

*Vibrio anguillarum*에 대한 항균성 세균의 분리 (Vibriostatic activity of marine bacteria)

변주영 · 김은희[†]

여수대학교 어병학과

항균성세균을 이용하여 어류질병을 control 하기 위한 기초 연구로서 *Vibrio anguillarum*에 대하여 항균력을 갖는 세균(Probiotic strain = Probiot)을 분리하여 *in vitro*상에서 항균력을 조사하였다. 분리된 항균성 균주는 *Pseudomonas aeruginosa* JYMB1-3로 명명되었으며, 본 균주는 *Edwardsiella tarda*와 *Streptococcus* sp.에 대하여 동시에 항균력을 나타내었으나 *Vibrio*종에 대하여 특이적으로 높은 항균력을 갖고 있었다. 한편 항비브리오성 물질은 세균내에서 생산되어 균체외로 분비되는 것으로 보이며 약 10^7 cells의 *P. aeruginosa* JYMB1-3가 24시간 동안 증식하면서 생산한 항균성 물질은 Chloramphenicol 2.5 μ g정도에 해당하는 vibriostatic activity를 보였다.

Key words: Vibriostatic activity, Probiotic strain, *Pseudomonas aeruginosa*, Growth inhibition, Marine bacteria.

Nair and Simidu(1987)는 많은 세균이 다른 세균을 죽이거나 억제하는 항생 물질을 생산할 수 있고, 이들은 해수, 저질층, 플랑크톤 등으로부터 널리 검출된다고 하였으며, Fabregas *et al.*(1991)은 해양 환경으로부터 분리된 몇몇 세균의 항균 활성에 관하여 보고하였다. 식품 및 의약산업에서 유용미생물을 이용하는 것은 그 역사를 오래하고 있으며 농업분야에서도 이미 오래전부터 생물체제의 우수성을 인정하여 미생물농약을 실용화하고 있으나, 수산약으로써 미생물체제의 개발은 전무하다.

양식어류에 발병하는 각종 질병 문제를 해결하기 위하여 신속진단법(정 등, 1997)이나 면역증강 사료 개발(박 등, 1997) 및 백신에 의한 면역화와 사육수의 소독에 의한 예방법(Itoh *et al.*, 1997) 등을 개발하여 적용하고 있지만, 아직까지 어류질병은 대부분 각종 화학요법제에 의한 치료에 의존하고 있다. 그러나 약제내성 병원세균의 증가로 인하여 화학요법제에 의한 치료를 기대 할 수 없게 되었다(최 등, 1996; Kim and Aoki, 1993). 한편 약제의 어체내 잔류 가능성에 의한 수산식품의 안전성 및 미분해 약제의 방출로 인한 수질오염 등에 관한 일반인들의 관심이 높아짐에 따라 어류질

병의 생물학적 Control(Bioremediation)에 관한 관심이 증가하여, 어류병원세균에 대하여 항균력을 갖는 세균(Probiotic strain or Probiot)을 탐색하여 이용하고자하는 연구가 다양하게 진행되고 있다. Dopazo *et al.*(1988)은 항균물질을 생산하는 해양세균이 *Pasteurella piscicida*의 성장을 억제할 수 있다 하였고, Bly *et al.*(1997)은 *Pseudomonas fluorescens* 균주가 *Saprolegnia*의 균사 성장을 억제하므로 Channel catfish의 *Saprolegniosis*의 치료 및 예방을 위하여 이용 가능하다고 보고하였다. Smith and Davey(1993)는 *Aeromonas salmonicida*의 성장에 경쟁적 저해를 가져오는 *P. fluorescens*를 어류로부터 분리하였고, Austin *et al.*(1995)은 *Vibrio ordalii*, *V. anguillarum*, *A. salmonicida*에 의한 질병을 예방하기 위하여 *V. alginolyticus*를 생물 전구체(Probiotic strain)로 이용 가능하다고 하였다. 이 밖에도 어류, 새우, 굴의 질병예방을 위한 생물 전구체 균주로 *P. fluorescence*와 *V. alginolyticus* 등의 분리종이 검토되고 있다(Ruangpan *et al.*, 1998; Nakamura *et al.*, 1999).

이러한 모든 연구 결과는 대부분의 probiot가 한 종의 병원세균에 대하여만 항균효과를 나타내는 경우가 많으므로 각각의 어류 병원세균에 대한

[†]Corresponding author

probiotic가 개별적으로 개발되어야 하는 어려움이 있지만 probiotic의 실용화 가능성을 보여주는 것이라 하겠다. 어류질병을 control하기 위하여 항균성세균을 직접 이용하는 것은 일차적으로 이들 항균성세균이 어류에 질병을 유발하지 않아야 한다는 전제 조건을 충족시켜야 한다. 한편 어류 체내의 세균총 및 환경수의 세균총을 파괴하지 않고 체내에 정착할 수 있는 세균의 종류는 어류가 서식하고 있는 자연 환경수의 세균총에 많이 의존하고 있으므로 지역에 따라 새로운 균주를 개발할 필요가 있다. 본 연구에서는 세균성 어류질병을 예방하기 위한 생물전구체(Probiotic)의 개발에 목적을 두고, 1차적으로 *V. anguillarum*에 항균력을 갖는 자연균주를 분리하여 항균력을 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주

양만장, 어류 사육수, 어류 장기 및 표층해수로부터 분리한 균을 이용하여 항균성 균주를 탐색하였다. 사육수 및 해수 내의 세균은 Marine agar 2216(Difco) 배지에서 25°C로 5일간 배양하였고 어류의 각 기관은 homogenizer로 균질화하여 Nutrient Agar(NA, Difco) 배지에 도말하여 배양한 후 평판에 나타나는 집락을 무작위로 선택하여 새로운 동일 배지 상에 2차 순수 분리하였다. 본 실험에 사용된 병원성 균주인 *Vibrio anguillarum* (PT 213)과 *Streptococcus* sp.(NG 8206)는 부경대학교 수산생명의학과로부터 분양 받았고, *Edwardsiella tarda* 및 *Vibrio* sp.는 여수 인근 양어장의 병어로부터 분리하였으며, *Staphylococcus epidermidis*(KCTC 1917)는 균주 센타(Korean Collection for Type Cultures)로부터 분양 받았다.

항균성 균주의 분리 및 항균범위

병원세균을 TSA(Tryptic Soy Agar: Difco)배지에 도말하고, 여기에 분리 균주를 중층 접종한 후, 25°C에서 24시간 동안 배양하여, 분리 균주 주변에 병원세균의 성장 저지대가 1 mm 이상 형성된 세균을 항균성 균주로 하였다. 항균성 세균의 항균범위 및 항균력은 한천평판 확산법으로 조사하였다. TSB(Tryptic Soy Broth)에서 25°C 24시간 동안 배양한 병원세균 및 항균성 세균을 분광

광도계(Milton Roy, USA)로 600 nm에서 각각 흡광도 0.05와 0.15로 조정하였다. 병원세균을 TSA에 도말하고 그 위에 항균성 세균을 각각 5 µl씩 중층 접종하였다. 25°C에서 24시간 배양하여 나타내는 저지대의 크기로 항균력을 비교하였다.

균주의 동정

세균의 형태 및 생화학적 특성에 따라(Kadota, 1990) 속 수준까지 간이 동정하였으며, Automated bacteria identification system(Biolog)을 이용하여 종을 동정하였다.

항균성 물질의 생산

항균성 물질의 생산형태를 알아보기 위하여 세균 배양 여액 및 세균 파쇄물의 항균력을 조사하였다. 병원세균 및 항균성 세균을 각각 25°C로 24시간 배양한 후, 항균성 세균은 실온에서 8000 rpm으로 5분간 원심분리 하였다. 원심분리한 항균성 세균의 상등액은 0.45 µm membrane filter (Advantec MFS, U.S.A)로 여과하였고 집균된 세균은 0.9% 멸균 생리식염수로 3회 세척하고, 습중량 10 mg(20 mg/ml)을 취하여 초음파분쇄기(HD 70 Sonopuls Ultrasonic Homogenizers, Bandelin)로 Cycle 50, MS 72/D에서 10분간 파쇄 하였다. 병원세균을 접종한 plate에 배양 상등액 및 세균 파쇄액을 상층하고, 25°C에서 24시간 배양한 후, 저지대의 형성 여부를 관찰하였다.

한천중층법에 의한 항균력 측정

Nutrient broth(NB)에서 25°C로 24시간 배양한 항균성 세균을 NA에 각각 5 µl씩 접종하여 3일간 배양한 후 15분간 chloroform gas에 노출시켜 사균화 하였다. 한편 흡광도 0.2로 조정된 병원세균을 soft agar와 혼합하여 사균화된 항균세균 위에 double-layer(Sugita *et al.*, 1996)를 만든 후 25°C로 24시간 배양하여 나타나는 성장 저지대의 크기를 비교하였다.

Chloramphenicol과 항균세균의 항균력 비교

항균력을 화학 요법제와 비교하기 위하여 *V. anguillarum*에 대한 chloramphenicol의 억제 효과와 비교하였다. Chloramphenicol 5 µg, 2.5 µg, 1.25 µg, 0.625 µg, 0.313 µg을 함유하는 filter

disk와 1.2×10^7 cells의 항균성 균주를 일반적인 약체감수성 disk test 방법에 준하여 *V. anguillarum* plate위에 상층하고, 24시간 배양한 후에 나타난 성장저지대의 크기를 비교하여 항균성 세균으로부터 생산된 항균물질의 역가를 측정하였다.

항균성세균의 어류에 대한 안전성 검증

항균성세균을 TSB로 25°C에서 24시간 배양한 후 실온에서 8000 rpm으로 5분간 원심분리하고 0.65% 생리 식염수에 현탁하여 원심분리 함으로써 세척하였다. 이를 3회 반복하여 세균내의 배지를 제거하였다. 0.65% 생리식염수로 Mcfarland number $3(9 \times 10^8$ CFU/ml)이 되도록 조정 한 후 약 10 cm 크기의 황점볼락 10마리에 각각 0.1 ml 씩 복강주사 하였고, Control은 0.65% 생리식염수 만을 주사하였다. 2주일간 어류를 관찰하여 폐사어 를 조사하였다. 실험 수조의 사육수는 실험 종료 시까지 교환하지 않았으며 사료는 투여하지 않았다.

결과 및 고찰

***Vibrio anguillarum*에 대한 항균성 균주의 분리 및 동정**

전체 조사 균주는 총 309 균주였으며, *Vibrio anguillarum*에 대하여 항균력을 나타낸 균주는 4균 주로 넙치 사육수와 해수로부터 분리되었다(Tables 1 and 2). 그러므로 어류 사육수 내에는 병원세균 과 길항 세균이 공존하고 있음을 알 수 있었다. Nair and Simidu(1987)는 부영양화가 세균의 항균 성 물질 생산을 억제하므로 양식장 같이 영양이 충분한 지역보다 해양에 더 많은 항균성 세균이 존재한다고 보고하였다. 그러나 Bly et al.(1997)은 일부 항균성세균이 어류 병원세균과 접촉했을 때

만 항균물질을 분비하는 특성이 있다고 하였다. 본 연구에서는 항균성 균주의 분리비가 넙치 사육수 에서 높았는데 이는 영양에 대한 경쟁성 뿐 아니 라 공존에 의한 접촉이 항균물질의 생산을 유도하 였다고도 볼 수 있다. *V. anguillarum*과 *Vibrio* sp.에 대하여 항균력을 나타내는 4 균주의 항균범 위는 Table 2와 같다. JY22와 23은 *V. anguillarum*에 대하여만 항균력을 보였고 JY124와 JYMB1-3는 두 균주에 모두 항균력을 보였다. *V. anguillarum*에 대한 항균력이 가장 강하다고 판정 되었던 JY124는 계대 배양에 어려움이 있었으므로 JYMB1-3를 *V. anguillarum*에 대한 Probiotic Strain으로 최종 선발하였다.

본 균주는 Gram 음성 호기성 간균으로 운동성 이 없고 용혈능력이 없으며, catalase와 oxidase 양 성 반응을 나타내었다. 한편 미생물자동동정장치를 이용한 동정 결과 *Pseudomonas aeruginosa*와 높 은 유사성을 나타내어 *P. aeruginosa* JYMB1-3로 명명하였다.

Table 2. Antibacterial spectrum of four vibriostatic isolates. Activity was estimated by the size of inhibition zone

JY strain	22	23	124	MB1-3
Pathogen				
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	++ ^{a1}	++	-	+++
<i>Streptococcus</i> sp.	++	++	++	++
<i>Vibrio anguillarum</i>	++	++	+++	++
<i>Vibrio</i> sp.	-	-	++	++
<i>Edwardsiella tarda</i>	+	+	-	+

^{a1}Inhibition zone: +, 1-10 mm ; ++, 11-15 mm; +++, >15mm; -, no inhibition

Table 3. Antibacterial activities of cell homogenate(CH) and culture supernatant(CS) of vibriostatic strain, JYMB1-3

JYMB1-3	CH	CS
Pathogen		
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	- ^{a1}	-
<i>Streptococcus</i> sp.	+	-
<i>Vibrio anguillarum</i>	+	+
<i>Vibrio</i> sp.	+	+
<i>Edwardsiella tarda</i>	+	+

^{a1};-; no inhibition, +; inhibition

Table 1. Sources of isolates and vibriostatic strains

Source	No. of isolate(Vibriostatic strain)
Eel and eel farm	39
Flounder farm	58(3)
Flounder	70
Surface sea water	142(1)
Total	309(4)

Fig. 1. Growth inhibition of antibacterial substance produced from *Pseudomonas aeruginosa* JYMB1-3 against fish pathogens using double layer method (Dopazo *et al.*, 1988); *Vibrio anguillarum*(A), *Vibrio* sp.(B), *Edwardsiella tarda*(C), and *Streptococcus* sp.(D) and *Staphylococcus epidermidis*(E).

JYMB1-3의 항균범위

JYMB1-3는 *Vibriosis*뿐만 아니라 다른 종류의 병원세균에 대해서도 동시에 항균력을 나타내어 Multiple Probiotic Strain(MPS)로 개발 가능성을 시사하였다(Tables 2 and 3). 그러나 double layer method에 의하여 항균력을 확인한 결과(Fig. 1), JYMB1-3에 의하여 생산된 물질은 *S. epidermidis*에 대하여는 전혀 항균력을 보이지 않았고 *Streptococcus* sp. < *Edwardsiella tarda* < *V. anguillarum*의 순으로 항균력을 나타냄으로써 *V. anguillarum*에 대하여 특이적으로 강한 항균력을 갖는 것을 알 수 있었다.

항균성 물질의 생산

JYMB1-3가 항균성 물질을 생산하는 특성을 알아보기 위하여 세균 배양 여액과 세균 파쇄액의 항균력을 비교하였다(Table 3). 농축하지 않은 세균 배양 여액(CS)에서는 약하지만 *V. anguillarum*, *Vivrio* sp.와 *E. tarda*에 대하여 항균력이 나타났고, 세균 파쇄액(CH)은 *S. epidermidis*를 제외한 모든 균주에 대하여 항균력을 가졌다. 그러므로 JYMB1-3는 분비성 항균물질과 비분비성 항균물질을 생산하는 것으로 보이며, *V. anguillarum*에 대한 항균성 물질은 세균이 생산하여 균체 밖으로 분비하는 것으로 보인다. 한편 JYMB1-3가 *S.*

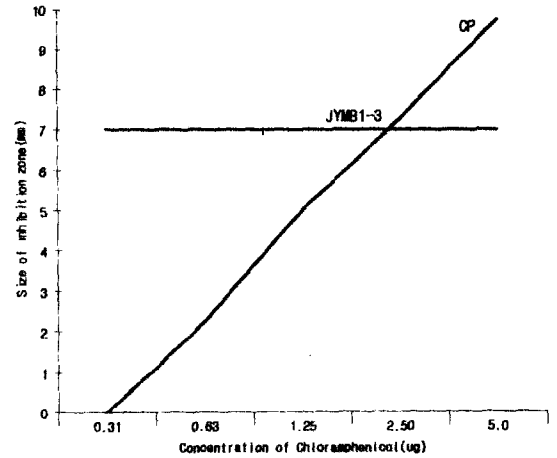


Fig. 2. Comparison of antibacterial activity between JYMB1-3 and chloramphenicol against *Vibrio anguillarum*.

*epidermidis*에 대하여 항균력을 나타낸 것은(Table 2) 배지 성분에 대한 competition이거나, 항균력 지속 시간이 상당히 짧은 물질에 의한 것으로 보이며 이는 double layer method에 의한 세균생산물 항균력 검증(Fig. 1)의 결과와 일치하였다.

항균력

JYMB1-3가 *V. anguillarum*에 대하여 나타내는 항균력을 기존에 사용되고 있는 항균물질인 chloramphenicol의 것과 비교한 결과, 약 10^7 cells 이 24시간 동안 증식하면서 생산한 항균성 물질은 Chloramphenicol의 2.5 μ g 정도에 해당하는 항균력을 갖는 것으로 나타났다(Fig. 2).

어류에 대한 probiotic 균주의 안전성

JYMB1-3를 황점볼락 치어에 복강 주사한 후 14일까지 육안적으로 관찰한 결과 시험어 모두 정상 상태로 100% 생존하였다. Olsson *et al.*(1992)과 Westerdahl *et al.*(1991)은 어류 병원세균에 대하여 생장억제 효과를 나타내는 세균을 Turbot 장내에 정착시키는데 성공하였다. 이들은 모두 일차적으로 어류에 질병을 유발하지 않는다는 전제 조건을 충족시키고 있다.

그러므로 본 연구에서 얻어진 항균성 균주도 항균물질의 생산·정제 뿐 아니라, 이들을 어체에 정착시킴으로써 지속적인 생산유도로 질병 예방을 위한 생물 전구체로 이용 가능할 것으로 생각된

다. 그러나 이들을 어류질병 제어를 위한 생물 전구체로 이용하기 위하여는 각 종별 어류에 대한 이들의 안전성을 비롯하여 항균력의 지속성, *in vivo*에서의 병원세균 제어효과 및 생존기간, 투여 방법에 따른 효과 검증 등이 계속적으로 수행되어야 할 것이다.

참고문헌

- Austin, B., Stuckey, L. F., Robertson, P. A. W., Effendi, I. and Griffith, D. R.: 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, 1995.
- Bly, J. E., Quiniou, S. M-A., Lawson, L. A. and Clem L. W.: Inhibition of *Saprolegnia* pathogenic for fish by *Pseudomonas fluorescens*. J. Fish Dis., 20: 35-40, 1997.
- Dopazo, C. P., Lemos, M. L., Lodeiros, C., Bolinches, J., Barja, J. L. and Toranzo, A. E.: Inhibitory activity of antibiotic-producing marine bacteria against fish pathogens. J. Appl. Bacteriol., 65: 97-101, 1988.
- Fabregas, J., Munoz, A., Otero, A., Barja, J. L. and Romaris, M. : A preliminary study on antimicrobial activities of some bacteria isolates from marine environment. Nippon Suisan Gakkaishi, 57: 1377-1382, 1991.
- Itoh, S., Yoshimizu, M. and Ezura, Y.: Disinfectant effects of low level of total residual oxidants in artificial seawater on fish pathogenic microorganisms. Nippon Suisan Gakkaishi, 63 : 92-102, 1997.
- Kadota, H. : 해양미생물 연구법, 학회 출판 센터, 1990.
- Kim, E. and Aoki, T.: Drug resistance and broad geographical distribution of identical R plasmid of *Pasteurella piscicida* isolated from cultured yellowtail in Japan. Microbiol. Immunol., 37: 103-109, 1993.
- Nair, S. and Simidu, U.: Distribution and significance of heterotrophic marine bacteria with antibacterial activity. Appl. Environ. Microbiol.: 2957-2962, 1987.
- Nakamura, A., Takahashi, K. G. and Mori, K.: Vibriostatic bacteria isolated from rearing seawater of oyster brood stock: potentially as biocontrol agents for vibriosis in oyster larvae. Fish Pathol., 34: 139-144, 1999.
- Olsson, J. C., Westerdahl, A., Conway, P. L. and Kjelleberg, S.: Intestinal colonization potential of Turbot(*Scophthalmus maximus*) and Dab(*Limanda limanda*) -associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. Appl. Environ. Microbiol.: 551-556, 1992.
- Ruangpan, L., Na-anan, P. and Direkbusarakom, S.: Inhibitory effect of *Vibrio alginolyticus* on the growth of *V. harveyi*. Fish Pathol., 33: 293-296, 1998.
- Smith, P. and Davey, S.: Evidence for the competitive exclusion of *Aeromonas salmonicida* from fish with stress-inducible furunculosis by a fluorescent pseudomonad. J. Fish Dis., 16: 521-524, 1993.
- Sugita, H., Shibuya, K., Shimooka, H. and Y. Deguchi: Antibacterial abilities of intestinal bacteria in freshwater cultured fish. Aquaculture, 145: 195-203, 1996.
- Westerdahl, A., Olsson, J. C., Kjelleberg, S. and Conway, P. L.: Isolation and characterization of Turbot(*Scophthalmus maximus*) associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. Appl. Environ. Microbiol. : 2223-2228, 1991.
- 박성우, 김영길, 최동림: β -glucan 투여에 의한 조피볼락 (*Sebastes schlegeli*)의 세균성 질병에 대한 저항성 향상. 한국어병학회지, 10: 143-152, 1997.
- 정순윤, 손상규, 정준기, 허민도, 정현도: ELISA법을 이용한 *Edwardsiella tarda*의 직접 검출. 한국어병학회지, 10: 75-86, 1997.
- 최민순, 최상훈, 박관하, 장선일, 윤창용, 조정근, 송희종 : 뱀장어 병어로부터 분리한 *Edwardsiella tarda*의 약제 내성. 한국어병학회지, 9: 195-201, 1996.

Inhibitory Activity of Marine Bacterium on the Growth of *Vibrio anguillarum*

Juyong Byon and Eunheui Kim

Department of fish Pathology, Yosu National University, Yosu 550-749, Korea

The antibacterial activity of marine bacterium (*Pseudomonas aeruginosa* JYMB1-3) was assayed against *Vibrio anguillarum* with the aim of evaluating the possible use for biocontrolling fish disease as probiotic strain. Inhibition test on the solid medium showed that vibrios were especially sensitive to the JYMB1-3. *Edwardsiella tarda*, *Streptococcus* sp. and *Staphylococcus epidermidis* were also sensitive to that strain, however the antibacterial abilities were varied to the pathogens. The vibriostatic activity of antibacterial substance produced from 10^7 cells of the strain for 24 hours was equivalent to 2.5 μg of chloramphenicol.

Key words : Vibriostatic activity, Probiotic strain, *Pseudomonas aeruginosa*, Growth inhibition, Marine strain