

〈Original article〉

양식 전복 (*Haliotis discus hannai*) 으로부터 분리된 *Vibrio harveyi* 의 생화학적 특성 및 병원성

김진도* · 김명석¹ · 원경미¹ · 도정완¹ · 이덕찬¹ · 정승희¹ · 진세운 · 이남실¹ · 조미영¹

국립수산과학원 남해수산연구소, ¹국립수산과학원 병리연구과

The Pathogenicity and Biochemical Characteristics of *Vibrio harveyi* Isolated from the Pacific Abalone, *Haliotis discus hannai*

Jin-Do Kim*, Myoung-Sug Kim¹, Kyung-Mi Won¹, Jeong-Wan Do¹, Deok Chan Lee¹,
Sung Hee Jung¹, Se Yoon Jin, Nam-Sil Lee¹ and Miyoung Cho¹

SSFRI, National Institute Fisheries Science, Yeosu 58780, Republic of Korea

¹Pathology Division, National Institute Fisheries Science, Busan 46083, Republic of Korea

Abstract - Recently, mass mortality of the young abalone *Haliotis discus hannai* has occurred in commercial seed production farms in Korea. The mortality rate was above 50% of the total cultured organisms in the farm, and the shell length of the moribund organisms was about 3cm. The mortal phenomenon was that the young abalones were weakly scattered on the bottom of the pond from the attachment matrix, or that they could not be moved back to their normal positions. The diseased farmed Pacific abalone had abdominal edema. From the edema in the moribund individuals, three bacterial strains were isolated and all the strains were identified as *Vibrio harveyi*. These strains were compared with thirty six strains isolated from the fish. The results was that the *Vibrio harveyi* from the fish were sorted into genogroup A or B; however, the three strains of the diseased farmed Pacific abalone were sorted into genogroup A and the new genogroup C. The identical mortality and pathological symptoms of the naturally infected organisms were reproduced by artificial infection with WA AG-1 and WA CS-5 strains. The LD₅₀ of WA AG-1 and WA CS-5 were each 1.0×10^3 cfu animal⁻¹ and 1.7×10^4 cfu animal⁻¹.

Keywords : abalone, mass mortality, *Vibrio harveyi*, LD₅₀

서 론

최근 국내의 전복 양식 방법이 해상의 가두리에서 대량 생산하는 규모로 발전함에 따라 전복의 종묘생산업도 크게

성장하게 되었다. 전복의 양식기술은 개발 초기에는 단지 부 착성 구조류를 부착 기질에 대량 배양하여 이를 전복 유생 의 먹이로 사용하여 전복을 사육하였다. 이어서 유생이 어린 전복으로 어느 정도 성장하게 되면 서서히 먹이를 해조류로 전환하여 사육하여 양성용 종묘를 생산하였다. 그러나 최근 에 어린 전복을 위한 전용 배합 사료가 개발됨으로써 이전 의 부착 구조류에만 의존하던 방법에 비하면 종묘의 크기가

* Corresponding author: Jin-Do Kim, Tel. 061-690-8986,
Fax. 061-685-9073, E-mail. jdk0123@korea.kr

월등히 크고 많은 양의 종묘를 생산할 수 있게 되었다. 이렇게 생산된 대부분의 전복 종묘는 해상의 가두리 양식장으로 이송하여 사육된다. 따라서 사전에 종묘의 품질 및 건강 상태가 전복의 양식에서 중요한 인자이다. 그러나 대부분의 전복 종묘 양식장에서는 사육 수조 내에 지나치게 많은 양의 유생을 사육함으로써, 수조 내에 사료찌꺼기 등 침전물이 증가하여 수질이 악화되어 사육 중인 어린 전복이 세균 등의 병원체에 노출되기 쉽다. 특히 전염성 바이러스나 세균에 감염될 경우, 그 사망률이 높아서 생산량이 급감할 수 있다.

현재까지 전복에 대량 폐사를 일으킨다고 알려진 질병은 바이러스의 일종인 전복 herpes virus (AbHV)에 의한 감염, rickettsia에 속하는 *Xenohalioticticus californiensis*에 의한 감염 등이다. 이에 관하여 국외에서는 여러 보고가 있었으나 (Wang *et al.* 2004; Chang *et al.* 2005; Hooper *et al.* 2007), 국내에서는 비 병증 예의 근육 변성에 관한 보고가 있을 뿐이다 (Kim *et al.* 2014).

*Vibrio harveyi*는 해수 중에 상재하는 Gram 음성 세균으로 발광성을 지니며, 해양생물에 조건적으로 감염되어 피해를 입힌다 (Austin and Zhang 2006). 특히 새우 종묘의 생산에 있어 치명적인 피해를 주는 것으로 알려져 있으며 (Prayitno and Latchford 1995; Robertson *et al.* 1998), 전복에 있어서는 근육에 수포를 형성하는 특징적 증상을 나타내며 대량 폐사를 일으킨다는 국외의 보고가 있다 (Sewabe *et al.* 2007; Jiang *et al.* 2013).

본 연구는 최근 국내의 육상 전복 종묘 양식장에서 매년 발생하는 어린 전복의 대량 폐사와 관련하여 조사를 실시하여 그 원인을 구명하고자 하였다. 그 결과, 폐사가 일어난 양식장 내의 어린 전복으로부터 폐사와 관련된 세균을 분리하였으며, 분리된 균을 전복에 병원성이 있다고 알려진 *V. harveyi*로 동정하였다. 또한 어류로부터 분리된 *V. harveyi*의 동정에 관한 다른 연구자들의 결과와 비교하였으며, 인위 감염 시험을 실시하여 반수 치사농도 및 그 병원성을 확인함으로써 전복의 대량 폐사와 관련된 원인균을 *V. harveyi*로 구명하였다.

재료 및 방법

1. 원인균의 분리 및 염기서열 분석

원인균의 분리를 위해 국내 육상 전복 양식장이 밀집되어 있는 전남 지역의 폐사 현상이 일어났던 적이 있는 양식장 10개소(완도 4, 해남 2, 진도 4개소)를 대상으로 6월부터 10월까지 매월 1회, 조사를 실시하였다. 조사를 위한 시료는 양식장 내의 수조에서 복부 근육에 수포를 형성하는 특징을

나타내며 폐사되고 있는 전복을 10마리 이상 채취하여 매월 100마리 전후의 전복을 대상으로 조사를 실시하였다. 채취된 시료는 살아있는 상태로 실험실로 옮겨져 원인균의 분리에 사용되었다. 각 개체의 환부로부터 일회용 주사기로 검체를 채취하여 TCBS 및 BHI 평판 배지에 접종한 후, 도말하였다 (Fig. 1). 도말된 평판 배지는 25°C에서 48시간 배양하였으며, 배양 후 배지 상의 집락 중 우점종을 선택하여 균 동정시험을 실시하였다.

동정시험은 분리한 균을 API kit 20E (Biomereix사) 및 *Vibrio* 4종 동정용 kit (국립수산과학원)에 의한 시험에 의해 *V. harveyi*로 간이 동정된 균을 국내의 전문업체 (Solgent, Korea)에 sequencing을 의뢰하여 동정하였다. 또한 다른 병원체인 전복 Herpes virus 및 *X. californiensis*의 검출 여부도 병행하여 조사하였다.

전복 Herpes virus의 검출 여부는 시료 10마리씩을 pool로 하여 치질과 근육조직의 일부를 떼어내어 마쇄한 후 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA는 PCR을 실시하여 병원체의 감염 여부를 확인하였다. 진단용 primer는 OIE (Office International des Epizooties; 국제수역사무국)에서 지정한 것을 사용하였다 (Table 1). *X. californiensis*에 대해서는 전복을 해부하여 내장과 근육의 일부를 마쇄한 후, DNA를 추출하여 OIE에서 지정한 primer를 사용하여 PCR (Polymerase Chain Reaction) 기법을 통해 감염 여부를 확인하였다 (Table 2).



Fig. 1. The characteristic symptoms as a blister (arrow) on the ventral muscle of diseased young abalone, *Haliotis discus hannai*.

Table 1. The primer sets for the detection of pathogenic herpesvirus in the abalone

	PCR primers	Product size
AbHV-16	5'-GGCTCGTTCGGTTCGTAGAATG-3'	522-588 bp
AbHV-17	5'-TCAGCGTGTACAGATCCATGTC-3'	

Table 2. The primer sets for the detection of the pathogenic *Xenohaliotis californiensis* in the abalone

	PCR primers	Product size
RA 5-1	5'-GTTGAACGTGCCTTCAGTTTAC-3'	160 bp
RA 3-6	5'-ACTTGGACTCATTCAAAAGCGGA-3'	

2. 균주별 인위 감염 시험

분리된 균의 병원성을 확인하기 위한 인위 감염 시험에는 전복에서 분리되었으나 서로 다른 genogroup a에 속한 WD CS-5와 genogroup c에 속한 3개의 균주를 같은 group으로 간주하여 그중 WD AG-1만을 사용하여 인위 감염 시험을 실시하였다. 인위 감염 시험은 15 L 용량의 사각 유리 수조 (45.0×30.5×33.0 cm)에 해수를 채워 균의 농도별로 건강한 어린 전복을 각각 10마리씩 수용하여 Air만을 공급하면서 매일 20%씩 환수를 하였다(수온 25°C). 균의 인위 감염을 위해 WA AG-1과 WA CS-5를 각각 BHI 평판 배지에서 25°C, 48시간 배양한 균을 Disposable Loop (Becton, Dickinson and Company)를 사용하여 집균하였다. 이를 생리식염수로 1 mg mL⁻¹의 농도로 희석한 것을 원액으로 하였다. 이 원액을 희석하여 각각 1.15×10²~10⁵ cfu animal⁻¹ 및 1.10×10²~10⁵ cfu animal⁻¹의 4단계의 농도별로 전복 10마리의 발 근육 내에 0.05 mL씩 주사하였다. 또한 시험구당 1개의 대조구를 설정하여 생리식염수를 0.05 mL씩 주사하였다.

감염을 시킨 후에는 매일 시험 전복의 폐사 상황 및 수포의 형성 등을 12일간 관찰하면서 기록하여 probit analysis에 의해 반수 치사농도를 구하였다(Miller and Tainter 1944). 또한 폐사 직전의 어린 전복의 혈 림프액 및 수포로부터 균을 다시 분리하여 PCR에 의한 동정을 실시하였다.

3. 병리조직학적 변화

인위 감염시킨 어린 전복의 병리조직학적 변화를 관찰하기 위하여 균별로 가장 높은 농도로 주사한 시험구(각 10마리)를 별도로 설정하였다. 인위 감염 후에는 수온을 25°C로 유지하면서 2주간 병적인 증상의 발현 또는 폐사 직전의 어린 전복을 선택하여 부검하여 조사하였다. 부검은 어린 전복 전체를 부안액(Bouin's solution)에 고정한 다음, 12~24시간 내에 패각으로부터 깨끗하게 분리하여 같은 고정액에 6시간 다시 고정한 후 Ethyl alcohol (60~100%)에서 단계별 탈수, xylene에서 투명화 과정을 거쳐 파라핀에 포매하여 파라핀 조직 블록을 제작하고, Microtome (Leica, Germany)을 사용하여 4 μm 두께로 박절하여 슬라이드글라스에 부착시켰다. 이어서 50°C 오븐에서 건조시켜 자동 자동염색시스템(Leica, Germany)으로 H&E (hematoxylin and Eosin) 염색

후, 봉입을 실시하여 제작된 조직표본을 광학현미경으로 관찰하였다(Scope A1, Zeiss, Germany).

결 과

1. 원인균의 분리, 동정 및 염기서열분석

폐사가 발생한 시기는 9월 초순경으로 수온이 고수온에서 서서히 하강하는 시기였다. 이때의 수온은 23.0°C 전후이었으며, 전복은 2~3 cm 크기로 성장하였다. 폐사가 진행 중인 사육 수조 내에서 폐사 직전의 전복을 10마리 이상을 수거하여 원인균의 분리에 사용하였다. 이러한 개체들은 대부분이 복부의 근육에 수포가 형성된 환부를 가지고 있었으며(Fig. 1). 이들 환부로부터 균을 분리하여 동정한 결과, 전복에 병원성이 있다고 알려진 *V. harveyi*로 동정되었다. 반면, 전복의 대량 폐사를 일으킨다고 알려진 전복 herpes virus 및 *X. californiensis*는 검출되지 않았다.

분리된 4개의 균과 표준 균주 2개의 생화학적 특성을 비교하여 시험한 결과, 본 균들과 표준 균주와의 생화학적 특성의 차이는 TCBS 평판 배지 상에서의 colony의 색의 차이 외에는 모든 성상이 일치하였다(Table 3). 또한 4개의 균과 현재까지 어류 및 전복 등으로부터 분리되어 *V. harveyi*로 보고된 다른 균들과 염기서열을 비교하여 분석한 결과, 본 시험에서의 4개의 균 중 1개는 genogroup a에, 또 다른 3개의 균은 genogroup c에 속하였다(Fig. 2).

2. 균주별 인위 감염 시험

인위 감염된 어린 전복은 감염 후 시간이 경과함에 따라 무기력해지면서 스스로 뒤집는 능력이 떨어지거나 복부의 근육 부분에 수포를 형성하는 특이한 증상을 나타내었다. WD AG-1과 WD CS-5 균주로 인위 감염시킨 전복의 폐사는 균의 농도가 높은, 10⁵ cfu animal⁻¹의 농도의 시험구에서 감염 후 2일째부터 각각 4마리 및 1마리씩 폐사되었다. 이후 10⁴ cfu animal⁻¹의 농도에서는 5일째 50%가 폐사되었다. 이를 probit analysis에 의해 균의 반수 치사농도를 산출한 결과, WA AG-1과 WA CS-5의 반수 치사농도는 각각 1.0×10³ cfu animal⁻¹ 및 1.7×10⁴ cfu animal⁻¹이었다(Fig. 3).

3. 병리조직학적 변화

인위 감염시킨 어린 전복의 병리조직학적 변화는 세균감염으로 인한 염증반응으로 보이는 혈구세포의 침윤이 각 조직 부위에서 관찰되었다. 아가미는 상피세포의 비대 및 핵 응축으로 관찰되는 세포 변성과 함께 중심부에 혈구세포의

Table 3. The biochemical characteristic of four isolated strains from abalone, *Haliotis discus hannai* in comparison with reference strain of *Vibrio carchariae* (ATCC 35084) and *Vibrio harveyi* (ATCC 14126)

Characteristics	Present strains (4 isolated)	<i>V. carchariae</i> (ATCC35084)	<i>V. harveyi</i> (ATCC14126)
Gram	-	-	-
Motility	+	+	+
Luminescence	-	+	+
Growth on TCBS	G	Y	Y
4°C	-	-	-
25°C	+	+	+
37°C	+	+	+
Oxidase production	+	+	+
β-galactosidase	-	-	-
Arginine dehydrolase	-	-	-
Lysine decarboxylase	+	+	+
Ornithine decarboxylase	+	+	+
Citrate utilisation	-	-	-
H ₂ S production	-	-	-
Urease production	-	-	-
Tryptophane desaminase	-	-	+
Indole production	+	+	+
Acetoin production	-	-	-
Gelatine hydrolysis	-	-	-
Fermentation of glucose	+	+	+
Mannitol	+	+	+
Inositol	-	-	-
Sorbitol	-	-	-
Rhamnose	-	-	-
Sucrose	+	+	+
Melibiose	-	-	-
Amygdaline	+	-	+
Arabinose	-	-	-
Reduction of No ₃ → No ₂	+	+	+

침윤이 관찰되었다(Fig. 4a). 소화선(digestive gland) 주위의 결합조직에서도 혈구의 침윤 반응이 관찰되었으며(Fig. 4b), 소화선 상피에서는 호산성 과립구가 다수 관찰되었으며 결합조직에도 혈구 침윤이 관찰되었다(Fig. 4c).

고 찰

양식 중인 어린 전복의 대량 폐사에 관한 연구 중 병원성 세균에 의한 폐사에 관한 연구로서 참전복 및 오분자기에 대량 폐사를 일으키는 병원체가 *V. carchariae* 또는 *V. harveyi*로 밝혀진 바 있다(Nishimori *et al.* 1998; Sawabe *et al.* 2007). 이 균은 연안의 해수 중에 상재하는 균으로서 쉽게 분리가 되지는 않으나, 일정한 조건이 형성되면 다양한 해양 생물에 감염되어 피해를 주는 것으로 알려져 있다. 특히 갑각류인 새우에 있어서는 전 세계적으로 피해를 일으키고 있다(Muroga 2001; Austin and Zhang 2006).

본 연구에서 세균 검출 여부를 위해 조사한 전복의 90%

이상의 개체로부터 세균이 분리되었으며, 그중 비브리오로 간이 동정된 균주가 *V. harveyi*로 동정이 확정되었으나, 조사 당시 양식장에서 전복의 폐사가 발생한 사실과 전복으로부터 본 균이 쉽게 분리된 사실로 유추해 볼 때, 전복 대량 폐사의 원인이 *V. harveyi*에 의한 것일 가능성이 높다.

본 균은 단독으로 전복에 감염되어 피해를 일으키는 경우는 적지만 일단 발병하면 50% 이상의 폐사를 일으킨 예가 많다(Nicolas *et al.* 2002; Sewabe *et al.* 2007; Jiang *et al.* 2013). 본 균은 주로 해수의 수온 상승기인 6월경 및 하강기인 9월 중에 50% 이상의 대량 폐사를 일으킨다고 알려져 있었으나(현지 양식어민의 설명), 본 연구의 조사 기간 중에는 9월 중에만 대량 폐사 현상을 확인할 수 있었다. 시기에 따른 *V. harveyi*에 의한 감염 양상을 밝혀내지는 못하였으나, 관찰 사실로 미루어 볼 때, 전복 양식 현장에서는 9월 중에 감염방지를 위해 각별히 노력해야 할 것으로 보인다.

*V. harveyi*에 감염된 전복에서 초기에는 그 증상이 쉽게 관찰되지 않으나, 폐사가 일어나기 시작하면 피해량이 급격히 증가한다. 특히 최근의 지구 온난화에 의한 해수 수온의

상승, 부적절한 사육관리로 인해 전복이 병원성 세균에 대한 저항성 부족이 발병의 요인으로 작용할 수 있을 것으로 생각된다(Kim *et al.* 2005; Marie *et al.* 2009).

본 연구에서 분리된 균은 기존의 전복에서 분리되어 보고된 *V. harveyi*와 거의 같은 생화학적 성상을 나타내었으며,

인위 감염에 의한 시험도 다른 연구자의 연구와 비슷한 결과를 나타내었다(Sewabe *et al.* 2007). 이는 어린 전복의 대량 폐사가 세균 감염에 의해서 일어날 수 있다는 사실을 입증하여 준다. 하지만 반수 치사농도가 어류나 새우류에 대한 다른 연구자의 연구 결과에서는, $10^4 \sim 10^7$ cfu animal⁻¹의 높은 농도임에 비해 본 연구에서는 $10^3 \sim 10^4$ cfu animal⁻¹로 낮은 결과를 나타내었으므로 이에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다(Alvarez *et al.* 1998; Soffientino *et al.* 1999). 조사 대상 양식장의 폐사를 일으킬 만한 환경적 변화가 전혀 없었으며, 대량 폐사를 일으키는 병원체인 전복 herpes virus 및 *X. californiensis*의 검출이 되지 않았다(Sewabe *et al.* 2007). 다른 세균성 질병과 마찬가지로 본 균의 감염은 사육 환경의 악화에 많은 영향을 받을 것으로 생각된다(Judith *et al.* 2005; Youhei *et al.* 2010). 연어류의 감염 예에서, 본 균의 독성이 Extracellular products (ECP) 내에 있는 Hemolysin의 activity에 영향을 받는다고 보고한 바 있으므로 전복에 관한 연구에서도 이러한 요인 등의 작용에 관한 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다(Zhang and Austin 2000).

본 연구에서 분리된 4개의 균주 중 3개 균주의 염기서열은 어류에서 분리된 균과는 다른 genogroup에 속하는 것으로 나타났으며, 이들 균주 내에는 전복 특유의 병원성 유전 인자가 존재할 것으로 추정되어 앞으로 이에 관한 연구도 필요할 것으로 생각된다(Sewabe *et al.* 2007; Jiang *et al.* 2013). 또한 본 균만을 감염 초기에 신속하게 검출하기 위한 특이 진단 키트의 개발도 요구된다(Fukui and Sewabe 2007).

병리조직학적으로는 궤양이나 출혈성 반점 등을 형성하는 다른 비브리오 속 세균에 의한 감염 증상과는 달리 복부

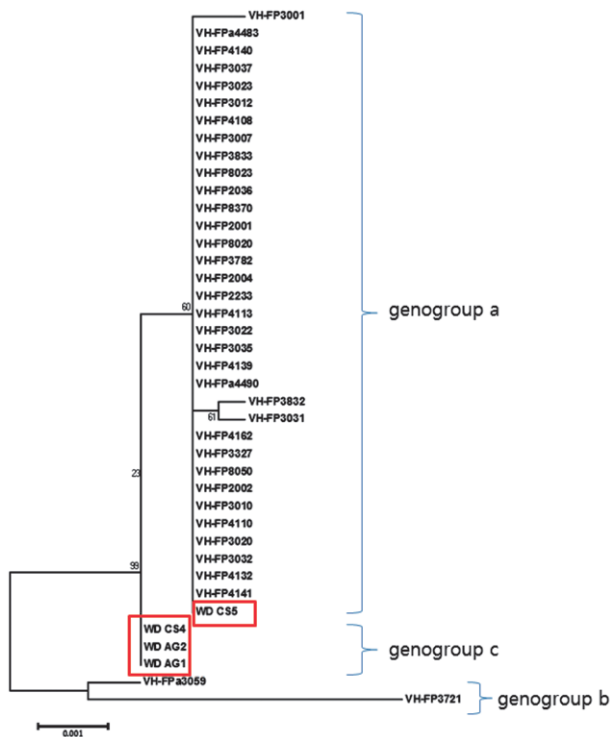


Fig. 2. The diagram of genogroups between strains from the abalone and reference strains from the diseased various marine fishes. The represented strains in the red quadrangles are isolated *V. harveyi* of the present study.

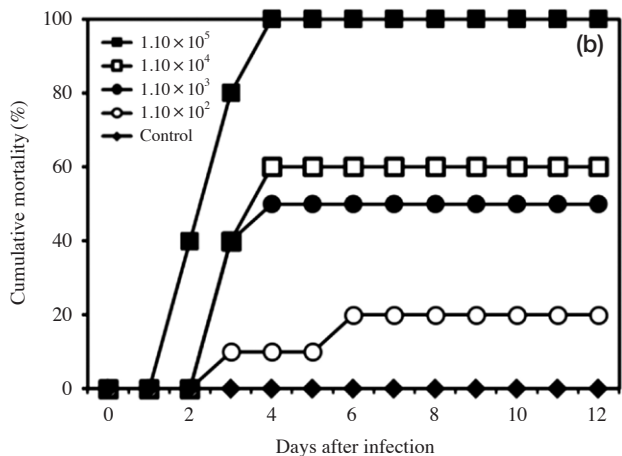
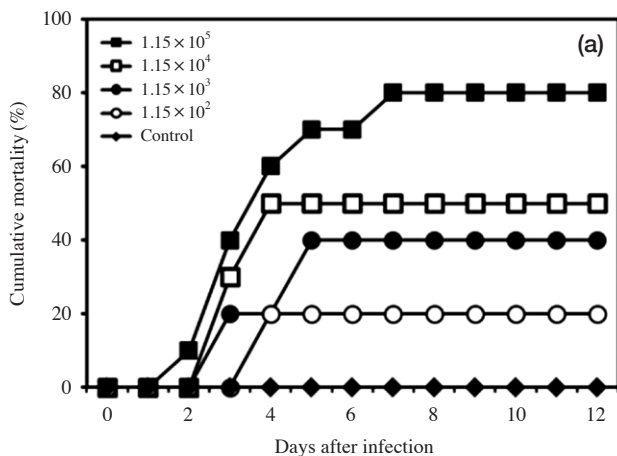


Fig. 3. The mortality of abalone after artificial infection with two strains (a: WD AG-1, b: WD CS-5) of *V. harveyi* for 12 days.

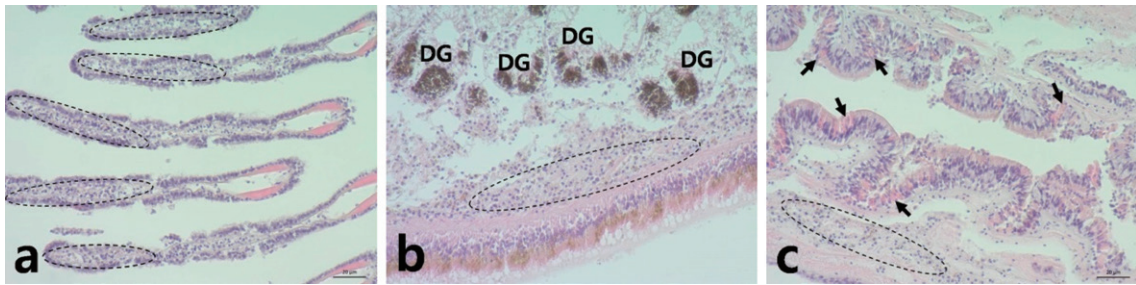


Fig. 4. The histopathological changes in the major organs of artificial infected abalone, *Haliotis discus hannai* (a: Inflammatory epithelial cell (black circle), b: Epithelial ulceration and hemocyte infiltration in DG, c: Infiltration of eosinophilic granular cell in DG (black arrow)).

의 근육 내에 수포를 형성하는 특징을 나타냈다. 세균 감염에 의해 나타나는 염증 반응은 인위 감염된 전복의 각 주요 조직에서 나타났으며 특히 소화관 내에서 심하였다. 이는 본 균의 감염 메커니즘의 특성의 하나로 폐사에 관여할 것으로 생각되며, 전복 사육 수조의 청결성 유지, 먹이의 오염 방지, 오염되지 않은 사육수 확보 등 전복 양식 전반에 위생적인 면을 충분히 고려함으로써 본 균이 전복에 경구적으로 감염되는 것을 적극적으로 방지해야 할 것으로 판단된다.

적 요

최근 어린 전복의 대량 폐사가 국내의 전복 종묘 양식장에서 발생하였다. 죽은 어린 전복의 마리 수는 전체 사육 마리 수의 약 50% 이상이었으며, 그 크기는 각각 3 cm 전후였다. 폐사의 현상은 어린 전복이 부착 기질로부터 탈락되어 힘이 없이 바닥에 깔려 있거나, 뒤집어진 상태에서 스스로 일어나지 못하였다. 이러한 개체들은 대부분 근육에 수포를 형성하고 있는 병리학적 특징을 나타내었다. 폐사 직전의 전복으로부터 3개의 균이 분리되었으며, 이들은 16S rDNA 염기서열 분석에 의해 모두 *V. harveyi*로 동정되었다. 또한 이들을 어류에서 분리된 *V. harveyi* 36개의 균들과 염기서열을 비교 분석한 결과, 어류에서 분리된 *V. harveyi*는 genogroup a와 b로 구별되며, 전복에서 분리된 3균주는 genogroup a와 새로운 genogroup c에 속하였다. 그중 WA AG-1과 WA CS-5 균을 건강한 전복에 인위 감염시킨 결과, 자연 감염된 개체와 같은 외부 및 병리조직학적 증상을 나타내면서 폐사하였으며, 그 반수 치사농도는 각각 1.0×10^3 cfu animal⁻¹ 및 1.7×10^4 cfu animal⁻¹이었다.

사 사

이 논문은 2017년 국립수산물품질관리원 수산생물질병 특성연구(R2017064)의 지원으로 수행된 연구입니다.

REFERENCES

- Alvarez JD, B Austin, AM Alvarez and H Reyes. 1998. *Vibrio harveyi*: a pathogen of penaeid shrimps and fish in Venezuela. *J. Fish Dis.* 21:313-316.
- Austin B and XH Zhang. 2006. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Lett. Appl. Microbiol.* 43:119-124.
- Chang PH, ST Kuo, SH Lai, Hs Yang, YY Ting, CL Hsu and HC Chen. 2005. Herpes-like virus infection causing mortality of cultured abalone *Haliotis diversicolor supertexta* in Taiwan. *Dis. Aquat. Org.* 65:23-27.
- Fukui Y and T Sawabe. 2007. Improved one-step colony PCR detection of *Vibrio harveyi*. *Microbes Environ.* 22:1-10.
- Hooper C, PH Smith and J Handlinger. 2007. Ganglioneuritis causing high mortalities in farmed Australian abalone (*Haliotis laevigata* and *Haliotis rubra*). *Aust. Vet. J.* 85:188-193.
- Jiang Q, L Shi, C Ke, W You and J Zhao. 2013. Identification and characterization of *Vibrio harveyi* associated with diseased abalone *Haliotis diversicolor*. *Dis. Aquat. Org.* 103:133-139.
- Judith H, C Jeremy, D Linda, G Les and T David. 2005. Bacterial infection in Tasmanian farmed abalone: causes, pathology, farm factors and control options. In *Asian Aquaculture V, Proceedings of the 5th symposium on diseases in Asian aquaculture*. pp. 289-299.
- Kim BS, SJ Yi, SM Hwang, MK Lee, YJ Park, KJ Song and MD Huh. 2014. Myopathy in clinically healthy cultured abalone *Haliotis discus hannai*. *Kor. J. Fish. Aquat. Sci.* 47:174-178.
- Kim TH, MH Yang, MK Choe, SJ Han and IK Yeo. 2005. Physiological studies on acute water-temperature stress of juvenile abalone, *Haliotis discus hannai*. *Kor. J. Fish. Aquat. Sci.* 18:7-12 (in Korean).
- Marie AT, B Olivier, LG Nelly, H Sylvain, LN Jean, K Marcel and P Christine. 2009. Influence of temperature and spawn-

- ing effort on *Haliotis tuberculata* mortalities caused by *Vibrio harveyi*: an example of emerging vibriosis linked to global warming. *Glob. Change Biol.* 15:1365–1376.
- Miller LC and ML Tainter. 1944. Estimation of LD₅₀ and its error by means of log-profit graph paper. *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.* 57:261.
- Muroga K. 2001. Viral and bacterial diseases of marine fish and shellfish in Japanese hatcheries. *Aquaculture* 202:23–44.
- Nicolas JL, O Basuyaux, J Mazurié and A Thébault. 2002. *Vibrio carchariae*, a pathogen of the abalone *Haliotis tuberculata*. *Dis. Aquat. Org.* 50:35–43.
- Nishimori E, O Hasegawa, T Numata and H Wakabayashi. 1998. *Vibrio carchariae* causes mass mortalities in Japanese abalone, *Sulculus diversicolor* supratexta. *Fish Pathol.* 33:495–502.
- Sawabe T, S Inoue, Y Fukui, K Yoshie, Y Nishihara and H Miura 2007. Mass mortality of Japanese abalone *Haliotis discus hannai* caused by *Vibrio harveyi* infection. *Microbes Environ.* 22:300–308.
- Soffientino B, G Todd, RN David, LS Jenniffer, M Michael and GC Marta. 1999. Infectious necrotizing enteritis and mortality caused by *Vibrio carchariae* in summer flounder *Paralichthys dentatus* during intensive culture. *Dis. Aquat. Org.* 38:201–210.
- Wang J, Z Guo, J Feng, G Liu, L Xu, B Chen and J Pan. 2004. Virus infection in cultured abalone, *Haliotis diversicolor Reeve* in Guangdong Province, China. *J. Shellfish Res.* 23: 1163–1168.
- Youhei F, SI Saitoh and T Sawabe. 2010. Environmental determinants correlated to *Vibrio harveyi*-mediated death of marine gastropod. *Environ. Microbiol.* 12:124–133.
- Zhang XH and B Austin. 2000. Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonids. *J. Fish Dis.* 23:93–102.

Received: 6 December 2017

Revised: 13 December 2017

Revision accepted: 14 December 2017