

*Bacillus*속 미생물의 용존황화수소 저감효과와 흰다리새우 (*Litopenaeus vannamei*)에의 영향

최준호 · 이지훈 · 박정진 · 이민선 · 배준성 · 신동훈* · 박관하†

군산대학교 수산생명의학과, *신동수산질병관리원

Reduction of dissolved hydrogen sulfide and mortality of white leg shrimp, *Litopenaeus vannamei* by *Bacillus* spp. microorganisms

Jun-Ho Choi, Ji-Hoon Lee, Jung-Jin Park, Min-Sun Lee, Jun-Sung Bae, Dong-Hun Shin* and Kwan Ha Park†

Department of Aquatic Life Medicine, College of Ocean Science and Technology, Kunsan National University, San-68 Miryong-dong, Gunsan City, Jeonbuk, Korea
*Shindong Control Center For Aquatic Animal Diseases, 21, Seokdong-ro, Eumam-myeon, Seosan City, Chungnam, Korea

The utility of *Bacillus* spp. organisms for reduction of dissolved hydrogen sulfide (H₂S) in white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) culture was tested with different combinations of *Bacillus* spp. microorganisms: combination A (*B. subtilis* + *B. licheniformis*); combination B (*B. licheniformis* + *B. amyloliquefaciens*); combination C (*B. subtilis* + *B. licheniformis* + *B. amyloliquefaciens*). Of these 3 combinations, C was effective in few hours after addition whereas B needed longer time to be effective. The H₂S-reducing effect of combination C was dependent on the amount of microorganisms added to H₂S-containing test solution. Exposure of white leg shrimp to H₂S at 8 mg/L for 7 days led to survival of 80% and 1 mg/L for 14 days it was 82.5%. The survival rate was 97.5% when combination C was simultaneously added to shrimp tanks during H₂S exposure at 1 mg/L for 14 days. It was demonstrated that combination C microorganisms (*B. subtilis* + *B. licheniformis* + *B. amyloliquefaciens*) can reduce dissolved H₂S concentrations, and this effect can be utilized to protect white leg shrimp from H₂S toxicity.

Key words: *Bacillus* spp., Dissolved H₂S, *Litopenaeus vannamei*, White leg shrimp

1990년대부터 시작된 새우양식은 2001년에 생산량이 3,268톤으로 최고를 달성한 뒤로 해마다 감소하였다(Jang and Jun, 2005). 이는 과거에 질병, 특히 흰점바이러스(White spot syndrome virus,

WSSV)에 감수성이 높은 대하(*Fenneropenaeus chinensis*)를 주양식종으로 생산하였기에 피해가 컸다(Heo *et al.*, 2000; Jang *et al.*, 2006; Jang *et al.*, 2007). 이후 2003년에 미국 하와이로부터 처음으로 흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*)를 도입하여 2015년 양식새우 생산량은 5,500톤으로 증가하였으며 이중 흰다리새우의 비율이 99.4%를 점유하

†Corresponding author: Kwan Ha Park
Tel: +82-63-469-1885, Fax: +82-63-469-7444
E-mail: khpark@kunsan.ac.kr

고 있어 주 양식종으로 자리매김 하였다(Kim *et al.*, 2017). 흰다리새우는 다른 양식새우류에 비해 질병내성이 높고, 성장률이 빠르며 또한 바이러스에 비감염된 무병(specific pathogen free, SPF) 계열이 이미 상업화 되고 있는 등 다양한 양식요소의 적합한 특성을 가지고 있어 원산지인 미주 뿐 아니라 동남아 여러 국가들에서 양식의 주종을 이루고 있는 실정이다(Briggs *et al.*, 2004; FAO, 2006).

황화수소는 새우양식장에서 양식생물의 배설물과 잉여사료 등의 퇴적 및 용존산소의 고갈로 저질악화를 가속화시켜 생성된다. 새우양식을 많이 하는 내만, 연안, 호 및 양식장과 같은 물의 유동성이 적은 수역에서는 유기물이나 질소, 인 등의 영양염류농도가 높다. 때문에 유기물 분해에 따른 산소소비로 수계환경을 산화상태로부터 환원상태로 이동시켜 황산염환원에 의해 황화수소가 발생한다(Gunnarsson and Ronnow, 1982; Gavis and Grant, 1986; Ochi and Takeoka, 1986; Imabayashi, 1987; Thompson *et al.*, 1989; Vetter *et al.*, 1989; Kang, 1997).

황화수소가 수생생물에 미치는 영향에 관한 연구는 어류 및 갑각류에 대하여 일부 이루어져 있을 뿐이다(Bonn and Follis, 1967; Adelman and Smith, 1970, 1972; Donavon and Llyod, 1974a, b; Kang *et al.*, 1995a, b). 새우에서 나타나는 황화수소 중독증은 새혹병(Back gill disease)으로 아가미가 검게 변하는 증상의 질병이며(Gunalan *et al.*, 2014), 새우류는 황화수소 농도 4mg/L에서 대량폐사도 발생할 수 있다고 알려져 있다(Jee and Kang, 2004).

아직까지 미생물로 용존황화수소를 저감시킬 수 있는 방법은 거의 알려져 있지 않으나 일부 육상동물에서는 미생물이 첨가된 사료를 급여하였을 때 분변중의 황화수소 생성량을 줄일 수 있다는 연구(Jeong *et al.*, 2017)결과가 있으므로 *Bacillus*속 미생물을 이용해 새우양식장의 용존황화수소 농

도를 저감하여 수질 및 저질을 개선할 수 있는 기술을 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

시험용 새우

전북 익산 소재 지수식 양식장에서 평균 체중 25 ± 5 g의 흰다리새우(*L. vannamei*)를 구입하여 사용하였다. 새우는 실험실 수조에 수용 후 공식현상을 피하기 위하여 퓨리나 사료(Cargil Agri Purina, Inc. Korea)를 매일 2회(오전 10시, 오후 6시) 체중의 2%씩 공급하였다. 사육수조는 178(W) × 75(L) × 55(H) cm 크기의 FRP수조 (수량 200 L 수준으로 유지, 수온 25°C 염도 2.5 psu)이며 지속적으로 폭기 하면서 14일간 순치한 후 시험에 사용하였다.

시험용 *Bacillus*속 미생물 및 시험군 설정

본 연구에서는 *Bacillus*속의 *B. subtilis*, *B. licheniformis* 및 *B. amyloliquefaciens*를 3가지 조합으로 구성하여 사용하였다. 즉 대조군은 시험균체를 넣지 않았고, 시험군 A는 *B. subtilis* 와 *B. licheniformis* 혼합제제이고, 시험군 B는 *B. licheniformis* 와 *B. amyloliquefaciens*의 혼합제제이며 시험군 C는 *B. subtilis*, *B. licheniformis* 및 *B. amyloliquefaciens*의 혼합제제이다(Table 1). 균주들은 ATCC에서 구입 후 균주(*B. subtilis* ATCC 23857, *B. amyloliquefaciens* ATCC 23842, *B. licheniformis* ATCC 14580)를 BHI배지(Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)를 이용하여 26°C에서 48시간 배양 하였다.

황화수소(H₂S) 분석

용존황화수소측정은 농도별로 2가지의 분석법을 사용하였다. 우선 높은 농도(1 mg/L 이상)의 용존황화수소 분석은 상업용 키트(Water Work™, 481197-20, Industrail Test System, Inc, USA)와 분광

Table 1. Composition of microorganisms

Groups	Microorganisms	Ratio (%)
Control	None	None
Combination A	<i>Bacillus subtilis</i> + <i>B. licheniformis</i>	50/50
Combination B	<i>B. amyloliquefaciens</i> + <i>B. licheniformis</i>	50/50
Combination C	<i>B. subtilis</i> + <i>B. amyloliquefaciens</i> + <i>B. licheniformis</i>	33.3/33.3/33.3

광도계를 병용한 분석방법을 고안하여 측정하였다. 이 분석 키트는 육안적으로 반응물을 측정하도록 제작된 것이지만 정확한 용존황화수소 측정을 위해 본 키트를 이용하여 반응시킨 반응용액을 분광광도계(Optizen POP, Meacasy, Korea)를 활용하여 표준곡선에 대입하여 분석하였다. 즉, 반응 stick의 시료반응 부분을 절단하여 3 mL 주사기 내에 넣고 시료 2.6 mL를 주사기로 채취하여 20초간 진탕 한 뒤 분광광도계를 이용하여 흡광값을 측정하였다. 표준곡선은 3차 증류수에 황화나트륨(Na_2S , Sigma, St. Louis, MO, USA)을 첨가하여 50 mg/L의 용존황화수소 농도로 원액을 조제한 뒤 단계 희석하여 Water Work™ 키트를 사용하여 각 농도에 따른 흡광값을 측정하였다. Base line은 3차 증류수를 사용하였다. 낮은 황화수소 농도(1 mg/L 이하)는 Easy-Read™(Ultra-Low Hydrogen Sulfide, 481201, Industrail Test Systems, INC, USA)키트를 사용하였다. 측정방법은 플라스틱 병에 표시된 선 까지 50 mL의 시료를 담은 뒤, 키트에 동봉되어있는 2종의 시약을 넣고 교반한 뒤 stick을 꽂아 넣어 2분간 반응시킨 뒤 표준검사판과 stick의 반응 색을 비교하여 용존황화수소 농도를 측정하였다. 용존황화수소 농도는 최저 0.005 mg/L 수준까지 검출이 가능하였다.

시험군 조합 3종의 용존황화수소 저감능

용존황화수소 저감능을 확인하기 위해 비이커에 시험균체를 배양한 후 황화수소를 가하여 폭로시킨후 용존황화수소의 양을 측정하였다. 즉, 비이커에 증류수 1 L를 첨가하고 시험균체(1 g/L)가 증식할 수 있도록 LB배지(Becton, Dickinson and Co., USA)를 1 g 첨가하였다. 이 혼합물을 $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 로 유지하여 48시간 배양하였다. 균체 배양액의 용존황화수소 농도가 3 mg/L가 되도록 황화나트륨을 첨가하였다. 용존황화수소의 농도는 폭로 직후를 0시간으로 기준하여 0.5, 2 및 12시간에 측정하였다.

시험군C의 첨가량에 따른 용존황화수소 저감능

비이커에 증류수를 1 L 첨가한 뒤 LB배지 1 g을 첨가하고 시험군 A, B, C를 1 g/L 농도로 $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 의 수온을 설정하여 48시간 배양한 후 시험에 사용

하였다. 시험균체 배양액을 교반 후 일정량(5, 10, 50 mL)을 채취하고 원심분리(3,000 x g, 5 min)하여 균체를 얻었다. 균체를 PBS 1 mL에 희석하고 희석된 균체를 50 mL로 조제한 용존황화수소(3 mg/L) 용액에 투여하여 황화수소의 농도변화를 측정하였다. A시험군과 B시험군은 배양액 50 mL를 채취한 후 시험에 사용하였고, C시험군은 배양액의 5, 10, 50 mL를 채취하여 시험에 사용하였다. 용존황화수소는 시험균체 첨가 직후를 0시간으로 간주하고 1, 2, 6 및 12시간 후에 측정하였다. 황화수소는 산소와 반응하여 신속히 산화하기 때문에 측정 시에만 시험 튜브의 마개를 열어 측정하였다.

흰다리새우에 대한 황화수소의 독성

흰다리새우에게 미치는 황화수소의 독성 농도를 알아보기 위해 순치한 흰다리새우를 각 시험군당 20마리씩 시험수조(수온 $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$, pH 7-8, 용존산소 7-8 mg/L, 염도 2.5 psu)에 수용한 뒤, 황화나트륨으로 용존황화수소가 1, 2, 4, 8 mg/L 수준이 되게 노출하여 시험하였다. 황화수소는 매일 오전 10시에 1회씩 수조에 가해 7일간 노출하였다. 시험기간 중 사망 개체 발생 여부를 관찰하였으며 환수는 수행하지 않았다.

시험군C가 황화수소에 노출된 흰다리새우의 생존에 미치는 영향

황화수소에 의한 흰다리새우의 사망과 이에 미치는 시험군C의 영향을 측정하기 위한 시험을 하였다. 시험군C(1 g/L)를 흰다리새우와 함께 48시간 배양 및 측양 후, 용존황화수소 농도를 1 mg/L 수준이 되게 황화나트륨을 매일 1회 노출하였다. 각 시험군당 흰다리새우를 20마리씩 수용하였고 사육수 100 L에서 2반복으로 시험하였다. 생존율의 측정은 14일간 하였으며 시험기간 중 환수를 수행하지 않았다.

통계처리

시험 결과는 평균 \pm 표준편차 (mean \pm S.D.)로 표현하고 시험군간 평균의 통계학적 유의성 검정을 위해 ANOVA분석 후 Dunnett's multiple comparison 검정을 post-hoc test로 사용하였다. P 값이 0.05

이하일 때 유의성이 있다고 판정하였다.

결 과

시험군 조합 3종의 용존황화수소 저감능

대조군의 경우 황화나트륨을 가하고 용존황화수소 농도가 2 mg/L 수준으로 상승하여 2시간 동안 안정적으로 유지되었다(Fig. 1). 시험군A 및 B는 황화수소 폭로 후 2시간까지는 용존황화수소농도에 영향을 미치지 않았고 시험군C는 황화나트륨을 폭로한 뒤 대조군 보다 0.5 및 2시간에 낮은 용존황화수소가 측정되었다. 반면 12시간 후에는 시험군C의 시험군이 대조군과 통계적으로 동일한 용존황화수소를 나타냈으며 특이하게도 시험군B의 시험군에서 12시간 후에 대조군 대비 통계적으로 유의한 용존황화수소 저감능을 나타냈다.

시험군C의 첨가량에 따른 용존황화수소 저감능

대조군의 용존황화수소 농도는 시간이 지남에도 감소하지 않았다. 시험군에서는 먼저 시험군A와 B에서 균체 배양액 50 mL의 펠릿을 첨가하였지만 시간이 지속됨에 따라 용존 황화수소의 농도는 초기농도와 통계적으로 동일하였다. 시험군C에서는 12시간에 배양액의 첨가량이 다른 모든 시험군에서 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 용존황

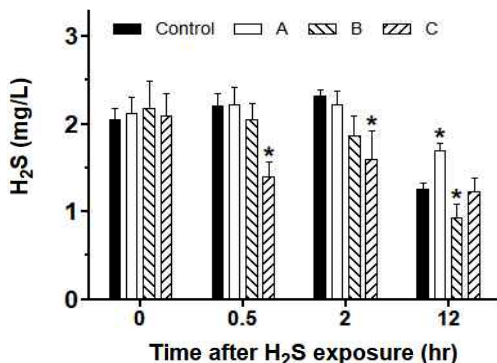


Fig. 1. Hydrogen sulfide(H₂S) reducing activity of 3 different combinations of *Bacillus* spp.. Microorganisms cultured for 48 hr in LB medium. Initial amount of microorganisms was 1 g/L. H₂S was added at 3 mg/L concentration (N=3). *Significant difference from control at P<0.05 as determined by Dunnett's multiple comparison.

화수소가 저장되었다. 그러나 분석 초기시점인 1, 2 및 6시간에는 시험군C에서 50 mL 배양액의 펠릿을 첨가한 시험군이 가장 우수한 용존황화수소 저감능을 나타냈다(Fig. 2). 결과적으로 시험군A, B, C 중 시험군C가 타시험군 대비 가장 우수한 용존황화수소 저감능을 나타냈다.

흰다리새우에 대한 황화수소의 독성

황화수소에 노출된 흰다리새우의 최종 누적 치사율은 용존황화수소 농도가 1, 2, 4, 8 mg/L에서 각각 8, 13, 12, 20%로 나타났다(Fig. 3).

시험군C가 황화수소에 노출된 흰다리새우의 생존에 미치는 영향

용존황화수소를 1 mg/L의 농도로 연속적으로 노출하였을 때 2일째부터 대조군에서 흰다리새우의 치사가 발생하기 시작하였다(Fig. 4). 마지막 시험종료 시점까지 대조군에서는 꾸준히 치사가 지속되었으나 시험군C를 투입한 실험군은 대조군 대비 흰다리새우의 생존률이 더 높았다(82.5% vs. 97.5%).

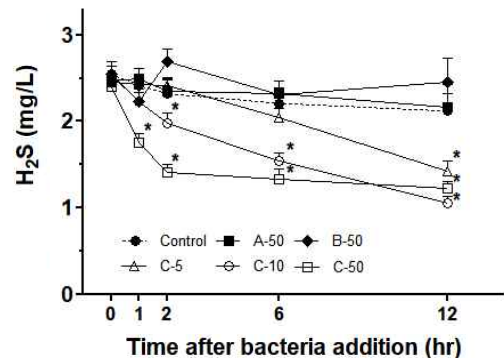


Fig. 2. Effects of different amount of microorganisms added to hydrogen sulfide-containing solution. Microorganisms were harvested from different volumes of culture media. Microbial pellets were added to H₂S (3 mg/L) solution containing. A-50, microorganisms harvested from 50 mL A combination; B-50, microorganisms harvested from 50 mL B combination; C-5 - C-50, microorganisms harvested from 5 - 50 mL C combination (N=3). *Significant difference from control at P<0.05 as determined by Dunnett's multiple comparison.

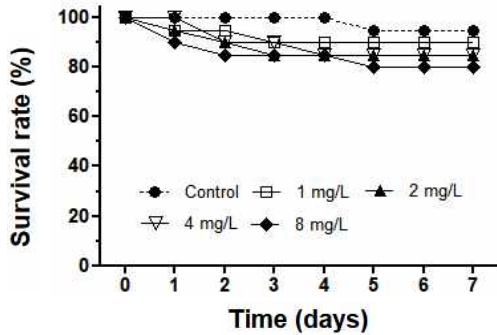


Fig. 3. Survival rate of white leg shrimp to hydrogen sulfide (H₂S) exposure. Twenty shrimp per each group were exposed to different concentrations of H₂S (1-8 mg/L) for 7 days once daily.

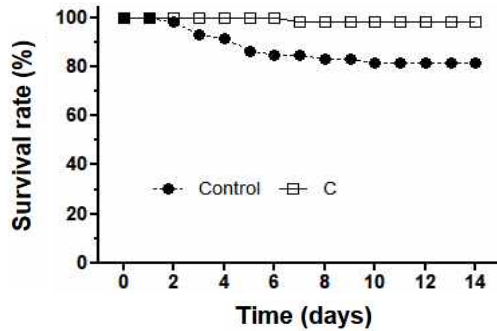


Fig. 4. Effects of microbial combination C on survival rate of white leg shrimp exposed to hydrogen sulfide (H₂S). Microbial combination C (1 mg/L) and shrimp were put into a tank at the same time and cultured for 48 hr. Shrimp were exposed to H₂S at 1 mg/L for 14 days (N=2). Data are mean values from duplicate tests.

고 찰

황화수소(H₂S) 가스 생성은 혐기성 조건에서 많은 종류의 미생물들에 의해 일어난다. 이들 중 황화수소를 생산하는 일반적인 미생물로 *Pseudomonas*속, *Citrobacter*속, *Aeromonas*속, *Salmonella*속 미생물들과 대장균이 알려져 있다. 대조적으로 황화수소를 분해하는 미생물 중에는 *Bacillus*속 미생물들이 알려져 있다(Friedrich *et al.*, 2001). 본 연구는 *Bacillus*속의 미생물이 돼지 분변에서 발생하는 황화수소 가스의 저감능을 보고한 연구(Jeong *et al.*, 2017)에 착안하여 새우에서 유독한 용존황화

수소의 발생을 저감하고자 시험하였다. 또한 이 용존황화수소 저감능이 흰다리새우의 생존율에 영향을 미치는지 시험하였다.

본 연구에서는 *Bacillus*속 미생물을 시험군A(*B. subtilis* + *B. licheniformis*), 시험군B(*B. licheniformis* + *B. amyloliquefaciens*), 시험군C(*B. subtilis* + *B. licheniformis* + *B. amyloliquefaciens*)의 조합으로 시험하였다. Fig. 1은 각각의 시험군체를 48시간 동안 배양 후 배양액에 3 mg/L 수준의 황화수소를 폭로한 시험이다. 황화수소 폭로 후 대조군은 2시간까지 용존황화수소 농도가 감소하지 않았고 12시간 때에는 감소하였다. 시험군A는 황화수소 폭로 후 대조군과 유의한 차이가 없었지만 12시간 때에는 오히려 증가하였다. 이는 시험군A의 조합이 용존황화수소 농도 저감에는 효과가 없고 오히려 부정적인 측면으로 현장에 적용하기에는 적절하지 않은 시험군으로 사료된다. 시험군B는 황화수소 폭로 후 2시간까지 용존황화수소 농도가 통계적으로 유의한 수준까지 저감되지 않았지만 평균적으로는 감소하였고 시험군C는 통계적으로 유의한 용존황화수소 감소능을 나타냈다. 하지만 12시간에는 시험군B만 유의한 감소능을 나타내어 용존황화수소 감소능이 시험군C보다 늦게 발휘되는 것으로 사료된다. 영양상태가 충분한 조건에서 하나의 미생물이 분열해서 2개의 미생물이 되었을 때까지를 한 세대라 하고 세대기간(generation time)이란 그때까지 걸리는 시간을 말한다. 세대기간은 균종, 배양 조건 등에 따라 다르며(Lee *et al.*, 1999) 영양배지상에서 시험군C가 B보다 미생물의 증식이 더 신속하여 짧은 유도기를 가짐은 물론 세대기간도 짧기 때문에 미생물의 도태 속도(쇠퇴기) 또한 빨라서 12시간에 오히려 시험군B가 대조군 대비 용존황화수소 감소능이 유의한 것으로 사료된다. 즉 시험군C의 3종 조합이 수중 내 발생한 용존황화수소 감소능이 가장 신속하게 발휘되며 향후 미생물 및 영양물질의 투여간격과 양을 적절하게 모색한다면 가장 우수한 조합으로 사료된다. 또한 균체들을 투여 시 배양액 상에서 총균수의 변화를 측정하여 3종의 균체들 간 정확한 세대기간을 파악함이 중요할 것으로 사료된다. 증식이 완료된 균체 펠렛을 조제된 황화수소용액에 투여하고 용존

황화수소 저감능을 측정 결과(Fig. 2) 대조군 대비 A 및 B시험군은 유의한 차이가 없었고 시험군C만이 유의하게 용존황화수소 저감을 나타내었다. 특히 6시간까지 시험군C 펠렛의 양과 용존황화수소 저감능이 펠렛의 농도 의존적으로 나타나 시험군C는 용존황화수소를 명확히 저감시킴을 확인하였다. 이 시험은 시험군체의 증식에 필요한 요소를 제거한 뒤 시험한 것으로 Fig. 1과는 차이가 있어 미생물의 증식 속도 및 사멸시간이 황화수소 농도의 저감에 관련이 있을 것으로 사료된다. 앞의 결과를 종합해보면, 시험군C가 초기에 용존황화수소 농도 저감능이 우수한 점으로 보아 시험군C를 영양물질과 혼합하여 수중 내 군체의 생존시간 및 증식량을 증가시켜주거나 군체를 자주 사육수에 첨가해줌으로써 효과적인 용존황화수소 저감효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다. 나아가 본 연구에서 *Bacillus*속 미생물의 조합에서 미생물간의 종과 비율의 차이가 미생물의 생육에 영향을 끼치는 것으로 보이며 추가적인 연구가 필요하다고 사료된다. 또한 황화수소를 발생하는 미생물 자체도 고농도의 용존황화수소 존재(547 mg/L)하에서 생육이 완전히 저해된다는 보고(Reis *et al.*, 1992)가 있다. 이처럼 자체 생산물인 황화수소에 의해 생육 억제가 발생하는 점을 고려하여 본 연구에서는 예비 시험을 통해 미생물이 저해 받지 않은 농도와 실제 자연계 수중에서 일반적으로 발생 가능한 수준인 1-3 mg/L로 정하여 시험하였다.

황화수소농도에 따른 대하(*Fenneropenaeus chinensis*)의 폐사율을 시험한 연구에서 용존황화수소 농도 0.05 mg/L부터 사료효율 및 성장률에 나쁜 영향을 미친 연구결과가 있다(Jee and Kang, 2004). 또 다른 연구에서 대하는 용존황화수소 농도 0.2 mg/L 이상부터 폐사가 시작되어 4 mg/L에서는 전량 폐사가 된다는 보고가 있다(Shigueno, 1975). 하지만 본 연구에서는 시험 최고농도인 8 mg/L에서 20%의 누적폐사만이 발생하였다(Fig. 3). 이는 선행연구에서 사용한 시험용 새우의 크기는 평균 0.5 g의 치하 수준이므로 본 연구에서 사용한 평균 25 g의 새우 크기와 차이가 있어 황화수소 방어능에 차이가 나타난 결과로 사료되어 추후 치하를 대상으로 시험군C의 유효성을 평가해 볼 필요성이 있

다고 생각된다. 또한 흰다리새우 성체도 용존황화수소 방어능이 치하에 비해 강하지만 지속적으로 황화수소에 노출될 시 생존에 매우 불리한 영향이 나타남을 본 연구를 통해 알 수 있었다.

본 연구에서 사용한 시험군C(*B. subtilis* + *B. licheniformis* + *B. amyloliquefaciens*)의 투입이 용존황화수소를 저감시켜 흰다리새우의 치사율에 긍정적인 효과를 증명하였다(Fig. 4). 사육수 내에서 지속적인 용존황화수소(1 mg/L)의 발생은 흰다리새우에서 14일간 약 18% 수준으로 누적폐사율이 나타났지만, 시험군C를 투입한 시험군에서는 14일간 누적폐사율이 2.5%로 나타났다. 이는 앞의 시험결과(Figs. 1, 2)와 종합하여 시험군C가 수중내의 용존황화수소를 저감시켜 흰다리새우의 생존율을 높여준 것으로 사료된다.

본 연구에서는 시험군C의 3종 *Bacillus*속 미생물이 용존황화수소 저감을 목적에 두고 연구했지만 흰다리새우 사육수에 *Bacillus*속 미생물을 첨가하였을 때 질소노폐물 중 새우에게 가장 유해한 암모니아를 유의적으로 감소한 보고도 있다(Nimrat *et al.*, 2012). 이는 *Bacillus*속 미생물이 용존황화수소 뿐만 아니라 사료 노폐물 등에서 발생한 유기탄소 농도를 저감하여 사육수의 안전성을 부여함으로써 또 다른 측면에서 양식새우의 수질에 의한 독성 피해를 줄일 수 있다고 사료된다. Liu *et al.* (2009)은 발효된 낫토에서 분리한 *B. subtilis*를 사료에 10^8 CFU kg⁻¹ 농도로 혼합하여 흰다리새우에게 98일 동안 급이 하였을 때 대조군에 비해 유의적으로 높은 성장률을 보고하고 있고 유사하게 동일 물질을 흰다리새우에게 급이 하였을 때 성장률의 증가 효과를 또 다른 연구에서 보고하였다(Balcazar *et al.*, 2007). 이 결과는 *B. subtilis*가 단백질 분해효소의 분비를 촉진하여 소화율의 증가로 성장촉진이 일어났다고 사료된다. 전복(*Haliotis discus*)에게 *B. amyloliquefaciens*를 급이 하였을 때 성장률의 차이는 없으나 *Vibrio tubiashii*의 공격시험에 있어 항병력의 증가를 측정한 연구가 있고(Park *et al.*, 2016), 넙치(*Paralichthys olivaceus*)에게 *B. licheniformis*를 급이 한 뒤 *Streptococcus iniae*에 대한 항병력 증가를 보고하였다(Cha *et al.*, 2012).

이상의 결과, 시험에 사용한 3종의 *Bacillus*속 미

생물을 이용하여 용존황화수소 농도를 감소시켜 수질 개선효과를 볼 수있으며 이 효과가 흰다리새우에 대한 황화수소의 독성저감효과로 나타나 직접적으로 폐사를 줄임으로서 Bacillus속 미생물을 이용한 흰다리새우 사육기술로 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

흰다리새우양식에 있어 저면에서 생성된 황화수소(H₂S)를 Bacillus속 미생물을 이용하여 저감이 가능한지 아래 3가지 균주들의 조합에 대해 시험하였다. 시험에 사용한 3가지 Bacillus속 균주들을 A시험군(B. subtilis + B. licheniformis), B시험군(B. licheniformis +B. amyloliquefaciens) 및 C시험군(B. subtilis + B. licheniformis + B. amyloliquefaciens)으로 구성하였다. 3가지 조합으로 시험균을 배양 한 뒤, 인위적으로 황화수소(3 mg/L)를 폭로하여 용존황화수소를 측정하였다. 그 결과, 시험군C가 용존황화수소를 초기에 저감하는 것을 측정하였다. 또한 시험군C를 배양하여 분리한 균체의 양을 달리하여 황화수소용액에 가했을 때 황화수소 감소능은 첨가한 균체의 양에 비례하여 증가하였다. 그러나 이 조건에서 최대량의 균체를 가하였을 때에도 시험군A 및 B는 황화수소 감소능을 발휘하지 못하였다. 용존황화수소가 흰다리새우에게 미치는 독성을 평가하기 위해, 황화수소(1-8 mg/L)를 폭로(매 1회/1일, 7일간 반복)하여 생존율을 측정 한 결과 8 mg/L에서 가장 높은 누적치사율(20%)을 유발하였다. 흰다리새우 사육수에 시험군C(1 g/L)를 48시간 배양한 후 황화수소 1 mg/L에 폭로시키면서 흰다리새우 생존율을 14일간 지속 관찰한 결과 대조군에서 82.5% 시험군C를 가한 시험군에서는 97.5% 수준의 생존율이 관찰되었다. 그러므로 새우양식에서 3종의 Bacillus속 시험군C는 유해한 용존황화수소의 발생을 줄이고 나아가 흰다리새우 생산량의 증대를 가져올 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 해양수산과학기술진흥원의 양식어류

생산성 향상을 위한 미생물 복합제의 사업화 과제 (17B178803180)의 지원으로 수행하였습니다.

References

- Adelman, I. R. and Smith, L. L.: Effect of hydrogen sulfide on northern pike eggs and sac fry. Trans. Amer. Fish. Soc., 99: 501-509, 1970.
- Adelman, I. R. and Smith, L. L.: Toxicity of hydrogen sulfide to goldfish, *Carassius auratus* as influenced by temperature, oxygen and bioassay techniques. J. Fish. Res. Bd. Can., 29: 1309-1317, 1972.
- Balcazar, J. L. Rojas-Luna, T. and Cunningham, D. P.: Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. J. Invert. Pathol., 96: 174-150, 2007.
- Bonn, E. and Follis, B.: Effect of hydrogen sulfide of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. Trans. Amer. Fish. Soc., 96: 31-36, 1967.
- Briggs, M., Funge-Smith, S., Subasinghe R. and Phillips, M.: Introductions and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific. RAP publication. Bangkok, 10: 92, 2004.
- Cha, J. H., Yang, S. I., 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.
- Donavon, O. and Llyod, S.: Factors influencing acute toxicity estimates of hydrogen sulfide to freshwater invertebrates. Water Res., 8: 739-746, 1974a.
- Donavon, O. and Llyod, S.: Chronic toxicity of hydrogen sulfide to *Gammarus pseudolimnaeus*. Trans. Amer. Fish. Soc., 4: 819-822, 1974b.
- FAO, State of world aquaculture. FAO technical report. Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Fishery Resources Division, Rome, 2006.
- Friedrich, C. G., Rother, D., Bardischewsky, F., Quentmeier, A. and Fischer, J.: Oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by bacteria: Emergence of a common mechanism?. Appl. Environ. Microbiol., 67: 2873-2882, 2001.
- Gavis, J. and Grant, V.: Sulfide, iron, manganese and phosphate in the Chesapeake Bay during anorexia. Estuar. Coast. Shelf Sci., 23: 452-469, 1986.
- Gunalan, B., Soundarapandian, P., Anand, T., Kotiya,

- A. S. and Simon, N. T.: Disease occurrence in *Litopenaeus vannamei* shrimp culture systems in different geographical regions of India, *Int. J. Aquacult.*, 4: 24-28, 2014.
- Gunnarsson, L. A. H. and Ronnow, P. H.: Interrelationship between sulfate reducing and methane producing bacteria in coastal sediments with intense sulfide production. *Mar. Biol.*, 69: 121-128, 1982.
- Heo, M. S., Sohn, S. G., Sim, D. S., Kim, J. W., Park, M. A., Jung, S. H., Lee, J. S., Choi, D. L., Kim, Y. J. and Oh, M. J.: Isolation and characterization of white spot syndrome baculovirus in cultured penaeid shrimp (*Penaeus chinensis*). *J. Fish Pathol.*, 13: 7-13, 2000.
- Imabayashi, H.: Interaction between benthic communities and oxygen-deficient water mass in eutrophic waters. *Bull. Coast. Oceanogr.*, 26: 119-128, 1987.
- Jang, I. K. and Jun, J. C.: Current status of shrimp diseases and its control in Korea. Proc. the 1st Korea-U.S. Seminar and Workshop on the Sustainable Marine Shrimp Culture, Incheon, Korea., 27-28, 2005.
- Jang, I. K., Cho, Y. R., Lee, J. Y., Seo, H. C., Kim, B. L., Kim, J. S. and Kang, H. W.: Selective predatory effect of river puffer in WSSV-infected shrimp in culture of shrimp with river puffer under laboratory scale. *J. Aquacult.*, 20: 270-277, 2007.
- Jang, I. K., Han, H. S. and Lim, H. J.: Viral infection rate in wild brood stock of the fleshy shrimp, *Fenneropenaeus chinensis* from Korean waters. Proceeding of the World Aquaculture Society, Firenze, Italy, 95, 2006.
- Jee, J. H. and Kang, J. C.: Effects of the different level of dissolved oxygen, ammonia and hydrogen sulfide on survival and growth of juvenile, *Fenneropenaeus chinensis*. *J. Aquacult.*, 17: 235-239, 2004.
- Jeong, Y. D., Kim, D. W., Min, J. Y., Yu, D. J., Lee, S. H., Nam, T. K., Kim, K. H. and Kim, Y. H.: Effects of dietary supplementation of fermented milk on growth, intestinal microorganisms and fecal noxious gas emission in sucking pigs. *Ann. Anim. Res. Sci.*, 28: 116-121, 2017.
- Kang, J. C., Matsuda, O. and Norifumi, I.: Effect of hypoxia and hydrogen sulfide on survival of the prawn *Macrobrachium nipponense* in Lake Kojima, Japan. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 6: 821-826, 1995a.
- Kang, J. C., Matsuda, O. and Norifumi, I.: Avoidance and behavior of prawn *Macrobrachium nipponense* by oxygen depletion and hydrogen sulfide. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 6: 827-831, 1995b.
- Kang, J. C.: Acute toxicity of hydrogen sulfide to larvae and adults of blue crab *Portunus trituberculatus*, White shrimp *Metapenaeus* and prawn *Macrobrachium nipponense*. *J. Fish Pathol.*, 10: 65-72, 1997.
- Kim, S. K., Shim, N. Y., Jang, J. W., Jun, J. C., Kim, S. K. and Shin, Y. K.: Effect of acclimation methods on physiological status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* Larvae to low salinities. *Kor. J. Environ. Biol.*, 35: 6-12, 2017.
- Lee, H. J., Joo, Y. J., Park, C. S., Lee, J. S., Park, Y. H., Ahn, J. S., and Mheen, T. I.: Fermentation patterns of green onion kimchi and Chinese cabbage kimchi. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 31, 488-494, 1999.
- Liu, C. H., Chiu, C. S., Ho, P. L. and Wang, S. W.: Improvement in the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by a protease-producing probiotic, *Bacillus subtilis* E20, from natto. *J. Appl. Microbiol.*, 107: 1031-1041, 2009.
- Nimrat, S., Suksawat, S., Boonthai, T. and Vuthphandchai, V.: Potential *Bacillus* probiotics enhance bacterial numbers, water quality and growth during early development of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Vet. Microbiol.*, 159: 443-450, 2012.
- Ochi, T. and Takeoka, H.: The anoxia water mass in Hiuchi-Nada, Part I. Distribution of the anoxia water mass. *J. Oceanogr. Soc. Jpn.*, 42: 1-11, 1986.
- Park, J. Y., Kim, W. S., Kim, H. Y. and Kim, E. H.: Potential use of *Bacillus amyloliquefaciens* as a probiotic bacterium in abalone culture. *J. Fish Pathol.*, 29: 35-43, 2016.
- Reis, M. A. M., Almeida, J. S., Lemos, P. C., and Carrondo, M. J. T.: Effect of hydrogen sulfide on growth of sulfate reducing bacteria. *Biotechnol. Bioeng.*, 40: 593-600, 1992.
- Shigueno, K.: Shrimp Culture in Japan. Assoc. Int. Tech. Promotion, Tokyo. 153, 1975.
- Thompson, B. E., Bay, S. M., Anderson, J. W., Laughlin, J. D., Greenstin, D. and Tsukada, D.: Chronic effects of contaminated sediments on the urchin *Lyttechinus pictus*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 8: 629-637, 1989.
- Vetter, R. D., Matrai, P. A., Javor, B. and Obrien, J.: Reduced sulfur compounds in the marine environment: analysis by high-performance liquid chromatography. American Chemical Society. Washington DC, ACS Symposium. 293: 249-262, 1989.

Manuscript Received : May 2, 2018

Revised : Jun 7, 2018

Accepted : Jun 14, 2018