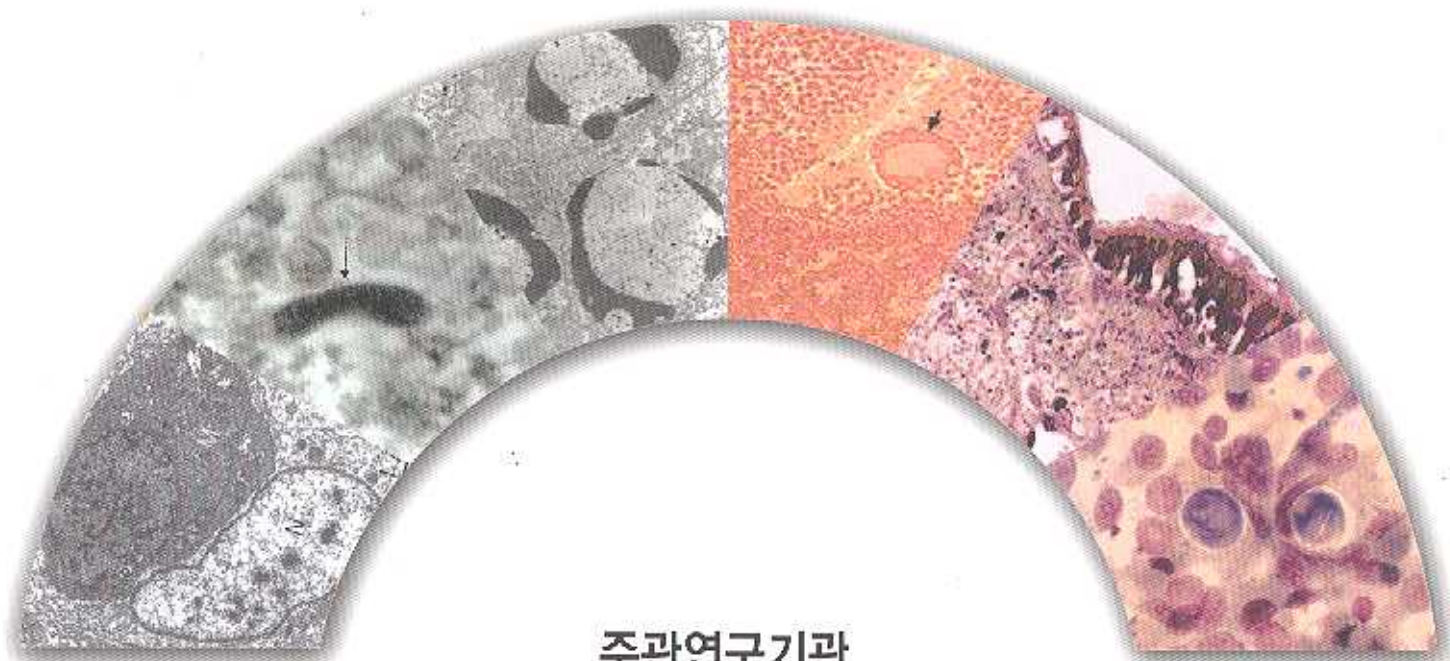


최 종  
연구보고서

# 패류유행성 전염병 제어기술개발

Development of control for epizootic  
diseases of molluscs



주관연구기관  
국립수산과학원

농림수산식품자료실



0015133

해양수산부

# 제 출 문

해양수산부 장관 귀하

본 보고서를 “패류 유행성 전염병 제어기술개발에 관한 연구”과제의 최종보고서로 제출합니다.

2004년 9월 19일

주관기관명: 국립수산과학원

총괄연구책임자: 김 진 우

연구원: 박 미 선

박 명 애

김 이 청

최 동 림

이 주 석

지 보 영

도 정 완

최 혜 승

정 승 희

권 문 경

오 명 주

정 성 주

장 경 립

이 주

강 창 근

이 남 실

최 희 정

강 형 길

협동연구기관명: 군 산 대 학 교

협동연구책임자: 박 성 우

# 요 약 문

## I. 제목

패류 유행성 전염병 제어기술 개발

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

전세계적으로 본격적인 패류양식이 시작된 1970년도 이후 오늘날에 이르기까지 세계 여러 나라의 양식패류에서 심각한 질병들이 발생하여 많은 경제적인 피해를 입히고 있으나, 이러한 질병들을 치료할 수 있는 효과적인 방법은 거의 개발되어 있지 않은 실정이다. 그 이유는 1) 숙주의 생리학적, 생태학적, 해부학적 지식 ; 2) 병원체의 생활사, 대사생리와 숙주의 방어기작; 3) 관련연구팀간의 상호 보완적인 협력 등이 결여되어 있었기 때문이다. 패류양식의 특성상 완전히 외부환경에 노출되어 있기 때문에 병원체의 감염과 확산이 용이하며, 폐사 발생시 동시다발적으로 발생하기 때문에 피해의 규모가 매우 크다는 특징을 가지고 있다. 우리나라에서는 1970년대 백합이 대량폐사되어 많은 피해를 입힌 바 있으며, 비슷한 시기에 프랑스에서는 보나미아병에 의해 넙적굴이 대량폐사된 바 있다. 1996년 일본의 진주조개의 대량폐사로 인해 매년 60%이상의 소실이 발생하고, 2000년에는 중국의 산둥성에서 양식가리비의 대량폐사로 90%이상의 피해를 입었다. 이러한 전철을 밟지 않기 위해서 전 세계의 많은 나라들이 양식패류의 심각한 전염병의 유입과 확산을 방지하기 위하여 많은 노력을 기울이고 있다. 우리나라는 외국으로부터 굴, 진주조개, 우렁챙이 등의 치패를 비롯한 많은 양식생물이 양식용으로 이식되고 있어 심각한 병원체의 유입 가능성이 있으나, 바지락의 퍼킨수스병 외에는 현재까지 심각한 질병의 감염례는 알려져 있지 않다. 따라서 양식패류에 감염되어 피해를 유발하고 있는 유행성 전염병을 진단하고, 이러한 질병을 제어할 수 있는 기술의 개발이 시급하다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

2001년 9월부터 2004년 9월까지 3년간 우리나라의 주요양식 패류인 굴, 바지락, 진주담치, 참가리비 및 진주조개에 대한 질병 제어기술을 개발하기 위하여 주기적으로 시료를 채취하여 기생충성, 세균성 및 바이러스성 질병의 감염유무를 조사하였으며, 아울러 모니터링 결과 관찰된 질병에 대한 진단기술을 개발하였다. 질병 모니터링을 실시한 결과, 양식패류로부터 이미 알려진 질병과 더불어 현재까지 전혀 알려지지 않은 질병들도 관찰되었다. 굴에서는 이미 보고된 바 있는 난소기생충병과 우리나라에서는 처음으로 Mycoplasma-like organism 감염증

과 Viral gametocytic hypertrophy가 관찰되었다. 난소기생충은 oocyte의 세포질 내에 감염되기 때문에 현재 사용되고 있는 병리조직학적 방법으로는 초기 진단이 곤란하여 감염 초기에 진단이 가능한 PCR진단법의 조건을 확립하였다. 바지락의 경우, 퍼킨수스병의 진단개발을 위해 PCR 진단법의 조건을 확립하여 병리조직학적 방법과 혈액도말에 의한 Hemacolor 염색법 및 FTM 배양법과의 진단 민감도를 비교하였다. 진주조개의 경우 도출된 머나바이러스 감염증에 대한 진단법을 개발하기 위하여 PCR진단법의 조건을 확립하였다. 아울러 연구기간동안 발생한 바 있는 양식 패류의 폐사원인을 구명하기 위하여 2002년 동해안의 전복양식장에서 발생한 양식 전복의 대량폐사와 2004년 인천지역의 바지락 폐사원인 등에 대한 원인을 구명하기 위하여 폐사원인에 대한 연구를 수행하였다.

## IV. 연구개발결과

### 1. 양식 패류 질병 모니터링 개발

패류 질병 모니터링을 개발하기 위하여 우리나라의 주요 양식 품종인 굴, 바지락, 진주담치, 진주조개 및 참가리비에 대한 질병 모니터링을 실시하여 “한국식 패류질병 모니터링 방법”을 도출하고자 연구를 수행하였다. 연간 모니터링의 회수는 분기별 1회씩 4회가 적당하지만, 대상 패류의 성숙시기와 산란시기를 고려하여 조정할 수 있다. 시료수를 결정하기 위해서는 감염율에 대한 신뢰도가 고려되어야 하며, 패류 질병에 대한 정확성 및 신뢰성 있는 진단을 위하여 한 지점 당 30개체의 시료수가 적당하다. 조사지역의 정점은 해수의 유동과 거리를 고려하여야 하기 때문에 정점의 수를 규정하기는 어렵다. 하지만 만과 같은 지역의 모니터링에서는 만의 입구와 내만의 중간지점 및 가장 안쪽 지점을 선택하는 것이 매우 바람직하다. 시료의 운반은 4℃를 유지하여 24시간 내에 운반하여야 한다. 과도한 운반시간과 온도는 시료의 조직에 스트레스요인으로 작용 할 수 있기 때문이다. 시료의 검사는 세포배양법에 의한 검사가 어렵기 때문에 병리조직검사, 전자현미경적 검사 및 분자생물학적 검사로 세부화하여 처리한다. 따라서 한 개체를 3등분으로 나누어 데비드슨용액 고정, 칼슨용액 고정 및 -80℃ 냉동으로 처리해야 한다. 데비드슨용액에 고정된 시료는 일반적인 병리조직학적 검사를 위하여 파라핀에 포매한 후 마이크로톰으로 잘라 염색하여 광학현미경적으로 관찰한다. 관찰한 시료에서 질병 증상을 보일 경우 칼슨용액에 고정된 시료를 글루탈알데하이드로 재고정하여 전자현미경적 시료로 재사용할 수 있다. 또한 -80℃ 냉동된 시료를 사용하여 분자생물학적인 검사가 가능하다. 패류 질병 진단의 난이성으로 인하여 패류 질병검사시 표준검사법에 따라 진행하면서 지속적인 “Ring test”를 실시하여 연구원의 능력의 검증이 요구된다.



## 2. 양식패류 유행성 전염병

### 2-1. 굴의 난소기생충병

굴의 난소기생충 감염증의 감염율은 조사기간동안 총 6개소에서 시기와 장소에 따라 다르게 나타났다. 시기별로 보면 2002년 6월~2002년 10월까지 Station 1, 2, 4에서 30%이상의 감염율이 나타나 검사기간중 가장 높은 감염율을 나타내었다. 장소에 따른 연중 평균 감염율은 Station 6이 0%로 가장 낮게 나타났으며, Station 3 0.51%, Station 5 1.89%, Station 4 3.03%, Station 2 8.85%, Station 1이 10.37%로 나타나 Station 1의 연중 평균 감염율이 가장 높게 나타났다.

난소기생충에 감염된 굴의 외부증상은 유백색의 결절이 생식소에서 형성되며, 심한 경우 물굴화 되었다. 병리조직학적으로 관찰 결과, 난소기생충이 난의 세포질에 감염되어 있었다. 난소기생충에 감염된 난은 정상적인 발달을 하지 못하고 퇴화되거나 가장자리로 밀려나 있었다. 이러한 난소기생충은 난의 세포질 내에서 1개에서 6개의 기생충이 모여 큰 공포를 형성하고 있으며, 핵과 호염기성의 작은 구형의 세포로 이루어져 있었다. 난소기생충의 크기는 2.5~20.9  $\mu\text{m}$ 로 다양하게 관찰되었으며, 이러한 크기의 차이는 이 기생충의 성장과 분열로 인해 나타나는 것으로 추정되었다. 이 기생충의 광학현미경적 특징은 기생충의 세포질은 호염성, 핵은 호산성을 띤다. 대개의 감염체는 성숙한 굴의 난모세포에서 각 primary cell 내에서 2개의 sporants를 포함하며, 각 developing spore을 가지고 있다. primary cells은 3~6개의 sporants를 포함하고 있으나, 드물게 관찰되었다. 산란이 완전히 종료되는 10~11월의 조직표본에서는 미발달한 난모 세포로 차 있으며, 난황 과립을 가진 대형의 성숙한 난모 세포를 제외하고는 난모세포의 세포질에서 *M. chungmuensis*이 관찰되었으며, 이렇게 감염된 난이 생식소 내에 남아 있는 경우에는 여포주위에서 강한 혈구성 침윤과 난소의 붕괴 및 사멸되는 것을 관찰할 수 있었다. 12월 이후 숙주로부터 방출된 난소기생충은 아가미 주위에서 관찰되었다. 이는 재감염 하기 위한 현상으로 추정된다.

난소기생충에 감염된 굴의 체성분의 분석 결과, 정상개체에 비하여 난소 기생충에 감염된 굴의 글리코젠 함량이 낮은 농도로 나타났으며, 혈장단백질 또한 정상개체에 비해 낮은 농도로 나타나 난소기생충증은 체내 대사 장애를 유발하는 것으로 추정되었다.

난소기생충의 PCR 진단법을 개발하기 위하여 굴의 생식소로부터 분리한 DNA를 주형으로 *M. chungmuensis* 18S rRNA gene primer인 CHU1 및 CHU2을 이용한 PCR 결과 500bp의 산물이 얻어졌다. 이러한 결과는 병리조직검사결과 감염이 확인되어 PCR실험 결과와 병리조직검사는 결과가 일치하였다. 또한 실험결과 얻어진 PCR 산물이 *M. chungmuensis* 18S rRNA의 유전자인지 알아보기 위하여 염기서열을 분석한 결과 일본에서 보고된 *M. chungmuensis*의 유전자와 99%일치하는 것으로 나타났다. 난소기생충은 세포 내에 감염되는 기생

충이기 때문에 초기 감염시기에는 현재 이용하고 있는 병리조직학적 진단방법이나 전자현미경적 방법으로는 진단이 곤란하기 때문에 유전자 분석을 통한 진단 기술의 개발이 강력히 요구된다. 따라서 본 연구에서는 이러한 진단상의 어려움을 해결하기 위하여 난소기생충의 18S rRNA를 대상으로 적합한 primer를 제작하여 유전자 진단법의 조건을 확립하였다. 그 결과 500bp의 PCR 반응 산물을 얻을 수 있었으며, 기존의 염기서열(GeneBank 110795)과 비교한 결과, 99% 이상의 상동성을 확인할 수 있었다. 따라서 이 진단법은 난소기생충의 질병 모니터링에 적합할 것으로 판단된다.

개발된 PCR 방법을 통하여 진주담치의 난소기생충 질병의 감염을 확인한 결과, 병리조직학적으로는 전혀 관찰되지 않은 진주담치에서 난소기생충의 감염을 확인하였으며, 진주담치에서 검출된 난소기생충의 염기서열도 우리나라의 굴에서 검출된 난소기생충과 일치하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 난소기생충의 감염경로를 밝히는 중요한 자료로 제공될 것이다.

## 2-2. 바지락 퍼킨수스병

바지락에서 검출된 기생충성 질병은 바지락의 모든 장기의 결합조직에 감염되어 염증성 반응 또는 육아종을 형성하는 질병으로 원인체가 *Perkinsus* sp.이다. 이 기생충의 감염율은 고창과 태안지역에서 채취한 바지락을 헤마칼라염색, 병리조직학적 방법 및 RFTM 배양법 등 검출방법에 따라 차이가 있었으나 종합적인 감염율로 보면, 고창지역은 2002년 3월부터 2003년 9월까지 100%의 감염율이 나타났으며, 태안지역의 경우 동계에는 낮아지고 하계에는 감염율이 증가되어 20~70%의 감염율을 나타내었다.

바지락의 퍼킨수스 감염증의 진단법을 개발하기 위하여 바지락의 아가미에서 분리한 template DNA로부터 Pk5S primers를 이용한 PCR 결과 379bp의 산물이 얻어졌다. 검출된 PCR 산물을 염기서열 분석에서는 Pk5S primers에 의한 산물은 GeneBank에 등록된 AF140295인 *Perkinsus atlanticus*의 5S ribosomal RNA gene과 100% 상동성을 나타내었다. 2004년 4월부터 7월까지 태안과 고창지역에 분포하고 있는 동죽, 바지락, 굴 및 피빨고둥의 아가미에서 DNA를 추출하여 PCR반응을 시킨 결과 시료로 사용한 모든 패류에서 *Perkinsus* sp.가 검출되었다. PCR법으로 조사한 2지역의 평균감염율은 바지락이 95.0%, 굴은 10.0%, 동죽은 62.5%, 피빨고둥은 46.9%로 나타났다. 이러한 감염율은 패류의 서식환경과 관련이 있음을 알 수 있는데 갯펄에서 서식하는 바지락과 동죽이 암반에 부착하여 서식하는 굴과 피빨고둥에 비해 감염율이 높게 나타났다. 이러한 경향으로 보아 서해안에 서식하는 거의 모든 패류에 *Perkinsus* sp. 감염이 만연되어 있으며, 갯펄에 서식하는 패류일수록 감염율이 높을 것으로 추정된다.

## 2-3. 굴의 MLO 감염증

굴의 간체장 상피세포에 감염된 Mycoplasma-like organism(MLO)는 광학현미경으로는 관

찰되지 않았으며, 전자현미경으로 관찰되었다. 세포내 감염된 MLO는 매우 다양한 형태를 가지고 있었으며, 단간형이 주로 관찰되고, 장간형이나 구형도 관찰되었다. 간형은 직경이 45~86 nm, 길이가 200~500 nm이상이었으며, 구형은 직경이 70~120 nm이었다. 드물게 도우넛 형태도 관찰되었다. MLO는 세포막으로 둘러싸여져 있었으며, 세포질 내에는 prokaryotic ribosome과 섬유성 DNA-like strand가 관찰되었으나, 부수적인 세포내 기관과 같은 구조는 전혀 관찰되지 않았다. 중증 감염을 보이는 숙주의 세포 내에 괴사증상을 보이는 미토콘드리아와 ribosome이 관찰되었다.

#### 2-4. 굴의 VGH 감염증

굴의 생식소 조직에서 발생하는 Viral gametocytic hypertrophy(VGH)는 우리나라에서 최초로 발견된 질병이다. 이 감염증은 여름보다 봄에 발현률이 두드러지게 나타나는 것으로 확인되었다. 10월 전, 후로는 발현이 전 지역에서 관찰되지 않았다. 2002년과 2003년 두 해를 두고 비교했을 때, 2003년의 발현률이 높았으며, 지역적으로는 St. 2, St. 6 그리고 St. 5에서 높은 발현률을 나타내었고, St. 3과 St. 1이 순차적으로 나타났다. St. 4는 2002년 10월에 1회 발현 개체가 확인되었으나 그 이외로는 나타나지 않았다. 월별로 가장 큰 발현률을 나타낸 곳은 St. 2이지만 지속성으로 봤을 때는 St. 5에서 가장 오랫동안 나타났다. 2002년에는 대부분이 수컷 개체에서 나타난 반면, 2003년 관찰 시에는 암컷 개체에서도 다수 관찰되었다.

생식소 내의 호염기성 봉입체로 관찰되는 본 증상은 봉입체에 따라 생식소 내 가장자리로 배열되는 다핵의 거대세포를 형성하거나, 봉입체 내부가 균질화된 호염성의 형태를 나타내기도 했으며, 가장자리로 길은 호염성의 테두리를 형성한 것도 나타났다. 봉입체에 따라 파괴된 핵에서 나온 염색질의 응집체가 점상으로 염색되어 관찰되기도 한다. 봉입체 주변은 세포가 존재하지 않는 빈공간을 형성하고 형성단계에 따라 약간의 괴사세포가 관찰되기도 했으며, 빈공간의 두께는 봉입체에 따라 다르게 나타났다. 그러나 봉입체 주위의 생식소 조직은 변성을 일으키지 않았으며 혈구응집과 같은 숙주 방어기작이나, 다른 병적소견도 나타내지 않았다. H&E 염색에서는 길은 푸른색 내지는 보라색을 나타냈으며, Feulgen 반응에서는 길은 보라색을, Phloxine tartrazine 염색에서는 주홍색을 나타냈다. 봉입체의 형태는 구형에서 난형으로 다양하게 나타났으며, 크기도 다양하여 직경이 작게는 15  $\mu\text{m}$ 에서 큰 것은 60  $\mu\text{m}$ 로 관찰되었다. 투과전자현미경으로 미세구조를 관찰한 결과, 봉입체 내에 바이러스양의 입자가 가득 차 있었으며, 바이러스 입자는 envelop이 없는 정20면체의 형태로 직경이 약 40~45 nm 로 관찰되었다. 이 같은 형태학적 특징은 papovavirus와 유사한 것으로 판단되었다. 또, 수적으로는 적지만 봉입체 주변으로 방출된 바이러스 입자가 드물게 관찰되었다. 미세구조 관찰에서도 봉입체 주위의 생식세포에는 명확한 세포변성이 관찰되지 않았다.

## 2-5. 진주조개 버나바이러스 감염증

진주조개의 병리조직학적 관찰 결과, 근섬유의 연화와 괴사, 난세포 핵의 초자적 변성, 소화맹낭의 위축, 소화맹낭 tubule내의 과립상의 봉입체가 형성되어 어류유래의 주화세포를 이용한 세포배양법으로는 바이러스의 배양이 이루어지지 않았다. 따라서 바이러스의 진단을 위하여 PCR 검사법을 개발하여 진단한 결과 버나바이러스의 감염을 확인하였다.

## 2-6. 진주담치 이형혈구증

진주담치의 아가미조직에 이형 혈구의 침착이 관찰되었다. 이들 혈구는 핵이 가장자리로 뭉쳐져서 링 모양 혹은 초승달 모양의 염색질을 가지고 있었다. 이들 염색질은 Feulgen 반응에서 짙은 보라색을 나타내어 DNA 물질임이 증명되었다. 전자현미경적 관찰에서는 허피스바이러스의 감염이 확인되지 않았다. 허피스바이러스의 감염을 확인하기 위하여 PCR 검사법을 개발하여 진단한 결과 700bp의 반응물이 생성되어 허피스바이러스의 감염을 확인하였다.

## 2-7. 참굴의 녹색굴

굴의 체표면에 녹색의 침착물이 생성되어 녹색으로 변화되는 현상이 발생하여 원인의 구명이 필요하였다. 이러한 녹색의 반점은 아가미나 멘틀 혹은 palp에 국한되어 나타나거나 개체 전체가 녹색화되는 경우도 일부 관찰되었다. 헤마칼라로 염색하여 관찰한 결과, 녹색으로 변한 조직에서 세포질 내에 밝고 투명한 입자들을 가진 혈구들이 관찰되었다. 전자현미경적 관찰 결과, 혈구의 세포질 내에서 막으로 둘러싸여진 vesicle이 관찰되었다. 이러한 vesicle내에서 바이러스와 유사한 입자들이 관찰되었으며, 입자의 크기는 직경이 130 nm내외이며, 형태는 육각형이나 원형이었다. 또한 envelop을 가지고 있었다. 이러한 형태학적인 특징은 이리도바이러스로 추정되었다.

## 3. 패류 양식장 소독 처리 지침

양식 패류의 인공종묘의 비중이 점차 증가하고 있어 건강종묘의 생산을 위하여 종묘생산장의 소독 지침이 필요하다. 소독처리대상에 대한 소독처리방법을 작성하였다. 또한 할로겐 화합물인 요오드의 잔류독성을 제거하기 위한 중화방법도 기술하였다.

## 4. 표준진단지침서

국제수역사무국이 패류의 유행성 전염병으로 지정한 Notifiable disease to OIE(OIE에 보고해야 할 질병)는 Bonamiosis(보나미아 감염증), Haplosporidiosis(하프로스포리디움 감염증),

Mikrocytosis(마이크로사이토스 감염증), Marteiliosis(마텔리아 감염증)과 Perkinsiosis(퍼킨수스 감염증)은 매우 심각한 패류의 전염병으로 분류되고 있으며, 이들 질병은 양식 패류의 심각한 질병을 유발할 뿐만 아니라 자연자원에 감염될 경우 심각한 피해를 일으킬 우려가 있기 때문에 이 질병들에 대한 주의깊은 모니터링을 필요하다. 따라서 5가지 질병에 대한 질병진단을 위하여 표준진단지침서를 작성하였다.

## 5. 양식패류 대량폐사 원인구명

### 5-1. 서해안 양식 바지락 폐사원인조사

2004년 인천지역에서 발생한 바지락의 대량폐사 원인을 구명하기 위하여 연구를 수행하였다. 병든 바지락은 발과 외투막이 수축되어 있었다. 동일한 시기의 군산의 바지락과 비만도를 비교한 결과 유의하게 낮았다. 병든 바지락의 조직 스템프와 병리조직표본에서 *Perkinsus* sp.의 영양체가 확인되었다. *Perkinsus* sp.의 검출율은 잠입하지 못한 개체에서 100%, 잠입한 개체에서는 80%로 잠입하지 못한 개체에서의 감염율이 높게 나타나 대량폐사가 *Perkinsus* sp.의 감염과 밀접한 관계가 있음을 시사하였다.

### 5-2. 양식 전복 폐사원인 구명 및 진단기술 개발

2002년 6월경 경북 연안의 전복양식장에서 전복이 대량폐사되어 폐사 원인을 구명하고자 연구를 수행하였다. 병든 전복의 혈액으로부터 swarming하는 그람-음성의 단간균이 분리되었다. 이 세균은 API 20E와 Biolog GN system의 결과를 분석한 결과 *Vibrio alginolyticus*로 동정되었다. 병리조직학적 검사결과, 발과 멘틀의 결합조직과 근조직에서 많은 수의 세균이 관찰되었으며, 이 균의 병원성 시험을 통하여 대량폐사의 원인이 *Vibrio alginolyticus*의 전신적인 감염에 의한 것으로 추정되었다. 이 균의 PCR 진단법을 개발하기 위하여 16S 및 16S/23S intergenic spacer에 대한 primer를 제작하여 특이 primer를 개발하였다. 16S/23S intergenic spacer의 염기서열을 분석한 결과 현재까지 알려지지 않은 염기서열이기 때문에 Genebank에 AY601670으로 등록하였다. 또한 면역혈청학적 진단방법을 개발하기 위하여 단클론항체를 생산하였다.

# SUMMARY

## Development of control for epizootic diseases of molluscs

### Background

From 1970's, when world aquaculture of molluscs recognized economical importance, to present, it is likely that serious bivalve mollusc diseases in many countries on the world have had an economic impact on farming and wild harvesting of molluscs in the region but effective control for those has not been developed. Because there is lack of 1) physiological, ecological and histological knowledges of host; 2) life-cycle of pathogen and defence mechanism of host; 3) complementary collaboration between relative research-teams. Since almost cultured molluscs is exposed to the environment, it is easy to infect and rapidly spreads to almost of farming molluscs and causes mass mortalities. In 1970's, mass mortality of hard clam *Meretrix lusoria* from Korea caused socio-economic problems, and Bonamiosis caused substantial mortalities of the European flat oyster *Ostrea edulis* in France. In 1996, Japan has lost up to 60% of production of cultured Pearl oyster annuary. Recently in 2000, mass mortalities of cultured scallop has caused economic impacts in China. For preventing from repeating the same mistakes, almost countries has made great efforts for preventing the pathogens from spreading to the their cultured molluscs. In Korea, since many kinds of aquatic animals which are included oyster, pearl oyster and tunicate for aquaculture has been imported during last decade, it will possibly cause to bring the pathogens to the region. But only *Perkinsus atlanticus* has been detected in manila clam in the region. In order to ensure that mollusc production can contribute to food availability, the unidentified diseases of cultured molluscs in the region have to classified and controlled by health management.

### Subject matters

Disease monitoring had been carried out periodically for importance farmed molluscs, oyster, manila clam, mussel, scallop and pearl oyster in order to develop of control for epizootic diseases of molluscs. During the disease monitoring of the molluscs, several diseases are detected which are reported and unreported in Korea. Marteilioidosis which has

been detected and Mycoplasma-like organism infection and Viral gametocytic hypertrophy which did not reported are observed in oyster. Since *Marteilioides chungmuensis* infects in the cytoplasm of oocyte, early developmental stages outside the oocytes have not been located due to a lack of observability in histological sections, and the inability to experimentally infect oysters under laboratory conditions makes the detection of early developmental stages difficult, PCR diagnostic method for *Marteilioides chungmuensis* was developed during this study. For the development of diagnostic method for *Perkinsus* sp. infected in manila clam, PCR method was established and after that, PCR technique were compared with histology, hemacolor staining and RFTM culture for diagnostic sensitivity. Since Birnavirus infection was detected from pearl oyster during monitoring, PCR method was established for Birnavirus diagnosis. During this study, mass mortalities of abalone and manila clam occurred, the causative agent of those mortalities was studied.

## Results

### 1. Development of guideline of disease monitoring of molluscs

Guideline of diseases monitoring for molluscs in Korea was suggested by the results of farmed molluscs, oyster, manila clam, mussel, scollop and pearl oyster. The frequency of sampling should be determined by the cycle of infection by the pathogen and prepatent period and sampling should be carried out at least fourth a year. The sampling size should be determined by assumed prevalence, the sample size for each site is a minimum of 30 or sufficient number to ensure detection at a 95% confidence level of pathogen carriers. The number of sampling sites must be selected so as to maximise the chances of detecting pathogens. Account must be taken of parameters having an effect on the pathogenic agents, such as stocking density, water flow. In the case of gulf area, the sampling sites have to include the mouth, middle and bottom site of gulf. All sampled molluscs must be delivered to the approved diagnostic laboratory with 24 hours after sampling. Excessive time and temperature will cause stress on sample and may alter histological symptoms. There is no cell-line appropriate to molluscs virus, the samples should be exam by hitological techniques, electron microscopy methods and molecular biological methods. Therefore, each sample should be divided by three pieces and preserved in Davidson's solution, Carson's solution and -80°C. Tissue sample fixed in Davidson's solution can be used for histological analysis after embedding with paraffin and stained with different histochemical methods. There is pathological symptom observed by microscopy, the other piece in the Carson's solution



may be good for electron microscopy methods because material fixed in Carson's solution shows good ultrastructure. Material in  $-80^{\circ}\text{C}$  can be used for molecular biological methods, if available. Ring test is valuable for verification for diagnosticians.

## 2. Epizootic diseases of molluscs

### 2-1. Marteilioidosis of oyster

Infection rates of Marteilioidosis of oyster during disease monitoring were different from sampling site and season. Maximum infection rate was 30% that was observed in station 1, 2 and 4 from June to October in 2002. Annual infection rate on each site was 0% in station 6 that was minimum and 0.51%, 1.89%, 3.03%, 8.85%, 10.37% in station 3, 5, 4, 2 and 1, respectively. Gross symptoms of Marteilioidosis of oyster were formation of nodules on the reproductive tissues and watery oyster in severe case. With histological observation, *Marteilioides chungmuensis* infects cytoplasm of oocyte. The infected oocytes showed undeveloped, degenerated and/or margined to the cell membrane by the parasite infection. The parasite made a vesicle in cytoplasm of oocyte by one to six parasites that consist of nucleus and basophilic cell within the vesicle. Size of the parasite ranges from 2.5 to 20.9  $\mu\text{m}$  in diameter, depending on growth and division of parasite. Almost parasites have two sporonts within primary cells, while unusually 3~6 sporonts were observed within the primary cells. Biochemical analysis of oyster tissue showed glycogen level as well as serum protein level of infected oysters was lower than uninfected ones. It suggests that the infection of parasite may cause a significant metabolic impact. For development of PCR method, with CHU1/CHU2 primer set that were designed for *M. chungmuensis* 18S rDNA gene, we get a 500bp PCR product amplified from DNA template of oyster reproductive tissue. These results ensured by observation of histological examinations. These PCR product's nucleotide sequences showed 99% identities with those of *M. chungmuensis* reported from Japan. Therefore we establish the genetic diagnostic method with suitable primer set for the *M. chungmuensis*, and this method may be available to disease monitoring.

This PCR method was applied for diagnosis *M. chungmuensis* of in mussel, the infection of *M. chungmuensis* was recognized. The nucleotide sequences of *M. chungmuensis* from mussel showed 99% identities with those of *M. chungmuensis* of oyster. These results may provide important data for infection mechanism of *M. chungmuensis*.

## 2-2. Perkinsosis of manila clam

Perkinsosis was observed in manila clam and causative agent of parasitic infection that the parasite infects connective tissues of almost internal organs and might cause inflammatory responses and granuloma. The infection rates was 100% in Gochang from March 2002 to August 2003 and 20~70% in Taean during disease monitoring. For development of PCR method, with pk5S primer set that were designed for *Perkinsus atlanticus* 5S rDNA gene, we get a 379bp PCR product amplified from DNA template of manila clam gill tissue. These PCR product's nucleotide sequences showed 100% identities with those of *Perkinsus atlanticus* Genbank AF140295. This PCR method was applied for diagnosis *P. atlanticus* in surf clam, manila clam, oyster and Thomas's rapa whelk taken from the costal area of Taean and Gochang from April to July 2004, the parasite was detected from all samples and infection rates were 95%, 10%, 62.5% and 46.9% in the manila clam, oyster, surf clam and Thomas's rapa whelk, respectively. This results suggests that the parasite may infect almost molluscs which lives in western coast of Korea.

## 2-3. MLO infection of oyster

During routine survey of Pacific oyster *Crassostrea gigas* collected from Tongyoung area in southern coast of Korea, histological examination revealed that a intracellular microorganisms infected the digestive gland of the oyster. They infected hepatopancreatic cells extensively. The size of intracellular microorganism was of 45 to 86 nm in diameter and 200 nm to more than 500 nm in length. They were pleomorphic. The morphological characteristic of intracellular microorganisms lacked cell wall and was bounded by the plasma membrane. They contained typical prokaryotic ribosomes and fibrillar DNA-like strands. No additional internal structure has been observed. Based on the lack of cell wall and the cellular localization, the intracellular microorganism is considered as a Mycoplasma-like organism.

## 2-4. VGH infection of oyster

During a routine survey of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Tongyoung on the southern coast of Korea, basophilic inclusions were observed in the gonadal tissues. They were detected from March to May at prevalences of 3.3~7.1%. The inclusion bodies were Feulgen-positive and stained red orange with phloxine tartrazine. Electron microscopic observation revealed non-enveloped, icosahedral particles 40~45 nm in diameter. These morphological characteristics resemble those of papovavirus-like inclusions previously described from Pacific and eastern (American) oysters, *C. virginica*, in North America. Although

many mitochondrial bodies and intact sperm cells were observed around the inclusion body, no host reaction, such as hemocytic infiltration was detected.

#### 2-5. Birnavirus infection of Pearl oyster

During routine survey of Pearl oysters, necrosis of muscular fiber, hyaline droplet degeneration of oocyte nucleus, atrophy of hepatopancreatic tubules and a inclusionbody in the hepatopancreas are observed by histopathological observation. CPE was not observed in the inoculation of cell lines. Birnavirus infection was identified by PCR method.

#### 2-6. Abnormal hemocyte of mussel

During routine survey of mussel, abnormal hemocyte infiltration on the gill tissue of mussel was observed. The hemocyte has enlarged nuclei with abnormal marginated chromatin. Some nuclei of hemocyte appeared with a ring-shaped or crescent-shaped chromatin. The condensed chromatin was Feulgen-positive. Transmission electron microscopy did not reveal the presence of herpesvirus in the hemocyte. In order to detect herpesvirus, herpesvirus infection was detected by the formation of 700bp PCR product.

#### 2-7. Green oyster syndrome

During routine survey of oyster, green color change in the mantle tissue of oyster was observed. Green spots were observed on the gill, mantle and/or palp, in some cases greenish coloration on the whole body was also observed. Refrigent material in the cytoplasm of hemocyte was observed by staining the tissue imprints with Hemacolor kit. Transmission electron microscopy revealed the presence of irido-like virus in the vesicle that appeared in the cytoplasm of hemocyte. The virus has envelop and is 130 nm in diameter. The morphological characteristics suggest that the virus seems iridovirus.

### **3. Guideline of disinfection of mollusc farms**

Since hatchery reared seeds is beginning assume the massive proportions of molluscs aquaculture, the Guideline of mollusc farms is strongly needed for production of healthy seed. Disinfectants and concentrations for disinfection are prepared for mollusc farms. Additionally, procedure of neutralization of halogens are described for removing the residual toxicity of disinfectants and protection of the environment.

#### 4. Diagnostic guide for important mollusc diseases

Notifiable diseases of mollusc to OIE are Bonamiosis, Haplosporidiosis, Mikrocytosis, Marteiliosis and Perkinsiosis. Since those diseases are classified important diseases of molluscs and may cause significant mortalities of farmed molluscs as well as wild stocks, continuous and serious monitoring for the diseases are strongly needed. Therefore, diagnostic guide for those diseases are prepared.

#### 5. Study of massive mortalities of cultured molluscs

##### 5-1. Massive mortality of manila clam in western coast

Since the massive mortality of manila clam was appeared in Incheon area in 2004, study was performed for causative agent. The diseased clams showed atrophied mantle. The condition index of diseased clam was lowered that that of Kunsan clam in same period. The trophozoites of *Perkinsus* sp. were founded in tissue imprints and histological sections of diseased clam collected from Incheon. Infection rates of *Perkinsus* sp. are 100% in surface-caught clam and 80% in underground-caught clam. The result suggests *Perkinsus* sp. is a causative agent of massive mortality of manila clam in Incheon.

##### 5-2. Massive mortality of abalone in eastern coast

Since the massive mortality of abalone was appeared in western coast in 2002, study was performed for causative agent. *Vibrio alginolyticus* was isolated the haemolymph of diseased abalones (*Haliotis discus hannai*). The strain was a Gram-negative, straight rod, motile on TSA. The strain was classified *Vibrio alginolyticus* by API 20E and Biolog GN system. Many bacteria were observed in the connective and muscular tissue of the foot and mantle. These bacteria infection is presented in the diseased abalones and seems to be systemic. Necrosis of the connective tissue and muscular fibres was noted and could be associated with the presence of the bacteria. Experimental challenge ensure that *Vibrio alginolyticus* is a causative agent of massive mortality of abalone. For establishment of PCR diagnosis, specific primer set are designed that are targeted on 16S and 16S/23S intergenic spacer. Since the nucleotide sequences of 16S/23S intergenic spacer are unreported in Genebank, the sequences are registered as AY601670 in Genebank. In addition, monoclonal antibody are produced for immunological diagnostic methods.

# Contents

Chapter 1 Summary of the subject .....	1
References .....	5
Chapter 2 Status of research of Molluscs diseases .....	7
Chapter 3 Development of guideline of disease monitoring of molluscs .....	9
Section 1 Guideline of disease monitoring of molluscs .....	9
1. Introduction .....	9
2. Materials and methods .....	9
2-1. Sampling .....	9
2-2. Shipment of samples .....	10
2-3. Macroscopic examination .....	11
2-4. Histological examination .....	11
2-5. Electron microscopical examination .....	11
3. Results and discussion .....	12
3-1. Sampling .....	12
3-2. Shipment of samples .....	13
3-3. Macroscopic examination .....	13
3-4. Histological examination .....	13
4. References .....	14
Section 2 <i>Marteilioides chungmuensis</i> of Pacific oyster .....	15
1. Introduction .....	15
2. Materials and methods .....	15
2-1. Sampling .....	15
2-2. Macroscopic examination .....	16
2-3. Histological examination .....	16
2-4. Electron microscopical examination .....	16
3. Results and discussion .....	17
3-1. Monitoring of <i>Marteilioides chungmuensis</i> .....	17
3-1-1. Status of infection of <i>Marteilioides chungmuensis</i> .....	17
3-1-2. Impacts of host by <i>Marteilioides chungmuensis</i> -Histological changes .....	19
3-1-3. Ultrastructure-observation of Electron microscope .....	22
4. References .....	25

Section 3 Appearance and pathogenicity of <i>Marteilioides chungmuensis</i> in pacific oyster	28
1. Introduction	28
2. Materials and methods	28
2-1. Sampling	28
2-2. Examination of <i>Marteilioides chungmuensis</i> infection levels	28
2-3. Evaluation of oyster condition factors	29
3. Results	29
3-1. Correlation condition factor to levels of <i>Marteilioides chungmuensis</i> infection	29
3-1-1. Glycogen content	29
3-1-2. Biochemical analysis of oyster tissue	29
3-1-3. Serum protein	30
4. Discussion	30
5. References	33
Section 4 Development of PCR diagnostic method of <i>Marteilioides chungmuensis</i>	35
I. <i>Marteilioides chungmuensis</i> of Pacific oyster	35
1. Introduction	35
2. Materials and methods	35
2-1. Sampling	35
2-2. DNA extraction	35
2-3. PCR and electrophoresis of agarose gel	36
2-4. Analysis of nucleotide sequences of PCR product	37
3. Results and discussion	37
4. References	39
II. <i>Marteilioides chungmuensis</i> of mussel	40
1. Introduction	40
2. Materials and methods	40
2-1. Sampling	40
2-2. DNA extraction	40
2-3. PCR and electrophoresis of agarose gel	40
2-4. Analysis of nucleotide sequences of PCR product	40
3. Results and discussion	40
4. References	43
Section 5 Infection of Mycoplasma in Pacific oyster	44
1. Introduction	44
2. Materials and methods	44
3. Results	44
4. Discussion	49

5. References .....	50
Section 6 Viral gametocytic hypertrophy (VGH) in Pacific oyster .....	51
1. Introduction .....	51
2. Materials and methods .....	51
3. Results and discussion .....	51
3-1. Monthly prevalence of VGH .....	51
3-2. Impacts of host-Histological changes .....	52
3-2. Ultrastructure-Observation of electron microscope .....	53
4. References .....	56
Section 7 Green oyster syndrome in Pacific oyster .....	57
1. Introduction .....	57
2. Materials and methods .....	57
2-1. Sampling .....	57
2-2. Hemacolor stain .....	57
2-3. Histological & Electron microscopical examination .....	57
3. Results and Discussion .....	58
4. References .....	61
Section 8 Infection of birnavirus of pearl oyster .....	62
1. Introduction .....	62
2. Materials and methods .....	62
2-1. Cell culture .....	62
2-2. Diagnosis of infection of birnavirus by RT-PCR .....	63
3. Results .....	63
3-1. Cell culture .....	63
3-2. Diagnosis of infection of birnavirus by RT-PCR .....	63
3-3. Histological changes by infection of birnavirus .....	64
4. Discussion .....	64
5. Summary .....	65
6. References .....	66
Section 9 Abnormal hemocyte of mussel .....	67
1. Introduction .....	67
2. Materials and methods .....	67
2-1. Sampling .....	67
2-2. Histological examination .....	67
2-3. Electron microscopical examination .....	68
2-4. PCR .....	68



3. Results .....	69
3-1. Histological examination .....	69
3-2. Electron microscopical examination .....	69
3-3. PCR .....	71
4. Discussion .....	71
5. References .....	72
Section 10 <i>Vibrio alginolyticus</i> of abalone in eastern coast .....	74
I. Massive mortality of cultured abalone and development of diagnosis .....	74
1. Introduction .....	74
2. Materials and methods .....	74
2-1. Isolation and identification of bacteria .....	74
2-2. Histological examination .....	74
2-3. DNA extraction .....	74
2-4. PCR and electrophoresis of agarose gel .....	75
2-5. Analysis of nucleotide sequences of PCR product .....	76
2-6. Experimental challenge of <i>Vibrio alginolyticus</i> PD2 .....	76
3. Results and discussion .....	77
3-1. Isolation and identification of bacteria .....	77
3-2. Histological examination .....	80
3-3. Experimental challenge .....	83
3-4. Analysis of nucleotide sequences of PCR product .....	83
4. References .....	87
II. Production of monoclonal antibody against the agent of abalone Vibriosis, <i>Vibrio alginolyticus</i> .....	88
1. Materials and methods .....	88
1-1. Immunization of mouse .....	88
1-2. Production of MAB .....	88
1-2-1. Production of hybridoma .....	88
1-2-2. Selection of hybridoma cell .....	88
1-2-3. Production of MAB .....	91
1-2-4. ELISA .....	91
2. Results .....	91
Section 11 Infection of <i>Perkinsus</i> sp. in cultured manila clam .....	94
1. Introduction .....	94
2. Materials and methods .....	94
2-1. Sampling .....	94
2-2. Observation of tissue imprints .....	94

2-3. Observation of histological sections .....	95
2-4. Detection of <i>Perkinsus</i> sp. by FTM culture .....	95
2-5. Detection of <i>Perkinsus</i> sp. by PCR .....	96
2-6. Analysis of nucleotide sequences of PCR product .....	96
2-7. Field trial by PCR .....	97
2-8. Study of massive mortality of cultured manila clams in Incheon in 2004 .....	97
3. Results and discussion .....	97
3-1. Environment of farms and growth of clam .....	97
3-2. Detection of <i>Perkinsus</i> sp. ....	98
3-2-1. Staining of Hemacolor on tissue imprints .....	98
3-2-2. Histological examination .....	100
3-2-3. Detection of <i>Perkinsus</i> sp. by FTM culture .....	102
3-3. Detection of <i>Perkinsus</i> sp. from manila clam, oyster, surf clam and Thomas's rapa whelk by PCR .....	106
3-4. Detection of <i>Perkinsus</i> sp. from massive mortality of cultured manila clams In Incheon in 2004 .....	107
4. References .....	113
Section 12 Changes of bacterial and <i>Vibrio</i> counts from seawater, mud and manila clam tissue .....	
1. Introduction .....	116
2. Materials and methods .....	116
2-1. Changes of bacteria and <i>Vibrios</i> numbers .....	116
2-2. Pathogenicity .....	117
3. Results and discussion .....	117
3-1. Changes of bacterial counts .....	117
3-2. Changes of <i>Vibrios</i> counts .....	121
3-3. Pathogenicity of <i>Vibrio</i> .....	128
4. References .....	133
Section 13 Changes of non-specific defence activities .....	
1. Introduction .....	135
2. Materials and methods .....	135
2-1. Sample .....	135
2-2. Lysozomal activity of hemolymph .....	135
2-3. Serum agglutination titer .....	135
2-4. Bactericidal activity of hemocyte .....	136
2-5. Hemocyte activity .....	136
2-6. Changes of composition of hemocytes .....	136
3. Results and discussion .....	136

3-1. Lysozomal activity of hemolymph .....	136
3-2. Hemocyte activity .....	137
4. References .....	141
Section 14 Development of PCR method based on 16S rRNA for diagnosis of <i>Vibrio</i> <i>tapetis</i> and field trial .....	143
1. Introduction .....	143
2. Materials and methods .....	143
2-1. DNA extraction and primers .....	143
2-2. PCR .....	144
2-3. Specificity .....	144
2-4. Detection of <i>Vibrio tapetis</i> from experimentally infected manila clam .....	144
2-5. Field trial of PCR method .....	146
3. Results and discussion .....	147
3-1. PCR .....	147
3-2. in vitro detection of <i>Vibrio tapetis</i> by PCR method .....	147
3-3. Field trial of PCR method and detection of <i>Vibrio tapetis</i> from massive mortality of cultured manila clams in Incheon in 2004 .....	147
4. References .....	152
Section 15 Guideline of disinfection of mollusc farms .....	154
1. Introduction .....	154
2. Disinfection procedure .....	154
3. Disinfectants .....	154
3-1. Pipeline and tank .....	154
3-2. Effluent water .....	155
3-3. Clothing and equipment .....	155
3-4. Special recommendations .....	156
4. Disinfection with iodine .....	156
Section 16 Diagnostic guide for important mollusc diseases .....	157
1. Introduction .....	157
2. Bonamiosis .....	157
3. Haplosporidiosis .....	159
4. Marteiliosis .....	163
5. Mikrocytosis .....	165
6. Perkisiosis .....	168
7. References .....	171
Chapter 4 Conclusion .....	173

Chapter 5 Achievement of goals and contribution of related fields .....	175
Chapter 6 Application plan of research results .....	176
Chapter 7 Scientific information of foreign countries in the research period .....	177
Appendix 1 <i>Vibrio alginolyticus</i> 16S/23S ITS gene complete sequence	
Appendix 2 Control of protection the spread of Mollusc epizootic diseases	

# 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	1
참고문헌 .....	5
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	7
제 3 장 패류 질병 모니터링 표준기술 개발 .....	9
제 1 절 패류질병 모니터링 표준기술 개발 .....	9
1. 개요 .....	9
2. 재료 및 방법 .....	9
2-1. 시료채집 .....	9
2-2. 시료 운반 .....	10
2-3. 육안적 검사 .....	11
2-4. 조직학적 검사 .....	11
2-5. 전자현미경적 검사 .....	11
3. 결과 및 고찰 .....	12
3-1. 시료 채집 .....	12
3-2. 시료 운반 .....	13
3-3. 육안적 검사 .....	13
3-4. 조직학적 검사 .....	13
4. 참고문헌 .....	14
제 2 절 참굴의 난소기생충 질병 .....	15
1. 서론 .....	15
2. 재료 및 방법 .....	15
2-1. 시료채집 .....	15
2-2. 육안적 검사 .....	16
2-3. 조직학적 검사 .....	16
2-4. 전자현미경적 검사 .....	16
3. 결과 및 고찰 .....	17
3-1. 난소기생충 질병의 모니터링 .....	17
3-1-1. 난소기생충의 감염실태 .....	17
3-1-2. 난소기생충이 숙주에 대한 영향-병리조직학적 변화 .....	19
3-1-3. 난소기생충의 미세구조-전자현미경적 관찰 .....	22
4. 참고문헌 .....	25

제 3 절 참굴에 감염되는 난소기생충의 출현 특성과 병원성 .....	28
1. 서론 .....	28
2. 재료 및 방법 .....	28
2-1. 시료 채집 .....	28
2-2. 난소기생충 감염 조사 .....	28
2-3. 건강도 판정 .....	29
3. 결과 .....	29
3-1. 난소기생충 감염정도에 따른 건강도 .....	29
3-1-1. 글리코겐 함량 .....	29
3-1-2. 일반 체성분 .....	29
3-1-3. 혈장 단백질 .....	30
4. 고찰 .....	30
5. 참고문헌 .....	33
제 4 절 난소기생충 PCR 진단법 개발 .....	35
I. 참굴의 난소기생충 .....	35
1. 서론 .....	35
2. 재료 및 방법 .....	35
2-1. 시료채취 .....	35
2-2. DNA 추출 .....	35
2-3. PCR 및 agarose gel 전기영동 .....	36
2-4. PCR 산물의 염기서열 확인 .....	37
3. 결과 및 고찰 .....	37
4. 참고문헌 .....	39
II. 진주담치의 난소기생충 .....	40
1. 서론 .....	40
2. 재료 및 방법 .....	40
2-1. 시료채취 .....	40
2-2. DNA 추출 .....	40
2-3. PCR 및 agarose gel 전기영동 .....	40
2-4. PCR 산물의 염기서열 확인 .....	40
3. 결과 및 고찰 .....	40
4. 참고문헌 .....	43
제 5 절 굴의 Mycoplasma 감염증 .....	44
1. 서론 .....	44
2. 재료 및 방법 .....	44
3. 결과 .....	44
4. 고찰 .....	49

5. 참고문헌 .....	50
제 6 절 굴의 Viral gametocytic hypertrophy .....	51
1. 서론 .....	51
2. 재료 및 방법 .....	51
3. 결과 및 고찰 .....	51
3-1. VGH의 월별 발현율 .....	51
3-2. 숙주에 대한 영향-조직학적 변화 .....	52
3-3. 미세구조-전자현미경적 관찰 .....	53
4. 참고문헌 .....	56
제 7 절 참굴의 녹색굴 출현에 대한 연구 .....	57
1. 서론 .....	57
2. 재료 및 방법 .....	57
2-1. 시료 .....	57
2-2. Hemacolor stain .....	57
2-3. 병리조직학적 및 전자현미경적 검사 .....	57
3. 결과 및 고찰 .....	58
4. 참고문헌 .....	61
제 8 절 진주조개(Pinctada fucata)의 버나바이러스 감염증 .....	62
1. 서론 .....	62
2. 재료 및 방법 .....	62
2-1. 세포배양에 의한 바이러스 진단 및 세포 선택성 조사 .....	62
2-2. RT-PCR에 의한 버나바이러스 진단 .....	63
3. 결과 .....	63
3-1. 세포배양에 의한 바이러스 진단 및 세포 선택성 조사 .....	63
3-2. RT-PCR에 의한 버나바이러스 진단 .....	63
3-3. 버나바이러스 감염에 의한 조직학적 변화 .....	64
4. 고찰 .....	64
5. 요약 .....	65
6. 참고문헌 .....	66
제 9 절 진주담치의 이형혈구 감염증 .....	67
1. 서론 .....	67
2. 재료 및 방법 .....	67
2-1. 시료 채취 .....	67
2-2. 광학현미경적 실험 .....	67
2-3. 전자현미경적 실험 .....	68
2-4. PCR 분석 .....	68



3. 결과 .....	69
3-1. 광학현미경적 관찰 .....	69
3-2. 전자현미경적 관찰 .....	69
3-3. PCR 분석 .....	71
4. 고찰 .....	71
5. 참고문헌 .....	72
제 10 절 양식 전복의 비브리오 감염증 .....	74
I. 양식 전복 폐사원인 구명 및 진단기술 개발 .....	74
1. 서론 .....	74
2. 재료 및 방법 .....	74
2-1. 세균의 분리 및 동정 .....	74
2-2. 조직학적 검사 .....	74
2-3. DNA의 추출 .....	74
2-4. Polymerase chain reaction (PCR) 및 agarose gel 전기영동 .....	75
2-5. PCR 산물의 염기서열 확인 .....	76
2-6. <i>Vibrio alginolyticus</i> PD2 균주의 병원성 시험 .....	76
3. 결과 및 고찰 .....	77
3-1. 세균의 분리 및 동정 .....	77
3-2. 병리조직학적 관찰 .....	80
3-3. 병원성 시험 .....	83
3-4. PCR과 염기서열 분석 .....	83
4. 참고문헌 .....	87
II. 전복의 비브리오병 원인균인 <i>Vibrio alginolyticus</i> 에 대한 Monoclonal antibody 생산 .....	88
1. 재료 및 방법 .....	88
1-1. 마우스 면역 .....	88
1-2. 단클론 항체 생산 .....	88
1-2-1. 하이브리도마(Hybridoma) 제조 .....	88
1-2-2. 하이브리도마(Hybridoma) 세포 선택의 원리 .....	88
1-2-3. 단클론항체의 생산 .....	91
1-2-4. ELISA .....	91
2. 결과 및 고찰 .....	91
제 11 절 양식 바지락의 퍼킨수스 감염증 .....	94
1. 서론 .....	94
2. 재료 및 방법 .....	94
2-1. 시료채집 .....	94
2-2. 도말표본의 검색 .....	94
2-3. 병리조직학적 검색 .....	95

2-4. FTM의 배양에 의한 <i>Perkinsus</i> 검출(Ray, 1966) .....	95
2-5. PCR을 이용한 <i>Perkinsus</i> sp. 검출 .....	96
2-6. PCR 산물의 염기서열 확인 .....	96
2-7. PCR을 이용한 현장시험 .....	97
2-8. 2004년 인천지역 대량폐사 바지락에서의 검출 .....	97
3. 결과 및 고찰 .....	97
3-1. 양식장 환경과 성장 .....	97
3-2. <i>Perkinsus</i> sp.의 검출 .....	98
3-2-1. 도말표본의 Hemacolor 염색 .....	98
3-2-2. 병리조직학적 검사 .....	100
3-2-3. FTM 배양에 의한 검출 .....	102
3-3. PCR에 의한 동족, 바지락 및 피빨고등에서의 <i>Perkinsus</i> sp. 검출 .....	106
3-4. 2004년 인천지역 대량폐사 바지락에서의 <i>Perkinsus</i> sp. 검출 .....	107
4. 참고문헌 .....	113
제 12 절 해수, 저질 및 바지락조직의 생균수 및 비브리오균수의 변화 .....	116
1. 서론 .....	116
2. 재료 및 방법 .....	116
2-1. 생균수 및 <i>Vibrio</i> 균수 .....	116
2-2. 병원성 .....	117
3. 결과 및 고찰 .....	117
3-1. 생균수의 변화 .....	117
3-2. <i>Vibrio</i> 균수의 변화 .....	121
3-3. <i>Vibrio</i> 균의 병원성 .....	128
4. 참고문헌 .....	133
제 13 절 바지락의 <i>V. tapetis</i> 의 감염에 대한 비특이 방어인자의 활성 변화 .....	135
1. 서론 .....	135
2. 재료 및 방법 .....	135
2-1. 시료 .....	135
2-2. 혈청 라이소자임의 활성 .....	135
2-3. 혈청의 응집가 .....	135
2-4. 혈청의 살균능 .....	136
2-5. 혈구의 탐식능 .....	136
2-6. 혈구 조성의 경시적 변화 .....	136
3. 결과 및 고찰 .....	136
3-1. 라이소조움 활성의 변화 .....	136
3-2. 혈구의 탐식능 .....	137
4. 참고문헌 .....	141

제 14 절 16S rRNA를 이용한 <i>Vibrio tapetis</i> 의 PCR 진단법 개발 및 현장 적용시험	143
1. 서론	143
2. 재료 및 방법	143
2-1. DNA 추출 및 primers	143
2-2. PCR	144
2-3. 특이성의 검정	144
2-4. PCR을 이용한 인위감염 바지락에서의 <i>V. tapetis</i> 검출	144
2-5. PCR 법의 현장 적용	146
3. 결과 및 고찰	147
3-1. PCR	147
3-2. PCR을 이용한 in vitro에서의 <i>V. tapetis</i> 검출	147
3-3. 현장 적용 및 인천지역 대량폐사 바지락에서의 검출	147
4. 참고문헌	152
제 15 절 패류 양식장 소독 처리 지침	154
1. 개요	154
1-1. 소독처리방법	154
1-2. 소독대상	154
1-3. 주의사항	154
2. 소독처리방법	154
2-1. 유입수	154
2-2. 시설물 소독	154
2-3. 배출수 처리	154
3. 소독제	154
3-1. 파이프 라인 및 탱크	154
3-2. 배출수	155
3-3. 의복과 시설	155
3-4. 주의사항	156
4. 요오드 소독 방법	156
제 16 절 패류질병 진단 지침서	157
1. 개요	157
2. 보나미아 감염증	157
2-1. 원인체	157
2-2. 숙주 및 숙주에 대한 영향	157
2-3. 지정학적 분포	158
2-4. 진단	158
2-4-1. 스크리닝 방법	158
2-4-2. 잠정진단법	159
2-4-3. 확정진단법	159

3. 하프로스포리디움 감염증 .....	159
3-1. 원인체 .....	159
3-2. 숙주 및 숙주에 대한 영향 .....	160
3-3. 지정학적 분포 .....	160
3-4. 진단 .....	160
3-4-1. 스크리닝 방법 .....	160
3-4-2. 잠정진단법 .....	161
3-4-3. 확정진단법 .....	162
4. 마텔리아 감염증 .....	163
4-1. 원인체 .....	163
4-2. 숙주 및 숙주에 대한 영향 .....	163
4-3. 지정학적 분포 .....	164
4-4. 진단 .....	164
4-4-1. 스크리닝 방법 .....	164
4-4-2. 잠정진단법 .....	165
4-4-3. 확정진단법 .....	165
5. 마이크로사이토스 감염증 .....	165
5-1. 원인체 .....	165
5-2. 숙주 및 숙주에 대한 영향 .....	165
5-3. 지정학적 분포 .....	166
5-4. 진단 .....	166
5-4-1. 스크리닝 방법 .....	166
5-4-2. 잠정진단법 .....	167
5-4-3. 확정진단법 .....	167
6. 퍼킨수스 감염증 .....	168
6-1. 원인체 .....	168
6-2. 숙주 및 숙주에 대한 영향 .....	168
6-3. 지정학적 분포 .....	168
6-4. 진단 .....	169
6-4-1. 스크리닝 방법 .....	169
6-4-2. 조직학적 진단 .....	169
6-4-3. 잠정진단법 .....	170
6-4-3. 확정진단법 .....	170
7. 참고문헌 .....	171
<b>제 4 장 결론 .....</b>	<b>173</b>
<b>제 5 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....</b>	<b>175</b>
<b>제 6 장 연구개발결과의 활용계획 .....</b>	<b>176</b>
<b>제 7 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학 기술정보 .....</b>	<b>177</b>

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

패류는 전 세계적으로 널리 식용으로 하는 양식 대상 품종인 수산생물로서, 특히 미국, 유럽 등 선진국에서는 고가로 판매되어 매우 부가가치가 높은 양식 대상종이다. 전 세계 양식 패류의 총생산량은 11백만톤으로 경제적 가치로는 99억US\$에 달하였으며, 이는 전 세계 양식 총생산량의 44%를 차지하고 있을 만큼 중요한 위치에 있다(FAO 2003). 참굴(*Crassostrea gigas*)과 참가리비(*Pecten yessoensis*) 및 바지락(*Ruditapes philippinarum*)은 전세계 품종별 양식생산량에서 각각 2위, 7위, 8위이며, 경제적 가치측면에서 각각 2위, 8위, 9위로 전세계 주요 양식종의 10위권 내에 속하고 있다(FAO 2003). 아울러, 전세계 해산양식의 총 생산량 중에서 패류는 48%를 차지하며, 해조류 44%, 어류 7%, 갑각류 1%로 패류가 해산양식 생산량에서 가장 높은 비중을 차지하고 있다(FAO 2003). 나아가 전 세계 패류 생산량의 87%가 아시아-태평양지역의 9개국(중국, 한국, 일본, 태국, 말레이시아, 필리핀, 호주, 싱가포르, 홍콩)에서 생산되고 있기 때문에, 이 지역에서의 양식 패류의 생산은 전 세계 양식생산량의 증대에 많은 기여를 할 뿐 아니라, 앞으로 아시아-태평양 지역의 경제발전에 많은 기여를 할 것으로 기대되고 있다.

전 세계적으로 본격적인 패류양식이 시작된 1970년대 이후 오늘날에 이르기까지 세계 여러 나라의 양식 패류에서 심각한 질병들이 발생하여 많은 경제적인 피해를 입히고 있다. 예컨대, 1970년대 우리나라의 서해안 백합의 대량폐사는 경제적 손실뿐만 아니라 백합서식종의 소실로 인하여 백합양식의 붕괴를 유발하여 경제적 손실이 막대하다. 비단 우리나라뿐만 아니라, 1970년대 초반 프랑스의 넙적굴이 *Marteilia refringens* (Grizel et al. 1974)에 의해 대량폐사되어 막대한 경제적 손실을 유발하였다. 또한, 1996년 하절기부터 일본 연안의 진주조개 양식장에서 양식진주조개가 대량폐사 되기 시작하여 매년 약 60%가 폐사되고 있으며, 최근 원인이 그 유래가 알려져 있지 않은 진주조개바이러스로 보고되었다(Miyazaki et al. 1999). 최근 중국의 산동성에서 양식 가리비가 대량폐사되어 생산량이 급격히 감소되고 있다(Wang, personal communication). 이러한 양식 패류의 폐사는 비단 양식어민의 경제적 손실뿐만 아니라 자연 서식자원에도 영향을 미치기 때문에 세계 각국은 자국 자원의 보호를 위하여 질병 모니터링을 지속적으로 실시하고, 심각한 전염병의 자국내 유입 차단을 위해 많은 노력을 기울이고 있다.

세계무역기구는 자국의 동물자원의 보호를 위하여 동물과 동물제품의 국제간 교류는 국제수역사무국 감독 하에서 개발된 표준의 이용, 지침과 권고사항을 따르도록 명확하게 권고하고 있다(OIE 2000). 현재 국제수역사무국에서 지정하고 있는 패류의 병원체는 10종

으로 아시아 지역에서는 4종(*Marteilioides sydneyi*, *Bonamia* sp., *Mikrocytos roughleyi*, *Perkinsus olseni*)이 보고되고 있으며, 지정 질병과 밀접한 관련이 있는 6종의 질병 원인균인 *Marteila lengehi*, *Marteilia* sp., *Marteilioides branchialis*, *Marteilioides chungmuensis*, *Haplosporidium* sp. and *Perkinsus* sp. 등이 보고되어 있다. *M. sydneyi*는 호주산 양식 *Saccostrea commercialis*를 90% 이상 폐사시켜 생산량의 40%를 감소시킨 바 있으며, *Bonamia* sp.는 1986년부터 1992년까지 뉴질랜드의 자연산 넙적굴, *Tiostrea chilensis*를 90% 폐사시켰다. 또한, *Mikrocytos roughleyi*는 뉴사우스웨일즈의 *S. commercialis*의 생산을 감소시키는 가장 심각한 기생충으로 알려져 있으며, *P. olseni*는 1972년부터 호주의 전복 폐사를 일으키는 중요한 기생충으로 보고되었다. 국제수역사무국 지정질병인 *Haplosporidium nelsoni*가 미국 서부 해안에서 일본 마쯔시마만으로 이식된 참굴에서 발견된 바 있다는 보고가 있으나, 미국의 버지니아굴과 같은 대량 폐사를 일으키지는 않았다. 그러나, 일본과 한국에서 미국으로 이식된 건강한 참굴에서 *H. nelsoni*가 대량폐사를 일으킨 바 있어 주목되고 있다. 난소기생충 *M. chungmuensis*는 호주 북부의 굴, *Saccostrea echinata*와 한국과 일본의 참굴 *Crassostrea gigas*에 감염되어 심각한 피해를 입히고 있다. 이러한 사례이외에도 중국의 가리비 대량폐사, 일본과 인도네시아 및 필리핀에서 발생한 진주조개 대량폐사와 같이 우리나라를 포함한 아시아의 여러 나라들이 지난 몇 년 전부터 패류의 유행성 질병에 의한 폐사 문제에 직면해 오고 있다. 그러나, 이러한 질병들은 치료할 수 있는 효과적인 방법은 거의 개발되어 있지 않다. 그 이유는 1) 숙주의 생리, 생태, 해부 지식 ; 2) 병원체의 생활사, 대사생리와 숙주의 방어 기작 ; 3) 관련 연구팀간의 상호 보완적인 협력 등이 결여되어 있었기 때문이다. 따라서, 완전히 외부환경에 노출된 패류양식 방법의 특성상 병원체의 감염과 확산이 용이하며, 폐사가 발생할 경우 동시다발적으로 발생하기 때문에 피해 규모는 상상을 초월하게 매우 크며, 병원체가 풍토병화 되어 지속적인 피해를 유발하게 된다.

우리나라는 아태지역에서 양식패류의 생산량이 중국에 이어 2위에 위치하고 있으나 (FAO 2003), 양식 패류의 질병 실태에 대한 체계적인 연구가 미비한 실정이다. 현재까지 알려진 보고는 체계적인 질병의 모니터링에 미치지 못하는 일시적인 연구로 주요 양식종의 질병 현황에 대한 자료가 충분하지 못한 실정이다. 따라서, 본 연구는 우리나라의 주요양식 대상종인 굴, 바지락, 참가리비, 진주담치와 진주조개에 대하여 우리나라의 실정에 적합한 질병 모니터링 방법을 개발하고, 패류의 질병을 유발하는 병원체에 대하여 제어기술을 개발하기 위하여 수행되었다.

Table 1. 2001 World Production of Marine Molluscs(FAO 2003)

Country	Species (Common name & Scientific name)	Production(mt)
China	Pacific cupped oyster( <i>Crassostrea gigas</i> )	3,490,972
	Sea mussels nei(Mytilidae)	568,305
	Yesso scallop( <i>Patinopecten yessoensis</i> )	960,294
	Blood cockle( <i>Anadara granosa</i> )	232,229
	Japanese carpet shell( <i>Ruditapes phillipinarum</i> )	2,014,426
	Constricted tagelus( <i>Sinonovacula constricta</i> )	597,374
	Marine molluscs nei( <i>Mollusca</i> )	1,248,835
Rep. Korea	Pacific cupped oyster( <i>Crassostrea gigas</i> )	174,117
	Abalones nei( <i>Haliotis spp</i> )	29
	Korean mussel( <i>Mytilus coruscus</i> )	13,653
	Yesso scallop( <i>Patinopecten yessoensis</i> )	66
	Inflated ark( <i>Scapharca broughtonii</i> )	7,359
	Blood cockle( <i>Anadara granosa</i> )	3,842
	Japanese hard clam( <i>Meretrix Iusora</i> )	26
	Japanese carpet shell( <i>Ruditapes phillipinarum</i> )	16,433
Japan	Oriental cyclina( <i>Cyclina sinensis</i> )	25
	Constricted tagelus( <i>Sinonovacula constricta</i> )	1,550
	Pacific cupped oyster( <i>Crassostrea gigas</i> )	231,490
	Yesso scallop( <i>Patinopecten yessoensis</i> )	235,613
Thailand	Clams, etc. nei( <i>Bivalvia</i> )	1,777
	Cupped oyster nei( <i>Crassostrea spp</i> )	16,100
	Green mussel( <i>Perna viridis</i> )	89,200
Malaysia	Blood cockle( <i>Anadara granosa</i> )	40,000
	Cupped oyster nei( <i>Crassostrea spp</i> )	264
	Green mussel( <i>Perna viridis</i> )	6,880
China, Taipei	Blood cockle( <i>Anadara granosa</i> )	70,816
	Pacific cupped oyster( <i>Crassostrea gigas</i> )	16,837
	Abalones nei( <i>Haliotis spp</i> )	2,496
	Japanese carpet shell( <i>Ruditapes phillipinarum</i> )	315
	Hard clam( <i>Mercernaria Mercernaria</i> )	28,164
Philippines	Clams, etc. nei( <i>Bivalvia</i> )	257
	Constricted tagelus( <i>Sinonovacula constricta</i> )	51
Australia	Slipper cupped oyster( <i>Crassostrea iredalnei</i> )	19,042
	Green mussel( <i>Perna viridis</i> )	13,513
Singapore	Cupped oyster nei( <i>Crassostrea spp</i> )	31
	Blacklip abalone( <i>Haliotis rubra</i> )	53
	Australian mussel( <i>Mytilus planulatus</i> )	2,497
China, H. Kong	Green mussel( <i>Perna viridis</i> )	2,853
Total	Pacific cupped oyster( <i>Crassostrea gigas</i> )	610
		3,952,316



Table 2. 2001 World Production of Marine Aquaculture(FAO 2003)

	Species	Production(mt)	Value(US\$'000)
Molluscs	Oysters	4,207,818	3,474,955
	Abalones	5,425	73,882
	Mussels	1,370,631	616,401
	Scallops	1,219,127	1,667,949
	Calms	3,109,024	3,465,561
	Cuttlefishes	16	66
	Marine molluscs nei	1,344,763	644,685
Crustaceans	Crabs	164,232	675,061
	Lobsters	35	1,325
	Shrimps	1,270,875	8,432,149
	Marine crustaceans nei	36,278	145,113
Marine fishes	Flounder, halibuts, soles	28,459	303,201
	Cods, hakes, haddocks	703	2,069
	Miscellaneous coastal fishes	362,265	1,769,246
	Miscellaneous demersal fishes	9,330	54,715
	Tunas, bonitos, billfishes	14,018	204,540
	Miscellaneous pelagic fishes	163,790	1,355,506
	Marin fishes not identified	512,460	399,617

Table 3. 2001 World Production by species groups(FAO 2003)

	Species	Production(mt)	Value(US\$'000)
	Carps	16,427,626	15,986,670
	Brown seaweeds	4,691,270	2,852,500
	Oyster	4,207,818	3,474,955
	Miscellaneous aquatic plants	1,219,127	1,667,949
		3,109,024	3,465,561
		16	66
	Total	1,344,763	644,685

## 참고문헌

- FAO (2003) FAO yearbook, Fisheries statistics; Aquaculture production 2001. FAO Fisheries Series, No. 64. Rome, FAO.
- Grizel H, Comps M, Bonami JR, Cousserans F, Duthoit JL, Le Pennec MA (1974) Recherche sur l'agent de la maladie de la glande digestive de *Ostrea edulis* L. *Science et Pêche*, 240, 7~30
- Miyazaki T, Goto K, Kobayashi T, Kageyama T, Miyata M. (1999) Mass mortalities associated with a virus disease in Japanese pearl oysters *Pinctada fucata martensii*. *Dis Aquatic Org*, 37, 1-12
- OIE (2000) Diagnostic manual for aquatic animal diseases, Third Edition, 2000. Office International des Epizooties, Paris, France. 237p

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

현재 국제수역사무국에서 지정하고 있는 패류의 질병은 10종으로 아시아 지역에서는 4종 (*Marteilioides sydneyi*, *Bonamia* sp., *Mikrocytos roughleyi*, *Perkinsus olseni*)이 보고되고 있으며, 지정 질병과 밀접한 관련이 있는 6종의 질병(*Marteila lengehi*, *Marteilia* sp., *Marteilioides branchialis*, *Marteilioides chungmuensis*, *Haplosporidium* sp. and *Perkinsus* sp.)이 보고되어 있다. *M. sydneyi*는 호주산 양식 *Saccostrea commercialis*를 90% 이상 폐사시켜 생산량의 40%를 감소시킨 바 있으며, *Bonamia* sp.는 1986년부터 1992년까지 뉴질랜드의 자연산 넙적굴, *Tiostrea chilensis*를 90% 폐사시킨 바 있다. 또한 *Mikrocytos roughleyi*는 뉴사우스웨일즈의 *S. commercialis*의 생산을 감소시키는 가장 심각한 기생충으로 알려져 있으며, *P. olseni*는 1972년부터 호주의 전복 폐사를 일으키는 중요한 기생충으로 보고되고 있다. 국제수역사무국 지정질병인 *Haplosporidium nelsoni*가 미국 서부 해안에서 일본 마쓰시마만으로 이식된 참굴에서 발견된 바 있다는 보고가 있으나 미국의 버지니아굴과 같은 대량 폐사를 일으키지는 않았으나, 일본과 한국에서 미국으로 이식된 건강한 참굴에서 *H. nelsoni*가 대량폐사를 일으킨 바 있어 주목되고 있다. 난소기생충 *M. chungmuensis*는 호주 북부의 굴, *Saccostrea echinata* 와 한국, 일본 등의 참굴, *Crassostrea gigas*에 감염되어 심각한 피해를 입히고 있다. 위에서 언급된 질병들 외에도 중국의 가리비 대량 폐사, 일본, 인도네시아, 필리핀의 진주조개 대량 폐사와 같이 우리나라를 포함한 아시아의 여러 나라들이 지난 몇 년 전부터 패류의 유행성 질병에 의한 폐사 문제에 직면해 있다. 국제수역사무국은 위에서 언급한 5종의 지정전염병에 대한 진단방법의 표준화를 위하여 1997년에 “Diagnostic manual for aquatic animal diseases”를 초판으로 출간한 바 있다. 이 진단지침은 전 세계의 160여개국의 국제수역사무국 회원국이 검토하여 현재까지 계속 업데이트를 하고 있다. 그러나 대부분의 패류가 아시아지역에서 생산되고 있어 아시아-태평양지역에 적합한 진단지침의 개발이 강력히 요구되어 세계식량기구(FAO)와 아시아양식기구(NACA)에서 주관하여 양식생물의 질병 전문가들이 참여하여 “Asia diagnostic guide to aquatic animal diseases”를 2001년도에 출간하여 아시아-태평양지역의 여러나라에서 활용되고 있다. 이와같이 패류의 질병에 대한 심각성과 중요성이 대두되고 있는 실정이지만 정작 우리나라의 경우 많은 패류가 생산되고 있지만 어떠한 전염성 질병이 있는지에 대한 연구는 미미한 실정이며, 국제기준에 적합한 진단기술의 개발도 없는 실정이다.

# 제3장 패류 질병 모니터링 개발

## 제 1 절 패류 질병 모니터링 표준기술 개발

### 1. 개요

패류 질병 모니터링에서 가장 어려운 과제는 질병의 진단이다. 패류는 같은 양식수산물인 어류와는 달리 유영을 하지 않고, 대부분의 시간동안 물속에 잠겨있기 때문에 질병에 감염되더라도 육안적인 판단이 곤란하다. 아울러 물속에 잠겨있는 패류의 경우 어류와는 달리 폐사가 발생하는 동안 특이한 증상이나 이상유형의 관찰이 거의 불가능하다. 나아가 패류의 경우 개방된 수계에서 양식하고 있기 때문에 전염병과 같이 일시적인 대량폐사를 일으키는 질병의 감염은 해수를 통해 광범위한 확산을 일으키며, wild population에 감염되어 자원의 폐사로 인한 소실을 유발할 수 있다. 따라서 패류는 질병이 발생한 이후의 원인구명조사 보다는 질병 감염 유무를 인지할 수 있는 질병 모니터링(Disease monitoring) 또는 건강조사(Health surveillance)를 실시하여야 한다.

우리나라의 패류양식은 시설의 설치 및 관리의 용이성, 먹이생물, 태풍과 같은 자연재해 등의 요인으로 인하여 만을 중심으로 발달되어 왔으며, 패류양식이 주류를 이루는 굴 수하식은 경남 통영 일원을 중심으로 개발되기 시작하여 경남 및 전남 일원으로 확대되었고, 생산량이 2002년 17만4천톤에 달하여 중국(349만톤), 일본(23만톤)에 이어 아시아-태평양지역에서 3번째로 많은 생산국으로 자리하고 있다. 그러나 우리나라의 패류의 질병 상황에 대한 정기적인 질병 모니터링이나 건강조사가 이루어지지 않고 있어 지속적인 패류양식을 위해서 이러한 질병 모니터링이 필요하다. 따라서, 본 연구에서는 우리나라 주요생산 품종인 굴, 바지락, 진주담치, 진주조개 참가리비 등의 질병 모니터링을 실시하여 표준 질병 모니터링 방안을 제시하고자 한다.

### 2. 재료 및 방법

#### 2-1. 시료채집

참굴, 진주담치, 진주조개, 바지락, 참가리비 등 5종의 양식 패류를 시기별, 장소별 채집하여 실험에 사용하였다(Fig. 1-1).

참굴은 통영, 거제 일원의 6개 지역을 선정하였다. 참굴은 해당 지역으로부터 2001년 9월부터 2003년 8월까지 매달 1회씩 시료를 채집하였다.

진주담치는 마산, 거제, 통영 일원의 5개 지역을 선정하였다. 진주담치는 해당 지역으로부터 2001년 9월부터 2003년 8월까지 매달 1회씩 시료를 채집하였다.

참가리비는 고성, 강릉 일원의 2개 지역을 선정하였다. 참가리비는 해당 지역으로부터 2001년 9월부터 2003년 8월까지 분기별로 1회씩 시료를 채집하였다.

바지락은 고창, 태안 일원의 2개 지역을 선정하였다. 바지락은 해당 지역으로부터 2001년 9월부터 2003년 8월까지 분기별로 1회씩 시료를 채집하였다.

진주조개는 통영, 남제주군 일원의 2개 지역을 선정하였다. 진주조개는 해당 지역으로부터 2001년 9월부터 2003년 8월까지 분기별로 1회씩 시료를 채집하였다.

## 2-2. 시료 운반

정해진 시료채집 장소에서 각각 30개체 이상을 채집하여 비닐봉투에 넣은 후 시료채집 장소와 시간 및 건강상태 등이 기록된 라벨을 봉투에 붙여 냉장상태로 실험실로 운반하였다. 시료운반은 채집된 후 비닐봉투에 넣어 냉장상태로 24시간이내에 실험실로 운반하였다. 비닐봉투에는 표본장소와 건강상태를 기록한 라벨을 붙였다.

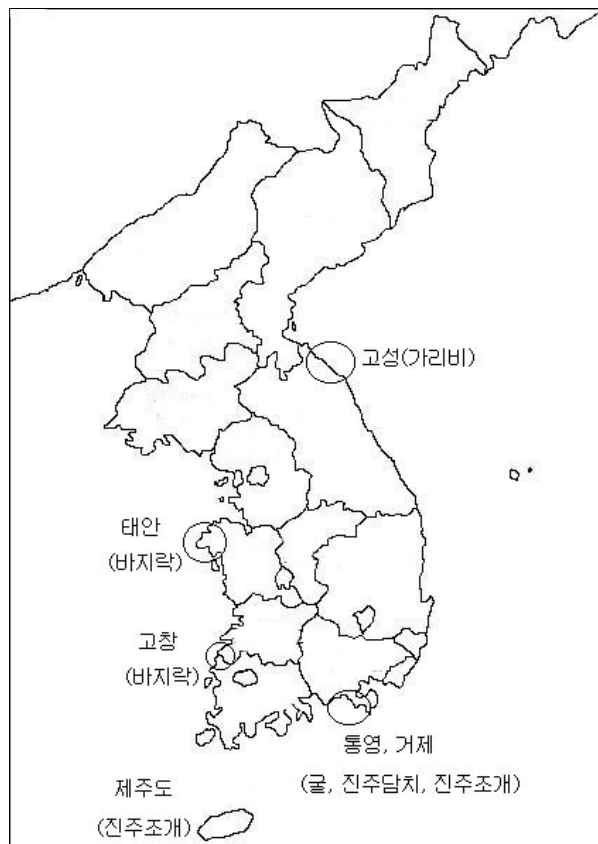


Fig. 1-1. Sampling site of molluscs

### 2-3. 육안적 검사

실험실에 도착한 시료는 패각에 부착된 이물질이나 부착생물을 깨끗하게 제거하기 위하여 플라스틱 솔로 문지른 후 해수로 세정하였다. 패각의 크기를 측정하기 위하여 버니어캘리퍼로 각장과 각고를 측정하였다. 패각을 제거 할 때는 외투막, 아가미, 심장, 소화관 조직이 상하지 않도록 조심스럽게 패각을 분리하였다. 패각이 제거된 패류의 육질부에서 비정상 조직, 상처 조직, 이상 패각체 및 패각 천공 생물 및 외투막에 서식하는 특이생물이 있는지 조사하여 기록하였다.

### 2-4. 조직학적 검사

시료의 세포와 조직을 광학현미경적으로 검사하기 위하여 조직학적 검사를 수행하였다. 조직을 알맞은 크기로 잘라 여러 가지 단계(고정, 탈수, 투명화, 포매, 세절, 염색 및 봉입)를 거쳐 검사를 수행하였다. 조직 고정은 살아있는 상태의 형태를 유지하기 위하여 최대한 빠른 시간 내에 고정액에 고정하였다. 고정액은 Davidson용액과 Carson용액을 사용하였다. 조직관찰용 시료로 사용될 부분을 Davidson용액에 고정하여 사용하고, 남은 부분은 Carson용액에 고정하여 보관하였다. 산란시기의 시료는 점액물질이 다량 분비되어 조직의 고정을 방해하기 때문에 고정액 통을 잘 흔들어 점액물질을 떨어뜨린 후 새로운 고정액으로 교체하였다. 고정이 끝난 시료는 70~100% 알콜로 단계적으로 처리하여 탈수시킨 후 크실렌을 처리하여 투명화 시켰다. 투명화된 시료는 60°C의 파라핀 용액에 넣어 포매하였다. 포매한 블록을 콜드플레이트에 놓고 경화시킨 후 마이크로톰으로 2~3  $\mu\text{m}$ 로 잘라 슬라이드글라스에 붙여 60°C에서 하룻밤 방치하였다. 파라핀을 제거하기 위하여 크실렌에 10~20분간 슬라이드글라스를 담귀둔 후 알콜 100%에 10분(2회) 처리하여 흐르는 수돗물에 10분간 담귀서 rehydration 시켰다. 염색은 haematoxylin과 eosin으로 대비염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

### 2-5. 전자현미경적 검사

생체조직을 3~4 mm로 잘라 3% glutaraldehyde에 넣고, 4°C에서 1시간동안 고정한 다음 cacodylated buffer로 3회 씻고, 1% osmic acid로 후고정하여 cacodylated buffer로 2회 세척하였다. Carson용액에 고정한 조직은 3% glutaraldehyde에 고정하기 전에 cacodylated buffer로 매일 2회씩 7일간 씻음. 탈수는 에탄올을 이용하고, 마지막으로 propylene oxide로 투명화하여 Epon에 포매하였다. Semi-thin은 0.5~1  $\mu\text{m}$ 로 잘라 1% toluidine blue로 90~100°C에서 염색하여 공기중에 말린 후 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다. Ultrathin은 80~100 nm로 잘라 copper grid에 올려 uranyl acetate와 lead citrate로 염색하여 전자현미경으로 관찰하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3-1. 시료 채집

패류의 질병 모니터링을 위해서 가장 중요한 점은 시료의 개체수가 충분히 많아야 한다는 점이다. Table 1-1은 개체군의 수에 대하여 감염율별 필요한 시료의 개체수를 표시한 것이다. 개체군의 수가 50마리인 경우 2%의 감염율을 검출하기 위해서는 46개체를 채집하여야 하며, 5%의 감염율을 검출하기 위해서는 29개체를 채집하여야 한다. 주로 패류의 개체군이 1,000,000마리를 초과하기 때문에 시료의 채집수는 2%, 5% 및 10% 감염율인 경우 각각 150개체, 60개체 및 30개체를 채집하는 것이 적당하다(Ossiander & Wedemeyer 1973). 그러나 질병 모니터링의 대상이 패류로서 서식지가 바다라는 개방된 환경일 경우, 질병을 유발하는 병원체나 carrier의 적정 감염율에 적합한 95%의 신뢰도를 만족할 수 있는 시료의 채집량은 최소한 150 개체 이상이 되어야 한다고 권고하고 있다(OIE 2000). 이러한 권고에 따라 통영과 거제와 같은 굴양식 밀집지역을 조사할 경우 시료의 수는 각 지점별 150개체씩 해야 한다. 따라서 6지점을 조사한다면 900개체를 매회 조사하는 것이 된다. 이러한 물량의 처리는 상당한 소요시간과 인원 및 비용이 필요하기 때문에 채집 시료의 수에 대한 조정이 필요하다. 따라서 본 연구에서는 통영과 거제 일원의 6개 지점에서 30개체씩을 매월 채집하여 모니터링을 실시하였다. 시료에 대한 질병 조사 결과를 통하여 시료의 개체 수에 대한 고찰을 통해 적정 시료의 수를 제시하고자 한다.

시료의 채집에서 시료의 개체수 만큼 고려되어야 하는 다른 사항은 연령이다. 검출대상의 질병이 보다 진단이나 검출이 용이하도록 연령이 고려되어 시료를 선택하여야 한다. 예컨대, 1년생의 패류에는 거의 감염이 되지 않고 주로 2년생 이상에서 감염되는 질병의 경우 2년생의 패류를 채집하는 것이 적절하다.

Table 1-1. Sample size based on assumed pathogen prevalence in lot(Ossiander & Wedemeyer 1973)

Lot size	Prevalence(%)			
	1	2	5	10
50	46	46	29	20
100	93	76	43	23
250	156	110	49	25
500	223	127	54	26
1000	256	136	55	27
2500	279	142	56	27
5000	288	145	57	27
10000	292	146	57	27
100000	296	147	57	27
1000000	297	147	57	27
>1000000	300	<b>150</b>	60	<b>30</b>

### 3-2. 시료 운반

채집된 시료는 살아있는 상태로 실험실에 운반하기 위하여 냉장상태로 운반하였으며, 패각이 손상되지 않도록 충격에 유의하였다. 운반하는 도중에 오염을 방지하기 위하여 패각을 신선한 해수로 충분히 씻은 후 깨끗한 비닐봉지에 시료를 담았다. 시료의 운반 시 여러 개의 시료가 섞여서 혼동의 가능성을 배제할 수 없기 때문에 각 시료의 라벨링을 철저히 해야 하며, 물에 젖더라도 손상되지 않도록 주의를 기울려야 한다.

### 3-3. 육안적 검사

실험실에 운반된 시료는 패각을 제거하기 전에 먼저 패각에 묻어있는 이물질의 오염이나 펄을 제거한 후 깨끗한 해수로 시료를 세정하였다. 패각을 제거할 때는 패각이 깨지지 않고, 패각 속의 생물이 손상을 받지 않도록 최대한 조심스럽게 패각을 열고, 패각 속의 생물의 형태학적 변이를 관찰하였다.

### 3-4. 조직학적 검사 및 전자현미경적 검사

패류 질병 모니터링을 통하여 관찰된 조직학적 검사 및 전자현미경적 검사의 결과는 다음과 같다.

참굴의 조직학적 검사 결과 생식소내에서 시기와 장소에 따라 차이는 있으나 난소기생충의 감염이 특징적으로 나타났다. 난소기생충의 감염은 주로 oocyte의 세포질에서 일어나며, 난소기생충이 감염된 oocyte는 비정상적인 발달이 특징적이었다. 이러한 난소기생충의 감염은 현재까지 굴에서만 알려져 왔으나 본 연구 결과 진주담치에서도 감염이 확인 되었다.

참굴에서는 현재까지 전혀 알려져 있지 않은 Mycoplasma의 감염이 확인되었다. Mycoplasma는 매우 작은 prokaryotic기생체로서 세포벽이 전혀 없고, 단지 이중막인 원형질막으로 둘러싸여진 미생물의 일종이다. Mycoplasma의 감염 부위는 세포질 내에서 일어났으며, 형태는 단간형과 장간형 또는 구형도 관찰이 되었다. 주로 관찰된 감염부위는 간체장 상피세포의 세포질이었다. 심하게 감염된 세포의 경우 세포내 소기관은 관찰되지 않았고 미트콘드리아와 ribosome만 관찰되었다.

참굴의 생식소조직에서 비대세포의 출현이 관찰되었다. 생식소의 호염기성 봉입체로 관찰되는 이 질병의 증상은 여러 가지 형태의 봉입체의 유형이 관찰되었으며, 플겐반응과 phloxine 반응에서 모두 양성반응을 나타내었다. 봉입체의 크기는 매우 다양하였으며, 직경이 15  $\mu\text{m}$ 에서 큰 것은 60  $\mu\text{m}$ 이상도 관찰되었다. 이 봉입체를 전자현미경적으로 미세구조를 관찰한 결과, 봉입체내에 envelop이 없는 정20면체의 바이러스 입자가 가득차 있었다. 이러한 형태학적인 특징은 Papovavirus와 유사하였다. 이러한 papovavirus의 감염증상은 참굴뿐만 아니라 진주담



치의 생식소에서도 관찰되었다.

참굴의 체표면에 녹색은 침착물이 형성되어 나타나는 녹색굴 현상을 전자현미경적으로 관찰한 결과 직경 130 nm의 이리도바이러스가 세포내에 감염된 것이 관찰되었다. 이러한 이리도바이러스는 OVVD를 유발하는 이리도바이러스에 비하여 현저히 적은 크기를 가지고 있었다.

진주담치의 아가미 조직에 혈구의 침착이 일어나며, 이러한 혈구들이 비정상적인 핵의 형태를 가지고 있었다. 비정상적인 핵의 형태는 핵인이 가장자리로 몰려있거나 심하게 응집된 증상이었다. 전자현미경적 관찰 결과, Herpesvirus는 관찰되지 않았으나 PCR 검사결과 Herpesvirus의 감염이 확인되었다 .

진주조개의 조직학적 검사결과, 근섬유의 연화와 괴사, 난세포 핵의 초자적 변성, 소화맹난의 위축, 소화맹난 내의 봉입체 등이 관찰되었으며, 이러한 증상을 가진 개체들의 PCR 검사결과 버나바이러스의 감염이 확인되었다.

바지락의 아가미와 멘틀을 비롯한 대부분의 내부조직에서 *Perkinsus atlanticus*의 감염이 병리조직학적 검사결과 확인되었다.

이러한 조직학적 및 전자현미경적 검사 결과는, 질병별 유형과 특징이 모두 다르기 때문에 각 질병별로 분류하는 것이 바람직 할 것으로 생각되어 다음 장부터 각 질병별로 작성하기 때문에 각 질병에 대한 결과를 참고하시기 바랍니다.

#### 4. 참고문헌

- OIE (2000) Diagnostic manual for aquatic animal diseases, Third Edition, 2000. Office International des Epizooties, Paris, France. 237p
- Ossiander FJ, Wedermeyer G (1973) Computer program for sample size required to determine disease incidence in fish populations. J. Fish. Res. Board Can., 30, 1383-1384

## 제 2 절 참굴의 난소 기생충 질병

### 1. 서 론

난소기생충인 *Marteilioides chungmuensis*는 참굴 *Crassostrea gigas*의 난소의 세포질 내에서 관찰된다. 이 기생충은 Bae et al.(1976)이 충무 근해산 참굴에서 발견하여 보고하였으며, 전(1970, 1979)이 김해 녹산의 굴 양식장과 진해만 및 거제만의 굴 수하식 양식장의 양식 굴에서 발견하여 보고한 바 있다. 이 기생충은 Phylum Asctospora Sprague에 속하며, 주로 난소의 세포질 내에 감염되며, 크기는 직경 3~3.5 mm이다(Comps et al. 1986). 이 기생충에 감염된 굴은 육안적으로 관찰이 가능할 정도로 비정상적인 형태변화를 일으키며, 심한 경우 굴은 물굴화되고 난소는 흑과 같은 덩어리를 형성하게 되므로 상품성을 잃게 된다.

난소기생충이 굴의 번식에 미치는 영향은 난자를 피사 시킬 뿐 만 아니라 수정란의 정상적인 발생과 발달을 저해시키기 때문에 참굴의 양식 산업에 중요한 질병이다(Park et al. 1999). 따라서 이 기생충은 한국의 남해안 연안의 양식 참굴의 가장 심각한 질병의 원인체이다(Park et al. 2003).

지난 10여년간의 난소기생충에 대한 감염을 조사 결과 이 기생충이 남해, 서해 및 동해 연안의 주요 양식굴로 확산되어 있는 것으로 나타나 심각성을 더하고 있다(Bae et al. 1976, Chun 1970, Park & Chun 1989, Park et al. 1999). 더욱이, 이 기생충의 출현시기가 주로 난소가 발달하는 5~9월이었으나 근래 출현시기가 연중 나타나는 경향을 보이고 있다(Park et al. 2003).

따라서 본 연구는 남해안 연안의 양식굴에 감염된 난소기생충의 특성을 파악하고, 숙주에 대한 영향과 감염 분포 등을 밝혀 제어기술을 개발하기 위한 기초자료로 제공하고자 수행하였다.

### 2. 재료 및 방법

#### 2-1. 시료채집

참굴을 통영, 거제 일원의 6개 지역에서 2001년 11월부터 2003년 8월까지 매달 1회 씩 각 지점에서 30개체 이상을 채집하여 비닐봉투에 넣은 후 시료채집 장소와 시간 및 건강상태 등이 기록된 라벨을 봉투에 붙여 냉장상태로 실험실로 운반하였다. 시료운반은 채집된 후 비닐봉투에 넣어 냉장상태로 24시간 이내에 실험실로 운반하였다. 비닐봉투에는 표본장소와 건강상태를 기록한 라벨을 붙였다.

## 2-2. 육안적 검사

실험실에 도착한 시료는 폐각에 부착된 이물질이나 부착생물을 깨끗하게 제거하기 위하여 플라스틱 솔로 문지른 후 해수로 세정하였다. 폐각의 크기를 측정하기 위하여 버니어캘리퍼로 각장과 각고를 측정하였다. 폐각을 제거 할 때는 외투막, 아가미, 심장, 소화관 조직이 상하지 않도록 조심스럽게 폐각을 분리하였다. 폐각이 제거된 패류의 육질부에서 비정상 조직, 상처 조직, 이상 폐각체 및 폐각 천공 생물 및 외투막에 서식하는 특이생물이 있는지 조사하여 기록하였다.

## 2-3. 조직학적 검사

시료의 세포와 조직을 광학현미경적으로 검사하기 위하여 조직학적 검사를 수행하였다. 조직을 알맞은 크기로 잘라 여러 가지 단계(고정, 탈수, 투명화, 포매, 세절, 염색 및 봉입)를 거쳐 검사를 수행하였다. 조직 고정은 살아있는 상태의 형태를 유지하기 위하여 최대한 빠른 시간 내에 고정액에 고정하였다. 고정액은 Davidson용액과 Carson용액을 사용하였다. 조직관찰용 시료로 사용될 부분을 Davidson용액에 고정하여 사용하고, 남은 부분은 Carson용액에 고정하여 보관하였다. 산란시기의 시료는 점액물질이 다량 분비되어 조직의 고정을 방해하기 때문에 고정액 통을 잘 흔들어 점액물질을 떨어뜨린 후 새로운 고정액으로 교체하였다. 고정이 끝난 시료는 70~100% 알콜로 단계적으로 처리하여 탈수시킨 후 크실렌을 처리하여 투명화시켰다. 투명화된 시료는 60°C의 파라핀 용액에 넣어 포매하였다. 포매한 블록을 콜드플레이트에 놓고 경화시킨 후 마이크로톰으로 2~3  $\mu\text{m}$ 로 잘라 슬라이드글라스에 붙여 60°C에서 하룻밤 방치하였다. 파라핀을 제거하기 위하여 크실렌에 10~20분간 슬라이드글라스를 담귀둔 후 알콜 100%에 10분(2회) 처리하여 흐르는 수돗물에 10분간 방치하였다. 염색은 haematoxylin 과 eosin으로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

## 2-4. 전자현미경적 검사

생체조직을 3~4 mm로 잘라 3% glutaraldehyde에 넣고, 4°C에서 1시간동안 고정한 다음 cacodylated buffer로 3회 씻고, 1% osmic acid로 후고정하여 cacodylated buffer로 2회 세척하였다. Carson용액에 고정한 조직은 3% glutaraldehyde에 고정하기 전에 cacodylated buffer로 매일 2회씩 7일간 씻음. 탈수는 에탄올을 이용하고, 마지막으로 propylene oxide로 투명화하여 Epon에 포매하였다. Semi-thin은 0.5~1  $\mu\text{m}$ 로 잘라 1% toluidine blue로 90~100°C에서 염색하여 공기중에 말린 후 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다. Ultrathin은 80~100 nm로 잘라 copper grid에 올려 uranyl acetate와 lead citrate로 염색하여 전자현미경으로 관찰하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3-1. 난소 기생충 질병의 모니터링

##### 3-1-1. 난소기생충의 감염실태

2001년 11월부터 2003년 9월 까지 경남 통영과 거제지역의 6개소(Fig. 2-1)에서 채집한 참굴을 병리조직학적 방법을 통하여 난소기생충의 감염여부를 검사한 결과, 난소기생충의 감염율은 채집한 시기와 장소에 따라 차이를 보였다. Fig. 2-2에서 보는 바와 같이 station 6에서는 전혀 검출이 되지 않았으나 그 외 station 1, 2, 3, 4, 5에서는 연중 0~36.4%의 감염율을 나타내었다. 시기별로 보면 2001년 11월~2002년 2월까지 전 지역에서 전혀 감염되지 않았으며, 또한 2003년 3월~2003년 6월 까지 전 지역에서 전혀 감염개체가 나타나지 않았다. 그 외 기간동안의 난소기생충의 감염율을 보면 2002년 6월~2002년 10월 까지 station 1, 2, 4의 시료에서 난소기생충의 30%이상의 감염율이 관찰되어 검사기간 중 가장 높은 감염율을 보였다. 장소별 난소기생충의 감염율을 분석한 결과, 연중 평균 감염율은 station 6가 0%로 가장 낮게 나타났으며, station 3이 0.51%, station 5이 1.89%, station 4가 3.03%, station 2가 8.85% station 1이 10.37%의 순으로 나타나 station 1이 연중 평균 감염율이 가장 높았다. 지역별 감염율의 차이에 대한 보고는 일본의 경우, 히로시마현 부근 양식장에 있어서의 난소기생충 감염굴 조사에서는 종래의 굴 양식에 그다지 좋은 조건이 아닌 고염, 빈영양 해역인 히로시마 동부에 위치한 양식장에 많이 발생하며, 저염, 부영양 해역으로 굴 성육에 적합한 히로시마 서부 해역에서는 적게 발생하였다고 보고되었으며, 감염굴 발생이 전혀 없는 히로시마 주변에서 채묘한 것을 히로시마현 동부 해역으로 이식해, 성장시킨 것은 난소기생충 출현율이 높다

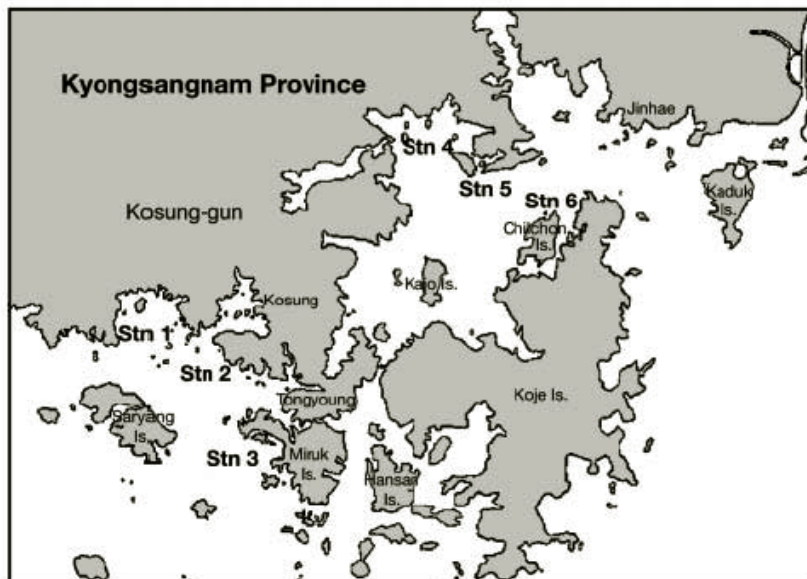


Fig. 2-1. Map showing the sampling stations of Pacific oysters.

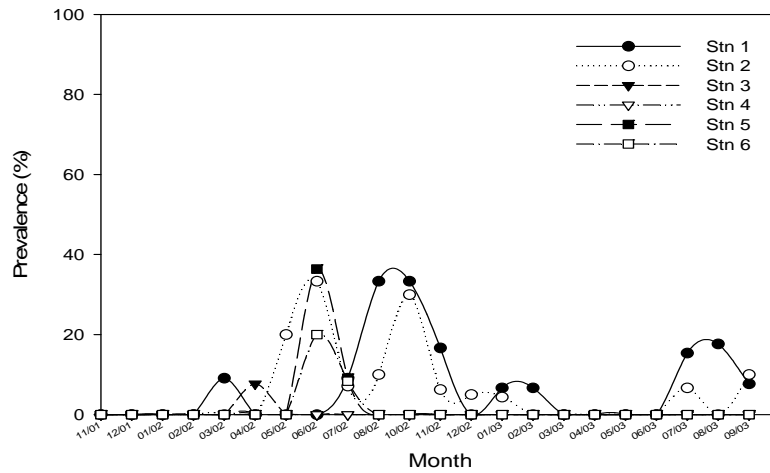


Fig. 2-2. Prevalence of *Marteilioides chungmuensis* in Pacific oyster *Crassostrea gigas* from 6 sites in the Tongyoung & Geoje(n=30)

고 보고되었다(Matsuzato et al. 1977). 그러나, 본 연구 결과에서 나타난 난소기생충의 지역별 감염율의 차이는 계속 연구되어야 할 과제인 것으로 추정된다. 본 연구기간동안 관찰된 난소기생충은 통영, 거제지역의 양식굴에 연중 감염되는 것으로 나타났으며, 감염율의 변화를 보면 성 성숙이 급속히 진행되는 5월 이후 20%의 높은 감염률을 보이면서 6~8월 산란기에 30% 이상의 감염률을 관찰 할 수 있었으며, 특히 주 산란 직전인 7월에 36%까지 감염율이 증가되었다. 또한 생식소의 퇴화기인 10월까지도 약 30%의 비교적 높은 감염률을 보였으며, 11월을 기점으로 감소하는 경향을 나타내었다. 이러한 난소기생충 감염율의 변화는 산란과 밀접한 연관성이 있음을 추정할 수 있었다.

난소기생충은 한국의 남해, 서해 및 동해 연안의 주요 굴 양식장에서 채집된 굴의 난소 내에서 확인된바 있어 지역적으로 광범위하게 확산되어 있는 것으로 나타났다(Bae et al. 1976, Chun 1970, 1979, Park & Chun 1989, Park et al. 1999). 난소기생충의 감염률은 지역별, 시기별 다소 차이가 있으나 5월부터 수온이 상승하면서 감염률도 증가되는 경향을 보였으며 8~9월에 최고 감염률을 나타내었다(Park et al. 1999). 난소기생충의 감염률이 10월을 기점으로 감소하는 경향을 나타내는 것은 난소기생충에 감염된 개체가 난 방출 후 쇠약해진 상태에서 폐사하는 것과 연관이 있는 것으로 추측할 수 있다.

난소기생충의 감염률은 1980년대 후반에는 8.3%까지 감염되었으며(Elston 1993), 차츰 해마다 증가하고 있으며, 감염시기 역시 산란기에서부터 연중감염으로 확산되고 있으나(Park 2002), 본 2001~2003년도의 연구결과에서는 연중 감염되는 것은 확인되나 연중 평균 감염율은 비교적 낮게 나타났다.

### 3-1-2. 난소기생충이 숙주에 대한 영향 - 병리조직학적 변화

일반적으로 *Marteilioides chungmuensis*에 감염된 굴에서는 생식소부위에 난 덩어리가 군데군데 뭉쳐져 있는 것을 관찰 할 수 있으며, 이 뭉쳐진 난 덩어리는 작은 것은 2~3 mm, 큰 것은 10~15 mm로 그 수도 1~2개 인 것에서부터 많은 것은 15~20개에 이른다. 이러한 결절부는 일반적으로 표면이 매끄럽게 부풀어 오르고, 유백색에서 황백색으로 관찰된다. 때로는 1개체에서 여러 개의 평편한 좁쌀 같은 융기가 나타나 정상적인 굴과 구별하기 힘들 때도 있으며, 결절부 이외의 연체부는 일반적으로 탄력이 적고 충실치 못한 물갈 상태로 되며, 아가미 새엽의 퇴색이나 부종이 관찰되기도 한다(Fig. 2-3).

이러한 결절 조직은 주로 난소로부터 시작되며, 이 생식소 조직을 슬라이드 글라스에 도말하여 광학현미경적으로 관찰하거나(Fig. 2-4A), Hemacolor 염색 시(Fig. 2-4B), 정상적인 난 형성 과정과 비교해 볼 때, *M. chungmuensis*에 감염된 난소는 정상적인 발달이 되지 못하고, 미성숙란으로 도태되거나 세포질 내에서 가장자리로 밀려나 있으며, 감염된 개체는 변성된 난세포의 세포질 내에서 핵을 가진 구형의 세포가 단일체 혹은 2~4개가 한 겹의 막에 싸여 난소 내 대량증식 관찰되었다.

*M. chungmuensis*는 광학현미경적인 관찰 결과 산란기에 높은 감염율과 다양한 형태의 기생충이 관찰되었다. 난세포의 세포질 내에서 1개에서 6개의 기생충이 모여 1개의 큰 공포를 형성하고 있는 것을 볼 수 있으며, 이들 기생충은 핵과 1개 또는 2개의 강한 호염기성의 작은 구형의 세포를 함유하고 있다. 기생충의 크기는 2.5~20.9  $\mu\text{m}$ 로 다양하게 관찰되었는데, 이러한 크기의 차이는 이 기생충의 성장과 분열로 인해 나타나는 것으로 추정되었다(Fig. 2-5,6). 또한 이 기생충의 광학현미경적 특징은 기생충의 세포질은 호염성, 핵은 호산성을 띤다(Fig. 2-6). 대개의 감염체는 성숙한 굴의 난모세포에서 각 primary cell 내에서 2개의 sporants (secondary cells)를 포함하며, 각 developing spore을 가지고 있다. primary cells은 3~6개의 sporants(각각 developing spore을 가지고 있음)을 포함하고 있으나, 드물게 관찰 된다(Fig. 2-7,8).

산란이 완전히 종료되는 10~11월의 조직표본에서는 미발달한 난모 세포로 차 있으며, 난황 과립을 가진 대형의 성숙한 난모 세포를 제외하고는 난모세포의 세포질에서 *M. chungmuensis*이 관찰되었으며, 이렇게 감염된 난이 생식소 내에 남아 있는 경우에는 여포주위에서 강한 혈구성 침윤과 난소의 붕괴 및 사멸되는 것(Fig. 2-9,10)을 관찰할 수 있었다. 12월 이후 숙주로부터 방출된 난소기생충은 아가미 주위에서 관찰되었다(Fig. 2-11,12). 이는 재감염 하기 위한 현상으로 추정된다. Imanaka 등(2001)은 매우 작은 미성숙 난에서 이 기생충의 감염되어 있어 초기 발생단계에서 감염이 일어나는 것으로 추정한 바 있다. 그러나 본 연구 결과에서 나타난 조직학적 결과는 이미 난소기생충에 감염된 oocyte가 숙주로부터 방출되는 것으로 추정된다.



Fig. 2-3. Large nodules on the surface of the soft tissues of *C. gigas* caused by infection with *M. chungmuensis*.

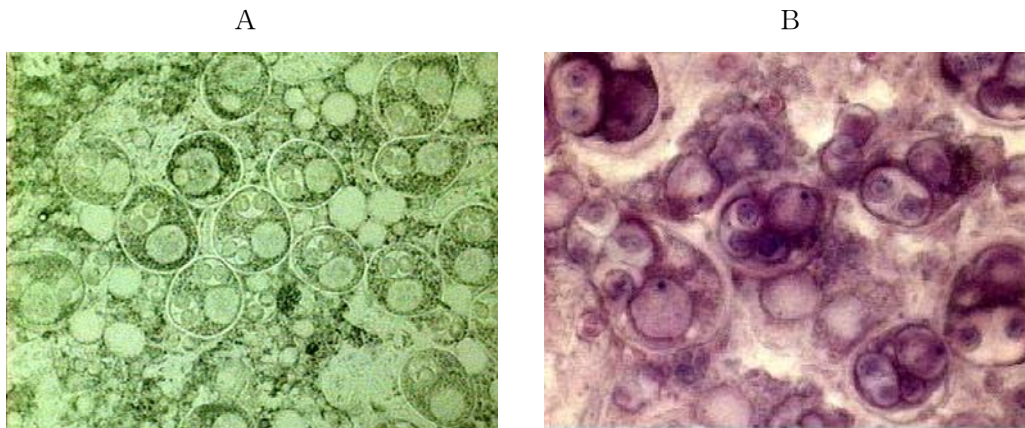


Fig. 2-4. Microscopical observation of *Marteilioides chungmuensis*-infected tissue. Unstained(A) and Hemacolor stained(B)

왜냐하면, oocyte에 감염된 난소기생충이 난소기생충을 둘러싼 막을 터뜨리고 방출되는 것이 아니라 굴의 생식소에 감염된 형태와 동일한 Fig. 2-11,12와 같은 형태로 방출되기 때문이다.

*M. chungmuensis*에 감염된 굴은 산란 후 쇠약한 굴에 기생하여 난소를 용해시키고, 나아가서는 굴을 죽게 된다고 보고되었으며(Matsuzato et al. 1977, Matsuzato & Masumura 1988, Park & Chun 1989), 또한 난소에 감염되어 난자를 괴사시킬 뿐만 아니라 수정란의 정상적인 발생과 발달을 저해시키는 것으로 보고하였다(Park 1999). 또한 *M. chungmuensis*가 굴에 영향을 미치는 병원체라고 보고한 바 있다(Imai et al. 1968, Chun 1979). *M. chungmuensis*는 산란이 완전히 종료되는 10월과 11월에도 참굴의 난소 내에서 관찰되며(Park & Chun 1989),



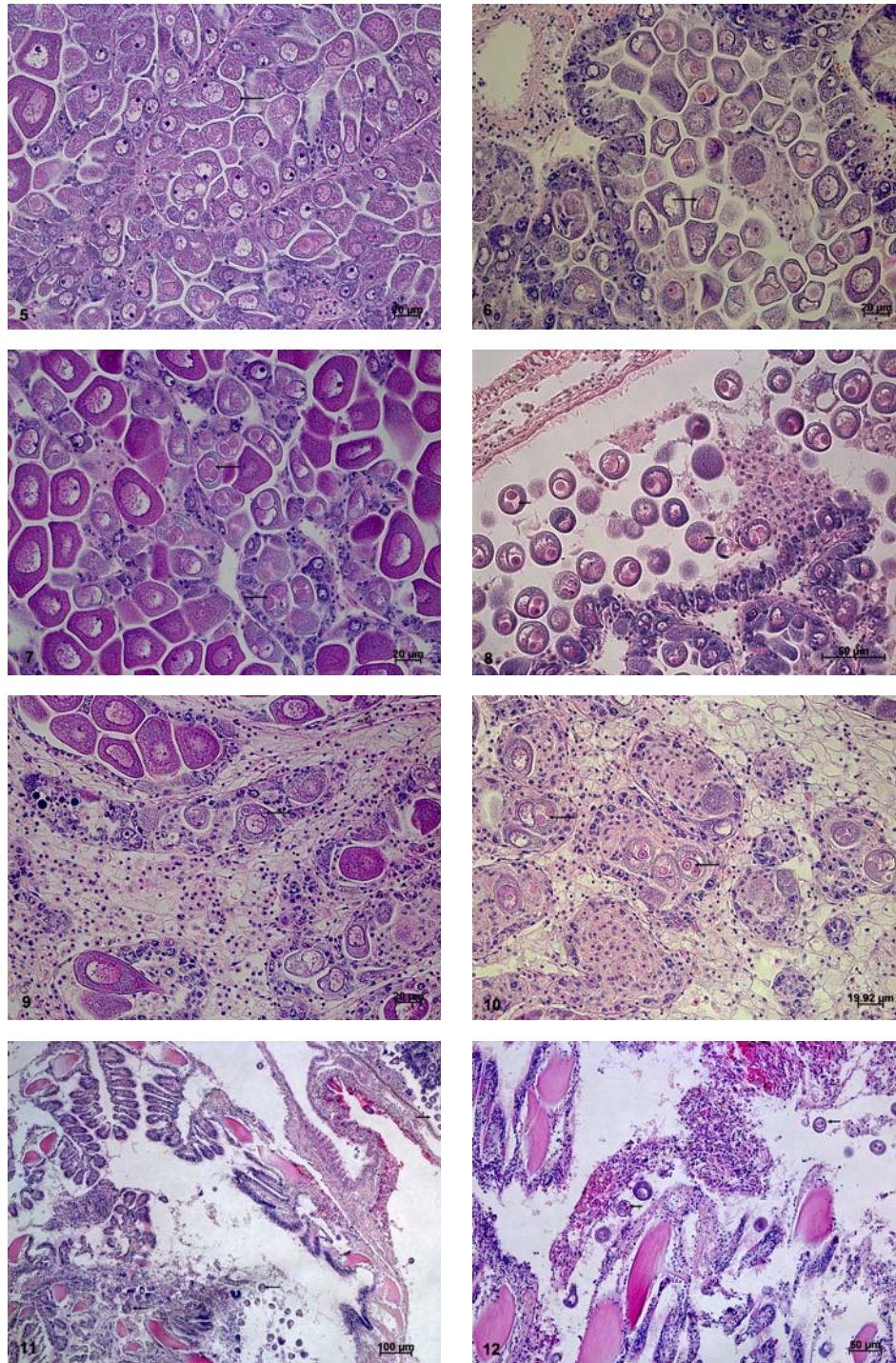


Fig. 2-5~12. Histological observations of *M. chungmuensis* infected in *C. gigas*. 5. Mal-development of oocyte infected with *M. chungmuensis* was shown. 6. The parasite in the oocyte showed eosinophilic cytoplasm and basophilic nucleus. 7. 2 to 3 sporants was observed in the oocyte. 8. 6 sporants in a oocyte. 9. Hemocyte infiltration observed around infected oocytes. 10. Heavy infiltration of hemocyte and inflammatory response was shown around infected oocytes. 11,12. Sporulated parasites near gill



정상적인 난 형성과정과 비교하여 볼 때 특이한 현상을 나타내며, 특히 *M. chungmuensis*에 감염된 굴의 생식소에 있어서는 정상적인 성숙난소와는 달리 여포주위에서 강한 혈구성 침윤을 관찰할 수 있으며, 일부 정상적인 난세포는 흡수 되고 있는 것을 볼 수 있다고 하였다 (Park & Chun 1989). 이러한 혈구성 침윤은 본 연구에서도 자주 관찰이 되며, 과다하게 침윤된 혈구들에 의해 정상적인 난세포마저도 탐식되는 것을 관찰 할 수 있었다. 바지락에서는 다양한 성숙단계의 *Marteilioides*-like organism이 난세포의 세포질에서 대량 발견되었으나, 현저한 조직학적 변화는 관찰되지 않았으며, 감염된 난세포주위로 강한 혈구성침윤이 관찰되었으나(Lee et al. 2001), Dorange & Le Penec(1989)와 같이 단순한 산란기 이후의 정상적인 생리적 반응으로 보고하였다. 이러한 혈구가 비정상적으로 조직내에 침윤하는 현상은 기생충 감염이외에도 각종 스트레스 요인에 의한 반응으로 알려져 있다. 패각손상, 수온 상승(Feng 1965) 및 탄화수소류의 오염(Afferent 1988, Weinstein 1997)에 의하여 각종 내장 결합조직에 혈구가 침윤한다고 보고되고 있다.

Ogasawara et al. (1962)은 감염난 세포는 핵 및 원형질 괴사 등이 일어나므로 수정이 불가능할 것으로 보고한 바 있다. 난소기생충에 감염된 난과 동일 생식소에 감염난과 함께 있었던 정상난을 대상으로 인공 발생 실험을 실시한 결과, 난소기생충 감염난은 수정이 불가능하였으며, 동일 생식소에 감염난과 함께 있었던 정상난은 가능하였으나, 80% 이상이 형태적으로 비정상적인 발생을 하였으며, 초기 각정기에서 전량 폐사하였다고 보고한 바 있다(Park et al. 1999). 감염된 난자는 genital canal를 통해 방출되거나 난소 내 여포에 남아있게 되는데, 이 기생충은 감염된 굴의 reproductive output에 많은 영향을 미친다. 감염은 산란의 지연과 난소의 성숙을 방해함으로써 산란을 실패하게 만든다고 보고하였다(Ngo et al. 2003). 그러나 난소기생충에 감염된 굴이 이 기생충의 감염으로 인하여 폐사에 까지 이른다는 것이 실험적으로 입증된 보고는 아직까지 없다.

*M. chungmuensis*에 감염된 참굴은 산란기가 지난 후, 글리코겐이 축적되어 살이 차기 시작하는 11월과 12월까지도 물굴 상태로 있었으나 기타 소화작용이나 위상피조직 등은 정상적인 것으로 나타났다. 그러나 *M. chungmuensis*에 감염된 비정상적인 난이 밖으로 배출되어 바지락(Lee et al. 2001)에서 다양한 성숙단계의 *Marteilioides*-like organism이 관찰되듯이 타 생물체에 침입하는지는 금후 면밀한 연구가 필요하다고 생각된다.

### 3-1-3. 난소기생충의 미세구조 - 전자현미경적 관찰

semi-thin section의 관찰시 난세포의 세포질 내에서 1개에서 6개의 기생충이 모여 1개의 큰 공포를 형성하고 있는 것을 볼 수 있다. 이들 기생충은 핵과 1개 또는 2개의 강한 호염기성의 작은 구형의 세포를 함유하고 있다(Fig. 2-13).

전자현미경적 미세구조를 연구한 결과, 직경 4~12  $\mu\text{m}$ 에 달하는 둥근 세포형태인 *M. chung*

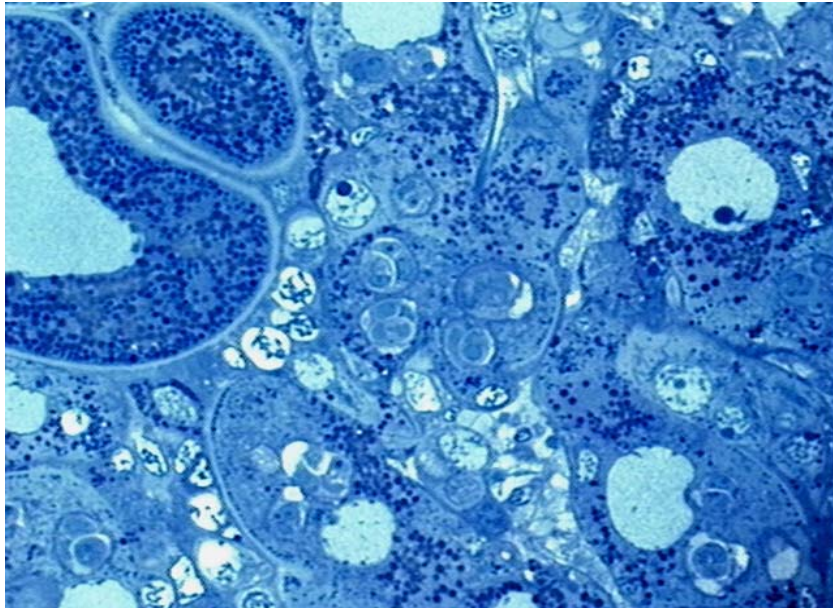


Fig. 2-13. Observation of semi-thin section of oocytes infected with *M. chungmuensis*(1% Toluidine-blue stain)

*muensis*는 암컷의 성세포의 세포질 내에 기생한다. 초기 기생충은 길이 4~7  $\mu\text{m}$ 와 크기 3~4  $\mu\text{m}$ 의 난형이며, 1차 세포의 세포질 내에는 풍부한 ribosome과 haplosporosome이라 불리는 크기 100~150 nm에 달하는 난형의 dense particle이 관찰된다(Fig. 2-14). 감염된 일차세포는 숙주의 세포질 내에서 분열 증식하여 3개의 2차세포를 형성하여 방출되는 것으로 추정되었으며, 2차세포가 또 다른 3차 포자를 형성하는 것이 관찰되었다. 1차 세포의 세포질 내에 있는 난형의 2차 세포는 크기 2.5~3.5  $\mu\text{m}$ 로 2차 세포의 핵은 원형질로 둘러 싸여져 있으며, 2차 세포의 세포질 내에서는 mitochondria와 많은 ribosome이 있는 것을 관찰할 수 있었으나, *Marteilia sp.*의 성장과정에서 관찰되는 paraclastaline(=striated inclusion)는 관찰되지 않았으며, mycoplasma로 추정되는 입자가 발견되었다. 난세포 내에 기생하는 mycoplasma 입자에 대한 구체적인 연구 보고는 아직 없는 실정이므로, 이러한 mycoplasma 입자에 대한 생물학적 동정 및 숙주세포에 미치는 영향 등에 대한 구체적인 조사연구가 필요하다(Fig. 2-15). 초기형태로부터 발달된 기생충은 외생발아에 의해 1차 세포내에 2개의 새로운 2차 세포를 함유하게 되며, 나아가서는 이미 haplosporosome이 생성되어 있는 2차 세포내에 내성발아에 의해 3차 세포를 형성하게 된다.

Egg disease를 유발하는 *M. chungmuensis* 즉, 난소 내 기생충에 관한 초기의 보고에서 Imai 등(1968)은 난소 내 기생충이 'amoeboid parasite'와 유사한 특징을 나타낸다고 하였으며, 그 후 Matsuzato 등(1977)은 난소 내 기생충의 미세구조학적인 연구를 실시하였으나 분류학적으로 정확한 결론을 내리지 못한 것으로, 1979년 전은 난소 내 기생충에 관한 연구에서 이것

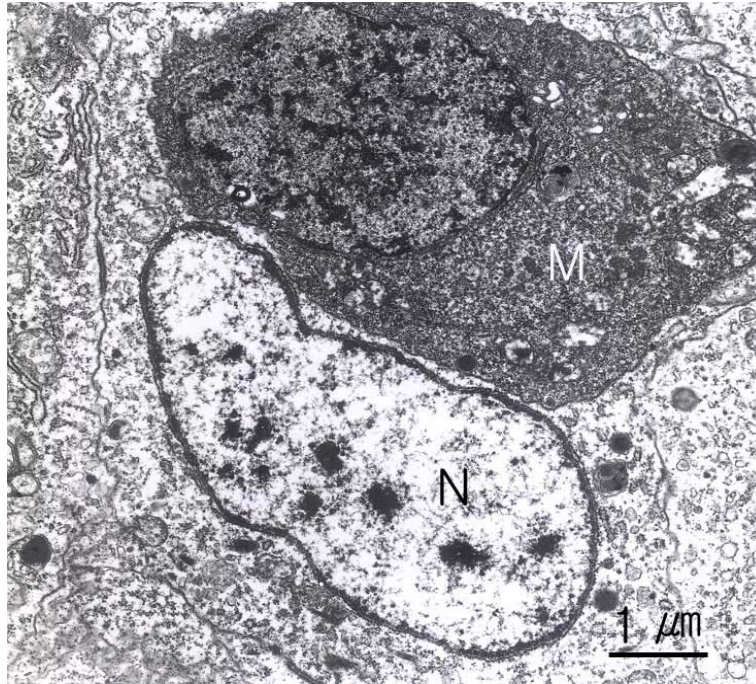


Fig. 2-14. TEM observation of *M. chungmuensis*. Primary cell of *M. chungmuensis*. Early developmental stage of *M. chungmuensis*(M) adjacent to the nucleus(N) of the host cell(ova) in the gonad of *C. gigas*.

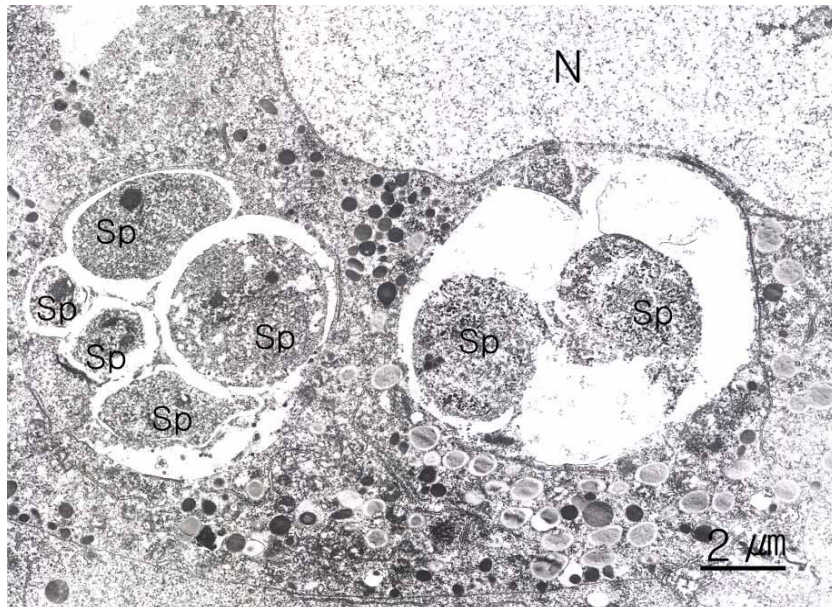


Fig. 2-15. TEM observation of *M. chungmuensis*. Ova of *C. gigas* containing two primary cells of *M. chungmuensis* adjacent to its nucleus(N). The cytoplasm of both primary cells is disintegrating but the primary cell on the right has two sporonts(Sp), while the one on the left is unusual in having five sporonts, two of which are producing spores(Sp\*).



이 *Acanthamoeba*라고 보고하였다. 그러나 Comps 등(1986)은 난소 내 기생충의 미세구조학적 관찰결과, 참굴의 난모 세포에 기생하는 난소 내 기생충의 세포질 내에 haplosporosome이 존재하고 근세포내의 내생발아에 의해 포자세포가 형성되는 점 등으로 미루어 *Acanthamoeba*가 아닌 phylum Ascetospora, class paramyxea에 속하는 protistan parasite라는 견해를 밝혔으며, 이 난소 내 기생충을 새로운 속과 종인 *M. chungmuensis*로 명명하였다. 현재까지 알려진 바에 의하면, 굴의 난소기생충병은 Paramyxean protozoa(Desportes & Perkins 1990, Berthe et al. 2000)인 *M. chungmuensis*가 굴의 자성 생식소의 세포질에 감염되어 일어나는 질병(Comps et al. 1986, Park et al. 1999)으로 난소기생충병은 아메바성 일차세포형태를 지닌 영양세포가 난원세포의 세포질 내에서 분열 증식하여 2차세포로 성장하여 배출되는 것으로 알려져 있다(Anderson & Lester 1992). Park & Chun(1989)은 *M. chungmuensis*의 성숙과정에 대한 미세구조학적 관찰결과, *M. chungmuensis*의 세포질 번식은 경우에 따라서 내생 또는 외생발아에 의해 일어난다는 것을 알 수 있었다. 이와 같이 근세포, 1차 세포내에서 내생발아에 의해 생겨난 2차 세포는 내생발아에 의해 3차 세포를 생성함과 동시에 외생발아에 의해 포자모세포로 발달하는 2개의 2차 세포를 생성한다고 알려져 있다.

#### 4. 참고문헌

- Afferent M (1988) Histopathological changes related to chemical contamination in *Mytilus edulis* from field and experimental conditions. Mar. Ecol. Prog. Ser. 46, 101-107
- Anderson TJ, Lester RJG (1992) Sporulation of *Marteilioides branchialis* n.sp. (Paramyxea) in the Sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis*: an electron microscope study. J. Protozoology 39, 502-508
- Berthe FCJ, Le Roux F, Peyretailade E, Peyret P, Rodriguez D, Gouy M, Vivares CP (2000) Phylogenetic analysis of the small subunit ribosomal RNA of *Marteilia refringens* validates the existence of Phylum Paramyxea (Desportes and Perkins, 1990). J. Eukaryotic Microbiology 47, 288-293
- Chun SK (1979) Amoeba infection in oyster (*Crassostrea gigas*). Bulletin of the Korean Fisheries Society. 12, 281-285
- Comps M, Park MS, Desportes I (1986) Etude ultrastructurale de *Crassostrea gigas* n.g. n.sp., parasite des ovocytes de l'huitre *Crassostrea gigas* Th. Protistologica 22, 279-285
- Desportes I, Perkins FO (1990) Phylum Paramyxea. In: Margulis, L., J.O. Corliss, M. Melkonian and D.J. Chapman (eds), Handbook of Protoctista. Jones and Bartlett Publishers, Boston, MA. Pg. 30-35

- Dorange G, Le Pennec M (1989) Ultrastructural study of oogenesis and oocytic degeneration in *Pecten maximus* from the Bay of St. Brieuc. *Mar. Biol.* 103, 339-348
- Elston RA (1993) Infectious diseases of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Annual Review of Fish Diseases.* 3, 259-276
- Feng SY (1965) Pinocytosis of proteins by oyster leucocytes. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. Woods Hole Mass.* 129, 95-105
- Imai T, Mori K, Sugawara Y, Tamate H, Oizumi J, Itakawa O (1968) Studies on the mass mortality of oysters in Matsushima Bay VII. Pathogenetic investigation. *Tohoku Journal of Agricultural Research* 19, 250-265
- Imanaka S, Itoh N, Ogawa K, and Wakabayashi H (2001) Seasonal fluctuations in the occurrence of abnormal enlargement of the ovary of Pacific oyster *Crassostrea gigas* at Gokasho Bay, Mie, Japan. *Fish Pathology (Tokyo)* 36, 83-91
- Itoh N, Oda T, Ogawa K, Wakabayashi H (2002a) Identification and development of a paramyxean ovarian parasite in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish Pathology (Tokyo)* 37, 23-28
- Lee MK, Cho BY, Lee SJ, Kang JY, Jeong HD, Huh SH, Huh MD (2001) Histopathological lesions of manila clam, *Tapes philippinarum*, from Hadong and Namhae coastal areas of Korea. *Aquaculture.* 201(3-4), 199-209
- Matsuzato T, Masumura K (1988) Abnormal enlargement of the ovary of oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) by an unidentified parasite. *Inter. J. Aqua. Fish. Tech.*, 9, 3-7
- Matsuzato TT, Arakawa KY, Masumura K (1977) Studies on the so-called abnormal egg-mass of Japanese oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg)- I. Distribution of the oyster collected in the coast of Hiroshima Pref., and parasite in the egg-cell. *Bulletin of the Hiroshima Fisheries Experimental Station.* 8, 9-25
- Ngo TTT, Berthe FCJ, Choi KS (2003) Prevalence and infection intensity of the ovarian parasite *Marteilioides chungmuensis* during an annual reproductive cycle of the oyster *Crassostrea gigas*. *Dis Aquat Org* 56, 259-267
- Park MS, Lim HJ, Yoo HY, Jeon MJ (1999) Assessment of reproductive health in the wild seed oysters, *Crassostrea gigas*, from two locations in Korea. *J Shellfish Res*, 18, 445-450
- Park MS (2002) Survey on the ovarian parasite, in the cultures Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in Korea. *Handbook and Abstracts, Fifty Symposium on diseases in Asian Aquaculture, Queensland, Australia, 24-28, November, 2002.* pp.96
- Park MS, Chun SK (1989) Study on *Marteilioides chungmuensis* Comps et al., 1986 parasite of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. *J. Fish Pathol.*, 2(2), 53-70

- Park MS, Kang CK, Choi DL, Jee BY (2003) Appearance and pathogenicity of ovarian parasite *Marteilioides chungmuensis* in the farmed Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in Korea. J. Shellfish Research 22, 475-479
- Park MS, Lyu HY, Lee TS (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(1), 62-67
- Weinstein JE (1997) Floranthene-induced histological alterations in oysters, *Crassostrea virginica* : seasonal field and laboratory studies. Mar. Environ. Res. 43, 201-218
- 배평암, 강필애, 김윤 (1976) 충무근해산 굴의 조직학적 연구. 수진연보, 15, 83-88
- 전세규 (1970) 굴의 질병에 관한 연구, 1. 병리조직학적 연구. 한수지 3(1), 7-18

# 제 3 절 참굴에 감염되는 난소기생충(*Marteilioides chungmuensis*)의 출현 특성과 병원성

## 1. 서 론

난소기생충 *Marteilioides chungmuensis*는 참굴 *Crassostrea gigas*의 자성 생식소에 선택적으로 감염되며, Phylum Ascetospora Sprague 1978에 속하는 세포내 기생성 원생동물이다 (Comps et al. 1986, Park & Chun 1989). 이 기생충은 난자의 세포질내에 감염되며, 형태는 구형으로 직경이 3~3.5  $\mu\text{m}$ 이다(Comps et al. 1986).

난소기생충이 굴의 번식에 미치는 영향에 대해 지난 10여년 동안 연구되어져 왔다. 그 결과 이 기생충은 난소에 감염되어 난자를 괴사시킬 뿐 만 아니라 수정란의 정상적인 발생과 발달을 저해시키는 것으로 나타났다(Park et al. 1999). 또한 난소기생충에 감염된 굴은 생식소에 비정상적인 난괴를 형성함으로써 외관상 혐오감으로 상품성을 떨어뜨리기도 한다. 따라서 이 기생충은 한국의 남해안 연안의 양식 참굴의 가장 심각한 병원생물이다. 이 기생충은 우리나라 남해, 서해 및 동해 연안의 주요 굴 양식장에서 채집된 굴의 난소 내에서 확인된 바 있어 지역적으로 광범위하게 확산되어 있는 것으로 나타났다(Bae et al. 1976, Chun 1970, 1979, Park & Chun 1989, Park et al. 1999). 이 기생충의 감염율은 지역별, 시기별 다소 차이가 있으나 5월부터 수온이 상승하면서 감염율도 증가되는 경향을 보였으며 8~9월에 최고 감염율을 나타내었다(Park et al. 1999). 특히 1990년대에 들어 남해안 연안의 굴 양식장에서 난소기생충의 출현율이 급격히 증가함에 따라 굴종묘의 안정적인 확보에 큰 차질을 빚고 있는 실정이다.

현재까지 난소기생충에 대한 연구는 병리조직학적 증상과 감염율 및 감염경로에 대해 수행되어 왔으나 난소기생충이 숙주에 미치는 영향에 대해서는 비교적 알려진 바 없다. 따라서 본 연구는 난소기생충의 출현 특성과 병원성을 밝혀 난소기생충이 굴의 재생산 외에 양식생태에 미치는 영향을 밝히기 위하여 실시하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2-1. 시료 채집

질병 모니터링을 위하여 채집된 참굴 시료 중에서 난소기생충에 감염된 개체를 실험에 사용하였다

### 2-2. 난소기생충 감염 조사

난소기생충 감염 조사는 굴 패각을 깨끗이 씻은 후, 개각하여 몸통부분의 중간을 3 mm 두께

의 대각선으로 잘라 Davidson액에 고정시킨 다음, 알코올로 탈수하여 5  $\mu\text{m}$  두께의 파라핀 절편을 만들어 Harris' hematoxylin-eosin 염색으로 slide 표본을 제작하고 광학현미경으로 조직을 관찰하였다. 한편, 난소기생충 감염 여부 조사에 있어 초기 감염시에는 파라핀 조직 표본의 현미경적 관찰로는 감염 여부를 판별하기 어렵기 때문에 초기 감염단계의 난소기생충 감염 조사는 신선한 굴의 생식소 부위를 절개하여 slide glass에 도말하고 eosin-methylene blue로 염색한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

### 2-3. 건강도 판정

건강도 판정을 위한 난소기생충 감염 개체와 비감염 개체의 구분은, 굴이 산란기에 도달해 있고, 육질부의 외부적인 관찰만으로도 난소기생충에 감염된 개체의 식별이 가능한 5~9월에 생식소의 도말에 의한 난소기생충 감염 여부 판정 후, 감염 개체 중에서도 생식소 내의 50% 이상의 난이 감염된 개체를 H(heavy), 50% 이하가 감염된 개체를 M(mild)으로 구분하여 실험 개체별로 생식소를 제외한 가식부를 절단하여 분석에 사용하였다.

개체별 글리코겐 함량은 Hangerdorn-Gensen법(일본식품공업학회, 1984)으로 일반 체성분은 AOAC법(1990)에 따라 분석하였으며, 혈장단백질은 Lowry법(1951)으로 분석하였다.

## 3. 결 과

### 3-1. 난소기생충 감염정도에 따른 건강도

#### 3-1-1. 글리코겐 함량

월별 글리코겐 함량의 평균값은 생식소가 난소기생충에 50% 이상 감염된 개체(H군)와 50% 이하 감염된 개체(M군) 및 비감염구에서 각각 2.0~14.8%, 2.1~16.0%, 4.0~20.2%로 나타났다. 모든 실험구에서 글리코겐 함량의 최대값은 5월, 최소값은 8월에 나타났다(Fig. 3-1). 감염군의 글리코겐 함량은 비감염군에 비하여 지속적으로 낮은 값을 유지하였으며, H군과 M군은 거의 유사하게 나타났다.(analysis of variance,  $P < 0.01$  for all the sampling months, Table 3-1). 글리코겐 함량이 산란 후 생식소 퇴화기인 9월에 급격히 저하되는 것으로 나타났다. 하지만, 하절기 산란 이후, 감염개체군(M군 및 H군)과는 달리 비감염 개체군의 글리코겐 함량은 회복하는 것으로 나타났다.

#### 3-1-2. 일반 체성분

육질부 일반 체성분 중 지질함량은 H군, M군 및 비감염구에서 각각 11.5~14.08%, 10.0~13.0%, 5.0~9.0%로 나타났다(Fig. 3-2). 감염군의 글리코겐 함량은 비감염군에 비하여 약간 높은 값을 나타내었으며(paired  $t$ -test,  $P = 0.06$  for both infected group), H군과 M군은 거의



유사하게 나타났다(paired *t*-test, *P* = 0.174). 단백질 함량은 H군, M군 및 비감염구에서 각각 56.4~62.0%, 55.1~58.9%, 53.2~55.8%로 나타났다. 감염개체군(M군 및 H군)과 비감염 개체군의 유의한 차이는 나타나지 않았다(paired *t*-test, *p*=0.111 between H- and M-groups, *p*=0.562 between H-group and uninfected oysters, and *p*=0.673 between M-group and uninfected oysters). 탄수화물 함량은 H군, M군 및 비감염구에서 각각 4.2~17.0%, 9.1~20.1%, 8.7~25.6%로 나타났다. 회분 함량은 H군, M군 및 비감염구에서 각각 11.5~27.7%, 16.9~25.1%, 10.7~25.6%로 나타났으며, 8월에 최고치를 나타내고, 5월에 최저치를 나타내었다. 감염과 관련된 유의한 차이는 관찰되지 않았다(paired *t*-test, *P*=0.930, *P*=0.384, *P*=0.085).

### 3-1-3. 혈장 단백질

혈장단백질은 정상개체가 5.12~11.41  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , H군은 3.08~4.04  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , M군은 3.74~6.24  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 로 감염개체가 정상개체에 비해 생리활성이 아주 나쁜 것으로 나타났으며, 정상개체는 산란 이후 혈장단백질의 양이 증가하는 반면, 감염개체에 있어서는 계속 감소하였다(Fig. 3-3).

## 4. 고찰

굴 난소기생충은 참굴의 난에 기생하여 난을 용해시키고 굴을 폐사시키며, 수정란의 정상적인 발생과 발달을 저해하는 것으로 알려져 오고 있다(Matsuzato et al. 1977, Matsuzto & Masumura 1988, Park & Chun 1989). Park et al.(1999)은, 난소기생충에 감염된 난과 동일 생

Table 3-1. Results of ANOVA and Tukey post-hoc test(=0.05) for absolute values of tissue glycogen and serum protein in each sampling month.

Parameters	Month	H-group			M-group			Uninfected oysters		P
Tissue glycogen (% of dry tissue)	May	14.8	2.5	=	16.0	1.8	<	20.2	2.6	< 0.001
	June	11.9	2.2	=	13.5	2.0	<	16.8	0.5	< 0.001
	July	3.8	0.5	=	4.7	1.2	<	5.7	0.9	< 0.001
	August	1.8	0.6	=	2.2	0.5	<	4.0	0.5	< 0.001
	September	2.0	0.7	=	2.1	0.7	<	6.8	0.6	< 0.001
Serum protein (g/l)	May	4.0	0.7	<	6.2	0.7	<	11.4	0.5	< 0.001
	June	3.5	0.4	<	6.2	1.3	<	8.3	0.4	< 0.001
	July	3.7	0.5	<	4.8	0.3	<	7.2	0.5	< 0.001
	August	3.1	0.5	<	4.1	0.5	<	5.1	0.8	< 0.001
	September	3.1	0.7	=	3.7	0.7	<	6.5	1.0	< 0.001

Data represent mean  $\pm$  1SD

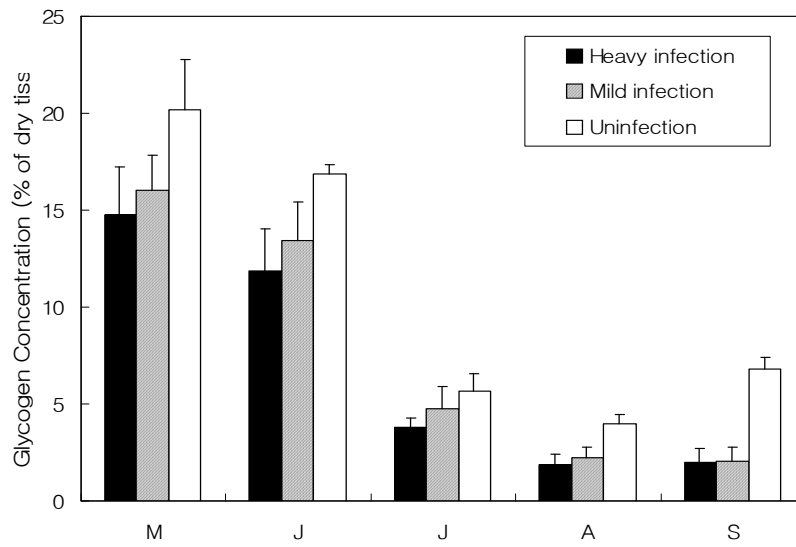


Fig. 3-1. Glycogen concentration( $\pm$ SD) in infected and uninfected oysters.

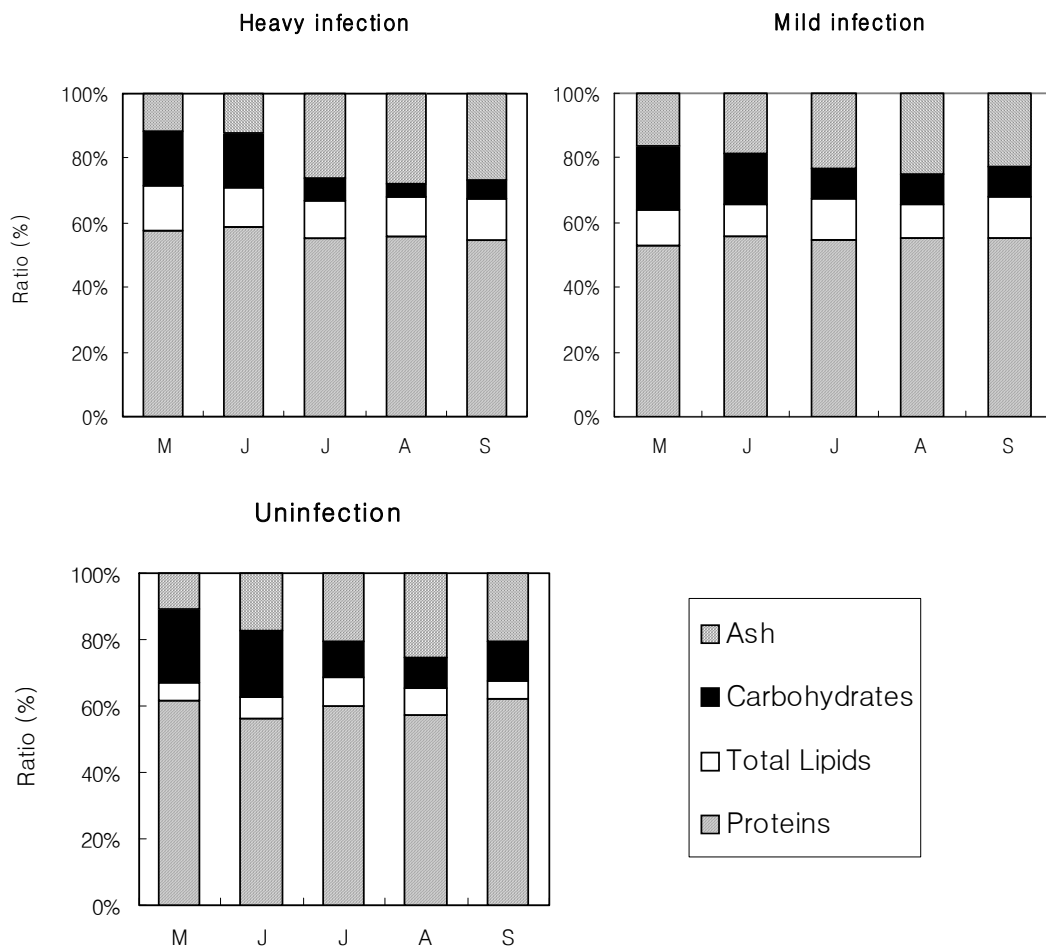


Fig. 3-2. Biochemical composition of infected and uninfected oysters.

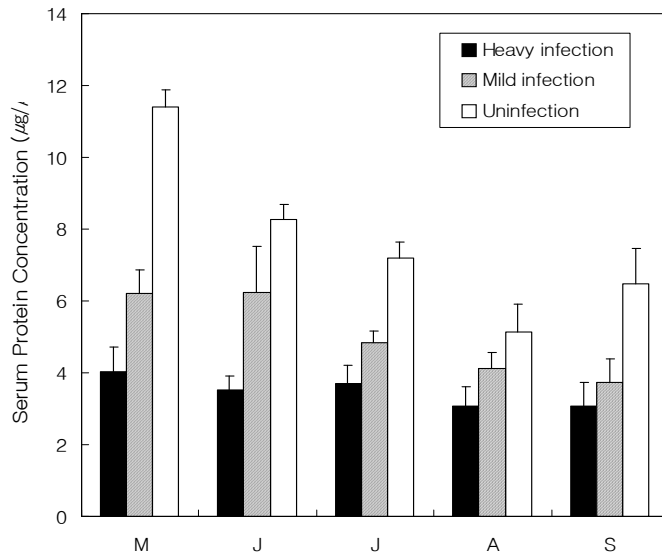


Fig. 3-3. Serum protein concentration( $\pm$ SD) in infected and uninfected oysters.

식소에 감염란과 함께 있었던 정상란을 대상으로 인공 발생 실험을 실시한 결과, 난소기생충 감염란은 수정이 불가능하였으며, 동일 생식소에 감염란과 함께 있었던 정상란은 가능하였으나, 80% 이상이 형태적을 비정상적인 발생을 하였으며, 초기 각정기에서 전량 폐사하였다고 보고한 바 있다. 그러나 난소기생충에 감염된 굴이 이 기생충의 감염으로 인하여 폐사에까지 이른다는 것이 실험적으로 입증된 것은 아직까지 없다.

본 연구결과, 난소기생충 감염굴과 비감염굴의 건강도에 있어서 육질부의 글리코겐 함량이 감염개체가 정상개체에 비하여 적었으며, 정상개체는 산란 후 생식소 퇴화기에 글리코겐 함량이 증가한 반면, 감염개체는 산란시기와 동일한 수치를 유지하였다. 글리코겐은 생식과 성장을 위한 필수성분이며(Encomio & Chu 2000), 주로 digestive gland와 gonad 및 외투막에 축적되는 것으로 보고되었다(Berthelin et al. 2000). 또한 생식활동을 위해 gonad와 외투막의 글리코겐이 주공급원인 것으로 보고되었다. 따라서 본 연구결과에서 감염개체의 글리코겐 함량이 정상개체보다 낮은 현상은 난소기생충 감염증이 생식활동에 직접적인 영향을 미치는 것을 나타낸다. 단백질은 gametogenetic effort에 사용되지는 않으나 필수적인 체구성성분이다(Berthelin et al. 2000). 정상개체는 산란 이후 혈장 단백질의 양이 증가하는 반면, 감염개체에 있어서는 계속 감소하여 서식환경이 열악할 시 폐사에까지 이를 수 있는 것으로 판단되었다. 본 연구에서 산란 후 참굴의 혈장 단백질의 증가는 성장을 위한 단백질의 공급으로 여겨지나 감염개체의 경우 혈장단백의 감소는 난소기생충의 감염으로 인한 영향으로 성장을 위한 에너지의 감소를 유발하는 것으로 추측된다. 그리고 난소기생충의 감염율이 10월을 기점으로 감소하는 경향을 나타내는 것도 난소기생충에 감염된 개체가 난 방출 후 쇠약해진 상태에서 폐사

하는 것과 연관이 있는 것으로 추측되어진다.

요약하면 난소 기생충에 감염된 굴의 글리코겐 함량이 낮은 농도로 나타났으며, 혈장단백질 또한 정상개체에 비해 낮은 농도로 나타나 난소기생충증은 체내 대사 장애를 유발하는 것으로 추정되었다.

## 5. 참고문헌

- AOAC (1990) Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 15th Ed. Association of Official Analytical Chemists Inc. Virginia, 1298pp
- Berthelin C, Kellner K, Mathieu M (2000) Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West Coast of France), Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 125(3), 359-369
- Comps M, Park MS, Desportes I (1986) Etude ultrastructurale de *Crassostrea gigas* n.g. n.sp., parasite des ovocytes de l'huitre *Crassostrea gigas* Th. Protistologica 22, 279-285
- Chun SK (1979) Amoeba infection in oyster (*Crassostrea gigas*). Bulletin of the Korean Fisheries Society. 12, 281-285
- Encomio V, Chu FLE (2000) The effect of PCBs on glycogen reserves in the eastern oyster *Crassostrea virginica*. Mar. Environ. Res. 50, 45-49
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275
- Matsuzato T, Hoshina T, Arakawa KY, Masumura K (1977) Studies on the so-called abnormal egg-mass of Japanese oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg)- I. Distribution of the oyster collected in the coast of Hiroshima Pref., and parasite in the egg-cell. Bull. Hiroshima Fish. Exp. St., 8, 9-25
- Matsuzato T, Masumura K (1988) Abnormal enlargement of the ovary of oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) by an unidentified parasite. Inter. J. Aqua. Fish. Tech., 9, 3-7
- Park MS, Lyu HY, Lee TS (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(1), 62-67 (in Korean)
- Park MS, Chun SK (1989) Study on *Marteilioides chungmuensis* Comps et al., 1986 parasite of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. J. Fish Pathol., 2(2),

53-70 (in Korean)

배평암, 강필애, 김윤 (1976). 충무근해산 굴의 조직학적 연구. 수진연보, 15, 83-88

일본식품공업학회, 1984. 식품분석법. 제2판. 광림. 동경, pp. 208-210

전세규 (1970) 굴의 질병에 관한 연구, 1. 병리조직학적 연구. 한수지 3(1), 7-18

## 제 4 절 난소기생충의 PCR 진단법 개발

### I. 참굴의 난소기생충

#### 1. 서론

참굴 *Crassostrea gigas*는 단일종으로서의 생산량으로 비교해 볼 때 전세계에서 생산되는 해조류를 제외한 양식 어류, 갑각류, 패류 중에서 갖아 생산량이 많은 양식 품종으로 중국, 한국, 일본, 프랑스, 호주, 캐나다 등 세계 각국에서 생산되고 있는 가장 중요한 양식 품종 중 하나이다(FAO 2001).

현재까지 보고된 바에 따르면 참굴의 심각한 기생충성 질병은 북미지역에서 대량폐사를 유발한 바 있는 마이크로사이토스 감염증(Quayle 1961)을 유발하는 *Mikrocytos mackini*(Farley et al. 1988)와 참굴의 난소에 감염되어 생식소의 발달을 억제하고 생식소의 비정상적인 형태를 유발하는 *M. chungmuensis*(Comps et al. 1986)이다.

난소기생충은 한국(Chun 1979)과 일본(Seki 1934)에서 보고된 바 있으며, 감염율의 변화(Imanaka et al. 2001, Ngo et al. 2003), 생화학적 감염 특성(Park et al. 2003), 숙주범위(Itoh et al. 2004), 분자생물학적 진단방법(Itoh et al. 2003a, b) 등에 대해 보고된바 있다.

난소가 발달하기 전단계의 *M. chungmuensis*의 감염여부가 조직학적 검사방법을 통해 관찰할 수 없기 때문에 확인되지 못하고 있는 실정으로 이 기생충을 보균하고 있는 생물에 대한 모니터링에 많은 제한 요소가 되고 있다. 이 기생충의 초기 감염단계의 보균숙주의 확인을 위해서 PCR방법의 개발이 필요하며, 기존의 *M. chungmuensis*의 종내 변이를 비교하기 위하여 18S rRNA의 염기서열을 대상으로 PCR primer를 제작하고, PCR 조건을 확립하여 진주담치의 보균숙주 여부를 검사하였다.

#### 2. 재료 및 방법

##### 2-1. 시료 채취

참굴의 질병 모니터링을 위하여 채취한 시료를 실험에 이용하였다.

##### 2-2. DNA 추출

굴의 생식소를 절제하여 DNA 분리에 사용하였다. 조직시료에서 DNA 분리는 High pure PCR template preparation kit(Roche, Germany)를 이용하였다. 조직시료 20 mg에 tissue lysis buffer(4 M urea, 200 mM Tris, 20 mM NaCl, 200 mM EDTA, pH 7.4) 200  $\mu$ l를 첨가하여 균질화한 후 proteinase K(0.02 mg/ml) 40  $\mu$ l를 첨가하여 55°C에서 1시간 동안 방치하였다. 여

기에 binding buffer(6 M guanidine-HCl, 10 mM urea, 10 mM Tris-HCl, 20% Triton X-100(v/v), pH 4.4) 200  $\mu$ l를 첨가하여 혼합한 후 72°C에서 10분간 방치하였으며, 다시 100  $\mu$ l isopropanol을 첨가하여 혼합하였다. 조립된 High pure filter tube에 lysis solution을 옮겨서 8,000 rpm에서 1분간 원심분리하였다. Washing buffer(20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, 80% ethyl alcohol(v/v), pH 7.5)로 8,000 rpm에서 1분간 2회 세정하였다. 남아있는 washing buffer를 제거하기 위하여 14,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 filter tube를 멸균된 1.5 ml microtube에 옮겨 미리 70°C로 데워진 elution buffer(10mM Tris, pH 8.5) 50  $\mu$ l를 첨가하여 14,000 rpm에서 1분간 원심분리하여 DNA를 분리하였다. 분리된 DNA의 최종 농도는 50 ng/ $\mu$ l가 되도록 흡광도 A260/280 nm에서 조정하였다.

### 2-3. PCR 및 agarose gel 전기영동

위에서 분리한 DNA를 template로 하여 PCR을 실시하였다. Primer는 GeneBank의 *M. chungmuensis* 18S rRNA gene(Accession number AB110795)을 이용하여 Table 4-1과 같이 CHU1 및 CHU2를 제작하였다. PCR 반응조건은 Table 4-2과 같이 PCR 반응조건은 1X PCR buffer(20 mM Tris-hydrochloride pH 8.4, 50 mM KCl and 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>), 200 uM dNTP(Bioneer, Korea), 0.2 uM primers 및 2U Taq DNA polymerase(Bioneer, Korea)를 혼합하여 50 ng의 template DNA를 첨가한 후 DNA Engine DYAD(MJ Research, USA)을 이용하여 Table 4-2와 같이 반응시켜 증폭된 반응생성물을 1X TAE(40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA) buffer 상에서 1.5% agarose gel에 loading한 후 100V에서 15분간 전기영동하여 Ethidium bromide(Sigma, USA)로 염색한 후 UV-illuminator를 사용하여 PCR 생성물을 확인하였다.

Table 4-1. PCR primers used to amplify 18S rRNA

Primer sets	Orient	Oligo sequence	PCR product size(BP)
18S rRNA	sence	TGCTGAGACTAAAACGTCTG	500
	antisence	TCCGTCAATTCCTTTAAGTT	

Table 4-2. Condition of reaction steps and PCR cycles of 18S rRNA

	Temperature(°C)	Reaction time	Number of cycle
Pre-denaturation	94	30 min	1
Denaturation	94	40 sec	35
Annealing	52	3 min	
Extention	72	40 sec	
Post-extention	72	40 sec	1

#### 2-4. PCR 산물의 염기서열 확인

전기영동하여 확인한 PCR 산물에 해당되는 부분을 agarose gel에서 칼로 절취하여 잘라내어 QIAquick Gel Extraction kit(Qiagen, USA)로 PCR 산물을 정제하였다. 정제된 DNA는 pGEM-T easy vector(Promega, pGEM-T easy vector system, USA)에 ligase buffer 5  $\mu$ l, pGEM-T easy vector 1  $\mu$ l, PCR산물 2  $\mu$ l, T4 DNA ligase 1  $\mu$ l, Deionized water 1  $\mu$ l를 혼합하여 실온에서 백터에 삽입하였다. PCR product를 함유한 plasmid를 JM109(Takara, Japan) competent cell에 heat shock 방법으로 transformation하여 2%(w/v) X-gal 40  $\mu$ l, 20%(w/v) IPTG solution 7  $\mu$ l, ampicillin 50  $\mu$ g/ml이 포함된 LB agar(Bacto tryptone 10 g/l, bacto yeast extract 5 g/l, sodium chloride 10 g/l, bacto agar 15 g/l) plate에 도말하여 37°C에서 18시간 배양한 후 PCR 산물 유전자가 삽입된 백색 집락을 선택하였다. 이 집락을 50  $\mu$ g/ml Ampicillin(Sigma, USA)이 첨가된 LB broth(Yeasty extract 5 g/l, pancreatic digest of casein 10 g/l, sodium chloride 10 g/l, Difco ; Miller)에서 대량 배양한 후 원심 분리하여 수확한 시험관으로부터 plasmid DNA를 EcoRI으로 절단하여 inserted DNA의 유무와 크기를 확인하였다. 분리한 plasmid는 Sanger et al.(1977)의 방법으로 염기서열을 분석하였고, automatic sequencer(ABI 377, USA)를 사용하여 T7 universal primer와 Sp6 universal primer로 염기서열을 분석하였다. 분석된 염기서열은 GeneBank의 Blast 검색을 통하여 이미 등록된 유전자의 염기서열과 비교하였다.

### 3. 결과 및 고찰

양식굴의 생식소로부터 분리한 DNA를 주형으로 *M. chungmuensis* 18S rRNA gene primer인 CHU1 및 CHU2을 이용한 PCR 결과 500bp의 산물이 얻어졌다(Fig. 4-1). 이 실험에 사용된 시료인 S1~S10을 PCR 실험 후 병리조직검사결과 감염이 확인되어 PCR실험 결과와 병리조직검사는 결과가 일치하였다. 또한 실험결과 얻어진 PCR 산물이 *M. chungmuensis* 18S rRNA의 유전자인지 알아보기 위하여 염기서열을 분석한 결과 일본에서 보고된 *M. chungmuensis*의 유전자와 99%일치하는 것으로 나타났다(Fig. 4-2).

난소기생충은 세포 내에 감염되는 기생충이기 때문에 초기 감염시기에는 현재 이용하고 있는 병리조직학적 진단방법이나 전자현미경적 방법으로는 진단이 곤란하기 때문에 유전자 분석을 통한 진단 기술의 개발이 강력히 요구된다(Bondad-Reantaso et al. 2001). 따라서 본 연구에서는 이러한 진단상의 어려움을 해결하기 위하여 난소기생충의 18S rRNA를 대상으로 적합한 primer를 제작하여 유전자 진단법의 조건을 확립하였다. 그 결과 Fig. 4-1과 같이 500bp의 PCR 반응 산물을 얻을 수 있었으며, 기존의 염기서열(GeneBank 110795)과 비교한 결과, 99% 이상의 상동성을 확인할 수 있었다. 따라서 이 진단법은 난소기생충의 질병 모니터링에 적합할 것으로 판단된다.

개발된 PCR 방법을 통하여 진주담치의 난소기생충 질병의 감염을 확인한 결과, 진주담치에



서도 난소기생충의 감염을 확인하였으며, 진주담치에서 검출된 난소기생충의 염기서열도 우리나라의 굴에서 검출된 난소기생충과 일치하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 난소기생충의 감염경로를 밝히는 중요한 자료로 제공될 것이다.

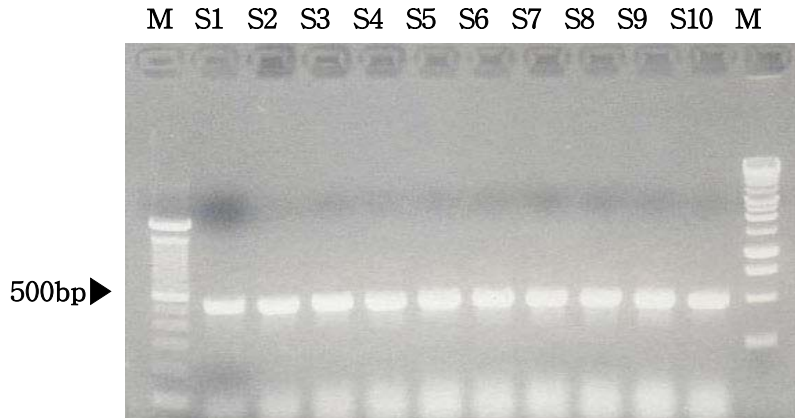


Fig. 4-1. Agarose gel electrophoresis of PCR products. Lane M ; 100bp DNA ladder marker, S1~S10 : sample

```

Query: 10   ccagaagccaa-tcactccagcttcctcggggacccaacaccgggtcacagagtgtaaacgc 68
           |||
Sbjct: 1063 ccagaagccaaatcaactccagcttcctcggg-acccaacaccgggtcacag-gtgtaaacgc 1006
           |||
Query: 69   ggcgctcgggcccgggtcggcatagtttggggcacaccgctaccggggtatctaactcctgttg 128
           |||
Sbjct: 1005 ggcgctcgggcccgggtcggcatagtttggggcacaccgctaccggggtatctaactcctgttg 946
           |||
Query: 129  actacggtggcttccgctcctttatcgacggaaacgctctagacgagtgccctcgctttcg 188
           |||
Sbjct: 945  actacggtggcttccgctcctttatcgacggaaacgctctagacgagtgccctcgctttcg 886
           |||
Query: 189  gctgtccttgcaaggatcatcagatthttaccctcgccctgcagttcactcgtctccgacc 248
           |||
Sbjct: 885  gctgtccttgcaaggatcatcagatthttaccctcgccctgcagttcactcgtctccgacc 826
           |||
Query: 249  gtccccgttgatcatcacctgcgctcttggaaacgccgagcgcaggtttcgttctacgatt 308
           |||
Sbjct: 825  gtccccgttgatcatcacctgcgctcttggaaacgccgagcgcaggtttcgttctacgatt 766
           |||
Query: 309  ccatgcaaaacctcgagcacgagctcgccttgatcacctggtttgggtcacggacgtgg 368
           |||
Sbjct: 765  ccatgcaaaacctcgagcacgagctcgccttgatcacctggtttgggtcacggacgtgg 706
           |||
Query: 369  accgacgcacgccgaggcgaacgaacggctcgtggcggagcggccatctcgcccggcgggt 428
           |||
Sbjct: 705  accgacgcacgccgaggcgaacgaacggctcgtggcggagcggccatctcgcccggcgggt 646
           |||
Query: 429  cgaccgcacgctccgccggttggttccgactacagacgttt 469
           |||
Sbjct: 645  cgaccgcacgctccgccggttggttccgactacagacgttt 605
           |||

```

Fig. 4-2. Partial sequence of *Marteilioides chungmuensis* 18S ribosomal RNA from Pacific oyster. Thick letter is shown to difference of the sequence of isolated parasite by this study with the sequence of *Marteilioides chungmuensis* 18S ribosomal RNA in Genebank(Accession number AB110795).

#### 4. 참고문헌

- Bondad-Reantaso MG, McGladdery SE, East I, Subasinghe RP (2001) Asia Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases. FAO Fisheries Technical Paper 402 Supplement 2. Food and Agriculture Organisation of the United Nations and Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific, Rome. Pg. 144-146
- Chun SK (1979) Amoeba infection in oyster (*Crassostrea gigas*). Bulletin of the Korean Fisheries Society. 12, 281-285
- Comps M, Park MS, Desportes I (1986) Etude ultrastructurale de *Crassostrea gigas* n.g. n.sp., parasite des ovocytes de l'huitre *Crassostrea gigas* Th. Protistologica 22, 279-285
- FAO. (2001) FAO yearbook, Fisheries statistics; Aquaculture production 2001. FAO Fisheries Series, No. 64. Rome, FAO.
- Farley CA, Wolf PH, Elston RA (1988) A long-term study of "microcell" disease in oysters with a description of a new genus, *Mikrocytos* (g.n.) and two new species *Mikrocytos mackini* (sp.n.) and *Mikrocytos roughleyi* (sp.n.). Fish. Bull. 86, 581-593
- Imanaka S, Itoh N, Ogawa K, Wakabayashi H (2001) Seasonal fluctuations in the occurrence of abnormal enlargement of the ovary of Pacific oyster *Crassostrea gigas* at Gokasho Bay, Mie, Japan. Fish Pathology (Tokyo) 36, 83-91
- Itoh N, Oda T, Yoshinaga T, Ogawa K (2003a) Isolation and 18S ribosomal DNA gene sequence of *Marteilioides chungmuensis* (Paramyxia), an ovarian parasite of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Diseases of Aquatic Organisms 54, 163-169
- Itoh N, Oda T, Yoshinaga T, Ogawa K (2003b) DNA probes for detection of *Marteilioides chungmuensis* from the ovary of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Fish Pathology (Tokyo) 38, 163-169
- Itoh N, Tun KL, Komiyama H, Ueki N, Ogawa K (2004) An ovarian infection in the Iwagaki oyster, *Crassostrea nippona*, with the protozoan parasite *Marteilioides chungmuensis*. Journal of Fish Diseases 27, 311-314
- Ngo TTT, Berthe FCJ, Choi KS (2003) Prevalence and infection intensity of the ovarian parasite *Marteilioides chungmuensis* during an annual reproductive cycle of the oyster *Crassostrea gigas*. Diseases of Aquatic Organisms 56, 259-267
- Park MS, Kang CK, Choi DL, Jee BY (2003) Appearance and pathogenicity of ovarian parasite *Marteilioides chungmuensis* in the farmed Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in Korea. Journal of Shellfish Research 22, 475-479
- Quayle DB (1961) Denman Island disease and mortality, 1960. Fisheries Research Board of Canada Manuscript Repory 713. Ottawa
- Seki H (1934) The abnormal development of the oyster gonadss in Hiroshima bay. Bull. Japan Sci. Soc. 9, 93-99

## II. 진주담치의 난소기생충

### 1. 서론

진주담치 *Mytilus galloprovincialis*는 우리나라의 주요 패류 양식 품종 중에서 생산량으로 볼 때 16천톤으로 굴, 바지락 다음으로 3위를 차지하고 있어 경제적으로 매우 중요한 종이다. 진주담치의 주요 양식장이 굴의 난소기생충병이 감염된 지역이기 때문에 난소기생충과 진주담치의 상관관계를 분석할 필요가 있다. *M. chungmuensis*는 Paramyxean의 일종으로 일본과 한국의 양식 굴 *Crassostrea gigas*의 난소에 감염되어 난소의 비정상적인 비대증을 유발한다 (Comps et al. 1986). 본 연구에서는 굴의 난소기생충병의 진단을 위해 개발된 PCR 진단법과 병리조직학적 방법을 통하여 진주담치에 대한 *M. chungmuensis*의 감염여부와 조직학적 영향에 대하여 연구하였다.

### 2. 재료 및 방법

#### 2-1. 시료 채취

진주담치의 질병 모니터링을 위하여 채취한 시료를 실험에 이용하였다.

#### 2-2. DNA 추출

참굴의 방법과 동일한 방법을 사용하였다.

#### 2-3. PCR 및 agarose gel 전기영동

참굴의 방법과 동일한 방법을 사용하였다.

#### 2-4. PCR 산물의 염기서열 확인

참굴의 방법과 동일한 방법을 사용하였다.

### 3. 결과 및 고찰

양식 진주담치의 생식소로부터 분리한 DNA를 주형으로 *M. chungmuensis* 18S rRNA gene primer인 CHU1 및 CHU2을 이용한 PCR 결과 500bp의 산물이 얻어졌다(Fig. 4-7). 검사시료 21마리 중에서 6마리에서 PCR 양성반응이 나타나 28%의 개체가 감염되어 있었다. 이 실험에 사용된 시료에 대한 병리조직검사결과 Fig. 4-3~6과 같이 생식소에 *M. chungmuensis* 감염이 확인되었다. 또한 실험결과 얻어진 PCR 산물이 참굴의 *M. chungmuensis* 18S rRNA의 유전자인지 알아보기 위하여 염기서열을 분석한 결과 일본에서 보고된 *M. chungmuensis*의 유전자와 99%일치하는 것으로 나타났다(Fig. 4-8).

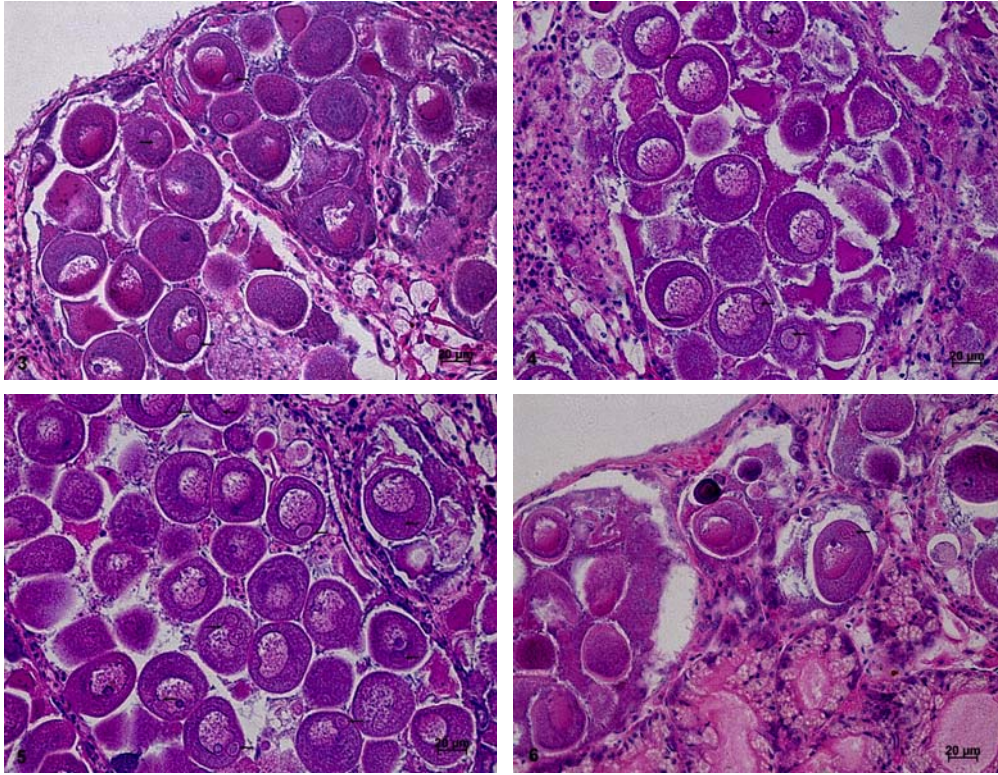


Fig. 4-3~6. Histopathological observation of mussel infected with *M. chungmuensis*. 3. The parasite was observed in the cytoplasm of oocyte. 4. The parasite has eosinophilic cytoplasm and basophilic nucleus. 5. The parasite did not caused mal-development of oocyte. 6. Only 1 sporant of *M. chungmuensis* was observed in the cytoplasm.

현재까지 알려진 바에 의하면 난소기생충은 한국과 일본의 참굴에 감염되는 것으로 알려져 왔 으며(Park et al. 2003, Imanaka et al. 2001), 최근 일본의 Iwaki oyster인 *Crassostrea nippona* (Itoh et al. 2004)에 감염되는 것으로 보고된 바 있다. 본 연구 결과, *M. chungmuensis*가 진 주담치에도 감염되는 것으로 밝혀졌다. 이러한 연구결과는 난소기생충이 참굴과 Iwaki oyster 및 진주담치가 감염대상 종이 된다는 의미이며, 따라서 향후 이매패의 또 다른 숙주에 대한 감염도 추정된다. 예컨대, 난소기생충은 이매패류의 중간 전이가 일어나는 것으로 추정할 수 있을 것이다. 그러나, 현재까지 이러한 중간 전이를 입증할 수 있는 감염경로가 밝혀지지 않았기 때문에 이를 입증할 수 있는 실험결과가 필요하다.

본 연구 결과 개발된 PCR 방법을 통하여 진주담치의 난소기생충 질병의 감염을 확인한 결과, 병리조직학적으로는 전혀 관찰되지 않은 진주담치에서 난소기생충의 감염을 확인하였으며, 진주담치에서 검출된 난소기생충의 염기서열도 우리나라의 굴에서 검출된 난소기생충과 일치하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 난소기생충의 감염경로를 밝히는 중요한 자료로 제공될 것이다.

M 1 2 3 4 5 6 7 M 8 9 10 11 12 13 14 M 15 16 17 18 19 20 21

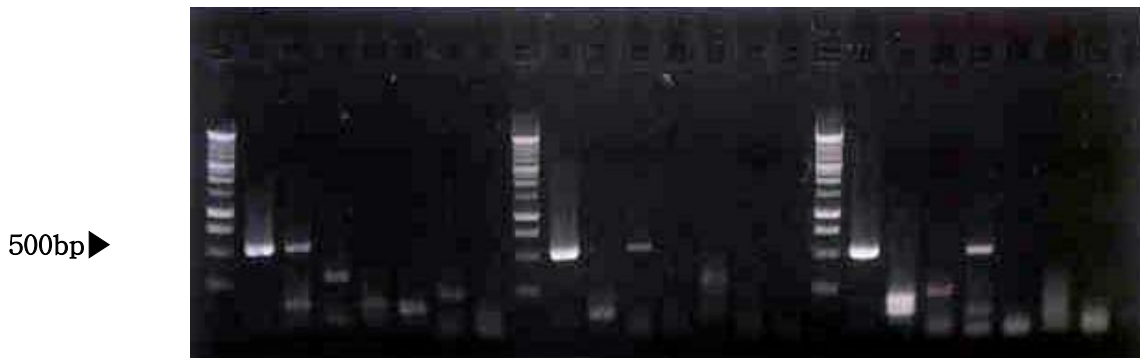


Fig. 4-7. Agarose gel electrophoresis of PCR products. Lane M ; 100bp DNA ladder marker, S1~S21 : sample

```

Query: 1 gagactaaaacgtctgtagtcggaaccaacggcggagcgtgcggtcggaccgccggcg 60
          |||
Sbjct: 598 gagactaaaacgtctgtagtcggaaccaacggcggagcgtgcggtcggaccgccggcg 657
Query: 61 agatggccgctccgccacgaccgttcgttcgctcggcggtcggtccaacgtccgtga 120
          |||
Sbjct: 658 agatggccgctccgccacgaccgttcgttcgctcggcggtcggtccaacgtccgtga 717
Query: 121 cccaaaccaggtgatcaaggcgagctcgtgctcgatggttttgcatggaatcgtagaacg 180
          |||
Sbjct: 718 cccaaaccaggtgatcaaggcgagctcgtgctcgatggttttgcatggaatcgtagaacg 777
Query: 181 aaacctgcgctcggcgttccaagagcgcaggtgatgatcaacaggagcggcggagacga 240
          |||
Sbjct: 778 aaacctgcgctcggcgttccaagagcgcaggtgatgatcaacaggagcggcggagacga 837
Query: 241 gtgaaactgcagggcgaggggtaaaatctgatgatccttgcaagacagccgaaagcgaagg 300
          |||
Sbjct: 838 gtgaaactgcagggcgaggggtaaaatctgatgatccttgcaagacagccgaaagcgaagg 897
Query: 301 cactcgtctagagcgtttccgctcgataaaggacggaagccaccgtagtcaacaagattag 360
          |||
Sbjct: 898 cactcgtctagagcgtttccgctcgataaaggacggaagccaccgtagtcaacaagattag 957
Query: 361 ataccccggtagcgggtgccccaaactatgccgaccggcccgcgcccgtttacacct 420
          |||
Sbjct: 958 ataccccggtagcgggtgccccaaactatgccgaccggcccgcgcccgtttacacct 1017
Query: 421 gtgaccggtggtgggtccgaggaagctggagtgatttgcttctgggagattacggctgc 480
          |||
Sbjct: 1018 gtgaccggtggtgggtccgaggaagctggagtgatttgcttctgggagattacggctgc 1077
Query: 481 aaagctgaaacttaaggaattgacggaa 509
          |||
Sbjct: 1078 aaagctgaaacttaaggaattgacggaa 1106

```

Fig. 4-8. Comparison of Partial sequence of *Marteilioides chungmuensis* 18S ribosomal RNA from mussel. Thick letter is shown to difference of the sequence of isolated parasite by this study with the sequence of *Marteilioides chungmuensis* 18S ribosomal RNA in Genbank(Accession number AB110795).

#### 4. 참고문헌

- Comps M, Park MS, Desporates I (1986) Etude ultrastructurale de *Crassostrea gigas* n.g. n.sp., parasite des ovocytes de l'huitre *Crassostrea gigas* Th. Protistologica 22, 279-285
- Imanaka S, Itoh N, Ogawa K, Wakabayashi H (2001) Seasonal fluctuations in the occurrence of abnormal enlargement of the ovary of Pacific oyster *Crassostrea gigas* at Gokasho Bay, Mie, Japan. Fish Pathology (Tokyo) 36, 83-91
- Itoh N, Tun KL, Komiyama H, Ueki N, Ogawa K (2004) An ovarian infection in the Iwagaki oyster, *Crassostrea nippona*, with the protozoan parasite *Marteilioides chungmuensis*. J Fish Diseases 27, 311-314
- Park MS, Kang CK, Choi DL, Jee BY (2003) Appearance and pathogenicity of ovarian parasite *Marteilioides chungmuensis* in the farmed Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in Korea. J Shellfish Research 22, 475-479

## 제 5 절 굴의 *Mycoplasma* 감염증

### 1. 서 론

*Mycoplasma*는 매우 작은 prokaryotic 기생체로서 세포벽이 전혀 없으며, 단지 이중막인 원형질막으로만 이루어져 있다(Razin & Freundt 1983). Harshbarger 등(1977)은 *Crassostrea virginica*의 간체장의 상피세포에 감염된 mycoplasma-like organism(MLO)를 처음으로 보고한 이래, 현재까지 mycoplasma가 해양 무척추동물에서 보고된 바 있다. 예컨대, filamentous MLO가 흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*)의 간체장에서 관찰되었으며(Krol et al. 1991), 보리새우(*Penaeus japonicus*)의 간체장에서도 발견된 바 있다(Choi et al. 1996). 또한 최근 지중해의 *Urastoma cyprinae*에서도 MLO의 감염이 보고된 바 있다(Comps & Tige 1999). 그러나 현재까지 참굴에서 이러한 MLO의 감염에 대한 보고는 없었다. 통영지역의 양식산 참굴에 대한 MLO의 감염이 질병 모니터링 결과 관찰되어 그 결과를 보고하고자 한다.

### 2. 재료 및 방법

질병 모니터링을 위하여 채집된 양식산 참굴을 상법에 따라 데이비드슨용액에 고정하여 병리조직학적으로 검사하였다. 투과전자현미경적 검사를 위하여 칼슘용액에 고정된 조직을 4°C에서 2.5% glutaraldehyde(0.2M cacodylate buffer, pH 7.2)로 1시간 고정한 후 1% osmium tetroxide(0.2M cacodylate buffer, pH 7.2)로 후고정 하였다(Choi et al. 1996). 고정된 시료를 상법에 따라 Epon에 포매하여 미세절편을 만들었다. 염색은 5% uranyl acetate와 lead citrate로 하여 Jeol 1200 EX-2로 80kV로 관찰하였다.

### 3. 결 과

MLO에 감염된 참굴의 병리조직학적 관찰한 결과, Fig. 5-1과 같이 병리조직학적 변화는 관찰되지 않았다. 광학현미경적 관찰을 통해서도 참굴의 간체장 조직 내에서 MLO가 관찰되지 않았다. 그러나 투과전자현미경적 관찰을 통해 간체장의 상피세포에 MLO가 감염이 되어 있는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 5-2). 세포내에 감염된 MLO는 매우 다양한 형태를 가지는 intracellular parasite이다. 투과전자현미경적으로 관찰된 MLO의 형태는 여러 가지로 나타났으며, 그 형태는 주로 직경이 45~86 nm의 단간형과 200~500 nm 이상의 장간형이었다. 또한 구형의 형태도 관찰되었으며, 직경이 70~120 nm로 관찰되었다(Fig. 5-3,5). Fig. 5-4와 같이 도넛형태의 특이한 형태의 MLO도 관찰이 되었다. MLO는 세포질 내에 prokaryotic ribosome과 fibrillar DNA-like strand를 가지고 있는 것이 관찰되었다. 이러한 prokaryotic microorganism은 감염된 간체장 상피세포의 세포질 내에서만 관찰되었다. 심하게 감염된 세포의 경우 다른



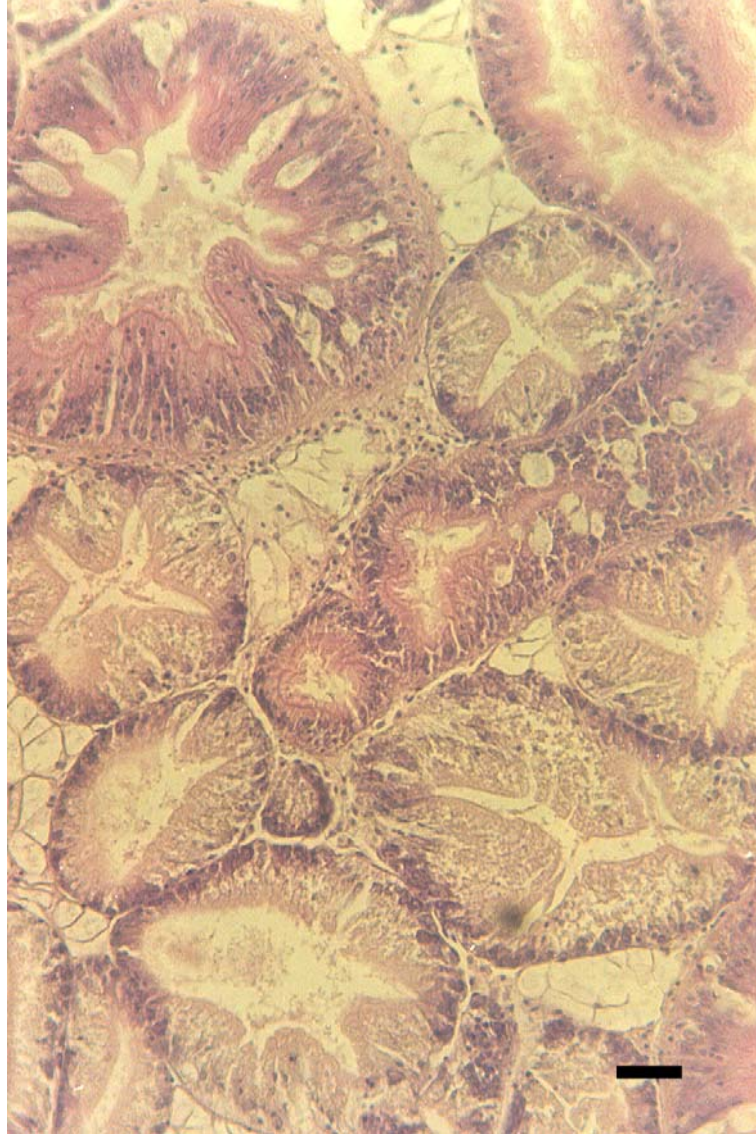


Fig. 5-1. Section through digestive gland of *Crassostrea gigas*. Hematoxylin-eosin. Scale bar = 1  $\mu\text{m}$ .



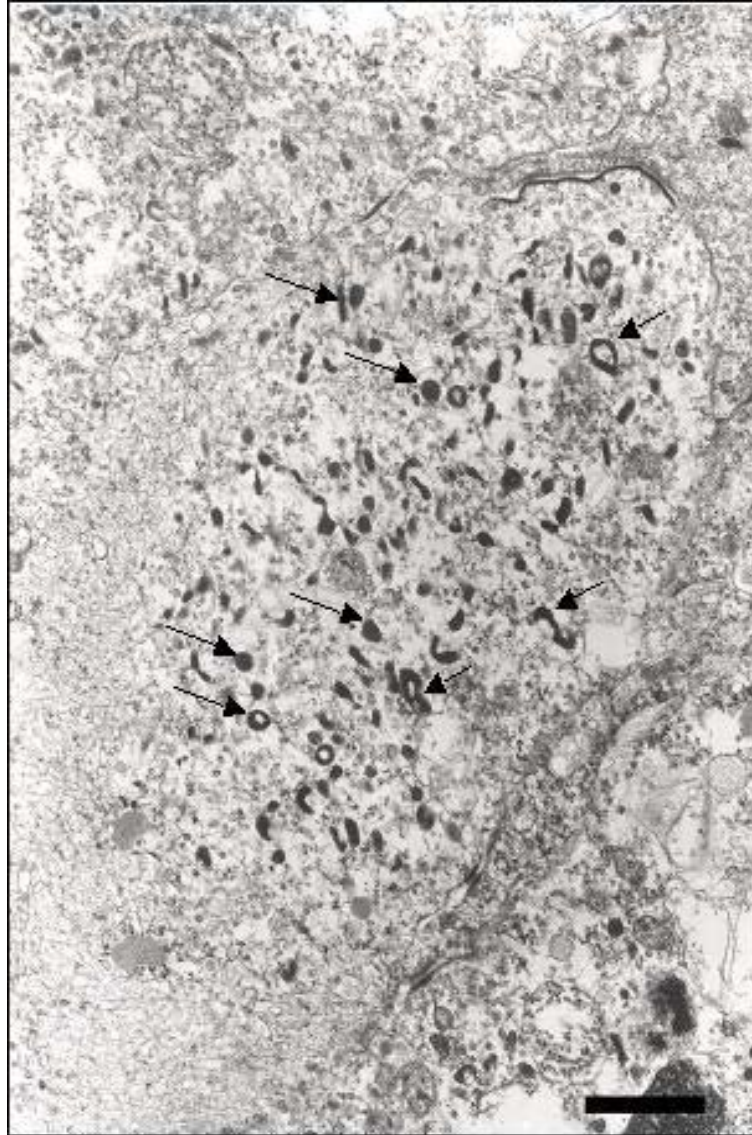


Fig. 5-2. Mycoplasma-like organism(MLO) in hepatopancreatic cell of *Crassostrea gigas*. The MLOs(arrows) were found free in the cytoplasm. Scale bar = 1  $\mu\text{m}$ .

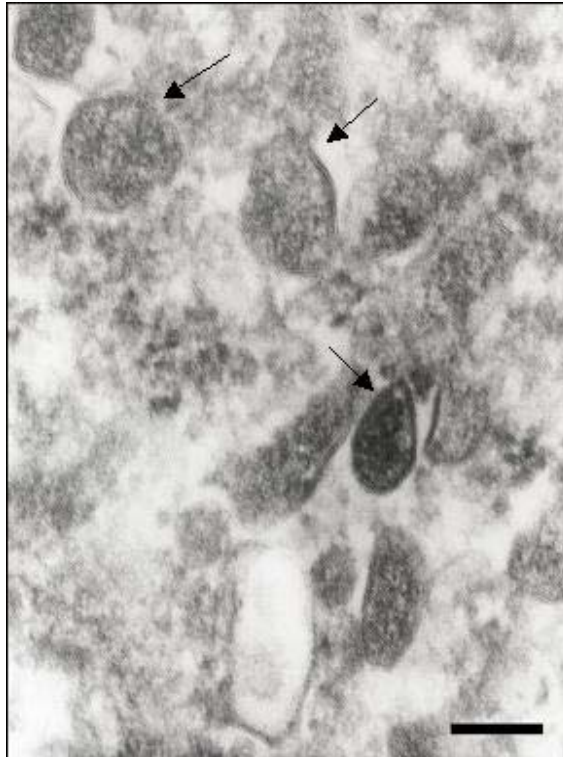


Fig. 5-3. Electron micrograph of round MLOs. Scale bar = 100 nm.

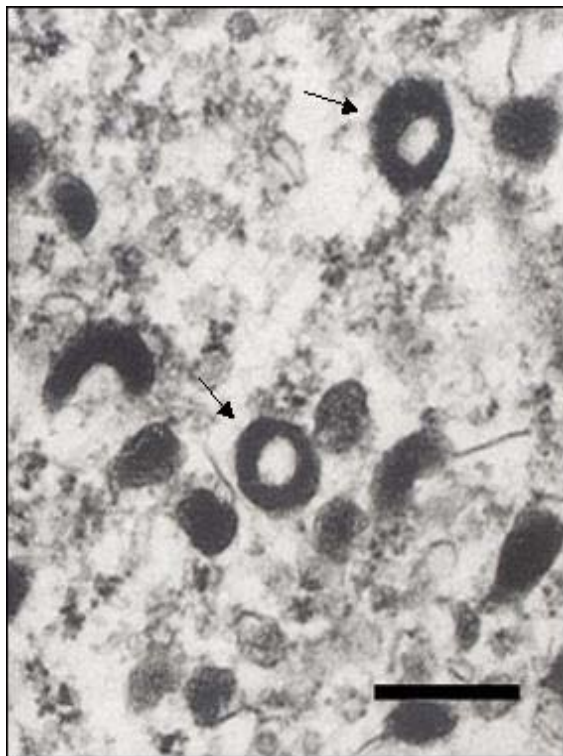


Fig. 5-4. Electron micrograph of MLOs with spherical dilations(arrows). Scale bar = 250 nm.



Fig. 5-5. Electron micrograph of a MLO showing fine structure of the cell membrane. Scale bar = 50 nm.

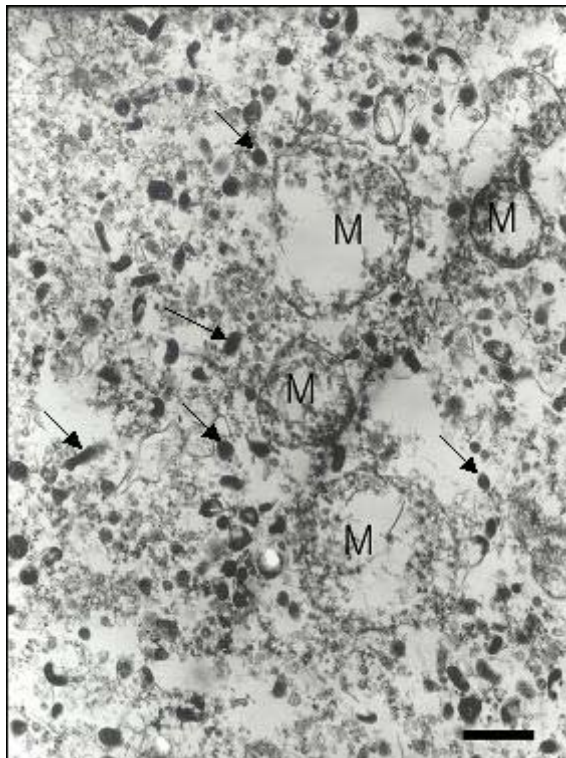


Fig. 5-6. Electron micrograph of MLOs(arrows) associated with mitochondrias(M). Scale bar= 100 nm.

세포 내 기관은 관찰되지 않고 미토콘드리아와 ribosome 만 관찰되었다(Fig. 5-6). 참굴의 간체장에 감염된 MLO의 감염 강도는 다르게 관찰되었지만 대부분의 간체장세포에 감염되어 있는 것으로 보였다. 감염된 숙주세포의 주변에서 방어 반응으로 보이는 현상은 전혀 관찰되지 않았다.

#### 4. 고찰

Mollicute는 intracellular membrane나 membrane-bound structure를 가지지 않으며, 따라서 MLO는 living membrane vesicle로 인정된다(Davis & lee 1982, Razin & Freundt 1983). 따라서 적합하게 고정된 단일이중막과 절편된 세포의 증명은 새로운 MLO분리종의 규정에 필수적인 요구조건이다. 본 연구를 통해 관찰된 참굴의 간체장 상피세포의 세포질 내에서 관찰된 세포내 미생물은 세포벽이 결여되어 있었으며, 단지 원형질막으로 둘러싸여 있기 때문에 Mycoplasma로 추정된다. 본 연구에서 관찰된 미생물은 간체장의 상피세포 내 세포질에 감염되어 있어서 굴에 감염되어 세포내에 특이하게 membrane-bound cytoplasmic inclusion을 형성하는 것으로 알려진 크기가 매우 작은 rickettsia-like bacteria와는 구별된다(Renault & Cochenec 1994). 이러한 근거들은 mollicute를 나타낸다. 따라서 본 연구에서 나타난 참굴의 간체장 상피세포의 세포 내에 감염된 미생물은 MLO로 판단되어진다.

Filamentous mollicute는 미국의 텍사스에서 양식되는 흰다리새우(*L. vannamei*)에서 검출된 바 있다(Krol et al. 1991). 또한 일본에서 수입된 보리새우(*P. japonicus*)에서도 관찰되었다(Choi et al. 1996). 이러한 mollicute들의 구조는 filamentous이고, terminal bleb를 가진 가지를 가지고 있었다. 또한 지중해에 서식하는 *U. cyprinae*로부터 관찰된 MLO는 rod 형태를 가지고 있었다(Comps & Tigé 1999). 하지만 본 연구에서 관찰된 MLO는 short rod나 round type으로 지금까지 보고된 형태와는 다소 다르게 나타났다. Mycoplasma의 형태는 growth medium의 nutritional quality와 삼투압은 물론, 배양시 성장단계에 따라 결정된다고 알려져 있다. Filamentous growth는 통상적으로 적합한 성장환경에서 young logarithmic growth와 밀접한 연관이 있다(Razin & Freundt 1983). 하지만, filamentous phase는 일시적인 성장단계이며, filamentous phase는 구형의 체인 형태로 바뀌고 나서 체인이 깨지면서 구형의 형태가 된다(Razin & Freundt 1983). 본 연구에서 관찰된 참굴의 MLO는 미토콘드리아와 같이 관찰되었는 바, 이는 MLO가 매우 하등하고 작은 genome를 가지고 있으며, parasitic mode를 하는 것에 대한 영향으로 mycoplasma가 한정된 biosynthetic ability를 가지는 것을 입증해 줄 수 있을 것이다.

Mycoplasma는 다양한 해양 동물로부터 보고되고 있다(Tully & Whitcomb 1979, Lauckner 1983, Sparks 1985). 이러한 MLO 중에서 많은 종의 이매패류의 폐사와 관련이 있는 종들도

있다(Azevedo 1993, Bower & Meyer 1991, Bower & Meyer 1995, Hine & Diggles 2002). 본 연구가 진행된 2002년의 통영지역에서 MLO가 심하게 감염된 참굴이 대량폐사가 발생하지 않았다. 따라서 참굴에 대한 MLO의 병원성은 확실하게 단정할 수는 없는 실정이다. 따라서 참굴과 MLO 간에 연관성을 결정할 수 있는 실험적인 자료가 필요하다.

## 5. 참고문헌

- Azevedo C (1993) Occurrence of an unusual branchial mycoplasma-like infection in cockle *Cerastoderma edule* (Mollusca, Bivalvia). *Dis. Aqua. Org.*, 16, 55-59
- Bower SM, Meyer G (1991) Diseases of Japanese scallops (*Patinopecten yessoensis*) caused by an intracellular bacterium. *J. Shellfish Res.*, 10, 531
- Bower SM, Meyer G (1995) Causes of mortalities among cultured Japanese scallops (*Patinopecten yessoensis*) in British Columbia. *J. Shellfish Res.*, 14, 227
- Choi DL, Sohn SG, Park MA, Heo MS, Renault T (1996) Detection of a mollicute-like organism in kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*. *J. Fish Pathol.*, 9, 33-40
- Comps M, Tigé G (1999) Prokaryotic infections in the mussel *Mytilus galloprovincialis* and its parasite the turbellarian *Urastoma cyprinae*. *Dis. Aquat. Org.*, 38, 211-217
- Davis RE, Lee IM (1982) Pathogenicity of Spiro- plasmas, Mycoplasma-like organisms, and vascular- limited fastidious walled bacteria. In: *Phytopathogenic Prokaryotes*, Vol. 1. Academic Press, NY, pp. 499-504
- Harshbarger JC, Chang SC, Otto SV (1977) Chlamydiae (with phages), mycoplasmas, and rickettsiae in Chesapeake Bay bivalves. *Science*, 196, 666-668
- Hine PM, Diggles BK (2002) Prokaryote infections in New Zealand scallops *Pecten novaezealandiae* and *Chlamys delicatula*. *Dis. Aquat. Org.*, 50, 145-152
- Krol RM, Hawkins WE, Overstreet RM (1991) Rickettsial and mollicute infections in hepatopan- creatic cells of cultured Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). *J. Invertebr. Pathol.*, 57, 362-370
- Lauckner G (1983) Diseases of Mollusca: Bivalvia. In: O. Kinne ed. *Diseases of marine animals*. Vol. II, Chap. 13. Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, pp. 477-961
- Razin S, Freundt EA (1983) Class Mollicutes. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore, MD, pp. 740-757
- Renault T, Cochenec N (1994) Rickettsia-like orga- nisms in the cytoplasm of gill epithelial cells of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *J. Invertebr. Pathol.* 64, 160-162
- Sparks AK (1985) Rickettsiae, Clamydiae, and myco- plasmas of invertebrate. In: A.K. Sparks ed. *Synopsis of invertebrate pathology*. Elsevier, Amsterdam, pp. 165-180
- Tully JG, Whitcomb RF (1979) Human and animal mycoplasmas. In: J.G. Tully and R.F. Whitcomb, ed. *The mycoplasmas*, Vol. II. Academic Press, NY

## 제 6 절 굴의 Viral gametocytic hypertrophy

### 1. 서 론

2002년 11월부터 경남 통영, 거제지역 6개소의 굴 양식지에서 매달 시료를 채집(Station별로 30개체), 3개년에 걸쳐 총 22회의 조사에서 굴의 생식소 내 봉입체로 확인되는 VGH(Viral gametocytic hypertrophy) 발현상황을 조사, 분석하였다.

VGH는 papova-like virus의 감염으로 나타나는 것으로 알려져 있으며 오스트레일리아 북부의 진주조개의 labial palp 상피에 감염된 것(Norton et al. 1993), 미국(Meyers 1981, Farley 1985, Winstead et al. 1998, Winstead & Courtney 2003)과 캐나다의 벗굴(*Crassostrea virginica*)의 생식소 상피(McGladdery & Stephenson 1994)에서 보고되어 있으며, *Crassostrea gigas*, *C. commercialis*, *Ostrea lurida* 그리고 *O. edulis*에서는 유사 병소가 그 이전부터 보고되었고(Farley 1978) 대합류인 *Mya arenaris*의 아가미 상피 및 다른 조직에서도 종양과 유사한 병소를 기술하였다(Farley 1976).

### 2. 재료 및 방법

질병 모니터링을 위해 채집한 참굴 시료를 상법에 따라 데비드슨용액에 고정하여 병리조직학적으로 검사하였다. 투과전자현미경적 검사를 위하여 칼슘용액에 고정된 조직을 4°C에서 2.5% glutaraldehyde(0.2M cacodylate buffer, pH 7.2)로 1시간 고정한 후 1% osmium tetroxide(0.2M cacodylate buffer, pH 7.2)로 후고정 하였다. 고정된 시료를 상법에 따라 Epon에 포매하여 미세절편을 만들었다. 염색은 5% uranyl acetate와 lead citrate로 하여 Jeol 1200 EX-2로 80 kV로 관찰하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3-1. VGH의 월별 발현률

VGH의 경우는 여름보다 봄에 발현률이 두드러지게 나타나는 것으로 확인되었다. 2002년에는 3월부터 5월, 2003년에는 4월부터 6월, 그리고 지역에 따라 7월, 8월에도 관찰되었다. 2002년 3월에서 5월 사이에는 St. 3, 2, 6 그리고 5에서 발현하였으며, 10월에 두 지역(St. 3, 4)에서 일시적으로 관찰되었으나, 타 지역에서는 나타나지 않았다. 10월 전, 후로는 발현이 전 지역에서 관찰되지 않았다. 2002년과 2003년 두 해를 두고 비교했을 때, 2003년의 발현률이 높았으며, 지역적으로는 St. 2, St. 6 그리고 St. 5에서 높은 발현률을 나타내었고, St. 3과 St. 1이 순차적으로 나타났다. St. 4는 2002년 10월에 1회 발현개체가 확인되었으나 그 이외로는



나타나지 않았다. 월별로 가장 큰 발현률을 나타낸 곳은 St. 2이지만 지속성으로 봤을 때는 St. 5에서 가장 오랫동안 나타났다(Fig. 6-1).

암수개체 별 VGH의 발현률을 따로 나타내지는 않았지만, 2002년에는 대부분이 수컷 개체에서 나타난 반면, 2003년 관찰 시에는 암컷 개체에서도 다수 관찰되었다. McGladdery & Stephenson(1994)의 보고에서 나타난 경우도 암컷과 수컷개체 모두의 생식소에서 비대세포(hypertrophied cells)의 출현을 설명하고 있으나, 그 발생비율에 관한 내용은 상세히 나타나 있지 않다. 2002년과 2003년 사이의 암, 수 개체에 따른 발생 비율에서 차이가 나는 것에 관한 설명을 뒷받침해 줄만한 근거자료는 찾기 어렵지만 암수 분화율 또는 분화시기와도 관련이 있을 것으로 생각된다.

수온과의 관계는 수온이 상승하기 시작하는 3월경부터 5월까지이며 수온이 급상승하기 시작하는 6월부터는 발현되지 않는 경향을 보였다. 그러나 2002년과 2003년의 수온을 비교해 보았을 때, 큰 수온차이를 찾아 볼 수 없어, 2년간의 VGH 발현율과 수온과의 관련성을 찾기는 어려웠다.

### 3-2. 숙주에 대한 영향-조직학적 변화

생식소 내의 호염기성 봉입체로 관찰되는 본 증상은 봉입체에 따라 생식소 내 가장자리로 배열되는 다핵(multi-nuclear)의 거대세포를 형성하거나(Fig. 6-3,5), 봉입체 내부가 균질화된 호염성의 형태를 나타내기도 했으며(Fig. 6-2) 가장자리로 짙은 호염성의 테두리를 형성한

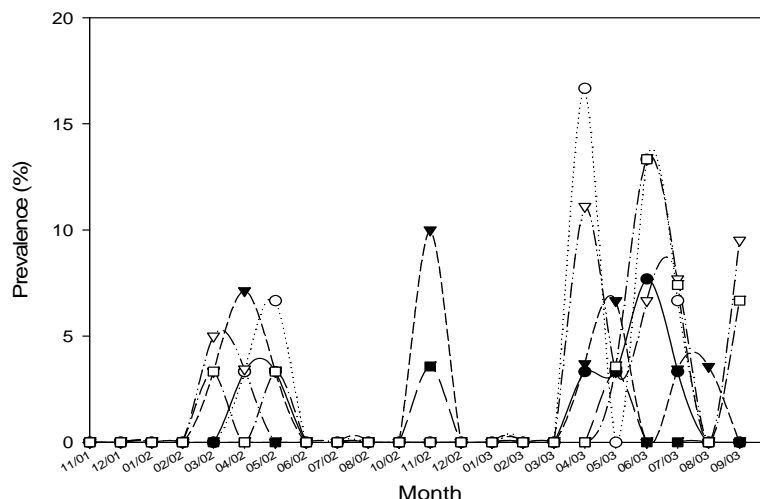


Fig. 6-1. Prevalence of viral gamtocyctic hypertrophy(VGH) in Pacific oyster *Crassostrea gigas* from 6 sites(Stn 1 —●—, Stn 2 ...○..., Stn 3 ---▼---, Stn 4 ·—▽·· —, Stn 5 —■— and Stn 6 ·—□·—) in Tongyong and Geoje(n=30).

것도 나타났다. 봉입체에 따라 파괴된 핵에서 나온 염색질의 응집체가 점상으로 염색되어 관찰되기도 한다.(Fig. 6-4). 봉입체 주변은 세포가 존재하지 않는 빈공간을 형성하고 형성단계에 따라 약간의 피사세포가 관찰되기도 했으며, 빈공간의 두께는 봉입체에 따라 다르게 나타났다(Fig. 6-2,3). 그러나 봉입체 주위의 생식소 조직은 변성을 일으키지 않았으며 혈구응집과 같은 숙주 방어기작이나, 다른 병적소견도 나타내지 않았다. 일반적 조직관찰에 사용되는 H&E(Hematoxylin & Eosin) 염색에서는 짙은 푸른색 내지는 보라색을 나타냈으며, 세포 내 DNA를 선택적으로 염색하는 Feulgen 반응에서는 짙은 보라색을(Fig. 6-4), Phloxine tartrazine 염색에서는 주홍색을 나타냈다(Fig. 6-5). 봉입체의 형태는 구형에서 난형으로 다양하게 나타났으며, 크기도 다양하여 직경이 작게는 15  $\mu\text{m}$ 에서 큰 것은 60  $\mu\text{m}$ 로 관찰되었다.

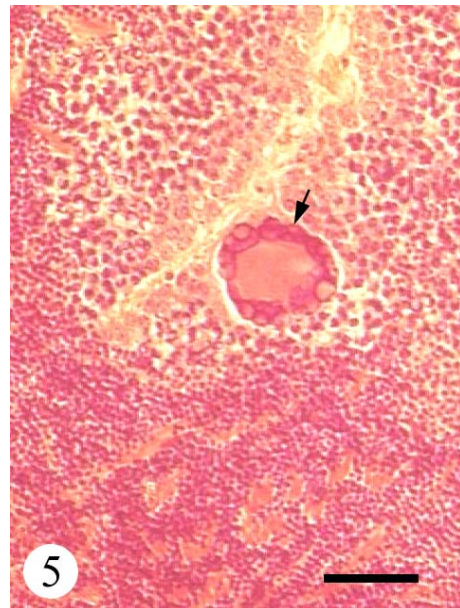
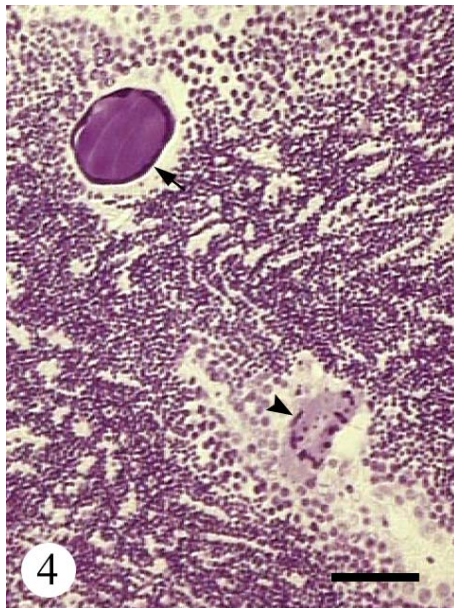
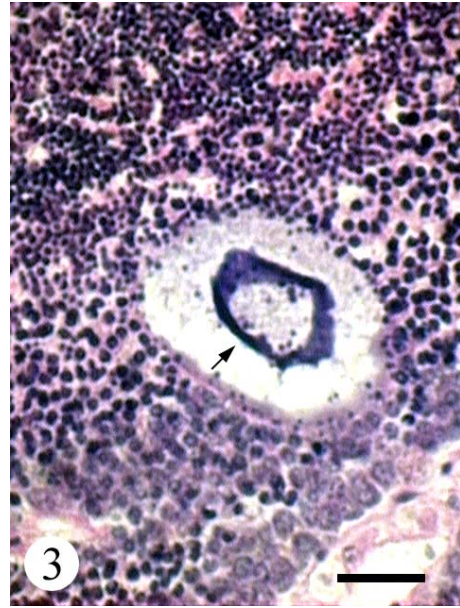
척추동물에 보고되고 있는 Papovavirus는 두 종류로, papillomaviruses 그리고 polyomaviruses 이고 사마귀, 유두종(papilloma), 피부암 등의 원인이다. 이에 반해 VGH에 감염된 굴이나 다른 패류의 경우 생식소 내의 봉입체 형성 이외에 표피의 종양이나, 다른 변성이 관찰되지 않았다. 본 조사에서 관찰된 virus 입자는 그 크기로 보아 polyomavirus에 가까우나, 이전의 보고에서는 paillomavirus-like virus로 말하고 있다(McGladdery & Stephenson 1994). McGladdery & Stephenson(1994)의 보고에 따르면 Papova-like virus의 세포내 복제로 세포가 비대된 것이 명확히 관찰되며, 감염 빈도는 대부분 낮게 나타나서, 슬라이드 표본 한 개당 5개 이하의 감염 세포수를 관찰한 것으로 보고되었으며, 드물게 높은 빈도를 보인 경우도 나타났다고 한다. 이러한 비대세포의 출현에도 불구하고 굴의 건강이나, 산업적 피해에는 큰 영향을 주지 않았다고 한다.

본 관찰결과에서도 발현빈도 수는 낮았지만 심한 감염개체의 경우, 한 슬라이드 표본에서 60개 이상의 봉입체가 나타나기도 했다. papova-like virus의 감염으로 생식소와 다른 조직에 병적변화를 일으키지는 않았지만 봉입체가 다양한 크기로 생식소의 일부를 점령하는 만큼 굴 생식에 영향을 끼칠 가능성을 배제할 수는 없을 것으로 사료된다.

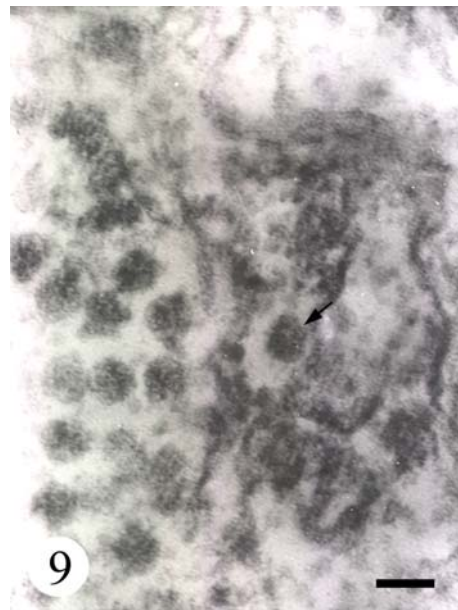
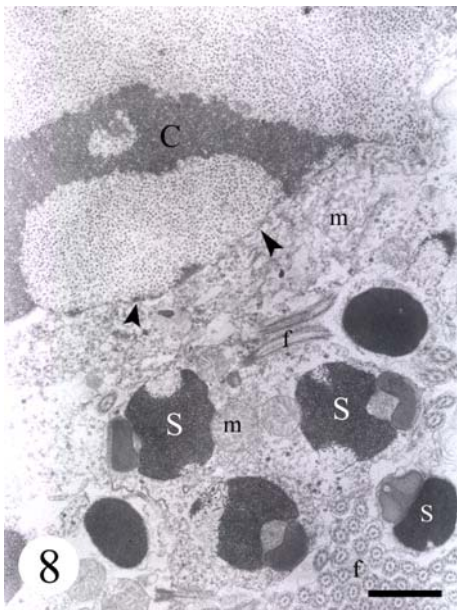
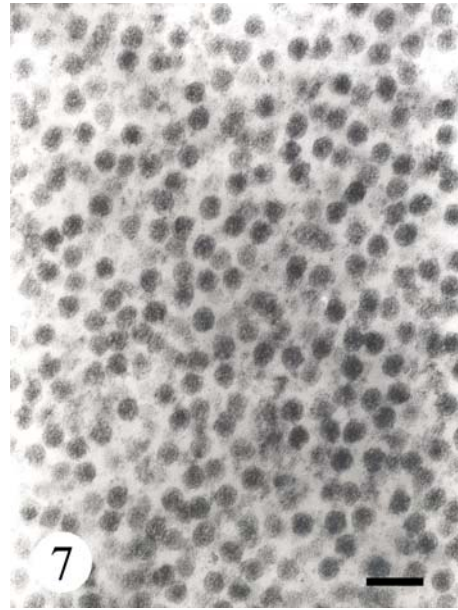
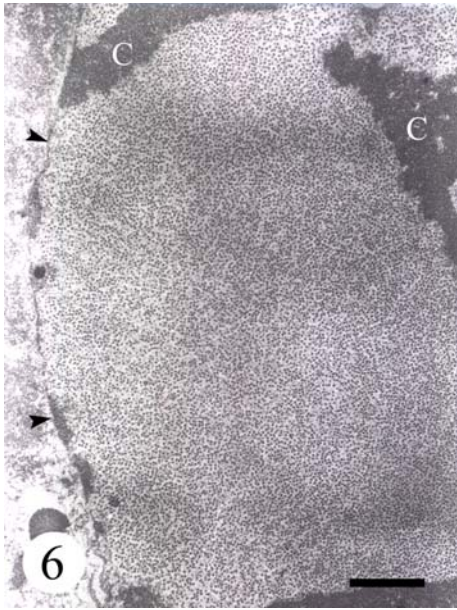
### 3-3. 미세구조-투과전자현미경 관찰

투과전자현미경으로 미세구조를 관찰한 결과, 봉입체 내에 바이러스양의 입자가 가득 차 있었으며(Fig. 6-6), 바이러스 입자는 envelop이 없는 정20면체의 형태로 직경이 약 40~45 nm로 관찰되었다(Fig. 6-7). 이 같은 형태학적 특징은 papovavirus(Akermann & Berthiaume 1995, Dimmock & Primrose 1994)와 유사한 것으로 판단되었다. 봉입체 가장자리의 전자밀도가 높게 관찰되는 부분은 광학현미경 상에서 관찰된 봉입체 가장자리의 두꺼운 테두리와 일치하는 부분으로 염색질(chromatin)이 응집되어 나타나는 것이었으며, 봉입체 주변으로 많은 미토콘드리아와 정세포(정충)가 흩어져 있는 것이 관찰되었다(Fig. 6-8). 또, 수적으로는 적지만 봉입체 주변으로 방출된 바이러스 입자가 드물게 관찰되었다(Fig. 6-9). 미세구조 관찰에서도 봉입체 주위의 생식세포에는 명확한 세포변성이 관찰되지 않았다.





- Fig. 6-2. Two inclusion bodies(arrow) in reproductive gland of male individual. Basophilic homogeneous inclusion bodies are among germ cells. Surrounding tissue lacks necrotic cells.(H&E) (bar=35  $\mu\text{m}$ ).
- Fig. 6-3. The inclusion body is organized into a ring-like structure of condensed chromatin. Unstained regions are found outside and inside of the inclusion body.(H&E) (bar=20  $\mu\text{m}$ ).
- Fig. 6-4. Inclusion body(arrow) is Feulgen positive and the other structure(arrow head) has an indistinct outline and spotted chromatin debris.(Feulgen reaction) (bar=25  $\mu\text{m}$ ).
- Fig. 6-5. Inclusion body(arrow) has several nuclei at its margin and stains color of red orange.(Phloxine tartrazine) (bar=25  $\mu\text{m}$ )



- Fig. 6-6. Transmission electron micrograph of inclusion body, filled with viral particles. Arrow heads : edge of inclusion body ; C : condensed chromatin. Scale bar=1  $\mu$ m.
- Fig. 6-7. Details of viral particles, which arenon enveloped, icosahedral and 40-45nm in diameter. Scale bar=100 nm.
- Fig. 6-8. Transmission electron micrograph of inclusion body and surrounding tissue. Arrow heads : edge of inclusion body ; C : condensed chromatin ; m : mitochondria ; S : head of spermatozoa ; f : flagella of spermatozoa. Scale bar=1  $\mu$ m.
- Fig. 6-9. Released virus particle(arrow) is observed outside inclusion body. Scale bar=50 nm



#### 4. 참고문헌

- Ackermann HW, Berthiaume L (1995) Atlas of Virus Diagrams. CRC Press, Inc. 63, 64pp
- Dimmock NJ, Primrose SB (1994) Introduction to Modern Virology, forth edition. Blackwell Science Ltd.
- Farley CA (1976) Ultrastructural observations on epizootic neoplasia and lytic virus infection in bivalve mollusks. Progress in Experimental Tumor Research 20, 283-294
- Farley CA (1985) Viral gametocytic hypertrophy in oysters. In: C.J. Sindermann (ed.) Identification Leaflets for Diseases and Parasite of Fish and Shellfish, No. 25. ICES, Copenhagen. 5 pp
- McGladdery SE, Stephenson MF (1994) A viral infection of the gonads of eastern oyster (*Crassostrea virginica*) from Atlantic Canada. Bull Aqua Associ Can 94(3), 84-86
- Meyers TR (1981) Endemic diseases of cultured shellfish of Long Island, New York: adult and juvenile American oysters (*Crassostrea virginica*) and hard clams (*Mercenaria mercenaria*). Aquaculture 22, 305-330
- Norton JH, Shepherd MA, Prior HC (1993) Papovavirus-like infection of the Golden-Lipped Pearl Oyster, *Pinctada maxima*, from the Torres Strait, Australia. J Invert Pathol 62, 198-200
- Winstad JT, Courtney LA (2003) Ovacystis-like condition in the eastern oyster *Crassostrea virginica* from the northeastern Gulf of Mexico. Dis Aquat Org 53, 89-90
- Winstead JT, Overstreet RM, Courtney LA (1998) Novel parasites in the eastern oyster *Crassostrea virginica* from two Gulf of Mexico bays. J. Shellfish Res 17, 341-342

## 제 7 절 참굴의 녹색굴 출현에 대한 연구

### 1. 서 론

참굴의 양식과정 중에서 개체의 표면에 녹색으로 변화되는 현상이 발생하여 원인의 규명이 필요하였다. 이러한 증상은 일본에서 보고된 양식 참굴의 바이러스성 외투막 녹색화증과 유사하였다. 일본의 경우 양식 참굴의 바이러스성 외투막 녹색화증은 대량폐사를 수반하여 일어났지만 우리나라의 경우에는 대량폐사를 수반하지 않은 점이 가장 큰 차이점이라고 할 수 있다. 일본의 양식 참굴의 바이러스성 외투막 녹색화증은 1998년 히로시마현의 굴의 대량폐사와 관련이 있으며, 병리조직학적 관찰 결과 외투막과 심장에 혈구의 침윤이 나타나며, 육각형에서 원형의 바이러스가 관찰되었다. 또 바이러스의 인위감염 실험 결과 4주의 실험기간 중 60~90%의 누적폐사율이 나타나 녹색화증의 원인이 바이러스성 질병이라고 증명된 바 있다. 우리나라의 참굴의 녹색굴 출현현상은 대량폐사를 수반하지는 않으나 국민의 정서상 녹색의 침착 현상이 혐오감을 주어 상품성을 떨어뜨리게 되므로 원인의 규명이 필요하다. 따라서 본 연구는 녹색굴의 출현에 대한 병리조직학적 및 전자현미경적 변화를 관찰하여 그 결과를 보고하고자 한다.

### 2. 재료 및 방법

#### 2-1. 시료

참굴의 질병 모니터링 중 육안적 검사 결과 녹색굴로 보이는 개체를 실험에 사용하였다.

#### 2-2. Hemacolor stain

육안적 관찰결과, 녹색으로 침착된 부분을 일부 절제하여 조직여액을 충분히 제거한 후 슬라이드에 수회 도말하였다. 도말된 슬라이드는 공기중에서 건조하여 Hemacolor kit로 염색하였다. Hemacolor kit내의 1, 2, 3 염색액을 각각 1분씩 염색한 후 흐르는 물에 5분간 방치하여 과다한 염색액을 제거하였다. 염색된 슬라이드는 공기 중에서 말린 후 광학현미경으로 관찰하였다.

#### 2-3. 병리조직학적 및 전자현미경적 검사

질병 모니터링을 위해 채집한 참굴 시료를 상법에 따라 데이비드슨용액에 고정하여 병리조직학적으로 검사하였다. 투과전자현미경적 검사를 위하여 칼슨용액에 고정된 조직을 4°C에서 2.5% glutaraldehyde(0.2M cacodylate buffer, pH 7.2)로 1시간 고정한 후 1% osmium tetroxide

(0.2M cacodylate buffer, pH 7.2)로 후고정 하였다. 고정된 시료를 상법에 따라 Epon에 포매하여 미세절편을 만들었다. 염색은 5% uranyl acetate와 lead citrate로 하여 Jeol 1200 EX-2로 80kV로 관찰하였다.

### 3. 결과 및 고찰

녹색굴은 Fig. 7-1과 같이 녹색의 침착물이 개체의 조직 내에 생성되어 외관상으로 녹색의 반점이나 부분으로 관찰되었다. 일부 개체들에 있어서 녹색의 반점은 아가미나 멘틀 혹은 palp 등에 국한되어 나타난 경우도 있었으며, 개체 전체가 녹색화되어 나타난 개체도 일부 관찰되었다. 그러나 이러한 개체들에 있어서 외관상으로 괴사된 부분이나 특이한 병리학적 증상은 관찰되지 않았다.

녹색을 띠는 조직부분을 절제하여 슬라이드에 도말하여 헤마칼라로 염색한 결과 혈구의 세포질 내에 밝고 투명한 입자들이 가득 차있는 것이 관찰되었다(Fig. 7-2). 이러한 물질은 헤마칼라로 염색되지 않고 투명하게 보였다. 이러한 현상은 혈구의 탐식 작용으로 생기는 현상과 매우 유사하게 관찰되었다. 그러나 대부분의 혈구 탐식 작용은 특정한 형태를 가진 macrophage와 같은 형태의 혈구가 이러한 작용을 하게 되는데, 녹색굴에서 나타난 현상은 대부분의 혈구가 모두 세포질 내에 밝고 투명한 입자들이 가득 차있어서 혈구의 탐식작용으로 판단하기 어려웠다.

전자현미경적 관찰 결과, 혈구의 세포질 내에서 막으로 둘러싸여진 vesicle이 관찰되었다(Fig. 7-3). 이러한 vesicle내에서 바이러스와 유사한 입자들이 관찰되었으며(Fig. 7-4), 입자의 크기는 직경이 130 nm내외이며, 형태는 육각형이나 원형이었다. 또한 envelop을 가지고 있었다(Fig. 7-5, 6).

패류의 이리도바이러스 감염증에 대한 보고에서 현재까지 알려진 이때패의 이리도바이러스는 3 종류이다. 이러한 바이러스에 대하여 순수분리가 되지 않았으며, 깊은 연구는 이루어지지 않았음에도 불구하고, 바이러스의 형태나 크기(직경 380 nm), DNA 존재여부 등으로 인하여 이리도바이러스로 분류되어져 왔다. 가장 처음 보고된 이리도바이러스 감염증은 포르투갈 굴 *Crassostrea angulata*에서 보고된 감염증으로 아가미조직의 괴사를 유발하고, 혈구의 감염을 일으키는 특징이 있다. 이 감염증을 유발하는 바이러스 입자는 감염된 세포내에 봉입체를 형성하는 특징이 있다(Comps 1970, 1972).

이리도바이러스는 *Crassostrea angulata*와 *C. gigas*(유생)기 잘 감염되며, 이리도바이러스에 감염된 *C. angulata*는 아가미나 혈구와 결합조직에 장애가 일어나 치명적인 피해를 입는다(Comps & Duthoit 1976, Comps & Masso 1978). *C. gigas*에 대한 이 바이러스 감염은 유생의 폐사를 유발하며, 따라서 참굴이 이 질병에 감염되었을 때를 oyster velar virus disease라

고 부르기도 한다(Elston & Wilkinson 1985). 이리도 바이러스 질병의 발생지역은 아직까지 보고되지 않았지만 스페인과 프랑스, 포르투갈에 분포한다. 미국의 서부해안의 와싱턴주의 부화장들에서 유생의 폐사가 발생하고 있다(Comps 1983, 1988, Elston 1979, 1980). 이매패류의 주화세포가 없는 관계로 감염된 조직을 도말하거나 절편을 만들어 염색하여 검경하고, 감염이 추정되는 경우 전자현미경으로 관찰하는 것이 유일한 진단방법이다. 이 질병을 특이적으로 진단할 수 있는 용이한 방법은 현재까지도 확립되어 있지 않다. 아가미병 발생시 및 1970년 대 랑폐사시에 전자현미경으로 감염어를 관찰한 결과 30~40  $\mu\text{m}$ 의 매우 큰 다형세포 및 결합조직에서 바이러스가 발견되었다. 이러한 세포들은 봉입체를 가지고 있으며, 바이러스 입자가 봉입체로부터 빠져나오는 것이 관찰되었다. 바이러스입자는 이십면체로 직경이 380 nm와 350 nm이며, 250 nm와 190 nm의 전자밀도가 높은 nucleoids를 가진다. OVVD의 이리도바이러스는 velum의 상피세포에만 감염한다. 이 바이러스도 이십면체이며, 직경은 230 nm이다.



Fig. 7-1. External view of Green oyster

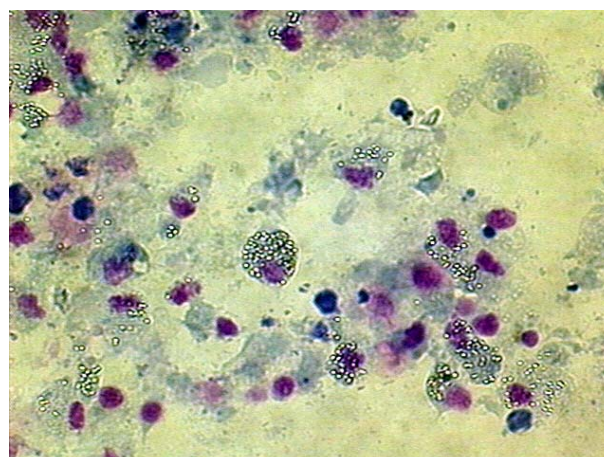


Fig. 7-2. Refringent material was observed in hemocyte of Green oyster

본 연구결과 관찰된 이리도바이러스는 정이십면체로서 직경이 130 nm로서 현재까지 보고된 이매패류의 이리도바이러스와 비교할 때 크기가 매우 작은 이리도바이러스이다. 이러한 크기의 이리도바이러스는 우리나라의 돌돔에 대한 대량폐사를 유발하는 이리도바이러스와 유사한 크기이다. 현 시점에서 돌돔의 이리도바이러스가 양식굴에 이리도바이러스병을 일으키는지 혹은 보균자로서 존재하는 것인지에 대한 판단을 할 수 있는 명확한 자료가 없다. 아울러 본 연구에서 녹색굴의 감염개체에서 확인된 이리도바이러스가 원인 병원체로서 추정이 되는지에 대해서는 추후 병인학적 원인 연구가 필요하다.

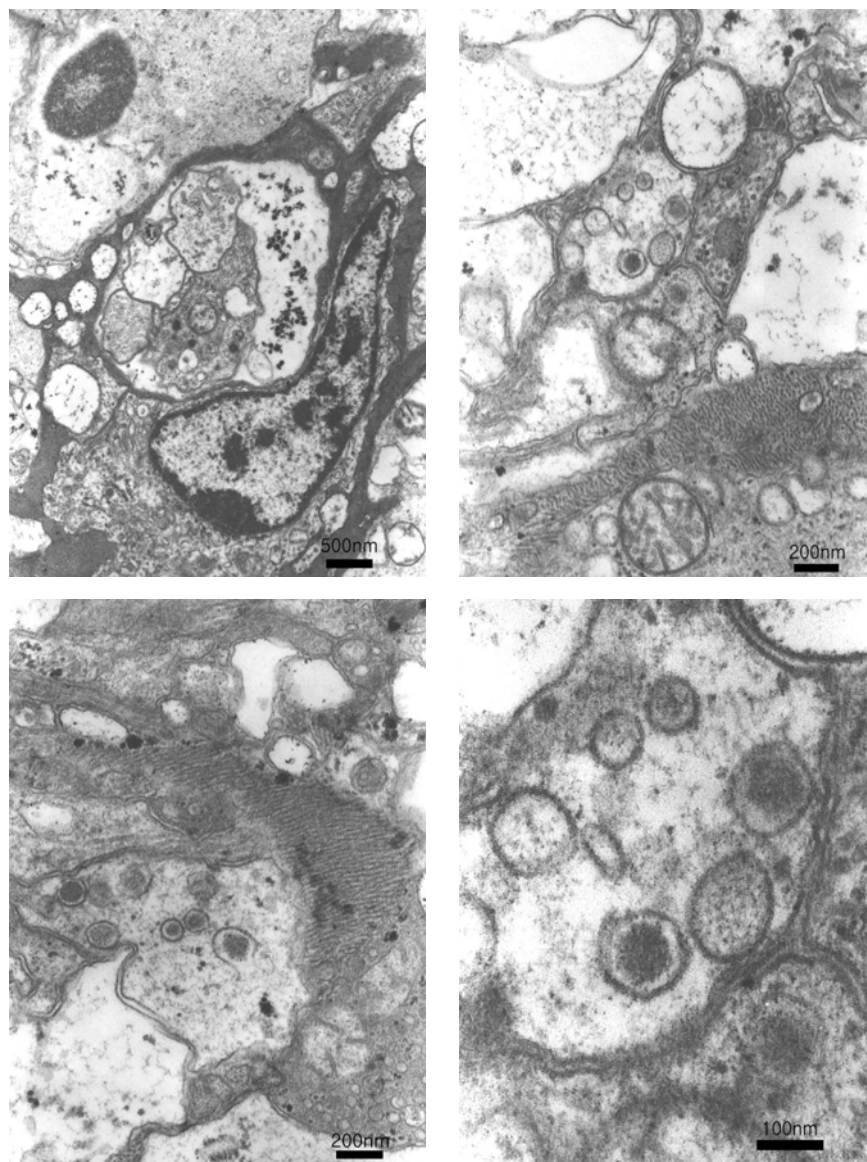


Fig. 7-3~6. Transmission electron micrograph of green oyster. 3. Large vesicle was observed in the cytoplasm. 4. Virus particle in the vesicle. 5. Virus particle has electron dense core with capsid. 6. Empty capsid and mature virus particle.

#### 4. 참고문헌

- Comps M (1970) La maladie des branchies chez les huîtres du genre *Crassostrea*, caractéristiques et évolution des altérations, processus de cicatrisation. *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.*, 34, 23-44
- Comps M (1972) Observations sur la résistance d'huîtres du genre *Crassostrea* au cours de la mortalité massive de 1970-1971 dans le bassin de Marennes-Oléron. *Cons. Inter. Explor. Mer*, CM. K 22, 9 pp
- Comps M (1983) Recherches histologiques et cytologiques sur les infestations intracellulaires des mollusques bivalves marins. Thèse Doct. Ctat Sci. Nat., Montpellier, France, 128 pp
- Comps M, Duthoit JL (1976) Infection virale associée à la maladie des branchies de l'huître portugaise *Crassostrea angulata* LmK. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 283, D, 1595-1596
- Comps M, Masso RM (1978) Study with fluorescent technique of the virus infection of the portuguese oyster *Crassostrea angulata* LmK. *Proc. Inter. Coll. Invertebr. Pathol.*, 11-17 Sept. 1978, 39-40
- Elston R (1979) Virus-like particles associated with lesions in larvae of pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *J. Invertebr. Pathol.*, 33, 71-74
- Elston R (1980) Ultrastructural aspects of a serious disease of hatchery reared larval oysters, *Crassostrea gigas* Thünberg. *J. Fish Dis.*, 3, 1-10
- Elston R, Wilkinson MT (1985) Pathology, management and diagnosis of oyster velar virus disease(OVVD). *Aquaculture*, 48, 189-210



## 제 8 절 진주조개(*Pinctada fucata*)의 버나바이러스 감염증

### 1. 서 론

최근 국내에서 양식되고 있는 진주조개는 일본에서 모패와 치패를 가져다 양식하는 곳이 많은 실정이다. 일본의 경우, 1994년경부터 서일본 각지에서 양식 진주조개의 치패, 모패 및 핵이 삽입된 조개가 연체부와 패각 유축 또는 황갈색을 나타내면서 대량폐사를 불러와, '97~'99년에는 생산량이 현저히 줄어들어 진주양식사업이 파멸에 가까운 상태에 까지 이르렀다. 폐사된 진주조개의 원인 규명을 위한 다양한 조사 가운데, 병든패와 죽은패에서 birnavirus가 분리되었으며, 대량폐사의 원인으로 바이러스 감염을 보고한 바 있다.

패류에 있어 버나바이러스 감염증에 관해서는 오래 전에 Tellin clam *Tellina tenuis* 에서 birnavirus-like virus의 감염으로 보고하였고(Buchanan 1973, Hill 1976), 그 원인 바이러스를 TV(Tellina virus)로 명명하였다(Dobos et al. 1979). 그 외에도 oyster 등에도 유사 바이러스의 검출을 보고하고 있으나, 어류에서 분리되는 IPNV(infectious pancreas necrotic virus)와 유사하다는 것 외에는 구체적인 바이러스의 특징은 명확히 밝혀져 있지 않았다. 최근 일본의 양식 진주조개의 대량폐사와 관련하여 감염성질병, 플랑크톤의 부족, 양식지역의 환경수 오염 등(Miyazaki et al. 1999)이 제기 되었으나 Suzuki(1998a) 등이 birnavirus 감염을 그 원인으로 보고하였다. 이 Marine birnavirus(MABV)는 그 독성이 매우 약한 것으로 설명하고 있으며(Suzuki et al. 1998b) 수온이나 중금속 오염 등의 환경 스트레스가 복합적으로 작용하였을 가능성을 설명하고 있다(Chou et al. 1994, 1998)

본 조사에서도 우리나라에서 양식되고 있는 진주조개를 대상으로 2002년 2003년에 걸쳐 세포배양법, Polymerase chain reaction 법(PCR법) 및 조직학적 검사법으로 바이러스성 질병을 진단한 결과, PCR에 의하여 birnavirus 감염이 확인되어 그 내용을 다음과 같다.

### 2. 재료 및 방법

#### 2-1. 세포배양에 의한 바이러스 진단 및 세포 선택성 조사

채집한 패류의 아가미와 소화맹낭을 Hanks' basal salt solution에 넣어 균질화하여 10배 희석한 후, 2,000×g(4℃)에서 15분간 원심분리하여 상등액을 membrane filter(0.45 μm, Corning)로 여과하였고, 여과액은 최종 희석배수를 50배로 하여 바이러스 접종액으로 사용하였다.

CHSE-214, RTG-2, BF-2, EPC, FHM 세포는 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco BRL)이 첨가된 Dulbecco's modified eagle medium(DMEM-10)으로 24시간 배양하여 단층배양 후 바이러스 접종액을 0.5 mL씩 접종하고 20℃에서 1시간 흡착시킨 후 DMEM-5로 20~25℃에

서 2주일간 배양하여 세포변성효과(cytopathic effect, CPE)를 관찰하였다.

### 2-2. RT-PCR에 의한 버나바이러스 진단

RNA 분리는 패류의 생체조직(소화맹낭 1 g)을 잘라내어 Ultraspec-II RNA Isolation Kit (Biotechx)를 사용하여 분리하였고, 유전자 증폭에는 Taq polymerase, Reverse transcriptase을 이용한 RT-PCR법을 사용하였다. PCR에 사용한 primer는 Table 8-1과 같이 사용하였으며, PCR 반응조건은 94°C에서 5분간 predenaturation 시킨 후, 94°C에서 30초간 denaturation, 55°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 extention 반응을 30cycles를 진행시킨 후 72°C에서 5분간 postextension 시키는 방법으로 실시하였다. 여기서 얻은 PCR product는 EtBr 로 염색, 1.5% agarose gel에 전기영동시킨 후 UV로 가시화시켜 확인하였다.

## 3. 결 과

Birnavirus는 2002년 12월의 시료에서 검출되었으며, 그 외의 시료에서는 검출되지 않았다. 바이러스 분리를 위하여 실험한 결과는 다음과 같다.

### 3-1. 세포배양에 의한 바이러스 진단 및 세포 선택성 조사

바이러스 분리를 위하여 CHSE-214, RTG-2, BF-2, EPC, FHM 세포에 채집한 시료들을 접종하여 CHSE-214, RTG-2, BF-2 세포는 20°C에서, EPC, FHM 세포는 25°C에서 2주일간 배양하면서 세포 변성을 관찰한 결과, 모든 세포에서 CPE는 관찰되지 않았다.

### 3-2. RT-PCR에 의한 바이러스 진단

진주조개의 소화맹낭에서 RNA를 추출하고 birnavirus의 primer set를 이용하여 RT-PCR을 실시한 결과, 2002년 12월에 채집한 시료 중에서 3마리에서 예상된 크기인 440bp의 증폭산물을 확인할 수 있어 진주조개에 birnavirus 감염이 확인되었다(Fig. 8-1).

Table 8-1. PCR primers used to amplify 16S and 16S/23S intergenic spacer

Primer sets	Orient	Oligo sequence	PCR product size(BP)
16S rRNA	sence	5'-GGTCAACAACCAACTAGTGACC-3'	440
	antisence	5'-GTTGGGATTGACTGCGTAAAC-3'	

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 P

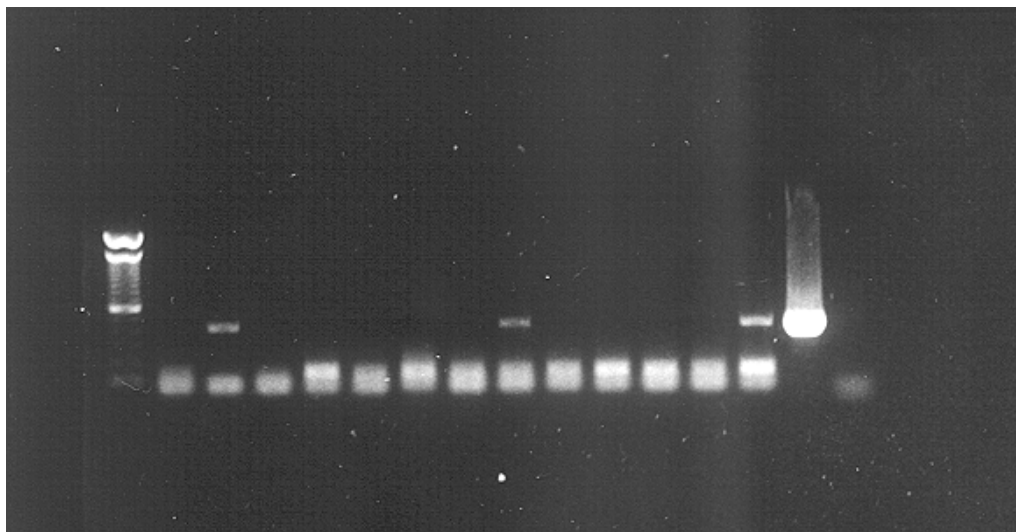


Fig. 8-1. Analysis of birnavirus in pearl oyster samples by RT-PCR.

M : Marker, 1~13 lane : pearl oyster samples,  
2, 8, 13 lane : pearl oyster infected with birnavirus  
P : birnavirus positive

### 3-3. 버나바이러스 감염에 의한 조직학적 변화

Birnavirus가 감염된 시료는 외부증상은 뚜렷하게 나타나지 않았으나 병리조직학적으로는 아가미 조직의 근섬유 괴사, 소화맹낭 상피의 위축 및 난세포핵의 초자적 변성을 보이는 병소가 소수 관찰되었다(Fig. 8-2).

## 4. 고찰

진주조개에서 검출된 birnavirus는 어류에서 주로 검출되는 바이러스로서 국내 진주조개양식장에서는 처음으로 검출되어졌다. 어류주화세포에서는 CPE가 관찰되지 않았으나 RT-PCR을 이용한 바이러스 진단에서 birnavirus가 검출되었으며, 이것은 바이러스의 초기 감염에 의한 것으로 생각되어진다. 또한 패류의 폐사나 빈사와 상관없이 조사하여 일부개체에서 검출되었으므로 Suzuki 등(1998 b)이 보고 한 것과 같이 본 바이러스는 그 자체의 독성은 약한 것으로 생각되며, 환경적인 영향과 복합적으로 작용하여 병증을 유발할 가능성이 클 것으로 생각된다. 일본에서 분리 보고된 MABV와의 관련성이나 환경요소 등(수온, 중금속 오염, 플랑크톤)의 영향에 대해서는 앞으로 더 조사, 연구 되어져야 할 부분이며, 이러한 RT-PCR 방법을 응용, 패류양식장 전체를 대상으로 신속하고 정확한 바이러스 감염여부조사에 이용함으로써 양식패류의 바이러스 감염에 대한 체계적인 정보의 확립이 가능하게 되었다.

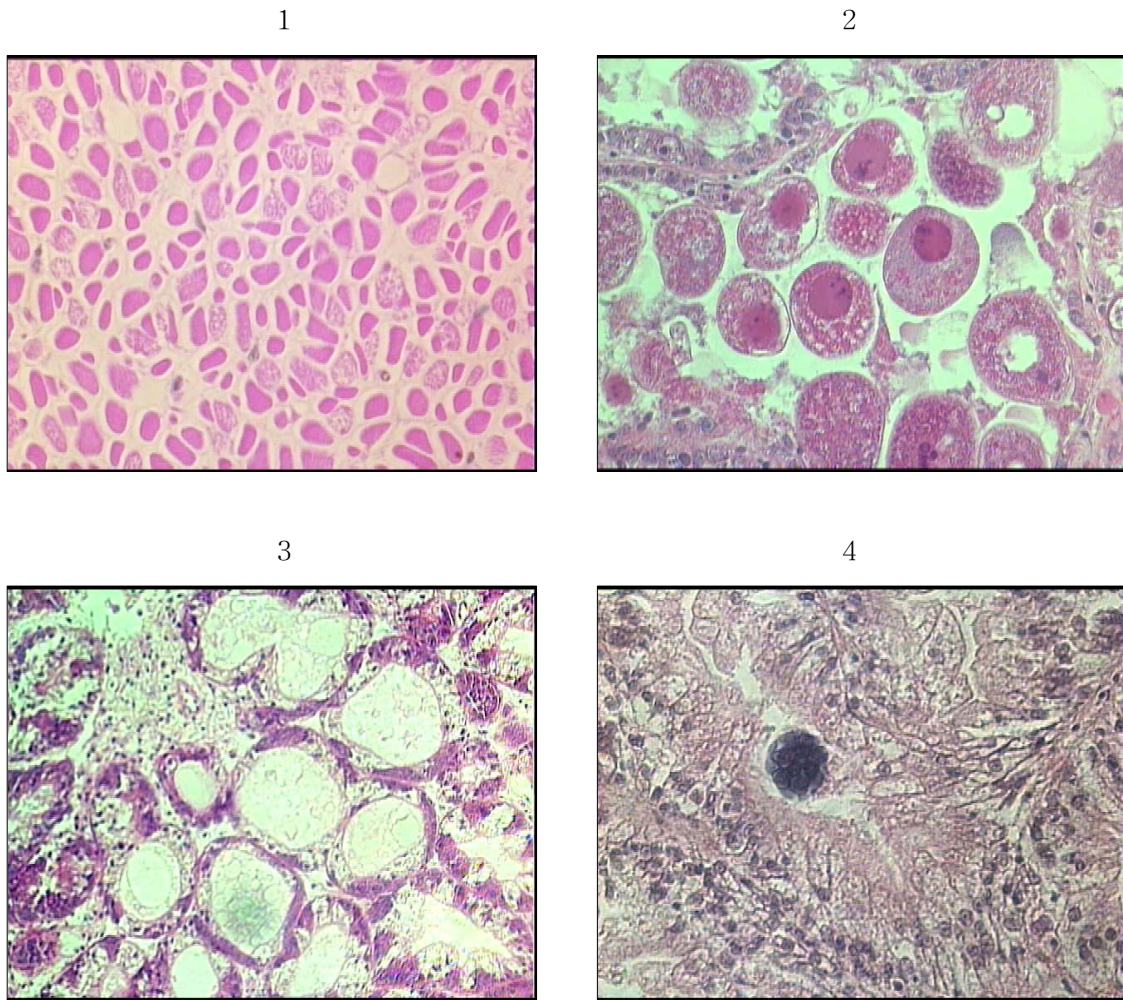


Fig. 8-2. Histopathological observation of Pearl oysters infected by Birnavirus.

- 1 : Necrosis of muscular fibers
- 2 : Hyaline droplet degeneration of oocyte nucleus
- 3 : Atrophy of hepatopancreatic tubules
- 4 : A inclusionbody in the hepatopancreas

## 5. 요약

2002, 2003년에 걸쳐 우리나라 동해안의 강원도 고성에서 양식되고 있는 진주조개를 대상으로 세포배양법, Polymerase chain reaction 법(PCR법) 및 조직검사로 바이러스성 질병을 진단한 결과, 2002년 12월의 시료에서 birnavirus 감염이 PCR법으로 확인되었다. 어류유래의 주화세포를 이용한 세포배양법으로는 바이러스 배양이 이루어지지 못했으며, 조직검사에서도 일부 개체에서 아가미 조직의 근섬유 괴사, 소화맹낭 상피의 위축 및 난세포핵의 초자적 변성이 관찰되었다.

## 6. 참고문헌

- Buchanan JS (1973) Electron microscope observations of virus-like particles in the digestive gland of the marine bivalve *Tellina tenuis*. In: Proceedings of the 5th International Colloquium on Insect Pathology and Microbial Control, and 6th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, p.28
- Chou YH, Chang SJ, Lee HY, Chiou YC (1998) Preliminary evidence for the effect of heavy metal cations on the susceptibility of hard clam (*Meretrix lusoria*) to clam birnavirus infection. *Fish Pathol* 33, 213-219
- Chou YH, Li HJ, Lo CF (1994) Pathogenicity of a birnavirus to hard clam (*Meretrix lusoria*) and effect of temperature stress on its virulence. *Fish Pathol* 29, 171-175
- Dobos P, Hill BJ, Hallett R, Kells DTC, Becht H, Tenings D (1979) Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes. *Journal of Virology* 32, 593-605
- FAO (2001) FAO yearbook, Fisheries statistics; Aquaculture production 2001. FAO Fisheries Series, No. 64. Rome, FAO
- Hill BJ (1976) Properties of a virus isolated from the bivalve mollusc *Tellina tenuis* (da Costa), In: Page, L.A. (ed.) *Wildlife Diseases*. Plenum Press, New York, pp.445-452
- Miyazaki T, Goto K, Kobayashi T, Kageyama T, Miyata M (1999) Mass mortalities associated with a virus disease in Japanese pearl oysters *Pinctada fucata martensii*. *Dis Aquatic Org*, 37, 1-12.
- Suzuki S, Kamakura M, Kusuda R (1998a) Isolation of birnavirus from Japanese pearl oyster *Pinctada fucata*. *Fish Sci(Tokyo)* 64, 342-343
- Suzuki S, Utsunomiya I, Kusuda R (1998b) Experimental infection of marine birnavirus strain JPO-96 to Japanese pearl oyster *Pinctada fucata*. *Bull Mar Sci Fish Kochi Univ* 18, 39-41

## 제 9 절 진주담치의 이형혈구 감염증

### 1. 서론

우리나라에서 생산되고 있는 진주담치는 지중해담치(*Mytillus galloprovincialis*)에 속하며, 생산량은 13천톤으로 경제적 가치로는 4.7백만달러(56억원)이다(FAO 2001). 진주담치의 2001년도 전세계 생산량은 426백만톤으로 굴, 바지락, 가리비 다음으로 가장 많이 생산되는 양식 패류로 매우 중요한 양식 품종이다(FAO 2001).

진주담치에 대한 질병 모니터링 결과, 진주담치의 아가미 조직 내에서 산재된 혈구들 중에서 비정상적인 핵을 가진 혈구들이 관찰되었다. 이들 혈구들은 형태학적인 특징은 정상적인 혈구들에 비해 상대적으로 핵이 비대해 있으며, 핵인이 가장자리에 몰려있는 있거나 심하게 응집되어 있는 증상을 나타내었다. 이러한 혈구들의 형태학적인 특징이 굴이나 바지락에 감염된 Herpesvirus에 대한 감염 특징과 유사하였다.

1972년 이후 세계 여러나라에서 많은 종류의 패류에서 herpes-like virus 감염이 보고되고 있다(Farley et al. 1972, Renault et al. 2000). Herpes-like virus 감염은 참굴 *Crassostrea gigas*(Hine et al. 1992, Nicolas et al. 1992, Renault et al. 1994), 유럽넙적굴 *Ostrea edulis* (Comps & Cochenec 1993, Renault et al. 2000), *Tiostrea chilensis*(Hine et al. 1998)와 바지락 *Ruditapes philippinarum*(Renault 1998) 등에서 보고된 바 있다.

본 연구는 진주담치의 아가미 조직의 광학현미경적 관찰과 투과전자현미경적 관찰을 통해 이형혈구의 형태학적 및 미세구조의 변화를 연구하고 herpes-like virus의 진단을 위한 PCR을 통해 바이러스 감염 여부를 진단하였다.

### 2. 재료 및 방법

#### 2-1. 시료 채취

진주 담치의 질병 모니터링을 위하여 채취한 시료를 실험에 이용하였다.

#### 2-2. 광학현미경적 실험

진주 담치의 각 개체의 반을 광학현미경적 관찰을 위해 Davidson 고정액에 고정하고, 나머지 부분은 전자현미경적 관찰을 위해 Carson 용액에 고정하였다. 이틀정도 Davidson 용액에 고정한 뒤 샘플들을 순차 알콜에서 탈수 한 뒤, 자이렌에 투명화 과정을 거친 뒤, 파라핀에 포매 한 뒤 4~5  $\mu\text{m}$ 로 박절하였다. 절편은 파라핀을 제거한 뒤 HE 염색과 DNA 관찰을 위해 폴겐(Feulgen) 염색을 실시하였다.

### 2-3. 전자현미경적 실험

전자현미경적 관찰을 위해, 감염된 개체의 gill, mantle 및 digestive gland를 각각을 Carson 용액에서 0.2M cacodylated buffer로 일주일 동안 린스 한 뒤 3% glutaraldehyde으로 옮겨서 4°C에서 1시간정도 고정한다. 1% Osmic acid로 2차 고정을 한 뒤 알콜에서 순차적으로 탈수를 시키고, 부분적으로 10분 동안 cacodylated buffer에서 다시 수화 시킨 다음, propylene oxide로 투명화 하여 Epon에 포매 하였다. 시료를 80~100 nm로 잘라 copper grid에 올려 uranyl acetate와 lead citrate로 염색하여 전자현미경으로 관찰하였다.

### 2-4. PCR 분석

광학현미경상 이상혈구가 관찰되는 개체를 선별하여 PCR 분석을 실시하였으며, 샘플은 사전에 일부분을 발취해서 냉동보관 해두었던 진주담치의 gill, mantle 및 digestive gland를 절제하여 DNA 분리에 사용하였다. 조직시료에서 DNA 분리는 High pure PCR template preparation kit(Roche, Germany)를 이용하였다. 조직 시료 20 mg에 tissue lysis buffer(4M urea, 200 mM NaCl, 200mM EDTA, pH 7.4) 200  $\mu$ l를 첨가하여 균질화한 후 proteinase K(0.02 mg/ml) 40  $\mu$ l를 첨가하여 55°C에서 1시간 동안 방치하였다. 여기에 binding buffer(6M guanidine-HCl, 10 mM urea, 10 mM Tris-HCl, 20% Triton X-100(v/v), pH 4.4) 200  $\mu$ l를 첨가하여 혼합한 후 72°C에서 10분간 방치하였으며, 다시 100  $\mu$ l isopropanol을 첨가하여 혼합하였다. 조립된 High pure filter tube에 lysis solution을 옮겨서 8,000 rpm에서 1분간 원심 분리하였다. Wash buffer(20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, 80% ethyl alcohol(v/v), pH 7.5)로 8,000 rpm에서 1분간 2회 세정하였다. 남아있는 washing buffer를 제거하기 위하여 14,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 filter tube를 멸균된 1.5ml microtube에 옮겨 미리 70°C로 데워진 elution buffer(10 mM Tris, pH 8.5) 50  $\mu$ l를 첨가하여 14,000 rpm에서 1분간 원심 분리하여 DNA를 분리하였다. 분리된 DNA의 최종 농도는 50 ng/ $\mu$ l가 되도록 흡광도 A260/280 nm에서 조정하였다.

위에서 분리한 DNA를 template로 하여 PCR을 실시하였다. 사용된 primers(Arzul et al. 2001)와 positive(Le Deff & Renault, 1999)는 NCBI에 등록되어져 있는 OsHV-1 genome sequence(Accession number AY509253)를 바탕으로 디자인 된 것을 참고하였다(Table 9-1). PCR 반응은 1X PCR buffer(20 mM Tris-hydrochloride pH 8.4, 50 mM KCl and 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>), 200 uM dNTP(Bioneer, Korea), 0.2 uM primers 및 2U Taq DNA polymerase (Bioneer, Korea)를 혼합하여 50 ng의 template DNA를 첨가한 후 DNA Engine DYAD(MJ Research, USA)을 이용하여 Table 9-2와 같이 반응시켜 증폭된 반응생성물을 1X TAE (40mM Tris-acetate, 1mM EDTA) buffer 상에서 1.5% agarose gel에 loading한 후 100V에서 15분간 전기영동하여 Ethidium bromide(Sigma, USA)로 염색한 후 UV-illuminator를 이용하여 PCR 생성물을 확인하였다.

Table 9-1. PCR primers

Primer	Direction	Sequence	T <sub>m</sub> (°C)	GC Content	Product size
Gp3	Forward	5'-GGT TGT GGG TTT GGA AAT GT-3'	53.8	45	698-bp
Gp4	Reverse	5'-GGC GTC CAA ACT CGA TTA AA-3'	53.2	45	

Table 9-2. Condition of reaction steps and PCR cycles

	Tem (°C)	Time	Cycle
Preheating	94	5 min	1
Denaturation	94	30 sec	35
Annealing	58	30 sec	
Extension	72	30 sec	
Elongation	72	5 min	1

### 3. 결 과

#### 3-1. 광학현미경적 관찰

2001년 11월부터 2003년 9월 까지 경남 통영과 거제지역의 6개소에서 채집한 진주 담치를 병리조직학적 방법을 통하여 이상 질병 감염여부를 검사한 결과, 주로 아가미 조직에서만 응집된 염색질을 가진 비정상적인 핵이 관찰되었다. 감염 시기와 장소는 수온이 상승하는 2002년 5~6월 두 달 동안 station 34와 사량도 에서만 관찰되었으며, 나머지 시료에서는 전혀 검출이 되지 않았다.

HE 염색하여 광학현미경적 관찰 시 아가미 세번 조직 내 이상 핵의 세포가 확인되었다. 매우 농축된 핵은 혈구와 같이 판단되는 ovoid cells에서 관찰되었으며, 이들 혈구는 핵이 가장 자리로 뭉쳐져서 링 모양 혹은 초승달 모양의 염색질을 가졌다. 감염은 주로 아가미 조직에서만 응집된 염색질을 가진 비정상적인 핵이 관찰되었다(Fig. 9-1,2).

이상혈구의 염색질내의 DNA를 증명하기 위해 DNA를 구성하는 deoxyribose가 가수분해하여 유리되는 aldehyde기를 이용하는 풀젠(Feulgen)염색을 실시하여 광학현미경적 관찰 한 결과, 이상형태의 염색질에서 진한 적색으로 DNA가 강한 양성반응을 나타내는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 9-3).

#### 3-2. 전자현미경적 관찰

감염된 혈구는 핵이 비대해지고, 염색질이 한쪽으로 몰려진 형태를 가진다. 핵은 쇠약해보이며, 전자밀도가 진하게 관찰되며, 염색질이 초승달 모양으로 농축되거나, 핵막 주위로 밀도 있게 몰려있었다. 세포형질의 농축으로 인해 세포 수축 관찰되나, 세포질내의 세포소기관의 변성은 관찰되지 않았다. 짙게 농축된 염색질의 세포에서 바이러스 입자는 관찰되지 않았다(Fig. 9-4).



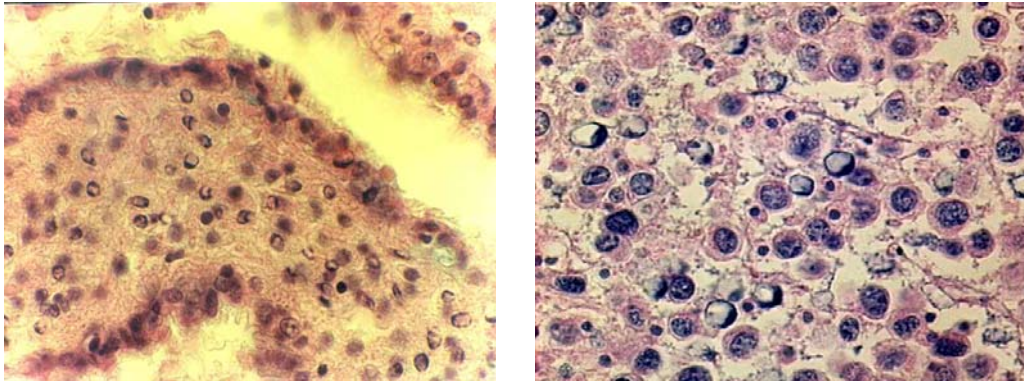


Fig. 9-1,2. Light micrographs of abnormal hemocyte infection on gill of mussel. 1. Many abnormal hemocytes have marginated nucleus. 2. Abnormal cells with condensed nuclei and chromatin margination.(H-E stained)

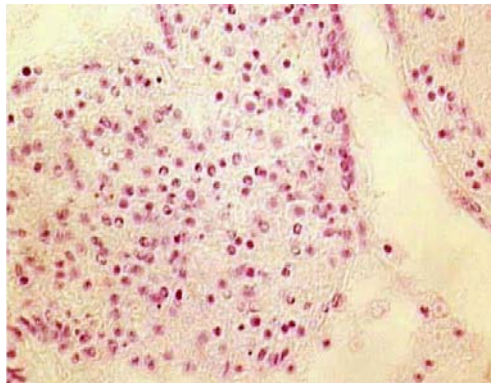


Fig 9-3. Abnormal cells with condensed nuclei and chromatin margination. Abnormal hemocytes stained Feulgen positive.

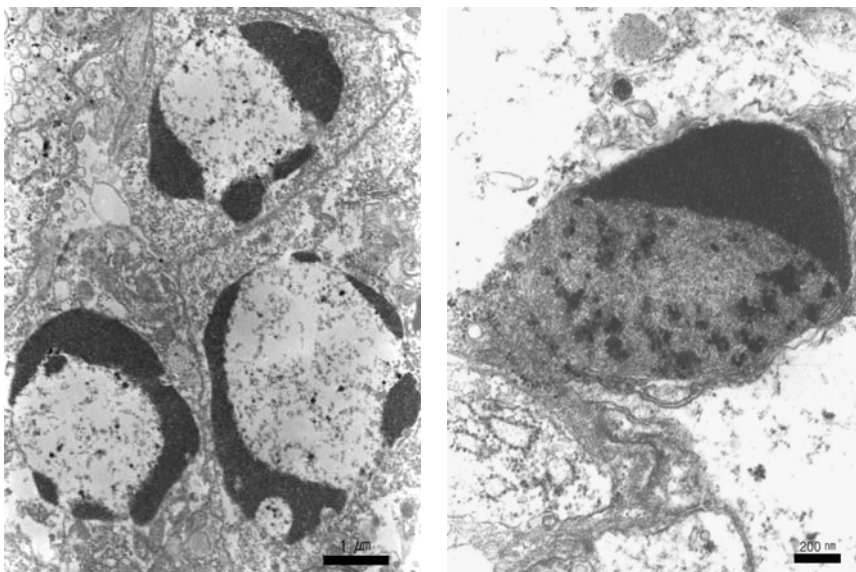


Fig. 9-4. Transmission electron micrographs of abnormal hemocytes showing a crescent-shaped condensation of the chromatin.

### 3-3. PCR 분석

Gp3/4 primer를 이용하여 PCR한 결과 약 700bp의 크기의 product가 1에서 검출이 되었다 (Fig. 9-5).

## 4. 고찰

이상의 광학현미경적 관찰결과나 PCR 반응결과로 미루어 보아 herpes-like virus 감염이라고 진단 할 수 있으나, 전자현미경적 관찰에서는 virus particle이 전혀 관찰되지 않았다. 이러한 herpes-like virus 감염은 해양 척추동물과 ostreid bivalves를 포함하는 무척추동물에서 보고 되어왔었다(Farley et al. 1972, Hine et al. 1992, Nicolas et al. 1992, Comps & Cochenec 1993, Renault et al. 1994, Hine et al. 1998). Manila clam에서도 herpes-like virus 감염이 보고 되었었는데, virogenesis는 주로 fibroblastic-like cells에서 일어나며, 혈구에서는 본 연구에서와 같이 virus particles은 거의 발견되지 않았으며, 염색질이 핵막으로 밀도 있게 몰려있거나, 하나의 구형으로 관찰되며, 세포질의 수축이 관찰되었다고 하였다(Arzul et al. 2001).

이러한 apoptosis를 나타내는 현상들은 herpesviridae family에 의해 감염되는 것을 포함하는 다른 여러 바이러스 감염에도 나타난다(Chou & Roizman 1992, Krueger et al. 1995, Hanon et al. 1996, Koyoma & Miwa 1997, Mastino et al. 1997, Wilson et al. 1997, Kieff & Shenk 1998). Apoptosis는 bivalves가 herpes-like virus에 감염되는 동안 일어난다고 볼 수도 있다 (Renault 1998, Renault et al. 200a, Arzul et al. 2001). 세포가 apoptosis가 진행하게 되면, 핵의 붕괴가 apoptosis의 증명이며, 염색질은 빠르게 핵막을 따라 초승달 모양으로 농축이 되고, 세포질도 농축은 되지만, 미토콘드리아와 리보솜의 형태는 유지한다(Cohen 1998). Apoptosis

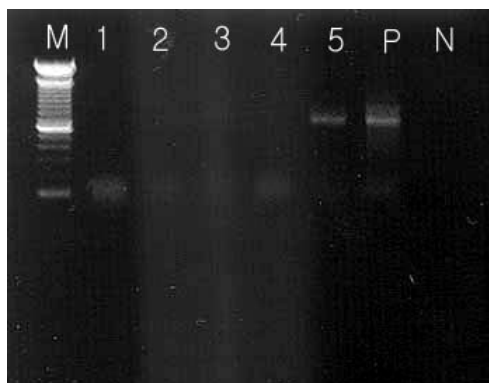


Fig 9-5. PCR analysis using primer pair Gp3/Gp4.  
1-5 : samples, N : negative control(distilled water),  
P : positive control(OsHV-1 DNA), M : 100-bp ladder(Promega)

에서 핵의 변화는 완전한 막의 손실보다 우선으로 관찰된다(Arzul et al. 2001). 본 연구에서의 초미세구조 변화로는 apoptosis의 특징을 쉽게 관찰 할 수 있었다. 염색질 농축의 결과인 전자밀도가 높은 nuclear matrix의 형성은 여러 감염동물에서 보고 되어왔었고, apoptotic 핵의 특징인 염색질의 물림과 농축 역시 인지할 수 있었다.

그러나 특이하게도 이러한 초미세구조 변화는 아가미 새변의 혈구에서만 관찰되었다. 만약에 herpes-like virus에 감염된 진주 담치의 방어기작에 포함하는 세포인 혈구가 파괴되는 과정의 변화라고 한다면, herpes-like virus는 활성적인 혈액 T-lymphocytes에 apoptosis를 유발하며(Kieff & Shenk 1998), 활성적인 혈액 T-lymphocytes는 부분적 herpes-like virus 감염을 제거하는 중요한 역할을 하고, 이들의 파괴는 숙주 내에 바이러스를 퍼트리면서 viral clearance를 지연시킬 수 있다. Apoptosis의 유도는 바이러스가 숙주의 면역계와 오랫동안 공존을 하기 위한 수단이다. 다소의 바이러스와 혈구가 희생되는 동안 다른 세포들은 감염이 되고, 바이러스는 살아남게 되는 것이다(Arzul et al. 2001).

하지만 본 연구결과에서는 앞선 가정과는 달리 감염된 혈구가 순환계 전반에서 관찰되는 것이 아니라, 아가미의 국소적인 부분의 혈구만 apoptosis가 관찰이 되었다. 그리고 전자현미경적 표본에서 virus particles은 전혀 관찰이 되지 않았으며, PCR 반응 결과에서도 5개체 중 1개체에서만 양성 반응을 나타내었다. 이러한 일련의 결과들을 종합해 볼 때 진주 담치 아가미의 이상혈구가 관찰되는 원인은 herpes-like virus의 감염일 가능성은 높으나, 차후 다른 primer를 이용한 PCR 반응과 염기서열 분석 실험을 통해 면밀한 검증이 필요한 부분이며, 본 연구에서와 같은 이상 혈구의 원인이 virus 감염이 아닌 수중환경의 갑작스런 독극물의 부착 혹은 침투 등으로 유도되어진 것으로 생각해볼 수도 있다. 이러한 화학적 오염물질에 의한 영향으로는 이때때의 아가미 결합조직의 초자적 변성, 아가미의 점액과다 분비, 기생충 감염, 생식소 및 혈구의 종양성 변화 및 육아종성 병변, 조직 내 혈구 침윤, 소화맹낭의 파괴 등이 보고되어 왔었다(Bayne et al. 1980).

## 5. 참고문헌

- Arzul I, Nicolas JN, Davison A, Renault T (2001) French Scallops: A new host for Ostreid Herpesvirus-1. *Virology*, 290, 342-349
- Comps M, Cochenec N (1993) A herpes-like virus from the European oyster *Ostrea edulis*. *J. Inv. Pathol.* 62. 201 - 203
- Farley CA, Banfield WG, Kasnic JRG, Foster WS (1972) Oyster herpes-type virus. *Science*. 178, 759 - 760
- FAO (2001) FAO yearbook, Fisheries statistics; Aquaculture production 2001. FAO Fisheries Series, No. 64. Rome, FAO

- Hine PM, Wesney B, Hay BE (1992) Herpesvirus associated with mortalities among hatchery-reared larval Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Dis. Aquat. Org.* 12, 135-142
- Hine PM, Wesney B, Besant P (1998) Replication of a herpes-like virus in larvae of the flat oyster *Tiostrea chilensis* at ambient temperatures. *Dis. Aquat. Org.* 32, 161-171
- Nicolas JL, Comps M, Cochenec N (1992) Herpes-like virus infecting Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 12, 11-13
- Renault T (1998) Infections herpétiques chez les invertébrés: détection de virus de type herpes chez les mollusques bivalves marins. *Virologie* 2, 401-403
- Renault T, Cochenec N, Le Deuff RM, Chollet B (1994) Herpes-like virus infecting Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) spat. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 14, 64-66
- Renault T, Le Deuff RM, Chollet B, Cochenec N, Gérard A (2000) Concomitant herpes-like virus infections among hatchery-reared larvae and nursery-cultured spat *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Dis. Aquat. Org.* 42, 173-183

## 제 10 절 양식 전복의 비브리오 감염증

### I. 양식 전복 폐사원인 구명 및 진단기술 개발

#### 1. 서론

비브리오 속은 그람 음성의 단간균으로 35종의 종이 속해 있는 것으로 알려져 있으며, 연안과 해양에 널리 분포하고 있다(Huq & Colwell 1995). 비브리오병은 양식생물의 질병에 깊은 연관이 있는 것으로 알려져 있으며, 많은 경제적 피해를 유발하고 있다(Austin & Austin 1999). 대체로, 비브리오균은 바다에 서식하는 척추동물(Sorum et al. 1993, Diggles et al. 2000) 뿐 만 아니라 무척추동물(Goarrant et al. 2000, Takahashi et al. 2000)에 이르기까지 병원성을 나타내는 종이 증가되고 있으며, 널리 확산되고 있는 추세이다. 그러나 현재까지 전복의 비브리오병에 대해서는 보고가 비교적 많지 않다(Elston & Lockwood 1983, Dixon et al. 1991, Anguiano-Beltran et al. 1998, Nishimori et al. 1998, Liu et al. 2000, Lee et al. 2000). 아울러, 전복의 비브리오병의 원인균이 *Vibrio alginolyticus*로 동정된 비브리오병에 대한 보고는 매우 적다. 최근 경북 연안에서 양식 중인 양식 전복(*Haliotis discus hannai*)의 대량폐사가 발생하여 원인을 구명하여, 그 결과 *Vibrio alginolyticus*로 밝혀서 균의 성상과 진단법에 대하여 결과를 보고한다.

#### 2. 재료 및 방법

##### 2-1. 세균의 분리 및 동정

2002년 6월경 경북 연안의 전복양식장에서 전복이 대량폐사하여 병든 전복을 양식장에서 실험실로 운반하였다. 전복의 haemolymph를 1 ml 주사기로 추출하여 1% NaCl이 첨가된 tryptic soy agar(TSA, Difco, USA)와 thiosulphate citrate bile agar(TCBS, Difco)에 접종하여 20°C에서 24시간 배양한 후 형성된 집락을 API 20E와 GN plate(GN system, BIOLOG, USA)를 사용하여 생화학적 성상을 통해 동정하였으며, 표준균주인 *Vibrio alginolyticus* ATCC 17749를 사용하여 결과를 비교하였다.

##### 2-2. 조직학적 검사

병든 전복의 조직을 분리하여 적당한 크기로 잘라 데이비드슨용액에 고정하여 상법에 따라 4  $\mu$ m로 잘라서 Harris's haematoxylin과 eosin으로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

##### 2-3. DNA의 추출

전복의 대량폐사원인균으로 분리된 *Vibrio alginolyticus* PD2 균주를 1.5% NaCl이 첨가된

tryptic soy agar(TSA, Difco, USA)에 접종하여 27°C에서 24시간 배양하여 6,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 얻어진 pellet을 TE buffer(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH7.6)에 1회 세척하여 얻어진 pellet를 DNA 분리에 사용하였다. 시료에서 DNA 분리는 High pure PCR template preparation kit(Roche, Germany)를 이용하였다. *Vibrio alginolyticus* PD2 균주 20 mg에 tissue lysis buffer(4 M urea, 200 mM Tris, 20 mM NaCl, 200 mM EDTA, pH 7.4) 200  $\mu$ l를 첨가하여 균질화한 후 proteinase K(0.02 mg/ml) 40  $\mu$ l를 첨가하여 55°C에서 1시간 동안 방치하였다. 여기에 binding buffer(6 M guanidine-HCl, 10 mM urea, 10 mM Tris-HCl, 20% Triton X-100(v/v), pH 4.4) 200  $\mu$ l를 첨가하여 혼합한 후 72°C에서 10분간 방치하였으며, 다시 100  $\mu$ l isopropanol을 첨가하여 혼합하였다. 조립된 High pure filter tube에 lysis solution을 옮겨서 8,000 rpm에서 1분간 원심분리하였다. Washing buffer(20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, 80% ethyl alcohol(v/v), pH 7.5)로 8,000 rpm에서 1분간 2회 세정하였다. 남아있는 washing buffer를 제거하기 위하여 14,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 filter tube를 멸균된 1.5 ml microtube에 옮겨 미리 70°C로 데워진 elution buffer(10 mM Tris, pH 8.5) 50  $\mu$ l를 첨가하여 14,000 rpm에서 1분간 원심분리하여 DNA를 분리하였다. 분리된 DNA의 최종 농도는 50 ng/ $\mu$ l가 되도록 흡광도 A260/280 nm에서 조정하였다.

#### 2-4. Polymerase chain reaction(PCR) 및 agarose gel 전기영동

위에서 분리한 DNA를 template로 하여 PCR을 실시하였다. Primer는 GeneBank의 *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA gene(Accession number, AF233451)을 이용하여 Table 10-1과 같이 16S-F, 16S-R, 16/23S-F 및 16/23S-R을 제작하였다. PCR 반응조건은 1X PCR buffer(20 mM Tris-hydrochloride pH 8.4, 50 mM KCl and 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>), 200 uM dNTP(Bioneer, Korea), 0.2 uM primers 및 2U Taq DNA polymerase(Bioneer, Korea)를 혼합하여 50 ng의 template DNA를 첨가한 후 DNA Engine DYAD(MJ Research, USA)을 이용하여 Table 10-2와 같이 반응시켜 증폭된 반응생성물을 1X TAE(40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA) buffer 상에서 1.5% agarose gel에 loading한 후 100V에서 15분간 전기영동하여 Ethidium bromide (Sigma, USA)로 염색한 후 UV-illuminator를 사용하여 PCR 생성물을 확인하였다.

Table 10-1. PCR primers used to amplify 16S and 16S/23S intergenic spacer

Primer sets	Orient	Oligo sequence	PCR product size(BP)
16S rRNA	sence antisence	GTGCCTAATACATGCAAG CCGCGATTACTAGCGA	1362
16S/23S rRNA	sence antisence	TTGTACACACCGCCCGT CCTTTCCCTCACGGTACT	880

Table 10-2. Condition of reaction steps and PCR cycles of 16S rRNA and 16S/23S rRNA

	Temperature(°C)	Reaction time	Number of cycle
Pre-denaturation	94	5 min	1
Denaturation	94	30 sec	35
Annealing	55	30 sec	
Extention	72	1 min	
Post-extention	72	5 min	1

## 2-5. PCR 산물의 염기서열 확인

전기영동하여 확인한 PCR 산물에 해당되는 부분을 agarose gel에서 칼로 절취하여 잘라내어 QIAquick Gel Extraction kit(Qiagen, USA)로 PCR 산물을 정제하였다. 정제된 DNA는 pGEM-T easy vector(Promega, pGEM-T easy vector system, USA)에 ligase buffer 5  $\mu$ l, pGEM-T easy vector 1  $\mu$ l, PCR산물 2  $\mu$ l, T4 DNA ligase 1  $\mu$ l, Deionized water 1  $\mu$ l를 혼합하여 실온에서 벡터에 삽입하였다. PCR product를 함유한 plasmid를 JM109(Takara, Japan) competent cell에 heat shock 방법으로 transformation하여 2%(w/v) X-gal 40  $\mu$ l, 20%(w/v) IPTG solution 7  $\mu$ l, ampicillin 50  $\mu$ g/ml이 포함된 LB agar(Bacto tryptone 10 g/l, bacto yeast extract 5 g/l, sodium chloride 10 g/l, bacto agar 15 g/l) plate에 도말하여 37°C에서 18시간 배양한 후 PCR 산물 유전자가 삽입된 백색 집락을 선택하였다. 이 집락을 50  $\mu$ g/ml Ampicillin(Sigma, USA)이 첨가된 LB broth(Yeasty extract 5 g/l, pancreatic digest of casein 10 g/l, sodium chloride 10 g/l, Difco ; Miller)에서 대량 배양한 후 원심 분리하여 수확한 시험균으로부터 plasmid DNA를 EcoRI으로 절단하여 inserted DNA의 유무와 크기를 확인하였다. 분리한 plasmid는 Sanger et al. (1977)의 방법으로 염기서열을 분석하였고, automatic sequencer(ABI 377, USA)를 사용하여 T7 universal primer와 Sp6 universal primer로 염기서열을 분석하였다. 분석된 염기서열은 GeneBank의 Blast 검색을 통하여 이미 등록된 유전자의 염기서열과 비교하였다.

## 2-6. *Vibrio alginolyticus* PD2 균주의 병원성 시험

*Vibrio alginolyticus* PD2 균주를 1.5% NaCl이 함유된 TSA broth(Difco, USA)에 접종하여 27°C에서 24시간 배양한 다음, 10,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 pellet을 수확하여 멸균된 해수로 희석하여 균의 농도가  $4.1 \times 10^7$  CFU/ml 되게 조정하여 병원성시험에 사용하였다. 세균의 농도는 TSA plate에 재접종하여 균수를 계수하여 확인하였다. 국립수산물과학원에서 사육중인 크기 3-4 cm의 참전복(*Haliotis discus hannai*)을 병원성 시험에 사용하였다. 균의 농도가  $4 \times 10^4$  CFU/ml과  $10^6$  CFU/ml인 균액을 0.1 ml씩 오른쪽 멘틀에 주사하고, 대조구는 멸균 생리식염수를 동량으로 주사하였다. 주사한 전복은 수온 20°C의 수조에 넣은 후 매일 2회씩 1주

일간 상태를 관찰하였다. 폐사된 개체는 haemolymph를 채취하여 1.5% NaCl이 함유된 TSA 배지와 TCBS 배지에 재접종하여 분리·동정하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3-1. 세균의 분리 및 동정

병든 전복의 haemolymph로부터 분리된 균주는 그람-음성의 단간균으로 1.5% NaCl이 함유된 TSA 배지에서 swarming을 하는 특징을 나타내었다. Table 10-3에 나타난 바와 같이 API 20E와 Biolog GN system의 결과를 분석한 결과 PD2 strain이 *Vibrio alginolyticus*로 동정되었다.

Table 10-3. Biochemical characteristics of *Vibrio alginolyticus* PD-2 strain isolated from diseased abalone

Test method	Character	PD-2	ATCC17749
Biolog GN system (26°C, 24h)	Utilization of :		
	α-cyclodextrin	+	+
	dextrin	+	+
	glycogen	+	+
	tween 40	+	+
	tween 80	-	+
	N-acetyl-D-galactosamine	-	-
	N-acetyl-D-glucosamine	+	+
	adonitol	-	-
	L-arabinose	-	-
	D-arabitol	-	-
	cellobiose	-	-
	i-erythritol	-	-
	D-fructose	+	+
	L-fucose	-	-
	D-galactose	-	-
	gentiobiose	-	-
	α-D-glucose	+	+
	m-inositol	-	-
	α-D-lactose	-	-
	lactulose	-	-
	maltose	+	+
	D-mannitol	+	+
	D-mannose	-	-
	D-melibiose	-	-
	β-methyl D-glucoside	-	-
	D-psicose	+	+
	D-raffinose	-	-
	L-rhamnose	-	-
	D-sorbitol	-	-
	sucrose	+	+



Table 10-3. (Continued)

Test method	Character	PD-2	ATCC17749
Biolog GN system (26°C, 24h)	D-trehalose	+	+
	turanose	-	-
	xylitol	-	-
	methyl pyruvate	-	+
	mono-methy succinate	+	+
	acetic acid	-	+
	cis-aconitic acid	-	-
	citric acid	-	-
	formic acid	-	-
	D-galactonic acid lactone	-	-
	D-galacturonic acid	-	-
	D-gluconic acid	+	+
	D-glucosaminic acid	-	-
	D-glucuronic acid	-	-
	$\alpha$ -hydroxybutyric acid	-	-
	$\beta$ - hydroxybutyric acid	-	-
	$\gamma$ - hydroxybutyric acid	-	-
	p-hydroxy phenylacetic acid	-	-
	itaconic acid	-	-
	$\alpha$ -keto butyric acid	-	-
	$\alpha$ -keto glutaric acid	+	+
	$\alpha$ -keto valeric acid	-	-
	D,L-lactic acid	+	+
	malonic acid	-	-
	propionic acid	-	+
	quinic acid	-	-
	D-saccharic acid	-	-
	sebacic acid	-	-
	succinic acid	+	+
	bromo succinic acid	+	+
	succinamic acid	-	-
	glucuronamide	-	-
	alaninamide	-	-

Table 10-3. (Continued)

Test method	Character	PD-2	ATCC17749
Biolog GN system (26°C, 24h)	D-alanine	+	+
	L-alanine	+	-
	L-alanyl-glycine	+	-
	L-asparagine	+	+
	L-aspartic acid	+	+
	L-glutamic acid	+	+
	glycyl-L-aspartic acid	+	-
	glycyl-L-glutamic acid	+	+
	L-histidine	+	+
	hydroxyl L-proline	-	+
	L-leucine	-	+
	L-ornithine	-	-
	L-phenylalanine	-	-
	L-proline	+	+
	L-pyroglutamic acid	-	-
	D-serine	+	-
	L-serine	-	+
	L-threonine	+	+
	D,L-carnitine	-	-
	$\gamma$ -amino butyric acid	-	-
	urocanine acid	-	-
	inosine	+	+
	uridine	+	+
	thymidine	+	+
	phenyl ethylamine	-	-
	putrescine	-	+
	2-amino ethanol	-	+
	2,3-butanediol	-	-
	glycerol	+	+
	D,L-glycerol phosphate	+	+
	glucose-1-phosphate	-	+
	glucose-6-phosphate	+	+

Table 10-3. (Continued)

Test method	Character	PD-2	ATCC17749
API 20E system (26°C, 24h)	Presence of :		
	β-galactosidase(ONPG test)	-	-
	Arginine dihydrolase	-	-
	Lysine decarboxylase	+	+
	urease	-	-
	tryptophan deaminase	+	-
	gelatinase	-	+
	cytochrome-oxidase	-	-
	Production of :		
	H <sub>2</sub> S	-	-
	indole	+	+
	NO <sub>2</sub>	ND	ND
	Utilization of :		
	citrate	-	-
	glucose	+	+
	mannitol	+	+
	inositol	-	-
	sorbitol	-	-
	rhamnose	-	-
	sucrose	+	+
melibiose	-	-	
amygdalin	-	-	
arabinose	-	-	

### 3-2. 병리조직학적 관찰

병든 전복을 병리조직학적으로 관찰한 결과, 아가미조직에 섬모충의 감염이 관찰되었으며 (Fig. 10-1,2), 발 부분에 metazoa의 감염이 관찰되었다(Fig. 10-3). 또한 발과 멘틀의 결합조직과 근조직에서 세균의 감염이 관찰되었다. 아가미조직에서 관찰되는 섬모충은 아가미 조직에 병리조직학적 증상을 유발하지 않았다. 발에 감염된 metazoa는 주변조직에 괴사를 유발하여 일부 조직의 괴사가 관찰되었다. 발과 멘틀의 결합조직과 근조직에서 관찰되는 많은 수의 세균(Fig. 10-4,5,6)은 조직의 괴사와 밀접한 연관이 있는 것으로 관찰되었으며, 전신적인 감염 증상을 보였다. 전복의 결합조직과 근조직에서 관찰되는 전신적인 괴사의 원인은 *Vibrio alginolyticus*의 감염에 의한 것으로 추정된다.

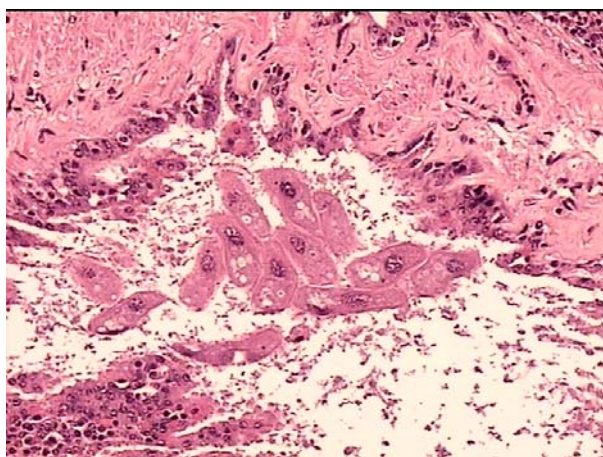


Fig. 10-1. Different ciliates in gill tissue were observed in infected abalone.

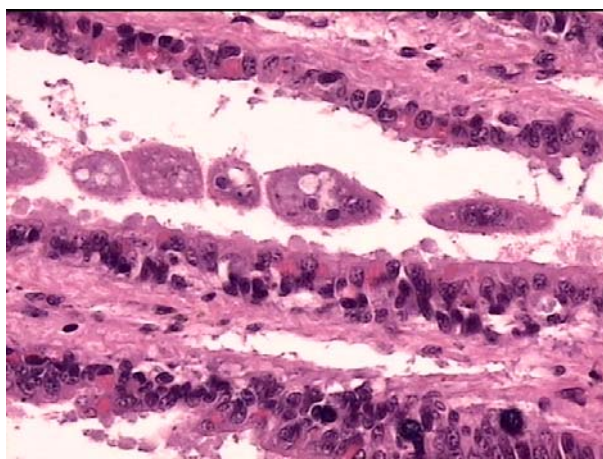


Fig. 10-2. Different ciliates in gill tissue were observed in infected abalone.

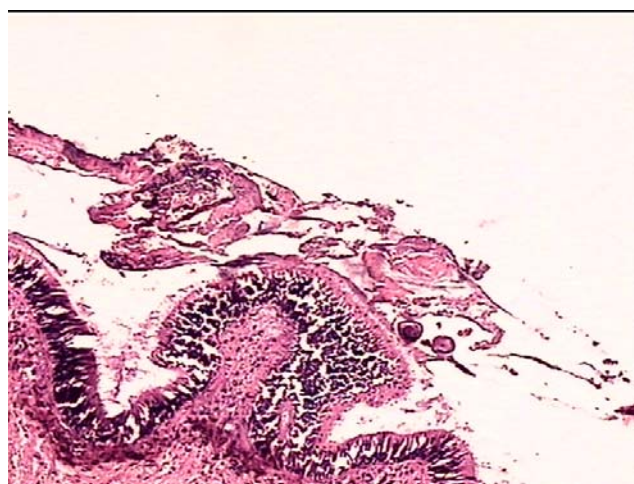


Fig. 10-3. Metazoan are found along the foot in infected abalone.

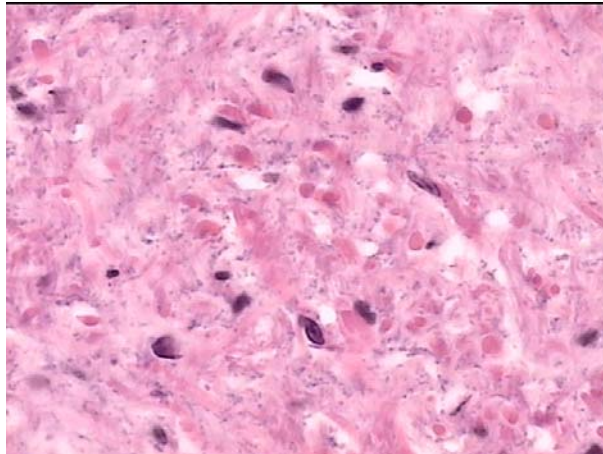


Fig. 10-4. Bacterial infection observed on connective tissue of mantle in infected abalone.

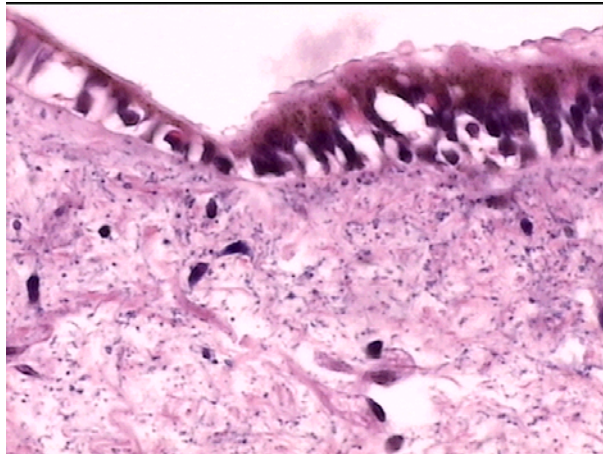


Fig. 10-5. Bacterial infection of foot in infected abalone. Necrosis of the connective tissue and muscular fibres were noted.

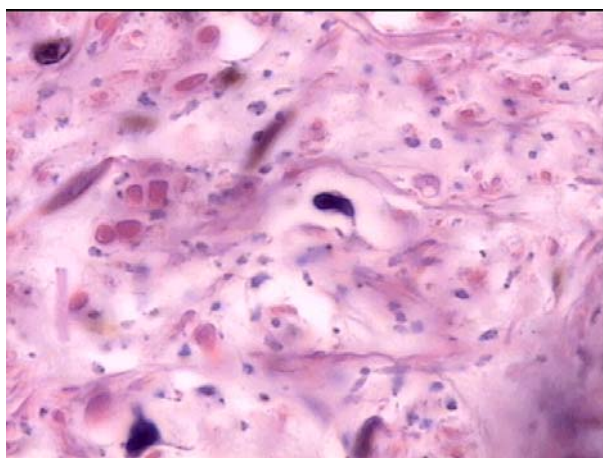


Fig. 10-6. Bacterial infection of muscular tissue of foot in infected abalone.

### 3-3. 병원성 시험

*Vibrio alginolyticus* PD2의 병원성을 시험하기 위하여  $4 \times 10^4$  CFU/ml와  $10^6$  CFU/ml로 주사한 결과, 주사 후 1일 만에 각각 50%와 100% 폐사하였으며, 폐사는 1일 내에만 나타났으며, 그 이후에는 나타나지 않았다(Fig. 10-7). 폐사체로부터 분리된 균주는 주사한 균주와 동일한 균주로 나타났다.

### 3-4. PCR과 염기서열 분석

*Vibrio alginolyticus* PD2 균주에서 분리한 template DNA로부터 16S rDNA와 16S/23S rDNA intergenic spacer에 대한 16S-F/16S/R(A) 및 16\_23S-F/16\_23S-R(B) primers를 이용한 PCR 결과 각각 1362bp와 880bp의 산물이 얻어졌다(Fig. 10-8). 검출된 PCR 산물의 염기서열 분석에서는 *Vibrio alginolyticus* PD2 균주에 대한 16S-F/16S/R(A) primer에 의한 산물은 GeneBank에 등록된 accession number AF513447.1인 *Vibrio alginolyticus*의 16S ribosomal RNA gene과 99% 상동성을 나타내었다(Fig. 10-9). 16\_23S-F/16\_23S-R(B) primer에 의한 산물인 16S/23S intergenic spacer의 염기서열은 GeneBank에 미등록된 염기서열로서 GeneBank에 AY601670로 등록하였다(별첨 1). *Vibrio alginolyticus* PD2 균주의 16S/23S intergenic spacer의 염기서열은 Fig. 10-10에 나타난 바와 같이 대부분의 염기서열이 *Vibrio parahaemolyticus*와 93% 이상 유사성을 나타내었다.

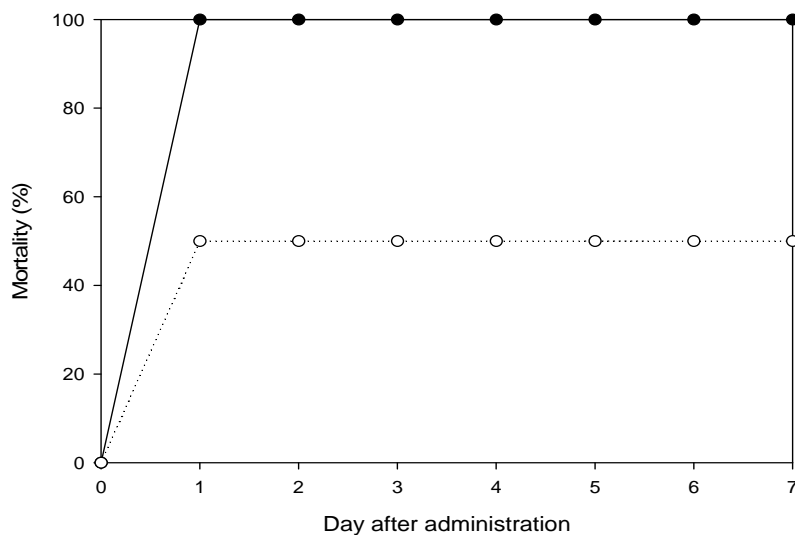


Fig. 10-7. Mortality of abalone by injection of different concentration of *Vibrio alginolyticus* PD2. Concentrations of bacteria were  $4 \times 10^4$  CFU/ml(--●--) and  $10^6$  CFU/ml(--○--).

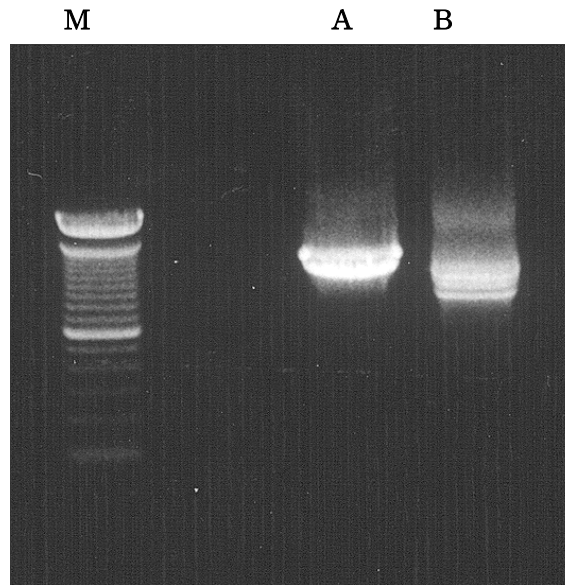


Fig. 10-8. PCR result with 16S-F/16S/R(A) and 16\_23S-F/16\_23S-R(B) primers(M : Marker bands)

Table 10-4. *Vibrio* stains used in phylogenetic analysis.

Species	Source	Accession number
<i>V. parahaemolyticus</i>	J Clin Microbiol 38(6), 2000	AP005083
<i>V. cholerae</i>	Nature 406(6795), 2000	AE004341
<i>V. vulnificus</i>	Infect Immun 71(10), 2003	AE016801
<i>V. parahaemolyticus</i> (2)	J Clin Microbiol 38(6), 2000	AP005082
<i>V. mediterranei</i>	Int J Syst Evol Microbiol 51(pt4), 2001	AJ294422
<i>V. agarivorans</i>	Int J Syst Evol Microbiol 51(pt6), 2001	AJ310650
<i>V. pelagius</i>	Int J Syst Evol Microbiol 51(pt4), 2001	AJ294424

본 연구에서 전북의 대량폐사원인균으로 병든 전북에서 분리된 PD2 균주는 형태학적 연구결과와 표준균주인 *Vibrio alginolyticus* ATCC 17749와 비교한 생화학적 연구결과로 표준균주인 *Vibrio alginolyticus*로 동정되었다. 또한 *Vibrio alginolyticus* PD2균주의 16S ribosomal RNA의 염기서열을 분석한 결과, GeneBank에 등록된 accession number AF513447.1인 *Vibrio alginolyticus*의 16S ribosomal RNA gene과 99% 상동성을 나타내어 이를 뒷받침해 주었다.

*Vibrio alginolyticus*는 red abalone인 *H. rufescens*(Elston & Lockwood 1983, Anguiano-Beltran et al. 1998)와 South African abalone인 *H. midae*(Dixon et al. 1991)의 병원균으로 보고된 바 있으며, 대만의 양식 오분자기 *Haliotis diversicolor supratexta*의 병원균으로 보고된 바 있다(Lee et al. 2001). 또한 일본에서는 오분자기에 대한 *V. carchariae*가 병원균으로 보고된 바 있다(Nishimori et al. 1998).



```

Query: 4      cgattactagcgattccgacttcatggagtcgagttgcagactccaatccggactacgac 63
Sbjct: 1318   cgattactagcgattccgacttcatggagtcgagttgcagactccaatccggactacgac 1259
Query: 64      gcactttttgggattcgctcactctcgcaagttggccgacctctgtatgcgccattgtag 123
Sbjct: 1258   gcactttttgggattcgctcactctcgcaagttggccgacctctgtatgcgccattgtag 1199
Query: 124     cacgtgtgtagccctactcgttaagggccatgatgacttgacgtcgtccccacctctctcc 183
Sbjct: 1198   cacgtgtgtagccctactcgttaagggccatgatgacttgacgtcgtccccacctctctcc 1139
Query: 184     ggtttatcaccggcagctcctcctggagttcccgcattactcgtcggcaacaaggataa 243
Sbjct: 1138   ggtttatcaccggcagctcctcctggagttcccgcattactcgtcggcaacaaggataa 1079
Query: 244     gggttgcgctcgttgcgggacttaaccaacatttcacaacacgagctgacgacagccat 303
Sbjct: 1078   gggttgcgctcgttgcgggacttaaccaacatttcacaacacgagctgacgacagccat 1019
Query: 304     gcagcacctgtctcagagttcccgaaggcacaatccatctctggaagttctctggatg 363
Sbjct: 1018   gcagcacctgtctcagagttcccgaaggcacaatccatctctggaagttctctggatg 959
Query: 364     tcaagagtaggtaaggttcttcgcttgcatcgaattaaaccacatgctccaccgcttgt 423
Sbjct: 958     tcaagagtaggtaaggttcttcgcttgcatcgaattaaaccacatgctccaccgcttgt 899
Query: 424     gggggccccgctcaattcatttgagttttaatcttgcgaccgtactccccaggcggctca 483
Sbjct: 898     gggggccccgctcaattcatttgagttttaatcttgcgaccgtactccccaggcggctca 839
Query: 484     cttaacgcgttagctccgaaagccacggctcaaggccacaacctccaagtagacatcgtt 543
Sbjct: 838     cttaacgcgttagctccgaaagccacggctcaaggccacaacctccaagtagacatcgtt 779
Query: 544     tacggcgtggactaccagggtatctaatcctggttgcctcccacgctttcgcatctgagt 603
Sbjct: 778     tacggcgtggactaccagggtatctaatcctggttgcctcccacgctttcgcatctgagt 719
Query: 604     gtcagtatctgtccagggggcgccttcgccaccggattccttcagatctctacgcatt 663
Sbjct: 718     gtcagtatctgtccagggggcgccttcgccaccggattccttcagatctctacgcatt 659
Query: 664     tcaccgctacacctgaaattctacccccctctacagtactctagtctgccagtttcaaat 723
Sbjct: 658     tcaccgctacacctgaaattctacccccctctacagtactctagtctgccagtttcaaat 599
Query: 724     gctattccgaggttgagccccgggctttcacatctgacttaacaaaccacctgcatgagc 783
Sbjct: 598     gctattccgaggttgagccccgggctttcacatctgacttaacaaaccacctgcatgagc 539
Query: 784     tttacgcccagtaattccgattaacgctcgcacacctccgtattacgcggtgctggcac 843
Sbjct: 538     tttacgcccagtaattccgattaacgctcgcacacctccgtattacgcggtgctggcac 479
Query: 844     ggagtagccggtgcttctctgtcgttaacgtcaaacacgcccgtattaacgacgccc 903
Sbjct: 478     ggagtagccggtgcttctctgtcgttaacgtcaaacacgcccgtattaacgacgacca 419
Query: 904     ccttctcagcactgaaagtactttacaacccgaaggccttcttcatacacgcgcatgg 963
Sbjct: 418     ccttctcagcactgaaagtactttacaacccgaaggccttcttcatacacgcgcatgg 359
Query: 964     ctgcatcaggcttgcccattgtgcaaatatccccactgctgcctcccgtaggagctcg 1023
Sbjct: 358     ctgcatcaggcttgcccattgtgcaaatatccccactgctgcctcccgtaggagctcg 299
Query: 1024    gaccgtgtcagttccagtggtgatcatcctctcagaccagctagggatcgtcgcc 1083
Sbjct: 298     gaccgtgtcagttccagtggtgatcatcctctcagaccagctagggatcgtcgcc 239
Query: 1084    ttggtgagcccttacctcaccaactagctaatcccacctaggcatactctgacgagag 1143
Sbjct: 238     ttggtgagcccttacctcaccaactagctaatcccacctaggcatactctgacgagag 179
Query: 1144    gcccgaggctccccctctttggccgtaggcatcatgcggtattagccatcgtttccaat 1203
Sbjct: 178     gcccgaggctccccctctttggccgtaggcatcatgcggtattagccatcgtttccaat 119
Query: 1204    ggttatccccacatcagggttaattcctaggcattactcaccgctccgcccgtcgagcg 1263
Sbjct: 118     ggttatccccacatcagggttaattcctaggcattactcaccgctccgcccgtcgagcg 59
Query: 1264    cgttatcgttccccgaaggttcagataactcgtttccgctcagacttgcattg 1315
Sbjct: 58     cgttatcgttccccgaaggttcagataactcgtttccgctcagacttgcattg 7

```

Fig. 10–9. Comparison of the nucleotide sequences of 16S ribosomal RNA gene of *Vibrio alginolyticus* PD2 strain with those of *V. alginolyticus*(GeneBank accession number AF513447)





#### 4. 참고문헌

- Anguiano-Beltran C, Searcy-Bernal R, Lizarraga-Partida ML (1998) Pathogenic effects of *Vibrio alginolyticus* on larvae and postlarvae on the red abalone *Haliotis rufescens*. Dis Aquatic Org 33, 119-122
- Austin B, Austin DA (1993) Vibrionaceae representatives. In: Austin B, Austin DA (Eds), Bacterial Fish Pathogens, 2nd Edition. Ellis Horwood Ltd., Chichester, pp. 265-307
- Diggles BK, Carson J, Hine PM, Hickman RW, Tait MJ (2000) *Vibrio* species associated with mortalities in hatchery-reared turbot (*Colistium nudipinnis*) and brill (*C. guntheri*) in New Zealand. Aquaculture 183, 1-12
- Dixon MG, Hecht T, Brandt CR (1991) Identification and treatment of Clostridium and *Vibrio* infection in South African abalone, *Haliotis midae* L. J. Fish. Dis. 14, 693-695
- Elston R, Lockwood GS (1983) Pathogenesis of Vibriosis in cultured juvenile red abalone *Haliotis rufescens* Swanson. J Fish Dis 6, 111-128
- Goarant C, Herlin J, Brizard R, Marteau AL, Martin C, Martin B (2000) Toxic factors of *Vibrio* strains pathogenic to shrimp. Dis Aquatic Org 40, 101-107
- Huq A, Colwell RR (1995) Vibrios in the marine and estuarine environments. J Mar Biotechnol 3, 60-63
- Lee KK, Liu PC, Chen YC, Huang CY (2001) The implication of ambient temperature with the outbreak of vibriosis in cultured small abalone *Haliotis diversicolor supertexta* Lischke. J. Therm. Biol. 26, 585-587
- Liu PC, Chen YC, Lee KK (2001) Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased small *Haliotis diversicolor supertexta*. Microbios, 104, 71-77
- Nishimori E, Hasegawa O, Numata T, Wakabayashi H (1998) *V. carchariae* causes mass mortalities in Japanese abalone, *Sulculus diversicolor supertexta*. Fish Pathol. 33, 495-502
- Sorum H, Myhr E, Zwicker BM, Lillchaug A (1993) Comparison by plasmid profiling of *Vibrio salmonicida* strains isolated from diseased fish from different north European and Canadian coastal areas of Atlantic ocean. Can J Fisher Aquatic Sci 50, 247-250
- Takahashi KG, Nakamura A, Mori K (2000) Inhibitory effects of ovoglobulins on bacillary necrosis in larvae of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. J Invert Pathol 75, 212-217

## II. 전복의 비브리오병 원인균인 *Vibrio alginolyticus*에 대한 Monoclonal antibody 생산

### 1. 재료 및 방법

#### 1-1. 마우스 면역

*Vibrio alginolyticus*를 TSB에 2% NaCl를 첨가한 배지를 이용하여 30°C에 하룻밤 배양한 다음 2% Formalin으로 죽인 후 PBS 세척한 다음 무게를 측정하여 항원으로 사용하였다. 항원 50~100 ug을 complete Freund's adjuvant와 1:1로 섞어서 6주령인 female Balb/c mice의 복강에 주입한다. Incomplete Freund's adjuvant를 사용하여 14~28일 동안 2주 간격으로 주입한다. 마지막 면역 후 일주일 후에 마우스 꼬리에 boosting한다. Boosting 3일 후 세포융합을 한다.

#### 1-2. 단클론항체생산

##### 1-2-1. 하이브리도마(Hybridoma)의 제조

Hybridoma를 이용한 단클론항체의 생산 과정은 아래 Fig. 10-9에서 알 수 있다. 단클론항체를 얻기 위하여는, 먼저 항원을 마우스에 주사하여, 생쥐의 혈액 중에 그 항원과 반응할 수 있는 B 림프구의 수를 훨씬 많이 늘어나게 만든다. 특정한 항원과 반응하는 B 림프구의 수가 많아지게 되면 원하는 hybridoma를 얻을 수 있는 가능성이 높아지게 되므로, 원하는 항체를 얻기가 쉬워지게 된다. 면역된 마우스에서 비장을 떼어내어 림프구를 분리한 다음, 배양한 myeloma 세포와 융합시킨다. 융합된 세포를 hypoxanthin, aminopterin, 그리고 thymidine이 첨가되어 있는 배지(HAT medium)에서 배양하여 myeloma와 B림프구만이 융합된 세포(hybridoma)를 선택적으로 얻는다. 얻어진 hybridoma 세포 중에서 원하는 항체를 생산하는 세포를 선별(screening)해내어 단클론항체를 생산할 수 있는 것이다.

##### 1-2-2. 하이브리도마(Hybridoma) 세포 선택의 원리

Myeloma 세포와 B림프구를 융합하게 되면 원하는 hybridoma도 만들어지지만, 융합되지 않고 남아있는 myeloma 세포나 B림프구들도 있으며, 심지어는 myeloma 세포끼리 또는 B림프구끼리 융합된 세포들도 존재하게 된다. 그러므로 hybridoma 세포를 얻기 위하여 이들 여러 세포로부터 myeloma와 B림프구만이 융합된 세포를 얻어야 한다. Hybridoma 제조에 사용되는 myeloma 세포는 원래 B림프구가 종양세포로 전환되어 얻어진 세포이므로, 스스로 항체를

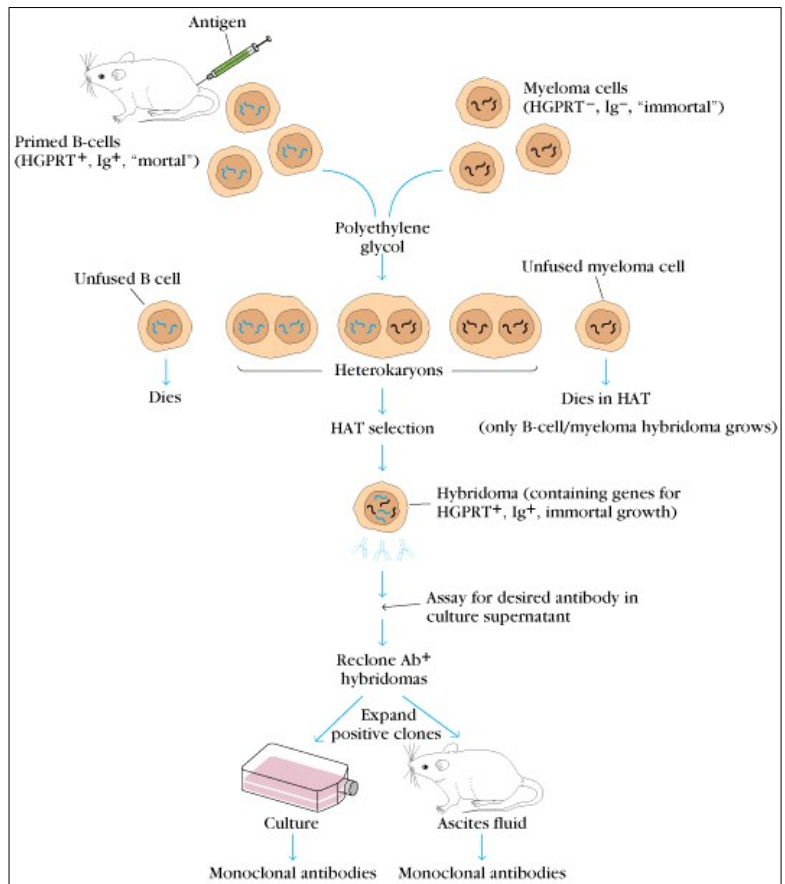


Fig. 10-9. Pathway of Monoclonal antibody production

생산하는 능력이 있다. 그러므로 이 myeloma 세포를 그대로 B림프구와의 융합에 사용한다면 원하지 않는 항체가 원하는 항체와 섞여져서 만들어 질 것이다. 이를 방지하기 위하여, 먼저 myeloma 세포에 돌연변이를 유도하여 항체를 생산하지 못하는 돌연변이체를 얻은 다음, 융합에 사용한다. 항체를 만들지 못하는 돌연변이 myeloma 세포가 얻어졌다고 해서 그대로 융합에 사용할 수가 없다. 왜냐하면, 융합되지 않은 myeloma 세포나 myeloma 세포끼리 융합된 세포들은 여전히 시험관에서 잘 자라기 때문에 myeloma 세포와 B림프구가 융합된 경우와 구별되지 않고 잘 자라게 된다. 이렇게 되면 나중에 항체를 생산하지 못하는 myeloma 세포가 많이 존재하게 되며, 결과적으로 그들로부터 원하는 항체를 생산하는 hybridoma 클론을 선별해내는 데 큰 어려움을 겪게 된다. 이와 같은 현상을 방지하기 위하여, hybridoma의 제조에 사용되는 myeloma 세포에 또 다른 돌연변이를 유도하여, myeloma 세포가 B림프구와 융합되지 못하면 죽어버리도록 만든다. 이러한 목적을 위하여 항체를 생산하지 못하는 myeloma 세포의 nucleotide의 생합성의 과정에 돌연변이를 유도하여, 특별한 조건에서 DNA의 복제가 일어나지 않게 만들면, B림프구와 융합되지 않은 myeloma 세포를 쉽게 제거할 수 있게 되는 것이다.

DNA 복제에는 핵산 합성의 원료인 purine과 pyrimidine염기가 필요하므로, 복제가 일어나기 위해서는 이들 염기를 세포가 섭취하든지 아니면 생합성하여야 한다. 이 중 purine염기의 생합성은 세포 내에서 phosphoribosyl pyrophosphate와 uridilic acid로부터 시작되는데(Fig. 10-10의 de novo pathway), 이 purine 생합성 과정은 aminopterin이라는 화합물에 의하여 차단이 될 수가 있고, 결과적으로 DNA의 복제가 중지되어 세포는 결국 죽고 만다. 그러나 보통의 세포들은 aminopterin으로 처리하더라도 예비적인 purine 생합성 과정이 있어서(Fig. 10-10의 salvage pathway), nucleotide를 합성할 수 있으며 죽지 않고 살 수 있다. 이 구원경로는 thymidine과 hypoxanthin으로부터 각각 pyrimidine과 purine nucleotide를 만드는 과정으로, 이 과정에서 중요한 효소가 각각 thymidine kinase(TK)와 hypoxanthin guanine phosphoribosyl transferase(HGPRT) 라는 효소들이다. 그러므로 세포를 aminopterin으로 처리하더라도, 배지에 thymidine과 hypoxanthin을 넣어준다면 정상세포는 TK와 HGPRT 효소가 존재하기 때문에 죽지 않고 살아남을 수 있으며, 마찬가지로 정상세포와 융합된 hybridoma 세포도 죽지 않게 된다. 그러므로 TK와 HGPRT 효소의 유전자 중 하나에라도 돌연변이가 일어나면, 돌연변이 된 세포는 aminopterin이 들어 있는 배지에서 thymidine이나 hypoxanthine을 넣어주어도 nucleotide 생합성이 막혀서 성장을 할 수가 없는 것이다. 이러한 원리를 이용하여 항체를 생산하지 못하게 만든 myeloma 세포에 또 다시 TK나 HGPRT 효소 중 하나의 유전자에 돌연변이를 유도하여, 돌연변이 된 myeloma 세포를 만들어 hybridoma 제조에 사용하였다. 이러한 돌연변이체 myeloma 세포는 aminopterin과 thymidine, hypoxanthine이 함유된 배지(HAT medium)에서 성장할 수 없지만, myeloma 세포와 B림프구와 융합되어 얻어진 hybridoma 세포에는 B림프구가 제공한 정상적인 TK나 HGPRT 효소가 있기 때문에, 이 배지에서 hybridoma

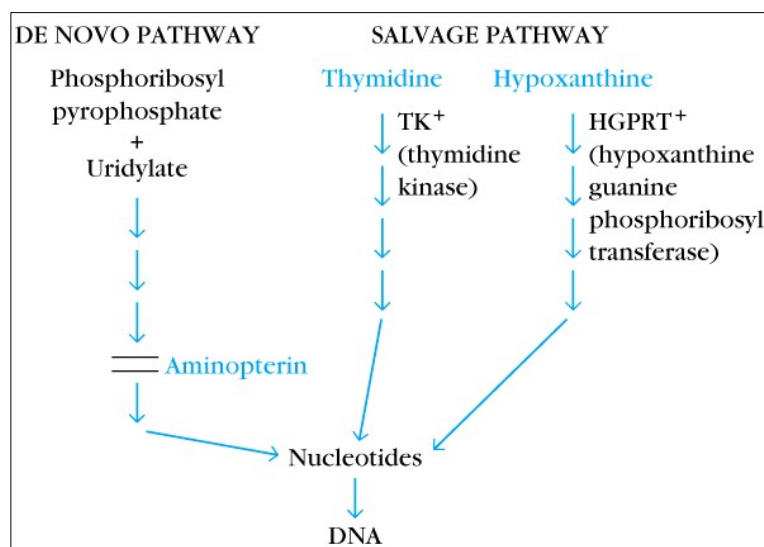


Fig. 10-10. Biosynthesis of nucleotide and principle of hybridoma selection

세포만이 성장을 계속할 수 있는 것이다. 반면에, myeloma 세포와 융합되지 않은 B림프구들은 시험관에서 계속하여 자랄 수 없는 세포들이기 때문에, 배양하다 보면 자연히 죽어나가게 된다. 이와 같이하여, HAT이 들어있는 배지에서는 자연히 myeloma와 B림프구가 융합된 hybridoma만이 성장하게 되는 것이다.

### 1-2-3. 단클론항체의 생산

HAT selection을 거쳐서 일단 hybridoma가 얻어지면, 이들 중에서 원하는 항체를 생산하는 hybridoma세포를 선별해내야 하며, 이들 세포를 정제하여 원하는 단클론항체를 생산하는 hybridoma세포를 분리해내면, 그 세포로부터 원하는 단클론항체를 얻을 수 있다(Fig. 10-11). 먼저, hybridoma 세포를 각각의 세포를 서로 나누어 서로 다른 배양접시에 배양한다. 배양이 어느 정도 이루어지면, ELISA를 이용하여 배양된 배지를 항원과 반응시켜 원하는 항체가 만들어진 hybridoma 클론을 선별해낸다. 이 과정을 몇 번 되풀이하면, 원하는 단클론항체만을 생산하는 하나의 hybridoma 클론을 얻을 수 있다. 원하는 hybridoma 클론이 분리되면, 이 클론을 배양하여 배양액에 존재하는 단클론항체를 분리하여 사용할 수도 있으며, 마우스의 복강에 hybridoma 클론을 주사하여 얻은 복수액(ascite fluid)으로부터 단클론항체를 얻을 수도 있다. 이렇게 얻어진 단클론항체는 면역진단, 면역치료, 그리고 항원 및 항체의 분자생물학적인 연구, 더 나아가 촉매항체와 같은 유용한 항체를 얻는 데에도 널리 이용되고 있다.

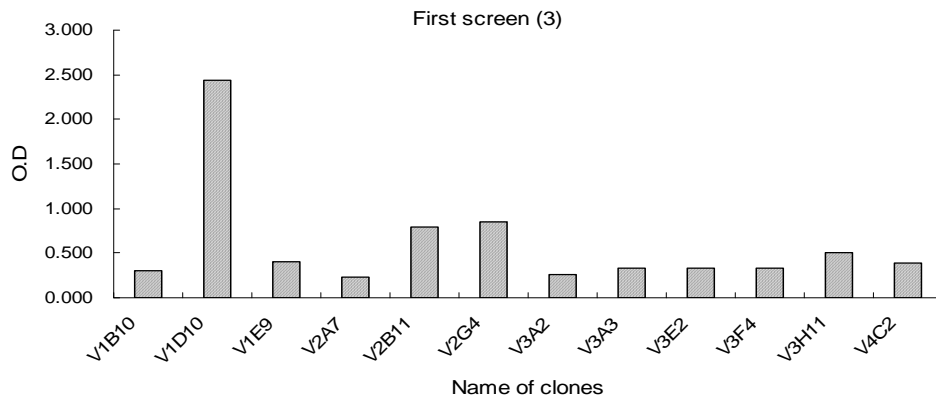
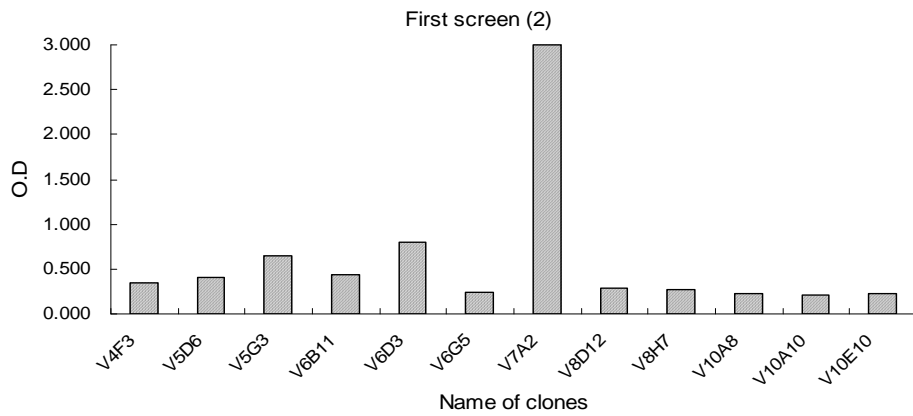
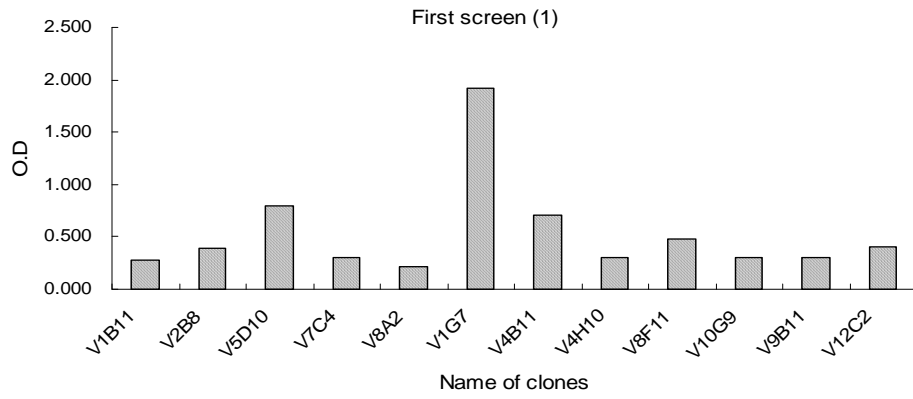
### 1-2-4. ELISA

0.1% poly-L-lysine을 이용하여 96well plate를 실온에서 poly-L-lysine을 coating 한 다음, 1시간 후 poly-L-lysine을 제거하고 준비된 세균(*Vibrio alginolyticus*) (O.D=1)을 poly-L-lysine이 coating된 plate에 실온에서 1시간동안 부착 시킨다. 부착된 세균을 0.05% glutaldehyde를 이용하여 실온에서 25분 동안 고정시킨다. Low salt washing buffer를 이용하여 3회 세척한 후 5% skim milk로 실온에서 1시간동안 blocking을 한 다음 Low salt washing buffer를 이용하여 3회 세척한 후 hybridoma cell의 supernatant을 실온에서 1시간동안 반응시킨다. 반응을 시킨 다음 High salt washing buffer를 사용하여 다시 5회 세척한 다음 Goat anti mouse를 5000배로 dilution하여 실온에서 1시간 반응시킨다. High salt washing buffer를 사용하여 5회 세척한 후 TMB를 이용하여 발색시킨다. 어두운 곳에서 10~20분 발색 후 2N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 이용하여 반응을 중지시킨다. ELISA read를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정한다.

## 2. 결과 및 고찰

총 56개의 클론(Fig. 10-11)을 획득하여 스크린을 하였다. 선발의 기준은 대조군과 비교하여

3배이상의 양성이 보이는 것만을 골라서 *Vibribo alginolyticus*에 대한 양성으로 간주하여 선 발하였다.



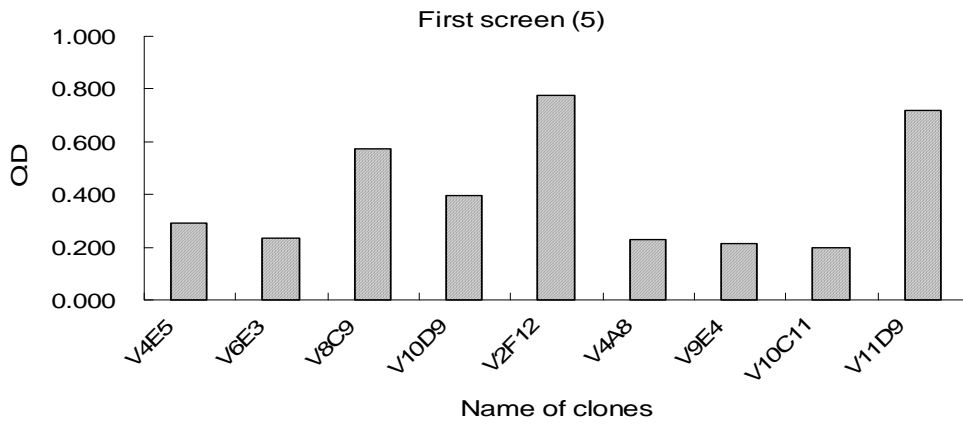
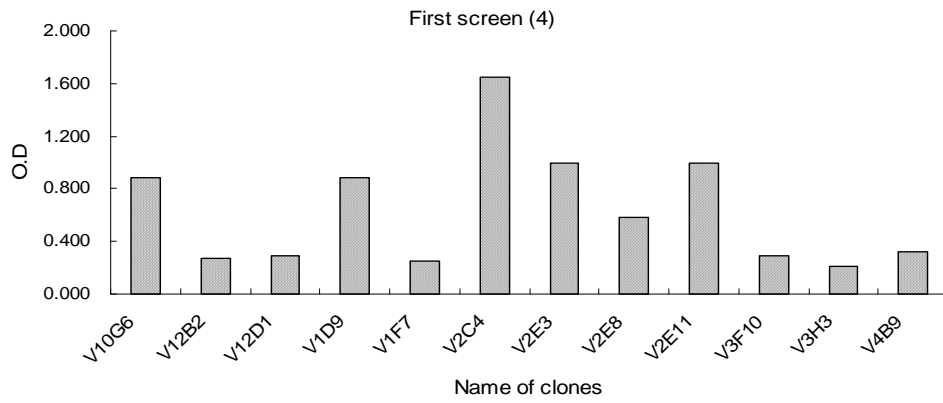


Fig. 10-11 Result of O.D Produced from clone of *Vibrio alginolyticus*.



## 제 11 절 양식 바지락의 퍼킨수스 감염증

### 1. 서론

원충류인 *Perkinsus* sp.는 이매패류의 사망과 깊은 관계를 가지고 있는 것으로 알려져 있으며, 포르투갈과 스페인 (Azevedo 1989, Figueras et al. 1992, 1996, Sagrita et al. 1995, 1996, Cigarria et al. 1997), 일본 (Hamaguchi et al. 1998)에 분포하는 바지락류 (*Ruditapes decussatus*, *R. philiphinarum*)에 감염되는 것으로 보고되었다. 또한 북중미의 굴의 폐사의 원인으로 보고되어지고 있다 (Andrew 1996, Burreson & Rogone Calvo 1996, Soniat 1996). 우리 나라에서 양식되고 있는 바지락인 Manila clam에서도 *Perkinsus* sp.가 감염되어 중요한 사망원인으로 추정되어지고 있다 (Choi & Park 1997, Choi et al. 1998, Park et al. 1999).

*Perkinsus* sp.의 감염을 확인하기 위한 방법으로는 종래의 병리조직학적 방법과 Ray's fluid thyoglycollate medium (FTM)에 조직편을 넣어서 배양하는 방법이 주로 사용되고 있다. (Chagot et al. 1987, Navas et al. 1992, Rodriguea & Navas 1995). 그러나 이러한 방법은 시간이 많이 소모되고 결과 또한 다분히 주관적이기 때문에 분자생물학적 기법을 사용한 PCR법이 개발되어 감염의 확인에 사용되고 있다 (Marsh et al. 1995, Hamaguchi et al. 1998).

본 연구에서는 서해안의 충남 태안과 전북 고창지역에서 양식되는 바지락의 계절별 감염상황을 조직절편을 병리조직학적으로 검사하는 재래적 방법과 신속 검출을 위한 Hemacolor염색 및 FTM에 배양하여 hypnospore를 확인하는 방법과 병행하여 PCR법으로 *Perkinsus* sp.의 감염상황을 조사하였다. 또한 본 연구기간 동안에 대량폐사가 발생한 인천 연안의 양식장에서 채취한 바지락을 대상으로 현장 조사를 실시한 결과를 보고한다.

### 2. 재료 및 방법

#### 2-1. 시료채집

충남 태안군 피도 소재의 1개소와 전북 고창군 심원면 소재의 1개소를 선정하여 (Fig. 11-1), 각 지역에 가로 세로 1 m씩 정방형의 구획을 3개소 설치하여 시료 채취시 마다 모두 채집하여 각장과 중량을 측정하였으며, 이와는 다른 곳에서 임의로 폐류를 채취하여 얼음 상자에 채워서 실험실로 운반하여 사용하였다.

#### 2-2. 도말 표본의 검색 (cytological diagnosis)

바지락의 폐각근을 절단한 다음 각정 부위에서 발쪽으로 소화관 맹장의 정중앙을 잘라내어 여과지로 수분을 제거한 다음 슬라이드 도말표본을 만들었다. 이 때 폐각근은 별도로 잘라내

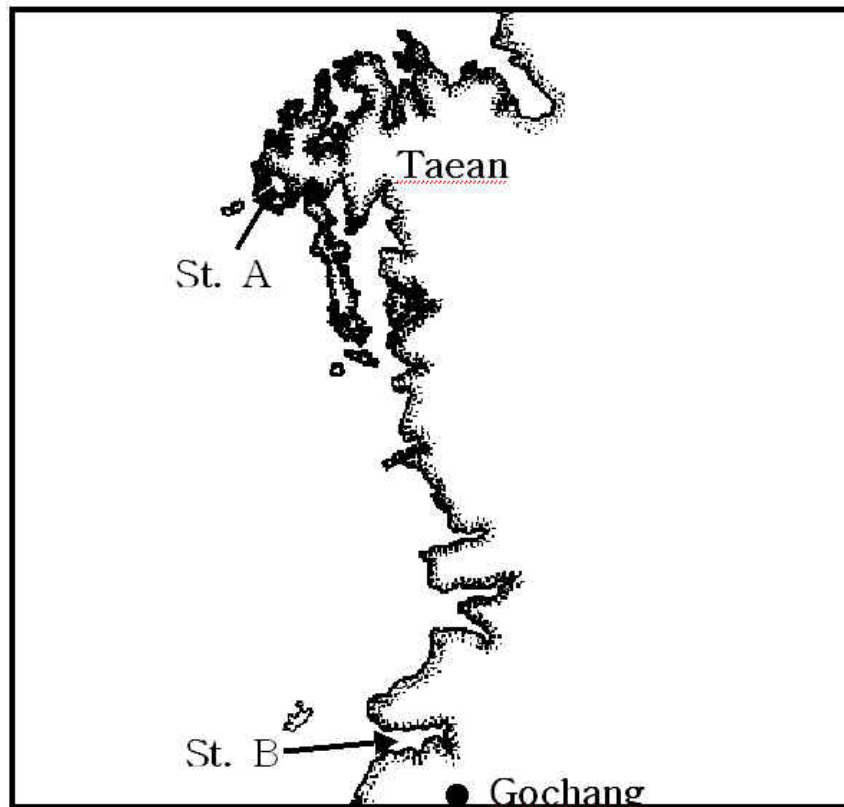


Fig. 11-1. Map showing two sampling stations (St. A in Taean & St. B in Gochang).

어 같은 방법으로 같은 슬라이드에 도말하였다. 슬라이드 도말표본은 공기중에 건조시킨 다음 Hemacolor (Merck)로 제조사의 지시에 따라 염색하였다. 염색 표본은 봉입한 다음 400배~800배의 현미경으로 기생충의 감염여부를 확인하였다.

### 2-3. 병리조직학적 검사

해부용 칼로 패각을 절단하여 패액을 버린 다음 10% 포르말린 해수액에 30분간 고정하여 조직을 굳힌 다음, 각정 부위에서 발부위로 소화관 맹장의 정중앙을 잘라 양분하고 다시 뚜껑을 5 mm 정도로 절단한 다음 Davidson액 (해수 1200 ml, 95% ethanol 1200 ml, formalin 300 ml, glycerol 400 ml, glacial acetic acid 10%)에 12~24시간 고정한 후 70%알콜에 보존하거나 곧바로 알콜 계열로 탈수하여 상법에 따라 파라핀 절편을 만들어 HE염색 후, 현미경하에서 관찰하였다. 이 때 부착근은 별도로 절단하여 같은 방법으로 고정하였다.

### 2-4. FTM의 배양에 의한 *Perkinsus* 검출 (Ray, 1966)

멸균한 Ray의 Fluid thioglycolate medium (thioglycolate medium, fluid 7.3 g, NaCl 5 g, distilled water 242.5 ml)에 생체 시료를 넣고 실온 암흑에서 3~7일간 배양하여 배양액을 버

리고 생체시료에 루골액을 떨어 뜬 후 청색의 감염 증체를 판정하였다. 루골액은 potassium iodide 6 g과 iodine 4 g을 증류수 100 ml에 녹여 저장액으로 하고, 사용할 때에는 저장액 1 ml를 증류수 25 ml로 희석시켜 사용하였다.

## 2-5. PCR을 이용한 *Perkinsus* sp.의 검출

시료의 아가미를 절취하여 아가미를 절취하여 ACCUPREP kit (Bioneer Co.)를 사용하여 DNA를 추출하였다. Primers로서 Pk5S (5'-cgt cga ata cac cgg at-3', 5'-tag tcc atc gtc acc a-3')를 사용하였다.

DNA는 DNA thermal cycler (GeneAmp PCR System 9700, PE Applied Biosystems, USA)를 이용하여 DNA를 증폭시켰다. 즉 Tag DNA polymerase 1 U, dNTPs 250 uM, Tris-HCl, pH 9.0 10 mM, KCl 40 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM과 dye가 혼합된 PCR PreMix (AccuPower, Bioneer, Korea)에 primer pair를 1  $\mu$ l, DW 16  $\mu$ l, DNA template 1  $\mu$ l를 첨가하여 혼합한 다음 조건에서 DNA를 증폭시켰다. PCR 조건은 initial denaturation (94°C, 5min), denaturation (94°C, 30sec), annealing (50°C, 45sec)과 extension (72°C, 45sec) 및 final extension (72°C, 5min)의 조건으로 25 cycles반복하였다. 증폭된 DNA 18  $\mu$ l를 TAE electrophoresis buffer (40 mM Tris, 20 mM acetate, 2 mM EDTA)에 용해시킨 1.5% agarose gel상에서 전기영동하여 자외선 램프하에서 밴드를 확인하였다.

## 2-6. PCR 산물의 염기서열 확인

전기영동하여 확인한 PCR 산물에 해당되는 부분을 agarose gel에서 칼로 절취하여 잘라내어 QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen, USA)로 PCR 산물을 정제하였다. 정제된 DNA는 pGEM-T easy vector (Promega, pGEM-T easy vector system, USA)에 ligase buffer 5  $\mu$ l, pGEM-T easy vector 1  $\mu$ l, PCR산물 2  $\mu$ l, T4 DNA ligase 1  $\mu$ l, Deionized water 1  $\mu$ l를 혼합하여 실온에서 벡터에 삽입하였다. PCR product를 함유한 plasmid를 JM109 (Takara, Japan) competent cell에 heat shock 방법으로 transformation하여 2% (w/v) X-gal 40  $\mu$ l, 20% (w/v) IPTG solution 7  $\mu$ l, ampicillin 50  $\mu$ g/ml이 포함된 LB agar (Bacto tryptone 10 g/l, bacto yeast extract 5 g/l, sodium chloride 10 g/l, bacto agar 15 g/l) plate에 도말하여 37°C에서 18시간 배양한 후 PCR 산물 유전자가 삽입된 백색 집락을 선택하였다. 이 집락을 50  $\mu$ g/ml Ampicillin (Sigma, USA)이 첨가된 LB broth (Yeast extract 5 g/l, pancreatic digest of casein 10 g/l, sodium chloride 10 g/l, Difco, Miller)에서 대량 배양한 후 원심분리하여 수확한 시험균으로부터 plasmid DNA를 EcoRI으로 절단하여 inserted DNA의 유무와 크기를 확인하였다. 분리한 plasmid는 Sanger et al. (1977)의 방법으로 염기서열을 분석하였고, automatic sequencer (ABI 377, USA)를 사용하여 T7 universal primer와 Sp6 universal

primer로 염기서열을 분석하였다. 분석된 염기서열은 GeneBank의 Blast 검색을 통하여 이미 등록된 유전자의 염기서열과 비교하였다.

## 2-7. PCR을 이용한 현장시험

2004년부터 4월부터 7월까지 태안지역과 고창지역에 서식하는 바지락, 굴, 동죽 및 고등 각 20개체를 채집하여 아가미를 절취한 다음 DNA를 추출하여 위의 방법에 따라 PCR법으로 *Perkinsus* sp.감염율의 변화를 조사하였다.

## 2-8. 2004년 인천지역 대량폐사 바지락에서의 검출

대량폐사가 발생한 해역에는 갯펄 속으로 잠입하지 못하고 갯펄에 노출된 채로 사망한 개체 또는 무기력한 개체는 파도에 밀려 한 곳에 밀집하게 쌓이게 됨으로 더 많이 폐사한 것으로 보인다 (Fig. 11-11,12). 대량폐사가 발생한 2일 후인 2004년 3월 24일 인천 영흥도 부근에서 갯펄에 잠입하지 못하고 갯펄위에 나와 있는 20개체 (27.19~35.36 mm, 중량, 2.92~8.21 g)와 갯펄 속에 잠입하여 있는 개체군 20개체 (27.35~39.60 mm, 중량 4.10~12.94 g)의 2그룹으로 구분하여 채집하였다. 채집한 시료는 얼음 상자에 넣어 본 연구실로 운반하였다. 시료는 부착된 갯펄을 수도수로 깨끗이 세척하고 계측하여 성숙도 지수를 산출한 다음 실험에 사용하였다. 성숙도 지수의 대조군은 폐사가 발생하지 않은 군산지역에서 채집한 바지락을 사용하였다. 인천지역에서 시료를 채집 당시의 수온은 7.5°C였고 저질의 온도는 14°C였다. *Perkinsus* sp.의 검출은 시료 (n=6)의 외투막, 아가미, 폐각근, 발 및 소화관의 스템프 표본을 만들어 건조시킨 다음 Hemacolor 및 Diff-Quick염색 표본 및 병리조직 표본을 만들어 HE염색 후 검경함과 동시에 위의 방법에 따라 PCR법을 사용하였다.

# 3. 결과 및 고찰

## 3-1. 양식장 환경과 성장

2001년 12월과 2002년 3월, 6월, 8월, 11월, 2003년 1월 3월 6월 및 9월 조사지역의 수온은 Table 11-1에 표시한 것처럼 태안이 각각 7.0°C, 11.0°C, 25.0°C, 28.0°C, 10.5°C, 5.5°C, 13.5°C, 25.0°C, 27.0°C였으며, 고창지역의 수온은 각각 5.4°C, 15.0°C, 24.0°C, 26.0°C, 8.8°C, 1.6°C, 6.5°C, 22.0°C, 25.0°C였다. 한편 조사기간의 비중은 태안지역이 각각 1.027, 1.026, 1.022, 1.009, 1.257, 1.026, 1.025, 1.026, 1.008였으며, 고창지역은 각각 1.025, 1.024, 1.028, 1.017, 1.025, 1.026, 1.026, 1.020, 1.018였다. 2001년 12월과 2002년 3월, 6월, 8월, 11월, 2003년 1월 3월 6월 및 9월 태안과지역의 각장은 각각 26.59±3.14 mm, 27.30±2.86 mm, 28.39±2.29 mm, 28.27±2.62 mm, 28.95±2.50 mm, 29.39±2.90 mm, 30.57±2.18 mm, 31.37±2.02 mm 그리고 32.24±2.47 mm이었다. 고창지역은 2001

Table 11-1. Water temperature, salinity and shell size of the clams in two culturing beds for Manila clams

Date	Locations					
	Taeon			Gochang		
	WT(°C)	Salinity	Shell size(mm)	WT(°C)	Salinity	Shell size(mm)
Dec. 2001	7.0	1.027	26.59±3.14	5.4	1.025	31.34±3.36
Mar. 2002	11.0	1.026	27.30±2.86	15.0	1.024	32.25±3.67
Jun.	25.0	1.022	28.39±2.29	24.0	1.028	33.87±3.84
Aug.	28.0	1.009	28.27±2.62	26.0	1.017	34.58±3.25
Nov.	10.5	1.257	28.95±2.50	8.8	1.025	35.87±3.16
Jan. 2003	5.5	1.026	29.39±2.90	1.6	1.026	30.34±2.85
Mar.	13.5	1.025	30.57±2.18	6.5	1.026	34.59±3.11
Jun.	25.0	1.026	31.37±2.02	22.0	1.020	33.24±1.61
Sep.	27.0	1.008	32.24±2.47	25.0	1.018	33.89±2.01

년 12월과 2002년 3월, 6월, 8월, 11월, 2003년 1월 3월 6월 및 9월의 고창지역의 각장은 각각 31.34±3.36 mm, 32.25±3.67 mm, 33.87±3.84 mm, 34.58±3.25 mm, 35.87±3.16 mm, 30.34±2.85 mm, 34.59±3.11 mm, 33.24±1.61 mm 그리고 33.89±2.01 mm로 고창지역의 성장이 양호하였다.

### 3-2. *Perkinsus* sp.의 검출

#### 3-2-1. 도말 표본의 Hemacolor 염색

30개체의 외투막, 아가미, 발, 소화관 및 패각근의 스탬프 표본을 만들어 hemacolor로 염색하여 검경한 결과는 Fig. 11-2에서처럼 1개의 공포 특징적으로 한쪽으로 치우쳐 있는 영양체가 발견되어 Choi et al. (1998)의 결과와 일치하였다.

*Perkinsus* sp.의 태안과 고창지역의 조직부위별 계절별 감염율은 Fig. 11-3에 나타내었다. 태안지역에서는 2001년 12월과 2002년 3월에는 모든 조직에서 검출되지 않았다. 2002년 6월에 외투막에서 3.3%만이 검출되다가 8월에는 외투막과 아가미에서 각각 3.3%와 16.6%가 검출되었다. 11월에는 외투막에서는 검출되지 않은 반면에 아가미와 소화관에서 각각 3.3%가 검출되었다. 2003년 1월과 3월에는 발과 부착근에서만 각각 3.3%가 검출되었다. 6월에는 외투막에서 6.6%, 소화관에서 3.3%가 검출되었으며, 9월에는 외투막에서 3.3%, 발에서 10.0%가 검출되었다.

한편 고창지역에서는 2001년 12월 소화관에서 6.6%, 2002년 3월에는 아가미에서 3.3%가 검출되었지만 다른 조직에서는 검출되지 않았다. 2002년 6월에는 외투막과 아가미에서 각각 3.3%와 6.6%가 검출되었고, 8월에는 외투막에서 3.3%, 아가미에서 10.0%, 소화관에서 16.6%가 검출되었다.

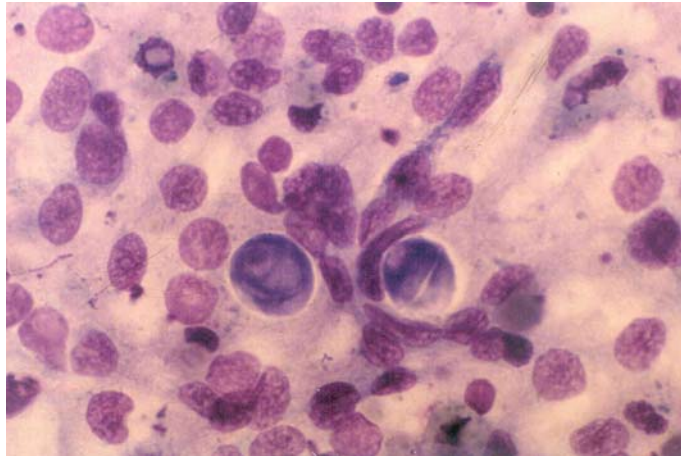


Fig. 11-2. Trophozoites of *Perkinsus* sp. stained with hemacolor showing a eccentric nucleus and a characteristic large vacuole in the cytoplasm.

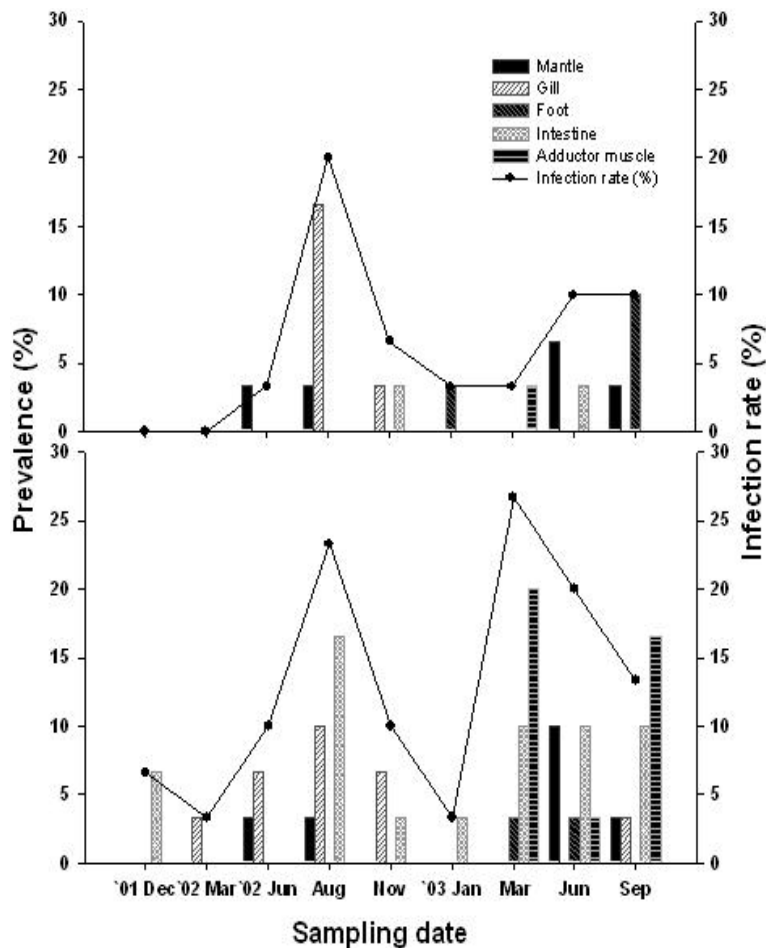


Fig. 11-3. Seasonal prevalence (%) of *Perkinsus* sp. in the organ stamps of the clams (n=30) stained with hemacolor solution. Clams were taken from the culturing beds in Taean (upper) and Gochang (lower) from Nov. 2002 to Sep. 2003.

11월에는 아가미와 소화관에서 6.6%와 3.3%가 검출되었다. 2003년도에는 1월에는 소화관에서 3.3%가 검출되었지만 3월에는 발, 소화관 및 부착근에서 각각 3.3%, 10.0%, 20.0%가 검출되었다. 6월에는 외투막과 소화관에서 각각 10.0%, 발과 부착근에서 각각 3.3%가 검출되었다. 9월에는 외투막과 아가미에서 각각 3.3%, 소화관에서 10.0%, 부착근에서 16.6%가 검출되었다.

이들 지역에서의 월별 감염율은 태안은 '01년 12월과 '02년 3월에는 검출되지 않았고, 고수온기인 '02년 6월과 8월에 각각 3.3%와 20.0%가 감염되었다. 저수온기인 동년 11월과 '03년 1월과 3월에 각각 6.6%, 3.3% 및 3.3%가 감염되었다. 한편 고창지역은 '01년 12월과 '02년 3월에 각각 6.6%와 3.3%가 감염되어 있었다. '02년 6월과 9월은 10.0%와 23.3%, 11월과 '03년 1월과 3월에는 각각 10.0%, 3.3%, 26.7%가 감염되어 있었다. '03년 6월과 9월에는 각각 20.0%와 13.3%가 감염되어 있었다. 조직별의 감염율은 보면 태안 지역은 아가미, 외투막 및 발에서 감염율이 높았고, 고창지역은 아가미, 장 및 폐각근에서 높게 나타나는데 아가미는 2지역에서 모두 높은 감염율을 보였다. 한편 월별 감염율은 여름철에는 높고 겨울철에는 낮은 경향이었지만 고창지역은 수온이 상승하기 전인 초봄에서도 감염율이 높았다.

바지락 조직의 stamp표본을 Hemacolor염색하여 영양체를 확인하는 방법은 비교적 단시간에 간단하게 검사할 수 있는 점에서는 편리한 방법이긴 하지만 감염강도가 낮은 감염초기 단계에서는 검출이 용이하지 않기 때문에 (Choi et al. 1998), 이 방법에 의한 감염율은 FTM배양법이나 병리조직학적 검사방법에 비해 낮은 결과였지만 신속진단에서는 아주 유용한 방법이라 사료된다.

### 3-2-2. 병리조직학적 검사

*Perkinsus* sp.의 영양체는 아가미, 발, 외투막, 소화관, 소화관및 부착근에서 모두 검출되었다. 총체는 각 기관의 결합 조직내에 1~12 cells의 trophozoites가 에오진호성 또는 무염색의 원형 또는 선상의 cyst유사 구조물내에 집합체를 이루고 있었다 (Fig. 11-4). 이러한 집합체내의 trophozoites는 원형 또는 타원형으로 거의 총체의 대부분을 차지하는 1개의 커다란 공포와 편재된 핵이 호염기성의 세포벽에 쌓여있었다. 이렇게 영양체의 집합체 주변에는 가벼운 혈구의 침윤이 관찰되었다.

2지역에서 채취한 바지락의 월별 및 조직별 검출율은 Fig. 11-5에 나타내었다. 태안지역에서는 '01년 12월, 2002년 3월 및 6월에는 어떠한 조직에서도 검출되지 않았다. '02년 8월에서는 외투막, 아가미 및 부착근에서 3.3%, 소화관에서 6.6%검출되었지만 발에서는 검출되지 않았다. 11월에는 외투막과 발에서 각각 3.3%, 아가미와 소화관에서 16.6%가 검출되었지만 폐각근에서는 검출되지 않았다. '03년 1월에는 외투막, 발, 폐각근에서 각각 6.6%가, 아가미에서 10%, 소화관에서 16.6%가 검출되었다. 3월에는 외투막, 소화관 및 폐각근에서 각각 6.6%가 검출되었고 아가미에서 13.2%가 검출되었지만 발에서는 검출되지 않았다. 6월에는 외투막과 발에서 각각 3.3%, 아

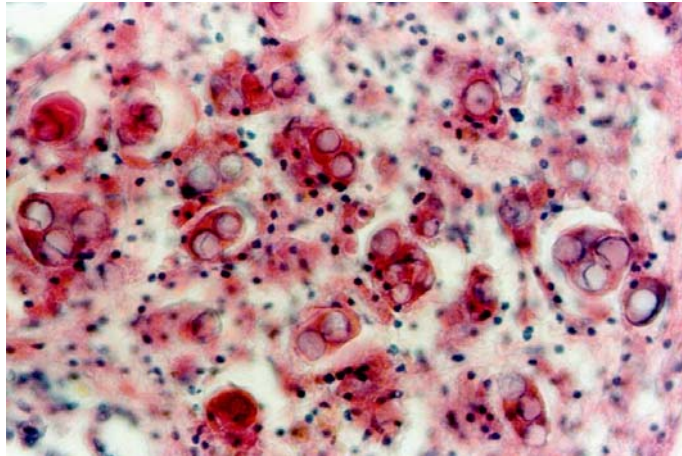


Fig. 11-4. Trophozoites of *Perkinsus* sp. in the mantle of the Manila clam detected with the conventional histopathological method. Note some trophozoites with a large eccentric vacuole in the connective tissue. HE.

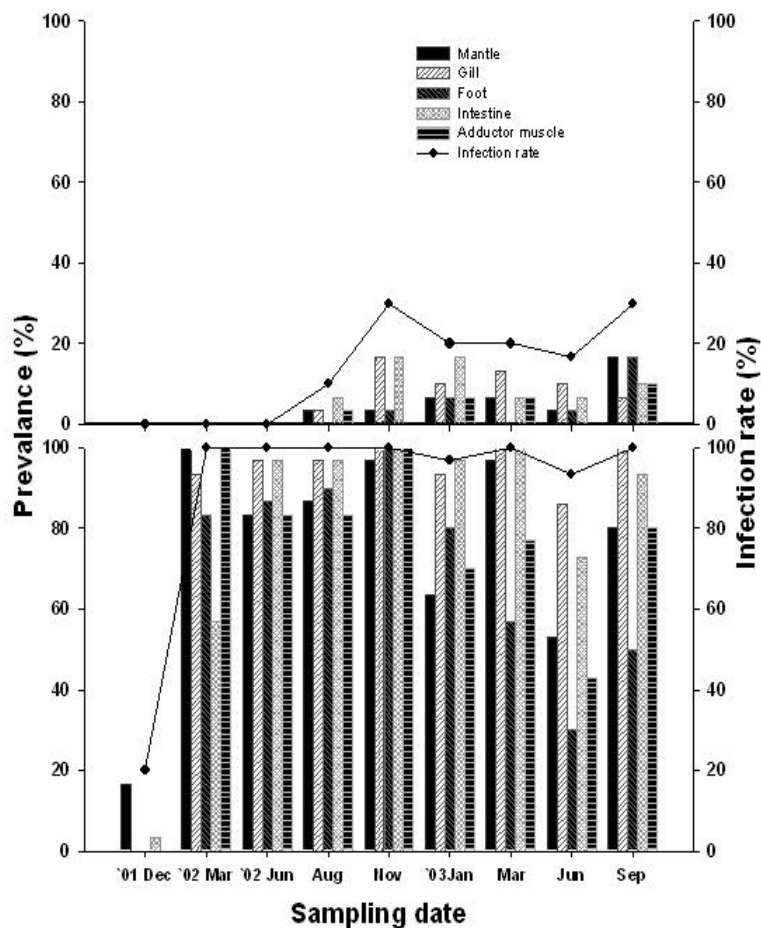


Fig. 11-5. Seasonal prevalence (%) of *Perkinsus* sp. in the tissues of calms detected with the conventional histopathological method. The same calms were used in Fig. 4. Upper, Taean, lower, Gochang.



가미에서 10%, 소화관에서 6.6%가 검출되었지만 패각근에서는 검출되지 않았다. 9월에는 아가미에서 6.6%, 소화관과 패각근에서 10%가 검출되었으며, 외투막과 발에서 16.6%가 검출되었다.

한편 고창지역에서는 '01년 12월은 외투막과 소화관에서 각각 16.6%와 3.3%가 검출되었다. '02년 3월 외투막과 패각근에서 100%, 아가미, 발, 소화관에서 각각 93.3%, 83.3% 및 56.7%가 검출되었다. 6월에는 외투막과 패각근에서 83.3%, 아가미와 장에서 97.0%, 발에서 86.7%가 검출되었다. 8월에는 아가미와 장에서 97.0%, 외투막, 발 및 패각근에서 각각 86.7%, 90.0%와 83.3%가 검출되었다. 11월에는 아가미, 발, 소화관, 패각근에도 모두 100%검출되었고, 외투막에서 97.0%가 검출되었다.

'03년 1월에는 외투막과 아가미에서 63.6%와 93.3%, 발과 소화관에서 80.0%와 97.0%, 패각근에서 70.0%가 검출되었다. 동년 3월에는 아가미와 소화관에서 100%, 외투막과 발에서 97.0%와 57.0%, 패각근에서 77.0%가 검출되었다. 6월에는 외투막과 아가미에서 각각 53.0%와 86.0%, 발과 소화관에서 각각 30.0%와 73.0%, 패각근에서 43.0%가 검출되었다. 또 동년 9월에는 외투막과 패각근에서 80.0%, 아가미와 발에서 각각 100%와 50.0%, 소화관에서 93.3%가 검출되었다.

태안 지역은 2002년 8월에 처음으로 검출되기 시작하여 11월에 최고치에 달한 다음 점차 감소하기 시작하였지만 이듬해 3월부터 다시 상승하기 시작하였다. 고창지역은 2002년부터는 계절 및 월별에 관계없이 항상 100%검출되었다. 검출장기별로 보면 태안지역은 조사초기에는 아가미와 소화관에서의 검출율이 높았지만 점차 외투막과 발에서의 검출율도 높아졌다. 고창지역은 아가미, 외투막 및 소화관에서의 검출율이 높은 경향이였다.

패류의 조직내 *Perkinsus* sp.는 거의 모든 장기의 결합조직내에 다양한 크기의 영양체의 형태로 분포하며 영양체는 크기가 다양한 공포를 가지고 있고, 때로는 공포가 핵을 한쪽으로 밀어붙임에 따라 반지와 같은 형태로 관찰된다. 어떤 영양체는 여러개의 영양체가 cluster를 형성하는 것을 특징적이라는 기존의 보고 (Azevedo 1989, Sagrita et al. 1995, 1996, Choi et al. 1998, Hamaguchi et al. 1998)와 유사하였다. 이러한 병리조직학적 연구의 대부분은 전체의 개체의 감염상황을 조사한 것이 대부분이지만 본 연구에서는 각 조직별로 구분하여 감염율을 조사한 결과 Hemacolor 염색법이나 FTM배양법보다 감염율이 높게 나타나 조직절편의 제작에 시간이 소요되기는 하지만 감염 상황 특히 감염율을 조사하는 방법으로는 가장 효과적인 방법으로 판단되었다. 또한 감염율이 비교적 낮은 태안지역은 바지락의 조직별로 영양체의 관찰이 곤란한 경우도 있었지만 감염율이 높은 고창지역에서는 거의 모든 기관에서 비슷한 경향으로 검출되었다. Hamaguchi et al. (1998)은 심한 감염을 나타내는 개체에서는 육안으로도 조직표면에 흰반점으로 관찰될 정도라고 보고하였다.

### 3-2-3. FTM 배양에 의한 검출

조직을 절취하여 FTM에 배양하여 루골액을 떨어뜨리면 Fig. 11-6처럼 청색, 감청색 또는

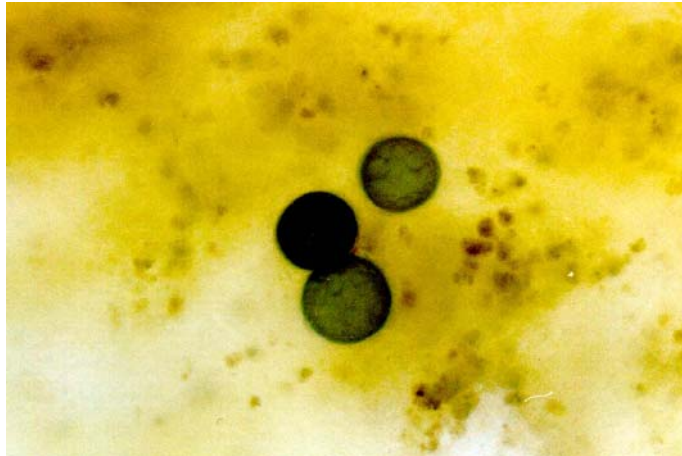


Fig. 11-6. Hypnospores of *Perkinsus* sp. after incubation of Manila clam mantle in Ray's fluid thioglycolate medium (RFTM). The spores are stained large dark blue cells with Lugol's iodine.

녹색으로 염색되는 원형의 충체 hypnospore가 발견되었다.

2지역에서 채취한 바지락의 월별 및 조직별 검출율은 Fig. 11-7에 나타내었다. 10개체의 외투막, 아가미, 발, 소화관 및 패각근의 조직편을 FTM에 배양한 결과 2001년 12월 태안지역에서 외투막과 발에서는 검출되지 않았지만 아가미와 패각근에서 각각 10%, 소화관에서 20%가 검출되었다. 2002년 3월에는 외투막과 발에서는 검출되지 않았고, 아가미와 소화관에서 각각 40%, 패각근에서 10%가 검출되었다. 6월에는 발과 패각근에서 각각 10%, 외투막과 소화관에서 각각 20%와 30%, 아가미에서 60%가 검출되었다. 8월에는 외투막과 소화관에서 각각 60%, 아가미와 발에서 각각 70%와 40%, 패각근에서 30%가 검출되었다. 11월에는 외투막, 아가미 및 패각근에서 각각 40%, 발과 소화관에서 각각 10%와 70%가 검출되었다. 2003년 1월에는 외투막과 패각근에서 각각 30%, 아가미와 소화관에서 각각 40%, 발에서 20%가 검출되었다. 3월에는 모든 장기에서 검출되지 않았다. 6월에는 발과 패각근에서 각각 10%, 외투막과 아가미에서 각각 30%와 40%, 소화관에서는 검출되지 않았다. 9월에는 외투막과 소화관에서 각각 70%, 아가미와 발에서 각각 50%, 패각근에서 30%가 검출되었다. 한편 고창지역에서는 2001년 12월에는 외투막과 아가미에서 각각 30%와 40%, 패각근에서 10%가 검출되었지만 발과 소화관에서는 검출되지 않았다. 2002년 3월에는 외투막과 아가미에서 각각 50%, 발과 패각근에서 각각 10%, 소화관에서 20%가 검출되었다. 6월에는 아가미와 소화관에서 각각 80%, 외투막과 발에서 각각 50%와 40%, 패각근에서 30%가 검출되었다. 8월에는 외투막, 아가미, 발 및 패각근에서 각각 100%가 검출되었고, 소화관에서는 90%가 검출되었다. 11월에는 외투막, 아가미, 소화관 및 패각근에서 각각 100%, 발에서 90%가 검출되었다. 2003년 1월에는 외투막과 아가미에서 각각 80%, 발과 소화관에서 각각 20%와 100%, 패각근에서 50%가 검출되었다.

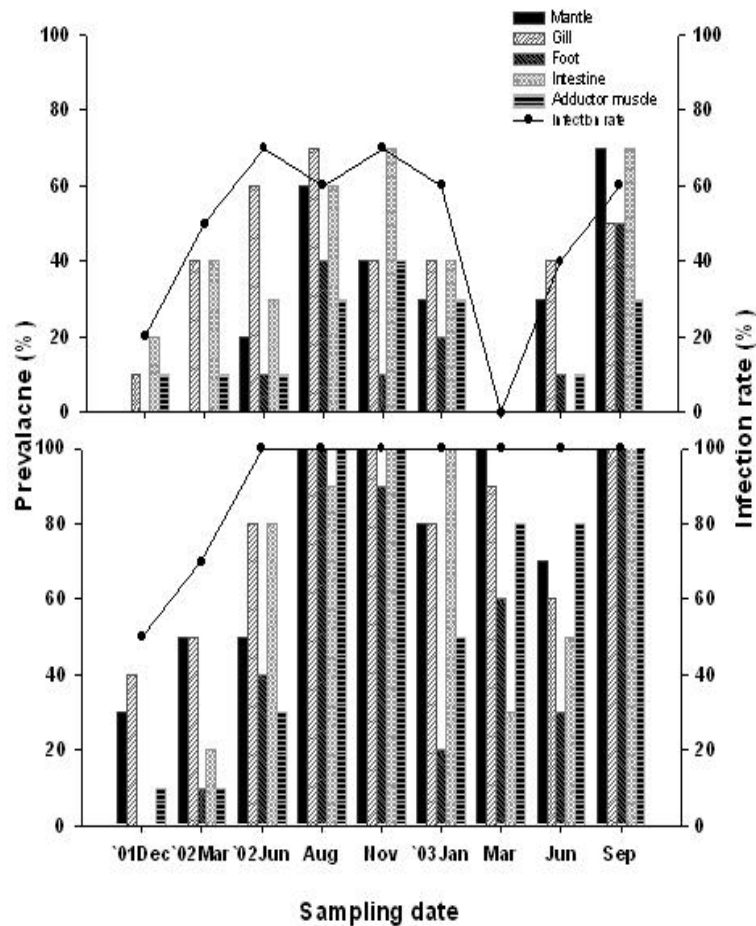


Fig. 11-7. Seasonal prevalence (%) of *Perkinsus* sp. in the calms tissues from Taean (Upper) and Gochang (lower). The organs of ten calms from each location were dissected out and the prevalence was determined by standard Ray's FTM assay.

3월에는 외투막과 아가미에서 100%와 90%, 발과 소화관에서 각각 60%와 30%, 패각근에서 80%가 검출되었다. 6월에는 외투막과 아가미에서 각각 70%와 60%, 발과 소화관에서 각각 30%와 50%, 패각근에서 80%가 검출되었다. 9월에는 모든 장기에서 100%검출되었다.

기생충의 검출율은 지역적으로는 고창지역이 태안지역에 비해 훨씬 높았으며, 부위별로는 외투막, 아가미, 패각근에서의 검출율이 높았으며 그 중에서 아가미의 검출율이 항상 높았다. 또 계절별로는 태안지역은 3월부터 감염율이 높아져서 저수온기에 낮아지는 경향이 보였지만 고창지역에서는 연중 100%감염되어 있는 것으로 나타났다.

FTM배양법은 (Ray 1966) 패류 조직편을 배양한 다음 루골액을 떨어뜨렸을 때 타원형의 감청색으로 염색되는 hypnospores가 발견되면 양성으로 판단하는 *Perkinsus* sp.의 진단을 위한 표준법으로 취급되고 있다 (Choi et al. 1989, Perkins 1996, Gauthier & Fisher, 1990). 그러나 Almeida et al. (1999)는 해양에 서식하는 와편모조류인 *Alexandrium* sp, *Ceratium* sp.,

Heterocapsa, Gyrodinium, Gymnodinium 등도 양성반응을 나타내내는 것으로 보고하였지만 현재에서도 가장 많이 활용되는 방법이다. 그러나 배양에 사용하는 조직에 따라 많은 차이가 있다는 것이 증명되어지고 있다. 즉 Gauthier & Fisher (1990)는 혈림프를 배양하는 것이 가장 손쉽고 정확한 방법이라고 보고하였다. 그러나 Rodriguea & Navas (1995)는 감염이 확인된 개체에서 혈림프, 아가미 및 내장 조직을 채취하여 FTM에 배양한 결과 혈림프에서는 69%, 아가미에서는 90%, 그 외 조직에서는 95%가 양성반응을 나타내었다. 또한 FTM 배양에서 감염이 확인되지 않은 개체에서 혈림프, 아가미 및 나머지 조직의 46%, 22%, 13%가 양성반응으로 나타남으로서 FTM배양법으로 진단하기에 가장 적합한 조직은 아가미라고 주장하였다. 본 연구에서도 외투막, 아가미, 폐각근에서의 검출율이 높았으며 그 중에서 아가미의 검출율이 항상 높게 나타나 이들의 결과와 일치하고 있다.

고창과 태안지역에서 채취한 바지락을 Hemacolor 염색, 병리조직학적 방법 및 Ray의 조직배양법에 의한 검사 결과를 종합하여 2지역의 월별 감염율을 표시하면 Fig. 11-8과 같다. 즉 고창지역은 조사를 시작한 2001년 12월에는 감염율이 50%이었으나 2002년 3월부터 2003년 9월까지 100%가 감염되었다. 한편 태안지역은 2001년 12월 20%, 2002년 3월은 50%, 2002년 6월 70%, 동년 8월은 60%, 11월에는 70%, 2003년 1월에 60%, 3월에는 20%, 6월에는 40%, 6월에는 60%로 동계에는 감염율이 낮아지고 하계에는 감염율이 높은 경향을 나타내었다.

Choi et al. (1998)은 태안과 고창지역의 감염율이 태안 77~100%, 고창이 23~95%이며, 최저 감염은 동계에 최고 감염은 여름철인 것으로 보고하였다. 그러나 비슷한 지역을 조사한 본 연구에서는 태안이 고창지역에 비해 훨씬 높은 감염율을 보이며, 동계인 12월~2월을 제외하고는 거의 비슷한 감염율로 나타나 그들의 조사시점에 비해 훨씬 더 많이 만연된 것

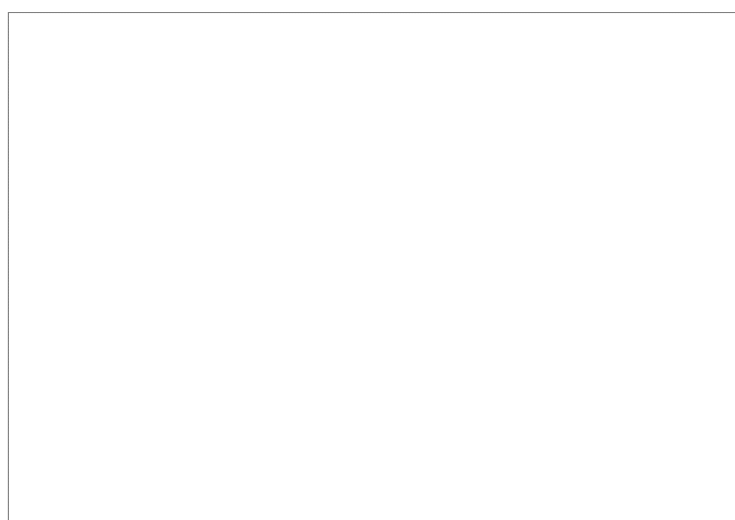


Fig. 11-8. Seasonal prevalence (%) of *Perkinsus* sp. in the calms from Taeon and Gochang from Dec. 2001 to Sep. 2003.

으로 추정된다. 한편 우리나라의 해역별 *Perkinsus* sp.의 감염상황을 조사한 Park & Choi (2001)에 의하면 조사시기가 서로 상이하기 때문에 상대적 비교는 곤란하며, 조사 양식별로는 심한 차이가 나긴 하지만 서해와 남해에서 채취한 것들의 감염율이 동해산에 비해 훨씬 높게 나타났다고 하였다.

### 3-3. PCR에 의한 동족, 바지락 및 피빨 고등에서의 *Perkinsus* sp. 검출

바지락의 아가미에서 분리한 template DNA로부터 Pk5S primers를 이용한 PCR 결과 379 bp의 산물이 얻어졌다 (Fig. 11-9). 검출된 PCR 산물을 염기서열 분석에서는 Pk5S primers에 의한 산물은 GeneBank에 등록된 Accession number AF140295인 *Perkinsus atlanticus*의 5S ribosomal RNA gene과 100% 상동성을 나타내었다 (Fig. 11-10).

2004년 4월부터 7월까지 태안과 고창지역에 분포하고 있는 동죽, 바지락, 굴 및 피빨고등의 아가미에서 DNA를 추출하여 PCR반응을 시킨 결과 Fig. 11-9와 같이 시료로 사용한 모든 패류에서 *Perkinsus* sp.가 검출되었다.

각 패류에서의 검출 상황은 Fig. 11-11에 나타난 것처럼 태안지역에서 채집한 바지락은 80~100%, 굴은 0~20%, 동죽은 45~85%, 피빨고등은 20~75%가 감염된 것으로 나타나, 바지락의 감염율이 가장 높았고 이어서 동죽, 피빨고등, 굴의 순으로 감염율이 높았다. 한편 고창지역에서 채집한 시료의 경우 바지락은 85~100%, 굴은 0~30%, 동죽은 30~90%, 피빨고등은 25~85%로 태안과 마찬가지로 바지락의 감염율이 가장 높게 나타났고 동죽, 피빨고등 및 굴의 순으로 감염율이 높아 태안에서 채집한 시료의 감염상황과 유사하였다.

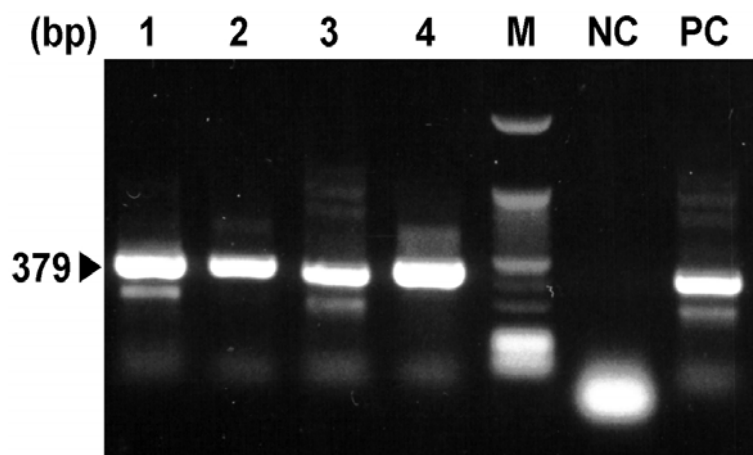


Fig. 11-9. Detection of *Perkinsus* sp. in clam by PCR amplification. The specimens were taken from the costal area of Taean and Gochag. 1, surf calm (*Mectra veneriformis*); 2, Manila clam (*Ruditapes philippinarum*); 3, Oyster (*Crassostrea gigas*); 4, Thomas's rapa whelk (*Rapana venosa*); M, size marker; NC, negative control; PC, positive control.

PCR법으로 조사한 2지역의 평균감염율은 바지락이 95.0%, 굴은 10.0%, 동죽은 62.5% 피빨고둥은 46.9%로 나타났다. 이러한 감염율은 패류의 서식환경과 관련이 있음을 알 수 있는데 갯펄에서 서식하는 바지락과 동죽이 암반에 부착하여 서식하는 굴과 피빨고둥에 비해 감염율이 높게 나타났다. 이러한 경향으로 보아 서해안에 서식하는 거의 모든 패류에 *Perkinsus* sp. 감염이 만연되어 있으며, 갯펄에 서식하는 패류일수록 감염율이 높을 것으로 추정된다 (Fig. 11-12).

#### 3-4. 2004년 인천지역 대량폐사 바지락에서의 *Perkinsus* sp. 검출

폐사지역에서 채집한 바지락은 발과 외투막이 수축되어 있으며, 패각내의 내용물이 건강한 개체에 비해 훨씬 적은 소위 여윈 상태로 내장부의 광택도 건강개체에 비해 약했다 (Fig. 11-13). 대조로 폐사가 발생하지 않은 군산 지역에서 채집한 바지락과의 비만도 (condition index, CI)를 비교한 결과 Table 11-2에 표시한 것처럼 인천 지역에서 채집한 바지락의 CI가 유의하게 낮았다.

또 조직의 스템프 표본의 hemacolor 및 Diff-Quick염색 표본은 Fig. 11-14에 나타난 것처럼 hemacolor염색과 Diff-Quick염색에서 모두 *Perkinsus* sp.의 원형의 특징적인 편재된 무염색의 공포를 가진 호염기성 영양체가 다수 관찰되었다. 표면에 나와 있는 바지락과 갯펄에 잠입하고 있는 그룹간의 조직별의 검출률은 Fig. 11-15에 나타내었다. 한편 병리조직표본에서도 Fig. 11-16처럼 태안이나 고창지역에서 채취한 시료와 마찬가지로 아가미, 발, 패각근, 간췌장 및 소화관 등의 결합조직에 영양체가 확인되었다.

갯펄에 잠입하지 못하고 갯펄위에 나와 있는 개체 (n=5)의 감염율은 hemacolor염색에서는 0~100%, Diff-Quick염색에서는 0~80%였다. 각 부위별로 아가미에서의 감염율이 90%로 가장 높았으며, 발에서는 검출되지 않았다. 한편 잠입하고 있는 개체 (n=5)의 감염율은 hemacolor염색에서 40~80%, Diff-Quick염색에서 20~80%였다. 각 부위별로는 아가미와 소화관이 각각 80%로 가장 높게 검출되었으며 패각근이 30%로 낮게 검출되었다. 이것을 조직별로 비교하면 아가미에서의 검출율이 항상 높았고, 채취 그룹별로 비교하면 갯펄에 나와 있는 개체는 100%, 잠입하고 있는 개체는 80%로 갯펄 위에 나와 있는 개체에서의 감염율이 높게 나타났다. 이러한 결과는 위의 태안과 고창에서 채취한 바지락에서의 조사결과와 비슷하였다.

한편 PCR을 사용하여 *Perkinsus* sp.의 감염을 조사한 결과는 Fig. 11-17에 나타난 것처럼 미잠입개체에서는 조사한 3개체 모두에서 검출되었으며, 갯펄에 잠입하고 있는 개체는 검사한 4개체 중 3개체에서 감염이 확인되어 대량폐사가 *Perkinsus* sp.의 감염과 관계있음이 시사되었다.

이상의 결과를 종합하면 *Perkinsus* sp.의 감염상황을 조사하는데는 종래의 병리조직학적 검사가 가장 효과적이며, 기관별로는 아가미가 가장 효율적이라 판단된다. 또 태안과 고창지역의 바지락은 모두 *Perkinsus* sp.에 감염되어 있으며, 감염율이 낮은 곳인 태안에서는 동계에는 감염율이 낮아지는 경향이었지만 심한 감염이 확인된 고창지역은 계절적 변화와는 관계없

```

P. atlanticus: 1      cgtcgaatacaccggatcccatccgaactccgaagttaagcggcgcaaggcccggatagt 60
|||||
Sbjct:           17      cgtcgaatacaccggatcccatccgaactccgaagttaagcggcgcaaggcccggatagt 76

P. atlanticus: 61     actggggtgggggaccgccgggaagtccttagggtgctgctggcttcttttaaatcgc 120
|||||
Sbjct:           77     actggggtgggggaccgccgggaagtccttagggtgctgctggcttcttttaaatcgc 136

P. atlanticus: 121    actcatggcttgatgcatgctgcaagccccggagccccctggacaatggtatcccagct 180
|||||
Sbjct:           137    actcatggcttgatgcatgctgcaagccccggagccccctggacaatggtatcccagct 196

P. atlanticus: 181    caacaacgagcaacagtgctatggcaagtagtccactagagagccaagtcgacaatctct 240
|||||
Sbjct:           197    caacaacgagcaacagtgctatggcaagtagtccactagagagccaagtcgacaatctct 256

P. atlanticus: 241    acaacattgtccaaggggaaagggggcgcggaagttgacctgcagcagagggaaaag 300
|||||
Sbjct:           257    acaacattgtccaaggggaaagggggcgcggaagttgacctgcagcagagggaaaag 316

P. atlanticus: 301    atgctgagtttgctgcacccaactttgcgcaacttggcgaagttgacttgaggcgagg 360
|||||
Sbjct:           317    atgctgagtttgctgcacccaactttgcgcaacttggcgaagttgacttgaggcgagg 376

P. atlanticus: 361    gtaaaagatgctatggttggtgcggaacca 390
|||||
Sbjct:           377    gtaaaagatgctatggttggtgcggaacca 406

```

Fig. 11-10. Partial sequence of *Perkinsus atlanticus* 5S ribosomal RNA. The sequence of isolated parasite by this study are same with the sequence of *Perkinsus atlanticus* 5S ribosomal RNA in Genebank (Accession number AF140295).

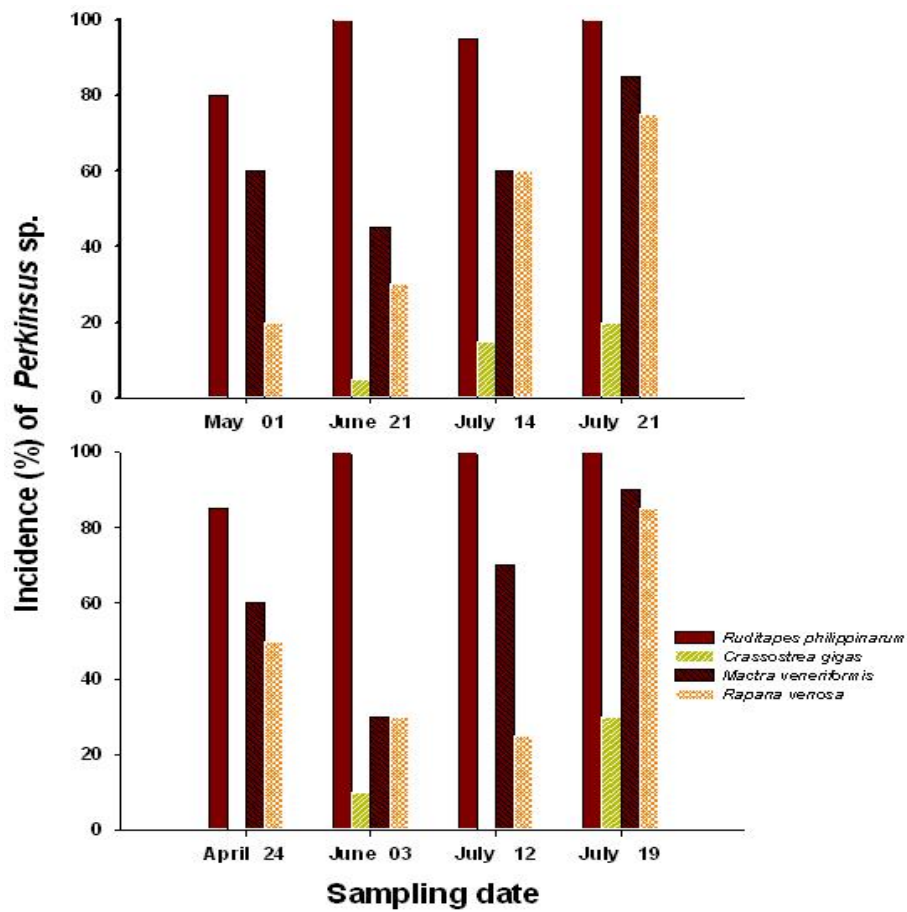


Fig. 11-11. Incidence (%) of *Perkinsus* sp. detected by PCR amplification. The specimens were taken from the coastal area of Taean (upper) and Gochang (lower). Twenty individuals were used each trial.



Fig. 11-12. Infected calms were pushed onto the shore by tides, gapping on the sediment.



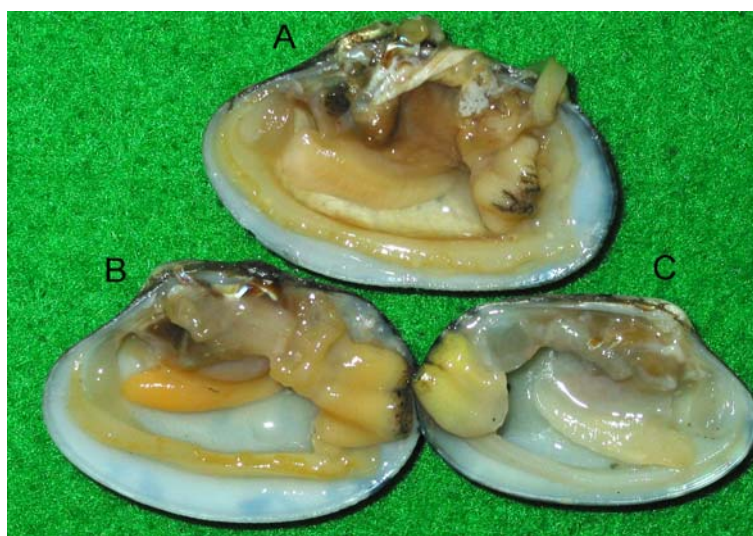


Fig. 11-13. Healthy (A) and diseased (B & C) Manila calms (*Ruditapes philippinarum*). Clams were taken from farms at Kunsan (A) and Inchon (B & C). B, burrowing one in the sediment ; C, surfacing one on the sediment.

Table 11-2. Condition index (CI) of clams from Inchon and Gunsan

No.	Inchon						Gunsan clam		
	Surfacing clam			Burrowing clam			Shell length (mm)	Flesh weight (g)	CI
	Shell length (mm)	Flesh weight (g)	CI	Shell length (mm)	Flesh weight (g)	CI			
1	34.13	1.62	0.041	31.02	1.20	0.040	36.88	3.53	0.070
2	30.37	1.16	0.041	28.67	1.08	0.046	38.33	3.14	0.056
3	36.10	1.99	0.042	36.43	2.09	0.043	37.21	3.01	0.059
4	34.78	1.33	0.032	30.19	1.15	0.042	31.91	2.25	0.069
5	33.44	1.51	0.041	28.07	0.91	0.041	33.86	2.38	0.061
6	31.65	1.21	0.038	32.02	1.56	0.048	32.34	2.22	0.066
7	35.31	0.90	0.020	34.60	1.75	0.042	33.76	2.21	0.058
8	30.05	1.54	0.057	28.67	0.98	0.042	34.14	2.47	0.062
9	32.43	1.22	0.036	31.90	1.37	0.042	35.01	2.58	0.060
10	30.64	0.97	0.034	32.71	1.33	0.038	34.70	2.99	0.072
11	36.80	1.95	0.040	28.80	1.08	0.045	33.97	2.52	0.064
12	30.11	1.04	0.038	27.30	0.98	0.048	32.03	1.87	0.057
13	30.67	0.93	0.032	34.40	1.77	0.043	34.94	2.75	0.065
14	32.22	1.27	0.038	30.41	1.20	0.043	35.91	2.51	0.054
15	32.33	1.39	0.041	30.77	1.19	0.041	31.68	1.85	0.058

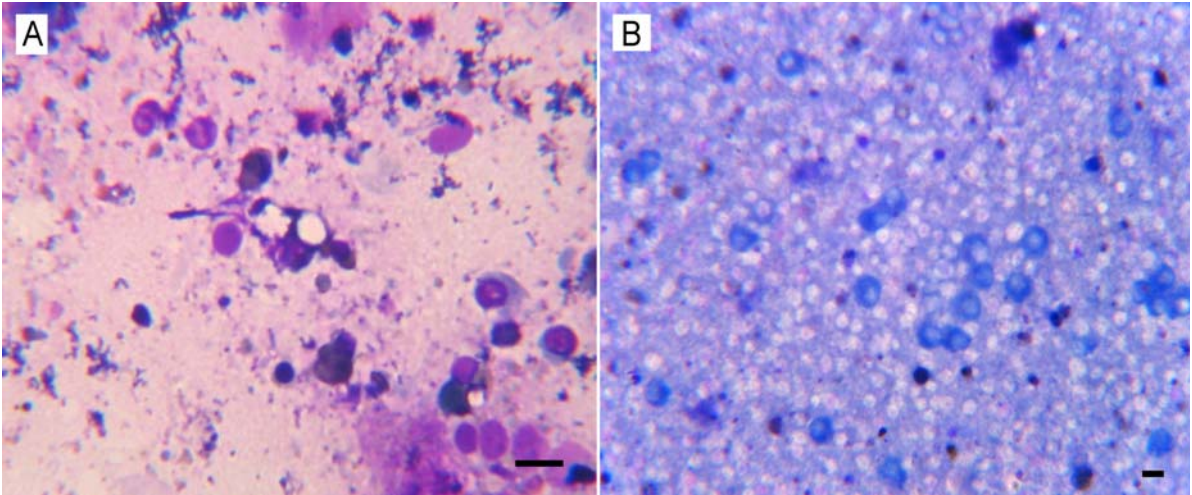


Fig. 11-14. Microphotographs of the mantle of surfacing clam stained with hemacolor (A) and the intestine of burrowing clam stained with Diff-Quick (B). Bars indicate 10  $\mu$ m.

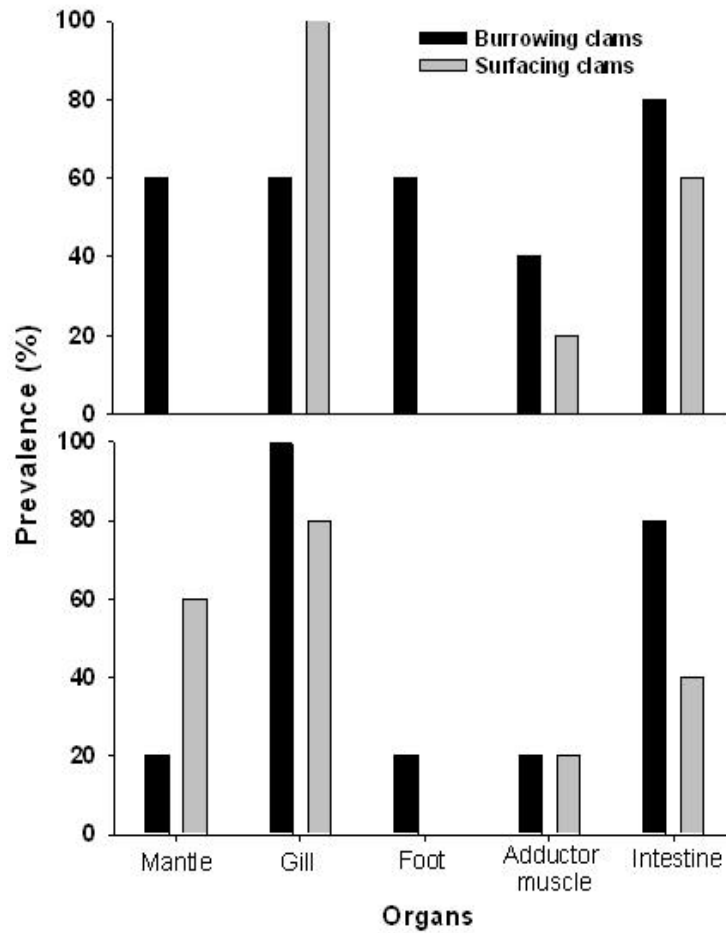


Fig. 11-15. Prevalence of *Perkinsus* sp. in different clam organs stained with hemacolor (upper) and Diff-Quick (lower).



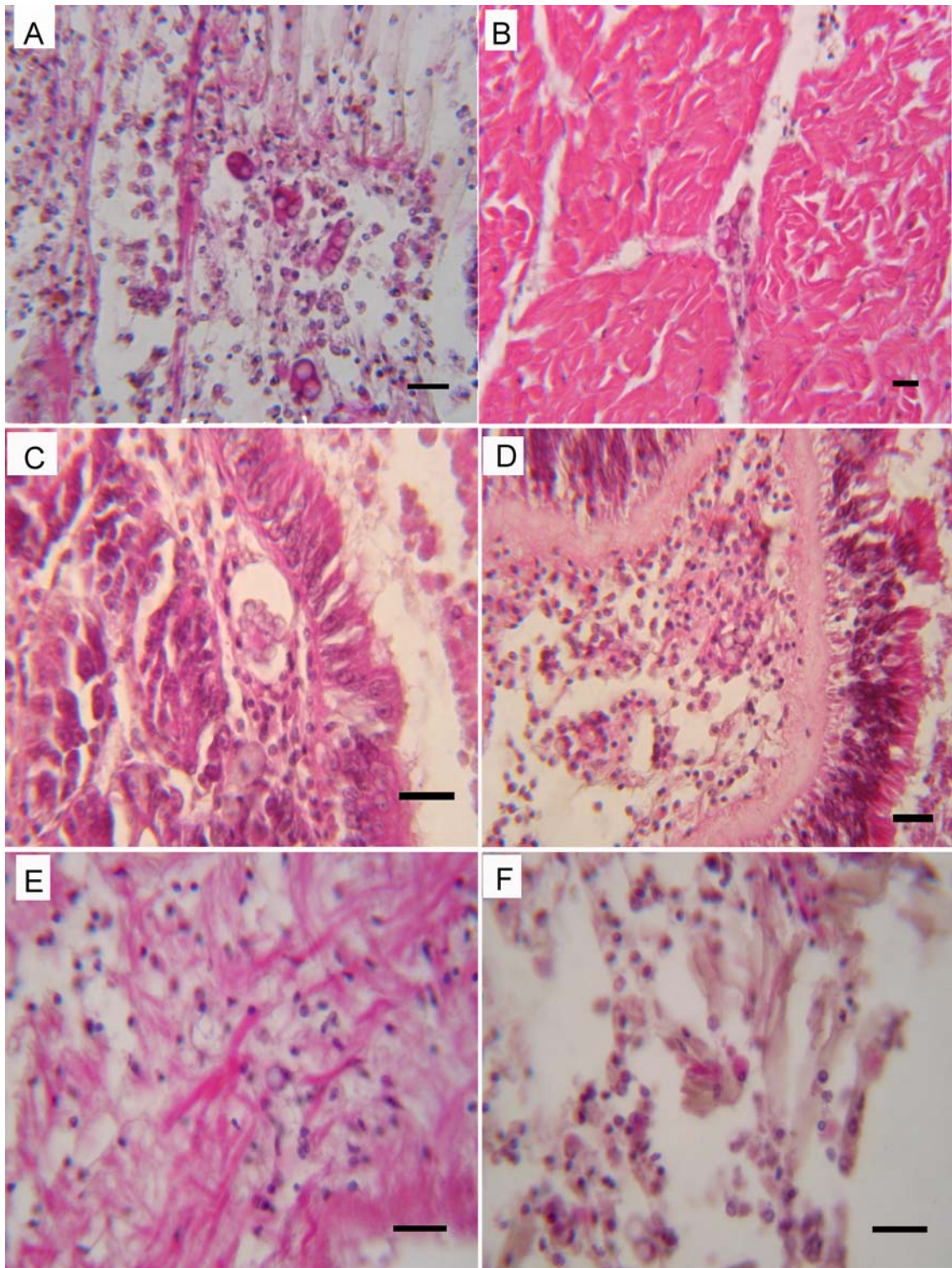


Fig. 11-16. Microphotographs of *Perkinsus* sp. in various tissues of clams taken from a culturing bed in the coastal area of Inchon where mass mortality was occurred during March, 2004. Davidson fixative, HE stain. Bars indicate 20  $\mu$ m. A, gill ; B, adductor muscle ; C, hepatopancreas ; D, intestine ; E, foot ; F, gill.

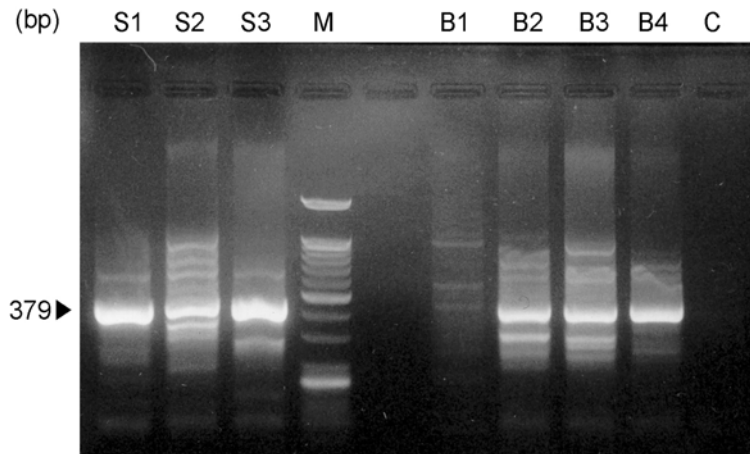


Fig. 11-17. Detection of *Perkinsus* sp. in Manila clams by PCR amplification. The clams were taken from a culturing bed in the costal area of Incheon where mass mortality was occurring during during March, 2004. S1-S3 ; surfacing calms ; M, size marker ; C, control ; B1-B4, burrowing clams.

이 언제나 감염율이 높았다. 또한 PCR법에 의한 조사의 결과는 채래식의 검출방식에 비해 검출율이 높았으며, 다른 패류에서도 감염을 확인할 수 있는 유용한 방법으로 판단되었다.

한편 대량폐사지역에서 채집한 바지락의 결과도 계절별 조사와 마찬가지로 높은 비율의 감염율을 보였는데 이는 *Perkinsus* sp.가 바지락 폐사의 직접적인 원인 인지는 단정하기 어렵지만 감염후의 쇠약에 따른 먹이 섭취의 장애 또는 잡입 능력의 저하 등의 요인과 관계하여 폐사에 영향을 끼치는 것은 확실할 것으로 판단된다.

#### 4. 참고문헌

- Almeida M, Berthe F, Thebault A, Dinis MT (1999) Whole clam culture as a quantitative diagnostic procedure of *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) in clams *Ruditapes decussatus*. *Aquaculture*, 177, 325-332
- Andrew JD (1996) History of *Perkinsus marinus*, a pathogen of oysters in Chesapeake Bay 1950-1984. *J. Shellfish Res.*, 15, 13-16
- Azevedo C (1989) Fine structure of *Perkinsus atlanticus* n sp. (Apicomplexa, Perkinsea) parasite of the clam *Ruditapes decussatus* from Portugal. *J. Parasitol.*, 75, 627-635
- Burreson EM, Ragone Calvo LM (1996) Epizootiology of *Perkinsus marinus* disease of oyster in Chesapeake Bay, with emphasis on data since 1985. *J. Shellfish Res.*, 15, 17-34
- Chagot D, Comps M, Boulo V, Ruano F, Grizel H (1987) Histological study of a cellular reaction in *Ruditapes decussatus* infected by a protozoan. *Aquaculture*. 67, 260-261

- Cigarria J, Rodriguez C, Fernandes JM (1997) Impact of *Perkinsus* sp. in Manila clams, *Ruditapes phillipinarum* beds. Dis. Aquat. Org., 29, 117-120
- Choi DL, Kwon JN, Park SW (1998) Infection and rapid detection of *Perkinsus* sp. in cultured baby neck clam, *Ruditapes phillipinarum* from western coast of Korea. Kor. J. Fish Pathol., 11, 69-76
- Choi KS, Park KI (1997) Report of the occurrence of *Perkinsus* sp. in the Manila clam, *Ruditapes phillipinarum* in Korea. J. Aquacult., 9, 227-237
- Choi KS, Wilson EA, Lewis DH, Powell EN, Ray SM (1989) The energetic cost of *Perkinsus marinus* parasitism in oysters : quantification of the thioglycolate method. J. Shellfish Res. 8, 125-131
- Gauthier JD, Fisher WS (1990) Hemolymph assay for diagnosis of *Perkinsus marinus* in oysters *Crassostrea virginica*. J. Shellfish Res., 9, 367-371
- Figueras A, Robledo JAF, Novoa B (1992) Occurrence of haplosporidian and *Perkinsus*-like infection in carpet-shell clams, *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758) of the Rio de Vigo (Galicia, NW, Spain). J. Shellfish Res., 11, 377-382
- Figueras A, Robledo JAF, Novoa B (1996) Brown ring disease and parasites in clams (*Ruditapes decussatus* and *R. phillipinarum*) from Spain and Portugal. J. Shellfish Res., 15, 363-368
- Fisher WS, Oliver LM (1996) A whole-oyster procedure for diagnosis of *Perkinsus marinus* disease using Ray's fluid thioglycollate culture medium. J. Shellfish Res., 15, 109-117
- Hamaguchi M, Suzuki N, Usuki H, Ishioka K (1998) *Perkinsus* protozoan infection in short-neck clam *Tapes* (*Ruditapes phillipinarum*) in Japan. Fish Pathol., 33, 473-48.
- Marsh, A G, Gauthier, JD, Vasta GR (1995) A semiquantitative PCR assay for assessing *Perkinsus marinus* infections in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. J. Parasitol., 81, 577-583
- McLaughlin SM, Faisal M (1999) A comparison of diagnostic assays for detection of *Perkinsus* spp. in the softshell clam *Mya arenaria*. Aquaculture, 197-204.
- Navas JI, Castillo MC, Vera P, Ruiz-Rico M (1992) : Principal parasites observed in clams, *Ruditapes decussatus* (L.), *Ruditapes phillipinarum* (Adams et Reeve), *Venerupis pullasta* (Montagu) and *Venerupis aureus* (Gmelin), from the Huelva coast (S. W. Spain). Aquaculture, 107, 193-199.
- Park KI, Choi KS, Choi JW (1999) Epizootiology of *Perkinsus* sp. found in the Manila clam, *Ruditapes phillipinarum* in Komsae bay, Korea. J. Kor. Soc, 32,3, 303-309.
- Perkins FO (1996) The structure of *Perkinsus marinus* (Mackin, Owen & Collier, 1950) Levine, 1978 with comments on taxonomy and phylogeny of *Perkinsus* sp. J.

- Shellfish Res., 15, 67-87
- Ray SM (1966) A review of the culture method for detecting *Dermocystium marinum* with suggested modifications and precautions. Proc. Natl. Shellfish Assoc., 54, 55-69
- Rodriguea F, Navas JI (1995) A comparison of gill and hemolymph assays for the thioglycolate diagnosis of *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) in clams, *Ruditapes decussatus* (L.) and *Ruditapes philliphinarum* (Adams et Reeve). Aquaculture, 132, 145-152
- Sagrita E, Durfort M, Azevedo C (1995) *Perkinsus* sp. (Phylum Apicomplexa) in Mediterranean clam *Ruditapes semidescussatus*. Ultrastructural observations of the cellular response of the host. Aquaculture. 132, 153-160
- Sagrita E, Durfort M, Azevedo C (1996) Ultrastructural data on the life cycle of the parasite, *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa), on the clams, *Ruditapes philliphinarum*, in the Mediterranean. Sci. Mar., 60, 283-288
- Soniat TM (1996) Epizootiology of *Perkinsus marinus* disease of eastern oysters in Gulf of Mexico. J. Shellfish Res. 15, 35-43

## 제 12 절 해수, 저질 및 바지락 조직의 생균수 및 비브리오균수의 변화

### 1. 서론

양식 바지락의 vibrio병은 1987년대 프랑스의 서북연안에서 양식중인 바지락 *Ruditapes philliphinarum*에 처음 발병하여 스페인과 포르투갈을 중심으로 외투막과 접하는 패각내부에 갈색의 병소가 형성되는 소위 “brown ring disease”라 불리는 질병이 발병하여 많은 피해를 초래하고 있다. (Pailliard et al. 1994, Paillard & Maes 1995a, 1995b). 이러한 특징적인 증상을 나타내는 바지락에서 분리된 원인균은 *Vibrio*속으로 분류되지만 기존의 종과는 차이가 나기 때문에 *Vibrio* P1 또는 *Vibrio splendidus*으로 명명되었지만, Castro et al. (1996)에 의해 *Vibrio tapetis* (Borrego et al. 1996)라는 이름으로 확정되어졌다.

*V. tapetis*가 감염되는 것으로 확인된 패류는 바지락류에 속하는 *R. philliphinarum*, *R. decussatus*, *Tapes rhomboides*와 *Venerupis aurea*에 한정되어 있으며, 감염 부위 또한 패각 뿐만 아니라 바지락의 내부에도 침입하여 폐사를 일으키는 것으로 밝혀졌다 (Allam et al. 2002). 그러나 실험적 감염에 의해서는 바지락류 이외의 다른 패류인 *Crassostrea giagas*, *Pecten maxiums* 등에서도 바지락과 같은 특이한 brown ring이 형성되지 않지만 감염은 성립하는 것으로 보고되고 있다(Paillard et al. 1996).

본 장에서는 서해안에서 양식되는 바지락에서의 *V. tapetis*의 감염 상황을 확인하기 위한 일환으로 양식장과 바지락의 조직내의 생균수와 비브리오균의 조성을 조사하여 우점종으로 나타난 균바지락에 대한 병원성을 조사하였다.

### 2. 재료 및 방법

#### 2-1. 생균수 및 *Vibrio*균수

양식장의 해수는 멸균 채수병에 해수 100 ml를 채수하여 0.45  $\mu$ m로 여과한 여과멸균 해수로 10단계 희석하였다. 펄(습중량 5 g)은 10배량의 여과멸균 해수를 가하여 혼합한 다음 200 g에 5분간 원심분리한 다음 침전을 버리고 상청액을 여과멸균해수 10단계 희석하여 사용하였다.

바지락은 20~30마리씩을 냉장하여 실험실로 운반한 다음 표면을 세척한 후 각장 또는 각쪽을 측정하고 패각에서 육질부를 분리하여 무게를 정량하였다. 아가미, 소화관, 외투막을 잘게 mince한 다음 0.1% peptone saline water를 첨가하여 homogenize한 다음 200 g, 5분간 4  $^{\circ}$ C에 원심분리하였다. Pelleted tissue는 버리고 supernatant는 여과멸균 해수로 희석하여 10<sup>6</sup>까지 단계 희석하였다. 각 희석액의 0.1 ml를 Zobell 2216 (Marine agar) 와 TCBS에 접종하여 20 $^{\circ}$ C에서 24시간~48시간 배양하여 총균수와 *Vibrio*균의 생균수를 구하였다. 생균수를 계

수한 다음 평판을 임의로 구획한 후 30 colony를 선택하여 순수 분리한 다음 간이동정표를 토대로 하여 작성한 Fig. 12-1의 동정도표에 따라 genus수준까지 동정하여 각 종별의 %조성을 구한다.

TCBS에 자란균은 그람 음성, 운동성, 옥시다제 양성, 포도당의 발효적 이용 및 0/129 disc (Oxoid, 150 ug)한 감수성을 확인한 다음, Alsina & Blanch (1994a, b)의 동정기준에 따라 species단위까지 동정하였다. 세균학적 정상검사의 일부는 MacDonnell et al. (1982)에 의해 개정된 제조회사의 사용지침에 따라 API 20E (BioMeriux)를 사용하였다.

*V. tapetis*의 분리는 Noel et al. (1996)의 방법에 따라 Marine agar에 1% mannitol (W/V), 1% bromthymol blue를 첨가하여 평판을 만든 다음 균을 접종하여 20°C에 일주일간 배양한 후 mannitol의 비분해 때문에 형성되는 푸른색의 띠를 가진 녹색 집락을 선택하여 TCBS와 marine agar에 접종한 다음 각각 20°C와 30°C에서 24시간 배양한 다음 TCBS에서 녹색의 집락이 형성되지만 고온에 약하여 marine agar평판에서 자라지 않는 것을 선택하였다.

## 2-2. 병원성

해수에서의 출현빈도가 높은 *V. parahemolyticus*와 바지락에서의 출현빈도가 높은 *Vibrio splendidus* II 및 바지락의 비브리오병의 원인균인 *V. tapetis* (NCIMB 13622)를 Zobell borth (Gibco)에 접종하여 20°C에 72시간 전 배양하였다. 바지락에 인위감염은 Allam et al. (1996)의 방법에 따라 배양균을 멸균해수에  $1 \times 10^5$  cells/ml,  $1 \times 10^8$  cells/ml로 현탁시킨 균액을 제조하였다. 균액의 접종은 바지락을 미리 실온의 공기 중에 12시간 노출시켜 패각을 열게한 다음 멸균주사기를 사용하여 패류당 균액 0.1 ml 주입하였다. 균액을 주입한 패류는 균액이 조직에 흡수되도록 다시 실온에서 6시간 방치한 다음 수조로 옮겨 10일 동안 사육하면서 누적 사망률을 구하였다. 대조군은 균액 대신에 멸균해수를 동량 주입하였다. 균접종 후의 사육온도는 *V. parahemolyticus*와 *V. splendidus* II는 27°C와 20°C에서 *V. tapetis*는 20°C에서만 실시하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3-1. 생균수의 변화

해수, 저질 및 바지락의 아가미, 외투막 및 소화관내의 생균수는 Fig. 12-2에 나타내었다. 태안 고창 두 지역 모두 연중 저질의 생균수가 해수나 바지락의 조직에 비해 항상 높게 검출되었다. 저질의 생균수는 수온이 높은 하계에는 감소하고 동계에는 증가하는 경향이였다. 한편 해수의 생균수도 저질과 유사한 경향으로 수온에 따라 초봄에서 여름철에는 감소하고 동계에는 약간 증가하는 경향이였다. 바지락 조직의 생균수는 아가미와 외투막의 경우는 서식 환경인 해수와 저질의 생균수의 변동과 거의 유사한 경향이였는 반면 소화관의 생균수는 환



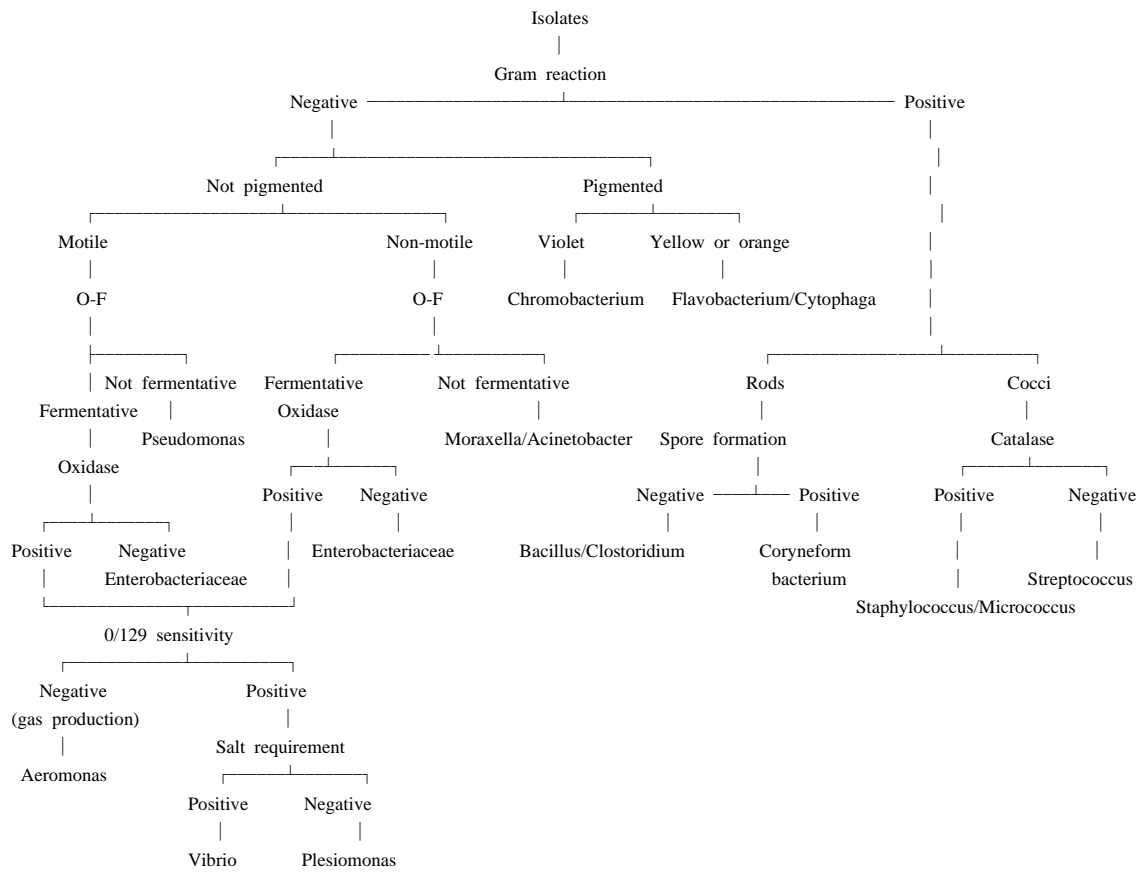


Fig. 12-1. Identification scheme of bacterial genus from calms, water and sediment.

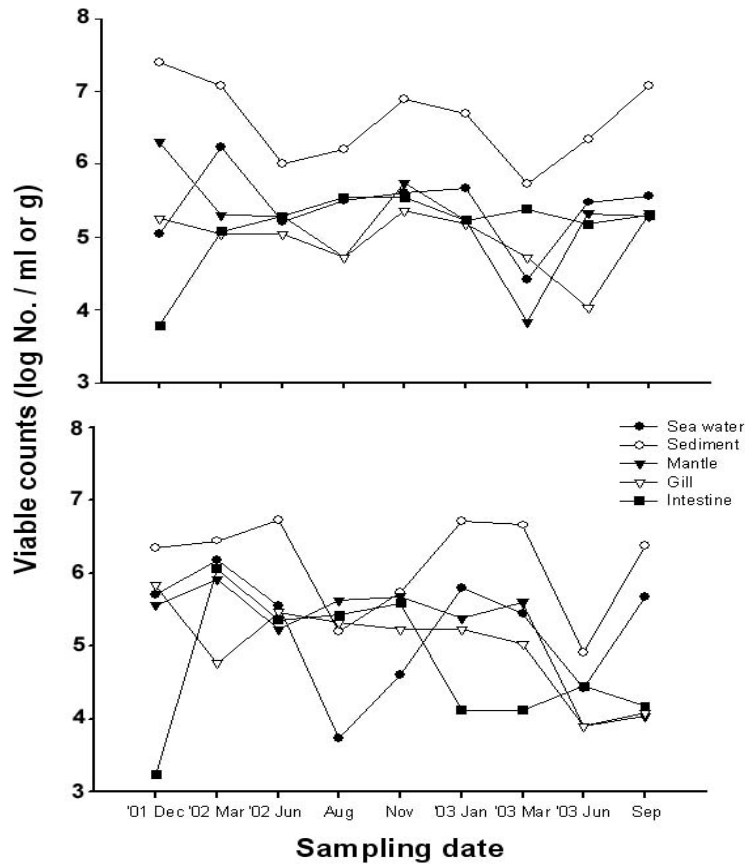


Fig. 12-2. Changes in the average bacterial counts (log No./ml or g) in seawater, sediment and clam from Tean (upper) and Gochang (lower).

경과는 관계가 없이  $10^4$ - $10^5$ 의 범위에서 연중 좁은 변동 폭을 나타내고 있다. 또 지역을 비교하여 보면 성장이 양호한 태안지역의 바지락은 소화관내의 균수의 변동 폭의 적은 반면에 고창지역은 2003년 1월부터 태안지역의 바지락에 비해 평균수가 1/10로 감소하는 특이한 경향을 보였는데 이러한 감소는 동년 여름철의 바지락 대량폐사와 관계가 있을 것이라 생각된다.

해수에서의 평균수의 조성은 Fig. 12-3에 표시한 것처럼 *Vibrio*, *Aeromonas*, *Flavobacterium/Cytaophaga* 및 *Staphylococcus/Micrococcus*가 우점종이었으며 특히 *Vibrio*와 *Aeromonas*는 계절에 관계없이 항상 분리되어졌다.

Simidu et al. (1982)는 Bengal bay와 남지나해(표층 수온 25-28°C) 해역의 해수중의 중속영양세균의 조사한 결과 해수중의 우점종은 *Vibrio*이며, *Pseudomonas*, *Moraxella/Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*의 빈출빈도가 높았다고 보고하였다. 이 중 *Pseudomonas*는 수심이 800m깊은 곳에서 많이 검출되며, gram양성균은 수심이 깊을수록 검출 빈도가 높았다고 하였다. Simidu et al. (1971)은 일본 연안에서 *Vibrio*와 *Aeromonas*가 항상 높은 비율로 검출되어지는데 이들 세균은 해산동식물의 존재와 밀접한 관계가 있어, 연안에서 어

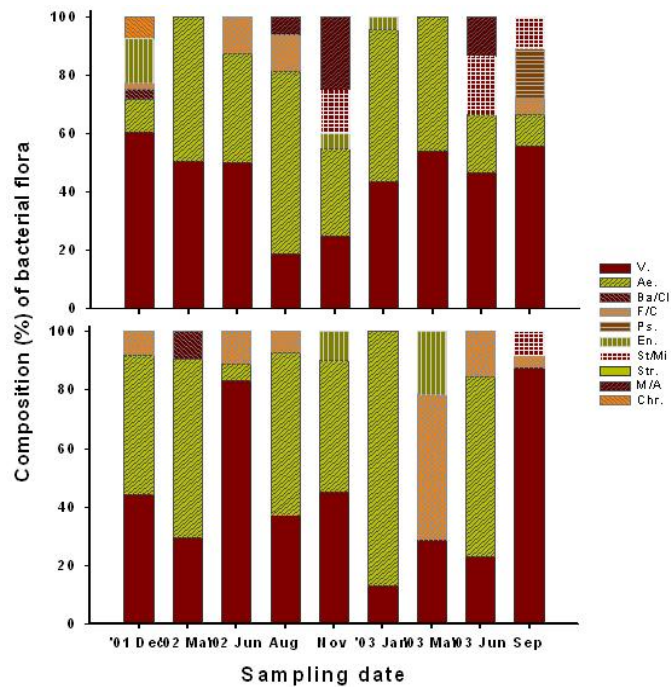


Fig. 12-3. Composition (%) of bacterial species isolated from seawater from Taean (upper) and Gochang (lower). V. *Vibrio*; Ae, *Aeromonas*; Ba/Cl, *Bacillus/Clostridium*; F/C. *Flavobacterium/Cytophaga*; Ps, *Pseudomonas*; En, Enterobacteriaceae; St/Mi, *Staphylococcus/Micrococcus*; Str, *Streptococcus*; M/A, *Moraxella/Acinetobacter*; Chr, *Chromobacterium*.

획되는 어류의 소화관의 세균상에서도 압도적으로 *Vibrio*와 *Aeromonas*가 우점종 (Aiso et al. 1968, Simidu et al. 1969)으로 나타나는 이유와 깊은 관련이 있으며, 연안 해수역에 분포하는 수산동식물의 체표에 부착하고 있는 세균의 70%전후가 *Vibrio-Aeromonas*라는 결과를 보고하였다. 본 연구에서 *Vibrio-Aeromonas*가 우점종으로 계절에 관계없이 분리되어져 해수에서의 세균상과 일치하는 결과를 나타내었는데 이는 바지락의 양식과 밀접한 관계가 있을 것이라 생각된다.

저질에서의 생균수의 조성은 Fig. 12-4에 나타낸 것처럼 해수와 마찬가지로 *Vibrio-Aeromonas*가 최우점종이며, *Flavobacterium/Cytaophaga* 및 *Staphylococcus/Micrococcus*가 우점종이 었다. 그러나 태안지역에서는 *Vibrio*균의 숫자가 고창지역에 비해 항상 높은 비율로 나타난 반면, 고창지역은 *Vibrio*균의 변화가 심하고 태안지역에 비해 *Aeromonas*균이 높게 나타나는 경향이 었다.

바지락 각 조직에서의 생균의 조성은 Table 12-3과 Table 12-4에 나타낸 것처럼 해수나 저질의 우점종과 마찬가지로 *Vibrio-Aeromonas*가 최우점종이며, *Flavobacterium/Cytaophaga* 및 *Staphylococcus/Micrococcus*가 우점종이 었으며 고창지역은 태안지역에 비해 *Staphylococcus/Micrococcus*의 검출이 많은 경향이 었다.

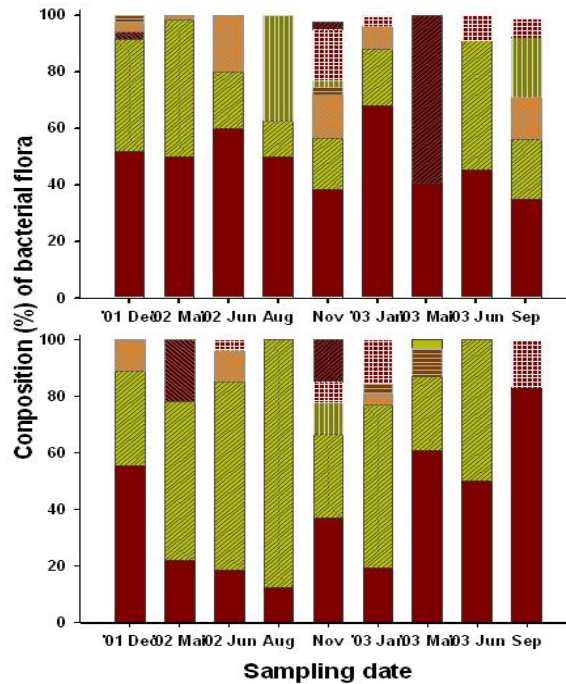


Fig. 12-4. Composition (%) of bacterial species isolated from seawater from Taeon (upper) and Gochang (lower). Legend are the same in Fig. 12-3.

### 3-2. *Vibrio*균수의 변화

해수, 저질 및 바지락의 아가미, 외투막 및 소화관내의 *Vibrio*균수는 Fig. 12-5에 나타내었다. 해수보다는 저질에서 균수가 많은 경향이었으며, 이러한 현상은 고창지역이 더욱 뚜렷하였다. 해수와 저질의 균수는 초봄-초여름에 감소하는 경향이였다. 한편 바지락에서의 균수는 소화관에서는 변동의 폭이 적은 반면 아가미와 외투막에서는 봄-초여름에 걸쳐 급격한 감소가 확인되었지만 그 원인은 명확하지 않다.

해수에서의 *Vibrio*균의 조성은 Fig. 12-6에 나타낸 것처럼 우점종으로는 *V. fluvialis*, *V. harveyi*, *V. splendidus* II, *V. damsela*, *V. mediterranei* 등이 높은 비율로 검출되었다. 태안 지역은 *V. fluvialis*와 *V. damsela*가 연중 우점종이었으며, *V. splendidus* II와 *V. mediterranei*는 하계에는 증가하고 동계에는 감소하는 경향이였다. 고창지역은 *V. fluvialis*와 *V. splendidus* II가 연중 우점종이었으며, 뚜렷한 계절적 변동경향은 확인할 수 없었다.

양식장 저질의 *Vibrio*균의 조성은 Fig. 12-7에 나타낸 것처럼 해수와 마찬가지로 *V. fluvialis*,가 연중 우점종이었다. 태안지역은 *V. alginolyticu*와 *V. splendidus* II의 검출비율이 매우 낮은 반면 고창지역은 높은 경향을 나타내었다.

바지락의 외투막, 아가미 및 소화관에서 분리한 *Vibrio*균의 조성은 Table 12-5와 Table 12-6에 나타내었다. 해수와 저질과 마찬가지로 *V. fluvialis*가 연중 우점종이었다. 고수온기에는 *V. mimicus*와 *V. splendidus* II가 증가하는 경향이었는데 이 2종 이외에 *V. harveyi*의 비율이 높아지는 경향이였다

Table 12-3. Composition (%) of bacterial species in different organs of clams from Taean

Sampling date	Clam organs	Composition (%) of bacteria species										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Others
'01 Dec	Mantle	60.3	26.7	0	0	0	0	13.0	0	0	0	0
	Gill	77.8	0	0	0	0	22.2	0	0	0	0	0
	Intestine	60.9	30.4	0	0	0	8.7	0	0	0	0	0
'02 Mar	Mantle	86.7	13.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Gill	50.0	50.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Intestine	64.8	29.5	0	5.7	0	0	0	0	0	0	0
Jun	Mantle	38.5	53.8	0	0	0	0	0	7.7	0	0	0
	Gill	63.6	22.7	0	13.7	0	0	0	12.5	0	0	0
	Intestine	47.1	47.0	0	0	0	0	0	0	0	0	5.9
Aug	Mantle	50.0	25.0	0	0	25.0	0	0	0	0	0	0
	Gill	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Intestine	15.4	0	0	0	0	80.8	0	0	0	3.8	0
Nov	Mantle	24.4	26.8	0	19.5	0	7.3	12.2	0	9.8	0	0
	Gill	23.5	47.0	0	5.9	0	7.3	11.8	0	0	0	4.5
	Intestine	57.7	23.0	0	15.4	0	3.9	0	0	0	0	0
'03 Jan	Mantle	38.5	38.5	0	15.3	0	0	0	0	7.7	0	0
	Gill	27.3	45.4	0	27.3	0	0	0	0	0	0	0
	Intestine	15.4	30.8	0	53.8	0	0	0	0	0	0	0
Mar	Mantle	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Gill	25.0	0	0	75.0	0	0	0	0	0	0	0
	Intestine	44.5	5.5	0	16.7	0	0	0	5.5	27.8	0	0
Jun	Mantle	0	0	0	0	0	18.7	0	0	81.3	0	0
	Gill	37.5	62.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Intestine	63.6	0	0	0	0	27.3	0	0	9.1	0	0
Sep	Mantle	42.9	7.1	0	35.7	0	14.3	0	0	0	0	0
	Gill	31.3	18.7	0	12.5	0	0	18.7	18.8	0	0	0
	Intestine	62.5	0	0	18.8	6.2	12.5	0	0	0	0	0

1, *Vibrio* ; 2, *Aeromonas* ; 3, *Bacillus/Clostridium* ; 4, *Flavobacterium/Cytophaga* ; 5, *Pseudomonas* ; 6, *Enterobacteriaceae* ; 7, *Staphylococcus/Micrococcus* ; 8, *Streptococcus* ; 9, *Moraxella/Acinetobacter* ; 10, *Chromobacterium*.

Table 12-4. Composition (%) of bacterial species in different organs of clams from Gochang

Sampling date	Clam organs	Composition (%) of bacteria species										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Others
'01 Dec	Mantle	63.0	2.8	0	0	16.7	11.2	6.3	0	0	0	0
	Gill	80.0	0	0	0	0	0	20.0	0	0	0	0
	Intestine	92.3	0	0	0	0	0	7.7	0	0	0	0
'02 Mar	Mantle	64.5	35.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Gill	59.1	40.9	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Intestine	62.8	37.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Jun	Mantle	38.5	53.8	0	0	0	0	7.7	0	0	0	0
	Gill	22.7	63.6	0	13.7	0	0	0	0	0	0	0
	Intestine	47.0	47.1	0	0	0	0	5.9	0	0	0	0
Aug	Mantle	84.4	12.5	0	3.1	0	0	0	0	0	0	0
	Gill	50.0	43.7	0	6.3	0	0	0	0	0	0	0
	Intestine	75.0	10.0	0	10.0	0	0	5.0	0	0	0	0
Nov	Mantle	41.7	19.4	38.9	0	0	0	0	0	0	0	0
	Gill	46.1	15.4	0	38.5	0	0	0	0	0	0	0
	Intestine	93.1	6.9	0	0	0	0	0	0	0	0	0
'03 Jan	Mantle	66.7	0	0	11.1	0	5.5	16.7	0	0	0	0
	Gill	46.2	38.5	0	15.3	0	0	0	0	0	0	0
	Intestine	90.0	0	0	0	0	0	10.0	0	0	0	0
Mar	Mantle	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Gill	75.0	0	0	25.0	0	0	0	0	0	0	0
	Intestine	50.0	0	0	20.0	0	20.0	10.0	0	0	0	0
Jun	Mantle	16.7	16.6	0	0	0	0	66.7	0	0	0	0
	Gill	16.7	66.6	0	0	0	0	16.7	0	0	0	0
	Intestine	55.5	15.9	0	4.8	0	0	0	0	0	0	23.8
Sep	Mantle	50.0	37.5	0	12.5	0	0	0	0	0	0	0
	Gill	11.0	33.4	0	0	0	0	55.6	0	0	0	0
	Intestine	72.7	0	0	18.2	0	0	0	9.1	0	0	0

1, *Vibrio* ; 2, *Aeromonas* ; 3, *Bacillus/Clostridium* ; 4, *Flavobacterium/Cytophaga* ; 5, *Pseudomonas* ; 6, *Enterobacteriaceae* ; 7, *Staphylococcus/Micrococcus* ; 8, *Streptococcus* ; 9, *Moraxella/Acinetobacter* ; 10, *Chromobacterium*.

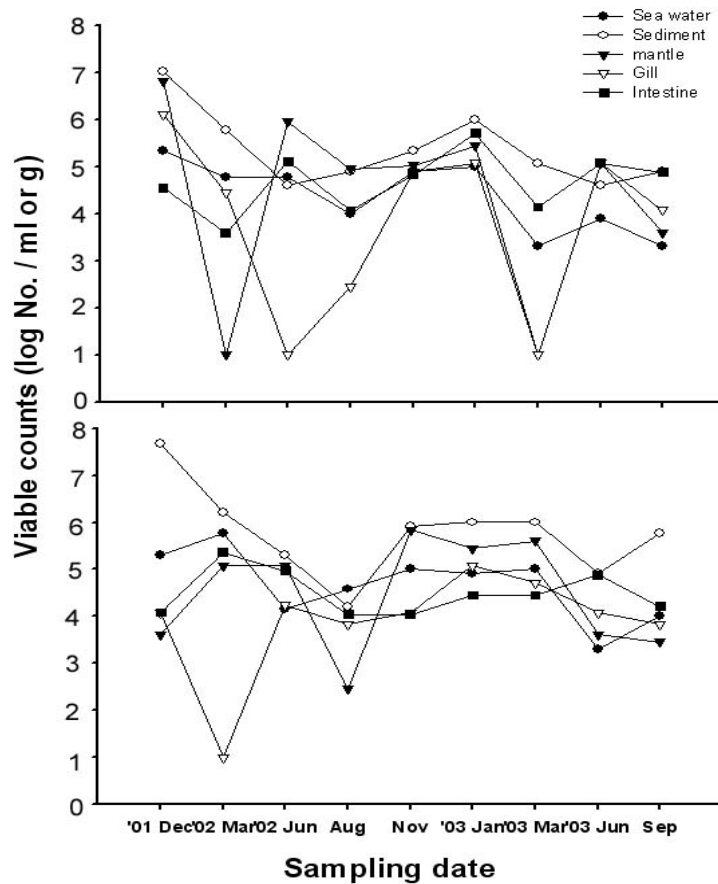


Fig. 12-5. Changes in the number of *Vibrio* species (log No./ml or g) in seawater, sediment and clam tissues from Tean (upper) and Gochang (lower).

*V. tapetis*의 분리는 Noel et al. (1996)의 방법에 따라 marine agar에 1% mannitol (W/V), 1% bromthymol blue를 첨가하여 평판을 만든 다음 균을 접종하여 20°C에 일주일간 배양한 후 mannitol의 비분해 때문에 형성되는 푸른색의 띠를 가진 녹색 집락의 분리를 시도하였으나 그러한 형태를 가진 균은 분리되지 않아 해수, 저질 또는 바지락 조직으로부터 배양학적인 방법으로 분리하지 못하였다. 이러한 결과의 원인으로서 Castro et al. (1997)도 스페인 남부에서 Brown ring disease의 증상을 나타내고 있는 바지락에서 배양학적인 방법으로 *V. tapetis*를 분리하지 못하였다. 그 이유로서 바지락에 간접형광항체법으로 탐지가능한 균수는 외투액 ml당  $10^3$  cells정도이지만, 이 농도의 균수는 배양학적인 방법으로는 분리 불가능하다고 하였다. 그럼으로 우리나라의 바지락에도 이 균의 존재여부를 확인하기에는 재래적인 방법으로는 불가능하므로 배양전의 증균배양 등의 분리과정의 변형이 필요할 것으로 판단된다.

바지락에서 가장 우점종으로 분리되는 *Vibrio*균중에서 출현비율이 가장 높은 *V. splendidus* II의 대표 균주인 JH-01균주를 비슷한 성상을 나타내는 *V. splendidus* II, *V. tapetis*와의 성상의 차이를 Table 7에 나타내었다.

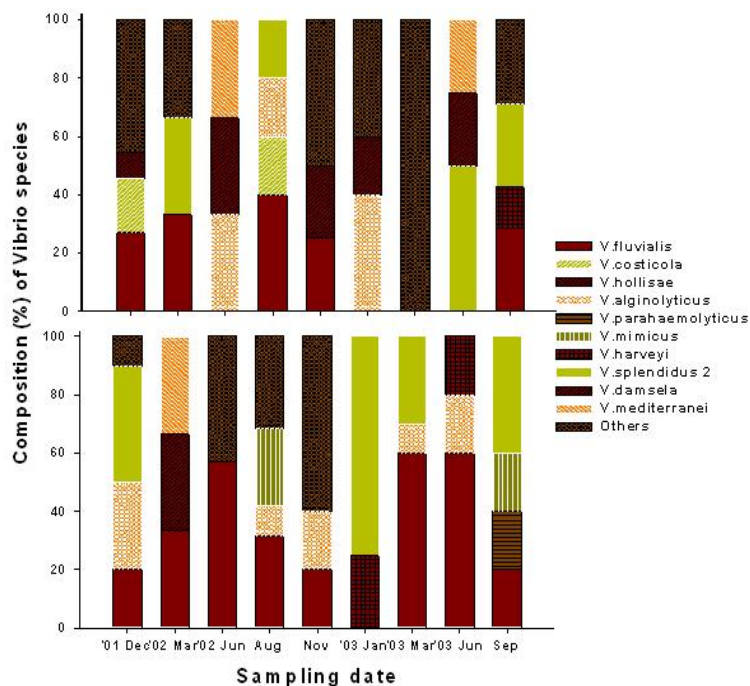


Fig. 12-6. Composition (%) of *Vibrio* species isolated from seawater from Taean (upper) and Gochang (lower).

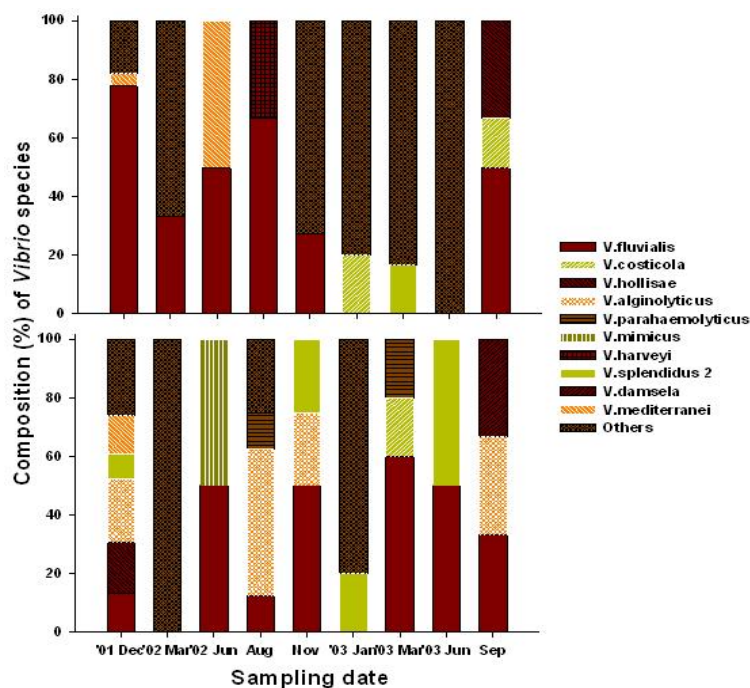


Fig. 12-7. Composition (%) of *Vibrio* species isolated from the sediment of culturing bed for manilla clam in Taean (upper) and Gochang (lower).



Table 12-5. Composition (%) of *Vibrio* species in different organs of clams from Taean

Sampling date	Clam organs	Composition (%) of <i>Vibrio</i> species										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Others
'01 Dec	Mantle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	80	20
	Gill	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
	Intestine	27.8	0	27.8	0	0	0	0	0	0	0	44.4
'02 Mar	Mantle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Gill	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
	Intestine	46.2	0	0	0	0	0	0	0	0	19.2	34.6
Jun	Mantle	0	0	0	0	28.5	42.9	0	0	0	0	28.5
	Gill	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Intestine	20	0	50	0	0	0	0	0	0	0	30
Aug	Mantle	0	0	0	43	0	0	0	14	0	0	0
	Gill	0	0	0	0	0	50	0	0	0	0	50
	Intestine	64	0	0	0	0	18	0	0	0	0	18
Nov	Mantle	50	0	0	0	12.5	0	0	0	0	37.5	0
	Gill	66.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33.4
	Intestine	0	0	0	20	0	0	0	0	0	40	40
'03 Jan	Mantle	0	0	50	0	0	0	0	0	0	50	0
	Gill	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
	Intestine	0	0	0	0	0	0	0	25	0	50	25
Mar	Mantle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Gill	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Intestine	71.4	0	0	0	0	0	0	28.6	0	0	0
Jun	Mantle	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0
	Gill	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0
	Intestine	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0
Sep	Mantle	40	0	0	0	20	0	0	0	0	0	40
	Gill	0	0	0	40	0	0	0	0	0	20	40
	Intestine	66.7	0	0	0	0	33.3	0	0	0	0	0

1 : *V. fluvialis*, 2 : *V. costicola*, 3 : *V. hollisae*, 4 : *V. alginolyticus*, 5 : *V. parahaemolyticus*, 6 : *V. mimicus*, 7 : *V. harveyi*, 8 : *V. splendidus* II, 9 : *V. damsela*, 10 : *V. mediterranei*.

Table 12-6. Composition (%) of *Vibrio* species in different organs of clams from Gochang

Sampling date	Clam organs	Composition (%) of <i>Vibrio</i> species										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Others
'01 Dec	Mantle	0	0	0	0	0	33.3	0	0	33.3	0	33.3
	Gill	11.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	88.9
	Intestine	55.6	0	33.3	0	0	0	0	0	0	11.1	0
'02 Mar	Mantle	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Gill	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Intestine	35.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	64.7
Jun	Mantle	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0
	Gill	53.8	0	0	7.7	0	7.7	0	0	0	30.7	0
	Intestine	14.3	0	28.6	0	0	0	0	0	0	0	57.1
Aug	Mantle	0	0	0	0	0	50	50	0	0	0	0
	Gill	60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40
	Intestine	0	0	0	62.5	0	0	0	25	0	0	12.5
Nov	Mantle	40	0	0	0	0	0	40	0	20	0	0
	Gill	66.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33.3
	Intestine	0	16.7	0	0	0	0	0	50	0	0	33.3
'03 Jan	Mantle	50	0	0	0	0	0	0	0	50	0	0
	Gill	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
	Intestine	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0
Mar	Mantle	33.3	33.3	0	0	0	0	0	0	0	0	33.3
	Gill	25	0	0	0	0	75	0	0	0	0	0
	Intestine	50	0	50	0	0	0	0	0	0	0	0
Jun	Mantle	66.7	33.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Gill	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0
	Intestine	57.9	0	0	7.9	0	31.6	23.7	0	0	0	0
Sep	Mantle	0	0	0	50	0	0	0	0	50	0	0
	Gill	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	60
	Intestine	58.3	0	8.3	0	0	0	0	0	0	0	33.4

분리균은 TCBS에서 녹색집락의 형성되어 녹색의 집락을 형성하는 *V. tapetis*와 차이가 나며, 또한 BTB teepol배지에서 황색집락을 형성하여 청색의 집락을 형성하는 *V. tapetis*와는 배양학적인 차이가 있었다. 발육온도에 있어서도 35°C에서 발육하였지만 *V. tapetis*는 발육하지 못하여 배양온도에서도 차이가 확인되었다. ALO반응에서는 (-, -, -)로 *V. splendidus biovar I*의 (+, -, -)와는 차이를 보였다. 한편 mannitol, sorbitol, sucrose의 이용에서 (+, -, -)로, (-, -, -)인 *V. tapetis*와 차이를 나타내어 분리균은 *V. splendidus biovar II*로 동정되었다. *V. tapetis*는 통상의 동정을 위하여는 indole생산, 4°C에서의 발육, 30°C와 식염 6%에서 미발육, arginine dehydrogenase negative,  $\beta$ -galactosidase positive, gelatin, casein, lecithin 및 전분의 가수분해 음성, sucrose, mannitol, amygdalin의 미이용이 종래의 *Vibrio*와는 큰 차이가 난다 (Borrego et al. 1996). *V. splendidus*는 *V. tapetis*와 달리 aconitate, D-alanine,  $\alpha$ -ketoglutarate, DL-lactate, maltose, mannitol, porline, pyruvate와 L-threonine을 이용할 수 있다 (Borrego et al. 1996).

Jensen et al. (2003)은 *V. splendidus*와 *V. tapetis*는 매우 유사하지만 배양학적, 분자생물학적 차이를 보고하였다. 즉 배양학적으로 *V. splendidus*는 혈액첨가배지에서 베타용혈의 회백색 집락이 형성되는 반면, *V. tapetis*는 *V. splendidus biovar I*와 집락의 모양과 색깔은 유사하지만 용혈반응이 일어나지 않는다. 또 marine agar에서 18°C의 암조건에서 계대배양을 계속 하면 형태는 유지하지만 실온에서 marine broth에 배양하면 *V. splendidus*는 고유의 노란색에 변함이 없지만, *V. tapetis*는 검어지면서 2주 이내에 갈색으로 변하게 된다고 하였다. 생화학적인 성장도 매우 유사하지만 37°C에서의 성장, arginine dehydrogenase, sorbitol, sucrose, mannitol에서 *V. splendidus biovar I*는 (+, +, +, -, +), *V. tapetis*는 (-, -, -, +, -)의 성상을 나타냄으로써 sorbitol의 분해를 2종의 분류형질로 이용하는 것이 적합하다고 보고하였다. 한편 Maes & Paillard (1992)와 Borrego et al. (1996)은 sucrose를 2종의 구분하는데 사용할 것을 제안하였다.

### 3-3. *Vibrio*균의 병원성

*V. parahemolyticus*, *V. splendidus II* (JH-1) 및 대조로 사용한 바지락 BRD의 원인균인 *V. tapetis* (NCIMB 13622)의 바지락에 대한 병원성을 조사한 결과 *V. parahemolyticus*는 27°C에서는  $10^7$  cells과  $10^6$  cells을 접종하였을 때의 누적사망율은 각각 75%와 50%로 높았지만  $10^5$  cells과  $10^4$  cells을 접종하였을 때는 각각 25%와 10%였다. 한편 20°C에서는  $10^7$  cells과  $10^6$  cells을 접종하였을 때의 누적사망율은 55%와 35%였으며, 27°C보다 낮았으며,  $10^5$ 과  $10^4$ 을 접종하였을 때는 각각 40%와 5%로 고농도로 접종하였을 때는 고온일수록 사망률이 높은 반면 저수일 경우에는  $10^5$  cells을 접종하였을 때도 사망률이 높았다(Fig. 12-8).

*V. splendidus II* (JH-01)를 접종하였을 때의 누적 사망률은 Fig. 12-9와 Fig. 12-10에 나

Table 12-7. Comparison of phenotypic characteristics for distinguishing present isolate (JH-01) from related reference *Vibrio* strains

Characteristics	<i>Vibrio</i> species			
	Present strain JH-1	<i>V. splendidus</i> biovar II (ATCC 33789)	<i>V. splendidus</i> biovar I (ATCC 34125)	<i>V. tapetis</i> (NCIMB 13622)
Gram	-	-	-	-
Morphology	curved rod	curved rod	curved rod	curved rod
TCBS medium	green	green	yellow	green
Oxidase	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+
Motility	+	+	+	+
Indole	+	+	+	+
Nitrate	+	+	+	+
BTB teepol medium	yellow	yellow	yellow	blue
0/129 (150 $\mu$ g)	S	S	S	S
20 $^{\circ}$ C				
0% NaCl	-	-	-	-
3% NaCl	+	+	+	+
5% NaCl	+	+	+	+
8% NaCl	+	+	+	-
10% NaCl	-	-	-	-
Growth				
at 5 $^{\circ}$ C	+	+	-	+
at 30 $^{\circ}$ C	+	+	+	+
at 35 $^{\circ}$ C	+	+	+	-
at 38 $^{\circ}$ C	-	-	-	-
Acid from glucose	+	+	+	+
Gas from glucose	-	-	-	-
ONPG	-	-	-	+
Arginine dihydrolase	-	-	+	-
Lysine decarboxylase	-	-	-	-
Ornithine decarboxylase	-	-	-	-
Citrate	-	-	+	-
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-
Urease	-	+	+	-
Tryptophane deaminase	+	-	-	+
V-P	-	-	+	-
Gelatinase	+	+	+	-
Glucose	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	-
Inositol	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-
Sucrose	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-
Amygdalin	-	-	-	-
Arabinose	-	-	-	-

S ; sensitive.

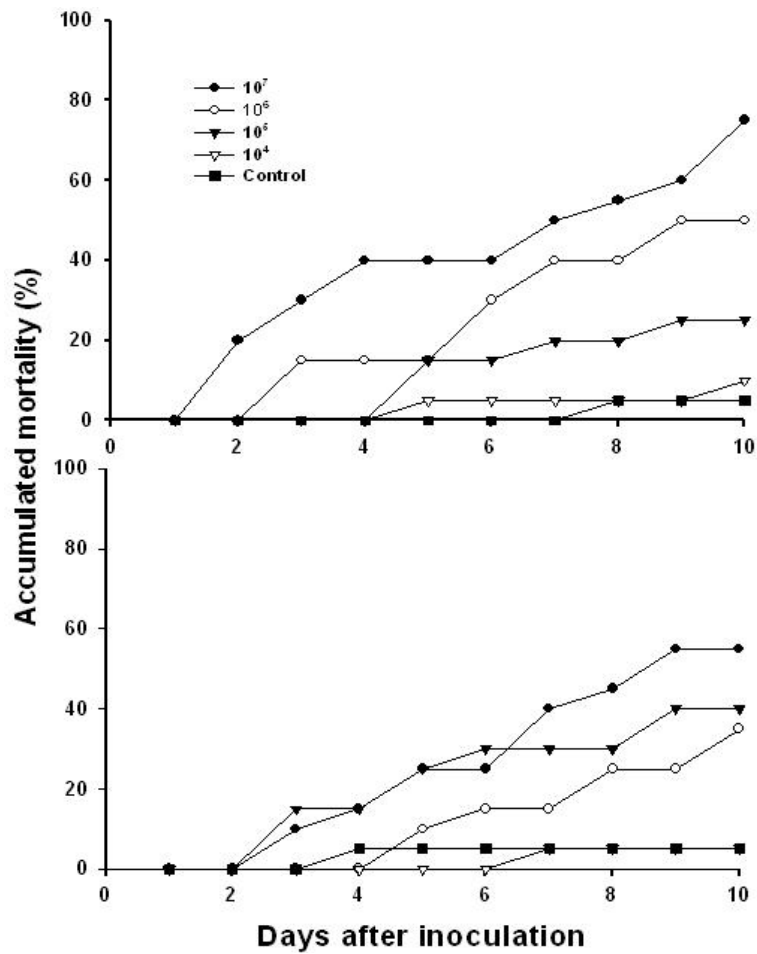


Fig. 12-8. Accumulated mortality of Manila clams inoculated with different concentrations of *V. parahemolyticus* at 27°C (upper) and 20°C (lower). Twenty calms were used each trail.

타내었다. 27°C와 20°C에서 모두 접종 3일후부터 사망률이 급격히 증가하여 10<sup>5</sup> cells이상의 접종군에서는 모두 90%이상의 사망률을 나타내었으며, 10<sup>4</sup> cells을 접종한 군에서도 27°C에서는 65%, 20°C에서는 90%가 사망하여 *V. parahemolyticus*보다는 사망률이 현저히 높았다.

바지락의 BRD의 원인균인 표준균주 *V. tapetis* (NCIMB 13622)를 개체당 10<sup>4</sup> cells 및 10<sup>7</sup> cells을 접종하고 20°C에서 10일간의 누적폐사율은 Fig. 12-10에 표시하였다. *V. tapetis* 10<sup>4</sup> cells을 접종하였을 때는 40개체 중 27개체가 사망하여 사망률은 67.5%였으며, 10<sup>7</sup> cells을 접종하였을 때는 40개체중 3개체가 사망하여 사망률은 7.5%에 불과하였으며, 사망개체에 있어서도 원인균에 의한 특징적인 증상인 패각내면의 chonchiolin침착에 의한 갈색반점도 관찰되지 않았다.

본 연구에서는 바지락에서 우점종으로 출현하여 *V. splendidus* II. (JH-01)로 동정되는 균을 접종에서는 고수온과 저수온에 높은 폐사율을 나타내었다. 그러나 "brown ring disease"의 원

인균인 *V. tapetis*를 바지락에 인위 감염시켰을 경우 사망률도 *V. splendidus* II에 비해 낮을 뿐만아니라 특징적인 증상인 "brown ring disease"의 증상도 발견되지 않았다. Paillard et al. (1994)는 *V. tapetis*를 인위 감염시켰을 때 프랑스산 *R. decussatus*는 *R. philliphinarum*에 비해 BRD의 발현율이 낮다고 보고하였다. Allam et al. (2001)은 같은 바지락류라 할지라도 산지와 종에 따라 BRD증상의 발현에 차이가 있다고 보고하였다. 즉 프랑스과 미국산 *R. philliphinarum*과 프랑스산 *R. decussatus*에 *V. tapetis*를 인위감염시킨 다음 BRD의 발현을 관찰한 결과 *R. philliphinarum*중에서 프랑스산은 100%인 반면 미국산은 52%, 프랑스산 *R. decussatus*로 부터는 37%에서 BRD가 확인되었다고 보고하였다. BRD가 관찰되는 개체중에서 프랑스산 *R. decussatus*는 89%, 미국산 *R. philliphinarum*은 62%가 정상의 상태로 회복한 반면 프랑스산 *R. philliphinarum*은 겨우 12%만이 회복하였다고 하였다. 특히 대조로 생리식염수를 접종한 *R. decussatus*는 전혀 BRD가 발견되지 않았지만, 프랑스산 *R. philliphinarum*은 17%에서 BRD가 발현되었다고 보고하였다. 이처럼 프랑스산 *R. philliphinarum*이 다른 바

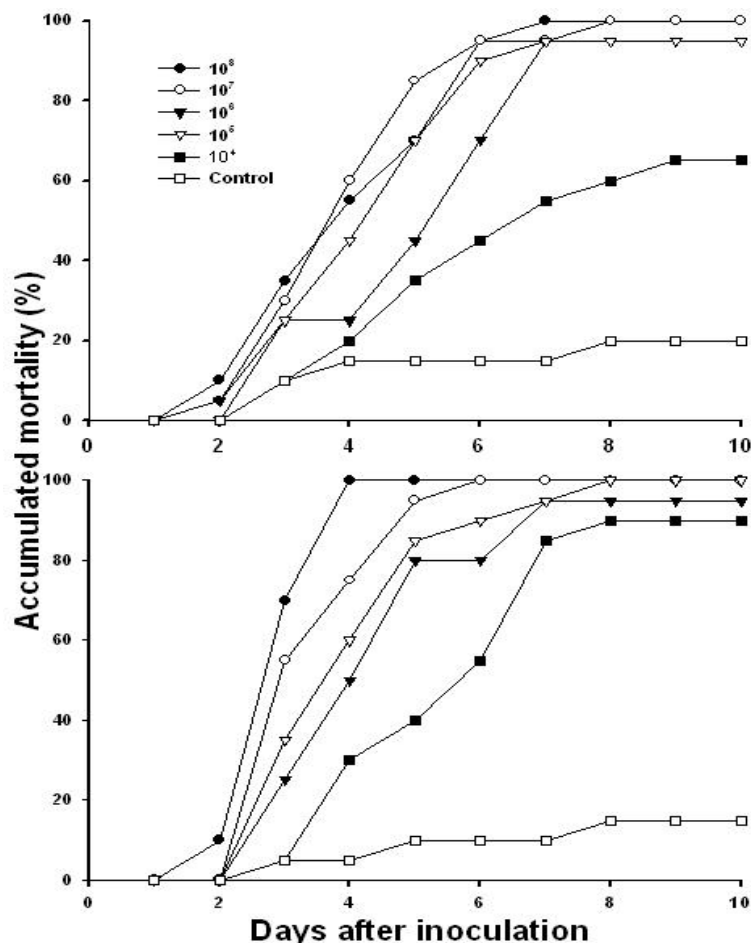


Fig. 12-9. Accumulated mortality of Manila clams inoculated with different concentrations of *V. splendidus* II (JH-1) at 27°C (upper) and 20°C (lower). Twenty calms were used each trail.

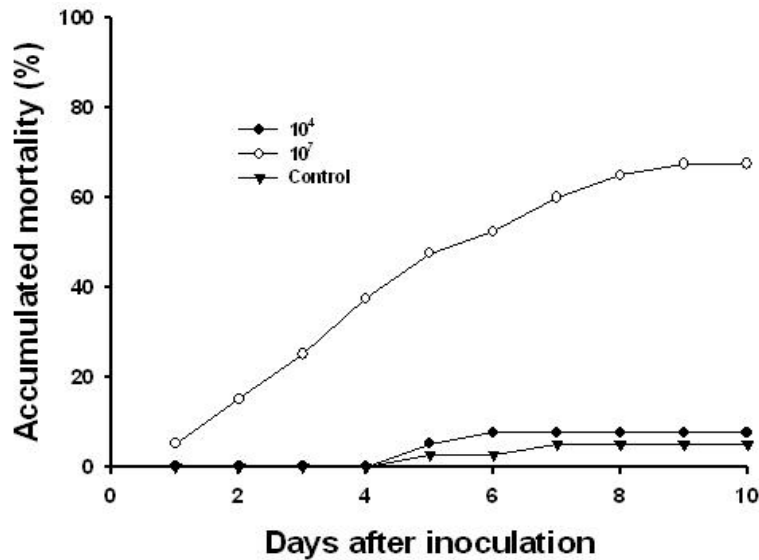


Fig. 12-10. Accumulated mortality of Manila clams inoculated with different concentrations of the causative agent of brown ring disease, *V. tapetis* (NCIMB 13622) at 20 °C. Forty calms were used each trail.

지락에 비해 BRD의 발현율이 높은 것은 다른 지역산이나 종에 비해 탐식능력이 있는 과립구의 비율이 낮기 때문에 자체의 방어능의 결여에서 기인된다고 추론하였다.

패류에서 BRD와 유사한 증상은 화학물질, 환경요인 및 기생충의 감염 등 여러 가지 요인에 의해 발생하는 것으로 보고되었다. 즉 Tributyltin은 *Crassostrea gigas*의 shell chamber에 영향을 끼쳐 석회 침착을 방해하며, diflubenzuron도 *Anodonta cygnea*의 패각 안쪽에 유기물이 축적되는 것을 방해하는 것으로 보고되었다 (Machado et al. 1990). 또 산소 과포화에 의한 가스병도 굴이나 바지락의 패각 안쪽에 conchiolin의 반점을 형성하는 것으로 보고되었다 (Malouf et al. 1972). 봄과 여름철의 대량폐사 후 살아남아 빈사 상태에 있는 비단가리비, *Patinopecten yessoensis*에도 BRD와 유사한 증상이 발견되며 원인으로서는 겨울철의 저수온, 영양결핍, 고밀도 사육 등의 환경요인이 원인으로 제기되었으며 다른 요인으로는 여름철의 난소의 비정상적인 성숙에 의해서도 유발된다고 보고하였다 (Mori 1975, Kawamoto 1985). 또 termatodes의 감염에 의해서도 사멸된 metacercaria를 석회물질이 덮고 있는 유사한 증상이 나타나며, *Haplosporidium nelsoni* (Farley 1968)나 곰팡이의 감염 (Alderman & Jones 1975, Raghukumar & Lande 1988)에 의해서도 발생하는 것으로 보고되고 있다.

본 연구에서 바지락에 접종하였을 때 BRD가 발현하지 않은 것으로 보아 우리나라산 바지락에서는 BRD의 증상은 생기지 않는 것으로 판단되었다. 그러나 양식장의 노후화와 환경의 악화가 초래되었을 때의 발현 가능성은 배제할 수 없으므로 지속적인 모니터링이 필요하다고 생각된다.

#### 4. 참고문헌

- Aiso K, Simidu U, Hasuo K (1968) Microflora in the digestive tract of inshore fish in Japan. *J. Gen. Microbiol.*, 52, 361-364
- Alderman DJ, Jones EBG (1967) Shell disease of *Ostrea edulis* L. *Nature*, 216, 797-798
- Allam B, Ashton-Alcox KA, Ford SE (2001) Haemocyte parameters associated with resistance to brown ring disease in *Ruditapes spp.* clams. *Dev. & Comp. Immunol.*, 25, 365- 375
- Allam B, Paillard C, Ford SE (2002) Pathogenicity of *Vibrio tapetis*, the etiologic agent brown ring disease in clams. *Dis. Aquat. Org.*, 48, 221-231
- Alsina M, Blanch AR (1994) A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. *J. Appl. Bacteriol.*, 76, 79-84
- Alsina M, Blanch, AR. (1994) Improvement and update of a set keys for biochemical identification of *Vibrio* species. *J. Appl. Bacteriol.*, 77, 719-721
- Borrego JJ, Castro D, Luque A, Paillare C, Maes P, Garcia MT, Ventosa A (1996) *Vibrio tapetis* nov., the causative agent of the brown ring disease affecting cultured clams. *Intl. J. Sys. Bacteriol.*, 46, 480-484
- Castro D, Santamaria JA, Luque A, Marinez-Manzanares E, Borrego JJ (1996) Antigenic characterization of the etiological agent of the brown ring disease affecting manila clams. *Syst. Appl. Microbiol.*, 19, 231-239
- Castro D, Santamaria JA, Luque A, Marinez-Manzanares E, Borrego JJ (1997) Determination of the etiological agent of brown ring disease in southwestern Spain. *Dis. Aquat. Org.*, 29, 181-188
- Farley CA (1968) *Michinia nesoni* (*Haplosporidia*) disease syndrome in the American oyster *Crassostrea virginica*. *J. Protozool.*, 15, 585-599
- Jensen S, Samuelsen OB, Anderson K, Torkildsen L, Lambert C, Choquet G, Paillard C, Bergh, O (2003) Characterization of strains of *Vibrio splendidus* and *V. tapetis* isolated from crokwing warasse *Symphodus melops* suffering *vibriosis*. *Dis. Aquat. Org.*, 53, 26-31
- Kawamoto K (1985) Gonadal development of cultured scallops, *Patinopecten yessoensis* (Jay) off Rumoi (Hokkaido). *Scient. Rep. Hokkaido Fish. Expl. Stn.*, 31, 9-13
- Machado J, Coimbra J, Castilho F, Sa C. (1990) Effect of Diflubenzuron on shell formation of the freshwater clam, *Anadonta cygnea*. *Archs. Environ. Contam. Toxicol.*, 19, 35-39
- Malouf R, Keck R, Maurer D, Epifanio C (1972) Occurrence of gas-bubble disease in three species of bivalve molluscs. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 29, 588-589
- Mori K (1975) Seasonal variation in physiological activity of scallops under culture in the



- coastal waters of Sannriku district, Japan, and a physiological approach of a possible cause of their mass mortality. *Bull. Mar. Biol. Stn. Asamushi Tohoku Univ.* 15, 59-79
- Noel R, Nicolas JL, Boulo V, Mialhe E, Roch P (1996) Development of a colony-blot Elisa assay using monoclonal antibodies to identify *Vibrio* P1 responsible for "brown ring disease" : in the clam *Tapes philippinarum*. *Aquaculture*, 146, 171-178
- Paillard C, Alcox K, Ford SE (1996) Changes in hemolymph and extrapallial fluid parameters in the American oyster diseases *Crassostrea virginica* affected by the juvenile oyster disease. *Aquat. Living Resour.* 9, 145-158
- Paillard C, Maes P (1995a) The brown ring disease in the Manila clams, *Ruditapes philippinarum*. 1. Ultrastructural alternations of the periostracal lamina. *J. Invert. Pathol.*, 65, 95-101
- Paillard C, Maes P (1995b) The brown ring disease in the Manila clams, *Ruditapes philippinarum*. 2. Microscopic study of the brown ring syndrome. *J. Invert. Pathol.*, 65, 101-110
- Paillard C, Maes P, Oubella R (1994) Brown ring disease in clams. *Annu. Rev. Fish Dis.*, 4, 219-240
- Raghukumar C, Lande V (1988) Shell disease of rock oyster *Crassostrea cucullata*. *Dis. Aquat. Org.*, 4, 77-41
- Simidu S, Ashino K, Kaneko E (1971) Bacterial flora of phyto- and zoo-plankton in the inshore water of Japan. *Can. J. Microbiol.*, 17, 1157-1160
- Simidu S, Kaneko E, Aiso K (1969) Microflora of fresh and stored flatfish, *Kareius bicoloratus*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 35, 77-82
- Simidu S, Tsukamoto K, Akagi Y (1982) Heterotrophic bacterial population in Bengal bay and the South China sea. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 48, 425-431

# 제 13 절 바지락의 *V. tapetis*의 감염에 대한 비특이 방어인자의 활성 변화

## 1. 서론

패류의 생체 방어능력은 세포성 또는 액성의 비특이적 방어인자가 주체로서 주로 혈림프가 담당하고 있다. 이러한 비특이 방어인자에는 혈청의 라이소자임 활성, 응집가 및 살균능력과 혈구세포의 탐식능력 등이 이용되고 있다. 혈구의 구성과 혈림프의 비특이 활성의 변화는 숙주의 생리상태 또는 질병에 대한 방어능력을 평가하는 지표로 널리 사용되어지고 있다 (Chu & La Payre 1993a, 1993b, Chu et al. 1993, Ford et al. 1993, La Peyre et al. 1995, Oubella et al. 1996). 혈구세포에서 생산되어 혈림프 중으로 방출되는 살균물질인 lysozyme은 주로 패류의 과립구내에서 발견되어지며 (Rodrick & Cheng 1974), 혈구세포가 이물질을 탐식하는 동안에 탈과립이란 과정을 통하여 혈림프내로 유리되어져 (Darnell et al. 1986), 이물질을 소화분해시키는 작용을 한다. 또한 중요한 액성방어인자는 세균이나 기생충과 같은 입자성 이물질을 응집시켜 병원체를 불활화시키는 능력도 가지고 있다 (Chu 1988, Olafsen 1988).

본 장에서는 *V. tapetis*의 위감염에도 불구하고 BRD라는 특이적 증상이 발현되지 않는 이유를 알아보기 위하여 *V. tapetis*를 인위감염 바지락을 시료로 하여 라이소자임의 활성, 혈청의 응집가, 살균능력 및 혈구의 구성의 변화를 조사하여 우리 나라산 바지락의 *V. tapetis*의 감염에 대한 활성의 변화를 조사하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2-1. 시료

제 2장의 병원성 조사시의 접종방법에 따라 *V. tapetis* (NCIMB 13622)를 개체 당  $10^4$  cells 또는  $10^7$  cells를 접종한 다음 사육수조에 수용하고 경시적으로 후패각근에서 혈림프를 채취한 다음 pool하여 사용하였다.

### 2-2. 혈청 라이소자임의 활성

5마리에서 채혈한 다음 pool하여 4°C에서 3000 g, 30분간 원심하여 혈청을 분리한다. 혈청은 0.1 M phosphate buffer (pH 6.24)에 용해시킨 *Micrococcus lysodeikticus* (0.2 mg/ml) 부유액 1.7 ml에 혈청 0.3 ml를 첨가하여 실온에서 1분간격으로 4분간 450 nm에서 흡광도를 측정하여 분간의 0.001의 흡광도 감소치를 1 unit로 표시한다 (Santarem et al. 1994).

### 2-3. 혈청의 응집가

3~4마리에서 채취하여 pool한 혈구액을 원심분리하여 혈청을 분리한 다음 96 well micro-

plate에 50  $\mu$ l 주입한 다음 식염 0.15 M 첨가한 TSB로 2단계 희석계열을 만든다. 각 well에 TSB에 1~2%로 부유시킨 sheep red blood cells (SBRC)를 동량 첨가하여 실온에서 2~3시간 배양한다. 대조는 혈청대신에 TBS를 동량 주입한다. 응집이 보이는 최고희석배율의 역수를 응집가로 표시하였다.

#### 2-4. 혈청의 살균능

6-10마리의 바지락의 후패각근에서 채취한 혈구를 pool하여 원심분리하여 혈구를 제거한 다음 0.45  $\mu$ m 필터로 여과하여 혈청을 분리한 다음 Ordas et al. (2000)의 방법에 따라 *V. tapetis*와 대조로서 *Escherichia coli* (ATCC 13706)에 대한 살균능력을 측정하였다. 분리 혈청 25  $\mu$ l를 96 well microplate에 25  $\mu$ l씩 분주하고 TSB에  $1 \times 10^8$  cells/ml로 부유시킨 세균액 75  $\mu$ l를 각 well에 첨가하여 잘 혼합한 다음 18°C에서 3시간 배양하였다. Plate를 200g에 10분간 원심하여 상청을 제거한 다음 TSB에 5 mg/ml로 용해시킨 3-(4,5-dimethylthiazo-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)을 TSB로 10배 희석시킨 희석액 100  $\mu$ l를 각 well에 첨가한 다음 18°C에서 15분간 암조건하에 방치한 다음 600  $\mu$ m에서 흡광도를 측정하여 살균능을 측정하였다. 대조로는 바지락 혈청 대신에 TSB를 첨가하였다. 살균능지수 (bactericidal activity index, BI)은 실험군의 흡광도/대조군의 흡광도로 표시하였다.

#### 2-5. 혈구의 탐식능

후패각근에서 채취한 혈구를 습윤상자에 넣어 25°C에서 슬라이드글라스에 부착시킨 다음 미부착혈구를 멸균여과해수로 제거한다. 여과해수에 부유시킨 zymosan을 혈구와의 비율이 10 : 1이 부착혈구에 첨가한 다음 25°C에서 1시간 배양한 후 여과해수로 세척하고 건조시킨 다음 May-grünwald Giemsa 염색 후 검경하면서 200개의 세포중에 탐식한 혈구를 계수하여 탐식율과 탐식지수를 구하였다.

#### 2-6. 혈구 조성의 경시적 변화

후패각근에서 채혈한 혈액이 도말 표본을 만들어 May-grünwald Giemsa 염색 후 200개의 세포중에서 과립구와 무과립구가 차지하는 비율 (%)을 구하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3-1. 라이소자임 활성의 변화

*V. tapetis*를 개체당  $10^4$  cell씩 접종하고 경시적으로 채취한 혈장의 라이소자임 활성은 Fig. 13-1에 나타난 것처럼 접종군에서는 접종 1일 후부터 라이소자임의 활성이 현저한 변화가 관찰

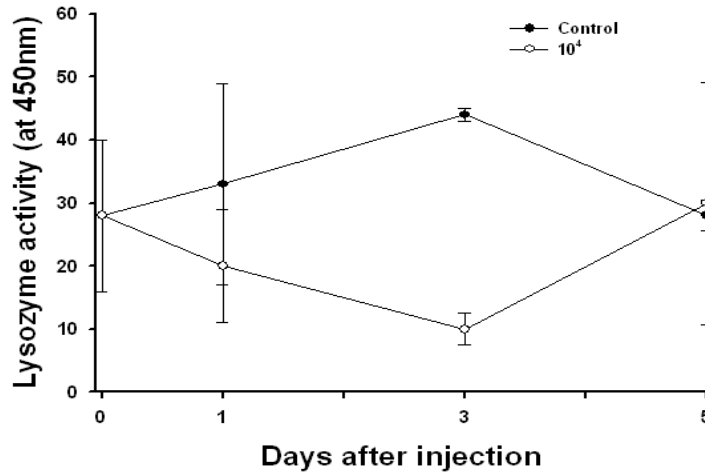


Fig. 13-1. Lysozomal activities of hemolymph of the clams experimentally challenged with  $10^4$  cells of *V. tapetis* (NCIMB 13622) per a individual. The hemolymph was pooled from 5 clams each trial (n=5). Mean±SE.

되었지만 대조군에서는 변화가 거의 없었다. 이러한 결과는 우리나라산 바지락은 *V. tapetis*의 침입에 효율적으로 반응하여 과립구가 가지고 있는 라이소자임을 혈림프로 방출하여 이 균의 침입에 효율적으로 대처할 수 있는 능력이 있다는 것을 의미한다. Allam et al. (2000)이 바지락에 *V. tapetis*를 접종하였을 때 접종 6시간후에 활성이 상승하였다가 1일후에 리소조움의 활성이 감소한 다음 그 후부터는 증가한다는 결과와는 비슷한 경향을 나타내고 있다. 그러나 이와는 반대로 Ordas et al. (2000)은 *Perkinsus altanticus*에 자연 감염된 바지락의 비특이인자의 활성은 비감염 개체의 식작용, 혈구수 및 살균작용은 감염어에 비해 높은 반면 라이소자임활성, 단백질의 양 및 응집가는 감염어에 비해 낮게 난다고 보고하였는데, 이는 Chu & LaPeyre (1993b)의 지적처럼 라이소자임의 활성은 세균성질병의 비특이적 방어인자와 밀접한 관계가 있기 때문이라 생각된다. 한편 Allem et al. (2001)에 미국과 프랑스에 있는 바지락의 *Vibrio*병에 대한 비특이적 방어능을 조사한 결과 미국산 바지락이 총혈구수, 과립구의 수 및 탐식능력이 프랑스산에 비해 현저히 높아 양식지역별로 차이가 있음을 보고하였다.

### 3-2. 혈구의 탐식능

*V. tapetis*를 인위감염한 바지락의 zymosan입자에 대한 탐식율과 탐식지수는 Fig. 13-2와 Fig. 13-3에 표시하였다. 인위 감염 개체와 대조군 모두 탐식율은 접종후의 시간이 경과할수록 현저히 감소하였는데 접종개체의 감소율이 현저하였으며, 2접종 농도에 따른 차이는 없었다. 한편 탐식지수는  $10^4$ 접종군에서 접종 1일후에 탐식지수의 증가가 있었지만 그 후는 지속적으로 감소하였으며,  $10^7$ 접종군이 이 비해 감소율이 높은 경향이였다. 한편 대조군은 경시적

변동의 변화가 거의 없이 평균 1.7-2.4개의 zymosan을 탐식하였다. 바지락에도 다른 패류와 마찬가지로 2종류의 혈구인 과립구와 무과립구로 구분 가능하며(Lopez et al. 1997b), 숫자적으로는 과립구가 무과립구보다 풍부하고 탐식능력이 강하다고 보고하였다 (Lopez et al. 1997a, Pipe et al. 1997). 본 실험에서도 활발한 탐식능을 보이는 것은 대부분이 과립구였으며, 평균탐식지수는 1.7이었지만 병원균의 접종군에서 대조군에 비해 탐식율 및 탐식지수의 현저한 감소가 확인되었었다. 이러한 결과는 Allam et al. (2000)의 바지락에 *V. tapetis*를 접종하였을 때 탐식율이 증가하는데 이러한 라이소자임의 활성화와 탐식능의 증가를 주체로 하는 비특이적 인자의 활성화의 증가가 병원체로부터 생체를 보호하는 주요한 기능이라고 추정하였다. 그러나 그의 결과에서 혈구와 패액내의 이들 요소의 활성을 비교하였을 때 패액내의 활성이 항상 높게 나타내고 있다. 이는 개방혈관계인 패류의 순환계는 염증부위로 이동한 혈구는 지속적으로 외부로 방출되기 때문에 혈구의 기능이 실제로 발휘되는 감염부위에서의 기능이

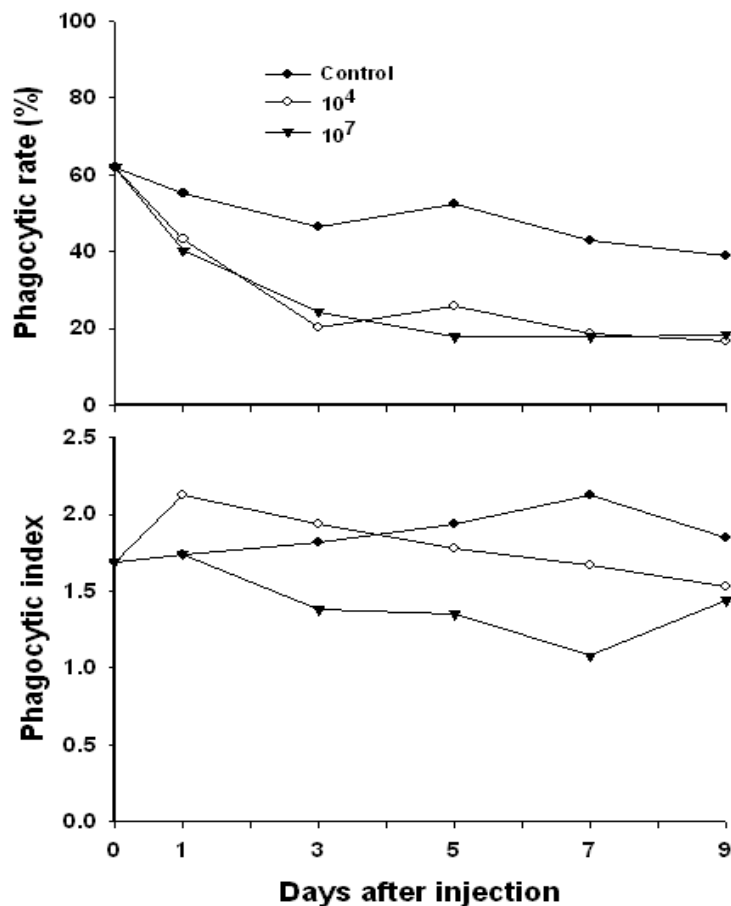


Fig. 13-2. Phagocytic activity of the hemolymph of clam to zymosan. The pooled hemolymph from 5 individuals was obtained from the posterior adductor muscle of clams previously challenged with *V. tapetis* (NCIMB 13622).

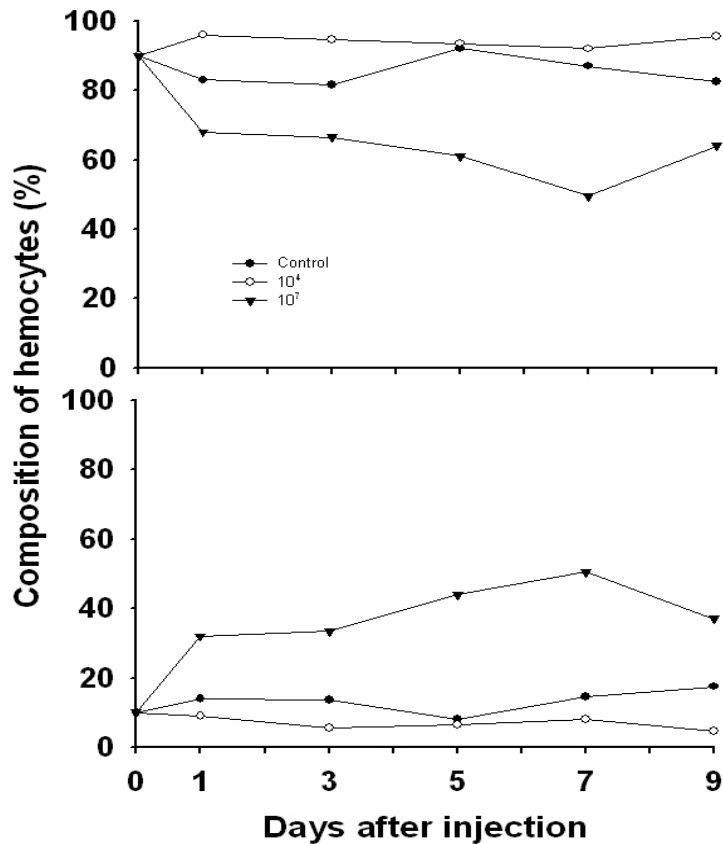


Fig. 13-3. Changes in the composition of granulocytes (upper) and agranulocytes (lower) in the hemolymph from clams injected with *Vibrio tapetis* (NCIMB 13622).

최대로 됨을 의미한다. 따라서 패류에서도 포유류나 어류처럼 bone marrow pool의 존재 여부는 확실하지 않지만 이물의 침입을 인식하고 탐식하는 것은 주로 혈림프임으로 순환하는 혈림프가 침입부위로 이동하고 실제로 순환계에 존재하는 것은 미숙 또는 생산되지 얼마되지 않기 때문에 상대적으로 활력이 약하게 나타난 것으로 추정할 수 있다.

바지락 혈구의 대부분은 과립구로  $10^4$  cells의 *V. tapetis* 접종군과 대조군은 과립구와 무과립구의 변동의 폭은 Fig. 13-3에 나타난 것처럼 현저한 차이가 없었다. 그러나  $10^7$  cells의 *V. tapetis* 접종군은 접종후 7일까지 과립구의 비율이 감소하는 반면 무과립구가 증가하는 경향이 있었다.

패류의 혈구 조성은 계절적 요인에 영향을 받아 특히 먹이의 양과 수온과 밀접한 관계를 가지고 변동하여 (Feng 1965, Santarem et al. 1994), 수온이 높은 시기에는 최고치를 나타내고 산란 후에 최저치를 나타낸다. 산란 후의 혈구수의 감소원인으로서 생식소내의 조직 파괴물을 제거하기 위하여 많은 혈구가 생식소로 이동하기 때문이라 추정하고 있다. (Suresh & Mohandas 1990, Santarem et al. 1994). 혈구의 조성에서 기생충이 감염되었을 때는 무과립구

가 증가하는 것은 과립구가 기생충을 제거하기 위하여 탈과립 현상을 일으켜 과립구가 감소하였기 때문으로 보고되고 있다 (Ford et al. 1993). Allam et al. (2000)은 바지락에 *V. tapetis*를 인위 감염시켰을 때 패액에서 혈구수의 현저한 증가가 관찰되는데 증가는 접종 7일후에 최대값에 도달한 후 계속적으로 감소하기 시작하여 49일째에 접종전의 상태로 되돌아온다고 보고하였다. 그러나 증가하는 혈구수를 비교하여 보면 증가분은 대부분이 죽은 세포였다. 이러한 혈구세포의 붕괴는 패류의 생체방어의 하나로서 (Feng 1988, Cheng 1996), 세균을 인위 접종하였을 때 1일 이내에 증가하여 7~14일의 범위에서 그 증가는 지속된다고 하였다 (Suresh & Mohandas 1990). Oubella et al. (1994, 1996)은 이러한 혈구수의 변화를 접종 직후의 증가는 조직속에 있던 혈구가 순환혈로 이동하기 때문이며, 최고치에 도달한 후의 감소는 순환혈이 감염부위로 이동하기 때문이라고 고찰하고 있다. 그러나 Allam et al. (2000)의 결과에서는 인위 감염부위인 패액에서 현저한 증가가 관찰된 것은 패류의 혈구도 어류와 마찬가지로 탐식능력을 가진 혈구가 감염부위에 축적된다는 것을 의미한다. 따라서 조직에서 순환혈로 혈구가 유입되는 것으로 해석하는 것은 모순이라 생각한다. Allam et al. (2000)은 총혈구수와 죽은 혈구수의 변동이 반비례관계가 있는 것을 기준으로 혈구중 죽은 세포의 증가를 혈구에 대해 독성을 지닌 세균 (Borrego et al. 1996b)에 의한 혈구의 죽음과 살아있는 혈구수의 감소에 의한 상대적 증가로 해석하고 패류와 세균과의 상호작용에 의한 영향이 있을 것으로 추정하였다. 본 연구에서는 인위감염 세균 감염에 실제적 배제 역할을 담당하는 과립구와 무과립구의 비율을 조사하여 방어동향을 파악하고자 하였다. 즉 저농도의 세균을 주입하였을 때 패류의 과립구와 무과립구의 변화에는 큰 변화가 없는 반면 고농도의 세균이 주입되었을 때는 과립구는 감소하는 반면 무과립구의 비율이 증가하는 경향이었다. 그럼으로 정상적인 양식환경에서 패류는 생리적으로 침입세균의 방어에 대처할 수 있지만 일시에 고농도의 세균이 주입되었을 때는 탐식의 주역할을 담당하는 과립구의 감염부위로의 이동으로 순환계에는 과립구가 감소하고 상대적으로 무과립구가 증가한 때문으로 생각된다. 한편 Allam et al. (2001)은 *V. tapetis*를 접종하였을 때 과립구의 변화와 BRD의 증상의 발현과는 밀접한 관계가 있음을 보고하였다. 즉 *R. decussatus*와 프랑스산 *R. philliphinarum*은 는 과립구가 감소한 반면 미국산 *R. philliphinarum*은 변화가 없었다. 이것을 BRD와 관련시켰을 때 *R. decussatus*는 가벼운 정도의 chonchiolin침착이 형성된 다음 회복하였지만 프랑스산 *R. philliphinarum*은 현저한 침착에 뒤이은 회복은 발견할 수 없었다고 하였다. 한편 미국산 *R. philliphinarum*은 침착이 거의 없는 것은 식세포가 효과적으로 *V. taptis*의 침입에 대처할 수 있기 때문이라고 하였다. 본 연구에서도 *V. tapetis*를 접종하였을 때 저농도에서는 거의 변화가 없는 반면 고농도에서 약간의 증가가 관찰된 것으로 미루어 우리나라산 바지락은 *V. tapetis*의 침입을 저지하는 능력이 높기 때문에 BRD의 증상이 생기지 않았다고 판단된다.

#### 4. 참고문헌

- Allam B, Ashton-Alcox KA, Ford SE (2001) Haemocyte parameters associated with resistance to brown ring disease in *Ruditapetis* spp. clams. Dev. Comp. Immunol. 25, 365-375
- Allam B, Paillard C, Auffret M (2000) Alterations in hemolymph and extracellular fluid parameters in the manila clam, *Ruditapetis phillipinarum*, challenged with pathogen *Vibrio tapetis*. J. Invert. Pathol., 76, 63-69
- Borrego JJ, Luque A, Castro D, Santamaria JA, Martinez-Manzanares E (1996b) Virulence factors of *Vibrio* P1, the causative agent of brown ring disease in the Manila clam, *Ruditapes phillipinarum*, Aquat. Liv. Res., 9, 125-136
- Cheng TC (1996) Hemocytes ; forms and functions. In "The eastern oyster, *Crassostrea virginica*". Kennedy, V. S., Newell, R. I. E. and Eble, A. E., Eds. Maryland Sea Grant, College park. pp 179-200
- Chu FLE (1988) Humoral defense factors in marine bivalves. Am. Fish. Soc. Special Pub., 18, 178-188
- Chu FL, La Payre JF (1993a) Development of disease caused by the parasite *Perkinsus marinus* and defense-related haemolymph factors in three populations of oysters from the Chesapeake bay, USA. J. Shellfish Res., 12, 21-27
- Chu FL, La Payre JF (1993b) *Perkinsus marinus* susceptability and defense-related activities in eastern oyster *Crassostrea virginica* : temperature effects. Dis. Aquat. Org., 16, 223-234
- Chu FL, La Payre JF, Bureson CS(1993)*Perkinsus marinus* infection and potential defense-related activities in eastern oyster *Crassostrea virginica* : salinity effects. J. Invert. Pathol., 62, 226-232
- Darnell JE, Lodish HF, Baltimore D (1986) Molecular cell biology. Scientific American Books., pp 1192
- Feng SY (1988) Cellular defense mechanisms of oysters and mussels. Am. Fish. Soc., Spec. Pub. 18, 153-168
- Ford SE, Kanaley SA, Littlewood DTJ (1993) Cellular responses of oysters infected with *Haplosporidium nelsoni* : changes in circulating and tissue infiltrating haemocytes. J. Invert. Pathol., 61, 49-57
- Chu FL, La Payre JF, Meyers JM (1995) Haemocytic and humoral activities of eastern and Pacific oysters following challenge by the protozoan *Perkinsus marinus* : Fish & Shellfish Immunol., 5, 179-190
- Lopez C, Carballal MJ, Azevedo C, Villalba A (1997a) Morphological characterization of the haemocytes of the clam, *Ruditapetis descussatus* (Mollusca ; Bivalvia). J.



- Invert. Pathol., 69-51-57
- Lopez C, Carballal MJ, Azevedo C, Villalba A (1997b) Differential phagocytic ability of the circulating haemocyte types of the carpet shell clam, *Ruditapes decussatus* (Mollusca : Bivalvia). Dis. Aquat. Org., 30, 209-215
- Olafsen JA (1988) Role of lectins in invertebrate humoral defense. Am. Fish. Soc. Special Pub., 18, 189-205
- Ordas MC, Ordas M, Beloso C, Figueras A (2000) Immune parameters in carpet shell naturally infected with *Perkinsus atlanticus*. Fish & Shellfish Immunol., 10, 597-609
- Oubella R, Paillard C, Maes P, Auffret M (1994) Changes in hemolymph parameters in the Manila clam *Ruditapes phillipinarum* (Mollusca, Bivalvia) following bacterial challenge. J. Invert. Pathol., 64, 33-39
- Oubella R, Paillard C, Maes P, Auffret M (1996) Selective induction of hemocytic response in *Ruditapes phillipinarum* (Bivalvia) by different species of *Vibrio* (Bacteria). Aquat. Liv. Res., 9, 137-143
- Pipe RK, Farley SR, Coles JA (1997) The separation and characterization of hemocytes from the mussel, *Mytilus edulis*. Cell & Tissue Res., 289, 537-545
- Rodrick GE, Cheng TC (1974) Kinetics properties of lysozyme from the hemolymph of *Crassostrea virginica*. J. Invert. Pathol., 24, 41-48
- Santarem MM, Robledo JAF, Figueras A (1994) Seasonal changes in hemocytes and serum defense factors in the blue mussel, *Mytilus galloprovincialis*. Dis. Aquat. Org., 18, 217-222
- Suresh K, Mohandas A (1990) Number and type of hemocytes in *Sunetta scripa* and *Villorita cyprinoides var cochinchinensis* (Bivalvia), and leukocytosis subsequent to bacterial challenge. J. Invert. Pathol., 55, 312-318

# 제 14 절 16S rRNA를 이용한 *Vibrio tapetis*의 PCR진단법 개발 및 현장 적용 시험

## 1. 서론

수산생물에 질병을 유발하는 *Vibrio*균의 감염을 확인하기 위해서는 반선택배지인 TCBS에 배양한 후 그람 음성, 운동성, 옥시다제 양성, 포도당의 발효적 이용 및 0/129 disc (Oxoid, 150 ug)한 감수성을 확인한 다음 재래식 방법으로 생화학적 검사를 실시하는 것이 기본이다. 그러나 이것은 번거로울 뿐만 아니라 시간이 많이 소모됨으로 이것을 보완하기 위하여 생화학적 검사에 API 20E (BioMeriux)를 병용하기도 한다.

바지락의 비브리오병의 원인균인 *Vibrio tapetis*의 분리는 Marine agar에 1% mannitol (W/V), 1% bromthymol blue를 첨가하여 평판을 만든 다음 균을 접종하여 20°C에 일주일간 배양한 후 mannitol의 비분해 때문에 형성되는 푸른색의 띠를 가진 녹색 집락을 선택하여 TCBS와 marine agar에 접종한 다음 각각 20°C와 30°C에서 24시간 배양한 다음 TCBS에서 녹색의 집락이 형성되지만 고온에 약하여 marine agar평판에서 자라지 않는 것을 선택하는 방법도 개발되었다 (Noel et al. 1996). 그러나 몇몇 생화학 성상에 있어 *Vibrio splendidus biovar II*와 유사한 점이 많아 2종을 엄밀히 구분하는 데는 어려움이 있다 (Castro et al. 1992, Jensen et al. 2003). 이러한 점을 보완하기 위하여 원인균을 배양한 다음 항토끼혈청을 사용한 슬라이드응집반응과 간접형광항체법, 단크론항체를 사용하는 Elisa법 (Castro et al. 1995, Noel et al. 1996)이 면역학적 방법이 개발되어 있다.

PCR법은 샘플의 처리, 병원균에 대한 특이성 및 재현성이 높기 때문에 어류 질병의 진단에 유용하게 사용되고 있으며, 패류의 세균, 기생충 및 바이러스성 질병의 진단법으로 개발되고 있다(Kekker-Cousin et al. 1993, Stokes et al. 1995, Atmar et al. 1996, Le Roux et al. 1999, Renault et al. 2000, Arzul et al. 2001, Lipart & Renault 2002, Novoa et al. 2002, Itoh et al. 2004). 본 연구에서는 바지락의 비브리오병의 원인균인 *Vibrio tapetis*의 진단을 위한 PCR법을 확립하고, 인위 감염시킨 바지락을 대상으로 특이성을 확인한 다음 양식현장에서 채집한 패류에서 적용한 결과를 보고한다.

## 2. 재료 및 방법

### 2-1. DNA 추출 및 primers

Zobell 2216E 한천배지에 20°C, 24시간 배양한 *V. tapetis* (NCIMB 13622)를 수확한 다음 멸균증류수로 2회 원심세척한 다음, 재부유시켜 균부유액을 만들었다. 40  $\mu$ l의 균부유액에 10  $\mu$ l

의 proteinase K (1 mg/ml, Sigma)와 50  $\mu$ l의 2 x K buffer (40 mM tris buffer, 0.2% Nonidet P-40, 0.2 mM EDTA, 1% Tween 20, distilled water, pH 8.0)을 혼합하였다. 혼합액을 60°C에 20분간, 이어서 100°C에 15분간 처리한 후, 얼음 위에서 냉각시킨 다음 8000 rpm에 5분간 원심하여 DNA를 추출하였다. 폐류는 아가미를 절취하여 ACCUPREP kit (Bioneer Co.)를 사용하여 DNA를 추출하였다. *V. tapetis*는 Jensen et al. (2003)의 VtF (5'-aac gag aag tag ctt gct ac-3' : positions 64 to 83)와 VtR (5-cac gct att aac gta cac c-3', positions 448 to 466)를 사용하였다 (Fig. 14-1).

## 2-2. PCR

DNA는 DNA thermal cycler (GeneAmp PCR System 9700, PE Applied Biosystems, USA)를 이용하여 DNA를 증폭시켰다. 즉 Tag DNA polymerase 1 U, dNTPs 250  $\mu$ M, Tris-HCl, pH 9.0 10 mM, KCl 40mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM과 dye가 혼합된 PCR PreMix (AccuPower, Bioneer, Korea)에 primer pair를 1  $\mu$ l, DW 16  $\mu$ l, DNA template 1  $\mu$ l를 첨가하여 혼합한 다음 조건에서 DNA를 증폭시켰다. PCR 조건은 initial denaturation (94°C, 5min), 94°C에서 30sec denaturation, 54°C에서 1min분 annealing과 72°C에서 1.5min extension, final extension (72°C, 5min)의 조건으로 25cycle 반복하였다. 증폭된 DNA 18  $\mu$ l를 TAE electrophoresis buffer (40mM Tris, 20 mM acetate, 2 mM EDTA)에 용해시킨 1.5% agarose gel 상에서 전기영동하여 자외선 램프하에서 밴드를 확인하였다.

## 2-3. 특이성의 검정

Primer sets와 PCR 조건의 특이성을 Table 14-1에 표시한 대조균주를 사용하여 위의 방법에 따라 DNA를 추출한 다음 PCR product를 agarose gel 영동하여 밴드의 크기를 비교하였다. 세균은 Zobell 2216E 한천배지에 20°C, 24시간 전배양한 균을 사용하였다.

## 2-4. PCR을 이용한 인위감염 바지락에서의 *V. tapetis* 검출

접종균과 친화성 높은 조직을 선택하기 위하여 건강한 바지락에 *V. tapetis*를 감염시킨 다음 경시적 사육하면서 각 조직을 채취하여 PCR법에 의한 검출에 정도를 판정하였다. 즉 30 cm×90 cm×45 cm의 유리수조 2개에 각각 50마리를 넣고 여과해수로 채워 수심 30 cm로 한 다음 통기하면서 25°C에 2~3일간 순치한 후 사용하였다. 순치시킨 바지락 30마리에 개체당 *V. tapetis* 10<sup>4</sup> cells과 10<sup>8</sup> cells을 접종시킨 후 같은 온도에 사육하면서 1, 3, 5, 7, 9일의 간격으로 4마리의 바지락을 임의로 채취하여 외투막, 아가미, 소화관 및 발의 조직을 절취하였다.

1 agagtttgat cntggctcag attgaacgct ggcggcaggc ctaacacatg caagtcgagc  
61 ggaaacgaga agtagcttgc tacttcggcg tcgagcggcg gacgggtgag taatgcctag

-----  
Forward (VtF)

121 gaaattgccc tgatgtgggg gataaccatt ggaaacgatg gctaataccg cataatgcct  
181 tcggggccaaa gagggggacc ttccggcctc tcgcgtcagg atatgcctag gtgggattag  
241 ctagtgtgtg aggtaatggc tcaccaaggc gacgatccct agctggtctg agaggatgat  
301 cagccacact ggaactgaga cacgggtccag actcctacgg gaggcagcag tggggaatat  
361 tgacaatgg gcgcaagcct gatgcagcca tgccgcgtgt atgaagaagg ccttcggggtt  
421 gtaaagtact ttcagcagtg aggaaggggt gtacgttaat agcgtgcatc cttgacgtta

-----  
Reverse (VtR)

481 gctgcagaag aagcacoggc taactccgtg ccagcagccg cggtataacg gagggtcgca  
541 gcgttaatcg gaattactgg gcgtaaagcg catgcagggtg gttcgttaag tcagatgtga  
601 aagcccgggg ctcaacctcg gaactgcatt tgaactggc gggctagagt actgtagagg  
661 ggggtagaat ttcaggtgta gcggtgaaat gcgtagagat ctgaaggaat accagtgggc  
721 aaggcggccc cctggacaga tactgacact cagatgcgaa agcgtgggga gcaaacagga  
781 ttgatatacc tggtagtcca cgccgtaaac gatgtctact tggaggttgt ggccttgagc  
841 cgtggcttcc ggagctaacg cgtaagttag accgcctggg gagtacggtc gcaagattaa  
901 aactcaaatg aattgacggg ggccccgaca agcgggtggag catgtggttt aattcgatgc  
961 aacgcgaaga accttaccta ctcttgacat cnacagaagc cagcggagac gcagggtgtc  
1021 cttcgggaac tgtaagacag gtgctgcatg gctgtcgtca gctcgtgttg tgaatgttg  
1081 ggttaagtcc cgcaacgagc gcaaccctta tccttgtttg ccagcagagta atgtcgggaa  
1141 ctccagggag actgccggtg ataaccgga ggaaggtggg gacgacgtca agtcatcatg  
1201 gcccttacga gtagggctac acacgtgcta caatggcgca tacagagggc agccaaccag  
1261 cgatgggtgag cgaatcccaa aaagtgcgtc gtagtcogga ttggagtctg caactcgact  
1321 ccatgaagtc ggaatcgcta gtaatcgtga atcagaatgt cacgggtgaat acgttcccgg  
1381 gccttgataca cacogcccggt cacaccatgg gtagtgggctg caaaagaagt aggtagtta  
1441 acctttcggg gaggacgctt accactttgt ggttc

Fig. 14-1. Nucleotide sequence of *Vibrio tapetis* genomic DNA showing the position of the primers used in this study.

Table 14-1. *Vibrio* stains used for PCR amplification in this study.

Species	Strain
<i>V. anguillarum</i>	SG 7701
<i>V. alginolyticus</i>	ALG-1
<i>V. carchariae</i>	ATCC 35084
<i>V. campbellii</i>	ATCC 10801
<i>V. harveyi</i>	ATCC 14126
<i>V. ordalii</i>	ATCC 33509
<i>V. parahaemolyticus</i>	VP-001
<i>V. splendidus</i> biovar I	ATCC 34125
<i>V. splendidus</i> biovar II	ATCC 33789
<i>V. tapetis</i> I	NCIMB 13622

각 조직의 25~50 mg를 1.5 ml 에펜돌프시험관에 옮겨 ACCUPREP kit (Bionneer)를 사용하여 DNA를 추출하였다. 즉 조직이 들어있는 1.5 ml 에펜돌프시험관에 TL Buffer 200  $\mu$ l, proteinase K (20mg/ml) 20  $\mu$ l을 첨가하여 60°C에 1~3시간 방치하는 동안 15분 간격으로 볼텍스 믹스하여 DNA를 추출하였다. 그 후는 위의 *V. tapetis*의 DNA분리방법과 같은 방법으로 DNA를 추출하였다. 분리된 DNA는 4°C 또는 -20°C에 보관하여 사용하였다. *V. tapetis*는 TSA에 25 °C에서 24시간 배양한 균을 멸균해수에 희석시켜 소정의 농도로 조정하였다.

## 2-5. PCR법의 현장 적용

현장 조사는 2004년 4월부터 7월까지 충남 태안과 전북 고창 지역에서 채집한 바지락, 굴 (*Crassostrea gigas*), 동죽 (*Macra veneriformis*) 및 피빨 고둥 (*Rapana venosa*)을 채취하여 실험실로 운반한 다음 수도수로 폐각을 세척하였다. 시료로 사용한 각 패류의 개체의 속성은 Table 14-2에 나타낸 것과 같다. 크기의 측정이 끝난 개체는 개각하여 아가미를 절취한 다음 위의 방법에 준하여 DNA를 추출한 다음 PCR을 실시하여 특이밴드를 확인하여 감염율을 구하였다.

또 2004년 3월에 대량폐사가 발병한 인천지역의 바지락을 대상으로 적용시험을 실시하였다. 각 시료는 폐사가 발생한 인천 앞바다의 영흥도 주변에서 갯펄에 잠입하지 못하고 표층에 나와 있는 개체를 시료로 하여 아가미조직과 혈림프를 채취하여 상법에 따라 총균수와 *Vibrio*균수를 계수하였다. 또 혈림프중의 *Vibrio*균은 위의 방법에 따라 species수준까지 분류하였다. 채취한 시료중 갯펄에 잠입하지 못한 3개체와 갯펄속에 잠입하고 있는 4개체의 아가미를 절취하여 ACCUPREP kit (Bionneer Co.)를 사용하여 DNA를 추출하여위의 조건에 따라 PCR을 실시하였다. 대조로는 폐사가 일어나지 않는 군산지역에서 채집한 바지락을 사용하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3-1. PCR

Primer sets (VtF and VtR)를 사용하여 *V. splendidus biovar I*, *V. splendidus biovar II*, *V. harveyi*, *V. campbellii*, *V. carchariae*, *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *V. ordalii*, 및 *V. parahaemolyticus*에서 추출한 DNA를 사용하여 PCR 증폭시킨 다음 agarose gel 전기영동시킨 결과를 Fig. 14-2에 나타내었다. 사용한 primer sets와 PCR 조건은 *V. tapetis*에 대해서만 414bp의 특이 밴드와 검출되었을 뿐 다른 균으로부터는 확인되지 않았다.

#### 3-2. PCR을 이용한 In vitro에서의 *V. tapetis* 검출

개체당  $10^4$  cells의 *V. tapetis*를 접종하였을 때는 1일 후에는 아가미에서만 특이 밴드가 검출되었고 다른 조직에서는 검출되지 않았다. 접종 3일후에는 모든 조직에서 검출되지 않았다. 그러나 그 이후에는 어떠한 조직에서도 검출되지 않았다 (Fig. 14-3).

한편 개체당  $10^8$  cells의 *V. tapetis*를 접종하였을 때는 접종 1일후에는 아가미와 소화관에서 밴드가 확인되었지만 외투막과 발에서는 검출되지 않았다. 그러나 3일부터는 모든 조직에서 검출되었지만 특히 아가미에서 검출량이 많았고, 5일과 7일후에는 외투막과 발, 9일후에는 아가미와 발에서 검출량이 많았다 (Fig. 14-4).

#### 3-3. 현장 적용 및 인천지역 대량폐사 바지락에서의 검출

태안과 고창지역에서 채취한 바지락, 동죽, 굴 및 피빨고둥의 아가미를 시료로 하여 PCR법으로 조사한 *V. tapetis*의 검출상황은 Fig. 14-5와 Fig. 14-6와 같다. 태안지역에서 채취한 바지락은 0%, 굴은 25~30%, 동죽은 5.0~10.0%, 피빨고둥은 0%가 검출되었다. 한편 고창지역은 바지락은 0%, 굴은 15~20%, 동죽은 10%, 피빨고둥은 0%가 검출되었다. 2지역 모두 바지락과 피빨고둥에서는 전혀 검출되지 않은 반면 굴이 23.1%, 동죽이 9.4%가 검출되었다.

한편 2004년 3월 대량폐사가 발생한 인천지역에서 채집한 바지락은 Fig. 14-7과 같이 발과 외투막이 수축되어 있으며, 패각내의 내용물이 건강한 개체에 비해 훨씬 적은 소위 여윈 상태로 내장부의 광택도 건강개체에 비해 약했다.

인천에서 채집한 바지락과 폐사가 발생하지 않은 군산연안에서 채집한 바지락의 아가미 조직의 총균수와 혈림프 중의 *Vibrio*균수 및 조성을 조사한 결과 인천지역에서 채집한 바지락 중 갯펄에 노출된 개체의 조직의 일반세균의 균수는  $2.1 \times 10^2 \sim 8.8 \times 10^4$ 이었으며, 잠입개체는  $1.1 \times 10^5$ 이었고, 대조로 사용한 군산에서 채취한 바지락은  $5.0 \times 10 \sim 3.2 \times 10^5$ 이었다. 한편 혈림프에서 분리한 *Vibrio*균은 미잠입 개체는  $1.3 \times 10^2$ , 잠입개체는  $1.1 \times 10^4$ 이었으며, 군산 바지락

Table 14-2. Size of the specimens used for the detection of *V. tapetis* by PCR

Sampling date	Locality	Species		
		Scientific name	Shell length (mm)	Weight with shell (g)
2004 April 24	Gochang	<i>Ruditapes philippinarum</i>	36.76±1.7	1.73±0.2
		<i>Crassostrea gigas</i> *	109.47±14.8	12.39±1.3
		<i>Macra veneriformis</i>	40.57±3.1	2.31±0.1
		<i>Rapana venosa</i>	50.94±4.1	22.47±0.9
May 1	Taeon	<i>Ruditapes philippinarum</i>	36.31±1.8	1.75±0.2
		<i>Crassostrea gigas</i>	75.50±5.9	8.14±0.8
		<i>Macra veneriformis</i>	39.47±2.5	2.38±0.1
		<i>Rapana venosa</i>	60.62±3.5	23.02±0.7
June 3	Gochang	<i>Ruditapes philippinarum</i>	37.20±3.4	1.71±0.1
		<i>Crassostrea gigas</i>	115.18±8	12.35±1.5
		<i>Macra veneriformis</i>	38.64±2.5	2.31±0.1
		<i>Rapana venosa</i>	49.47±4	22.4±1.1
June 21	Taeon	<i>Ruditapes philippinarum</i>	37.10±1.5	1.84±0.2
		<i>Crassostrea gigas</i>	78.03±3.9	8.35±1
		<i>Macra veneriformis</i>	39.56±2.4	2.4±0.2
		<i>Rapana venosa</i>	58.42±3.7	23.08±0.7
July 12	Gochang	<i>Ruditapes philippinarum</i>	32.68±1.7	1.76±0.2
		<i>Crassostrea gigas</i>	110.17±13.6	12.71±1.4
		<i>Macra veneriformis</i>	34.21±2.2	2.3±0.2
		<i>Rapana venosa</i>	67.33±5.3	23.1±1.2
July 14	Taeon	<i>Ruditapes philippinarum</i>	36.35±2.9	1.83±0.2
		<i>Crassostrea gigas</i>	77.44±6.4	8.26±0.4
		<i>Macra veneriformis</i>	35.72±1.4	2.35±0.1
		<i>Rapana venosa</i>	63.46±5.1	23.12±0.8
July 19	Gochang	<i>Ruditapes philippinarum</i>	36.29±2.2	1.78±0.4
		<i>Crassostrea gigas</i>	106.55±12.5	12.76±1
		<i>Macra veneriformis</i>	37.36±2.2	2.3±0.2
		<i>Rapana venosa</i>	69.01±2	23.29±1.6
July 21	Taeon	<i>Ruditapes philippinarum</i>	37.64±2.4	1.98±0.2
		<i>Crassostrea gigas</i>	76.27±8.5	8.16±1.1
		<i>Macra veneriformis</i>	39.1±1.5	2.44±0.3
		<i>Rapana venosa</i>	83.06±4.3	23.57±1.8

\* Mean±SD of Twenty individuals except 15 individuals of *C. gigas* taken in Apr. 24.

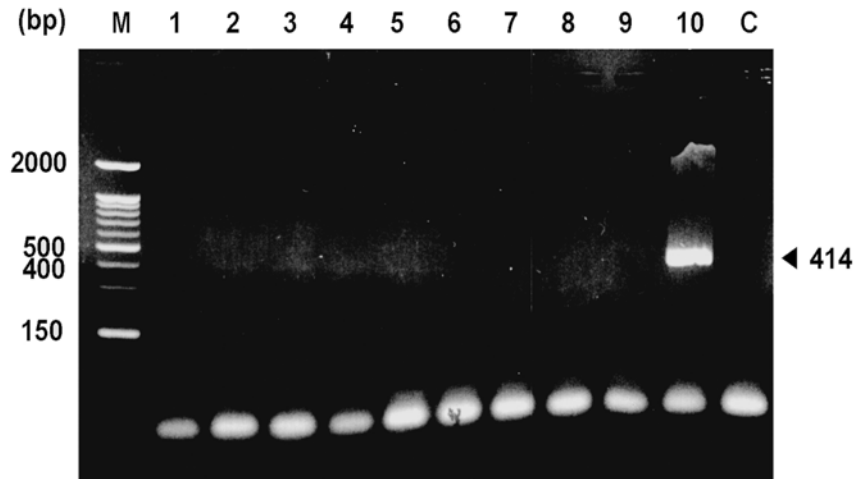


Fig. 14-2. Specificity of PCR products using the primers (VtF and VtR). M, size maker (100-bp ladder) ; C, distilled water (negative control) ; 1. *V. splendidus* biovar I ; 2, *V. splendidus* biovar II ; 3, *V. harveyi* ; 4. *V. campbellii* ; 5. *V. carchariae* ; 6 : *V. anguillarum* ; 7, *V. alginolyticus* ; 8, *V. ordalii*, 9, *V. parahaemolyticus* ; 10, *V. tapetis*

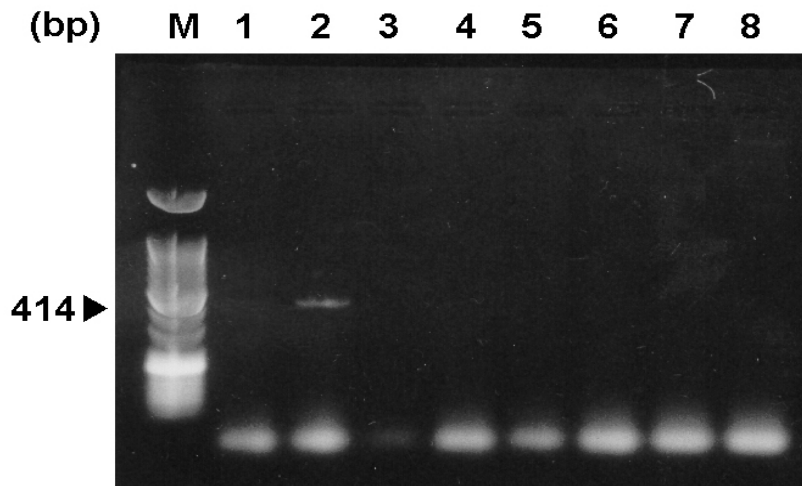


Fig. 14-3. Application of the specific primers (VtF and VtR) for the detection of *V. tapetis* to different tissues of Manila clam experimentally infected with  $10^4$  cells per an individual. Tissues were taken 1 (1 to 4) and 3 days (5 to 8) after the inoculation. M, size maker ; 1 and 5, mantle ; 2 and 6, gill ; 3 and 7 ; intestine ; 4 and 8, adductor muscle.

은 검출되지 않았다. 미잡입 개체의 혈림프에서 분리한 *Vibrio*균은 *V. splendidus* II가 72%, Phenon 10/85가 28%였으며, 잠입 바지락의 경우에는 *V. mediterranei*가 85%, Phenon 10/85가 15%였다. 이들 인천에서 채집한 바지락을 시료로 하여 PCR을 실시한 결과 Fig. 36과 표시한 것처럼 인천에서 채집한 바지락에서 *V. tapetis*는 미잡입개체는 3미 모두, 잠입개체는 4미중에서 1개체만이 확인되었다.



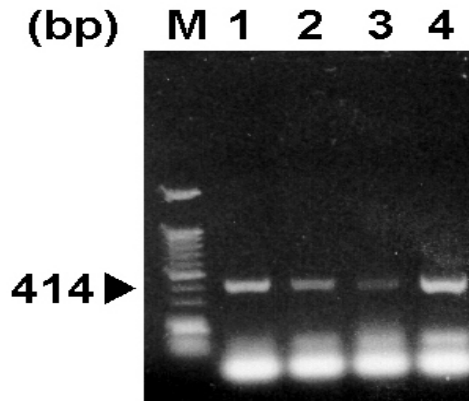


Fig. 14-4. Application of the primers (VtF and VtR) for the detection of *V. tapetis* specific to different tissues Manila clam experimentally infected with  $10^8$  cells per individual. Tissues were taken 5 days after inoculation. M, size maker ; 1, mantle ; 2, gill ; 3 ; intestine ; 4, adductor muscle.

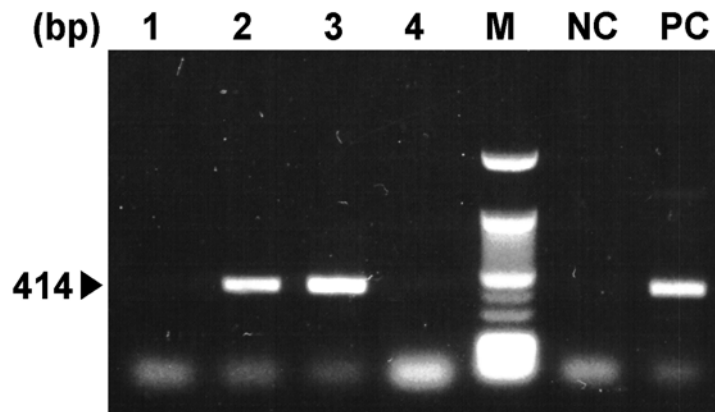


Fig. 14-5. Detection of *V. tapetis* by PCR amplication. The specimens were taken from the costal area of Taean and Gochag. 1, Manila clam (*Ruditapes philiphinarum*) ; 2, surf calm (*Mectra veneriformis*) ; 3, oyster (*Crassostrea gigas*) ; 4, Thomas's rapa whelk (*Rapana venosa*) ; M, size marker ; NC, negative control ; PC, positive control.

본 연구에서 *V. tapetis*의 탐지를 위해 설정한 primer sets와 아가미를 시료로 한 PCR 조건은 *V. tapetis*의 탐지에 효과적임이 판명되었다. 그러나 배양학적인 방법에 의해서는 *V. tapetis*의 존재를 확인하지는 못하였다. Castro et al. (1997)도 스페인 남부에서 Brown ring disease의 증상을 나타내고 있는 바지락에서 배양학적인 방법으로 *V. tapetis*를 분리하지 못하였다. 그 이유로서 바지락에 간접형광항체법으로 탐지가 가능한 균수는 외투액 ml당  $10^3$  cells정도이지만, 이 농도의 균수는 배양학적인 방법으로는 분리 불가능하다고 하였다. 그럼으로 우리나라의 바지락에도 이 균의 존재여부를 확인하기에는 재래적인 방법으로는 불가능함으로 배양전의 증균배양 등의 분리과정의 변형이 필요할 것으로 판단된다.

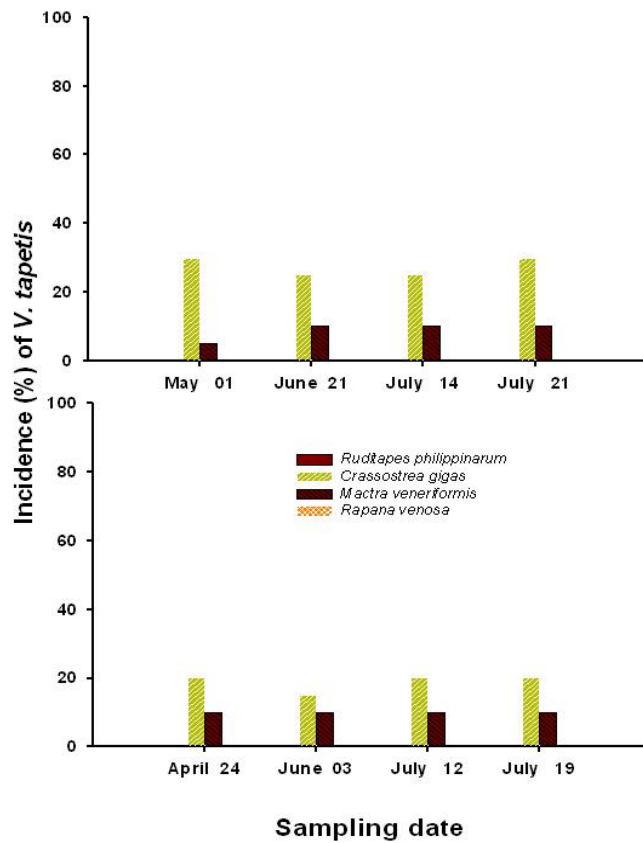


Fig. 14-6. Incidence (%) of *V. tapetis* detected by PCR amplification. The specimens were taken from the coastal area of Taean (upper) and Gochang (lower). Twenty individuals were used each trial.

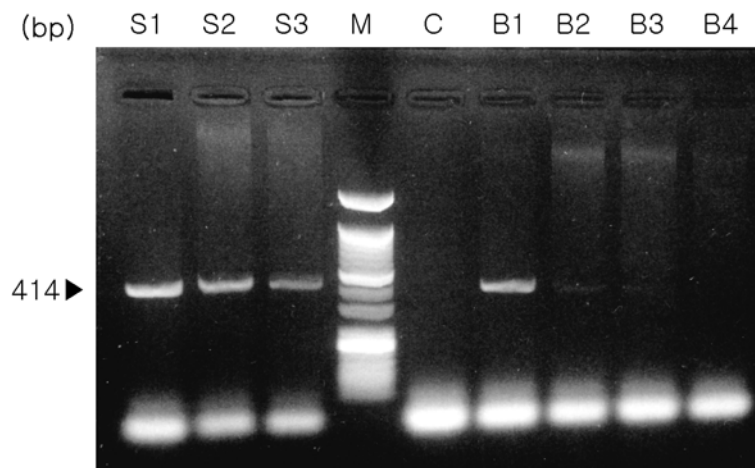


Fig. 14-7. PCR products using the *Vibrio tapetis* specific primers (VtF and VtR) for the detection of *V. tapetis* in the gills of clams. The clams were taken from a farm in Inchon where mass mortality was occurring. S1-S3 ; surfacing calms ; M, size marker ; C, control clam taken from Kunsan ; B1-B4, burrowing clams.

본 연구의 결과를 종합하면 건강한 바지락에서는 *V. tapetis*가 검출되지 않는 반면 폐사지역에서 채취한 바지락에서는 PCR법에 의해서는 검출되지만 일반적인 배양법에 의해서는 배양이 불가능하다는 것이 판명되었다. 또 검출을 위한 조직으로는 아가미가 가장 좋은 것으로 판명되었다. 그럼으로 *V. tapetis*가 바지락의 폐사에는 관계하지만 직접적인 원인일 가능성은 적은 것다는 것을 처음으로 제기하였다. 그러나 우리나라 해역에서의 *V. tapetis*균의 존재와 바지락에의 감염유무를 확인하기 위해서는 증균 배양과 같은 배양학적인 방법의 개량에 의해 균의 존재를 확인과 병원성에 관한 연구를 수행할 필요가 있다고 생각한다.

#### 4. 참고문헌

- Atmar RR, Neill FH, Woodley CM, Nanger R, Fout GS, Burkhardt W, Leja L, McGovern ER (1996) Collaborative evaluation of a method for the detection of Norwalk virus in shellfish tissues by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 254-258
- Arzul I, Renault T, Lipar C, Davison AJ (2001) Evidence for interspecies transmission of oyster herpesvirus in marine bivalves. *J. Gen. Virol.*, 82, 865-870
- Castro D, Luque A, Santamaria JA, Maes P, Marinez-Manzanares E, Borrego JJ (1995) Development of immunological techniques for the detection of the potential causative agent of the brown ring disease. *Aquaculture*, 132, 97-104
- Castro D, Martinez-Manzanares E, Luque A, Fouz B, Morinigo MA, Borrego JJ, Toanzo AE (1992) Characterization of strains related to brown ring disease outbreaks in southwestern Spain. *Dis. Aquat. Org.*, 14, 229-236
- Jensen S, Samuelsen OB, Andersen K, Torkildsen L, Lambert C, Choquet G, Paillard C, Bergh O (2003) Characterization of strains of *Vibrio splendidus* and *V. tapetis* isolated from corkwing wrasse *Symphodus melops* suffering vibriosis. *Dis. Aquat. Org.* 53, 25-31
- Itoh N, Tun KL, Komiyama H, Ueki N, Ogawa K (2004) An ovarian infection in the Iwagaki oyster, *Crassostrea nippona*, with the protozoan parasites *Martelliodes chungmuensis*. *J. Fish Dis.*, 27, 311-314
- Kellner-Cousin K, Gall GI L, Despres B, Kaghad M, Legoux P, Shire D (1993) Genomic DNA cloning of rickettsia-like organisms (RLO) of Saint-Jacques scallop *Pecten maximus* : evaluation of prokaryote diagnosis by hybridization with a non-isotopically labelled probe and by polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org.*, 15, 145-152
- Le Roux F, Audemard C, Barnaud A, Berthe F (1999) DNA probes as potential tools for the detection of *Marteilia refringens*. *Mar. Biotechnol.*, 1, 588-597
- Lipart C, Renault T (2002) Herps-like virus detection in infected *Crassostrea gigas* spat using DIG-labelled probes. *J. Virol. Method.* 101, 1-10

- Noel T, Nicolas JL, Boulo V, Mialhe E, Proch P (1996) Development of a colony-blot ELISA assay using monoclonal antibodies to identify *Vibrio* P1 responsible for "brown ring disease" in the clam *Tapes philippinarum*. *Aquaculture*, 146, 171-178
- Novoa B, Ordas MC, Figueras A (2002) Hypernospores detected by RFTM in clam (*Ruditapes decussatus*) tissues belong to two different protozoan organisms, *Perkinsus atlanticus* and *Perkinsus*-like organism. *Aquaculture*. 209, 11-18
- Renault T, Le Deuff RM, Lipart C, Delsert C (2000) Development of a PCR procedure for the detection of a herpes-like virus infecting oysters in France. *J. Virol. Method.*, 88, 41-50
- Stokes NA, Siddall ME, Burreson EM (1995) Detection of *Haplosporidium nelsoni* (Halposporidia : Haplosporidiidae) in oysters by PCR amplification. *Dis. Aquat. Org.*, 23, 145-152

## 제 15 절 패류양식장 소독 처리 지침

### 1. 개요

- 1-1. 소독처리방법: 소독처리대상(물질 혹은 장소)의 크기, 유형 및 성상에 따라 선택
- 1-2. 소독대상: 사람 피부, 수정란 표면, 옷, 그물, 플라스틱, 시멘트
- 1-3. 주의사항: 사람의 피부나 눈에 위험한 소독물질이 접촉되지 않도록 방수옷, 장화, 보안경 및 모자를 착용하고, 호흡기를 보호하기 위해 마스크를 착용하여야 함. 또한 소독제를 보관할 경우 사람/동물에 위해가 되지 않도록 주의해야 함.

### 2. 소독처리방법

- 2-1. 유입수: 1.0 및 0.22  $\mu\text{m}$  여과 혹은 화학적 처리
- 2-2. 시설물 소독(순환여과식 양식장): 패류 보호
- 2-3. 배출수 처리: 환경 보호

### 3. 소독제

#### 3-1. 파이프라인 및 탱크

파이프라인과 탱크의 일상적인 소독은 매우 중요하다. 소독의빈도는 양식 패류의 이동에 따라 달라진다. 고밀도 패류는 소독된 탱크로 주기적으로 순환시켜야 하며, 오존이나 염소로 처리하여 소독한 후 중화시킨 사육수로 교체해 주어야 한다. 양식장으로 새로 들여온 패류는 완전히 소독된 탱크에 넣어야 한다.

소독대상의 유기물량은 대부분 소독제의 소독성능을 저하시키기 때문에 유입수의 여과는 매우 중요하다. 아울러, 소독하고자 하는 대상의 표면은 소독하기 전에 매우 깨끗이 씻어야 한다. 세척제는 소독제와 친화성이 있어야 하며, 두가지 모두 표면에 친화성이 있어야 한다(예를 들면, 요오드용액은 산성을 띄기 때문에 알칼리성의 콘크리트에는 사용할 수 없음). 세척시 발생하는 세척수는 배수되기전에 소독하여야 한다. 표면의 완전한 범위를 고압분사나 세척제를 사용하여 세척한다. 소독제를 사용할 때 보호복의 착용이 필요하다.

규칙적인 파이프라인(매일), 탱크 및 기타 시설(예: 먹이 생물 배양기구)의 표면 소독처리와 아울러 공기 혹은 가열건조는 매우 바람직하다(특히 질병 발생시).

- 3-1-1. 염소는 주로 Sodium hypochlorite(Chlorox, 가정용 염소표백제등)가 주로 사용된다. 50 mg/l 염소(50 ppm)를 모든 파이프라인에 가득 채운다. 이 소독은 미생물이나 라비린

톨루이드(전복 기생충)에 대해 효과적이다. 최소한 30분간 방치한 후 소독제를 제거하고, 깨끗한 해수로 씻어준다. 염소 소독제는 배수하기 전에 중화시켜야 한다. 중화방법은 활성탄을 통과시켜 과다한 염소와 chloramine를 제거하여 할 수 있다. Sodium thiosulfate와 같은 중화제나 폭기를 통하여 중화할 수도 있다(chloramine은 제거되지 않음).

3-1-2. 요오드는 일반적으로 200~250 mg/l(200~250 ppm)의 농도로 사용되는 알칼리성 용액으로 노출시간은 최소한 10분이다.

참고사항: 1000 mg/l의 농도의 요오드(iodophore)는 Labyrinthuloides haliotidis에 효과가 없는 것으로 알려져 있다. 요오드는 탱크와 파이프라인을 완전히 건조시킨 후 사용하는 것이 훨씬 효과적인 것으로 나타났다.

### 3-2. 배출수

3-2-1. 오존은 양식장 배출수의 미생물 함량 조절에 성공적으로 사용되고 있다. 오존과 해수의 상호작용에 의한 잔류성분(잔류 산화물)이 0.08~1.0 mg/l일 경우 살아있는 미생물(기본적으로 세균)을 감소시키기 충분한 것으로 간주되고 있다.

참고사항: 해수에서의 잔류성분을 측정하는 것은 해수에서 산화물이 연속적으로 형성되기 때문에 곤란하다. 오존과 해수간에 형성되는 산화물(hypobromite, bromine 혹은 hypobromous acid)는 굴의 유생에 독성이 있으며(다른 패류의 유생에 대해서도 가능성이 있음), 패류 양식장에서 배출되기 전에 활성탄에 통과시켜 제거하여야 한다. 오존처리 후 해수에 자외선을 조사하면 완벽한 멸균을 위해 필요하다(검역시설).

3-2-2. 25 mg/l 염소 농도로 sodium hypochlorite를 해수에 처리하는 것은 원생동물성 기생충의 구제에 적합하다(예: 라비린톨루이드). 하지만 50 mg/l의 염소 농도는 완전한 미생물 멸균에 적용된다. 보다 높은 염소 농도는 검역에 사용될 수 있다. 이러한 경우 적합한 중화 처리와 독성 가스 배출시설이 요구된다.

3-2-3. 요오드의 경우 위의 원생동물성 기생충의 구제 방법에 효과적이지 못하다.

### 3-3. 의복과 시설

소독하기 전에 세척제와 소독제로 표면을 깨끗이 씻어야 한다.

3-3-1. 요오드용액(예: Betadine) 200~250 mg/l의 농도로 신발-소독조를 설치한다.

3-3-2. 염소(가정용 표백제를 50 mg/l 농도로 사용)를 신발-소독조와 시설(또는 기구) 세척에 사용한다.

3-3-3. Sodium hydroxide(1% NaOH+0.1% Teepol 혹은 기타 세척제)가 고무로 된 장화의 footbath에 효과적임(구두나 일반 신발은 절대 사용할 수 없음).

### 3-4. 주의사항

- 3-4-1. 염소와 오존은 해수에서 장기간 지속되는 잔류 산화물을 생산한다. 염분도 35 ppt의 해수는 60 ppm의 bromide 이온을 가지고 있으며, 이 이온이 오존에 의해 hypobromite를 생성한다. 동일한 염분도를 가진 인공해수는 bromine과 hypobromous acid를 생성한다. 이러한 잔류 산화물들이 굴의 유생(다른 패류의 유생)에 독성을 나타내기 때문에 살아있는 유생에 적용하기 전에 활성탄을 통과시키는 것이 필수적이다. 요오드를 사용할 경우 sodium(potassium) thiosulfate를 처리하여 중화하여야 한다(중화방법 참조).
- 3-4-2. 잔류 산화물의 모니터링을 규칙적으로 이루어져야 하며 특히수온의 편차가 높을 시에 주의해야 한다. 해수에서 잔류 오존을 측정할 수 없기 때문에 feedback loop와 같은 대안적인 모니터링 방법이 설치되어야 한다. 소모시스템밀폐 공간 내에서 소독 중에 발생하는 독성 가스를 제거하기 위해 설치되어야 한다. 가스의 배출 시에는 배출가스 규정에 따라야 한다.
- 3-4-3. 패류 종묘 배양장과 양식장에서 조건성 병원균의 증식을 감소시키기위해 다음과 같은 방법이 유용하게 사용될 수 있다.
- ① 먹이생물 배양시 병원균 유입 차단
  - ② 적절한 사육수 여과, 탱크와 파이프 및 기구의 규칙적인 소독, footbath의 소독액 교환
  - ③ 감염된 개체와 오염된 기구를 초기감염시기에 발견하여 확산을 차단
  - ④ 감염 개체를 적절한 방법으로 폐기하고, 기구를 멸균
  - ⑤ 2차적인 감염이 되지 않도록 양식장내의 감염 원인을 분석(먹이생물, 유입수 장치, 양식 생물)

## 4. 요오드 소독 방법

요오드용액내의 iodophor가 소독 효과를 나타내기 때문에 pH가 매우 중요하다. pH6 이하에서는 수정란에 독성이 강하며, pH8 이상에서는 소독효과가 떨어진다. 따라서 소독용 요오드용액은 pH6-8사이에 있어야 한다. 소독용 요오드용액의 pH가 6이하인 경우 pH를 조정하기 위해서 100 mg/l  $\text{Na}_2\text{HCO}_3$ 를 첨가하여 조정할 수 있다.

수정란을 요오드용액으로 소독할 경우 반드시 깨끗한 물로 세정하여 유기물을 제거한 후 소독하여야 소독효과를 높일 수 있다.

요오드소독약을 사용 중에 소독약의 색깔이 연노랑으로 바뀌면 반드시 요오드용액을 교체하여야 한다.

패류의 수정란을 요오드용액으로 소독할 경우 각 패류 품종에 따른 요오드의 독성을 염두에 두어야 하기 때문에 반드시 예비시험을 거친 후 사용하여야 한다.

## 제 16 절 패류 질병 진단 지침서

### 1. 개요

양식패류의 심각한 질병을 유발하는 것으로 알려진 많은 질병들 중에서 국제수역사무국에서 지정한 Notifiable disease to OIE(OIE에 보고해야할 질병)는 Bonamiosis(보나미아 감염증), Haplosporidiosis(하프로스포리디움 감염증), Mikrocytosis(마이크로사이토스 감염증), Marteiliosis(마텔리아 감염증)과 Perkinsiosis(퍼킨수스 감염증)은 매우 심각한 패류의 전염병으로 분류되어 있으며, 이들 질병으로 인해 많은 피해가 발생된 바 있어 세계 각국은 자국으로 유입되는 것을 막기 위하여 많은 노력을 경주하고 있다. 지난 3년간의 본 연구 결과 다행스럽게도 우리나라에는 바지락에 감염된 *Perkinsus atlanticus*를 제외한 다른 질병은 감염되지 않은 것으로 나타났다. 이러한 질병들이 우리나라로 유입되면 패류양식이 매우 중요한 우리나라의 입장에서는 많은 경제적인 피해가 불가피하게 되므로 모든 수단을 강구하여 이들 질병의 국내 유입을 막는 것이 필요하다. 따라서 본 연구 결과를 바탕으로 국제수역사무국에서 지정한 Notifiable disease to OIE(OIE에 보고해야할 질병)에 대한 표준질병진단지침서를 작성하여 외국으로부터 국내로 유입되는 패류의 질병검사의 표준을 제시하고자 한다.

### 2. *Bonamia ostreae* 감염증

#### 2-1. 원인체

보나미아감염증은 북반구에서 발생하고 있는 *Bonamia ostreae*와 남반구에서 *Bonamia* sp.의 감염에 의해 발생한 굴의 질병만 다룬다. 알려진 *Bonamia* spp. 범위 외의 것을 검출했다면, 동정을 위해서는 전자현미경적 또는 분자생물학적 방법을 동원하여 다른 microcell species(즉, *Midrocytos mackini* & *M. roughleyi*)와 구별하여야 한다. 어떤 이때때에서든지 이들 병원체가 심각한 것으로 사료되면 국제수역사무국의 표준연구실(OIE Reference Laboratory)과 상의해야 한다.

Bonamiosis의 원인충은 *Bonamia ostreae*와 *Bonamia* sp.로 분류학적 관계는 불분명하다. 그러나 두 종간에는 핵심 세포 기관에서의 명확한 차이가 있는데, *Bonamia* sp.는 명확하게 *Bonamia ostreae*와 구별된다. 또한 Bonamiosis는 microcell disease, 즉 넓적굴의 hemocyte disease(*B. ostreae*) 또는 해저굴의 hemocyte disease(*Bonamia* sp.)로 알려져 있다.

#### 2-2. 숙주 및 숙주에 대한 영향

*Bonamia ostreae*는 원래 넓적굴(*O. edulis*)과 *O. conchaphila*(=*O. lurida*)에 발생하나 *O.*



*puelchana*, *O. angasi*와 *Tiostrea chilensis*(=*T. lutaria*)에도 감염된다. *Bonamia* sp.는 보통 *O. angasi*와 *O. denselammellosa*와 *T. chilensis*에서 발생한다. *Ostrea*와 *Tiostrea*의 모든 종 및 다른 굴류(*Crassostrea rivularis* = *C. arakensis*)에도 감수성이 있을 수 있다.

Bonamiosis는 넓적굴의 hemocyte에 치명적 감염을 유발하며 때로 황색조로 변색과 아가미 및 맨틀에 광범위한 병소를 동반하기도 한다. 그러나 감염된 굴의 대부분은 정상적인 외관을 나타낸다. 병소는 아가미 결합조직과 맨틀, 소화선에서 형성된다. 이들 hemocyte 내의 원충들이 신속하게 압도적인 수로 전신적 감염이 되고 이는 폐사와 동시에 일어난다. 감수성이 높은 숙주에서 bonamiosis는 hemocyte에 치명적 감염이 발생한다. *Bonamia* spp. 에 의한 병리가 숙주의 종류이나 감염된 군집에 따라 다를 수도 있다. 예를 들면 Tasmania의 굴에서 *Bonamia* sp. 감염의 경우 상당한 상피 증생을 나타내고 전신 감염이 없는 군집에서는 국소적 농양소를 형성한다.

감염은 연중 발생하지만 유행 정도나 감염 강도는 고수온기에 더 높은 경향이 있다. 북반구에서는 9월에 *B. ostreae* 감염이 가장 유행한다. *Bonamia* sp.는 1월에서 4월에 가장 유행하고 9월과 10월에는 거의 검출되지 않는다. *B. ostreae*와 *Bonamia* sp.의 감염기간은 5달 정도이다.

Bonamiosis는 실험적 접종이나 침지 감염 방법으로는 감염이 발생하지 않는다.

감수성 기관의 염색 조직 절편이나 조직 압평 검사가 스크리닝 방법으로 적당하다. 그러나 최초 감염 5개월 동안에는 일반적 방법으로는 검출되지 않는다.

## 2-3. 지정학적 분포

*Bonamia* sp.의 지정학적으로 호주(Western Australia, Victoria와 Tasmania)와 뉴질랜드(South Island 근처와 North Island 아래)에 분포한다. *Bonamia ostreae*는 덴마크, 프랑스, 이탈리아, 네덜란드, 스페인, 영국(스코틀랜드 제외), 미국(캘리포니아, 메인 및 워싱턴 주)에서 보고되었다.

## 2-4. 진단

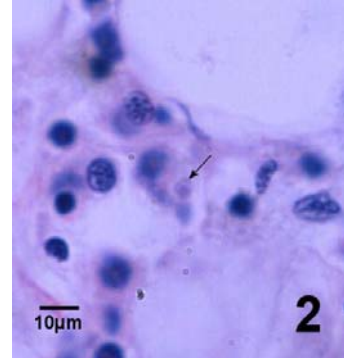
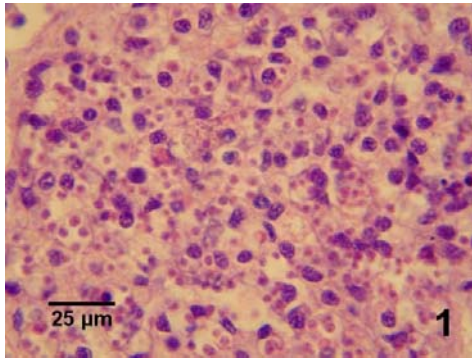
### 2-4-1. 스크리닝 방법

#### 2-4-1-1. 조직학적 방법

연조직을 등에서 배쪽으로 횡단하여 두껍게 자른 후 즉시 고정액(Davidson's sol.)에 고정하거나 크기가 작을 경우 패각만 제거한 후 나머지를 고정한다.

HE 염색과 같은 비특이적 염색으로 *Bonamia*를 관찰 할 수 있다. 위심강과 아가미를 지나는 2장의 조직 절편을 제작한다. 연속 절편 제작은 필요 없다.

hemocytes 안이나 결합조직 또는 아가미, 장관 또는 맨틀 상피에 2~5  $\mu\text{m}$  크기의 기생충을 관찰한다. 그러나 오진을 피하기 위해서는 hemocytes 내에 있는 기생충이 검출되어야 한다.



#### 2-4-1-2. 조직도말염색법

굴의 생식소 또는 심장 조직을 슬라이드 위에 압평하여 도말한다. 압평 슬라이드는 건조 후 메탄올에 고정한다. 일반 혈구 염색 kit로 염색한 후 수돗물로 행구어 낸 후 차거나 따뜻한 곳에서 완전히 건조시키고 커버글라스로 봉입한다.

세포질은 호염성, 핵은 호산성으로 나타나는 2~5  $\mu\text{m}$  크기의 기생충이 hemocytes 내외에서 관찰된다. Immersion oil하에서 800~1000배의 배율로 관찰시간은 슬라이당 10분이면 충분하다. 조직표본에 비해 이 방법으로 관찰 시에 더 크게 관찰된다.

#### 2-4-2. 잠정진단법

앞서 기술한 세포수준의 검사가 사용된다.

#### 2-4-3. 확정진단법

##### 2-4-3-1. 전자현미경검사법

*Bonamia* sp. 와 *Bonamia ostreae*의 형태적인 차이점(haplosporosome과 large globules의 수, mitochondria의 형태와 핵과 세포질의 비율)이 있다. *Bonamia* sp.의 plasmodia의 형태는 그 크기(4.0~4.5  $\mu\text{m}$ ), 불규칙한 세포 및 핵의 윤곽, 무형질의 세포질 포함물(multi-vesicular bodies)와 Golgi 모양의 sER의 배열에서 구별된다. Intermediate form이 plasmodial form 보다 세포질의 전자 밀도가 더 높고, 크기도 3.0~3.5  $\mu\text{m}$ 로 다소 작다. Golgi와 핵물질 복합체에서 형성된 haplosporosomes은 어떤 바이러스와 구성이나 구조 측면에서 유사하다.

### 3. *Haplosporidium nelsoni* 감염증

#### 3-1. 원인체

Haplosporidiosis의 원인충으로 phylum Haplosporidia의 *Haplosporidium nelsoni*(=*Minchinia nelsoni*)와 *H. costale*(=*Minchinia costalis*) 2종만 언급한다. 일반적으로 *Haplosporidium*

*nelsoni*는 MSX(multinucleate sphere X)로 마찬가지로 *H. costale*는 SSO(seaside organism)으로 알려져 있다.

### 3-2. 숙주 및 숙주에 대한 영향

버지니아굴(*Crassostrea virginica*)는 *H. nelsoni*와 *H. costale* 모두에 감수성이 있고, *H. nelsoni*는 참굴(*Crassostrea gigas*)에도 감수성이 있다.

*H. nelsoni*는 hemocytes, 결합조직, 소화선 상피에 감염된다. 감염시에 또한 아가미와 맨틀의 적갈색으로 변색되기도 한다. 굴 유생에는 *H. nelsoni*의 sporulation, 성패에는 spradic이 유력하다. MSX의 포자는 digestive tubules의 상피세포에 SSO의 포자는 결합조직에서 발생한다. 여름철에 *H. nelsoni*에 감염되면 digestive tubule의 상피의 점진적인 파손을 유발한다. 이와는 달리 *H. costale*는 결합조직에서의 포자 형성이 없고, sporulation시에도 현저한 계절적인 폐사가 발생하지는 않는다. 북반구에서 5월 중순과 10월 말경 사이에 *H. nelsoni* 감염이 발생하였다. 폐사는 초봄에 시작하였지만 새로 감염되거나 재감염으로 인한 폐사는 여름과 9월 가을에 최고치로 나타났다. MSX는 15 ppt이상의 염분농도로 제한되는데, 20 ppt에서 빠르고 높은 폐사율이 나타난다. 수온이 20°C 이상일 때에 질병이 사라지는 것으로 나타났다. 20°C에서 10 ppt의 염분농도로 2주간 유지하면 기생충을 사멸시킬 수 있으나 참굴에서는 그렇지 않다. *H. costale*는 5월과 6월 사이에 폐사가 발생한다.

실험실 조건 하에서 인위적으로 감염시키는 것은 불가능하다. *Haplosporidium* spp.의 생활사는 알려져 있지 않지만, 중간 숙주로 여겨진다.

### 3-3. 지정학적 분포

지정학적으로 *H. nelsoni*는 north Florida에서 Massachusetts와 미국 메인주에 위치한다. 풍토지역(enzootic area)으로는 Delaware Bay, Chesapeake Bay, Long Island와 Cape Cod에 국한된다. 또한 미국의 캘리포니아와 워싱턴의 참굴에서도 보고되고 있다. *H. costale*는 Long Island Sound와 미국의 뉴욕에서 Cape Charles, 버지니아에서 보고되었다.

### 3-4. 진단

#### 3-4-1. 스크리닝 방법

##### 3-4-1-1. 조직학적 방법

좌우 수직면을 따라 내장 덩어리를 절취하여 Davidson's 또는 Carson's(필요시 전자현미경 샘플을 위해) 고정액에 고정한다. 고정 비율은 고정액 10에 조직 1이상을 넘기지 않는다.

조직편을 통상적인 조직 처리 과정에 따라 처리한다. Haplosporidia가 HE 염색과 같은 비특

이적 염색으로 관찰된다. Modified Ziehl-Neelsen carbol fuschin technique시에 *H. costale*의 plasmodia와 포자 내에서 광택의 적색 sporoplasm을 확인한다. 각 굴로부터 다른 2 장의 절편을 준비하여 검사한다.

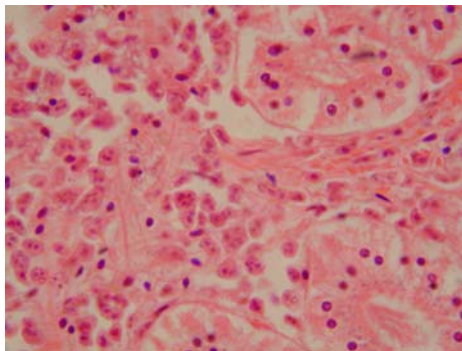
여러 단계의 기생충이 아가미, 촉수, 결합조직과 소화선 상피에서 관찰된다. MSX의 포자는 digestive tubules의 상피세포에서 관찰된다. SSO의 포자는 결합조직에서 관찰된다.

*H. nelsoni*의 multinucleate plasmodia(직경 4~30  $\mu\text{m}$ )는 결합조직 전반에 걸쳐 관찰된다. Plasmodia는 5월 중순에서 10월에 검출된다. Sporogonic stage(sporocysts 직경 20~50  $\mu\text{m}$ )와 포자(4~6  $\mu\text{m}$ ×5~8  $\mu\text{m}$ )는 소화선의 상피에 국한되어 나타난다. Sporocysts는 소화 상피세포를 파괴하고 발달 중인 또는 성숙 포자를 소화선의 내강으로 방출한다. 포자는 유생에 독성을 가지나 성패에서는 드물다.

참굴에서 sporogonic stage와 포자는 소화선의 상피에 국한되지만 다른 조직에서도 또한 발생한다. 감염이 만성화되면 Plasmodia 집합소 주위로 hemocyte의 침윤과 숙주 세포의 괴사가 일어난다.

소화선의 결합조직, 맨틀, 생식소에서 *H. costale*의 sporulation이 관찰되지만, 소화선 상피에서는 관찰되지 않는다. Plasmodia는 3월과 6월 사이에 쉽게 검출된다. 직경 3  $\mu\text{m}$ 의 포자가 패각을 벌리고 있는 빈사개체의 굴에서 쉽게 발견된다. 이 층은 7월과 3월 사이에는 쉽게 검출되지 않는다.

*H. costale*의 모든 단계는 그 크기가 *H. nelsoni*의 반 정도이고 포자는 digestive tubule에서는 관찰되지 않는다.



### 3-4-2. 잠정진단법

#### 3-4-2-1. 조직도말염색법

굴 유생에서 *H. nelsoni*의 sporulation이 일어나기 때문에 검사대상으로서 굴 유생이 적합하다. 좌우 수직면을 따라 소화선과 아가미를 절취해서 여과지에서 여분의 수분을 제거한다. 소화

선, 아가미, 맨틀의 절취면이 슬라이드 글라스의 바닥에 향하도록 압평한다. 공기 건조 후 2~3분간 메탄올에 고정한다.

슬라이드는 시판 혈구 염색 kit로 염색한 후 봉입한다.

Plasmodium stages(MSX: 4~30  $\mu\text{m}$  & SSO : 2~15  $\mu\text{m}$ )는 호염성의 세포질과 다수의 호산성의 핵을 가진다. 이 단계는 아가미와 측수, 결합조직에서 발생하고, *H. nelsoni*는 소화선의 상피에서 발생한다.

### 3-4-3. 확정진단법

#### 3-4-3-1. In situ hybridisation examination of *Haplosporoidum nelsoni*

최근에 in situ hybridisation *H. nelsoni*와 *H. costale*의 분자생물학적 동정을 위해 개발되었다. 이 기술은 훈련 및 특별한 장치가 필요하며 가능한 연구소도 일부에 불과하다. 그러나 in situ hybridisation은 종 동정의 어려움을 해결할 수 있고 몇 년 후에는 많은 연구소에도 적용할 수 있을 것이다. *H. nelsoni*의 경우 subunit rRNA gene이 염기서열이 분석되었고 specific probe도 설계되었다.

in situ hybridisation의 과정은 아래와 같다. 과정에는 Positive와 negative controls도 포함되어야 한다.

- i) 좌우 수직면을 따라 내부 내장을 절취하고 Davidson's 용액(glycerin 10%, formalin 20%, 95% ethanol 30%, dH<sub>2</sub>O 30%, glacial acetic acid 10%)에 24시간 이상 고정한다. 고정 비율은 고정액 10에 조직 1이상을 넘기지 않는다.
- ii) 조직편을 통상적인 조직 처리 과정에 따라 처리한다. 조직 절편의 두께는 6 $\mu\text{m}$ 의 두께로 제작하여 3-aminopropytriethoxylane-coated slides에 부착한다. 처리가 끝난 조직 절편은 40°C의 신전기에서 하루동안 완전히 녹여 부착시킨다.
- iii) 슬라이드 조직 절편을 xylene이나 다른 독성이 덜한 용매에 10분 동안 담가 두어 탈과라핀 시킨다. 이 과정은 한번 더 반복 후에 100% 에탄올로 용매를 완전히 제거하고 다시 순차계 에탄올로 다시 수화시킨다. 그런 후에 절편 조직을 PBS로 헹구어 낸다.
- iv) Proteinase K(100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PBS)로 처리하여 37°C에서 15분간 반응시킨다. 재반응을 중지시키기 위해 0.2% glycerine PBS에 5분간 헹구어 낸다. 그런 다음 슬라이드 조직 절편을 2 $\times$ SSC(standard saline citrate)에 둔다.
- v) 조직 절편 슬라이드를 습윤 상자에서 42°C, 1시간동안 prehybridisation solution(4 $\times$ SSC 300  $\mu\text{l}$ , 50% formamide, 5 $\times$ Denhardt's sol., 0.5 mg/ml yeast rRNA, 0.5 mg/ml denatured herring sperm DNA)과 반응시킨다.
- vi) Prehybridisation sol.을 2 ng/ $\mu\text{l}$  digoxigenin-labelled oligonucleotide probe prehybrid-

- disation buffer로 교체한다. MSX1347 probe의 염기서열은 5'-ATG-TGT-TGG-TGA-CGC-TAA-CCG-3'이다. 슬라이드를 in situ hybridisation plastic cover slip을 덮고 heating block에서 90°C에서 12분간 둔다. 습윤 상자에서 42°C, overnight hybridisation 시키기 전에 슬라이드를 얼음 위에서 1분간 식혀준다.
- vii) 슬라이드를 2×SSC로 실온에서 5분간 1×SSC로 실온 5분간 2번, 0.5×SSC로 42°C에서 10분간 2번 행구어 준다. 그리고 나서 buffer 1(100 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl)에 둔다.
- viii) 0.3% Triton X-100과 2% sheep serum Buffer를 첨가시킨 buffer 1, 250  $\mu$ l로 반응을 중지시킨다. Antidigoxigenin-alkaline phosphatase conjugate는 제조사의 추천에 따라 0.3% Triton X-100과 1% sheep serum을 첨가한 buffer 1에 희석한다. 슬라이드 조직 절편을 습윤 상자에서 실온으로 3시간 반응시킨다.
- ix) 슬라이드는 buffer 1에서 5분간, buffer 2(100 mM Tris, pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>)에서 5분간 2번 행구어 낸다. 그런 다음 슬라이드를 color development solution +240  $\mu$ g levamisole 로 덮은 후 습윤 상자를 암소에서 2시간 동안 둔다. TE buffer (Tris, EDTA[ethylene diamine tetra-acetic acid])로 발색을 중지시킨다.
- x) 슬라이드를 dH<sub>2</sub>O로 행구어 낸다. 슬라이드 절편을 대조 염색하고 합성수지로 봉입한다. 총의 세포에 라벨 유무로 *H. nelsoni*를 검증한다.

## 4. *Marteilia refrigence* 감염증

### 4-1. 원인체

Marteiliosis의 원인충은 *Marteilia* 속의 *M. refrigens* 와 *M. sydneyi*에 대해 언급한다. Marteiliosis는 또한 *M. refrigens*에 의한 Aber disease, *M. sydneyi*에 의한 QX disease로 알려져 있다. 미국의 플로리다에서 또 다른 *Marteilia* 감염이 가리비(*Argopecten gibbus*)에서 알려져 있는데 종까지 동정은 되지 않았다.

### 4-2. 숙주 및 숙주에 대한 영향

*M. refrigens*는 유럽산 넓적굴(*Ostrea edulis*)에 치명적인 기생충이며, *M. sydneyi*는 시드니굴(*Saccostrea commercialis*)과 가시굴(*Saccostrea echinata*)에 영향을 끼친다.

그 외에 프랑스, 이탈리아 및 스페인에서 홍합(*Mytilus galloprovincialis*)과 진주담치(*Mytilus edulis*)의 *Marteilia maurini* 감염이 보고되어있다. *M. maurini*는 *M. refrigens*와의 구별이 쉽지 않기 때문에 명확한 2종과의 분류학적 타당성이 의문시된다. 페르시아 만에서 봄베이 굴(*Saccostrea cucullata*)의 *Marteila lenghi*, 프랑스 Scrobicularia plana에서의 *Marteila chri-*

*stensenii*는 sproangia의 세포질내 포함물과 포자의 형태적인 특징에서 다른 종과는 명확하게 구별된다. *Tiostrea chilensis*, *Ostrea angasi*, *O. puelchana*, *Cerastoderma(=Cardium) edule*, 진주담치(*Mytilus edulis*), *Mytilus galloprovincialis*, 참굴(*Crassostrea gigas*)와 버지니아굴(*C. virginica*)에서 *Marteilia* spp. 또한 보고되고 있다.

*Marteila refrigens*는 주로 소화선에서 발병하여 쇠약, 저장 glycogen 소실, 소화선의 퇴색, 성장 장애와 폐사와 같은 증상과 관련된다. 초기 단계에서는 촉수, 위장, digestive duct와 아가미 상피에서 발생한다. 마찬가지로 *M. sydneyi*에 감염된 굴에서도 완전한 resorbed gonad와 같은 약한 상태가 된다. *M. sydneyi*가 대항 감염되면 소화선 상피가 완전히 파괴된다. 초기 감염 후 60일 이내에 기아로 인해 폐사에 이르게 된다.

유럽산 넓적굴에서 *M. regregens*의 감염은 수온이 17°C 이상인 봄과 여름에 한정된다. *M. sydneyi*는 여름과 이른 가을에 감염된다. 그러나 질병은 계절과는 무관하게 진행되며 폐사율이 높고, 포자는 연중 관찰된다. 고염분은 *Marteilia* spp.의 성장을 억제한다. 감염의 형태나 숙주 밖에서의 생활사는 알려져 있지 않다. 실험실에서의 인위 감염이 불가능하기 때문에 중간 숙주로 여겨진다.

#### 4-3. 지정학적 분포

지정학적으로 *Marteilia refrigens*는 프랑스, 그리스, 이탈리아, 모로코, 포르투갈 및 스페인에, *Marteila sydneyi*는 New South Walse, Queensland 와 Western Australia에 분포한다.

#### 4-4. 진단

##### 4-4-1. 스크리닝 방법

##### 4-4-1-1. 조직학적 방법

조직 검사를 위해 소화선을 절취하여 Davidson's 또는 Carson's(필요시 전자현미경 샘플을 위해) 고정액에 고정한다. 고정 비율은 고정액 10에 조직 1 이상을 초과하지 않는다.

조직편은 통상적인 조직 처리 과정에 따라 처리한다. *M. regregens* 관찰을 위해 HE, Millot's trichrome과 같은 비특이적인 염색을 실시한다. 절편조직은 여분을 두어 기생충 관찰을 높일 수 있는 다른 염색방법을 실시한다. 굴 샘플 당 2장 정도의 절편이 필요하다.

*Marteilia*의 초기 단계에서는 위, 장관, digestive duct의 상피에서 관찰된다. 더 발달 단계는 digestive tubule의 상피에서 관찰된다. Free sporangia 또한 장의 lumen에서 관찰된다. Sporulation 기간동안 다른 원생동물과 *Marteila* spp.를 구별 가능한 유일한 특징인 세포내에서 딸세포로 분열하는 양상이 확인된다.

#### 4-4-2. 잠정진단법

##### 4-4-2-1. 조직도말염색법

소화선을 절취한 샘플을 여과지로 여분의 물기를 제거 후에 슬라이드에 압평한다. 슬라이드는 공기 건조 후에 메탄올에 2~3분간 고정한다.

샘플은 일반 시판용 혈구 염색 kit로 염색 한 후 수돗물로 씻고 완전히 건조 후 봉입한다.

기생충의 크기는 초기 단계에는 5~8  $\mu\text{m}$ 로 sporulation 시에는 40  $\mu\text{m}$ 에 까지 이른다 세포질은 호염성, 핵은 호산성을 띤다. Secondary cell 또는 sporoblasts는 bright halo(색이 아주 옅음)로 둘러싸여 있다. 관찰시간은 슬라이드 당 10분이면 충분하다.

#### 4-4-3. 확정진단법

##### 4-4-3-1. 투과전자현미경 검사

*Marteila sydneyi*는 plasmodia의 striated inclusion이 없고, 각 plasmodium은 sporangial primordia가 8~16개, 각 sporangium에는 포자가 2~3개있고 성숙한 포자를 둘러싸는 concentric membrane에 heavy layer가 있다. 반면 *M. refrigens*는 각 plasmodium에 8개의 sporangial primordia가 있으며 각 sporangium에는 4개 이상의 포자가 있다.

### 5. *Microcytos mackini* 감염증

#### 5-1. 원인체

굴의 Microcytosis의 원인충으로 캐나다 서부 연안의 *Microcytos mackini*와 호주 동부 연안의 *M. roughleyi*에 대해서만 언급한다. 알려진 *Microcytos* spp. 범위 밖의 것을 검출했다면, 동정을 위한 전자현미경적 또는 분자생물학적 방법을 동원하여 다른 microcell species(즉, *Bonamia ostreae*, *Bonamia* sp.)와 구별하여야 한다. 어떤 이매패에서든지 이들 병원체가 심각한 것으로 사료되면 국제수역사무국의 표준연구실(OIE Reference Laboratory)과 상의해야 한다.

#### 5-2. 숙주 및 숙주에 대한 영향

*Microcytos mackini*와 *M. roughleyi*는 분류학적 위치가 명확하지 않다. Microcytosis는 또한 Denman Island disease, microcell disease of Pacific oyster(*M. mackini*), Australian winter disease, winter mortality 또는 microcell disease of Sydney rock oyster(*M. roughleyi*)로 알려져 있다.

*Microcytos mackini*는 참굴(*Crassostrea gigas*), 넓적굴(*Ostrea edulis*), *O. conchaphila*(=*O. lurida*)에 감염되며 실험적으로는 버지니아굴(*C. virginica*)에도 감염된다. 참굴은 다른



종에 비해 실험실 및 현장에서의 실험 공격시 질병에 대한 저항성이 높다. *M. roughleyi*는 시드니굴(*Saccostrea commercialis*)에 감염된다.

*Mikrocytos mackini*는 주로 혈관주위 결합조직 세포의 국소 세포내 감염으로 hemocytes의 침윤과 조직의 괴사를 동반한다. 계속해서 질병은 폐각의 갈색의 흉터와 부합하는 맨틀의 농포, 농양, 궤양을 유발한다. 현미경적 병소는 항상 관찰되지는 않는다. 농양은 과립성 hemocytes, hyalinocytes 와 1~3  $\mu\text{m}$ 의 작은 세포로 구성된다. 심각하게 감염되면 2년 이상 굴에 한정되어 나타난다. *M. roughleyi*는 육악적 소견이 없고, 역으로 건강해 보이는 개체가 감염이 되어 있다. 결합조직 세포를 제외하고 hemocytes 내에 전신적으로 감염되어 아가미, 결합조직, 생식소와 소화관에 농양형의 병소를 형성한다.

*Mikrocytos mackini*의 경우 간조시에 성패에서 폐사율이 약 40%에 이른다. 북반구에서 이 질병은 수온이 4월과 5월에 더 자주 발생하며 이후 10°C이하 일 때에 3-4개월 동안 지속되고 고염분에서 성장이 활발하다. 남반구에서 *M. roughleyi*에 의한 질병은 저수온과 고염분일 때 발생하여 출하 직전의 겨울철에 성숙 시드니굴은 70%까지 폐사되며 질병이 퍼지기까지 2달 반이면 된다.

### 5-3. 지정학적 분포

지정학적으로 *M. mackini*는 캐나다의 남서부 연안에 위치한다. 또한 Henry Bay, Denman Island를 포함한 Georgia 해협 전역에 상재하고, Vancouver Island 주위의 특정 지역에 국한된다. *M. roughleyi*는 호주의 New South Wales에 발생한다.

### 5-4. 진단

#### 5-4-1. 스크리닝 방법

##### 5-4-1-1. 조직학적 방법

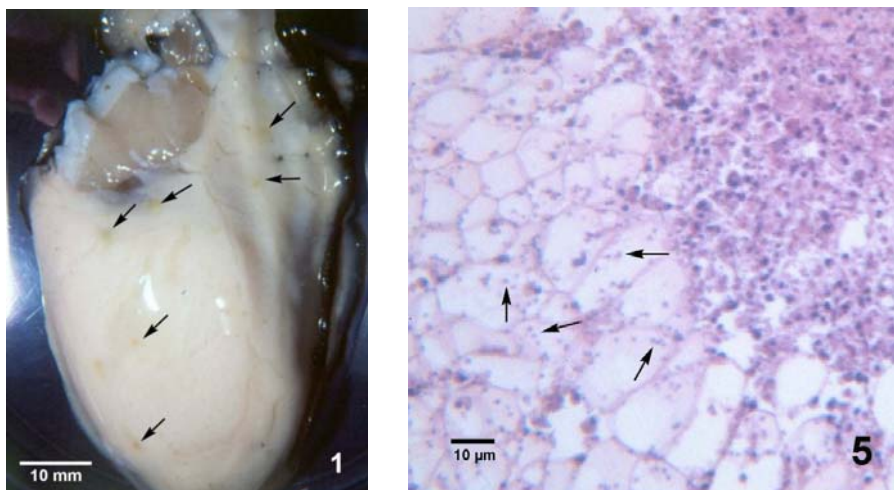
조직학적 검사를 위해 가능하다면 감염된 굴의 농포나 농양소를 지나도록 조직편을 절취한다. 조직 절편은 Davidson's 또는 Carson's(필요시 전자현미경 샘플을 위해) 고정액에 고정한다. 고정 비율은 고정액 10에 조직 1이상을 넘기지 않는다.

조직편은 통상적인 조직 처리 과정에 따라 처리한다. HE 염색과 같은 비특이적 염색 방법으로 *Mikrocytos*를 관찰할 수 있다. 개체 당 2장 정도의 절편을 immersion oil하의 배울에서 현미경으로 검사한다.

*Mikrocytos mackini*는 혈관 주위 결합조직 세포내에서 관찰되며 직경이 2~3  $\mu\text{m}$ 로 근처에 농양성 병소가 위치한다. 이 층은 또한 근세포와 가끔은 병소내의 hemocytes 내외에서 관찰된다.

*Mikrocytos roughleyi*는 농양소의 hemocytes 내에서 1~2  $\mu\text{m}$ 의 크기로 관찰되는데 원형의 핵은 1  $\mu\text{m}$ 이상이고 양극 또는 편심성 nucleolar structures를 포함하고 있다. 때로는 세포질내 공포 때문에 핵이 세포의 가장자리 쪽에 위치하기도 한다.

*M. roughleyi*는 hemocytes 내에서의 모든 단계에서 *M. mackini*와는 구별되고, *M. mackini*는 주로 병소의 혈관 주위 결합조직 세포에서 관찰된다.



#### 5-4-2. 잠정진단법

##### 5-4-2-1. 조직도말염색법

가능하다면 농양소나 껍양부위를 절취한 조직편을 여과지에 여분의 수분을 털어내고 감염 부위를 슬라이드 글라스에 압평한다. 슬라이드는 공기 건조 후 2~3분간 메탄올에 고정한다.

시판용 혈구 염색 kit를 사용하여 염색하고 커버 글라스로 봉입한다.

원인충이 숙주 세포와는 무관하게 또는 드물지만 hemocytes 내에서 직경 2~3  $\mu\text{m}$ 의 크기로 호염성의 세포질과 호산성의 핵으로 관찰된다.

#### 5-4-3. 확정진단법

##### 5-4-3-1. 조직학적 검사

위에서 기술한 조직학적 검사를 확정 진단 방법으로 사용한다.

##### 5-4-3-2. 투과전자현미경 검사

*M. mackini*와 *Bonamia* spp.는 초미세학적 구조로 분별할 수 있다. *M. mackini*의 핵소체는 핵의 중심에 위치하는 반면 *B. ostreae*는 편심에 위치하고 *M. mackini*의 mitochondria는 분명히 결핍되어 있다.

## 6. *Perkinsus marinus* 감염증

### 6-1. 원인체

여기서는 Perkinsosis의 원인충으로 *Perkinsus marinus*와 *P. olseni*에 대해서만 언급한다. 다른 *Perkinsus* spp.는 이매패에 감염되는데, 북미 서부 연안의 *Macoma baltica*, 아시아 및 유럽의 남동부의 *Tapes decussatus*와 바지락(*T. philippinarum*) 열대와 아열대 수역의 많은 종에서 감염된다.

### 6-2. 숙주 및 숙주에 대한 영향

Perkinsosis는 해산 무척추동물의 포자충문(*phylum Apicomplexa*)에 속하는 원충성 감염증으로 원인충으로는 속명 *Perkinsus*로 *Perkinsus marinus*와 *P. olseni*가 있다. *P. marinus*는 전에는 *Dermocystidium marinum*, 그 후에 *Labyrinthomyxa marina*로 불렸다. *P. marinus*는 또한 'Dermo'라고 알려져 있다. 지금은 포자충문에 두고 있지만, 최근의 연구에서는 *Perkinsus*속이 Dinoflagellida에 더 가까운 것으로 보고 있다. 게다가 rDNA의 internal transcribed spacers(ITS)의 nucleotide의 배열 분석으로 *P. olseni*가 *P. atlanticus*와 같은 것이라고 나타났다.

*P. marinus*는 버지니아굴(*C. virginica*)에서 경제상 중요한 원인충이다. 참굴(*C. gigas*)에서도 실험적 감염은 가능하지만, 질병에 대한 저항성이 더욱 높다. *P. olseni*는 *Haliotis ruber*, *H. cyclobates*, *H. acalaris*와 *H. laevigata*에도 영향을 끼친다. 대서양과 태평양 및 지중해의 50종 이상의 무척추동물에서 무해하지만 *perkinsus*가 잠복하고 있을지도 모른다.

*Perkinsus*의 증식으로 결합조직과 상피세포가 파괴되어 약화된다. 농양 또한 가끔 확인된다. 감염된 *Haliotis* spp.의 발과 맨틀에 8mm 이상의 농포가 형성되어 상품성을 하락시킨다. *P. olseni*는 전복의 폐사 및 *H. laevigati*의 대량손실과 직접적인 연관이 있는 것으로 여겨진다. 참굴이 *P. marinus*에 감염되면 소화선이 창백해지고, 심하게 쇠약해지고, 패각을 열며, 맨틀 수축, 생식소 발달 억제, 성장 장애와 때로는 농양소를 확인 할 수 있다. 버지니아굴에서는 가끔 폐사율이 95%에까지 이른다.

*Perkinsus* spp.의 증식은 20°C 이상의 고수온기에 활발하여 병원성 및 폐사율이 최고치에 이른다. 감염형은 두 개의 편모를 가진 zoospore로 숙주의 조직내에서 trophozoite로 발달한다. Trophozoite는 숙주내에서 2분법으로 분열 증식한다. *Perkinsus* spp.의 검출을 위해서는 조직 절편을 FTM(fluid tioglycollat medium)에 배양한다.

### 6-3. 지정학적 분포

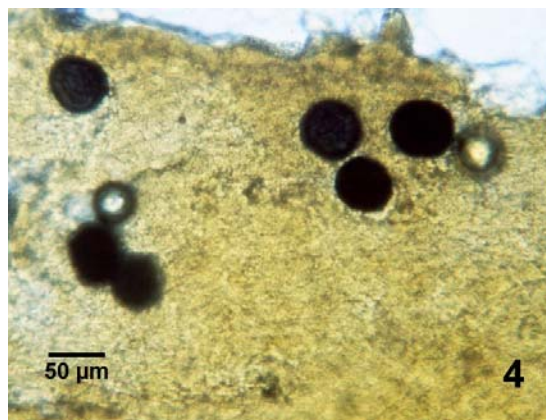
*Perkinsus*는 지정학적으로 South Australia에 분포한다. *Perkinsus marinus*는 미국의 메사

츄세츠에서 플로리다의 동부 연안, 걸프 해안에서 베네주엘라를 따라, 푸에르토리코, 쿠바와 브라질에서 검출된다. 이것은 미국의 진주만, 하와이까지 유입되었다. 수년에 걸친 반복적인 유입으로 최근에는 뉴저지, 케이프코드와 메인주에까지 분포 범위가 확장되었는데, 겨울철의 수표면 온도의 상승과도 연관된다.

#### 6-4. 진단

##### 6-4-1. 스크리닝 방법

##### 6-4-1-1. Thioglycollate medium 배양에 의한 진단



5×10 mm의 조직편(굴의 직장 부위나 전복의 패각근 또는 맨틀)을 절취하여 0.5 mg/ml benzylpenicillin을 첨가한 FTM에 22~25℃에서 4~7일간 암소에서 배양한다.

배양된 층의 크기는 3~10 μm에서 70~250 μm 이다. 배양된 조직편을 모아서 Lugol's iodine 1/5 sol.에 10분간 염색하여 커버글라스로 봉입 후 신선한 상태에서 현미경으로 관찰한다. Perkinsus의 hypnospores는 구형으로 외벽은 blue 또는 bluish-black로 염색된다.

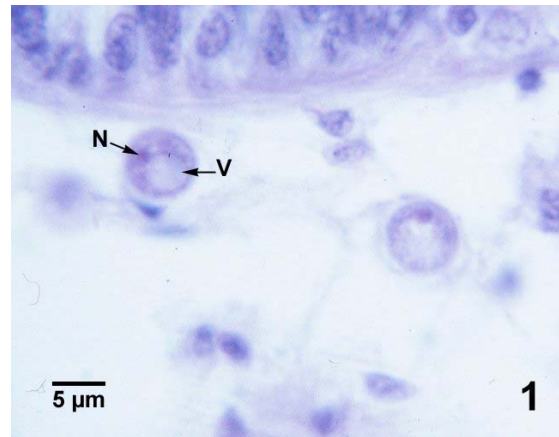
##### 6-4-2. 조직학적 진단

좌우 수직면을 따라 내부를 절취하여 Davidson's 용액에 고정한다. 고정 비율은 고정액 10에 조직 1이상을 넘기지 않는다.

조직편은 통상적인 조직 처리 과정에 따라 처리한다. Perkinsus spp.가 HE 염색과 같은 비특이적 염색으로 검출된다. 개체 당 2개 정도의 절편을 검사한다.

*Perkinsus marinus* 보통 전신적으로 감염된다. *P. olseni*는 통상 패각근과 맨틀의 결합조직에 국한된다. 모든 기관의 결합조직에 trophozoites(meronts, merozoites 또는 직경 2~3 μm의 aplanospore), 'singnet-ring' 단계(편심의 공포를 포함한 성숙 trophozoites, meronts, merozoites,

또는 직경 3~10  $\mu\text{m}$ 의 aplanospores)와 'rosettes'(tomonts, sporangia 또는 2, 4, 8, 16, 32의 trophozoites를 포함한 schizonts)가 관찰된다.



성숙 trophozoites는 공포(vacuole)가 특징적으로 핵은 가장자리 쪽에 위치한다. HE 염색에서 trophozoites의 세포질은 핑크색, 핵은 청색으로 염색된다. 종에 따라 trophozoites의 크기는 다양해서 *P. marinus*는 5~7  $\mu\text{m}$ , *P. olseni*는 13~16  $\mu\text{m}$ 에 이르지만, *Perkinsus* spp. 간의 형태학적 특징은 명확하지 않다.

#### 6-4-3. 잠정진단법

##### 6-4-2-1. Thioglycollate medium 배양에 의한 진단

위에서 기술한 방법을 추정 진단 방법으로 사용하면 된다.

#### 6-4-4. 확정진단법

##### 6-4-3-1. 투과전자현미경 검사

*Perkinsus*의 종간의 명확한 특징은 zoospore의 초미세구조이다. *P. marinus*의 FTM하에서 transferring prezoosporangia가 생산한 zoospore를 해수에 두면 zoosporangia로 발달한 후 수많은 운동성의 2 편모 zoospores를 생산한다. Anterior flagellum은 머리카락 또는 가시 모양의 구조로 구성되며 posterior flagellum은 매끈한 구조이다. Zoospores의 침복체(apical complex)는 conoid, subpellicular microtubules, rhoptries, rectilinear micronemes와 conoid-associated micronemes으로 구성된다. 큰 공포 또한 zoospore의 앞쪽 말단에 있다.

## 7. 참고문헌

- Andrews JD (1965) Infection experiments in nature with *Dermocystidium marinum* in Chesapeake Bay. *Chesapeake Science*, 6, 60-67
- Andrews JD (1988) Epizootiology of the disease caused by the oyster pathogen *Perkinsus marinus* and its effects on the oyster industry. *Amer. Fish. Soc. Special Publication*, 18, 47-63
- Bower SM (1988) Circumvention of mortalities caused by Denman Island oyster disease during mariculture of Pacific oysters. *Am. Fish. Soc. Special Publication*, 18, 246-248
- Bower SM, Hervio D, McGladdery SE (1994) Potential for the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, to serve as a reservoir host and carrier of oyster pathogens. ICES Council Meeting Papers, Copenhagen, Denmark, ICES-CM-1994/F:30
- Burreson EM (1994) Further evidence of regular sporulation by *H. nelsoni* in small oysters, *C. virginica*. *J. Parasitol.*, 80, 1036-1038
- Burreson EM, Robinson ME, Villalba A (1988) A comparison of paraffin histology and hemolymph analysis for the diagnosis of *Haplosporidium nelsoni* (MSX) in *Crassostrea virginica* (Gmeline). *J. Shellfish Res.*, 7, 19-23
- Elston RA, Farley CA, Kent ML (1986) Occurrence and significance of bonamiasis in European flat oysters *Ostrea edulis* in North America. *Dis. Aquat. Organisms*, 2, 49-54
- Farley CA (1967) A proposed life cycle of *Minchinia nelsoni* (Haplosporida, Haplosporidiidae) in the American oyster *Crassostrea virginica*. *J. Protozool.*, 14, 616-625
- Farley CA, Wolf PH, Elston RA (1988) A long-term study of 'microcell' disease with a description of a new genus, *Mikrocytos* (g. n.), and two new species, *Mikrocytos mackini* (sp. n.) and *Mikrocytos roughleyi* (sp. n.). *fishery Bulletin*, 86, 581-593
- Grizel H, Comps M, Bonami JR, Cousserans F, Duthoit JL, Le Pennec MA (1974) Recherche sur l'agent de la maladie de la glande digestive de *Ostrea edulis* L. *Science et Pêche*, 240, 7-30
- Grizel H, Comps M, Cousserans F, Bonami JR, Vago C (1974) Etude d'un parasite de la glande digestive observée au cours de l'épizootie actuelle de l'huître plate. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 279, D, 783-784
- Grizel H (1985) Etudes des récentes épizooties de l'huître plate *Ostrea edulis* L. et de leur impact sur l'ostreiculture bretonne. thèse de doctorat, Université des Sciences et Techniques de Languedoc, Montpellier, France
- Perkins FO, Menzel RW (1967) Ultrastructure of sporulation in the oyster pathogen *Dermocystidium marinum*. *J. Invertebr. Pathol.*, 9, 205-229
- Pichot Y, Comps M, Tigé G, Grizel H, Rabouin MA (1979) Recherches sur *Bonamia ostreae* gen. n., sp. n., parasite nouveau de l'huître plate *Ostrea edulis* L. *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.*, 43, 131-140

## 제 4 장 결 론

전 세계 양식 패류의 총생산량은 11백만톤으로 경제적 가치로는 99억US\$에 달하였으며, 이는 전세계 양식 총생산량의 44%를 차지하고 있을 만큼 중요한 위치에 있다(FAO 2003). 참굴(*Crassostrea gigas*)과 참가리비(*Pecten yessoensis*) 및 바지락(*Ruditapes philippinarum*)은 전세계 품종별 양식생산량에서 각각 2위, 7위, 8위이며, 경제적 가치측면에서 각각 2위, 8위, 9위로 전세계 주요 양식종의 10위권 내에 속하고 있다(FAO 2003). 아울러, 전 세계 해산양식의 총 생산량 중에서 패류는 48%를 차지하며, 해조류 44%, 어류 7%, 갑각류 1%로 패류가 해산양식 생산량에서 가장 높은 비중을 차지하고 있다(FAO 2003). 나아가 전 세계 패류 생산량의 87%가 아시아-태평양지역의 9개국(중국, 한국, 일본, 태국, 말레이시아, 필리핀, 호주, 싱가포르, 홍콩)에서 생산되고 있기 때문에, 이 지역에서의 양식 패류의 생산은 전 세계 양식생산량의 증대에 많은 기여를 할 뿐 아니라, 앞으로 아시아 태평양 지역의 경제발전에 많은 기여를 할 것으로 기대되고 있다. 우리나라의 해산 양식 패류에 있어서 생산량별로 보면 굴, 바지락, 진주담치, 세꼬막, 피조개 등의 순이다. 이러한 양식패류의 경제적, 사회적 중요성은 주지의 사실이다.

전 세계적으로 질병으로 인한 양식패류의 대량폐사는 심각한 경제적 사회적 문제를 야기한 바 있다. 예컨대, 미국 버지니아굴의 퍼킨수스병과 하프로스포리디움병, 프랑스 넵적굴의 마텔리아병과 보나미아병, 한국의 백합대량폐사, 중국의 가리비바이러스병과 전복대량폐사, 일본의 진주조개바이러스병, 스페인과 포르투갈 등의 바지락 퍼킨수스병, 캐나다굴의 마이크로사이토스병 등 패류의 질병들이 국한된 지역에서 심각한 폐사를 유발한 후 점차 전 세계적으로 확산되고 있는 추세이다. 따라서 전 세계국가들은 자국의 양식패류와 자연자원을 보존하기 위하여 패류의 대량폐사를 유발하는 전염성 질병의 유입과 확산을 방지하기 위하여 많은 노력을 경주하고 있다. 아울러, 전 세계 160여개국의 회원으로 구성된 동물의 전염병을 담당하는 국제기구인 국제수역사무국에서는 패류의 전염성 질병 중에서 퍼킨수스병, 하프로스포리디움병, 보나미아병, 마이크로사이토스병 및 마텔리아병 등 5종에 대하여 보고해야할 질병으로 지정하여 질병의 관리에 많은 노력을 기울이고 있다.

우리나라의 경우, 1970년대 백합의 대량폐사로 심각한 경제사회적 문제를 경험한 바 있으며, 매년 가을철에 주기적으로 바지락의 퍼킨수스병으로 대량폐사를 겪고 있으며, 지역적으로 양식패류의 대량폐사가 간헐적으로 발생하여 많은 경제적 손실을 입고 있다. 그럼에도 불구하고, 현재까지 양식패류의 전염성 질병에 대한 정기적인 질병 모니터링과 건강관리대책이 전혀 없기 때문에 질병으로 인한 대책의 수립이 매우 절실한 실정이다. 우리나라의 양식패류에 감염되는(혹은 감염된) 전염성 질병은 비단 우리나라의 양식패류에 피해를 일으킬 뿐만 아니라 패류의 국가간 이동으로 다른 나라의 양식패류에 전염되어 피해를 유발하게 되어 국가의 신

되성에 심각한 문제를 유발할 수 있기 때문에 더욱 심각한 주의가 필요하다.

따라서, 본 연구는 우리나라의 주요양식 대상종인 굴, 바지락, 참가리비, 진주담치 및 진주조개에 대하여 우리나라의 실정에 적합한 질병 모니터링 방법을 개발하고, 양식패류의 질병을 유발하는 병원체에 대하여 제어기술을 개발하기 위하여 수행되었다.

양식패류의 세균성, 기생충성 및 바이러스성 질병 모니터링을 위하여 전 세계의 많은 나라들은 자국의 환경에 적합한 모니터링 방법을 제시하고 있다. 그러나 현재 우리나라에서는 양식생물의 폐사가 발생하면 일시적인 폐사원인을 찾기에 급급해 온 것이 주지의 사실이다. 이는 우리나라가 아시아-태평양지역에서 양식 패류의 생산량으로 볼 때 중국 다음으로 2위에 위치해 있는 나라라는 관점에서는 매우 부족한 점이 많음은 공통된 인식이다. 질병 모니터링을 가이드라인을 설정하기 위하여 고려된 사항은 시료채집 장소의 선정, 채집 빈도, 시료 운반, 검사방법 등이며, 한국식에 적합한 일정한 기준을 설정한 다음 그 기준에 따라 연구기간 동안 질병 모니터링을 실시하였다. 이러한 기준의 설정시 우리나라의 양식패류의 질병에 대한 구체적인 실태자료가 없었기 때문에 많은 전문가들의 자문을 받아 설정한 바 있다. 그 결과, 현재까지 보고된 질병이외에 우리나라에서 전혀 알려지지 않은 질병들이 검출되었다. 굴의 *Marteilioides chungmuensis*와 바지락의 *Perkinsus* sp.는 이전에 보고된 질병이다. 현재까지는 *M. chungmuensis*가 굴에만 감염되는 것으로 알려져 있었는데, 본 연구결과 진주담치에도 감염이 되는 것으로 나타났다. 또한 바지락의 *Perkinsus* sp.도 굴, 동죽, 피뿔고둥에도 감염되는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 질병 모니터링의 중요성을 다시금 인식하게 한다. 굴의 *Mycoplasma* 감염증과 VGH 감염증은 우리나라에서는 처음 검출된 질병이다. 또한 굴의 VGH 감염증이 진주담치에도 매우 낮은 빈도로 나타났다. 이러한 *Mycoplasma* 감염증과 VGH 감염증은 비록 현재까지 폐사를 유발하지 않으나 세포내에 감염되는 질병이기 때문에 지속적인 주의를 요하는 것으로 추정된다. 아울러, 매년 녹색굴의 발생으로 인하여 원인의 구명이 필요했던 바 본 연구 결과 이리도바이러스의 감염이 확인되어 이리도바이러스가 녹색굴 유발의 원인으로 추정되었다. 진주조개의 질병 모니터링 결과, 버나바이러스의 감염이 확인된 바 있다. 그러나 가리비에서는 질병이 확인되지 않았다. 따라서 굴의 심각한 폐사를 유발하는 퍼킨수스병, 하프로스포리디움병, 보나미아병, 마이크로사이토스병 및 마텔리아병 등 5종의 국제수역사무국 지정전염병은 우리나라의 굴에는 전혀 감염되지 않았음을 확인하였다. 이러한 결과는 우리나라 굴의 건강관리에 매우 중요한 자료로 제공될 수 있을 것으로 판단된다.

본 연구 결과 검출된 패류의 질병에 대한 제어기술을 개발하기 위하여 진단법을 개발하였다. 양식패류는 개방된 바다에서 양식이 되기 때문에 감염의 예방이나 치료는 거의 불가능하기 때문이다. 감염초기에 진단이 가능한 진단법을 개발하여 감염의 확산을 억제할 수 있는 것이 최선이기 때문이다. 우리나라의 양식패류에서 가장 문제가 되는 굴의 *M. chungmuensis* 감염증과 바지락의 *Perkinsus* sp. 감염증에 대한 PCR 진단법을 개발하였다.



## 제 5 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

양식패류의 건강관리를 위하여 유행성 전염병의 현황을 파악하여 제어기술을 개발하는데 목적이 있었으며, 그 목적에 해당하는 굴과 진주담치의 *Marteilioides chungmuensis* 감염증, 바지락의 *Perkinsus* sp. 감염증과 *Vibrio tapetis* 감염증, 전복의 *Vibrio alginolyticus* 감염증, 진주담치의 이형혈구감염증, 진주조개의 버나바이러스 감염증 등에 대한 PCR 진단법을 개발하였으며, 전복의 *Vibrio alginolyticus* 감염증에 대한 면역혈청학적 진단법을 개발하기 위하여 단클론항체를 개발한 바 있다.

또한 본 연구에서 개발한 질병 모니터링의 결과 현재까지 우리나라의 양식패류에서 전혀 알려지지 않은 굴의 *Mycoplasma* 감염증, Viral gametocytic hypertrophy(VGH) 감염증, 전복의 비브리오 감염증, 진주담치의 이형혈구 감염증 등이 확인되어 본 연구 결과 개발된 질병 모니터링의 효과를 입증하였다.

우리나라의 주요 양식패류인 굴, 바지락, 진주담치, 진주조개 및 가리비 등 5종의 패류에서 퍼킨수스병을 제외한 하프로스포리디움병, 보나미아병, 마이크로사이토스병 및 마텔리아병 등 4종의 국제수역사무국 지정전염병은 우리나라에서 전혀 감염되지 않았음이 확인된 바 외국으로부터 국내로 이러한 유행성 전염병의 유입을 억제하기 위하여 국제수역사무국에서 정한 양식패류의 지정 전염병에 대한 표준검역서를 작성하였다. 이 검역서는 수산물품질검사원에서 양식패류의 검역시 사용될 수 있도록 관련 검사원의 교육에 활용될 수 있을 것이다.

본 연구결과 개발된 양식패류의 질병 모니터링 방법은 2005년부터 수산과학원 병리연구팀에서 굴의 하프로스포리디움 감염증의 모니터링에 적용될 것이다.

## 제 6 장 연구개발결과의 활용계획

### 1. 정책활용 : 패류 전염병 질병 모니터링 모델 제공

본 연구결과 제시된 표준질병 모니터링 방법이 국제기준에 적합하며, 우리나라의 양식패류 질병을 모니터링 하기에 적합하기 때문에 표준모니터링모델로 하여 국가적인 패류질병 모니터링에 적용할 예정이다. 현행법상 수산생물의 전염병 예방에 대한 법이 제정되어 있지 않기 때문에 “수산생물전염병예방법(가칭)”을 제정시(2005년예정) 기초자료로 제공함.

### 2. 교육 및 지도 활용

현재까지 수산기술관리소 및 양식 어업인을 대상으로 ‘우리나라 굴양식 현안문제점과 경쟁력 강화’, ‘바지락 폐사원인 및 대책’, ‘전복질병 및 대책’ 등 5회에 걸쳐서 국립수산과학원 연수부에서 원격기술상담을 실시한 바 있으며, “육상패류양식장 소독처리방법” 안내서를 제작하여 관련 기관 및 양식어업인에게 배포 한 바 있으며, 지속적으로 교육 및 지도 할 예정이다.

### 3. 국내외 전문학술지 게재

현재까지 SCI 학술지에 2편, 국내전문학술지에 1편의 논문을 게재한 바 있으며, “전복의 비브리오팀”과 “한국의 양식패류의 질병 상황”에 대한 논문을 전문학술지에 투고할 예정이다.

### 4. 국내 및 국제학술대회 발표

현재까지 국외학술회에 4편, 국내학술회에 1편을 발표한 바 있으며, 최근 2004년 9월 18일 예정인 한일공동심포지움에 1편을 발표하였으며, 2005년 세계양식학회(인도네시아 발리)에 발표할 예정이다.

### 5. 신문방송 홍보

한국수산신문 6월 21일자 패류건강관리를 위하여 “체계적 질병 모니터링 실시”의 특집 기사를 투고한 바 있으며, 패류의 건강관리의 인식 전환과 필요성에 대하여 수산양식 등 전문수산지에 양식어업인의 홍보를 지속할 예정이다.

### 6. 타 연구개발사업에의 활용

2005년 해양수산부의 신규사업인 “OIE 업무 활성화” 사업 중 질병정밀진단실험실 설치 및 운영사업에 본 연구의 개발기술을 적용하여 패류질병 모니터링연구를 수행할 예정이다. 또한 수산과학원 병리연구팀에서 굴의 하프로스포리디움 감염증에 대한 모니터링을 연구사업으로 수행할 예정이다.

## 제 7 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학 기술정보

2002년 프랑스해양개발연구소(IFREMER) Station La Tremblade는 국제수역사무국과 EU에서 지정한 패류질병 표준진단실험실로 패류의 질병 모니터링과 진단방법의 개발을 위하여 많은 연구를 수행하고 있다. 본 연구소에 방문하여 패류의 질병에 대한 진단법을 연수한 내용은 다음과 같다.

### -PCR 진단 실험 개요

	PCR condition	target gene	template	product size	Reference
C1/C6	94°C 1' 50°C 1' 72°C 1'	herpes-like virus	<i>C.gigas</i>	896	Herpes-like virus infections in hatchery-reared bivalve larvae in Europe: specific viral DNA detection by PCR
C2/C6			<i>O.edulis</i>	709	
A3/A4			<i>R.decussatus</i>	1001	
A5/A6			<i>R.philippinarum</i>	917	
CS1/CAS2 (universal)	94°C 1'	ribosomal gene	<i>Ostrea edulis</i>	1325	Detection of <i>Bonamia ostreae</i> based on small subunit ribosomal probe
BO/BOAS (specific)	55°C 1' 72°C 1'		purified <i>B.ostreae</i> a heavily infected oyster( <i>O.edulis</i> ) a lightly infected oyster ( <i>O.edulis</i> )	300	
SS2/SAS2 (specific)	94°C 1' 55°C 1' 72°C 1'	18S gene	<i>M.refringens</i> <i>M.refringens</i> -infected <i>M.edulis</i> <i>M.refringens</i> -infected <i>O.edulis</i> <i>M.refringens</i> sporangia purified from <i>O.edulis</i>	702	DNA probes as potential tools for the detection of <i>Marteilia refringens</i>
CAS1S/CAS2 (universal)			<i>M.refringens</i> -infected <i>M.edulis</i> paraffin-embedded tissue <i>M.refringens</i> -infected <i>O.edulis</i> paraffin-embedded tissue <i>M.refringens</i> -infected <i>M.edulis</i>	521	

2004년 호주의 퀸즐랜드대학교의 기생충학연구실에서 전복의 *Candidatus Xenohalictis californiensis* 감염증과 굴의 보나미아 감염증에 대한 진단법에 대한 연수를 실시한바 있다. 전복의 *Candidatus Xenohalictis californiensis* 감염증의 진단법은 다음과 같다.

The PCR primers developed for *Candidatus Xenohalictis californiensis* detection target small subunit ribosomal DNA and have been shown to be sensitive and specific for this pathogen and specifically amplify a 160 base-pair segment. Primers are currently designated as: RA 5-1 (5-GTT-GAA-CGT-GCC-TTC-AGT-TTA-C-3) and RA 3-6 (5-ACT-TGG-

ACT-CAT-TCA-AAA-GCG-GA-3). PCR amplification is performed in a standard 50  $\mu$ l reaction volume containing 10 mM Tris, pH 8.3 (at 25°C), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.001% (w/v) gelatin, 400  $\mu$ M of dNTP, 5  $\mu$ M tetramethyl ammonium chloride, 40 pmoles of each primers, 2 units of Taq polymerase, and template DNA. The programme for amplification reaction is: initial denaturation at 95°C for 5 minutes, 40 cycles at 95°C for 1 minute, 50°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds, and a final extension at 72°C for 10 minutes.

별첨 1

## 별첨 2. 패류 유행성 전염병 확산방지 대책

현재 우리나라는 수산생물의 전염병에 대하여 국가에서 관리하고 있지 않다. 왜냐하면 가축 전염병예방법의 가축의 범위를 소, 말, 당나귀, 노새, 면양, 산양, 칠면조, 오리, 거위, 돼지, 개, 닭, 꿀벌, 기타 대통령령으로 정하는 동물로 한정하고 있어 수산생물을 포함하지 않는다. 이러한 법적 조치가 없기 때문에 수산생물, 특히 양식패류에 감염되어 피해를 유발하는 전염병에 대한 효과적인 조치를 취하는 것은 현실적으로 불가능하다. 즉 전염병에 감염된 양식패류는 전염병의 확산을 방지하기 위해서 이동을 제한하고, 도살하여야 하는데 법적 규제가 없기 때문에 조치를 취할 수 없다는 것이다. 따라서 양식패류의 전염병을 적절히 조치할 수 있는 법적 규제가 필요하다. 아울러 본 연구 결과 도출된 양식패류의 전염성 질병에 대한 지속적인 질병 모니터링으로 전염병의 감염실태를 파악하여야 한다.

### 1. 제도적인 정책

양식패류의 전염병에 대한 제도적인 관리를 위하여 수산생물 전염병예방법의 제정이 필요하다. 이 법의 범위는 질병 모니터링의 실시, 법정 전염병의 강제조치 및 피해보상, 양식장 방역조치 등의 내용이 포함되어야 한다. 수산생물 전염병예방법의 법안 제정의 필요성에 대하여 해양수산부에 건의한 바 있으며, 해양수산부장관은 2004년 국정감사에서 2005년 정기국회에 이 법령의 제정을 위하여 법안을 상정할 것으로 답변한 바 있어 법령의 제정이 추진되고 있다.

### 2. 패류 질병의 연구

양식패류의 전염성 질병에 대한 지속적인 연구로 양식패류의 유행성 전염병에 대하여 병원체의 특성, 숙주에 대한 영향, 병원체의 분포, 진단방법 및 치료방법 등 연구결과가 필요하다. 이러한 자료를 기초로 하여 방역대책과 같은 제도적인 정책을 수립이 가능하다. 또한 외국의 전염병 발생상황과 진단법 개발 등의 정보를 수집하기 위하여 국제수역사무국과 긴밀한 협력이 필요하다.

### 3. 국내방역 및 검역의 강화

양식패류의 전염성 질병의 확산을 방지하기 위하여 감염된 패류의 이동을 억제하기 위하여 우리나라를 25~32개 권역으로 나누어 각 권역에서 타 권역으로 이동시 무병증명서를 첨부하도록 조치하기 위하여 각 권역에 정밀진단실험실을 설치하여 질병의 진단을 담당하여야 한다. 2005년부터 2010년까지 매년 5~8개의 정밀진단실험실을 설치하여 수산생물의 전염성 질병의 진단을 담당하게 될 것이다. 또한 국외로부터 유입될 우려가 있는 해외전염병에 대한 검역을 강화하기 위하여 수산생물의 검역을 강화하여야 한다.