

어류 병원세균, *Listonella anguillarum*에 대한 *Pseudomonas aeruginosa* MB I-3의 항균 효과

이수정* · 윤이나 · 김진도** · 이정식 · 김은희†

전남대학교 수산생명의학과, *부산광역시 수산자원연구소, **국립수산과학원 병리연구과

Antibacterial Effects of *Pseudomonas aeruginosa* MB I-3 against *Listonella anguillarum*

Su-Jung Lee*, I Na Youn, Jin-Do Kim**, Jung Sick Lee and Eunheui Kim†

Department of Aqualife Medicine, Chonnam National University, Yeosu 550-749, Korea

*Busan Marine Resources Research Institute, Busan 618-814, Korea

**Pathology division, National Fisheries Research and Development Institute, Busan 619-705, Korea

To study the possible use of probiotics in fish farming, The *in vitro* and *in vivo* antibacterial effects of *Pseudomonas aeruginosa* MB I-3 (MB I-3) against the fish pathogenic bacterium *Listonella anguillarum* were evaluated. The inhibitory effects of MB I-3 against vibrios were investigated by the double layer method and the co-culture. The results showed that MB I-3 inhibited the growth of pathogenic vibrios including *Listonella anguillarum*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio furnissii*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus*. Extracellular substances obtained from the cultural supernatant of MB I-3 by ethyl acetate extraction showed inhibitory effects on *L. anguillarum*. The antibacterial substance of MB I-3 was evaluated to destroy the cell membrane of *L. anguillarum* in electron micrographs. The probiotic effects of MB I-3 was tested by exposing olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) fry to *L. anguillarum* with or without MB I-3. The cumulative mortality of olive flounder fry infected with *L. anguillarum* was 24% in the group with MB I-3, while it was 46% in the control group without MB I-3. These results indicate that MB I-3 has potential applications as a probiotic for the control of fish pathogenic vibrios in fish rearing system.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa* MB I-3, *Listonella anguillarum*, Probiotics, Extraction, Antibacterial effect

양식 어류에 발생하는 질병은 양식 생산력의 심각한 저하를 가져온다. 질병 치료를 위하여 사용되는 항균제는 치료에 효과적이고 사용이 편리한 장

점이 있지만, 내성균 발생이나 항균 물질의 체내 잔류와 같은 문제점들을 안고 있다. 따라서 양식 어류에 있어서 질병 원인균의 과다 발생을 억제하고 어체의 건강을 유지시키기 위한 probiotics 개발에 관심이 집중되어 많은 연구들이 진행되어 왔다 (Irianto and Austin, 2002; Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008; Nwachi, 2013; Tuan *et al.*, 2013). 특히 많은

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

연구자들은 항세균성, 항곰팡이성, 항바이러스성 물질을 생산하는 비병원성의 세균을 탐색하여 양식장에 적용하고자 노력해왔다. 방 등 (1999)은 *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus coagulans* 및 lactoferrin을 이용하여 넙치 연쇄구균증에 대한 정균 효과를 조사한 결과 *L. plantarum*은 *in vitro* 상에서 *Streptococcus* sp.의 증식을 억제하는 동시에 어체에 성공적으로 정착된다고 보고하였다. Yang *et al.* (2003)은 발효 식품으로부터 3종의 어류 병원 세균에 대하여 항균력을 갖는 유산균을 분리하여 probiotic 균주로의 사용 가능성을 제기하였고, Cha *et al.* (2012)은 probiotic으로 *Bacillus* sp.를 첨가한 사료를 공급하였을 때 넙치 치어의 성장이 향상되었고 질병에 대한 저항성이 증가되었다고 보고하였다. Myouga *et al.* (1995)은 저질에서 분리한 *Aeromonas* sp.가 항바이러스성 물질을 생산하여 IHNV에 대한 저해 능력이 있음을 입증한 바 있으며, Harikrishnan *et al.* (2010)은 probiotics를 첨가한 사료가 넙치의 lymphocystis disease virus(LCDV) 질병에 대한 저항성을 증가시켰다고 보고하였다.

*Listonella anguillarum*은 1893년 뱀장어 red-pest의 원인균으로 최초 보고된 이래로 다양한 어종에서 질병을 유발하는 것으로 알려져 왔다. 특히 감염어의 혈액과 내부 장기에 병원균이 다량 존재하는 전형적인 출혈성 패혈증을 일으켜 양식장에 막대한 경제적 손실을 가져온다 (Austin and Austin, 2012). *L. anguillarum*에 대한 probiotics를 탐색하기 위하여 Balcázar *et al.* (2008)과 Chabrilón *et al.* (2006)은 어류의 장으로부터 lactic acid bacteria (LAB)를 분리하여 항균 효과를 확인하였고, 분리균주가 *in vitro*에서 어류의 장 점막에 정착하여 병원균의 부착을 억제하므로 어류 양식을 위한 probiotics로 이용 가능성이 있음을 밝힌 바 있다.

해산어 종묘 생산장에서 발생하는 세균성 질병은 폐사율이 높은 반면, 사육수의 환수 부족, 약제 투여 방법의 한계성 등으로 항생제 투여에 의한 치료 효과를 기대하기 어렵다 (Olafsen, 2001). 특히 사육 수조 내에서 나타나는 다양한 종류의 비브리오균들은 양식 어류의 초기 발생 단계에서 생산력 감소의 한 원인이 되고 있다 (Eddy and Jones, 2002). Hansen and Olafsen (1999)은 어류의 난이나

자어를 probiotic 균주와 함께 사육하였을 때 난이나 자어 표면의 세균총이 조절되어 질병 예방이 가능하다고 보고한 바 있다. 따라서 본 연구는 이전 연구에서 *L. anguillarum*에 대하여 생장 억제 효과가 있는 것으로 밝혀진 *Pseudomonas aeruginosa* MB I-3를 이용하여 넙치의 비브리오병에 대한 생물학적 방제 효과를 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

실험 균주 및 배양 배지

항비브리오 세균으로 이전 연구에서 분리된 *P. aeruginosa* MB I-3 (MB I-3)를 사용하였다 (Byon and Kim, 2000). 병원성 비브리오 균주로는 *L. anguillarum*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio furnissii*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* 등 8종을 균주 센타 (Korean Collection for Type Culture)로 부터 분양 받아 사용하였다. 일반 증균 배지로 trypton soy broth (TSB, BD)와 trypton soy agar (TSA, BD)를 사용하였고, 비브리오를 선택 배양하기 위하여 thiosulfate citrate bile salt sucrose (TCBS, BD)배지를 사용하였다.

In vitro 항균 활성

1) Plate assay

병원성 비브리오에 대한 MB I-3 균주의 항균 범위와 항균력을 알아보기 위하여 double layer법 (Sugita *et al.*, 1996)을 실시하였다. TSB에서 25°C로 24시간 배양한 MB I-3 균액을 1% NaCl이 첨가된 TSA 배지 중앙에 5 µl씩 접종하였다. 25°C에서 3일간 배양한 후, chloroform gas에 20분간 노출시켜 MB I-3 균주를 사균화하였다. *Vibrio* spp.를 10⁷ CFU/ml 함유한 0.7% soft agar를 MB I-3 plate에 중층시켜 25°C에서 2일간 배양하면서 생겨난 생장 저지대의 크기를 비교하였다.

2) Broth assay

해수 내에서 두 균주의 생장을 알아보기 위하여, 두 균주를 혼합으로 접종하여 배양 시간에 따른 생균수 변화를 조사하였다. MB I-3 와 *L. anguilla-*

*rum*을 각각 2% NaCl이 첨가된 TSB에서 25°C로 24시간 배양하여, 12,000 rpm으로 10분간 원심 분리한 후 0.8% 멸균 생리식염수로 3회 세척한 후 희석하여 1.2×10^9 CFU/ml 농도의 세균 현탁액을 준비하였다. 20 ml 멸균 해수에 두 균주를 1:1로 접종한 후 25°C에서 진탕 배양하면서 0, 3, 12, 24, 36, 48, 72, 96시간에 시료를 채취하여 단계 희석한 후 TSA와 TCBS에 배양하여 생균수를 조사하였다.

생장 억제된 *L. anguillarum*의 전자현미경 관찰

MB I-3의 항균 기작을 알아보기 위하여 투과 전자현미경 (JOEL 12,000 EX II)으로 생장이 억제된 *L. anguillarum*의 형태 변화를 관찰하였다. 시료는 MB I-3균주와 *L. anguillarum*을 TSB에서 25°C, 24시간 혼합 배양 후 원심 분리로 집균한 것과 평판배지에서 항균 물질의 확산으로 생장이 저지된 *L. anguillarum*을 모아서 사용하였다. 대조구는 균주를 TSB에서 단독 배양한 것을 사용하였다.

MB I-3 배양액으로부터 항균 물질 추출

MB I-3의 배양액으로부터 항균 물질을 추출하기 위하여 Lategan *et al.* (2006)의 방법에 따라 실험하였다. MB I-3를 TSB 1,000 ml에 접종하여 25°C에서 24시간 배양한 뒤 1시간 동안 70°C에서 열처리 한 후 4°C에서 6,000 rpm으로 15분간 원심 분리하여 얻은 상층액을 0.45 µm membrane filter (Adventec)로 여과하였다. 여과한 배양액과 ethyl acetate (Junsei)를 1:0.5, 1:0.3, 1:0.2 비율로 3회 분획하였으며 얻어진 ethyl acetate 용해성 물질은 회전식 진공농축기 (Buchi)를 이용하여 농축하였다. 농축한 물질은 dimethyl sulfoxide (DMSO, Junsei) 200 µl에 녹였다.

*L. anguillarum*을 도달한 TSA에 15 µl의 MB I-3 추출물을 흡수시킨 disk를 올려, 25°C에서 24시간 배양한 후 형성된 성장 저지대의 크기를 측정하였다.

MB I-3의 *in vivo* 항균 효과

시험어는 종묘생산장에서 1~2 cm (30 일령) 크기의 넙치 치어를 구입하여 사용하였다. 공격 실험을 위하여 MB I-3와 *L. anguillarum* 두 균주를 각각

TSB에서 25°C로 24시간 동안 배양한 후 원심 분리하고, 집균된 것을 0.65% 멸균 생리식염수로 세척 및 희석하여 현탁액을 준비하였다. 30 l의 사각 수조에 넙치를 100마리씩 3개 그룹 (2반복)으로 수용한 후 2개 그룹에 *L. anguillarum*을 최종 농도 10^5 CFU/ml 되도록 투여하고, 그 중 한 실험구에는 MB I-3 균주를 같은 농도로 투여하였다. 나머지 한 그룹은 아무 처리도 하지 않고 대조구로 사용하였다. 실험 기간 중 수온은 18~20°C로 유지하였으며 분말사료를 1일 3회 (어체중의 5%) 투여하였다. 환수는 거의 하지 않았으며 자연 증발된 수량의 물만 추가해 주면서 2주간 폐사를 관찰하였다. MB I-3 접종에 따른 사육 해수 내 세균총의 변화를 알아보기 위하여 실험 0, 7, 14일째 사육 수조의 여러 곳에서 해수를 채취하여 혼합한 후 시료로 사용하였다. 사육수 시료는 단계 희석한 후 TSA와 TCBS에 접종하여 25°C에서 24시간 배양하여 성장한 집락을 계수하였으며 총 균수 및 비브리오균과 MB I-3의 균수 변화를 조사하였다.

결 과

In vitro 항균 효과

P. aeruginosa MB I-3 (MB I-3)는 다양한 비브리오 속 세균에 대하여 항균력을 보였으며 *L. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *V. furnissii*, *V. parahaemolyticus* > *V. cholerae*, *V. vulnificus* > *V. fluvialis*, *V. harveyi* 순으로 저지대의 크기가 크게 나타났다. 특히 *L. anguillarum*에 대하여는 성장저지대가 25 mm 이상으로 높은 항균력을 보였다 (Table 1, Fig. 1). MB I-3 균주와 *L. anguillarum*을 멸균 해수에 혼합 접종한 후 시간 경과에 따른 생균수 변화를 조사하였다 (Fig. 2). 96시간 동안 두 균주 모두 $10^4 \sim 10^6$ CFU/ml 농도를 유지하였으나, 배양 9시간부터 *L. anguillarum*은 다소 성장 감소를 보이는 반면 MB I-3는 그 수가 일정하거나 다소 증가하는 경향을 보였다.

전자현미경 관찰

생장이 억제된 *L. anguillarum*을 전자현미경 ($\times 12,000$, $\times 25,000$)으로 관찰한 결과를 정상 상태

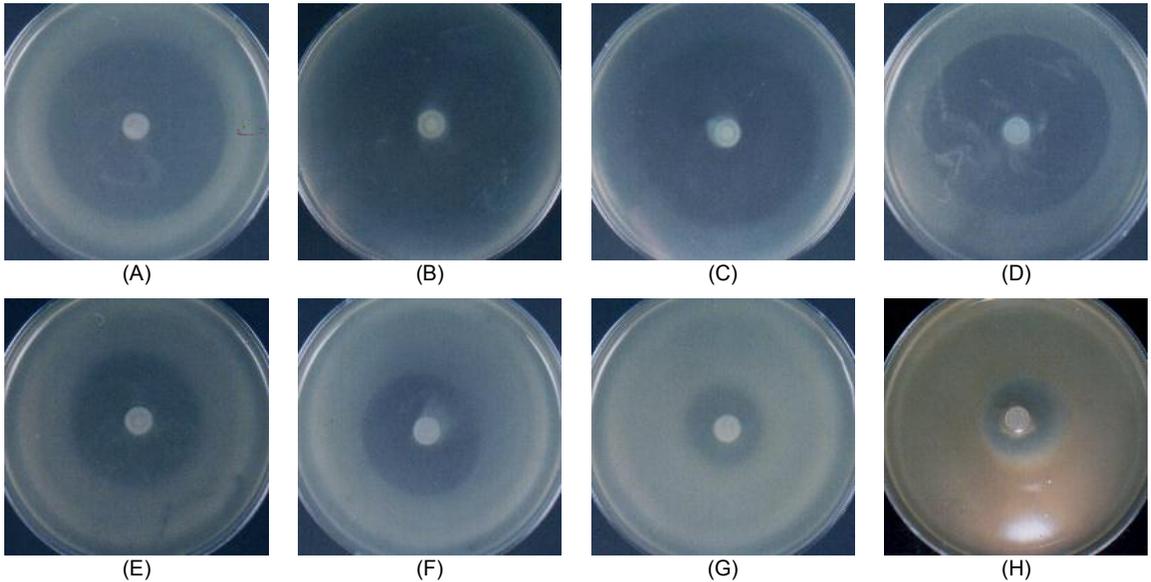


Fig. 1. Vibriostatic activity of *Pseudomonas aeruginosa* MB I-3 by the double layer method : (A) *Listonella anguillarum*, (B) *Vibrio alginolyticus*, (C) *Vibrio furnissii*, (D) *Vibrio parahaemolyticus*, (E) *Vibrio cholerae*, (F) *Vibrio vulnificus*, (G) *Vibrio fluvialis*, (H) *Vibrio harveyi*.

Table 1. Inhibitory effects of MB I-3 on the growth of pathogenic *Vibrio* strains. The activity was estimated as a size of clear zone after incubation on TSA plate at 25°C for 24 hrs.

Pathogen	Activity ^{a)}
<i>Listonella anguillarum</i>	+++
<i>Vibrio alginolyticus</i>	+++
<i>Vibrio furnissii</i>	+++
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	+++
<i>Vibrio cholerae</i>	++
<i>Vibrio vulnificus</i>	++
<i>Vibrio fluvialis</i>	+
<i>Vibrio harveyi</i>	+

^{a)}+++ (> 25 mm), strong inhibition
 ++ (16-25 mm), medium inhibition
 + (< 15 mm), weak inhibition

의 균주와 비교하였다. 대조구의 *L. anguillarum*에 비해 생장이 억제된 *L. anguillarum*은 세포막이 심하게 변형되거나 파괴되어 세포내 물질이 외부로 유출된 것을 볼 수 있었다 (Fig. 3). 이러한 현상은 broth에서보다 plate에 형성된 생장 저지대 경계부 세포에서 더욱 심하게 나타났다.

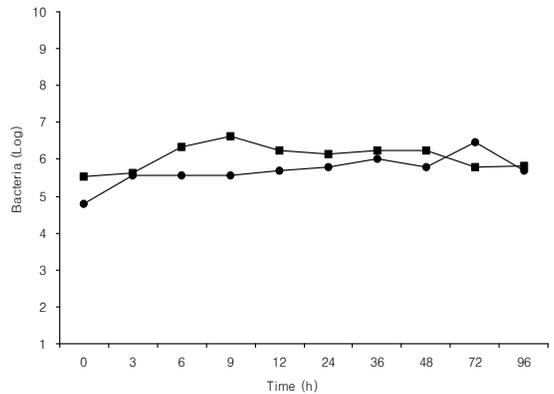


Fig. 2. Growth of MB I-3(●) and *Listonella anguillarum*(■) in sterilized marine water by mixed shake bottle culture.

MB I-3 배양액에서 추출한 물질의 항균력

MB I-3 배양 여액을 ethyl acetate로 추출한 추출물에서도 *L. anguillarum*에 대한 생장 억제대가 25 mm 정도 형성되었다 (Fig. 4)

넙치 치어에 대한 MB I-3의 in vivo 항균효과

넙치 치어 사육수에 *L. anguillarum*과 MB I-3를

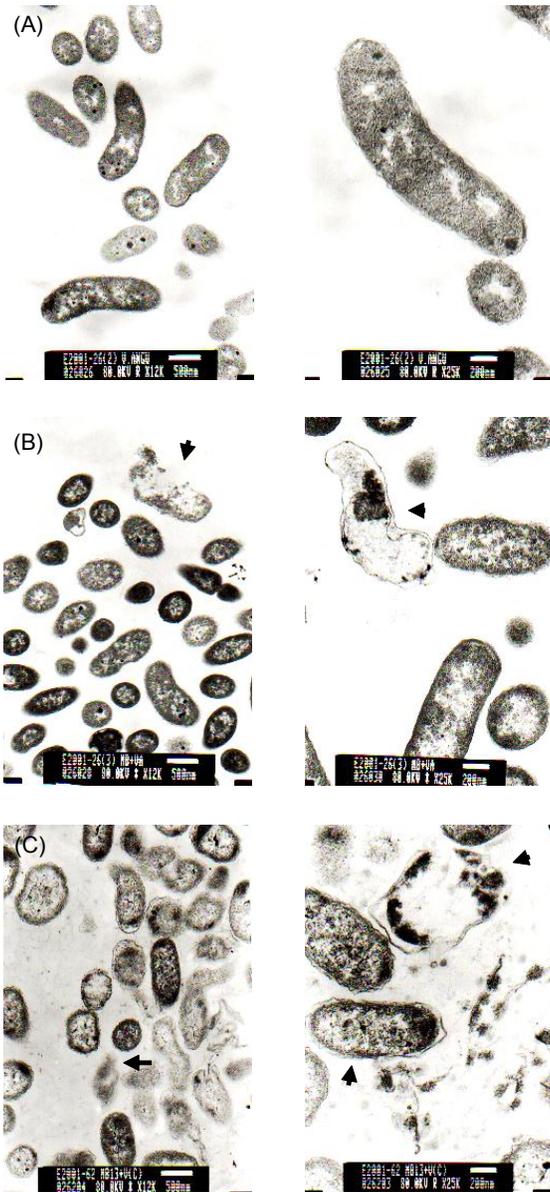


Fig. 3. Transmission electron micrographs of *Listonella anguillarum* in control (A) and the irregular cell membrane of *L. anguillarum* (arrows) after co-cultivation with MB I-3 at 25°C for 24 hrs in broth (B) or on agar plate (C). ($\times 12,000$, $\times 25,000$)

접종한 후 누적폐사율을 조사한 결과 (Fig. 5), *L. anguillarum* 감염구는 실험 3일째부터 폐사어가 나타났고, 2주 후에는 46%의 누적 폐사율을 보인 반면, MB I-3를 동량 투여한 실험구는 누적 폐사율

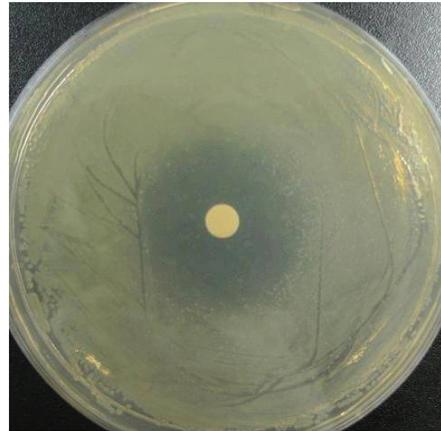


Fig. 4. Inhibitory effect on *Listonella anguillarum* of the extra cellular substance obtained from the cultural supernatant of *Pseudomonas aeruginosa* MB I-3 by ethyl acetate extraction.

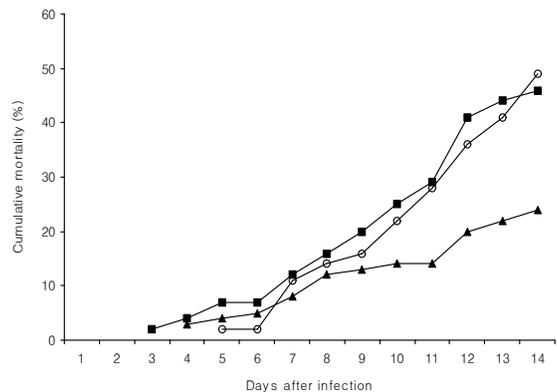


Fig. 5. Cumulative mortality of the flounder larvae infected with *Listonella anguillarum* with and without *Pseudomonas aeruginosa* MB I-3. ▲, *L. anguillarum* infection with 10^5 CFU/ml of MB I-3; ■, *L. anguillarum* alone; ○, Control (no inoculation)

이 24%였다. 그러나 아무 처리도 하지 않은 대조구에서도 누적폐사율이 49%로, *L. anguillarum* 단독 투여구와 비슷하게 나타났다.

L. anguillarum 감염 전 후, 사육수내 총 세균수와 비브리오균 수를 조사한 결과 (Table 2), 실험 전 사육수에는 비브리오균 수가 총 세균의 53.3%인 160 CFU/ml이었고, 어류의 장에서도 평균 1.6×10^3 CFU/fish 검출되었다. 사육수내의 총 세균수는 계속 증가하여 실험 2주째, *L. anguillarum* 단독 접

Table 2. Total bacteria and vibrios in the tanks before and after the infection of *Listonella anguillarum*. The values given are colony forming units per ml determined by the spread plate method on TSA and TCBS

Tank	Before infection	1 week after infection	2 weeks after infection
<i>L. anguillarum</i> alone	300 ^{a)} (160) ^{b)}	7,700 (2,730)	38,100 (1,230)
<i>L. anguillarum</i> + MB I -3	300 (160)	6,200 (370)	35,000 (180)
Control	300 (160)	5,300 (960)	81,000 (790)

^{a)}Total bacteria, ^{b)}Vibrios

중구와 MB I -3 균주 투여구에서 각각 38,100 CFU/ml, 35,000 CFU/ml로 유사한 수치를 나타내었다. 비브리오균 수는 *L. anguillarum* 단독 투여구에 비해 MB I -3를 함께 접종한 실험구에서 상당한 감소를 보였는데, 접종 2주 후에는 *L. anguillarum* 단독 투여구에 비해 14.6% (180 CFU/ml)에 불과했다. 한편 아무 처리하지 않은 대조구에서는 *L. anguillarum* 단독 투여구에 비해 비브리오균이 1주째 35%, 2주째 64%를 나타내었다.

고 찰

미생물은 어류의 표피, 아가미, 장관 등과 접해 있으면서 질병을 일으키는 한편, 양식생물의 영양 공급 및 수질과 질병의 control에 관여하는 등 어류 양식장에서 중요한 역할을 하고 있다 (Moriarty, 1997; Ringo and Birkbeck, 1999; Eddy and Jones, 2002). 어류의 발생 초기 단계에 형성되는 세균총은 환경의 미생물총에서 비롯되며 이후 치어의 발달에 영향을 줄 수 있다고 보고되어있다 (Hansen and Olafsen, 1999; Olafsen, 2001; Eddy and Jones, 2002). Probiotics는 개발 초기에 숙주 장내 세균의 균형을 조절함으로써 숙주에 유익한 영향을 주는 살아있는 미생물 먹이로 정의하였으므로 이들 유용세균의 숙주 장내 정착에 관한 많은 연구가 진행되어 있다 (Vine et al., 2004; Balcázar et al., 2006; Tuan et al., 2013). 그러나 probiotics는 장내에 정착

하지 않더라도 사육수의 미생물총을 조절함으로써 어류의 표피, 아가미 등에 접해있는 병원균의 수를 감소시켜 질병을 예방할 수 있다 (Kesarcodi-Watson et al., 2008; Tuan et al., 2013). Riquelme et al. (2000)은 scallop (*Argopecten purpuratus*) 유생 부화장에 probiotics를 첨가하여 유생의 미생물총을 조절함으로써 질병 예방이 가능함을 입증하였고, Nakamura et al. (1999)은 참굴 (*Crassostrea gigas*) 유생에 *V. alginolyticus* 감염 시 사육수에서 분리한 probiotics를 첨가할 경우 대조구 (8.4%)에 비해 생존율이 78%로 증가한다고 보고하였다. 본 연구에서 사용한 MB I-3도 다양한 병원성 비브리오에 대하여 항균력을 보였고 (Table 1 and Fig. 1), 해수에 함께 있을 때 *L. anguillarum*의 성장을 억제하는 효과가 인정됨으로써 (Fig. 2) 어류 사육수내 바브리오균의 수를 제어하기 위한 목적으로 사용할 수 있을 것으로 보였다.

한편 probiotic 균주가 분비하는 항균 물질에 대한 연구도 다양하게 이루어져 있는데, Lategan et al. (2006)은 *Aeromonas media* A199가 생산하는 항균성 물질이 indole임을 밝힌 바 있고, Castillo et al. (2008)은 해수에서 분리한 *Pseudoalteromonas* sp. A1-J11로부터 AVS-03a라고 명명한 항비브리오 물질을 추출하여 정제하였다. MB I-3 배양 여액을 ethyl acetate로 분획하여 얻어진 추출물도 *L. anguillarum*에 대한 성장 억제 효과를 나타냄으로써 (Fig. 4) MB I-3의 항균 물질은 세포 내에서 생산되어 외부로 분비되며 ethyl acetate로 추출 가능함을 알 수 있었다. 한편 생장이 억제된 *L. anguillarum*의 전자현미경 사진을 통해 볼 때 (Fig. 3), MB I-3가 분비하는 항균물질은 세포막을 파괴시킴으로써 살균 효과를 나타내는 것으로 추정된다.

Probiotic 세균은 일반적으로 siderophores, antibiotics, bacteriocins, lysozymes 등을 단독 또는 복합적으로 생산하거나, 유기산에 의한 pH 변화로 병원균의 성장을 억제하거나, 다른 균과의 영양 경쟁, 소화 효소 분비, 수질 개선 및 면역력 증강 등을 통하여 병원균에 대한 숙주의 저항력을 높이는 것으로 알려져 있다 (Balcázar et al., 2006; Crab et al., 2012; Tuan et al., 2013). 따라서 MB I-3 균주는 1차적으로 영양 경쟁보다는 항균 물질을 생산함으

로써 *L. anguillarum*의 성장을 억제하는 것이라 사료되지만 다른 효과에 대한 추가 연구도 필요하다.

넙치 치어 사육수에 *L. anguillarum*과 MB I-3를 접종한 후 누적 폐사율을 조사한 결과 (Fig. 5), *L. anguillarum* 감염구에 비해 MB I-3를 동량 투여한 실험구는 20% 감소된 누적 폐사율을 보였다. 그러나 아무 처리도 하지 않은 대조구에서도 누적 폐사율이 49%로, *L. anguillarum* 단독 투여구와 비슷하게 나타났는데, 이는 사육수와 어류에 상재하고 있던 비브리오균 (160 CFU/ml, 1.6×10^3 CFU/fish)이 폐사율에 영향을 미친 것으로 생각된다. *L. anguillarum* 감염 전 후, 사육수의 총 세균수와 비브리오균 수를 조사한 결과 (Table 2), 감염 전에는 사육수내에 비브리오균 수가 총 세균의 53.3%였다. 접종 2주째, 비브리오 단독 접종구와 MB I-3 균주 투여구에서 총 세균은 각각 38,100 CFU/ml, 35,000 CFU/ml 로 나타났으나 비브리오균 수는 MB I-3 균주를 함께 접종한 실험구에서 *L. anguillarum* 단독 투여구에 비해 14.6%를 나타내었다. 한편 아무 처리하지 않은 대조구에서는 비브리오균이 *L. anguillarum* 단독 투여구에 비해 2주째 64%를 나타내었다. 이와 같은 결과는 MB I-3가 사육수내의 세균총을 조절하였으며, 간접적으로 넙치 치어의 누적 폐사율을 감소시킨 것으로 보인다. 따라서 MB I-3는 사육수내에서 병원성 세균의 수를 조절함으로써 치어의 생존율을 높이기 위한 생물학적 방제제의 개발 가능성을 시사하였다.

요 약

질병 치료를 위하여 사용되는 항균제는 효과적이고 사용이 편리한 장점이 있지만, 내성균 발생이나 항균물질 잔류와 같은 문제점들을 안고 있다. 따라서 어류 질병 치료 및 예방을 위해 어류와 인체에 안전한 생약제 개발과 함께 어류 질병 원인균의 과다 발생을 억제하며 어체의 건강을 유지시키기 위하여 유용 균주를 이용하고자 하는 연구가 다양하게 진행되고 있다. 본 연구는 이전 연구에서 분리되어 *Listonella anguillarum*에 대하여 성장 억제효과가 있는 것으로 밝혀진 *Pseudomonas aeruginosa* MB I-3 (MB I-3)를 이용하여 넙치의 비브리

오병에 대한 생물학적 방제효과를 검토하였다. Double layered plate assay와 co-culture을 통하여 MB I-3의 *L. anguillarum*에 대한 성장 억제능력을 조사하였고, MB I-3 균주 배양액을 ethyl acetate로 추출하여 disk 확산법으로 추출물의 항균 효과를 확인하였다. 액체 및 고체 배양에서 생장이 억제된 *L. anguillarum*을 전자현미경으로 관찰하였으며, 넙치 치어 사육 수조에 *L. anguillarum*과 MB I-3 균주를 동시에 첨가하여 폐사율을 비교하였다. MB I-3는 8종의 병원성 비브리오균에 대하여 항균력을 나타내었으며, 96시간 동안 실시한 co-culture에서 *L. anguillarum*은 배양 후 9시간까지 성장 증가를 보였으나, 그 후 감소하는 경향을 보였다. 한편 MB I-3 배양액 추출물 또한 *L. anguillarum*에 항균활성을 보여 항균 물질이 ethyl acetate로 추출됨을 알 수 있었다. 전자현미경 관찰에서 *L. anguillarum*은 세포질의 밀도 감소 및 세포막의 swelling에 의한 세포 용해 현상을 보였다. 한편 MB I-3를 *L. anguillarum*과 함께 투여한 넙치 치어는 대조군에 비해 누적 폐사율이 약 20% 감소되는 결과를 보였으므로, MB I-3를 이용한 수산용 probiotics 개발 가능성을 시사하였다.

References

- Austin, B. and Austin, D.A.: Bacterial fish pathogens, pp357-411, 5th ed., Springer Dordrecht Heiderberg, London UK, 2012.
- Balcázar, J.L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuola, I., Cunningham, D., Vendrell, D. and Múzquiz, J.L.: The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, 114: 173-186, 2006.
- Balcázar, J.L., Vendrell, D., de Blas, I., Ruiz-Zarzuola, I., Muzquiz, J.L. and Girones, O.: Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. *Aquaculture*, 278: 188-191, 2008.
- Byon, J. and Kim, E. : Inhibitory activity of marine bacterium on the growth of *Vibrio anguillarum*. *J. Fish Pathol.*, 13: 1-6, 2000.
- Castillo, C.S., Wahid, M.I., Yoshikawa, T. and Sakata, T.; Isolation and inhibitory effect of anti-*Vibrio* substances from *Pseudoalteromonas* sp.A1-J11 isolated from the coastal sea water of Kagoshima bay. *Fish-*

- eries Science, 78: 174-179, 2008.
- Cha, J.H., Yang, S.Y., 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.
- Chabrilón, M., Arijó, S., Díaz-Rsales, P., Balebona, M.C. and Moriñigo, M.A.: Interference of *Listonella anguillarum* with potential probiotic microorganisms isolated from farmed gilthead seabream(*Sparus aurata*, L). Aquaculture Research, 37: 78-86, 2006.
- Crab, R., Defoirdt, T., Bossier, P. and Verstraete, W.; Biofloc technology in aquaculture: Beneficial effects and future challenges. Aquaculture, 356-357: 351-356, 2012.
- Eddy, S.D. and Jones, S.H.: Microbiology of summer flounder *Paralichthys dentatus* fingerling production at a marine fish hatchery. Aquaculture, 211: 2-28, 2002.
- Hansen, G.H. and Olafsen, J.A.: Bacterial Interactions in early stages of marine cold water fish. Microb. Ecol., 38: 1-26, 1999.
- Harikrishnan, R., Balasundaram, C. and Heo, M.S.: Effect of probiotics enriched diet on *Paralichthys olivaceus* infected with lymphocystis disease virus(LCDV). Fish and Shellfish Immunology, 29 : 868-874, 2010.
- Irianto, A. and Austin, B.: Probiotics in aquaculture. Journal of Fish Disease, 25: 633-642, 2002.
- Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M.J., Gibson, L.: Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. Aquaculture, 274: 1-14, 2008.
- Lategan, M.J., Booth, W., Shimon, R. and Gibson, L.F. : An inhibitory substance produced *Aeromonas media* A199, an aquatic probiotic. Aquaculture, 254: 115-124, 2006.
- Moriarty, D.J.W.: The role of microorganisms in aquaculture ponds. Aquaculture, 151: 333-349, 1997.
- Myoung, H., Yoshimizu, M., Tajima, K. and Ezura, Y.: Purification of an antiviral substance produced by *Alteromonas* sp. and its virucidal activity against fish viruses. Fish Pathology, 30: 15-22, 1995
- Nakamura, A., Takahashi, K.G. and Katsuyoshi, M.: Vibriostatic bacteria isolated from rearing seawater of oyster brood stock : Potentiality as biocontrol agents for vibriosis in oyster larvae. Fish Pathology, 34: 139-144, 1999.
- Nwachí, O.F.: An overview of the importance of probiotics in aquaculture. J. fish. Aquat. Sci., 8: 30-32, 2013.
- Olafsen, J.A.: Interaction between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. Aquaculture, 200: 223-247, 2001.
- Ringo, E. and Birkbeck, T.H.: Intestinal microflora of fish larvae and fry. Aquaculture Research, 30: 73-93, 1999.
- Riquelme, C., Araya, R. and Escibano, R.: Selective incorporation of bacteria by *Argopecten purpuratus* larvae: implications for the use of probiotics in culturing system of the Chilean scallop. Aquaculture, 181: 25-36, 2000.
- Sugita, H., Shibuya, K., Shimooka, H. and Deguchi, Y.: Antibacterial abilities of intestinal bacteria in freshwater cultured fish. Aquaculture, 145: 195-203, 1996.
- Tuan, T.N., Duc, P.M. and Hatai, K.: Overview of the use of probiotics in aquaculture. International Journal of Research in Fisheries and Aquaculture, 3: 89-97, 2013.
- Vine, N.G., Leukes, W.D., Kaiser, H., Daya, S., Baxter, J. and Hecht, T.: Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. Journal of Fish Disease, 27: 319-326, 2004.
- Yang, B.G., Jun, Y.J. and Heo, M.S. : Screening and characterization of probiotic strains for prevention of bacterial fish disease. Kor. J. Microbiol. Biotechnol., 31: 129-134, 2003.
- 방종득, 이주석, 지보영, 김이청, 정승희, 심두생, 이윤호: 정균물질과 어병세균과의 상호작용 연구. 수진사업보고서: 254-270, 1999.

Manuscript Received : December 20, 2013

Revised : April 07, 2014

Accepted : April 11, 2014