

갯바위에서 분리한 미생물의 항균활성 분석

박인숙 · 오륜경 · 이민정 · 문지영 · 김영옥 · 남보혜 · 공희정 · 김우진 · 안철민 · 김동균*

국립수산과학원 전라양식부 생명공학과

Antibacterial Activity of Bacteria Isolated from Rocks on the Seashore

In-Suk Park, Ryunkyoung Oh, Min Jeong Lee, Ji Young Moon, Young-Ok Kim, Bo-Hye Nam, Hee Jeong Kong, Woo-Jin Kim, Cheul Min An and Dong-Gyun Kim*

Biotechnology Research Division, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Korea

There is a great deal of research interest regarding substitutes for antibiotics because of various obstacles to the efficacy and use of antibiotics. We isolated and analyzed diversity of microbiota which exhibited antibacterial activity against 23 pathogenic bacteria, to develop alternative agent of antibiotics. By investigating the microbiota from rocks on the seashore, we characterized and obtained various antibacterial material-producing bacteria. Thirty-one isolates belong to four genera and seven species, according to 16S rDNA sequence analysis, showed antibacterial activities against 23 pathogenic bacteria. The Identity of 16S rDNA sequences indicated three species of *Bacillus*, one species of *Paenibacillus*, one species of *Pseudomonas* and two species of *Enterobacter*. Two isolates were similar to *Bacillus aerophilus*, four isolates were similar to *Bacillus pumilus*, seven isolates were similar to *Bacillus safensis*, 15 isolates were similar to *Paenibacillus polymyxa*, respectively. In addition, one isolate was similar with *Pseudomonas poae*, one isolate was similar to *Enterobacter asburiae*, and one isolate was similar to *Enterobacter ludwigii*, respectively. Variations of antibacterial activity and level among the same species were indicated the diverse strains of isolates. *Vibrio vulnificus* showed the highest degree of growth inhibition by 29 isolates. Further studies regarding antibacterial materials and bacteria suggest that development of probiotic strains or alternative agents to antibiotics.

Key words: Antibacterial activity, Rocks on the seashore, Substitutes for antibiotics

서 론

최근 수산업은 무분별한 포획으로 인한 어족자원의 고갈로 생산량이 감소하고 있으며, 지속적인 생산량 감소는 잡는 어업에서 기르는 어업으로 구조적인 변화를 요구하게 되었고, 이로 인하여 연근해 양식업이 수산물 시장에서 차지하는 비율이 점점 증가하고 있다(Kim et al., 2008). 양식 수산업의 목적은 짧은 시간 내 최소한의 비용으로 최대 생산량을 획득하는 것이기 때문에 대부분 양식장에서는 양식생물을 고밀도로 사육하는 경향이 있으며, 이로 인하여 양식생물의 스트레스 증가와 사육환경의 오염 등에 의한 질병의 감염 기회 및 발생 빈도가 증가하고 있다(Kim et al., 2008; Kim et al., 2014).

1990년도 이후부터 양식수산생물의 대량 폐사가 매년 빈번하게 보고되고 있으며, 양식어민들은 이러한 피해를 줄이기 위하

여 다양한 종류의 항생제 및 화학물질을 사용하게 되었다(Kim et al., 2014). 그러나 항생제의 잦은 사용은 오남용을 초래하고 이로 인하여 양식생물 체내축적 및 항생제 내성균주 발생 등 다양한 부작용이 발생하고 있다(Hill et al., 2009; Kim et al., 2014). 또한 항생제 사용은 약제 처리 가격 및 제반 인력 투입 등의 문제를 야기시켜, 전체 양식비용의 증가라는 악순환이 되풀이 되고 있다(Hill et al., 2009; Song et al., 2012; Kim et al., 2014). 따라서 많은 국가에서는 사료첨가제용 항생제를 전면 금지하고, 치료용 항생제의 사용을 엄격히 통제하고 있다(Hill et al., 2009; Kim et al., 2014).

최근에는 항생제를 대체할 수 있는 물질을 확보 및 개발하기 위하여 다양한 연구가 진행되고 있으며, 항생제 단점을 극복하기 위한 프로바이오틱스, phytobiotics, bacteriophage 및 효소제 등의 천연물 유래의 항균 물질개발 연구가 많이 보고되고 있

<http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2015.0904>



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

Korean J Fish Aquat Sci 48(6) 904-912, December 2015

Received 15 October 2015; Revised 12 November 2015; Accepted 16 November 2015

*Corresponding author: Tel: +82. 51. 720. 2454 Fax: +82. 51. 720. 2456

E-mail address: combikola@korea.kr

다(Ravi et al., 2007; Tom et al., 2007; Aditya et al., 2008; Rijkers et al., 2011; Jeong et al., 2014; Reverter et al., 2014). 그러나 대다수의 천연물 유래 항생제 대체물질은 원료물질의 원활한 공급, 원료물질로부터 균일한 목적성분의 추출, 목적물질의 순수정제 및 유효성분의 유기합성 등에 어려움이 있으며, 이러한 문제점은 천연물 유래 항생제 대체제의 대량생산 또는 산업화를 가로막는 원인으로 알려져 있다(Jeong et al., 2014). 따라서 다양한 천연물 유래 항균물질 중에서 미생물이 생산하는 항균 물질 또는 원균의 독성 및 안전성만 검증 된다면 효과적으로 안정적 공급과 활용이 가능하기 때문에 중요성과 가치가 매우 높다(Jeong et al., 2014).

항균활성, 면역력 증가 등 숙주의 몸에 유익한 효과가 있는 균주들을 프로바이오틱스(probiotics)라고 하며, 다양한 연구를 통해 많은 종의 미생물이 밝혀졌고 산업적으로 이용되고 있다(Rijkers et al., 2011). 그러나 수산업에서 이용되는 프로바이오틱스의 경우 사람에게 사용하는 프로바이오틱스 종을 그대로 사용하거나, 육상에서 분리된 미생물을 주로 사용하고 있으며, 상용화된 미생물은 대부분 외국에서 수입하여 사용하고 있는 실정이다(Aditya et al., 2008). 따라서 육상 환경에서 분리한 균주나 외국에서 개발한 균주가 아닌 우리나라의 연근해 양식장 환경에 알맞은 토종 미생물의 분리 및 선정이 중요하며, 이를 위하여 본 연구에서는 우리나라 남해안 갯바위 지역에서 분리한 미생물들의 타당성을 검토해 보았다.

다양한 해양환경 중, 조간대에 포함되지 않는 갯바위(Rocks on the seashore) 지역에 존재하는 해수 웅덩이는 밤낮 기온변화 차가 크고, 해수 또는 빗물의 유입과 증발현상으로 인한 염분 농도 변화의 폭이 크며, 태양광에 바로 노출되는 등의 특징이 있어 특이한 환경 및 생태계 군집을 지닌 곳으로 알려져 있다(Margrét et al., 2014). 그러나 이러한 갯바위 지역에 존재하는 미생물에 대한 연구는 그 결과가 매우 부족한 실정이며, 분리된 미생물 중에서 항균활성을 갖는 균주에 대한 연구는 전무한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 양식생물에 대량폐사를 유발하는 병원성 균주를 포함한 다양한 병원성 균주들에 대하여 항균활성이 있는 유용한 미생물을 확보하였으며, 분리 균들의 동정을 통하여 미생물의 다양성과 항균 활성을 분석하여 국내 양식 환경에 적합한 항생제 대체제로의 개발 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

샘플 미생물의 채집, 분리, 배양 및 보존

갯바위 지역 해수가 고인 웅덩이의 미생물을 수집하기 위하여 갯바위가 잘 발달한 남해안 일대의 갯바위에 존재하는 해수를 각각 채집하였다. 시료 채집을 위하여 수 주 동안 비가 오지 않고 풍량이 거세지 않았던 날을 선택하였으며, 조간대 지역에 포함되지 않는 갯바위 위치에 고여 있어 외부 해수 유입이 적고 오랫동안 고립된 장소만을 선정하여 채집하였다. 수집

한 해수시료는 무균상태에서 각각 marine agar (Difco, USA), R2A agar (Difco, USA), 1/10 marine agar (Difco, USA) 그리고 1/10 R2A agar (Difco, USA) 배지에 평판 도말 하였다. 각각의 시료를 도말한 평판배지는 20℃에서 배양하며 생겨나는 미생물 군락(colony)을 12시간 단위로 분석 및 분리 후 희석 평판법으로 순수 균체를 분리하여 각각의 액체 배지에 순수 배양하였다. 분리한 각각의 균주는 glycerol을 이용한 보존방법으로 -80℃에서 보관하며 분석하였다.

항균 활성 테스트

분리한 미생물은 순수 균락을 이루는지 확인한 뒤, 각각 분리한 액체배지에 접종하여 20℃에서 1-4일간 배양한 뒤 항균활성을 평가하였다. Table 1에 명기된 23종의 다양한 병원성 균을 피검균으로 하여 disc diffusion assay (Klancnik et al., 2010) 방법으로 갯바위 분리균주의 항균활성을 확인하였다. 23종의 병원성 균주들은 보고된 최적 액체배지에서 각각 배양한 후 600 nm에서 optical density ($OD_{600\text{ nm}}$) 값 0.1로 희석하여 평판배지 위에 도말 하였고, 갯바위 분리균주들은 각각의 marine 또는 R2A 등의 분리된 액체배지에서 48시간 동안 20℃에서 배양한 뒤 paper disk (ADVANTEC, 8 mm)에 60 μL 흡수시켜 피검균이 도말된 평판배지 위에서 배양하여 항균활성을 측정하였다. 24 시간동안 피검균의 배양조건에서 배양 후 paper disk 주위에 생육저해로 인하여 생성되는 투명환의 유무와 직경의 크기로서 항균 활성을 평가하였다(8-12 mm: *, 12-16 mm: **, 16 mm 이상: ***). 그리고 10% acetic acid를 대조구로서 항균 활성을 비교 및 평가하였다.

용혈활성 및 pH 보정에 따른 항균활성 평가

갯바위에서 분리한 미생물 중 항균활성을 보이지만 용혈작용을 유발하는 물질을 생산하는지 밝히기 위하여 혈액천천평판배지(Micromedia Co. Ltd, Korea)을 이용하여 용혈활성의 유무 및 활성의 종류(type)를 평가하였다. 혈액천천평판배지에 구멍을 내고 분리한 미생물의 배양액을 떨어뜨리는 방법으로 분리균주들이 알파(α), 베타(β) 또는 감마(γ) 용혈활성을 보이는지 평가하였다. 그리고 관찰된 항균활성이 분리미생물에서 생산된 유기산에 의한 활성인지를 평가하기 위하여 분리균주들의 배양액을 pH를 7-8 사이의 중성 값으로 보정 한 뒤 paper disk를 이용한 방법으로 항균활성의 여부 및 변화를 평가하였다.

항균활성 균주의 genomic DNA (gDNA) 추출 및 16S rDNA의 증폭

순수 분리한 균주들 중에서 피검균에 항균 활성을 보이는 균주만을 선별하여 marine 또는 R2A 등의 각각 분리된 액체배지에 접종하여 배양한 뒤 원심분리를 통하여 집광하였다. 수거한 균체들은 magnetic isolation kit (TNT, Japan)를 사용하여 충분히 lysis 시킨 후, 핵산추출자동화기기(MFX-6100, TOYOBO, Japan)을 이용하여 gDNA만을 순수하게 추출하

였다. 추출한 gDNA는 분광광도계를 이용하여 순도 및 농도를 측정하였으며, Weisburg et al. (1991)의 방법을 통하여 균주의 동정에 필요한 16S ribosomal DNA를 증폭하였다(Weisburg et al., 1991). 순수 분리한 gDNA를 주형으로 27F forward primer (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 1492R Reverse primer (5'-ACGTTTACCTTGTACGACTT-3')를 이용한 PCR을 수행하여 16S rDNA를 증폭하였다. PCR 증폭 반응의 mixture는 0.1 µg의 gDNA, 10 pM primer set, 2.5 mM deoxynucleoside triphosphate (dNTPs), 10X reaction buffer, ExTaq polymerase (Takara, Japan)와 distilled water로 최종 부피가 50 µL가 되도록 하였으며, 94℃에서 5분간 초기변성단계(initial denaturation)를 수행한 뒤, 94℃에서 1분간 변성(denaturation), 55℃에서 1분간 결합반응(annealing), 72℃에서 1분간 증폭반응(extension)을 30회 반복한 뒤 마지막으로 72℃에서 5분간 최종신장반응(final extension) 과정을 수행하였다.

분리균주 16S rDNA의 염기서열분석 및 다양성 분석

각 분리균주들의 16S rDNA 증폭반응 결과 유무와 정확한 크기를 확인하기 위하여 ethidium bromide (EtBr)를 포함하는 1% agarose gel을 이용한 전기영동을 통하여 PCR 반응산물의 유무와 증폭된 크기를 확인하였다. PCR 반응 결과물은 QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, German)를 사용하여 증폭된 16S rDNA를 순수하게 분리 정제한 뒤 순도와 농도를 분석하였으며, 3130XL PRISM genetic analyzer (Applied Biosystems, USA) 염기서열분석 기기를 이용하여 16S rDNA 염기서열을 결정하였다. 각각의 16S rDNA 정보는 BioEdit sequence alignment editor (version 7.2.3)의 ClustalW multi alignment 분석 프로그램을 이용하여 획득하였으며, 염기서열 정보는 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 검색을 통하여 가장 유사한 미생물종과 비교하여 분리한 항균활성 미생물들을 분석하였다.

결과 및 고찰

갯바위 유래의 항균 물질 생산 미생물 분리 및 종 다양성 분석

남해안 지역 갯바위 유래 해수들을 수거하여 marine, R2A, 1/10 marine 및 1/10 R2A 평판배지에 각각 도말 후 배양하고, 배양된 각각의 미생물 군락들은 streaking과 peaking 과정을 수행하여 하나의 순수한 colony로 분리하였다. 순수 분리된 균주들은 액체배지에서 배양 후 paper disk법을 이용하여 23종의 병원성 피검균에 대한 생육저해 활성 여부를 관찰하였다. 또한 항균 활성을 보이는 균주들의 16S rDNA 정보를 해독하여 항균활성을 보이는 갯바위 유래의 해양 미생물 다양성을 분석하였다. Table 1에 명기한 병원성 균주들을 피검균으로 paper disk를 이

용한 항균 활성 검사법을 통하여 64점의 분리균주가 항균물질을 생산함을 확인할 수 있었다. 64점의 분리균주를 산업적으로 활용하기 위하여 용혈활성과 같은 세포독성의 유무와 미생물이 생산하는 유기산 등으로 항균 활성을 보이는 효과를 평가하기 위하여 혈액천평판 배지를 이용하여 베타 또는 알파 용혈 활성을 평가 하고, 배양액의 pH를 7-8사이의 값으로 보정하여 항균 활성을 관찰하였다. 그 결과 64점의 분리균주들 중에서 31점의 분리균주만이 알파 또는 베타 용혈활성을 보이지 않았고, pH 보정에 따른 항균 활성의 변화는 모든 분리균주에서 발견할 수 없었다. 특이하게도 분리균주들의 반수 이상이 용혈활성을 보였지만 배양액 대부분은 중성의 pH 값을 기록하여 분리균 중 유산균은 없음을 판단 할 수 있었는데 이러한 결과는 미생물 분리에 사용된 배지가 marine 또는 R2A 계열의 배지였기 때문에 수집한 샘플 내에 존재하는 유산균 계열의 미생물이 생육하기에는 적합한 조건이 아니기 때문이라고 판단된다.

분리한 31점의 균주는 약 1.5 kbp 크기의 16S rDNA 염기서열 분석을 통하여 4개의 속(genus)에 속하는 7종(species)의 미생물들과 가장 근연종들로 밝혀졌다(Table 2). 분리균들은 *Bacillus aerophilus* 2점, *Bacillus pumilus* 4점, *Bacillus safensis* 7점, *Paenibacillus polymyxa* 15점, *Pseudomonas poae* 1점, *Enterococcus asburiae* 1점, 그리고 *Enterobacter ludwigii* 1점으로 밝혀져 분리균주들이 같은 종으로 중복됨을 알 수 있었다(Table 2). 항균활성을 보이는 분리된 미생물 중에서 *Bacillus* 종 또는 *Paenibacillus* 종이 31점 중에서 28점으로 밝혀졌는데, 이는 해수 또는 해양환경 등에 가장 많이 존재하는 미생물이 *Bacillus* 종 또는 *Paenibacillus* 종이며, 특히 *Bacillus* 종은 다른 미생물과는 달리 외부의 염도 또는 UV광선 등에 강한 저항력을 보이는 특성이 있다고 보고되어 본 연구에서 분리한 지역의 특성과 분리된 미생물 종의 결과를 뒷받침해 줄 수 있는 상당히 근거 있는 결과임을 알 수 있었다(Gwon et al., 2013, Kim et al., 2012; Kothari et al., 2013). 그러나 해수, 퇴적물 및 해양생물 장관 등의 다양한 해양 환경에서는 *Bacillus* 종 또는 *Paenibacillus* 종과 함께 *Aeromonas* 종, *Pseudomonas* 종, *Shewanella* 종 그리고 *Vibrio* 종들이 자주 발견된다고 보고되었으나, 본 연구에서는 *Bacillus*와 *Paenibacillus* 종과 함께 *Pseudomonas poae*만이 분리되었고 *Enterobacter* 종이 분리되어 일반적인 해양환경 미생물 군집과는 다름을 알 수 있었으며, 이는 항균활성을 나타내는 균주만을 선별하였기 때문으로 사료된다(Gwon et al., 2013, Kim et al., 2012; Kothari et al., 2013). 또한 본 연구에서 분리한 31균주와 각각의 근연종간의 16S rDNA 염기서열 유사도는 99% 이상의 높은 값을 알 수 있었으며, 16S rDNA 정보만으로는 갯바위 유래 항균활성을 가지는 신종의 균주를 발견할 수는 없었다(Table 2).

본 연구에서 가장 많은 수의 분리균을 기록한 *P. polymyxa* 균주는 그람양성, 간균의 형태로 편모를 통한 운동성이 있고, 비병원성의 내생포자를 생산하며, 토양과 해양환경에서 자주 발견

Table 1. List of pathogenic bacteria species used in this study

	Species	Source	Growth medium	Incubation temperature
A	<i>Bacillus cereus</i>	KCTC 1012	BHI	30°C
B	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	YM	25°C
C	<i>Edwardsiella tarda</i>	KCTC 12267	BHI	30°C
D	<i>Enterobacter cloacae</i>	KCTC 2361	NB	37°C
E	<i>Enterococcus faecalis</i>	KCTC 3206	MH	37°C
F	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	NB	37°C
G	<i>Klebsiella pneumonia</i>	KCTC 12385	NB	37°C
H	<i>Lactococcus garvieae</i>	KCTC 3772	MRS	37°C
I	<i>Proteus mirabilis</i>	KCTC 2510	MH	37°C
J	<i>Providencia stuartii</i>	KCTC 2568	MH	37°C
K	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 15522	NB	37°C
L	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	Tryptic soy	37°C
M	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	KCTC 3341	MH	37°C
N	<i>Streptococcus iniae</i>	KCTC 3657	BHI + 0.5% glucose	37°C
O	<i>Streptococcus mutans</i>	KCTC 3065	BHI	37°C
P	<i>Streptococcus parauberis</i>	KCTC 3651	BHI + 1% NaCl	25°C
Q	<i>Streptococcus vestibularis</i>	KCTC 3650	MH	37°C
R	<i>Vibrio anguillarum</i>	KCTC 2711	BHI	30°C
S	<i>Vibrio alginolyticus</i>	KCTC 2472	BHI	37°C
T	<i>Vibrio harveyi</i>	KCCM 40866	Marine	26°C
U	<i>Vibrio ichthyenteri</i>	FB 4004	BHI + 1% NaCl	25°C
V	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	KCCM 41664	TSB + 2.5% NaCl	37°C
W	<i>Vibrio vulnificus</i>	KCCM 41665	TSB + 1% NaCl	30°C

BHI, Brain heart infusion; YM, Yeast Mold; NB, Nutrient Broth; MH, Mueller Hinton; TSB, Tryptic soy broth.

되는 미생물이다(Ash et al., 1993; Timmusk et al., 2005; Ravi et al., 2007). 많은 연구에서 *P. polymyxa* 균주는 질소고정화, 식물의 성장촉진물질 생산, 다양한 분해효소 생산, 작물에 유해한 곰팡이류 또는 병원성 균의 생육을 저해하는 물질을 생산하기 때문에 유용 미생물로 보고되고 있어 본 연구에서 발견한 균주의 유용성은 더욱 높게 평가할 수 있게 되었다(Ravi et al., 2007; Liebminger et al., 2012). 특히 *P. polymyxa*는 poly-myxin과 lantibiotic와 같은 천연항생물질을 생산한다고 알려져 있어 본 연구에서 발견한 분리균주의 항균활성을 증명하는 동시에 향후 분리균주를 이용하여 항생제를 대신한 수산용 프로바이오틱스 균주로 활용을 기대할 수 있었다(Zengguo et al., 2007; Lal and Tabacchioni, 2009).

B. safensis 균주는 그람양성균, 포자를 생산하는 간균형태의 균주로서 염, UV, 그리고 감마방사선 등에 매우 저항성이 높다고 보고되어 있으며, 다른 *Bacillus* 종과 함께 식물의 성장을 촉진하는 물질을 생산한다고 알려져 농업분야에서 유용한 산업용 균주로 인식되어 있다(Sari et al., 2007; Kothari et al., 2013; Kumar et al., 2014).

B. pumilus 균주는 그람양성, 호기성균이며, 포자를 생산하는 균주로 일반적으로 환경 샘플에서 많이 발견된다고 보고되고 있다(Kempf et al., 2005). 또한 UV에 노출, 건조한 상황 그리고 과산화수소와 같은 산화제 처리 등의 다양한 환경적인 스트레스에 강한 저항력이 보고되고 있다(Kempf et al., 2005). Hill et al. (2009)은 새우(black tiger shrimp, *Penaeus monodon*)에서 분리된 *B. pumilus*은 높은 염도에도 생육이 가능하며, 어병 세균인 *Vibrio alginolyticus*에 대한 항균 활성이 있음을 보고하였는데, 본 연구에서 분리한 균주도 *V. alginolyticus*에 대한 항균활성을 확인 할 수 있었다(Hill et al., 2009). 일부 *B. pumilus* 종은 농작물의 뿌리에 생기는 유해 곰팡이포자들의 발아를 막아주는데 효능이 있다고 보고되어 있고(Garbeva et al., 2003; Joo et al., 2004; Satomi et al., 2006), pumilin이라는 항균물질을 생산하는 것으로 알려져 있다(Bhate, 1955). 31종의 항균활성을 보이는 미생물 중 *B. pumilus* 종은 미국 FDA에서 인정한 17종의 GRAS (Generally Recognized As Safe) 균주 중 하나로(GRAS Notice, GRN No. 561) 안정성과 유용효과가 이미 입증된 미생물이기 때문에 수산 양식산업에 활용성이 더욱 높

Table 2. List of isolated strains and results of BLAST search with 16S rDNA sequences

	Isolates		Identity	Species	Genus	Family	Order	Class	Phylum	Kingdom
1	D28	2	100%	<i>Bacillus aerophilus</i>						
2	D70-10R		99%							
3	RD6	4	99%	<i>Bacillus pumilus</i>						
4	D116-2-1OR									
5	D116-2-2OR									
6	S118-2-2OR									
7	RD118-1	7	99%	<i>Bacillus safensis</i>						
8	RD118-3									
9	RS116-2									
10	RS118-1									
11	D118-2-2OR									
12	S118-2-1OR									
13	D118-2-1OR									
14	DR05-2A	15	99%	<i>Paenibacillus polymyxa</i>						
15	DR07-1A									
16	DR07-3									
17	R07-4									
18	RD05-4									
19	DR07-2B									
20	DR07-1C									
21	DR07-1B									
22	DR07-2A									
23	RD05-2B									
24	R05-1-3									
25	DR05-2-1									
26	Dr07-2-1									
27	DR05-1-1									
28	DR07-2-2									
29	RD100	1	99%	<i>Pseudomonas poae</i>	Pseudo-	Pseudo-	Pseudo-	Pseudo-		
					monadaceae	monadales	monadales			
30	RS86-1	1	99%	<i>Enterobacter asburiae</i>	Enterobacte-	Enterobacte-	Enterobacte-	Gamma	Gamma	
					riaceae	riales	riales	Proteobacteria	Proteobacteria	
31	RS86-2	1	99%	<i>Enterobacter ludwigii</i>						
31 isolates	31	99%	7	4	4	3	2	2	1	

고, 수산 양식업 외 다양한 산업에서 활용될 것으로 기대할 수 있었다.

1/10 marine 배지에서는 단 하나의 균주를 분리할 수 있었으며, 16S rDNA의 유사도를 분석한 결과 *B. aerophilus* 종과 가장 유사한 결과를 알 수 있었다(Table 2). 본 연구에서는 두 점의 *B. aerophilus*를 분리할 수 있었는데 각각 1/10 marine 배지와

R2A 배지에서 분리하였으며, 16S rDNA 염기서열 정보에 의한 분류는 같은 종의 미생물로 분류 되었으나, 항균활성의 경우 R2A 배지에서 분리한 균주에서 좀 더 다양한 항균 활성이 발견 되었다(Table 2). 이러한 결과는 같은 균주가 성분이 다른 배지에서 배양 되었을 때 다른 대사산물을 생산하기 때문에 발생하는 현상으로 추정할 수 있었으며, 본 연구에서는 분리균주들을

16S rDNA 정보에 의하여 분류하였기 때문에 다른 종으로 밝혀질 수도 있음을 유추할 수 있었다. 본 연구에서 분리한 항균활성을 가지는 미생물들은 같은 종으로 규명되었지만 항균활성의 스펙트럼이나 세기가 조금씩 다를 수 있었다(Table 2, 3) 특히 *P. polymyxa* 종은 다른 종에 비해 15점의 같은 종의 분리균이 있음을 알 수 있었고, 배양 방법이 같아도 각각의 피검균에 대한 항균활성 차이를 기록하여 미생물학적 또는 생화학적 연

구가 더욱 필요함을 알 수 있었다(Table 3). 이러한 현상은 다양한 연구에서 같은 *P. polymyxa* 종에는 속하지만 strain 또는 분리 지역에 따라 항균 활성과 항균 스펙트럼이 다르다는 보고를 통해 확인할 수 있으며, 이는 *P. polymyxa* 종이 polymixin A, B, E (colistin), polipeptins, jolipeptins, gatavalin, gavaserin 그리고 saltavalin과 같은 다양한 항균성분을 생산하기 때문에 strain 또는 분리 지역에 따라 생산되는 항균 물질이 다를 수 있음을 추측할 수

Table 3. Antibacterial activities of isolates against 23 pathogenic strains

Isolates	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	Total
1		**												**		**			*				**	5 spp.
2		***				**	**							**		**					*		**	7 spp.
3														**	**	**			*				*	5 spp.
4		***				**		*	**					**		**			*				**	8 spp.
5		***				**		*					**	**		**			*		*		**	9 spp.
6		***				**										**			*				**	5 spp.
7																**			*				*	3 spp.
8		***														**			*				*	4 spp.
9		***				**									***	**			*				**	6 spp.
10		***				**										**			*				**	5 spp.
11		***				**										**			*				**	5 spp.
12		***				**										**			*		*		**	6 spp.
13		***				**										**			*				**	5 spp.
14	**		*	**		**	**	*			**				**	**		**	*		*	**	*	14 spp.
15		**	*	**			**	*		**	**				**	**		**	*		*	**	*	14 spp.
16	***		*	**		**	**	*		**					**	**					*	**	*	12 spp.
17	***	**		**			**			**					***	**		**			*	**	**	11 spp.
18	**	**	*	**		**	**	*		**					**	**		**	*		*	**	*	15 spp.
19	***	**				**	**	*		**						**		**			*	**	**	11 spp.
20	***	**		**		**	**			**	**					**		**			*	**	**	12 spp.
21	***	***		**		**				**								**			*	**	**	9 spp.
22	**	**				**	**	*		**								**			*	**	*	10 spp.
23	**	**		***		**	**			**						**			*	*	*	**	*	12 spp.
24	***			**		**	***	*	**	**	**				**	**		**	*		*	*		14 spp.
25	***			**		**	**				**					**			*	*	*	**	*	11 spp.
26	***	***		**		**	**	**		**					**	**		**	*	*	*	**	**	15 spp.
27	*					**		*		**					**				*	*	*			8 spp.
28	***			**		**	**	*		**					**	**			*		*	**	*	12 spp.
29														***									*	2 spp.
30																							**	1 spp.
31		**																					**	2 spp.
	14	21	4	12	0	22	14	12	2	0	14	4	1	5	12	25	0	10	21	4	18	14	29	

Alphabets and numbers in a "isolates" column indicate pathogenic bacteria described in Table 1 and species of isolates in Table 2, respectively.

Levels of antimicrobial activities were evaluated by number of asterisks (*).

있어, 다양한 종류의 항균물질을 생산하는 *P. polymyxa* 종이 천연항생제 대체물질의 개발에 매우 큰 의의가 있음을 알 수 있었다(Choi et al., 2011).

*B. aerophilus*의 경우 높은 고도의 대기권에서 분리 되었다고 알려져 있어 갯바위유래의 미생물로 유추하기에 어려움이 있었으나 *B. safensis*, *B. pumilus*, *B. aerophilus* 균주는 *Bacillus* 균주들 중에서 유사도가 매우 높은 것으로 알려져 있으며, 유사도가 99%가 넘기 때문에 16S rDNA 보다는 *gyrB*라는 유전자의 복제와 전사과정에 관련이 있는 유전자의 염기서열에 의해서 정확하게 구별 된다고 보고되었다(Shivaji, 2006; Wang et al., 2007). 특히 *B. pumilus*와 *B. safensis*는 유사도가 높아 16S rDNA 정보로는 두 종의 분류가 어렵다고 보고되었다(Shivaji, 2006; Wang et al., 2007). 따라서 차후 연구에서 *gyrB*와 같은 다른 유전자 분석을 통하여 분리한 *Bacillus* 균주들 간에 상관관계 분석이 필요할 것으로 사료된다.

항균활성을 보이는 미생물 중 *Bacillus* 종의 미생물을 제외하고는 *Pseudomonas poae*와 두 종의 *Enterobacter* 균주가 분리되었다(Table 2). 그 중 *P. poae* 균주는 형광의 물질을 생산하는 그람음성 균주로, *Pseudomonads* 속에 속하며, 다양한 환경에서 분리 및 보고되는 균주이다(Behrendt et al., 2003). 그리고 분리된 *P. poae* 균주는 식물에 병을 유발하는 *Phoma betae*, *Rhizoctonia solani* 그리고 *Sclerotium rolfsii* 등의 병원성 곰팡이 등의 생육을 억제하는 활성이 알려져 있어 식용작물의 재배에 유익한 균주로 보고 되어있다(Henry et al., 2013).

본 연구에서 분리한 두 종의 *Enterobacter* 균주는 각각 *E. asburiae*와 *E. ludwigii*와 유사도가 가장 높은 균주로 밝혀졌는데, 두 균주는 병원성 균주로 알려져 있어 본 연구결과에 가장 특이한 결과였다(Table 2). *E. asburiae*는 그람음성의 간균 형태로, enteric group 17에 속하는 균주로서 1986년에 분류 및 명명되었다(Brenner et al., 1986). 주로 폐렴 등의 병원성에 대해 보고되어 항균활성 또는 공생 미생물로 보고된 다른 분리균주와는 특성이 달라 독특한 결과였다(Brenner et al., 1986). 그러나 최근에 일부 연구팀에 의하여 ethanol과 hydrogen을 생산하거나 glucose dehydrogenase 등을 분비하여 당을 분해하는 것이 보고되어 좀 더 많은 연구가 필요한 종으로 사료된다(Changhao et al., 2009). 다른 한 종의 *Enterobacter*는 *E. ludwigii*으로써 2005년에 *E. cloacae* 종에서 신종으로 분리 된 종이다(Hoffmann et al., 2005). *E. ludwigii*는 다른 *Enterobacteria*와는 달리 myo-inositol과 3-O-methyl-d-glucopyranose를 영양원으로 사용하여 생육이 가능하다는 차이가 있으며, 식물의 성장을 촉진하고 다양한 분해효소를 생산하며, 농약을 제거 및 분해한다는 활성이 보고되어 있다(Hoffmann et al., 2005).

본 연구에서 분리된 항균활성을 보이는 균주들은 *Paenibacillus*와 *Bacillus* 종을 포함하는 Bacillales목과 그렇지 않은 종들로 구분할 수 있었으며, Bacillales 목에 속하는 분리균주들이 높은 항균 활성을 나타내어 수산용 프로바이오틱스 종으로 개

발에 더욱 유용함을 알 수 있었다(Table 3). 특히 *Paenibacillus* 및 *Bacillus* 종들은 *Lactobacillus plantarum* (KCTC 3108)과 *Lactococcus lactis* (KCTC 3769)와 같은 대표적인 프로바이오틱스 균주들 보다 더욱 강한 항균활성을 기록하였으며(Data not shown), 포자를 생산하는 특징이 있기 때문에 생산, 운송 및 보관이 용이하고 사용방법이 간단하여 *Pseudomonas* 또는 *Enterobacter* 종의 분리균주들 보다 프로바이오틱스 균주 또는 항생제 대체제 등으로 활용성이 높을 것으로 사료된다(Hill et al., 2009).

항균 활성의 다양성 및 특성 분석

분리균주들의 항균활성은 대부분 2일 이상 배양해야만 관찰할 수 있었으며, 병원성 균주의 생육을 저해하여 생성된 투명환의 유무 및 크기를 통하여 분리균주의 항균활성을 평가하였다(Table 3). 그 결과 *B. aerophilus* (1, 2번균주) 종은 5-7균주, *B. pumilus* (3-6번 균주) 종은 5-9 균주, *B. safensis* (7-13번 균주) 종은 3-6균주, *P. polymyxa* (14-28번 균주) 종은 8-15균주 그리고 *P. poae* (29번 균주) 종, *E. asburiae* (30번 균주) 종, *E. ludwigii* (31번 균주) 종은 각각 1-2균주의 피검균에 대한 항균 활성을 기록하여 각각의 종에 따라 항균활성에 차이를 알 수 있었고, 활성의 유형을 통하여 분류할 수 있음을 알 수 있었다(Table 3). 그리고 이러한 분리균주의 항균활성에 따른 분류는 16S rDNA에 따른 종분류와 매우 유사한 결과를 나타내어 종에 따라 다른 종류의 항균물질을 생산 함을 알 수 있었다(Table 2, 3).

P. polymyxa 종의 분리균주들은 21번 균주(DR07-1B)를 제외하고 10종 이상의 병원성 피검균들에 항균활성을 기록하여 나머지 분리균주들보다 월등히 많은 수의 병원균에 대한 항균 활성을 기록하였으며, 특히 A (*Bacillus cereus*), C (*Edwardsiella tarda*), D (*Enterobacter cloacae*), K (*Pseudomonas aeruginosa*), L (*Staphylococcus aureus*), R (*Vibrio anguillarum*), T (*Vibrio harveyi*) 그리고 V (*Vibrio parahaemolyticus*) 피검균주에 분리균주들 중에서 유일하게 항균 활성을 나타내었다(Table 3). 그리고 *P. polymyxa* 다음으로는 *B. pumilus* 균주 그룹이 5-9 균주에 대한 항균활성을 보여 두 번째로 넓은 항균활성을 기록하였다(Table 3). 또한 M (*Staphylococcus haemolyticus*)과 N (*Streptococcus iniae*) 균주는 *B. aerophilus*와 *B. pumilus* 종에서만 활성이 있음을 알 수 있었다(Table 3). 반면에 B (*Candida albicans*), F (*Escherichia coli*), P (*Streptococcus parauberis*), S (*Vibrio alginolyticus*) 및 W (*Vibrio vulnificus*) 균주는 대부분의 분리균주에 생육저해 활성을 보였으며, 그 중 *V. vulnificus* 균주는 31개의 분리균주 중 2점의 분리균주를 제외한 29개의 분리균주에 생육을 저해 받아 분리균주에 가장 민감한 항균활성을 보이는 피검균였으며, 다음으로는 *S. parauberis* 균주가 25점의 분리균주들에 의한 생육저해를 기록하였다(Table 3). 그러나 본 연구과정에서 분리한 31점의 모든 미생물은 E (*Enterococcus faecalis*), J (*Providencia stuartii*) 그리고

Q (*Streptococcus vestibularis*) 피검균주에 대한 항균활성은 배양액에서 직접 관찰 할 수 없었다(Table 3).

분리한 31점의 미생물 중에서 *P. polymyxa* 균주에 속하는 18번과 26번 균주가 23종의 피검균 중에서 15점에 균주에 항균활성을 기록하였으며, 14, 15번과 24번 균주가 14종의 병원성 미생물에 대하여 항균활성을 기록하였다(Table 3). 그러나 *P. poae*의 근연종인 29번 균주와 *E. ludwigii* 근연종인 31번 균주는 각각 O (*S. mutans*)와 W (*V. vulnificus*) 그리고 B (*C. albicans*)와 W (*V. vulnificus*) 두 균주에만 항균활성을 기록하였다(Table 3). 그리고 *E. asburiae* 균주는 오직 W (*V. vulnificus*) 균주에만 생육을 저해하는 활성을 보여 분리균주 중에서 가장 좁은 항균활성 범위를 기록 하였다(Table 3).

본 연구에서는 항균활성 범위가 좁은 *Enteriobacter*와 *Pseudomonas* 종의 균주를 제외하고는 그람음성 및 양성 균주 모두에 항균활성을 관찰 할 수 있었으며, *C. albicans*와 같은 진균류의 병원성 균주에도 활성이 있었다(Table 3). 또한 특정균주의 경우 배양액, 상층액 그리고 세포 파쇄물에 대한 항균 활성의 유무와 범위가 다를 수 있었다(Data not shown). 따라서 특정 균주의 경우 한 가지의 항균물질을 생산하는 것이 아니라 둘 이상의 물질을 생산하며, 이로 인하여 항균활성의 특징과 범위가 다를 수 있었다(Table 3).

항생제를 대체할 수 있는 물질을 탐구하기 위해서는 병원성 균주를 제어할 수 있는 미생물 또는 미생물이 생산하는 물질의 발견이 중요하다(Kim et al., 2008). 그리고 사용할 균주는 우리나라의 연근해 양식 환경에 알맞은 균주를 선별해야 하며, 양식생물의 장관 내에서 내산성, 정착성 및 적응력이 중요하다(Aditya et al., 2008; Hill et al., 2009). 또한 기존에 밝혀진 항균물질을 생산하거나 다양한 활용성이 보고되어 있어도 분리원과 항균 활성에 대한 평가가 다르다면 활용 가능성이 매우 크며, 본 연구에서 알 수 있듯이 항균활성의 범위가 다른 여러 균주들을 혼합하여 사용한다면 어병세균에 의한 대량폐사 등의 피해를 크게 줄일 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구 등을 통하여 우리나라 수산양식 환경에 적합한 다양한 유용균주의 확보 및 평가가 지속적으로 수행되어야 할 것이며, 이러한 결과는 우리나라 실정에 맞는 항생제 대체용 미생물 유래 제어물질의 개발에 매우 유용한 결과 및 자료를 제공할 것으로 사료된다. 차후의 연구를 통하여 본 연구에서 분리한 균주들의 어류에 대한 안정성, 독성평가, 항균 메커니즘, 미생물학적 및 생화학적 분석 후 다양한 수산분야에 활용을 한다면 어류 병원성 균주들의 제어할 수 있는 항생제 대체제의 역할과 함께 사료효율 증가 등의 부수적인 다양한 효과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

사 사

이 논문은 2015년도 국립수산물품질관리원 수산과학연구소(R2015022)의 지원으로 수행된 연구이며 연구비 지원에 감사

드립니다.

References

- Aditya K, Heinrich K, Lategan MJ and Gibson L. 2008. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture* 274, 1-14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.11.019>
- Ash C, Priest FG and Collins MD. 1993. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Anton Leeuw Int J G* 64, 253-260.
- Behrendt U, Ulrich A and Schumann P. 2003. Fluorescent pseudomonads associated with the phyllosphere of grasses; *Pseudomonas trivialis* sp. nov., *Pseudomonas poae* sp. nov. and *Pseudomonas congelans* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 53, 1461-1469.
- Bhate DS. 1955. Pumilin, a New Antibiotic from *Bacillus pumilus*. *Nature* 175, 816-817.
- Brenner DJ, McWhorter AC, Kai A, Steigerwalt AG and Farmer JJ. 1986. *Enterobacter asburiae* sp. nov., a new species found in clinical specimens, and reassignment of *Erwinia dissolvens* and *Erwinia nimipressuralis* to the genus *Enterobacter* as *Enterobacter dissolvens* comb. nov. and *Enterobacter nimipressuralis* comb. *J Clin Microbiol* 23, 1114-1120.
- Changhao B, Zhang X, Ingram LO and Preston JF. 2009. Genetic Engineering of *Enterobacter asburiae* strain JDR-1 for efficient production of ethanol from hemicellulose hydrolysates. *Appl Environ Microbiol* 75, 5743-5749.
- Choi HJ, Kim YE, Bang JH, Kim DW, Ahn CS, Jeong YK and Joo WH. 2011. Characterization of an Indigenous antimicrobial substance-producing *Paenibacillus* sp. BCNU-5011. *Kor J Microbiol Biotechnol* 26, 100-106.
- Garbeva JA, Veen V and Elsas JDV. 2003. Predominant *Bacillus* spp. in agricultural soil under different management regimes detected via PCR-DGGE. *Microbial Ecol* 45, 302-316. <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-002-2034-8>.
- Gwon BG, Kim YO, Nam BH, Kim WJ, Kong HJ, Kim BS, Jee YJ, Lee SJ, An CM and Kim DG. 2013. Analysis of diversity of hemolytic microbiome from aquafarm of arkshell, *Scapharca broughtonii*. *J Fish Pathol* 26, 193-206.
- Henry M, Christin Z, Mohammadali A, Ralf T, Peter MK, Gerhard GT and Gabriele B. 2013. Complete genome sequence of the sugar beet endophyte *Pseudomonas poae* RE*1-1-14, a disease-suppressive bacterium. *Genome announce* 2, e00020-13.
- Hill JE, Baiano JCF and Barnes AC. 2009. Isolation of a novel strain of *Bacillus pumilus* from penaeid shrimp that is inhibitory against marine pathogens. *J Fish Dis* 32, 1007-1016.
- Hoffmann H, Stindl S, Stumpf A, Mehlen A, Monget D, Heese-

- manss J, Schleifer K and Roggenkamp A. 2005. Description of *Enterobacter ludwigii* sp. nov., a novel *Enterobacter* species of clinical relevance. Syst Appl Microbiol 28, 206-212. <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2004.12.009>.
- Jeong JW, Park SH, Kim DH, Jeun YC and Heo MS. 2014. Antibacterial effect of bacteria isolated from the plant Rhizosphere against pathogenic bacteria of fish. J Life Sci 24, 757-761. <http://dx.doi.org/10.5352/JLS.2014.24.7.757>.
- Joo G, Kim Y, Lee I, Song K and Rhee I. 2004. Growth promotion of red pepper plug seedlings and the production of gibberellins by *Bacillus cereus*, *Bacillus macroides* and *Bacillus pumilus*. Biotechnol Lett 26, 487-491.
- Kempf MJ, Chen F, Kern R and Venkateswaran K. 2005. Recurrent isolation of hydrogen peroxide-resistant spores of *Bacillus pumilus* from a spacecraft assembly facility. Astrobiology 5, 391-405.
- Kim DG, Nam BH, Kong HJ, Kim WJ, Kim BS, Jee YJ, Lee SJ, Jung CG and Kim YO. 2012. Analysis of hemolytic microflora from the ark shell (*Scapharca broughtonii*). J Life Sci 22, 642-649.
- Kim WJ, Cho MY, Jee B, Park MA and Kim NY. 2014. Administration and use of aquaculture drugs in Korea. Korean J Fish Pathol 27, 67-75.
- Kim YB, Moon YG, Ha JH, Kang CH, Kam SK, Song CB, Oh MC and Heo MS. 2008. Investigation of microbial contamination the level in fish farms of Jeju east coast. J Life Sci 18, 395-402.
- Klancnik A, Piskernik S, Jersek B, Mozina SS. 2010. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. J Microbiol Methods 81, 121-126.
- Kothari VV, Kothari RK, Kothari CR, Bhatt VD, Nathani NM, Koringa PG, Joshi CG and Vyas BRM. 2013. Genome sequence of salt-tolerant *Bacillus safensis* strain VK, isolated from saline desert Area of Gujarat, India. Genome Announc 1, e00671-13.
- Kumar D, Parshadb R and Gupta VK. 2014. Application of a statistically enhanced, novel, organic solvent stable lipase from *Bacillus safensis* DVL-43. Int J Biol Macromol 66, 97-107.
- Lal S and Tabacchioni S. 2009. Ecology and biotechnological potential of *Paenibacillus polymyxa*: a minireview. Indian J Microbiol 49, 2-10. <http://dx.doi.org/10.1007/s12088-009-0008-y>.
- Liebming S, Aichner M, Oberauer L, Furnkranz M, Cardinale M and Berg G. 2012. A new textile-based approach to assess the antimicrobial activity of volatiles. Textile Res J 82, 484-491. <http://dx.doi.org/10.1177/0040517511429607>.
- Margrét A, Starri H, Anna RJ and Oddur V. 2014. Novel bacteria associated with Arctic seashore lichens have potential roles in nutrient scavenging. Canadian J Microbiol 60, 307-317.
- Ravi AV, Musthafa KS, Jegathammbal G, Kathiresan K and Pandian SK. 2007. Screening and evaluation of probiotics as a biocontrol agent against pathogenic Vibrios in marine aquaculture. Lett Appl Microbiol 45, 219-223.
- Reverter M, Bontemps N, Lecchini D, Banaigs B and Sasal P. 2014. Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives. Aquaculture 433, 50-61.
- Rijkers GT, Vos WM, Brummer RJ, Morelli L, Corthier G and Marteau P. 2011. Health benefits and health claims of probiotics: Bridging science and marketing. Brit J Nutr 106, 1291-1296.
- Sari E, Etebarian R and Aminian H. 2007. The effects of *Bacillus pumilus*, isolated from wheat rhizosphere, on resistance in wheat seedling roots against the Take-all fungus, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. J Phytopathol 155, 720-727.
- Satomi M, La DMT and Venkateswaran K. 2006. *Bacillus safensis* sp. nov., isolated from spacecraft and assembly-facility surfaces. Int J Syst Evol Micro 56, 1735-1740.
- Shivaji S. 2006. *Bacillus aerius* sp. nov., *Bacillus aerophilus* sp. nov., *Bacillus stratosphericus* sp. nov. and *Bacillus altitudinis* sp. nov., isolated from cryogenic tubes used for collecting air samples from high altitudes. Int J Syst Evol Micro 56, 1465-1473.
- Song JW, Lim SJ, Oh DH, Cha JH and Lee KJ. 2012. Effects of dietary supplementation with nucleotide on growth performance, feed utilization, and Non-specific immune responses of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Korean J Fish Aquat Sci 45, 648-653. <http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2012.0648>.
- Timmusk S, Grantcharova N, Gerhart E and Wagner H. 2005. *Paenibacillus polymyxa* invades plant roots and forms biofilms. Appl Environ Microbiol 71, 7292-7300.
- Tom D, Nico B, Patrick S, Willy V and Peter B. 2007. Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example. Trends Biotechnol 25, 472-479.
- Wang LT, Lee FL, Tai CJ and Kasai H. 2007. Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. Int J Syst Evol Micro 57, 1846-50.
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA and Lane DJ. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J Bacteriol 173, 697-703.
- Zengguo H, Kisla D, Zhang L, Yuan C, Green-Church KB and Yousef AE. 2007. Isolation and Identification of a *Paenibacillus polymyxa* strain that coproduces a novel lantibiotic and polymyxin. Appl Environ Microbiol 73, 168-178.