

서해안 양식 바지락에 발생한 *Perkinsus* sp. 감염증과 신속검출

최동림[†] · 권정노 · 박성우*

국립수산진흥원 서해수산연구소 군산분소, *군산대학교 해양과학대학 수족병리학과

매년 폐사가 발생해 온 서해안 연안의 고창과 태안에서 채집한 양식 바지락에서 복합포자충류인 *Perkinsus* sp.가 관찰되었다. 기생충에 감염된 바지락은 육안적으로 아가미와 육질의 표면에서 유백색의 결절이 나타났다. 기생충의 영양체는 편재된 핵을 가지고 있으며, 아가미와 외투막, 간 췌장, 생식소 조직에서 이분열에 의해 증식하며, 육아종의 형성과 혈구의 침윤을 유발하였다. 감염된 바지락을 FTM에 배양한 결과 영양체의 크기가 커지면서 루골용액에 의해 검게 염색된 구형의 유주자낭을 형성하였다. *Perkinsus* sp.의 평균 감염율은 9개월의 조사 기간 동안 고창이 73.1%, 태안이 94.8%로 나타났으며, 감염율은 각장의 크기가 클수록 증가하는 경향을 나타내었다. Hemacolor kit는 바지락의 대량폐사와 밀접한 연관이 있는 *Perkinsus* sp.의 영양체의 신속진단에 유용한 것으로 나타났다.

Key words: Babyneck clam, *Ruditapes philippinarum*, Histology, Hemacolor stain, Rays FTM, *Perkinsus* sp.

서해안 연안의 간석지는 노랑조개, 백합, 굴, 바지락 및 키조개 등의 패류가 자연 서식하고 있으며, 이러한 패류의 서식이 적합한 여러 간석지에서 오래 전부터 유용 패류의 양식이 성행해 왔으며, 각 지역에서 생산되는 패류는 어민 소득과 지역 경제에 중요한 역할을 담당하고 있다.

지난 10여년 동안 서해안 연안의 양식 바지락이 매년 늦여름과 초가을 동안 대량폐사되어 양식 어민에게 심각한 경제적 손실을 입히고 있다. 외국에 있어서 양식 바지락의 대량폐사의 원인에 대해 Brown ring disease를 유발하는 *Vibrio* P1(Paillard and Maes, 1990; Noel et al., 1991, 1992)과 *Perkinsus atlanticus*(Da Ros and Canzonier, 1985; Chagot et al., 1987; Azevedo, 1989a, b; Sagrista et al., 1996)가 보고된 바 있으나, 국내에서는 아직 정확한 폐사원인이 밝혀져 있지 않은 상태이다. 따라서 본 연구는 서해안에서 양식하는 바지락의 대량폐사 원인을 구명하기 위하여 1996년부터 서해안 연안의 바지락 양식장을 대상으로 조사하였으며 그 결과, 바지락의 폐사 원인이 *Perkinsus* sp.

의 감염에 의한 것으로 추정되어 감염 바지락의 병리조직학적 변화와 감염 기생충의 신속 검출에 관하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

양식 바지락 채집

1996년 2월부터 1996년 10월까지 매월 1회 전북 고창군 심원면 하전리의 바지락 양식장 3개소와 충남 태안군 황도리 바지락 양식장 1개소에서 바지락을 채집하여 실험실로 운반하였다.

병리조직학적 연구

각 지점별 30개체 바지락의 패각을 담수로 깨끗이 씻고, 불기를 제거한 후 버니어캘리퍼로 각장을 측정하고, 패각근을 칼로 잘라 패각을 제거한 후, 즉시 Davidson 고정액에 고정하였다. 고정된 바지락은 알코올 계열로 탈수하고, Hemo-De(Fisher, USA)로 투명화한 후 Paraplast Xtra(Oxford, USA)로 포매하여 블록을 만들었다. 마이크로톰으로 4 µm의 절편을 만들어 슬라이드글라스에 부착한 후, Hematoxylin과 Eosin으로 염색하여 광학현미

[†]Corresponding author

경으로 관찰하였다.

Hemacolor 염색

아가미와 패각근 옆에 위치한 위심강 조직을 적출하여 여과지로 조직여액을 제거한 다음, 슬라이드글라스에 도말하였다. 도말한 슬라이드 글라스는 공기 중에 건조시킨 후, Hemacolor kit(Merck, Germany)로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

Fluid thiglycollate medium(FTM) 배양

바지락에 *Perkinsus* sp.의 감염 여부를 확인하기 위하여 Ray(1966)의 방법에 따라 Fluid thiglycollate medium을 만들어 15 ml 시험관에 10 ml씩 분주하였다. 패각을 제거한 바지락을 이분하여 한쪽은 FTM을 분주한 시험관에 넣고, 나머지 한쪽은 조직학적 검사를 실시하였다. FTM에 바지락을 넣고, 2주 동안 차광하여 실온에서 배양한 바지락을 시험관에서 꺼내어 패트리디쉬에 놓고, 1 ml Lugol용액을 떨어뜨려 1분 정도 방치한 후 광학현미경 하에서 조직을 잘게 찢으면서 *Perkinsus* sp.의 영양체를 세밀히 관찰하였다.

결 과

병리조직학적 관찰

감염된 바지락은 패각을 제거하기 위해 칼을 패각 사이에 삽입할 때 패각이 힘없이 잘 열리고, 한쪽 패각근을 잘랐을 때 나머지 한쪽의 패각근의 힘이 급격히 떨어졌다. 감염된 바지락은 패각을 열고 육질을 관찰한 결과 윤기와 탄력이 없었다. 바지락의 구순부가 패각에 붙어 잘 떨어지지 않거나 녹아 없어진 경우도 종종 나타났다(Fig. 1). 아가미나 구순부 및 육질의 표면에는 직경 1 mm 내외의 유백색의 결절이 산재해 있었다.

병리조직학적 관찰 결과 결절은 아가미, 외투막, 간 철허장 및 근육 등을 비롯한 모든 조직 내에서 산재되어 있었으며, 숙주세포들로 둘러싸여 육아종을 형성하거나 혈구의 침윤을 특징으로 하는 염증성 반응이 관찰되었다. 결절 내에는 반구형 혹은 구형의 영양체가 한 개 혹은 수십 개가 존재하며, 영양체는 호산성의 숙주괴사성 물질로 둘러싸여져 있었다(Fig. 2). 영양체는 직경이 5-12 μ m

이며, 반구형 또는 구형으로 한 개 혹은 여러 개의 액포와 세포막 한쪽에 치우친 핵을 가지고 있었다(Fig. 3). 간철허장 결합조직은 감염된 영양체의 증식으로 인하여 관상구조의 위축과 피사가 관찰되었다(Fig. 4). 아가미 2차 새엽 사이에는 영양체의 증식으로 인해 육아종과 염증성 반응이 대부분의 감염된 바지락에서 관찰되었다(Fig. 5). 기생충에 감염된 생식소 조직은 감염되지 않은 바지락에 비해 거의 생식소가 발달하지 않았다(Fig. 6).

바지락의 조직에 감염된 영양체는 증식하면서 주변의 숙주세포를 융해시켜 공포를 형성하며, 영양체의 수가 증가할수록 공포의 크기가 증가하였다(Fig. 7). 영양체는 원형질의 이 분열에 의해 모세포가 4세포 또는 8세포로 분열(핵분열 후 세포질 분열)하여 증식하는 것으로 생각되었다(Fig. 8).

도말 표본의 Hemacolor 염색

아가미 혹은 위심강 조직을 슬라이드글라스에 도말하여 Hemacolor kit로 염색한 후 광학현미경으로 관찰한 결과 두 가지 형태의 영양체가 관찰되었다. 미성숙된 영양체로 보이는 반구형의 영양체는 크기가 5-10 μ m이며, 한 개 혹은 여러 개의 영양체가 숙주의 탐식세포의 붕괴물로 보이는 물질로 이루어진 막으로 둘러싸여져 있으며, 세포질 내에는 다수의 호염기성 과립이 관찰되었다(Fig. 9). 성숙된 영양체는 숙주붕괴물로부터 이탈하여 크기가 10-15 μ m로 커지면서 거의 구형에 가까우며, 핵은 세포막에 가깝게 한쪽에 치우쳐 있고, 투명한 액포를 가지고 있었다(Fig. 10).

Perkinsus sp. 감염율

1996년 2월부터 10월까지 전북 고창과 태안의 바지락 양식장에서 채집한 바지락의 *Perkinsus* sp.의 월별 감염율은 고창이 23-95%, 태안이 77-100%로 월별 평균 감염율은 각각 73%와 95%이었다(Fig. 11). 두 지역에서 공히 봄철에 감염율이 높게 나타나 고창과 태안에서 채집된 바지락의 90% 이상이 감염되어 있었다. 최저 감염율은 겨울인 2월에 나타났으며, 고창과 태안의 감염율이 각각 23%와 77%로 나타났다. 두 지역 모두 8월에 감염율이 다소 감소하다가 9월부터 다시 증가하는 경향을 나타내었다.

Fig. 1. Photomicrograph of infected babyneck clam, *Ruditapes philippinarum*. Labial palp was attached on the inner shell surface.

Fig. 2-7. Photomicrographs of trophozoites of *Perkinsus* sp. founded in *Ruditapes philippinarum*. 2. Trophozoites surrounded by dense material (arrow) from host origin. 3. Trophozoite showing a large vacuole and an eccentric nucleus. 4. Trophozoites (arrow) in connective tissue of hepatopancrease. 5. Cross section through gill showing the localization of the trophozoites within the branchial space. 6. Section of reproductive tissue showing infiltration of hemocytes and undeveloped eggs (arrows). 7. Section of mantle showing intensive infiltration of hemocytes and enlarged cyst surrounded by fibrillar material from host origin.

조사 기간 동안 채집된 바지락 704마리에 대한 *Perkinsus* sp.의 감염율과 각장의 크기와의 관계는

Fig. 12와 같다. 각장의 크기에 따라 분류한 바지락 개체군 중에서 각장이 10-15 mm, 15-20 mm,

Fig. 8. Schizont (arrow) in cyst.

Fig. 9-10. Photomicrographs of trophozoites colored by Hemacolor stain. Trophozoites surrounded by dense material (arrow) from host origin. 10. Free trophozoite in hemolymph.

Fig. 13. Photomicrographs of prezoosporangium (arrow) in the gill showing black sphere stained by Lugals solution.

Fig. 14. Photomicrographs of zoosporangium containing numerous zoospores, some leaving the sporangium by the discharge tube (arrow).

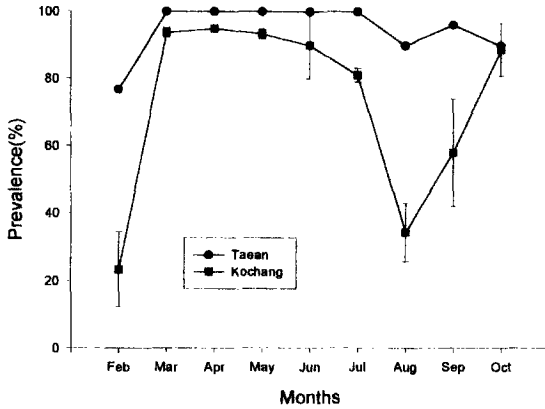


Fig. 11. Prevalence of *Perkinsus* sp. in clams from each site of the survey during February to October 1996. Means \pm S.D.

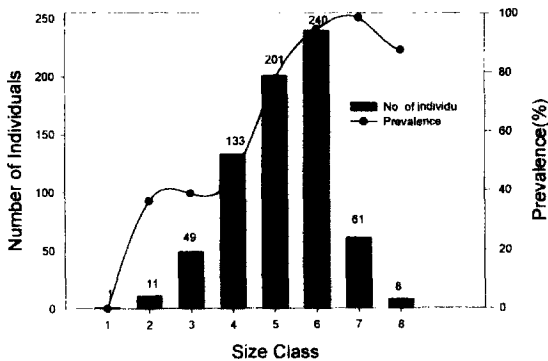


Fig. 12. Number of individuals of clams examined during 9 months survey and prevalence of *Perkinsus* sp. according to size class (1, 10-15 mm; 2, 15-20 mm; 3, 20-25 mm; 4, 25-30 mm; 5, 30-35 mm; 6, 35-40 mm; 7, 40-45 mm; 8, 45-50 mm).

20-25 mm, 25-30 mm, 30-35 mm, 35-40 mm 및 40-45 mm 바지락의 평균 감염율은 0, 36, 39, 44, 78 및 98%로 나타나 *Perkinsus* sp.의 가장 높은 감염율은 각장이 40-45 mm의 개체군에서 98%로 나타났다. 따라서 *Perkinsus* sp. 감염율은 패각의 길이 증가함에 따라 증가하는 경향이 보였다.

Fluid thiglycollate medium(FTM) 배양

Ray's FTM에 배양한 결과 영양체는 Lugol염색에 의해 흑색, 감청색 혹은 녹색으로 염색되었다(Fig. 13). 산소가 결핍된 FTM배양조건에서 영양체는 분열증식하지 않고, 영양체의 크기가 60-150

μm 로 커지면서 영양체 내부에 수백 개의 유주자를 형성하여 배출관을 통해 유주자를 배출하였다(Fig. 14).

고 찰

Perkinsus sp.의 감염은 이탈리아, 스페인, 포르투갈의 바지락 대량폐사와 밀접한 연관이 있는 것으로 보고되었으며(Da Ros and Canzonier, 1985; Chagot *et al.*, 1987; Azevedo, 1989a, b; Sagrista *et al.*, 1996), 우리나라에서도 남해안에 서식하고 있는 바지락에서 *Perkinsus*-like sp.가 검출된 바 있다(Choi and Park, 1997). 주로 바지락의 아가미, 외투막, 소화선 조직에 감염되어 심한 염증반응과 육아종을 유발하여 호흡장애와 폐사를 일으키는 것으로 알려진 *Perkinsus atlanticus*는 매우 위험한 병원균으로 간주되고 있다(Auzoux-Bordenave *et al.*, 1995). 본 연구결과에서 *Perkinsus* sp.는 주로 아가미, 외투막, 간 췌장, 소화관 등의 조직에서 심한 염증반응과 육아종의 형성 등 *Perkinsus atlanticus*에 의한 변화와 유사한 조직학적 변화가 관찰되었다. 그러나 현재까지의 보고에서는 바지락의 생식소 조직의 변화에 대한 언급을 찾아볼 수 없었으나, 본 연구 결과 *Perkinsus* sp.는 생식소 조직에 감염되어 염증성 반응을 일으켜 정상적인 바지락에 비해 생식소의 발달이 현저히 억제되는 것을 알 수 있었다. 이러한 현상은 *Perkinsus marinus*가 굴에 심하게 감염된 경우 번식을 억제하는 영향과 유사하다(Mackin, 1962; Choi *et al.*, 1989, 1993, 1994).

굴(*Crassostrea virginica*)에 기생하는 *Perkinsus marinus*의 경우 각장의 크기와 감염간의 관계는 잘 알려져 있다(Ray, 1966, 1996; Andrews, 1996). 즉, 성숙된 굴이 치패나 종패보다 현저히 감염이 용이하다는 것이다. 그러나 현재까지 바지락에 있어서는 각장의 크기와 감염율에 관한 보고는 없었다. 본 연구에서 각장의 크기와 *Perkinsus* sp.의 감염과의 관계를 분석한 결과, 각장의 크기가 증가할수록 감염율이 비례적으로 증가하는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 *Perkinsus* sp.의 감염이 모체로부터의 수직적인 감염이 아니라 주변의 감염 개체로부터 수평적인 감염에 기인하는 것으로 추

정된다. 아울러 태안과 고창의 감염율이 각기 다르며, 고창의 경우 양식장마다 차이가 있는 것은 *Perkinsus* sp.의 다중감염(multiple infection)에 기인하는 것으로 추정된다.

*Perkinsus*의 검출은 Ray(1966)의 FTM 배양에 의한 것이 일반적이지만 2주이상의 긴 시간이 소요되며, 현미경이나 여러 가지 실험 기기가 필요하다. 본 연구에서 사용한 Hemacolor kit 염색은 4-5분이 소요되며, 바지락에 감염된 영양체의 존재를 확인할 수 있기 때문에 Hemacolor kit 염색은 Ray의 FTM 배양의 단점을 보완해 신속 진단방법으로 사용이 가능할 것으로 사료된다. 그러나 Hemacolor kit 염색은 감염강도가 낮은 초기 감염의 경우 확인이 용이하지 않을 것으로 추정되므로 향후 검출감도를 높일 수 있는 방법을 개발하는 것이 필요할 것으로 사료된다.

아직까지 *Perkinsus* sp.에 대한 치료대책이나 예방방법이 알려져 있지 않기 때문에 바지락 종묘의 생산에 많은 어려움을 유발시킬 수 있을 것으로 사료된다. 현재 우리 나라의 바지락 양식방법이 자연산 치패나 종패에 의존하고 있는 실정으로 볼 때 *Perkinsus* sp.가 미감염된 지역으로 확산된다면 자연산 치패의 감소로 인하여 향후 바지락 양식의 중단 위기에 직면할 수도 있을 것으로 추정된다. 서해안과 남해안에서 양식되고 있는 바지락은 경제적으로 중요한 패류자원이며, 어민의 주요 소득원이기 때문에 향후 전 해안에 서식하고 있는 바지락에 대해 감염여부를 조사하여 미감염 지역을 보호할 수 있는 대책이 강구되어야 할 것으로 판단된다.

사 사

이 연구는 1996년 국립수산진흥원의 지원을 받아 서해수산연구소 군산분소의 수산시험연구과제(AP-01)로 수행되었음. 논문을 세심하게 다듬어주신 심사위원님께 심심한 감사를 드립니다.

참고문헌

Andrews, J. D.: History of *Perkinsus marinus*, a pathogen of oyster in Chesapeake Bay 1950-1984. J.

- Shellfish Res., 15: 13-16. 1996.
- Auzoux-Bordenave, S., Vigario, A. M., Ruano, F., Domart-Coulon, I. and Doumenc, D.: *In vitro* sporulation of the clam pathogen *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) under various environmental conditions. J. Shellfish Res., 14: 469-475. 1995
- Azevedo, C.: Fine structure of *Perkinsus atlanticus* n. sp. (Apicomplexa, Perkinsea) parasite of the clam *Ruditapes decussatus* from Portugal. J. Parasitol., 75: 627-635. 1989a.
- Azevedo, C.: *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa), a new species of parasite in the clam *Ruditapes decussatus* (Mollusca, Bivalvia). Pesca-Naveg., 93: 8-10. 1989b.
- Chagot, D., Comps, M., Boulo, V., Ruano, F. and Grizel, H.: Histological study of a cellular reaction in *Ruditapes decussatus* infected by a protozoan. Aquacul., 67: 260-261. 1987.
- Choi, K.-S., Lewis, D. H., Powell, E. N. and Ray, S. M.: Quantitative measurement of reproductive output in the American oysters, *Crassostrea virginica*, using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Aquacul. Fisheries Manag., 24: 375-398. 1993.
- Choi, K.-S., Wilson, E. A., Lewis, D. H., Powell, E. N. and Ray, S. M.: The energetic cost of *Perkinsus marinus* parasitism in oyster: quantification of the thioglycollate method. J. Shellfish Res., 8: 125-131. 1989.
- Choi, K.-S., Powell, E. N., Lewis, D. H. and Ray, S. M.: Instantaneous reproductive effort in female American oysters, *Crassostrea virginica*, measured by a new immuno-precipitation assay. Biol. Bull., 186: 41-61. 1994.
- Choi, K.-S. and Park, K.-I.: Report on the occurrence of *Perkinsus* sp. in the manila clams, *Ruditapes philippinarum* in Korea. J. Aquacul., 10: 227-237. 1997.
- Da Ros, L. and Canzonier, W. J.: *Perkinsus*, a protistan threat to bivalve culture in the Mediterranean basin. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol., 5: 23-24. 1985.
- Levine, N. D.: *Perkinsus* gen. n. and other new taxa in the protozoan phylum Apicomplexa. J. Parasitol., 64: 549. 1978.
- Mackin, J. G.: Oyster disease caused by *Dermocystidium marinum* and other microorganisms in Louisiana. Publ. Inst. Mar. Sci. Univ. Texas 7: 132-229. 1962.
- Noel, T., Aubree, E., Blateau, D., Mialhe, E. and Grizel, H.: Treatments against the *Vibrio* P1,

- suspected to be responsible for mortalities in *Tapes philippinarum*. *Aquacul.*, 107: 171-174. 1992.
- Noel, T., Boulo, V., Mialhe, E. and Nicolas, J. L.: Diagnosis of the Brown ring diseases in *Tapes philippinarum* with monoclonal antibodies. *European Aquaculture Society Special Publication*, 14: 234. 1991.
- Paillard C. and P. Maes: Etiologia de la maladie de lanneau brun chez *Tapes philippinarum*: pathogenecite dun *Vibrio* sp. *C. R. Acad. Sci. Paris*, t. 310, Serie III., 15-20. 1990
- Ray, S. M.: Histological perspective on *Perkinsus marinus* disease of oyster in the Gulf of Mexico. *J. Shellfish Res.*, 15: 9-12. 1996.
- Ray, S. M.: A review of the culture method for detecting *Dermocystidium marinum*, with suggested modifications and precautions. *Proc. Nat. Shellfish. Assoc.*, 54: 55-69. 1966.
- Sagrasta, E., M. Durfort and C. Azevedo: Ultrastructural data on the life cycle of the parasite, *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa), on the clam, *Ruditapes philippinarum*, in the Mediterranean. *Sci. Mar. Barc.*, 60: 283-288. 1996.

Infection and Rapid Detection of *Perkinsus* sp. in Cultured Babyneck Clam, *Ruditapes philippinarum* from Western Coast of Korea

Dong-Lim Choi, Jung-No Kwon and Sung-Woo Park*

Kunsan Laboratory, West Sea Fisheries Research Institute, NFRDI, Kunsan 573-030

*Department of Fish Pathology, College of Ocean Science & Technology,

Kunsan National University, Kunsan, 573-400, Korea

An apicomplexan parasite, *Perkinsus* sp. was observed from the cultured baby clams, *Ruditapes philippinarum*, collected from the coast of Kochang and Taean (South Korea), where it caused seasonal mortality of clams. Several milky-white cysts were observed on the surface of gill and visceral mass of parasitised clams. The trophozoites of parasite had eccentric nucleus and proliferated by schizogony in gill, mantle, hepatopancrease and reproductive tissues, resulting in the formation of granuloma and the intensive infiltration of hemocytes in the tissues. During incubation in FTM, trophozoites increased in size, resulting in prezoosporangia which appeared as round black spheres when colored with Lugol's iodine solution. The prevalence of *Perkinsus* sp. in clams was Kochang, 73.1%; Taean, 94.8% (during 9-mo. survey) and showed size-dependent infection. Hemacolor kit was useful to reduce time for diagnosis of the trophozoite of *Perkinsus* sp. that has been responsible of massive mortalities in the clam.

Key words: Babyneck clam, *Ruditapes philippinarum*, Histology: Hemacolor stain, Rays FTM, *Perkinsus* sp.