

< Original Article >

Propolis의 어류 병원성 세균에 대한 *in vitro* 항균 효과

허강준¹ · 원태경¹ · 신기욱^{2*}

충북대학교 수의과대학¹, 전북대학교 수의과대학 생체안전연구소²

In vitro antimicrobial activity of Korean propolis against fish pathogenic bacteria

Gang-Joon Heo¹, Tae-Gyeong Won¹, Gee-Wook Shin^{2*}

¹College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea
²Bio-Safety Research Institute and College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

(Received 12 February 2015; revised 6 March 2015; accepted 20 March 2015)

Abstract

The present study was to investigate *in vitro* antimicrobial effects of propolis against six different fish bacterial pathogens, *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *Vibrio vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *A. salmonicida* subsp. *masoucida*, *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*) using minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bacteriocidal concentration (MBC) tests. In the results, propolis exhibited antimicrobial activity against all bacteria used in the present study, but there was no marked difference in bacterial species except *Vibrio* species. Collectively, propolis was thought to be an usefulness antimicrobial substance for controlling bacterial diseases in the fish industry.

Key words : Propolis, Antimicrobial activity, Fish pathogenic bacteria

서 론

최근, 국내 양식 산업에서도 세균성 질병의 상시적 발생으로 인한 항균제의 남용으로 인하여 많은 내성 균주의 출현이 발생하고 있다. 그러나 어류의 세균성 질병 치료에 사용되는 항균제는 그 수가 제한되어 있어 양식 업자에게 경제적으로 많은 피해를 주고 있는 실정인데(박 등, 2007), 식품의 안전하고 위생적인 보존을 위하여 천연물질에서 항균성 물질을 탐색하여 이를 합성보존료에 대체할 수 있는 천연보존료나 병원성 미생물 살균제로 개발하기 위한 연구가 활발히 진행되어 왔다(Johnson 등, 1969; 정 등, 2001).

현재 어류의 질병 치료를 위하여 세균의 단백질 생합성을 방해하는 테트라사이클린계(Tetracyclines), DNA

가 형성되는 것을 억제하는 퀴놀론계(Quinolones) 및 세포벽의 기본 구성물질인 peptidoglycan 형성의 마지막 단계에 관여하는 효소인 transpeptidase의 작용을 억제함으로써 세포벽의 합성의 최종단계를 봉쇄하고, 세포내 막의 penicillin-binding protein (PBP)과 결합하여 PBP의 작용을 억제하는 것으로 알려진 페니실린계(Penicillins) 등의 항생제가 사용되고 있다. 이들 항생제가 어류나 최종 소비자인 사람의 체내에 장기간 축적될 경우 항생제 내성은 물론 균교대증이나 allergy 유발 등의 안전성에 문제가 될 수 있다. 또한, 우리나라 국민들의 생활수준 향상으로 인한 국민소득의 증대와 건강에 관한 관심이 높아짐에 따라, 영양, 맛 및 안전성의 순으로 중요시되던 종래의 식품의 개념이 (안전성 우선으로 바뀌게 되어) 항생제를 사용한 양식 어류에 대한 불신이 높아지고 있는 문제점이 있다(Choi 등, 2005).

*Corresponding author: Gee-Wook Shin, Tel. +82-63-270-3903, Fax. +82-63-270-3778, E-mail. shingw@chonbuk.ac.kr

따라서 수산용 의약품과 비슷한 항균 활성 효능을 가지는 천연물질을 탐색하여 양식 어류의 감염증 치료 및 예방에 이용하려는 연구가 많이 시도되고 있으며(윤과 배, 1998; Han과 Shin, 1994; Park 등, 1992; Choi 등, 2005), 이와 같은 항균물질의 개발은 값비싼 수산용 의약품을 대용할 천연 약제의 개발이라는 차원에서 그 의의가 크다고 하겠다(정 등, 2001).

양식어류 사육에 있어서 상재 발생하는 세균성 질병의 치료와 예방을 위해 항생제의 무분별한 오남용이 날로 심각해짐에 따라, 내성균의 출현 문제가 우리나라는 물론 외국에서도 매우 높은 빈도로 보고되고 있다(Aoki 등, 1973; 이 등, 2003; 김 등, 2010; Blackburn 등, 2010). 양식어류에서 질병을 일으키는 병원성 세균 중 내성을 나타내는 세균으로 *Aeromonas hydrophila* (Aoki 등, 1971b), *A. salmonicida* (Aoki 등, 1971a), *Vibrio* spp. (Aoki 등, 1973), *Edwardsiella tarda* (Aoki와 Egusa, 1977) 등 대부분의 그람음성균과 그람양성균인 *Streptococcus* spp. 등이 포함되어 있다(Aoki 등, 1990).

또한 양식장에서 과다하게 사용된 항생물질은 인근 하천에 오염되어 야생어류에까지 영향을 미치게 되고(Blackburn 등, 2010), 먹이사슬의 최종소비자인 사람에게도 영향을 미치는 등 안전성이 크게 문제가 되고 있다(장, 2000; Lee와 Lee, 2001). 이러한 항생제의 부작용 문제를 해결하기 위해 항균효과를 가지는 천연물로부터 항균성 물질을 추출하여 어류의 세균성 질병에 이용하려는 연구가 최근 활발하게 진행되고 있다(Kim 등, 1994; Mok 등, 2001; Jo 등, 2002; 김 등, 2011; 한 등, 2011; 허 등, 2013).

한편 프로폴리스는 꿀벌이 식물의 꽃이나 잎, 수목의 성장점을 보호하기 위하여 분비되는 물질과 나뭇가지의 껍질 등이 벗겨져 상처 난 곳을 오염으로부터 예방하고 미생물로부터의 오염을 막기 위하여 분비하는 보호물질을 모아들이는 것이다(박 등, 1995; Krell, 1996).

프로폴리스의 뜻은 그리스어인 pro (before)와 polis (city)의 합성어이며 꿀벌들이 벌집 입구에 프로폴리스를 이용하여 벽을 쌓는다는 의미에서 유래되었다(Bankova 등, 2000). 꿀벌이 식물에서 분비되는 물질을 수집하고 이것을 꿀벌 타액의 효소와 혼합하여 육아봉의 큰 턱샘에서 만들어 낸 프로폴리스는 박테리아와 균류에 약효가 있는 천연항생물질이다. 꿀벌은 이것을 봉군보호를 위하여 벌동내부의 오염되기 쉬운 곳에 바르고 오염균류나 바이러스 및 외적을 방어

하는데 활용한다. 특히, 여왕벌이 산란하기 전에 일벌이 미리 벌방에 프로폴리스를 얹게 발라서 알과 유충을 미생물로부터 안전하게 보호하며, 프로폴리스의 이와 같은 특성은 꿀벌이 채취한 식물체의 분비물 및 꿀벌의 타액에 미생물을 방어하는 물질이 있기 때문이다(박 등, 1995).

프로폴리스의 항균활성은 Serra Bonvehi 등(1997)이 15가지의 다른 수종에서 얻은 프로폴리스의 분석과 활성물질 및 식이에 대한 연구를 수행함으로써, 그 성분 중 Acacetin과 Apigenin이 대부분을 차지하고 Pinocembrin, Quercetin, Rutin, Vanillin 등이 적은 양으로 존재하며, *Bacillus subtilis*과 *Staphylococcus aureus*에 대하여 Tetracycline보다 53배, *Escherichia coli*에 대하여는 400배 정도로 높은 항균효과가 있음을 보고하였다.

따라서 본 실험에서는 항균효능이 있다고 알려진 벌꿀의 프로폴리스를 대상으로 하여 주요 어병 세균에 대한 항균력을 측정함으로써 프로폴리스를 이용한 수산용 천연약제의 개발을 위한 자료를 얻고자 하였다.

재료 및 방법

공시균주

공시균주로는 *A. hydrophila* (ATCC 7966), *V. vulnificus* (ATCC 33148), *V. parahaemolyticus* (ATCC 33844), *A. salmonicida* subsp. *masousida* (ATCC 27013), *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* (ATCC 33658), 그리고 Pirarucu에서 분리된 *E. tarda* (Korea, 2009)의 그람음성균의 총 6균주로 서울대학교 수의과대학 수생동물 질병학 연구실로부터 분양받아 실험에 사용하였다.

디스크 확산법에 의한 항균력 판정

Tryptic soy agar (Difco, USA) 평판배지에서 20°C로 24시간 배양한 신선한 colony를 0.85% 멸균생리식염수에 MacFarland 0.5의 탁도로 현탁시켜, 약 1~5x10⁶ CFU/mL의 균 현탁액을 만들었다. 이 시험균 현탁액 100 µL를 Muller-Hinton agar (Difco, USA) 배지에 분주하고, 멸균된 면봉으로 잘 도말하여 준비하였다. 멸균된 paper disk (ø10 mm, Advantec Toyo, Japan)에 propolis (80%) (Sigma Chem co, USA)를 10, 20, 30

mg씩 흡습시켜 충분히 건조시킨 후에, 각각의 disk를 시험균 현탁액이 도말된 Muller-Hinton agar 배지에 밀착시켜 올려놓은 후, 20°C에서 48시간 배양한 후에 disk 주변에 생긴 저지대의 직경을 측정하여 항균력 유무를 판정하였다.

또한 시판되고 있는 항생제 disk를 사용하여 공시 약제와의 항균력을 비교하였다. 항생제는 계열별로 한가지씩 선택하여 사용하였는데 β -lactam계로는 amoxicillin (30 μ g/disc), tetracycline계로는 tetracycline (30 μ g/disc), macrolide계로는 erythromycin (15 μ g/disc), sulfa계로는 trimethoprim-sulfamethoxazole (1.25 ~ 23.75 μ g/disc), ansamycin계로는 lincomycin (15 μ g/disc), quinolone계로는 nalidixic acid (30 μ g/disc), 그리고 phenicol계로는 chloramphenicol (30 μ g/disc)의 총 7 종류를 사용하여 propolis와 동일한 방법으로 어병 세균에 대한 항균력을 측정하였다. 항생제 disk 가운데 trimethoprim-sulfamethoxazole은 Biolab (Hungary)에서 구입하였으며 나머지는 모두 Liofilcam (Italy)에서 구입하였다.

최소억제농도와 최소살균농도에 의한 propolis의 항균력 측정

각 실험 균주에 대한 propolis의 최소억제농도(minimum inhibitory concentration)는 broth micro dilution 방법을 사용하여 측정하였다(Hisae 등, 1993; Lorian, 1986). 모든 균주는 tryptic soy agar 배지에 20°C에서 24시간 배양한 후, MacFarland 0.5 ($1 \sim 5 \times 10^6$ CFU/mL)로 탁도를 조절하여 균 현탁액을 준비하였다. Propolis를 Muller-Hinton broth에 5 ~ 2560 μ g/mL까지 단계별로 희석한 후, 균 현탁액을 각각 접종하고 48시간

배양한 후 최소억제농도를 측정하였다.

최소살균농도(minimum bacteriocidal concentration)는 균이 증식하지 않은 최소억제농도 이상의 배양액을 한천배지에 도말하여 균주를 접종시킨 후 배양하여 측정하였다. 최소살균농도는 최초의 접종균수의 99.9%를 사멸하는 최대희석배수의 농도로 정하였다.

결 과

디스크 확산법을 이용한 항균 효과

멸균된 paper disk에 propolis를 흡습시켜 균 현탁액이 도말된 Muller-Hinton agar 배지에 올려놓은 후, 20°C에서 48시간 배양한 후에 disk 주변에 생긴 저지대의 직경을 측정한 결과, propolis는 모든 시험균주에 대해 저용량(10 mg)에서 고용량(30 mg)으로 갈수록, 즉 용량에 비례하여 발육억제대가 넓게 나타났고 고용량(30 mg)의 경우 대조군으로 사용한 항생제와 유사한 유의할 만한 항균력을 나타내었다(Table 1).

Propolis와의 항균력을 비교하기 위하여 실시한 시판용 항생제의 경우, trimethoprim-sulfamethoxazole, nalidixic acid, tetracycline 및 chloramphenicol은 모든 시험균주에 대해 저지대를 나타내었고, amoxicillin과 lincomycin은 저지대가 나타나지 않거나 저지대가 좁게 나타났었다(Table 1). 같은 항생제에 대한 저지대는 균의 genus에 따라 비슷하게 관찰되었다.

Table 1. The result of antimicrobial sensitivity test by antibiotics and propolis

Strains	Diameter of inhibition zone (mm)							Propolis (mg)		
	AML ¹⁾	TE ²⁾	E ³⁾	SXT ⁴⁾	MY ⁵⁾	NA ⁶⁾	C ⁷⁾	10	20	30
	<i>A. hydrophila</i>	NA*	35	16	39	NA	38	45	13	21
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i>	10	40	31	38	13	41	50	13	22	29
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	8	38	25	41	NA	40	46	6	10	16
<i>V. vulnificus</i>	NA	35	29	42	NA	40	52	19	28	34
<i>V. paraheamolyticus</i>	30	35	25	39	16	38	52	22	30	41
<i>E. tarda</i>	7	35	15	37	10	39	45	11	16	25

*, no antibacterial activity.

¹⁾ML, amoxicillin; ²⁾TE, tetracycline; ³⁾E, erythromycin; ⁴⁾SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole; ⁵⁾MY, lincomycin; ⁶⁾NA, nalidixic acid; ⁷⁾C, chloramphenicol.

Table 2. The minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) of propolis against microorganisms

Strains	MIC	MBC
	Propolis (ppm)	Propolis (ppm)
<i>A. hydrophila</i>	2048	8192
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i>	4096	8192
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	2048	4096
<i>V. vulnificus</i>	1024	2048
<i>V. paraheamolyticus</i>	512	2048
<i>E. tarda</i>	2048	4096

최소억제농도와 최소살균농도에 의한 propolis의 항균 효과

Propolis를 증류수에 5~2560 µg/mL까지 단계별로 희석하여 *A. hydrophila* 외 5종의 어류 질병 세균에 대해 최소억제농도와 최소살균농도 값을 측정하였다. 그 결과, 모든 균주에서 최소억제농도가 512~2048 ppm로 어느 정도 유의성 있는 억제 정도를 나타내었는데, 그 중 *V. paraheamolyticus*는 512 ppm으로 모든 시험균 중 가장 낮은 최소억제농도 값, 즉 가장 강한 억제정도를 나타내었고 *V. vulnificus*의 경우 최소억제농도는 1024 ppm으로 두 번째로 강한 억제정도를 나타내었다(Table 2).

최소살균농도의 경우 최소억제농도와 동일하거나 2~4배 정도의 범위에서 관찰되었다(Table 2). *Aeromonas*속 균주의 경우 최소살균농도는 최소억제농도의 2~4배 농도인 2048 ppm과 4096 ppm에서 관찰되었고 *vibrio*속 균주는 1024~2048 ppm 사이에서 관찰되었으며, *vibrio*속 균주 중 *V. paraheamolyticus*는 최소살균농도가 1024 ppm으로 *V. vulnificus*보다 더 낮은 농도에서 균의 사멸 효과를 나타내었다. *E. tarda*의 경우 최소억제농도의 2배 농도인 4096 ppm에서 최소살균농도가 관찰되었다.

고 찰

최근 들어 항생제 내성 정도가 높아 미래에는 MRSA, VRSA와 같은 슈퍼박테리아의 생성으로 인한 감염에 대한 치료가 불가능한 상황에 놓일 것이라고 알려진 것 처럼 항생제 내성 문제는 전세계에 걸쳐 큰 문제가 되고 있다. 현재 양식 어류의 세균성 질병

의 치료에 있어서 항생제가 널리 사용되고 있는데, 오남용되었을 경우 내성균을 유발시킬 뿐만 아니라, 양식 어류의 체내에 잔류하여 최종 소비자인 사람의 건강에도 영향을 미칠 수 있다.

이러한 항생제의 부작용을 해결하기 위해 항생제 대체물질로 항균활성을 갖는 여러 가지 천연식물 성분이 사용되어오고 있는데(Johnson 등, 1969; Kim 등, 1994; 윤과 배, 1998; Lee 등, 2001; Mok 등, 2001; Jo 등, 2002; 정 등, 2001; 김 등, 2011; 허 등, 2013), 그 중에서 프로폴리스는 여러 가지 수목 및 꽃에서 꿀벌이 모아오는 물질이다. 프로폴리스의 주요 화학성분은 플라보노이드 화합물로 알려져 있다(Serra Bonvehi 등, 1997; 김, 2007).

본 실험에서 flavonoid 류의 성분 중 하나인 propolis를 디스크에 10 mg, 20 mg, 30 mg의 용량으로 흡습시켜 *A. hydrophila* 외 5종의 어류 질병 세균에 대한 항균 효과를 살펴보았을 때, 저용량(10 mg)에서는 거의 항균력을 나타내지 않았으나 용량을 높일수록 그에 비례하여 유의할 만한 항균력을 나타내었다. 특히 고용량(30 mg)에서는 대조물질인 항생제와 비슷한 정도의 매우 효과적인 항균력을 나타내었다. 그러나 시판용 항생제의 항균 효과 시험에서 *A. hydrophila* 외 5종의 어류 질병 세균은 amoxicillin과 lincomycin에 비교적 높은 내성을 나타내었다. 최소억제농도 측정시험의 경우 *V. vulnificus*와 *V. paraheamolyticus*가 다른 균주들에 비해 큰 감수성을 나타내었다. *V. vulnificus*와 *E. tarda*를 제외한 균의 경우도 최소억제농도가 640 ppm으로 유의할 만한 억제정도를 나타내었다. 최소살균농도 측정시험에서는 모든 균에서 대체적으로 비슷한 정도의 결과치를 나타내었는데 그 중 *Vibrio*속 균주가 *Aeromonas*속 균주와 *Edwardsiella*속 균주에 비해 비교적 높은 감수성을 나타내었다.

이상의 결과를 요약하면, flavonoid류의 성분 중 하나인 propolis는 *A. hydrophila* 외 6종의 어류 질병 세균에 대해 고용량(30 mg)에서 시중에 시판되는 항생제가 지닌 정도의 항균력을 나타냄을 알 수 있었고 최소억제농도, 최소살균농도 측정시험을 통해 세균의 종류에 따라 약간의 차이는 있지만 유의할 만한 항균력을 나타냄을 알 수 있었다.

이러한 결과는 수산용 의약품으로서 propolis의 활용가능성을 시사한다고 사료되고 안전성 측면에서의 연구와 더 많은 어류 질병 세균에 대한 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다. 또한 항생제 내성의 문

제점을 보완할 수산용 의약품으로서 천연 항균물질의 연구가 더 시행되어야 할 것으로 보인다.

결 론

본 실험에서 *A. hydrophila* 외 5종의 모든 어류 시험 균주에 대해 디스크확산법과 최소억제농도 및 최소살균농도 측정시험을 통해 꿀벌의 성분인 propolis의 주요 어류 질병 세균들에 대한 항균 효과를 알아본 결과, 고용량(30 mg)의 propolis를 이용한 디스크 시험에서 시판되는 항생제와 비슷한 정도의 항균력을 나타내었고, 저용량에서 고용량으로 갈수록 용량에 비례하여 항균력이 증가하는 경향을 나타내었다. 최소억제농도 및 최소살균농도 측정시험에서는 균마다 약간의 차이는 있지만 유의성 있는 억제정도를 나타내었다. 최소억제농도의 경우 가장 감수성이 크게 나타난 *V. parahaemolyticus* (512 ppm)와 두 번째로 감수성이 크게 나타난 *V. vulnificus* (1024 ppm)을 제외한 균들에서는 *A. hydrophila*, *A. salmonicida* subsp. *masoucida*, *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* 균주들은 2048~4096 ppm으로 약간 유의성 있는 억제정도를 나타내었고, *E. tarda* 균주는 2048 ppm으로 역시 약간의 유의성이 있는 억제정도를 나타냈다. Propolis를 4096 ppm 이상의 농도로 투여하였을 때 모든 균에서 완전한 억제 효과를 나타내었고, 8192 ppm 이상의 농도로 투여하였을 때 모든 균에 대해서 살균효과를 보였다.

감사의 글

이 논문은 2012년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

REFERENCES

- 김명석, 서정수, 박명애, 조지영, 황지연, 권문경, 정승희. 2010. 양식 넙치, *Paralichthys olivaceus*에서 분리된 *Edwardsiella tarda*, *Vibrio* spp., *Streptococcus* spp.의 항균제 내성 경향. *한국어병학회지* 23(1): 37-45.
- 김아라, 김도균, 변태환, 조은지, 이은우, 권현주, 김병우, 김태훈, 이경분, 김영만. 2011. 어병세균 *Edwardsiella tarda*에 대한 한약재 추출물의 항균활성. *한국식품저장유통학회지* 18(1): 87-90.
- 김병문. 2007. 프로폴리스 농도가 항균활성에 미치는 영향, 학위논문(석사), 강원대학교 화학공학과.
- 박호용, 오현우, 박두상, 장영덕. 1995. 한국산 봉오 추출물의 항생활성. *한국양봉학회지* 10(1): 53-56.
- 윤효인, 배순이. 1998. 양과외피 추출물의 어류 질병 세균에 대한 항균성 검색. *충남대학교 수의과대학 동물의과학 연구지* 6(1): 25-29.
- 이재인, 한기영, 박홍현. 2003. 수산물에서 분리한 대장균의 분리특성 및 항생제 감수성. *한국식품영양학회지* 16(2): 111-115.
- 정승희, 손영찬, 김이청. 2001. 식물성 생 약재 열추출물이 어병 원인세균에 대한 항균활성 및 넙치식세포의 활성산소생성에 미치는 *in vitro* 효과. *한국어병학회지* 14(1): 3-10.
- 장동석. 2000. 수산식품위생학. 정명당, 부산: 157-159.
- 한상미, 이광길, 박관규. 2011. 국내산 봉독의 어류병원성 세균에 대한 항균활성. *한국어병학회지* 24(2): 113-120.
- 허강준, 강진휘, 신기욱. 2013. 원저: 어류의 병원성 세균에 대한 curcumin의 항균효과. *한국가축위생학회지* 36(4): 297-301.
- Aoki T, Egusa S, Kimura T, Watanabe T. 1971a. Detection of R factors in naturally occurring *A. salmonicida* strains. *J Microbiol* 22: 716-717.
- Aoki T, Egusa S, Ogata Y, Watanabe T. 1971b. Detection of resistance factors in fish pathogen *A. linuefaciens*. *J Microbiol* 65: 343-349.
- Aoki T, Egusa S, Watanabe T. 1973. Detection of R+ bacteria in cultured marine fish, yellow tails. *J Microbiol Immunol* 21: 77-83.
- Aoki T, Takami K, Kitao T. 1990. Spread of drug resistant strains of *Streptococcus* sp. in yellow tail farms. The 2nd Asian Fisheries Forum. manila: 697-699.
- Bankova VS, de Castro SL, Marcucci MC. 2000. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 31(1): 3-16.
- Beuchat LR. 1976. Sensitive of *Vibrio parahaemolyticus* to spices and organic acids. *J. Food Science*. 41(4): 899-902
- Blackburn KJ, Mitchell AM, Blackburn HM, Curtis A, Thompson AB. 2010. Evidence of antibiotic resistance in free swimming, top-level marine predatory fishes. *J Zoo and Wildlife Med* 41(1): 7-16.
- Choi HS, Kim JS, Jang DS, Yu YB, Kim YC, Lee JS. 2005. Antibacterial activities of Galla Rhois extracts against Fish pathogenic bacteria. *Journal of fish pathology* 18(3): 239-245.
- Han JS, Shin DH. 1994. Antimicrobial effect of each solvent fraction of *Morus alba* Linne, *Sophora flavescens* alton on *Listeria monocytogenes*. *Korean J Food Sci Technol* 26: 539-544.
- Hisae M, Isao K. 1993. Bactericidal activity of anacardic acid against *Streptococcus mutans* and their potentiation. *J Agric Food Chem* 41: 1780.
- Johnson MG, Vaughn RH. 1969. Death of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* in the presence of freshly recon-

- stituted dehydrated garlic and onion. Appl. Microbiol. 17(6): 903M.
- Kim YG, Rho BJ, Lee KK. 1994. Antimicrobial activity of *Artemisia princeps* var. *orientalis* essential oil against fish pathogenic bacteria. J Fish Pathol 7: 113-117.
- Kim YG, Rho BJ, Lee KK. 1994. The dietary supplementing effects of Kugija, Lycium chinense, on immune responses of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, to *Edwardsiella tarda*. J. Fish Pathology 12: 73-81.
- Krell R. 1996. "Value-added products from beekeeping", Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome.
- Lee KK, Lee JY. 2001. Effect of plant extracted essential oil on antimicrobial activity for fish pathogens. J Aquac 14(2): 81-87.
- Lorian MD. 1986. Antibiotics in Laboratory medicine. 2 ed. Willams and Wilkins. Baltimore MD: 89-94.
- Mi-Ra Jo, Jin Woo Kim and Dong Soo Kim. 2002. Antimicrobial effects of natural plant and mushroom, *Dicyophora indusiata* extracts on fish pathogenic bacteria. J. Korea Fish. Soc. 35(6): 578-582.
- Mok JS, Song KC, Choi NJ. 2001. Antibacterial effect of fish diet soaked in *Salvia miltiorriza* extract. J Aquac 14: 157-163.
- Park UY, Chang DS, Cho HR. 1992. Screening of antimicrobial activity for medicinal herb extracts. J Korean Soc Food Nutr 21: 91-96.
- Serra Bonvehi J, Escolà Jordà R. 1997. Nutrient composition and microbiological quality of honeybee-collected pollen in Spain. Journal of Agricultural and Food Chemistry 45(3): 725-732.