한국어병학회지 제 14 권 제 1 호 (2001)
J. Fish Pathol., 14(1) : 11~15 (2001)

White Spot Baculovirus(WSBV) 미감염 새우(*Penaeus chinensis, Penaeus japonicus*) 종묘 생산

허문수† · 손상규* · 김종식**
제주대학교 해양생산과학부, *국립수산진흥원 진해내수면연구소,
**국립수산진흥원 군산분소

Production of Healthy Shrimp (*Penaeus chinensis, Penaeus japonicus*) Seedling Free from White Spot Baculovirus(WSBV)

Moon-Soo Heo†, Sang-Gyu Sohn* and Jong-Sik Kim**
Faculty of Applied Marine Science, Cheju National University, Cheju 690-756,
**Chinhae Regional Inland Fisheries Research Institute, NFDRI, Chinhae 645-250,*
***Kunsan Laboratory, West Sea Fisheries Research Institute, NFRDI, Kunsan 573-030*

For the production of healthy shrimp(*Penaeus chinensis, Penaeus japonicus*) seedlings free from the white spot baculovirus(WSBV), we tried to disinfect shrimp eggs with iodine. A relative hatching rate of over 50% has resulted from the treatments of fertilized eggs of fresh shrimps(*P. chinensis*) with an effective povidon-iodine concentration of 20-200 ppm for 30 seconds and 60 seconds, respectively. The 60 sec treatment group with a 20 ppm effective povidon-iodine concentration showed nearly a 50% relative hatching rate. The over 50 ppm treatment group, however, did not result in hatching show a relative hatching rate. These hatching rates were similar to those in the fertilized eggs of kuruma prawns treated with povidon-iodine solutions. In case of washing fertilized eggs with UV-irradiated seawater 33.3% relative hatching rate in fresh shrimps was much lower than 55.2% in kuruma shrimps. Treatment fertilized eggs of 2 species of shrimp with 200 ppm iodine for 30 sec did not affect the survival rate of the larvae until the early stage of the post larvae even though the hatching rates were low. In order to produce healthy shrimp seedlings non-infected by WSBV, the shrimp eggs should be washed with UV-irradated seawater and sterilized with a low povidon-iodine concentration for a short time.

Key word : Iodine disinfection, Hatching rate, Eggs washing, WSBV

우리나라 새우 양식장에서 1993년도부터 매년 발병하여 양식산 새우를 대량폐사 시키고 있는 WSBV 질병은 방역대책기술이 시급히 개발되어야 하나, 바이러스 질병은 특성상 바이러스에 감염된 후에는 적절한 치료대책이 없기 때문에 바이러스 질병은 사전에 예방하거나 사육환경을 개선하든지 면역증강제를 투여하여 양식 생물의 항병력을 증대시켜 바이러스 감염으로 인한 피해를 최소화시키는 것이 실질적인 방역 대책이 될 수 있다(허, 1997, 前田, 1997). 바이러스 질병 감염을 사전에 예방하는 방법으로서는 바이러스를 보균한 모하로부터 바이러스에 감염되지 않은 건강한 새우종묘를 생산하여 양식하여야 하고, 또는 바이러스를 보균한 서식생물(Lo *et al.*, 1997)이 서식하고 있는 양식장에 대해서는 양식장을 잘 건조시킨 후 일광소독과 염소소독을 하여 서식생물을 철저히 박멸하여야 한다(挑山, 1989). 그리고 양식생물의 항병력을 증대시키는 방법으로서는 새우 사육밀도를 줄이고 수질 및 저질이 악화되지 않도록 사육수의 환수량을 증대시켜 사육 환경을 개선하고 새우의 영양을 강화시켜야 한다. 양식새우의 WSBV에 대한 방역법으로 채란용 모하의 WSBV 보유의 유무 및 감염 경로의 파악과 난의 소독(Watanabe *et al.*, 1998), 사육 용수의 살균, 사육시설의 소독 등을 통한 본 바이러스 병원체의 침입경로의 차단 등도 고려할수 있다. 본 연구에서는 난의 요오드 소독(Batts *et al.*, 1991)을 통한 WSBV 미감염 종묘를 생산하기 위한 요오드의 유효한 처리농도 및

†Corresponding Author

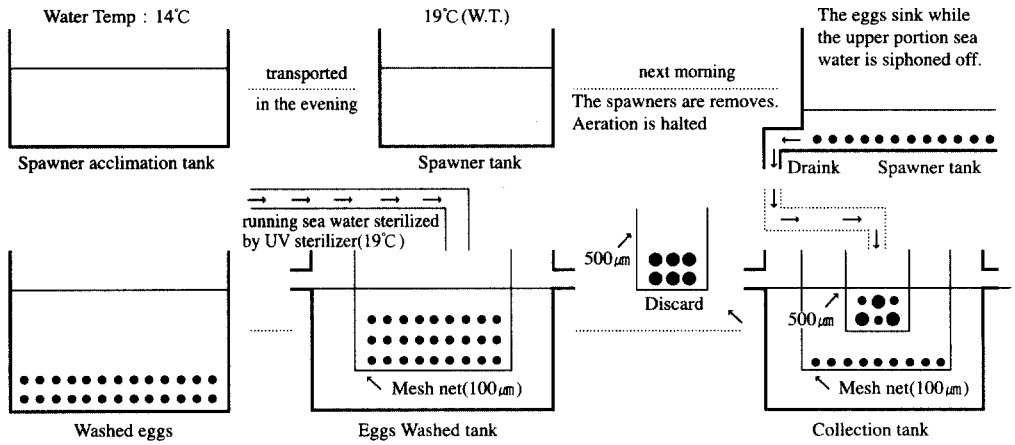

Fig. 1. General procedure for collecting of shrimp eggs prior to incubation.

WSBV 미감염 대하 종묘의 대량 생산을 위한 조건을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

대하와 보리새우

시험에 사용된 보리 새우와 대하 모하는 1997년 5~6월 사이에 전남 영광 및 충남 태안 앞바다에서 걸그물로 어획한 모하중 비교적 생식소가 발달한 암컷만 선별하여 활어차로 운반한 후, 자연수온에서 강한 폭기(aeration)와 함께 약 6시간 정도 대하 모하 안정용 수조에 수용하였다가 채란에 이용하였으며 크기는 전장 19~24 ㎝(평균전장 22.6㎝), 체중 45~80g(평균체중 65.5g)이었다. 난소 성숙상태는 초기구입 모하의 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. 보리새우 모하는 대하에 준하여 실험하였고 전장과 중량은 대하 모하와 거의 같았다.

산란유발, 수정란 수집 및 세란

안정용 수조에서 안정시킨 대하 모하중 활력이 좋은 개체를 선별, 저녁시간에 19℃로 조절된 채란용 1.5톤 F.R.P. 수조로 이동 수용하여 수온 상승자극(14℃→19℃)으로 산란을 유도하였으며, 모하의 수용밀도는 각 수조당 20마리씩으로 하였고 시험에 사용된 해수는 모두 해수용 필터(pore size 1㎛)를 통해서 3회 여과시킨 후, 자외선 유수 살균기로 살균하여 사용하였다. 방란이 완료된 다음날 채란용 수조에서 대하 모하를 제거하고 폭기를 중지시킨 후, 난을 가라 앉히고 상등액을 배수하였다. 침지된 수조의 배수구를 통하여 채란틀로 옮기고 먼저 망목 크기 500 ㎛인 망(net)을 통과시킨 후, 다시 100 ㎛의 채집망을 사용하여 수거하였으며, 수거된 난은 채란용 수조와 동일한 수온으로 조절된 자외선 살균해수를 유수시키면서 1~2분간 세란하여 시료로 이용하였다(Fig. 1). 세란을 실시하지 않은 대조구와 세란을 실시한 시험구의 일부 수정란을 수거하여 세란에 의한 소독효과를 조사하였다. 보리새우 모하는 대하 모하에 준하여 실험을 하였다.

수정란 소독

수집, 세란의 과정을 거친 수정란은 소독액 침지 직전, 자외선 살균 해수로 1회반복 세척하고 소독액에 일정시간 침지후 다시 흐르는 자외선 살균해수에 2분간 세란한 후 배양에 사용하였다. 소독약제로는 포비돈 요오드 용액을 사용하였고 이 용액을 살균 여과 해수로 희석하여 유효 요오드 농도 20~200 ppm의 용액에서 10~60초간 침지하여 소독을 실시하였다. 시험에 이용된 대하 모하는 방란을 마친 후 모두 수거하여 -70℃의 냉동고에 보관하였다가 바이러스 감염 조사용으로 사용하였다.

부화율 및 생존율 조사

부화율은 유효수량 10 ℓ 의 PVC 수조에 수조당

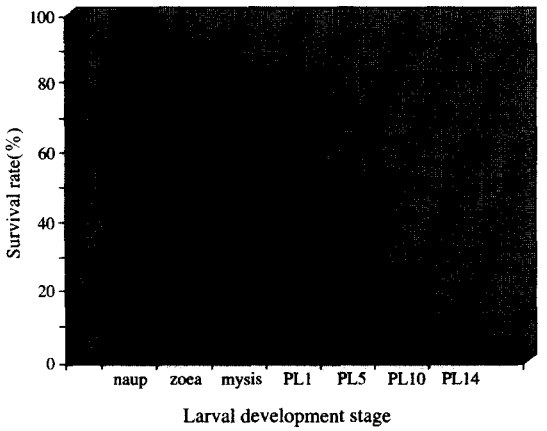

Fig. 2. Survival rate of shrimp larvae in different growth stages.

약 5,000개의 소독 처리된 수정란을 수용하고, 수온 19℃에서 48시간 배양후 현미경 검경으로 계수하여 조사하였다.

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

(여기에서 N=부화된 Nauplii 수, E=미부화한 수)

사육 기간 동안의 생존율은 표본 추출에 의한 방법으로 전체량을 추정하였으며, 유생 발달 단계별로 조사하였다.

소독효과 조사

세란을 실시하지 않은 대조구와 세란 및 소독을 실시한 시험구의 일부 수정란을 수거하여 난의 소독 효과는 Kimura et al(1995)이 WSBV의 감염 확인을 위해 사용한 연쇄효소중합반응(PCR)을 통하여 바이러스 감염여부를 확인하였다.

소형 및 대형수조 시험

소형수조 시험에서는 세란을 실시하지 않은 대조구, 세란만 실시한 처리구 및 요오드 농도 50, 100, 200ppm에서 30초간 소독처리 후 유효수량 1.5톤 F.R.P. 수조에 수용하고 배양하면서, 사육수가 25℃가 될 때까지 매일 1℃씩 사육 수온을 상승시키고 일정한 간격으로 바이러스 검사용 시료를 채취하였다. 대형 수조 시험에서는 수정란을 유효농도 200ppm의 요오드 용액에 30초간 소독을 실시한 후, 50톤 규모의 콘크리트 수조에 수용하여 사육하였으며 부화 유생 및 치하 사육은 일반적인 종묘 양산 방법에 의거하여 실시하였고, 포스트라바 유생기에 시료를 채취하여 소독을 실시하지 않은 대조구의 종묘와 함께 바이러스 보균여부를 조사하였다.

Table 1. Hatching rate of fertilized eggs of freshy shrimp (*Penaeus chinensis*) by iodine disinfection

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

Hatching rate in control eggs washed by water is 33%.

Table 2. Hatching rate of fertilized eggs of freshy shrimp (*Penaeus japonicus*) by iodine

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

Hatching rate in control eggs washed by water is 55.2%.

결과 및 고찰

부화율

대하의 수정난을 유효 오오드농도 20, 50, 100, 200 ppm에서 각각 30, 60초간 소독을 실시한 결과 각 농도의 30초 처리구에서는 50%이상의 상대 부화율(relative hathing rate)을 보인 반면, 60초 처리구에서는 20 ppm 처리구에서만 약 50%의 상대 부화율을 보일 뿐, 50 ppm 이상의 농도에서는 부화율 1% 미만으로 거의 부화되지 않았다(Table 1). 보리새우를 이용한 비교 실험에서는 요오드 농도 20, 50, 100 ppm의 농도에서 10, 30, 60초간 소독 처리한 결과 20 ppm 처리구를 제외한 50, 100 ppm의 농도에서 10, 30, 60초 처리구 모두 전혀 부화하지 않았고, 20 ppm에서 10초간 실시한 처리구에서만 부화율에 미치는 요오드 용액의 영향이 적었고, 50 ppm 처리구는 약 50%, 100 ppm 처리구에서는 약

80%의 현저한 부화율 억제 효과가 나타났다(Table 2). 이는 Sano and Momoyama(1992)가 보리새우의 수정난이 요오드농도 25 ppm에서 Baculovirus에 소독 효과가 있다는 것과 거의 일치함을 보여주었고, 고농도의 소독에서는 부화율에 큰 영향을 미치는 것으로 여겨진다. 이러한 결과로 미루어 보아 대하나 보리새우 모두 수정난의 소독에 사용하는 소독 약제의 농도가 높을수록 처리 시간이 길수록 부화율은 현저히 낮아지나, 특히 소독약제의 농도보다 처리 시간이 길어질 경우 부화율이 현저히 저하되는 것으로 나타났다. 그러나 대하의 경우 세란만 실시한 대조구의 부화율이 33.3%, 보리 새우는 대조구의 부화율이 55.2%로 단순비교는 어렵지만 대하의 경우 부화율이 낮은 것은 수정란의 수거 및 세란과정에서 오는 조작 및 충격에 의한 난의 손상이 많은 반면, 보리 새우는 수거 및 소독 과정의 물리적인 영향보다는 소독 약제에 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, 보리 새우의 경우 소독 약제의 종류에 관한 더 많은 연구가 필요한 것으로 생각된다.

생존율

소형 수조 시험에서는 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 보리 새우의 경우, 후기산 어미새우에서 채란한 수정란의 부화율 및 초기 생육이 부진한 것으로 알려져 있으며, 소형 수조 시험의 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 nauplius 유생에서 zoea 유생으로 변태하는 과정에서 다량의 감모가 발생하였으며, 이후 mysis 유생으로 변태하지 못하고 전량 폐사하였다. 따라서 특별히 소독을 실시하여 유생 사육을 할 경우 수정란질이 우수한 시기를 선택하여 채란하는 것도 매우 주요한 요인이 될 것으로 생각된다.대형 수조 시험에서는 요오드 처리에 따른 대하 수정란의 부화율 변화 조사결과를 토대로 유효 요오드 농도 200 ppm에서 30초간 수정란을 소독 처리하였다. 총 8,000천개의 수정란을 채란하였고, 1,000천마리의 nauplius 유생이 부화하여 부화율 12.5%였다. postlarva 1기 유생까지 800천마리가 생존하여 매우 높은 생존율을 보였으나 이후 계속 감모가 발생하여 수확기인 postlarva 14기에는 100천마리가 생존하여 생존율이 10%였다(Fig. 2). 이러한 결과로 미루어 보아 수정란의 소독으로 부화율은 낮아지지만 수정란 소독후 부화한 유생은 초기생잔에는 문제점이 없는 것으로 나타났다.

소독효과조사

소독 효과 조사를 확인하기 위해 산란용 대하 모하 50미에 대한 WSBV 보균 조사를 PCR법으로 검사한 결과 바이러스 보균율이 35%였으며, 이들 모하로부터 채란한 수정난을 자외선 살균해수로 세척한 후 요오드 용액 200 ppm으로 30초간 소독한 시험구의 대하 치하(PL 14기)에서는 바이러스가 검출되지 않았으나, 수정난을 세척과 소독하지 않은 대조구의 대하 치하(PL 14기)에서는 바이러스가 검출되었다. 따라서 WSBV에 감염된 대하 모하로부터 바이러스에 미감염된 건강 새우 종묘를 생산하기 위해서는 반드시 수정난을 세척하고 요오드로 소독해야 하지만 요오드 용액으로 소독한 시험구에서는 부화율이 현저히 낮아지기 때문에 부화율이 높으면서 소독효과가 명확한 효과적인 소독방법에 관한 연구가 추후 수행되어야 할 것이다.

요 약

White Spot Baculovirus(WSBV) 미감염 새우 건강 종묘를 생산하기 위하여 난의 요오드 소독을 실시하였다. 유효 요오드농도 20, 50, 100, 200 ppm에서 각 시험구의 대하(*Penaeus chinensis*) 수정난을 각각 30, 60초 처리한 결과 각 농도의 30초 처리구에서는 50%이상의 상대부화율을 보였고, 60초 처리구에서는 20 ppm 처리구에서만 약 50% 상대 부화율을 보인 반면 50 ppm이상에서는 부화율이 거의 없었다. 보리새우(*Penaeus japoni cus*)에서도 비

슷한 결과를 보였다. 대하의 경우 세란만 실시한 대조구의 부화율은 33.3%이었지만, 보리새우는 55.2%로 상대적으로 높았다. 부화후 생존율을 보면 수정난의 소독으로 부화율은 낮아지지만 수정란 소독후 부화된 유생은 초기생육에는 문제점이 없었다. WSBV 미감염 건강종묘를 생산하기 위해서는 수정난을 세척하고 저농도의 요오드를 짧은 시간에 소독해야 한다.

사 사

과제는 1996년도 농림수산부에서 시행한 현장애로과제의 연구비 지원으로 수행되었으므로 감사의 마음을 전합니다.

참고문헌

Batts, W., M. Landolt and J.R Winton. : Inactivation of infectious heamatopoetic necrosis virus by low levels of iodine. Appl. Environ. Microbiol., 57 : 1379-1385, 1991.

Kimura., T. H. Nakano, K. Yamano and K. Inouye. : Purification of the rod shaped nuclear virus(RV-PJ) from kuruma shrimp, Penaeus japonicus. Fish Pathol., 30(4) : 287-288, 1995.

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. : White spot syndrome(WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. Dis. Aquat. Org., 29 : 205-211, 1997.

Sano, T and K. Momoyama. : Baculovirus infection of Penaeid shrimp in Japan. The Ocean Institute, 169-174, 1992.

Watanebe, K and M. Yoshimizu. : Disinfection of equip ments for aquaculture and fertilized eggs by ozonated seawater. Fish Pathol., 33(3) : 145-146, 1998

挑山和夫. : 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, 1989.

挑山和夫. : 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, 1989.

前田 稔. : 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, 1997.

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