

최      중  
연구보고서

**Probiotic을 이용한 대하새우양식장 환경개선 및  
생산성 향상 기술개발**

Environmental improvement and productivity  
elevation by using probiotics in shrimp culture  
ponds

2005. 12.

순천향대학교

국립수산과학원 서해수산연구소

해 양 수 산 부

## 제 출 문

해양수산부 장관 귀하

본 보고서를 “Probiotic을 이용한 대하새우양식장 환경개선 및 생산성 향상 기술개발”  
과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005년 12 월

주관연구기관명 : 순천향대학교

총괄연구책임자 : 마 채 우

세부연구책임자 : 오 계 현

연 구 원 : 신현웅, 방인철, 오철웅,  
김정년, 최충호, 임성도,  
정인주, 김종춘, 정윤환,  
손대선, 김광섭, 천재우,  
이성희, 노경미, 윤덕현

협동연구기관명 : 국립수산과학원 서해수산연구소

협동연구책임자 : 장 인 권

연 구 원 : 김찬옥, 임현정, 전제천,  
이진호, 한현섭, 이실한,  
김수경, 서형철

# 요 약 문

## I. 제 목

Probiotic을 이용한 대하새우양식장 환경개선 및 생산성 향상 기술개발

## II. 연구개발의 목적

1. 새우양식장 환경과 생태학적 요인 분석
2. 새우양식 생산성 향상을 위한 유익세균 검색
3. 새우양식장 수질환경 정화를 위한 유익세균 제제 개발
4. 기존 유익세균 제제(probiotant)의 수질개선 효과 연구
5. 개발된 Probiotant의 질병억제 및 생산성 향상

## III. 연구개발 내용

1. 새우양식장 환경 및 생물생태학적 요인
2. 새우양식장에 서식하는 곤쟁이의 개체군 역학
3. 새우양식장 유용 및 유해세균 검색
4. 미생물에 의한 새우 양식장 환경정화: 미생물학적 질소 및 인 제거
5. 새우 양식장에서 양식사료에 의한 오염환경의 미생물학적 제거
6. 새우 양식장에서 분리된 세균의 유용성 탐색
7. 새우 양식장 환경 정화를 위한 제제 개발
8. 수질변화에 미치는 probiotics의 효과 시험
9. 새우양식장의 양식생태 조사
10. Probiotics를 이용한 새우양식장 수질개선 및 질병억제 효과시험

## IV. 연구개발결과

1. 대하새우장에서 새우의 성장에 영향을 미치는 용존산소, 수온, pH, 염도, NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N, 클로로필 a를 포함하는 몇 가지 환경요인들을 조사하였다.

2. 조사기간 동안 수온의 범위는 23.8~33.1℃, 염분은 17.5~31.2 ppt, 용존산소는 5.08~8.22 ppm의 범위를 나타내었다. 양식장 수질내에 용존되어 있는 NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N, 그리고 NO<sub>3</sub>-N의 농도는 각각 0.024~0.034, 0.003~0.020, 0.004~0.009 mg/L였다. 클로로필 a는 0.002~0.118 ug/m<sup>3</sup> 범위에 있었다. 양식장에서 채취한 수질에서 다른 세균들의 분포를 알아보기 위하여 marine agar plates에서 분리 계수하였다. 총세균수는 대략 6.5 × 10<sup>4</sup>까지 증가하였다. BIOLOG 시험들 통하여 13가지의 세균들을 분리 동정하였다. 동물플랑크톤의 종조성 및 개체밀도 조사에서는 대하를 양식하는 호지에서 11종으로 나타났으며, 출현개체밀도를 보면, 평균 59,399 ind./m<sup>3</sup>로 나타났다.

3. 대하새우 양식장에 서식하는 곤쟁이, *Neomysis japonica*의 개체군 역학과 성 성숙에 관한 전반적인 생물학적 정보를 규명하였으며, 조사를 위한 표본의 채집은 충남 태안군 남면 당암리에 소재한 순천향대학교 해양수산연구소의 대하새우 양식장에서 2002년 10월부터 2003년 9월까지 12개월 동안 월 1회씩 채집하였다.

4. 곤쟁이의 개체군의 특징을 알기 위해 성비를 분석하였는데 암컷이 수컷에 비해 57.4%로 높은 수치를 나타내었다. 또한 평균 갑각장 ( $\pm$ 표준편차)은 암컷이 2.31 ( $\pm$ 0.52) mm이며, 수컷이 2.42 ( $\pm$ 0.48) mm로 수컷개체가 암컷개체보다 평균 갑각장이 더 큰 것으로 나타났다.

5. 암컷에 있어서 갑각장과 포란수의 관계는 갑각장이 증가함에 따라 포란수가 증가하였다. 전체 암컷 중에서 포란한 암컷을 성숙한 암컷으로 판단하여 추정된 암컷 개체의 50%가 성숙에 이르는 균성숙 체장은 4.48 mm로 나타났다.

6. ELEFAN 프로그램에서 추정된 von Bertalanffy 성장 매개변수를 바탕으로 계절적인 성장변동요인을 고려한 성장식을 추정하였을 때 동일한 연령에서 수컷보다 암컷의 성장률이 더 빠른 것으로 나타났다.

7. 어획물 곡선법에 의해 추정된 순간전사망계수는  $3.46 \text{ yr}^{-1}$ 로 나타났다. ELEFAN 프로그램에 의해 추정된 가입유형은 두개의 정규분포 곡선으로 나타났고, 추정된 가입 갑각장은 4.46 mm로 나타났다.

8. 상대성장은 갑각장과 전장을 자연로그 변환 후 갑각장 (CL)에 대한 전장 (TL)의 회귀분석 결과 상관계수는 비록 낮게 나타났지만 유의한 상관관계를 보여주었다. 이러한 결과는 암컷에 비해 수컷의 갑각장과 전장이 더 큰 것으로 나타났다.

9. 새우양식장내 환경개선과 병원성 세균에 대한 항균작용을 갖는 probiotics 미생물에 대한 연구를 실시하였다.

10. 본 연구의 첫 번째 부분에서는 수질오염원인 질소와 인의 미생물학적 제거에 대한 연구를 수행하였다. 새우양식장에서 채취한 물시료로부터 질소와 인을 제거할 수 있는 농화 배양을 획득하였다. 농화 배양으로부터 질소와 인 (N/P)이 포함된 고체 평판 배지에서 4개의 균주를 분리하였고, 이들 분리세균 가운데 N/P 제거가 탁월한 두개 균주인 CK-10과 CK-13을 이용하여 호기적 조건에서 N/P 제거 실험을 실시하였다.

11. 분리 균주는 현미경을 통하여 그람 양성이고, 간균의 형태임이 관찰되었다. BIOLOG system을 이용한 생리학적 분석을 통하여 이들 세균은 *Bacillus subtilis* CK-10과 *Bacillus thuringiensis* CK-13으로 각각 동정 및 명명되었다.

12. 질소 ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ )와 인 ( $\text{PO}_4^{3-}$ )의 제거는 호기적 조건하에서 250 ml 삼각 플라스크에서 N과 P를 포함하는 배지내에서 CK-10과 CK-13을 단일배양과 혼합배양을 병행하여 각각 조사하였다. 단일배양에서 CK-10과 CK-13은  $400 \mu\text{M NH}_4^+$ 를 24시간과 60시간 이내에 완전히 제거하였고, CK-10과 CK-13을 혼합한 혼합배양에서는  $400 \mu\text{M NH}_4^+$ 를 12시간내에 완전히 제거하였다. CK-13과 혼배배양에서는  $400 \mu\text{M NO}_2^-$ 를 배양 12시간내에 완전히 제거하였으나, CK-10은 36시간만에 제거하였다. CK-10은  $400 \mu\text{M NO}_3^-$ 에서 성장하였으나, 배양기간동안  $\text{NO}_3^-$ 을 완전히 제거하지 못하였고, CK-13과 혼합배양에서는 60시간 36시간내에 각각 완전히 제거하였다. 단일배양과 혼합배양에 의한  $125\sim 500 \mu\text{M PO}_4^{3-}$  제거실험을 실시한 결과, CK-10과 혼합배양에서는  $\text{PO}_4^{3-}$ 를 36시간내에 완전히 제거하였고, CK-13은 배양 60시간내에 완전히 제거하였다.

13. 질소와 인을 모두 포함하는 배지내에서 혼합배양에 의한 질소와 인 동시제거 실험을 실시하였다. 그 결과, 400  $\mu\text{M}$   $\text{NH}_4^+$ 와  $\text{NO}_2^-$ 는 12시간 이내에 제거되었고,  $\text{NO}_3^-$ 는 36시간 이내에 각각 제거되었으며, 500  $\mu\text{M}$   $\text{PO}_4^{3-}$ 도 36시간 이내에 제거되었다. 이 결과로 배지에 포함된 질소와 인 제거는 혼합배양에 의한 가속화되는 것이 증명되었다.

14. 양식사료에 포함된 당은 HPAEC-PAD 시스템을 이용해 분석되었다. 그 결과, 사료에 포함된 당은 glucose > galactose > galatosamine > mannose > fucose 순으로 확인되었다. 0.2% 사료로부터 N/P는 약간 용출되는 것이 측정되었다. CK-10과 CK-13을 사료에 접종한 후 일정량의 N/P가 용출되었으며 이들 세균에 의하여 제거되는 것이 관찰되었다. 혼합배양에서는 단일배양에서 보다 용출된 N/P를 효과적으로 제거하였으며, 용출된 모든 N/P는 배양 84시간 이내에 완전히 제거되었다. 그 결과 혼합배양에 의한 N과 P 제거는 시너지 효과 (synergic effect)를 나타내는 것으로 확인되었으며, 혼합된 *Bacillus* sp. CK-10과 *Bacillus* sp. CK-13은 단일 배양에 의한 것보다 질소와 인을 효과적으로 제거하는 것이 관찰되었다.

15. 본 연구의 두 번째 부분에서는 여러 가지 어류 질병원인 세균에 대한 해양환경으로부터 분리된 세균에 의한 항균활성 측정과 항균물질의 특성을 조사하였다. JK-8과 JK-11균은 양식장에서 채취한 물시료로부터 분리되었고, MRS 배지에서 성장되었다. 이들 균주는 현미경 관찰을 통하여 그람 양성이며, 간균형태의 세균임이 관찰되었고 BIOLOG 시스템을 이용한 생리학적 분석을 통해 동정되었다. GP2 Microplate의 당 이용한 분석에서 JK-8과 JK-11은 *Lactobacillus* 종으로 확인되었으며, JK-8은 *Lactobacillus plantarum*으로 JK-11은 *Lactobacillus hilgardii*로 동정되었으며, *Lactobacillus* sp. JK-8과 *Lactobacillus* sp. JK-11로 각각 명명되었다.

16. JK-8을 MRS 액체배지에 접종한 후 다른 농도의  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ 를 첨가하고 질소 제거능을 조사하였다. JK-8은 3시간 이내에 100, 200  $\mu\text{M}$ 의  $\text{NH}_4^+$ 와  $\text{NO}_2^-$ 를 완전히 제거하였고, 400  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_2^-$ 는 부분적으로 제거되었다. 100, 200, 300  $\mu\text{M}$ 의  $\text{NO}_3^-$ 는 12시간 이내에 제거된 반면에 JK-11은 일부  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ 를 제거하였고,  $\text{NO}_3^-$ 는 제거되지 않았다.

17. JK-8과 JK-11은 660 nm에서 생장이 측정되었고, 성장하는 동안 유기산을 생산하는 것이 관찰되었다. 유기산은 JK-8의 성장에 비례하여 생성되었고, lactic acid와 acetic acid는 JK-8 성장 동안 중간 대사산물로 검출되었다. 배양기간중에 생성된 유기산은 192.8 mM lactic acid와 43.6 mM acetic acid가 형성되었으며, 초기 pH는 배양 동안 감소하여 3.8로 나타났으며, JK-11은 소량의 lactic acid와 acetic acid를 형성하였고, 초기 pH는 7.0이었지만 배양 후 pH는 5.4였다.

18. 5배 농축된 배양 상등액에 노출된 어병 원인 세균의 살균율은 0.5시간에서 4시간 동안 조사되었다. 병원성 세균의 살균율은 분리균주의 상등액에 따라 영향을 받는 것으로 조사되었다. *V. harveyi*와 *V. parahaemolyticus*는 JK-8과 JK-11의 상등액에 민감하여, JK-8의 상등액에서 30분내에 각각 살균되었고, JK-11에서는 90분내에 살균되었다. *Streptococcus pyogenes*와 *Edwardsiella tarda*는 동일한 조건에서 JK-8과 JK-11의 상등액에 노출된 후 4시간내에 완전히 살균되었다.

19. 배양 농축상등액은 어류의 질병원인 세균에 대하여 plate diffusion assay 방법으로 항균활성을 측정하였다. pH를 조절하지 않은 JK-8의 항균활성은 낮은 pH의 의한 영향으로 관찰되었고, pH를 조절한 배양액에서는 약간의 투명대가 관찰되었다. JK-11의 경우, pH를 조절하

지 않은 상등액과 pH를 중성으로 조절한 상등액에서 모두 강한 항균활성이 어류 질병원인균에 대하여 나타났다.

20. 중간대사 산물은 HPLC에 의해 lactic acid와 acetic acid로 잠정적으로 분석되었으며, 이들 물질은 GC-MS를 통해 확인되었다.

21. *Lactobacillus* spp. JK-8과 JK-11는 강한 항균활성을 나타내었는데, JK-8은 유기산에 의한 항균활성이었으며, JK-11 상등액에 처리된 어병세균은 bacteriocin에 의하여 영향을 받는 것이 확인되었다.

22. JK-11에서부터 얻어진 bacteriocin의 항균활성은 radial diffusion assay을 이용해 측정되었다. RP-HPLC로부터 분리된 72개의 분획들 중 1번 분획에서 bacteriocin에 의한 항균활성이 관찰되었다. JK-11로부터 유도된 bacteriocin 물질은 Tricine SDS-PAGE를 통해 약 4 kDa의 protein으로 확인되었다.

23. 결과적으로, N/P를 제거하는 *Bacillus* spp. CK-10과 CK-13 그리고 어류의 질병원인균을 제어하는 *Lactobacillus* spp. JK-8과 JK-11은 본 연구에서 효과적으로 입증되었고, 그들은 probiotics 균주로서 충분한 가능성을 가진 것으로 조사되었다.

24. 새우양식장 사육수 수질개선에 효과를 주는 probiotics의 종류와 농도를 조사하기 위하여 *Bacillus licheniformis*, *B. megaterium*, *B. mesentericus*, *Lactobacillus acidophilus* 및 *Nitrosomonas* 등 5개의 균주를 이용하여 소형수조와 대형수조에서 다양한 농도의 probiotics와 함께 새우 유생, 치하 혹은 성체를 사육하고 수질변화를 조사하였다. 본 실험에 사용된 유익세균들은 사육수 내 독성의 암모니아성 질소와 아질산성 질소를 제거하여 이것을 무독성의 질산성 질소로 전환시킴으로써 사육수 수질개선에 효과가 있는 것으로 나타났다.

25. 새우양식장 현장적용실험을 위한 양식생태를 조사하기 위하여 2003년 5월~7월에 인천시 강화도 소재 축제식 새우양식장 2개에서 사육수의 수질변화 (일반수질환경 및 영양염류)와 세균상 변화 (총세균수, 비브리오균수)를 조사하고 양식새우의 기생충성 및 바이러스성 질병 실태를 조사하였다.

26. Probiotics에 의한 새우양식장 수질개선 및 질병억제 효과 조사를 위한 현장적용 실험을 위하여 2005년 6월~9월에 충남 서산에 위치한 새우양식장 2개에서 probiotics를 처리한 후 지속적인 당밀공급으로 타가영양상태를 유지시킨 처리구와 비처리 대조구 간에 수질 변화, 새우의 생산성, 질병발생율 등을 비교하였다. 처리구는 대조구에 비해 새우의 질병발생율은 낮고, 새우의 체중과 생산성, 생존율이 모두 높게 나타남으로써 probiotics 및 타가영양양식방법이 사육수의 수질을 개선시킴으로써 질병발생을 억제시키고 생산성을 향상시키는 것으로 확인되었다.

# S U M M A R Y

## I. Title

Environmental improvement and productivity elevation by using probiotics in shrimp culture ponds

## II. Purpose of research

1. Search of environmental and biological factors of shrimp culture pond
2. Search of usefulness of bacteria for productivity elevation of shrimp culture pond
3. Development of microbial agents for environmental clean-up of shrimp culture pond
4. Search of effects of probiotics on water quality
5. Search of improvement of control of diseases and productivity elevation by using probiotant in shrimp culture ponds

## III. Contents of research

1. Environmental and biological factors of shrimp culture ponds
2. Population dynamics of *Neomysis japonica* in shrimp culture ponds
3. Search of beneficial and harmful bacteria isolated from shrimp aquaculture pond
4. Environmental clean-up of shrimp aquaculture pond by microorganisms: microbiological removal of nitrogens and phosphorus
5. Microbiological treatment of contaminated environment derived from farming feed in shrimp aquaculture pond
6. Search of usefulness of bacteria isolated from shrimp aquaculture pond
7. Development of microbial agents for environmental clean-up of shrimp aquaculture pond
8. Effects of probiotics on water quality
9. Studies on aquaculture environments in shrimp ponds
10. Study on improvement of water quality and control of diseases by using probiotic bacteria in shrimp ponds

## IV. Result of research

Several environmental factors including dissolved oxygen, water body temperature, pH, salinity, NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N, chlorophyll a affecting on the growth of shrimp were examined.

The range of water temperature and salinity was 23.8~33.1°C and 17.5~31.2 ppt, respectively. The range of dissolved oxygen was 5.08~8.22 ppm. Concentrations of NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N, and NO<sub>3</sub>-N dissolved in water samples were determined to 0.024~0.034, 0.003~0.020, and 0.004~0.009 mg/L, respectively. Chlorophyll a content was examined in the range of 0.002~0.118 ug/m<sup>3</sup>. In order to understand the distribution of different bacteria in water samples collected in shrimp aquaculture, bacteria were isolated and enumerated on the marine agar plates. Total number of bacteria were increased to approximately 6.5 × 10<sup>4</sup>. Thirteen predominant bacteria were isolated and identified. The species composition of zooplankton in shrimp culture pond (rearing *Fenneropenaeus chinensis*) was 11 species. The species density was 59,399 ind./m<sup>3</sup>.

This study was population dynamics and sexual maturation of the *Neomysis japonica* that lived in shrimp culture pond. *N. japonica* was collected once a month from October, 2002 to September, 2003 at Soonchunhyang University Sea Marine Products Research Institutes shrimp culture pond which was in Dangam-ri, Nam-myeon, Taean-gun, Chungnam Province.

The analysis of the sex ratio showed a higher proportion of females than males. On an average, male carapace length was larger than female (2.31 mm for female and 2.42 mm for male).

Brood size increased isometric functions of female body size. The size of *N. japonica* at 50% sexual maturity was estimated as 4.48 mm. Estimation of growth, mortality and recruitment patterns were analysed by ELEFAN based on monthly length-frequency data. Parameters of growth were estimated, using the modified von Bertalanffy growth function (VBGF) model incorporating seasonal variation in growth. *N. japonica* females grew faster and reached a larger size at age earlier than males. The mortality rate (*z*) calculated by length-converted catch curves was 3.46 yr<sup>-1</sup>. *N. japonica* annual recruitment pattern showed two major peaks. Regression coefficients of log-transformed total length on log-transformed carapace length showed a significant relationship. Results showed that male carapace length and total length were larger than female.

The feasibility of using probiotic bacterial cultures, with the ultimate aim for the environmental cleanup and disease-control in aquaculture, was explored.

For N/P removal works, this work is focused on the bacterial elimination of nitrogens and phosphorus as aquatic contaminants. Enriched cultures capable of removing nitrogen/phosphorus (N/P) were obtained from water samples collected from a shrimp aquaculture farm. Several strains were isolated from the enriched culture on solid media containing N/P. Among the isolates, two excellent N/P removers, CK-10 and CK-13 were screened for this work. Microscopic examination of these strains revealed Gram-positive and rod-shaped cells.

For identification, physiological analyses using BIOLOG system were performed, and these strains indicated that the bacteria could be assigned, and designated as *Bacillus*



*subtilis* CK-10 and *Bacillus thuringiensis* CK-13, respectively. These strains, CK-10 and CK-13, were registered to GenBank as [AY941803] and [AY941804], respectively.

Removal of nitrogens ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ , or  $\text{NO}_3^-$ ) or phosphorus ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) was studied with single cultures or co-cultures, CK-10 and CK-13 in the media containing different concentrations of N or P in 250 ml Erlenmeyer flasks under aerobic conditions.

Complete elimination of 400  $\mu\text{M}$   $\text{NH}_4^+$  in single cultures, CK-10 or CK-13, was achieved within 60 hours or 24 hours, whereas co-cultures of CK-10 and CK-13 removed 400  $\mu\text{M}$   $\text{NH}_4^+$  within 12 hours of incubation. Similar results were obtained from the test cultures containing 400  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_2^-$  or  $\text{NO}_3^-$  in the media.

Both single culture, CK-13 and co-culture, CK-10 and CK-13 showed complete elimination within 12 hours. However culture CK-10 removed 400  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_2^-$  completely within 36 hours. CK-10 culture grew 400  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3^-$  but displayed only a partial removal, but CK-13 culture and the co-cultures were eliminated to completion within 60 hours and 36 hours, respectively.

The removal efficiencies of  $\text{PO}_4^{3-}$  in the concentration range of 125~500  $\mu\text{M}$  by single cultures or co-cultures were examined. Complete elimination of  $\text{PO}_4^{3-}$  was obtained from the two single cultures and co-culture within 60 hours of incubation.

Based on the results, simultaneous removal of all nitrogens and P in marine media was monitored in the co-cultures. As the results, 400  $\mu\text{M}$   $\text{NH}_4^+$  and 400  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_2^-$  were eliminated within 12 hours and  $\text{NO}_3^-$  within 36 hours, and 500  $\mu\text{M}$   $\text{PO}_4^{3-}$  was completely disappeared within 36 hours from the media. The work demonstrated that co-cultures accelerated the concurrent removal of N/P from the media.

Sugars contained in feed for fish was analysed by HPAEC-PAD system. As the results, the order of sugars contained in feed was glucose > galactose > galactosamine > mannose > fucose. Without the inoculation of the cultures, little leaching of N/P from 0.2% (w/v) feed was measured. Significant removal of leached N/P was observed after the inoculation of CK-10 or CK-13. Co-cultures showed effective removal of leached N/P, and all leached N/P disappeared completely within 84 hours.

The results of this work demonstrated that co-cultures showed the synergic effect to remove N and P. In consequence, combination of *Bacillus* sp. CK-10 and *Bacillus* sp. CK-13 proved to exert effect N and P removers. Simultaneously removal of nitrogens or phosphorus was studied with co-cultures under aerobic conditions in bench-scale cistern.

0.01% (w/v) Farming feed contained approx. 224.3  $\mu\text{M}$   $\text{NH}_4^+$ , 190.7  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_2^-$ , 125.3  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3^-$ , and 105.6  $\mu\text{M}$   $\text{PO}_4^{3-}$  which could dissolved within 144 hrs of leaching in aqueous solution followed by bacterial removal.

Complete bacterial removal of  $\text{NO}_2^-$  leached from 0.01% feed was achieved within 72 hrs, and  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{PO}_4^{3-}$  were removed to completion within 144 hrs, respectively. Co-cultures displayed only a partial removal of  $\text{NO}_3^-$  (94%) during the given period. The work demonstrated that co-cultures, CK-10 and CK-13 showed simultaneously effective

removal of N/P.

Microbial agents were manufactured by mixing and drying of co cultures, CK-10 and CK-13. The two types which are powdered and liquid were manufactured. Microbial agents showed simultaneously effective removal of N/P.

The second part in this work is to evaluate and characterize the antibacterial activities to disease-causing bacteria by bacteria isolated from marine environment. Strains JK-8 and JK-11 were screened from water samples of aquaculture farm and were developed to grow on MRS media for lactobacilli. Microscopic examination of the isolates revealed Gram-positive and rod-shaped cells.

The physiological and biochemical analyses using BIOLOG system were carried out to identify the strains. Analyses of the carbohydrate utilization profiles based on the GP2 Microplate placed JK-8 and JK-11 as *Lactobacillus* species with confidence of over 97%.

On the basis of the results, the isolates could be assigned to *Lactobacillus plantarum* JK-8 and *L. hilgardii* JK-11, and designated as *Lactobacillus* spp. JK-8 and JK-11, respectively. JK-8 cultures pre-grown in MRS liquid media was tested for the removal of different nitrogens -  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ , and  $\text{NO}_3^-$  in the concentrations range of up to 400  $\mu\text{M}$ . Complete elimination of  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_2^-$  to 100 to 200  $\mu\text{M}$  was achieved within 3 hours. JK-8 cultures were able to partially eliminate 400  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_2^-$  whereas  $\text{NO}_3^-$  in the concentration range of 100 to 300  $\mu\text{M}$  was eliminated to completion within 12 hours.

Two strains, JK-8 and JK-11, were tested for the changes in the optical density at 660 nm associated with cell growth and production of organic acids.

Increase in organic acids paralleled the cell growth in JK-8 cultures. Lactic acid and acetic acid were detected as the major intermediates in the growth media in this work. Their concentrations were reached to the levels as high as 192.8 mM of lactic acid and 43.6 mM acetic acid, respectively. The initial pH decreased to pH 3.8 during the incubation. JK-11 produced only small amount of lactic acid and acetic acid, and the initial pH 7.0 to pH 5.4.

The killing rate of disease-causing bacteria to fish was examined during 0.5~4 hours of incubation with 5-fold cell-free concentrated supernatants. The killing rate of the pathogens was affected by the supernatants depending on the bacteria. Both *Vibrio harveyi* and *V. parahaemolyticus* were significantly susceptible to the supernatants derived from JK-8 and JK-11, and killed within 30 mins by JK-8 and 90 mins, respectively. Complete elimination of *Streptococcus pyogenes* and *Edwardsiella tarda* were achieved within 4 hours after exposure of the supernatants, JK-8 and JK-11 under the same conditions.

The bacteriocidal activity using plate diffusion method against the target bacteria was determined with the supernatants. Without pH-nonadjustment of JK-8 culture, the bacteriocidal activities against test bacteria were observed in the plates because of low values as pH 3.8, whereas little inhibition was observed in the pH-adjusted cultures. In pH-adjusted and pH-nonadjusted cultures of JK-11, the strong bacteriocidal activities were

shown on the target bacteria in this experiment.

Detection of intermediates was based on HPLC methodology. The chromatograms demonstrated that both lactic acid and acetic acid could be successfully resolved under the analytical conditions. GC-MS analysis was performed to verify these organic acids. Both *Lactobacillus* spp. JK-8 and JK-11 had strong bacterial activity. However the antagonistic activity of JK-8 against the target bacteria was due to the organic acids produced, and the bacteria treated with the supernatants of JK-11 demonstrated no growth onto the plates because of bacteriocin. Bacteriocidal activity of bacteriocin obtained from JK-11 was determined by radial diffusion assay. Among 72 fractions collected from RP-HPLC, the first fraction showed the strongest bacteriocidal activity in this experiment. Molecular mass of bacteriocidal substance derived from JK-11 was measured by Tricine SDS-PAGE and the value was determined as approximately 4 kDa.

In consequence, both N/P removers, *Bacillus* spp. CK-10 and CK-13, and bacteriociders, *Lactobacillus* spp. JK-8 and JK-11 proved to exert effective strains tested in this work and they have a considerable potential for use as probiotic bacteria.

To determine effective concentrations and kinds of probiotics improving water quality, changes of nutrients in rearing water were investigated after shrimp larvae, juveniles and adults were cultured with different concentrations of probiotics in small and large tanks. It was confirmed that all five probiotics changed toxic ammonia and nitrite nitrogen into nontoxic nitrate nitrogen and improved water quality.

To investigate environments of shrimp ponds for application of probiotics, changes of water quality and bacterial status were monitored from two shrimp ponds in Ganghwa Is., Incheon from May to July, 2005 and the disease infection rate of parasites and viruses were also examined from farmed shrimps.

A shrimp pond in Seosan, Chungnam-do was treated with probiotics and maintained under heterotrophic conditions from July to September, 2005, and water quality, shrimp productivity and disease infection rate in the treated pond were compared with control pond. The treated pond showed better water quality, higher productivity and higher survival rate than the control pond. It was confirmed that providing probiotics to shrimp ponds and maintaining heterotrophic conditions can improve water quality and enhance productivity and survival rate of shrimp.

# CONTENTS

List of tables .....	16
List of figures .....	19
Chapter 1. Introduction .....	31
Chapter 2. Environmental monitoring and biological ecology in shrimp culture ponds .....	33
Section 1 Introduction .....	33
Section 2 Materials and methods .....	33
1. Environmental and biological factors of shrimp culture ponds .....	33
가. Analysis of environmental factors .....	33
나. Analysis of biological factors .....	34
다. Analysis of microbiological factors .....	35
2. Population dynamics of <i>Neomysis japonica</i> in shrimp culture ponds .....	35
가. Changes of water temperature, salinity and dissolved oxygen .....	35
나. Variation in ratio of female/male .....	35
다. Size at sexual maturity .....	36
라. Number of incubation .....	36
마. Growth, death and admission .....	36
바. Relative growth .....	37
Section 3 Results and discussion .....	38
1. Environmental and biological factors of shrimp culture ponds .....	38
가. Analysis of environmental factors .....	38
나. Analysis of biological factors .....	41
다. Analysis of microbiological factors .....	44
2. Population dynamics of <i>Neomysis japonica</i> in shrimp culture ponds .....	45
가. Changes of water temperature, salinity and dissolved oxygen .....	45
나. Variation in ratio of female/male .....	46
다. Size at sexual maturity .....	48
라. Number of incubation .....	49
마. Growth, death and admission .....	52
바. Relative growth .....	55
Chapter 3. Environmental clean-up of shrimp farming pond by microorganisms and development of microbial agents .....	58
Section 1 Introduction .....	58
Section 2 Materials and methods .....	58
1. Search of beneficial and harmful bacteria isolated from shrimp aquaculture pond .....	58

가.	Growth and distribution of bacterial colony	58
나.	Morphological and physiological characterization of bacterial isolates	58
다.	Growth and distribution of bacterial colonies	59
2.	Environmental clean-up of shrimp aquaculture pond by microorganisms:	
	microbiological removal of nitrogens and phosphorus	59
가.	Isolation and maintenance of the bacterial isolates	59
나.	Morphological examination and physiological characterization of the bacterial isolates	59
다.	Identification of the bacterial isolates	60
라.	Measurement of nitrogen and phosphorus	60
3.	Microbiological treatment of contaminated environment derived from farming feed in shrimp aquaculture pond	61
가.	Measurement of nitrogens and phosphorus leached from farming feed	61
나.	Measurement of nitrogens and phosphorus by the bacterial isolates	61
다.	Analyses of sugars derived from farming feed	62
4.	Search of usefulness of bacteria isolated from shrimp aquaculture pond	62
가.	Isolation of lactic acid bacteria and culture conditions	62
나.	Morphological examination and physiological characterization of lactic acid bacteria	62
다.	Identification of lactic acid bacteria	62
라.	Removal of nitrogens by lactic acid bacteria	63
마.	Examination of antibiotic-spectrum	63
바.	Determination of killing effect of cultural concentrates against pathogenic bacteria	63
사.	Growth of lactic acid bacteria and determination of organic acids	63
아.	Analysis of organic acids by HPLC	64
자.	Analysis of organic acids by GC-MS	64
차.	Morphological examination of bacterial cells by SEM	64
카.	Formation of antibacterial substance	65
타.	Verification of antibacterial substance by RP-HPLC	65
파.	Ultrasensitive radial diffusion assay	66
하.	Tricine SDS-PAGE	66
5.	Development of microbial agents for environmental clean-up of shrimp aquaculture pond	66
가.	Manufacture of microbial agents	66
나.	Removal of nitrogens/phosphorus by microbial agents in cistern	67
Section 3 Results and discussion		67
1.	Search of beneficial and harmful bacteria isolated from shrimp aquaculture pond	67
가.	Characteristics of bacterial isolates	67
나.	Morphological and physiological characteristics of bacterial isolates	68
다.	Growth and distribution of bacterial colonies	77

2. Environmental clean-up of shrimp aquaculture pond by microorganisms:	
microbiological removal of nitrogens and phosphorus .....	91
가. Isolation of bacteria .....	91
나. Morphological examination and physiological characterization of the bacterial isolates .....	91
다. Identification of the bacterial isolates .....	93
라. Growth of the bacterial isolates and pH changes .....	96
마. Removal of $\text{NH}_4^+$ by bacterial isolates .....	98
바. Removal of $\text{NO}_2^-$ by bacterial isolates .....	98
사. Removal of $\text{NO}_3^-$ by bacterial isolates .....	99
아. Removal of $\text{PO}_4^{3-}$ by bacterial isolates .....	100
자. Simultaneous removal of nitrogens and phosphorus .....	101
3. Microbiological treatment of contaminated environment derived from farming feed in shrimp aquaculture pond .....	102
가. Leaching of nitrogens and phosphorus from farming feed .....	102
나. Microbiological removal of nitrogens and phosphorus from farming feed .....	102
다. Analyses of sugars derived from farming feed .....	105
4. Search of usefulness of bacteria isolated from shrimp aquaculture pond .....	106
가. Isolation of lactic acid bacteria .....	106
나. Morphological examination and physiological characterization of lactic acid bacteria .....	106
다. Identification of lactic acid bacteria .....	106
라. Removal of nitrogens by <i>Lactobacillus</i> sp. JK-8, JK-11 .....	111
마. Antibacterial spectrum of <i>Lactobacillus</i> sp. JK-8, JK-11 .....	112
바. Killing effect of <i>Lactobacillus</i> sp. JK-8, JK-11 against pathogenic bacteria .....	113
사. Growth of <i>Lactobacillus</i> sp. JK-8, JK-11 and production of organic acids .....	119
아. Analysis of organic acids by HPLC .....	120
자. Analysis of organic acids by GC-MS .....	121
차. SEM Examination of cells exposed by cultural concentrates of <i>Lactobacillus</i> sp. JK-8, JK-11 .....	122
카. Production of antibacterial substance by <i>Lactobacillus</i> sp. JK-8, JK-11 .....	125
타. RP-HPLC .....	126
파. Ultrasensitive radial diffusion assay .....	127
하. Tricine SDS-PAGE .....	127
5. Development of microbial agents for environmental clean-up of shrimp aquaculture pond .....	128
가. Removal of nitrogens and phosphorus derived from farming feed .....	128
나. Bacterial growth and pH changes in cistern .....	130
다. Manufacture of microbial agents .....	130
라. Turbidity changes based on the addition of microbial agents in cistern .....	132
마. Removal of nitrogens and phosphorus leached from farming feed by microbial agents in cistern .....	132

Chapter 4. Improvement of water quality and control of diseases by using probiotic bacteria in shrimp ponds .....	134
Section 1 Introduction .....	134
Section 2 Materials and methods .....	134
1. Effects of probiotics on water quality .....	134
가. Probiotic bacteria .....	134
나. Growth of the shrimp .....	135
다. Probiotics treatment .....	135
라. Analysis of water .....	135
2. Studies on aquaculture environments in shrimp ponds .....	136
가. Monitoring water quality of shrimp ponds .....	136
나. Investigation of disease status in farmed shrimp .....	136
3. Study on improvement of water quality and control of diseases by using probiotic bacteria in shrimp ponds .....	136
가. Shrimp ponds preparation .....	136
나. Planting a seedling and administration .....	137
다. Treatment of water improvement .....	137
라. Shrimp a specimen and water sampling .....	137
4. The water quality, bacillus and investigation of disease status .....	137
가. Monitoring water quality of shrimp ponds .....	137
나. Total bacterial numbers .....	138
다. Investigation of disease status in farmed shrimp .....	138
Section 3 Results and discussion .....	139
1. Effects of probiotics on water quality .....	139
가. Viability of probiotics in sea water .....	139
나. Effects of probiotics on rearing water quality of shrimp .....	142
다. Effects of probiotics on rearing water quality of shrimp larvae .....	148
라. Effects of probiotics on water quality of shrimp juveniles reared in small tanks .....	157
마. Effects of probiotics on water quality of adult shrimp reared in large tanks .....	159
바. Comparison of mixed different probiotics effects on water quality of adult shrimp reared in large tanks .....	161
2. Studies on aquaculture environments in shrimp ponds .....	163
가. Monitoring water quality of shrimp ponds .....	163
나. Investigation of disease status in farmed shrimp .....	169
3. Study on improvement of water quality and control of diseases by using probiotic bacteria in shrimp ponds .....	171
가. Investigation of water quality in shrimp ponds .....	171
나. Effects of probiotics on water quality in shrimp ponds .....	181
다. Study on disease infection rate of farmed shrimp .....	186
라. Production and survival rate of farmed shrimp .....	192

Chapter 5. Achievement and expectable effects of the research .....	196
Section 1 Achievement of research purpose .....	196
Section 2 Contribution to related fields .....	199
Chapter 6. Utilization plan of research results .....	200
Section 1 Utilization plan .....	200
Section 2 Utilization of research results .....	200
Section 3 Utilization project .....	204
Chapter 7. References .....	206



## List of tables

Table 2-1. Chlorophyll a variation picking periods of shrimp culture pond waters ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) .....	42
Table 2-2. Species composition of zooplankton in shrimp culture pond .....	43
Table 2-3. Total germ coefficient and distribution of shrimp culture pond free medical care (CFU/ml, $\times 10^4$ ) .....	44
Table 2-4. Parameters for estimation of size at sexual maturity in female <i>Neomysis japonica</i> collected from October 2002 to september 2003. $CL_{50}$ indicates a length at 50% sexual maturity .....	48
Table. 2-5. Details of linear regressions for ovigerous females of <i>Neomysis japonica</i> . $\text{Log}_e$ egg number (EN) is regressed on $\text{log}_e$ carapace length (CL) *** $P < 0.001$ .....	52
Table. 2-6. von Bertalanffy growth parameters estimated by the ELEFAN analysis of length–frequency data for males, females and pooled data. $L_\infty$ , asymptotic length (mm); $K$ , growth coefficient ( $\text{yr}^{-1}$ ); $t_0$ , theoretical age at zero length (yr); $C$ , amplitude of growth oscillation; $WP$ , wintering point; $\phi'$ , growth performance index; $Rn$ , score function .....	64
Table. 2-7. von Bertalanffy growth parameters estimated by the ELEFAN analysis of length–frequency data for males, females and pooled data. $L_\infty$ , asymptotic length (mm); $K$ , growth coefficient ( $\text{yr}^{-1}$ ); $\phi'$ , growth performance index .....	57
Table 3-1. The Characterization of the isolates isolated from a shrimp aquaculture farm .....	67
Table 3-2. Morphological and physiological characteristics of the strain M-001 .....	69
Table 3-3. Morphological and physiological characteristics of the strain M-002 .....	69
Table 3-4. Morphological and physiological characteristics of the strain M-003 .....	70
Table 3-5. Morphological and physiological characteristics of the strain M-004 .....	70
Table 3-6. Morphological and physiological characteristics of the strain M-005 .....	71
Table 3-7. Morphological and physiological characteristics of the strain M-006 .....	71
Table 3-8. Morphological and physiological characteristics of the strain M-007 .....	72
Table 3-9. Morphological and physiological characteristics of the strain M-008 .....	72
Table 3-10. Morphological and physiological characteristics of the strain M-009 .....	73
Table 3-11. Morphological and physiological characteristics of the strain M-010 .....	73
Table 3-12. Morphological and physiological characteristics of the strain M-011 .....	74
Table 3-13. Morphological and physiological characteristics of the strain M-012 .....	74
Table 3-14. Morphological and physiological characteristics of the strain M-013 .....	75
Table 3-15. The degradation of starch and gelatin by the isolates .....	75
Table 3-16. Physiological and biological characterization of the isolate, M-001 using the BIOLOG Analysis System .....	78
Table 3-17. Physiological and biological characterization of the isolate, M-002 using the BIOLOG Analysis System .....	79

Table 3-18. Physiological and biological characterization of the isolate, M-003 using the BIOLOG Analysis System .....	80
Table 3-19. Physiological and biological characterization of the isolate, M-004 using the BIOLOG Analysis System .....	81
Table 3-20. Physiological and biological characterization of the isolate, M-005 using the BIOLOG Analysis System .....	82
Table 3-21. Physiological and biological characterization of the isolate, M-006 using the BIOLOG Analysis System .....	83
Table 3-22. Physiological and biological characterization of the isolate, M-007 using the BIOLOG Analysis System .....	84
Table 3-23. Physiological and biological characterization of the isolate, M-008 using the BIOLOG Analysis System .....	85
Table 3-24. Physiological and biological characterization of the isolate, M-009 using the BIOLOG Analysis System .....	86
Table 3-25. Physiological and biological characterization of the isolate, M-010 using the BIOLOG Analysis System .....	87
Table 3-26. Physiological and biological characterization of the isolate, M-011 using the BIOLOG Analysis System .....	88
Table 3-27. Physiological and biological characterization of the isolate, M-012 using the BIOLOG Analysis System .....	89
Table 3-28. Physiological and biological characterization of the isolate, M-013 using the BIOLOG Analysis System .....	90
Table 3-29. The identification of the isolates .....	91
Table 3-30. Morphological and physiological characteristics of the strain CK-10 .....	92
Table 3-31. Morphological and physiological characteristics of the strain CK-13 .....	93
Table 3-32. Physiological and biochemical characterization of the isolate, CK-10 using the BIOLOG Analysis System .....	94
Table 3-33. Physiological and biochemical characterization of the isolate, CK-13 using the BIOLOG Analysis System .....	95
Table 3-34. Morphological and physiological characteristics of the strain JK-8 .....	107
Table 3-35. Morphological and physiological characteristics of the strain JK-11 .....	108
Table 3-36. Physiological and biochemical characterization of the isolate, JK-8 using the BIOLOG Analysis System .....	109
Table 3-37. Physiological and biochemical characterization of the isolate, JK-11 using the BIOLOG Analysis System .....	110
Table 4-1. Changes in parasitic infection rate of gills .....	169
Table 4-2. Comparison of water temperature, DO and pH changes for three weeks in pond 1 (Jul. 7 to Aug. 17, 2005) .....	178
Table 4-3. Comparison of nutrients in ponds 1 and 2 .....	181
Table 4-4. Comparison of total number of bacteria and <i>Vibrio</i> in ponds 1 and 2 .....	184
Table 4-5. Rate of total <i>Vibrio</i> number to total bacterial number in ponds 1 and 2 ..	184
Table 4-6. Changes of parasitic infection rate on shrimp gills in ponds 1 and 2 .....	187

Table 4-7. Changes of parasitic infection rate on gills and white spot occurrence rate on carapace in ponds 1 and 2 .....	188
Table 4-8. Changes of viral infection rate in ponds 1 and 2 .....	189
Table 4-9. Changes of total body length of shrimp in ponds 1 and 2 (unit : mm) .....	192
Table 4-10. Changes of body weight of shrimp in ponds 1 and 2 (unit : g) .....	193
Table 4-11. Production and survival rate of shrimp in ponds 1 and 2 .....	194

## List of figures

Fig. 2-1. Changes of water temperature during investigation period .....	38
Fig. 2-2. Changes of water salinity during investigation period .....	39
Fig. 2-3. Changes of dissolved oxygen (mg/L) during investigation period .....	39
Fig. 2-4. Changes of $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (mg/L) during investigation period .....	40
Fig. 2-5. Changes of $\text{NO}_2^-\text{-N}$ (mg/L) during investigation period .....	40
Fig. 2-6. Changes $\text{NO}_3^-\text{-N}$ (mg/L) during investigation period .....	41
Fig. 2-7. Variation of Chlorophyll a in shrimp culture pond .....	42
Fig. 2-8. Species density of zooplankton in shrimp culture pond .....	43
Fig. 2-9. Total germ coefficient and distribution of shrimp culture pond .....	45
Fig. 2-10. The cluster photographs produced by free medical care smear 1: A, 2: B, 3: C, 4: D, 5: E, 6: F, 7: G, 8: H .....	45
Fig. 2-11. Monthly variation of water temperture (▲) and salinity (●) from october 2002 to september 2003 .....	46
Fig. 2-12. Monthly variation of dissolved oxygen from October 2002 to september 2003 .....	46
Fig. 2-13. Monthly variation in ratio of female/male in monthly samples of <i>Neomysis japonica</i> .....	47
Fig. 2-14. Length-frequency distribution of male and female <i>Neomysis japonica</i> collected from october 2002 to september 2003 .....	47
Fig. 2-15. A logistic function fitting proportion of mature females <i>Neomysis japonica</i> to carapace length. $CL_{50}$ indicates a point corresponding to a proportion of 50% .....	49
Fig. 2-16. Relationship between carapace length (CL) and number of eggs (EN) in female <i>Neomysis japonica</i> (a : Pooled, b : Embryonic stage) .....	50
Fig. 2-17. Relationship between carapace length (CL) and number of eggs (EN) in female <i>Neomysis japonica</i> (a : Nauplioid stage, b : Postnauplioid stage) .....	51
Fig. 2-18. Length-frequency distribution, expressed as occurrence of males (a), females (b) and pooled data (c) of <i>Neomysis japonica</i> from October 2002 to september 2003 and estimated growth curves. The number in parenthesis below months are indicated sample sizes .....	53
Fig. 2-19. Average growth curves for males, females and pooled data of <i>Neomysis japonica</i> based on length-frequency distributions from october 2002 to september 2003 .....	54
Fig. 2-20. Length-converted catch curve of <i>Neomysis japonica</i> based on length-frequency data from october 2002 to september 2003 .....	55
Fig. 2-21. The annual recruitment pattern of <i>Neomysis japonica</i> as identified by ELEFAN II routine .....	55
Fig. 2-22. Relationship between carapace length (CL) and total length (TL) in female (a) and male (b) of <i>Neomysis japonica</i> .....	56

Fig. 2-23. Relationship between carapace length (CL) and total length (TL) in female and male of <i>Neomysis japonica</i> .....	57
Fig. 3-1. The single colony of the isolates isolated from a shrimp aquaculture farm. A: M-001, B: M-002, C: M-003, D: M-004, E: M-005, F: M-006, G: M-007, H: M-008, I: M-009, J: M-010, K: M-011, L: M-012, M: M-013 .....	68
Fig. 3-2. The production of clear zone by the isolates with starch media. A: M-001, B: M-005, C: M-007, D: M-010, F: M-011, G: M-012 .....	76
Fig. 3-3. The production of clear zone with gelatin media. A: M-002, B: M-003, C: M-004, D: M-005, E: M-007, F: M-010, G: M-011 .....	76
Fig. 3-4. 16S rRNA sequence of <i>Bacillus</i> sp. CK-10. The isolate was registered in Genbank as [AY941803] .....	96
Fig. 3-5. 16S rRNA sequence of <i>Bacillus</i> sp. CK-13. The isolate was registered in Genbank as [AY941804] .....	96
Fig. 3-6. Cell growth (○) and pH (●) variation according to <i>Bacillus</i> sp. CK-10 growth in N/P removal liquid media .....	97
Fig. 3-7. Cell growth (○) and pH (●) variation according to <i>Bacillus</i> sp. CK-13 growth in N/P removal liquid media .....	97
Fig. 3-8. Changes in concentration of residual $\text{NH}_4^+$ in single cultures, <i>Bacillus</i> sp. CK-10 (A) or <i>Bacillus</i> sp. CK-13 (B), and co-culture, <i>Bacillus</i> sp. CK-10 and <i>Bacillus</i> sp. CK-13 (C) growing with 200 $\mu\text{M}$ (●), 300 $\mu\text{M}$ (▲), and 400 $\mu\text{M}$ (■) $\text{NH}_4^+$ as nitrogen source .....	98
Fig. 3-9. Changes in concentration of residual $\text{NO}_2^-$ in single cultures, <i>Bacillus</i> sp. CK-10 (A) or <i>Bacillus</i> sp. CK-13 (B), and co-culture, <i>Bacillus</i> sp. CK-10 and <i>Bacillus</i> sp. CK-13 (C) growing with 200 $\mu\text{M}$ (●), 300 $\mu\text{M}$ (▲), and 400 $\mu\text{M}$ (■) $\text{NO}_2^-$ as nitrogen source .....	99
Fig. 3-10. Changes in concentration of residual $\text{NO}_3^-$ in single cultures, <i>Bacillus</i> sp. CK-10 (A) or <i>Bacillus</i> sp. CK-13 (B), and co-culture, <i>Bacillus</i> sp. CK-10 and <i>Bacillus</i> sp. CK-13 (C) growing with 200 $\mu\text{M}$ (●), 300 $\mu\text{M}$ (▲), and 400 $\mu\text{M}$ (■) $\text{NO}_3^-$ as nitrogen source. ....	100
Fig. 3-11. Changes in concentration of residual $\text{PO}_4^{3-}$ in single cultures, <i>Bacillus</i> sp. CK-10 (A) or <i>Bacillus</i> sp. CK-13 (B), and co-culture, <i>Bacillus</i> sp. CK-10 and <i>Bacillus</i> sp. CK-13 (C) growing with 125 $\mu\text{M}$ (●), 250 $\mu\text{M}$ (▲), and 500 $\mu\text{M}$ (■) $\text{PO}_4^{3-}$ as phosphorus source. ....	101
Fig. 3-12. Changes in concentrations of residual 400 $\mu\text{M}$ $\text{NH}_4^+$ (●), 400 $\mu\text{M}$ $\text{NO}_2^-$ (▲), 400 $\mu\text{M}$ $\text{NO}_3^-$ (■), and 500 $\mu\text{M}$ $\text{PO}_4^{3-}$ (◆) in co-culture, <i>Bacillus</i> sp. CK-10 and <i>Bacillus</i> sp. CK-13 (C) .....	101
Fig. 3-13. Dissolution of $\text{NH}_4^+$ (●), $\text{NO}_2^-$ (▲), $\text{NO}_3^-$ (■), and $\text{PO}_4^{3-}$ (◆) in sea water from 0.2% farming feed .....	102
Fig. 3-14. Removal of $\text{NH}_4^+$ (●), $\text{NO}_2^-$ (▲), $\text{NO}_3^-$ (■), and $\text{PO}_4^{3-}$ (◆) from 0.2% farming feed suspension incubated with <i>Bacillus</i> sp. CK-10 .....	103
Fig. 3-15. Removal of $\text{NH}_4^+$ (●), $\text{NO}_2^-$ (▲), $\text{NO}_3^-$ (■), and $\text{PO}_4^{3-}$ (◆) from 0.2% farming feed suspension incubated with <i>Bacillus</i> sp. CK-13 .....	104

Fig. 3-16. Removal of $\text{NH}_4^+$ (●), $\text{NO}_2^-$ (▲), $\text{NO}_3^-$ (■), and $\text{PO}_4^{3-}$ (◆) from 0.2% farming feed suspension incubated with co-culture, <i>Bacillus</i> sp. CK-10 and <i>Bacillus</i> sp. CK-13 .....	104
Fig. 3-17. Sugar analysis of farming feed by Bio-LC DX; (A) control and (B) farming feed .....	105
Fig. 3-18. Changes in concentrations of residual $\text{NH}_4^+$ (A), $\text{NO}_2^-$ (B), and $\text{NO}_3^-$ (C) in <i>Lactobacillus</i> sp. JK-8 cultures. Concentrations of nitrogens in the cultures were 100 $\mu\text{M}$ (●), 200 $\mu\text{M}$ (▲), 300 $\mu\text{M}$ (■), 400 $\mu\text{M}$ (◆) of $\text{NH}_4^+$ and $\text{NO}_2^-$ , and 25 $\mu\text{M}$ (●), 50 $\mu\text{M}$ (▲), 75 $\mu\text{M}$ (■), 100 $\mu\text{M}$ (◆) of $\text{NO}_3^-$ , respectively .....	111
Fig. 3-19. Changes in concentrations of residual $\text{NH}_4^+$ (A), $\text{NO}_2^-$ (B), and $\text{NO}_3^-$ (C) in <i>Lactobacillus</i> sp. JK-11 cultures. Concentrations of nitrogens in the cultures were 100 $\mu\text{M}$ (●), 200 $\mu\text{M}$ (▲), 300 $\mu\text{M}$ (■), 400 $\mu\text{M}$ (◆) of $\text{NH}_4^+$ and $\text{NO}_2^-$ and 25 $\mu\text{M}$ (●), 50 $\mu\text{M}$ (▲), 75 $\mu\text{M}$ (■), 100 $\mu\text{M}$ (◆) of $\text{NO}_3^-$ , respectively .....	112
Fig. 3-20. Antibacterial activity of <i>Lactobacillus</i> sp. JK-8 against <i>Virio parahaemolyticus</i> (A), <i>Virio harveyi</i> (B) and <i>Edwardsiella tarda</i> (C) .....	112
Fig. 3-21. Antibacterial activity of <i>Lactobacillus</i> sp. JK-11 against <i>Virio parahaemolyticus</i> (A), <i>Virio harveyi</i> (B) and <i>Edwardsiella tarda</i> (C) .....	113
Fig. 3-22. Killing of pathogens after exposure of cell-free concentrated supernatants derived from JK-8 (A); control (○), <i>Vibrio parahemolyticus</i> (●), <i>V. harveyi</i> (▲), <i>Edwardsiella tarda</i> (■), <i>Streptococcus pyogenes</i> (◆) At intervals, the number of colony-forming units per ml of culture was determined .....	114
Fig. 3-23. Photographs of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> with JK-8 concentrate (X5); (A) control, (B) 30 mins .....	114
Fig. 3-24. Photographs of <i>Vibrio harveyi</i> with JK-8 concentrate (X5); (A) control, (B) 30 mins .....	115
Fig. 3-25. Photographs of <i>Edwardsiella tarda</i> with JK-8 concentrate (X5); (A) control, (B) 30 mins, (c) 60 mins .....	115
Fig. 3-26. Photographs of <i>Streptococcus pyogenes</i> with JK-8 concentrate (X5); (A) control, (B) 60 mins, (C) 120 mins, (D) 180 mins .....	116
Fig. 3-27. Killing of pathogens after exposure of cell-free concentrated supernatants derived from JK-11 (A); control (○), <i>Vibrio parahemolyticus</i> (●), <i>V. harveyi</i> (▲), <i>Edwardsiella tarda</i> (■), <i>Streptococcus pyogenes</i> (◆) At intervals, the number of colony-forming units per ml of culture was determined .....	117
Fig. 3-28. Photographs of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> with JK-11 concentrate (X5); (A) control, (B) 30 mins. (C) 60 mins .....	117
Fig. 3-29. Photographs of <i>Vibrio harveyi</i> with JK-11 concentrate (X5); (A) control, (B) 30 mins. (C) 60 mins, (D) 90 mins .....	118

Fig. 3-30. Photographs of <i>Edwardsiella tarda</i> with JK-11 concentrate (X5); (A) control, (B) 60 mins, (c) 120 mins .....	118
Fig. 3-31. Photographs of <i>Streptococcus pyogenes</i> with JK-11 concentrate (X5); (A) control, (B) 120 mins (C) 240 mins .....	118
Fig. 3-32. Growth of test cultures JK-8, measured as cell density (○), associated with the parallel formation of lactic acid (●) and acetic acid (▲), and pH changes (■) .....	119
Fig. 3-33. Growth of test cultures and JK-11, measured as cell density (○), associated with the parallel formation of lactic acid (●) and acetic acid (▲), and pH changes (■) .....	120
Fig. 3-34. HPLC chromatograms of standards (A) and of culture samples harvested from JK-8 cultures initially (B) and after 24 hrs (C) and 48 hrs of incubation (D) .....	120
Fig. 3-35. GC-MS data for a culture analyzed after 48 hrs of incubation. MS fragmentation patterns of the compounds representing the two peaks (A and C) in the TIC are indicated and the respective chemical structures of the compounds are also given. Peak B was DMSO used as a solvent ..	121
Fig. 3-36. Scanning electron micrographs of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> treated with JK-8 concentrate (X5) (A) untreated cells (B) cells treated with 5-fold concentrated supernatants for 6 hrs. Arrows indicate the punctured cell envelopes .....	122
Fig. 3-37. Scanning electron micrographs of <i>Vibrio harveyi</i> treated with JK-8 concentrate (X5) (A) untreated cells (B) cells treated with 5-fold concentrated supernatants for 6 hrs. Arrows indicate the punctured cell envelopes .....	122
Fig. 3-38. Scanning electron micrographs of <i>Edwardsiella tarda</i> treated with JK-8 concentrate (X5) (A) untreated cells (B) cells treated with 5-fold concentrated supernatants for 6 hrs. Arrows indicate the punctured cell envelopes .....	123
Fig. 3-39. Scanning electron micrographs of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> treated with JK-11 concentrate (X5) (A) untreated cells (B) cells treated with 5-fold concentrated supernatants for 6 hrs. Arrows indicate the punctured cell envelopes .....	123
Fig. 3-40. Scanning electron micrographs of <i>Vibrio harveyi</i> treated with JK-11 concentrate (X5) (A) untreated cells (B) cells treated with 5-fold concentrated supernatants for 6 hrs. Arrows indicate the punctured cell envelopes .....	124
Fig. 3-41. Scanning electron micrographs of <i>Edwardsiella tarda</i> treated with JK-11 concentrate (X5) (A) untreated cells (B) cells treated with 5-fold concentrated supernatants for 6 hrs. Arrows indicate the punctured cell envelopes .....	124

Fig. 3-42. Inhibition of JK-8 cultures supernatant by the plate diffusion assay. Filter discs soaked with 5-fold concentrated supernatants were placed onto lawn plates of <i>V. parahemolyticus</i> (A), <i>V. harveyi</i> (B), and <i>Edwardsiella tarda</i> (C), respectively; adjusting the pH 7.0 (1) and non-adjusting the pH 3.8 (2) derived from JK-8 .....	125
Fig. 3-43. Inhibition of JK-11 cultures supernatant by the plate diffusion assay. Filter discs soaked with 5-fold concentrated supernatants were placed onto lawn plates of <i>V. parahemolyticus</i> (A), <i>V. harveyi</i> (B), and <i>Edwardsiella tarda</i> (C), respectively; adjusting the pH 7.0 (1) and non-adjusting the pH 5.4 (2) derived from JK-11 .....	126
Fig. 3-44. RP-HPLC data for a culture sample analyzed 5-fold concentrated supernatants. A fragmentation indicated bacteriocin-like substance .....	126
Fig. 3-45. Antibacterial activities against <i>E. coli</i> in radial diffusion assay. Panel A shows the results of antibacterial activities against <i>E. coli</i> and panel B don't. Well 1 shows strong antibacterial activities as bacteriocin-like substance .....	127
Fig. 3-46. Tricine SDS-PAGE showing bacteriocin-like substance isolated <i>Lactobacillus</i> sp. JK-11. Lane M, molecular weight markers; lane 1, bacteriocin-like substance. Bacteriocin-like substance indicated molecular weight 4 kDa .....	128
Fig. 3-47. Survival of N/P removers (CK-10 and CK-13) in the addition of zeolite (●) and in the absence of zeolite (○) .....	129
Fig. 3-48. Freeze-dried microbial agent ; (A) powered type and (B) liquid type .....	129
Fig. 3-49. Removal of $\text{NH}_4^+$ (●), $\text{NO}_2^-$ (▲), $\text{NO}_3^-$ (■), and $\text{PO}_4^{3-}$ (◆) from 0.01% (w/v) farming feed suspension incubated (A) with co-cultures, <i>Bacillus</i> sp. CK-10 and <i>Bacillus</i> sp. CK-10, and (B) without cultures. Initial inoculum of co-cultures was $4.7 \times 10^4$ cells/ml .....	130
Fig. 3-50. pH changes (■) and log colony-forming unit (□) of total bacteria incubated (A) with co-cultures, <i>Bacillus</i> sp. CK-10 and <i>Bacillus</i> sp. CK-13 and (B) without cultures .....	131
Fig. 3-51. Photographs of bench-scale cisterin incubated (a) with microbial agent, and (b) without microbial agent during the incubation period of (A) 0 hr, (B) 48 hrs, (C) 96 hrs, (D) 144 hrs, respectively .....	132
Fig. 3-52. Removal of $\text{NH}_4^+$ (●), $\text{NO}_2^-$ (▲), $\text{NO}_3^-$ (■), and $\text{PO}_4^{3-}$ (◆) from 0.01% (w/v) farming feed suspension incubated (A) with microbial agent including zeolite, and (B) with dried microbial pellet (B). Initial inoculum of co-cultures was $4.6 \times 10^4$ cells/ml .....	133
Fig. 4-1. Growth of each probiotic bacterium in sea water .....	141
Fig. 4-2. Effect of <i>B. licheniformis</i> on water quality according to the size of initial inoculum. The graphs marked with astrisks represent the control (no inoculum); diamonds, inoculum of $1.2 \times 10^3$ ; squares, inoculum of $1.2 \times 10^4$ CFU/ml; triangles, inoculum of $2.4 \times 10^4$ CFU/ml; circles, inoculum of $4.8 \times 10^4$ CFU/ml .....	143



Fig. 4-3. Effect of <i>B. megaterium</i> on water quality according to the size of initial inoculum. The graphs marked with astrisks represent the control (no inoculum); diamonds, inoculum of $3.5 \times 10^3$ CFU/ml; squares, inoculum of $4.7 \times 10^3$ CFU/ml; triangles, inoculum of $5.8 \times 10^3$ CFU/ml; circles, inoculum of $7.0 \times 10^3$ CFU/ml .....	144
Fig. 4-4. Effect of <i>B. mesentericus</i> on water quality according to the size of initial inoculum. The graphs marked with astrisks represent the control (no inoculum); diamonds, inoculum of $4.7 \times 10^2$ CFU/ml; squares, inoculum of $1.4 \times 10^3$ CFU/ml; triangles, inoculum of $2.4 \times 10^3$ CFU/ml; circles, inoculum of $3.3 \times 10^3$ CFU/ml .....	145
Fig. 4-5. Effect of <i>L. acidophilus</i> on water quality according to the size of initial inoculum. The graphs marked with astrisks represent the control (no inoculum); diamonds, inoculum of $1.1 \times 10^3$ CFU/ml; squares, inoculum of $3.3 \times 10^4$ CFU/ml; triangles, inoculum of $5.5 \times 10^4$ CFU/ml; circles, inoculum of $7.7 \times 10^4$ CFU/ml .....	146
Fig. 4-6. Effect of <i>Nitrosomonas</i> + <i>Nitrobacter</i> on water quality according to the size of initial inoculum. The graphs marked with astrisks represent the control (no inoculum); squares, inoculum of 2.2 CFU/ml; triangles, inoculum of $2.2 \times 10$ CFU/ml; circles, inoculum of $2.2 \times 10^2$ CFU/ml .....	147
Fig. 4-7. Effect of <i>B. licheniformis</i> on the quality of water for juvenile shrimp culture according to the size of initial inoculum. The graphs marked with astrisks represent the control (no inoculum); diamonds, inoculum of $2.4 \times 10^3$ CFU/ml; squares, inoculum of $7.2 \times 10^3$ CFU/ml; triangles, inoculum of $2.4 \times 10^4$ CFU/ml .....	150
Fig. 4-8. Effect of <i>B. megaterium</i> on the quality of water for juvenile shrimp culture according to the size of initial inoculum. The graphs marked with astrisks represent the control (no inoculum); diamonds, inoculum of $2.4 \times 10^2$ CFU/ml; squares, inoculum of $7.0 \times 10^2$ CFU/ml; triangles, inoculum of $2.4 \times 10^3$ CFU/ml .....	151
Fig. 4-9. Effect of <i>B. mesentericus</i> on the quality of water for juvenile shrimp culture according to the size of initial inoculum. The graphs marked with astrisks represent the control (no inoculum); diamonds, inoculum of $4.7 \times 10^4$ CFU/ml; squares, inoculum of $1.4 \times 10^5$ CFU/ml; triangles, inoculum of $4.7 \times 10^5$ CFU/ml .....	152
Fig. 4-10. Effect of <i>L. acidophilus</i> on the quality of water for juvenile shrimp culture according to the size of initial inoculum. The graphs marked with astrisks represent the control (no inoculum); diamonds, inoculum of 1.1 CFU/ml; squares, inoculum of $1.1 \times 10$ CFU/ml; triangles, inoculum of $1.1 \times 10^2$ CFU/ml .....	153
Fig. 4-11. Effect of <i>Nitrosomonas</i> + <i>Nitrobacter</i> on the quality of water for juvenile shrimp culture according to the size of initial inoculum. The graphs marked with astrisks represent the control (no inoculum); squares, inoculum of $2.2 \times 10$ CFU/ml; triangles, inoculum of $2.2 \times 10^2$ CFU/ml .....	154

Fig. 4-12. Effect of each probiotic bacterium on the quality of water for juvenile shrimp culture. Each bacterium was inoculated at the optimal concentration. The graphs marked with asterisks represent the control (no inoculum); diamonds, <i>B. licheniformis</i> ( $7.2 \times 10^3$ CFU/ml); squares, <i>B. megaterium</i> ( $7.0 \times 10^2$ CFU/ml); triangles, <i>B. mesenterius</i> ( $1.4 \times 10^5$ CFU/ml); circles, <i>L. acidophilus</i> ( $3.3 \times 10$ CFU/ml); filled circles, <i>Nitrosomonas + Nitrobacter</i> ( $2.2 \times 10^2$ CFU/ml) .....	156
Fig. 4-13. Effect of probiotic bacteria on the quality of water for juvenile shrimp culture. The graphs marked with asterisks represent the control (no inoculum); Bl, <i>B. licheniformis</i> ( $2.0 \times 10^2$ CFU/ml); Bm, <i>B. megaterium</i> ( $2.0 \times 10^2$ CFU/ml); La, <i>L. acidophilus</i> (1.0 CFU/ml); N, <i>Nitrosomonas + Nitrobacter</i> (0.2 CFU/ml) .....	158
Fig. 4-14. Effect of probiotic bacteria on the quality of water for adult shrimp culture. The graphs marked with asterisks represent the control (no inoculum); Bl, <i>B. licheniformis</i> ( $2.0 \times 10^2$ CFU/ml); Bm, <i>B. megaterium</i> ( $2.0 \times 10^2$ CFU/ml); La, <i>L. acidophilus</i> (1.0 CFU/ml); N, <i>Nitrosomonas + Nitrobacter</i> (0.2 CFU/ml) .....	160
Fig. 4-15. Effect of the mixed probiotic bacteria on the quality of water for adult shrimp culture. The graphs marked with asterisks represent the control (no inoculum); triangles, the bacterial mixture. The bacterial mixture contained <i>B. licheniformis</i> ( $2.0 \times 10^2$ CFU/ml), <i>B. megaterium</i> ( $1.4 \times 10^4$ CFU/ml), <i>L. acidophilus</i> ( $3.3 \times 10$ CFU/ml), <i>Nitrosomonas + Nitrobacter</i> (0.2 CFU/ml) .....	162
Fig. 4-16. Changes of water temperature in ponds 1 and 2 .....	163
Fig. 4-17. Changes of pH in ponds 1 and 2 .....	164
Fig. 4-18. Changes of salinity in ponds 1 and 2 .....	164
Fig. 4-19. Changes of dissolved oxygen concentration in ponds 1 and 2 .....	165
Fig. 4-20. Changes of water transparency in ponds 1 and 2 .....	165
Fig. 4-21. Changes of NH <sub>4</sub> -N concentration in ponds 1 and 2 .....	166
Fig. 4-22. Changes of NO <sub>2</sub> -N concentration in ponds 1 and 2 .....	166
Fig. 4-23. Changes of NO <sub>3</sub> -N concentration in ponds 1 and 2 .....	167
Fig. 4-24. Changes of PO <sub>4</sub> -P concentration in ponds 1 and 2 .....	167
Fig. 4-25. Changes of total bacterial number in ponds 1 and 2 .....	168
Fig. 4-26. Changes in number of <i>Vibrio</i> spp. ....	168
Fig. 4-27. Changes in WSSV infection rate of <i>F. chinensis</i> .....	170
Fig. 4-28. Changes in HPV infection rate of <i>F. chinensis</i> .....	170
Fig. 4-29. Changes of water temperature in ponds 1 and 2 .....	172
Fig. 4-30. Changes of dissolved oxygen concentration in ponds 1 and 2 .....	173
Fig. 4-31. Changes of salinity in ponds 1 and 2 .....	173
Fig. 4-32. Changes of pH in ponds 1 and 2 .....	174
Fig. 4-33. Changes of alkalinity in ponds 1 and 2 .....	174
Fig. 4-34. Changes of water temperature successively monitored for three weeks with 30 min. interval in pond 1 (Jul. 7 to Aug. 17, 2005) .....	176

Fig. 4-35. Changes of dissolved oxygen concentration successively monitored for three weeks with 30 min. interval in pond 1 (Jul. 7 to Aug. 17, 2005) .....	176
Fig. 4-36. Changes of pH successively monitored for three weeks with 30 min. interval in pond 1 (Jul. 7 to Aug. 17, 2005) .....	177
Fig. 4-37. Changes of salinity successively monitored for three weeks with 30 min. interval in pond 1 (Jul. 7 to Aug. 17, 2005) .....	177
Fig. 4-38. Daily change of water temperature in pond 1 (monitored interval, 30 min.; Jul. 7, 2005) .....	179
Fig. 4-39. Daily change of dissolved oxygen concentration in pond 1 (monitored interval, 30 min.; Jul. 7, 2005) .....	179
Fig. 4-40. Daily change of pH in pond 1 (monitored interval, 30 min.; Jul. 7, 2005) ..	180
Fig. 4-41. Daily change of salinity in pond 1 (monitored interval, 30 min.; Jul. 7, 2005) .....	180
Fig. 4-42. Changes of TAN (total ammonia nitrogen) concentration in ponds 1 and 2 .....	182
Fig. 4-43. Changes of nitrite concentration in ponds 1 and 2 .....	182
Fig. 4-44. Changes of nitrate concentration in ponds 1 and 2 .....	183
Fig. 4-45. Changes of total <i>Vibrio</i> number in ponds 1 and 2 .....	185
Fig. 4-46. Changes of total bacterial number in ponds 1 and 2 .....	185
Fig. 4-47. Stalked protozoans ( <i>Zoothamnium</i> sp.) attached on gill lamellae of shrimp (X100) .....	187
Fig. 4-48. Electrophoresis photograph of the 1st duplex PCR product detecting for HPV and WSSV .....	190
Fig. 4-49. Electrophoresis photograph of the 2nd PCR product detecting WSSV .....	190
Fig. 4-50. Electrophoresis photograph of PCR product detecting IHHNV .....	190
Fig. 4-51. White spot on carapace .....	191
Fig. 4-52. Microscopic photo of white spots on carapace (X100) .....	191
Fig. 4-53. Changes of total body length of shrimp in ponds 1 and 2 .....	193
Fig. 4-54. Changes of body weight of shrimp in ponds 1 and 2 .....	194

# 목 차

표목차 .....	16
그림목차 .....	19
제 1 장 서 론 .....	31
제 2 장 새우양식장의 환경 모니터링 및 생물생태 .....	33
제 1 절 서 론 .....	33
제 2 절 재료 및 방법 .....	33
1. 새우양식장 환경 및 생물생태학적 요인 .....	33
가. 새우양식장 환경요인 조사 .....	33
나. 새우양식장 생물상 조사 .....	34
다. 새우양식장 병원성 미생물상 조사 .....	35
2. 새우양식장에 서식하는 곤쟁이의 개체군 역학 .....	35
가. 양식장 내 서식하는 곤쟁이의 채집과 환경 요인분석 .....	35
나. 성비와 개체군의 구조 .....	35
다. 군성숙도 (Size at sexual maturity) .....	36
라. 포란수 .....	36
마. 성장과 사망 및 가입유형 .....	36
바. 상대성장 .....	37
제 3 절 결과 및 고찰 .....	38
1. 새우양식장 환경 및 생물생태학적 요인 .....	38
가. 새우양식장 환경요인 조사 .....	38
나. 새우양식장 생물상 조사 .....	41
다. 새우양식장 병원성 미생물상 조사 .....	44
2. 새우양식장에 서식하는 곤쟁이의 개체군 역학 .....	45
가. 양식장 내 서식하는 곤쟁이의 채집과 환경 요인분석 .....	45
나. 성비와 개체군의 구조 .....	46
다. 군성숙도 (Size at sexual maturity) .....	48
라. 포란수 .....	49
마. 성장과 사망 및 가입유형 .....	52
바. 상대성장 .....	55
제 3 장 미생물에 의한 새우양식장 환경정화 및 미생물 제제 개발 .....	58
제 1 절 서 론 .....	58
제 2 절 재료 및 방법 .....	58
1. 새우양식장 유용 및 유해세균 검색 .....	58
가. 세균 집락의 생성과 분포 .....	58
나. 분리 세균의 형태학적 및 생리학적 특징 .....	58
다. 분리 세균의 동정 .....	59
2. 미생물에 의한 새우 양식장 환경정화: 미생물학적 질소 및 인 제거 .....	59

가. 세균의 분리 및 배양 .....	59
나. 분리 세균의 형태학적 관찰 및 생리 화학적 특성 조사 .....	59
다. 분리 세균의 동정 .....	60
라. 질소와 인 측정 .....	60
3. 새우 양식장에서 양식사료에 의한 오염환경의 미생물학적 제거 .....	61
가. 양식 사료로부터 용출되는 질소와 인 측정 .....	61
나. 분리 세균에 의한 질소와 인 제거 측정 .....	61
다. 양식사료의 당분석 .....	62
4. 새우 양식장에서 분리된 세균의 유용성 탐색 .....	62
가. 유산균의 분리 및 배양 조건 .....	62
나. 유산균의 형태학적 및 생리학적 특징 .....	62
다. 유산균의 동정 .....	62
라. 유산균에 의한 질소 제거 .....	63
마. 항균 스펙트럼 조사 .....	63
바. 농축 배양상등액에 대한 병원성 세균의 살균율 측정 .....	63
사. 유산균의 성장과 유기산 측정 .....	63
아. HPLC에 의한 유기산의 분석 .....	64
자. GC-MS에 의한 유기산의 분석 .....	64
차. 주사전자현미경을 이용한 세포 외부형태 관찰 .....	64
카. 항균물질의 생성 확인 .....	65
타. RP-HPLC에 의한 항균물질의 확인 .....	65
파. Ultrasensitive radial diffusion assay .....	66
하. Tricine SDS-PAGE .....	66
5. 새우 양식장 환경 정화를 위한 제제 개발 .....	66
가. 미생물제제의 생산 .....	66
나. 미생물제제를 이용한 수조에서의 질소/인의 제거 .....	67
제 3 절 결과 및 고찰 .....	67
1. 새우양식장 유용 및 유해세균 검색 .....	67
가. 분리 세균 집락의 특성 .....	67
나. 분리 세균의 형태학적 및 생리학적 특성 .....	68
다. 분리 세균의 동정 .....	77
2. 미생물에 의한 새우 양식장 환경정화: 미생물학적 질소 및 인 제거 .....	91
가. 세균의 분리 .....	91
나. 분리 세균의 형태학적 관찰 및 생리 화학적 특성 .....	91
다. 분리 세균의 동정 .....	93
라. 분리 세균의 성장과 pH 변화 .....	96
마. 분리 세균의 $\text{NH}_4^+$ 의 제거 .....	98
바. 분리 세균에 의한 $\text{NO}_2^-$ 의 제거 .....	98
사. 분리 균주에 의한 $\text{NO}_3^-$ 의 제거 .....	99
아. 분리 균주에 의한 $\text{PO}_4^{3-}$ 의 제거 .....	100
자. 혼합배양에 의한 질소 및 인의 동시 제거 .....	101
3. 새우 양식장에서 양식사료에 의한 오염환경의 미생물학적 제거 .....	102
가. 양식 사료에서 질소와 인의 용출 .....	102

나. 양식 사료로부터 질소와 인의 미생물학적 제거 .....	102
다. 양식 사료의 당분석 .....	105
4. 새우 양식장에서 분리된 세균의 유용성 탐색 .....	106
가. 유산균의 분리 .....	106
나. 유산균의 형태학적 관찰 및 생리 화학적 특성 .....	106
다. 유산균의 동정 .....	106
라. 유산균에 의한 질소 제거 .....	111
마. 항균 스펙트럼 .....	112
바. 농축 배양상등액에 대한 병원성 세균의 살균율 .....	113
사. 유산균의 생장 및 측정 .....	119
아. HPLC에 의한 유기산 분석 .....	120
자. GC-MS 분석 .....	121
차. 주사전자현미경에 의한 농축 배양상등액 노출 세균의 관찰 .....	122
카. 항균물질의 생성 확인 .....	125
타. RP-HPLC .....	126
파. Ultrasensitive radial diffusion assay .....	127
하. Tricine SDS-PAGE .....	127
5. 새우 양식장 환경 정화를 위한 제제 개발 .....	128
가. 미생물제제의 생산 .....	128
나. 양식사료에서 유래하는 질소와 인의 제거 .....	130
다. 수조에서의 세균 생장과 pH 변화 .....	130
라. 12 L 수조에서 미생물제제 투여에 따른 혼탁도 변화 .....	132
마. 12 L 수조에서 미생물제제에 의한 양식사료로부터 질소/인 제거 .....	132
제 4 장 Probiotics를 이용한 새우양식장 수질개선 및 질병억제 .....	134
제 1 절 서론 .....	134
제 2 절 재료 및 방법 .....	134
1. 수질변화에 미치는 probiotics의 효과 시험 .....	134
가. 시험에 사용된 probiotic bacteria의 균주 .....	134
나. 새우의 사육 .....	135
다. 유익세균 (Probiotics) 처리 .....	135
라. 수질분석 .....	135
2. 새우양식장의 양식생태 조사 .....	136
가. 새우양식장 수질 환경 조사 .....	136
나. 새우양식장 질병 감염실태 조사 .....	136
3. Probiotics를 이용한 새우양식장 수질개선 및 질병억제 효과조사 .....	136
가. 시험양식장 선정 및 준비 .....	136
나. 종묘입식 및 사육관리 .....	137
다. 사육수 수질개선을 위한 처리 .....	137
라. 새우 표본조사 및 사육수 샘플링 .....	137
4. 사육수 수질, 세균상 및 양식새우 질병 분석 .....	137
가. 수질환경 조사 및 수질분석 .....	137
나. 사육수 총세균수 조사 .....	138

다. 양식새우의 질병분석 .....	138
제 3 절 결과 및 고찰 .....	139
1. 수질변화에 미치는 probiotics의 효과 시험 .....	139
가. 해수 내 유익세균의 성장도 분석 .....	139
나. 유익세균에 의한 새우 사육수의 수질개선 효과 .....	142
다. 유익세균에 의한 유생 사육수의 수질개선 효과 .....	148
라. 대형수조에서의 치하 사육시 유익세균에 의한 수질개선 효과 비교 .....	157
마. 대형수조에서의 성체 사육시 유익세균에 의한 수질개선 효과 비교 .....	159
바. 성체 사육시 혼합유익세균에 의한 수질개선 효과 비교 .....	161
2. 새우양식장의 양식생태 조사 .....	163
가. 새우양식장 수질환경 조사 .....	163
나. 새우양식장 질병 감염실태 조사 .....	169
3. Probiotics를 이용한 새우양식장 수질개선 및 질병억제 효과시험 .....	171
가. 새우양식장 수질환경 조사 .....	171
나. 사육수 수질에 미치는 유익세균의 효과 조사 .....	181
다. 새우의 질병감염율 변화 .....	186
라. 새우의 생산성 및 성장률 비교 .....	192
제 5 장 목표달성도 및 기대효과 .....	196
제 1 절 연도별 연구개발 목표 및 달성도 .....	196
제 2 절 기대효과 .....	199
제 6 장 연구개발 결과의 활용계획 .....	200
제 1 절 활용방안 .....	200
제 2 절 연구성과 활용 .....	200
제 3 절 활용계획 .....	204
제 7 장 참고문헌 .....	206

# 제 1 장 서 론

Probiotics는 그리스어에서 유래한 말로, 1965년 Lilly와 Stillwell에 의해 처음으로 사용되었고, 미생물 연구의 발전과 함께 그 의미도 변화해 왔다. Probiotics의 현대적 개념은 1974년 Parker에 의해 장내 미생물의 균형에 도움을 주는 물질 또는 미생물로 소개되었고, 1989년 Fuller는 사람 또는 동물에 대해 장내 균총의 성질을 개선시켜 숙주에게 유익한 효과를 주는 살아있는 미생물의 단독 또는 혼합 배양물로서 숙주에 대해 유익한 효과를 주는 생균제제라는 정의를 통해 현대적 개념을 정립하였다 (Kaur et al., 2002; Gatesoupe, 1999; Fuller, 1989).

Probiotics는 장내 균총의 안정화, 유해세균의 정착 억제에 따른 부패산물 생성 감소 및 질병 예방, 면역 활성화 작용, 백신 조절 작용, 설사 치료 및 예방, 항암작용, 항바이러스 효과, 항균활성 효과, 콜레스테롤 저하, 유당불내증의 경감, 식중독 예방 등의 기능을 갖고 있는 것으로 알려져 있다 (Hirayama and Rafter, 2000; Yoon et al., 1998; Saavedra, 2001). 이러한 이점들이 확대되면서 기능성 제품으로 probiotics를 이용하려는 연구가 활발하게 이루어지고 있다. Probiotics에 의해 생산되는 기능성 제품으로는 발효유, 건강식품, 유산균 정장제, 동물 약품 등이 알려지고 있다 (Saavedra, 2001; Ger et al., 2005). Probiotics로 이용되는 미생물은 *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* 그리고 *Bifidobacterium* 등이 있으며, 이들 가운데 가장 많이 이용되고 있는 대표적인 미생물은 *Lactobacillus*와 *Bifidobacterium*로 유산균 (lactic acid bacteria)을 이용한 연구가 활발하게 이루어지고 있다 (Chung et al., 2003; Kim et al., 1994). Pool-Zobel et al., 1996은 쥐를 대상으로 단일세포 (single cell) 수준에서 유전자독성 (genotoxic) 효과를 측정하는 comet assay 방법을 통하여 probiotics 후보 균주인 *Lactobacillus acidophilus*, *L. Gasseri*, *L. confusus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium breve*, 그리고 *B. longum* 등은 N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)와 1,2-dimethylhydrazine (DMH) 물질에 의해 DNA가 손상되지 않도록 하는 유전독성억제 효과 (antigenotoxic effect)를 나타내는 것을 확인하였다. Zamfir et al., 2000은 낙농제품으로부터 분리된 *Lactobacillus acidophilus* IBB 801이 항균물질인 acidophilin 801을 생산하고 병원성 세균인 *Escherichia coli*와 *Salmonella* sp.의 성장을 억제한다고 보고하였다.

Probiotic는 주로 인간과 육상 가축을 대상으로 사용되어져 왔으나 최근에는 해양생물의 양식 산업에까지 이용하게 되었다. 즉 수질의 개선에 의한 생물학적 구제 혹은 병원균에 대한 항균작용으로 생물학적 조절을 하는 미생물에 대한 충칭으로 probiotics의 이용범위가 넓혀지게 되었다 (Gatesoupe, 1999; Ringo and Gatesoupe, 1998). 수산 양식 산업에서 probiotics를 처음으로 도입한 사람은 Kozasa, 1986로 알려져 있고, 그의 연구에서 토양으로부터 분리한 *Bacillus toyoi*는 *Edwardsiella* sp.에 감염된 뱀장어의 폐사를 줄일 수 있다고 보고하였다. 그 후 probiotics는 식물먹이생물, 어류, 패류, 및 새우류 등 수산양식의 거의 모든 분야에 걸쳐 사용 효과가 보고되어지고 있다 (Lim, 2004).

우리나라의 새우 양식은 1970년대와 80년대에 종묘생산과 양식이 동시에 시작되어 발달하였으며, 1993년 이후로 새우의 생산량은 연도별로 기복이 심할 뿐만 아니라 연안환경, 먹이생물, 적절한 수질환경 관리 및 바이러스 질병 등의 문제로 인해 유희 해수 호지가 매년 늘어나고 있는 추세이며, 특히 단위 면적당 생산량은 감소하고 있다 (해양수산부, 2000).



새우양식은 연간 3천톤 이상이 생산되는 서해안 주요 양식산업 품종으로 자리잡고 있지만 해마다 바이러스를 비롯한 각종 세균성 질병으로 인하여 막대한 경제적 손실을 입고 있는 실정이다. 양식새우의 질병발생을 억제하고 양식생산성을 회복시키기 위해서는 축제식 양식장의 수질환경을 개선시킬 수 있는 생물학적 기술의 개발이 필요하다. 특히 대하양식은 1968년 종묘 생산에 대한 연구를 시점으로 많은 연구가 되어 왔으나, 양식장의 환경관리에 관한 연구는 미비한 실정이다.

새우 양식의 성패는 환경관리에 있다고도 볼 수 있을 정도로 환경의 관리가 아주 중요하다. 특히 양식장의 자체오염은 가장 심각한 문제이다. 또한 양식장을 장기간 사용할수록 밑바닥에 오염물이 점차 누적되어 자가오염이 날로 심해진다. 자가오염의 다른 원인은 양식기술 문제로 사료의 질, 영양가 배합의 불합리, 사료를 주는 방법, 시간과 주기의 불합리를 들 수 있다.

최근에 와서 새우류 양식과 환경과의 관계를 규명하기 위한 연구들을 보면 주로 수온, 염분, 용존산소와 같은 일반적인 수질환경에 영향을 주는 요인에 한정되어 있는 것을 볼 수 있다 (Chen, 1990; Liao and Chien, 1990; Yang, 1990; Chen and Kou, 1992; Chen and Lin, 1991).

본 연구는 “Probiotic을 이용한 대하새우 양식장 환경개선 및 생산성 향상기술개발”이라는 제목으로 수질환경과 질병으로 인하여 생산성이 저하된 우리나라 새우양식장의 환경 개선 및 생산성 향상에 그 목적이 있다. 특히 이를 위해서 새우 양식장의 지속적인 환경 모니터링과 생태계의 분석이 필수적이며, 미소생태계인 세균과 기타 미생물의 보다 정확한 분석과 현황과악 역시 중요한 항목이다. 특히 본 연구에서는 양식장과 새우양식장에 서식하는 유용세균을 분리 검색하여 양식장 환경 개선과 질병을 예방 및 면역을 강화 시킬 수 있는 Probiotant를 개발하였다.

Probiotics는 양식장 수질환경을 개선할 수 있는 다양한 미생물 복합체로서 probiotics의 현장적용 실험을 통하여 이들의 수질개선 효과를 구명하고 양식새우의 생산성을 향상시킬 수 있는 환경친화적 양식기술을 확립하고자 본 연구를 수행하였다.

현재 사용되고 있는 유익세균제제는 대부분이 수입된 완제품이거나 세균의 원종을 수입하여 국내에서 생산된 제품이 대부분이다. 이들의 문제점은 우리나라 양식장환경에 맞지 않아 그 실효성과 경제성에 대해 어민들이 이의를 제기하고 있다. 따라서 본 연구는 우리나라 양식장에 서식하는 유익세균을 분리하여 그 제재를 개발하였으며, 실험결과 그 효과가 탁월한 것으로 판명되었다. 또한 현장에서 유익세균제제를 실험한 결과 또한 우수성이 인정되었다.

## 제 2 장 새우양식장의 환경 모니터링 및 생물생태

### 제 1 절 서 론

일반적으로 양식장의 수질환경에 영향을 주는 요인은 편의상 물리적 요인과 화학적 요인, 생물학적 요인으로 구별하고 있다. 물리적 요인은 수온, 수량, 물의 색깔과 투명도 등이며, 화학적 요인은 수중에 녹아있는 용존산소량(DO), 수소이온농도(pH), 염분, 경도, 대사노폐물(암모니아, 아질산염, 질산염 등) 등이 있다. 생물학적 요인은 양식지에 직접 또는 간접적으로 작용하는 각종 생물들인데, 양식장에 서식하고 있는 각종 플랑크톤, 세균, 동식물 등이 이에 해당된다. 이들 중 세균은 새우 양식장에 서식하는 유용 및 유해세균으로 동·식물플랑크톤은 대하의 초기 먹이로서 매우 중요한 위치에 있다. 그러나 아직도 이러한 세균과 환경을 동시에 연구하는 시도는 많이 이루어지지 않고 있는 실정이다.

따라서 본 장에서는 새우 양식장의 사육환경 요인에 관한 자료를 체계적으로 분석하여 환경악화로 인한 폐사, 질병의 발생, 성장의 저하, 품질의 악화 등을 극소화하며, 실제적으로 양식장 경영의 경비 절감과 소득의 안정적인 확보에 기여하는데 그 목적이 있다. 특히 양식장에 서식하는 주요 미소생태계 및 동, 식물플랑크톤이 환경에 미치는 종합적인 영향을 파악하여, 이들 중 주요 우점종의 분포 및 종조성 등의 파악을 통해 양식장의 기초적인 생태학적 특징도 규명하고자 하였다. 또한 본 연구에서는 새우의 양식관리상 파악해야 할 기초 환경요인은 어떠한 것이며 이러한 기초 환경요인들을 어떻게 파악하여 사육관리에 활용하느냐에 대해서도 연구 하였다.

### 제 2 절 재료 및 방법

#### 1. 새우양식장 환경 및 생물생태학적 요인

##### 가. 새우양식장 환경요인 조사

본 연구의 조사기간은 2003년 5월부터 10월까지 월 1회씩 조사하였으며, 조사장소는 충남 태안군 순천향대학교 부설 해양수산연구소 새우양식장(면적 10,000 m<sup>2</sup>, 북위 36° 40', 동경 126° 18')이었다.

##### (1) 수온, 염분 및 용존산소 측정

조사항목은 DO, 수온, pH, 염도, 탁도, 수질(NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N, PO<sub>4</sub>-P)을 측정하였으며, 환경적 요인 분석을 위해 시료채집 시 연안수의 시료채집은 양식장으로 유입되는 수문 근처에서 채집하였으며, 채집장소와 인근연안의 거리는 20 m 정도이며 조석의 차로 인하여 문의 근처까지 해수가 유입되는 시기에 조사하였다. 새우양식장은 해수의 유동이 적은 곳으로 양식장으로 유입되는 해수의 유입 흐름은 인근연안에서 수문을 통하여 유입된 후, 저수지에서 저장된 후 각 호지로 유입된다. 따라서 각 정점에서 매회 시료를 채집 후 측정하며 수온, 용존산소량, pH를 측정하였다.

## (2) 영양염 농도 측정

연안수 및 대하 새우양식장 수질환경 조사는 연안수를 대상으로 월2회 이상 채수하여 일반수질 ( $\text{NH}_4\text{-N}$ ,  $\text{NO}_2\text{-N}$ ,  $\text{NO}_3\text{-N}$ ,  $\text{PO}_4\text{-P}$ )과 영양염을 분석하고 양식장의 기본수질은 주별로 측정하였고 사육용수의 취수지점 부근 연안수와 실내수조 및 야외사육지를 대상으로 취수하여 실험실에서 일반수질과 영양염을 조사 분석하였다.

질소 농도의 측정은 새우양식장에서 채취한 물시료에 포함되어 있는 암모니아 질소 ( $\text{NH}_4\text{-N}$ ), 아질산 질소 ( $\text{NO}_2\text{-N}$ ), 질산 질소 ( $\text{NO}_3\text{-N}$ )의 농도를 결정하였다. 총 질소 (T-N)는 이들 농도를 합하여 결정하였다. 암모니아 질소는 새우 양식장에서 채취하여 여과한 물시료 2.5 ml를 취하여, 100 ul 페놀 용액과 100 ul sodium nitroprusside 용액을 첨가하였다. 여기에 100 ml alkaline citrate와 25 ml sodium hypochlorite solution을 혼합하여 만든 oxidizing solution을 250 ul 첨가하여 빛이 차단된 곳에서 1시간 동안 반응시킨 후, 흡광도 640 nm 에서 측정하여 미리 작성한 검량선을 이용하여 암모니아 질소의 양을 결정하였다. 아질산 질소는 여과된 물시료 5 ml를 취하여, 100 ul sulfalnylamide 용액 (0.5%, w/v) 섞고 5분간 방치한 다음, 100 ul *N*-(1-naphthyl) ethylenediamine 용액 (0.1% w/v)을 넣어 혼합하여 12분간 반응시킨 후, 흡광도 543 nm에서 측정하여 미리 작성한 검량선을 이용하여 아질산 질소의 양을 결정하였다.

질산 질소는 여과된 물시료 10 ml를 취하여, 2 ml sodium chloride 용액 (30%, w/v)과 진한 황산을 1/5 희석시킨 황산 10 ml를 넣어 세계 흔들어 냉각하였다. 여기에 0.5 ml brucine-sulfanylic acid 용액을 넣고 섞은 후, 95°C에서 20분간 가열반응 시켜, 즉시 얼음물에 담가 25°C까지 냉각하여, 흡광도 410 nm에서 측정하여 미리 작성한 검량선을 이용하여 질산 질소의 양을 결정하였다.

## 나. 새우양식장 생물상 조사

### (1) 식물 플랑크톤 조사

식물플랑크톤의 종조성 및 현존량 분석은 미세 조류의 검경을 위한 시료를 2000 ml sample 중 1000 ml은 현장에서 중성 Formaldehyde로 최종 농도가 약 3%로 고정하여 연구실로 운반하여 48시간 이상을 침전법에 의해서 시료를 침전시킨 후, 상층액을 가능한 siphon방식에 의하여 제거하고 남은 시료를 McAlice의 처리방법에 따라 처리한 후 Sedgewick-Rafter 침전법에 따라 200 ml로 농축시킨 후 S-R counting chamber를 사용하여 현미경 (CK2 Olympus)을 이용하여 (X200)에서 시료의 개체수를 계수 한다. 동정은 (X400~1,000)에서 실시하였다.

군집구명을 위하여 풍부도 지수 (Margalef 1958), 균등성 지수 (Pielou 1966), 그리고 우점도 지수 (McNaughton, 1968)를 사용. 정점간 다양도 지수는 (Shannon and Weaver 1949)

$$H' = -\sum pi \log pi$$
$$pi = ni / N$$

$pi$ 는 전체 출현종 중에서  $i$ 번째의 종이 차지하는 비율이며, 여기서  $N$ 은 단위체적당 총세포수,  $S$ 는 출현수,  $ni$ 는 출현조별 세포수로 규명하였다.

생물학적 요인 분석 클로로필a 측정은 새우양식장의 클로로필a량 변화를 조사하기 위하여

채취한 물시료 1 L를 pore size가 0.45  $\mu\text{m}$ 인 membrane filter (Pall-Gelman, East Hills, NY, USA)로 여과하였다. 50 ml 원심분리 튜브에 여과시킨 membrane filter와 90% 아세톤 10 ml를 튜브에 넣고 핀셋으로 membrane filter를 아세톤 용액에 잠기게 한 후, 튜브의 마개를 막고 4°C에서 24시간 방치하였으며, 이를 4,000 rpm에서 20분간 원심분리 하였다. 상등액을 석영 큐벳을 이용하여 630 nm, 645 nm, 663 nm, 750 nm에서 각각의 흡광도를 측정하였다. 이때 대조 블랭크는 90% 아세톤용액을 사용하였으며, Jeffrey (1976)의 계산식에 따라 클로로필a 양을 산출하였다.

## (2) 동물플랑크톤 조사

양식장내 해수호지의 동물성 부유생물은 정량적인 관찰을 위해 여수계를 부착한 변형 NORPAC net (망구 직경 45 cm; 망목 0.08 mm)를 사용하여 저층에서 표층까지 약 1 m/sec의 속도로 수직 채집하였다. 정성적인 연구를 위해서는 수평으로 무작위 채집하였다. 채집된 동물플랑크톤은 선상에서 즉시 중성 포르말린으로 고정한 후, 실험실에서 개체수를 측정하여 생물량을 구하였다. 동물플랑크톤은 해부 현미경하에서 각 분류군 별로 분류하였으며, 분할이 필요한 경우에는 Plankton sample splitter를 사용하여 1/2 내지 1/4로 분할하였다. 동물플랑크톤은 가능한 종수준까지 분류하고, 그렇지 못한 경우에는 상위 분류군 별로 묶어 분류, 계수한 다음 단위 수량당 개체수로 환산하였다.

## 다. 새우양식장 병원성 미생물상 조사

세균 집락의 생성과 분포는 새우양식장에서 채취한 물시료를 marine agar plate 상에 100  $\mu\text{l}$ 를 도말하여 37°C에서 2~3 일간 배양하여 생성된 집락을 계수하였다. 총 균수와 세균의 종류에 따른 집락의 형태와 색소의 형성, 그리고 집락의 분포에 대하여 관찰하였다.

## 2. 새우양식장에 서식하는 곤쟁이의 개체군 역학

### 가. 양식장 내 서식하는 곤쟁이의 채집과 환경 요인분석

본 연구의 재료인 곤쟁이 (*Neomysis japonica*)의 채집은 2002년 10월부터 2003년 9월까지 충남 태안군 남면 당암리에 소재한 순천향대학교 해양수산연구소 (북위 36° 40', 동경 126° 18')의 새우 양식장에서 주간에 월 1회씩 채집하였다.

채집에 사용된 net는 두 종류였는데 표준 채집망은 구경 50 cm, 길이 190 cm, 망목크기가 330  $\mu\text{m}$ 이며, hand net에 사용된 것은 구경 24.5 cm 망목크기가 50  $\mu\text{m}$ 이다. 채집 수심은 채집망이 살짝 가라앉을 정도로 하여 60~70 cm의 깊이에서 채집하였으며 hand net으로 채집시에는 수표면에서부터 70 cm 깊이에서 채집하였다. 채집된 표본은 즉시 10%의 중성 포르말린으로 고정하여 24시간 후에 75% 알콜로 재고정한 후 분석에 사용하였다.

### 나. 성비와 개체군의 구조

곤쟁이의 성 구분은 선별된 개체를 무작위 추출하여 제 2 배다리의 교접각 (penis) 유무와 복난엽 (oostegite) 유무를 해부현미경 하에서 관찰하여 구분했으며, 월별 성비는 무작위 추출한 개체에 대하여 암·수를 구분한 후 수컷에 대한 암컷의 비율 (F/M)로 나타내었다. 채장은 표준채장으로써 쌍안입체현미경 (OLYMPUS SZX12)의 이미지 분석시스템 (Image analysis

software Version 4.5)을 이용하여 눈구멍기저에서 갑각의 정중선 뒷가장자리까지 짧은 거리인 갑각장 (Carapace Length : CL)을 0.001 mm까지 측정하였다.

다. 군성숙도 (Size at sexual maturity)

곤쟁이의 군성숙도의 성숙한 암컷의 판단은 전체 암컷 중 포란한 암컷을 판단하고 성숙한 암컷의 비를 각 체장 계급별로 다음과 같은 로지스틱 방정식에 의해 추정하였다 (Campbell, 1985).

$$P = \frac{1}{[1 + \exp(a + bCL)]}$$

여기에서  $P$ 는 성숙비,  $a$ 와  $b$ 는 로지스틱 방정식의 상수,  $CL$ 은 갑각장을 나타낸다. 상수의 추정은 SYSTAT Version 10.0의 비선형 회귀분석 (nonlinear regression analysis)을 이용하였으며, 군성숙도 ( $CL_{50}$ )는 상수  $a$ 와  $b$ 의 비로써 구할 수 있다 ( $CL_{50} = |a/b|$ ).

라. 포란수

포란한 암컷으로부터 난을 분리하여 쌍안입체현미경 (OLYMPUS SZX12)을 이용하여 발달 정도에 따라 크게 3단계로 나누어 구분하였다. 즉 배 단계 (Embryonic stage), 노플리우스 단계 (Nauplioid stage) 그리고 노플리우스후 단계 (Postnauplioid stage)이다 (Ma, et al., 2002). 또한 난 단계별 체장에 대한 포란수를 회귀분석 하였다.

마. 성장과 사망 및 가입유형

개체군 성장 매개 변수의 체장빈도 분포는 암컷과 수컷 및 전체를 대상으로 체장을 0.25 mm 간격으로 나누고 각 체장계급에 대한 개체수로 표시하여 나타낸 월별 갑각장 빈도분포 자료를 이용하여 변형된 von Bertalanffy growth function (VBGF)에 의해 이루어졌으며 (Pitcher and MacDonald, 1973; Pauly and Gaschütz, 1979; Pauly et al., 1984), 이러한 분석과 성장 매개변수 ( $L_{\infty}$ ,  $K$ ,  $C$ ,  $WP$ )의 추정은 체장 빈도 분포 자료를 이용한 FiSAT II Version 1.0.0 프로그램의 ELEFAN을 이용하였다.

$$L_t = L_{\infty} \cdot [1 - \exp(-K(t - t_0) - (CK/2\pi)\sin(2\pi(t - t_s)))]$$

$L_t$ 는  $t$ 세의 갑각장,  $L_{\infty}$ 는 이론적인 최대 갑각장,  $K$ 는 성장계수  $t_0$ 는 체장이 0일 때의 연령,  $C$ 는 계절적인 변동요인의 강도를 나타내는 매개변수,  $t_s$ 는 WP (Wintering point; 일년 중 성장이 가장 느린 시기를 년에 대한 비로서 나타낸 값)에서 0.5를 뺀 값으로 구하였다. 성장곡선은 갑각장 빈도자료를 FiSAT II Version 1.0.0 프로그램의 ELEFAN의 비변수 추정방법 (Non-parametric method)을 이용하여 추정하였다. 암·수간의 성장을 비교하기 위해  $L_{\infty}$ 와  $K$ 값을 이용하여 Pauly and Munro (1984)의 방법에 따라 성장 비교지수 (Grown performances Index,  $\phi'$ )를 구하였다.

$$\phi' = \log_{10}K + 2 \cdot \log_{10}L_{\infty}$$

Z는 암·수 합친 자료 (pooled data)의 성장 매개변수 자료를 이용하여 어획물 곡선법으로 추정하였다. 순간 전사망계수는 성장 매개변수를 이용하여 채집망에 채집된 모든 체장 그룹들의 곡선에서 오른쪽으로 감소하는 부분을 회귀직선으로 나타내어 산출하였다. 회귀직선은  $\ln(\%N/\Delta t) = a+bt'$  로 나타내어지며, N은 상대적 연령 t'에 대한 개수이며,  $\Delta t$ 는 갑각장단위에서 성장에 필요한 시간을 나타낸다 (Pauly, 1983; 1984).

$$\ln\left[\frac{N(L_1, L_2)}{\Delta t(L_1, L_2)}\right] = C - Z\left[\frac{t(L_1) + t(L_2)}{2}\right]$$

여기에서 N은 체장 계급  $L_1$ 과  $L_2$  사이의 개체수,  $\Delta t$ 는 체장  $L_1$ 에서  $L_2$ 까지 성장하는데 걸리는 시간, t는 각 체장계급에서의 연령, C는 상수를 가리키며, 기울기인 Z가 순간전사망계수가 된다.

가입 갑각장 ( $l_b$ )은 갑각장 도수 분포에서 최소 갑각장 계급의 중앙치와 도수를 각각  $l_{\min}, f_{\min}$  최대 도수를 가진 갑각장 계급의 중앙치와 도수를 각각  $l_{\max}, f_{\max}$ 라 하면, 가입 갑각장  $l_b$ 는 다음과 같다.

$$l_b = \frac{l_{\min}f_{\min} + l_{\max}f_{\max}}{f_{\min} + f_{\max}}$$

가입유형은 von Bertalanffy 성장식과 성장 매개변수를 이용하여 추정하고 월별 갑각장 빈도분포도에서 연급군 모드의 최소 평균체장 그룹의 출현시기와 연관지어 해석하였다. 가입유형의 정규분포는 FiSAT II Version 1.0.0 프로그램의 NORMSEP (Hasselblad, 1966)을 이용하여 결정하였다.

#### 바. 상대성장

곤쟁이의 갑각장과 전장을 이용하여 상대성장에 대하여 조사하였다. 조사 기간에 채집한 곤쟁이의 체장은 표준체장으로써 쌍안입체현미경 (OLYMPUS SZX12)의 이미지 분석시스템 (Image analysis software Version 4.5)을 이용하여 눈구멍 기저에서 갑각의 정중선 뒷가장자리까지 짧은 거리인 갑각장 (Carapace Length : CL)과 미절의 끝인 전장 (Total Length : TL)까지를 0.001 mm까지 측정하였다. 체장과 전장을 회귀분석을 하고 기울기와 절편을 비교하기 위해서 공분산분석 (Analysis of Covariance: ANCOVA)을 이용하였다.

체장의 빈도분포의 차이는 Kolmogorov-Smirnov two-sample test로 검정하였다 (Sokal and Rohlf, 1995). 월별 성비 차이는 Chi-square test로 검정하였다. 암·수간의 갑각장 크기 비교는 ANOVA에 위배되었을 때는 비모수 검정 방법인 Mann-Whitney U-test와 Kruskal-Wallis test를 통해 평균에 대한 차이를 검정하였다. 갑각장과 포란수의 상관관계는 회귀분석을 하였으며 갑각장과 체장의 상관관계는 회귀분석 후 절편의 비교와 기울기의 비교를 공분산을 통하여 분석하였다. 이러한 모든 통계분석은 컴퓨터 프로그램인 MINITAB

Version 12.1과 SYSTAT Version 10.0 및 S-PLUS 2000을 이용하였다.

### 제 3 절 결과 및 고찰

#### 1. 새우양식장 환경 및 생물생태학적 요인

가. 새우양식장 환경요인 조사

(1) 수온, 염분 및 용존산소의 변화

조사기간 동안 수온의 범위는 23.8~33.1℃로 최고수온이 30℃를 넘었으나, 수온의 변화는 완만해서 대하의 성장과 생존에 적합하였다 (Fig. 2-1).

염분은 17.5~31.2 ppt로 변화의 폭이 심하게 나타났는데, 6월말 이후 장마와 강우가 계속되었기 때문이며, 강우 후에도 저수된 바닷물의 교환없이 계속 유지하므로 염분이 강우에 따른 영향을 많이 받는 것으로 조사되었으나 대하의 성장에 영향을 미칠 정도는 아니었다. (Fig. 2-2).

용존산소는 5.08~8.22 ppm의 범위를 나타내었다. 이와 같은 수치는 새우의 생존에 영향을 미칠 정도로 낮은 수치를 나타내지는 않았다. 7월 말경에 용존산소가 8.22 ppm으로 다소 높은 수치를 나타내었는데, 이는 식물플랑크톤의 증식에 의한 것으로 추정된다 (Fig. 2-3).

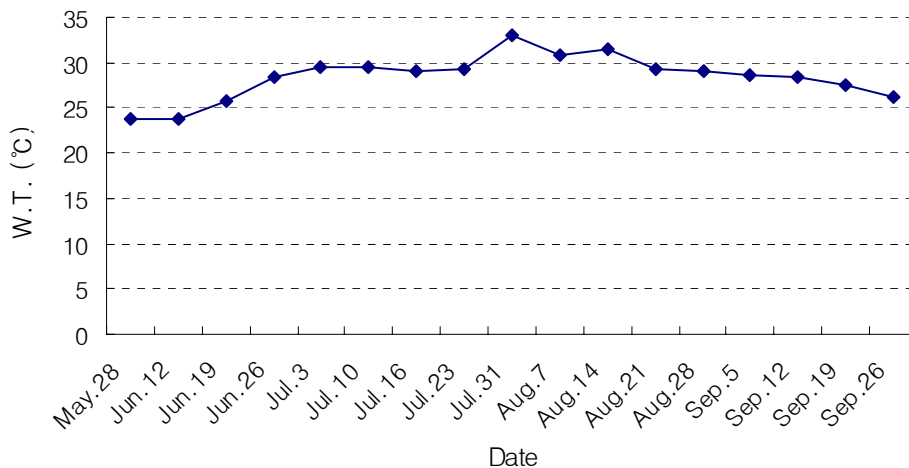


Fig. 2-1. Changes of water temperature during investigation period

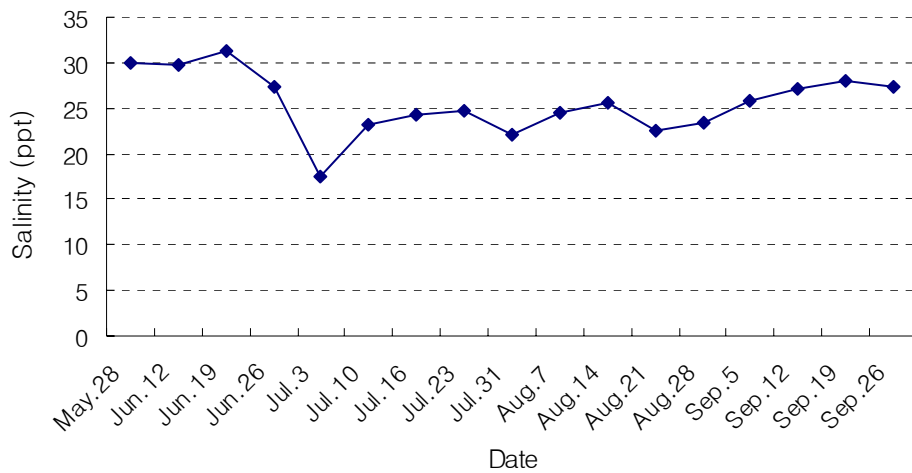


Fig. 2-2. Changes of water salinity during investigation period

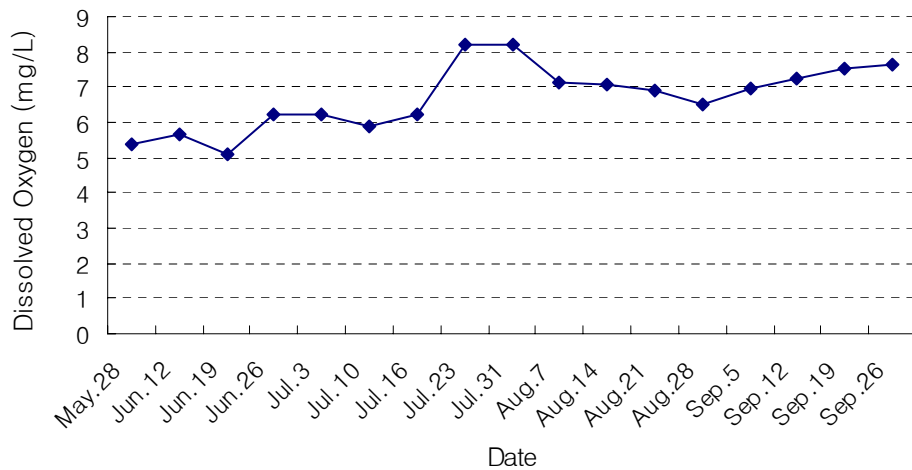


Fig. 2-3. Changes of dissolved oxygen (mg/L) during investigation period

(2) 영양염 농도의 변화

질소 농도는 암모니아 질소, 아질산 질소, 질산 질소를 각각 측정하였다. 조사시기는 5월 28일부터 9월 26일 동안 17회에 걸쳐 실시되었다.  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 의 농도는 0.024~0.034 mg/l의 범위였으며 (Fig. 2-4),  $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 의 농도는 0.003~0.020 mg/l (Fig. 2-5). 또한  $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 의 농도도 0.004~0.009 mg/l의 수치를 나타내었다 (Fig. 2-6).

양식장 내의 아질산은 최초 조사 시에 0.005 mg/l에서 0.020 mg/l로 증가하는 것이 관찰되었으나, 암모니아 질소와 질산 질소는 다소 감소하였다. 그러나 총 질소의 양은 비교적 일정하게 유지되었다.



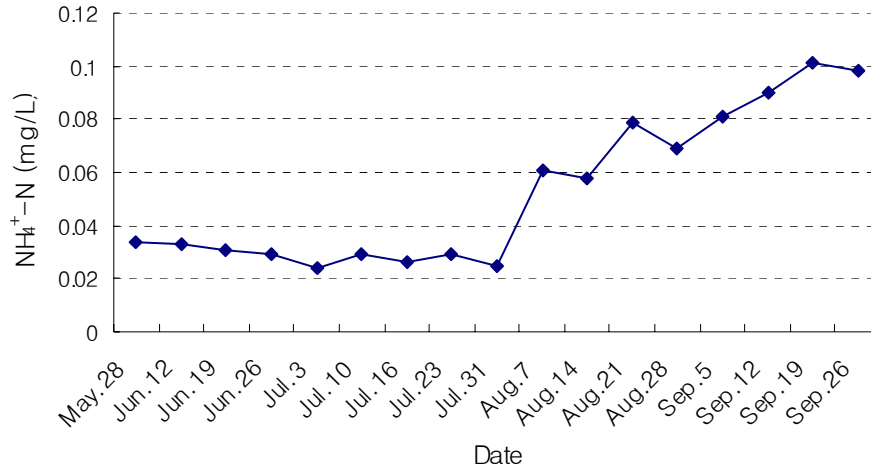


Fig. 2-4. Changes of  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  (mg/L) during investigation period

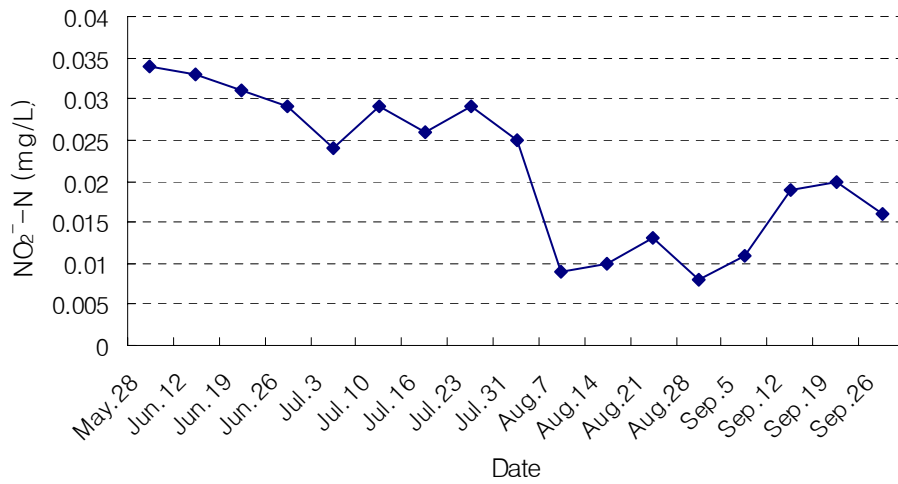


Fig. 2-5. Changes of  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  (mg/L) during investigation period

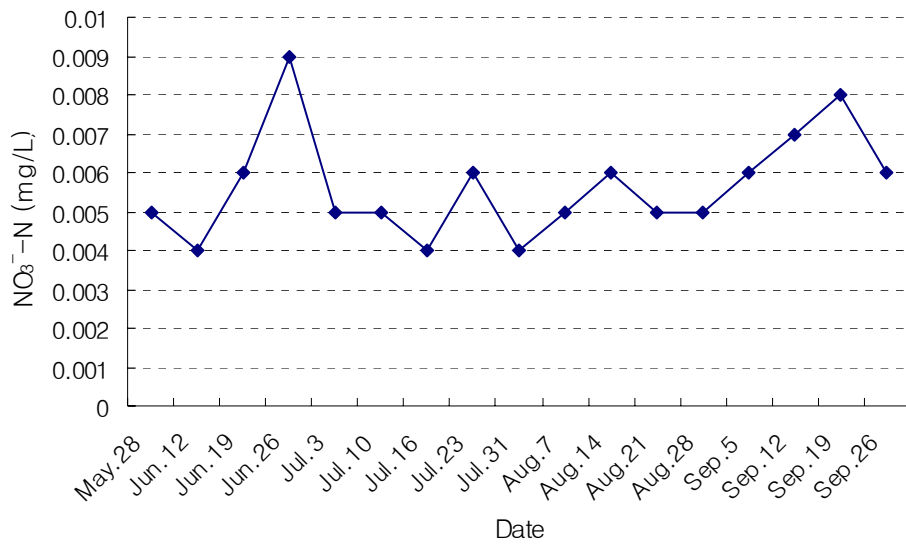


Fig. 2-6. Changes NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N (mg/L) during investigation period

나. 새우양식장 생물상 조사

(1) 클로로필a 측정

새우양식장에서 조류의 증식상태를 알아보기 위하여 클로로필a의 양을 측정하였다. 클로로필a는 실험기간 중에 채취된 시료에서 비교적 일정하게 유지되었다. 클로로필a의 농도는 양식장의 수질에서 질소와 인의 양과 밀접한 관련이 있다. 새우양식장의 시료에 포함된 클로로필a 농도는 Table 2-1과 Fig. 2-7에 나타나 있다.

Table 2-1. Chlorophyll a variation picking periods of shrimp culture pond waters (ug/m<sup>3</sup>)

물시료	채취일자	Chlorophyll a	비고
1	May 28, 2003	0.002	
2	June 12, 2003	0.003	
3	June 19, 2003	0.003	
4	June 26, 2003	0.002	
5	July 3, 2003	0.009	
6	July 10, 2003	0.018	
7	July 16, 2003	0.006	
8	July 23, 2003	0.004	
9	July 31, 2003	0.007	
10	August 7, 2003	0.009	
11	August 14, 2003	0.008	
12	August 21, 2003	0.01	
13	August 28, 2003	0.012	
14	September 5, 2003	0.009	
15	September 12, 2003	0.015	
16	September 19, 2003	0.02	
17	September 26, 2003	0.013	

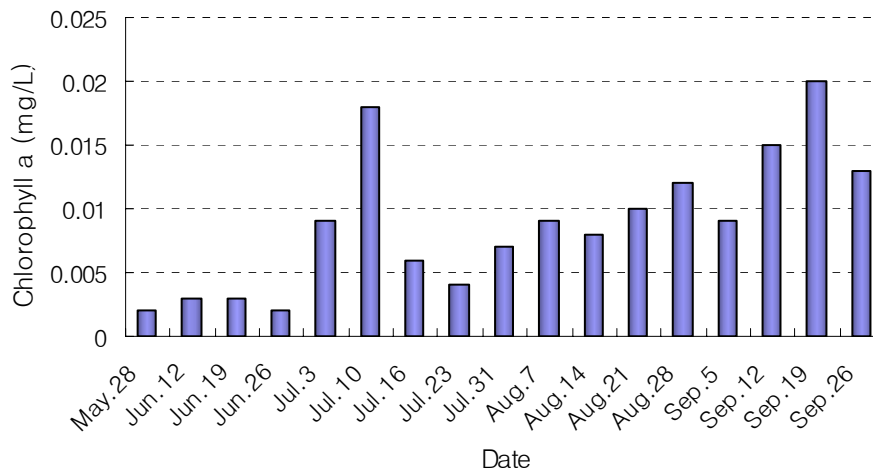


Fig. 2-7. Variation of Chlorophyll a in shrimp culture pond

(2) 동물플랑크톤의 종조성 및 개체밀도

조사기간 동안 호지내에 출현한 동물성 부유생물의 종 수와 출현개체밀도를 보면 (Table

2-2), 총 11종, 59,399 ind./m<sup>3</sup>로 나타났다.

주요 우점종과 그들의 출현 밀도를 살펴보면, 호지별 출현밀도를 보면 (Fig. 2-8), *Farella* sp.가 222,099 ind./m<sup>3</sup>로 가장 우점적이었으며, 그다음이 야광충인 *Noctiluca scintillans*가 154,273 ind./m<sup>3</sup> 출현하였다.

Table 2-2. Species composition of zooplankton in shrimp culture pond

Species/Date	5월 2일	6월 8일	6월 21일	6월 29일	6월 30일	7월 10일	7월 16일	7월 23일	7월 31일	8월 7일	8월 14일	8월 21일	8월 28일	9월 5일	9월 12일	9월 19일	9월 26일
Spionidae larvae			*	*	*	*	*	*									
<i>Noctiluca scintillans</i>			*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			*	*
Gastropoda larvae							*	*	*								
<i>Sagitta crassa</i>		*	*				*	*			*		*	*	*	*	*
Copepodid larvae					*	*	*										
<i>Acartia hongii</i>	*		*	*	*	*	*	*	*	*							
<i>Centropages abdominalis</i>	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		*
<i>Eurytemora pacifica</i>	*						*										
<i>Labidocera rotunda</i>			*				*	*		*					*	*	
Harpacticoid copepoda	*		*	*	*	*	*	*	*		*			*	*	*	*

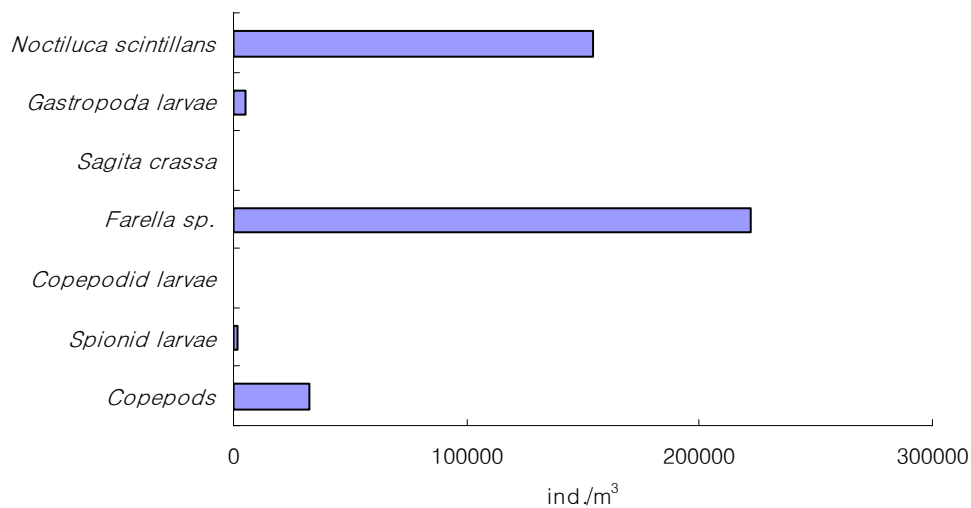


Fig. 2-8. Species density of zooplankton in shrimp culture pond.

다. 새우양식장 병원성 미생물상 조사  
(1) 새우양식장의 세균상 조사

태안 새우양식장에서 채집한 시료를 marine agar plate 상에 자라난 집락의 총 세균수를 계수하였으며, 집락의 분포와 형태, 그리고 각 세균의 색소 형성을 관찰하였다 (Table 2-3). 총 세균수의 변화추이는 Fig. 2-9에 나타나 있다. Fig. 2-10은 세균집락이 자란 marine agar plate 를 보여주고 있다.

Table 2-3. Total germ coefficient and distribution of shrimp culture pond free medical care (CFU/ml,  $\times 10^4$ )

물시료	조사일자	총세균수 ( $\times 10^4$ )	비고
1	May 28, 2003	1.53	사진 1A 참고
2	June 12, 2003	1.29	사진 1B 참고
3	June 19, 2003	1.72	
4	June 26, 2003	2.80	사진 1C 참고
5	July 3, 2003	3.90	사진 1D 참고
6	July 10, 2003	6.56	사진 1E 참고
7	July 16, 2003	6.48	사진 1F 참고
8	July 23, 2003	3.29	사진 1G 참고
9	July 31, 2003	3.02	사진 1H 참고
10	August 7, 2003	4.10	
11	August 14, 2003	4.25	
12	August 21, 2003	5.01	
13	August 28, 2003	5.39	
14	September 5, 2003	5.51	
15	September 12, 2003	4.98	
16	September 19, 2003	5.23	
17	September 26, 2003	5.56	

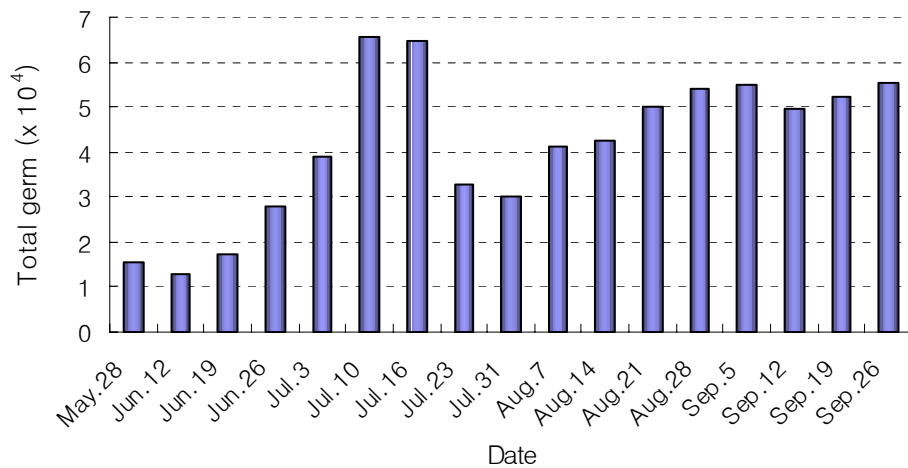


Fig. 2-9. Total germ coefficient and distribution of shrimp culture pond

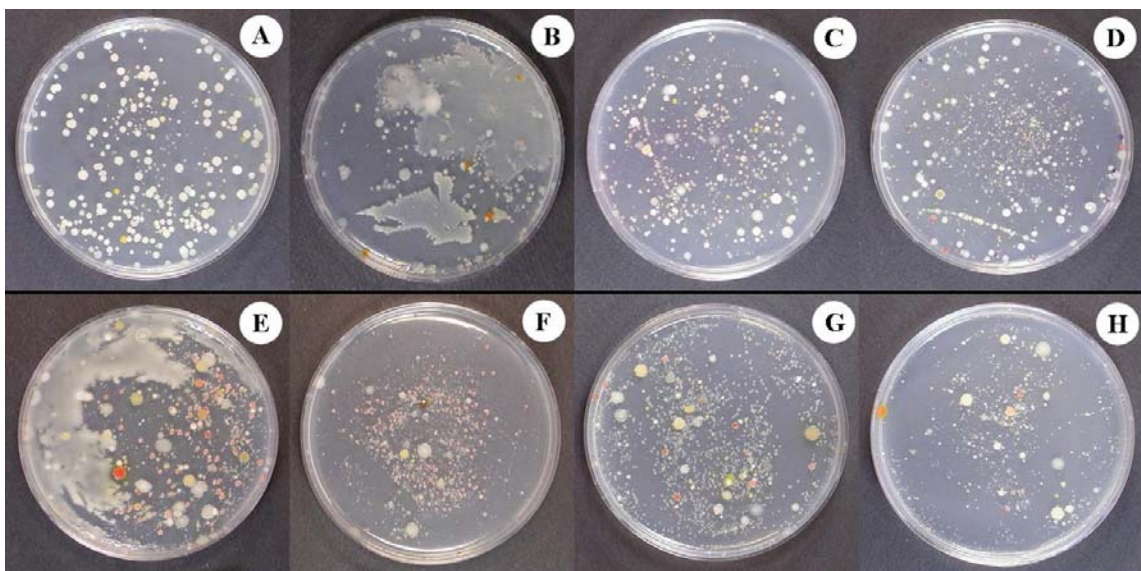


Fig. 2-10. The cluster photographs produced by free medical care smear 1: A, 2: B, 3: C, 4: D, 5: E, 6: F, 7: G, 8: H

## 2. 새우양식장에 서식하는 곤쟁이의 개체군 역학

### 가. 양식장 내 서식하는 곤쟁이의 채집과 환경 요인분석

조사기간 동안의 환경요인 변화를 살펴보면 수온은 2.4~30.8℃로 평균 16.32℃ (±9.86)의 변화를 나타내었으며, 1월에 2.4℃로 가장 낮았으며 7월에 30.8℃로 가장 높게 나타났다 (Fig. 2-11). 염분도는 16~35‰로 평균 27.23‰ (±6.17)이었으며, 8월에 16‰로 가장 낮게 나타났으며 11월에 30.59‰로 가장 높게 나타났다 (Fig. 2-11). 용존산소량은 4.89~6.94 mg/l로 3월에 4.89 mg/l로 가장 낮게 나타났으며 7월에 6.94 mg/L로 가장 높게 나타났고 평균 5.96 mg/l (±0.64)로 비교적 고른 수치를 나타냈다 (Fig. 2-12).

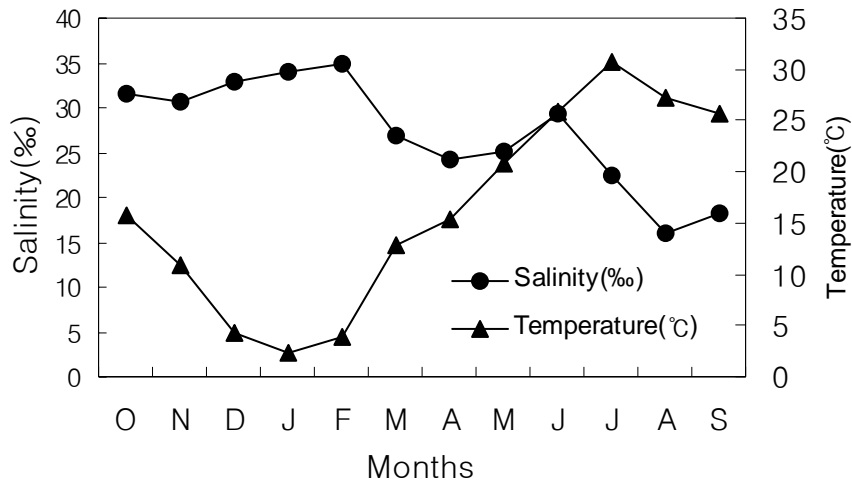


Fig. 2-11. Monthly variation of water temperature (▲) and salinity (●) from October 2002 to September 2003

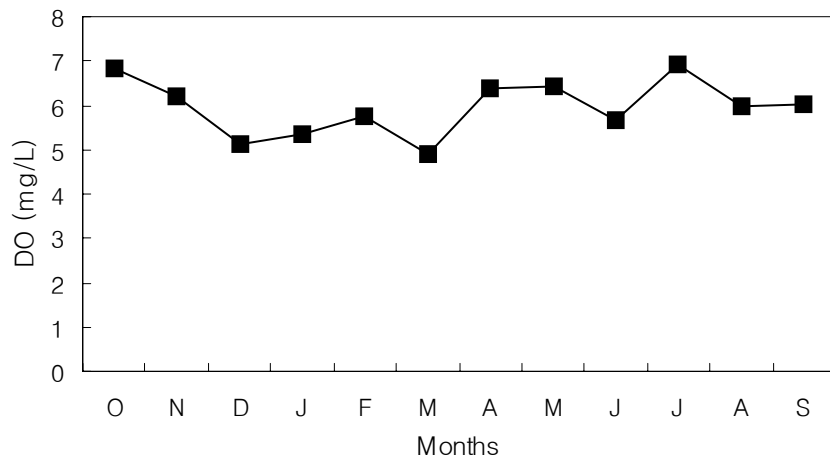


Fig. 2-12. Monthly variation of dissolved oxygen from October 2002 to September 2003

나. 성비와 개체군의 구조

곤쟁이의 성비는 조사기간 동안에 총 1,687개체 중 암컷이 969개체로 57.4%를 차지하였으며, 수컷이 718개체로 43.6%를 차지하여 암컷의 출현 비율이 수컷에 비하여 더 많이 출현하였다. 조사기간 동안 월별 성비는 2003년 3월에 2.43로 가장 높았으며, 2002년 10월에 0.90로 가장 낮게 나타났다. 2002년 10월을 제외하고 모든 기간동안 암컷이 수컷보다 더 많이 출현하였으며 (Fig. 2-13), 통계분석 결과 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다 ( $\chi^2 = 21.20$ ,  $df. = 11$ ,  $P < 0.05$ ).

조사기간 동안에 갑각장 범위는 암컷의 경우 1.04~5.08 mm였으며, 수컷의 경우 1.02~3.63 mm였다 (Fig. 2-14). 평균 갑각장 ( $\pm$ 표준편차)은 암컷이 2.31 ( $\pm 0.52$ ) mm이며, 수컷이 2.42 ( $\pm 0.48$ ) mm로 수컷개체가 암컷개체보다 평균 갑각장이 더 큰 것으로 나타났다. 조사기간 동안

곤쟁이의 암컷과 수컷의 체장 빈도 분포에 대한 통계분석 결과 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다 (Kolmogorov - Smirnov two-sample test ;  $d_{max} = 0.141$ ,  $P < 0.001$ ).

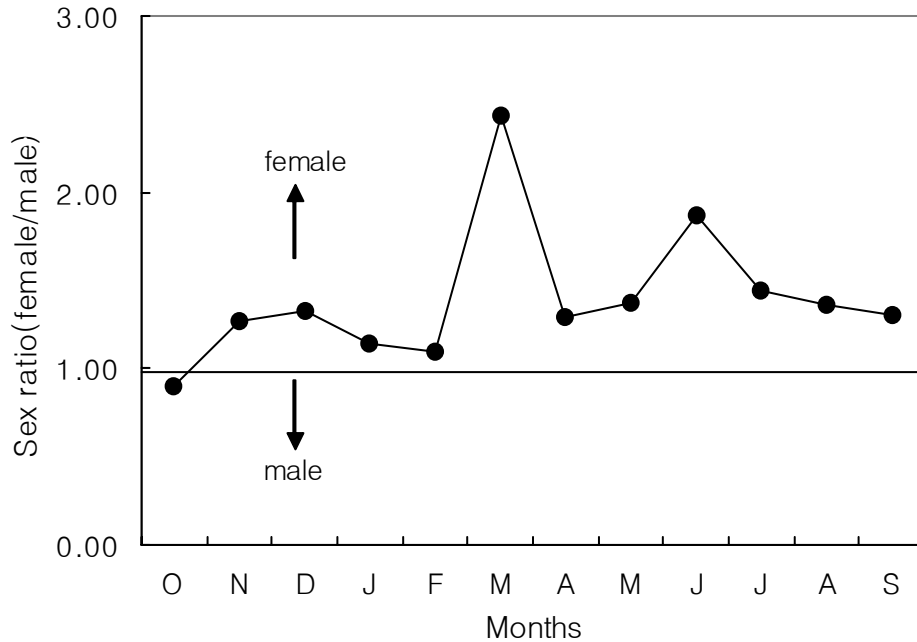


Fig. 2-13. Monthly variation in ratio of female/male in monthly samples of *Neomysis japonica*

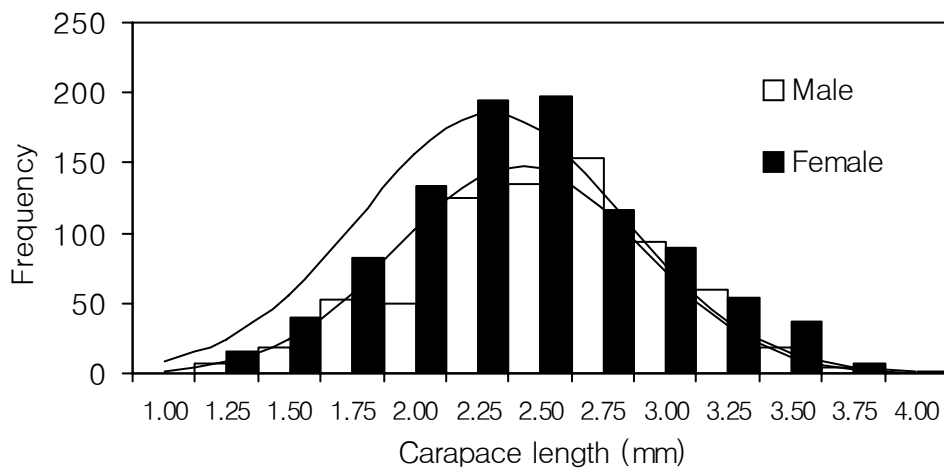


Fig. 2-14. Length-frequency distribution of male and female *Neomysis japonica* collected from October 2002 to September 2003



다. 균성숙도

곤쟁이는 갑각장 1.04~5.08 mm 범위에 있는 총 969개체의 암컷 중 201개체가 성숙한 개체인 것으로 나타났다. 갑각장과 성숙한 암컷의 비율간의 관계를 로지스틱 방정식을 이용하여 다음과 같은 방정식을 얻었다.

$$P = \frac{1}{[1 + \exp(3.385 - 0.755CL)]}$$

( $r^2=0.7211$ ,  $P<0.001$ )

위 식으로부터 추정된 50%가 성숙에 이르는 갑각장 ( $CL_{50}$ )은 4.483 mm로 나타났다 (Table 2-4, Fig. 2-15).

Table 2-4. Parameters for estimation of size at sexual maturity in female *Neomysis japonica* collected from October 2002 to september 2003.  $CL_{50}$  indicates a length at 50% sexual maturity

Equations and details	Species
Proportion mature( $P$ ) = $1/[1+\exp(a+bCL)]$	<i>Neomysis japonica</i>
$a$	3.34
$b$	-0.76
$CL_{50}$	4.48
$r^2$	0.721
$P$	<0.001

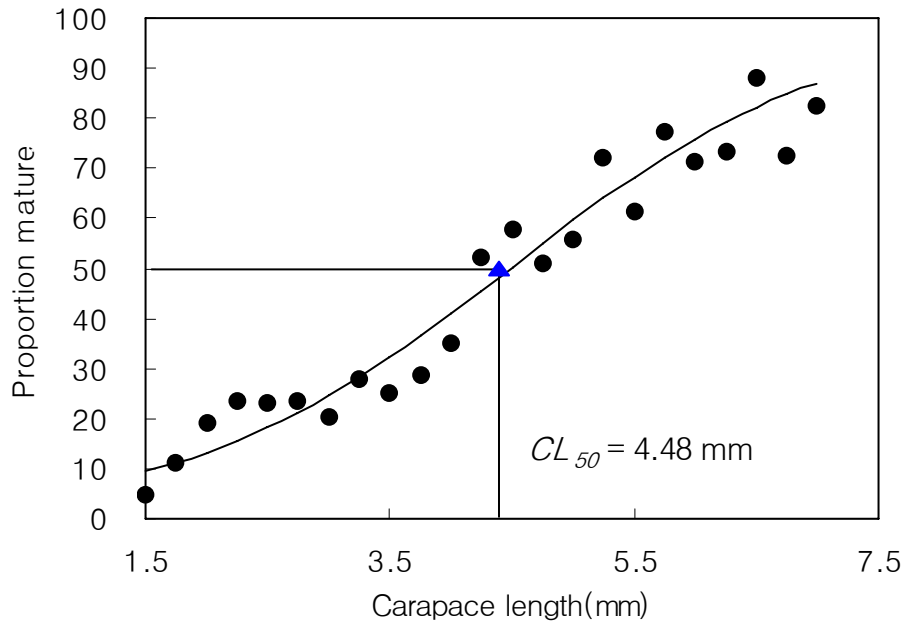


Fig. 2-15. A logistic function fitting proportion of mature females *Neomysis japonica* to carapace length.  $CL_{50}$  indicates a point corresponding to a proportion of 50%

라. 포란수

곤쟁이의 포란한 암컷 201개체를 관찰한 결과 최대 포란수는 3.54 mm에서 44개, 최소 포란수는 갑각장 1.70 mm에서 3개로 계수되었고, 평균 포란수 ( $\pm$ 표준편차)는 16.55 ( $\pm$ 9.19)개로 나타났다. 포란한 암컷개체의 포란 갑각장 범위는 1.70~3.54 mm였고, 평균 갑각장은 2.57 ( $\pm$ 0.49) mm로 나타났다. 갑각장과 포란수를 자연로그로 변환한 후 갑각장 (CL)에 대한 포란수 (EN)의 회귀분석 결과  $\ln EN = 0.654 \ln CL + 1.944$  ( $n=201$ ,  $r^2=0.06$ ,  $P<0.001$ )로 나타났다 (Fig. 2-16). 이 결과로 비추어 볼 때 계수값이 낮게 나오기는 했지만 유의한 관계가 있는 것으로 판단된다.

난 단계별 갑각장 (CL)과 포란수 (EN)의 상관관계식은 곤쟁이의 경우 배 단계 (embryonic stage)에서는 (Fig. 2-16):  $\ln EN = 0.434 \ln CL + 2.029$  ( $n=60$ ,  $r^2=0.02$ ,  $P<0.001$ )로 나타났고, 노플리우스 단계 (nauplioid stage)에서는 (Fig. 2-17):  $\ln EN = 0.073 \ln CL + 2.410$  ( $n=77$ ,  $r^2=0.002$ ,  $P<0.001$ )로 나타났고, 노플리우스 후 단계 (postnauplioid stage)에서는 (Fig. 2-17):  $\ln EN = 1.512 \ln CL + 1.240$  ( $n=64$ ,  $r^2=0.22$ ,  $P<0.001$ )로 나타났다 (Table 2-5).

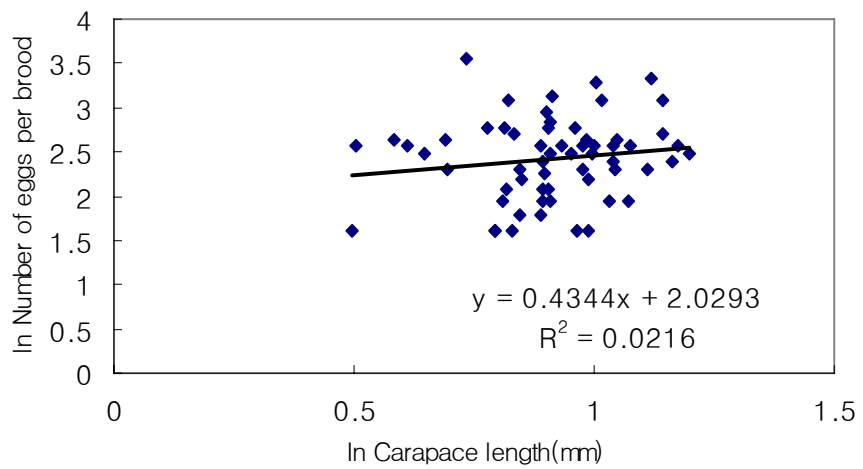
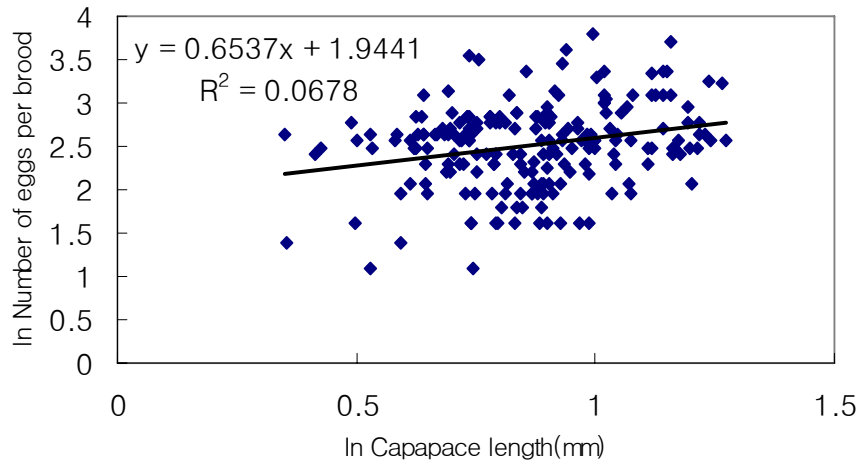


Fig. 2-16. Relationship between carapace length (CL) and number of eggs (EN) in female *Neomysis japonica* (a : Pooled, b : Embryonic stage)

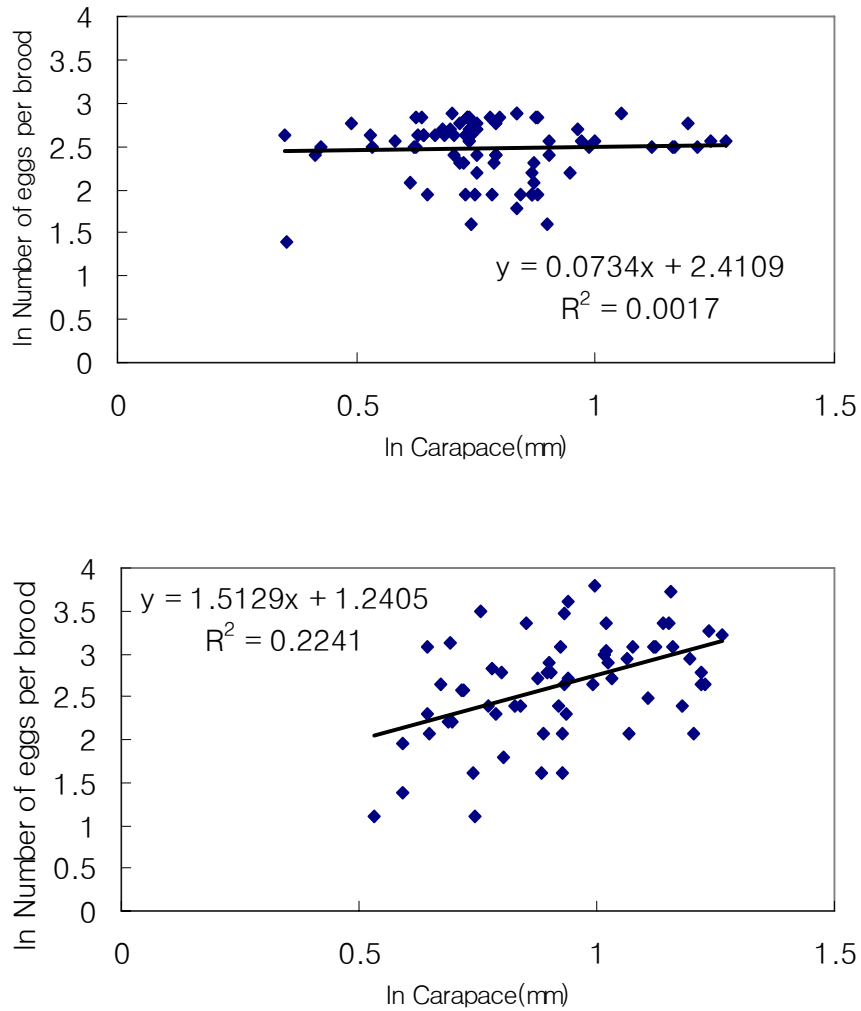


Fig. 2-17. Relationship between carapace length (CL) and number of eggs (EN) in female *Neomysis japonica* (a : Nauplioid stage, b : Postnauplioid stage)

Table. 2-5. Details of linear regressions for ovigerous females of *Neomysis japonica*.  $\log_e$  egg number (EN) is regressed on  $\log_e$  carapace length (CL) \*\*\*P<0.001

Species	Egg stage	Regressions	±slope	n	r <sup>2</sup>
<i>N. japonica</i>	embryonic stage	lnEN=0.434 lnCL+2.029	0.46	60	0.02***
	nauplioid stage	lnEN=0.073 lnCL+2.410	0.34	77	0.002***
	postnauplioid stage	lnEN=1.512 lnCL+1.240	0.61	64	0.22***

마. 성장과 사망 및 가입유형

곤쟁이의 갑각장 범위는 수컷의 경우 1.02~3.63 mm였으며, 암컷의 경우 1.04~5.08 mm였다. 조사 기간 동안 체장계급 0.25 mm 간격으로 ELEFAN 프로그램을 이용한 모드의 진행양상을 보면 연간 차이는 있었으나 2월과 8월에 새로운 세대가 출현하는 것으로 나타났다 (Fig. 2-18). ELEFAN 프로그램에서 추정된 von Bertalanffy 성장 매개변수는 (Table. 2-6)과 같다. 이론적으로 최대체장과 성장계수는 암컷의 경우 6.34 mm, 0.81 year<sup>-1</sup>로 나타났고 수컷의 경우 3.85 mm, 0.88 year<sup>-1</sup>로 나타났다. 동일한 연령에서 수컷보다 암컷의 성장률이 더 빠른 것으로 나타났고, 성장비교 지수의 결과에 있어서도 암컷이 1.51, 수컷이 1.12로 성장률의 차이가 큰 것으로 판단되었으며, 전체 개체에 대한 성장비교지수는 1.24로 추정되었다. 계절적인 성장 변동요인은 암컷의 경우 0.99, 수컷의 경우 0.90, 전체 개체에 대해서는 0.95로 나타나 계절적인 성장 변동폭이 매우 큰 것으로 나타났다. 성장이 느린 시기인 동계점은 암컷이 0.80, 수컷이 0.99, 전체 개체에 대해서는 0.89로 나타나 산란시기로 판단되는 저수온 기간인 동계동안의 성장이 가장 느린 것으로 판단되었다 (Fig. 2-19).

곤쟁이의 순간 전사망계수 (Z)는 갑각장 자료나 성장 매개변수를 이용하여 상대연령 및 그 연령에 해당하는 개체수와 어획물 곡선법 분석에 사용된 자료를 통해 회귀식 추정하였다. 추정된 순간 전사망계수 (Z)는 3.46 year<sup>-1</sup>로 계산되었다 (Fig. 2-20).

ELEFAN 프로그램에 의해 추정된 곤쟁이의 가입유형을 보면 두 개의 정규분포 곡선을 나타내는데, 이것은 일년 동안 두 번 (2월과 8월)의 가입이 일어난다는 것을 지적하고 있다 (Fig. 2-21). 이러한 결과는 앞서 갑각장 빈도분포에서 보여주었던 것과 일치하였고, 가입률은 추계보다 하계에 높은 것으로 나타났다. 식에 의해 추정된 곤쟁이의 가입 각장은 2.41 mm로 나타났다.

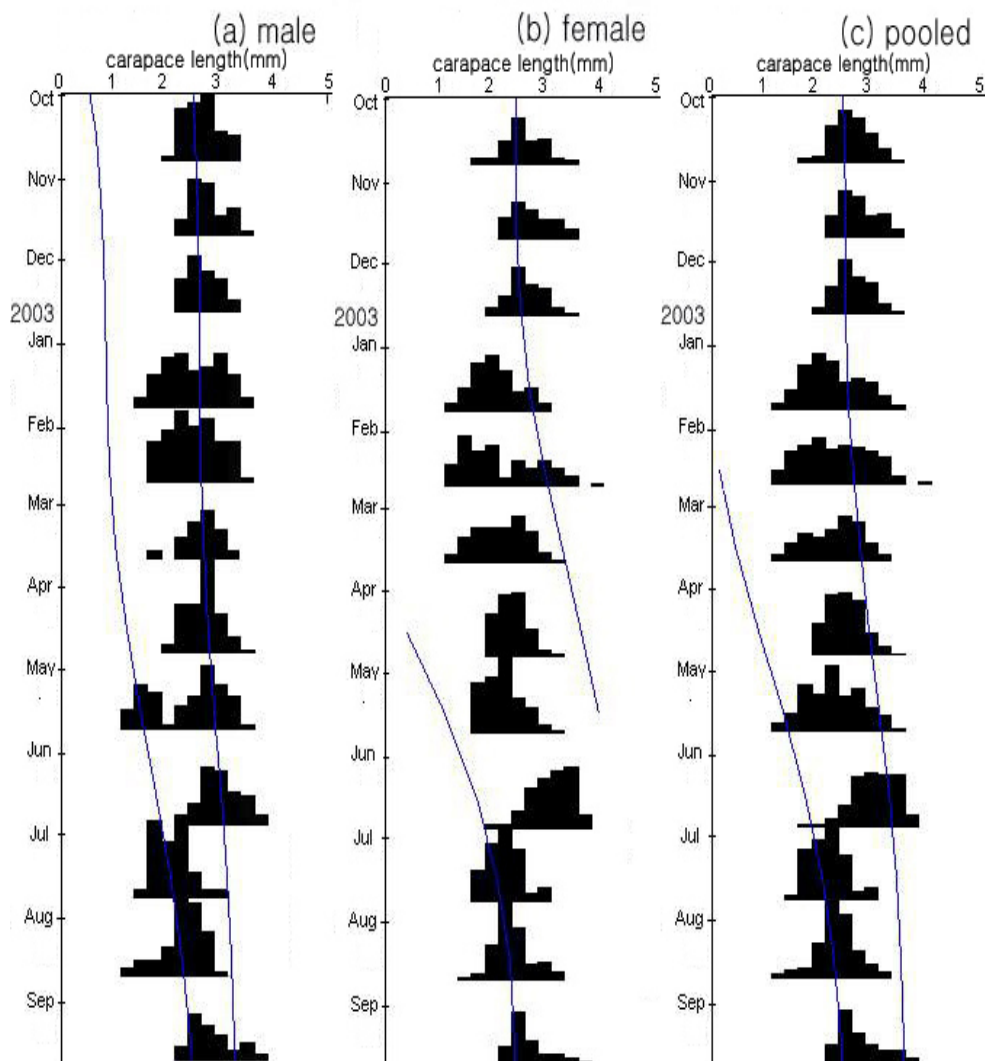


Fig. 2-18. Length-frequency distribution, expressed as occurrence of males (a), females (b) and pooled data (c) of *Neomysis japonica* from October 2002 to september 2003 and estimated growth curves. The number in parenthesis below months are indicated sample sizes

Table. 2-6. von Bertalanffy growth parameters estimated by the ELEFAN analysis of length-frequency data for males, females and pooled data.  $L_{\infty}$ , asymptotic length (mm);  $K$ , growth coefficient ( $\text{yr}^{-1}$ );  $t_0$ , theoretical age at zero length (yr);  $C$ , amplitude of growth

oscillation; *WP*, wintering point;  $\phi'$ , growth performance index; *Rn*, score function

	Males	Females	Pooled
$L_{\infty}$	3.85	6.34	4.46
$K$	0.88	0.81	0.87
$t_0$	0	0	0
$C$	0.90	0.99	0.95
<i>WP</i>	0.99	0.80	0.89
$\phi'$	1.12	1.51	1.24
<i>Rn</i>	0.407	0.419	0.384

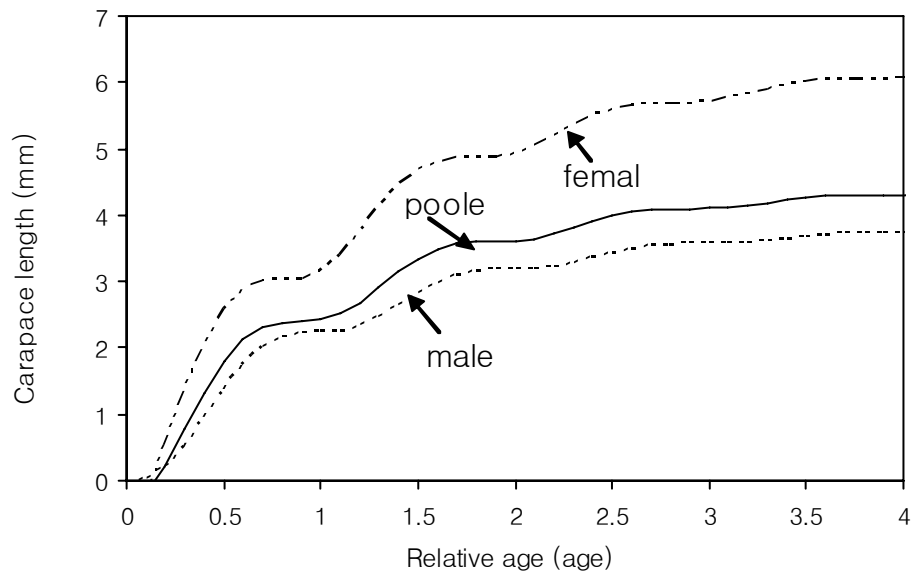


Fig. 2-19. Average growth curves for males, females and pooled data of *Neomysis japonica* based on length-frequency distributions from october 2002 to september 2003

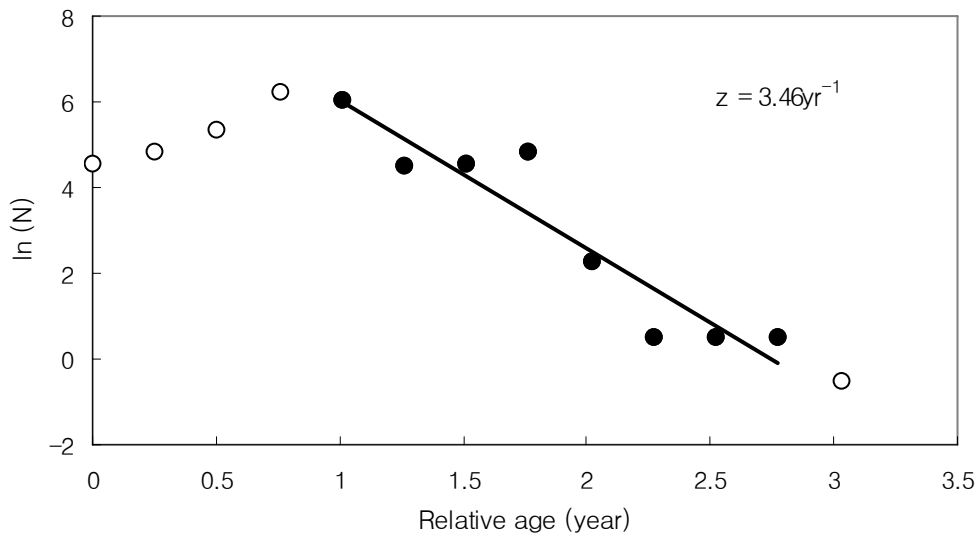


Fig. 2-20. Length-converted catch curve of *Neomysis japonica* based on length-frequency data from october 2002 to september 2003

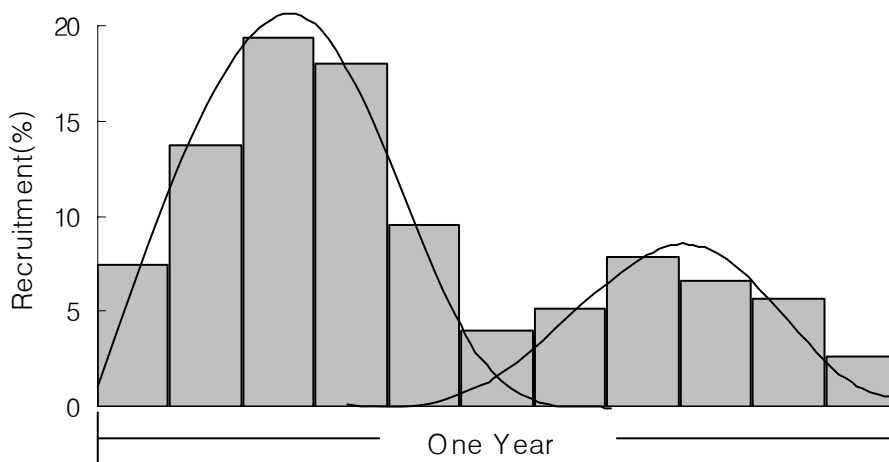


Fig. 2-21. The annual recruitment pattern of *Neomysis japonica* as identified by ELEFAN II routine

바. 상대성장

조사 기간에 채집한 곤쟁이의 갑각장 (CL)과 전장 (TL)의 회귀관계는 암컷과 수컷으로 구분하여 표시하였다 (Fig. 2-22). 암컷과 수컷의 갑각장의 범위는 각각 1.04~5.08 mm과 1.02~3.63 mm이며, 전장의 암컷과 수컷의 평균 전장의 범위는 각각 4.00~21.37 mm과 4.76~15.70 mm이다. 암컷과 수컷의 평균 갑각장 ( $\pm$ 표준편차)은 각각 2.31 ( $\pm$ 0.52) mm와 2.42 ( $\pm$ 0.48) mm로 나타났고, 평균 전장 ( $\pm$ 표준편차)은 각각 9.64 ( $\pm$ 2.06) mm와 9.90 ( $\pm$ 1.94) mm로 나타났다. 이 결과를 통하여 볼 때 암컷에 비해 수컷의 갑각장과 전장이 더 큰 것으로 나타났다. 회귀분



석한 결과를 토대로 기울기와 절편을 비교하기 위해서 공분산분석 ANCOVA 을 이용한 결과 기울기의 차이가 없었다 (ANCOVA:  $F=0.22$ ,  $d.f.=1$ ,  $1648$ ,  $P>0.6$ ). 따라서 공통기울기 ( $bc=3.631$ )를 가정한 절편의 차이를 분석한 결과 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다 (ANCOVA:  $F= 8408.14$ ,  $d.f.=1$ ,  $1685$ ,  $P<0.001$ ) (Fig. 2-23). 분석을 통한 결과 갑각장이 증가함에 따라 전장도 증가함을 알 수 있었으며, 또한 암컷에 비해 수컷의 갑각장과 전장이 더 큰 것을 알 수 있었다.

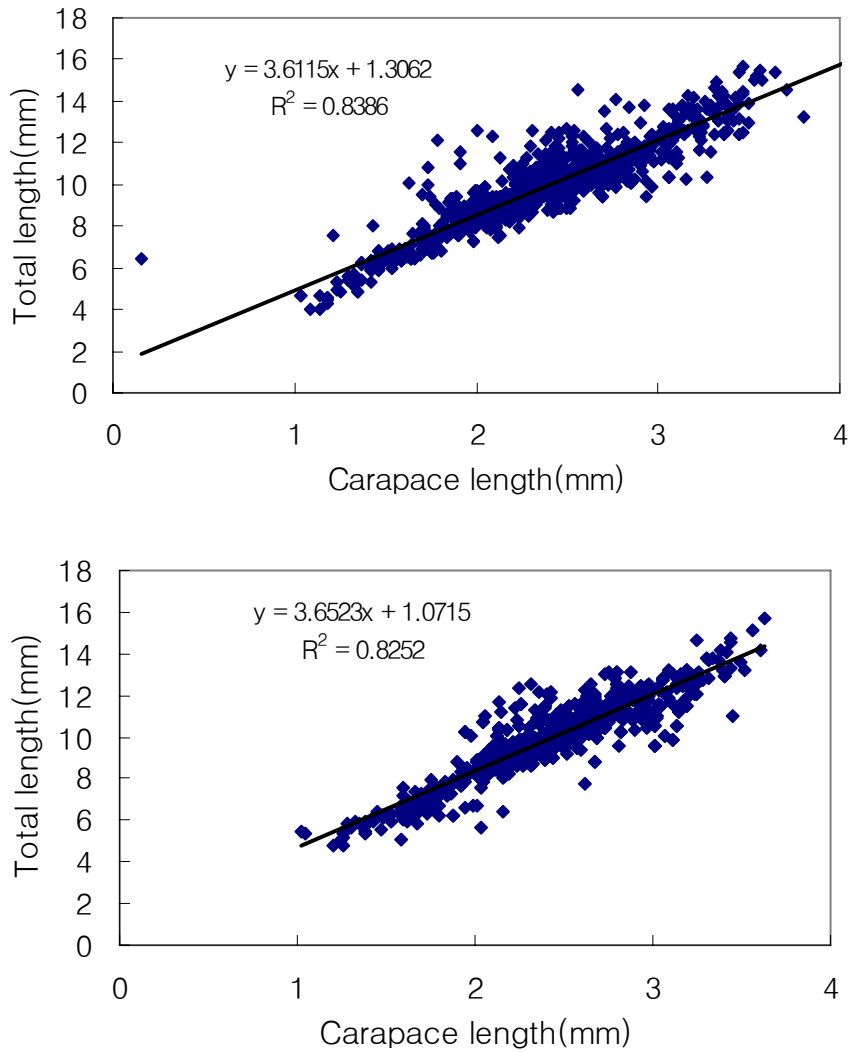


Fig. 2-22. Relationship between carapace length (CL) and total length (TL) in female (a) and male (b) of *Neomysis japonica*

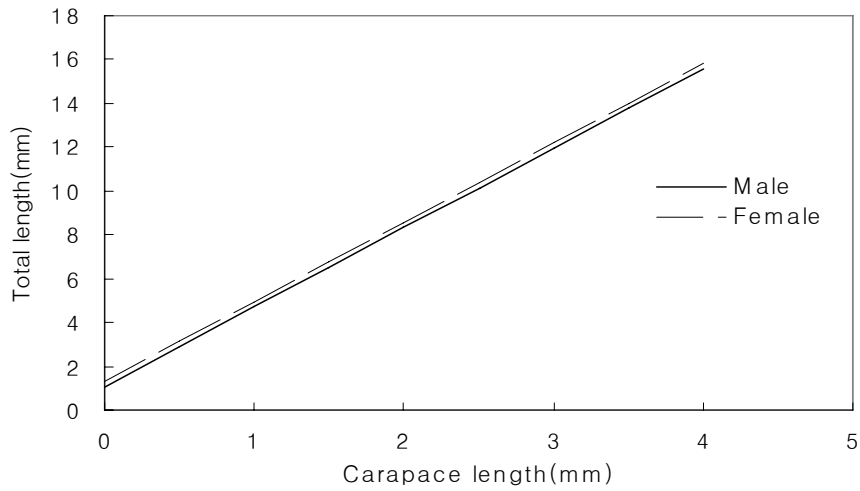


Fig. 2-23. Relationship between carapace length (CL) and total length (TL) in female and male of *Neomysis japonica*

Table. 2-7. von Bertalanffy growth parameters estimated by the ELEFAN analysis of length-frequency data for males, females and pooled data.  $L_{\infty}$ , asymptotic length (mm);  $K$ , growth coefficient ( $\text{yr}^{-1}$ );  $\phi'$ , growth performance index

Species	Parameter	Males	Females	Pooled
<i>N. japonica</i>	$L_{\infty}$	3.85	6.34	4.46
	$K$	0.88	0.81	0.87
	$\phi'$	1.12	1.51	1.24
<i>L. gracilis</i>	$L_{\infty}$	12.22	12.43	13.40
	$K$	0.58	0.90	0.60
	$\phi'$	1.94	2.14	2.04
<i>A. chinensis</i>	$L_{\infty}$	10.48	13.51	13.94
	$K$	0.84	0.69	0.64
	$\phi'$	1.97	2.10	2.09

### 제 3 장 미생물에 의한 새우양식장 환경정화 및 미생물

# 제제 개발

## 제 1 절 서 론

Probiotic는 주로 인간과 육상 가축을 대상으로 사용되어져 왔으나 최근에는 해양생물의 양식 산업에까지 이용하게 되었다. 즉 수질의 개선에 의한 생물학적 구제 혹은 병원균에 대한 항균작용으로 생물학적 조절을 하는 미생물에 대한 총칭으로 probiotics의 이용범위가 넓혀지게 되었다. 수산 양식 산업에서 probiotics를 처음으로 도입한 사람은 Kozasa, 1986로 알려져 있고, 그의 연구에서 토양으로부터 분리한 *Bacillus toyoi*는 *Edwardsiella* sp.에 감염된 뱀장어의 폐사를 줄일 수 있다고 보고하였다. 그 후 probiotics는 식물먹이생물, 어류, 패류, 및 새우류 등 수산양식의 거의 모든 분야에 걸쳐 사용 효과가 보고되어지고 있다.

최근 양식장내 수질의 악화를 가속화시키고 어류에게 직접적인 독성을 나타내는 질소와 인을 일정농도로 유지시키고, 질소와 인을 포함하는 오염물질로부터 수질환경을 개선할 목적으로 probiotics를 활용한 질소와 인의 미생물학적 제거에 관한 연구들이 보고되고 있다. Rengpipat 등은 *Bacillus* sp. S11를 실험용 새우양식장에 처리한 후  $\text{NH}_4^+$ 와  $\text{NO}_2^-$ 를 측정된 결과, 접종 초기에는 1.67 mg/l의  $\text{NH}_4^+$ 와 2.5 mg/l  $\text{NO}_2^-$ 로 측정되었지만, 7일 후  $\text{NH}_4^+$ 와  $\text{NO}_2^-$ 는 거의 나타나지 않았다고 보고하였고, 100일 동안 probiotics를 처리한 실험과 처리하지 않은 실험을 동시에 실시하여 새우의 무게와 생존율이 30% 이상 증가하였다고 보고하였다. Queiroz and Boyd, 1998은 probiotics 세균으로 *Bacillus* 종을 매기 양식장내에 접종한 결과, 양식장내 수질이 개선되어 얼룩매기의 생산과 생존율이 증가하는 것을 확인하였다.

본 연구에서는 궁극적으로 새우양식에 유용한 probiotics를 개발할 목적으로 (1) 새우양식에서 환경오염원으로 문제를 일으키는 질소와 인을 미생물학적 제거를 통하여 수질을 개선하고, (2) 새우 생육기간중에 발생하는 다양한 어병 원인세균을 제거하는 세균들을 분리하여 다양한 실험을 수행하였다.

## 제 2 절 재료 및 방법

### 1. 새우양식장 유용 및 유해세균 검색

#### 가. 세균 집락의 생성과 분포

새우양식장에서 채취한 물시료를 marine agar plate 상에 100 ul를 도말하여 37°C에서 2~3일간 배양하여 생성된 집락을 계수하였다. 총균수와 세균의 종류에 따른 집락의 형태와 색소의 형성 그리고 집락의 분포에 대하여 관찰하였다.

#### 나. 분리 세균의 형태학적 및 생리학적 특징

Marine agar plate로부터 13 종류의 세균을 분리하였으며 이들 세균들에 대하여 형태학적 및 생리학적 시험을 실시하였다. 그람염색의 결과에 따라 일차적으로 세균을 구분하였으며 세균의 형태를 조사하였다. 생리학적 시험은 indole 생성, methyl red 반응, Voges-Proskauer 시험, 녹말 분해능, 젤라틴 분해능, catalase 생성, oxidase 생성, citrate 이용여부,  $\text{H}_2\text{S}$  생성,

lithmus milk의 펩톤화 (peptonization) 여부에 대하여 조사하였다.

이 가운데 녹말과 젤라틴을 분해하는 세균들에 대하여 분해 활성에 대하여 조사하였다. 녹말의 분해 활성은 녹말 배지상에 filter disc를 올려놓고 여기에 100 ul의 분리세균 접종액을 흡수시켜 37°C에서 1~2일간 배양한 후 요오드 용액을 반응시켜 투명지역의 형성을 관찰하여 결정하였다. 젤라틴의 분해 활성은 녹말의 분해 활성 시험과 같은 방법으로 실시한 후, HgCl<sub>2</sub> 용액을 반응시켜 투명지역 형성을 관찰하여 결정하였다.

#### 다. 분리 세균의 동정

분리 세균의 동정은 여러 가지 생리생화학적 시험과 GN2/GP2 Microplate™ Identification System (BIOLOG, Hayward, CA., USA)를 이용하여 동정하였다. 사용된 배지는 BUG agar와 5%의 sheep blood를 혼합한 plate에서 순수 배양한 균주를 GN/GP inoculation fluid에 옮겨 현탁하였다. 세균 현탁액을 Biolog Turbidimeter (BIOLOG, Hayward, CA, USA)를 이용하여 20~63%까지 맞추고 GN2 / GP2 MicroPlate의 96개의 well에 각각 150 ul씩 분주하였고, 30~37°C에서 4~6시간 동안 배양하였다. 배양된 MicroPlate의 결과는 직접 확인하였으며, MicroLog™ database software를 통해 동정하였다.

## 2. 미생물에 의한 새우 양식장 환경정화: 미생물학적 질소 및 인 제거

### 가. 세균의 분리 및 배양

충남 태안군 소재 순천향대학교 부설 해양수산 연구소 새우양식장에서 채취한 물시료로부터 농화 배양기법 (enrichment culture technique)을 이용하여 질소와 인을 제거할 수 있는 혼합배양 (mixed culture)을 획득하였다 (Sudo et al., 1997; Uemoto and Saiki, 1996). 농화 배양에 사용된 질소와 인 제거 배지는 1 L의 인공해수 (artificial sea water) (Instant Ocean France Aquarium System, France)에 1.43 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 2.56 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1 μM FeCl<sub>3</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.8 μM MgSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.2 μM ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O를 넣고 탄소원으로 10 mM glucose와 10 mM fructose를 첨가하여 기본배지로 사용하였다. 여기에 질소원 (nitrogen source)으로서 400 μM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaNO<sub>2</sub>, 또는 NaNO<sub>3</sub>, 그리고 인원 (phosphorus source)으로서 500 μM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>를 첨가하여 질소 또는 인 (N/P)의 제거 실험을 실시하였다. 준비된 배지는 0.5 N NaOH를 이용하여 pH 7.0로 조절한 후, 121°C에서 15분간 고압 멸균하였다. 멸균된 배지에 농화된 혼합배양을 접종한 후에 25°C에서 분당 150회로 회전하는 진탕 배양기에서 배양하였다. 혼합 배양으로부터 N/P 제거 고체 평판 배지에 3차례에 걸친 도말을 통하여 4개의 순수 배양을 분리하여 본 실험에 사용하였다. 이들 제거세균은 균주의 특성을 지속적으로 보존하기 위하여 -70°C에서 냉동 보관하였으며, 별도로 본 실험을 계속적으로 수행하기 위하여 25°C, 분당 150회 회전하는 회전 진탕 배양기에서 배양을 유지하였다.

### 나. 분리세균의 형태학적 관찰 및 생리 화학적 특성 조사

질소와 인 제거세균을 Luria-Bertani (LB) 고체 평판 배지에 도말하여 단일 집락의 형태학적 관찰을 하였고, 그람 염색 후 위상차 현미경으로 세균의 형태학적 특성을 조사하였다. 분리 세균의 생리 화학적 특성을 조사하기 위하여 glucose 이용여부, methyl red-voges proskauer (MR-VP) 시험,

citrate와 녹말의 이용여부, indole 생성유무, Klingler iron agar (KIA) 시험, gelatin 이용여부, urease 존재여부, lithmus milk 시험 등을 실시하였다. 탄소원으로 1% glucose가 포함된 액체배지에 분리된 세균을 접종한 후, 색의 변화를 관찰하였으며, 0.5% glucose가 포함된 MR-VP 배지에 분리 세균을 접종한 후 MR 배지에서는 pH 지시약인 methyl red를 3방울 떨어뜨리고, VP 배지에는  $\alpha$ -naphthol 12방울과 40% KOH 6방울을 첨가 후 색깔 변화를 관찰하였다 (Benson, 1998). 분리 세균의 citrate 이용여부를 조사하기 위하여 Simmon's citrate 고체 평판배지 (Difco, Detroit, MI, USA)에 분리세균을 접종한 후, 배지의 색의 변화를 관찰하였고, 녹말의 분해여부를 알아보기 위하여 녹말 고체평판배지에 세균을 접종하고 그람 요오드 용액을 첨가하여 집락 주위에서 투명대 형성 여부를 관찰하였다. Indole 생성 시험은 1% peptone이 포함된 tryptone 액체배지에 균주를 접종한 후, 20방울의 Kovac 시약을 첨가하여 시험관을 가볍게 흔들어 주면서 배지의 색 변화를 관찰하였다. H<sub>2</sub>S의 생성은 KIA (Difco, Detroit, MI, USA)에 균주를 접종한 후, 고체배지 표면의 색 변화를 관찰하였으며, gelatin 평판배지에 균주를 접종한 후, HgCl<sub>2</sub>를 첨가하여 집락 주위에 투명대 형성을 관찰하였고 urease 생성 여부는 색의 변화를 관찰하였다. Lithmus milk 시험은 lithmus milk (Difco, Detroit, USA)에 균주를 접종하여 37°C에서 48시간 배양한 후 펩톤화 (peptonization)를 관찰하였다.

#### 다. 분리 세균의 동정

분리 세균들의 동정을 위해서 biolog universal growth (BUG) (BIOLOG, Hayward, CA, USA) 고체 배지에 도말하여 30°C에서 24시간 배양하였다. 분리된 세균들은 GP2 MicroPlate™ Identification System (BIOLOG, Hayward, CA, USA)를 이용하여 동정되었다. 5%의 sheep blood를 혼합한 BUG 고체 배지에 순수 배양한 균주를 GP inoculating fluid에 옮겨 현탁하였다. 세균 현탁액을 Biolog Turbidimeter (BIOLOG, Hayward, CA, USA)를 이용하여 20~28% 까지 맞추고 GP2 MicroPlate의 96개 well에 각각 150  $\mu$ l씩 분주하고, 30°C에서 12~24시간 동안 배양하였다. MicroPlate는 직접 또는 Biolog MicroStation™을 사용하여 결과를 확인하였으며, MicroLog™ database software를 사용하여 동정하였다. 또한 분리세균들에 대한 16s rDNA 염기서열을 분석하여 분자유전학적 동정을 실시하였다.

#### 라. 질소와 인 측정

##### (1) NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 측정

잔존 ammonium의 측정은 발색 정량방법인 indophenol blue 방법을 사용하여 측정하였다 (Pai et al., 2001; Aminot et al., 1997). 채취한 시료를 0.45  $\mu$ m syringe filter로 여과한 후 2.5 ml 취하여, 100  $\mu$ l 페놀 용액과 100  $\mu$ l sodium nitroprusside 용액을 첨가하고, 여기에 100  $\mu$ l alkaline citrate와 25 ml sodium hypochlorite solution을 혼합하여 만든 산화용액을 250  $\mu$ l 첨가하여 빛이 차단된 곳에서 1시간 동안 반응시켰다. 발색 정량은 분광광도계 (V-55 UV/Vis Spectrophotometer, Jasco Co., Japan)를 사용하여 파장 640 nm에서 측정하였고, ammonium chloride (Sigma Co., St. Louis, MO, USA)를 표준품으로 사용하여 미리 작성한 검량선으로부터 잔존 ammonium의 양을 결정하였다.

##### (2) NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 측정

잔존 nitrite의 측정은 Griess reaction 방법을 이용하여 측정하였다 (Uemoto and Saiki,

1996). 채취한 시료를 0.45  $\mu\text{m}$  syringe filter로 여과한 후 5 ml를 취해, 0.5% (w/v) sulfanilamide 용액 100  $\mu\text{l}$  을 섞고 5분간 방치하였다. 여기에 100  $\mu\text{l}$  *N*-(1-naphthyl)ethylenediamine 용액 (0.1% w/v)을 넣어 혼합하여 12분간 반응시켰다. 발색 정량은 분광광도계를 사용하여 파장 543 nm에서 측정하였고, sodium nitrite (Sigma Co., St. Louis, MO, USA)를 표준품으로 이용하여 미리 작성한 검량선으로부터 잔존 nitrite의 양을 결정하였다.

### (3) $\text{NO}_3^-$ 측정

잔존 nitrate의 측정은 brucine 방법을 이용하여 측정하였다 (Rhee et al., 1997). 채취한 시료를 0.45  $\mu\text{m}$  syringe filter로 여과한 후 10 ml를 취하여, 2 ml sodium chloride 용액 (30%, w/v) 과 진한황산을 1/5 희석시킨 황산 10 ml를 넣어 세계 흔들어 냉각하였다. 여기에 0.5 ml brucine-sulfanylic acid 용액을 넣고 섞은 후, 95°C에서 20분간 가열반응 시켜 후, 즉시 얼음물에 담가 25°C까지 냉각하고, 분광광도계를 사용하여 파장 410 nm에서 측정하였다. 측정된 흡광도 값은 potassium nitrate (Sigma Co., St. Louis, MO, USA)를 표준품으로 이용하여 미리 작성한 검량선으로부터 잔존 nitrate의 양을 결정하였다.

### (4) $\text{PO}_4^{3-}$ 측정

잔존 phosphate의 측정은 molybdate-blue 방법을 이용하여 측정하였다 (Sudo et al., 1997). 채취한 시료를 0.45  $\mu\text{m}$  syringe filter로 여과한 후 4 ml를 취하여, 0.4 ml의 몰리브덴산 암모늄-아스코르빈산 (ammonium molybdate-ascorbic acid)의 혼합 용액을 넣고 잘 섞었다. 여기에 증류수로 최종 부피가 5 ml가 되도록 하고 약 15분간 실온에서 방치한 후 분광광도계를 사용하여 파장 880 nm에서 측정하였다. 측정된 흡광도 값은 potassium phosphate (Sigma Co., St. Louis, MO, USA)를 표준품으로 이용하여 미리 작성한 검량선으로부터 phosphate의 양을 결정하였다.

## 3. 새우 양식장에서 양식사료에 의한 오염환경의 미생물학적 제거

### 가. 양식 사료로부터 용출되는 질소와 인 측정

사료 투여시 수계로 용출되는 질소와 인의 양을 알아보기 위하여 사료 0.2 g을 100 ml에 넣고 시간 경과에 따른  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ , 그리고  $\text{PO}_4^{3-}$ 의 용출량을 측정하였다. 사용된 사료 (Woo Sung Feed Co., Daejeon, Korea)의 조성은 조단백질 50%, 조지방 7%, 조회분 17%, 조섬유 3%, 칼슘 1%, 인 2.7% 였다.

질소와 인 용출 시험을 위해서 사료 pellet은 멸균하여 직접 이용하거나 막자사발에서 미세한 가루로 만들어 사용하였다. 배지내로 용출되는  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ 의 정량적 측정은 이전에 서술한 방법에 의해 실시하였다.

### 나. 분리세균에 의한 질소와 인 제거 측정

새우 양식사료에서 용출되는 질소와 인을 제거시킬 목적으로 사료 0.2 g을 막자사발에서 미세한 가루로 만들어 100 ml의 인공 해수에 넣어 용출시킨 후, 질소와 인 제거세균인 *Bacillus* sp. CK-10과 *Bacillus* sp. CK-13를 각각 접종하여 용출된 질소와 인의 제거율을 각각 측정하였다. 각 화합물의 정량적 측정은 이전에 서술한 방법에 의해 실시하였다.

#### 다. 양식사료의 당분석

양식사료에 포함된 당을 분석하기 위하여 산 가수분해를 통해 당을 용출시키고, HPAEC-PAD (high-pH anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection) 로 분석하였다. 이용된 HPAEC-PAD 시스템은 PED2 pulsed electrochemical detector가 부착된 Bio-LC DX300 & 600 (Dionex, Sunnyvale, CA, USA)이었다. 분석에 이용된 컬럼(column)은 Dionex사의 CarboPac PA1 컬럼 (4.6 × 250 mm, Sunnyvale, CA, USA)을 사용하였다. HPAEC-PAD 작동조건에서 flow rate는 1.0 ml/min, 분석시간은 20분, detector의 wavelength는 350 nm이었고, PC10 controller에 의해 자동적으로 주입 (injection)되어 분석되었다. 분석을 위해 사료 0.01 g는 2 M trifluoroacetic acid (TFA) (Sigma Co., St. Louis, MO, USA)와 6 N HCl에 녹여 100°C에서 4시간동안 반응시킨 후 건조하여, 100 µl의 증류수에 녹인 후, 0.45 µm nylon membrane filter에 여과하여 분석하였다. 당 분석에 사용된 분석용 표준품은 fucose, galactosamine, glucosamine, galactose, glucose, mannose이었다.

### 4. 새우 양식장에서 분리된 세균의 유용성 탐색

#### 가. 유산균의 분리 및 배양 조건

유산균 (lactic acid bacteria)을 분리하기 위하여 동일한 지역의 새우양식장으로부터 채취한 물시료를 0.3% 탄산칼슘이 포함된 MRS (Difco, Detroit, MI, USA) 고체 평판 배지에 도말하고 25°C에서 배양하여 투명대 형성이 탁월한 단일 세균 2개를 분리하였다. 배지제조는 일반적으로 사용되는 물 대신에 인공해수를 사용하였다. 분리세균들은 sheep blood agar 배지에 도말하여 용혈성을 확인하고 비용혈성 유산균을 선택하여, 본 실험에 사용하였다 (Yang et al., 2003). 이들 유산균은 균주의 특성을 지속적으로 보존하기 위하여 -70°C에서 냉동 보관하였으며, 별도로 본 실험을 계속적으로 수행하기 위하여 25°C, 분당 150회 회전하는 회전 진탕 배양기에서 배양을 유지하였다.

#### 나. 유산균의 형태학적 및 생리학적 특징

유산균을 0.3% 탄산칼슘이 포함된 MRS (Difco, Detroit, MI, USA) 고체 평판 배지에 도말하여 위에서 서술한 방법과 동일하게 형태학적 관찰과 생리 화학적 특성을 조사하였다.

#### 다. 유산균의 동정

분리 세균들의 동정을 위해서 biolog universal growth (BUG) (BIOLOG, Hayward, CA, USA) 고체 배지에 도말하여 30°C에서 24시간 배양하였다. 분리된 세균들은 GP2 MicroPlate™ Identification System (BIOLOG, Hayward, CA, USA)를 이용하여 동정되었다. 5%의 sheep blood를 혼합한 BUG 고체 배지에 순수 배양한 균주를 GP inoculating fluid에 옮겨 현탁하였다. 세균 현탁액을 Biolog Turbidimeter (BIOLOG, Hayward, CA, USA)를 이용하여 20~28%까지 맞추고 GP2 MicroPlate의 96개 well에 각각 150 µl씩 분주하고, 30°C에서 12~24시간 동안 배양하였다. MicroPlate는 직접 또는 Biolog MicroStation™을 사용하여 결과를 확인하였으며, MicroLog™ database software를 사용하여 동정하였다.

#### 라. 유산균에 의한 질소 제거

분리된 유산균에 의한 질소 제거 실험을 실시하였다. 분리세균 *Lactobacillus* sp. JK-8와 *Lactobacillus* sp. JK-11을 MRS 배지에 각각 접종하고 24시간 동안 배양하였다. 새로운 MRS 배지에 전 배양액을 접종량이 1% (w/v)가 되도록 접종하고 6시간 배양 후  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ , 그리고  $\text{NO}_3^-$ 를 각각 다른 농도로 첨가하였다 (Yoo et al., 2003).  $\text{NH}_4^+$ 과  $\text{NO}_2^-$ 는 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ , 300  $\mu\text{M}$  그리고 400  $\mu\text{M}$ 이 되게 첨가하여 1시간 간격으로  $\text{NH}_4^+$ 과  $\text{NO}_2^-$ 의 농도를 측정하였고,  $\text{NO}_3^-$ 는 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 75  $\mu\text{M}$  그리고 100  $\mu\text{M}$ 이 되게 첨가하여  $\text{NO}_3^-$ 의 농도를 측정하였다. 잔존  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ , 그리고  $\text{NO}_3^-$ 의 농도는 위에서 기술한 동일한 방법으로 실시하였다.

#### 마. 항균 스펙트럼 조사

분리된 유산균 *Lactobacillus* sp. JK-8와 *Lactobacillus* sp. JK-11의 항균활성 측정을 위해서 Yang et al., 2003의 방법에 따라 농축 배양상등액을 제조하였다. 분리세균 JK-8와 JK-11을 MRS broth에 접종하여 25°C에서 48 시간 동안 배양 한 후 3,500  $\times g$ 에서 10분간 원심 분리하여 세균을 제거하고, 0.45  $\mu\text{m}$  syringe filter로 여과한 후 freeze dryer를 이용하여 5배 농축하였다. 농축된 배양상등액의 항균활성 확인은 plate diffusion assay 방법을 사용하였다 (Schillinger and Lucke, 1989). 항균활성 확인에 사용된 대상균주는 *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi*, *Edwardsiella tarda* 등을 이용하였다. 미리 만들어진 nutrient agar (NA) (Difco, Detroit, MI, USA)와 marine agar (MA) (Difco, Detroit, MI, USA) 고체 배지에 억제 여부 시험균을 도말하고 paper disc (Advantec, Toyo Roshi Kaisha, Ltd. Japan)를 올려놓은 후 농축 배양 상등액 50  $\mu\text{l}$ 을 paper disc에 올려놓고 37°C에서 각각 24시간 성장시킨 후 투명대를 확인하였다. 대상 균주로는 *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi*, *Edwardsiella tarda*, *Streptococcus pyogenes* 등을 선택하여 사용하였다.

#### 바. 농축 배양상등액에 대한 병원성 세균의 살균을 측정

분리된 유산균 *Lactobacillus* sp. JK-8와 *Lactobacillus* sp. JK-11에서 얻어진 농축 배양상등액에 노출된 세균의 살균율을 알아보기 위하여 대상 세균을 액체배지에 접종한 후 대수 생장기 (exponential phase)를 거치면서 파장 660 nm에서 O.D 값이 0.8일 때, 원심분리용 튜브에 넣고 2,000  $\times g$ 에서 10분간 원심분리를 실시하였다. 상등액은 버리고 얻어진 균체를 10 ml phosphate buffer (pH 7.0)로 3회 세척하였다. JK-8와 JK-11에서 얻어진 농축 배양상등액에 세균의 최종 농도가  $10^7 \sim 10^8$  cells/ml 되게 동일한 양을 접종하였다. JK-8과 JK-11의 농축 배양상등액으로 처리된 *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi*, *Edwardsiella tarda*, *Streptococcus pyogenes*는 각각 30분 간격으로 고체배지에 100  $\mu\text{l}$ 를 평판 도말하여 37°C에서 배양한 후 형성된 집락을 계수하여 농축 배양상등액의 노출시간에 따른 세균의 살균을 각각 분석하였다.

#### 사. 유산균의 성장과 유기산 측정

분리된 유산균의 성장에 따른 유기산 생성을 측정하였다. 분리 균주 *Lactobacillus* sp. JK-8와 *Lactobacillus* sp. JK-11을 MRS 액체배지에 접종하여 48시간동안 12시간 간격으로 시료를 채취하여 생성된 유기산을 측정하였다. 배양동안에 생성된 유기산은 HPLC를 이용해 측정하였다. 분리 균주의 생장은 분광광도계 (V-550 UV/Vis Spectrophotometer, Jasco Co., Japan)를



사용하여 파장 660 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 아. HPLC에 의한 유기산의 분석

분리 세균 *Lactobacillus* sp. JK-8와 *Lactobacillus* sp. JK-11에 의해 생성되는 유기산 분석을 위하여 high performance liquid chromatography (HPLC)로 분석하였다. 분석에 이용된 HPLC 시스템은 SPD-10A UV/Vis detector가 부착된 Shimadzu사의 LC-10AT 제품을 사용하였으며, SUPELCO 사의 SUPELCOGEL C-610H 컬럼 (300 × 7.8 mm, particle size 9 μm)을 이용하였다. HPLC 작동 조건에서 전개 용매의 flow rate는 0.5 ml/min, 분석시간은 30분, UV/Vis detector의 파장은 210 nm으로 맞추어 사용하였다. 전개용매는 HPLC용 증류수 (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)가 0.1% phosphoric acid가 되도록 혼합하여 pore size가 0.45 μm인 membrane filter (Pall-Gelman, East Hills, NY, USA)에 여과하여 사용하였다.

유기산의 생성은 HPLC를 이용하여, 분석용 표준품과 배양액으로부터 채취한 시료를 대상으로 정량 분석하였다. Lactic acid와 acetic acid를 각각 1:1의 비율로 혼합한 10 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM 그리고 400 mM의 표준품을 만들었다. 이 용액을 0.45 μm syringe filter로 여과하고, 10 μl Hamilton syringe를 사용하여 HPLC injector 내 주사한 후 정량 분석을 위한 표준 곡선을 작성하였다. 배지내에 생성되는 lactic acid와 acetic acid를 정량하기 위하여 배양액으로부터 채취한 시료는 2,000 ×g에서 10분간 원심 분리한 후 0.45 μm syringe filter로 여과하여 분석하였다.

#### 자. GC-MS에 의한 유기산의 분석

분리 세균 *Lactobacillus* sp. JK-8에 의해 생성되는 유기산 분석을 위하여 gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)로 분석하였다. 유기산 분석에 사용한 GC-MS 기기는 electron ionization detector가 장치된 Shimadzu 사의 GCMS-QP5050 제품이었고, 컬럼은 Shimadzu사의 CBP5-M25 capillary 컬럼 (25 m × 0.22 mm, particle size 0.25 μm)을 사용하였다. GC-MS 작동 조건에서 carrier gas는 helium을 사용하였으며, flow rate는 1.5 ml/min 되도록 하였고, injection volume은 1 μl, injection temperature 250°C, oven temperature에서 80°C로 시작하여 10°C/min 상승시켜 최종 온도가 270°C가 될 때까지 총 15분간 분석하였다. MS data는 Shimadzu사의 library (NIST, Shimadzu Co.)를 이용하여 분석하였다. 시료 준비는 배양액으로부터 채취한 시료를 2,000 ×g에서 10분간 원심분리하고 동결건조를 이용해 물층을 제거하고, dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma Co., St. Louis, MO, USA)에 녹여 0.45 μm syringe filter로 여과하여 사용하였다.

#### 차. 주사전자현미경을 이용한 세포 외부형태 관찰

농축배양 상등액에 노출된 세균의 세포 외부 형태의 변화를 알아보기 위하여 주사전자현미경을 이용하여 세포의 외부 형태를 관찰하였다. 배양 상등액에 노출된 세균의 형태를 관찰하기 위한 시료준비는 Park et al., 2001의 방법을 사용하였다. 세균을 액체배지에 접종하여 O.D값이 0.8일 때까지 성장시킨 후, 배양액을 원심 분리용 튜브에 넣고 2,000 ×g에서 10분간 원심 분리하였다. 얻어진 균체를 준비된 농축배양 상등액에 접종하고, 37°C에서 6시간 노출시켰다. 12시

간 후 배양액을 2,000 ×g에서 10분간 원심 분리하여 균체를 회수하고, 10 mM의 phosphate buffer (pH 7.0)로 2회 세척하였다. 세척된 균체는 동일한 buffer에 현탁하여 pore size가 0.45 μm인 membrane filter (Pall-Gelman, East Hills, NY, USA)로 여과하였다. 균체가 흡착된 membrane filter를 0.5 × 0.5 cm의 크기로 자르고, 100 mM phosphate buffer (pH 7.2)에 희석하여 만든 2.5% glutaraldehyde (Grade I, Sigma, St. Louis, MO, USA)로 4시간동안 고정하였다. 동일한 buffer로 15분씩 2회 세척한 후, 여러 농도의 알코올 (30, 50, 60, 70, 80, 90, 95%)로 각각 15분씩 연속적으로 탈수시켰다. 100%의 알코올에서 15분씩 2회 최종 탈수하고 100% 알코올과 isoamyl acetate가 1:1로 혼합된 시약으로 15분간 처리한 후, 100% isoamyl acetate에서 4시간 동안 반응시켜 공기 중에서 건조하였다. 12시간 이상 건조시킨 membrane filter를 슬라이드 glass위에 부착한 후, sputter coater (IB-3, Giko Engineering Co., Tokyo, Japan)를 사용하여 두께가 300 Å이 되도록 2 mA로 30분간 golding coating하여 주사현미경 (LEO, Berkochen, Germany)으로 관찰하였다.

#### 카. 항균물질의 생성 확인

분리된 유산균 *Lactobacillus* sp. JK-8와 *Lactobacillus* sp. JK-11에서 생성된 항균물질을 확인하기 위하여 Schellinger and Lucke, 1989의 방법을 이용하였다. JK-8와 JK-11에서 얻어진 농축 배양상등액의 pH를 7.0으로 중화시키고, catalase (Sigma Co., St. Louis, MO, USA)를 1 mg/ml가 되도록 첨가해 유기산과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 제거시킨 후 plate diffusion assay 방법으로 투명대의 크기를 비교해 항균물질의 생성을 확인하였다.

#### 타. RP-HPLC에 의한 항균물질의 확인

분리균주 JK-11에 의해 생성되는 항균물질을 확인하기 위해 reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC)를 이용하였다. JK-11에서 얻어진 배양농축상등액을 0.1% trifluoroacetic acid (TFA)가 포함된 HPLC용 증류수 (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)와 동일하게 섞어주고 3,500 ×g에서 20분간 원심분리를 실시하였다. 원심분리를 통해 얻어진 시료를 0.45 μm syringe filter로 여과시키고, 50 μl를 이용해 RP-HPLC를 실시하였다. 분석에 사용된 RP-HPLC 시스템은 15X UV/Vis detector가 부착된 Gilson사의 제품을 사용하였으며, VYDAC 사의 C<sub>18</sub> column (4.6 × 250 mm, particle size 5 μm, Hesperia, USA)을 이용하였다. 분석시간은 80분, UV/Vis detector의 파장은 214 nm으로 맞추어 사용하였다. 전개용매 조건에서 Solution A는 0.1% TFA가 포함된 HPLC용 증류수를 이용하였고, Solution B는 0.1% TFA가 포함된 HPLC용 acetonitrile (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)를 사용하였다. 시료를 column에 주입한 후 처음 10분간 Solution A 95%, Solution B 5%로 평형을 유지한 후 0.5 ml/min의 flow rate로 Solution B를 5~65%까지 60분간 1%/min씩 증가하도록 linear gradient를 걸어주었다. 분석되는 peak들을 분취기로 1분 간격으로 채취하여 radial diffusion assay에 사용하였다.

#### 파. Ultrasensitive radial diffusion assay

RP-HPLC의 분취기로 모아진 72개의 fraction에 들어있는 항균물질을 확인하기 위해 radial diffusion assay 방법을 이용하였다. Radial diffusion assay은 Lehrer 등의 방법을 토대로 항균

활성을 측정하고자 하는 각각의 시료들을 완전히 건조시키고, 5  $\mu$ l의 0.01% acetic acid에 부유시켰다. 세균의 준비는 고온 멸균된 tryptic soy borth (TSB) (Difco, Detroit, MI, USA)에 *E. coli* K112를 접종하고 37°C의 진탕 배양기에서 12시간 배양 후 새로운 TSB 액체배지를 준비하여 접종량이 1%가 되도록 접종한 후 2시간 30분 동안 배양하였다. 배양된 액체배지를 원심분리하고 얻어진 세균은 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4)로 2번 세척한 후에 세균이 660 nm에서 O.D 값이 0.35~0.7 사이가 되도록 희석하였다. 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4)와 100 mM sodium citrate buffer (pH 7.4)를 9:1의 비율로 만든 buffer 10 ml에 TSB 3 mg과 agarose (Sigma Co., St. Louis, MO, USA) 0.1 g를 넣어 underlay agar를 만들었다. 여기에 대수증식기의 세균을 혼합하여 Petri dish (Falcon Co., Franklin, NJ, USA)에 붓고, underlay agar가 굳으면 일정한 간격으로 직경 3 mm의 구멍을 뚫은 후, 준비된 시료 5  $\mu$ l를 구멍에 loading하였다. 시료들이 loading된 underlay agar plate를 뒤집은 상태로 37°C에서 3시간 배양한 다음 TSB 0.6 g과 agarose 0.1 g이 포함된 overlay agar 10 ml를 plate에 부어 굳힌 후 37°C에서 뒤집은 상태로 12시간 배양하였다. 배양후 5% acetic acid로 세균의 성장을 중지시키고, 세균의 성장억제 정도를 나타내는 투명대의 크기를 측정하여 (1 mm = 10 unit) 항균활성의 정도를 확인하였다.

#### 하. Tricine SDS-PAGE

분리 세균 *Lactobacillus* sp. JK-11에서 얻어진 항균물질의 크기를 분석하기 위하여 사용한 방법은 Schagger and Von Jagow, 1987의 Tricine SDS-PAGE 방법을 일부 수정하여 이용하였다. Tricine SDS-PAGE는 4% stacking gel과 16.5% separating gel에 upper buffer로 cathode buffer (0.8 M Tris, pH 8.9)와 lower buffer인 anode buffer (0.4 M Tris, 0.4 M Tricine, 0.4% SDS, pH 8.23)를 사용하여 35 mA 조건 하에서 실시되었다. Bradford 방법으로 단백질 정량을 실시한 시료는 표준품이 10  $\mu$ g이 되게 맞추어 준비하고 1  $\times$  sample buffer로 총 부피를 맞춘 후, stacking gel에 주입하였다. 전개된 gel은 Coomassie brilliant blue R-250 (Sigma Co., St. Louis, MO, USA)으로 20분간 염색하고 destaining solution으로 destaining한 후 band를 확인하였다.

### 5. 새우 양식장 환경 정화를 위한 제제 개발

#### 가. 미생물제제의 생산

균주 CK-10와 CK-13을 각각 LB 배지에 24시간동안 배양하여, 원심분리용 튜브에서 원심분리시킨 후 완충용액으로 세척하여 펠릿을 준비하였다. 이러한 과정을 3회 반복 하였으며 만들어진 각 균주의 펠릿을 동결건조기에 넣어 24시간동안 동결건조 시켰다. 건조된 균체에 담체인 zeolite를 두 배가 되게 넣어 잘 혼합하여 추후 미생물제제 (microbial agent)로서 이용하기 위하여 냉장고에 보관하였다.

#### 나. 미생물제제를 이용한 수조에서의 질소/인의 제거

12 L 벤치규모의 수조에 0.01% (w/v) 양식사료를 넣고, 이전에 서술한 방법에 의해 제조된 미생물제제를 접종하여 시간 경과에 따른 잔존 질소와 인의 양을 조사하였다. 실험은 3 L의

바닷모래와 12 L 천연해수를 담은 수조에서 수행되었으며, 산소는 산소공급 장치를 통하여 수조에 공급되었으며, 온도는 25℃로 일정하게 유지하였다.

### 제 3 절 결과 및 고찰

#### 1. 새우양식장 유용 및 유해세균 검색

##### 가. 분리 세균 집락의 특성

고체배지상의 분리 세균의 집락의 형태와 색소, 그리고 집락의 분포에 대하여 관찰하였다. Table 3-1은 분리된 세균 13가지에 대한 집락의 가장자리 형태, 입면도, 질감, 빛 투과상태 그리고 색깔을 보여준다. 고체배지에 생성된 분리세균의 집락들은 사진에서 보여주고 있다 (Fig. 3-1).

Table 3-1. The Characterization of the isolates isolated from a shirmp aquaculture farm

균주번호	특이사항 (가장자리 형태; 입면도; 질감; 빛 투과상태; 색깔)	비고
M-001	렌즈형; 볼록형; 윤이남; 투과 집락; 형광색	Photo 1A
M-002	원형; 볼록형; 흐릿함; 투과 집락; 상아색	Photo 1B
M-003	렌즈형; 볼록형; 윤이남; 투과 집락; 상아색	Photo 1C
M-004	원형; 오뎅형; 윤이남; 불투과 집락; 빨간색	Photo 1D
M-005	부정형; 볼록형; 윤이남, 점액성임; 투과 집락; 상아색	Photo 1E
M-006	렌즈형; 볼록형; 흐릿함; 불투과 집락; 상아색	Photo 1F
M-007	부정형; 볼록형; 윤이남; 반투과 집락; 상아색	Photo 1G
M-008	부정형; 오뎅형; 불투과 집락; 상아색	Photo 1H
M-009	곱슬형; 융기형; 거침; 불투과 집락; 주황색	Photo 1I
M-010	부정형; 오뎅형; 윤이남; 반투과 집락; 회색	Photo 1J
M-011	부정형; 오뎅형; 윤이남; 반투과 집락; 상아색	Photo 1K
M-012	주름형; 볼록형; 거침; 투과 집락; 상아색	Photo 1L
M-013	렌즈형; 오뎅형; 윤이남; 투과 집락; 상아색	Photo 1M

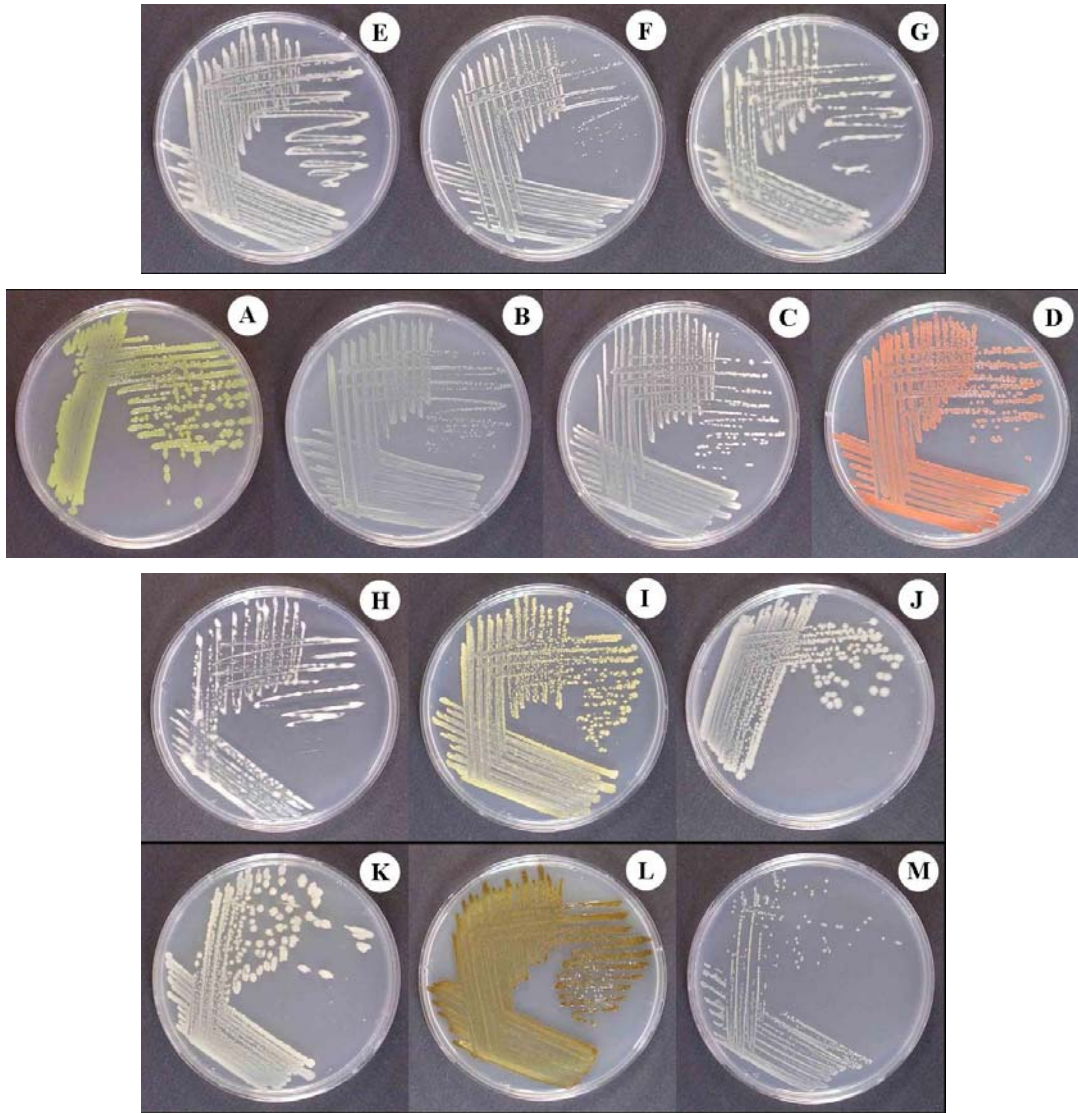


Fig. 3-1. The single colony of the isolates isolated from a shrimp aquaculture farm. A: M-001, B: M-002, C: M-003, D: M-004, E: M-005, F: M-006, G: M-007, H: M-008, I: M-009, J: M-010, K: M-011, L: M-012, M: M-013

#### 나. 분리세균의 형태학적 및 생리학적 특성

분리된 세균에 대한 생리학적 시험은 indole 생성, methyl red 반응, Voges-Proskauer 시험, 녹말 분해능, 젤라틴 분해능, catalase 생성, oxidase 생성, citrate 이용여부, H<sub>2</sub>S 생성, lithmus milk의 이용 여부에 대하여 조사하였으며 그 결과는 Tables 3-2~14에 나타나 있다.

녹말과 젤라틴을 분해하는 세균을 Table 3-15에 요약하였으며, 녹말을 분해하는 세균들에 대하여 분해 정도를 관찰하였고 (Fig. 3-2), 단백질인 젤라틴 분해정도를 각각 사진에서 보여 주고 있다 (Fig. 3-3).

Table 3-2. Morphological and physiological characteristics of the strain M-001

---

<u>Morphological characteristics</u>	
Cell shape	Coccus
Gram stain	Positive
<u>Physiological characteristics</u>	
Indole production	-
Methyl red	-
Voges-Proskauer	-
Starch hydrolysis	+
Gelatin hydrolysis	-
Catalase	-
Oxidase	-
Simmon's citrate	-
H <sub>2</sub> S (KIA) Production	-
Litmus milk (peptonization)	-

---

Table 3-3. Morphological and physiological characteristics of the strain M-002

---

<u>Morphological characteristics</u>	
Cell shape	Coccus
Gram stain	Positive
<u>Physiological characteristics</u>	
Indole production	-
Methyl red	-
Voges-Proskauer	-
Starch hydrolysis	-
Gelatin hydrolysis	+
Catalase	+
Oxidase	-
Simmon's citrate	-
H <sub>2</sub> S (KIA) Production	-
Litmus milk (peptonization)	-

---

Table 3-4. Morphological and physiological characteristics of the strain M-003

---

<u>Morphological characteristics</u>	
Cell shape	Short rod
Gram stain	Negative
<u>Physiological characteristics</u>	
Indole production	-
Methyl red	-
Voges-Proskauer	-
Starch hydrolysis	-
Gelatin hydrolysis	+
Catalase	+
Oxidase	+
Simmon's citrate	+
H <sub>2</sub> S (KIA) Production	-
Litmus milk (peptonization)	-

---

Table 3-5. Morphological and physiological characteristics of the strain M-004

---

<u>Morphological characteristics</u>	
Cell shape	Long rod
Gram stain	Positive
<u>Physiological characteristics</u>	
Indole production	-
Methyl red	-
Voges-Proskauer	-
Starch hydrolysis	-
Gelatin hydrolysis	+
Catalase	+
Oxidase	-
Simmon's citrate	-
H <sub>2</sub> S (KIA) Production	-
Litmus milk (peptonization)	-

---

Table 3-6. Morphological and physiological characteristics of the strain M-005

---

<u>Morphological characteristics</u>	
Cell shape	Coccus
Gram stain	Negative
<u>Physiological characteristics</u>	
Indole production	-
Methyl red	-
Voges-Proskauer	-
Starch hydrolysis	+
Gelatin hydrolysis	-
Catalase	+
Oxidase	+
Simmon's citrate	-
H <sub>2</sub> S (KIA) Production	-
Litmus milk (peptonization)	-

---

Table 3-7. Morphological and physiological characteristics of the strain M-006

---

<u>Morphological characteristics</u>	
Cell shape	Short rod
Gram stain	Positive
<u>Physiological characteristics</u>	
Indole production	-
Methyl red	-
Voges-Proskauer	-
Starch hydrolysis	-
Gelatin hydrolysis	+
Catalase	+
Oxidase	+
Simmon's citrate	+
H <sub>2</sub> S (KIA) Production	-
Litmus milk (peptonization)	-

---



Table 3-8. Morphological and physiological characteristics of the strain M-007

---

<u>Morphological characteristics</u>	
Cell shape	Short rod
Gram stain	Negative
<u>Physiological characteristics</u>	
Indole production	-
Methyl red	-
Voges-Proskauer	-
Starch hydrolysis	-
Gelatin hydrolysis	+
Catalase	+
Oxidase	+
Simmon's citrate	+
H <sub>2</sub> S (KIA) Production	-
Litmus milk (peptonization)	-

---

Table 3-9. Morphological and physiological characteristics of the strain M-008

---

<u>Morphological characteristics</u>	
Cell shape	Short rod
Gram stain	Positive
<u>Physiological characteristics</u>	
Indole production	-
Methyl red	-
Voges-Proskauer	-
Starch hydrolysis	-
Gelatin hydrolysis	-
Catalase	+
Oxidase	-
Simmon's citrate	-
H <sub>2</sub> S (KIA) Production	-
Litmus milk (peptonization)	-

---

Table 3-10. Morphological and physiological characteristics of the strain M-009

---

<u>Morphological characteristics</u>	
Cell shape	Long rod
Gram stain	Positive
<u>Physiological characteristics</u>	
Indole production	-
Methyl red	-
Voges-Proskauer	-
Starch hydrolysis	-
Gelatin hydrolysis	-
Catalase	+
Oxidase	-
Simmon's citrate	-
H <sub>2</sub> S (KIA) Production	-
Litmus milk (peptonization)	+

---

Table 3-11. Morphological and physiological characteristics of the strain M-010

---

<u>Morphological characteristics</u>	
Cell shape	Short rod
Gram stain	Positive
<u>Physiological characteristics</u>	
Indole production	-
Methyl red	-
Voges-Proskauer	-
Starch hydrolysis	+
Gelatin hydrolysis	+
Catalase	+
Oxidase	+
Simmon's citrate	-
H <sub>2</sub> S (KIA) Production	-
Litmus milk (peptonization)	-

---

Table 3-12. Morphological and physiological characteristics of the strain M-011

---

<u>Morphological characteristics</u>	
Cell shape	Coccus
Gram stain	Positive
<u>Physiological characteristics</u>	
Indole production	-
Methyl red	-
Voges-Proskauer	-
Starch hydrolysis	+
Gelatin hydrolysis	+
Catalase	+
Oxidase	-
Simmon's citrate	-
H <sub>2</sub> S (KIA) Production	-
Litmus milk (peptonization)	+

---

Table 3-13. Morphological and physiological characteristics of the strain M-012

---

<u>Morphological characteristics</u>	
Cell shape	Short rod
Gram stain	Positive
<u>Physiological characteristics</u>	
Indole production	-
Methyl red	-
Voges-Proskauer	-
Starch hydrolysis	+
Gelatin hydrolysis	-
Catalase	+
Oxidase	-
Simmon's citrate	-
H <sub>2</sub> S (KIA) Production	-
Litmus milk (peptonization)	-

---

Table 3-14. Morphological and physiological characteristics of the strain M-013

<u>Morphological characteristics</u>	
Cell shape	Short rod
Gram stain	Positive
<u>Physiological characteristics</u>	
Indole production	-
Methyl red	-
Voges-Proskauer	-
Starch hydrolysis	-
Gelatin hydrolysis	-
Catalase	+
Oxidase	+
Simmon's citrate	-
H <sub>2</sub> S (KIA) Production	-
Litmus milk (peptonization)	-

Table 3-15. The degradation of starch and gelatin by the isolates

균주번호	녹말 / 젤라틴 분해능		투명구역 크기 (cm)	
	녹말	젤라틴	녹말 평균	젤라틴 평균
M-001	+	-	1.13	-
M-002	-	+	-	1.46
M-003	-	+	-	1.57
M-004	-	+	-	1.54
M-005	+	+	1.74	1.49
M-006	-	-	-	-
M-007	+	+	2.21	1.81
M-008	-	-	-	-
M-009	-	-	-	-
M-010	+	+	1.24	1.67
M-011	+	+	1.11	1.50
M-012	+	-	1.60	-
M-013	-	-	-	-

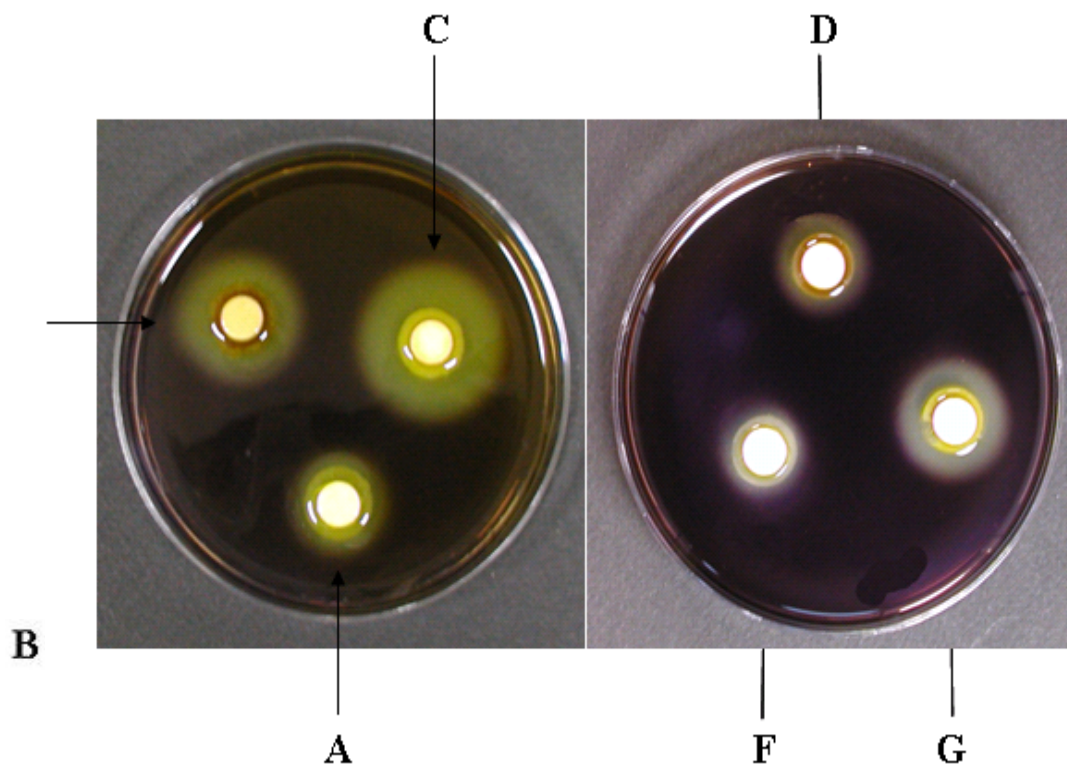


Fig. 3-2. The production of clear zone by the isolates with starch media. A: M-001, B: M-005, C: M-007, D: M-010, F: M-011, G: M-012

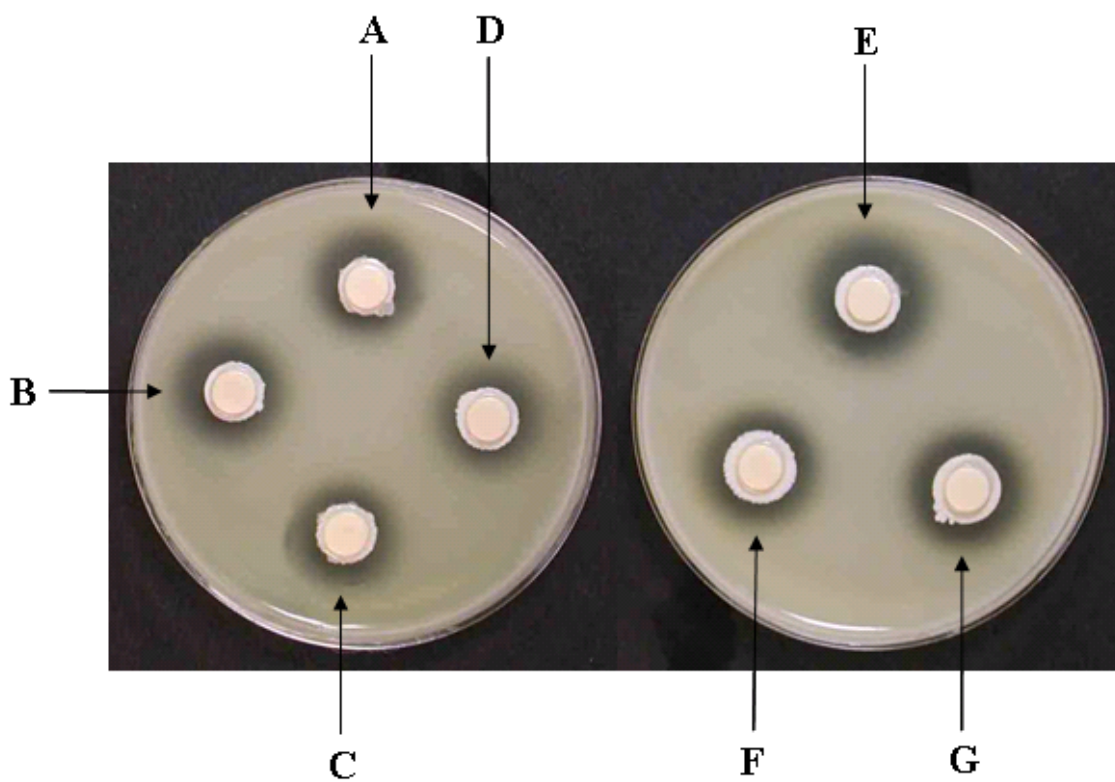


Fig. 3-3. The production of clear zone with gelatin media. A: M-002, B: M-003, C: M-004, D: M-005, E: M-007, F: M-010, G: M-011

#### 다. 분리세균의 동정

분리세균 13가지에 대한 동정은 일차적으로 그람염색의 결과를 토대로 하여 GN2 MicroPlate™ (Biolog, Inc., Hayward, CA, USA)에 접종하여 다양한 기질의 이용여부를 확인한 결과를 통하여 동정을 실시하였다 (Tables 3-16~28). Biolog 시험 결과에서 각 분리세균은 Table 3-29에서 보여주는 바와 같이 동정되었다.

Table 3-16. Physiological and biological characterization of the isolate, M-001 using the BIOLOG Analysis System

Physiological & biochemical tests		Physiological & biochemical tests	
Water	-	D-Tagatose	-
$\alpha$ -Cyclodextrin	-	D-Trehalose	+
$\beta$ -Cyclodextrin	-	Turanose	-
Dextrin	+	Xylitol	-
Glycogen	-	D-Xylose	-
Inulin	+	Acetic acid	+
Mannan	+	$\alpha$ -Hydroxybutyric acid	+
Tween 40	+	$\beta$ -Hydroxybutyric acid	-
Tween 80	+	$\gamma$ -Hydroxybutyric acid	+
<i>N</i> -Acetyl-D-glucosamine	-	$\rho$ -Hydroxyphenyl acetic acid	-
<i>N</i> -Acetyl-D-mannosamine	-	$\alpha$ -Ketoglutaric acid	-
Amygdain	+	$\alpha$ -Ketovaleric acid	+
L-Arabinose	+	Lactamide	+
D-Arabitol	+	D-Lactic acid methylester	-
Arbutin	-	L-Lactic acid	+
Cellobiose	+	D-Malic acid	-
D-Fructose	+	L-Malic acid	+
L-Fucose	-	Methylpyruvate	-
D-Galactose	-	Mono-methylsuccinate	-
D-Galacturonic acid	-	Propionic acid	-
Gentiobiose	+	Pyruvic acid	+
D-Gluconic acid	-	Succinamic acid	-
$\alpha$ -D-Glucose	+	Succinic acid	-
<i>m</i> -Inositol	-	<i>N</i> -Acetyl L-glutamic acid	+
$\alpha$ -D-lactose	-	Alaninamide	+
Lactulose	-	D-Alanine	-
Maltose	+	L-Alanine	+
Maltotriose	-	L-Alanyl-glycine	-
D-Mannitol	+	L-Asparagine	+
D-Mannose	+	L-Glutamic acid	-
D-Melezitose	+	Glycyl-L-glutamic acid	-
D-Melibiose	+	L-Pyroglutamic acid	-
$\alpha$ -Methyl D-galactoside	-	L-Serine	+
$\beta$ -Methyl D-galactoside	-	Putrescine	-
3-Methyl glucose	-	2,3-Butanediol	-
$\alpha$ -Methyl D-glucoside	-	Glycerol	+
$\beta$ -Methyl D-glucoside	-	Adenosine	+
$\alpha$ -Methyl D-mannoside	-	2-Deoxyadensine	+
Palatinose	-	Inosine	-
D- Psicose	+	Thymidine	+
D-Raffinose	-	Uridine	-
L-Rhamnose	-	Adenosine-5'-monophosphate	-
D-Ribose	+	Thymidine-5'-monophosphate	-
D-Salicin	-	Uridine-5'-monophosphate	-
Sedoheptulosan	-	Fructose-6-phosphate	+
D-Sorbitol	-	Glucose-1-phosphate	-
Stachyose	-	Glucose-6-phosphate	-
Sucrose	+	D-L- $\alpha$ -Glycerol phosphate	-

Table 3-17. Physiological and biological characterization of the isolate, M-002 using the BIOLOG Analysis System

Physiological & biochemical tests		Physiological & biochemical tests	
Water	-	D-Tagatose	-
$\alpha$ -Cyclodextrin	-	D-Trehalose	-
$\beta$ -Cyclodextrin	-	Turanose	-
Dextrin	-	Xylitol	-
Glycogen	-	D-Xylose	+
Inulin	-	Acetic acid	-
Mannan	-	$\alpha$ -Hydroxybutyric acid	-
Tween 40	-	$\beta$ -Hydroxybutyric acid	-
Tween 80	-	$\gamma$ -Hydroxybutyric acid	-
<i>N</i> -Acetyl-D-glucosamine	-	$\rho$ -Hydroxyphenyl acetic acid	-
<i>N</i> -Acetyl-D-mannosamine	-	$\alpha$ -Ketoglutaric acid	-
Amygdain	-	$\alpha$ -Ketovaleric acid	-
L-Arabinose	+	Lactamide	-
D-Arabitol	-	D-Lactic acid methylester	-
Arbutin	-	L-Lactic acid	-
Cellobiose	-	D-Malic acid	-
D-Fructose	-	L-Malic acid	-
L-Fucose	-	Methylpyruvate	-
D-Galactose	-	Mono-methylsuccinate	-
D-Galacturonic acid	-	Propionic acid	-
Gentiobiose	-	Pyruvic acid	-
D-Gluconic acid	-	Succinamic acid	-
$\alpha$ -D-Glucose	+	Succinic acid	-
<i>m</i> -Inositol	-	<i>N</i> -Acetyl L-glutamic acid	-
$\alpha$ -D-Lactose	-	Alaninamide	-
Lactulose	-	D-Alanine	-
Maltose	-	L-Alanine	-
Maltotriose	-	L-Alanyl-glycine	-
D-Mannitol	-	L-Asparagine	-
D-Mannose	-	L-Glutamic acid	-
D-Melezitose	-	Glycyl-L-glutamic acid	-
D-Melibiose	-	L-Pyroglutamic acid	-
$\alpha$ -Methyl D-galactoside	-	L-Serine	-
$\beta$ -Methyl D-galactoside	-	Putrescine	-
3-Methyl glucose	-	2,3-Butanediol	-
$\alpha$ -Methyl D-glucoside	-	Glycerol	+
$\beta$ -Methyl D-glucoside	-	Adenosine	-
$\alpha$ -Methyl D-mannoside	-	2-Deoxyadensine	-
Palatinose	-	Inosine	-
D- Psicose	+	Thymidine	-
D-Raffinose	-	Uridine	-
L-Rhamnose	-	Adenosine-5'-monophosphate	-
D-Ribose	+	Thymidine-5'-monophosphate	-
D-Salicin	-	Uridine-5'-monophosphate	-
Sedoheptulosan	-	Fructose-6-phosphate	-
D-Sorbitol	-	Glucose-1-phosphate	-
Stachyose	-	Glucose-6-phosphate	-
Sucrose	-	D-L- $\alpha$ -Glycerol phosphate	-



Table 3-18. Physiological and biological characterization of the isolate, M-003 using the BIOLOG Analysis System

Physiological & biochemical tests		Physiological & biochemical tests	
Water	-	<i>P</i> -Hydroxyphenylacetic acid	-
$\alpha$ -Cyclodextrin	-	Itaconic acid	-
Dextrin	+	$\alpha$ -Ketobutyric acid	-
Glycogen	-	$\alpha$ -Ketoglutaric acid	+
Tween 40	+	$\alpha$ -Ketovaleric acid	-
Tween 80	+	D,L-Lactic acid	-
<i>N</i> -Acetyl-D-galactosamine	-	Malonic acid	-
<i>N</i> -Acetyl-D-glucosamine	+	Propionic acid	-
Adonitol	-	Quinic acid	-
L-Arabinose	-	D-Saccharic acid	-
D-Arabitol	-	Sebacic acid	+
Cellobiose	+	Succinic acid	+
<i>i</i> -Erythritol	-	Bromo succinic acid	+
D-fructose	+	Succinamic acid	+
L-Fucose	-	Glucuronamide	-
D-Galactose	-	Alaninamide	-
Gentiobiose	-	D-Alanine	+
$\alpha$ -D-Glucose	+	L-Alanine	-
<i>m</i> -Inositol	-	L-Alanylglycine	+
$\alpha$ -D-Lactose	-	L-Asparagine	-
Lactulose	-	L-Aspartic acid	-
Maltose	+	L-Glutamic acid	+
D-Mannitol	-	Glycyl-L-aspartic acid	-
D-Mannose	+	Glycyl-L-glutamic acid	+
D-Melibiose	+	L-Histidine	-
$\beta$ -Methyl D-glucoside	+	Hydroxy-L-proline	-
Psicose	-	L-Leucine	-
D-Raffinose	-	L-Ornithine	-
L-Rhamnose	-	L-Phenylalanine	-
D-Sorbitol	-	L-Proline	+
Sucrose	+	L-Pyroglutamic acid	-
D-Trehalose	-	D-Serine	-
Turanose	+	L-Serine	+
Xylitol	-	L-Threonine	-
Methylpyruvate	-	D,L-Carnithine	-
Mono-methylsuccinate	+	$\gamma$ -Aminobutyric acid	-
Acetic acid	-	Urocanic acid	-
<i>cis</i> -Aconitic acid	-	Inosine	-
Citric acid	-	Uridine	-
Formic acid	-	Thymidine	-
D-Galactonic acid lactone	-	Phenylethylamine	-
D-Galacturonic acid	-	Putrescine	-
D-Gluconic acid	-	2-Aminoethanol	-
D-Glucosaminic acid	-	2,3-Buthanediol	-
D-Glucuronic acid	-	Glycerol	+
$\alpha$ -Hydroxybutyric acid	-	D,L- $\alpha$ -Glycerol phosphate	-
$\beta$ -Hydroxybutyric acid	-	Glucose-1-phosphate	-
$\gamma$ -Hydroxybutyric acid	-	Glucose-6-phosphate	-

Table 3-19. Physiological and biological characterization of the isolate, M-004 using the BIOLOG Analysis System

Physiological & biochemical tests		Physiological & biochemical tests	
Water	+	<i>P</i> -Hydroxyphenylacetic acid	-
$\alpha$ -Cyclodextrin	+	Itaconic acid	+
Dextrin	+	$\alpha$ -Ketobutyric acid	+
Glycogen	+	$\alpha$ -Ketoglutaric acid	+
Tween 40	+	$\alpha$ -Ketovaleric acid	+
Tween 80	+	D,L-Lactic acid	+
<i>N</i> -Acetyl-D-galactosamine	+	Malonic acid	+
<i>N</i> -Acetyl-D-glucosamine	+	Propionic acid	+
Adonitol	+	Quinic acid	+
L-Arabinose	-	D-Saccharic acid	+
D-Arabitol	+	Sebacic acid	-
Cellobiose	+	Succinic acid	+
<i>i</i> -Erythritol	+	Bromo succinic acid	+
D-Fructose	-	Succinamic acid	+
L-Fucose	+	Glucuronamide	+
D-Galactose	+	Alaninamide	+
Gentiobiose	+	D-Alanine	+
$\alpha$ -D-Glucose	+	L-Alanine	+
<i>m</i> -Inositol	+	L-Alanylglycine	+
$\alpha$ -D-Lactose	+	L-Asparagine	+
Lactulose	+	L-Aspartic acid	+
Maltose	+	L-Glutamic acid	+
D-Mannitol	+	Glycyl-L-aspartic acid	+
D-Mannose	+	Glycyl-L-glutamic acid	+
D-Melibiose	+	L-Histidine	+
$\beta$ -Methyl D-glucoside	+	Hydroxy-L-proline	+
Psicose	+	L-Leucine	+
D-Raffinose	+	L-Ornithine	+
L-Rhamnose	-	L-Phenylalanine	+
D-Sorbitol	+	L-Proline	+
Sucrose	+	L-Pyroglutamic acid	+
D-Trehalose	+	D-Serine	-
Turanose	+	L-Serine	+
Xylitol	+	L-Threonine	+
Methylpyruvate	+	D,L-Carnitine	+
Mono-methylsuccinate	+	$\gamma$ -aminobutyric acid	+
Acetic acid	+	Urocanic acid	-
<i>cis</i> -Aconitic acid	+	Inosine	+
Citric acid	+	Uridine	+
Formic acid	+	Thymidine	-
D-Galactonic acid lactone	+	Phenylethylamine	+
D-Galacturonic acid	+	Putrescine	+
D-Gluconic acid	+	2-Aminoethanol	-
D-Glucosaminic acid	+	2,3-Buthanediol	+
D-Glucuronic acid	+	Glycerol	+
$\alpha$ -Hydroxybutyric acid	+	D,L- $\alpha$ -Glycerol phosphate	+
$\beta$ -Hydroxybutyric acid	-	Glucose-1-phosphate	+
$\gamma$ -Hydroxybutyric acid	+	Glucose-6-phosphate	+

Table 3-20. Physiological and biological characterization of the isolate, M-005 using the BIOLOG Analysis System

Physiological & biochemical tests		Physiological & biochemical tests	
Water	-	<i>P</i> -Hydroxyphenylacetic acid	-
$\alpha$ -Cyclodextrin	+	Itaconic acid	-
Dextrin	+	$\alpha$ -Ketobutyric acid	-
Glycogen	+	$\alpha$ -Ketoglutaric acid	-
Tween 40	+	$\alpha$ -Ketovaleric acid	-
Tween 80	+	D,L-Lactic acid	+
<i>N</i> -Acetyl-D-galactosamine	-	Malonic acid	-
<i>N</i> -Acetyl-D-glucosamine	+	Propionic acid	-
Adonitol	-	Quinic acid	-
L-Arabinose	+	D-Saccharic acid	-
D-Arabitol	-	Sebacic acid	-
Cellobiose	-	Succinic acid	+
<i>i</i> -Erythritol	-	Bromo succinic acid	+
D-Fructose	+	Succinamic acid	-
L-Fucose	-	Glucuronamide	-
D-Galactose	+	Alaninamide	-
Gentiobiose	-	D-Alanine	+
$\alpha$ -D-Glucose	+	L-Alanine	-
<i>m</i> -Inositol	-	L-Alanylglycine	+
$\alpha$ -D-Lactose	-	L-Asparagine	+
Lactulose	-	L-Aspartic acid	+
Maltose	+	L-Glutamic acid	+
D-Mannitol	+	Glycyl-L-aspartic acid	-
D-Mannose	+	Glycyl-L-glutamic acid	+
D-Melibiose	-	L-Histidine	-
$\beta$ -Methyl D-glucoside	+	Hydroxy-L-proline	-
Psicose	+	L-Leucine	-
D-Raffinose	-	L-Ornithine	-
L-Rhamnose	-	L-Phenylalanine	-
D-Sorbitol	-	L-Proline	+
Sucrose	-	L-Pyroglutamic acid	-
D-Trehalose	+	D-Serine	-
Turanose	+	L-Serine	+
Xylitol	-	L-Threonine	+
Methylpyruvate	+	D,L-Carnithine	-
Mono-methylsuccinate	+	$\gamma$ -Aminobutyric acid	-
Acetic acid	+	Urocanic acid	+
<i>cis</i> -Aconitic acid	-	Inosine	+
Citric acid	-	Uridine	+
Formic acid	-	Thymidine	+
D-Galactonic acid lactone	-	Phenylethylamine	-
D-Galacturonic acid	-	Putrescine	-
D-Gluconic acid	-	2-Aminoethanol	-
D-Glucosaminic acid	-	2,3-Buthanediol	-
D-Glucuronic acid	+	Glycerol	+
$\alpha$ -Hydroxybutyric acid	-	D,L- $\alpha$ -Glycerol phosphate	+
$\beta$ -Hydroxybutyric acid	-	Glucose-1-phosphate	-
$\gamma$ -Hydroxybutyric acid	-	Glucose-6-phosphate	+

Table 3-21. Physiological and biological characterization of the isolate, M-006 using the BIOLOG Analysis System

Physiological & biochemical tests		Physiological & biochemical tests	
Water	-	<i>P</i> -Hydroxyphenylacetic acid	-
$\alpha$ -Cyclodextrin	+	Itaconic acid	-
Dextrin	+	$\alpha$ -Ketobutyric acid	-
Glycogen	+	$\alpha$ -ketoglutaric acid	+
Tween 40	+	$\alpha$ -Ketovaleric acid	+
Tween 80	+	D,L-Lactic acid	+
<i>N</i> -Acetyl-D-galactosamine	-	Malonic acid	-
<i>N</i> -Acetyl-D-glucosamine	-	Propionic acid	-
Adonitol	-	Quinic acid	-
L-Arabinose	+	D-Saccharic acid	-
D-Arabitol	+	Sebacic acid	-
Cellobiose	+	Succinic acid	+
<i>i</i> -Erythritol	+	Bromo succinic acid	+
D-Fructose	+	Succinamic acid	+
L-Fucose	-	Glucuronamide	+
D-Galactose	-	Alaninamide	+
Gentiobiose	+	D-Alanine	-
$\alpha$ -D-Glucose	+	L-Alanine	+
<i>m</i> -Inositol	-	L-Alanylglycine	+
$\alpha$ -D-Lactose	-	L-Asparagine	+
Lactulose	-	L-Aspartic acid	+
Maltose	+	L-Glutamic acid	+
D-Mannitol	-	Glycyl-L-aspartic acid	-
D-Mannose	+	Glycyl-L-glutamic acid	-
D-Melibiose	+	L-Histidine	+
$\beta$ -Methyl D-glucoside	+	Hydroxy-L-proline	-
Psicose	+	L-Leucine	+
D-Raffinose	+	L-Ornithine	-
L-Rhamnose	-	L-Phenylalanine	+
D-Sorbitol	-	L-Proline	+
Sucrose	+	L-Pyroglutamic acid	+
D-Trehalose	+	D-Serine	-
Turanose	-	L-Serine	+
Xylitol	-	L-Threonine	+
Methylpyruvate	+	D,L-Carnithine	-
Mono-methylsuccinate	+	$\gamma$ -Aminobutyric acid	+
Acetic acid	+	Urocanic acid	-
<i>cis</i> -Aconitic acid	+	Inosine	+
Citric acid	+	Uridine	-
Formic acid	-	Thymidine	+
D-Galactonic acid lactone	-	Phenylethylamine	-
D-Galacturonic acid	-	Putrescine	-
D-Gluconic acid	-	2-Aminoethanol	-
D-Glucosaminic acid	-	2,3-Buthanediol	+
D-Glucuronic acid	-	Glycerol	+
$\alpha$ -Hydroxybutyric acid	-	D,L- $\alpha$ -Glycerolphosphate	-
$\beta$ -Hydroxybutyric acid	+	Glucose-1-phosphate	-
$\gamma$ -Hydroxybutyric acid	+	Glucose-6-phosphate	-

Table 3-22. Physiological and biological characterization of the isolate, M-007 using the BIOLOG Analysis System

Physiological & biochemical tests		Physiological & biochemical tests	
Water	-	<i>P</i> -Hydroxyphenylacetic acid	-
$\alpha$ -Cyclodextrin	-	Itaconic acid	-
Dextrin	+	$\alpha$ -Ketobutyric acid	-
Glycogen	+	$\alpha$ -Ketoglutaric acid	-
Tween 40	+	$\alpha$ -Ketovaleric acid	-
Tween 80	+	D,L-Lactic acid	+
<i>N</i> -Acetyl-D-galactosamine	-	Malonic acid	-
<i>N</i> -Acetyl-D-glucosamine	+	Propionic acid	-
Adonitol	-	Quinic acid	-
L-Arabinose	-	D-saccharic acid	-
D-Arabitol	-	Sebacic acid	-
Cellobiose	-	Succinic acid	-
<i>i</i> -Erythritol	-	Bromo succinic acid	-
D-Fructose	+	Succinamic acid	-
L-Fucose	-	Glucuronamide	-
D-Galactose	-	Alaninamide	-
Gentiobiose	-	D-Alanine	-
$\alpha$ -D-Glucose	+	L-Alanine	-
<i>m</i> -Inositol	-	L-Alanylglycine	+
$\alpha$ -D-Lactose	-	L-Asparagine	-
Lactulose	-	L-Aspartic acid	-
Maltose	+	L-Glutamic acid	-
D-Mannitol	+	Glycyl-L-aspartic acid	-
D-Mannose	+	Glycyl-L-glutamic acid	-
D-Melibiose	-	L-Histidine	-
$\beta$ -Methyl D-glucoside	-	Hydroxy-L-proline	-
Psicose	+	L-Leucine	-
D-Raffinose	-	L-Ornithine	-
L-Rhamnose	-	L-Phenylalanine	-
D-Sorbitol	-	L-Proline	-
Sucrose	+	L-Pyroglutamic acid	-
D-Trehalose	+	D-Serine	-
Turanose	-	L-Serine	-
Xylitol	-	L-Threonine	-
Methylpyruvate	-	D,L-Carnithine	-
Mono-methylsuccinate	-	$\gamma$ -Aminobutyric acid	-
Acetic acid	+	Urocanic acid	-
<i>cis</i> -Aconitic acid	-	Inosine	+
Citric acid	-	Uridine	-
Formic acid	-	Thymidine	-
D-Galactonic acid lactone	-	Phenylethylamine	-
D-Galacturonic acid	-	Putrescine	-
D-Gluconic acid	-	2-Aminoethanol	-
D-Glucosaminic acid	-	2,3-Buthanediol	-
D-Glucuronic acid	-	Glycerol	-
$\alpha$ -Hydroxybutyric acid	-	D,L- $\alpha$ -Glycerol phosphate	-
$\beta$ -Hydroxybutyric acid	-	Glucose-1-phosphate	-
$\gamma$ -Hydroxybutyric acid	-	Glucose-6-phosphate	-

Table 3-23. Physiological and biological characterization of the isolate, M-008 using the BIOLOG Analysis System

Physiological & biochemical tests		Physiological & biochemical tests	
Water	-	<i>P</i> -Hydroxyphenylacetic acid	-
$\alpha$ -Cyclodextrin	-	Itaconic acid	-
Dextrin	-	$\alpha$ -Ketobutyric acid	+
Glycogen	+	$\alpha$ -Ketoglutaric acid	+
Tween 40	+	$\alpha$ -Ketovaleric acid	+
Tween 80	+	D,L-Lactic acid	-
<i>N</i> -Acetyl-D-galactosamine	-	Malonic acid	-
<i>N</i> -Acetyl-D-glucosamine	-	Propionic acid	+
Adonitol	-	Quinic acid	+
L-Arabinose	-	D-Saccharic acid	-
D-Arabitol	+	Sebacic acid	+
Cellobiose	+	Succinic acid	+
<i>i</i> -Erythritol	+	Bromo succinic acid	-
D-Fructose	-	Succinamic acid	+
L-Fucose	-	Glucuronamide	-
D-Galactose	-	Alaninamide	+
Gentiobiose	-	D-Alanine	-
$\alpha$ -D-Glucose	-	L-Alanine	-
<i>m</i> -Inositol	-	L-Alanylglycine	+
$\alpha$ -D-Lactose	+	L-Asparagine	+
Lactulose	+	L-Aspartic acid	+
Maltose	+	L-Glutamic acid	+
D-Mannitol	+	Glycyl-L-aspartic acid	+
D-Mannose	-	Glycyl-L-glutamic acid	+
D-Melibiose	+	L-Histidine	+
$\beta$ -Methyl D-glucoside	-	Hydroxy-L-proline	+
Psicose	-	L-Leucine	+
D-Raffinose	-	L-Ornithine	+
L-Rhamnose	-	L-Phenylalanine	+
D-Sorbitol	+	L-Proline	-
Sucrose	+	L-Pyroglutamic acid	+
D-Trehalose	+	D-Serine	-
Turanose	-	L-Serine	+
Xylitol	+	L-Threonine	-
Methylpyruvate	-	D,L-Carnithine	-
Mono-methylsuccinate	+	$\gamma$ -Aminobutyric acid	+
Acetic acid	-	Urocanic acid	-
<i>cis</i> -Aconitic acid	+	Inosine	-
Citric acid	-	Uridine	-
Formic acid	-	Thymidine	-
D-Galactonic acid lactone	-	Phenylethylamine	-
D-Galacturonic acid	-	Putrescine	-
D-Gluconic acid	-	2-Aminoethanol	-
D-Glucosaminic acid	+	2,3-Buthanediol	-
D-Glucuronic acid	-	Glycerol	-
$\alpha$ -Hydroxybutyric acid	-	D,L- $\alpha$ -Glycerol phosphate	+
$\beta$ -Hydroxybutyric acid	+	Glucose-1-phosphate	+
$\gamma$ -Hydroxybutyric acid	-	Glucose-6-phosphate	+

Table 3-24. Physiological and biological characterization of the isolate, M-009 using the BIOLOG Analysis System

Physiological & biochemical tests		Physiological & biochemical tests	
Water	-	D-Tagatose	+
$\alpha$ -Cyclodextrin	-	D-Trehalose	+
$\beta$ -Cyclodextrin	+	Turanose	+
Dextrin	+	Xylitol	+
Glycogen	-	D-Xylose	+
Inulin	-	Acetic acid	+
Mannan	+	$\alpha$ -Hydroxybutyric acid	+
Tween 40	+	$\beta$ -Hydroxybutyric acid	+
Tween 80	+	$\gamma$ -Hydroxybutyric acid	+
<i>N</i> -Acetyl-D-glucosamine	-	$\rho$ -Hydroxyphenyl acetic acid	-
<i>N</i> -Acetyl-D-mannosamine	+	$\alpha$ -Ketoglutaric acid	+
Amygdain	+	$\alpha$ -Ketovaleric acid	+
L-Arabinose	+	Lactamide	-
D-Arabitol	+	D-Lactic acid methylester	+
Arbutin	+	L-Lactic acid	+
Cellobiose	+	D-Malic acid	-
D-Fructose	+	L-Malic acid	-
L-Fucose	-	Methylpyruvate	+
D-Galactose	+	Mono-methylsuccinate	+
D-Galacturonic acid	+	Propionic acid	+
Gentiobiose	+	Pyruvic acid	+
D-Gluconic acid	+	Succinamic acid	+
$\alpha$ -D-Glucose	+	Succinic acid	+
<i>m</i> -Inositol	+	<i>N</i> -Acetyl L-glutamic acid	+
$\alpha$ -D-Lactose	-	Alaninamide	+
Lactulose	-	D-Alanine	-
Maltose	+	L-Alanine	-
Maltotriose	+	L-Alanyl-glycine	-
D-Mannitol	+	L-Asparagine	-
D-Mannose	+	L-Glutamic acid	+
D-Melezitose	+	Glycyl-L-glutamic acid	-
D-Melibiose	+	L-Pyroglutamic acid	+
$\alpha$ -Methyl D-galactoside	-	L-Serine	-
$\beta$ -Methyl D-galactoside	-	Putrescine	-
3-Methyl glucose	+	2,3-Butanediol	-
$\alpha$ -Methyl D-glucoside	+	Glycerol	+
$\beta$ -Methyl D-glucoside	+	Adenosine	+
$\alpha$ -Methyl D-mannoside	-	2-Deoxyadensine	-
Palatinose	+	Inosine	-
D- Psicose	+	Thymidine	+
D-Raffinose	+	Uridine	+
L-Rhamnose	-	Adenosine-5'-monophosphate	-
D-Ribose	+	Thymidine-5'-monophosphate	-
D-Salicin	+	Uridine-5'-monophosphate	+
Sedoheptulosan	-	Fructose-6-phosphate	+
D-Sorbitol	+	Glucose-1-phosphate	-
Stachyose	-	Glucose-6-phosphate	+
Sucrose	+	D-L- $\alpha$ -Glycerol phosphate	-

Table 3-25. Physiological and biological characterization of the isolate, M-010 using the BIOLOG Analysis System

Physiological & biochemical tests		Physiological & biochemical tests	
Water	-	<i>P</i> -Hydroxyphenylacetic acid	-
$\alpha$ -Cyclodextrin	-	Itaconic acid	-
Dextrin	-	$\alpha$ -Ketobutyric acid	-
Glycogen	-	$\alpha$ -Ketoglutaric acid	-
Tween 40	+	$\alpha$ -Ketovaleric acid	-
Tween 80	+	D,L-Lactic acid	-
<i>N</i> -Acetyl-D-galactosamine	-	Malonic acid	-
<i>N</i> -Acetyl-D-glucosamine	-	Propionic acid	-
Adonitol	-	Quinic acid	-
L-Arabinose	-	D-Saccharic acid	-
D-Arabitol	-	Sebacic acid	-
Cellobiose	-	Succinic acid	+
<i>i</i> -Erythritol	-	Bromo succinic acid	-
D-Fructose	-	Succinamic acid	-
L-Fucose	-	Glucuronamide	-
D-Galactose	-	Alaninamide	-
Gentiobiose	-	D-Alanine	-
$\alpha$ -D-Glucose	-	L-Alanine	-
<i>m</i> -Inositol	-	L-Alanylglycine	-
$\alpha$ -D-Lactose	-	L-Asparagine	-
Lactulose	-	L-Aspartic acid	-
Maltose	-	L-Glutamic acid	-
D-Mannitol	-	Glycyl-L-aspartic acid	-
D-Mannose	-	Glycyl-L-glutamic acid	-
D-Melibiose	-	L-Histidine	-
$\beta$ -Methyl D-glucoside	-	Hydroxy-L-proline	-
Psicose	-	L-Leucine	-
D-Raffinose	-	L-Ornithine	-
L-Rhamnose	-	L-Phenylalanine	-
D-Sorbitol	-	L-Proline	-
Sucrose	-	L-Pyroglutamic acid	-
D-Trehalose	-	D-Serine	-
Turanose	-	L-Serine	-
Xylitol	-	L-Threonine	-
Methylpyruvate	-	D,L-Carnithine	+
Mono-methylsuccinate	-	$\gamma$ -Aminobutyric acid	+
Acetic acid	-	Urocanic acid	-
<i>cis</i> -Aconitic acid	-	Inosine	-
Citric acid	-	Uridine	-
Formic acid	-	Thymidine	-
D-Galactonic acid lactone	-	Phenylethylamine	-
D-Galacturonic acid	-	Putrescine	-
D-gluconic acid	-	2-Aminoethanol	-
D-Glucosaminic acid	-	2,3-Buthanediol	-
D-Glucuronic acid	-	Glycerol	-
$\alpha$ -Hydroxybutyric acid	-	D,L- $\alpha$ -Glycerolphosphate	-
$\beta$ -Hydroxybutyric acid	-	Glucose-1-phosphate	-
$\gamma$ -Hydroxybutyric acid	-	Glucose-6-phosphate	-



Table 3-26. Physiological and biological characterization of the isolate, M-011 using the BIOLOG Analysis System

Physiological & biochemical tests		Physiological & biochemical tests	
Water	-	D-Tagatose	+
$\alpha$ -Cyclodextrin	-	D-Trehalose	-
$\beta$ -Cyclodextrin	-	Turanose	-
Dextrin	-	Xylitol	-
Glycogen	-	D-Xylose	+
Inulin	-	Acetic acid	+
Mannan	-	$\alpha$ -Hydroxybutyric acid	+
Tween 40	+	$\beta$ -Hydroxybutyric acid	-
Tween 80	+	$\gamma$ -Hydroxybutyric acid	-
<i>N</i> -Acetyl-D-glucosamine	-	$\rho$ -Hydroxyphenyl acetic acid	-
<i>N</i> -Acetyl-D-mannosamine	-	$\alpha$ -Ketoglutaric acid	-
Amygdain	-	$\alpha$ -Ketovaleric acid	+
L-Arabinose	-	Lactamide	-
D-Arabitol	-	D-Lactic acid methylester	-
Arbutin	-	L-Lactic acid	-
Cellobiose	-	D-Malic acid	-
D-Fructose	-	L-Malic acid	-
L-Fucose	-	Methylpyruvate	-
D-Galactose	-	Mono-methylsuccinate	-
D-Galacturonic acid	-	Propionic acid	-
Gentiobiose	-	Pyruvic acid	-
D-Gluconic acid	-	Succinamic acid	-
$\alpha$ -D-Glucose	-	Succinic acid	-
<i>m</i> -Inositol	-	<i>N</i> -Acetyl L-glutamic acid	-
$\alpha$ -D-lactose	-	Alaninamide	-
Lactulose	-	D-Alanine	-
Maltose	-	L-Alanine	-
Maltotriose	-	L-Alanyl-glycine	-
D-Mannitol	-	L-Asparagine	-
D-Mannose	-	L-glutamic acid	-
D-Melezitose	-	Glycyl-L-glutamic acid	-
D-Melibiose	-	L-Pyroglutamic acid	+
$\alpha$ -Methyl D-galactoside	-	L-Serine	-
$\beta$ -Methyl D-galactoside	-	Putrescine	-
3-Methyl glucose	-	2,3-Butanediol	-
$\alpha$ -Methyl D-glucoside	-	Glycerol	+
$\beta$ -methyl D-glucoside	-	Adenosine	-
$\alpha$ -Methyl D-mannoside	-	2-Deoxyadensine	-
Palatinose	-	Inosine	-
D- Psicose	+	Thymidine	-
D-Raffinose	-	Uridine	+
L-Rhamnose	-	Adenosine-5'-monophosphate	-
D-Ribose	+	Thymidine-5'-monophosphate	-
D-Salicin	-	Uridine-5'-monophosphate	-
Sedoheptulosan	-	Fructose-6-phosphate	-
D-Sorbitol	-	Glucose-1-phosphate	-
Stachyose	-	Glucose-6-phosphate	-
Sucrose	-	D-L- $\alpha$ -Glycerolphosphate	-

Table 3-27. Physiological and biological characterization of the isolate, M-012 using the BIOLOG Analysis System

Physiological & biochemical tests		Physiological & biochemical tests	
Water	-	D-Tagatose	+
$\alpha$ -Cyclodextrin	-	D-Trehalose	+
$\beta$ -Cyclodextrin	-	Turanose	+
Dextrin	+	Xylitol	+
Glycogen	-	D-Xylose	+
Inulin	-	Acetic acid	+
Mannan	+	$\alpha$ -Hydroxybutyric acid	+
Tween 40	+	$\beta$ -Hydroxybutyric acid	+
Tween 80	+	$\gamma$ -Hydroxybutyric acid	+
<i>N</i> -Acetyl-D-glucosamine	-	$\rho$ -Hydroxyphenyl acetic acid	-
<i>N</i> -Acetyl-D-mannosamine	-	$\alpha$ -Ketoglutaric acid	+
Amygdain	-	$\alpha$ -Ketovaleric acid	+
L-Arabinose	+	Lactamide	-
D-Arabitol	+	D-Lactic acid methylester	+
Arbutin	-	L-Lactic acid	+
Cellobiose	-	D-Malic acid	-
D-Fructose	+	L-Malic acid	-
L-Fucose	-	Methylpyruvate	+
D-Galactose	-	Mono-methyl succinate	+
D-Galacturonic acid	-	Propionic acid	+
Gentiobiose	-	Pyruvic acid	+
D-Gluconic acid	-	Succinamic acid	+
$\alpha$ -D-Glucose	+	Succinic acid	+
<i>m</i> -Inositol	-	<i>N</i> -Acetyl L-glutamic acid	+
$\alpha$ -D-Lactose	-	Alaninamide	+
Lactulose	-	D-Alanine	-
Maltose	-	L-Alanine	-
Maltotriose	-	L-Alanyl-glycine	-
D-Mannitol	+	L-Asparagine	-
D-Mannose	+	L-Glutamic acid	+
D-Melezitose	-	Glycyl-L-glutamic acid	-
D-Melibiose	-	L-Pyroglutamic acid	+
$\alpha$ -Methyl D-galactoside	-	L-Serine	-
$\beta$ -Methyl D-galactoside	-	Putrescine	-
3-Methyl glucose	-	2,3-Butanediol	-
$\alpha$ -Methyl D-glucoside	-	Glycerol	+
$\beta$ -Methyl D-glucoside	-	Adenosine	+
$\alpha$ -Methyl D-mannoside	-	2-Deoxyadensine	-
Palatinose	+	Inosine	-
D- Psicose	+	Thymidine	+
D-Raffinose	+	Uridine	+
L-Rhamnose	-	Adenosine-5'-monophosphate	-
D-Ribose	+	Thymidine-5'-monophosphate	-
D-Salicin	+	Uridine-5'-monophosphate	+
Sedoheptulosan	-	Fructose-6-phosphate	+
D-Sorbitol	+	Glucose-1-phosphate	-
Stachyose	-	Glucose-6-phosphate	+
Sucrose	+	D-L- $\alpha$ -Glycerol phosphate	-

Table 3-28. Physiological and biological characterization of the isolate, M-013 using the BIOLOG Analysis System

Physiological & biochemical tests		Physiological & biochemical tests	
Water	-	<i>P</i> -Hydroxyphenylacetic acid	-
$\alpha$ -Cyclodextrin	-	Itaconic acid	-
Dextrin	-	$\alpha$ -Ketobutyric acid	-
Glycogen	+	$\alpha$ -Ketoglutaric acid	-
Tween 40	+	$\alpha$ -Ketovaleric acid	-
Tween 80	+	D,L-Lactic acid	-
<i>N</i> -Acetyl-D-galactosamine	-	Malonic acid	-
<i>N</i> -Acetyl-D-glucosamine	-	Propionic acid	-
Adonitol	-	Quinic acid	-
L-Arabinose	-	D-Saccharic acid	-
D-Arabitol	-	Sebacic acid	-
Cellobiose	-	Succinic acid	-
<i>i</i> -Erythritol	-	Bromo succinic acid	-
D-Fructose	-	Succinamic acid	-
L-Fucose	-	Glucuronamide	-
D-Galactose	-	Alaninamide	-
Gentiobiose	-	D-Alanine	-
$\alpha$ -D-Glucose	-	L-Alanine	-
<i>m</i> -Inositol	-	L-Alanylglycine	-
$\alpha$ -D-Lactose	-	L-Asparagine	-
Lactulose	-	L-Aspartic acid	-
Maltose	-	L-Glutamic acid	+
D-Mannitol	-	Glycyl-L-aspartic acid	-
D-Mannose	-	Glycyl-L-glutamic acid	-
D-Melibiose	-	L-Histidine	-
$\beta$ -Methyl D-glucoside	-	Hydroxy-L-proline	-
Psicose	-	L-Leucine	-
D-Raffinose	-	L-Ornithine	-
L-Rhamnose	-	L-Phenylalanine	-
D-Sorbitol	-	L-Proline	-
Sucrose	-	L-Pyroglutamic acid	-
D-Trehalose	-	D-Serine	-
Turanose	-	L-Serine	+
Xylitol	-	L-Threonine	-
Methylpyruvate	+	D,L-Camitine	-
Mono-methylsuccinate	-	$\gamma$ -Aminobutyric acid	-
Acetic acid	-	Urocanic acid	-
<i>cis</i> -Aconitic acid	-	Inosine	-
Citric acid	-	Uridine	-
Formic acid	-	Thymidine	-
D-Galactonic acid lactone	-	Phenylethylamine	-
D-Galacturonic acid	-	Putrescine	-
D-Gluconic acid	-	2-Aminoethanol	-
D-Glucosaminic acid	-	2,3-Buthanediol	-
D-Glucuronic acid	-	Glycerol	-
$\alpha$ -Hydroxybutyric acid	-	D,L- $\alpha$ -Glycerol phosphate	-
$\beta$ -Hydroxybutyric acid	-	Glucose-1-phosphate	-
$\gamma$ -Hydroxybutyric acid	-	Glucose-6-phosphate	-

Table 3-29. The identification of the isolates

균주번호	동정
M-001	<i>Corynebacterium nitrilophilus</i>
M-002	<i>Clavibacter agropyri</i>
M-003	<i>Sphingomonas adhaesiva</i>
M-004	<i>Brevundimonas vesicularis</i>
M-005	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
M-006	<i>Pseudomonas bathycetes</i>
M-007	<i>Vibrio tubiashii</i>
M-008	<i>Sphingomonas macrogoltabidus</i>
M-009	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>
M-010	<i>Burkholderia glumae</i>
M-011	<i>Corynebacterium urealyticus</i>
M-012	<i>Rhodococcus fascians</i>
M-013	<i>Psychrobacter immobilis</i>

## 2. 미생물에 의한 새우 양식장 환경정화: 미생물학적 질소 및 인 제거

### 가. 세균의 분리

새우양식장에서 채취한 물시료로부터 농화 배양기법을 통하여 얻어진 미생물 검소시범에서 질소원으로서  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ , 또는  $\text{NO}_3^-$ 를 그리고 인원으로서  $\text{PO}_4^{3-}$ 을 포함하는 무기 고체 평판 배지에 5 차례에 걸친 계대 (subculturing)를 통하여 질소와 인의 제거능을 가지는 4개의 단일 세균을 선별하였다. 이렇게 선별된 세균들은 N/P 제거 액체 배지에 옮겨 25°C에서 분당 150 회로 회전하는 회전 진탕 배양기에서 배양하면서 질소 및 인 제거능을 확인하였다. 그 중에서 질소와 인의 제거능이 탁월한 2개의 균주를 선정하여 본 연구에 사용하였다.

### 나. 분리세균의 형태학적 관찰 및 생리 화학적 특성

두 개의 분리 세균에 대하여 잠정적으로 균주 CK-10과 CK-13이라 명명하고, 형태학적 관찰과 생리 화학적 특성을 조사하였다.

균주 CK-10은 간상형이었으며 그람 양성으로 나타났다. CK-10의 생리 화학적 시험을 실시한 결과는 Table 3-30에 나타나 있다. Indole 형성 유무시험은 음성으로 나타났으며, methyl red-voges proskauer (MR-VP) 시험과 disulfhydrase에 의한  $\text{H}_2\text{S}$ 의 형성 시험에서도 음성반응을 나타내었다. Gelatinase, amylase 그리고 catalase의 존재 여부 시험은 모두 양성반응이었으며, oxidase와 urease의 존재 여부 시험은 음성으로 나타났었다. 탄소원과 에너지원으로 citrate의 이용여부를 알아보는 Simmon's citrate 이용시험은 음성으로 나타났으며, lithmus milk 시험에서는 단백질을 분해하였으며, 펩톤화 (peptonization)는 되지 않았다.

균주 CK-13은 간상형이었으며 그람 양성으로 나타났다. CK-13의 생리 화학적 시험을 실시한 결과는 Table 3-31에 나타나 있다. Indole 형성 유무시험은 음성으로 나타났으며, MR-VP

시험과 Disulphydrase에 의한 H<sub>2</sub>S의 형성 시험에서도 음성반응을 나타내었다. Gelatinase, amylase, catalase 그리고 urease의 존재 여부 시험결과는 모두 양성반응이었지만, oxidase 존재 여부 시험은 음성을 나타냈다. 탄소원과 에너지원으로 citrate의 이용여부를 알아보는 Simmon's citrate 이용시험은 음성으로 나타났으며, lithmus milk 시험에서는 단백질을 분해하였으며, 펩톤화는 되지 않았다.

Table 3-30. Morphological and physiological characteristics of the strain CK-10

<u>Morphological characteristics</u>	
Cell shape	Long rod
Gram staining	positive
<u>Physiological characteristics</u>	
Indole production	-
Methyl red	-
Voges-Proskauer	-
Starch hydrolysis	+
Gelatin hydrolysis	+
Catalase	+
Oxidase	-
Simmon's citrate	-
H <sub>2</sub> S (KIA)	-
Litmus milk (peptonization)	-
Chritensen's urease	-
Phenylalanine deaminase	-

+ : Positive reaction, - : Negative reaction

Table 3-31. Morphological and physiological characteristics of the strain CK-13

---

**Morphological characteristics**

Cell shape	Long rod
Gram staining	positive

**Physiological characteristics**

Indole production	-
Methyl red	-
Voges-Proskauer	-
Starch hydrolysis	+
Gelatin hydrolysis	+
Catalase	+
Oxidase	-
Simmon's citrate	-
H <sub>2</sub> S (KIA)	-
Litmus milk (peptonization)	-
Chritensen's urease	+
Phenylalanine deaminase	-

---

**+ : Positive reaction, - : Negative reaction**

다. 분리 세균의 동정

형태학적 및 생리학적 특성을 관찰한 분리세균 CK-10과 CK-13에 대하여 동정 (identification)하였다. 두 균주 CK-10과 CK-13에 대하여 다양한 탄소원 이용여부를 동정하는 BIOLOG system을 사용하였고, 그 결과를 Table 3-32와 Table 3-33에 각각 나타내었다. 또한 16s rDNA 염기서열을 분석하여 동정을 실시한 결과, 이들 분리세균 CK-10은 *Bacillus subtilis* 로 CK-13은 *Bacillus thuringiensis*로 각각 동정되었으며, GeneBank에 각각 [AY941803]과 [AY941804]로 등록되었다. 분리세균 CK-10과 CK-13의 16s rDNA의 염기서열은 각각 Fig. 3-4와 Fig. 3-5에 나타나 있다.

Table 3-32. Physiological and biochemical characterization of the isolate, CK-10 using the BIOLOG Analysis System

Physiological & biochemical tests		Physiological & biochemical tests	
Water	-	D-Tagatose	-
$\alpha$ -Cyclodextrin	-	D-Trehalose	+
$\beta$ -Cyclodextrin	+	Turanose	+
Dextrin	+	Xylitol	-
Glycogen	+	D-Xylose	-
Inulin	-	Acetic acid	+
Mannan	+	$\alpha$ -Hydroxybutyric acid	-
Tween 40	+	$\beta$ -Hydroxybutyric acid	-
Tween 80	+	$\gamma$ -Hydroxybutyric acid	-
N-Acetyl-D-glucosamine	+	$\rho$ -Hydroxyphenyl acetic acid	-
N-Acetyl-D-mannosamine	+	$\alpha$ -Ketoglutaric acid	+
Amygdain	+	$\alpha$ -Ketovaleric acid	+
L-Arabinose	-	Lactamide	-
D-Arabitol	-	D-Lactic acid methylester	+
Arbutin	+	L-Lactic acid	+
Cellobiose	+	D-Malic acid	-
D-Fructose	+	L-Malic acid	+
L-Fucose	-	Methylpyruvate	+
D-Galactose	+	Mono-methylsuccinate	+
D-Galacturonic acid	-	Propionic acid	-
Gentiobiose	+	Pyruvic acid	+
D-Gluconic acid	+	Succinamic acid	+
$\alpha$ -D-Glucose	+	Succinic acid	+
<i>m</i> -Inositol	-	N-Acetyl L-glutamic acid	+
$\alpha$ -D-Lactose	-	Alaninamide	-
Lactulose	-	D-Alanine	+
Maltose	+	L-Alanine	+
Maltotriose	+	L-Alanyl-glycine	+
D-Mannitol	+	L-Asparagine	+
D-Mannose	+	L-Glutamic acid	+
D-Melezitose	+	Glycyl-L-glutamic acid	+
D-Melibiose	+	L-Pyroglutamic acid	+
$\alpha$ -Methyl D-galactoside	-	L-Serine	+
$\beta$ -Methyl D-galactoside	-	Putrescine	-
3-Methyl glucose	+	2,3-Butanediol	+
$\alpha$ -Methyl D-glucoside	+	Glycerol	+
$\beta$ -Methyl D-glucoside	-	Adenosine	+
$\alpha$ -Methyl D-mannoside	-	2-Deoxyadensine	+
Palatinose	+	Inosine	+
D-Psicose	+	Thymidine	+
D-Raffinose	+	Uridine	+
L-Rhamnose	-	Adenosine-5'-monophosphate	-
D-Ribose	+	Thymidine-5'-monophosphate	+
D-Salicin	+	Uridine-5'-monophosphate	-
Sedoheptulosan	-	Fructose-6-phosphate	-
D-Sorbitol	+	Glucose-1-phosphate	-
Stachyose	+	Glucose-6-phosphate	-
Sucrose	+	D-L- $\alpha$ -Glycerolphosphate	+

Table 3-33. Physiological and biochemical characterization of the isolate, CK-13 using the BIOLOG Analysis System

Physiological & biochemical tests		Physiological & biochemical tests	
Water	-	D-Tagatose	-
$\alpha$ -Cyclodextrin	-	D-Trehalose	+
$\beta$ -Cyclodextrin	-	Turanose	+
Dextrin	+	Xylitol	-
Glycogen	+	D-Xylose	+
Inulin	-	Acetic acid	+
Mannan	+	$\alpha$ -Hydroxybutyric acid	+
Tween 40	+	$\beta$ -Hydroxybutyric acid	+
Tween 80	+	$\gamma$ -Hydroxybutyric acid	-
N-Acetyl-D-glucosamine	+	$\rho$ -Hydroxyphenyl acetic acid	-
N-Acetyl-D-mannosamine	+	$\alpha$ -Ketoglutaric acid	-
Amygdain	-	$\alpha$ -Ketovaleric acid	+
L-Arabinose	+	Lactamide	-
D-Arabitol	-	D-Lactic acid methylester	+
Arbutin	-	L-Lactic acid	+
Cellobiose	+	D-Malic acid	-
D-Fructose	+	L-Malic acid	+
L-Fucose	-	Methylpyruvate	+
D-Galactose	-	Mono-methylsuccinate	+
D-Galacturonic acid	-	Propionic acid	+
Gentiobiose	-	Pyruvic acid	+
D-Gluconic acid	-	Succinamic acid	-
$\alpha$ -D-Glucose	+	Succinic acid	-
<i>m</i> -Inositol	-	N-Acetyl L-glutamic acid	+
$\alpha$ -D-Lactose	-	Alaninamide	+
Lactulose	-	D-Alanine	+
Maltose	+	L-Alanine	+
Maltotriose	+	L-Alanyl-glycine	+
D-Mannitol	-	L-Asparagine	+
D-Mannose	+	L-Glutamic acid	+
D-Melezitose	-	Glycyl-L-glutamic acid	+
D-Melibiose	-	L-Pyroglutamic acid	+
$\alpha$ -Methyl D-galactoside	-	L-Serine	+
$\beta$ -Methyl D-galactoside	-	Putrescine	+
3-Methyl glucose	-	2,3-Butanediol	+
$\alpha$ -Methyl D-glucoside	-	Glycerol	+
$\beta$ -Methyl D-glucoside	-	Adenosine	+
$\alpha$ -Methyl D-mannoside	-	2-Deoxyadensine	-
Palatinose	+	Inosine	+
D-Psicose	+	Thymidine	+
D-Raffinose	+	Uridine	+
L-Rhamnose	+	Adenosine-5'-monophosphate	+
D-Ribose	+	Thymidine-5'-monophosphate	+
D-Salicin	+	Uridine-5'-monophosphate	+
Sedoheptulosan	-	Fructose-6-phosphate	+
D-Sorbitol	-	Glucose-1-phosphate	-
Stachyose	-	Glucose-6-phosphate	+
Sucrose	+	D-L- $\alpha$ -Glycerolphosphate	+



1	cg tgg cttc	tg gtt aggt a	cg tct cgg tg	cc gcc ctatt	tga acgg cac	ttg ttc ttc c
61	cta aca acag	ag ctt tacga	tcc gaa aacc	ttc atc actc	acg cgg cggt	gct ccg tcag
121	act ttc gtc c	att gcg gaag	att cc tact	gct gcct ccc	gtag gagt ct	ggg ccg tgc
181	tcag tccc ag	tgt ggcc gat	cacc ctct ca	ggc cgg ctac	gcat cgt cgc	ctt ggt gagc
241	cg ttac ctca	cca actag ct	aat gcg ccgc	ggg tcc atct	gta agt ggta	gcc gaag cca
301	c ctttt atgt	ctga accatg	cggt tcaa ac	aacc atcc gg	tatt agcccc	ggtt tccc gg
361	ag ttat ccca	gtct tacagg	cagg ttacc c	acgt gttact	cacc cgtccg	ccg cta acat
421	caggg agcaa	gctccc atct	gtcc cgtc ga	ctt gcat gta	ttag gcac gc	cgcc agc gtt
481	cg tctc tgagc	aggg gattca	aaact ctaaa	gg		

Fig. 3-4. 16S rRNA sequence of *Bacillus* sp. CK-10. The isolate was registered in Genbank as [AY941803]

1	ccgtggc ttt	tggttaggta	cg tct cgg tg	cc gcc ctatt	tga acgg cac	ttg ttc ttc c
61	cctaacaaca	ag ctt tacga	tcc gaa aacc	ttc atc actc	acg cgg cggt	gct ccg tcag
121	gactttc gtc	att gcg gaag	att cc tact	gct gcct ccc	gtag gagt ct	ggg ccg tgc
181	ctcag tcca	tgt ggcc gat	cacc ctct ca	ggc cgg ctac	gcat cgt cgc	ctt ggt gagc
241	ccgttacctc	cca actag ct	aat gcg ccgc	ggg tcc atct	gta agt ggta	gcc gaag cca
301	gc ctttcaat	ctga accatg	cggt tcaa ac	aacc atcc gg	tatt agcccc	ggtt tccc gg
361	gagttatccc	agtcttatgg	gcagg ttacc	cacgt gttac	tcacc cgtcc	gcc gcta act
421	tcttgagagc	aagctctcaa	tcc attcgct	cgact tgc at	gtatt aggca	cgcc gcc age
481	gttcatccth	agcaggggaa	tcaaaattct	aa		

Fig. 3-5. 16S rRNA sequence of *Bacillus* sp. CK-13. The isolate was registered in Genbank as [AY941804]

라. 분리 세균의 생장과 pH 변화

질소와 인 (N/P) 제거 액체배지에 분리 세균을 접종하고 각 세균의 생장, 그리고 배양기간 중의 pH 변화를 12시간 간격으로 측정하였다. 분리 균주 *Bacillus* sp. CK-10은 12시간 지난 후부터 자라기 시작하여 12~48시간 범위 내에서 빠른 생장을 보였으며, 균주가 성장하는 동안 pH는 다소 감소하였다가 증가하여 72시간 경과 후 7.12로 측정되었다 (Fig. 3-6). *Bacillus* sp. CK-13은 짧은 유도기를 거치면서 자라기 시작하여 36시간까지 빠른 생장을 보였으며, 균주가 성장하는 동안 pH는 다소 감소하였다가 증가하여 72시간 경과 후 6.87로 측정되었다 (Fig. 3-7).

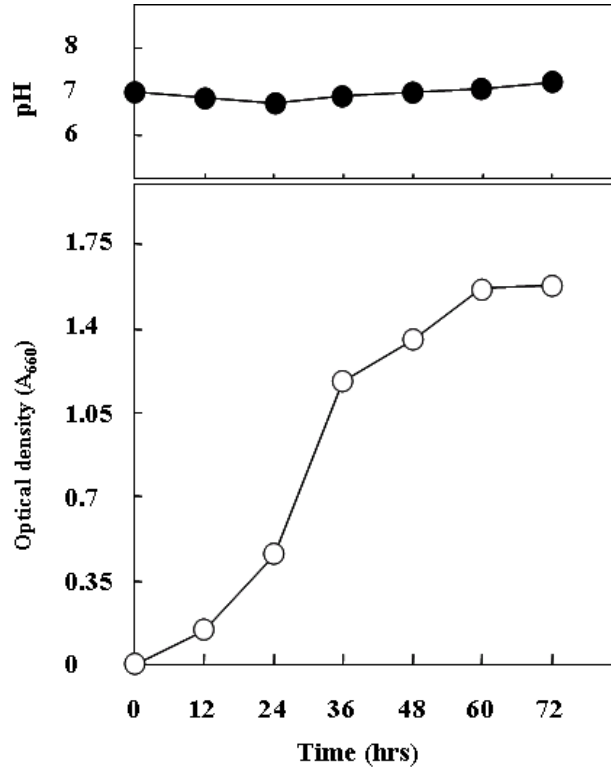


Fig. 3-6. Cell growth (○) and pH (●) variation according to *Bacillus* sp. CK-10 growth in N/P removal liquid media

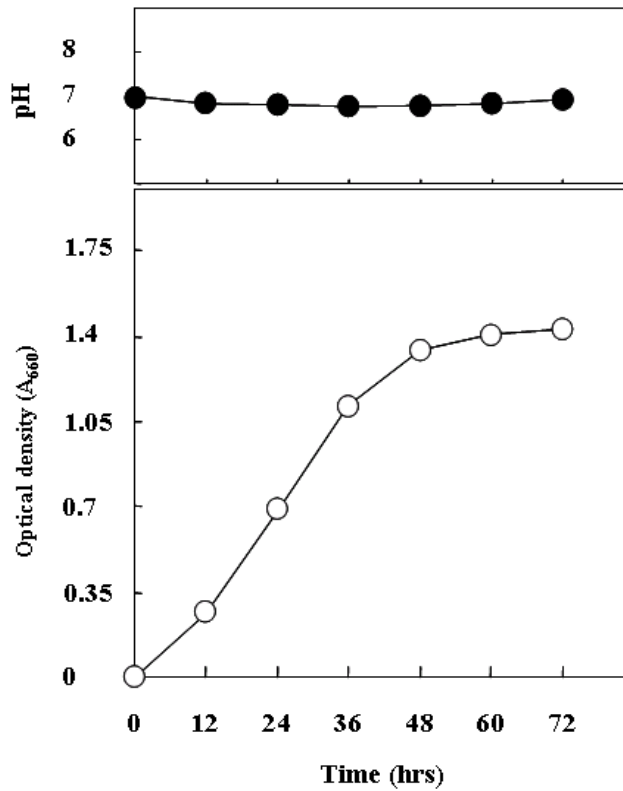


Fig. 3-7. Cell growth (○) and pH (●) variation according to *Bacillus* sp. CK-13 growth in N/P removal liquid media

마. 분리세균의 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>의 제거

(1) 단일배양에 의한 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>의 제거

Ammonium을 대상 기질로 포함하는 무기 액체 배지에서 단일 배양에 의한 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>의 제거율을 조사하였다. 배지내 ammonium의 초기 농도는 200 μM, 300 μM 그리고 400 μM 이었고, 초기 pH는 7.0이었다.

*Bacillus* sp. CK-10의 경우 200 μM의 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>를 36시간이내에 제거하였고, 300 μM과 400 μM NH<sub>4</sub><sup>+</sup>를 48시간과 60시간이내에 완전히 제거하였다 (Fig. 3-8A). *Bacillus* sp. CK-13에서는 200 μM과 300 μM의 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>를 12시간이내에, 400 μM의 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>를 24시간이내에 완전히 제거하였다. 본 연구를 통하여 CK-13은 탁월한 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 제거능을 나타내었다 (Fig. 3-8B).

(2) 혼합배양에 의한 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>의 제거

Ammonium을 포함하는 무기 액체 배지에서 혼합배양 (co-culture)에 의한 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>의 제거율을 조사하였다. 두 가지 분리세균 *Bacillus* sp. CK-10과 *Bacillus* sp. CK-13을 혼합하여 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>가 포함된 무기 액체 배지에 접종하고 제거율을 조사한 결과 200 μM, 300 μM 그리고 400 μM의 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>는 배양 12시간이내에 완전히 제거되는 것이 관찰되었다. 본 연구에서 혼합배양에 의한 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 제거는 단일 배양에 의한 것보다 탁월한 것으로 조사되었다 (Fig. 8-8C).

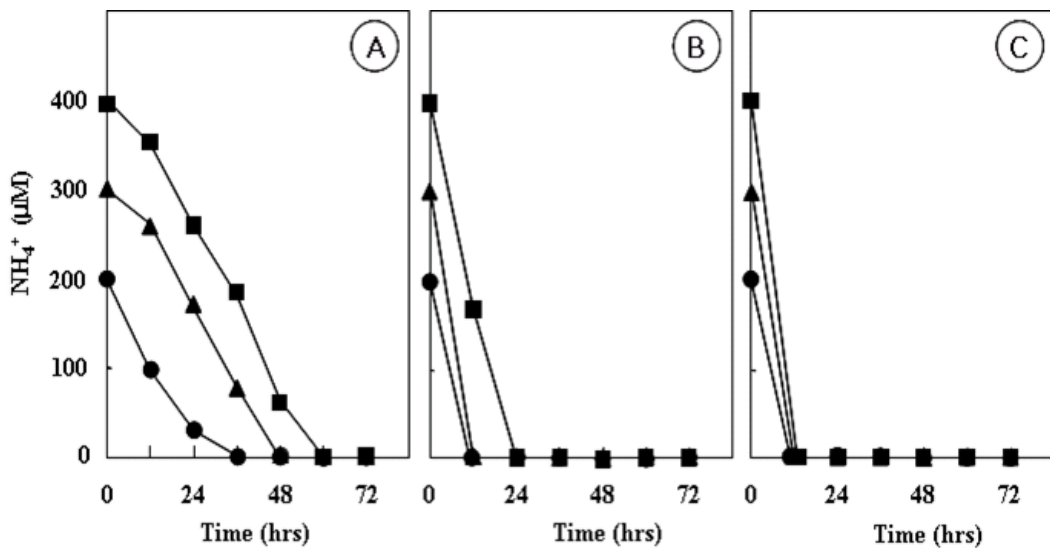


Fig. 3-8. Changes in concentration of residual NH<sub>4</sub><sup>+</sup> in single cultures, *Bacillus* sp. CK-10 (A) or *Bacillus* sp. CK-13 (B), and co-culture, *Bacillus* sp. CK-10 and *Bacillus* sp. CK-13 (C) growing with 200 μM (●), 300 μM (▲), and 400 μM (■) NH<sub>4</sub><sup>+</sup> as nitrogen source

바. 분리 세균에 의한 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>의 제거

(1) 단일배양에 의한 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>의 제거

Nitrite를 포함하는 무기 액체 배지에서 단일 배양에 의한 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>의 제거율을 조사하였다. 배지내 대상기질의 초기 농도는 200 μM, 300 μM 그리고 400 μM 이었고, pH는 7.0이었다.

*Bacillus* sp. CK-10에서 200 μM의 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>를 24시간이내에 제거하였고, 300 μM과 400 μM NO<sub>2</sub><sup>-</sup>를 36시간이내에 완전히 제거하였다 (Fig. 3-9A). *Bacillus* sp. CK-13에서는 200 μM, 300

$\mu\text{M}$  그리고  $400 \mu\text{M}$ 의  $\text{NO}_2^-$ 를 12시간이내에 완전히 제거하였다. 본 연구를 통하여 CK-13은 탁월한  $\text{NO}_2^-$ 의 제거능을 나타내었다 (Fig. 3-9B).

(2) 혼합배양에 의한  $\text{NO}_2^-$ 의 제거

Nitrite를 포함하는 무기 액체 배지에서 혼합배양에 의한  $\text{NO}_2^-$ 의 제거율을 조사하였다. 두 가지 분리세균 *Bacillus* sp. CK-10과 *Bacillus* sp. CK-13을 혼합하여  $\text{NO}_2^-$ 가 포함된 무기 액체 배지에 접종하고 제거율을 조사한 결과  $200 \mu\text{M}$ ,  $300 \mu\text{M}$  그리고  $400 \mu\text{M}$ 의  $\text{NO}_2^-$ 는 배양 12시간이내에 완전히 제거되는 것이 관찰되었다. 본 연구에서 혼합배양에 의한  $\text{NO}_2^-$  제거와 CK-13의 제거능이 동일하게 조사되었다 (Fig. 3-9C).

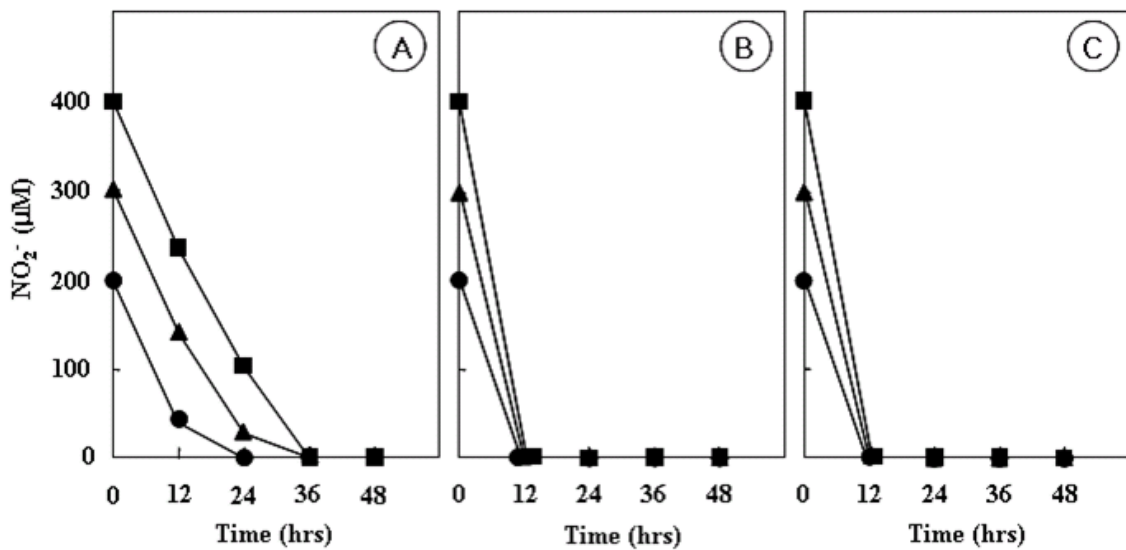


Fig. 3-9. Changes in concentration of residual  $\text{NO}_2^-$  in single cultures, *Bacillus* sp. CK-10 (A) or *Bacillus* sp. CK-13 (B), and co-culture, *Bacillus* sp. CK-10 and *Bacillus* sp. CK-13 (C) growing with  $200 \mu\text{M}$  (●),  $300 \mu\text{M}$  (▲), and  $400 \mu\text{M}$  (■)  $\text{NO}_2^-$  as nitrogen source

사. 분리 균주에 의한  $\text{NO}_3^-$ 의 제거

(1) 단일배양에 의한  $\text{NO}_3^-$ 의 제거

Nitrate를 포함하는 무기 액체 배지에서 단일 배양에 의한  $\text{NO}_3^-$ 의 제거율을 조사하였고, 배지내 대상기질의 초기 농도는  $200 \mu\text{M}$ ,  $300 \mu\text{M}$  그리고  $400 \mu\text{M}$  이었고, pH는 7.0이었다.

*Bacillus* sp. CK-10에서  $200 \mu\text{M}$ 의  $\text{NO}_3^-$ 를 60시간이내에 제거하였고,  $300 \mu\text{M}$ 의  $\text{NO}_3^-$ 를 72시간이내에 완전히 제거하였다.  $400 \mu\text{M}$ 의  $\text{NO}_3^-$ 는 72시간 지난 후 약 80%가 제거되었다 (Fig. 3-10A). *Bacillus* sp. CK-13에서는  $200 \mu\text{M}$ ,  $300 \mu\text{M}$  그리고  $400 \mu\text{M}$ 의  $\text{NO}_3^-$ 를 36, 48 그리고 60시간이내에 각각 완전히 제거하였다. 본 연구를 통하여 CK-13은 탁월한  $\text{NO}_3^-$ 의 제거능을 나타내었다 (Fig. 3-10B).

(2) 혼합배양에 의한  $\text{NO}_3^-$ 의 제거

Nitrate를 포함하는 무기 액체 배지에서 혼합배양에 의한  $\text{NO}_3^-$ 의 제거율을 조사하였다. 두 가지 분리세균 *Bacillus* sp. CK-10과 *Bacillus* sp. CK-13을 혼합하여  $\text{NO}_3^-$ 가 포함된 무기 액

체 배지에 접종하고 제거율을 조사한 결과 200  $\mu\text{M}$ 의  $\text{NO}_3^-$ 를 24시간 이내에 완전히 제거하였고, 300  $\mu\text{M}$ 과 400  $\mu\text{M}$ 의  $\text{NO}_3^-$ 는 배양 36시간 이내에 완전히 제거되었다. 본 연구에서 혼합배양에 의한  $\text{NO}_3^-$ 제거는 단일 배양에 의한 것보다 탁월한 것으로 조사되었다 (Fig. 3-10C).

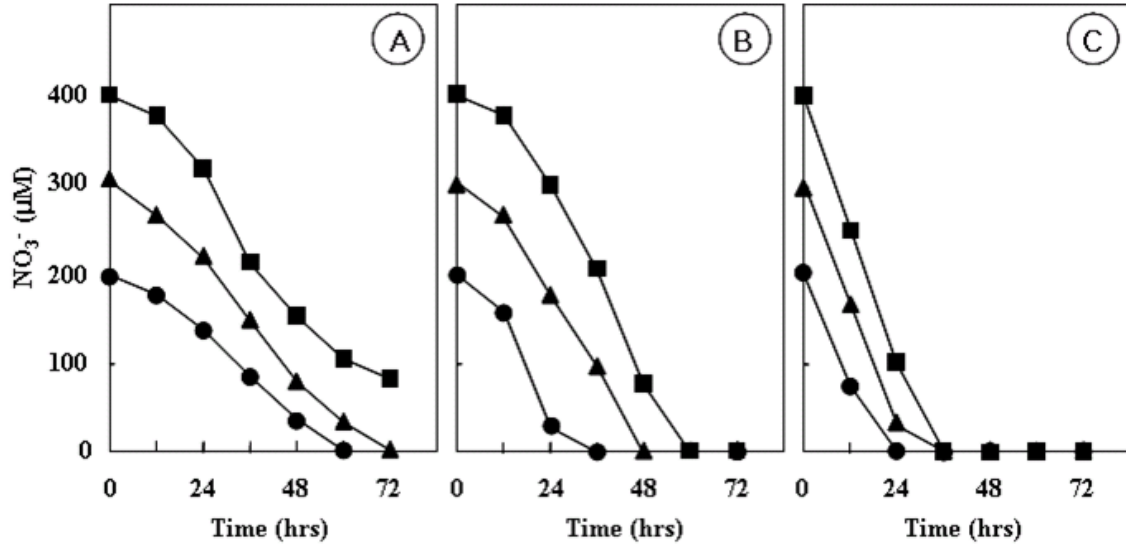


Fig. 3-10. Changes in concentration of residual  $\text{NO}_3^-$  in single cultures, *Bacillus* sp. CK-10 (A) or *Bacillus* sp. CK-13 (B), and co-culture, *Bacillus* sp. CK-10 and *Bacillus* sp. CK-13 (C) growing with 200  $\mu\text{M}$  (●), 300  $\mu\text{M}$  (▲), and 400  $\mu\text{M}$  (■)  $\text{NO}_3^-$  as nitrogen source

#### 아. 분리균주에 의한 $\text{PO}_4^{3-}$ 의 제거

##### (1) 단일배양에 의한 $\text{PO}_4^{3-}$ 의 제거

Phosphate를 포함하는 무기 액체 배지에서 단일 배양에 의한  $\text{PO}_4^{3-}$ 의 제거율을 조사하였다. 배지내 대상기질의 농도는 125  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$  그리고 500  $\mu\text{M}$  이었고, pH는 7.0이었다.

*Bacillus* sp. CK-10에서 125  $\mu\text{M}$ 과 250  $\mu\text{M}$ 의  $\text{PO}_4^{3-}$ 를 12시간과 24시간 이내에 제거하였고, 500  $\mu\text{M}$ 의  $\text{PO}_4^{3-}$ 를 48시간 이내에 완전히 제거하였다 (Fig. 3-11A). *Bacillus* sp. CK-13에서는 125  $\mu\text{M}$ 과 250  $\mu\text{M}$ 의  $\text{PO}_4^{3-}$ 를 24시간과 36시간 이내에 각각 제거하였고, 500  $\mu\text{M}$ 의  $\text{PO}_4^{3-}$ 를 60시간 이내에 완전히 제거하였다. 본 연구를 통하여 CK-10은 탁월한  $\text{PO}_4^{3-}$ 의 제거능을 나타내었다 (Fig. 3-11B).

##### (2) 혼합배양에 의한 $\text{PO}_4^{3-}$ 의 제거

Phosphate를 포함하는 무기 액체 배지에서 혼합배양 (co-culture)에 의한  $\text{PO}_4^{3-}$ 의 제거율을 조사하였다. 두 가지 분리세균 *Bacillus* sp. CK-10과 *Bacillus* sp. CK-13을 혼합하여  $\text{PO}_4^{3-}$ 가 포함된 무기 액체 배지에 접종하고 제거율을 조사한 결과 125  $\mu\text{M}$ 과 250  $\mu\text{M}$ 의  $\text{PO}_4^{3-}$ 를 12시간과 24시간 이내에 완전히 제거하였고, 500  $\mu\text{M}$ 의  $\text{PO}_4^{3-}$ 는 배양 36시간 이내에 완전히 제거되는 것이 관찰되었다. 본 연구에서 혼합배양에 의한  $\text{PO}_4^{3-}$ 제거는 단일 배양에 의한 것보다 탁월한 것으로 조사되었다 (Fig. 3-11C).

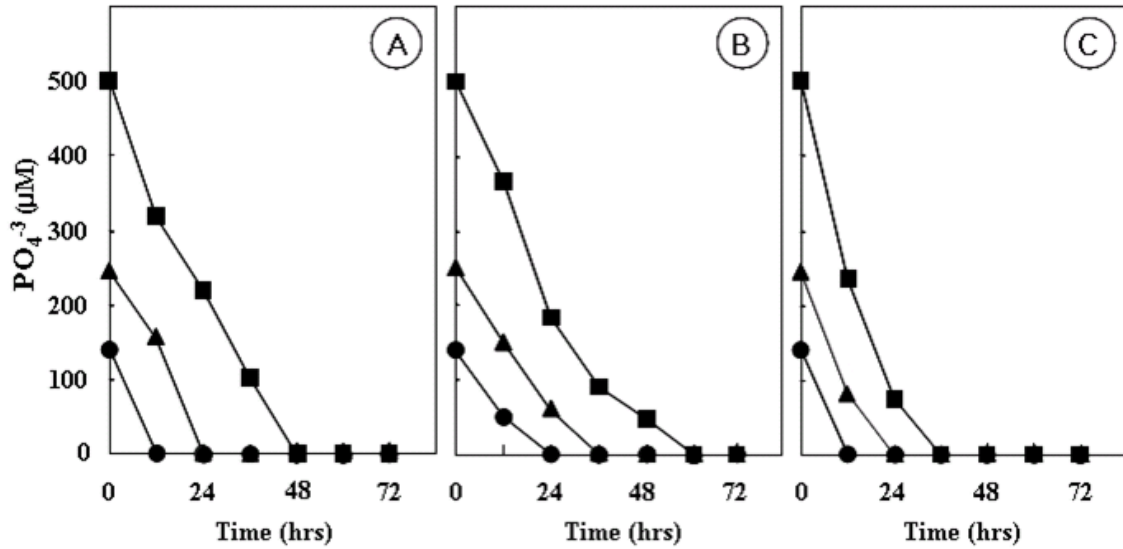


Fig. 3-11. Changes in concentration of residual  $PO_4^{3-}$  in single cultures, *Bacillus* sp. CK-10 (A) or *Bacillus* sp. CK-13 (B), and co-culture, *Bacillus* sp. CK-10 and *Bacillus* sp. CK-13 (C) growing with 125  $\mu M$  (●), 250  $\mu M$  (▲), and 500  $\mu M$  (■)  $PO_4^{3-}$  as phosphorus source

자. 혼합배양에 의한 질소 및 인의 동시 제거

두 가지 분리세균 *Bacillus* sp. CK-10과 *Bacillus* sp. CK-13의 혼합배양을 이용하여 준비된 액체배지에서  $NH_4^+$ ,  $NO_2^-$ ,  $NO_3^-$ 와  $PO_4^{3-}$ 의 동시제거 실험을 수행하였다. 400  $\mu M$ 의 질소와 500  $\mu M$  인의 동시제거 실험에서,  $NH_4^+$ 와  $NO_2^-$ 는 12시간 이내에 완전히 제거되었고,  $NO_3^-$ 와  $PO_4^{3-}$ 는 36시간 이내에 완전히 제거되는 것이 관찰되었다 (Fig. 3-12).

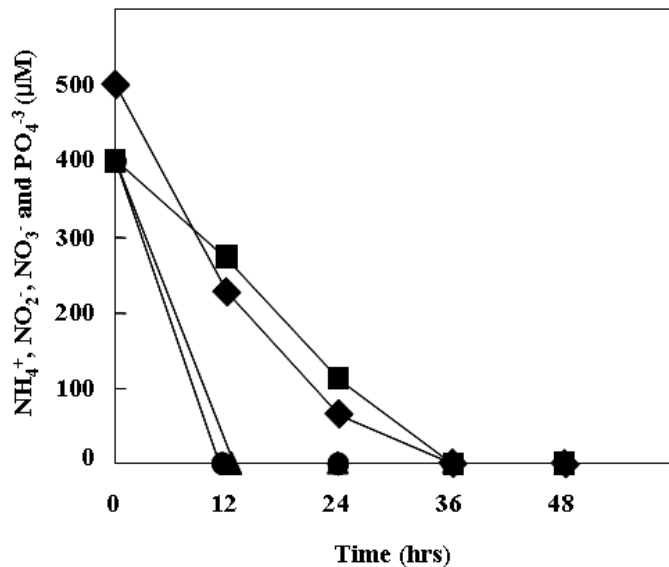


Fig. 3-12. Changes in concentrations of residual 400  $\mu M$   $NH_4^+$  (●), 400  $\mu M$   $NO_2^-$  (▲), 400  $\mu M$   $NO_3^-$  (■), and 500  $\mu M$   $PO_4^{3-}$  (◆) in co-culture, *Bacillus* sp. CK-10 and *Bacillus* sp. CK-13

### 3. 새우 양식장에서 양식사료에 의한 오염환경의 미생물학적 제거

#### 가. 양식 사료에서 질소와 인의 용출

새우 양식장에서 사용하는 양식 사료 0.2 g를 100 ml의 인공해수에 용해시켜 용출된 질소와 인의 양을 각각 측정하였다. 사료 pellet을 그대로 인공해수에 넣고 72시간 동안 용출시험을 실행한 결과, 질소와 인은 거의 관찰되지 않았다. 그러나 막자사발을 이용해 미세한 가루로 만들어 수행한 용출실험에서 초기에는 미량만이 관찰되던 질소와 인이 시간이 경과하면서 상당량 용출되어, 72시간이 경과한 후 약 33.3  $\mu\text{M}$   $\text{NH}_4^+$ , 12.9  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_2^-$ , 81.5  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3^-$ , 그리고 248  $\mu\text{M}$   $\text{PO}_4^{3-}$ 가 측정되었다 (Fig. 3-13).

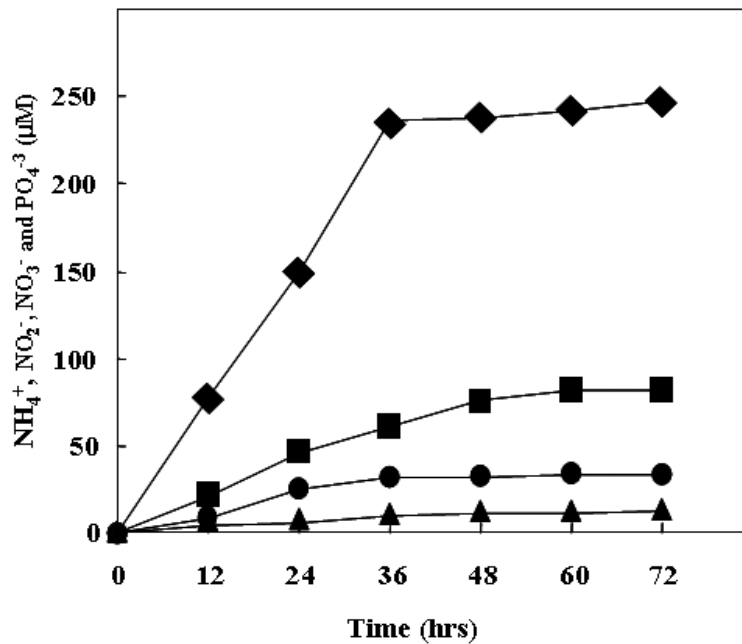


Fig. 3-13. Dissolution of  $\text{NH}_4^+$  (●),  $\text{NO}_2^-$  (▲),  $\text{NO}_3^-$  (■), and  $\text{PO}_4^{3-}$  (◆) in sea water from 0.2% farming feed

#### 나. 양식 사료로부터 질소와 인의 미생물학적 제거

##### (1) 단일배양에 의한 질소와 인의 제거

0.2% (w/v)의 양식 사료를 인공해수에 녹인 후 *Bacillus* sp. CK-10과 *Bacillus* sp. CK-13을 각각 접종하여 시간 경과에 따른 질소와 인의 제거율을 측정하였다.

*Bacillus* sp. CK-10을 접종하여 36시간이 경과한 후 약 287  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_2^-$ 이 용출되었으며, 배양 72시간 이내에 완전히 제거되었다.  $\text{NH}_4^+$ 와  $\text{NO}_3^-$ 는 48시간 경과한 후, 약 975  $\mu\text{M}$ 과 428  $\mu\text{M}$ 이 각각 용출되었으며, 120시간 이내에 70%와 65% 정도가 각각 제거되는 것이 관찰되었다. 배양 초기 60시간 경과한 후  $\text{PO}_4^{3-}$ 는 약 644  $\mu\text{M}$ 이 용출되었으며 108시간 이내에 완전히 제거되었다 (Fig. 3-14).

*Bacillus* sp. CK-13을 접종하여 36시간이 경과한 후 약 324  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_2^-$ 이 용출되었으며, 배양 60시간 이내에 완전히 제거되었다.  $\text{NH}_4^+$ 는 48시간 경과한 후 약 980  $\mu\text{M}$ 이 용출되었으며, 배양 120시간 이내에 완전히 제거되는 것이 관찰되었다.  $\text{NO}_3^-$ 도 60시간 경과한 후 약 410  $\mu\text{M}$ 이 용출되었으며, 배양 120시간 이내에 완전히 제거되었다. 배양 초기 48시간 경과한 후  $\text{PO}_4^{3-}$ 는 약

661  $\mu\text{M}$ 이 용출되었으며 배양 120시간동안에 65% 정도가 제거되는 것이 관찰되었다 (Fig. 3-15).

(2) 혼합배양에 의한 질소와 인의 제거

0.2% (w/v)의 양식 사료를 인공해수에 녹인 후 *Bacillus* sp. CK-10와 *Bacillus* sp. CK-13의 혼합배양을 접종하여 시간 경과에 따른 질소와 인의 제거율을 측정하였다. 혼합배양을 양식 사료가 포함된 배지에 접종한 결과,  $\text{NO}_2^-$ 와  $\text{NH}_4^+$ 는 배양 초기 24시간 경과한 후 약 440  $\mu\text{M}$ 과 940  $\mu\text{M}$ 이 각각 용출되었으며, 배양 36시간과 72시간이내에 완전히 제거되었다.  $\text{PO}_4^{3-}$ 와  $\text{NO}_3^-$ 는 36시간 경과한 후 약 610  $\mu\text{M}$ 과 520  $\mu\text{M}$ 이 각각 용출되었으며, 72시간과 84시간이내에 완전히 제거되는 것이 관찰되었다 (Fig. 3-16).

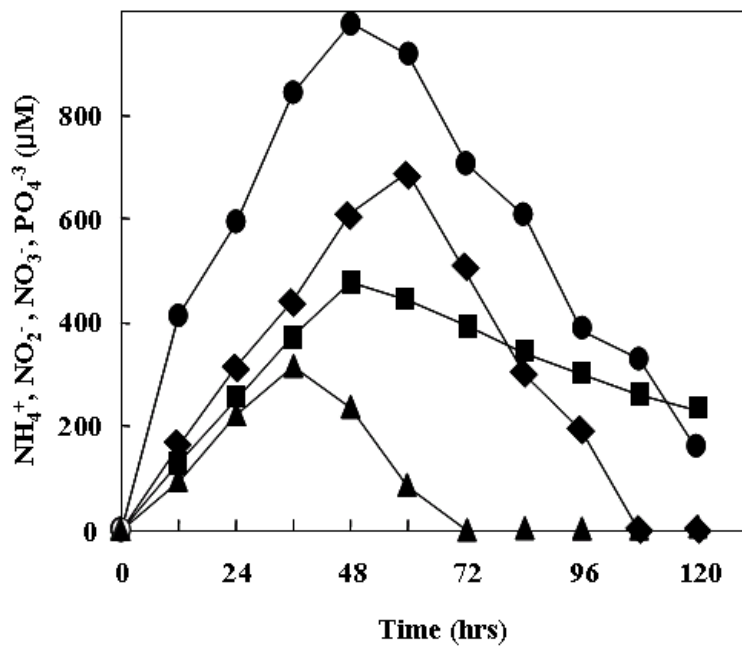


Fig. 3-14. Removal of  $\text{NH}_4^+$  (●),  $\text{NO}_2^-$  (▲),  $\text{NO}_3^-$  (■), and  $\text{PO}_4^{3-}$  (◆) from 0.2% farming feed suspension incubated with *Bacillus* sp. CK-10



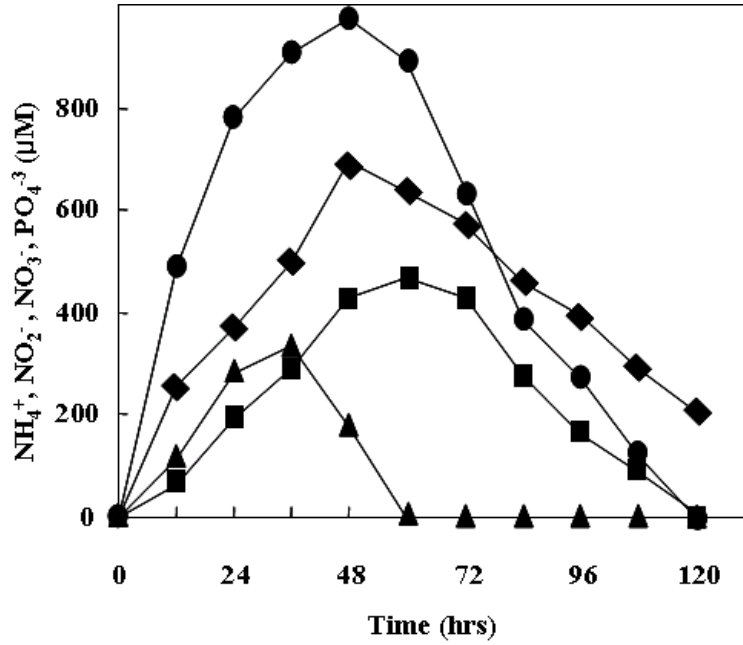


Fig. 3-15. Removal of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (●), NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (▲), NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (■), and PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (◆) from 0.2% farming feed suspension incubated with *Bacillus* sp. CK-13

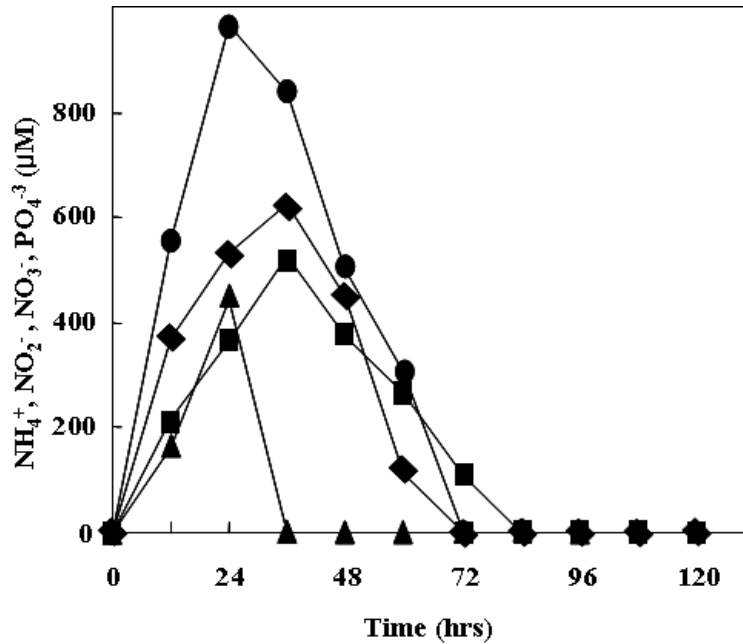


Fig. 3-16. Removal of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (●), NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (▲), NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (■), and PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (◆) from 0.2% farming feed suspension incubated with co-culture, *Bacillus* sp. CK-10 and *Bacillus* sp. CK-13

다. 양식 사료의 당분석

양식 사료에 포함된 당을 HPAEC-PAD 시스템을 이용해 분석하였다. 양식 사료에는

glucose가 가장 많이 포함되어 있었으며, galactose, galatosamine, mannose 등의 순이었으며, fucose도 소량 포함되어 있는 것이 확인되었다 (Fig. 3-17).

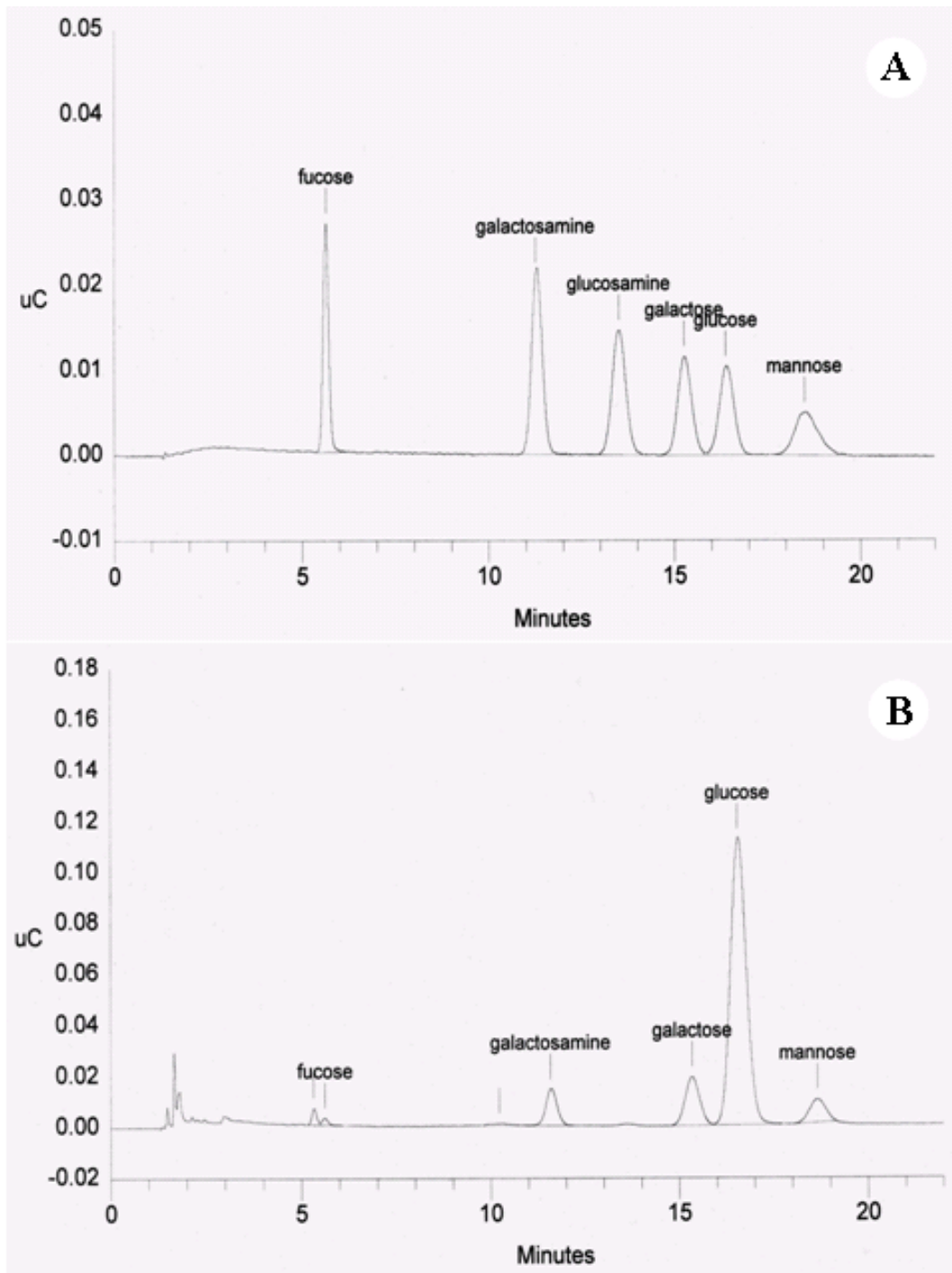


Fig. 3-17. Sugar analysis of farming feed by Bio-LC DX; (A) control and (B) farming feed

#### 4. 새우 양식장에서 분리된 세균의 유용성 탐색 가. 유산균의 분리

0.3% 탄산칼슘이 포함된 MRS 고체 평판 배지에서 탄산칼슘이 중화되어 생긴 투명대(clear zone) 형성이 탁월한 3개의 유산균 (lactic acid bacteria)을 채취한 물시료로부터 선별하였다. 이렇게 선별된 세균들은 용혈성 시험을 통해 비용혈성으로 확인된 2개의 균주를 선정하여 본 연구에 사용하였다.

#### 나. 유산균의 형태학적 관찰 및 생리 화학적 특성

두 개의 유산균에 대하여 잠정적으로 균주 JK-8과 균주 JK-11로 명명하고, 형태학적 관찰과 생리 화학적 특성을 조사하였다.

균주 JK-8은 간상형이었으며 그람 양성으로 나타났다. JK-8의 생리 화학적 시험을 실시한 결과는 Table 3-34에 나타나있다. Indole 형성 유무시험결과는 음성으로 나타났으며, disulfhydrase에 의한 H<sub>2</sub>S의 형성 시험에서도 음성반응을 나타내었다. MR 시험은 양성반응으로 나타났고, VP 시험에서는 음성으로 밝혀졌다. Gelatinase, amylase, catalase, urease 그리고 oxidase 존재 여부 시험에서는 모두 음성반응이었다. 탄소원과 에너지원으로 citrate의 이용여부를 알아보는 Simmon's citrate 이용시험은 배지가 푸른색으로 변하는 양성반응을 나타내었다. Lithmus milk 시험에서는 젓당발효가 일어나 산성을 나타냈고, 펩톤화는 되지 않았다.

균주 JK-11은 간상형으로 그람 양성이었다. JK-11의 생리 화학적 시험을 실시한 결과는 Table 3-35에 나타나있다. Indole 형성 유무시험은 음성으로 나타났으며, disulfhydrase에 의한 H<sub>2</sub>S의 형성 유무시험에서도 음성반응을 나타내었다. MR 시험에서는 양성반응으로 나타났고, VP 시험에서는 음성으로 밝혀졌다. Gelatinase, catalase, urease 그리고 oxidase의 존재 여부 시험에서는 모두 음성반응이었고, amylase 존재 여부 시험에서는 양성반응을 나타내었다. 탄소원과 에너지원으로 citrate의 이용여부를 알아보는 Simmon's citrate 이용시험은 배지가 푸른색으로 변하는 양성반응을 나타내었다. Lithmus milk 시험에서는 젓당발효가 일어나 산성을 나타냈고, 펩톤화는 되지 않았다.

Table 3-34. Morphological and physiological characteristics of the strain JK-8

---

<b><u>Morphological characteristics</u></b>	
Cell shape	Long rod
Gram staining	positive
<b><u>Physiological characteristics</u></b>	
Indole production	-
Methyl red	+
Voges-Proskauer	-
Starch hydrolysis	-
Gelatin hydrolysis	-
Catalase	-
Oxidase	-
Simmon's citrate	+
H <sub>2</sub> S (KIA)	-
Litmus milk (peptonization)	-
Chritensen's urease	-
Phenylalanine deaminase	-

---

+ : Positive reaction, - : Negative reaction

Table 3-35. Morphological and physiological characteristics of the strain JK-11

<b><u>Morphological characteristics</u></b>	
Cell shape	Long rod
Gram staining	positive
<b><u>Physiological characteristics</u></b>	
Indole production	-
Methyl red	+
Voges-Proskauer	-
Starch hydrolysis	+
Gelatin hydrolysis	-
Catalase	-
Oxidase	-
Simmon's citrate	+
H <sub>2</sub> S (KIA)	-
Litmus milk (peptonization)	-
Chritensen's urease	-
Phenylalanine deaminase	-

+ : Positive reaction, - : Negative reaction

다. 유산균의 동정

형태학적 및 생리학적 특성을 관찰한 유산균 JK-8과 JK-11에 대하여 동정을 실시하였다. 두 균주 JK-8과 JK-11에 대하여 다양한 탄소원 이용여부를 동정하는 BIOLOG system을 사용하였고, 그 결과를 Table 3-36과 3-37에 각각 나타내었다. MicroLog<sup>TM</sup> database software를 이용하여 분석한 결과 JK-8은 *Lactobacillus plantarum* 그리고 JK-11은 *Lactobacillus hilgardii* 로 각각 동정되었으며, 본 연구에서는 이들 유산균에 대하여 *Lactobacillus* sp. JK-8와

*Lactobacillus* sp. JK-11로 명명하였다.

Table 3-36. Physiological and biochemical characterization of the isolate, JK-8 using the BIOLOG Analysis System

Physiological & biochemical tests		Physiological & biochemical tests	
Water	-	D-Tagatose	+
$\alpha$ -Cyclodextrin	-	D-Trehalose	+
$\beta$ -Cyclodextrin	-	Turanose	+
Dextrin	+	Xylitol	-
Glycogen	-	D-Xylose	+
Inulin	-	Acetic acid	+
Mannan	-	$\alpha$ -Hydroxybutyric acid	-
Tween 40	-	$\beta$ -Hydroxybutyric acid	-
Tween 80	-	$\gamma$ -Hydroxybutyric acid	+
N-Acetyl-D-glucosamine	+	$\rho$ -Hydroxyphenyl acetic acid	-
N-Acetyl-D-mannosamine	-	$\alpha$ -Ketoglutaric acid	-
Amygdalin	-	$\alpha$ -Ketovaleic acid	+
L-Arabinose	-	Lactamide	-
D-Arabitol	-	D-Lactic acid methylester	-
Arbutin	-	L-Lactic acid	-
Cellobiose	+	D-Malic acid	-
D-Fructose	+	L-Malic acid	-
L-Fucose	+	Methylpyruvate	-
D-Galactose	-	Mono-methylsuccinate	-
D-Galacturonic acid	-	Propionic acid	-
Gentiobiose	+	Pyruvic acid	-
D-Gluconic acid	+	Succinamic acid	-
$\alpha$ -D-Glucose	+	Succinic acid	-
<i>m</i> -Inositol	-	N-Acetyl L-glutamic acid	-
$\alpha$ -D-Lactose	+	Alaninamide	-
Lactulose	+	D-Alanine	-
Maltose	+	L-Alanine	-
Maltotriose	-	L-Alanyl-glycine	-
D-Mannitol	+	L-Asparagine	-
D-Mannose	+	L-Glutamic acid	-
D-Melezitose	+	Glycyl-L-glutamic acid	-
D-Melibiose	-	L-Pyroglutamic acid	-
$\alpha$ -Methyl D-galactoside	+	L-Serine	-
$\beta$ -Methyl D-galactoside	+	Putrescine	-
3-Methyl glucose	+	2,3-Butanediol	-
$\alpha$ -Methyl D-glucoside	-	Glycerol	+
$\beta$ -Methyl D-glucoside	-	Adenosine	+
$\alpha$ -Methyl D-mannoside	-	2-Deoxyadenine	+
Palatinose	-	Inosine	-
D-Psicose	+	Thymidine	+
D-Raffinose	+	Uridine	-
L-Rhamnose	-	Adenosine-5'-monophosphate	-
D-Ribose	+	Thymidine-5'-monophosphate	-
D-Salicin	+	Uridine-5'-monophosphate	-
Sedoheptulosan	-	Fructose-6-phosphate	+
D-Sorbitol	+	Glucose-1-phosphate	-
Stachyose	-	Glucose-6-phosphate	-
Sucrose	-	D-L- $\alpha$ -Glycerolphosphate	-

Table 3-37. Physiological and biochemical characterization of the isolate, JK-11 using the BIOLOG Analysis System

Physiological & biochemical tests		Physiological & biochemical tests	
Water	-	D-Tagatose	+
$\alpha$ -Cyclodextrin	-	D-Trehalose	+
$\beta$ -Cyclodextrin	-	Turanose	+
Dextrin	+	Xylitol	+
Glycogen	+	D-Xylose	-
Inulin	-	Acetic acid	+
Mannan	-	$\alpha$ -Hydroxybutyric acid	+
Tween 40	+	$\beta$ -Hydroxybutyric acid	-
Tween 80	+	$\gamma$ -Hydroxybutyric acid	+
N-Acetyl-D-glucosamine	+	$\rho$ -Hydroxyphenyl acetic acid	-
N-Acetyl-D-mannosamine	+	$\alpha$ -Ketoglutaric acid	+
Amygdain	+	$\alpha$ -Ketovaleric acid	+
L-Arabinose	+	Lactamide	-
D-Arabitol	+	D-Lactic acid methylester	-
Arbutin	+	L-Lactic acid	+
Cellobiose	+	D-Malic acid	-
D-Fructose	+	L-Malic acid	+
L-Fucose	-	Methylpyruvate	+
D-Galactose	+	Mono-methylsuccinate	+
D-Galacturonic acid	+	Propionic acid	+
Gentiobiose	+	Pyruvic acid	+
D-Gluconic acid	+	Succinamic acid	-
$\alpha$ -D-Glucose	+	Succinic acid	+
<i>m</i> -Inositol	+	N-Acetyl L-glutamic acid	+
$\alpha$ -D-Lactose	-	Alaninamide	+
Lactulose	-	D-Alanine	-
Maltose	+	L-Alanine	+
Maltotriose	+	L-Alanyl-glycine	+
D-Mannitol	+	L-Asparagine	+
D-Mannose	+	L-Glutamic acid	+
D-Melezitose	+	Glycyl-L-glutamic acid	+
D-Melibiose	+	L-Pyroglutamic acid	+
$\alpha$ -Methyl D-galactoside	-	L-Serine	+
$\beta$ -Methyl D-galactoside	-	Putrescine	-
3-Methyl glucose	+	2,3-Butanediol	+
$\alpha$ -Methyl D-glucoside	+	Glycerol	+
$\beta$ -Methyl D-glucoside	+	Adenosine	+
$\alpha$ -Methyl D-mannoside	-	2-Deoxyadensine	+
Palatinose	+	Inosine	+
D-Psicose	+	Thymidine	+
D-Raffinose	+	Uridine	+
L-Rhamnose	-	Adenosine-5'-monophosphate	+
D-Ribose	+	Thymidine-5'-monophosphate	+
D-Salicin	+	Uridine-5'-monophosphate	+
Sedoheptulosan	+	Fructose-6-phosphate	+
D-Sorbitol	+	Glucose-1-phosphate	-
Stachyose	-	Glucose-6-phosphate	+
Sucrose	+	D-L- $\alpha$ -Glycerolphosphate	+

라. 유산균에 의한 질소 제거

(1) JK-8에 의한 질소 제거

분리 유산균 *Lactobacillus* sp. JK-8의 질소 제거능력 여부를 조사하였다. JK-8이 접종된 배양액에 100  $\mu$ M과 200  $\mu$ M의  $\text{NH}_4^+$ 를 각각 첨가하였을 경우, 1시간과 3시간 이내에 완전히 제거하였고, 300  $\mu$ M과 400  $\mu$ M의  $\text{NH}_4^+$ 를 12시간동안 65%와 35% 정도를 각각 제거하는 것으로 확인되었다 (Fig. 3-18A). 100  $\mu$ M과 200  $\mu$ M의  $\text{NO}_2^-$ 를 1시간 이내에, 300  $\mu$ M를 3시간 이내에

완전히 제거하였다. 그러나 400  $\mu\text{M}$ 이 첨가되었을 경우 거의 제거가 이루어지지 않았다 (Fig. 3-18B). 25  $\mu\text{M}$ 과 50  $\mu\text{M}$ 의  $\text{NO}_3^-$ 를 각각 3시간과 6시간 이내에 완전히 제거하였으며, 75  $\mu\text{M}$ 도 12시간 이내에 완전히 제거되었지만 100  $\mu\text{M}$ 은 거의 제거되지 않았다 (Fig. 3-18C).

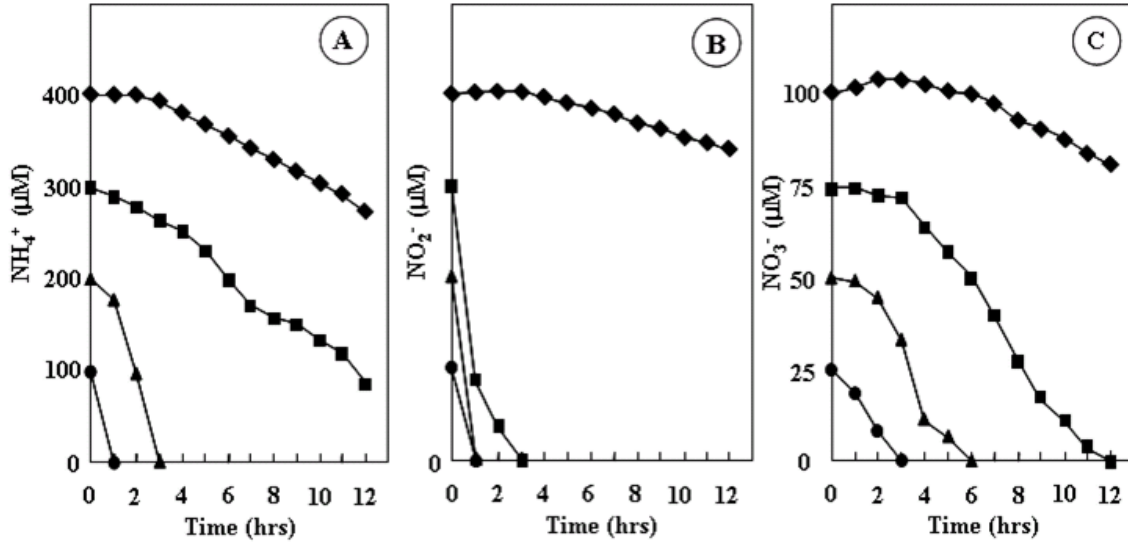


Fig. 3-18. Changes in concentrations of residual  $\text{NH}_4^+$  (A),  $\text{NO}_2^-$  (B), and  $\text{NO}_3^-$  (C) in *Lactobacillus* sp. JK-8 cultures. Concentrations of nitrogens in the cultures were 100  $\mu\text{M}$  (●), 200  $\mu\text{M}$  (▲), 300  $\mu\text{M}$  (■), 400  $\mu\text{M}$  (◆) of  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_2^-$ , and 25  $\mu\text{M}$  (●), 50  $\mu\text{M}$  (▲), 75  $\mu\text{M}$  (■), 100  $\mu\text{M}$  (◆) of  $\text{NO}_3^-$ , respectively

## (2) JK-11에 의한 질소 제거

분리 유산균 *Lactobacillus* sp. JK-11에 의한 질소 제거능력 여부를 조사하였다. JK-11이 접종된 배양액에 100  $\mu\text{M}$ 과 200  $\mu\text{M}$ 의  $\text{NH}_4^+$ 를 첨가하였을 경우, 8시간과 12시간동안 60% 정도를 제거하였고, 300  $\mu\text{M}$ 과 400  $\mu\text{M}$ 은 거의 제거되지 않는 것이 관찰되었다 (Fig. 3-19A). 100  $\mu\text{M}$ 과 200  $\mu\text{M}$ 의  $\text{NO}_2^-$ 를 5시간과 12시간 이내에 제거하였고, 300  $\mu\text{M}$ 은 3시간동안 약 50% 정도를 제거되는 것이 관찰되었다. 400  $\mu\text{M}$ 이 첨가되었을 경우 거의 제거가 이루어지지 않았다 (Fig. 3-19B). JK-11은  $\text{NO}_3^-$ 를 제거하지 못하는 것이 관찰되었다 (Fig. 3-19C).



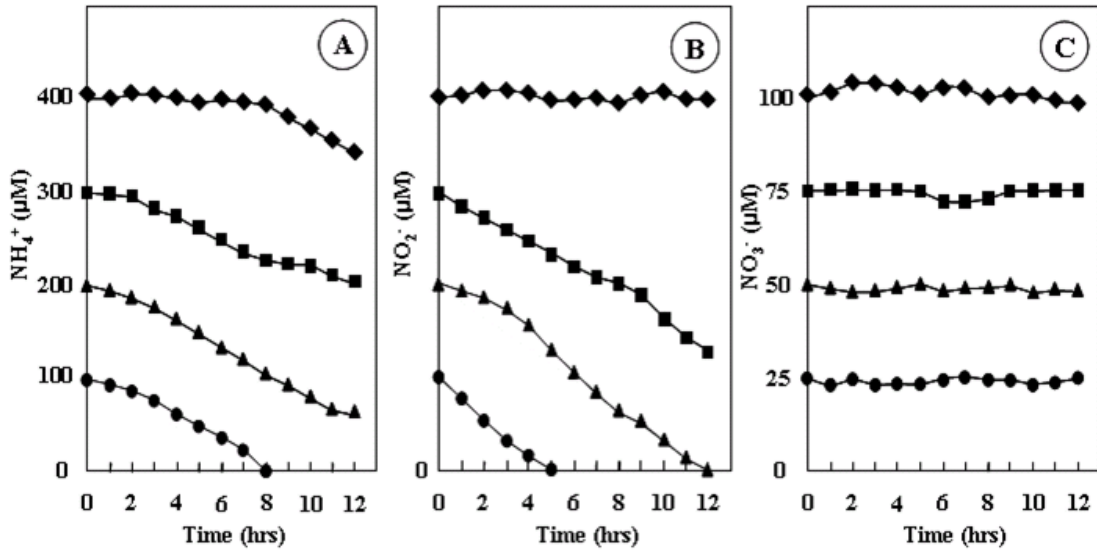


Fig. 3-19. Changes in concentrations of residual  $\text{NH}_4^+$  (A),  $\text{NO}_2^-$  (B), and  $\text{NO}_3^-$  (C) in *Lactobacillus* sp. JK-11 cultures. Concentrations of nitrogens in the cultures were 100  $\mu\text{M}$  (●), 200  $\mu\text{M}$  (▲), 300  $\mu\text{M}$  (■), 400  $\mu\text{M}$  (◆) of  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_2^-$  and 25  $\mu\text{M}$  (●), 50  $\mu\text{M}$  (▲), 75  $\mu\text{M}$  (■), 100  $\mu\text{M}$  (◆) of  $\text{NO}_3^-$  respectively

마. 항균 스펙트럼

(1) *Lactobacillus* sp. JK-8

분리 유산균 *Lactobacillus* sp. JK-8에서 얻어진 농축 배양상등액의 항균활성을 plate diffusion assay 방법으로 확인하였고, 항균 스펙트럼을 조사하였다. JK-8에서 얻어진 농축 배양상등액은 여러 가지 그람 양성 세균과 그람 음성 세균의 생장을 억제하는 것이 관찰되었다. 항균 스펙트럼 조사에서 농축 배양상등액으로 처리한 *Vibrio harveyi*의 경우 투명대 (inhibition zone) 크기가 20 mm로 가장 크게 나타났다. 또한 *Vibrio parahaemolyticus*의 경우 19 mm로 나타났고 *Edwardsiella tarda*는 18 mm로 나타났다. 이 세균들에 대한 투명대 형성은 Fig. 3-20에서 보여주고 있다. *Streptococcus pyogenes*는 14 mm로 가장 작은 크기로 측정되었다.



Fig. 3-20. Antibacterial activity of *Lactobacillus* sp. JK-8 against *Vibrio parahaemolyticus* (A), *Vibrio harveyi* (B) and *Edwardsiella tarda* (C)

(2) *Lactobacillus* sp. JK-11

분리 유산균 *Lactobacillus* sp. JK-11에서 얻어진 농축 배양상등액의 항균활성을 plate diffusion assay 방법으로 확인하였고, 항균 스펙트럼을 조사하였다. *Lactobacillus* sp. JK-11은 JK-8과 마찬가지로 여러 가지 그람 양성 세균과 그람 음성 세균의 생장을 억제하는 것이 관찰되었으며, *Vibrio harveyi*의 경우 투명대 (inhibition zone) 크기가 19 mm로 가장 크게 나타났다. 또한 *Vibrio parahaemolyticus*의 경우 18 mm로, *Edwardsiella tarda*도 17 mm로 나타났다. 이 세균들에 대한 투명대 형성은 Fig. 3-21에서 보여주고 있다. 투명대의 크기가 가장 작은 것은 *Streptococcus pyogenes*로 12 mm를 나타내었다.

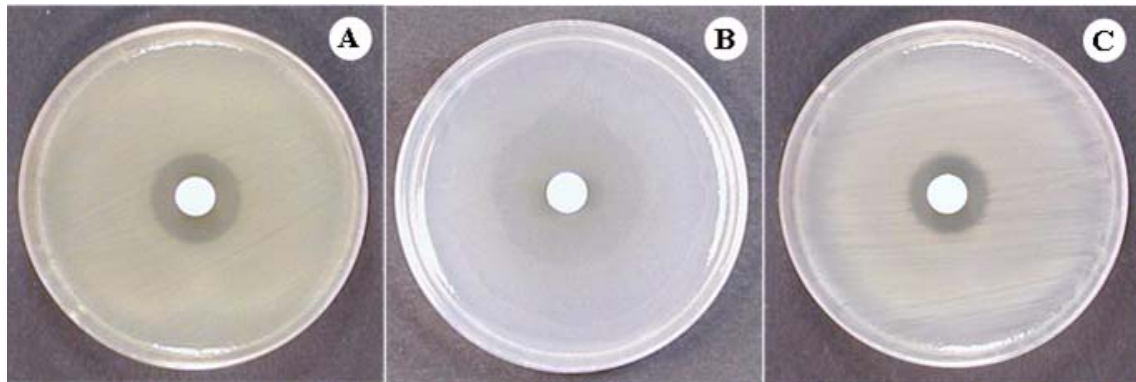


Fig. 3-21. Antibacterial activity of *Lactobacillus* sp. JK-11 against *Vibrio parahaemolyticus* (A), *Vibrio harveyi* (B) and *Edwardsiella tarda* (C)

바. 농축 배양상등액에 대한 병원성 세균의 살균율

(1) JK-8에 대한 병원성 세균의 살균율

병원성 세균들에 대한 JK-8의 생존력을 조사하였다. 분리한 유산균 *Lactobacillus* sp. JK-8의 배양액을 5배 농축시킨 후, 이 농축 배양상등액에 어류에 질병을 일으킬 수 있는 병원성 세균 (potentially pathogenic bacteria)으로 간주되는 4가지 세균을 노출시킨 후, 30분 간격으로 4시간 동안 고체 배지에 평판 도말하여 살균율을 관찰하였다 (Fig. 3-22). 그람 음성 세균인 *Vibrio parahaemolyticus*와 *Vibrio harveyi*를 농축 배양상등액에 노출시킨 경우 30분 이내에 세균이 모두 사멸하여 고체 배지상에 집락이 관찰되지 않았다 (Figs. 3-23 & 3-24). 또한 *Edwardsiella tarda*의 경우 1시간 이내에 모두 사멸하였다 (Fig. 3-25), 그람 양성 세균인 *Streptococcus pyogenes*는 3시간 이내에 모두 사멸하여 집락이 관찰되지 않았다 (Fig. 3-26).

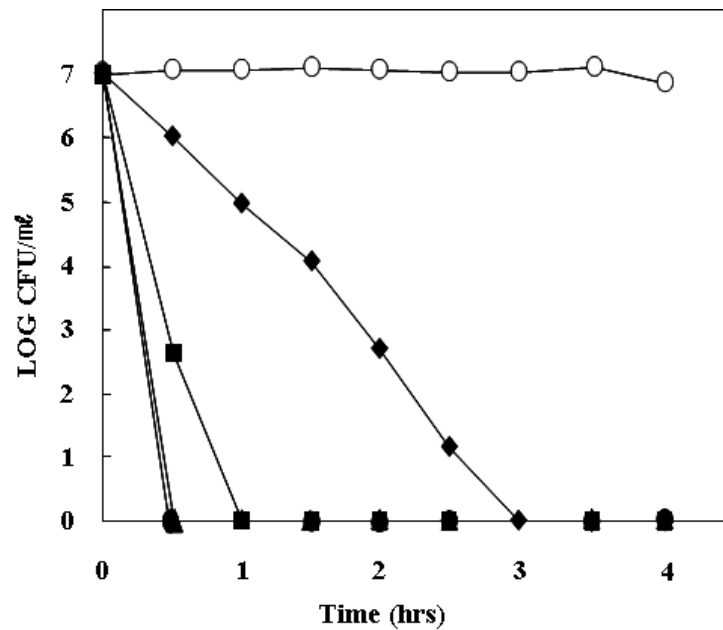


Fig. 3-22. Killing of pathogens after exposure of cell-free concentrated supernatants derived from JK-8 (A); control (○), *Vibrio parahemolyticus* (●), *V. harveyi* (▲), *Edwardsiella tarda* (■), *Streptococcus pyrogenes* (◆) At intervals, the number of colony-forming units per ml of culture was determined

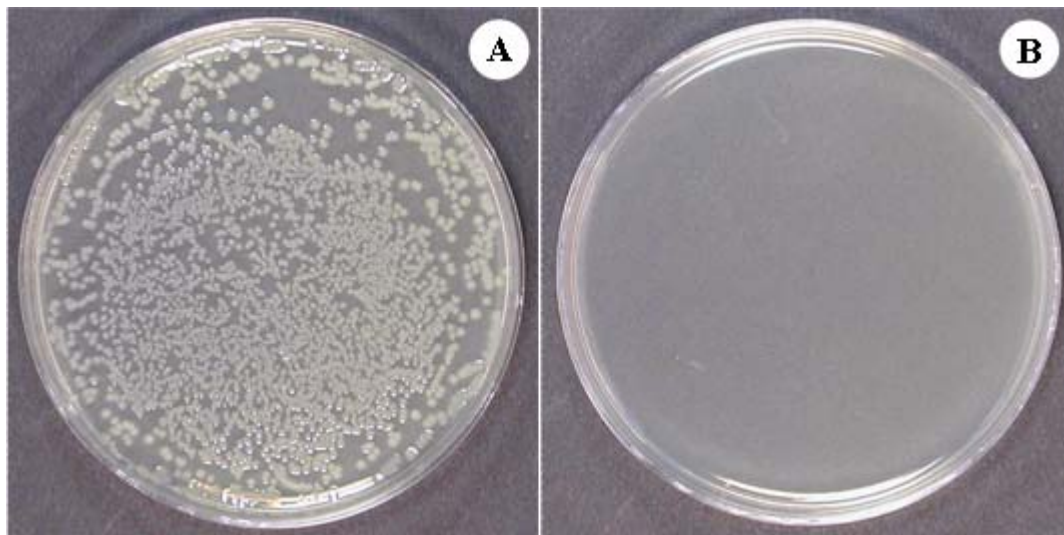


Fig. 3-23. Photographs of *Vibrio parahaemolyticus* with JK-8 concentrate (X5); (A) control, (B) 30 mins

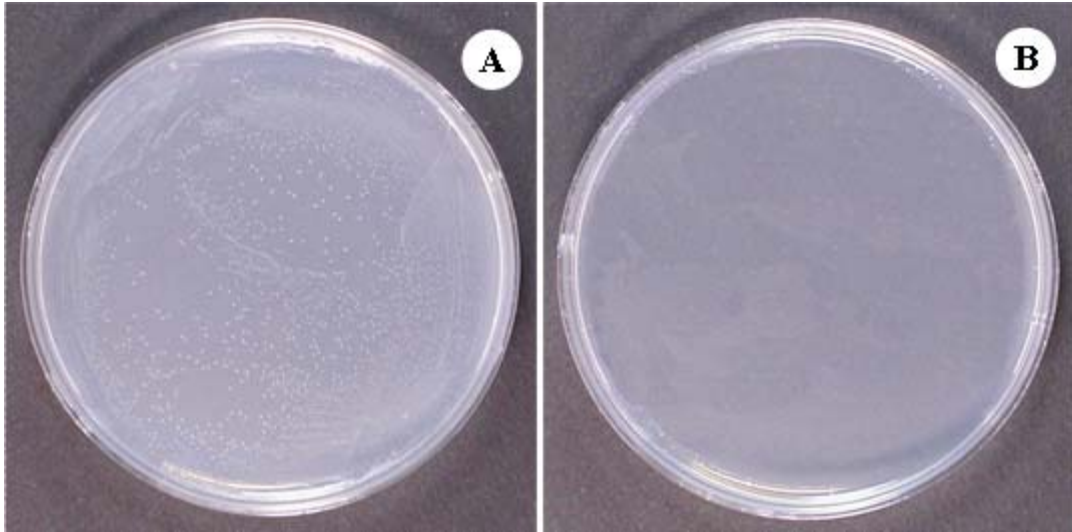


Fig. 3-24. Photographs of *Vibrio harveyi* with JK-8 concentrate (X5); (A) control, (B) 30 mins

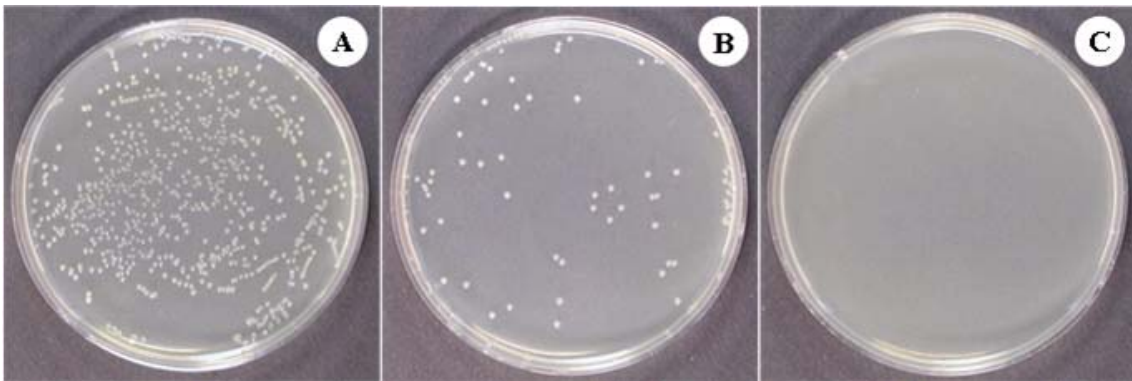


Fig. 3-25. Photographs of *Edwardsiella tarda* with JK-8 concentrate (X5); (A) control, (B) 30 mins, (c) 60 mins

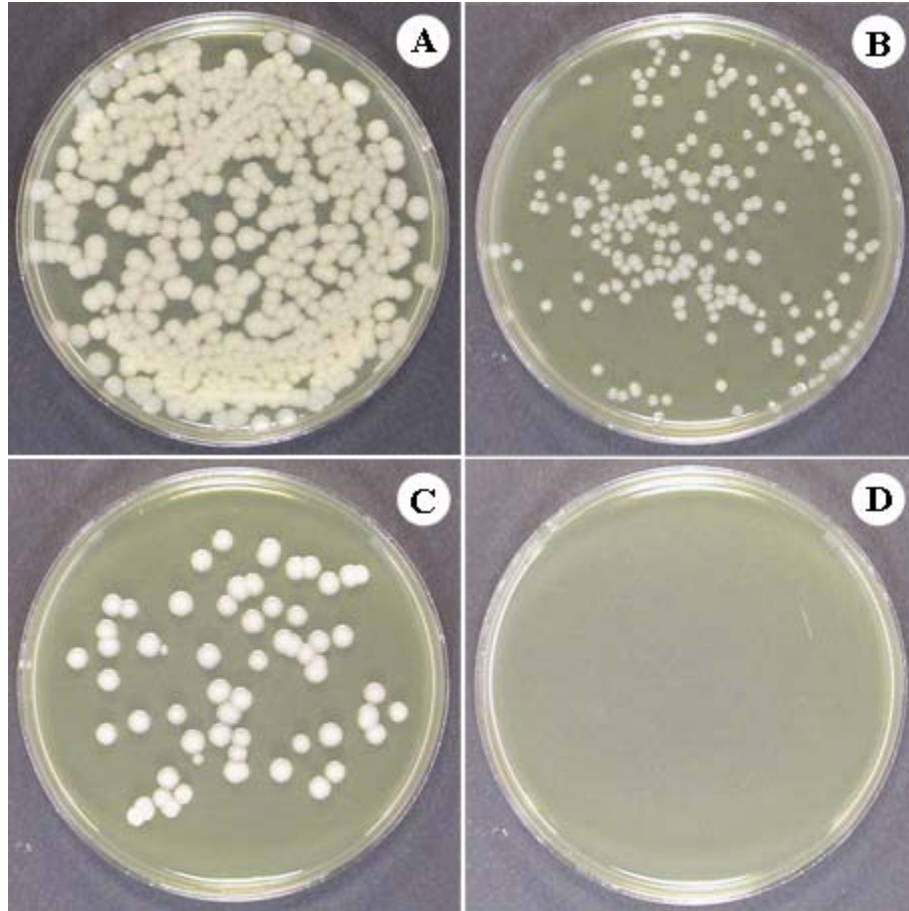


Fig. 3-26. Photographs of *Streptococcus pyogenes* with JK-8 concentrate (X5); (A) control, (B) 60 mins, (C) 120 mins, (D) 180 mins

(2) JK-11에 대한 병원성 세균의 살균율

병원성 세균들에 대한 JK-11의 살균력을 조사하였다. 분리 유산균 *Lactobacillus* sp. JK-11의 배양액을 5배 농축시킨 후, 이 농축 배양상등액을 JK-8과 마찬가지로 잠재 병원성 세균으로 간주되는 7가지 세균을 노출시킨 후, 30분 간격으로 4시간 동안 고체 배지에 평판 도말하여 살균율을 관찰하였다 (Fig. 3-27). 그람 음성 세균인 *Vibrio parahaemolyticus*와 *Vibrio harveyi*를 농축 배양액에 노출시킨 경우 1시간과 1시간 30분 이내에 세균이 모두 사멸하여 고체 배지상에 집락이 관찰되지 않았다 (Figs. 3-28 & 3-29). 또한 *Edwardsiella tarda*의 경우 2시간 이내에 사멸하였고, 그람 양성 세균인 *Streptococcus pyogenes*는 4시간 이내에 모두 사멸하여 집락이 관찰되지 않았다 (Figs. 3-30 & 3-31).

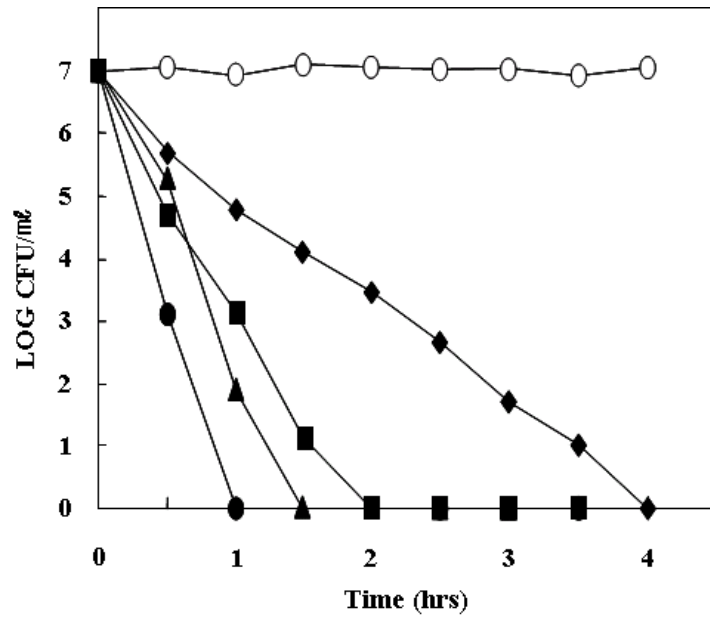


Fig. 3-27. Killing of pathogens after exposure of cell-free concentrated supernatants derived from JK-11 (A); control (○), *Vibrio parahemolyticus* (●), *V. harveyi* (▲), *Edwardsiella tarda* (■), *Streptococcus pyrogenes* (◆) At intervals, the number of colony-forming units per ml of culture was determined

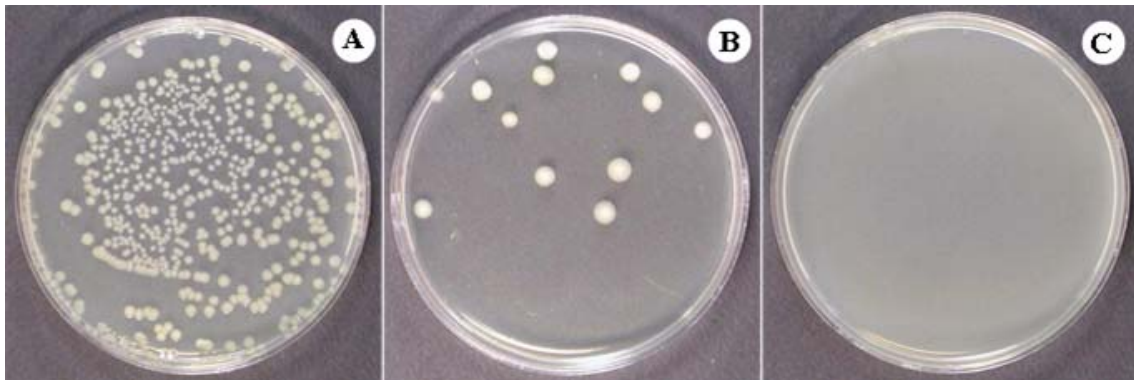


Fig. 3-28. Photographs of *Vibrio parahaemolyticus* with JK-11 concentrate (X5); (A) control, (B) 30 mins. (C) 60 mins

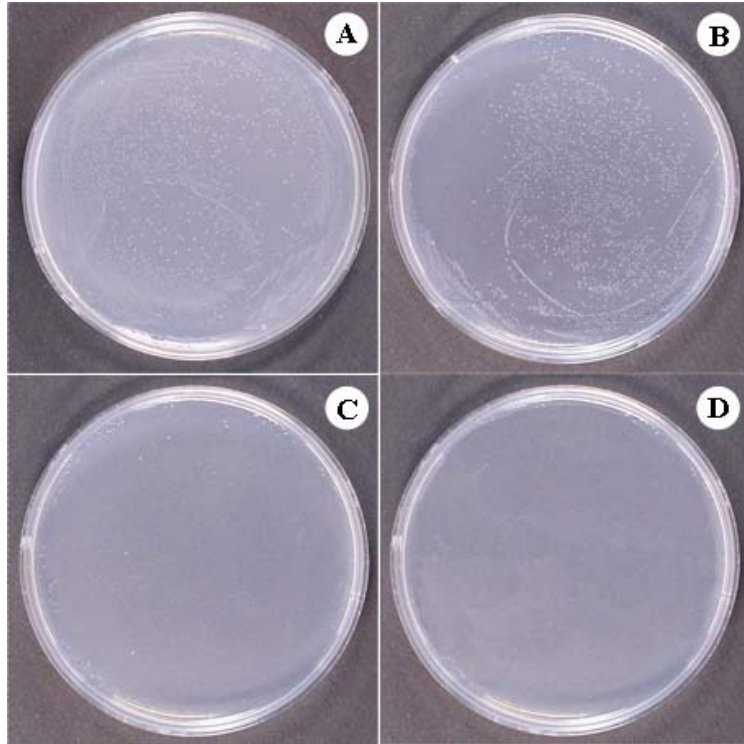


Fig. 3-29. Photographs of *Vibrio harveyi* with JK-11 concentrate (X5); (A) control, (B) 30 mins, (C) 60 mins, (D) 90 mins

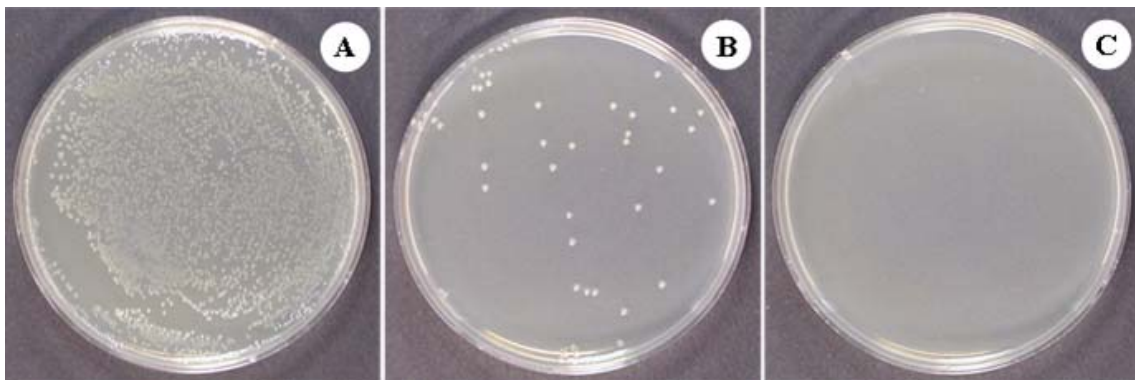


Fig. 3-30. Photographs of *Edwardsiella tarda* with JK-11 concentrate (X5); (A) control, (B) 60 mins, (c) 120 mins

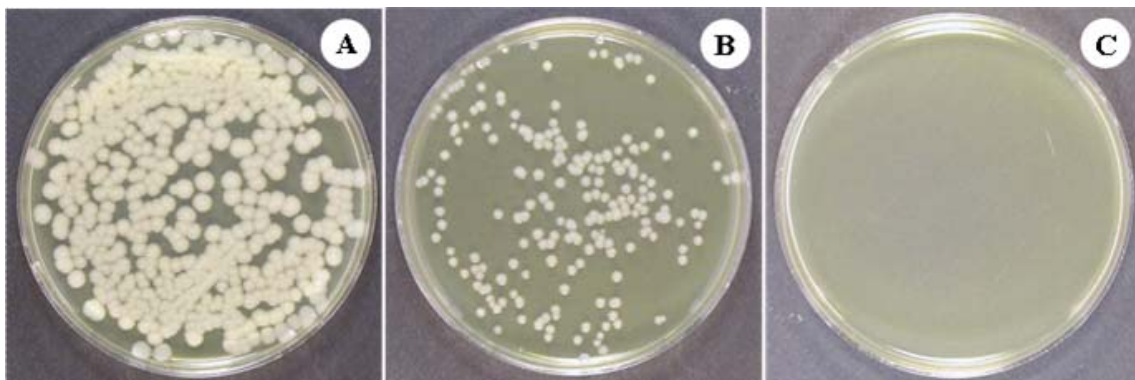


Fig. 3-31. Photographs of *Streptococcus pyogenes* with JK-11 concentrate (X5); (A) control, (B) 120 mins (C) 240 mins

사. 유산균의 성장 및 측정

(1) *Lactobacillus* sp. JK-8의 성장 및 유기산 측정

새우 양식장에서 분리한 *Lactobacillus* sp. JK-8을 MRS 액체배지에 접종하고 세균의 성장 및 유기산 생성 그리고 배양기간 중의 pH의 변화를 6시간 간격으로 측정하였다. *Lactobacillus* sp. JK-8은 배양 12시간 이후부터 36시간까지 빠르게 성장하였으며, 이와 관련하여 pH도 급격하게 감소되는 현상이 관찰되었다. 배양 초기의 pH는 7이었으나 48시간이 지난 최종 pH는 3.84로 나타났다.

본 실험에서 JK-8의 성장에 따른 유기산 (lactic acid와 acetic acid)의 양은 HPLC를 이용하여 분석하였다. 표준품으로 제조된 authentic standard에서 lactic acid의 peak는 16.326 min에서 acetic acid의 peak는 19.301 min에서 나타났다. JK-8의 성장에 비례하여 유기산이 생성되었는데 48시간이 지난 후 lactic acid와 acetic acid는 192.8 mM과 43.6 mM이 각각 생성되었다. 이와 관련하여 유기산의 생성이 높아짐에 따라 pH가 감소되는 것이 관찰되었다 (Fig. 3-32).

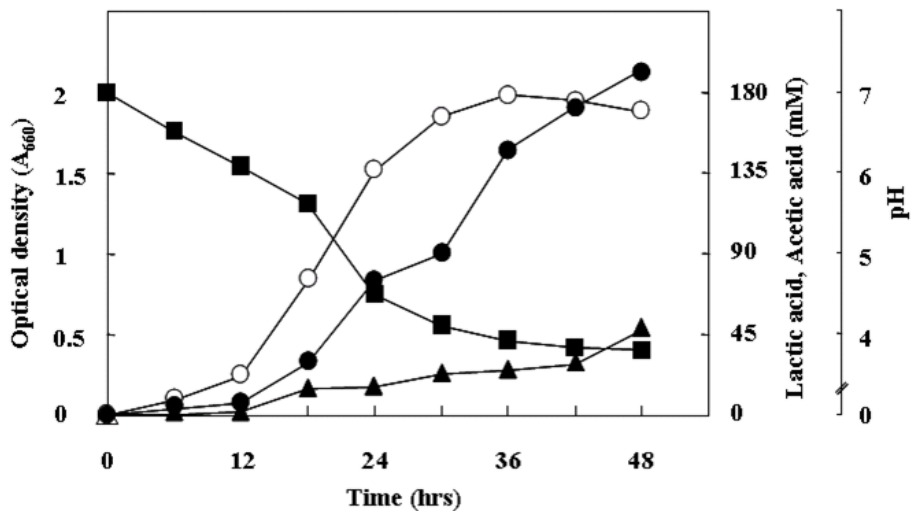


Fig. 3-32. Growth of test cultures JK-8, measured as cell density (○), associated with the parallel formation of lactic acid (●) and acetic acid (▲), and pH changes (■)

(2) *Lactobacillus* sp. JK-11의 성장 및 유기산 생성

새우 양식장에서 분리한 유산균 *Lactobacillus* sp. JK-11을 MRS 액체배지에 접종하고 세균의 성장 및 유기산 생성 그리고 배양기간 중의 pH의 변화를 6시간 간격으로 측정하였다. 유산균 JK-11은 배양 12시간 이후부터 36시간까지 급격하게 성장했으며, 이와 관련하여 pH는 다소 감소하는 현상이 관찰되었다. 배양 초기의 pH는 7이었으나 48시간이 지난 최종 pH는 5.4로 나타났다. JK-11의 성장에 따른 유기산 (lactic acid와 acetic acid)의 양을 HPLC를 이용하여 분석하였는데, 48시간 지난 후의 lactic acid와 acetic acid는 45.7 mM과 11.8 mM이 생성되었다 (Fig. 3-33).



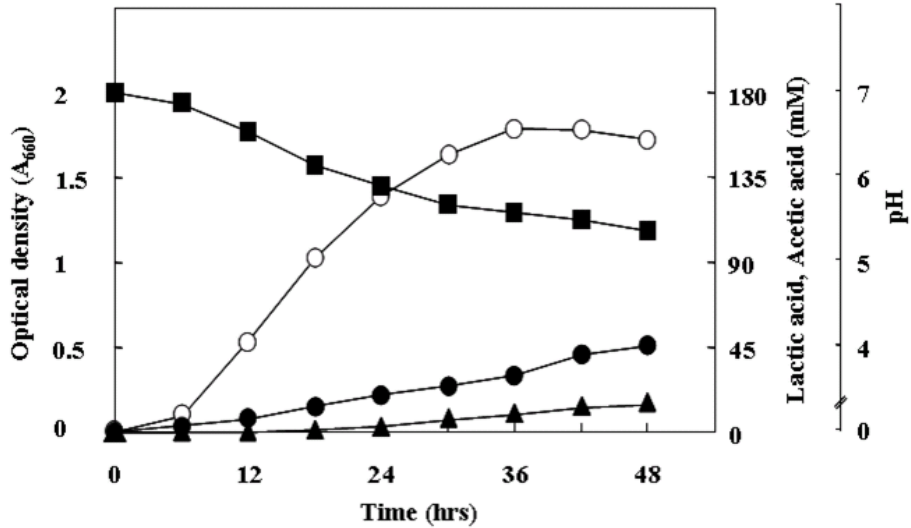


Fig. 3-33. Growth of test cultures and JK-11, measured as cell density (○), associated with the parallel formation of lactic acid (●) and acetic acid (▲), and pH changes (■)

아. HPLC에 의한 유기산 분석

분리 유산균 *Lactobacillus* sp. JK-8의 배양 기간동안 대사물질로서 배양액에서 생성되는 유기산을 조사 분석하였다. 배양초기에는 거의 존재하지 않았던 유기산이 배양기간이 진행됨에 따라 JK-8 균주의 성장과 비례하여 생성되었다. 얻어진 배양액 시료를 HPLC를 이용하여 분석한 결과는 lactic acid와 acetic acid가 혼합된 authentic standard와 비교하여 16.326 min과 19.301 min에서 동일한 peaks가 탐침 되었으며 잠정적으로 각각 lactic acid와 acetic acid로 명명하였다 (Fig. 3-34). 배양 48시간동안 배양액내에는 192.8 mM lactic acid와 43.6 mM acetic acid가 생성되었으며, 이 시점에서의 pH는 3.84였다.

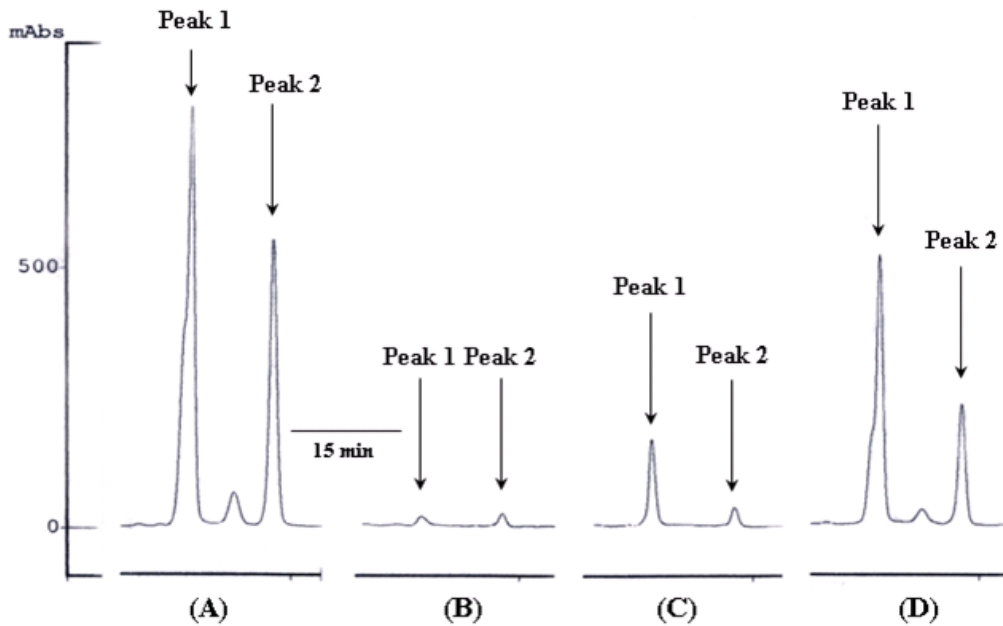


Fig. 3-34. HPLC chromatograms of standards (A) and of culture samples harvested from JK-8 cultures initially (B) and after 24 hrs (C) and 48 hrs of incubation (D)

자. GC-MS 분석

배양 중에 생성된 유기산을 확인하기 위하여, 48시간 경과한 배양액을 동결건조하고 물 층을 제거한 후, DMSO에 녹여서 1  $\mu$ l를 GC-MS에 injection 시킨 결과는 Fig 3-35에서 보여주는 바와 같다. GC-MS 분석에서 retention time 2.850 min은 acetic acid로 6.492 min은 lactic acid로 분석되었으며, 5.517 min은 DMSO로 MS library를 통해 확인되었다.

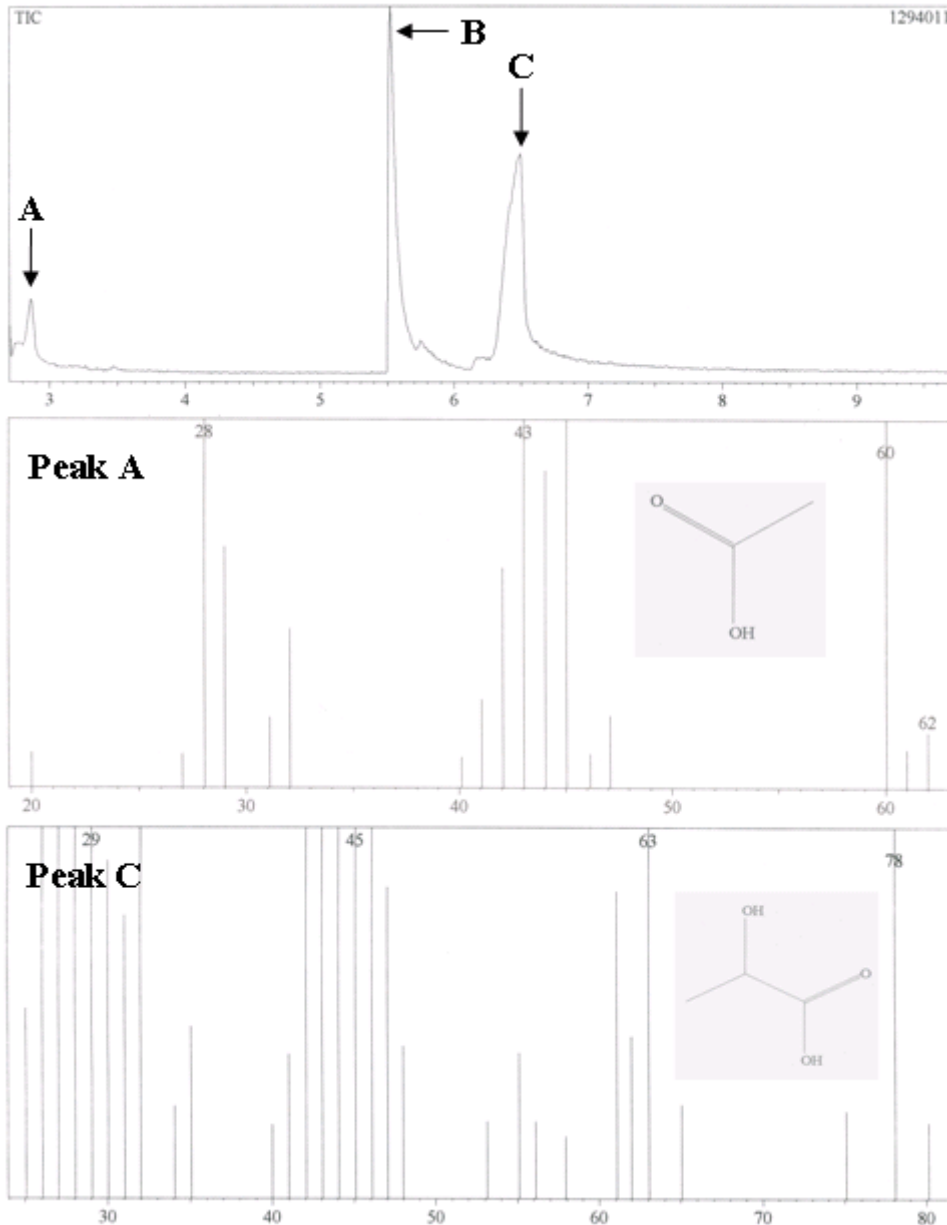


Fig. 3-35. GC-MS data for a culture analyzed after 48 hrs of incubation. MS fragmentation patterns of the compounds representing the two peaks (A and C) in the TIC are indicated and the respective chemical structures of the compounds are also given. Peak B was DMSO used as a solvent

차. 주사전자현미경에 의한 농축 배양상등액 노출 세균의 관찰

(1) *Lactobacillus* sp. JK-8 관찰

분리 세균 *Lactobacillus* sp. JK-8의 농축 배양상등액에 병원성 세균을 노출시킨 후 세균의 외부 형태 변화를 주사전자현미경을 이용하여 관찰하였다. 정상적인 *Vibrio parahaemolyticus*, *V. harveyi* 그리고 *Edwardsiella tarda*의 표면은 매끄러운 것으로 관찰되었으나, 각 균주를 농축 배양상등액에 6시간 동안 노출하였을 때 세포들의 외부 형태가 변화하는 것이 관찰되었다. 농축 배양상등액에 노출된 *Vibrio parahaemolyticus*의 표면은 울퉁불퉁하며, 구멍이 생기는 모습이 몇몇의 세포에서 관찰되었고 (Fig. 3-36), *Vibrio harveyi*는 *V. parahaemolyticus*의 표면과 비슷하게 구멍이 생기고 주그러드는 모습이 관찰되었다. (Fig 3-37). *Edwardsiella tarda*의 표면에서 약간 움푹패이거나 구멍이 생기는 모습이 관찰되었다 (Fig. 3-38).

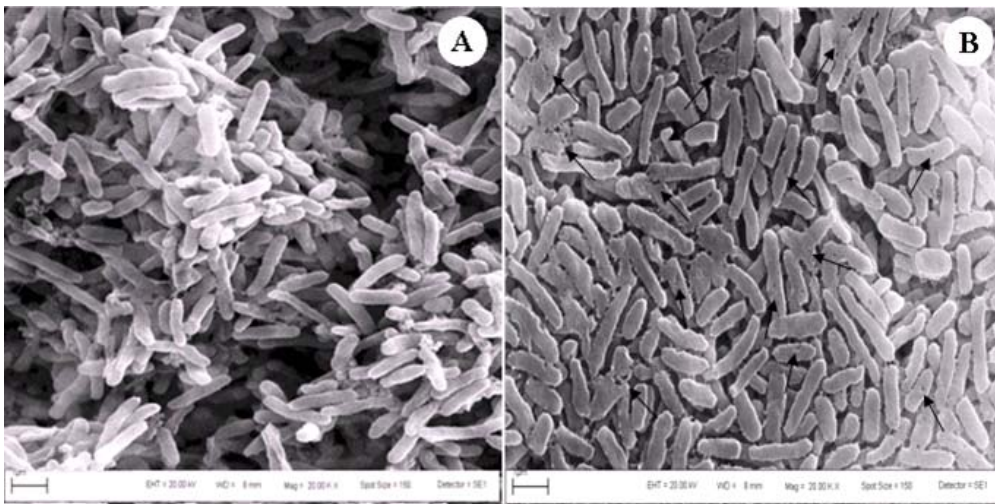


Fig. 3-36. Scanning electron micrographs of *Vibrio parahaemolyticus* treated with JK-8 concentrate (X5) (A) untreated cells (B) cells treated with 5-fold concentrated supernatants for 6 hrs. Arrows indicate the punctured cell envelopes

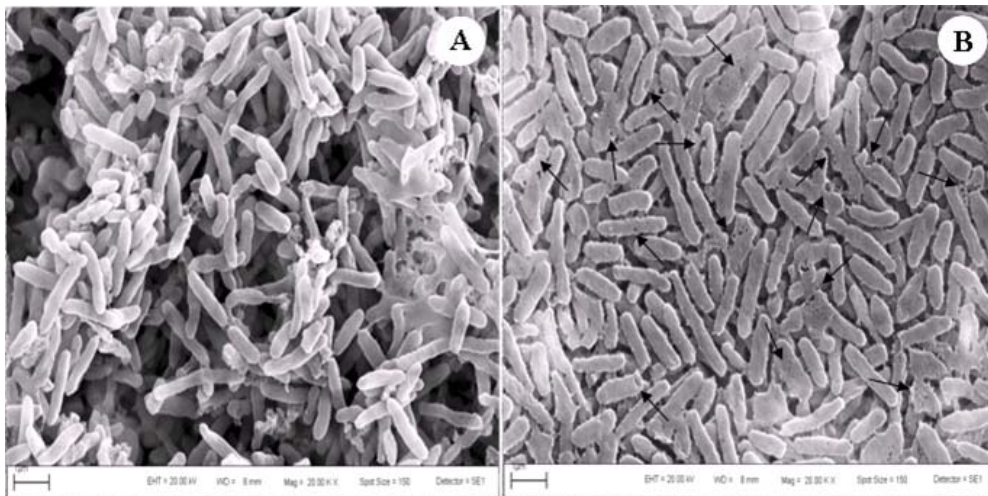


Fig. 3-37. Scanning electron micrographs of *Vibrio harveyi* treated with JK-8 concentrate (X5) (A) untreated cells (B) cells treated with 5-fold concentrated supernatants for 6 hrs. Arrows indicate the punctured cell envelopes

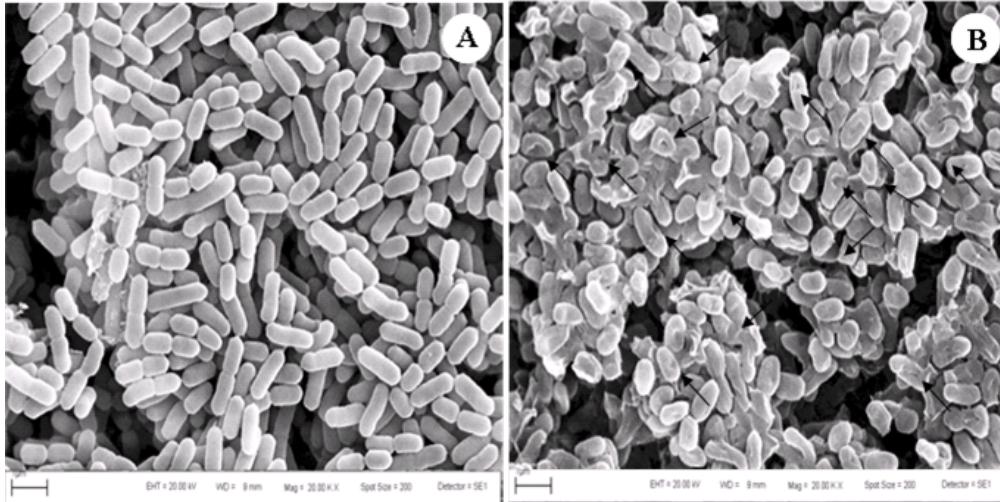


Fig. 3-38. Scanning electron micrographs of *Edwardsiella tarda* treated with JK-8 concentrate (X5) (A) untreated cells (B) cells treated with 5-fold concentrated supernatants for 6 hrs. Arrows indicate the punctured cell envelopes

(2) *Lactobacillus* sp. JK-11 관찰

분리 유산균 *Lactobacillus* sp. JK-11의 농축 배양상등액에 병원성 세균을 노출시킨 후 세균의 외부 형태 변화를 주사전자현미경을 이용해 관찰하였다. 정상적인 *Vibrio parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *Edwardsiella tarda*의 표면은 매끄러운 것으로 관찰되었으나, 각 균주를 농축 배양상등액에 6시간 동안 노출되었을 때 세포들의 외부 형태가 크게 변화하는 것이 관찰되었다. 농축 배양상등액에 노출된 *Vibrio parahaemolyticus*의 표면은 대부분이 울퉁불퉁하며 움푹 파이거나 쭈그러들며 구멍이 생기고 세포벽이 붕괴되는 모습이 관찰되었고 (Fig. 3-39), *Vibrio harveyi*는 대부분 쭈그러들며 구멍이 생기고 세포벽이 뭉그러지는 모습이 관찰되었다 (Fig 3-40). *Edwardsiella tarda*는 대부분의 세포가 쭈그러들었으며 세포의 끝에 구멍이 생겨 끝이 둥글지 않은 세포의 모습이 관찰되었다 (Fig. 3-41).

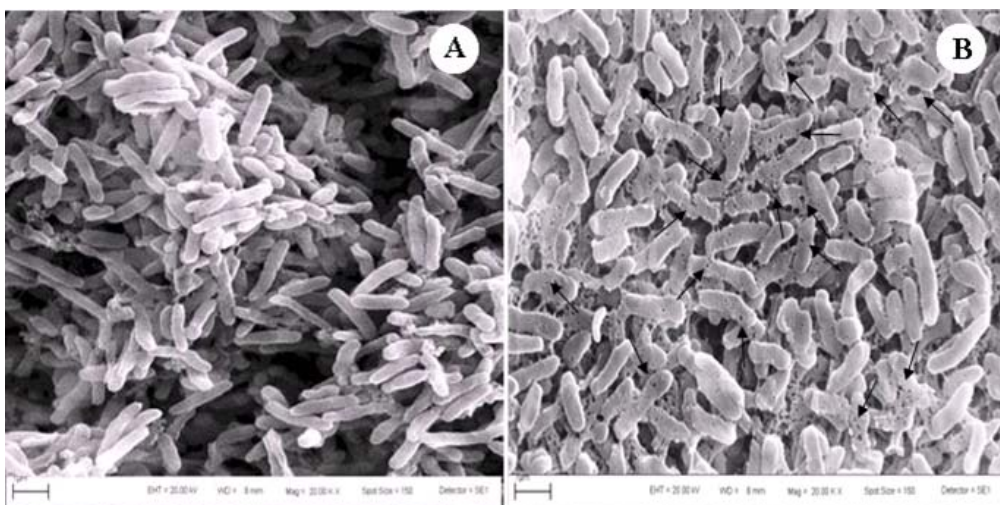


Fig. 3-39. Scanning electron micrographs of *Vibrio parahaemolyticus* treated with JK-11 concentrate (X5) (A) untreated cells (B) cells treated with 5-fold concentrated supernatants for 6 hrs. Arrows indicate the punctured cell envelopes

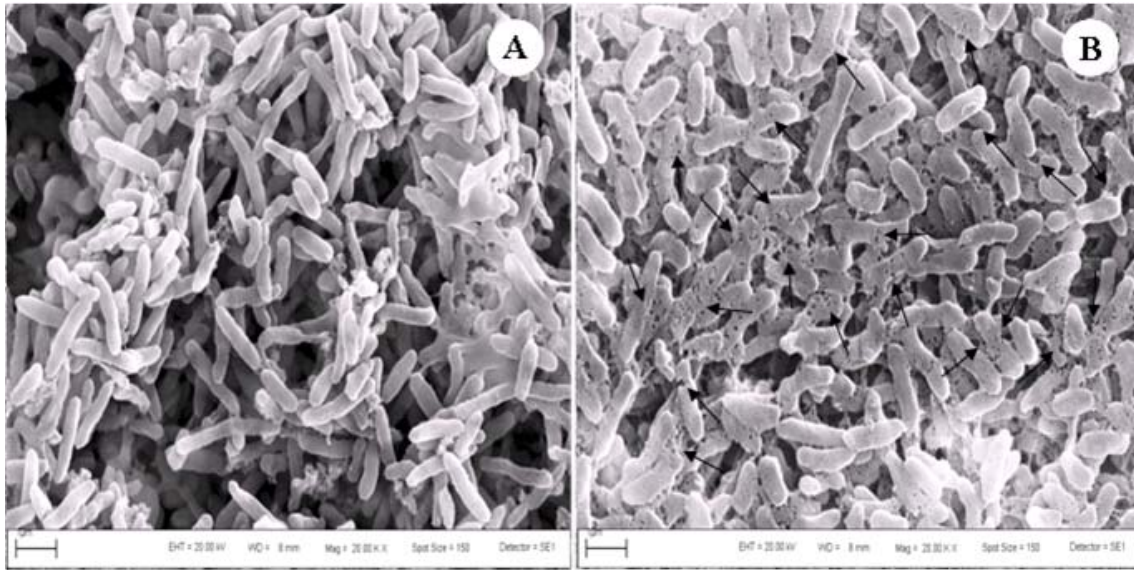


Fig. 3-40. Scanning electron micrographs of *Vibrio harveyi* treated with JK-11 concentrate (X5) (A) untreated cells (B) cells treated with 5-fold concentrated supernatants for 6 hrs. Arrows indicate the punctured cell envelopes

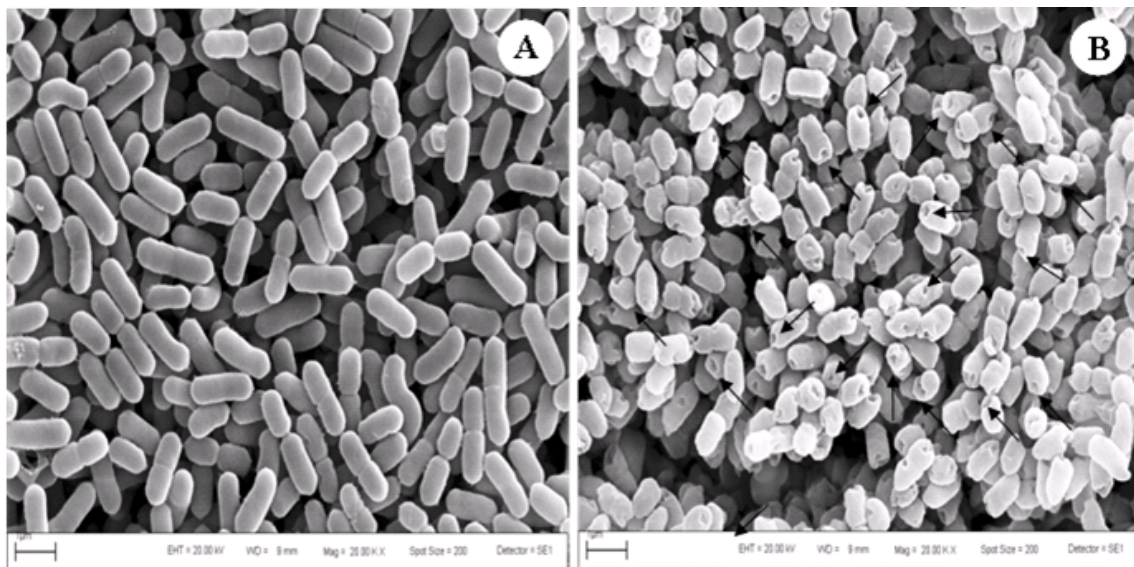


Fig. 3-41. Scanning electron micrographs of *Edwardsiella tarda* treated with Jk-11 concentrate (X5) (A) untreated cells (B) cells treated with 5-fold concentrated supernatants for 6 hrs. Arrows indicate the punctured cell envelopes

카. 항균물질의 생성 확인

(1) *Lactobacillus* sp. JK-8 항균물질 확인

분리 유산균 *Lactobacillus* sp. JK-8의 항균물질을 확인하기 위해 catalase를 처리하고 pH를 중성으로 만든 농축 배양상등액과 그렇지 않은 상등액을 plate diffusion assay 방법으로 비교하여 관찰하였다. 병원성 세균 *Vibrio parahaemolyticus*, *V. harveyi* 그리고 *Edwardsiella tarda*에 대한 항균활성 실험에서 pH가 조절되지 않은 농축 배양상등액은 뚜렷한 투명대를 형성하였지만, pH가 조절된 농축 배양액에서는 투명대가 관찰되지 않았다 (Fig. 3-42).

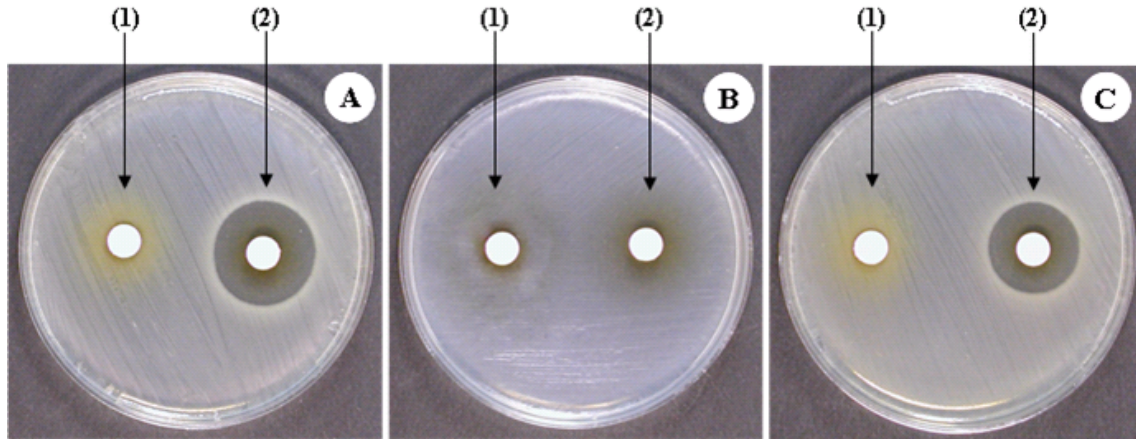


Fig. 3-42. Inhibition of JK-8 cultures supernatant by the plate diffusion assay. Filter discs soaked with 5-fold concentrated supernatants were placed onto lawn plates of *V. parahaemolyticus* (A), *V. harveyi* (B), and *Edwardsiella tarda* (C), respectively; adjusting the pH 7.0 (1) and non-adjusting the pH 3.8 (2) derived from JK-8

(2) *Lactobacillus* sp. JK-11 항균물질 확인

분리 유산균 *Lactobacillus* sp. JK-11의 항균물질을 확인하기 위해 catalase를 처리하고 pH를 중성으로 만든 농축 배양상등액과 그렇지 않은 상등액을 plate diffusion assay 방법으로 비교하여 관찰하였다. 병원성 세균 *Vibrio parahaemolyticus*, *V. harveyi* 그리고 *Edwardsiella tarda*에 대한 항균활성 실험에서 pH가 조절되지 않은 농축 배양상등액과 pH가 조절된 농축 배양상등액 모두 뚜렷한 투명대 (inhibition zone)를 형성하였다 (Fig. 3-43). 이 결과로 JK-11의 항균물질은 유기산이 아닌 다른 것으로 판단된다.

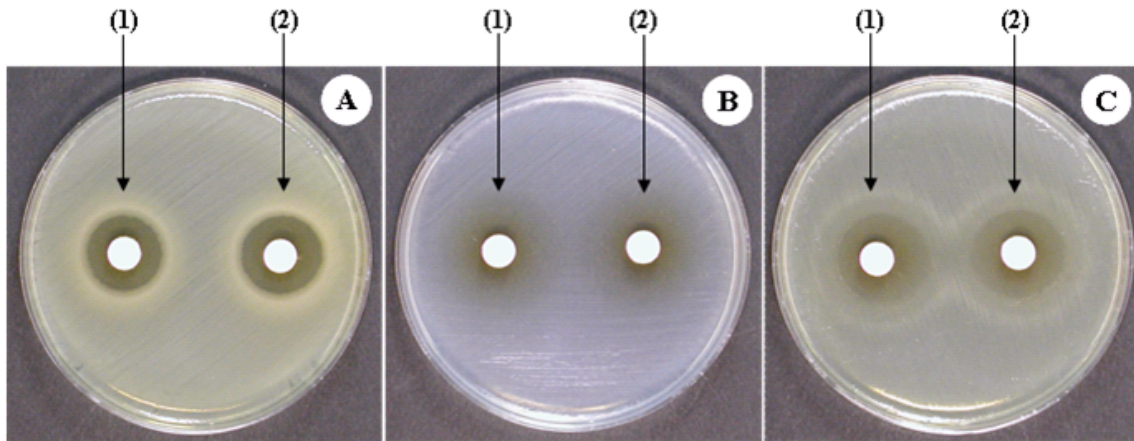


Fig. 3-43. Inhibition of JK-11 cultures supernatant by the plate diffusion assay. Filter discs soaked with 5-fold concentrated supernatants were placed onto lawn plates of *V. parahemolyticus* (A), *V. harveyi* (B), and *Edwardsiella tarda* (C), respectively; adjusting the pH 7.0 (1) and non-adjusting the pH 5.4 (2) derived from JK-11

#### 타. RP-HPLC

분리 유산균 *Lactobacillus* sp. JK-11의 배양 기간동안 배양액에 생성되는 항균물질을 분리하기 위하여 RP-HPLC (reverse-phase high performance liquid chromatography)를 이용하였다. JK-11의 농축 배양상등액을 injection 하여 얻어진 결과는 Fig. 3-44에 나타나있다. RP-HPLC에서 처음 10분전까지는 농도구배를 걸어주지 않고 10분부터 0.5 ml/min의 flow rate로 acetonitrile을 1% 씩 증가시키면서 용출되는 분획 (fraction)들을 채취해 radial diffusion assay 방법을 이용하여 항균활성 측정에 사용하였다. A Peak는 bacteriocin 유사 물질로 강한 항균 활성을 나타내는 것으로 확인되었다.

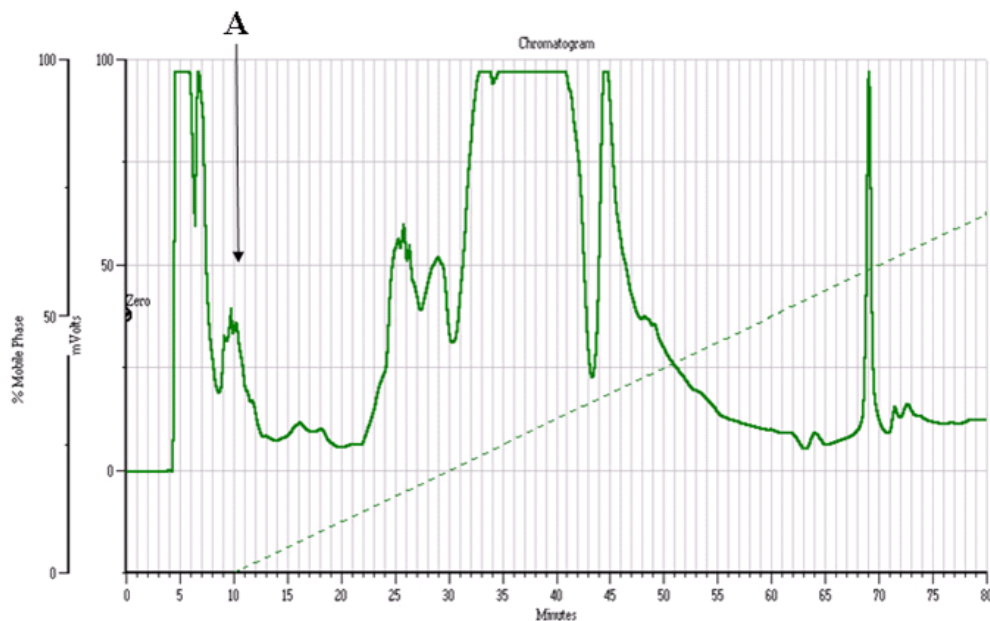


Fig. 3-44. RP-HPLC data for a culture sample analyzed 5-fold concentrated supernatants . A fragmentation indicated bacteriocin-like substance

파. Ultrasensitive radial diffusion assay

분리 유산균 *Lactobacillus* sp. JK-11에 의해 생성되는 항균물질을 분리하여 항균활성 측정 은 radial diffusion assay 방법을 이용하였다. RP-HPLC에서 얻어진 72개의 fraction들을 완전히 건조시키고 0.5% acetic acid에 다시 부유시킨 후 *E. coli*가 들어있는 plate에 접종해 투명대의 크기를 측정해 항균활성을 확인하였다. 72개의 fraction에 대한 항균활성 실험에서 첫 번째에 해당하는 fraction에 강한 항균 활성을 가지는 항균물질이 들어있는 것을 확인하였다 (Fig. 3-45).

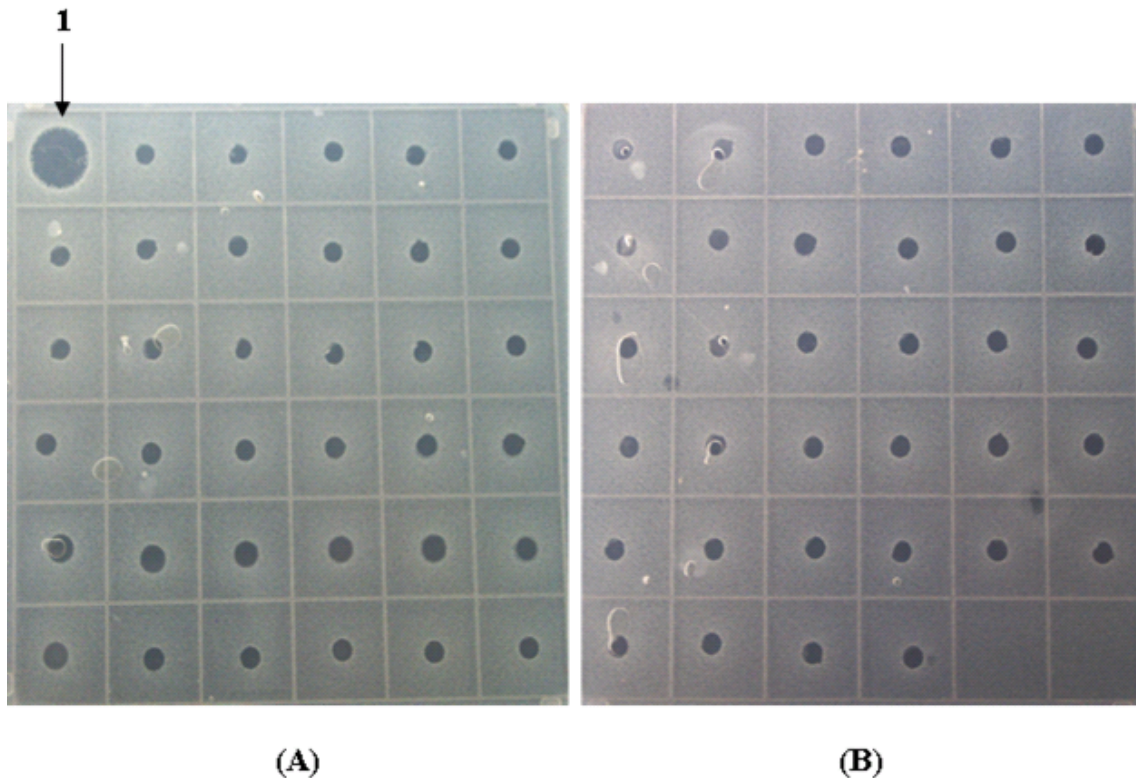


Fig. 3-45. Antibacterial activities against *E. coli* in radial diffusion assay. Panel A shows the results of antibacterial activities against *E. coli* and panel B don't. Well 1 shows strong antibacterial activities as bacteriocin-like substance

하. Tricine SDS-PAGE

분리 유산균 *Lactobacillus* sp. JK-11에 생성되는 항균물질의 분자 크기를 확인하기 위해 RP-HPLC에서 얻어진 첫 번째 fraction을 Bradford 방법에 의해 단백질을 정량하여 10  $\mu$ g의 표준품과 Tricine SDS-PAGE를 수행하였다. 그 결과 *E. coli*에 대해 강한 항균 활성을 나타내는 bacteriocin 유사 물질의 분자 크기는 약 4 kDa으로 확인되었다 (Fig. 3-46).



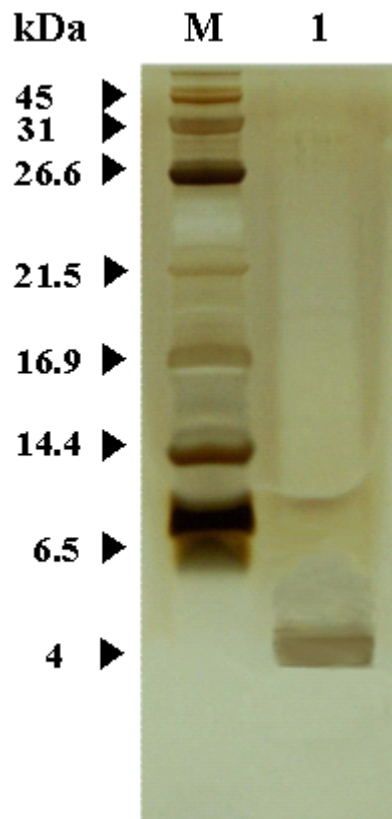


Fig. 3-46. Tricine SDS-PAGE showing bacteriocin-like substance isolated *Lactobacillus* sp. JK-11. Lane M, molecular weight markers; lane 1, bacteriocin-like substance. Bacteriocin-like substance indicated molecular weight 4 kDa

## 5. 새우 양식장 환경 정화를 위한 제제 개발

### 가. 미생물제제의 생산

균주 CK-10와 CK-13을 각각 LB 배지에 24시간동안 배양하여, 원심분리용 튜브에서 원심 분리시킨 후 완충용액으로 세척하여 펠릿을 준비하였다. 이러한 과정을 3회 반복하였으며 만들어진 각 균주의 펠릿을 동결건조기에 넣어 24시간동안 동결건조 시켰다. 건조된 균체에 담체인 zeolite를 두 배가 되게 넣어 잘 혼합하여 추후 미생물제제 (microbial agent)로서 이용하기 위하여 냉장고에 보관하였다. 냉장고에 보관된 zeolite를 혼합한 균주와 zeolite를 혼합하지 않은 균주의 시간경과에 따른 생존율을 조사하였다 (Fig. 3-47). 그림에서 보는 바와 같이 zeolite가 첨가된 상태에서 혼합균주는 zeolite가 첨가되지 않은 상태에서보다 균주의 생존력이 유지되는 것으로 나타났다. 이러한 결과를 토대로 하여 CK-10과 CK-13의 혼합균주에 zeolite를 첨가한 분말형태의 미생물제제 (Fig. 3-48A)와 액상형태의 미생물제제 (Fig. 3-48B)를 생산하였다.

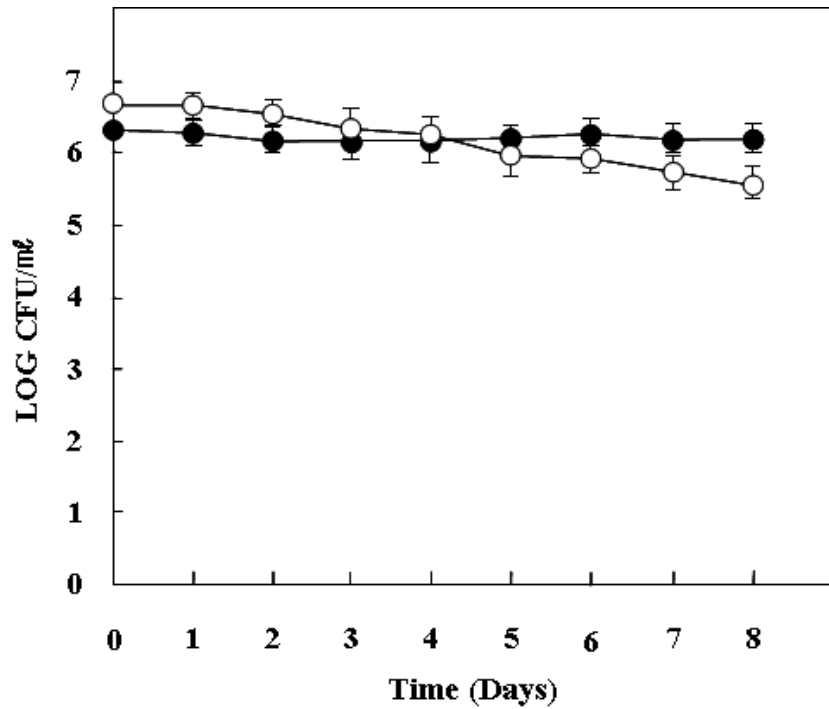


Fig. 3-47. Survival of N/P removers (CK-10 and CK-13) in the addition of zeolite (●) and in the absence of zeolite (○)



Fig. 3-48. Freeze-dried microbial agent; (A) powered type and (B) liquid type

나. 양식사료에서 유래하는 질소와 인의 제거

2개의 12 L 용량의 벤치규모 수조에서 천연해수에 0.01% (w/v)의 양식사료를 각각 넣고,

한 수조에는 CK-10과 CK-13의 혼합배양을 접종하고, 다른 수조에는 미접종 상태에서 질소와 인의 제거능을 144시간 동안 관찰하였다. 혼합배양을 접종한 수조에서는 24시간이 경과한 후 190.7 uM  $\text{NO}_2^-$ 가 용출되었고, 72시간만에 완전히 제거되었다.  $\text{NH}_4^+$ 와  $\text{PO}_4^{3-}$ 는 48시간이 지난 후 224.3 uM과 105.6 uM이 각각 용출되었으며, 144시간이내에 완전히 제거되었다.  $\text{NO}_3^-$ 는 4시간 후 125.3 uM이 생성되었고 관찰 동안 약 94%가 제거되는 것이 관찰되었다 (Fig. 3-49A). 그러나 미접종 상태에 의한 질소와 인의 제거 실험에서는 양식사료로부터 지속적인 용출과 함께 질소와 인이 증가하였으며 제거는 이루어지지 않았다 (Fig. 3-49B).

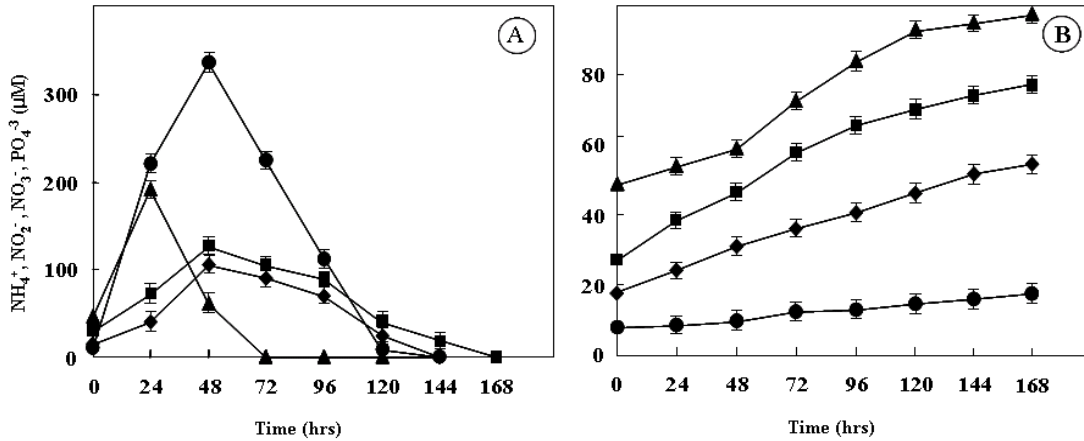


Fig. 3-49. Removal of  $\text{NH}_4^+$  (●),  $\text{NO}_2^-$  (▲),  $\text{NO}_3^-$  (■), and  $\text{PO}_4^{3-}$  (◆) from 0.01% (w/v) farming feed suspension incubated (A) with co-cultures, *Bacillus* sp. CK-10 and *Bacillus* sp. CK-10, and (B) without cultures. Initial inoculum of co-cultures was  $4.7 \times 10^4$  cells/ml

#### 다. 수조에서의 세균 성장과 pH 변화

벤치규모의 수조에 양식사료를 각각 넣고, 한 수조에는 CK-10과 CK-13의 혼합배양을 접종하고, 다른 수조에는 미접종 상태에서 총 세균의 성장과 pH 변화를 관찰하였다. 혼합배양을 접종한 수조의 pH는 7.01에서 144시간이 지난 후 7.95로 증가하였고, 총 균수는  $4.7 \times 10^4$ 개에서 48시간이 지난 후  $3.4 \times 10^6$ 개까지 증가하였고, 그 이후부터 감소하기 시작하여 144시간이 지난 후  $6.5 \times 10^3$ 개가 되었다 (Fig. 3-50A). 그러나 미접종 상태의 수조에서는 pH가 7.02에서 7.51로 증가하였다. 또한 총 균수는  $1.7 \times 10^2$ 개에서  $5.6 \times 10^3$ 개까지 증가하였다가 다소 감소하여 144시간이후에는  $6.9 \times 10^2$ 개로 나타났다 (Fig. 3-50B).

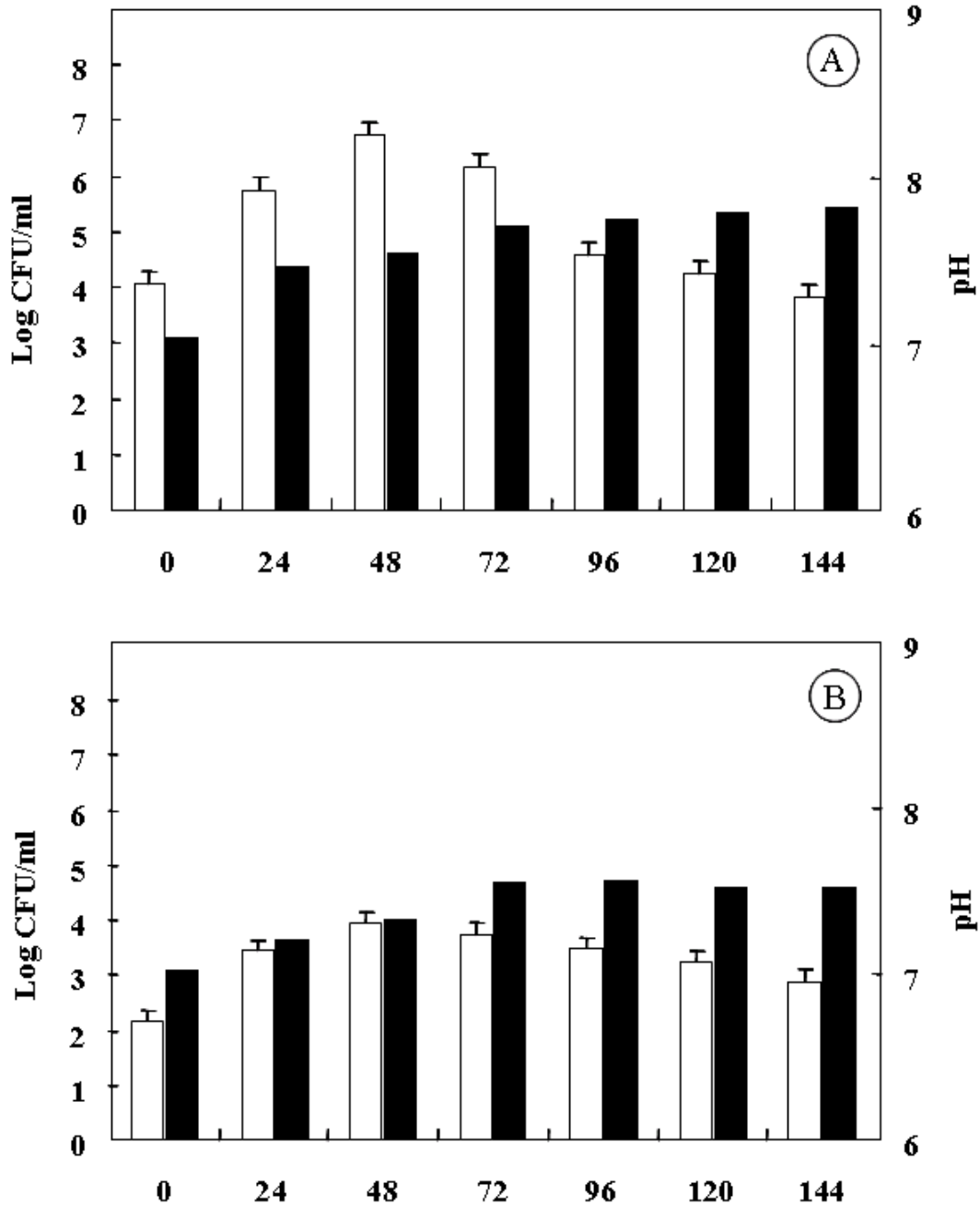
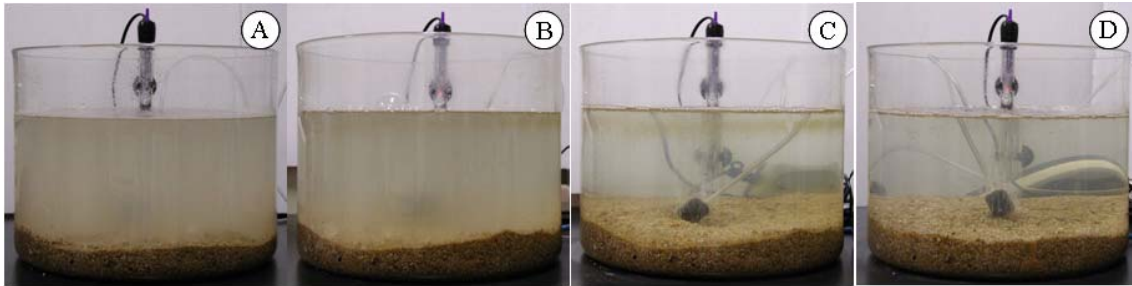


Fig. 3-50. pH changes (■) and log colony-forming unit (□) of total bacteria incubated (A) with co-cultures, *Bacillus* sp. CK-10 and *Bacillus* sp. CK-13 and (B) without cultures

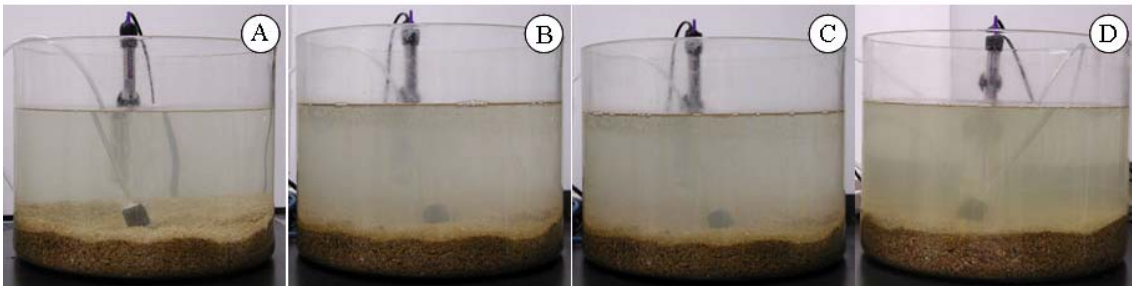
라. 12 L 수조에서 미생물체제 투여에 따른 혼탁도 변화

수조에 양식사료를 첨가하고 미생물체제를 투여하여 수조에서 탁도의 변화를 관찰하였다. Fig. 3-51에서 보는바와 같이 시간이 경과함에 따라 수조내의 혼탁도가 변화하는 것이 관찰되었다. 처음에는 맑았으나 시간에 경과함에 따라 탁도가 크게 증가하였으며, 72시간에 경과한

후에는 다시 맑아지는 것이 관찰되었다 (Fig. 3-51). 이러한 현상은 질소와 인을 제거하는 CK-10과 CK-13로 만들어진 미생물제제가 투여된 양식사료를 산소가 공급되는 상태에서 균주의 왕성한 성장과 함께 사료를 신속하게 분해 시키고, 이 과정에서 수조내의 혼탁도가 증가하였으며, 시간이 경과하면서 물속에 용해된 질소와 인을 지속적으로 제거하여 궁극적으로 수질을 깨끗하게 정화시키는 것으로 확인되었다.



(a)



(b)

Fig. 3-51. Photographs of bench-scale cistern incubated (a) with microbial agent, and (b) without microbial agent during the incubation period of (A) 0 hr, (B) 48 hrs, (C) 96 hrs, (D) 144 hrs, respectively

마. 12 L 수조에서 미생물제제에 의한 양식사료로부터 질소/인 제거

미생물제제가 투여된 12 L 수조에서 혼탁도의 변화를 통해서 양식사료가 분해되는 것을 육안으로 확인한 후, 질소와 인이 효율적으로 제거되었는지를 질소와 인의 분석을 통하여 확인하였다. 2개의 12L 용량의 벤치규모 수조에서 천연해수에 0.01% (w/v)의 양식사료를 넣고, zeolite가 첨가된 미생물제제를 접종하여 zeolite가 첨가되지 않고 동결건조만 한 미생물 건조물을 접종하여 양식사료에서 유래하는 질소와 인의 제거능을 192시간동안 비교 관찰하였다 (Fig. 3-52A & 3-52B).

Zeolite를 포함하는 미생물제제를 접종한 수조에서  $\text{NH}_4^+$ 는 168시간만에,  $\text{PO}_4^{3-}$ 는 144시간만에,  $\text{NO}_2^-$ 는 96시간만에,  $\text{NO}_3^-$ 는 192시간만에 각각 완전히 제거되었다.

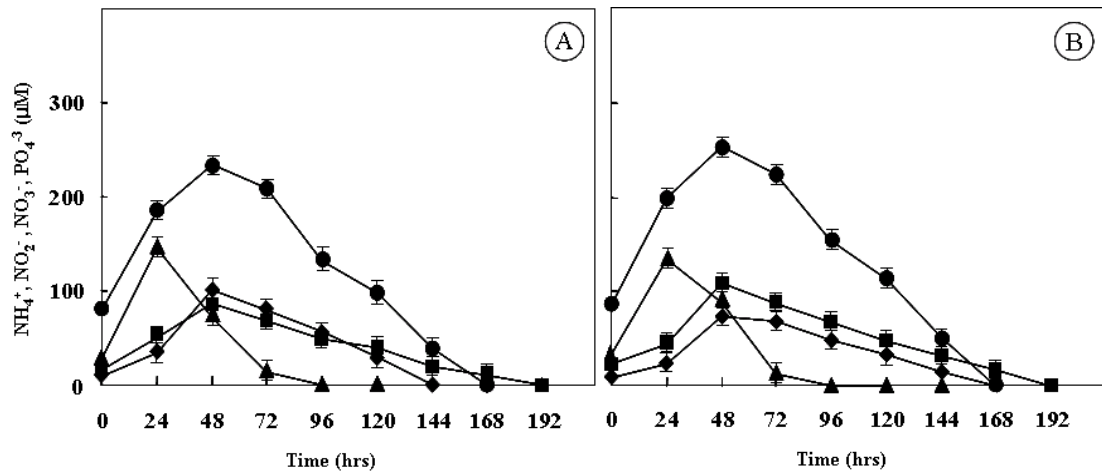


Fig. 3-52. Removal of  $\text{NH}_4^+$  (●),  $\text{NO}_2^-$  (▲),  $\text{NO}_3^-$  (■), and  $\text{PO}_4^{3-}$  (◆) from 0.01% (w/v) farming feed suspension incubated (A) with microbial agent including zeolite, and (B) with dried microbial pellet (B). Initial inoculum of co-cultures was  $4.6 \times 10^4$  cells/ml

## 제 4 장 Probiotics를 이용한 새우양식장 수질개선 및 질병억제

### 제 1 절 서론

양식새우의 질병발생을 억제하고 양식생산성을 회복시키기 위해서는 축제식 양식장의 수질 환경을 개선시킬 수 있는 생물학적 기술의 개발이 필요하다. 본 장에서는 다양한 종류의 probiotic bacteria가 수질개선에 미치는 효과와 적정 농도를 규명하고 현장적용 시험을 통하여 probiotics가 수질개선 및 질병억제에 미치는 효과를 확인하며 이러한 probiotics를 사육수 내에서 지속적으로 활성화시킴으로써 생산성을 향상시킬 수 있는 환경친화적인 양식기술개발을 연구하였다.

## 제 2 절 재료 및 방법

### 1. 수질변화에 미치는 probiotics의 효과 시험

#### 가. 시험에 사용된 probiotic bacteria의 균주

본 실험에 사용된 균주는 Hanpoong Industry Co. (Korea)에서 상품화를 위해 균주별로 생산된 6종의 probiotic 세균을 이용하였다. 사용된 균주는 *Bacillus* 3종 (*B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. mesentericus*), *Lactobacillus* 1종 (*L. acidophilus*), *Nitrosomonas europaea* 와 *Nitrobacter winogradskyi*이다. 각각의 균주는 포도당과 함께 동결 건조된 분말형태로 이루어졌으며, *Nitrosomonas*와 *Nitrobacter*는 혼합 액체상태로 제공받았다.

#### (1) 배지

유익세균 생장도 분석실험을 위해 사용한 생육배지는 MA (marine agar 2216, DIFCO)배지를 사용하였다. 배지조성은 증류수 1 ℓ 안에 peptone 5 g, yeast extract 1 g, ferric citrate 0.1 g, sodium chloride 19.45 g, magnesium chloride 8.8 g, sodium sulfate 3.24 g, calcium chloride 1.8 g, potassium chloride 0.55 g, sodium bicarbonate 0.16 g, potassium bromide 0.08 g, agar 15 g, strontium chloride 34 mg, boric acid 22 mg, sodium silicate 4 mg, sodium fluoride 2.4 mg, ammonium nitrate 1.6 mg, disodium phosphate 8 mg이었다.

#### (2) 균주 배양

분말형태의 *Bacillus* 3종과 *Lactobacillus* 1종은 멸균한 해수 (29 ppt) 10 ml에 각 100 mg씩 넣어 혼합한 후, 23℃의 항온실에서 일주일 간 정치배양하였다. 액상의 *N. europaea*와 *N. winogradskyi*의 혼합 세균은 멸균한 해수 (29 ppt) 10 ml에 1 ml을 넣어 혼합한 후, 동일조건 하에서 정치배양하였다.

#### 나. 새우의 사육

#### (1) 실험용 새우

사육 실험에 사용된 새우는 대하 (*Fenneropenaeus chinensis*)이며, PCR을 통해 흰반점바이러스 (WSSV)에 감염되지 않은 무병모하 (SPF, specific pathogen free)로부터 생산된 얼은 종묘로서, 국립수산물과학원 태안수산종묘시험장에서 제공받았다.

#### (2) 사육조건

유익세균의 수질개선력을 알아보기 위한 실험에서는 수질개선 효과를 분석하기 위하여 수질이 악화된 사육수가 필요하기 때문에, 새우를 사육했던 사육수를 직접 채취하여 세균 첨가로 인한 수질개선 정도를 분석하였다. 본 연구에서는 태안수산종묘시험장의 새우 유생 사육수를 시료로 이용했다. 사육실험을 통한 수질개선 효과 실험에서는 1차 침전 후 자외선 살균기를 통해 여과된 자연해수를 사용하였다.

사육실험에 들어가기 전 유익세균의 수질개선력을 알아보기 위한 실험에서는 20 ℓ 원통형 폴리에틸렌 수조 안에 유생 사육수 (29 ppt) 10 ℓ를 담은 후, air-stone을 부착한 호스를 통해서 공기를 계속 주입시키고 온도는 22±1℃, 광주기는 12L:12D로 유지시켰으며, 실험이 진행되는 일주일 동안 사육수 교환은 하지 않았다. 새우 유생을 사육하면서 유익세균을 처리한 실험에서도 동일한 사육조건으로 진행하였다. 유생 사육시 급이는 상품화된 새우사료 (pellet 사료)를 하루에 4회 공급하였으며 하루 공급량이 체중의 10%를 넘지 않도록 하였다.

대형수조를 이용한 치하 및 성체 사육시 유익세균을 처리한 실험에서는 600 ℓ의 원형수조에 400 ℓ 여과해수 (30 ppt)를 담은 후, air-stone을 부착한 호스를 통해서 공기를 계속 주입시키고 온도는 25±1℃, 광주기는 12L:12D로 유지시켰으며 사육수는 4일에 한번씩 20%의 해수를 교환하였다. 성체 사육시 급이는 하루 체중의 5~7%를 공급하였다.

#### 다. 유익세균 (Probiotics) 처리

유익세균은 해수 10 ℓ에 실험 첫날 농도별 첨가 한 후, 일주일 동안 재첨가는 이루어지지 않았다. 유익세균의 혼합실험은 해수 400 ℓ에 실험첫날 유익세균을 살포한 후, 4일에 한 번씩 20%의 해수 교환과 8일에 한번씩 40%의 유익세균을 재첨가하였다. 대조구 수조에는 유익세균을 첨가하지 않았다.

#### 라. 수질분석

새우 유생 사육수를 이용한 수질개선 효과 실험에서는 수질분석 kit (Aquamerck, Microquant, Merck Co., Germany)를 사용하였으며 유생 사육시 사육수의 수질분석은 Spectroquant 수질분석 kit (Merck Co., Germany)를 사용하여 spectrophotometer (Genesys 5, Spectronic Instrument, USA)로 흡광도를 측정하였다.

유생 사육시 사육수 시료는 퇴적된 찌꺼기와 함께 수조의 중앙에서 이틀에 한 번씩 채취하여 pH, 영양염류농도 (NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N, PO<sub>4</sub>-P), 알칼리도 변화를 측정하여 비교하였다. 혼합 유익세균 처리시에는 4일에 한번씩 시료 채취하여 분석하였고, 분석항목은 NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N, PO<sub>4</sub>-P였으며, 분석방법은 해양 환경공정 시험방법으로 분석하였다.

## 2. 새우양식장의 양식생태 조사

### 가. 새우양식장 수질 환경 조사

2003년 5월말부터 강화도 소재 축제식 새우양식장 2개소에서 일간 용존산소 (Dissolved Oxygen), 수온, pH, 염분, 투명도 및 알칼리도를 측정하였으며 2주 간격으로 영양염류 (NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N, PO<sub>4</sub>-P) 및 총세균수와 비브리오 균수를 조사하였다.

수온, pH, 용존산소 (DO) 및 염분은 수질측정기 (YSI 85)로, 투명도는 secchi disk로 측정하였으며 영양염류 (NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N, PO<sub>4</sub>-P)는 사육수를 1,000 mL씩 채수하여 냉동시켜



둔 뒤 실험실에 운반하여 정밀분석 하였다. 세균의 정량은 양식장 현지에서 총 세균수 조사를 위하여는 marine agar에, *Vibrio* sp.의 조사를 위하여는 TCBS media를 이용하여 incubator에서 48시간 배양한 후 colony를 계수하여 산정하였다.

#### 나. 새우양식장 질병 감염실태 조사

장소는 양식장 환경요인 조사 양식장과 동일하였으며 2주 간격으로 기생충 감염여부와 바이러스 (WSSV, HPV) 감염율을 PCR (polymerase chain reaction) 방법에 의해 조사하였다. 기생충 감염여부는 양식장별 대하 5마리를 그물 등으로 채집하여 현장에서 광학현미경 및 육안으로 아가미와 부속지의 감염상을 관찰하여 사상균 (Filamentous bacteria), 섬모충류, 미세조류 (microalgae), 아가미 손상 여부, 아가미 이물질 부착상태 등을 관찰하여 감염강도에 따라 5단계로 구분하였다.

### 3. Probiotics를 이용한 새우양식장 수질개선 및 질병억제 효과조사

#### 가. 시험양식장 선정 및 준비

##### (1) 양식장 위치 및 면적

현장 시험양식을 위하여 충남 서산시 대산읍 독곶리 소재 축제식 양식장 2개를 선정하였으며, 유익세균 처리구 (Pond 1)는 11,200 m<sup>2</sup> (80 × 140 m), 대조구 (Pond 2)는 10,500 m<sup>2</sup> (70 × 150 m)의 면적으로 조성하였다.

##### (2) 양식장 준비

(가) 2005년 3월부터 굴삭기 등 중장비를 이용하여 양식장의 저질을 제거하고 제방을 다시 정비하여 양식장의 제방높이는 1.8~2.0 m로 조절하였다. 양식장 조성 후 바닥을 건조시키고, 4월 중순 사육수 (해수)를 취수하여 수심 1.0 m로 조절한 후, 사육수 내 바이러스 등 병원성 미생물과 바이러스 중간숙주를 죽이기 위하여 염소살포 (최종 염소유효농도 20 ppm)를 하였다. 입식 전 사육수의 생태적 안정화를 위하여 유기비료 (계분)을 각 사육지에 300 kg씩 살포하여 식물플랑크톤을 번식시켰다.

(나) 수차 : 산소공급과 사육수 교반을 위하여 pond 1 (처리구)에는 paddle wheel type aerator (2HP) 8대와 저층산소교환을 위하여 Aspirator type aerator 2대 (2HP) 등 총 10대 (20HP)의 수차를 사육지 가장자리 및 중앙에 설치하였다. Pond 2 (대조구)에는 aspirator type aerator 없이 paddlewheel type aerator 10대 (총 20HP)를 설치하였다.

#### 나. 종묘입식 및 사육관리

(1) 종묘입식 : 2005년 6월 12일 흰다리새우 (*Litopenaeus vannamei*) PL 12기를 pond 1과 pond 2에 각각 300,000마리 (26.8 마리/m<sup>2</sup>), 300,000마리 (28.6 마리/m<sup>2</sup>) 입식하였다.

(2) 사육관리 : 사료는 starter를 시작으로 새우의 성장에 따라 흰다리새우 전용사료를 공급하였다. 사료공급은 입식 후 2개월까지 하루 3회 (07:00, 14:00, 18:00), 2개월 이후부터는 하루 2회 (07:00, 18:00) 공급하였다.

다. 사육수 수질개선을 위한 처리

사육수의 수질개선을 위한 probiotics (유익세균)의 활성화를 위하여 seed로서, 처리군 (pond 1)에는 입식 후 30일째 (7월 12일)부터 *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium* 및 *Enterococcus faecium* (Hanpung Industry Co.)을 각각  $2.5 \times 10^8$  CFU/g의 농도로 0.5 kg 씩 사육지에 살포하였다 (각 유익세균의 최종농도 111.6 CFU/mL). 유익세균은 1주일 간격으로 1개월간 총 4회 살포하였다.

Probiotics 살포와 동시에 (입식 40일), probiotic bacteria의 활성화를 위한 탄소원의 공급을 위하여 액상 당밀 (Cane Molasses, 48~56% sugar 함유)을 3일간 80 L/일의 양으로 살포하고, 이후 1주일간은 40 L/일 씩 공급한 이후 양식 종료시까지 2~3일에 1회씩 40 L의 당밀을 양식장 전체에 고루 살포하였다. 처리군 (pond 1)은 injector type aerator 2대를 중앙으로 설치함으로써 저층 산소공급과 함께 유기물의 침전을 방지하여 인위적으로 공급한 probiotics뿐 아니라 사육수 내에 존재하는 상존 질화세균의 활성을 높이도록 하였다.

라. 새우 표본조사 및 사육수 샘플링

새우의 성장도와 질병분석을 위하여 매주 1회 10~20마리의 새우를 투망 등을 이용하여 채집하여 아이스박스에 넣어 실험실로 운반한 후 체장과 체중을 측정하였다. 사육수 영양염류 분석을 위하여 새우 채집시 1 L의 사육수를 채수하여 냉장상태로 실험실로 운반한 후 분석시까지  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 냉동 보관하였다.

#### 4. 사육수 수질, 세균상 및 양식새우 질병 분석

가. 수질환경 조사 및 수질분석

(1) 일반 수질환경 조사

수온, pH, DO, 염분은 수질측정기 (YSI 85 model, Yellow Springs Instrument, Ohio, USA)를 이용하여 매일 2회 (07:00, 14:00) 측정하였다.

(2) 영양염류의 현장 측정

현장에서의 신속한 수질분석을 위하여 간이수질키트 (Merck Co., Germany)를 이용하여  $\text{NH}_4\text{-N}$ ,  $\text{NO}_2\text{-N}$  및 alkalinity를 매주 1회씩 측정하였다. 본 현장측정 데이터는 양식관리를 위하여 사용하였으며, 보고서에는 기술하지 않았다.

(3) 영양염류의 정밀분석

사육수 영양염류 변화의 정밀한 분석을 위하여 매주 채수된 사육수는 실험실에 냉동보관 후 1개월 단위로 해양환경공정시험방법에 따라서  $\text{NH}_4\text{-N}$ ,  $\text{NO}_2\text{-N}$ ,  $\text{NO}_3\text{-N}$ 을 분석하였다.

(4) 일반수질의 연속측정

사육수의 DO, 수온, pH, 염분에 대한 연속적인 변화를 조사하기 위하여 수질연속측정장치 (YSI 6600EDS model, Yellow Springs Instrument, Ohio, USA)를 수심 0.4m에 설치하여 30분 간격으로 3주간 (2005년 7월 28일~8월 17일) 수질을 monitoring 하였다.

## 나. 사육수 총세균수 조사

### (1) 수중 생균수 조사

사육수의 유익세균 생균수 변화를 조사하기 위한 간접적인 indicator로서 사육수로부터 Marine agar 및 TCBS 배지를 사용하여 총생균수 및 비브리오 균수를 측정하였다. 생균수의 측정은 주 1회 하였으며, 사육수를 멸균수에  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  단계별로 희석하여 100  $\mu\text{l}$ 씩 배지에 도말한 다음 25°C에서 24~48시간 배양하여 colony를 계수하였다. 균수는  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  농도의 계수를 평균하여 계산하였다.

### (2) 배지 조성 및 제조

MA (marine agar 2216, DIFCO) 배지 조성은 증류수 1  $\ell$ 에 peptone 5 g, yeast extract 1 g, ferric citrate 0.1 g, sodium chloride 19.45 g, magnesium chloride 8.8 g, sodium sulfate 3.24 g, calcium chloride 1.8 g, potassium chloride 0.55 g, sodium bicarbonate 0.16 g, potassium bromide 0.08 g, agar 15 g, strontium chloride 34 mg, boric acid 22 mg, sodium silicate 4 mg, sodium fluoride 2.4 mg, ammonium nitrate 1.6 mg, disodium phosphate 8 mg 이었다. 증류수 1  $\ell$ 에 marine agar 55.1 g을 넣고 용해시킨 후 121°C에서 15분간 autoclave를 하여 50~60°C로 식혀서 15~20 ml씩 petri dish에 분주하여 사용하였다.

비브리오 계수를 위한 TCBS (TCBS agar, DIFCO) 배지조성은 증류수 1  $\ell$  안에 yeast extract 5 g, proteose peptone No.3 10 g, sodium citrate 10 g, sodium thiosulfate 10 g, oxgall 8 g, saccharose 20 g, strontium chloride 10 g, ferric ammonium citrate 1 g, bromthymol blue 0.04 g, thymol blue 0.04 g, agar 15 g으로서 증류수 1  $\ell$ 에 TCBS를 89 g을 넣고 고압멸균하지 않고 용해시킨 후 50~60°C로 식혀서 15~20 ml씩 petri dish에 분주하여 사용하였다.

## 다. 양식새우의 질병분석

질병분석은 기생충, 바이러스성 질병을 대상으로 실시하였다.

### (1) 기생충성 질병

기생충 감염여부는 양식장별 대하 5마리를 그물 등으로 채집하여 실험실로 운반한 후 광학 현미경을 이용하여 분석하였다. 아가미의 경우 5마리를 대상으로 사상균 (filamentous bacteria), 섬모충류, 미세조류 (microalgae), melanization 여부, 아가미 이물질 부착상태 등을 1~5 단계로 구분하였으며, 갑각은 별도 분리하여 갑각의 흰반점 유무를 3단계로 구분하였다.

### (2) 바이러스성 질병

바이러스는 대하에서 일반적으로 발생하는 WSSV와 HPV 및 흰다리새우 특이 바이러스인 IHNV에 대하여 PCR (polymerase chain reaction) 법에 의하여 검출하였다. 양식중인 새우 5~9마리의 아가미 혹은 복지를 분리하여 DNA extraction kit (genomic DNA kit, Qiagen co.)를 이용하여 genomic DNA를 추출한 후 PCR (polymerase chain reaction)에 의해서 WSSV (흰반점바이러스)와 IHNV (감염성 조혈조직괴사바이러스)를 다음과 같은 방법으로 검출하였다.

#### (가) Primers design

WSSV (White spot syndrome virus)의 nucleocapsid sequence로부터 1F/1R (365 bp)

와 nested primer로서 4F/4R (324 bp)의 두 set의 primer를 제작하였다. HPV (Hepatopancreatic parvo-like virus)를 위해서는 H1F/H1R (592 bp)를 제작하였다. IHNV (Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus)의 검출을 위하여 IHNV-R/IHNV-F (1.6 kb)의 primer를 제작하였다.

#### (나) Polymerase Chain Reaction

PCR reaction을 위한 master mix는 DNA polymerase enzyme (rTaq, 5u/λ, Takara Co. Ltd., Japan) 0.2 μl, 10X PCR buffer 2.0 μl, 2.5 mM dNTP 1.0 μl, 20pmole primer 각각 0.25 μl와 함께 distilled water를 넣어 19 μl로 조절한 후 template로서 새우의 genomic DNA 1.0 μl를 넣어 20 μl로 하였다. WSSV의 nested PCR을 위해서는 상기의 master mix에 nested primer set와 1차 PCR product 1.0 μl를 넣어 PCR 반응을 수행하였다.

WSSV 및 HPV의 PCR 반응은 DNA의 pre-denaturation을 위하여 94°C, 5min 후 denaturation 94°C, 1min, annealing 58°C, 1min, extension 72°C, 1min의 반응을 35 cycles 수행한 후 72°C, 7min을 두었다. IHNV의 반응을 위해서는 DNA의 pre-denaturation을 위하여 94°C, 5min 후 denaturation 94°C, 2min, annealing 53°C, 2min, extension 72°C, 3min의 반응을 35 cycles 수행한 후 72°C, 7min을 두었다.

#### (다) Electrophoresis

PCR product는 1.2% agarose gel에서 80V에서 30분~1시간 전기영동하여 EtBr 염색 후 UV 하에서 밴드 유무를 확인하였다.

## 제 3 절 결과 및 고찰

### 1. 수질변화에 미치는 probiotics의 효과 시험

#### 가. 해수 내 유익세균의 성장도 분석

해수내 유익세균의 성장도 분석은 유익세균이 실제 해수가 갖는 염도에서 배양 시 균수 변화를 통해 성장도를 분석하여, 앞으로의 수질개선 효과를 조사하기 위한 실험 기간동안 유익세균의 재첨가 필요성을 판단하고자 실험하였다.

*B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. mesentericus* 등 *Bacillus* 3종과 *Lactobacillus* 1종 (*L. acidophilus*)은 멸균한 해수 (29 ppt) 10 ml에 각 100 mg씩 넣어 혼합한 후, 23°C의 항온실에서 일주일간 정치배양하였다. 해수와 혼합 직후 및 배양하는 동안 매일 일정량의 시료를 채취하여 희석한 후 MA (marine agar)배지에 도말하여 30°C에서 1일간 배양하여 균수를 측정하였다. 액상의 *N. europaea*와 *N. winogradskyi*의 혼합 세균은 멸균한 해수 (29 ppt) 10 ml에 1 ml을 넣어 혼합한 후, 23°C에서 일주일간 정치배양하였다. 마찬가지로 해수와 혼합 직후와 배양하는 동안 매일 일정량의 시료를 채취하여 희석한 후 MA배지에 도말하였으며, 30°C에서 2일간 배양하여 균수를 측정하였다. 모든 실험은 반복실험을 거쳤으며, 실험결과 균수 변화에 대한 결과는 Fig. 4-1에 균별 log수로 나타내었다.

실험결과 *Nitrosomonas* + *Nitrobacter* 혼합세균만이 첫날부터 일주일동안 지속적인 증가

를 보였으며, 나머지 균들은 다소 감소하는 현상을 보였다. *L. acidophilus*의 경우, 첫날 균수에 비해 각각 3%와 27%로 감소하였고 다른 균들에 비해 다소 생장도가 떨어짐을 알 수 있었다. 그 밖의 세균들의 변화를 살펴보면 가장 많은 감소를 보인 *B. mesentericus*와 *B. licheniformis*는 39%로 감소하였고, *B. megaterium*은 108%로 증가하였다. 실험 대상 유익세균을 일주일 해수에서 배양한 결과, 일주일 동안 균수의 변화는 있었지만, 심하게 사멸되는 현상은 관찰되지 않았다. 따라서 수질개선 효과를 알아보기 위한 실험과 유생 사육실험을 하는 일주일동안 유익세균의 재침가는 생략하기로 하였다.

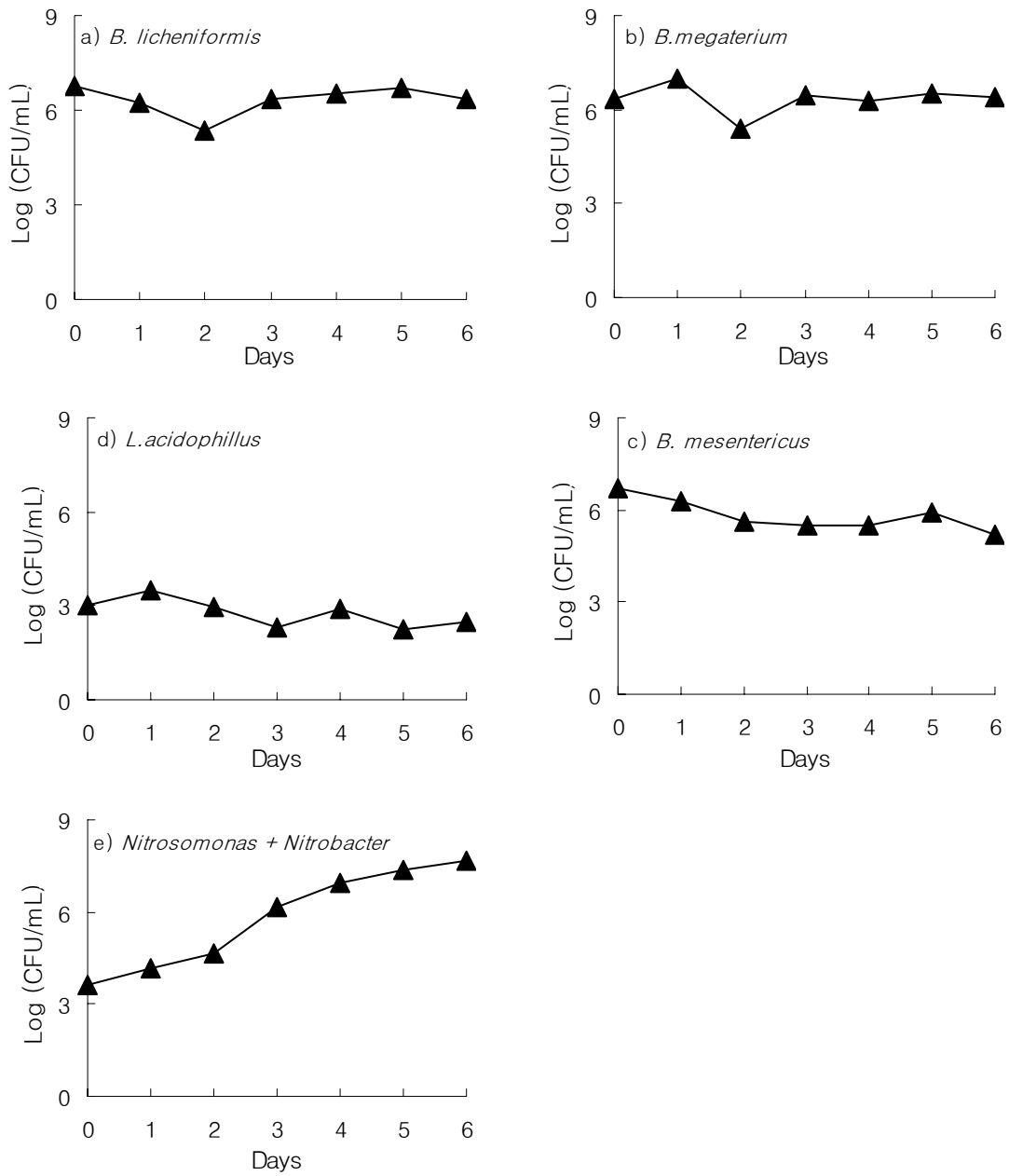


Fig. 4-1. Growth of each probiotic bacterium in sea water

나. 유익세균에 의한 새우 사육수의 수질개선 효과

유익세균을 이용한 사육실험에 들어가기 전에 수질 정화능력이 있는지 알아보려고 새우가 없는 조건에서 새우 유생을 사육했던 사육수에 유익세균만을 농도별로 처리한 후, 수질변화를 알아보았다. 실험기간은 일주일 동안 실행하였으며, 이틀에 한 번씩 시료를 채수한 후 현장용

수질분석 kit를 이용하여 암모니아, 아질산, 질산, 알칼리도, pH를 분석하였다. 실험결과는 각각의 군에 따른 분석항목별 그래프 (Fig. 4-2~6)로 나타내었고 수질개선 효과를 판단하는 기준은 새우 양식의 적정 권장되는 수질기준을 넘지 않는 범위 내에서 대조구와 농도를 비교하여 판단하였다.

사육수는 유익세균에 의한 질산화 과정을 통해 암모니아와 아질산염이 분해되며, 탈질화 과정을 통해  $\text{NO}_3^-$ 는 최종적으로  $\text{N}_2$ 로 환원된다.



그러므로, 본 실험에서는 수서 생물에 독성을 나타내는 암모니아와 아질산염의 농도 감소와 함께 질산염의 농도가 증가되는 양상을 보이면서, 대조구와 농도 차이를 크게 나타내는 유익세균이 수질개선에 효과가 있는 것으로 판단하였다. 또한 알칼리도는 수중에 함유돼 있는 알칼리분 (양이온)을 탄산칼슘 ( $\text{CaCO}_3$ )으로 환산하여 1 l 중의 mg으로 표시한 것으로 즉 산을 중화시키는데 필요한 능력을 나타낸다.

먼저 *B. licheniformis*의 농도별 실험결과 (Fig. 4-2), 암모니아와 아질산염의 농도가 점차 증가하여 일주일째인 마지막날에는 대조구보다 높게 나타났다. 가장 높은 처리농도인  $4.8 \times 10^4$  CFU/ml만이 대조구보다 낮은 농도를 보였지만 0.1~0.2 mg/l의 차이로 개선효과를 나타내었다고 판단할 수 없었다. 이와같은 결과는 다른 유익세균 처리구에서도 비슷하게 나타났다. 본 실험에서 유익세균 처리 후 영양염류의 농도가 감소할 것으로 기대했으나, 예상과는 달리 일주일동안 그 수치는 계속 증가했으며, 모든 처리구에서 대조구보다 더 높은 농도를 보였다. *B. megaterium*을 농도별 처리한 그룹 (Fig. 4-3)에서 마찬가지로 암모니아와 아질산염의 농도가 대조구보다 모두 높게 나타났다. 가장 높게 처리한 농도인  $7.0 \times 10^4$  CFU/ml에서는 암모니아가 최고 약 5배 높게 나타났으며 아질산염은 약 1.5배 높게 나타나 개선효과가 나타나지 않았다. *B. mesentericus*를 처리한 실험구 (Fig. 4-4) 또한 암모니아 농도에서 대조구보다 높게 나타났으며, 아질산염의 변화는 대조구와 같이 0 mg/l을 일주일 동안 유지해 변화가 없었으나 이는 분석 kit의 측정범위에서 벗어난 낮은 농도였기 때문이라 추측된다 (그래프에 나타내지 않았음). *L. acidophilus*와 *Nitrosomonas* + *Nitrobacter*를 처리한 실험구 또한 수질이 향상되는 현상은 관찰되지 않았다 (Fig. 4-5, 6). 이와 같이 유익세균 처리구가 대조구에 비해 수질이 향상되지 않거나 오히려 공급하지 않았기 때문에 유익세균의 대사활동에 필요한 에너지원의 부족으로 인한 세균활동 저하에 기인한 것으로 추측된다.

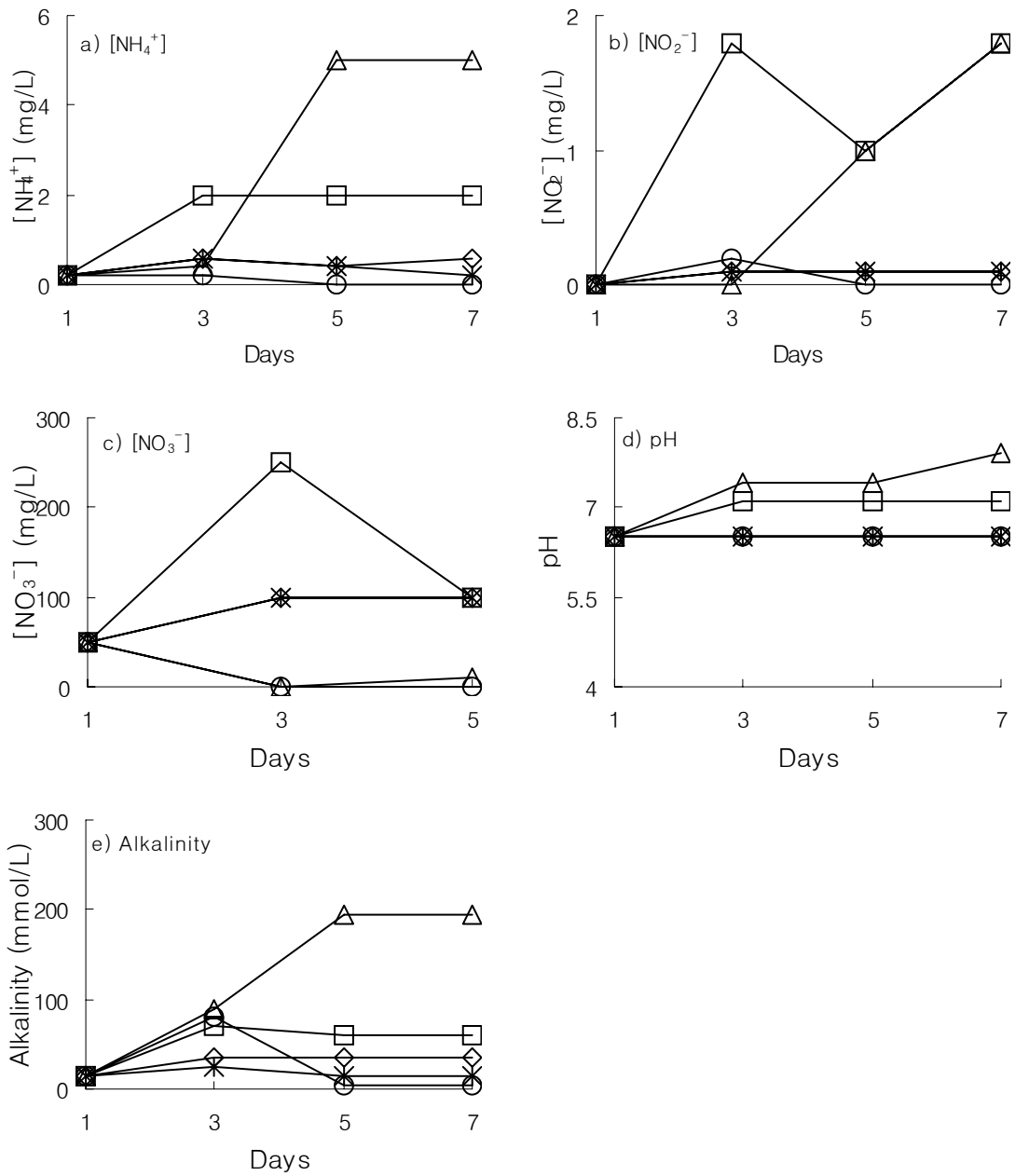


Fig. 4-2. Effect of *B. licheniformis* on water quality according to the size of initial inoculum. The graphs marked with asterisks represent the control (no inoculum); diamonds, inoculum of  $1.2 \times 10^3$  CFU/ml; squares, inoculum of  $1.2 \times 10^4$  CFU/ml; triangles, inoculum of  $2.4 \times 10^4$  CFU/ml; circles, inoculum of  $4.8 \times 10^4$  CFU/ml



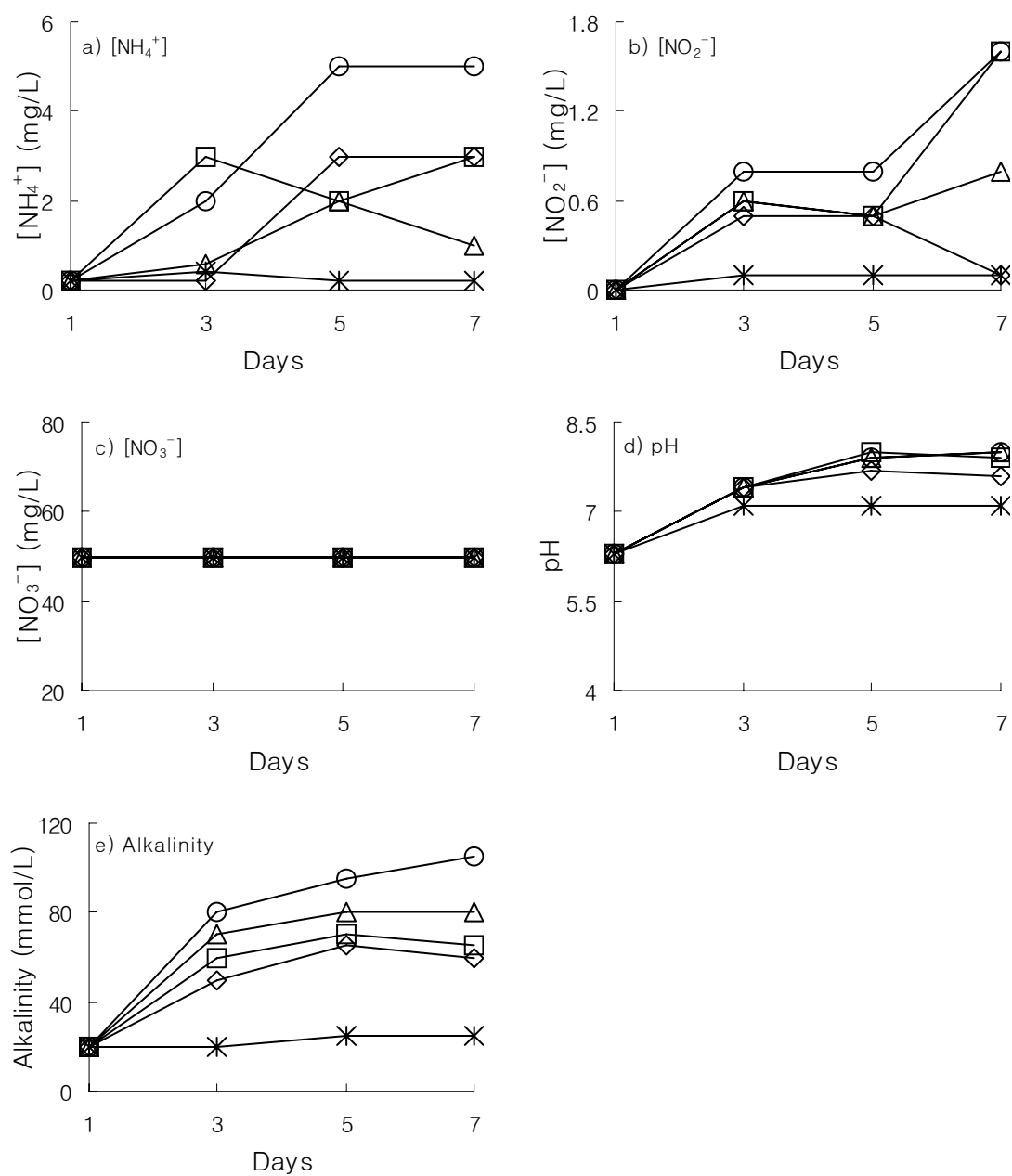


Fig. 4-3. Effect of *B. megaterium* on water quality according to the size of initial inoculum. The graphs marked with astrisks represent the control (no inoculum); diamonds, inoculum of  $3.5 \times 10^3$  CFU/ml; squares, inoculum of  $4.7 \times 10^3$  CFU/ml; triangles, inoculum of  $5.8 \times 10^3$  CFU/ml; circles, inoculum of  $7.0 \times 10^3$  CFU/ml

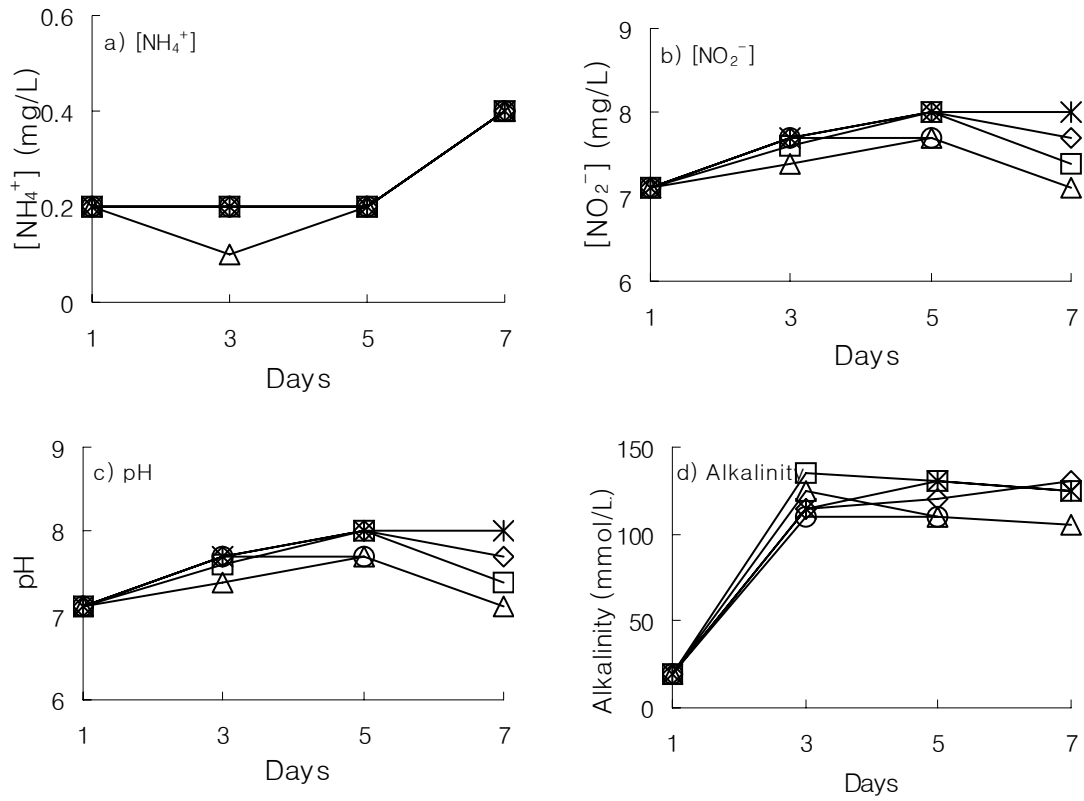


Fig. 4-4. Effect of *B. mesentericus* on water quality according to the size of initial inoculum. The graphs marked with asterisks represent the control (no inoculum); diamonds, inoculum of  $4.7 \times 10^2$  CFU/ml; squares, inoculum of  $1.4 \times 10^3$  CFU/ml; triangles, inoculum of  $2.4 \times 10^3$  CFU/ml; circles, inoculum of  $3.3 \times 10^3$  CFU/ml

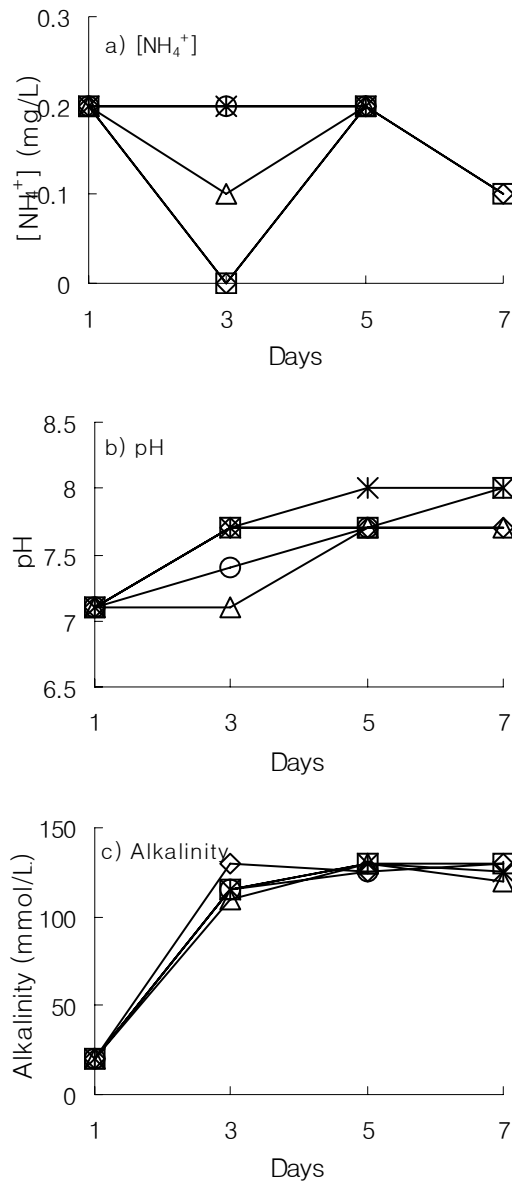


Fig. 4-5. Effect of *L. acidophilus* on water quality according to the size of initial inoculum. The graphs marked with asterisks represent the control (no inoculum); diamonds, inoculum of  $1.1 \times 10^3$  CFU/ml; squares, inoculum of  $3.3 \times 10^4$  CFU/ml; triangles, inoculum of  $5.5 \times 10^4$  CFU/ml; circles, inoculum of  $7.7 \times 10^4$  CFU/ml

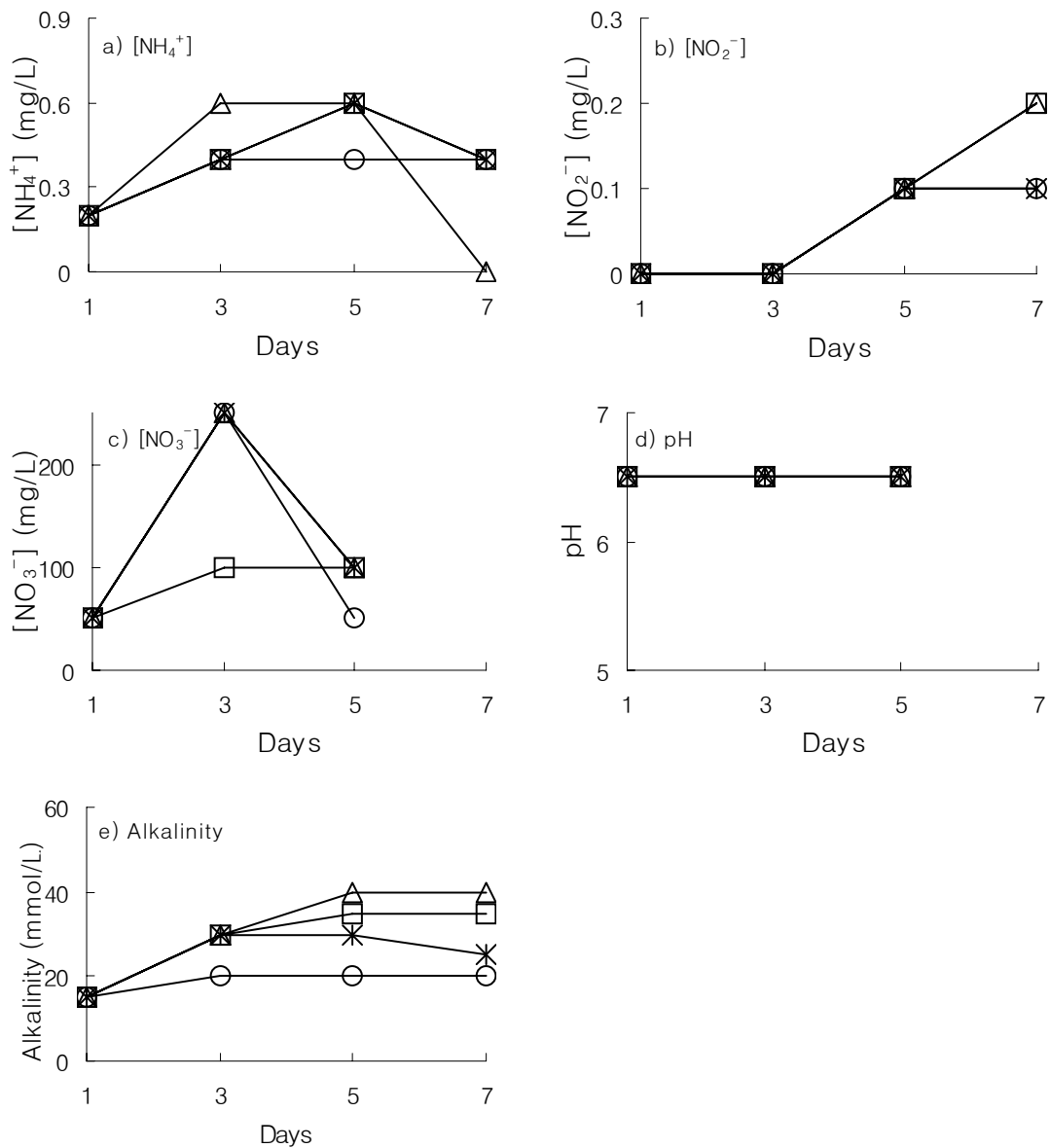


Fig. 4-6. Effect of *Nitrosomonas* + *Nitrobacter* on water quality according to the size of initial inoculum. The graphs marked with asterisks represent the control (no inoculum); squares, inoculum of 2.2 CFU/ml; triangles, inoculum of  $2.2 \times 10^1$  CFU/ml; circles, inoculum of  $2.2 \times 10^2$  CFU/ml

다. 유익세균에 의한 유생 사육수의 수질개선 효과

(1) 접종량에 따른 유익세균의 수질개선 효과

앞서 한 실험과 같은 환경조건에서 새우 유생을 사육하면서 유익세균을 농도별로 각각 처리한 후 사육수의 수질변화를 조사하였다. 실험에 사용된 새우는 평균 체장 9.25 cm, 평균 체

중 0.01 g의 크기로 10 ℓ 각 수조별 20마리씩 넣어 사육하였다. 이틀에 한 번씩 사육수를 채수하여 감압여과기를 통해 부유물질을 제거한 후 spectroquant 수질분석 kit를 이용하여 흡광도를 측정하여 분석하였다. 유익세균은 균별로 세 가지 농도로 처리하였으며, 대조구에는 균을 살포하지 않았다. 실험 결과는 각 세균별로 Fig. 8~12와 같이 나타내었다.

*B. licheniformis*로 처리한 결과, 대조구와 비교하여 암모니아성 질소와 아질산성 질소가 현저히 낮은 농도를 보였다 (Fig. 4-7). *B. licheniformis*를  $7.2 \times 10^3$  CFU/ml로 처리한 경우 대조구의 암모니아성 질소의 농도는 7일째 2.855 mg/ℓ로 급격히 증가한 반면, 처리구는 0 mg/ℓ로서 대조구에 비해 약 2.8배 낮게 나타났다. 아질산성 질소의 농도는 거의 모든 처리농도에서 0.387~0.624 mg/ℓ로서 대조구의 3.337 mg/ℓ에 비해 약 5.3~8.6배 낮은 농도를 나타냈다. 질산성 질소의 농도는  $2.4 \times 10^3$  CFU/ml로 처리한 실험구를 제외하고 0.177~2.158 mg/ℓ로서 대조구의 0 mg/ℓ에 비해 모두 높은 농도를 나타내었고, 인산성 인의 농도는 0.627~1.010 mg/ℓ로서 대조구의 농도 0.655 mg/ℓ와 뚜렷한 차이를 나타내지 않았다. 이와 같이 대부분의 유익세균 처리구에서 암모니아성 질소와 아질산성 질소의 농도가 대조구에 비해 크게 낮아진 것은 유익세균의 활동에 의해 사육수의 수질이 향상되었음을 보여주는 것이며, 이와는 반대로 질산성 질소의 농도가 증가한 것은 유익세균의 활동으로 아질산성 질소가 축적된 결과에 기인한 것으로 추측된다.

*B. megaterium*을 처리한 실험구에서도 또한 암모니아성 질소와 아질산성 질소 제거에 큰 효과를 보였다 (Fig. 4-8). 암모니아성 질소는 *B. megaterium*  $2.4 \times 10^2$  CFU/ml의 농도 처리구에서 7일째에 2.01 mg/ℓ로서 대조구에 비해 약 1.4배로 농도가 증가하였지만 여전히 대조구보다는 낮았으며, 모든 처리구에서 대조구에 비해 낮은 농도를 나타냈다. 아질산성 질소 역시 모든 처리구에서 0.507~1.151 mg/ℓ로서 대조구 3.337 mg/ℓ에 비해 2.9배에서 6.5배로 낮은 농도를 보였다. 질산성 질소는 대조구가 0 mg/ℓ인 반면, 모든 처리구에서 0.665~1.747 mg/ℓ로 높게 나타나 *B. megaterium*는 *B. licheniformis*와 마찬가지로 수질향상에 좋은 효과를 나타내었다.

*B. mesentericus*와 *L. acidophilus* 처리구에서도 암모니아성 질소와 아질산성 질소의 농도의 감소와 질산성 질소의 농도가 증가함을 관찰할 수 있었다 (Fig. 10~11). *B. mesentericus* 처리구 (Fig. 4-9)의 암모니아성 질소는 *B. mesentericus*  $4.7 \times 10^4$  CFU/ml의 농도로 처리한 실험구를 제외하고 모든 처리구에서 7일째에 0.01~0.023 mg/ℓ의 농도를 나타내어 대조구의 농도 3.048 mg/ℓ에 비해 수질향상 효과를 알 수 있었다. 또한 아질산성 질소의 농도는 처리구에서 7일째에 0.242~1.058 mg/ℓ를 보여 대조구의 농도 3.337 mg/ℓ에 비해 뚜렷한 차이를 나타냈다. 질산성 질소의 농도는 대조구가 0 mg/ℓ인 반면, *B. mesentericus*  $4.7 \times 10^5$  CFU/ml 처리구의 농도가 1.710 mg/ℓ를 나타냈고, 인산성 인의 농도는 대조구의 농도 0.655 mg/ℓ였지만 처리구의 농도는 0.655~1.419 mg/ℓ로 일주일 동안 계속 증가하였다.

*L. acidophilus*를 실험한 처리구 (Fig. 4-10)에서도 암모니아성 질소의 농도는 모든 처리구에서 7일째에 0~1.235 mg/ℓ의 농도를 나타내어 대조구의 농도 2.855 mg/ℓ와 큰 차이를 보였고 아질산성 질소의 농도도 마찬가지로, 처리구에서 0.180~0.314 mg/ℓ의 농도를 나타내어 대조구의 농도 3.337 mg/ℓ와 비교하여 수질향상을 판단할 수 있었다. 질산성 질소의 농도는 처리구에서 0.890~2.439 mg/ℓ를 나타내어 대조구에 비해 크게 증가하였다.

*Nitrosomonas* 혼합세균은 모든 수질항목에서 대조구에 비해 큰 차이를 보이지 않았다

(Fig. 4-11). 암모니아성 질소의 농도는 대조구의 농도 1.764 mg/ℓ에 비해 처리구의 농도는 1.606~1.677 mg/ℓ를 나타냈으며, 아질산성 질소의 농도는 대조구의 농도가 0.018 mg/ℓ에 비해 처리구의 농도는 0.016~0.015 mg/ℓ를 나타내었다. 질산성 질소의 농도는 처리구에서 0.091 mg/ℓ를 나타내어 대조구의 농도 0.328 mg/ℓ보다 오히려 감소함을 보였다. 이는 *Nitrosomonas* 혼합세균의 처리농도가  $2.2 \times 10 \sim 4.7 \times 10^2$  CFU/ml로 다른 유익세균의 처리농도 비해 매우 낮은 농도로 처리한 결과에 기인한 것으로 사료된다.

앞선 예비실험과는 달리 유익세균을 처리한 농도는 크게 다르지 않았지만 *Nitrosomonas* 혼합세균을 제외한 모든 처리구에서 수질개선 효과를 나타낸 것으로 보아 앞선 실험이 처리농도의 부족으로 인한 현상은 아닌 것으로 판단되었다. 이번 실험이 새우와 사료의 공급없이 사육수에 유익세균만을 처리한 앞선 실험에서보다 좋은 수질개선 효과를 확인할 수 있었던 이유는 유생에게 급이한 사료 내에 포함된 탄소원으로 인해 유익세균의 성장과 활성도를 증진시켰을 가능성이 있을 것으로 추측된다. 새우 양식장 내에서 사육수 내의 자연 수질 정화를 유도하기 위해 자가영양생물 (미세조류)보다 타가영양 미생물인 세균의 우점을 돕기 위해 에너지원인 탄소원으로 당밀 등을 공급하는 시도가 있어 왔으며 실제로 조류에 의한 수질개선보다 세균에 의한 개선효과가 더 뛰어남을 보고하였다 (Burford et al, 2003).

유익세균을 단독으로 농도별로 처리했을 경우, 각각의 처리농도 중 가장 낮은 농도의 처리구만을 제외한 농도에서는 암모니아성 질소와 아질산성 질소의 감소효과를 보였다. 가장 낮은 처리 농도인 *B. licheniformis*  $2.4 \times 10^3$  CFU/ml, *B. megaterium*  $2.4 \times 10^2$  CFU/ml, *B. mesentericus*  $4.7 \times 10^4$  CFU/ml, *L. acidophilus* 1.1 CFU/ml의 처리구에서 7일째 암모니아성 질소와 아질산성 질소의 농도는 대조구에 비해 낮은 농도를 유지했지만 다른 높은 농도의 처리구에 비교하면 감소 효과가 낮은 것으로 나타났다. 인산성 인의 농도는 모든 농도의 유익세균 처리구에서 대조구와 차이를 보이지 않았으며, 시간이 경과할수록 높은 농도를 보여주었다. 이것은 인의 농도가 대부분 사용되지 않은 먹이에 포함된 인이 크게 관여하는 가운데 과 (Rodehutschord and Pfeffer, 1995), 사육수 비교환으로 인해 축적된 사료의 영향으로 판단된다. 또한 Rangpipat et al. (2000)은 *Bacillus* S11을 *P. monodon*의 먹이와 함께 사용하여 수질변화를 알아보았을 때에도 인산염의 농도가 처음부터 꾸준히 증가하는 결과를 나타내었다.

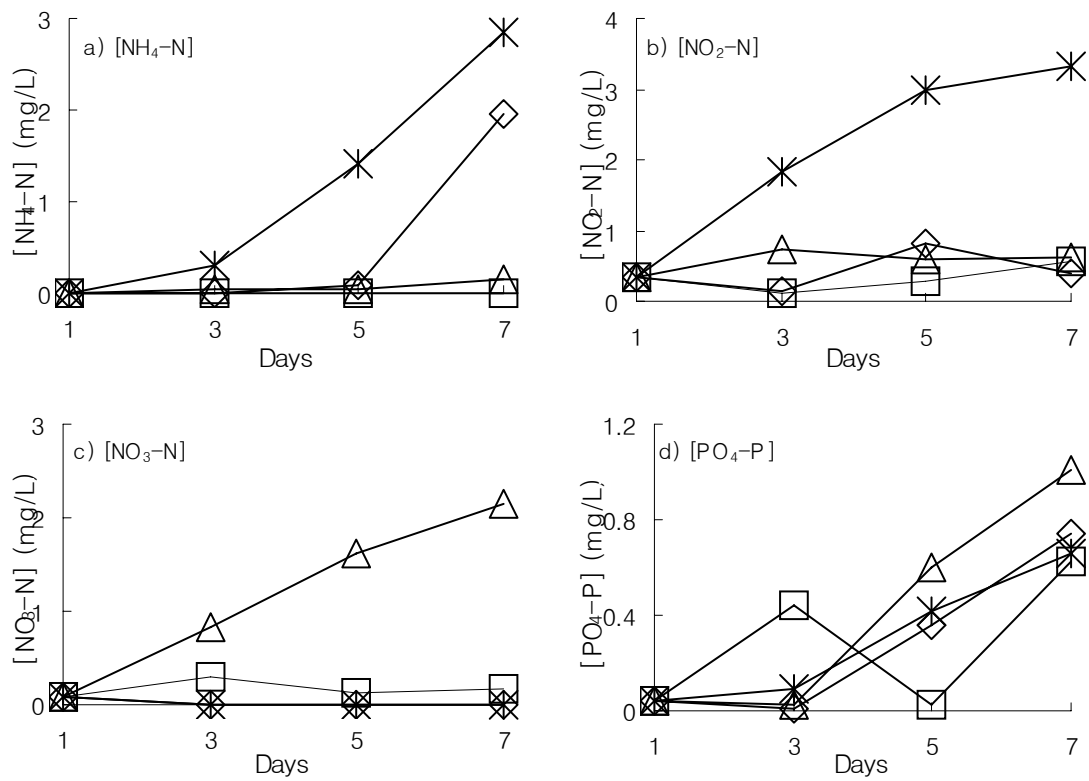


Fig. 4-7. Effect of *B. licheniformis* on the quality of water for juvenile shrimp culture according to the size of initial inoculum. The graphs marked with asterisks represent the control (no inoculum); diamonds, inoculum of  $2.4 \times 10^3$  CFU/ml; squares, inoculum of  $7.2 \times 10^3$  CFU/ml; triangles, inoculum of  $2.4 \times 10^4$  CFU/ml

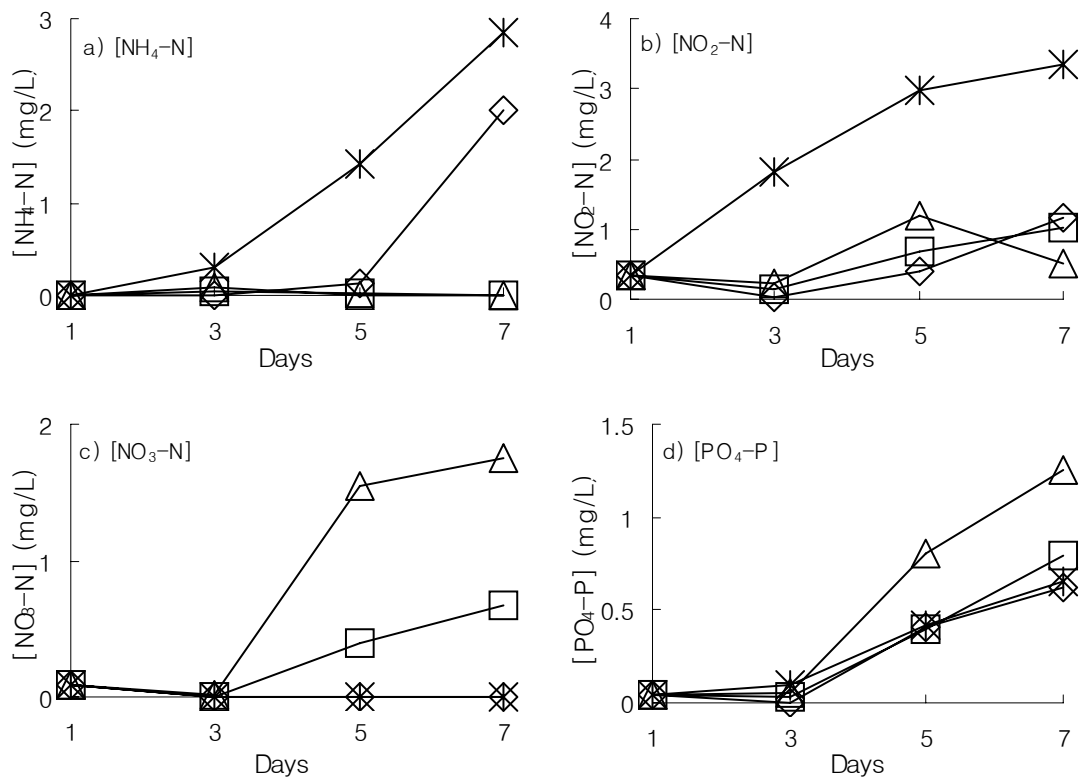


Fig. 4-8. Effect of *B. megaterium* on the quality of water for juvenile shrimp culture according to the size of initial inoculum. The graphs marked with asterisks represent the control (no inoculum); diamonds, inoculum of  $2.4 \times 10^2$  CFU/ml; squares, inoculum of  $7.0 \times 10^2$  CFU/ml; triangles, inoculum of  $2.4 \times 10^3$  CFU/ml



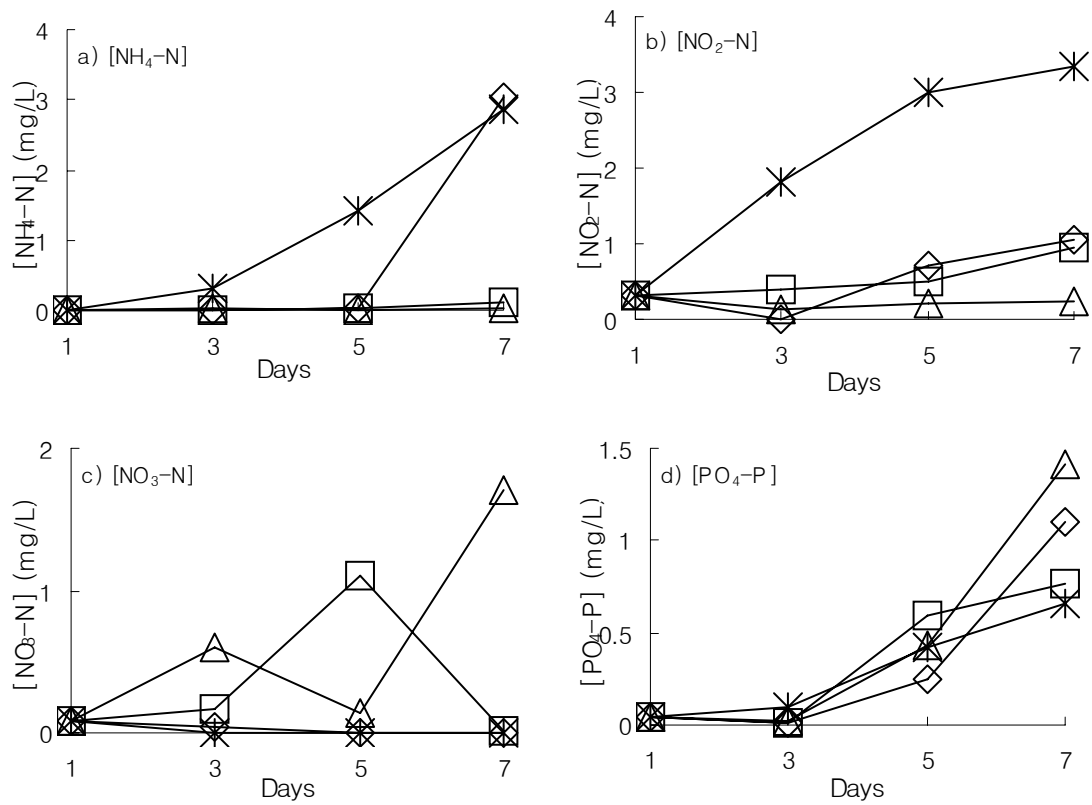


Fig. 4-9. Effect of *B. mesentericus* on the quality of water for juvenile shrimp culture according to the size of initial inoculum. The graphs marked with asterisks represent the control (no inoculum); diamonds, inoculum of  $4.7 \times 10^4$  CFU/ml; squares, inoculum of  $1.4 \times 10^5$  CFU/ml; triangles, inoculum of  $4.7 \times 10^5$  CFU/ml

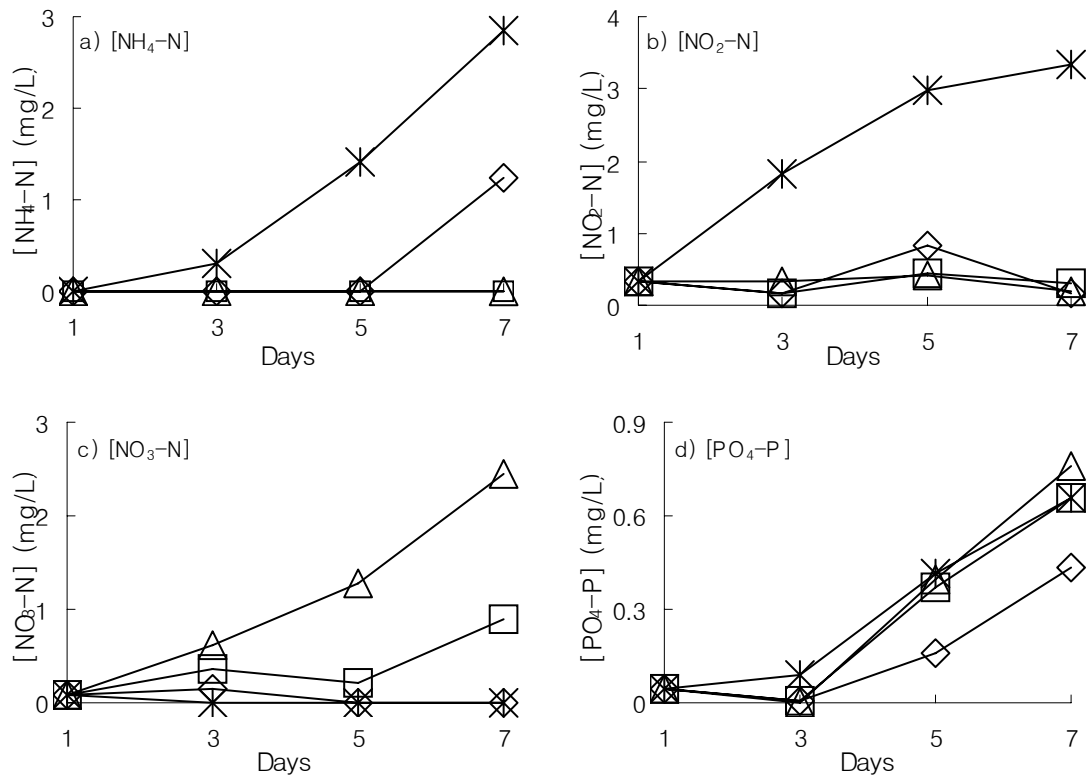


Fig. 4-10. Effect of *L. acidophilus* on the quality of water for juvenile shrimp culture according to the size of initial inoculum. The graphs marked with asterisks represent the control (no inoculum); diamonds, inoculum of 1.1 CFU/ml; squares, inoculum of  $1.1 \times 10^2$  CFU/ml; triangles, inoculum of  $1.1 \times 10^3$  CFU/ml

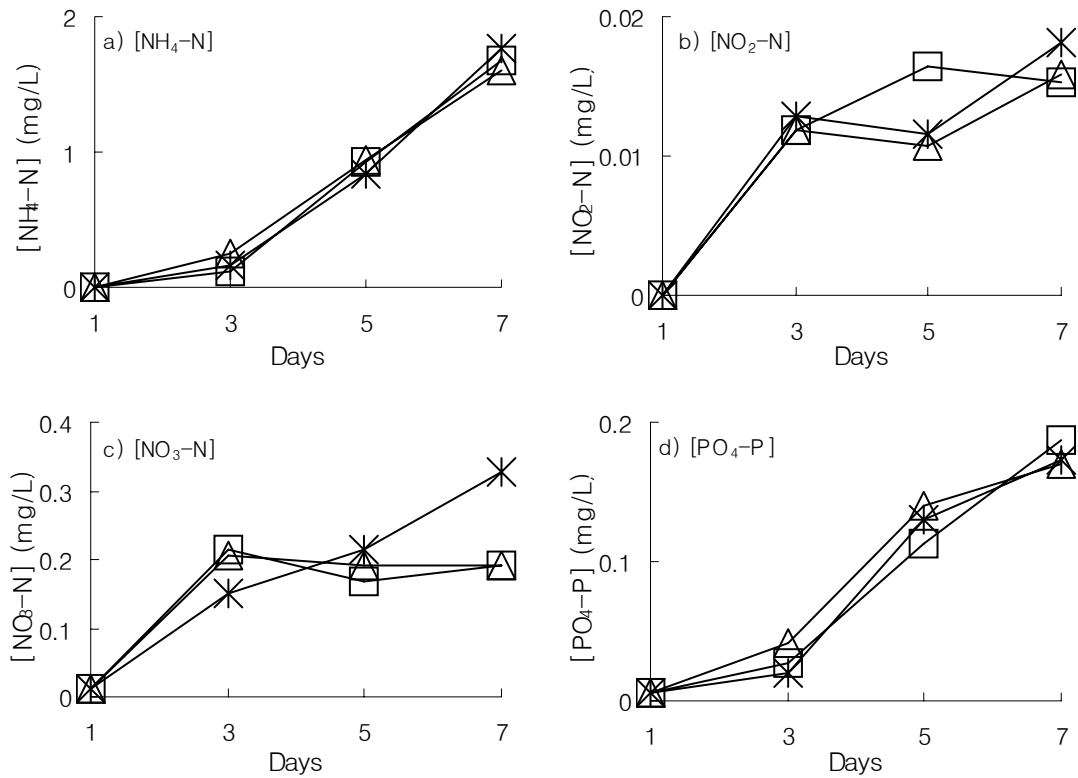


Fig. 4-11. Effect of *Nitrosomonas* + *Nitrobacter* on the quality of water for juvenile shrimp culture according to the size of initial inoculum. The graphs marked with asterisks represent the control (no inoculum); squares, inoculum of  $2.2 \times 10^2$  CFU/ml; triangles, inoculum of  $2.2 \times 10^3$  CFU/ml

## (2) 유익세균의 종류별 수질개선 효과 비교

유익세균의 종류별 수질개선 효과를 조사하기 위하여 앞선 실험 (다. (1) 접종량에 따른 유익세균의 수질개선 효과)에서 실험구별 효과가 가장 좋은 농도를 선택하여 새우와 함께 사육하고 일주일 후 사육수 수질변화를 조사하였다. 실험에 사용된 새우 유생의 평균 체장은 7.97 mm, 체중은 0.008 g이었으며, 10 l 수조에 각각 30마리씩 수용하였다. 사육조건 및 수질분석 방법은 앞선 실험과 동일하였다.

유생사육 1주일 후 수질분석 결과는 Fig. 4-12에 나타내었다. 암모니아성 질소는 *Nitrosomonas* 혼합세균을 제외하고는 모든 처리구에서 0.174~0.204 mg/l 로서 대조구의 1.161 mg/l 에 비해 약 0.14배 나타났으나, *Nitrosomonas* 혼합세균 처리구는 1.301 mg/l 로서 대조구

와 큰 차이를 보이지 않았다.

아질산성 질소의 경우는 암모니아성 질소와 비슷한 경향을 보였는데 *Nitrosomonas* 혼합세균은 0.052 mg/ℓ로서 대조구의 0.046 mg/ℓ와 큰 차이를 나타내지 않은 반면, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. mesentericus*, *L. acidophilus* 처리구에서는 0.002~0.008 mg/ℓ로서 대조구에 비해 0.04~0.17배 낮은 농도를 보였다.

질산성 질소의 경우, *Nitrosomonas* 혼합세균은 2.225 mg/ℓ로서 대조구의 0.299 mg/ℓ와 비슷한 반면, 그 밖의 *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. mesentericus*, *L. acidophilus* 처리구에서는 0.448~0.698 mg/ℓ로서 대조구에 비해 높게 나타났다.

인산성 인의 농도는 모든 유익세균 처리구에서 0.013~0.133 mg/ℓ로서 대조구의 0.192 mg/ℓ에 비해 낮게 나타났다.

이상의 결과에서 *Nitrosomonas* 혼합세균을 제외한 *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. mesentericus*, *L. acidophilus* 의 4종의 유익세균은 새우의 건강에 악영향을 미치는 암모니아성 질소와 아질산성 질소의 농도를 크게 낮춰주어 수질향상에 많은 효과를 가져오는 것으로 나타났다. 반면 대부분의 처리구에서 질산성 질소의 농도는 증가하였는데 이것은 유익세균의 활발한 활동으로 유해한 암모니아성 질소와 아질산성 질소가 무해한 질산성 질소로 전환되었음을 의미한다. 그러나 *Nitrosomonas* 혼합세균 처리구의 경우 분석한 질소화합물의 농도가 대조구에 비해 큰 차이를 보이질 않았는데 이것은 *Nitrosomonas*와 *Nitrobacter*의 제조과정상 기술적인 문제로 인하여 높은 농도로 생산하지 못했기 때문에 본 실험에서는 다른 유익세균에 비해 매우 낮은 농도 (2.2 CFU/ml)로 처리한 결과에 기인한 것으로 사료된다. 따라서 *Nitrosomonas*와 *Nitrobacter*의 수질에 미치는 영향을 보다 정확히 규명하기 위해서는 다른 유익세균과 비슷한 농도로 처리하여 조사할 필요가 있다.

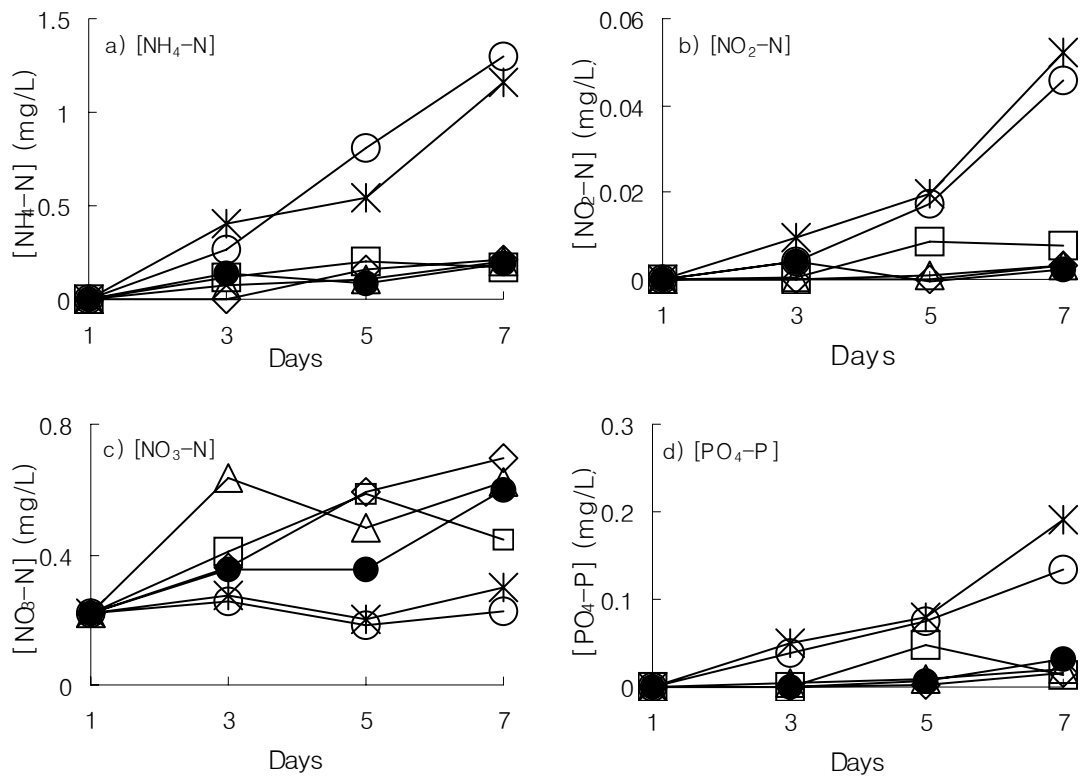


Figure 4-12. Effect of each probiotic bacterium on the quality of water for juvenile shrimp culture. Each bacterium was inoculated at the optimal concentration. The graphs marked with asterisks represent the control (no inoculum); diamonds, *B. licheniformis* ( $7.2 \times 10^3$  CFU/ml); squares, *B. megaterium* ( $7.0 \times 10^2$  CFU/ml); triangles, *B. mesentericus* ( $1.4 \times 10^5$  CFU/ml); circles, *L. acidophilus* ( $3.3 \times 10$  CFU/ml); filled circles, *Nitrosomonas* + *Nitrobacter* ( $2.2 \times 10^2$  CFU/ml)

라. 대형수조에서의 치하 사육시 유익세균에 의한 수질개선효과 비교

앞선 실험에서는 소형수조 (10 l)에서 유생 사육시 첨가한 유익세균의 수질개선 효과를 확인하였는데, 대부분의 유익세균 처리구에서 암모니아성 질소와 아질산성 질소 농도의 감소와 질산성 질소의 농도가 증가하는 것으로 나타났다. 본 실험에서는 대형수조에서 치하를 사육하는 환경에서도 그 효과를 나타내는지 조사하였다.

실험에 사용된 수조는 600 l의 원형수조로서 400 l의 자연해수 (30 ppt)를 담았으며 각 수조별 평균체장 43.28 mm, 평균체중 0.8 g의 치하 25마리씩 수용하고 25±1℃에서 21일간 사육하였다. 먹이는 체중의 7%를 하루에 네 번 급이하였다. 사육수는 4일에 한번씩 20% 해수를

교환하고 수질을 분석하였으며 8일마다 최초 유익세균 첨가량의 40%를 재첨가하였다. 사용한 유익세균은 *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *L. acidophilus* 및 *Nitrosomonas* + *Nitrobacter* 혼합세균이었으며, 처리농도는 *B. licheniformis*와 *B. megaterium*은  $2.0 \times 10^2$  CFU/ml, *L. acidophilus*는 1.0 CFU/ml, *Nitrosomonas* 혼합세균은 0.2 CFU/ml로 처리하였다.

21일간 사육기간 동안 수질분석 결과는 Fig. 14에 나타내었다. 사육 21일째 사육수의 암모니아성 질소의 농도는 대조구에서 1.796 mg/l 으로 가장 높게 나타났으며 처리구는 0.313~1.43 mg/l 으로 대조구보다 모두 낮게 나타났다. 이중 *Nitrosomonas* 처리구와 *L. acidophilus* 처리구는 0.751, 0.313 mg/l 로서 대조구에 비해 각각 41, 17%의 낮은 농도를 보여주었다.

아질산성 질소의 경우, *Nitrosomonas* 처리구를 제외하고는 모두 대조구와 비슷하거나 낮게 나타났다. *B. megaterium*은 0.489 mg/l 로서 대조구의 0.478 mg/l 와 거의 동일하였으나, *B. licheniformis*와 *L. acidophilus*는 0.371 mg/l 및 0.226 mg/l 로서 각각 대조구의 77, 47%에 머물렀다.

질산성 질소의 경우, 실험 8일째까지는 대부분 처리구가 대조구에 비해 같거나 높게 나타났다. 실험 12일째 이후부터는 대조구의 농도와 큰 차이를 보이지 않았다. 실험 21일째 질산성 질소의 농도는 *L. acidophilus* 처리구를 제외하고는 모두 0.066~0.085 mg/l 로서 대조구의 농도 0.075 mg/l 와 큰 차이를 보이지 않았다. 반면 *L. acidophilus* 처리구는 0.042 mg/l 로서 가장 낮은 농도를 보였다.

인산성 인은 대조구의 농도 0.269 mg/l 에 비해 *Nitrosomonas* 혼합세균의 처리구는 0.399 mg/l 로 다소 높게 나타났으며 *B. megaterium*의 농도는 0.269 mg/l 로 대조구와 차이가 없었다. *B. licheniformis*와 *L. acidophilus*의 농도는 각각 0.188, 0.201 mg/l 로 대조구보다 낮게 나타났다.

본 실험에서 처리된 유익세균의 농도는 앞선 소형수조 (10 l)에서의 유익세균 효과 시험에 비해 매우 낮은 농도 [*B. licheniformis* ( $7.2 \times 10^3$  CFU/ml)의 2.7%; *B. megaterium* ( $7.0 \times 10^2$  CFU/ml)의 28.6%; *L. acidophilus* ( $3.3 \times 10$  CFU/ml)의 3%; *Nitrosomonas* + *Nitrobacter* ( $2.2 \times 10^2$  CFU/ml)의 0.09%]이었음에도 불구하고 수질향상 효과의 경향성을 확인할 수 있었다. 특히 암모니아성 질소와 아질산성 질소 농도는 대부분의 유익세균 처리구에서 대조구에 비해 낮게 나타나 이 단계에서의 질소화합물에 미치는 유익세균의 활동이 활발히 진행됨을 알 수 있었다. 그러나 질산성 질소의 경우 모든 유익세균 처리구의 농도가 대조구의 농도에 비해 비슷하거나 낮게 나타나 아질산성 질소로부터 질산성 질소로의 전환이 활발히 진행되지 않은 것으로 조사되었다. 이것은 유익세균의 처리농도가 상대적으로 높았던 소형수조를 이용한 앞선 실험 (다. 유익세균에 의한 유생사육수의 수질개선 효과)에서 유익세균 처리구의 질산성 질소의 농도가 대조구에 비해 높게 나타난 점을 고려할 때, 본 실험에서 사용된 유익세균의 농도가 너무 낮은 것에 기인하는 것으로 추측된다. 따라서 보다 좋은 수질향상 효과를 얻기 위해서는 유익세균의 처리농도가 높아져야 할 필요가 있으며 적정 처리농도를 규명하기 위해서는 앞선 두 실험의 처리농도 범위 내에서 보다 세밀한 농도별 수질향상 효과실험이 이루어져야 할 것이다.

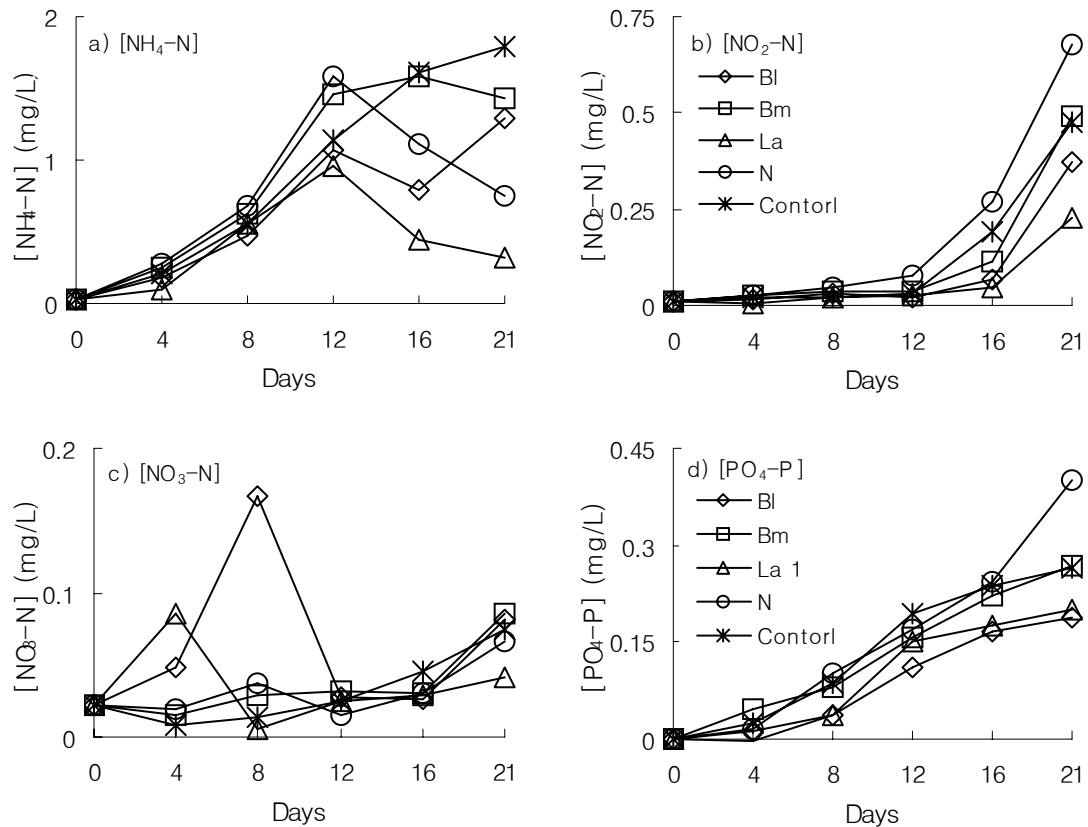


Fig. 4-13. Effect of probiotic bacteria on the quality of water for juvenile shrimp culture. The graphs marked with asterisks represent the control (no inoculum); Bl, *B. licheniformis* ( $2.0 \times 10^2$  CFU/ml); Bm, *B. megaterium* ( $2.0 \times 10^2$  CFU/ml); La, *L. acidophilus* (1.0 CFU/ml); N, *Nitrosomonas* + *Nitrobactor* (0.2 CFU/ml)

마. 대형수조에서의 성체 사육시 유익세균에 의한 수질개선 효과 비교

대형수조에서의 치하 사육시 유익세균에 의한 수질개선 효과를 확인한 후, 성체 사육에서의 유익세균 효과를 알아보려고 하였다.

앞선 실험과 마찬가지로 600 l 크기의 원형수조에 400 l의 여과해수 (30 ppt)를 넣고 각 수조별 평균체장 89.09 mm, 평균체중 8.9 g의 새우 20마리씩 수용하였다. 사육조건은 25±1℃에서 21일간 유지하면서 먹이는 새우 총 체중의 7%를 하루에 네 번에 나누어 급이하였다. 사

육수는 4일에 한 번씩 채수하여 수질을 분석하였고, 8일마다 최초 유익세균 첨가량의 40%를 재첨가하였다. 실험새우의 크기와 사육온도를 제외하고 앞선 실험조건은 동일하였다.

실험 21일 동안의 사육수 수질분석 결과는 Fig. 4-14에 나타내었다. 암모니아성 질소는 실험 8일째까지는 모든 실험구가 비슷하였으나 그 이후에는 *B. megaterium*을 제외하고는 모두 대조구에 비해 낮게 나타났다. 실험 21일째 *B. megaterium*의 농도는 2.425 mg/l로 대조구의 2.347 mg/l과 비슷하였으며 *Nitrosomonas* 혼합세균은 0.159 mg/l, *B. licheniformis*와 *L. acidophilus*는 모두 0으로 가장 낮은 값을 보였다.

아질산성 질소의 농도는 처리구의 농도가 0.828~1.028 mg/l로서 대조구의 농도 1.041 mg/l에 비해 비슷하거나 약간 낮게 나타났다.

질산성 질소의 농도는 대조구의 농도 3.416 mg/l에 비해 *Nitrosomonas* 혼합세균과 *B. magaterium*의 농도가 3.064~3.116 mg/l으로 약간 낮게 나타났으며 다른 유익세균 처리구에서는 3.621~4.320 mg/l으로 약간 높게 나타났다. 이 중 *L. acidophilus* 처리구의 농도가 4.320 mg/l으로 가장 높게 나타나긴 했으나 모든 실험구에서 큰 차이를 보이지는 않았다.

인산성 인의 농도는 대조구의 농도 1.162 mg/l에 비해 처리구의 농도는 1.025~1.165 mg/l로 거의 비슷하게 나타났다.

대형수조에서의 유익세균과 함께 성체새우를 사육한 결과, 암모니아성 질소 농도를 제외하고는 아질산성 질소 및 질산성 질소 농도에서는 큰 차이를 발견하지 못했다. 앞선 대형수조에서의 치하 (평균체중 0.8 g) 사육시 처리했던 것과 동일한 농도로 유익세균을 처리했음에도 불구하고 실험 21일째 암모니아성 질소의 농도는 *B. megaterium*을 제외하고는 대조구에 비해 모두 낮게 나타나 유익세균의 효과를 확인할 수 있었다. 그러나 아질산성 질소 및 질산성 질소의 경우는 전 실험기간 동안 대조구와 처리구 간에 큰 농도 차이를 관찰할 수 없었다.

이러한 결과는 대형수조에서의 치하 사육시 질산성 질소의 농도 변화에서도 마찬가지로었는데, 이것은 처리한 유익세균의 낮은 농도에 기인한 것으로 추측된다. 동일조건에서 치하 대신 성체를 사육했던 본 실험에서는 질산성 질소 및 아질산성 질소의 농도에서도 유익세균의 효과를 확인하기 힘들었던 이유는 치하 실험과 마찬가지로 유익세균의 낮은 처리 농도 뿐 아니라 수조내 새우 생체량의 증가에도 원인이 있는 것으로 추측된다. 본 실험에서 사육된 수조별 새우의 총 생체량은 178 g으로 치하사육시의 총중량 20 g에 비해 8.9배가 증가하였으나 사용된 유익세균의 농도는 동일하였다.

본 실험에서 처리된 유익세균의 농도는 총 생체량이 크게 증가된 성체새우로부터 배출되는 증가된 암모니아성 질소 화합물을 분해하는데 크게 부족했던 것으로 판단되며, 따라서 유익세균의 처리농도는 사육되는 새우의 생체량의 증가에 비례하여 증가되어야 할 필요가 있을 것으로 사료된다.



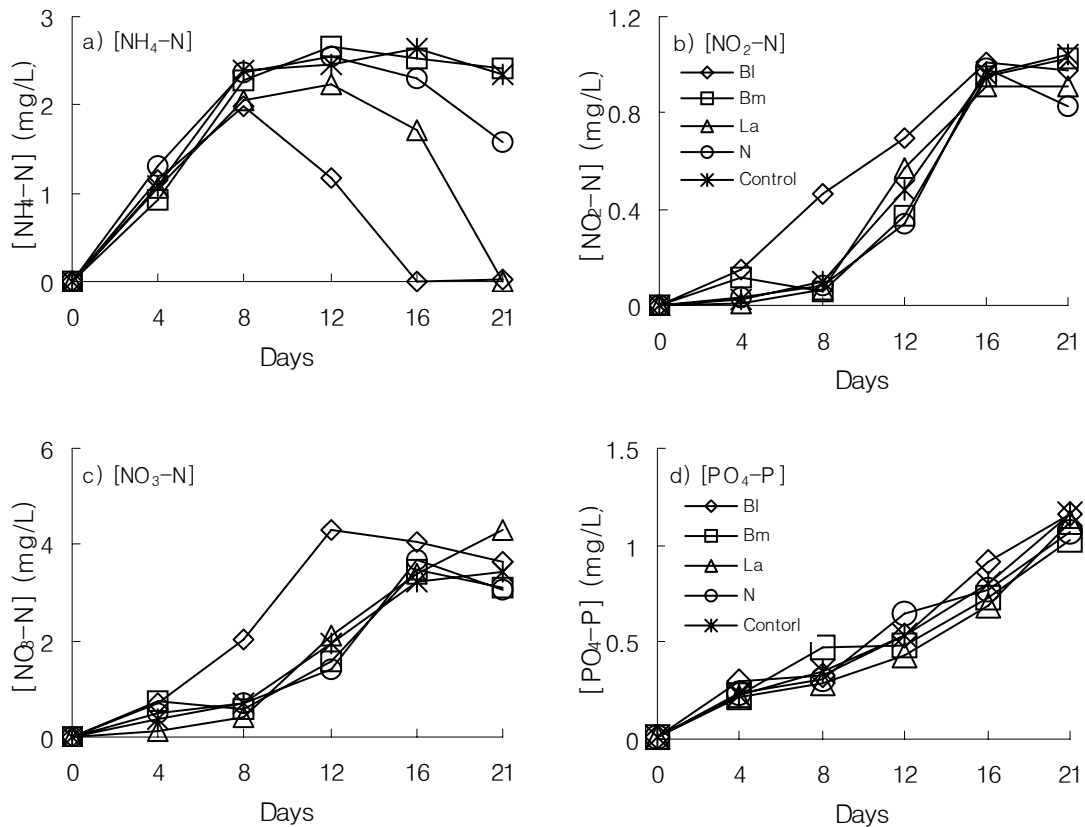


Figure 4-14. Effect of probiotic bacteria on the quality of water for adult shrimp culture. The graphs marked with asterisks represent the control (no inoculum); Bl, *B. licheniformis* ( $2.0 \times 10^2$  CFU/ml); Bm, *B. megaterium* ( $2.0 \times 10^2$  CFU/ml); La, *L. acidophilus* (1.0 CFU/ml); N, *Nitrosomonas* + *Nitrobactor* (0.2 CFU/ml)

바. 성체 사육시 혼합유익세균에 의한 수질개선 효과 비교

앞선 실험들을 통해 유익세균이 사육수 수질개선에 효과가 있음을 확인하고 대형 수조에서의 성체 새우 사육 시 혼합 유익세균의 효과를 조사하고자 다음과 같이 실험을 수행하였다.

실험구는 혼합세균 처리구와 대조구로서 600 l의 원형수조에 여과해수 400 l (30 ppt)를 넣고 각 실험구별 20마리의 새우 (평균체장 89.09 mm, 평균체중 8.9 g)를 수용하였다. 사육조건은 수온 25±1°C에서 21일간 유지하였으며 먹이는 새우 총체중의 7%를 하루에 네 번 나누어 급이하였다. 사육수는 4일에 한 번씩 20%의 해수를 교환하고 수질을 분석하였으며, 8일에 한 번씩 최초 첨가량의 40%의 유익세균을 재첨가하였다.

혼합 유익세균으로서 *B. licheniformis* ( $2.0 \times 10^2$  CFU/ml), *B. megaterium* ( $1.4 \times 10^4$  CFU/ml), *L. acidophilus* ( $3.3 \times 10$  CFU/ml), *Nitrosomonas* + *Nitrobacter* (0.2 CFU/ml)를 처리하였다.

혼합 유익세균과 함께 성체새우 사육 21일동안 수질분석 결과는 Fig. 4-15에 나타내었다. 암모니아성 질소의 농도는 사육 4일째까지는 대조구와 처리구가 비슷하였으나 8일째에는 대조구의 2.347 mg/l 에 비해 처리구는 1.027 mg/l 로 약간 낮았다. 8일 이후부터는 대조구의 농도는 2.357~2.389 mg/l 으로 비슷한 수준을 유지한 반면 처리구의 농도는 점차 감소하여 21일째에 1.027 mg/l 로서 대조구의 43.7%에 불과하였다. 아질산성 질소는 혼합 유익세균 처리구의 농도가 사육 16일째까지는 대조구와 비슷한 경향으로 증가하였으나 21일째에 0.659 mg/l 의 농도로 대조구의 1.041 mg/l 보다 감소하였다. 질산성 질소의 경우는 마찬가지로 사육 16일째까지는 혼합 유익세균 처리구의 농도와 대조구의 농도가 비슷한 농도로 증가하였으나 21일째에 대조구의 농도가 3.416 mg/l 로 혼합 유익세균 처리구 2.993 mg/l 에 비해 다소 증가하였다. 인산성 인의 농도는 전 실험기간동안 혼합 유익세균 처리구가 대조구에 비해 약간 낮게 나타났으며 사육 21일째에는 대조구의 1.162 mg/l 에 비해 처리구는 0.984 mg/l 로 낮았다.

균주별 혹은 농도별 유익세균과 함께 새우를 사육했던 앞선 실험 (다. 유익세균에 의한 유생사육수의 수질개선 효과)과는 달리 유익세균을 혼합 처리한 실험에서는 암모니아성 질소의 농도는 대조구에 비해 감소하였으나 아질산성 질소와 질산성 질소의 농도는 대조구와 큰 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과는 앞서 실시한 유익세균 균주별 성체사육 실험 (마. 대형수조에서의 성체 사육시 유익세균에 의한 수질개선 효과 비교)결과와 매우 비슷한 경향을 보여주는 것이다. 앞선 성체사육 실험과 마찬가지로 유익세균을 혼합 처리한 본 실험에서는 유익세균의 수질향상 효과가 뚜렷했던 소형수조실험에서 처리했던 유익세균의 농도에 비해 0.09~28.6%의 낮은 농도로 유익세균을 처리했기 때문에 유익세균에 의한 충분한 효과를 얻지 못했을 가능성이 높다. 또 다른 원인으로서는 본 실험에 사용된 새우의 생체량 증가에 비해 사용된 유익세균의 부족에 있는 것으로 추측된다. 예를 들어 연어과 어류는 체중의 약 1/10의 N을 방출하며 (Penczak et al., 1982), 이중 80~90%의  $\text{NH}_3$ ,  $\text{NH}_4^+$ 는 아가미를 통하여 방출되는 것으로 보고되고 있다 (Forster and Goldstein, 1969; Rychly, 1980). 이와 같이 수중에 질소의 양은 수서생물의 체중에 크게 영향을 받는다는 사실을 알 수 있다. 따라서 사육수 수질향상의 효과적인 결과를 얻기 위해서는 적정량의 유익세균 농도를 유지해야하며 사육생물의 생체량 증가에 따라서 유익세균의 공급량도 증가되어야 할 필요가 있다. 그러나 양식장에서의 효과적인 사육수 수질개선을 위해서는 유익세균 적정사용 농도 및 사육생물의 총 생체량 증가에 따른 적정 유익세균 공급량에 대한 보다 정확한 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

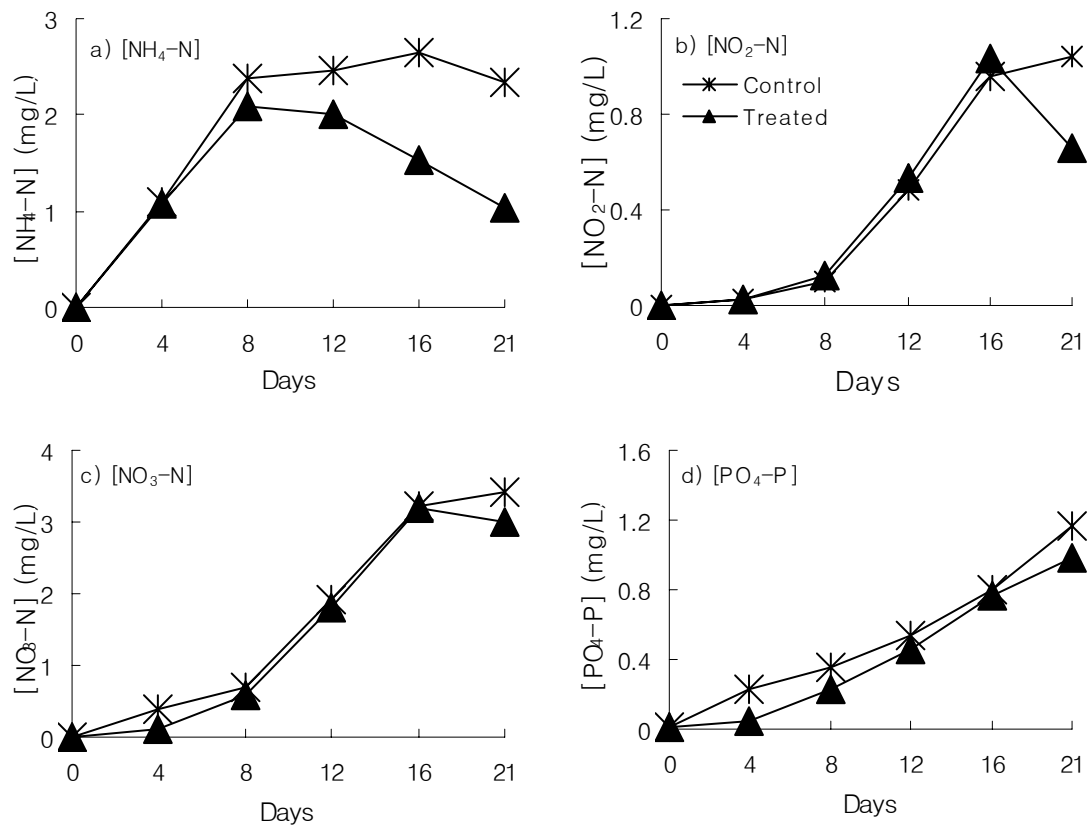


Fig. 4-15. Effect of the mixed probiotic bacteria on the quality of water for adult shrimp culture. The graphs marked with asterisks represent the control (no inoculum); triangles, the bacterial mixture. The bacterial mixture contained *B. licheniformis* ( $2.0 \times 10^2$  CFU/ml), *B. megaterium* ( $1.4 \times 10^4$  CFU/ml), *L. acidophilus* ( $3.3 \times 10$  CFU/ml), *Nitrosomonas* + *Nitrobacter* (0.2 CFU/ml)

## 2. 새우양식장의 양식생태 조사

### 가. 새우양식장 수질환경 조사

#### (1) 일반 수질환경의 일간 변화

조사기간 동안 수온의 범위는 강화 1이 21~27.5℃, 강화 2가 21.5~28.3℃로 최고수온이 양쪽 모두 30℃를 넘지 않았으며, 수온의 변화 또한 완만해서 대하의 성장과 생존에 적합하였다 (Fig. 4-16).

pH는 강화 1이 8.2~8.8, 강화 2가 7.5~8.8로 대하의 성장과 생존에 적합한 범위였으나 강

화 1은 7월 25일을 제외한 전기간에 걸쳐 일간 변화가 0.5를 초과하는 시기가 없었으나 강화 2는 6월 17일과 7월 22일, 7월 26일이 pH의 변화가 0.5 이상으로 커 강화 1에 비하여 대하의 생존에 스트레스의 요인이 될 수 있었을 것으로 판단된다 (Fig. 4-17).

염분은 강화 1이 25.0~32.2 ppt, 강화 2가 28.5~35.0 ppt로 강화 1이 2에 비하여 다소 낮았다. 강화 1은 강우 후에도 저수된 바닷물의 교환없이 계속 유지하므로 염분이 강우에 따른 영향을 많이 받는 것으로 조사되었으나 대하의 성장에 영향을 미칠 정도는 아니었다. 강화 2는 강우 후 저수된 물을 약간씩 환수해 줌으로써 강화 1에 비하여 염분의 변화가 완만하였다 (Fig. 4-18).

용존산소는 강화 1이 5.9~9.6 ppm, 강화 2가 6.17~12.28 ppm의 범위를 나타내었다. 두 양식장 모두 새우의 생존에 영향을 미칠 정도로 낮은 수치를 나타내지는 않았으나 강화 2는 강화 1에 비하여 일간 변화가 심한 것으로 조사되었다. 강화 2의 경우, 7월 중순에 용존산소가 12.28 ppm으로 다소 높은 수치를 나타내었는데 이는 식물플랑크톤의 대증식에 의한 것으로 추정된다 (Fig. 4-19).

투명도는 강화 1이 0.63~0.71 m, 강화 2가 0.42~0.69 m의 범위였다. 강화 1은 투명도가 크게 변화하지 않고 일정한 수준으로 항상 유지되었으나, 강화 2는 양식이 진행될수록 투명도가 다소 낮아지는 경향을 나타내었다. 그러나 대하의 생존에 문제가 될 만한 수치까지 낮아지지는 않았다 (Fig. 4-20).

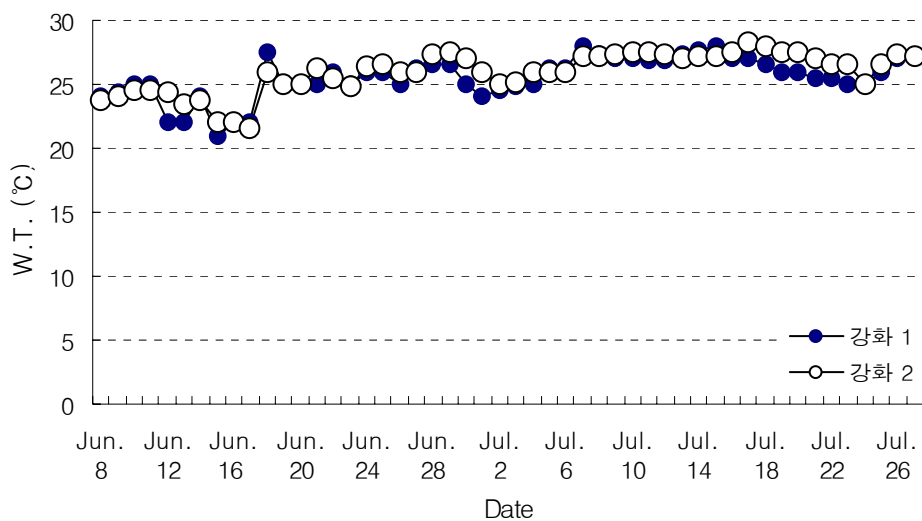


Fig. 4-16. Changes of water temperature in ponds 1 and 2

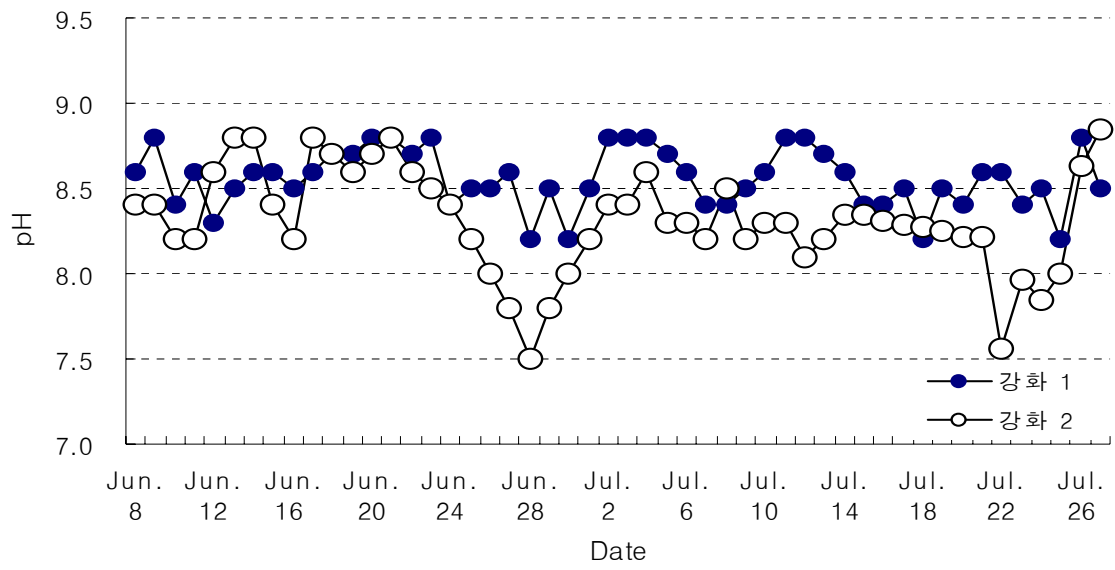


Fig. 4-17. Changes of pH in ponds 1 and 2

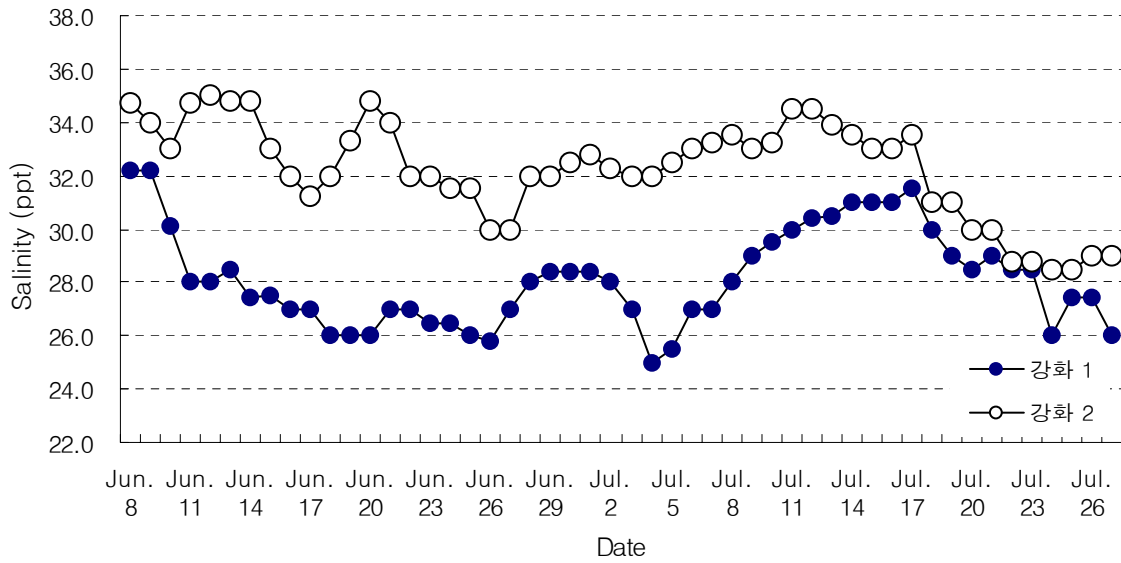


Fig. 4-18. Changes of salinity in ponds 1 and 2

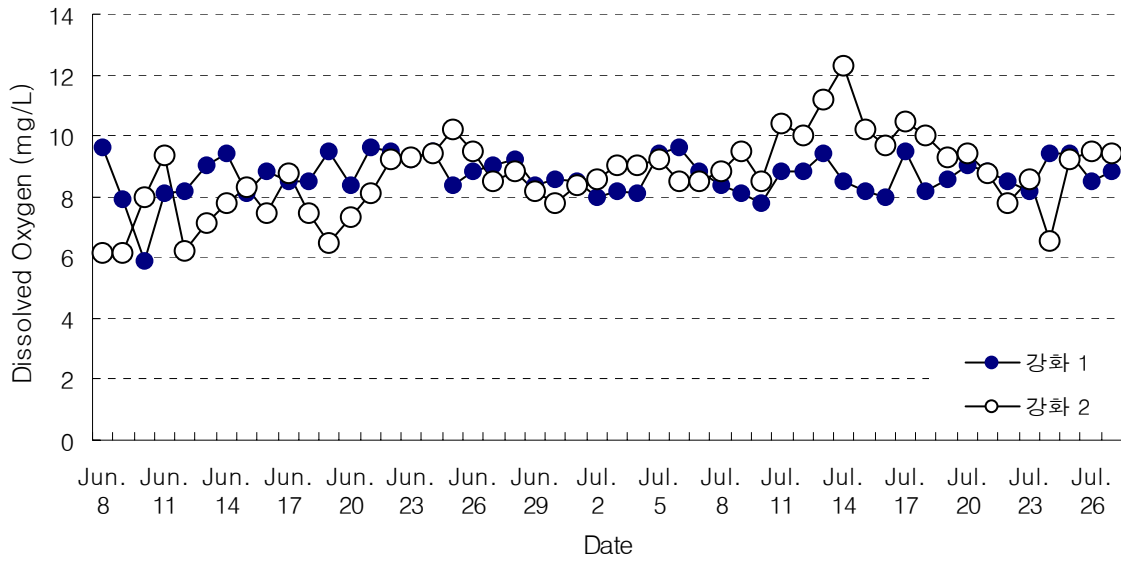


Fig. 4-19. Changes of dissolved oxygen concentration in ponds 1 and 2

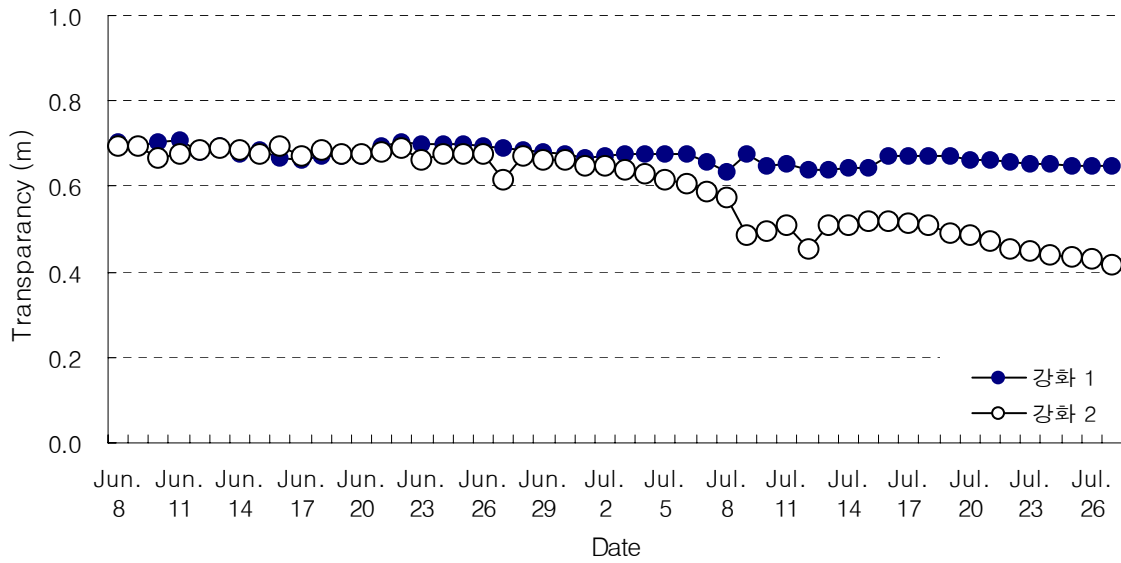


Fig. 4-20. Changes of water transparency in ponds 1 and 2

(2) 새우양식장 영양염 농도의 분석

NH<sub>4</sub>-N의 농도는 강화 1과 강화 2가 모두 0.11~0.15 mg/L의 범위였으며 (Fig. 4-21), NO<sub>2</sub>-N의 농도는 강화 1이 0.009~0.016 mg/L, 강화 2가 0.007~0.013 mg/L로 강화 1이 다소 높

은 수치를 나타내었다 (Fig. 4-22). 또한  $\text{NO}_3\text{-N}$ 의 농도도 강화 1이 0.036~0.066 mg/L, 강화 2가 0.005~0.016 mg/L로 강화 1이 높은 수치를 나타내었다 (Fig. 4-23).

$\text{PO}_4\text{-P}$ 의 농도는 강화 1이 0.098~0.299 mg/L, 강화 2가 0.013~0.200 mg/L의 범위로 분석되어 (Fig. 4-24) 전반적으로 강화 1 양식장이 강화 2 양식장에 비하여 부영양화된 경향을 나타내었다.

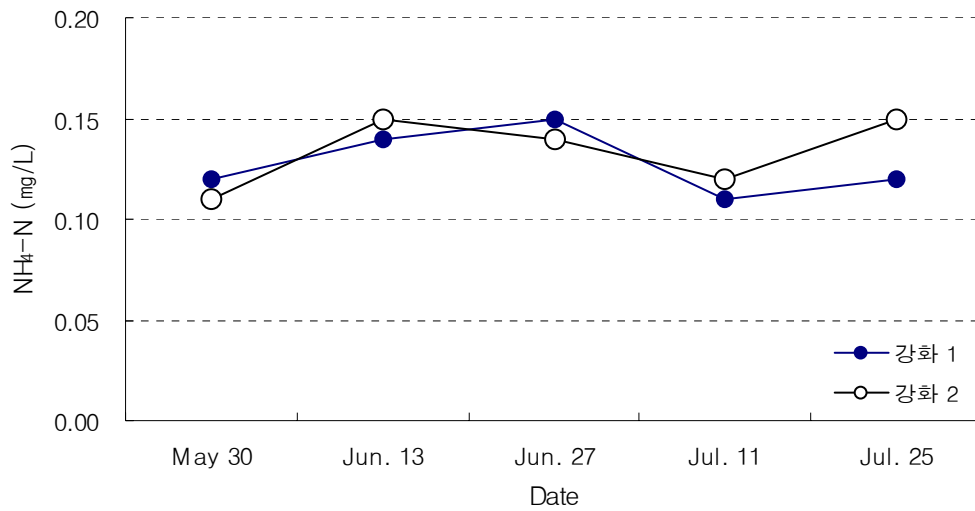


Fig. 4-21. Changes of  $\text{NH}_4\text{-N}$  concentration in ponds 1 and 2

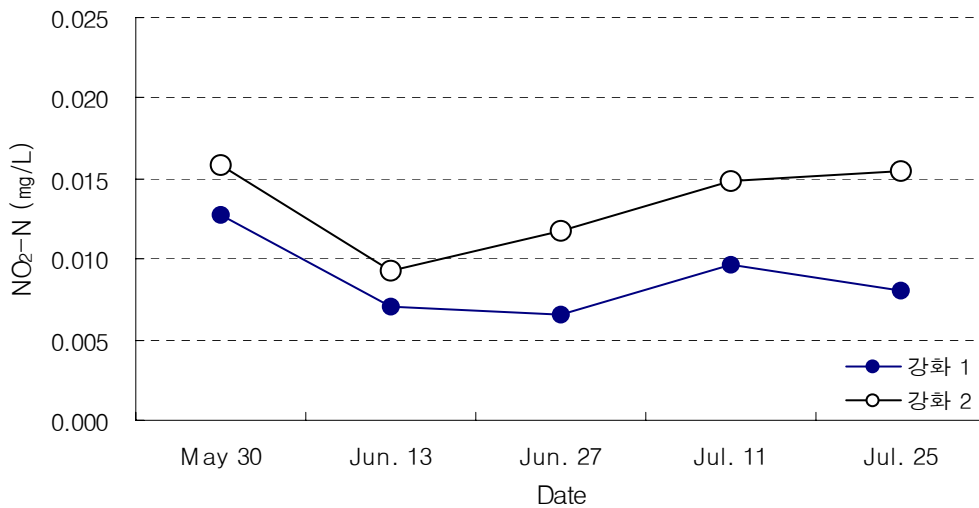


Fig. 4-22. Changes of  $\text{NO}_2\text{-N}$  concentration in ponds 1 and 2

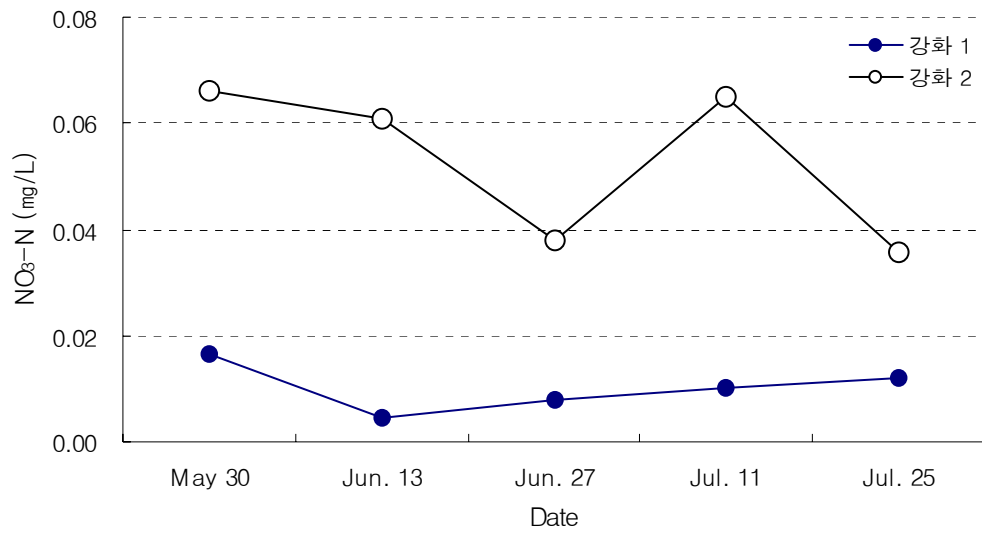


Fig. 4-23. Changes of NO<sub>3</sub>-N concentration in ponds 1 and 2

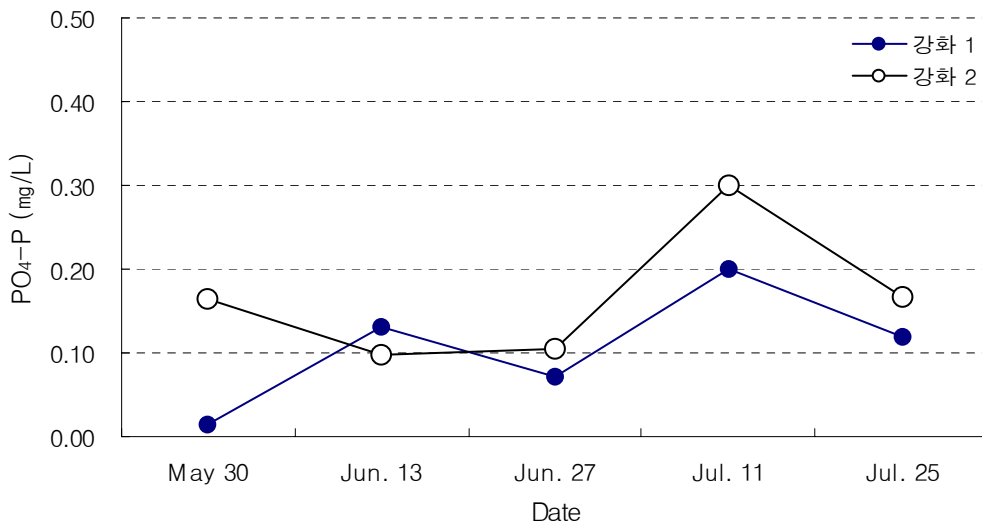


Fig. 4-24. Changes of PO<sub>4</sub>-P concentration in ponds 1 and 2

### (3) 새우양식장 세균상 조사

총 세균수 조사 결과, 강화 1은 5월 하순부터 7월 중순까지는  $122 \sim 162 \times 10^3$  CFU/mL로 비슷한 수치를 나타내다가 7월 하순에  $354 \times 10^3$  CFU/mL로 급격히 증가하였다. 강화 2의 총 세균수는  $159 \sim 430 \times 10^3$  CFU/mL로 조사를 시작한 후부터 양식이 진행됨에 따라 계속 증가



하는 경향을 나타내어 7월 하순에는 강화 1에 비하여 총 세균수가 1.2배 많은 것으로 조사되었다 (Fig. 4-25).

비브리오 균수는 강화 1은 양식 초기인 5월 하순과 6월 중순에는 나타나지 않다가 6월 하순부터 비브리오 균수가 증가하기 시작하여 7월 하순에는  $8 \times 10^2$  CFU/mL의 수치를 나타내었다. 강화 2는 조사를 시작한 5월 하순에는  $2 \times 10^2$  CFU/mL로 조사되었으나 양식이 진행됨에 따라 점차 수치가 증가하여 7월 하순에는  $2 \times 10^3$  CFU/mL로 조사되었다 (Fig. 4-26).

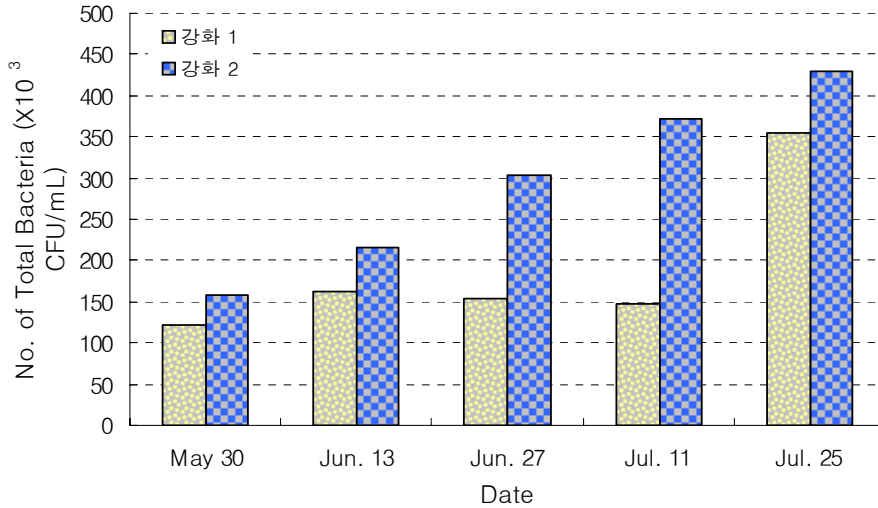


Fig. 4-25. Changes of total bacterial number in ponds 1 and 2

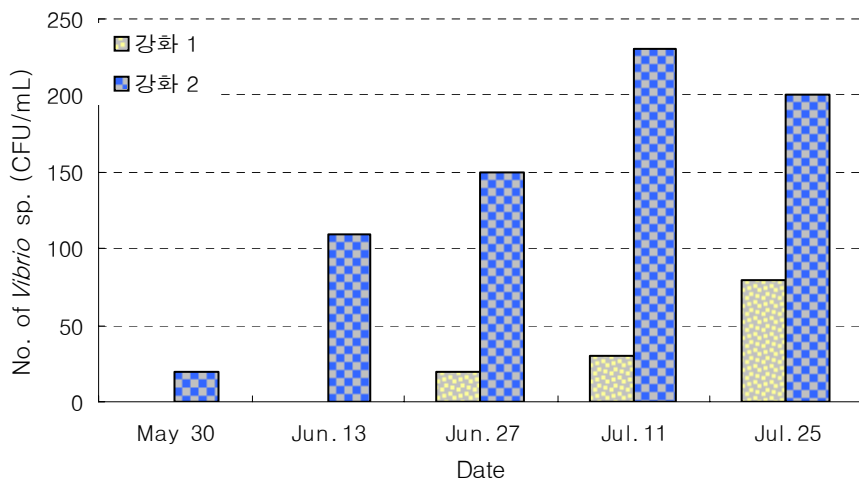


Fig. 4-26. Changes in number of *Vibrio* spp.

나. 새우양식장 질병 감염실태 조사

(1) 기생충 감염율

양식장별 대하 아가미의 기생충 및 기타 부착물 감염율 및 감염 강도를 조사한 결과, 강화 1은 5월 하순과 6월 중순에는 관찰 대하의 20%에서 미세조류가 아가미에 미량 부착되어 있는

것이 관찰되었으며, 6월 하순부터 7월 중순까지는 섬모충류가 아가미에 미량 흡착되어 있는 개체가 40% 정도 관찰되었으나 7월 하순에는 섬모충류의 흡착이 관찰되지 않고 흑색소가 침착된 부위가 발견되는 개체가 40%정도 관찰되었다 (Table 4-1).

강화 2는 5월 하순에 detritus가 미량 관찰되는 개체가 40%였으며, 6월 중순에는 미세조류가 20% 개체에서 미량 관찰되었고 6월 하순에는 섬모충류가 발견되는 개체가 20%, 흑색소 침착 개체가 20%, detritus 흡착 개체가 60% 관찰되었다. 그러나 7월 중순에는 섬모충류와 detritus가 흡착된 개체가 관찰되지 않고 원생동물과 흑색소 침착 부위를 가진 개체가 각각 20, 40% 관찰되었다. 7월 하순에는 detritus와 흑색소 침착 부위를 가진 개체가 40%씩 관찰되었다 (Table 4-1).

Table 4-1. Changes in parasitic infection rate of gills

Date	양식장	아가미의 기생충 및 기타 부착물	감염강도 (범위)	감염율 (감염개체수/조사수)
May 30	강화 1	microalgae	1>(0~1)	1/5
	강화 2	detritus	1>(0~1)	2/5
Jun. 13	강화 1	microalgae	1>(0~1)	1/5
	강화 2	microalgae	1>(0~1)	1/5
Jun 27	강화 1	stalked ciliates	1>(0~2)	2/5
		microalgae	1>(0~1)	1/5
	강화 2	stalked ciliates melanized lesion detritus	1>(0~1) 1>(0~1) 1>(0~1)	1/5 1/5 3/5
Jul. 11	강화 1	stalked ciliates	1>(0~1)	2/5
	강화 2	unid. protozoa melanized lesion	1>(0~1) 1>(0~2)	1/5 2/5
Jul. 25	강화 1	melanized lesion	1>(0~1)	2/5
	강화 2	detritus melanized lesion	1>(0~1) 1>(0~2)	2/5 2/5

## (2) 바이러스 감염실태 조사

흰반점바이러스 (WSSV) 감염율은 강화 1이 5월, 6월 하순이 0%, 7월 하순이 20%였으며, 강화 2는 5월 하순이 0%, 6월 하순이 10%, 7월 하순이 20%였다. 그러나 바이러스의 감염 정도는 두 양식장 모두 극히 초기 단계로서 발병으로 진행되지는 않았다 (Fig. 4-27).

간췌장바이러스 (HPV)는 강화 1이 5월 하순에 30%, 6월 중순, 6월 하순이 50%, 7월 중순이 60%, 7월 하순이 70%였으며, 강화 2가 5월 하순이 40%, 6월 중순이 50%, 6월 하순, 7월 중순이 60%, 7월 하순이 70%의 감염율을 나타내어 흰반점바이러스에 비하여 높은 감염율을 나타내었다 (Fig. 4-28).

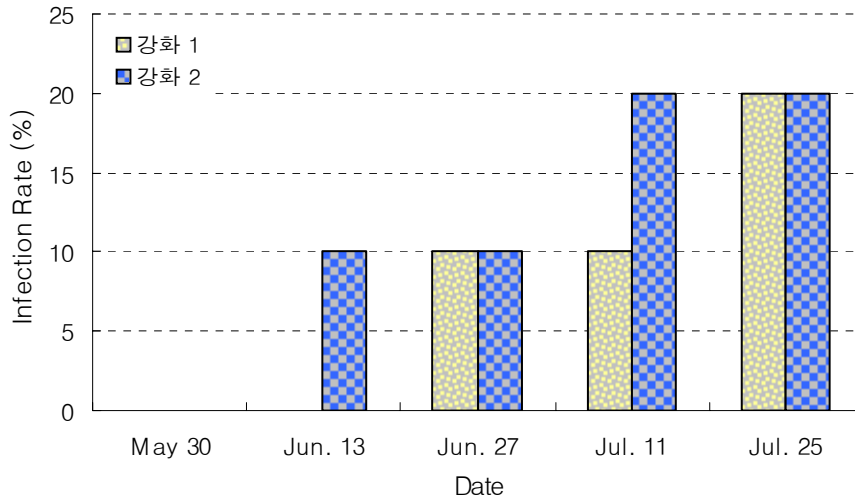


Fig. 4-27. Changes in WSSV infection rate of *F. chinensis*

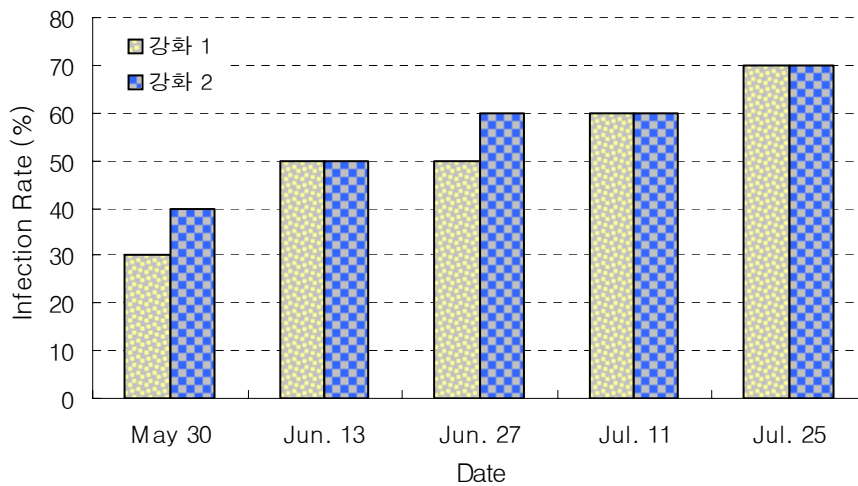


Fig. 4-28. Changes in HPV infection rate of *F. chinensis*

### 3. Probiotics를 이용한 새우양식장 수질개선 및 질병억제 효과시험

#### 가. 새우양식장 수질환경 조사

##### (1) 전사육기간 양식장의 일반수질환경 변화

##### (가) 수온

전 사육기간 동안 사육수 수온은 23.1~31.7℃ (평균 27.5℃)로서 새우의 성장에 적합한 범위를 유지하였다. 전반적으로 pond 1과 2의 수온은 큰 차이를 보이지 않고, 거의 같은 경향을 보여주었다. 사육 초기인 6월에는 25℃ 이하로 내려간 기간은 없었으며, 폭우가 내린 7월 10일 이후에는 양 사육지에서 3℃ 정도의 수온 강하가 있었다. 특히 7월 10일까지는 26℃가 유지되다가 7월 11일에는 23.1℃, 7월 12일에는 23.5℃로서 양 식기간 중 가장 낮은 수온변화를 보여 주었다. 강우가 없는 7월 13일 이후에는 수온은 점차 상승하여 7월 18일에는 처음으로 30℃를 넘고 7월 23일에는 31.5℃를 기록하였다. 이러한 고수온은 8월 초순과 중순 약간의 강우에 의한 단기간 수온저하를 제외하고는 지속적으로 유지되다가 8월 16일 최고수온인 31.7℃를 정점으로 점차 강하하였다. 8월 18일 이후에는 30℃ 이하로 떨어져서 8월 24일까지 24.2℃ 까지 서서히 내려갔으며, 집중호우가 내린 8월 25~26일에는 21.4℃로 급강하하였다.

#### (나) 용존산소 농도

사육기간 동안 용존산소농도 (DO)의 변화는 (Fig. 4-30)에 나타나있다. Pond 1의 DO는 4.85~12.04 ppm (평균 8.47 ppm)이었다. Pond 2는 7월 6일부터 DO를 측정하기 시작하였으며, 5.52~13.32 ppm (평균 8.19 ppm)의 범위를 보였다. Pond 1의 경우, probiotics를 처리하기 이전인 7월 20일 이전에는 두세 차례의 DO 저하를 제외하고는 9 ppm 이상을 유지했지만, probiotics와 당밀을 공급하기 시작한 7월 20일 이후부터는 점차 강하하여 7월 27일에는 최저농도인 4.85 ppm까지 떨어졌다. 당밀이 공급되기 시작한 7월 20일 이후의 pond 1의 DO 평균 농도는 7.41 ppm으로 동기간의 pond 2의 DO 농도에 비하여 0.7 ppm 이상이 낮게 나타났다. 전반적으로 DO 저하에 의하여 새우가 수면위로 상승하거나 외적으로 스트레스를 받은 일은 발견되지 않았다.

#### (다) 염분

Pond 1과 2에서 염분은 사육초기부터 상당한 차이가 있었다 (Fig. 4-31). Pond 1의 경우, 사육수 물만들기 이전부터 담수를 유입하여 염분을 9 ppt까지 저하시켰으며, pond 2에는 자연해수로 시작하여 양식기간 동안 소량의 담수를 지속적으로 공급하여 염분을 서서히 강하시켰다. Pond 1은 전기간 동안 염분 7.3~9.1 ppt (평균 8.3 ppt)를 유지하였으며 소량의 담수공급으로 수분 증발량을 보충하여 염분의 큰 차이를 보이지 않았다. Pond 2는 18.8~28.4 ppt (평균 21.93 ppt)의 범위로서 양식기간 동안 서서히 저하되었다. 흰다리새우는 0 ppt의 염분에서도 양식되는 점을 고려하면 양 사육지에서 염분에 의한 스트레스는 없었던 것으로 판단된다.

#### (라) pH

pH의 일일변화는 (Fig. 4-32)에 나타나있다. 사육기간 동안 pond 1의 pH는 7.2~9.3 (평균 8.47)의 범위를 보여주었으며, 7월 28일에 7.2, 8월 16~18일의 7.71~7.91을 제외하고는 8.0 이상을 유지하였다. Pond 2의 경우, pH는 8.03~9.0 (평균 8.56)의 범위를 보여주었으며 전 기간동안 8.0 이하로 저하된 시기는 없었으며 비교적 안정된 범위를 나타냈다. 전반적으로 양 사육지의 pH는 새우의 성장에 적정범위로 유지되었다.

(마) 알칼리도 (Alkalinity)

알칼리도의 주간 변화는 (Fig. 4-33)에 나타나있다. Pond 1은 알칼리도 범위는 55~140 ppm 이었으며 평균 80 ppm을 나타냈다. Pond 2의 경우, 알칼리도는 120~200 ppm의 범위를 나타냈으며 평균 농도는 149.5 ppm 이었다. Pond 2는 pond 1에 비해 평균 70 ppm 정도가 높게 유지되었다. Pond 1은 양식기간 동안 염분이 pond 2에 비해 크게 낮게 유지되어 알칼리도가 낮게 나타난 것으로 판단된다. Pond 1의 경우, 알칼리도 저하시 탄산칼슘을 살포하였으며, 평균 알칼리도 농도는 새우의 최저요구량 80 ppm 이하로 크게 내려가지는 않았다.

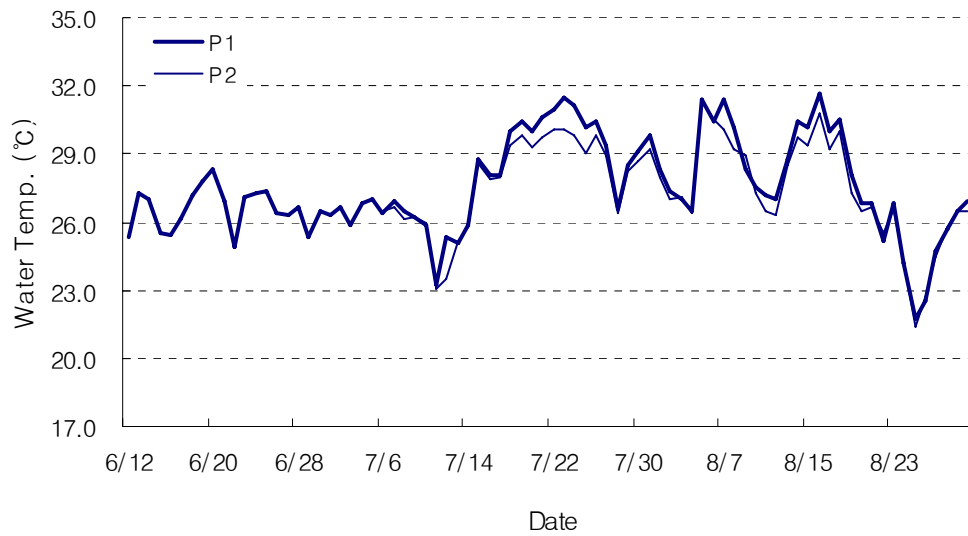


Fig. 4-29. Changes of water temperature in ponds 1 and 2

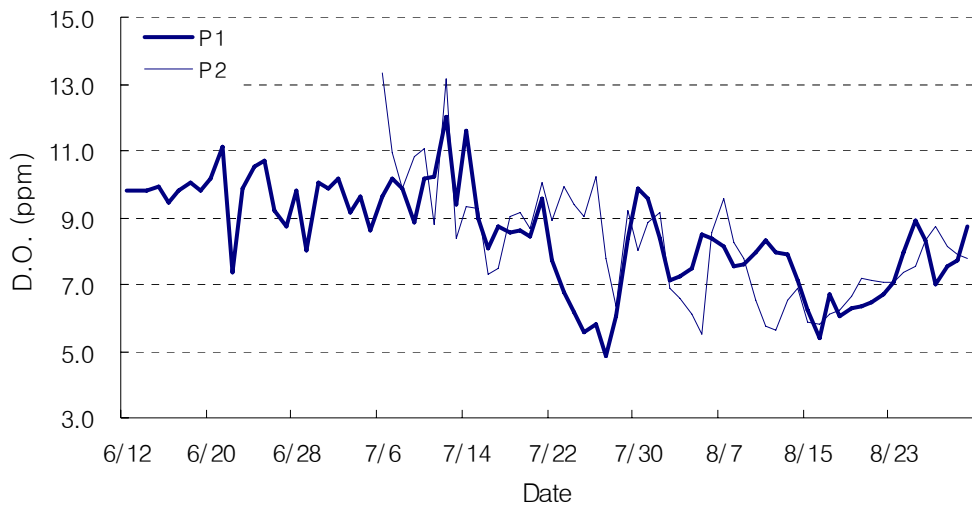


Fig. 4-30. Changes of dissolved oxygen concentration in ponds 1 and 2

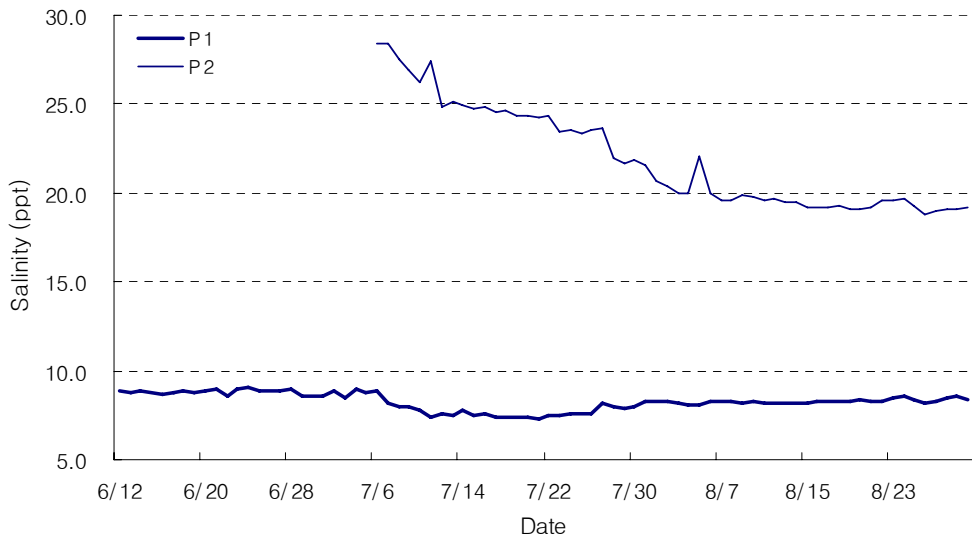


Fig. 4-31. Changes of salinity in ponds 1 and 2

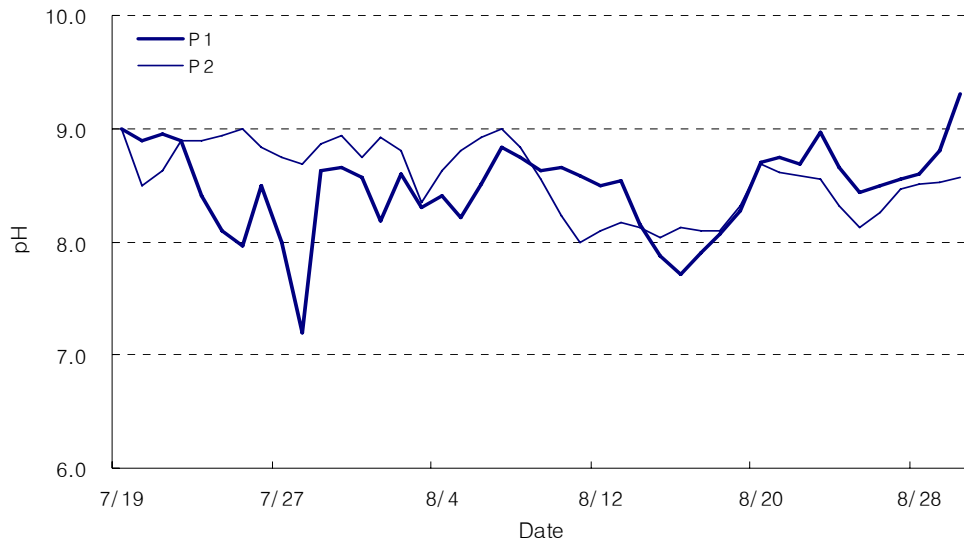


Fig. 4-32. Changes of pH in ponds 1 and 2

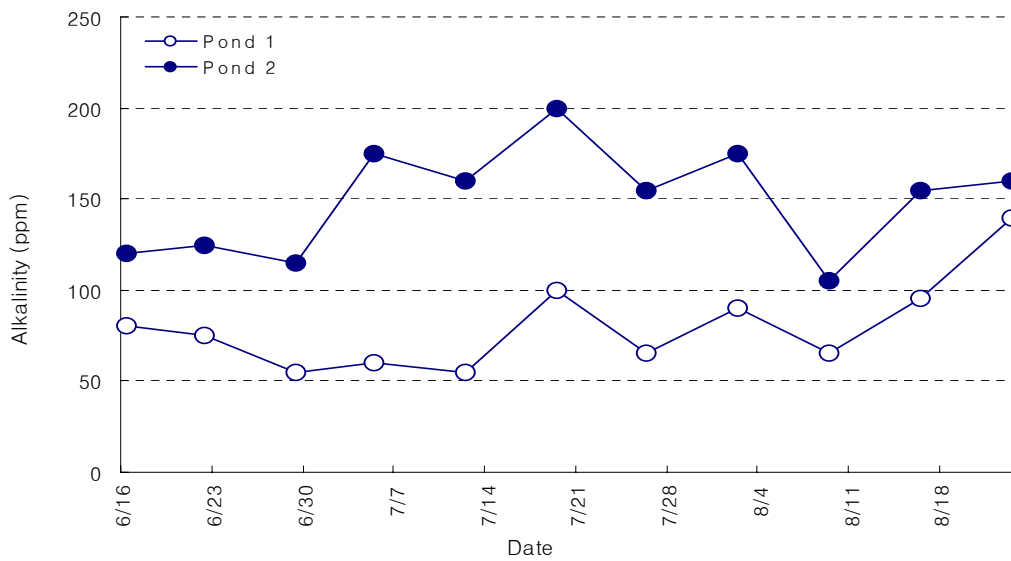


Fig. 4-33. Changes of alkalinity in ponds 1 and 2

(2) 단기간 양식장 수질환경 연속측정 결과

(가) 수온

YSI 수질 연속측정장치로 2005년 7월 28일~8월 17일까지 3주간 pond 1의 사육수의 수온을

측정한 결과는 (Fig. 4-34)에 나타나 있다. 이 기간동안 사육수 수온 변화는 뚜렷한 일주변화를 보여준다. 강우가 있었던 5~7일째와 13~17일째에는 주야간 수온변화가 1℃ 이하를 보여주었으나, 강우가 없는 맑은 날에는 약 2~2.5℃의 변화가 있었다. 주야간 수온변화가 가장 크게 나타난 시기인 8월 4일에는 3.71℃였으며, 가장 적었던 8월 2일에는 0.26℃로 나타났다. 이 기간 동안 최고 및 최저 수온은 각각 31.87, 25.69℃였으며, 최고수온의 평균값은 29.34℃, 최저수온의 평균값은 27.68℃로 나타났다. 최고 수온에 도달하는 평균시간은 16시 50분이었으며, 최저 수온은 평균 8시 04분에 나타나는 것으로 조사되었다.

#### (나) 용존산소 (DO)

용존산소 농도의 일주변화도 수온과 마찬가지로 뚜렷한 주야 변화를 보여주었다 (Fig. 4-35). 하루 중 DO 농도가 최고로 높아지는 시간은 평균 16시 39분이며, 최저에 도달하는 시간은 평균 05시 58분으로 조사되었다. 조사기간 동안 DO 농도는 최고 10.3 ppm, 최저 3.12 ppm을 기록하였으며, 평균 최고 농도는 8.17 ppm, 평균 최저농도는 4.58 ppm으로 새우의 성장에 적합하였다. DO 농도의 주야 차가 가장 심한 날에는 5.12 ppm 까지 차이가 났으며, 흐린 날에는 최저 2.81 ppm으로 주야간 차이가 크게 나타나지 않았다.

#### (다) pH 변화

3주간 연속측정된 pH의 일일변화는 (Fig. 4-36)에 나타나있다. pH의 변화는 수온 및 DO 변화와 마찬가지로 뚜렷한 주야변화를 보여준다. 또한 pH 변화는 수온, DO 변화와 밀접한 상관관계를 보여주며, 상승과 하강의 패턴도 매우 유사하였다.

조사기간 동안 pH의 최고 및 최저값은 각각 8.55, 7.31로 나타났다. 전 기간 동안 최고값의 평균은 8.29였으며, 최저값의 평균은 7.68이었다. 하루 중 pH가 가장 높아지는 평균 시간은 오후 5시 07분이었으며, 가장 낮아지는 시간은 오전 7시 11분으로 조사되었다. 하루 중 pH가 가장 많은 차이를 나타낼 때는 0.88이며, 가장 적은 차이가 날 때는 0.29로 나타났다.

#### (라) 염분

3주간 연속측정된 염분변화는 (Fig. 4-37)에 나타나있다. 염분은 수온, DO, pH와는 달리 일주변화를 보이지 않았다. 조사기간 동안 염분은 6~8.3 ppt의 범위로 나타났으며, 평균 7.62 ppt를 보여주었다. Pond 1의 염분은 초기부터 담수를 유입하여 저염분 상태로 양식을 시작하였으며, 조사기간 중 5일까지는 점차 상승하였다가 8 ppt 전후에서 안정된 패턴을 보여주었다.



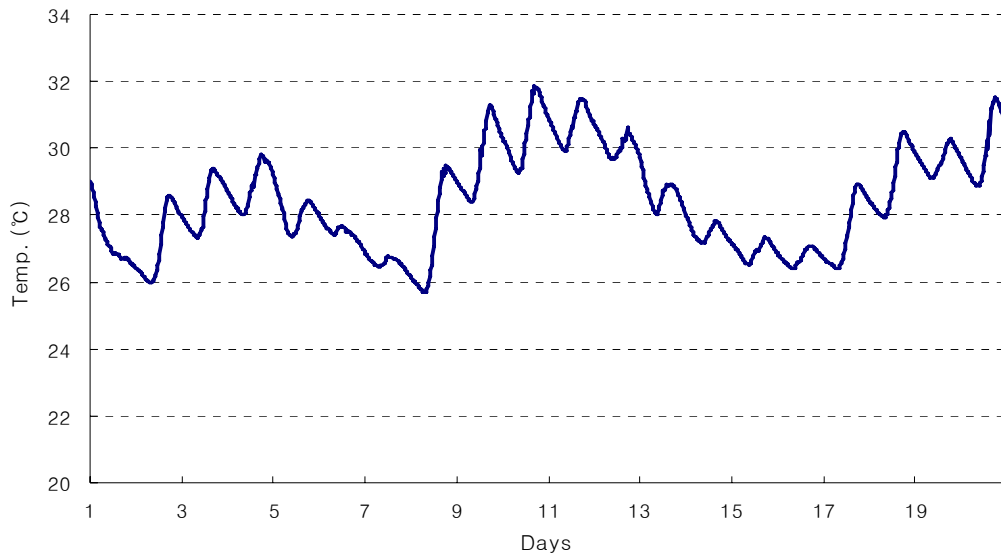


Fig. 4-34. Changes of water temperature successively monitored for three weeks with 30 min. interval in pond 1 (Jul. 7 to Aug. 17, 2005)

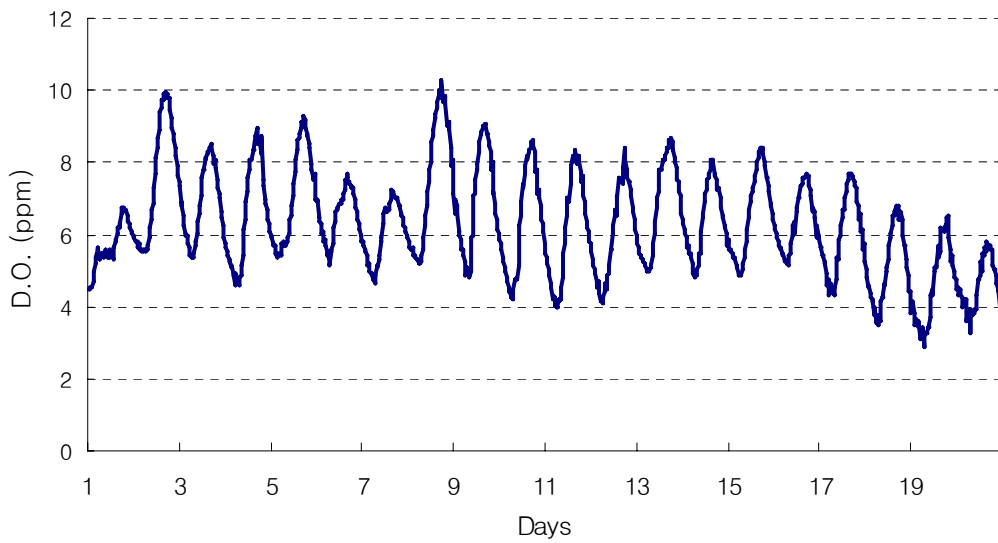


Fig. 4-35. Changes of dissolved oxygen concentration successively monitored for three weeks with 30 min. interval in pond 1 (Jul. 7 to Aug. 17, 2005)

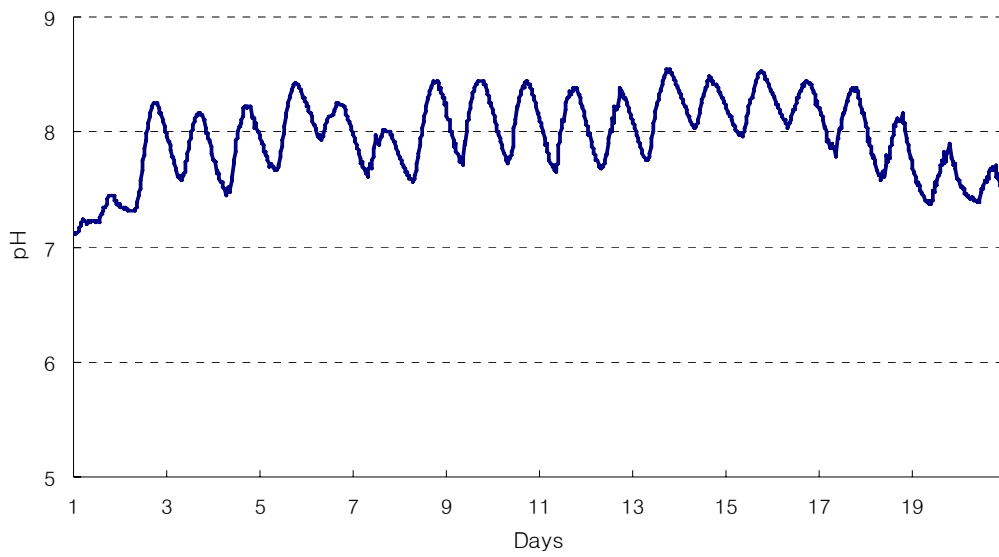


Fig. 4-36. Changes of pH successively monitored for three weeks with 30 min. interval in pond 1 (Jul. 7 to Aug. 17, 2005)

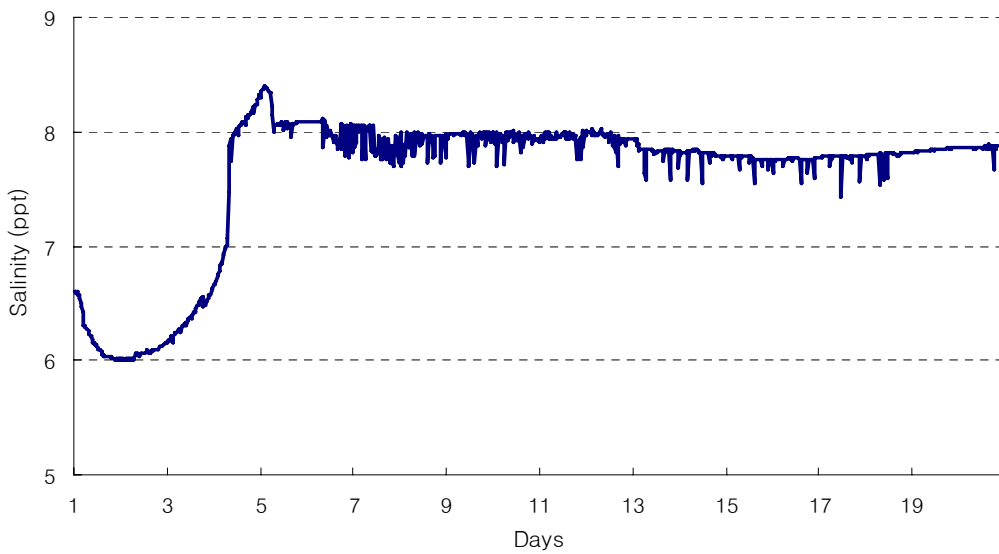


Fig. 4-37. Changes of salinity successively monitored for three weeks with 30 min. interval in pond 1 (Jul. 7 to Aug. 17, 2005)

Table 4-2. Comparison of water temperature, DO and pH changes for three weeks in pond 1 (Jul. 7 to Aug. 17, 2005)

	수온 (°C)	DO (ppm)	pH
최고값	31.87	10.3	8.55
최저값	25.69	3.12	7.31
최고 평균	29.34	8.17	8.29
최저 평균	27.68	4.58	7.68
평균 최고시간	16:50	16:39	17:07
평균 최저시간	08:04	05:58	7:11
일일 최고차	3.71	5.12	0.88
일일 최저차	0.26	2.81	0.29

(3) 24시간 양식장 일반 수질환경 연속측정 결과

(가) 수온

7월 31일 pond 1의 사육수 수온을 연속측정한 결과는 (Fig. 4-38)에 나타나 있다. 수온은 0시부터 점차 내려가서 아침 8시에 가장 낮은 28.01°C를 보였으며, 이후 점차 증가하여 오후 5시에 29.81°C로 가장 높게 나타났다. 하루의 수온차는 1.81°C로 조사되었다.

(나) 용존산소 농도

용존산소 농도의 일변화는 (Fig. 4-39)에 나타나 있다. 용존산소 농도의 일변화는 수온변화와 매우 비슷한 양상을 보여준다. 0시부터 DO는 점차 감소하여 아침 5시에 가장 낮은 4.57 ppm을 나타냈으며, 이후 점차 증가하여 오후 4시 30분에 8.95 ppm으로 가장 높게 나타났다. 이후 DO 농도는 새벽까지 지속적으로 감소한다. 7월 31일의 하루 DO 차는 4.38 ppm이었으며 평균 DO 농도는 6.58 ppm으로 나타났다.

(다) pH

pH의 일변화는 (Fig. 4-40)에 나타나 있다. 하루 중 pH는 아침 6시에 7.45로서 가장 낮게 나타났으며, 이후 점차 증가하여 오후 4시에 가장 높은 8.23을 나타냈다. 이러한 pH 최고, 최저 시간은 용존산소 및 수온의 최고, 최저 시간과 거의 비슷하게 나타났다. pH의 일교차는 0.78로서 새우에게 스트레스를 줄 수 있는 변화이며, 평균 7.86으로 조사되었다.

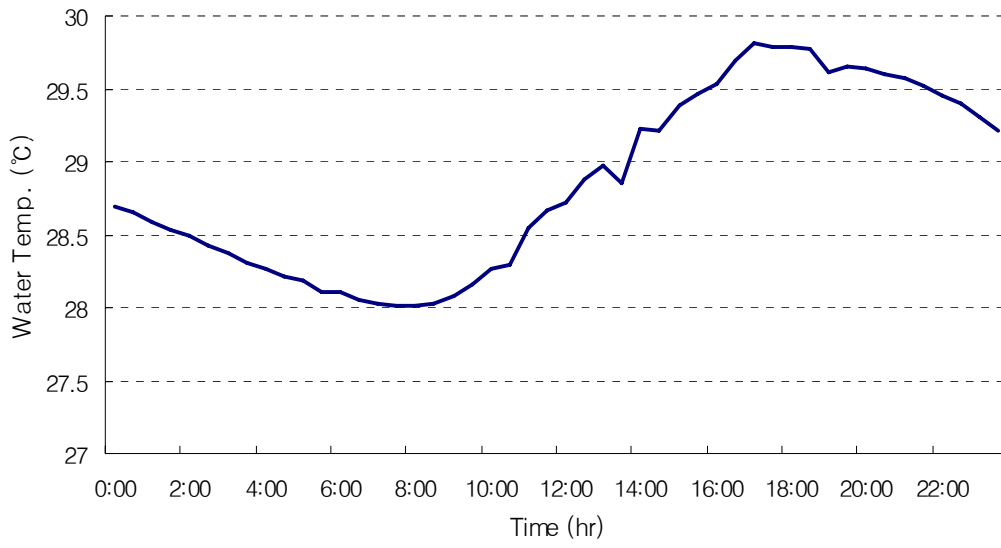


Fig. 4-38. Daily change of water temperature in pond 1 (monitored interval, 30 min.; Jul. 7, 2005)

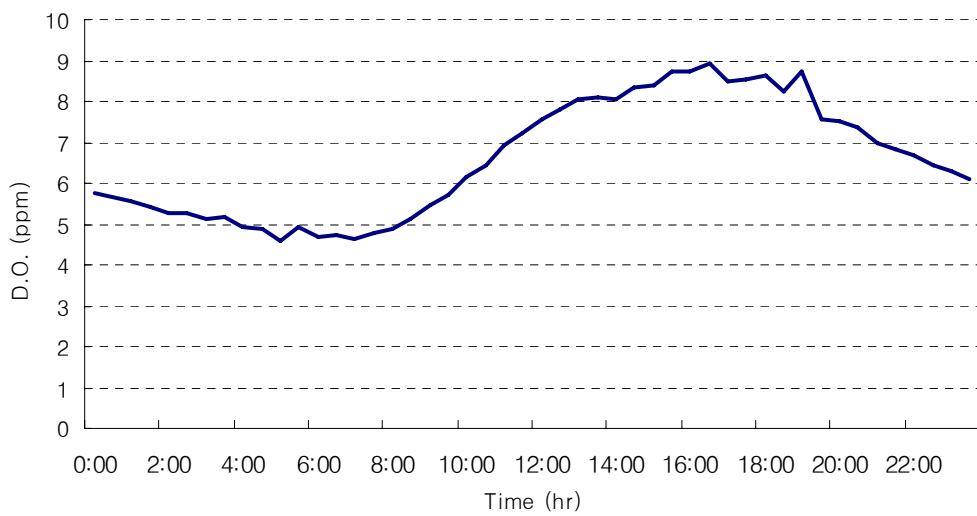


Fig. 4-39. Daily change of dissolved oxygen concentration in pond 1 (monitored interval, 30 min.; Jul. 7, 2005)

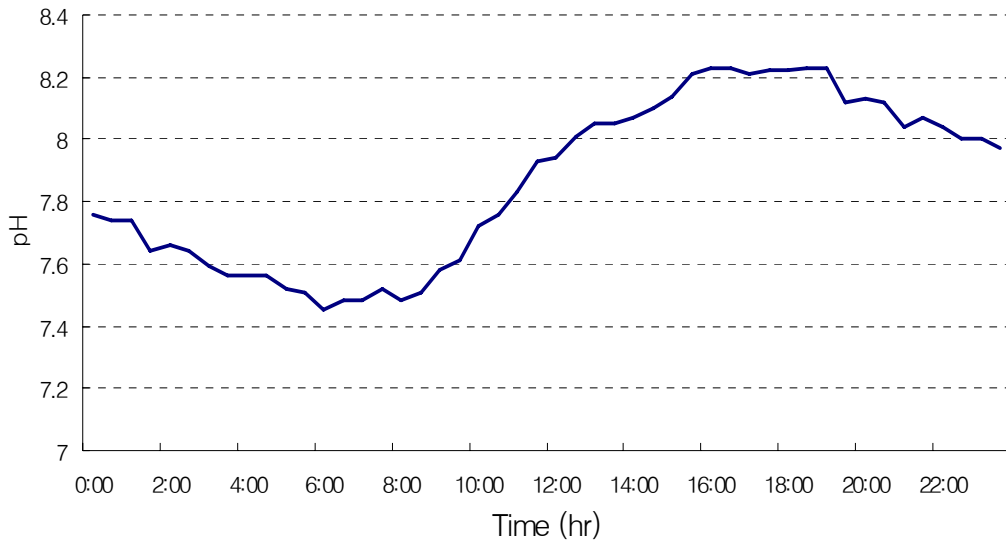


Fig. 4-40. Daily change of pH in pond 1 (monitored interval, 30 min.; Jul. 7, 2005)

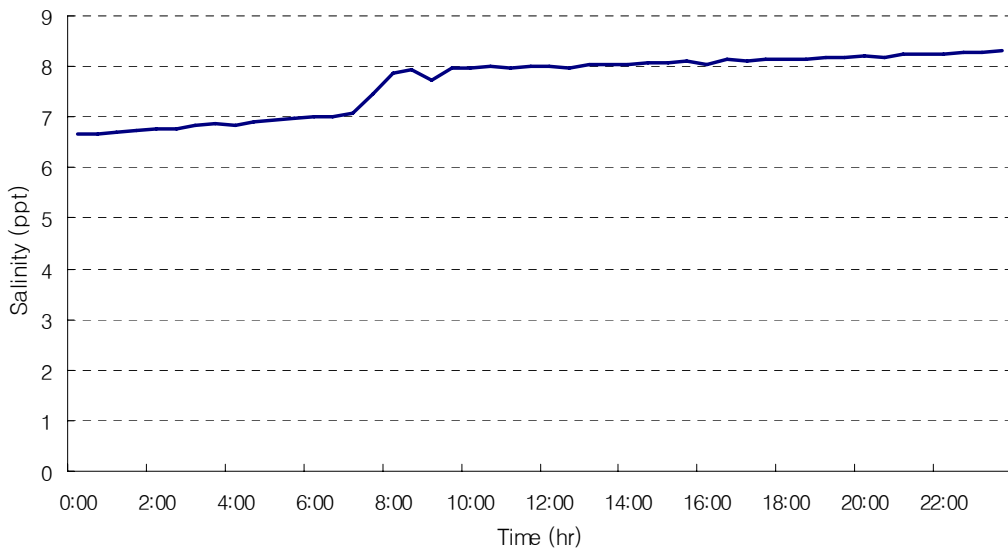


Fig. 4-41. Daily change of salinity in pond 1 (monitored interval, 30 min.; Jul. 7, 2005)

나. 사육수 수질에 미치는 유익세균의 효과 조사

(1) 사육수의 영양염류 변화

6~8월 동안 pond 1과 2의 사육수 영양염류 변화를 조사한 결과는 (Fig. 4-42, 44), (Table

4-3)에 나타나 있다. 조사기간 동안 pond 1 (처리군)의 총암모니아성 질소 (TAN)의 농도는 0.003~0.173 ppm의 범위였으며 평균 0.048 ppm으로 조사되었다. Pond 2 (대조군)의 TAN은 0.003~0.478 ppm, 평균농도 0.138 ppm으로 pond 1에 비하여 2.9배 높게 나타났다. Pond 1의 경우, TAN은 6월 29일까지 0.018~0.043 ppm의 범위로 낮게 유지되었으나 7월 6일 0.173 ppm으로 급증한 이후 8월 9일 0.132 ppm을 제외하고는 0.057 ppm 이하를 유지하였다. Pond 2의 경우, pond 1과 비슷하게 6월 말까지는 0.003~0.064 ppm으로 낮게 유지되었으나, 7월 6일 0.478 ppm, 7월 13일 0.4 ppm으로 급격하게 증가하였다. 이후 8월 3일까지 0.1 ppm 정도 유지되었다. Probiotics와 당밀을 공급하기 시작한 7월 10일 이후에는 8월 9일을 제외하고는 항상 pond 2가 pond 1에 비하여 TAN 농도는 계속 높게 나타났다.

아질산염 농도 변화는 (Fig. 4-43)에 나타나 있다. Pond 1의 아질산염 농도는 전기간동안 0.01~0.06 ppm의 범위였으며, 평균 농도는 0.033 ppm이었다. Pond 2의 아질산염 농도 범위는 0.014~0.116 ppm이었으며 평균 농도는 0.052 ppm으로서 pond 1에 비하여 1.56배 높게 나타났다. Pond 1의 경우, 아질산염 농도는 초기부터 점차 증가하여 7월 6일에 0.478 ppm으로 최고 농도를 보인 이후, 점차 감소하는 추세를 보였다. Pond 2의 아질산염 농도는 점차 증가하여 7월 13일 0.113 ppm, 7월 20일 0.116 ppm으로 최고치를 나타낸 이후 점차 감소하는 경향을 보였다.

질산염 농도변화는 (Fig. 4-44)에 나타나 있다. Pond 1의 질산염 농도는 점차 증가하여 6월 29일 0.046 ppm을 나타낸 이후 점차 감소는 경향을 보여주었다. Pond 1의 질산염 농도는 0.012~0.046 ppm의 범위를 나타내었고, 평균 0.032 ppm으로 조사되었다. Pond 2의 경우, 농도 범위는 0.026~0.068 ppm으로 평균 0.041 ppm으로 조사되었다.

Table 4-3. Comparison of nutrients in ponds 1 and 2

	Pond 1			Pond 2		
	TAN	Nitrite	Nitrate	TAN	Nitrite	Nitrate
Maximum	0.173	0.060	0.046	0.478	0.116	0.068
Minimum	0.003	0.010	0.012	0.003	0.014	0.026
Mean	0.048	0.033	0.032	0.138	0.052	0.041
SD	0.054	0.015	0.011	0.157	0.039	0.016

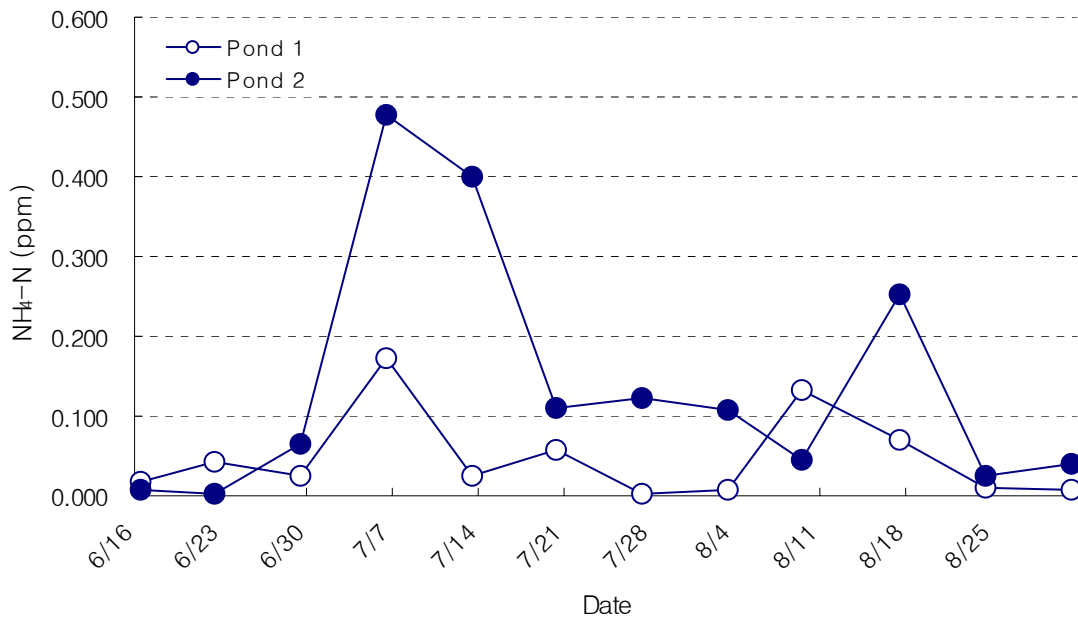


Fig. 4-42. Changes of TAN (total ammonia nitrogen) concentration in ponds 1 and 2

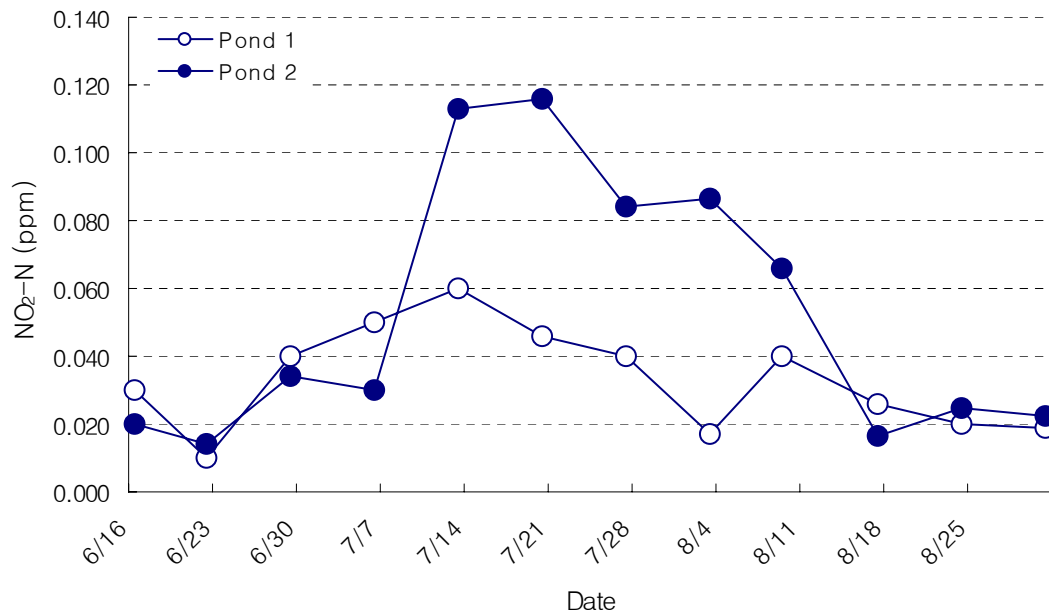


Fig. 4-43. Changes of nitrite concentration in ponds 1 and 2

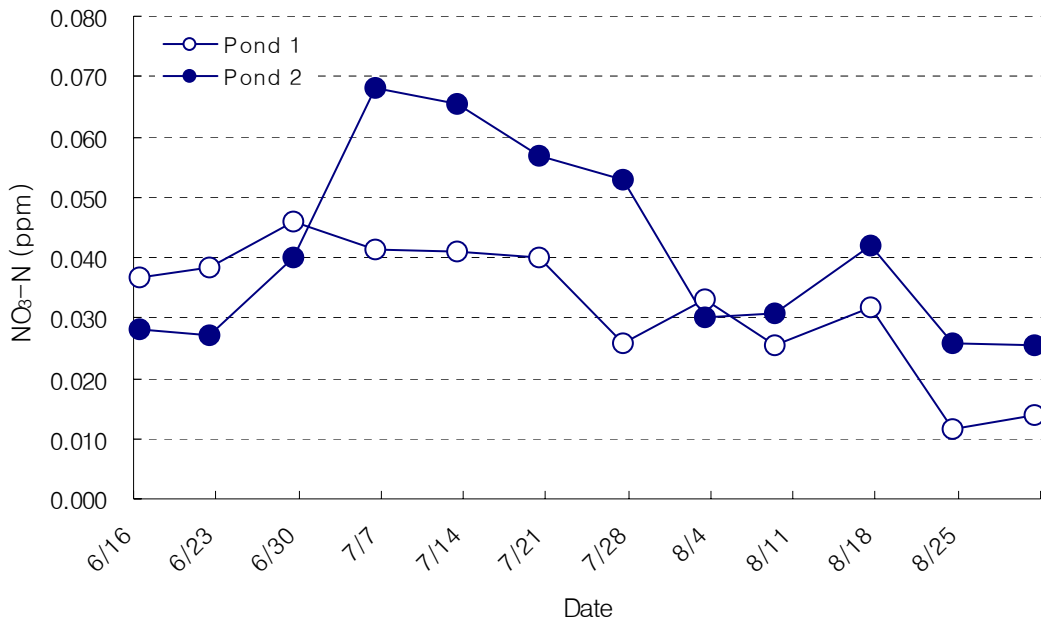


Fig. 4-44. Changes of nitrate concentration in ponds 1 and 2

(2) 사육수의 세균수 변화

4종류의 probiotics를 접종하고, 탄소원인 당밀을 주기적으로 공급하기 시작한 7월 20일부터 매주 pond 1 (처리군)과 pond 2 (대조군)의 사육수로부터 총세균수 및 비브리오균수를 측정 한 결과는 (Table 4-4) 및 (Fig. 4-45, 46)과 같다.

총세균수의 경우, 당밀공급 시작 시기인 7월 20일에는 pond 1, pond 2는 각각 25.1 및 14.3  $10^3$  CFU/ml로서 pond 1이 pond 2에 비하여 약간 높았다. 이후 pond 1의 총세균수는 36.5~142.25 CFU/ml로서 평균 58.36 CFU/ml를 유지하였다. 대조군인 pond 2의 경우, 전 기간동안 7.7~35.9 CFU/ml로서 평균 17.15 CFU/ml를 유지하였다. 전 기간동안 pond 1의 총세균수는 pond 2에 비해 낮아진 시기는 없었으며, 8월 17일에는 최대 13.7배의 차이를 보였다. 전 기간 동안 pond 1은 pond 2에 비해 총세균수는 평균 3.40배로 높게 나타났다.

TCBS 배지로 조사된 비브리오균수의 경우, 7월 20일에는 pond 1과 pond 2는 거의 비슷하게 각각 2.95와 2.75 CFU/ml로 나타났다. 8월 9일을 제외하고는 나머지 기간동안 pond 1은 pond 2에 비하여 낮은 농도의 비브리오균수를 나타냈으며, 전기간 pond 1과 pond 2의 평균 총 비브리오균수는 각각 2.80, 3.58 CFU/ml로 조사되어 크게 차이가 나타나지 않았다.

Pond 1과 2의 총세균수의 대한 비브리오균수의 비율은 (Table 4-5)에 나타나 있다. Pond 1의 경우, 비브리오균수의 비율은 7월 20일 11.8%였으나, 7월 27일에 7.28%, 8월 3일 2.07%로 낮아지다가 8월 9일 28.3%로 증가한 후에는 다시 0.47~1.56%의 비율로 낮아졌다. 전기간 동안 총균수에 대한 비브리오균수의 비율은 평균 7.5%를 보였다.

Pond 2의 경우, 7월 20일 18%로 pond 1에 비해 다소 높았으며, 7월 27일에는 19.75%, 8월 3일에는 70.52%로 급증하였다. 이후에는 8.1~43.9%의 비율을 보였으며 전 기간동안 평균 24.64%를 보였다. 전 기간동안 평균 비브리오균수의 비율은 pond 2는 pond 1에 비하여 약 15 배 이상 높게 나타났다.



Table 4-4. Comparison of total number of bacteria and *Vibrio* in ponds 1 and 2  
(unit :  $\times 10^3$ )

Date	No. of total bacteria			No. of total <i>Vibrio</i>		
	Pond 1	Pond 2	ratio of pond 1 /pond 2	Pond 1	Pond 2	ratio of pond 1 /pond 2
7/20	25.1	14.3	1.76	2.95	2.57	1.15
7/27	44.76	31.9	1.40	3.26	6.3	0.52
8/3	45.74	7.7	5.94	0.95	5.43	0.17
8/9	36.5	35.9	1.02	10.3	2.9	3.55
8/17	56.38	8.6	13.7	0.57	3.78	0.15
8/24	142.25	10.38	5.13	0.67	1.33	0.50
8/31	57.77	11.24	3.40	0.9	2.77	0.32
Mean	58.36	17.15	3.40	2.80	3.58	0.78

Table 4-5. Rate of total *Vibrio* number to total bacterial number in ponds 1 and 2  
(unit :  $\times 10^3$ )

Date	Pond 1	Pond 2
7/20	11.8	18.0
7/27	7.28	19.75
8/3	2.07	70.52
8/9	28.3	8.1
8/17	1.01	43.9
8/24	0.47	12.28
8/31	1.56	24.64
Mean	7.50	28.17

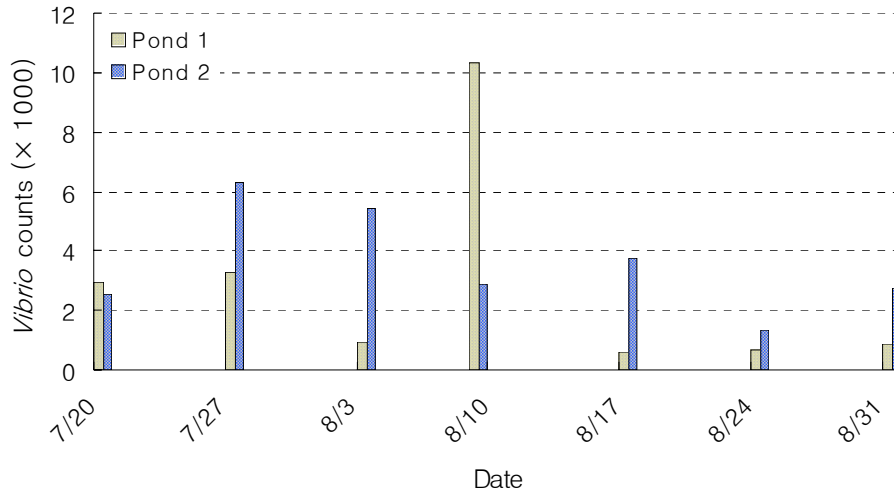


Fig. 4-45. Changes of total *Vibrio* number in ponds 1 and 2

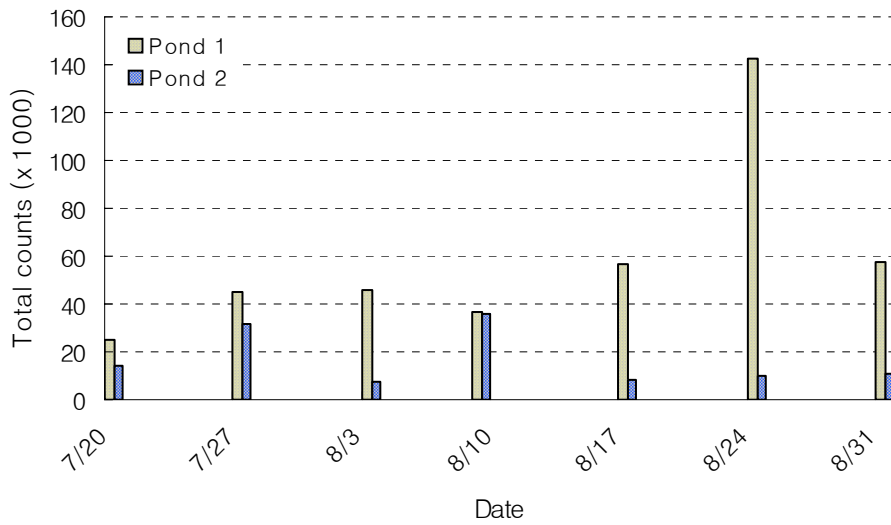


Fig. 4-46. Changes of total bacterial number in ponds 1 and 2

다. 새우의 질병감염을 변화

(1) 기생충성 질병 조사

양식기간 중 pond 1과 2의 새우의 아가미 기생충 및 갑각의 흰반점무늬 조사 결과는 (Table 4-6)에 나타나있다. 조사기간 중 새우의 아가미로부터 filamentous bacteria, short

rod-shaped bacteria, diatoms 및 algae는 발견되지 않았다. 아가미 세사 (gill lamellae)의 melanization은 양 사육지에서 7월 말부터 8월초에 걸쳐 발견되었다. Pond 1과 2에서 모두 7월 27일 gill의 melanization은 감염강도 2.0, 감염빈도 100%로 나타났으며, 8월 3일에는 pond 2의 새우에서만 빈도 80%, 감염강도 1.4로 나타났다. 이후에는 melanization 개체는 발견되지 않았다. Melanization의 평균 감염강도와 빈도는 pond 1과 2가 각각 0.28 (14.2%), 0.48 (25.7%)로서 pond 2가 pond 1에 비해 약간 높게 나타났다.

Stalked protozoans는 주로 고착성 섬모충류인 *Zoothamnium* sp.로서 우리나라 새우양식장에서는 7월에 많이 발생한다. Pond 1의 경우 7월 27일 감염강도 0.8, 감염빈도 40%였으며, pond 2에서는 감염강도 1.4, 빈도 100%로서 pond 2의 새우에 훨씬 많은 섬모충류가 감염된 것으로 조사되었다. 8월 3일에는 pond 2의 새우에서만 강도 0.6, 빈도 60%의 비율로 검출되었다. 섬모충류의 평균 강도와 빈도는 pond 1이 0.11, 5.7%, pond 2가 0.28, 22.9%로서 pond 2의 새우가 pond 1에 비해 2배 이상의 강도로 나타났다. 아가미에 부착하는 섬모충류는 사육수 수질의 간접적인 지표로 이용될 수도 있으며, 새우의 활력이나 성장이 좋지 않을 경우에 주로 발생하기도 한다. 새우가 활력이 양호하거나 성장이 좋아 탈피를 정상적으로 하게 되면 아가미의 섬모충류는 탈피각과 함께 탈락된다.

Detritus는 새우의 아가미활동이 활발하지 못하면 발생할 수도 있지만 주로 새우의 샘플링 과정에서 발생하는 것으로 pond 2에서 발견된 detritus는 후자에 속하는 것으로 판단된다.

Table 4-6. Changes of parasitic infection rate on shrimp gills in ponds 1 and 2

Date	Ponds	Filamentous bacteria	Short rod-shaped bacteria	Melanined lesions	Stalked protozoans	Diatoms /Algae	Detritus
Jun. 29	Pond 1	-	-	-	-	-	-
	Pond 2	-	-	-	-	-	-
Jul. 27	Pond 1	-	-	2.0 (100)	0.8 (40)	-	-
	Pond 2	-	-	2.0 (100)	1.4 (100)	-	-
Aug. 3	Pond 1	-	-	-	-	-	-
	Pond 2	-	-	1.4 (80)	0.6 (60)	-	-
Aug. 9	Pond 1	-	-	-	-	-	-
	Pond 2	-	-	-	-	-	0.6 (40)
Aug. 17	Pond 1	-	-	-	-	-	-
	Pond 2	-	-	-	-	-	-
Aug. 24	Pond 1	-	-	-	-	-	-
	Pond 2	-	-	-	-	-	-
Aug. 31	Pond 1	-	-	-	-	-	-
	Pond 2	-	-	-	-	-	0.4 (40)
Mean	Pond 1	0	0	0.28 (14.2)	0.11 (5.7)	0	0
	Pond 2	0	0	0.48 (25.7)	0.28 (22.9)	0	0.09 (11.4)

※ 아가미의 감염강도 : 0, 없음; 1, 1=20%, 2=21-40%; 3=41-60%; 4=61-80%; 5=81-100%; ( )는 발견된 개체수의 %



Fig. 4-47. Stalked protozoans (*Zoothamnium* sp.) attached on gill lamellae of shrimp (X100)

(2) 바이러스성 질병 조사

(가) 현미경에 의한 갑각의 흰반점무늬 조사 결과

갑각의 흰반점무늬는 흰반점바이러스 (WSSV) 감염여부를 판단할 수 있는 간접적인 지표로 사용할 수 있다. 6월 29일 조사된 pond 1과 2의 새우에서는 모든 개체들이 흰반점무늬를 가지고 있었으며, 감염강도는 각각 1.8, 2.0을 나타내었다. 7월 27일 조사된 개체들도 60~80%의 새우가 흰반점무늬를 형성하고 있었으며, 감염강도는 6월에 비하여 다소 떨어진 0.8과 1.4를 나타내었다. 8월에는 5회 조사되었으며, 발견 강도와 빈도는 pond 1에서 0~0.2, 0~60%, pond 2에서는 0.2~1.0, 20~100% 범위로 나타났다. 조사된 전 기간동안 흰반점무늬의 평균 강도는 pond 1과 2에서 각각 0.5, 0.82로서 pond 2가 pond 1에 비해 64% 높게 나타났으며, 평균 빈도는 각각 42.8%, 57.1%로서 pond 2가 33.4% 높게 나타났다.

Table 4-7. Changes of parasitic infection rate on gills and white spot occurrence rate on carapace in ponds 1 and 2

Date	Pond 1		Pond 2	
	강도	검출빈도 (%)	강도	검출빈도 (%)
Jun. 29	1.8	100	2.0	100
Jul. 27	0.8	80	1.4	60
Aug. 3	0.6	60	1.0	100
Aug. 9	0.2	20	0.6	60
Aug. 13	0.2	20	0.2	20
Aug. 24	0.2	20	0.4	40
Aug. 31	0	0	0.2	30
Mean	0.5	42.8	0.82	57.1

※ 갑각의 흰반점무늬 검출 강도 : 1~3(3단계 구분), +~+++; ( )는 흰반점무늬가 발견된 개체수의 백분율

(나) PCR에 의한 바이러스 감염을 비교

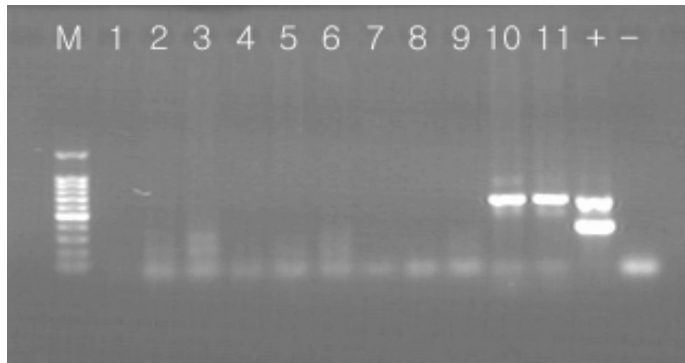
PCR (polymerase chain reaction)에 의해 조사된 HPV, WSSV, IHHNV 바이러스의 감염율은 (Table 8)에 나타나 있다.

HPV (간췌장바이러스)와 IHHNV (감염성조혈조직괴사바이러스)는 pond 1과 2의 새우에서 전혀 검출되지 않았다. HPV는 현재까지 자연산 흰다리새우에서는 발견된 경우가 없으며, 양식산에서도 발견되지 않았다. IHHNV는 흰다리새우에 감염되고 대량 폐사를 유발시키는 대표적인 바이러스로서 우리나라에서도 드물게 감염된 것으로 알려져 있지만, 본 시험양식장의 새우에서는 전혀 검출되지 않았다.

WSSV (흰반점바이러스)는 입식시 조사된 postlarva에서 100% 검출되었다. 7월 27일에 조사된 pond 1의 새우는 80%가 검출되었으며, pond 2에서는 100%로서 거의 대부분의 새우가 WSSV에 감염된 것으로 조사되었다. 8월 17일 조사된 pond 1과 2의 새우는 각각 77.8%, 88.9%의 새우가 감염된 것으로 나타났다.

Table 4-8. Changes of viral infection rate in ponds 1 and 2

Date	Pond 1			Pond 2		
	HPV	WSSV	IHHNV	HPV	WSSV	IHHNV
Jun. 12	0/5 (0%)	5/5 (100%)	ND	0/5 (0%)	5/5 (100%)	ND
Jul. 27	0/5 (0%)	4/5 (80%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	5/5 (100%)	0/5 (0%)
Aug. 17	0/8 (0%)	7/9 (77.8%)	0/8 (0%)	0/9 (0%)	8/9 (88.9%)	0/9 (0%)
Mean	0%	85.9%	0%	0%	96.3%	0%

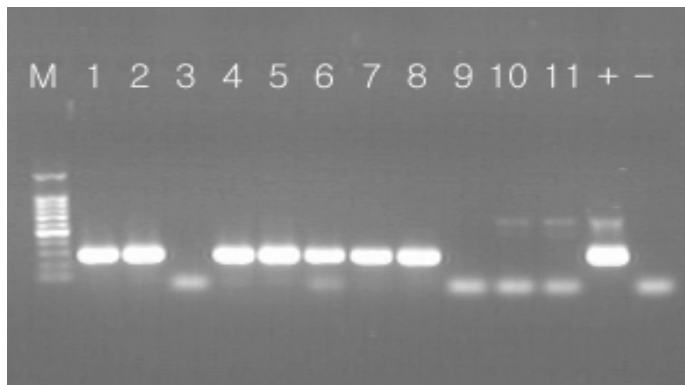


<- HPV (592bp)

<- WSSV (365bp)

Fig. 4-48. Electrophoresis photograph of the 1st duplex PCR product detecting for HPV and WSSV

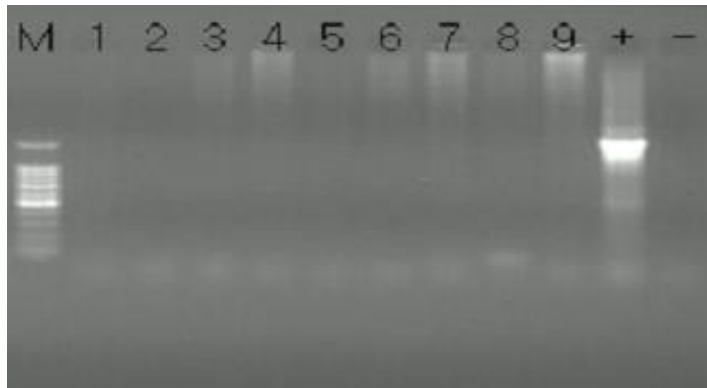
\* M = Marker (100bp DNA Ladder), numbers = samples; +, positive control; -, negative control



<- WSSV (324bp)

Fig. 4-49. Electrophoresis photograph of the 2nd PCR product detecting WSSV

\* M = Marker (100bp DNA Ladder), numbers = samples; +, positive control; -, negative control



<- IHHNV (1.6kb)

Fig. 4-50. Electrophoresis photograph of PCR product detecting IHHNV

※ M = Marker (100bp DNA Ladder), numbers = samples; +, positive control; -, negative control



Fig. 4-51. White spot on carapace





Fig. 4-52. Microscopic photo of white spots on carapace (X100)

#### 라. 새우의 생산성 및 성장률 비교

##### (1) 새우의 성장률 조사

Pond 1과 2의 새우의 성장률 (체중, 체장)은 (Table 4-9, 4-10)에 나타나 있다. 체장의 경우, pond 1과 2의 새우는 전기간 동안 비슷한 경향을 보여주었다. 최종 조사된 8월 31일, pond 1과 2의 평균 체장은 각각 121.6, 118 mm로서 pond 1이 pond 2에 비해 약 3.6 mm 큰 것으로 나타났다.

체중의 경우, 7월 27일까지는 pond 1과 2에서 큰 차이 없이 비슷한 성장을 보였으나, 8월 3일에는 각각 6.6 g, 5.05 g으로 pond 1이 높은 성장률을 보여주었다. 이러한 성장률 차이는 8월 3일 이후 계속 유지되어 마지막 조사된 8월 31일에는 pond 1과 2에서 각각 14.06 g, 13.14 g으로 pond 1이 pond 2에 비해 0.92 g 높게 나타났다.

Table 4-9. Changes of total body length of shrimp in ponds 1 and 2 (unit : mm)

Date	Pond 1				Pond 2			
	Min	Max	Mean	SD	Min	Max	Mean	SD
6/29	-	-	-	-	20.84	22.66	14.93	1.29
7/6	24.65	48.71	35.77	0.21	21.54	38.71	26.64	6.54
7/13	34.44	61.01	47.42	8.06	50.1	68.25	52.75	6.78
7/20	58.43	74.21	61.38	4.68	66.7	73.2	67.4	5.69
7/27	73.86	85.83	81.04	4.68	73.49	83.93	79.09	4.18
8/3	74.33	99.61	93.19	10.82	79.02	93.96	86.51	6.22
8/9	83.87	113.76	101.47	8.98	86.9	101.13	95.30	4.8
8/17	85.8	123.91	111.9	12.39	100.69	115.98	109.47	11.44
8/24	87.11	124.71	113.1	15.03	109.24	128.4	110.29	4.83
8/31	91.23	132.9	118.3	12.00	102.71	123.34	114.57	7.01
9/7	105.87	135.2	121.6	9.63	93.81	126.18	118	5.39
9/14	105.37	140.78	128.03	9.31	103.95	130.69	117.74	6.09

Table 4-10. Changes of body weight of shrimp in ponds 1 and 2 (unit : g)

Date	Pond 1				Pond 2			
	Min	Max	Mean	SD	Min	Max	Mean	SD
6/29	-	-	-	-	0.06	0.08	0.058	0.012
7/6	0.93	0.82	0.443	0.21	0.09	0.42	0.237	0.13
7/13	0.35	1.81	1.185	0.43	1.02	2.45	1.54	0.54
7/20	1.24	3.69	3.14	0.37	2.27	4.23	3.08	0.24
7/27	3.28	5.15	4.46	0.73	3.33	5.36	4.08	0.62
8/3	3.16	7.93	6.0	1.79	3.64	6.68	5.05	1.19
8/9	4.1	11.3	7.97	2.17	5.19	7.16	6.54	0.94
8/17	5.26	15.24	11.14	3.93	7.77	11.58	10.19	1.23
8/24	5.4	17.26	11.86	3.77	10.61	16.28	10.83	2.95
8/31	6.39	18.78	12.88	3.69	7.65	13.8	11.90	1.86
9/7	9.52	19.48	14.06	3.16	6.32	14.42	13.14	1.8
9/14	13.1	23.2	17.26	2.81	7.62	22.01	16.37	3.61

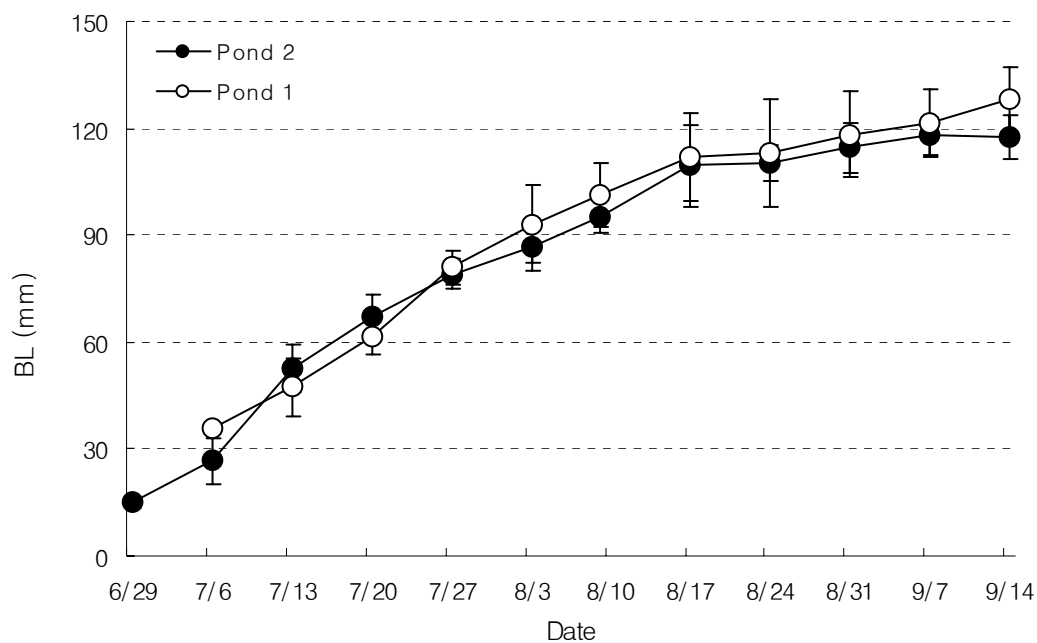


Fig. 4-53. Changes of total body length of shrimp in ponds 1 and 2

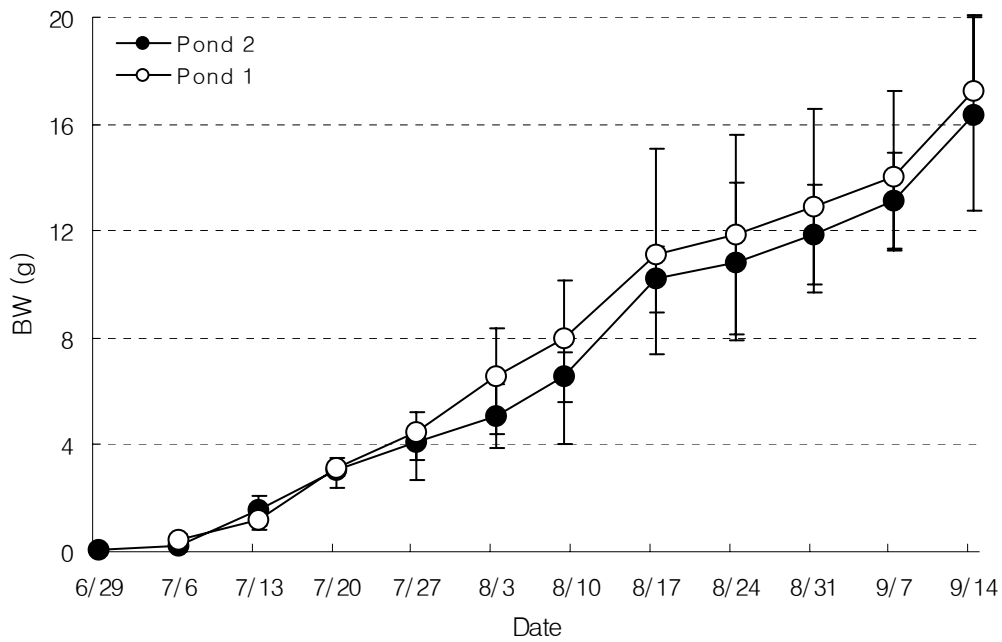


Fig. 4-54. Changes of body weight of shrimp in ponds 1 and 2

(2) 새우의 생산성 및 생존율

Probiotics 처리후 당밀을 지속적으로 공급하여 타가영양상태를 유지한 사육지 (pond 1)은 대조구 (pond 2)에 비해서 새우의 평균체중, 생산량 및 생존율이 모두 높게 나타났다. 94일 사육후 수확 시 새우의 평균체중은 pond 1이 17.26 g으로 pond 2의 16.37 g에 비해 0.89 g 크게 나타났다 (Table 4-11). 단위면적당 생산량은 pond 1이 0.26 kg/m<sup>2</sup> 으로 pond 2에 비해 15.8% 높았으며, 최종 생존율도 pond 1이 57.2%로서 pond 2의 48.7%에 비해 8.5%가 높았다. 결과적으로 타가영양상태를 유지함으로써 유익세균을 충분히 활성화시키고 따라서 사육수의 수질 (특히 질소화합물)을 개선시킴으로써 새우의 성장과 생존에 좋은 결과를 가져오는 것으로 판단된다.

Table 4-11. Production and survival rate of shrimp in ponds 1 and 2

	면적 (m <sup>2</sup> )	입식량 (PL)	입식밀도 (PL/m <sup>2</sup> )	수확평균 체중(g)	생산량 (kg)	단위생산량 (kg/m <sup>2</sup> )	생존율 (%)	양성기간 (day)
Pond 1	11,200	300,000	26.8	17.26	2,960	0.264	57.2	94
Pond 2	10,500	300,000	28.6	16.37	2,390	0.228	48.7	94

※ Stocking on Jun. 12, 2005; harvest on Sep. 14, 2005

## 제 5 장 목표달성도 및 기대효과

### 제 1 절 연도별 연구개발 목표 및 달성도

#### 1. 연구개발 목표의 달성도

제 1 세부과제인 새우양식장 수중 및 저서 생태 및 환경 모니터링에 관한 연구는 태안에 소재하는 순천향대학교 해양수산연구소 새우양식장과 경기도 강화에 소재하는 새우양식장에서 각각 양식장 생물상조사와 환경요인 대한 조사하였으며, 분석 자료는 결과에 기술하였다. 특히 2차 년도에는 새우양식장에 서식하는 곤쟁이 에 대한 종합적인 연구를 통하여 새우양식장의 동식물 플랑크톤 및 그 외 서식하는 생물들의 생활사를 파악하여 새우양식장의 환경모니터링 분석에 도움이 되었다. 3차 년도에는 최근에 시험양식을 실시하고 있는 흰다리새우 양식장에서 기초적인 생태 및 환경조사도 시행하였다.

제 2세부과제인 probiotant에 대한 현장 실험과 미소 생태계 실험은 1차년도와 2차년도에 걸쳐 실시하여 그 결과를 분석하여 제시하였다. 순천향대학교 미생물 연구실에서 분석된 내용과 서해수산연구소에서 분석된 결과를 나열하였는데 특히 특허 출원 중인 probiotant는 실험 결과 타 제품에 비해 탁월한 성능을 보였으며, probiotant의 현장실험에서도 우수한 결과를 보였다.

제 3세부과제인 면역기능조사 및 질병억제 활성 실험은 그 결과를 도출하였으며 새우양식장 유용 및 유해세균 검색에 관한 연구는 전국 주요 새우양식장의 수서세균에 대한 분리 동정 및 검색을 실시하여 그 중 최적의 활성을 보이는 균주를 검색하여 활성도를 분석하였다.

#### 2. 상기 평가의 착안점에 따른 달성도에 대한 자체평가

새우양식장 생태계 모니터링 (100%) : 새우양식장 환경 및 생태계에 대한 연구는 1차와 2차에 걸쳐 태안양식장과 강화양식장에서 현장조사와 실험실 분석을 실시하였으며, 특히 3차년도에는 최근 많은 관심을 보이고 있는 흰다리 새우양식장에 대한 기초적인 조사도 실시하였다.

새우양식장 유익세균 현장실험과 미소생태계 실험 (100%) : 새우양식장 미소 생태계에 대한 연구는 강화 양식장과 태안양식장에서 실시하였으며, 수서세균의 종조성과 분포에 대한 결과도 도출하였다. 특히 개발된 Probiotant를 이용한 실험은 마무리 단계로 그 결과를 기술 하였다.

새우양식장 미생물의 면역기능조사 및 질병억제 활성 실험 (100%) : 새우양식장 유용 및 유해 세균에 대한 연구와 함께 진행되고 있는 최적 미생물의 면역기능조사와 질병억제 활성 실험은 태안 소재 새우 양식장에서 분리한 균에 대해 연구하였으며 그 결과를 기술하였다.

3. 계획대비 진도표

구분 개발내용	연구 개발 기간 (1차년도 월차별)												진도 (%)	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
● 새우양식장 수중 및 저서 생태 및 환경 모니터링														100
- 새우양식장 생물상 조사														
- 새우양식장 환경요인 조사														100
● 새우양식장 미소 생태계 분석														
- 수서세균의 종류와 분포														100
- 총세균수 변화														
● 새우양식장 유용 및 유해 세균 검색														100
- 세균의 동정 및 분리														
- 세균의 형태학적 및 생리학적 특징														100
총진도율	5	10	15	20	30	40	50	60	70	80	90	100		

개발내용	구분	연구 개발 기간 (2차년도 월차별)												진도 (%)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
● 새우양식장 환경 및 생물상 모니터링														100
	- 새우양식장 환경 조사													
	- 새우양식장 생물상 조사													100
● 기존 probiotics의 현장 실험														
	- 새우양식장 수질환경 조사													100
	- 새우양식장 질병 감염실태 조사													
● 인공 미소생태계 실험 (microcosm)														100
	- Probiotics에 의한 수질 변화 분석													
	- 유익세균에 의한 새우양식장 수질개선 효과 조사													100
● 면역기능조사 및 질병억제 활성 최적화														
	- 미생물에 의한 새우양식장 환경정화													100
	- 새우양식장에서 분리된 세균의 유용성 탐색													
	- 새우양식장에서 양식사료에 의한 오염환경의 미생물학적 제거													100
총진도율		5	10	15	20	30	40	50	60	70	80	90	100	

구분 개발내용	연구 개발 기간 (3차년도 월차별)												진도 (%)	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
<ul style="list-style-type: none"> <li>● Probiotant활성 안정화 및 양식장 응용               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 시험양식장 수질의 안정화</li> <li>- 시험 양식장 환경 연속조사</li> </ul> </li> <li>● Probiotant 대량 생산 기술 확립               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 대량 배양 기술개발</li> <li>- Probiotant의 활성도 분석</li> <li>- Probiotant의 대량 생산 기반 구축 및 시제품 생산</li> </ul> </li> <li>● 질병 억제 및 생산성 향상               <ul style="list-style-type: none"> <li>-Probiotant 사용 양식장 새우 질병 억제 효과 분석</li> <li>- 새우 양식장 새우의 생산성 향상 모델링 개발</li> <li>- 개발된 Probiotant와 기존 Probiotant의 성능 및 경제성 비교</li> </ul> </li> </ul>													100	
														100
														100
														100
														100
														100
														100
														100
														100
														100
														100
	<b>총진도율</b>	5	10	15	20	30	40	50	60	70	80	90	100	



## 제 2 절 기대효과

1. probiotics 처리로 새우 질병제어에 의한 양식 생산량 증대
  - 가. probiotant의 자체 생산기술 개발로 외화 대체 효과.
  - 나. 특허 출원으로 바이오 산업의 기반 조성.
  - 다. probiotics 처리로 새우양식장 수질개선 및 질병억제에 의한 대량폐사 억제.
  - 라. probiotics 적용에 의한 양식생산성 회복으로 양식어가 소득 증대.
  - 마. Probiotics 국산화로 수입산 대체효과 및 해외수출 기대.
  
2. 기술적 측면
  - 가. probiotics에 대한 기술개발 방법확립은 해양생물공학에 대한 기초기술.
  - 나. 새우양성장의 생태계 분석은 새우 양식 생산성 향상을 위한 유용한 자료.
  - 다. 새우질병에 대한 면역체계연구로 질병억제 기작을 밝힐 수 있는 기초연구.
  
3. 경제 · 산업적 측면
  - 가. 개발된 probiotics의 상품화로 서해안의 새우 양식산업 활성화.
  - 나. 새우질병 통제로 양식 새우의 생산력 및 어민소득 증대.

## 제 6 장 연구개발 결과의 활용계획

### 제 1 절 활용방안

1. 새우양식의 생산성 향상을 위한 질병 억제 제재로 사용함으로써 양식 어민들의 애로사항을 해결.
2. 선발된 균주와 활성화 기법 등에 특허 출원으로 bio 산업으로 이전 및개발된 기술은 어류 양식장에서의 probiotics 개발의 기초자료로 활용.
3. 구축된 probiotics 개발 방법은 기업에 기술이전을 통하여 상업화.

### 제 2 절 연구성과 활용

1. 산업재산권 (특허, 실용신안, 의장, 프로그램 등)

구 분	기 술 명 칭	출원(공고, 등록) 번호	출원 (공고, 등록) 일자	발명자 (출원인)	출원국	비 고
특허	수중의 질소, 인,또는 질소와 인을 동시 제거하는 능력을 가진 바실러스 속 균주 CK-10 및 CK-13과 이를 이용한 질소 및 인의 제거 방법	2005-58025	2005. 06. 30	오계현, 마채우	대한민국	

2. 논문게재 실적

제 목	발표자	학술지명	통권, 호	년, 월	발행기관
해양에서 분리한 <i>Lactobacillus</i> sp. JK-8에 의한 질병원인 세균의 살균효과	천재우, 마채우, 오계현	순천향 자연과학연구	10권 2호	2004년 12월	순천향대학교
새우양식장에서 분리한 <i>Lactobacillus</i> sp. JK-8의 생리학적 특성	천재우, 마채우, 오계현	한국미생물학회지	41권 1호	2005년 3월	한국미생물학회
새우 양식장에서 분리한 <i>Bacillus</i> sp. CK-10과 <i>Bacillus</i> sp. CK-13에 의한 질소와 인의 제거	천재우, 마채우, 이상현, 오계현	한국미생물공학회지	33권 2호	2005년 5월	한국미생물공학회
새우 양식장에서 분리한 해양세균 <i>Bacillus</i> sp. CK-10과 <i>Bacillus</i> sp. CK-13에 의한 양식 사료에 포함된 질소와 인의 제거	천재우, 마채우, 강형일, 오계현	한국생물공학회지	20권 2호	2005년 4월	한국생물공학회
대하 ( <i>Fenneropenaeus chinensis</i> )양식장 사육수에 미치는 Probiotics의 효과	장인권, 한현섭, 임현정	한국수산학회지	37권 2호	2004년	한국수산학회지
새우양식 질병관리 및 수질관리-저서	장인권, 한현섭	국립수산과학원	40p	2003년 7월	서해수산연구소
새우양식 질병관리 및 수질관리 (개정판)-저서	장인권, 한현섭	국립수산과학원	40p	2004년 7월	서해수산연구소

### 3. 학술회의 발표실적

제 목	발표자	학술회의명	발표년 월일	발행기관
Environmental factors affecting on shrimp cultivation and bacterial examination in shrimp aquaculture	Jae-Woo Chun, Chae-Woo Ma, and Kye-Heon Oh	Proceedings of 2003 International Meeting of the Federation of Korean Microbiological Societies	2003년 10월	Korean Microbiological Society
Antibacterial activity and N-compound removal for <i>Lactobacillus</i> sp. JK-8 for use as a probiotic bacterium	Jae-Woo Chun, Eun-Mi Ho, Chae-Woo Ma, and Kye-Heon Oh	Proceedings of 2004 International Meeting of the Microbiological Society of Korea	2004년 5월	Korean Microbiological Society
Simultaneous removal of nitrogen and phosphorus as aquatic contaminant by marine bacteria isolated from shrimp aquaculture ponds	C. W. Ma, J. W. Chun, and K. H. Oh	Proceeding of The Sixth Japan-Korea, Korea- Japan joint Symposium on Aquaculture	2004년 9월	Japanese Society for Aquaculture Research
Bacteriocidal effect and removal of N-compound of <i>Lactobacillus</i> sp. JK-8 for use as a probiotic bacterium	K. H. Oh, J. W. Chun, and C. W. Ma	Proceeding of The Sixth Japan-Korea, Korea- Japan joint Symposium on Aquaculture	2004년 9월	Japanese Society for Aquaculture Research
Elimination Nitrogens and Phosphorus by Co-cultures, <i>Bacillus</i> sp. CK-10 and <i>Rhodococcus</i> sp. CK-13 Isolated from Marine Environment	Jae-Woo Chun, Chae-Woo Ma, Hyung-Teel Kahng and Kye-Heon Oh	Proceedings of 2004 International Meeting of the Federation of Korean Microbiological Societies	2004년 10월	Korean Microbiological Society
Comparison of Bactericidal Agents of <i>Lactobacillus</i> spp. JK-8 and JK-11 against Pathogenic Bacteria	Jae-Woo Chun, Chae-Woo Ma, and Kye-Heon Oh	Proceedings of 2004 International Meeting of the Federation of Korean Microbiological Societies	2004년 10월	Korean Microbiological Society

3. 학술회의 발표실적 (계속)

제 목	발표자	학술회의명	발표년 월일	발행기관
Bacteriocidal activity of <i>Lactobacillus</i> sp. JK-11 against Pathogenic bacteria	Kye-Heon Oh, Jae-Woo Chun, and Chae-Woo Ma	Proceedings of 2004 International Meeting of the Microbiological Society of Korea	2005년 5월	Korean Microbiological Society
Microbial clean-up of contaminated sea water in bench-top scale Cistern: Removal of Nitrogens and Phosphorus	Jae-Woo Chun, Chae-Woo Ma, Hyung-Teel Kahng and Kye-Heon Oh	Proceedings of 2004 International Meeting of the Microbiological Society of Korea	2005년 5월	Korean Microbiological Society
대하 새우양식장에 서식하는 곤쟁이 ( <i>Neomysis japonica</i> )의 개체군 역학과 성성숙	임성도, 마채우, 오철웅, 김종춘	2004년 수산관련 공동학술대회	2004년 5월	한국수산학회
Probiotics에 의한 새우양식장의 수질개선 효과	장인권, 마채우, 오계현	2004년 추계 한국양식학회	2004년 10월	한국양식학회
대하의 생존과 성장에 미치는 probiotic bacterium의 효과	장인권, 마채우, 오계현	2004년 추계 한국양식학회	2004년 10월	한국양식학회
새우양식 문제점 및 신기술	장인권	새우양식생산성향상을 위한 미니심포지엄	2004년 2월	국립수산과학원
새우양식장 수질관리	장인권	새우양식장 수질관리를 위한 심포지엄	2004년 3월	국립수산과학원
흰다리새우의 양식과 전망	장인권	갑각류양식생산성향상을 위한 심포지엄	2004년 12월	국립수산과학원
Heterotrophic shrimp culture technologies	In-Keon Jang and T. Samochoa	he 1st Korea-U.S. Seminar and Workshop on the sustainable marine shrimp culture	2005년 8월	국립수산과학원

4. 기타 활용실적 (어업인 기술교육 발표)

일 시	명 칭	발표제목	주관	장 소
2002. 11. 12	어업인 현지 교육	새우양식 및 질병관리	국립수산과학원	인천
2002. 11. 14	어업인 현지 교육	새우양식 및 질병관리	국립수산과학원	목포
2003. 3. 29	해면양식과정교육	갑각류 (새우) 양식	국립수산과학원	부산
2003. 6. 24	원격수산기술교육	새우양식 바이러스질병 및 환경관리	국립수산과학원	부산
2003. 7. 22	원격수산기술교육	새우양식현황 및 선진양식기술 (유익세균)	국립수산과학원	부산
2003. 11. 12	새우양식 어업인교육	바이러스질병대책 및 신기술	국립수산과학원	인천
2003. 11. 14	새우양식 어업인교육	바이러스질병대책 및 신기술	국립수산과학원	태안
2003. 11. 16	새우양식 어업인교육	바이러스질병대책 및 신기술	국립수산과학원	목포
2004. 5. 4	원격수산기술교육	새우양식최신기술정보	국립수산과학원	인천
2004. 12. 3	대하양식 연찬회	새우양식 생산성 향상 방안	목포지방해양수산청	목포
2004. 12. 7	원격수산기술교육	새우순환여과양식기술	본원 연수부	부산
2004. 12. 10	갑각류양식생산성향상을 위한 심포지엄	흰다리새우의 양식과 전망	서해수산연구소	태안
2005. 4. 15	해면양식과정 교육	갑각류 (새우)양식	본원 연수부	부산

### 제 3 절 활용계획

핵심기술 (연구내용)	활 용 계 획 (활용시기, 활용방법 등을 요약하여 기재)
한국산유익세균제재 개발	현재 국내 특허 출원이며, 관심 있는 기업에 기술이전 (2006년 이후)
유익세균의 현장실험 및 생산성조사	국내에서 처음으로 실시하였으며, 일부 내용은 발표 및 논문으로 투고하였으며, 일부 결과는 어민들에게 자료 제공 (2006년 이후)
대하새우양식장 미소생태 조사	국내 처음이며 현재 논문발표 및 투고 준비 중임 (2006년)
유익세균의 양식장 새우질병억제효과	2004년 이후 논문과 양식 기술지에 발표 하였으며 양식어민들에게 도움이 되었으리라 판단됨

## 제 7 장 참고문헌

- Aminot, A., D. S. Kirkwood and R. Kerouel. 1997. Determination of ammonia in seawater by the indophenol-blue method: evaluation of the ICES NUTS I/C 5 questionnaire. *Marine Chemistry* 56, 59-75.
- Benson, H. J. 1998. *Microbiological applications*. McGraw-Hill Companies, Inc. USA, P. 155-163.
- Campbell, A., 1985. Application of a yield and egg-per-recruit model to the lobster fishery in the Bay of Fundy. *North American Journal of Fisheries Management*, 5, 91-104.
- Chen. J. C., 1990. Lethal effects of ammonia and nitrite on *Penaeus chinensis* juveniles. *Mar. Biol.*, 107, 427-431.
- Chen. J. C. and C. Y. Lin, 1991. Lethal effects of ammonia and nitrite on *Penaeus penicillatus* juveniles at two salinity levels. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100C, 477-482.
- Chen. J. C. and Y. Z. Kou, 1992. Effects of ammonia on growth and molting of *Penaeus japonicus* juveniles. *Aquacult.*, 104, 249-260.
- Chung, W. B., W. S. Soe, J. Y. Cha, and Y. S. Cho. 2003. Isolation and Characterization of *Lactobacillus* sp. FF-3 for probiotics production from korean Dongchimi. *Kor. J. Food Preser.* 10, 406-410.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66, 365-371.
- Gatesoupe, F. J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 180, 147-165.
- Ger B., R. Severijnen, and H. Timmerman, 2005. Effect of antibiotics, prebiotics and probiotics in treatment for hepatic encephalopathy. *Medical Hypotheses*, 64, 64-68.
- Hirayama, K. and J. Rafter. 2000. The role of probiotic bacteria in cancer prevention. *Microbes and Infection* 2, 681-686.
- Jeffrey, S. W. 1976. Occurrence of chlorophyll C1 and C2 in algae. *J. Phycol.*, 12(3), 349-54.
- Kaur, I. P., K. Chopra, and A. Saini. 2002. Probiotics: potential pharmaceutical applications. *Eur. J. Pharma. Sci.* 15, 1-9.

- Kim, W. J., S. S. Hong, and S. K. Cha. 1994 Selection of human-originated *Lactobacillus acidophilus* for production of probiotics. *J. Microbiol. Biotechnol.* 4, 151-154.
- Kozasa, M. 1986. Toyocerin (*Bacillus toyoi*) as growth promoter for animal feeding. *Microbiologie-Aliments-Nutrition* 4, 121-135.
- Lehre R. I., R. Micheal, S. S. Sylvia, L. Harwig, J. Richard and E. Patricia. 1991. Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. *J. Immunol. Meth.* 137, 167-173,
- Liao, I. C. and Y. H. Chien, 1990. Evaluation and comparison of the culture practices for *Penaeus orientalis*, *Penaeus japonicus*, *Penaeus penicillatus* in Taiwan. In K. L. Main and W. Fulks, *The Cult of Cold-Tolerant Shrimp: Proceedings of an Asian-U.S. Workshop on Shrimp Culture*. The Oceanic Institute, Hawaii, U.S.A. pp. 49-63.
- Lim, H. J., J. H. Park, and I. K. Jang .2004. Effect of probiotics on water quality in the shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) ponds. *J. Kor. Fish. Sci.* 37, 91-97.
- Ma, C. W., S. Y. Hong and S. G. Jo, 2002. Marsupial Development and Molt Cycle of *Archaeomysis kokuboi* (Crustacea: Mysidacea). *J. Fish. Sci. Tech.* 5(4), 271-280.
- Margalef, R., 1958. Information theory in ecology. *Gen. Syst*, 3, 36-71.
- McNaughton, S. J. 1968. Relationship among functional properites of California grassland. *Nature*, 216, 168-169.
- Pai, S. C., Y. J. Tsau, and T. I. Yang. 2001. pH and buffering capacity problems involved in the determination of ammonia in saline water using the indophenol blue spectrophotometric method. *Anal. Chim. Acta.* 434, 209-216.
- Pauly, D. and G. Gaschütz, 1979. A simple method for fitting oscillating length growth data, with a program for pocket calculators. *ICES C.M./G:* 24, 1-26.
- Pauly, D., J. Ingles and R. Neal, 1984. Application to shrimp stocks of objective methods for the estimation of growth, mortality and recruitment-related parameters from length-frequency data (ELEFAN 1and 2). In: J. A. Gulland and B. J. Rothschild eds., *Penaeid shrimp - their biology and management*. Fishing News Books, Blackwell Blackwell Scientific Publications Ltd. Oxford, 220-234.



- Pauly, D. and J. L. Munro, 1984. Once more on the comparison of growth in fish and invertebrate. *Fishbyte*, 2, 21.
- Pauly, D., 1983. Length-converted catch curves: A powerful tool for fisheries research in the tropics (Part I). *Fishbyte*, 1, 9-13.
- Pauly, D., 1984. Length-converted catch curves: A powerful tool for fisheries research in the tropics (Part II). *Fishbyte*, 2, 17-19.
- Pielou, E. C., 1966. Shannon's formula as a measure of specific diversity: its use and misuse. *Amer. Nat*, 100, 463-465.
- Pitcher, T. J. and P. D. M. MacDonald, 1973. Two models for seasonal growth in fishes. *Journal of Applied Ecology*, 10, 559-606.
- Pool-Zobel, B. L., C., Neudecker, I. Dmizlaff, S. Ji, U. Schillinger, C. Rumney, M. Moretti, I. Vilarini, R. Scassellati-Sforzolini, and I. Rowland. 1996. *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* mediated antigenotoxicity in the colon of rats. *Nutr. Cancer* 26, 365-380.
- Queiroz, J., and C. Boyd. 1998. Effects of a bacterial inoculum in channel catfish ponds. *J. World Aquacult. Soc.* 29, 67-73.
- Rhee, J. S., Y. S. Kim, Y. H. Jung, and H. J. Rhee. 1997. A study on the determination of N ( $\text{NO}_2^-$ ), N ( $\text{NO}_3^-$ ) and N ( $\text{NH}_4^+$ ) in environmental samples by flow injection analysis. *J. Kor. Chem. Sci.* 41, 256-265,
- Ringo, E. and F. J. Gatesoupe. 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture* 160, 177-203.
- Saavedra, J. M. 2001. Clinical application of probiotics agents. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 1147-1151.
- Schillinger U., and F. K. Lucke. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1901-1906.
- Shannon, C. E., & Weaver, W. 1949. *The mathematical theory of communication*. Urbana, IL: University of Illinois Press.

- Shariff, M., F. M. Yusoff, T. N. Devaraja and P. S. Srinivasa Rao. 2001. The effectiveness of a commercial microbial product in poorly prepared tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius), ponds. *Aquacul. Res.* 32, 181-187.
- Sudo, S., A. Yamada, K. Kokatsu, N. Nakamura, and T. Matsunaga. 1997. Development of a phosphate-removal system using a marine photosynthetic bacterium *Chromatium* sp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47, 78-82.
- Uemoto, H., and H. Saiki, 1996. Nitrogen removal by tubular gel containing *Nitrosomonas europaea* and *Paracoccus denitrificans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4224-4228.
- Yang, B. G., J. L. Lee, and M. S. Heo. 2003. Antibacterial activity of *Lactobacillus sakei* Bk19 against fish pathogenic bacteria. *Kor. J. Microbiol.* 39, 56-61.
- Yoon, Y. H., D. G., Kang, Y. J. Baek, and C. S. Huk. 1998. Cholesterol assimilation activity of *Lactobacillus* spp. from Kefir and Yoghurt and non starter strains. *Kor. J. Dairy Sci.* 20, 143-152.
- Zamfir, M., R. Callewaert, P. C. Cornea, and V. L. De. 2000. Production kinetics of acidophilin 801, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801. *FEMS Microbiol. Lett.* 190, 305-308.
- 해양수산부. 2000. 세우양식과 질병관리.

## 주 의

1. 이 보고서는 해양수산부에서 시행한 수산특정연구개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 해양수산부에서 시행한 수산특정연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안됩니다.