



## 저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

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

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

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

[Disclaimer](#) 

이 학 석 사 학 위 논 문

Bio-floc 시스템을 이용한 대하,  
*Fenneropenaeus chinensis*의 생산성에  
관한 연구



2015년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 명 의 학 과

김 민 수



이 학 석 사 학 위 논 문

Bio-floc 시스템을 이용한 대하,  
*Fenneropenaeus chinensis*의 생산성에  
관한 연구

지도교수 강 주 찬

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함.

2015년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 명 의 학 과

김 민 수

김민수의 이학석사 학위논문을 인준함.

2015년 2월 22일



주 심 이학박사 정 현 도 (인)

위 원 이학박사 김 도 형 (인)

위 원 이학박사 강 주 찬 (인)

# 목 차

목 차 .....	i
Abstract .....	iii
I. 서론 .....	1
II. 재료 및 방법 .....	3
1. 실험새우 및 실험환경 .....	3
2. 환경 분석 .....	4
2-1 수질 분석 .....	4
2-1-1. 용존산소 (DO)	
2-1-2. 화학적 산소 요구량 (COD)	
2-1-3. 부유 물질 (SS)	
2-1-4. 총 질소 (Total-N)	
2-1-5. 암모니아성 질소 ( $\text{NH}_4^+$ -N)	
2-1-6. 인산 인 ( $\text{PO}_4^-$ -P)	
2-2 미생물 조성 .....	6
2-2-1. Total bacterial count (TBC)	
2-2-2. <i>Lactobacillus sp.</i>	
2-2-3. <i>Bacillus sp.</i>	
2-2-4. <i>Rhodobactor sp.</i>	
3. 생산성 분석 .....	7
3-1 성장 .....	7
3-2 면역 .....	8
3-2-1. proPhenoloxidase (proPO)	
3-2-2. Lysozyme (LYS)	
3-2-3. Serine Proteinase (SP)	
3-3 생화학분석 .....	10
3-3-1. Superoxide dismutase (SOD)	
3-3-2. Catalase	
3-3-3. Glutathione (GSH)	
4. 유의성 검정 .....	11
III. 결과 .....	12

1. 환경 분석 .....	12
1-1 수질 분석 .....	12
1-1-1. 용존산소 (DO)	
1-1-2. 화학적 산소 요구량 (COD)	
1-1-3. 부유 물질 (SS)	
1-1-4. 총 질소 (Total-N)	
1-1-5. 암모니아성 질소 (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N)	
1-1-6. 인산 인 (PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> -P)	
1-2 미생물 조성 .....	19
1-2-1. Total bacterial count (TBC)	
1-2-2. <i>Lactobacillus sp.</i> count	
1-2-3. <i>Bacillus sp.</i> count	
1-2-4. <i>Rhodobactor sp.</i> count	
2. 생산성 분석 .....	24
2-1 성장률 .....	24
2-1-1 Daily weight gain	
2-1-2 Daily length gain	
2-2 면역 .....	28
2-2-1. proPhenoloxidase (proPO) gene expression	
2-2-2. Lysozyme (LYS) gene expression	
2-2-3. Serine Proteinase (SP) gene expression	
2-3 생화학분석 .....	34
2-3-1. Superoxide dismutase (SOD) activity	
2-3-2. Catalase activity	
2-3-3. Glutathione (GSH) level	
IV. 고찰 .....	40
V. 요약 .....	45
VI. 참고문헌 .....	46

Min Su Kim

Department of Fish pathology, Graduate School,  
Pukyong National University

### Abstract

Effective microorganisms have been used since before its wide range of uses. Especially, many studies have been conducted for increasing the productivity in aquaculture.

One of them, the objective of this study was to investigate the effects of 90 days exposure to bio-floc (0, 60, 80, 100, 120, 140%) that is composed of *Bacillus sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Rhodobactor sp.* on water analysis, microbial composition of shrimp tanks and growth, immune related gene expression, antioxidative response of shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. Concentration ratio 100 is 1liter bio-floc per seawater 50ton. Compared to control, Total-N,  $\text{NH}_4^+$ -N,  $\text{PO}_4^-$ -P of water were improved in 120, 140 bio-floc concentration in shrimp tank through the water analysis. I found bio-floc concentration that changed a each 3 type microorganism for 5days and 10 days. and It is decreased and bio-floc was inserted every 5 days to maintain  $10^6$  bio-floc concentration in day 5. Daily length gain and daily weight gain were significantly increased in 100, 120, 140 bio-floc concentration respectively for 90 days. proPO, LYS gene expression of immune related gene were significantly increased at 120, 140 bio-floc concentration in hepatopancreas. But no change was detected in SP gene expression of immune related gene and it was significantly increased at 140 bio-floc concentration only. SOD activity was decreased at 80, 100, 120, 140 bio-floc concentration in hepatopancreas. And catalase activity was significantly decreased at 120, 140 bio-floc concentration in hepatopancreas. GSH level was significantly decreased at 60, 80, 100, 120, 140 bio-floc concentration in hepatopancreas.

In conclusion, It is the most effective to growth, immune gene expression, antioxidative activity, water quality improvement in bio-floc 120% concentration,  $10^6$  cfu/ml of bio-floc TBC and insert bio-floc in every 5 day. Then, I think it is contributing to increase shrimps productivity.

## I. 서론

유용미생물의 사용은 폐수처리에 적용이 되었다 그 효용성이 알려지면서 동물공급 사료 등 에 이용이 되었다. 그러다 토양개발 농업에 이용한 뒤 수산업으로 퍼져 나가고 있는 실정이다. 여러 가지 보고가 있지만 그 중에 양식업에 효과가 있다는 연구 결과가 밝혀지고 있다.

유용미생물은 1970년대부터 동물사료공급에 사용되어지고 있다. 유용미생물과 사료를 혼합하여 동물의 성장을 증가시키고 질병에 대한 저항성을 높이는데 목적이 있는데 여러 나라에서 *Lactobacilli* 같은 유용미생물을 사용하여 면역 시스템에 자극을 줄 수 있다. (Fuller,1992) 이러한 유용 미생물의 이점을 사람, 돼지, 소, 양계의 영양을 위해 적용되었지만 수산양식에서 유용미생물의 사용이 상대적으로 적었다. 따라서 치어, 가재류, 굴의 성장과 생존율을 높이기 위한 여러 가지 연구들이 진행되어져 왔고 이를 적용하기 시작했다 (Ali, 2000).

유용미생물은 종류에는 다양하게 많지만 그 중에서 본 연구에 사용한 균들은 *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Rhodobactor*의 3가지 균들이다.

*Bacillus* 균의 특징은 다양한 exoenzyme을 분비하며 (Moriarty, D.J.W., 1996) 장에 존재함으로써 유해균을 차단하여 유용미생물의 선점을 통해 생존율을 증가시킨다. 또한 양식수와 새우의 소화관에서 colonize를 할 수 있고, *Vibrio*균 대신 장에 존재함으로써 생존율을 높인다 (Rengpipat et al, 1998a). 매우 다양한 antibiotic compounds를 자연적으로 생산한다. 새우의 소화관에서 lipase, protease, amylase의 활성을 증가 시키는 결과를 가져오며 (Moriarty, D.J.W., 1998) 새우에서 세포성 체액성 면역반응 둘 다 활성을 가져 병원성에 저항성을 높여 생존율을 높인다 (Rengpipat et al, 2000). 또한 granulocyte의 phagocytic 활성을 자극시켜 새우에 면역원으로서 활동한다 (tami et al, 1998). *Penaeus monodon* 에서 유용미생물인 *Bacillus* 균을 통해 성장과 생존율의 향상을 보였다는 연구 결과가 있으며 (Rengpipat et al, 1998b, Rengpipat et al, 2000) Indian white shrimp에서 *Bacillus* 균을 이용하니 소화관 내 *Bacillus* 균이 존재하여 소화효소 활성을 높이고 생존율, 성장률의 향상을 나타낸 결과가 있다 (Saeed Ziaei-Nejad et al, 2005).

*Lactobacillus* 균의 특징은 젖산균 중에 하나로서 우유 (Daly C, 1983, Stadhouders J, 1974, Stadhouders J, 1974) 나 다른 발효식품에 초기 배양체로서 오랫동안 사용되어져 왔다 (Jay J.M., 1992). 이러한 발효의 생산물들은 젖산으로서 안전한 식품보존과 향을 증진시키는 역할을 한다 (Gilliland, S.E., 1985). 이러한 *Lactobacillus*균은 돼지의 똥, 장, 위에 있는 *Escherichia coli*를 줄여주는 역할을 하며 송아지에서 *E.coli* 독소를 중화시켜준다 (Gilliland, S.E. et al, 1980). 또한 *Lactobacillus*균은 돼지에서 사료 첨가제로서 숙주 대사를 향상시키고 serum cholesterol과 amine를 줄여주는 역할을 하며 (Gilliland, S.E., Nelson, C.R. and Maxwell, C. 1985) 쥐 (Garvie, E.I. et al, 1984), 닭(Barrow, P.A. 1998, Fuller, R. et al, 1981), 돼지 (Jonsson, E. and Henningsson, S. 1991)에서 소화력을 향상시키는 hydrolytic enzyme을 생산한다. 이와 같이 수산업에 대한 좋은 사례로서 *Penaeus monodon*에서 *Lactobacillus* 균을 사료에 첨가하여 새우를 관찰하였을 때 성장률과 생존율이 크게 향상 되었으며, *Vibrio harveyi*를 challenge test하여 10일간 관찰한 결과에서는 *Lactobacillus* 균을 통한 새우의 폐사율은 0%, control구간에서는 74%의 폐사율

을 기록하였다 (Wannipa Phianphak et al, 1999).

*Rhodoabactor sp.* 균 즉, 광합성 균이라고 하는 이 균의 특징은 혐기성 조건이나 낮은 산소농도의 환경에서 성장하며 (D. White, 2000) 혐기성에서 광합성을 하며 oxygen, nitrate, trimethylamine N-oxide (TMAO), or dimethylsulfoxide (DMSO)를 사용하여 성장한다. (S.J. Ferguson, J.B. Jackson and A.G. McEwan, 1987) 수산양식에서 유기물 오염을 컨트롤할 수 있는 중요한 역할을 한다. (T.N. Ryan et al, 2004) 특히 대사적으로, 다목적인 박테리아 중 하나로서 (A. Hiraishi, J.L. Shi and H. Kitamura, 1989) carbon dioxide를 흡수 하면서 성장하지만, 유기물의 분해에 의해 biomass를 증가시킨다 (G. Najafpour, H. Younesi and A.R. Mohamed ,2006). 산소가 존재할 때에는 호흡에 의해 에너지를 만들어 내며, 다양한 carbon-containing compound, sugars, lignin monomers, methanol 같은 물질들을 분해한다 (N. Ryan, 2004). 광합성 균에 대한 연구 실험에서 *Rhodopseudomonas palustris* 균을 농도별로 흰다리 새우 양식에 접종시켰을 때 균 농도가 증가함에 따라서 P, N, COD 농도가 감소하며 제거 비율이 증가하였다 (Wen Luo et al, 2012).

지난 몇십년 동안 수산양식은 세계에서 가장 빠르게 급증하는 식량 생산의 역할로 해오고 있으며 특히 새우양식은 매년 16.8%씩 증가하고 있다. 반면 World Bank report에 따르면 새우질병에 따른 새우 손실액이 전 세계적으로 30억 달러에 이르고 있다. 약물에 대해 저항성을 가지는 박테리아에 의해 항생제의 사용이 부정적인 결과에 이르게 하기 때문에 비병원성박테리아를 사용한 유용미생물의 사용이 초점을 맞추고 있다 (Vaseeharan B and Ramasamy P, 2003). 수산양식은 현재 세계에서 가장 빠르게 증가하는 식량 생산 부분으로서 더욱 집약화되고 다양화되어지고 있다 (Bondad-Reantaso et al, 2005). 따라서 수산양식의 생산의 상업화와 집약양식의 증가에 대해 각종 질병과 유행병을 방지하고 종자를 향상시키며 수질관리 뿐만 아니라 중간육성 및 본양성의 기술 증가, 양식시 적절한 사료 공급과 먹이공급 메커니즘 개발 등이 필요하다 (Subasinghe, R.P et al, 2003). 그 중에 질병발생은 수산양식 생산에 경제적으로나 사회적으로 가장 큰 문제점을 일으킨다 (Qi et al, 2009). 게다가 수산양식시 사료비는 대부분의 양식어종에서 운영비용의 70%까지 든다 (Muzinic et al, 2004). 따라서 양식된 어종의 급이 효율성을 향상시키고 성장을 증가시키기 위해서 사료의 질과 급이 방법이 더욱 고려되어야 할 필요가 있다. 따라서 몇몇 이전 연구에서 보듯이 어류와 새우의 면역시스템을 증가시키기 위해서 유용 미생물의 공급이 질병 발생을 줄여줄 수 있다고 보도되고 있다 (Kim, D.H. and B. Austin, 2006), (Mohideen et al, 2010), (Wang, Y.B. and Q. Gu, 2010). 또한 사료의 효율성을 높여주고 성장을 증가시킴으로써 양식 비용의 절감을 가져올 수 있다 (Wang, Y.B. and Z.R. Xu, 2006), (Soundarapandian, P., V. Ramanan and G.K. Dinakaran, 2010), (Faramazi, M et al, 2011), (Mohapatra, S et al, 2012), (Peterson, B.C., N.J. Booth and B.B. Manning, 2012). 게다가 수계동물의 생리작용을 향상시키기 위해서 유용 미생물은 수질을 향상시키며 사료의 효율성을 높여 어류 생산 향상에 기여하는 결과를 가져온다는 연구가 있다 (Boyd, C.E. and A. Gross, 1998), (Verschuere, L et al, 2000), (Ngan, P.T.T. and T.Q. Phu, 2011) (Nimrat, S., S. Suksawat, T. Boonthai and V. Vuthiphandchai, 2012). 그러므로 우리나라 새우인 대하 양식이 줄어들고 있는 상황에서 위에서 설명한 유용미생물을 이용하여 여러 가지 균주를 조합하여 그 집합체인 bio-floc을 이용한다면 새우의 면역능을 향상시키고 성장률을 증가시켜 우리나라 양식의 생산성을 발전시켜 양식 산업이 더욱 발전되는 계기가 되지 않을까 싶어 본 연구를 시작하게 되었다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험새우 및 실험환경

본 실험에 사용한 실험새우는 인천수산연구소에서 분양 받은 대하, *Fenneropenaeus chinensis*로 1주간 순치시킨 후 전장 1.5cm내외, 평균체중 0.00575g의 치하를 사용하였다. 선별된 개체는 400×400×600mm의 원형 수조 내 해수 180L를 채워 입식하였고 모래를 3cm가량 채워 넣었다. 실험을 위한 외부온도는  $24.5\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 로 일정하게 유지하였으며, 실험에 사용된 해수의 수질은 Table. 1과 같다.

Bio-floc 사용을 위해 *Lactobacillus sp.*, *Bacillus sp.* (EM, Korea)균 20L, 당밀 20L, 해수 580L, 담수 380L에 혼합하여 2주간  $37^{\circ}\text{C}$  배양된 균과 *Rhodobactor sp.* ((주)두산에코비즈넷, Korea)균 500mL, 해수 99.4L, 비타민 100mL를 혼합하여 3일간 배양한 균을 통하여 만든 bio-floc의 농도가 0, 60, 80, 100, 120, 140 가 되도록 설정하였다. 50ton의 해수에 1L의 bio-floc의 농도를 100%로 기준으로 잡았다.

Table 1. The chemical components of seawater and initial experimental condition used in the experiments.

Item	Value
Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )	$24.5\pm 0.5$
pH	$8.0\pm 0.5$
Salinity ( $\%$ )	$30.5\pm 1.0$
DO (mg/L)	$7.1\pm 0.3$
COD (mg/L)	$1.13\pm 0.1$
SS (mg/L)	$1.22\pm 0.5$
$\text{NO}_2^-$ -N ( $\mu\text{g/L}$ )	$1.3\pm 0.3$
$\text{NO}_3^-$ -N ( $\mu\text{g/L}$ )	$11.48\pm 1.0$
$\text{NH}_4^+$ -N ( $\mu\text{g/L}$ )	$12.5\pm 0.7$
$\text{PO}_4^-$ -P ( $\mu\text{g/L}$ )	$1.5\pm 0.5$

## 2. 환경 분석

### 2-1 수질 분석

국토해양부에서 정한 해양환경공정시험기준 (2010.12.8 개정)에 따라 수질을 분석하였으며 각 실험에 따르는 방법들은 다음과 같다.

#### 2-1-1. 용존 산소 (DO)

Winkler(1888)가 처음 제정한 방법을 Strickland 와 Parsons(1968)에 수정한 것을 사용하였으며 염화망간과 알칼리 요오드화나트륨용액을 첨가하여 수산화망간(II)을 침전시켜 용존산소량에 대응하여 유리되어진 요오드를 티오황산나트륨으로 적정하여 정량한다.

#### 2-1-2. 화학적 산소 요구량 (COD)

산화제인 과망간산칼륨을 넣은 후 60분간 가열 반응하여 화학적으로 산화시킬 수 있는 물질을 산화시키며 티오황산나트륨으로 적정한다. 이때 소비되는 산소량을 측정하는 것으로 유기물의 양을 간접적으로 측정한다.

#### 2-1-3. 부유 물질 (SS)

잘 혼합된 시료를 유리섬유여과지 (GF/F filter paper, 공경 0.7 $\mu$ m)에 여과한 후 105-110 $^{\circ}$ C에 항량으로 건조하여 여과지의 증가된 무게를 부유물질의 양으로 한다.

#### 2-1-4. 총 질소 (Total-N)

아질산성 질소는 술퍼닐아미드와 반응하여 디아조늄 이온을 형성한 후 나프틸에틸렌디아미드와 반응하여 아조화합물을 생성하게 되는데 이 때 발색된 시료를 분광광도계를 이용하여 흡광도 543nm에서 측정하였다.

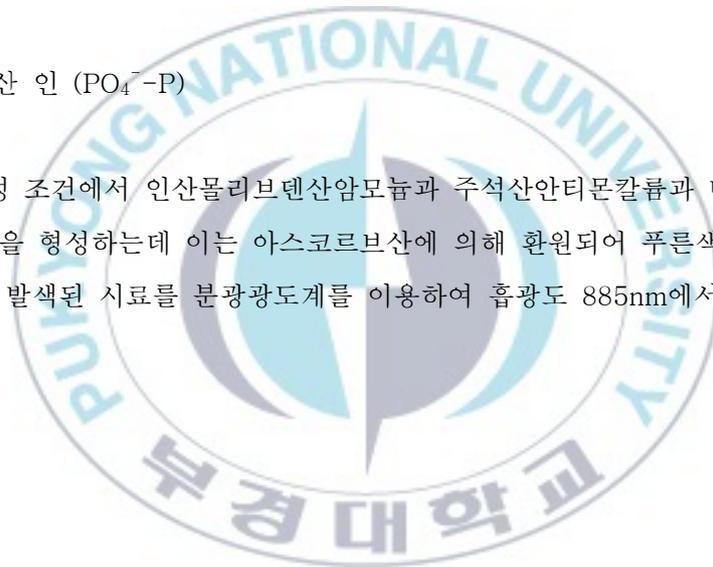
질산성 질소는 해수 중에서 질소계 화합물 중 열역학적으로 비교적 안정화 되어있으므로 구리 촉매로 처리된 카드뮴 환원관을 이용하여 아질산성 질소로 환원시킨 후 아질산성 질소의 측정원리에 측정한다.

#### 2-1-5. 암모니아성 질소 ( $\text{NH}_4^+-\text{N}$ )

해수중의 암모니아는 염기성 차아염소산용액과 산화 반응하여 모노클로아민을 생성하며 이를 페놀과 촉매인 니트로프러시드, 차아염소산에 의해 인도페놀을 형성시켜 발색된 시료를 분광광도계를 이용하여 흡광도 640nm에서 측정하였다.

#### 2-1-6. 인산 인 ( $\text{PO}_4^{3-}-\text{P}$ )

인산 인은 산성 조건에서 인산몰리브덴산암모늄과 주석산안티몬칼륨과 반응하여 인산몰리브덴산 착화합물을 형성하는데 이는 아스코르브산에 의해 환원되어 푸른색의 용액을 생성하게 된다. 이렇게 발색된 시료를 분광광도계를 이용하여 흡광도 885nm에서 측정하였다.



## 2-2 미생물 조성

Bio-floc의 농도가 100, 150 구간에 5일, 10일 후의 미생물 조성에 따라 각각의 수조에 서 물을 채수하여 10배씩 희석하여 각 단계별로 1ml 씩 아래의 미생물 종류에 따라 배지에 분주하여 35℃, 48h 후 집락의 수를 조사하였다.

### 2-2-1. Total bacterial count (TBC)

Total bacterial count는 1% NaCl, Nutrient Agar (NA) 23g을 1L 3차 증류수에 넣어 녹인 후 121℃ 15분 Autoclave에 고압 멸균 시킨다. 그 후 petridish에 부운 후 각 농도별의 시료를 단계 희석하여 집락의 수를 확인한다.

### 2-2-2. *Lactobacillus sp.*

*Lactobacillus sp.* 균은 MRS Broth 55g, 1.7% Agar, 1% NaCl을 1L 3차 증류수에 넣어 녹인 후 121℃ 15분 Autoclave에 고압 멸균 시킨다. 그 후 petridish에 부운 후 각 농도별의 시료를 단계 희석하여 집락의 수를 확인한다. API(E & 50CHB & CHL) 등의 생화학적 test를 통하여 세균을 확인하였다.

### 2-2-3. *Bacillus sp.*

*Bacillus sp.* 균은 Mannitol-Egg Yolk-Polymyxin (MYP) Agar 46g, 1% NaCl을 1L 3차 증류수에 넣어 녹인 후 121℃ 15분 Autoclave에 고압 멸균 시킨다. 45-50℃정도 식힌 후 12.5ml Egg Yolk Enrichment 50%와 4.1ml Polymyxin을 넣어준 후 잘 섞어준다. 그 뒤 petridish에 부운 후 각 농도별의 시료를 단계 희석하여 집락의 수를 확인한다. API(E & 50CHB & CHL) 등의 생화학적 test를 통하여 세균을 확인하였다.

### 2-2-4. *Rhodobactor sp.*

*Rhodobactor sp.* 균은 Malate basal broth에 1.7% Agar, 1% NaCl을 1L 3차 증류수

에 넣어 녹인 후 121℃ 15분 Autoclave에 고압 멸균 시킨다. 그 후 petridish에 부운 후 각 농도별의 시료를 단계 희석하여 집락의 수를 확인한다.

### 3. 생산성 분석

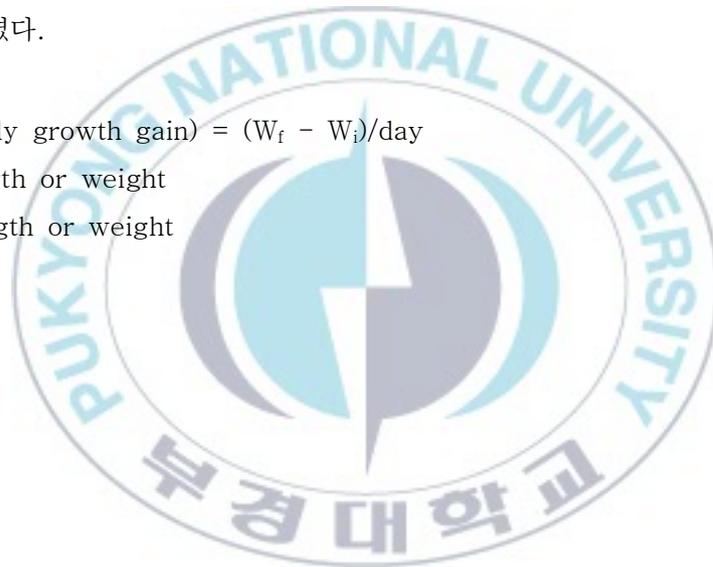
#### 3-1 성장

실험에 사용한 새우는 실험에 들어가기 전 전장과 체중을 측정하였으며, bio-floc을 투입 후 45일, 90일 후에 전장과 체중을 측정하였다. 일일전장성장량, 일일체중성장량은 다음과 같이 측정하였다.

일일성장량 (Daily growth gain) =  $(W_f - W_i)/\text{day}$

$W_f$  = Final length or weight

$W_i$  = Initial length or weight



### 3-2 번역

새우의 간체장의 번역 유전자 발현을 측정하기 위해 Trisol로 teflon-glass homogenizer (099CK4424, Glass-Col, Germany)를 이용하여 조직을 균질화하였다. 그 뒤 Chloroform 을 첨가하여 vortexing 시킨 후 이것을 4℃, 12000g로 15분간 원심 분리하여 상등액을 분리하였다. 상층액과 동량의 Isopropanol을 넣고 4℃, 12000g로 15분간 원심 분리하여 펠렛을 만든다. 80% ethyl achol로 첨가 후 4℃, 12000g로 15분간 원심분리하여 세척한다.

NFW를 이용하여 RNA를 희석 후 1 $\mu$ g/ $\mu$ l 정량하여 cDNA 합성 키트 (Promega, MADI, USA)를 이용하여 cDNA로 합성시킨다.

합성된 cDNA를 아래 Table 2 에 따른 primer를 사용하였으며 House keeping gene으로서  $\beta$ -actin을 사용하였다. primer의 제작은 primer3 프로그램을 이용하여 제작 후 bioneer에서 primer를 공급받았다.

TOPreal qPCR 2X Premix (SYBR Green, Enzynomics, Korea)로 real-time PCR (Roche)을 이용하여 Relative mRNA expression을 확인하였다. PCR의 조건은 Table 3과 같다.

Table 2. Sequence of  $\beta$ -actin primer used in this study.

	$\beta$ -actin	Sequence (5' to 3')
Primer	Forward	CGA GGT ATC CTC ACC CTG A
	Reverse	CGG AGC TCG TTG TAG AAG G

Table 3. Experiment condition of Real time PCR

	Temperature (°C)	Time	cycle
Pre-incubation	95	10 min	1
Denaturation	95	10 sec	
Annealing	60	15 sec	45
Extension	72	25 sec	
Melting curve	95, 60, 72	10, 15, 25 sec	1

3-2-1. proPhenoloxiase (proPO)

Table 4. Sequence of proPhenoloxiase (proPO) primer used in this study.

	proPhenoloxiase (proPO)	Sequence (5' to 3')
Primer	Forward	GAT ATC CTC GGC GAT GTG T
	Reverse	AGG GTC ATG CGA GAA AGC T

3-2-2. Lysozyme (LYS)

Table 5. Sequence of Lysozyme (LYS) primer used in this study.

	Lysozyme (LYS)	Sequence (5' to 3')
Primer	Forward	GTA ACA AAC GCG ACC TCG A
	Reverse	CCG TGC CAG GCT GTA TAT C

3-2-3. Serine Proteinase (SP)

Table 6. Sequence of Serine Proteinase (SP) primer used in this study.

	Serine Proteinase (SP)	Sequence (5' to 3')
Primer	Forward	TAT GTG GCG GAT CCC TTA T
	Reverse	GGT GAT AGT CCC CAA GAC G

### 3-3 생화학분석

새우의 간체장의 효소 활성을 측정하기 위해 조직을 washing buffer (0.1M KCl, pH 7.4)로 세척 후, homogenizing buffer (0.1M PBS, pH 7.4)로 teflon-glass homogenizer (099CK4424, Glass-Col, Germany)를 이용하여 균질화하였다. 이것을 4℃, 10000g로 30분간 원심분리하여 상등액을 실험에 사용하였다.

SOD 활성을 측정하기 위해 1X Lysis Buffer (10mM Tris, pH 7.5, 150mM NaCl, 0.1 mM EDTA)를 사용하여 조직을 균질화한 후 이것을 4℃, 12000g로 10분간 원심분리하여 상등액을 실험에 사용하였다 모든 상등액은 실험 전까지 -75℃ (MDF-U53V, SANYO Electric Co. Ltd., Japan)에 보관하였다.

조직의 단백질 함량은 Bradford (1976) 방법을 이용한 kit (Biorad. Co., Ltd.)를 이용하여 정량하였다.

#### 3-3-1. Superoxide dismutase (SOD)

SOD activity는 chromagen reduction의 inhibitor rate로 측정하는 SOD Assay Kit (Cell biolabs Inc)를 이용하였다. 각 상등액은 5의 배수씩 0.1mM PBS로 희석 후 분광광도계를 이용하여 흡광도 490nm에서 측정하였다. 측정값으로 inhibitor rate를 구하여 unit/mg protein으로 표시하였다.

$$* \text{SOD activity (inhibition \%)} = (\text{OD}_{\text{blank}} - \text{OD}_{\text{sample}}) / (\text{OD}_{\text{blank}}) \times 100$$

#### 3-3-2. Catalase

Catalase activity는 과산화수소의 분해의 비율에 따른 catalase의 농도에 대하여 남아있는 과산화수소에 반응하는 양을 측정하는 Catalase Assay Kit (Cell biolabs Inc)를 이용하였다. 2가지 Reaction 반응을 통하여 분광광도계를 이용하여 흡광도 520nm에서 측정하였다. Catalase activity assay standard curve를 이용하여 OD값에 대한 Catalase activity를 측정하였고 unit/mg protein으로 표시하였다.

### 3-3-3. Glutathione (GSH)

Reduced glutathione 함량은 Beutler 등 (1963)의 방법을 이용하였다. 상등액에 precipitation solution (metaphosphoric acid, Na<sub>2</sub>EDTA, NaCl)을 첨가하여 혼합 후 4500g에 10분간 원심분리 하였다. 그 상등액에 0.3M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>을 넣고, 0.5mM DTNB로 발색시켜 분광광도계로 412nm에서 흡광도를 측정하였다. GSH 함량은 reduced glutathione standard curve를 이용하여 측정하였고, nmol GSH/mg protein으로 표시하였다.

#### 4. 유의성 검정

실험 분석 결과에 대한 통계학적 유의성은 SPSS 통계 프로그램 (SPSS Inc.)을 이용하여 ANOVA test를 실시하여 Duncan's multiple range test를 통해  $P < 0.05$  일 때 유의성이 있는 것으로 간주하였다.



### Ⅲ. 결과

#### 1. 환경 분석

##### 1-1 수질분석

사육수의 수질의 변화를 45일, 90일 후에 측정하였는데, 그 결과를 figure 1 ~ 6에 나타내었다. Total-N,  $\text{NH}_4^+$ -N 및  $\text{PO}_4^-$ -P의 양은 시간이 흐를수록 대조구와 비교하여 감소되는 경향을 나타내었다. 하지만 bio-floc의 농도에 따른 수질 변화는 보이지 않았다.



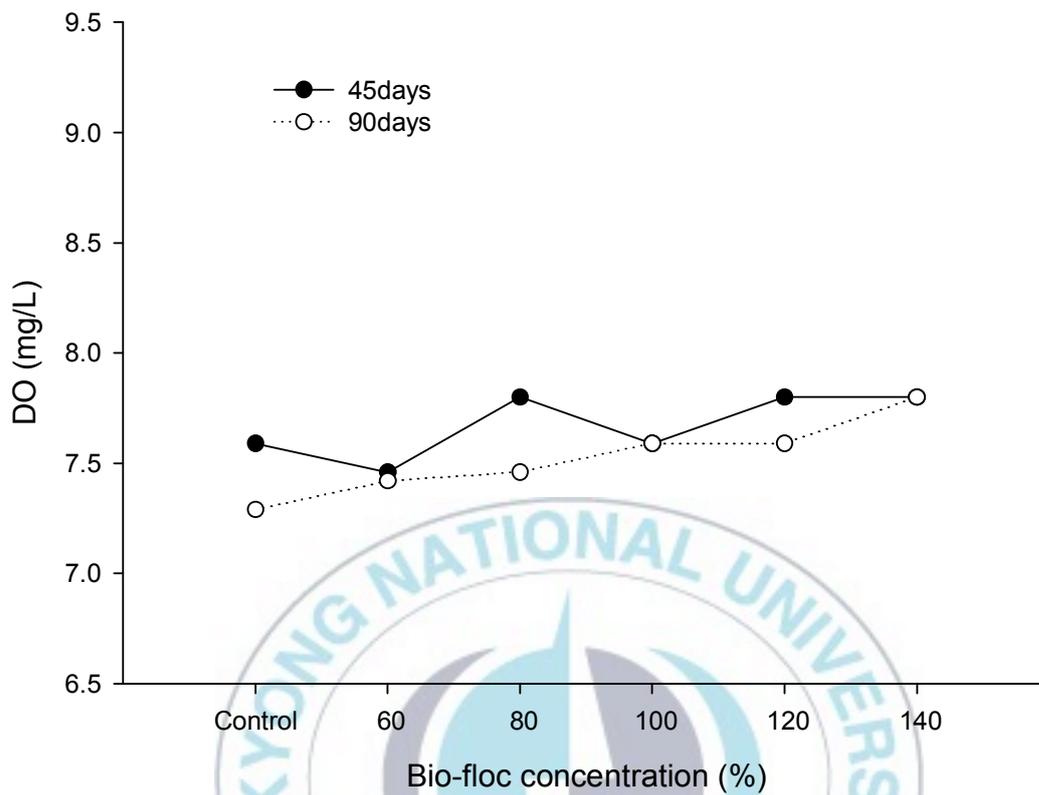


Figure 1. Changes DO in breeding water exposed to bio-floc concentration for 90 days.

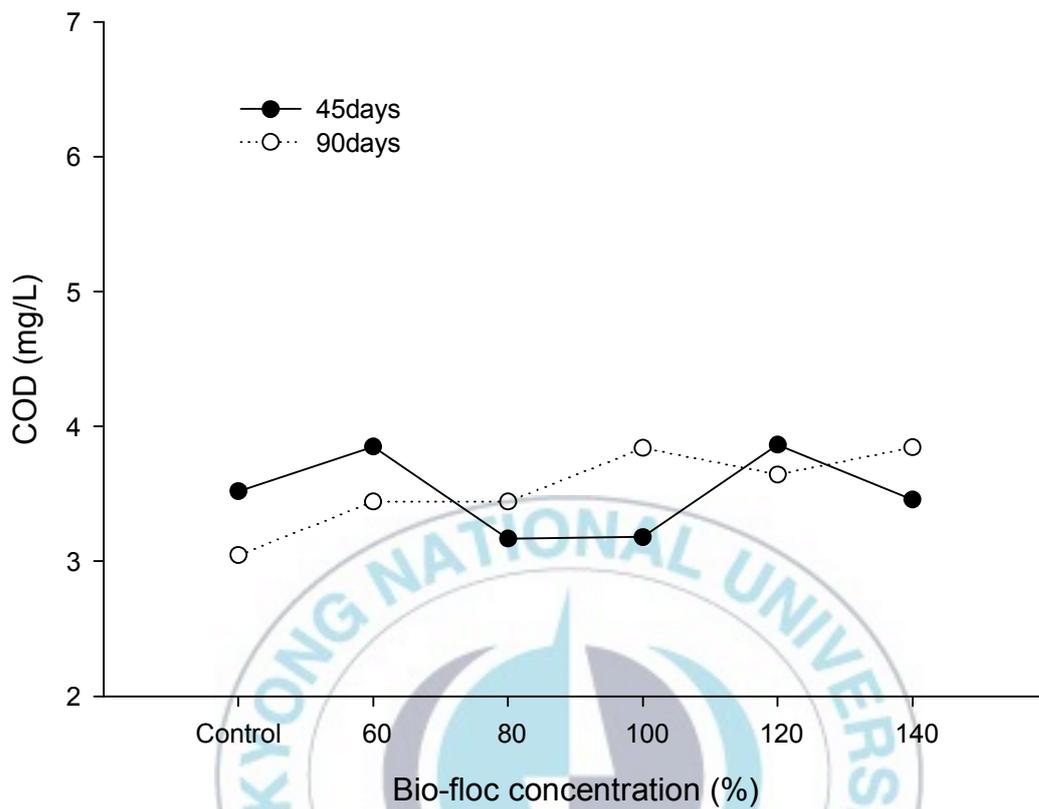


Figure 2. Changes COD in breeding water exposed to bio-floc concentration for 90 days.

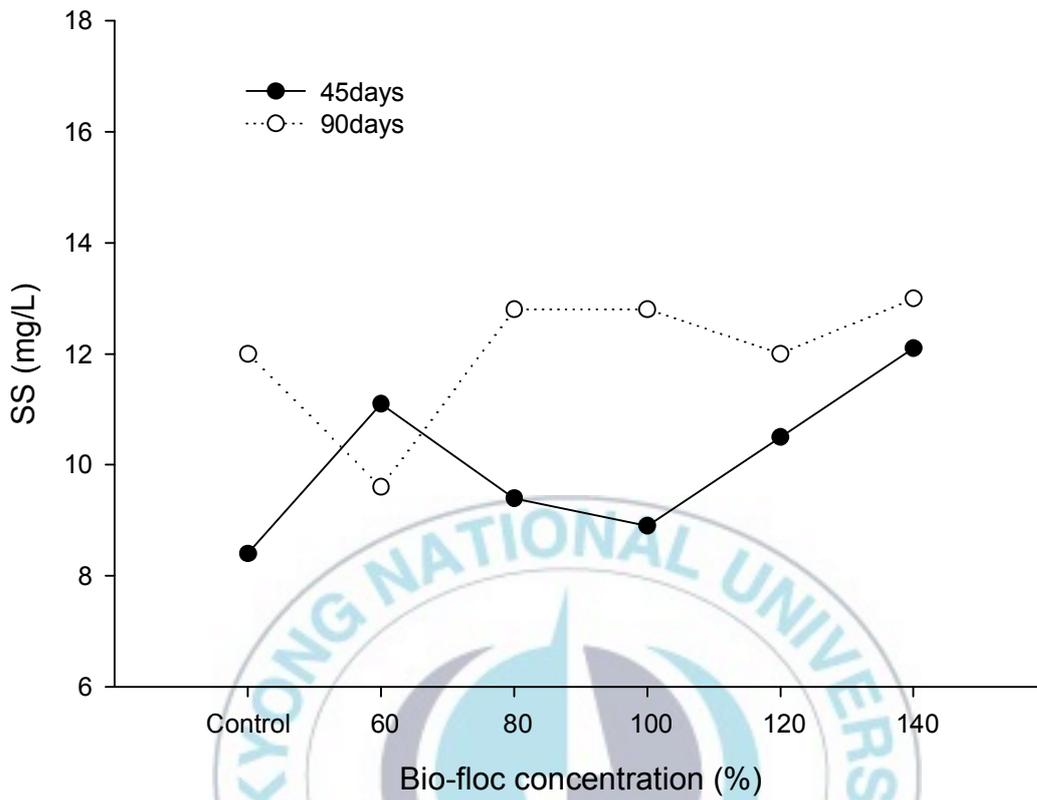


Figure 3. Changes SS in breeding water exposed to bio-floc concentration for 90 days.

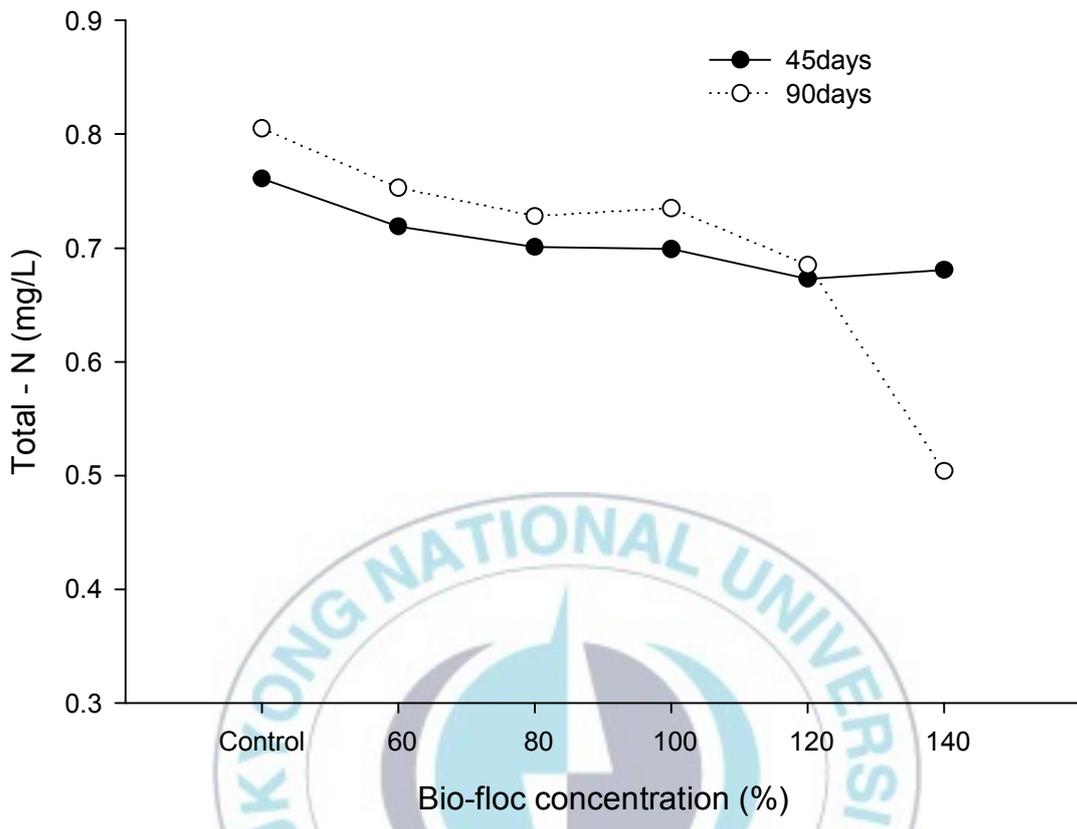


Figure 4. Changes Total-N in breeding water exposed to bio-floc concentration for 90 days.

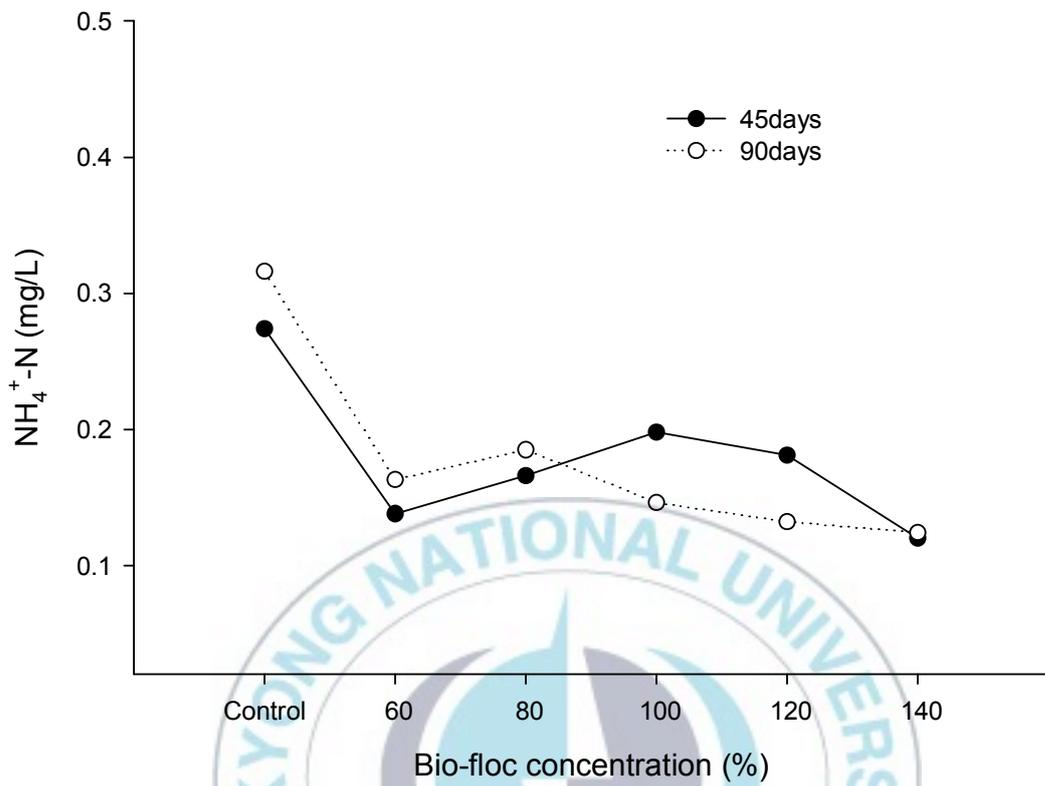


Figure 5. Changes  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  in breeding water exposed to bio-floc concentration for 90 days.

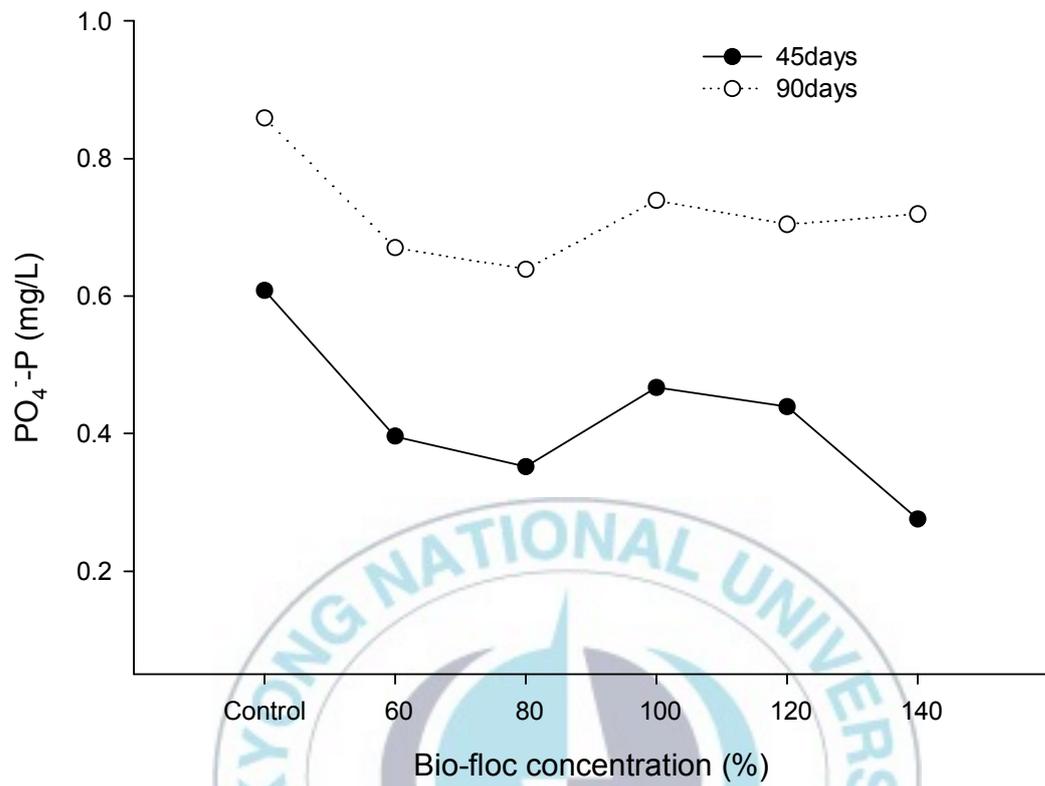


Figure 6. Changes  $PO_4^{-}-P$  in breeding water exposed to bio-floc concentration for 90 days.

## 1-2 미생물 조성

해수에 100, 150 농도별로 bio-floc의 미생물 조성 변화를 0, 5일 및 10일 후에 각각 측정하였을 때 그 결과를 Fig. 7 ~ 10에 나타내었다. 시간이 지날수록 각각의 군에 대한 농도가 감소하였으며, bio-floc의 농도가 높을수록 균의 농도가 작은 폭으로 감소하였다.



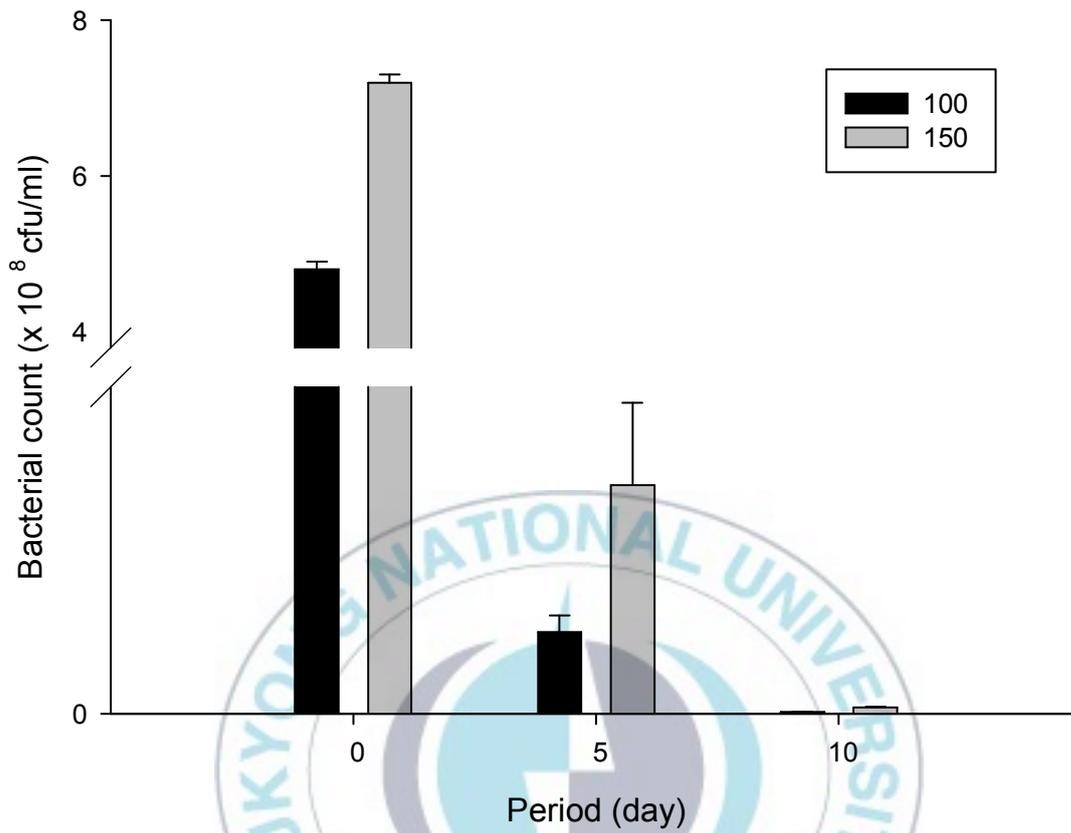


Figure 7. Changes of *Bacillus sp.* microorganisms in sea water exposed to bio-floc 100, 150 concentration for 10 days.

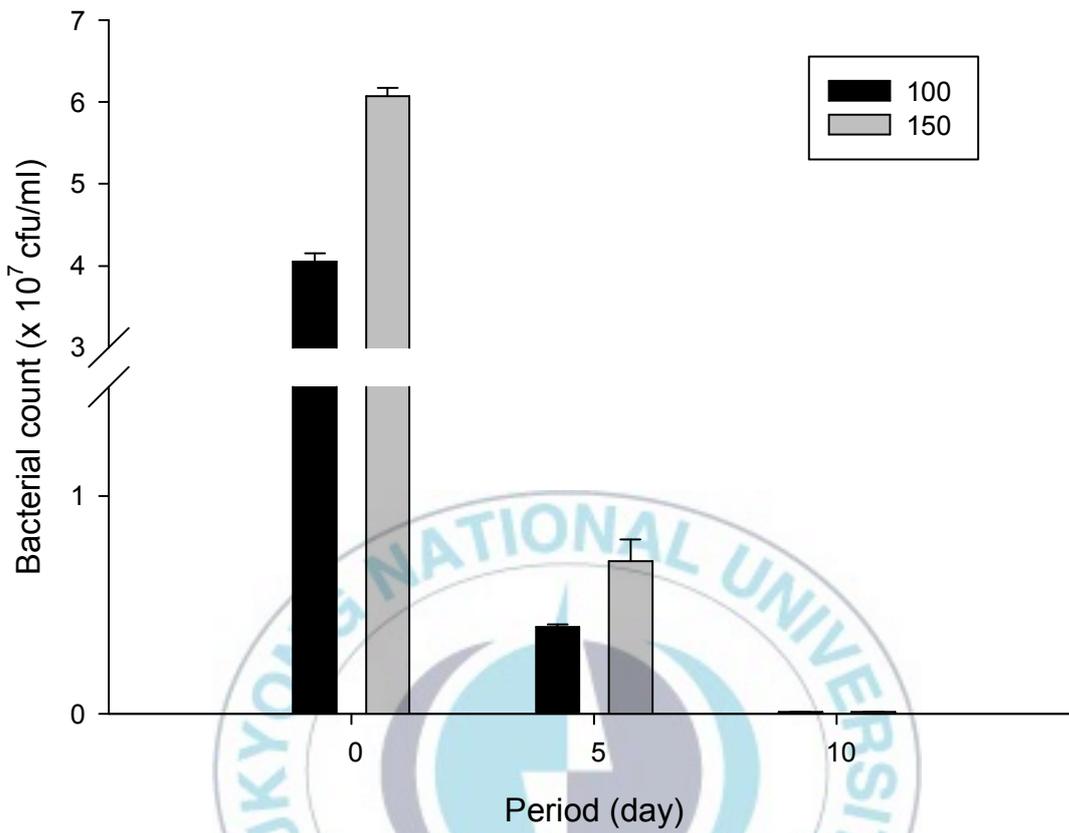


Figure 8. Changes of *Lactobacillus sp.* microorganisms in sea water exposed to bio-floc 100, 150 concentration for 10 days.

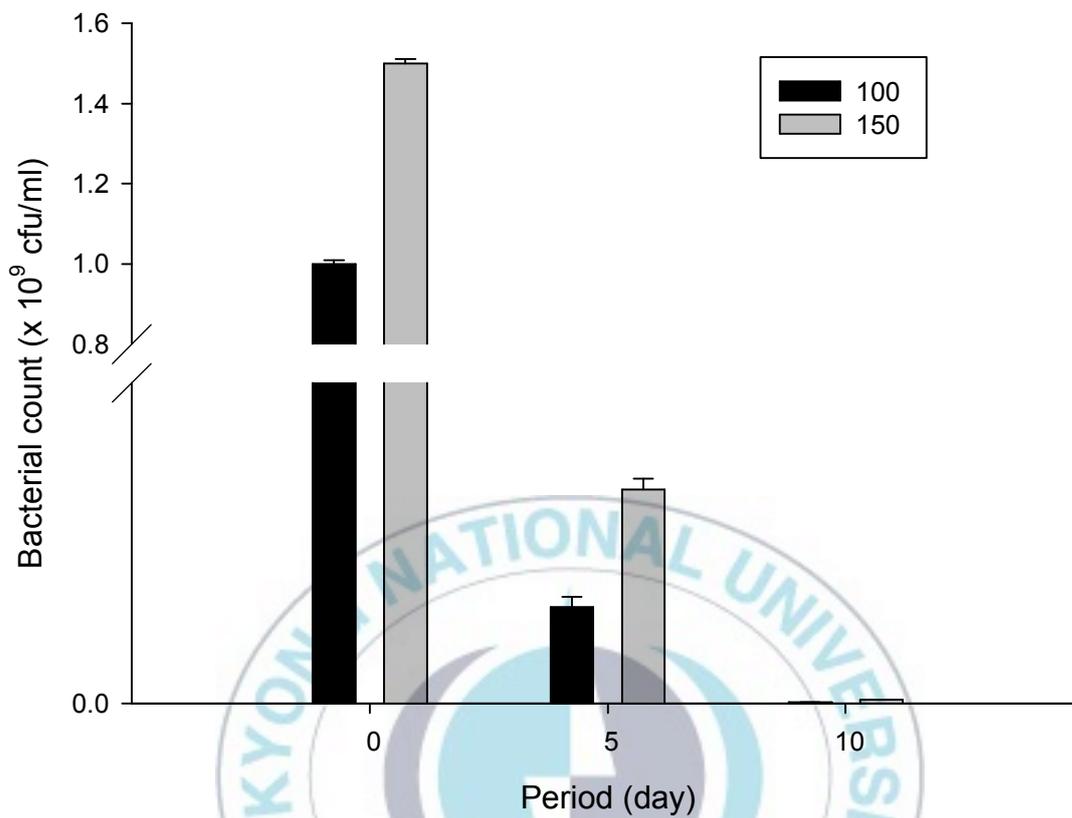


Figure 9. Changes of *Rhodobactor sp.* microorganisms in sea water exposed to bio-floc 100, 150 concentration for 10 days.

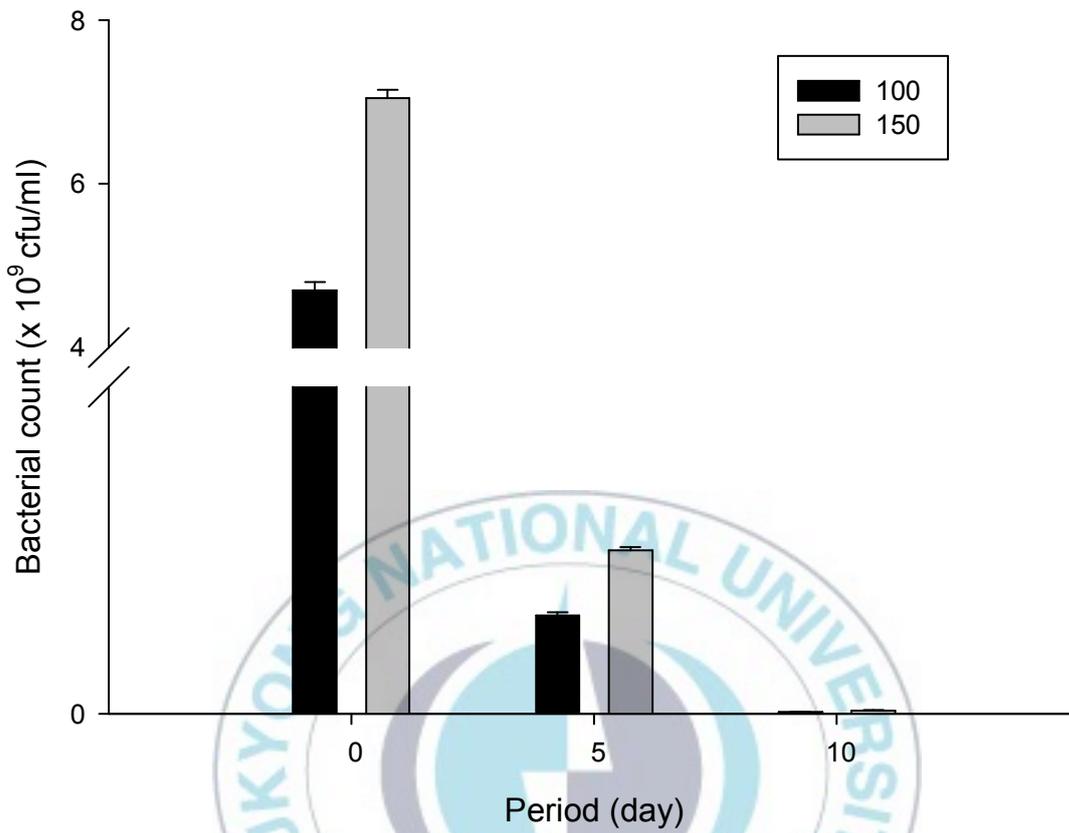


Figure 10. Changes of Total bacteria microorganisms in sea water exposed to bio-floc 100, 150 concentration for 10 days.

## 2. 생산성 분석

### 2-1 성장률

#### 2-1-1 일일 체중 성장

대하의 체중 변화를 45일, 90일 후에 각각 측정한 결과를 Fig. 11에 나타내었다. 45일 후 bio-floc의 농도가 100, 120 및 140일 때 유의한 체중 증가를 보였으며 120 농도구간에서 가장 높은 성장률을 보였다. 90일 후의 전장의 변화 역시 bio-floc의 농도가 120, 140일 때 유의한 증가를 보였으며 120 농도구간에서 가장 높은 성장을 보였다.



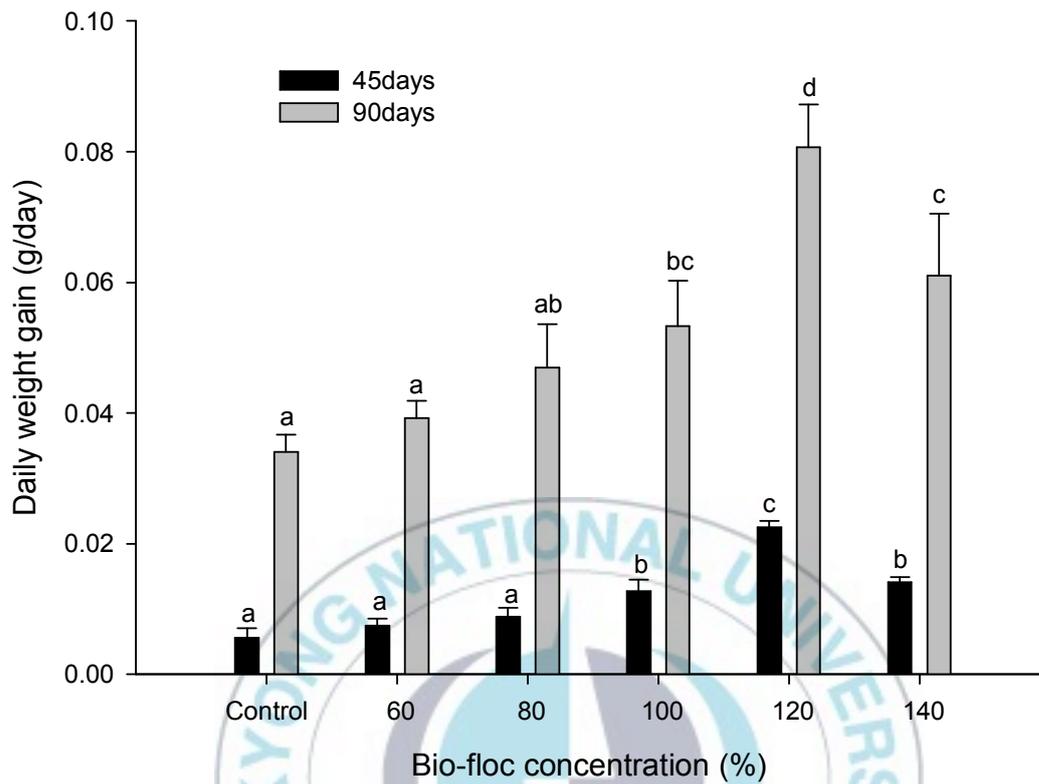


Figure 11. Daily weight gain of shrimp after 45days and 90days, *Fenneropenaeus chinensis* exposed to the different concentration of bio-floc. Concentration ratio 100 is 1liter bio-floc per seawater 50ton. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly different ( $P < 0.05$ ) as determined by Duncan's multiple range test.

## 2-1-2 일일 전장 성장

대하의 전장의 변화를 45일, 90일 후에 각각 잴 때 그 결과를 Fig. 12에 나타내었다. 45일 후의 전장의 변화는 bio-floc의 농도가 100, 120 및 140일 때 유의한 증가를 보였으며 120 농도구간에서 가장 큰 성장률을 보였다. 90일 후의 전장의 변화 역시 bio-floc의 농도가 100, 120 및 140일 때 유의한 증가를 보였으며 120 농도구간에서 가장 큰 성장률을 보였다.



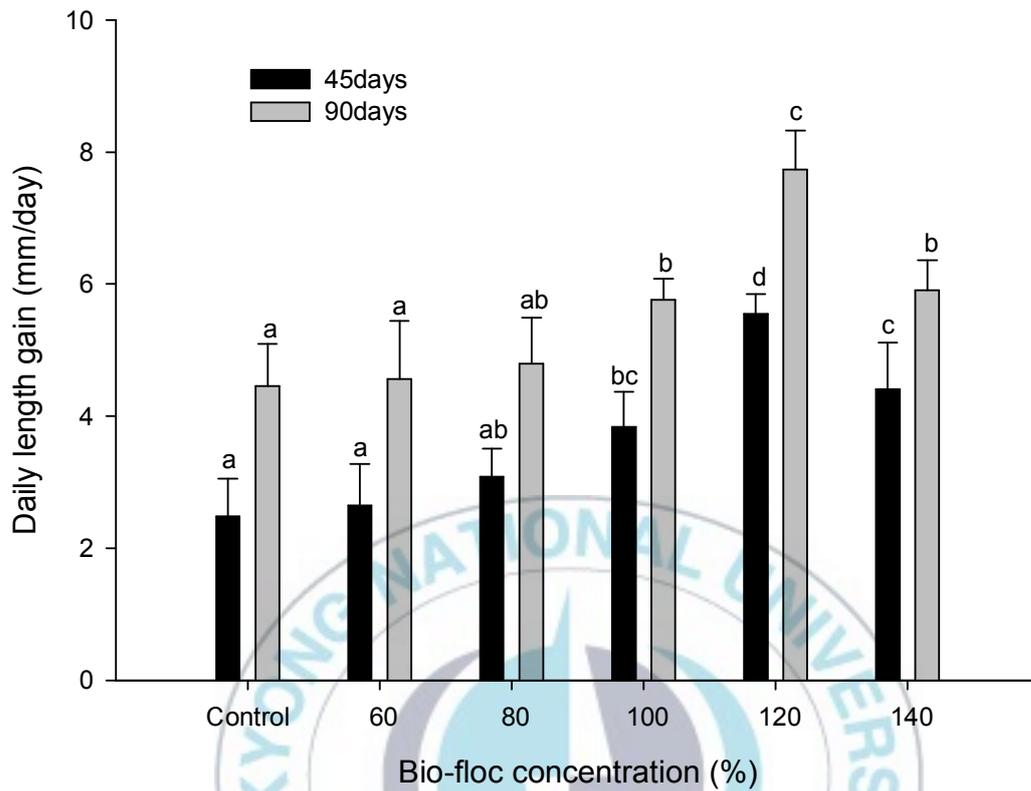


Figure 12. Daily length gain of shrimp after 45days and 90days, *Fenneropenaeus chinensis* exposed to the different concentration of bio-floc. Concentration ratio 100 is 1liter bio-floc per seawater 50ton. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly different ( $P < 0.05$ ) as determined by Duncan's multiple range test.

## 2-2 번역

### 2-2-1 proPhenoloxidase (proPO) gene expression

Bio-floc균에 노출된 대하의 간체장 내 proPO의 번역 유전자 발현 결과를 Fig. 13에 나타내었다. proPO의 발현은 대조구와 비교하여 다른 구간에서는 유의한 차이가 없었으나 60, 120, 140 구간에서는 유의적으로 증가하는 경향을 나타내었다.



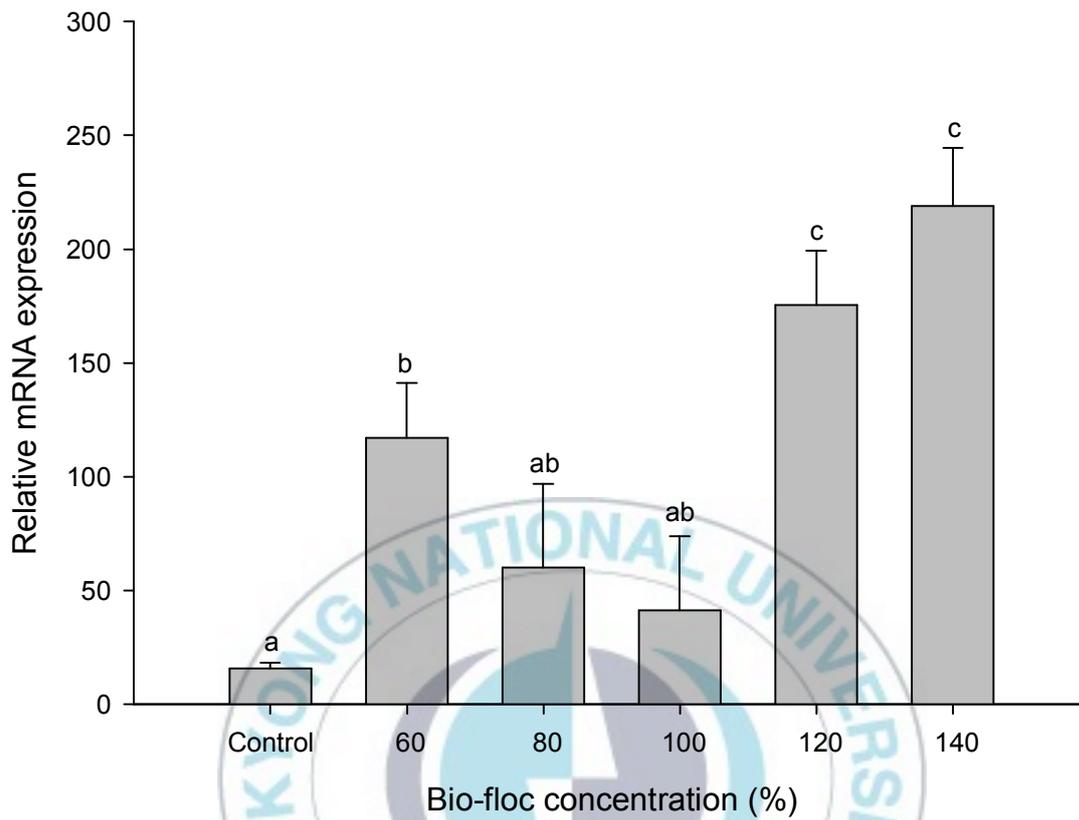


Figure 13. Changes of proPhenoloxidase (proPO) gene expression in hepatopancreas of shrimp, *Fenneropenaeus chinensis* exposed to the different concentration of bio-floc. Concentration ratio 100 is 1liter bio-floc per seawater 50ton. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly different ( $P < 0.05$ ) as determined by Duncan's multiple range test.

### 2-2-2 Lysozyme (LYS) gene expression

Bio-floc에 노출된 대하의 간체장 내 LYS의 면역 유전자 발현 결과를 Fig. 14에 나타내었다. LYS 활성은 대조구와 비교하여 bio-floc이 증가함에 따라 유의한 증가를 나타냈고, bio-floc의 농도가 높아질수록 LYS의 발현이 높아지는 경향을 나타내었으며 120, 140 구간에서 유의한 증가를 보였다.



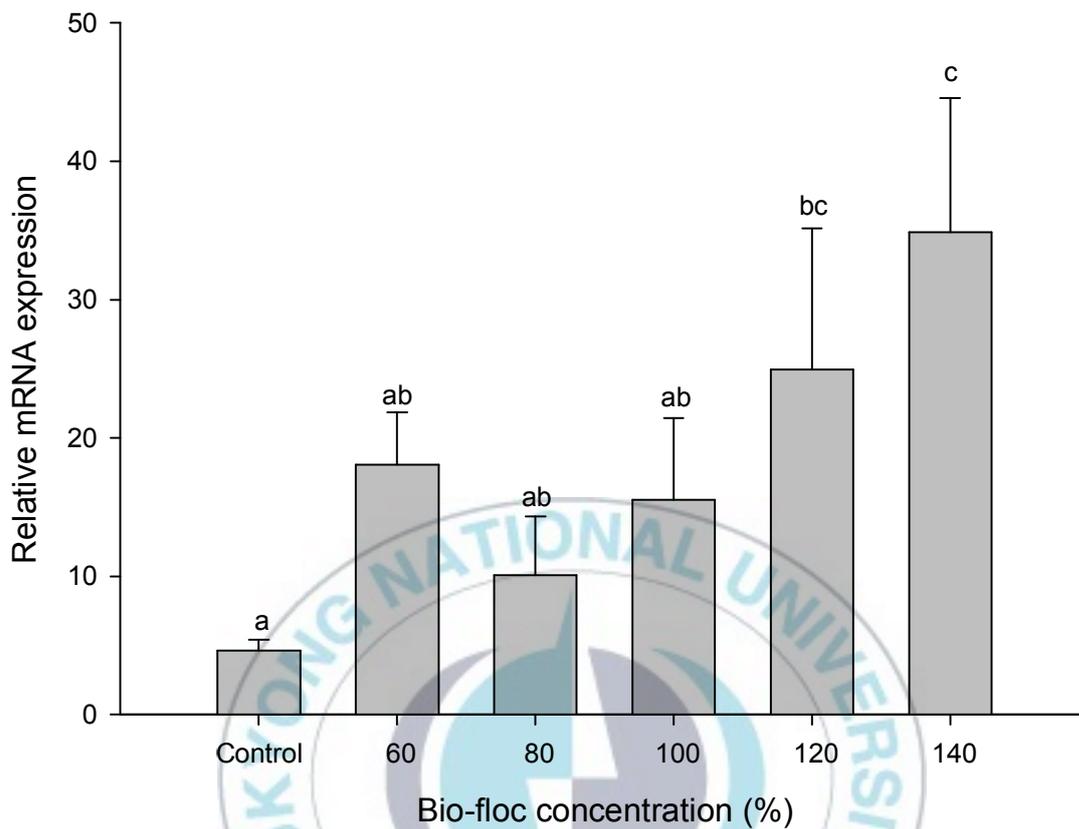


Figure 14. Changes of Lysozyme (LYS) gene expression in hepatopancreas of shrimp, *Fenneropenaeus chinensis* exposed to the different concentration of bio-floc. Concentration ratio 100 is 1liter bio-floc per seawater 50ton. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly different ( $P < 0.05$ ) as determined by Duncan's multiple range

### 2-2-3 Serine Proteinase (SP) gene expression

Bio-floc에 노출된 대하의 간체장 내 SP의 면역 유전자 발현 결과를 Fig. 15에 나타내었다. SP는 대조구와 비교하여 bio-floc이 증가함에 따라 유의한 차이를 나타나지 않았고, 가장 높은 구간인 140의 bio-floc의 농도에서 SP의 활성이 높아지는 경향을 나타내었다.



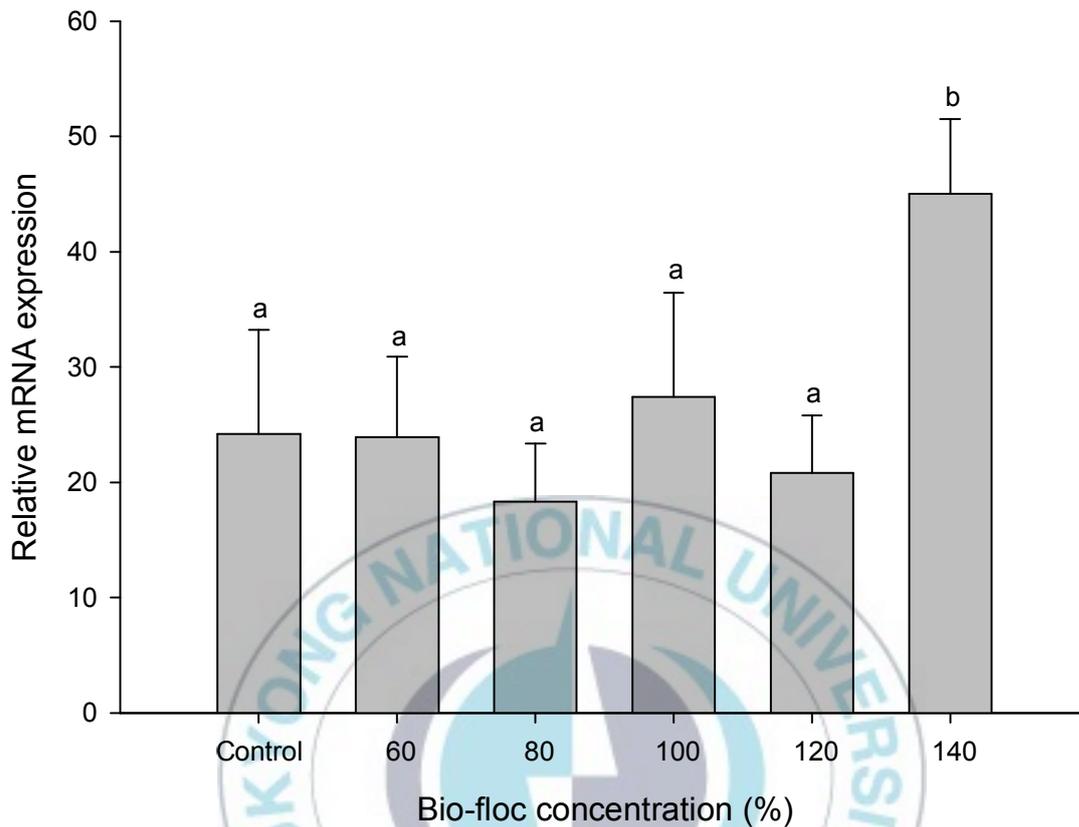


Figure 15. Changes of Serine Proteinase (SP) gene expression in hepatopancreas of shrimp, *Fenneropenaeus chinensis* exposed to the different concentration of bio-floc. Concentration ratio 100 is 1liter bio-floc per seawater 50ton. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly different ( $P < 0.05$ ) as determined by Duncan's multiple range test.

## 2-3 생화학 분석

### 2-3-1 Superoxide dismutase (SOD)

Bio-floc에 노출된 대하의 간체장 내 SOD 활성 결과를 Fig. 16에 나타내었다. SOD 활성은 대조구와 비교하여 bio-floc이 증가함에 따라 농도가 80에서부터 유의한 활성 감소를 나타냈고, bio-floc의 농도가 높은 구간인 120, 140 에서 가장 낮은 활성을 나타내었다.



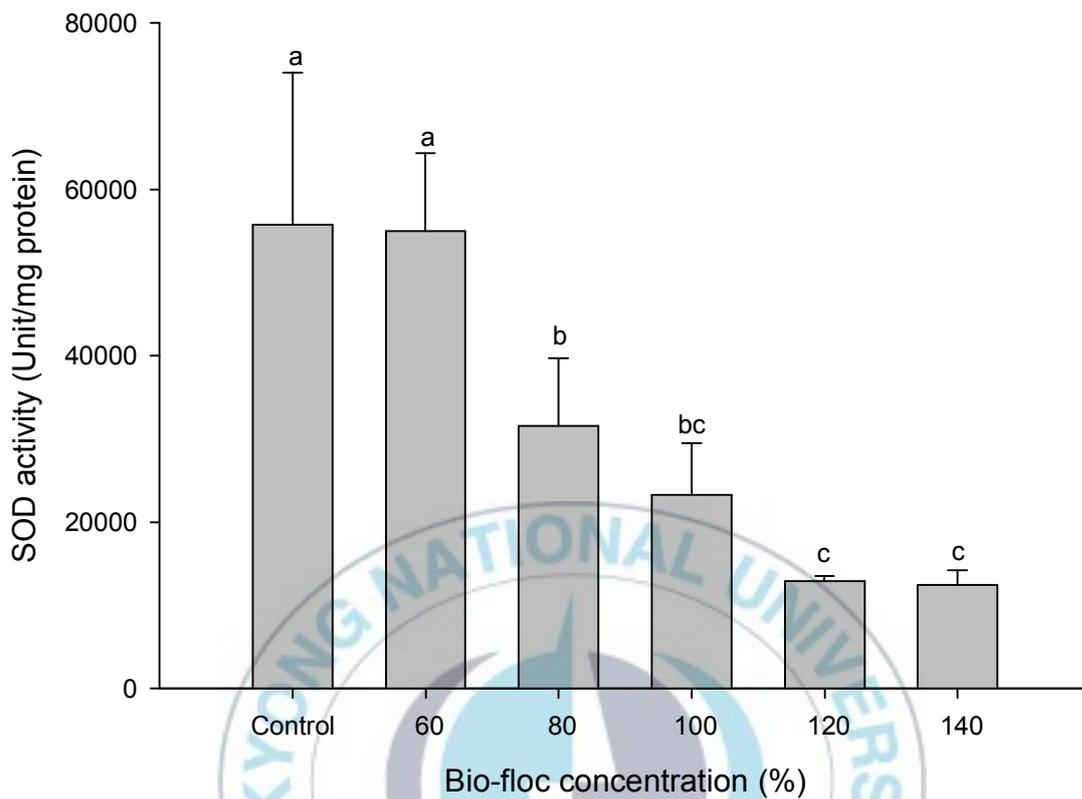


Figure 16. Changes of Superoxide dismutase (SOD) activity in hepatopancreas of shrimp, *Fenneropenaeus chinensis* exposed to the different concentration of bio-floc. Concentration ratio 100 is 1liter bio-floc per seawater 50ton. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly different ( $P < 0.05$ ) as determined by Duncan's multiple range test.

### 2-3-2 Catalase activity

Bio-floc에 노출된 대하의 간체장 내 catalase 활성 결과를 Fig. 17에 나타내었다. Catalase 활성은 대조구와 비교하여 bio-floc의 농도가 120, 140에서 유의한 감소를 나타냈고 120에서 가장 낮은 활성을 보였다.



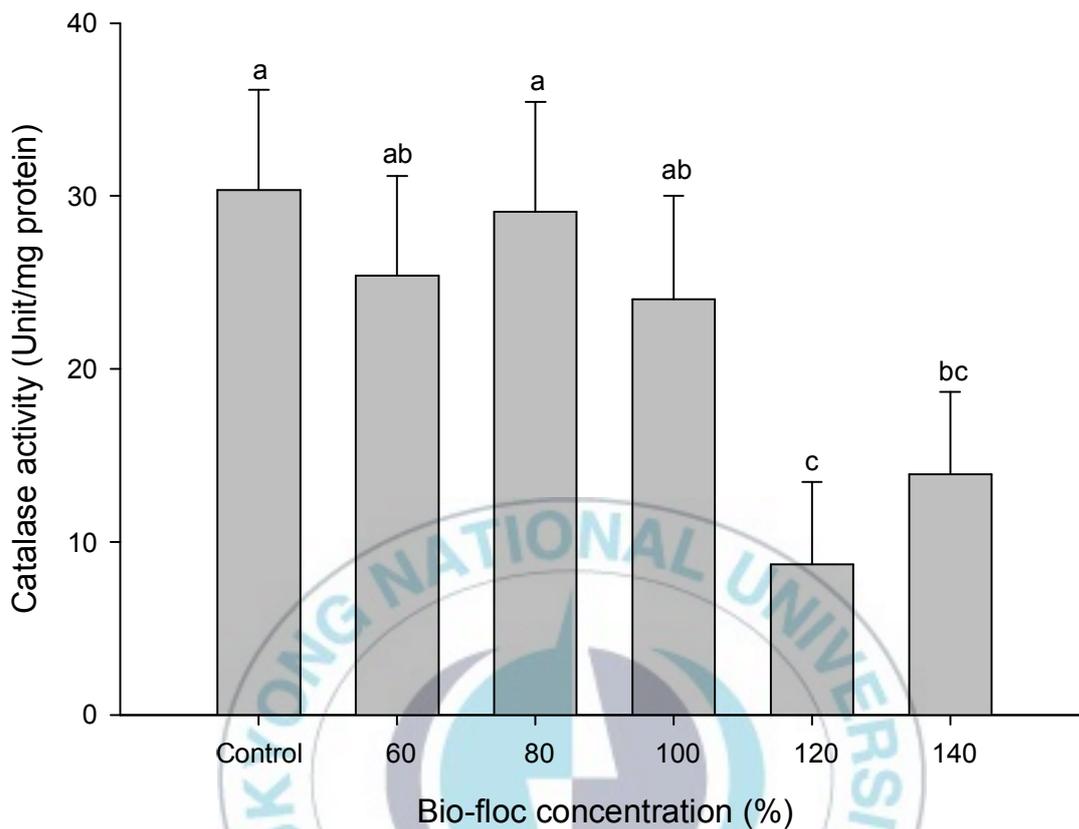


Figure 17. Changes of Catalase activity in hepatopancreas of shrimp, *Fenneropenaeus chinensis* exposed to the different concentration of bio-floc. Concentration ratio 100 is 1liter bio-floc per seawater 50ton. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly different ( $P < 0.05$ ) as determined by Duncan's multiple range test.

### 2-3-3 Glutathione (GSH) level

Bio-floc에 노출된 대하의 간체장 내 reduced glutathione 함량 결과를 Fig. 18에 나타내었다. GSH 함량은 대조구와 비교하여 유의한 감소를 나타냈지만, bio-floc의 농도별로 보았을 때는 유의한 차이를 보이지 않았다.



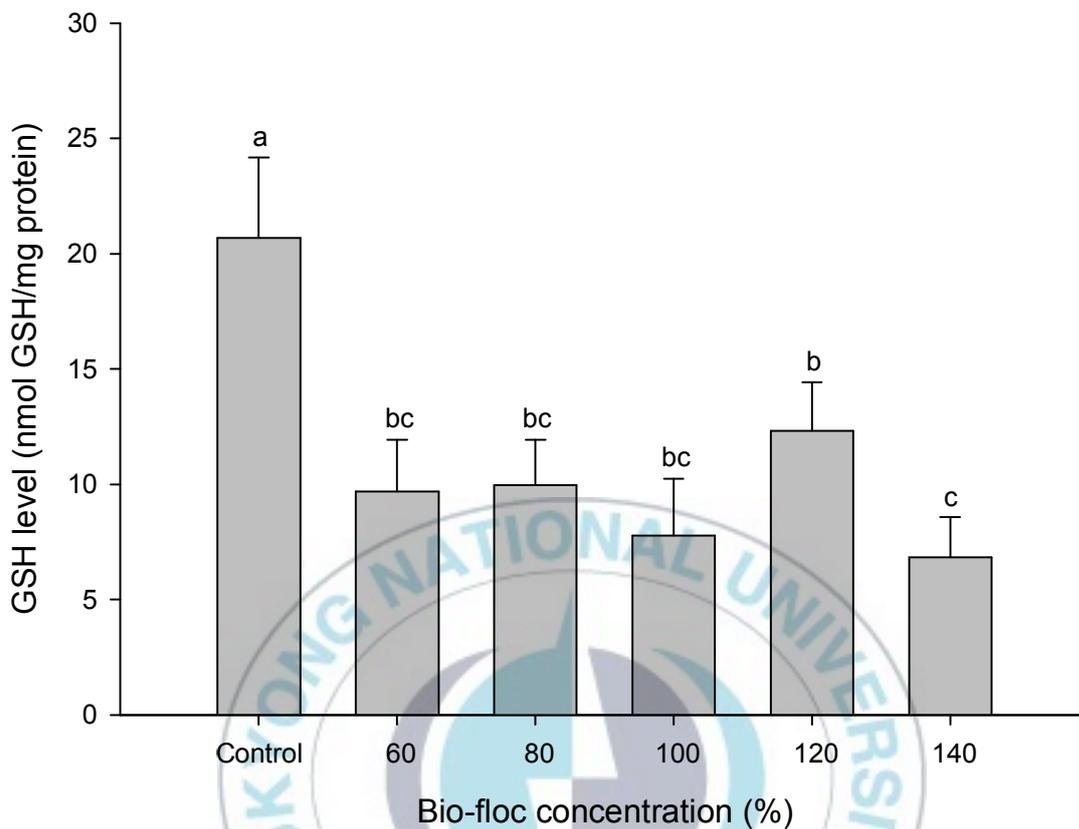


Figure 18. Changes of GSH level in hepatopancreas of shrimp, *Fenneropenaeus chinensis* exposed to the different concentration of bio-floc. Concentration ratio 100 is 1liter bio-floc per seawater 50ton. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly different ( $P < 0.05$ ) as determined by Duncan's multiple range test.

## IV. 고찰

수산양식에서 특히 새우양식을 함에 있어서 많은 양의 질소성 물질 즉, 아질산성 질소, 질산성 질소, 암모니아성 질소들과 인 물질들이 발생하는데 이런 현상들에 의해 조류가 증폭되고 과부화 현상에 의해 환경적인 문제점이 많이 발생하고 있다 (C. Liu et al. 2007). 따라서 이러한 문제점을 해결하기 위해 사용한 방법 중에 물리, 화학, 생물학적 방법 중에서 친환경적으로 안정성을 가지는 미생물을 이용하여 분해하는 방법을 택하였다 (L.E et al. 2010). 그 중에 광합성균은 혐기성 광영양 생물로서 빈산소나 혐기성 조건에서 유기물을 분해하는 역할을 한다 (D. White 2000). 따라서 유기물의 오염이나 양식장 환경수에 대하여 영양염을 분해함으로써 수질을 개선하는 역할을 한다 (A. Hiraishi et al. 1989). 한 연구에서는 광합성균을 이용하여 새우 수조별로 수질 측정을 하였을 때 광합성균의 농도가 증가함에 따라 인, 아질산, 질산, 암모니아 값이 유의적으로 감소하는 것을 발견하였다. 이때 광합성균의 농도는  $4 \times 10^6$  CFU/ml 일 때 가장 좋은 효과를 내는 것으로 확인되었다 (Wen Luo . 2012). 위의 논문처럼 본 연구에서도 bio-floc을 사용하였을 때  $10^6$ 군 이상의 광합성균에 의해서 아질산, 질산, 암모니아의 농도가 bio-floc을 처리하지 않은 구간에 비해 줄어든 것을 확인할 수 있었다. 따라서 이 bio-floc에 의해 수질이 정화되면서 새우를 키우는데 긍정적인 영향을 끼치는 것으로 생각되어진다.

본 연구에서 0일, 5일, 10일간 각각의 미생물의 농도 변화 추이를 지켜봤는데 5일 이후의 미생물의 농도가 급격히 떨어지는 것을 확인할 수 있었다. *Bacillus* 균의 농도는  $4.8 \times 10^8$  cfu/ml이 시간이 흐를수록 5일, 10일 뒤에는 각각  $5 \times 10^6$ ,  $1.1 \times 10^5$ , *Lactobacillus* 균도 역시 각각  $4.05 \times 10^7$ ,  $4 \times 10^6$ ,  $8 \times 10^4$ , *Rhodobactor* 균도 각각  $1 \times 10^9$ ,  $9 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$  으로 점점 미생물 양이 줄어드는 경향을 보인다. TBC 농도 역시 각각  $4.7 \times 10^9$ ,  $3 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^5$  로 줄어든다. 한 연구에서는 *Bacillus coagulans*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Lactobacillus acidophilus* 균을 잉어에 사료에 섞어서 준 결과  $10^6$  cfu/g 이상의 균의 농도에서 성장률에 대해서 유의한 증가폭을 나타낸 연구가 있다. (Yang. 2011) 미생물 균종마다 적용되는 균의 농도가 다르지만 본 연구에 실험한 균들은  $10^6$  cfu/ml에 효과가 있는 것으로 판단된다. 미생물 균종마다 적용되는 균의 농도가 다르지만 본 연구에 실험한 균들은  $10^6$  cfu/ml에 효과가 있는 것으로 판단된다. 따라서 앞선 연구들처럼 *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Rhodobactor* 균이  $10^6$  이상일 때 효과가 있다는 참고하여 본 연구에서는 5일마다 bio-floc을 조합하여 농도를 맞추었다. 새우 중에 특히 대하는 공식을 가지고 있는데 수색이 너무 많으면 이러한 증상이 더 높아져 생존율이 낮아진다. 수색이 많다는 것은 미생물의 존재여부, 유기물의 양, SS 등에 의해 나타나는데 본 연구에서는 미생물의 양에 따라 수색을 결정된다고 생각하고 이 부분에 초점을 맞추었다. 따라서  $10^6$  cfu/ml 이상의 미생물 균주를 넣어주면 미생물의 작용에 의해 수질의 변화를 가지며 5일 이상 지났을 시  $10^6$  이하로 균이 떨어지므로 5일마다 주기로 bio-floc을 주입해 주면 더 좋은 결과를 나타낼 것으로 생각되어진다.

유용미생물 각각을 사용하여 성장과 생존율을 비교한 연구들은 많이 볼 수가 있다. 일반적으로 유용미생물을 사용하였을 때 특히, *Lactobacillus sp.*, *Rhodopseudomonas sp.*, *Bacillus sp.* 균을 사용했을 때 성장률과 생존율이 control과 비교하여 다른 연구가 많았다. Rengpipat et al., 1998a,b. 연구에서는 *Bacillus* 균을 *P. monodon*에 처리한 것도 안한

것에 대하여 초기에 성장과 생존율의 차이를 발견하였다. 또한 이전 연구에서는 동물들에 유용미생물을 주입시켰을 때 control 에 비해서 생존율이 더 높게 나타나는 연구 결과들이 있다 (Nikoskelainen et al. 2001; Chang and Liu 2002; Newaj-Fyzul et al. 2007). 하지만 YANBO WANG and QING GU, 2010 연구에서는 *P. monodon*에 대하여 생존율에 대해서는 유의한 변화를 발견하지 못한 연구도 있었다. 그 이유는 양식 시스템에서 인산인 농도를 높게 유지한 것이 부정적인 영향을 끼쳤다고 생각하고 있다. 반면에 *Bacillus coagulans*를 처리한 새우에서는 일일 체중 증가량에 대하여 유의한 변화가 관찰되었다. 또한 다른 유용미생물인 *Enterococcus faecium*을 사용하였을 때 틸라피아에서 일일 체중 증가량과 최종 체중이 증가된 결과를 보인 연구결과도 있다. 이 미생물 역시 장내세균의 일종으로서 소화관내에서 여러 작용한 것으로 보인다 (Wang et al. 2008). *P. monodon*의 larvae기 성장을 촉진시키는 토양 미생물을 사용했을 때에도 비슷한 결과를 발견할 수 있었다 (Maeda & Liao . 1992). 다른 연구결과에서는 *Bacillus* 균이 외분비 효소를 분비함으로써 (Moriarty 1996, 1998) 소화관 내에서 소화효소를 활성화 하여 사료효율이 증가하며 성장률과 생존율이 증가한다는 보고도 있다 (Saeed Ziaei-Nejad et al. 2006). 하지만 흰다리 새우에서 상용화된 *Bacillus* 균을 이용하여 성장률과 생존율의 차이가 없다는 반대의 연구 결과도 보고되었다 (Shariff et al. 2001, McIntoch et al. 2000). *Lactobacillus sp.*를 사용하여 *P. monodon*에 사료와 섞어서 실험했을 때 *V. harve*에 대해 challenge test를 했을 때 생존율과 생존율에 대해 유의한 증가를 보였다는 연구가 있다 (Wannipa Phianphak et al. 1999). 본 연구에서는 일일 체중 증가율이 bio-floc을 이용하지 않은 control 구간보다 100 % 이상의 농도에 대하여 유의한 증가를 나타내었다. 또한 유의한 결과를 나타내지는 않았지만 다른 구간에서도 bio-floc을 사용한 구간에서 평균적으로 큰 체중 증가량을 보였다. 그리고 일일 체중 증가율에 대해서도 역시 control 구간보다 bio-floc을 사용한 구간에서 대체적으로 증가된 향상을 보였으며 100 %이상의 농도에서 유의한 증가를 나타내었다. 앞에서 언급한 다른 연구결과에서 역시 유용 미생물이나 다른 어종 및 동물을 통해서도 성장과 생존율에 대하여 유의한 결과를 나타내는 경우가 많았다. 여러 조합을 통해 만들어진 bio-floc 역시도 각각의 균의 특성에 맞게 장내 세균으로서 본 연구에서 실험한 대하에서도 역시 성장을 향상 시키는 결과를 가져왔다.

어린새우로부터 hemocyte를 채취하여 면역반응을 분석하는 것이 불가능하다. 따라서 면역 관련 유전자인 proPO, LYS, SP의 발현을 SYBR green real-time PCR을 통해 분석하는 방법을 택하였다. 새우는 무척추동물로서 비특이적인 면역반응을 가지고 있다 (Sakai 1999, Bache`re 200). 따라서 백신이나 면역증강제 같은 경우에는 특이 병원체에 대하여 짧은 기간에만 효과가 있다 (Sung et al. 1996). 이와 대조적으로 효과적인 유용미생물 처리를 통하여 새우의 장에서 우점을 선점하고 혈청학적 면역력과 경쟁적 배제를 증가시키는 결과를 가져와서 비특이적 질병 보호 대하여 더 크게 작용을 한다. 특히 *Bacillus sp.*의 사용은 tiger shrimp에서 세포성과 체액성 면역 방어 활성을 통해 질병을 예방하는 결과를 가져온다 (Rengpipat S et al. 2000). 또 다른 연구에서는 Indian white shrimp 인 *Fenneropenaeus indicus*의 새우에 *Bacillus* 균을 사용하여 소화관 내의 분포를 보았는데 초기 새우의 소화관내에서 *Bacillus* 균의 수가 증가되어 있는 것으로 보였다 (Saeed Ziaei-Nejad et al. 2006). 또한 *Bacillus* 균은 다른 균에 비해 영양적으로나 공간적으로 앞지를 수 있는 균이며, antibiotics를 생산을 통해 다른 균을 배척할 수 있다 (Moriarty, 1998, Verschuere et al., 2000). 하지만 nauplius기에서 post-larvae기 이전까지는 효과

가 있었지만 양식장 환경상태에서는 *Bacillus* 균의 colonization된 비율이 매우 낮아서 그 효과가 불분명하다는 연구 결과도 있다 (Saeed Ziaei-Nejad et al. 2006). 매우 다양한 antibiotic 물질이 자연적으로 *Bacillus* 균에 의해 생성되어지며 *Bacillus* 균이 노출이 안되었을 때는 다른 균이 저항 유전자를 가지기 힘들 것으로 보인다 (Moriarty, 1998). 또한 *Bacillus* 균은 세포성, 체액성 면역반응을 활성화 시켜 병원체에 대하여 저항성을 증가시켜 새우의 생존율을 향상시키는 연구결과도 있다 (Rengpipat et al., 2000). 갑각류에서 proPO system은 방어 반응에 가장 중요한 역할을 한다. serine proteinase에 의해서 proPO가 PO로 전환되는데 (Söderhäll K and Cerenius L. 1998), serine proteinase가 PO의 활성화와 반응에 연관된 중요한 효소이다 (Perazzolo LM and Barracco MA. 1997). *Bacillus coagulans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Rhodopseudomonas palustris* 균을 사용하였을 때 유용미생물을 사용하지 않은 구간에 비해서 각각 phenoloxidase 의 활성이 나타났다 (YANBO WANG and QING GU, 2010). 다른 연구에서는 흰대리 새우의 larvae 시기에 *Bacillus subtilis*를 사용하였을 때 균을 사용하지 않은 구간에 비하여 proPO gene expresstion이 높아지는 경향을 보였다 (Kuan-Fu Liu et al. 2010). 유용 미생물을 사용하여 처리한 실험에서 새우 면역반응이 증가한 결과가 더 많은 연구들이 있다 (Chiu CH et at. 2007, Tseng DY et al. 2009, Rengpipat S et al. 2000). Chiu CH et at 연구에서는 *L. vannamei*에서 *L. plantarum* 균을 사용하여 경구 투여를 통해 *V. alginolyticus*를 주입시켰을 때 질병에 대한 저항성과 면역반응이 증가되는 결과를 보였다. 그리고 Rengpipat et al. 실험에서는 *Bacillus* 균을 주입한 후 *P.monodon*의 PO 활성과 phagocytic activity가 증가되었다는 연구결과를 보였다. 새우에서 더 큰 phagocytic activity를 위한 granulocyte에 작용에 의해 면역 기능을 유발하는 것이 *Bacillus* 균의 표면에 있는 peptidoglycan과 관련되어 있다고 생각한다 (Itami T et al. 1998). 또 다른 연구에서는 사료에 *B. subtilis* 균을 첨가하여 *L. vannamei* juvenile에 줬을 때 *V. alginolyticus*의 병원성 미생물에 대해 질병 저항성을 가졌으며, PO activity와 phagocytic activity, clearance efficiency 의 면역반응이 증가했지만, total hemocyte count, superoxide anion, superoxide dismutase, glutathione peroxidase에 대한 유의성은 발견되지 않은 연구 결과도 있다 (Tseng DY et al. 2009). 하지만 *B. subtilis*를 첨가한 사료를 첨가한 새우에서 PO activity와 proPO gene expression의 증가는 보였으나 Serine proteinase expresstion은 유의성이 없었다 (Tseng DY et al. 2009). 또 다른 연구에서는 흰대리 새우의 larvae 시기에 *Bacillus subtilis*를 사용하였을 때 균을 사용하지 않은 구간에 비하여 serine proteinase gene expresstion이 유의한 차이가 없는 것을 보였다 (Kuan-Fu Liu et al. 2010). antibacterial protein 인 Lysozyme은 무척추 동물의 선천적 면역 시스템에서 중요한 성분으로 보고되어있으며, 용균성 영향을 기본으로 하는 단백질이다 (Jolles P and Jolles. 1984). 또한, 유용미생물을 처리한 *L. vannamei* postlarvae기에서 Lysozme의 발현이 증가되었는데 antibacterial activity의 증진으로 인한 것으로 간주되어진다 (Taoka et al. 2009). 흰대리 새우의 larvae 시기에 *Bacillus subtilis*를 사용하였을 때 균을 사용하지 않은 구간에 비하여 Lysozyme gene expresstion이 높아지는 경향을 보였다 (Kuan-Fu Liu et al. 2010). 또한 킬라피아에서 *Lactobacillus* 균과 *Bacillus* 균을 사용하여 Lysozyme의 활성을 비교해 보았는데 control 구간에 비해 각각의 균에 대해서 Lysozyme의 활성이 증가한 경향을 보였으며 이 두가지 균을 조합하였을 때가 control 구간뿐만 아니라 각각의 균을 처리했을 때 보다 더 높은 Lysozyme의 활성을 보였다 (Salah et al. 2008).

위의 연구 결과에서 보듯이 본 연구에서도 proPO, LYS의 활성을 보인 것도 bio-floc 내의 *Bacillus* 균과 *Lactobacillus* 균의 작용으로 인해 새우 내 간체장의 활성이 높아지고 우점을 통하여 비특이적 면역능이 향상되었고, 유용 미생물균들 즉, 여러 종의 균을 합쳐서 만든 bio-floc에 의해 Serine proteinase는 효소역할로서만 수행만 할뿐 유의한 차이를 보이지는 않았지만 proPO gene expresstion을 증가가 나타났으며 면역 유전자에 긍정적인 영향을 끼친 것으로 생각되어진다.

Superoxide dismutase (SOD)는 세포의 항산화 방어 메카니즘에 중요한 역할을 한다. SOD 활성의 조절은 생물학적 시스템 내 산화 스트레스에 대한 초기 지표로, 항산화 효소 중 oxyradical 형성을 억제하여 산소 독성에 대한 첫 방어선으로 고려된다 (Firat et al., 2009; Li et al., 2010). 본 연구에서는 대하의 간체장 내의 SOD 활성을 측정하였다. 그 결과 전체적으로 control에 비해서 bio-floc을 넣어준 곳에서 80, 100, 120, 140 농도에서 유의한 활성 감소를 나타냈다. 일반적으로 SOD는 중금속이나 독성물질에 노출 시 활성이 증가하는 경향을 보인다. 세포 내 유해성 물질은 단백질, 핵산, 지질의 손상에 의해 결국 세포 사멸을 야기하는 활성산소종 (ROS)을 발생시킨다. ROS의 해로운 효과는 reduced glutathione 같은 비효소적 항산화물질 (Zirong and Shijun, 2007)과 superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione reductase (GR) 같은 항산화 효소 (Oruç and Üner, 2000)의 항산화 활동에 의해 조절된다. 위에서 언급했듯이 세포 내에선 산화 스트레스에 대해 항산화 활동을 한다. 주요 항산화 효소로 superoxide dismutase (SOD)는 superoxide anion을 hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ )로 변환시키며, catalase (CAT)는  $H_2O_2$ 를 물과 산소 분자로 분해시킨다. 또한 glutathione peroxidase (GPx)는  $H_2O_2$ 와 lipid hydroperoxide 모두 환원시킨다 (Nordberg and Arnér, 2001; Almeida et al., 2007). Glutathione S-transferase (GST)는 무독화 효소로 모든 호기성 생물에 존재하며, 내인성과 외인성 기질을 tripeptide GSH 황 원자의 친핵성 공격을 촉매한다. 그럼으로써 기질을 reduced glutathione에 결합시키거나 glutathione disulfide 생성으로 환원 또는 이성체로 변환시킨다 (Vuilleumier, 1997 ;Kim et al., 2001; Vuilleumier and Pagni, 2002). 또한 지질과 핵산의 hydroperoxide와 다른 지질 과산화 생성을 제거하는 기능도 있다고 알려져 있다 (Hayes et al., 1995). 세포의 주요 non-protein인 glutathione은 xenobiotics, oxyradicals, metal cations의 독성에 대한 세포 방어에 관여한다 (Meister and Anderson, 1983; Segner and Braunbeck, 1998). 한 연구에서는 *Bacillus coagulans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Rhodopseudomonas palustris* 균을 사용하였을 때 유용미생물을 사용하지 않은 구간에 비해서 각각 SOD의 활성이 증가하는 경향을 나타내었고 (YANBO WANG and QING GU, 2010), 이와 비슷하게 흰다리 새우에서 *bacillus* 균을 사용했을 때 비슷한 결과를 나타낸 연구도 있었다. (Gullian et al. 2004) 하지만 본 연구에서는 SOD의 양이 control에 비해 bio-floc을 처리한 구간에서 유의적으로 감소된 현상이 발생했는데 이는 활성산소 즉, ROS의 발생이 control 구간에 비해 낮아진 것으로 생각되어지며, 이에 따라 발생하는  $H_2O_2$ 의 양이 줄어들면서 catalase의 양도 줄어든 것으로 보인다. 또한 비슷한 작용을 하는 GPx도 역시 줄어들면서 아예 작용하는 GSH의 양이 감소가 발생했다고 추측되어

진다. 이는 control 구간이 bio-floc을 처리한 구간보다 수질 오염이 심해지면서 스트레스나 유기물에 의한 산화작용에 의한 것으로 생각되어진다.



## V. 요약

유용미생물은 예전부터 사용되어왔고 그 효용범위가 넓다. 특히 수산양식에서의 적용을 통해 생산성 향상을 향상시켜 양식 발전을 위한 연구가 진행되고 있다. 그 중에 본 연구에서는 *Bacillus sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Rhodobactor sp.* 세 가지 균을 조합하여 만든 bio-floc을 50,000:1의 비율로 희석하여 이를 100 %로 하였고, 이때 총 세균 수는  $10^9$  CFU/ml이었다. 실험에 사용한 bio-floc 농도는 각각 0, 60, 80, 100, 120 및 140 % 6구간을 설정하였다. 각각의 bio-floc 농도에서 3개의 균의 조성변화를 확인한 결과, 시간이 지날수록 균의 농도가 감소하는 경향이 나타났고, bio-floc의 효율성은 5일차에  $10^6$  CFU/ml의 농도가 유지되므로 5일마다 bio-floc을 첨가하였다. Bio-floc 첨가에 따른 사육 환경 및 생산성 (성장, 면역, 산화효소) 분석은 45 및 90일째 실시하였다.

대하 사육수 중의 영양염류와 암모니아 농도를 측정된 결과, bio-floc을 처리한 구간이 대조구 보다 낮게 나타난 것으로 보아 bio-floc 처리가 수질을 개선한 것으로 보인다. 대하의 체장 및 체중 성장은 bio-floc의 농도 100, 120, 140 %에서 대조구에 비해 유의적으로 증가하였으며 ( $P < 0.05$ ), 특히 120 %에서 가장 높은 성장을 나타냈다. 또한 면역관련 유전자 proPO와 LYS의 발현은 bio-floc 농도 120 % 이상에서 유의한 증가를 보였고, SP는 140 %에서 유의한 증가를 보였다 ( $P < 0.05$ ). SOD 활성은 bio-floc 농도 80 % 이상에서, catalase 활성은 bio-floc 농도 120 % 이상에서 유의한 감소를 보였고, GSH 활성은 모든 bio-floc 처리구간에서 유의한 감소를 나타냈다 ( $P < 0.05$ ).

따라서 본 연구결과로부터 bio-floc 처리는 대하 양식장의 환경개선 및 대하의 생산성을 향상시킬 것으로 예상되며, 그 농도는 120 %가 가장 적합한 것으로 생각된다. 미생물 균의 농도 역시  $10^6$ 균 이상 유지되었을 때 효과가 크게 나타나므로 bio-floc의 농도가 떨어지는 5일마다 이 조합된 bio-floc을 넣어주게 되면 대하를 기르는데 있어서 생산성 향상에 기여를 할 것으로 본다.

## VI. 참고문헌

- A. Hiraishi, J.L. Shi and H. Kitamura (1989). Effects of organic nutrient strength on the purple non-sulfur bacterial content and metabolic activity of photosynthetic sludge for wastewater treatment, J. Ferment. Bioeng. 68 269-276.
- Ali (2000). Probiotics in fish farming. Evaluation of a bacterial mixture. PhD Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences. Ume<sup>o</sup>a, Sweden.
- Almeida, E.A., Bainy, A.C.D., Loureiro, A.P.M., Martinez, G.R., Miyamoto, S., Onuki, J., Barbosa, L.F., Garcia, C.C.M., Prado, F.M., Ronsein, G.E., Sigolo, C.A., Brochini, C.B., Martins, A.M.G., Medeiros, M.H.G. and Di Mascio (2007). Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. Comp. Biochem. Physiol., Part A: Mol. Integr. Physiol. 146, 588-600.
- Bache`re E. (2000). Shrimp immunity and disease control. Aquaculture 191-311.
- Barrow, P.A., Simpson, J.M. and Lovell, M.A (1988). Intestinal colonization on the chicken by food-poisoning *Salmonella serotypes*. Microbial characteristics associated with faecal excretion. Avian Pathology 17, 571-588.
- Bondad-Reantaso, M.G., R.P. Subasinghe, J.R. Arthur, K. Ogawa , S. Chinabut , R. Adlard, Z. Tan and M. Shariff (2005). Disease and health management in Asian aquaculture. Vet. Parasitol., 132:249-272.
- Bondad-Reantaso (2005). Disease and health management in Asian aquaculture. Vet. Parasitol., 132:249-272.
- Boyd, C.E. and A. Gross (1998). Use of probiotics for improving soil and water quality in aquaculture ponds. In: T.W.Flegel (Ed.) Advances in shrimp biotechnology. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok.
- C. Liu, W. Xia, J.W. Park (2007). A wind-driven reverse osmosis system for aquaculture wastewater reuse and nutrient recovery, Desalination 202:24-30.

- Chang CI and Liu WY (2002). An evaluation of two probiotic bacterial strains, *Enterococcus faecium* SF68 and *Bacillus toyoi*, for reducing edwardsiellosis in cultured European eel, *Anguilla anguilla* L. *Journal of Fish Diseases* 25:31-115.
- Chiu CH, Guu YK, Liu CH, Pan TM and Cheng W (2007). Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. *Fish Shellfish Immunol* 23:364e77.
- Daly, C (1983). The use of mesophilic cultures in the dairy industry. *Antonie van Leeuwenhoek* 49, p. 297.
- D. White (2000). *Physiology and biochemistry of prokaryotes*, Oxford Univ. Press, New York, NY.
- Faramazi, M, S. Kiaalvandi, M. Lashkarbolooki and F. Iranshahi (2011). The investigation of *Lactobacillus acidophilus* as probiotics on growth performance and disease resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *American-Eurasian Journal of Scientific Research*, 6(1):32-38
- Firat, O., Cogun, H.Y., Aslanyavrusu, S. and Kargin, F. (2009). Antioxidant responses and metal accumulation in tissues of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* under Zn, Cd and Zn plus Cd exposures. *J. Appl. Toxicol.* 29, 295-301.
- Fuller, R., Houghton, S.B. and Brooker, B.E (1981). Attachment of *Streptococcus faecium* to the duodenal epithelium of the chicken and its importance in colonization of the small intestine. *Applied and Environmental Microbiology* 41, 1433-1441.
- Fuller (1992). *Probiotics: History and Development of Probiotics*. Chapman & Hall, New York
- G. Najafpour, H. Younesi and A.R. Mohamed (2006). A survey on various carbon sources for biological hydrogen production via the water-gas reaction using a photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*, *Energy Sources, Part A: Recovery Until Environ Effects* 28:1013-1026.
- Garvie, E.I., Cole, C.B., Fuller, R. and Hewitt, D (1984). The effect of yoghurt on some components of the gut microflora and the metabolism of lactose in the

rat. *Journal of Applied Bacteriology* 56, 237-245.

Gilliland, S.E (1985). Role of starter culture bacteria in food preservation. In: *Bacterial Starter Cultures for Food* (ed. S. E. Gilliland), CRC Press, Boca Raton, FL. p.175.

Gilliland, S.E., Bruce, B.B., Bush, L.J. and Stanley, T.E (1980). Comparison of two strains of *Lactobacillus acidophilus* as dietary adjuncts for young calves. *Journal of Dairy Science* 63, 964-972.

Gilliland, S.E., Nelson, C.R. and Maxwell, C (1985). Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology* 49, 377-381

Itami, T., Asano, M., Tokushige, K., Kubono, K., Nakagawa, A., Takeno, N., Nishimura, H., Maeda, M., Kondo, M. and Takahashi, Y (1998). Enhancement of disease resistance of Kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. *Aquaculture* 164, 277-288.

Jay J.M (1992). Fermented foods and related products of fermentation. In: *Modern Food Microbiology*, Fourth edition, (ed. J. L. Jay) Van Nostrand Reinhold, New York. pp. 371-409.

John D. Hayes, and David J. Pulford (1995). The Glutathione S-Transferase Supergene Family: Regulation of GST and the Contribution of the Isoenzymes to Cancer Chemoprotection and Drug Resistance Part I

Jolles P and Jolles J (1984). What's new in lysozyme research? *Mol Cell Biochem* ;63:165e89.

Jonsson, E. and Henningson, S (1991). Establishment in the piglet gut of *lactobacilli* capable of degrading mixed-linked  $\beta$ -Dglucans. *Journal of Applied Bacteriology* 70, 512-516.

Kenneth Söderhäll and Lage Cerenius (1998). Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity.

Kim, D.H. and B. Austin (2006). Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. *Fish & Shellfish*

Immunology, 21:513-524.

Kim, H.G., Park, K.N., Cho, Y.W., Park, E.H., Fuchs, J.A. and Lim, C.J (2001). Characterization and regulation of glutathione Stransferase gene from *Schizosaccharomyces pombe*. Biochim. Biophys. Acta. 1520, 179-185.

Kuan-Fu Liu, Chiu-Hsia Chiu, Ya-Li Shiu, Winton Cheng and Chun-Hung Liu (2010). Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae

L.E. de-Bashan and Y. Bashan (2010). Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects, Bioresource Technol. 101:1611-1627.

Li, Z.H., Velisek, J., Zlabek, V., Grabic, R., Machova, J., Kolarova, J. and Randak, T. (2010). Hepatic antioxidant status and hematological parameters in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, after chronic exposure to carbamazepine. Chem. Biol. Interact. 183, 98-104.

Maeda M and Liao IC (1992). Effect of bacterial population on the growth of a prawn larva, *Penaeus monodon*. Bulletin of National Research Institute of Aquaculture 21:2529.

Mariel Gulliana, Fabiano Thompsonb, Jenny Rodriguezc (2004). Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*

Meister A and Anderson M.E. (1983). Glutathione. Annu. Rev. Biochem. 52, 711-760.

McIntosh, D., Samocha, T.M., Jones, E.R., Lawrence, A.L., McKee, D.A., Horowitz, S. and Horowitz, A. (2000). The effect of a commercial bacterial supplement on the high-density culturing of *Litopenaeus vannamei* with a low-protein diet in an outdoor tank system and no water exchange. Aquac. Eng. 21, 215-227.

Mohapatra, S., T. Chakraborty, A.K. Prusty, P. Das, K. Paniprasad and K.N. Mohanta (2012). Use of probiotics in the diet of rohu, *Labeo rohita* fingerlings: effects on growth nutrient digestibility, retention digestive enzyme activities and intestinal microflora. Aquaculture Nutrition, 18:1-11

Mohideen, M.M., A. Kader, T.S. Mohan, S.P. Mohamed and M.I.Z. Hussain (2010).

Effect of Probiotic Bacteria on the Growth rate of Fresh Water Fish, Catla catla. International Journal of Biological Technology, 1(2):113-117.

Moriarty, D.J.W. (1996). Microbial biotechnology: a key ingredient for sustainable aquaculture. Infofish Int. 4, 29-33.

Moriarty, D.J.W. (1998). Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. Aquaculture 164, 351-358.

Moss, S.M., Pruder, G.D., Leber, K.M. and Wyban, J.A. (1992). The relative enhancement of *Penaeus vannamei* growth by selected fractions of shrimp pond water. Aquaculture 101, 229-239.

Muzinic, L.A., K.R. Thompson, A. Morris, C.D. Webster, D.B. Rouse and L. Manomaitis (2004). Partial and total replacement of fish meal with soybean meal and brewer's gains with yeast in practical diets for Australian red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*). Aquaculture, 230:359-376.

Newaj-Fyzul A, Adesiyun AA, Mutani A, Ramsubhag A, Brunt J and Austin B (2007). *Bacillus subtilis* AB1 controls Aeromonas infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Journal of Applied Microbiology 103:1699706.

Nikoskelainen S, Ouwehand AC, Salminen S and Bylund G (2001). Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*. Aquaculture 198:22936.

Nimrat, S., S. Suksawat, T. Boonthai and V. Vuthiphandchai (2012). Potential *Bacillus* probiotics enhance bacterial numbers, water quality and growth during early development of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Veterinary Microbiology, 159:443-450

Ngan, P.T.T. and T.Q. Phu (2011). Effects of *Bacillus* bacteria (B8, B37, B38) on water quality of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) cultured tanks. Proceedings of the 4th aquaculture and fisheries conference, 28-41.

Nordberg, J. and Arner, E.S. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. Free Radical Biol. Med. 31, 1287-1312.

Peterson, B.C., N.J. Booth and B.B. Manning (2012). Replacement of fish meal in juvenile channel catfish, *Ictalurus punctatus*, diets using a yeast-derived

protein source: the effects on weight gain, food conversion ratio, body composition and survival of catfish challenged with *Edwardsiella ictaluri*. *Aquaculture Nutrition*, 18:132-137.)

Perazzolo LM and Barracco MA. The prophenoloxidase activation system of the shrimp *Penaeus paulensis* and associated factors. *Dev Comp Immunol* 1997;21:385e95.

Qi, Z.Z., X.H. Zhang, N. Boon and P. Bossier (2009). Probiotics in aquaculture of China- Current state, problems and prospect. *Aquaculture*, 290:15-21

Rengpipat, S., Phianphak, W., Piyatiratitivorakul, S. and Menasveta, P. (1998). Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. *Aquaculture* 167, 301-313.

Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S. and Menasveta, P. (1998). Probiotics in aquaculture: a case study of probiotics for larvae of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). In: Flegel, T.W. (Ed.), *Advances in Shrimp Biotechnology*. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok.

Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S. and Menasaveta, P. (2000). Immunity enhancement on black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). *Aquaculture* 191, 271-288.

Rengpipat, S., Phianphak, W., Piyatiratitivorakul, S. and Menasveta, P. (1998). Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. *Aquaculture* 167, 301-313.

Saeed Ziaei-Nejad, Mehran Habibi Rezaei, Ghobad Azari Takami, Donald L. Lovett, Ali-Reza Mirvaghefi and Mehdi Shakouri (2005). The effect of *Bacillus spp.* bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*.

Sakai M. (1999). Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture* 172:6392.

Salah Mesalhy Aly, Yousef Abdel-Galil Ahmed, Ahlam Abdel-Aziz Ghareeb and Moahmed Fathi Mohamed (2008). Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of

*Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections.

- Shariff, M., Yusoff, F.M., Devaraja, T.N. and Srinivasa Rao, S.P. (2001). The effectiveness of a commercial microbial product in poorly prepared tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius), ponds. *Aquac. Res.* 32, 181–187.
- S.J. Ferguson, J.B. Jackson and A.G. McEwan (1987) Anaerobic respiration in the *Rhodospirillaceae*: Characterization of pathways and evaluation of roles in redox balancing during photosynthesis, *FEMS Microbiol. Rev.* 46:117–143.
- Söderhäll K and Cerenius L (1998). Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr Opin Immunol* 10:23e8
- Segner H and Braunbeck T. (1998). Cellular response profile to chemical stress. In *Ecotoxicology, Part 3*, SchÜürmann G, Markert B (eds). Wiley/Spektrum Akademische, New York, 521–569.
- Soundarapandian, P., V. Ramanan and G.K. Dinakaran (2010). Effect of probiotics on the growth and survival of *Penaeus monodon* (Fabricius). Current probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* against experimental *Edwardsiella tarda* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 113:339–347.
- Stadhouders, J (1974). Dairy starter cultures. *Milchwissenschaft* 29(6), p. 329.
- Subasinghe, R.P., D. Curry, S.E. McGladdery and D. Bartley (2003). Recent technological innovations in aquaculture. Review of the State of World Aquaculture, *FAO Fisheries Circular*, pp. 59–74.
- Sung HH, Yang YL and Song YL. (1996). Enhancement of microbicidal activity in the tiger shrimp *Penaeus monodon* via immunostimulation. *Journal of Crustacean Biology* 16:27884.
- Taoka Y, Maeda H, Jo JY, Jeon MJ, Bai SC and Lee WJ (2009). Growth stress tolerance and non-specific immune response of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* to probiotics in a closed recirculating system. *Fish Sci* ;72:310e21
- T.N. Ryan, F.G. Rachel, R.L and Edward, W (2004). Godchaux, Phototrophic utilization of taurine by the purple nonsulfur bacteria *Rhodopseudomonas palustris* and *Rhodobacter sphaeroides*, *Microbiology* 150:1881–1891

- Tseng DY, Ho PL, Huang SY, Cheng SC, Shiu YL and Chiu CS, (2009). Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20. Fish Shellfish Immunol ;26:339e44.
- Vaseeharan B and Ramasamy P (2003). Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Lett Appl Microbiol 36: 83–87.
- Verschuere, L., G. Rombaut, P. Sorgeloos and W. Verstraete (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 64(4):655–671.
- Vuilleumier, S. (1997). Bacterial glutathione S–transferases: what are they good for? J. Bacteriol. 179, 1431–1441.
- Vuilleumier, S. and Pagni, M. 2002). The elusive role of bacterial glutathione S–transferases: new lessons from genomes. Appl. Microbiol. Biotechnol. 58, 138–146.
- Wang, Y.B. and Q. Gu (2010). Effect of probiotics on white shrimp (*Penaeus vannamei*) growth performance and immune response. Marine Biology Research, 6:327–332.
- Wang, Y.B. and Z.R. Xu (2006). Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. Animal Feed Science and Technology, 127:283–292.
- Wang YB, Tian ZQ, Yao JT and Li WF. (2008). Effect of probiotics, *Enterococcus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. Aquaculture 277:20307.
- Wannipa Phianphak, Sirirat Rengpipat, Somkiat Piyatiratitivorakul, and Piamsak Menasveta (1999). Probiotic Use of *Lactobacillus* spp. for Black Tiger Shrimp, *Penaeus monodon*
- Wen Luo, Xianyu Deng, Wentao Zeng and Daheng Zheng. (2012). Treatment of wastewater from shrimp farms using a combination of fish, photosynthetic bacteria, and vegetation

Yang (2011). Use of probiotics *Bacillus coagulans*, *Rhodopseudomonas palustris* and *Lactobacillus acidophilus* as growth promoters in grass carp (*ctenopharyngodon idella*) fingerlings

Yanbo Wang and Qing Gu (2010). Effect of probiotics on white shrimp (*Penaeus vannamei*) growth performance and immune response.

Zirong X. and Shijun B. (2007). Effects of waterborne Cd exposure on glutathione metabolism in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver. *Ecotoxicol. Environ. Safety*. 67, 89-94.

