

碩士學位論文

바지락에 기생하는 Perkinsus의 출현
및 진단에 관한 연구



濟州大學校 大學院

水産生物學科

朴 燮 一

1999年 6月

바지락에 기생하는 Perkinsus의 출현 및 진단에 관한 연구

指導教授 崔 光 植

朴 燮 一

이 論文을 理學碩士學位 論文으로 提出함

1999年 6月

朴 燮 一의 理學碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 임 윤 규 印

委 員 최 광 식 印

委 員 허 문 수 印

濟州大學校 大學院

1999年 6月

Occurrence of *Perkinsus* sp. in the Manila Clam,
Ruditapes philippinarum and Development
of Diagnostic Methods

Kyung-Il Park

(Supervised by professor Kwang-Sik Choi)



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE

DEPARTMENT OF MARINE BIOLOGY
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

JUNE 1999

Summary

Prevalence and infection intensity of *Perkinsus* sp. (Apicomplexa, Perkinsidae) were measured from the ten species of marine molluscs including *Ruditapes phillipinarum*, *Coecella chinensis*, *Solen strictus*, *Scapharca broughtonni*, *Tegillarca granosa*, *Pinctata fucata martensii*, *Rapana benosa*, *Crassostrea gigas* and *Scapharca subcrenata* collected from thirteen sites along the south and west coast of Korea during May 1997 and November 1998. Microscopic histopathology of the *Perkinsus* infection and new diagnostic methods were studied using histology, FTM and immunological techniques.

1. The protozoan parasite, *Perkinsus* sp. was found in the 2 of 10 species, the Manila clam *Ruditapes phillipinarum* and the Arc shell, *Scapharca broughtonni*.
2. The parasites were found in the Manila clams collected from the 11 out of 13 sites where the most Manila clams harvested. The clams from Waido and Kimyung were not infected with the *Perkinsus*.
3. For quantitative evaluation of hypnospore, Choi's method was applied after incubating the clams in FTM. As a result of *Perkinsus* counting the highest number of hypnospores was observed from the clams collected from Mokpo, followed by the clams from Kangjin. The lowest number of hypnospores was observed in the clams from Chepudo and Chujado.
4. The most severely infected organ of the clam was the gills, followed by digestive gland, mantle, siphones and foot. The relationship between the total number of hypnospores per gram wet tissue weight of the whole clam and the number of hypnospore per gram wet tissue of the gill is as follows.

$$Y=3.3667X-104,612$$

($r^2=0.88$) where Y is total hypnospores, X is the number of hypnospores counted from the gill.

5. After 6 hours of hypnospore formation in FTM, mean diameter of hypnospore was to be $15\mu\text{m}$, then greatly increased to $65\mu\text{m}$ within 24hours, but no growth of hypnospore occurred afterwards.

6. Induction of zoospore formation was accomplished using Auzoux-Bordenave's method which uses GF/C filtered seawater adjusted to 33-34 ppt, 24°C . After 24hours of incubation the hypnospores began to divide, and zoospores ($4.17\mu\text{m}$ of height, $9.63\mu\text{m}$ long flagella) were released via discharging tube within 24-48 hours.

7. The size of trophozoites varied within 5 to $14\mu\text{m}$ in diameter, each had an eccentric nucleus and a large vacuole.

8. Indirect ELISA was selected as a quantitative assay for hypnospore antigen. ELISA titration curve indicated that the antibody used in ELISA detected as little as 60ng/ml Perkinsus protein.

9. Fluorescence immunostained hypnospore and histological sections of infected clam tissue indicated that the antibody developed in this study detected the hypnospore and trophozoite phase of Perkinsus. Also the antibody exhibited a positive reaction with hemocytes of the clam from Wando.

목 차

Summary	1
I. 서 론	3
II. 재료 및 방법	
1. <i>Perkinsus</i> sp.의 분포와 생태학적 특성	7
1) 시료 채집	7
2) Fluid Thioglycollate Medium (FTM) 기법	10
3) 조직학적 관찰	10
4) 감염진단	10
5) 바지락 부위별 <i>Perkinsus</i> sp. 감염률 조사	12
6) Hypnospore의 성장	12
7) Zoosporulation	12
2. 조직병리학적 관찰	12
3. 면역학적 방법을 이용한 <i>Perkinsus</i> sp. 진단기술개발	13
1) 항원 준비	13
2) 항체 개발	14
3) Rabbit anti- <i>Perkinsus</i> sp. immunoglobulin (IgG)분리	14
4) 시료준비	14
5) Enzyme Linked Immunosorbent Assay	14
6) Immunofluorescence Assay	15
7) Immunohistochemical Assay.....	15
III. 결 과	
1. <i>Perkinsus</i> sp.의 분포와 생태학적 특성	19
1) <i>Perkinsus</i> sp.의 분포	19
2) 지역별 감염률과 감염정도	19
3) 바지락 부위별 <i>Perkinsus</i> 감염정도	22
4) Hypnospore의 성장	27
5) Zoosporulation	27
2. 조직병리학적 관찰	27
3. 면역학적 방법을 이용한 진단기술 개발	33
1) Enzyme Linked Immunosorbent Assay	33
2) Immunofluorescence Assay	34
3) Immunohistochemistry.....	34
IV. 고 찰	46
V. 요 약	51
VI. 참고문헌	53
Appendix	
감사의 글	

List of Figures

	Page
1. Schematic life cycle of <i>P. atlanticus</i> , parasite of clams, <i>Tapes decussatus</i>	6
2. Locations of sampling sites.....	9
3. Schematic illustration of indirect ELISA used in the detection of <i>Perkinsus</i> sp.....	18
4. A. Purified <i>Perkinsus</i> hypnospores using Choi's technique. B. Heavily infected gills of <i>R. philipinarum</i> stained with Lugol's iodine.....	20
5. A correlation between the size of clam and Mackin's scale.....	25
6. Percent infection intensity of <i>Perkinsus</i> sp. in the organs of the Manila clam.....	26
7. Correlation between the number of hypnospores in gill tissue and whole tissue.....	28
8. Growth of <i>Perkinsus</i> sp. hypnospores cultured in FTM at 23°C.....	29
9. <i>In vitro</i> sporulation of <i>Perkinsus</i> sp. in GF/C filtered seawater.....	30
10. Zoospores releasing from hynospore.....	31
11. The Manila Clam, <i>Ruditapes philipinarum</i>	32
12. Trophozoites of <i>Perkinsus</i> sp. found in the Manila clam.....	35

Figures continued

	page
13. Gill plica heavily infected with the parasite <i>Perkinsus</i> sp.....	36
14. A tumor on the foot infected with <i>Perkinsus</i> sp.....	37
15. Stomach of <i>R. philippinarum</i> filled with planktonic particles.....	38
16. Digestive gland tubules infected with <i>Perkinsus</i> sp..	39
17. Trophozoites of <i>Perkinsus</i> sp. and nodular reaction in the female gonad of <i>R. philippinarum</i>	40
18. A typical ELISA titration curve for rabbit anti- <i>Perkinsus</i> sp. IgG.....	42
19. <i>Perkinsus</i> hypnospores stained with FITC goat anti-rabbit IgG.....	43
20. Trophozoites and hemocytes in the gill of the Manila clam stained with FITC goat anti-rabbit IgG(A). Magnified trophozoite of <i>Perkinsus</i> sp.....	44
21. Relationship between Mackin's scale and the number of hypnospores per gram tissue wet weight.....	45

I. 서론

바지락은 우리 나라에서 굴과 홍합 다음으로 많이 생산되는 패류로서 산업적으로 매우 중요한 수산 자원이다. 그러나 1990년대 들어 60,000 톤을 상회하던 바지락 천해양식 생산량은 해마다 감소하여 1995년도에는 15,000 톤을 생산하는 데 그치고 있으며, 이는 바지락 양식 어민들에게 큰 경제적 손실이 되고 있다(한국수산회, 1996). 이와 같은 바지락 생산의 감소는 최근 들어 남·서해안에서 발생하고 있는 여름철 고 수온기의 바지락 대량 폐사가 그 원인인 것으로 분석되고 있으나, 폐사의 직접적인 원인에 대하여는 아직까지 정확히 알려지지 않고 있어 그 원인 규명과 대책 수립에 대한 관심이 높아지고 있다. 바지락 대량 폐사 원인은 여러 가지로 추측되며, Choi와 Park(1997)은 바지락에 기생하는 *Perkinsus* sp.의 국내산 바지락에 있어 그 존재를 밝힌 보고서에서 바지락 개체 당 100,000 내지 3,500,000개의 *Perkinsus* 개체를 보고한 바 있다. 최 등(1998) 역시 바지락의 대량 폐사 원인을 고 수온에 의한 생리적 스트레스, 퇴적물 조성의 악화 및 기생 생물인 *Perkinsus* sp. 등으로 규명하였다(국립수산진흥원, 1998; 최 등, 1998).

*Perkinsus*는 발견 당시 담수어의 곰팡이성 기생충과 유사했기 때문에 *Dermocystidium marinum*으로 분류되었으나(Mackin et al., 1950), 후에 Perkins(1976)는 전자현미경을 이용하여 이들의 유주자에서 Apical complex를 발견함으로써 이를 바탕으로 Levine은 Apicomplexa 문, Perkinsea 강, Perkinsida 목, Perkinsidae 과, *Perkinsus* 속으로 분류하여 오늘에 이르고 있다(Levine, 1978). 하지만 근래에 들어 밝혀진 *Perkinsus*의 다양한 생활사적 특징과 분자생물학의 발달에 따른 DNA 염기서열은 이 기생충이 Apicomplexa보다는 dinoflagellates와의 유연성이 강함을 보여주고 있다(Goggin and Baker, 1993; Siddall et al. 1995, Siddall

et al, 1997).

*Perkinsus*는 현재 세계적으로 *P. marinus*, *P. olseni*, *P. atlanticus*, *P. karlssoni*, *P. qugwadi* 등 5 종이 알려져 있다. 이들은 모두 해산 연체동물의 숙주로 삼는데, *P. marinus*는 대서양산 굴 *Crassostrea virginica*에서 (Mackin et al., 1950) *P. olseni*는 호주산 전복 *Haliotis ruber*에서 (Lester and Davis, 1981), *P. karlssoni*는 캐나다산 해만가리비 *Argopecten irradians*에서 (McGladdery et al, 1991), *P. atlanticus*는 지중해산 바지락 *Ruditapes decussatus*에서 (Azevedo, 1989), 그리고 최근 *P. qugwadi*는 캐나다산 참가리비 *Patinopecten yessoensis*에서 (Blackbourn et al., 1998) 발견되어 보고되었다. 특히 *P. marinus*는 1950년대 초 이들의 존재가 처음 발견된 이래 현재까지 미국의 대서양산 굴 수산업에 막대한 피해를 주고 있으며, *P. atlanticus*도 포르투갈과 지중해 연안 바지락에 기생하며 이들의 대량 폐사를 유발하는 것으로 알려져 있다(Auzeoux-Bordenave, 1995; Andrews, 1996; Azevedo, 1989; Chagot et al., 1987).

Perkinsus spp. 는 아주 독특한 생활사를 갖고 있다. 이들은 이동성과 비이동성 양쪽 모두의 생활사를 갖고 있는데, 숙주 안에서 기생할 때는 이 분에 의해 증식하는 trophozoite이다. Trophozoite는 비이동성으로서 직경이 2-10 μ m 정도이며(Perkins, 1996), trophozoite가 숙주로부터 분리되어 무산소 상태에 방치하면 hypnospore라는 또 다른 비 이동성의 생활사를 갖게 된다. 이때 큰 특징 중 하나는 그 크기가 큰 폭으로 증가하는데, 대서양산 굴 *Crassostrea virginica*에서 발견되는 *P. marinus*의 경우 20-200 μ m에 달하게 된다. Hypnospore가 유산소 상태의 염분 20-30%의 해수에 놓이게 되면 세포 분열을 통하여 한 쌍의 섬모를 가져 이동성이 있는 Zoospore(유주자)를 형성하게 되면서 새로운 숙주로 이동하게 된다. 이후에 섬모가 유실되면 다시 미성숙 trophozoite가 된다(Figure 1).

Perkinsus sp.의 감염 여부를 진단하기 위해서는 Fluid Thioglycollate Media(FTM)에 시료를 넣어 암실에서 약 2주간 배양 후 Lugol's iodine으로 염색하여 확인하는 Ray의 방법(Ray 1954)이 현재 널리 이용되고 있으

며, 감염 정도를 판정하는 방법으로는 Mackin의 기준(Mackin's scale, Mackin, 1962)이 개발되어 이용되고 있다. FTM에서 배양된 Perkinsus를 정량적으로 분석하는 방법으로 Choi et al. (1989)은 2mol의 NaOH를 이용하여 불필요한 조직을 제거하고 Perkinsus만 순수 분리해 내는 방법을 개발하였으며, 현재 Perkinsus의 감염을 정량적으로 확인하는 방법으로 널리 이용되고 있다(Choi et al., 1989; Rodriguez and Navas 1995; Fisher and Oliver 1996). 그러나 최근에 발견된 *P. qugwadi*의 경우 기존의 FTM 기법으로 진단이 불가능한 것으로 밝혀졌으며(Blackbourn et al., 1998), 또한 감염 초기 단계에서의 신속하고 정량적인 진단을 위한 새로운 진단기술의 개발이 필요하게 되었다. 이에 따라 면역학적인 방법과 PCR (Polymerase Chain Reaction) 기법이 개발되어 Perkinsus 진단과 종 동정에 이용되고 있다(Dungan and Roberson 1993; Choi et al., 1991; Marsh et al., 1995; Robledo et al., 1998).

지난 50여 년간 굴에 기생하는 *P. marinus*에 관하여는 비교적 상세한 연구가 진행되어오고 있으나 *P. atlanticus* 와 기타 종에 대한 연구는 아주 미진한 편이다. 특히 국내의 경우 그 동안 *Perkinsus* sp.의 국내 발견과 병리학적인 특성에 관한 연구가 있었으나, 바지락 폐사 현상과 최근 들어 한·일 어업협정 이후 '기르는 어업'에 대한 중요성의 대두에 비추어 연구 성과는 아직 미진하다고 할 수 있다. 이에 본 연구는 우리나라 남·서해안 일대에서 나타나고 있는 바지락 대량 폐사의 원인 규명의 일환으로 첫째, 폐사의 원인 생물로 추정되는 *Perkinsus* sp.의 감염 분포와 그 정도를 조사하였으며, 둘째, 조직병리학적 측면에서 *Perkinsus* sp.가 숙주에 미치는 영향과 숙주의 반응 기작을 관찰하였고, 셋째, 면역학적인 기법을 이용한 감염 초기 진단 기술을 개발 가능성을 확인하며, 넷째, 이 기생충의 생태학적 특성을 연구함으로써 Perkinsus 감염에 대한 대책을 수립하고 안정적인 패류 생산을 위한 기초적 자료로 이용하기 위하여 실행되었다.

II. 재료 및 방법

1. *Perkinsus* sp.의 분포와 생태학적 특성

1) 시료 채집

Perkinsus sp.의 국내 감염 분포를 조사하기 위하여 1997년 5월부터 1998년 11월까지 제주에서는 추자, 서귀포, 성산, 오조리, 외도천 하구, 김녕 등 6개소에서, 육지부에서는 경기도의 제부도, 충남 보령, 전북 곰소만, 전남 목포, 강진, 완도, 장흥, 여수 등 8개소에서 바지락을 채집하였다 (Figure 2). 이들 채집지 중 제주도의 추자도, 오조리와 육지부의 채집지들은 사니질이 잘 발달된 지역으로 오래 전부터 패류양식이 성행하고 있는 지역들이다. 반면 제주의 김녕과 성산항의 조간대는 대부분 암반으로 이루어져 있어서 바위틈의 얇은 사니질 특성을 갖고 있는 곳이다.

바지락 이외에도 대양조개, *Heteromacoma irus*, 퇴조개, *Coecella chinensis*는 제주 김녕항에서, 참굴, *Crassostrea gigas*는 충남 창기와 간월도, 전북 곰소만에서, 피빨고둥, *Rapana benosa*, 피조개, *Scapharca broughtonii*는 전북 곰소만에서, 맛, *Solen strictus*, 꼬막, *Tegillarca granosa*, 새꼬막, *Scapharca subcrenata*은 전남 강진에서, 진주조개, *Pinctata fucata martensii*는 경남 통영에서 채집하여 실험에 이용하였다. 또한 연령에 따른 감염률을 알아보기 위하여 치패부터 다양한 크기의 바지락을 전남 강진의 바지락 양식장에서 채집하였다 (Table 1). 이상의 시료들은 실험실로 옮긴 후 체내의 진흙과 모래 등을 제거하기 위하여 해수에 1일동안 담가 두었으며 각장, 각고, 각폭, 습중량을 측정 후 FTM 방법으로 감염진단을 하였으며 시료의 일부는 조직병리학적 관찰을 위해 조직절편을 제작하였다.

2) Fluid Thioglycollate Medium(FTM) 기법

Perkinsus 종의 진단을 위해서는 FTM 기법이 현재까지는 표준방법이라 할 수 있다. FTM의 제조는 20g의 NaCl과 30g의 dehydrated fluid thioglycollate medium을 1L의 증류수에 넣고 교반기 위에서 황금색으로 변할 때까지 가열하였다. 상온으로 식힌 다음 15ml tube에 10ml 씩 분주한 후 고압멸균 시킴으로써 FTM tube내에 산소를 제거하고 *Perkinsus* sp.의 성장에 필요한 충분한 양의 영양분이 있도록 했다. 그 다음 검사하고자 하는 시료를 멸균된 해부용 칼과 핀셋을 이용하여 각각의 tube에 넣은 후 박테리아의 번식을 억제하기 위하여 5ml의 증류수에 1g의 chloramphenicol을 넣어 잘 혼합한 후 2.5ml를 추출한 다음 nystatin 500,000 unit/10ml H₂O와 섞은 후 50 μ l씩 주입하였다(Ray, 1996; Wilson-Ormond et al., 1993). 시료가 들어 있는 각각의 tube는 실온의 압실에서 2주간 배양하였다.

3) 조직학적 관찰 - 2. 참조

4) 감염 진단

배양이 끝난 조직을 petri-dish 위에 놓고 멸균된 핀셋을 이용하여 분해한 다음 pasteur pipet 으로 Lugol's iodine을 떨어뜨려 조직과 잘 섞은 후 해부현미경으로 검사하였다. Lugol's iodine은 Perkinsus hypnospore의 탄수화물과 반응하여 구(球)형의 검은색이나 검은 갈색으로 염색되어 나타나므로 Perkinsus 감염을 진단할 수 있다. 정량적 분석을 위하여 시료의 일부는 Mackin(1962)의 Table 2 와 같은 기준에 따라 시료의 감염정도를 측정하였다. 또한 Hypnospore 계수를 통한 보다 정확한 감염도 측정을 위하여 Choi et al.,(1989, 1993) 방법에 따라 FTM에서 배양된 시료를 원심분리기를 이용하여 원심분리(2,000 rpm, 10분)한 후 상등액을 제거하고 2 mol의 NaOH를 5ml씩 주입하였다. 시료의 분해를 촉진시키기 위하여 50℃의 항온 수조에서 30분간 반응 시켰으며, 이와 같은 작업을 3회 이상 반복 실시함으로써 가능한 한 순수한 hypnospore만 남도록 하였다. 마지막으로 혈

구 계수판을 이용하여 *Perkinsus hypnospore*를 4회 반복 계수하였다.

5) 바지락 부위별 *Perkinsus* sp. 감염률 조사

바지락 부위별 *Perkinsus* sp.의 감염률을 조사하기 위하여 전남 목포산 바지락 22개체를 채집하여 아가미, 소화맹낭, 외투막, 족(足), 폐각근을 적출한 후 10ml의 FTM에 넣고 1주일간 배양하였다. 배양이 끝난 시료는 2mol의 NaOH 처리를 한 다음 혈구계수판으로 계수하였다.

6) Hypnospore의 성장

바지락의 아가미만을 적출한 후 면도칼을 이용하여 분쇄하였다. 분쇄가 끝난 시료를 9개의 FTM tube에 넣고 23°C±2°C의 암실에서 배양 후 6시간, 12시간, 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일이 경과할 때마다 각각의 tube에 Lugol's iodine을 떨어뜨리고 현미경 아래에서 hypnospore의 사진을 촬영하였다. 촬영된 사진은 scanning한 후 Image analysis를 통한 시간에 따른 hypnospore의 성장을 측정하였다.

7) Zoosporulation

유주자 발생 실험에 이용된 바지락은 전남 강진산으로서 1998년 10월 제주 동문 시장에서 구입하였으며 실험실로 옮긴 후 Auzoux-Bordenave (1995) 등의 방법에 따라 바지락 아가미만을 적출하여 FTM에 넣고 2일간 실온의 암실에서 배양하였다. FTM을 제거한 후 GF/C filter로 여과된 해수에 Nystatin-chloramphenicol 항생제를 첨가하였으며, hypnospore를 넣고 Auzoux-Bordenave(1995) 등의 방법에 따라 실내 기온 25-27°C, 염분 30-33‰, pH 8을 유지시키면서 유주자 발생을 현미경을 이용하여 관찰하였다.

2. 조직병리학적 관찰

실험에 이용된 바지락은 1999년 1월 전라남도 완도에서 채집되었으며 실험실로 옮긴 후 NOAA의 생식소 분석 방법(Powell, 1993)에 따라 아가미, 생식소, 소화맹낭, 족(足) 등이 포함되도록 5mm 두께의 횡단면으로 자른 후 Bouin's fixative에 24시간 고정하였다. 고정이 끝난 조직은 자동 탈수기를 이용 탈수시켰으며, 파라핀으로 포매한 후 마이크로톰으로 두께 4 μm 의 절편을 제작하였다. 각각의 절편은 BSA(Bovine Serum Albumin)를 접착제로 슬라이드 위에 부착하였으며 Hematoxylin과 Eosin으로 염색 후 광학현미경(Olympus, CH30)을 이용하여 다양한 배율 아래에서 바지락의 각 기관을 관찰하였다.

3. 면역학적 방법을 이용한 *Perkinsus* sp. 진단기술 개발



1) 항원 준비

이 실험에 이용된 항원으로 *Perkinsus hypnospore*를 이용하였다. 먼저 hypnospore를 순수 분리하기 위하여 시장에서 각폭 20-40mm의 바지락을 구입하여 아가미만을 적출한 후, Ray(1954, 1966)의 FTM 배양 방법에 따라 FTM 10ml와 nystatin-chloramphenicol 항생제 50 μl 가 첨가된 15ml tube에서 2주간 배양하였다. 배양이 끝난 아가미를 원심분리(2,000rpm, 20분)하여 상등액을 제거하고 아가미를 petri-dish에서 면도칼을 이용하여 분쇄하였으며 망목 크기가 120 μm 와 45 μm 인 sieve를 이용하여 hypnospores를 1차 분리하였다. 2차 분리는 PBS(pH 7.4)로 희석한 후 수차례의 원심분리(1,500 rpm, 5분)를 통하여 얻었으며 현미경으로 찌꺼기가 없음을 확인하였다. 순수하게 분리된 hypnospore는 PBS로 희석한 후 초음파 파쇄기(2 $^{\circ}\text{C}$, 30 Watts, 5분)를 이용하여 분쇄하였다. 분쇄도중 단백질의 변성을 억제하기 위하여 시료가 든 tube를 얼음이 든 비커에 넣은 상태에서 균질화 하였다. 충분히 균질화 된 hypnospore는 -70 $^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다.

2) 항체개발

먼저 항원의 단백질을 BCA protein assay kit(Pierce, No 23225)를 이용하여 적정한 후 1mg/ml 이 되도록 PBS로 희석하였다. Table 3. 과 같이 항체개발 첫 주에 항원 0.5ml와 Freund's Adjuvant Complete(FAC) 0.5ml를 혼합한 후, 토끼의 뒷다리와 등의 피하에 다섯 부위로 나누어 주사하였다. 첫 번째 항원 주사 7일 후, 첫 주와 같은 양의 항원과 Freund's Adjuvant Incomplete(FAI) 용액 0.5ml를 혼합하여 첫 주와 같은 요령으로 토끼에 주사하였다. 항원-FAI 주사는 일주일 간격으로 6주간 실시하였다(Table 3).

3) Rabbit anti-*Perkinsus* sp. immunoglobulin(IgG) 분리

마지막 주사 1주일 후 토끼로부터 30ml의 혈액을 채취하여 serum을 분리하였다. 그 다음 serum은 50% saturated ammonium sulfate로 침전시킨 후 원심분리 (1,000×g, 30분)하여 침전물만 분리하였으며, dialysis tube를 이용하여 투석한 후 단백질을 정량하고 4℃에서 보관하였다.

4) 시료 준비

Perkinsus sp.에 심각하게 감염된 전남 완도산 바지락을 채집하여 아가미와 폐각근을 적출하였으며 비감염지역으로 알려진 제주 김녕 바지락의 아가미와 폐각근을 분리하여 각각 초음파 파쇄기(20 Watts, 5분)로 파쇄한 후 원심분리(500×g, 10분) 하였으며, 단백질 측정 후 -70℃에 보관하였다.

5) Enzyme Linked Immunosorbent Assay(ELISA)

ELISA 실험에 사용될 시료는 *Perkinsus* 감염 바지락의 아가미, 폐각근, 비감염지역 바지락의 아가미, 폐각근과 *Perkinsus* hypnospore, 대조구로 사용될 굴 외투막 등 6종류의 시료를 총 단백질 양이 각각 500μg이 되도록

조절한 다음 2배수로 30ng/ml 까지 희석하여 Polystyrene 96-well ELISA microtitre plate에 50 μ l씩 넣은 후 4 $^{\circ}$ C에서 12시간 동안 반응시켰다. 배양이 끝난 plate는 0.5%의 PBS(0.5% Triton X-100)로 2회 세척하였고, 1%의 bovine serum albumin 200 μ l를 주입하여 1시간 동안 blocking하였다. 0.5% PBS(0.5% Triton X-100)으로 2회 세척 후 rabbit anti-*Perkinsus* sp. hypnospore IgG 10 μ g/ml을 각각의 well에 50 μ l 씩 주입하였다. 1시간 동안 배양 후 다시 0.5%의 PBS(0.5% Triton X-100)으로 3회 세척하였고, goat anti-rabbit serum IgG Alkaline phosphatase conjugate을 200배로 희석하여 50 μ l씩 주입하였다. 1시간 동안 배양 후 5회 세척하였으며, 50 μ l의 substrate(p-nitrophenylphosphate)을 주입한 후 30분 3M의 NaOH로 반응을 저지시키고 ELISA reader를 이용하여 405nm 파장에서 optical density(O.D.)를 측정하였다(Figure 3).

6) Immunofluorescence Assay

FTM에서 배양된 hypnospore를 순수 분리하여 100,000cell/ml이 되도록 하고 이 tube에 0.1M의 PBS (pH 7.3)로 3회 세척한 후, 1/10, 1/50, 1/100, 1/200, 1/500의 비율로 희석된 rabbit anti-*Perkinsus* IgG (1차 항체)를 첨가하여 실온에서 반응시켰다. 배양 후 PBS로 3회 원심분리(500 \times g, 10분)하여 세척하였다. 여기에 anti-rabbit IgG-FITC 접합체를 반응시켰다. Anti-rabbit IgG는 1/50, 1/100, 1/200로 희석하여 hypnospore에 첨가한 후 상온에서 40분간 배양하였다. 배양 후 PBS로 3회 세척한 다음 형광 현미경을 이용 *Perkinsus* 세포에 형광물질의 부착여부를 검사하였다.

7) Immunohistochemical Assay

면역조직화학 실험을 위하여 감염지역으로 알려진 전남 완도산 바지락과 감염 정도가 미약한 제주 김녕산 바지락, *Perkinsus*의 감염과 무관한 전남 통영산 참굴, *Crassostrea gigas*, 제주 김녕산 대양조개, *Heteromacoma irus*를 2의 방법으로 조직절편을 제작하였다. 그 다음 두께

6 μ m의 절편을 만들어 슬라이드 위에 도말한 후 xylene을 이용하여 파라핀을 제거하였고, 알코올을 이용한 탈수 과정을 거쳐 최종 PBS로 치환시켰다. PBS로 치환된 절편들은 rabbit anti-*Perkinsus* sp. IgG를 1/50, 1/100, 1/200로 희석하여 실온의 humid chamber에서 30분간 반응시켰으며 PBS로 3회 10분간 세척한 후 FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG를 1/100, 1/200, 1/400로 희석하여 실온의 humid chamber에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 절편은 PBS로 4회 20분간 세척하여 반응이 일어나지 않은 항체를 제거하였으며, eosin에서 1분간 염색 후 조직절편을 형광현미경 하에서 관찰하였다.

III. 결 과

1. *Perkinsus* sp.의 분포와 생태학적 특성

1) *Perkinsus* sp.의 분포

총 10종의 패류를 대상으로 Ray의 FTM기법과 조직학적 방법을 이용하여 *Perkinsus* sp.의 감염 여부를 검사하였다. 검사 결과 이들 중 바지락, *R. philippinrum*과 피조개, *S. broughtonii*가 *Perkinsus* sp.에 감염되어 있음이 확인되었다. 바지락의 경우 14개 조사 지역 중 13개 지역에서, 피조개는 1개 지역에서 발견되었고, 나머지 대양조개, *H. irus*, 퇴조개, *C. chinensis*, 맛조개, *S. strictus*, 꼬막, *T. granosa*, 새꼬막, *S. subcrenata*, 진주조개, *P. fucata martensii*, 피빨고둥, *R. venosa*, 굴, *C. gigas*, 등 8종에서는 검출되지 않았다. 감염된 바지락은 경기도의 제부도산, 충남의 보령산, 전북의 곰소만, 전남의 목포, 강진, 장흥, 완도, 여수산 바지락였으며 제주의 추자, 오조리, 성산, 서귀포의 바지락이 *Perkinsus*에 감염되어 있었다. 하지만 김녕, 외도천의 바지락에서는 발견되지 않았다(Table 4). 피조개의 경우 전남 곰소에서 채집된 개체들에서 발견되었다. 조직학적 검사 결과 전남 강진산 바지락의 아가미에서 trophozoite가 발견되었지만 그 수는 미미하였다. FTM 방법에 의한 Lugol's iodine 염색 결과 *Perkinsus*는 숙주의 부위별로 상당히 다른 감염률을 보이고 있었다. 특히 감염이 심한 부위는 아가미와 소화맹낭였으며 상대적으로 족(足)과 입·출수공, 폐각근에서는 그 감염도가 낮게 나타났다(Figure 4).

2) 감염률과 감염 정도

FTM 방법에 의한 *Perkinsus* sp. 감염률 검사에서 충남 보령, 전북 곰

소만, 전남 목포, 강진(중·대형 바지락), 장흥, 완도, 여수에서 채집된 바지락은 100% 감염률을 보였다. 경기도 제부도산은 87%, 전남 강진산(중·소형)은 61%, 완도산은 84%였고, 제주의 성산항 85%, 서귀포산 67%, 오조리산 60%, 추자산 23%가 감염되어 있었다. 그러나 제주의 외도, 김녕 바지락에서는 *Perkinsus*가 검출되지 않았다(Table 4). Choi의 방법에 의한 *Perkinsus hypnospore* 계수결과 전남 목포산 3,924,309개, 강진산(중·대형) 3,243,852개로써 감염률과 감염정도가 가장 심한 지역이었다. 그 다음으로는 전북 고평산 지역으로써 1,077,628개가 발견되었으며, 전남 여수산의 경우 개체당 평균 625,520개의 *Perkinsus* sp. 에 감염되어 있었고, 완도산 447,532개, 제주 성산항 228,063개, 충남 보령산 26,597개, 전남 장흥산 26,083개, 제주 오조리산 929개, 제부도산 226개, 추자산 13개의 hypnospore가 검출되었다. 피조개는 전북 고평산에서 채집된 개체들로서 총 8개체 중 2개체에서 발견됨으로 감염율은 25%였으나 개체당 각각 10, 6개의 hypnospore가 발견됨으로써 그 감염 정도는 아주 미미하였다. 연령에 따른 *Perkinsus* sp. 감염조사 결과 전남 강진산의 각폭 20mm 이하의 개체들에서는 전혀 검출되지 않았으나, 20mm 이상의 개체들은 100% 감염되어 있음이 관찰됨으로써 어린 개체들 보다는 고연령군의 감염이 심함을 보여 주었다(Table 5). 또한 완도산 바지락에서도 *Perkinsus* sp.에 감염이 안된 개체들은 상대적으로 작은 개체들이었으며(Table 6), 고평산 바지락의 Mackin's index에 따른 감염도 측정에서도 연령이 높은 개체들에서 감염도가 높아짐이 관찰되었다(Figure 5).

3) 바지락 부위별 *Perkinsus* sp. 감염정도

바지락 부위별 *Perkinsus* sp.의 감염정도는 조사되었던 22개체 중 3개체를 제외하고는 비교적 일정하게 나타났다(Figure 6). 감염정도가 가장 심한 부위는 아가미였고, 소화맹낭, 외투막, 입·출수공, 족(足)의 순서였다. 바지락 1개체당 전체 hypnospore 수에 대한 각 부위의 hypnospore 수를 백분율로 나타내면 아가미 46.12%, 소화맹낭 28.98%, 외투막, 21.94%, 폐각

근 1.65%, 족(足), 1.31%로써 아가미에 전체 Perkinsus의 약 절반정도가 분포하고 있었다. 전체 Perkinsus 수와 아가미에서 검출된 Perkinsus 수와의 상관관계는 $Y(\text{바지락 } 1\text{g 중의 Perkinsus 수})=3.37X(\text{아가미 } 1\text{ g 중의 Perkinsus 수})-104612$ 였다(Figure 7).

4) Hypnosore의 성장

23°C의 FTM에서 배양중인 hypnosore는 배양시작 후 6시간째 그 직경이 $15\mu\text{m}(N=15)$ 로써 trophozoite와 큰 차이가 없었지만 12시간 경과 후부터는 급격히 성장하여 $40\mu\text{m}(N=25)$ 가 되었고, 배양 1일째는 $65\mu\text{m}(N=40)$, 2일째 $70\mu\text{m}(N=40)$, 3일째 $67\mu\text{m}(N=40)$, 7일째는 $80\mu\text{m}(N=40)$ 로써 배양 24시간 이후부터는 hypnosore의 성장은 급격히 둔화되는 것이 관찰되었다(Figure 8).



5) 유주자발생

암실의 여과해수에서 배양된 hypnosore는 약 24시간만에 세포 분열이 일어나기 시작했다. 먼저 세포질이 두꺼워진 자리에서 discharging tube가 형성이 되었으며 이후 세포 분열이 일어났다. 그림 9는 세포분열 직전의 hypnosore부터 2, 4, 8, 16, 32 세포기까지의 분화과정을 보여주고 있다. 분열시작 후 24-48시간 이내에 유주자는 discharging tube를 통하여 방출됐다. 이때 유주자의 몸체는 길이가 $4.17\mu\text{m}(N=17)$ 였으며, flagella의 길이는 $9.63\mu\text{m}(N=8)$ 였다(Figure 10).

2. 조직병리학적 관찰

실험에 앞서 육안 관찰에 의한 바지락의 외형적 특징은 폐각근이 느슨하여 약간의 gaping 현상이 있었으며, 육질부는 윤기가 없었고, 특히 아가미와 족(足) 부위에서 다수의 직경 1-2mm인 흰색의 결절들이 관찰되었다

(Figure 11).

조직 절편에 대한 검사 결과 *Perkinsus* sp.의 trophozoite가 농밀하게 분포하는 부위는 아가미, 족(足), 위(胃) 외벽, 소화맹낭 등이었다. 이들 trophozoite는 직경이 5-14 μ m으로써 수 개에서 수십 개씩 집단을 이루고 있었으며 호산성으로 eosin에 염색되어 붉은 색을 띠었다. 이들 trophozoite는 *Perkinsus* sp.의 특징인 세포 내에 공포(vacuole)가 있고 그 가장 자리에 핵이 위치하는 반지형태를 하고 있었다(Figure 12). 이들 주변에는 eosin에 염색된 바지락의 과립세포가 밀집해 있는 것이 관찰되었다. 아가미의 경우 plical fold 내의 water chamber가 trophozoite로 채워져 있었으며 그 주위에는 다수의 바지락 혈구들이 집중되어 있었다(Figure 13). 족(足)의 표면에서 육안으로 관찰되었던 흰색의 결절은 조직학적 검사결과 *Perkinsus* sp.가 밀집해있고 그 주위에 혈구가 집중되어 나타난 종양의 일종으로 판단되었다(Figure 14). 위(胃)는 플랑크톤 입자들로 차 있었으며 위(胃) 외벽을 따라서 trophozoite가 관찰되었다. 이들은 아가미나 족(足)의 종양 부위보다는 그 밀도가 낮았지만 2-10여 개의 세포가 집단을 형성하고 있었으며 그 주위로 혈구의 집중이 현상이 나타났다(Figure 15). 소화맹낭의 연결조직내에서도 1-4개의 trophozoite가 모여있는 것이 관찰되었으며, 혈구의 집중은 앞서 다른 부위보다는 현저하게 낮았다(Figure 16). 생식소에서는 채집 시기가 1월이었지만 아직 방출되지 않은 성숙한 난모세포가 관찰되었고 비대해진 난소소엽 내에 trophozoite가 모여 있었으며 그 주위로 혈구의 집중 현상이 관찰되었다(Figure 17).

3. 면역학적 방법을 이용한 진단기술 개발

1) Enzyme Linked Immunosorbent Assay

각 시료와 substrate과의 반응 결과 blank와 대조구로 사용된 굴 외투막에서는 반응이 일어나지 않았으나 완도산 바지락의 아가미와, 김녕산 바

지락의 아가미에서는 반응이 일어남을 확인할 수 있었다. 그림 18에 rabbit anti-*Perkinsus* sp. IgG의 적정곡선을 나타내었으며, 표 7은 *Perkinsus* sp. 단백질에 대한 흡광도를 나타내고 있다. 이 연구에서 개발된 *Perkinsus* sp. hypnospore 항체는 최저 60ng/ml의 *Perkinsus* sp. protein까지 적정할 수 있었다. 적정 값은 완도와 김녕 바지락의 아가미가 순수한 hypnospore의 값 보다 높게 검출되었다.

2). Immunofluorescent Assay

그림 19는 FITC labeled goat anti-rabbit IgG에 염색된 *Perkinsus* sp. hypnospore를 보여주고 있다. FITC에 의해 hypnospore의 표면에서 녹색으로 발색됨이 관찰되었다.

3). Immunohistochemistry Assay

실험에 이용된 시료중 전남 완도산 바지락의 아가미와 족(足)의 결절부위에서 FITC에 염색된 trophozoites를 확인 할 수 있었으며 또한 본 실험을 통하여 개발된 항체는 바지락의 혈구세포와도 강하게 반응함이 관찰되었다. 그러나 김녕산 바지락에서는 반응이 관찰되지 않았으며 대조구로 이용되었던 *C. gigas*와 *H. irus*에서도 FITC에 반응된 물질은 발견되지 않았다.

IV. 고 찰

Perkinsus는 지난 1940년대 말 미국의 루이지애나에서 최초로 발견된 이래 현재까지 5종이 학계에 보고된 상태이며, 특히 *P. marinus*와 *P. atlanticus*는 높은 폐사율과 빠른 전염성 때문에 일찍이 큰 주목을 받아오고 있는 패류질병이다. 국내에서는 1997년 Choi and Park(1997)에 의해 최초로 이들의 존재가 학계에 보고되었고, 90년대 초부터 발생하고 있는 여름철 고수온기 바지락 대량폐사의 원인생물로 추측되고 있지만 이에 대한 본격적인 연구는 진행되지 않고 있다. 연구 결과 나타난 *Perkinsus* sp.의 국내 분포는 채집지 최북단인 경기도의 제부도부터 최남단 서귀포까지 우리나라 남·서해안의 주요 바지락 양식장이 *Perkinsus* sp.에 감염되어 있는 것으로 나타났으며, 일본의 Hiroshima와 Kumamoto 지역에서도 감염된 바지락이 보고된 상태이므로 동북아시아에 서식하는 바지락은 이미 *Perkinsus* sp.에 감염된 것으로 추측된다. Perkinsus가 바지락에 미치는 가장 큰 피해는 지속적으로 숙주의 에너지를 흡수하여 숙주가 천천히 죽어 가게 만드는데 있다. 즉 숙주는 먹이 섭식 활동을 통하여 얻은 에너지 대부분을 기생충에게 빼앗겨 외형적으로는 성장 둔화 현상이 나타나며, 산란기인 경우 생식소 발달의 저하, 포란도 감소 등이 나타나고, 또한 숙주의 면역성을 떨어뜨려 다른 병원균의 감염 시, 치명적인 결과를 낳게 하기도 한다(Menzel and Hopkins. 1954; Ray and Chandler. 1954; Paynter and Burrenson, 1991; Choi et al, 1989; Barber & Mann 1994, Kennedy et al, 1995). Choi et al.(1989)의 보고에 의하면 대서양산 굴의 경우 *P. marinus*의 수가 1,000,000개체 이상 존재하면 이들의 호흡 및 번식에 의하여 소비되는 에너지가 숙주의 순생산량을 초과하게 되어 궁극적으로 폐사한다고 보고하였다. 현재까지 Perkinsus가 바지락의 성장 및 번식에 미치는 영향에 대해서는 아직 구체적인 연구가 이루어지지 않고 있어 정확한 영향은

밝혀지지 않고 있지만, 감염이 심한 전북 곰소, 전남 목포, 강진 바지락의 경우 hypnosporium 수가 1,000,000개 이상 관찰되고 있어 바지락도 이와 유사한 영향을 받고 있을 것으로 여겨진다.

바지락 부위별 Perkinsus 검사결과 아가미에서 전체 hypnosporium 수의 약 46%가 분포하고 있음이 밝혀졌다. 이는 아가미에서 생리활성이 빠르게 진행되므로 보다 많은 에너지를 쉽게 획득할 수 있기 때문인 것으로 사료된다. 또한 아가미에서 검출된 hypnosporium 수와 전체 hypnosporium 수와의 상관관계를 밝힘으로써 아가미를 이용한 정량적인 바지락내 Perkinsus 감염정도를 측정할 수 있게 되었으며, 아가미를 제외한 잔여 조직을 이용한 다양한 생화학적 분석을 통하여 Perkinsus 감염에 따른 바지락의 생리적 변화를 조사할 수 있는 장점을 갖고 있다. 또한 이 방법은 기존의 Mackin's scale을 이용한 감염정도 측정이 실제 hypnosporium 수(數)와는 상당한 오차를 보이고 있어(Figure 20) 바지락의 경우 보다 정확한 감염정도 측정을 위해서도 유용한 방법으로 여겨진다.

조직시료를 제작하여 Perkinsus가 체내에 기생하는 단계인 trophozoite 시기의 크기를 측정한 결과 그 직경은 6-10 μ m로 이는 지중해 산 바지락에서 보고된 *P. atlanticus*와 유사한 크기이다(Azevedo, 1989; Sagrista et al, 1995). 또한 FTM 배양 후 형성된 휴면포자의 일종인 hypnosporium의 직경은 20 내지 113 μ m로 (N=68, mean=60 μ m, STD= \pm 22.8) Azevedo(1989)의 보고에 의한 20-40 μ m 및 Auzoux-Bordenave et al.(1995)의 20 내지 100 μ m과 흡사한 결과를 보이고 있다. 또한 이 연구에서 관찰된 *Perkinsus* sp. 와 *P. atlanticus* 모두 바지락을 숙주로 삼는 공통점이 있으며, 일본산 바지락 *R. philippinarum*에서 발견된 *Perkinsus* sp.의 PCR 검사결과 *P. atlanticus* 와 *P. olseni*의 nucleotide sequence와 거의 동일한 것으로 밝혀짐에 따라 (M. Hamaguchi et al., 1998) 국내에서 발견되고 있는 *Perkinsus* sp.는 지중해에서 보고된 *P. atlanticus*와 분류학적으로 동일종이거나 근연종으로 사료된다.

조직병리학적 검사결과 나타난 *Perkinsus* sp.의 주요 감염부위는 아가

미, 족(足), 위, 소화맹낭 이었고 난소소엽에서도 관찰되었다. 이들 부위 중 시료채집 시 육안으로 관찰되었던 족(足) 표면의 유백색 결절이 *Perkinsus* sp.의 감염에 인한 염증 현상이었음이 밝혀짐으로써 *Perkinsus* sp.는 숙주로부터 영양분을 흡수할 뿐만 아니라 세포의 손상까지 가져 올 수 있음이 밝혀졌다. 이 같은 현상은 아가미와 위, 소화맹낭 등에서도 나타났는데 아가미 plica 내의 water chamber, 위 외벽의 연결조직, 소화맹낭의 연결조직 등에서 다수의 *Perkinsus* sp.가 혈구의 집중과 염증을 유발하는 것이 관찰되었다. 이상의 기관들의 기능을 살펴보면 족(足)은 이동에 관여하며, 아가미는 수류(水流)를 일으켜 먹이가 되는 입자들을 모으고 산란활동 시 난소로부터 방출된 알 덩어리를 날개의 난으로 분리시킴으로써 부화율을 높이며, 위는 먹이를 보관하고, 소화맹낭에서는 영양분을 흡수한다(Kenedy et al., 1996). 이런 중요한 기능을 담당하는 기관들이 *Perkinsus* sp.의 감염으로 염증을 유발하게 되면 본래의 기능이 저하되고 이는 결과적으로 바지락의 생리적 균형을 깨뜨림으로써 면역성을 떨어뜨리고 폐사를 유발하는 것으로 추측된다.

이때패의 건강 상태를 조직학적으로 판단하기 위해서는 소화맹낭의 공간을 측정하는 기술이 개발되어 이용되고 있다. 즉, 질병이 들었거나 스트레스를 받았든지, 먹이공급이 부족 할 경우 소화맹낭의 관(管)이 확장된다고 보고하고 있다(Winstead, 1995; Ellis et al, 1998). 그러나 그림 14와 같이 본 실험에 이용된 바지락의 소화맹낭은 감염정도가 심함에도 불구하고 비교적 건강한 상태의 소화맹낭 형태를 보여주고 있다. 이는 그림 13이 보여 주듯이 위가 먹이로 채워져 있는 것으로 미루어 채집당시 먹이의 공급이 원활했기 때문인 것으로 사료된다. 또한 *P. marinus*의 감염률은 계절적 요인을 많이 받는 것으로 알려져 있다(Burreson and Ragono Calvo, 1991; Ford, 1996). 즉 고수온 고염분 시기인 늦여름에 감염도가 최대에 이르는 특성을 감안하면 연중 최저 수준의 수온기로 여겨지는 채집당시는 감염률 또한 상대적으로 낮은 시기였다고 추측된다. 그러므로 *Perkinsus* sp.의 발생 호조건기인 늦여름에는 에너지 불균형으로 인한 대량폐사가 예상되며,

이는 가을철 바지락 대량 폐사를 보고한 최 등(1996, 1998) 등의 예로서 뒷받침될 수 있다.

초기 감염 진단과 정량적인 진단을 위해 개발된 rabbit anti-*Perkinsus* sp. hypnospore는 ELISA에 적용 시켰을 때 0.06-10 μ g/ml의 *Perkinsus* sp. hypnospore 단백질을 검출할 수 있었으며, Choi et al.(1991)은 0.02-0.313 μ g/ml을 검출하였다고 보고한 바 있다. 이는 매우 소량의 *Perkinsus* 단백질만으로도 정량적 진단이 가능함을 보여주는 것이며, 감염 초기 진단 또한 가능함을 보여주는 것이다. 또한 면역형광법에 의해 *Perkinsus* hypnospore가 발광되는 것이 관찰됨으로써 본 실험에서 개발된 항체는 *Perkinsus* sp.의 3단계 생활사 중 trophozite 단계와 hypnospore 단계의 단백질을 검출할 수 있음이 확인되었다. 하지만 유주자 단계는 실험되지 않았으므로 이 연구에서 개발된 항체가 *Perkinsus* 전(全) 단계를 검출해낼 수 있는지에 대해서는 계속적인 실험이 필요하다. 비감염지역으로 알려진 제주 김녕산 바지락의 아가미와 폐각근의 단백질이 rabbit anti-*Perkinsus* hypnospore 항체와 반응한 이유는 아마도 1997년도 5월 채집 당시는 비감염 상태였으나 면역 실험에 이용된 1998년 12월의 바지락은 감염정도는 미약하긴 했지만 *Perkinsus* 에 감염된 바지락이었기 때문인 것으로 사료되며 이는 FTM 검사로 확인되었다. 특히 완도산과 김녕산 아가미의 O.D. 값이 hypnospore의 O.D. 값보다 더 높게 검출된 것은 바지락에 기생하는 *Perkinsus*가 바지락과 비슷한 항원을 갖고 있기 때문인 것으로 Choi et al.(1991)은 추측하였으며, Monts et al.(1997) 등은 *P. atlanticus*에 감염된 바지락, *R. phillipinarum*은 시간이 경과해도 다른 이물질에 대해서는 방어작용을 하나 *P. atlanticus*에 대해서만큼은 방어물질을 분비하지 못한다고 보고하였는데, *P. atlanticus*는 다른 이물질과는 달리 바지락이 자신과 동질로 인식하도록 하기 위한 바지락과 동일한 단백질을 갖게 되며 이를 항원으로 사용한 결과 감염이 미약한 바지락의 아가미에서도 높은 O.D. 값이 검출된 것으로 여겨진다. 그러므로 면역학적인 방법을 이용하여 *Perkinsus* sp.를 진단하기 위해서는 *Perkinsus* sp.의 특정 단백질을 순수 분리해내는

작업이 선행되어야 할 것이다.

현재까지 알려진 Perkinsus의 피해를 최소화하기 위한 방법으로 Krantz와 Jordan(1996)은 유전적으로 Perkinsus에 강한 내성을 가진 품종의 서식 지역을 보호하고 모패 양성, 효과적인 진단기술 개발, 숙주-기생충-환경간의 생태학적 상호작용에 대해 연구할 것을 제안하고 있는데 이 연구를 통하여 경기의 제부도, 제주의 추자도, 외도천 하구 등에 서식하는 바지락은 Perkinsus 감염이 아주 미약한 것으로 밝혀짐에 따라 향후 Perkinsus의 생태학적 특성을 비교 연구하는데 좋은 지역이 될 것으로 사료된다.

바지락은 조간대 진흙 속에 서식하는 특성 때문에 다양한 기생충에 노출될 가능성을 갖고 있다. 김과 전(1983)은 바지락에 기생하는 기생충으로 국내산 바지락에서 Gymnophallid cercaridae의 *Cercaria tapes*을 검출하였고, Bower et al.(1992)은 캐나다산 바지락에서 *Nemotopsis*-like, Gregarine-like, Coccidia-like, *Rhabdocela turbellaria*, *Trematode metacercaria* 등의 기생충을 발견하여 보고한 바 있다. 하지만 Perkinsus가 주목받고 있는 이유는 높은 폐사율과 빠른 전염성 때문이다. 이 때문에 국제수역사무국(OIE)과 아시아·태평양 양식수산물센터(NACA)에서는 이미 Perkinsus를 국제수생동물위생규약 질병으로 규정하고 있을 정도로 이들에 대한 위험성은 널리 인식되고 있다. 그러므로 Perkinsus의 생태학적 특성을 연구하고, 비감염지역을 발굴하며 양식 방법을 개선하는 등 Perkinsus의 피해를 최소화 할 수 있는 방법에 대한 연구가 절실히 요구된다.

요 약

1997년 5월부터 1998년 11월까지 바지락에 기생하는 *Perkinsus* sp.의 국내 분포와 감염정도, 조직병리학적 특징 및 진단기술 개발을 위하여 전국의 17개 지역 10종의 패류를 대상으로 FTM 방법과 조직학적 방법, 면역학적인 방법을 이용하여 조사한 결과는 다음과 같다.

1. 10종의 패류 중 바지락과 피조개에서만 *Perkinsus*가 발견되었으며, 피조개의 감염정도는 극히 경미하였다.
2. *Perkinsus* sp.는 우리 나라 남·서해안의 주요 바지락 서식지의 바지락에 분포하고 있었으며, 제주의 외도는 비감염 지역이었다.
3. Choi et al.,(1989) 방법에 따른 hypnospore 계수 결과 전남 목포산 바지락 1개체 당 3,924,309개, 강진산(중·대형) 3,243,852개가 관찰됨으로써 감염정도가 가장 심하였으며, 제주도산과 추자산은 각각 226개, 13개로써 감염정도가 경미하였다.
4. 바지락 부위별 감염정도가 가장 심각한 부위는 아가미였고, 소화맹낭, 외투막, 입·출수공, 족(足)의 순서였다. 전체 *Perkinsus* 수와 아가미에서 검출된 *Perkinsus* 수와의 상관관계는 $Y(\text{Perkinsus}/\text{바지락 전체 습중량 } 1\text{g}) = 3.37X(\text{Perkinsus}/\text{아가미 } 1\text{g}) - 104,612$ 였다. 이를 바탕으로 바지락의 *Perkinsus* 진단과 감염정도 측정 기법을 개발하였다.
5. 23°C의 FTM에서 배양한 hypnospore는 배양시작 후 6시간째 그 직경이 15 μm (N=15)로써 trophozoite와 큰 차이가 없었지만 12시간 경과 후부터는 급격히 성장하였고 24시간 이후부터는 그 성장이 멈춤으로써 FTM 진단은 배양 2일 후부터 가능성이 확인되었다.
6. 암실의 여과해수에서 배양된 hypnospore는 약 24시간만에 세포 분열이 일어나기 시작했다. 분열시작 후 24-48시간 이내에 유주자는 discharging tube를 통하여 방출됐다. 이때 유주자의 몸체는 길이가 4.17 μm (N=17)였으며, flagella의 길이는 9.63 μm (N=8)였다.

7. Trophozoite는 직경이 5-14 μ m으로써 수 개에서 수 십 개씩 집단을 이루고 있었으며 호산성으로 eosin에 염색되어 붉은 색을 띠었다. 이들 trophozoite는 *Perkinsus* sp.의 특징인 세포 내에 공포(vacuole)가 있고 그 가장 자리에 핵이 위치하는 반지형태를 하고 있었다.

8. ELISA 분석결과 개발된 *Perkinsus* sp. hypnospore 항체는 최저 60ng/ml의 *Perkinsus* sp. protein을 적정할 수 있었다.

9. 형광면역 분석결과 형광물질이 hypnospore의 표면에서 발색됨을 확인할 수 있었으며, 면역조직화학 분석결과 trophozoite에서 반응함의 관찰됨으로써 이 실험을 통하여 개발된 항체는 *Perkinsus*의 생활사중 hypnospore와 trophozoite 단계의 단백질을 검출할 수 있음이 확인되었다. 그러나 바지락 혈구와 반응한 결과에 대해서는 계속적인 연구가 필요하다.

참고문헌

- 국립수산진흥원 남해수산연구소. 1997. 남해안 양식생물 폐사 원인 조사. 남해수산연구소 자료집 6호. 61-73, 77-88, 97-106.
- 국립수산진흥원. 1998. 바지락양식장의 지속적 생산에 관한 연구. 국립수산진흥원 연보 제 29 호 (1997),65~69.
- 김영길, 전세규. 1983. 조개류에 기생하는 흡충류에 관한 연구. III. 바지락 *Tapes philipinarum* 에 기생한 Gymnophallid cercaria의 1 신종, *Cercaria tapes* n. sp.에 대하여. 한국수산학회지. 16(2),154~158.
- 수산연감, 1998, '97 수산연감. 동양문화주식회사. 서울, 569pp.
- 최동림, 권정노, 김용철. 1996. 양식바지락 폐사 원인 조사. 서수연사업보고서. 226-236.
- 최동림, 권정노, 박성우. 1998. 서해안 양식 바지락에 발생한 *Perkinsus* sp. 감염증과 신속 검출. 한국어병학회지. 11(1):69~76.
- Andrews J. D. 1996. History of *Perkinsus marinus*, a pathogen of oysters in Chesapeake Bay 1950-1984. *J. Shellfish Res.* 15(1),13~16.
- Auzoux-Bordenave, S., A.M. Vigario, F. Ruano, I. Domart-Coulon, and D. Doumenc. 1995. *In vitro* sporulation of the clam pathogen *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) under various environmental conditions. *J. Shellfish Res.* 14(2),469~475.
- Azevedo, C. 1989. *Perkinsus atlanticus*, a new species of parasite in the clam *Ruditapes decussatus* (Mollusca, Bivalvia). *Pesca Naveg.* 8~10.
- Barber B. J. & S. M. Mann. 1994. Growth and mortality of eastern oysters, *Crassostrea virginica* (Germlin, 1970), and Pacific oysters,

- Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) under challenge from the parasite, *Perkinsus marinus*. *J. Shellfish Res.* 13,109~114.
- Blackbourn, J., S.M. Bower and G. R. Meyer. 1997. *Perkinsus qugwadi* sp.nov. (intertae sedis), a pathogenic protozoan parasite of Japanese scallops, *Patinopecten yessoensis*, cultured in British Columbia, Canada. *Can. J. Zool.* 76,942~953.
- Bower, S.M., J. Blackbourn and G.R. Meyer. 1992. Parasite and symbiont fauna of Japanese littlenecks, *Tapes philippinarum* (Adams and Reeve, 1850), in British Columbia. *J. Shellfish Res.* 11,13~19.
- Burrenson, E.M. and L.M. Ragone Calvo. 1996. Epizootiology of *Perkinsus marinus* in Chesapeake Bay, with emphasis in data since 1985. *J. Shellfish Res.* 15(1),17-34.
- Chagot, D., M. Comps, V. Ruvano and H. Grizel. 1987. Histological study of a cellular reaction in *Ruditapes decussatus* infected by a protozoan. *Aquaculture.* 67(2):260~261.
- Choi, K. S., E. A. Wilson, D. H. Lewis, E. N. Powell, & S. M. Ray. 1989. The energetic cost of *Perkinsus marinus* parasitism in oysters: Quantification of the thioglycollate method. *J. Shellfish Res.* 8,125~131.
- Choi, K.S., Lewis, D.H., Powell, E.N., Frelter, P.F., and Ray, S.M., 1991, A polyclonal antibody developed from *Perkinsus marinus* hypnospores fails to cross react with other life stages of *P. marinus* in oyster(*Crassostrea virginica*) tissue. *J. Shellfish Res.* 10(2),411~415.
- Choi, K. S. & K. I. Park 1997. Report on the Occurrence of *Perkinsus* sp. In the Manila Clams, *Ruditapes philippinarum* in Korea. *Korean J. Aquacul.* 10,227~237.

- Dungan, C.F., and B.S. Robert. 1993. Binding specificities of mono- and polyclonal antibodies to the protozoan oyster pathogen *Perkinsus marinus*. *Dis. Aquat. Org.* 15,9~22.
- Ellis, M.S., R.D. Barber, R.E. Hilman, Y. Kim and E. N. Powell. 1998. Histopathology analysis. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 130. NOAA/NOS/ORCA, Silver Spring, MD. pp. 198~215.
- Fisher W.S. and L.M. Oliver. 1996. A whole-oyster procedure for diagnosis of *Perkinsus marinus* disease using Ray's fluid thioglycollate culture medium. *J. Shellfish Res.* 15(1),109~117.
- Ford, S.E. 1996. Range extension by the oyster parasite *Perkinsus marinus* into the northeastern United States: Response to climate changes? *J. Shellfish Res.* 15(1),45~56.
- Goggin, C. L. & S. C. Barker. 1993. Phylogenetic position of the genus *Perkinsus* (Protista, Apicomplexa) based on small subunit ribosomal RNA. *Parasitology.* 60,65~70.
- Hamaguchi, M., N. Suzuki, H. Usuki and H. Ishioka. 1998. *Perkinsus* Protozoan Infectious in Short-necked clam *Tapes (=Ruditapes) philippinarum* in Japan. *Fish Pathology.* 33(5),473~480.
- Kennedy V. S., R. I. E. Newell, G. E. Krantz & S. Otto. 1995. Reproductive capacity of the eastern oyster *Crassostrea virginica* infected with the parasite *Perkinsus marinus*. *Dis. Aquat. Org.* 23,135~144.
- Kennedy V., R.I.E. Newell and A.F. Eble. 1996. The Eastern Oyster *Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant Book, Maryland, p.19~73.
- Krantz, G.E. and S. J. Jordan. 1996. Management alternatives protecting *Crassostrea virginica* fisheries in *Perkinsus marinus* enzootic and epizootic areas. *J. Shellfish Res.* 15,167~176.

- Lester, R. J. G. & G. H. G. Davis. 1981. A New Perkinsus Species (Apicomplexa, Perkinsea) From the Abalone *Haliotis ruber*. *J. Invertebr. Pathol.* 37,181~187.
- Levine, N.D. 1978. *Perkinsus* gen.n. and other new taxa in the protozoan Phylum Apicomplexa. *J. Parasitol.* 64(3),549.
- Mackin, J. G. 1962. Oyster disease caused by *Dermocystidium marinum* and other microorganisms in Luisiana. *Publ. Inst. Mar. Sci. Univ. Texas*, 7,132~229.
- Mackin, J. G., H. M. Owen & A. Colloer. 1950. Preliminary note on the occurrence of a new protistan parasite, *Dermocystidium marinum n. sp.* In *Crassostrea virginica* (Gemelin). *Science.* 111,328~329.
- Marsh, A.G., J.D. Gauthier and G.R. Vaster. 1995. A semiquantitative PCR assays for assessing *Perkinsus marinus* infectious in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *J. Parasitol.* 81(4),577~583.
- McGladdery, S. E., R. J. Cawthorn & B. C. Bradford. 1991. *Perkinsus karlssoni* (Apicomplexa) in bay scallops *Argopecten irradians*. *Dis. Aquat. Org.* 10,127~137.
- Menzel R. W. & Hopkins. 1954. Effects of two parasites on the growth of oysters. *Proc. Natl. Shell Asso.* vol. 45.
- Monts, J.F., J.A. Del Rio, M. Durfort and J. Garcio-Valero. 1997. The protozoan parasite *Perkinsus atlanticus* elicits a unique defensive response in the clam *Tapes semidecussatus*. *Parasitology.* 114,339~349.
- Paynter K. T. and E. M. Burrenson. 1991. Effects of *Perkinsus marinus* infection in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*: II. Disease development and impact on growth rate at different salinities. *J. Shellfish Res.* 10, 425~431.

- Ray, S. M. 1954. Experimental studies on the transmission and pathogenicity of *Dermocystidium marinum*, a fungus parasite of oyster. *J. Parasitol.* 40,235.
- Perkins, F.O. 1976. Zoospores of the oyster pathogen, *Dermocystidium marinum*, I. Fine structure of the conoid and other sporozoan-like organelles. *J. Parasitol.* 62,959~974.
- Perkins, F.O. 1996. The structure of *Perkinsus marinus* (Mackin, Owen and Collier, 1950) Levine, 1978 with comments on taxonomy and phylogeny of *Perkinsus* spp. *J. Shellfish Res.* 15(1),67~87.
- Ray S. M. & Chandler. 1954. *Dermocystidium marinum*, a parasite of oysters. *Exp. Parasitol.* 4,172~200.
- Rodriguez, F. and J.I. Navas. 1995. A comparison of gill and hemolymph assays for the thioglycollate diagnosis of *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) in clams, *Ruditapes decussatus* (L.) and *Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeve). *Aquaculture.* 132,145-152.
- Robledo, J.A.F., J.D. Gauthier, C.A. Coss, A.C. Wright, and G.R. Vasta. 1998. Species-specificity and sensitivity of a PCR-based assay for *Perkinsus marinus* in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*: A comparison with the fluid thioglycollate assay. *J. Parasitol.* 84(6),1237-1244.
- Sagrista, E., Durfort, M., and Azevedo, C., 1995, *Perkinsus* sp. (Phylum Apicomplexa) in Mediterranean clam *Ruditapes semidecussatus*: ultrastructural observation of the cellular response of the host, *Aquaculture.* 132,153~160.
- Siddall, M. E., Stokes, N. A. & Burreson, E. M. 1995. Molecular phylogenetic evidence that the phylum Haplosporidia has an

alveolate ancestry. *Mol. Biol. Evolu.* 12,573~581.

Siddall, M. E., K. S. Reece & E. M. Bureson. 1997. 'Total evidence' refutes the inclusion of *Perkinsus* species in the phylum Apicomplexa. *Parasitology.* 115~165.

Winstead, J.T. 1995. Digestive tube atrophy in eastern oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin 1791), expressed to salinity and starvation stress. *J. shellfish Res.* 14,105~111.



감사의 글

누구보다도 즐거운 대학원 과정을 보냈다는 생각이 듭니다. 학문에 대한 끝없는 도전과 방향을 이끌어주시고 이를 위해 실험할 수 있는 모든 여건을 준비하여 주신 최광식 교수님과 힘들 때마다 곁에 있어준 동료들 그리고 꾀은일을 마다 았았던 후배들이 있었기 때문입니다. 더욱이 몃소 뜨거운 열정으로 탐구하는 자세를 보여주시는 지도 교수님의 모습은 앞으로 삶을 살아가면서 항상 되새김할만한 스승의 모습이라고 믿습니다. 면역관련 내용을 꼼꼼히 읽어주시고 논리적이기 못한 문장들을 바로잡아 주신 심사위원장이신 수의학과의 임윤규 교수님께 감사드립니다. 또한 실험 전반에 대해 조언과 격려 하여주시는 심사위원 허문수 교수님께 감사드립니다. 그리고 대학원과정동안 관심과 힘을 주신 해양생산과학부 이정재 교수님, 정상철 교수님, 이기완 교수님, 노 섬 교수님, 송춘복 교수님, 이제희 교수님, 여인규 교수님 그리고 해양연구소의 이영돈 교수님께 감사드립니다. 실험실 동료들인 이창호, 이주한, 강도형, 강상균, 고덕임, 현창용과 졸업한 후배들에게 힘든 일만 부탁한 것 같아 미안하고 준비하는 일들이 모두 잘 이루어졌으면 좋겠습니다. 이외에도 Perkinsus와 관련된 귀중한 자료를 보내준 미국과 유럽의 연구자들에게도 고마움을 표하고 싶습니다. 바쁘다는 핑계로 소홀히 대했던 제광교회 청년부의 지도 목사님과 회원들에게 무어라 사죄의 말을 해야할지 모르겠습니다. 기도해 주시고 관심 가져 주셔서 고맙습니다. 특히 동기들 송일권, 이선경, 조은숙, 아들 사랑에 폭 빠져 있는 혜정, 금미 그리고 덕향. 모두가 미소를 머금게 하는 친구들입니다. 자식을 멀리까지 보내시고 뒷바라지 해주신 부모님께 감사드리며 신희의 꿈에 젓어 있을 막내 상미, 그리고 미국에서 열심히 일하고 있는 연희-빨리 만날 수 있는 시간이 왔으면 좋겠습니다. 사랑의 빛을 진 분들을 꾀으라면 이모, 이모부, 이종 사촌들을 빼놓을 수 없습니다. 별 때마다 용기와 사랑을 주신 이분들을 생각하면 전 참 행복한 사람이구나 새삼 느낍니다. 특별히 감사를 표할 분이 계신데 바로 외할머니이십니다. 30년 가까이 살아오면서 당신께 항상 빛지고 살아오고 있다는 생각입니다. 할머니의 기도가 꾀 이루어졌으면 하고 항상 건강하시길 하나님께 기도합니다. 외할머니 고맙습니다.

Appendix 1. FTM results of *R. philipinarum* collected from Changheong on Sep 21, 1997. SWD=shell width in mm, TWWT=total tissue wet weight in gram, N. spores / unit Wt=number of hyhnospores per gram tissue wet weight.

No	SWD	TWWT	N of spores/ individual	N of spores/g TWWT
1	29.50	1.310	7,500	5,725
2	29.75	.	6,250	.
3	30.75	1.250	3,750	3,000
4	30.90	1.910	1,250	654
5	30.90	1.590	20,000	12,579
6	31.60	2.232	41,250	18,481
7	32.10	2.076	2,500	1,204
8	32.20	2.005	47,500	23,691
9	32.40	2.061	7,500	3,639
10	32.85	2.051	65,000	31,692
11	33.00	2.247	62,500	27,815
12	33.60	2.251	7,500	3,332
13	33.80	2.711	32,500	11,988
14	34.40	2.264	33,333	14,723
15	35.60	2.377	48,750	20,509
16	35.60	2.589	0	0
17	35.90	2.044	1,250	612
18	36.40	2.672	2,500	936
Mean	34.36	2.327	26,083	11,525
STD	2.12	0.416	22,732	10,521

Appendix 2. FTM results of *R. philipinarum* collected from Komsoe on Dec 3, 1997. SWD=shell width in mm, TWWT=total tissue wet weight in gram, N. spores / unit Wt=number of hyphospores per gram tissue wet weight.

No	SWD	TWWT	N of spores/ individual	N of spores/g TWWT
1	31.60	1.123	475,000	422,974
2	32.40	1.074	161,667	150,528
3	32.70	1.351	600,000	444,115
4	32.80	0.913	616,667	675,429
5	32.90	1.266	162,500	128,357
6	33.20	1.321	216,667	164,017
7	33.20	1.270	2,075,000	1,633,858
8	33.30	1.498	20,000	13,351
9	33.50	1.021	122,500	119,980
10	33.60	1.473	1,475,000	1,001,358
11	33.70	1.253	285,000	227,454
12	33.80	1.698	550,000	323,910
13	33.90	1.462	258,333	176,699
14	34.10	1.383	608,333	439,865
15	34.80	1.455	16,667	11,455
16	34.90	1.296	566,667	437,243
17	35.30	1.558	2,358,333	1,513,693
18	35.50	1.626	316,667	194,752
19	35.70	1.988	2,666,667	1,341,382
20	35.85	1.517	375,000	247,198
21	36.00	1.172	2,350,000	2,005,119
22	37.10	1.312	4,091,667	3,118,648
23	39.75	1.919	1,200,000	625,326

24	40.10	1.879	2,175,000	1,157,531
25	40.50	2.218	1,975,000	890,442
26	42.00	2.371	2,300,000	970,055
Mean	35.08	1.478	1,077,628	709,028
STD	2.73	0.358	1,077,958	734,519

Appendix 3. FTM results of *R. philipinarum* collected from Seogwipo on Oct 12, 1997. SWD=shell width in mm, TWWT=total tissue wet weight in gram, N. spores / unit Wt=number of hyphospores per gram tissue wet weight.

No	SWD	TWWT	N of spores/ individual	N of spores/g TWWT
1	17.20	0.189	0	0
2	18.05	0.294	6,250	21,258.5
3	18.40	0.249	0	0
4	21.10	0.330	43,750	132,575.8
5	21.55	0.405	6,250	15,432.1
6	22.45	0.477	243,750	511,006.3
7	22.55	0.249	18,750	75,301.2
8	23.30	0.425	0	0
9	23.70	0.470	1,250	2,659.574
10	24.00	0.527	18,750	35,578.75
11	24.10	0.605	43,750	72,314.05
12	24.10	0.505	18,750	37,128.71
13	24.90	0.706	0	0
14	25.70	0.716	12,500	17,458.1
15	26.35	0.879	1,512,500	1,720,705
16	26.80	0.581	0	0
17	26.85	0.660	37,500	56,818.18
18	28.00	0.928	0	0
19	28.30	0.845	62,500	73,964.5
20	28.40	0.971	0	0
21	32.45	1.758	131,250	74,658.7
22	35.25	1.987	1,875,000	943,633.6
23	35.80	1.487	31,250	21,015.47
Mean	25.19	0.706	176,684	165,717.8
STD	4.84	0.471	484,923	400,431.6

Appendix 4. FTM results of *R. phillipinarum* collected from Ojori on Sep 28, 1997. SWD=shell width in mm, TWWT=total tissue wet weight in gram, N, spores / unit Wt=number of hyphospores per gram tissue wet weight.

No	SWD	TWWT	N of spores/ individual	N of spores/g TWWT
1	22.80	0.390	0	0
2	24.90	0.490	0	0
3	25.40	0.534	5	9
4	25.65	0.562	0	0
5	26.00	0.570	1	2
6	26.60	0.516	6	12
7	26.60	0.725	0	0
8	27.10	0.605	2,500	4,132
9	27.60	0.673	18	27
10	27.60	0.652	0	0
11	27.80	0.645	3,750	5,814
12	29.10	0.670	0	0
13	29.40	0.762	20	26
14	32.10	1.086	0	0
15	33.20	1.461	10	7
16	34.40	1.217	100	82
17	34.90	1.513	0	0
18	35.25	1.085	10,000	9,217
19	35.40	1.551	1,250	806
20	35.70	1.299	8	6
Mean	29.72	0.875	930	1,059.98

STD	4.12	0.377	2,365	2,473.02
-----	------	-------	-------	----------

Appendix 5. FTM results of *R. philippinarum* collected from Yeosu on Oct 28, 1997. SWD=shell width in mm, TWWT=total tissue wet weight in gram, N. spores / unit Wt=number of hyphospores per gram tissue wet weight.

No	SWD	TWWT	N of spores/ individual	N of spores/g TWWT
1	27.00	0.860	368,750	428,779
2	27.00	0.934	356,250	381,424
3	27.40	0.819	512,500	625,763
4	27.70	0.954	593,750	622,379
5	27.80	0.728	393,750	540,865
6	27.80	0.960	132,500	138,020
7	29.50	1.294	1,843,750	1,424,845
8	29.80	0.968	116,250	120,093
9	30.20	1.320	31,250	23,674
10	31.20	1.163	412,500	354,686
11	31.20	1.123	1,925,000	1,714,159
12	31.60	1.104	375,000	339,673
13	33.20	1.562	437,500	280,089
14	33.40	1.070	31,875	29,789
15	34.10	1.401	2,112,500	1,507,852
16	36.60	1.458	60,000	41,152
17	36.80	1.996	668,750	335,045
18	45.80	2.875	887,500	308,695
Mean	31.56	1.255	625,520.8	512,054.8
STD	4.73	0.509	656,711.1	513,759.9

Appendix 6. FTM results of *R. philipinarum* collected from Poryung on Dec 12, 1997. SWD=shell width in mm, TWWT=total tissue wet weight in gram, N. spores / unit Wt=number of hypospores per gram tissue wet weight.

No	SWD	TWWT	N of spores/ individual	N of spores/g TWWT
1	25.90	0.760	625	822
2	26.10	0.688	7,500	10,901
3	26.60	0.780	3,750	4,807
4	26.70	0.836	7,500	8,971
5	27.10	0.845	9,375	11,094
6	27.10	0.914	3,750	4,102
7	27.40	0.745	6,250	8,389
8	28.10	1.001	18,125	18,106
9	28.30	0.822	30,000	36,496
10	28.60	1.059	7,500	7,082
11	30.50	1.137	50,000	43,975
12	31.20	1.655	20,000	12,084
13	31.60	1.321	2,500	1,892
14	31.60	1.264	18,125	14,339
15	32.30	1.347	131,875	97,902
16	32.30	0.731	74,375	101,744
17	33.10	1.546		
18	33.10	1.512	30,000	19,841
19	33.40	1.830	14,375	7,855
20	34.10	1.944	31,875	16,396
21	34.60	1.886	6,250	3,313
22	38.20	2.136	16,875	7,900
Mean	31.02	1.291	26,597.2	23,416.08

STD	3.36	0.456	30,573.0	28,311.34
-----	------	-------	----------	-----------

Appendix 7. FTM results of *R. phillipinarum* collected from Chepu on Dec 20, 1997. SWD=shell width in mm, TWWT=total tissue wet weight in gram, N. spores / unit Wt=number of hypospores per gram tissue wet weight.

No	SWD	TWWT	N of spores/ individual	N of spores/g TWWT
1	27.5	0.328	200	609
2	28.3	0.628	20	31
3	28.7	0.705	0	0
4	29.3	0.815	0	0
5	29.3	0.615	200	325
6	29.6	0.845	200	236
7	30.1	0.898	100	111
8	30.2	0.469	0	0
9	30.4	0.809	500	618
10	31.1	0.897	50	55
11	31.4	1.033	1,000	968
12	31.8	1.193	0	0
13	31.8	1.110	500	450
14	31.8	0.833	10	12
15	32.2	1.155	20	17
16	32.2	1.206	30	24
17	32.8	1.212	1,000	825
18	33.1	1.273	50	39
19	34.0	1.283	20	15
20	34.3	0.935	500	534
21	34.5	1.586	500	315
22	34.6	1.273	500	392
23	35.0	1.582	300	189
24	35.2	1.237	200	161
25	35.5	1.323	30	22
26	35.6	1.573	5	3
27	36.0	1.572	30	19
28	37.0	1.686	20	11

29	37.3	1.821	500	274
30	40.1	1.464	300	204
Mean	32.69	1.112	226.16	215.72
STD	3.02	0.377	283.14	267.79

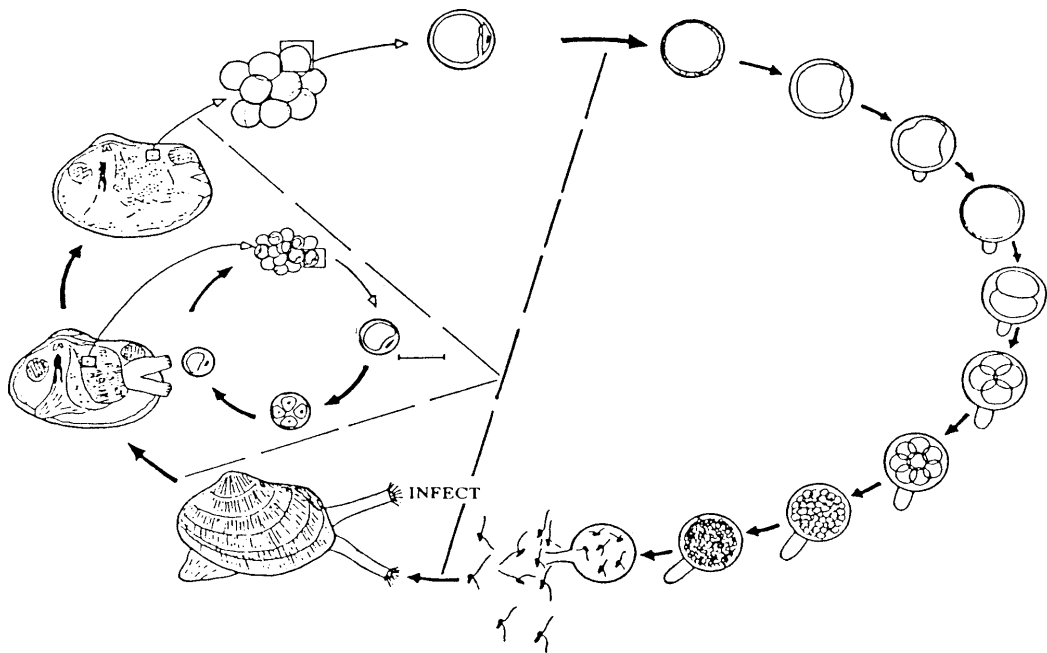


Fig. 1. Schematic life cycle of *Perkinsus atlanticus*, parasite of clams, *Tapes decussatus* (adopted from Auzoux-Bordenve et al., 1995)



Fig. 2. Locations of sampling sites

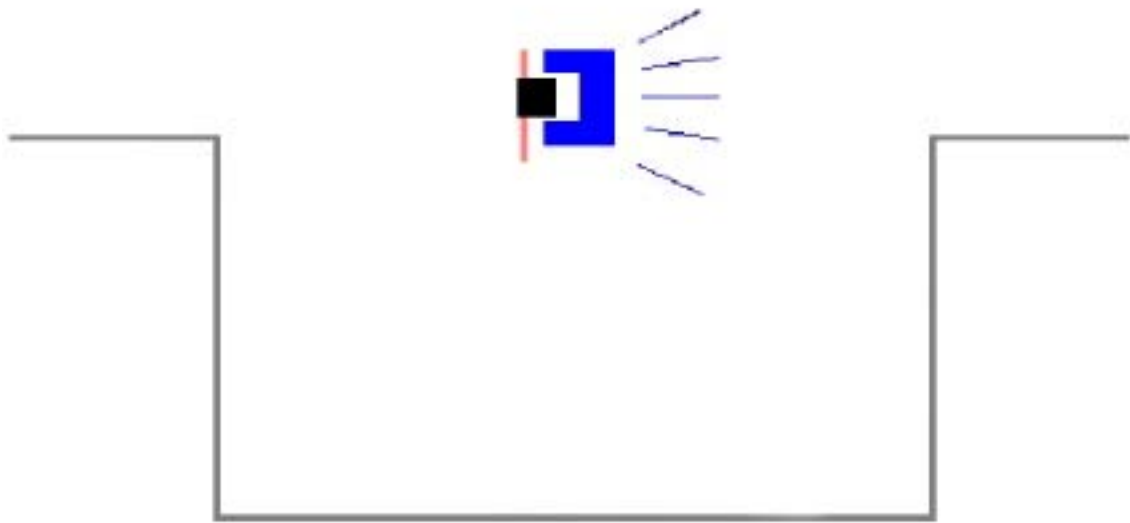


Fig. 3. Schematic illustration of ELISA used in the detection of *Perkinsus* sp.

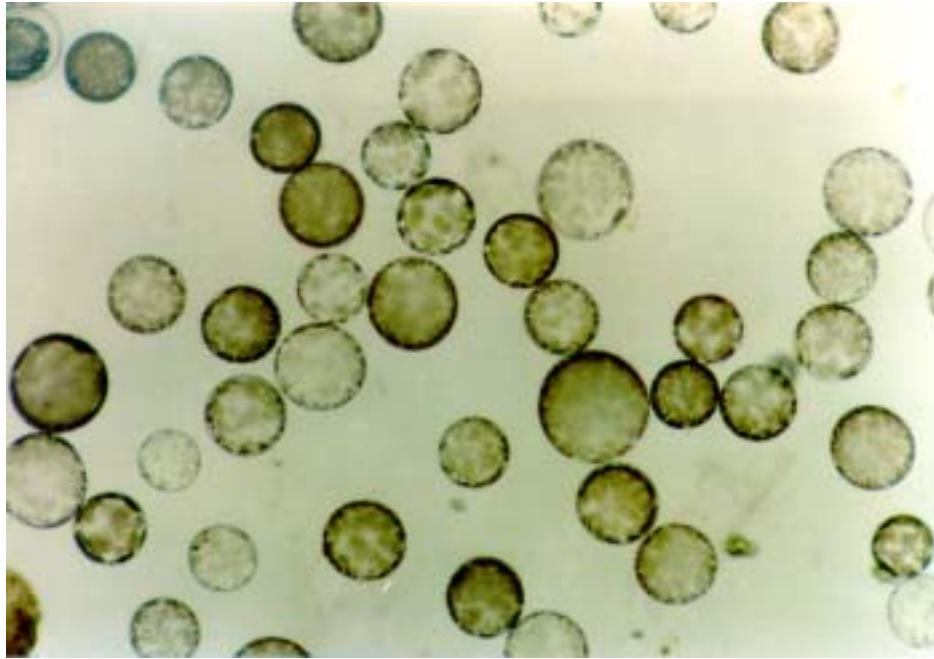


Fig. 4. A. Purified *Perkinsus hynospores* using Choi's technique. B. Heavily infected gills of *R. philipinarum* stained with Lugol's iodine.

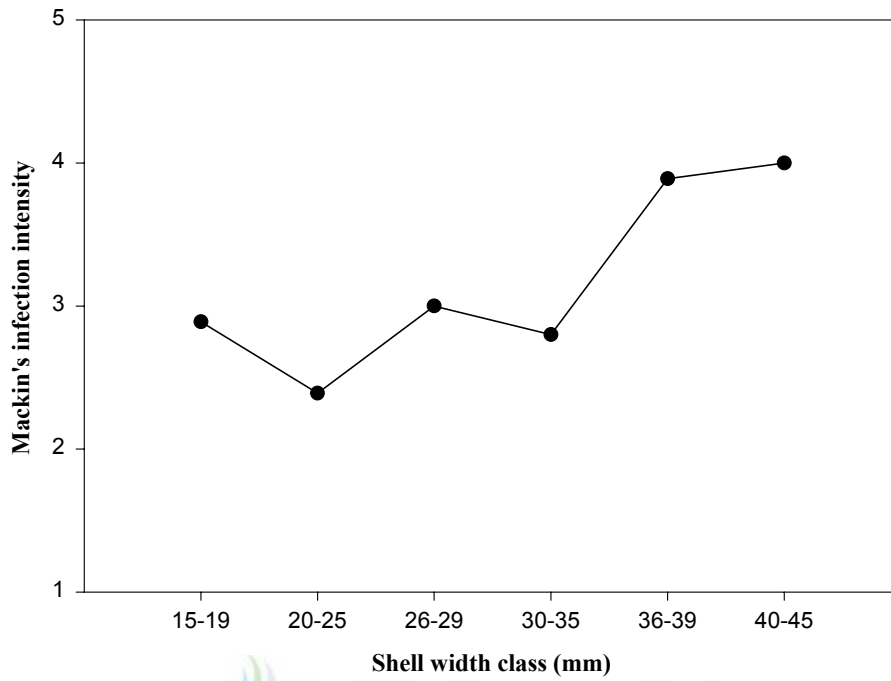


Fig. 5. A correlation between the size of clam and Mackin's scale.

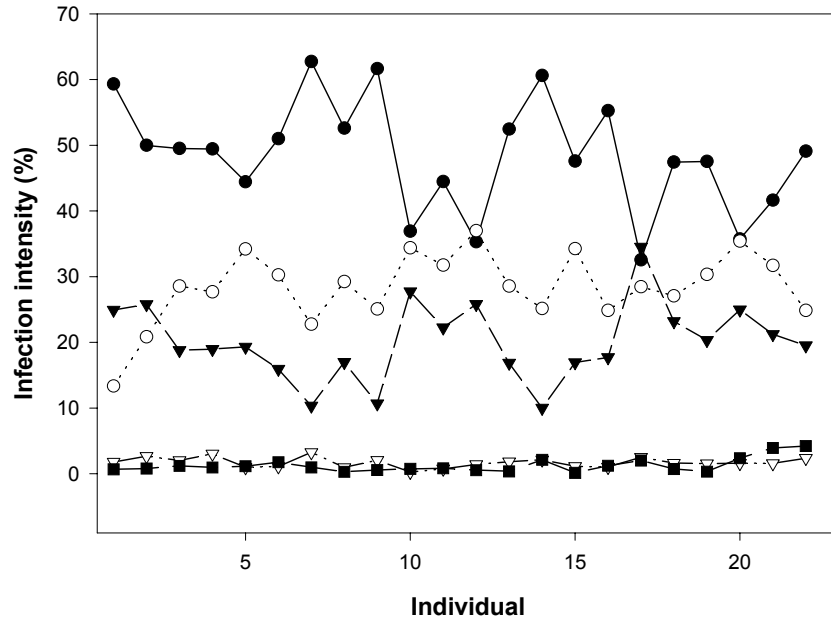


Fig. 6. Percent infection intensity of *Perkinsus* sp. in the organs of the Manila clam.

●=gill, ○=visceral mass, ▼=mantle, ▽=adductor muscle, ■=foot.

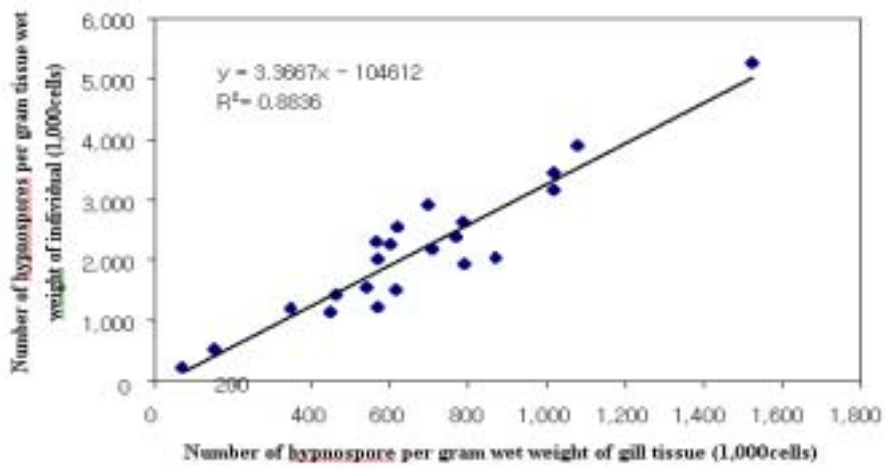


Fig. 7. Correlation between the number of hyphospores found in gill tissue and whole tissue.

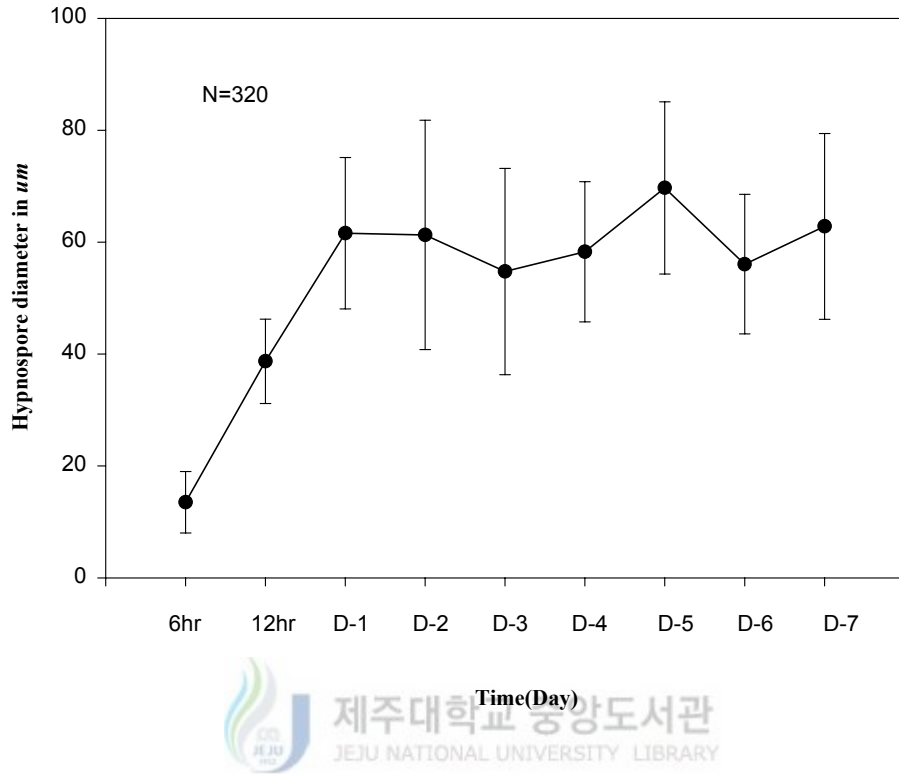


Fig. 8. Growth of *Perkinsus* sp. hyhnospores cultured in FTM at 23 °C .

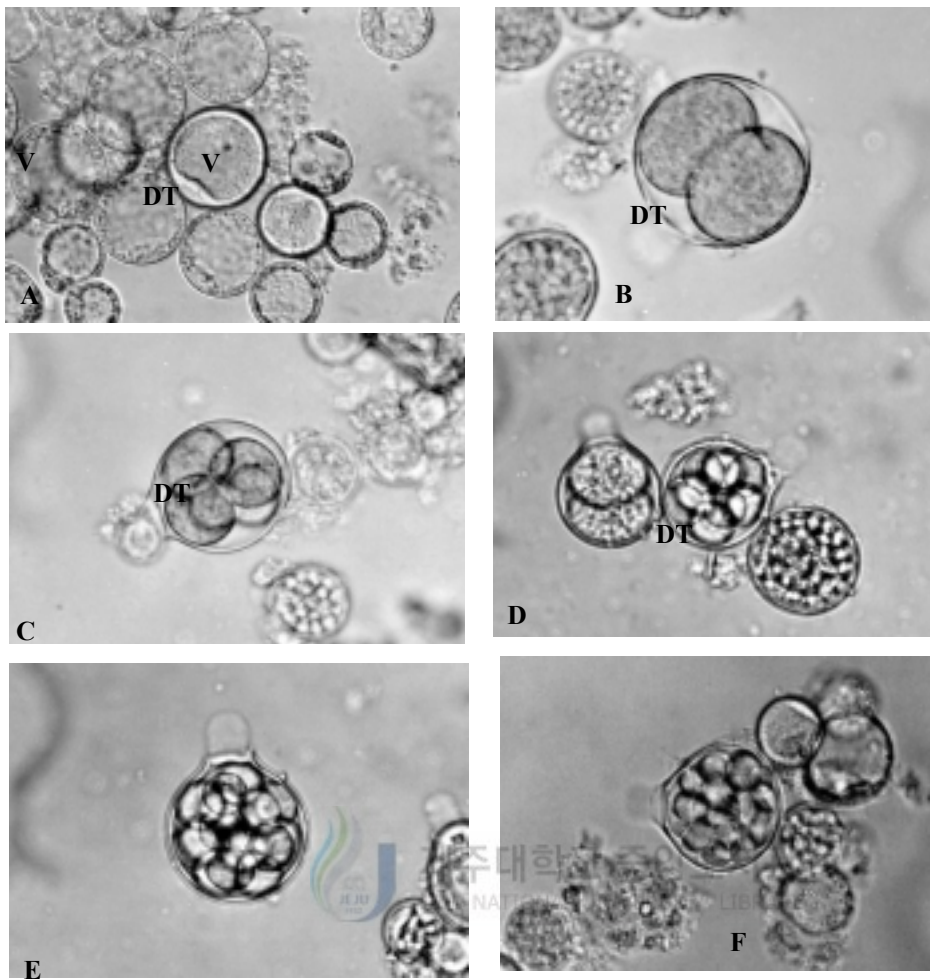


Fig. 9. *In vitro* sporulation of *Perkinsus* sp. in GF/C filtered seawater. A Beginning of ecentric vacuole subdivision, B; 2 cell-stage, C; 4 cell-stage, D; 8 cell-stage. E 16 cell-stage, F32 cell-stage. Scale-bar = 25 μ m. Vacuole (V); Discharging tube (DT). 400 X.



Fig. 10. Zoospores releasing from hynospore. Scale=5 μ m.

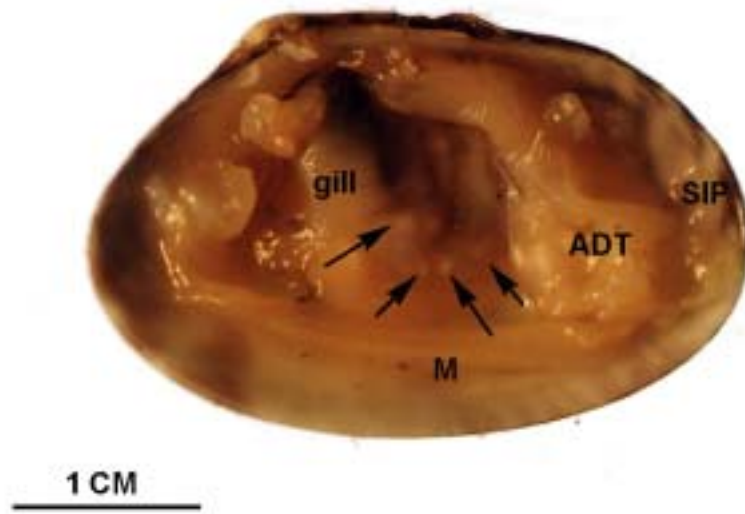


Fig. 11. The Manila Clam, *Ruditapes philipinarum*. (M; mantle, ADT; adductor muscle, SIP siphon)

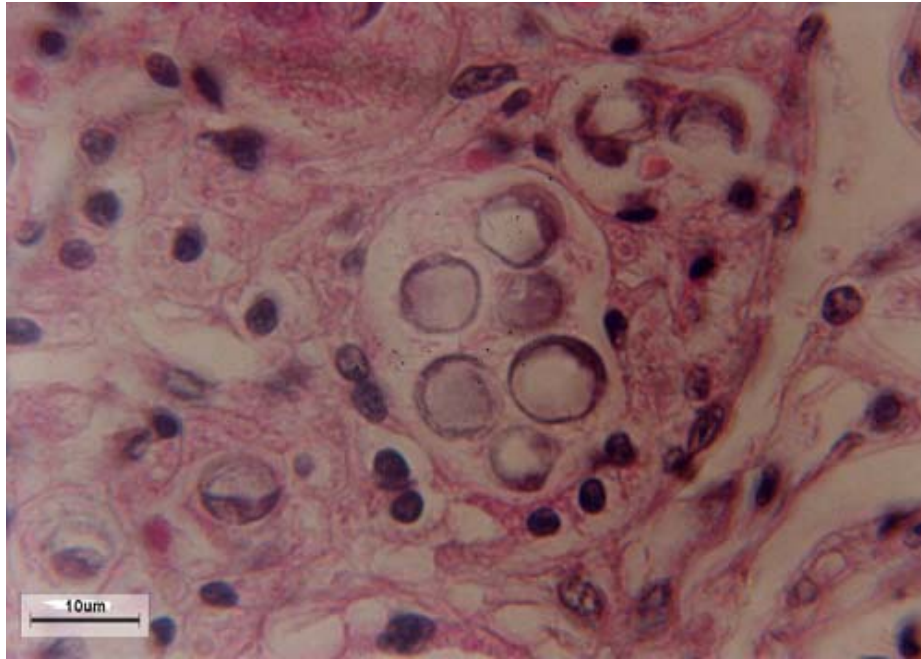


Fig. 12. Trophozoites of *Perkinsus* sp. found in the Manila clam. Vacuole (V); Nucleus (N). 1,000 X.

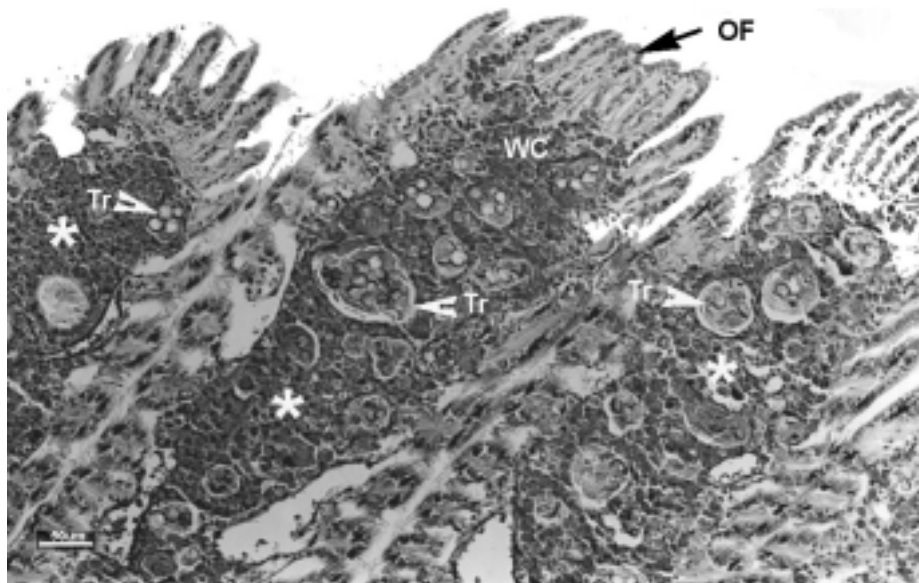


Fig. 13. Gill plica heavily infected with the parasite *Perkinsus* sp. (Tr; trophozoites, OF ; ordinary filaments, WC ; water chamber)

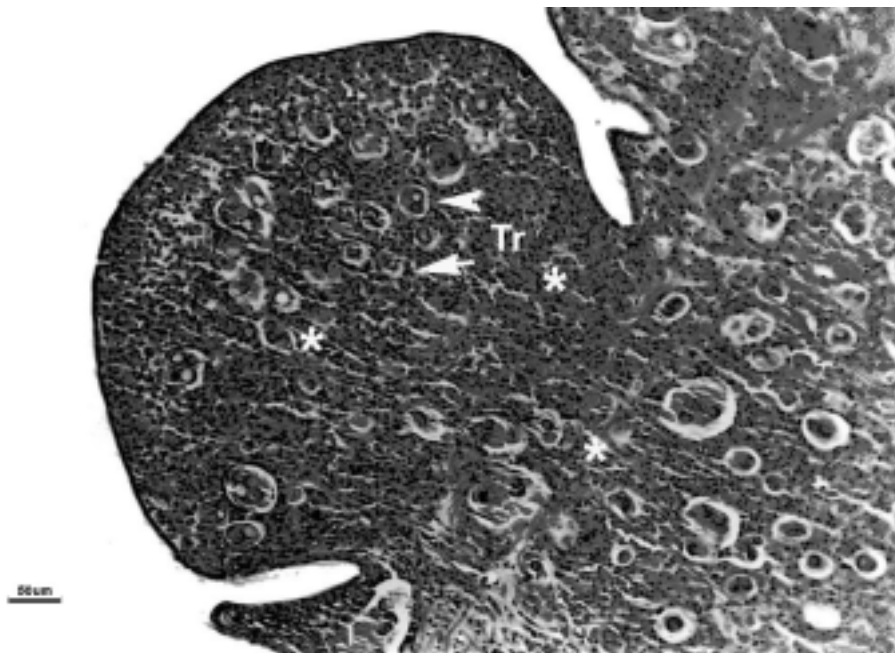


Fig. 14.A tumor on the foot infected with *Perkinsus* sp. (Tr: trophozoites)

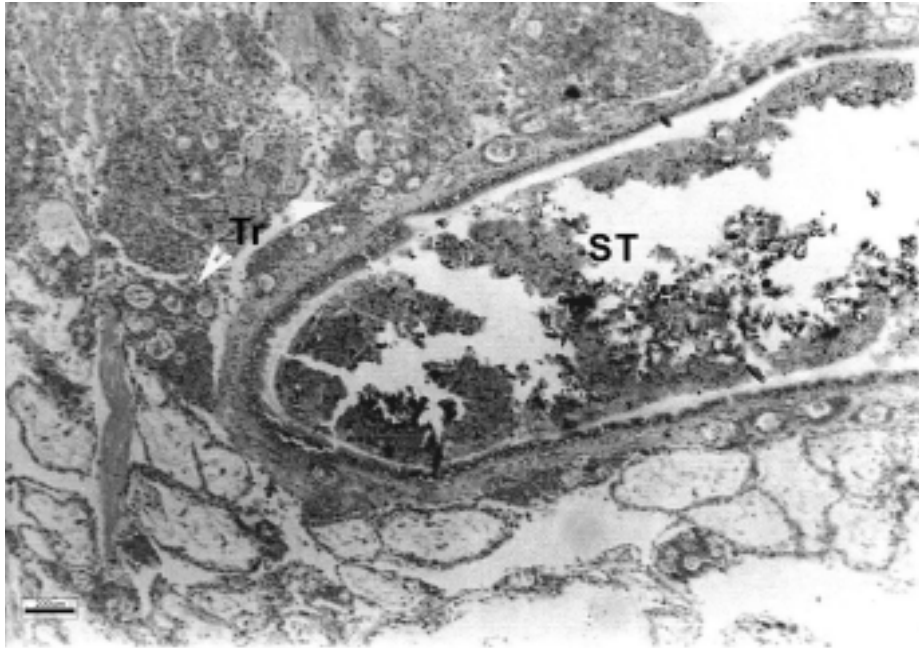


Fig. 15. Stomach of *R. philippinarum* is filled with planktonic particles. (ST; stomach, Tr trophozoites)

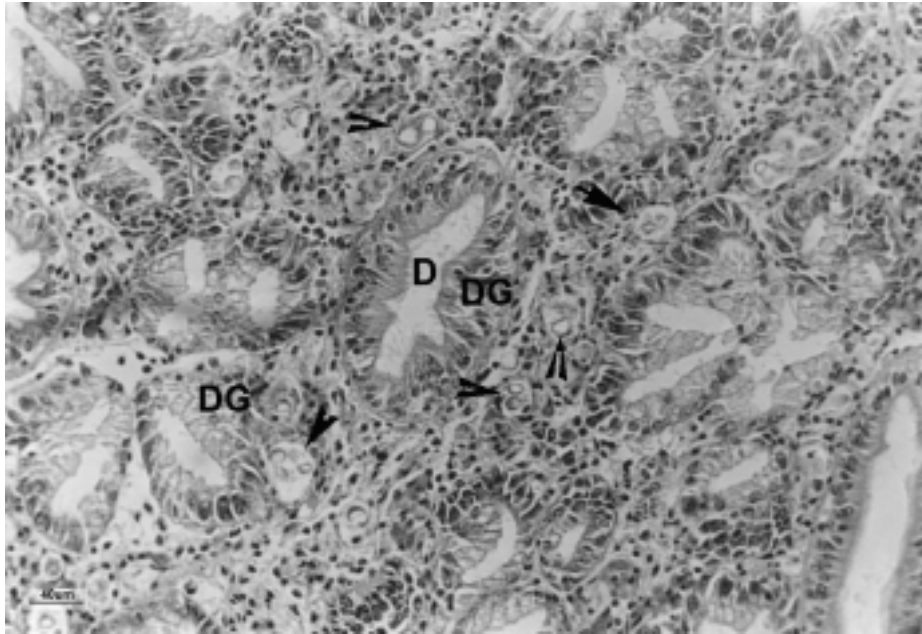


Fig. 16. Digestive gland tubes infected with *Perkinsus* sp. (D; duct, DG; digestive gland tubes, arrows trophozoites)

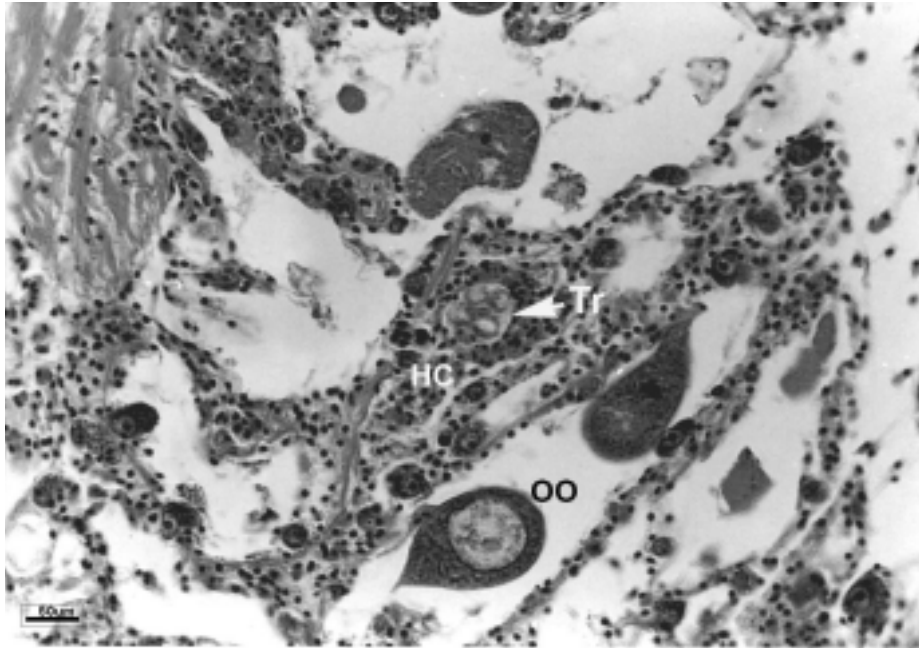


Fig. 17. Trophozoites of *Perkinsus* sp. and nodular reaction in the female gonad of *R. pillipinarum*. (OO: oocytes, Tr: trophozoites, HC: hemocytes)

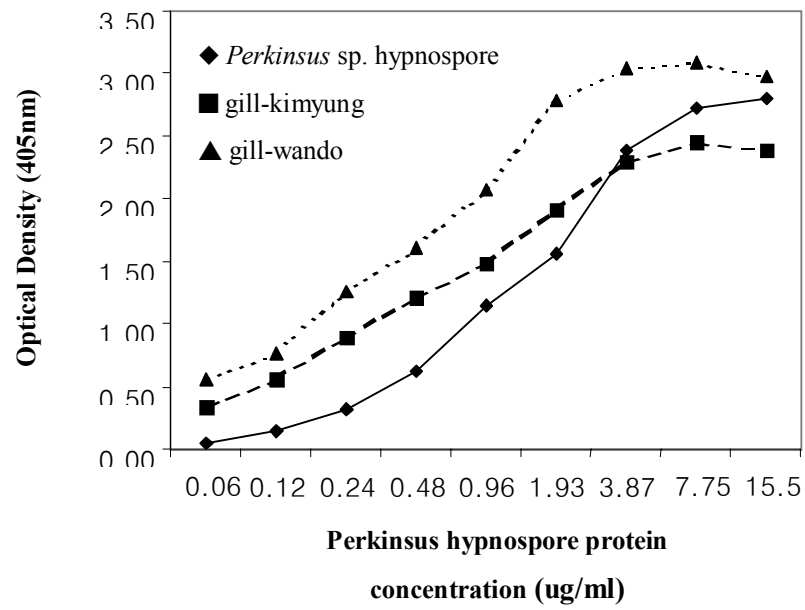


Fig. 18. A typical ELISA titration curves for rabbit anti-*Perkinsus* sp. IgG.

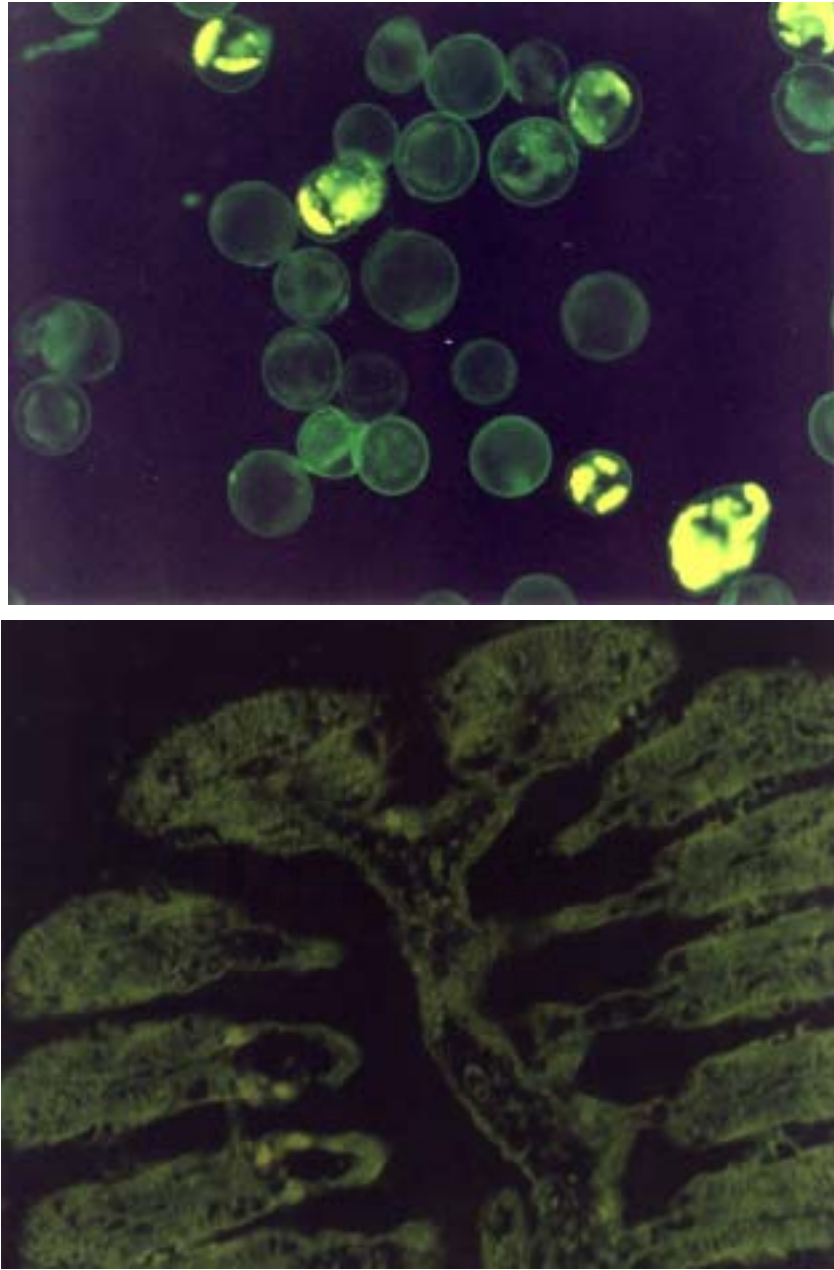


Fig. 19. Perkinsus hyphospores stained with FITC goat ant-rabbit IgG (A). Gill of *Crassostrea gigas*, is not stained with FITC (B). 100X.

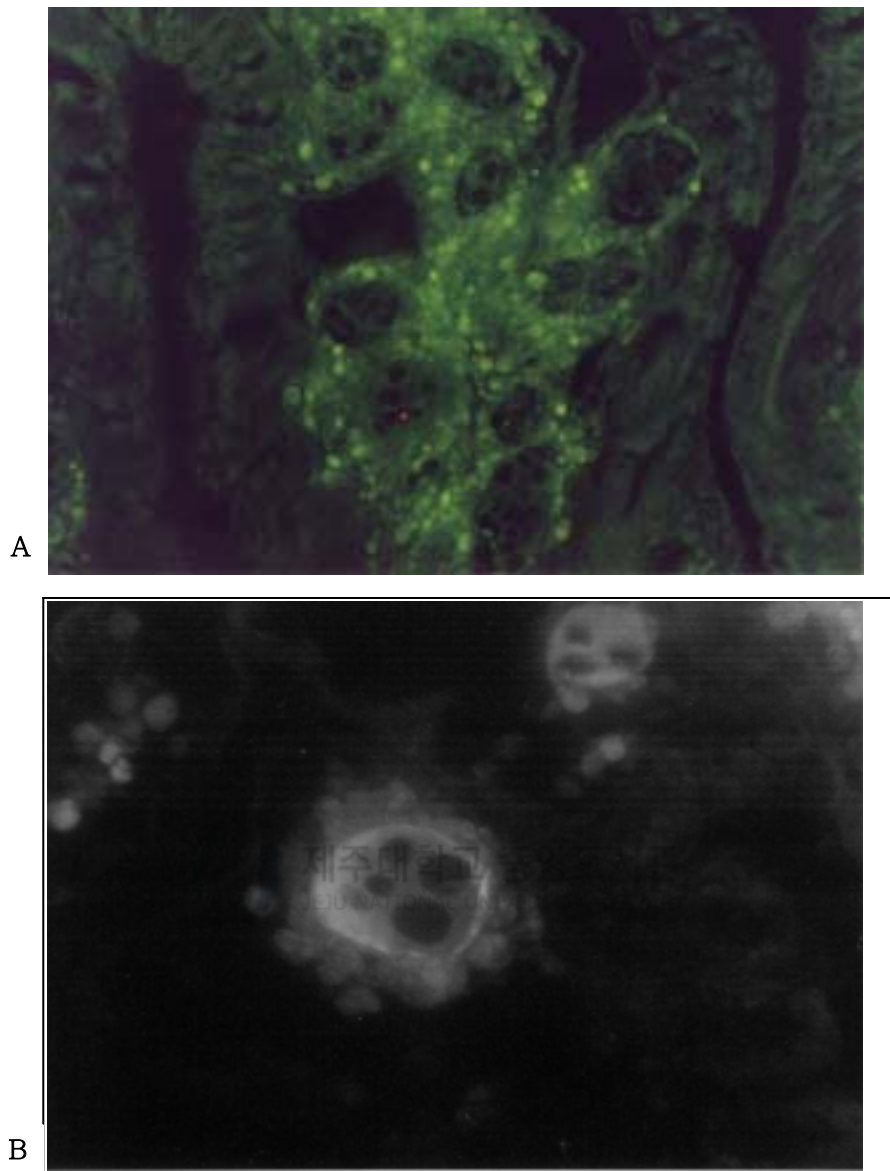


Fig. 20. Trophozites and hemocytes in the gill of the Manila clam stained with FITC goat anti-rabbit IgG(A). Magnified trophozoite of *Perkinsus* sp. (B). A(100X), B(400X)

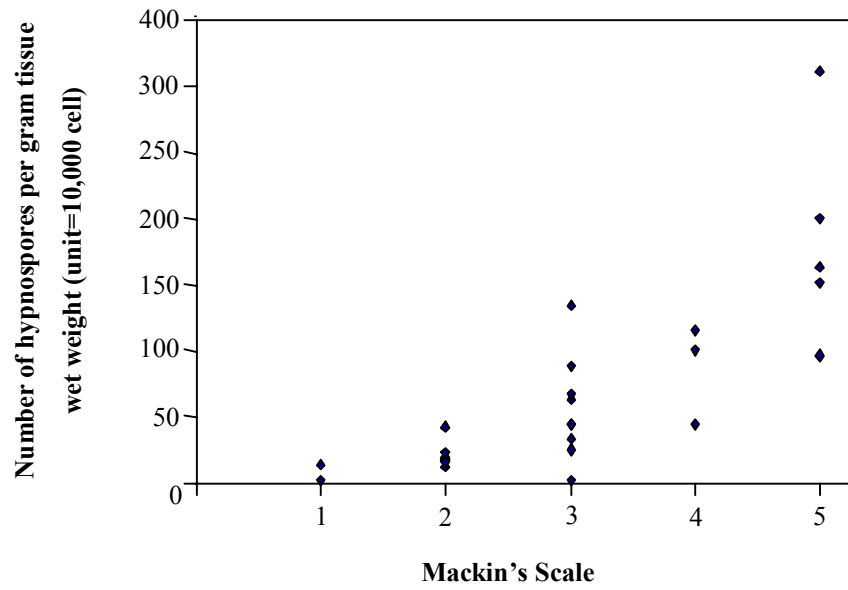


Fig. 21. Relationship between Mackin's scale and the number of hyphospores per gram tissue wet weight.

List of Tables

Table	Page
1. Sampling locations and the species used in analysis for examining <i>Perkinsus species</i>	8
2. A modified Mackin's scale used in determining <i>Perkinsus</i> sp. infection intensity.....	11
3. Summary of immunization protocol.....	17
4. Results of the FTM test conducted on the ten species of marine molluscs.....	21
5. FTM results of <i>R. philipinarum</i> collected from Kangjin on June 23, 1997.....	23
6. FTM results of <i>R. philipinarum</i> collected from Wando on June 23, 1997.....	24
7. ELISA titration curve for rabbit anti- <i>Perkinsus</i> sp. IgG.....	41

Table 1. Sampling locations and the species used for analysis for examining *Perkinsus species*. FTM : Fluid Thioglycollate Media (FTM) technique applied for analysis. Histology : histological slide is made from specimen for examining *Perkinsus species*.

Date	Sampling Locality	Geographical position	Species Collected	Remarks
97/05/14	Kimnyung, Cheju	N33° 33'E126° 42'	<i>R. philippinarum</i> <i>Heteromacoma irus</i> <i>Coecella chinensis</i>	FTM, Histology
97/05/14	Kangjin, Chun-Nam	N34° 30'E126° 45'	<i>R. philippinarum</i> <i>Solen strictus</i>	FTM, Histology
97/06/23	Waido, Cheju	N33° 30'E126° 25'	<i>R. philippinarum</i>	FTM
97/06/23	Wando, Chun-Nam	N34° 20'E126° 45'	<i>R. philippinarum</i>	FTM, Histology
97/06/23	Kangjin, Chun-Nam	N34° 30'E126° 45'	<i>R. philippinarum</i> <i>Tegillarca granosa</i> <i>Scaphaca subcrenata</i>	FTM, Histology
97/09/21	Changheong, Chun-Nam	N34° 40'E127° 00'	<i>R. philippinarum</i>	FTM
97/09/28	Sungsan, Cheju	N33° 31'E126° 53'	<i>R. philippinarum</i>	FTM
97/09/28	Ojori, Cheju	N33° 32'E126° 52'	<i>R. philippinarum</i>	FTM
97/10/12	Seogwipo, Cheju	N33° 12'E126° 32'	<i>R. philippinarum</i>	FTM
97/10/28	Yeosu, Chun-Nam	N34° 35'E127° 40'	<i>R. philippinarum</i>	FTM
97/12/03	Komsoe, Chun-Buk	N35° 32'E126° 40'	<i>R. philippinarum</i>	FYM
97/12/12	Komsoe, Chun-Buk	N35° 32'E126° 40'	<i>Rapana benosa</i>	FTM
97/12/12	Komsoe, Chun-Buk	N35° 32'E126° 42'	<i>S. broughtonii</i>	FTM
97/12/12	Poryung, Chung-Nam	N36° 22'E126° 30'	<i>R. philippinarum</i>	FTM
97/12/20	Chepu, Kyung-Gi	N37° 12'E126° 28'	<i>R. philippinarum</i>	FTM
98/01/18	Komsoe, Chun-Buk	N35° 32'E126° 40'	<i>C. gigas</i>	FTM
98/01/18	Changgi, Chung-Nam	N36° 33'E126° 15'	<i>C. gigas</i>	FTM
98/01/18	Ganwul, Chung-Nam	N36° 40'E126° 10'	<i>C. gigas</i>	FTM
98/06/04	Mokpo, Chun-Nam	N34° 48'E126° 25'	<i>R. philippinarum</i>	FTM
98/11/14	Tongyong, Kyung-Nam	N34° 50'E128° 30'	<i>Pinctata fucata martensii</i>	FTM, Histology

Table 2. A modified Mackin's scale used in determining *Perkinsus* sp. infection intensity.

Infection intensity	Numerical code	Description
Heavy (H)	5	75 to 100% of tissue is covered with hypnospores
Moderate Heavy (MH)	4	50 to 75% of the tissue is covered with hypnospores
Moderate (M)	3	25 to 50% of the tissue is covered with hypnospores
Light Moderate (LM)	2	>125 hypnospores occurs but less than 25% of the tissue is covered.
Light (L)	1	10 to 100 hypnospores present in the tissues
Very Light (VL)	0.5	Less than 10 hypnospores present
Negative (N)	0	No hypnospore present

Table 3. Summary of immunization protocol.

Time		Dosage
1st Week	Initial injection	1mg Antigen in 500 μ l + 500 μ l FAC
2nd Week	Booster	500 ug Antigen in 500 μ l + 500 μ l FAI
3rd Week	Booster	500 ug Antigen in 500 μ l + 500 μ l FAI
4th Week	Booster	500 ug Antigen in 500 μ l + 500 μ l FAI
5th Week	Booster	500 ug Antigen in 500 μ l + 500 μ l FAI
6th Week	Booster	500 ug Antigen in 500 μ l + 500 μ l FAI
7th Week	Booster	500 ug Antigen in 500 μ l + 500 μ l FAI

FAC: Freund's adjuvant complete. FAI: Freund's adjuvant incomplete

Table 4. Results of the FTM test conducted on the ten species of marine molluscs.

Species	Locality	N	Shell Width (height) ±STD (mm)	Tissue Wet Weight ±STD (gram)	FTM results	Percent infection (%)	Number of spores/individual	Number of spores/gram tissue
<i>H. irus</i>	Kimnyung Cheju	7	36.60 ± 5.43	2.71 ± 0.28	-	0	0	0
<i>C. chinensis</i>	Kimnyung Cheju	9	24.09 ± 2.71	--	-	0	0	0
<i>S. strictus</i>	Kangjin Chun-Nam	12	66.58 ± 4.07	--	-	0	0	0
<i>S. subcrenata</i>	Kangjin Chun-Nam	5	84.22 ± 8.45	37.96 ± 1.45	-	0	0	0
<i>T. granosa</i>	Kangjin Chun-Nam	25	32.15 ± 4.31	2.91 ± 0.01	-	0	0	0
<i>R. philippinarum</i>	Waido, Cheju		--	--	-	0	0	0
<i>R. philippinarum</i>	Kimnyong Cheju	30	30.35 ± 0.62	--	-	0	0	0
<i>P. fucata martensii</i>	Tongyong, Kyung-Nam	105	83.04 ± 6.78	14.99 ± 0.55	-	0	0	0
<i>R. benosa</i>	Komsae, Chun-Buk	5	--	--	-	0	0	0
<i>S. broughtonii</i>	Komsae, Chun-Buk	8	--	--	-	25	8	-
<i>C. gigas</i>	Komsae, Chun-Buk	50	42.93 ± 1.49	1.70 ± 0.63	-	0	0	0
<i>C. gigas</i>	Changgi, Chung-Nam	20	39.00 ± 5.80	2.51 ± 0.06	-	0	0	0
<i>C. gigas</i>	Ganwul, Chung-Nam	10	41.70 ± 8.14	1.83 ± 0.87	-	0	0	0
<i>R. philippinarum</i>	Chuja, Cheju	30	36.99 ± 3.31	2.40 ± 0.73	+	23	12.6 ± 3.71	6.24 ± 8.53
"	Chepu, Kyung-Gi	30	32.69 ± 3.02	1.11 ± 0.38	+	87	226 ± 283	215 ± 267
"	Kangjin Chon-Nam	37	43.52 ± 4.45	4.23 ± 0.78	+	100	3,243,852 ± 5,783,409	695,433 ± 111,197
"	Kangjin Chon-Nam	28	27.53 ± 2.55	2.11 ± 0.76	+	61	697,321 ± 21,925	247,784 ± 301,433
"	Wando Chon-Nam	19	35.28 ± 5.79	2.92 ± 0.71	+	84	447,532 ± 590,218	121,179 ± 5,661
"	Changheong, Chun-Nam	20	34.36 ± 2.12	2.33 ± 0.42	+	95	26,083 ± 2731	11,525 ± 0,521
"	Ojori, Cheju	20	29.72 ± 4.12	0.88 ± 0.38	+	60	929 ± 365	1059 ± 473
"	Yeosu, Cheju	18	31.56 ± 4.73	1.27 ± 0.51	+	100	625,520 ± 56,711	512,054 ± 513,759
"	Komsae, Chun-Buk	26	35.08 ± 2.73	1.48 ± 0.37	+	100	1,077,628 ± 1,077,958	709,028 ± 734,519
"	Poryung, Chung-Nam	30	31.02 ± 3.36	1.30 ± 0.47	+	100	26,597 ± 30,573	23,416 ± 28,311
"	Mokpo, Chun-Nam	27	51.70 ± 3.97	5.59 ± 0.35	+	100	3,924,309 ± 515,569	715,895 ± 340,035
"	Seogwipo, Cheju	25	25.19 ± 4.84	0.71 ± 0.47	+	70	176,684 ± 484,923	165,717 ± 400,431
"	Sungsan, Cheju	23	28.36 ± 6.35	0.99 ± 0.49	+	85	228,063 ± 18,748	409,721 ± 611,774

N=number of individual analyzed, STD=Standard deviation, FTM results:+ hyphospore present, - hyphospore absent.

Table 5. FTM results of *R. philipinarum* collected from Kangjin on June 23, 1997. SWD=shell width in mm, TWWT=total tissue wet weight in gram, N. spores / unit Wt=number of hypnospores per gram tissue wet weight, N. code=Mackin□s scale expressed as a numerical code.

No	SWD	TWWT	N. spores/ individual	N. spores/ unit Wt(g)	Mackin□ code	N. code
1	17.70	0.260	0	0	N	0
2	121.20	0.089	0	0	N	0
3	9.35	0.042	0	0	N	0
4	10.70	0.048	0	0	N	0
5	10.70	0.058	0	0	N	0
6	11.90	0.083	0	0	N	0
7	12.30	0.075	0	0	N	0
8	10.50	0.059	0	0	N	0
9	10.30	0.056	0	0	N	0
10	10.75	0.066	0	0	N	0
11	38.25	3.564	1,162,500	326,178	H	5
12	40.25	4.302	1,715,625	398,797	H	5
13	40.15	4.617	1,050,000	227,420	M	3
14	40.10	3.988	496,875	124,593	M	3
15	39.10	3.841	778,125	202,584	H	5
16	37.65	2.170	1,415,625	652,362	H	5
17	36.70	3.811	843,750	221,399	H	5
18	36.00	3.167	3,675,000	1,160,404	H	5
19	37.60	3.323	1,340,625	403,438	H	5
20	30.50	2.081	440,625	211,737	H	5
21	41.85	5.103	806,250	157,995	H	5
22	37.60	3.435	1,096,875	319,323	M	3
23	29.20	1.737	900,000	518,135	H	5
24	31.10	1.799	1,425,000	792,107	H	5
25	30.55	1.682	700,000	416,171	H	5
26	31.50	1.947	1,471,875	755,971	H	5
27	36.10	3.515	0	0	N	0
28	40.20	4.179	206,250	49,354	M	3
Mean	27.53	2.110	697,321	247,785		2.75

Table 6. FTM results of *R. phillipinarum* collected from Wando on June 23, 1997. SWD=shell width in mm, TWWT=total tissue wet weight in gram, N. spores / unit Wt=number of hyphospores per gram tissue wet weight, N. code=Mackin□s scale expressed as a numerical code.

No	SWD	TWWT	N. of spores / individual	N. spore / g TWWT	Mackin□s code	N. code
1	27.50	1.313	0	0	N	0
2	29.00	1.396	37,500	26,862	L	1
3	29.20	1.484	0	0	N	0
4	29.70	1.358	0	0	N	0
5	30.60	2.054	131,250	63,899	H	5
6	30.90	1.795	56,250	31,337	L	1
7	32.20	1.870	450,000	240,641	LM	2
8	32.45	2.485	271,875	109,406	M	3
9	33.10	1.640	37,500	22,865	L	1
10	33.70	2.031	206,250	101,551	H	5
11	34.90	2.563	46,875	18,289	LM	2
12	35.90	2.879	440,625	153,047	LM	2
13	37.35	2.276	140,625	61,786	M	3
14	37.60	3.804	1,575,000	414,037	MH	4
15	39.10	3.565	1,921,875	539,095	H	5
16	41.50	5.255	825,000	156,993	LM	2
17	43.20	4.419	112,500	25,458	L	1
18	44.60	6.676	1,368,750	205,025	H	5
19	47.80	6.669	881,250	132,141	M	3
Mean	35.28	2.92	447,532	121,179		2.37

Table 7. ELISA titration curve for rabbit anti-*Perkinsus* sp. IgG.

Protein(ug)	Optical Density		
	Hypnospor e	Gill-Kimyung	Gill-Wando
7.750	2.724	2.452	3.079
3.875	2.392	2.285	3.031
1.937	1.562	1.914	2.778
0.968	1.146	1.483	2.063
0.484	0.625	1.215	1.600
0.242	0.318	0.890	1.254
0.121	0.145	0.557	0.768
0.060	0.054	0.334	0.551

감사의 글

누구보다도 즐거운 대학원 과정을 보냈다는 생각이 듭니다. 학문에 대한 끝없는 도전과 방향을 이끌어주시고 이를 위해 실험할 수 있는 모든 여건을 준비하여 주신 최광식 교수님과 힘들 때마다 곁에 있어준 동료들 그리고 꾀은일을 마다 았았던 후배들이 있었기 때문입니다. 더욱이 몸소 뜨거운 열정으로 탐구하는 자세를 보여주시는 지도 교수님의 모습은 앞으로 삶을 살아가면서 항상 되새김할만한 스승의 모습이라고 믿습니다. 면역관련 내용을 꼼꼼히 읽어주시고 논리적이기 못한 문장들을 바로잡아 주신 심사위원장이신 수의학과의 임윤규 교수님께 감사드립니다. 또한 실험 전반에 대해 조언과 격려 하여주시는 심사위원 허문수 교수님께 감사드립니다. 그리고 대학원과정동안 관심과 힘을 주신 해양생산과학부 이정재 교수님, 정상철 교수님, 이기완 교수님, 노 섬 교수님, 송춘복 교수님, 이제희 교수님, 여인규 교수님 그리고 해양연구소의 이영돈 교수님께 감사드립니다. 실험실 동료들인 이창호, 이주한, 강도형, 강상균, 고덕임, 현창용과 졸업한 후배들에게 힘든 일만 부탁한 것 같아 미안하고 준비하는 일들이 모두 잘 이루어졌으면 좋겠습니다. 이외에도 Perkinsus와 관련된 귀중한 자료를 보내준 미국과 유럽의 연구자들에게도 고마움을 표하고 싶습니다. 바쁘다는 핑계로 소홀히 대했던 제광교회 청년부의 지도 목사님과 회원들에게 무어라 사죄의 말을 해야할지 모르겠습니다. 기도해 주시고 관심 가져 주셔서 고맙습니다. 특히 동기들 송일권, 이선경, 조은숙, 아들 사랑에 폭 빠져 있는 혜정, 금미 그리고 덕향. 모두가 미소를 머금게 하는 친구들입니다. 자식을 멀리까지 보내시고 뒷바라지 해주신 부모님께 감사드리며 신혼의 꿈에 젖어 있을 막내 상미, 그리고 미국에서 열심히 일하고 있는 연희-빨리 만날 수 있는 시간이 왔으면 좋겠습니다. 사랑의 빛을 진 분들을 꺾으라면 이모, 이모부, 이종 사촌들을 빼놓을 수 없습니다. 별 때마다 용기와 사랑을 주신 이분들을 생각하면 전 참 행복한 사람이구나 새삼 느낍니다. 특별히 감사를 표할 분이 계신데 바로 외할머니이십니다. 30년 가까이 살아오면서 당신께 항상 빛지고 살아오고 있다는 생각입니다. 할머니의 기도가 꼭 이루어졌으면 하고 항상 건강하시길 하나님께 기도합니다. 외할머니 고맙습니다.