

## HRV(*Rhabdovirus olivaceus*), FBV(flounder birnavirus) 및 RVS(retrovirus of salmonid)의 감염가에 미치는 해수의 영향

오명주<sup>†</sup> · 최태진\* · 심두생\*\* · 박명애\*\* · 손상규\*\* · 김진우\*\* · 김영진\*\*\*

여수수산대학교 어병학과 · \*부경대학교 미생물학과 · \*\*국립수산진흥원 병리과

\*\*\*부산대학교 생물학과

양식넙치의 병원바이러스인 HRV 및 FBV, 연어과 유래 바이러스이면서 해산어에 병원성을 나타내는 RVS를 대상으로 넙치사육해수, 2차종류수 및 Hanks' BSS중에서의 바이러스 감염가의 변화를 관찰하고 사육해수중에 존재하는 미생물과의 상호작용을 검토하였다.

HRV, FBV, RVS의 감염가는 2차종류수 및 Hanks' BSS중에서 21일간 안정적이었으나, 사육해수 중에서 HRV는 0℃를 제외한 5, 10, 15, 20℃의 실험구에서 바이러스 현탁후 7일째부터 감염가의 저하를 확인할 수 있었고, RVS에서도 감염가의 하락이 확인되었다. HRV 및 RVS를 고압멸균, 여과처리 및 무처리 사육해수에 현탁시켜 본 결과 무처리 사육해수에서 바이러스감염가의 하락을 나타내는데 비하여 고압멸균 및 여과 처리한 사육해수중의 바이러스 감염가는 비교적 안정적이었다. 사육해수에 1% MEM10을 첨가하여 15℃에서 7일간 배양한 후 여과 처리하여 얻은 여과액에 HRV를 현탁시켜 감염가의 변화를 관찰한 결과 1일에서 3일째에 감염가가 검출한계 이하로 하락하였으며, 해수배양액내의 세균 수는  $8.1 \times 10^6$  cells/ml이었고, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium* 및 *Vibrio*속 세균이 분리되었다. 분리된 *Pseudomonas* 및 *Vibrio*속의 대표주에서 항바이러스작용 물질의 생산이 확인되었다.

Key words : HRV, FBV, RVS, Antiviral substance, *Pseudomonas*, *Vibrio*

HRV(*Rhabdovirus olivaceus*)는 1980년대 중반부터 일본의 넙치 양식장에서 분리 보고되어진(Gorie *et al.*, 1985; Kimura *et al.*, 1986) 이래, 그 원인으로 보이는 질병이 넙치 양식장에서 발병되어져 왔으며, 국내에 있어서도 1990년대 이후 넙치양식장에서 매년 발병되어지고 있다. Nishizawa *et al.* (1991)은 HRV는 연어과에

서 분리되어지는 같은 바이러스과에 속하는 병원바이러스인 IHNV(infectious hematopoietic necrosis virus) 및 VHSV(viral hemorrhagic septicemia virus)와 거의 유사한 바이러스학적 특성을 가지고 있는 유사종의 바이러스로 생각하여 viral genome 및 viral protein의 구조를 비교한 바 있다. 근년 국내 넙치 종묘생산장에서

<sup>†</sup> Corresponding author

문제가 되어지는 바이러스로서 넘치 버어나바 이러스 FBV(flounder birnavirus)가 있다. Sohn *et al.*(1995)에 의하면 넘치에서 발견되어진 이 바이러스는 연어과의 감염성 췌장괴사증의 원인 바이러스인 IPNV(infectious pancreatic necrosis virus)와 바이러스 RNA 및 단백질의 구조가 유사하고 혈청학적으로 유사한 바이러스로 보고하고 있다. 이전부터 연어 및 송어류의 이상유영증은 어병학자들에게 관심의 대상이 되어온 것으로 Oh *et al.*(1995 a, b; 1996)에 의하여 그 원인이 바이러스에 의한 것이며, 원인 바이러스는 신종의 RVS(retrovirus of salmonid)로 확인되어졌다. 이 바이러스는 그 이후 국내에서도 발견되어졌으며, 넘치 및 조피블락 대상의 인위 감염실험에서 넘치에서의 병원성을 확인하고, 병리학적으로 연어과 어류에서와 유사한 질병의 발생을 확인하였다(Oh *et al.*, 미발표 결과).

양식어류 유래 병원바이러스의 세포계외에서의 생존성에 관한 연구로서 IPNV 및 IHNV를 대상으로 PBS, BSS, MEM 중에서 생존성에 대하여 Amend(1970), Mackelvie and Desautels (1975), Gosting and Gould(1981) 등이 보고한 바 있으나, 어류의 서식환경 수중에서의 감염가의 변화에 대한 보고는 많지 않고 Toranzo and Hetrick(1982)이 하천수 및 기수, 해수중의 poliovirus type 1의 생존성을 IPNV, IHNV와 비교한 것 및 IPNV의 해수중의 생존성을 검토한 것(Toranzo *et al.*, 1983) 등이 있다. 한편, poliovirus를 비롯한 인체 유래의 enterovirus의 하천수나 해수 중에서의 생존성을 연구한 바에 의하면, 이러한 바이러스의 감염성에 영향을 미치는 인자로서는 염분 및 수온(Lo *et al.*, 1976), 화학물질(Salo and Cliver, 1978), 미세입자 및 오니(Labelle *et al.*, 1980), 미생물(Fujioka *et al.*, 1980) 등이 있는 것으로

보고되어져 있으며, 그 중에서도 바이러스의 생존률은 고압멸균 혹은 여과 멸균해수중에 비하여 무처리 해수 중에서 낮은 점으로부터 해수중의 미생물의 관여가 중요시 되어졌다. Magunuson *et al.* (1967)은 항바이러스 작용을 가진 세균으로서 *Vibrio marinus*를 분리보고하였고, Kamei *et al.*(1987)은 기수 및 해수지역에서 채수한 실험수내에서 IHNV에 항바이러스성 효과를 가지는 물질을 분리한 세균을 검색하였다. 하지만, 일반적으로 해산양식어에서 발생되어지는 바이러스성 질병의 원인 바이러스에 대한 항바이러스성 물질생산 세균의 검색에 대한 보고는 없다.

본 연구에서는 해산어 양식장의 사육해수, 2차중류수 및 Hanks' balanced salt solution(HBSS)을 사용하여 각종 온도조건하에서 HRV, FBV 및 RVS의 바이러스감염가의 변동을 확인하고, 사육해수중에 존재하는 미생물과 HRV, FBV 및 RVS와의 상호작용을 고압멸균해수, 여과제균해수 및 무처리 사육해수중의 감염가의 변동으로 확인하였다. 또한 사육해수에서 분리한 세균의 대표주를 대상으로한 세균배양액의 항바이러스 효과를 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 바이러스 및 세포배양

해산어류 병원바이러스인 HRV(*Rhabdovirus olivaceus*, strain DH-9708), FBV(flounder birnavirus, strain WH-9702) 및 연어과 어류 병원 바이러스인 RVS(retrovirus of salmonid, strain BrCo-9221c)의 3종을 실험에 사용하였다.

100 IU/ml의 penicillin, 100 µg/ml의 streptomycin, 10% FBS (fetal bovine serum) 첨가 MEM (Eagles' minimum essential

medium, Gibco)으로 배양한 RTG-2(rainbow trout gonads cell) 주화세포에 14℃에서 7일간 배양하여 세포변성이 충분히 진행되었음을 확인한 후 바이러스 및 세포유래물질이 부유되어 있는 배양액을 2,100×g로 4℃에서 20분간 원심 분리하여 세포잔류물 등을 제거한 상층액을 밀리포어필터 HA(0.45μm)로 여과한 후, -80℃에서 실험사용때 까지 보존하였다.

#### 바이러스 assays

바이러스 assays는 각각의 well에  $2.5 \times 10^5$  cells/ml로 조정된 RTG-2 세포를 100μl씩 넣어 15℃에서 1일간 배양하여 준비한 96-well microtiter plate를 이용한 TCID<sub>50</sub>법으로 행하였다. 각 4개의 well에 10배 희석법에 의해 희석된 각각의 바이러스액을 50μl씩 접종하고, 15℃에서 10일간 배양한 후 10%의 포르말린으로 세포를 고정하고 0.1% 크리스탈바이오렛으로 염색하여 각 well 내의 세포를 관찰하였다. 각각의 바이러스 특유의 세포변성을 확인하고, Barren and Karber(1931)의 방법으로 TCID<sub>50</sub>치를 계산하였다.

#### 실험수

전남 여수 인근의 돌산도에 위치한 넘치 육상 양어장의 사육해수를 멸균한 유리병에 채수하여 사용하였으며, 대조구로서 2차중류수 및 HBSS(Hanks' balanced salt solution, Gibco)를 사용하였다. 사육해수는 실험의 필요에 따라서는 고압멸균 혹은 0.20μm Nucleopore filter로 여과제균하여 사용하였다.

#### 실험수 중에서의 바이러스의 생존성

멸균된 125ml 용량의 유리병에 실험수(사육해수, 2차중류수, HBSS)를 각 99ml씩 넣고 실험 바이러스액(6.55 log TCID<sub>50</sub>/ml of HRV, 7.80 log TCID<sub>50</sub>/ml of FBV, 8.05 log TCID<sub>50</sub>/ml of RVS) 1ml를 첨가하여 잘 섞은 후, 각 바이러스 현탁 실험수를 5개의 F-25 플라스크에 20ml씩 분주하여, 0, 5, 10, 15, 20℃에 21일간 정치하였다. 바이러스 현탁후 3, 7, 14, 21일 째에 바이러스 감염가를 RTG-2 세포를 사용하여 96 well plate 상에서 마이크로플레이트법으로 측정하였으며, 측정시의 바이러스 현탁액 제균은 0.40μm Nucleopore filter로 행했다. 사육해수중에 바이러스를 넣고 일정기간 정치 시에 해수 내에 존재하는 바이러스 감염가 변동의 영향요인 유무를 확인하기 위하여 무처리해수구, 고압증기멸균구 및 0.20μm Nucleopore filter 여과구로 나누어 HRV 및 RVS를 접종하고 15℃에서의 바이러스 감염가의 변화를 확인했다. 또한 사육해수에 10%가 되게 MEM10을 가하여 사육해수중에 포함되어 있을 미생물을 15℃에서 7일간 배양한 후, 0.20μm Nucleopore filter로 여과제균 시킨 실험수 99ml에 HRV를 1ml 희석한후 배양여과액내에서의 바이러스 감염가의 동태를 확인하였다.

15℃ 7일간 배양한 10% MEM10 첨가 사육해수내의 생균수 및 균의 분류

10% MEM10 첨가 사육해수내의 생균수는 실험수를 HBSS로 10배수 희석시키고, 각 희석액을 해수기초배지(SWA: 5g polypeptone (Difco), 1g yeast extract (Difco), 1g beef extract (Difco), 1g proteus peptone (Difco), 15g agar, per 1000ml 75% artificial sea water (pH 7.8)) 표면에 도말한 후, 25℃ 7일간 호기적으로 배양하여 발생된 세균 집락수를 세어 1

ml 당의 생균수를 산출하였다.

균주의 분리는 평판배지상에서의 일정 면적 중의 집락 약 30개를 채택하고, 각각의 집락을 순수배양하여 Shewan *et al.* (1960) 및 Shimizu and Ezura (1987)의 분류방법에 따라 속 단계까지 분류하였다.

#### 분리균의 항바이러스작용

분리균주 중에서 *Pseudomonas* (YW-03, YW-12), *Achromobacter* (YW-01, YW-21), *Flavobacterium/Cytophaga* (YW-17, YW-23) 각 2주 및 *Vibrio* 1주 (YW-15)를 택하여 50ml의 CYG액체배지 (5g casamino acids (Difco), 0.5g yeast extract (Difco), 1g glucose, 6.8g NaCl, 0.4g KCl, 0.2g MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.2g CaCl<sub>2</sub> (anhydrous), per 1,000ml distilled water (pH 7.2))에 접종하여 25℃ 3일간 160rpm으로 진탕 배양한 후, 배양액을 각 10ml씩 취하여 고압멸균, 여과멸균(0.45μm, HA)시킨 실험구 및 무처리 배양액구를 준비하였다. 준비된 처리 또는 무처리 실험구 10ml에 HRV 및 RVS 바이러스액을 1ml씩 접종하여 잘 섞은 후, 89ml의 CYG 배지를 더하여 15℃에서 정치배양 하였다. 대조군으로서는 99ml의 CYG 배지에 바이러스액을 1ml 접종하여 같은 방법으로 배양하였다. 바이러스 접종 후부터 1, 3, 6, 12시간 및 1, 3, 5, 10일 째의 바이러스 감염가를 microplate titer법으로 측정하였다.

## 결 과

사육해수 HBSS 및 2차증류수 중에서의 바이러스 감염가의 변화

사육해수, HBSS 및 2차증류수 중에서의

HRV 감염가의 변화를 Table 1에 나타내었다. 양어용수에 HRV를 현탁한 경우 0℃에서는 21일간 바이러스의 감염의 변화가 거의 보이지 않았으나, 5, 10, 15, 20℃에서는 7일째부터 급격한 바이러스 감염가의 저하가 관찰되었고, 온도가 상승됨에 따라 그 폭은 크게 나타났다. 2차증류수 중에서는 0, 5, 10℃에서는 21일간 안정하였으나 15℃에서 14일 째부터 다소 감소하는 경향이 나타났다. HBSS중의 각 온도구간별의 감염가의 증감은 21일간의 시험기간동안 안정된 상태를 보였다.

사육해수, HBSS 및 2차증류수 중에서 FBV 감염가의 변화를 Table 2에 나타내었다. FBV의 경우 사육해수에 현탁한 후 0, 5, 10, 15℃의 실험구에서는 전반적으로 감염가의 변동은 나타나지 않았으며, 20℃의 실험구에서는 7일째부터 1 order가 저하된 바이러스 감염가를 나타내었다. 2차증류수 및 HBSS 중에서는 전 실험 온도구간에서 안정된 경향을 나타내었다.

사육해수 중의 RVS의 감염가의 변화를 Table 3에 나타내었다. RVS를 실험한 사육해수의 경우 온도조건에 따라 약간의 바이러스 감염가의 변동이 나타났으나, 증류수, HBSS 실험구에서는 실험 온도범위에서 감염가의 큰 변동을 보이지 않았다.

무처리, 고압멸균 및 여과멸균 사육해수중의 HRV 및 RVS의 성장

사육해수의 무처리, 고압멸균처리, 여과멸균처리구에서의 HRV 및 RVS의 감염가의 변화를 Table 4 및 5에 나타내었다.

HRV는 무처리수에서는 현탁 3일째에 벌써 2 order 이상의 바이러스 감염가의 감소가 나타나고, 7일째에는 검출한계 이하가 되었으나 고압멸균구 및 여과멸균으로 제공한 사육용수중에

Table 1. Survival of HRV in fish rearing seawater, double distilled water and Hanks' BSS at temperatures of 0, 5, 10, 15 and 20 °C

Treated Temp.( °C)	Days after virus inoculation				
	0	3	7	14	21
Rearing seawater					
0	3.80*	3.80	3.55	3.55	3.55
5	3.80	3.55	2.30	2.30	1.93
10	3.68	3.30	2.05	1.05	<0.80
15	3.80	1.80	0.80	<0.80	<0.80
20	3.93	1.30	<0.80	<0.80	<0.80
Double distilled water					
0	3.93	3.80	3.80	3.68	3.80
5	3.80	3.68	4.05	3.80	3.80
10	3.80	3.80	3.80	3.55	3.68
15	3.68	3.55	3.55	3.05	2.93
20	3.80	3.30	3.55	3.05	3.05
Hanks' BSS					
0	4.05	4.05	4.05	4.05	4.05
5	4.05	3.80	4.05	4.05	3.93
10	3.80	4.05	3.93	3.80	4.05
15	3.80	3.80	3.80	3.63	3.80
20	4.05	3.80	4.05	3.55	3.80

\* Viral infectivity (log TCID<sub>50</sub>/ml), average of two trial examinations.

서는 21일까지 감염가의 변화는 그다지 나타나지 않았다.

Table 5에서는 RVS의 결과를 나타내고 있는데 RVS는 무처구에서의 바이러스 감염가의 감소정도는 HRV의 경우에 비하여 늦게 감소되어 14일째의 검사치가 2 order 정도의 감소를 나타내었으나 여과멸균 및 고압멸균구의 바이러스

감염가의 변화는 HRV의 유사한 경향으로 나타났다.

MEM10을 10% 첨가한 사육해수의 15 °C 7일간 배양후 여과제균액 중에서의 HRV 바이러스 감염가의 변화

사육용수에 10%의 MEM10을 첨가하여 15 °C

Table 2. Survival of FBV in fish rearing seawater at temperatures of 0, 5, 10, 15 and 20℃

Test Temp.(℃)	Days after virus inoculation				
	0	3	7	14	21
0	4.30*	4.30	4.55	4.43	4.05
5	4.55	4.55	4.05	4.30	4.17
10	4.43	4.30	4.05	4.05	4.05
15	4.30	4.05	3.55	3.55	3.43
20	4.55	4.05	3.05	3.30	3.05

\* Viral infectivity (log TCID<sub>50</sub>/ml), average of two trial examinations.

Table 3. Survival of RVS in fish rearing seawater at temperatures of 0, 5, 10, 15 and 20℃

Test Temp.(℃)	Days after virus inoculation				
	0	3	7	14	21
0	5.05*	4.80	5.05	4.93	4.80
5	4.80	4.55	4.55	4.80	4.30
10	4.93	4.30	3.80	4.05	3.55
15	5.05	4.17	4.30	3.05	3.05
20	4.55	4.30	3.55	2.93	2.17

\* Viral infectivity (log TCID<sub>50</sub>/ml), average of two trial examinations.

Table 4. Survival of HRV in untreated, filter-sterilized and autoclaved fish rearing seawater at 15℃

Rearing Water	Days after virus inoculation				
	0	3	7	14	21
Untreated	3.80*	1.30	0.80	<0.80	<0.80
Filtrated	3.80	3.55	3.05	3.05	2.68
Autoclaved	3.80	3.55	3.55	3.43	3.05

\* Viral infectivity (log TCID<sub>50</sub>/ml), average of two trial examinations.

에서 7일간 배양한 후, 0.20 $\mu$ m Nucleopore filter  
로서 여과하고, 여과액내에 HRV를 현탁시켜

바이러스 감염가의 변화를 관찰한 결과를  
Table 6에 나타내었다. HRV의 바이러스 감염

Table 5. Survival of RVS in untreated, filter-sterilized and autoclaved fish rearing seawater at 15℃

Rearing Water	Days after virus inoculation				
	0	3	7	14	21
Untreated	4.55*	3.30	2.80	2.05	1.80
Filtrated	4.30	3.80	3.05	2.80	2.55
Autoclaved	4.55	4.55	3.55	3.80	3.80

\* Viral infectivity (log TCID<sub>50</sub>/ml), average of two trial examination.

Table 6. Survival of HRV at 5, 10, 15, 20℃ in filter-sterilized fish rearing seawater incubated with 10%(V/V) MEM10 at 15℃, for 7 days

Test Temp.(℃)	Days after virus inoculation					
	0	1	3	5	7	14
5	3.80*	1.05	<0.80	<0.80	<0.80	<0.80
10	3.80	<0.80	<0.80	<0.80	<0.80	<0.80
15	3.68	<0.80	<0.80	<0.80	<0.80	<0.80
20	3.80	<0.80	<0.80	<0.80	<0.80	<0.80

\* Viral infectivity (log TCID<sub>50</sub>/ml), average of two trial examinations.

가는 5, 10, 15, 20℃의 실험구에서 1일 및 3일째에 검출한계 이하로 나타났다. MEM10을 10% 첨가하여 15℃에서 7일간 배양하였을 때의 배양해수중의 생균수는  $8.1 \times 10^6$  cell/ml 이었다. 해수기초배지상의 세균 집락중에서 선발하여 순수분리한 30균주의 속단위의 분류 결과 *Pseudomonas*속 에 포함되는 균주가 13, *Achromobacter*속이 7, *Flavobacterium/Cytophaga*속이 4, *Vibrio*속으로 분류되어지는 것이 2균주 있었으며, 배양이 불가능하였거나 균의 동정이 되지 않은 것이 4균주로 나타났다.

분리균주의 항바이러스작용

분리균주 중에서 *Pseudomonas* (YW-03,

YW-12), *Achromobacter* (YW-01, YW-21), *Flavobacterium/Cytophaga* (YW-17, YW-23) 및 *Vibrio* (YW-15)를 대표로 택하여 HRV에 대한 항바이러스 작용을 관찰한 결과를 Table 7에 나타내었다. 세균접종을 하지 않은 CYG 배지에 HRV를 현탁한 것을 대조구, 각각의 균주를 CYG 배지에 배양하고 그 배양액을 여과 또는 고압멸균 시킨후 HRV를 접종한 것 및 세균 배양후 멸균처리 하지 않고 HRV를 접종한 것을 실험구로 하여, 반응시간 경과에 따라 얻어지는 바이러스 감염가를 대조구의 수치를 기준으로 하여 비교하였다. *Pseudomonas*속 세균인 YW-03, YW-12주의 경우 CYG만의 대조구 및 세균 배양후 고압멸균을 행한 구에서는 실험 개시 10일 경과때 까지도 바이러스 감염가가 안

Table 7. Survival of HRV at 15°C in CYG broth, filtered, autoclaved and untreated culture broth of *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium* and *Vibrio* isolated from fish rearing seawater

Genus (strain) / test	Hours after virus inoculation						
	1	2	3	24	72	120	240
<i>Pseudomonas</i> sp.							
YW-03 F	3.80**	3.80	3.55	2.30	1.55	<0.80	<0.80
A	3.55	3.55	3.55	3.55	3.55	3.43	3.43
U	3.55	<0.80	<0.80	-	-	-	-
YW-12 F	3.68	3.55	3.80	2.05	2.05	<0.80	<0.80
A	3.80	3.68	3.80	3.80	3.80	3.55	3.55
U	3.55	<0.80	<0.80	-	-	-	-
<i>Achromobacter</i> sp.							
YW-01 F	3.80	3.80	3.80	3.05	2.55	2.55	2.55
A	3.80	3.55	3.55	3.55	3.80	3.05	3.05
U	3.80	<0.80	<0.80	-	-	-	-
YW-21 F	3.80	3.55	3.55	3.80	3.55	3.55	3.55
A	3.55	3.55	3.55	3.55	3.43	3.05	3.05
U	3.80	<0.80	<0.80	-	-	-	-
<i>Flavobacterium</i> / <i>Cytophaga</i> sp.							
YW-17 F	3.55	3.30	3.30	3.05	3.55	2.80	2.80
A	3.68	3.55	3.05	3.30	3.43	3.30	3.30
U	3.43	<0.80	<0.80	-	-	-	-
YW-23 F	3.30	2.80	2.55	2.30	2.55	2.55	2.55
A	3.55	3.55	3.55	3.55	3.30	3.05	3.05
U	3.55	<0.80	<0.80	-	-	-	-
<i>Vibrio</i> sp.							
YW-15 F	3.80	3.30	3.30	1.68	<0.80	<0.80	<0.80
A	3.68	3.55	3.55	3.55	3.30	3.30	3.30
U	3.80	1.30	<0.80	<0.80	-	-	-
U							
Control (CYG)	3.80	3.80	3.80	3.80	3.55	3.80	3.80

\* Filter-sterilized (F), autoclaved (A) and untreated (U) culture broth.

\*\* Viral infectivity (log TCID<sub>50</sub>/ml), average of two trial examinations.



정한 경향을 보였다. 하지만 여과 처리한 배양액 중에서는 바이러스 감염가가 5일 이후 검출한계를 벗어날 정도로 하락하였고, 멸균 및 여과처리를 하지 않은 세균 배양액에 바이러스를 접종한 실험구의 경우에는 접종후 1시간째의 조사에서 감염가는 검출한계 이하로 감소되어졌다. *Achromobacter*속, *Flavobacterium/Cytophaga*속 세균의 경우, 무처리 세균첨가구의 경우에 있어 *Pseudomonas*속과 같이 접종후 1시간만에 바이러스의 검출이 불가능하였으나, 고압멸균구에서의 바이러스 감염가의 변동은 보이지 않았으며, 여과처리구에서의 감염가의 하락 경향도 크게 나타나지 않았다. *Vibrio* 속의 YW-15균주를 대상으로 한 실험에서는 여과처리군에서 바이러스 감염가 저하효과가 있는 것으로 확인되었다.

## 고 찰

본 연구에서는 HRV, FBV, RVS와 같은 어류병원 바이러스를 대상으로 해산어 사육용수, 2차증류수 및 HBSS중에서의 바이러스 감염가의 변화를 0, 5, 10, 15, 20℃의 온도 조건하에서 21일간 관찰하였는데, HRV는 2차증류수 및 HBSS 중에서 안정적이었으나, 사육해수의 경우 0℃를 제외한 실험구에서 실험개시 7일째부터 급격한 바이러스 감염가의 저하가 관찰되었고, 온도가 상승됨에 따라 그 폭은 크게 나타났다. FBV의 경우, 사육해수에 현탁한 후 0, 5, 10, 15℃ 실험구에서 전반적으로 감염가의 변동이 보이지 않았고, 증류수 및 HBSS 중에서도 안정된 경향을 나타냈다. RVS는 사육해수의 경우 온도조건에 따라 바이러스 감염가의 변동이 나타났으나, 증류수, HBSS 실험구에서는 실험 온도범위에서는 감염가의 큰 변동을 보이지 않았다. 연어 송어류에서 중요한 병원 birnavirus인 IPNV 및 rhabdovirus인 IHNV의 경우 HBSS

중에서는 감염가의 변동이 나타나지 않는다 (Gosting and Gould, 1981) 보고가 있는데, 이는 본 실험 대상 바이러스에 있어서도 일치하는 결과로, Yoshimizu *et al.*(1986)의 결과와도 유사한 경향을 보였다. 하지만 이와 비교하여 FBV를 제외한 HRV 및 RVS의 해산어 사육용수중에서 감염가가 감소되어지는 경향은 실험 해수중에 특정 바이러스에 영향을 미치는 인자에 의해 나타났을 것으로 생각되어진다.

한편, HRV 및 RVS를 고압멸균처리, 여과멸균처리한 사육해수에 접종하여 무처리 사육해수구와 비교하였을 때, 두 바이러스는 무처리 사육해수에서는 급격한 바이러스 감염가의 저하를 나타내었으나, 고압멸균 및 여과멸균 처리구에서의 바이러스 감염가는 비교적 안정한 상태를 유지하고 있었다. Toranzo *et al.* (1983)은 IPNV의 불활성화에 해수중의 미생물이 관여하고 있다고 보고하였으며, Kamei *et al.* (1987) 또한 이러한 사실에 근거하여 하천수에서 연어과의 IPNV 및 IHNV에 대하여 불활화 능력과 가진 항바이러스물질 생성 새균을 screening 하였다고 보고하였다. Fujioka *et al.* (1980)은 인체에 병원성을 지닌 enterovirus의 불활화에 해수중의 미생물이 관여하는 것으로 보고하였다. 본 실험에서 해산어사육해수의 고압멸균 및 여과처리구와 미처리구 사이에서 HRV 및 RVS 감염가의 변화폭의 정도가 서로 다르게 나타나는 점으로부터 해산어류 양식수내에 존재하는 미생물 혹은 미생물이 생산하는 0.20 $\mu$ m의 여과막을 통과하는 물질이 관여한다는 사실이 확인되어진 것으로 생각할 수 있다.

이러한 점에서부터 본 실험 바이러스의 불활화 현상에 미생물이 관여하는 것을 확인하기 위하여 사육해수의 MEM10을 10% 농도로 첨가하여 15℃에서 7일간 배양한 후, 배양해수를 여과하여 제균하고 그 여과액에 HRV를 접종한

후 감염가의 변화를 관찰한 결과, 1일에서 3일째에 감염가가 검출한계 이하로 나타났으며, 여과전 배양해수내의 세균수는  $8.1 \times 10^6 \text{ cell/ml}$ 이었고, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium* 및 *Vibrio*가 분리되어졌다. 이들 세균 중에서 항바이러스성 물질을 생산하는 세균을 알아보기 위하여 HRV를 대상으로 조사한 결과 *Pseudomonas* 및 *Vibrio*속으로 분류된 균주의 실험에서 세균 배양액의 여과액 내에서 HRV는 접종 5일 이후 검출되어지지 않았다. 이러한 결과는 이들 세균들을 순수 분리하고, 배양 및 농축을 행한 후 그 물질을 정제함으로써, 해산어류의 병원성 바이러스를 제어할 수 있는 물질의 개발이 가능할 것으로 시사되었다. 앞으로 본 연구에서 분리되어진 *Pseudomonas* sp. 및 *Vibrio* sp. 가 생성하는 항바이러스 물질의 동정 및 정제에 관한 연구 및 다양한 해산어류 병원바이러스에 대한 불활화의 선택성을 확인하므로써 바이러스질병 방역에 유용하게 사용하기 위한 지속적 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## 사 사

이 논문은 1996년도 한국학술진흥재단의 대학부설연구소 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

## 참 고 문 헌

- Amend, D.F. : Control of infectious hematopoietic necrosis virus disease by elevating the water temperature. Fish. Res. Bd. Can., 27: 265-270, 1970.
- Fujioka, R. S., Loh, P. C. and Lau, L. S. : Survival of human enteroviruses in the Hawaiian ocean environment : evidence for virus inactivation microorganisms. Appl. Environ. Microbiol., 39: 1105-1110, 1980.
- Gorie, S., Nakamoto, K. and Kawashima, K. : Disease of culture hirame *Paralichthys olivaceus* : preliminary report on a disease of marine pen cultured flounder may be caused by viral infection. Bull. Hyogo Pref. Fish. Exp. Stn., 23: 66-68, 1985.
- Gosting, L. H. and Gould, R. W. : Thermal inactivation of infectious hematopoietic necrosis and infectious pancreatic necrosis viruses. Appl. Environ. Microbiol., 41: 1081-1082, 1981.
- Kamei, Y., Yoshimizu, M., Ezura, Y. and Kimura, T. : Effects of environmental water on the infectivities of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) and infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). J. Appl. Ichthyol., 4: 37-47, 1987.
- Kimura, T., Yoshimizu, M. and Gorie, S. : A new rhabdovirus isolated in Japan from cultured hirame and ayu. Dis. Aquat. Org., 1: 209-217, 1986.
- Labell, R. L., Gebra, C. P., Goyal, S. M., Melnic, J. L., Gech, I. and Bogdan, G. F. : Relationships between environmental factors, bacterial indicators and the occurrence of enteric viruses in estuarine sediments. Appl. Environ. Microbiol., 39: 588-596, 1980.
- Lo, S., Gilbert, J. and Hetrick, F. : Stability of human enteroviruses in estuarine and marine waters. Appl. Environ. Microbiol., 32: 245-249, 1976.
- Mackelvie, R. M. and Desautels, D. : Fish viruses: survival and inactivation of infectious pancreatic necrosis virus. Fish. Res. Bd. Can., 32: 1267-1273, 1975.

- Magunuson, S., Gundersen, K., Brandberg, A. and Lycke, E. : Marine bacteria and their possible reation to the virus inactivation capacity of sea water. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.*, 71: 274-280, 1967.
- Nishizawa, T., Yoshimizu, M. Winton, J. R. and Kimura, T. : Comparison of genomic size and synthesis of structural proteins of HRV, IHNV and VHS virus. *Fish Pathol.*, 26(2): 77-81, 1991.
- Oh, M.-J., Yoshimizu, M., Kimura, T. and Ezura, Y. : A new virus isolated from salmonid fish. *Fish Pathol.*, 30(1): 23-32, 1995a.
- Oh, M.-J., Yoshimizu, M., Kimura, T. and Ezura, Y. : Pathogenicity of the new virus isolated from brain of abnormally swimming salmonid. *Fish Pathol.*, 30(1): 33-38, 1995b.
- Oh, M.-J. : Molecular biological characterization of the new virus isolated from abnormally swimming salmonid - RT activity. *J. Fish Pathol.*, 9(2): 177-183, 1996.
- Salo, R. J. and Cliver, J. S. : Inactivation on enteroviruses by ascorbic acid and sodium bisulfate. *Appl. Environ. Microbiol.*, 36: 68-75, 1978.
- Shewan, J. N., Hdbbs, G and Hodgkiss, W. : The *Pseudomonas* and *Achromobacter* groups of bacteria in the spoilage of marine white fish. *J. Appl. Bact.*, 23: 463-468, 1960.
- Sohn, S.-G., Park, M.-A. Do, J.-W., Jung, C.-R. and Park, J.-W. : Characterization of birnavirus isolated from cultured flounder fry. *J. Fish Pathol.*, 8(2): 91-98, 1995.
- Toranzo, A. E. and Hetrick, F. M. : Comparative stability of two salmonid viruses and poliovirus in fresh, esturine and marine water. *J. Fish Dis.*, 5: 223-231, 1982.

Effects of environmental seawater  
on the infectivities of HRV(*rhabdovirus olivaceus*),  
FBV(flounder birnavirus) and RVS(retrovirus of salmonid)

Myung-Joo Oh, TaeJin Choi\*, Doo-Saing Sim\*\* Myoung-Ae Park\*\*  
Sang-Gyu Sohn\*\*, Jin-Woo Kim\*\* and Young-Jin Kim\*\*\*

Department of Fish Pathology, Yosu National Fisheries University

\*Department of Microbiology, Pukyung National University,

\*\*Pathology Division, National Fisheries Research & Development Agency,

\*\*\*Department of Biology, Pusan National University

Water samples collected from marine fish culture system in Korea were compared for their capability to reduce the infectivity titers of HRV (*rhabdovirus olivaceus*), FBV(flounder birnavirus) and RVS(retrovirus of salmonid). In addition, interaction between viruses and microorganisms present in the rearing seawater was examined.

The titer of HRV and RVS were reduced at 15℃ to less than detectable limits within 3 to 5 days using untreated samples of seawater. No reduction of infectivity was noted in bacteria-free water treated by filtration or autoclaving.

Bacteria (*Pseudomonas* and *Vibrio* sp.) isolated from the water collected from a flounder culture system showed the inactivation activity of HRV.

---

Key words : HRV, FBV, RVS, Antiviral substance, *Pseudomonas*, *Vibrio*