

Edwardsiella tarda의 특이 Bacteriophage와 Bacillus subtilis가 혼합된 사료급이가 나일 틸라피아(Oreochromis niloticus)의 선천적 면역반응과 항균효과에 미치는 영향

백민석 · 황요셉 · 최상훈*

군산대학교 수산생명의학과

The Effects of a Dietary *Edwardsiella tarda* Specific Bacteriophage and *Bacillus subtilis* Mixture on Innate Immune Responses and Antibacterial Activity of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*

Min Suk Baek, Yo Sep Hwang and Sanghoon Choi*

Department of Aquatic Life Medicine, Kunsan National University, Gunsan 573-701, Korea

The present study investigated the effects of dietary *Edwardsiella tarda* (*E. tarda*) specific bacteriophage (phage) and *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) mixture on innate immune responses and antibacterial activity of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. In a dietary experiment, tilapia were fed the control diet (C), a phage-only supplemented diet (P), a *B. subtilis* only supplemented diet (B), or a *B. subtilis* and phage mixed diet (B+P). A respiratory burst and significant increase in lysozyme activity ($P<0.05$) were noted in the B+P group, as compared to other groups after 4 days of feeding. The B group showed a significant ($P<0.05$) increase in respiratory burst and lysozyme activity versus the C and P groups, whereas no significant increases ($P<0.05$) were observed in the P and C groups. ACH_{50} was significantly up-regulated in the B+P group versus other groups after 8 days of feeding ($P<0.05$). *In vivo* antibacterial activity was significantly enhanced in the B+P fed group, as compared to other groups ($P<0.05$) after 7 days of *E. tarda* challenge. A significant ($P<0.05$) increase in antibacterial activity was seen in the B group, as compared to C or P groups after 14 days of feeding. These results suggest that a *B. subtilis* and phage mixture could be utilized as an alternative to antibiotics in the control of fish diseases caused by *E. tarda*.

Key words: *Edwardsiella tarda*, Innate immune responses, Lysozyme, Bacteriophage

서 론

에드워드병의 원인균인 *Edwardsiella tarda* (*E. tarda*)는 수중 및 정상어의 장내에 상재해 있지만 고밀도 양식에 의한 물리적 스트레스를 비롯하여 사육환경 악화, 먹이경쟁, 생활공간의 협소, 수산약제의 사용, 저수온 및 고수온 등에 의해 많은 스트레스 조건 하에서 기회성 감염균으로서 각종 양식 어류에 감염되어 경제적으로 많은 손실을 초래하고 있다(Kanai et al., 1988; Bang et al., 1992). 특히 넙치 양식에서 가장 많은 피해를 주는 에드워드병의 발병 증상으로는 복부팽창 및 탈장 등의 증상이 있으며 주로 고수온기에 많이 나타나는 질병이다(Kusuda and

Kawai, 1998). 현재 본 질병은 화학적 치료와 관련된 오염 및 다양한 항생제 내성균의 출현 때문에 어류양식에 있어서 예방 및 치료가 더욱 어려워지고 있다(Chinabut and Puttinaowarat, 2005). 따라서 기존의 질병예방 및 치료의 문제점에 대한 대책으로 친환경적인 bacteriophage (phage)나 *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*)와 같은 probiotics에 대한 관심과 연구가 점차 증가되고 있는 실정이다(Salminen et al., 1999; Park et al., 2000).

Phage는 숙주세포인 세균에 감염하여 숙주세포의 생체 기능을 이용하여 증식하는 바이러스로서 자연계에 널리 분포하고 있다(Carlton, 1999). Phage는 1915년 Twort와 1917년 d'Herelle에 의해서 최초로 발견되었으며(Sulakvelidze et al.,

Article history;

Received 4 October 2013; Revised 19 December 2013; Accepted 4 February 2014

*Corresponding author: Tel: +82. 63. 469. 1886 Fax: +82. 63. 463. 9493

E-mail address: shchoi@kunsan.ac.kr

Kor J Fish Aquat Sci 47(1) 023-030, February 2014

<http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2014.0023>

pISSN:0374-8111, eISSN:2287-8815

© The Korean Society of Fishereis and Aquatic Science. All rights reserved

2001) 1980년도에는 phage의 임상실험이 성공하였다(Smith and Huggins, 1980; Smith and Huggins, 1982). 이후 동물의 세균성 질병에 대한 phage치료가 가능하다는 연구가 많이 보고 되었으며(Soothill, 1992; Soothill, 1994; Merrill et al., 1996; Barrow et al., 1998) 또한 어류의 세균성 질병에 대한 phage치료연구도 상당수 보고 되었다(Rodgers et al., 1981; Stevenson and Airdrie, 1984; Park et al., 2000).

Probiotics는 숙주의 건강에 유익한 효과를 나타내는 살아있는 미생물로서 다양한 종류의 정상 장내 세균총에서 병원성 세균에 대해 증식을 억제하는 항균력이 있는 것으로 알려져 있으므로 정상 장내 세균총의 균형을 유지하고 병원성 세균의 증식을 억제하는데 중요한 역할을 담당한다(Shahani and Ayebo, 1980; Fuller, 1989). 이러한 probiotics의 유용한 효과는 주로 사람과 가축에 대한 실험보고 내용이 대부분을 차지하고 있으나(Tournut, 1989) 어류와 다른 수생생물에서도 선천적 면역반응 향상과 병원성 미생물을 억제시키는 것으로 연구보고 되고 있다(Burr et al., 2005; Wang et al., 2008; Nayak, 2010; Cha et al., 2012). 수산양식에서 사용되는 probiotics로는 *Lactobacillus* sp., *Bacillus* sp., *Saccharomyces* sp. 및 *Enterococcus* sp. 등이 있다(Kumar et al., 2008). Probiotics가 첨가된 사료공급 시 장내 해로운 균의 번식을 억제하고(Perdigon et al., 1990), 장내 미생물 형성에 영향을 미쳐(Shahani and Ayebo, 1980) 장내 독소 제거에 의해 장 질환을 억제할 뿐만 아니라 비특이적 면역기능 강화(Shida et al., 1980) 등 여러가지 다양하고도 유익한 효과들이 나타난다는 연구결과가 보고되었다(Nayak et al., 2007; Kumar et al., 2008; Aly et al., 2008; Cutting, 2011; Cha et al., 2012).

그러므로 본 연구에서는 항생제 대체제를 개발하기 위한 기초적인 자료로서 *E. tarda*에 대한 phage를 자체적으로 분리하여 phage의 항균효과를 확인한 후 probiotics와의 혼합투여가 어류의 모델로서 나일 틸라피아(*Oreochromis niloticus*)의 선천적 면역반응과 항균 효과에 미치는 영향을 조사함으로써 에드워드병에 대한 예방 및 치료 대책의 가능성을 확보하고자 하였다.

재료 및 방법

Bacillus subtilis 분리 및 동정

숙성된 김치를 Luria Bertani (LB) broth에 넣고 37°C에서 24시간 배양한 후 멸균된 생리식염수 (Phosphate Buffered Saline, pH 9.2, PBS)로 1:10 단계희석하고 LB agar에 도말하여 *B. subtilis*와 유사한 형태 집락 5가지를 분리하였다. 분리된 균들은 *E. tarda*에 대한 항균효과를 측정 후 가장 효과가 좋은 균주를 16S rRNA gene을 이용하여 *B. subtilis*임을 입증하였다. DNA sequencing에 사용된 *B. subtilis*의 16S rRNA gene에 대한 universal primer는 Table 1에 나타내었다.

Table 1. Universal primers for *B. subtilis* KM-1 16S rRNA

Primer Name	Object	Primer Sequence 5' to 3'
16S-27F	16S rRNA sequence amplification	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG
16S-1492R	16S rRNA sequence amplification	TACGGYTACCTTGTACGAC

병원성 균주

본 연구에서 사용한 *E. tarda* (KCTC 12267)는 Korean Collection for Type Culture (KCTC)에서 분리 보존하고 있던 균주를 분양 받았다. 분양 받은 균주는 brain heart infusion (BHI) broth와 *Salmonella shigella* (SS) agar를 이용하여 2차 계대배양한 후 사용하였다.

Phage

우리나라의 서해안 및 남해안에 위치한 100여 군데의 양식장에서 수집된 물 sample로부터 본 연구실에서 분리된 *E. tarda*의 특이 phage를 사용하였다(Lee et al., 2011).

실험 사료

본 연구에서는 기초사료로 (주)카길에그리퓨리나 양어용 부상사료를 사용하였다. 기초사료의 영양성분은 34%, 조지방 6%, 조회분 15%, 조섬유 5%, 칼슘 0.8% 및 인 0.8%로서 실험에 사용된 사료는 기초사료를 포함하여 총 4가지로 제조하여 사용하였다. 첫 번째 사료는 *B. subtilis* (2×10^8 CFU/g)와 phage (3×10^7 PFU/g)를 혼합하여 첨가하고 호기성 조건으로 37°C incubator에서 2일 간 발효시킨 후 건조하여 사용하였다. 두 번째 사료는 *B. subtilis* (2×10^8 CFU/g)를 첨가하여 호기성 조건으로 37°C incubator에서 2일간 발효시킨 후 건조하여 사용하였다. 세 번째 사료는 phage (3×10^7 PFU/g)만 첨가하여 건조시킨 후 사용하였다. 네 번째 사료는 대조 균으로서 기초사료에 *B. subtilis*와 phage를 첨가하였을 때 사용되었던 동일부피의 BHI를 첨가한 후 동일 조건에서 건조시킨 후 사용하였다. 모든 사료는 발효와 동시에 자연 건조된 상태로 플라스틱 지퍼백에 넣어 사료공급 전까지 4°C에서 보관한 후 실험에 사용하였다.

실험어

군산대학교 부속양식장으로부터 평균체중이 100 ± 12 g의 나일 틸라피아(*Oreochromis niloticus*) 200마리를 분양 받았다. 분양 받은 틸라피아를 1 ton의 원형수조에 수온 23-25°C에서 1주일간 순치시킨 후 실험에 사용하였다.

선천적 면역반응

*B. subtilis*와 phage가 나일 틸라피아의 선천적 면역반응에 미치는 영향을 조사하기 위해 2가지 방법으로 실험을 수행하였다. 1차 실험은 *B. subtilis*와 phage가 혼합된 첨가사료(B+P)를

급이 하는 group, *B. subtilis* 첨가사료(B)만 급이 하는 group, phage 첨가사료(P)만 급이 하는 group 및 기초사료(C)만 급이 하는 대조군의 4개 group으로 나누어 80 L 수조에 group 당 각각 13마리씩 수용하였다. 각각 제조된 사료는 14일간 공급하였으며 sample은 사료공급 7일 및 14일째에 수집하였다. 2차 실험은 B+P공급 시 나일 틸라피아의 선천적 면역반응이 어느 정도의 기간 동안 유지되는지 알아보기 위해 수행되었다. 총 4개의 group으로 나누어 80 L 수조에 각각 13마리씩 수용하였다. 첫 번째 group은 B+P를 14일간 공급하였으며 두 번째 group은 B+P를 4일간만 공급하고 실험종료 시까지 사료를 공급하지 않았다. 두 개의 대조군 group도 BHI만 처리한 C를 같은 방법으로 공급하였다. Sample은 사료공급 4, 8, 10일 및 14일째에 각각 수집하였다.

Sample 수집

혈청 수집을 위해 틸라피아의 미병부에서 혈액을 채취하였다. 혈액은 4°C에서 24시간 동안 응고시킨 후 1,000×g에서 3분간 원심분리 하여 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청은 lysozyme 활성과 alternative complement pathway (ACH₅₀) 활성 분석에 사용하였다. 백혈구 수집을 위해 틸라피어를 개복하여 지방층과 막을 제거한 후 순수한 두신만을 적출하였다. 적출한 두신을 nylon mesh위에서 눌러 백혈구를 유출하였고 Histopaque-1077 (Sigma)을 이용하여 2,500×g에서 30분간 원심분리 하여 분리된 buffy-coat 부근에서 백혈구만을 순수 분리하였다. 분리된 백혈구는 혈구계산판을 이용하여 계수하였다. 백혈구의 세포 수는 10⁶ cell/mL로 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco)용액에 부유시켜 respiratory burst 활성 분석에 사용하였다.

Respiratory burst 활성

백혈구 식세포 작용의 respiratory burst 활성은 Secombes (1990)의 방법에 따라 nitroblue tetrazolium (NBT, Sigma)을 사용하여 분석하였다. 백혈구를 96 well plate에 200 µL씩 분주한 후 120×g에서 5분간 원심분리 하였다. PBS로 2회 washing한 후 phorbol myristate acetate (PMA, 1 µg/mL)를 첨가한 NBT (1 mg/mL)를 각각 100 µL씩 첨가하여 25°C에서 1시간 동안 배양하였다. 배양 후 70% methanol로 고정하고 PBS로 2회 washing한 후 2 M KOH 120 µL와 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma)를 첨가하였다. 첨가 후 Microplate reader기 (Sunrise, TECAN) 620 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Lysozyme 활성

혈청의 lysozyme 활성은 Sheikhzadeh et al. (2012)의 방법을 응용하여 분석하였다. 96 well plate에 0.2 M citrate phosphate buffer (pH 5.8)에 2 mg/mL의 *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma)를 부유시킨 용액을 well당 75 µL와 혈청 25 µL를 분주하여 반응시켜 30초 후부터 4분 30초까지 감소하는 흡광도의 양

을 Microplate reader기 405 nm에서 측정하였다. 이때 1 unit은 분당 0.001의 흡광도가 감소하는 양으로 표현하였다.

Alternative complement pathway 활성(ACH₅₀)

ACH₅₀은 Yano (1992)의 방법을 이용하여 분석하였다. 토끼의 혈액을 귀의 정맥혈관에서 채취하여 Histopaque-1077을 이용하여 적혈구만을 분리하였다. 분리된 토끼의 적혈구를 PBS로 2회 washing한 후 0.01 M EGTA-Mg-Gelatin veronal buffer (EGTA-Mg-GVB)로 희석하여 1×10⁸ cell/mL의 농도로 조절하여 사용하였다. 틸라피아의 혈청을 EGTA-Mg-GVB로 1:20의 농도로 희석한 후 96well plate에 well당 200, 150, 125, 100, 75 µL씩 분주하고 EGTA-Mg-GVB로 각각의 well의 총량이 200 µL가 되도록 맞추어주었다. 그 다음 분리된 토끼 적혈구(1×10⁸ cell/mL)를 각각의 well에 100 µL씩 분주하여 25°C incubator에서 1시간 동안 반응시킨 후 120×g에서 5분간 원심분리 한 다음 각각의 well에서 상청액 100 µL씩을 채취하여 Micro plate reader 405 nm에서 분석하였다.

$$ACH_{50} \text{ value (Unit/mL)} = 1/K \times \text{혈청 희석 배수} \times 0.5$$

In vivo 항균효과

나일 틸라피아의 *E. tarda* 인위적 감염 시 *B. subtilis*와 phage가 생체 내에서 미치는 항균효과를 알아보기 위해 2가지 방법으로 실험을 수행하였다. 1차 실험은 4개의 group으로 나누어 80 L 수조에 각각 13마리씩 수용하였다. B+P, B, P 및 C를 각각의 group에 4일간 공급한 후 1일간 절식시켜 *E. tarda* (1×10⁷ CFU/mL)를 틸라피아의 복강에 주사하였다. 주사 이후 14일 동안 각각의 사료를 공급하였다. 주사 후 0, 7, 14일째에 각각 group에서 4마리씩 모든 장기를 적출하였다. 적출된 장기에 멸균된 PBS 1 mL을 혼합해서 균질화한 후 거즈를 이용해서 1,000×g로 원심분리 하여 착즙 하였다. 그 후 착즙부유액을 멸균된 PBS로 1:10 단계희석 하여 SS agar에 평판도말법으로 *E. tarda*의 생균수를 측정하였다.

2차 실험은 1차 실험과 마찬가지로 4개의 group으로 나누어 80 L 수조에 틸라피어를 각각 13마리씩 수용한 후 2개의 group은 B+P와 C를 각각 4일간 공급하여 1일간 절식시킨 후 *E. tarda* (1×10⁷ CFU/mL)를 복강에 주사하고 사료를 공급하지 않았다. 나머지 2개의 group은 이전 group과 동일한 조건에서 10일 동안 각각의 사료를 공급하였다. C를 공급하고 *E. tarda* 주사 후 10일간 사료를 공급하거나 하지 않은 2개의 group을 대조군으로 설정하였다. 모든 group에서 주사 후 4, 6일 및 10일째에 각각 3마리씩 모든 장기를 적출하여 1차 실험과 같은 방법으로 측정하였다.

통계 분석

데이터를 평균과 표준편차(Mean ± S.D.)로 표현하여 PRIMER (Mc Graw-Hill, Inc., ver. 1.5)의 one way analysis of vari-

Fig. 1A

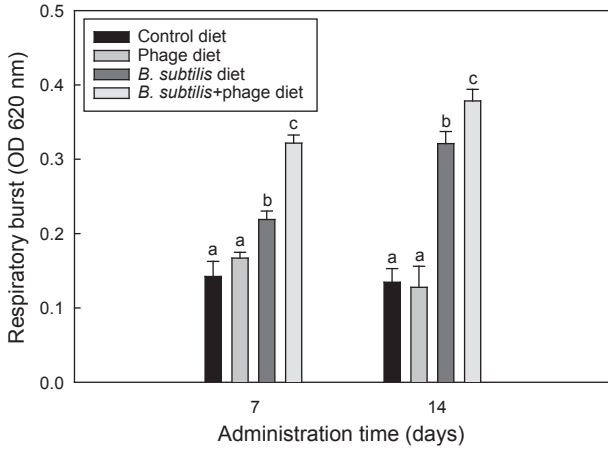


Fig. 1B

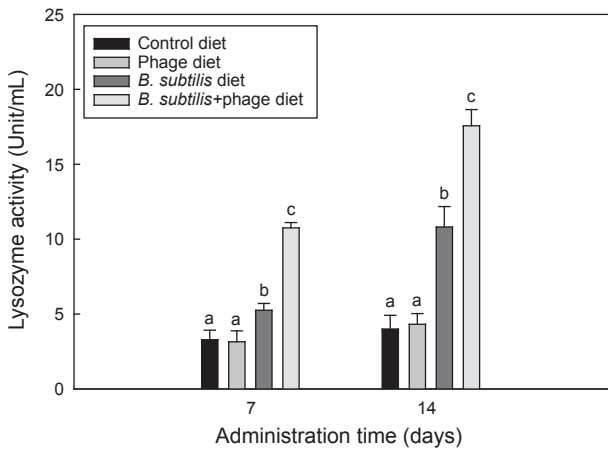


Fig. 1C

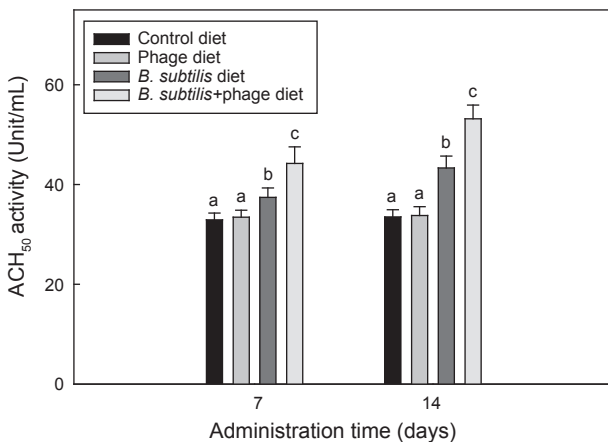


Fig. 1. Respiratory burst activity (A), lysozyme activity (B) and ACH₅₀ (C) of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fed the control diet, phage (3×10^7 PFU/g) supplemented diet, *B. subtilis* (2×10^8 CFU/g) supplemented diet and phage and *B. subtilis* mixed diet for 14 days. Data represent the mean \pm S.D. (n=4). Different letters above the bars indicate significant differences ($P < 0.05$).

ance를 이용하여 측정하였다. Student-Newman-Keuls test로 각 group사이의 유의성을 검정하였으며 $P < 0.05$ 일 경우 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서는 다양한 항생제 내성균의 출현과 같은 기존의 질병예방 및 치료의 문제점에 대한 대책으로 관심이 높아진 친환경적인 phage와 probiotics의 일종인 *B. subtilis*가 혼합된 첨가사료를 이용하여 나일 틸라피아의 선천적 면역반응과 에드와드증의 원인균인 *E. tarda*에 대한 항균효과가 증강되는지에 대한 조사를 수행하였다.

B. subtilis 동정

김치에서 분리된 균주를 16S rRNA universal primer로 F, 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3', R, 5'-TACGGY-TACCTTGTACGAC-3'을 이용한 염기 서열 분석 결과 Genbank에 등록된 accession number JF496383.1인 *B. subtilis*의 16S ribosomal RNA gene과 100% 상동성을 나타내었다(Baek et al., 2013).

선천적 면역반응

식세포작용에 의해서 생기는 중간대사 산물인 활성산소(O_2^-)와 같은 reactive oxygen species (ROS)는 강력한 살균 효과가 있는 것으로 알려져 있으며(Ellis, 1999) lysozyme은 peptidoglycan이라는 세균의 세포벽 성분을 분해하는 작용을 가지고 있으며 이외에도 옵소닌, 항바이러스 항암작용 등에도 관여를 하는 것으로서 보고 되어있다(Jolles and Jolles, 1984). 그리고 보체의 alternative pathways는 세균, 진균, 바이러스 및 기생충 등에 대한 어류의 강력한 선천적 방어기작으로 보고 되어있다(Müller-Eberhard, 1988).

B+P, B, P 및 C를 4개의 group에 각각 14일간 공급한 후 선천적 면역반응 1차 실험의 respiratory burst, lysozyme 및 ACH₅₀ 활성 결과는 Fig. 1 A, B 및 C에 각각 나타내었으며 모두 유사한 결과들을 보였다. B+P를 공급한 group이 C, P 및 B를 공급한 group에 비해 사료공급 후 7일 및 14일 째 모두 respiratory burst, lysozyme 및 ACH₅₀ 활성이 유의성 있게 증가($P < 0.05$)되었다. B를 공급한 group은 대조군 및 P를 공급한 group에 비해 7일 및 14일 째 모두 유의적으로 높은($P < 0.05$) 수치를 보였으나 B+P를 공급한 group 보다는 낮은 수치를 나타내었다. P만 급여한 group은 대조군 group과 유의적인 차이가 없었다($P > 0.05$).

B+P공급 시 나일 틸라피아의 선천적 면역반응이 어느 정도의 기간 동안 유지되는지 알아보기 위해 수행한 선천적 면역의 활성 결과는 Fig. 2 A, B 및 C에서 나타내었으며 모두 유사한 결과들을 보였다. B+P를 14일간 지속적으로 공급한 group이 다른 group들에 비해 8일째부터 14일째까지 respiratory burst, lysozyme 및 ACH₅₀ 활성이 유의성 있게 높게 증가($P < 0.05$)되

Fig. 2A

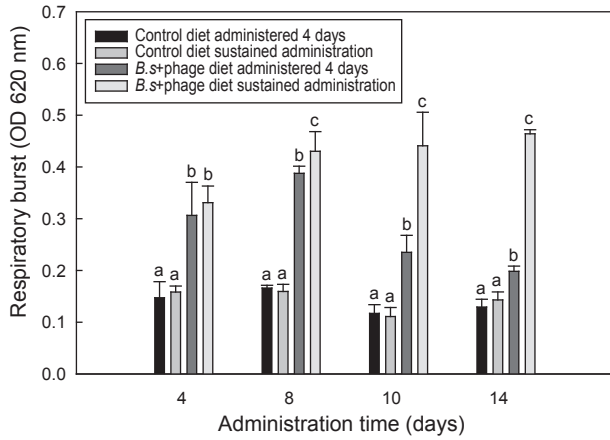


Fig. 2B

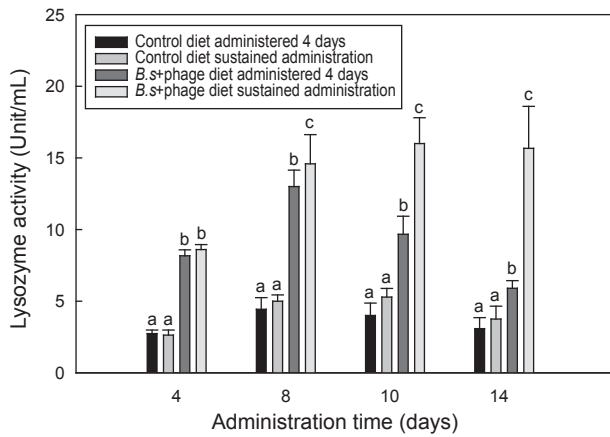


Fig. 2C

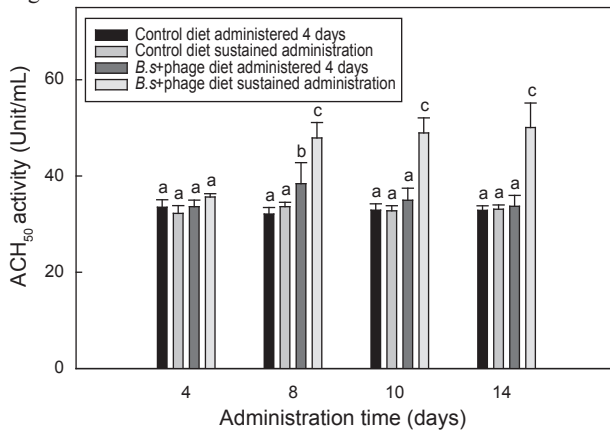


Fig. 2. Respiratory burst activity (A), lysozyme activity (B) and (C) ACH₅₀ of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fed the control diet for 4 and 14 days, respectively and phage (3×10^7 PFU/g) and *B. subtilis* (2×10^8 CFU/g) mixed diet for 4 and 14 days, respectively. Data represent the mean±S.D. (n=5). Different letters above the bars indicate significant differences ($P < 0.05$).

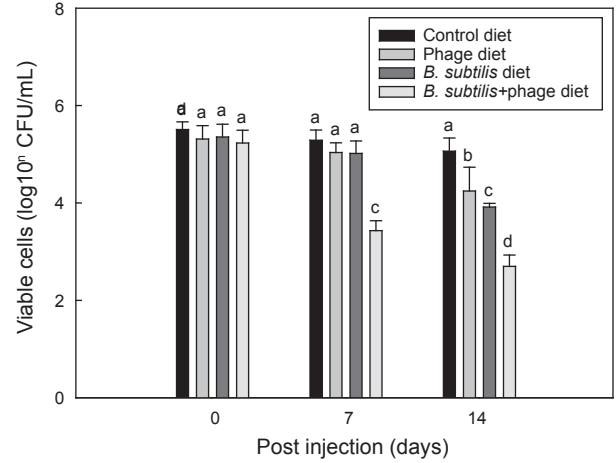


Fig. 3. Antibacterial effect of phage and *B. subtilis* supplemented diet fed for 14 days after *E. tarda* injection. Data represent the mean±S.D. (n=4). Different letters above the bars indicate significant differences ($P < 0.05$).

었다. B+P를 4일 간만 공급한 group의 respiratory burst, lysozyme 활성은 8일째까지는 대조군 group들에 비해 높은 값을 보였으나 10일째부터는 점차적으로 수치가 떨어지는 것이 확인되었으며 ACH₅₀ 활성은 8일째에만 대조군 group들에 비해 유의성 있게 높은($P < 0.05$) 수치를 보였다. 기초사료를 공급한 2개의 대조군 group간의 유의적인 차이는 없었다($P > 0.05$). 이와 같은 결과는 이전의 연구들에서도 *B. subtilis* 첨가사료를 공급하였을 때 도미(Salinas et al., 2005), 나일 틸라피아(Aly et al., 2008), 무지개송어(Panigrahi et al., 2007), 잉어과 어류(Kumar et al., 2008) 등에서 respiratory burst, lysozyme 및 ACH₅₀ 활성이 향상되었다고 보고된 내용과 일치하였다. 그러나 어류에서 probiotics가 어떠한 메커니즘에 의해 선천적 면역반응을 향상시키는 지에 대한 정확한 메커니즘은 보고되어 있지 않다. Abraham et al. (2007)도 생균제가 어류의 생존능력과 면역력을 향상시킬 수 있다고 보고 하였지만 그 메커니즘에 대한 정확한 해답은 제시하지 못하였다. 이전의 연구에서는 *B. subtilis*와 probiotics인 inulin, chitosan 및 fructooligosaccharide 등이 혼합된 첨가사료를 공급하여 어류의 선천적 면역반응이 향상되었다는 보고(Zhang et al., 2010; Geng et al., 2011; Cerezuela et al., 2012)는 되어 있지만 *B. subtilis*와 phage를 혼합투여 했을 시 선천적 면역반응에 미치는 영향 등에 관련된 연구는 아직까지 보고 되지 않았다. 본 연구의 결과 phage 자체로는 틸라피아의 선천적 면역기능을 증가시키지는 못하였지만 생균제와 혼합투여 되었을 시 생균제만 투여되었을 때보다 유의적 상승효과($P < 0.05$)가 나타났다. 그러나 어떻게 *B. subtilis*와 phage가 혼합투여 되었을 때 단독으로 처리되었을 때보다 선천적 면역기능이 상승되는지에 대한 추가적인 연구가 요구된다.

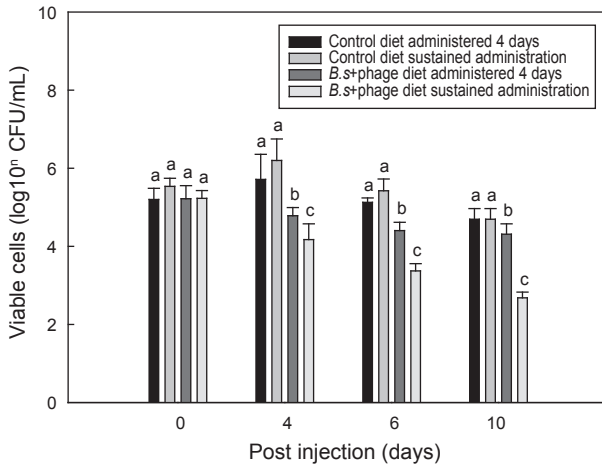


Fig. 4. Antibacterial effect of phage and *B. subtilis* supplemented diet fed for 4 days only and consecutive 10 days after *E. tarda* injection. Data represent the mean±S.D. (n=3). Different letters above the bars indicate significant differences ($P<0.05$).

In vivo 항균효과

Fig. 3는 B와 P 각각 및 B+P를 급여한 각 group의 틸라피아에 *E. tarda*를 복강 주사한 후 14일 동안 지속적으로 각 group에 해당되는 사료를 급여 한 후 나타나는 항균효과를 보여준다. B+P를 공급한 group은 *E. tarda* (1×10^7 CFU/mL) 복강 주사 이후 7일 및 14일째에 다른 group에 비해 *E. tarda*에 대해 유의적으로 가장 높은($P<0.05$) 항균효과를 보였다. B 자체만을 공급한 group은 14일째에 대조군 및 P를 공급한 group에 비해 *E. tarda*에 대한 유의성 있는 ($P<0.05$) 상승된 항균효과를 보였으나 B+P를 공급한 group 보다는 낮은 항균효과를 나타내었다. 동일 어종인 나일 틸라피아를 대상으로 한 다른 연구에서도 (Aly et al., 2008) *B. subtilis*를 공급한 group에서 대조군에 비해 *Aeromonas hydrophila*와 *Pseudomonas fluorescens*에 대한 저항성이 향상되었다고 보고되었다. P 자체만을 공급한 group은 14시간째에 대조군 group보다 높은 유의성 있는($P<0.05$) 항균효과 차이를 나타냈다. 이전의 연구에서도 phage를 첨가한 사료를 방어와 은어에게 공급하였을 때 *Lactococcus garvieae*와 *Pseudomonas plecoglossicida*에 대한 각각의 저항성이 향상되었다고 보고되었다(Park et al., 2000). 이러한 결과는 phage 자체가 틸라피아의 생체 내에서 *E. tarda*에 대한 항균력을 나타내는 것으로 추정할 수 있다. 한편으로 B+P를 공급한 group에서는 대조군은 물론 B 또는 P만을 급여한 group보다 높은 항균효과를 보였다. 이러한 향상된 항균효과는 본 연구에서 분석한 선천적 면역반응의 증가와 밀접한 연관이 있을 것으로 추정된다. 다른 많은 연구에서도 *B. subtilis*가 첨가된 사료를 어류(Qi et al., 2009; Nayak, 2010; Sun et al., 2010; Merrifield et al.,

2010)와 새우(Li et al., 2009; Tseng et al., 2009)에 공급하였을 때 세포성 및 체액성 면역기능이 향상되어 세균 및 바이러스 등에 대한 저항성이 향상되었다고 보고되었다. 그러나 B+P를 공급하였을 때 어떠한 메커니즘에 의해 phage가 *B. subtilis*를 도와 선천적 면역기능과 더불어 항균력을 상승시키는 지에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

Fig. 4는 B+P를 급여한 틸라피아에 *E. tarda*를 투여한 후 10일까지 지속적으로 B+P를 급여한 group과 일반사료만을 급여한 group에서 나타나는 항균효과에 대한 차이를 보여주고 있다. *E. tarda* (1×10^7 CFU/mL) 복강 주사 이후 B+P를 지속적으로 급여한 group이 4일부터 10일까지 다른 group에 비해 유의적으로 가장 높은($P<0.05$) 항균효과를 보였다. 그러나 B+P를 4일 간만 공급한 group은 *E. tarda* 주사 이후 4일째에 대조군 group들에 비해 높은 항균효과를 보였으나 4일 이후부터는 일수에 상관없이 항균효과 차이는 크게 나지 않았다. 기초사료를 공급한 2개의 대조군 group 각각은 *E. tarda*에 대해 유의적인 차이를 나타내지 않았다($P>0.05$). *E. tarda*를 복강 주사 한 이후 4일에서 10일까지의 결과를 통해 B+P를 지속적으로 공급한 group이 B를 4일 간만 공급한 group보다 높은 항균효과가 있다는 것을 확인하였다. 그러나 이번 연구결과만으로는 질병 감염 이후에 probiotics와 phage를 지속적으로 공급해야만 병원균에 대한 치료가 가능하다고 단정하기에는 어려움이 있다. 틸라피아를 대상으로 한 다른 연구에서는 *B. subtilis* 첨가사료를 1-2개월간 공급한 후 질병에 대한 저항성 실험을 수행하였기 때문에 (Aly et al., 2008) 추후에는 *E. tarda* 복강 주사 이전에 사료를 장기간 공급하여 주사 이전까지 만 사료를 공급한 group과 주사 이후에도 지속적으로 해당사료를 공급한 group간의 차이를 비교하는 추가적인 연구가 수행되어야 할 것이다.

결론적으로 본 연구에서는 B+P공급이 B 및 P공급 보다 나일 틸라피아의 선천적 면역반응과 *E. tarda*에 대한 항균효과를 향상시켰다. 이러한 결과들은 *B. subtilis*와 phage를 혼합한 사료 첨가제가 어류의 각종 세균성 질병의 예방은 물론 치료를 위한 항생제 대체제로서 충분한 가능성이 있음을 암시해 주고 있다.

사 사

이 논문은 2012년도 중소기업청 창업성장과제(12B12224700) 연구비 지원으로 연구되었습니다.

References

- 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, Abdel-Galil Ahmed Y, Abdel-Aziz Ghareeb A and Mohamed MF. 2008. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lacto-*

- bacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. Fish Shellfish Immunol 25, 128-136. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2008.03.013>.
- Baek MS, Hwang YS and Choi SH. 2013. Mixture of *Edwardsiella tarda* specific bacteriophage and *Bacillus subtilis* KM-1 enhanced bactericidal activity against *Edwardsiella tarda*. J Fish Pathol 26, 185-191.
- Bang JD, Chun SK, Park SI and Choi YJ. 1992. Studies on the biochemical and serological characteristics of *Edwardsiella tarda* isolated from cultured flounder, *Paralichthys olivaceus*. Fish Pathol 5, 29-35.
- Barrow P, Lovell M and Berchieri A. 1998. Use of lytic bacteriophage for control of experimental *Escherichia coli* septicemia and meningitis in chickens and calves. Clin Diagn Lab Immunol 5, 294-298.
- Bizani D and Brandelli A. 2002. Characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus sp.* strain 8A. J Appl Microbiol 93, 512-519. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01720.x>.
- Burr G, Gatlin D and Ricke S. 2005. Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of prebiotics and probiotics in finfish aquaculture. J World Aquacult Soc 36, 425-436. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-7345.2005.tb00390.x>.
- Carlton RM. 1999. Phage therapy: past history and future prospects. Immuno Ther Exp 47, 267-274.
- Cerezuela R, Guardiola FA, Meseguer J and Esteban MÁ. 2012. Increases in immune parameters by inulin and *Bacillus subtilis* dietary administration to gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) did not correlate with disease resistance to *Photobacterium damsela*. Fish Shellfish Immunol 32, 1032-1040. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2012.02.025>.
- Cha JH, Yang SY, Woo SH, Song JW, Oh DH and Lee KJ. 2012. 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. <http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2012.0035>.
- Chinabut S and Puttinaowarat S. 2005. The choice of disease control strategies to secure international market access for aquaculture products. Dev Biol 121, 255-261.
- Cutting SM. 2011. Bacillus probiotics. Food Microbiol 28, 214-220.
- Ellis AE. 1999. Immunity to bacteria in fish. Fish Shellfish Immunol 9, 291-308.
- Fuller R. 1989. probiotics in man and animals. J Appl Bacteriol 66, 365-378.
- Geng X, Dong XH, Tan BP, Yang QH, Chi SY, Liu HY and Liu XQ. 2011. Effects of dietary chitosan and *Bacillus subtilis* on the growth performance, non-specific immunity and disease resistance of cobia, *Rachycentron canadum*. Fish Shellfish Immunol 31, 400-406. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2011.06.006>.
- Jolles P and Jolles J. 1984. What's new in lysozyme research? Always a model system, today as yesterday. Mol Cell Biochem 63, 165-189.
- Kanai K, Tawaki S and Uchida Y. 1988. An ecological study of *Edwardsiella tarda* in flounder farm. Fish Pathol 22, 41-47.
- Kumar R, Mukherjee SC, Ranjan R and Nayak SK. 2008. Enhanced innate immune parameters in *Labeo rohita* (Ham.) following oral administration of *Bacillus subtilis*. Fish Shellfish Immunol 24, 168-172. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2007.10.008>.
- Kusuda R and Kawai K. 1998. Bacterial diseases of cultured marine fish in Japan. Fish Pathol 33, 221-227.
- Lee CH, Heo YJ, Baek MS, Lee JU, Kang JY, Han MJ, Kyoung SB and Choi SH. 2011. Characterization of *Edwardsiella tarda* specific phage isolated from fish farms on west coast of Korea. J Fish Pathol 24, 85-93. <http://dx.doi.org/10.7847/jfp.2011.24.2.085>.
- Li JQ, Tan BP and Mai KS. 2009. Dietary probiotic *Bacillus OJ* and isomaltooligosaccharides influence the intestine microbial populations, immune responses and resistance to white spot syndrome virus in shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Aquaculture 291, 35-40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.03.005>.
- Merrifield DL, Dimitroglou A, Bradley G, Baker RTM and Davies S J. 2010. Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) I. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria. Aqua Nutr 16, 504-510. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00689.x>.
- Müller-Eberhard HJ. 1988. Molecular organization and function of the complement system. Ann Rev Biochem 57, 321-347.
- Nakai T, Sugimoto R, Park KH, Matsuoka S, Mori K, Nishioka T and Maruyama K. 1999. Protective effects of bacteriophage on experimental *Lactococcus garvieae* infection in yellowtail. Dis Aquat 37, 33-41.
- Nayak SK. 2010. Probiotics and immunity: a fish perspective. Fish Shellfish Immunol 29, 2-14.
- Nayak SK, Swain P and Mukherjee SC. 2007. Effect of dietary supplementation of probiotic and vitamin C on the immune response of Indian major carp. Fish Shellfish Immunol 23, 892-896. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2007.02.008>.
- Paek NS, Lim YB and Kim YM. 2001. Antibacterial Activity and Growth Promotion in Aquacultured Fish by Probiotics. Kor J Appl Microbiol Biotechnol 29, 56-61.
- Panigrahi A, Kiron V, Satoh S, Hirono I, Kobayashi T, Sugita H, Puangkaew J and Aoki T. 2007. Immune modulation and expression of cytokine genes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* upon probiotic feeding. Dev Comp Immunol 31, 372-382. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2006.07.004>.
- Park SC, Ichiro S, Minoru F, Koh-Ichiro M and Toshihiro N.

2000. Isolation of Bacteriophage Specific to a Fish Pathogen, *Pseudomonas plecoglossicida*, as a Candidate for Disease Control. *Applied and Environmental Microbiology*, 1416-1422.
- Perdigon, G., Nader de macias, M. E., Alvarez, S., Oliver, G. and Pesce de Hologado, A. A. (1990) Prevention of gastrointestinal infection using immunobiological method with milk fermented with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. *J Dairy Res* 57, 255-264.
- Qi ZZ, Zhang XH, Boon N and Bossier P. 2009. Probiotics in aquaculture of China current state, problems and prospect. *Aquaculture* 290, 15-21. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.02.012>.
- Rodgers CJ, Pringle JH, McCarthy DH and Austin B. 1981. Quantitative and qualitative studies of *Aeromonas salmonicida* bacteriophage. *J Gen Microbiol* 125, 335-345.
- Salinas I, Cuesta A, Esteban MA and Meseguer J. 2005. Dietary administration of *Lactobacillus delbrueckii* and *Bacillus subtilis*, single or combined, on gilthead seabream cellular innate immune responses. *Fish Shellfish Immunol* 19, 67-77.
- Salminen S, Ouwehand A, Benno Y and Lee YK. 1999. Probiotics: How should they be defined *Trends. Food Sci Technol* 10, 107-110.
- Secombes CJ. 1990. 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, editors. *Techniques in fish immunology*. Fair, Haven, N.J, SOS Publications. 137-154.
- Shahani KM and Ayebo AD. 1980. Role of dietary lactobacilli in gastrointestinal microecology. *Am J Clin Nutr* 33, 2448-2457.
- Sheikhzadeh N, Karimi Pashaki A, Nofouzi K, Heidarieh M and Tayefi-Nasrabadi H. 2012. Effects of dietary Ergosan on cutaneous mucosal immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol* 32, 407-410. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2011.11.028>.
- Shida K, Makino K, Morishita A, Takamizawa K, Hachimura S, Ametani A, Sato T, Kumagai Y, Habu S and Kaminogawa S. 1980. Lactobacilli in gastrointestinal microecology. *Am J Clin Nutr* 33, 2448-2457.
- Smith HW and Huggins MB. 1980. The association of the O18, K1 and H7 antigens and the Co1V plasmid of a strain of *Escherichia coli* with its virulence and immunogenicity. *J Gen Microbiol* 128, 387-400.
- Smith HW and Huggins MB. 1982. Successful treatment of experimental *Escherichia coli* infections in mice using phage: its general superiority over antibiotics. *J Gen Microbiol* 128, 307-318.
- Soothill JS. 1992. Treatment of experimental infections of mice with bacteriophages. *J Med Microbiol* 37, 258-261.
- Soothill JS. 1994. Bacteriophage prevents destruction of skin grafts by *Pseudomonas aeruginosa*. *Burns* 20, 209-211.
- Sulakvelidze A, Alavidze Z and Morris JG. 2001. Bacteriophage therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 649-659.
- Stevenson RMW and Airdrie DW. 1984. Isolation of *Yersinia ruckeri* bacteriophages. *Appl Environ Microbiol* 47, 1201-1205.
- 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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2010.07.018>.
- Tseng DY, Ho PY, Huang SY, Cheng SC, Shiu YL, Chiu CS and Liu CH. 2009. Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20. *Fish Shellfish Immunol* 26, 339-344. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2008.12.2003>.
- Wang Y, Tian Z, Yao j and Li W. 2008. Effect of probiotics, *Enterococcus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. *Aquaculture* 277, 203-207. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.03.007>.
- Yano T. 1992. Assay of hemolytic complement activity. In: Stolen J S, Fletcher T C, Anderson D P, Hattari S C, Rowley A F, editors. *Techniques in fish Immunology*. SOS Publications, New Jersey, U.S.A., 131-141.
- Zhang Q, Ma H, Mai K, Zhang W, Liufu Z and Xu W. 2010. Interaction of dietary *Bacillus subtilis* and fructooligosaccharide on the growth performance, non-specific immunity of sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol* 29, 204-211.
- Zhao Y, Zhang W, Xu W, Mai K, Zhang Y and Liufu Z. 2012. Effects of potential probiotic *Bacillus subtilis* T13 on growth, immunity and disease resistance against *Vibrio splendidus* infection in juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol* 32, 750-755. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2012.01.027>.
- Zheng G, Yan LZ, Vederas JC and Zuber P. 1999. Genes of the sbo-alb locus of *Bacillus subtilis* are required for production of the antilisterial bacteriocin subtilosin. *J Bacteriol* 181, 7346-7355.