

## 갯지렁이(*Perinereis aibuhitensis*)에서 분리한 광염성 해양 미생물 *Bacillus* sp. EBW4의 특성 및 유기물 분해능 분석

신세연<sup>1</sup> · Khorloo Yundendorj<sup>1</sup> · 이상석<sup>2</sup> · 이동현<sup>3</sup> · 강경호<sup>4</sup> · 강형일<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>순천대학교 환경교육과, <sup>2</sup>순천대학교 동물자원학과  
<sup>3</sup>제주대학교 기초과학연구소, <sup>4</sup>전남대학교 수산양식학부

### Characterization and Organic Hydrocarbons Degradation Potential of Euryhaline Marine Microorganism, *Bacillus* sp. EBW4 Isolated from Polychaete (*Perinereis aibuhitensis*)

Seyeon Shin<sup>1</sup>, Khorloo Yundendorj<sup>1</sup>, Sang-Suk Lee<sup>2</sup>, Dong-Heon Lee<sup>3</sup>, Kyoung-Ho Kang<sup>4</sup>, and Hyung-Yeel Kahng<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Environmental Education, <sup>2</sup>Department of Animal Science and Technology, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Republic of Korea

<sup>3</sup>The Research Institute for Basic Sciences, Jeju National University, Jeju 690-756, Republic of Korea

<sup>4</sup>Department of Aquaculture, Chonnam National University, Yeosu 550-749, Republic of Korea

(Received January 28, 2013 / Accepted February 12, 2013)

In this study, euryhaline marine microorganism, *Bacillus* sp. strain EBW4 isolated from polychaete (*Perinereis aibuhitensis*) of Suncheon Bay was physiologically, biochemically and genetically characterized. Based on 16S rRNA sequence, EBW4 was found to share 98.25% similarity with *Bacillus hemisentroti* JSM076093<sup>T</sup>, 97.96% similarity with *Bacillus hwajinponensis* SW-72<sup>T</sup> and 96.28% similarity with *B. algicola* KMM3737<sup>T</sup>, respectively. The temperature range for the growth of strain EBW4 was 4-40°C, NaCl concentration range 0-17% and pH range pH 5-9, revealing that EBW4 was euryhaline bacterium. Major fatty acids in strain EBW4 were composed of anteiso C<sub>15:0</sub> (48.2%), iso C<sub>16:0</sub> (12.1%), anteiso C<sub>17:0</sub> (11.6%) and iso C<sub>14:0</sub> (9.4%). EBW4 was found to have DNase, amylase, protease and lipase for the degradation of macromolecules such as DNA, carbohydrates, proteins, lipids, etc. The enzyme activities of alkaline phosphatase, esterase (C<sub>4</sub>), leucine arylamidase and α-chymotrypsin were also found in strain EBW4. Analysis of the biodegradation ability of EBW4 for organic hydrocarbons under different salinity conditions using synthetic water waste revealed that EBW4 exhibited the ability to degrade organic hydrocarbons very quickly, suggesting strain EBW4 may be a good candidate for the application to various industries.

**Keywords:** *Bacillus*, *Perinereis aibuhitensis*, euryhaline microorganism, organic hydrocarbons degradation

해양환경에서 *Bacillus* 종들은 여러 해양 생물에 내생하는 것으로 알려져 있다(Kennedy *et al.*, 1998; Hovda *et al.*, 2007). 갯지렁이는 조간대 환경에서 살아가는 저서생물로 수서 환경을 정화하는데 큰 역할을 하는 것으로 알려져 있으며(Vigneswaran *et al.*, 1999; Palacios and Timmons, 2001; Campos *et al.*, 2002; Davidson *et al.*, 2008), 수서 환경 모니터링을 위한 지표생물로도 사용되어 왔다(Bryan and Gibbs, 1987; Fourcy *et al.*, 2002; Pérez *et al.*, 2004). 특히 *Perinereis* sp.를 비롯한 여러 종의 갯지

렁이들의 유기물 이용능이 뛰어난 것으로 알려져 있어(Fujioka *et al.*, 2007) 세균의 영양학적 기능과 관련하여서도 갯지렁이를 대상으로 한 연구가 폭 넓게 수행되어 왔다(Prieur *et al.*, 1990; Gili and Coma, 1998; Orejas *et al.*, 2000). 갯지렁이 *Sabella spallanzanii*는 주위 환경으로부터 *Bacillus*를 비롯하여 다양한 세균을 축적하고 농축할 수 있는 능력이 있음이 보고된 바 있다(Stabili *et al.*, 2006).

Gatesoupe (1999)는 *Bacillus*가 소화계와 면역계를 촉진하는 능력이 있어 프로바이오틱스(probiotics)로 사용할 수 있음을 보고한 바 있으며, *Bacillus subtilis*는 단백질, 탄수화물, 지질 분해 효소 등 다양한 효소들을 생산할 수 있는 능력으로 인하여 숙주의 자연적 소화 활동에 기여하는 것으로 알려져 있다(Verschuere *et*

\*For correspondence. E-mail: kahng@sunchon.ac.kr; Tel.: +82-61-751-3358

al., 2000; Ziacei-Nejad *et al.*, 2006). 이외에도 *B. subtilis*는 항미생물제를 생산하거나 영양과 공간에 대한 경쟁을 통하여 잠재적 병원미생물에 의한 피해를 방지하는 기능도 있는 것으로 알려져 있다(Vaseeharan and Ramasamy, 2003). 해양 어류에서 흔하게 나타나는 *B. pumilus* (Sugita *et al.*, 1998)는 세포외 프로테아제, 아밀라아제, 셀룰라아제 등 소화 활동에 관련된 주요 효소를 (Ghosh *et al.*, 2002), 그리고 *B. licheniformis*는 항바이러스제를 생산하는 것으로 보고되어 있다(Arena *et al.*, 2006). *Bacillus*는 어류 및 새우와 같은 수산양식에도 유용하게 활용할 수 있는 것으로 알려져 있으며, *B. subtilis*를 *B. licheniformis* 또는 *B. pumilus*와 함께 송어에 투여하였을 때 송어의 성장과 면역 저항성을 향상시킬 수 있음이 알려져 있고(Raida *et al.*, 2003; Bagheri *et al.*, 2008), *Bacillus*의 몇몇 종은 새우 양식에서 항생제 대체제로 제안되고 있다(Banerjee *et al.*, 2007).

본 연구에서는 연안 갯벌에서 유기물 분해능이 매우 우수한 것으로 알려진 갯지렁이(*Perinereis aibuhitensis*)에서 분리된 광염성 세균, *Bacillus* sp. EBW4균의 특성 및 다양한 유기물 분해능을 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 분리 및 배양

본 연구에서는 갯벌 환경에서 환경정화 기능을 담당하는 것으로 알려져 있는 갯지렁이(*P. aibuhitensis*)를 순천만 갯벌에서 채취하여 이로부터 미생물을 분리하였다. 갯지렁이를 BM buffer (Mikesell *et al.*, 1993) 30 ml가 포함된 conical tube에 넣은 후 교반기에서 격렬하게 세 번 세척한 후, 70% ethanol에서 짧게 다시 한 번 세척하였다. 세척한 갯지렁이를 멸균한 면도날로 갯지렁이의 복부를 절개한 후, BM buffer 50 ml가 포함된 conical tube에 넣어 격렬하게 교반하여 갯지렁이 내생 미생물이 buffer안으로 빠져 나오게 하였다. 이어서 갯지렁이를 제거한 후 12,000 rpm으로 원심분리하여 침전물을 모은 후 2 ml의 BM buffer를 첨가하여 잘 섞은 후, 100  $\mu$ l씩 Marine Agar (MA) (BD Difco, USA) 배지에 접종하여 미생물을 배양하였다.

### 16S rRNA 유전자 염기서열 및 계통관계 분석

균주 EBW4를 50 ml의 LB 배지에 접종하고 30°C 진탕 배양기에서 180 rpm으로 24시간 동안 배양한 후 원심분리(5,000 rpm, 10 min, 4°C)하여 세포를 수확한 후 genomic DNA를 분리하였다. 회수된 배양세포를 5 ml TES buffer (0.1 M Tris-HCl; pH 7.0, 0.01 M EDTA, 1 M NaCl)로 재현탁하고, lysozyme (10 mg/ml)을 200  $\mu$ l 첨가하여 37°C에서 15분간 반응시켰다. 10% SDS를 100  $\mu$ l 첨가하고 잘 섞어준 후 50  $\mu$ l proteinase K (20 mg/ml)와 5  $\mu$ l RNase를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 5 ml TES buffer와 10 ml의 phenol을 첨가하여 잘 섞어주었다. 원심분리를 통하여 얻어진 상정액을 취하여 새로운 tube로 옮긴 후 동량의 phenol/chloroform/isoamyl alcohol로 2회, chloroform으로 1회 처리하였다. 상정액을 취하여 새로운 tube로 옮긴 후 1/10 volume의 3 M sodium acetate (pH 5.4)와 2-3

volume의 100% ethanol을 첨가하여 30분간 실온에서 방치하였다. 원심분리 후 상정액을 버리고, 70% ethanol을 처리하여 염류를 씻어낸 후, 다시 한 번 원심분리하였다. 상정액을 버리고 공기 중에서 ethanol을 제거한 후, 침전물 500  $\mu$ l의 멸균수에 녹여 다음 실험에 사용하였다. Total DNA의 정제를 위해 crude DNA를 10 ml cesium chloride (CsCl) 용액에서 녹인 후 ethidium bromide (EtBr)를 첨가하여 구경의 직경이 0.2  $\mu$ m 막 여과지를 이용하여 30분간 투석하여 DNA 용액을 회수하여 농축한 후 특정 유전자의 증폭 또는 클로닝을 위한 시료로 사용하였다.

세균의 16S rDNA를 증폭하기 위해 균주들을 액체 배지에서 30°C에서 2-3일 동안 배양한 후 이로부터 추출된 genomic DNA와 27F와 1522R로 이루어진 한 세트의 프라이머를 사용하여 이미 알려진 방법에 따라 PCR을 수행하였다(Lane, 1991). PCR 반응은 GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, CT)를 사용하여 수행하였고, 반응 조건은 95°C에서 5분간 초기 열처리를 한 후, 95°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분씩 30번 반복하여 마지막에는 72°C에서 10분간 처리한 후 4°C에서 보관하였다. 증폭된 DNA는 1.0% agarose gel에서 전기영동한 후 gel extraction kit (SolGent, Korea)에 의해 회수되었다. 회수된 DNA는 pGEM-T easy vector (Promega, USA)에 ligation한 후 *E. coli* JM109에 형질전환하였다. 형질전환된 클론의 플라스미드 DNA를 분리한 후 promoter primer나 SP6 promoter primer를 이용하여 ABI 377 자동염기서열 분석기(Applied Biosystem, USA)에서 양방향으로 DNA sequencing을 수행하였다.

결정된 염기서열은 Ribosomal Database Project-II (<http://rdp.cme.msu.edu>)와 GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov>)의 database를 이용하여 분석하였다. 염기서열이 결정된 미생물의 계통관계는 EZtaxon server를 이용하여 type 균주들의 16S rRNA 염기서열과의 관계를 나타내었다(Chun *et al.*, 2007). Alignment는 CLUSTAL X 1.83 (Täubel *et al.*, 2003)에 의해 수행되었으며, 염기서열 간 gap은 BioEdit 프로그램을 이용하여 편집하였다(Hall, 2007). 계통도는 MEGA 5 program (Kumar *et al.*, 2008)의 neighbor-joining 방법(Saitou and Nei, 1987)으로 그렸고, 계통도의 지형은 bootstrap 분석을 통해 평가되었다(Felsenstein, 1985). 기타 언급하지 않은 분자생물학적 실험은 이미 잘 알려진 방법(Maniatis *et al.*, 1982)에 따라 수행하였다.

### 환경 조건별 균주 생장능 시험

본 연구에서는 배지별 생장여부와 온도, pH, 염도 등 세 가지 환경 조건을 달리하여 균주의 생장 여부를 조사하였다. 배지별 균 생장능은 Marine Ager (MA), Luria-Bertani (LB), Tryptic Soy Agar (TSA), Nutrient Agar (NA), R2A 배지에서 30°C에 배양하여 조사하였으며, 모두 Difco 제품을 사용하였다. 온도별 균 생장능은 MA 고체 배지에 접종 후 4-42°C 범위에서 배양하여 조사하였다. 배양의 최적 pH는 액체상의 Marine Broth (MB) (Difco) 배지 제조 시 10 N NaOH와 6 N HCl을 이용하여 pH 3-11까지 pH 1씩 차이를 두고 9개 tube에 각각 접종 72시간 배양하여 하루에 한 번씩 자람의 유무를 체크하였다. 염도별 균 생장능은 배지 제조 시 NaCl가 전혀 포함되지 않은 MA 배지 조성 성분

외에 NaCl 농도를 0-12%로 조정하여 균주를 배양하여 확인하였다. 균주의 생장 여부는 균주 접종 후 각 균주의 적정 생장 온도에서 5일간 배양하면서 생장여부를 확인하였다.

### 세균의 형태적, 생리·생화학적 특성 분석

세균의 형태 및 생리·생화학적 특성을 분석하기 위해 균주들을 3% sea salts가 첨가된 LBSS 고체배지에 접종하여 25°C에서 배양하였다. 먼저 5-7일 동안 배양하면서 형성되는 단일 콜로니의 형태, 색깔, 크기를 관찰하였다. 균주의 형태와 크기는 그람 염색을 실시한 후 그람 양성인지 음성인지 판별하고 광학현미경을 통해 크기와 형태를 관찰하였다. 그람 염색은 Hucker의 방법(1923)을 따라 수행하였다. 항산성(acid-fastness)은 Ziehl-Neelsen의 방법(Bishop and Neuman, 1970)에 따라 염색을 한 후 현미경으로 관찰하였다. 포자의 관찰은 슬라이드 글라스에 증류수를 한 방울 떨어뜨리고 MA 배지에서 배양한 균을 멸균된 이쑤시개로 떠서 준비된 슬라이드 글라스에 넓게 도말한 후 열고정을 한 후, Moeller의 방법(1891)에 따라 염색한 후 현미경으로 관찰하였다. 혐기적 조건에서 균이 성장할 수 있는지는 Oxoid사의 혐기성 배양기 안에 AnaeroGen™을 넣어 혐기적 조건을 만들어주고 30°C에서 48시간 균을 배양하여 관찰하였다. 탄수화물로부터 산 생성여부는 본 연구에서는 10% lactose가 포함된 ASS (Ammonium Salt Sugars) 배지에 균을 접종하여 균의 생장과 산 생성 여부를 조사하였다. 균이 탄수화물을 산화하는지 발효하는지 알아보고자 OF medium (Hugh and Leifson's, 1953)을 만든 후 2개의 배지에 같은 균을 멸균된 백금선을 사용하여 수직으로 중앙에 2 cm 깊이까지 접종하고 하나의 배지는 paraffin을 이용해 즉시 차폐시켜 배양한 후 관찰하였다. 30°C에서 배양한 후 14일간 매일 관찰하였다. 균주의 운동성은 0.4%의 agar를 포함시킨 semisolid 배지에서 확인하였고, 산소 대사와 관련된 oxidase는 Oxidase Reagent Kit (bioMérieux)를 이용하여 콜로니 색의 변화로 분석하였다. Catalase는 3% 과산화수소를 균체에 떨어뜨려 거품이 발생 유무로 판단하였다.

기타 분리 균주의 생리·생화학적 특성은 여러 API kit (bioMérieux, USA)를 사용하였으며, API 20E, API 20NE, API 50CHB 그리고 API ZYM kit를 동시에 이용하여 균주의 특성을 조사하였다. 이때 균주는 LBSS 고체배지를 이용하여 25°C에서 2-3일간 배양하였으며, 성장된 균체는 멸균된 3% sea salt 용액에 현탁하여 제조회사의 지시에 따라 수행하였다. 주요 조사 항목으로는 nitrate 환원반응, esterase (C4), esterase lipase (C8), leucine arylamidase, acid phosphatase, naphthol-AS-Bi-phosphohydrolase, glucose acidification, gelatin 액화, arginine dihydrolase, urease, β-glucosidase, β-galactosidase, alkaline phosphatase, lipase (C14) 등이 효소활성 유무, indole 생성 여부 등을 들 수 있다. 또한 탄소원 mannitol, gluconate, malate, citrate, glucose, arabinose, mamnose, N-acetyl-glucosamine, maltose, caprate, adipate, phenyl-acetate 등의 동화 여부 등에 대하여 조사하였다.

### 세포막의 지방산 분석

분리 균주에 대한 세포지방산 분석은 MIDI를 이용하여 수행

하였다. 이를 위하여 분리 균주를 MA 배지에서 25°C에서 72시간 동안 배양하였다. 분석기기는 미생물 동정 시스템(Microbial Identification System MIDI, Microbial ID. Inc., USA)을 사용하였으며, 분석된 데이터는 TSBA40 (Sherlock Version 4.0; Microbial Identification System MIDI, Microbial ID. Inc.)에서 검색하였다. 배양제 40 mg을 루프로 캡 튜브에 취한 후 메탄올과 증류수를 1:1로 혼합한 용액에 15% 수산화나트륨이 포함된 시약 1 ml을 가하여 100°C에서 25분간 반응시켜 세포 내 지방산을 추출하였다. 추출된 지방산의 메틸화를 위하여 6 N HCl 2 ml을 첨가하고 80°C에서 10분간 반응시킨 후 재빨리 냉각시켰으며, 수용성의 상태인 지방산을 유기상으로 전환시키기 위하여 hexan과 methyl-tert buthyl ether를 1:1 혼합한 용액 1.25 ml을 첨가한 후 10분 동안 회전시켜주어 상정액만을 취했다. 마지막으로 포화된 수산화나트륨 용액 3 ml로 시료를 세척한 후 분석기기를 통하여 동정하였다.

### 고분자 물질 분해 효소 활성 및 유기물 분해능 분석

*Bacillus*는 다양한 고분자 물질 분해능이 있는 것으로 알려져 있어, DNA, 셀룰로오스, 녹말, 카세인 그리고 Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80이 포함된 MA 고체 배지에 본 연구에서 분리한 균주 EBW4를 접종한 후, 이들 고분자 물질 분해에 관련된 효소, DNase, cellulase, amylase, protease 그리고 lipase 활성이 있는지에 대해 조사하였다. 균주의 핵산 분해능은 DNA 물질이 포함된 배지에 접종 후 30°C에서 3일 배양 후 1 M HCl을 떨어뜨렸을 때 균체 주변에 생성되는 투명환으로, cellulose 분해능은 congo red로 30분간 염색 후 1 M NaCl을 이용하여 5분간 탈색하여 형성된 투명환으로, 녹말 분해는 iodine으로 30분 염색 후 1 M NaCl로 5분간 탈색하여 형성된 투명환으로 판단하였다. 카세인과 Tween은 각각 2일, 3일 배양하여 별다른 염색과정을 거치지 않고 육안으로 관찰된 투명환으로 분해능을 확인하였다. 또한 고체배지에서의 효소 활성 시험과 함께 EBW4 균주의 일반 유기물 분해능을 시험하기 위하여, 이미 알려진 방법(Kapdan and Erten, 2007)을 변형하여 BM buffer에 glucose와 peptone이 4:1 비율로 혼합된 10,000 mg/L의 고농도 합성 폐수를 제조하고 최종 NaCl 농도가 0, 3, 10, 15%가 되게 한 후, 30°C, pH 7 조건에서 120시간 EBW4를 배양하면서 유기물 분해능을 TOC양으로 조사하였다. TOC의 잔존량을 측정하기 위하여 합성 폐수가 포함된 1 L BM 배지에 균주 EBW4를 접종하여 배양하면서 매 24시간 마다 50 ml 시료를 채취한 후 일부는 OD (600 nm) 값을 측정하는데 사용하였고, 나머지는 10,000 rpm에서 10분간 원심 분리한 후, 상정액만을 취해 멸균된 50 ml conical tube에 옮겨 -70°C에서 TOC를 측정할 때까지 보관하였다. TOC 측정에는 Phoenix 8000 TOC Analyzer (Teledyne Technologies Co., USA)를 이용하여 수행하였다.

### 결과 및 고찰

#### 갯지렁이 내생 *Bacillus* sp. EBW4의 계통관계

갯지렁이 추출물을 접종한 MA 배지에서 성장하여 나타난 집

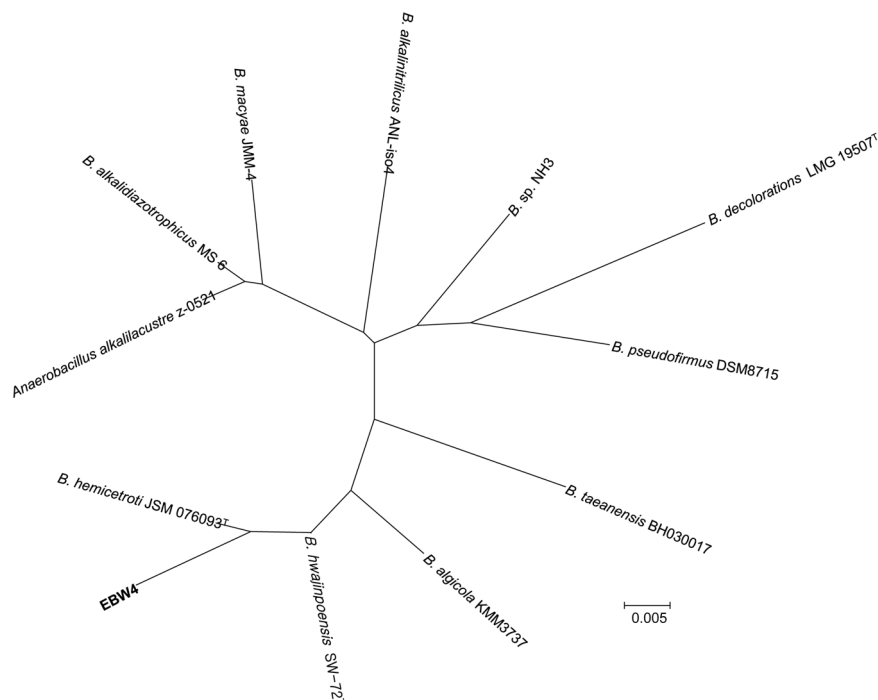
락(colony)을 선별하여 순수 배양한 후 얻어진 여러 균주 중 광염성 신 균주이면서 고분자 유기물 분해능이 우수한 EBW4를 선별한 후 16S rRNA 염기서열 1,375-bp를 기초로 선별 균주들 간의 계통관계를 분석하였다(Fig. 1). EBW4는 같은 종으로 *B. hemocentroti* JSM076093<sup>T</sup> (Chen *et al.*, 2011)와 97.96%로 가장 높은 상동성을 나타내었고, *B. hwanhinponensis* SW-72<sup>T</sup> (Yoon *et al.*, 2004) 그리고 *B. algicola* V2-BIII-A2<sup>T</sup> (Ivanova *et al.*, 2004)와 96.28%의 높은 상동성을 나타내었다. *B. hemocentroti* JSM 076093<sup>T</sup>은 성게(*Hemicentrotus pulcherrimus*)로부터 분리한 세균으로 비운동성 내생포자 형성균으로 알려져 있다(Chen *et al.*, 2011). *B. algicola* KMM 3737<sup>T</sup>는 갈조류인 *Fucus evanescens*에서 분리한 세균으로 갈조류의 엽상체가 분해될 때 농화배양을 통해 분리된 것으로 보고된 바 있다(Ivanova *et al.*, 2004). 다양한 종류의 *Bacillus* 균주들이 갯지렁이(*Periserrula leucophryna*)로부터 분리 보고된 바 있다(Joo *et al.*, 2004). 특히 *Bacillus* 균주를 이용한 수질정화능(Kennedy *et al.*, 1998; Moriarty, 1998; Gomez-Gil *et al.*, 2000), 중금속 제거능(Guo *et al.*, 2010) 그리고 유기물 제거능(Guncheva and Zhiryakova, 2011)은 대표적인 해양환경 정화를 위해 사용된 예이다. 본 연구에서 사용한 갯지렁이(*P. aibuhitensis*)의 미생물상에 대해서는 처음으로 보고하는 것으로 파악되고 있다. 따라서 본 연구에서 해양 갯벌의 갯지렁이로부터 다양한 유기물 분해능이 우수하고 광염성 신균주로 여겨지는 *Bacillus* 균주, EBW4에 대한 연구의 가치가 크다고 할 수 있다.

**환경조건별 *Bacillus* sp. EBW4의 생리 생화학적 특성 조사**

*Bacillus* sp. EBW4를 30℃, 호기성 및 혐기성 조건에서 5개의 다른 배지를 이용하여 성장능을 시험하였다. 균주 EBW4는

MA와 R2A 배지에서 호기성 조건에서 성장하였으나 혐기성 조건에서도 미약하게 성장하는 것으로 나타났다(Table 1). 이러한 사실은 균주 EBW4가 조건적 호기성 균(facultative aerobe)임을 제시해준다. 균주 EBW4가 glucose를 첨가한 산화 발효(oxidation-fermentation; OF) 배지를 이용한 탄수화물을 이용방법을 조사한 결과 EBW4는 발효를 통해 당을 이용하는 것으로 나타났다.

EBW4는 4-40℃의 온도 범위에서 성장하였으며, 성장 염도 범위는 0-17% NaCl (w/v), 성장 pH 범위는 pH 5-9로 나타났다. EBW4와 계통관계가 가장 가까운 *B. hemocentroti* (Chen *et al.*, 2011)의 성장 온도 범위는 5-40℃, 성장 염도 범위는 0.5-25% (w/v) NaCl, 성장 pH 범위는 pH 6.0-10.5로 성장가능한 온도와 염도 범위가 균주 EBW4와 상당히 일치하는 것으로 나타났으나, pH 조건에서는 균주 EBW4가 약한 산성 조건에서 성장가능한 호중성 균주인 반면, *B. hemocentroti*는 상대적으로 강한 알칼리성 조건에서 성장가능한 호중성 균주로 나타났다. 특히 극호염성 세균(extremohalophile)의 성장범위가 15-30%라는 점을 고려해본다면, 균주 EBW4는 극호염성 환경에서도 살아가는 균으로 염분이 없는 환경에서부터 극고염성 환경에 이르기까지 매우 폭 넓은 범위 염도 조건에서 성장할 수 있는 광염성 세균(euryhaline bacterium)으로 밝혀졌다. 이는 EBW4 균주가 염분이 전혀 없는 조건에서부터 다량의 염분이 포함된 조건에 이르기까지 다양한 환경에 잘 적응했음을 제시해준다. 균주 EBW4의 주요 효소 활성을 시험한 결과, EBW4는 alkaline phosphatase, gelatinase esterase (C4), leucine arylamidase, α-chymotrypsin 활성을 가지는 것으로 밝혀졌다(Table 1). *B. hemocentroti*는 EBW 균주가 가지지 않은 urease, acid phosphatase, esterase



**Fig. 1.** Phylogenetic tree of *Bacillus* sp. EBW4 isolated from polychaete (*P. aibuhitensis*) based on 16S rRNA sequence.

**Table 1.** Major phenotypic characteristics that differentiate *Bacillus* sp. EBW4 and phylogenetically closely related strains

Characteristic	EBW4	<i>B. hemicentroti</i> JSM 076093 <sup>T</sup>	<i>B. hwanjinponensis</i> SW-72 <sup>T</sup>	<i>B. algicola</i> KMM3737
Pigment production	Dark yellow	Yellow	Light yellow	Light yellow
Catalase	+	+	+	w
Oxidase	+	-	+	-
Aerobic or anaerobic growth	Facultative anaerobic growth	Facultative anaerobic growth	Aerobic growth	Aerobic growth
Motility	v	-	-	ND
Salinity range for growth (NaCl %)	0–17<	0.5–25	2–19(–20)	0–3
Temperature range for growth (°C)	>4–40	5–40	10–40(–50)	10–45(–50)
pH range for growth	5.0–9.0	6.0–10.5	5.0–9.5	7.0–10.0
Enzyme activity				
Urease	-	+	-	+
Gelatinase	+	+	+	+
Acid phosphatase	-	+	ND	ND
Alkaline phosphatase	+	+	ND	ND
Esterase (C4)	+	+	ND	ND
Esterase lipase (C8)	-	+	ND	ND
Leucine arylamidase	+	+	ND	ND
α-Chymotrypsin	+	+	ND	ND
Naphthol-AS-BI-phospho-hydrolase	-	+	ND	ND
α-Glucosidase	-	+	ND	ND
β-Glucosidase	-	-	ND	ND

+, positive; -, negative; w, weak positive; ND, not determined

Data of *B. hemicentroti* JSM 076093<sup>T</sup>, *B. hwanjinponensis* SW-72<sup>T</sup> and *B. algicola* KMM3737 were adapted from Chen *et al.* (2011), Yoon *et al.* (2004), and Ivanova *et al.* (2011), respectively.

lipase (C8), naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, α-glucosidase 등의 활성을 가지고 있었다.

균주 EBW4의 단일 탄소원으로 다양한 기질의 이용 여부를 시험한 결과, EBW4는 N-acetyl-glucosamine, amygdalin, arbutin, cellobiose, D-turanose, esculin, fructose, galactose, gluconate, 2-keto-gluconate, 5-keto-gluconate, glucose, glycerol, glycogen, maltose, mannitol, mannose, melibiose, melezitose, raffinose, ribose, salicin, starch, sucrose, trehalose, α-methyl-D-glucoside 등을 잘 이용할 수 있는 것으로 나타났다(Table 2). EBW4와 상동성을 가지는 *B. hemicentroti* (Chen *et al.*, 2011)는 단일 탄소원으로 N-acetyl-glucosamine, amygdalin, cellobiose, galactose, glycerol, glycogen, mannose, melezitose, raffinose, salicin, trehalose 등을 이용하지 못하는 것으로 나타나 생리학적 특성에 있어 두 균주 간 상당한 차이점이 있는 것으로 나타났다.

#### *Bacillus* sp. EBW4의 지방산 분석

균주 EBW4의 세포막을 구성하는 주요 지방산으로 anteiso C<sub>15:0</sub>, iso C<sub>16:0</sub>, anteiso C<sub>17:0</sub>, iso C<sub>14:0</sub> 등으로 각각 48.2, 12.1, 11.6, 9.4% 비율로 나타났다(Table 3). 계통학적 관계가 가장 가까운 *B. hemicentroti*와 *B. hwanjinponensis* 주요 지방산 및 그 비율에 있어 유사한 양상을 보였다. 균주 EBW4와 16S rRNA 염기서열에서 96.28%의 상동성을 보이는 *B. algicola* V2-BIII-A2<sup>T</sup> (Ivanova *et al.*, 2004)의 경우, anteiso C<sub>15:0</sub>의 비율이 65.7%로 상대적으로 매우 큰 비율로 나타났다. 지방산이 0.6%의 작은 비율로 나타났지만 C<sub>15:0</sub>과 C<sub>16:1</sub> ω9c는 비교 대상 균주 중 오직

EBW4에서만 발견되었다.

**Table 2.** Utilization of carbohydrates by *Bacillus* sp. EBW4 isolated from polychaete (*P. aibuhitensis*)

Carbohydrates	Reaction	Carbohydrates	Reaction
Glycerol	+	Salicin	+
Erythritol	-	Cellobiose	+
D-Arabinose	-	Maltose	+
L-Arabinose	-	Lactose	-
Ribose	+	Melibiose	+
D-Xylose	-	Sucrose	+
L-Xylose	-	Trehalose	+
Adonitol	-	Inulin	-
β-Methyl-D-xyloside	-	Melezitose	+
Galactose	+	Raffinose	+
Glucose	+	Starch	+
Fructose	+	Glycogen	+
Mannose	+	Xylitol	-
Sorbose	-	Gentiobiose	-
Rhamnose	-	D-Turanose	+
Dulcitol	-	D-Lylose	-
Inositol	-	D-Tagatose	-
Mannitol	+	D-Fucose	-
Sorbitol	-	L-Fucose	-
α-Methyl-D-mannoside	-	D-Arabitol	-
α-Methyl-D-glucoside	+	L-Arabitol	-
N-Acetyl-glucosamine	+	Gluconate	+
Amygdalin	+	2-keto-Gluconate	+
Arbutin	+	5-keto-Gluconate	-
Esculin	+		

+, positive; -, negative

**Table 3.** Comparative analysis of fatty acid composition (%) of *Bacillus* sp. EBW4 and the phylogenetically related *Bacillus* strains. Fatty acids amounting to less than 0.5% in all strains tested are not listed. tr, Trace (<0.5%); -, not detected.

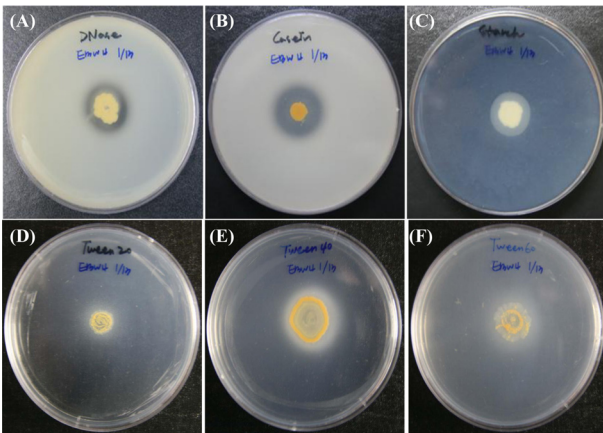
Fatty acid	EBW4	<i>B. hemocentroti</i> JSM 076093 <sup>T</sup>	<i>B. hwanjinponensis</i> SW-72 <sup>T</sup>	<i>B. algicola</i> KMM3737
iso C <sub>14:0</sub>	9.4	9.0	11.6	5.5
C <sub>14:0</sub>	0.7	0.6	-	0.6
iso C <sub>15:0</sub>	4.8	3.5	4.1	5.5
anteiso C <sub>15:0</sub>	48.2	47.5	49.1	65.7
C <sub>15:0</sub>	0.6	-	2.1	2.4
iso C <sub>16:0</sub>	12.1	12.8	16.8	8.1
iso C <sub>16:1</sub>	-	-	-	0.9
C <sub>16:1</sub> ω9c	0.6	-	-	-
C <sub>16:1</sub> ω11c	1.2	1.2	-	-
C <sub>16:0</sub>	4.0	6.0	0.9	0.9
C <sub>16:1</sub> ω7c alcohol	2.6	2.8	4.6	-
anteiso C <sub>16:1</sub>	-	-	-	0.7
iso C <sub>17:0</sub>	-	0.9	0.6	-
anteiso C <sub>17:0</sub>	11.6	12.9	10.3	7.0
anteiso C <sub>17:1</sub>	-	-	-	1.4

Data of *B. hemocentroti* JSM 076093<sup>T</sup>, *B. hwanjinponensis* SW-72<sup>T</sup>, and *B. algicola* KMM3737 originated from Chen *et al.* (2011), Yoon *et al.* (2004), and Invanoval *et al.* (2011), respectively.

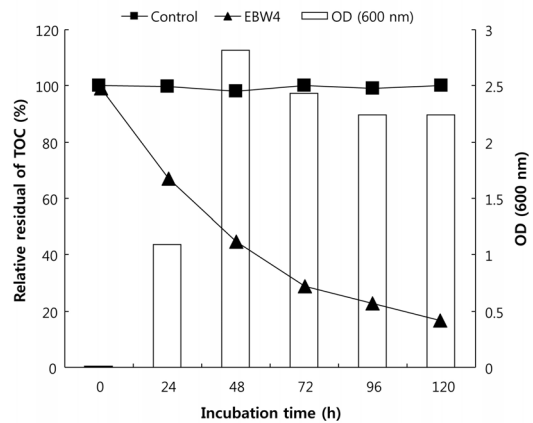
***Bacillus* sp. EBW4의 고분자물질 분해 효소 활성능**

고분자 물질을 사용하여 각 물질 분해에 관련된 효소 활성을 측정된 결과 균주 EBW4는 DNase, amylase, protease, lipase 등의 활성을 가지고 있었다(Fig. 2 and Table 4). DNA 물질이 포함된 배지에 1 M HCl을 떨어뜨렸을 때 DNase 활성을 갖고 있는 균주는 DNA를 분해하여 균체 주변이 투명하게 변하는데 (Jeffries *et al.*, 1957) EBW4는 뚜렷한 투명대를 형성하여 DNase 활성이 매우 높음을 알 수 있었다. Starch와 Casein을 함유한 배지를 이용하여 그 분해능을 시험한 결과 EBW4는 다당류인 Starch 분해에 필요한 amylase와 단백질인 Casein 분해에 필요한 효소 활성이 있음을 알 수 있었다. 여러 종류의 Tween이 포함된 배지에서 균을 배양한 후 균체 주변이 뿌옇게 변하는 것을 확인한 결과, EBW4는 Tween 20, Tween 40 그리고 Tween 60을 분해할 수 있는 lipase 활성을 가지고 있는 것으로 조사되었으나 Tween 80을 이용하지는 못하는 것으로 조사되었다. Cellulose

분해 여부를 관찰하고자 cellulose가 함유된 배지에 균을 48시간 배양한 뒤 congo-red (0.1%)로 염색, 30분 후 1 M NaCl로 세척을 해 색을 관찰한 결과 EBW4는 cellulose 분해에 필요한 cellulase 활성을 갖고 있지 않은 것으로 나타났다. 다양한 종류의 고분자 유기물질을 분해할 수 있는 효소들이 해양 생물 유래 *Bacillus* 균들에서 생산되는 것으로 보고된 바 있다 (Verschuere *et al.*, 2000; Ghosh *et al.*, 2002; Ziaei-Nejad *et al.*, 2006). 특히 균주 EBW4와 계통관계가 가장 가까운 *B. hemocentroti* (Chen *et al.*, 2011)는 casein, starch, Tween 20, Tween 40 그리고 Tween 60을 이용하는데 필요한 효소활성을 가지고 있었지만, 균주 EBW4와는 달리 핵산(DNA)을 분해하는 필요한 효소 활성은 없었다. 동해에서 분리된 *B. hwanjinponensis*는 protease, amylase, lipase 활성을 모두 가지는 있는 것으로 보고된 바 있으며, Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80을 모두 이용할 수 있는 것으로 알려져 있다 (Yoon *et al.*, 2004). 또 다른 연관 균



**Fig. 2.** Enzyme activities of *Bacillus* sp. EBW4 for the degradation of several kinds of macromolecules (A, DNA; B, casein; C, starch; D, Tween 20; E, Tween 40; F, Tween 60).



**Fig. 3.** Measurement of TOC with strain EBW4 over the incubation time using BM buffer containing the synthetic water waste in which glucose and peptone were mixed in the ratio of 4:1.

**Table 4.** Evaluation of enzyme activities for the utilization of macromolecules in *Bacillus* sp. EBW4 isolated from polychaete (*P. aibuhitensis*)

Macromolecules	EBW4	<i>B. hemicentroti</i> JSM 076093 <sup>T</sup>	<i>B. hwajinponensis</i> SW-72 <sup>T</sup>	<i>B. algicola</i> KMM3737
DNA	+	-	ND	ND
Casein	+	+	+	-
Cellulose	-	-	ND	ND
Starch	+	+	+	+
Tween				
20	+	+	+	ND
40	+	+	+	-
60	+	+	+	ND
80	-	-	+	-

+, positive; -, negative; w, weak positive; ND, not determined  
Data of *B. hemicentroti* JSM 076093<sup>T</sup>, *B. hwajinponensis* SW-72<sup>T</sup>, and *B. algicola* KMM3737 originated from Chen et al. (2011), Yoon et al. (2004), and Invanoval et al. (2011), respectively.

주인 *B. algicola*는 amylase 활성을 가지고 있었으나 casein을 분해할 수 있는 protease 및 lipase 활성은 없는 것으로 보고된 바 있다(Ivanova et al., 2004). 특히 균주 EBW4는 *B. hemicentroti*와 약간의 차이는 있었으나 여러 고분자 활성에 필요한 amylase, protease 그리고 lipase 등의 효소 활성을 가지고 있다는 점에서 두 균주 간 생화학적 특성이 상당 부분 일치하는 것으로 나타났다. 이러한 사실은 균주 EBW4의 환경정화나 의약학 분야 등 산업적 활용 범위가 매우 클 것임을 제시해준다.

#### *Bacillus* sp. EBW4의 유기물 분해능

Figure 3은 3% NaCl 농도가 더해진 10,000 mg/L의 높은 농도의 합성폐수를 사용하여 30°C에서 120시간 배양하면서 TOC의 변화 추이로 유기물의 이용능을 조사한 결과이다. 합성폐수 안의 유기물의 잔존량은 24시간 배양 시간대에 68%, OD (600 nm)값이 약간 감소하면서 정지기 상태인 48시간 배양 시간대에 46%, 72시간대 30%로 급속한 감소를 보였다. 0-15% NaCl 농도 별 유기물 분해능에는 큰 차이가 없어 광염성 조건에서도 유기물 분해에 필요한 효소활성이 잘 유지되는 것으로 나타났다.

#### 적용

본 연구에서는 연안갯벌 갯지렁이(*Perinereis aibuhitensis*)에서 분리한 광염성 미생물, *Bacillus* sp. EBW4의 특성과 다양한 환경조건에서 유기물 분해능을 분석하였다. 16S rRNA 염기서열에 기초하여 동정한 결과, 균주 EBW4는 *Bacillus hemicentroti* JSM076093<sup>T</sup>와 98.3%, *Bacillus hwajinponensis* SW-72<sup>T</sup>와 97.96% 그리고 *Bacillus algicola* KMM3737<sup>T</sup>와 96.28%의 상동성을 보였다. EBW4의 생장 가능한 온도 범위는 4-40°C, 염분도 범위는 0-17‰, pH 범위는 5-9로 나타나 EBW4는 광염성 균주로 밝혀졌다. EBW4의 세포막을 구성하는 주요 지방산으로는 anteiso C<sub>15:0</sub>, iso C<sub>16:0</sub>, anteiso C<sub>17:0</sub>, iso C<sub>14:0</sub> 등으로 각각 48.2, 12.1, 11.6, 9.4% 비율로 나타났다. EBW4는 탄수화물, 단백질, 지방 등 다양한 고분자 유기물을 분해할 수 있는 DNase, amylase, protease, lipase 등의 효소 활성뿐만 아니라, alkaline phosphatase,

esterase (C4), leucine arylamidase 그리고 α-chymotrypsin 효소 활성도 가지고 있었다. 다양한 염분 농도 조건에서 합성폐수를 이용한 실험에서 EBW4은 조사한 모든 범위의 염분 조건에서도 유기물 분해능이 우수하였다.

#### 감사의 말

본 연구는 2010-2012년도 농림수산식품기술기획평가원의 연구개발사업비와 2010년도 순천대학교 연구비의 연구지원으로 수행되었음.

#### 참고문헌

- Arena, A., Maugeri, T.L., Pavone, B., Iannello, D., Gugliandolo, C., and Bisignano, G. 2006. Antiviral and immunoregulatory effect of a novel exopolysaccharide from a marine thermotolerant *Bacillus licheniformis*. *Int. Immunopharmacol.* **6**, 8-13.
- Bagheri, T., Hedayati, S.A., Yavari, V., Alizade, M., and Farzanfar, A. 2008. Growth, survival and gut microbial load of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) fry given diet supplemented with probiotic during the two months of first feeding. *Turk. J. Fish. Aquat. Sci.* **8**, 43-48.
- Banerjee, S., Devaraja, T.N., Shariff, M., and Yusoff, F.M. 2007. Comparison of four antibiotics with indigenous marine *Bacillus* spp. in controlling pathogenic bacteria from shrimp and Artemia. *J. Fish Dis.* **30**, 383-389.
- Bishop, P.J. and Neuman, G. 1970. The history of the Ziehl-Neelsen stain. *Tubercle.* **51**, 196.
- Bryan, G.W. and Gibbs, P.E. 1987. Polychaete common ragworms as indicators of heavy-metal availability in marine deposits, pp. 37-39. In Capuzzo, J.M. and Kester, D.R. (eds.), Biological Processes and Wastes in the Oceans. Robert E Krieger Publishing Co., Malabar, Florida, USA.
- Campos, L.C., Su, M.F.J., Graham, N.J.D., and Smith, S.R. 2002. Biomass development in slow sand filters. *Water Res.* **36**, 4543-4551.
- Chen, Y.G., Zhang, Y.Q., He, J.W., Klenk, H.P., Xiao, J.Q., Zhu, H.Y., Tang, S.K., and Li, W.J. 2011. *Bacillus hemicentroti* sp. nov., a moderate halophile isolated from a sea urchin. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **61**, 2950-2955.
- Chun, J., Lee, J.H., Jung, Y., Kim, M., Kim, S., Kim, B.K., and Lim, Y.W. 2007. EzTaxon : a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int. J. Syst. Evolution Microbiol.* **57**, 2259-2261.
- Davidson, J., Helwig, N., and Summerfelt, S.T. 2008. Fluidized sand biofilters used to remove ammonia, biochemical oxygen demand, total coliform bacteria, and suspended solids from an intensive aquaculture effluent. *Aquacult. Engineer.* **39**, 6-15.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies : an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783-791.
- Fourcy, D., Jumel, A., Heydorff, M., and Lagadic, L. 2002. Esterases as biomarkers in *Nereis (Hediste) diversicolor* exposed to temephos and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* used for mosquito control in coastal wetlands of Morbihan (Brittany, France). *Mar. Environ. Res.* **54**, 755-759.
- Fujioka, Y., Shimoda, T., and Srithong, C. 2007. Diversity and community structure of macrobenthic fauna in shrimp aquaculture ponds of the Gulf of Thailand. *Jap. Agric. Res. Quart.* **41**, 163-172.

- Gatesoupe, F.J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquacult.* **180**, 147–165.
- Ghosh, K., Sen, S.K., and Ray, A.K. 2002. Characterization of bacilli isolated from the gut of rohu, *Labeo rohita* fingerlings and its significance in digestion. *J. Appl. Aquacult.* **12**, 33–42.
- Gili, J.M. and Coma, R. 1998. Benthic suspension feeders : their paramount role in littoral marine food webs. *Trends Ecol. Evol.* **13**, 316–321.
- Gomez-Gil, B., Roque, A., and Turnbull, J.F. 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquacult.* **191**, 259–270.
- Guo, H., Luo, S., Chen, L., Xiao, X., Xi, Q., Wei, W., Zeng, G., Liu, C., Wan, Y., and Chen, J. 2010. Bioremediation of heavy metals by growing hyperaccumulaor endophytic bacterium *Bacillus* sp. L14, *Bioresour. Technol.* **101**, 8599–8605.
- Guncheva, M. and Zhiryakova, D. 2011. Catalytic properties and potential applications of *Bacillus* lipases. *J. Mol. Cat. B Enzym.* **68**, 1–21.
- Hall, T. 2007. BioEdit. Biological sequence alignment editor for Win95/98/NT/2K/XP. Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA.
- Hovda, M.B., Sivertsvik, M., Lunestad, B.T., Lorentzen, G., and Rosnes, J.T. 2007. Characterisation of the dominant bacterial population in modified atmosphere packaged farmed halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) based on 16S rDNA-DGGE. *Food Microbiol.* **24**, 362–371.
- Hucker, G.J. and Cohn, H.J. 1923. Methods of Gram staining. *Tech. Bull. N.Y. State Agric. Exp. Sta.* **93**.
- Hugh, R. and Leifson, E. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **66**, 24–26.
- Ivanova, E.P., Alexeeva, Y.A., Zhukova, N.V., Gorshkova, N.M., Buljan, V., Nicolau, D.V., Mikhailov, V.V., and Christen, R. 2004. *Bacillus algicola* sp. nov., a novel filamentous organism isolated from brown alga *Fucus evanescens*. *System. Appl. Microbiol.* **27**, 301–307.
- Jeffries, C.D., Holtman, D.F., and Guse, D.G. 1957. Rapid method for determining the activity of microorganisms on nucleic acids. *J. Bacteriol.* **75**, 590–591.
- Joo, H.-S., Kumar, C.G., Park, G.-C., Paik S.R., and Chang, C.-S. 2004. Bleach-resistant alkaline protease produced by *Bacillus* sp. isolated from the Korean polychaete, *Periserrula leucophryna*. *Process Biochem.* **39**, 1441–1447.
- Kapdan, I.K. and Erten, B. 2007. Anaerobic treatment of saline wastewater by *Halanaerobium lacusrosei*. *Process Biochem.* **42**, 449–453.
- Kennedy, S.B., Tucker, J.W., Neidig, C.L., Vermeer, G.K., Cooper, V.R., Jarrell, J.L., and Sennett, D.G. 1998. Bacterial management strategies for stock enhancement of warm water marine fish : a case study with common snook (*Centropomus undecimalis*). *Bull. Mar. Sci.* **62**, 573–588.
- Kumar, S., Nei, M., Dudley, J., and Tamura, K. 2008. Mega : a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinform.* **9**, 299–306.
- Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In Stackebrandt, E. and Goodfellow, M. (eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. pp. 115–75. John Wiley and Sons, New York, N.Y., USA.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. 1982. *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., USA.
- Mikesell, M.D., Kukor, J.J., and Olsen, R.H. 1993. Metabolic diversity of aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from a petroleum-contaminated aquifer. *Biodegradation* **4**, 249–259.
- Moeller, M. 1891. Ueber eine neue Methode der Sporenfärbung. *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.* **10**, 273–277.
- Moriarty, D.J.W. 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. Aquatic zooremediation: deploying animals to remediate contaminated aquatic environments. *Aquacult.* **164**, 351–358.
- Orejas, C., Gili, J.M., Arntz, W.E., Ros, J.D., López, P.J., Teixidó, N., and Filipe, P. 2000. Benthic suspension feeders, key players in Antarctic marine ecosystems. *Contribut. Sci.* **1**, 299–311.
- Pérez, E., Blasco, J., and Solé, M. 2004. Biomarker responses to pollution in two invertebrate species: *Scrobicularia plana* and *Nereis diversicolor* from the Cádiz bay (SW Spain). *Mar. Environ. Res.* **58**, 275–279.
- Palacios, G.L. and Timmons, M.B. 2001. Determining design parameters for recovery of aquaculture wastewater using sand beds. *Aquacult. Engineer.* **24**, 289–299.
- Prieur, D., Mével, G., Nicolas, J.L., Plusquellec, A., and Vigneulle, M. 1990. Interactions between bivalve molluscs and bacteria in the marine environment. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* **28**, 277–352.
- Raida, M.K., Larsen, J.L., Nielsen, M.E., and Buchmann, K. 2003. Enhanced resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Yersinia ruckeri* challenge following oral administration of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* (BioPlus2B). *J. Fish. Dis.* **26**, 495–498.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method : a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406–425.
- Stabili, L., Licciano, M., Giangrande, A., Fanelli, G., and Cavallo, R.S. 2006. *Sabella spallanzanii* filter-feeding on bacterial community: ecological implications and applications. *Mar. Environ. Res.* **61**, 74–92.
- Sugita, H., Hirose, Y., Matsuo, N., and Deguchi, Y. 1998. Production of the antibacterial substance by *Bacillus* species strain NM12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish. *Aquacult.* **165**, 269–280.
- Täubel, M., Kämpfer, P., Buczolits, S., Lubitz, L., and Busse, H.-J. 2003. *Bacillus barbaricus* sp. nov., isolated from an experimental wall painting. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**, 725–730.
- Vaseeharan, B. and Ramasamy, P. 2003. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Lett. Appl. Microbiol.* **36**, 83–87.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., and Verstraete, W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Res.* **64**, 655–671.
- Vigneswaran, S., Ngo, H.H., and Wee, K.L. 1999. Effluent recycle and waste minimisation in prawn farm effluent. *J. Cleaner Prod.* **7**, 121–126.
- Yoon, J.H., Kim, I.G., Kang, K.H., Oh, T.K., and Park, Y.H. 2004. *Bacillus hwajinponensis* sp. nov. and an unnamed *Bacillus* genomospecies, novel members of *Bacillus* rRNA group 6 isolated from sea water of the East Sea and the Yellow Sea in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 803–808.
- Ziaei-Nejad, S., Rezaeib, M.H., Takamic, G.A., Lovettd, D.L., Mirvaghefia, A., and Shakourie, M. 2006. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Aquacult.* **252**, 516–524.