

# 왕우럭 (*Tresus keenae*) 에서 분리한 장내미생물 *Bacillus species*를 이용한 유생 사육

강한승<sup>1</sup>, 최희찬<sup>2</sup>, 조정현<sup>2</sup>, 김철원<sup>3</sup>

<sup>1</sup>엠에스바이오랩, <sup>2</sup>국립수산과학원 동해수산연구소, <sup>3</sup>한국농수산대학교

## Larval breeding using *Bacillus species*, an intestinal microorganism isolated from Surf Clam (*Tresus keenae*)

Han Seung Kang<sup>1</sup>, Hee Chan Choi<sup>2</sup>, Jung Hyun Cho<sup>2</sup> and Chul Won Kim<sup>3</sup>

<sup>1</sup>MS BioLab, 3F, 103 Gayang-ro, Dong-gu, Daejeon 34576, Korea

<sup>2</sup>Fisheries Resources and Environmental Division, East Sea Fisheries Research Institute, Gangneung 25435, Korea

<sup>3</sup>Department of Aquaculture, Korea National College of Agriculture and Fisheries, Kongjwipatjwi-ro 1515, Wansan-gu, Jeonju, Jeollabuk-do 54874, Korea

### ABSTRACT

In this study, we conducted a larval breeding study of *Tresus keenae* using 5 *Bacillus* genera, which are excellent in the ability to decompose high molecular weight organic matter and the antibacterial activity of pathogenic bacteria, among the 65 *Bacillus* genera. Research results that the relationship between larval growth and viability was high in the TKI42 and microbial mixed strains of TKI02 + TKI14 + TKI26 + TKI32 + TKI42. The growth and viability of larvae at the amount of the mixed microbial strain (TKI02 + TKI14 + TKI26 + TKI32 + TKI42) was  $1.0 \times 10^6$  CFU/ml, which was the best growth, and  $1.0 \times 10^7$  CFU/ml, which was the lowest. And the survival rate was the best at  $1.0 \times 10^5$  CFU/ml. In addition, the growth and survival rate were high when the mixed microbial strain ( $1.0 \times 10^6$  CFU/ml) with a water temperature of 25°C was treated. In this study, when the growth and survival of larval breeding was investigated based on five *Bacillus* strains, the prediction of the application to the breeding of organisms in the aquaculture industry based on the special ability of a single strain is uncertain. Rather than developing and using only a single strain, it is thought that the effect can be expected to using mixed strains.

**Keywords** *Tresus keenae*, *Bacillus*, microbial, growth, survival rate

### 서 론

왕우럭 (*Tresus keenae*) 은 개량조개과 (Mactridae), 왕우럭속 (Tresus) 에 속하는 비부착성 대형패류로 우리나라 거제, 사천, 남해, 여수 연안 및 일본의 조간대에 분포 서식한다. 경제성이 높은 왕우럭은 남획 및 연안해역의 오염에 따른 자원량의 감소가 일어나고 있다. 따라서 산업적 가치가 높은 품종이

며, 자원 감소에 의한 생산성 저하의 문제 등에 대비하여 왕우럭의 자원 조성이나 양식산업화를 위한 인공종묘생산 기술의 개발은 매우 중요하다.

왕우럭의 인공종묘생산과 관련한 기초 연구로는 수온, 염분 등과 관련하여 생리, 생화학적인 변화 등에 관한 연구 (Newell & Kofoed, 1977; Loomis *et al.*, 1995; Chapple *et al.*, 1998; Shin & Wi, 2004), 산란과 유생 발생 (Kang & Kim, 2018) 및 사육조건과 먹이생물에 의한 유생의 성장과 생존율 (Min, 2019) 등이 보고되었다.

최근, 양식산업 분야에서는 생균제 프로바이오틱스 (probiotics) 를 양식생물에 적용하여 영양성분의 소화 및 흡수의 개선을 통한 성장 및 생존의 향상을 보고하였다 (Xie *et al.*, 2013; Bidhan *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2017). 특히, 패류인 전복에 *Bacillus amyloliquefaciens*를 프로바이오틱스로 이용하여 성장율과 생존을 개선한 연구가 이루어져

Received: December 17, 2020; Revised: December 24, 2020;  
Accepted: December 31, 2020

Corresponding author: Chul Won Kim

Tel: +82 (63) 238-9250, e-mail: aquaworld@korea.kr  
1225-3480/24778

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.

패류의 인공종묘생산에 프로바이오틱스를 이용한 생산성 향상을 기대할 수 있게 되었다. 프로바이오틱스의 기능은 소화 및 흡수의 개선과 더불어, bacteriocin의 생산을 통한 항균력 향상이 이루어져 유해세균의 억제 또는 사멸 등을 기대할 수 있다 (Muñoz-Atienza *et al.*, 2013). Bacteriocin은 단백질성 천연항생물질이기 때문에 체내의 소화액과 가수분해 효소들에 의해 쉽게 분해되어 잔류성이 적고 생물에도 무해하다고 알려져 있다 (Cleveland *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2005). Bacteriocin은 *Bacillus* spp.에서 많은 연구가 되어 있는데, 항균활성의 효용성 때문에 *Bacillus*와 관련된 bacteriocin은 식품, 농업, 제약산업에의 적용에 대한 가능성이 높은 상태이다 (Abriouel *et al.*, 2010; Lee & Kim, 2011).

본 연구진은 왕우럭 인공종묘생산의 효율을 개선하기 위한 목표의 선행연구로 왕우럭 소화관에서 프로바이오틱스의 세균 탐색을 수행하였다 (Lee *et al.*, 2017). 분리한 미생물들 중 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 조사하였다. 또한 항균활성의 유전자적 배경을 찾고자 알려진 *Bacillus* spp.의 bacteriocin 유전자를 타겟으로 PCR 분석을 수행하였다. 연구 결과 분리한 다수의 미생물들이 고분자 분해 활성 및 항균활성을 가지는 것으로 조사되었다 (Lee *et al.*, 2017).

따라서 본 연구에서는 왕우럭에서 분리하여 *in vitro* 실험에서 고분자 유기물질 분해능력 및 항균활성 능력을 검증한 생균제 프로바이오틱스를 이용하여 *in vivo* 실험의 일환으로 유생의 사육에 미치는 영향을 살펴보고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 균주의 분리

본 연구에 사용된 왕우럭 (*Tresus keenae*) 은 잠수기 어업을 이용하여 포획되었으며 여수의 한 양식업체를 통해 2016년 7월과 11월에 각각 30 마리씩 수집하였다 (Fig. 1). 수집한 개체는 각고, 각장, 각폭을 측정하고 탈염 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 측정하고 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 분리

하여 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 현탁 시켜 -80°C에 보관하였다.

### 2. 장내 미생물 종류에 따른 유생의 성장과 생존

왕우럭의 장에서 분리된 장내미생물 중 TKI02 (*Bacillus thuringiensis*), TKI14 (*Bacillus amyloliquefaciens*), TKI26 (*B. thuringiensis*), TKI32 (*B. amyloliquefaciens*), TKI42 (*B. amyloliquefaciens*) 5종을 선택하여 유생사육 실험에 사용하였다. 선택된 미생물 균주는 앞선 선행 연구 (Lee *et al.*, 2017) 에서 고분자 분해 활성 및 항균활성 분석 시 우수한 능력을 나타낸 것이기에 유생의 사육에 적합하리라 판단하여 선택하였다. 유생사육에 미생물을 첨가하지 않은 대조군 (Control), TKI02, TKI14, TKI26, TKI32, TKI42와 미생물 전체를 혼합한 TKI02 + TKI14 + TKI26 + TKI32 + TKI42 등 7개로 구분하여 유생사육 실험을 하였다. 미생물 첨가 농도는  $100 \times 10^4$  CFU/ml를 기준으로 하였다. 왕우럭의 유생사육은 2017년 5월에 한국농수산대학 수산생물사육실에서 실시하였다. 3 L 비이커에 건강한 D상 유생 ( $88.5 \pm 0.5 \mu\text{m}$ ) 10 개체/ml를 수용하여 수온  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , 염분은 자연여과 해수, 먹이공급은 *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros simplex*, *Tetraselmis suecica*를 혼합하여  $5 \times 10^4$  cells/mL을 1일 2회 공급하였으며 실험기간은 21일이었다. 환수는 3일 간격으로 전량하였으며, 유생 30 개체를 채집하여 광학현미경 (Olympus BX-50) 을 이용하여 성장 (각장, 각고) 를 측정하였으며 생존율은 환수 시 생존한 유생량을 측정하고 실험시작 시 수용한 유생량에서 생존한 유생량을 계산하여 산출하였다. 모든 실험은 3 반복 실시하였고, 실험구별 성장과 생존율의 통계처리 는 one-way ANOVA test를 실시하였으며 평균간의 유의성 ( $P < 0.05$ ) 은 Duncan's multiple range test (Duncan, 1955) 으로 검정하였다.

### 3. 장내 미생물 첨가량에 따른 유생의 성장과 생존

장내 미생물 5종을 모두 섞은 TKI02 + TKI14 + TKI26 + TKI32 + TKI42를 대상으로 미생물 양  $1.0 \times 10^4$  CFU/ml,  $1.0 \times 10^5$  CFU/ml,  $1.0 \times 10^6$  CFU/ml,  $1.0 \times 10^7$  CFU/ml 4개의 실험구 및 미생물을 첨가하지 않은 대조군 (Control) 로 구분하여 성장과 생존을 조사하였다. 3 L 비이커에 건강한 D상 유생 ( $88.5 \pm 0.5 \mu\text{m}$ ) 10 개체/ml를 수용하여 수온  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , 염분은 자연여과 해수, 먹이공급은 *I. galbana*, *C. simplex*, *T. suecica*를 혼합하여  $5 \times 10^4$  cells/mL을 1일 2회 공급하였으며 실험기간은 21일이었다. 환수는 3일 간격으로 하면서 유생 30 개체를 채집하여 광학현미경 (Olympus



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

BX-50) 을 이용하여 성장 (각장, 각고) 를 측정하였으며 생존율은 환수 시 생존한 유생량을 측정하고 실험시작 시 수용한 유생량에서 생존한 유생량을 계산하여 산출하였다. 모든 실험은 3 반복 실시하였고, 실험구별 성장과 생존율의 통계처리는 one-way ANOVA test를 실시하였으며 평균간의 유의성 ( $P < 0.05$ ) 은 Duncan's multiple range test (Duncan, 1955) 으로 검정하였다.

#### 4. 수온과 장내 미생물 첨가에 따른 유생의 성장과 생존

장내 미생물을 첨가하지 않은 대조구와 5종의 장내 미생물을 혼합한 TKI02 + TKI14 + TKI26 + TKI32 + TKI42 실험구 2개로 구분하여 수온 15°C, 20°C, 25°C 및 30°C 조건에서 유생 사육 실험을 하였다. 미생물은  $1.0 \times 10^6$  CFU/ml 첨가하였다. 유생사육은 수온조절이 가능한 30 L 사각수조에 건강한 D상 유생 ( $86.5 \pm 3.0 \mu\text{m}$ ) 을 10 개체/ml를 수용하였으며 먹이공급은 *I. galbana*, *C. simplex*, *T. suecica*를 혼합하여  $5 \times 10^4$  cells/mL을 1일 2회 공급하였으며 실험기간은 21일간 수행하였다. 환수는 3일 간격으로 하면서 유생 30 개체를 채집하여 광학현미경 (Olympus BX-50) 을 이용하여 성장 (각장, 각고) 를 측정하였으며 생존율은 환수 시 생존한 유생량을 측정하고 실험시작 시 수용한 유생량에서 생존한 유생량을 계산하여 산출하였다. 그리고 모든 실험은 3 반복으로 실시하였고, 실험구별 성장과 생존율의 통계처리는 two-way ANOVA test를 실시하였으며 평균간의 유의성 ( $P < 0.05$ ) 은 Duncan's multiple range test (Duncan, 1955) 으로 검정하였다.

## 결 과

### 1. 균주의 분리

실험에 사용한 왕우럭의 계측형질을 측정한 결과, 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). 2016년 7월과 11월에 30 마리씩 수집한 왕우럭 장내에서는 총 65개의 분리주가 분리되었다 (Table 1). 계절에 따른 균주의 분리를 살펴보면 2016년 7월에 수집된 왕우럭 장내에서 분리된 43균주는 19개의 속과 36개의 종 (미동정 2종 포함) 으로 구성되어 있었다 (Table 2). 2016년 11월에 수집된 왕우럭 장내 분리된 22균주는 10개의 속과 19개의 종 (미동정 5종 포함) 으로 구성되어 있었다 (Table 3). (Lee *et al.*, 2017)

### 2. 장내 미생물 종류에 따른 유생의 성장과 생존

왕우럭 유생의 사육에 미생물의 처리는 종류에 따라 각장, 각고, 일간성장 및 생존율에 차이가 났다 (Table 4). 실험개시와 비교하여 실험종료 시 각장 성장은 TKI42 실험구와 TKI02 + TKI14 + TKI26 + TKI32 + TKI42 실험구에서 다른 실험구에 비해 각각  $248.7 \pm 14.2 \mu\text{m}$ 와  $246.7 \pm 10.8 \mu\text{m}$ 로 높게 성장하였다. 각고 성장은 TKI42 실험구와 TKI26 실험구에서 각각  $208.3 \pm 18.9 \mu\text{m}$ 와  $207.6 \pm 16.2 \mu\text{m}$ 로 높게 나타났다. 일간성장은 TKI42 실험구와 TKI02 + TKI14 + TKI26 + TKI32 + TKI42 실험구에서 각각  $7.6 \pm 0.95 \mu\text{m}$ 와  $7.5 \pm 1.31 \mu\text{m}$ 로 높게 나타났다. 생존율은 TKI02 + TKI14 + TKI26 + TKI32 + TKI42 실험구에서  $46.5 \pm 5.3\%$ , TKI42 실험구에서  $41.3 \pm 3.2\%$ 로 높게 나타났다. 미생물의 처리 종류에 따른 유생의 성장과 생존에는 TKI42 균주 처리 실험구에서 각장, 각고, 일간성장 및 생존율 등이 높게 나타났다. 또한 TKI02 + TKI14 + TKI26 + TKI32 + TKI42 균주 혼합물 실험구에서도 각고 성장을 제외한 각장, 일간성장 및 생존율에서 높게 나타났다.

### 3. 장내 미생물 첨가량에 따른 유생의 성장과 생존

장내미생물의 첨가량에 따른 유생의 성장과 생존 연구에서 미생물의 선택은 TKI02 + TKI14 + TKI26 + TKI32 + TKI42 균주 혼합물을 선택하였다. 균주 혼합물은 장내 미생물

**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 townneri</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 fozzii</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>			

의 종류에 따른 유생의 성장과 생존에서 TKI42와 함께 높은 성장 및 생존율을 보여주었다. 특정 단일 균주의 실험에 비해 균주 혼합물의 실험이 합리적이라 판단되어 실험 미생물로 선택하였다. 장내 미생물 첨가량에 따른 유생의 성장과 생존은 차이가 있게 나타났다 (Table 5).

각장 성장은  $1.0 \times 10^6$  CFU/ml 실험구에서  $242.2 \pm 10.5 \mu\text{m}$ 로 가장 높게 나타났다. 각고 성장은  $1.0 \times 10^6$  CFU/ml 실험구에서  $211.7 \pm 14.0 \mu\text{m}$ 로 가장 높았으며, 일간성장 또한  $1.0 \times 10^6$  CFU/ml 실험구에서  $7.3 \pm 0.75 \mu\text{m}$ 로 가장

높게 나타났다. 생존율은  $1.0 \times 10^5$  CFU/ml 실험구에서  $35.9 \pm 2.9\%$ 로 가장 높게 나타났다. 반면에  $1.0 \times 10^7$  CFU/ml 실험구에서는 각장 ( $225.6 \pm 13.1 \mu\text{m}$ ), 각고 ( $198.3 \pm 14.9 \mu\text{m}$ ), 일간성장 ( $6.5 \pm 0.81 \mu\text{m}$ ) 및 생존율 ( $18.7 \pm 3.8\%$ ) 등 모든 항목에서 가장 낮게 나타났다.

#### 4. 수온과 장내 미생물 첨가에 따른 유생의 성장과 생존

수온과 장내 미생물의 첨가에 따른 유생의 성장과 생존 연구에서 미생물의 선택은 TKI02 + TKI14 + TKI26 + TKI32

**Table 2.** Classification of the genus and species of bacteria isolated from the intestine of *Tresus keenae* in July 2016

Genus		Species		n
1	Bacillus	1	<i>Bacillus vietnamensis</i>	1
2	Streptococcus	2	<i>Bacillus thuringiensis</i>	2
3	Pseudomonas	3	<i>Streptococcus parauberis</i>	1
4	Vagococcus	4	<i>Pseudomonas pachastrellae</i>	1
5	Tenacibaculum	5	<i>Vagococcus carniphilus</i>	1
6	Shewanella	6	<i>Tenacibaculum lutimaris</i>	1
7	Vibrio	7	<i>Shewanella gaetbuli</i>	1
8	Acinetobacter	8	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1
9	Psychrobacter	9	<i>Bacillus aquimaris</i>	1
10	Planococcus	10	<i>Vibrio alginolyticus</i>	1
11	Microbacterium	11	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	5
12	Staphylococcus	12	<i>Acinetobacter venetianus</i>	1
13	Pantoea	13	<i>Psychrobacter nivimaris</i>	1
14	Myroides	14	<i>Vibrio natriegens</i>	1
15	Lactococcus	15	<i>Bacillus stratosphericus</i>	1
16	Enterococcus	16	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	1
17	Neisseria	17	<i>Microbacterium flavum</i>	1
18	Kurthia	18	<i>Acinetobacter townneri</i>	1
19	Klebsiella	19	<i>Staphylococcus stepanovicii</i>	1
		20	<i>Microbacterium esteraromaticum</i>	1
		21	<i>Pantoea ananatis</i>	1
		22	<i>Myroides pelagicus</i>	1
		23	<i>Lactococcus raffinolactis</i>	1
		24	<i>Enterococcus devriesei</i>	1
		25	<i>Vagococcus carniphilus</i>	1
		26	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	1
		27	<i>Bacillus galactosidilyticus</i>	1
		28	<i>Neisseria flavescens</i>	1
		29	<i>Lactococcus lactis</i>	2
		30	<i>Kurthia gibsonii</i>	1
		31	<i>Shewanella colwelliana</i>	1
		32	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1
		33	<i>Vibrio neocaledonicus</i>	1
		34	<i>Streptococcus mitis</i>	1
		35	<i>Planococcus</i> sp.	1
		36	<i>Vibrio</i> sp.	1

+ TKI42 균주 혼합물을 선택하였다. 균주 혼합물의 선택은 유생의 성장과 생존에서 높은 성장 및 생존율을 보여주었고, 특정 단일 균주의 실험에 비해 균주 혼합물의 실험이 합리적이 라 판단되어 실험 미생물로 선택하였다. 왕우럭 유생의 성장과 생존에 균주 혼합중 처리와 수온을 달리하여 사육한 결과의 성장 및 생존율은 다음과 같이 나타났다 (Table 6). 각장 성장은 15°C에서 대조구 205.4 ± 13.3 μm, 균주 혼합중 실험구

220.7 ± 14.5 μm, 20°C에서 대조구 214.9 ± 10.9 μm, 균주 혼합중 실험구 229.5 ± 11.9 μm, 25°C에서 대조구 225.7 ± 14.5 μm, 균주 혼합중 실험구 240.9 ± 17.5 μm, 30°C에서 대조구 228.5 ± 15.0 μm, 균주 혼합중 실험구 237.3 ± 15.1 μm로 나타났다. 각고 성장은 15°C에서 대조구 173.9 ± 13.4 μm, 균주 혼합중 실험구 190.9 ± 14.7 μm, 20°C에서 대조구 185.8 ± 14.2 μm, 균주 혼합중 실험구 197.1 ± 15.5

**Table 3.** Classification of the genus and species of bacteria isolated from the intestine of *Tresus keenae* in October 2016

	Genus		Species	n
1	Shewanella	1	<i>Enterococcus faecalis</i>	1
2	Enterococcus	2	<i>Microbacterium oxydans</i>	1
3	Microbacterium	3	<i>Marinomonas pontica</i>	1
4	Marinomonas	4	<i>Bacillus vietnamensis</i>	1
5	Bacillus	5	<i>Shewanella arctica</i>	2
6	Staphylococcus	6	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1
7	Psychrobacter	7	<i>Psychrobacter glacincola</i>	1
8	Pseudoalteromonas	8	<i>Staphylococcus hominis</i>	1
9	Tenacibaculum	9	<i>Shewanella fidelia</i>	1
10	Colwellia	10	<i>Psychrobacter fozii</i>	1
		11	<i>Tenacibaculum discolor</i>	1
		12	<i>Colwellia aestuarii</i>	1
		13	<i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i>	1
		14	<i>Psychrobacter piscatorii</i>	1
		15	<i>Shewanella sp.</i>	1
		16	<i>Pseudoalteromonas sp.</i>	1
		17	<i>Pseudoalteromonas sp.</i>	2
		18	<i>Pseudoalteromonas sp.</i>	1
		19	<i>Shewanella sp.</i>	2

**Table 4.** Growth and survival rate of *Tresus keenae* larvae according to types of intestinal microorganisms

Experimental Group	Start of experiment		End of experiment		Daily growth ( $\mu\text{m}$ )	Survival rate (%)
	Shell length ( $\mu\text{m}$ )	Shell height ( $\mu\text{m}$ )	Shell length ( $\mu\text{m}$ )	Shell height ( $\mu\text{m}$ )		
Control	88.8 $\pm$ 3.5 <sup>a</sup>	69.8 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>	231.1 $\pm$ 13.0 <sup>ab</sup>	203.2 $\pm$ 18.0 <sup>ab</sup>	6.8 $\pm$ 1.24 <sup>ab</sup>	26.0 $\pm$ 2.9 <sup>b</sup>
TKI02	88.3 $\pm$ 3.9 <sup>a</sup>	70.9 $\pm$ 2.6 <sup>a</sup>	223.1 $\pm$ 15.7 <sup>b</sup>	202.0 $\pm$ 13.0 <sup>ab</sup>	6.4 $\pm$ 0.98 <sup>b</sup>	33.4 $\pm$ 4.9 <sup>ab</sup>
TKI14	89.0 $\pm$ 2.8 <sup>a</sup>	69.9 $\pm$ 2.5 <sup>a</sup>	224.6 $\pm$ 16.4 <sup>b</sup>	200.0 $\pm$ 17.1 <sup>b</sup>	6.5 $\pm$ 1.01 <sup>b</sup>	30.5 $\pm$ 2.8 <sup>b</sup>
TKI26	87.7 $\pm$ 4.3 <sup>a</sup>	70.2 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>	235.2 $\pm$ 13.9 <sup>ab</sup>	207.6 $\pm$ 16.2 <sup>a</sup>	7.2 $\pm$ 0.88 <sup>a</sup>	35.6 $\pm$ 4.5 <sup>ab</sup>
TKI32	89.0 $\pm$ 3.9 <sup>a</sup>	69.8 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	226.5 $\pm$ 14.2 <sup>b</sup>	200.0 $\pm$ 12.9 <sup>a</sup>	6.5 $\pm$ 0.75 <sup>b</sup>	28.0 $\pm$ 4.7 <sup>b</sup>
TKI42	88.2 $\pm$ 4.4 <sup>a</sup>	70.6 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	248.7 $\pm$ 14.2 <sup>a</sup>	208.3 $\pm$ 18.9 <sup>a</sup>	7.6 $\pm$ 0.95 <sup>a</sup>	41.3 $\pm$ 3.2 <sup>a</sup>
TKI (02 + 14 + 26 + 32 + 42)	88.6 $\pm$ 3.9 <sup>a</sup>	70.1 $\pm$ 2.6 <sup>a</sup>	246.7 $\pm$ 10.8 <sup>a</sup>	204.3 $\pm$ 15.3 <sup>ab</sup>	7.5 $\pm$ 1.31 <sup>a</sup>	46.5 $\pm$ 5.3 <sup>a</sup>

$\mu\text{m}$ , 25 $^{\circ}\text{C}$ 에서 대조구 208.8  $\pm$  12.5  $\mu\text{m}$ , 군주 혼합종 실험구 213.6  $\pm$  17.8  $\mu\text{m}$ , 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 대조구 201.8  $\pm$  12.1  $\mu\text{m}$ , 군주 혼합종 실험구 209.1  $\pm$  14.4  $\mu\text{m}$ 로 나타났다. 일간성장 은 15 $^{\circ}\text{C}$ 에서 대조구 5.68  $\pm$  1.2  $\mu\text{m}$ , 군주 혼합종 실험구 6.40  $\pm$  1.3  $\mu\text{m}$ , 20 $^{\circ}\text{C}$ 에서 대조구 5.96  $\pm$  1.2  $\mu\text{m}$ , 군주 혼합종 실험구 6.79  $\pm$  1.3  $\mu\text{m}$ , 25 $^{\circ}\text{C}$ 에서 대조구 6.61  $\pm$  1.2  $\mu$

m, 군주 혼합종 실험구 7.32  $\pm$  1.3  $\mu\text{m}$ , 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 대조구 6.75  $\pm$  1.2  $\mu\text{m}$ , 군주 혼합종 실험구 7.17  $\pm$  1.3  $\mu\text{m}$ 로 나타났다. 생존율은 15 $^{\circ}\text{C}$ 에서 대조구 24.7  $\pm$  4.3%, 군주 혼합종 실험구 28.0  $\pm$  4.5%, 20 $^{\circ}\text{C}$ 에서 대조구 23.1  $\pm$  4.1%, 군주 혼합종 실험구 39.5  $\pm$  5.7%, 25 $^{\circ}\text{C}$ 에서 대조구 26.0  $\pm$  4.1%, 군주 혼합종 실험구 42.2  $\pm$  5.1%, 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 대조구 23.0  $\pm$

**Table 5.** Growth and survival rate of *Tresus keenae* larvae according to amount of addition of intestinal microorganisms

Experimental Group (CFU/ml)	Start of experiment		End of experiment		Daily growth ( $\mu\text{m}$ )	Survival rate (%)
	Shell length ( $\mu\text{m}$ )	Shell eight ( $\mu\text{m}$ )	Shell length ( $\mu\text{m}$ )	Shell height ( $\mu\text{m}$ )		
Control	88.9 $\pm$ 2.9 <sup>a</sup>	69.7 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	226.9 $\pm$ 9.7 <sup>b</sup>	199.9 $\pm$ 11.6 <sup>b</sup>	6.6 $\pm$ 0.95 <sup>b</sup>	19.7 $\pm$ 4.3 <sup>b</sup>
1.0 $\times$ 10 <sup>4</sup>	89.1 $\pm$ 3.4 <sup>a</sup>	69.2 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	228.9 $\pm$ 13.9 <sup>b</sup>	201.3 $\pm$ 13.1 <sup>b</sup>	6.7 $\pm$ 1.01 <sup>b</sup>	23.7 $\pm$ 3.1 <sup>ab</sup>
1.0 $\times$ 10 <sup>5</sup>	88.7 $\pm$ 4.3 <sup>a</sup>	69.5 $\pm$ 2.8 <sup>a</sup>	240.6 $\pm$ 16.2 <sup>a</sup>	209.7 $\pm$ 13.5 <sup>a</sup>	7.2 $\pm$ 0.88 <sup>a</sup>	35.9 $\pm$ 2.9 <sup>a</sup>
1.0 $\times$ 10 <sup>6</sup>	87.6 $\pm$ 3.1 <sup>a</sup>	69.3 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	242.2 $\pm$ 10.5 <sup>a</sup>	211.7 $\pm$ 14.0 <sup>a</sup>	7.3 $\pm$ 0.75 <sup>a</sup>	29.3 $\pm$ 4.2 <sup>a</sup>
1.0 $\times$ 10 <sup>7</sup>	88.6 $\pm$ 3.5 <sup>a</sup>	67.6 $\pm$ 2.7 <sup>a</sup>	225.6 $\pm$ 13.1 <sup>b</sup>	198.3 $\pm$ 14.9 <sup>b</sup>	6.5 $\pm$ 0.81 <sup>b</sup>	18.7 $\pm$ 3.8 <sup>b</sup>

**Table 6.** Growth and survival rate of *Tresus keenae* larvae according to water temperature and type of intestinal microorganisms

Water temperature	Type of microorganisms	Start of experiment		End of experiment		Daily growth ( $\mu\text{m}$ )	Survival rate (%)
		Shell length ( $\mu\text{m}$ )	Shell height ( $\mu\text{m}$ )	Shell length ( $\mu\text{m}$ )	Shell height ( $\mu\text{m}$ )		
15 $^{\circ}$ C	Control	86.1 $\pm$ 4.9 <sup>a</sup>	66.4 $\pm$ 3.2 <sup>a</sup>	205.4 $\pm$ 13.3 <sup>c</sup>	173.9 $\pm$ 13.4 <sup>c</sup>	5.68 $\pm$ 1.2 <sup>c</sup>	24.7 $\pm$ 4.3 <sup>c</sup>
	TKI (02 + 14 + 26 + 32 + 42)	86.0 $\pm$ 4.0 <sup>a</sup>	66.6 $\pm$ 3.6 <sup>a</sup>	220.7 $\pm$ 14.5 <sup>b</sup>	190.9 $\pm$ 14.7 <sup>b</sup>	6.40 $\pm$ 1.3 <sup>ab</sup>	28.0 $\pm$ 4.5 <sup>b</sup>
20 $^{\circ}$ C	Control	89.8 $\pm$ 3.0 <sup>a</sup>	67.8 $\pm$ 3.3 <sup>a</sup>	214.9 $\pm$ 10.9 <sup>c</sup>	185.8 $\pm$ 14.2 <sup>c</sup>	5.96 $\pm$ 1.2 <sup>c</sup>	23.1 $\pm$ 4.1 <sup>c</sup>
	TKI (02 + 14 + 26 + 32 + 42)	86.9 $\pm$ 3.4 <sup>a</sup>	67.3 $\pm$ 3.8 <sup>a</sup>	229.5 $\pm$ 11.9 <sup>ab</sup>	197.1 $\pm$ 15.5 <sup>b</sup>	6.79 $\pm$ 1.3 <sup>b</sup>	39.5 $\pm$ 5.7 <sup>ab</sup>
25 $^{\circ}$ C	Control	86.8 $\pm$ 3.4 <sup>a</sup>	69.8 $\pm$ 4.0 <sup>a</sup>	225.7 $\pm$ 14.5 <sup>b</sup>	208.8 $\pm$ 12.5 <sup>ab</sup>	6.61 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>	26.0 $\pm$ 4.1 <sup>c</sup>
	TKI (02 + 14 + 26 + 32 + 42)	87.1 $\pm$ 3.8 <sup>a</sup>	70.1 $\pm$ 4.6 <sup>a</sup>	240.9 $\pm$ 17.5 <sup>a</sup>	213.6 $\pm$ 17.8 <sup>a</sup>	7.32 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>	42.2 $\pm$ 5.1 <sup>ab</sup>
30 $^{\circ}$ C	Control	86.8 $\pm$ 4.4 <sup>a</sup>	69.8 $\pm$ 3.2 <sup>a</sup>	228.5 $\pm$ 15.0 <sup>b</sup>	201.8 $\pm$ 12.1 <sup>ab</sup>	6.75 $\pm$ 1.2 <sup>ab</sup>	23.0 $\pm$ 2.9 <sup>c</sup>
	TKI (02 + 14 + 26 + 32 + 42)	86.8 $\pm$ 3.9 <sup>a</sup>	70.9 $\pm$ 3.7 <sup>a</sup>	237.3 $\pm$ 15.1 <sup>ab</sup>	209.1 $\pm$ 14.4 <sup>ab</sup>	7.17 $\pm$ 1.3 <sup>ab</sup>	35.3 $\pm$ 4.9 <sup>ab</sup>

2.9%, 균주 혼합종 실험구 35.3  $\pm$  4.9%로 나타났다. 수온과 미생물 처리에서 유생의 성장과 생존율은 25 $^{\circ}$ C 수온에서 균주 혼합종을 처리 시 각장, 각고, 일간성장 및 생존율에서 모두 높게 나타났다.

## 고 찰

급증하는 수산물의 수요에 의해 양식산업은 경제적으로 매우 중요한 산업이다. 특히 우리나라는 국토의 삼면이 바다로 이루어져 있어 양식산업의 비중이 높은 국가이다. 그러나 양식산업은 대상 생물의 높은 사육 밀도, 수질환경 요인 등에 의해 면역력이 저하되고, 그러한 원인으로 인해 항생제의 사용이 요구되고 있다. 항생제의 사용은 생물 체내 항생물질의 축적 및 내성을 갖는 미생물의 증가로 인해 장내 세균총의 파괴가 이루

어 질 수 있다. 따라서 이러한 양식생물은 식용으로서의 가치도 떨어지게 된다.

장내에 서식하는 유익한 세균들은 대사, 면역, 성장 및 비타민 생성 등의 역할을 한다. 생균제 프로바이오틱스는 유해세균에 대한 항균력이 있음이 사람 등에서 보고 되어졌다 (Shokryazdan *et al.*, 2014). 프로바이오틱스의 수산 양식 생물체에의 적용도 이루어지고 있으나 낮은 수온 및 높은 염도는 적용에의 어려운 요소이다. 따라서 수산 대상 생물 장내 유익세균에서의 프로바이오틱스의 개발은 매우 중요하다.

본 연구진의 일원은 앞선 연구에서 왕우럭의 소화관에서 65개의 *Bacillus*속의 세균들을 분리하였다 (Lee *et al.*, 2017). 왕우럭 장내 세균들에서 *Bacillus*속들이 가장 높은 비율로 존재함이 밝혀졌는데 이는 *Bacillus*속 세균들이 토양, 농작물, 하수, 폐수, 발효식품 뿐만 아니라 해양환경과 여러 해양 생물

의 체내에서도 높은 비율로 존재하는 미생물총이란 보고와 유사하다 (Ivanova *et al.*, 1999; Cahill, 2009; Ki *et al.*, 2009). 해양 생물에서 유래한 *Bacillus*속 세균은 다양한 고분자 유기물질을 분해하는 효소를 생산할 수 있는 것으로 보고되어 있다 (Ziaei-Nejad *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2011; Shin *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2017).

왕우럭 장내에서 분리한 *Bacillus*속 미생물중 고분자 유기물 분해능과 항균력이 우수하다고 검증한 5가지를 대상으로 왕우럭 유생 사육에 적용하였다. 미생물 종류에 따른 유생의 성장 및 생존율을 비교했을 때 TKI42와 TKI02 + TKI14 + TKI26 + TKI32 + TKI42의 미생물 혼합 균주에서 높게 나타났다. 유생사육에 미생물 첨가량에 따른 성장과 생존율의 결과는 TKI02 + TKI14 + TKI26 + TKI32 + TKI42 혼합 균주  $1.0 \times 10^6$  CFU/ml에서 성장이 가장 좋았고  $1.0 \times 10^7$  CFU/ml에서는 가장 낮았다. 그리고 생존율은  $1.0 \times 10^5$  CFU/ml에서 가장 좋았다. 유생사육에서 수온 25°C 및 혼합 미생물 균주 ( $1.0 \times 10^6$  CFU/ml) 를 처리했을 때 성장 및 생존율이 높았다. 이러한 결과는 유생의 사육에 있어서 성장 및 생존에는 적절한 유익한 미생물들이 존재함을 나타낸다. 또한 미생물의 첨가 투여량도 적절한 농도의 양이 존재함을 알려준다.

연구에 사용한 미생물 균주는 각각 고분자 분해능과 항균력에 있어서 능력의 차이는 있으나 우수하다고 선택한 세균이다. 고분자 유기물질의 분해에 있어서는 TKI14, TKI32, TKI42에서 DNase 활성, TKI42에서 cellulose 활성, TKI02, TKI14, TKI32에서 amylase 활성, TKI02, TKI14, TKI26, TKI32에서 casein 분해효소 활성, TKI02, TKI14, TKI26, TKI42에서 tween 분해 능력이 확인 되었다 (Lee *et al.*, 2017). 유생의 성장 및 생존율에 우수하다고 나타난 TKI42의 특별한 차별적 우수성은 발견되지 않았다.

연구에 사용한 균주에 대한 항균활성의 결과에서도 병원성 세균에 따라 항균활성의 존재 및 강약이 달랐다 (Lee *et al.*, 2017). 이는 선별된 *Bacillus* spp. 균주 각각이 보유한 bacteriocin 유전자의 종류 및 유전자의 개수가 달라 병원성 세균에 대해 억제 기전에 차이가 있기 때문이라 생각된다. 보고에 의하면 bacteriocin 유전자가 단백질 수준에서 생성하는 bacteriocin의 생산량, 생산시기 및 발현수준은 다를 수 있다고 알려져 있다 (Yang *et al.*, 2002).

따라서 유생사육 등 양식산업에서의 유용 장내세균을 적용 시에는 세균 중에서 우수한 종을 분리하고 난 뒤 적용 시험을 거쳐 생물 특이적 우수한 세균을 차별적 적용을 통한 접목이 필요하다고 생각된다. 이는 결과에서 보여주듯이 고분자 유기물질 분해능력과 병원성 세균에 대한 항균활성의 능력만으로는 생물에게 적용 가치를 예측할 수 없기 때문이다.

본 연구에서 5개의 *Bacillus* 균주에 고분자 유기물질 분해

능력과 병원성 세균 항균활성능력을 토대로 유생사육의 성장 및 생존을 조사했을 때, 단일 균주만을 개발 및 사용하는 것보다는 효과가 다른 여러 균주를 혼합하여 사용했을 때 상가 및 상승 효과를 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

## 요 약

본 연구는 왕우럭에서 분리한 65개의 *Bacillus*속 중에서 고분자 유기물 분해능력 및 병원성 세균 항균 활성이 우수한 5개의 *Bacillus*속을 이용하여 왕우럭 유생 사육 연구를 수행하였다. 연구 결과 유생의 성장 및 생존율과의 관계는 TKI42와 TKI02 + TKI14 + TKI26 + TKI32 + TKI42의 미생물 혼합 균주에서 높게 나타났다. 미생물 혼합균주 (TKI02 + TKI14 + TKI26 + TKI32 + TKI42) 의 첨가량에 대한 유생의 성장 및 생존율은  $1.0 \times 10^6$  CFU/ml에서 성장이 가장 좋았고  $1.0 \times 10^7$  CFU/ml에서는 가장 낮았다. 그리고 생존율은  $1.0 \times 10^5$  CFU/ml에서 가장 좋았다. 또한 수온 25°C 및 혼합 미생물 균주 ( $1.0 \times 10^6$  CFU/ml) 를 처리했을 때 성장 및 생존율이 높았다. 본 연구에서 5개의 *Bacillus* 균주를 토대로 유생사육의 성장 및 생존을 조사했을 때, 단일 균주만의 특별한 능력을 토대로 양식산업 생물 사육에의 접목은 예측의 불확실성이 존재하기에 단일 균주만을 개발 및 사용하는 것보다는 효과가 다른 여러 균주를 혼합하여 사용하는 게 효과를 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

## REFERENCES

- Abriouel, H., C.M. Franz, N.B. Omar. and A. Gálvez. (2010) Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS. Microbiol. Rev.*, **35**: 201-232.
- Bidhan, C.D., D.K. Meena, B.K. Behera, P. Das, P.D. Mohapatra. and A.P. Sharma. (2014) Probiotics in fish and shellfish culture: immunomodulatory and ecophysiological responses. *Fish. Physiol. Biochem.*, **40**: 921-971.
- Cahill, M.M. (1990) Bacterial flora of fishes: a review. *Microb. Ecol.*, **19**: 21-41.
- Cleveland, J., T.J. Montville, I.F. Nes. and M.L. Chikindas. (2001) Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food. Microbiol.*, **71**: 1-20.
- 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.
- 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 (2018) 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.
- 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.
- Lee, H. and H.Y. Kim. (2011) Lantibiotics, class I bacteriocins from the genus *Bacillus*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **21**: 229-235.
- 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.
- Muñoz-Atienza, E., B. Gómez-Sala, C. Araújo, C. Campanero, R. Del Campo, P.E. Hernández, C. Herranz, and L.M. Cintas. (2013) Antimicrobial activity, antibiotic susceptibility and virulence factors of lactic acid bacteria of aquatic origin intended for use as probiotics in aquaculture. *BMC. Microbiol.*, **13**: 15.
- 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, J.Y., W.S. Kim, H.Y. Kim, and E.H. Kim. (2016) Potential use of *Bacillus amyloliquefaciens* as a probiotic bacterium in abalone culture. *J. Fish Pathol.*, **29**: 35-43.
- Shin, S., K. Yundendorj, S.S. Lee, K.H. Kang, and H.Y. Kahng. (2013) Physiological and Biochemical Characterization of *Bacillus* spp. from Polychaete, *Perinereis aibuhitensis*. *J. Life Sci.*, **23**: 415-425.
- 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.
- Shokryazdan, P., C.C. Siew, R. Kalavathy, J.B. Liang, N.B. Alitheen, M. Faseleh Jahromi, and Y.W. Ho. (2014) Probiotic Potential of Lactobacillus Strains with Antimicrobial Activity against some human pathogenic strains. *Biomed. Res. Int.*, 2014: 927268
- Xie, F., T. Zhu, F. Zhang, K. Zhou, Y. Zhao, and Z. Li. (2013) Using *Bacillus amyloliquefaciens* for remediation of aquaculture water. *Springerplus*, **2**: 119.
- Yang, E.J., J.Y. Chang, H.J. Lee, J.H. Kim, D.K. Chung, J.H. Lee, and H.C. Chang. (2002) Characterization of the antagonistic activity against LactoBacillus plantarum and induction of bacteriocin production. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **34**: 311-318.
- Ziaei-Nejad, S., M.H. Rezaei, G.A. Takami, D.L. Lovett, A.R. Mirvaghefi and Mirvaghefi. Shakouri. (2006) The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture*, **252**: 516-524.

