



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

**A THESIS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE**

Seasonal changes in the *Perkinsus olseni* infection in an annual reproduction of Manila Clam *Ruditapes philippinarum* from a tide flat on Jonghyun in Incheon bay on the west coast of Korea.

Ji En, Im

**Department of Marine Life Science
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY**

AUGUST 2019

Seasonal changes in the *Perkinsus olseni* infection in an annual reproduction of Manila Clam (*Ruditapes philippinarum*) from a tide flat on Jonghyun in Incheon bay on the west cost of Korea.

Ji En, Im

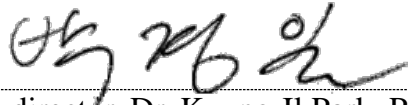
(Advised by Professor Kwang-Sik Choi)

A dissertation submitted in partial fulfillment of the requirement for the degree of

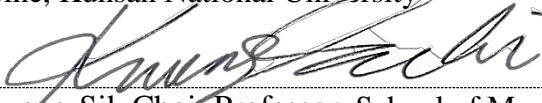
Master of Science

June 2019

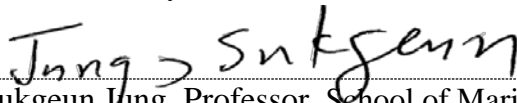
This dissertation has been examined and approved by



Thesis director, Dr. Kyung-Il Park, Professor, Department of Aquatic Life Medicine, Kunsan National University



Dr. Kwang-Sik Choi, Professor, School of Marine Biomedical Science, Jeju National University



Dr. Sukgeun Jung, Professor, School of Marine Biomedical Science, Jeju National University

2019.06
Date

**Department of Marine Life Science
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY**

CONTENTS

ABSTRACTS.....	ii
LIST OF FIGURES	iii
LIST OF TABLES	v
1. INTRODUCTION	1
2. MATERIALS AND METHODS.....	5
2.1. Sampling	5
2.2. <i>Perkinsus olseni</i> assay.....	8
2.3. Histological observation	8
2.3.1. Annual gametogenesis.....	9
2.4. Statistical Analyses	11
3. RESULTS	12
3.1. Environmental parameters	12
3.1.1. Water temperature & Salinity.....	12
3.1.2. Chlorophyll a.....	14
3.2. Biometric measurements.....	16
3.2.1. Shell Length (SL, mm).....	16
3.2.2. Tissue wet weight (TWWT, g).....	16
3.2.3. Density	16
3.2.4. Condition Index (CI)	19
3.3. <i>Perkinsus olseni</i> infection intensity	21
3.3.1. Gill Assay	21
3.3.2. Whole body burden	24
3.4. Reproductive cycle.....	27
4. DISCUSSION	32
REFERENCES.....	36

ABSTRACTS

이 연구에서는 2007년 1월부터 같은 해 12월까지 1년간 인천 종현에 서식하는 바지락 360개체 대상으로 생식소 발달의 계절적 변화, *Perkinsus olseni* 감염도(infection intensity), 생식세포 발달 단계를 수온, 염분, 및 해수 중의 chlorophyll a 농도와와의 관계와 연관하여 분석하였다. 조사 지역에서 매월 각장 (shell length, SL) 3mm 이상의 바지락 개체 70마리를 채집 분석하였고, *P. olseni*의 감염도는 Ray's Fluid Thioglycollate Medium (RFTM)분석법과 조직학적 방법으로 측정하였다. 종현 갯벌에서 암컷 바지락의 배우자 형성은 2007년 4월에 시작되었다. 월 평균 건강도 (Condition Index, (tissue weight/shell weight)x100)는 조직 건중량 (dry wt)의 경우 2.811- 17.267 이었고, 습중량 (wet wt)의 경우, 0.254 - 1.050의 범위였으며, 산란 직전에 최대값을 보인 이후 감소하는 경향을 보였다. *P. olseni*의 감염율 (prevalence)은 산란 전 7월에 가장 낮은 76.7%였고 산란 후 10월에 100%로 가장 높았다. *P. olseni* 감염도는 7월에 $42,737 \pm 91,604$ cell/g wt로 가장 낮았는데, 이는 강우로 인한 낮은 염분에 기인한 것으로 사료되었다. 계절별 *P. olseni* 감염도는 산란 이후 수온이 상승하는 9월 이후 증가 추세를 보이다가 수온이 떨어지기 시작하는 늦가을(October-February)에 감염도가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 월별 건강도는 해수중의 chlorophyll a 농도가 높은 봄철에서 산란 전 까지 증가하였으며, 가을철 산란 후 감소하였다. 계절에 따른 건강도의 변화는 해수 중 먹이량과 밀접한 관계가 있는 것으로 사료되었으나, *P. olseni* 감염이 미치는 영향은 미미한 것으로 추정되었는데, 이는 감염도가 낮은 것에 기인한 것으로 추정되었다. 인천 종현 갯벌에서 채집된 바지락에 기생하는 *P. olseni*의 감염도는 다른 연구지역에서 보고된 결과와 비교 시, 낮은 것으로 판단되었으며, 이는 겨울철 최저 수온 및 기수지역의 특징인 염분의 계절적 변화와 밀접한 관계를 갖는 것으로 사료되었다.

List of Figures

- Fig. 1.** Location of the sampling site, Jonghyun tidal flat (37°16'50.0"N; 126°32'51.1"E). 6
- Fig. 2.** Jonghyun tidal flat in Incheon bay. 7
- Fig. 3.** A 50x50cm quadrat used in clam density survey. 7
- Fig. 4.** Monthly variation in the surface sea water temperature and salinity referred from Korea Hydrographic and Oceanographic Administration. 13
- Fig. 5.** Monthly variation in Chlorophyll a in the water column at the sampling site during the course of study. The data were referred from NOAA EARTHDATA database. 15
- Fig. 6.** CI (tissue wet weight/shell weight) of Manila clam varied from January to December 2007 at Jonghyun tidal flat. 20
- Fig. 7.** Monthly mean of *P. olseni* infection intensity (cells/g gills) determined from the gill tissues using RFTM and NaOH digestion. 22
- Fig. 8.** Prevalence of *P. olseni* in the gill tissues. 23
- Fig. 9.** Prevalence of *P. olseni* determined from RFTM on whole body tissues. 25
- Fig. 10.** *P. olseni* infection intensity determined from whole body tissues using RFTM and NaOH digestion. 26
- Fig. 11.** Monthly variation in the reproductive stage of female Manila Clam at the sampling site in 2007. 28
- Fig. 12.** Micrographs showing different reproductive stages of the females. A: Resting stage, gonad follicle is empty. B: Early developing stage, as the small oocyte are developing along the follicle walls. C: Late developing

stage, as the oocyte density and the follicle size increased. D: Ripe stage, as the follicles filled with fully mature oocytes. E; Partially spawning, as the mature eggs are detached from the follicle wall and egg number become decreased. F: Spent stage, as the follicles appear empty and the residual oocytes (arrows) are resorbed. 29

Fig. 13. Monthly variation in the reproductive stage of male Manila Clam at the sampling site in 2007. 30

Fig. 14. Micrographs showing different reproductive stages observed from the males.

A: Resting stage, as the follicle is empty. B: Early developing stage, as the small gametes are developing along the follicle walls. C: Late developing stage, the number of spermatozoa and the follicle size become increased. D: Ripe stage, as the spermatozoa tails are pointing toward the center of the lumen, forming concentric bands. E: Partially spawning stage, as the empty space in the follicles become evident, due to releasing of the mature spermatozoa. F: Spent stage, as the follicle areas become decreased and residual spermatozoa can be observed. 30

List of Tables

Table 1 Classification of reproductive stage of the female Manila clam, <i>Ruditapes philippinarum</i> (Drummond et al, 2006)	10
Table 2 Monthly observed clam density (individual/50x50 cm) and mortality at the sampling site	17
Table 3 Biometry of Manila clam analyzed in this study	18

1. Introduction

바지락 *Ruditapes philippinarum*은 백합목 (Order Veneroida), 백합과 (Family Veneridae)에 속하는 이매패류로 한국, 중국, 일본, 필리핀 등의 아시아 대륙 동부 연안에 널리 분포한다 (Chew, 1989). 바지락은 우리나라 서해안과 남해안의 조간대 사니질에 분포하며 (Yoo, 1976), 세계적으로는 중국, 일본의 사할린뿐만 아니라 프랑스, 스페인, 영국, 미국, 캐나다 등지에도 이식되어 양식되고 있다. 바지락은 성장이 빠르고 환경변화에 대한 적응력이 뛰어나기 때문에 국내 수산업에 있어 굴 홍합과 더불어 수산 자원으로서 그 가치가 매우 높고, 어촌경제의 중추적인 양식 종으로 그 가치가 매우 높게 평가된다 (Eugenia et al., 1992; Lee et al., 1996; Chung et al., 2001).

바지락은 담수의 영향을 받는 조간대부터 수심 10m 내외의 모래와 가는 자갈이 섞여 있는 모래펄에 서식하는데 우리나라의 경우 산란기는 6~8월로 알려지고 있다. 바지락의 수명은 약 8~9년이지만 상품크기가 되기까지는 2~3년 내외가 소요되며, 이 때 각장 (shell length)의 길이는 평균 35mm 정도다. 양식 바지락은 종묘를 뿌려서 방양 후 수확 시까지 양성 관리하여 상품 크기가 되면 수확하는 방법으로 생산하고 있다 (수산과학원). 국립수산과학원 자료에 따르면, 바지락은 1년생의 경우 각장 8.8 mm, 2년생 21.2 mm, 3년생 34.4 mm, 4년생 40.9 mm, 5년 44.3 mm, 6년 50.0mm이며 수명은 8~9년 정도이다.

FAO 발표 자료에 따르면 2016년에는 세계 바지락 생산량은 4,251,263 MT으로, 이중 99%에 해당하는 4,173,191 MT 중국에서 생산되었고, 이탈리아 33,500MT, 한국이 28,606 MT로 알려지고 있다. 그러나 매년 바지락 생산량이 꾸

준하게 증가하고 있는 중국과는 달리, 우리나라의 경우 바지락 생산량은 매년 큰 차이를 보이며 지난 20년간 바지락 생산량은 꾸준히 감소하였다.

서해안 갯벌에서 생산되는 바지락은 어민들에게는 매우 중요한 소득원이다. 그러나 고밀도와 제한된 공간에서 바지락과 같은 이매패류 양식은 종종 전염병의 발병을 야기시키고, 이는 곧 대량 폐사로 이어져 생산량에 큰 영향을 미쳤다. 특히 이매패류에서 발병하는 원생생물 기생생물인 *Perkinsus*는 바지락과 대서양굴 (*Crassostrea virginica*)의 집단 폐사를 유발하는 것으로 알려지고 있다 (Mackin, 1962; Park et al., 1999; Park and Choi, 2001). 특히 *P. olseni*는 우리나라 남해안 및 서해안에 서식하는 바지락의 대량폐사를 일으키는 원인생물로 지목되고 있으며 (Park et al. 1999; Park and Choi 2001), 일본 (Hamaguchi et al. 1998; Maeno et al. 1999; Choi et al. 2002)과 중국(Liang et al. 2001)에서도 검출되었다. 이러한 질병은 패류의 양식 생산량과 내수 시장 소비 및 수출 등의 무역에도 중대한 제약으로 인식되어 경제 발전과 사회 경제적 수입 모두에 영향을 미치고 있다.

이매패류는 바이러스, 박테리아, 기생생물을 포함한 다양한 환경 스트레스 요인에 노출된다 (Pillard et al. 2004; Renault and Novoa 2004; Park et al. 2008). *Perkinsus* 속에 속하는 기생생물들은 숙주 조직의 염증 느린 성장, 조직 괴사, 그리고 숙주의 집단 폐사를 초래한다. (Mackin, 1962; Park et al., 1999; Park and Choi, 2001). 대서양굴에 기생하는 *Perkinsus marinus*가 유발하는 중증 감염은 숙주 생식세포의 성숙을 지연시켜 번식을 저해하는 것으로 알려지고 있다. (Choi et al. 1989, 1993; Dittman 1993; Choi et al. 1994). 바지락에 기생하는 *P. olseni* 는 또한 숙주의 성장과 생식세포형성에 이용 가능한 에너지를 소비함으

로써 숙주의 번식과 성장을 저해한다. (Villalba et al. 2004, 2005; Park et al. 2006). *P. olsenii*의 경우 바지락 조직에 심각한 염증을 유발하며 (Hamaguchi et al., 1998; park et al., 2006; Waki et al., 2012), 바지락 치폐의 폐사를 유발하는 것으로 알려지고 있다 (Waki et al., 2012; 2018).

Perkinsus 감염은 조직학적 방법 (Mackin, 1951; Perkins and Menzel, 1966; Azevedo, et al., 1990; Navas et al., 1992; Montes et al., 1996; Bower et al., 1998), 항원-항체 반응을 이용한 면역학적 진단 기법 (Choi et al., 1991; Dungan et al., 1993; Romestand et al., 2001), Ray (1966)가 개발한 RFTM 배양액 (fluid thioglycollate medium, FTM)를 기초로 한 진단 기법 (RFTM 기법, Ray, 1953, 1966; Choi et al., 1989; Bushek et al., 1994; Rodriguez and Navas, 1995; Fisher and Oliver, 1996; Almeida et al., 1999; Ford et al., 1999), PCR에 의한 RNA 염기서열 분석 방법 (Marsh et al., 1995; Penna et al., 2001; Park et al., 2002; Burreson et al., 2004; Dungan and Reece, 2006; Moss et al., 2008; N. K. Sanil et al., 2012; Cho, 2016) 등, 다양한 분석 방법으로 진단되고 있다.

Ray's RFTM (Ray' Fluid Thioglycollate Medium Assay, Ray 1953, 1966) q 분석법은 *Perkinsus* 연구에서 가장 널리 사용되고 있는 진단기법 중 하나이다. *P. olsenii* 는 trophozoite, hypnospore, zoospore (Auzoux-Bordenave et al., 1995; Perkins, 1996; Choi et al., 2005)로 구성된 독특한 생활주기를 가지고 있다. *Perkinsus*에 감염된 숙주세포는 trophozoite 상태의 *Perkinsus*를 포함하며, 이를 혐기성 배양액 (anaerobic media)인 FTM에서 배양할 경우, 번식은 일어나지 않으며, trophozoite가 hypnospore (=prespore)를 형성하면서 그 세포 크기가 확대된다. *Perkinsus* hypnospore의 세포벽은 요오드 염색액에 짙은 파란색이나 갈

색으로 염색되어 현미경 하에서 동정이나 계수가 가능하다. Choi et al. (1989)는 처음으로 RFTM에서 배양된 *P. marinus* hypnospore를 2M NaOH 이용하여 순수 분리하는 방법을 개발하였다. 이에 따라 *Perkinsus* 감염의 진단에는 RFTM 기법과 병행하여 2M NaOH 용액을 이용하여 분리된 *Perkinsus* hypnospore를 혈구 계수판 (hemocyte count slide)을 이용하여 계수하는 정량적 분석 방법이 *Perkinsus*의 진단에 널리 쓰이고 있다.

조직학적 전자현미경 검사는 감염이 의심되는 숙주의 조직 (전체 또는 아가미 일부)을 Davidson's 고정액에서 24시간 동안 고정하고, 파라핀에 침지시켜 Harris's hematoxylin 과 eosin Y(Howard and Smith, 1983)로 염색 후 절편하여 광학현미경하에서 관찰하는 방법이다. 이 방법으로 *P. olseni* 계수뿐 아니라, 기관별 (foot, gill, mantle, adductor muscle, siphon, digestive gland)로 조직관찰, 생식소 발달 등에 대한 조사가 가능하다 (Park and Choi 2002).

P. olseni 의 감염도 (infection intensity)와 감염율 (prevalence)는 숙주인 바지락이 서식하고 있는 환경의 염분, 온도 및 먹이와 같은 환경인자의 시, 공간적 변화와 밀접한 관계를 갖는 것으로 알려지고 있다. 이 연구에서는 서해안 조간대 갯벌인 인천 대부도 중현 갯벌에 서식하는 바지락에서 출현하는 *P. olseni* 감염의 계절적 변화와 이들 기생생물과 생식소 발달 및 이에 영향을 미치는 환경인자에 관하여 고찰하였다.

2. Materials and Methods

2.1. Sampling

이 연구에 사용된 바지락은 인천 대부도 중현 갯벌에서 (Fig. 1, 2) 2007년 1월부터 12월까지 매월 1회 각장 (shell length, SL) 30mm 이상의 바지락 70개체를 채집하여 분석에 이용하였다. 채집된 바지락은 실험실로 옮겨 각장, 습중량 (Tissue Wet weight, TWWT)을 기록한 후 60도에서 건조시켜 패각 건조량 (Shell Dry Weight, SDWT)을 측정하였다. 바지락의 건강도는(Condition Index, CI)는 습중량 (TWWT)과 건조된 패각(SDWT) 또는 조직건중량과 패각의 무게비 ($CI = TWWT/SDWT$ 또는 $((TDWT/SDWT) \times 100)$)로 나타내었다. 총 70개의 시료 중, 30개체는 전체 조직에 포함된 *P. olsenii* 측정에 사용하였고, 나머지 40개체는 패각을 제거한 뒤 Davidson's solution에 고정하여 조직 시료를 작성하였다.

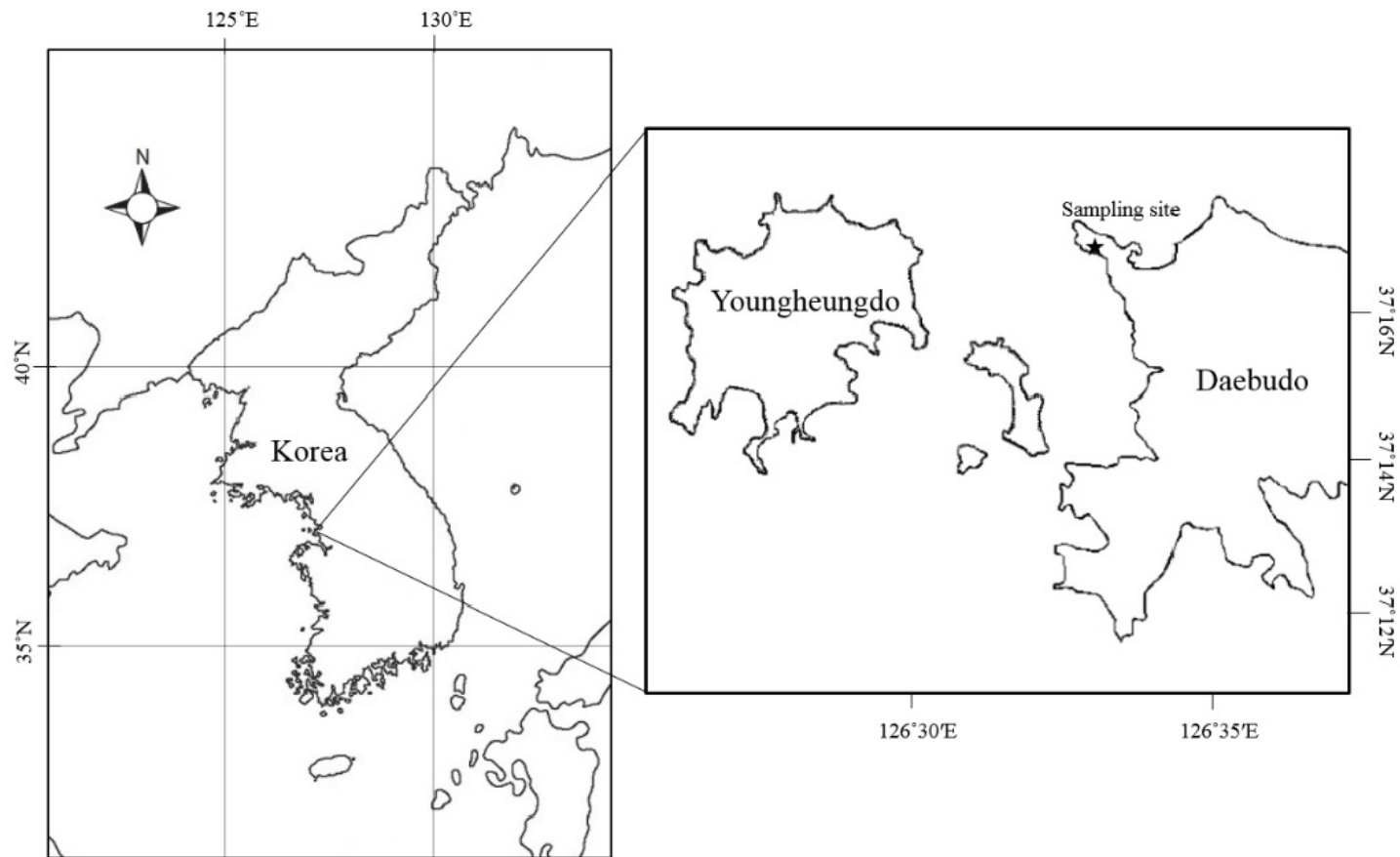


Fig. 1. Location of the sampling site, Jonghyun tidal flat (37°16'50.0"N; 126°32'51.1"E).



Fig. 2. Jonghyun tidal flat in Incheon bay.



Fig. 3. A 50x50cm quadrat used in clam density survey.

2.2 *Perkinsus olseni* assay

총 70개의 시료 중, 30개체는 각 바지락 개체에 기생하는 *P. olseni*의 감염도 (cells/g tissue)와 감염율 (prevalence, 전체 검사한 개체 중 감염된 개체의 백분율) 측정에 이용되었다. Total *P. olseni* infection intensity 측정은 패각 및 체조직 무게 측정이 완료된 바지락의 전체 체조직을 FTM에 투여하여 실험실 온도 하에서 일주일간 배양하였다. 생식소 발달에 *P. olseni*가 미치는 영향을 알아보기 위하여 바지락의 한쪽 아가미를 절취하여 무게를 측정한 후, 미리 준비해 놓은 멸균된 5 ml FTM 배지에 항생제와 같이 넣고 실온의 암실에서 1주일간 배양하였다. 배양이 끝난 바지락 전체 체조직이나 아가미 시료는 2M NaOH 5ml를 배양 용기에 첨가한 후, 60도에서 30분간 배양하였다. 배양이 완료된 시료는 원심 분리하여 NaOH 용액을 제거하였으며, 이를 2~3회 반복하여 *P. olseni* 이외의 불순물을 제거하였다. 분리된 *P. olseni*는 혈구 계수판을 이용하여 각 시료 당 4회 반복 계수하였다. 바지락 한 마리 전체에 분포하는 *P. olseni* 감염도는 *P. olseni* cells/g TWT 또는 *P. olseni* cells/g gills로 나타내었다.

2.3 Histological observation

생식소 발달 정도와 *P. olseni* 감염도를 조직학적으로 관찰하기 위해 패각에서 바지락 조직을 분리하여 Davidson의 용액에 48시간 고정하였다. 기관별 (foot, gill, mantle, adductor muscle, siphon, digestive gland)조직을 3mm 두께로 횡절편으로 절취하여 Powell et al.(1993) 방법에 따라 에탄올을 이용하여 탈수 후 파라핀에 포매하였다. 파라핀 블록은 6 μ m로 절단하여 Harris's hematoxylin 과

eosin Y(Howard and Smith, 1983)로 염색하였다. 완성된 조직학적 시료는 광학현미경으로 10x400 배율로 검사하였다.

2.3.1 Annual gametogenesis

현미경으로 배우자체 (gamete) 형성 과정을 관찰하고 생식소의 성숙 등급을 Drummond et al. (2006)에 따라 휴지기 (Resting), 초기 발달기 (Early developing), 후기 발달기 (Late developing), 완숙기 (Ripe), 산란기(Partially spawned) 및 소모기/흡수기 (Spent/Resorbing) 등 총 6단계로 분류 하였다. (Table 1.)

생식소 발달 관찰 외 조직 슬라이드에서 관찰되는 *P. olsenii* 의 감염율과 감염도를 조사하고, Ngo and Choi (2004) 에서 정한 수량적인 지수를 적용 각 조직시료에 감염도를 5단계로 구분하여 결정하였다.

- (1) 0 = *P. olsenii* 가 전체 조직에서 관찰되지 않음.
- (2) 1 = *P. olsenii* 가 아가미와 외투막에서만 검출됨.
- (3) 2 = 아가미, 외투막, 소화관에서만 검출,
- (4) 3 = 아가미, 외투막, 소화관, 생식소에서 검출,
- (5) 4 = 발을 포함한 모든 종류의 조직에서 검출

Table 1 Classification of reproductive stage of the female Manila clam, *Ruditapes philippinarum* (Drummond et al, 2006)

Reproductive stage	Scale	Description
Resting	0	Gonad follicle compose of connective tissue. The follicle is empty, oogonia cannot be observed.
Early developing	1	Gonad proliferation initiates; increasing number of oocytes at follicular wall, no free oocyte in the follicles.
Late developing	2	Free oocytes in the lumen but most oocytes attach on the follicular walls.
Ripe	3	Gonad filling large surface area, oogenesis follicle full with polygonal configuration oocytes.
Partially spawning	4	Numbers of free oocytes in lumen are decrease, empty space in follicle can be observed.
Spent/Resorbing	5	Follicles appear broken, scatter and relatively empty, only residual oocytes numerous numbers of phagocytes.

2.4 Statistical Analyses

통계적 분석은 SAS(SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA)를 사용하여 평균과 표준 편차를 계산 후 서로 다른 감염 수준에서의 *P. olsenii* 감염도와 바지락 CI의 계절성을 테스트하기 위해, 표본 수집 기간을 3월~5월(봄), 6월(여름), 9월~11월(가을), 12월~2월(겨울)로 구분하여 ANOVA와 Duncan's multiple range test로 $p < 0.05$ 유의수준으로 4가지 범주로 분류 하였다.

3. Results

3.1 Environmental parameters

3.1.1 Water temperature & Salinity

이번 연구에 사용된 수온 자료는 국립해양조사원 (Korea Hydrographic and Oceanographic Administration, <http://www.khoa.go.kr>) 연안정지관측지점에서 채집지역과 가장 근접한 당진항 해양관측부이에서 수집한 수온 및 염분 자료를 사용하였다. 인천 당진항 지역의 월 평균 수온 범위는 2007년 14.4℃를 보였다. 최저 수온은 2월에 3.9℃로 가장 낮았으며 최고 수온은 9월에 25.3℃로 가장 높게 나타났다. 염분은 조사 기간 중 25.8-30.4psu 범위를 보였으며, 8월과 10월 사이에 가장 낮았는데, 이는 여름철 집중호우에 기인한 것으로 사료되었다 (Fig. 4.)

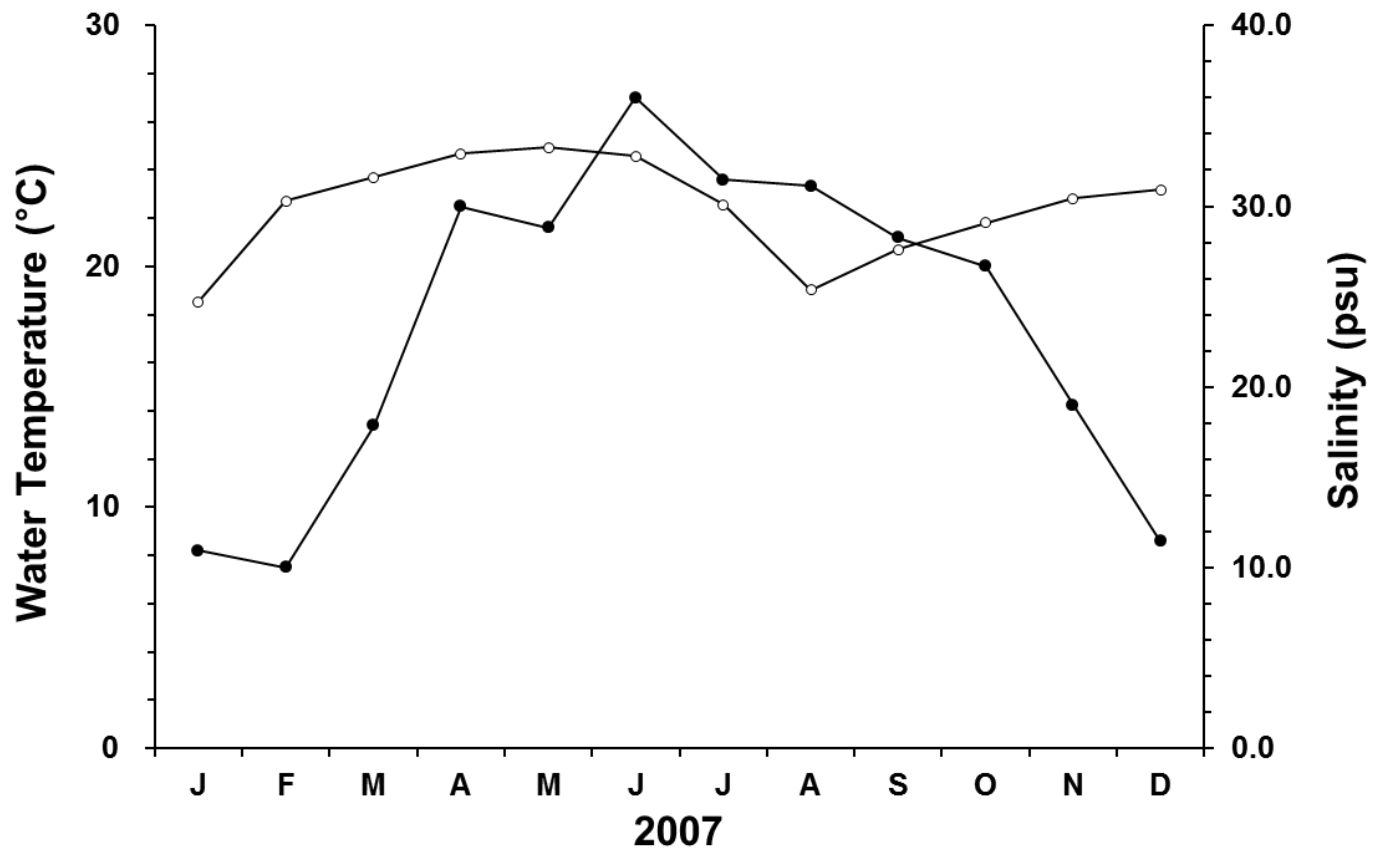


Fig. 4. Monthly variation in the surface sea water temperature and salinity referred from Korea Hydrographic and Oceanographic Administration.

3.1.2. Chlorophyll a

NOAA EARTHDATA database를 이용하여 2007년 조사지역 주변의 Chlorophyll a 연중변화 추정하였다 (Fig. 5.) 월별 Chlorophyll a 의 평균 수치는 4.08($\mu\text{g/L}$) 이었고, 최소값 (3.02 $\mu\text{g/L}$)은 7월, 최대치는 8월 (7.25 $\mu\text{g/L}$)로 나타났다.

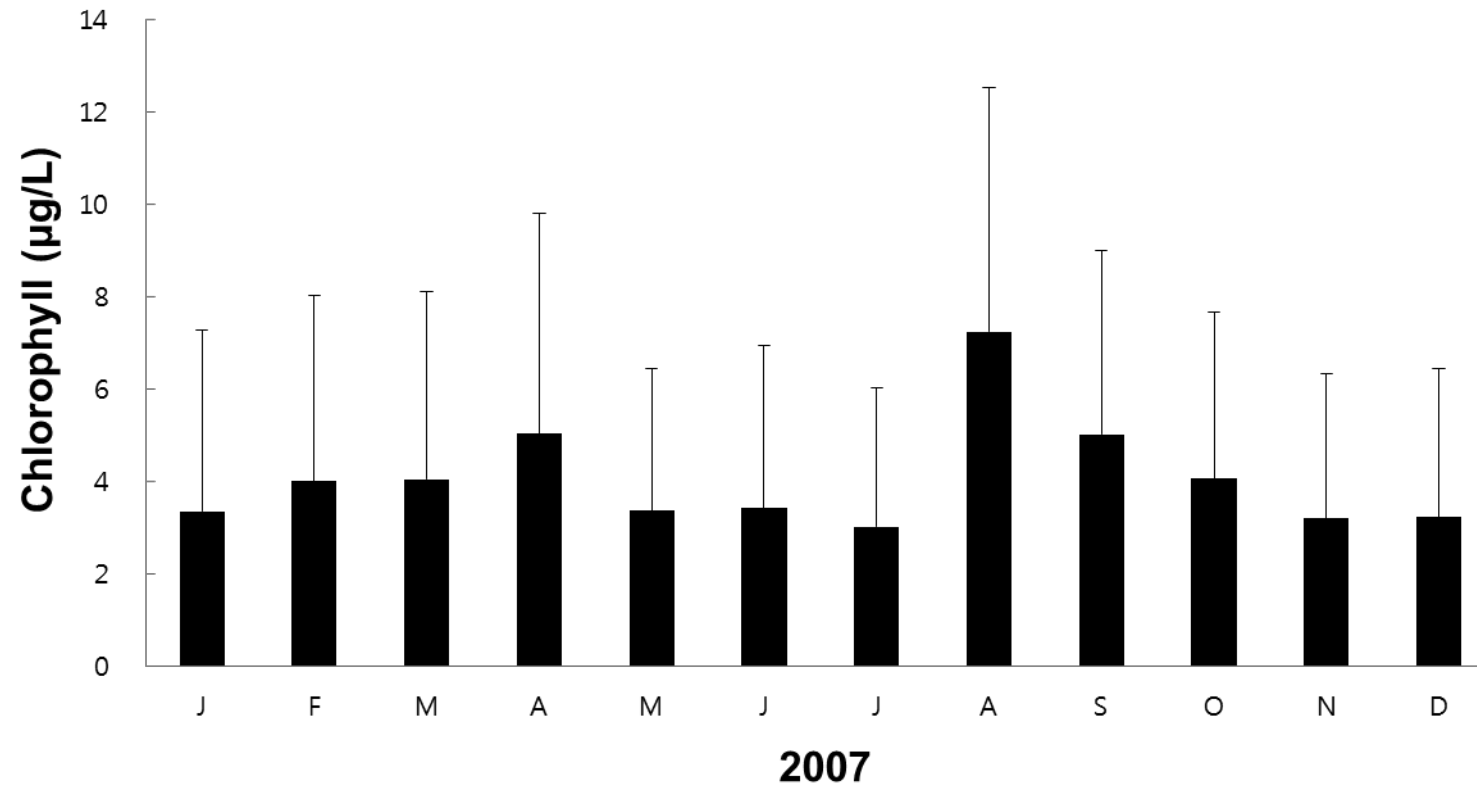


Fig. 5. Monthly variation in Chlorophyll a in the water column at the sampling site during the course of study. The data were referred from NOAA EARTHDATA database.

3.2. Biometric measurements

3.2.1. Shell length (SL, mm)

이 연구에 사용된 바지락의 월 평균 각장 (Shell length)과 체중량 (Tissue Weight)은 Table 3과 같다. 매 월 채집 분석된 바지락의 각장은 36-38mm 범위의 크기 이었으며, 이는 3-4년 생으로 추정되었다.

3.2.2. Tissue wet weight (TWWT, g)

월 평균 TWWT는 4월에 최대값을 보인 후 6월과 7월에 증가하여 8월부터 감소하는 경향을 보였다. 연구기간 동안 4월에 가장 높게 관찰되었고, 11월에 가장 낮은 것으로 조사되었다. 이 지역의 가장 낮은 달의 평균 TWWT 범위는 $2.30 \pm 0.4g$ 이었으며, 가장 높았던 달의 평균 TWWT는 $3.16 \pm 0.9g$ 으로 가장 낮았던 달의 평균 TWWT 보다 약 1.4배 높은 것으로 나타났다.

3.2.3. Density

조사기간 중 인천 대부도 중현 갯벌에 분포하는 바지락의 월별 서식 밀도 ($50 \times 50 \text{cm}^2$) 및 추정 사망률은 Table 2와 같다. 연구지역의 서식 밀도는 4월에 가장 낮게, 8월에 가장 높게 관찰되었다. 바지락의 사망률은 3월과 4월에만 관찰되었으며, 그 범위는 11-19% 이었다.

Table 2 Monthly observed clam density (individual/50x50 cm) and mortality at the sampling site

Month	Density (50*50 cm)	Dead shells	Total count	Mortality
J	26	0	26	0
F	23	0	23	0
M	30	7	37	11.8
A	21	9	30	18.9
M	26	0	26	0
J	24	0	24	0
J	24	0	24	0
A	39	0	39	0
S	33	0	33	0
O	33	0	33	0
N	28	0	28	0
D	36	0	36	0

Table 3 Biometry of Manila clam analyzed in this study

Month	N	SL (mm)	TWT (g)
J	70	37.5±2.5	2.61±0.66
F	70	37.7±2.2	2.34±0.49
M	70	38.1±2.3	2.69±0.69
A	70	39.0±2.5	3.16±0.88
M	70	37.6±2.3	2.53±0.55
J	70	36.7±2.1	2.97±0.78
J	70	37.1±3.1	2.97±0.88
A	70	36.4±2.2	2.45±0.51
S	70	37.1±2.9	2.51±0.82
O	70	39.0±2.6	2.58±0.59
N	70	37.6±1.9	2.30±0.42
D	70	38.8±2.5	2.42±0.60

3.2.4. Condition Index (CI)

종현 바지락의 월별 CI (Condition Index, CI= Tissue wet weight/shell dry weight) 변화는 Fig. 6와 같다. 월 평균 CI은 0.254 - 1.050의 범위였으며, 2월에 최소값을 나타낸 이후 6월과 7월 사이 최대값을 보였다. CI는 10월 이후 서서히 감소하는 경향을 보이고 있었다. CI 최대값은 7월에 0.60 ± 0.10 이며, 최소값은 2월에 0.42 ± 0.09 로 관찰되었다.

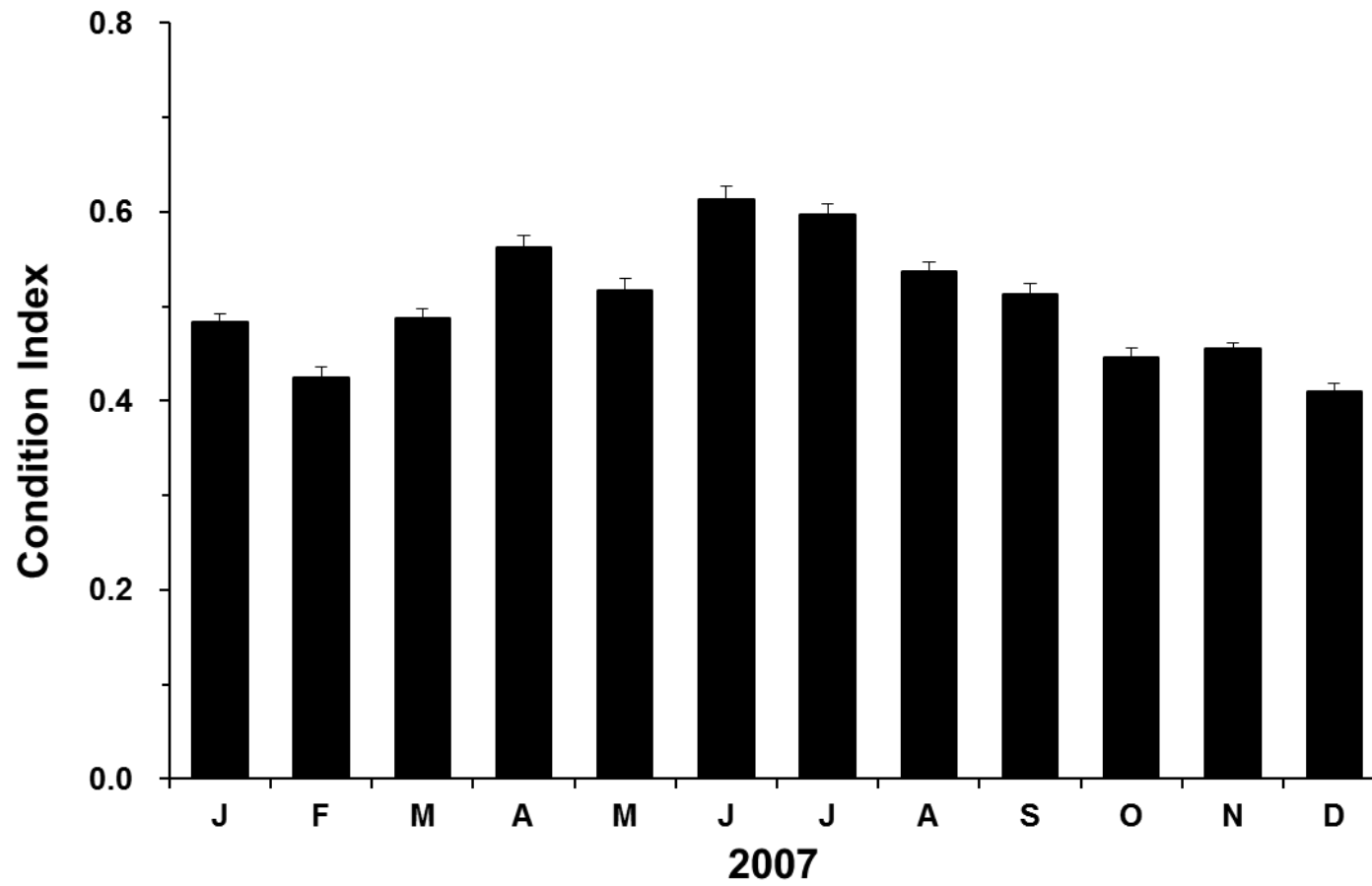


Fig. 6. CI (tissue wet weight/shell weight) of Manila clam varied from January to December 2007 at Jonghyun tidal flat.

3.3. *Perkinsus olseni* infection intensity

3.3.1 Gill Assay

RFTM/2M NaOH 방법을 이용해 지역 및 월별 아가미에서 관찰된 *P. olseni* 감염도 결과는 Fig. 7과 같다. 조사기간 중 감염율은 9월과 10월에 각각 90.0% 97.5%로 높게 나타났으며, 감염도는 $544,906 \pm 807,648$ (cells/g gills), $459,676 \pm 643,184$ (cells/g gills) 이었다. 감염율은 6월에 77.5%로 가장 낮았으며, 이 기간 중 감염도는 $278,977 \pm 353,807$ (cells/g gills) 로 나타났다. (Fig. 7. 8.)

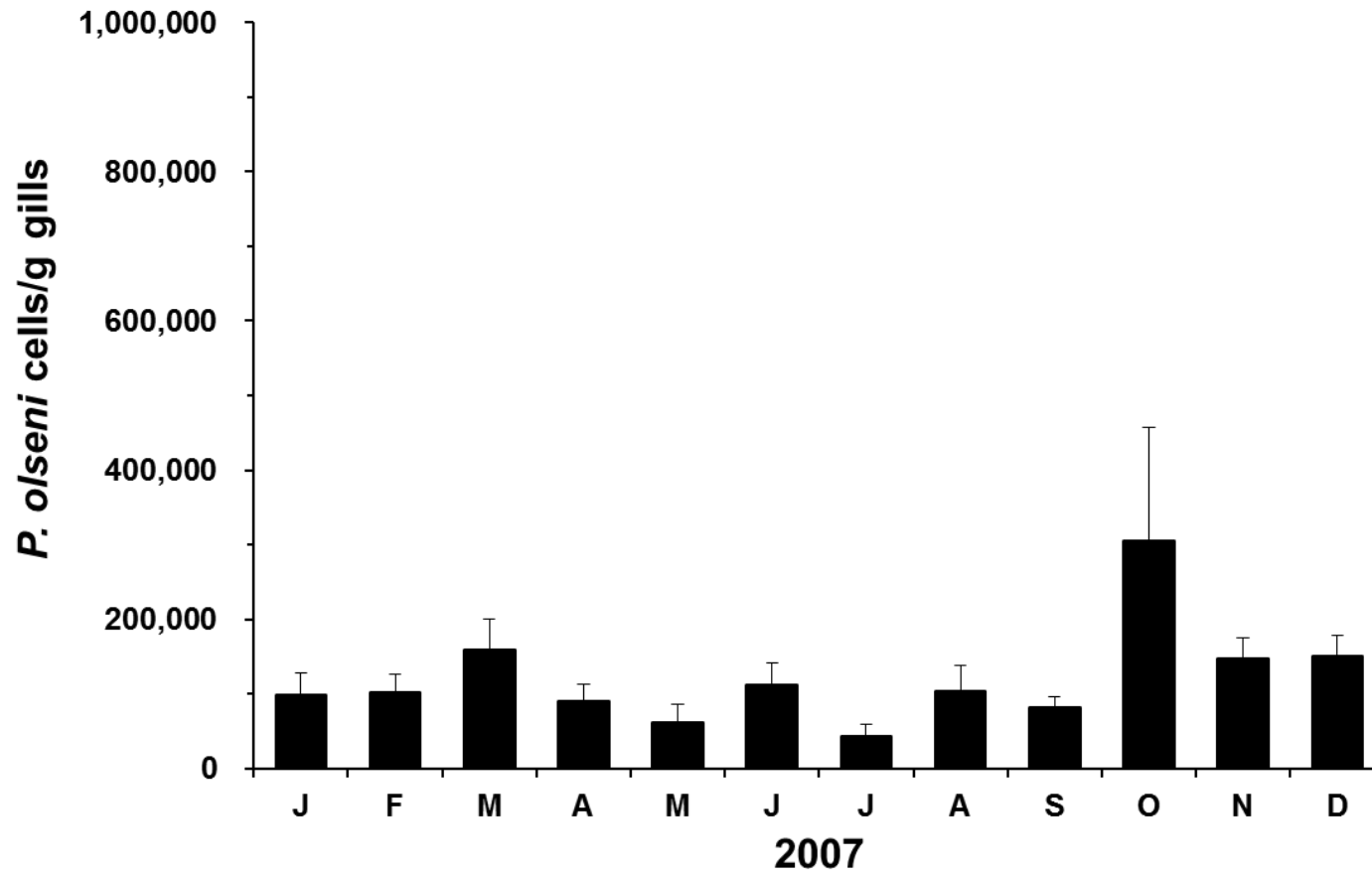


Fig. 7. Monthly mean of *P. olseni* infection intensity (cells/g gills) determined from the gill tissues using RFTM and NaOH digestion.

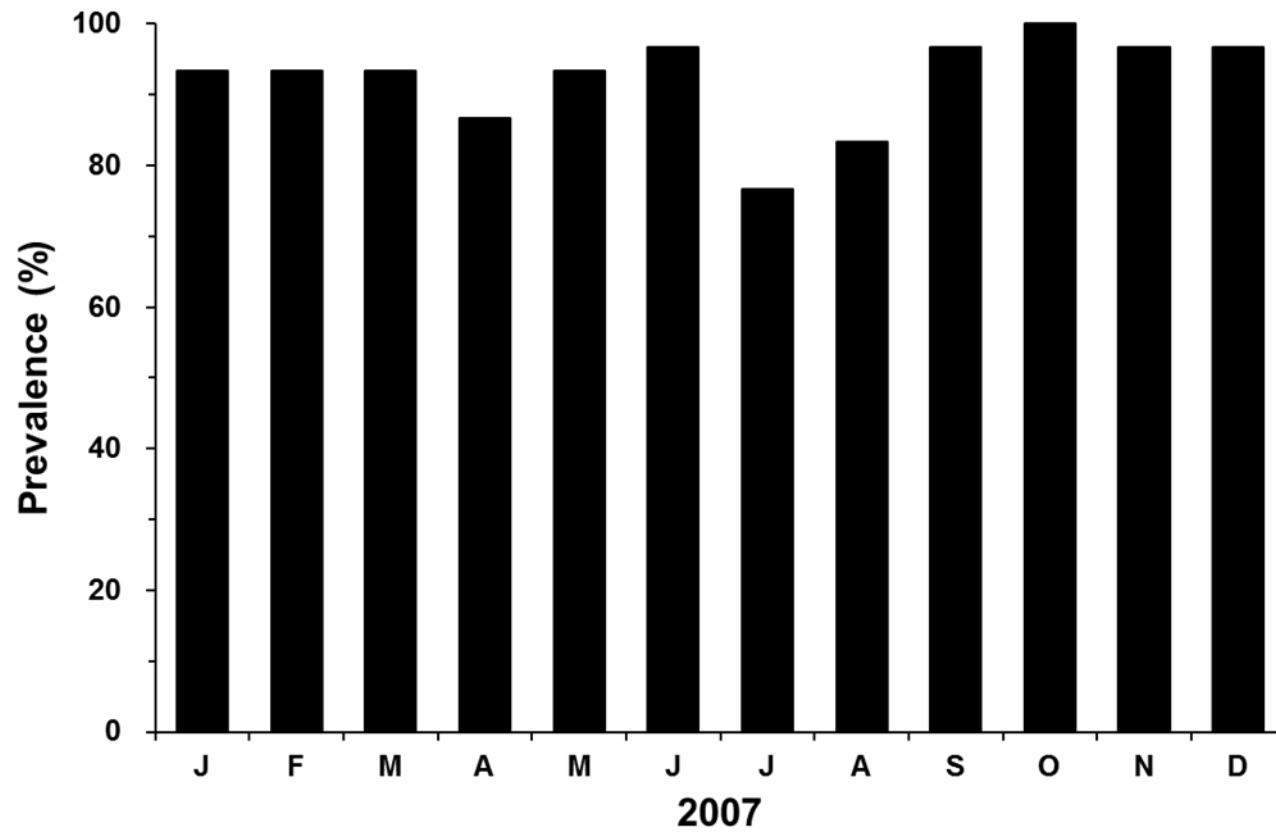


Fig. 8. Prevalence of *P. olsenii* in the gill tissues.

3.3.2 Whole body burden

이 연구에서는 바지락 개체 전체에 분포하는 *P. olsenii*의 감염도 (infection intensity)를 추정하기 위하여 아가미조직을 이용한 *P. olsenii* 감염도 조사와 별도로 매월 30개체의 바지락을 상대로 *P. olsenii* 감염도 (whole body burden)를 조사하였다. 아가미조직내의 *P. olsenii* 감염도 조사와 같은 방법으로 RFTM에서 일주일간 배양된 바지락에 분포하는 *P. olsenii*는 2M NaOH로 처리한 후, 계수하여 최종적으로 감염도는 *P. olsenii* cells/g tissue로 표현하였다.

Whole body burden을 통한 *P. olsenii*의 감염율 (prevalence)는 7월 최소값 76.7%를 보였으며, 최대값은 10월 100%로 나타났다 (Fig. 9). *P. olsenii*의 감염도는 7월 에 최소값을 보였으며 ($42,737 \pm 91,604$ cells/g TWT), 10월 감염율이 최대일 때 최대 감염도 ($305,484 \pm 832,398$ cells/g TWT)를 나타냈다. *P. olsenii* whole body burden의 감염도는 전반적으로 여름철 초기에 낮게 나타났으며, 7,8월 산란기를 거쳐 휴지기 (resting)인 가을에 증가하는 양상을 보였다 (Fig. 10).

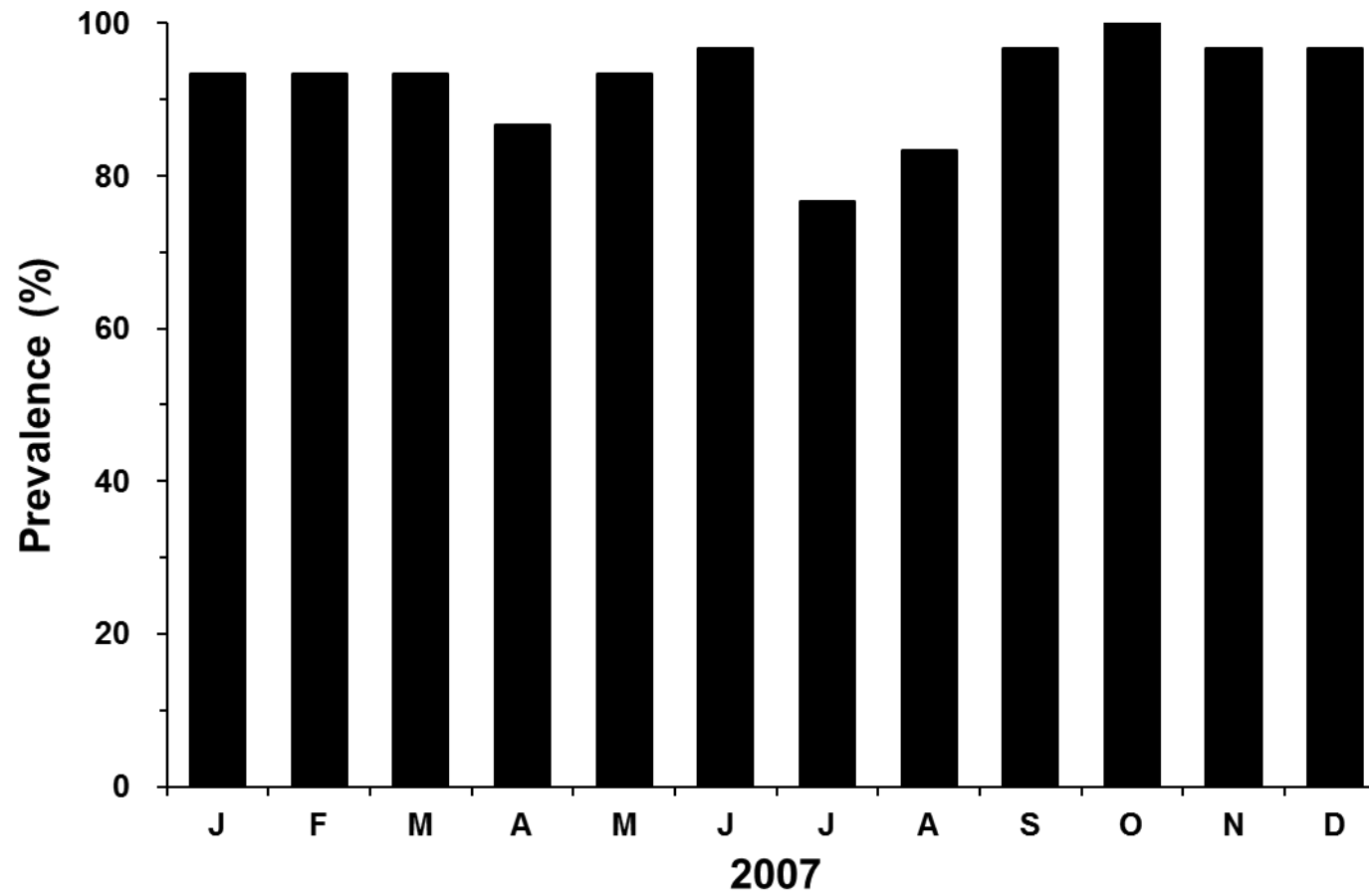


Fig. 9. Prevalence of *P. olseni* determined from RFTM on whole body tissues.

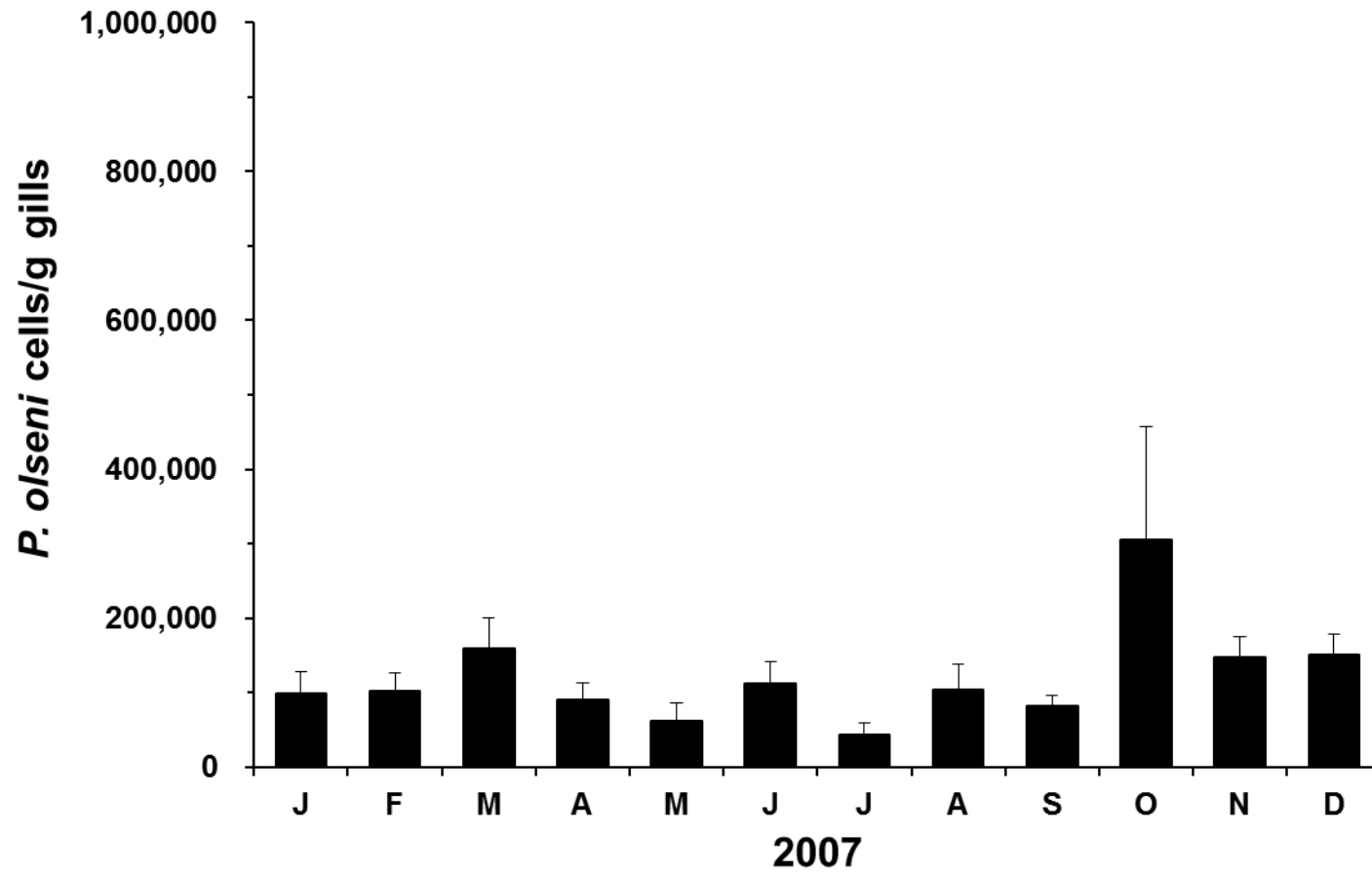


Fig. 10. *P. olseni* infection intensity determined from whole body tissues using RFTM and NaOH digestion.

3.4. Reproductive cycle

연구 기간 중, 인천 대부도 종현 갯벌 지역 암컷 바지락의 월별 생식소 변화는 Fig. 11. 과 같다. 조직학적 관찰 결과, 생식세포의 초기 발달기 (Early developing)는 2007년 3월에 관찰되기 시작하였다. 완숙기 (Ripe) 암컷 바지락 생식소는 6월에 70.6%로 증가하였다. 산란 (Partially spawned)은 7월에서부터 9월까지 관찰되었으나, 7월과 8월 각각 68.8%와 77.3%를 보임으로 주 산란기가 7,8월임을 알 수 있었다. 생식소가 관찰되지 않는 휴지기 (Resting)는 10월부터 나타났다. 현미경을 이용한 생식소의 조직학적 관찰 결과는 Fig. 12와 같다.

2007년 인천 대부도 종현 갯벌에서 채집된 바지락의 연간 생식소 발달은 Fig. 13과 같다. 수컷 바지락의 생식소 초기 발달은 암컷과 동일한 시기인 3월에 관찰되었으며, 6월에는 완숙기에 접어들어 방정 직전인 바지락이 전체 조사한 바지락의 42.9%를 차지하였다. 방정은 7월에서부터 9월까지 일어난 것으로 관찰되었으나, 7월과 8월 각각 90.9%와 94.1%를 보임으로 주된 방정 시기는 암컷 바지락의 산란기인 7,8월과 동일한 것으로 확인되었다. 생식소가 관찰되지 않는 휴지기는 11월부터 나타났다. 현미경으로 관찰된 수컷 바지락 정소의 연중 생식소 발달은 Fig. 14와 같다.

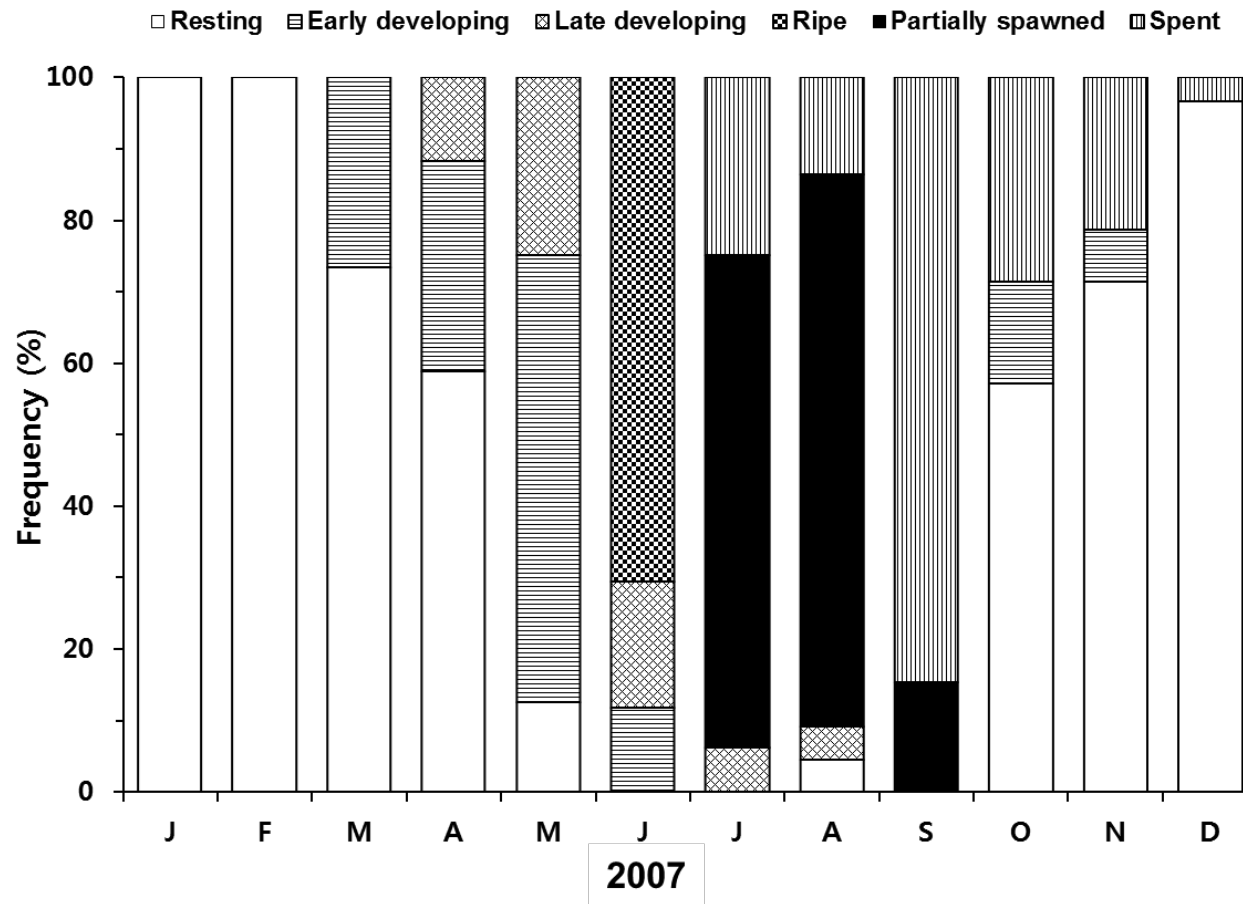


Fig. 11. Monthly variation in the reproductive stage of female Manila Clam at the sampling site in 2007.

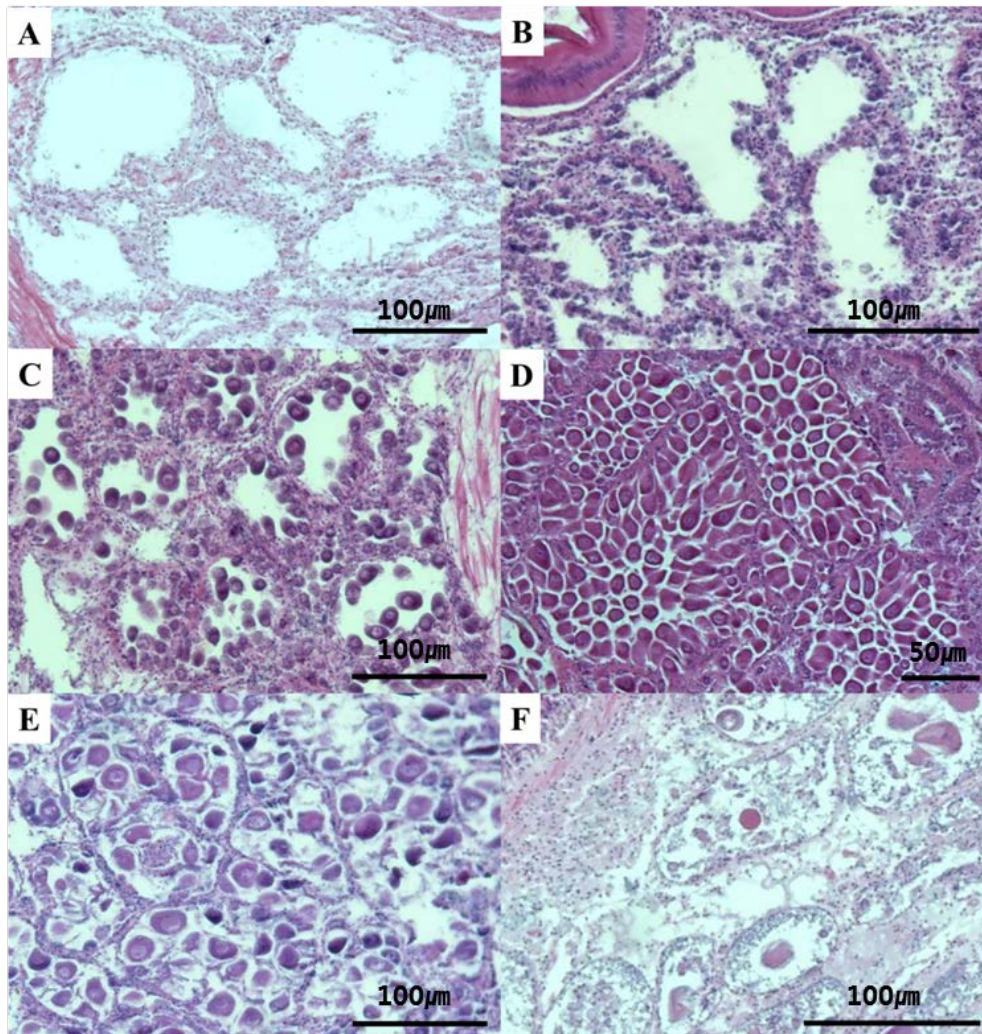


Fig. 12. Micrographs showing different reproductive stages of the females. A: Resting stage, gonad follicle is empty. B: Early developing stage, as the small oocyte are developing along the follicle walls. C: Late developing stage, as the oocyte density and the follicle size increased. D: Ripe stage, as the follicles filled with fully mature oocytes. E; Partially spawning, as the mature eggs are detached from the follicle wall and egg number become decreased. F: Spent stage, as the follicles appear empty and the residual oocytes (arrows) are resorbed.

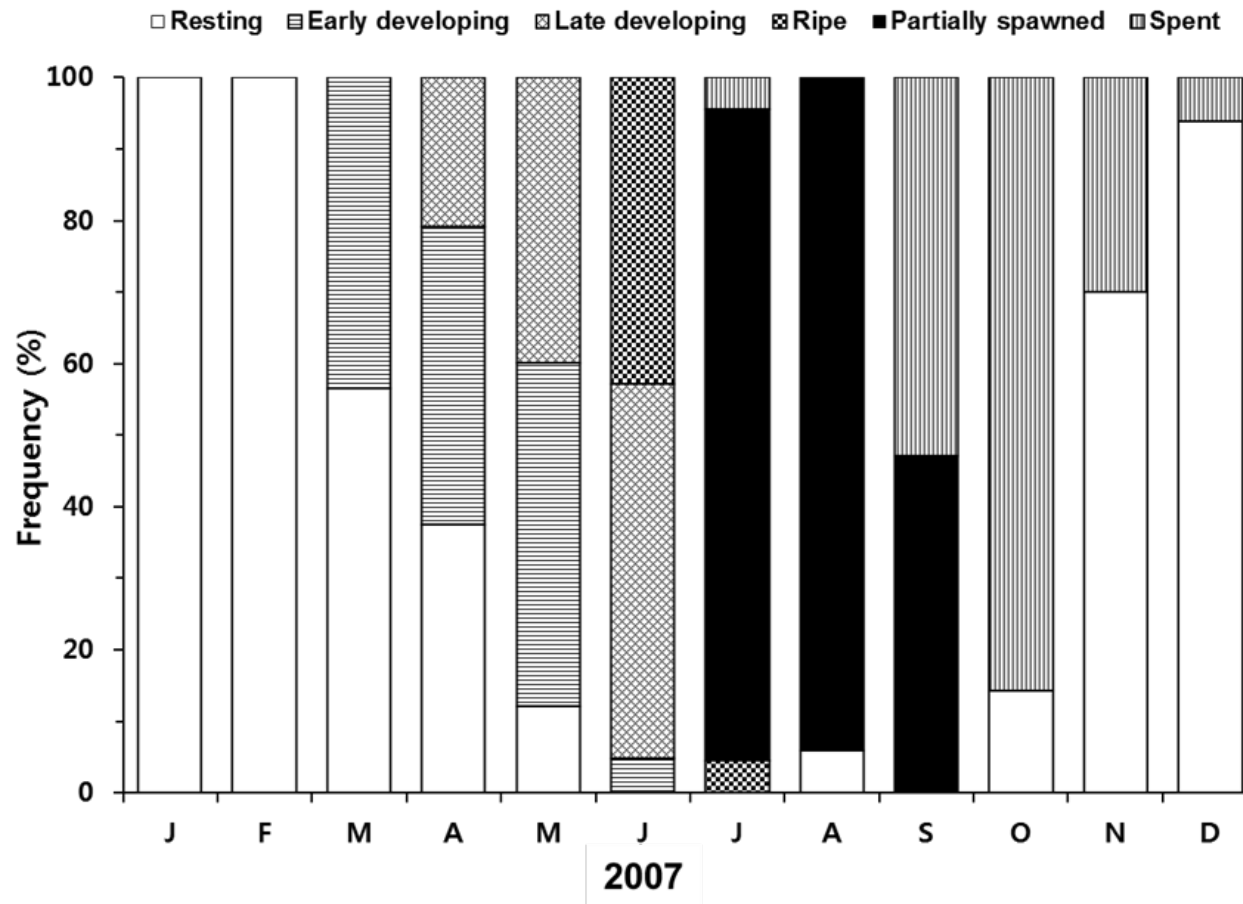


Fig. 13. Monthly variation in the reproductive stage of male Manila Clam at the sampling site in 2007.

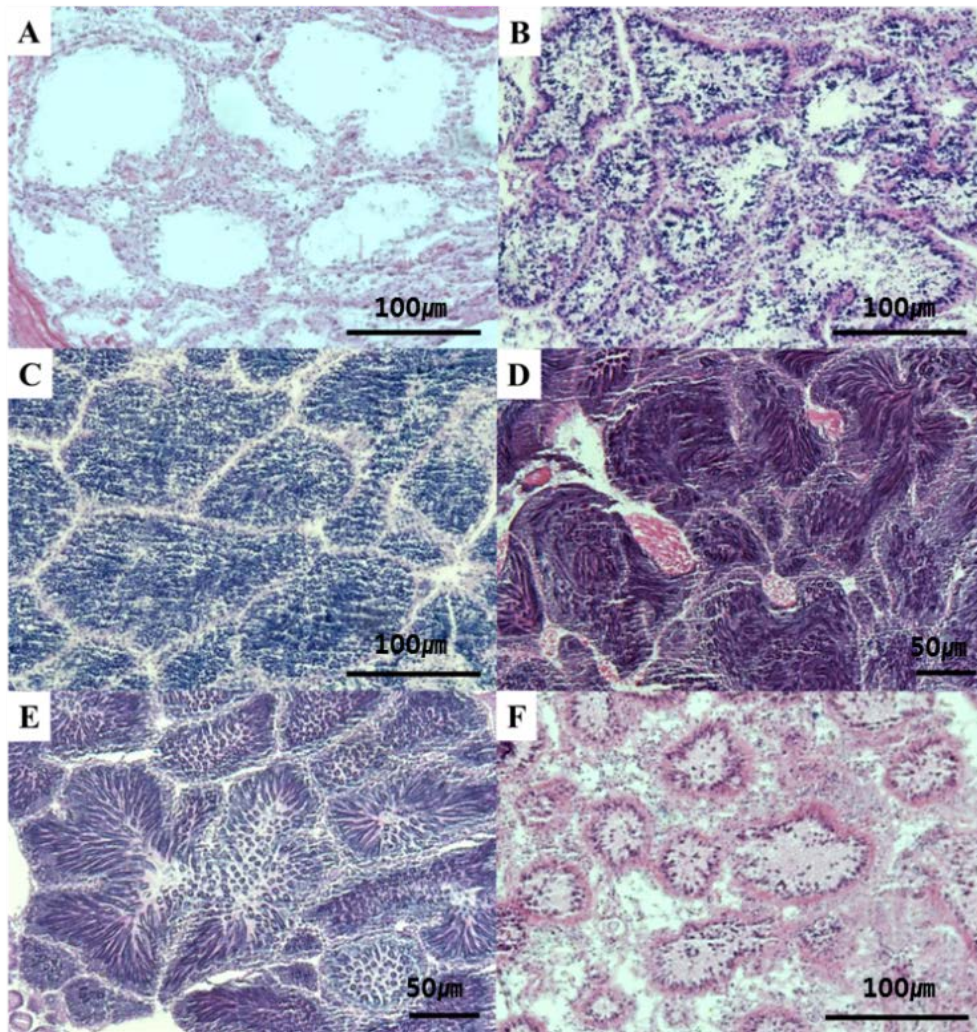


Fig. 14. Micrographs showing different reproductive stages observed from the males. A: Resting stage, as the follicle is empty. B: Early developing stage, as the small gametes are developing along the follicle walls. C: Late developing stage, the number of spermatozoa and the follicle size become increased. D: Ripe stage, as the spermatozoa tails are pointing toward the center of the lumen, forming concentric bands. E: Partially spawning stage, as the empty space in the follicles become evident, due to releasing of the mature spermatozoa. F: Spent stage, as the follicle areas become decreased and residual spermatozoa can be observed.

4. Discussion

4.1. Condition Index (CI)

Condition Index (건강도)는 해산 이매패류의 영양상태 또는 일반적인 건강 상태를 나타내는 지표로 사용되고 있다 (Rainer and Mann 1992; Crosby and Gale 1990). CI의 연중 변화 양상은 일반적으로 에너지 저장기간과 배우자형성기간 동안에는 증가하고, 산란을 마친 시기에는 감소하여어 번식주기 산정이나 자연 개체군의 계절에 따른 생리상태 변화를 이해하는데 있어 지표로 이용되었다 (Gosling 2003; Lawrence & Scott 1982; Widdows 1985). 해산 이매패류의 번식주기와 패류의 체내 에너지 저장 및 활용 과정은 종종 밀접한 관계를 보인다 (Sastry 1979; Urrutia et al. 1999). 해산 이매패류는 탄수화물 형태로 저장된 물질을 산란을 위한 난 형성과정에서 난 단백질로 전환되는 것으로 알려지고 있다 (Robert et al. 1993; Berthelin et al. 2000; Ojea et al. 2004; Dridi et al. 2007).

바지락의 CI는 생식소 발달이 완숙기로 진행하면서 증가하고 산란 직전의 상태일 때 최고로 높아진다. 이와 같은 CI의 최대값은 육질 및 생식소 성장이 최대로 이루어 졌음을 의미한다. 이번 연구기간 동안 관찰된 종현 지역의 월 평균, 0.254 - 1.050의 범위였으며, CI 변화 양상을 조직학적 관찰결과와 비교해 봤을 때도 생식소 발달 변화와 매우 일치하는 경향을 보이고 있었다. 휴지기 상태인 10월부터 2월(겨울) 사이에 가장 낮게 관찰되었고, 산란 직전에 최대값을 보인 이후 감소하는 경향을 보였다.

4.2. Reproductive cycle

바지락, 굴과 같은 해산 이매패류의 연중 번식 (gametogenesis)은 해수 중의 수온과 먹이 (이 연구의 경우 chlorophyll a 총량)가 매우 중요한 환경인자로 작용하며, 특히 수온은 산란시기를 결정하는 중요한 요소로 알려져 있다 (Galtsoff 1964; Yamamoto and Iwata 1956; Holland and Chew 1974; Hofmann et al. 1992; Kennedy et al. 1996, Meneghetti et al. 2004). Sastry (1976)에 의하면, 수온은 생식소 발달을 유발하며, 이매패류 종 및 이들이 서식하는 환경에 따라 산란 임계온도가 있다고 보고하였다. 열대지방에 서식하는 패류는 연중 산란의 양상을 보이는 반면 (Kang et al. 2005; Pouvreau et al. 2000 a, b), 온대 기후에 속하는 우리나라에 서식하는 바지락은 4월-10월 사이 1-2 차례 산란하는 것으로 알려지고 있다 (Chung et al. 1994, 2001; Park and Choi 2004; Shin 1996; Won 1994). Park and Choi(2004) 의 연구에 의하면 곰소만 지역에 서식하는 바지락은 7월-10월 사이에 수온이 20℃ 정도에서 산란이 이루어지며, ELISA를 통한 번식량 측정 결과, 이 지역 바지락은 연 중, 3회의 산란 정점 (peak)을 보인다고 보고하였다. 이 연구에서는 조직학적 방법에 의존하여 산란시기를 추론하였으며, 그 결과 종현 갯벌에 분포하는 바지락은 수온이 20℃ 이상인 7월에서 9월까지 1회 산란한 것으로 추정된다.

P. olsenii 감염은 숙주인 바지락이 성장 및 번식에 이용해야 할 에너지를 기생생물이 소비하여, 바지락의 성장을 저해, 바지락의 상품가치 하락 및 생산량에 부정적인 영향을 미치는 것으로 알려지고 있다 (Villalba et al. 2004, 2005; Park et al. 2006). 또한 조직학적 관찰에 의하면, *P. olsenii*는 숙주인 바지락조직에 심각한 염증을 유발하는 것으로 보고되고 있다 (Hamaguchi et al., 1998; park

et al., 2006; Waki et al., 2012). Waki et al. (2012, 2018)에 의하면 일본 구마모 토현 아리아케 갯벌에 서식하는 바지락 치폐의 폐사는 *P. olsenii* 감염과 직접적인 관계가 있는 것으로 보고하였다.

인천 대부도 중현 갯벌에 분포하는 바지락에서 관찰된 *P. olsenii*의 감염율은 산란 전 7월에 가장 낮은 76.7%였고 산란 후 10월에 100%로 가장 높았다. 또한 *P. olsenii* 감염도가 7월에 $42,737 \pm 91,604$ cell/g wet tissue 이었는데, 이는 강우로 인한 담수의 유입으로 염분이 낮아진 것에 기인한 것으로 사료되었다. Fig. 4에서 볼 수 있듯이, 염분은 7월과 8월에 다른 달과 비교 시 3-4 ppt 정도 낮아졌는데, 이는 여름철 장마로 인하여 담수가 한강으로 경기만에 유입된 것에 기인한 것으로 사료된다. Villalba et al. (2004)에 의하면, *P. olsenii*는 저염 (low salinity)과 저온 (low temperature) 환경에서 세포분열이 느린 것으로 보고한 바 있다.

*P. olsenii*의 감염도 (infection intensity)는 바지락이 산란을 완료한 9월과 10월에 높게 나타났다. 이 시기 바지락 조직 관찰에서는 여포세포내 다량의 혈구 관찰되었는데, 이는 바지락이 산란이 완료되고 남은 생식세포를 흡수하는 과정을 반영하는 것으로 사료된다. 일반적으로 이때패류는 산란이 완료되고 남은 생식세포는 혈구세포의 식세포작용 (phagocytosis)에 의하여 흡수되는데, 이 때 식세포작용을 위한 혈구세포의 생산으로 인하여 축적된 많은 에너지를 소비하며, 또한 외부 환경으로부터 공급되는 에너지, 즉 먹이가 부족할 경우, 급격한 면역력 감소를 보인다 (Hong et al. 2014). 따라서 이러한 시기에 숙주의 면역력은 낮아질 것으로 예측되며, 상대적으로 기생생물인 *P. olsenii*는 숙주의 면역활동으로부터 덜 영향을 받아 감염도나 감염율이 증가한 것으로 사료되나, 이러한 가설은 실험

을 통하여 증명되어야 할 것으로 사료된다.

이 연구에서는 *P. olsenii* 감염이 미치는 영향은 미미한 것으로 나타났는데, 이는 감염율은 높으나 감염도가 낮은 것에 기인한 것으로 추정되었다. 인천 중현 갯벌에서 채집된 바지락에 기생하는 *P. olsenii*의 감염도는 다른 연구지역에서 보고된 결과와 비교 시, 낮은 것으로 판단되었으며, 이는 겨울철 최저 수온 및 기수지역의 특징인 염분의 계절적 변화와 밀접한 관계를 갖는 것으로 사료되었다.

References

- Almeida, M., F. Berthe, A. Thebault and M.T. Dinis. 1999. Whole clam culture as a quantitative diagnostic procedure of *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) in the clam *Ruditapes decussatus*. *Aquaculture* 177: 325-332.
- 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. *Journal of Shellfish Research* 14: 469-475.
- Azevedo, C. L. Corral and R. Cachola. 1990. Fine structure of zoosporulation in *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa: Perkinsea). *Parasitology* 100: 351-358.
- Barber BJ and Blake NJ. 1991. Reproductive physiology. In: Shumway, S.E. (Ed.), *Scallops: Biology, ecology and aquaculture*. Elsevier pp. 1095.
- Berthelin C, Kellner K & Mathieu M. 2000. Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West Coast of France). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 125, 359-369.
- Bower, S.M., J. Blackbourn and G.R. Meyer. 1998. Distribution, prevalence, and pathogenicity of the protozoan *Perkinsus qugwadi* in Japanese scallops, *Patinopecten yessoensis*, cultured in British Columbia, Canada. *Canadian Journal of Zoology* 76: 954-959.
- Bushek, D., S.E Ford and S.K Allen. 1994. Evaluation of methods using Ray's fluid thioglycollate medium diagnosis of *Perkinsus marinus* infection in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Annual Review of Fish Diseases* 4: 201-217.
- Camacho AP, Delgado M, Fernandez-Reiriz MJ and Labarta U. 2003. Energy balance, gonad development and biochemical composition in the clam *Ruditapes decussates*. *Marine Ecological Progress Series* 258, 133-145.
- Chew, K. K. 1989. Manila clam biology and fishery development in Western north America. In "Clam mariculture in North America (eds. by J. J. Manzi and M. Castagna)", Elsevier, Amsterdam, pp. 243-261.
- Cho, Y. G., 2016. DNA sequence variation among in vitro cultured *Perkinsus olseni* isolates derived from Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Korea: comparison of four commonly used DNA markers of *Perkinsus* sp. MS. thesis,

Jeju Nat. Univ. Jeju. pp. 45

- Choi, K.-S., D.H. Lewis, E.N. Powell and S.M. Ray. 1993. Quantitative measurement of reproductive output in the American oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin), using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Aquaculture and Fisheries Management* 24: 375-398.
- Choi, K.-S., D.H. Lewis, E.N. Powell, P.F. Frelie and S.M. Ray. 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. *Journal of Shellfish Research* 10: 411-415.
- Choi, K.-S., E.A. Wilson, D.H. Lewis, E.N. Powell and S.M. Ray. 1989. The energetic cost of *Perkinsus marinus* parasitism in oysters: quantification of the thioglycollate method. *Journal of Shellfish Research* 8: 125-131.
- Choi, K.-S., K.-I. Park, M. Cho and P. Soudant. 2005. Diagnosis, pathology, and taxonomy of *Perkinsus* sp. isolated from the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Korea. *Journal of the Korean Aquaculture Society* 18: 207-214.
- Choi, K.-S., K.-L. Park, K.-W. Lee and K. Matsuoka. 2002. Infection intensity, prevalence and histopathology of *Perkinsus* sp. in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, in Isahaya Bay, Japan. *Journal of Shellfish Research* 21: 119-125.
- Choi, K.-S., E.N. Powell, D.H. Lewis and S.M. Ray. 1994. Instantaneous reproductive effort in female American oysters, *Crassostrea virginica*, measured by a new immunoprecipitation assay. *Biological Bulletin* 186: 41-61.
- Chung EY, Hur SB, Hur YB, Lee JS (2001) Gonadal maturation and artificial spawning of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia: Veneridae), in Komso Bay, Korea. *J Fish Sci Tech* 4:208-218
- Chung, E.-Y., D.-K. Rhu and J.-H. Lee. 1994. Gonadal development and reproductive cycle of the short-necked clam, *Ruditapes philippinarum* (Pelecypoda: Veneridae), on the coast of Kimje, Korea. *J. Malacol.* 10: 38-54.
- Chung, E.-Y., Hur, H.-B., Hur, Y.-B., Lee, J.-S., 2001. Gonadal maturation and artificial spawning of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia: Veneridae), in Komso Bay, Korea. *Journal of Fisheries Science and Technology* 4, 208-218.
- Crosby MP and Gale LD. 1990. A review and evaluation of bivalve condition index

- methodologies with a suggested standard method. J Shellfish Res 9, 233-237.
- Dittman, D. E. 1993. The quantitative effects of *Perkinsus marinus* on reproduction and condition in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*. J. Shellfish Res. 12:127.
- Dridi S, Romdhane MS & Elcafsi M. 2007. Seasonal variation in weight and biochemical composition of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in relation to the gametogenic cycle and environmental conditions of the Bizert lagoon, Tunisia. Aquaculture 263, 238-248.
- Drummond, L., Mulcahy, M., Culloty, S., 2006. The reproductive biology of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, from the North-West of Ireland. Aquaculture 254, 326-340.
- Dungan, C.F. and B.S. Roberson 1993. Binding specificities of mono- and polyclonal antibodies to the protozoan oyster pathogen *Perkinsus marinus*. Diseases of Aquatic Organisms 15: 9-22.
- Dungan, C.F. and K.S. Reece. 2006. In vitro propagation of two Perkinsus spp. Parasites from Japanese Manila clams *Venerupis philippinarum* and description of *Perkinsus honshuensis* n. sp. Journal of Eukaryotic Microbiology 53: 316-326.
- Eugenia, R, Pazo, J.P., Garcia, A., and Fernández cortés, F. 1992. Reproductive cycle of Manila clam, *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850) in Ria of Vigo (NW Spain). Sci. Mar., 56(1): 61-67.
- 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. Journal of Shellfish Research 15: 109-117.
- Ford, S.E., A. Schotthoefer and C. Spruck. 1999. In vivo dynamics of the microparasite *Perkinsus marinus* during progression and regression of infections in eastern oysters. Journal of Parasitology 85: 273-282.
- Galtsoff PS. 1964. The American oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. Fisheries Bulletin 64,1-479.
- Gosling, E., 2003. Bivalve Mollusks: Biology, Ecology and Culture. Fishing News Books. 443 pp.

- Hamaguchi, M. N. Suzuki, H. Usuki and H. Ishioka. 1998. Perkinsus protozoan infection in the short necked clam, *Tapes (=Ruditapes) philippinarum*, in Japan. Fish Pathology 33: 473-480.
- Hofmann, P.B., Powell, E.N., Clinck, J.M., Wilson, E.A., 1992. Modeling oyster populations III. Critical feeding periods, growth and reproduction. Journal of Shellfish Research 11, 399-416.
- Holland, D. A. and K. K. Chew. 1974. Reproductive cycle of the Manila clam *Venerupis japonica* from Hood Canal, Washington. Proc. Natl. Shellfish. Assoc. 64: 53-58.
- Hong H-K., Donaghy L., Park H.-S., Choi, K.-S. 2014. Influence of reproductive condition of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* on hemocyte parameters during early postspawning period. Aquaculture 434: 241-248.
- Kang CK, Park MS, Lee PY, Choi WJ and Lee WC. 2000. Seasonal variations in condition, reproductive activity and biochemical composition of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in suspended culture in two coastal bays of Korea. Journal of Shellfish Research 19(2), 771-778.
- Kang DH, Park HS, Yi SK and Choi KS. 2005. Reproductive condition of the tropical black lip pearl oyster, *Pinctada margaritifera* (Linnaeus 1758) from Chuuk lagoon, federated state of Micronesia during the summer months in 2003. Ocean and Polar Research 27(3), 351-358.
- Kennedy VS, Newell RIE and Eble. 1996. The eastern oyster *Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant College Publication UM-SG-TS-TS-96-01. 734 pp.
- Lawrence DE and Scott GI. 1982. The determination and use of condition index of oysters. Estuaries 5, 23-27.
- Liang, Y.-B., X.-C. Zhang, L.-J. Wang, B. Yang, Y. Zhang and C.-L. Cai. 2001. Prevalence of Perkinsus sp. in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, along the northern coast of the Yellow Sea in China. Oceanologica et Limnologica Sinica 32: 502-511 (in Chinese with English abstract).
- Mackin, J.G. 1951. Histopathology of infection of *Crassostrea virginica* (Gmelin) by *Dermocystidium marinum* Mackin, Owen, and Collier. Bulletin of Marine Science 1: 72-87.
- Mackin, J.G. 1962. Oyster disease caused by *Dermocystidium marinum* and other

- microorganisms in Louisiana. Publication of Institute of Marine Science, University of Texas 7: 132-229.
- Maeno, Y., T. Yoshinaga and K. Nakajima. 1999. Occurrence of *Perkinsus* species (Protozoa, Apicomplexa) from Manila clam, *Tapes philippinarum*, in Japan. *Fish Pathology* 34: 127-131.
- Marin, M.G., Moschino, V., Deppieri, M., Lucchetta, L., 2003. Variations in gross biochemical composition, energy value and condition index of *T. philippinarum* from the lagoon of Venice. *Aquaculture* 219, 859-871.
- Marsh, A.G., J.D. Gauthier and G.R. Vastar. 1995. A semi-quantitative PCR assay for assessing *Perkinsus marinus* infection in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Journal of Parasitology* 81: 577-583.
- Meneghetti, F., Moschino, V., Da Ros, L., 2004. Gametogenesis cycle and variations in oocyte size of *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice. *Aquaculture* 240, 473-488.
- Montes, J., M. Durfort and J. Garcia-Valero. 1996. When the venerid clam, *Tapes decussatus*, is parasitized by the protozoan *Perkinsus* sp. it synthesizes a defensive polypeptide that is closely related to p225. *Diseases of Aquatic Organisms* 26:149-157.
- Moss, J.A., J. Xiao, C.F. Dungan and K.S. Reece. 2008. Description of *Perkinsus beihaiensis* n. sp., a new *Perkinsus* sp. parasite in oysters of southern China. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 55: 117-130.
- Navas, J.I., M.C. Castillo, P. Vera and M. Ruiz-Rico. 1992. Principal parasites observed in the clams, *Ruditapes decussatus* (L), *Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeve), *Venerupis pullastra* (Montagu), and *Venerupis aureus* (Gmelin), from Huelva coast (S.W. Spain). *Aquaculture* 107: 193-199.
- Ngo, T.T.T., Choi, K.-S., 2004. Seasonal changes of *Perkinsus* and *Cercaria* infections in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* from Jeju, Korea. *Aquaculture* 239, 57-68.
- Ojea J, Pazos AJ, Martinez D, Novoa S, Sanchez JL & Abad M. 2004. Seasonal variation in weight and biochemical composition of the tissues of *Ruditapes decussatus* in relation to the gametogenic cycle. *Aquaculture* 238, 451-468.
- Park K-I, Choi J-W, Choi K-S (1999) Epizootiology of *Perkinsus* sp. found in the

- Manila clam, *Ruditapes philippinarum* in Komsoe Bay, Korea. Journal of Korean Fisheries Society 32:303-309.
- Park K-I, Choi K-S (2001) Spatial distribution of the protozoan parasite *Perkinsus* sp., found in the Manila clams, *Ruditapes philippinarum*, in Korea. Aquaculture 203:9-22.
- Park, K.-I., A. Figueras and K.-S. Choi. 2006. Application of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the study of reproduction in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*: (Mollusca: Bivalvia): II. impacts of *Perkinsus olseni* on clam reproduction. Aquaculture 251: 182-191.
- Park, K.-I., Choi, K.-S., 2004. Application of enzyme-linked immunosorbent assay for studying of reproduction in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia): I. quantifying eggs. Aquaculture 241, 667-687.
- Park, K.-I., H. Tsutsumi, J.-S. Hong and K.-S. Choi. 2008. Pathology survey of the short-neck clam *Ruditapes philippinarum* occurring on sandy tidal flats along the coast of Ariake Bay, Kyushu, Japan. Journal of Invertebrate Pathology 99: 212-219.
- Penna, M.-S., M. Khan and R.A. French. 2001. Development of multiplex PCR for the detection of *Haplosporidium nelsoni*, *Haplosporidium costale* and *Perkinsus marinus* in the eastern oyster (*Crassostrea virginica* Gmelin, 1791). Molecular and Cellular Probe 15: 385-390.
- Perkins, F. O. 1996. The structure of *Perkinsus marinus* (Mackin, Owen, and Collier, 1950) Levine, 1978, with comments on the taxonomy and phylogeny of *Perkinsus* sp. Journal of Shellfish Research 15: 67-87.
- Perkins, F.O. and R.W. Menzel. 1966. Morphological and cultural studies of a motile stage in the life cycle of *Dermocystidium marinum*. Proceedings of the National Shellfisheries Association 56: 23-30.
- Pillard C (2004) A short-review of brown ring disease, a vibriosis affecting clams, *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus*. Aquatic Living Resources 17:467-475.
- Pouvreau S, Bacher C and Héral. 2000b. Ecophysiological model of growth and reproduction of the black pearl oyster, *Pinctada margaritifera*: potential applications for pearl farming in French Polynesia. Aquaculture, 186, 117-144.

- Pouvreau S, Gangnery A, Tiapari J, Lagarde F, Garnier M and Bodoy A. 2000a. Gametogenic cycle and reproductive effort of the tropical black lip pearl oyster, *Pinctada margaritifera* (Bivalvia: Pteriidae), cultivated in Takapoto Atoll (French Polynesia). *Aquatic Living Resources* 13, 37-48.
- Rainer JS and Mann R. 1992. A comparison of methods for calculating condition index in eastern Oysters, *Crassostrea virginica* (GMELIN, 1791). *Journal of Shellfish Research* 11(1), 55-58.
- Ray, S.M. 1953. Studies on the occurrence of *Dermocystidium marinum* in young oysters. *Proceedings of the National Shellfisheries Association* 44: 80-92.
- Ray, S.M. 1966. A review of the culture method for detecting *Dermocystidium marinum* with suggested modifications. *Proceedings of the National Shellfisheries Association* 54: 55-69.
- Robert, R., Trut, G., Laborde, J.L., 1993. Growth, reproduction and gross biochemical composition of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in the Bay of Arcachon, France. *Marine Biology* 116, 291-299.
- 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.
- Romestand, B., J. Torreilles and P. Roch. 2001. Production of monoclonal antibodies against the protozoa, *Perkinsus marinus*: estimation of parasite multiplication in vitro. *Aquatic Living Resources* 14: 352-357.
- Sanil, N.K., G. Suja, J. Lijo and K.K. Vijayan. 2012. First report of *Perkinsus beihaiensis* in *Crassostrea madrasensis* from the Indian subcontinent. *Diseases of Aquatic Organisms* 98: 209-220.
- Sastry, A. N. 1979. Pelecipoda (excluding Ostreidea), In "Reproduction of marine invertebrates" (A.C. Giese & J.S Pearse, eds.), Academic Press, New york 5: 113-292.
- Shin, S. H., 1996. Growth and Production of Short-necked Clam (*Tapes philippinarum*: Bivalvia) in Kwangyang Bay. MS. thesis, Yosu Nat. Fish. Univ. Yosu. pp. 118 (in Korean).
- Urrutia MB, Ibarrola I, Iglesias JIP and Navarro E. 1999. Energetics of growth and

- reproduction in a high-tidal population of the clam *Ruditapes decussates* from Urdaibai Estuary (Basque Country, N. Spain). *Journal of Sea Research* 42, 35-48.
- Villalba A, Casas SM, Lopez C, Carballal MJ (2005) Study of perkinsosis in the carpet shell clam *Tapes decussates* in Galicia (NW Spain). II. Temporal pattern of disease dynamics and association with clam mortality. *Diseases of Aquatic Organisms* 65:257-267.
- Villalba A, Reece KS, Ordas C, Casas SM, Figueras A (2004) Perkinsosis in molluscs: a review. *Aquatic Living Resources* 17:411-432.
- Waki, T., Shimokawa, J., Watanabe, S., Yoshinaga, T., Ogawa, K., 2012. Experimental challenges of wild Manila clams with *Perkinsus* species isolated from naturally infected wild Manila clams. *Journal of Invertebrate Pathology* 111, 50-55.
- Waki, T., Takahashi M, Eki T., Hiasa M, Umeda K, Karakawa N, Yoshinaga T., 2018. Impact of *Perkinsus olseni* infection on a wild population of Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Ariake Bay, Japan. *Journal of Invertebrate Pathology* 153: 134-144.
- Widdows J. 1985. Physiological Measurements. In: B. L. Bayne, editor. *The effects of stress and pollution on marine animals*. New York: Praeger Scientific. Pp. 3-45.
- Won, M. S. 1994. Seed production and environmental influence on productivity of the short necked clam, *Ruditapes philippinarum*. Ph. D. thesis, Busan, Nat. Fish. Univ., Busan pp. 220.
- Yamamoto, K. and F. Iwata. 1956. Studies on the bivalve *Venerupis japonica*, in Akkeshi Lake. II. Growth rate and biological minimum size. *Bull. Hokkaido Reg. Fish. Res. Lab.* 14: 57-63.
- Yoo, J. S. 1976. *Korean shellfishes in colour*, Iljisa., pp. 129.

감사의 글

석사과정을 진행하면서 저의 학위논문이 잘 마무리될 수 있게 많은 분들의 도움이 있었습니다. 이 글을 통해 감사의 인사를 드리고자 합니다.

때늦은 졸업에 이르기까지 미약하기만 한 저에게 끊임없이 인내와 용기를 심어주신 최광식 교수님 감사합니다. 그럴싸한 포장과 답을 찾는 저에게 석사 논문은 결과만이 해답이 아니라는 것을 알게 해주신 최광식 교수님, 이 분야의 대선배로서 학문적인 깨우침뿐 아니라 학위과정의 의미와 연구에 대한 조언과 격려를 아끼지 않으시고 저로 하여금 배움에 대한 노력하는 자세와 자긍심을 일깨워 주셨습니다. 교수님의 지도를 통해 제가 부족한 점이 무엇이고 어떤 방향으로 나아가야 할 지에 대해 제대로 알 수 있었습니다. 그리고 바쁘신 중에도 꼼꼼하고 면밀하게 논문을 심사해 주시고, 질적 향상에 도움을 아끼지 않으신 박경일 교수님과 정석근 교수님께 지면을 빌어 감사 인사를 드립니다. 특히 최광식 교수님과 박경일 교수님의 선행 연구가 없었더라면 저의 논문은 세상에 나올 수 없었다고 생각합니다. 학위를 준비하면서 교수님들의 업적이 얼마나 위대한지 다시 한번 깨닫게 되었습니다. 대한민국 패류 질병의 최고 권위자로서 진심으로 존경합니다.

낮선 연구실 분위기가 이제 좀 익숙해지고, 석사 과정이 어떤 것인지 겨우 알아가는 중인데 벌써 마지막이라니 아쉬움이 많이 남습니다. 연구실 일로 바쁘고 와중에도, 학위가 무사히 나올 수 있도록 큰 역할을 해준 조영관 연구원 정말 고맙습니다. 데이터 분석에 무지렁이인 저에게 새로운 세상을 알게 해주고, 제대로 형식을 갖춘 논문이 탄생할 수 있도록 세심하게 조언해주시고 수정과 교정에 도

움을 주신 해주신 이해미 박사님 감사합니다. 그리고 다들 바쁜 와중에도 제 연구를 도와주신 무척추동물 실험실 연구원 모두에게도 감사인사 전합니다.

자랑스런 한화 아쿠아플라넷 동료들, 그 무엇보다도 소중하게 여기고 있는 여러분들과 졸업의 기쁨을 나누고 싶습니다. 특히 연구에 대한 열정과 의지를 함께 해주고 지원을 아끼지 않았던 채정희 대리에게 진심으로 감사의 말 전합니다. 그리고 가장 결정적인 순간에 영어 능력자로서 도움 주시고, 힘들었던 고비를 무사히 넘게 해준 홍원희 수의사에게도 감사의 마음 전합니다. 힘든 시기에 같은 길을 걷고 있는 김창완 계장도 여러모로 감사하고, 졸업 축하합니다. 또한 저를 최광식 교수님 실험실로 이끌어 준 Kioost 김태호 연구원, 당신 덕분에 학위를 받게 되었습니다. 고맙습니다. 욕심 많은 상사를 만나 업무의 굴레를 한없이 들고 있는 우리 직원들, 늘 미안하고 고맙고 사랑합니다.

마지막으로 자식의 그늘진 곳에서 하염없이 서 계시는 우리 부모님, 건강한 모습으로 오랫동안 제 곁에서 지켜봐 주시길 모든 신을 총동원해 기도 드립니다. 항상 저를 믿어주시고 묵묵히 응원해주시는 부모님 감사하고, 사랑합니다. 그리고 가까이에서 인생의 중요한 시기에 깨알 같은 조언을 해주는 제 인생의 교과서 같은 임태훈 오라버니도 너무 고맙다는 말 전하고 싶습니다. 저를 단단하고 굳건히 지켜주고 있는 가족들에게 이 학위를 바치고 싶습니다.

지면의 제한으로 언급하지 못한 모든 분들께도 감사의 말 전합니다. 석사 과정은 저에게는 감사함이라는 마음을 항상 품을 수 밖에 없도록 만들어 준 소중한 시간이었습니다. 밀지 않으면 움직이지 않는 저를 이 자리까지 오게 해 주신 것은 저를 아끼고 사랑해 주셨던 바로 여러분들 이십니다. 여러분이 있어 제

가 있습니다. 감사하고 사랑합니다.

막상 끝내고 나니 이상하게도 새로 시작했다는 느낌만이 남습니다. 이 느낌 그대로 더욱 정진하여 해양수산 분야에 그리고 아쿠아리움 분야에서 꼭 필요한 전문가가 되겠습니다. 모두 진심으로 감사합니다.