

Candidate Probiotic Bacteria의 어류병원성 *Streptococcus* sp. 성장에 대한 억제 효과

이민영* · 김은희†

*해양수산부 통상무역협력과, 전남대학교 수산생명의학과

Inhibitory Effects of Candidate Probiotic Bacteria on the Growth of Fish Pathogenic Bacteria, *Streptococcus* sp.

Minyeong Lee* and Eunheui Kim†

*International Commerce and Trade Division, Ministry of Oceans and Fisheries, Sejong si 339-012, Korea
Department of Aqualife Medicine, Chonnam National University, Yeosu 550-749, Korea

For the treatments and protection of bacterial fish disease, many requirements are needed for aquatic probiotics so that they are effective in aquaculture animals but are also harmless to humans. In the present study, among 17 candidate probiotic bacteria (CPB) obtained from the edible part of the shellfish, *Bacillus* sp. CPB-St (CPB-St) were selected and *in vitro* evaluated for the possibility as a probiotic strain for the control of fish streptococcosis which frequently occurs in the olive flounder farms. CPB-St showed inhibitory effects on the growth of various fish pathogenic bacteria, *Streptococcus* sp., *S. parauberis*, *S. iniae*, *Lactococcus garvieae* and *L. piscium* by the double layer test ranging about 18~26 mm of clear zone. Inhibitory activity of CPB-St to *Streptococcus* sp. was observed 6 hours after and the growth of *Streptococcus* sp. was decreased to 8~55 folds in the co-culture of CPB-St with *Streptococcus* sp.. The safety of CPB-St to fish and survival of CPB-St in the intestine were assessed in the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Fish mortality was not observed in artificial infection with CPB-St for 2 weeks. CPB-St was entirely excreted from the stomach and intestine 24 hours after oral injection. This results indicate that CPB-St has potential applications as a probiotic for the control of fish streptococcosis in aquaculture.

Key words: Candidate probiotic bacteria (CPB), *Bacillus* sp., Oyster, *Streptococcus* spp., Antibacterial effect

양식생물의 질병치료를 목적으로 항균제를 지속적으로 사용하는 것은 내성균 출현 및 식품 내 약품 잔류라는 부정적인 측면이 제기될 수 있다 (van der Waaij and Nord, 2000). 한편 어류 백신이

개발되고 상품화 되었지만 광범위한 질병 조절이 불가능하고, 특히 자-치어기에 있어서는 면역적격 여부와 예방 효과가 불투명하다. 뿐만 아니라 주사에 의한 백신 처리는 작은 어류나 많은 수의 어류에 적용하기에는 비실용적인 면들이 있다 (Gram *et al.*, 1999). 그러므로 이러한 문제점들을 보완하면서 질병의 치료 및 예방을 위해 사용할 수 있는

†Corresponding author: Eunheui Kim
Tel: +82-61-659-7171, Fax: +82-61-659-7179
E-mail: ehkim@chonnam.ac.kr

프로바이오틱스 (Probiotics)에 관한 연구가 다방면에서 이루어지고 있다 (Irianto and Austin, 2002; Nwachi, 2013; Tuan *et al.*, 2013). Probiotics는 사람이나 동물에게 건조 세포나 발효 산물의 형태로 투여하여 숙주의 장내세균총을 개선하여 좋은 영향을 주는 단일 혹은 복합 형태의 생균제, 동물용 사료 첨가제로서의 생물체나 물질 그리고 살아있는 미생물 사료 첨가제 등으로 정의되어진다 (Gatesoupe, 1999; Irianto and Austin, 2002). 양식 어류에 있어서도 질병 원인균의 과다 발생을 억제하고 어체의 건강을 유지시키기 위한 probiotics 개발에 관심이 집중되어 많은 연구들이 진행되어 왔다 (Irianto and Austin, 2002; Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008; Nwachi, 2013; Tuan *et al.*, 2013). 양식 어류의 세균성 질병 중 주로 고수온기에 치어에서 성어에 이르기까지 많이 발생하여 큰 피해를 일으키는 연쇄상구균증의 원인균은 *Streptococcus iniae*, *S. parauberis*, *Lactococcus garvieae* 등이 있다 (Austin and Austin, 2012). 이러한 연쇄상구균증을 치료하기 위하여 다양한 노력들이 이루어지고 있으나, 최근 들어 식생활 안전에 대한 소비자들의 선호도가 높아져 양식 생물의 초기 사육 과정부터 건강하고 무해한 상태의 생산 체계가 요구되고 있다. 양식생물의 질병 치료에 있어서도 양식 생물 자체의 건강만을 고려한 연구와 대책보다는 소비 주체인 인간에게 무해한 치료 및 예방 대책이 현실적으로 필요하다.

본 연구에서는 전 세계적으로 날 것으로 많이 소비되고 있는 굴과 기타 패류들의 가식 부위로부터 분리되는 세균들을 이용하여 다양한 어류 병원성 세균에 대하여 증식 억제력을 보이는 candidate probiotic bacteria (CPB)를 1차로 분리하고, 특히 연쇄상구균증을 일으키는 4종의 세균을 target bacteria로 하여 효과적인 증식 억제 능력을 보이는 세균을 선발하여 (이하 CPB-St) *in vitro*와 *in vivo* 조건에서 항균 효과를 알아보았다.

재료 및 방법

CPB의 분리 및 동정

CPB를 분리하기 위하여 사용한 패류는 여수시 가막만, 고흥군 나로도, 남해군 강진만 해역의 양

식장에서 채취한 굴 (*Oyster, Crassostrea gigas*), 바지락 (Short-necked clam, *Ruditapes philippinarum*), 피조개 (Ark shell, *Scapharca broughtonii*), 새조개 (Egg cockle, *Fulvia mutica*)였다. 이들 패류를 각각 10~20 개체씩 가식 부위를 모아 무균적으로 균질화한 후 멸균생리수로 희석하여 일반증균배지 (TSA)에 배양하였다. 각각의 특징적인 colony를 취하여 target bacteria와 double streaking으로 배양하여 성장 억제대가 0.5 mm 이상 형성되었을 때 1차적으로 CPB 균주로 선택하였다. CPB의 target bacteria로서 어류 병어에서 분리한 *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *Listonella anguillarum*, *Streptococcus* sp.와, 균주 센타로부터 분양받은 *S. iniae* (ATCC 3657), *S. parauberis* (ATCC 3651), *L. garviae* (ATCC 3772), *L. piscium* (ATCC 3639), *Vibrio harveyi* (KCTC 2717), *Pseudomonas fluorescens* (IMSNU 10205), *P. putida* (KCTC 1644), *Staphylococcus epidermidis* (KCTC 1917)를 사용하였다. 다양한 병원세균에 항균력을 보이며 특히 *Streptococcus* spp.에 강한 항균력을 지닌 CPB-St를 선발하였으며, 선발된 균주의 형태 및 생화학적인 특성에 근거하여 간이 동정하였다.

CPB-St의 항균범위 확인

CPB-St의 target bacteria에 대한 성장 억제 능력은 double layer test (Sugita *et al.*, 1998)로 확인하였다. CPB-St를 TSB에서 25°C, 24시간 배양하여 농도를 조정된 후 (1.5×10^8 CFU/ml) 1% NaCl이 첨가된 TSA 배지 중앙에 5 μ l씩 접종하여 25°C에서 3일간 배양하였다. Chloroform으로 30분간 처리하여 CPB-St를 사균화시킨 후, 10^7 CFU/ml의 target bacteria를 함유한 0.7% soft agar (Bacto Agar, Difco)를 CPB-St plate에 증충시켜 30°C에서 24시간 배양하면서 나타나는 inhibition zone의 크기를 비교하였다.

CPB-St의 항균제 감수성 시험

CPB-St를 McFarland 0.5 (1.5×10^8 CFU/ml)로 조정하여 0.7% soft agar와 섞어서 TSA 배지에 증충시켰다. 16종의 항균제 disc (ampicillin, BBL, chloramphenicol, clindamycin, doxycycline, erythromycin,

gentamicin, kanamycin, nalidixic acid, norfloxacin, ofloxacin, oxolinic acid, oxytetracycline, rifampin, streptomycin, sulfamethoxazole trimethoprim, tetracycline)를 올리고 25°C에서 18시간 배양 후 저지환의 직경을 측정하여 항균제 내성 유무를 확인하였다.

CPB-St와 *Streptococcus* sp.의 혼합배양에서 나타나는 성장 억제 효과

CPB-St와 *Streptococcus* spp.를 각각 30°C에서 24시간 배양하여 균수를 10^5 CFU/ml로 조정하고 50 ml의 BHI 액체 배지에 단독 또는 혼합으로 0~60시간까지 배양하면서 생균수의 변화를 plate count법으로 조사하였다. Oxolinic acid (OA, Sigma)에 대하여 *Streptococcus* sp.와 CPB-St가 각각 내성과 감수성을 나타내는 특성을 이용하여 40 µg/ml의 OA가 포함된 BHIA를 만들어 CPB-St와 *Streptococcus* sp.가 혼합 배양된 조건의 실험구내에서 두 균의 수적 변화를 조사하였다.

CPB-St의 어류에 대한 인위 감염

평균 전장 18 cm, 전중 42 g의 넙치 각각 10마리에 10^8 CFU/ml의 CPB-St를 0.1 ml 복강 주사 또는 강제 경구 투여 하였으며, 대조구로는 멸균된 NaCl 용액을 동량 투여 하였다. 1일 1회 배설물을 제거한 후 동량의 여과 해수를 보충해 주면서 2주간 사육하였으며, 실험 기간 중 폐사어 및 폐사 직전 어류는 해부하여 세균을 분리 하였고, 종료시점에서 모든 실험어들을 해부하여 균을 분리하였다.

어류 위와 장에서 시간 경과에 따른 CPB-St의 검출

Suction catheter 12FR을 이용해서 10^8 CFU/ml의 CPB-St를 넙치의 위 속으로 주입한 후, 시간 경과별로 위와 장에서의 생존율을 알아보았다. 0, 0.5, 1, 2, 4, 12, 24시간 후에 균을 주입한 넙치를 해부하였고 식도에서 유문수 전까지를 위 (stomach) 부위로 하고, 유문수에서 직장까지를 장 (intestine) 부위로 하였다. 각 부위를 무균적으로 취하여 9 ml 멸균 생리식염수와 섞어 homogenizer로 마쇄한 후 회석하여 TSA 배지에 도말하여 균수를 확인 하였다. Control은 같은 조건의 넙치 중 CPB-St를 접종

하지 않은 것을 사용하였다.

결 과

CPB의 검출률과 특성 분석

패류의 가식부위를 배지에 접종하여 자라난 균들 중 형태적으로 구분되는 세균 및 상호 성장 저지 능력을 보이는 세균 198균주를 분리하였다. 이들 중, 1 종 이상의 target bacteria에 대해 성장 저지대를 0.5 mm 이상 형성하는 균주는 30균주 (약 15%)였으며, double layer test에서 성장 억제 효과를 나타낸 균주는 17균주였다 (Table 1). 패류 종류별로 CPB는 굴에서 118균주 중 11균주, 바지락에서 41균주 중 3균주, 피조개에서 13균주 중 1균주 그리고 새조개에서 26균주 중 2균주로 나타났다. 성장 억제 효과를 가진 17균주는 모두 그람 양성균이었으며, 간균의 형태로 포자를 형성하는 균이 12균주로 대부분을 차지하였다. 그 중, 굴에서 분리되어 *Streptococcus* spp.에 대하여 강한 성장 억제 효과를 보인 CPB-7은 형태학적 및 생화학적 특성을 조사한 결과 *Bacillus* sp.로 동정되었다 (*Bacillus* sp. CPB-St) (Fig. 1 and Table 1).

CPB-St의 항균 범위

어류병원성 세균에 대한 CPB-St의 항균 범위는 Fig. 2와 같다. 그람 음성균인 *A. hydrophila*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *E. tarda*, *L. anguillarum* 그리고

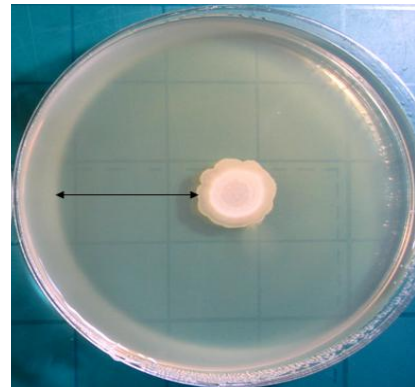


Fig. 1. Growth inhibition zone (about 29 mm) of *Streptococcus* sp. by the *Bacillus* sp. CPB-St after incubation for 5 days in TSA at 20°C.

Table 1. Morphological and biochemical characteristics of the 17 candidate probiotic bacteria (CPB) obtained from the edible part of the shellfish

CPB No.	Origin	Gram stain	Shape	Motility	Endospore	Catalase	Oxidase
1	Short necked clam	+	Bacilli	+	+	+	-
2		+	Bacilli	+	+	+	-
3		+	Bacilli	+	+	+	-
4	Oyster	+	Long-bacilli	-	-	+	-
5	Ark shell	+	Bacilli	+	+	+	-
6	Oyster	+	Bacilli	+	+	+	-
7		+	Bacilli	+	+	+	-
8		+	Bacilli	+	+	+	-
9		+	Bacilli	+	+	+	-
10		+	Bacilli	+	+	+	-
11		+	Long-bacilli	-	-	+	-
12		+	Long-bacilli	-	-	+	-
13		+	Bacilli	+	+	+	-
14		+	Bacilli	+	+	+	-
15	+	Long-bacilli	-	-	+	-	
16	Egg cockle	+	Bacilli	+	+	+	-
17		+	Bacilli	-	-	+	-

Table 2. Biochemical characteristics of the strain, *Bacillus* sp. CPB-St showed inhibitory effects on the growth of various fish pathogenic bacteria

Character	CPB-St
Gram stain	G+
Motility	+
Shape	Rod
Catalase	+
Cytochrome oxidase	-
Oxidative(O) - fermentative(F) metabolism of glucose	non O/F
Acid production in TSI medium	A/A
H ₂ S production	-
Citrate utilization	+
Growth in thioglycollate medium	Facultative anaerobes
Endospores produced	+

*V. harveyi*에 대한 생장 억제대의 크기는 10 mm 이하였으나, 그람양성균인 *L. garviae*와 *S. epidermidis*에 대해서는 18~19 mm로 나타났다. 그 외 그람양성 구균인 *S. iniae*, *L. piscium*, *Streptococcus* sp., 그리고 *S. parauberis*에 대한 증식 억제대는 25

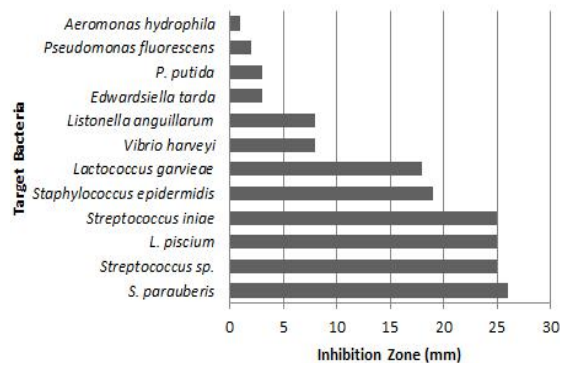


Fig. 2. Growth inhibition zone (mm) of various fish pathogens by *Bacillus* sp. CPB-St incubated for 3 days. The clear zones were measured in double layered plates.

~26 mm로 특히 크게 나타났다.

항균제에 대한 CPB-St의 감수성

16종의 항균제에 대한 감수성을 조사한 결과 clindamycin에만 내성을 나타내었고, oxolinic acid, doxycycline 그리고 ofloxacin에 대해서는 강한 감수성, streptomycin과 chloramphenicol에 대해서는 중등도 감수성을 보였다 (Table 3).

CPB-St와 *Streptococcus* sp.의 동시배양에서 나타나는 성장 억제 효과

액체배지에서 CPB-St와 *Streptococcus* sp.를 단독 또는 혼합 배양 하였을 때, 단일 배양에서 *Streptococcus* sp.는 배양 후 12시간, CPB-St는 배양 후 48시간 전 후에 증식 최고치를 나타냈다. 혼합 배양에서의 성장 특성을 동 시간대 별로 비교하였을 때 *Streptococcus* sp.에서는 6시간째에 성장 억제 작용이 관찰되었으며 12시간 전후로 8~55배 정도의 성장 감소가 나타났다. 반면, CPB-St는 계속 균수가 증가하는 현상을 보였다 (Fig. 3).

CPB-St의 어류에 대한 병원성

CPB-St를 넙치에 인위 감염시킨 결과 (Fig. 4), 복강 주사 실험구에서는 10일 이후 3마리의 폐사가 나타났고, 대조구에서는 7일 이후 5마리가 폐사하였다. 8마리의 폐사어로부터 모두 *Vibrio*의 특성을 지닌 세균이 검출되었다. 그러나 강제 경구 투여구에서는 2주간 모두 폐사가 없었다. 실험이 종료된 후에 모든 실험구의 남아있는 넙치를 해부하여 균을 분리하였으나 CPB-St는 검출되지 않았다.

시간 경과에 따른 CPB-St의 어류 위와 장에서의 생존율

CPB-St를 넙치에 강제 경구 투여한 후, 위와 장

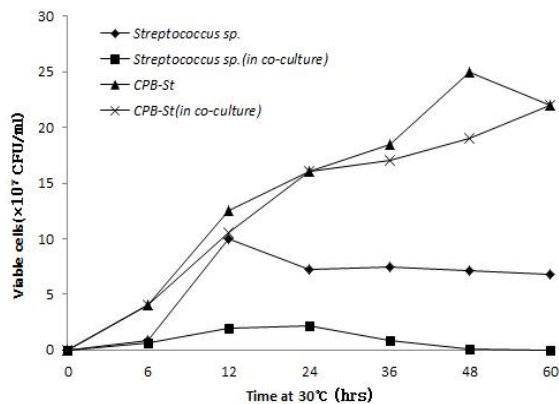


Fig. 3. Viable cell counts of *Streptococcus* sp. and *Bacillus* sp. CPB-St showed in alone or co-culture for 60 hours. Inhibitory activity of *Bacillus* sp. CPB-St to *Streptococcus* sp. was observed 6 hours after in the co-culture of *Bacillus* sp. CPB-St with *Streptococcus* sp.

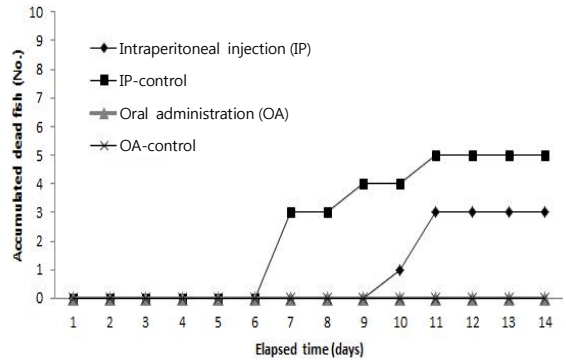


Fig. 4. Accumulated dead fish of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) infected artificially with intraperitoneal injection or oral administration of the *Bacillus* sp. CPB-St.

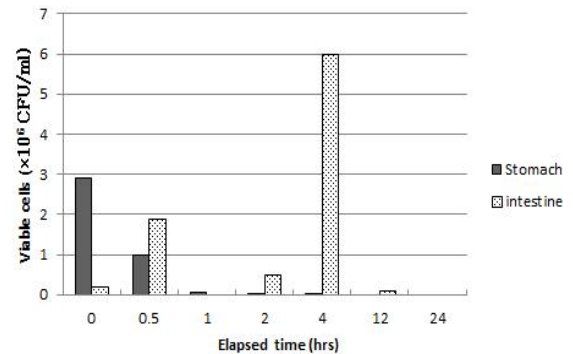


Fig. 5. Viable cells detected in the stomach and intestine of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) after oral injection of *Bacillus* sp. CPB-St.

에서의 생존율을 알아본 결과 위에서는 4시간까지 수가 감소하는 형태를 보였으나 생존이 확인되었고, 장에서는 12시간까지 생존이 확인되었으나 24시간째에서는 관찰되지 않았다 (Fig. 5).

고 찰

식량 자원의 생산 과정에서 생물의 질병을 치료하기 위하여 사용되어 온 항균제는 오래 전부터 항균제 내성균에 의한 질병 발생이나 항균제의 체내 잔류와 같은 문제를 일으킴으로써 소비 주체인 인간에게 식품 안전성에 관한 새로운 과제를 주어왔다. 결국 항균제 사용에 대한 규제와 더불어 적절한 치료 대책들이 필요하게 됨으로써 대상 숙주뿐만 아니라 인간에게도 유익한 probiotic 세균을

이용하는 연구들이 진행되어왔다 (Gomez-Gil *et al.*, 2000; Fernández *et al.*, 2003; Cha *et al.*, 2012). 특히 Yang *et al.* (2003)은 인체에 대한 안전성을 고려하여 발효 식품으로부터 3종의 어류병원세균에 대하여 항균력을 갖는 유산균을 분리하여 probiotic 균주로의 사용 가능성을 제기하였다. Probiotics는 일반적으로 siderophores, antibiotics, bacteriocins, lysozymes 등을 단독 또는 복합적으로 생산하거나 유기산에 의한 pH 변화로 병원균의 성장을 억제하거나, 다른 균과의 영양 경쟁, 소화효소 분비, 수질 개선 및 면역력 증강 등을 통하여 병원균에 대한 숙주의 저항력을 높이는 것으로서 효과를 발휘하는 것으로 알려져 있다 (Balcázar *et al.*, 2006; Crab *et al.*, 2012; Tuan *et al.*, 2013). 사육 생물의 질병예방 및 생산량 증대를 위하여 probiotics를 이용하고자 하는 경향에 맞추어, 어류 양식 현장에서 양식 어류의 장이나 해수로부터 유용세균을 분리하여 수산용 probiotics를 개발하려는 연구가 진행되어 왔다 (Ringø and Gatesoupe, 1998; Verschueren *et al.*, 2000; Irianto and Austin, 2002). 본 연구에서는 수산생물과 소비 주체인 인간에게 유해하지 않은 probiotics 개발을 목표로 인간이 낳 것으로 섭취하는 시기의 패류로부터 유용세균을 분리하고자 하였다.

분리된 총 균주의 약 9%에 해당하는 세균이 (17 균주) 1종 이상의 어류병원세균에 대하여 성장 억제 효과를 보였으며, 특히 *Streptococcus spp.*에 대하여 강한 성장 억제 효과를 보인 균주 (CPB-St)에 대하여 probiotic으로서의 개발 가능성을 알아보았다. CPB-St와 *Streptococcus sp.*의 혼합 배양에서 6시간 이후 *Streptococcus sp.*의 성장 억제가 나타난 것으로 보아 (Fig. 3) 어류의 장 내에서 CPB-St에 의한 *Streptococcus spp.*의 control이 가능할 것으로 판단되었다. 그러나 *Streptococcus sp.*는 혼합배양 6시간째부터 CPB-St에 의하여 생장이 억제되긴 하였으나 미약하나마 24시간까지 증가를 보였는데 이는 CPB-St가 일정 농도 이상이 되어야만 *Streptococcus sp.*의 성장을 완전히 억제할 수 있음을 시사한다. 그러므로 CPB-St를 현장에 적용하여 원하는 시간에 병원체의 완전한 성장 억제효과를 보기 위해서는 적정 투여 농도에 대한 연구가 필요

Table 3. Antibiotic susceptibility of the *Bacillus sp.* CPB-St

Antibiotics	Disc Potency	Diameter(mm) of clear zone	Condition
Ampicillin	10 µg	29	Sensitive(S)
Chloramphenicol	30 µg	23	S
Clindamycin	2 µg	14	Resistance
Doxycycline	30 µg	30	S
Erythromycin	15 µg	25	S
Gentamicin	10 µg	21	S
Kanamycin	30 µg	22	S
Nalidixic Acid	30 µg	20	S
Norfloxacin	10 µg	20	S
Ofloxacin	5 µg	24	S
Oxolinic Acid	2 µg	23	S
Oxytetracycline	30 µg	25	S
Rifampin	5 µg	24	S
Streptomycin	25 µg	15	S
Sulfamethoxazole	23.75 µg	35	S
Trimethoprim	1.25 µg		
Tetracycline	30 µg	25	S

하다.

Probiotic 세균의 항균제 감수성 조사는 항균제가 사용되고 있는 대상 생물들에 사용할 probiotic 균을 선택할 때 참고 자료가 된다. 따라서 CPB-St의 항균제 감수성을 알아본 결과 (Table 3), 대부분의 항균제에 대하여 강한 감수성을 나타냄으로써 항균제와의 동시 사용은 부적합하다고 볼 수 있다.

복강 및 소화관 내에 CPB-St를 주입하여 숙주에 대한 병원성 유무를 알아본 시험에서 넙치의 폐사를 유발하지 않았으므로 (Fig. 4) CPB-St는 숙주인 넙치에게 사용하였을 때 안전성이 있다고 판단되었다. CPB-St를 최종적으로 숙주에게 사용하기 위해서는 먹이를 통한 경구투여가 이루어져야 하므로 CPB-St를 강제 경구 투여하여 위와 장에서 검출을 시도한 결과, 위에서는 4시간 전후에 장으로 이동하거나 일부는 위액에 의해 사멸된 것으로 보였고, 장에서는 12시간까지 생존 하였지만, 24시간 이후에는 모두 배출되는 것으로 나타났으므로 CPB-St의 투여 간격은 1일 1~2회가 적합할 것으로 추정된다. Cha *et al.* (2012)은 probiotic으로 *Bacillus sp.*를 첨가한 사료를 공급하였을 때 넙치

치어의 성장이 향상되었고 질병저항성이 증가되었다고 보고하였다. 그러므로 본 연구에서 분리된 *Bacillus* sp. CPB-St 도 probiotic bacteria로 이용하기 위해서는 추후 어류의 장내 정착 가능성, 사료와 함께 급이 후의 효과 검증이 필요하며 이를 바탕으로 연쇄상구균증이 주로 발생하는 시기에 예방을 위해 적절하게 이용되어질 수 있을 것으로 판단된다.

요 약

세균성 어류질병의 치료 및 예방을 위하여 어류와 인체에 안전한 수산용 probiotic의 개발이 요구되고 있다. 본 연구에서는 남해안 일대에서 양식되고 있는 참굴 (*Crassostrea gigas*), 바지락 (*Ruditapes philippinarum*), 피조개 (*Scapharca broughtonii*), 새조개 (*Fulvia mutica*)의 가식 부위로부터 17균주의 candidate probiotic bacteria (CPB)를 분리하였다. 나아가 다양한 연쇄상구균 (*Lactococcus garvieae*, *L. piscium*, *Streptococcus* sp., *S. iniae*, and *S. parauberis*)에 대하여 강한 성장 억제력을 보이는 균주 (CPB-St)를 선별하여 어류의 연쇄구균증 관리를 위한 probiotic 균주로서의 개발 가능성을 알아보았다. CPB-St 균주를 double layer test를 통하여 다양한 연쇄상구균들에 대한 성장 억제 정도를 알아보았으며, 혼합 배양에서의 *Streptococcus* sp.에 대한 성장 억제 능력을 확인하였고, CPB-St의 어류에 대한 안전성 및 장내 생존 유무를 평가하였다. CPB-St는 대부분의 연쇄상구균에 대하여 18~26 mm의 성장 억제대를 형성함으로써 높은 성장 억제 능력을 보였다. CPB-St와의 혼합 배양에서 *Streptococcus* sp.는 6시간째부터 성장 억제 현상이 관찰되기 시작하여 12시간 전후로 8~55배 정도의 감소를 나타내었다. CPB-St의 어류에 대한 병원성 유무를 알아본 결과, 2주일 동안 CPB-St로 인한 어류 폐사는 관찰되지 않았다. CPB-St의 1회 강제 경구 투여 후, 위와 장에서 CPB-St의 생존을 확인한 결과 투여 24시간 후에는 CPB-St가 모두 배출되는 것으로 나타났다. CPB-St를 probiotic bacteria로 개발하기 위해서는 어류의 장내 정착 가능성과 먹이를 통한 효과의 정확한 검증이 추후 이루어져야 할 것이다.

References

- Austin, B. and Austin, D.A.: Bacterial fish pathogens, pp17-57, 5th ed., Springer Dordrecht Heiderberg, London UK, 2012.
- Balcázar, J.L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D. and Múzquiz, J.L.: The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, 114: 173-186, 2006.
- Cha, J.H., Yang, S.Y., Woo, S.H., Song, J.W., Oh, D.H. and Lee, K.J.: Effects of dietary supplementation with *Bacillus* sp. on growth performance, feed utilization, innate immunity and disease resistance against *Streptococcus iniae* in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Kor J Fish Aquat Sci*, 45: 35-42, 2012.
- Crab, R., Defoirdt, T., Bossier, P. and Verstraete, W.: Biofloc technology in aquaculture: Beneficial effects and future challenges. *Aquaculture*, 356-357: 351-356, 2012.
- Fernández, M.F., Boris, S. and Barbès, C.: Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, 94: 449-455, 2003.
- Gatesoupe, F.J.: The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 180: 147-165, 1999.
- Gomez-Gil, B., Roque, A. and Turnbull, J.F.: The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture*, 191: 259-270, 2000.
- Gram, L., Melchiorsen, J., Spanggaard, B., Huber, I. and Nielsen, T.F.: Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 969-973, 1999.
- Irianto, A. and Austin, B.: Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 25: 333- 342, 2002.
- Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M.J., Gibson, L.: Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, 274: 1-14, 2008.
- Nwachì, O.F.: An overview of the importance of probiotics in aquaculture. *J. fish. Aquat. Sci.*, 8: 30-32, 2013.
- Ringø, E. and Gatesoupe, F.: Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture*, 160: 177-203, 1998.

- Sugita, H., Hirose, Y., Matsuo, N. and Deguchi, Y.: Production of the antibacterial substance by *Bacillus* sp. strain NM 12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish. *Aquaculture*, 165: 269-280, 1998.
- Tuan, T.N., Duc, P.M. and Hatai, K.: Overview of the use of probiotics in aquaculture. *International Journal of Research in Fisheries and Aquaculture*, 3: 89-97, 2013.
- van der Waaij, D. and Nord, C.E.: Development and persistence of multi-resistance to antibiotics in bacteria: an analysis and a new approach to this urgent problem. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 16: 191-197, 2000.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P. and Verstraete, W.: Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and molecular biology reviews*, 64: 655-671, 2000.
- Yang, B.G., Jun, Y.J. and Heo, M.S.: Screening and characterization of probiotic strains for prevention of bacterial fish disease. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.*, 31: 129-134, 2003.

Manuscript Received : July 30, 2014

Revised : August 05, 2014

Accepted : August 20, 2014