

어류의 세균성 질병 예방을 위한 Probiotic 균주의 선발 및 특성

양병규 · 전유진 · 허문수*
제주대학교 해양생산과학부

Screening and Characterization of Probiotic Strains for Prevention of Bacterial Fish Diseases. Yang, Byung-Gyoo, You-Jin Jun and Moon-Soo Heo*. Faculty of Applied Marine Science, Cheju National University, Jeju-do 690-810, Korea – The purpose of the present study was to screen the effective of lactic acid bacteria (LAB) as probiotics, which are able to protect aquacultural fish pathogenic bacteria, and investigate their characterization. Twenty strains of lactic acid bacteria were isolated from fish intestine, fermented fish foods and kimchis. These bacteria were screened for antagonistic activity against fish pathogenic bacteria. Seven tested LAB strains were able to inhibit the fish pathogenic bacteria, including *Vibrio anguillarum*, *Edwardsiella tarda*, and *Streptococcus* sp.. Of the probiotic candidates, BK19 strain isolated from fermented pollack viscera indicated the largest inhibition activity. Moreover, this strain showed a resistance over low pH and antibiotic agents. Therefore this probiotic candidate BK19 was finally selected and identified as a probiotic strain. This particular probiotic bacteria was identified as *Lactobacillus sakei* BK19 by biochemical characteristics and 16S rRNA PCR amplification.

Key words: Fish diseases, probiotic, lactic acid bacteria, *Vibrio anguillarum*

양식산업에 있어 어류의 질병예방 및 치료를 위한 가장 일반적인 방법에는 항생제 투여 등의 화학적인 방법과 백신 요법이 있는데 [5] 항생제요법인 경우 오남용에 따른 내성균의 출현 [16]과 체내잔류 [19] 등 사회적, 생태적으로 심각한 문제를 유발하고 있어 그 사용이 규제되고 있는 실정이다 [1]. 따라서 기존의 어병예방 및 치료의 문제점에 대한 대안책으로 친환경적인 probiotic 요법에 대한 관심과 연구가 최근 많아지고 있다 [12].

Probiotics란 숙주동물의 장내균총(intestinal microbes)을 개선시킴으로써 숙주에게 유익한 영향을 주는 미생물 첨가제를 말한다 [6]. Probiotics의 영향은 유익한 균주를 투여하거나 장내에 정착 시켰을 때 병원성 세균이 장내에 정착하고 증식하는 것을 억제시키고 유익세균이 성장하며 분비하는 여러 대사물질과 효소들에 의해 숙주동물의 소화를 증대시켜 준다. Probiotics로서 많이 이용되어 온 미생물은 유산균(lactic acid bacteria, LAB)이다 [11]. 유산균은 그람양성, 비운동성, 비포자성 및 catalase 음성인 세균으로서 자연계에 널리 분포하고 있을 뿐만 아니라 동물의 장이나 발효식품 등에서도 쉽게 발견된다 [11]. 이들 유산균들이 항균활성 등에 의해 장내균총을 개선시키는 중요한 미생물이라는 것은 이미 많이 알려져 있으며 이러한 유산균의 항균활성 인자는 유기산과 과산화수소 및 bacteriocin [10] 등에 의한다.

또한 유산균은 장내 상피세포에 부착하여 정착함으로써 병원균의 감염과 성장을 억제하게 된다. 유산균의 병원성 세균에 대한 항균활성에 대한 연구는 *Listeria monocytogenes* [4], *Escherichia coli* [2], *Salmonella typhimurium* [8], *Vibrio anguillarum* [9] 등의 미생물에 대한 항균활성이 있다고 보고되어 있다. 그러나 probiotics로서 유산균은 대부분의 어병세균 및 병원성 세균이 그람음성인데 반하여 그 항균활성은 계통적으로 유사한 그람양성 세균에 대해서만 항균활성을 나타낸다는 한계점이 있다 [15]. 따라서 probiotics 균주로서 산업적으로 응용하기 위해 분리된 균주는 그람양성 세균 뿐만 아니라 그람음성 세균의 성장까지도 저해할 수 있는 넓은 항균 스펙트럼을 갖고 있어야 한다. 또한 probiotics의 지속적인 항균작용과 유익한 효과를 갖기 위해서는 pH가 낮은 위와 담즙 그리고 여러 가지 소화효소 등의 환경 조건에서도 생존하여야 하며, 어병치료를 위한 항생제 투약 시기에도 생존하여야 한다. 즉, probiotics 균주가 갖추어야 할 또 다른 중요한 조건은 내산성 및 내담즙성 그리고 항생제에 대한 적절한 내성을 갖고 있어야 한다는 점이다 [16].

따라서 본 논문은 넓은 항균 스펙트럼을 갖고 있으면서 pH 내성 및 항생제 내성 등을 갖고 있는 probiotics 균주를 어류의 장내와 한국의 전통 발효식품인 김치와 젓갈 등에서 선발하여 어류의 세균성 질병 예방 혹은 치료를 함으로써 양식산업의 효율성을 증대시키고자 한다.

*Corresponding author
Tel. 82-64-754-3473, Fax: 82-64-756-3493
E-mail: msheo@cheju.cheju.ac.kr

재료 및 방법

Probiotic 균주의 분리 및 선정

유산균의 분리 및 선정. 김치 및 각종 젓갈류는 생리식염수로 단계 희석시켜 사용하였고 양식어류는 장내를 생리식염수로 세척 후 단계 희석시킨 후 배양하여 20여종의 유산균을 분리하였다. 유산균 배양배지로는 1%의 CaCO₃를 첨가한 mann, rogosa and sharpe broth 및 agar (MRS, Difco)를 사용하였다. 분리된 균은 면양 혈청배지에 도말하여 용혈성을 확인하여 비용혈성 유산균을 선택하였다.

피검균의 분리. 어병세균인 *Vibrio anguillarum* KCTC 2711은 한국유전자은행(The Korean Collection for Type Cultures)에서 분양 받아 사용하였고, *Edwardsiella tarda* 및 *Streptococcus* sp.는 병에 걸린 넙치의 두신 및 비장에서 직접 분리하였다. 병원세균의 배양은 *V. anguillarum*인 경우 trypticase soy broth(TSB, Difco), *E. tarda* 및 *Streptococcus* sp.인 경우 brain heart infusion broth(BHIB, Difco)를 이용하여 32°C에서 배양하였으며, 장기보관을 위해 모든 균주는 30% glycerol를 첨가하여 -70°C에 보관하였고 2회 계대 배양하여 사용하였다.

피검균 길항 유산균의 분리 및 선정. 유산균의 1차 선별을 위해 유기산에 의한 항균활성을 MRS agar상에서 agar spotted method를 이용하여 *V. anguillarum*, *Edwardsiella tarda* 및 *Streptococcus* sp.에 대한 길항능을 확인하여 후보 균주로서 선별하였다. 1차로 선별된 유산균 중 bacteriocin 유사물질에 의한 항균활성을 갖고 있는 균주를 선별하기 위하여 nutrient agar (NA, Difco) 배지상에서 spotted method로 검토하였다[4,13]. Agar spotted method인 경우 전 배양된 probiotic 후보균주 5~10 µl를 NA 한천배지 표면에 적하시킨 후 37°C에서 24시간 배양하여 집락이 형성된 표면에 1 × 10⁵ CFU/ml의 피검균이 첨가된 연 한천배지(0.7% agar) 10 ml를 증충하여 4°C에서 4시간 방치한 후 32°C에서 24시간 배양하여 저지환을 확인함으로써 항균활성을 측정하였다.

내산성 유산균의 분리 및 선정. 내산성 probiotic 균주를 선별하기 위하여 10 ml의 MRS broth에 4 M의 HCl을 첨가하여 pH 4에서 pH 9까지 조절한 후 1차로 선별된 probiotic 후보균주에 대하여 pH 조건에 따른 성장을 확인하였다. pH를 조절한 각각의 배양액에 1 × 10⁵ CFU/ml 농도의 균액 100 µl를 접종하여 4, 6, 8, 12, 24 시간 배양 후 probiotic균의 성장을 흡광도(OD_{630nm})를 측정하여 확인하였다.

항생제 내성 유산균의 분리 및 선정. 항생제 감수성 실험은 agar disc diffusion assay를 통하여 확인하였다. 1.5 × 10⁵ CFU/ml 농도의 균액 100 µl를 mueller hinton agar (MHA, Difco) 배지 위에 도말 한 후 항생제 disc를 배지표면 위에 부착시켜 상온에서 10분간 방치한 후 32°C, 24시간 배양하여 저지환을 확인하였다. 시험에 사용된 항생제는 amoxicillin(AMC), tetracycline(TE), oxytetracycline(T), chloram-

phenicol(C), cephalothin(CF), nalidixic acid(NA), ciprofloxacin(CIP), novobiocin(NB), doxycycline(D), sulfadiazine(SD), neomycin(N), erythromycin(E) 등 12종의 항생제를 본 시험에 사용하였다.

공시균주의 선정 및 동정

상기 실험에서 사용된 총 20종의 probiotic 후보균주 중에서 항균활성, 내산성 및 항생제 내성 등의 시험에서 가장 우수한 균주를 최종적으로 선별하여 분리된 균주를 그람염색, 포자유무, 운동성 및 전자현미경 관찰 등 형태학적 특성을 확인하였다. 생화학적 성상은 Api 50CHL(Biomerieux, France)을 이용하여 상법에 따라 시행하였고 16S rRNA PCR을 통한 동정은 전 배양된 균체를 QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN Inc.)을 이용하여 상법에 따라 선별균주의 total DNA를 분리하여 TE buffer에 희석시킨 후 PCR 반응을 하였다. PCR 반응은 총 부피 50 µl에 genomic DNA 3 µl, Taq DNA polymerase(Bioneer, Korea) 2.5 µl, 10 × reaction buffer 5 µl, deoxy nucleoside triphosphates 2 µl, TE buffer 32.5 µl, 각각의 primer(forward primer 5'-GCC GCG TGA GTG AAT AAG G-3'와 reverse primers 5'-ACA TGC TCC ACC GCT TGT G-3') 2.5 µl를 첨가하여 반응하였다. 증폭은 프로그래밍 된 DNA mini cycler (PTC-150, MJ Research, USA)에서 수행하였다. PCR 반응 조건은 먼저 94°C에서 5분간 denaturation하고, 30주기 동안 94°C에서 45초간 denaturation, 50°C에서 45초 annealing, 72°C에서 45초간 extension 하여 마지막으로 72°C에서 10분간 extension을 수행하였다. 증폭된 PCR product는 1% agarose(Agarose LE, Promega CO.) gel을 0.5 µg/ml ethidium bromide로 염색하여 확인하였다.

결과 및 고찰

Probiotic 균주의 분리 및 선정

유산균의 분리 및 선정. 20종의 유산균을 김치, 어류의 장 그리고 젓갈류 등에서 분리하였다. 각 시료는 생리식염수로 세척하여 단계희석법으로 1% CaCO₃를 첨가한 MRS agar 표면에 도말한 후 24시간 동안 35°C에서 배양하면서 투명환이 형성되는 유산균을 분리하였다.

피검균 길항 유산균의 분리 및 선정. 병원성 세균인 *V. anguillarum*, *E. tarda* 및 *Streptococcus* sp. 등에 대한 항균활성이 있는 probiotic 후보균주 중에서 *V. anguillarum*에 대한 항균활성은 BK1(김치), BK4(넙치 장), BK6(넙치 유분수), BK15(멸치젓), BK18(오징어젓) 및 BK19(창란젓)에서 확인되었고(Fig. 1a), BK4와 BK19에서는 *Streptococcus* sp.에 대한 항균활성이 확인되었다(Fig. 1b). 그러나 *E. tarda*에 대한 항균활성은 BK19에서만 관찰되었다(Fig. 1c).

내산성 유산균의 분리 및 선정. Probiotic의 조건 중 내산

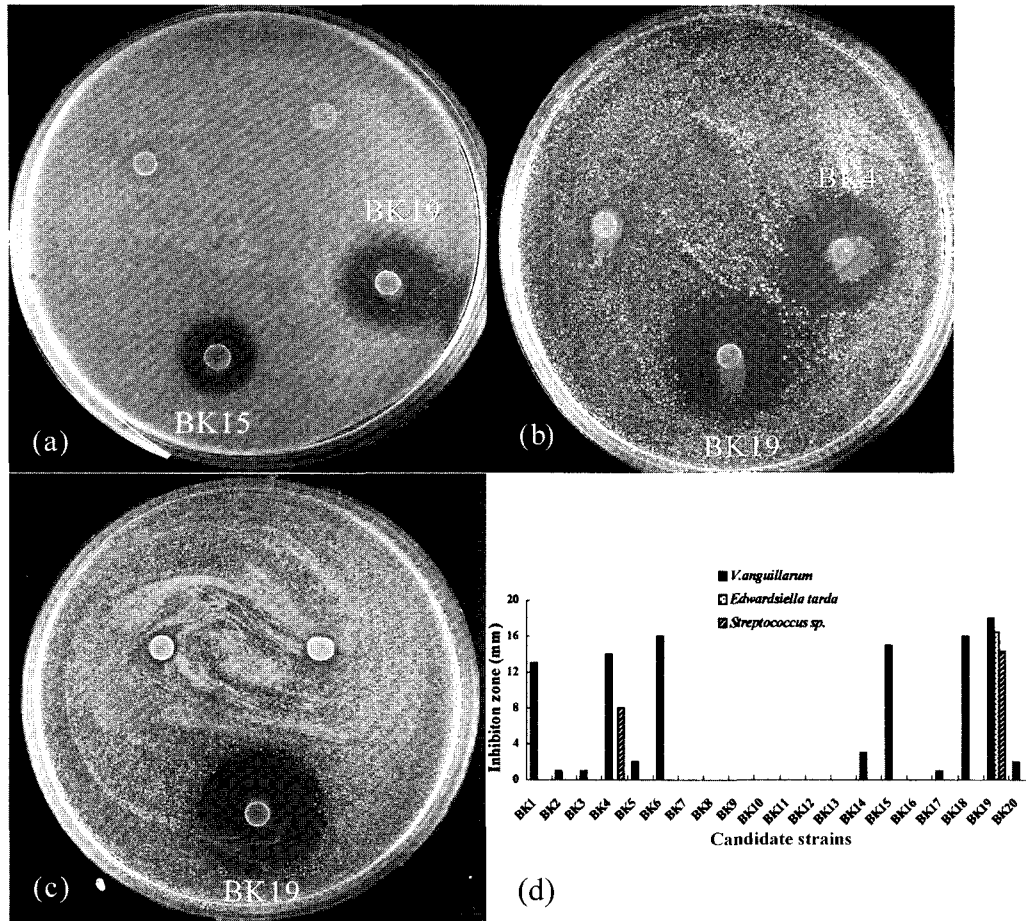


Fig. 1. Antibacterial activity of the isolated LAB against *V. anguillarum* (a), *Streptococcus sp* (b), *E. tarda* (c) and inhibition zone of diameters (d). Soft agar containing the indicate microorganisms was overlaid on nutrient agar and cultured at 32°C.

성은 생균을 사료와 함께 투여하였을 때 pH가 낮은 장기인 위에서도 생존해야 활성을 유지할 수 있기 때문에 매우 중요한 요소 중 하나이다. Probiotic 후보균주의 초기 pH에 따른 성장을 확인한 결과 Table 1과 같이 젓갈류에서 분리된 BK14, BK15, BK18 그리고 BK19 균주에서 pH 4~4.5

Table 1. The growth of LABs at different initial culture pH values.

Strains	Initial pH of the culture medium						
	4.0	4.5	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0
BK1	-	-	+	+++	+++	+++	+++
BK2	-	-	+	+++	+++	+++	+++
BK4	-	-	+	+++	+++	+++	+++
BK14	+	++	+++	+++	+++	+++	+++
BK15	+	++	+++	+++	+++	+++	+++
BK18	+	++	+++	+++	+++	+++	+++
BK19	+	++	+++	+++	+++	+++	+++

- : NO growth ++ : 10^6 CFU/ml
 + : 10^4 CFU/ml +++ : >math>10^8</math> CFU/ml

에서도 성장이 확인되어 높은 내산성이 확인된 반면, 김치 및 넙치 장에서 분리된 probiotic 후보균주 (BK1, 2 및 BK4)에서는 낮은 pH에 대하여 감수성이 높았다. 양식 넙치에서 분리된 BK4인 경우 비교적 넓은 항균 스펙트럼과 양식 넙치의 상재세균이라는 점에서 probiotic 후보균주로서의 장점이 있으나 pH 4.5 이하에서의 성장이 확인되지 않아 양식용 probiotic 균주로 적합하지 않은 것으로 사료된다.

항생제 내성 유산균의 분리 및 선정. 양식장의 어류 질병 치료시 항생제 처리 기간에도 probiotic 균주는 장내에서 정착 및 생존해야 하기 때문에 항생제 감수성 또한 probiotic 균주의 선별에 있어서 매우 중요한 요소로서 12종의 시판용 항생제에 대하여 감수성을 확인한 결과(Table 2) 3종의 후보 균주인 BK2, BK17, BK19에서 6종의 항생제에 대해서 내성을 보였으며 BK20에서는 5종에 대하여 항생제 내성이 관찰되었고 비교적 항생제 내성이 있어 질병 치료를 위한 항생제 처리 기간에도 장내에서 정착하여 생존할 수 있다고 판단된다. 반면 chloramphenicol과 doxycycline에 대하여는 모든 분리 균주에서 감수성이 확인되어 사료 첨가용 생균제의 적용시 각각의 항생제와의 병용가능성을 검증하여야 한다.

Table 2. Antibiotic susceptibility test of probiotic strains and pathogenic *V. anguillarum*.

Antibiotics	Inhibition zone (mm)											
	<i>V. anguillarum</i>	BK1	BK2	BK3	BK4	BK14	BK15	BK16	BK17	BK18	BK19	BK20
AM30	10.15	13.9	10.4	16.5	15.1	16.2	9	0	9	0	8.1	8
TE30	34.1	32	17.2	30.5	32.3	25.9	20.9	14	0	18.7	17	16.3
T30	31.3	25.1	22.8	30	16.5	31	22.2	17.6	0	21	17.6	22
C30	22.6	38.5	24.2	25.2	24.3	26.4	23.3	16.2	27	26.2	26.5	26.4
CF30	0	14	20.1	10	0	13.2	13.1	14.5	21.6	18.5	16.3	14.2
NA30	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0
CIP5	19.4	16	0	15.7	16.5	13.5	8	8	0	8	0	0
NB5	24.6	16	0	12.3	13.2	13.4	8	8	00	9	0	0
D30	32.9	27.3	28.3	29	27	36	25	21.3	0	22.1	24.9	21.7
SD25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N30	0	0	0	0	0	0	0	8	20	0	0	0
E15	10.1	9	0	9	9	15.8	25	17	21	22.1	0	23.5

AMC : Amoxicillin, TE : Tetracycline, T : Oxytetracycline, C : Chloramphenicol, CF : Cephalothin, NA : Nalidixic acid, CIP : Ciprofloxacin, NB : Novobiocin, D : Doxycycline, SD : Sulfadiazine, N : Neomycin, E : Erythromycin.

Table 3. Carbohydrate utilization patterns of isolated LAB, BK19.

Characterization	Strain No.	Characterization	Strain No.
	BK19		BK19
Control		Esculine	
Glycerol		Salicine	+
Erythritol		Cellobiose	+
D-Arabinose		Maltose	+
L-Arabinose	+	Lactose	
Ribose	+	Melibiose	+
D-Xylose	+	Saccharose	+
L-Xylose		Trehalose	+
Adonitol		Inuline	
β Methyl-xyloside		Melezitose	
Galactose	+	D-Raffinose	+
D-Glucose	+	Amidon	
D-Fructose	+	Glycogene	
D-Mannose	+	Xylitol	
L-Sorbose		β Gentiobiose	+
Rhamnose		D-Turanose	+
Dulcitol		D-Lyxose	
Inositol		D-Tagatose	+
Mannitol		D-Fucose	
Sorbitol	+	L-Fucose	
α Methyl-D-mannoside		D-Arabitol	
α Methyl-D-glucoside	+	L-Arabitol	
N Acetyl glucosamine	+	Gluconate	+
Amygdaline	+	2 ceto-gluconate	
Arbutine	+	5 ceto-gluconate	

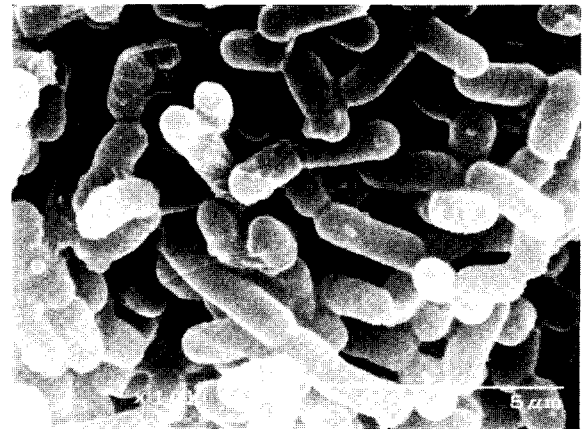


Fig. 2. Scanning electron micrograph (SEM) of the isolate LAB, BK19 from fermented pollack viscera.

공시균주의 선정 및 동정

상기의 결과를 토대로 항균 스펙트럼이 넓고 항균활성이 높으면서 항생제 내성 및 pH 내성이 높은 probiotic 균주로서 적합한 균을 창란젓에서 분리하여 BK19로 간이 명명하고 동정하였다. 창란젓에서 분리된 BK19 균주는 그람양성, 비 운동성, catalase 음성인 유산균으로서 생화학적 성상은 Api 50CHL을 통하여 확인한 결과 Table 3과 같았다. SEM 관찰에서는 직경 2.5~3 μm 크기의 *Lactobacillus* sp.임을 확인하였다(Fig. 2). 16S rRNA PCR 증폭을 통한 555 bp의 oligo nucleotides를 sequence 하여 GeneBank의 database에 있는 *Lactobacillus* spp.와 alignment한 결과(Fig. 3) *Lactobacillus sakei*와 100% 유사하여 본 공시균을 *Lactobacillus*



Fig. 3. Alignment of 16S rRNA of the isolated LAB, BK19 from fermented pollack viscera. Star mark indicates identical base.

sakei BK19로 명명하였다.

Choi 등[2]의 보고에 의하면 김치에서 분리된 *Pediococcus* 속과 *Leuconostoc*속 등에서도 *Escherichia coli*에 대한 항균 활성이 확인되었다. 본 실험에서 분리된 김치 유산균의 항균활성은 BK1에 서만 *V. anguillarum*에 대한 항균활성이 관찰되었고 BK2 및 BK3에 서는 항균활성이 관찰되지 않았다. 그리고 *E. tarda* 및 *Streptococcus* sp.에 대한 항균활성은 김치에서 분리된 모든 균주에서 관찰되지 않아 항균 스펙트럼이 좁았다. 배지 상에서 관찰된 저지환은 병원세균에 대한 특이적 항균활성이 확인 되었는데 이는 NA배지의 구성 성분이 단백질원 중심으로 되어있고 발효를 위한 탄소원이 결핍되어 유기산을 생산하지 못하기 때문이며 NA배지에서 관찰되는 저지환의 영향은 유기산이 아닌 bacteriocin-like substance에 의한 것이라고 판단된다. 또한 탄소원이 없는 배지에서는 유산균의 성장이 극히 제한되기 때문에 항균성 물질을 분비할 수 없다고 판단된다. 대부분의 bacteriocin 생산 유산균들은 좁은 항균 스펙트럼을 갖고 있으며 계통적으로 유사한 그람양성 세균에 대해서만 저해를 하는 것이 대부분인데 본 실험에서 분리된 probiotic 후보균주 중 BK4와 BK19는 그람양성 세균인 *V. anguillarum* 및 그람양성 세균인 *Streptococcus* sp.에 대해서도 항균활성을 보여 비교적 항균 스펙트럼이 넓다고 여겨진다.

Probiotic 효과는 항생제에 의한 항균력에 비해 강도가 약 하지만 친환경적이며 내성균 발생에 대한 문제가 없으며 생 균제를 이용한 사료화의 가능성도 있기 때문에 그 중요성과 관심이 높아지고 있다. Probiotic의 적절한 이용과 개발은 이미 사람을 포함한 육상동물에서 많이 연구가 되어왔으나 양 식어류의 생리적 특성 연구는 미비하여 양식 산업에서의 probiotic 이용은 낮은 실정이다. 따라서 probiotic 효과를 극대화시키기 위해서는 양식어류의 생리적 연구와 토착미생물에 대한 연구가 필요하며, 장내 토착 유익세균의 증식을 향상시킬 수 있는 prebiotic 연구 즉, non-digestible oligosaccharides의 선택[3]과 탁월한 내산성, 내담즙성 등을 갖고 있는 probiotic stater의 개발이 시급한 실정이다. 본 연구에서 분리된 *L. sakei* BK19는 창란젓에서 분리되었다는 점에서 양식현장의 적용성은 아직 불확실하다. 앞으로 장 정착능에 대한 연구와 장내에 정착하고 있는 상재균에 대한 probiotic 균주의 분리 및 이용이 필요할 것으로 사료된다.

요 약

본 실험의 목적은 Gram 양성균 뿐만 아니라 어병세균인 Gram 음성세균에 대한 넓은 항균활성 및 내산성 그리고 항생제 내성을 갖고 있는 유용한 probiotic 후보균주를 선발하

여 어류의 세균성 질병 예방 혹은 치료를 함으로써 양식산업의 효율성을 증대시키고자 한다. 20종의 유산균을 김치, 양식 넙치의 장 그리고 각종 젓갈류 등에서 분리하여 어류 병원성 세균에 대한 항균능을 MRS agar상에서 agar spotted method에 의해 조사하여 *Vibrio anguillarum*, *Edwardsiella tarda* 그리고 *Streptococcus* sp.에 대해 항균활성이 있는 7종의 균주를 1차 선발을 하였다. pH 및 항생제 내성능을 검토하여 probiotic 균주를 분리하였다. 분리된 후보 균주 창란젓에서 분리된 BK19에서 가장 큰 항균 spectrum과 pH 내성 그리고 항생제에 대한 내성이 확인되어 최종적으로 본 실험의 공시균주로 선발하여 생화학적, 형태학적 특성 및 16S rRNA 분석을 통하여 *Lactobacillus sakei* BK19로 동정하였다.

감사의 글

본 논문은 학술진흥재단의 2002년도 신진교수연구과제(과제번호 : KRF-2002-003-F00028) 지원에 의하여 연구로 연구비 지원에 깊은 감사를 드립니다.

REFERENCES

- Aoki, T., K. Tamaki, and T. Kitao. 1990. Spread of drug resistant strains of *Streptococcus* sp. in yellowtail farms. 2nd Asian Fish. Forum, Tokyo, **22**: 697-699.
- Choi, H. J., H. S. Lee, S. Her, D. H. Oh, and S.S. Yoon. 1999. Partial characterization and cloning of leuconocin J, a bacteriocin produced by *Leuconostoc* sp. J2 isolated from the Korean fermented vegetable Kimchi. *J. Appl. Microbiol.* **86**: 175-176.
- Collins, M. D. and G. R. Gibson. 1999. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *Am. J. Clin. Nutr.* **69**: 1052-1057.
- Corsetti, A., M. Gobbetti, and E. Smacchi. 1996. Antimicrobial activity of sourdough lactic acid bacteria: isolation of a bacteriocinlike inhibitory substance from *Lactobacillus sanfrancisco* C57. *Food Microbiol.* **13**: 447-456.
- Eldar, A., O. Shapiro, Y. Bejerano, and H. Bercovier. 1995. Vaccination with whole cell vaccine and bacterial protein extract protects tilapia against *Streptococcus difficile* meningo encephalitis. *Vaccine.* **13**: 867-870.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animal. *J. Appl. Bacteriol.* **66**: 365-378.
- Holck, A., L. Axelsson, S. E. Birkeland, T. Aukrust, and H. Bloom. 1992. Purification and amino acid sequence of sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sakei* LB 706. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 2720-2721.
- Hudault, S., V. Lievin, M. F. Bernet-Camard, and A. L. Servin. 1997. Antagonistic activity exerted in vitro and in vivo by *Lactobacillus casei* (strain GG) against *Salmonella typhimurium* C5 infection. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 513-518.
- Olsson, J. C., A. Westerdahl, P. L. Conway, and S. Kjelleberg. 1992. Intestinal colonization potential of turbot *Scophthalmus maximus* and dab *Limanda limanda*-associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 551-556.
- Piard, J. C. and M. Desmazeaud. 1992. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antibacterial substances. *Lait.* **72**: 113-142.
- Ringo, E. and F. J. Gatesoupe. 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture.* **160**: 177-203.
- Salminen, S., A. C. Ouwehand, Y. Benno, and Y. K. Lee. 1999. Probiotics: how should they be defined Trends. *Food Sci. Technol.* **10**: 107-110.
- Schillinger, U. and F. K. Lucke. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sakei* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 901-1906.
- Smith, P., M. P. Hiney, and O. B. Samuelson. 1994. Bacterial resistance to antimicrobial agents used in fish farming: a critical evaluation of method and meaning. *Annu. Rev. Fish Dis.* **4**: 273-313.
- Suma, K., M. C. Misra, and M. C. Varadaraj. 1998. Plantaricin LP84, a broad spectrum heat-stable bacteriocin of *L. plantarum* NCIM 2084 produced in a simple glucose broth medium. *Int. J. Food Microbiol.* **40**: 17-25.
- Verschuere L., G. Rombaut, P. Sorgeloos, and W. Verstraete. 2000. probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mole. Biol. Rev.* **64**: 655-656.
- Witte, W., I. Klare, and G. Werner. 1999. Selective pressure by antibiotics as feed additives. *Infection.* **27**: 35-38.

(Received Jan. 28, 2003/Accepted Apr. 7, 2003)