

어병균 *Vibrio anguillarum* 생육 저해 인자를 생산하는 *Bacillus amyloliquefaciens* H41의 분리

김영희* · 정영기¹ · 정경태 · 류은주² · 정유정³

동의대학교 생명응용과학과, ¹동아대학교 생명공학과, ²한서대학교 미용학과, ³이화여자대학교 대학원

Received March 17, 2006 / Accepted May 2, 2006

Isolation of *Bacillus amyloliquefaciens* H41 Producing Growth Inhibition Factor against *Vibrio anguillarum*. Young-Hee Kim*, Yong-Kee Jeong¹, Kyung-Tae Chung, Eun-Ju Rhu² and Yu-Jeong Jeong³. Dept. of Life Science and Biotechnology, Dong-Eui University, Busan, Korea. Dept. of Biotechnology, ¹Dong-A University, Busan, Korea. ²Dept. of Cosmetology, Hanseo University, Seo San City, Chung Nam, Korea. ³Graduate School of Ewha Womans University, Seoul, Korea – To investigate the possible use of probiont in fish farming industry, a bacterium with inhibitory effect against *Vibrio anguillarum* was isolated from gastro-intestinal tract of the marine fish of yellow tail. It was identified to be *Bacillus amyloliquefaciens* H41 based on biochemical and physiological characterization. The optimal growth conditions of the isolated strain were 1% peptone, 1.5% yeast extract, 1% sucrose, 0.5% NaCl, 0.05% MgSO₄·7H₂O, pH 7.0-8.0, and 20 hr of incubation between 28-35°C under aeration. The culture supernatant of the isolated strain showed inhibition activity against *V. anguillarum*. Inhibition activity was cleared by forming a clear zone by a paper-disk method. The maximal production of growth inhibition factor was induced by cultivation under 1% peptone, 1.5% yeast extract, 1% sucrose, 1% NaCl, 0.05% MgSO₄·7H₂O, pH 7.5 and at 35°C. The highest growth inhibition factor production was observed after 16-24 hr cultivation under aeration. The culture supernatant of the isolated strain showed inhibition activity whereas no inhibition activity was shown from the standard *B. amyloliquefaciens* KCTC 1724 strain. The growth inhibition affected only against *V. anguillarum* among other pathogenic *Vibrios* tested here.

Key words – *Vibrio anguillarum*, *Bacillus amyloliquefaciens* H41, growth inhibition factor

현재 어류 양식업에 가장 큰 문제점으로 환경적인 요인과 아울러 세균, 바이러스 및 진균 등의 미생물 감염에 의한 집단폐사가 있다. 지금까지 이러한 어병 균을 제어하기 위하여 항생제, 화학요법제, 백신 등이 사용되고 있다[8,10]. 그러나 이러한 방법들은 수체에 광범위하게 사용하는 데는 한계가 있고, 항생물질의 다량 살포는 내성균이 출현하는 문제점이 나타나게 되었고, 어류의 내성균이 인체에까지 전이되는 상황이 전개되어 왔으며, 치어의 경우 투여 방법이나 대량의 어류에 백신이 만족스러운만한 반응을 나타내지 못한다는 어려움이 존재 한다[6].

이러한 문제 해결법의 하나로 환경 친화적인 방법을 찾고 있는데 최근에는 어류질병의 방제를 목적으로 항균물질을 생산하거나 경쟁적 저해를 유발하는 균들을 분리하였으며[2,6] 이들 중에는 이미 어병 균의 생물 방제균으로 *Pseudomonas* [2,6] 및 여러 세균을 [1,4,5,14] 산업적으로 이용하고자하는 시도가 진행 중이다. 많은 해양세균이 다른 해양세균의 증식을 억제하는 물질을 생산할 수 있고 이들은 해수, 저질층 플랑크톤 등으로부터 검출되고 있다는 결과가 보고되고 [2,4,5,14] 해양환경으로부터 분리된 몇몇 세균의 항균활성에

대한 연구를 통하여 어병균의 생물학적 방제에 대한 가능성을 높이고 있다[1,8,13].

본 과정에서 담수어와 해수어에 중요한 독성미생물이며 심각한 어병균으로 알려진 *Vibrio anguillarum*의 생물 방제를 목적으로 해양 세균 중에서 본 균에 항균력을 가지는 균을 찾고자 하였다. *V. anguillarum*의 주요 증세로는 어류의 출혈과 괴사 등을 유발하는 질병으로 수산 양식업계에 제한 요인이 되어 왔으나 병원성 요인이거나 그 작용기작에 대한 연구는 있으나 아직까지 확실한 대처법은 없는 실정이다[3,7,11,12].

따라서 본 연구는 양식업에 막대한 경제적인 손실을 가져다주는 주요 세균중의 하나인 *V. anguillarum*을 예방하기 위한 생물 전구체(probiont)의 개발[1,16]에 목적을 두고 어류에서 *V. anguillarum*의 생육에 저해를 나타내는 균을 분리하게 되어 앞으로 산업적 이용 가능성에 대한 기초자료로 활용하고자 이 분리 균의 생육특성 및 생육 저해인자의 생산 특성 등을 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

균 분리

*V. anguillarum*의 생육 저해균주를 분리하기 위하여 해산 어를 대상으로 장의 여러 부위, 지느러미, 어체 표면 등에서

*Corresponding author

Tel : +82-51-890-1535, Fax : +82-51-890-1532

E-mail : yhkim@deu.ac.kr

다양한 가검물을 회수하여 NSS buffer와 VNSS broth (Table 1)로 균을 1차 배양[15]하고, VNSS agar에 paper-disk 방법을 사용하여 *V. anguillarum*을 저해하는 균주를 다시 선별하였다. 저해를 나타내는 1종의 균주를 선별하여 생화학적 특성을 파악하여 1차 동정을 행한 뒤 정확한 확인을 위해 미생물 자동 동정분석기로(E-10136, Biolog Microstation, Biolog, USA)분석하였다. 분리균의 생화학적 성상은 표준 균주인 *Bacillus amyloliquefaciens* KCTC1724 균주를 사용하여 비교하였고 생육 저해 대상균주로는 *Vibrio anguillarum* NCMB1 표준균주를 사용하였다. 분리후 균 배양을 위하여 기본 배지로 peptone을 사용하였다.

분리 균의 생육저해물질 생성 확인

VNSS 배양배지에 분리 균을 접종하고 28℃에서 18-24 시간 배양한 후 원심 분리(3,000 xg, 10분)하여 배양 상등액을 준비하고, 균체를 초음파 파쇄기를(Sonifier 250, Branson, USA) 이용하여 파쇄하고 *V. anguillarum* NCMB1 균주는 nutrient broth에 0.5%의 NaCl을 첨가하고 28℃에서 18-24시간 배양한 다음 다시 nutrient 한천배지에 도달한 후 paper-disk를 놓고 분리 균의 배양 상등액 및 균체 파쇄액을 투여하여 투명환의 생성여부로 생육저해 물질 생성 양상으로 판독하였다. 분리 균주와 표준 균주와의 생육 저해능 비교는 분리균주와 표준균주 *B. amyloliquefaciens* KCTC 1724를 paper-disk 법을 사용하여 투명환의 생성여부로 *V. anguillarum* NCMB1의 생육 저해능의 유무를 비교하였다.

생육도 측정 및 생육저해물질 활성측정법

V. anguillarum NCMB1균의 배양배지에 분리 균 1%의 배양액을 접종하여 배양하면서 시간별로 단계적 희석을 하여 분광광도계로 (Shimazu UV-160A, Japan) 660 nm에서 생육도를 측정하고 저해물질의 활성 측정은 colony forming unit (CFU)/ml로 하였으며 1 unit의 결정은 50%의 생육억제를 기준으로 설정하였다.

Table 1. Compositions of NSS solution and VNSS agar

NSS		VNSS agar	
NaCl	17.6 g	Peptone	0.5 g
Na ₂ SO ₄	1.47 g	Yeast extract	0.5 g
NaHCO ₃	0.08 g	Glucose	0.5 g
KCl	0.25 g	Starch	0.5 g
KBr	0.04 g	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.01 g
MgCl ₂ · 6H ₂ O	1.87 g	Na ₂ HPO ₄	0.01 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.41 g	Agar	15 g
SrCl ₂ · 6H ₂ O	0.008 g	NSS solution	1 L
H ₃ BO ₃	0.008 g		
DW	1 L		

분리 균의 다른 Vibrio 속에 대한 생육 저해능

병원균으로 알려진 *V. parahaemolyticus*, *V. anguillarum*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. mimicus*, *V. vulnificus* 등의 *Vibrio* 속에 대해 분리균주가 저해능을 가지고 있는지를 paper-disk 법을 통하여 확인하였다.

분리 균의 최적 생육 및 저해물질 생산조건

분리 균의 최적 생육조건 및 저해물질 생산조건 검토를 위하여 기본 배지에, 배양시간, pH, 온도, 탄소원, 질소원을 사용하였고 금속이온농도는 0%, 0.05%, 0.15%, 0.2% 등을 달리하여 최적 농도를 비교하였다.

결 과

균 분리

해산어의 여러 부위의 장, 피부, 아가미에서 다종의 균을 분리하여 VNSS 액체배지에서 1차로 20여종의 균을 분리한 결과 방에서 분리된 균이 nutrient 한천 배지 상에서 *V. anguillarum* NCMB1에 대해 투명환이 생성되어 저해능력을 가지고 있다고 판단되어 이를 동정하기 위하여 미생물 자동 동정 분석기로 동정한 결과 95% 이상의 높은 유사값으로 *Bacillus amyloliquefaciens*로 확인되어 *B. amyloliquefaciens* H41으로 명명하고 표준균주인 *B. amyloliquefaciens* KCTC1724 와 특성을 비교한 후 사용하였다(Table 2).

저해물질 생성 확인

분리 균주인 *B. amyloliquefaciens* H41과 표준균주인 *B. amyloliquefaciens* KCTC1724 균주를 paper-disk 법을 사용하여 투명환의 생성여부로 *V. anguillarum* 생육 저해능의 유무

Table 2. Physiology and biochemical characteristics of *B. amyloliquefaciens* H41

Characteristics	<i>B. amyloliquefaciens</i> H41
Shape	Rod
O ₂ demand	Aerobic
Spore formation	+
Gram stain	Positive
Catalase production	-
Casein test	+
Urea hydrolysis	-
Indole	-
Gelatin	+
Fibrinogen	+
Skim milk	-
TSI test	AL/AC
Sodium citrate	-
H ₂ S production	-

AL: Alkali reaction, AC: Acid reaction

를 비교한 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 분리 균주인 *B. amyloliquefaciens* H41에서 만이 투명환을 나타내어 저해능이 있는 것을 관찰할 수 있었다. 이 과정에서 배양 상등액에서는 투명환이 확인되었으나 파쇄한 균체 액에서는 확인할 수 없어 이후 배양 상등액 만을 사용하였다.

다른 *Vibrio* spp.에 대한 저해 능

B. amyloliquefaciens H41의 다른 *Vibrio* spp. 에 대한 저해능 비교에서는 병원균으로 알려진 *V. fluvialis*, *V. parahaemolyticus*, *V. furnissi*, *V. mimicus*, *V. vulnificus* 등을 대상으로 저해능을 시험해본 결과 *V. anguillarum* NCMB1에만 저해 능을 나타내는 것을 관찰할 수 있었다(data not shown).

생육 저해물질 생산에 영향을 미치는 인자

균의 증식용으로는 peptone 배지를 기본배지로 하고 저해 물질의 생산에 영향을 미치는 인자로 다음과 같은 조성을 적용하였다.

초기 pH, NaCl 농도

기본배지에 pH를 각각 달리하여 저해 균의 특성을 비교한 결과 Fig. 2에서 나타난 바와 같이 pH 7.5에서 가장 높은 생육을 나타내었으며 생육저해물질의 활성을 측정해 본 결과, pH 7.5에서 가장 활성이 좋은 것으로 나타나 생육저해물질 생산을 위해 이후의 과정에서는 이 범위를 적용하였다.

B. amyloliquefaciens H41의 생육도 및 생육저해 물질의 생산에 NaCl 이 영향을 미칠 것으로 판단되어 pH 7.5로 조정된 기본 배지에 NaCl의 농도를 각기 달리하여 배양한 후 생육저해 균의 생육도와 생육저해물질 생산 정도를 측정하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 0.5% NaCl 농도일 때 저해균의 생육이 가장 높았고 NaCl의 농도가 1%일 때 생육저해물질의 활성이 가장 높았다. 초기 pH 결과와 마찬가지로 *B. amyloliquefaciens* H41의 생육과 생육저해물질 생산조건도 큰 차이가 나타남을 보여주었다.

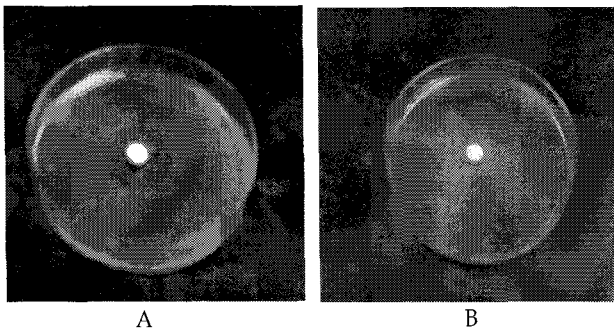


Fig. 1. Comparison of inhibition activity between *B. amyloliquefaciens* H41 and *B. amyloliquefaciens* KCTC 1724 on *V. anguillarum* NCMB1. A: *B. amyloliquefaciens* H41, B: *B. amyloliquefaciens* KCTC 1724

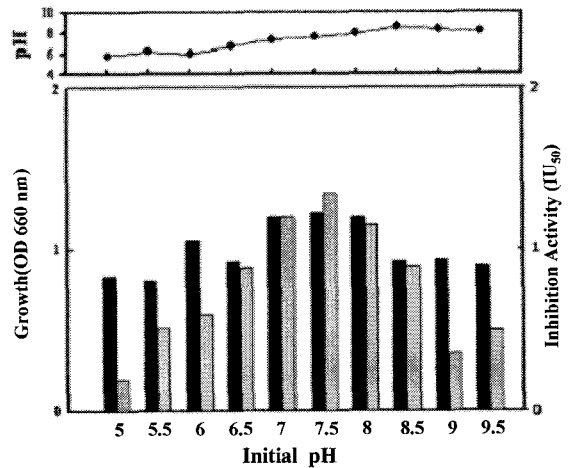


Fig. 2. Effect of initial pH on the cell growth and inhibition activity of *B. amyloliquefaciens* H41. ■ Growth, ▨ Inhibition activity

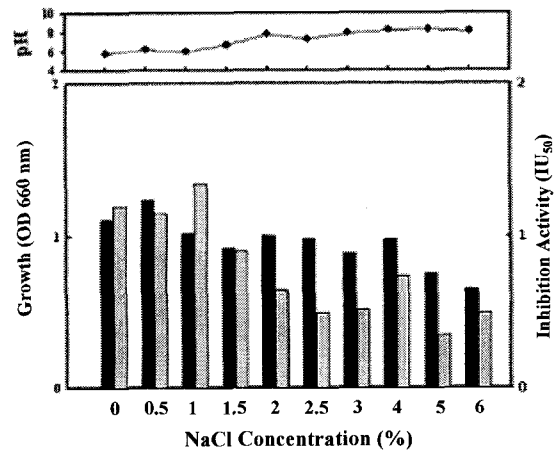


Fig. 3. Effect of NaCl concentration on the cell growth and inhibition activity of *B. amyloliquefaciens* H41. ■ Growth, ▨ Inhibition activity

탄소원, 질소원

기본 배지조성에서 각종 탄소원을 1%씩 배지에 첨가하여 배양한 결과 Fig. 4에서 보는 것과 같이 균의 증식은 모든 탄소원의 첨가에서 비교적 다른 양상을 나타내었는데 생육과 생육저해물질 생산 모두에서 sucrose가 높은 활성을 나타내어 생육저해물질의 생산을 위한 최적 탄소원은 sucrose로 결정하였다. 따라서 sucrose를 각각의 농도별로 조절하여 배양한 결과 Fig. 5에서 나타난 바와 같이 1%에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 탄소원인 sucrose를 1% 포함한 기본배지에 다양한 질소원을 첨가하여 균의 생육도와 생육저해물질의 생산을 비교한 결과 Fig. 6에서 보는 바와 같이 yeast extract의 첨가에서 균의 생육도 및 생육저해물질의 활성이 높게 나타나 기본 배지 외에 1.5%의 yeast extract를 첨가 사용하였다.

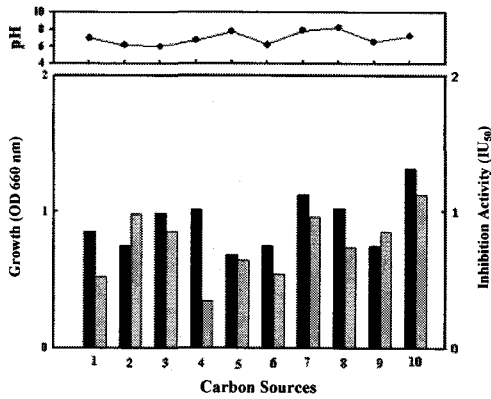


Fig. 4. Effect of carbon sources on the cell growth and inhibition activity of *B. amyloliquifaciens* H41. 1: Control, 2: Lactose, 3: Xylose, 4: Fructose, 5: Arabinose, 6: Cellobiose, 7: Glucose, 8: Galactose, 9: Maltose, 10: Sucrose. ■ Growth, ▨ Inhibition activity

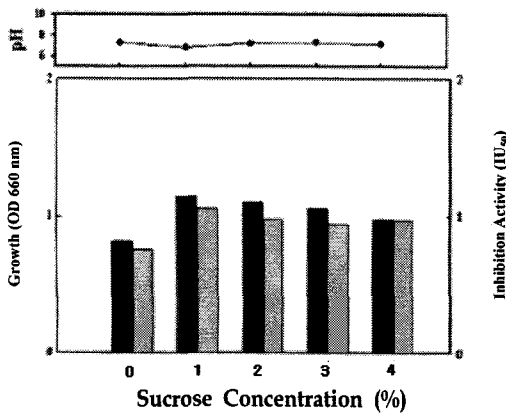


Fig. 5. Effect of sucrose concentration on the cell growth and inhibition activity of *B. amyloliquifaciens* H41. ■ Growth, ▨ Inhibition activity

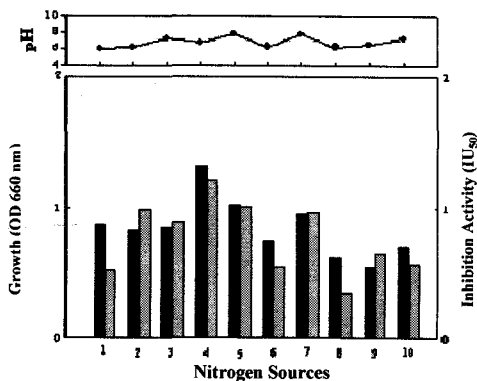


Fig. 6. Effect of nitrogen sources on the cell growth and inhibition activity of *B. amyloliquifaciens* H41. 1: Control, 2: Bactopeptone, 3: Beef extract, 4: Yeast extract, 5: Trypton, 6: Casamino acid, 7: Soytone, 8: $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$, 9: NaNO_3 NH_4Cl , 10: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. ■ Growth, ▨ Inhibition activity

배양온도

배양온도에 따른 균의 생육도는 28-35°C로 나타났으며 생육저해물질의 생산 온도는 35°C임을 Fig. 7에서 알 수 있다. 따라서 이후의 실험과정에서는 35°C를 적용하였다.

금속이온

위에서의 최적조건으로 조절한 기본배지에 여러 가지 금속이온을 0.05% 농도별로 첨가하여 배양한 결과 Fig. 8에서 나타난 바와 같이 Mg^{+2} , Ca^{+2} 를 함유하는 배지에서 활성이 나타났고 그 중에서 Mg^{+2} 을 함유하는 배지에서 가장 높은 활성을 나타내었다. Co^{+2} , Fe^{+2} , Hg^{+2} , Zn^{+2} , Ag^{+2} 을 함유하는 배지에서는 오히려 활성이 떨어지는 것으로 나타나 이 같은 금속이온은 생육저해물질의 생산을 방해하는 것으로 나타났다. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 0.05%단위로 조절하여 배양한 결과 0.05%의 농도에서 가장 높은 활성을 얻을 수 있었다(data not shown).

생육도 및 생육저해물질 최고생성시간

이상의 조건들을 검토하여 분리 균의 생육도 및 생육저해물질의 생산을 위한 최적 배양 조건은 생육은 1.0%의 peptone의 기본배지에 0.5% NaCl, 1.0% sucrose, 1.5% yeast extract, 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7.0-8.0, 배양시간은 20 시간 대였으며 온도는 28-35°C이었음을 알 수 있었으며 생육저해물질의 생산 최적 조건은 기본배지에 1.0%의 NaCl, 1.0%의 sucrose, 1.5%의 yeast extract, 0.05%의 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 첨가하여 초기배양 pH를 7.5로 조절하여 35°C에서 140 rpm으로 진탕 배양하였을 때 Fig. 9에서 보는 바와 같이 16시간대에서 생육 저해물질의 활성이 가장 높은 것으로 나타났으며 36시간이 넘어가면서 활성이 점차 떨어지는 것을 관찰할 수 있었다.

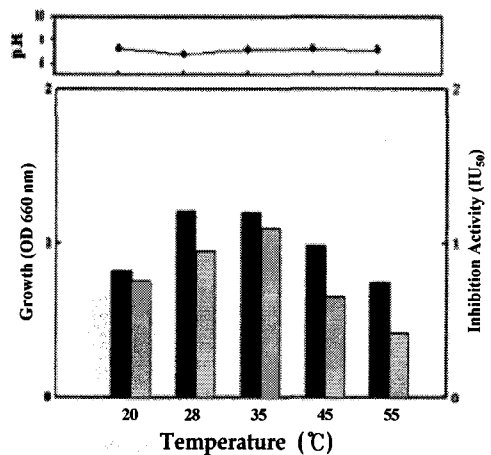


Fig. 7. Effect of temperature on the cell growth and inhibition activity of *B. amyloliquifaciens* H41. ■ Growth, ▨ Inhibition activity

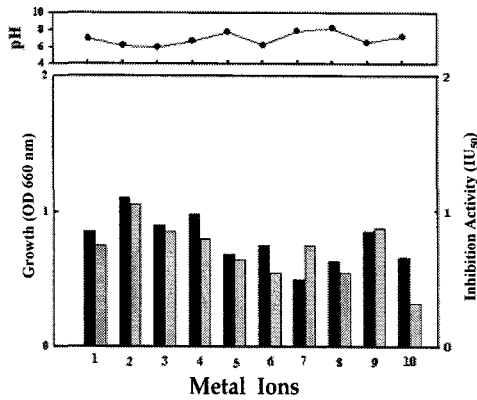


Fig. 8. Effect of metal ions on the cell growth and inhibition activity of *B. amyloliquefaciens* H41. 1: Control, 2: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 3: $MnSO_4$, 4: $CaCl_2$, 5: $CoCl_2$, 6: $FeSO_4$, 7: $HgCl_2$, 8: $ZnSO_4$, 9: $CuSO_4$, 10: $AgNO_3$.
 ■ Growth, ▨ Inhibition activity

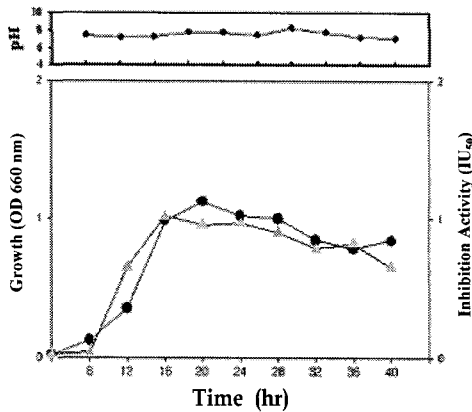


Fig. 9. Time course of cell growth and inhibition activity of *B. amyloliquefaciens* H41.
 ● : Cell growth, ▲ : Inhibition activity

고찰

어류 양식 산업에서의 질병발생은 세계적으로, 지리적으로도 많은 차이를 나타내고 있으며 항생제 사용에 따른 비용이나 관리 등이 매우 심각한 현실이다[10,12]. 이미 백신이 개발되고 상용화 되고 있으나 모든 어류의 질병을 통제하지는 못한다. 더구나 치어의 경우 만족할만한 면역효과를 얻을 수 없을 뿐만 아니라 반드시 백신에 반응한다고도 할 수 없는 실정이다[6]. 지속적인 항생물질이나 화학요법제의 경우 그 방법의 선택이 중요하며 주사에 의한 백신은 대량 사육 어류나 작은 어류의 경우 비실용적이라는 점이 지적되었으며 항생제 대량 사용이 내성균을 생성하게 되어 그 심각성은 인체에까지도 전이 된다는 점이다. Gram[6]은 항생제 내성 미생물의 증가에 따른 문제점을 해결할 수 있는 방법으로 probiotic biocontrol agent로서 비병원성 세균, 이를테면 유산균을 사용하는 방법이라든지 *Pseudomonas* 등을 이용하여 어병

균에 길항 작용을 하는 미생물을 사용하여 어병균을 제어하는 대안을 제시하였다. 또한, 이러한 목적을 달성하기 위하여 fish probiotic bacteria[1,2,4,6,16]를 탐색하는데 관심을 높게 만들었다.

Vibrio anguillarum 은 세계적으로 자연산이나 양식 어류의 패혈을 일으키는 주요 어병균이다[3,7,11,12]. 따라서 이를 구제하기 위한 다각적인 시도도 이루어지고 있는 실정이다. 최근에는 육지 양식어류 질병을 자외선을 이용하여 물고기의 질병을 일으키는 기생충과, 곰팡이, 세균, 바이러스 등을 죽이는데 상당한 효과를 본 것으로 보고되었으며 오존을 이용한 살균소독법도 이용 가능하다[9].

본 과정에서는 환경 친화적인 방법개발의 하나로 해양 미생물 군집 중에서 어병균의 길항작용을 하는 미생물을 찾자 시도한 결과 여러 종의 미생물군집들 중에서 한 종류만을 찾을 수 있었다. 이미 살아있는 어류의 여러 부위에 많은 종류의 미생물이 분포되고 있음이 입증되었으므로[5,13,14,15] 본 과정에서도 여러 종류의 해산어를 대상으로 아가미, 장, 표피 등에서 분리를 시도한 결과 방어의 장내에서 추출된 가검물의 배양과정에서 *B. amyloliquefaciens* H41를 분리할 수 있었는데 분리에 사용한 어류는 자연산이었다. 이 분리 균만이 *V. anguillarum*의 생육에 영향을 미치는 것을 확인 할 수 있었는데 이러한 성과로 볼 때 자연산 어류의 부착세균 군집 중에서 어병균의 biocontrol에 이용할 수 있는 균주의 탐색이 가능할 것으로 보였다.

본 과정에서 저해능에 대한 감수성 비교를 위하여 분리 균과 표준균주를 동시에 시험한 결과 분리균주는 *V. anguillarum* NCMB1에 저해능을 나타내었으나 *B. amyloliquefaciens* KCTC1724 균주는 저해 능을 나타내지 않아 균마다 감수성에 대한 차이를 볼 수 있었으며 이 결과는 앞으로도 다양한 균종의 분리를 요구하는 부분이기도 하다.

Westerdahl[17]은 어류의 여러 부위를 달리하여 어병균 억제 균의 분포를 관찰하였는데 어류의 위, 위 유문부, 심이지장, 공장, 직장 등에 분포된 균총 중에서 저해 균들의 분리를 보고하였는데 각각의 부위에서는 분리된 균수가 달랐으며 특히 심이지장에서 많은 균의 분리 결과를 발표하였다. 이 같은 보고를 볼 때 어류의 장이 어병균 생육 억제 균의 분리에 도움이 될 것으로 판단되어졌으나 본 과정에서는 내장의 부위를 구분하지 않아 정확하게 어떤 부위라고 판단 할 수는 없었다. 앞으로는 부위별로 분리를 시도하면 좋은 결과를 얻을 수 있을 것으로 기대되며 다양한 어종을 대상으로 분리를 시도하면 다른 어병균에 저해를 나타내는 균의 분리도 가능 할 것으로 생각되었다.

해양 세균 중에는 여러 균이 있으나 본 과정에서는 병원성이 알려져 있는 대표적인 균에만 저해능을 검토하였으나 다양한 해양 균들을 대상으로 시험해 볼 필요가 있는 것으로 사료되며 이미 보고 된 자료에서[1,2,16,17] 해양 미생물들 간

의 길항사례를 제시하였으며 특히 본 균이 어류의 장에서 분리되었으므로 양식 어류의 여러 병원체의 biocontrol 면에서 지속적인 균의 분리를 시도한다면 의외로 좋은 결과를 얻을 수 있을 것으로 판단된다. Gram[6] 등이 해산어의 정상 균총 중에서 길항작용을 하는 biocontrol 목적을 위한 가능성을 제시하였으며 본 과정에서도 시판중인 해산어를 중심으로 분리를 시도한 결과 본 분리 균을 분리 할 수 있었는데 지속적인 분리를 통하여 다양한 균종의 분리를 시도해 볼 필요가 있다고 사료된다. 앞으로 본 균에 의한 생육저해 물질을 정제 과정 등을 통하여 물리화학적 성상 및 특성 등을 밝혀 불예정으로 이는 다음 과정에서 밝힐 예정이다.

요 약

양식 산업의 문제점인 어병균을 방제하기 위한 생물 전구체의 개발을 목적으로 해산어의 내장 추출물에서 어병균인 *Vibrio anguillarum*의 생육을 저해하는 새로운 균주를 분리, 동정하여 *Bacillus amyloliquefaciens* H41으로 명명하고 생육 특성 및 생육저해인자 생성 조건을 검토하였다. 분리 균의 생육 최적 조건은 기본배지로 1% peptone, 질소원으로 1.5% yeast extract, 탄소원으로 1% sucrose, 0.5% NaCl, 금속이온으로는 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 이었으며 pH는 7.0-8.0, 온도는 28-35°C에서 20시간의 진탕배양이었다. *V. anguillarum* 생육 저해물질은 *B. amyloliquefaciens* H41의 배양 상등 액에서 볼 수 있었는데 paper-disk 법으로 투명환의 생성여부로 확인하였다. 분리 균에 의한 생육저해 물질 생산 최적 조건은 1% peptone, 1.5% yeast extract, 1% NaCl, 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1%의 sucrose이었으며 최적 pH는 7.5, 최적온도는 35°C이었다. 분리 균은 최적 배양조건하에서 저해물질을 배양 후 16 시간부터 24시간대에 가장 높은 활성을 나타내었다. 저해 활성반응은 분리 균에서는 저해 활성을 나타내었으나 *B. amyloliquefaciens* KCTC1724 표준균주에는 저해활성을 나타내지 않는 대조를 보였다. 또한 분리 균에 의해 생산된 저해물질은 *V. anguillarum* 에는 생육 억제 효과를 나타내었으나 다른 인체 병원성 *Vibrio*에는 전혀 영향을 미치지 않는 것으로 나타나 균주 선택성이 특이적이었다.

감사의 글

본 연구는 2005학년도 동의대학교 학술지원연구비 지원에 의하여 이루어졌기에 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Austin, B., L. F. Stuckey, P. A. W. Robertson, I. Effendi and D. R. Griffith. 1995. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *J. Fish Dis.* **18**, 93-96.
2. Bly, J. E., S. M. A. Quiniou, M. A. Lawson and L. W. Clem. 1997. Inhibition of *Saprolegnia* pathogenic for fish by *Pseudomonas fluorescens*. *J. Fish Dis.* **20**, 35-40.
3. Cross, J. H., M. H. Schiewe and S. Falkaw. 1977. Evidence for plasmid contribution to the virulence of the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Infect. Immun.* **27**, 897-902.
4. Dopazo, C. P., Lemos, M. L., Lodeiros, C. Bolinches, J. L. Barja and A. Torranzo. 1988. Inhibitory activity of antibiotic-producing marine bacteria against fish pathogens. *J. Appl. Bacteriol.* **65**, 97-101.
5. Febregas, J., A. Munoz, A. Otero, J. L. Barja and M. Romaris. 1991. A preliminary study on antimicrobial activities of some bacteria isolates from marine environment. *Nippon Suisan Gakkaishi* **57**, 1377-1382.
6. Gram, L., J. Melchiorson, B. Spanggard, I. Huber and T. F. Nielsen. 1999. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(3), 969-973.
7. Horne M. T. and A. Baxendale. 1983. The adhesion of *Vibrio anguillarum* to host tissues and its role in pathogenesis. *Journal of Fish Diseases* **6**, 461-471.
8. Horne M. T., M. Tatner, S. Mcderment and C. Agius. 1982. Vaccination of rainbow trout, Richardson, at low temperatures and the long-term persistence of protection. *Journal of Fish Diseases* **5**, 343-345.
9. Itoh, S., Yoshimizu, M. and Ezura, Y. 1997. Disinfectant effects of low level of total residual oxidants in artificial seawater on fish pathogenic microorganisms. pp. 92-102, *Nippon Suisan Gakkaishi* 63, Japan.
10. Kim. E. and Aoki, T. 1993. Drug resistance and broad geographical distribution of identical R plasmid of *Pasteurella piscicida* isolated from cultured yellowtail in Japan. *Microbiol. Immunol.* **37**, 103-109.
11. Kim, Y. H. 1998. Purification of hemolysin from *Vibrio anguillarum* isolated from fish. *J. Life Science* **8**(5), 598-603.
12. Larsen, J. L. and H. B. Rasmussen. 1988. Study of *Vibrio anguillarum* strains from different sources with emphasis on ecological and pathological properties. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**(9), 2264-2267.
13. Lemos, M. L., A. E. Toranzo, and J. L. Barja. 1985. Antibiotic activity of epiphytic bacteria isolated from intertidal seaweeds. *Microb. Ecol.* **11**, 149-163.
14. Nakamura, A., Takahashi, K. G. and, K. Mori. 1999. Vibriostatic bacteria isolated from rearing seawater of oyster blood stock: potentially as biocontrol agents for vibriosis in oyster larvae. *Fish Pathol.* **34**, 139-144.
15. Olsson, J. C., A. Westerdaahl, P. L. Conway, and S. Kjelleberg. 1992. Intestinal colonization potential of turbot(*Scophthalmus maximus*) and dab(*Limanda limanda*)-associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**(2), 551-556.

16. Spanggaard, B., I. huber, J. Nielson, E. B. Sick, C. B. Pipper, T. Martinussen, W. J. Slierendrecht and L. Gram. 2001. The probiotic potential against vibriosis of the indigenous microflora of rainbow trout. *Environ. Microbiol.* **3(12)**, 755-765.
17. Westerdahl, A., J. C. Olsson, S. Kjelleberg and P. L. Conway. 1991. Isolation and characterization of turbot (*Scophthalmus maximus*) associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2223-2228.