

대문어(*Enteroctopus Dofleini*) 인공 종자 생산과정에서 관찰된 *Vibrio* spp.의 국내 첫 보고

김동휘 · 유해균* · 김기태* · 허문수** · 정민민†
국립수산과학원(박사후인턴 · *연구사) · **제주대학교(교수) ·
†국립수산과학원(연구관)

First Report in Korea of *Vibrio* spp. Observed during the Artificial Seeding Production Process of the Giant Pacific Octopus, *Enteroctopus Dofleini*

Dong-Hwi KIM · Hae-Kyun YOO* · Ki-Tae KIM* · Moon-Soo HEO** · MIN-MIN JUNG†
National Institute of Fisheries Science(postdoctoral intern · *researcher) ·
**Jeju National University(professor) · †National Institute of Fisheries Science(senior researcher)

Abstract

We are conducting research on the artificial seeding production of the giant Pacific octopus (*Enteroctopus dofleini*) for the first time in Korea, and studies have been conducted on the *Vibrio* spp. that occur during this process. In the artificial seeding production process of the giant Pacific octopus, *Vibrio splendidus*, *V. chagasii*, *V. kanaloae*, and *V. pelagius* were detected in the mortalities of giant Pacific octopus paralarvae and *Artemia*. It is widely known that *V. splendidus* is mostly isolated from Pacific oysters (*Crassostrea gigas*), and there have been no reports of its discovery in giant Pacific octopus paralarvae. *V. chagasii*, *V. kanaloae*, and *V. pelagius* have been reported to belong to the clade of *V. splendidus*. After the challenge experiment the survival rate of giant Pacific octopus paralarvae in the group injected with *V. splendidus* without antibiotic treatment sharply decreased to the 50% range on days 2. In contrast, the group treated with antibiotics and injected with *V. splendidus* showed a survival rate of over 80% on days 2. *Vibrio* spp. were observed in both *Artemia* and giant Pacific octopus paralarvae, however, research is deemed necessary to investigate the impact of these *Vibrio* spp. on giant Pacific octopus paralarvae in the future.

Key words : Cephalopoda, Giant pacific octopus, Paralarvae, *Artemia*, *Vibrio splendidus*

I. 서론

우리나라의 연안어업 생산량은 조사가 시작된 1970년 816천 톤을 시작으로 1987년 2,465천 톤을 기점으로 2021년에는 1,422천 톤으로 감소하였다(KOSIS, 2022). 연안어업 생산량 감소요인으

로는 기후변화로 인한 어업환경 변동, 무분별한 남획으로 인한 수산 자원량 감소 등이 그 원인으로 주목되고 있으며(Kim, 2022), 이를 위한 대책으로 양식기술 개발을 통한 수산물 공급이 대안으로 활용되고 있다. 현재 우리나라는 어류, 해조류, 패류, 갑각류 등 다양한 양식기술을 개발하여

† Corresponding author : 033-660-8544, jminmin@korea.kr

* 이 연구는 국립수산과학원(R2024030, 문어류 양식기술 개발)의 지원에 의해 진행되었습니다.

경제적 효과와 식생활에 중요한 역할을 담당하고 있다.

동해 특산품종 중 하나인 대문어(*Enteroctopus dofleini*)는 두족강, 문어목, 문어과의 연체동물로 우리나라, 일본, 알래스카 등 북태평양에 주로 서식한다(Lee et al., 2014; NFRDI, 2005). 크기는 약 3m까지 성장하고 최대 무게는 272kg까지 보고된 바 있다(NFRDI, 2005). 동해안의 대문어는 1990년대 후반에 약 5,400톤이 어획되었으나, 기후변화와 남획으로 인하여 한때 3,500톤까지 어획량이 감소하였고 수요와 공급의 원칙에 따라 어획량이 감소하면서 대문어의 어업 생산금액은 지속해서 증가하고 있다(Choi et al., 2018). 대문어는 어획량의 감소로 인해 높은 시장가격을 형성하고 있으며, 이에 따라 2012년에는 자원회복사업 대상 종으로 선정되어 다양한 연구사업이 진행되고 있다. 현재 대문어와 참문어와 같은 문어류의 초기 먹이생물에 관한 연구 개발은 아직 성공하지 못하고 있다(Villanueva and Norman, 2008). 이러한 문제와 자원회복 문제를 해결하기 위한 대안으로 대문어 양식기술 개발에 대한 중요성이 대두되고 있다.

한편, 양식생물의 초기 먹이생물로 로티퍼(*Brachionus* sp.)와 알테미아(*Artemia* sp.)가 양식산업 현장에서 이용되고 있다(Kim et al., 1996; Gallagher and Brown, 1975; Watanabe et al., 1983; Léger et al., 1986; Bengtson et al., 1991; Jung and Rho, 2007). 특히 초기 먹이생물(로티퍼와 알테미아)의 안정적인 배양 기술 개발과 활용은 우리나라의 넙치 양식산업의 오늘날 발전에 중요한 요소기술 중 하나로 자리 잡았으며, 수산생물의 양식산업 현장에서는 적합한 먹이생물의 활용 가능여부가 양식산업의 성공 여부를 좌우하는 중요한 요인이다(Jung, 2014).

그 가운데, 알테미아는 수산생물의 초기동물 먹이생물로의 이용 방법이 비교적 편리하여 다양한 방법으로 다양한 수산 생물에 먹이생물로 활용되고 있다(Kim et al., 1996; Léger et al.,

1986). 이처럼 양식생물의 초기 먹이생물로 알테미아는 그 가치와 효과가 입증된 바 있다(Kim et al., 1996). 하지만 알테미아의 시스트와 부화 유생에서는 양식 생물에 해로운 영향을 미칠 수 있는 다양한 종류의 *Vibrio* spp.가 확인되었다(Gomez-Gil et al., 2004; Igarashi et al., 1989 Lopez-Torres and Lizárraga-Partida, 2001; Gomez-Gil et al., 1994; Muroga et al., 1994; Pector et al., 1994; Verdonck et al., 1994). 알테미아의 시스트 상태에서는 비교적 적은 양의 *Vibrio* spp.가 검출되지만(Gomez-Gil et al., 2004; Austin and Allen, 1982; Dehasque et al., 1991), 부화 직후의 유생 단계에서는 106~108 CFU/ml (*Artemia* nauplii homogenate)로 높은 농도의 *Vibrio* spp.가 검출되고 있다(Gomez-Gil et al., 2004; Lopez-Torres and Lizárraga-Partida, 2001).

본 연구의 목적은 대문어(*Enteroctopus dofleini*)의 인공 종자 생산과정에서 발견되는 *Vibrio* spp.와 대문어 유생의 생존율과의 상관관계를 통해, 안정적인 대문어 인공 종자 생산기술의 기반을 마련하는 데 있다.

II. 연구 방법

1. 대문어 유생 확보

우리나라 동해안에서 대문어(*Enteroctopus dofleini*)의 산란 시기는 2월에서 5월 사이로 알려져 있으며(Lee et al., 2014), 실험에 이용한 대문어(암컷)는 2월과 4월에 걸쳐서 강원도 고성군과 경상북도 포항시 연안에서 어획한 암컷 개체를 활용하였다.

실험용 어미 대문어의 선별은 먼저 교접완의 유무로 암컷임을 확인한 후 암컷의 군 성숙 체중으로 알려진 12.2kg 이상의 개체를 먼저 선별하고(Lee et al., 2014), 그중에서 생식소가 있는 몸통 부위를 손으로 만져보았을 때 난피가 발달된 개체 중 중량이 높은 개체를 선택하였는데, 이와

같은 과정을 거쳐 체중 20~29kg의 암컷 7마리를 확보하였다.

자연에서 확보된 포란 상태의 암컷 개체는 수온 10~14°C, 염분 27~33 PSU, 용존산소 4 mg/L 이상을 유지하면서 유수식과 순환 여과 사육이 함께 운전 가능한 산란용 사육 수조에서 반 순환 여과 사육방식으로 사육하였다.

산란 수조에 수용된 암컷 개체는 산란이 이루어진 후 산란된 알에서 유생이 부화 될 때까지 대게(*Chionoecetes opilio*), 새우(*Litopenaeus vannamei*), 가리비(*Patinopecten yessoensis*)를 먹이로 공급하면서 사육하였다. 한편, 산란 후 알을 관리하는 과정에서 어미가 폐사하였을 때는 수류를 교반(aeration)하는 방법으로 알에서 대문어 유생이 부화 될 때까지 인위적으로 관리하였다. 부화된 대문어 유생은 물과 함께 산란 수조에서 분리하여 같은 수질 조건으로 미리 준비된 유생사육 수조로 옮긴 후, 인공 종자 생산기술 개발 연구에 활용하였다.

부화된 대문어의 유생에게는 살아있는 양성 알테미아와 신선한 조갯살을 포함하여 냉동먹이(알테미아, 곤쟁이, 새우살, 실지렁이)를 먹이로 혼합 공급하면서 사육하였다. 사육수는 냉각장치를 통해 수온을 10~14°C로 조절하여 사용하였다.

2. 알테미아 배양

대문어 유생을 위한 먹이생물로서 양성 알테미아의 배양은 알테미아 시스트(Separt, Inve)로부터 부화된 알테미아 유생을 배양 용기(7.6 L와 1.94 m³)에서 온도 26~28°C, 염분 30~33 PSU, 용존산소 4 mg/L 이상으로 조절하여, 식물 먹이생물(*Tetraselmis* sp.)을 먹이로 공급하면서 7~12 mm 까지 배양하였다.

3. *Vibrio* spp. 생균수 측정 및 동정

Vibrio spp.의 생균수 측정을 위해 2 ml 마쇄

튜브(Autoclaved homogenizer kit, InnogeneTech)에 4종의 냉동먹이(알테미아, 곤쟁이, 새우살, 실지렁이)와 조갯살 그리고 알테미아의 부화 유생과 성체, 알테미아를 배양하는데 사용된 식물 먹이생물(*Tetraselmis* sp.)과 함께 대문어의 유생(정상 개체 및 폐사체)을 균질화기(SpeedMill plus, analytikjena)로 마쇄하였다. 샘플은 0.85% NaCl을 첨가한 PBS (Phosphate buffered saline, Samchun)에 10배 희석하여 TCBS (Difco, USA) 100 ul를 도달한 후, 25°C에서 48시간 배양하였다. 배양 후 선별된 균주는 1.5% NaCl을 첨가한 Brain Heart Infusion Broth (BHIB, Difco, USA)에 접종하여 25°C에서 48시간 배양시킨 후, -80°C에 20% (v/v) glycerol에 보관하였다.

Vibrio spp.의 동정을 위해 AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 DNA를 추출하였다. PCR 분석을 위해 Accupowre® PCR PreMix (Bioneer, Korea)를 사용하였으며, primer는 Lane (1991)을 참고하여 27 Forward (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') primer와 1492 Reverse (5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3')를 사용하였다. PCR 반응은 94°C에서 pre-denaturation 2분, 94°C에서 denaturation 30초, 55°C에서 annealing 45초, 72°C에서 extension 1분을 40 cycle 수행한 후, 72°C extension 7분간 반응하였다. 증폭된 PCR product는 1.5% agarose에서 전기영동(mupid-2plus, Optima)하여 확인하였다. 염기서열 결정은 Bionics에 의뢰하여 분석하였다.

분석된 염기서열은 NCBI (National Center Biotechnology Information)의 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)에서 유사한 염기서열과 비교하고, 가까운 종으로 나타나는 서열을 확인하였다. 분리된 균주의 염기서열과 BLAST에서 나타난 염기서열의 multiple alignment 방법은 Mega 11.0 software에 포함된 Clustal W를 이용하였다. Tree topology의 작성은 neighbor-joining 방법으로 작성하였다. Tree topology의 신뢰성 평가

를 위해 1,000회의 replication을 적용한 bootstrap 분석을 하였다.

4. 공격 실험(Challenge test)

대문어 인공 종자 생산과정에서 *Vibrio* spp.가 가장 많이 관찰된 알테미아와 *Vibrio* spp. 중 가장 많이 동정된 *V. splendidus*가 대문어 유생에게 미치는 영향을 알아보기 위해 공격 실험을 진행하였다. 사육 수조의 조건은 수온 $10.3\pm 0.2^{\circ}\text{C}$, 염분 33.25 ± 0.12 PSU, 용존산소량 6.47 ± 1.03 mg/L로 설정하였다. 수조당 41일령 대문어 유생 3마리를 수용하였으며, 실험구 조건은 알테미아와 *V. splendidus*의 유무, 항생체의 유무로 나누었다. 실험은 3 반복으로 진행하였다. Fato et al.(2003)을 참고하여 *V. splendidus*의 농도를 1.0×10^8 CFU/ml로 조정하여 대문어 유생을 1시간 침지하였다. 항생체는 양식 생물에게 일반적으로 사용되는 수산용 항생제 중에서 감수성 테스트에 가장 유효한 결과가 관찰된 florfenicol (Aqua Powercall, DaehanNupharm)을 사용하였으며(Zhai et al., 2019), 10 ppm에 1시간 약욕하였다. 실험은 2주간 진행하였다.

5. 통계 분석

분석 결과의 통계처리는 SPSS (SPSS INC, Version 18.0) 프로그램을 이용하여 독립검정을 시행하여 T-test ($P<0.05$)로 평균 간의 유의성을 검정하였다. 통계 분석을 일원분산분석(ANOVA)과 Tukey 테스트를 사용하여 평균을 비교함으로써 수행되었다. 결과값은 평균값 \pm 표준편차 (mean \pm SD)로 나타내었고 백분율 값은 arcsine 변형 값으로 계산하여 통계 분석하였다.

Ⅲ. 연구 결과

1. *Vibrio* spp. 생균수 및 동정

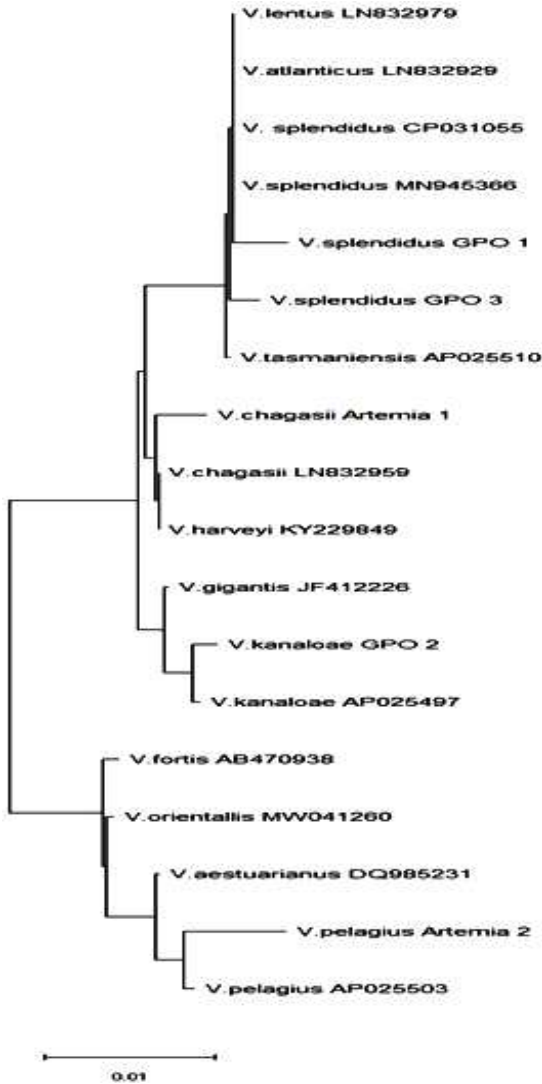
대문어 인공 종자 생산과정에서 대문어 유생 폐사체와 알테미아로부터 동정된 *Vibrio* spp. 세균은 *V. splendidus*, *V. chagasii*, *V. kanaloae*, *V. Pelagius*가 확인되었다([Fig. 1]). 이 중에서 대문어 유생 폐사체에서 *V. splendidus*가 2종, *V. kanaloae*가 1종, 알테미아에서 각각 *V. chagasii*, *V. Pelagius*가 동정되었다. *V. splendidus*의 경우 대부분 참굴에서 분리되는 것으로 알려졌으며, 대문어 유생에서 발견된 보고는 없었다. 배양학적 특성으로 TCBS에 배양 후 sucrose를 분해하여 노란색의 집락을 보이는 균주는 *V. splendidus*, *V. kanaloae*, *V. pelagius*이며, sucrose를 분해하지 못해 초록색 집락을 보이는 균주는 *V. splendidus*, *V. chagasii* 이었다. *V. splendidus*의 경우 노란색과 초록색의 집락이 관찰되었다.

알테미아 부화유생(노플리우스)과 성체, 조갯살, 냉동먹이(알테미아, 곤쟁이, 새우살, 실지렁이), 알테미아 배양용 식물 먹이생물(*Tetraselmis* sp.) 그리고 사육 해수에 대하여 *Vibrio* spp.의 생균수를 확인한 결과는 [Fig. 2]와 같다. 사육 해수, 조갯살, 냉동먹이(알테미아, 곤쟁이, 새우살, 실지렁이), 알테미아 배양용 식물 먹이생물(*Tetraselmis* sp.)에서는 *Vibrio* spp.가 검출되지 않거나, 비교적 적은 양이 검출되었다. 이에 비해 알테미아의 경우, 노플리우스에서 $6.1\times 10^2\sim 4.9\times 10^6$ CFU/ml, 성체에서 $1.9\times 10^3\sim 5.9\times 10^6$ CFU/Artemia의 *Vibrio* spp.가 검출되었다. 대문어 유생 폐사체와 부화 유생에 대한 *Vibrio* spp.의 생균수를 확인한 결과는 [Fig. 3]과 같다. 대문어 유생 폐사체에서 $1.1\times 10^2\sim 7.6\times 10^8$ CFU/GPO의 *Vibrio* spp.가 검출되었다. 대문어 부화 유생의 경우 내재 세균으로 *Vibrio* spp.를 가지고 있는 것으로 확인되었으며, 이는 어미로부터 수직 감염에 의한 것으로 판단된다.

2. 대문어 유생의 생존율

공격 실험 후 대문어 유생의 생존율은 항생제

를 처리하지 않고 *V. splendidus*를 접종한 그룹에서 2일 차에 생존율이 50%대로 급격하게 감소하였다(Fig. 4).



[Fig. 1] Phylogenetic tree based on partial nucleotide sequence showing the position of *Vibrio* spp. within the radiation of the genus *Vibriosis*. The distinct *Vibriosis* species determined by neighbour-joining method using Mega 11 program. The numbers indicate the percentages of bootstrap support from 1,000 replicates.

이에 비해 항생제를 처리하고, *V. splendidus*를 접종한 그룹에서는 2일차에 80%가 넘는 생존율을 보였다. 시간이 지남에 따라 항생제의 유무에 따라 대문어 유생 생존율의 차이가 벌어지는 양상을 보였다. 이전 연구에 따르면 florfenicol, cefaclor, gentamicin, ampicillin, nalidixic acid, oxytetracycline중에서 florfenicol이 in vitro 상에서 *V. splendidus*에 가장 큰 항균 활성을 가진 것으로 보고되었다(Yi et al., 2017).

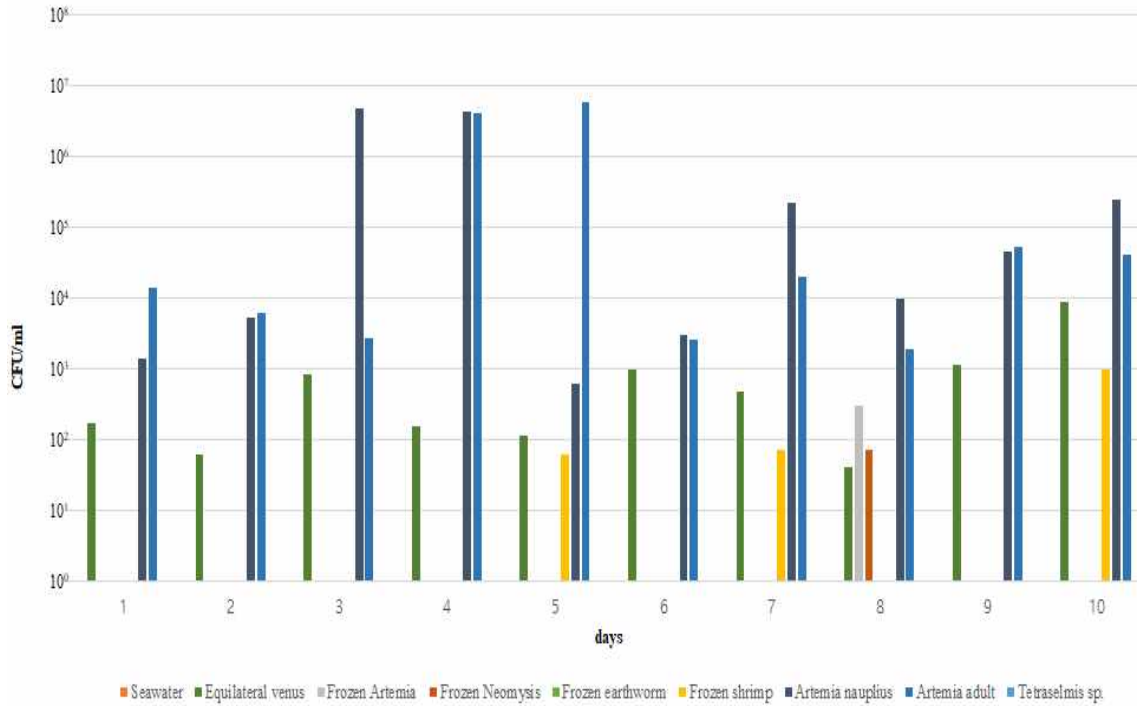
또한, 항생제, 알테미아, *V. splendidus*를 처리하지 않은 대조구는 4일간 폐사가 없었으나, 8일째 전량 폐사하였는데, 이것은 무급이가 원인으로 판단된다.

IV. 결론

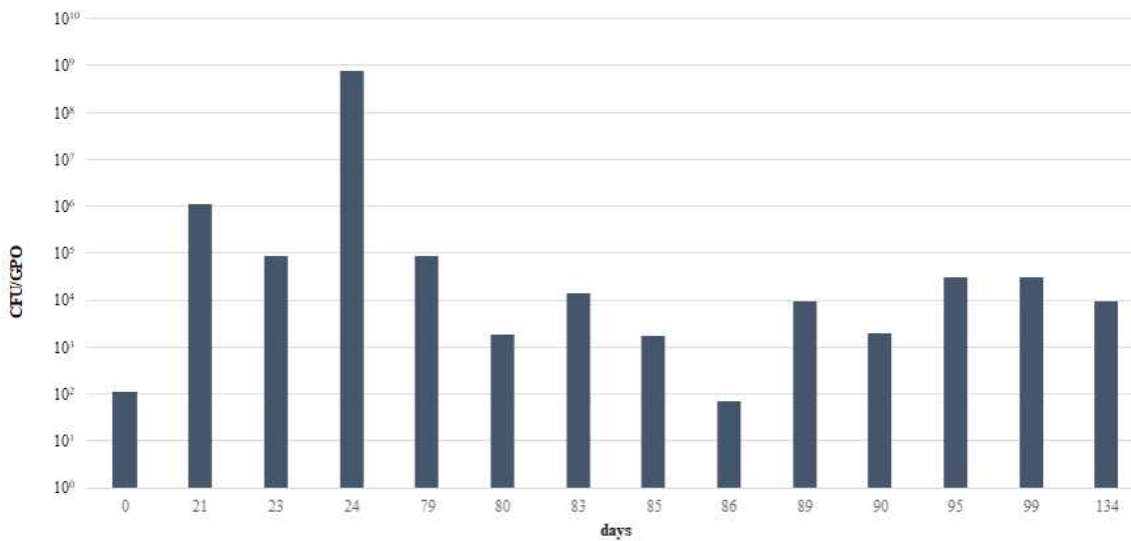
이 연구에서 추진 중인 대문어의 인공 종자 생산기술 연구에서 대문어 유생에게 필요한 초기 먹이생물에 관한 연구가 이루어지지 않은 현 상태에서 각국의 연구자들은 기존 개발된 동물 먹이생물로서 쉽게 접근이 가능한 알테미아를 대문어와 같은 두족류의 인공 종자 생산 기술개발을 위한 초기 먹이생물로 이용하고 있다. 특히 대문어와 참문어와 같은 문어류의 초기 먹이생물에 관한 연구 개발은 아직 성공하지 못하고 있다 (Villanueva and Norman, 2008). 이러한 가운데, 대문어 인공 종자 생산을 방해하는 요인으로 지금까지 주목해 온 적합한 먹이 탐색 이외의 방해 요인으로서 인공 종자 생산과정에서 관찰되는 *Vibrio* spp.의 영향에 관한 연구는 이 보고가 첫 보고로 판단된다.

Vibrio spp.는 다양한 해양 동물에게 주요 병원균으로 널리 알려져 있으며(Reichelt et al., 1976), 수온, 숙주의 면역상태, 수질 등 다양한 요인에 영향을 받는 기회감염 병원균으로 분류된다(Liu et al., 2013).

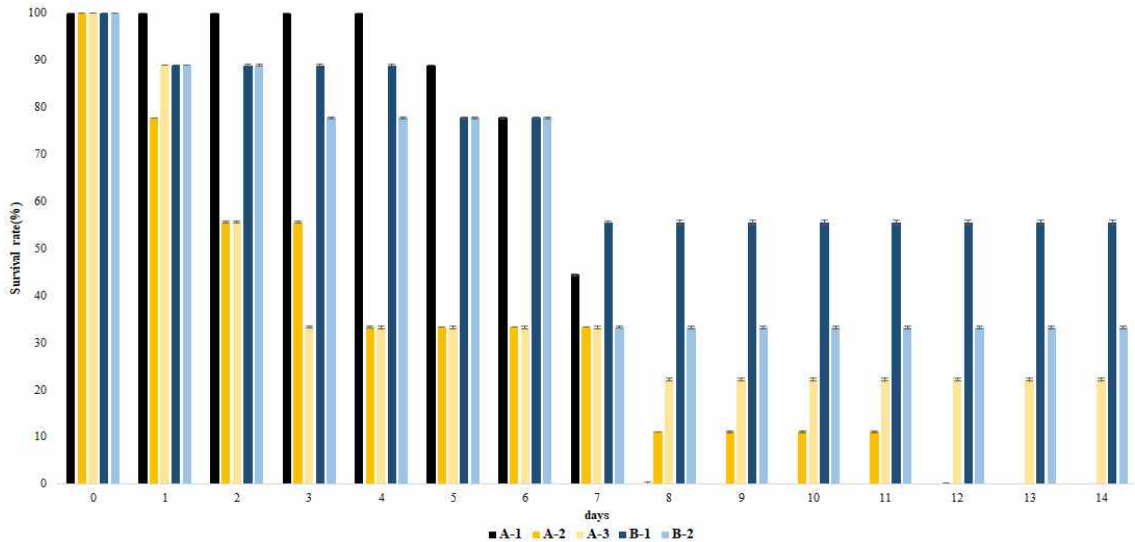
대문어(*Enteroctopus Doflein*) 인공 종자 생산과정에서 관찰된 *Vibrio* spp.의 국내 첫 보고



[Fig. 2] Measurements of *Vibrio* spp. colonies count isolated from 8 different used feed organisms for the giant Pacific octopus, *Enteroctopus dofleini* paralarvae proceeding.



[Fig. 3] Measurements of *Vibrio* spp. colonies count isolated from mortalities at different ages of giant Pacific octopus, *Enteroctopus dofleini* paralarvae.



[Fig. 4] Survival rates of giant Pacific octopus, *Enteroctopus dofleini* paralarvae infected with *V. splendidus*. (A-1: antibiotics x, *Artemia* sp. x, *V. splendidus* x; A-2: antibiotics x, *Artemia* sp. x, *V. splendidus* o; A-3: antibiotics x, *Artemia* sp. o, *V. splendidus* o; B-1: antibiotics o, *Artemia* sp. o, *V. splendidus* o; B-2: antibiotics o, *Artemia* sp. x, *V. splendidus* o)

수산생물의 인공 종자 생산과정에서 초기 먹이생물로 사용되는 알테미아에서 *Vibrio* spp.가 검출된다는 보고가 있었다(Gomez-Gil et al., 2004). 대문어의 인공 종자 생산기술을 개발하고자 이 연구에서는 대문어의 초기 폐사 원인 분석을 위하여 *Vibrio* spp.의 동태에 관한 연구를 진행하였다. 연구 결과, 알테미아 부화 유생(노플리우스)에서 $6.1 \times 10^2 \sim 4.9 \times 10^6$ CFU/ml, 성체에서 $1.9 \times 10^3 \sim 5.9 \times 10^6$ CFU/*Artemia*가 검출되었고, 이러한 결과는 기존의 연구에서 나타나듯이 알테미아의 부화 유생과 배양된 성체에서 많은 *Vibrio* spp.가 검출된다는 결과와 일치하였다(Gomez-Gil et al., 2004; Lopez-Torres and Lizárraga-Partida, 2001). 대문어 인공 종자 생산과정에서 알테미아가 중요한 요인이므로, 알테미아에서 *Vibrio* spp.를 효과적으로 줄이는 방법이 모색되어야 한다. 또한, 검출된 *Vibrio* spp.가 대문어 유생에 어떠한 영향을 미치는지에 관한 연구는 향후 진행되어야 할 것이다.

대문어 부화 유생에서 관찰된 *Vibrio* spp.는 어미로부터의 수직 감염에 의한 것으로 판단되는

데, 관련 선행 연구로서 두족류의 어미로부터 수정란에 질병이 전파된다는 이전 연구 결과가 있다(Barbieri et al., 1996; Barbieri et al., 1997; Grigioni et al., 2000). 하지만 어미로부터의 *Vibrio* spp.에 대한 생균수 검사를 하지 못하여, 수직 감염에 관한 연구는 향후 진행되어야 할 것이다.

*V. splendidus*는 그람 음성 세균으로 우리나라 연안에서 비교적 쉽게 관찰되는 세균이며, 해양생물의 상태에 따라 기회감염을 일으키는 것으로 알려져 있다 (Zhang and Li, 2021; Torresi et al., 2011; Li et al., 2021). 또한 *V. splendidus*는 참굴 (*Crassostrea gigas*) (Cao et al., 2018; Li et al., 2021; Sugumar et al., 1998; Lacoste et al., 2001; Waechter et al., 2002; Gay et al., 2004), 참문어 (*Octopus vulgaris*) (Farto et al., 2003; Gay et al., 2004), 큰가리비 (*Pecten macimus*) (Sugumar et al., 1998; Gay et al., 2004)등에서 검출되는 것으로 보고되었다.

이 연구에서는 동정된 *V. splendidus*의 경우 대부분 참굴에서 분리되었다고 알려져 있으며,

대문어 유생에서 발견되었다는 보고는 없었다. 이에 대문어 유생에서 검출된 *V. splendidus*가 어미로부터의 수직 감염에 의한 것인지, 해수 유입 혹은 먹이생물(알테미아 등)에서 수평감염 되었는지 세밀한 연구가 필요한 것으로 판단된다.

또한, 이 연구에서 분리된 *V. chagasii*, *V. kanaloae*, *V. pelagius*는 *V. splendidus*의 clade에 속하는 것으로 보고되었다 (Lasa et al., 2013; Saulnier et al., 2017). TCBS에서 *V. splendidus*를 배양하였을 때 나타나는 집락의 색이 노란색과 초록색으로 관찰되는데, 이전의 연구 결과에 따르면 분리된 *V. splendidus*에 따라 sucrose 분해의 차이가 있다고 한다 (Lee, 1996; Lacoste et al., 2001; Kesarcodi-Watson, et al., 2009). *V. splendidus*의 sucrose 분해능의 차이가 발생하는 이유와 기전은 향후 추가 연구가 필요하다고 판단된다.

공격 실험의 경우 항생제 유무에 따른 유의적인 차이가 존재하였지만, 알테미아와 *V. splendidus*에 대한 상관관계를 확인하지 못하였다. 또한, 먹이를 공급하지 않은 대조구에서 대문어 유생끼리 공식이 일어남에 따라 향후 연구를 진행할 시, 이에 대한 문제점을 보완해야 할 것이다. 연구에서 진행한 연구를 기초로 향후 연구에서는 문제점을 보완하여 추가적인 결과가 도출되어야 할 것으로 판단된다.

본 연구의 결과는 대문어(*Enteroctopus dofleini*)의 인공 종자 생산과정에서 관찰되는 *Vibrio* spp.가 대문어 유생의 생존에 영향을 줄 수 있음을 배제할 수 없었다. 향후 안정적인 대문어 양식산업을 위해 두족류의 인공 종자 생산과정에서 *Vibrio* spp.의 영향에 관한 추가적인 연구가 필요할 것이다.

References

Austin B and Allen D(1982). Microbiology of laboratory-hatched brine shrimp (*Artemia*). Aquaculture, 26, 369~383.

[https://doi.org/10.1016/0044-8486\(82\)90170-3](https://doi.org/10.1016/0044-8486(82)90170-3)
 Barbieri E, Gullede J, Moser D and Chieng CC(1996). New evidence for bacterial diversity in accessory nidamental gland of the squid (*Loligo forbesi*). Biol Bull, 192(2), 316~317.
<https://doi.org/10.1086/BBLv191n2p316>
 Barbieri E, Barry K, Child A and Wainwright N(1997). Antimicrobial activity in the microbial community of the accessory nidamental gland and egg cases of *Loligo pealei* (Cephalopoda: Loliiginidae). Biol Bull, 193(2), 275~276.
<https://doi.org/10.1086/BBLv193n2p275>
 Bengtson DA, Léger P and Sorgeloos P(1991). Use of *Artemia* as a food source for aquaculture. 225~258.
<https://doi.org/10.1201/9781351069892>
 Cao R, Wang Q, Yang D, Liu Y, Ran W, Qu Y, Wu H, Cong M, Li F, Ji C and Zhao J(2018). CO₂-induced ocean acidification impairs the immune function of the Pacific oyster against *Vibrio splendidus* challenge: An integrated study from a cellular and proteomic perspective. Sci Total Environ, 625, 1574~1583.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.056>
 Choi JH, Kwon DH, Lee JB, Yang JH and Kim DH(2018). Estimation optimal fishing effort of giant octopus, *Enteroctopus dofleini* by combo fishing. J Korean Soc Fish Ocean Technol, 54(4), 333~342.
<http://dx.doi.org/10.3796/KSFOT.2018.54.4.333>
 Dehasque M, Verdonck L, Sorgeloos P, Swings J, Léger P and Kersters K(1991). Determination of the bacterial contamination in live food production system in marine fish hatcheries in southern Europe. Larvi, 91, 399~402.
 Farto R, Armada SP, Montes M, Guisande JA, Perez MJ and Nieto TP(2003). *Vibrio lentus* associated with diseased wild octopus (*Octopus vulgaris*). J Invertebr Pathol, 83(2), 149~156.
[https://doi.org/10.1016/S0022-2011\(03\)00067-3](https://doi.org/10.1016/S0022-2011(03)00067-3)
 Gallagher M and Brown WD(1975). Composition of San Francisco Bay brine shrimp (*Artemia salina*). J Agric Food Chem, 23, 630~632.
<https://doi.org/10.1021/jf60200a008>
 Gay M, Renault T, Pons AM and Le Roux R(2004). Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to

- kill *Crassostrea gigas*: taxonomy and host alterations. *Dis Aquat Org*, 62(1-2), 65~75.
<http://doi.10.3354/dao062065>
- Gomez-Gil RSB, Abreu-Grobois FA, Romero-Jarero J, and Herrera-vega M(1994). Chemical disinfection of *Artemia* nauplii. *J World Aquacult Soc*, 25(4), 579~583.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1994.tb00829.x>
- Gomez-Gil B, Thompson FL, Thompson CC, Garcia-Gasca A, Roque A and Swings J(2004). *Vibrio hispanicus* sp. nov., isolated from *Artemia* sp. and sea water in Spain. *Int J Syst Evol Microbiol*, 54, 261~265.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.02775-0>
- Grigioni S, Boucher-Rodoni R, Demarta A, Tonolla M and Peduzzi R(2000). Phylogenetic characterization of bacterial symbionts in the accessory nidamental glands of the sepoid *Sepia officinalis* (Cephalopoda: Decapoda). *Mar Biol*, 136, 217~222.
<https://doi.org/10.1007/s002270050679>
- Igarashi MA, Sugita H and Deguchi Y(1989). Microflora associated with eggs and nauplii of *Artemia salina*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55, 2045.
- Jung MM(2014). Interspecific relationships between coexisting micro-organisms in the freshwater Rotifer (*Brachionus calyciflorus*) culture tanks as microcosm. *J Fish Mar Sci Educ*, 26(1), 1~9.
<http://dx.doi.org/10.13000/JFMSE.2014.26.1.1>
- Jung MM and Rho S(2007). Live Food Organisms for Aquaculture. Onnuri Press, Cheju, 256.
- Kesarcodi-Watson A, Kaspar H, Lategan MJ and Gibson L(2009). Two pathogens of Greenshell TM mussel larvae, *Perna canaliculus*: *Vibrio splendidus* and a *V. coralliilyticus/ neptunius*-like isolate. *J Fish Dis*, 32, 499~507.
<http://doi.10.1111/j.1365-2761.2009.01006.x>
- Kim GJ(2022). Variations in catches of fisheries according to the climate change of Korea. *Journal of Disaster Information*, 18(1), 194~201.
<https://doi.org/10.15683/kosdi.2022.3.31.194>
- Kim JH, Masseur KC and Hardy RW(1996). Adult *Artemia* as food for first feeding coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture*, 144(1-3), 217~226.
[https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(96\)01296-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(96)01296-3)
- KOSIS (Korean statistical information service) <http://kosis.kr/index/index.do>
- Lacoste A, Jalabert F, Malham S, Cueff A, Célébart F, Cordevant C, Lange M and Poulet SA(2001). A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). *Dis Aquat Org*, 46(2), 139~145.
<http://doi.10.3354/dao046139>
- Lane DJ(1991). 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Stackebrandt E & Goodfellow M, eds, 115~175.
- Lasa A, Dieguez AL and Romalde, JL(2013). *Vibrio toranzoniae* sp. nov., a new member of the *Splendidus* clade in the genus *Vibrio*. *Syst Appl Microbiol*, 36, 96~100.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2012.11.005>
- Lee M, Taylor GT, Bricej M, Ford SE and Zahn S(1996). Evaluation of *Vibrio* spp. and microplankton blooms as causative agents of juvenile oyster disease in *Crassostrea virginica* (Gmelin). *J Shell Res*, 15, 319~329.
- Lee SI, Yang JH, Lee HW, Kim JB and Cha HK(2014). Maturity and spawning of the giant Pacific octopus, *Octopus dofleini* in the coast of Gangwondo, East Sea. *J Kor Soc Fish Tech*, 50(2), 154~161.
<https://doi.org/10.3796/KSFT.2014.50.2.154>
- Léger P, Bengtson DA, Simpson KL and Sorgeloos P(1986). The use and nutritional value of *Artemia* as a food source. *Oceanogr Marm Biol Ann Rev*, 24, 521~623.
- Li Y, Wood TK, Zhang W and Li C(2021). *Vibrio splendidus* persister cells induced by host coelomic fluids show a similar phenotype to antibiotic-induced counterparts. *Environ Microbiol*, 23(9), 5605~5620.
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.15717>
- Liu R, Qiu L, Yu Z, Zi J, Yue F, Wang L, Zhang H, Teng W, Liu X and Song L(2013). Identification and characterization of pathogenic *Vibrio splendidus* from Yesso scallop (*Patinopecten yessoensis*) cultured in a low temperature environment. *J Invertebr Pathol*, 114, 144~150.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2013.07.005>
- López-Torres MA and Lizárraga-Partida ML(2001). Bacteria isolated on TCBS media associated with

- hatched *Artemia* cysts of commercial brands. *Aquaculture*, 194, 11~20.
[https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00505-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00505-6)
- Muroga K, Suzuki K, Ishimaru K and Nogami K(1994). Vibriosis of swimming crab *Portunus trituberculatus* in larviculture. *J World Aquacult Soc*, 25(1), 50~54.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1994.tb00803.x>
- National Fisheries Research and Development Institute (NFRDI) (2005). Commercial cephalopods of the world. Yemoo Press, Busan, 172.
- Pector R, Tackaert W, Abellin P, Ollivier F and Sorgeloos P(1994). A comparative study on the use of different preparations of decapsulated *Artemia* cysts as food for rearing catfish (*Clarias gariepinus*) larvae. *J World Aquacult Soc*, 25(3), 366~370.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1994.tb00220.x>
- Reichert JL, Baumann P and Baumann L(1976). Study of genetic relationships among marine species of the genera *Beneckeia* and *Photobacterium* by means of in vitro DNA/DNA hybridisation. *Arch Mikrobiol*, 110, 101~120.
<https://doi.org/10.1007/BF00416975>
- Saulnier D, De Decker S, Tourbiez D and Travers MA(2017). Development of a duplex Taqman real-time PCR assay for rapid identification of *Vibrio splendidus*-related and *V. aestuarianus* strains from bacterial cultures. *J microbiol Methods*, 140, 67~69.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2017.07.002>
- Sugumar G, Nakai T, Hirata Y, Matsubara D and Muroga K(1998). *Vibrio splendidus* biovar II as the causative agent of bacillary necrosis of Japanese oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Dis Aquat Org*, 33(2), 111~118.
<http://doi.10.3354/dao033111>
- Torresi M, Acciari VA, Piano A, Serratore P, Prencipe V and Migliorati G(2011). Detection of *Vibrio splendidus* and related species in *Chamelea gallina* sampled in the adriatic along the abruzzo coastline. *Vet Ital*, 47(3), 363~370.
- Verdonck L, Swings J, Kersters K, Dehasque M, Sorgeloos P and Leger P(1994). Variability of the microbial environment of rotifer *Brachionis plicatilis* and *Artemia* production systems. *J world Aquacult Soc*, 25, 55~59.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1994.tb00804.x>
- Villanueva R and Norman MD(2008). Biology of the planktonic stages of benthic octopus. *Oceanogr Marm Biol Ann Rev*, 46, 105~202.
- Waechter M, Le Roux F, Nicolas JL, Marissal E and Berthe F(2002). Characterization of *Crassostrea gigas* spat pathogenic bacteria. *CR Biologies*, 325(3), 231~238.
[http://doi.10.1016/S1631-0691\(02\)01428-2](http://doi.10.1016/S1631-0691(02)01428-2)
- Watanabe T, Kitajima C and Fujita S(1983). Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review. *Aquaculture*, 34, 115~143.
[https://doi.org/10.1016/0044-8486\(83\)90296-X](https://doi.org/10.1016/0044-8486(83)90296-X)
- Yi SW, Moon SH, Cho HS and Kim CW(2017). Degradation capability of macromolecular organic matters and antimicrobial activities of *Bacillus* species isolated from surf clam (*Tresus Keenae*). *Korean J Vet Serv*, 40(4), 265~275.
<https://doi.org/10.7853/kjvs.2017.40.4.265>
- Zhai Q, Li J, Feng Y and Ge Q(2019). Evaluation of combination effects of *Astragalus* polysaccharides and florfenicol against acute hepatopancreatic necrosis disease-causing strain of *Vibrio paraheamolyticus* in *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol*, 86, 374~383.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.11.065>
- Zhang W and Li C(2021). Virulence mechanisms of vibrios belonging to the *V. splendidus* clade as aquaculture pathogens, from case studies and genome date. *Rec Aquac*, 13(4), 2004~2026.
<https://doi.org/10.1111/raq.12555>
-
- Received : 13 February, 2024
 - Revised : 26 February, 2024
 - Accepted : 04 March, 2024