



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.




변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

The logo of Jeju National University is located in the top left corner. It features a circular emblem with a stylized flame or 'J' shape in the center, surrounded by the text 'JEJU NATIONAL UNIVERSITY 1952'. Below the emblem, the Korean text '제주대학교' is visible.

석사학위논문

넙치(*Paralichthys olivaceus*)사료 내
Probiotic의 첨가에 따른 성장, 사료효율,
비특이적 면역력, 수질정화능력 및
*Streptococcus iniae*에 대한
질병저항성에 미치는 영향

제주대학교 대학원

수산생명과학과

차 지 훈

2012년 2월

넙치(*Paralichthys olivaceus*)사료 내
Probiotic의 첨가에 따른 성장, 사료효율,
비특이적 면역력, 수질정화능력 및
*Streptococcus iniae*에 대한
질병저항성에 미치는 영향

지도교수 이 경 준

차 지 훈

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함

2012 年 2 月

차지훈의 이학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 정준범 (印)

위 원 김기영 (印)

위 원 이경준 (印)

濟州大學校 大學院

2012 年 2 月

Effects of dietary probiotic, *Bacillus* spp.
on growth performance, feed utilization,
innate immunity, disease resistance against
Streptococcus iniae and water quality for
olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)

Ji-Hoon Cha

(Supervised by professor Kyeong-Jun Lee)

A thesis submitted in partial fulfillment
of the requirement for the degree of
Master of Science

Department of Marine Life Sciences
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

February, 2012

목 차

Abstract -----1

Chapter

서 론 ----- 3

Experiment I

재료 및 방법 ----- 6

실험사료 ----- 6

사용균주 ----- 9

실험어 및 사육관리 ----- 10

샘플수집 및 분석 ----- 11

공격실험 ----- 12

통계학적 분석 ----- 14

Experiment II

실험사료 및 실험조건 -----14

Probiotic 균주 -----16

수질샘플 및 분석 ----- 16

통계학적 분석 ----- 17

결과 및 고찰

Experiment -1 결과 ----- 18

Experiment -2 결과 -----20

Abstract

Two consecutive studies were conducted to investigate the effects of dietary supplementation of probiotics on growth performances, feed utilization, innate immunity, disease resistance against *Streptococcus iniae* and water quality for juvenile olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). In experiment I, four experimental diets were prepared by supplementing three different *Bacillus spp.* probiotics (*B. subtilis*, *B. pumilus* and *B. licheniformis*) into a control diet at the level of 0.5 %. Fish (initial mean body weight, 25 g) were randomly distributed into twelve 150 L capacity polyvinyl circular tanks (25 fish per tank). Triplicate groups of fish were fed the experimental diets to apparent satiation (twice a day, 09:00 and 17:00 h) for 8 weeks. To analyze innate immune responses, blood samples were collected at the end of the feeding trial and after three days of challenge with *S. iniae*. At the end of the feeding trial, weight gain, specific growth rate, feed conversion ratio and protein efficiency ratio of the fish fed *B. subtilis* supplemented diet were significantly ($P < 0.05$) higher than those of the fish fed the control diet. Respiratory burst activity significantly increased in the group fed *B. pumilus* supplemented diet at both sampling times and in the group *B. subtilis* after challenge test in comparison to the control group. The lysozyme activity did so in the group fed *B. subtilis* only after challenge and significantly higher levels of superoxide dismutase were observed in the fish fed *B. pumilus* and *B. licheniformis* diets. However, the serum myeloperoxidase level was not significantly affected by dietary supplementation of probiotics. The fish fed the control diet showed the highest cumulative mortality rate, and it was significantly higher than that of the fish fed *B. pumilus* and *B. licheniformis* supplemented diets. In experiment II, the fish were fed a commercial diet to apparent satiation and they were transferred to 64 L

plastic tanks with three replications at a density of 30 fish per tank. The water of the tanks was not exchanged for 5 days and the ammonium concentration of each tank was measured with 24 h intervals from the addition of probiotics. Three different types of probiotic microbes including *Bacillus subtilis* (1), *Bacillus subtilis* (2) and *Bacillus licheniformis* were used. Each probiotic solution was prepared to 10^4 CFU/ml. The ammonium concentration was significantly decreased when *B. subtilis* was added to the rearing water indicating improvement of water quality in the presence of probiotic. Also, significantly lower mortality was observed by addition of *B. subtilis* to the water in comparison to the control group. In conclusion, the use of *B. subtilis* can be suggested for enhancement of growth and innate immune responses as well as improvement of water quality for olive flounder.

서론

양식산업은 식량산업에서 매우 중요한 분야로 빠르게 성장하고 있다. 세계 양식생산량은 2009년 기준으로 3,500여 만톤을 기록하고 있다(FAO, 2009). 양식산업에서 발생하는 어류질병은 막대한 손실을 초래한다. 지난 10년동안 병원성 미생물에 의한 어류질병은 양식산업에 막대한 피해와 경제적 손실을 입혔다. 국내의 경우, 고밀도 양식으로 인한 세균, 바이러스, 진균 및 기생충 등의 병원체가 단독 혹은 혼합 감염되어 전염 속도가 빠르고 그 피해가 막대한 것으로 알려져 있다. 이러한 질병을 예방하기 위해 과다한 화학약품이 사용되고 있다(Rodriguez et al, 2007). 과다한 화학약품의 사용은 내성균의 확산을 초래하고 수질환경을 오염시켜 생태 환경에 악영향을 끼친다.

최근에는 어류질병을 예방하고 면역력을 증진시키기 위한 친환경 미생물 사용에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(Toranzo et al, 1993). 생균제(Probiotic)는 어류에 있어 병원균의 통제, 건강증진 및 생존율의 향상 등에 효과가 있는 것으로 보고되고 있다(Lauzon et al, 2010). 순환여과시스템과 못양식에서의 한정된 수량의 물을 이용하는 환경에서도 양식어종의 최종 대사산물인 암모니아의 독성을 제거할 수 있다고 보고되었다(Bower and Bidwell, 1978). 생균제는 살아있는 미생물로서 적절한 양으로 투여되었을 때 장내의 미생물균형을 조절하여 성장뿐만 아니라 면역반응에도 긍정적인 영향을 미친다고 보고되었다(Yeo and Liong, 2009; Lauzon et al, 2010). 유산균의 발효산물인 유산과 초산은 발암물질의 생성을 억제하고, 장을 산성화하여 유해균의 발육을 저하시켜 상대적으로 유산균들의 생존율을 높이는 것으로 알려졌다

(Lee, 2008). 동물용 생균제는 가축의 생산성 향상을 목적으로 사용되며 유기산, 과산화수소(H_2O_2) 및 박테리옌을 생성하여 장내 유해세균 및 부패관련 균주들을 감소시킴으로써 성장과 사료효율을 증진시키는 것으로 보고되었다(Klaenhammer, 1988). 또한 소화기관에서 단백질 분해효소에 의해 분해됨으로써 체내에 무해하고 잔류성이 없는 장점이 있다(Cleveland et al, 2001). 생균제는 수질개선제로써 수중의 암모니아를 효과적으로 분해하여 수질을 개선시킨다는 연구들이 보고되고 있다(Chuntapa et al, 2003; Khatoon et al, 2007; Zhou et al, 2009). 어류양식에 있어서 가장 효과적인 생균제는 어종에 따라 다르지만, *Lactobacillus* 또는 *Streptococcus (Enterococcus)* 균주가 가장 많이 사용되고 있다(Lara-Flores et al, 2003). 어류를 대상으로, *Lactobacillus* 균주의 사료 내 첨가는 장내에 서식하는 병원균의 증식저해(Santos et al, 1996), 인위적 감염에서의 생존율 향상(Gatesoupe, 1994; Gildber et al, 1997; Robertson et al, 2000) 및 면역력 증강(Gatesoupe, 1994)에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 보고되었다.

넙치(*Paralichthys olivaceus*)는 우리나라에서 가장 많이 양식되는 해산어종으로, 1990년 1,037톤에서 2010년도에는 80,075톤의 생산량을 기록하며 급성장하고 있는 어종이다(Ministry of Maritime Affairs and Fisheries 2009). 하지만 국내의 경우, 대표적인 고밀도 양식으로 질병과 스트레스에 의한 대량폐사의 문제점이 야기되고 있다. 양어가들은 항생제 및 화학약품에 의존하고 있지만, 과도한 항생제의 사용은 감염어의 치료를 더욱 어렵게 하며 인근 양어장으로 약제 내성균의 확산을 초래하여 해양생태 환경에 악영향을 끼치게 된다(Rodriguez et al, 2007).

European Union (EU)에서는 항생제 사용을 금지하려는 취지에서 최대잔

류허용기준을 설정하여 항생제 및 화학약품에 대한 법적인 규제가 이루어졌다 (Vanbelle, 1989; Avella et al, 2010). 따라서 무분별한 항생제 사용의 대체방안으로 양식어류의 면역능력을 향상시키는 천연사료첨가제에 관한 연구들이 보고되고 있다(Kim et al, 2006; Kim et al, 2009; Son et al, 2009; Kim et al, 2010; Geng et al, 2011; Song et al, 2011). 무지개 송어, Snook, 잉어 및 터복을 대상으로 한 연구에서는 사료 내 *Streptococcus* 균주 또는 *Bacillus* 균주를 첨가하였을 때 성장과 사료효율이 증가되었다고 보고되었다(Vaquez-Juarez et al, 1993; Mohanty et al, 1996; Bogut et al, 1998; Kennedy et al, 1998; De Schrijver and Ollevier, 2000). 반면, 틸라피아를 대상으로 사료 내 *S. faecalis* 및 *B. breve* 와 같은 생균제를 첨가하였을 경우, 성장에 아무런 영향을 끼치지 않은 결과도 보고되었다(Merrifield et al, 2009; Sun et al, 2010). 동일 속의 probiotic 균주를 사용하더라도 균주별 특성과 기능성의 차이로 첨가효능은 상이하게 나타날 수 있다. 따라서 이 연구는 국내 양식장을 대상으로 분리한 *Bacillus* 균주 3종을 첨가하여 성장, 사료효율, 비특이적 면역반응, *Streptococcus iniae*에 대한 질병저항성과 수질정화능력에 미치는 영향을 알아보고자 수행되었다.

Experiment I

재료 및 방법

1) 실험사료

실험에 사용된 4개의 실험사료는 조단백질 43%, 조지방 14%로 제조하였으며, 에너지는 17.4 MJ/kg로 실험실에서 동일하게 제조되었다(Table 1). 실험에 사용된 *Bacillus* 균주의 성분분석 결과는 Table 2에 나타내었다. 실험사료는 생균제가 첨가되지 않은 대조구에 각각 0.5%의 생균제를 첨가하여 제작하였으며, 생균제가 첨가되는 양만큼 cellulose 양을 감소시켜 생균제 첨가에 따른 영양소의 변화가 없도록 하였다. 실험사료의 제조는 파쇄기를 이용하여 모든 사료원을 분말형태로(200um 이하) 만든 후, 각 사료원을 사료조성표에 따라 정확히 무게를 재고 혼합하였다. 혼합 후 사료원 총량의 30%에 해당하는 증류수를 첨가하여 사료혼합기(NVM-14-2P, Daeyoung, Korea)로 혼합, 반죽하였다. 혼합반죽물은 소형초파기(SMC-12, Kuposlice, Korea)를 이용하여 직경 3mm 크기로 성형한 후 펠렛형태로 가공되었다. 제작된 실험사료는 선풍기를 이용하여 2일간 자연 건조시킨 후 시브(Sieve)를 이용하여 적당한 크기로 가공되었으며, 사료공급 전까지 -20°C 냉동고에 보관한 후 실험에 사용되었다.

Table 1. Composition of the basal diet for juvenile olive flounder (% DM)

Ingredients	%
White fish meal	36.0
Soybean meal	12.0
Corn gluten meal	8.0
Wheat flour	30.5
Squid liver oil	5.0
Soybean oil	5.0
Carboxymethylcellulose	1.0
Cellulose	0.5
Mineral mix ¹	1.0
Vitamin mix ²	1.0

¹MgSO₄.7H₂O, 80.0; NaH₂PO₄.2H₂O, 370.0; KCl, 130.0; Ferric citrate, 40.0; ZnSO₄.7H₂O, 20.0; Ca-lactate, 356.5; CuCl, 0.2; AlCl₃. 6H₂O, 0.15; Na₂Se₂O₃, 0.01; MnSO₄.H₂O, 2.0; CoCl₂.6H₂O, 1.0.

²L-ascorbic acid, 121.2; DL- α tocopheryl acetate, 18.8; thiamin hydrochloride, 2.7; riboflavin, 9.1; pyridoxine hydrochloride, 1.8; niacin, 36.4; Ca-D-pantothenate, 12.7; myo-inositol, 181.8; D-biotin, 0.27; folic acid, 0.68; p-aminobenzoic acid, 18.2; menadione, 1.8; retinyl acetate, 0.73; cholecalciferol, 0.003; cyanocobalamin, 0.003.

Table 2. Proximate composition of the 4 experimental diets (% DM)

Diets	Dry matter	Protein	Lipid	Ash
Control	88.5	43.8	14.2	7.34
<i>B. subtilis</i>	88.4	43.9	14.1	7.48
<i>B. pumilus</i>	87.6	45.0	14.6	7.44
<i>B. licheniformis</i>	89.1	43.9	14.0	7.09

2) 사용균주

본 실험에 사용한 *Bacillus* 균주는 양어용 probiotics 균주를 사용하였다. 3종류의 균주는 생산성이 우수한 국내 양식장에서 선발된 균주로서 단백질, 지방, 전분, 섬유소 등에 대한 복합소화효소 활성 및 *Streptococcus iniae*, *Aeromonas salmonicida*, *Edwardsiella tarda*, *Vibrio harveyi* 등의 병원성 세균과 수생곰팡이에 대한 복합 항균활성과 siderophore 생산성 평가 등을 통해 선발된 균주이다. 실험에 사용한 3개 균주는 *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*로 동정되었다.

B. subtilis 균주는 국내 넙치양식장에서 분리한 균주로 protease, amylase, cellulase, lipase와 같은 소화효소활성이 우수하고 병원성 균주와의 경쟁적 철분 포획을 위한 siderophore 생산성이 높으며 *S. iniae*, *A. salmonicida*, *E. tarda*, *V. Harveyi* 에 높은 항균활성이 있는 것으로 선택되었다. Ziaei-Nejad (2006)에 따르면 *B. subtilis*는 장내에서 protease와 다른 효소의 분비를 촉진시키며, 장내에서 항균물질을 생산하여 병원균을 차단하고 영양소의 흡수를 돕는다고 보고되었다(Vaseeharn and Ramasamy, 2003).

B. pumilus 균주도 *S. iniae*, *A. salmonicida*, *E. tarda*, *V. Harveyi* 에 매우 높은 항균활성을 가지며 특히, amylase, cellulase, lipase 소화효소의 생산성이 우수한 것으로 보고되었다(Ghosh et al, 2002)

*B. licheniformis*는 국내 새우양식장에서 분리한 균주로서 protease와 amylase의 활성이 우수하며 역시 *S. iniae*, *A. salmonicida*, *E. tarda*, *V. harveyi*에 항균활성이 뛰어난 것으로 알려진 균주이다. *B. licheniformis*는 성장과 면역을 증강시키고 항바이러스 효과가 있다고 보고되었다(Arena et al,

2006;Raida et al, 2003; Bagheri et al, 2008).

3) 실험어 및 사육관리

실험어인 넙치치어는 전라남도에 위치한 종묘배양장에서 구입하여 제주대학교 소속 해양과환경연구소로 이송되었다. 2주간 3톤 FRP 수조에서 시판 배합사료를 공급하면서 실험환경에 적응할 수 있도록 순치시킨 후 실험에 사용되었다. 예비사육 후 넙치(초기평균무게: 25 ± 0.6 g)는 총 12개의 150L 원형 수조에 각 수조 당 25마리씩 무작위로 선택하여 배치되었다(Fig 1). 사육수는 모래 여과해수를 사용하여 3 L/min의 유수량이 되도록 조절되었고 모든 실험수조에 충분한 용존산소 유지를 위하여 에어스톤을 설치하였다. 광주기는 형광등을 이용하여 12L:12D 조건으로 유지되었고, 실험기간 동안 사육수온은 17-21°C 범위로 자연수온에 의존하였다. 실험사료는 1일 2회(09:00와 17:00)로 육안관찰에 의한 만복공급을 하였다. 실험어의 무게측정은 3주마다 실시되었고, 측정 24시간 전에 실험어의 스트레스를 줄이기 위해 모든 어류를 절식시켰다. 사료공급실험은 총 8주간 수행되었다.



Figure 1. Experimental rearing tanks (3 ton FRP and 150 L PP tanks)

4) 샘플수집 및 분석

8주간의 사료공급 후, 어류의 최종무게를 측정하여 증체율(Weight gain), 일간성장률(Specific growth rate), 사료효율(Feed conversion ratio), 단백질이용효율(Protein efficiency ratio) 및 생존율(Survival)을 계산하였다. 최종무게 측정 후, 각 수조당 6마리(사료구당 18마리)의 실험어를 무작위로 선별하여 2-phenoxyethanol 용액(100ppm)으로 마취시킨 후 6마리 중 3마리는 헤파린이 처리된 주사기를 이용하여 꼬리 미병부에서 채혈하였다. 채혈된 전혈은 hematocrit, hemoglobin 및 대식세포활성(NBT; nitroblue-tetrazolium) 분석에 이용되었다. Hematocrit은 헤파린이 처리된 모세혈관 채혈튜브(Micro-hematocrit capillary tube)에 혈액을 채운 후, 고무판(Wax plates)에 세워 혈액진단원심분리기(Micro Hematocrit VS-12000, Vision, Korea)에서 10분간 원심분리하여 값을 측정하였다. Hemoglobin, triglyceride, glucose, total protein, total cholesterol, ALT (alanine aminotransferase) 및 AST (aspartate aminotransferase) 분석은 각각의 시판 Kit시약과 반응시킨 후 혈액생화학분석기(Express plus system, Seac, USA)를 이용하여 분석하였다. 남은 3마리의 혈액은 헤파린이 처리되지 않은 주사기를 이용하여 채혈하였으며 채혈된 전혈은 상온에서 60분간 방치시킨 후 원심분리기로(5,000 × g) 혈청을 분리하여 myeloperoxidase 및 SOD (superoxide dismutase) 활성을 분석하였다.

일반성분분석은 AOAC (1995) 방법에 따라 수분은 상압가열건조법(125℃, 3시간), 조회분은 직접회화로법(550℃, 6시간), 단백질은 자동 조단백질분석기(Kjeltec System 2300, Sweden)로 분석되었으며, 지방은 Folch et al. (1959)의

방법에 따라 Soxhlet 추출장치(Soxhlet Heater System C-SH6, Korea)를 이용하여 분석되었다.

혈액내의 대식세포활성은 Kumari and Sahoo (2005)의 분석방법을 이용하여 호중구의 oxidative radical 생성량을 측정하였다. 혈액(전혈)과 NBT solution (0.2%)을 1:1의 비율로 각각 50 μ l씩 혼합한 후, 25°C에서 30분 동안 반응시킨 반응물을 50 μ l씩 유리튜브에 옮긴 후, formazon 생성을 감소시키기 위해 dimethyl formamide를 1 mL씩 넣었다. 이후 2,000 \times g에서 5분 동안 원심분리하여 상층액을 취한 후, 분광광도계(Genesys 10 UV, Beckman, USA)를 이용하여 540 nm에서 NBT의 감소 범위를 측정하였다. Blank는 dimethyl formamide를 사용하였다.

혈청 내 myeloperoxidase (MPO)활성은 Kumari and Sahoo (2005)의 방법을 기초로 분석하였다. 먼저 HBSS (Hanks balanced salt solution)용액을 96-well plates에 80 μ l씩 분주한 다음 혈청 20 μ l를 넣은 후 20 mM TMB (3,3',5,5'- tetramethylbenzidine hydrochloride) 용액과 5 mM H₂O₂용액을 넣고, 2분간 반응시킨 후 4M H₂SO₄용액을 35 μ l 첨가하여 microplate reader (Thermo, Biochrom, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

혈청 내 superoxide dismutase (SOD)활성은 superoxide dismutase assay kit (Sigma, 19160)를 이용하여 분석되었다.

5) 공격실험(Challenge test)

8주간의 성장실험 종료 후, 혈액 및 전어체 샘플을 하고 남은 어류를 대상으로 공격실험을 실시하였다. 그람양성 세균인 *S. iniae*을 이용하여 10⁹ CFU/mL의 농도가 되도록 멸균 생리식염수에 현탁한 후, 어류를 1시간 동안

현탁액에 침지하였다. *S. iniae*에 감염시킨 실험어(총 120마리)는 총 12개의 64L 수조에 3반복으로 배치되었다(Fig 2). 모든 수조는 22-25℃ 수온으로 유지되었고 에어스톤으로 충분한 용존산소를 유지하였다. 매일 100% 환수를 하였고 총 18일 동안 누적폐사율을 조사하였다.



Figure 2. Experimental tanks for challenge tests against *S. iniae*

6) 통계학적 분석

실험사료군의 배치는 완전확률계획법(Completely randomized design)을 실시하였고, 분석결과는 SPSS (Statistical package for the social sciences, Version 11.0) 프로그램을 이용하여 One-way ANOVA를 실시한 이후 실험구 간의 유의성은 LSD (Least Significant Difference)로 평균간의 유의성 ($P < 0.05$)을 비교하였다. 데이터는 평균값±표준편차(mean±SD)로 나타내었고, 백분율 데이터는 arcsine 변형값으로 계산하여 통계분석하였다.

Experiment -II

재료 및 방법

1) 실험사료 및 실험 조건

실험에 사용된 넙치 치어는 제주도에 위치한 개인 양어장에서 구입하여 제주대학교 소속 해양과환경연구소로 이송하였다. 3톤 FRP 사각수조에 약 2000마리를 순치한 후, 2주 동안 상업용 배합사료 (수협사료 No. 4)를 공급하면서 실험환경에 적응할 수 있도록 하였다. 본 실험에 사용된 실험수조는 Fig. 3에 나타내었다. 실험시작 전, 약 30분 동안 사료를 반복공급하였다. 사료 공급 후, 64 L 플라스틱 사각수조에 30 L 물을 채운 후, 넙치 치어(평균무게: 30.1 g)를 수조 당 30마리씩 3반복으로 무작위 배치시켰다. 사육수는 환수하지 않고 그대로 사용하였으며, 모든 수조에 에어스톤을 설치하였고 총 5일간에

걸쳐 암모니아의 농도변화를 조사하였다.



Figure 3. Experimental rearing tanks (3 ton FRP and 64 L plastic tanks)

2) Probiotic 균주

본 실험에 사용한 *Bacillus* spp. 균주는 특성이 다른 한 종류의 *Bacillus subtilis* (1)과 *Bacillus subtilis* (2)균과 *Bacillus licheniformis*균을 사용하였다. *B. subtilis* (1)는 아질산과 암모니아 분해능력이 높은 것으로 동정되었고 *B. subtilis* (2)는 소화효소, amylase, cellulose, protease, 암모니아 및 아질산 분해능력이 좋은 것으로 동정되었다. 또한, *B. licheniformis*는 cellulose, amylase, protease가 좋은 것으로 동정되었다. 실험에 사용된 *Bacillus* spp.의 현탁액을 준비하였으며, 각각의 probiotic 현탁액은 10^4 CFU/ml씩 매 24시간 간격으로 각 수조에 주입하였다.

3) 수질 샘플 및 분석

실험 시작전에 예비실험으로 넙치 치어를 대상으로 상업사료를 반복공급하여 실험수조에 무작위로 어류를 배치 시킨 후, 암모니아, 아질산염 및 질산염의 변화를 조사하였다. 예비실험은 3개의 같은 용량의 플라스틱 수조를 사용하여 총 5일 동안 암모니아 변화 패턴을 조사하였고 그 결과는 Fig. 4에 나타내었다. 사육해수는 probiotic을 첨가하지 않고 순치한 어류의 수조에서 0, 3, 6, 9, 12, 24, 54, 72, 96 및 120시간 후에 각각 50 mL씩 샘플하였다.

본 실험에서 probiotic의 종류에 따른 수질정화 능력을 평가하기 위해 예비실험과 동일한 방법으로 상업사료를 반복으로 공급한 후, 실험수조(64 L)에 무작위로 어류를 배치시켰다. 실험어 배치 후, 모든 실험사육 수조의 사육수를 깨끗하게 환수한 다음 0, 24, 48, 72, 96 및 120시간째에 각각 50 mL씩의 사육수를 샘플하였다. 균주의 주입은 24 hr 간격으로 각 실험수조에 총 3가지의

균주를 각각 10^4 CFU/ml를 주입하였다. 동일한 실험조건을 유지하기 위해 대조구는 *Bacillus* 균주가 들어가는 양만큼 해수(3.3 mL)를 주입하였다.

샘플수집 후 암모니아농도를 분석하였고, 분석하고 남은 해수샘플은 -20°C 냉동고에 보관한 후 아질산염 및 질산염 분석에 사용되었다. 이들 분석은 수질분석기(RQflex 10, MERCK, Germany)를 이용하여 Kit로 각각의 시약과 반응시킨 후 분석하였다. 암모니아 이온(NH_4^+)의 농도범위는 0.2-7.0 mg/L 및 5.0-20.0 mg/L 두 가지의 범위의 Kit를 사용하였으며, 아질산염(NO_2^-)의 농도범위는 0.5-25.0 mg/L의 키트를 사용하였고, 질산염(NO_3^-)의 농도범위는 5-225 mg/L였다.

4) 통계학적 분석

실험사료군의 배치는 완전확률계획법(Completely randomized design)을 실시하였고, 분석결과는 SPSS (Statistical package for the social sciences, Version 11.0) 프로그램을 이용하여 One-way ANOVA를 실시한 이후 실험구간의 유의성은 LSD (Least Significant Difference)로 평균간의 유의성 ($P < 0.05$)을 비교하였다. 데이터는 평균값 \pm 표준편차(mean \pm SD)로 나타내었고, 백분율 데이터는 arcsine 변형 값으로 계산하여 통계 분석하였다.

결과 및 고찰

Experiment I

8주간의 성장실험 결과는 Table 3에 나타내었다. *B. subtilis* 균주가 첨가된 그룹 증체율, 일간성장률, 사료효율 그리고 단백질이용효율에서 Control 그룹에 비해 유의적으로 높은 값을 보였다. 생존율에서는 *B. subtilis*와 *B. pumilus*를 공급한 그룹에서 유의적으로 높은 생존율을 보였다. 이 연구에서 *B. subtilis* 균주가 다른 균주들에 비해 넙치의 성장을 촉진시킨 것은 *B. subtilis* 균주가 단백질분해효소의 분비를 촉진시켜 사료의 단백질소화율을 증진시켰을 것으로 추측된다. 유사한 연구결과로 틸라피아(Aly et al, 2008), white shrimp (Balcazar et al, 2007) 그리고 해삼(Zhang et al, 2010)을 대상으로 한 연구에서 유사한 결과를 보였다. 어류에서의 사료 내 생균제의 첨가는 protease, amylase, lipase (Bairagi et al, 2002; Skrodenyte-Arbaciauskiene, 2007)와 같은 소화효소의 활성화에 의해 어류의 소화율이 향상되어 사료의 이용성이 증가하는 것으로 보고되었다(Son et al, 2009). *B. subtilis*는 여러 효소의 활성을 향상시킴으로써 장내에서의 영양소 흡수를 촉진시킨다고 보고되었다(Zhang et al, 2010). 우수성이 보고된 생균제라도 대상어종과 실험조건에 따라 그 효능은 다르게 나타날 수 있으며 동일 속의 균주라도 종의 특성에 따라 그 결과는 상이하게 나타날 수 있다. 따라서 각 어종의 특성에 적합한 생균제의 탐색과 균주선발이 필요할 것으로 사료된다.

대식세포는 체내에 침입한 세균, 바이러스 등을 가수분해함으로써 활성화

소(reactive oxygen species, ROS)를 증가시키게 되는데 이를 알아내는 표식 방법으로 nitroblue tetrazolium (NBT) test가 이용된다. MPO는 감염과 염증 반응에 작용하는 효소로, 감염된 숙주에 독성을 주어 병원성 미생물을 사멸시킨다고 보고되었다(Palic et al, 2005). SOD활성은 과산화이온을 산소와 과산화수소로 바꿔주는 반응을 촉매하는 대표적인 항산화 효소로서, 체내에 침입한 병원체를 제거하는 역할을 한다(Fattman et al, 2003). 사육실험이 끝난 후 NBT활성(Fig. 5)에서는 *B. pumilus*를 첨가한 그룹에서 유의적으로 높은 경향을 보였으나 공격실험 후 면역분석에서는 *B. subtilis*와 *B. pumilus*을 첨가한 그룹에서 유의적으로 높은 값을 보였다. Lysozyme활성(Fig. 6)에서는 사육실험 후 면역분석에서는 유의적인 차이를 보이지 않았으나 공격실험 후 면역분석에서는 *B. subtilis*을 첨가한 그룹에서 유의적으로 높은 경향을 보였다. SOD활성(Fig. 7)에서는 사육실험 후 *B. pumilus*를 공급한 그룹에서 유의적으로 높은 경향을 보였으나 공격실험 후 면역분석에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다. MPO활성(Fig. 8)에서는 모든 그룹에서 유의적인 차이가 없었다. Gilthead seabream (*Sparusaurata*)을 대상으로 사료 내 생균제를 첨가하였을 때, 어류 장내에 면역글로블린(immunoglobulin; Ig)과 acidophilc granulocytes가 증가하여 면역력을 향상시켰다고 보고되었고(Picchietti et al, 2007), 대서양 연어를 대상으로 한 실험에서는 lymphoid cells, macrophages, granulocytes, Ig M과 같은 면역인자가 증가되어 면역력이 향상되었다고 보고되었다(Bakke-Mckellep et al, 2007). 따라서, 사료에 첨가된 생균제의 효능은 모든 어종에 동일하게 적용되는 것이 아니라 양식생물의 종류, 연령, 성장단계와 생균제의 종류, 배양방법 및 첨가농도에 따라 달라질 수 있으므로 각 어종에 적합한 균주의 선택과 사료 내 첨가함량의 조절이 중요할 것으로 사료된다.

8주간 사육실험 후의 어류질병에 대한 공격실험 결과는 Fig. 9에 나타내었다. *S. iniae*를 인위감염 시켰을 때, 대조구에서는 3일째부터 사망개체가 발견되었고 감염 18일째에 약 45%의 낮은 생존율을 보였다. *B. pumilus*와 *B. licheniformis*가 첨가된 그룹에서는 같은 기간에 85% 이상의 높은 생존율을 보였으며 대조구에 비해 유의적으로 높은 생존율을 나타내었다($P < 0.05$). 동일 어종인 넙치(15g)를 대상으로 한 연구에서는(Taoka et al, 2006) 사료 내 1%의 농도로 *S. cerevisiae*를 첨가하여 7주 동안 사육한 후, *V. anguillarum* (2×10^7 CFU/mL)을 접종하여 공격실험을 수행했을 때, 생균제를 첨가하지 않은 대조구보다 유의적으로 높은 생존율을 보임으로서 이번 연구의 결과와 비슷한 경향을 보여주었다. 이러한 결과는 생균제의 생리활성촉진에 의한 비특이적 면역력의 증가가 넙치의 질병저항성을 증진시켰을 것으로 판단된다. 하지만 이번 연구결과만으로는 생균제의 여러 생리활성 기작 중 어떠한 기작에 의한 것인지는 단정짓기 어렵다. Abraham et al. (2007)도 생균제가 어류의 생존능력과 내성면역력을 향상시킬 수 있다고 보고하였지만 그 메커니즘에 대한 정확한 해답은 제시하지 못하였다.

이번 연구의 결과를 종합해 볼 때 사료 내 *B. subtilis*의 첨가는 넙치의 성장 뿐 만 아니라 어류질병을 유발시키는 병원균에 대한 질병저항성을 높일 수 있을 것으로 사료된다. 추후 연구에서는 우수성이 보고된 생균제의 첨가농도를 조절하여 사료 내 적정 첨가량을 규명하고 사료첨가제로써 생균제가 안정적으로 사용될 수 있는 결과를 도출해야 할 것으로 판단된다.

2. Experiment II

생균제의 수질정화능력을 조사하기 위한 예비실험으로 사료공급 후 어류

의 최종대사산물인 암모니아의 농도가 어떻게 변화하는지 알아보기 위해 총 5일간 24시간 간격으로 시료를 채취하였다. 암모니아 농도는 Fig. 4에 나타내었다. 예비분석결과, 0시간부터 54시간까지는 0.3-0.4 mg/L로 거의 변화가 없었다. 54시간 이후부터는 암모니아의 농도가 급격히 증가하여 120시간째에는 4.1 mg/L까지 증가되었다. 생균제의 수질정화능력을 조사하기 위해 3가지 probiotic 균주를 이용한 결과는 Fig. 10에 나타내었다. 균주는 매 24시간 간격으로 5일 동안 주입하였다. 균주 주입 후 48시간째(실험시작 72시간)에 암모니아 제거효과가 나타나기 시작한 다음, 120시간째에는 더욱 큰 차이를 보였다. 120시간 이후 마지막 샘플을 하고 약 20시간 후에 전체 수조에서 암모니아 독성에 의한 폐사가 일어났다. 균주 중에서는 *B. subtilis* (1)과 *B. licheniformis*를 넣은 실험구가 대조구와 비교하여 유의적으로 높은 암모니아 제거효과를 보였다. 실험종료 후의 폐사율은 Fig. 11에 나타내었다. Probiotic이 첨가된 모든 실험구에서 첨가되지 않은 대조구보다 낮은 폐사율을 보였으며, 특히 *B. subtilis* (2) 실험구에서는 대조구에 비해 유의적으로 낮은 폐사율을 보임으로서 사육수 내의 probiotic 첨가는 넙치의 생존율을 높일 수 있을 것으로 추측된다. Zhou et al. (2009)과 Ziaei-Nejad et al. (2006)은 *Bacillus* spp.을 사육수에 첨가하였을 경우 white shrimp와 새우유생의 생존율이 증가된다고 보고하였고, Rengipat et al. (1998)은 사육수 내 첨가된 *Bacillus* spp.는 사육수와 새우의 소화기관에 서식함으로써 높은 생존율을 보인다고 보고하였다. 또한, 수질첨가제로써 생균제는 유기물의 분해, 질소와 인의 감소 및 암모니아를 줄일 수 있다고 보고되었다(Boyd CE and Massaut L, 1999). 따라서 사육수 내의 probiotic (*Bacillus* spp.) 첨가는 암모니아 제거 측면에서의 수질정화 효과와 어류의 생존율을 높일 수 있을 것으로 보인다.

요 약 문

본 연구는 넙치(*Paralichthys olivaceus*)를 대상으로 probiotic의 첨가에 따른 성장, 비특이적 면역반응 및 *Streptococcus iniae*에 대한 질병저항성과 수질정화능력을 평가하기 위해 수행되었다. 실험 1에서는 3가지의 *Bacillus* spp.를 선택하여(*Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*) 대조구에 각각 0.5%씩 첨가하였으며 8주간의 사양실험이 진행되었다. 실험 2에서는 넙치 치어(평균무게: 30.1 g)를 64 L 플라스틱 사각수조에 수조 당 30마리씩 3반복으로 무작위 배치하여 총 5일간에 걸쳐 암모니아의 농도변화를 조사하였다. 두 종의 *Bacillus* spp. (*Bacillus subtilis* (1), *Bacillus subtilis* (2), *Bacillus licheniformis*) 균주로 특성이 다른 *Bacillus subtilis* (1)과 *Bacillus subtilis* (2) 그리고 *Bacillus licheniformis*를 사용하여 수질정화능력을 평가하였다. 실험 1의 결과, *B. subtilis*의 첨가는 넙치 치어에서 약 25%의 성장과 사료효율, 단백질전환효율, 일간성장률 그리고 생존율에 효과가 있을 것으로 판단된다. 공격실험 전과 공격실험 후의 비특이적 면역분석에서도 *B. subtilis*를 첨가한 그룹이 대조구에 비해 높은 면역활성을 나타내었다. 공격실험에서 *B. pumilus*와 *B. licheniformis*를 첨가한 그룹이 대조구에 비해 높은 생존율을 보임으로써 *S. iniae*에 대한 질병저항성을 높일 수 있을 것으로 판단된다. 5일간의 실험 후 *B. subtilis* (1)을 사육수에 첨가하였을 때 대조구와 비교하여 유의적으로 높은 암모니아 제거효과를 보였다. 5일 후의 생존율에서는 *B. subtilis* (2)를 첨가한 실험구가 대조구에 비해 높은 생존율을 나타내었다. 따라서 사료 내 *B. subtilis*의 첨가는 성장 뿐 만 아니라 어류질병을 유발시키는

병원균에 대한 저항성을 높일 수 있을 것으로 사료되며, 사육수 내의 probiotic (*Bacillus* spp.) 첨가는 암모니아제거 측면에서의 수질정화 효과와 어류의 생존율을 높일 수 있을 것으로 판단된다.

Table 3. Growth performance of olive flounder fed 4 experimental diets containing 3 different probiotics for 8 weeks.

	WG (%) ¹	SGR (%) ²	Survival (%)	FCR ³	PER ⁴
Control	103±5.6 ^a	1.42±0.06 ^a	77.3±15.1 ^a	1.59±0.15 ^b	1.10±0.1 ^a
<i>Bacillus subtilis</i>	130±9.3 ^b	1.67±0.08 ^b	97.3±2.3 ^b	1.16±0.05 ^a	1.40±0.0 ^b
<i>Bacillus pumilus</i>	121±13.8 ^{ab}	1.58±0.12 ^{ab}	98.7±2.3 ^b	1.24±0.05 ^{ab}	1.30±0.1 ^{ab}
<i>Bacillus licheniformis</i>	108±14.7 ^{ab}	1.47±0.14 ^{ab}	86.7±4.6 ^{ab}	1.35±0.16 ^{ab}	1.20±0.1 ^{ab}

Mean values of triplicate groups are presented as mean ± SD. Values in the same column having different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$).

¹Weight gain (%) = $100 \times (\text{final mean body weight} - \text{initial mean body weight}) / \text{initial mean body weight}$

²Specific growth rate (%) = $[(\log_e \text{ final body weight} - \log_e \text{ initial body weight}) / \text{days}] \times 100$

³Feed conversion ratio = dry feed fed / wet weight gain

⁴Protein efficiency ratio = wet weight gain / total protein given

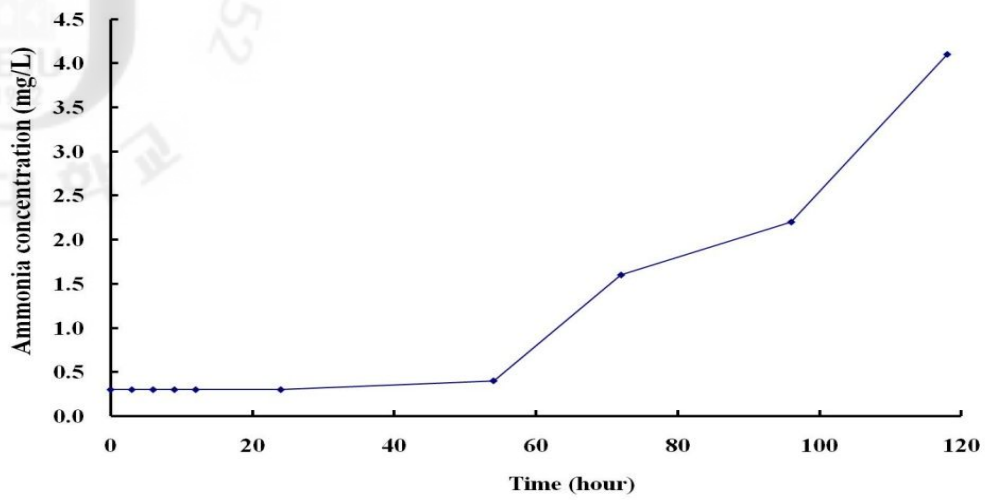


Figure 4. The changes of ammonium concentration in the rearing water of olive flounder after a satiation feeding in a preliminary test.

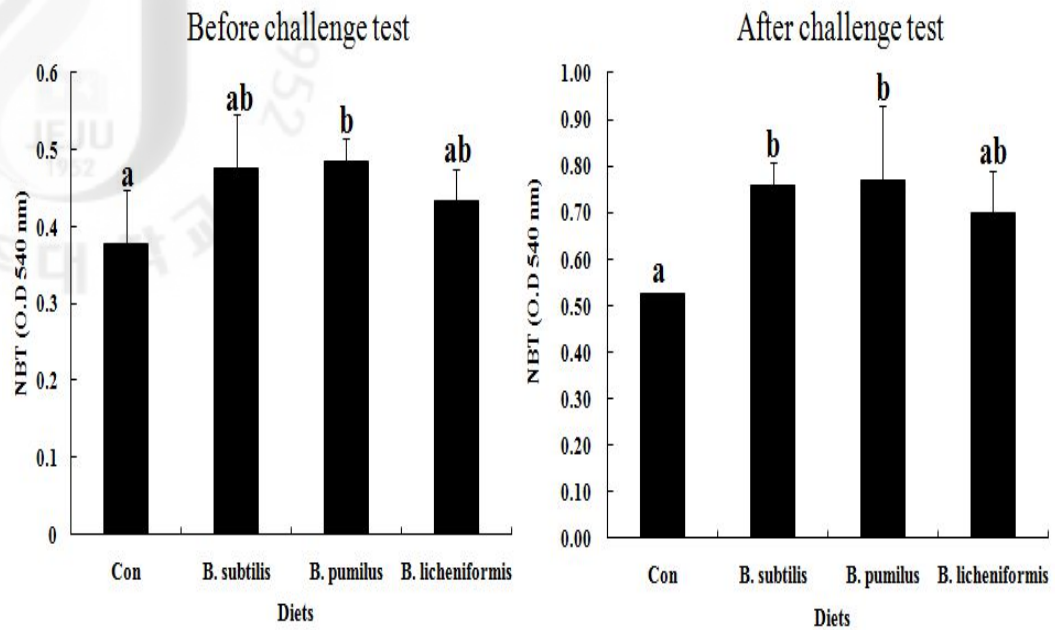


Figure 5. Nitro Blue Tetrazolium (NBT) activity of olive flounder before and after the challenge test

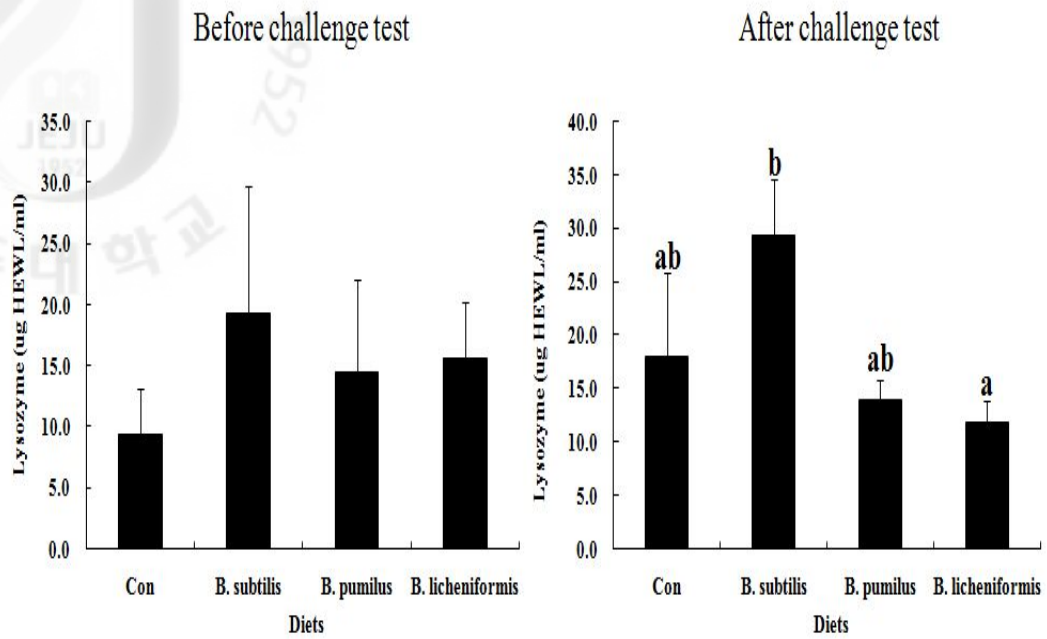


Figure 6. Lysozyme activity of olive flounder before and after the challenge test.

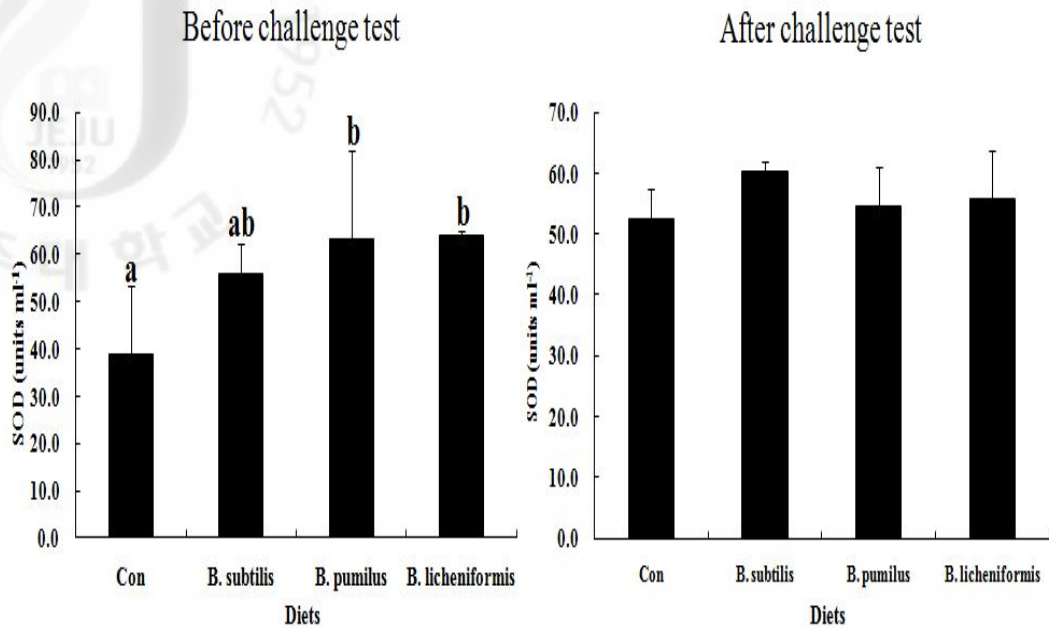


Figure 7. Superoxide dismutase (SOD) activity of olive flounder before and after the challenge test.

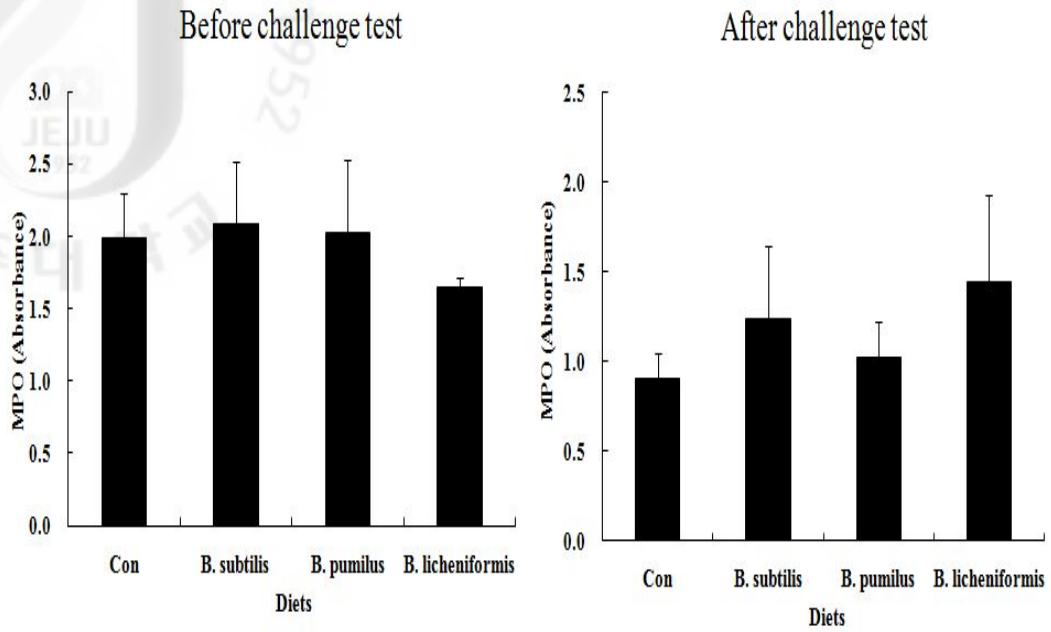


Figure 8. Myeloperoxidase (MPO) activity of olive flounder before and after the challenge test.

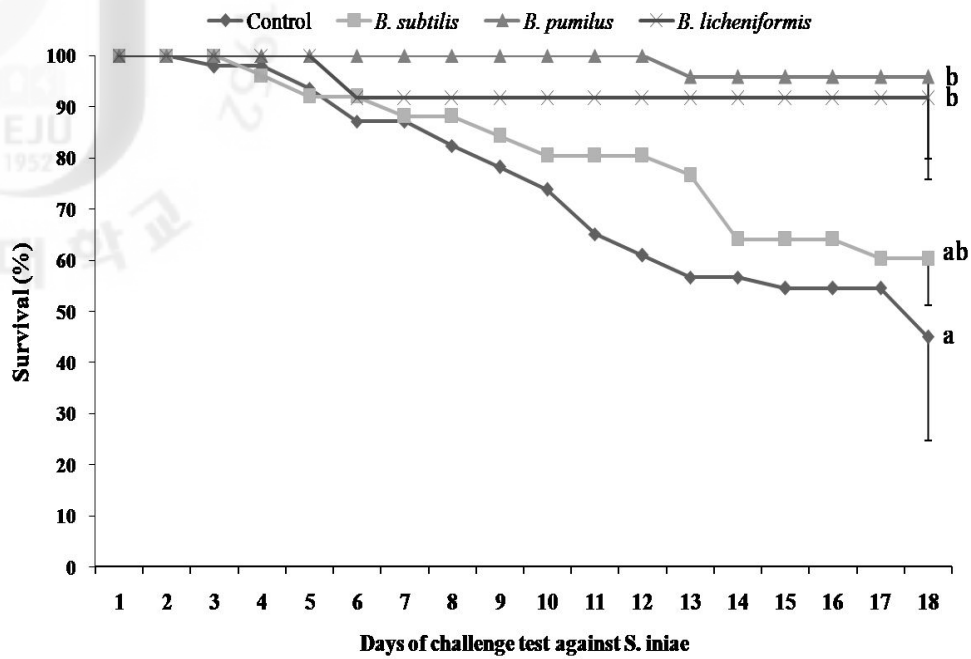


Figure 9. cumulative mortality of olive flounder fed four experimental diets 3 different *Bacillus* spp. after challenge with *S. iniae* by immersion (10^9 CFU/ml).

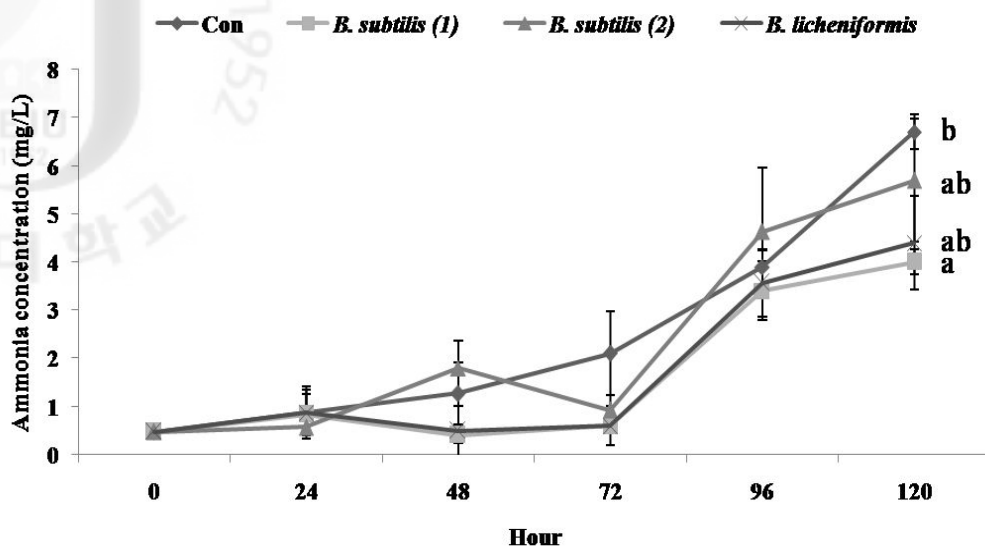
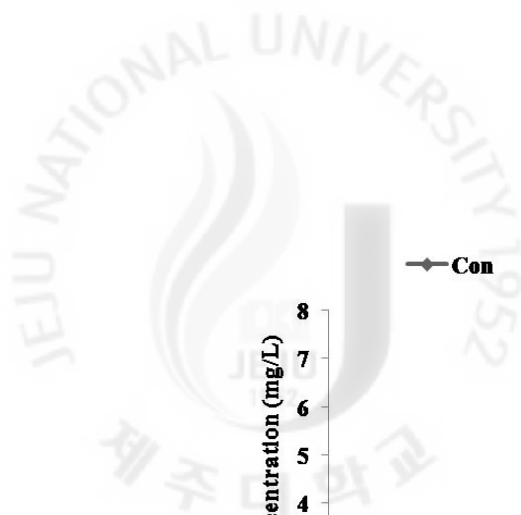


Figure 10. The effect of probiotics on the changes of ammonia concentration in the rearing water for olive flounder (10^4 CFU/ml).

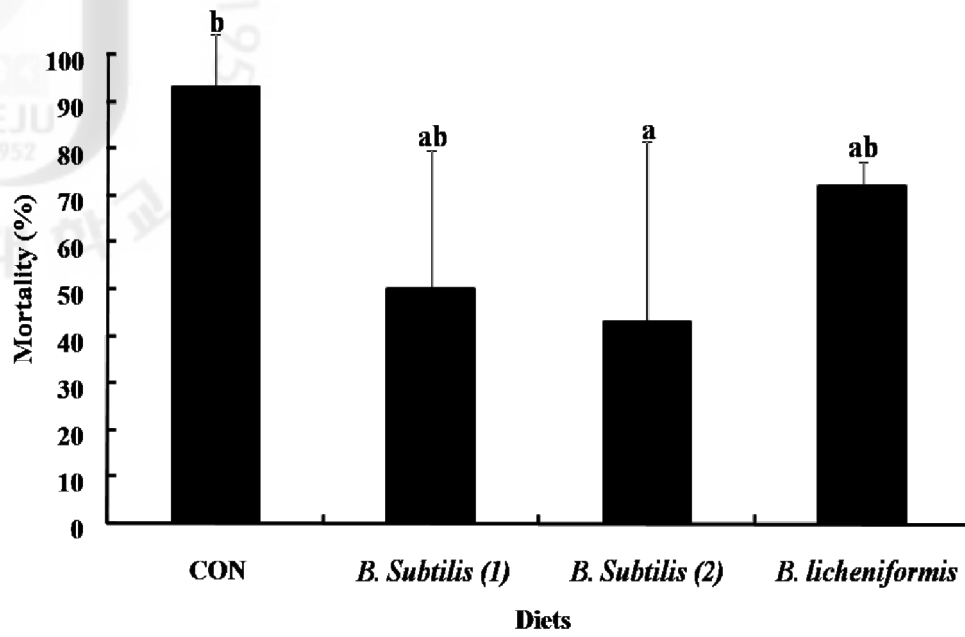


Figure 11. The effect of probiotics on mortality of juvenile olive flounder in probiotic treated rearing water after 120 hour.

참 고 문 헌

- Abraham TJ, Babu CHS, Mondal S and Banerjee T. 2007. Effects of dietary supplementation of commercial human probiotic and antibiotic on the growth rate and content of intestinal microflora in ornamental fishes. *Bangladesh J Fish Res* 11, 57-63.
- Aly SM, Ahmed YA, Ghareeb AA and Mohamed MF. 2008. 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.
- AOAC (1995) *Official Methods of Analysis*, 16th ed. Arlington, VA: Association of Official Analytical Chemists Ed.
- Avella MA, Gioacchini G, Decamp O, Makridis P, Bracciatelli C and Carnevali O. 2010. Application of multi-species of *Bacillus* in seabream larviculture. *Aquaculture* 305, 12-19.
- Bairagi A, Ghosh K, Sen SK and Ray AK. 2002. Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. *Aquaculture International* 10, 109-121.
- Bakke-Mckellep AM, Froystad MK, Lilleeng E, Dapra F, Refstie S, Krogdahl A et al. 2007. Response to soy: T-cell-like reactivity in the intestine of Atlantic salmon, *Salmosalar*. *J Fish Dis* 30, 13-25.
- Balcazar JL, Rojas-Luna T and Cunningham DP. 2007. 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 Invertebr Pathol 96, 147-150.

Bogut I, Milakovic Z, Bukvic Z, Brikic S and Zimmer R. 1998. Influence of probiotic (*Streptococcus faecium* M74) on growth and content of intestinal micro florain carp (*Cyprinus carpio*) Czech J Animal Sci 43, 231-235.

Bower, C.E. and Bidwell, J.P., 1978. Ionization of ammonia in seawater: effects of temperature, pH and salinity. J. Fish. Res. Bd. Can., 65, 1012-1016.

Boyd CE, Massaut L. 1999. Risks associated with the use of chemicals in pond aquaculture. Aquac Eng. 20, 113-32.

Chuntapa, B., Powtongsook, S., Menasveta, P., 2003. Water quality control using *Spirulina platensis* in shrimp culture tanks. Aquaculture 220, 355-366.

Cleveland J, Montville TJ, Nes IF and Chikindas ML. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. Int J Food Microbial 71, 1-20.

De-Schrijver, R and Ollevier F. 2000. Protein digestion in Juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) and effects of dietary administration of *Vibrio proteolyticus*. Aquaculture 186, 107-116.

Fattman CL, Shaefer LM and Oury TD. 2003. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. Free Rad Biol Med 35, 236-256.

Folch J., Lees, M and Sloane-Stanley GH. 1957. A Simple Method for the Isolation and purification of Total Lipides from Animal Tissues. J Biol

Chem 226, 497-509.

Gatesoupe FJ. 1994. Lactic acid bacteria increase the resistance of turbot larvae, (*Scophthalmus maximus*) against pathogenic *vibrio*. *Aquat Living Resour* 7, 182-277.

Geng X, Dong XH, Tan BP, Yang QH, Chi HY, Liu HY and Liu XQ. 2011. Effect of dietary probiotic on the growth performance, non-specific immunity and disease resistance of cobia, *Rachycentron canadum*. *Aquacult Nutr* 10, 1365-2095.

Ghosh K, Sen SK and Ray AK. 2002. Characterization of bacilli isolated from the gut of rohu, *Labeo rohita* fingerlings and its significance in digestion. *J Appl Aquacult* 12, 33-42.

Gidberg A, Mikkelsen H, Sandaker E and Ringo E. 1997. Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on the growth and survival of fry of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Hydrobiologia* 352, 270-285.

Kennedy T, Ghio AJ, Reed W, Samet J, Zagorski J, Quay J, Carter J, Dailey L, Hoidal JR and Devlin RB. 1998. Copper-dependent inflammation and Nuclear Factor- κ B Activation by Particulate Air Pollution. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19, 366-378.

Khaton, H., Yusoff F.M., Banerjee, S., Shariff, M., and Mohamed, S., 2007. Use of periphytic cyanobacterium and mixed diatoms coated substrate for improving water quality, survival and growth of *Penaeus monodon* Fabricius post larvae. *Aquaculture* 271, 196-205.

Kim DH and Austin B. 2006. Cytokine expression in leucocytes and gut

cells of rainbowtrout, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, induced by probiotic. Vet Immunol Immunopathol 114, 297-304.

Kim SS, Jang JW, Song JW, Lim SJ, Jeong JB, Lee SM, Kim KW, Son MH. and Lee KJ. 2009. Effects of dietary supplementation of alga mixtures (*Hizikia fusiformis* and *Eckloniacava*) on innate immunity and disease resistance against *Edwardsiella tarda* in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Kor J Fish Aquat Sci 42, 614-620.

Kim SS, Song JW, Jeong JB, Jeon YJ, Yeo IK and Lee KJ. 2010. Effects of dietary supplementation of fermented garlic powder on immune responses, blood components, and disease resistance against principal fish disease of juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus* in low temperature season. J Anim Sci Tech 52, 337-346.

Klaenhammer TR. 1988. Bacteriocin of lactic acid bacteria. Biochimie 70, 337-349

Kumari K and Sahoo PK. 2005. Effects of cyclophosphamide on the immune system and disease resistance of Asian catfish *Clarias batrachus*. Fish Shellfish Immunol 19, 307-316.

Lara-Flores M, Olvera-Novoa MA, Guzman-Mendez BE and Lopez-Madrid W. 2003. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Niletilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture 216, 193-201.

Lauzon HI, Gudmundsdottir S, Steinarsson A, Oddgeirsson M, Martinsdottir

E and Gudmundsdottir BK. 2010. Impact of probiotic intervention on microbial load and performance of Atlantic cod (*Gadus morhus* L.) juveniles. *Aquaculture* 310, 139-144.

Lee EY. 2008. Problems and verification system of Probiotics as Livestock-environment Improving Agent Produced and Circulated. *Kor J Microbiol Biotechnol* 36, 87-95.

Merrifield DL, Bradley G, Baker RTM and Davies SJ. 2009. Probiotic application for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) II. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria postantibiotic treatment. *Aquacult Nutr* 10, 1365-2095.

Ministry of Maritime Affairs and Fisheries. 2009. *Aquaculture Statistic from Ministry of Maritime Affairs and Fisheries.*

Mohanty BK, Sahoo T and Bastia D. 1996. Relationship between sequence-specific termination of DNA replication and transcription. *EMBO J* 15, 2530-2539.

Pack SH, Wang SY and Han KN. 2008. Effect of Dietary Supplement of Probiotics on Growth and Blood Assay of Rockfish *Sebastes schlegeli*. *J Aquaculture* 21, 1-6

Palic D, Andreasen CB, Menzel BW and Roth JA. 2005. A rapid, direct assay to measure degranulation of primary granules in neutrophils from kidney of fathead minnow (*Pimephales promelas Rafiesque, 1820*). *Fish Shellfish Immunol* 19, 217-227.

Picchietti S, Mazzini M, Taddei AR, Renna R, Fausto AM, Mulero V,

Carnevali O, Cresci A and Abelli L. 2007. Effect of administration of probiotic strains on GALT of larval gilthead seabream: Immunohistochemical and ultrastructural studies. *Fish Shellfish Immunol* 22, 57-67.

Raida MA, Larsen JL, Nielsen ME and Buchmann K. 2003. Enhanced resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, against *Yersinia ruckeri* challenge following oral administration of *B. subtilis* and *B. licheniformis*. *J Fish Dis* 26, 495-498.

Rengpipat S., Phianphak W., Piyatriratitivorakul S and Menasveta P. 1998. Effect of probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. *Aquaculture* 167, 301-313.

Robertson PAW, O'Dowd C, Burrells C, Williams P and Austin B. 2000. Use of Carnobacterium sp. a probiotic for Atlantic salmon (*Salmosalar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Aquaculture* 185, 235-243.

Rodriguez JC, Pastor E, Ruiz M, Flores E and Royo G. 2007. Antibiotic resistance during therapy: mechanisms and means of control. *Infect Dis Drug Targets* 7, 43 - 45.

Rodriguez JC, Pastor E, Ruiz M, Flores E and Royo G. 2007. Antibiotic resistance during therapy: mechanisms and means of control. *Infect Dis Drug Targets* 7, 43 - 45.

Santos JA, Lopez-Diaz T, Garcia-Fernandez MC, Garcia-Lopez ML and Otero A. 1996. Effect of lactic starter culture on the growth and

- protease activity of *Aeromonas hydrophila*. J Appl Bacteriol 80, 13-18.
- Skrodenyte-Arbaciauskiene V. 2007. Enzymatic activity of intestinal bacteria in roach *Rutilus rutilus* Fisheries Sci 73, 964-966.
- Son VM, Chang CC, Wu MC, Guu YK, Chiu CH and Cheng W. 2009. 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.
- Sun YZ, Yang HL, Ma RL and Lin WY. 2010. Probiotic applications of two dominant gut *Bacillus* strains with antagonistic activity improved the growth performance and immune responses of grouper *Epinephelus coioides*. Fish Shellfish Immunol 29, 803-809.
- Taoka Y, Maeda H, Jo JY, Jeon MJ, Bai SC, Lee WJ, Yuge K and Koshio S 2006. Growth, stress tolerance and non-specific immune response of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* to probiotics in a closed recirculating system. Fisheries Sci 72, 310-321.
- Vanbelle M. 1989. The European perspective on the use of animal feed additives. In Biotechnology in the 7. Feed Industry, T. P. Lyons (Ed.), Nottingham University Press, Nottingham, U. K. pp. 375.
- Vazquez-Juarez R, Ascencio F, Andlid T, Gustafsson L and Wadstrom T. 1993. The expression of potential colonization factors of yeasts isolated from fish during different growth conditions. Can J Microbiol 39, 1135-1141.

- Vazquez-Juarez R, Ascencio F, Andlid T, Gustafsson L and Wadstrom T. 1993. The expression of potential colonization factors of yeasts isolated from fish during different growth conditions. *Can J Microbiol* 39, 1135-1141.
- Yeo SK and Liong MT. 2009. Effect of prebiotics on viability and growth characteristics of probiotics in soymilk. *J Sci Food Agric* 90, 267-275.
- Zhang Q, Ma HM, Mai KS, Zhang WB, Liufu ZG and Xu W. 2010. Interaction of dietary *Bacillus subtilis* and *Fructooligosaccharide* on the growth performance, non-specific immunity of sea cucumber, *Apostichopus japonicas*. *Fish Shellfish Immunol* 29, 204-211.
- Zhou XU., Wang YB and Li WF. 2009. Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities. *Aquaculture*. 287, 349- 353.
- Ziaei-Nejad S, Rezaei MH, Takami GA, Lovett DL, Mirvaghefi A and Shakouri M. 2006. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus Indicus*. *Aquaculture* 252, 516-524.

감사의 글

3년이 지난 후 학교에 다시 돌아왔을 때 기대와 두려움이 가장 컸습니다. 백지상태에서 다시 그림을 그리려하니 저의 한계를 느꼈고 많은 생각을 하게 되었습니다. 하지만 이경준 교수님 그리고 우리 양어사료 영양학연구실 동료로부터 많은 도움을 얻으며 성취감도 느꼈습니다. 하지만 어느덧 석사 기간을 마무리하면서 감사의 글을 쓰고 있다는 게 실감이 나지 않습니다. 먼저 많이 모자란 저를 학문의 길로 인도해 주신 이경준 교수님의 은혜에 감사의 마음을 전하고 싶습니다. 그리고 제 석사학위 논문 심사를 위해 고생하신 김기영 교수님, 정준범 교수님 그리고 석사학위 동안 많은 가르침을 주신 아버지 같은 이기완 교수님, 송춘복 교수님, 최광식 교수님, 이제희 교수님, 허문수 교수님, 여인규 교수님, 전유진 교수님, 김기영 교수님, 정석근 교수님, 이승현 교수님께도 감사의 말씀드립니다. 양어사료영양학 연구실에서 동거동락한 식구, 무섭고 다정다감한 큰형님 영준이형, 미국에서 공부하고 있는 봉주형, 까칠하고 꼼꼼한 세진형, 희라아빠 성삼이, 만물 박사 대한이, 새 신랑이 된 진우, 의리 사나이 호관이, 이란에서 온 사마드 부부 그리고 우리 연구실의 희망 정목이, 지미, 초롱이 이들이 있었기에 오늘의 제가 있는 것 같습니다. 마지막으로 저를 믿어주고 도와주신 사랑하는 부모님과 많은 조언을 해주신 매형과 누나에게 감사의 마음을 전합니다.