

Probiotics를 양식넙치에 투여시 *Streptococcus iniae*에 대한 면역반응 및 병저항성

장익수 · 김동휘 · 허문수*

제주대학교 해양과학대학 수산생명의학과 및 해양과 환경연구소

Dietary Administration of Probiotics, *Bacillus* sp. IS-2, Enhance the Innate Immune Response and Disease Resistance of *Paralichthys olivaceus* against *Streptococcus iniae*

Ik-Soo Jang, Dong-Hwi Kim, and Moon-Soo Heo*

Department of Aquatic Biomedical Science and Marine and Environment Research Institute,
Jeju National University, Jeju 690-756, Republic of Korea

(Received May 13, 2013 / Accepted June 26, 2013)

The strains were added to the feed in the concentration of 10^3 , 10^5 , and 10^7 CFU/kg and 2% of fishes were given the feed twice a day (8 AM and 5 PM) for 12 weeks. In result of the nonspecific immune response study to examine Respiratory burst activity, Lysozyme activity and Phagocytosis activity every two weeks until the end of the study, all test samples showed greater activities than control samples and improved immune activity with *Bacillus* sp. IS-2. The mortality test performed by artificial infection using *Streptococcus iniae*, a pathogenic bacterium, after the completion of this study also showed over 55% greater survival rate in all test samples. In result of performing PCR using the universal primer to verify that the probiotic stays in the intestines of the fishes, all test samples showed PCR product of 1,465 bp. Based on the above findings, it was concluded that *Bacillus* sp. IS-2 in the feed improved farmed flatfish's immune system and resistance against diseases as the probiotics. Also, the physiological indicators discovered by this study would be useful for identifying the mechanisms of probiotics.

Keywords: *Paralichthys olivaceus*, *Streptococcus iniae*, disease resistance, innate immune response, probiotics

현재 우리나라 해산어류 양식은 1970년대부터 각종 어류에 대한 양식기술이 개발되면서 어종별 양식 생산량은 지금까지 약 205%의 증가를 보이고 있으며, 2003년 기준으로 어류양식생산량은 72,393톤에 달하며 국민의 단백질 식량산업으로 자리를 굳히고 있다(National Fisheries Research & Development Institute, 2000). 이러한 양식생산량의 증가는 전 세계적으로 매년 급증하고 있는 추세이며 1인당 1년 수산식품의 소비량을 확인해 보면 1992년 13.5 kg에서 2002년에 16.0 kg으로 10년간 약 19% 증가하였으며, 2010년에는 17 kg으로 사상 최고치를 경신하여 평균 동물성 단백질 섭취량의 15%를 담당하면서 30억명 이상에게 수산물 공급되고 있다고 밝혀졌다(Food and Agriculture Organization, 2011).

그러나 양식 어류의 생산량을 높이기 위한 양식장의 밀식과 열악한 사육수 등은 양식 어류의 항병력을 약화시켜 어류질병이 빈번히 나타나 경제적 손실이 높아지고 있다(Ministry for Food,

Agriculture, Forestry and Fisheries, 2003). 제주 양식넙치의 경우 폐사현황을 보면 2007년 3,869톤(생산량 2만825톤), 2008년 4,519톤(생산량 2만4천184톤), 2009년 4,427톤(생산량 2만6천24톤), 2010년 5,601(생산량 2만2천139톤)으로 해마다 증가하고 있으며, 폐사로 인한 피해액은 2007년 320억원, 2008년 294억원, 2009년 376억원, 2010년 513억원으로 조사되었다(Statistics Korea, 2011). 양식 어류의 질병예방 및 치료를 위한 가장 일반적인 방법에는 항생제 투여 등의 화학적인 방법과 백신요법이 있는데 항생제 요법인 경우 오남용에 따른 내성균의 출현(Smith et al., 1994)과 체내잔류(Karunasagar et al., 1994) 등 사회적, 생태적으로 심각한 문제를 유발하고 있어 그 사용이 규제되고 있는 실정이다. 백신요법의 경우 양식어류는 군집을 대상으로 투여하고 주로 면역력이 약한 자치어를 대상으로 하기 때문에 백신투여가 매우 번거롭고 많은 인력이 필요한 실정이다. 또한 세균성 질병의 복합적인 감염에 따른 효과적인 백신의 개발이 없어 어병 예방과 치료를 위한 대책으로서는 한계에 와 있다고 할 수 있다. 따라서 기존의 문제점에 대한 대책으로 천연 자원인 미생물 자원을 이용한 probiotics를 양어사료에 첨가한 친환경적

*For correspondence. E-mail: msheo@jejunu.ac.kr; Tel.: +82-64-754-3473; Fax: +82-64-756-3493

인 요법에 관심과 연구가 최근 많아지고 있다.

Probiotics의 기본적 조건으로는 그람 음성, 양성 세균을 저해할 수 있는 넓은 항균 스펙트럼을 갖고 있어야 하며, 지속적인 항균작용과 pH가 낮은 위와 담즙 그리고 여러 가지 소화효소 등의 환경 조건에서도 생존할 수 있어야 한다. 또한 어병 치료를 위한 항생제 투약 시기에도 생존할 수 있어야 한다(Verschuere *et al.*, 2000). 따라서 본 연구에서는 양식 생산성을 높이고 양식 환경 개선에 도움이 되며, 양식 넙치의 면역증강 효과가 있는 probiotics 균주 개발을 하기 위해 넓은 항균 스펙트럼을 갖고 있으면서 pH 내성 및 열안정성, 내염성을 갖고 있는 *Bacillus* sp. IS-2 균주를 선발하였으며, 이를 이용하여 각기 다른 농도로 사료에 첨가하여 양식 현장에 사용하였을 때 나타나는 양식넙치의 면역 반응, 병저항성을 조사하여 차후 probiotics를 이용한 사료 첨가제 개발을 위한 기초자료로서 이용하고자 한다.

재료 및 방법

실험어 사육관리

본 실험은 제주도 함덕리에 위치한 해양과환경연구소에서 수행하였고, 실험어로 사용된 넙치는 제주도 위미리에 위치한 (주)금강수산에서 분양을 받았다. 실험 시작 전에 사용한 넙치는 실험 환경에 적응시키기 위해 약 2주일 동안 기초사료를 공급하여 순치시켰으며, 실험 시작 전 넙치의 평균 무게는 210 ± 13 g이었다. 사육 수조는 1,000 L 원형수조를 사용하였고, 각 수조당 70 마리씩 수용하였으며, 사육수량은 1일 3회 환수, 충분한 산소 공급을 위하여 통기 하였다. 실험 기간 중의 수온, 용존산소(dissolved oxygen, DO), pH, 염분은 매일 YSI (YSI-556MPS, YSI Environmental, USA)를 이용해 측정하였다. 실험 기간 중 사육 온도는 $11.5\text{--}22.5^\circ\text{C}$, 염분은 $33.64\text{--}35.01\text{‰}$, pH는 $7.89\text{--}8.50$, DO는 $6.65\text{--}9.25$ 이었다. 사료는 1일 2회(오전 8시, 오후 5시) 넙치 체중의 2%씩 공급 하였으며, 실험 사육은 총 12주 동안 수행하였다.

실험사료 및 설계

사료 제작을 위하여 시판하고 있는 넙치용 배합사료에(조단 백질 52%, 조지방 11%, 조섬유 3%, 조회분 14%, 인 2.7%, 칼슘 1.5%, Suhyup Co., Korea) 대량 배양 된 분리균주 *Bacillus* sp. IS-2를 각각 첨가하여 10^3 , 10^5 , 10^7 CFU/kg의 실험 사료를 제작 하였다. 대조구는 probiotics를 첨가하지 않은 일반 사료를 투여 하였으며, 사료 투여는 1일 2회(오전 8시, 오후 5시) 넙치 체중의 2%씩 공급 하였으며, 실험 사육은 총 12주 동안 수행하였다.

성장도 조사 및 혈액학적 분석

실험어의 어체 측정은 실험 시작 후 4주마다 측정을 하였으며, 측정 24시간 전에 절식시킨 후, 각 실험구에서 무작위로 12 마리를 선발하여 실험어 전체 무게를 측정하여 증중량을 구하였고, 실험어의 전장은 각각의 개체의 전장을 확인 한 후 평균을 측정하였다. 혈액분석 측정을 위한 채혈 방법으로는 채혈 24시간 전부터 절식을 시킨 후, 마취제를 사용하지 않고 각 실험구에서

무작위로 10마리를 선발한 후, 1 ml 주사기를 사용하여 넙치의 미부정맥에서 1 ml 채혈하였다. 채취된 혈액은 4°C 에서 2시간 보관 후에 4°C 원심분리기를 이용하여 $1,200 \times g$, 10 min에서 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청은 간수치 측정을 위해 실험에 사용하였으며, 남은 시료의 경우 -60°C 에서 따로 보관하였다. 혈청 중의 성분은 대해서는 9가지 항목을 조사하였는데, Glutamic pyruvic transaminase (GPT), Glutamic oxalacetic transaminase (GOT), Total protein, Lactate Dehydrogenase (LDH), Glucose 그리고 Triglyceride (TG)의 성분 조사는 자동 혈액 분석 장치(Ch100 Plus, DaeKwang Meditech, Korea)를 이용하여 측정하였다.

어류 식세포의 활성산소 측정

어류 식세포 작용을 알아보기 위하여 Respiratory burst activity를 분석하였다(Anderson and Siwicki, 1994). 실험어의 미부에서 채취한 전혈을 1.5 ml 마이크로튜브에 넣고 0.2% NBT (Nitrobluetetrazolium, Sigma)를 전혈과 1:1로하여 30분간 상온에서 반응시킨 후, 1 ml dimethylformamide를 넣고 반응을 정지시킨다. 그런 다음 $500 \times g$ 에서 5분간 원심분리 한 후 상층액을 수거하여 micro well plate reader (Packard Spectrocount Instruments, USA)를 이용해 540 nm에서 흡광도 값을 측정한다. Blank는 dimethylforamode로 하고, 대조구는 NBT 시약을 사용하였다.

라이소자임 활성 조사

넙치의 라이소자임 측정을 위하여 Kumari와 Sahoo에 따라 분석하였다(Kurami and Sahoo, 2005). 라이소자임활성을 측정하기 위해 각각의 실험구미부에서 채취한 혈액의 혈청 50 μl 와 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 6.2)에 *Micrococcus lysodeikticus* (0.2 mg/ml)를 부유시킨 solution 1 ml을 96-well plate에 혼합시킨다. 20°C 조건에서 micro well plate reader를 이용하여 530 nm에서 0.5분과 4.5분에 흡광도를 측정하였다. 라이소자임의 활성 단위는 분당 0.001의 흡광도 감소를 나타내는 효소의 양으로 정의하였다.

백혈구 활성 측정

실험어에서 채취한 혈액에서 분리된 백혈구를 이용하여 Seeley의 방법에 따라 실시하였다(Seeley *et al.*, 1990). Hitopaque 1.119 (11191-100 ml, Sigma, USA)와 분리된 혈액 샘플을 1:1로 섞어 400 g, 30 min, 15°C 의 조건으로 원심분리 해준 다음 분리층을 파스퇴르 피펫을 이용하여 Mononuclear cell (MNC)의 세포를 분리하여 $1 \times \text{HBSS}$ (Hank's Balanced Salt Solution, MNC의 3배)로 3회 수세 후, cell counting을 통해 계수 한 다음, Congo red 염색약으로 염색된 yeast cell을 20:1의 비율로 상온에서 1시간 반응을 하여 phagocytosis를 유도한다. 그 후 1 ml ice-cold HBSS와 1 ml hitopaque-1.077 (Sigma-Aldrich)을 각각의 시료에 더해준 다음 $850 \times g$, 5 min 동안 원심분리를 시켜 반응이 유도된 yeast cells를 분리하여 최종적으로 510 nm의 흡광도 값을 통해 Phagocytosis를 수치화하여 나타내었다(Using trypsin-EDTA as a blank).

Table 1. Serum analysis of Olive flounder that was fed with *Bacillus* sp. IS-2 mixed and non-mixed control diet for 12 weeks

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

Glutamic oxalacetic transaminase (GOT), Glutamic pyruvic transaminase (GPT), Total protein (TP), Glucose (GLU), Total cholesterol (TC)

인위감염에 의한 생존율 조사

일반사료에 *Bacillus* sp. IS-2를 첨가하여 투여할 시 넙치의 항병력에 미치는 영향을 조사하기 위하여 양식장에 발병 빈도가 가장 높은 그람 양성 세균인 *Streptococcus iniae*를 이용하여 공격실험을 실시하였다. *Streptococcus iniae* (KCTC 3657)는 생명자원센터(Korean Collection for Type Culture, KCTC)에서 분양 받아 Brain Heart Infusion Agar (BHIA, Difco Co., USA)를 사용하여 3반복 접종하여 37°C 배양하였으며, 3×10⁵ CFU/ml의 농도가 되도록 0.85% 멸균 생리식염수에 현탁 한 후, 공격 실험용으로 사용하였다. 공격실험은 사료투여 후 12주 후에 실시하였으며 대조구를 비롯하여 실험구에서 무작위로 30마리씩 선정하여 1 ml 주사기를 이용하여 각 마리당 200 µl씩 복강주사 후 20일 동안 누적 폐사율을 조사하였다.

공시 균주의 장내 확인

사료 첨가제로 사용된 *Bacillus* sp. IS-2의 장 내 생존을 확인하기 위해 실험이 종료 된 후, 각각의 실험구의 실험어에서 장을 분리하여 MRS agar (Man Rogosa and Sharpe agar, Difco Co.) 배지에 16시간 동안 배양 후, 7,000×g 15 min, 4°C의 조건으로 원심분리하여 균체를 수집하였다. 수집된 균체를 Genomic DNA Extraction kit (Bioneer, Korea)를 사용하여 Chromosomal DNA를 분리한 후, Universal primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. 합성된 oligonucleotides의 각각의 primer는 7F (5'-AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG-3'), 1492R (5'-GGA TAC CTT GTT ACG ACT T-3')로 사용하였다. 증폭된 PCR product는 Ethidium bromide (Sigma-Aldrich)가 첨가된 상태에서 전기영동하여 1% agarose (Promega Co., USA) gel에서 확인하였다.

통계처리

해양연구소에서 사육한 넙치의 성장 및 분석 결과의 통계처리는 SPSS (SPSS INC., Version 12.0) program을 이용하여 독립 검정을 실시하여 t-test (P<0.05)로 평균간의 유의성을 검정하였다. 결과 값은 평균값±표준편차(mean±SD)로 나타내었고 백분율 값은 arcsine 변형값으로 계산하여 통계분석하였다.

결 과

성장도 조사 및 혈액학적 분석

Bacillus sp. IS-2 첨가 사료 투여가 넙치의 성장에 미치는 영

향을 조사하기 위해 12주 동안 각기 다른 농도의 *Bacillus* sp. IS-2를 첨가한 실험구와 *Bacillus* sp. IS-2를 첨가하지 않은 대조구의 양식 어류의 체중변화에 대한 결과를 나타내었다(Fig. 1). 결과를 보면 *Bacillus* sp. IS-2를 첨가한 사료를 급여한 넙치와 *Bacillus* sp. IS-2를 첨가하지 않은 일반 사료를 급여한 넙치는 사육 8주 동안 비례적으로 성장하였다. 하지만 마지막 12주 성장 실험 후 최종 어체의 평균 무게를 측정할 결과 10⁵ CFU/kg 첨가사료를 급여한 실험구에서 대조구에 비해 약 13% 정도 높은 성장률을 나타냈다. 이와 같은 결과는 *Bacillus* sp.의 첨가가 틸라피아(Aly et al., 2008), 잉어(Mohanty et al., 1996), 해삼(Zhang et al., 2010)을 대상으로 한 연구에서도 본 연구와 유사한 결과를 보였으며 이는 사료 내 생균제를 첨가하면 동물에 있어 소화율을 증가시켜 사료의 이용성을 향상시키는 것으로 보고된 것과도 일치하였다(Bougon et al., 1988; Rychen and Nunues, 1995). 또한 probiotics를 통한 여러 효소의 활성을 향상시킴으로써 장내에서의 영양소 흡수를 촉진시킨다고 보고된 것과도 일치한 결과를 나타내었다(Zhang et al., 2010).

본 실험의 실험구와 대조구의 혈액학적 분석결과를 Table 1에 나타내었다. 간 독성을 나타내는 지표인 GPT 및 GOT, 단백질, 총콜레스테롤을 함량은 실험구간에서 유의적인 차이를 나타내지 않았으며, 이는 체내의 장내에 머무는 생균제에 의한 독성이나 어체 내 문제가 발생하지 않는 것으로 사료된다. 그러나

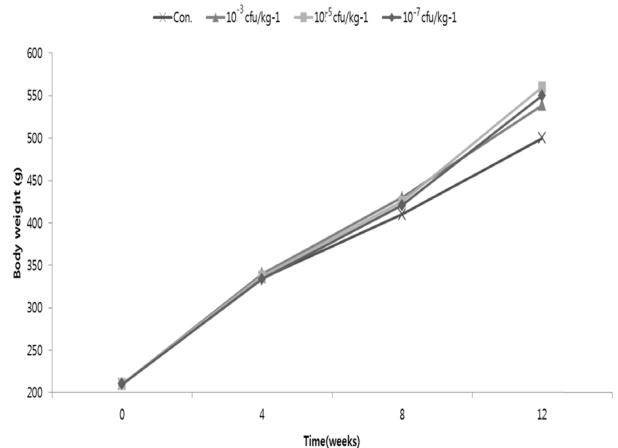


Fig. 1. Weight (g) of Olive flounder that was fed with probiotics and non-mixed control diet for 12 weeks and weighted every 2 weeks.

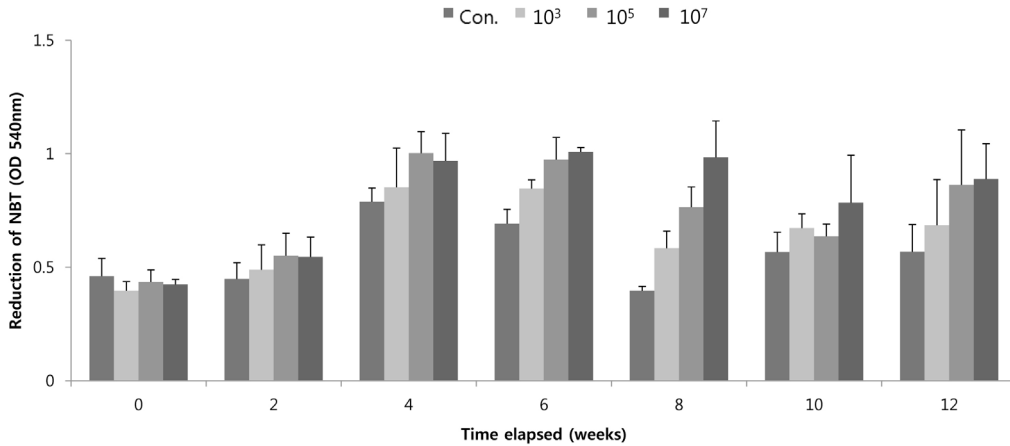


Fig. 2. NBT reduction of Olive flounder that was fed with *Bacillus* sp. IS-2 and non-mix control diet for 12 weeks.

glucose의 경우 실험이 종료된 시점에서 증가되는 변화를 확인할 수 있었는데 이는 수질악화 및 수온의 변화와 같은 일시적인 스트레스 반응 때문이라 생각되어지며 이러한 glucose의 증가경향은 Pagrus major, Striped bass, Chinook salmon 등을 이용한 수온변화 연구를 통하여 보고 되었다(Wardle, 1972).

어류 식세포의 활성산소 측정

식세포의 활성산소 측정은 병원체 침입 등에 의해 자극된 전신 식세포의 활성산소(O₂)와 같은 산소라디칼(ROS)을 측정하는 시험으로 잘 알려진 NBT 환원법으로 식세포 활성을 측정하였다. *Bacillus* sp. IS-2 사료 첨가 투여에 대한 식세포의 활성산소 측정 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 실험이 시작된 후부터 모든 실험구에서는 대조구보다 높은 값을 나타내었으며, 4주가 지나기 시작한 후부터는 10⁵ CFU/kg 실험구와 10⁷ CFU/kg에서 유의적으로 높은 값을 나타내었다. 이러한 결과는 대하, 무지개 송어, 터봇 및 유럽산 뱀장어에게 *Bacillus* sp. 및 *Saccharomyces cerevisiae*를 공급하였을 때 NBT 활성값을 증가시킨다는 보고와 일치하였다(Wardle, 1972; Anderson *et al.*, 1979; Griffin,

1983; Chang and Liu, 2002; Tseng *et al.*, 2009). 이는 어체 내에서 생균제가 어류의 면역체계를 직간접적으로 영향을 미쳐 산소라디칼을 중화시키는 것으로 여겨지며, 이로 인해 식세포의 호흡폭발시 발생하는 ROIs (Reactive Oxygen Intermediates)의 생성에도 영향을 미친 것으로 사료된다.

라이소자임 활성 측정

라이소자임은 비특이적 방어기작들 중에 대표적인 것으로 자연계에 넓게 분포하는 효소로서, 이 효소는 peptidoglycan이라는 세균의 세포벽 성분을 분해하는 작용을 가지고 있으며, 이외에도 옹소닌, 항바이러스, 항암작용 등에도 관여를 하는 것으로 보고되고 있다(Jolles and Jolles, 1984). 본 실험 결과 *Bacillus* sp. IS-2 생균제를 첨가한 사료를 투여한 실험구가 대조구에 비해 더 높은 라이소자임 활성이 있는 것으로 나타났다(Fig. 3). 실험이 종료된 시점에서는 10⁵ CFU/kg의 실험구에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 이와 같은 결과는 *Bacillus subtilis*와 *S. cerevisiae*를 양식 넙치 사료에 첨가 후 투여하여 라이소자임 활성 값이 증가했다는 결과와 유사하며(Taoka *et al.*, 2006), *S.*

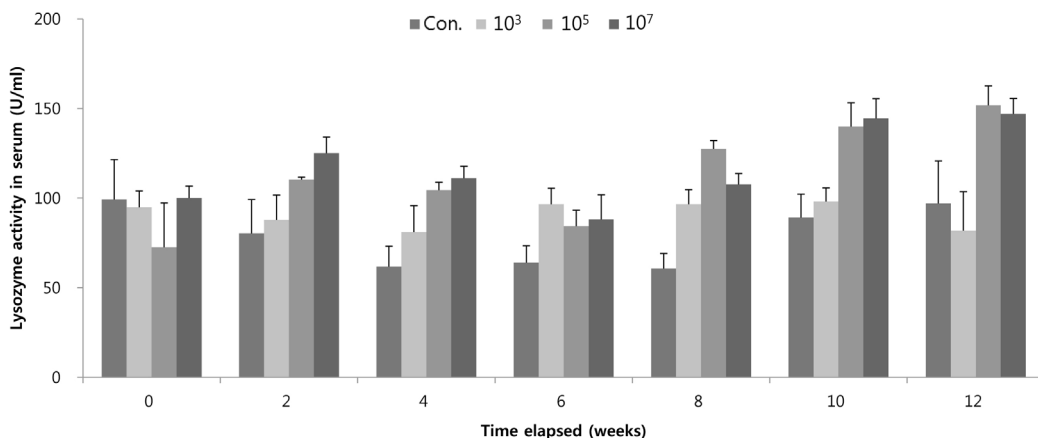


Fig. 3. Lysozyme activity in serum of Olive flounder that was fed with *Bacillus* sp. IS-2 and non-mix control diet for 12 weeks.

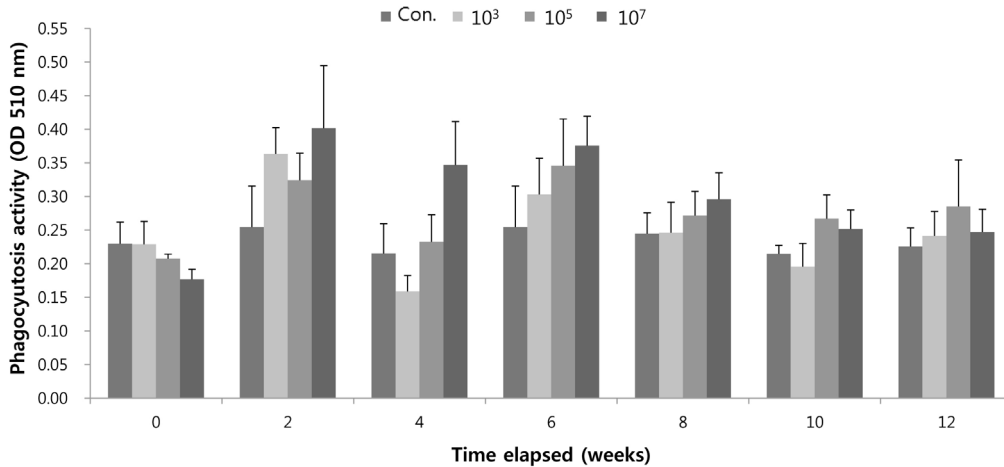


Fig. 4. Phagocytosis activity in serum of Olive flounder that was fed with *Bacillus* sp. IS-2 and non-mix control diet for 12 weeks.

cerevisiae p13를 Grouper 사료 내 각기 다른 농도로 투여하였을 시에 10⁵ CFU/kg 실험구에서 가장 높은 라이소자임 활성값을 확인하였다는 보고와도 일치한다(Chiu et al., 2010).

백혈구 활성 측정

식세포 활성 측정 결과 실험 사료를 투여 한 이후 모든 실험구에서는 대조구에 비해 높은 활성을 유지되었으며(Fig. 4) 특히 10⁵ CFU/kg 그룹에서는 8주차 때부터 다른 농도의 실험구에 비해 비교적 높은 활성을 확인 할 수 있었다. 이와 같은 결과는 이상의 비특이적 면역 반응 실험 결과로부터 probiotics를 사료 내 첨가하여 투여하는 것이 어류의 질병저항성에 중요한 역할을 하는 식세포 활성이 증가되는 것으로 확인 되었으며, 10⁵ CFU/kg 이상의 농도로 첨가하는 것이 식세포 활성 증강에 있어서 높은 활성을 나타내는 것을 확인하였다.

인위감염에 의한 생존율 조사

Bacillus sp. IS-2를 각기 다른 농도로 첨가한 사료를 투여한 실험구와 일반사료를 투여한 대조구의 어병 세균에 대한 공격실험의 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 10⁵ CFU/kg의 농도로 조정된 *S. iniae*를 모든 실험이 종료된 시기에 접종하여 20일 동안 누적 폐사율을 확인 하였는데 5일째부터 모든 실험구와 대조구에서

폐사가 시작되어 10³ CFU/kg 실험구에서는 73%의 폐사율을 10⁵ CFU/kg 실험구에서는 53%의 폐사율을 나타냈으며, 10⁷ CFU/kg 실험구에서는 45%의 폐사율을 보여 대조구에 비해 많게는 55% 이상의 높은 생존율을 나타내었다. White shrimp의 사료 내 *B. subtilis*를 첨가하여 10일 동안 투여 한 실험구에 *Vibrio harveyi* (10⁵ CFU/shrimp)를 접종하여 공격실험을 수행한 결과 생균제를 첨가하지 않은 대조구보다 유의하게 낮은 폐사율을 보였으며 (Zokaeifar et al., 2012) 또한 사료 내 *B. subtilis* E20을 첨가하여 Grouper에 28일 동안 투여한 실험구에 *Streptococcus* sp.를 접종한 후 누적폐사율을 확인해 본 결과 생균제를 첨가하지 않은 대조구보다 유의하게 높은 생존율을 보인 결과를 나타내어(Liu et al., 2012) 본 연구결과와 매우 유사한 결과를 보여 주었다. 이러한 결과는 생균제의 생리활성촉진에 의한 비특이적 면역력의 증가에 따라 넙치의 질병저항성이 증가되었을 것으로 판단된다.

***Bacillus* sp. IS-2 장내 확인**

모든 실험이 종료된 후 일반사료를 급여한 대조구와 각각의 실험사료를 급여한 실험어의 장을 분리하여 배양된 균체의 DNA를 분리한 후, 제작 된 Universal primer를 이용한 PCR 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 일반사료를 투여한 대조구를 제외한 모든 실험구에서 1,465 bp의 PCR product를 확인할 수 있었다.

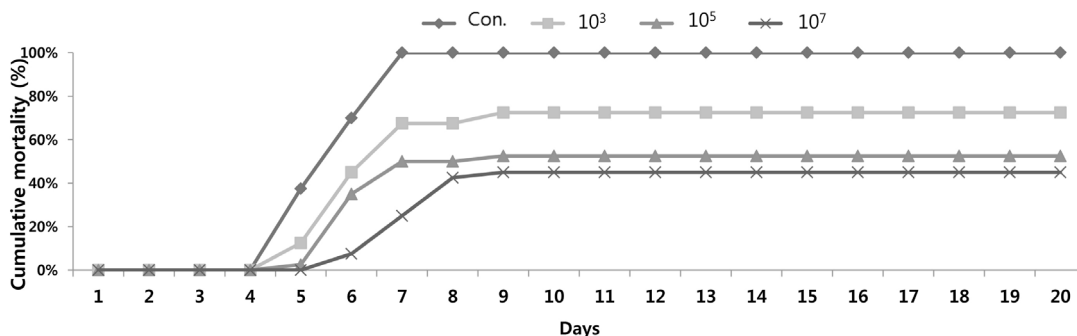


Fig. 5. Cumulative mortality (%) after intraperitoneal injection of *S. iniae* in Olive flounder.

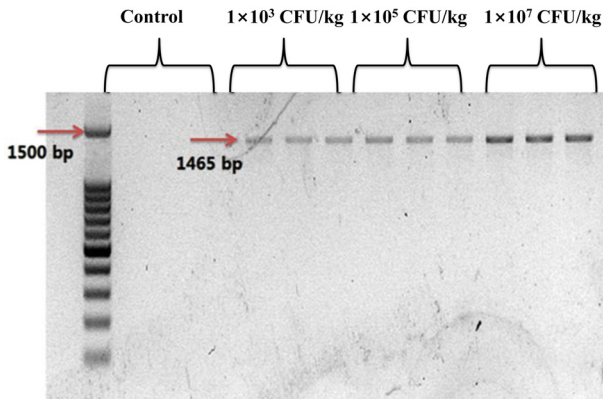


Fig. 6. Detection of *Bacillus* sp. IS-2 in the intestines of *Bacillus* sp. IS-2 fed the control diet and *Bacillus* sp. IS-2 containing diets at 10^3 , 10^5 , and 10^7 colony-forming units (CFU/kg diet) by gel electrophoresis of polymerase chain reaction products amplified using the specific primer pair, forward primer 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') reverse primer 1492R (5'-GGTTACCTGTTACGACTT-3'), of a specific open reading frame from the *Bacillus* sp. genome.

Saccharomyces cerevisiae P13을 Grouper에 투여 후 본 연구와 같은 방법으로 장내 부착 균주를 확인해 본 결과 본 연구결과와 비슷한 결과를 확인 할 수 있었으며(Chiu *et al.*, 2010), 이는 사료를 통해 섭취된 실험 균주가 위와 같은 소화기관을 통하여 무사히 장내에 도달하였음을 확인 할 수 있는 결과라 사료된다.

본 실험의 결과를 통해 *Bacillus* sp. IS-2의 사료 내 첨가는 양식넙치의 성장 및 비특이적 면역반응을 증가시켜 *S. iniae*에 대한 질병저항성을 향상시켜 사료첨가제로 사용이 가능함을 보여주었다. 또한 각기 다른 농도를 통하여 실험을 실시한 결과 10^5 CFU/kg 이상의 농도로 첨가하여 공급할 경우 양식넙치의 면역반응과 질병저항성에 가장 좋은 효과를 나타낼 수 있음을 확인하였다. 앞으로 probiotics를 통한 양식어류의 생존능력과 면역능력 향상 메커니즘에 대한 깊은 연구가 필요할 것으로 사료되며 이를 통해 고품질 배합사료 개발 및 양식생산성 향상에 크게 기여할 것으로 사료된다.

고찰

본 연구는 양식 넙치(*Paralichthys olivaceus*) 사료 내 생균제 첨가가 넙치의 성장, 면역반응 및 병저항성에 미치는 영향을 평가하였다. 실험사료는 넙치용 배합사료(조단백질 52%, 조지방 11%, 조섬유 3%, 조회분 14%, 인 2.7%, 칼슘 1.5%, Suhyup Co., Korea)에 *Bacillus* sp. IS-2를 첨가하여 10^3 , 10^5 , 10^7 CFU/kg의 실험사료를 제작하였다. 2주간의 예비사육 후, 평균무게 210 ± 13 g인 실험어를 1,000 L 원형수조에 실험구 당 70마리씩 무작위로 배치하여 실험사료를 1일 2회 어체 중의 2%씩 12주 동안 공급하였다. 성장도 조사 결과 모든 실험구에서는 일반사료를 투여한 대조구에 비해 높은 성장률을 나타내었으며 10^5 CFU/kg 실험구에서는 대조구에 비해 약 13% 정도 높은 성장률을 나타내었다. 혈액분석 결과에는 glucose를 제외한 GOT, GPT, 단백질, 총

콜레스테롤 등에서 실험구간 유의적인 차이를 나타내지 않고 생균제로 인한 간독성이나 어체 내 문제가 발생하지 않은 것으로 사료된다. Glucose의 경우 실험 종료 시점에서 증가되는 변화를 확인 할 수 있었는데 이는 수온, 수질에 의한 일시적인 현상이라 사료된다. Respiratory burst activity (NBT assay)에 있어서는 실험사료를 공급한 실험구가 대조구에 비해 높은 값을 확인할 수 있었으며 특히 10^5 CFU/kg 실험구와 10^7 CFU/kg 실험구에서 유의적으로 높은 값을 확인하였다. 혈청의 라이소자임 및 백혈구 활성에 있어서도 실험사료를 투여한 실험구에서 대조구에 비해 높은 활성을 확인하였다. 공격실험 결과, *S. iniae*를 접종한지 5일째부터 폐사가 시작되어 7일째 일반사료를 투여한 대조구에서는 100% 폐사율을 보인 반면, 10^3 CFU/kg 실험구에서는 73%의 폐사율을 10^5 CFU/kg 실험구에서는 53%의 폐사율을 나타냈으며, 10^7 CFU/kg 실험구에서는 45%의 폐사율을 보여 대조구에 비해 많게는 55% 이상의 높은 생존율을 나타내었다. 사료 내 첨가한 *Bacillus* sp. IS-2의 장내 생존 확인을 위해 실험이 종료된 후 모든 실험구와 대조구 실험어의 장을 분리하여 배양된 균체의 DNA를 분리 한 후에 제작된 Universal primer를 이용한 PCR 결과 일반사료를 투여한 대조구를 제외한 모든 실험구에서 1,465 bp의 PCR product를 확인 할 수 있었다.

상기 결과를 토대로 양식넙치 사료 내 *Bacillus* sp. IS-2의 첨가는 양식넙치의 성장 및 면역증강, *S. iniae*에 대한 병저항성에 좋은 효과를 나타내어 사료첨가제로써의 이용 가능성이 클 것이라 사료된다.

적요

본 연구는 양식 넙치 *Paralichthys olivaceus* 사료 내 생균제 첨가가 넙치의 성장, 면역반응 및 병저항성에 미치는 영향을 평가하였다. 실험사료는 넙치용 배합사료(조단백질 52%, 조지방 11%, 조섬유 3%, 조회분 14%, 인 2.7%, 칼슘 1.5%, Suhyup Co., Korea)에 *Bacillus* sp. IS-2를 첨가하여 10^3 , 10^5 , 10^7 CFU/kg의 실험사료를 제작하였다. 2주간의 예비사육 후, 평균무게 210 ± 13 g인 실험어를 1,000 L 원형수조에 실험구 당 70마리씩 무작위로 배치하여 실험사료를 1일 2회 어체 중의 2%씩 12주 동안 공급하였다. 성장도 조사 결과 모든 실험구에서는 일반사료를 투여한 대조구에 비해 높은 성장률을 나타내었으며 10^5 CFU/kg 실험구에서는 대조구에 비해 약 13% 정도 높은 성장률을 나타내었다. 혈액분석 결과에는 glucose를 제외한 GOT, GPT, 단백질, 총콜레스테롤 등에서 실험구간 유의적인 차이를 나타내지 않아 생균제로 인한 간독성이나 어체 내 문제가 발생하지 않은 것으로 사료된다. Glucose인 경우 실험 종료 시점에서 증가되는 변화를 확인 할 수 있었는데 이는 수온, 수질에 의한 일시적인 현상이라 사료된다. Respiratory burst activity (NBT assay)에 있어서는 실험사료를 공급한 실험구가 대조구에 비해 높은 값을 확인할 수 있었으며 특히 10^5 CFU/kg 실험구와 10^7 CFU/kg 실험구에서 유의적으로 높은 값을 확인하였다. 혈청의 lysozyme 및 백혈구 활성에 있어서도 실험사료를 투여한 실험구에서 대조구에 비해 높은 활성을 확인 하였다. 공격실험 결과, *Streptococcus iniae*를

접종한지 5일째부터 폐사가 시작되어 7일째 일반사료를 투여한 대조구에서는 100% 폐사율을 보인 반면, 10^3 CFU/kg 실험구에서는 73%의 폐사율을 10^5 CFU/kg 실험구에서는 53%의 폐사율을 나타냈으며, 10^7 CFU/kg 실험구에서는 45%의 폐사율을 보여 대조구에 비해 많게는 55% 이상의 높은 생존율을 나타내었다. 사료 내 첨가한 *Bacillus* sp. IS-2의 장내 생존 확인을 위해 실험이 종료 된 후 모든 실험구와 대조구 실험어의 장을 분리하여 배양 된 균체를 DNA를 분리 한 후에 제작 된 detection primer를 이용한 PCR 결과 일반사료를 투여한 대조구를 제외한 모든 실험구에서 1,465 bp의 PCR product를 확인 할 수 있었다.

상기 결과를 토대로 양식업 사료 내 *Bacillus* sp. IS-2의 첨가는 양식업의 성장 및 면역증강, *S. iniae*에 대한 병정항성에 좋은 효과를 나타내어 사료첨가제로써의 이용 가능성이 클 것이라 사료된다.

감사의 말

본 연구는 지식경제부 및 정보통신산업진흥원의 이공계 전문가 기술지원 서포터즈사업의 연구결과로 수행되었으며 이에 깊은 감사를 드립니다(NIPA-2011-C7210-1101-0001).

참고문헌

- Aly, S.M., Ahmed, Y.A., and Mohamed, M.F. 2008. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish Shellfish Immunol.* **25**, 128-136.
- Anderson, D.P., Robertson, B.S., and Dickson, O.W. 1979. Cellular immune response in rainbow trout, *Salmon gairdneri* Richardson to *Yersinia ruckeri* O-antigen monitored by the passive haemolytic plaque assay test. *J. Fish Dis.* **2**, 169-178.
- Anderson, D.P. and Siwicki, A.K. 1994. Duration of protection against *Aeromonas-samonisida* in brook trout immunostimulated with glucan or chitosan by injection or immersion. *Progressive Fish-Culturist* **56**, 258-261.
- Bougon, M., Launay, M., and Le Menec, M. 1988. Influence d'un probiotique, l'Biocroissance, sur les performances des poudeuses. *Bull. Inf. Stn. Exp. Avicult. Ploufragan* **28**, 110-115.
- Chang, C.I. and Liu, W.Y. 2002. An evaluation of two probiotic bacterial strains, *Enterococcus faecium* SF68 and *Bacillus toyoi*, for reducing *Edwardsiella* incultured European eel, *Anguilla anguilla* L. *J. Fish Dis.* **25**, 311-315.
- Chiu, C.H., Cheng, C.H., Gua, W.R., Guu, Y.K., and Cheng, W. 2010. Dietary administration of the probiotic, *Saccharomyces cerevisiae* P13, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides*. *Fish Shellfish Immunol.* **29**, 1053-1059.
- Food and Agriculture Organization. 2011. Statistics at FAO.
- Griffin, B.R. 1983. Opsonic effect of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) antibody on phagocytosis of *Yersinia ruckeri* by trout leukocytes. *Dev. Comp. Immunol.* **7**, 253-259.
- Jolles, P. and Jolles, J. 1984. What is new in lysozyme research always a model system, today as yesterday. *Mol. Biochem.* **63**, 165-189.
- Karunasagar, I., Pai, R., Malathi, G.R., and Karunasagar, I. 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquacult.* **128**, 203-209.
- Kurami, J. and Sahoo, P.K. 2005. Effects of cyclophosphamide on the immune system and disease resistance of Asian catfish *Clarias batrachus*. *Fish Shellfish Immunol.* **19**, 307-316.
- Liu, C.H., Chiu, C.H., Wang, S.W., and Cheng, W. 2012. Dietary administration of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, enhances the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides*. *Fish Shellfish Immunol.* **33**, 699-706.
- Ministry for Food Agriculture Forestry and Fisheries. 2003. Statistical year book of maritime affairs and fisheries.
- Mohanty, S.N., Swain, S.K., and Tripathi, S.D. 1996. Rearing of catla (*Caltilacatla Ham.*) spawn on formulated diets. *J. Aquacult. Tropics* **11**, 253-258.
- National Fisheries Research & Development Institute. 2000. Prevention of bacterial fish diseases and medical treatment for produce health fish.
- Rychen, G. and Nunues, S. 1995. Effects of three microbial probiotics on postprandial concentration differences of glucose, galactose and amino-nitrogen in the young pig. *Br. J. Nutr.* **74**, 19-26.
- Seeley, K.R., Gillespie, P.D., and Weeks, B.A. 1990. A simple technique for the rapid spectrophotometric determination of phagocytosis by fish macrophages. *Mar. Environ. Res.* **30**, 123-128.
- Smith, P., Hiney, M.P., and Samuelson, O.B. 1994. Bacterial resistance to antimicrobial agents used in fish farming: a critical evaluation of method and meaning. *Annu. Rev. Fish Dis.* **4**, 273-313.
- Statistics Korea. 2011. Aquaculture Status Survey.
- Taoka, Y., Maeda, H., Jo, J.Y., Jeon, M.J., Bai, S.C., Lee, W.J., Yuge, K., and Koshio, S. 2006. Growth, stress tolerance and non-specific immune response of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* to probiotics in a closed recirculating system. *Fish. Sci.* **72**, 310-321.
- Tseng, D.Y., Ho, P.L., Huang, S.Y., Cheng, S.C., Shiu, Y.L., Chiu, C.S., and Liu, C.H. 2009. Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20. *Fish Shellfish Immunol.* **26**, 339-344.
- Verschuere L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., and Verstraete, W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 655-656.
- Wardle, C.S. 1972. The changes in blood glucose in *Pleuronectes platessa* following capture from the wild: A stress reaction. *J. Marine Biological.* **52**, 635-651.
- Zhang, Q., Ma, H.M., Mai, K.S., Zhang, W.B., Liufu, Z.G., and Xu, W. 2010. Interaction of dietary *Bacillus subtilis* and fructooligosaccharide on the growth performance, non-specific immunity of sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol.* **29**, 204-211.
- Zokaeifar, H., Balcazar, J.L., Saad, C.R., Kamarudin, M.S., Sijam, K., Arshad, A., and Nejat, N. 2012. Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.* **33**, 683-689.