

## Probiotic 기능을 가진 미생물을 함유한 양어용 생균제가 넙치의 성장, 선천성면역 및 항병능에 미치는 영향

이지훈 · 채영식\* · 박정진 · 최준호 · 김동건\*\* · 박관하†

전라북도 군산시 산-68 미룡동 군산대학교 수산생명의학과

\*경기도 의왕시 맑은내길 67 지식산업센터 B동 한국에스지에스 301호

\*\*경기도 안산시 단원구 목해동 452-1 제일바이오 연구소

## Effects of Probiotic Microbes on Growth Performance, Innate Immunity, and Pathogen Sensitivity in Cultured Olive Flounder

Ji-Hoon Lee, Young-Sik Chae\*, Jung-Jin Park, Jun-Ho Choi,  
Dong-Gun Kim\*\* 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

\*SGS Korea, Knowledge Industrial Center, 67 Malgeunnae-gil, Uiwang City, Gyeonggi-do, Korea

\*\*R & D Center, Cheil-Bio Co., 452-1 Moknae-dong, Danwon-gu, Ansan-si, Gyeonggi-do, Korea

Probiotic principles can be applied in aquaculture for the purpose of growth and immunity stimulation, disease prevention and eventually better production performance. This study was to assess effects of combinations of microbes containing two *Bacillus* sp., plus one *Lactobacillus* sp. as the basal preparation (BSL-LAB), and additional *Nitrosomonas* sp. (nitrifying bacteria consortium, NBS) in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). The effects examined were growth parameters, hematologic parameters, innate immunity and pathogen challenge test. Fish were assigned to 4 treatments as Control (no probiotics), Group A (*Bacillus* and *Lactobacillus* to culture water), Group B (*Bacillus* and *Lactobacillus* both in water and feed), Group C (same as Group B with additional *Nitrosomonas* in feed). Fish were allocated to the above 4 groups, each group being composed of triplicate 30 fish, for a 7-week feeding in the laboratory. Positive effects were observed both in growth and pathogen sensitivity with all three probiotic combinations. Such effects were attributed to improved innate immune functions. This result indicates that the tested probiotic microbes are beneficial to olive flounder aquaculture.

**Key words:** Probiotic, Olive flounder, Growth performance, Hematology, Innate immunity

우리나라는 지난 40여 년간 급속한 양식기술의

발달로 연안 해역의 양식어장이 급격히 확대되고 있으나 장기적인 어장사용과 시설과다 설치로 어장의 저질노화 및 질병의 빠른 전파로 단위 면적당 생산량 감소로 인한 피해가 증가되고 있어 (NFRDI, 1993), 양식생물의 질병억제를 위해 사용되는 항

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

생제 대신 친환경적이며 숙주의 성장률 및 선천성 면역에 효과가 있다고 알려진 생균제 (probiotics)의 관심이 높아지고 있다 (Fuller, 1989).

생물학적 제제인 생균제를 이용한 연구가 활발히 진행되고 있는데, 생균제는 살아있는 유익미생물이며 섭취에 의하여 숙주동물의 장내 미생물의 균형유지, 장내 유해 세균의 증식억제 및 소화효율 증진 등의 기능을 통하여 가축의 생산성 증가 효과가 있고, 대장에 존재하는 미생물총 중에서 *Bifidobacteria*와 *Lactobacillus*의 성장을 선택적으로 자극하는 것으로 알려져 있다 (Choi *et al.*, 2011). 또한, 최근의 연구에서는 생균제가 *Bifidobacteria*, *Lactobacillus*, *Bacillus* 및 효모와 같은 유익 미생물들이 가축의 성장을 증진시킨다고 보고되었으며, 공중보건 측면에서 설사, 변비의 개선, 면역, 발효유, 이유식, 건강기능식품 및 일반의약품 등에도 폭넓게 사용되고 있고 (Bae, 1997; Choi *et al.*, 2011; Savadogo *et al.*, 2004), *Bacillus*속 세균 대부분은 항균활성물질을 생산한다고 알려져 있다 (Jeong *et al.*, 2010; Todorova and Kozuharova, 2010). *Lactobacillus*속 세균은 생균제로 널리 이용되고 있는 대표적인 세균으로 미국식품의약국 (FDA)에서 안전하다고 인정한 미생물이며 (Datta *et al.*, 1995; Leal-Sánchez *et al.*, 2002; Orrhge and Nord, 2000), 또한, 장내 상피세포에 부착하여 장내 균총의 성질을 개선시켜 균총의 안정화, 유해세균의 정착 억제에 따른 부패산물 생성 감소 및 질병 예방, 면역 활성화 작용 등 숙주동물에 많은 도움을 주는 것으로 알려져 있다 (Daeschel, 1989; Dahiya and Speck, 1968; Savadogo *et al.*, 2004). 생균제는 효능 효과에 따라 주로 *Lactobacillus*, *Bacillus* 및 *Bifidobacterium*속 등의 균주를 많이 이용하고 있으며 본 연구에서는 *Bacillus subtilis*, *Bacillus li-*

*cheniformis* 그리고 *Lactobacillus plantarum*을 이용하여 제조한 생균제를 어류에 적용하여 어류 성장에 미치는 효과, 선천성면역 및 항병성 등에서의 유용성 유무를 넙치에서 평가하였다.

## 재료 및 방법

### 시험어

전남 완도 소재 육상 수조식 양식장에서 구입한 평균 어체중  $8.2 \pm 0.6$  g의 넙치를 사용하였다. 어류는 실험실 수조에 수용 후 서서히 대조군 사료의 급이량을 증가시키면서 2주간에 걸쳐 순치를 진행하였다. 사육수조는  $278(W) \times 75(L) \times 55(H)$  cm 크기의 FRP수조 (수량 200 L 수준으로 유지, 수온  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , 염도 30 psu)에 지속적으로 폭기하면서 사육하였다. 모든 시험구는 수조당 30마리씩 3반복으로 시행하였으며, 7주간의 성장시험 종료 후, 일부는 혈액과 두신 백혈구 세포에 대한 시험에 나머지는 공격시험을 실시하였다.

### 사용균주 및 시험제제의 투여

본 연구에서 사용된 미생물은 *Bacillus*속의 *Bacillus subtilis*와 *Bacillus licheniformis*, *Lactobacillus*속의 *Lactobacillus plantarum* 균주로 구성되어 제조된 분말 (BSL/LAB)과 nitrifying bacteria consortium (*Nitrosomonas sp.*, Kim *et al.* 2010)분말을 (주)제일바이오에서 조제하여 시험에 사용하였다. 시험균의 구성은 먼저, 사료 및 사육수에 BSL/LAB가 첨가되지 않은 대조군을 구성하였고 나머지 시험군은 모두 BSL/LAB를 동량으로 수중투여하고 group A는 일반사료, group B는 BSL/LAB를 사료에 0.05% 첨가, group C는 BSL/LAB를 0.05% 및 NBS를 0.1% 첨가하여 투여하였다 (Table 1). 시

Table 1. Composition of experimental groups

| Groups  | Inclusion into culture water |                                   | Inclusion into feed                  |       |
|---------|------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|-------|
| Control | None                         |                                   | None                                 |       |
| Group A | BSL/LAB                      | $1 \times 10^{12}$ cells each/ton | None                                 |       |
| Group B | BSL/LAB                      | $1 \times 10^{12}$ cells each/ton | BSL/LAB                              | 0.05% |
| Group C | BSL/LAB                      | $1 \times 10^{12}$ cells each/ton | BSL/LAB                              | 0.05% |
|         |                              |                                   | NBS (nitrifying bacteria consortium) | 0.1%  |

Preparation added to feed contained equal cell number of 3 bacteria.

험 사료는 넙치 치어용 펠렛사료 (Fish Top Power No. 5, 우성사료, 대전)를 사용하였고, BSL/LAB를 수조내로 투입하는 경우에는 주 1회씩 별도로 사육수조 내로 투여 ( $1 \times 10^{12}$  cells each/ton)하였다. 제조한 사료는 일일 투여량을 어체중의 2%로 조절하여 매일 2회에 나누어 7주간 투여하였다.

### 일반성장에 대한 평가

시험제제가 일반 성장에 미치는 영향을 평가하기 위해 시험개시 시점과 종료시점에 체중과 사료 소비량을 측정하여 사료계수 (feed-conversion ratio), 일간성장률 (specific growth rate)을 산출하였다.

### 분석용 시료

성장시험이 종료된 넙치를 군당 10마리씩 임의로 포획하여 AQUIS<sup>®</sup> (Lower Hutt, New Zealand)로 마취하고 미부혈관에서 얻은 혈액으로 부터혈청의 분리를 위해 4℃에서 응고시킨 후  $3,000 \times g$ 에서 10분간 원심분리하였다. 백혈구 분리를 위해 넙치를 개복하여 복막을 제거한 후 두신을 무균적으로 적출하였다. 적출한 두신을 nylon mesh위에서 부드럽게 압착하여 백혈구를 유출하였고 Histopaque-1077 (Sigma)을 이용하여  $2,500 \times g$ 에서 30분간 원심분리하였다 (Secombes *et al.*, 1990; Sheikhzadeh *et al.*, 2012). 분리된 buffy-coat 부근에서 백혈구만을 분리하여 혈구계산판을 이용하여 계수하였다. 백혈구의 세포 수는  $1 \times 10^6$  cell/mL로 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco, Grand Island, NY, USA)용액에 부유시켜 식세포의 활성 산소 생성능 분석에 사용하였다.

### 혈액의 분석

혈액학적 측정 항목은 hematocrit, 적혈구수, 백혈구수를 측정하였다. 먼저 hematocrit는 micro-hematocrit법으로 capillary tube에 혈액을 넣고 원심분리기 (HA-200, 한일과학, 강릉)에서 5분간  $5,000 \times g$ 으로 원심 분리 후 혈구부분의 비율을 측정하였다. 적혈구 및 백혈구수의 측정은 Hayem 용액으로 10배와 100배씩 희석하고 Thomas hemocytometer (Marienfeld, Lauda Königshofen, Germany)에 놓고 광학현미경 (Olympus CX31, Tokyo, Japan)으로 관

찰, 계수하였다.

### 라이소자임 활성

혈청의 라이소자임 활성은 turbidometric method를 이용하여 용균능을 분석하였다 (Parry *et al.*, 1965). 즉, 혈청 50  $\mu$ L와 *Micrococcus lysodeikticus* (2 mg/mL, Sigma, Tokyo, Japan) 950  $\mu$ L를 혼합하여 25℃에서 4분 30초간 반응시키면서 530 nm에서 흡광도를 측정하였다. 라이소자임 활성은 흡광도 값이 분당 0.001 감소할 때를 1 unit으로 계산하였다.

### 두신 식세포의 활성산소 생성능

식세포의 활성산소 생성능은 nitroblue tetrazolium (NBT) 환원능을 이용하여 분석하였다 (Bridle *et al.*, 2005). 넙치 두신에서 분리한 백혈구를 96 well plate에 200  $\mu$ L씩 분주한 후  $120 \times g$ 에서 5분간 원심분리하였다. Phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2)으로 2회 세척한 후 phorbol myristate acetate (1  $\mu$ g/mL, Sigma)를 첨가하였다. 여기에 nitroblue tetrazolium (NBT, 1 mg/mL, Sigma)를 well 당 100  $\mu$ L씩 첨가하여 25℃에서 1시간 동안 배양하였다. 배양 후 70% methanol로 고정하고 PBS로 2회 세척한 후 2 M KOH 120  $\mu$ L와 dimethyl sulfoxide 140  $\mu$ L를 첨가하였다. 첨가 후 630 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 병원성 세균 공격시험

투여종료 후 일부의 어류를 대상으로 생균제 첨가 사료 투여가 넙치의 항병력에 미치는 영향을 알아보기 위하여 그람음성 세균인 *Edwardsiella tarda* KCTC 122679 균주로 공격시험을 하였다. 즉, 시험 균주를 brain-heart infusion 배지에 접종하고 30℃, 48 시간 배양 후 계열희석하여 균수를 측정하였다. 공격시험을 위해 배양액을 멸균 생리식염수로  $1 \times 10^7$  cfu/mL이 되도록 조절하여 0.1 mL씩 복강 주사 ( $1 \times 10^6$  cfu/fish)하였다. 공격시험 기간 동안  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 의 수온으로 유지하였다. 시험어는 각 군당 20마리씩 3반복으로 시행하였고 14일 동안 누적폐사율을 평가하였다.

### 통계처리

데이터를 평균  $\pm$  표준편차 (mean  $\pm$  S.D.)로 표현하고 시험군간 평균의 통계학적 유의성 검정을 위해 ANOVA분석 후 Newman-Keuls 검정을 post-hoc test로 사용하였다. P 값이 0.05이하일 때 유의성이 있다고 판정하였다.

## 결 과

### 일반성장

BSL/LAB과 NBS를 같이 투여한 시험군 (Group C)에서 최종 체중의 유의성 있는 증가가 관찰되었으며 이 효과는 일간성장률에 반영되었다 (Table 2). 사료계수에서는 통계학적으로 유의성 있는 변화가 나타나지는 않았다.

### 혈액학

혈액학적 분석 결과 hematocrit치와 적혈구수는 시험군 모두 통계학적으로 유의성 있는 차이가 발견되지 않았다 (Fig. 1a,b). 반면 백혈구수는 BSL/LAB과 NBS를 같이 투여한 시험군 (Group C)에서 통계

학적으로 유의성 있는 증가가 나타났다 (Fig. 1c).

### 혈청 라이소자임 활성

어류의 선천면역계 중 체액성 면역의 일종인 라이소자임 활성도를 측정한 결과, 일반사료를 투여한 대조군을 제외한 나머지 시험군 모두 (Group A, B, C) 통계적으로 유의성 있는 증가가 나타났다 (Fig. 2a).

### 두신 식세포의 활성산소 생성능

어류의 선천면역계 중 세포성 면역의 일종인 식세포의 활성산소 생성능을 측정하였다. 그 결과, BSL/LAB만 투여한 군 (Group B)과 BSL/LAB과 NBS를 함께 투여한 시험군 (Group C)에서는 대조군과 통계학적으로 유의성 있는 증가가 나타났다 (Fig. 2b). BSL/LAB을 수중내 투여하면서 일반사료를 급여한 시험군 (Group A)은 대조군과 통계학적으로 유의성 있는 차이가 존재하지는 않았지만, 평균값에서는 증가경향이 확인되었다.

### 병원성 세균 공격시험

시험제제를 투여한 모든 군에서 대조군과 비교

Table 2. Effect of probiotics on the general growth of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*

| Parameters                        | Control          | Group A          | Group B          | Group C           |
|-----------------------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|
| Initial body weight (g)           | 5.76 $\pm$ 0.82  | 5.71 $\pm$ 0.94  | 5.38 $\pm$ 1.01  | 5.58 $\pm$ 1.13   |
| Final body weight (g)             | 25.94 $\pm$ 5.43 | 27.67 $\pm$ 4.86 | 25.05 $\pm$ 5.83 | 31.08 $\pm$ 6.81* |
| Specific growth rate (SGR, %/day) | 2.21 $\pm$ 0.07  | 2.32 $\pm$ 0.11  | 2.26 $\pm$ 0.10  | 2.43 $\pm$ 0.09*  |
| Feed conversion ratio (FCR, g/g)  | 0.92 $\pm$ 0.14  | 0.76 $\pm$ 0.23  | 0.86 $\pm$ 0.11  | 0.88 $\pm$ 0.16   |

Thirty samples (n=30) from each of the triplicate aquarium were analyzed.

\*Significant difference from control,  $p < 0.05$ .

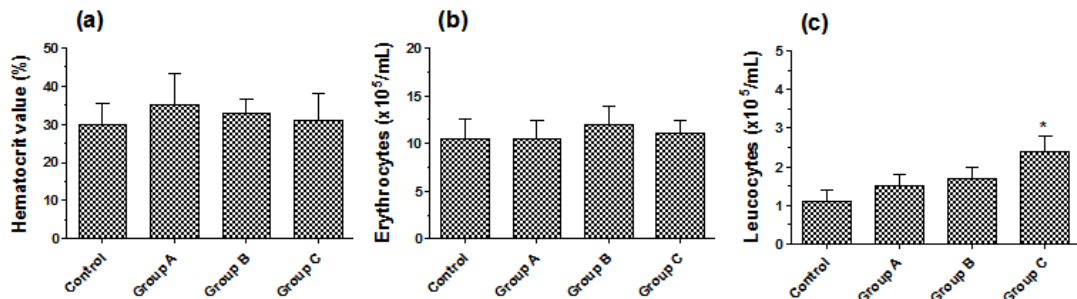


Fig. 1. Effect of probiotics on blood parameters Ht (a), RBC (b), WBC (c) in olive flounder. Ten samples (n=10) from each of the triplicate aquarium were analyzed. \*Significant difference from control,  $p < 0.05$ .

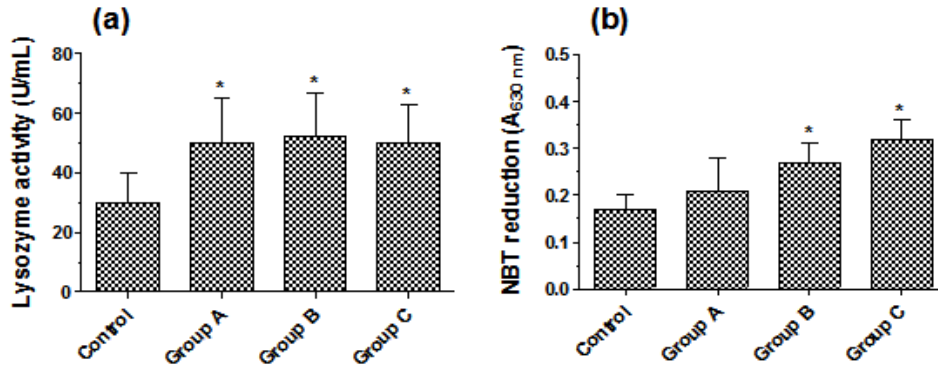


Fig. 2. Lysozyme activity (a) and reactive oxygen production (b) of olive flounder. Ten samples (n=10) from each of the triplicate aquarium were analyzed. \*Significant difference from control,  $p < 0.05$ .

하여 *Edwardsiella tarda*에 의해 유발되는 치사효과에 유의성 있는 방어작용을 발휘하였다 (Fig. 3). 특히 BSL/LAB의 수중내 투여 (Group A)만으로도 대조군에 비해 높은 생존능을 발휘하였다 (45.0% vs 10.0%).

## 고 찰

생균제 (probiotics)는 살아있는 미생물로서 숙주 장내 세균의 균형을 적절하게 조절할 뿐만 아니라 성장률 향상 및 면역 증진 효과가 있는 것으로 알려져 있다 (Lauzon *et al.*, 2010). 최근에는 여러 종류의 생균제 중 특히 기능성 사료첨가제로 잘 알려져 있는 유산균 (lactic acid bacteria)에 대한 연구가 많이 진행되고 있으며 유용 기능으로써는 각종 유

기산을 생성하여 장내 유해 미생물의 생육을 억제하고 장관의 연동운동을 촉진시켜 소화 및 흡수를 돕는 것으로 알려져 있다 (Pack *et al.*, 2008). 특히 유산균을 어류를 대상으로 한 연구의 예로는 틸라피아 (Beveridge *et al.*, 1989), 넙치 (Byun *et al.*, 1997), 잉어 (Noh *et al.*, 1994) 등의 연구보고가 있으며 성장 및 선천면역효과가 존재하는 것으로 보고하고 있다. 그 외에도 *Bacillus* sp. 등도 생균제의 중요 성분으로 사용되고 있으며 (Cha *et al.*, 2012) 본 연구에서는 생균제로 주목받고 있는 *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Lactobacillus plantarum* 균주 3종과 질화박테리아를 혼합하여 경구투여 및 수중투여로 어류에게 미치는 영향을 평가하였다.

본 연구에서 생균제 및 질화박테리아를 동시에 첨가하여 제조한 사료를 7주동안 경구투여한 시험군 (Group C)의 성장을 대조군에 비해 촉진하였으며 그 결과가 일간성장률 증가로도 관찰되었다. 이는 어류양식에서 사육수중 질소노폐물의 축적은 성장 및 면역에 부적절한 영향을 초래하기 때문에 (Snieszko, 1974) 본 연구에서는 질화박테리아의 원활한 질화작용으로 성장률에 긍정적인 영향을 받았다고 생각된다. 그러나 성장의 촉진에도 불구하고 사료계수에서는 통계학적으로 유의성 있는 감소가 나타나지 않은 점은 이 때 생균제들이 주로 식욕을 증진시킴으로써 나타난 결과로 추정된다. 즉 성장촉진효과가 섭취량의 증가에 주로 기인하며, 동일한 사료량 섭취시 소화율이나 대사능의 증

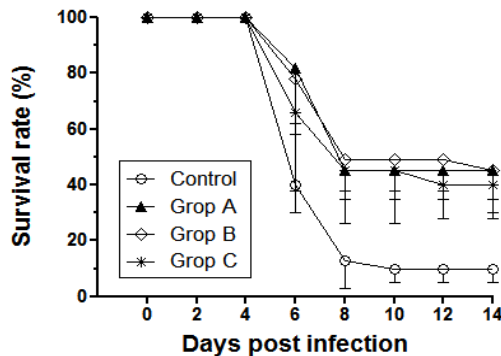


Fig. 3. Survival rate of olive flounder challenged with *E. tarda* treated in probiotics. Twenty samples (n=20) from each of the triplicate aquarium were analyzed.

진 (Cha *et al.*, 2012)에 따라 나타나는 성장이 유리해진 것은 아니라는 의미로 해석된다. 어류에서 생균제와 관련된 시험결과를 보면 틸라피아 (Aly *et al.*, 2008; Vazquez-Juarez *et al.*, 1993), 잉어 (Mohanty *et al.*, 1996), 터봇 (Naik *et al.*, 1999) 등을 대상으로 한 연구에서도 유사한 결과를 관찰하였다.

한 종의 어류에서 유용성이 있는 생균제라도 대상어종과 또는 실험조건에 따라 그 효능은 다르게 나타날 수 있으며 (Cha *et al.*, 2012)어중에 따라 최적의 생균제 선택과 성장촉진효과를 위해 필요한 사육온도도 있을 가능성이 있다고 알려져 있다 (Pack *et al.*, 2008). 생균제의 성장촉진 현상은 각종 소화효소의 활성화에 의한 어류의 소화효율을 증가시켜 사료이용성을 향상시키는 것으로 생각되며 (Son *et al.*, 2009), 그 결과 단백질 전환효율 및 사료효율이 증가한다고 보고하고 있다 (Maurilio Lara-Flores *et al.*, 2003). 특정 어류에서 어떤 기전에서 기인하는 간에, 본 연구에서 발견된 생균제의 조합이 동일한 사육조건에서 체중증가 속도를 촉진한다는 것은 중요한 장점으로 인식된다.

혈액성분은 서식환경과 먹이의 종류에 따라 주로 변하는 것으로 알려져 있으며 (Nakagawa *et al.*, 1977) 적혈구수와 hematocrit의 수치는 일반사료를 급이한 대조군과 실험군간 차이는 나타나지 않았다. 이 결과는 타 연구자의 선행 연구와 유사한 결과를 보였다 (Pack *et al.*, 2008). 반면 백혈구수는 BSL/LAB과 NBS를 같이 투여한 시험군에서 통계적으로 유의한 증가를 보여 질화박테리아의 수질정화 능력이 우수한 것으로 생각되고 어류의 스트레스저감으로 이어져 이는 선천면역의 지표인 백혈구의 증가로 생각된다. 어류의 백혈구는 세포내식작용을 하며 (Park, 1995) 선천면역과 상당한 연관성이 있는 혈액학적 요소이다. 따라서 이 결과는 시험제제의 투입에 따른 면역기능의 향진 현상을 반영하는 것으로 사료된다.

선천성 면역능 측정의 지표인 lysozyme과 식세포 활성화산소 생성능 시험의 결과에서, lysozyme의 활성이 모든 생균제 투여군에서 관찰되었다. Lysozyme은 어류에서 비특이적 방어기작을 수행하는 대표적인 성분으로 자연계에 넓게 분포하는 효

소이다. 세균의 세포벽 성분인 펩티도글리칸을 분해하는 기능을 가지고 있고 옹소닌, 항바이러스, 항암작용 등에도 관여를 하는 것으로 알려져 있다 (Kim *et al.*, 2007). 시험군 모두 대조군에 비해 통계적으로 유의한 증가를 나타내었는데 이는 *Lactobacillus*와 *Bacillus* 속 균주들은 항암, 항산화, 면역증강, 항균효과 등 (Yoo *et al.*, 2003; Ju and Oh, 2009)의 기능을 발휘한다는 사실과 직접적 관련성이 있는 것으로 사료된다. 식세포 활성화산소 생성능은 nitroblue tetrazolium을 환원하는 능력으로 반응성 산소종 (reactive oxygen species, ROS)의 생성량을 평가하는 지표로 사용된다. 이 평가법은 측정방법이 간편하여 선천적 면역지표로 많이 사용된다 (Kim *et al.*, 1993). 본 연구에서는 lysozyme활성능과 유사한 증가가 나타났지만, 차 등의 연구 (Cha *et al.*, 2012)에서는 넙치치어에서 일반사료를 급이한 대조군에 비해 유의적인 차이를 보이지 않았다고 보고하였다. 이는 사료에 첨가된 생균제의 종류 및 첨가량이 본 연구와 상이하였기 때문에 나타난 차이로 추정된다.

7주간 투여 후 *E. tarda*에 대한 공격시험 결과는 대조군의 최종 생존률이 10%인 반면, 생균제 첨가 급이 및 사육수중 투여그룹에서는 모두 40% 이상의 생존율을 보였다. 치어기 넙치사료 내 *Bacillus* spp. 와 *S. cerevisiae* 를 첨가하여 8주 동안 투여 후 *E. tarda*를 접종한 결과 누적폐사율은 생균제를 첨가하지 않은 대조군보다 유의하게 낮은 결과를 나타낸다 (Jeong *et al.*, 2006). 이러한 결과는 생균제의 다양한 숙주 내 작용으로 사료되며 어류의 생존과 면역력을 증강시킬 수 있다고 알려져 있지만 그 메커니즘은 아직 명확히 알려져 있지 않다 (Abraham *et al.*, 2007).

본 시험의 결과를 통해 *Bacillus*속의 *Bacillus subtilis*와 *Bacillus licheniformis*, *Lactobacillus*속의 *Lactobacillus plantarum* 균주와 NBS (nitrifying bacteria consortium)박테리아의 혼합 첨가급이는 넙치치어의 증체율 뿐만 아니라 선천성 면역반응도 증가시켜 *E. tarda*에 대한 질병저항성을 향상시킴을 관찰하였다. 이런 결과들은 생균제를 어류의 첨가제로 적용한다면 어류 양식생산성에 긍정적인 효과를 얻을 것을 시사한다.

## 요 약

생균제는 성장촉진, 면역증진 및 질병예방에서 넓치 *Paralichthys olivaceus* 치어의 양식에서 우수한 생산효과로 적용될 수 있다. 성장률, 선천성면역 및 항병력을 증강시킬 수 있는 생균제의 효과를 조사하기 위해 *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* 및 *Lactobacillus plantarum* (BSL-LAB)이 혼합되어있는 생균제와 NBS (nitrifying bacteria consortium) 분말을 사료에 첨가 또는 수조에 투입하여 시험을 수행하였다.

생균제 첨가사료는 7주간 투여하였고 3가지의 생균제 조합 시험군 모두에서 넓치의 성장과 항병력에서 대조군에 비해 높은 유효성을 발휘 하였다. 어병세균에 대한 항병력의 긍정적인 결과는 생균제에 대한 면역기능의 향상으로 나타난 효과이며 상기 시험결과로 볼 때, 넓치치어 양식에서 생균제의 혼합첨가는 성장 및 선천성면역 뿐만 아니라 질병저항성에 좋은 효과를 나타낼 수 있을 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 한국해양과학기술진흥원 미래해양산업기술개발사업 (과제명: 양어어류 생산성 향상을 위한 미생물복합제 개발)의 지원으로 수행되었습니다.

## References

- Abraham TJ, Babu CHS, Mondal S and Banerjee T. 2007.
- Aly SM, Ahmed YA, Ghareeb AA and Mohamed MF. : Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. Fish Shellfish Immunol, 25: 128-136, 2008.
- Bae JH.: Effect of white ginseng on the function of mouse peritoneal macrophages and their gene expression. J Korean Soc Food Sci Nutr, 26: 1252-1257, 1997.
- Beveridge, M. C. M., M. Begum, G. N. Frerichs and S. Miller. : The ingestion of bacteria in suspension by the tilapia, *Oreochromis niloticus*. Aquaculture, 81: 373-378, 1989.
- Bridle A. R., Carter C. G., Morrison R. N. & Nowak B. F. : The effect of  $\beta$ -glucan administration on macrophage respiratory burst activity and Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), challenged with amoebic gill disease—evidence of inherent resistance. Journal of Fish Diseases, 28: 347-356, 2005.
- Byun, J. W., S. C. Park, Y. Benno and T. K. Oh. : Probiotic effect of *Lactobacillus* sp. DS-12 in flounder (*Paralichthys olivaceus*). J. Gen. Appl. Microbiol., 43: 305-308, 1997.
- Cha, J. H., Yang, S. Y., Woo, S. H., Song, J. W., Oh, D. H., & 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*. Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 45: 35-42, 2012.
- Choi NG, Hwang IH, Park C, Kim DC, Baek SW, Moon SH, Cho WM and Hong SK. : Effect of *Lactobacillus* base probiotics feeding on the growth performance, blood parameters and cecal lactic acid bacteria of broiler chicken: meta-analysis. Korean J Org Agric, 19: 565-575, 2011.
- Daeschel MA. : Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as preservatives. J Food Technol, 43: 164-167, 1989.
- Dahiya RS and Speck ML.: Hydrogen peroxide formation by lactobacilli and its effect on *Staphylococcus aureus*. J Dairy Sci, 51: 1568-1572, 1968.
- Datta. R., Tsai SP, Bonsignore P, Moon SH and Frank JR. : Technological and economic potential of poly (lactic acid) and lactic acid derivatives. FEMS Microbiol Rev, 16: 21-231, 1995.
- Fuller, R. : Probiotics in man and animals, a review. J. Appl. Bacteriol., 66: 365-378, 1989.
- Jeong JH, Jeon YD, Lee OM, Kim JD., Lee NR, Park GT and Son HJ. : Characterization of multi-functional feather-degrading *Bacillus subtilis* isolated from forest soil. Biodegradation, 21: 1029-1040, 2010.
- Jeong CW, Choi HJ, Yoo GY, Lee SH, Kim YC, Okorie OE, Lee JH, Jun KD, Choi SM, Kim KW, Kang YJ, Kang JC, Kong IS and Bai SC. : Effects of dietary probiotics supplementation on juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. J Kor Fish Soc, 39: 460-465, 2006.
- Ju KE and Oh NS. : Effect of the Mixed Culture of

- Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum* on the Quality of Cheonggukjang. Kor J Food Sci Technol, 41: 399-404, 2009.
- Kim HS, Chung SK and Jung Jin. : Reevaluation of the effect of Triton X-100 on the assay of superoxide radical by the nitrobluetetrazolium reduction method. Korean J Environ Agric, 28: 310-325, 1993.
- Kim TS, Kim HS, Kwon SK and Park HD. : Nitrifying Bacterial Community Structure of a Full-Scale Integrated Fixed-Film Activated Sludge Process as Investigated by Pyrosequencing. J. Microbiol. Biotechnol, 21: 293-298, 2010.
- Kim MC, Kim MJ, Kim JS and Heo MS. : Effect of culture broth from mushroom mycelium on growth nad non-specific immune parameters in flounder (*Paralichthys olivaceus*) by oral administration. J Life Sci, 17: 1434-1440, 2007.
- Lauzon HI, Gudmundsdottir S, Steinarsson A, Oddgeirsson M, Martinsdottir E and Gudmundsdottir BK. : Impact of probiotic intervention on microbial load and performance of Atlantic cod (*Gadus morhus* L.) juveniles. Aquaculture, 310: 139-144, 2010.
- Leal-Sánchez, MV, Jiménez-Díaz R, Maldonado-Barragán A, Garrido-Fernández A and Ruiz-Barba JL. : Optimization of bacteriocin production by batch fermentation of *Lactobacillus plantarum* LPCO10. Appl Environ Microbiol, 68: 4465-4471, 2002.
- Maurilio, Lara-Flores, M. A. Olvera-Novoa, B. E. Guzman-Mendez and W. Lopez-Madrid. : Use of the bacteria *streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture, 216: 193-201, 2003.
- Mohanty BK, Sahoo T and Bastia D. : Relationship between sequence-specific termination of DNA replication and transcription. EMBO J, 15: 2530-2539, 1996.
- Naik, A. T. R., H. S. Murthy and T. J. Ramesha. : Effect of graded levels of G-probiotic on growth, survival and feed conversion of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. Fish. Technol., 36: 63-66, 1999.
- Nakagawa, H., M. Kayama and K. Ikuta. : Electrophoretic evidence of seasonal variation of carp plasma albumin. J. Fac. Fish. Anim. Husb. Hiroshima Univ., 16: 99-106, 1977.
- NFRDI. : Development of technique for bottom environment of aquaculture farm. MAFRA, Se-jong, Korea. pp. 317, 1993.
- Noh, S. H., I. K. Han, T. H. Won and Y. J. Choi. : Effect of antibiotics, enzyme, yeast culture and probiotics on the growth performance of Israeli carp. Korean J. Anim. Sci., 36: 480-486, 1994.
- Orrhge K and Nord CE. : *Bifidobacteria* and *Lactobacillus* in human health. Drugs Exptl Clin Res, 26: 95-111, 2000.
- Park SW. : Studies on classification of Korea catfish (*Silurus asotus*) peripheral leucocytes. J Fish Pathol, 8: 47-55, 1995.
- Pack SH, Wang SY and Han KN. : Effect of dietary supplement of probiotics on growth and blood assay of rockfish *Sebastes schlegeli*. J Aquaculture, 21: 1-6, 2008.
- Parry, R. M., Chandau, R.C. and Shahani, R.M. : A rapid and sensitive assay of muramidase. Proc. Soc. EXP. Biol. Med., 119: 384-386, 1965.
- Savadogo, A., Ouattara, C. A., Bassole, I. H., and Traore, A. S. : Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from Burkina Faso fermented milk. Pakistan Journal of nutrition, 3: 174-179, 2004.
- Secombes C.J. : Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity, in: Stolen J.S., Fletcher T.C., Anderson D.P., Roberson B.S., Van Muiswinkel W.B. (Eds.), Techniques in Fish Immunology. SOS Publications, FairHaven, NewJersey, pp.137-154, 1990.
- Snieszko, S. F. : The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. Journal of Fish Biology, 6: 197-208, 1974.
- Son VM, Chang CC, Wu MC, Guu YK, Chiu CH and Cheng W. : Dietary administration of the probiotic, *Lactobacillus plantarum*, enhanced the growth, innate immune responses and disease resistance of the grouper *Epinephelus coioides*. Fish Shellfish Immunol, 26: 691-698, 2009.
- Sheikhzadeh N., Pashaki A. K., Nofouzi K., Heidarieh M. and Tayefi-Nasrabadi H. : Effects of dietary Ergosan on cutaneous mucosal immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish and Shellfish Immunology, 32: 407-410, 2012.
- Todorova S and Kozhuharova L. : Characteristics and antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* strains isolated from soil. World J Microbiol Biotechnol, 26: 1207-1216, 2010.
- Vazquez-Juarez R, Ascencio F, Andlid T, Gustafsson L and Wadstrom T. : The expression of potential colonization factors of yeasts isolated from fish during different growth conditions. Can J Microbiol, 39:



1135-1141, 1993.

Yoo HJ, Lee SS, LEE DS and Kim HB. : Isolation of *Lactobacillus plantarum* HB1 from Tongchimi and Its Nitrite-Scavenging Effect. Kor J of Microbiol, 39: 192-196, 2003.

---

Manuscript Received : May 15, 2017

Revised : May 25, 2017

Accepted : May 25, 2017