

북방전복, *Haliotis discus hannai*에 대한 *Bacillus amyloliquefaciens*의 probiotic 효과

박진영 · 김위식 · 김흥윤 · 김은희[†]

전남대학교 수산생명의학과

Potential use of *Bacillus amyloliquefaciens* as a probiotic bacterium in abalone culture

Jin Yeong Park, Wi-Sik Kim, Heung Yun Kim and Eunheui Kim[†]

Department of Aqualife Medicine, Chonnam National University, Yeosu 59629, Korea

In comparison to the numbers of such studies of fish, few studies have been carried out on the immunity, physiology and ecology of abalone, while studies on abalone disease are also extremely rare. Moreover, mass mortality of cultured abalone due to pathogenic bacteria has not been reported in the southern coast of Korea. However, *Vibrio*-like bacteria have been isolated from dead abalone, which indicates that a review is required in order to determine the cause of abalone mortality. Use of an antimicrobial agent to minimize the damage caused by disease in abalone farms is common, but the therapeutic effects are insignificant. Demand for probiotics has increased, but research on the development of probiotics for use in abalone culture is very rare. Therefore, the present study isolated KC16-2 from fermented kimchi soup and investigated the characteristics of the isolate as a candidate probiotic bacterium in abalone. KC16-2 was identified as *Bacillus amyloliquefaciens* (*B. amyloliquefaciens* KC16-2) based on its biochemical properties and 16S rRNA gene sequence. *B. amyloliquefaciens* KC16-2 showed inhibitory effects against the growth of various vibrios *in vitro*, and kept the numbers constant until four days after inoculation in marine water at a temperature of 15~25°C, indicating the possible use of KC16-2 as a probiotic, except in the winter. The growth of KC16-2 was inhibited by bile salt, but the numbers increased over time suggesting the bacteria were still alive in the abalone's digestive tract. Abalone fed with a diet including KC16-2 for 12 weeks showed good growth, but showed no significant differences from the control group. However, the mortality of the abalone supplied the probiotic diet was reduced to half that of the control group in a challenge test with *Vibrio tubiashii*. Therefore, we suggest that *B. amyloliquefaciens* KC16-2 could be used as a probiotic bacterium for control of the mortality of abalone caused by opportunistic pathogenic vibrios.

Key words: Abalone, Probiotics, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Vibrio tubiashii*

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

우리나라에서 북방전복, *Halotis discus hannai*은 주요 양식 생산 및 자원 관리 대상 품종으로서 지난 10년간 양식 산업은 급격히 증가하였고 식량 산업으로서 그 가치가 점점 높아지고 있지만 (KNSO, 2013; 박 등, 2013), 사육환경의 악화로 질병이 빈번하게 발생하여 양어가의 경제적 손실이 높아져왔다 (국립수산진흥원, 2000). 전복질병에 대한 대책으로 probiotics에 대한 요구가 증가하였지만, 전복용 probiotics 개발에 관한 연구는 매우 드물다. 전복폐사에는 복합적인 요인들이 작용하고 있지만 기회감염성 병원체의 감염도 한 원인으로 고려될 수 있다. 전복 치패에서 vibrios로 인하여 많은 폐사가 일어나 경제적 손실을 일으킨 사례가 외국에서 보고된 바 있으나 (Liu *et al.*, 2000; Tomoo *et al.*, 2007), 국내에서는 *Vibrio*로 인한 폐사 발생 사례는 보고되어 있지 않다. 그러나 전복 폐사체로부터 *Vibrio*성 세균들이 높은 빈도로 분리되고 있어, 이들 *Vibrio*속 세균과 전복 폐사와의 관련성에 대한 검토가 필요하다.

Probiotic 세균은 장내미생물의 균형을 개선할 뿐 아니라, 박테리옌, 유기산, 과산화수소, 단쇄 지방산, siderophores 등을 분비하여 숙주 생물에 이로운 영향을 주는 것으로 알려져 있다 (Balcazar *et al.*, 2006). Probiotics로 많이 이용되는 *Bacillus* 속 균들은 해양 생물에서도 매우 다양한 기능을 나타내는 것으로 보고되어 있다 (Kennedy *et al.*, 1998; Hovda *et al.*, 2007). *Bacillus subtilis*와 *B. licheniformis* 또는 *B. pumilus*를 함께 송어에 투여하였을 때 성장과 질병 저항성을 돕는 효과가 있었다는 보고가 있으며 (Raida *et al.*, 2003; Bagheri *et al.*, 2008), *Bacillus*의 몇몇 종은 새우의 질병원인 세균에 대하여 높은 성장 저해를 보이고 있어 항생제 대체제로 제안된 바 있다 (Banerjee *et al.*, 2007). 전복을 대상으로 probiotic의 사용 가능성을 검토한 예로는, Macey and Coyne (2004, 2006)가 전복의 장내에서 분리한 *Vibrio midae* SY9와 효모 *Cryptococcus* sp. SS1 및 *Debaryomyces hansenii* AY1을 전복 사료에 첨가하여 생존과 성장률이 증가되었다고 한 보고가 있고, 전복의 장에서 분리한 *Pseudalteromonas* sp.를 사료에 첨가하면 소화관 내에서 영양분의 이용률이 높아지고 소화효소의 증가

로 성장률이 증가하는 효과가 나타났다는 보고가 있다 (ten Doeschate and Coyne, 2008).

따라서 본 연구에서는 항*Vibrio* 효과를 갖는 균주를 probiotic 세균으로 이용하여 *Vibrio* 감염에 대한 전복의 방어 효과를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

Probiotic 균주의 분리 및 동정

Probiotic 균주로 내염성이면서 인체에 위해하지 않은 균을 분리하기 위하여 숙성된 김치액을 사용하였다. 김치액을 멸균된 2% NaCl 용액으로 희석하여, 1% NaCl이 첨가된 tryptic soy agar (TSA, BD)에 접종하였다. 25°C에서 48시간 배양한 후 나타난 세균 집락을 분리하여 KC로 명칭하고 형태학적 특성과 catalase 및 oxidase 활성시험 결과에 근거하여 간이 동정하였다. 항*Vibrio* 효과를 보인 균들은 16S rRNA universal primers (fD1, AGAGTTTGAT CCTGGCTCAG; rP2, ACGGCTACCTTGTTACGA CTT) (Weisburg *et al.*, 1991)를 이용하여 pre-denaturation (95°C, 5min) 1 cycle; denaturation (95°C, 30 sec), annealing (55°C, 1 min), extension (72°C, 1 min) 30 cycles; final extension (72°C, 5 min) 1 cycles의 조건으로 polymerase chain reaction (PCR)을 실시하였다. PCR 산물은 purification kit (AccuPrep, Bioneer)를 이용하여 정제한 후 sequencing을 의뢰하였다 (Solgent Corp.). 얻어진 염기 서열은 NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA)의 BLAST search를 이용하여 기존의 보고된 세균종과 비교하였다.

Probiotic 균주들의 항 비브리오 활성

KC균주의 항비브리오 활성을 알아보기 위하여 한천 확산법을 실시하였다. 실험에 사용한 vibrios는 질병 증상을 보이는 전복에서 분리한 19 균주이다 (Table 1). 모든 KC균들은 TSA배지로 배양하였고, vibrios는 marine 2216 agar (MA, BD)에서 배양하였다. 각각의 *Vibrio*를 25°C에서 24시간 진탕배양한 후, MA배지에 100 µl씩 도말하고, KC균 5 µl를 중층하여 24시간 배양한 후, 성장억제대의 크기를 측정하여 비교하였다.

Bacillus amyloliquefaciens KC16-2 특성 분석

1) 병원성 비브리오에 대한 항균력

다양한 균주들에 대하여 항비브리오 효과를 보인 *B. amyloliquefaciens* KC16-2을 선발하여 병원성 비브리오에 대한 항균력을 한천확산법으로 확인하였다. 사용한 병원성 vibrios는 KCTC (Korean Collection for Type Culture)에서 분양 받은 것과 폐사한 전복으로부터 분리하여 전복에 대한 병원성이 확인된 균주들이다(Table 2).

2) 전복에 대한 위해성

시험균을 tryptic soy broth (TSB, Difco, BD)로 25°C에서 24시간 진탕배양한 후 12,000 rpm으로 4°C에서 10분간 원심분리하여 배지성분을 제거하고, 2% NaCl 용액으로 2회 세척한 후 7 l 사각 수조에 1.5×10^6 CFU/ml의 농도가 되도록 현탁하였다. 실험수조에 전복을 10개체씩 수용한 후 2주간 폐사를 조사하였다.

3) 해수 온도에 따른 생존률 비교

Marine broth에서 24시간 배양한 균을 12,000 rpm으로 4°C에서 10분간 원심 분리하여 배지 성분을 제거하고 2% NaCl 용액으로 2회 세척하였다. Pore size 0.45 μ m 박막여과기 (Adventec)로 여과된 해수 20 ml에 1.2×10^6 CFU/ml이 되도록 균을 첨가한 후 온도를 10°C, 15°C, 20°C, 25°C로 설정하여 7일간 배양하면서 1일 1회 시료를 채취하여 TSA 배지에 접종한 후 25°C에서 24시간 배양하여 나타난 균의 집락을 계수하였다.

4) 담즙 내성

Walker and Gilliland (1993)의 방법에 따라 균을 600 nm에서 optical density (OD)값이 0.8에서 1.0이 되도록 배양한 후 0.3%의 oxgall (Neogen)을 첨가한 TSB 배지에 접종하여 25°C에서 100 rpm으로 배양하면서 12시간 동안 3시간 간격으로 OD를 측정하였다.

5) 항균제 감수성

항균제 감수성은 디스크 확산법으로 확인하였다. 25°C에서 TSB로 24시간 배양한 균을 1% NaCl

을 포함하는 Mueller Hinton (MH, Difco, BD)배지에 100 μ l씩 도말한 후 항균제 disc를 올려놓고, 25°C에서 24시간 배양하여 나타난 성장억제대의 크기를 측정하였다. 사용한 항균제 disc는 amoxicillin, ciprofloxacin, compound sulphonamides, doxycycline, enrofloxacin, erythromycin, florfenicol, flumequine, nalidixic acid, neomycin, oxolinic acid, oxytetracycline, tetracycline, trimethoprim (Oxoid)이다.

실험사료 제조

시중에서 유통되고 있는 전복사료 (동아원)에 probiotic으로 선발된 KC16-2균을 첨가하여 시험사료를 제조하였다. TSB에 24시간 배양한 균을 원심 분리하여 배지 성분을 제거한 후 2% NaCl 용액으로 2회 세척하였다. 2% NaCl용액으로 약 1.5×10^9 CFU/ml의 농도가 되도록 설정한 균액 10 ml와 10 g의 사료를 혼합하는 비율로 섞어 40°C에서 건조한 후 냉장 보관하면서 전복에 공급하였고, 주 1회 새로이 제조하였다.

Probiotic 사료의 효과 조사

1) 성장률 비교

실험에 사용한 북방전복은 평균 각장 32.76 mm (± 1.47), 평균 전중 3.76 g (± 0.48)으로 전라남도 여수시 돌산읍 소재 한국수산자원육성센터로 부터 분양받아 500 l 원형 순환 여과식 사육 수조에서 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 2주간 순치시켰다. 순치 기간 동안 시판 사료를 격일로 모든 전복이 충분히 먹을 양으로 투여하였으며 차기 사료 투여 시에는 남아있는 이전 사료를 모두 제거하였다. 순치된 실험전복을 20 l 순환 여과식 수조에 각각 50마리씩 2반복으로 수용하고 2일 주기로 사료를 공급하였다. 사육수 수온은 20 ~ 22°C의 범위였으며 3.6 l/min로 순환시켰고 주 1회 모두 환수 하면서 12주 동안 사육하였다. 실험 개시 및 종료 시기에 각장과 전중량을 측정하여 비교하였다.

2) 비브리오 감염에 대한 저항성 비교

전복 공격실험에 사용한 병원균은 복족 근육 위축 증상을 보이면서 폐사한 북방전복 치패로부터

Table 1. Screening of probiotic bacteria based on the anti-*Vibrio* effects

<i>Vibrio</i> like organism	KC					
	16-1	16-2	16-3	16-4	16-9	16-10
VG4-2	-	+	+	-	+/-	-
VG5	+	+	+	+	++	-
VG7	-	++	+	-	+	+
VG7-1	-	++	++	+/-	+/-	++
VG11	+/-	++	-	++	++	++
VG12	++	++	++	+++	+++	+
VG32	+/-	++	+	++	++	+
VG46	+	++	+	+	++	+
VG51	++	+	+	+/-	++	+
VY2	+	+	+	++	++	+/-
VY3-2	++	+	+	+/-	++	+
VY15	-	+	+	+/-	+/-	+/-
VY16	-	+	+	+/-	+/-	-
VY23	++	++	+	+/-	++	+
VY24	+/-	++	++	+/-	+/-	+
VY30	++	+	+	-	+++	+
VY31	+/-	+	+	+	+	-
VY35	+/-	++	++	-	+/-	+
VY49	+/-	++	+	+/-	+/-	+

+++ , > 5 mm; ++, 2~5 mm; +, ≤, 1mm

분리하여 *V. tubiashii*로 동정된 것으로서 건강한 전복의 혈림프동에 접종하여 병원성을 확인한 것이다. 사육실험 종료 후, 시험사료를 먹인 그룹과 일반사료를 먹인 그룹의 전복치패를 24시간 절식 시킨 후, 10 ℓ수조에 3반복으로 10개체씩 수용하였다. Macey and Coyne (2004)의 방법에 따라 *V. tubiashii*를 전복 개체당 10^7 CFU가 되도록 멸균주사기로 0.1 ml씩 혈림프동 내로 주사하였고 대조군은 동량의 생리식염수를 주사하여 2주 동안 폐사율을

조사하고, 폐사의 원인을 확인하기 위해 매일 사망한 개체의 혈림프동 부분을 절개하여 혈림프를 TCBS에 배양하여 *V. tubiashii*의 존재를 확인하였다.

유의성 검증

전복 성장을 비교하기 위하여 SPSS 통계 프로그램으로 ANOVA를 실시하고 Duncan's multiple range test를 통해 $p < 0.05$ 일 때 유의한 것으로 평가하였다.

결과 및 고찰

Probiotic균주의 분리 및 동정

숙성된 김치에서 *Vibrio* spp.에 항균력을 보이는 균들 중, 질병에 감염된 전복에서 분리한 vibrios로 의심되는 19종에 대하여 가장 광범위한 항균력을 나타내는 균주는 KC16-2 이었다 (Table 1). KC16-2는 내생포자를 형성하는 간균으로 운동성이 없으며, catalase와 oxidase에 양성의 성상을 보임으로써

Table 2. Inhibitory activities of *Bacillus amyloliquefaciens* KC16-2 against various pathogenic *Vibrio*

Pathogen	Inhibition zone
1. <i>Listonella anguillarum</i> (KCTC 2711)	++
2. <i>Vibrio harveyi</i> (KCTC 12724)	++
3. <i>V. parahaemolyticus</i> (KCTC 2729)	++
4. <i>V. tubiashii</i> (KCTC 12729)	++
5. <i>V. harveyi</i> (isolated)	++
6. <i>V. tubiashii</i> (isolated)	++

Clear zone: +++ , > 5 mm; ++, 2~5 mm; +, ≤, 1mm

잠정적으로 *Bacillus* sp.로 동정되었다. 또한 16S rRNA gene sequence를 분석한 결과 KC16-2균은 *Bacillus amyloliquefaciens*의 16S rRNA gene sequence와 99% 이상의 상동성을 보였으므로 본 probiotic 균주는 *B. amyloliquefaciens* KC16-2로 명명되었다. KC16-2는 숙성된 김치액으로 부터 분리되었지만, 신 (2013)은 *B. amyloliquefaciens*을 전복의 장에서 분리하여 보고하였다. 뿐만 아니라 해양생물의 장내에서 발견되는 *Bacillus*균들은 다양한 유기물을 분해할 수 있는 효소들을 생산할 수 있는 것으로 보고된 바 있다(Verschuere *et al.*, 2000; Ghosh *et al.*, 2002; Ziaei-Nejad *et al.*, 2006). 그러므로 *B. amyloliquefaciens* KC16-2는 전복의 probiotic 균주로의 사용이 용이할 것으로 여겨진다.

B. amyloliquefaciens KC16-2의 특성

1) 전복에 대한 위해성

KC16-2는 1.5×10^6 CFU/ml의 농도에서 2주일간 전복에 질병을 유발하지 않았으며 전복의 활력, 섭이 능력, 폐사율 등에도 차이가 없었다. 사료첨가제로 사용될 probiotics 균은 가축에 대한 안전성이 있어야 함은 물론 증식속도가 빠르고 균주의 분류학적 위치가 명확하며 안정성이 확립된 균주를 사용해야한다는 조건이 있다 (한국과학기술연구원, 2006). 본 분리균은 전복에 대해 위해성을 갖지 않으며 분류학적 위치가 명확하다고 할 수 있다.

2) 병원성 vibrios에 대한 성장 억제 효과

KC16-2는 *V. harveyi*, *L. anguillarum* (Iehata *et al.*, 2009), *V. parahaemolyticus* (Liu *et al.*, 2006)와 양식 전복 폐사체로 부터 분리한 *V. tubiashii*, *V. harveyi*에 대하여 광범위한 항균력을 나타내었다(Table 2).

3) 해수 생존률

KC16-2는 해수 온도에 따라 생존율에 차이를 보였는데, 15°C와 20°C에서 접종 1일 후부터 6일까지 균의 양이 10^5 CFU/ml 이상 유지되었으나 균수는 점점 감소하는 경향을 나타내었다. 그러나 10°C, 25°C에서는 3일 후 균의 수가 10^4 CFU/ml 이하로 감소하였으며 특히 10°C에서 균수 감소 경향이 뚜렷하게 나타났다(Fig. 1). 전복은 사료를 갉아 먹는

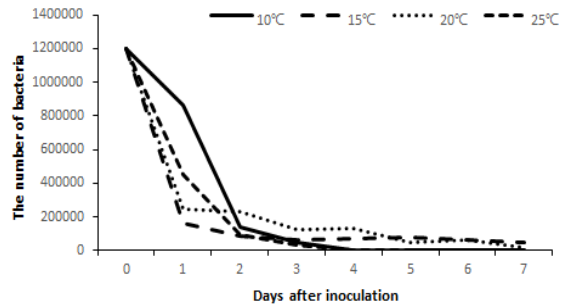


Fig. 1. Survival of *Bacillus amyloliquefaciens* KC16-2 in filtered marine water according to temperature.

섭식 특성을 갖고 있으므로 사료에 probiotic 균을 배합하여 투여 했을 때, 균은 해수 중에 노출되게 됨으로써 해수의 온도변화에 따라 생존력이 달라질 수 있다. 전복은 먹이활동이 수온과 밀접한 관계가 있어 보통 7°C 이하에서는 거의 먹이를 먹지 않으며, 활동도 매우 둔하게 된다. 일간 섭식율은 수온 10.9°C일 때 체중의 7.5%, 16.5°C일 때 14.7%, 20.3°C일 때 17.6%를 섭이하므로 전복양식에서 성장 적수온은 20°C 전후로 보고 되고있다(한, 1998). 그러므로 수온 20°C에서 전복의 섭이율이 높고, 균 또한 높은 생존율을 유지하고 있기 때문에 사료에 균을 부착시켜 해수 중에 투여하여도 무방할 것으로 보인다.

4) 담즙 내성

0.3%의 oxgall이 첨가된 TSB 배지에서 KC16-2는 대조군과 비교했을 때 3시간 후에 균의 증식이 다소 감소하였고, 투여 6시간 후에는 oxgall이 첨가되지 않은 TSB에서의 성장과 비교하였을 때 담즙에서 47.7%로 감소하는 경향이 나타났으며, 9시간이 경과하였을 때는 37.7%로 감소하였으나 대조군과 유사한 증식 패턴을 보였다(Fig. 2). Probiotic 균이 섭이를 통해 소화관 내로 들어가 머물면서 효과를 내기 위해서는 담즙과 각종 소화효소의 작용에 내성을 나타내야한다. 담즙은 보통 pH7.8-8.6으로 알칼리성이나 위액에 의해 중화가 이루어지게 된다. 본 분리균은 담즙에 의해 생장이 억제되기는 하나, 시간 경과에 따라 처음 투여 농도 보다는 증가하는 양상을 보이고 있어 담즙이 있는 곳에서도 사망하지 않고 생존 가능하다고 판단된다.

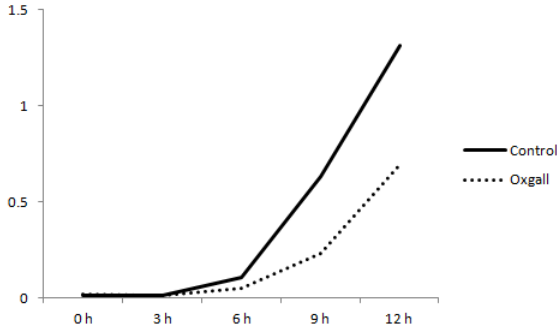


Fig. 2. Optical density of *Bacillus amyloliquefaciens* KC16-2 incubated without (control) or with 0.3% oxgall at 600nm.

5) 항생제 감수성

Probiotic균의 항균제 감수성 조사 결과는 probiotic을 사용하는 양식 생물에 사용할 항균제를 선택할 때 참고자료로 이용될 수 있다(이와 김, 2014). KC16-2는 trimethoprim에 대하여 저항성이었고, 전복 병원성 *V. tubiashii*는 neomycin에 대하여 저항성을 나타내었다. 한편 oxolinic acid, oxytetracycline, tetracycline에 대하여 KC16-2는 감수성이 낮지만, *V. tubiashii*는 감수성이 있었다(Table 3). KC16-2균이 tetracycline 계열의 항생제인 tetracycline과 oxy-

Table 3. Sensitivities of *Bacillus amyloliquefaciens* KC16-2 and *Vibrio tubiashii* to the antimicrobial agent

	<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>V. tubiashii</i>
Amoxicillin	+++	++
Ciprofloxacin	+++	++
Doxycycline	+++	++
Enrofloxacin	+++	++
Erythromycin	+++	++
Florfenicol	+++	+++
Flumequine	+++	++
Nalidixic acid	++	++
Neomycin	++	-
Oxolinic acid	+	++
Oxytetracycline	+	+++
Sulfonamides, Compound	+++	++
Tetracycline	+	++
Trimethoprim	-	++

Clear zone : +++, >20mm; ++, 10~20mm; +, ≤ 10

tetracycline에서는 낮은 감수성을 나타냄으로써 이 계통의 항균제는 KC16-2와 병용 가능할 것으로 판단된다.

B. amyloliquefaciens KC16-2 첨가 사료가 전복의 성장에 미치는 영향

시판 사료를 공급한 전복과 probiotic사료를 공급한 전복의 각장과 전중량을 비교한 결과(Fig. 3), 각장은 일반 사료를 공급한 수조에서는 34.09 ± 2.67 mm, probiotic 사료를 공급한 수조에서는 33.74 ± 2.26 mm로 유의적인 차이는 없었다 ($p > 0.05$). 그러나 이 두 그룹은 사육 초기의 크기 (32.76 ± 1.46 mm)에 비하면 유의한 성장을 하였다 ($p = 0.014$). 한편 전중량도 시판 사료를 공급한 수조에서 3.89 ± 0.88 g, probiotic사료를 공급한 수조에서

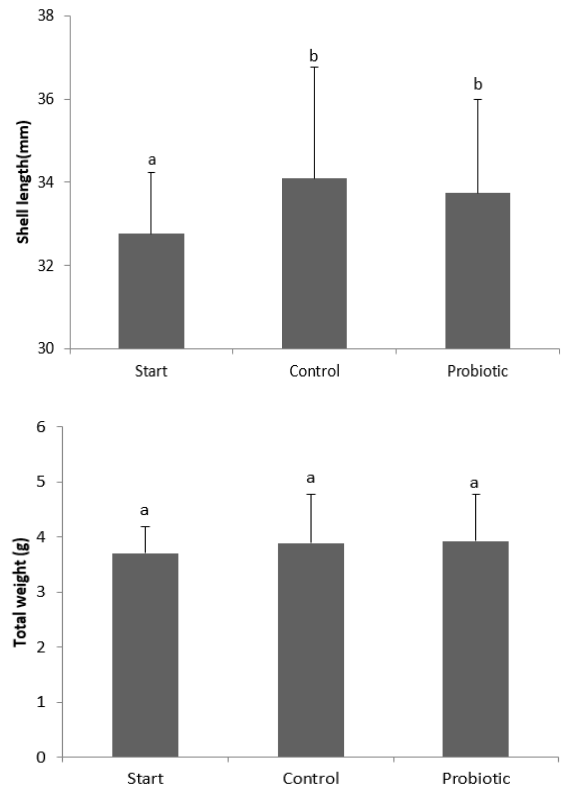


Fig. 3. Growth of abalone fed a commercial (control) or probiotic-supplemented diet for 12 weeks. Values with different superscript are significantly different at $p < 0.05$ as determined by SPSS program.

3.93 ± 0.85 g 으로 유의한 차이는 없었으며 이는 또한 사육 전 전복의 무게와도 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다($p = 0.21$). 사육 기간 중 시판 사료를 공급한 전복은 평균 88%가 생존 하였고, probiotic 사료를 공급한 전복은 평균 85%가 생존 하였다(데이터 미제시). 각장과 전중량 및 누적 폐사량이 시판 사료를 먹인 그룹에 비해 KC16-2균이 첨가된 probiotic 사료를 먹인 그룹에서 다소 좋게 나타났지만 통계적으로 유의한 차이는 없었으므로 KC16-2는 전복의 성장에 부정적인 영향이 없는 것으로 여겨졌다.

인위 감염에 대한 전복의 저항성

시판 사료와 KC16-2를 첨가한 사료를 각각 투여하여 사육한 전복에 대하여 *V. tubiashii*를 인위 감염시킨 결과(Fig. 4) 시판사료를 먹인 그룹의 비감염 전복에서 누적폐사율이 35%인 반면(BDC in Fig. 4), *V. tubiashii*를 감염시킨 전복에서는 70%의 높은 폐사율이 나타났다(BDV in Fig. 4). 한편, probiotics 사료를 먹인 그룹의 비감염 전복에서는 폐사율이 10%로 나타났지만(PDC in Fig. 4), *V. tubiashii*를 감염시킨 전복은 35%의 누적폐사율이 나타나(PDV in Fig. 4) 시판사료를 먹이고 병원성 균주

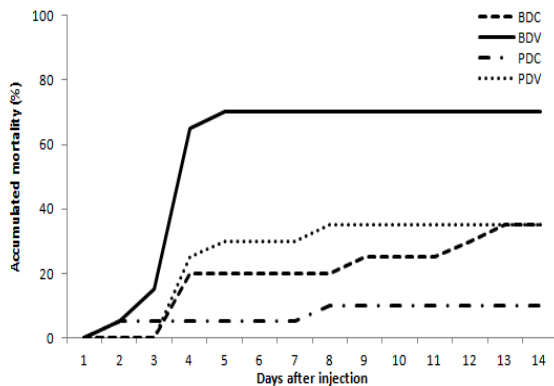


Fig. 4. Accumulated mortalities of abalone cultured using commercial feed with or without supplementation of the probiotic bacterium, *Bacillus amyloliquefaciens* KC16-2 followed by challenge with *Vibrio tubiashii*. BDC, basal diet control group; BDV, basal diet group challenged with *V. tubiashii*; PDC, probiotic diet control group; PDV, probiotic diet group challenged with *V. tubiashii*.

를 감염 시킨 그룹에 비해 절반의 누적폐사율을 나타내었다.

그러므로 KC16-2는 *in vitro* 실험에서 vibrios에 대하여 광범위한 성장 억제 효과를 보였으며, 사료와 혼합하여 전복에 투여하였을 때 병원성을 가진 *V. tubiashii*에 대하여 폐사율을 감소시키는 결과를 보임으로써, 기회감염성 vibrios로 인한 전복의 폐사를 감소시키는 긍정적인 효과가 있을 것이라 사료되었다.

요 약

전복의 면역, 생리 및 생태에 관한 기초 연구는 매우 부족하며 전복 질병에 관한 연구 또한 어류에 비하여 극히 취약한 상태이다. 외국의 경우 전복 치패에서 vibrios로 인한 피해 사례가 많이 보고되어 있으나 우리나라에서는 세균성 질병으로 인한 전복 폐사에 관한 보고가 드물다. 그러나 폐사체로부터 vibrios가 높은 빈도로 분리되고 있어 이들 *Vibrio*속 세균과 전복 폐사와의 관련성에 대한 검토가 필요하다. 현재 전복 양식 현장에서는 질병으로 인한 피해를 최소화하기 위해 항균제를 사용하고 있지만 치료 효과는 미미한 수준이다. 이에 대한 대책으로 probiotics에 대한 요구가 증가하고 있어 본 연구에서는 인체에 위해하지 않은 균을 분리하여 전복 probiotics로서의 개발 가능성을 알아보았다. 잘 숙성된 김치액에서 분리된 균들 중 다양한 vibrios에 대하여 항균력을 나타낸 KC16-2를 candidate probiotic 균으로 선발하였다. KC16-2는 생화학적 특성과 16S rRNA gene sequence에 근거하여 *Bacillus amyloliquefaciens*로 동정되었다 (*B. amyloliquefaciens* KC16-2). *B. amyloliquefaciens* KC16-2는 *in vitro* 실험에서 병원성 비브리오에 대하여 광범위한 성장 억제 효과를 보였으며, 온도 15 ~ 25°C의 해수에서 4일까지 일정수를 유지하였으므로 겨울 이외의 기간에는 사용이 가능하다고 판단되었다. 또한 담즙에 의해 생장이 억제되었으나 시간 경과에 따라 처음 투여 농도보다 증가하는 양상이 관찰되어 담즙이 있는 곳에서도 생존 가능하다고 판단되었다. 시판 사료에 KC16-2를 혼합하여 12주간 전복에 투여하였을 때 대조구에 비해

다소 좋은 성장을 보였으나 통계학적으로 유의한 차이는 없었다. 한편 전복에 병원성을 가진 *Vibrio tubiashii*의 인위감염실험에서 probiotic사료를 공급한 수조에서 폐사율을 약 50% 감소시키는 결과를 나타냄으로써 기회성 vibrios로 인한 전복의 폐사를 줄이기 위하여 KC16-2의 사용이 긍정적으로 검토될 수 있음을 시사하였다.

References

- Bagheri, T., Hedayati, S. A., Yavari, V., Alizade, M. and Farzanfar, A.: Growth, survival and gut microbial load of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) fry given diet supplemented with probiotic during the two months of first feeding. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 8(1): 43-48, 2008.
- Balcázar, J. L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuola, I., Cunningham, D., Vendrell, D. and Muzquiz, J. L.: The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary microbiology* 114(3): 173-186, 2006.
- Banerjee, S., Devaraja, T. N., Shariff, M. and Yusoff, F. M.: Comparison of four antibiotics with indigenous marine *Bacillus* spp. in controlling pathogenic bacteria from shrimp and artemia. *J. Fish Dis.* 30, 383-389, 2007.
- Ghosh, K., Sen, S. K. and Ray, A. K.: Characterization of Bacilli isolated from the gut of rohu, *Labeo rohita*, fingerlings and its significance in digestion. *Journal of Applied Aquaculture* 12(3): 33-42, 2002.
- Hovda, M. B., Sivertsvik, M., ToreLunestad, B., Lorentzen, G. and Rosnes, J. T.: Characterisation of the dominant bacterial population in modified atmosphere packaged farmed halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) based on 16S rDNA-DGGE. *Food microbiology* 24(4): 362-371, 2007.
- Iehata, S., Inagaki, T., Okunishi, S., Nakano, M., Tanaka, R. and Maeda, H.: Colonization and probiotic effects of lactic acid bacteria in the gut of the abalone *Haliotis gigantea*. *Fisheries Science* 75(5): 1285-1293, 2009.
- Kennedy, B. S., Tucker Jr, J. W., Neidig, C. L., Vermeer, G. K., Cooper, V. R., Jarrell, J. L. and Sennett, D. G.: Bacterial management strategies for stock enhancement of warmwater marine fish: a case study with common snook (*Centropomus undecimalis*). *Bulletin of Marine Science* 62(2): 573-588, 1998.
- KNSO: KOSIS Statistical DB. Korea National Statistical Office, Daejeon, Korea, 2013.
- Liu, P. C., Chen, Y. C., Huang, C. Y., Lee, K. K.: Virulence of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from cultured small abalone, *Haliotis diversicolor super-texta*, with withering syndrome. *Letters in applied microbiology* 31(6): 433-437, 2000.
- Macey, B. M. and Coyne, V. E.: Improved growth rate and disease resistance in farmed *Haliotis midae* through probiotic treatment. *Aquaculture* 245(1-4): 249-261, 2004.
- Macey, B. M. and Coyne, V. E.: Colonization of the gastrointestinal tract of the farmed south african abalone *Haliotis midae* by the probionts *Vibrio midae* SY9, *Cryptococcus* sp. SS1, and *Debaryomyces hansenii* AY1. *Marine Biotechnology* 8(3): 246-259, 2006.
- Raida, M., Nielsen, M. E. and Buchmann, K.: Enhanced resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Yersinia ruckeri* challenge following oral administration of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* (BioPlus2B). *Journal of Fish Diseases* 26(8): 495-498, 2003.
- ten Doeschate, K. I. and Coyne, V. E.: Improved growth rate in farmed *Haliotis midae* through probiotic treatment. *Aquaculture* 284(1-4): 174-179, 2008.
- Tomoo, S., Sahoko, I., Youhei, F., Kaoru, Y., Yutaka, N. and Hiroki, M.: Mass mortality of japanese abalone *Haliotis discus hannai* caused by *Vibrio harveyi* infection. *Microbes and Environments* 22: 300-308, 2007.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P. and Verstraete, W.: Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and molecular biology reviews* 64(4): 655-671, 2000.
- Walker, D. K. and Gilliland, S. E.: Relationships among bile tolerance, bile salt deconjugation and assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Science* 76(4): 956-961, 1993.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. and Lane, D. J.: 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173, 697-703, 1991.
- Ziaei-Nejad, S., Rezaei, M. H., Takami, G. A., Lovett, D. L. and Mirvaghefi, A. R.: The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture* 252

- (2): 516-524, 2006.
- 국립수산진흥원: 건강어류 생산을 위한 어병예방 및 치료대책, 2000.
- 김병학, 박민우, 손맹현, 김태익, 명정인: 해상가두리 및 실내 육상수조에서 북방전복, *Haliotis discus hannai* 치패의 적정 수용밀도에 관한 연구. 한국패류학회지, 29(3), 189-195, 2013.
- 박철지, 남원식, 이정호, 노재구, 김현철, 박종원, 황인준, 김성연: 북방전복(*Haliotis discus hannai*)의 mitochondrial DNA 영역별 유전적 변이성 분석. 한국패류학회지, 29(4), 335-341, 2013.
- 신세연: 해양 생물 유래 *Bacillus* 균주의 계통 관계 및 생리화학적 특성 분석. 순천대학교 교육대학원. 순천, 2013.
- 이민영, 김은희: Candidate probiotic bacteria의 어류병원성 *Streptococcus* sp. 성장에 대한 억제 효과. 한국어병학회지, 27, 107-114, 2014.
- 한국과학기술연구원: Probiotics의 연구개발 동향, 2006.
- 한석중: 전복양식. 도서출판 구덕. 부산, 1998.

Manuscript Received : August 6, 2015

Revised : November 10, 2015

Accepted : November 10, 2015