

넙치 유래 VHSV (Viral haemorrhagic septicemia virus)의 살균방법별 저감효과 연구

김재옥*[†] · 장광일** · 김영재*** · 권문경**

*국립수산물품질관리원 통영지원, **국립수산물품질관리원 수산방역과, ***(주)한국수산방역기술

Comparision study on disinfection systems for decrease in viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)

Jae-Ok Kim*[†], Gwang Il Jang** , Young-Jae Kim*** and Mun-Gyeong Kwon**

*Tongyeong Regional Office, National Fishery Products Quality Management Service (NFQS)
**Aquatic Disease Control Division, National Fishery Products Quality Management Service (NFQS)
***Korea Aquatic Biosecurity Technology, Busan 48569, Republic of Korea

Viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) is mainly transmitted horizontally by water-borne transmission. To prevent the spread of infectious VHSV in the aquatic environment, the water treatment is needed in aquaculture system. Although several studies have investigated to reduction of VHSV titer using the water treatment system, comparing of viral titer reduction in seawater by using different types of disinfection system has not been studied yet. Here, we determined the disinfectant effect of VHSV in seawater by using 4 types (UV radiation, plasma-AOP, electrolysis, ozonation) disinfection system. Moreover, cumulative mortality and detection rate of VHSV in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) after cohabitation challenges was also investigated viral reduction by disinfection system (UV radiation or plasma-AOP) or by untreated system. VHSV copy numbers were decreased from $10^{5.54}$ copies/mL to $10^{2.17\pm 0.53}$ copies/mL, $10^{2.31\pm 0.22}$ copies/mL, $10^{2.44\pm 0.27}$ copies/mL, and $10^{3.14\pm 0.11}$ copies/mL by the UV radiation, plasma-AOP, electrolysis, ozonation, respectively. In cohabitation challenge, the cumulative mortality and VHSV detection rate of olive flounder by the plasma-AOP treatment is lower than that by the UV radiation treatment and positive control. These results suggest that the plasma-AOP treatment system can be useful for efficient inactivation of VHSV.

Key words: Viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV), Disinfection system, Olive flounder

서 론

바이러스성출혈성패혈증(Viral haemorrhagic sep-

ticemia, VHS)의 원인 병원체인 바이러스성출혈성 패혈증바이러스(VHS virus, VHSV)는 전 세계에 걸쳐 약 80여종의 담수 및 해수 어류에서 감염되며 특히 유럽의 양식산 연어과 어류와 동아시아의 양식산 넙치(*Paralichthys olivaceus*)에 발병하여 경제적으로 심각한 피해를 입히는 병원체로 알려져 있

[†]Corresponding author: Jae-Ok Kim
Tel: +82-55-640-3157, Fax: +82-55-641-8205
E-mail: kimjaeok@korea.kr

다(Wolf, 1988; Ishiki *et al.*, 2001; Skal *et al.*, 2005; WOA, 2021). VHS는 전염속도가 빠르고 대량폐사를 일으켜 지속적인 감시 및 관리가 필요하여 세계동물보건기구(World Organisation for Animal Health, WOA)에서 관리 대상 질병으로 지정되어 있다(WOA, 2021). 우리나라에서도 법정전염병으로 지정하여(Aquatic organism disease control act, 2021) 국내외적으로 관리하고 있으며, 양식시설에서 VHS가 발생하게 되면 발생시설 내 어류의 이동 제한 및 시설·사육 도구 등에 대한 소독의 방역조치가 이루어지고 있다.

VHSV는 *Rahbdoviridae*과 Novirahbivirus 속에 속하는 탄환형의 바이러스로서 negative-sense RNA를 가지고 있다(Tordo *et al.*, 2005). VHSV의 주 감염경로는 수평감염으로 알려져 있으며(Hershberger *et al.*, 2011), VHSV 보유 어류로부터의 감염 및 양식장 인근 해역에서의 VHSV 유입에 의한 감염을 예방하기 위해서는 사육용수 관리가 매우 중요하다고 볼 수 있다. 이러한 관리를 위해 사육용수에 존재하는 VHSV를 인위적으로 제거할 수 있는 살균처리의 방법이 제시되고 있으며 양식용수 살균 방식으로 주로 1) UV 방식, 2) 플라즈마 방식, 3) 오존 방식, 그리고 4) 전기분해 방식이 있다(Kang *et al.*, 2015). UV 방식의 살균처리법은 자외선을 이용하여 병원 미생물의 DNA 또는 RNA 복제를 저해시켜 사멸 또는 불활성화 시키는 원리로 알려져 있고(Kang *et al.*, 2015), 플라즈마 방식의 살균처리법은 각종 활성산소종(Reactive oxygen species, ROS)을 생성하여 수중의 세균 및 바이러스의 외막과 DNA를 파괴하는 원리로 알려져 있다(Deng *et al.*, 2006). 오존 방식의 살균처리법은 세포막을 손상시켜 세포막의 구조 변화 및 염색체 DNA를 파괴하여 살균하는 방식이며, 전기분해 방식의 살균처리법은 전기분해 과정에서 생성된 차아염소산(HOCl)과 차아염소산 이온(OCl⁻)과 같은 유효염소로 살균하는 방식으로 알려져 있다(Lee *et al.*, 2013).

현재까지 다양한 용수 살균 방식을 이용한 수산생물 질병 저감 사례 연구가 다양하게 수행되었으나, VHSV를 대상으로 살균방법별 해수 내 바이러스 저감효과를 비교한 연구 사례는 없는 실정이다. 따라서, 본 연구는 국내 넙치 양식장에서의 VHS에

대한 피해 저감을 위한 대책연구의 기초자료를 제공하기 위해 사육용수 살균방법별 넙치 유래의 VHSV 살균 및 저감효과를 비교, 평가하고자 한다.

재료 및 방법

VHSV 유래 및 배양

본 연구에 사용된 VHSV는 부산 기장군 지역의 넙치로부터 분리한 KJ2008 분리주(genotype IVa)를 사용하였다(Kim and Kim, 2011). VHSV를 배양하기 위하여 75 cm² tissue culture flask에 Epithelioma papulosum cyprini cell line(EPC)을 단층으로 배양 후 바이러스를 접종하여 15°C에서 7일간 배양하면서 cytopathic effects(CPE)를 관찰하였다. 세포의 90% 이상이 용해되면 배양액을 취해 원심분리(4,000×g, 10분, 4°C) 및 syringe filter(0.45 μm)로 여과하여 세포 잔여물을 제거한 후 얻어진 상층액은 실험에 사용하기 전까지 -80°C에 보존하였다.

용수 살균 시스템 구성

본 연구에서 사용한 용수 살균방식 모델은 UV, 플라즈마AOP, 오존, 전기분해 방식의 살균 시스템을 적용한 것으로, 처리용량과 용수 주입량을 모두 동일(유입펌프 15W, Flow rate 25 mL/s)하도록 설계 및 제작하였다(Fig. 1). 4종의 살균 시스템 중 UV 방식의 경우 Ø 30×200(mm) 규격의 UV 처리관과 자외선 조사량은 1.232 mJ/cm²로 설계하였으며(Fig. 1A), 플라즈마AOP 방식은 유동 전력 공급 장비를 이용하여 40W의 전압을 가하여 일반 해수에 대한 살균소독이 가능하도록 설계하였다(Fig. 1B). 전기분해 방식의 살균 시스템의 경우 염소 생성량이 120 mg/hr, 처리 반응조는 450 mL의 규격으로 제작하였고(Fig. 1C), 오존 방식의 경우 Ø 30×200 (mm) 규격의 반응관을 설치하고 오존 발생량은 84 mg/hr로 설계하였다(Fig. 1D).

살균방법별 VHSV 살균효과 시험

4종(UV, 플라즈마AOP, 오존, 전기분해)의 살균 시스템이 적용된 각각의 수조(5L)에 2L의 멸균 해수를 준비한 후, 모두 VHSV 최종농도가 10^{5.54} copies/mL가 되도록 희석하였다. 실험 수온은 모든 실험

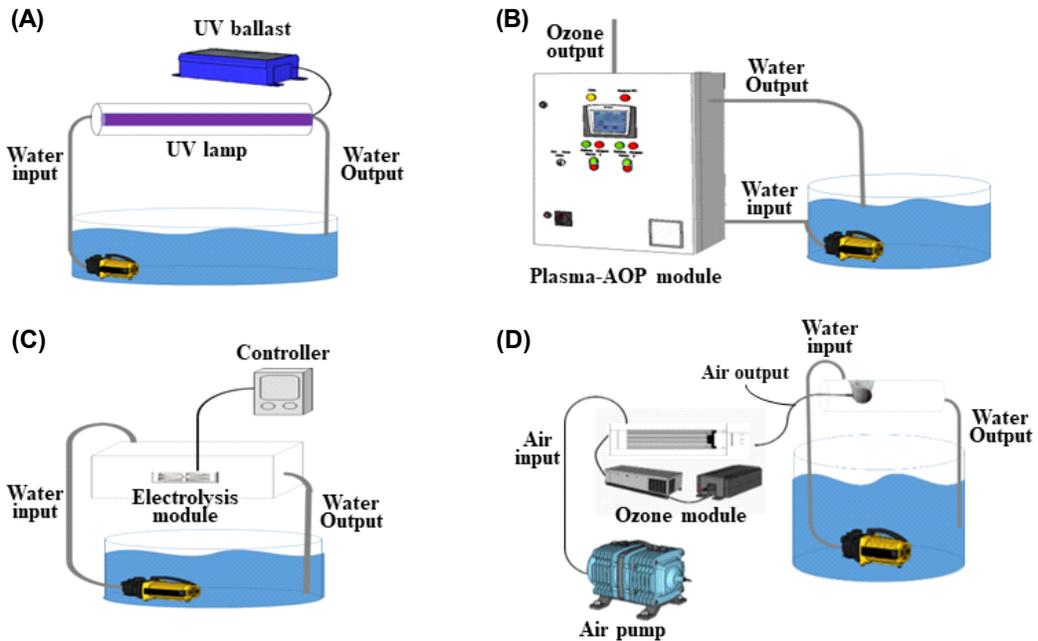


Fig. 1. Schematic illustration of UV radiation (A), plasma-AOP (B), electrolysis (C), and ozonation (D) disinfection system.

험구에서 15°C로 유지한 상태에서 해수를 살균처리 하였다. 살균방법별 저감효과를 비교하기 위하여 각 수조별 살균처리 전 또는 직후 해수 시료 200 uL씩 채집하여 Pierce *et al.* (2013)의 방법을 이용하여 바이러스 정량(RT-qPCR) 분석하였다. 간단히 설명하면, TRIzol method에 따라 RNA를 추출한 후 1 uL RNA에 상업용 Kit(MMLV Reverse Transcription Kit, Bioneer)를 사용하여 20 uL의 cDNA를 합성하였다. qPCR은 상업용 Kit(LightCycler 480 probes Master mix, Life Technologies)를 사용하여 5 uL의 cDNA 및 정량분석용 VHSV primer(Table 1)를 첨가하여 실시하였다(94°C 3분, 40 cycles: 94°C 5초, 58°C 10초, 72°C 15초). 표준곡선(Standard

curve)은 단계회석($10^8 \sim 10^1$)한 plasmid DNA를 이용하여 도출하였고, VHSV copy number는 plasmid DNA copy 값(x)에 대한 Ct 값(y)의 표준 회귀식인 $y = -3.0655x + 33.235$ 으로 계산하였다.

수평감염 실험을 통한 살균방법별 VHSV 확산 저감효과 분석

총 8개의 원형 50L 수조를 구비한 후 VHSV 감염이력이 없는 160마리의 건강한 넙치(체장 12~14 cm)를 각 수조에 순치(수조당 20마리)하였다. 수평감염 실험을 위해 접종구(4개 수조)와 비접종구(4개 수조)를 구분하고, 접종구로부터 방출되는 사육용수가 살균시스템별 통과유무에 따라 비접종구

Table 1. Primers used in this study

Primer	Sequence(5'-3')	Used for	Reference
VN-F	ATG-GAA-GGA-GGA-ATT-CGT-GAA-GCG	Conventional PCR	WOAH (2019)
VN-R	GCG-GTG-AAG-TGC-TGC-AGT-TCC-C	Conventional PCR	
pVHS4b-F2	GCC-GGA-ATC-CTT-ATG-CCG-ATC	RT-qPCR	Pierce <i>et al.</i> , 2013
pVHS4b-R2	CCC-TTG-ACG-ATG-TCC-ATG-AGG-TT	RT-qPCR	
pVHS4b-1NT	ACT-GGC-CCA-GAC-TGT-CAA(Labelled with FAM)	RT-qPCR	

로 유입된 후, 다시 접종구 수조로 순환되도록 설계한 4개의 시험구(A~D)를 준비하였다: (A) UV 방식의 살균처리시스템이 적용된 시험구, (B) 플라즈마AOP 방식의 살균시스템이 적용된 시험구, (C) 살균시스템이 적용되지 않은 양성대조구, (D) 살균시스템이 적용되지 않은 음성대조구. A~C의 접종구 수조에 순치된 60마리 넙치(수조당 20마리)는 어체당 VHSV 10^6 TCID₅₀/mL를 100 uL씩 복강 주사하였고, D의 접종구 수조에 순치된 20마리 넙치는 PBS 100 uL씩 복강주사하였다. A~D의 모든 비접종구 수조에 순치된 80마리 넙치(수조당 20마리)는 아무것도 접종하지 않았다. 접종 후 3주간 수온은 15°C로 유지하였으며, 실험기간동안 어체 중 1%에 해당하는 부상 사료를 1일 1회 급이하였다. 그룹별 각 수조에서 실험어의 임상증상, 폐사 여부를 매일 관찰한 후 누적폐사율을 산출하였다. 또한 VHSV 검출율을 조사하기 위해 각 수조의 실험어의 신장과 비장 조직을 채집하여 WOAH (2019) 방법에 따라 VHSV를 검출(Conventional PCR)하였다(Table 1).

결과 및 고찰

본 연구에서는 대표적인 용수 살균방식인 UV, 플라즈마AOP, 전기분해, 오존 방식을 대상으로 살균방식별 처리전후의 해수 내 VHSV copy number를 측정하여 VHSV에 대한 살균효과를 분석하고자 하였다. UV 방식의 살균 시스템을 통해 처리된 VHSV 농도는 $10^{2.17\pm 0.53}$ copies/mL로 확인되었으며, 처리전 해수 내 VHSV 농도($10^{5.54}$ copies/mL, 이하 같음) 대비 99.96%의 살균효율을 나타내었다(Table 2). 플라즈마AOP 방식의 경우 처리된 해수 내

VHSV 농도는 $10^{2.31\pm 0.22}$ copies/mL로 확인되었으며, 살균효율은 99.94%로 나타내었다. 전기분해 방식으로 처리된 해수 내 VHSV 농도는 $10^{2.44\pm 0.27}$ copies/mL(99.92% 살균효율), 오존 방식의 살균 시스템으로 처리된 해수 내 VHSV 농도는 $10^{3.14\pm 0.11}$ copies/mL(99.92% 살균효율)로 각각 확인되었다. VHSV는 UV 처리에 불활화 되고, 염소 또는 차아염소산 등과 같은 소독제에 불활화 되는 것으로 알려져 있다(WOAH 2021). 현재까지 VHSV에 대하여 다양한 살균처리 방식을 통한 저감연구가 수행되어져 왔으나(Kang *et al.*, 2015; Oye and Rimstad 2001; Afonso *et al.*, 2012; You *et al.*, 2020), 대부분 UV 방식의 살균시스템에 관한 연구에 한하여 보고된 바 있다. 본 연구에서는 4종의 용수 살균처리 시스템인 UV, 오존, 플라즈마AOP, 전기분해 방식을 이용하여 VHSV의 살균효과를 분석한 결과 모든 살균처리 방식에서 대조군($10^{5.54}$ copies/mL)과 비교하여 최소 $10^{3.14}$ copies/mL에서 최대 $10^{2.17}$ copies/mL의 바이러스 농도로 바이러스가 $10^{2.4}$ ~ $10^{3.37}$ copies/mL(99.6%~99.9% 살균효율)로 감소된 것을 확인하였다(Table 2). 특히 UV 방식에서 VHSV 유전자는 $10^{3.37}$ copies/mL이 감소된 결과를 보였는데, 이는 Afonso *et al.* (2012)에서도 UV 방식(3.28 mJ/cm²)으로 배양배지의 VHSV를 살균시킨 결과 10^3 pfu/mL의 농도가 감소하여 본 연구에서의 결과와 유사하게 나타났다. 또한, You *et al.* (2020)은 플라즈마 방식으로 VHSV를 살균처리 했을 때 실험군($10^{1.45}$ TCID₅₀/mL)은 대조군($10^{4.41}$ TCID₅₀/mL)과 비교하여 $10^{2.65}$ TCID₅₀/mL(살균효율 99.99%)의 역가 차이가 나타나 명백한 바이러스 불활성화 효과를 확인하여 본 연구에서의 결과와 비슷하게 나타났다. 4종의 용수 살균처리 시스템 중 오존 방식의 경

Table 2. The copy number of VHSV in seawater before and after the treatment by UV radiation, plasma-AOP, electrolysis, and ozonation disinfection system

Disinfection system	Log10 (VHSV copies/mL)		Efficiency of disinfection (%)
	Before treatment	After treatment	
UV radiation	5.54	2.17±0.53	99.96
Plasma-AOP		2.31±0.22	99.94
Electrolysis		2.44±0.27	99.92
Ozonation		3.14±0.11	99.6

우 VHSV 유전자는 $10^{3.14}$ copies/mL로 다른 3종의 살균 방식에 비해 낮은 살균효율을 나타냈다. 현재 까지 오존 방식의 살균처리시스템을 기반으로 VHSV에 대한 살균효과를 분석한 사례가 없다. Liltved *et al.* (2006)은 VHSV와 같은 어류 RNA 바이러스인 전염성연어빈혈증바이러스(Infected salmon anaemia virus, ISAV) 배양액을 대상으로 UV 방식 또는 오존 방식의 살균처리를 통해 저감효과를 비교 분석한 연구가 있다. 그 결과에서 ISAV는 UV 방식에서 99.9%의 살균효율을 확인하였으나, 오존 방식에서는 90%로 확인되었다. 그러나 신경괴사증바이러스(Nervous necrosis virus, NNV)를 대상으로 오존 처리한 결과, 바이러스 불활성화 효과를 확인하였고(Arimoto *et al.*, 1996), VHSV와 같은 *rabdoviridae*에 속하는 수포성구내염바이러스(Vesicular stomatitis indian virus, VSIV)도 오존처리 후 불활성화 상태를 확인한 바 있다(Murray *et al.*, 2008). 이러한 결과는 살균방식에 의한 차이뿐만 아니라 다양한 어류 또는 가축 바이러스별 특성에 따른 저항성과 연관이 있는 것으로 사료되며 보다 효율적인 병원체의 살균을 위해서 살균방식에 의한 바이러스별 살균효과 등에 대한 추가 연구가 이루어져야 할 것이다.

본 연구에서는 해수 내 바이러스에 대한 살균효과 분석방법을 위해 분자생물학적 방법인 conventional PCR 또는 RT-qPCR 검출법을 이용하였는데 이는 유전자 검출 기반에 한한 것으로, 바이러스 활성도 검출에 관한 조사가 이루어지지 않았다. Jeong *et al.* (2019)에서는 본 연구에서 사용한 바이러스와 동일한 유전자형인 VHSV genotype IVa를 대상으로 해수 내 생존능을 조사하기 위해 유전자 검출 기반인 RT-qPCR과 활성도 조사를 위한 감염가(titer)를 비교 분석하였다. 이를 통해 해수 내 VHSV는 10^4 copies/mL 이하에서 바이러스의 불활성화 상태(검출이하의 바이러스 감염가)를 확인하였다. 이러한 결과는 본 연구에서 실험한 모든 살균처리 방식에서 VHSV를 처리했을 경우 VHSV는 $10^{3.14}$ copies/mL 이하로, 이는 활성도가 없는 불활성화 상태의 바이러스로 될 수 있음을 시사한다.

사육용수를 대상으로 전기분해 방식과 오존 방식의 살균시스템은 살균처리과정에서 생성되는

부산물 또는 총잔류산화물(Total residual oxidants, TRO)과 같은 독성물질이 생성되기 때문에 양식생물에 대한 안전성 확보에 어려움이 많다(Liltved *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2018). 특히 오존의 경우 부산물인 브롬산염(BrO_3^-)이 생성되는데 이는 발암물질로 제시되고 있으며(EPA, 2019), 오존을 기준 이상의 농도로 사용하면 양식어류는 물론 생물학적 여과조의 여과세균에도 유독할 수 있다(Park *et al.*, 2018). 또한 살균방법별 VHSV에 대한 살균효과 실험에서 UV 방식과 플라즈마AOP 방식에 비해 전기분해 방식과 오존 방식의 살균효율은 상대적으로 낮은 것으로 확인된 바 있다. 이러한 이유로 본 연구에서는 VHSV에 감염된 어체로부터 방출되는 바이러스에 대하여 안전성이 확보되어 양식장에서 상업적으로 적용되고 있는 UV 방식과 플라즈마AOP 방식의 살균시스템을 대상으로 시스템 적용 유무에 따른 저감효율을 평가하고자 하였다. 살균시스템을 적용하지 않은 양성 대조구에서 접종 개체는 접종 7일째부터 폐사가 발생하여 실험시간 동안 100% 누적폐사율이 나타났다(Fig. 2A). 비접종개체의 경우 12일차부터 폐사가 발생하여 실험기간동안 35%의 누적폐사율이 관찰되었다. Kim and Oh (2020)는 넙치 VHSV에 대하여 수평감염 실험을 통해 넙치에 어체당 VHSV $10^{5.5}$ TCID₅₀/mL 농도로 인위감염한 접종구에서 100% 누적폐사율과, 공동사육한 비접종개체에서 60% 누적폐사율을 확인한 바 있다. 이러한 결과를 통해 VHSV에 감염된 개체로부터 방출된 바이러스는 물을 매개로 공동사육개체에 수평감염과 폐사를 유발할 수 있음을 확인하였다. UV 방식의 살균시스템이 적용된 시험구에서 접종개체는 7일째부터 폐사가 나타나기 시작하여 100% 누적폐사율이 나타났으며, 비접종개체의 경우 실험기간 동안 7마리가 폐사하였다(누적폐사율 35%, Fig. 2B). 플라즈마AOP 방식의 살균시스템이 적용된 시험구의 경우, 접종개체는 접종 8일차부터 폐사가 발생하였으나 대조군에 비해 낮은 75% 누적폐사율이 나타났다(Fig. 2C). 비접종개체 또한 18일차부터 폐사가 발생하여 실험기간동안 10%의 누적폐사율을 확인하였다. 음성 대조구의 경우 실험기간 동안 접종개체 및 비접종개체 모두 폐사가 발생하지 않았다(data not

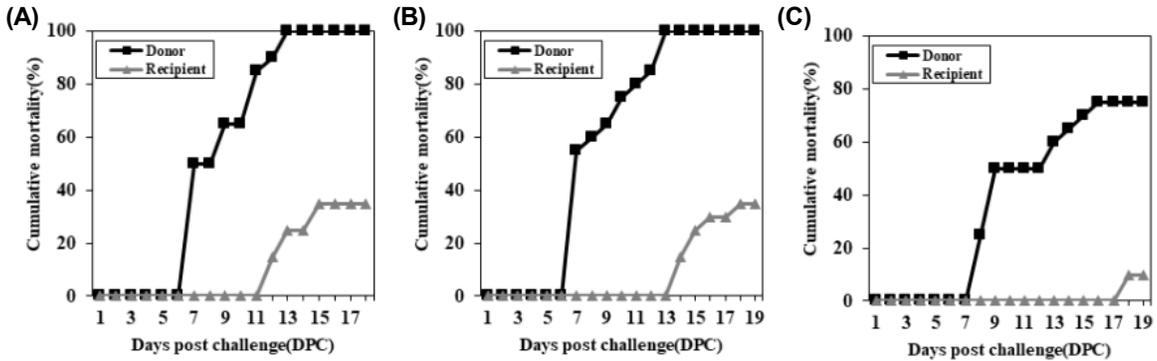


Fig. 2. Cumulative mortality (%) of cohabitated recipient fish after VHSV-infected donor fish in the cohabitation challenge(Positive control) (A), treatment by UV radiation (B), and plasma-AOP (C) disinfection system. The donor fish groups ($n = 20$ in each group) were intraperitoneally(IP) with VHSV(VHSV 10^5 TCID₅₀/fish), naive fish(recipient groups, $n = 20$ in each group) were cohabited with the donor fish.

shown). 비접종개체가 수용된 수조에서 실험기간 동안 폐사한 넙치, 실험 종료 후 살아있는 넙치를 대상으로 PCR 검사를 실시한 결과 살균시스템이 적용된 시험구의 VHSV는 UV 방식에서 40%, 플라즈마AOP 방식에서 10% 검출되었으며, 이러한 결과는 양성 대조구(60%)에 비해 낮게 검출된 것을 확인할 수 있었다(Table 3).

수산생물 질병은 물을 매개로 확산되기 때문에 제어 시스템이 갖춰지지 않은 양식장에서 질병이 발생할 경우, 단시간에 높은 폐사율로 이어져 심각한 피해를 초래할 수 있다. VHSV는 수중 환경으로 유입되어 숙주에 침입할 수 있음을 나타내기 때문에(Hershberger *et al.*, 2011), 이러한 특성을 충분히 고려하여 양식장 내 질병 발생을 효율적으로 예방하기 위해서는 유입수 혹은 사육용수의 살균 처리가 매우 중요하다. 본 연구에서는 사육용수 살균처리 유무에 따른 넙치 VHSV 수평감염 실험을 통해 바이러스를 살균처리했을 때 저감효과가 있음을 확인하였다(Fig. 2, Table 3). 비록 2종의(UV, 플라

즈마AOP) 살균시스템을 적용한 실험구는 대조구와 비교하여 저감효과가 있음을 확인하였으나, UV 방식의 경우 플라즈마AOP 방식에 비해 저감효율성이 낮은 것으로 나타났다. 이는 UV 방식의 살균효과는 용수의 탁도와 용수 내 유기물 등 다양한 영향을 받게 되어(Kang *et al.*, 2015), 수조의 넙치의 생리적인 활동에 영향을 받아 상대적으로 VHSV의 저감효율이 떨어진 것으로 사료된다. 플라즈마AOP 방식의 살균시스템을 적용하여 용수를 처리할 경우 감염개체로부터 방출되는 VHSV의 확산을 낮춰 접종개체와 공동사육개체의 감염율과 폐사율을 효과적으로 감소시키는 것으로 확인하였다. Lee *et al.* (2013)에 의하면 플라즈마 방식의 살균시스템은 ROS 생성으로 병원체 살균뿐만 아니라 유기물, 질소성 물질 등에 대한 감소로 수질 향상에도 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Schroeder *et al.*, 2011; Spliliotopolulou *et al.*, 2018). 이러한 결과로 플라즈마AOP 방식의 살균시스템을 양식장 유입수에 적용하였을 때 VHSV에 대한

Table 3. Comparison of the numbers of recipient fish and PCR results after cohabitation challenge with VHSV-infected donor fish by UV radiation or Plasma-AOP disinfection system

Group	Total no.	No. of dead fish	No. of survived fish	PCR result	
				Positive/total	Detection(%)
Positive control	20	7	13	12/20	60
UV radiation	20	7	13	8/20	40
Plasma-AOP	20	2	18	2/20	10

저감효율이 높을 수 있음을 시사한다. Faisal and Winters (2011) 및 Faisal *et al.* (2012)는 단각류의 일종인 *Diporeia spp.*에서 감염력을 지닌 VHSV (genotype IVb)가 확인되었고 야생어류에서의 VHSV 발생과 상관성을 확인하여 플랑크톤이 VHSV를 매개하는 매개체의 역할을 할 수 있다고 보고하였다. 이러한 연구결과는 살균처리 시스템을 이용하여 사육용수 내 병원체 뿐만 아니라 미세조류와 같은 바이러스 매개체도 저감하는 것이 중요하며, 이를 제어하기 위한 살균방식별 바이러스 매개체 저감효과, 체내 바이러스 분포도 조사와 같은 감염 특성과 관련한 추가 연구가 필요하다고 사료된다.

본 연구 결과를 통해 살균방법별 넙치 유래의 VHSV 살균 및 저감효과를 확인하여 살균장치 등을 통해 이를 제어하는 경우 환경감염 및 어체 감염에 예방효과를 가져온다는 결과를 도출하였으며 이를 통해 양식장의 질병 확산 방지와 기초연구로 활용 가능할 것으로 사료된다.

감사의 말

본 연구는 국립수산물품질관리원(수산생물 검·방역 관리 기술개발, NFQS2023001)의 지원에 의해 수행되었습니다.

References

Arimoto, M., Sato, J., Marutama, K., Mimura, G., & Furusawa, I.: Effect of chemical and physical treatments on the inactivation of striped jack nervous necrosis virus(SJNNV). *Aquaculture*, 143:15-22, 1996.

Afonso, L.O., Richmond, Z., Alex, Eaves, R.A., Richard, J., Hawley, L.M., & Garver, K.A.: Use of Ultraviolet C (UVC) Radiation to Inactivate Infectious Hematopoietic Necrosis Virus (IHNV) and Viral Hemorrhagic Septicemia Virus (VHSV) in Fish Processing Plant Effluent. *Journal of Aquaculture Research and Development*, 3:1-5. 2012.

Faisal, M., Winters, AD.: Detection of Viral Hemorrhagic Septicemia Virus (VHSV) from *Diporeia spp.* (*Pontoporeiidae*, *Amphipoda*) in the Laurentian Great Lakes, USA. *Parasites & Vectors*, 4(1):2. 2011.

Faisal, M., Shavaliar, M., Kim, RK., Millard, E., V, Gunn

MR., Winters, AD., Schulz, CA., Eissa, A., Thomas, MV., Wolgamood, M., Whelan, GE., Winton, J.: Spread of the emerging viral hemorrhagic septicemia virus strain, genotype IVb, in Michigan, USA. *Viruses*, 4(5), 734-760. 2012.

Deng, X., Shi, J. and Kong, M.G.: Physical Mechanisms of Inactivation of *Bacillus subtilis* Spores Using Cold Atmospheric Plasmas. *IEEE Transactions on Plasma Science.*, 34:1310-1316, 206. 2006

EPA. Options to curb the transport of viral hemorrhagic septicemia virus in inter-lake vessel ballast water; United States Environmental Protection Agency: Washington, USA. 2019.

Jeong, J. M., Jee, B. Y., Kwon, M. G., Se, J. S., Hwang, S. D., Lee, J. H., Hwang, J, Y.: Analysis of the stability of Viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) depending on water temperature. *Journal of Fisheries and Marine Sciences Education.*, 31(5), 1465-1469. 2019.

Hershberger, P. K., J. L. Gregg, C. A. Grady, L. M. Hart, S. R. Roon, and J. R. Winton.: ctors controlling the early stages of viral hemorrhagic septicemia epizootics: low exposure levels, virus amplification and fish o fish transmission. *Journal of Fish Diseases* 34: 893-899. 2011.

Ishiki, T., Nishizawa, T., Kobayashi, T., Nagano, T. and Miyazaki, T.: An outbreak of VHSV viral hemorrhagic septicemia virus) infection in farmed Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in Japan. *Dis. Aquat. Org.*, 47: 87-9, 201. 2001.

Kang, B.J., Jang, Y. H., Jhon, B. K., Park, B. H., & Shin, D. H.: Effect of UV disinfection following mechanical filtration for influent seawater on decrease in disease outbreak of juvenile olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Journal of Fish Pathology*, 28(3), 125-131. 2015.

Kim, M. S., and Kim, K. H.: Protection of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, against viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) by immunization with NV gene-knockout recombinant VHSV. *Aquaculture* 314: 39-43. 2011.

Kim, S. J., and Oh, M. J.: Potentiality to natural immunization inducement against VHS in olive flounder by live VHSV immersion vaccination at temperature controlled culture condition. *Virus Research* 288: 198140. 2020.

Korean Law: Aquatic organism disease control act. Act No.17036. 2021.

Lee, H. J., Yu, H. S., Oh, E. G., Shin, S. B., Park, K.,

- & Kim, J. H.: Germicidal Effect of Electrolyzed Seawater on Live Fish and Shellfish. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 46(5), 534-539. 2013.
- Liltved, H., Vogelsang, C., Modahl, I., & Dannevig, B. H.: High resistance of fish pathogenic viruses to UV irradiation and ozonated seawater. *Aquaculture engineering*, 34: 72-82. 2006.
- Oye, A. K., & Rimstad, E.: Inactivation of infectious salmon anaemia virus, viral haemorrhagic septicaemia virus and infectious pancreatic necrosis virus in water using UVC irradiation. *Diseases of aquatic organisms*, 48(1), 1-5. 2001.
- Park, S. D., Kim, Y. H., Park, J. H., & Kim, P. K.: Changes in Water Quality and Bacterial Compositions in Culture Water of an Ozonated Flounder Farm. *Korean Society of Environmental Biology*, 36(1): 90-97. 2018.
- Pierce, L. R., Willey, J. C., Palsule, V. V., Yeo, J., Shepherd, B. S., Crawford, E. L., & Stepien, C. A.: Accurate detection and quantification of the fish Viral Hemorrhagic Septicemia virus (VHSV) with a two-color fluorometric real-time PCR assay. *PLoS one*, 8(8), e71851. 2013.
- Skal, H., Olesen, N.J. and Melergard, S.: Viral haemorrhagic septicemia virus in marine fish and its implications for fish farming-a review. *J. Fish Dis.*, 28: 509-529, 205. 2005.
- Tordo, N., Benmansour, A., Calisher, C., Dietgen, R., Fang, R.-X., Jackson, A.O., Kurath, G., Nadin-Davis, S., Tesh, R.B. and Walker, P.J.: Family Rhabdoviridae. In Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Manilof, J., Deselberger, U and Bal, L. A., editors. *Virus taxonomy: Eighth report of the international committee on taxonomy of viruses*. Elsevier/Academic Press, London, United Kingdom. p. 623-64, 205. 2005.
- WOAH. *Manual of Diagnostic tests for Aquatic Animals. Viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV)*; World Organisation for Animal Health: Paris, France. 2019.
- WOAH. *Manual of Diagnostic tests for Aquatic Animals. Viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV)*; World Organisation for Animal Health: Paris, France. 2021.
- Wolf, K.: Viral hemorrhagic septicemia. In Wolf, K., editor. *Fish viruses and fish viral diseases*. Cornell University Press, Ithaca, New York, USA. 217-249, 198. 1988
- Schroeder, J.P., Crot, P.L., Von, Dewitz. B., Waler, U. and Hanel, R.: Potential and limitations of ozone for the removal of ammonia, nitrite, and yellow substances in marine recirculating aquaculture systems, *Aquacultural Engineering*, 45:35-41, 201. 2011.
- Spilotopoulou, A., Rojas-Tirado, P., Chetri, R.K., Ka-en, L.F. and Andersen, H.R.: Ozonation control and effects of ozone on water quality in recirculating aquaculture systems, *Water Research*, 13:289-298, 2018.
- You, J. H., Lee, J. H., Mun, S. H., Kwon, S. R., Park, T. S., & Kwon, J. Y.: Disinfection effect of corona discharged plasma water on fish pathogens. *Journal of Fish Pathology*, 33(1), 63-69. 2020.

Manuscript Received : May 14, 2023

Revised : May 26, 2023

Accepted : May 31, 2023