

어류병원성 연쇄구균의 성장을 억제하는 *Bacillus pumilus* CPB-St의 생물학적 특성

이민영* · 김은희†

*해양수산부 수산정책실, 전남대학교 수산생명의학과

Biological Characters of *Bacillus pumilus* CPB-St Inhibiting the Growth of Fish Pathogenic Streptococci

Minyeong Lee* and Eunheui Kim†

*Fisheries policy office, Ministry of Oceans and Fisheries, Sejong si 339-012, Korea
Department of Aqualife Medicine, Chonnam National University, Yeosu 550-749, Korea

The biological characteristics of *Bacillus* sp.CPB-St as a probiotic strain to control fish streptococcosis was determined. Based on 16S rRNA sequencing, *Bacillus* sp.CPB-St was identified as *Bacillus pumilus* and named *B. pumilus* CPB-St (Abbreviated as CPB-St). Growth inhibitory activity of CPB-St against *Streptococcus* spp. was examined at three different incubation temperatures (20°C, 25°C, and 30°C) and three culture media (NA, TSA, and BHIA) based on the diameter of inhibition zone. Its activity (inhibition zone of 11~29 mm) at 20°C was higher than that (12~21 mm) at 30°C. Its activity (29 mm) in NA media was the same as that (29 mm) in TSA media. However, it was higher than that (22 mm) in BHIA media. The inhibitory activity of CPB-St against *Streptococcus* spp. was high at pH7. However, its activity was the same at salinity of 0.5% to 3%. CPB-St showed maximum growth after incubation at 25°C for 48 h. To use CPB-St as probiotics, settlement studies in fish intestine and its efficacy through feeding are needed. CPB-St was highly resistant to gastric juice at pH4 and flounder's bile salt as well as deoxycholic acid at 300 µg/ml. CPB-St showed optimal viability in 1% NaCl. It showed similar growth in 0% to 7% NaCl. CPB-St could tolerate -20°C and -70°C for 45 min. There was no difference in the growth of the strain between room temperature and 4°C. Fish diet supplemented with CPB-St could be stored at low temperature without cell loss. Therefore, CPB-St might be used as probiotics to control streptococcosis of fish.

Key words: Fish disease, Probiotic bacteria, *Bacillus pumilus* CPB-St, Streptococcus

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 증식을 억제하고 어체의 건강을 유지시키기 위한 probiotics 개발에 관심이 집중되어 많은 연구들이 진

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

행되어 왔다 (Verschuere *et al.*, 2000; Irianto and Austin, 2002a,b; Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008; Nwachi, 2013; Tuan *et al.*, 2013). 사람이나 가축으로부터 분리된 균주를 어류에 이용한 예로써 인간에게 유용한 효과를 발휘하는 것으로 알려진 *Lactobacillus rhamnosus*를 이용하여 무지개송어의 절창병 원인균인 *Aeromonas salmonicida*의 생존억제 및 무지개송어의 면역 증강 효과에 관한 연구 (Nikoskelainen *et al.*, 2001, 2003)와 *L. rhamnosus* JCM 1136의 균주를 무지개송어에 먹임으로써 선천적 면역 증강 및 장내 정상세균총의 변화를 알아본 연구 (Panigrahi *et al.*, 2004) 등이 있다. 한편 수산생물로부터 분리된 균주를 probiotics로 이용한 연구로는 Atlantic salmon의 장으로부터 분리된 *Carnobacterium* sp.가 atlantic salmon과 rainbow trout의 병원성 세균에 대하여 유용한 작용을 한다는 보고가 있다 (Robertson *et al.*, 2000). 또한 새우 부화장으로부터 분리된 *Vibrio alginolyticus*가 새우 양식에 큰 손실을 주는 *V. harveyi*에 대해 inhibition effect를 가진다는 보고가 있으며 (Ruangpan *et al.*, 1998). 그리고 Atlantic cod의 장으로부터 분리된 *Carnobacterium divergens*를 사료와 섞어 먹임으로써 성장과 생존율이 증가하였다는 보고가 있다 (Gildberg *et al.*, 1997).

이전 연구에서 연쇄상구균에 특이적으로 증식억제능력을 보였던 *Bacillus* sp.CPB-St를 선발하여 probiotic bacteria로서의 사용 가능성을 검토한 바 있다 (Lee and Kim, 2014). 본 균을 어류 양식을 위한 probiotic bacteria로 개발하기 위해서는 어류의 장내 환경에서 생존 가능해야 한다. 그러므로 본 연구에서는 *Bacillus* sp.CPB-St의 pH 및 담즙 내성을 포함한 다양한 생물학적인 특성을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

Bacillus sp. CPB-St의 동정

양식산 굴로부터 분리되어 어류병원성 연쇄상구균에 대하여 생장억제효과가 있는 것으로 보고된 (Lee and Kim, 2014) *Bacillus* sp.CPB-St를 16S rRNA 유전자의 염기서열에 근거하여 동정하였다.

Universal primer (fD1, AGAGTTTGATCCTGGC-TCAG; rP2, ACGGCTACCTTGTTACGACTT)를 이용하여 polymerase chain reaction (PCR: Pre-denaturation, 95°C, 5 min, 1 cycle; Denaturation, 95°C, 30 sec; Annealing, 55°C, 30 sec; Extension, 72°C, 90 sec, 30 cycles; Final extension, 72°C, 5 min, 1 cycle)을 실시하였다. PCR 산물을 purification kit (AccuPrep, Bioneer)를 이용하여 정제한 후 sequencing 의뢰하여 얻은 염기 서열을 NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA)의 Blast Search를 이용하여 기존의 보고된 세균종과 비교하였다.

배양 조건에 따른 CPB-St의 항균력 변화

다양한 조건에서 배양한 CPB-St가 *Streptococcus* sp.에 대하여 어느 정도 생장억제능력을 나타내는 지 알아보기 위하여 double layer test (Sugita *et al.*, 1996)를 실시하였다. CPB-St를 배지 중앙에 5 µl 접종하여 25°C에서 3일간 배양한 후 chloroform으로 30분간 처리하여 CPB-St를 사균화 시켰다. 10⁷ CFU/ml의 *Streptococcus* sp.를 함유한 0.7% soft agar (Bacto Agar, Difco)를 CPB-St plate에 중층시켜 30°C에서 24시간 배양하여 생장 억제 정도를 측정하였다.

배지의 종류와 배양 온도 및 배양 시간이 항균력에 미치는 영향을 알아보기 위해서 NA, TSA 그리고 BHIA 배지에서 20°C, 25°C 및 30°C로 배양하였으며, 배양 시간은 0~120시간 까지 24시간 간격으로 조사하였다 (Sugita *et al.*, 1998; Avonts *et al.*, 2004).

한편 pH는 TSA 배지를 pH 4.0~9.0의 6 단계로 조정하여 사용하였으며, 염분 농도는 TSA 배지에 NaCl의 농도를 0.5~10%의 12 단계로 조정하였다.

CPB-St의 생물학적 특성 조사

1) 생장곡선

적정 시점에서의 균의 확보 및 다른 응용실험에 활용하기 위해서는 세균의 생장곡선을 알아보는 것이 필요하다. CPB-St의 생장곡선을 알아보기 위하여 흡광도를 측정하였다. 200 ml의 TSB에 10⁵ CFU/ml의 CPB-St를 접종하고 30°C에서 90 rpm으

로 48시간 동안 배양하면서 2시간 간격으로 600 nm에서 흡광도를 측정하여 성장곡선으로 나타내었다.

2) 인공위액에 대한 내성

양식넙치 위(stomach)의 pH 측정결과를 토대로 인공위액에 대한 내성실험을 수행하였다. 1N HCl을 사용하여 pH 4.0 으로 조정된 TSB 배지에 1% pepsin (Sigma)을 첨가하여 인공위액으로 사용하였다 (Park *et al.*, 1998). CPB-St는 TSB 배지에 24시간 배양한 후 원심분리 (8000 rpm, 15°C, 10 min)하여 cell을 회수하고 멸균 생리식염수 (0.65% NaCl)로 2회 세척한 후, 생균수 10⁶ CFU/ml 수준으로 인공위액에 접종한 후 25°C로 배양하면서 5시간 동안 일정 간격으로 TSA 배지에 도말하여 생균수를 측정하였다. Control은 pH 7.0 으로 조정하고 pepsin은 첨가하지 않았다.

3) 담즙에 대한 내성

CPB-St의 담즙에 대한 내성은 넙치로부터 담즙을 직접 취하여 사용하는 방법과 배지에 deoxycholic acid (Sigma)를 농도별로 만들어 CPB-St를 배양하는 방법을 이용하였다 (Lee *et al.*, 1991).

전장 25 cm의 넙치로부터 쓸개에 모여져 농축되어 있는 담즙을 분리하여 직경 0.20 µm membrane filter로 여과하였다. 25°C에서 24시간 동안 배양하여 10⁷ CFU/ml의 농도로 조정된 CPB-St 10 µl에 PBS (0, 10, 30, 60 µl)와 Bile (90, 80, 60, 30 µl)을 각각 섞어 최종량을 100 µl로 조정하였고, 25°C에서 1시간 배양한 후 TSA에 각각 도말하여 25°C에서 24시간 배양한 후 결과를 확인하였다. 또한 deoxycholic acid (담즙산)를 0~500 µg/ml 농도별로 첨가하여 제작한 TSA 배지에 CPB-St를 10⁵ CFU/ml로 조정된 것을 도말하여 25°C에서 48시간 배양하면서 증식유무를 확인하였다.

4) 염분 (NaCl) 농도 내성

NaCl을 0.5~20% 함유한 TSA 배지에 10⁵ CFU/ml로 조정된 CPB-St를 도말하여 25°C에서 48시간 배양한 후 colony 수와 크기 그리고 증식유무를 확인하였다.

5) 저온 내성

CPB-St를 10⁵ CFU/ml로 조정된 뒤 소형 tube에 1 ml씩 분주하여 실온 (25°C), 냉장 (4°C), 냉동 (-20°C), 초저온냉동 (-70°C) 조건에 각각 넣은 후 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180분 경과 후에 TSA 배지에 도말하여 25°C에 배양한 후 온도에 따른 시간대별 차이를 비교하였다.

결 과

Bacillus sp. CPB-St의 동정

Bacillus sp.CPB-St의 16S rRNA 유전자의 염기서열을 NCBI의 Blast Search를 이용하여 기존의 보고된 세균종과 비교한 결과 *Bacillus pumilus*와 99% 이상의 상동성을 보였으므로 본 균주를 *B. pumilus* CPB-St(이하 CPB-St)로 명명하였다.

배양 조건에 따른 CPB-St의 항균력 변화

1) 배지, 배양온도와 시간에 따른 변화

NA와 TSA 배지에 배양하였을 때 나타내는 증식 억제력은 유사하였지만, BHIA 배지에서는 2~7 mm정도 다소 낮게 나타났다 (Table 1). 또한 20°C와 25°C에서 배양하였을 때가 30°C에서 보다 시간대별 억제능력이 높게 나타났다.

2) 배지의 pH에 따른 변화

pH 4.0~9.0의 범위에서 배양한 CPB-St가 나타내는 생장억제대의 크기를 배양 24시간 후에 비교한 결과 (Fig. 1), pH 7.0에서 18 mm로 가장 높게 나타

Table 1. Inhibition zone of *Bacillus pumilus* CPB-St against *Streptococcus* sp. according to culture medium, temperature and incubation time

Hour	Medium			NA			TSA			BHIA		
	20	25	30	20	25	30	20	25	30	20	25	30
24	13 ^a	16	16	13	15	16	11	13	12			
48	20	21	20	21	22	20	18	17	15			
72	24	24	20	24	25	20	20	18	15			
96	25	25	21	26	25	21	21	18	15			
120	29	26	18	29	26	17	22	19	16			

a Inhibition zone (mm)

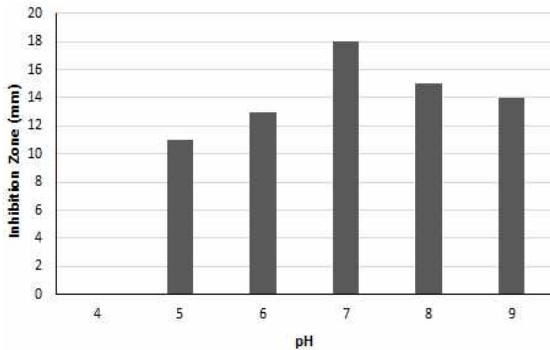


Fig. 1. Inhibition zone of *Bacillus pumilus* CPB-St against *Streptococcus* sp. in TSA medium adjusted to various pH. The growth of *Streptococcus* sp. was not detected at pH 4.

났고, 산 보다는 염기의 조건에서 다소 높은 항균력을 보였다. pH 4.0에서는 CPB-St의 증식은 이루어졌지만, *Streptococcus* sp.의 증식이 억제되어 항균력을 확인할 수 없었다.

3) 배지의 염분 농도에 따른 변화

배양배지 내의 염분농도가 0.5~10% 일 때 나타나는 항균 범위를 배양 24 시간 후에 확인한 결과 3%의 농도까지 항균범위가 18 mm로 동일하게 나타났고, 농도가 높아질수록 항균범위가 줄어들었으며 8% NaCl 이상의 농도에서는 CPB-St의 증식은 관찰되었지만, *Streptococcus* sp.의 증식이 관찰되지 않아 항균력을 확인할 수 없었다 (Fig. 2).

Bacillus pumilus CPB-St의 생물학적 특성

1) 성장곡선

CPB-St의 성장곡선을 알아보기 위하여 48시간 동안 배양하면서 흡광도를 조사한 결과 완만한 증가 경향을 보였으며, 48시간에 최고의 증식을 보였다 (Fig. 3).

2) 인공위액에 대한 내성

24시간 절식시킨 30 cm 넓치의 위를 분리하여 pH를 측정 한 결과 3.0~4.0을 나타내었다. 또한 양식 넓치 위의 pH를 근거로 하여 pH 4.0으로 조정 한 인공위액에서의 CPB-St의 내성을 조사한 결과 (Fig. 4), 5시간이 경과한 시점까지 CPB-St는 조금

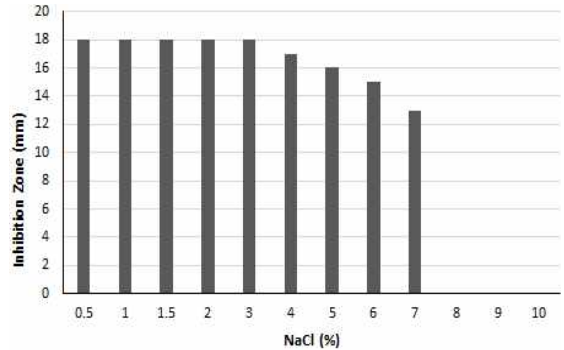


Fig. 2. Inhibition zone of *Bacillus pumilus* CPB-St against *Streptococcus* sp. in TSA medium adjusted to various concentrations of NaCl. The growth of *Streptococcus* sp. was not detected from 8% to 10% of NaCl

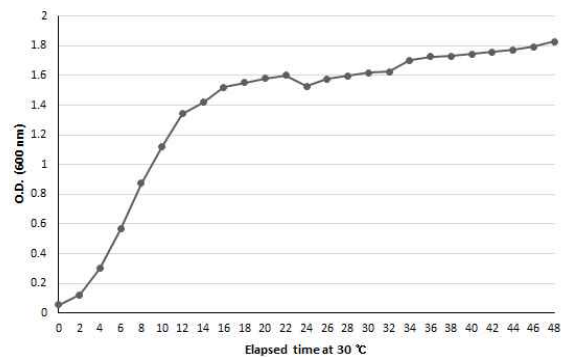


Fig. 3. Growth curve of *Bacillus pumilus* CPB-St cultured in TSB medium at 30°C for 48 hours.

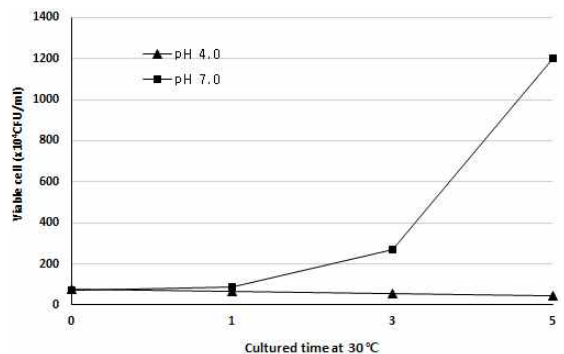


Fig. 4. Viable cell numbers of *Bacillus pumilus* CPB-St in TSB medium adjusted to pH 4.0 or pH 7.0.

씩 감소하는 변화를 보인 반면 대조구인 pH 7.0에서는 일반적인 균의 증식형태를 보였다.

Table 2. Resistance of *Bacillus pumilus* CPB-St to bile acid for 48 hours

Deoxycholic acid (µg/ml)	Growth of CPB-St
0	+
100	+
200	+
300	+
400	-
500	-

3) 담즙에 대한 내성

넙치에서 분리한 담즙을 농도별로 CPB-St와 섞어서 배양한 결과 농도에 관계없이 CPB-St는 동일하게 성장하였다. 한편 TSA 배지에 deoxycholic acid를 첨가하여 CPB-St를 배양한 결과 48시간을 기준으로 300 µg/ml의 농도까지 CPB-St의 증식이 확인되었다 (Table 2).

4) NaCl 농도 내성

NaCl이 함유된 TSA 배지에서 CPB-St의 성장을 확인한 결과, 1%의 농도에서 최적의 성장을 보였으며 7%의 농도까지는 80% 이상의 증식을 보였다 (Fig. 5).

5) 저온 내성

저온에서의 생존력을 알아본 결과 -20°C와 -70°C에서는 45시간 경과 시점부터 대조군에 비해 성장 감소가 나타났다. 그러나 냉장 온도(4°C)에서는 실온과 별다른 차이를 보이지 않았다 (Fig. 6).

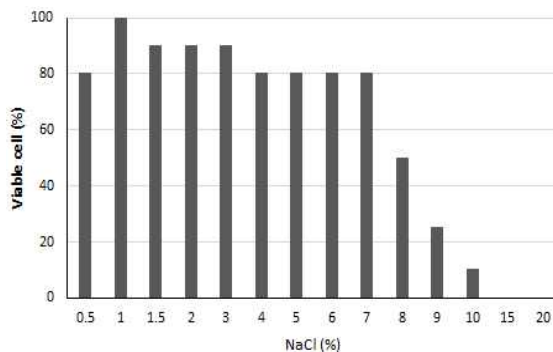


Fig. 5. Viable cell of *Bacillus pumilus* CPB-St in TSA medium prepared with various concentrations of NaCl.

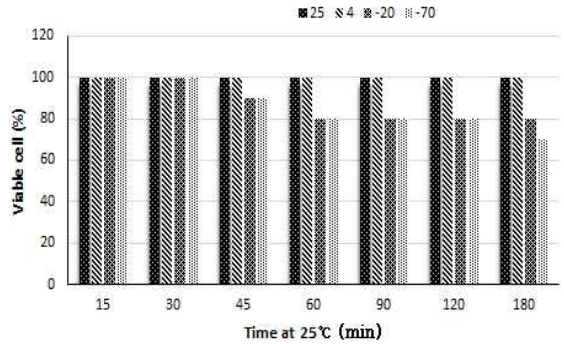


Fig. 6. Viable cell of *Bacillus pumilus* CPB-St after incubation at various temperatures.

고 찰

양식생물생산 경향이 양적인 생산에 주력하였던 것에서 소비 주체인 인간에 대한 안전성을 고려하는 것으로 전환됨에 따라 항균제에 대한 사용규제가 불가피하게 되었다. 따라서 보다 적절한 치료대책들이 강구 되었으며 그 중 대상숙주 뿐만 아니라 인간에게도 유익한 세균을 이용하는 연구가 진행되어 왔다 (Gomez-Gil *et al.*, 2000; Fernandez *et al.*, 2003; Macey and Coyne, 2004). 이전 연구에서 어류에 사용하는 probiotics의 인체에 대한 안전성을 고려하여, 사람이 날 것으로 섭취하는 패류로부터 유용세균을 분리하여 이의 probiotics로서의 이용가능성을 보고한 바 있다 (Lee and Kim, 2014). 본 연구는 이 세균을 유용세균으로 개발하기 위하여 필요한 기초조사로서 세균의 생물학적 특성들을 알아 보았다.

CPB-St의 배양 조건에 따라 병원성 *Streptococcus* sp.에 대한 항균력을 비교해 본 결과 고온 보다 저온 (20°C)에서, 고 영양배지 보다는 일반배지 (NA and TSA)에서 배양 하였을 때 높은 항균력을 보였다. 이는 *Streptococcus* sp.가 생장 적온이 보다 높고 BHIA와 같은 특수영양분이 함유된 배지에서 잘 자라는 특성 때문인 것으로 보인다. pH 7.0의 조건과 0.5~3% 염분농도 범위에서 항균범위가 높게 나타났다. pH 4.0과 염분농도 8% 이상에서 CPB-St의 증식은 보였지만, *Streptococcus* sp.가 증식하지 않았기에 항균력을 관찰할 수 없었다. 하지만 확인 되어진 부분의 자료를 근거로 CPB-St가

pH 4.0과 염분농도 8% 이상에서도 항균력을 나타낼 수 있을 것으로 보인다.

CPB-St의 성장은 48시간 까지 지속적인 증가를 보이고 있으며 증식 속도가 빠르고 그 양도 많기 때문에 향후 대량생산 형태를 가진다면 균의 확보에 어려움이 없을 것으로 여겨진다. 경구로 투여되는 probiotics는 내산성이 있어야 할 뿐 아니라, 일정 기간 장내에 머물기 위해서는 쓸개에서 분비되는 담즙 (pH 7.8~8.6)과 각종 소화효소의 분해 작용에 저항성이 있어야 한다. 순수한 위액의 pH는 2.0 전후로서 대부분의 미생물들은 여기에서 사멸하게 된다. 하지만, 먹이를 함께 투여할 경우 완충작용으로 인해 pH는 높아지게 되고 *in vitro*와 *in vivo*에서의 실험결과는 거의 일치한다는 보고가 있다 (Park *et al.*, 1996). CPB-St의 인공 위액 및 어류 담즙에 대한 내성을 조사한 결과, pH 4.0에서 생장이 감소하는 경향을 보였으나 probiotic를 사료에 섞어 경구로 투여되는 방법을 고려했을 때 완충작용이 나타나므로 실제 위에서의 감소율은 크지 않을 것으로 여겨진다. 어류에게 급이 된 사료가 소화 작용을 거쳐 위를 통과하는 시간이 2시간 시점부터이므로 실험에서 보여준 5시간 경과 실험은 위액에 대한 내성의 가능성을 부여해 주는 것으로 보여 진다. CPB-St가 섭이를 통해 소화관 내로 들어가면서 위를 통과한 후 장을 거쳐야 하는 과정에서 일정 기간 장내에 머물기 위해서는 쓸개에서 분비되는 담즙과 각종 소화효소의 작용에 견뎌내야 한다. 담즙의 pH는 7.8~8.6으로 알칼리성이며 산성인 위액에 의해 중화가 이루어진다. 쓸개즙 속에 있는 담즙산의 하나인 deoxycholic acid를 함유한 배지에서 CPB-St는 300 µg/ml까지 생존이 가능하였는데, 이는 유산균의 경우 담즙내성이 250~500 µg/ml로 보고 된 것에 근거했을 때 담즙에 대한 내성이 있는 것으로 여겨진다 (Lee *et al.*, 1991). 또한 넓치로부터 직접 담즙을 취하여 농도별로 조사한 결과 CPB-St의 증식 억제가 나타나지 않았으므로 담즙에 대해 안정하다고 보여진다. CPB-St는 염분농도 0.5~10% 사이에서 생장이 가능한 광염성 세균으로써 사육수의 염분 농도에 영향을 받지 않을 것으로 보인다. 냉동 보관용 생사료와 배합사료를 섞어서 Moist Pellet (MP)사료를 만드는 과정

에 CPB-St를 첨가할 경우 저온에서의 내성이 요구되는데 CPB-St의 경우 사출기를 통과하는 시간까지 안전할 것으로 보여 진다.

그러므로 CPB-St는 사료에 섞어 투여하였을 때 저온에 의한 균 손실이 없으며 어류의 장내환경에서도 안정할 것으로 판단되어 수산용 probiotic로 개발 가능하다고 판단된다.

요 약

어류병원성 연쇄상구균에 대하여 항 미생물 효과를 갖는 것으로 보고된 *Bacillus sp.* CPB-St를 수산용 probiotics로 개발하기 위한 기초 조사로서 미생물의 생물학적인 특성을 알아보았다. *Bacillus sp.* CPB-St는 16S rRNA 유전자 염기서열에 근거하여 *Bacillus pumilus*로 동정되었으며 *B. pumilis* CPB-St (이하 CPB-St)로 명명되었다. CPB-St를 배양 온도 및 배지의 종류에 따라 *Streptococcus sp.*에 대한 생장억제능력을 평가한 결과, 20°C(억제대: 11~29 mm)에서 배양하였을 때가 30°C (12~21 mm)에서 배양했을 때보다 생장억제효과가 높았고, NA (29 mm)와 TSA (29 mm)에서는 유사하였으나 BHIA (22 mm)에서는 낮게 나타났다. 또한 생장억제대의 크기는 pH 7.0에서 18 mm로 가장 높게 나타났고, 염분농도 0.5~3%에서는 동일하였다. 한편 CPB-St의 생물학적 특성을 알아본 결과 30°C에서 완만한 증식을 보였으며 배양 후 48시간에 최고 생장을 나타내었다. pH 4.0로 조정된 인공위액에서는 5시간까지 약간의 감소만 나타내었다. 넓치에서 채취한 담즙에서 CPB-St는 농도에 관계없이 동일한 성장을 보였으며 deoxycholic acid가 첨가된 TSA배지에서 300 µg/ml의 농도까지 증식 가능하였다. 또한 1%의 염분농도에서 최적의 성장을 보였으며 7%의 농도까지 증식에 큰 차이를 보이지는 않았고 저온 내성의 경우 -20°C와 -70°C에서는 45분경과 시점부터 대조군에 비해 성장 감소가 나타났으나 4°C에서는 실온과 차이를 보이지 않았다. 따라서 CPB-St는 어류의 소화관 내에서의 생존가능성이 높으며 사료에 첨가하여 저온에 보관하여도 균수가 감소되지 않을 것으로 판단된다.

References

- Avonts, L., van Uytven, E. and de Vuyst, L.: Cell growth and bacteriocin production of probiotic *Lactobacillus* strains in different media. *Int. Dairy J.*, 14: 947-955, 2004
- Fernández, M.F., Boris, S. and Barbés, C. : Probiotic properties of human *Lactobacilli* strains to be used in the gastrointestinal tract. *J. of App. Microbiol.*, 94: 449-455, 2003.
- Gildberg, A., Mikkelsen, H., Sandaker, E. and Ringø, E. : Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Hydrobiologia*, 352: 279-285, 1997.
- 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.
- Irianto, A. and Austin, B.: Probiotics in aquaculture. *J. of Fish Disease*, 25: 633-642, 2002a.
- Irianto, A. and Austin, B. : Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. of Fish Diseases*, 25: 333-342. 2002b.
- 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.
- Lee, J.K., Kim, W.T. and Lee, J.H. : Isolation and identification of lactic acid bacteria for preparation of probiotics. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 19: 429-432. 1991.
- Lee, M. and Kim, E. : Inhibitory effects of candidate probiotic bacteria on the growth of fish pathogenic bacteria, *Streptococcus* sp.. *J. Fish. Pathol.*, 27: 107-114, 2014.
- Macey, B.M and Coyne, V.E. : Improved growth rate and disease resistance in farmed *Haliotis midae* through probiotic treatment. *Aquaculture*, 245: 249-261, 2004.
- Nikoskelainen, S., Ouwehand, A.C., Bylund, G. and Salminen, S. : Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*. *Aquaculture*, 198: 229-236, 2001.
- Nikoskelainen, S., Ouwehand, A. C. Bylund, G., Salmi-nen, S. and Lilius, E-M. : Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Fish Shellfish Immunol.*, 15: 443-452, 2003.
- Nwachi, O.F.: An overview of the importance of probiotics in aquaculture. *J. fish. Aquat. Sci.*, 8: 30-32, 2013.
- Panigrahi, A., Kiron, V., Kobayashi, T., Puangkaew, J., Satoh, S. and Sugita, H. : Immune responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136. *Vet. Immunol. and Immunopathol.*, 102: 379-388, 2004.
- Park, C.J., Pyeon, J.S., Cho, Y. K., Hong, S. S. and Lee, H. S.: Characteristics of *Enterococcus* sp. isolated from animal intestine and powder. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 24: 393-398, 1996.
- Park, H.S., Lee, S. H. and Uhm, T. B. : Selection of microorganisms for probiotics and their characterization. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 27: 433-440, 1998.
- Robertson, P.A.W., O'Dowd, C., Burrells, C., Williams, P. and Austin, B. : Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Aquaculture*, 185: 235-243, 2000.
- 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.
- Sugita, H., Shibuya, K., Shimooka, H. and Dehuchi, Y. : Antibacterial abilities of intestinal bacteria in freshwater cultured fish. *Aquaculture*, 145 : 195-203, 1996.
- 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. *Int. J. of Res. in Fish. and Aquaculture*, 3: 89-97, 2013.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P. and Verstraete, W. : Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. and Mol. Biol. reviews*, 64: 655-671. 2000.

Manuscript Received : Jul 4, 2015

Revised : Aug 10, 2015

Accepted : Aug 17, 2015