

香魚의 腸胞子蟲(*Thelohanellus kitauei*) 症의 豫防 및 治療에 관한 基礎的 研究*

Ⅱ. 物理化學的 要因이 腸胞子蟲 胞子에 미치는 影響

全北大學校 獸醫寄生蟲學教室

李宰求 · 金鍾五 · 朴培根

要約: 장포자충(*Thelohanellus kitauei*) 포자의 극사탈출 여부를 生死 判定 基準으로 하여 物理化學的 要因이 포자의 活性 및 生存에 미치는 影響에 대하여 관찰하였다. 신선 포자를 0.45% 및 0.9% 생리식염수와 증류수에 현탁시켜 5°C 또는 28°C에 단기간 보존하면 3일까지, Tyrode액에 현탁시켜 -70°C에 단기간 냉동 보존하면 8일까지 극사탈출률이上昇하였다. 신선 포자를 0.45% 생리식염수에 현탁시켜 5°C에 장기간 보존하면 1,270일간 생존할 수 있을 것으로 推定되며, 증류수에 현탁시켜 28°C에 보존하면 152일간 밖에 생존하지 않으나, Tyrode액에 현탁시켜 -70°C에 냉동 보존하면 780일 후에도 냉동 초기와 거의 같은 패턴으로 생존하는 것으로 나타났다. 한편, 신선 포자를 Tyrode액에 현탁, 냉동시킨 다음 5°C의 조건 하에서 解凍시킬 때 포자의 極絲脫出率이 가장 높았다.

냉동 후 해동 포자에 熱을 가하면 냉동기간이 길수록 극사탈출률이 약간 높아지는 경향이었으며 180일간 냉동력에 있어서 포자가 전부 사멸하는 限界點은 대체적으로 60°C 78.5시간, 70°C 23.4시간, 80°C 189.1분 또는 90°C 10.5분이었다. 냉동 포자의 해동 후 사멸에 要하는 대체적인 기간도 냉동기간이 길수록 길며, 그 限界點은 20일간 냉동 시 17.4일, 100일간 냉동 시 33.2일, 400일간 냉동 시 37.8일이었다. 냉동 포자를 해동 후 自然乾燥시키면 냉동기간이 길수록 포자의 사멸에 要하는 대체적인 기간도 길며, 그 限界點은 540일간 냉동시 23.5일, 160일간 냉동시 21.0일, 20일간 냉동시 14.4일이었다. 한편, 냉동 후 해동 포자에 10W 紫外線燈을 조사하면 냉동기간이 길수록 빨리 사멸하며, 그 限界點은 100일간 냉동시 26.0시간, 300일간 냉동시 21.9시간, 540일간 냉동시 13.9시간이었다. 각종 소독제(1,000 ppm)가 200일간 냉동 후 해동 포자를 사멸시키는데 필요한 시간은 산화칼슘 5.2分, 過망간酸칼륨 10.4分, 말라카이트그린 27.8分, 포르말린 14.3時間의 순이었다. 그리고, 각종 抗原蟲 및 抗真菌劑 중에서 ketoconazole, metronidazole, dapsone의 順으로 일시적인 극사탈출 억제 효과가 認定되었다.

이상의 실험 결과로 미루어 보아 장포자충증의 感染을 예방하기 위해서는 現時點에 있어서 양어장의 바닥을 콘크리트로 築造하여 완전 건조시킨 다음 산화칼슘을 撒布하고 太陽光線을 수일 간에 걸쳐 照射시키는 방법 밖에 없는 것으로 생각된다.

Key words: *Thelohanellus kitauei*, *Cyprinus carpio nudus*, extrusion of polar filament, physical and chemical factors

緒 論

1987년부터 連 4年間에 걸쳐 우리 나라 各地域 各處의 2년생 이상 香魚의 가두리 養殖場에서 여름철에 腸胞子蟲인 *Thelohanellus kitauei*에 의해 발생한 腸胞子

蟲症의 예방 및 치료 방법을 開發하기 위한 기초적 연구의 일환으로 전번에는 腫瘤 內의 포자를 同定한 다음 조직학적인 방법을 適用하여 증류의 消長 過程에 대하여 조사, 검토하였는데(李 등, 1990), 이번에는 物理化學的 要因이 試驗管 內에서 포자의 活性 또는 生存에 미치는 影響에 관하여 조사하고 이 포자에 대한 殺蟲性 藥劑의 선별을 試圖하였다.

* 이 연구는 1989年度 産學協同財團의 研究費 支援에 의하여 이루어졌음.

材料 및 方法

昭陽潭의 潑林水産 가두리 養殖場에서 사육하고 있는 腸胞子蟲(*T. kitauai*) 感染 香魚에서 채취한 腫瘍로부터 얻은 胞子의 新鮮한 狀態의 것 또는 -70°C 에 冷凍保存하여 5°C 에서 解凍시킨 것을 실험에 사용하였다.

極囊 內的 極絲 脫出 實驗은 다음과 같이 실시하였다. 즉, 육안적으로 보아 先端이 破裂되지 않은 종류만을 선별, 장관 詰막으로부터 채취하여 소량의 Tyrode 액을 添加하면서 믹서틀 이용, 磨碎하여 懸濁液을 만들었다. 이 현탁액을 Tyrode액으로 數回에 걸쳐 遠心 洗滌한 다음 희석하여 25 μl 當 200개 정도의 포자가 함유되게 조정하여 (以下 胞子 稀釋液이라고 略함) 슬라이드글라스 위에 그 25 μl 를 取하였다. 그 위에 5% KOH 25 μl 를 追加, 극사의 脫出 與否를 관찰하여 극사가 탈출한 것은 포자가 생존한 것, 극사가 탈출하지 않는 것은 포자가 瘞사한 것으로 判定하였다.

한편, 物理化學的 要因이 腸胞子蟲 胞子의 活性 또는 生存에 미치는 影響은 다음과 같은 방법으로 시험관 내 실험을 모두 3반복으로 실시하여 그 결과를 통계처리하였다.

懸濁液의 種類 및 冷凍 後 解凍 溫度가 胞子의 活性에 미치는 影響: 포자 희석액 1 ml 씩을 자동피펫으로 여러 개의 원침관에 취하여 2,000 rpm에서 3분간 원심분리시켜 가능한 한 浮遊한 Tyrode액을 모두 除去시킨 다음 거기에 0.45% 및 0.9% 생리식염수, 증류수 그리고 Tyrode액 10 ml씩을 각각 넣어 원침시켜 상청액을 제거하였다. 이들 沈渣(10만~20만개의 포자 함유)에 위의 4종의 현탁액 1 ml씩을 넣어 현탁시켜서 -20°C 에서 24시간 豫冷시키고 나서 -70°C 에서 15일간 냉동시킨 다음 5°C , 18°C 및 28°C 에서 각각 解凍시켜 포자의 극사탈출률을 조사하였다.

短期 保存이 胞子의 活性에 미치는 影響: 포자 희석액 1 ml씩을 여러 개의 원침관에 취하여 전술한 세척 방법으로 처리한 다음 거기에 0.45% 및 0.9% 생리식염수, 증류수, Tyrode액 1 ml씩을 각각 넣어 현탁시켜서 5°C 와 28°C 에 각각 보존하면서 7일간에 걸쳐 경시적으로 포자의 극사탈출률을 調査하였다.

短期 冷凍이 胞子의 活性에 미치는 影響: 포자 희석액 1 ml씩을 여러 개의 4 ml 들이 병에 취하여 -20°C 에 24시간 예냉시킨 다음 -70°C 에 냉동, 보존하면서 經時的으로 포자의 活性이 가장 활발하였던 5°C 에서 해동시켜 8일간에 걸쳐 포자의 극사탈출률을 調査하였다.

懸濁液의 種類 및 保存 溫度가 胞子의 生存에 미치는 影響: 포자 희석액 5 ml씩을 자동피펫으로 여러 개의 원침관에 취하여 사술한 방법으로 세척 조작하여 거기에 0.45% 및 0.9% 생리식염수, 증류수 및 Tyrode

액 5 ml씩 그리고 별도로 이들 현탁액에다 페니실린 50 IU/ml와 黃酸스트렙토마이신 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 첨가한 것을 각각 넣어 혼합한 다음 5°C 와 28°C 에 각각 보존하면서 경시적으로 장기간에 걸쳐 포자의 극사탈출률을 조사하였다. 이 경우에 있어서 이들 현탁액은 長期間에 걸쳐 보존하기 때문에 용액의 腐敗를 예방하기 위하여 포자의 극사탈출률을 조사할 때마다 각 용액은 원친 세척 방법을 利用하여 교체하였다.

高溫이 胞子의 生存에 미치는 影響: 포자 희석액 1 ml 씩을 자동피펫으로 여러 개의 원침관에 취하여 전술한 세척 방법으로 처리하여 4 ml 들이 병에 옮기고 나서 Tyrode액 1 ml씩을 가하여 -20°C 로 예냉시킨 다음 -70°C 로 여러 기간 동안 냉동보존한 다음 5°C 에 해동시킨 것(이하 解凍 胞子 稀釋液이라 略함)을 10 ml 들이 시험관에 각각 넣은 다음 Tyrode액으로 약 200개/25 μl 포자가 함유되게 조정하여 미리 60°C , 70°C , 80°C 및 90°C 로 조정된 수조 내에 넣어 해동 포자 희석액을 때때로 저어주었다. 각 시험관 내에서 해동 포자 희석액 25 μl 씩을 經時的으로 취하여 포자의 극사탈출률을 조사하였다.

長期 冷凍이 解凍 後 胞子의 活性에 미치는 影響: 포자 희석액 1 ml씩을 전술한 세척 방법으로 처리하여 0.45% 및 0.9% 생리식염수, 증류수, Tyrode액에 각각 현탁시켜 -20°C 에서 24시간 豫冷시킨 다음 -70°C 에 냉동보존하면서 1~2개월 간격으로 5°C 에서 해동시켜 포자의 극사탈출률을 조사하였다.

冷凍 期間이 解凍 後 胞子의 生存에 미치는 影響: 여러 기간 동안 냉동시킨 해동 포자 희석액을 5°C , 28°C 및 실온에 보존하여 經時的으로 포자의 극사탈출률을 조사하였다.

空氣中 自然 乾燥가 胞子의 生存에 미치는 影響: 여러 기간 동안 냉동시킨 해동 포자 희석액 25 μl 씩(약 200개의 포자 함유)을 여러 개의 슬라이드글라스 위에 각각 취하여 室溫에서 자연 건조시킨 다음 경시적으로 포자의 극사 탈출률을 조사하였다.

紫外線이 胞子의 生存에 미치는 影響: 여러 기간 동안 냉동시킨 해동 포자 희석액 25 μl 씩(약 200개의 포자 함유)을 여러 개의 슬라이드글라스 위에 각각 취하여 실온에서 자연 건조시킨 다음 密閉容器에 넣어 10W의 紫外線燈으로 70 cm 높이 위에서 照射시키면서 경시적으로 포자의 극사탈출률을 조사하였다.

各種 消毒劑가 胞子의 生存에 미치는 影響: -70°C 에서 200일간 냉동시킨 해동 포자 희석액 1 ml씩을 10 ml 들이 시험관에 각각 취하여 전술한 세척 방법으로 처리한 다음 過망간酸칼륨, 말라카이트그립, 포르말린, 酸化칼슘 등 소독제의 여러 농도 희석액을 가한 다음 28°C 의 水槽에 放置하면서 경시적으로 포자의 극사탈출률을 조사하였다.

各種 抗原蟲劑 및 抗真菌劑가 胞子의 活性에 미치는 影響: 지금까지 각종 동물에 사용하고 있는 sodium

Table 1. Extrusion rates of polar filaments of *Thelohanellus kitauei* spores* depending on thawing temperatures and suspensions

Thawing temp.	Suspensions			
	0.45% NaCl(%)	0.9% NaCl(%)	D.W.(%)	Tyrode's sol.(%)
5°C	77.10±4.19	72.46±1.91	68.40±4.54	90.58±0.73
18°C	75.72±3.57	68.90±3.17	66.50±5.93	88.16±2.66
28°C	83.00±2.89	71.87±4.37	63.90±6.17	83.80±4.25

* Freezing for 15 days at -70°C

Each value represents the mean of triplicate determinations with the standard deviation.

salinomycin, dapson, sodium lasalocid, halofuginone bromhydrate, sulfaquinoxaline, amprolium hydrochloride, sulfamonomethoxine, sulfadimethoxine, albendazole, ketoconazole, metronidazole, tinidazole, fumagillin, furaltadone tartrate, nifurprinol, fasigyn 등 16종의 抗原蟲 및 抗真菌劑 100 mg씩을 10 ml의 증류수에 용해시킨 다음 5단계까지 10배 系列稀釋한 것, 즉 ml당 10 mg, 1 mg, 0.1 mg, 0.01 mg 및 0.001 mg씩 함유한 것을 1 ml씩 10 ml 들이 시험관에 각각 취하여 이에 -70°C에서 70일간 냉동시킨 해동 포자 회석액 1 ml의 沈渣를 각각 追加하여 28°C의 水槽에 放置하면서 경시적으로 포자의 극사탈출률을 조사하였다.

結 果

縣濁液의 種類 및 冷凍 後 解凍 溫度가 胞子の 活性에 미치는 影響: 신선 포자를 여러 가지 용액에 현탁시켜 냉동, 해동시켰을 때 그 활력에 있어서 가장 적합한 현탁액과 해동 온도를 設定하기 위하여 여러 상태에서 포자의 극사탈출률을 조사한 결과 Table 1에 표시한 바와 같이 포자의 환경에 가장 적합한 조건은

Table 2. Extrusion rates of polar filaments of *T. kitauei* spores in short term storages at 5°C

Days after storage	Suspensions			
	0.45% NaCl (%)	0.9% NaCl (%)	D.W. (%)	Tyrode's sol. (%)
0	43.3	43.3	43.3	43.3
1	52.5	53.3	50.0	43.0
2	50.0	50.0	49.9	44.9
3	50.2	50.8	50.1	45.5
4	41.5	43.5	42.9	46.5
5	43.2	43.3	42.5	47.6
6	42.5	41.8	42.1	47.2
7	44.4	45.4	43.9	47.4

Each value represents the mean of triplicate determinations.

Tyrode液에 현탁시켜 5°C에서 解凍시키는 것이었다.

短期 保存이 胞子の 活性에 미치는 影響: 新鮮 胞子를 여러 가지 용액에 현탁시켜 5°C와 28°C에서 7일간에 걸쳐 단기간 보존하면서 경시적으로 포자의 극사탈출률을 조사한 결과는 Table 2 및 Table 3에 표시한 바와 같았다. 즉, 5°C에 보존하였을 경우 극사탈출률이 0.45% 및 0.9% 생리식염수 그리고 증류수에서 모두 3일 후까지 10% 정도 상승했다가 그 후부터는 原狀으로 복귀하였으나 Tyrode液에서는 경시적인 變動이 거의 없었다. 그리고 28°C에 보존하였을 경우에도 5°C의 경우와 거의 같은 패턴으로 변동하였다.

短期 冷凍이 胞子の 活性에 미치는 影響: 신선 포자를 Tyrode액에 현탁시켜 -20°C에서 24시간 예냉시킨 다음 -70°C에서 냉동 후 8일간에 걸쳐 경시적으로 해동시켜 포자의 극사탈출률을 조사한 결과는 Fig. 1에 표시한 바와 같이 시일이 경과함에 따라 높아졌다. 즉, 포자의 극사탈출률은 1일 후에 50.7%이었던 것이 4일 후 63.5%, 8일 후 80.5%로서 시간이 경과함에 따라 상승하는 직선적인 변화를 하며 이는 日을 函數로 한 $Y=4.25X+46.47$ 의 一次方程式에 잘 符合되며 이 경우에 있어서 實測値와 推定値와의 相關係數는 $R=0.9546$ 이었다.

Table 3. Extrusion rates of polar filaments of *T. kitauei* spores in short term storages at 28°C

Days after storage	Suspensions			
	0.45% NaCl (%)	0.9% NaCl (%)	D.W. (%)	Tyrode's sol. (%)
0	43.3	43.3	43.3	43.3
1	58.7	61.7	58.6	36.6
2	55.9	57.0	54.9	35.8
3	51.5	53.0	50.7	35.0
4	45.2	47.5	44.5	35.6
5	46.6	46.2	43.1	36.1
6	45.9	44.3	44.3	34.9
7	44.2	44.1	41.8	34.5

Each value represents the mean of triplicate determinations.

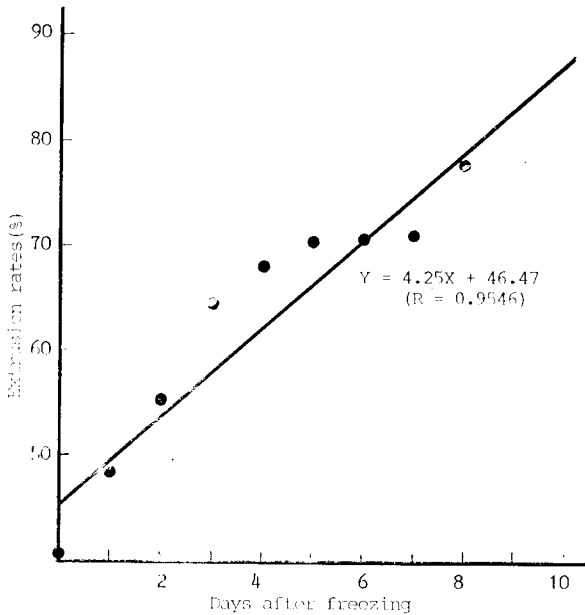


Fig. 1. Extrusion rates of polar filaments of *T. kitauaei* spores in short term freezing at -70°C .

懸濁液의 種類 및 保存 溫度가 胞子の 生存에 미치는 影響: 신선 포자를 여러 가지 용액에 현탁시켜 28°C 에 보존하던 용액에 따라 다소의 차이는 있지만 시간이 경과함에 따라 포자의 극사탈출률이 점점 낮아지는 직선적인 변화를 하며 이는日を 函數로 한 다음과 같은 一次方程式에 잘 부합된다. 즉, 0.45% 생리식염수 $Y = -0.58X + 49.54$ ($R = 0.9551$), 0.9% 생리식염수 $Y = -0.48X + 49.26$ ($R = 0.9372$), Tyrode액 $Y = -0.33X + 34.14$ ($R = 0.7404$), 증류수 $Y = -0.27X + 41.15$ ($R = 0.9501$)로 表示할 수 있으므로, 대체적으로 증류수 152.4日, Tyrode액 103.5日, 0.9% 생리식염수 102.6日, 0.45% 생리식염수 85.4日에 극사탈출률이 0%에 이르게 된다.

그리고 新鮮 胞子를 위와 같은 방법으로 처리하여 5°C 에 보존하여도 포자의 생존력이 28°C 에 보존한 것에 비하여 훨씬 길어져 保存開始 後 760일까지 Tyrode액을 除外하고는 모두 사멸하지 않았으며, 그 밖의 양상은 위와 같았다. 즉, 0.45% 생리식염수 $Y = -0.03X + 38.11$ ($R = 0.5301$), 0.9% 생리식염수 $Y = -0.04X + 39.86$ ($R = 0.5872$), Tyrode액 $Y = -0.12X + 42.23$ ($R = 0.6250$), 증류수 $Y = -0.03X + 36.38$ ($R = 0.5798$)의 一次方程式으로 表現할 수 있으나 保存開始 後 760日의 극사탈출률의 實測値는 0.45% 생리식염수 24.4%, 0.9% 생리식염수 18.6%, 증류수 20.8%이었으며 推定値는 0.45% 생리식염수 10.7%, 0.9% 생리식염수 8.8%, 증류수 6.6%이다. 포자가 전부 사멸하는때 351.9日을 요하였던 Tyrode액을 除外하고는 실측치와

추정치의 상관계수가 낮지만 위의 一次方程式으로 胞子が 全滅하는 限界點을 推定하여 본다면 0.45% 생리식염수 1,270日, 0.9% 생리식염수 997日 및 증류수 1,213日일로 나타났다.

한편, 新鮮 胞子를 캐니실린 50 IU/ml과 황산스트렙토마이신 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 가한 여러 가지 용액에 현탁시켜 5°C 에 보존하여도 현탁액에만 현탁시켜 보존한 위의 경우와 비슷한 현상이 일어났다. 즉, 0.45% 생리식염수 $Y = -0.03X + 35.94$ ($R = 0.4912$), 0.9% 생리식염수 $Y = -0.03X + 37.67$ ($R = 0.5581$), Tyrode액 $Y = -0.13X + 46.07$ ($R = 0.6269$), 증류수 $Y = -0.04X + 40.04$ ($R = 0.6217$)의 一次方程式으로 表現할 수 있으나 保存開始 後 760日의 극사탈출률의 實測値는 0.45% 생리식염수 22.8%, 0.9% 생리식염수 20.3%, 증류수 24.0%이었으며 推定値는 0.45% 생리식염수 12.0%, 0.9% 생리식염수 10.4%, 증류수 5.4%이다. 극사탈출률이 0%에 이르는때에 354.4日을 요하였던 Tyrode액을 제외하고는 현탁액에만 부유시킨 경우와 같은 狀況이지만 위와 같은 一次方程式으로 胞子の 死滅時點을 推定하여 본다면 0.45% 생리식염수 1,198日, 0.9% 생리식염수 1,256日, 증류수 1,001日이다.

高溫이 胞子の 生存에 미치는 影響: 解凍 胞子 회색액에 연을 가하던 온도가 높을수록 그리고 시간이 경과할수록 포자의 극사탈출률이 低下되는데, 같은 연을 같은 기간 동안 가한다 하더라도 냉동 기간이 길수록 극사탈출률이 다소 높아졌다. 이들은 모두 直線의인 變化를 하며 時間(60°C , 70°C) 또는 分(80°C , 90°C)을 할수로 한 다음과 같은 一次方程式에 잘 부합되었다. 즉, 60°C 에 있어서 30일간 냉동; $Y = -0.99X + 70.71$ ($R = 0.9957$), 60일간 냉동; $Y = -0.96X + 74.30$ ($R = 0.9957$), 180일간 냉동; $Y = -0.97X + 76.13$ ($R = 0.9966$), 300일간 냉동; $Y = -1.08X + 99.36$ ($R = 0.9215$), 420일간 냉동; $Y = -1.20X + 84.55$ ($R = 0.9920$), 70°C 에 있어서 30일간 냉동; $Y = -3.65X + 50.02$ ($R = 0.9042$), 60일간 냉동; $Y = -3.06X + 62.97$ ($R = 0.9782$), 180일간 냉동; $Y = -2.72X + 63.72$ ($R = 0.9569$), 300일간 냉동; $Y = -2.56X + 83.57$ ($R = 0.9849$), 420일간 냉동; $Y = -2.35X + 71.98$ ($R = 0.9674$), 80°C 에 있어서 30일간 냉동; $Y = -0.77X + 66.63$ ($R = 0.9564$), 60일간 냉동; $Y = -0.66X + 67.18$ ($R = 0.9322$), 180일간 냉동; $Y = -0.37X + 69.96$ ($R = 0.9505$), 300일간 냉동; $Y = -0.31X + 68.26$ ($R = 0.9696$), 420일간 냉동; $Y = -0.27X + 69.76$ ($R = 0.9664$), 540일간 냉동; $Y = -0.37X + 77.98$ ($R = 0.9839$), 90°C 에 있어서 30일간 냉동; $Y = -1.23X + 9.81$ ($R = 0.9896$), 60일간 냉동; $Y = -1.02X + 9.75$ ($R = 0.9377$), 180일간 냉동; $Y = -0.97X + 10.23$ ($R = 0.9503$), 300일간 냉동; $Y = -0.88X + 8.87$ ($R = 0.9535$), 420일간 냉동; $Y = -1.04X + 10.96$ ($R = 0.9853$), 540일간 냉동; $Y = -3.64X + 42.78$ ($R = 0.8333$) 등으로 나타났다.

그러므로 冷凍 期間이 길수록 포자의 극사탈출률이 다소 높은 편이며, 극사탈출률이 0%에 이르는 데 要하는 시간은 대체적으로 다음과 같다. 즉, 60°C에 있어서 30일간 냉동 71.4시간, 60일간 냉동 77.4시간, 180일간 냉동 78.5시간, 300일간 냉동 92.0시간, 420일간 냉동 70.5시간, 70°C에 있어서 30일간 냉동 13.7시간, 60일간 냉동 20.6시간, 180일간 냉동 23.4시간, 300일간 냉동 32.6시간, 420일간 냉동 30.6시간, 80°C에 있어서 30일간 냉동 86.5분, 60일간 냉동 101.8분, 180일간 냉동 189.1분, 300일간 냉동 220.2분, 420일간 냉동 258.4분, 540일간 냉동 210.8분, 90°C에 있어서 30일간 냉동 8.0분, 60일간 냉동 9.6분, 180일간 냉동 10.5분, 300일간 냉동 10.1분, 420일간 냉동 10.5분, 540일간 냉동 11.8분 등이었다.

長期 冷凍이 解凍 後 胞子の 活性에 미치는 影響 : 포자의 장기 냉동이 5°C에서의 解凍 後 活性에 미치는 영향에 관한 조사 결과는 Table 4에 表示한 바와 같이 -70°C에서 780일간 냉동시킨 다음 解凍시켜도 극사탈출률은 15일간 냉동 후 解凍시킨 것과 비교하여 거의 差異가 없었다.

冷凍 期間이 解凍 後 胞子の 生存에 미치는 影響 : 冷凍 胞子는 냉동 기간의 長短과 解凍 조건(溫度의 差異)에 따라 解凍 후 포자의 극사탈출률이 각각 다르지만 시일이 경과함에 따라 저하하였다. 즉, 냉동 기간

이 길수록 그리고 실온 및 28°C에 비하여 5°C에서 解凍시키는 것이 극사탈출률이 다소 높은 편인데 이들은 모두 직선적인 변화를 하며 日을 函數로 한 다음과 같은 一次方程式에 잘 부합된다. 즉, 20일간 냉동에 있어서 5°C에서의 解凍, 보존; $Y = -4.31X + 74.87 (R = 0.9691)$, 실온에서의 解凍, 보존; $Y = -5.35X + 77.89 (R = 0.9832)$, 28°C에서의 解凍, 보존; $Y = -5.35X + 79.59 (R = 0.9815)$, 50일간 냉동에 있어서 5°C에서의 解凍, 보존; $Y = -3.72X + 84.25 (R = 0.9937)$, 실온에서의 解凍, 보존; $Y = -4.04X + 84.56 (R = 0.9910)$, 28°C에서의 解凍, 보존; $Y = -3.85X + 84.85 (R = 0.9914)$ 이다. 그리고 5°C에서의 解凍, 보존에 있어서 100일간 냉동; $Y = -3.05X + 101.13 (R = 0.9806)$, 140일간 냉동; $Y = -2.32X + 82.23 (R = 0.9977)$, 200일간 냉동; $Y = -2.06X + 75.15 (R = 0.9481)$, 300일간 냉동; $Y = -2.42X + 95.56 (R = 0.9855)$, 400일간 냉동; $Y = -2.31X + 87.23 (R = 0.9960)$, 480일간 냉동; $Y = -2.55X + 84.38 (R = 0.9908)$, 540일간 냉동; $Y = -2.60X + 86.27 (R = 0.9882)$ 이다.

그러므로 5°C에 解凍, 保存하였을 경우에 있어서 극사탈출률이 0%에 이르는 데 소요되는 기간은 20일간 냉동시 17.4日, 50일간 냉동 22.6日, 100일간 냉동 33.2日, 140일간 냉동 35.4日, 200일간 냉동 36.5日, 300일간 냉동 39.5日, 400일간 냉동 37.8日, 480일간 냉동 33.1日, 540일간 냉동 33.2日이었다.

空氣 中 自然 乾燥가 胞子の 生存에 미치는 影響 : 냉동 후 解凍시킨 포자를 건조 상태에 보존하면 냉동 기간이 길수록 胞子の 극사탈출률이 다소 높아지는데 이들은 모두 직선적인 변화를 하며 日을 函數로 한 다음과 같은 一次方程式에 잘 부합된다. 즉, 20일간 냉동; $Y = -3.76X + 54.27 (R = 0.9701)$, 70일간 냉동; $Y = -4.14X + 74.96 (R = 0.9942)$, 160일간 냉동; $Y = -3.91X + 82.14 (R = 0.9934)$, 420일간 냉동; $Y = -3.75X + 83.53 (R = 0.9974)$, 540일간 냉동; $Y = -3.65X + 85.69 (R = 0.9945)$ 이다. 그러므로 자연 건조 상태에 있는 포자가 全部 사멸하는데 要하는 기간은 540일간 냉동 23.5일, 420일간 냉동 22.3일, 160일간 냉동 21.0일, 70일간 냉동 18.1일, 20일간 냉동 14.4일이었다.

紫外線이 胞子の 生存에 미치는 影響 : 解凍 포자에 다 10W 紫外線燈을 조사하면 포자의 극사탈출률은 냉동 기간이 길수록 그리고 시간이 經過함에 따라 저하하는데 이들은 모두 직선적인 변화를 하며, 時間을 함수로 한 다음과 같은 一次方程式에 잘 부합된다. 즉, 100일간 냉동; $Y = -3.21X + 83.35 (R = 0.9940)$, 200일간 냉동; $Y = -2.39X + 56.90 (R = 0.9343)$, 300일간 냉동; $Y = -4.18X + 91.62 (R = 0.9709)$, 420일간 냉동; $Y = -5.01X + 76.37 (R = 0.9756)$, 540일간 냉동; $Y = -6.06X + 83.96 (R = 0.9663)$ 이다. 그러므로 극사탈출률이 0%에 이르는 데 要하는 時間은 100일간 냉동시

Table 4. Extrusion rates of polar filaments of *T. kitazei* spores in long term freezing at -70°C

Duration of freezing (days)	Suspensions			
	0.45% NaCl (%)	0.9% NaCl (%)	D.W. (%)	Tyrodé's sol. (%)
15	77.10	72.46	68.40	90.58
30	70.52	65.82	49.92	80.50
60	68.96	82.52	57.18	71.20
90	84.64	77.60	73.38	87.10
120	80.60	86.60	64.40	86.20
180	83.30	81.60	58.50	85.90
240	82.80	84.70	69.40	90.40
300	81.70	78.60	74.10	88.30
360	86.80	86.00	59.50	85.60
420	89.70	89.70	71.80	90.30
480	87.90	89.70	80.70	83.80
540	88.70	89.30	75.80	82.70
600	87.80	87.90	80.60	88.90
660	88.40	88.80	78.50	86.10
720	89.70	93.40	82.90	86.80
780	89.10	92.20	82.70	87.45

Each value represents the mean of triplicate determinations.

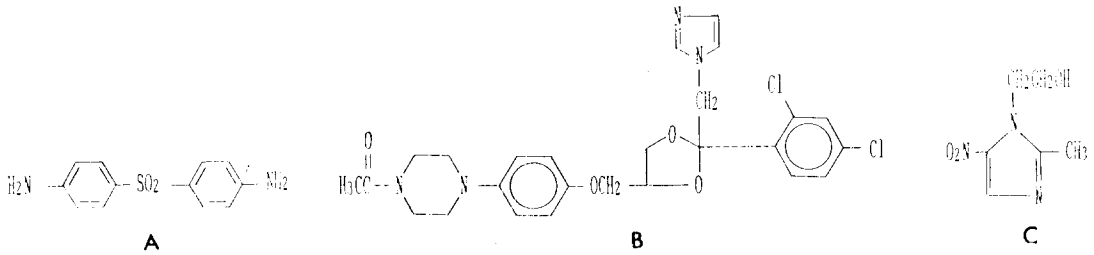


Fig. 2. Structures of dapsone(A), ketoconazole(B) and metronidazole(C).

26.0시간, 200일간 냉동 23.8시간, 300일간 냉동 21.9시간, 420일간 냉동 15.2시간, 540일간 냉동 13.9시간이었다.

各種 消毒劑가 胞子의 生存에 미치는 影響 : 소독제의 종류에 따라 -70°C에 200일간 냉동한 다음 5°C에서 해동시킨 포자를 사멸시키는데 필요한 기간이 다르며, 포자에의 접촉 시간이 경과함에 따라 극사멸출률이 저하하는데 이들은 모두 直線의인 變化를 한다. 酸化칼슘에 있어서 分(1,000 ppm, 500 ppm) 또는 日(1~100 ppm)을 함수로 한 다음과 같은 一次方程式에 잘 符合된다. 즉, 1,000 ppm에서 $Y = -11.06X + 57.73$ (R=0.8758), 500 ppm $Y = -4.06X + 63.28$ (R=0.9424), 100 ppm $Y = -1.38X + 49.12$ (R=0.8508), 50 ppm $Y = -1.23X + 55.47$ (R=0.9163), 30 ppm $Y = -1.19X + 63.96$ (R=0.9660), 10 ppm $Y = -1.16X + 70.86$ (R=0.9746), 5 ppm $Y = -1.15X + 74.63$ (R=0.9729), 1 ppm $Y = -1.17X + 83.89$ (R=0.9647)이다.

過당간酸칼륨에 있어서는 分(100~1,000 ppm), 時間

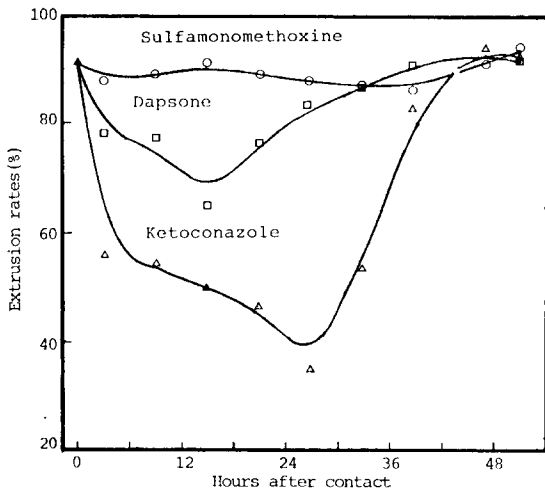


Fig. 3. Effects of dapsone, ketoconazole and sulfamonomethoxin (10mg/ml) on the viability of *T. kitauai* spores *in vitro*.

(50 ppm) 또는 日(1~30 ppm)을 函數로 한 다음과 같은 一次方程式에 잘 符合된다. 즉, 1,000 ppm에서 $Y = -4.60X + 47.75$ (R=0.8420), 500 ppm $Y = -2.34X + 55.57$ (R=0.8490), 100 ppm $Y = -0.51X + 79.07$ (R=0.9923), 50 ppm $Y = -6.66X + 70.50$ (R=0.9522), 30 ppm $Y = -1.28X + 50.59$ (R=0.8677), 10 ppm $Y = -1.22X + 64.39$ (R=0.9606), 5 ppm $Y = -1.24X + 72.56$ (R=0.9753), 1 ppm $Y = -1.12X + 83.40$ (R=0.9630)이다.

말라카이트그린에 있어서는 分(1,000 ppm, 500 ppm) 또는 日(1~100 ppm)을 函數로 한 다음과 같은 一次方程式에 잘 符合된다. 즉, 1,000 ppm에서 $Y = -1.55X + 43.09$ (R=0.7097), 500 ppm $Y = -0.43X + 43.84$ (R=0.7971), 100 ppm $Y = -1.69X + 51.53$ (R=0.9015), 50ppm $Y = -1.00X + 57.87$ (R=0.8855), 30 ppm $Y = -1.13X + 69.26$ (R=0.9700), 10 ppm $Y = -1.13X + 71.95$ (R=0.9718), 5 ppm $Y = -1.06X + 76.82$ (R=0.9422), 1 ppm $Y = -1.17X + 87.80$ (R=0.9388)이다.

포르말린에 있어서는 時間(1,000 ppm, 500 ppm) 또는 日(1~100 ppm)을 函數로 한 다음과 같은 一次方程式에 잘 符合된다. 즉, 1,000 ppm에서 $Y = -4.06X + 58.00$ (R=0.9387), 500 ppm $Y = -1.68X + 72.54$ (R=0.9894), 100 ppm $Y = -5.80X + 65.37$ (R=0.9635), 50 ppm $Y = -2.58X + 55.91$ (R=0.9171), 30 ppm $Y = -1.52X + 53.44$ (R=0.8928), 10 ppm $Y = -1.54X + 61.13$ (R=0.9567), 5 ppm $Y = -1.39X + 66.24$ (R=0.9823), 1 ppm $Y = -1.49X + 81.44$ (R=0.9969)이다.

그러므로 1,000 ppm의 각종 소독제가 포자를 모두 사멸시키는데 필요한 대체적인 시간은 酸化칼슘 5.2分, 過당간酸칼륨 10.4分, 말라카이트그린 27.8分, 포르말린 14.3時間의 순으로 나타났다.

各種 抗原蟲 및 抗眞菌劑가 胞子의 活性에 미치는 影響 : 지금까지 각종 동물에 사용하고 있는 16종의 항원충 및 항진균제를 10배 계열 희석하여 시험관 내에서 -70°C에서 70일간 냉동한 다음 5°C에서 해동시킨 포자에 직접 접촉시켜 포자의 활성에 미치는 영향에 관하여 조사한 바 dapsone, ketoconazole 및 metronid-

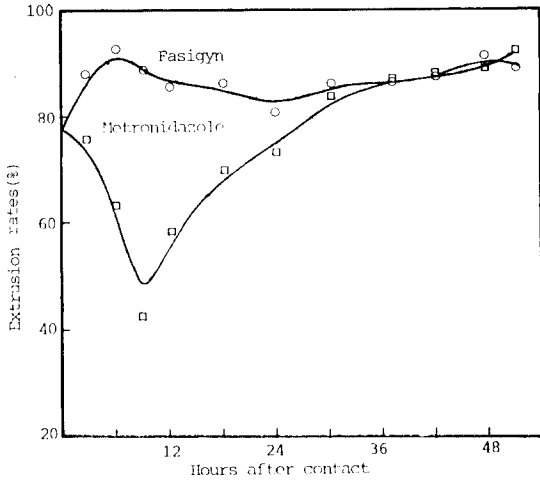


Fig. 4. Effects of metronidazole and fasigyn(10 mg/ml) on the viability of *T. kitavei* spores *in vitro*.

azole(Fig. 2)에서만 일시적으로 포자의 활성이 저하되었다.

癩病이나 放線菌症 등에 적용하는 dapsone에 있어서 포자의 활성에 미치는 영향은 Fig. 3에 표시한 마와 같이 10 mg/ml에서만 포자에의 접촉 후부터 약 20시간에 걸쳐(접촉 후 15시간에 65.5%로서 최저치) 포자의 극사탈출률이 대조인 91.4%에 비하여 70%까지 일시적으로 저하하였다. 한편, 나머지 낮은 농도에 있어서는 포자의 활성에 거의 영향을 미치지 않았다.

抗原菌劑인 ketoconazole에 있어서 포자의 활성에 미치는 영향은 Fig. 3에 표시한 마와 같이 10 mg/ml에서 포자에의 접촉 후 극사탈출률이 점점 저하하여 대조인 91.4%에 비하여 27시간에 최저치인 35%까지 저하하였다가 다시 점점 상승하여 40시간 전후에는 80%까지에 이르렀다. 한편, 나머지 낮은 농도에 있어서도 극히微弱하나마 포자의 활성에 다소 영향을 미쳤다.

트리코모나스 感染症에 適用하고 있는 metronidazole에 있어서 포자의 활성에 미치는 영향은 Fig. 4에 표시한 마와 같이 10 mg/ml에서 포자에의 접촉 후 극사탈출률이 점점 低下하여 對照인 77.5%에 비하여 9시간에 최저치인 43.3%까지 저하하였다가 다시 점점 上昇하여 27시간에 대조와 비슷한 값에 이르렀다. 한편, 10 mg/ml의 10배 계열 희석 농도는 포자의 활성에 거의 영향을 미치지 않았다.

考 察

有極孢子蟲類의 포자는 숙주인 魚類에 섭취되어 그 소화관 내에서 소화효소에 의하여 극사(發芽管)를 脫

출시켜 소화관 내벽을 뚫어 포자를 벽에 매달리게 한 다음 孢子殼이 열려져 아메바狀 芽體(sporoplasm)가 밖으로 나오는데, 이는 소화액에 약하므로 極絲의 內腔을 관통하여 안전하게 宿主體內로 옮겨진다고 한다. 이러한 極絲 脫出은 生活史에 있어서 不可決의 중요한 生態的 現象이며 極絲 脫出能을 잃은 孢子는 이미 숙주에의 감염 능력이 없다고 한다. 이러한 사실을 이용하여 有極孢子蟲類의 孢子 成熟度나 生死 判定은 일반적으로 極絲의 脫出 與否가 그 기준이 되고 있다.

極絲를 脫出시키는 방법으로서 生理的 方法, 機械的 方法 및 化學的 方法의 세가지가 알려졌다. 生理적 方法은 숙주의 소화액을 이용하는 것이며, 기계적 方法은 加壓에 의한 것이며, 화학적 탈출 방법은 옛날부터 많은 학자의 관심사가 되어 왔다. 일찌기 Kudo(1918)는 누에나방인 *Bombyx mori*의 유충의 絹絲腺으로부터 微孢子蟲類에 속하는 *Nosema bombycis* 孢子의 극사탈출을 야기하는 약품으로서 30% 과산화수소수(H_2O_2)가 가장 우수하다고 하였으며, 그 機構을 다음과 같이 설명하였다. 즉, 포자 내에 있는 peroxidase에 의하여 H_2O_2 가 분해되어 생기는 가스의 힘에 의하여 극사가 탈출하며, 한편 이와 같은 현상이 일어나지 않는 건조한 포자 내에는 peroxidase가 없거나 또는 거의 없는데 이는 포자의 活性과 전혀 관련이 없으며, 포자를 건조시키거나 또는 알코올로 처리해도 이 효소가 불활성화되기 때문에 탈출 현상이 일어나지 않는다고 하였다. 그리고, 그는 물보다는 링겔液에 포자를 현탁시킨 쪽이 극사탈출 성적이 양호하며, 포자 현탁액에 炭酸水素나트륨($NaHCO_3$)을 첨가하여 弱알칼리로 하면 극사탈출이 촉진되지만 酸의 存在는 H_2O_2 의 작용을 저해한다고 하였다. 이 밖에도, 포자 현탁액에 NaCl을 첨가하여 滲透壓을 높이거나 또는 等量의 0.2M KCl을 가하면 극사탈출률이 향상되고 30% H_2O_2 를 6%로 희석한 편이 有效하다는 보고가 있다(Ohshima, 1927, 1933 & 1939).

한편, 알칼리에 의한 극사탈출 촉진 효과의 知見은 H_2O_2 를 사용하지 않고 極絲를 탈출시키는 NaOH-HCl 중화법의 開發로 이어졌으며 (Ohshima and Suzuki, 1939), 또 각종 이온의 극사탈출에 미치는 영향을 解明하는 研究로 발전하였다. 즉, *Nosema bombycis*에 관한 Ohshima의 一連의 研究(1964a & c, 1965a & b, 1966a)에서 K 이온은 극사탈출을 자극하며(至適 pH 9-11, 至適 溫度 25°C), 炭酸 이온은 이를 돕고, Na 이온은 이에 관여하지 않으며, Ca 이온이나 2價의 水銀 이온은 이를 고도로 저해한다는 것을 알게 되었다. Nakajima and Egusa(1975b)는 은어(*Plecoglossus altivelis*)에 기생하는 微孢子蟲인 *Glugea* sp. 포자의 극사탈출에 가장 적합한 시약으로서 1% KOH 수용액을 30% H_2O_2 에 약 1% 비율로 첨가한 것을 권장하였다. Nakajima and Egusa(1974)는 *Myxobolus koi*의 포자는 자연적으로 건조시켜 1~10%의 KOH를 처리하면 극사가 가장 잘 탈출하는데 반하여 酸-알칼리에

의한 中和法이나 30% H₂O₂의 처리는 적용할 수 없다고 하였다.

그리고, Lom and Vavra(1963)는 칼륨化合物 등의 자극에 의한 극사의 脫出 機轉에 대하여 이들 物質의 자극에 의하여 活性化된 포자의 內部에서 polaroplast의 部分이 吸水, 膨化함으로써 上昇된 胞子內 壓力이 posterior vacuole로 移行, 이를 膨化시켜 극사를 탈출시킨다고 說明하였다. 이에 反하여 Ohshima(1966b)는 胞子 自體는 이미 충분한 內壓을 지니고 있으므로 칼륨化合物의 자극은 단지 壓力을 解放시킬 뿐이며 물의 存在는 필요없다고 생각하였다. Hashimoto et al. (1976)은 *Pleistophora anguillarum*의 포자는 pH 3~4, 5~10°C, 15% H₂O₂에서 극사가 가장 잘 탈출하는 것이 特異하다고 하였다.

일찍이 Kudo(1916)는 粘液胞子蟲類에 속하는 *Myxidium* sp., *Zschokkeella acheilognathi* 및 *Myxosoma funduli*의 포자도 30% H₂O₂에 의하여 극사가 탈출된다고 보고하였으며, Hoshina(1951)는 뱀장어 (*Anguilla japonica*)에 기생하는 *Pleistophora anguillarum*의 포자는 슬라이드글라스 위에 도말하여 건조만 시켜도 극사가 탈출한다고 하였다. 그리고, Awakura(1974)는 연어科 魚類에 기생하는 *Glugea(Nosema) takedai*의 포자를 1% H₂O₂, K⁺, Mg⁺, Na⁺, H₂O, NaCl(1, 5, 10%), 트립신(0.4%, 0.8%), 무지개송어의 위액 등과 직접 접촉시킨 바 트립신에서만 극사가 탈출하였다고 보고하였다. 이와 같이 有極胞子蟲類의 種에 따라 극사의 탈출 유도 방법이 다르므로 著者 등은 前報(李 등, 1990)에서 1~10%의 KOH를 장포자충의 포자에 처리하여 극사탈출을 試圖한 바 모든 농도에서 거의 일정한 성적을 얻었으므로 이 실험에서도 5% KOH를 사용하기로 하였으며, 또한 先人들이 이미 適用하고 있는 포자의 극사탈출 여부를 기준으로 하여 포자의 생사 여부도 판정하였다.

物理化學的 要因이 유극포자충류의 포자에 미치는 영향에 관한 조사 연구는 폭넓게 수행된 바 있지만 특히 장포자충인 *T. kitauei*의 포자에 관하여 검토한 보고는 없는 실정이다. 즉, *Nosema bombycis*의 포자를 링겐液 속에 현탁시켜 2~5°C에 보존한 바 10年 3個月 後에도 약간이 生存하여 감염력을 지니고 있다는 사실이 실험을 통하여 확인되었으며(Ohshima, 1964b), 은어에 기생하는 *Glugea* sp. 포자는 2.2~7°C의 물속에서 105日間이나 생존하였다고 하였다(Nakajima and Egusa, 1975b). 그리고, *Myxobolus koi*의 포자는 -10~-20°C의 냉동고 내에서 5개월 후까지 거의 變化하지 않았으나(Nakajima and Egusa, 1974), *Glugea* sp. 胞子は -20°C에서 30분 후에 모두 사멸하였다고 한다(Nakajima and Egusa, 1975c).

*Nosema bombycis*의 胞子は 건조에 약하여 3일 후에 죽으며(Kudo, 1918), 공기 중에서 건조 뿐만 아니라 冷凍 乾燥에 의해서도 신속하게 포자가 죽는데 그 原因

은 건조에 의한 극사의 粘彈性(viscoelasticity)이 凝結하기 때문이라고 한다(Ohshima, 1964b). 은어에 기생하는 *Glugea* sp.의 경우도 포자가 건조에 매우 弱하여 슬라이드글라스 위에 떨어뜨린 포자 현탁액의 수분이 증발하면 극사가 탈출하지 않으며, 건조한 포자에 다시 물을 添加해도 극사는 탈출하지 않는다(Nakajima and Egusa, 1975c). 그리고, 연어科 魚類에 기생하는 *Glugea(Nosema) takedai*의 胞子도 36°C에서 건조시키면 6시간 후에는 사멸한다고 한다(Awakura, 1974).

한편, *Myxobolus koi*의 포자를 건조시키면 극사탈출률이 약간 저하하지만 5個月間이나 生存하였는데 건조상태에서 자외선을 照射하면 3일 이내에 모두 사멸한다고 한다(Nakajima and Egusa, 1974). 또, 자외선은 액체에 대한 透過力이 약하기 때문에 물속의 胞子를 죽이는 것은 不可能하다고 생각하였는데 *Glugea* sp.의 포자현탁액(14日間 冷蔵保存)을 슬라이드글라스 위에 떨어뜨려 10W의 자외선등을 10 cm 높이 위에서 照射시킨 바(1,000 μW/cm²의 放射照度) 14分 後에 극사탈출률이 0%에 이르렀다는 실험결과는 意外이었으며, 또한 太陽光線에 조사하면 1시간 후에 모두 사멸한다고 한다(Nakajima and Egusa, 1975c).

Nosema bombycis 胞子は 1% 醋酸산에 10分, 1% 포르말린에 15分, 0.05% 昇汞에 60分, 1N HCl에 2시간에 사멸한다고 하였다(Ohshima, 1939). *Glugea* sp.에 있어서 가티온性 界面活性劑는 0.01%에서 3시간 以內에 胞子를 사멸시키며, 鹽素 化合物 中에서 sodium dichloroisocyanurate(순도 62%)는 0.01%에서 3시간에 胞子가 全滅한다. Orthodichlorobenzene과 cresol의 合劑인 cocktone도 胞子에 대하여 위와 같은 效果를 보였다. 3종 phenol의 合劑인 one stroke embon도 0.01%에서 3시간 이내에 포자를 全滅시킨다(Nakajima and Egusa, 1975c). 그리고, *Glugea(Nosema) takedai*의 胞子は 过氧化산칼륨 1:1,000과 bleaching powder 1:1,000에서 5분 후, 포르말린 1:50에서 10분 후에 사멸한다(Awakura, 1974). Hoffman and Hoffman(1972)은 *in vitro*에서 *Myxosoma cerebralis*의 포자에 여러 가지 소독약을 직접 접촉시켜 극사탈출 여부에 의하여 소독 작용을 檢討한 바 1.0%, 0.5% 및 0.25%의 산화칼슘과 1% KOH가 2일 이내에 포자를 모두 사멸시킨다는 것을 확인한 다음 2週齡의 무지개송어(*Salmo gairdneri*)를 사용하여 *in vivo*에서 산화칼슘에 관하여 검토한 바 極上의 豫防效果를 거둘 수 있다고 하였다.

본 실험에 있어서 장포자충의 포자를 여러 가지 현탁액에 부유시켜 -70°C에 단기간(15일) 냉동 보존하여 여러 온도에서 해동시켰을 때 현탁액의 종류와 해동 온도가 극사탈출률에 영향을 미치는 것으로 나타났다. 즉, 현탁액의 종류 중에서는 Tyrode액, 0.45% 및 0.9% 생리식염수, 증류수의 순으로, 해동 조건(온도)은 5°C, 18°C, 28°C의 순으로 극사탈출률이 높았다.

이와 같이 포자를 Tyrode액에 현탁시켰을 때에 극사탈출률이 가장 높았던 것은 Kudo(1918)가 *Nosema bombycis* 포자를 물보다도 Ringer液에 현탁시켰을 때 극사탈출률이 높았던 結果와 一致하며, 냉동 포자를 5°C에서 해동시킬 경우 극사탈출률이 가장 높았던 것은 냉동 및 해동 온도의 差異가 다른 경우보다 적어 孢子 自體에 대한 조직 손상이 가장 적었기 때문이 아닌가 생각된다.

장포자충의 新鮮 孢子를 여러 가지 용액에 현탁시켜 5°C 또는 28°C에 短期保存하여 극사탈출률을 경시적으로 조사한 바 0.45% 및 0.9% 생리식염수와 증류수에서 보존 후부터 3일간에 걸쳐 다소 상승하는 경향이었고, Tyrode액에 현탁시켜 -70°C에 短期 冷凍시키면 時日이 경과함에 따라 냉동 후부터 8일까지 역시 현저하게 상승하였다. 그리고, 장포자충의 신선 포자를 28°C에 장기 보존하면 증류수에서 153일까지, 5°C에 장기 보존하면 0.9% 생리식염수에서 760일이 되어도 8.8%(推定値)가 생존하였으며, 여러 가지 현탁액에 페니실린과 스트렙토마이신을 첨가하여 5°C에 장기 보존하여도 前者와 같은 패턴이었으며, Tyrode액에 현탁시켜 -70°C에서 780일간에 걸쳐 장기 냉동, 보존하여 해동시켜서 극사탈출률을 조사한 바 15일간의 냉동 배에 비하여 거의 차이가 없었다. 또, 냉동 포자를 5°C에서 해동시켜 그 수명을 조사한 바 냉동 기간이 길어짐에 따라 수명이 점점 길어져 100일간 냉동 후부터 거의 일정한 수준을 유지하는 현상이 인정되었다.

장포자충의 신선 포자의 단기 보존이 극사탈출률에 미치는 영향에 관한 결과는 *Myxobolus koi*의 신선 포자의 극사탈출률(44.5%)이 25±0.5°C의 물속에 방치하였을 때에 7일까지 60%까지 상승하였다는 보고(Nakajima and Egusa, 1974), 그리고 은어로부터 摘出한 直後의 xenoma 內 *Glugea* sp. 포자의 극사탈출률(KOH加 30% H₂O₂)이 平均 1.2%이었으나 2.2~7°C의 조건하에서 여러 가지 현탁액에 보존한 20일 후에는 증류수 56.0%, 링겔液 22.4%, 無處理 6.8%, 88일 후에는 링겔液 80.6%, 증류수 93.3%(xenoma 內에서 이미 33.6%가 극사탈출), 無處理 거의 모두 腐敗하였으며, 또한 xenoma 內의 포자가 물에 민감하게 感應하여 극사탈출률이 活性化되어 시간이 경과함에 따라 xenoma 內에서 수가 적지만 포자가 극사를 탈출시킨다고 한 보고(Nakajima and Egusa, 1975a)와 거의 一致한다. 그리고, 장포자충의 신선 포자를 0.9% 생리식염수에 현탁시켜 5°C에 보존하면 760일이 되어도 8.8%(推定値)가 생존한다는 결과는 *Nosema bombycis*의 포자를 사용한 Ohshima(1964b)의 보고와 一致하며, 장포자충의 신선 포자를 -70°C에 냉동시킨 바 780일이 되어도 극사탈출률이 15일에 비하여 전혀 變動하지 않는 것은 *Myxobolus koi*의 신선 포자를 사용한 실험결과(Nakajima and Egusa, 1974)와 一致하였다.

한편, *Glugea* sp.의 포자는 50°C에서 3分(Nakajima

and Egusa, 1975c), 그리고 *Glugea(Nosema) takedai*의 포자는 60°C에서 5分(Awakura, 1974)에 모두 사멸한다고 하는데 장포자충의 포자(180일간 냉동)는 60°C 78.5시간, 70°C 23.4시간, 80°C 189.1分, 90°C 10.5분에 모두 사멸하며, 해동 포자에 동일한 열을 가한다 하더라도 냉동 기간이 길수록 포자의 수명이 약간 길었다. 또한, 장포자충의 냉동 포자를 해동시킨 다음 자연 건조시켜 보존하면 냉동 기간이 길수록 포자의 수명이 다소 길어져 20일간 냉동시 14.4일, 16일간 냉동시 21.0일, 420일간 냉동시 22.3일에 모두 사멸하였다.

이러한 여러 가지 事實들은 장포자충 등의 포자는 溫度가 극히 낮은 물속이나 냉동 조건에서 活性化된다는 것을 意味할 뿐만 아니라 이들 孢子는 生活史에 있어서 한 때 온도가 극히 낮은 물속에서 經過하지 않으면 안된다는 것을 示唆하고 있다.

장포자충 포자의 자외선에 대한 저항성은 *Myxobolus koi*와 *Glugea* sp.의 것에 비하여 차이는 있었으나(Nakajima and Egusa, 1974 & 1975c), 냉동기간이 길수록 저항력이 약한 결과가 認定된 것은 본 실험에 있어서 냉장 및 냉동, 고온, 건조 등이 포자의 활성 내지 생존에 미치는 영향에 관한 실험 결과와 相反된 현상이 나타난 특징적인 것이라 하겠다. 그리고, 장포자충 포자의 소독제로서 1,000 ppm에서 5.2분에 포자를 전멸시킬 수 있는 酸化칼슘을 권장할 수 있는데 이는 *Myxosoma cerebralis* 포자에 대한 산화칼슘의 효과와 거의 一致되는 所見이다(Hoffman and Hoffman, 1972).

장포자충의 포자는 0.9% 생리식염수에 현탁시켜 5°C에 보존하면 760일까지 약 8.8%, 여기에 페니실린과 黃酸스트렙토마이신을 추가하면 약 10.4%가 생존한다고 推定하고 있으나, 28°C에서는 102.6일에 모두 사멸하며, -70°C에 냉동 보존하면 780일이 되어도 전혀 生存에 영향을 받지 않지만 160일간의 냉동 포자를 自然 乾燥시키면 약 21일, 1,000 ppm 산화칼슘의 시험관 내에서 약 5.2분, 200일간의 냉동 포자를 자연 건조상태 하에서 10W의 자외선등을 70 cm 높이 위에서 조사하면 23.8시간에 각각 사멸하므로 장포자충증을 예방하기 위해서는 양어장을 콘크리트로 축조하여 완전 건조시킨 다음 酸化칼슘을 산포하고 太陽光線を 數日間에 걸쳐 조사하면 좋은 效果를 얻을 수 있다고 생각된다.

지금까지 여러 學者들은 有極孢子蟲類에 속하는 여러 種類의 포자에 관한 殺蟲性 藥劑의 선별을 *in vitro*에서 수행하였으나 만족스러운 결과를 얻지 못하였다. 즉, Nakajima and Egusa(1974)는 *Myxobolus koi*의 포자가 抗말라리아劑인 amodiaquine과 primaquine이 100 ppm에서 7일 이내에 비로소 극사탈출률이 消失되었다고 하였으며, Nakajima and Egusa(1975c)는 *Glugea* sp.에 대한 fumagillin의 殺孢子效果는 전혀 인정할 수 없으므로 이 物質이 感染 初期의 아메바狀 芽體에만 有效하다는 事實을 뒷받침하였으며, 설파劑,

抗말라리아劑, 抗콕시들통劑를 직접 접촉시킨 후 24시간에도 殺孢子性이 매우 微弱하거나 또는 거의 없었다고 하였다.

본 실험에 있어서 지금까지 각종 동물에 사용하고 있는 16종의 抗原蟲 및 抗真菌劑 중에서 장포자충의 포자를 죽일 수 있는 藥劑를 시험관 내에서 선별한 바 ketoconazole, metronidazole, dapsone의 순으로 일시적인 극사탈출 억제 효과만이 인정되었다. 그리고 *in vivo*에서 잉어의 renal sphaerosporosis와 *Thelohanellus nikolskii* 감염증, 뱀장어의 *Myxidium giardi* 감염증, 연어의 *Hexamita salmonis* 감염증, 은어의 *Glugea plecoglossi* 감염증, 뱀장어의 *Pleistophora anguillarum* 감염증 등의 感染 初期에 殺蟲效果가 있다고 알려진 fumagillin(Yasutake *et al.*, 1961; Takahashi and Egusa, 1976; Kano and Fukui, 1982; Molnar *et al.*, 1987; Szekely *et al.*, 1988; Molnar, 1989)은 *in vitro*에서 전혀 效果가 없으므로 역시 初期狀態의 아메바狀 芽體에만 作用하는 것이 틀림 없는 것 같다. 그러나, 시험관 내 실험과 생체 내 실험이 반드시 一致되는 것은 아니기 때문에 보다 폭넓은 실험을 수행하여 結論을 내려야 할 것으로 생각된다.

이상의 실험 결과로 미루어 보아 현시점에서는 물속이나 향어의 종류 내에 있는 腸孢子蟲의 孢子를 사멸시켜 장포자충증의 예방 效果를 얻는다는 것은 거의 불가능하다고 생각되며, 孢子보다도 저항성이 弱하다고 생각되는 감염 초기의 아메바狀 芽體나 영양형을 魚體 내에서 공격하는 방법을 檢討하지 않으면 안될 것으로 생각된다.

參 考 文 獻

- Awakura, T. (1974) Studies on the microsporidian infection in salmonid fishes. *Hokkaido Fish Hatchery*, 29:1-95 (in Japanese).
- Hashimoto, K., Sasaki, Y. and Takinami, K. (1976) Conditions for extrusion of the polar filament of the spore of *Pleistophora anguillarum*, a microsporidian parasite in *Anguilla japonica*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 42(8):837-845 (in Japanese).
- Hoffman, G.L.Sr. and Hoffman, G.L.Jr. (1972) Studies on the control of whirling disease (*Myxosoma cerebralis*) I. The effects of chemicals on spores *in vitro*, and of calcium oxide as a disinfectant in simulated ponds. *J. Wildlife Dis.*, 8:49-53.
- Hoshina, T. (1951) On a new microsporidian, *Pleistophora anguillarum*, n. sp., from the muscle of the eel, *Anguilla japonica*. *J. Tokyo Univ. Fish.*, 38:35-49.
- Kano, T. and Fukui, H. (1982) Studies on *Pleistophora* infection in eel, *Anguilla japonica* I. Experimental induction of microsporidiosis and fumagillin efficacy. *Fish Pathol.*, 16(4):192-200 (in Japanese).
- Kudo, R. (1916) Contributions to the study of parasitic protozoa. III. Notes on Myxosporidia found in some fresh-water fishes of Japan, with the description of three new species. *J. Parasitol.*, 3:3-9.
- Kudo, R. (1918) Experiments on the extrusion of polar filaments of Cnidosporidian spores. *J. Parasitol.*, 4(4):141-147.
- Lom, J. and Vavra, J. (1963) The mode of sporoplasm extrusion in Microsporidian spores. *Acta Protozool.*, 1(10):81-89.
- Molnar, K., Baska, F. and Szekely, C. (1987) Fumagillin, an efficacious drug against renal sphaerosporosis of the common carp, *Cyprinus carpio*. *Dis. Aquat. Org.*, 2:187-190.
- Molnar, K. (1989) Possible uses of fumagillin against different fish parasites. Chinoin Pharmaceutical and Chemical Works Ltd., Budapest, Hungary, pp. 1-4.
- Nakajima, K. and Egusa, S. (1974) Sporocidal effects of some chemicals on the spores of *Myxobolus koi* Kudo. *Fish Pathol.*, 8(2):161-164 (in Japanese).
- Nakajima, K. and Egusa, S. (1975a) Preliminary experiments on the control of glugeosis of the cultured Ayu, *Plecoglossus altivelis* I. Xenoma removed from host. *Fish Pathol.*, 9(2):134-139. (in Japanese).
- Nakajima, K. and Egusa, S. (1975b) Preliminary experiments on the control of glugeosis of the cultured Ayu, *Plecoglossus altivelis* II. Extrusion of the polar filament. *Fish Pathol.*, 9(2):140-150 (in Japanese).
- Nakajima, K. and Egusa, S. (1975c) Preliminary experiments on the control of glugeosis of the cultured Ayu, *Plecoglossus altivelis* III. Sporocidal effects of physical and chemical agents. *Fish Pathol.*, 9(2):151-161 (in Japanese).
- Ohshima, K. (1927) A preliminary note on the structure of the polar filament of *Nosema bombycis* and its functional significance. *Annot. Zool. Jap.*, 11(3):235-243.
- Ohshima, K. (1933) Influence of K⁺ and Na⁺ on the filament evagination of *Nosema bombycis* in the digestive juice of silkworm larvae and by hydrogen peroxide. *J. Sericul. Sci.*, 5(1):54-56 (in Japanese).
- Ohshima, K. (1939) A new method for discrimination

- of life or death of the spore of *Nosema bombycis*. *Bull. Jap. Assoc. Sci.*, 14(2):307-313(in Japanese).
- Ohshima, K. and Suzuki, M. (1939) A new method effective in evaginating polar filament of *Nosema bombycis* Nägeli. *Jap. J. Zool.*, 51(7):463-473(in Japanese).
- Ohshima, K. (1964a) Stimulative or inhibitive substance to evaginate the filament of *Nosema bombycis* Nägeli I. The case of artificial buffer solution. *Jap. J. Zool.*, 14(2):209-229.
- Ohshima, K. (1964b) Method of gathering and purifying active spores of *Nosema bombycis* and preserving them in good condition. *Annot. Zool. Jap.*, 37(2):94-101.
- Ohshima, K. (1964c) Effect of potassium ion on filament evagination of spores of *Nosema bombycis* as studied by neutralization method. *Annot. Zool. Jap.*, 37(2):102-103.
- Ohshima, K. (1965a) Substance stimulating or inhibiting the evagination of the filament of *Nosema bombycis* Nägeli. II. The case of digestive juice and its electrolyzed juice of starved silkworm larvae. *Annot. Zool. Jap.*, 38(3):134-139.
- Ohshima, K. (1965b) Substance stimulating or inhibiting the evagination of the filament of *Nosema bombycis* Nägeli. III. Action of HCO_3^- in the digestive juice of starved silkworm larvae, and the method effective in evaginating the filament *in vitro*. *Annot. Zool. Jap.*, 38(4):198-206.
- Ohshima, K. (1966a) On morphological and physical nature of the filament and spore membrane of *Nosema bombycis*. *Jap. J. Zool.*, 15(2):183-202.
- Ohshima, K. (1966b) Emergence mechanism of sporoplasm from the spore of *Nosema bombycis*, and the action of filament during evagination. *Jap. J. Zool.*, 15(2):203-220.
- 李宰求·金鍾五·金平吉·朴培根(1990) 香魚의 腸孢子蟲(*Thelohanellus kitauei*) 症의 豫防 및 治療에 관한 基礎的 研究 I. 腫瘤의 消長 過程. *기생충학잡지*, 28(3):183-194.
- Szekely, Cs., Molnar, K. and Baska, F. (1988) Efficacy of fumagillin against *Myxidium giardi* Cepede, 1906 infection of the European eel (*Anguilla anguilla*): New observations on myxidiosis of imported glass eels. *Acta Vet. Hungarica*, 36(3-4):239-246.
- Takahashi, S. and Egusa, S. (1976) Studies on *Glugea* infection of the Ayu, *Plecoglossus altivelis* II. On the prevention and treatment—(1) Fumagillin efficacy as a treatment. *Fish Pathol.*, 11(2):83-88 (in Japanese).
- Yasutake, W.T., Bubler, D.R. and Shanks, W.E. (1961) Chemotherapy of hexamitiasis in fish, *J. Parasitol.*, 47(1), 81-86.

Prophylactic and therapeutic studies on intestinal giant-cystic disease of the Israel carp caused by *Thelohanellus kitauei*

II. Effects of physical and chemical factors on *T. kitauei* spores *in vitro*

Jae Ku Rhee, Jong Oh Kim and Bae Keun Park

Department of Parasitology, School of Veterinary Medicine

Chonbuk National University, Chonju 560-756, Korea

In a basic attempt to develop the prophylactic and therapeutic measures on intestinal giant-cystic disease of the Israel carp, *Cyprinus carpio nudus*, the effects of physical and chemical factors on viability or survival of the spores of *Thelohanellus kitauei* were checked *in vitro* by means of extrusion test on the polar filament.

When the fresh spores suspended with 0.45% and 0.9% sodium chloride solution and distilled water were laid at 5°C and 28°C for short terms, the extrusion rates increased until the 3rd day, meanwhile when some of them were suspended with Tyrode's solution at -70°C the rates increased gradually until the 8th day. Viabilities of the spores suspended with 0.9% saline and added antibiotics to the suspension at 5°C for long terms lasted for 997 days and 1,256 days (presumed values) at maximum, respectively. The spores suspended with distilled water at 28°C for long terms survived 152.4 days, but the spores suspended with Tyrode's solution at -70°C for long terms showed almost the same viable pattern as early freezing stages up to 780 days. The spores suspended with Tyrode's solution, frozen at -70°C and thawed at 5°C, showed the highest rate of extrusion of the polar filament.

In the case of frozen spores, the extrusion rates during heating tend to become higher in accordance with the increase of frozen period, and the critical points of 180 day-frozen spores to be killed were generally 78.5 hr. at 60°C, 23.4 hr. at 70°C, 189.1 min. at 80°C or 10.5 min. at 90°C. The longer the spores were frozen, the more time was needed for the death of spores after thawing; 20 days-17.4 days, 100 days-33.2 days, and 400 days-37.8 days. The longer the spores were frozen, the more time was needed for the death of spores at a conventional when they were dried air drying condition, 540 days-23.5 days, 160 days-21.0 days, and 20 days-14.4 days. On the other hand, the longer the spores were frozen, the more spores were dead rapidly when they were irradiated with 10W UV-ray; 100 days-26.0 hr, 300 days-21.9 hr, and 540 days-13.9 hr. The time needed for killing 200 days-frozen spores by various disinfectants at 1,000 ppm was 5.2 min. by calcium oxide, 10.4 min. by potassium permanganate, 27.8 min. by malachite green and 14.3 hr. by formalin. Transient inhibitory effects of the extrusion of the polar filament were observed by various antiprotozoal and antifungal agents in the descending order of ketoconazole, metronidazole and dapsone.

The above results presume that full drying, followed by spraying CaO and maintaining sunny condition for a few days on the concrete bottoms of fish farm may be an effective method for the prevention of intestinal giant-cystic disease. [Korean J. Parasit., 28(4):241-252, December 1990]