

모노퍼설페이트 화합물의 *Vibrio harveyi*에 대한 살균력 및 흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*)에서의 독성

민정란 · 나광¹ · 정현진¹ · 정상희*

호서대학교 임상병리학과, ¹바이오펜코리아 동물의학사업부

Bactericidal Efficacy of a Monopersulfate Compound against *Vibrio harveyi* and Toxicity to *Litopenaeus vannamei*

Jeong-Ran Min, Kwang Na¹, HyunJin Chong¹ and Sang-Hee Jeong*

Department of Biomedical Laboratory Science, Hoseo University, Aasan 31499, Korea

¹Animal Health, Bayer Korea, Seoul 07071, Korea

Vibrio harveyi is one of the most serious pathogens causing vibriosis in larval and grow-out shrimp culture. This study was performed to investigate the bactericidal effect of a monopersulfate compound against *V. harveyi* and its toxicity in *Litopenaeus vannamei*. The monopersulfate compound was prepared at 0, 0.15, 0.3, 0.6, 1.2, and 2.4 ppm for the bactericidal efficacy study, and then *V. harveyi* was added at a rate of 1×10^6 CFU/mL. Subsequently, five shrimps/dose were added to the water bath. The other groups of shrimp were exposed to monopersulfate, but not to the bacterium. None of the shrimps exposed to any of the monopersulfate treatment doses without bacteria died, and no changes in their movement were detected for 7 days. However, shrimps exposed to bacteria without monopersulfate showed decreased movement and lethargy, but no death. The total number of other bacteria and *V. harveyi* at the different concentrations decreased significantly by 4-6 log values compared to that in the bacterial control group. The monopersulfate compound completely inhibited *V. harveyi* growth beginning 1 h after exposure to 2.4 ppm. These results show that the monopersulfate compound is an efficient disinfectant against naturally occurring marine bacteria and *V. harveyi* without being toxic to shrimp.

Key words: *Vibrio harveyi*, Monopersulfate, Disinfectant effect, Shrimp, *Litopenaeus vannamei*

서론

수산양식은 빠르게 성장하는 식품 생산 산업의 하나이며 2014년 기준 우리나라 양식수산물 생산량은 약 157만톤으로 전체 어업생산량 대비 3.4%를 차지하며 생산액으로 비교하면 전체 어업생산액 중 13.0%를 차지하고 있다(통계청, 2015). 국내 수산양식 산업 중 새우 양식산업은 1990년대에 보리새우(*Marsupenaeus japonicus*)를 중심으로 급속히 성장하였으나 흰반점병(White Spot Disease, WSD) 등의 전염병으로 성장이 주춤하다가 2006년부터 상대적으로 질병에 대한 저항성이 좋은 흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*)를 양식하기 시작하여, 현재 새우양식의 대부분을 차지하고 있다(Jang et al., 2007). 전세계적

으로도 새우 양식 생산은 매년 16.8%의 성장률을 보이고 있다(Subnutith et al., 2008, Janarthanam et al., 2012). 그러나 세균 또는 바이러스 감염에 의한 질병 발생, 부적절한 사육 환경 등은 새우 양식을 어렵게 하는 주요 요인이며(Pattamarat et al., 2010) 특히, 새우에서 세균 감염증 중 비브리오 감염증은 아시아 국가들의 새우 양식장에서 큰 문제를 유발하고 있으며, 이로 인한 세계 경제적 손실액은 약 3억달러로 추정되고 있다(Janarthanam et al., 2012). 새우양식은 높은 생산성을 확보하기 위하여 밀집양식이 이루어지고 있는데 이는 필연적으로 질병의 발생과 전파를 초래한다. 비브리오균은 다양한 해양생물에서 병원성이 강한 병원체로 인식되고 있으며, 이중 *Vibrio harveyi*는 toxR gene, haemolysin gene 등의 독력 발현 유전자를 가지고

<http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2015.0661>



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Korean J Fish Aquat Sci 48(5) 661-667 October 2015

Received 17 August 2015; Revised 19 October 2015; Accepted 22 October 2015

*Corresponding author: Tel: +82. 41. 540. 9675 Fax: +82. 51. 540. 9829

E-mail address: jeongsh@hoseo.edu

있으며, 새우의 larva 또는 postlarva 시기에 감염되어 100% 폐사를 유발하고, 새우의 간췌장에서 가장 빈번하게 검출되고 있다(Gopal et al., 2005, Ruwandepika et al., 2010, Saori et al., 2011, Soto-Rodriguez et al., 2012). Jung et al. (2012)은 2007-2010년 하절기 국내 새우 양식장의 새우 2,413마리에 대하여 세균 및 기생충 감염 현황을 조사한 결과 병원체 감염율이 15.5-61.8%이었으며, *Vibrio* sp. 감염률은 5.2-30%로 나타났음을 보고하였다. 현재, 새우 양식장에서 비브리오 감염증을 효과적으로 관리하기 위하여 수질 관리, 양성 수조의 염도 저감화, 새우에 대한 스트레스 감소, 항생제 또는 소독제 사용, 프로바이오틱 사용을 행하고 있다(Kulwadee et al., 2011). 소독제로 사용되고 있는 모노퍼설페이트 화합물(monopersulfate compound)은 세균 세포질의 단백질과 다른 구성성분들의 산화를 통한 효소 시스템의 억제와 세포벽 견고성을 손실시켜 살균 작용을 나타내는 산화제 계열 화합물질로 수산양식에서 *Vibrio anguillarum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio splendidus*, *Vibrio parahaemolyticus* *Aeromonas hydrophyla* sub sp. 등의 세균에 대하여 최소억제농도가 25.6-51.2 mg/L 로서 우수한 항균효과가 있음이 보고되는 등(Wang et al., 2008) 수산양식에서의 유효 소독제로 소개되고 있다. 그러나 비브리오균에 대한 유효 항균농도에서의 모노퍼설페이트 화합물이 새우에 미치는 독성에 대한 자료는 부족한 실정이다. 이에 본 연구에서는 국내 대량으로 양식되는 흰다리새우에서 문제가 되는 *Vibrio harveyi*에 대한 모노퍼설페이트 화합물의 살균효과와 이의 유효농도에서 흰다리새우에 대한 독성을 확인하고자 수행하였다.

재료 및 방법

새우 사육 관리

본 연구에 사용된 흰다리새우는 충남 당진에 위치하고 있는 양식장에서 공급받아 사용하였다. 흰다리새우 사육에 필요한 해수는 자외선 살균 처리 여과수(R/O 수, carbon/micro filter로 1차 정제 후 R/O membrane로 2차 정제하여 자외선 살균 처리한 음수)에 해수염(Red Sea Salt, Red Sea사)으로 염도 18-19 psu로 제조하여 만든 해수와 양식장에서 제공받은 해수를 혼합하여 사용하였다. 이렇게 준비한 해수에 2개월령(7-8 g)의 흰다리새우 5마리씩을 산소 발생장치가 장착된 26×42×18 cm의 사각 사육수조에서 사육하였으며, 사육온도는 26-28℃로 유지하였다.

Monopersulfate 화합물 처리 농도

Monopersulfate compound (50.69% w/w)를 함유하는 버콘아쿠아틱(Virkon® Aquatic)제품을 바이엘코리아(주)(서울, 한국)로부터 제공받아 본 연구에 사용하였다. Monopersulfate 화합물의 살균 효과를 확인하기 위한 시험균의 구성은 Table 1과 같이 설정하였다. Monopersulfate 화합물의 희석은 살균

효력시험에 들어가기 1시간 전에 준비하였으며, 10 L 해수에 monopersulfate 화합물 0, 0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 2.4 ppm (버콘아쿠아틱 제품으로서 0, 0.3, 0.6, 1.2, 2.4, 4.8 ppm)이 되도록 첨가하였다.

사용 균주 및 배양

본 연구에 사용된 *Vibrio harveyi* (FP8370)는 국립수산과학원에서 분양 받아 사용하였다. *Vibrio harveyi*의 증균은 1.5% NaCl이 첨가된 Trypticase Soy Agar (TSA, Difco)에 접종하여 30℃ 배양기에서 18-24 시간 배양 한 후 4-5개의 단일 콜로니를 취하여 1.5% NaCl이 함유된 Tryptic soy broth (TSB, Difco)에 넣어 30℃ 진탕배양기(100 rpm)에서 18-24시간 배양하였다. 증균 배양된 세균은 Whatman No 2 filter paper로 여과한 해수를 이용하여 세척하였다. 즉, 증균 배양된 *Vibrio harveyi*를 원심분리(3,000 rpm, 10 min)한 후 상층액을 제거하고, 균체를 해수로 재부유 시켰으며, 이 과정을 3회 반복하였다. 마지막 세척 후 균체를 해수로 현탁 한 후 *Vibrio harveyi*의 균수를 MacFarland No 0.5로 조정하였다.

Virulence gene 확인

본 연구에서 사용된 *Vibrio harveyi*의 virulence gene을 확인하기 위하여 세균 배양 후 DNA 추출 kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 Genomic DNA를 추출하였다. toxR gene과 haemolysin gene의 발현을 확인하기 위한 primer는 Table 2에 제시하였다.

*Vibrio harveyi*로부터 추출한 DNA 2 µL, forward primer 및 reverse primer (20 pmol/µL) 각 1 µL를 16 µL의 PCR 반응액(H₂O 9.8 µL, 10× PCR buffer 2 µL, 10 mM dNTPs 2 µL, 20 mM MgCl₂ 2 µL, Hotstart polymerase 0.2 µL) (GeneAll Biotechnology, Korea)에 첨가하여 혼합한 후, 94℃에서 10분간 변성시킨 후 94℃에서 1분, 55℃ (haemolysin gene)/53℃ (toxR gene)에서 1분, 72℃에서 1분의 조건으로 30 cycles 수행한 후 72℃에서 10분간 신장하였다.

Table 1. Experimental design for the determination of the bactericidal effect of monopersulfate compound (Virkon® Aquatic)

Treatment Condition	Contents according to treatment condition		
	Sea Water	Monopersulfate compound	Bacteria
Monopersulfate treatment	+ ¹	+	+
Bacterial control	+	- ²	+
Sea Water control	+	-	-
Monopersulfate compound toxicity	+	+	-

¹ The letter indicates presence. ² The letter indicates absence.

Table 2. Nucleotide sequences of primers for amplification of the virulence genes in *Vibrio harveyi*

Target gene	Primer	Nucleotide sequences (5'→3')	Product size(bp)	Reference
Tox R gene	toxRF1	GAA GCA GCA CTC ACC GAT	382	Pang et al. (2006)
	toxRR1	GGT GAA GAC TCA TCA GCA		
Hemolysin gene	VHF1	ATC ATG AAT AAAACT ATT ACG TTA CT	308	Mia and Cynthia (2004)
	VhemoR	GCT TGA TAA CAC TTT GCG GT		

hpi; hours post-inoculation

**Vibrio harveyi* 1×10⁶ CFU/mL, all shrimps were in lethargy and showing no response to outside stimulus.

PCR 증폭산물을 1.5% agarose gel에 전기 영동하여 UV illuminator 상에서 특이적인 증폭산물을 확인하였다.

Luminescence 발현 확인

공시하는 *Vibrio harveyi* 균이 발광성을 띠는 균이지 확인하기 위하여 1.5% NaCl이 첨가된 TSB 배지에 균을 접종한 후 30℃ 배양기에서 24시간 배양한 후 균 현탁액을 TSB에 2배 희석하여 96 well plate에 200 µL씩 넣고, TSB 배지를 blank로 하여 Glomax multi detection system (Promega, USA)으로 발광량을 측정하였다.

살균효과 시험 - 총균수 및 *Vibrio harveyi* 균수 측정

Monopersulfate 화합물의 *Vibrio harveyi*에 대한 살균효과를 확인하기 위하여 국립수산물품질관리원 고시(제 2013-13호, 2015.05.20) 소독제 효력시험지침을 기본으로 하되 변형하여 살균효능 시험을 실시하였다. 즉, 해수 10 L에 monopersulfate 화합물 0, 0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 2.4 ppm (버코아쿠아텍 제품으로서 각각 0, 0.3, 0.6, 1.2, 2.4, 4.8 ppm) 농도로 처리하고, MacFarland No 0.5로 조정된 *Vibrio harveyi*를 1×10⁶ CFU/mL이 되도록 첨가한 후 30분간 반응시켰으며, 10분마다 혼합하였다. Monopersulfate 화합물과 비브리오균의 반응이 있는 후 30분 후에 새우 5마리를 각각의 수조에 넣고 3일간 새우의 상태 및 생존 유무를 확인하였다. 해수 중 *Vibrio harveyi*의 감소여부를 확인하기 위하여 monopersulfate 화합물 처리 후 1시간, 6시간, 24 시간째에 일정량의 해수를 취하여 멸균 PBS로 10배 계단 희석한 후 Thiosulfate Citrate Bile Salt Agar (TCBS agar, Difco)에 도말하여 30℃ 배양기에서 18-24 h 배양한 후 집락수를 측정하였다. 총 세균수 측정은 TSA에 도말하여 측정하였다.

새우에 대한 독성시험

Monopersulfate 화합물의 흰다리새우에 대한 독성을 확인하기 위하여 해수 10 L에 monopersulfate 화합물 0, 0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 2.4 ppm (버코아쿠아텍 제품으로서 각각 0, 0.3, 0.6, 1.2, 2.4, 4.8 ppm) 농도로 처리하고 새우 5마리를 각각의 수조에 넣고 7일간 새우의 상태 및 생존유무를 조사하였다.

통계처리

실험 결과는 평균과 표준편차(mean ± S.D)로 나타내었으며,

각 실험군의 유의성은 STATISTICA (DELL Software, USA) 프로그램을 이용하여 ANOVA test와 Duncan's multiple range test (P<0.05)로 분석하였다.

결과 및 고찰

Monopersulfate compound가 새우의 질병 원인체인 *Vibrio harveyi*에 대한 살균 소독효과 및 흰다리새우에 대한 독성을 확인하기 위하여 시험을 수행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

*Vibrio harveyi*의 virulence gene 확인

본 연구에 사용된 *Vibrio harveyi*는 haemolysin gene과 toxR gene을 모두 함유하는 것으로 확인되었다(Fig. 1). *Vibrio harveyi*는 다양한 병원성 인자를 가지고 있으며 이에는 caseinase, gelatinase, phospholipase, lipase, haemolysin, cystein protease 등이 보고되어 있다(Liu et al., 1996). 이중 toxR은 trans-membrane 전사 조절인자로서 비브리오균에서 다른 병원성 유전자의 조절에 매우 중요한 역할을 하며 *Vibrio harveyi* 외에

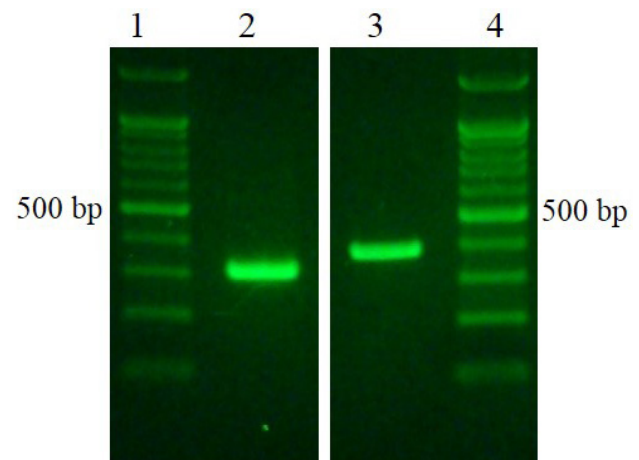


Fig. 1. PCR amplified fragment of the hemolysin gene and toxR gene of *Vibrio harveyi* obtained using different primers. Lane 2 contains the hemolysin gene. Lane 3 contains the toxR gene. Lane 1 and 4 contain the 100 bp DNA ladder

Vibrio cholera, *Vibrio paraheamolyticus* 등에서도 발견되는 것으로 보고되어 있다(Lin et al., 1993, Miller and Mekalanos, 1988). Haemolysin인자는 용혈과 세포분해를 유발하는 중요한 병원성 인자로서 *Vibrio harveyi* 외에 *Vibrio cholera*, *Vibrio paraheamolyticus* 등에서도 확인되고 있어 수평적 유전자 전달(horizontal gene transfer)이 *Vibrio* 균속간에 이루어지고 있음을 알 수 있다(Ruwandeeepika et al., 2010). 본 연구에서 공시한 *Vibrio harveyi*는 비브리오 균의 균력을 대표하는 *toxR* 유전자와 haemolysin 유전자가 확인되었으며 이는 새우에서 병원성이 크음을 의미한다.

Luminescence 확인

배양 된 분리 균주를 Glomax multi detection system (Promega, USA)으로 발광량을 측정된 결과, 100-200 cpm 정도로 균을 접종하지 않은 TSB 배지와 유사한 값을 나타내어 luminescence 가 감지되지 않는 것으로 판정하였다. Defoirdt et al. (2008)는 비록 많은 *Vibrio harveyi*가 발광성을 띠는 것으로 알려져 있지만 그 발광성 정도는 균주간에 차이가 크고 발광성을 보이지 않는 균주도 있음을 보고하였으며 발광성을 띠지 않는 *Vibrio harveyi*가 높은 용혈성을 보이는 등 발광성 세기나 발광성을 띠는지 여부와 병원성간에는 상관성이 없음을 보고하였다. 균주별로 발광성에 있어 차이가 나타나는 원인은 아직까지 명확히 규명되지는 않았지만 발광성을 보이지 않는 균주는 *lux operon* 이나 quorum sensing signal transduction과 같은 발광조절인자 유전자에 결손이 발생한 것으로 추측되고 있다(Defoirdt et al., 2005). 본 연구에 공시한 *Vibrio harveyi*는 *toxR* 유전자나 haemolysin 유전자는 발견되나 발광성이 감지되지 않는 균주이었다.

Monopersulfate 화합물과 비브리오균 동시노출이 새우 생존율에 미치는 영향

Monopersulfate 화합물이 0, 0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 2.4 ppm의 농도로 처리 된 해수에 *Vibrio harveyi*를 첨가하여 30분간 monopersulfate 화합물과 반응시킨 후 새우 5마리씩을 각각의 수조에 넣고 3일간 생존유무를 관찰한 결과, 모든 시험군에서 폐사한 새우는 관찰되지 않았다. 다만 *Vibrio harveyi*만 처리 된 병원체 대조군에서는 새우의 활력이 현저히 감소하는 것이 관찰되었다(Table 3). 이를 통하여 monopersulfate 화합물은 최고 2.4 ppm까지 투여하여도 새우에는 이상을 야기하지 않음을 알 수 있으며 *Vibrio harveyi*를 1×10^6 CFU/mL의 농도로 해수를 통하여 새우에 3일동안 노출 시 새우의 활력은 저하시키나 폐사까지는 유발시키지 않음을 알 수 있었다.

일반적으로 *Vibrio harveyi*는 균주별로 병원성이 다양하여 새우 체중 g당 10^3 - 10^7 CFU의 높은 양의 균수에서도 새우에 폐사를 유발하지 않는 균주가 있는가 하면 최근 중국에서 보고되고 있는 *Vibrio harveyi* HLB0905 균주의 경우와 같이 38 CFU의 양으로도 48시간 이내에 접종된 흰다리새우에서 60%가 폐사

Table 3. Proportion of shrimp showing mortality after monopersulfate compound (MPC) and *Vibrio harveyi* inoculation

Treatment	Number of shrimp	Proportion of shrimp showing mortality at each time point (hpi)		
		24	48	72
Control	5	0/5	0/5	0/5
MPC 0.15 ppm	5	0/5	0/5	0/5
MPC 0.3 ppm	5	0/5	0/5	0/5
MPC 0.6 ppm	5	0/5	0/5	0/5
MPC 1.2 ppm	5	0/5	0/5	0/5
MPC 2.4 ppm	5	0/5	0/5	0/5
Bacterial control*	5	0/5	0/5	0/5

하는 고도의 병원력을 지니는 경우도 있다(Zhou et al., 2012). *Vibrio harveyi* HLB0905 균주는 비발광성의 고병원성을 띠며 HLB0905 균주로 명명되었고 높은 폐사율과 섬유세포와 횡문근의 심각한 괴사가 유발되고 꼬리부분에 탁한 손상이 특징적으로 관찰되어 “세균성 백미병(bacterial white tail disease, WTD)”으로 불리고 있다.

본 연구에서 공시한 *Vibrio harveyi*는 비발광성의 *toxR*과 haemolysin 등의 병원성 인자를 띠는 균주로서 1×10^6 CFU/mL의 양으로 해수에 첨가한 후 흰다리새우를 균이 있는 해수에 넣어 균에 노출시켰다. 이러한 조건에서는 흰다리새우의 단 시간내의 폐사는 관찰되지 않으며, 활동성 저하가 관찰되었다.

Monopersulfate 화합물에 의한 총 세균수 변화

Monopersulfate 화합물 0, 0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 2.4 ppm의 농도를 해수에 처리하고 *Vibrio harveyi*를 첨가하여 30분간 monopersulfate 화합물과 반응시킨 후 새우 5마리씩을 각각의 수조에 넣은 후 1시간, 6시간, 24시간째에 총 세균수를 측정된 결과 Table 4와 같이 나타났다. 즉, monopersulfate 화합물에 의하여 1시간째에는 총세균수는 모든 농도의 monopersulfate 화합물 처리농도에서 약 10^5 CFU/mL의 현저한 감소가 확인되었으며 최고 농도인 1.2 ppm에서는 10^6 CFU/mL 이상의 균 억제 효과가 확인되었다. 이러한 균 억제는 해수에 monopersulfate 첨가 후 6시간, 24시간째에도 유사하게 나타났으나, 1.2 ppm과 2.4 ppm에서는 다른 농도군에 비해서도 유의한 감소($P < 0.001$)가 확인되어 농도가 높을수록 총균수 억제효과는 강하게 유지됨을 알 수 있다(Fig. 2). Monopersulfate는 산화 계열 소독제로서 조류 제거(algicide) 효과와 살균 효과가 우수하며 농도와 반응시간에 의해 소독력이 결정되며 20분 이상 노출될 경우 효과가 분명히 나타나는 것으로 보고되어 있다(Wu et al., 2014). 본 연구에서는 monopersulfate 화합물과 균액을 30분간 반응하고 이후 새우에 노출시킨 바 이러한 조건에서 새우에는 영향을 미치지 않으면서 살균효과가 24시간 까지도 유지됨을 알 수 있다.

Table 4. The total bacteria growth on a TSA agar with different concentration of monopersulfate compound (MPC)

Treatment Condition	No. of total bacteria (CFU/mL)		
	After 1 h	After 6 h	After 24 h
Control	236±50.8 (×10 ⁶)	317±29.7 (×10 ⁶)	72.5±10 (×10 ⁶)
MPC 0.15 ppm	4.8±0.3 (×10 ³)*	7.3±1.0 (×10 ³)*	6.4±0.9 (×10 ³)*
MPC 0.3 ppm	16±5.7 (×10 ³)*	11±4.2 (×10 ³)*	8.6±1.7 (×10 ³)*
MPC 0.6 ppm	5.1±0.4 (×10 ³)*	8.6±0.8 (×10 ³)*	7.0±1.4 (×10 ³)*
MPC 1.2 ppm	30±4.0 (×10 ³)*	1.1±0.3 (×10 ³)*	2.6±1.6 (×10 ³)*
MPC 2.4 ppm	0.4±0.1 (×10 ³)*	1.0±0.3 (×10 ³)*	1.5±0.8 (×10 ³)*

TSA, Trypticase Soy Agar

*: significantly different at $P<0.001$ comparing control.

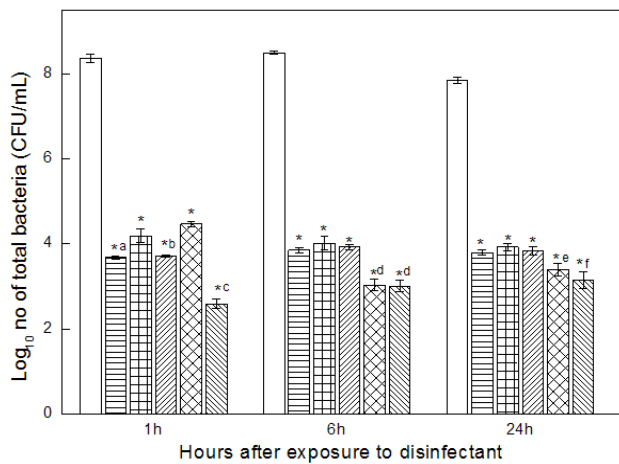


Fig. 2. Inhibition of the growth of bacteria in sea-water after incubation in the presence of various concentration of monopersulfate compound. Results are mean±SD of triplicate data. □, bacterial control; ▨, monopersulfate compound 0.15 ppm; ▩, monopersulfate compound 0.3 ppm; ▪, monopersulfate compound 0.6 ppm; ▤, monopersulfate compound 1.2 ppm; ▥, monopersulfate compound 2.4 ppm *Significantly different from bacterial control ($P<0.001$) a, significantly different from monopersulfate compound 0.3 ppm ($P<0.01$) and 1.2 ppm ($P<0.001$) b, significantly different from monopersulfate compound 0.3 ppm and 1.2 ppm ($P<0.01$) c, significantly different from monopersulfate compound 0.3 ppm and 1.2 ppm ($P<0.001$) d, significantly different from monopersulfate compound 0.15, 0.3, and 0.6 ppm ($P<0.01$) e, significantly different from monopersulfate compound 0.15ppm ($P<0.01$), 0.3ppm ($P<0.001$) and 0.6ppm ($P<0.01$) f, significantly different from monopersulfate compound 0.15, 0.3, and 0.6ppm ($P<0.001$)

Monopersulfate 화합물에 의한 *Vibrio harveyi* 균수 변화

Monopersulfate 화합물 농도에 따른 *Vibrio harveyi* 균 역

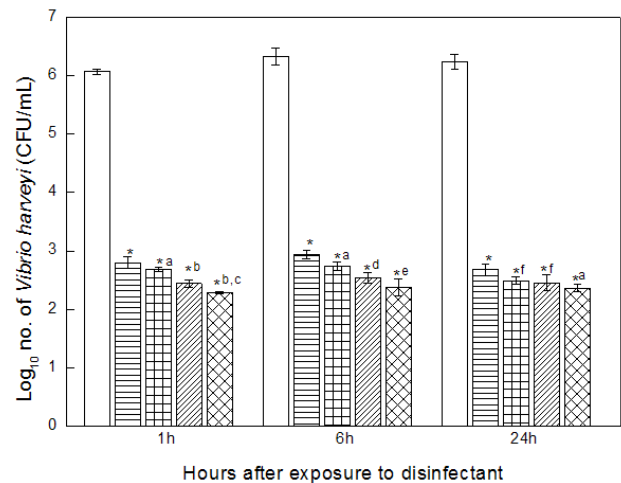


Fig. 3. Inhibition of the growth of *Vibrio harveyi* in sea-water after incubation in the presence of various concentration of monopersulfate compound. Results are mean±SD of triplicate data. □, bacterial control; ▨, monopersulfate compound 0.15 ppm; ▩, monopersulfate compound 0.3 ppm; ▪, monopersulfate compound 0.6 ppm; ▤, monopersulfate compound 1.2 ppm; ▥, monopersulfate compound 2.4 ppm *Significantly different from the bacterial control group ($P<0.001$) a, significantly different from monopersulfate compound 0.15 ppm ($P<0.01$) b, significantly different from monopersulfate compound 0.15 ppm and 0.3 ppm ($P<0.001$) c, significantly different from monopersulfate compound 0.6 ppm ($P<0.05$) d, significantly different from monopersulfate compound 0.15 ppm ($P<0.001$) and 0.3 ppm ($P<0.05$) e, significantly different from monopersulfate compound 0.15 ppm ($P<0.001$) and 0.3 ppm ($P<0.01$) f, significantly different from monopersulfate compound 0.15 ppm ($P<0.05$)

제 효과를 확인하기 위하여 0, 0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 2.4 ppm의 monopersulfate와 *Vibrio harveyi* 를 30분간 반응시킨 후 일정량의 해수를 취하여 TCBS 배지에 도말하여 배양 한 후 *Vibrio harveyi* 균수를 측정 한 결과 Table 5와 같은 결과를 얻었

Table 5. The *Vibrio harveyi* growth on a TCBS agar with different concentration of monopersulfate compound (MPC)

Treatment Condition	No. of <i>Vibrio harveyi</i> (CFU/mL)		
	After 1 h	After 6 h	After 24 h
Control	1.2±0.1 (×10 ⁶)	2.1±0.7 (×10 ⁶)	1.8±0.5 (×10 ⁶)
MPC 0.15 ppm	6.4±0.7 (×10 ²)*	8.5±1.4 (×10 ²)*	4.8±1.1 (×10 ²)*
MPC 0.3 ppm	4.8±0.3 (×10 ²)*	5.5±0.9 (×10 ²)*	3.1±0.4 (×10 ²)*
MPC 0.6 ppm	2.8±0.4 (×10 ²)*	3.5±0.7 (×10 ²)*	3.0±1.0 (×10 ²)*
MPC 1.2 ppm	1.9±0.1 (×10 ²)*	2.4±0.8 (×10 ²)*	2.3±0.3 (×10 ²)*
MPC 2.4 ppm	NC	NC	NC

NC: Not counted. TCBS: Thiosulfate Citrate Bile Salt

*: significantly different at $P < 0.001$ comparing control

다. 즉, 반응 후 1시간, 6시간, 24시간째 병원체 대조군의 *Vibrio harveyi*는 평균 $1.7 \pm 0.5 \times 10^6$ CFU/mL로 확인 된 반면, monopersulfate 2.4 ppm에서는 반응 후 1시간째부터 *Vibrio harveyi*가 검출되지 않았다. 또한, monopersulfate 0.15, 0.3, 0.6, 1.2 ppm에 서는 *Vibrio harveyi* 균수는 각각 $6.6 \pm 1.9 \times 10^2$ CFU/mL, $4.5 \pm 1.2 \times 10^2$ CFU/mL, $3.1 \pm 0.4 \times 10^2$ CFU/mL, $2.2 \pm 0.3 \times 10^2$ CFU/mL으로 병원체 대조군에 비하여 약 10^4 배 감소하였으며 균억제 정도는 농도의존적이었다($P < 0.001$). Monopersulfatedml *Vibrio harveyi* 균에 대한 살균효과는 노출 후 6시간째 및 24시간 째에도 지속적으로 유지되어 농도의존 적으로 살균효과가 나타났고 최고용량인 monopersulfate 2.4 ppm에 의해서는 24시간까지 *Vibrio harveyi*가 검출되지 않았다. 따라서 monopersulfate 2.4 ppm을 첨가할 경우 해수중의 *Vibrio harveyi*가 완벽하게 제거됨을 알 수 있다.

Monopersulfate compound의 흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*)에서의 안전성

Monopersulfate 화합물이 흰다리새우에 미치는 영향을 조사 하기 위하여 수조에 0, 0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 2.4 ppm의 monopersulfate을 첨가한 후 흰다리새우를 5마리씩 넣고 7일간 관찰한 결과 새우는 모두 생존하였고 활동력 등에도 대조군과 차이가 없었다(Table 6). 현재까지 monopersulfate 화합물의 흰다리새우에 대한 독성 관련 연구보고는 없다. 본 연구에서는 monopersulfate가 해수에서 *Vibrio harveyi*를 거의 완벽하게 살균하는 농도인 2.4 ppm에서 7일간의 사육 기간 중 새우의 생존과 활동력에는 영향이 없음이 확인되었는바, monopersulfate 화합물이 새우양식에 있어 새우에는 영향을 미치지 않으면서 비브리오균 제거할 수 있는 유효한 소독제로 쓰일 수 있음을 알 수 있다.

결론적으로, monopersulfate 화합물은 자연적으로 해수 중에 존재하는 세균과 새우 양식업에서 심각한 질병 원인체 중 하나인 *Vibrio harveyi*를 효과적으로 억제하며 유효성이 확인된 농도에서 새우의 생존과 활동력에 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.

Table 6. Proportion of shrimp showing mortality after monopersulfate compound (MPC) exposure

Treatment	Number of shrimp	Proportion of shrimp showing mortality at each time point (hpt)				
		24	48	72	120	168
Control	5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
MPC 0.15 ppm	5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
MPC 0.3 ppm	5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
MPC 0.6 ppm	5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
MPC 1.2 ppm	5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
MPC 2.4 ppm	5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

hpt; hours post-treatment.

All shrimps from each group were not showing clinical signs.

References

- Defoirdt T, Bossier P, Sorgeloos P and Verstraete W. 2005. The impact of mutations in the quorum sensing systems of *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio harveyi* on their virulence towards gnotobiotically cultured *Artemia franciscana*. *Environ Microbiol* 7, 1239-1247. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00807.x>
- Defoirdt T, Verstraete W and Bossier P. 2008. Luminiscence, virulence and quorum sensing signal production by pathogenic *Vibrio campbellii* and *Vibrio harveyi* isolates. *J Appl Microbiol* 104, 1480-1487. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03672.x>
- Gopal S, Ota SK, Kumar S, Karunasagar I, Nishibuchi M and Karunasagar I. 2005. The occurrence of *Vibrio* species in tropical shrimp culture environments; implications for food safety. *Int J Food Microbiol* 102, 151-159. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.011>
- Judith M, Conejero U and Hedreyda CT. 2004. PCR detection of hemolysin (*vhh*) gene in *Vibrio harveyi*. *J General Appl Microbiol* 50, 137-142. <http://dx.doi.org/10.2323/jgam.50.137>
- Jung SH, Choi HS, Do JW, Kim MS, Kwon MG, Seo JS, Hwang

- JY, Kim SR, Cho YR, Kim JD, Park MA, Jee BY, Cho MY and Kim JW. 2012. Monitoring of bacteria and parasites in cultured olive flounder, black rockfish, red sea bream and shrimp during summer period in Korea from 2007 to 2011. *J Fish Pathol* 25, 231-241. <http://dx.doi.org/10.7847/jfp.2012.25.3.231>.
- Kanjana K, Radtanatip T, Asuvapongpatana S, Withyachumnarnkul B and Wongprasert K. 2011. Solvent extracts of the red seaweed *Gracilaria fisheri* prevent *Vibrio harveyi* infections in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish shellfish Immunol* 30, 389-396. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2010.11.016>.
- Karunasagar I, Pai R, Malathi GR and Karunasagar I. 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture* 128, 203-209. [http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)90309-3](http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486(94)90309-3).
- Lakshmi B, Viswanath B and Sai Gopal DVR. 2013. Probiotics as antiviral agents in shrimp aquaculture. *J Pathogens* 1-14. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/424123>.
- Lin Z, Kumagai K, Baba K, Mekalanos JJ and Nishibuchi M. 1993. *Vibrio parahaemolyticus* has a homolog of the *Vibrio cholerae* toxRS operon that mediates environmentally induced regulation of the thermostable direct hemolysin gene. *J Bacteriol* 175, 3844-3855.
- Liu PC, Lee KK and Chen SN. 1996. Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in tiger prawn *Penaeus monodon*. *Lett Appl Microbiol* 22, 413-416. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.1996.tb01192.x>
- Miller VL and Mekalanos JJ. 1988. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires toxR. *J Bacteriol* 170, 2575-2583.
- Mine S and Boopathy R. 2011. Effect of organic acids on shrimp pathogen, *Vibrio harveyi*. *Current Microbiol* 6, 1-7. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-011-9932-2>.
- Nimrat S, Bart AN, Keataskit A and Vuthiphandchai V. 2008. Microbial flora of spermatophores from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) declines over long-term cryostorage. *Aquaculture* 274, 247-253. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.11.018>.
- Pang L, Zhang X-H, Zhong Y, Chen J, Li Y and Austin B. 2006. Identification of *Vibrio harveyi* using PCR amplification of the toxR gene. *Lett Appl Microbiol* 43, 249-255. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01962.x>.
- Rattanachuay P, Kantachote D, Tantirungkij M, Nitoda T and Kanzaki H. 2010. Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by extracellular compounds from a proteolytic bacterium *Pseudomonas* sp. W3 *Electronic J Biotechnol* 13, 1-12. <http://dx.doi.org/10.2225/vol13-issue1-fulltext-2>.
- Ruwandeeepika HAD, Defoirdt T, Bhowmick PP, Shekar M, Bossier P and Karunasagar I. 2010. Presence of typical and atypical virulence genes in vibrio isolates belonging to the *harveyi* clade. *J Appl Microbiol* 109, 888-889. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04715.x>.
- Soto-Rodriguez SA, Gomez-Gil B, Lozano R, del Rio-Rodriguez R, Diéguez AL and Romalde JL. 2012. Virulence of *Vibrio harveyi* responsible for the “Bright-red” Syndrome in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *J Inverteb Pathol* 109, 307-317. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2012.01.006>.
- Statistics Korea. 2015. Fishery Production Survey in 2014. Statistics Korea, Daejeon, Korea
- Wang, B, AIHong X, Li B, Wang J and Zhang Z. 2008. Efficacy of potassium monopersulfate compound in inhibiting and killing common pathogenic bacteria in the aquaculture industry. *Chinese J Disinfection* 25, 501-502.
- Won KM, Choi JH, Kim YC and Park SI. 2007. Microbiological characteristics of *Vibrio harveyi*. *J Fish Pathol* 20, 237-247.
- Wu M, Xu X, Zeng Y, Zhang J, Li X, Xu J and Duan R. 2015. Algicidal and bactericidal effect of potassium monopersulfate compound on eutrophic water. *Appl Mechanics Materials* 707, 259-262. <http://dx.doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMM.707.259>
- Zhou J, Fang W, Yang X, Zhou S, Hu L, Li X, Qi X, Su H and Xie L. 2012. A nonluminescent and highly virulent *Vibrio harveyi* strain is associated with “Bacterial White Tail Disease” of *Litopenaeus vannamei* shrimp. *PLoS ONE* 7, 1-6. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0029961>.