

The Antimicrobial Activity of *Bacillus amyloliquefaciens* JFP-02 Against Fish Pathogenic Bacteria Under Various Culture Conditions

Dong-Hwi Kim¹, Young-Gun Moon² and Moon-Soo Heo^{2*}

¹Aquaculture Industry Research Division, East Sea Fisheries Research Institute, National Institute of Fisheries Science, Gangneung 25435, Korea

²Department of Aquatic Biomedical Sciences, Jeju National University, Jeju 63243, Korea

Received August 13, 2024 / Revised August 23, 2024 / Accepted August 26, 2024

The antimicrobial activity of *Bacillus amyloliquefaciens* JFP-02 against nine fish pathogenic bacteria isolated from olive flounder aquaculture farms on Jeju Island was assessed under various medium compositions, pH levels, and incubation temperatures. The fish pathogenic bacteria isolated were *Flexibacter maritimus*, *Staphylococcus caprae*, *Edwardsiella tarda*, *Streptococcus parauberis*, *Photobacterium damsela*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio campbellii*, *Vibrio alginolyticus*, and *Vibrio anguillarum*. The antibiotic susceptibility testing results for the fish pathogenic bacteria indicated the highest sensitivity to florfenicol, followed by gentamycin and neomycin. The bacteria exhibited the greatest resistance to penicillin, with amoxicillin and erythromycin showing the next highest levels of resistance. *B. amyloliquefaciens* JFP-02 exhibited the highest growth activity at pH 9, while the greatest antimicrobial activity was observed at pH 6. Likewise, although the highest growth occurred at 30°C, the most significant antimicrobial effect was observed at 20°C. Among the various medium components, the antimicrobial activity of *B. amyloliquefaciens* JFP-02 was highest when dextrin was used as the carbon source, leading to the greatest growth and antimicrobial activity. Additionally, among the nitrogen sources, the addition of yeast extract resulted in the highest growth and antimicrobial activity. For inorganic salts, although the highest growth activity was observed with MgSO₄·7H₂O and FeSO₄·7H₂O, the greatest antimicrobial effect was observed with KH₂PO₄.

Key words : Antibiotics, antimicrobial, *Bacillus amyloliquefaciens*, fish pathogenic bacteria, olive flounder

서 론

우리나라의 양식산업은 1960-70년대 해조류를 시작으로 1980년대 어류 양식이 발전하기 시작하였다[25]. 이러한 흐름으로 제주도의 넙치 양식산업은 1980년 중반에 육상수조 방식으로 시작하여 끊임없는 기술의 발전에 힘입어 2023년 기준 전국 생산량의 약 51.7%(21,047톤)를 차지하고 있다[16, 21]. 그러나 최근에 넙치 양식은 시장가격 하락, 양식 비용 상승과 수온, 수질오염, 질병 등으로 인한 폐사량 증가로 인한 문제가 꾸준히 제기되어 왔다[9].

어류 질병은 초창기 기생충 및 세균에 의한 단독 감염이 주로 발생하였다면, 최근에는 다양한 병원체에 의한

혼합감염의 발생 빈도가 증가하여 대량 폐사로 이어지고 있다[3, 17]. 하지만 국내에는 질병 발생에 따른 폐사에 대한 통계 자료가 미비하다[3, 6]. 향후 넙치를 비롯한 다양한 양식 생물의 질병으로 인한 피해를 최소화하기 위해서는 질병 발생 현황과 그로 인한 폐사량에 대한 통계 자료가 필요하다. 현재 양식 넙치에 주로 발병하는 어류 질병세균은 *Vibrio* spp., *Streptococcus* spp., *Edwardsiella tarda*, *Flexibacter maritimus* 등이 보고되었다[8, 13]. 이러한 어류 질병세균에 대한 예방책으로 백신과 치료제로 항생제가 있지만, 항생제 오남용과 그로 인한 항생제 내성균으로 인한 문제도 동시에 일어나고 있다. 이러한 이유로 항생제를 대체하고자 천연 물질에서 분리한 항균물질, probiotics, 유용 미생물 등을 이용한 다양한 연구가 진행되고 있다.

본 연구진은 이전에 probiotics (*Bacillus* sp., *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*)를 양식 어류에 적용하였을 때 나타나는 비특이적 면역반응과 항균 활성에 대한 연구를 진행하였다[7, 11, 14, 15]. 이번 논문에서는 제주도 넙치 양식장에서 분리한 어류 질병세균에 대한 항생제 내성을 확인

*Corresponding author

Tel : +82-64-754-3473, Fax : +82-64-756-3493

E-mail : msheo@jejunu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

하고, 다양한 조건에서 probiotics 균주인 *Bacillus amyloliquefaciens* JFP-02를 배양하여 어류 질병세균에 대한 항균 활성을 확인하고자 한다.

재료 및 방법

어류 질병세균 분리

어류 질병세균을 확보하기 위해 제주도 내에 위치한 넙치 육상 양식장 중 8개소를 무작위로 선별하여, 사육수, 배출수, 유입수, 넙치를 채취하였다. 넙치에서 분리한 간과 신장, 사육수, 배출수, 유입수를 0.85% 생리식염수에 1 ml 넣어 희석한 후 Brain Heart Infusion Agar (BHIA, Difco, Sparks, MD, USA)에 도말하여 25°C에서 48시간 배양하였다. 생육된 집락을 순수 분리하여 향후 연구에 사용하였다.

염기서열 분석

순수 분리한 세균에서 2.5% Chelex (Chelex® 100 Molecular Biology Grade Resin, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)를 이용하여 DNA를 추출하였다. 세균의 동정을 위하여 16S rRNA 유전자를 증폭시키기 위해 27F (5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCA-3') primer와 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGAC-3') primer를 사용하였다 [22]. AccuPower® PCR Pre-Mix (Bioneer, Daejeon, Korea)에 최종 부피 25 µl로 맞추어 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 94°C 5분; 94°C 1분, 55°C 1분, 72°C 1분을 30 cycle; 72°C 10분 반응하였다. 증폭된 PCR product는 1% agarose gel에서 전기영동을 이용하여 확인하였다. 분석된 염기서열은 NCBI의 BLAST에서 유사한 염기서열과 비교하고, 가까운 종으로 나타나는 서열을 확인하였다.

어류 질병세균의 항생제 감수성

항생제에 대한 내성 유무를 확인하기 위해 일반적으로 사용되는 수산용 항생제 8종(Table 1)을 사용하였고, Bauer-kirby test를 통해 내성 균주와 감수성 균주로 분리하였다.

세균 배양액을 Mueller Hinton Agar (MHA, Difco)에 도말한 후, 항생제 디스크를 올려 25°C에서 48시간 배양하였다. 억제환의 크기를 측정하여 항생제 내성에 대한 유무를 판단하였다.

pH 변화에 따른 생육도 및 항균 활성

B. amyloliquefaciens JFP-02를 이용하여 배지의 pH 변화에 따른 어류 질병세균에 대한 항균 활성을 확인하기 위해 de Man, Rogosa and Sharpe Broth (MRSB, Difco)에 1 M HCl과 1 M NaOH를 이용하여 pH를 4-9의 범위로 조정하여 121°C, 15분 동안 멸균하였다. 제조된 배지에 전 배양된 *B. amyloliquefaciens* JFP-02를 1%씩 접종하여 30°C에서 200 rpm으로 48시간 배양한 후, 660 nm에서 배양액의 탁도를 측정하여 생육도를 확인하였다. 항균 활성은 전 배양된 *B. amyloliquefaciens* JFP-02를 8 mm paper disc에 100 µl 분주하여 30°C에서 24시간 건조시켰다. 전 배양된 세균을 MHA에 도말하여 건조된 paper disc를 올린 후 30°C에서 48시간 배양하여 형성된 억제환으로 항균 활성을 측정하였다.

온도 변화에 따른 생육도 및 항균 활성

B. amyloliquefaciens JFP-02를 이용하여 배양 온도 변화에 따른 어류 질병세균에 대한 항균 활성을 확인하기 위해, MRSB에 전 배양된 *B. amyloliquefaciens* JFP-02를 1%씩 접종하였다. 배양 온도를 10°C, 20°C, 30°C, 40°C, 50°C로 조절하여 200 rpm으로 48시간 배양한 후, 660 nm에서 배양액의 탁도를 측정하여 생육도를 확인하였다. 항균 활성은 전 배양된 *B. amyloliquefaciens* JFP-02를 8 mm paper disc에 100 µl씩 분주하여 30°C에서 24시간 건조시켰다. 전 배양된 세균을 MHA에 도말하여 건조된 paper disc를 올린 후 30°C에서 48시간 배양하여 형성된 억제환으로 항균 활성을 측정하였다.

배지 성분에 따른 생육도 및 항균 활성

B. amyloliquefaciens JFP-02를 이용하여 배지 성분 변화

Table 1. Type of antibiotics and sensitivity ranges for identifying antibiotic resistant fish pathogenic bacteria

Antibiotics	Concentrations (µg)	Diameter of inhibition zone (mm)		
		Resistant	Weakly sensitive	Sensitive
Amoxicillin (AML)	10	≤13	14-17	≥18
Gentamicin (GN)	10	≤12	13-14	≥15
Erythromycin (EM)	15	≤13	14-22	≥23
Florfenicol (FFL)	30	≤12	13-17	≥18
Neomycin (NEO)	10	≤12	13-16	≥17
Oxytetracycline (OTC)	30	≤14	15-18	≥19
Penicillin (PE)	10 unit	≤19	20-27	≥28
Tetracycline (TC)	30	≤14	15-18	≥19

에 따른 어류 질병세균에 대한 항균 활성을 확인하기 위해 GY배지(yeast extract 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.02%)에 탄소원 dextrin, saccharose, sorbitol을 각각 1%씩 첨가하였다. GY배지(dextrin 0.5%, MgSO₄·7H₂O 0.02%)에 질소원 malt extract, peptone, yeast extract를 각각 0.5%씩 첨가하였다. 또한 무기염 KH₂PO₄, MgSO₄·7H₂O, FeSO₄·7H₂O를 각각 0.1%씩 GY배지(dextrin 0.5%, yeast extract 0.1%)에 첨가하였다. 이후 각각의 배지에 전 배양된 *B. amyloliquefaciens* JFP-02를 1%씩 접종하여 30°C에서 200 rpm으로 48시간 배양한 후, 660 nm에서 배양액의 탁도를 측정하여 생육도를 확인하였다. 항균 활성은 전 배양된 *B. amyloliquefaciens* JFP-02를 8 mm paper disc에 100 µl씩 분주하여 30°C에서 24시간 건조시켰다. 전 배양된 세균을 MHA에 도말하여 건조된 paper disc를 올린 후 30°C에서 48시간 배양하여 형성된 억제환으로 항균 활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

어류 질병세균 확보

제주도 넙치 양식장 8개소에서 총 9종의 어류 질병세균을 분리하였다. 체색흑화, 지느러미 출혈 및 부식, 주둥이 발적, 체표 비늘 탈락, 아가미 부식 등의 증상을 유발하는 *Flexibacter maritimus*, *Staphylococcus caprae*, *Edwardsiella tarda*, *Streptococcus parauberis*, *Photobacterium damsela*가 동정되었다[1, 12, 14, 26, 27]. 또한 복부팽만, 탈장, 지느러미 갈라짐, 비늘 탈락, 체색흑화, 체표출혈, 안구 돌출 및 출혈 등의 외부증상과 출혈성 복수, 간 출혈, 비장 위축, 점상 출혈 등의 내부 증상을 유발하는 *Vibrio harveyi*, *Vibrio campbellii*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio anguillarum*가 동정되었다[4, 5, 18, 19]. 넙치 양식장에서 가장 빈번하게 발생하는 세균으로 *S. parauberis*와 *Vibrio* spp.가 있으며 [20, 28], *Vibrio* spp.의 경우 *V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. campbellii*, *V. tubiashii*, *V. fluvialis* 등이 주로 검출되며, 이러한 세균은 단독 감염 및 복합 감염으로 나타난다[18, 20, 23].

항생제 감수성

항생제 감수성 테스트 결과 florfenicol만 9종의 어류 질병세균에 감수성을 보였으며, *S. parauberis*는 8종의 항생제에 대해 감수성을 가지고 있었다(Table 2). *F. maritimus*는 oxytetracycline에만 내성을 가졌고, *E. tarda*는 erythromycin, oxytetracycline, penicillin, tetracycline에 내성을 가졌고, *S. caprae*는 erythromycin, penicillin에 내성을 가졌으며, *P. damsela*는 amoxicillin, oxytetracycline, penicillin, tetracycline에 내성을 가졌다. *V. campbellii*는 amoxicillin, gentamycin, erythromycin, neomycin, erythromycin, penicillin에 내성을 가졌고, *V. alginolyticus*는 amoxicillin, gen-

Table 2. Antibiotics susceptibility testing of fish pathogenic bacteria isolated from Jeju island olive flounder aquaculture farm (Inhibition zone (mm))

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
AML	30	19	34	19	0	11	0	10	0
GN	35	21	14	23	14	11	13	23	12
EM	41	0	27	0	16	11	13	23	12
FFL	39	28	27	28	24	20	40	34	26
NEO	26	25	13	23	14	11	12	17	19
OTC	10	9	29	32	10	18	21	22	25
PE	31	9	40	17	0	19	0	0	0
TC	17	11	25	34	9	0	27	32	25

1, *Flexibacter maritimus*; 2, *Edwardsiella tarda*; 3, *Streptococcus parauberis*; 4, *Staphylococcus caprae*; 5, *Photobacterium damsela*; 6, *Vibrio campbellii*; 7, *Vibrio alginolyticus*; 8, *Vibrio anguillarum*; 9, *Vibrio harveyi*.

tamycin, erythromycin, neomycin, erythromycin에 내성을 가졌고, *V. anguillarum*은 amoxycillin, penicillin에 내성을 가졌으며, *V. harveyi*는 amoxycillin, gentamycin, erythromycin, penicillin에 내성을 가졌다. 어류 질병세균에 대하여 florfenicol이 가장 큰 감수성을 보였고, gentamycin, neomycin이 감수성을 보였다. 또한 penicillin에 대하여 어류 질병세균이 가장 큰 내성을 가졌으며, amoxycillin과 erythromycin에 대하여 내성을 보였다.

pH 변화에 따른 생육도 및 항균 활성 효과

B. amyloliquefaciens JFP-02를 이용하여 배지의 pH 변화에 따른 어류 질병세균에 대한 항균 활성을 확인한 결과, *P. damsela*를 제외한 모든 어류 질병세균에 대하여 항균 활성을 보였다(Fig. 1). 이중 *F. maritimus*, *E. tarda*, *V. alginolyticus*에 대해서는 모든 pH 범위에서 항균 활성을 보였다. pH 6에서는 8종의 어류 질병세균에 대하여 항균 활성을 보였고, pH 4와 pH 5에서는 5종, pH 7에서는 4종, pH 8에서는 7종, pH 9에서는 6종에 대하여 항균 활성을 보였다. *B. amyloliquefaciens* JFP-02는 pH 9에서 가장 높은 생육 활성을 나타냈지만(Table 3), 생육 활성과는 별개로 항균 활성은 pH 6에서 가장 높은 것을 확인하였다. Lee 등[24]은 *B. amyloliquefaciens*는 주로 중성 pH와 약 알칼리 pH에서 뛰어난 효소활성을 지닌다고 하였는데, 항균 활성도 이에 속하는 것으로 사료된다.

온도 변화에 따른 생육도 및 항균 활성 효과

B. amyloliquefaciens JFP-02를 이용하여 배양 온도의 변화에 따른 어류 질병세균에 대한 항균 활성을 확인한 결과, 20°C에서만 모든 어류 질병세균에 대하여 항균 활성을 보였다(Fig. 2). 10°C, 30°C에서 8종, 50°C에서 7종, 40°C에서 5종의 어류 질병세균에 대하여 항균 활성을 보였다.

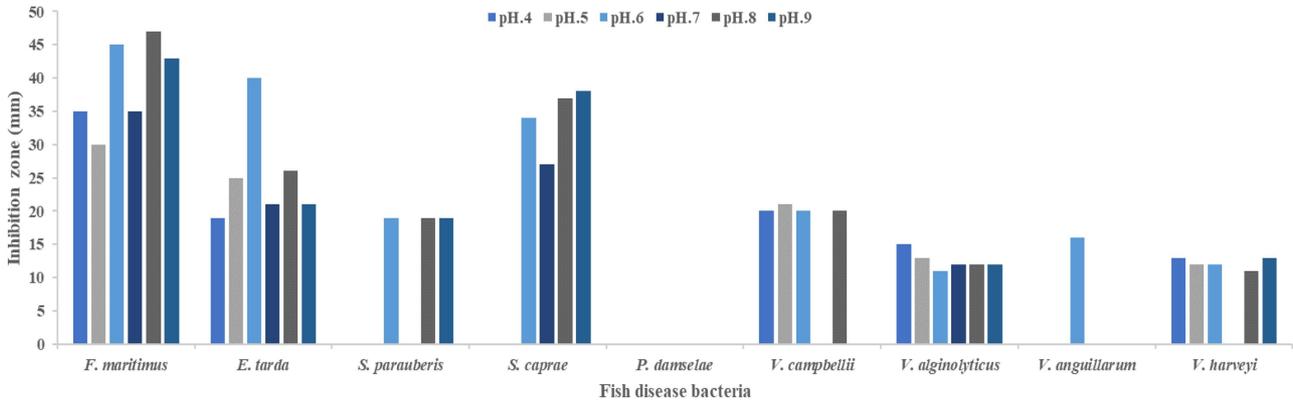


Fig. 1. Antibacterial efficacy of *Bacillus amyloliquefaciens* JFP-02 against fish pathogenic bacteria under varying pH conditions.

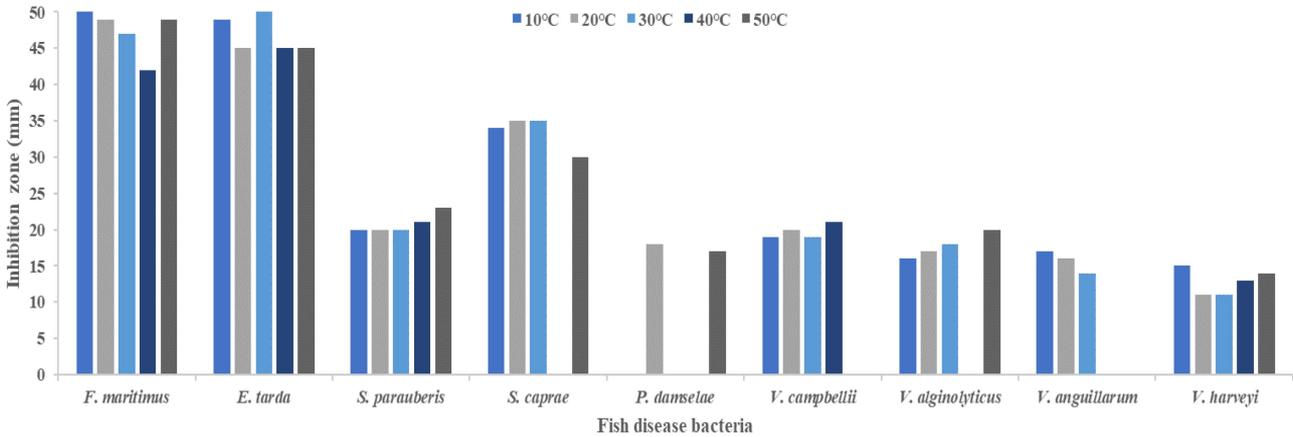


Fig. 2. Antibacterial efficacy of *Bacillus amyloliquefaciens* JFP-02 against fish pathogenic bacteria under varying temperature conditions.

Table 3. Growth activity of *Bacillus amyloliquefaciens* JFP-02 under various culture conditions

pH	4	5	6	7	8	9
Growth (A_{660})	0.117	0.113	0.067	0.195	0.025	0.545
Temperature	10°C	20°C	30°C	40°C	50°C	
Growth (A_{660})	0.0746	0.902	1.518	1.262	1.139	
Carbon sources	Dextrin	Saccharose	Sorbitol			
Growth (A_{660})	0.282	0.341	0.224			
Nitrogen sources	Malt extract	Peptone	Yeast extract			
Growth (A_{660})	0.046	0.163	0.330			
Inorganic salts	KH_2PO_4	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$			
Growth (A_{660})	0.211	0.377	0.155			

B. amyloliquefaciens JFP-02는 30°C에서 가장 높은 생육 활성을 나타냈지만(Table 3), 항균 활성 효과는 20°C에서 가장 높은 것을 확인하였다.

배지 성분 변화에 따른 생육도 및 항균 활성 효과

Dextrin이 첨가되지 않은 GY배지에 탄소원 dextrin, sac-

charose, sorbitol을 각각 1%씩 첨가하여 *B. amyloliquefaciens* JFP-02를 접종하여 어류 질병세균에 대한 항균 활성을 확인한 결과, *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. harveyi*를 제외한 다른 어류 질병세균에 대하여 항균 활성을 보였다(Fig. 3A). Dextrin을 첨가하였을 때 가장 높은 항균 활성을 보였고, sorbitol, saccharose 순으로 높은 항균 활성

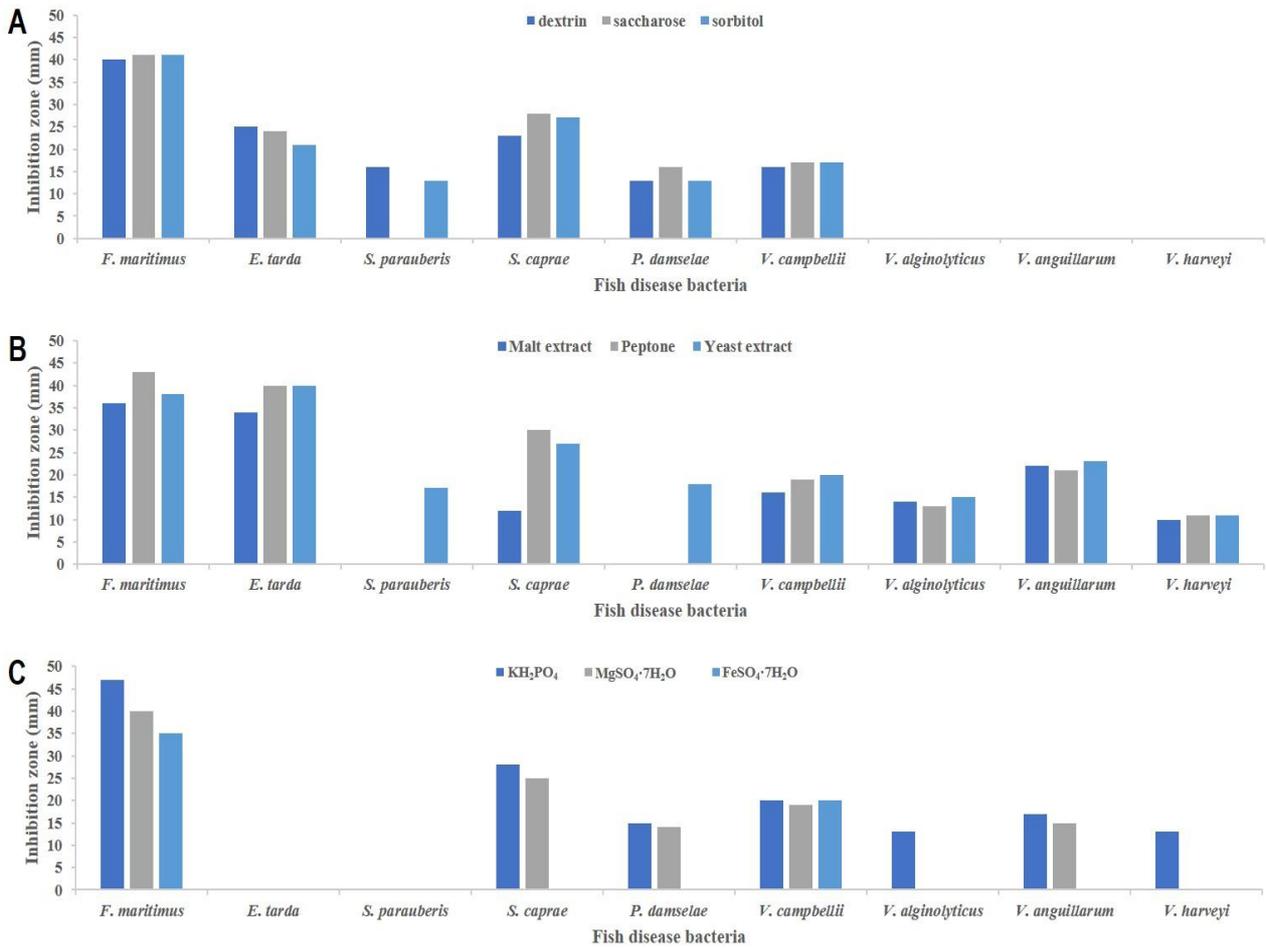


Fig. 3 Antibacterial efficacy of *Bacillus amyloliquefaciens* JFP-02 against fish pathogenic bacteria based on medium compositions. (A) Carbon sources, (B) nitrogen sources, (C) inorganic salts.

을 보였다. *B. amyloliquefaciens* JFP-02는 배지에 탄소원 중 dextrin을 첨가 시 가장 높은 생육 활성(Table 3)과 항균 활성을 보였다. Dextrin이 *B. amyloliquefaciens* JFP-02의 생육과 항균 활성에 미치는 영향을 향후 추가 연구가 필요하다.

Yeast extract가 첨가되지 않은 GY배지에 질소원 malt extract, peptone, yeast extract를 각각 0.5%씩 첨가하여 *B. amyloliquefaciens* JFP-02를 접종하여 어류 질병세균에 대한 항균 활성을 확인한 결과, *S. parauberis*, *P. damselae*를 제외한 다른 어류 질병세균에 대하여 항균 활성을 보였다(Fig. 3B). Yeast extract를 첨가하였을 때 가장 높은 항균 활성을 보였으며, 다음으로 peptone, malt extract순으로 높은 항균 활성을 보였다. *B. amyloliquefaciens* JFP-02는 배지에 질소원 중 yeast extract를 첨가 시 가장 높은 생육 활성(Table 3)과 항균 활성을 보였다. Yeast extract는 *Bacillus subtilis* 생육에 가장 좋은 질소원이라는 결과가 있으며[13], Kang 등[10]에 따르면 항진균성 물질을 생산하는 유용 미생물의 배지성분에 가장 좋은 질소원은 yeast

extract라는 연구 결과가 있었다.

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 가 첨가되지 않은 GY배지에 무기염 KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 각각 0.1%씩 첨가하여 *B. amyloliquefaciens* JFP-02를 접종하여 어류 질병세균에 대한 항균 활성을 확인한 결과, KH_2PO_4 에서 가장 높은 항균 활성을 보였다(Fig. 3C). KH_2PO_4 를 첨가하였을 때 *E. tarda*, *V. harveyi*를 제외한 어류 질병세균에서 항균 활성을 보였으며, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 순으로 높은 항균 활성을 보였다. *B. amyloliquefaciens* JFP-02는 배지에 무기염 중 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 첨가 시 높은 생육 활성을 나타냈지만(Table 3), 항균 활성 효과는 KH_2PO_4 에서 가장 높은 것을 확인하였다. Chen 등[2]에 따르면 유용 미생물의 항균물질 생산에 가장 좋은 배지 성분 중 하나가 KH_2PO_4 라는 연구 결과가 있었다.

어류 질병세균이 항생제에 대한 내성을 가지게 되면 치료가 어려워지며, 항생제의 오남용으로 인한 2차 피해로 이어질 수도 있다. 이러한 문제를 해결하기 위해 천연물 및 probiotics를 이용한 어류 질병세균의 치료제 개발에

대한 연구가 활발히 이뤄져야 한다. 이에 따라 본 연구에서는 probiotics 균주인 *B. amyloliquefaciens* JFP-02을 이용하여 어류 질병세균에 대한 항균 활성 효과에 대하여 연구를 진행하였다. 위의 연구 결과를 토대로 dextrin, yeast extract, KH₂PO₄를 첨가한 생육배지에 *B. amyloliquefaciens* JFP-02를 pH 6, 20°C에서 배양할 때 어류 질병세균에 대한 항균 활성이 우수하였다. 향후 probiotics 균주인 *B. amyloliquefaciens* JFP-02의 생육도와 항균 활성이 동시에 뛰어난 조건을 탐색하여 어류 질병세균에 대한 치료제로 이용 가능한 연구가 필요하다.

감사의 글

본 논문은 2024학년도 제주대학교 교육·연구 및 학생 지도비 지원에 의해서 연구되었습니다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Chen, D., Wang, K., Geng, Y., Wang, J., Huang, L. and Li, J. 2011. *Streptococcus iniae* isolated from channel catfish (*Ictalurus punctatus*) in China. *Isr. J. Aquacult. Bamid.* **63**, 593-600.
- Chen, W., He, Y., Zhou, Y., Shao, Y., Feng, Y., Li, M. and Chen, F. 2015. Edible filamentous fungi from the species *Monascus*: early traditional fermentations, modern molecular biology, and future genomics. *Compr. Rev. Food Sci. Food. Saf.* **14**, 555-567.
- Cho, M. Y., Kim, M. S., Choi, H. S., Park, G. H., Kim, J. W., Park, M. S. and Park, M. A. 2008. A statistical study on infectious diseases of cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus* in Korea. *J. Fish Pathol.* **21**, 271-278.
- Chun, H. J., Kim, W. S., Cho, M. Y., Jung, S. H. and Han, H. J. 2018. Characteristics of *Vibrio anguillarum* isolated from seawater cultured rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in Korea. *Korean J. Fish Aquat. Sci.* **51**, 254-261.
- Han, C. M., Jung, S. J., Oh, M. J., Han, S. H. and Park, J. S. 2010. Design and implementation of olive flounder *Paralichthys olivaceus* disease diagnosis program. *J. Fish Pathol.* **23**, 379-388.
- Heo, J. H., Jung, M. H., Cho, M. H., Kim, G. H., Lee, K. C., Kim, J. H. and Jung, T. S. 2002. The epidemiological study on fish disease in the southern area of Kyeongnam. *J. Vet. Clin.* **19**, 14-18.
- Jang, I. S., Kim, D. H. and Heo M. S. 2013. Dietary administration of probiotics, *Bacillus* sp. IS-2, enhance the innate immune response and disease resistance of *Paralichthys olivaceus* against *Streptococcus iniae*. *Korean J. Microbiol.* **49**, 172-178.
- Jang, Y. H., Jeong, J. B., Yeo, I. K., Kim, K. Y., Harikrishnan R. and Heo, M. S. 2009. Biological characterization of *Tenacibaculum maritimum* isolated from cultured olive flounder in Korea and sensitivity against native plant extracts. *J. Fish. Pathol.* **22**, 53-65.
- Jwa, M. S., Park, K. I. and Kim, D. H. 2020. The current status and an economic analysis of Jeju olive flounder aquaculture. *J. Kor. Soc. Fish Mar. Edu.* **32**, 1612-1622.
- Kang, B., Zhang, X., Wu, Z., Wang, Z. and Park, S. 2014. Production of citrinin free *Monascus* pigments by submerged culture at low pH. *Enzyme Microb. Tec.* **55**, 50-57.
- Kim, D. H. and Heo, M. S. 2019. Dietary effect of *Bacillus subtilis* MD-02 on innate immune response and disease resistance in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **47**, 132-138.
- Kim, D. H., Lim, B. S., Ki, J. S. and Park, S. W. 2020. Disease pathogen detection status of the cultured catfish, *Silurus asotus* in Chungcheong and Jeolla provinces during 2004~2018. *J. Kor. Soc. Fish Mar. Edu.* **32**, 879-890.
- Kim, D. H., Park, S. H., Kim, J. H., Lee, H. R. and Heo, M. S. 2017. Screening of antimicrobial activity of marine derived biomaterials against fish pathogens. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **45**, 1-7.
- Kim, D. H., Subramanian, D. and Heo, M. S. 2017. Dietary effect of probiotic bacteria, *Bacillus amyloliquefaciens*-JFP2 on growth and innate immune response in rock bream *Oplegnathus fasciatus*, challenged with *Streptococcus iniae*. *Isr. J. Aquac.* **69**, 1354-1365.
- Kim, D. H., Subramanian, D., Park, S. H., Jang, Y. H. and Heo, M. S. 2017. Assessment and potential application of the probiotic strain, *Bacillus amyloliquefaciens* JFP2, isolated from fermented seafood-Jeotgal in flounder *Paralichthys olivaceus* juveniles. *Isr. J. Aquac.* **69**, 1352-1364.
- Kim, J. O. and Kang, S. K. 2011. Economic impact effect analysis of flounder aquaculture industry in Jeju. *J. Fish Bus. Adm.* **42**, 85-96.
- Kim, J. W., Jung, S. H., Park, M. A., Do, J. W., Choi, D. L., Jee, B. Y., Cho, M. Y., Kim, M. S., Choi, H. S., Kim, Y. C., Lee, J. S., Lee, C. H., Bang, J. D., Park, M. S. and Seo, J. S. 2006. Monitoring of pathogens in cultured fish of Korea for the summer period from 2000 to 2006. *J. Fish Pathol.* **19**, 207-214.
- Kim, S. M., Won, K. M., Woo, S. H., Li, H., Kim, E. J., Choi, K. J., Cho, M. Y., Kim, M. S. and Park, S. I. 2005. *Vibriosis* isolated from diseased marine culturing fishes in Korea. *J. Fish Pathol.* **18**, 133-145.
- Kim, S. W., Kim, J. O., Kim, W. S., Kim, D. H. and Oh, M. J. 2014. *Vibrio anguillarum* infection in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* during seawater adaption. *J. Fish Pathol.* **27**, 133-137.
- Kim, Y. J., Jun, L. J., Lee, Y. J., Oh, Y. E., Lee, E. J. and Jeong, J. B. 2024. Monitoring of pathogenic bacteria in cultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) of Jeju

- curing the summer of 2022. *J. Fish Pathol.* **37**, 61-69.
21. KOSIS (Korean Statistical Information Service). 2024. Aquaculture status survey. <https://kosis.kr/index/index.do>.
 22. Lane, D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. pp. 115-175. In: Stackebrandt, E. and Goodfellow, M. (eds.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Wiley: New York, NY, USA.
 23. Lee, H. G., Kim, H. J. and Kim, I. 1991. Isolation of *Vibrio* species from cultured flounder (*Paralichthys olivceus*) with ulcers and ascites in the southern coast of Korea during the winter season. *Kor. J. Microbiol.* **29**, 319-328.
 24. Lee, H. H., Cha, M. J. and Oh, K. H. 2020. Comparison of physicochemical factors influencing the production of fibrinolytic enzymes from *Bacillus amyloliquefaciens* G-13 in fibrin zymographic gel. *Korean Soc. Biotechnol. Bioeng. J.* **35**, 199-207.
 25. Lee, H. Y., Im, T. H., Kang, H. G. and Han, B. S. 2024. Policy suggestions for sustainable aquaculture development. *J. Kor. Soc. Fish Mar. Edu.* **36**, 374-386.
 26. Li, Y., Wang, L., Lu, S., Wang, S., Zhang, H., Yang, Y., Li, M. and Chen, S. 2020. Genome sequence of the versatile fish pathogen *Edwardsiella tarda* provides insights into its adaptation to broad host ranges and intracellular niches. *PLoS One.* **4**, e7646.
 27. Park, J. J. and Kim, S. R. 2021. Effect of antibiotics treatment for edwardsiellosis of olive flounder *Paralichthys olivaceus* in biofloc environment. *J. Fish Pathol.* **34**, 225-231.
 28. Shim, J. D., Hwang, S. D., Jang, S. Y., Kim, T. W. and Jeong, J. M. 2019. Monitoring of the mortalities in olive flounder (*Paralichthys olicaceus*) farms of Korea. *J. Fish Pathol.* **32**, 29-35.

초록 : *Bacillus amyloliquefaciens* JFP-02의 다양한 배양조건에서 어류 질병세균에 대한 항균 활성 효과

김동휘¹ · 문영건² · 허문수^{2*}

(¹국립수산과학원 동해수산연구소, ²제주대학교 해양과학대학 수산생명의학과)

다양한 조건의 배지 성분 및 pH, 배양온도에서 *Bacillus amyloliquefaciens* JFP-02를 배양하여 제주도 넙치 양식장에서 분리된 어류 질병세균 9종에 대한 항균 활성을 확인하였다. *Flexibacter maritimus*, *Staphylococcus caprae*, *Edwardsiella tarda*, *Streptococcus parauberis*, *Photobacterium damsela*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio campbellii*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio anguillarum*가 동정되었다. 어류 질병세균에 대하여 florfenicol이 가장 큰 감수성을 보였고, 다음으로 gentamycin, neomycin이 감수성을 보였다. 또한 penicillin에 대하여 어류 질병세균이 가장 큰 내성을 가졌으며, 다음으로 amoxycillin과 erythromycin에 대하여 내성을 보였다. *B. amyloliquefaciens* JFP-02는 pH 9에서 가장 높은 생육 활성을 나타냈지만, 항균 활성은 pH 6에서 가장 높은 것을 확인하였으며, 배양온도는 30°C에서 가장 높은 생육 활성을 나타냈지만, 항균 활성 효과는 20°C에서 가장 높은 것을 확인하였다. 배지 성분에 따른 *B. amyloliquefaciens* JFP-02의 항균 활성은 탄소원 중 dextrin을 첨가 시 가장 높은 생육 활성과 항균 활성을 보였다. 또한, 질소원 중 yeast extract를 첨가 시 가장 높은 생육 활성과 항균 활성을 보였으며, 무기염 중 MgSO₄·7H₂O, FeSO₄·7H₂O를 첨가 시 높은 생육 활성을 나타냈지만, 항균 활성 효과는 KH₂PO₄에서 가장 높은 것을 확인하였다.