

# 왕우럭 (*Tresus keenae*) 에서 분리한 장내미생물 *Bacillus species*의 균주를 이용한 생물막 (biofilm) 형성 및 효과

김철원<sup>1</sup>, 이승원<sup>2</sup>, 이영미<sup>3</sup>, 강한승<sup>3</sup>

<sup>1</sup>한국농수산대학교, <sup>2</sup>국립축산과학원, <sup>3</sup>엠에스바이오랩

## Biofilm formation and effects using strains of intestinal *Bacillus species* isolated from Surf Clam (*Tresus keenae*)

Chul Won Kim<sup>1</sup>, Seung Won Yi<sup>2</sup>, Young Mi Lee<sup>3</sup> and Han Seung Kang<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Aquaculture, Korea National College of Agriculture and Fisheries, Kongjwipatjwi-ro 1515, Wansan-gu, Jeonju, Jeollabuk-do 54874, Korea

<sup>2</sup>National Institute of Animal Science, Kongjwipatjwi-ro 1500, Iseo-myeon, Wanju-gun, Jeollabuk-do 55365, Korea

<sup>3</sup>MS BioLab, 3F, 103 Gayang-ro, Dong-gu, Daejeon 34576, Korea

### ABSTRACT

In this study, 65 strains were isolated from Surf clam and *Tresus keenae*. Among the isolated strains, *Bacillus* genus strains were used to select strains with good effects on organic matter decomposition ability, pathogenic bacteria antibacterial activity, digestion, absorption and larval growth. Biofilm formation, water purification and seedling effects were investigated using the selected strain. As a result of the study, it was confirmed that strain specificity exists in the formation of biofilms, water purification and seedling effects. The results of this study are expected to be usefully utilized in the shellfish aquaculture industry. In addition, the purpose of this study is to inform researchers that they should be interested in and do a lot of research.

**Keywords** *Tresus keenae*, *Bacillus*, biofilm, shellfish, aquaculture

### 서 론

왕우럭 (*Tresus keenae*) 은 개량조개과 (Mactridae), 왕우럭속 (*Tresus*) 에 속하며 우리나라 거제, 사천, 남해, 여수 등 남해안과 일본의 조간대에 분포 서식하는 비부착성 대형패류이다. 경제성이 높은 수산생물 왕우럭은 남획 및 연안오염의 원인 등으로 인해 자원의 감소가 일어나고 있다. 따라서 왕우럭의 자원조성이나 양식산업화를 통한 소득 창출을 이루기 위

해서는 왕우럭에 관한 기초 연구가 필요하다.

왕우럭과 관련한 기초 연구로는 수온, 염분 등과 관련하여 생리, 생화학적 변화 등에 관한 연구 (Newell & Kofoed, 1977; Loomis *et al.*, 1995; Chapple *et al.*, 1998; Shin & Wi, 2004), 수온 및 염분 등이 유생의 성장과 생존에 관한 연구 (Kang & Kim, 2018a), 산란 및 유생 발생에 관한 연구 (Kang & Kim, 2018b), 모패관리와 성숙촉진에 관한 연구 (Kim *et al.*, 2011), 사육조건과 먹이생물에 의한 유생의 성장과 생존율에 관한 연구 (Min, 2019), 장내 미생물 분리 및 항균활성에 관한 연구 (Lee *et al.*, 2005), 미생물을 이용한 유생 사육에 관한 연구 (Kang *et al.*, 2020) 등이 보고되었다.

해양의 패류 양식장은 도시화로 인한 인구증가에 따른 도시 하수의 과량유입, 해역 주변 산업시설에서 유입되는 산업용 폐수의 유입 및 양식장의 자가 오염 등으로 인하여 저질이 부식 및 황폐화 되면서 양식생물 패류의 집단폐사가 발생한다는 보고가 있다 (Choi *et al.*, 1999). 오염물질 및 생활하수의 유입은 저질 및 퇴적층에 산소 결핍현상 유도, 질소 및 인산염의 해

Received: December 10, 2021; Revised: December 22, 2021; Accepted: December 30, 2021

Corresponding author: Han Seung Kang

Tel: +82 (42) 632-9753, e-mail: hanseungkang66@gmail.com  
1225-3480/24807

This is an Open Access Article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License with permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproducibility in any medium, provided the original work is properly cited.



Fig. 1. The photography of shellfish of *Tresus keenae*.

수로의 유입 증가 등이 적조현상 발생의 원인으로 작용하여 정착성 수산생물의 서식을 방해하고 또한 채묘나 양식도 힘들게 한다는 연구 결과도 있다 (Deng *et al.*, 2010).

생물막 (Biofilm) 이란, 미생물 군집으로 부착 표면에 세포들이 서로 부착되어 형성된 것을 말한다 (Banin *et al.*, 2005). 생물막은 식품뿐만 아니라 정수기, 상하수도, 산업용배관, 공기정화시설, 생활용품 및 의료기기 등 모든 종류의 인공 시설물 표면에 미생물들이 부착하면서 형성하는데, 부유 상태의 세균 (planktonic bacterial cells) 세포와 상당히 다른 미생물 군집으로 소독제 및 항생제에 대한 독특한 내성으로 인해 인공장기, 치과 의료기구 등에서의 생물막의 형성은 우리 몸에 질병을 발생시키는 원인으로 작용하여 공중보건의 문제가 발생할 가능성이 있다 (Donlan and Costerton, 2002; Donlan *et al.*, 2004; Rayner *et al.*, 2004; Cappelli *et al.*, 2007). 생물막내의 세균 등의 미생물은 부유 상태의 세균보다 항생물질에 대한 내성이 최고 1,000배 이상 높아 기존 항생제로는 치료하기가 어렵다고 알려져 있다 (Rasmussen *et al.*, 2006).

생물막은 보건위생적 측면에서의 위험성에 비교하여 환경공학 적 활용에서는 물의 배수 중 유기물을 분해하거나 제거하기 위해 생물막을 수질정화에 사용하고 있다. 물의 배수에 생물막의 활용은 친환경적 생물정화방법으로 오염물질을 정화할 수 있는 미생물의 동정, 분리를 통해 미생물을 선정하여 유기오염물질 등의 다양한 환경오염물질들의 분해를 통한 수질 정화가 이루어진다 (Chung *et al.*, 2003). 자연에서도 미생물이 모래나 자갈 등에 생물막을 형성하여 모래나 자갈의 입자 사이로 오염수가 통과될 경우, 이들 입자 표면에 생성된 생물막에 의해 유기물을 분해시킨다고 알려져 있다 (Choi *et al.*, 2003). 해양생태계에서 환경정화에서의 생물막의 활용 사례는 원유, 탄화수소 오염의 정화 및 인공물의 방오화합물로 사용한다는 보고가 있다 (Carla *et al.*, 2010; Debdeep *et al.*, 2013).

본 연구진은 왕우럭 인공종묘생산의 효율을 개선하기 위한 목표의 선행연구로 왕우럭 소화관에서 프로바이오틱스의 세균 탐색을 통해 고분자 유기물질 분해능력이 뛰어난 *Bacillus*

spp. 균주를 선별하여 5종의 패류 병원성 세균에 대한 항균활성을 수산용 항생제를 포함한 항생제 10개를 양성 대조군으로 설정하여 상대적으로 항균활성을 비교 조사하여 다수의 미생물들이 고분자 분해 활성 및 항균활성을 가지는 것을 확인하였다 (Yi *et al.*, 2017). 또한 왕우럭에서 분리한 65개의 *Bacillus* spp. 중에서 고분자 유기물 분해능력 및 병원성 세균 항균 활성이 우수한 5개의 *Bacillus* spp.을 이용하여 왕우럭 유생 사육에 적용한 결과 유생의 성장 및 생존율에 긍정적인 영향을 미치는 것을 확인하였다 (Kang *et al.*, 2020).

본 연구에서는 왕우럭에서 분리하여 *in vitro* 실험에서 고분자 유기물질 분해능력과 항균활성 능력 검증 (Yi *et al.*, 2017) 및 *in vivo* 실험에서 유생의 사육에 긍정적인 영향 (Kang *et al.*, 2020) 을 미친 *Bacillus* spp.로 생성한 생물막을 이용하여 인공종자생산 과정에 소화 및 흡수를 돕는 작용뿐 아니라 먹이 찌꺼기 등 유기물에 대한 강력한 분해자로서의 수질 정화 역할을 통해 인공종자 채묘과정에 미치는 영향에 대해 살펴보고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 균주의 분리 및 동정

본 연구에 사용된 왕우럭 (*Tresus keenae*) 은 잠수기 어업을 이용하여 포획되었으며 여수의 한 양식업체를 통해 2016년 7월과 11월에 각각 30마리씩 수집하였다, 2016년 7월에 수집한 왕우럭의 평균 각장 크기는  $11.49 \pm 0.55$  cm, 각고  $7.87 \pm 0.36$  cm, 각폭  $4.59 \pm 0.27$  cm, 전중량  $208.67 \pm 35.63$  g, 육중  $67.72 \pm 6.92$  g이었다. 2016년 11월에 수집한 왕우럭의 평균 각장 크기는  $12.88 \pm 0.18$  cm, 각고  $9.12 \pm 0.35$  cm, 각폭  $5.06 \pm 0.42$  cm, 전중량  $353.44 \pm 29.72$  g, 육중량  $95.22 \pm 6.25$  g이었다 (Fig.1). 왕우럭의 외부형질 측측을 마친 후 탈출 수돗물로 2-3회 정도 세척하여 불순물을 제거한 뒤 멸균된 해부용 칼을 이용하여 패각과 근육을 제거하고 소화관을 분리하였다. 분리된 왕우럭 각 개체의 장은 상온의 멸균

PBS에 3회 세척하였고 무게를 측정된 뒤 균질화기기 (Omni homogenizer, Waterbury, CT) 를 사용하여 마쇄하였다. 마쇄액은 PBS에 10:1, 100:1로 희석하여 tryptic soy agar (TSA), 2% NaCl을 첨가한 TSA, marine agar (MA), MRS agar 배지에 도말하여 25°C에서 48시간까지 배양하였으며, 24시간째, 48시간째, 72시간째에 세균의 성장을 확인 후 모양, 색, 크기가 다른 colony를 분리하여 MA에 순수 배양하였다. 순수 배양한 세균은 단일 colony로 성장한 것을 확인한 뒤 marine broth (MB), TSB, BHI 배지에 옮겨 증강 배양 하였고, 25% glycerol이 첨가된 MB 배지에 현탁시켜 -80°C에 보관하였다.

각 균주의 DNA 추출은 DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany) 를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 수행하였다. 추출된 DNA는 Epoch spectrophotometry 의 take 3 session (Biotek, MA, USA)을 이용해 260 nm, 280 nm, 320 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

균주의 동정은 16S rRNA 유전자 27F 및 1492R primer 를 이용해 DNA Engine Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad, CA, USA) 로 PCR을 수행하여 16S rRNA 유전자를 증폭하였다. PCR 산물은 정제 후 BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) 을 사용해 시퀀싱 반응을 진행하였고 잔여 dNTP와 반응물을 제거한 후 ABI 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, CA, USA) 를 사용하여 염기서열을 분석하였다 (Macrogen, Daejeon, Korea). 분석된 16S rRNA 유전자 염기서열은 BioEdit software와 SeqMan software (DNASTAR, WI, USA) 를 이용하여 trimming, alignment, assembly를 수행한 뒤 BLAST search (NCBI, MD, USA) 를 이용하여 각 세균을 동정하였다. BLAST search만으로 종 단위까지 정확한 동정이 어려운 경우, 각 세균의 genus에 속하는 type strain을 수집하여 염기서열의 상동성 비교 및 계통분석을 실시하여 동정하였다.

## 2. 장내 미생물의 생물막 (biofilm) 형성 능력

본 연구진의 선행 연구에서 왕우력의 장에서 분리된 장내미생물 중 in vitro 실험에서 고분자 유기물질 분해능력과 항균 활성 능력 검증 및 in vivo 실험에서 유생의 사육에 긍정적 영향을 미친 미생물 TKI01 (*B. vietnamensis*), TKI02 (*B. thuringiensis*), TKI14 (*B. amyloliquefaciens*), TKI18 (*B. stratosphericus*), TKI26 (*B. thuringiensis*), TKI32 (*B. amyloliquefaciens*), TKI42 (*B. amyloliquefaciens*) 7종을 선택하여 실험에 사용하였다. TCPM (Tissue Culture Plate Method) 방법으로 생물막의 형성 능력을 평가하였다. 균주의 배양에 사용하는 배지는 tryptic soy broth (TSB) 배지, 1%

glucose가 첨가된 TSB (TSBglu) 배지 및 brain-heart infusion (BHI) 에 2% sucrose가 첨가된 BHIsuc배지 등이며 배양시험 시 96-well tissue culture plate에 용량 90 ul 씩 분주하여 넣었다. 미생물 균주는 각각 10 ul 접종하여 25°C에서 48시간 배양하였다. 배양액을 제거하고 PBS로 3회 세척한 뒤 0.1% crystal violet solution을 이용해 각 well을 5분 동안 염색하였다. PBS로 2회 세척한 뒤 수분을 제거하기 위해 air-dry하였다. 염색된 생물막은 정량적 분석을 위해 100% ethanol로 10분 동안 용해하였고, 570 nm에서 흡광도를 측정 한 값으로 생물막 형성능력을 평가하였다.

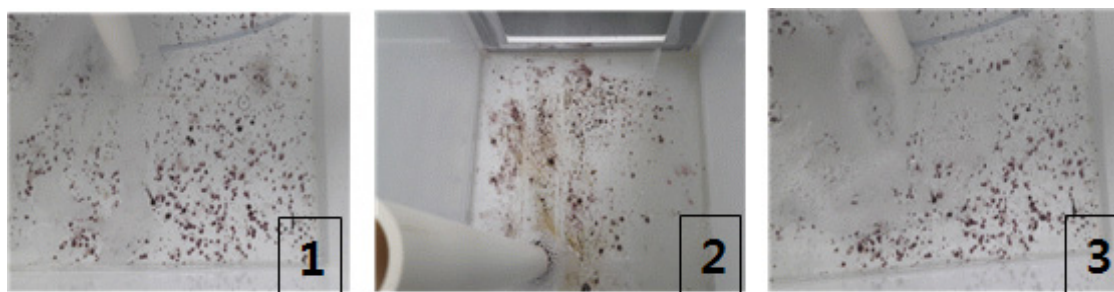
## 3. 생물막 형성에 따른 수질 변화

왕우력 장내미생물 7종의 미생물 균주 중 생물막 형성능력에서 강한 생물막 형성이 관찰된 TKI26 (*B. thuringiensis*), TKI32 (*B. amyloliquefaciens*), TKI42 (*B. amyloliquefaciens*) 3종 균주와 TKI26 + TKI32 + TKI42 혼합균주를 30 L 사각 수조에  $1.0 \times 10^6$  CFU/ml농도로 첨가하여 6일 동안 생물막이 시각적으로 확인할 수 있을 정도로 형성시켰다. 그리고 다시 9일 동안 농축먹이생물인 *I. galbana*를 1 ml ( $10 \times 10^9$  cells/ml) 를 첨가하여 수질의 변화를 3일 간격으로 관찰하였다. 수온, 염분, DO, pH는 YSI-2000을 사용하여 측정하였으며 암모니아성 질소 ( $\text{NH}_4$ ) 와 아질산성 질소 ( $\text{NO}_2$ ) 함량을 조사하였는데 암모니아성 질소 ( $\text{NH}_4$ ) 분석은 Indophenol법을 이용하였는데 전처리 후 분광광도계의 630 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 농도를 산출하였다. 또한 아질산성 질소 ( $\text{NO}_2$ ) 분석은 NED 법을 이용하였는데 전처리 후 분광광도계의 530 nm의 파장의 흡광도를 측정하여 농도를 산출하였다.

## 4. 생물막 형성에 따른 체묘 효과

생물막에 따른 체묘 효과 실험은 TKI26 (*B. thuringiensis*), TKI32 (*B. amyloliquefaciens*), TKI42 (*B. amyloliquefaciens*) 3종 균주를 30L pp사각수조에서 각각  $1.0 \times 10^6$  CFU/ml농도로 첨가하여 5일에 걸쳐 생물막을 형성하였다 (Fig.2). 실험에 사용된 왕우력 부착기 유생 (각장  $235.9 \pm 3.7 \mu\text{m}$ ) 은 안점과 발이 발달되어 있으며 섬모에 의한 먹이섭취가 활발한 D상부터 20일 동안 사육한 유생이었다. 먹이생물은 *I. galbana*와 *C. simplex*를  $3-15 \times 10^4$  세포/m 공급하였으며, 수온은  $24.5 \pm 1.0^\circ\text{C}$ 를 티타늄 히터로 유지하였고 수용밀도는 10 마리/ml이었다. 실험기간은 3일이었으며 체묘 유무는 사육수중에 부유하는 개체와 수조바닥 1 cm<sup>2</sup> 면적에서 채집한 개체를 실체현미경 (Olympus SZX7) 으로 개수하여 체묘율을 계산하였다.

## 결 과



**Fig. 2.** Biofilm using intestinal microorganism for seeding. 1: *B. amyloliquefaciens* (TKI42) 2: *B. amyloliquefaciens* (TKI32) 3: *B. thuringiensis* (TKI26).

**Table 1.** List of 65 bacteria strains isolated from the intestine of *Tresus keenae*.

Isolate	Season	Identification	Isolate	Season	Identification
TKI1	Summer	<i>Bacillus vietnamensis</i>	TKI39	Summer	<i>Neisseria flavescens</i>
TKI2	Summer	<i>Bacillus thuringiensis</i>	TKI40	Summer	<i>Lactococcus lactis</i>
TKI3	Summer	<i>Streptococcus parauberis</i>	TKI41	Summer	<i>Lactococcus lactis</i>
TKI4	Summer	<i>Pseudomonas pachastrellae</i>	TKI42	Summer	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
TKI5	Summer	<i>Vagococcus carniphilus</i>	TKI43	Summer	<i>Kurthia gibsonii</i>
TKI6	Summer	<i>Tenacibaculum lutimaris</i>	TKI45	Summer	<i>Shewanella colwelliana</i>
TKI7	Summer	<i>Shewanella gaetbuli</i>	TKI47	Summer	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
TKI8	Summer	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	TKI48	Summer	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
TKI9	Summer	<i>Bacillus aquimaris</i>	TKI49	Summer	<i>Vibrio neocaledonicus</i>
TKI10	Summer	<i>Vibrio alginolyticus</i>	TKI50	Summer	<i>Streptococcus mitis</i>
TKI11	Summer	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	TKI51	Autumn	<i>Shewanella</i> sp.
TKI12	Summer	<i>Acinetobacter venetianus</i>	TKI52	Autumn	<i>Enterococcus faecalis</i>
TKI14	Summer	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	TKI53	Autumn	<i>Microbacterium oxydans</i>
TKI15	Summer	<i>Psychrobacter nivimaris</i>	TKI54	Autumn	<i>Marinomonas pontica</i>
TKI16	Summer	<i>Vibrio natriegens</i>	TKI55	Autumn	<i>Bacillus vietnamensis</i>
TKI17	Summer	<i>Planococcus</i> sp.	TKI56	Autumn	<i>Shewanella arctica</i>
TKI18	Summer	<i>Bacillus stratosphericus</i>	TKI57	Autumn	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
TKI19	Summer	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	TKI58	Autumn	<i>Psychrobacter glacincola</i>
TKI20	Summer	<i>Microbacterium flavum</i>	TKI59	Autumn	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.
TKI21	Summer	<i>Acinetobacter towneri</i>	TKI64	Autumn	<i>Staphylococcus hominis</i>
TKI22	Summer	<i>Staphylococcus stepanovicii</i>	TKI66	Autumn	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.
TKI23	Summer	<i>Microbacterium esteraromaticum</i>	TKI67	Autumn	<i>Shewanella fidelia</i>
TKI26	Summer	<i>Bacillus thuringiensis</i>	TKI68	Autumn	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.
TKI27	Summer	<i>Pantoea ananatis</i>	TKI69	Autumn	<i>Psychrobacter fozii</i>
TKI28	Summer	<i>Myroides pelagicus</i>	TKI70	Autumn	<i>Shewanella</i> sp.
TKI29	Summer	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	TKI71	Autumn	<i>Tenacibaculum discolor</i>
TKI30	Summer	<i>Lactococcus raffinolactis</i>	TKI72	Autumn	<i>Colwellia aestuarii</i>
TKI31	Summer	<i>Vibrio</i> sp.	TKI73	Autumn	<i>Shewanella</i> sp.
TKI32	Summer	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	TKI74	Autumn	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.
TKI33	Summer	<i>Enterococcus devriesei</i>	TKI75	Autumn	<i>Shewanella arctica</i>
TKI34	Summer	<i>Vagococcus carniphilus</i>	TKI76	Autumn	<i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i>
TKI36	Summer	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	TKI77	Autumn	<i>Psychrobacter piscatorii</i>
TKI37	Summer	<i>Bacillus galactosidilyticus</i>			

**Table 2.** Biofilm formation ability performed by the Tissue Culture Plate Method (TCPM) method.

Isolate	TCP		
	TSB	TSB <sub>glu</sub>	BHI <sub>suc</sub>
TKI01	< 0.12	< 0.12	< 0.12
TKI02	< 0.12	< 0.12	0.1273 ± 0.0040
TKI14	0.1313 ± 0.0095	< 0.12	< 0.12
TKI18	< 0.12	0.1207 ± 0.0080	0.1303 ± 0.0131
TKI26	< 0.12	< 0.12	0.1223 ± 0.0023
TKI32	< 0.12	< 0.12	0.1270 ± 0.0060
TKI42	< 0.12	< 0.12	0.2603 ± 0.1407

### 1. 균주의 분리 및 동정

2016년 7월 여름에 채집된 왕우럭 (n = 30) 의 소화관에서 43주, 11월 가을에 채집된 왕우럭 (n = 30) 의 소화관에서 22주로 총 65주의 분리주가 수집되었다. 그 중에서 여름에 수집한 왕우럭 분리주 43주는 19개의 속과 중 수준에서 동정되지 않은 세균 2종을 포함하여 36개의 종으로 구성되어 있었고, 가을철에 수집한 왕우럭 장 분리주 22개는 10개의 속과 중 수준에서 동정되지 않은 세균 5종을 포함하여 19개의 종으로 구성되어 있었다 (Table 1) (Yi *et al.*, 2017; Kang *et al.*, 2020).

### 2. 장내 미생물의 생물막 (biofilm) 형성 능력

TCPM (Tissue Culture Plate Method) 법으로 시험을 수행한 결과, 당류가 첨가되지 않은 일반 TSB 배지에서는 TKI14 (*B. amyloliquefaciens*) 균주만이 생물막을 형성하였다. TSB<sub>glu</sub> 배지에서는 TKI18 (*B. stratosphericus*) 균주만이 생물막을 형성하였다. BHI<sub>suc</sub> 배지에서는 7개 균주들 중에서 TKI02 (*B. thuringiensis*), TKI18 (*B. stratosphericus*), TKI26 (*B. thuringiensis*), TKI32 (*B. amyloliquefaciens*) 및 TKI42 (*B. amyloliquefaciens*) 등 5개의 균주에서 생물막 형성이 관찰되었다 (Table 2).

### 3. 생물막 형성에 따른 수질 변화

선정한 3 종류의 균주를 대상으로 생물막을 형성한 후에 수질변화를 조사하였다 (Table 3). 15일간의 실내 실험에서 수온은 17.9-18.7°C로 조사되었다. 염분 농도는 28.9-29.3 psu로 나타났다. 실험 시 6일째부터 먹이생물 *I. galbana*를 대조구를 비롯하여 전 실험구에 공급하였다. 용존산소 (DO) 및 pH는 대조구 및 생물막 형성을 위한 균주가 포함된 실험구에 따라 차이가 났다. 대조구에서 용존산소는 8.05 mg/L에서 먹이생물 *I. galbana*를 첨가한 6일부터 점차 감소하여 실험종료 시에는 6.54 mg/L로 감소하여 나타났다. pH도 실험시작 시

7.72에서 실험종료 시 7.14로 감소하여 나타났다. TKI26 실험구의 용존산소는 실험시작 시 8.05 mg/L에서 실험종료 시 8.06 mg/L으로 나타나 *I. galbana*를 첨가하여도 변화가 없는 것으로 나타났다. pH는 실험시작 시 7.72에서 실험종료 시 7.89로 증가하여 나타났다. TKI32 실험구의 용존산소는 실험시작 시 8.05 mg/L에서 실험종료 시 8.06 mg/L으로 나타나 *I. galbana*를 첨가에 따른 변화는 없는 것으로 나타났다. pH는 실험시작 시 7.72에서 실험종료 시 8.04로 증가하여 나타났다. TKI42 실험구의 용존산소는 실험시작 시 8.05 mg/L에서 실험종료 시 8.15 mg/L으로 나타나 다른 실험구에 비해 용존산소의 증가가 높게 나타났다. pH는 실험시작 시 7.72에서 실험종료 시 8.18로 다른 실험구에 비해 높게 증가하여 나타났다. 3종류 균주 (TKI26 + TKI32 + TKI42) 를 혼합하여 생물막 형성을 유도한 실험구에서의 용존산소는 실험시작 시 8.05 mg/L에서 실험종료 시 8.15 mg/L으로 나타나 TKI42 실험구와 비슷하고, 그 외 다른 실험구에 비해 용존산소의 증가가 높게 나타났다. pH는 실험시작 시 7.72에서 실험종료 시 8.10로 나타나 TKI42 실험구외의 다른 실험구에 비해 높게 증가하여 나타났다. 암모니아 및 아질산의 농도는 실험기간동안 시간의 경과에 따라 대조구 및 실험구에서 농도의 변화 차이가 크게 나타났다. 대조구에서 암모니아의 농도는 실험시작 시 1.67 µg/L에서 실험종료 시 2.73 µg/L로 증가하는 것으로 나타났으며 아질산도 실험시작 시 0.10 µg/L에서 실험종료 시 1.21 µg/L로 증가하여 나타났다. TKI26 실험구에서 암모니아의 농도는 실험시작 시 1.45 µg/L에서 시작하여 실험종료 시 2.14 µg/L로 증가하여 나타났으며, 아질산도 실험시작 시 0.09 µg/L에서 시작하여 실험종료 시 0.91 µg/L로 증가하여 나타났다. TKI32 실험구에서의 암모니아 농도는 실험시작 시 1.48 µg/L에서 시작하여 실험종료 시 2.09 µg/L로 증가하여 나타났으며, 아질산은 실험시작 시 0.07 µg/L에서 실험종료 시 0.80 µg/L로 나타났다. TKI42 실험구에서의 암모니아 농도는 실험시작 시 1.59 µg/L에서 실험종료 시

**Table 3.** Water quality change due to biofilm formation

Experimental group	Item	Number of days to measure water quality (Day)					
		0	3	6	9	12	15
Control	Water temperature (°C)	17.9	18.0	18.0	18.3	18.7	18.7
	Salinity (psu)	28.9	28.9	29.1	29.1	29.3	29.3
	DO (mg/L)	8.05	8.12	7.79	7.08	6.92	6.54
	pH	7.72	7.73	7.65	7.53	7.25	7.14
	NH <sub>4</sub> (μg/L)	1.67	1.62	2.47	2.60	2.75	2.73
	NO <sub>2</sub> (μg/L)	0.10	0.09	0.75	0.92	0.95	1.21
TKI26	Water temperature (°C)	17.9	18.0	18.0	18.3	18.7	18.7
	Salinity (psu)	28.9	28.9	29.1	29.1	29.3	29.3
	DO (mg/L)	8.05	8.11	8.01	8.08	8.06	8.06
	pH	7.72	7.75	7.87	8.01	7.90	7.89
	NH <sub>4</sub> (μg/L)	1.45	1.62	2.09	2.10	2.09	2.14
	NO <sub>2</sub> (μg/L)	0.09	0.10	0.78	0.86	0.74	0.91
TKI32	Water temperature (°C)	17.9	18.0	18.0	18.3	18.7	18.7
	Salinity (psu)	28.9	28.9	29.1	29.1	29.3	29.3
	DO (mg/L)	8.05	8.15	8.05	7.98	7.98	8.06
	pH	7.72	7.78	7.92	7.99	8.04	8.08
	NH <sub>4</sub> (μg/L)	1.48	1.52	1.88	1.95	1.89	2.09
	NO <sub>2</sub> (μg/L)	0.07	0.15	0.59	0.55	0.69	0.80
TKI42	Water temperature (°C)	17.9	18.0	18.0	18.3	18.7	18.7
	Salinity (psu)	28.9	28.9	29.1	29.1	29.3	29.3
	DO (mg/L)	8.05	8.15	8.08	8.08	8.10	8.15
	pH	7.72	7.73	7.96	8.05	8.14	8.18
	NH <sub>4</sub> (μg/L)	1.59	1.66	1.79	1.99	2.04	2.01
	NO <sub>2</sub> (μg/L)	0.07	0.09	0.57	0.77	0.55	0.65
TKI26 + TKI32 + TKI42	Water temperature (°C)	17.9	18.0	18.0	18.3	18.7	18.7
	Salinity (psu)	28.9	28.9	29.1	29.1	29.3	29.3
	DO (mg/L)	8.05	8.16	8.15	8.15	8.12	8.15
	pH	7.72	7.75	8.01	7.95	7.89	8.10
	NH <sub>4</sub> (μg/L)	1.60	1.55	1.59	1.78	2.00	2.11
	NO <sub>2</sub> (μg/L)	0.06	0.10	0.56	0.60	0.50	0.50

2.01 μg/L로 나타났으며, 아질산은 실험시작 시 0.07 μg/L에서 실험종료 시 0.65 μg/L로 나타났다. 3종류 균주(TKI26 + TKI32 + TKI42)를 혼합한 실험구에서의 암모니아 농도는 실험시작 시 1.60 μg/L에서 시작하여 실험종료 시 2.11 μg/L로 증가하여 나타났으며, 아질산은 실험시작 시 0.06 μg/L에서 실험종료 시 0.50 μg/L로 나타났다.

**4. 생물막 형성에 따른 채묘 효과**

생물막 형성에 따른 인공중자 및 수질에 미치는 영향이 왕우럭 치폐의 채묘와의 관계에 대해 조사하였다 (Table 4). 3일간

의 채묘 실험에서 채묘율은 첫날 1일째 채묘율 55.4%-62.7%으로 시작하여 3일째 79.4%-90.8% 범위로 대조군 및 실험구 간에 차이를 보였다. 대조군 및 실험구에서의 채묘율을 살펴보면 다음과 같다. 대조군은 1일째 59.7%의 채묘율을 보여주었으며, 3일째 88.2%의 채묘율을 보였다. TKI26 균주의 경우 1일째 55.4%의 채묘율을 보여주었고, 3일째 89.8%의 채묘율을 나타냈다. TKI32 균주의 경우 1일째 62.7%의 채묘율을 나타냈으며, 3일째 79.4%의 채묘율을 보여주었다. TKI42 균주의 경우 1일째 60.8%의 채묘율을 보여주었으며, 3일째 84.9%의 채묘율을 나타냈다. TKI26 + TKI32 + TKI42 혼

**Table 4.** Seedling rate according to biofilm types

Experimental group	Seedling rate(%)				
	0	1	2	3	Sum
Control	0	59.7	18.0	10.5	88.2 <sup>a</sup>
TKI26	0	55.4	22.1	12.3	89.8 <sup>a</sup>
TKI32	0	62.7	7.7	9.0	79.4 <sup>b</sup>
TKI42	0	60.8	15.6	8.5	84.9 <sup>ab</sup>
TKI26 + TKI32 + TKI42	0	57.5	27.6	5.7	90.8 <sup>a</sup>

합 균주 실험구에서의 1일째 채묘율은 57.5%를 보였고 3일째 채묘율은 90.8%로 대조군 및 실험구에서 혼합 균주의 3일째 채묘율이 가장 높게 나타났다. TKI26 + TKI32 + TKI42 혼합 균주 실험구의 3일째 채묘율 90.8%와 비교하여 TKI32 실험구에서 79.4%로 가장 낮게 나타났다. 그리고 대조군, TKI26 및 TKI42 실험구에서 각각 88.2%, 89.8% 및 84.9%로 나타났다.

## 고 찰

본 연구진은 경제성은 좋으나 생산성이 갈수록 저하되고 있는 패류 왕우력을 양식산업화 하기위한 기초연구로서 왕우력 장내 미생물을 분리하여 인공증자생산기술에 장내미생물 (probiotics) 을 활용하는 연구를 진행하고 있다 (Yi *et al.*, 2017; Kang *et al.*, 2020). 장내미생물을 패류 인공증자생산에 본격적으로 활용한 연구로는 국내에서 선구적으로 생각한다. 기존 미생물 활용 연구는 시중의 제품화된 미생물제제를 구입하여 연구하는 경향을 보여주었으나, 본 연구진은 왕우력 장 (intestine) 에서 직접 분리한 균주를 확보하였고, 균주를 대상으로 고분자분해능력 및 항균능력 등과 같은 다양한 환경 내성 연구를 통해 유용한 균주를 선택한 후, 장내미생물을 활용한 유생사육의 특성 등을 조사한 기초연구를 수행하였다 (Yi *et al.*, 2017; Kang *et al.*, 2020). 선행 연구 결과로서 소화관에서 여름과 겨울에 각각 33개 및 22개 총 65개의 미생물을 분리 및 동정하여 국내외를 통틀어 최초로 보고하였다 (Yi *et al.*, 2017). 소화관에서 분리한 세균의 종류는 계절에 따라 다르게 나타났다. 이는 계절의 변화는 육지에서 수계로 유입되는 영양염류의 양, 염분도, 수온, 밀도 등을 변화시킨다. 이러한 변화는 왕우력의 호흡률 및 여과율 등 대사활동에도 영향을 미친다는 보고가 있다 (Kim *et al.*, 2000; Shin and Yang, 2005). 따라서 환경의 변화는 먹이활동 및 대사활동을 변화시켜 소화관의 미생물 변화에도 영향을 줘서 계절에 따라 장내미생물의 종류도 다르게 존재한다고 생각된다. 분리한 균주 중에

는 고분자 분해 활성, 항균, 소화 및 흡수에 긍정적 활성 기능을 가진 균주들이 존재한다는 것을 확인하였다 (Yi *et al.*, 2017). 이러한 균주를 왕우력 유생의 사육에 접목하여 연구를 수행한 결과 성장 및 생존에 긍정적 영향을 미침을 확인하였다 (Kang *et al.*, 2020). 양식대상종에게 직접적인 효과가 있는 미생물을 동정 및 분리 연구는 향후 양식산업의 장내미생물 활용 연구분야에서 많은 주목 받을 것으로 판단된다. 또한 왕우력 인공증자생산에 효과가 있는 장내미생물 종류와 첨가량 등에 대한 자료는 향후 패류 인공증자생산의 효율성을 높이는데 크게 기여할 것으로 판단된다.

왕우력의 소화관에서 분리된 65개의 분리 균주들 중 *Bacillus*속의 세균들이 가장 많은 비율을 차지하며 분리되었다 (Table 1). *Bacillus*속 세균들은 토양, 농작물, 하수, 폐수, 발효식품 뿐만 아니라 해양환경과 여러 해양생물의 체내에서도 높은 비율을 차지하는 미생물로 보고되어졌다 (Cahill, 1990; Ivanova *et al.*, 1999; Ki *et al.*, 2009). *Bacillus*속에서 분리한 균주 중에서 고분자 분해 활성, 항균, 소화 및 흡수 등의 기능에서 우수한 활성을 나타낸 7개의 균주를 선별하여 생물막 형성 능력을 살펴보았다. 선정 균주 중에서 모든 균주에서 생물막이 형성되지는 않았다. 생물막이 형성된 균주는 TKI02 (*B. thuringiensis*), TKI14 (*B. amyloliquefaciens*), TKI18 (*B. stratosphericus*), TKI26 (*B. thuringiensis*), TKI32 (*B. amyloliquefaciens*) 및 TKI42 (*B. amyloliquefaciens*) 등 6개의 균주에서 생물막 형성이 관찰되었다 (Table 2). 생물막 형성은 모든 균주에서 형성되지는 않는 것으로 생각된다.

생물막은 미생물들이 분비한 다량체 기질 (polymeric matrix) 속에 형성된 미생물들의 집합 구조로서 인체감염과 산업시설 및 환경 등에 관여한다. 생물막은 고체 표면과 생물의 조직에서 형성될 수 있기 때문에, 생물체내 조직을 비롯해 각종 의료기구 (Fux *et al.*, 2005), 수도관, 하수관, 정수기, 공기정화시설 등에도 생물막이 형성되어 병원균 감염, 시설물들의 부식을 유발한다. 이러한 이유로 의학을 비롯해 토목, 건축, 환경 등 광범위한 분야에서 높은 관심을 받고 있다. 생물막



은 상기에서 열거한 부정적인 기능 외에도 수환경의 수질정화 기능의 긍정적 기능도 알려져 있다 (Choi *et al.*, 2003; Chung *et al.*, 2003; Carla *et al.*, 2010; Debdeep *et al.*, 2013). 본 연구에서 선정된 균주를 통한 생물막 형성 유도 후, 수질의 판단을 용존산소, pH, 암모니아 및 아질산의 잔존 농도를 비교하여 평가한 결과 균주에 따라 농도의 차이가 다르게 나타나는 것을 확인하였다. 대표적으로 암모니아의 농도는 TKI42에서 가장 낮은 농도로 나타났으며, 아질산의 경우는 TKI26, TKI32 및 TKI42 혼합균주 생물막에서 가장 낮은 농도로 나타났다 (Table 3).

패류의 채묘는 염분농도, 수온, 먹이생물, 조류 등의 환경요인과 기생충 등의 병리적 요인 등의 영향을 받는 것으로 많이 알려져 있다 (Park *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2001). 본 연구에서는 선정된 균주 TKI26, TKI32, TKI42를 대상으로 생물막을 형성한 후 채묘효율을 살펴보았다. 연구결과 대조구, TKI26 및 TKI42 실험구에서 각각 88.2%, 89.8% 및 84.9%로 나타났다. 혼합균주 TKI26 + TKI32 + TKI4 실험구의 3일째 채묘율은 90.8%로 관찰되었다 (Table 4). 결과를 살펴보면 *Bacillus*속의 세균 중에서 고분자 분해 활성, 항균, 소화, 흡수 및 수질 정화 등의 기능이 다른 균주에 비해 우수하다고 조사되어 선정된 균주를 사용한 채묘효율은 균주의 종류 및 혼합 정도에 따라 다르게 나타났다. 본 연구에서는 혼합균주 TKI26 + TKI32 + TKI4에서 채묘율이 가장 높게 나타났고 가장 낮은 채묘율을 보인 TKI42와는 5.9% 정도 차이를 보여 주고 있다. 생물막을 이용한 채묘효과 구멍은 아직 밝혀지지 않은 연구 부분이다. 본 연구진은 분리한 균주가 가지는 고분자 분해 활성, 항균, 소화, 흡수 및 수질 정화 등의 기능을 가진 균주로 형성한 생물막이 패류 채묘의 환경조건에 긍정적 역할을 할 것이라는 판단을 두고 연구를 수행하였다. 연구의 규모나 환경요인의 영향 등의 고려가 미진한 부분이 생태계 접목에 미흡하다 판단하나 채묘와 생물막의 연관 관계는 존재함을 알리고자 한 목적의 연구결과이다.

본 연구진은 패류 왕우럭을 대상으로 양식산업화 하기위한 인공종자생산 기초연구에 관심을 가지고 연구를 수행하였다. 그 중에서 장내미생물을 분리하여 인공종자생산기술에 장내미생물을 활용하는 연구를 진행하여 미생물의 양식생물 접목에의 유용성에 대해 보고하였다.

본 연구에서는 *Bacillus*속 균주에서 유용기능이 확인된 균주를 대상으로 생물막 형성, 수질 정화 및 채묘 효과 등을 조사한 연구결과를 보고하였다. 조사항목의 기능에 대해 균주 특이성이 존재함을 확인하였다. 본 연구결과는 미생물을 활용한 연구로서 패류 양식산업에 유용하게 활용될 것으로 생각된다. 본 연구결과는 미생물을 활용한 연구로서 향후 연구자들이 관심을 가지고 많은 연구를 해야 할 당위성을 알리고 싶은 목적이

있음을 전제드리고 싶다.

## 요 약

본 연구는 왕우럭에서 분리한 65개의 균주 중에서 *Bacillus*속 균주로서 고분자 유기물 분해능력, 병원성 세균 항균 활성, 소화, 흡수 및 유생 성장 등에 긍정적 효과를 보이는 균주를 이용하여 생물막 형성, 수질 정화 및 채묘 효과 등을 조사하였다. 연구결과 생물막 형성, 수질 정화 및 채묘 효과 등에 균주 특이성이 존재함을 확인하였다. 본 연구결과는 미생물을 활용한 연구로서 패류 양식산업에 유용하게 활용될 것으로 생각된다. 또한 향후 연구자들이 관심을 가지고 많은 연구를 해야 할 당위성을 알리고 싶은 목적이 있음을 전제드리고 싶다.

## 사 사

이 논문은 해양수산부 (해양수산과학기술진흥원) 의 어업현장의 현안문제지원사업중 새우 축제식양식장의 자율주행형 복합사육관리시스템 개발 (과제번호:20210460) 재원으로 수행되었습니다.

## REFERENCES

- Banin, E., M.L.Vasil. and E.P. Greenberg. (2005) Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**: 11076-11081.
- Cahill, M.M. (1990) Bacterial flora of fishes: a review. *Microb. Ecol.*, **19**: 21-41.
- Cappelli, G.M., F. Ricardi, G. Ravera, M. Ligabue, D. Ballestri, D. Bonucchi. and M. Bondi. (2007) Biofilm on artificial surfaces. *Contrib. Nephrol.*, **154**: 61-71.
- Choi, S.D., S.Y. Kim, H.Y. Moon, J.S. Park, S.J. Rha, C.Y. Woo, D.Y. Kim. and D.S. Jung. (1999) Mass mortality of oyster, *Crassostrea gigas* in Kamak Bay(I). *J. of Res. Ind. Yosu Univ.*, **8**: 259-266.
- Choi, I.S. J.H. Kim. G.W. Choi. and J.M. Oh. (2003) Estimation of water purification with applying porous cocreate to weir and riverbed materials. *J. Kor. Soc. Water Quality*, **36**: 1013-1023.
- Chung, J.W., J.Y. Yoon, J.R. Shin. and H.G. Kim. (2003) The study for performance test verification standard form approval procedure (draft) of OSBA. *J. Kor. Soc. Marine Enviro. Eng.*, **6**: 16-27.
- Chapple, J.P., G.R. Smerdon, R.J. Berry. and A.J.S. Hawkins. (1998) Seasonal changes in stress-70 protein levels reflect thermal tolerance in the marine bivalve *Mytilus edulis*. *L. J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **229**: 53-68.
- Deng, Y., B. Zheng, G. Fu, K. Lei. and Z. Li. (2010) Study on the total water pollutant load allocation in



- the Changjiang (Yangtze river) Estuary and adjacent seawater area. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, **86**: 331-336.
- Donlan, R.M. and J.W. Costerton. (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.*, **15**: 167-193.
- Donlan, R.M., J.A. Priede, C.D. Heyes, L. Sanii, R. Murga, P. Edmonds, I. El-Sayed. and M.A. El-Sayed. (2004) Model system for growing and quantifying *Streptococcus pneumoniae* biofilms in situ and in real time. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**: 4980-4988.
- Fux, C.A., J.W. Costerton, P.S. Stewart. and P. Stoodley. (2005) Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol.*, **13**: 34-40.
- Ivanova, E.P., M.V. Vysotskii, V.I. Svetashev, O.I. Nedashkovskaya, N.M. Gorshkova, V.V. Mikhailov, N. Yumoto, Y. Shiger, T. Taguchi and S. Yoshikawa. (1999) Characterization of *Bacillus* strains of marine origin. *Int. Microbiol.*, **2**: 267-271.
- Kang, H.S. and C.W. Kim (2018a) Effects of Water Temperature, Salinity, Rearing Density and Food Supply on the Growth and Survival of the Surf Clam, *Tresus keenae* Larvae. *JMLS.*, **3**: 67-73.
- Kang, H.S. and C.W. Kim (2018b) Spawning and larval developments of the Surf Clam, *Tresus keenae*. *Korean J. Malacol.*, **34**: 9-15.
- Kang, H.S., H.C. Choi, J.H. Cho and C.W. Kim (2020) Larval breeding using *Bacillus species*, an intestinal microorganism isolated from Surf Clam (*Tresus keenae*). *Korean J. Malacol.*, **36**: 219-227.
- Ki, J.S., W. Zhang. and P.Y. Qian. (2009) Discovery of marine *Bacillus species* by 16S rRNA and rpoB comparisons and their usefulness for species identification. *J. Microbiol. Methods.*, **77**: 48-57.
- Kim, J.H., Y.H. Kim, S.K. Kim, B.W. Kim. and S.W. Nam. (2011) Properties and industrial applications of seaweed polysaccharides-degrading enzymes from the marine microorganisms. *Microbiology and Biotechnology Letters*, **39**: 189-199.
- Kim, K.S., W.B. Lee, H.S. Joo, J.S. Lee, J.W. Cho, S.B. Chun, S.W. Lee. and J.C. Park (2000) Physicochemical Characteristics and Seasonal Distribution of Microbial Population in the Gangjin Bay Ecosystem. *Kor. J. Microbiol.*, **36**: 285-291.
- Lee, J.G., G.J. Lee. and S.M. Lim. (2005) Partial purification of bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* MJ-14 isolated from Meju. *J. Food. Hyg. Saf.*, **20**: 211-216.
- Loomis, S.H., A.D. Ansell, R.N. Gibson. and M. Barnes. (1995) Freezing tolerance of marine invertebrates. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.*, **33**: 337-350.
- Min, B.H. (2019) Growth and Survival on Rearing Conditions and Live Food for Larvae of the Keen's gaper *Tresus keenae*. *Korean J. Malacol.*, **35**: 9-17.
- Newell, R.C. and L.H. Kofoed. (1977) Adjustment of the components of energy balance in the gastropod *Crepidula fornicata* in response to thermal acclimation. *Mar. Boil.*, **44**: 275-286.
- Park, Y.J., S. Rho, C.S. Lee. (2001) Growth of the Scallop, *Patinopecten yessoensis* in suspended culture in the east coast of Korea. *Journal of Aquaculture*, **14**: 181-195.
- Park, M.S., H.Y. Lyu. and T.S. Lee. (1999) Investigation on the Cause of Bad Natural Seed Collection of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*: Relationships between the Conditions of Mother Shell and the Viability of the Released Eggs and Larvae Based on the Pathological and Embryological Survey. *J. Korean Fish. Soc.*, **32**: 62-67.
- Rasmussen, T.B. and M. Givskov (2006) Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *International Journal of Medical Microbiology*, **296**: 149-161.
- Rayner, J. R. Veeh. and J. Flood. (2004) Prevalence of microbial biofilms on fresh produce and household surfaces. *International Journal of Food Microbiology*, **15**: 29-39.
- Shin, Y.K. and C.H. Wi. (2004) Effect of temperature and salinity on survival and metabolism of the hard shelled mussel *Mytilus coruscus*, Bivalve: Mytilidae. *J. of Aquaculture*, **17**: 103-108.
- Shin, Y.K. and M.H. Yang. (2005) Effects of temperature and salinity on the survival and metabolism of *Tresus keenae* (Mollusca: Bivalvia). *Fish Aquatic. Sci.*, **8**: 161-166
- Yi, S.W. S.H. Moon, H.S. Cho. and C.W. Kim. (2017) Degradation capability of macromolecular organic matters and antimicrobial activities of *Bacillus species* isolated from surf clam (*Tresus keenae*). *Korean J. Vet. Serv.*, **40**: 265-275.

