

< Original Article >

왕우럭(*Tresus keenae*)에서 분리된 *Bacillus* species의 고분자 유기물질 분해능력과 항균활성

이승원^{1,2} · 문성현² · 조호성² · 김철원^{1*}

한국농수산대학 수산양식학과¹, 전북대학교 특성화캠퍼스 수의과대학 및 생체안전성 연구소²

Degradation capability of macromolecular organic matters and antimicrobial activities of *Bacillus* species isolated from surf clam (*Tresus keenae*)

Seung-Won Yi^{1,2}, Sung-Hyun Moon², Ho-Seong Cho², Chul-Won Kim^{1*}

¹Department of Aquaculture, Korea National College of Agriculture and Fisheries, Jeonju 54874, Korea

²College of Veterinary Medicine and Bio-Safety Research Institute, Chonbuk National University, Iksan 54596, Korea

(Received 7 December 2017; revised 20 December 2017; accepted 21 December 2017)

Abstract

The production of enzymes that help digestion, assimilation of essential nutrients, and prevent pathogenic bacteria are important for probiotics used in aquaculture. The objective of this study was to investigate enzyme activities for macromolecular organic matters and antimicrobial properties of the selected potential probiotics isolated from gut of surf clam (*Tresus keenae*) against well-known shellfish-pathogenic bacteria. Among 65 isolates from guts of 60 surf clams, seven *Bacillus* strains with outstanding degradation capability of macromolecule organic matter were selected as potential probiotics as follows: TKI01 (*B. vietnamensis*), TKI02, TKI26 (*B. thuringiensis*), TKI14, TKI32, TKI42 (*B. amylo-liquefaciens*), and TKI18 (*B. stratosphericus*). After *in vitro* antimicrobial activity test was performed against five shellfish-pathogenic bacteria including *Listonella anguillarum*, *Vibrio parahaemolyticus*, *V. splendidus*, *V. harveyi*, *V. tubiashii*, PCR assay was performed to detect bacteriocin-producing strain. PCR results revealed that the five *Bacillus* strains possessed diverse bacteriocin genes including ericinA, coagulins, surfactin, iturin, bacylomycin, fengycin, bacylisin, subtilin, and lantibiotics. In the present study, the selected seven *Bacillus* strains showed different enzyme activities according to types of macromolecule organic matters. And their antimicrobial activities varied based on the species of pathogenic bacteria. In addition, at least five *Bacillus* strains had genetic potential to produce several natural lipopeptide antibiotics that may help biological control of surf clam aquaculture. Therefore, mixed use of probiotics might show co-operative effect and increase the efficiency of probiotics rather than separate use. To the best of our knowledge, it is the first report on antimicrobial properties of *Bacillus* species isolated from surf clam.

Key words : Surf clam, *Tresus keenae*, Shellfish probiotics, *Bacillus* spp., Bacteriocin

서 론

왕우럭(*Tresus keenae*)은 개량조개과(Mactridae), 왕

우럭속(*Tresus*)에 속하는 비부착성 대형 패류로 한국과 일본에만 분포한다. 우리나라에서는 거제, 사천, 남해, 여수 등의 연안 바다에서 수심 5~20 m 전후의 사니질에 잠입하여 서식하는 특산종으로 자원량이 적은 편이다. 대부분은 일본에 수출되는 고가의 조개

*Corresponding author: Chul-Won Kim, Tel. +82-63-238-9250,
Fax. +82-63-238-9039, E-mail. aquaworld@korea.kr

이지만, 모패로 성장하기까지 2~3년 이상의 오랜 시간이 걸릴 뿐 아니라 현재는 남획으로 인하여 자연 자원량이 점차 감소하고 있는 실정이다. 게다가 왕우럭의 채집은 잠수부가 수심 20 m 전후에서 분사식 고압펌프를 이용하여 모래를 흩어낸 후 채취하는 방법으로 이루어져, 채집 대상인 왕우럭 성체뿐 아니라 주변 유생의 서식지도 파괴되어 자연 자원량의 감소를 심화시키고 있다.

따라서 왕우럭의 자원 조성이나 양식 산업화를 위한 인공종묘생산 기술개발이 시도되고 있지만 생태나 번식에 관한 기초자료의 부족으로 제약을 받고 있으며, 수행된 연구 마저도 대부분 일본에서 수행된 것이다. 국내에서는 1999년과 2005년에 왕우럭의 생식주기(Kim 등, 1999), 배우자 형성과정의 미세구조(Kim 등, 2005) 등의 성패를 대상으로 한 연구 보고가 있었을 뿐, 인공 종묘 치패에 관한 연구는 거의 없는 실정이다. 특히 왕우럭은 인공 종묘 생산이 이루어지고는 있으나 인위적 환경에서 유생 치패의 생존율이 낮아 대부분의 생산을 개체의 자연적인 성장과 번식에 기대고 있다.

최근, 어류 양식 분야에서는 프로바이오틱스 생균제를, 새우 양식 분야에서는 바이오플록 등 유용 미생물을 양식현장에 적용하여 개체들의 영양 성분의 소화 및 흡수를 돕고 사육수의 수질을 개선시키며 통상적인 방법으로는 양식이 어려운 수산자원의 대량 생산 및 친환경 양식에 이바지하고 있다(Bidhan 등, 2014; Taoka 등, 2006; Kim 등, 2015; Park 등, 2016; Xie 등, 2013). 이러한 유용미생물을 이용한 양식은 국내에서는 어류, 갑각류에 비해 패류에서는 그 도입이 늦은 편이지만 외국의 경우 그 시도와 연구가 활발히 진행되고 있다. 최근 Park 등(2016)은 패류인 전복에 *Bacillus amyloliquefaciens*를 프로바이오틱스 균주로 적용하여 성장율과 생존을 개선한 바 있어, 국내에서도 패류의 인공종묘 생산 현장에 프로바이오틱스를 적용하여 생산 효율 개선을 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

프로바이오틱스 세균은 소화 및 흡수를 돕는 기능에 더하여 여러 종류의 bacteriocin을 생산하여 항균력을 나타낼 경우 더욱 효율적일 수 있다(Muñoz-Atienza 등, 2013). 세균이 생산할 수 있는 단백질 항균 물질인 bacteriocin은 유해 세균의 억제 또는 사멸에 효과적이라고 알려져 있는데, 특히 패류에서는 전복에서 oxytetracycline을 제외하고는 항생제의 사용이 금지되어 있기 때문에 왕우럭의 인공종묘 생산 현장에서 유

해 세균을 억제하는데 기여할 수 있을 것이다(Barbosa 등, 2010; Desriac 등, 2010; Prieto 등, 2012). Bacteriocin은 단백질성 천연 항생 물질이기 때문에 인체 내의 소화액과 가수분해 효소들에 의해 쉽게 분해될 수 있어 잔류성이 적고 인체에도 무해하다고 알려져 있다(Cleveland 등, 2001; Lee 등, 2005). Bacteriocin은 젓산균 다음으로는 *Bacillus* spp.에서 가장 많이 연구되어 있는데, 그 항균활성 때문에 *Bacillus*와 관련된 bacteriocin은 식품, 농업, 제약산업에의 적용 가능성이 고려되고 있다(Abriouel 등, 2010; Lee와 Kim, 2011).

따라서 본 연구에서는 왕우럭의 소화관에서 잠재적 패류의 프로바이오틱스 균주로서, 고분자 유기물질의 소화와 흡수를 도울 수 있는 균주를 선별하여 잘 알려진 패류 병원체에 대해 항균활성을 탐구하고, PCR을 통해 항균력의 배경 물질을 밝혀내고자 하였다.

재료 및 방법

균주의 분리

본 연구에 사용된 왕우럭(*Tresus keenae*)은 잠수기 어업을 이용하여 포획되었으며 여수의 한 양식업체를 통해 여름과 가을에 각각 30마리씩 구입하였다. 채집한 개체는 각고, 각장, 각폭을 측정 후 탈염 수돗물로 2~3회 정도 세척하여 불순물을 제거한 뒤 멸균된 해부용 칼을 이용하여 패각과 근육을 제거하고 소화관을 분리하였다. 분리된 왕우럭 각 개체의 장은 상온의 멸균 PBS에 3회 세척하였고 무게를 측정 후 균질화기기(Omni homogenizer, Waterbury, CT)를 사용하여 마쇄하였다. 마쇄액은 PBS에 10:1, 100:1로 희석하여 tryptic soy agar (TSA), 2% NaCl을 첨가한 TSA, marine agar (MA), MRS agar 배지에 도말하여 25°C에서 48시간까지 배양하였으며, 24시간째, 48시간, 72시간째에 세균의 성장을 확인 후 모양, 색, 크기가 다른 colony를 분리하여 MA에 순수배양하였다. 순수배양한 세균은 단일 colony로 성장한 것을 확인한 뒤 marine broth (MB), TSB, BHI 배지에 옮겨 증강 배양 하였고, 25% glycerol이 첨가된 MB 배지에 현탁시켜 -70°C에 보관하였다.

DNA 추출

각 균주의 DNA 추출은 DNeasy Blood & Tissue kit

(Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 수행하였다. 추출된 DNA는 Epoch spectrophotometry의 take 3 session (Biotek, MA, USA)을 이용해 260 nm, 280 nm, 320 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

16s rRNA 유전자를 이용한 세균의 동정

27F, 1492R primer를 이용해 DNA Engine Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad, CA, USA)로 PCR을 수행하여 16s rRNA 유전자를 증폭하였다. PCR 산물은 정제 후 BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)을 사용해 시퀀싱 반응을 진행하였고 잔여 dNTP와 반응물을 제거한 후 ABI 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, CA, USA)를 사용하여 염기서열을 분석하였다(Macrogen, Daejeon, Korea). 분석된 16s rRNA 유전자 염기서열은 BioEdit software (Hall, 1999)와 SeqMan software (DNA-STAR, WI, USA)를 이용하여 trimming, alignment, assembly를 수행한 뒤 BLAST search (NCBI, MD, USA)를 이용하여 각 세균을 동정하였다. BLAST search만으로 종 단위까지 정확한 동정이 어려운 경우, 각 세균의 genus에 속하는 type strain을 수집하여 염기서열의 상동성 비교 및 계통분석을 실시하여 동정하였다. 분리주와 type strain과 염기서열은 BioEdit software (Hall, 1999)와 Clustal omega (EBI, Cambridge, UK)를 이용해 multi-alignment 후, MEGA6 software (Tamura 등, 2013)를 이용해 계통 분석을 실시하였다. 계통분석은 neighbor-joining method와 Kimura-2 parameter를 이용하여 수행하였고 1,000회의 bootstrap 분석을 통해 계통분석의 신뢰도를 평가하였다.

고분자 유기물질 분해능 시험

분리된 세균의 고분자 유기물질 분해능을 시험하기 위해 DNA 분해능 시험용 DNase test agar (MBCell, CA, USA) 배지를 제외하고는 모두 MA 배지를 사용하였다. 배지에는 각각 carboxymethylcellulose (cellulose; Merck Millipore, MA, USA), starch (Merck Millipore), skim milk (BD, NJ, USA), tween 20 (Merck Millipore), tween 40 (Merck Millipore), tween 60 (Merck Millipore), tween 80 (Merck Millipore)을 각각 1%씩 첨가해 목적인 배지를 만들었다. MA에 배양한 세균 분리주를 각각의 colony를 멸균 PBS에 섞어 McFarland 0.5로 탁

도를 조정된 뒤 그 균액을 8 mm의 paper disk에 100 μ L씩 흡수시켰다. 균액이 흡수된 paper disk는 각각의 배지에 접촉하여 25°C에서 48시간까지 배양한 뒤 분해능을 확인하였다.

DNA 분해능 시험은 분리주가 접종된 DNase test agar에 1N HCl을 부어 투명대 형성 여부로 DNase의 생성을 확인하여 수행하였다. 1% cellulose가 첨가된 MA 배지 위에는 0.1% congo-red solution을 떨어뜨린 뒤 30분 후 1M NaCl로 세척하여 배양된 세균의 주변부에서 희미한 노란색의 띠를 확인하여 cellulose 생성 여부를 확인하였다. Starch 분해능 시험은 1% Starch를 첨가한 MA 배지에 접종된 분리주의 paper disk를 올리고 48시간까지 배양하여 수행하였다. 이후, paper disk 주변에 Lugol's iodine을 떨어뜨려 주변부의 색 변화를 관찰하여 amylase의 생성 여부를 확인하였다. 진한 청색으로 변한 경우 음성, 투명대가 나타난 경우 양성으로 판정하였다. Cellulose 분해능 시험은 1% Cellulose를 첨가한 MA 배지에 접종된 분리주의 paper disk를 올리고 48시간까지 배양하여 수행하였다. 이후, paper disk 주변에 0.1% Congo red solution을 떨어뜨리고 30분간 염색한 뒤 1M NaCl로 세척하여 배양된 세균의 주변부의 색 변화로 cellulase의 생성 여부를 확인하였다. 색의 변화가 없는 경우 음성, 희미한 노란색~투명하게 나타날 경우 양성으로 판정하였다. Casein 분해능 시험은 1% Skim milk를 첨가한 MA 배지에 접종된 분리주의 paper disk를 올리고 48시간까지 배양하여 수행하였다. 이후, 배양된 세균의 주변부에 투명대가 형성되는지 확인하여 proteinase (caseinase)의 생성 여부를 확인하였다. Tween 분해능 시험: 각각 1% Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80을 첨가한 MA 배지에 접종된 분리주의 paper disk를 올리고 48시간까지 배양하였다. 이후, 배양된 세균의 주변부가 탁하게 변했는지 여부를 통해 lipase (tweenase)의 생성 여부를 확인하였다. 고분자 유기물질 분해능력이 뛰어난 9개의 균주를 선별하였다.

선별된 *Bacillus spp.* 균주의 패류병원성 세균에 대한 항균활성 탐색

본 실험에 사용된 패류 병원성 세균은 *Listonella anguillarum* KCTC 2711, *Vibrio parahaemolyticus* KCTC 2729, *V. splendidus* KCTC 12679, *V. harveyi* KCTC 12724, *V. tubiashii* KCTC 12729 균주로 한국생명공학연구원 생물자원센터(Korean Collection for

Type Cultures, KCTC)에서 분양받아 사용하였다. MA 배지에 25°C에서 배양하여 2회 계대배양한 뒤 사용하였다. 병원체 세균들은 탁도를 MacFarland turbidity 0.5로 조정하여 MA에 200 µL씩 도말하였다. 한편, 고분자 유기물질 분해능 시험을 통해 선별된 왕우력 장내 미생물(이하, 선별균주)은 각 균주에 적절한 액체배지에 접종하여 25°C에서 48시간 동안 배양하였다. 배양액은 8000 RPM에서 20분 동안 원심분리하여 상층액을 항균활성 시험에 사용하였다. 분리된 선별균주의 상층액은 0.45 µm syringe filter (Advantec, Tokyo, Japan)를 이용해 여과하였고, 멸균된 pipet tip을 이용해 병원체 세균이 도말된 배지 위에 8 mm의 hole을 만들어 100 µL씩 선별 균주의 여과 상층액을 접종하였다. 항균활성 시험 plate는 25°C에서 각 균주의 성장속도에 따라 24, 48, 72시간까지 배양되었다. 선별균주의 상층액이 접종된 hole 주변에 형성된 억제환은 24시간 단위로 관찰 및 측정되었다.

패류 병원성 세균에 대한 항생제 감수성 시험

잘 알려진 5종의 패류 병원성 세균에 대해, 선별된 7개 *Bacillus* spp. 균주의 항균활성과 항생제의 항균활성을 비교하기 위해 양성 대조군으로서 다양한 항생제가 포함된 8 mm의 항생제 디스크를 이용한 디스크 확산법으로 항생제 감수성 시험을 수행하였다. 접종액은 MA에 배양한 병원체 세균의 colony를 멸균 saline에 현탁하여 탁도를 0.5 McFarland로 조정하여 준비하였고, Mueller-Hinton agar (Oxoid, Hampshire, UK)에 면봉으로 골고루 도말하였다. 균이 접종된 배지 위에 항생제 disc를 올려 25°C에서 48시간까지 배양하였고, 항생제 디스크 주변에 형성된 억제환의 지름을 측정하여 기록하였다. 사용된 항생제 디스크는 ampicillin (Oxoid, 10 µg), cefaclor (BD, 30 µg), cefazolin (BD, 30 µg), colistin (Oxoid, 10 µg), erythromycin (BD, 15 µg), florfenicol (Oxoid, 30 µg), flumequine (Oxoid, 30 µg), gentamicin (BD, 10 µg), nalidixic acid (Oxoid, 30 µg), oxytetracycline (BD, 30 µg) 등 총 10종류였다.

선별된 *Bacillus* spp. 균주의 Bacteriocin 유전자 검출

항균력 시험 결과를 바탕으로 선별된 7주의 *Bacillus* 균주들이 알려진 bacteriocin 유전자를 보유하고 있는지 탐색하기 위해 PCR 분석을 수행하였다.

선별 균주의 항균 활성의 유전적 배경 탐색에 사용된 프라이머의 염기서열 및 annealing temperature 등 자세한 정보는 Table 1에 정리하였다. PCR 반응은 94°C에서 5분 initial denaturation 후 총 35 cycle로 94°C에서 30초, annealing temperature에서 30초, 72°C에서 30초를 수행하였으며, 마지막으로 72°C에서 5분 final extension의 과정으로 수행되었다. 증폭된 PCR product는 Redsafe (Intron, Daejeon, Korea)를 첨가한 1.5% TBE agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다.

결 과

세균의 분리 및 동정

여름에 채집된 왕우력($n=30$)의 소화관에서는 43주, 가을에 채집된 왕우력($n=30$)의 소화관에서는 22주 총 65주의 분리주가 수집되었다. 그 중에서 여름에 수집한 왕우력 분리주 43주는 19개의 속과 종 수준에서 동정되지 않은 세균 2종을 포함하여 36개의 종으로 구성되어 있었고, 가을철에 수집한 왕우력 장 분리주 22개는 10개의 속과 종 수준에서 동정되지 않은 세균 5종을 포함하여 19개의 종으로 구성되어 있었다(Table 2). 선별 및 분양을 통해 본 연구에 사용된 균주는 Table 3에 정리하였다.

선별된 *Bacillus* 균주의 고분자 유기물질 분해능 시험

시험 결과를 바탕으로 전체 균주들 중 고분자 유기물질 분해능이 뛰어난 7개의 *Bacillus* 속 균주를 선별하였다(Fig. 1, Table 4). DNase 배지에 선별 균주의 균액을 접종한 paper disk를 놓고 배양한 뒤 1M HCl을 떨어뜨렸을 때 TKI01, TKI14, TKI18, TKI32, TKI42 균주의 주변에는 뚜렷한 투명대가 형성되어 DNase 활성을 가지고 있는 것으로 나타났다. 또, cellulose가 함유된 배지에 균액을 접종한 paper disk를 놓고 48시간 배양한 뒤 congo-red (0.1%)로 염색하여 30분 후 1M NaCl로 세척한 결과, TKI01, TKI18, TKI42 균주 주변에는 희미한 노란색이 테두리가 나타나 cellulase 활성을 가지는 것으로 판정하였다. Starch를 함유한 배지에 균액을 접종한 paper disk를 놓고 배양한 뒤 Lugol's solution을 떨어뜨린 결과, TKI01, TKI02, TKI14, TKI32 균주의 주변에 투명대가 형성되어 amylase 활성을 가지는 것으로 판정하였고, 나머지 균주

Table 1. List of PCR primer sets used for detection of antimicrobial substance-encoding genes used in the present study

Target Gene	Primer	Sequences (5' → 3')	Annealing temperature (°C)	Product size (bp)	Reference
Subtilin	Spa-F	ACTATGAATCAATGGAAGG	50	370	Barbosa, 2010
	Spa-R	TTGCAGTTACAAGTTAGTG			
	spaS-F	GGTTTGTGGATGGAGCTGT	60	375	Mora et al, 2011
	spaS-R	GCAAGGAGTCAGAGCAAGGT			
Subtilosin	Sbo-F	GGTTGTGCAACATGCTCGAT	58	300	Barbosa, 2010
	Sbo-R	CTCAGGAAGCTGGTGAAGTC			
Sublancin	Sun-F	GTGTGCTGCGTTGTGGCTACAA	62	230	Barbosa, 2010
	Sun-R	TTGACGAGATACAAGCTAGTCC			
Coaguln	CoaA-F	GGTGGTAAATACTACGGTAATGGGGT	66	~600	Riazi et al, 2009
	CoaA-R	GTGTCTAAATTACTGGTTGATTCTGT			
Mersacidin	MrsA-F	CTTAATAAGGGGGTAATAC	56	270	Prieto et al, 2012
	MrsA-R	TAGGCTGTTCTTCTGAAGG			
Lichenicidin	Bli04127-F	GGAAATGATCTTTCATGG	60	215	Prieto et al, 2012
	Bli04127-R	TTAGTTACAGCTTGGCATG			
Eriцин A	EriSa-F	TGTCAAAGTTCGATGACTTC	56	171	Prieto et al, 2012
	EriSa-R	TCAGCACTTAGCAAATGTTG			
Haloduracin A1	BH0454-F	ATGGAAAATGCCTCTTGAG	54	191	Prieto et al, 2012
	BH0454-R	TTAGTTGCAAGAAGGCATG			
Haloduracin A2	BH0453-F	TTAGCACTGGCTTGTACACT	58	180	Prieto et al, 2012
	BH0453-R	TTGCGTAATCCTGAATTCCG			
Thuricin17	TucA123-F	GTAGGTCAAATGGAAACAC	52	589	Prieto et al, 2012
	TucA123-R	TTAACTTGCAGTACTAGCTC			
ThuricinH	H123-F	ATGGAAACACCAGTAGTACA	56	579	Prieto et al, 2012
	H123-R	TTAACTTGCAGTACTAGCTC			
Megacin A-216	P293A-F	TTACATACCATGAGAAGCGCAT	66	519	Prieto et al, 2012
	P293A-R	CATGTTAGTGCAGTTTACCTTC			
Cerein 7B	Cer7B-F	ATAGCTGGGGTAAATGTGTTG	62	153	Prieto et al, 2012
	Cer7B-R	AAAGTAGCTGCACCTGTAAG			
Class I-Type IIantibiotic	LanC-F	TAATTTAGGATWISYIMAYGG	40	~250	Wirawan et al, 2006
	LanC-R	ACCWKGIIICCRTRRCACCA			
	LanB-F	TATGATCGAGAARYAKAWAGATATGG	44	~400	Wirawan et al, 2006
	LanB-R	TTATTAIRCAIATGLAYDAWACT			
Class I-Type IIIantibiotic	LanM-F	TTGCWAGWYWTGRCWCATGG	49	330	Hyink et al, 2005
	LanM-R	CCTAATGAACCRTRRYAYCA			
Fengycin	fenD-F	GGCCCGTCTCTAAATCCAT	58	269	Mora et al, 2011
	fenD-R	GTCATGCTGACGAGAGCAAA			
Bacylloicin	bmyB-F	GAATCCCGTGTCTCCAAA	55	370	Mora et al, 2011
	bmyB-R	GCGGTATTGAATGCTTGT			
Iturin	ituC-F	GGCTGCTGCAGATGCTTTAT	58	423	Mora et al, 2011
	ituC-R	TCGCAGATAATCGCAGTGAG			
Surfactin	srfA-F	TCGGGACAGGAAGACATCAT	60	201	Mora et al, 2011
	srfA-R	CCACTCAAACGGATAATCCTGA			
Bacylisin	bacA-F	CAGCTCATGGGAATGCTTTT	56	498	Mora et al, 2011
	bacA-R	CTCGGTCCTGAAGGGACAAG			

는 투명대가 나타나지 않은 채 보라색으로 염색되어 amylase 활성이 없는 것으로 판정하였다. Skim milk를 함유한 배지에 균액을 접종한 paper disk를 놓고 배양한 결과, TKI01, TKI02, TKI14, TKI18, TKI26, TKI32 균주주변에는 투명대가 형성되어 casein 분해 효소 활성이 있는 것으로 나타났다. 한편, Tween 20, tween

40, tween 60, tween 80이 포함된 각각의 배지에서는 균액을 접종한 paper disk를 놓고 배양한 뒤 주변이 뿌옇게 변하는 것을 확인하여 tweenase (lipase) 활성을 확인하였다. TKI02, TKI14, TKI18, TKI26, TKI42 균주들은 분자량이 다른 tween을 모두 분해할 수 있는 것으로 나타났으나, TKI01 균주는 tween 20,

Table 2. The 65 isolates isolated from gut of Surf clam (*Tresus keenae*)

Isolate	Season	Identification	Isolate	Season	Identification
TKI1	Summer	<i>Bacillus vietnamensis</i>	TKI39	Summer	<i>Neisseria flavescens</i>
TKI2	Summer	<i>Bacillus thuringiensis</i>	TKI40	Summer	<i>Lactococcus lactis</i>
TKI3	Summer	<i>Streptococcus parauberis</i>	TKI41	Summer	<i>Lactococcus lactis</i>
TKI4	Summer	<i>Pseudomonas pachastrellae</i>	TKI42	Summer	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
TKI5	Summer	<i>Vagococcus carniphilus</i>	TKI43	Summer	<i>Kurthia gibsonii</i>
TKI6	Summer	<i>Tenacibaculum lutimaris</i>	TKI45	Summer	<i>Shewanella colwelliana</i>
TKI7	Summer	<i>Shewanella gaetbuli</i>	TKI47	Summer	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
TKI8	Summer	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	TKI48	Summer	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
TKI9	Summer	<i>Bacillus aquimaris</i>	TKI49	Summer	<i>Vibrio neocaledonicus</i>
TKI10	Summer	<i>Vibrio alginolyticus</i>	TKI50	Summer	<i>Streptococcus mitis</i>
TKI11	Summer	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	TKI51	Autumn	<i>Shewanella</i> sp.
TKI12	Summer	<i>Acinetobacter venetianus</i>	TKI52	Autumn	<i>Enterococcus faecalis</i>
TKI14	Summer	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	TKI53	Autumn	<i>Microbacterium oxydans</i>
TKI15	Summer	<i>Psychrobacter nivimaris</i>	TKI54	Autumn	<i>Marinomonas pontica</i>
TKI16	Summer	<i>Vibrio natriegens</i>	TKI55	Autumn	<i>Bacillus vietnamensis</i>
TKI17	Summer	<i>Planococcus</i> sp.	TKI56	Autumn	<i>Shewanella arctica</i>
TKI18	Summer	<i>Bacillus stratosphericus</i>	TKI57	Autumn	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
TKI19	Summer	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	TKI58	Autumn	<i>Psychrobacter glacincola</i>
TKI20	Summer	<i>Microbacterium flavum</i>	TKI59	Autumn	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.
TKI21	Summer	<i>Acinetobacter towneri</i>	TKI64	Autumn	<i>Staphylococcus hominis</i>
TKI22	Summer	<i>Staphylococcus stepanovicii</i>	TKI66	Autumn	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.
TKI23	Summer	<i>Microbacterium esteraromaticum</i>	TKI67	Autumn	<i>Shewanella fidelia</i>
TKI26	Summer	<i>Bacillus thuringiensis</i>	TKI68	Autumn	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.
TKI27	Summer	<i>Pantoea ananatis</i>	TKI69	Autumn	<i>Psychrobacter fozii</i>
TKI28	Summer	<i>Myroides pelagicus</i>	TKI70	Autumn	<i>Shewanella</i> sp.
TKI29	Summer	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	TKI71	Autumn	<i>Tenacibaculum discolor</i>
TKI30	Summer	<i>Lactococcus raffinolactis</i>	TKI72	Autumn	<i>Colwellia aestuarii</i>
TKI31	Summer	<i>Vibrio</i> sp.	TKI73	Autumn	<i>Shewanella</i> sp.
TKI32	Summer	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	TKI74	Autumn	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.
TKI33	Summer	<i>Enterococcus devriesei</i>	TKI75	Autumn	<i>Shewanella arctica</i>
TKI34	Summer	<i>Vagococcus carniphilus</i>	TKI76	Autumn	<i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i>
TKI36	Summer	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	TKI77	Autumn	<i>Psychrobacter piscatorii</i>
TKI37	Summer	<i>Bacillus galactosidilyticus</i>			

Table 3. Information of bacterial strains used in this study

Classification	Strain	Species	Source	Culture	
				Medium	Temperature
Potential Probiotics	TKI01	<i>Bacillus vietnamensis</i>	This study	MA, MB	25°C
	TKI02	<i>Bacillus thuringiensis</i>	This study	BHIA, BHIB	25°C
	TKI14	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	This study	TSA, TSB	25°C
	TKI18	<i>Bacillus stratosphericus</i>	This study	TSA, TSB	25°C
	TKI26	<i>Bacillus thuringiensis</i>	This study	BHIA, BHIB	25°C
	TKI32	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	This study	BHIA, BHIB	25°C
	TKI42	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	This study	BHIA, BHIB	25°C
Well-known Shellfish-Pathogenic Bacteria	KCTC2711	<i>Listonella anguillarum</i>	KCTC	MA, MB	25°C
	KCTC2729	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	KCTC	MA, MB	25°C
	KCTC12679	<i>Vibrio splendidus</i>	KCTC	MA, MB	25°C
	KCTC12724	<i>Vibrio harveyi</i>	KCTC	MA, MB	25°C
	KCTC12729	<i>Vibrio tubiashii</i>	KCTC	MA, MB	25°C

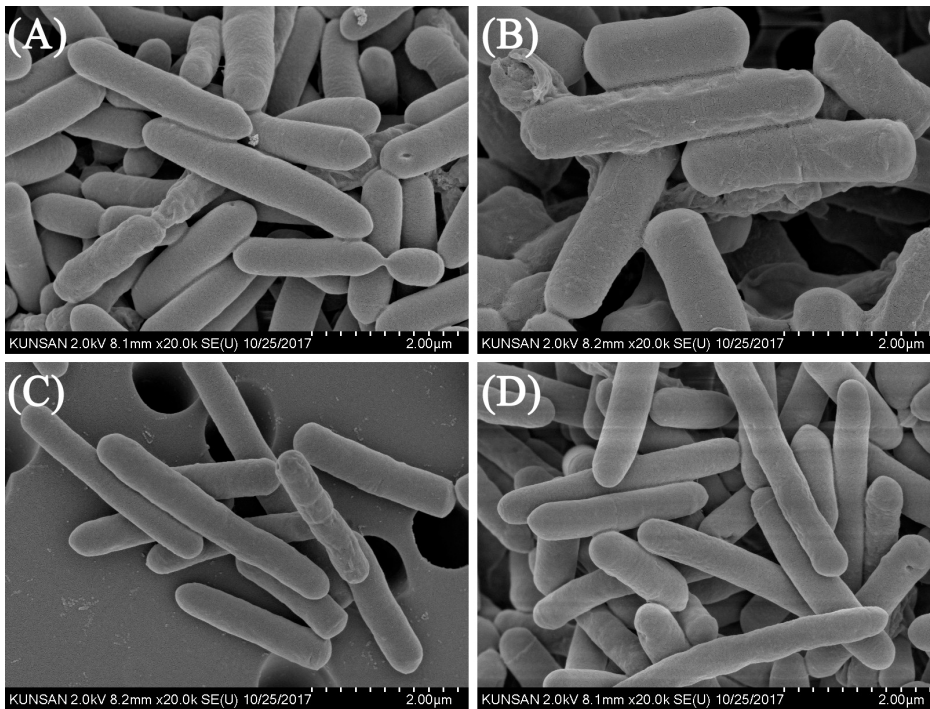


Fig. 1. Scanning electron micrographs of (A) *Bacillus vietnamensis* (TKI01 strain), (B) *B. thuringiensis* (TKI02, TKI26 strains), (C) *B. stratosphericus* (TKI18 strain), and (D) *B. amyloliquefaciens* (TKI14, TKI32, TKI42 strains) with magnification 20000X.

Table 4. Evaluation of enzyme activities for macromolecular organic matters in nine selected bacteria isolated from surf clam (*Tresus keenae*)

Isolate	Species	DNA	Starch	Cellulose	Skim milk	Tween			
						20	40	60	80
TKI01	<i>B. vietnamensis</i>	+	+	+	+	-	+	+	+
TKI02	<i>B. thuringiensis</i>	-	+	-	+	+	+	+	+
TKI14	<i>B. amyloliquefaciens</i>	+	+	-	+	+	+	+	+
TKI18	<i>B. stratosphericus</i>	+	-	+	+	+	+	+	+
TKI26	<i>B. thuringiensis</i>	-	-	-	+	+	+	+	+
TKI32	<i>B. amyloliquefaciens</i>	+	+	-	+	-	-	+	+
TKI42	<i>B. amyloliquefaciens</i>	+	-	+	-	+	+	+	+

Table 5. Evaluation of antimicrobial activity by measuring the inhibition zone diameter surrounding the 8-mm hole filled with supernatants of seven selected *Bacillus* spp. strains

Strain	Species	<i>Listonella</i>	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio splendidus</i>	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Vibrio tubiashii</i>
		<i>anguillarum</i> strain KCTC 2711	<i>parahaemolyticus</i> strain KCTC 2729	strain KCTC 12679	strain KCTC 12724	strain KCTC 12729
TKI01	<i>B. vietnamensis</i>	13±4.24	-	9	-	-
TKI02	<i>B. thuringiensis</i>	11±2.83	-	9	-	-
TKI14	<i>B. amyloliquefaciens</i>	11.5±0.71	17.5±7.78	10	28.5±6.36	-
TKI18	<i>B. stratosphericus</i>	29.5±4.95	16±7.07	10.5±0.71	30	26.5±7.78
TKI26	<i>B. thuringiensis</i>	11±2.83	-	-	10.5±2.12	19±4.24
TKI32	<i>B. amyloliquefaciens</i>	10.5±2.12	-	9	22±8.49	-
TKI42	<i>B. amyloliquefaciens</i>	-	-	-	23.5±7.78	14±1.41

Mean±SD (Unit: mm).

Table 6. The measurement of the inhibition zone diameter surrounding antimicrobial disks

Antimicrobial	Content	<i>Listonella anguillarum</i> strain KCTC 2711	<i>Vibrio</i> <i>parahaemolyticus</i> strain KCTC 2729	<i>Vibrio splendidus</i> strain KCTC 12679	<i>Vibrio harveyi</i> strain KCTC 12724	<i>Vibrio tubiashii</i> strain KCTC 12729
Ampicillin	10 µg	10	22	12	15	26
Erythromycin	15 µg	16	17	13	15	15
Gentamicin	10 µg	14	17	9	16	0
Cefazolin	30 µg	14	23	18	17	24
Florfenicol	30 µg	42	38	39	34	42
Cefaclor	30 µg	21	30	30	24	26
Flumequine	30 µg	30	13	15	16	20
Nalidixic acid	30 µg	23	9	12	12	13
Colistin	10 µg	9	20	19	9	14
Oxytetracycline	30 µg	0	0	13	0	21

Mean±SD (Unit: mm).

Table 7. The bacteriocin genes amplified by PCR in seven selected *Bacillus* spp

Strain	Species	Amplified Bacteriocin Genes
TKI01	<i>B. vietnamensis</i>	
TKI02	<i>B. thuringiensis</i>	Class I-Type I Lantibiotic (<i>LanC</i>), Bacylisin, Subtilin
TKI14	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Fengycin, Surfactin, Bacylisin
TKI18	<i>B. stratosphericus</i>	Fengycin
TKI26	<i>B. thuringiensis</i>	
TKI32	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Coagulin, Ericin A, Fengycin, Iturin, Surfactin, Bacylisin, Bacylloomicin
TKI42	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Fengycin, Surfactin, Bacylisin, Bacylloomicin

TKI32 균주는 tween 20, tween 40을 제외한 나머지 분자량의 tween에 대해서만 분해능을 나타냈다.

선별된 *Bacillus* 균주의 패류 병원성 세균에 대한 항균활성

알려진 패류 병원성 세균에 대한 7개 선별 균주의 항균활성 탐색 결과, *Listonella anguillarum* KCTC 2711 균주에 대해 TKI18 균주는 29.5±4.95 mm로 가장 높은 항균활성을 나타냈고, TKI01, TKI02, TKI14, TKI26, TKI32 균주는 10.5±2.12에서 13±4.24 mm 사이에서 비슷한 수준의 항균활성을 나타냈으며, TKI42 균주는 항균활성을 나타내지 않았다(Table 5). *Vibrio parahaemolyticus* KCTC 2729 균주에 대해서는 TKI14, TKI18 균주만이 각각 17.5±7.78, 16±7.07 mm의 억제대를 보이며 항균활성을 나타냈다. *V. splendidus* KCTC 12679 균주에 대해서는 대부분 9에서 10.5±0.71 mm

사이에서 약한 항균활성을 보였으며, TKI26, TKI42 균주는 항균활성을 나타내지 않았다. *V. harveyi* KCTC-12724 균주에 대해서는 TKI18 균주가 30 mm, 그 다음으로 TKI14, TKI42, TKI32 균주가 각각 28.5±6.36 mm, 23.5±7.78 mm, 22±8.49 mm의 억제대를 나타내며 강한 항균활성을 나타냈다. *V. harveyi*에 대해 TKI26 균주는 비교적 약한 10.5±2.12의 항균활성을 나타냈으며, TKI01, TKI02 균주는 항균활성을 나타내지 않았다. *V. tubiashii* KCTC12729 균주에 대해서는 TKI18 균주가 26.5±7.78 mm, 그 다음으로 TKI26, TKI42 균주가 각각 19±4.24 mm, 14±1.41 mm의 억제대를 형성하며 항균활성을 나타냈지만, 나머지 TKI01, TKI02, TKI14, TKI32 균주에서는 *V. tubiashii*에 대한 항균활성을 나타내지 않았다.

패류 병원성 세균에 대한 항생제 감수성 시험

L. anguillarum KCTC 2711 균주에 대해 florfenicol, flumequine, nalidixic acid는 각각 42 mm, 30 mm, 23 mm의 억제환을 형성하며 강한 감수성을 나타냈으나, oxytetracycline, colistin, ampicillin은 각각 0 mm, 9 mm, 10 mm의 억제환을 형성하여 감수성이 거의 없는 것으로 나타났다(Table 6). *V. parahaemolyticus* KCTC 2729 균주에 대해 florfenicol, cefaclor, cefazolin, ampicillin은 각각 38, 30, 23, 22 mm의 억제환을 형성하며 강한 감수성을 나타냈으나, oxytetracycline, nalidixic acid, flumequine은 각각 0 mm, 9 mm, 13 mm의 억제환을 형성하여 감수성이 거의 없는 것으로 나타났다. *V. splendidus* KCTC 12679 균주에 대해 florfenicol, cefaclor는 각각 39 mm, 30 mm의 억제환을 형성하며

강한 감수성을 나타냈으나 gentamicin, ampicillin, nalidixic acid, oxytetracycline은 각각 9 mm, 12 mm, 13 mm, 13 mm의 억제환을 형성하여 감수성이 거의 없는 것으로 나타났다. *V. harveyi* KCTC 12724 균주에 대해 florfenicol, cefaclor는 각각 34 mm, 24 mm의 억제환을 나타내며 강한 감수성을 나타냈으나 oxytetracycline, colistin, nalidixic acid는 각각 0 mm, 9 mm, 12 mm의 억제환을 형성하여 감수성이 거의 없는 것으로 나타났다. *V. tubiashii* KCTC 12729 균주에 대해 florfenicol, ampicillin, cefaclor, ceftazidime은 각각 42 mm, 26 mm, 26 mm, 24 mm의 억제환을 나타내며 강한 감수성을 나타냈으나 gentamicin, nalidixic acid는 각각 0 mm, 13 mm의 억제환을 형성하여 감수성이 거의 없는 것으로 나타났다.

선별된 *Bacillus* 균주의 Bacteriocin 유전자 검출

알려진 21종류의 *Bacillus* spp.의 bacteriocin 유전자를 targeting하는 22쌍의 primer로 대해 PCR 분석을 수행한 결과, TKI32 균주는 coagulase, ericin A, fengycin, iturin, surfactin, bacillolysin, bacyllosporin 등 가장 많은 7개의 항균물질 유전자를 보유하고 있었다(Table 7). 그 다음으로는 TKI42 균주가 fengycin, surfactin, bacillolysin, bacyllosporin 등 4개, TKI02 균주는 class I-type I lantibiotic (*LanC*), bacillolysin, subtilin, TKI14 균주는 fengycin, surfactin, bacillolysin 등 3개, 그리고 TKI18 균주는 fengycin 1개 bacteriocin에 대한 유전자를 보유하고 있었다. 그러나 본 연구에서 사용된 primer로는 TKI01, TKI26 균주에서 bacteriocin 유전자가 검출되지 않았다.

고 찰

본 연구에서는 여름과 가을에 왕우럭의 소화관에서 분리된 세균의 종류가 매우 달랐다. 계절의 변화는 육지에서 수계로 유입되는 영양염류의 양, 염분도, 수온, 밀도 등을 변화시키며, 이는 왕우럭의 호흡율, 여과율 등 대사활동에도 영향을 미친다(Kim 등, 2000; Shin과 Yang, 2005). 따라서 계절에 따른 환경의 변화가 왕우럭의 먹이활동 및 대사활동 역시 변화시켜 소화관의 미생물총 변화에도 영향을 준 것으로 생각된다. 그러나 본 연구에 사용된 60마리의 왕우럭 개체에서 분리된 미생물 분리 결과만으로 일반화하기는

어려우며, 더 정확한 분석을 위해서는 분리 및 배양이 가능한 미생물뿐만 아니라 계절별로 왕우럭의 서식환경 및 소화관의 미생물총을 비교 및 분석하는 추가적 연구가 필요할 것으로 생각된다.

본 연구에서는 왕우럭의 소화관에서 분리된 65개의 분리주들 중 *Bacillus*속의 세균들이 가장 많은 비율을 차지하며 분리되었는데, 이전 연구들 역시 *Bacillus*속 세균들은 토양, 농작물, 하수, 폐수, 발효식품 뿐만 아니라 해양환경과 여러 해양 생물의 체내에서도 높은 비율을 차지하는 미생물총으로 보고해왔다(Cahill, 2009; Ivanova 등, 1999; Ki 등, 2009). 본 연구에서 분리된 전체 균주의 고분자 물질 분해능력은 tween 40, tween 60에 대해 가장 높았고(51.5%), 그 다음으로 DNA (45.5%), starch와 tween 20 (42.4%), tween 80 (39.4%) 순이었으며 cellulose와 skim milk (27.3%)에 대한 분해 능력은 낮은 편이었는데(unpublished), 다양한 해양 생물에서 유래한 *Bacillus*속 세균은 다양한 고분자 유기물질을 분해하는 효소를 생산할 수 있는 것으로 보고되어 본 연구의 결과와 일치하였다(Kim 등, 2011; Shin 등, 2013; Ziaei-Nejad 등, 2006). 본 연구에서도 고분자 유기물질의 분해 활성이 우수한 선별균주가 모두 *Bacillus*속에 속하여 기존의 보고들과 일치하는 결과를 보였다.

한편, 선별된 7개 균주가 패류 병원성 세균에 대해 형성한 억제환을 비교했을 때, *L. anguillarum* KCTC 2711 균주에 대해 TKI18 균주는 양성대조군으로 사용한 10개의 항생제들 중 florfenicol보다는 작은 억제환을 형성하였고, flumequine과 조금 작거나 비슷한 크기의 억제환을 형성하여 비슷한 항균 효과를 나타냈다. 또한, 나머지 9개의 항생제들에 비해 더 큰 억제환을 형성하여 훨씬 뛰어난 항균활성을 나타냈다. *V. parahaemolyticus* KCTC 2729 균주에 대해 TKI14, TKI18 균주는 양성대조군으로 사용한 10개의 항생제들 중 erythromycin, gentamicin과 비슷한 크기의 억제환을 형성하여 비슷한 항균활성을 나타냈으나, 다른 균주들은 *V. parahaemolyticus*에 대해 항균력을 나타내지 않았다. *V. harveyi* KCTC 12724 균주에 대해 TKI14 균주는 florfenicol에 비해서는 작은 억제환을 형성하였으나, cefaclor와 비슷한 크기의 억제환을 형성하여 비슷한 수준의 항균력을 나타냈다. TKI32, TKI42 균주 역시 cefaclor와 비슷한 수준의 억제환을 형성하였으나 억제환 크기의 편차가 커 비슷한 수준의 항균력이라고 이야기하기는 어렵다. *V. tubiashii* KCTC 12729 균주에 대해 TKI18 균주는 ampicillin, cefaclor, ceftazidime

lin과 비슷한 크기의 억제환을 형성하여 비슷한 수준의 항균력을 나타냈다. TKI26 균주는 flumequine, oxy-tetracycline과, TKI42 균주는 erythromycin, colistin, nalidixic acid와 비슷한 크기의 억제환을 형성하였으나 비교적 약한 항균력을 나타냈다. *V. splendidus* KCTC 12679 균주에 대해 TKI26, TKI42 균주는 항균활성을 전혀 나타내지 않았으며, 다른 5개 균주들 역시 *V. splendidus*에 대해 9 mm에서 10 mm 전후의 억제환을 형성하여 항균활성이 거의 나타나지 않았다.

실험에 사용된 항생제 디스크는 디스크마다 항생제가 함유된 농도가 다르며, 디스크 주변에 형성된 억제환의 절대적인 크기가 아닌 각 항생제의 감수성 및 저항성 판정 기준에 따라 감수성 및 저항성 여부가 결정된다. 게다가 수질에서 분리된 저온의 세균에 대해서는 아직 항생제 저항성 판독 기준이 없기 때문에, 항생제 디스크 주변에 형성된 억제환의 지름과 선별 균주의 상층액 주변에 형성된 억제환의 지름을 직접적으로 비교하는 것은 항균활성능력의 절대적인 기준이 될 수 없다. 패류 병원성 세균에 대한 항생제 저항성 시험 결과, 항생제 계열별 또는 세균의 종별로 항생제의 종류와 세균의 종류에 따라 항균력에 차이가 있었는데, 마찬가지로, 왕우럭의 소화관에서 분리된 세균 7종 역시 병원성 세균의 종류에 따라 항균력의 차이를 나타냈다. 이는 7개의 선별된 *Bacillus* spp. 균주 각각이 보유한 bacteriocin 유전자의 종류와 보유한 유전자의 개수가 달라 병원성 세균을 억제하는 기전이 각각 다르기 때문으로 생각된다. 그러나 bacteriocin 유전자를 보유하고 있더라도 실제 단백질 수준에서 생성되는 bacteriocin의 생산량, 발현수준, 생산되는 시기가 다를 수 있다(Yang 등, 2002). 그러므로 유전자의 보유 여부만으로는 실제 bacteriocin의 발현 및 표현 수준을 예측할 수 없다. 본 연구에서 선별된 7개의 *Bacillus* 균주에 대해 고분자 유기물질 분해능력과 항균활성능력을 종합적으로 평가해보았을 때, 단일 균주만을 생균제로 개발 및 사용하는 것은 한계가 있을 것으로 보이나, 효과가 다른 여러 균주를 혼합하여 사용한다면 상가효과 또는 상승효과를 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

결 론

본 연구는 왕우럭의 완전양식 또는 인공종묘 생산 단계에 적용하여 생산 효율을 개선시켜줄 수 있는 잠

재적 프로바이오틱스 세균을 탐색하고자 수행되었다. 왕우럭의 소화관에서 여름과 겨울에 각각 33주, 22주의 미생물을 분리 및 동정하여 국내외를 통틀어 최초로 보고하였다. 분리주들 중 고분자 유기물질 분해능력이 뛰어난 7개의 *Bacillus* spp. 균주를 선별하여 알려진 5종의 패류 병원성 세균에 대한 항균활성을 조사하였으며, 수산용 항생제를 포함한 항생제 10개를 양성대조군으로 설정하여 상대적으로 항균활성을 비교하였다. 또, 항균활성의 유전자적 배경을 찾고자 알려진 *Bacillus* spp.의 bacteriocin 유전자를 타겟으로 PCR 분석을 수행하였다. 본 연구 결과에 따르면, 고분자 분해 활성에 있어서는 TKI01, TKI02, TKI26, TKI32, TKI45 균주가 소화 및 흡수에 가장 효과적일 것으로 생각된다. In vitro 항균활성능 시험에서는 병원성 세균의 종류에 따라 각 균주의 항균력의 수준이 다르게 나타났지만, PCR을 이용한 유전자 수준의 분석 결과, TKI01, TKI26 두 개 균주를 제외한 모든 균주가 잠재적 항균활성을 가지는 것으로 생각된다. 따라서 단일 균주의 사용보다는 고분자 유기물질 분해능과 항균활성이 다른 균주를 혼합하여 사용하는 것이 더 효과적일 것으로 생각된다. 그러나 in vitro 실험의 결과가 in vivo 적용 시험에서도 반드시 일관적으로 나타나는 것은 아니며 사육수와 왕우럭 유생의 생체 내 영향까지도 고려해야 하므로, 생균제로서의 개발을 위해서는 반드시 현장 또는 현장과 유사한 환경에서의 적용 시험을 수행하여 왕우럭 종묘의 생존율, 먹이활동, 수질환경, 사육수의 미생물총 변화 등에 대해 추가적인 연구를 수행할 필요가 있다.

감사의 글

본 연구는 한국해양과학기술진흥원 수산실용화기술개발사업 “왕우럭, *Tresus keenae*의 인공종묘생산 산업화를 위한 기술 개발(과제번호: 1525005525)”의 일환으로 수행되었으며 연구비 지원에 대하여 깊은 감사를 드립니다.

REFERENCES

- Abriouel H, Franz CM, Omar NB, Gálvez, A. 2010. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiol Rev* 35: 201-232.

- Barbosa TM. 2010. University College Cork, Cork, Ireland, Unpublished work.
- Bidhan CD, Meena DK, Behera BK, Das P, Mohapatra PD, Sharma AP. 2014. Probiotics in fish and shellfish culture: immunomodulatory and ecophysiological responses. *Fish Physiol Biochem* 40: 921-971.
- Cahill MM. 1990. Bacterial flora of fishes: a review. *Microb Ecol* 19: 21-41.
- Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int J Food Microbiol* 71: 1-20.
- Desriac F, Defer D, Bourgougnon N, Brilllet B, Le Chevalier P, Fleury Y. 2010. Bacteriocin as weapons in the marine animal-associated bacteria warfare: inventory and potential applications as an aquaculture probiotic. *Mar Drugs* 8: 1153-1177.
- Hyink O, Balakrishnan M, Tagg JR. 2005. *Streptococcus rattus* strain BHT produces both a class I two component lantibiotic and a class II bacteriocin. *FEMS Microbiol Lett* 252: 235-241.
- Ivanova EP, Vysotskii MV, Svetashev VI, Nedashkovskaya OI, Gorshkova NM, Mikhailov VV, Yumoto N, Shiger Y, Taguchi T, Yoshikawa S. 1999. Characterization of *Bacillus* strains of marine origin. *Int Microbiol* 2: 267-271.
- Ki JS, Zhang W, Qian PY. 2009. Discovery of marine *Bacillus* species by 16S rRNA and rpoB comparisons and their usefulness for species identification. *J Microbiol Methods* 77: 48-57.
- Kim DH, Lim HK, Mim KS, Chang YJ, Kim TI. 1999. Reproductive cycle of surf clam (*Tresus keenae*) in southern coast of Korea. *Korean J Fish Aquat Sci* 32: 659-663.
- Kim JH, Kim YH, Kim SK, Kim BW, Nam SW. 2011. Properties and industrial applications of seaweed polysaccharides-degrading enzymes from the marine microorganisms. *Microbiology and Biotechnology Letters* 39: 189-199.
- Kim JK, Kim DH, Yoo MS, Yang MH. 2005. Ultrastructure of Gametogenesis of the Surf Clam (*Tresus keenae*)(Mactridae: Bivalvia). *Korean J Fish Aquat Sci* 38: 94-99.
- Kim KS, Lee WB, Joo HS, Lee JC, Cho JW, Chun SB, Lee SW, Park JC. 2000. Physicochemical Characteristics and Seasonal Distribution of Microbial Population in the Gangjin Bay Ecosystem. *Kor J Microbiol* 36: 285-291.
- Kim MS, Min E, Koo JK, Kang JC. 2015. Effects of Bio-floc System on Growth and Environmental Improvement in the Chinese White Shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Korean J Fish Aquat Sci* 48: 688-695.
- Lee H, Kim HY. 2011. Lantibiotics, class I bacteriocins from the genus *Bacillus*. *J Microbiol Biotechnol* 21: 229-235.
- Lee JG, Lee GJ, Lim SM. 2005. Partial purification of bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* MJ-14 isolated from Meju. *J Food Hyg Saf* 20: 211-216.
- Mora I, Cabrefiga J, Montesinos E. 2011. Antimicrobial peptide genes in *Bacillus* strains from plant environments. *Int Microbiol* 14: 213-223.
- Muñoz-Atienza E, Gómez-Sala B, Araújo C, Campanero C, Del Campo R, Hernández PE, Herranz C, Cintas LM. 2013. Antimicrobial activity, antibiotic susceptibility and virulence factors of lactic acid bacteria of aquatic origin intended for use as probiotics in aquaculture. *BMC Microbiol* 13:15.
- Park JY, Kim WS, Kim HY, Kim EH. 2016. Potential use of *Bacillus amyloliquefaciens* as a probiotic bacterium in abalone culture. *J Fish Pathol* 29: 35-43.
- Prieto ML, O' Sullivan L, Tan SP, McLoughlin P, Hughes H, O'Connor PM, Cotter PD, Lawlor PG, Gardiner GE. 2012. Assessment of the bacteriocinogenic potential of marine bacteria reveals lichenicidin production by seaweed-derived *Bacillus* spp. *Mar drugs* 10: 2280-2299.
- Riazi S, Wirawan R, Badmaev V., Chikindas, M. 2009. Characterization of lactosporin, a novel antimicrobial protein produced by *Bacillus coagulans* ATCC 7050. *J Appl Microbiol* 106: 1370-1377.
- Shin S, Yundendorj K, Lee SS, Kang KH, Kahng HY. 2013. Physiological and Biochemical Characterization of *Bacillus* spp. from Polychaete, *Perinereis aibuhitensis*. *J Life Sci* 23: 415-425.
- Shin YK, Yang MH. 2005. Effects of temperature and salinity on the survival and metabolism of *Tresus keenae* (Mollusca: Bivalvia). *Fish Aquatic Sci* 8: 161-166.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Bio Evol* 30: 2725-2729.
- Taoka Y, Maeda H, Jo JY, Jeon MJ, Bai SC, Lee WJ, Yuge K, Koshio S. 2006. Growth, stress tolerance and non-specific immune response of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* to probiotics in a closed recirculating system. *Fish Aquatic Sci* 72: 310-321.
- Wirawan R, Klesse N, Jack R, Tagg J. 2006. Molecular and genetic characterization of a novel nisin variant produced by *Streptococcus uberis*. *Appl Environ Microb* 72: 1148-1156.
- Xie F, Zhu T, Zhang F, Zhou K, Zhao Y, Li Z. 2013. Using *Bacillus amyloliquefaciens* for remediation of aquaculture water. *Springerplus* 2: 119.
- Yang EJ, Chang JY, Lee HJ, Kim JH, Chung DK, Lee JH, Chang HC. 2002. Characterization of the antagonistic activity against *Lactobacillus plantarum* and induction of bacteriocin production. *Korean J Food Sci Technol* 34: 311-318.
- Ziaei-Nejad S, Rezaei MH, Takami GA, Lovett DL, Mirvaghefi AR, Shakouri M. 2006. 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: 516-524.