격실험에서 넙치의 주요 세균성 병원체인 *E. tarda, S. parauberis* 및 *V. harveyi*를 각각 PBS로 1 x 10^5 cfu/mL이 되도록 현탁하여, 각 group별로 넙치의 복강에 100㎕씩 접종하고, 음성대조구로서 PBS를 넙치의 복강에 100㎕씩 접종한 결과 *S. parauberis*와 *V. harveyi*를 사용하여 감염시킨 경우 마늘 및 유산균 복합제는 40%의 누적 폐사율 감소를 보였다. *E. tarda*를 사용하여 감염시킨 경우 실험 후 7~11일 사이에 약간의 폐사 지연효과가 있었으나 13일째 모두 폐사 하였다. 폐사한 넙치는 감염증상을 확인하였고, 비장, 신장, 간 조직을 채취하여 세균 배양 및 PCR 분석을 실시하여 접종한 세균이 다시 검출되는지 모두 확인하였다. 복합 유산균만을 사용한 첫 번째 공격실험 결과보다 모든 실험구에서 폐사가 전체적으로 빠르게 진행된 것은 26±0.5℃의 높은 수온 환경에서 실험했기 때문인 것으로 판단된다. 특히, *S. parauberis*와 *V. harveyi*를 사용하여 넙치를 감염시킨 경우, 대조구에 비해 상대생존율이 40% 이상으로 높은 항균효과를 나타내었지만, *E. tarda*에서 항균효과가 나타나지 않았던 이유는 높은 수온 환경뿐만 아니라, 해당 균주의 병원성이 실험에 사용된 다른 세균 종에 비해서 매우 높았기 때문인 것으로 판단된다. 폐사한 넙치는 감염증상을 확인하였고, 비장, 신장, 간 조직을 채취하여 세균 배양 및 PCR 분석을 실시하여 접종한 세균이 다시 검출되는지 모두 확인한 결과 정확하게 일치하는 것으로 나타났다.

이에 본 연구에서는 강력한 항산화 및 활성 산소 제거 기능이 있는 복합 유산균과 마늘을 분말로 사료에 첨가하여 넙치의 비 특이적 면역반응을 증진시켜 *S. parauberis, V. harveyi*에 대한 질병 저항성을 향상시켰으며, *E. tarda*에 대해

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

서는 약간의 폐사 지연효과가 있는 것으로 사료된다. 또한 복합 유산균 첨가사료 효율 측정결과 넙치 성장에도 도움이 되고, 사료효율도 약 7~12% 향상된 것으로 나타났으나, 마늘 및 복합 유산균 첨가사료의 효율은 이번 실험에서는 조사되지 못하였다.

결과적으로 마늘 및 복합 유산균제가 최근 문제가 되고 있는 합성항생제 사용을 줄이는데 도움이 될 것으로 보이며, 넙치의 면역력을 높일 수 있는 사료첨가제로 사용할 수 있을 것으로 판단된다.

이번 연구에서 복합 유산균의 항산화 효과와 활성산소 제거 기능에 마늘의 항균효과를 복합적으로 첨가한 사료에서 양식넙치의 *S. parauberis* 와 *V. harveyi* 세균에 대한 비 특이적 면역반응에 도움이 되는 것으로 나타나 천연사료첨가제로 사용이 가능할 수 있음을 보여 주었다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

참고 문헌

제주연구원. 2019. 제주지역 광어 양식산업의 실태와 경제성 분석.

한국해양대 해양과학기술연구소 · 해양과학부, 부경대 양식학과. 2004. 수송에 따른 양식넙치의 혈액변화.

Barton BA and GK Iwama. 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. Annu. Rev. Fish Dis. 1:3-26.

Bong-Kun Jhon, Man-Chul Kim, Young-Hoo Kim1 and Moon-Soo He. 2009. Effects of the Culture Broth of Lactic Acid Bacteria Cultured in Herb Extracts on Growth Promotion and Nonspecific Immune Responses of Aquacultured Fish.

Brunner, G. Reimbold, K. Meissauer A. Schirrmacher. V & Erkell, L. J.(1998). Sulfated glycosaminoglycans enhance tumor cell invasion in vitro by stimulating plasminogen activating, Exp Cell Res. 239, 301~310.

Casillas E, Ames W(1985) Serum chemistry of diseased English sole, Parophrys vetulus Girard, from polluted areas of Puget Sound, Washington. J Fish Dis 8;437-449.

Chen, D. and Ainsworth, A.J. 1992. : Glucan admonistration potentiates immune defense mechanism of channel catfish, ICtalurus punatatus Rafinesque.J. Fish Dis., 15:295-304.

Davis KB, Parker NC(1990) Physiological stress in striped bass: Effect of acclimation temperature. Aquaculture 91:349-358.

Engstad, R.E., Robertson, B. and Frivold, E. 1992. : Yeast glucan induce increase in activity of lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. Fish Dis., 15:295-304.

Gordon RB(1968) Distribution of transaminases (Aminotransferases) in the tissue of the Pacific salmon (Oncorhynchus) with emohasis on the properties and diagnosric use of glutamic oxaloace transaminase. J Fish Res Bd Can 25:1247-1268.

Gyeong Eon Noh, Woo-Jin Kim, Hyun Chul Kim, Choul-Ji Park and Jong-Won Park. 2017. Daily Rhythms and Effect of Short-term Starvation on the of Health Parameters in Olive Flounder

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Paralichthys olivaceus.

K. H. Kyung. 2006. Growth inhibitory activity of sulfur compounds of garlic against pathogenic microorganisms. Journal of Food Hygiene and Safety, Vol. 21, pp. 145-152.

H. K. Kim, H. J. Kwak, K. H. Kim. 2002. Physiological activity and antioxidative effect of garlic (Allium sativum L.) extract. Food Science and Biotechnology, Vol. 11, pp. 500-506.

H. Nakagawa, K. Tsuta, K. Kiuchi, H. Senzaki, K. Tanaka, K. Hioki, A. Tsubura. 2001. Growth inhibitory effects of diallyl disulfide on human breast cancer cell lines. Carcinogenesis, Vol. 22, pp. 891-897.

Hur JW (2002) Physiological responses of fishes to the artificial stresses in the process of aquaculture. Ph.D.Thesis, Pukyong National University, Busan, Korea.

Ik-Soo Jang, Dong-Hwi Kim, and Moon-Soo Heo. 2013. Dietary Administration of Probiotics, Bacillus sp. IS-2, Enhance the Innate Immune Response and Disease Resistance of Paralichthys olivaceus against Streptococcus iniae.

Ji-Hoon Cha, Si-Yong Yang, Seo-Hyung Woo, Jin-Woo Song, Dae-Han Oh and Kyeong-Jun Lee. 2012. Effects of Dietary Supplementation with Bacillus sp. on Growth Performance, Feed Utilization, Innate Immunity andDisease Resistance against Streptococcus iniae in Olive Flounder Paralichthys olivaceus.

Joong Kyun Jeon, Pyong Kih Kim, Yong Joo Park, Hyung Tack Huh. 1995. Study of Serum Constituents in Several Species of Cultured Fish.

Jφrgensen, J.B., Lunde, H. and Robertsen, B. 1993a. : Peritoneal and head kidney cell response to intraperitoneally injected yeast glucan in At-lantic salmon, Salmo salar L.J. Fish Dis., 16:313-325.

Kang-Woong KIM, Kyoung-Duck KIM, Bong-Joo LEE, Jin-Hyeok LEE, Sungchul C. BAI, Youn-Hee CHOI, Hyon-Sob HAN. 2013. Effects of Dietary Inclusion of Various Additives on Growth Performance and Immune Responses in Juvenile Olive Flounder(Paralichthys olivaceus).

Kim JH, Jeong MH, Jun JC and Kim TI. 2014. Changes in hematological

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

biochemical and non-specific immune parameters of olive flounder *Paralichthys olivaceus*, following starvation.

Kim, Y. C. Kim, K. W. Lee, S. H. Park, G. J. Okorie, E. O. Kang, Y. J. & Bai, S. C.(2006). Effects of dietary -1,3glucan β on growth and immune responses in juvenile olive flounder, Paralichthys oivaceus, Journal of Aquaculture 19, 247~253.

Kim MS, Cho JY and Choi HS. 2014. Identification of Vibrio harveyi, Vibrio ichthyoenteri and Photobacterium damselae isolated from olive flounder Paralichthys olivaceus in Korea by multiplex PCR developed using the rpoB gene. Fish Sci 80, 333-339. https://doi.org/10.1007/s12562-014-0702-5.

Kim SS, Galaz GB and Lee KJ and Lee YD. 2006. Effects of dietary supplementation of *Spirulina and Astaxanthin for juvenile olive flounder, Paralichthys olivaceus in low temperature season. J Aquaculture 19, 57-63.*

Korea Ocean Research & Development Institute. 1994. A Study on the Chemical Components of Sermum in Fishes.

K. Song, J. A. Milner. 2001. The influence of heating on the anticancer properties of garlic. Journal of Nutrition, Vol. 131, pp. 1054-1057.

Kwon, M. K. & Jung, S. H. (2012). Comparative study of Pathogenicity following single or coinfection with *Edwardsiella tarda* and *Streptococcus iniae* in olive flounder, Jour. Fish. Mar. Sci. Edu, 24(4), 591~601.

Lee, Jongtaik. 2014. Analysis for Manufacturing Technology and Market Trend of Feed Additive.

Maita M. 2007. Fish health assessment. In: Dietary supplements for the health and quality of cultured fish. Nakagawa H, Sato M and Gatlin DM III, eds. Cabi, Oxford, UK, 10-17.

Olsen YA, IE Einarsdottir and KJ Nissen. 1995. Metomidate anaesthesia in Atlantic salmon, Salmo salar, prevents plasma cortisol increase during stress. Aquaculture. 134:155-618.

Rao PP, Joseph KV, Rao KJ (1990) Histopathological and biochemical chage in the liver of a fresh water fish exposed to heptachlor. J Nat Conserv 2:33-137.

Sakai T, Iida T, Osatomi K and Kanai K. 2007. Detection of Type 1

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Fimbrial Genes in Fish Pathogenic and Non-pathogenic Edwardsiella tarda strains by PCR. Fish Pathology 42, 115-117. https://doi.org/ 10.3147/jsfp.42.115.

Smith GS and Lumsden JH. 1983. Review of neutrophil adher\-ence, chemotaxis, phagocytosis and killing. Vet Immunol Immunopathol 4, 177-236. https://doi.org/10.1016/0165- 2427(83)90058-2.

Smith, Peter et al.(1994). Bacterial resistance to antimicrobial agents used in fish farming: a critical evaluation of method and meaning. Annu. Rev. Fish Dis. 4, 273~313.

Son KT, Jo MR, Oh EG, Mok JS, Kwon JY, Lee TS, Song KC, Kim PH and Lee HJ. 2011. Residues of Ampicillin and Amoxicillin in Olive Flounder *Parlichthys oliveceus* Following Oral Administration. Korean J Fish Aquat Sci 44, 464-469. http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2011.0464.

Son KT, Oh EG, Park K, Kwon JY, Lee HJ, Lee TS and Kim JH. 2009. Antimicrobial Susceptibility of *Escherichia coli* Isolated from Fish Farms on the Southern Coast of Korea. Korean J Fish Aquat Sci 42. 322-328. https://doi.org/10.5657/kfas.2009.42.4.322.

Sung-Sam Kim, Ji-Woong Jang, Jin-Woo Song, Se-Jin Lim, Joon Bum Jeong, Sang-Min Lee, Kang-Woong Kim, Maeng-Hyun Son and Kyeong-Jun Lee. 2009. Effects of Dietary Supplementation of Alga Mixtures(Hizikia fusiformis and Ecklonia cava) on Innate Immunity and Disease Resistance Against Edwardsiella tarda in Olive Flounder(Paralichthys olivaceus).

Turner,A.H. 1937. Serum protein measurements in the lower vertebrates-Ⅱ. In marine teleosts and elasmobranchs. Biol Bull., 73, 511~526.

Wedemeyer GA and WT Yasutake. 1977. Clinical methods for the assessment of the effects of environmental stress on fish health. U.S. Fish and Wildlife Service Technical. pp.89.

Weon-Hee Moon, Keun-Dol Yook. 2014. Antimicrobial Effect of Garlic Extract against Pathogenic Bacteria.

Won Jin Kim, Young Soo Kim and Young Jin Chang. 2010. Comparison

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

of Hematological Properties in Cultured Olive Flounder Paralichthys olivaceus on Different Growth Stages and Seasons.

Woo SH, Kim HJ, Lee JS, Kim JW and Park SI. 2006. Pathogenicity and classification of streptococci isolated from cultured marine fishes. J Fish Pathol 19, 17-33.

Yanagisawa T, Hashimoto K (1984) Plasma albumins in elasmobranchs. Bull Jap Soc SCI Fish 1083.

Yoon SH, Jun LJ, Kim YJ, Jin JW and Jeong HD. 2012. Comparative risks of resistant microorganisms in the intestinal track of imported freshwater ornamental fish and cultured marine fish. J Fish Pathol 25. 77-84. https://doi.org/10.7847/jfp.2012.25.2.077

Yun-Hye Noh. 2021. Study of Dietary Supplementation for Diatom(*Melosira nummuloides*) and Diatom-derived Bio-Silica on the Physiological Responses of Olive Flounder(*Paralichthys olivaceus*).

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY