

EHP (*Enterocytozoon hepatopenaei*)에 오염된 사육기구에 대한 UV-C와 차아염소산칼슘의 소독 효과

류지민* · 노을빛* · 김보성**,*†

*국립군산대학교 수산생명의학과

**국립군산대학교 수산과학연구소

The disinfection effect of UV-C and calcium hypochlorite to shrimp farm instruments contaminated with EHP (*Enterocytozoon hepatopenaei*)

Ji Min Ryu*, Eul Bit Noh* and Bo Seong Kim**,*†

*Department of Aquatic Life Medicine, ONS College, Kunsan National University, Gunsan 54150, Korea

**Fisheries Science Institute, Kunsan National University, Gunsan 54150, Korea

In this study, nylon mash and silicone tube mainly used as shrimp farm equipment were contaminated with *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) which is the cause of Hepatopancreatic microsporidiosis (HPM), and were treated with calcium hypochlorite or UV-C disinfection methods for EHP eradication. As a result, similar with the control group (not disinfected), EHP was detected on the nested PCR until the 10 days in the UV-C single treated group. On the other hand, EHP was not detected from 7 days in calcium hypochlorite single treated group (total concentration 200 ppm as available chlorine), and combination of calcium hypochlorite and UV-C treated group revealed no detection of EHP from 3 days. It is appropriate that treated with UV-C and calcium hypochlorite for 3 days or single treated with calcium hypochlorite for 7 days to eradicate EHP on contaminated instrument used in shrimp farms. In contrast, disinfection effect of only using UV-C is very low.

Key words: EHP, disinfection, UV-C, calcium hypochlorite

간췌장미포자충병(HPM; hepatopancreatic microsporidiosis)은 새우류의 간췌장에 미포자충인 EHP (*Enterocytozoon hepatopenaei*)가 감염되어 현저한 성장둔화를 유발하는 소모성 질병으로 알려져 있다(Kumar *et al.*, 2022). EHP는 중간숙주가 필요하지 않아 개체간 감염 및 사육수를 통한 수평감염을 통하여 질병전파가 발생하는 것으로 알려져 있다(Chaijarasphong *et al.*, 2021). 간췌장미포자충병은

얼룩새우(*Penaeus monodon*), 흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*), 청새우(*Litopenaeus stylirostris*)에서 발생되어 Vietnam, India, Brunei, China, Indonesia, Malaysia, Venezuela, Australian 등 전세계적으로 발생 보고가 이루어지고 있으며, 대한민국에서는 2020년부터 양식 흰다리새우 및 큰징거미새우(*Macrobrachium rosenbergii*)에서 발생되고 있는 실정이다(Jang *et al.*, 2022; Kim *et al.*, 2021).

최근 간췌장미포자충병 치료책으로서 albendazole 약육법을 제시하는 연구결과가 있지만(Subash *et al.*, 2023), 국내에서는 실효적인 치료책

†Corresponding author: Bo Seong Kim
Tel: +82-63-469-1884, Fax: +82-63-469-7444
E-mail: fishpath@kunsan.ac.kr

이 없어 무엇보다 질병 전파 방지와 예방법이 중요한 것으로 알려져 있다. 질병의 전파 방지 관련 연구는 어류를 포함한 다양한 종에서 biosecurity 적용을 예로 들 수 있으며(Delabbio *et al.*, 2005), 새우류의 양식장에서도 주기적 예찰을 포함한 biosecurity 도입(Lightner, 2005; Lotz, 1997) 및 새우 양식장 내 biosecurity의 경제성 분석 연구가 진행되어 왔다(Schuur, 2003). 간체장미포자충병을 제어하기 위해 양식장에서 행해질 수 있는 biosecurity 방법들은 EHP를 보유할 수 있는 토양 및 carrier 제어, EHP에 오염된 먹이 급이 금지, 사육수 및 사육 기구의 소독 등이 포함된다(Yanong and Erlacher-Reid, 2012).

간체장미포자충병을 예방하기 위한 실험의 일환으로 EHP spore에 다양한 소독제 처리를 통한 EHP 불활성화를 측정된 결과, 과망간산칼륨(KMnO₄) 및 염소제(Chlorine)가 효과적인 것으로 보고되고 있으나(Aldama-Cano *et al.*, 2018; Pattarayingsakul *et al.*, 2022), 이들 연구에서는 EHP spore의 불활성과 관련된 극관 방출 억제능력만을 확인하는 수준으로 DNA 수준의 사멸기간에 대한 연구는 미비한 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 흰다리새우 육상수조 양식장에서 사용될 수 있는 관찰망 재질인 nylon mesh 및 폭기기구의 일부 재질인 silicon tube를 EHP로 오염시킨 후, chlorine 제제인 차아염소산칼슘(Calcium hypochlorite, Ca(ClO)₂)과 양식장에서 비교적 간편하게 사용가능한 UV-C (Ultraviolet C)를 단독 및 복합 처리할 때의 DNA 수준에서 EHP 사멸기간을 조사하는데 목적이 있다.

먼저 EHP 수득을 위해 간체장미포자충병에 감염된 흰다리새우의 간체장을 마쇄하여 Percoll gradient method를 이용하여 EHP를 분리하여 PBS에 현탁하였고, hemocytometer에서 계수하여 2.62×10^6 cells/ml 농도로 조정하였다(Aldama-Cano *et al.*, 2018). Silicon tube를 0.25×1 cm 규격으로 총 32개의 샘플을 제작한 후 1.5 ml E-tube에 독립적으로 분배하여 EHP spore 현탁액을 각각 200 μ l (5.24×10^5 cells)씩 분주하여 시료를 제작하였다. 이후 UV-C (40W, SANKYO DENKI, Japan)와 차아염소산칼슘(㈜참신메디칼, Korea)을 사용한 소독 방법

에 따라 4개군(대조군 및 실험 1~3군)으로 나누었으며 모든 실험은 실온에서 진행되었다.

먼저 대조군은 시료에 PBS를 200 μ l 추가하고 UV-C에 노출시키지 않은 군으로서, PBS 혼합 후 실온에서 방치하여 실험군 샘플링 주기인 3, 5, 7, 10일차에 2개의 시료를 각각 채취하였다. 실험 1군은 UV-C에 대한 단독 소독 효과를 판단하기 위한 군으로서, 시료에 PBS를 200 μ l 추가하고 시료 샘플링 시점(PBS 노출 후 3, 5, 7, 10일)까지 UV-C를 24시간 주기로 매일 1시간씩 노출시켰다. 실험 2군은 차아염소산칼슘의 단독 소독 효과를 관찰하기 위한 군으로서, 유효염소 농도 측정기(CM-V2, CAS, Korea)를 이용하여 유효염소 농도가 400ppm이 되도록 증류수에 차아염소산칼슘을 첨가하여 수용액을 만든 후, 시료에 각각 차아염소산칼슘 수용액 200 μ l를 추가하여 유효염소(최종적으로 Silicon tube를 포함한 EHP 현탁액 시료내 유효염소는 200 ppm)에 지속적으로 노출되도록 방치하여 샘플링 주기에 2개의 시료를 각각 채취하였다. 실험 3군은 UV-C와 차아염소산칼슘의 병합 소독효과를 관찰하기 위한 군으로서, 시료에 실험 2군과 동일한 농도의 차아염소산칼슘 수용액 200 μ l를 추가하여 UV-C를 24시간 주기로 매일 1시간씩 노출한 군으로 샘플링 주기에 2개의 시료를 각각 채취하였다. nylon mesh도 0.5×0.5 cm 규격으로 절제하여 silicon tube와 동일한 방법으로 24개의 샘플을 제작 및 소독 처리하고 3, 7, 10일차에 샘플링하였다.

샘플링하여 분석한 시료는 3가지 유형으로 오염기구, 오염기구 제거 후 잔여 EHP 현탁액 100 μ l, 현탁액을 완전히 제거한 E-tube로 나누어 EHP의 DNA 존재여부를 검사하였다. 간략하게, 시점별로 수집된 시료를 Patho Gene-spin™ DNA/RNA Extraction Kit (iNtRON, Korea)를 사용하여 제조사의 방법에 따라 DNA 추출 후 Table 1과 같이 primer set 및 조건을 사용하여 SWP-nested PCR 분석을 수행하였다(Jaroenlak *et al.*, 2016). PCR 산물은 1.5% agarose gel 상에서 전기영동하여 first PCR amplicon (514bp) 및 nested PCR amplicon (148bp)의 밴드를 확인하였다.

3일차부터 10일차에 대한 대조군 및 실험군의 DNA 추출 농도는 0.0~27.6 ng/ μ l로 나타났다. 비

Table 1. SWP-nested PCR primers and condition in this study

PCR step	Primer	Sequence (5' - 3')	size	PCR condition	Reference
First	SWP 1F	TTGCAGAGTGTGTTAAGGGTTT	514bp	[1 cycle] 95°C for 5min [30 cycles] 95°C for 30 sec, 58°C for 30 sec, 68°C for 45 sec	Jaroenlak <i>et al.</i> (2016)
	SWP 1R	CACGATGTGTCTTTGCAATTTTC		[1 cycle] 68°C for 5min	
Nested	SWP 2F	TTGGCGGCACAATTCTCAAACA	148bp	[1 cycle] 95°C for 5min [20 cycles] 95°C for 30 sec, 64°C for 30 sec, 68°C for 20 sec	
	SWP 2R	GCTGTTTGCTCCAACGTATTGGA		[1 cycle] 68°C for 5min	

교적 DNA 농도가 낮을 것으로 예상되는 현탁액을 완전히 제거한 E-tube에서 3 ng/μl 이하로 낮은 편에 속하지만 nested PCR 결과 양성 밴드를 확인할 수 있었다. DNA 농도와 nested PCR에서의 양성 결과를 이용하여 Logistic 회귀분석과 ROC 분석을 시행한 결과, DNA 농도가 EHP 검출에 있어서 직접적으로 작용하는 인자는 아닌 것으로 도출되어 본 연구에서 DNA 농도는 PCR 결과에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

Silicon tube 및 nylon mesh 소재의 대조군(UV-C 미처리 및 PBS 혼합군)은 7일차까지 2개의 시료에서 모두 양성 반응을 보였으나, 10일차에서는 50% 시료에서 양성 반응을 보이는 것으로 나타났다(Table 2). 미포자충의 경우 종마다 감염 보유능은 매우 상이한 것으로 나타나며, 짧으면 1주 길면 1년까지 감염능을 가질 수 있는 것으로 알려져 있다(Li *et al.*, 2003). 환경에서의 생존능 역시 종마다 매우 상이한 것으로 나타나는데, *Nosema apis*는 태양광에 24시간 노출 후에도 생존하였으나, *Nosema necatrix*는 태양광에 5시간 노출 후에 생존능을 잃는 것으로 보고되고 있다(Cali and Takvorian, 2004). 일부 수생 미포자충류의 alternative respiratory chain은 산소를 소모하여 ATP의 생산을 촉진하는 것으로 알려져 있으나(Williams *et al.*, 2014), EHP를 포함한 Enterocytozoonidae의 경우 ATP를 생산하기 위한 해당과정이 결여되어 있는 경우로 알려져 있다(Wiredu Boakye *et al.*, 2017). 본 연구에서 나타났던 대조군의 10일차 EHP 검출률 감소는 해당과정의 결여에 기인한 ATP 생산 등 대사기능

저하에 의한 짧은 생존기간의 결과로 생각되지만, 이의 규명을 위해 추가적으로 숙주외부의 환경에서 EHP 생존능에 대한 연구를 진행해야 할 것으로 사료된다.

실험 1군(PBS 추가 후 UV-C 단독처리군)에서도 대조군과 유사하게 샘플링 종료시점인 10일차까지 EHP가 검출되었다(Table 2). 이러한 검출은 EHP가 숙주가 없는 환경에서 최소 5일과 10일 사이에 감염력을 잃는다는 점을 감안할 때(Pattarayingsakul *et al.*, 2022), 오염기구의 비소독과 UV-C 단독처리는 잠재적인 감염원으로서 작용할 수 있을 것으로 사료된다. 새우 양식장에서 UV-C 처리는 순환여과양식 시스템에서 과도하게 발생한 세균의 효율적인 감소를 유발하기 위해 사용하는 방법으로 알려져 있으며(Teitge *et al.*, 2020), DNA와 RNA의 파괴를 통해 바이러스를 포함한 감염성 질병을 예방하기 위한 용도로서 소독방법으로 전세계적으로 사용하고 있는 방법이다(Chang *et al.*, 1998; Kasai *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2023). 하지만, 최근 미포자충류에서 DNA repair와 관련된 인자들이 발견되고 있으며(Mascarenhas dos Santos *et al.*, 2022), EHP에서도 DNA repair와 관련된 유전자가 검출되고 있어 UV-C에 의한 DNA 손상이 회복될 가능성도 있을 것으로 사료된다(Wang *et al.*, 2023). 일부 연구에서는 UV-C 등 다양한 자극이 미포자충에게 극관 방출 유도를 할 수 있는 것으로 알려져 있는데(Keeling and Fast, 2002), EHP spore의 극관 방출 유도는 흰다리새우에 대한 감염성을 매우 낮춘다고 보고되어 있다(Chaijarasphong *et al.*, 2021). 비록

Table 2. EHP detection rates of EHP-contaminated instruments using various disinfection treatment by SWP-nested PCR

Groups	Disinfection method	Instruments	Sampling date			
			3 day	5 day	7 day	10 day
Silicon group	Control	Piece of silicon	100% (2/2)	100% (2/2)	100% (2/2)	50% (1/2)
		Solution	100% (2/2)	100% (2/2)	100% (2/2)	0% (0/2)
		E-tube	100% (2/2)	100% (2/2)	100% (2/2)	0% (0/2)
	UV-C	Piece of silicon	100% (2/2)	100% (2/2)	50% (1/2)	0% (0/2)
		Solution	100% (2/2)	100% (2/2)	100% (2/2)	50% (1/2)
		E-tube	100% (2/2)	100% (2/2)	100% (2/2)	50% (1/2)
	Calcium hypochlorite	Piece of silicon	50% (1/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)
		Solution	50% (1/2)	100% (2/2)	0% (0/2)	0% (0/2)
		E-tube	0% (0/2)	50% (1/2)	0% (0/2)	0% (0/2)
	Calcium hypochlorite + UV-C	Piece of silicon	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)
		Solution	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)
		E-tube	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)
Nylon mesh group	Control	Piece of nylon mesh	50% (1/2)	n.d.	50% (1/2)	50% (1/2)
		Solution	100% (2/2)	n.d.	100% (2/2)	0% (0/2)
		E-tube	100% (2/2)	n.d.	100% (2/2)	0% (0/2)
	UV-C	Piece of nylon mesh	100% (2/2)	n.d.	50% (1/2)	50% (1/2)
		Solution	100% (2/2)	n.d.	100% (2/2)	50% (1/2)
		E-tube	50% (1/2)	n.d.	100% (2/2)	50% (1/2)
	Calcium hypochlorite	Piece of nylon mesh	0% (0/2)	n.d.	0% (0/2)	0% (0/2)
		Solution	100% (2/2)	n.d.	0% (0/2)	0% (0/2)
		E-tube	0% (0/2)	n.d.	0% (0/2)	0% (0/2)
	Calcium hypochlorite + UV-C	Piece of nylon mesh	0% (0/2)	n.d.	0% (0/2)	0% (0/2)
		Solution	0% (0/2)	n.d.	0% (0/2)	0% (0/2)
		E-tube	0% (0/2)	n.d.	0% (0/2)	0% (0/2)

N.d.: not determined

본 연구에서는 DNA 수준에서 EHP의 제거가 효과적으로 나타나지 않았지만, EHP의 감염성을 낮추기 위한 방법으로서 UV-C의 처리가 EHP에서 극관 방출 유발 및 흰다리새우 감염 저하를 유도할 수 있는지에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

반면, 실험 2군(차아염소산칼슘 단독처리군) 중 silicon tube에서는 5일차, nylon mesh에서는 3일차까지 EHP가 검출되었다. 이와 대조적으로 실험 3군(UV-C 및 차아염소산칼슘 복합 처리군)에서는 최초 샘플링 시점인 3일차부터 EHP가 검출이 되지 않았다(Table 2). 염소계 소독제는 비교적 가격이 저렴하고(Mohammed, 2019), 세균, 바이러스, 기생충, 진균을 포함한 많은 범위의 병원체를 불활화

시킬 수 있는 소독제로 쓰이고 있는 성분이다(Yanong and Erlacher-Reid, 2012). 염소계는 세균의 세포막 투과성을 변경시켜 DNA, RNA, 단백질을 포함한 거대분자들이 소실되게 유도하여 멸균할 수 있을 뿐만 아니라(Venkobachar *et al.*, 1977), 미포자충의 포자벽을 침투하여 단백질 2차 구조를 변경하여 생물학적 기능을 잃게 만들고(Zhang *et al.*, 2019), 심한 세포막 손상에 기인한 단백질 등 거대 분자들의 누출 등의 효과를 나타낸다(Jena *et al.*, 2017). 우리나라 흰다리새우 양식장에서도 염소계 소독제인 차아염소산칼슘은 높은 빈도로 사용하는 주요 소독제 중 하나로서(Kwon *et al.*, 2019), 차아염소산칼슘의 사육전 소독은 새우류에서 바이러스 및 미포자충의 감염률을 감소시킬 수 있는

것으로 보고되고 있다(Leblanc and Overstreet, 1991; Limsuwan *et al.*, 2008).

본 연구에서도 EHP에 오염된 시료를 고농도(유효염소 최종농도 200 ppm)의 차아염소산칼슘 단독으로 소독했을 때 5일차까지 EHP의 DNA가 검출되었지만, 7일차에 검출이 되지 않는 것으로 나타나 DNA 수준의 EHP 사멸을 위해서는 차아염소산칼슘 200 ppm으로 최소 7일이상 소독을 실시해야 하는 것으로 나타났다. 이는 STEL water (electrolyzed water)를 사용한 소독법에서 3일 동안의 잔여 염소(Cl⁻) LC₅₀이 모하에서 2.3 ppm, 생후 2달 된 치하에서 3.2 ppm인 것을 감안할 때(Park *et al.*, 2004), 흰다리새우 양식 중 EHP 구충제로서 차아염소산칼슘의 적용은 어려울 것으로 사료되며, 입식 전 사육지 소독을 위해 사용하는 방안으로 고려해야 한다. UV-C와 차아염소산칼슘을 복합하여 소독하였을 때, 3일차에 모두 EHP 음성 결과로 나타나 새우 양식장에서 오염된 소독기구를 사용할 때에는 해당 방법이 가장 신속하게 EHP를 제거할 수 있을 것으로 사료된다. 후속연구로서 EHP를 가장 신속하게 제거할 수 있는 UV-C 및 차아염소산칼슘 복합 소독 처리방법을 흰다리새우 양식 현장에서 도입하였을 때의 간헐장미포자충병 발생억제 효과에 대한 코호트 연구가 추가적으로 필요할 것으로 사료된다.

한편 본 연구에서 차아염소산칼슘 처리는 유기물이 거의 없는 조건에서 수행되었으나, 유기물이 많은 새우 양식장 현장에서의 소독제는 효과를 감면시킬 수 있어(Leal *et al.*, 2018), 사육기구를 담수로 세척하여 유기물을 제거한 후 차아염소산칼슘 처리를 하는 것이 EHP 소독에 효과가 있을 것으로 판단된다. 비록 본 연구에서 각 실험군별로 반복구가 다소 낮아(n=2) 다양한 통계분석을 도입할 수 없었지만, UV-C 단독 처리는 EHP 제거에 있어 효과가 미비하다는 점과 UV-C 및 차아염소산칼슘 복합처리를 통해 EHP 제거를 위한 소독기간을 더 줄일 수 있다는 새로운 견해를 제공한다는 점에서 의미가 있다.

비록 초기 사육수를 위한 일시적인 소독제의 처리는 새우 수확량에서 유의적인 차이를 나타내지 않았다는 일부 연구가 있지만(Bratvold *et al.*, 1999),

인도의 흰다리새우 양식장에서 간헐장미포자충병 단독으로 기인한 1헥타르(ha) 당 1.80 ± 0.24 ton 생산량 저하, 간헐장미포자충병 및 흰반점병 혼합감염에서 기인한 1 ha 당 1.89 ± 0.53 ton 생산량 저하 보고가 있는 만큼(Patil *et al.*, 2021), 산업적으로 매우 큰 영향을 끼치므로 사전에 철저한 EHP 통제(biosecurity 도입 및 운용 등)와 사육기구의 주기적인 소독을 통한 간헐장미포자충병 예방을 위한 대책이 필요하다.

특히, EHP는 chitin 성분 등의 외벽을 보유하고(Yuanlae *et al.*, 2024), 숙주 밖 외부환경에 대한 저항성이 있기 때문에(Weber *et al.*, 2015), 적절하게 제거될 수 있는 효과적인 방안이 강구되어야 한다. 본 연구 결과 사육기구 재질에 따라 다소 EHP의 검출률이 다르게 나타났는데, 축산에서 사육기구 재질에 따라 미생물의 출현도가 다른 점(이, 1984)과 수산양식시설에서도 미생물의 출현도가 다른 점을 비추어(Watanabe and Yoshimizu, 1998), EHP의 오염도가 사육기구 재질별로 다를 수 있을 것으로 사료된다. 따라서, 추후 연구에서는 새우 양식장 내 사육기구의 재질별 오염도 확인 및 세부적인 구제방법의 방안 등에 대한 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

사 사

이 논문은 국립군산대학교 수산과학연구소 학술연구비 지원에 의하여 연구되었음.

Reference

- Aldama-Cano, D.J., Sanguanrut, P., Munkongwongsiri, N., Ibarra-Gómez, J.C., Itsathitphaisarn, O., Vanichviriyakit, R., Flegel, T.W., Sritunyalucksana, K. and Thitamadee, S.: Bioassay for spore polar tube extrusion of shrimp *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP). *Aquaculture*, 490:156-161, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.02.039>
- Bratvold, D., Lu, J. and Browdy, C.L.: Disinfection, microbial community establishment and shrimp production in a prototype biosecure pond. *Journal of the world aquaculture society*, 30:422-432, 1999. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1999.tb00990.x>
- Cali, A., and Takvorian, P.M.: The Microsporidia: path-

- ology in man and occurrence in nature. *SE Asian J. Trop. Med. Public Health*, 35(Suppl 1):58-64, 2004.
- Chaijarasphong, T., Munkongwongsiri, N., Stentiford, G.D., Aldama-Cano, D.J., Thansa, K., Flegel, T.W., Sritunyalucksana, K. and Itsathitphaisarn, O.: The shrimp microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP): Biology, pathology, diagnostics and control. *Journal of invertebrate pathology*, 186:107458, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107458>
- Chang, P.S., Chen, L.J. and Wang, Y.C.: The effect of ultraviolet irradiation, heat, pH, ozone, salinity and chemical disinfectants on the infectivity of white spot syndrome baculovirus. *Aquaculture*, 166:1-17, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00238-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00238-X)
- Delabbio, J.L., Johnson, G.R., Murphy, B.R., Hallerman, E., Woart, A. and McMullin, S.L.: Fish disease and biosecurity: attitudes, beliefs, and perceptions of managers and owners of commercial finfish recirculating facilities in the United States and Canada. *Journal of Aquatic Animal Health*, 17:153-159, 2005. <https://doi.org/10.1577/H04-005.1>
- Jang, G.I., Kim, S.M., Oh, Y.K., Lee, S.J., Hong, S.Y., Lee, H.E., Kwon, M.G. and Kim, B.S.: First report of *Enterocytozoon hepatopenaei* infection in giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii* de Man) cultured in the Republic of Korea. *Animals*, 12:3149, 2022. <https://doi.org/10.3390/ani12223149>
- Jaroenlak, P., Sanguanrut, P., Williams, B.A., Stentiford, G.D., Flegel, T.W., Sritunyalucksana, K. and Itsathitphaisarn, O.: A nested PCR assay to avoid false positive detection of the microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in environmental samples in shrimp farms. *PLoS one*, 11:e0166320, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166320>
- Jena, K., Pandey, J., Upadhyaya, A., Mishra, Y., Gupta, V., Sinha, A., Kumari, R., and Priya, A.: Calcium hypochlorite causes annihilation of bio-molecules of nosema spores purified *Antheraea Mylitta*. *Int. J. Adv. Res.*, 5(4):1958-1965, 2017. <https://doi.org/10.21474/IJAR01/4038>
- Kasai, H., Yoshimizu, M. and Ezura, Y.: Disinfection of water for aquaculture. *Fisheries science*, 68:821-824, 2002. https://doi.org/10.2331/fishsci.68.sup1_821
- Keeling, P.J. and Fast, N.M.: Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annual Reviews in Microbiology*, 56:93-116, 2002. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160854>
- Kim, B.S., Jang, G.I., Kim, S.M., Kim, Y.S., Jeon, Y.G., Oh, Y.K., Hwang, J.Y. and Kwon, M.G.: First report of *Enterocytozoon hepatopenaei* infection in Pacific whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cultured in Korea. *Animals*, 11:3150, 2021. <https://doi.org/10.3390/ani11113150>
- Kumar, T.S., Praveena, P.E., Sivaramkrishnan, T., Rajan, J.J.S., Makesh, M. and Jithendran, K.: Effect of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) infection on physiology, metabolism, immunity, and growth of *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 553:738105, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738105>
- Kwon, M.G., Kim, S.M., Shin, K.W., Cho, M.Y., Hwang, S.D., Swo, J.S., Hwang, J.Y., and Jee, B.Y.: Epidemiological survey of infectious myonecrosis in farmed whiteleg shrimps (*Litopenaeus vannamei*) in Korea. *The Journal of the Korean Society for Fisheries and Marine Sciences Education*, 31(1):94-99, 2019. <http://doi.org/10.13000/JFMSE.2019.2.31.1.94>
- Leblanc, B.D. and Overstreet, R.M.: Efficacy of calcium hypochlorite as a disinfectant against the shrimp virus Baculovirus penaei. *Journal of Aquatic Animal Health*, 3:141-145, 1991. [https://doi.org/10.1577/1548-8667\(1991\)003<0141:EOCHAA>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8667(1991)003<0141:EOCHAA>2.3.CO;2)
- Leal, J.F., Neves, M.G.P., Santos, E.B., and Esteves, V.I.: Use of formalin in intensive aquaculture: properties, application and effects on fish and water quality. *Reviews in Aquaculture*, 10(2):281-295, 2018. <https://doi.org/10.1111/raq.12160>
- Li, H., Cui, Z., Cui, H., Bai, Y., Yin, Z. and Qu, K.: A review of influencing factors on a recirculating aquaculture system: Environmental conditions, feeding strategies, and disinfection methods. *Journal of the world aquaculture society*, 54:566-602, 2023. <https://doi.org/10.1111/jwas.12976>
- Li, X., Palmer, R., Trout, J., and Fayer, R.: Infectivity of microsporidia spores stored in water at environmental temperatures. *Journal of Parasitology*, 89(1): 185-188, 2003. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2003\)089\[0185:IOMSSI\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2003)089[0185:IOMSSI]2.0.CO;2)
- Lightner, D.V.: Biosecurity in shrimp farming: Pathogen exclusion through use of SPF stock and routine surveillance. *Journal of the world aquaculture society*, 36:229-248, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2005.tb00328.x>
- Limswan, C., Chuchird, N. and Laisutisan, K.: Efficacy of calcium hypochlorite on the prevalence of microsporidiosis (*Thelohania*) in pond-reared *Litopenaeus vannamei*. *Kasetsart J Nat Sci*, 42:282-288, 2008. <https://li01.tci-thaijo.org/index.php/anres/article/view/244445>
- Lotz, J.: Viruses, biosecurity and specific pathogen-free stocks in shrimp aquaculture. *World journal of mi-*

- crobiology and biotechnology, 13:405-413, 1997. <https://doi.org/10.1023/A:1018572132529>
- Mascarenhas dos Santos, A.C., Julian, A.T., and Pom- bert, J.F.: The Rad9-Rad1-Hus1 DNA Repair clamp is found in microsporidia. *Genome Biology and Evolution*, 14(4), evac053. 2022. <https://doi.org/10.1093/gbe/evac053>
- Mohammed, A.N.: Resistance of bacterial pathogens to calcium hypochlorite disinfectant and evaluation of the usability of treated filter paper impregnated with nanosilver composite for drinking water purification. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 16:28-35, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.09.002>
- Park, J.H., Seok, S.H., Cho, S.A., Baek, M.W., Lee, H.Y., Kim, D.J., Kim, H.Y., Chang, S.O. and Park, J.H.: Safety and protective effect of a disinfectant (STEL water) for white spot syndrome viral infection in shrimp. *Diseases of aquatic organisms*, 60:253-257, 2004. <https://doi.org/10.3354/dao060253>
- Patil, P.K., Geetha, R., Ravisankar, T., Avunje, S., Solan- ki, H.G., Abraham, T.J., Vinoth, S.P., Jithendran, K.P., Alavandi, S.V. and Vijayan, K.K.: Economic loss due to diseases in Indian shrimp farming with special reference to *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) and white spot syndrome virus (WSSV). *Aquaculture*, 533:736231, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736231>
- Pattarayingsakul, W., Munkongwongsiri, N., Thitama- dee, S., Sritunyalucksana, K. and Aldama-Cano, D.J.: Shrimp microsporidian EHP spores in culture water lose activity in 10 days or can be inactivated quickly with chlorine. *Aquaculture*, 548:737665, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737665>
- Schuur, A.M.: Evaluation of biosecurity applications for intensive shrimp farming. *Aquacultural Engineering*, 28:3-20, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0144-8609\(02\)00053-5](https://doi.org/10.1016/S0144-8609(02)00053-5)
- Subash, P., Uma, A., Ahilan, B. and Kannan, S.S.: *In vivo* and *in silico* investigations on the efficacy of albendazole against *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) infecting *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 575:739801, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739801>
- Teitge, F., Pepler, C., Steinhagen, D. and Jung-Schro- ers, V.: Water disinfection by ozonation has advan- tages over UV irradiation in a brackish water re- circulation aquaculture system for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of fish dis- eases*, 43:259-1285, 2020. <https://doi.org/10.1111/jfd.13238>
- Venkobachar, C., Iyengar, L., and Rao, A.P.: Mechanism of disinfection: effect of chlorine on cell membrane functions. *Water Research*, 11(8):727-729, 1977.
- Wang, L., Li, H., Shi, W., Qiao, Y., Wang, P., Yu, Z., Zhao, R., Hu, R., Shen, H., and Cheng, J.: Whole- genome sequencing and comparative genomic analy- sis of a pathogenic *Enterocytozoon hepatopenaei* strain isolated from *Litopenaeus vannamei*. *Aqua- culture International*, 31(1):523-546, 2023. <https://doi.org/10.1007/s10499-022-00990-9>
- Watanabe, K.I. and Yoshimizu, M.: Disinfection of equipments for aquaculture and fertilized eggs by ozonated seawater. *Fish Pathology*, 33:145-146, 1998. <https://doi.org/10.3147/jsfp.33.145>
- Weber, R., Deplazes, P., and Mathis, A.: Microsporidia. *Manual of clinical microbiology*, 2209-2219, 2015. <https://doi.org/10.1128/9781555817381.ch128>
- Williams, B.A., Dolgikh, V.V., and Sokolova, Y.Y.: Microsporidian biochemistry and physiology. *Microsp- oridia: pathogens of opportunity*, 245-260, 2014. <https://doi.org/10.1002/9781118395264.ch9>
- Wiredu Boakye, D., Jaroenlak, P., Prachumwat, A., Williams, T.A., Bateman, K.S., Itsathitphisarn, O., Sritunyalucksana, K., Paszkiewicz, K.H., Moore, K. A., and Stentiford, G.D.: Decay of the glycolytic pathway and adaptation to intranuclear parasitism within Enterocytozoonidae microsporidia. *Environ- mental Microbiology*, 19(5):2077-2089, 2017. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13734>
- Yanong, R.P., and Erlacher-Reid, C.: Biosecurity in aquaculture, Part 1: An overview. *Southern regional aquaculture center*, 4707:1-16, 2012.
- Yuanlae, S., Prasartset, T., Reamtong, O., Munkongwong- siri, N., Panphloi, M., Preechakul, T., Suebsing, R., Thitamadee, S., Prachumwat, A. and Itsathitphisarn, O.: Shrimp injection with dsRNA targeting the mi- crosporidian EHP polar tube protein reduces internal and external parasite amplification. *Scientific Re- ports*, 14:4830, 2024. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-55400-2>
- Zhang, Y., Miao, Z., Huang, X., Wang, X., Liu, J., and Wang, G.: Laser Tweezers Raman Spectroscopy (LTRS) to Detect Effects of Chlorine Dioxide on Individual *Nosema bombicis* Spores. *Applied Spec- troscopy*, 73(7):774-780, 2019. <https://doi.org/10.1177/0003702818817522>
- 이영욱: 소독제제의 효과적 사용과 국내현황. *대한수 의사회지*, 20:528-537, 1984.