

GOVP1199803942

최 종
연구보고서

637.52
L2938

양식산 새우류 질병대책

Studies on the control of cultured
shrimp viral disease

연구기관

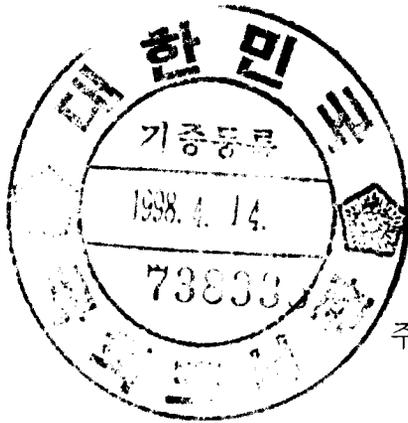
국립수산진흥원

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “양식산 새우류 질병 대책” 과제의 최종보고서로 제출합니다.



1998년 2월

주관연구기관명 : 국 립 수 산 진 흥 원

총괄연구책임자 : 손 상 규

연 구 원 : 장경립, 허문수, 김영진, 심두생
정영균, 박민우, 김선웅, 김진우
박명애, 정승희, 이주석, 지보영
김안영, 이정의, 박균출, 권선원
김재동, 고길룡, 김선만, 김상한
김진도, 김종화, 송재희, 정달상
최동립, 김종식, 조영록, 황경열
황준하, 김종경, 박춘호, 오명주

요 약 문

I. 제 목

양식산 새우류 질병 대책

II. 연구개발의 목적 및 중요성

우리나라 새우 양식산업은 서해안 지역을 중심으로 급속히 발전하였으나 1993년에 바이러스 질병이 발병하여 양식산 대하 및 보리새우를 대량폐사 시킨 후 매년 피해량이 증대되고 있다. 바이러스에 감염된 새우는 두홍부 및 체표에 흰반점 증상을 나타내므로 병명은 white spot syndrome disease(WSSD)라 부르기도 하는데, 이와 같은 질병으로 인한 새우 대량폐사는 비단 우리나라 뿐만 아니라 아시아 전역에서 일어나고 있다. 그래서 일본에서는 양식산 보리새우의 대량폐사 원인을 penaeid rod-shaped DNA virus(PRDV) 감염에 의한 penaeid acute viremia(PAV)라 하기도 하고, 중국에서는 hypodermal and hematopoietic necrosis virus(HHN BV) 감염에 의한 explosive epidemic disease라고도 하고 있다.

지금까지 전세계적으로 10여종의 새우 바이러스 질병이 보고되고 있지만 WSSD만큼 병원성이 강하고 감염대상 새우도 다양하면서 발병지역이 넓은 질병은 보고된 바가 없다. 따라서 WSSD가 발병한 국가에서는 본 바이러스 질병을 퇴치하기 위해 많은 노력을 하고 있지만, 아직까지 획기적인 방역대책 기술을 개발하지 못하고 있다. 특히 우리나라와 같이 한정된 지역에서 집약적으로 새우를 양식할 경우에는 본 바이러스 질병으로 인한 피해가 클 수 있는데 1996년의 경우를 보면 양식 총 예상 생산량의 75% 정도가 폐사하여 새우양식 어업인에게 엄청난 경제적 손실을

입힌 바가 있기 때문에 본 바이러스 질병에 대한 방역대책 기술이 더욱더 시급히 개발되어야 한다. 그래서 본 연구개발사업에서는 1차년도에 양식산 새우의 대량폐사 원인을 정확히 규명하고 유전공학기법을 이용한 질병 신속진단법과 질병감염 역학조사 및 방역기초기술을 개발한 후, 2차년도에는 새우양식장을 대상으로 신속진단법과 방역기술의 실용화에 중점을 두고자 한다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 새우 대량폐사 원인조사

양식산 새우 대량폐사 원인조사는 폐사한 새우로 부터 바이러스를 분리하여 바이러스의 물리·화학적 특성시험, 입자 관찰, 구조단백질 분석, 핵산 분석 및 유전자 증폭시험을 통해 원인 바이러스를 동정하고 감염된 새우의 병리학적 특성 관찰과 바이러스의 병원성을 감염방법별, 사육수온별, 새우크기별로 조사하였다.

2. 새우 바이러스 감염 역학조사

바이러스 감염 역학조사는 산란용 대하 및 보리새우 어미와 새우양식장 서식생물에 대한 바이러스 보균조사를 실시하고 고수온 및 저수온하에서 바이러스의 해수중 생존성 시험도 실시하였다.

3. 바이러스 신속진단법 개발

새우 폐사원인 바이러스의 특정유전자 염기서열을 분석하여 primer를 합성한 후, 유전자 증폭법(PCR)으로 신속진단법을 개발하여 새우양식장을 대상으로 신속진단법의 실용화 시험을 실시하였다.

4. 바이러스 방역대책 기술개발

바이러스 방역대책 기술을 개발하기 위해 실험실내에서 바이러스 소독시험, 저질소독 및 개선시험과 새우 면역증강시험을 실시하고 현지 새우양식장을 시험어장으로 조성하여 양식장 소독, 저질 개선, 담수처리 및 면역증강제 투여에 의한 바이러스 방역효과시험과 새우난 세척 및 소독에 의한 새우 건강종묘 생산시험도 실시하였다.

IV. 연구개발 결과

1. 새우 대량폐사 원인조사

우리나라 서해안 새우양식장에서 1993년 부터 양식산 대하 및 보리새우를 대량 폐사시킨 주 원인은 바이러스 감염이었으며, 원인 바이러스는 white spot baculovirus(WSBV)로서 일본에서 분리된 penaeid rod-shaped DNA virus(PRDV)와 유사하였다.

감염된 새우는 두흉부 및 체표의 큐티클층에 흰반점 증상을 나타내며 병리조직학적으로는 중·외배엽성 유래조직에 세포핵이 비대되거나 부구조화가 특징적이었고, 인위감염에 의한 새우 바이러스의 병원성은 주사감염, 경구감염 및 침지감염 순으로 나타났다. 사육수온에 따른 바이러스의 병원성은 수온이 높을수록 강하게 나타났으나 수온 15℃에서는 병원성은 없었다. 그리고 새우 바이러스는 새우크기에 관계없이 폐사를 일으키지만 새우크기가 적을수록 병원성이 강하게 나타났다.

2. 바이러스 감염 역학조사

종묘생산용으로 사용되는 자연산 대하 및 보리새우 어미에서 바이러스가 검출

되며, 새우양식장 서식생물 중에서도 속, 속부치 및 게가 바이러스를 보균하고 있었다. 그리고 새우 바이러스는 저수온(4℃)에서는 해수중에서 120일까지 병원성을 유지하나, 고수온(25℃)에서는 15일 이내에 병원성을 상실하였다.

3. 새우 바이러스 질병의 신속진단법 개발

새우 바이러스 유전자의 염기서열을 분석해서 제작한 primer를 이용한 PCR법은 바이러스 진단감도가 매우 뛰어나 0.1 picogram의 바이러스 DNA도 검출이 가능하였다. 그리고 동 진단법으로 새우양식장을 대상으로 바이러스 감염실태를 조사한 결과, 대부분의 새우양식장에서 바이러스가 검출되었다.

4. 바이러스 방역대책 기술개발

새우 바이러스는 염소소독, 일광소독, 건조 및 담수처리에 의해 병원성이 실효된다. 실내수조에서 바이러스에 오염된 저질을 염소소독하거나 저질개선하면 방역효과가 있으며, 또한 면역증강제를 급여하면 새우 항병력이 증대되었다. 그리고 새우양식장을 염소소독하고 저질을 개선한 후 면역증강제를 투여하면서 새우를 양식한 결과, 양식기간동안 대량폐사가 일어나지 않아 바이러스 질병에 대한 방역효과가 있음이 확인되었다. 아울러 바이러스를 보균한 대하어미에서 산출된 수정란을 세란하고 요오드로 소독하면 바이러스에 미감염된 새우종묘생산이 가능하였다.

V. 활용에 대한 건의

새우양식장 소독, 저질개선제 살포, 면역증강제 투여 등의 방역대책기술을 새우양식 어업인에게 보급하여 활용할 수 있도록 교육이 필요하며, 또한 새우 건강종묘

생산기술을 국립수산물품질관리원이나 민간 새우종묘생산 어업인에게 이전해서 바이러스에 미감염된 건강한 새우종묘를 생산, 공급하여 양식에 활용토록 기술지도가 시급하다. 그리고 국립수산물품질관리원은 새우양식장에 대한 바이러스 감염상태를 신속 진단법으로 주기적으로 조사하여 새우양식 어업인이 사전 예방대책을 강구할 수 있도록 진단 서비스를 제공하여야 한다.

Summary

I. Title

Studies on the control of cultured shrimp viral disease.

II. Purpose and significance

1. Final purpose

The final purpose of this study is to develop an effective shrimp virus control system to reduce loss of shrimp productivity by viral diseases on the cultured penaeid shrimp.

2. Significance

Shrimp culture industry has contributed to the local economic development of the western areas of Korea, as of the major income sources to the fisherman. However, since outbreak of viral diseases on the cultured shrimp occurred in 1993, the shrimp productivity was gradually decreased every year, resulting in 75% loss of cultured shrimp in 1996. Therefore, to expand and maintain the shrimp culture industry in Korea, it is urgent to identify the viral agent causing massive mortality of cultured shrimp and to develop a proper disease control system to minimize the losses.

III. The contents of this study

This study aimed to develop a disease control system against virus infection and the detailed contents of the study are as followed;

- Identification of the causative agent which leads to the massive mortality of cultured shrimp.
- Epidemiological studies of the shrimp virus.
- Development of the rapid diagnostic method to detect viral infection in shrimp.
- Development of the control system to protect cultured shrimps against viral diseases.

IV. Results

1. Identification of the causative agents

Viral infection and bad culture conditions were the major reasons which cause a massive death of shrimp in Korean shrimp farms since 1993. The causative virus was identified as WSBV, which is very similar or identical to PRDV which was previously isolated in Japan.

According to histopathological studies, several white spots were appeared on the carapace and the surface of infected shrimp and nuclei in the cells of ectodermal and mesodermal originated tissues were severely hypertrophied. The viral pathogenicity could be reproduced by artificial

infection of shrimp and it was stronger when the higher temperature and the smaller size of shrimp were involved.

2. Epidemiological studies of the shrimp virus

Virus was detected from naturally captured penaeid shrimps such as *P. chinensis* and *P. japonicus* and several species of crab, suggesting that these crustacean are carriers of virus in nature. The viral infectivity in sea water was maintained as long as 120 days at low temperature(4°C) but lost in 15 days at high temperature(25°C).

3. Development of the rapid diagnostic method

The genomic DNA sequence of shrimp virus was determined and a PCR diagnostic method using a pair of primers based on the genomic sequence was developed. This method was sensitive enough to detect at least 0.1 picogram of viral DNA. When applied this technique to field study, it turned out that most of shrimps cultured in the westerned areas of Korea were infected with virus.

4. Development of the control system against shrimp viral diseases

The virus was readily inactivated by chlorination, sunlight exposure drying and treatment of freshwater. According to experiments in indoor water tanks, shrimp death rate could be significantly reduced by chlorination of water and improvement of water quality. Also, feeding periodically shrimp

feed supplemented with immunostimulants it was possible to increase the resistance strength against virus, thus to prevent viral disease. Also, no massive mortality occurred when the same control system was applied to the shrimp farms. Furthermore, it was possible to produce a lot of non-infected hatchery shrimps by chlorination of fertilized eggs and washing them with UV-treated water.

Contents

List of Tables	16
List of Figures	18
Chapter 1. Introduction	27
Section 1. Purpose and significance of this study	27
Section 2. Scheme and extent of this study	28
Chapter 2. Investigation of mass mortality in shrimp	30
Section 1. Introduction	30
Section 2. Materials and methods	30
I. Characteristic of virus	30
1. Isolation of virus	31
2. Culture of virus	31
3. Physical and chemical test of virus	31
4. Viral particle by TEM	33
5. Analysis of viral structure protein	33
6. Analysis of viral nucleic acid	34
7. Amplification of viral genome	34
II. Pathological observation on the infected shrimp	35
1. Naturally infected shrimp	35
2. Artificially infected shrimp	35

3. Histopathological observation	36
III. Pathogenicity test of virus	36
1. Pathogenicity test by the methods of infection	36
2. Pathogenicity test by the water temperatures	37
3. Pathogenicity test by the shrimp sizes	37
Section 3. Results and discussion	38
I . Characteristics of virus	38
II. Viral particle by TEM	40
III. Analysis of viral structure protein and viral nucleic acid	40
IV. Amplification of viral genome	42
V. Identification of virus	42
VI. External symptom and histopathological change	46
1. External symptom	46
2. Histopathological observation	46
VII. Pathogenicity of virus	52
1. Pathogenicity by the methods of infection	52
2. Pathogenicity by the water temperatures	55
3. Pathogenicity by the shrimp sizes	55
Chapter 3. Epidemiological investigation of the shrimp virus	57
Section 1. Introduction	57
Section 2. Materials and methods	58
I . Virus detection from shrimp spawner	58

1. Fresh shrimp	58
2. Kuruma shrimp	58
II. Virus detection from inhabitant organisms in shrimp farms	58
III. Survival test in seawater	59
1. Survival test in low temperature seawater	59
2. Survival test in high temperature seawater	59
Section 3. Results and discussion	60
I. Shrimp spawner	60
II. Inhabitant organism	60
III. Survival in seawater	64
1. Low temperature seawater	64
2. High temperature seawater	65
Chapter 4. Rapid diagnosis development of the viral disease in shrimp	66
Section 1. Introduction	66
Section 2. Materials and methods	66
I. Isolation of virus	67
II. Isolation of viral DNA	67
III. Construction of WSBV genomic library and selection of recombinant plasmid DNA	68
IV. Southern hybridization	68
V. DNA sequencing and sequence analysis	69
VI. PCR amplification	69

Section 3. Results and discussion	70
I . Results	70
1. Isolation and DNA purification of virus	70
2. Construction and selection of virus genomic library	70
3. DNA sequencing and sequence analysis	70
4. Virus infection diagnosis by Southern blotting	80
5. PCR amplification of purified viral DNA	80
6. Sensitivity of PCR test	80
7. Direct detection of viral DNA from infected shrimp	81
8. Latent infection and diagnosis of postlarval shrimp	81
9. Sensitivity amplification of rapid diagnosis method	84
10. Detection of WSBV from white spot	84
11. The field application by rapid diagnosis method	85
II. Discussion	88
Chapter 5. Development of the control system against shrimp viral disease...	91
Section 1. Introduction	91
Section 2. Materials and methods	92
I . Viral inactivation test	92
1. Chlorine disinfection	92
2. Iodine disinfection	92
3. Sunlight exposure	92
4. Drying treatment	93

5. Freshwater treatment	93
II. Disinfection test in indoor	93
1. Effect of disinfection on the sediment	93
2. Effect of improvement on the sediment	95
3. Effect of immunostimulant	96
III. Control test in shrimp pond	97
1. The first field experiment	97
2. The second field experiment	100
IV. Production of healthy shrimp seedling	105
1. Shrimp spawner	105
2. Washing of fertilized egg	105
3. Disinfection of fertilized egg	106
4. Hatching rate	108
5. Survival rate	108
6. Effect of disinfection	108
Section 3. Results and discussion	109
I. Viral inactivation	109
1. Chlorine	109
2. Iodine	109
3. Sunlight	111
4. Drying	112
5. Freshwater	113
II. Disinfection in indoor	115

1. Chlorine disinfection	115
2. Sediment improvement	115
3. Immunostimulant	121
III. Control test in shrimp pond	124
1. The first year	124
2. The second year	127
IV. Production of healthy shrimp seedling	143
1. Hatching rate	143
2. Survival rate	145
3. Effect of disinfection	147
 Chapter 6. References	 148

List of Tables

Table 1. Susceptibility of fish cell lines to WSBV	38
Table 2. Effect of physical and chemical treatments on the pathogenicity of WSBV	39
Table 3. Detecting rate of WSBV from wild-caught shrimp spawners by white spot symptoms	61
Table 4. Detecting rate of WSBV from wild-caught shrimp spawners by PCR	61
Table 5. Mortality of kuruma shrimp fed with inhabitant organisms caught in shrimp ponds	62
Table 6. Detecting rate of WSBV from inhabitant organisms caught in shrimp pond by PCR	63
Table 7. Pathogenicity of WSBV suspended in seawater at 4 °C	64
Table 8. Pathogenicity of WSBV suspended in seawater at 25 °C	65
Table 9. Nucleotide sequence homology between S1 and other organisms	75
Table 10. Amino sequence homology between S1 and other organisms	76
Table 11. Nucleotide sequence homology analysis of pTZ18RE3	79
Table 12. Infection status of shrimps cultured in 1996	87
Table 13. Infection status of shrimps cultured in 1997	90
Table 14. Virucidal effect of sodium hypochlorite on WSBV	110

Table 15. Virucidal effect of povidon-iodine on WSBV	111
Table 16. Virucidal effect of sunlight exposure on WSBV	112
Table 17. Virucidal effect of drying on WSBV	113
Table 18. Virucidal effect of freshwater on WSBV	114
Table 19. Growth of fresh shrimp in the field experiment in 1996	124
Table 20. Growth of fresh shrimp in the field experiment in 1997	129
Table 21. Result of fresh shrimp culture in 1997	130
Table 22. Hatching rate of fertilized eggs of fresh shrimp by iodine disinfection	144
Table 23. Hatching rate of fertilized eggs of kuruma shrimp by iodine disinfection	146

List of Figures

Fig. 1. Electron microscopy of the lymphoid organ of naturally infected fresh shrimp	41
Fig. 2. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of viral proteins	42
Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of viral nucleic acids	44
Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of the products by PCR amplification of WSBV gene	45
Fig. 5. External signs of naturally infected fresh shrimp	47
Fig. 6. White spot symptoms of naturally infected fresh shrimp	48
Fig. 7. Magnified photography of white spots	49
Fig. 8. Photomicrographs of hypertrophied nuclei in the tissues of naturally infected fresh shrimp	50
Fig. 9. Mortality of fresh shrimp by artificial infections with WSBV	53
Fig. 10. Mortality of fresh shrimp infected with WSBV by water temperatures	54
Fig. 11. Mortality of fresh shrimp infected with WSBV by shrimp sizes	56
Fig. 12. Ethidium bromide-stained agarose gel of WSBV DNA	71
Fig. 13. Slot blotting analysis of WSBV recombinant clones	73
Fig. 14. Nucleotide sequence of WSBV recombinant clone S1	74
Fig. 15. Amino acid sequence derived from S1 nucleotide sequence	74

Fig. 16. Nucleotide sequence of WSBV recombinant clone	
pTZ18RE3	77
Fig. 17. Slot blot analysis of shrimp genomic DNA	81
Fig. 18. Agarose gel electrophoresis of the PCR product of	
WSBV DNA	81
Fig. 19. Detection limit of WSBV DNA by PCR amplification	83
Fig. 20. Detection of WSBV DNA from infected shrimp by PCR	
amplification	83
Fig. 21. Detection of WSBV DNA from white spots on the	
carapace	85
Fig. 22. Field applications of PCR diagnostic method in 1996	86
Fig. 23. Field applications of PCR diagnostic method in 1997	89
Fig. 24. Design of shrimp ponds for the field experiment in 1996	99
Fig. 25. Design of shrimp ponds for the field experiment in 1997	103
Fig. 26. Diagram of washing fertilized eggs of fresh shrimp	107
Fig. 27. Effect of disinfecting sediment contaminated with	
WSBV by sodium hypochlorite	117
Fig. 28. Changes of water quality parameters (DO, pH, salinity, COD)	
in rearing tanks by improvement reagents	118
Fig. 29. Changes of water quality parameters (NO ₃ -N, NO ₂ -N, NH ₄ -N,	
PO ₄ -P) in rearing tanks by improvement reagents	119
Fig. 30. Changes of sediment quality parameters (pH, TS, IL, COD)	
in rearing tanks by improvement reagents	120

Fig. 31. Mortality of fresh shrimp infected with WSBV by improvement reagents	122
Fig. 32. Mortality of fresh shrimp infected with WSBV by peptidoglycan	123
Fig. 33. Changes of water quality parameters in shrimp ponds	135
Fig. 34. Changes of sediment quality parameters in shrimp ponds	140
Fig. 35. Survival rates of shrimp larvae by stage	146

목 차

제 1 장 서 론	27
제 1 절 연구개발의 목적 및 중요성	27
제 2 절 연구개발의 추진체계 및 범위	28
제 2 장 새우 대량폐사 원인조사	30
제 1 절 서 론	30
제 2 절 재료 및 방법	30
1. 원인 바이러스 특성시험	30
가. 바이러스 분리	31
나. 바이러스 배양	31
다. 바이러스 특성시험	31
라. 바이러스 입자관찰	33
마. 바이러스 구조단백분석	33
바. 바이러스 핵산분석	34
사. 바이러스 유전자증폭	34
2. 감염 새우의 병리학적 특징 관찰	35
가. 자연감염 새우	35
나. 인위감염 새우	35
다. 병리조직 관찰	36
3. 새우 바이러스의 병원성 시험	36
가. 감염방법별 병원성	36

나. 사육수온별 병원성	37
다. 새우크기별 병원성	37
제 3 절 결과 및 고찰	38
1. 바이러스 특성	38
2. 새우 바이러스 입자	40
3. 바이러스 구조단백 및 핵산	40
4. 새우 바이러스의 유전자 증폭산물	43
5. 새우 폐사원인 바이러스 동정	43
6. 외부증상 및 병리조직	46
가. 새우 외부증상	46
나. 병리조직	46
7. 바이러스의 병원성	52
가. 감염방법별	52
나. 사육수온별	55
다. 새우크기별	55
제 3 장 새우 바이러스 감염 역학조사	57
제 1 절 서 론	57
제 2 절 재료 및 방법	58
1. 어미새우의 바이러스 보균조사	58
가. 대하어미 조사	58
나. 보리새우어미 조사	58
2. 서식생물의 바이러스 보균조사	58

3. 바이러스의 해수 생존 가능성 조사	59
가. 저수온 생존시험	59
나. 고수온 생존시험	59
제 3 절 결과 및 고찰	60
1. 새우어미	60
2. 서식생물	60
3. 바이러스의 해수 생존 가능성	64
가. 저수온	64
나. 고수온	65
제 4 장 새우 바이러스 질병 신속진단법 개발	66
제 1 절 서론	66
제 2 절 재료 및 방법	67
1. 바이러스 분리	67
2. 바이러스 DNA 분리	67
3. 새우 바이러스 genomic library의 구축 및 재조합 plasmid DNA의 선별	68
4. Southern 혼성화법	68
5. DNA sequencing 및 염기서열 분석	69
6. PCR 증폭	69
제 3 절 결과 및 고찰	70
1. 결과	70
가. 바이러스 분리 및 DNA 정제	70

나. 바이러스 게놈 library의 제조 및 선별	70
다. DNA sequencing 및 염기서열 분석	72
라. Southern blotting에 의한 바이러스 감염의 진단	80
마. 정제된 바이러스 DNA의 PCR증폭	80
바. PCR법의 감도 테스트	80
사. 감염새우로 부터 바이러스 DNA의 직접 검출	81
아. 잠복성 감염 및 치하의 진단	81
자. 신속진단법 감도증진시험	84
차. 감염새우의 갑각에 나타난 흰 반점으로부터 WSBV의 검출	84
카. 신속진단법 현장적용시험	85
2. 고찰	88
제 5 장 바이러스 방역대책 기술개발	91
제 1 절 서 론	91
제 2절 재료 및 방법	92
1. 바이러스 불활화시험	92
가. 염소소독	92
나. 요오드소독	92
다. 일광조사	92
라. 건조처리	93
마. 담수처리	93
2. 실내 방역시험	93
가. 저질소독 효과시험	93

나. 저질개선 효과시험	95
다. 새우 면역 증강시험	96
3. 새우양식장 방역시험	97
가. 1차 현장시험	97
나. 2차 현장시험	100
4. 새우건강종묘 생산시험	105
가. 어미새우	105
나. 수정란세란	105
다. 수정란소독	106
라. 부화율조사	108
마. 생존율조사	108
바. 소독효과조사	108
제 3 절 결과 및 고찰	109
1. 바이러스 불활화시험	109
가. 염소소독	109
나. 요오드소독	109
다. 일광소독	111
라. 건조처리	112
마. 담수처리	113
2. 실내 방역 효과시험	115
가. 저질 염소소독	115
나. 저질개선	115
다. 면역증강시험	121

3. 새우 양식장 방역시험	124
가. 1차 현장시험	124
나. 2차 현장시험	127
4. 새우 건강종묘 생산시험	143
가. 부화율	143
나. 생존율	145
다. 소독효과	147
제 6 장 참고 문헌	148

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 목적 및 중요성

우리나라 새우 양식산업은 서해안 지역을 중심으로 급속히 발전하였으나 1993년에 바이러스 질병이 발병하여 양식산 대하 및 보리새우를 대량폐사시킨 후 매년 피해량이 증대되고 있는데, 바이러스에 감염된 새우는 두홍부 및 체표에 흰반점 증상을 나타내므로 병명을 white spot syndrome disease(WSSD)라 부르고 있다. WSSD로 인한 새우 대량폐사는 비단 우리나라 뿐만 아니라 아시아 전역에서 일어나고 있으며, 일본에서는 양식산 보리새우의 대량폐사 원인을 penaeid rod-shaped DNA virus(PRDV) 감염에 의한 penaeid acuteviremia(PAV)라 하기도 하고, 중국에서는 hypodermal and hematopoietic necrosis virus(HHNBV) 감염에 의한 explosive epidemic disease라고도 한다.

지금까지 보고된 자료에 의하면 전세계적으로 10여종의 새우 바이러스 질병이 알려져 있지만 WSSD 만큼 병원성이 강하고 감염대상 새우도 다양하면서 발병지역이 넓은 질병은 보고된 바가 없다. 따라서 WSSD가 발병한 국가에서는 본 바이러스 질병을 퇴치하기 위해 많은 노력을 하고 있지만, 아직까지 획기적인 방역대책 기술을 개발하지 못하고 있다. 특히, 본 바이러스 질병은 한정된 지역에서 집약적으로 새우를 양식할 경우에는 집단적으로 대량폐사가 일어나는데, 우리나라는 1996년에 양식 총 예상 생산량의 75% 정도가 폐사함으로 인해 새우양식 어업인에게 엄청난 경제적 손실을 입힌 바가 있기 때문에 본 바이러스 질병에 대한 방역대책 기술이 더욱 더 시급히 개발되어야 한다. 그래서 본 연구개발사업에서는 1차년도에 양식산 새우의 대량폐사 원인을 정확히 규명하고 유전공학기법을 이용한 질병 신

속진단법과 질병감염 역학조사 및 방역기초기술을 개발한 후, 2차년도에는 새우양식장에서 실용화가 가능한 신속진단법과 방역기술을 개발하고자 하였다.

제 2 절 연구개발의 추진체계 및 범위

본 연구개발 사업의 추진체계는 새우 대량폐사 원인을 규명하기 위해 폐사한 새우로부터 병원체를 분리하여 인위감염에 의한 병원성을 확인한다. 그리고 질병감염 역학조사와 실내소독 및 저질개선시험을 통해서 방역 기초기술을 개발하고 유전공학적인 기법을 이용해서 질병 신속진단법을 개발한다. 개발된 질병 신속진단법의 실용화는 현장적용시험을 통해 가능성을 확인하고 새우 건강종묘 생산시험과 양식장 소독 및 저질개선에 의한 방역효과시험으로 방역대책 기술을 개발한다. 그리고 본 연구개발 사업의 추진범위는 새우 대량폐사 원인조사, 질병 신속진단법 개발, 양식장 환경 및 질병실태 조사, 질병감염 역학조사, 새우 건강종묘 생산 및 방역효과 시험으로 한다.

새우 대량폐사 원인을 조사하기 위해 폐사한 새우로부터 원인 바이러스를 분리·동정하고 바이러스의 병원성을 감염방법별·수온별·새우 크기별로 확인하며 감염된 새우의 병리조직학적 관찰도 실시한다.

바이러스 감염 역학조사는 종묘생산용으로 이용되는 자연산 대하 및 보리새우 어미와 새우양식장에 서식하고 있는 서식생물에 대한 바이러스 보균상태를 조사하고, 바이러스의 해수에서 생존성을 확인하여 바이러스 감염경로를 규명한다.

그리고 질병 신속진단법을 개발하기 위해 폐사한 새우로부터 분리한 바이러스의 핵산을 분석하여 primer를 합성한 후 유전자 증폭법(PCR)에 의한 신속진단법을 개발하여 새우양식장을 대상으로 바이러스 감염실태를 조사한다. 바이러스 방역

대책기술을 개발하기 위해 실험실 내에서 바이러스 소독시험, 저질소독 및 개선시험, 새우 면역증강시험을 실시하고 현지 새우양식장을 시험어장으로 조성하여 양식장 소독, 저질개선, 담수처리 및 면역증강제 투여에 의해서 바이러스 질병에 대한 방역효과시험을 실시하고 바이러스에 감염된 새우어미의 수정란을 세척하고 소독하여 바이러스에 미감염된 건강한 새우종묘 생산기술을 개발한다.

제 2 장 새우 대량폐사 원인조사

제 1 절 서 론

우리나라 새우 양식산업은 서해안 지역을 중심으로 130여개소의 새우양식장에서 연간 2천여톤의 새우를 생산하였으나 1993년 6~7월에 충남 태안 및 전북 고창 지역에서 난치성 전염병이 처음 발병한 후 매년 양식산 새우를 대량폐사 시키고 있고 피해지역도 점차 확산되고 있다. 감염된 새우는 두홍갑 및 체표에 흰반점 증상이 나타나므로 병명을 일반적으로 white spot syndrome disease(WSSD)라고도 부르는데 이와 같은 증상으로 인한 새우 대량폐사는 아시아 전역에서 일어나고 있다. 그래서 일본에서는 새우 대량폐사 원인을 처음에는 RV-PJ(rod-shaped nuclear virus of *Penaeus japonicus*) 감염증이라 하였으나, 그 후 井上 等(1996)이 보리새우류의 급성 바이러스 혈증(penaeid acutes viremia; PAV)이라 하고 폐사 원인 바이러스를 PRDV(penaeid rod-shaped DNA virus)라 하였으며, 중국에서는 이와 같은 새우질병을 explosive epidemic disease이라 하고, 폐사원인 바이러스를 HHNBV(hypodermal and hematopoietic necrosis baculovirus)라 하였다. 따라서 본 연구에서는 우리나라 새우양식장에서 양식산 새우를 대량폐사 시키는 원인을 정확히 규명하기 위해 폐사한 새우로부터 바이러스를 분리하여 바이러스의 특성시험과 병리조직 관찰 및 병원성 시험을 실시하였고, 또한 폐사원인인 바이러스를 일본에서 분리된 바이러스와 비교하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 원인 바이러스 특성시험

가. 바이러스 분리

서해안 지역(경기 화성, 충남 태안, 전북 고창 및 부안, 전남 영광)의 새우양식장에서 발병한 양식산 대하를 1993년부터 현지에서 수집하여 실험에 사용할 때까지 -85°C 에서 냉동보관하였다.

냉동보관한 대하의 두흉부조직(간체장, 림프기관, 위, 심장 등)을 적출하여 유발에 넣고 10배량의 PPB를 첨가해서 저온상태에서 마쇄한 후 $7,000\times\text{g}$ 에서 15분간 원심분리(Sorvall RC5C)하여 상층액을 수획하였다. 수획한 상층액은 $20,000\times\text{g}$ 에서 2시간 초원심분리(Beckman L₇)하여 pellet를 만든 다음, 3배량의 PPB로 재현탁해서 sucrose(20~50% w/w) 농도구배에서 $200,000\times\text{g}$ 로 3시간동안 초원심분리하여 바이러스를 분리하였다.

나. 바이러스 배양

새우 대량폐사 원인 바이러스를 순수분리하기 위해 어류주화세포를 이용하여 세포 배양법으로 바이러스 배양을 시도하였다.

바이러스 배양에 사용한 어류주화세포는 CHSE-214, RTG-2, EPC 및 FHM이며, 이들 어류주화세포는 DMEM 기본배지에 10% FBS(Gibco), 10mM glutamine(Gibco), 100 I.U./ml penicillin 및 streptomycin(Sigma)을 첨가한 배지로 배양하였다. 단층배양된 어류 주화세포에 바이러스에 감염된 새우 두흉부조직의 마쇄 여과액을 접종한 후 20°C , 25°C 에서 1주일간 배양하고 세포변성효과(CPE)가 나타나지 않으면 명목계대(blind passage)를 2회 실시하여 바이러스를 배양하였다.

다. 바이러스 특성시험

1) 바이러스액 제조

냉동보관한 대하의 두흉부조직을 적출하여 유발에 넣고 10배량의 멸균해수를 첨가해서 마쇄한 후, 7,000×g에서 15분간 원심분리하여 상층액을 수확하였다. 수확한 상층액은 0.45 μ m membrane filter(Corning)로 여과해서 -85℃에 냉동보관하면서 각종 실험용 바이러스액으로 사용하였다.

2) 바이러스의 물리, 화학적 처리

가) 열 안정성 시험

새우 바이러스액 5ml를 넣은 시험관에 멸균해수 5ml를 넣고 잘 흔든 후 50℃로 조정된 항온수조에서 30분간 방치하여 열(50℃)에 대한 새우 바이러스의 안정성을 시험하였다.

나) 강산 및 강알칼리 감수성 시험

pH 3, 11로 조정된 멸균해수 100ml에 새우 바이러스액 5ml를 넣고 3시간동안 정치하여 강산(pH 3)이나 강알칼리(pH 11)에 대한 새우 바이러스의 감수성을 시험하였다.

다) 에테르 감수성 시험

새우 바이러스액 4ml가 들어 있는 시험관에 에틸 에테르 1ml를 첨가하고 4℃에서 18시간동안 진탕한 후 에테르에 대한 새우 바이러스의 감수성을 시험하였다.

라) 바이러스 접종 및 병원성 조사

열, 강산, 강알칼리 및 에테르 처리한 새우 바이러스액 전량을 해수가 들어있는 20 l 아크릴수조에 각각 넣고 건강한 보리새우치하(평균체중 0.5g) 10미씩을 수

용한 다음, 수온 $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 에서 10일간 새우배합사료(천하제일사료)를 소량씩 급이하면서 새우 폐사유무를 관찰하였으며, 시험기간동안 수질악화를 방지하기 위해 매일 사육수량의 10% 정도를 환수하였다. 그리고 사육수조에 바이러스액을 처리하지 않고 첨가한 감염구와 바이러스액을 첨가하지 않은 미감염구를 각각 감염 대조구와 미감염 대조구로 설정하였다.

라. 바이러스 입자 관찰

바이러스 감염으로 인해 두홍갑 및 체표에 흰반점을 형성한 대하의 두홍부조직을 2.5% glutaraldehyde 액(pH 7.2, 4°C)으로 24시간동안 전고정하고 실온에서 2시간동안 1% osmium tetroxide 액(pH 7.2)으로 후고정하였다. 이어서 알코올계열로 탈수하여 푸로필렌옥사이드로 치환하고 Epon 812로 열중합해서 초미세절편기(Reichert-Jung)로 박질(60~90mm)하여 grid에 붙히고 uranyl acetate and lead citrate로 이중염색해서 투과전자현미경(Hitachi H-7100)로 바이러스 입자형태를 관찰했다.

마. 바이러스 구조단백 분석

새우감염 바이러스의 구조단백 분석을 위한 전기영동은 Laemmli(1970)의 방법에 따라 실시하였다. 즉 농축, 정제된 새우감염 바이러스를 동량의 SDS-sample buffer(2.3% SDS;0.05mM Tris, pH 6.8;10% glycerol (w/v);5% 2-mercaptoethanol)와 혼합하여 끓는 물에 2분간 처리하고 $10,000 \times g$ 에서 10초간 원심하여 시료를 준비하였다. 준비된 시료를 10% polyacrylamide gel에 loading하여 200 volts로 3시간 정도 전기영동한 다음 coomassie blue R-250으로 염색하고 탈색액(50% methanol;10% acetic acid)으로 탈색하였다. 바이러스 단백질의 분자량은 표준단백질

의 이동거리와 비교하여 결정하였다.

바. 바이러스 핵산 분석

새우감염 바이러스의 핵산을 분석하기 위해 바이러스 농축액 100 μ l에 reaction buffer 10 μ l(10mM Tris pH 7.6, 5mM EDTA pH 8.0, and 1% SDS)와 proteinase K(20mg/ml) 15 μ l를 넣고 혼합하여 55 $^{\circ}$ C에서 2시간동안 전처리하였다. phenol/chloroform으로 바이러스 핵산을 추출하고, 1/10의 3M 초산암모늄과 2배량의 무수에탄올을 첨가하여 -20 $^{\circ}$ C에 보관하면서 핵산을 침전시킨 다음, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 핵산을 모았다. 모아진 핵산은 TE buffer로 녹여서 실험에 사용할 때까지 -20 $^{\circ}$ C에 보관하였다. 바이러스 핵산은 상법에 따라 *Bam*H I, *Eco*R I, *Hind*III등의 제한효소를 이용하여 전체 길이를 확인하였다. TE에 녹인 바이러스 핵산 10 μ l를 eppendorf tube에 넣고 각 tube에 제한효소 1 unit, 10 \times reaction buffer를 넣은 후 37 $^{\circ}$ C에서 2시간동안 반응시킨 다음 1% agarose gel로 50 volts에서 2시간동안 전기영동하였다. 바이러스 핵산 band는 UV light상에서 확인하였다.

사. 바이러스 유전자 증폭

바이러스에 감염된 새우의 위상피와 표피를 적출하여 완전히 마쇄한 후 alkaline 처리법에 의해 total DNA를 분리하였는데, 치하의 경우에는 시료 전체를 마쇄하여 분리하였다. DNA의 분리여부는 0.7% agarose gel을 이용한 전기영동에 의해 확인하였다.

PCR 반응은 총 20 μ l의 volume으로 실시하였으며, 반응액에는 (주)바이오니아의 pre-mix 1 μ l, 100pM의 각 primer(5' ATC TGA TGA GAC AGC CCA AAG 3'와 5' GGG AAT GTT AAA TAT GTA TCG G 3'), 그리고 10ng의 template DNA를 사용하였다. PCR machine은 Perkin-Elmer사의 제품을 이용하

였고, 반응조건은 94 °C에서 5분간 변성시킨 뒤에 94 °C에서 30초간 denaturation, 55 °C에서 45초간 annealing, 72 °C에서 45초간 extension시켰다. 마지막에 72 °C로 5분간 extension을 완성시켰다. 반응종료 후, 1.5% agarose gel을 이용한 전기영동에 의해 바이러스 DNA가 증폭된 PCR 산물을 확인하였다. 한편 우리나라 새우양식장에서 분리된 바이러스와 일본 새우양식장에서 분리된 바이러스가 같은 종류인지를 비교하기 위해 Kimura(1996)가 일본새우 바이러스(PRDV)를 이용하여 제작한 primer(5' ATC ATG GCT GCT TCA CAG AC 3'와 5' GGC TGG AGA GGA CAA GAC AT 3', 5' TCT TCA TCA GAT GCT ACT GC 3'와 5' TAA CGC TAT CCA GTA TCA CG 3')를 사용해서 PCR반응을 실시하여 증폭된 PCR 산물을 비교하였다.

2. 감염새우의 병리학적 특징 관찰

가. 자연감염 새우

1995년 7월~8월에 서해안 지역에서 바이러스 감염으로 인해 폐사가 일어나고 있던 새우양식장의 대하를 채집해서 Davidson 액에 고정하여 병리조직 시험용으로 사용하였다.

나. 인위감염 새우

바이러스에 미감염된 건강한 대하(평균체중 8.7g) 10미를 150 ℓ F.R.P 수조에 수용하고 사육수온을 $25 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 로 조정한 후 바이러스에 감염된 대하의 두흉부조직을 1일 3회씩 2일간 먹이로 투여한 다음 새우배합사료를 연속해서 투여하면서, 시험기간중 새우의 유영상태와 외관증상을 육안적으로 매일 관찰하고 폐사 직전의 새우를 Davidson액에 고정하여 병리조직 시험에 사용하였다.

다. 병리조직 관찰

자연감염된 대하와 인위감염된 대하의 조직을 상법에 따라 조직절편을 만들어서 hematoxyline-eosin 및 giemsa염색을 실시하여 광학현미경으로 병리조직학적 관찰을 실시하였다.

3. 새우 바이러스의 병원성시험

가. 감염방법별 병원성

1) 주사감염

바이러스에 미감염된 대하(평균체중 15g) 10마의 복부근육 3절과 4절 사이에 냉동제조 보관한 새우 바이러스액 0.1ml씩을 주사한 다음 150 ℓ F.R.P 수조에 수용하고 새우배합사료를 급이하면서 폐사유무를 관찰하였다. 시험기간동안 사육수온은 $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 로 유지하고 유수식으로 사육수를 1일 3~5회전 환수하였다. 그리고 대조구는 새우 바이러스액 대신 멸균한 해수 0.1ml를 주사하였다.

2) 침지감염

바이러스 미감염된 건강한 대하(평균체중 15g) 10마를 150 ℓ F.R.P 수조에 수용하고 새우 바이러스액 5ml씩을 3일간 첨가하고 새우배합사료를 급이하면서 폐사유무를 관찰하였다. 시험기간동안 사육수온은 $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 로 유지하고 사육수는 바이러스액을 첨가하여 2시간이 경과한 후 부터 유수하여 1일 3~5회전 환수하였다. 그리고 대조구는 새우 바이러스액을 첨가하지 않고 시험하였다.

3) 경구감염

바이러스 미감염된 건강한 대하(평균체중 15g) 10마를 150 ℓ F.R.P 수조에 수

용하고 바이러스에 감염된 새우의 두홍부조직을 1일 3회씩 2일간 먹이고 난 후 새우배합사료를 급이하면서 폐사유무를 관찰하였다. 시험기간동안 사육수온은 $25 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 로 유지하고 유수식으로 사육수를 1일 3~5회전 환수하였다. 그리고 대조구는 바이러스에 감염된 대하의 두홍부조직 대신 바이러스에 미감염된 대하의 두홍부조직을 1일 3회씩 2일간 급이하였다.

나. 사육수온별 병원성

바이러스에 미감염된 건강한 대하(평균체중 15g) 10미씩을 150 ℓ F.R.P 수조에 수용하고 히타로 수온을 가온해서 사육수온을 15°C , 20°C , 25°C , 30°C 로 조정 한 후 경구감염법으로 바이러스에 감염된 대하의 두홍부 조직을 1일 3회씩 2일간 먹인 다음 새우배합사료를 계속 급이하면서 사육수온별 폐사율을 관찰하였다. 시험기간동안 유수식으로 사육수를 1일 3~5회전 환수하였으며, 대조구는 바이러스에 감염된 대하의 두홍부 조직 대신 새우배합사료를 급이하면서 사육수온별로 시험하였다.

다. 새우크기별 병원성

사육수온을 $25^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 로 조정 한 150 ℓ F.R.P 수조에 평균체장 7g, 13g, 20g 인 건강한 대하 10미씩을 수용하고 경구감염법으로 바이러스에 감염된 대하의 두홍부조직을 1일 3회씩 2일간 먹인 다음 새우배합사료를 계속 급이하면서 새우크기별로 폐사율을 관찰하였다. 시험기간동안 유수식으로 사육수를 1일 3~5회전 환수하였으며, 대조구는 바이러스에 감염된 대하의 두홍부조직 대신 새우배합사료를 급이하면서 새우크기별로 시험하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 바이러스 특성

새우 폐사원인 바이러스를 순수분리하기 위해 어류주화세포를 이용하여 세포배양법으로 바이러스 배양을 시도하였으나 표 1에서와 같이 실험에 사용한 어류주화세포에서는 세포변성효과(CPE)가 전혀 나타나지 않아, 바이러스 순수배양이 불가능하였다.

그리고 새우 바이러스의 물리·화학적 특성을 알기 위해 새우 바이러스액을 에테르, 강산, 강알칼리 및 열처리하여 새우 병원성시험을 통해서 시험한 결과, 표 2에서와 같이 에테르를 처리한 새우 바이러스는 병원성을 상실하여 시험기간동안

Table 1. Susceptibility of fish cell lines to white spot baculovirus (WSBV)

Cell lines	Incubation temp. (°C)	No. of blind passage	CPE
RTG-2	20	2	-
CHSE-214	20	2	-
	25	2	-
EPC	20	2	-
	25	2	-
FHM	20	2	-
	25	2	-
BF-2	20	2	-
	25	2	-

폐사가 전혀 일어나지 않았지만, 대조구에서는 폐사율이 100%로 나타났다. 石井 (1973)에 의하면 일반적으로 envelope(외막)을 갖는 바이러스는 지질 용해제인 ether나 chloroform 등에 쉽게 실활되므로, 본바이러스 입자(virion)도 envelope (외막)을 갖고 있다.

Table 2. Effect of physical and chemical treatments on the pathogenicity of WSBV

Treatments	No. of shrimp tested	No. of shrimp died	Mortality (%)
Ether, 18 hrs	10	0	0
Sea water, 18 hrs (control)	10	10	100
pH 3, 3 hrs	10	0	0
pH 11, 3 hrs	10	9	90
pH 7, 3 hrs (control)	10	10	100
50°C, 30 min	10	0	0
4°C, 30 min (control)	10	10	100

그리고 새우 바이러스를 강산(pH 3), 강알카리(pH 11) 및 열처리(50°C) 처리한 결과, 강알카리(pH 11)에 처리한 새우 바이러스는 내성이 강해 실험기간동안 폐사율이 90%였으나 강산(pH 3) 및 열처리에는 쉽게 실활되어 실험기간동안 전

혀 폐사가 일어나지 않았다. 따라서 이와 같은 사실은 보리새우의 바콜로 바이러스성 중장선 괴사증의 원인 바이러스인 BMNV(baculoviral mid-gut gland necrosis virus)가 강알카리에는 내성이 강하나 강산 및 열처리(50℃)에는 감수성이 강해 쉽게 병원성을 상실한다고 한 실험결과와 유사하다(Momoyama *et al.*, 1989).

2. 새우 바이러스 입자형태

바이러스에 감염된 새우의 림프기관(lymphoid organ) 및 위 큐티클 상피세포의 핵내에는 다수의 바이러스 입자가 전자현미경으로 관찰된다(그림 1). 전자현미경에 의한 바이러스 입자(virion)는 간상 바이러스로서 크기가 250~300×50~70 nm이며 nucleocapsid와 envelope로 구성되어 있다.

따라서 본 실험에서 관찰한 결과에 의하면 새우 바이러스는 감염된 세포의 핵내에서 증식함으로 인해 바이러스 핵산은 DNA인 것으로 생각되며, 또한 바이러스 입자의 형태나 크기를 보면 본 바이러스가 DNA 바이러스중 baculovirus 일종으로 추정된다. 그리고 보리새우류에 병원성을 갖는 baculovirus와 본 바이러스를 비교하면 BP, MBV 및 PBV 바이러스는 감염세포중에서 다각체라 불리워지는 특이한 포매체(inclusion body)를 형성하지만 BMNV와 YBV 바이러스는 포매체를 형성하지 않는다. 따라서 포매체를 형성하지 않은 본 바이러스는 BMNV와 YBV 바이러스와 유사하지만 이들 바이러스와는 바이러스 입자크기에 차이가 있었다.

3. 바이러스 구조단백 및 핵산 분석

SDS-PAGE법으로 새우 바이러스의 구조 단백질을 분석한 결과 그림 2에서 처럼 분자량 14에서 190KDa의 범위내에 약 21개의 단백질 band가 확인되었는데, 이

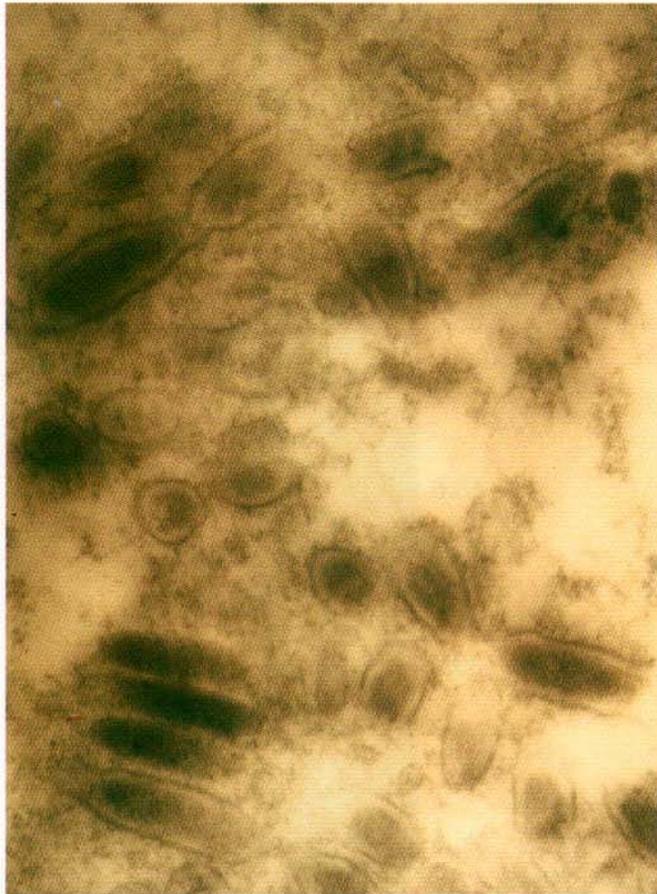


Fig. 1. Electron microscopy of the lymphoid organ of naturally infected fresh shrimp.



Fig. 1. Electron microscopy of the lymphoid organ of naturally infected fresh shrimp.

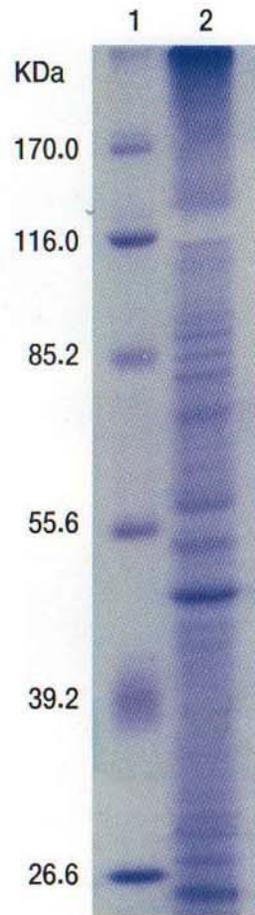


Fig. 2. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of viral proteins.
Lane 1 : Standard molecular weight marker,
Lane 2 : Viral protein.

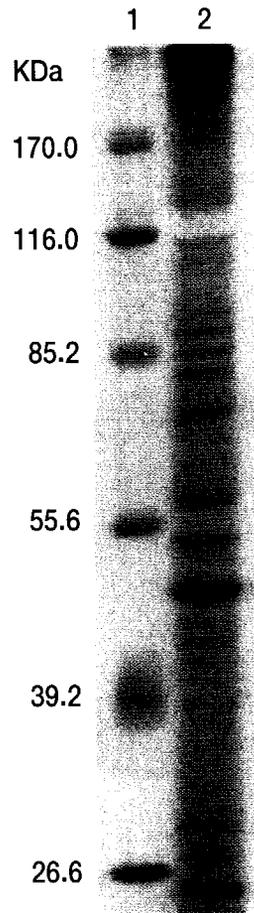


Fig. 2. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of viral proteins

Lane 1 : Standard molecular weight marker,

Lane 2 : Viral protein.

HHNBV 바이러스의 구조 단백질과 아주 유사하다(Huang *et al.*, 1995). 그리고 새우 바이러스의 total DNA를 *Bam HI*로 digestion하여 확인한 결과 그림 3에서 처럼 새우 바이러스의 핵산 크기는 약 114kb였다.

지금까지 보고된 자료에 의하면 일본에서 보리새우를 대량폐사시키는 새우류 급성 바이러스 혈증(PAV)의 원인 바이러스인 PRDV의 핵산크기는 163kb 정도 이고(Inouye *et al.*, 1996), 동남아지역에서 홍다리얼룩새우(*P. monodon*)를 대량 폐사시키는 SEMBV(systemic ectodermal and mesodermal baculovirus)의 핵산 크기는 약 168kb로(wongteerasupaya *et al.*, 1995) 이들 두 종류의 바이러스에 비해 본 실험에 사용한 바이러스의 핵산크기는 약간 적지만 일반적으로 baculovirus의 핵산크기가 90~230kb임을 감안하면 baculovirus의 일종으로 생각된다.

4. 새우 바이러스의 유전자 증폭

우리나라 서해안 새우양식장에서 대량폐사를 일으키는 원인 바이러스가 '90년 대초부터 매년 일본 보리새우양식장에서 대량폐사를 일으키는 새우류 급성 바이러스 혈증(PAV)의 원인 바이러스인 PRDV와 같은 종류의 바이러스인지를 비교하기 위해 Kimura등(1996)이 제작한 primer를 이용하여 PCR반응을 실시한 결과, PRDV의 PCR product와 같은 크기인 약 570bp에서 PCR 산물이 생성되어(그림 4), 우리나라에서 분리된 새우 바이러스는 일본에서 분리된 새우 바이러스(PRDV)와 유사한 종으로 생각된다.

5. 새우폐사 원인 바이러스 동정

우리나라 새우양식장에서 분리된 새우 바이러스는 외막(envelope)이 있으면서 포매체(inclusion body)를 형성하지 않는 간상 바이러스로서, 바이러스 입자(virion)



Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of viral nucleic acids.

Lane M : λ -HindIII marker,

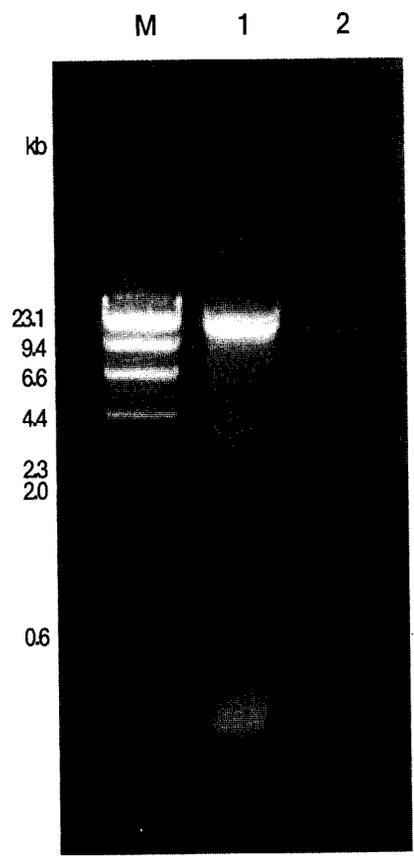


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of viral nucleic acids

Lane M : λ -HindIII marker.

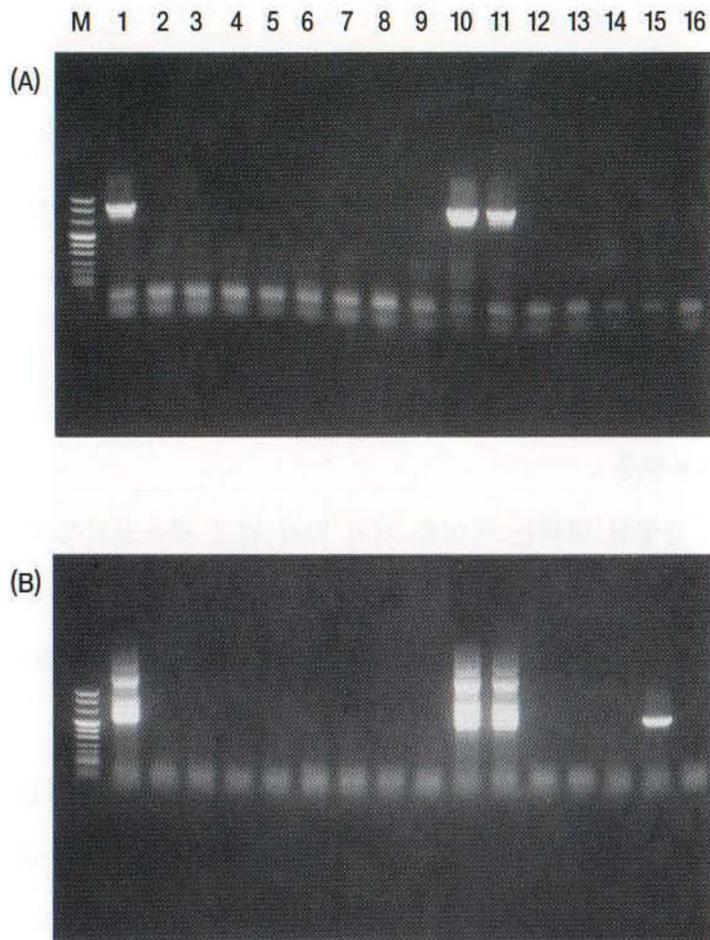


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of the products by PCR amplification of WSBV gene. (A) First amplification, (B) Nested amplification.

Lane M : 1 kb DNA ladder,

Lane 1, 10, 11, 15 : Diseased shrimp,

Lane 2~9, 12~14, 16 : Normal shrimp.

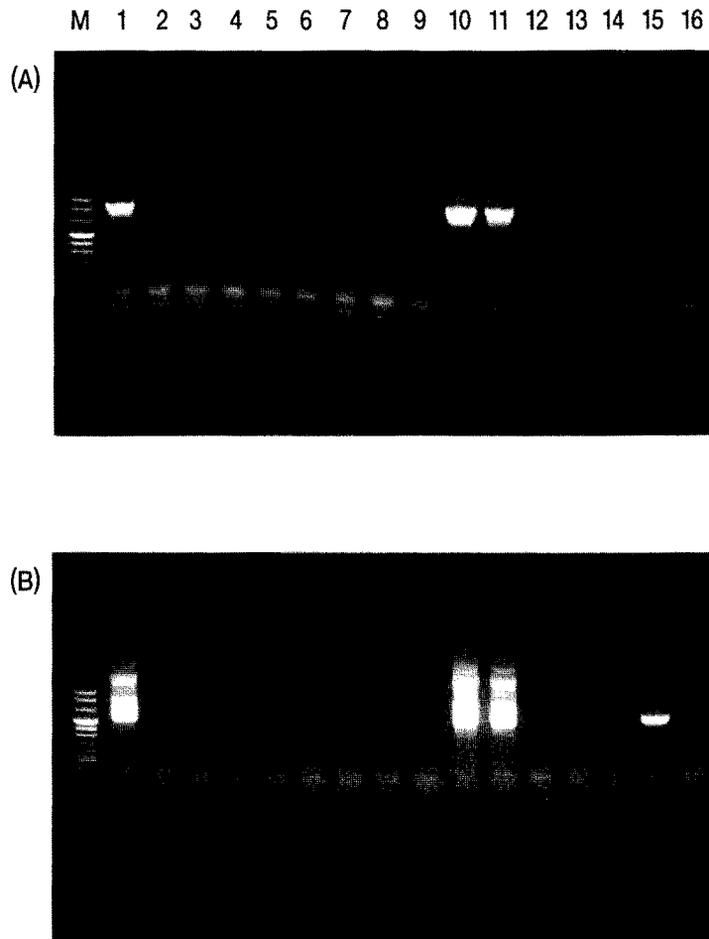


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of the products by PCR amplification of WSBV gene. (A) First amplification, (B) Nested amplification.

Lane M : 1 kb DNA ladder,

Lane 1, 10, 11, 15 : Diseased shrimp,

Lane 2~9, 12~14, 16 : Normal shrimp.

의 크기는 ultrathin section 상에서 $250 \sim 300 \times 50 \sim 70\text{nm}$ 였고, 바이러스의 구조단백은 분자량 14에서 190kDa 범위내에 약 21개의 단백질 band로 구성되어 있으며, total DNA의 크기는 약 114kb였다.

따라서 이상의 실험결과에 의하면 우리나라에서 분리된 바이러스는 WSBV로서 일본 보리새우양식장에서 분리된 새우류 급성 바이러스 혈증(PAV)의 원인 바이러스인 PRDV와 아주 유사한 바이러스로 생각된다.

6. 외부증상 및 병리조직

가. 새우 외부증상

바이러스에 감염된 대하는 먹이를 거의 먹지 않고 새우양식장 수면이나 가장자리를 힘없이 유영하다가 정지해서 단기간내 대량폐사한다. 감염된 대하는 육안적으로 보면 체색, 안테나, 꼬리 및 유영지가 붉게 되고 발병이 진행되며 따라 체색은 점차 퇴색되면서 안테나는 뿌러진다(그림 5).

특히 본 바이러스병에 감염된 대하는 특징적으로 두홍갑 및 체표의 큐티클층에 크기가 1-2mm 정도인 흰반점(white spot)을 형성하여 육안적으로 쉽게 관찰되는데(그림 6), 현미경으로 보면 흰반점은 국화꽃 모양을 하고 있다(그림 7). 그렇지만 이러한 증상은 바이러스 감염초기 단계에서는 거의 나타나지 않을 뿐만 아니라 경우에 따라서는 폐사가 일어나지 않은 양식장의 건강한 새우에서도 가끔 관찰되기 때문에 흰반점 형성 유무로서 새우 바이러스 감염상태를 정확히 진단하기에는 다소 문제가 있다고 생각된다.

나. 병리조직학적 관찰

본 바이러스병에 감염된 대하의 병리조직학적 이상은 큐티클층하의 상피세포층,



Fig. 5. External signs of naturally infected fresh shrimp. Diseased shrimp shows reddish scoloration of body, antenna and appendage.

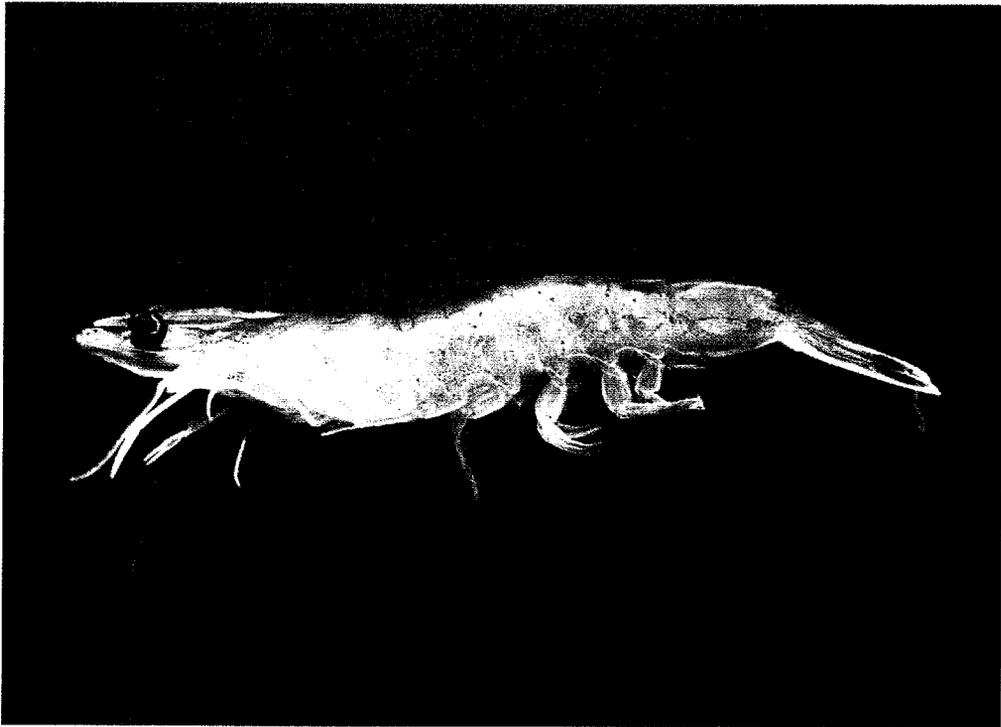


Fig. 5. External signs of naturally infected fresh shrimp. Diseased shrimp shows reddish scoloration of body, antenna and appendage.

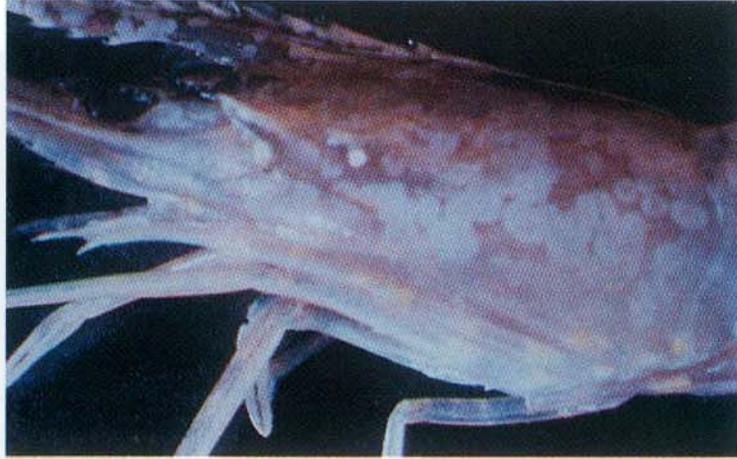


Fig. 6. White spot symptoms of naturally infected fresh shrimp.

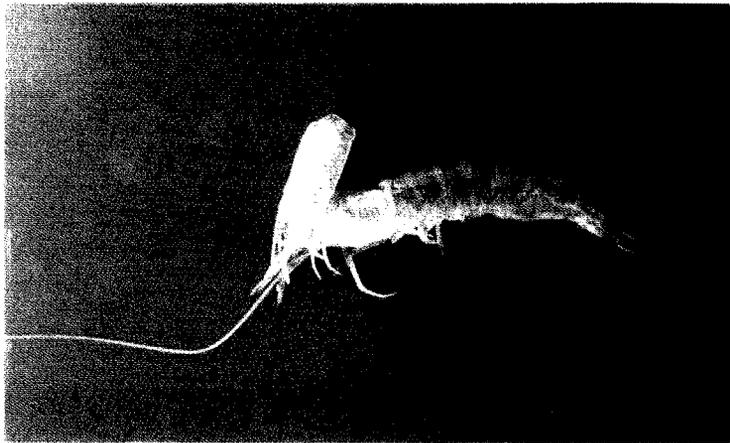


Fig. 6. White spot symptoms of naturally infected fresh shrimp

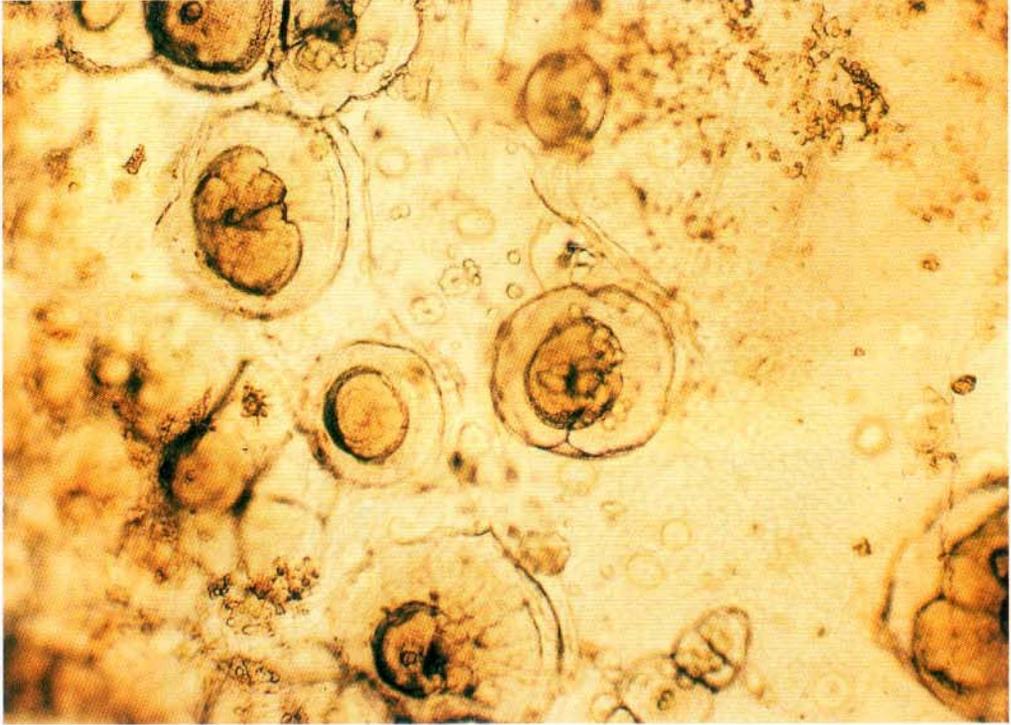


Fig. 7. Magnified photography of the white spots. White spots consist of larger outer transparent layer and smaller inner opaque layer.

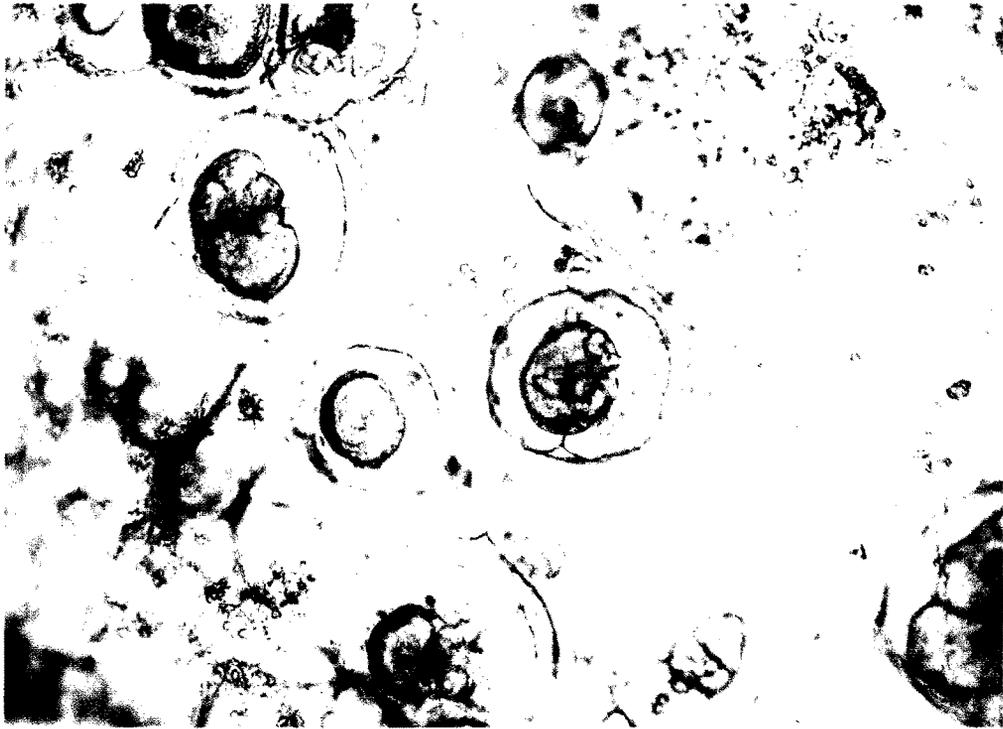


Fig. 7. Magnified photography of the white spots. White spots consist of larger outer transparent layer and smaller inner opaque layer.

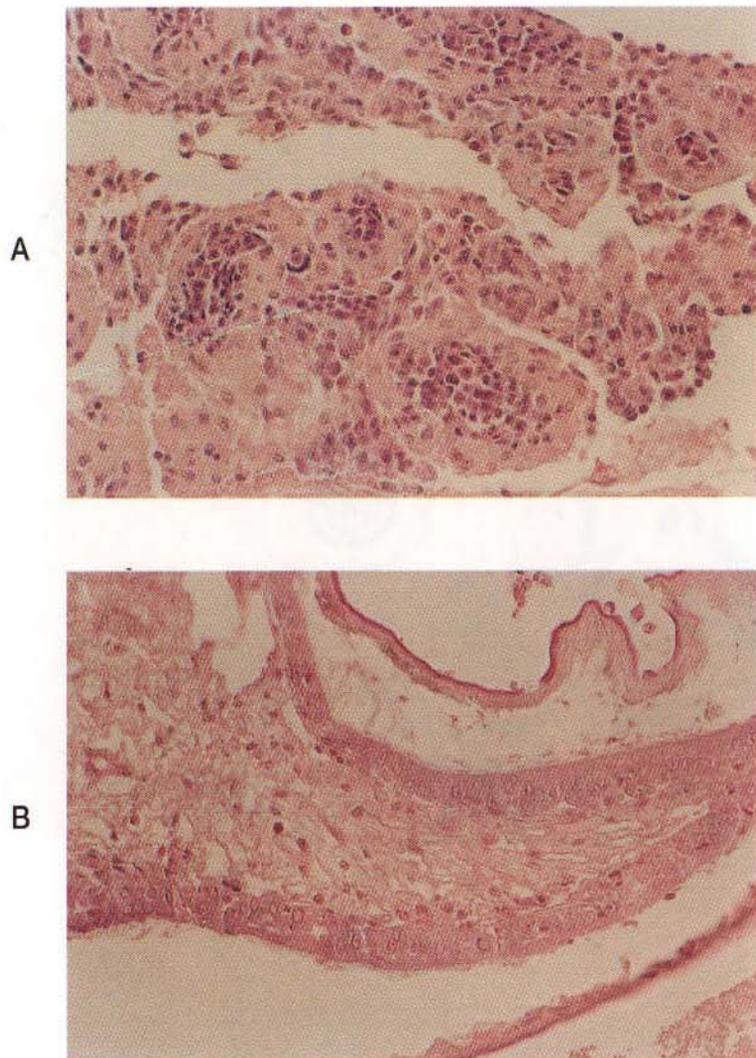


Fig. 8. Photomicrographs of hypertrophied nuclei in the tissues of naturally infected fresh shrimp, H-E stain.

A : Lymphoid organ, B : Stomach.

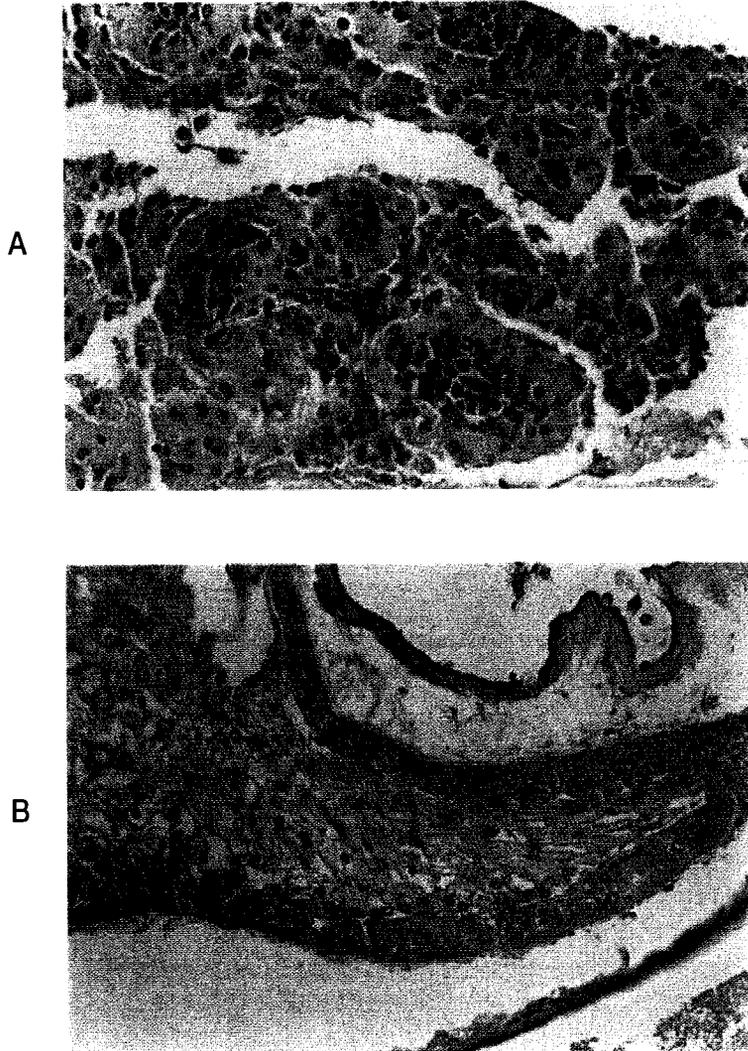


Fig. 8. Photomicrographs of hypertrophied nuclei in the tissues of naturally infected fresh shrimp. H-E stain.

A : Lymphoid organ, B : Stomach.

결합조직, 림프조직, 조혈조직 등 다양한 조직이나 기관에서 세포핵의 비대나 무구조화가 특징적인 병변으로 나타나고(그림 8), 이들 병변은 병리조직학적 실험에 사용한 새우의 감염정도에 따라 차이가 있었지만 자연감염된 새우나 인위감염된 새우에서 차이는 없었다. 그리고 병변세포의 이상핵의 중심부에는 hematoxylin에 진하게 염색되는 과립상 물질이 모여 있는 현상도 가끔 관찰되지만, 이상핵의 비대정도나 염색성 등은 세포종류에 따라서 상당한 차이가 있다. 이상핵(異常核)이 관찰되는 조직중에서도 그 출현빈도와 비대정도가 가장 심한 곳은 위상피 세포층이며, 림프기관에서는 세포핵의 비대나 무구조화가 비교적 적는데 비해 림프기관 고유의 구조인 초구조가 붕괴되거나 혈구 침윤현상이 일어난다. 그리고 baculovirus의 중요한 분류기준이 될 수 있는 봉입체(inclusion body)는 병변세포의 핵이나 세포질내에서 전혀 확인할 수 없었다.

지금까지 보리새우속 새우류에는 10여종의 바이러스가 보고되고 있다(Lightner *et al.*, 1992; Nadala *et al.*, 1992; Boonyaratpalin *et al.*, 1993). 이들중 세포병리학적으로 세포핵 비대증상을 초래하는 바이러스는 BP(Couch, 1974), BMNV(Sano *et al.*, 1981), MBV(Lightner *et al.*, 1983a) 및 PBV(Lester *et al.*, 1987)가 알려져 있으나 이들 baculovirus는 병변기관이 중장선(장을 포함함)에 한정되어 있기 때문에 본 연구에서 관찰된 병변조직이나 기관과는 차이가 있으며, 또한 IHHNV(Lightner *et al.*, 1983b)도 주요 피하조직과 조혈조직에 괴사를 일으키며 감염된 세포의 비대핵내에는 eosin호성의 Cowdry type A라 불리는 봉입체가 형성되기 때문에 본 바이러스 질병과는 차이가 있다. 그리고 최근에 홍다리얼룩새우(*Penaeus monodon*)를 대량폐사 시키는 YBV(Boonyaratpalin *et al.*, 1993)는 병리조직학적으로는 본 연구와 아주 유사한 병변증상을 나타내고 있지만 감염세포의 세포질내에서 Feulgen 양성반응을 나타내는 봉입체가 관찰되기 때문에 본 바이

러스 질병과는 차이가 있다. 그러나 1993년부터 일본에서 보리새우에 치명적인 피해를 일으키는 RV-PJ(Inouye *et al.*, 1994)는 감염된 보리새우의 두홍갑 및 체표 큐티클층에 흰반점을 형성하고 병리학적으로는 중·외배엽성 유래조직인 큐티클 상피세포층, 결합조직, 림프기관, 촉각선, 조혈조직, 신경조직 등의 세포에서 핵 비대나 무구조화 증상을 특징적으로 나타내고 감염된 세포의 핵과 세포질내에서 봉입체가 형성되지 않기 때문에(Momoyama *et al.*, 1994), 병리조직학적으로나 외부증상이 본 바이러스 감염증과 아주 유사하였다.

7. 바이러스의 병원성

가. 감염방법별 바이러스의 병원성

새우 바이러스의 병원성을 감염방법에 따라 비교하기 위해 시험한 결과, 그림 9에서 처럼 바이러스액을 주사한 시험구에서는 감염후 2일째 부터 폐사가 일어나기 시작하여 감염후 5일째 까지 전량 폐사하였으나, 바이러스액 대신 멸균해수를 주사한 대조구에서는 시험기간동안 전혀 폐사가 일어나지 않았다. 그리고 바이러스에 감염된 두홍부조직을 먹이로 투여한 경구감염 시험구에서는 감염후 4일째 부터 서서히 폐사가 일어나 감염후 10일째에 전량 폐사하였으나, 바이러스에 미감염된 대하의 두홍부조직을 먹이로 투여한 대조시험구에서는 시험기간동안 전혀 폐사가 일어나지 않았다. 바이러스액을 첨가한 침지 감염구에는 감염후 11일째부터 폐사가 일어나기 시작하였으나 시험기간동안 폐사율은 50%에 불과하였고 바이러스액을 첨가하지 않은 대조 시험구에서는 폐사가 전혀 일어나지 않았다. 따라서 새우 바이러스의 병원성은 인위감염 시험결과에 의하면 주사 감염구가 가장 높게 나타났지만, 바이러스에 감염된 병어의 두홍부를 먹이로 급이한 경구 감염구나 바이러스액을 사육수에 첨가한 침지 감염구에서도 감염이 쉽게 된다는 것은 새우 바이러스 질

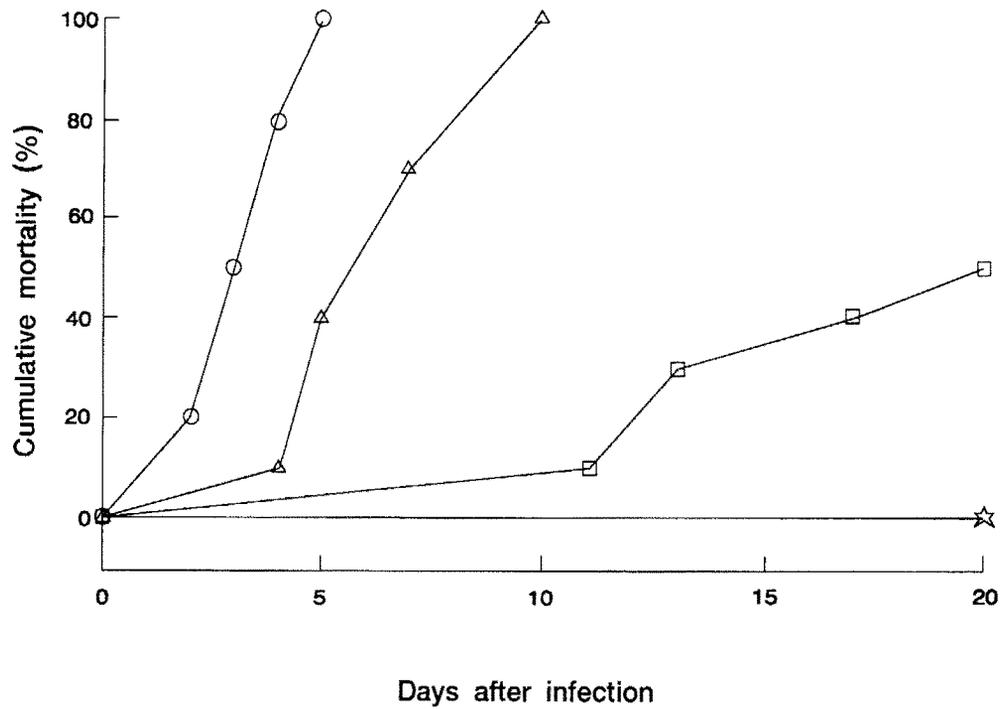


Fig. 9. Mortality of fresh shrimp by artificial infections with WSBV.

○ — ○ : intramuscular, △ — △ : oral,
 □ — □ : dipping, ☆ — ☆ : control.

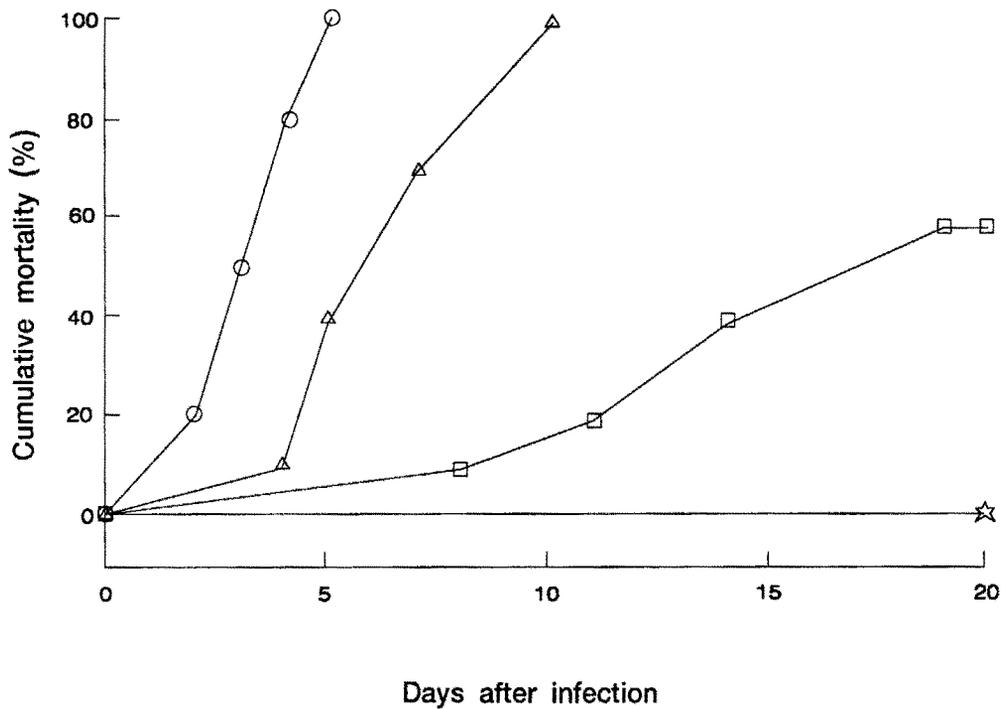


Fig. 10. Mortality of fresh shrimp infected with WSBV by water

temperatures.

○ — ○ : 30°C, △ — △ : 25°C, □ — □ : 20°C,

☆ — ☆ : 15°C.

만, 바이러스에 감염된 병어의 두홍부를 먹이로 급이한 경구 감염구나 바이러스액을 사육수에 첨가한 침지 감염구에서도 감염이 쉽게 된다는 것은 새우 바이러스 질병이 수평적으로도 전염이 가능한 것으로 생각된다.

나. 사육수온별 바이러스의 병원성

사육수온에 따른 새우 바이러스의 병원성을 확인하기 위해 바이러스에 미감염된 건강한 대하를 수온 15, 20, 25, 30℃에 순치, 사육한 후 바이러스에 감염된 대하의 두홍부 조직을 먹이로 경구투여해서 사육 수온별 누적폐사율을 관찰한 결과, 그림 10에서와 같이 수온 15℃ 시험구에서는 시험기간동안 전혀 폐사가 일어나지 않았으나, 수온 20℃ 시험구에서는 감염후 8일째 부터 폐사가 일어나기 시작하여 감염 20일째 까지 폐사율이 60%였으며, 수온 25℃ 시험구에서는 감염후 4일째 폐사하기 시작하여 10일째 전량 폐사하였고, 수온 30℃ 시험구에서는 감염후 2일째 부터 폐사가 급격히 일어나 5일째 전량 폐사하였다. 이와 같이 새우 바이러스는 수온 15℃에서는 폐사가 일어나지 않았으나, 수온 20℃ 이상에서는 수온이 높을수록 병원성이 높게 나타남을 알 수 있었다. 따라서 이러한 실험결과는 실제 새우양식장에서 바이러스 감염에 의한 새우 폐사가 수온 20℃를 상회하는 7월초순 부터 일어나기 시작하여 고수온기인 8~9월에 대량폐사가 일어나는 사실을 뒷받침해 주고 있다.

다. 새우크기별 바이러스의 병원성

새우크기에 따른 바이러스의 병원성을 확인하기 위해 평균체중 7g, 13g, 20g인 건강한 대하에 바이러스에 감염된 대하의 두홍부조직을 먹이로 경구투여해서 새우 크기별로 누적폐사율을 관찰한 결과, 그림 11에서 처럼 평균체중 7g인 대하는 감

염후 3일째 부터 급성적인 폐사를 일으켜 감염후 5일째 전량 폐사하였으며, 평균체중 13g인 대하는 감염후 4일째 부터 폐사하기 시작하여 10일째 전량 폐사하였다. 그리고 평균체중 20g인 대하는 감염후 8일째 폐사가 일어난 후 11일째 부터 급성적인 폐사를 일으켜 19일째 전량 폐사하였다. 이와같이 새우 바이러스의 병원성은 새우 크기에 따라 폐사시기에는 차이가 있지만 크기에 관계없이 강한 병원성을 나타내었다.

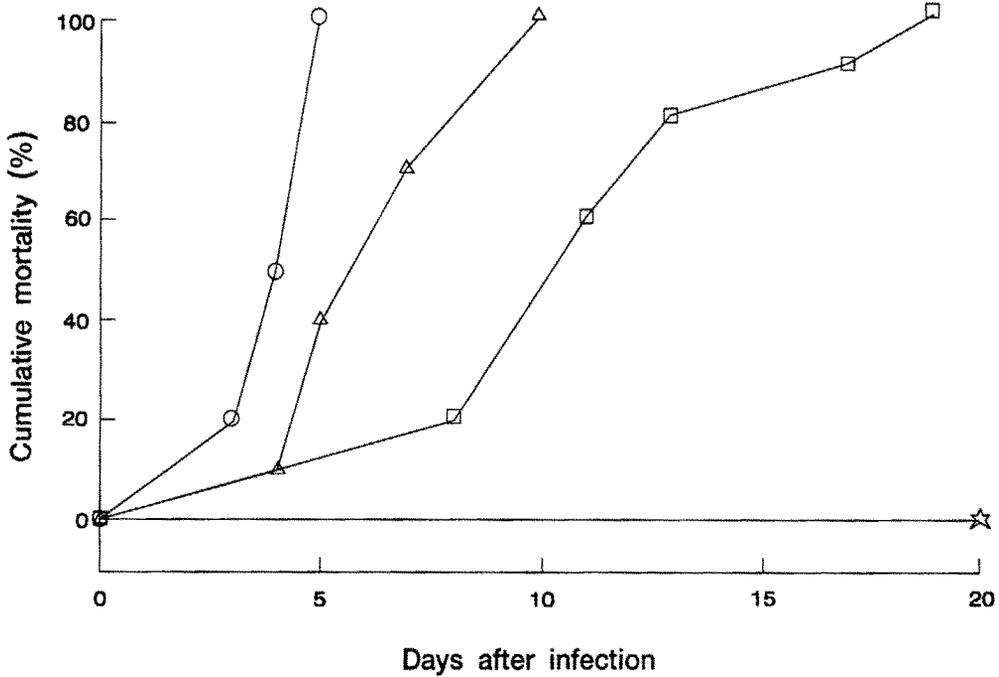


Fig. 11. Mortality of fresh shrimp infected with WSBV by shrimp sizes.

○ — ○ : 7g, △ — △ : 13g, □ — □ : 20g,
 ☆ — ☆ : control(7, 13, 20g).

제 3 장 새우 바이러스 감염 역학조사

제 1 절 서 론

우리나라 서해안 새우양식장에서는 1993년도에 바이러스 질병이 처음 발병하여 양식산 새우를 대량폐사시킨 후 해마다 바이러스 질병이 재발하고 있다. 이와 같이 바이러스 질병이 매년 재발하여 양식산 새우를 대량폐사 시킴에도 불구하고 적절한 방역대책을 수립할 수 없는 것은 새우 바이러스의 감염경로를 차단할 수 있는 바이러스 감염 역학조사가 이루어지지 못했기 때문이다.

일반적으로 양식생물의 바이러스 감염은 바이러스를 보균한 친어로 부터 생산한 치어로 바이러스가 감염되는 수직적 감염과 감염된 병어의 배설물 등을 통해 바이러스가 수중으로 배출되어 감염되는 수평적 감염으로 구분된다. 그러므로 새우 바이러스 질병도 감염경로를 수직적 감염과 수평적 감염으로 예상할 수 있다. 수직적 감염은 바이러스를 보균한 새우어미를 통해서 감염이 이루어질 수 있는데, Momoyama는 바쿨로 중장선 괴사증 바이러스(BMNV)는 보리새우 수정란을 세척하여 소독하면 감염을 예방할 수 있다고 하므로써 새우 바이러스 질병도 수직적인 바이러스 감염 가능성을 전혀 배제할 수 없다. 그리고 수평적인 감염은 새우양식장 내외에 서식하고 있는 서식생물이 바이러스를 보균해서 월동한 후 새우양식장에 바이러스를 배출하거나 바이러스 질병이 발병한 양식장에서 배출된 바이러스 오염수가 새우양식장 내로 유입되어 감염되는 것으로 구분하여 생각할 수 있다.

그래서 본 연구에서는 새우 바이러스의 감염경로를 규명하기 위해 수직적 감염 원인 새우어미에 대한 바이러스 보균조사와 수평적 감염원인 서식생물에 대한 바이러스 보균조사 및 새우 바이러스의 해수중 생존성에 관한 시험을 실시하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 새우어미의 바이러스 보균조사

가. 대하 어미

새우 종묘생산용으로 사용되는 자연산 대하어미에 대한 바이러스 보균조사를 위해 1996년 4월에 전남 고흥군 나로도 수역에서 채집한 대하어미 50미(평균체장 24.5cm, 평균중량 65g), 전남 영광군 범성포 수역에서 채집한 대하어미(평균체장 22.3cm, 평균중량 59g), 충남 태안군 안면도 수역에서 채집한 대하어미(평균체장 22.0cm, 평균중량 56g)는 두홍갑 및 체표의 흰반점 형성유무로 바이러스 보균상태를 조사하였고, 1997년 4월에 전남 영광군 범성포 수역에서 채집한 대하어미(평균체장 23.0cm, 평균중량이 59g)는 PCR법으로 바이러스 보균상태를 조사하였다.

나. 보리새우 어미

자연산 보리새우어미에 대한 바이러스 보균조사를 위해 경남 거제도 수역에서 1996년 6월에 채집한 보리새우어미(평균체장 19cm, 평균중량이 42g)는 두홍갑 및 체표의 흰반점 형성유무로 바이러스 보균상태를 조사하였고, 1997년 7월에 채집한 보리새우어미(평균체장 20cm, 평균중량 40g)는 PCR법으로 바이러스 보균상태를 조사하였다.

2. 서식생물의 바이러스 보균조사

새우양식장에 서식하고 있는 서식생물에 대한 바이러스 보균조사를 위해 충남 태안군 관내 대하양식장에서 1996년 3월에 채집한 속, 속부치, 게 및 지렁이를 20ℓ F.R.P 수조에 수용한 보리새우 20미씩(체중 1g 전후)에 2일마다 경구투여하고

수온 20~25℃에서 20일간 사육하면서 보리새우의 누적폐사율로 바이러스 보급 가능성을 예비적으로 조사하였다.

그리고 1997년 3월에 채집한 속, 속부치, 게 및 지렁이는 PCR법으로 바이러스 보급상태를 조사하였다.

3. 바이러스의 해수 생존 가능성 조사

가. 저수온 생존시험

평균해수 250ml씩에 새우 바이러스액 5ml를 넣고 밀봉한 후 4℃ 항온기에서 5, 15, 60, 120일동안 정치한 후 바이러스액 전량을 대하(체중 7.5~10g) 10미씩 수용한 20ℓ 아크릴 수조에 넣고 수온 23±2℃에서 30일간 사육하면서 폐사 유무를 관찰하였고 시험중 수질 악화방지를 위해 감염후 2일째 부터 매일 사육수량의 20%씩을 교환해 주고 새우배합사료를 소량씩 급이하였다.

나. 고수온 생존시험

평균해수 250ml씩에 새우 바이러스액 5ml를 넣고 밀봉해서 25℃ 항온기에서 5, 10, 15일동안 정치한 후 바이러스액 전량을 대하(평균체중 7.5g) 10미씩 수용한 20ℓ 아크릴 수조에 넣고 수온 25±0.5℃에서 30일간 사육하면서 폐사 유무를 관찰하였고 시험중 수질 악화방지를 위해 감염후 2일째 부터 매일 사육 수량의 20%씩을 교환해 주고 새우배합사료를 소량씩 급이하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 새우 바이러스 보균조사

1996년 4월에 채집한 대하어미와 1996년 6월에 채집한 보리새우어미에 대한 바이러스 보균상태를 두흉갑 및 체표의 흰반점 형성유무로서 조사한 결과 표 3에서와 같이 자연산 대하어미는 바이러스 보균율이 32~36%였고, 보리새우는 10%로 나타났다. 그리고 PCR에 의한 새우어미의 바이러스 보균율은 표 4에서 처럼 대하가 52%, 보리새우가 20%로 나타났다.

이상의 실험결과에 의하면 새우 종묘생산용으로 이용되는 자연산 대하는 채집 지역에 관계없이 높은 비율로 바이러스를 보균하고 있고, 또한 보리새우어미도 바이러스를 보균하고 있기 때문에 새우어미로 부터 바이러스가 수직감염될 가능성은 매우 높다. 이와 유사한 실험결과로서는 前田(1997)가 자연산 보리새우어미에 대한 바이러스 보균상태를 조사하였더니 높은 비율로 바이러스가 검출된다고 하였고, 또한 Wang 등(1997)도 자연산 greasy black shrimp로 부터 white spot virus가 높은 비율로 검출된다고 하였다.

따라서 바이러스를 보균한 새우어미로 부터 바이러스에 미감염된 건강한 새우 종묘를 생산하기 위해서는 새우 수정란을 소독하여 바이러스에 미감염된 건강새우 종묘를 생산할 수 있는 기술이 시급히 개발되어야 할 것이다.

2. 서식생물의 바이러스 보균조사

바이러스에 오염된 새우양식장에서 채집한 서식생물에 대한 바이러스 보균상태를 확인하기 위해 일차적으로 인위감염에 의한 보리새우치하의 누적폐사율을 조사한 결과, 표 5에서 처럼 속을 먹이로 급이한 시험구에서는 누적폐사율이 35%였고,

Table 3. Detecting rate of WSBV from wild-caught shrimp spawners by white spot symptom

Shrimps	Sampling area	Mean body weight(g)	No. of WS* /no. of samples	Detecting rate (%)
Fresh shrimp	Naro island	65	18/50	36
	Bubsungpo	59	16/50	32
	Anmyeon island	56	17/50	34
Kuruma shrimp	Kōje island	42	5/50	10

* White spot syptom.

Table 4. Detecting rate of WSBV from wild-caught shrimp spawners by PCR

Shrimps	Sampling area	Mean body weight(g)	No. of WS* /no. of samples	Detecting rate (%)
Fresh shrimp	Naro island	59	26/50	52
Kuruma shrimp	Kōje island	40	10/50	20

Table 5. Mortality of kuruma shrimp fed with inhabitant organisms caught in shrimp ponds

Species	No. of shrimp tested	No. of shrimp died	Mortality (%)
<i>Upogebia major</i>	20	7	35
<i>Callinectes japonica</i>	20	5	25
<i>Helice tridens</i>	20	5	25
<i>Nereis japonica</i>	20	1	5
Commercial diet	20	0	0

속부치 및 게 굽이구는 각각 25%, 지렁이 굽이구는 5%, 대조구는 0%로 나타나 속, 속부치 및 게와 같은 갑각류에 바이러스가 보균할 가능성이 매우 높은 것으로 생각된다. 그렇지만 일반적으로 바이러스는 종 특이성이 매우 강한 점을 고려하면 새우양식장에 서식하고 있는 지렁이를 굽이한 시험구에서 누적폐사율이 5%나 나타난 것은 의외의 결과로서 바이러스 감염에 의해 새우가 폐사하기 보다는 다른 요인에 의한 폐사일 가능성을 배제할 수 없다. 그래서 서식생물에 대한 바이러스 보균상태를 보다 더 명확히 조사하기 위해 본 사업의 2차년도인 1997년에 채집한 서식생물을 대상으로 PCR법으로 바이러스 보균조사를 실시한 결과, 표 6에서와 같이 바이러스 검출율이 속에서는 37%, 속부치 29%, 게 27%, 지렁이 0%로 나타났다.

따라서 양식장내 서식생물에 대한 바이러스 보균상태를 인위감염시험과 PCR법으로 조사한 결과에 의하면 갑각류인 속, 속부치 및 게에서는 높은 비율로 바이러

스가 검출되므로서 이들 서식생물이 새우 바이러스의 보균생물인 것으로 생각되지
만 지렁이는 보균생물이 아닌 것으로 판단된다.

위와 유사한 시험결과로서는 일본 山口縣의 보리새우양식장내 및 양식장 부근
에 서식하고 있는 갑각류를 채집하여 PCR법으로 WSBV 바이러스 보균상태를 조
사한 결과 4종류의 새우류와 10종류의 계에서 바이러스가 검출되며, 이들 서식생물
중 바이러스 검출율이 가장 높은(80%) *アシハラガ* (= *Helice tridens*)와 보리새
우를 동거사육한 결과 동거후 10일째 부터 폐사가 일어나기 시작하여 28일째 전량
폐사하였다고 보고하고 있다(前田). 그러므로 새우양식장에서 바이러스 질병이 매
년 재발하는 한 원인으로서는 새우양식장 내·외에 서식하고 있는 갑각류(게 및
새우류)가 바이러스를 보균한 채 유행하기 때문이라 생각된다.

Table 6. Detecting rate of WSBV from inhabitant organisms caught in
shrimp pond by PCR

Species	No. of PCR positive /no. of samples	Detecting rate (%)
<i>Upogebia major</i>	37/100	37
<i>Callinassa japonica</i>	29/100	29
<i>Helice tridens</i>	27/100	27
<i>Nereis japonica</i>	0/100	0

3. 바이러스의 해수 생존 가능성 조사

가. 저수온 생존성

새우 바이러스를 4℃에서 5, 15, 60, 120일간 보관한 후, 인위감염에 의한 새우의 누적폐사율로 바이러스의 생존성을 확인한 결과, 표 7에서와 같이 새우 바이러스는 저수온(4℃) 해수에서 120일이 경과해도 병원성이 실활되지 않으므로 새우 바이러스는 저수온 해수에서는 장기간동안 생존이 가능하다.

그렇지만 우리나라 연안에서는 바이러스가 중간숙주에 감염되지 않고 해수 중에 노출된 상태로 장기간동안 생존하기는 현실적으로 불가능할 것이다.

Table 7. Pathogenicity of WSBV suspended in seawater at 4℃

Periods (days)	No. of shrimp tested	No. of shrimp died	Mortality (%)
120	10	10	100
60	10	10	100
15	10	10	100
5	10	10	100
0	10	10	100

나. 고수온 생존성

새우 바이러스를 25℃에서 5, 10, 15일 경과한 후, 인위감염에 의한 새우의 누적폐사율로 바이러스의 생존성을 확인한 결과, 표 8에서와 같이 고수온 해수(25℃)에서 5일 경과한 시험구에서는 누적폐사율은 100%였으나, 10일 경과한 시험구에서는 60%, 15일 경과한 시험구에서는 전혀 폐사가 일어나지 않아 새우 바이러스는 고수온 해수에서는 시간이 경과함에 따라 서서히 실활되기 시작하여 15일이 경과하면 생존이 불가능하다. 그렇지만 바이러스 질병이 발병한 새우양식장에서 배출한 사육수를 양식장으로 바로 취수하면 바이러스 질병이 발병할 우려는 충분히 있다.

Table 8. Pathogenicity of WSBV suspended in seawater at 25℃

Periods (days)	No. of shrimp tested	No. of shrimp died	Mortality (%)
15	10	0	0
10	10	6	60
5	10	10	100
0	10	10	100

제 4 장 새우 바이러스 질병 신속진단법 개발

제 1 절 서 론

최근 국내 새우양식 규모가 점차 확대되고 있으며 이에 따른 WSBV의 감염에 의한 경제적 손실이 심각하므로 이에 대한 대책이 시급한 실정이다. 바이러스성 질병의 특성상, 일단 바이러스에 감염되면 치료하기가 쉽지 않고, 또한 양식새우와 같이 다수의 개체를 대상으로 바이러스의 감염을 예방하기 위한 백신의 이용에도 많은 어려움이 있다. 따라서 현재로서는 바이러스 감염에 의한 새우양식의 피해를 줄일 수 있는 가장 효과적인 방법은 바이러스의 감염 여부를 신속히 진단하여 적절한 조치를 취하는 것이다. 특히 감염 초기 및 잠복성 감염을 조기에 진단할 수 있는 신속하고 민감한 진단법을 개발하여 이용한다면 바이러스의 확산에 따른 피해를 최소화 할 수 있을 것이다.

일반적으로 WSBV의 감염여부를 확인할 수 있는 가장 간단한 방법은 새우의 갑각에 흰반점의 형성유무를 관찰하는 것이다(Chou *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1995). 그러나 감염초기나 잠복성 감염의 경우에는, 흰반점이 형성되지 않을 뿐 아니라 비감염 새우와 구분되는 뚜렷한 감염증상이 나타나지 않는다. 따라서 새우의 외형적 관찰만으로는 바이러스 감염이 많이 진행되어 치사 직전에 도달한 새우만을 진단할 수 있다는 한계점이 있다. 또한 WSBV의 감염이 가능한 새우세포주가 아직 마련되어 있지 않으므로 세포배양을 통한 바이러스의 검출도 불가능하다. 바이러스 감염을 진단할 수 있는 또 다른 방법으로는 전자현미경을 이용하여 새우 조직에서 바이러스 입자를 직접 관찰하는 것이다. 그러나 이 방법은 시간이 많이 소요되고 고가의 장비가 필요하다는 단점이 있다. 또한 다수의 시료를 동시에 검사하

기가 불가능하며 검사 비용이 많이 소요된다. 항원-항체진단법의 경우에는 다수의 시료를 동시에 신속하게 진단할 수 있다는 장점이 있지만 감염초기 및 잠복성 감염을 진단하기에는 감도가 낮다는 단점이 있다. 이에 반하여, PCR진단법은 감염 새우에서 바이러스 DNA를 선별적으로 증폭시켜 감염여부를 알아낼 수 있는 진단법으로 IHNV(Arakawa *et al.*, 1990)를 비롯한 여러 종류의 바이러스 진단을 위한 혁신적인 방법으로 널리 이용되고 있다.

따라서 본 연구에서는 우리나라 새우양식장에서 대량폐사한 새우로 부터 분리된 바이러스의 게놈 DNA를 클로닝하고 그 염기서열을 분석하고자 하였다. 또한 확보된 바이러스 DNA의 염기서열에 기초하여 감염 초기 및 잠복성 감염 상태에 있는 새우로 부터도 바이러스 감염여부를 신속하게 진단할 수 있는 감도 높은 PCR 진단법을 개발한 후 현장적응시험을 통하여 새우양식장에 대한 바이러스 감염분포를 조사하고자 하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 바이러스 분리

10cm 내외의 바이러스에 감염된 대하 혹은 보리새우의 간췌장 또는 표피부위를 3~4배량의 TN buffer에서 유발로 마쇄시킨 후 $1,000 \times g$ 에서 10분간 원심분리하여 세포찌꺼기 및 핵을 제거한다. 1차 원심분리 결과 생겨난 상등액을 20~50% (w/w) sucrose 농도구배 초원심분리($100,000 \times g$, 30분)를 실시하여 밀도구배에 의하여 형성된 바이러스층을 분리하여 3배량의 TN buffer에 희석시킨 후 다시 $100,000 \times g$, 30분간 초원심분리를 실시하여 침전물만을 수거하였다.

2. 바이러스 DNA 분리

분리한 바이러스 입자를 $500\mu\text{l}$ 의 digestion buffer에 현탁시킨 후, proteinase K(0.5 mg/ml)를 55°C 에서 1시간 처리한다. 바이러스 DNA는 phenol/chloroform 추출을 거친 뒤 에탄올에 침전시킨 후 말려서 TE buffer에 현탁시킨다. 바이러스 DNA는 0.7% agarose gel에서 전기영동하여 확인한다. 전체 게놈 DNA를 추출하기 위해서는 마쇄한 새우시료를 바로 phenol/chloroform 추출하여 에탄올에 침전시킨 후 말려서 TE buffer에 현탁시켰다.

3. 새우 바이러스 genomic library의 구축 및 재조합 plasmid DNA의 선별

정제된 바이러스 DNA를 *Sau3A1*으로 부분적으로 절단하거나 *Eco RI*으로 완전 절단시킨 후 각각 plasmid pTZ18R의 *Bam HI* 혹은 *Eco RI* site에 T4 DNA ligase를 이용하여 ligation하였다. 재조합 DNA 기술은 대부분 Sambrook 등(1989)을 참조하여 수행하였다. 재조합 plasmid DNA를 Cohen 등(1972)의 방법으로 준비한 competent cell에 형질전환시킨다. 재조합 plasmid의 선별을 위하여 x-gal 및 IPTG를 포함하는 agar plates위에 도말하여 흰 콜로니를 분리하였다. 선별된 콜로니를 배양한 후 Birnboim과 Doly(1979)의 알카리법으로 plasmid DNA를 분리하였다.

4. Southern 혼성화법

slot blot 혼성화실험을 위하여 $1\mu\text{g}$ 의 plasmid DNA를 0.1N NaOH로 변성시킨 후 nylon membrane filter에 slot blot manifolds(Life Technologies Inc., USA)를 이용하여 부착시킨 뒤 Kafatos 등(1979)의 방법으로 UV crosslinking시켜 필터에 고정시켰다. 혼성화과정은 ECL direct DNA labelling system(Amersham)을 이용하여 실시하였다.

PCR산물의 확인을 위하여 전기영동을 실시한 후 diffusion blotting법으로 DNA를 nylon membrane으로 옮긴 뒤 Feinberg와 Vogelstein(1983)의 방법에 의하여 [α - 32 P] dCTP와 Prime-a-Gene Labeling system(Promega)으로 표지시킨 probe를 이용하여 혼성화실험을 실시하였다. 최종적으로 준비된 필터는 autoradiography를 통하여 결과를 얻었다.

5. DNA sequencing 및 염기서열 분석

확보한 클론은 Sanger 등(1977)의 디데옥시 사슬 종결법으로 DNA sequencing하여 염기서열을 결정하였다. 이중가닥 및 단일가닥의 plasmid DNA를 주형으로 하고 적절한 forward 및 reverse primer를 이용하여 Sequenase(version 2.0, USB)로 반응을 수행하였다. 이미 알려진 바이러스들과는 염기 서열상의 상동성을 비교하기 위하여 WSBV의 염기서열을 European Bioinformatics Institute(EBI)의 world wide web site(<http://www.ebi.ac.uk/searches/fasta.html>)에 의뢰하여 Fasta homology search(Pearson과 Lipman, 1988)를 이용해서 EMBL nucleotide sequence database와 비교하였다.

6. PCR 증폭

먼저 WSBV의 염기서열 분석결과에 기초하여 한쌍의 oligonucleotide primers를 작성, 합성하였다. 본 실험에 주로 이용된 1F 및 1R의 염기서열은 각각 5' ATC TGA TGA GAC AGC CCA AG 3'와 5' GGG AAT GTT AAA TAT GTA TCG G 3'이었다. PCR증폭 반응은 Innis 등(1990)의 방법에 기초하여 50m M KCl, 10mM Tris-HCl(pH 9.0), 1.5mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 0.2m M씩의 dNTP, 15pmol의 각 primer, 약 10ng의 template, 그리고 Taq DNA

polymerase 1 unit로 수행하였다. 한방울의 mineral oil을 위에 떨어뜨린 뒤, DNA thermal cycler(ThermoJeT, Hofman-LaRoche Inc. USA)에서 30 cycles (94℃에서 30초, 55℃에서 45초, 72℃에서 45초) 증폭시켰다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 결과

가. 바이러스 분리 및 DNA 정제

1995년 서해안의 새우양식장에서 수거한 대하 및 보리새우중에서 갑각 및 부속지에 흰반점을 나타내는 새우를 대상으로 바이러스 분리를 시도하였다. 새우의 마쇄액을 sucrose 밀도구배 원심분리를 실시한 결과 뚜렷한 하나의 층이 형성되었고, 이 층을 주사기로 취하여 이로부터 바이러스 DNA를 추출하여 전기영동으로 확인한 결과(그림 12), 모든 샘플로부터 바이러스의 DNA가 분해됨이 없이 깨끗하게 정제되었다.

나. 바이러스 게놈 library의 제조 및 선별

새우 바이러스의 게놈 DNA를 *Sau3A1* 혹은 *Eco RI*으로 절단하여 phagemid library를 제조하였다. 이를 박테리아에 형질전환시킨 후, 선별하여 수십개의 재조합 DNA를 확보하였다. 이들 재조합체들이 새우게놈 DNA의 오염이 아닌, 바이러스의 DNA를 포함한다는 것을 확인하기 위하여 slot blot 혼성화 실험을 실시하였다. 감염새우 및 비감염새우로부터 추출한 전체 게놈 DNA으로 부터 준비한 probe를 일부 재조합체와 혼성화를 시켜 보았을 때, 대부분의 재조합체들은 감염된 새우

로 부터 유래한 probe와 강하게 결합하여 신호를 나타내었다(그림 13). 반면에 이들은 정상새우로 부터 유래한 probe와는 혼성화되지 않았다. 따라서 이들 재조합체들은 새우에 감염되어 질병을 유발한 바이러스 DNA를 함유함을 알 수 있다. 이들 재조합체중에서 보리새우로 부터 유래한 S1 및 대하에서 유래한 E3 클론을 선택하여 염기서열을 결정하는 등의 연구를 계속 진행하였다.

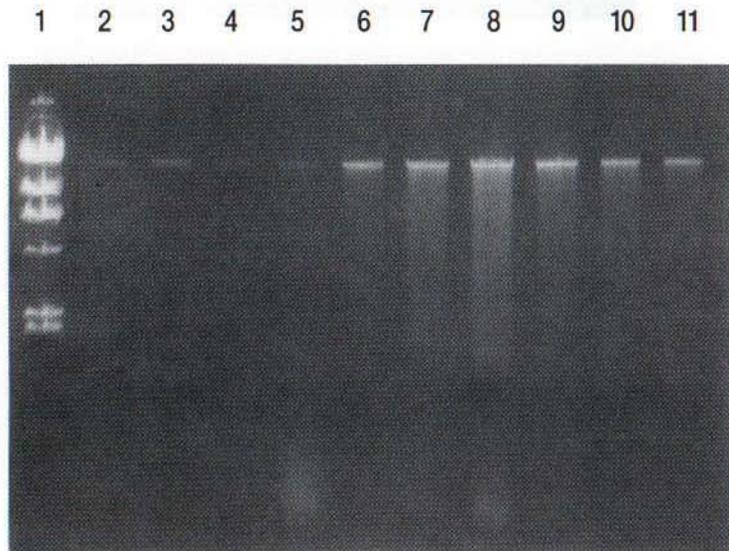


Fig. 12. Ethidium bromide-stained agarose gel of WSBV DNA extracted from purified virions. A single molecule of DNA is observed in the gel.

Lane 1 : λ Hind III marker,

Lane 2 - 11 : WSBV DNA from each of 11 respective preparations.

로 부터 유래한 probe와 강하게 결합하여 신호를 나타내었다(그림 13). 반면에 이들은 정상새우로 부터 유래한 probe와는 혼성화되지 않았다. 따라서 이들 재조합체들은 새우에 감염되어 질병을 유발한 바이러스 DNA를 함유함을 알 수 있다. 이들 재조합체중에서 보리새우로 부터 유래한 S1 및 대하에서 유래한 E3 클론을 선택하여 염기서열을 결정하는 등의 연구를 계속 진행하였다.

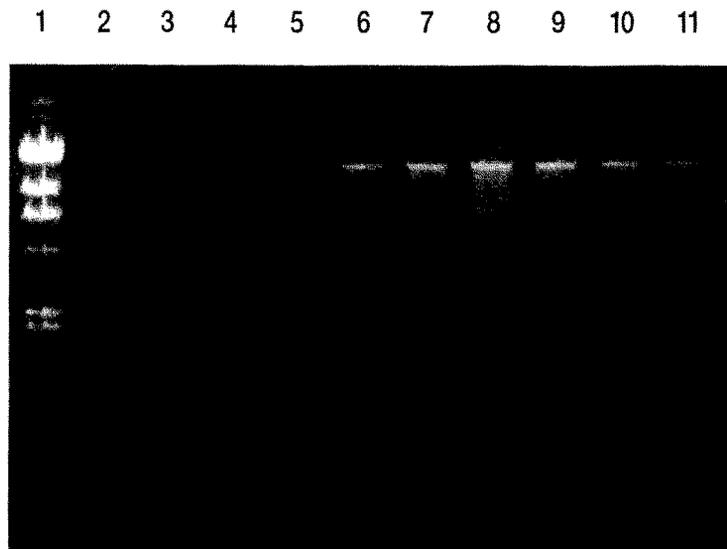


Fig. 12. Ethidium bromide-stained agarose gel of WSBV DNA extracted from purified virions. A single molecule of DNA is observed in the gel.

Lane 1 : λ Hind III marker,

Lane 2 - 11 : WSBV DNA from each of 11 respective preparations.

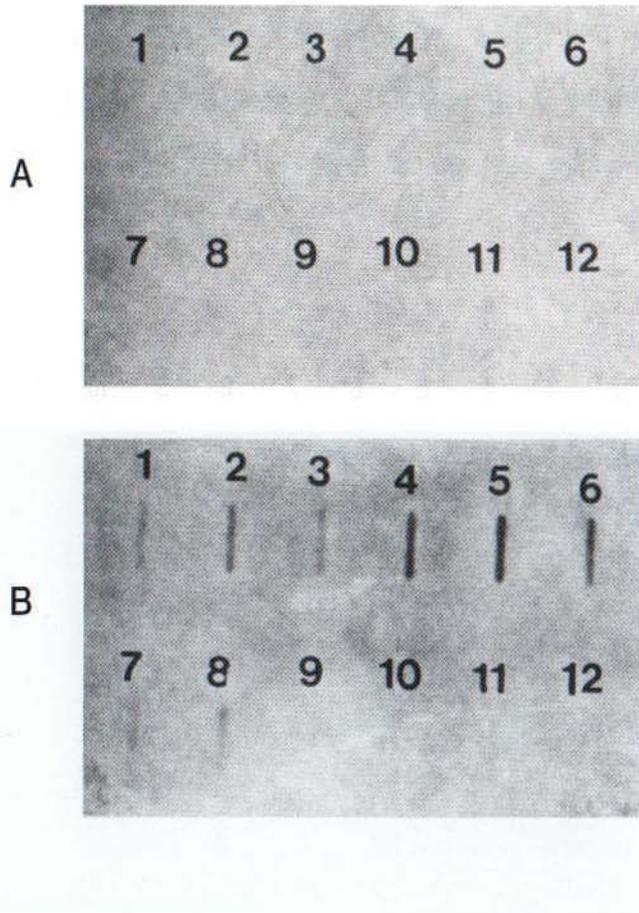


Fig. 13. Slot blotting analysis of WSBV recombinant clones probed with either uninfected total DNA (A) or infected total DNA (B).

Key to spots: 1 to 11, different isolates of WSBV recombinants;
12, negative control pTZ18R.

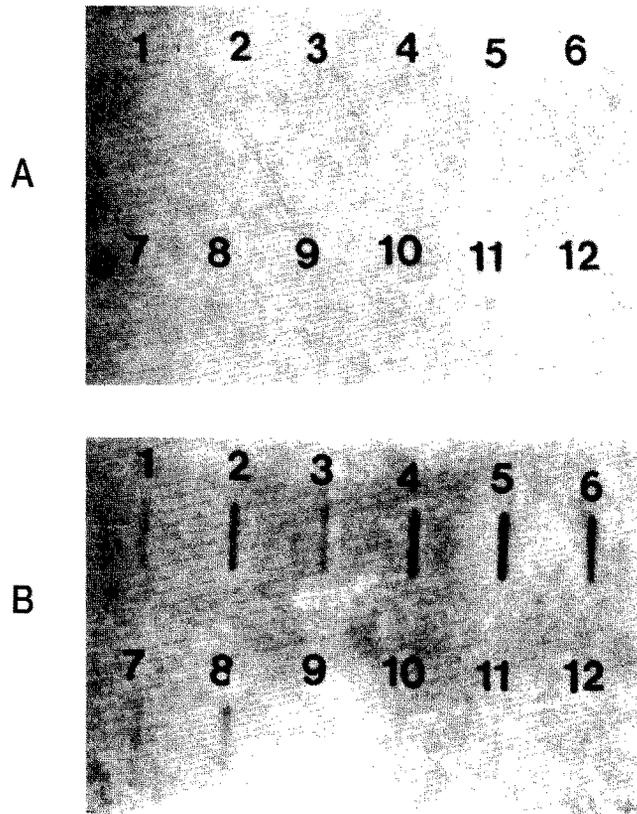


Fig. 13. Slot blotting analysis of WSBV recombinant clones probed with either uninfected total DNA (A) or infected total DNA (B).

Key to spots: 1 to 11, different isolates of WSBV recombinants
 12, negative control pTZ18R.

다. DNA sequencing 및 염기서열 분석

먼저, 보리새우에서 유래한 제조합체 중의 하나인 pTZ18RS1은 제한효소절단을 통하여 420bp크기의 바이러스 DNA를 가짐이 밝혀졌으며 이것의 염기서열을 DNA sequencing을 통하여 결정하여 그림 14에 제시하였다. 이 염기서열은 Gen-Bank에 accession number U89843으로 등록되었다. PC/Gene 프로그램을 이용하여 Fickett법에 의하여 S1의 암호영역을 추정해 본 결과, 168nt로부터 84개의 아미노산이 암호화될 수 있음을 알 수 있었다(그림 15).

S1의 염기서열을 Fasta homology search 프로그램을 이용하여 database에 등록된 현재까지 알려진 다른 바이러스 및 생물의 염기서열과 상동성을 비교한 결과, 일부 바이러스들과 어느 정도 상동성을 나타내었지만 그 영역이 좁고 상동성의 정도도 비교적 낮음을 알 수 있었다. 비교적 높은 상동성을 나타내는 염기서열을 표 9에 제시하였다.

염기서열 분석 결과와 마찬가지로 S1의 아미노산 서열을 다른 생물 및 바이러스들과 비교해 본 결과 S1과 높은 상동성을 나타내는 바이러스는 없었다. 비교적 높은 상동성을 나타내는 아미노산 서열을 표 10에 제시하였다. WSBV의 분류학적인 위치를 확실히 파악하기 위하여 이번에는 바이러스에 감염된 대하에서 유래하는 E3클론의 염기서열을 결정하였다. 이 클론은 제한효소의 분석 결과, 2,424 bp의 바이러스 DNA를 가진다는 것을 알 수 있었으며 이것의 염기서열은 그림 16에 제시되어 있다. E3의 염기서열을 database에 의뢰하여 지금까지 알려진 다른 바이러스 및 생물의 염기서열과 상동성을 비교한 결과, S1클론의 경우와 마찬가지로 일부 바이러스들과 어느 정도 상동성을 나타내었지만 그 영역이 좁고 상동성의 정도가 비교적 낮았다(표 11). 따라서 본 연구에서 분리된 WSBV는 지금까지 알려진 어떠한 바이러스 혹은 생물과도 구분되는 새로운 바이러스임을 알 수 있었다.

001 GGATCCAATT GTTGAGAGAT TTGTCACAAC TAAATCTGAT GAGACAGCCC AAGTTGTAA

1F

061 ACAGGCCGTT GATGAAAAAT ACGATGAATT ATTAGAAGAT AAGGTTGAAG AAATGAGACC

121 GGATATAATC AATGAAGCAT CCGAAACATA TGATAACTTG CTGCTGATAT GATAAGAGAG

181 GTAGACACTA GTAGTGTTAT TGCTCCTGCA ATAGCTGGCA CAGTGGCAAG AACTATCAAT

241 AATTTAAGAG ATAAAAGGAA AGAATATGAA AAGAGGCTAT GGACATTAGC CTACAAACCA

301 TGGAGAAGAT ATGTACAAGC AATTACAGTG ATGGAATTC GTTTATCATA TAAAGACCTG

361 ACTGTCCATG CCAATTCCGA TACATATTTA ACATTCCCTT TTTTAAGAAT AAAAAAGATC

1R

Fig. 14. Nucleotide sequence of WSBV recombinant clone S1.

Bold letters indicate a potential initiation site of polypeptide coded by S1, as analyzed by Fickett's method. Locations of the primers used for PCR are underlined.

01 MIREVDTSSV IAPAIAGTVA RTINNLSDKR KEVEKRLWTL AYKPWRRYVQ

51 AITVMEFRLS YKDLTVHANS DTYLTFPFLR IKKR

Fig. 15. Amino acid sequence derived from S1 nucleotide sequence.

Table 9. Nucleotide sequence homology between S1 and other organisms

Compared nucleotide sequences	Homology (%)	Number of by overlap
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ORF genes	84.6	26
<i>Caenorhabditis elegans</i> cosmid	58.3	120
<i>Bacillus subtilis</i> DNA	64.9	114
Mouse T-cell receptor alpha/delta chain locus	61.4	83
<i>Plasmodium falciparum</i> pol alpha gene	54.5	213
Human pligodendrocyte myelin glycoprotein exons 1-2	72.9	59
<i>Cyanophora paradoxa</i> cyanelle complete genome	63.1	65
Herpesvirus saimiri complete genome DNA	58.0	88
Entomopoxvirus gene for shperulin	52.2	337
Human hepersvirus-7 complete virion genome	58.9	90
Variola virus DNA complete genome	53.4	268
Visna virus Icelandic strain 1514 complete genome	59.4	138
African swine fever virus multigene families 360 and 110	63.3	79
Human papilloma virus type 23 complete genome	61.0	105
Buzura suppressaria nuclear polyhedrosis virus gene for polyhedrin protein	80.0	35
Hantivirus R22 precursor glycoprotein gene (Msegment)	70.5	61
Cassava vein mosaic virus, complete genome	56.6	113
Respiratory syncytial virus phosphoprotein RNA polymerase subunit	79.3	29
Human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein	54.1	246
Chilo iridescent virus type 6 zinc finger protein and non-histone	53.1	350
Bombox mori nuclear polyhedrosis virus DNA	64.0	50

Table 10. Amino sequence homology between S1 and other organisms

Compared amino acid sequences	Homology (%)	Number of amino acids overlap
HPBV9 (P17099) core antigen	18.2	22
Rat sodium channel protein, cardiac muscle	21.6	37
Yeast inhibitory regulator protein IRA2	44.0	25
<i>Marchantia polymorpha</i>	15.2	46
<i>Caenorhabditis elegans</i>	29.5	44
Hepatitis B virus 991	18.2	22
Haemophilus influenzae	13.0	69
Sendai virus	27.8	18
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> eIRA2 protein	44.0	25

1 gaattccaat caatgggaac aaataccaac cccatagaga cttcatcagt ggggtgtgaat
61 accaaccac ttccaacct cccccaagat tggtaattac tccttaacg aatgatgtac
121 cagaattgga catgatgtgg ctttattcgc cttccagagg aggtggaaat tctagaatga
181 gtgcaaatac aggaacatct cccctgtcta acacccaat tcctacctgc ttcacaggag
241 gtgcgaatgt agtagtgcct aatggatttg tcctccac gttccccta gaatgtgacg
301 aagatgatcc aagtattccc aattcttaca attacgaaca ggataaagtc tttcatccat
361 tttatgagta tatggccaaa tatctatccc ctcttgttcc atcatataac aaggacaga
421 cttgtaatgt tgcacaggag tggttcaagg gatccttctc tcttgcaaag cgtagaggaa
481 cagtcccaa attctgtagt aacatttccc acgctttctt ttgtaatatg gatgtatgta
541 ctgcatgtg caaatgggcg aagactgtaa ttagacatgg acaatattgt aatagatgta
601 tcgtaaggag gtcattgtaca tccatgctcg catatcacta cattgtttgc agagacgctt
661 catgtgatgt tccaagtgc agggaaaggg ttcgcaacga catggatgac tgattgattg
721 gttgatatgt gacatttct gtatattgtg taataagat accaataaac taatgtttta
781 tatatgattc tattttttta aaaaccttta aaaatataca tataaatga tgtatttttg
841 aaactacact ctggcagaat cagaccagac ccctgacct aagcagacca caggggagtc
901 ttagagaggc cacacttaga ccgatccct tcctccctca atgttaatca cacgcaagta
961 aaaacaccac ttctagaaa gggaggggaag gggtgacttg gtgatatcat aactggggaa
1021 tttcctctcc agatatctgg ctgtacacgt gtgagcgctt ctgggcgcga caagaaaaa
1081 attagtata tcataactgg ggaatttct ctccagatat ctggctgtac acgtgtgacg
1141 gcttctgggc gcgacaagaa aaaattagt gatataata ctggggaatt tcctctccag
1201 atatctgggt aagaaaaaa attagtata tcataactgg ggaatttct ctccagatat

Fig. 16. Nucleotide sequence of WSBV recombinant clone pTZ18RE3.

1261 ctgggtaaga aaaaaaatta gtgatatcat aactggggaa ttcctctcc agatatctgg
1321 ctgtacacat gtgagtggtc taatctcatt tttatatag aaaatataac tgaattagct
1381 ctctaaactt ttctcattt cttactctc tttgttigta tgcctacta ccagtggtca
1441 tataagaact ggagagatgg gagttttaa taacaaccct tcttaatccc tttcatgttt
1501 atatttaata aatataatca ccatggatat ttcaaataag acattatfff tagtagtcgg
1561 tacctffff ctgaccactt gtgcatcttg cagtccaact caaatcgtct ggaacctcat
1621 ggtagcttca tttgttggtat ttctaggaca taaactactt aaaaacatta cacctgtcaa
1681 tctggatctt gtcgaaaaa gcttcgtatt ctctgcaagt ttaaccatct cagaagaagc
1741 ccgtttattg aggattggaa acgtattaag ggactataat ggcaacaatt ttgaagagta
1801 tgaagaagaa gaagatagtg gtattgaaga ataataataa taataatggt ttgaataaaa
1861 tatagagata catttatatt gttttattg cattatata aaaaaagcac tacaaaattt
1921 gtacacatac attgagagaa aaaattgata caatttctc cttttttta ctggtatctg
1981 atttcttgat attcgagaga gttagtagta gcagaagaag tagcaccaac tccggctgca
2041 gaagttgtag gatagggcgg tggcaccggt ggcagcggca gcggcagcag cttcacggcg
2101 ttgttgtgt tccaggataa tctttgcgcg tttattcatt tcagtggtgc gtgtaaagat
2161 gcctctgttg tattggacca ccttattct atattctcg atgtcctat cgcgttcta
2221 aaaaaacttg gccatttctc cacaacgttg acgggctgcc catgcagtca tagccataaa
2281 atcaaattgg tcagaggtga tattatggtt gtttagaagg tccacagcgt aggccataca
2341 gctagcggca cgttgaatat tggagtactt gctgtttctt ggtttaaagg tatggatcac
2401 cttacttcca tcattcaaga attc

Fig. 16. Continued.

Table 11. Nucleotide sequence homology analysis of pTZ18RE3

Compared nucleotide sequences	Homology (%)	Number of by overlap
<i>Saccharomyces douglasii</i> mitochondrial DNA (2426nt)	53.8	532
<i>Plasmodium falciparum</i> (FCR3) cpn60 gene (3801nt)	67.3	110
<i>Drosophilla etrusca</i> highly repeated DNA (1416nt)	58.8	238
Vaccinia virus F fragment DNA (13326nt)	58.9	190
Cowpox virus host range gene (2300nt)	59.8	164
Human papilloma virus type-51 (7808nt)	57.0	270
<i>Autographa califonia</i> nuclear polyhedrin gene (1629nt)	67.8	90
Rotavirus group A chromosome segment (663nt)	68.9	106
Varocella-Zoster virus complete genome (49851nt)	60.1	153
Woodchuck hepatitis virus DNA (4305nt)	62.0	153
Ovine adenovirus terminal protein gene (10070nt)	65.5	84
<i>Echinochloa</i> hoja blanca tenuivirus (2336nt)	64.5	118
<i>Chorisyoneura fumiferana</i> nuclear polyhedrin gene (2110nt)	61.8	136

라. Southern blotting에 의한 바이러스 감염의 진단

새우에서 추출한 전체 DNA내에서 바이러스의 DNA를 검출하는 것이 가능함을 조사하기 위하여 slot blotting을 실시하였다. E3클론으로부터 바이러스 DNA를 잘라내어 probe로 준비하여 감염새우 및 비감염새우로부터 추출한 전체 DNA와 혼성화시켰다. 그 결과 바이러스 probe는 비감염새우로부터 유래한 게놈 DNA와는 반응하지 않고 감염새우로부터 뽑은 DNA와만 강하게 혼성화되었다(그림 17). 이 probe는 최소 10ng의 전체 DNA로부터도 바이러스 DNA를 검출할 수 있었다. 특히 간체장에서 추출한 DNA는 바이러스 전체에서 추출한 DNA보다 더 강하게 결합하여 간체장세포가 WSBV가 주로 복제하는 숙주세포임을 알 수 있었다.

마. 정제된 바이러스 DNA의 PCR증폭

먼저 순수분리된 바이러스 입자로부터 추출한 WSBV의 게놈 DNA를 S1의 염기서열에 기초하여 작성한 한쌍의 primer(1F와 1R)를 이용하여 PCR증폭이 가능한지를 알아 보았다. PCR 반응물을 전기영동으로 분석한 결과(그림 18), 양성대조군인 pTZ18R에서 얻어진 365bp와 동일한 PCR 산물이 보리새우 및 대하로부터 추출한 바이러스 DNA로부터 얻어졌다. 이로 부터 본 실험에서 작성한 PCR primer가 바이러스의 DNA를 증폭할 수 있음을 알 수 있으며, 대하 및 보리새우에 감염한 바이러스가 동일한 바이러스임을 알 수 있었다.

바. PCR법의 감도 테스트

PCR증폭에 의한 WSBV의 검출이 가능하므로 이번에는 PCR법의 감도, 즉 PCR에 의하여 검출 가능한 WSBV DNA의 최소량을 조사하기 위하여, WSBV DNA를 10ng에서 10fg까지 10배씩 연속적으로 희석하여 PCR반응에 이용하였다.

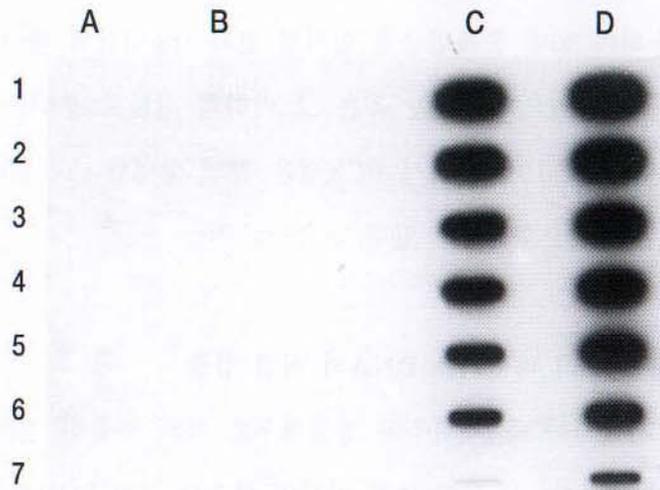


Fig. 17. Slot blot analysis of shrimp genomic DNA. Genomic DNA isolated from either uninfected (A and B) or WSBV infected (C and D) shrimps were hybridized with radiolabelled E3 probe. Total genomic DNA were isolated from either total shrimps (A and C) or hepatopancreases (B and D).

spots 1: 10 μ g, 2: 5 μ g, 3: 1 μ g, 4: 0.5 μ g, 5: 0.1 μ g, 6: 50 ng, 7: 10 ng.



Fig. 18. Agarose gel electrophoresis of the PCR product of WSBV DNA from purified virions.

- Lane 1 : λ phage DNA Hind III fragment marker,
- Lane 2 : a positive control plasmid pTZ18RS1,
- Lane 3 : WSBV DNA from *Penaeus japonicus*,
- Lane 4 : WSBV DNA from *Penaeus chinensis*.

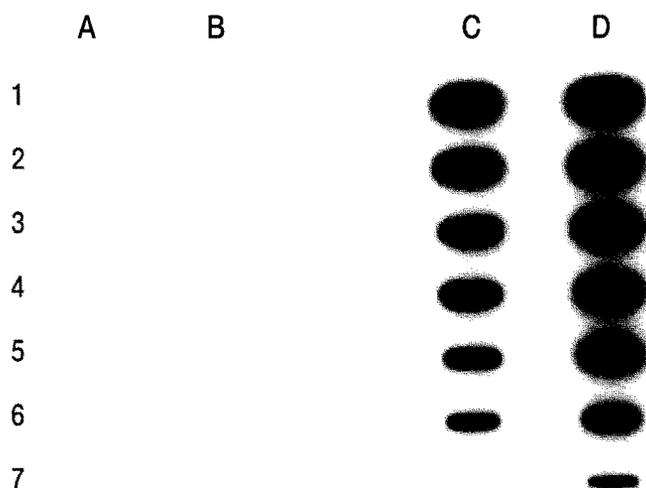


Fig. 17. Slot blot analysis of shrimp genomic DNA. Genomic DNA isolated from either uninfected (A and B) or WSBV infected (C and D) shrimps were hybridized with radiolabelled E3 probe. Total genomic DNA were isolated from either total shrimps (A and C) or hepatopancreases (B and D).
spots 1: 10 μ g, 2: 5 μ g, 3: 1 μ g, 4: 0.5 μ g, 5: 0.1 μ g, 6: 50 ng, 7: 10 ng

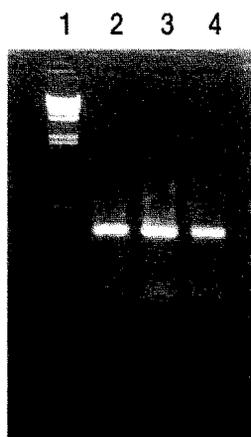


Fig. 18. Agarose gel electrophoresis of the PCR product of WSBV DNA from purified virions.
Lane 1 : λ phage DNA Hind III fragment marker,
Lane 2 : a positive control plasmid pTZ18RS1,
Lane 3 : WSBV DNA from *Penaeus japonicus*,
Lane 4 : WSBV DNA from *Penaeus chinensis*.

1F와 1R을 이용하여 30번 증폭반응을 실시한 결과 1pg이상의 바이러스 DNA에서만 반응산물이 검출되었으며 100fg 혹은 그 이하의 시료로 부터는 뚜렷한 밴드를 관찰할 수 없었다(그림 19). 따라서 PCR법은 앞서 설명한 slot blotting법보다 감도가 훨씬 높은 진단법으로 볼 수 있다.

사. 감염새우로 부터 바이러스 DNA의 직접 검출

바이러스에 감염되어 죽은 새우와 정상새우로 부터 추출한 전체 DNA를 PCR 증폭에 이용하여 보았다. 이 실험 결과 비감염 새우로 부터 PCR산물을 얻을 수 없었으나, 감염된 보리새우 및 대하로 부터 추출한 전체 DNA로 부터 365bp 크기의 산물을 얻을 수가 있었다(그림 20A). 이는 바이러스의 분리를 위한 복잡한 단계를 거치지 않고도 새우로 부터 추출한 전체 DNA를 이용하여 바이러스 감염 여부의 진단이 가능함을 알 수 있다. 또한 이는 본 실험에 이용된 S1클론이 바이러스 DNA를 포함한다는 것을 다시 한번 확인시켜 주는 결과이다.

전체 DNA로부터 얻어진 PCR산물이 바이러스 DNA로 부터 특이적으로 증폭되었음을 증명하기 위하여 Southern blotting을 실시하였다(그림 20B). S1에서 잘라낸 바이러스 DNA를 표지시켜 만든 probe로 혼성화시켰을 때, 모든 PCR산물들이 특이적으로 혼성화됨을 알 수 있었다. 따라서 본 실험에서 고안된 primer는 WSBV DNA를 검출하기에 적절한 것임을 알 수 있다.

아. 잠복성 감염 및 치하의 진단

앞서 진단한 새우의 경우, 감각에 뚜렷한 반점들이 나타나고 PCR법을 이용하지 않더라도 바이러스 감염여부를 알 수 있었던 새우를 대상으로 한 것들이었다. 따라서 외형상 감염증상이 전혀 나타나지 않고, 다른 진단법에 의하여서는 감염여

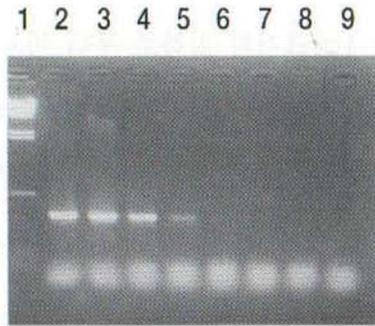


Fig. 19. Detection limit of WSBV DNA by PCR amplification with 30 cycles of incubation. Amplified products in agarose gel were stained with ethidium bromide.

Lanes: (1) 10 ng of WSBV DNA, (2) 1 ng, (3) 100 pg, (4) 10 pg, (5) 1 pg, (6) 100 fg, (7) 10 fg, (8) 1 fg, (9) 0 g.

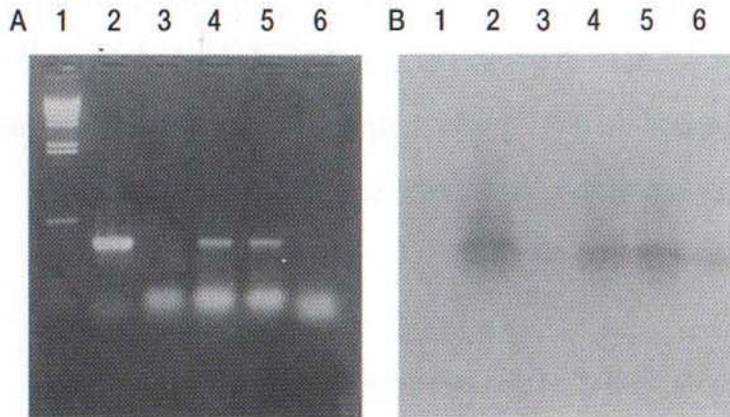


Fig. 20. Detection of WSBV DNA from infected shrimp by PCR amplification. (A) Agarose gel stained with ethidium bromide, (B) Southern blot hybridization with [α - 32 P] dCTP-labeled WSBV DNA from plasmid pTZ18RS1.

Lane 1 : λ phage DNA Hind III fragment marker,

Lane 2 : positive control plasmid pS1,

Lane 3 : total genomic DNA from uninfected *Peneaus japonicus*,

Lane 4 : total genomic DNA from infected *Peneaus japonicus*,

Lane 5 : total genomic DNA from infected *Penaeus chinensis*,

Lane 6 : total genomic DNA from hatchery *Penaeus japonicus*.

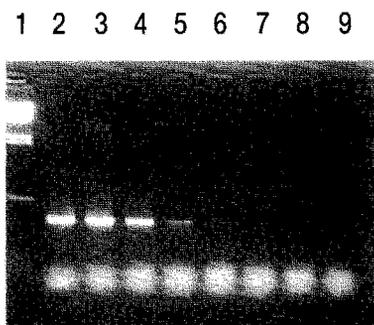


Fig. 19. Detection limit of WSBV DNA by PCR amplification with 30 cycles of incubation. Amplified products in agarose gel were stained with ethidium bromide.

Lanes: (1) 10 ng of WSBV DNA, (2) 1 ng, (3) 100 pg, (4) 10 pg, (5) 1 pg, (6) 100 fg, (7) 10 fg, (8) 1 fg, (9) 0 g.

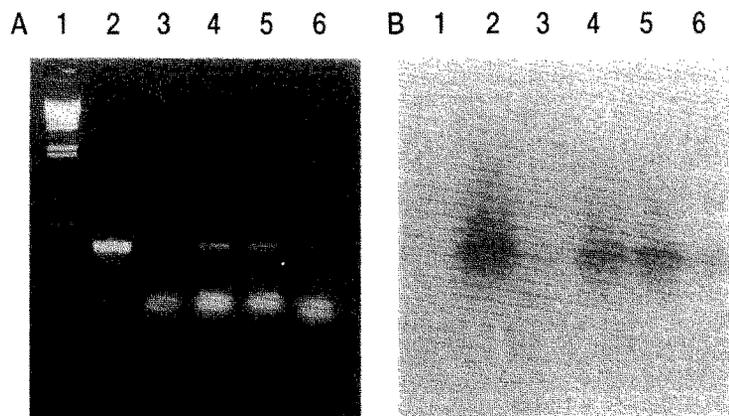


Fig. 20. Detection of WSBV DNA from infected shrimp by PCR amplification. (A) Agarose gel stained with ethidium bromide, (B) Southern blot hybridization with [α - 32 P] dCTP-labeled WSBV DNA from plasmid pTZ18RS1.

Lane 1 : λ phage DNA Hind III fragment marker,

Lane 2 : positive control plasmid pS1,

Lane 3 : total genomic DNA from uninfected *Penaeus japonicus*.

Lane 4 : total genomic DNA from infected *Penaeus japonicus*,

Lane 5 : total genomic DNA from infected *Penaeus chinensis*,

Lane 6 : total genomic DNA from hatchery *Penaeus japonicus*.

부를 전혀 알 수 없었던 약 1cm크기의 치하로 부터 바이러스의 감염여부를 알아보았다(그림 20). 실험결과 치하로 부터 적지만 동일한 크기의 PCR 산물이 검출되었다. 따라서 본 연구에서 개발된 PCR 진단법이 WSBV의 감염이 어느정도 진행된 새우의 감염여부를 진단할 수 있을 뿐 아니라 감염초기 혹은 잠복감염상태에 있는 새우의 진단에도 적합하다는 것을 보여준다.

자. 신속진단법 감도증진시험

바이러스 DNA를 probe로 이용하여 PCR법과 Southern blotting을 연계시키면 PCR법을 단독으로 실시할 때 보다 감도가 10배이상 증진되어 극소량의(0.1 pg) 감염바이러스도 검출이 가능하였다(그림 20B). 또한 죽은지 오래된 새우의 경우, 부패에 의한 새우조직의 손상으로 DNA 추출시 바이러스 DNA가 분해되어 PCR에 의한 바이러스의 검출이 용이하지 않았으나, 이 경우에는 sucrose gradient ultracentrifugation을 통하여 바이러스를 순수정제하여 PCR에 이용시 정확한 진단이 가능했다.

차. 감염새우의 갑각에 나타난 흰반점으로 부터 WSBV의 검출

WSBV에 감염된 새우는 갑각에 다수의 흰반점을 가지므로 이들 흰반점이 어떻게 형성되며 무엇을 함유하는 지를 알아보았다(그림 21). 이들 흰반점을 주사바늘 끝으로 긁어서 PCR 반응에 이용한 결과 바이러스 DNA와 동일한 크기의 산물이 증폭되었으므로 이들이 WSBV 바이러스 입자를 포함한다는 것을 알 수 있다. 따라서 흰반점은 갑각 바로 아래의 표피에서 바이러스 증폭이 왕성하게 일어나 바이러스 입자를 포함한 죽은 세포들이 표피에서 떨어져서 갑각의 내면에 축적된 것으로 볼 수 있다.

카. 신속진단법 현장적용시험

1996년도의 경우, 60곳의 서해안 새우양식장에서 채취한 샘플중에서 18개가 WSBV 바이러스 양성으로 진단되었고, 2곳의 치하를 검사하였을 때 1개만이 양성으로 나타났다(그림 22, 표 12). 바이러스의 감염정도는 호지마다 차이가 났으

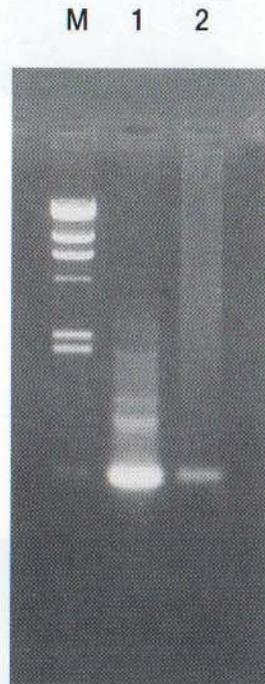


Fig. 21. Detection of WSBV DNA from white spots on the carapace of diseased shrimp.

Lane 1 : λ phage DNA Hind III fragment marker,

Lane 2 : positive control plasmid pTZ18RS1,

Lane 3 : white spot from diseased shrimp.

카. 신속진단법 현장적용시험

1996년도의 경우, 60곳의 서해안 새우양식장에서 채취한 샘플중에서 18개가 WSBV 바이러스 양성으로 진단되었고, 2곳의 치하를 검사하였을 때 1개만이 양성으로 나타났다(그림 22, 표 12). 바이러스의 감염정도는 호지마다 차이가 났으

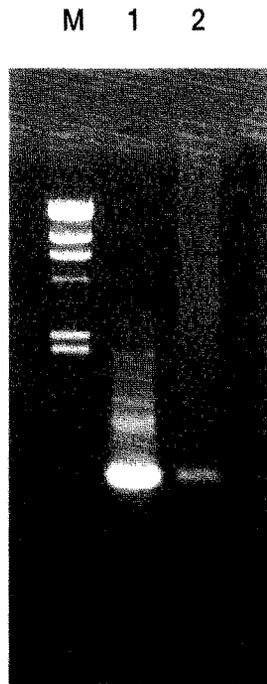


Fig. 21. Detection of WSBV DNA from white spots on the carapace of diseased shrimp.

Lane 1 : λ phage DNA Hind III fragment marker,

Lane 2 : positive control plasmid pTZ18RS1,

Lane 3 : white spot from diseased shrimp.

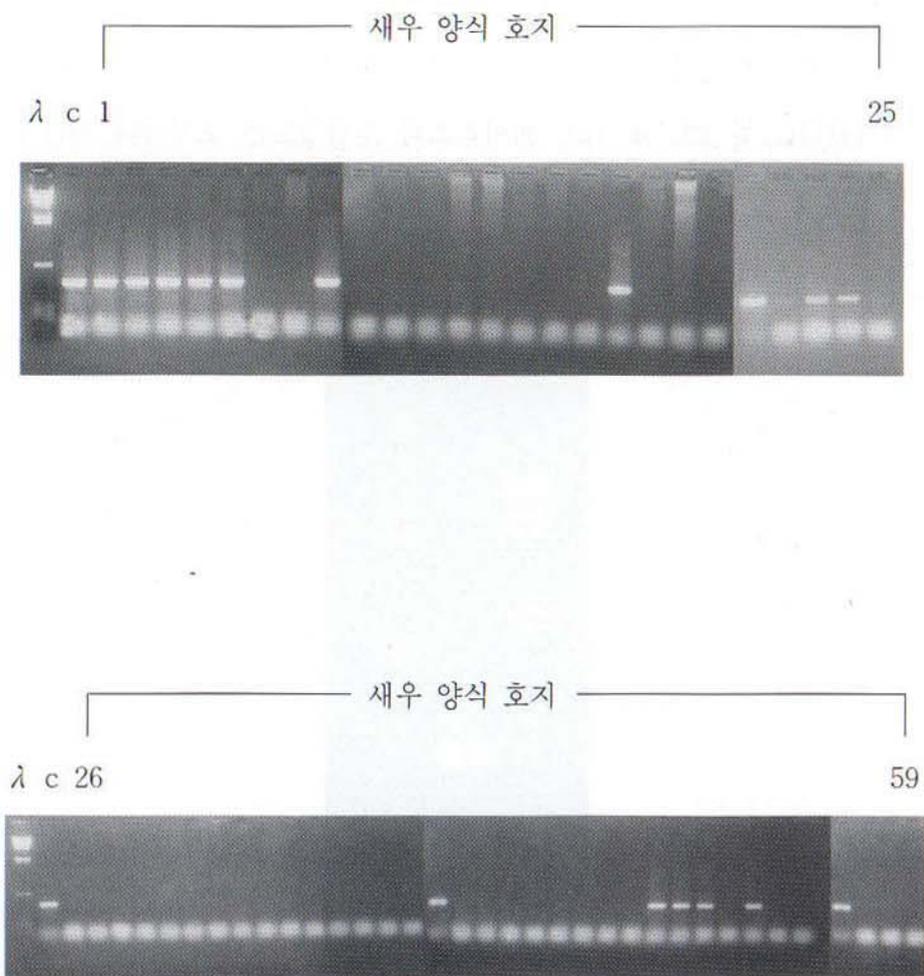


Fig. 22. Field applications of PCR diagnostic method in 1996.
 λ : λ Hind III marker, c : positive control pTZ18RS1,
 1-60 : cultured shrimps from different shrimp farms.

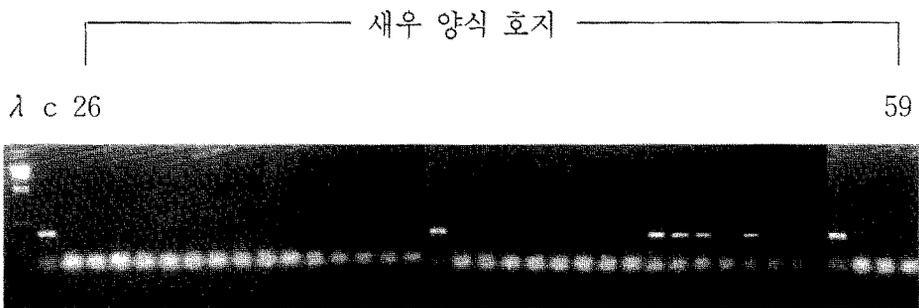
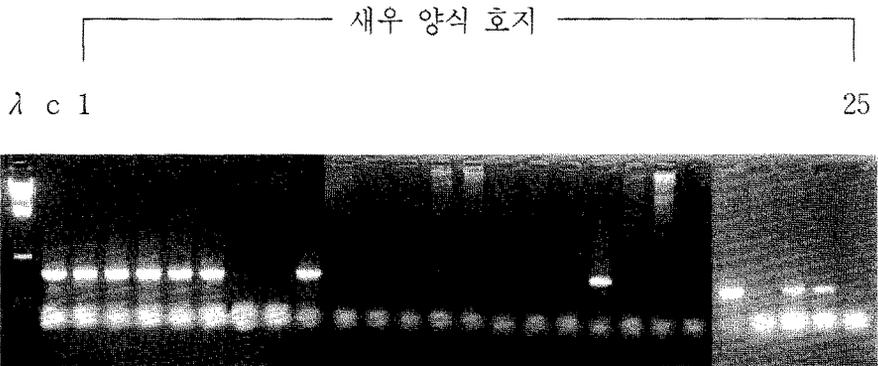


Fig. 22. Field applications of PCR diagnostic method in 1996.
 λ : λHind III marker, c : positive control pTZ18RS1,
 1-60 : cultured shrimps from different shrimp farms.

Table 12. Infection status of shrimps cultured in 1996

Shrimp farms	Infection status	Shrimp farms	Infection status
1	+++	31	-
2	+++	32	-
3	+++	33	-
4	+++	34	-
5	+++	35	-
6	-	36	-
7	-	37	-
8	+++	38	-
9	-	39	-
10	-	40	-
11	-	41	+++
12	-	42	-
13	-	43	-
14	-	44	-
15	-	45	-
16	-	46	-
17	+++	47	-
18	-	48	-
19	-	49	-
20	-	50	+++
21	+++	51	+++
22	+	52	+++
23	++	53	-
24	++	54	+++
25	+	55	-
26	-	56	-
27	-	57	+++
28	-	58	-
29	-	59	-
30	-	60	-

+++; very strongly infected, ++: strongly infected, +: weakly infected, -: no infected.

며 주로 새우가 집단폐사한 지역에서 많은 바이러스가 검출되었다. 1997년도의 경우에는 양식장 25곳에서 채취한 샘플중 23곳에서 새우바이러스가 검출되었다(그림 23, 표 13). 따라서 바이러스가 이미 전국적으로 확산되어 대부분의 양식새우들이 바이러스에 감염되어 있음을 알 수 있었다. 바이러스의 감염정도는 호지마다 별 차이없이 일정한 수준이었다.

2. 고찰

본 연구에서는 새우에 감염하여 흰반점을 유발하며 새우에 치명적인 질병을 일으키는 원인 바이러스 병원체를 분리하여 그 특성을 분자 수준에서 규명하고자 하였다. 염기서열 분석결과에 의하면 WSBV는 현재까지 알려진 바이러스와는 비교적 낮은 상동성을 보여 기존에 알려진 바이러스와는 구분되는 새로운 바이러스임을 알 수 있었다.

대부분의 바이러스성 질병의 경우, 일단 감염되면 치료가 거의 불가능하므로 감염의 예방에 주력하고 있다. 양식새우와 같이 다수의 개체를 상대로 감염 예방 백신을 투여한다는 것은 현실적으로 거의 불가능하므로 정확한 진단을 통하여 바이러스의 확산을 막는 것이 중요하다고 볼 수 있다. 본 연구에서는 새우에서 바이러스의 감염을 진단할 수 있는 두가지 방법을 개발하였다. 우선 Southern blotting에 기초한 바이러스 진단법의 경우 바이러스 DNA를 probe로 이용하여 새우에서 추출한 전체 DNA내에 바이러스 DNA의 존재 유무를 조사하는 것으로, 10ng의 전체 DNA로 부터 바이러스 DNA를 검출할 수 있었다. 이 방법은 과정이 다소 복잡하고 감도가 낮은 단점이 있지만 바이러스 감염을 충분히 진단할 수 있음을 보여주었다. 특히 죽은지 오래된 새우로부터 부패로 인하여 추출한 DNA가 많이 분해되는 경우가 있는데 이러한 샘플로 부터 PCR증폭에 의한 바이러스 DNA의 검출

이 어려우므로 이러한 경우에 적합한 진단법이라고 할 수 있다.

이에 반하여 PCR진단법은 매우 신속하고도 감도가 높은 방법으로써 감염초기 및 잠복감염상태의 바이러스조차도 진단이 가능한 방법으로 바이러스 감염의 진단에 매우 효과적인 방법이라고 할 수 있다. PCR증폭만으로도 1pg의 바이러스 DNA를 검출할 수 있으며 Southern blotting과 연계시에는 0.1 pg이하의 바이러스 DNA도 검출이 가능함을 보여 주었다. 이러한 방법들을 이용하여 새우양식장에서 채취한 시료들로 현장적용실험 결과 바이러스의 감염여부를 진단할 수 있었다. 따라서 본 과제에서 개발한 진단법을 새우양식에 적용한다면 바이러스의 확산에 따른 피해를 최소화할 수 있을 것으로 보인다.



Fig. 23. Field applications of PCR diagnostic method in 1997.
 λ : λ Hind III marker, c : positive control pTZ18RS1,
1-25 : cultured shrimps from different shrimp farms.

이 어려우므로 이러한 경우에 적합한 진단법이라고 할 수 있다.

이에 반하여 PCR진단법은 매우 신속하고도 감도가 높은 방법으로써 감염초기 및 잠복감염상태의 바이러스조차도 진단이 가능한 방법으로 바이러스 감염의 진단에 매우 효과적인 방법이라고 할 수 있다. PCR증폭만으로도 1pg의 바이러스 DNA를 검출할 수 있으며 Southern blotting과 연계시에는 0.1 pg이하의 바이러스 DNA도 검출이 가능함을 보여 주었다. 이러한 방법들을 이용하여 새우양식장에서 채취한 시료들로 현장적용실험 결과 바이러스의 감염여부를 진단할 수 있었다. 따라서 본 과제에서 개발한 진단법을 새우양식에 적용한다면 바이러스의 확산에 따른 피해를 최소화할 수 있을 것으로 보인다.

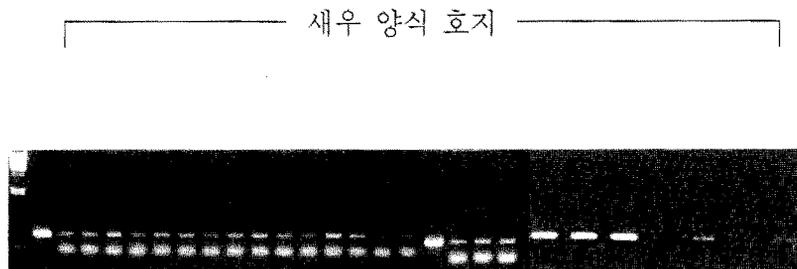


Fig. 23. Field applications of PCR diagnostic method in 1997.

λ : λ Hind III marker, c : positive control pTZ18RS1,

1-25 : cultured shrimps from different shrimp farms.

Table 13. Infection status of shrimps cultured in 1997

Shrimp farms	Infection status	Shrimp farms	Infection status
1	+++	14	++
2	+++	15	++
3	+++	16	+++
4	+++	17	+++
5	+++	18	+++
6	+++	19	+++
7	+++	20	+++
8	+++	21	+++
9	+++	22	-
10	+++	23	+++
11	+++	24	-
12	+++	25	++
13	+++		

+++; very strongly infected, ++; strongly infected, +; weakly infected, -: no infected.

제 5 장 바이러스 방역대책 기술개발

제 1 절 서 론

우리나라 새우양식장에서 1993년도 부터 매년 발병하여 양식산 새우를 대량폐사 시키고 있는 바이러스 질병에 대해서는 방역대책기술이 시급히 개발되어야 하나, 바이러스 질병은 특성상 질병이 감염된 후에는 적절한 치료대책이 없기 때문에 바이러스 질병감염을 사전에 예방하거나 사육환경을 개선하든지 면역증강제를 투여하여 양식생물의 항병력을 증대시켜 바이러스 감염으로 인한 피해를 최소화시키는 것이 실질적인 방역대책이 될 수 있다. 바이러스 질병감염을 사전에 예방하는 방법으로는 바이러스를 보균한 새우어미로부터 바이러스에 감염되지 않는 건강한 새우종묘를 생산하여 양식하여야 하고, 또한 바이러스를 보균한 서식생물이 서식하고 있는 양식장에 대해서는 양식장을 잘 건조시킨 후 일광소독과 염소소독을 하여 서식생물을 철저히 박멸하여야 한다. 그리고 양식생물의 항병력을 증대시키는 방법으로는 새우 사육밀도를 줄이고 수질 및 저질이 악화되지 않도록 사육수의 환수량을 증대시켜 사육환경을 개선하고 새우의 영양을 강화시켜야 한다.

이를 위해서 본 실험에서는 우선적으로 실험실내에서 약제, 일광, 건조 및 담수 처리에 의한 바이러스 불활화 효과시험과 저질개선에 의한 사육환경개선 효과시험을 수행하였고, 또한 면역증강제 투여에 의해 바이러스 방역 효과시험도 실시하였다. 이어서 현지 새우양식장을 시험어장으로 조성하여 양식장 소독, 저질개선 및 면역증강제 투여에 의한 방역효과를 조사하였으며 바이러스에 미감염된 건강한 새우종묘 생산시험도 하였다.

제 2절 재료 및 방법

1. 바이러스 불활화시험

가. 염소소독

멸균 해수 95ml와 새우 바이러스액 5ml를 삼각 플라스크에 넣고 소정의 차아염소산나트륨(유효염소 6% 함유)용액을 첨가해서 염소유효 농도를 5, 10, 30ppm으로 조정하고 실온에서 24시간동안 반응시킨 다음 0.1N 티오 황산나트륨 용액으로 중화시켰다. 이어서 중화시킨 바이러스액 전량을 대하(평균체중 7.5g) 10미씩을 수용한 20ℓ 아크릴 수조에 넣고 수온 $25 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 에서 30일간 사육하면서 폐사유무를 관찰하였으며 시험기간중 수질악화를 방지하기 위해 감염후 2일째부터 매일 사육수량의 20%씩을 교환해 주고 새우배합사료를 소량씩 급이하였다. 그리고 차아염소산나트륨 용액을 첨가하지 않은 바이러스액만의 시험구를 대조구로 하였다.

나. 요오드소독

포비돈 요오드(유효 요오드 0.7% 함유)로 유효 요오드 농도를 5, 10, 30ppm으로 조정한 멸균해수 50ml에 새우 바이러스액 5ml를 넣고 실온에서 1시간동안 방치한 후 처리한 바이러스액 전량을 대하(평균체중 7.5g)10미씩을 수용한 20ℓ 아크릴 수조에 넣고 수온 $25 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 에서 30일간 사육하면서 폐사유무를 관찰하였다. 그리고 요오드 용액을 첨가하지 않은 바이러스액만의 시험구를 대조구로 하였다.

다. 일광소독

새우 바이러스액 5ml를 지름 87mm인 유리샤레에 넣고 옥상에서 수평진탕기를 저속교반하면서 직사광선('96. 8. 14일: 14:00~16:00)을 2, 4시간동안 쬐인 후 바

이러스액 전량을 대하(평균체중 7.5g) 10미씩을 수용한 20 ℓ 아크릴수조에 넣고 수온 25±0.5℃에서 30일간 사육하면서 폐사유무를 관찰하였다. 그리고 직사광선에 쬐이지 않은 시험구를 대조구로 하였다.

라. 건조처리

새우 바이러스액 4ml를 멸균건조 여과지(직경 20cm) 1매씩을 고르게 적하하여 흡착시킨 후 클린벤치내에서 1, 2, 3시간동안 통풍하여 건조시킨 다음 해수 1000ml를 넣은 비이커에 여과지를 잘라서 넣고 마그네트로 교반하고 여과지를 제거한 후 대하(평균체중 7.5g) 10미씩을 수용한 20 ℓ 아크릴수조에 넣어서 수온 25±0.5℃에서 30일간 사육하면서 폐사유무를 관찰하였다. 그리고 여과지의 건조 정도를 알기 위해 클린벤치내에서 1, 2, 3시간동안 통풍한 후 바로 여과지 무게를 측정하여 수분 함유율을 계산하였으며 새우 바이러스액을 여과지에 흡착하고 건조시키지 않은 시험구를 대조구로 하였다.

마. 담수처리

담수를 첨가하여 해수비중을 1.010(60% 담수첨가), 1.015(40%), 1.020(20%), 1.025(0%)으로 조정 한 해수 200ml씩에 새우 바이러스액 5ml를 넣고 항온 인큐베이터(20℃) 내에서 5일간 정치한 후 바이러스액 전량을 대하(평균체중 7.5g) 10미씩을 수용한 20 ℓ 아크릴수조에 넣고 수온 25±0.5℃에서 30일간 사육하면서 폐사유무를 관찰하였다.

2. 실내 방역시험

가. 저질소독 효과

1) 시험수조 준비

바이러스 질병으로 양식산 대하가 대량폐사한 ('97. 7월) 새우양식장(전남 영광군 관내 소재)의 저질을 실험실로 운반해서 2개의 250ℓ F.R.P 수조 바닥에 10cm 정도씩 깔고 (저질면적 0.5m², 저질량 14kg) 사육해수를 20cm까지 채웠다.

2) 저질 염소소독

염소소독 시험구는 차아염소산나트륨 용액(유효농도 100ppm)으로 염소소독한 다음 사육해수를 채우고(수심 50cm) 사육수를 다시 염소소독(유효농도 5ppm)하였다. 염소소독한 사육수는 2일간 폭기(aeration)를 충분히 해서 잔류염소를 제거하였다.

3) 대하 사육

저질을 염소소독한 시험구와 염소소독하지 않은 대조구에는 평균체중 0.05g인 대하 치하 50미씩을 수용하고 수온 17~23℃에서 새우배합사료를 1일 3회씩 투여하면서 8주간 사육하였다. 사육기간중 수질악화 방지를 위해 유수식으로 사육수를 매일 30%씩 환수하였다.

4) 저질 소독효과 분석

시험기간동안 매일 폐사체를 수거하여 광학현미경으로 폐사 새우의 두흉갑 및 체표에 흰반점 형성유무를 확인, 바이러스 감염상태를 조사하였고, 또한 1주일 간격으로 누적폐사율을 조사하였다.

나. 저질 개선효과

1) 시험수조 준비

바이러스에 오염된 새우양식장의 저질을 수거하여 150 ℓ F.R.P 수조바닥에 10 cm씩(저질면적 0.5m², 저질량 14kg) 깔아서 저질개선시험에 사용하였다.

2) 저질개선제 살포

본 실험에서는 저질 개선효과를 비교 분석하기 위해 화학 저질개선구, 생물 저질개선구, 효소 저질개선구 및 대조구로 구분하였다. 화학 저질개선구는 일본 우부 화학(주)에서 제조, 시판하고 있는 클리어워터(수산화마그네슘)를 저질에 골고루 살포하였고(80g/m²), 생물 저질개선구는 일본 원천미생물 식품역분유한공사로 부터 구입한 argon을 저질에 살포하였고(1g/m²), 효소 저질개선구는 일본 소화효소 연구소(주)로 부터 구입한 SKK 200을 저질에 살포하였다(3g/m²).

3) 대하 사육

저질개선구 및 대조구에 평균체중 0.15g인 대하 치하 50미씩을 수용하고 수온 20~25℃에서 63일(9주)간 사육하면서 새우배합사료에 schizophyllan(SPG)을 0.1% 첨가한 면역증강사료(신촌사료)를 1일 3회씩(새우체중의 10%) 투여하였고, 수질 악화방지를 위해 유수식으로 사육수의 30%를 매일 환수하였다.

4) 새우 바이러스 감염

바이러스 감염에 의한 저질개선효과를 알기 위해 냉동제조 보관한 새우 바이러스액 5ml씩을 실험시작 1일째와 3일째에 시험구별로 접종하였다.

5) 저질개선효과 분석

가) 수질 분석

염분(salinity), 용존산소(DO), 수소이온농도(pH), 화학적 산소요구량(COD), 암모니아성 질소(NH₄-N), 아질산성 질소(NO₂-N), 질산성 질소(NO₃-N), 인산염 인(PO₄-P) 등을 환경오염 공정시험법에 준하여 측정하였다. 염분은 salinometer로 측정하였으며, pH는 pH meter로, 용존산소는 DO meter로 측정하였다. COD는 100℃ 알칼리성 과망간산칼륨법으로 정량하였으며, 암모니아성 질소는 인도페놀법으로, 질산성 질소는 Cu-Cd column을 이용한 아질산환원법으로, 아질산성 질소는 디아조법으로 각각 정량하였다. 인산염은 ascorbic acid를 이용한 몰리브덴 청법으로 비색정량하였다.

나) 저질 분석

화학적 산소요구량(COD), 총화합물(total sulfide), 강열감량(ignition loss : IL), pH 등을 환경오염 공정시험법에 준하여 측정하였다.

다) 새우 생존율 조사

시험기간동안 매일 새우 폐사유무를 관찰하여 시험구별로 생존율을 조사하였고, 또한 폐사새우는 광학현미경으로 두흉갑 및 체표의 흰반점 형성유무를 관찰하여 바이러스 감염상태를 조사하였다.

다. 새우 면역증강시험

1) 새우 사육

250 ℓ F.R.P 수조에 대하여(평균체중 10g) 20미씩을 수용한 후 유수식으로 사육

수를 1일 10%씩 환수하였으며 시험기간(30일)동안 사육수온은 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 유지하였다.

2) 면역사료 투여

시험구는 *Bifidobacterium thermophilum*에서 추출한 peptidoglycan(PG)를 0.1% 첨가한 새우 면역증강사료(천하제일사료)와 새우 일반사료를 7일간씩 1주일 간격으로 교대로 1일 3회 투여하였으며 대조구는 새우 일반사료(천하제일사료)만을 투여하였다.

3) 바이러스 인위감염

면역증강사료 투여에 의한 새우의 생체 방어능력을 확인하기 위해 실험시작 후 11일째에 냉동보관한 새우 바이러스액 5ml씩을 시험구 및 대조구에 접종하였고 또한 17일째는 바이러스에 감염되어 폐사한 대하의 두흉부조직을 먹이로 3회 급여하였다.

4) 면역효과 분석

시험기간동안 새우폐사 유무를 매일 관찰하여 시험구별로 생존율을 조사하여 면역증강효과를 분석하였다.

3. 새우양식장 방역시험

가. 1차 현장시험(1996년)

1) 시험어장 조성

1995년도 바이러스 감염에 의해 양식산 새우가 대량폐사한 전남 영광군 염산면

봉남리에 위치한 새우양식장(백산농장)을 시험호지로 선정하여 양식장 방역시험을 실시하였다. 시험호지는 염소소독 + 저질개선제(100g/m²) 처리구(A시험지), 염소소독 + 저질개선제(200g/m²) 처리구(B시험지), 염소소독 처리구(C시험지) 3개 시험지를 설정하였다(그림 24). 시험어장의 저질은 차아염소산나트륨(NaClO) 100 ppm의 농도로 염소소독하였다. 또한 염소소독이나 저질개선제를 살포하지 않은 호지를 대조구(D시험지)로 설정하였다.

2) 새우종묘 방양 및 사양관리

1996년 6월 5일에 평균전장 1.35cm(평균중량 0.02g)의 대하치하 80만미를 방양하였다. 각 시험지별 종묘의 방양미수는 A시험지(6,600m²)에는 14만미, B시험지(6,600m²)에는 13만미, C시험지(26,400m²)에는 53만미로 시험지당 방양밀도는 각각 21미/m², 20미/m², 20미/m²이었다. 대조구로서 염소소독이나 저질개선제를 살포하지 않은 인접어장(52,800m², D시험지)을 선정하였는데 방양밀도는 30미/m²이었다.

3) 새우성장도 조사

방양후 15일마다 20~30마리씩 시료를 채집하여 전장과 중량을 측정하였다.

4) 새우질병 조사

가) 기생성 질병

기생성 질병은 외관상 감염징후가 있는 개체의 아가미, 표피, 부속지 및 꼬리부분을 현미경으로 관찰하여 검사하였다.

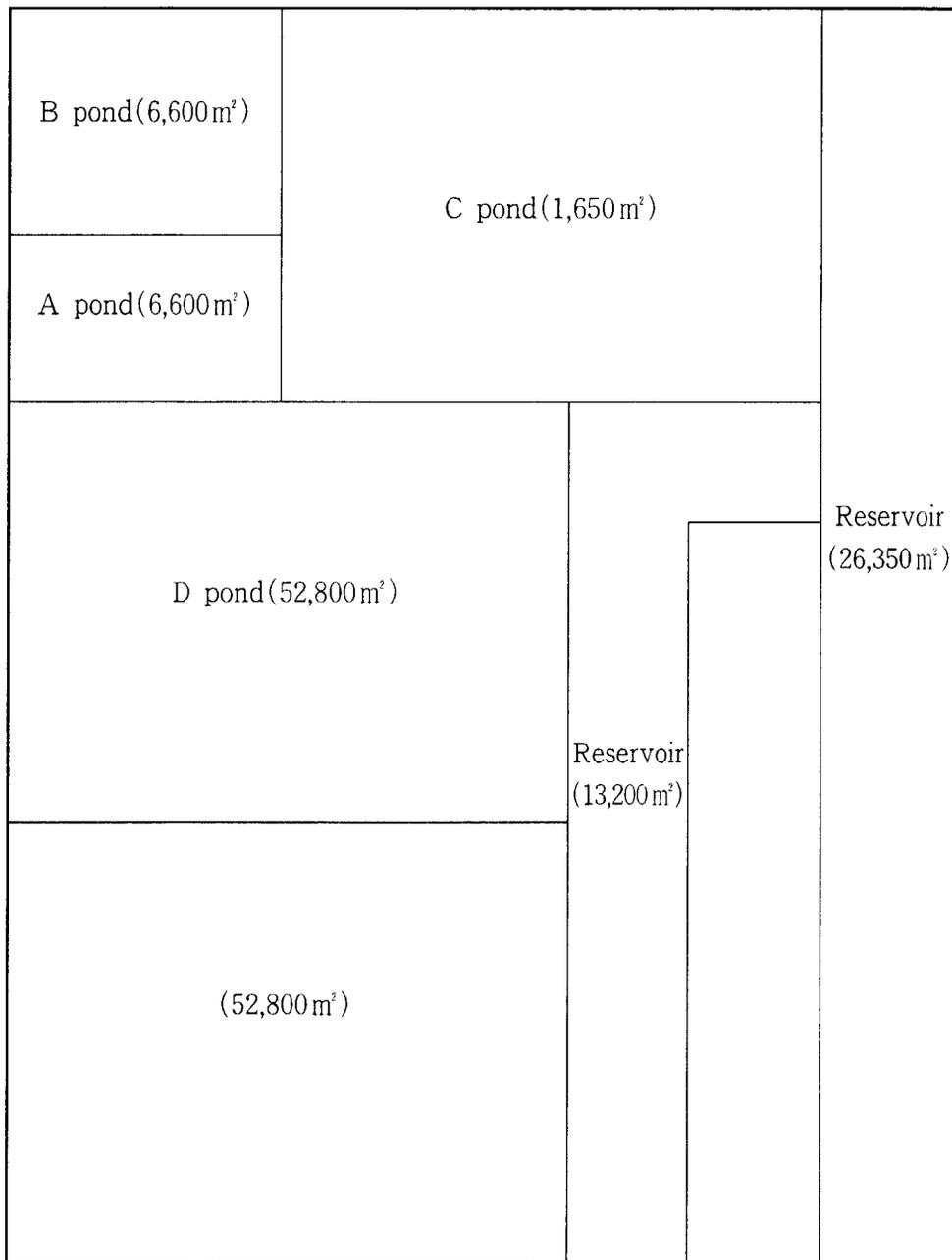


Fig. 24. Design of shrimp ponds for the field experiment in 1996.

나) 세균성 질병

세균성 질병은 외관상 질병이 의심되는 개체의 아가미, 혈임과 및 간체장의 조직 일부를 2.5% NaCl이 첨가된 TSA, marine agar, TCBS agar, cytophaga agar 등의 평판배지에 도말하여 실험실로 운반한 후, 25℃에서 24~48시간 배양해서 우점적으로 분리된 균을 Krieg과 Holt(1984)의 방법에 따라 속(genus) 단위까지 간 이동정하였다.

다) 바이러스성 질병

바이러스성 질병은 시험호지별로 시료를 채집하여 대하의 두흉부 및 체표에 흰 반점이 형성되어 있는지를 현미경으로 확인해서 바이러스 감염여부를 조사하였다.

5) 수질조사

수질환경 조사는 시험호지별로 지정된 장소에서 5월부터 7월까지 매월 2회, 총 6회 조사하였다. 시료는 각 시험호지별로 3점에서 채취하였다. 수온, 용존산소 및 염분도는 현장에서 측정하였고, pH, COD, SS, PO₄-P, NH₄-N, NO₂-N, NO₃-N 및 DIN 등은 실험실로 운반하여 분석하였다. 수온은 봉상온도계로, 염분은 inductivity coupled salino-meter, DO는 Winkler의 개량법, pH는 Orion Model 520A, COD는 알칼리성 과망간산 칼륨법, SS는 시료수 500 ml를 membrane 여지(HA type, 0.45μm)로 거른 후 105℃에서 6시간동안 건조시켜 그 무게를 측정하였고, PO₄-P, NH₄-N, NO₂-N, NO₃-N은 Strickland & Parson(1972)의 기재에 준하여 측정하였다.

6) 저질조사

저질조사는 수질조사와 동일한 지점의 시료를 채취하여 실험실에서 분석하였다. 황화물(H_2S)은 습시료 0.5~2.0g을 취하여 검지관법으로 측정 후 mg/g건너로 표시하였다. 저질 COD는 시료 1g을 달아 알칼리성으로 하여 과망간산 칼륨을 일정량 넣고 항온수조에서 1시간 가열 반응시킨 후, KI 및 $NaNO_3$ 를 가하여 냉각시킨 다음 증류수를 가해 여과하고, 이 여과액에 황산을 가해 유리된 요오드를 $Na_2S_2O_3$ 용액으로 적정하여 계산한 값을 mg/g건너로 표시하였다. 강열감량(IL)은 함수율 측정에 사용한 시료를 700℃에서 2시간 강열한 후 데시케이터중에서 약 1시간 방냉하여 무게를 달고 시료에 대한 무게 차이로 부터 계산하여 백분율로 표시하였다.

7) 플랑크톤 조사

각 시험호지별로 일정 장소에서 해수 1ℓ 씩을 채집하여 Lugol 용액으로 고정 한 후 실험실로 운반, 현미경하에서 시기별 출현종과 출현량을 조사하였다. 플랑크톤 출현종의 분류는 山路(1982), 심(1994, 1995)의 기재방법에 따라 검색, 동정하였으며 출현량은 고정된 각 시험호지별 시료를 침전관에서 침전시킨 후 검경하여 리터당 세포수(cells/ℓ)로 환산하였다.

나. 2차 현장시험

1) 시험어장 조성

1차년도 현장시험에서 시험새우 양식장을 염소로 소독하고 화학저질개선제를 살포하였지만 바이러스 감염으로 인해 전량 폐사하였다. 따라서 2차년도에는 염소 소독 및 화학저질개선제 살포외에 담수처리와 면역증강제를 투여하여 현장방역시험을 실시하였다.

시험어장은 경기도 안산시 대부동 소재의 새우양식장을 4개의 시험지(그림 25)로 구획하여 A시험지(2,750m²)는 중간육성지로서 화학저질개선제(200g/m²)를 살포하였고, B시험지(1,650m²)는 화학저질개선제(150g/m²)를 살포한 후 담수를 첨가하였으며, C시험지(1,650m²)는 저질개선제를 사용하지 않고 담수를 첨가하여 낮은 염분도로 사육하였다. A-1 시험지(11,800m²)는 본 양성지로서 화학저질개선제(200g/m²)를 살포하였다.

A, B, A-1시험지에 있어 저질개선제의 살포는 염소소독 및 물 만들기전(3. 20일)에 실시하고 트랙터로 경운하였다. 저질의 염소소독은 차아염소산나트륨 용액을 전 시험지에 60ppm의 농도로 살포하였다.

2) 새우종묘 방양 및 사양관리

'97년 6월 10일에 부안 수산종묘배양장에서 생산한 일반새우종묘(평균체중 0.02g)를 A시험지(2,750m²)에 560,000미(방양밀도 204미/m²), B시험(1,650m²)에 100,000미(방양밀도 61미/m²)를 방양하고, C시험지(1,650m²)에는 부안 수산종묘배양장에서 생산한 건강새우종묘 90,000미(방양밀도 55미/m²)를 방양한 후, 1주 간격으로 면역증강제 새우사료(천하제일사료)와 일반새우사료(천하제일사료)를 교대로 투여하였고, '97년 8월 5일에서 20일 사이에 과밀수용된 A 시험지로부터 새우 200,000미를 분양하여 A-1시험지에서 분양성하였다. 대조구(33,000m²)는 '97년 5월 25일에 일반새우종묘(체중 0.02g) 100만미(방양밀도 30미/m²)를 방양하였다.

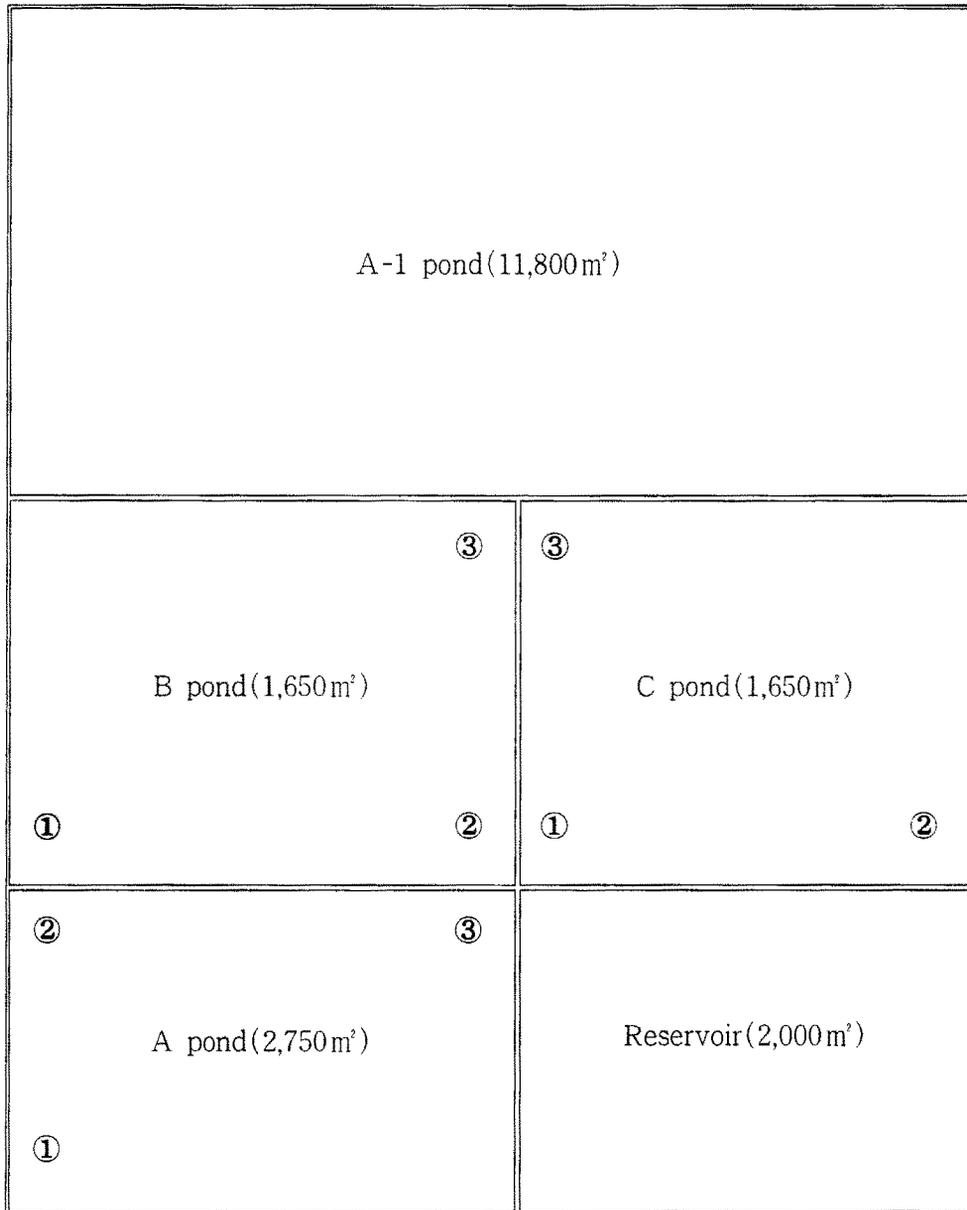


Fig. 25. Design of shrimp ponds for the field experiment in 1997.

○ : sampling station.

3) 새우 성장도 조사

새우 성장도는 시험호지별로 20~30마리씩 시료 채집하여 조사하였다.

4) 새우 질병 조사

가) 기생성 질병

1차년도와 동일한 방법으로 조사하였다.

나) 세균성 질병

1차년도와 동일한 방법으로 조사하였다.

다) 바이러스성 질병

각 시험호지별로 10~20마리씩 채집하여 PCR법으로 검사하였다.

5) 수질조사

수질환경 조사는 시험호지별로 지정된 장소에서 1997년 6월에는 종묘방양전 및 방양후 각 1회, 7월부터 9월까지는 월 2회 조사하였고, 10월에는 1회로 총 9회 조사하였다. 시료는 각 시험호지별로 3점씩 채취하여 평균치를 조사결과로 이용하였다. 수온, 비중 및 DO는 현장에서 조사하였고, 기타 조사항목(염분, 수소이온농도, 화학적산소요구량, 인산염, 암모니아, 아질산염, 질산염, 부유물질 등)은 실험실로 운반하여 1차년도와 동일한 방법으로 분석하였다.

6) 저질조사

시험호지별로 지정된 장소에서 수질조사와 병행하여 실시하였다. 각 시험호지

에서는 3지점(취수구, 중앙, 배수구), 대조구는 1지점에서 시료를 채취한 후, 아이스팩으로 냉장보존된 상태로 실험실로 운반하여 1차년도와 동일한 방법으로 분석하였다.

7) 플랑크톤 조사

1차년도와 동일한 방법으로 분석하였다.

4. 새우 건강종묘 생산시험

가. 어미새우

시험에 사용된 어미새우는 1997년 5~6월 사이에 전남 영광 및 충남 태안 앞바다에서 걸그물로 어획한 대하중 비교적 생식소가 발달한 암컷만 선별하여 활어차로 운반한 후, 자연수온에서 강한 포기(aeration)와 함께 약 6시간 정도 어미새우 안정용수조에 수용하였다가 채란에 이용하였으며, 크기는 전장 19~24cm(평균전장 22.6cm), 체중 45~80g(평균체중 65.5g)이었다.

난소 성숙상태는 초기구입 어미의 경우 육안관찰 및 현미경 검경시 초기성숙상태(early development stage)에 해당하였고, 6월 구입한 어미의 경우는 완숙상태(ripe stage)로 이미 1차 방란을 완료한 개체가 다수 발견되었다.

나. 수정란 세란

1) 산란유발

어미새우 안정용 수조에서 안정시킨 어미새우중 활력이 좋은 개체를 선별, 저녁시간에 19℃로 조절된 채란용 1.5톤 F.R.P 수조로 이동 수용하여 수온 상승 자극(14℃→19℃)으로 산란을 유도하였으며, 어미새우의 수용밀도는 각 수조당 20마

리씩으로 하였고 시험에 사용된 해수는 모두 해수용 필터(pore size $1\mu\text{m}$)를 통해 3회 여과시킨 후, 자외선 유수살균기로 살균하여 사용하였다.

2) 수정란의 수집 및 세란

방란이 완료되면 다음날 채란용 수조에서 어미새우를 제거하고 포기를 중지시킨 후, 난을 가라 앉히고 상등액을 배수하였다. 침지된 수정란은 수조의 배수구를 통하여 채란틀로 옮기고 먼저 망목 크기 $500\mu\text{m}$ 인 망(net)을 통과시킨 후, 다시 $100\mu\text{m}$ 의 채집망을 사용하여 수거하였으며, 수거된 난은 채란용수조와 동일한 수온으로 조절된 자외선 살균해수를 유수시키면서 1~2분간 세란하여 시료로 이용하였다(그림 26).

다. 수정란 소독

1) 소독방법

수집, 세란의 과정을 거친 수정란은 소독액 침지 직전, 자외선 살균해수로 1회 반복 세척하고 소독액에 일정시간 침지후 다시 흐르는 자외선 살균해수를 이용 2분간 세란한 후 배양에 사용하였다.

2) 소독약제

소독약제로는 포비돈 요오드 용액을 사용하였고 이 용액을 살균 여과해수로 희석하여 유효 요오드농도 20~200ppm의 용액에서 10~60초간 침지하여 소독을 실시하였다.

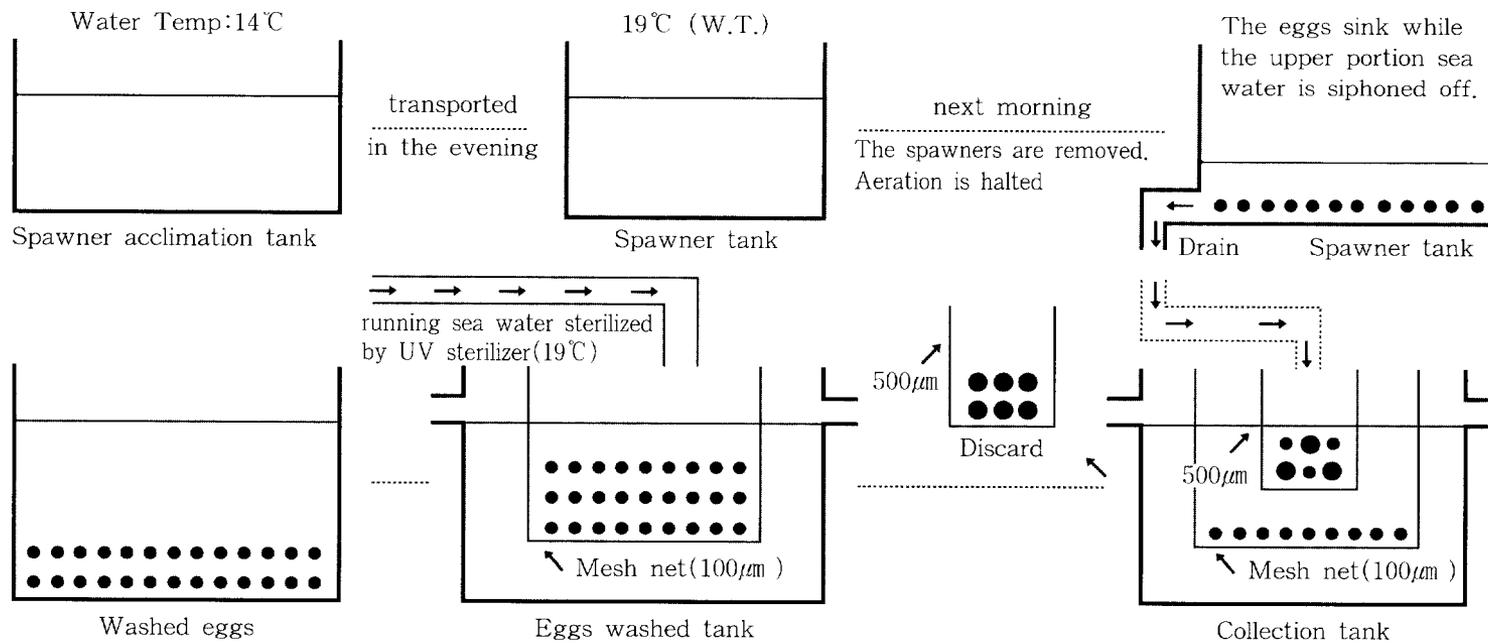


Fig. 26. Diagram of washing fertilized eggs of fresh shrimp.

라. 부화율 조사

유효수량 10 l 의 PVC수조에 수조당 약 5,000개의 소독 처리된 수정란은 수용하고, 수온 19℃에서 48시간 배양한후 현미경 검경으로 계수하여 조사하였다.

$$\text{부화율 (\%)} = \frac{N}{N+E} \times 100$$

(여기에서 N = 부화된 Nauplii 수, E = 미부화란 수)

마. 생존율 조사

사육기간 동안의 생존율은 표본추출에 의한 방법으로 전체량을 추정하였으며, 유생발달 단계별로 조사하였다.

바. 소독효과 조사

1) 어미새우

시험에 이용된 어미새우는 방란을 마친 후 모두 수거하여 -70℃의 냉동고에 보관하였다가 바이러스 감염조사용으로 사용하였다.

2) 수정란

세란을 실시하지 않은 대조구와 세란을 실시한 시험구의 일부 수정란을 수거하여 세란에 의한 소독효과를 조사하였다.

3) 소형수조 시험

세란을 실시하지 않은 대조구, 세란만 실시한 처리구 및 요오드 농도 50, 100, 200 ppm에서 30초간 소독처리 후 유효수량 1.5톤의 F.R.P 수조에 수용하고 배양

하면서, 사육수가 25℃가 될 때까지 매일 1℃씩 사육수온을 상승시키고 일정한 간격으로 바이러스 검사용 시료를 채취하였다.

4) 대형수조 시험

수정란을 유효농도 200ppm의 요오드용액에 30초간 소독을 실시한 후, 50톤 규모의 콘크리트 수조에 수용하여 사육하였으며 부화유생 및 치하사육은 일반적인 종묘양산 방법에 의거하여 실시하였고, 포스트라바 유생기에 시료를 채취하여 소독을 실시하지 않은 대조구의 종묘와 함께 바이러스 보균여부를 조사하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 바이러스 불활화 시험

가. 염소소독

새우 바이러스를 차아염소산나트륨 용액에 24시간 처리한 후 근육주사감염에 의한 새우의 누적폐사율로 염소소독 효과를 조사한 결과, 표 14에서 처럼 새우 바이러스는 유효농도 5, 10, 30ppm의 차아염소산나트륨 용액에서 전혀 폐사가 일어나지 않았으나, 대조구에서는 새우의 두흉갑 및 체표의 큐티클층에 흰반점이 형성되면서 전량 폐사하였고, 또한 前田(1997)도 PRDV를 차아염소산나트륨 용액 5ppm에서 10분간 처리하든지 1ppm에서 30분간 처리하면 바이러스가 실패된다고 하였다. 따라서 새우 바이러스는 염소소독에 의해서 쉽게 불활화가 되므로 바이러스에 오염된 새우양식장을 염소소독하면 방역효과가 있을 것으로 생각된다.

나. 요오드소독

바이러스 감염을 예방하기 위해 어류 수정란 소독에 널리 사용되는 요오드 용액을 이용해서 새우 바이러스 소독효과를 조사하였다.

Table 14. Virucidal effect of sodium hypochlorite (NaOCl) on WSBV

Conc. (ppm)	No. of shrimp tested	No. of shrimp died	Mortality (%)
30	10	0	0
10	10	0	0
5	10	0	0
0	10	10	100

본 실험에서는 새우 바이러스액을 유효농도 10, 20, 30ppm의 포비돈 요오드용액에 1시간동안 처리한 후 근육주사에 의한 새우의 누적폐사율을 요오드 소독효과를 조사한 결과, 표 15에서 처럼 요오드 용액을 처리한 시험구에서 감염 후 8일 이내에 전량 폐사하였고, 또한 대조구에서도 전량 폐사가 일어나 요오드 소독에 의해서 바이러스가 실효되지 못했다. 그렇지만 前田(1997)의 실험결과에 의하면 PRDV를 유효농도 10ppm의 요오드용액(포비돈 요오드)에서 30분간 처리하면 바이러스가 쉽게 불활화된다고 하였고, 또한 본 바이러스(WSBV)와 유사한 바이러스인 BMN(baculoviral mid-gut necrosis) 바이러스도 Momoyama(1989)의 실험결과에 의하면 유효농도 25ppm의 요오드 용액에 10분간 처리하면 바이러스가 불활화한다고 함에도 불구하고, 본 실험에서는 유효농도 30ppm의 요오드 용액에서 1시

간동안 처리하여도 바이러스의 실활효과가 나타나지 않았다. 일반적으로 요오드 용액은 유기물 함량이 많을 때 소독효과가 급격히 저하되므로 본 실험에 사용한 바이러스액이 순수분리된 바이러스로 제조한 것이 아니고 바이러스에 감염된 새우 두흉부 조직을 마쇄하여 제조한 것으로서 바이러스액에는 유기물이 다량 함유되어 있기 때문에 요오드 소독효과가 급격히 저하되었거나 아니면 요오드 독성에 의해서 새우가 전량 폐사하였는지도 모른다.

Table 15. Virucidal effect of povidon-iodine on WSBV

Conc. (ppm)	No. of shrimp tested	No. of shrimp died	Mortality (%)
30	10	10	100
20	10	10	100
10	10	10	100
0	10	10	100

다. 일광소독

새우양식장에서는 바이러스에 오염된 저질을 소독하기 위해 양식장 바닥을 건조시킨 후 경운하여 일광에 노출시키므로써 바이러스 소독효과가 있다는 점을 착안하여 본 실험에서는 태양광선이 강한 여름철 (1996년 8월 14일 14:00~16:00)에 새우 바이러스액을 태양광선에 노출시킨 후 바이러스의 불활화 효과시험을 관찰한 결과, 표 16에서와 같이 태양광선에 새우 바이러스액을 2, 4시간동안 노출시

킨 시험구에서는 시험기간동안 전혀 폐사가 일어나지 않았으나 대조구에서는 전량 폐사하였고, 또한 본 실험과 유사하게 Momoyama(1989)가 BMN 바이러스를 이용하여 태양광선 노출시간에 따른 바이러스의 불활화 효과시험을 한 결과, BMN 바이러스는 직사광선에 2시간 노출(자외선 조사량 $1.2 \times 10^6 \mu W \cdot sec/cm^2$)하면 바이러스가 완전히 실활되지 않지만, 3시간 노출(자외선 조사량 $1.6 \times 10^6 \mu W \cdot sec/cm^2$)하면 완전 실활된다고 하였다. 따라서 새우 바이러스를 태양광선에 충분히 노출하면 실활효과가 있으므로 바이러스에 오염된 새우양식장을 건조하여 태양광선으로 소독하여야 할 것으로 생각된다.

Table 16. Virucidal effect of sunlight exposure on WSBV

Exposure time (hr)	No. of shrimp tested	No. of shrimp died	Mortality (%)
4	10	0	0
2	10	0	0
0	10	10	100

라. 건조처리

새우 바이러스액을 흡착시킨 여과지를 클린벤치내에서 건조시켜 바이러스의 불활화 효과시험을 조사한 결과, 표 17에서와 같이 새우 바이러스액을 1, 2, 3시간 건조(흡습률 5.75~7.41%)시킨 시험구에서는 시험기간동안 폐사는 전혀 일어나지 않았으나, 바이러스를 건조시키지 않은 대조구에서는 시험기간동안 폐사율이

100%로 나타났고, 또한 前田도 PRDV를 건조시키면 바이러스가 실활된다고 하였으므로 본 바이러스는 건조에 의해서 실활이 가능함을 알 수 있다. 그렇지만 일반적으로 바이러스는 건조상태에서 비교적 안정하여(近藤, 1973), 누에의 NP virus는 사레내에서 건조시킨 상태에서 42일 이후에도 병원성을 유지하고 있으며(荒武等, 1985), 보리새우의 감염조직내의 BMNV는 동결 건조할 경우 7년 이상 활성을 유지한다고 함을 고려해 볼 때, 본 실험에서 건조로 인해서 바이러스가 쉽게 실활된 것은 건조시 수분증발에 따른 염분농도의 상승이 바이러스 실활에 관여하지 않았나 생각되지만, 하얗튼 새우양식장이나 사육기구 등을 충분히 건조시키면 바이러스 소독효과가 있을 것이다.

Table 17. Virucidal effect of drying on WSBV

Drying time(hr)	Water content in filter paper (%)	No. of shrimp tested	No. of shrimp died	Mortality (%)
3	5.75	10	0	0
2	6.01	10	0	0
1	7.41	10	0	0
0	100	10	10	100

마. 담수처리

우리나라 서해안 새우양식장중에서 담수 유입 영향을 많이 받는 지역의 새우양식장에서는 타지역에 비해 바이러스 감염으로 인한 피해가 적다는 사실에 착안하

여 담수 첨가량에 따른 새우 바이러스의 불활화 효과시험을 실시한 결과, 표 18에
 서와 같이 담수를 60% 첨가한 시험구(비중 1.010)에서는 시험기간(30일) 동안 전
 혀 폐사가 일어나지 않았으나, 40% 시험구(비중 1.015)에서는 감염 후 22일째부
 터 폐사가 일어나 시험기간동안 누적폐사율은 40%였고, 20% 시험구(비중 1.020)
 에서는 감염 후 19일째부터 폐사가 일어나 시험기간동안 누적폐사율은 50%였다.
 그리고 담수를 첨가하지 않은 대조구(비중 1.025)에서는 감염 후 13일째 부터 폐사
 가 일어나기 시작하여 감염 후 24일째 전량 폐사하였다. 따라서 본 실험결과에 의
 하면 새우 바이러스는 담수를 60%이상 첨가한 저비중 해수(1.010)에서 불활화되
 지만 이 농도의 저비중 해수에서 새우를 장기간 사육하면 생리적 장애에 의해 새우
 의 성장이 저하되거나 병에 대한 저항력이 저하될 우려가 있기 때문에 이에 대한
 실험이 추후 수행되어야 할 것이다.

Table 18. Virucidal effect of freshwater on WSBV

Freshwater content (%)	Specific gravity	No. of shrimp tested	No. of shrimp died	Mortality (%)
60	1.010	10	0	0
40	1.015	10	4	40
20	1.020	10	5	50
0	1.025	10	10	100

2. 실내 방역효과시험

가. 저질 염소소독

바이러스가 저농도(5ppm)의 염소용액에서도 쉽게 실효되므로 본 실험에서는 바이러스가 발병한 양식장의 저질을 수거하여 염소소독에 의한 방역효과를 시험한 결과, 그림 27에서와 같이 바이러스에 오염된 저질을 차아염소산나트륨 용액(유효농도 100ppm)으로 소독한 시험구에서는 누적폐사율이 53%였으나, 차아염소산나트륨 용액으로 소독하지 않는 대조구에서는 누적폐사율이 92%로 나타나 염소소독에 의한 방역효과가 있었다. 그렇지만 염소 소독액은 저질의 유기물 함량에 따라 소독효과에 상당한 차이가 있으므로 실제 새우양식장에서 저질을 염소소독할 때는 저질 오염정도를 고려하여 염소농도를 과감하여야 할 것이다.

나. 저질 개선

1) 수질개선효과

각종 저질개선제를 살포한 후 주기적으로 수질을 분석한 결과, 그림 28에서와 같이 용존산소(DO)는 시험구 모두 시험기간동안 6ppm 이상을 유지하여 새우 생존에 적합하였고, pH는 해역 I 등급 수준을 유지하였다. 염분도는 실험 개시 후 6주까지는 전 시험구 모두 높은 값을 유지하였으나 생물학적(Argon) 및 효소학적(SKK 200) 저질개선제를 투여한 시험구에서 9주째에는 염분농도가 저하되었다. 해수중에서 유기물 함량을 나타내는 간접적인 지표인 화학적 산소요구량(COD)은 대조구에서는 시험기간동안 점차 증가하여 해역 II 등급 수준의 수질을 유지하였으나 저질개선제를 투여한 전 시험구에서는 I 등급 수준을 유지함으로써 수질개선효과가 양호하였다. 그리고 아질산성 질소($\text{NO}_3\text{-N}$), 질산성 질소($\text{NO}_2\text{-N}$) 및 인산염 인($\text{PO}_4\text{-P}$)은 조사기간동안 모든 시험구에서 거의 비슷한 농도 분포를 나타냈

으며, 암모니아성 질소($\text{NH}_4\text{-N}$)는 저질개선제를 투여하지 않은 대조구에서 높은 수치를 나타낸 반면 저질개선제를 투여한 모든 시험구에서 시험개시 후 3주째 까지 증가하다가 감소하기 시작하여 시험 종료일인 9주째는 클리어워터 시험구에서 가장 낮은 값을 나타내어 수질 개선효과가 양호하였다(그림 29).

2) 저질개선효과

저질개선제를 살포한 후 주기적으로 저질을 분석한 결과 그림 30에서와 같이 pH는 저질개선제 시험구 모두 대조구보다 높은 수치를 유지하였다. 특히 클리어워터를 살포한 시험구에서 pH가 8~8.8로 유지되었는데, 이는 클리어워터 [$\text{Mg}(\text{OH})_2$] 주성분이 용해되었기 때문으로 생각된다. 그리고 새우의 세포내 호흡에 유독작용을 일으키는 것으로 알려져 있는 총황화물(TS)은 저질개선제 시험구 모두 대조구보다 낮은 값을 나타내어 저질개선효과가 있었고 특히 클리어워터 시험구가 가장 양호하였다. 저질내에 유기물의 많고 적음을 나타내는 강열감량(IL)은 저질개선제 시험구 모두 대조구보다 낮은 수치를 나타냈지만 클리어워터 시험구가 가장 낮았다. 화학적 산소요구량(COD)은 대조구에서는 시간이 경과함에 따라 점차 증가하는 경향을 나타냈으나 저질개선제 시험구에서는 감소하는 경향을 나타냄으로서 저질 개선효과가 명확히 나타났다.

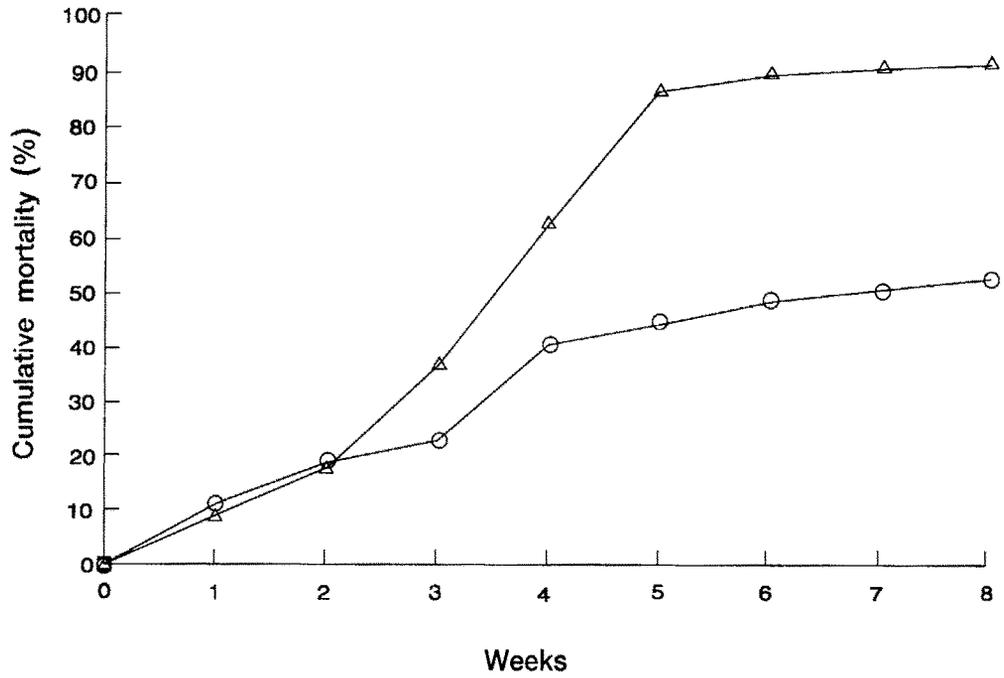


Fig. 27. Effect of disinfecting sediment contaminated with WSBV by sodium hypochlorite.

○ — ○ : NaClO(100ppm), △ — △ : Control.

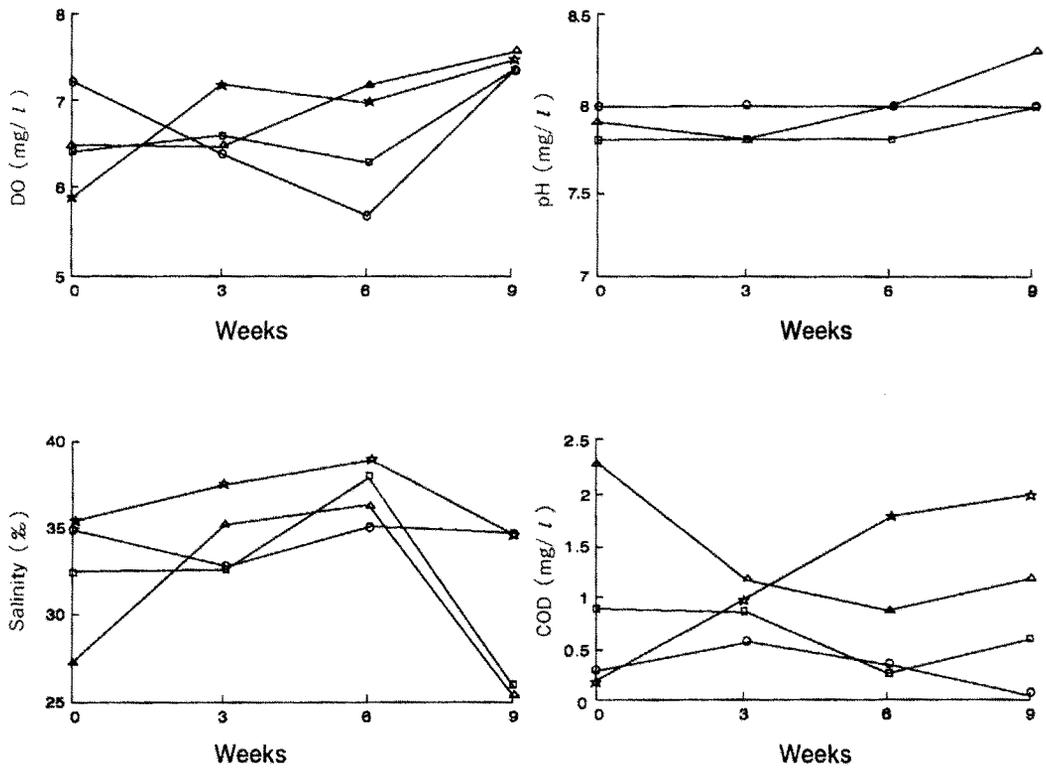


Fig. 28. Changes of water quality parameters(DO, pH, salinity, COD) in rearing tanks by improvement reagents.

○ — ○ : Clear water, △ — △ : Argon, □ — □ : SKK 200,
 ☆ — ☆ : Control.

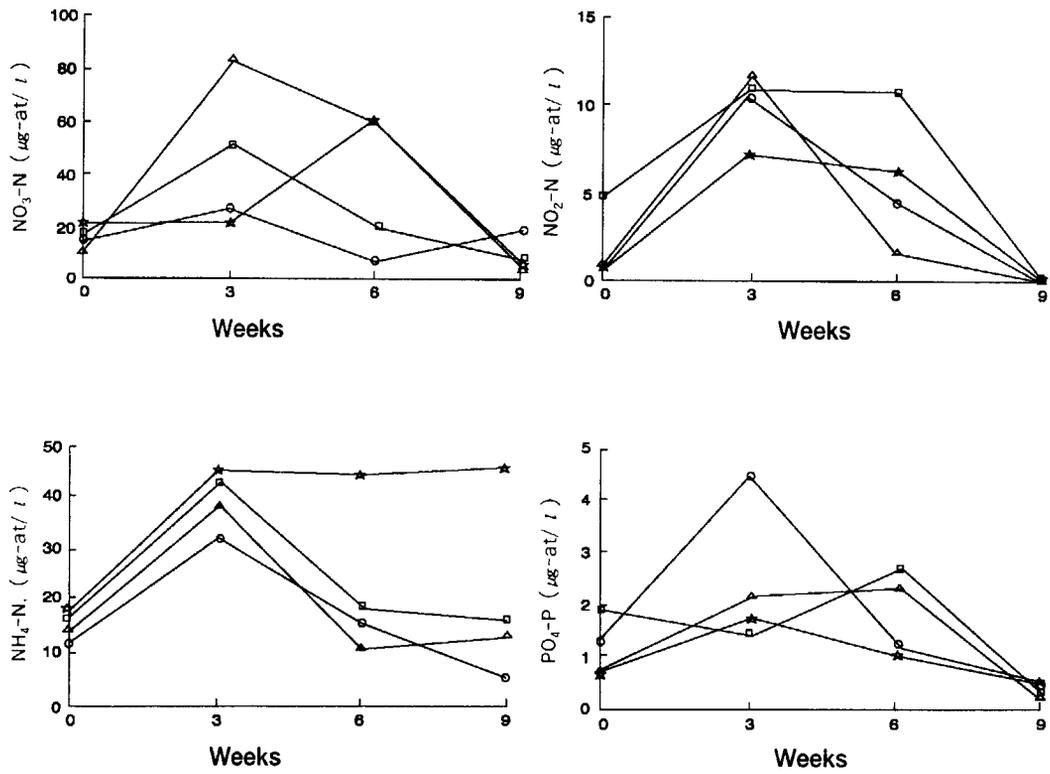


Fig. 29. Changes of water quality parameters($\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$, $\text{NH}_4\text{-N}$, $\text{PO}_4\text{-P}$) in rearing tanks by improvement reagents.

○ — ○ : Clear water, △ — △ : Argon, □ — □ : SKK 200,
 ☆ — ☆ : Control.

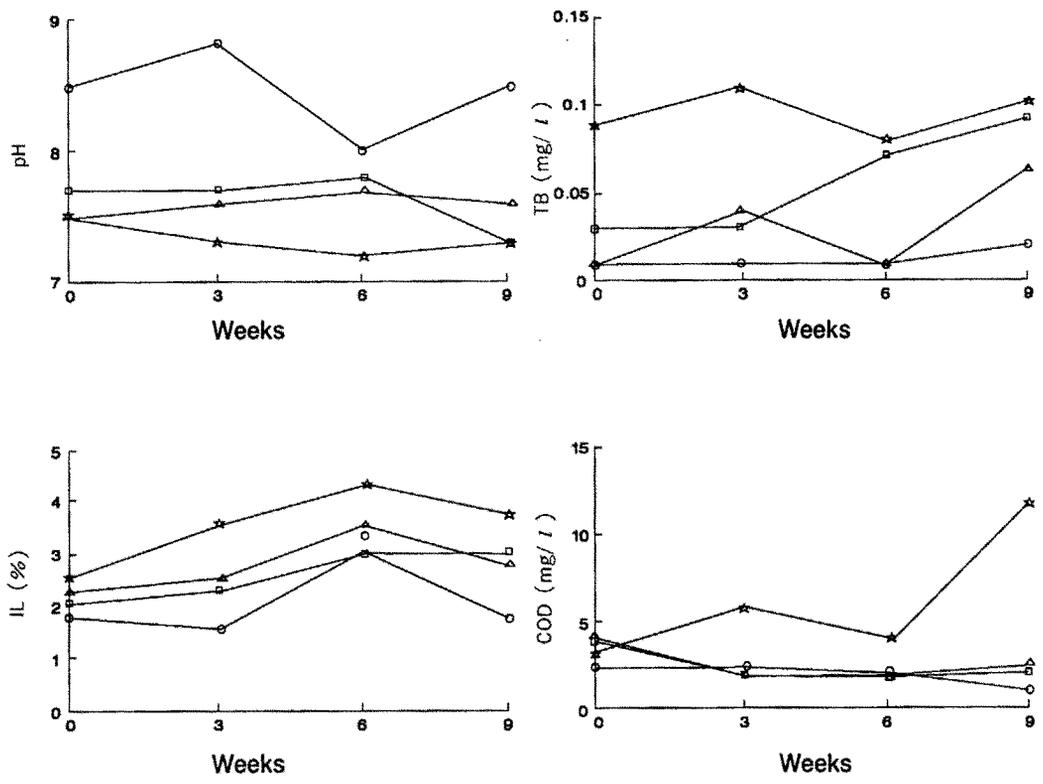


Fig. 30. Changes of sediment quality parameters(pH, TS, IL, COD) in rearing tanks by improvement reagents.

○ — ○ : Clear water, △ — △ : Argon, □ — □ : SKK 200,
 ☆ — ☆ : Control.

3) 방역효과

사육환경 개선을 통한 양식생물의 항병력을 증대시켜 바이러스 감염으로 인한 피해를 줄이기 위해 오염된 새우양식장의 저질을 수거해서 실험실 수조내에서 저질개선제를 살포한 후 바이러스를 인위감염시킨 대하의 누적폐사율을 조사한 과, 그림 31에서와 같이 저질개선제를 살포하지 않은 대조구에서는 실험기간(9주)동안 누적폐사율은 30%를 나타냈지만 생물 저질개선제(Argon) 및 효소 저질개선제(SKK 200)를 살포한 시험구에서는 누적폐사율이 각각 26%와 24%로 나타나 누적폐사율에 있어서는 대조구와 큰 차이는 없었다. 그렇지만 화학 저질개선제(Clear water)를 살포한 시험구에 있어서는 시험기간동안 누적폐사율이 4%에 불과하여 저질개선제에 의한 방역효과가 있었다. 그리고 본 실험에서는 저질개선제를 살포하지 않은 대조구에 있어서도 시험기간(9주)동안 바이러스 감염에 의한 누적폐사율이 전항에서 기술한 저질 염소소독시험의 대조구에 비해 급격히 감소한 것은 실험에 사용한 대하의 크기가 클 뿐만 아니라 면역증강제(schizophyllan)를 첨가한 새우배합사료를 급여하여 대하의 생체방어능력이 증가되었기 때문이라 생각되나 이에 대한 정확한 실험이 있어야 할 것이다.

다. 면역증강시험

새우 면역증강에 의한 바이러스 방역효과를 확인하기 위해 *Bifidobacterium thermophilum*에서 추출한 peptidoglycan(PG)를 0.1% 첨가하여 제조한 새우 면역사료를 주기적으로 투여한 후 바이러스 인위감염에 의한 새우의 누적폐사율을 조사한 결과, 그림 32에서와 같이 새우 일반사료만을 투여한 대조구에서는 시험기간동안 누적폐사율이 100%였으나, PG를 첨가한 새우 면역사료와 새우 일반사료를 1주일 간격으로 교대로 투여한 시험구에서는 전혀 폐사가 일어나지 않았다. 前

田(1997)는 면역증강제인 schizophyllan(SPG)나 peptidoglycan(PG)을 주기적으로 보리새우에 투여한 후 PRDV 바이러스를 인위감염시킨 결과, 면역증강제를 투여하지 않은 시험구에 비해 생존율이 매우 높았다고 하였고, 또한 松尾 등(1993)도 β -glucan 현탁액에 대해 치하를 3시간동안 침지시키면 대하 성장이 양호하고 phenoloxidase 활성이 상승하여 *Vibrio vulnificus*에 대한 감염 방어효과가 있다는 보고도 있다. 따라서 상기와 같은 결과를 미루워 볼 때 면역증강제 투여에 의해서 새우의 생체방어능력이 증가되므로서 바이러스 감염 방어효과가 있는 것으로 생각된다.

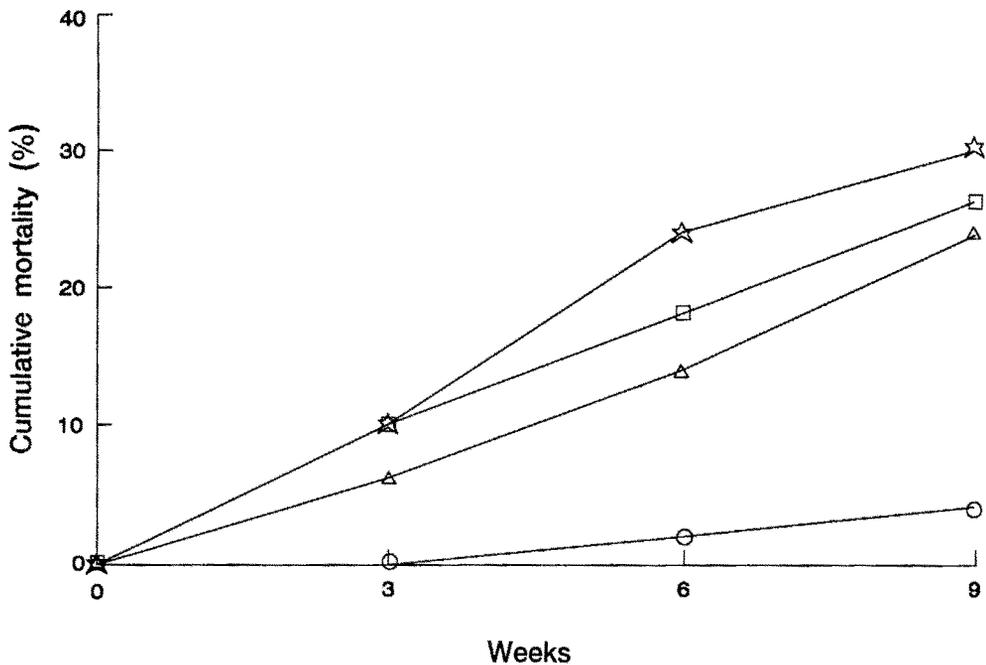


Fig. 31. Mortality of fresh shrimp infected with WSBV by improvement reagents

○—○ : Clear water, △—△ : Argon, □—□ : SKK 200,
 ☆—☆ : Control

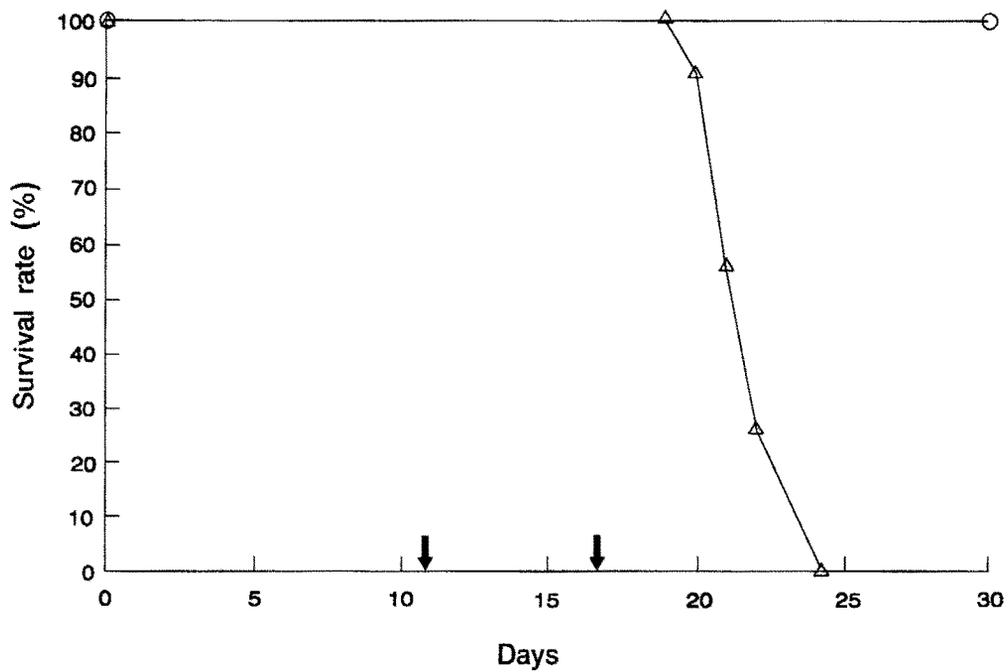


Fig. 32. Mortality of fresh shrimp infected with WSBV by peptidoglycan

○ — ○ : PG diet+Control diet, △ — △ : Control diet.

↓ : Virus infection.

3. 새우 양식장 방역시험

가. 1차 현장시험(1996년)

1) 대하의 성장

1차년도에 각 시험호지의 새우 성장도 조사결과는 표 19에서와 같다. 1996년 6월 5일에 평균중량 0.02g인 치하를 각 시험호지에 방양하여 성장도를 측정한 결과, 방양후 30일후(7. 5일)에는 새우의 평균중량이 A호지에서는 0.67g, B호지에서는 0.59g, C호지에서는 0.98g, D호지에서는 1.17g으로 새우 성장도는 D, C, A, B호지 순이었으나 7월 중순경에 대조시험구(D시험지)에서 바이러스 증상이 처음 확인된 후 7월하순에는 전 시험지로 바이러스 감염증상이 확산되어 전량 폐사하므로 대하 성장도를 지속적으로 비교할 수 없었다.

Table 19. Growth of fresh shrimp in the field experiment in 1996

Ponds	Mean body weight(g)		
	SD* 6.5	6.20	7.5
A	0.02	0.21	0.67
B	0.02	0.15	0.59
C	0.02	0.28	0.98
D	0.02	0.27	1.17

*Sampling date.

2) 새우질병 조사

각 시험호지를 대상으로 기생성, 세균성 및 바이러스질병 조사를 실시한 결과, 조사기간동안 병원성 기생성 및 세균성 질병은 발생하지 않았으나 바이러스 질병이 7월 중순에 대조구인 D호지에서부터 발병하여 7월 하순에는 전 시험호지(A, B, C)에서도 발병하였다.

3) 수 질

시험양식장의 각 호지별 수질환경의 조사결과, 수온은 1996년 5월 7일 최초 조사시 14.3℃에서 점차 상승하여 5월하순부터 7월초순까지는 19.5~25.6℃ 범위이었으나 장마 이후 7월하순에는 30℃내외까지 급격히 상승하였다.

염분은 5월하순과 6월초순에 33.07~34.90‰ 범위로 비교적 높았으나 6월중순의 장마 영향으로 6월하순 이후 30.03~32.40‰의 범위로 비교적 낮았다. 수소이온농도(pH)는 전체적으로 5월중순 이후 8.13~8.50의 범위로 적정값을 유지하였으나 C호지의 경우는 6월초순에 8.85로서 해역별 수질기준 II등급(7.8~8.5)을 약간 초과하였다.

용존산소(DO)는 6월초순에 다소 낮았지만 전 조사기간동안 모든 시험호지에서 3.97~8.32mg/l의 범위로 새우의 성장에 적합한 값을 유지하였다.

화학적산소요구량(COD)은 5월하순까지는 해역별 수질기준 II등급(2mg/l 이하)을 유지하였으나 6월부터는 점차 높아졌다. 시험호지의 경우 6월초순에 1.74~2.11mg/l, 7월하순에는 2.14~2.79mg/l 범위였고, 대조구의 경우는 6월초순에 2.28mg/l, 7월하순에 5.20mg/l의 범위로서 시일이 경과함에 따라 점차 높은 값을 보였고, 대조구가 시험호지보다 높게 나타나는 경향을 보였다.

부유물질(SS)은 7월초순까지 시험호지와 대조구가 뚜렷한 차이가 없이 60mg/

ℓ 이하를 유지하다가 7월하순에는 급격히 증가하여 67.3~193.0mg/ℓ 이었다. 인산염(PO₄-P)은 5월하순과 6월초순에는 0.17~2.28μg-at./ℓ 의 범위로 C시험호지를 제외한 모든 시험호지가 해역별 수질기준 II 등급(0.48μg-at./ℓ)을 초과하였으나 6월중순에는 0.20~0.60μg-at./ℓ 의 범위로 다소 낮아졌다. 장마 후인 7월초순에는 0.93~1.23μg-at./ℓ 로 다소 높은 값을 보였고, 7월중순에는 다시 해역별 수질기준 II 등급보다 낮았다.

용존성무기질소(DIN)는 5월중에 2.28~5.41μg-at./ℓ 의 범위였으나 6월초순부터 7월초순까지는 1μg-at./ℓ 이하의 비교적 낮은 값을 나타낸 후 7월하순에는 3.42~6.56μg-at./ℓ 범위로 비교적 높은 값을 보였다. 그러나 조사기간중 모든 시험호지에서 해역별 수질기준 II 등급(7.14μg-at./ℓ 이하) 보다는 낮았다.

4) 저 질

시험호지별 저질환경의 조사결과, 황화물(H₂S)은 5월하순경에 A, B시험구에 서 극소량 검출되었으나 그 이후에는 검출되지 않았다.

화학적산소요구량(COD)은 시험구 및 대조구 모두 전 기간동안 2.11~5.36mg/g.d 범위로 새우양식장 적지 기준치(20mg/g.d)보다 낮았다.

강열감량(IL)은 시험호지나 시기에 따른 유의차 없이 2.79~3.60% 범위를 유지 하였다.

5) 플랑크톤

각 시험구의 플랑크톤의 종 조성은 6월 23일 조사시 비교적 다양하게 나타났으며 출현량도 많았으나, 7월 4일 조사시에는 출현종에 있어서는 큰 차이가 없었지만 출현량이 크게 줄어들었고 7월 23일조사시에는 출현종이 훨씬 단순하였고 출현량

도 급격히 감소하였다.

식물플랑크톤의 출현종의 조성은 전 조사기간중 각 시험구 및 대조구에서 *Skeletonema* sp.가 70~95%이상으로 우점종을 차지하였고 그 다음으로 *Dinophysis* sp.가 15~20%이었으며, *Nitzschia* sp., *Pleurosigma* sp., *Rhizosolenia* sp. 등의 순으로 나타났다.

인근 연안해수의 종 조성과 비교하여 종류는 다양하지 않았으나, 출현종 및 우점종은 유사하였으며 양식장내에서 플랑크톤의 종 다양성 및 출현량은 사육수의 관리방법에 따라 크게 달라질 수 있을 것으로 추정되었다.

6) 방역효과 분석

현장시험에서 시험구 및 대조구 모두 사육기간동안 수질 및 저질은 대체적으로 양호한 상태였고, 또한 플랑크톤 조성에도 큰 문제점은 없었지만 대하 방양후 2개월 이내에 바이러스 감염으로 전량 폐사하였다. 이렇게 새우가 전량 폐사한 원인으로서는 첫째 염소소독을 실시하지 않은 대조구에서 제일 먼저 발병한 바이러스 질병이 인근의 시험호지로 전염되었거나, 둘째 바이러스에 오염된 해수가 취수구를 통해 양식장으로 유입되었거나, 세째 양식장 소독이 충분하지 않았거나, 네째 바이러스에 미감염된 건강한 새우종묘로 양식을 하지 않았기 때문으로 추측되지만 정확한 발병요인은 알 수 없었다.

나. 2차 현장시험(1997년)

1) 대하의 성장

2차년도의 각 시험호지의 대하 성장도 조사결과는 표 20에서와 같다. A시험지의 경우 방양밀도가 높아서 다른 시험지보다 성장이 다소 느려 평균중량이 최초

0.02g에서 7월초에 0.29g이었고 10월에 15.12g이었으나, B시험지의 경우 7월초에 0.34g이었고 10월에 16.57g이었다. C시험지의 경우는 7월초에 0.80g이었고 10월에 19.78g으로 성장하여 다른 시험지보다 빠른 성장을 보였다. A-1시험지는 A시험지에서 약 20만미를 본 양성을 위해 수용(8월 5~20일)하였는데 8월초에 2.34g이었고 10월에 16.54g으로 당초의 A시험지와 아주 근소한 성장차이가 있는 것으로 나타났다. 그러나 유사한 밀도인 B와 C시험지의 경우 C시험지에 있어서 성장이 빨랐는데 이는 최초 방양밀도의 차이와 요오드 처리에 의한 생존율의 저하, 수질환경의 열세 등으로 생존율이 감소된 결과로 밀도효과에 의한 성장 증가가 아닌가 생각된다.

시험호지별 생존율(11월 26일 수확)은 A시험지가 31.25%, B시험지가 42.5%, C시험지가 9.18%, A-1시험지가 8월에 본 양성하여 수확시까지의 생존율이 82.35%였다. A시험지의 경우 A-1시험지의 본양성분 20만미에 대한 생존미수를 포함하여 산정한 생존율은 49.5%였다. 이 결과에 의하면 C시험지의 경우 생존율이 가장 낮았는데 이는 요오드처리에 의한 초기종묘의 생존율 저하, 수질환경의 열세등에 의한 것으로 추정되며, 생존율이 가장 높은 A-1시험지의 경우 본양성분에 대한 수확까지의 생존율임으로 당연한 결과이다. A시험지의 경우 생존율이 31.25%로서 B시험지의 42.5%에 비하여 생존율이 낮은 것은 초기의 방양밀도의 차이로 볼 수 있으나, A-1시험지의 본양성분 20만미에 대한 생존미수를 포함하여 산정한 A시험지의 생존율은 49.5%로 B시험지의 생존율과 유사하므로 초기의 방양밀도의 차이가 본 실험의 결과로는 생존율에는 큰 영향을 주지 않았으나 성장에 있어서는 유의적인 차이를 나타내었다. 일반적으로 종묘의 방양밀도는 생존율에 큰 영향을 미치는 요소로서 알려져 있어 본 실험의 결과와 일치하지 않으나, 이는 양질의 먹이를 적절하게 공급하거나 적절한 환경관리등의 양식관리 방법에 의해 생존율의 감소를

Table 20. Growth of fresh shrimp in the field experiment in 1997

Sampling date	Mean body weight (g)				
	A	B	C	A-1	Control
6.10	0.02	0.02	0.02		0.13
6.26	0.10	0.09	0.29	-	0.73
7.10	0.29	0.34	0.80	-	1.66
7.30	0.77	1.82	2.04	-	2.67
8.13	2.22	2.48	4.47	2.34	6.05
8.25	2.63	3.92	6.23	4.48	7.84
9.09	4.96	5.79	8.68	6.93	9.02
9.24	14.25	14.48	15.27	14.87	16.75
10.17	15.12	16.57	19.78	16.54	20.89

Table 21. Result of culturing fresh shrimp in 1997

Items \ Ponds	A	B	C	A-1
Pond area(m ²)	2,750	1,650	1,650	1,650
Clear water(g/m ²)	200	150	0	0
Drain system	Center	Center	Side	Center
1st stocking				
Date	6.10	6.10	6.10	
No. of shrimp	560,000	100,000	90,000	
Shrimp size(cm)	1.2~1.5	1.2~1.5	1.2~1.5	
2nd stocking				
Date				8.2~21
No. of shrimp				200,000
Shrimp size(cm)				5~6
Total diet consumed (kg)	4,300	2,490	750	5,198
Harvesting				
Date	11.26	11.26	11.26	11.26
Total body weight (kg)	1,800	850	190	2,800
No. of shrimp	112,500	42,500	8,261	164,706
Mean body weight (g)	16	20	23	17
Survival rate(%)	31.25 (49.50)	42.50	9.18	82.35

200,000 shrimps collected from A pond were restocked at A-1 pond.

방지할 수도 있다고 사료된다(표 21).

2) 새우질병조사

가) 기생성 질병

기생성 질병은 시험기간 중 A시험구에서만 섬모충류인 *Zoothamnium* sp. 1종이 아가미 새엽에서 검출되었다. 검출정도는 7월 1차조사시에는 시료 10마리중 1~2개체의 매우 적은량이 검출되었지만 7월 2차조사와 8월 1차조사 및 9월 2차조사시에는 시료량의 20%정도에서 시료 1마리당 섬모충이 7~10개체 이상 검출되었다.

A시험구의 경우 중간육성을 위해 9월 초순까지 타 시험구에 비해 월등히 높은 밀도로 새우를 수용하여 A-1 시험호지로 일부를 나눠 수용하기 전까지는 상대적으로 기생충 감염 가능성이 높았던 것으로 판단되며, 특히 9월 중·하순경에는 장기간에 걸쳐 사육수의 환수가 불가하여 수질이 악화됨에 따라 기생충이 감염되었던 것으로 추측된다.

대조어장은 9월 2차조사시 시료량의 20%정도에서 시료 1마리당 섬모충이 6~10개체 검출되었다. 그러나 감염된 개체들은 비감염 개체들과 비교할 때 활력이나 외관상 특이할 만한 차이점은 없었다.

나) 세균성 질병

시험기간동안 검출된 세균으로는 *Vibrio* 속, *Aeromonas* 속, *Cytophaga* 속 세균이 주종을 이루었고, *Vibrio* 속 세균은 7월 하순이후 지속적으로 검출되었다.

검출시기별로 보면 치하 방양초기인 6월중에는 검출되지 않았으나, 7월 1차 조사시에는 시험구 A, B 및 D에서 각각 *Aeromonas* sp., *Enterobacter* sp. 등이 검출되었다. 7월 2차 조사시에는 D호지에서 *Vibrio* sp.만이 검출되었고, 8월 1차 조사시에는 검출되지 않았으나 8월 2차 조사시에는 대조구에서 *Cytophaga* sp.가 검출되었다. 9월중에는 각 시험구 전체의 호지에서 *Vibrio* sp.와 *Cytophaga* sp. 및 *Pseudomonas* sp.가 검출되었으며, 10월중에는 각 호지에서 *Vibrio* sp., *Pseudomonas* sp., *Aeromonas* sp., 등이 검출되었다.

검출부위는 아가미 새엽에서 검출되는 경우가 가장 많았고, 그밖에 혈임파액, 간체장에서 소량 검출되었다.

전체적인 검출 정도는 양식초기라고 할 수 있는 6월과 7월에는 검출되는 세균의 종류가 많지 않았고, 8월 1차 조사시에 시험구 및 대조구에서 검출되지 않았던 것은 7월중에 일부 세균의 검출로 사료에 항생제를 혼합하여 지속적으로 공급하였기 때문인 것으로 추정되어지며, 9월과 10월중에는 환수곤란, 저질악화 등 사육환경의 악화로 검출되는 균의 종류가 좀 더 다양해지고 대부분의 시료가 2균주 이상이 복합감염되어 있었다.

양식새우에서 세균감염에 의한 직접적인 폐사나 피해사례는 아직 국내에서는 알려지지 않았는데 본 시험기간 동안에도 조사된 일부시료들의 아가미 및 간체장, 혈임파액 등에서 세균들이 검출은 되었지만 감염정도가 심하지 않았기 때문에 정상개체와 구별되는 뚜렷한 증상은 관찰되지 않았다.

다) 바이러스성 질병

일반새우종묘(바이러스 보균)를 방양한 A, A-1, B 시험호지에서는 6월부터, 새우건강종묘(바이러스 미보균)를 방양한 C호지는 8월부터 바이러스가 검출되었으나 전 시험지 모두 10월까지 대량폐사는 없었다.

3) 수 질

양식기간동안 시험호지 및 대조호지에 대한 수질조사 결과는 그림 33과 같다.

수온은 종묘방양전인 6월 2일에 21.9~22.6℃, 7월초에 29.2~30.9℃, 8월초에 29.7~30.7℃, 9월초에 26.3~26.9℃, 10월에 17.1~17.6℃로 양식지 면적에 따라 수온에 약간의 차이가 있었으나 전 사육기간동안 대하의 성장수온인 18~30℃를 크게 벗어나지 않아 성장에 적합한 수온 범위였다.

용존산소는 시험지가 용존산소는 6월초에 7.60~8.05mg/ℓ, 7월초에 6.08~7.35mg/ℓ, 8월초에 6.37~8.50mg/ℓ, 9월초에 6.20~8.90mg/ℓ, 10월에 10.20~11.14mg/ℓ 이었고, 대조구 어장에 있어서는 6.60~8.95mg/ℓ 였다. 전 시험지에 있어서 8월말경에 가장 낮은 용존산소 농도(4.55~6.37mg/ℓ)를, 10월에 가장 높은 용존산소 농도를 나타내었다. 새우양식장의 특징적인 온도와 염분의 범위(각각 26~32℃, 10~25ppt)에서 적정성장을 위한 용존산소의 최소농도가 3.5ppm이므로 전 기간을 통하여 새우의 호흡 및 섭이등 생활활동에는 충분한 농도로 산소가 용존되어 있었다고 할 수 있다. 또한 연안의 평균적인 해수는 10~30℃에서 9.1~6.4mg/ℓ (6.3~4.4ml/ℓ)이 포화량이므로, 전 사육기간동안 포화량 이상의 DO치를 보였는데, 이는 식물플랑크톤의 광합성 작용 및 수차에 의한 포기의 결과로 생각된다. 특히 수온이 17℃정도로 저하된 10월에 있어서는 용존산소의 포화도가 130% 이상이 되었다.

염분농도(salinity)는 시험기간동안 A시험지가 15.63~32.80‰의 범위였고, B 시험지는 16.64~24.88‰, C시험지는 14.20~24.43‰로서 B와 C의 시험지는 25.0‰ 이하의 낮은 염분도를 유지하기 위해 지하수를 사용하여 주수하였다. A-1시험지는 27.56~32.64‰, 대조구 어장은 25.88~32.34‰였다. 전 사육기간동안 대하의 서식염분 범위(20~34‰, 위험염분 하한 2‰이하)를 벗어나지 않았다.

수소이온농도(pH)는 시험지가 사육기간동안 6.97~8.43이었으며, 대조어장은 7.82~8.58으로 시험지보다 다소 높은 측정치를 나타내었다. 전 양식지에 있어 양식후기인 8월이후 pH치가 감소되었다. pH에 대한 새우의 치사범위는 6 이하나 9 이상으로 치사범위를 벗어나지는 않았으나 대하양식의 최적 pH범위인 8.4~8.6으로는 유지되지 않았다.

화학적 산소요구량(COD)은 전 양식기간동안 시험지가 0.15~6.30mg/ℓ, 대조어장이 1.68~6.68mg/ℓ로 전반적으로 양식기간이 길수록 COD치가 증가하였다. 대하양식에 있어서 COD는 5mg/ℓ 이하여야 하는데, 9월말 이후부터는 이 수치를 일부 초과하고 있었다.

SS(suspended solid)는 전 시험지가 종묘방양전인 6월초의 조사시에 23.57~29.67mg/ℓ로 최저치를 나타내었으며, 7월말부터 현저히 SS량이 증가되었다가 9월말 이후 감소하였다. 대조어장의 경우도 동일한 양상을 나타내었다. 이는 새우의 성장과 수온상승에 반하여 부족되는 용존산소의 보충을 위하여 사용하는 수차의 사용대수와 관련이 있다고 생각된다. 시험호지별로는 B 시험지가 전반적으로 다른 시험호지보다 높았는데 8월말의 경우 315.30mg/ℓ의 아주 높은 SS를 나타내었다. B 시험호지의 경우 다른 시험호지보다 수심이 낮거나 수차의 방향등이 저층의 펄을 많이 일으켜 SS량이 증가된 것으로 추정된다. 탁도는 빛의 투과를 제한하여 양식장의 바닥층까지의 광합성활동을 제한하므로 플랑크톤량의 감소를 초래한다. 또

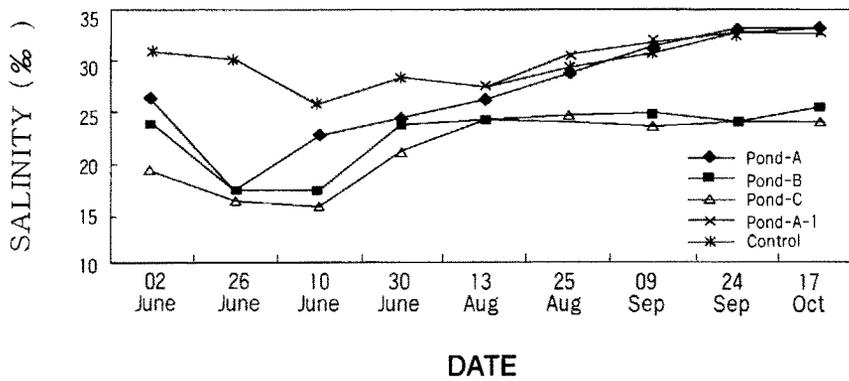
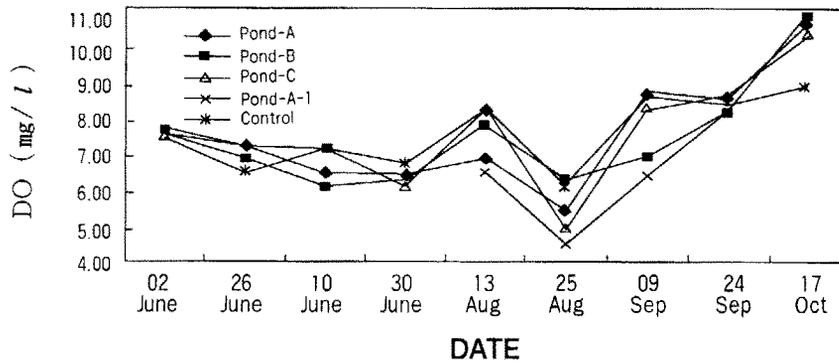
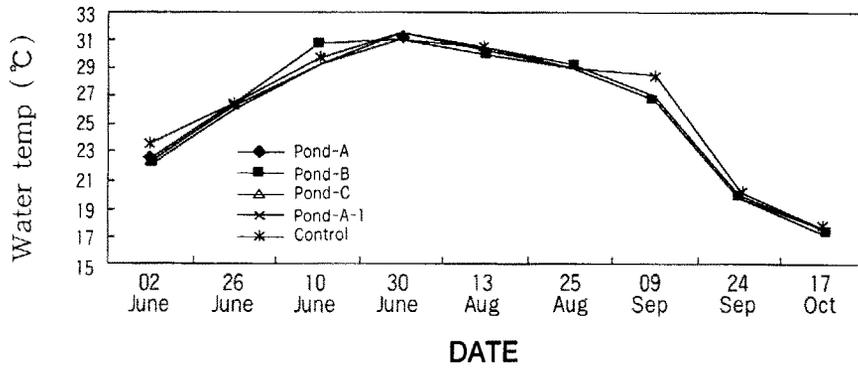


Fig. 33. Changes of water quality parameters in shrimp ponds.

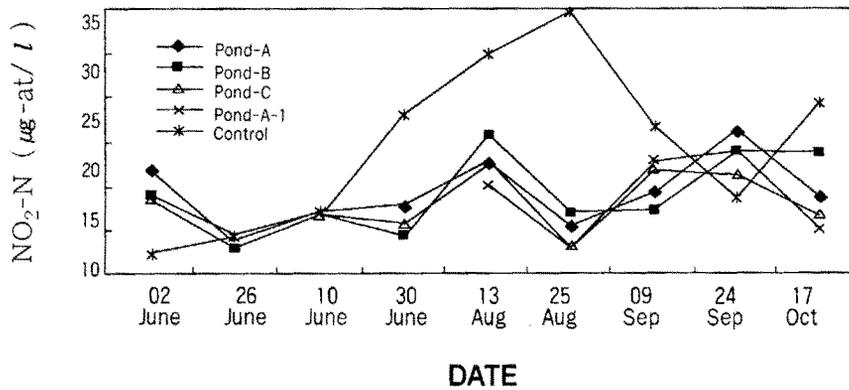
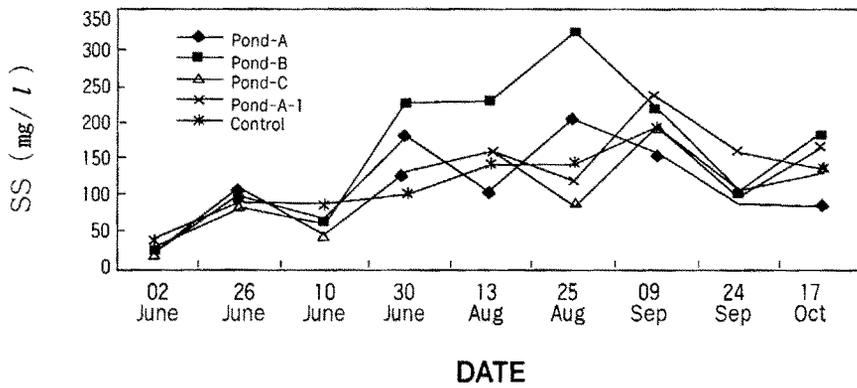
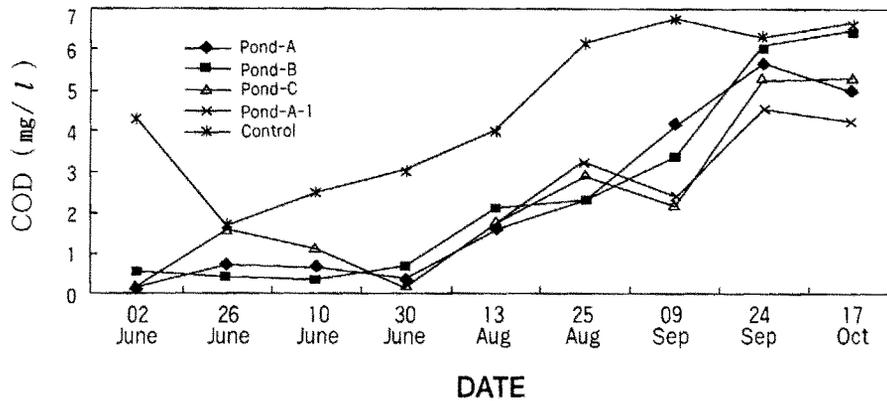


Fig. 33. Continued.

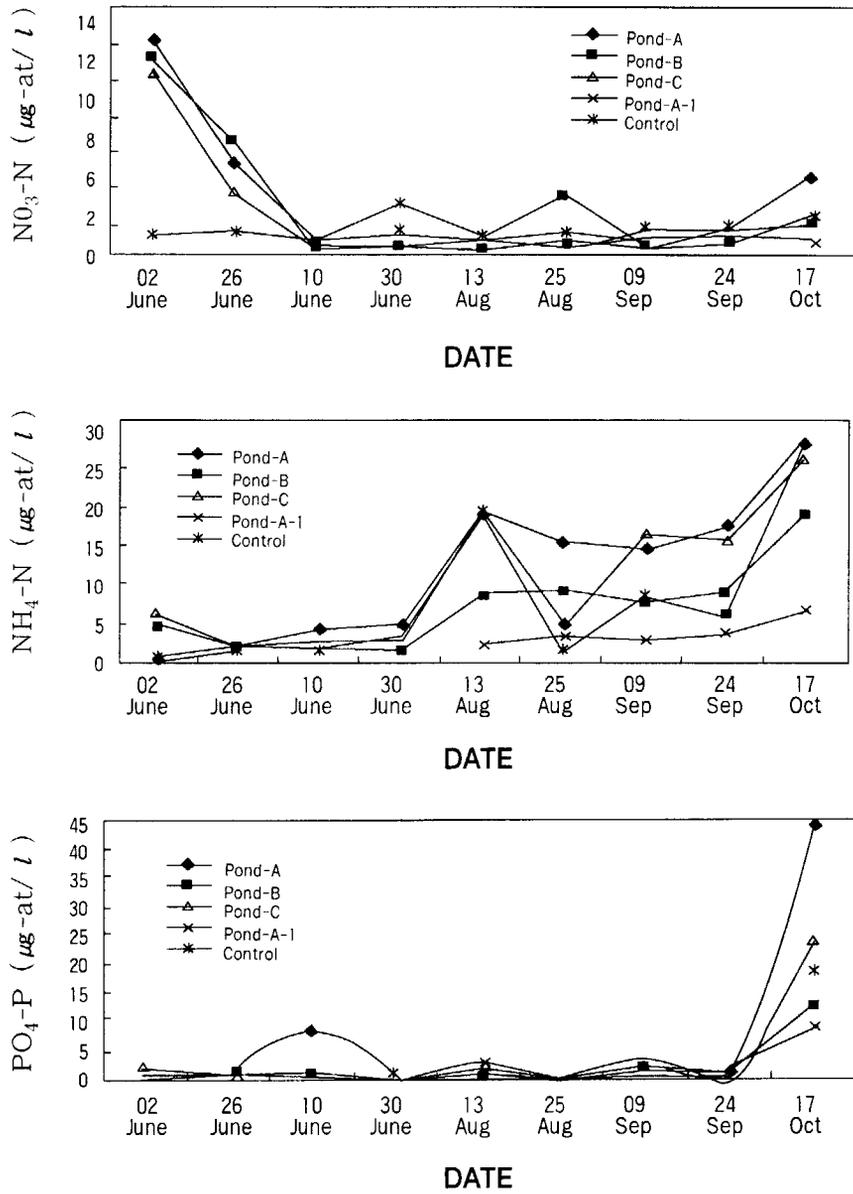


Fig. 33. Continued.

한 해수중의 탁도가 증가하면 어류에 있어서는 아가미에 현탁물이 쌓여 호흡에 영향을 미치게 되어 산소 소비속도가 저하하므로 본 어장의 대하도 아주 높은 수치의 SS에 의해 호흡대사와 또한 그 결과로서 전체적인 성장에 있어서도 영향을 받지 않았는가 추정된다.

$\text{NO}_2\text{-N}$ (아질산염)은 사육기간동안 시험지가 $0.12\sim 0.63\mu\text{g-at}/\ell$ 였으며, 대조어장은 $0.11\sim 1.18\mu\text{g-at}/\ell$ 였다. 새우양식에 적절한 아질산염은 $0.1\text{mg}/\ell$ ($7.14\mu\text{g-at}/\ell$) 이하로서 사육기간동안 아질산염은 아주 낮은 수치를 나타내어 성장에 적합하였다.

$\text{NO}_3\text{-N}$ (질산염)은 시험지가 6월초의 종묘방양전에 $10.42\sim 12.20\mu\text{g-at}/\ell$ 이었으나 이후 10월까지 $0.11\sim 6.69\mu\text{g-at}/\ell$ 였으며, 대조어장은 6월초에 $1.23\mu\text{g-at}/\ell$, 7월이후 $0.43\sim 3.51\mu\text{g-at}/\ell$ 이었다. 이는 6월초의 경우 물만들기가 완전히 이루어져 있지 않은 상태에서 질산염의 농도가 높았으나, 이후 질산염의 감소는 수온상승에 따른 식물플랑크톤의 번식에 의한 질산염의 소비 때문인 것으로 생각된다. 새우양식에 적절한 질산염은 $200\text{mg}/\ell$ 이하로서 사육기간동안 질산염은 대하의 성장에 적합한 수치이나, 식물플랑크톤의 번식에 의한 물만들기에는 낮은 농도인 것으로 사료된다.

$\text{NH}_4\text{-N}$ (암모니아성 질소)는 A시험지에서 조사기간동안 $1.03\sim 27.73\mu\text{g-at}/\ell$ 였고 B시험지는 $1.22\sim 18.37\mu\text{g-at}/\ell$ 이었으며, C시험지는 $1.25\sim 25.33\mu\text{g-at}/\ell$ 이었다. A-1시험지는 $1.93\sim 5.92\mu\text{g-at}/\ell$, 대조어장은 $0.48\sim 27.46\mu\text{g-at}/\ell$ 이었다. 8월초부터 뚜렷이 증가된 수치를 계속적으로 유지하였으며, 전체적으로 10월에 가장 높은 농도를 나타내었다. 가장 높은 밀도로 종묘를 방양한 A시험지가 전 시험지중에서 암모니아의 농도가 가장 높았으며, 동일면적에 유사한 밀도로 종묘를 방양한 B, C시험지에 있어서는 B시험지 보다 C 시험지에서 농도가 높았다.

암모니아성 질소는 주로 배설물, 먹이찌꺼기 등 동물질에서 유래하는 질소함유물로 2~17mg/ℓ (143~1,214 μ g-at/ℓ)에서 영향이 있다는 보고가 있는데 전 양식기간 동안 이러한 기준치보다 낮은 농도였다.

PO₄-P(인산염)은 조사기간동안 인산염은 A시험지에서 0.36~43.75 μ g-at/ℓ, B시험지에서 0.19~12.41 μ g-at/ℓ, C시험지에서 0.28~21.80 μ g-at/ℓ, A-1시험지에서 0.50~7.88 μ g-at/ℓ 였으며, 대조어장은 0.16~19.22 μ g-at/ℓ 이었다. A시험지의 경우 다른 시험지보다 다소 높은 인산염의 농도를 나타내었으며, 전 시험어장에 있어 10월에 가장 높은 인산염의 농도를 나타내었는데 이는 높은 수용밀도와 성장에 따른 급이량의 증대에 의한 것으로 사료된다.

4) 저 질

양식기간동안 시험호지 및 대조호지에 대한 저질조사 결과는 그림 34와 같다.

저질의 황화물(H₂S)은 6월 2일의 종묘방양전에는 전 시험지에서 검출되지 않았고 이후의 조사기간동안 A시험지는 0~79.87mg/g건니, B시험지는 0~19.83mg/g건니였으나 6월말, 7월말, 8월말에만 검출되었고, 6월초, 7월초, 8월초, 9월초와 말, 10월에는 전혀 검출되지 않았으며, C시험지는 0~51.5mg/g건니로 6월초와 7월초에만 검출되지 않았고, 이외의 조사기간에는 검출되었다. A-1시험지는 8월초에 0.77mg/g 건니, 8월말에 0.90mg/g건니, 9월초에 94.03 mg/g건니, 9월말에 38.30mg/g건니였으나 10월초의 조사에서는 검출되지 않았다. 대조 어장은 6월초, 7월말, 10월초에 검출되지 않았으며, 이후의 조사기간동안 3.4~165.00mg/g건니였다.

동일 규모에 유사한 밀도로 방양한 B와 C시험지의 경우 저질개선제를 투여한 B시험지에서 저질의 황화물이 양식기간중 C시험지보다 다소 검출량이 적어서 저질 개선제가 황화물의 생성억제에 기여한 것으로 추론할 수 있겠다. 보리새우의 경

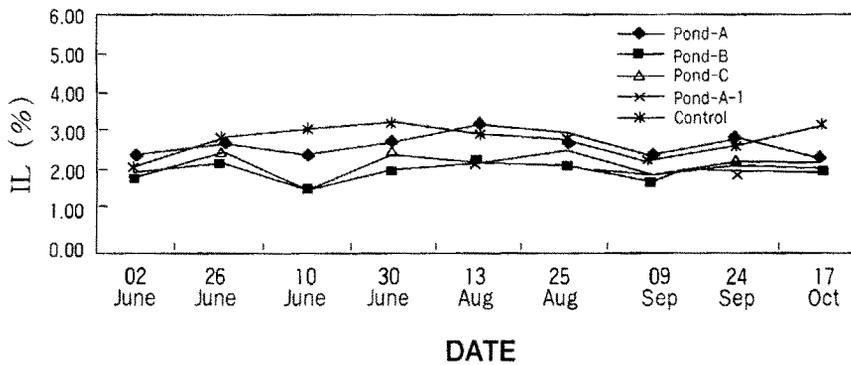
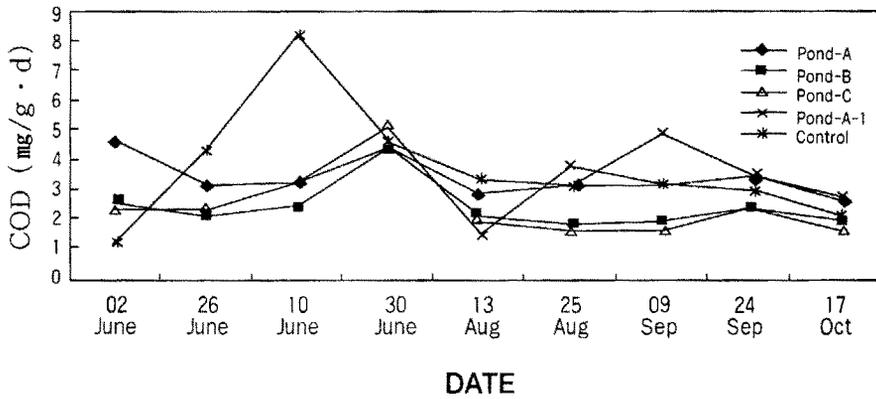
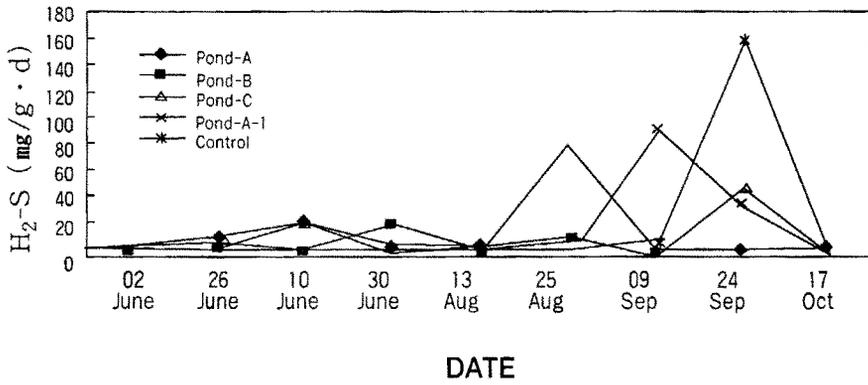


Fig. 34. Changes of sediment quality parameters in shrimp ponds

우 수질중에서 0.1~2.0ppm의 황화수소에 노출시 평형실조가 일어나며, 4.0ppm에 서는 곧 바로 죽는다고 하였다. 황화물의 경우 이온화된 형태(HS-와 S=)는 독성이 강하지 않고, 이온화되지 않은 황화수소는 독성이 매우 강하나 산소가 잘 용해 되어 있는 물속에서는 보통 발생하지 않으므로 대하에 대한 황화수소의 영향은 일부 조사시기나 조사지점에 있어서만 영향이 있었던 것으로 판단되며, 또한 대하가 저질에 잠사하는 습성이 약하고, 자유유영하는 수산생물이므로 직접적인 피해보다는 단지 서식구역의 제한등에 영향을 끼치지 않았나 사료된다.

저질의 COD는 조사기간동안 시험지는 1.65~5.23mg/g건니이었으며, 대조구는 1.18~8.24mg/g건니로 시험어장보다 높은 수치를 보였다. 그러나 사육기간동안 전 양식지에서 저질의 COD는 양식장 저질의 일반적 기준인 저질 COD 20mg/g 이하 보다 훨씬 낮은 농도였다.

강열감량(IL)은 조사기간동안 전체 시험지에서 1.56~3.19%였으며, 대조구 어 장의 경우 2.08~3.31%로 시험지 보다 다소 유기물이 많았다. 또한 각 시험지 및 대조어장에 있어서 조사기간동안 거의 균일한 수치를 보였다. 저질중 유기물은 저 질입도 0.1mm 이하의 니질함량이 20%일 때 조차도 유기물 함량이 2.5%인 것이 일 반적인 저질과 유기물의 관계인바, 본 조사에서의 강열감량은 이러한 기준을 감안 하면 그다지 높은 수치를 나타내지는 않았다.

5) 플랑크톤

조사기간동안 식물성 및 동물성플랑크톤은 총 55종이 출현하였으며, 이중 식물 성플랑크톤은 42종이 출현하였다.

식물성플랑크톤의 출현종수는 조사기간동안 12~25종으로 7월 30일과 9월 9일 의 조사결과 12종으로 가장 낮은 종조성을 보였고, 9월 24일에 25종으로 가장 많은

종수가 출현하였다. 월별 우점종으로는 6월 2일에는 *Skeletonema costatum*, *Nitzschia* sp.가 우점종으로 출현하였으며, 6월 25일에는 *Coscinodiscus* sp., 7월 10일에는 *Pleurosigma* sp., *Cylindrotheca closterium*, *Protoperdinium brochiiforma*, 7월 30일에는 *Coscinodiscus* spp., *Pleurosigma* sp., 8월 13일에는 *Coscinodiscus* sp., *Pleurosigma* sp., 8월 25일에는 *Chaetoceros* sp., *Nitzschia seriata*, *Cylindrotheca closterium*, 9월 9일에는 *Coscinodiscus* sp., 9월 24일에는 *Asterionella glacialis*, *Rhizosolenia* sp., *Chaetoceros* sp., *Nitzschia seriata*, 10월에는 *Asterionella glacialis* 이었다. 또한 조사기간중에 계속적으로 출현한 종은 *Actinoptychus senarius*, *Actinoptychus splendens*, *Coscinodiscus* spp., *Pleurosigma* spp., *Triceratium favus* 등이었다.

조사기간동안의 출현량은 89~120,184 inds./ℓ 였으며, 6월 25일 C 시험지에서 89 inds./ℓ 로 가장 적었으며, 10월 17일 B 시험지에서 120,184 inds./ℓ 로 가장 많은 출현량을 보였는데 이중 *Asterionella glacialis*가 118,700 inds./ℓ 로 많은 출현량을 보였다.

동물성플랑크톤은 조사기간동안 총 13종이 출현하였는데 출현종수는 4~9종의 종조성을 나타내었다. 출현량은 17~15,946 inds./ℓ 범위로 6월 2일 C 시험지에서 가장 낮았고, 7월 10일에 가장 많았는데 이중 *Tintinopsis* spp.가 14,251 inds./ℓ 로 많은 출현량을 보였다. 우점종은 6월 2일 요각류의 일종, 6월 25일 banacle larvae, 요각류의 일종, 7월 10일과 7월 30일에 *Tintinopsis* sp.와 요각류의 일종이 출현하였다. 8월 13일에는 *Leptotintinopsis* sp., 요각류의 일종, 8월 25일과 9월 9일에는 *Tintinopsis* spp., 요각류의 일종이었고, 9월 24일 *Synchaeta* sp., 요각류의 일종, 10월 17일 *Synchaeta* sp.였다. 조사기간동안에 계속적으로 출현한 종은 *Tintinopsis* spp. *Foraminifera*의 일종이었다.

6) 방역 효과분석

2차년도 현장시험에서는 전 시험호지 모두 바이러스 감염증상은 나타났으나 시험기간동안 대량폐사는 없었다. 이와 같이 대하에 바이러스 감염증상이 나타났음에도 불구하고 대량폐사가 일어나지 않았던 요인으로서는 첫째 양식초기에 담수처리에 의해서 사육해수의 염분농도가 저하됨으로서 바이러스의 병원성이 약하게 되었거나, 둘째 저질개선제를 투여함으로 인해 양식장 저질 및 수질환경이 개선되어 양식새우의 활력이 증대되었거나, 셋째 면역증강제 사료를 주기적으로 투여함으로 인해 새우의 생체 방어능력이 향상되어 바이러스 감염에 의한 대량폐사가 일어나지 않았는지 모른다.

4. 새우 건강종묘 생산시험

가. 부화율

유효 요오드농도 20, 50, 100, 200ppm에서 각각 30, 60초 소독을 실시한 결과 각 농도의 30초 처리구에서는 50%이상의 상대부화율(relative hatching rate)을 보인 반면, 60초 처리구에서는 20ppm 처리구에서만 약 50%의 상대부화율을 보일 뿐, 50ppm 이상의 농도에서는 부화율 1% 미만으로 거의 부화되지 않았다(표 22).

보리새우를 이용한 비교실험에서는 요오드 농도 20, 50, 100ppm의 농도에서 10, 30, 60초간 소독처리한 결과 20ppm 처리구를 제외한 50, 100ppm 처리구에서는 30, 60초 처리구 모두 전혀 부화하지 않았고, 20ppm에서 10초간 실시한 처리구에서만 부화율에 미치는 요오드 용액의 영향이 적었고, 50ppm 처리구는 약 50%, 100ppm 처리구에서는 약 80%의 현저한 부화율 억제효과가 나타났다(표 23).

이러한 결과로 미루어 보아 대하나 보리새우의 경우 공히 소독약제의 부화율에 미치는 영향은 소독약제의 농도가 높을수록 처리시간이 길수록 현저히 낮아지나,

Table 22. Hatching rate of fertilized eggs of fresh shrimp by iodine disinfection

Conc. (ppm)	Hatching rate (%)		
	Disinfecting time	30 sec	60 sec
200		25.9	0.9
100		29.7	0.0
50		14.3	0.1
20		31.5	18.5

Hatching rate in control(only washing) is 33%.

Table 23. Hatching rate of fertilized eggs of kuruma shrimp by iodine disinfection

Conc. (ppm)	Hatching rate (%)			
	Disinfecting time	10 sec	30 sec	60 sec
100		19.0	0	0
50		38.9	0	0
20		55.1	40.0	29.2

Hatching rate in control(only washing) is 55.2%.

특히 소독약제의 농도보다 시간이 길어질 경우 부화율이 현저히 저하되는 것으로 나타났다.

그러나 대하의 경우 세란만 실시한 대조구의 부화율이 33.3%, 보리새우는 대조구의 부화율이 55.2%로 단순비교는 어렵지만 대하의 경우는 수정란의 수거 및 세란과정에서 오는 조작 및 충격에 의한 난의 손상이 많은 반면, 보리새우는 수거 및 소독과정의 물리적인 영향보다는 소독약제에 대한 화학적인 약제 감수성이 대하에 비교하여 비교적 높은 것으로 생각된다. 따라서 새우류의 수정란 소독에 의한 부화율 감소를 방지하기 위해서는 대하의 경우 난 수거 및 세란, 소독과정에서 난이 받는 물리적인 충격을 줄일 수 있는 새로운 방법이 강구되어야 하며, 보리새우의 경우 소독약제의 종류에 관한 더 많은 연구가 필요한 것으로 생각된다.

나. 생존율

1) 소형수조 시험

세란을 실시하지 않은 대조구, 세란만 실시한 처리구, 요오드 농도 50, 100, 200 ppm에서 30초간 소독을 실시한 처리구중, 대조구와 세란만 실시한 처리구에서만 부화가 되었고, 나머지 소독 처리구는 처리 농도에 관계없이 모두 부화하지 않았다. 대하나 보리새우의 경우, 후기산 어미새우에서 채란한 수정란의 부화율 및 초기생육이 부진한 것으로 알려져 있으며, 소형수조시험의 경우 6월 중하·순경의 후기산 어미를 사용하여 채란함으로써, 비교적 난질이 우수한 초기산의 수정란에 비교하여 소독에 의한 부화율 저하가 현저했던 것으로 생각된다. 부화된 대조구와 세란만 실시한 시험구에서도 nauplius유생에서 zoea유생으로 변태하는 과정에서 다량의 감모가 발생하였으며, 이후 mysis유생으로 변태하지 못하고 전량 폐사하였다. 따라서 특별히 소독을 실시하여 유생사육을 할 경우 수정란질이 우수한 시기를 선택하여 채란하는 것도 매우 주요한 요인이 될 것으로 생각된다.

2) 대형수조 시험

요오드 처리에 따른 대하 수정란의 부화율 변화 조사결과를 토대로 유효 요오드 농도 200ppm에서 30초간 수정란을 소독처리하였다. 총 8,000천개의 수정란을 채란하였고, 1,000천마리의 nauplius유생이 부화하여 부화율 12.5%였다.

postlarva 1기 유생까지 800천마리가 생존하여 매우 높은 생존율을 보였으나, 이후 계속 감모가 발생하여 수확기인 postlarva 14기에는 100천마리가 생존하여 생존율 10%였다(그림 35). 이러한 결과로 미루어 보아 수정란의 소독으로 부화율은 낮아지지만 수정란 소독후 부화한 유생도 초기생육에는 문제점이 없는 것으로 나타났다.

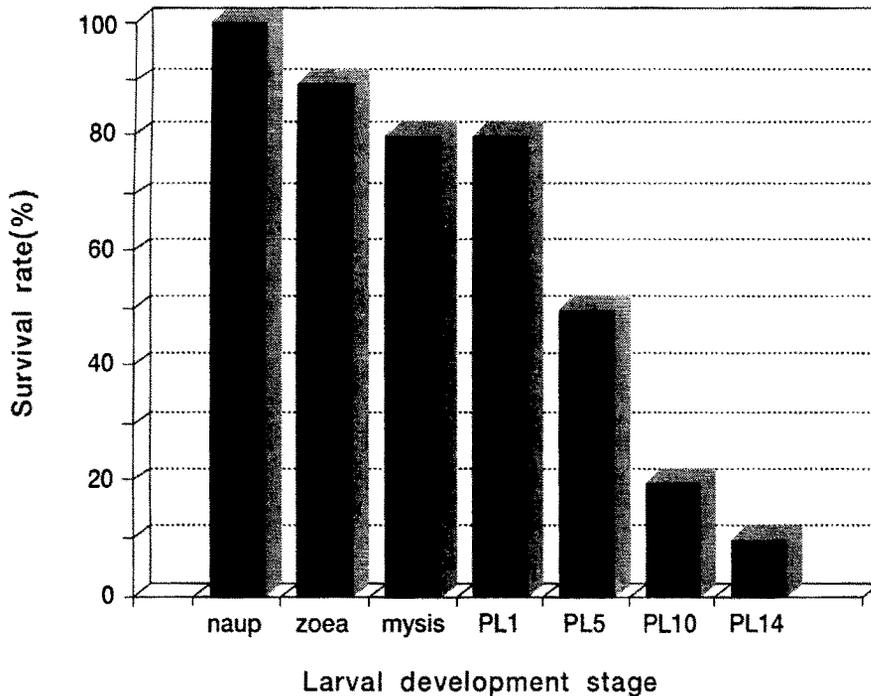


Fig. 35. Survival rate of shrimp larvae by stage.

3. 소독효과조사

소독효과조사를 확인하기 위해 산란용 대하어미 50미에 대한 바이러스 보균조사를 PCR법으로 검사한 결과 바이러스 보균율이 35%였으며, 이들 새우어미로부터 채란한 수정난을 자외선 살균해수로 세척한 후 요오드 용액 200ppm으로 30초간 소독한 시험구의 대하치하(PL 14기)에서는 바이러스가 검출되지 않았으나, 수정난을 세척과 소독하지 않은 대조구의 대하치하(PL 14기)에서는 바이러스가 검출되었다.

따라서 바이러스에 감염된 대하어미로부터 바이러스에 미감염된 건강새우종묘를 생산하기 위해서는 반드시 수정난을 세척하고 요오드로 소독해야 하지만 요오드 용액으로 소독한 시험구에서는 부화율이 급격히 감소되기 때문에 부화율이 높으면서 소독효과가 명확한 효과적인 소독방법에 관한 연구가 추후 수행되어야 할 것이다.

제 6 장 참 고 문 헌

- Arakawa, C. K., R. E. Deering, K. H. Higman, K. H. Oshima, P. J. O'Hara and J. R. Winton. 1990. Polymerase chain reaction(PCR) amplification of a nucleoprotein gene sequence of infectious hematopoietic necrosis virus. *Disease of Aquatic Organisms*, 8, 165-170.
- Birnboim, H. C. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Research*, 7, 1513.
- Chen, S-N., S-C. Chi, G-H. Kou and I-C. Liao. 1986. Cell culture from tissues of grass prawn, *Penaeus monodon*, *Fish Pathology*, 21(3), 161-166.
- Chiu, Y. N. 1988. Water quality management for intensive prawn ponds. Technical considerations for the management and operation of intensive prawn farms. pp. 172.
- Chou, H. Y., C. Y. Huang, C. H. Wang, H. C. Chiang and C. F. Lo. 1995. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Disease of Aquatic Organisms*, 23, 165-173.

- Cohen, S. N., A. C. Y. Chang and L. Hsu. 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria : Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. Proceedings of the National Academy of Science in USA, 69, 2110.
- Feinberg, A. F. and B. Vogelstein. 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Analytical chemistry, 132, 6-13.
- Fulks, W. and K. L. Main. 1992. Introduction. In : Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States. The Oceanic Institute, p. 5, 17, 43, 51.
- Hu, K., L. Wang, Y. Duan and S. Zhang. 1990. Studies on cell culture from the hepatopancreas of the oriental shrimp, *Penaeus orientalis* Kishinouye. Asian Fisheries Science, 3, 299-307.
- Huang, J. X., J. Yu. Song and C. Yang. 1994. Baculoviral hypodermal and hematopoietic necrosis - pathology of the shrimp explosive epidemic disease. Yellow Sea Fishery Research Institute, Qingdao, P. R. China, 16, 1-10.
- Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White. 1990. In: PCR

protocols: a guide to methods and applications, Academic Press, New York.

Inouye, K., S. Miwa, N. Oseko, H. Nakano and T. Kimura. 1994. Mass mortalities of cultured kuruma shrimp in Japan in 1993 : electron microscopic evidence of the causative virus. *Fish Pathology*, 29, 149-158 (in Japanese).

Inouye, K., K. Yamano, N. Ikeda, T. Kimura, H. Nakano, K. Momoyama, J. Kobayashi and S. Miyajima. 1996. The penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV), which causes *Penaeus* Acute Viremia(PAV). *Fish Pathology*, 31(1), 39-45.

Itami, T., Y. Takahashi, E. Tsuchihira and H. Egusa. 1994. Enhancement of disease resistance of kuruma prawn *Penaeus japonicus* and increase in phagocytic activity of prawn hemocytes after oral administration of β -1,3-glucan(Schizophyllan). The proceedings of Third Asian Fisheries Forum(ed. by L. M. Chou, A. D. Munro T. J. Lam *et al.*). Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, 375-378.

Kafatos, F. C., C. W. Jone and A. Efstratiadis. 1979. Determination of nucleic acid sequence homology and relative concentrations by dot blot hybridization procedure. *Nucleic Acid Research*, 7, 1541-1542.

- Kimura, T, H. Nakano, K. Momoyama, K. Yamano and K. Inouye. 1995. Purification of the rod-shaped nuclear virus(RV-PJ) from kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*. *Fish Pathology*, 30(4), 287-288.
- Krieg N. R. and J. G. Holt. 1984. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams and wilkins, Baltimore, 964 pp.
- Lightner, D. V. 1996. *A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Disease of Cultured Penaeid Shrimp*. World Aquaculture Society, 359 pp.
- Liu, R. Y. 1983. Shrimp mariculture studies in China. In: G. L. Rogers, R. Day and A. Lim(Editor), *Proceedings of the First International Conference on Warm Water Aquaculture - Crustacea*. Brigham Young University, Hawaii Campus, Laie, HI, pp. 82-87.
- Lo, C-F., J-H. Leu, C-H. Ho, C-H. Chen, S-E. Peng, Y-T. Chen, C-M. Chou, P-Y. Yeh, C-J. Huang, H-Y. Chou, C-H. Wang and C-H. Kou. 1996. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. *Disease Aquatic Organisms*, 25, 133-141.
- Lo, C-F., C-H. Ho, S-E. Peng, C-H. Chen, H-C. Hsu, Y-L. Chiu, C-F.

Chang, K-F. Liu, M-S. Su, C-H. Wang and G-H. Kou. 1997. White spot syndrome(WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. Disease Aquatic Organisms (in printed).

Momoyama, K., M. Hiraoka, H. Nakano, H. Koube, K. Inouye and N. Oseka. 1994. Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993 : histopathological studies. Fish Pathology, 29, 141-148 (in Japanese).

Momoyama, K., M. Hiraoka, K. Inouye, T. Kimura and H. Nakano. 1995. Diagnostic techniques of the rod-shaped nuclear virus infection in the kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*. Fish Pathology, 30(4), 263-269.

Nakano, H., H. Koube, S. Umezawa, K. Momoyama, M. Hiraoka K. Inouye and N. Oseko. 1994. Mass mortalities of cultured kuruma shrimp in Japan in 1993 : epizootiological survey and infection trials. Fish Pathology, 29, 135-139 (in Japanese).

Pearson, W. R. and D. J. Lipman. 1988. Improved tools for biological sequence comparison. Proceedings of the National Academy of Science in USA, 85, 2444-2448.

Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. In: Molecular cloning: a

laboratory manual(2nd ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Science in USA, 74, 5463.

Shariff, M. and R. P. Subasinghe. 1992. Major diseases of cultured shrimp in Asia : An overview. In : Fulks W. and K. L. Main(Editors), Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States, The Oceanic Institute, pp. 43~51.

Shigueno, K. 1975. Shrimp Culture in Japan. Association for International Technical Promotion, 153pp. (p. 69, 71).

Strickland, J. D. H. and T. R. Parsons. 1972. A practical handbook of seawater analysis. 2nd ed. Bull. Fish. Res. Bd. Can., 167-310.

Takahashi, Y., T. Itami, M. Kondo, M. Maeda, R. Fujii, S. Tomonaga, K. Supamattaya and S. Boonyaratpalin. 1994. Electron microscopic evidence of bacilliform virus infection in kuruma shrimp(*Penaeus japonicus*). Fish Pathology, 29(2), 121-125.

Takahashi, Y., T. Itami, M. Maeda, N. Suzuki, J. Kasornchandra, K.

Supamattaya, R. Khongparadit, S. Boonyaratpalin, M. Kondo, K. Kawai, R. Kusuda, I. Hirono and T. Aoki. 1996. Polymerase chain reaction(PCR) amplification of bacilliform virus(RV-PJ) DNA in *Penaeus japonicus* Bate and systemic ectodermal and mesodermal baculovirus(SEMBV) DNA in *Penaeus monodon* Fabricius. Journal of Fish Disease, 19, 399-403.

Toullec, J. Y., Y. Crozat, J. Patrois and P. Porcheron. 1996. Development of primary cell cultures from the penaeid shrimps *Penaeus vannamei* and *P. indicus*. Journal of Crustacean Biology, 16, 643-649.

Wang, C. H., C. Lo F, J. H. Leu, C. M. Chou, P. Y. Yeh, H. Y. Chou, M. C. Tung, C. F. Chang, M. S. Su and G. H. Kou. 1995. Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*. Disease of Aquatic Organisms, 23, 239-242.

Wang, K. 1983. Penaeid Culture. China Aquaculture Company, Beijing, China.

國立水產振興院. 1985. 해양오염 및 적조조사 지침. pp. 297.

심재형. 1994. 한국동식물도감 제34권 식물편(해양플랑크톤도감). 국정교과서주식회사, 487 pp.

심재형. 1995. 한국동식물도감 제35권 동물편(해양플랑크톤도감). 국정교과서주식회사, 487 pp.

허문수. 1997. 양식새우 *Penaeus chinensis*와 *Penaeus japonicus*의 바이러스성 질병. 부산대학교 박사학위논문.

高橋辛則, 伊丹利明, 近藤昌和. 1995. 甲殻類の生體防禦. 魚病研究, 30(2), 141-150.

廣瀬弘幸. 1981. 日本淡水藻圖鑑. 内田老鶴圃(株), pp. 923.

耿隆坤. 1995. 중국의 수산양식업-기수수역의 양식기술개발 및 연구방향. 양식산업, 2월, 55-99.

挑山和夫. 1989. 消毒劑によるバキユロウイルス性中腸腺壞死症(BMN)ウイルスの不活化效果. 魚病研究, 24(1), 47-49.

挑山和夫. 1989. バキユロウイルス性中腸腺壞死症ウイルス(BMNV)のエテル, 食鹽濃度およびpHに對する抵抗性. 魚病研究, 24(3), 175-177.

挑山和夫. 1989. 紫外線, 日光, 熱および乾燥によるバキユロウイルス性中腸腺壞死症(BMN)ウイルスの不活化. 魚病研究, 24(2), 115-118.

挑山和夫. 1989. バキユロウイルス性中腸腺壊死症ウイルス(BMNV)の感染組織および海水中での活性維持. 魚病研究, 24(3), 179-181.

挑山和夫, 平岡三登里, 中野平二, 河邊 博・井上 潔・大迫典久. 1994. 1993年に西日本で発生した養殖クルマエビの大量死: 病理組織観察. 魚病研究, 29(2), 141-148.

隆島史夫, 羽生 功. 1984. 水族繁殖学. 水産養殖学講座 第4巻, pp. 439.

山路 勇. 1982. 日本海洋プランクトン圖鑑. 保育社. pp. 537.

松居暢夫. 1982. クルマエビ 養殖實務.

日本栽培漁業協會. 1986. さいばい叢書 No.1 クルマエビ栽培漁業の手引き, 306pp. (p.37, 67, 149).

前田 稔. 1997. クルマエビの急性 ウイルス血症に 關する研究, 水産大學校學位 論文.