

## 한외여과막을 이용한 해수내 어류 병원바이러스 농축법

오명주<sup>†</sup> · 김석렬 · 정성주 · 김형탁\* · 김홍윤 · 여인규\*\*

여수대학교 어병학과, \*부경대학교 식품생명과학전공, \*\*제주대학교 해양생물공학과

해수중에 소수로 분포하는 어류 병원 바이러스의 검출을 목적으로 해산어류 병원바이러스의 일종인 marine birnavirus (MABV)를 대상으로하여 한외 여과막과 centricon을 이용한 농축효과를 바이러스의 주화세포내 감염에 의해 형성되어지는 CPE (cytopathic effect) 출현에 근거한 바이러스 감염가 측정법인 TCID<sub>50</sub> 계수법 및 주화세포상의 바이러스 감염에 의해 형성되어지는 plaque 계수법을 통해 검토하였다. 바이러스 회석액 시료 20 L를 1차 중공사한외여과막으로 3 시간 가동하면 200배로 농축되어지고, centricon으로 2차 농축하여 최초 시료 대비 20,000배 (최종량: 1 ml)로 농축가능하였다. 바이러스 회수율은 농축 전 바이러스 감염가와 비교하여 TCID<sub>50</sub>치로서는 94.4%, plaque 계수법으로는 88.7%를 나타내었다. 중공사 한외여과막과 centricon을 이용한 본 농축법은 해수내 바이러스의 검출을 위한 효과적인 농축방법으로 수계 바이러스 연구에 이용되어질 수 있을 것으로 판단되어졌다.

**Key words:** Virus concentration, Ultrafiltration, Sea water, Fish virus, Marine birnavirus

근래에 들어 국내 해산어 양식장의 사육 넙치, 조피볼락, 농어, 돌돔, 참돔 및 능성어 등에서 다양한 바이러스 질병에 의한 피해가 계속되어지고 있다(Oh & Jung, 1999; Oh, 1999). 그 중에서도 birnavirus 및 iridovirus에 속하는 몇 종류는 남해안 전 수역의 해수를 이용하는 다양한 양식장에서 확인되어지고 있다. 이와 같이 해산어 바이러스성 질병의 빈번한 발생 및 그 지역의 확산 조짐은 연안의 한정된 수역 및 그 해수를 이용하는 우리나라의 해산어 양식에 비추어 보았을 때 큰 문제점이 아닐 수 없다. 따라서, 질병 발생이전의 병원체 확산을 조사하여 조기에 대책을 수립하여야할 필요성이 매우 높아지고 있다.

Wolf(1988) 및 Kimura and Yoshimizu(1988)에 의하면 어류 병원바이러스의 경우 그 감염력이 수온변동이 있는 자연수계에서도 수개월에서 수년간 유지된다고 보고하고 있다. 지금까지 수중의 바이러스를 농축 및 검출하려는 연구는 주로 인간의 음용수 관리 목적에서 진행되어왔으며(이&김, 1999), 양식현장의 수중 어류병원바이러스 검출에 관한 연구로는 Maheshkumar 등(1991 a, b)에 의한 연어과 어류 병원바이러스인 infectious

pancreatic necrosis virus(IPNV)의 수계 감염 상황 파악을 위한 연구 등 수 건이 있을 뿐이다. 이처럼 아직까지 해산어 양식 현장 및 연안 수중에 분포하는 어류병원바이러스를 조사하기 위한 경제적이고 효율적인 연구법이 정립되지 않다.

본 연구에서는 어류 병원바이러스의 해산 양식어류 감염원으로서의 작용 및 연안 수역내 바이러스성질병 유행의 유형규명을 목적으로 하는 연구의 기초로서 marine birnavirus(MABV)를 대상으로 해수중에 미량으로 존재하는 바이러스의 효율적인 농축방법으로 사용하기 위하여 중공사막을 이용한 농축법을 검토하였다.

### 재료 및 방법

#### 바이러스 및 세포배양

바이러스의 농축법을 검토하기 위해 남해안의 양식넙치에서 분리된 marine birnavirus(MABV-NF4, Oh *et al.*, 1999b)를 사용하였다. 바이러스 배양에 사용한 주화세포는 본 연구실에서 보유하고 있는 CHSE-214(Chinooksalmon Embryo cell line)을 사용하였다. 세포배양액은 100 IU/ml의 penicillin, 100 µg/ml의 streptomycin, 10% FBS(Fetal Bovine Serum)를 첨가한 DMEM(Dulbecco's

<sup>†</sup>Corresponding author

Fig. 1. Diagram of the virus concentration.

Modified Essential Medium)을 사용하였다. 실험에 사용할 MABV의 배양은  $2.5 \times 10^5$  cells/ml로 조정된 배양세포액을 75F 플라스크에 각 25 ml씩 분주하여 하루동안 배양한 CHSE-214세포에 M.O.I 0.1이 되게 바이러스를 접종하고, 접종 후 15°C에서 5일간 저온인큐베이터에서 배양하여, 바이러스의 감염에 의한 MABV 특유의 CPE를 관찰한 후, 세포가 완전하게 lysis된 시점이 되면 바이러스 배양액을 무균상태로 4000 rpm 20분간 원심분리하여 세포잔유물을 제거한 상등액을 취하여 0.45 µl membrane filter로 여과하고 튜브에 각 1 ml 씩 분주하여 실험 사용 전까지 -80°C에 보관하였다.

#### 바이러스 titration

바이러스 titer는  $2.5 \times 10^5$  cell/ml가 되게 조정된 CHSE-214 cell 부유액을 96-well tissue culture plate에 100 µl씩 분주하여 1일 배양한 후, 농축효율을 파악하기 위한 바이러스 원액 시료의 titer 및 각각의 농축단계별에서 얻어진 시료내의 바이러스를 TCID<sub>50</sub>법으로 행하여 비교하였다. 즉 각각의 well에 HBSS로 10배 희석법에 의해 희석한 바이러스액을 100 µl씩 접종하고, 15°C에서 7일간 배양한 후 CPE의 발현을 확인하여, 10%의 포르말린으로 세포를 고정하고, 0.1% 크리스탈 바이오렛으로 염색한 후 각 well 내의 세포를 관찰하여 CPE 유무를 판정하였다. 그 판정에 따른 TCID<sub>50</sub>치는 Reed and Muench(1938)의 방법으로 계산하였다. 아울러 각각의 실험단계별 바이러스의 감염의 변동치를 비교하기 위하여  $1 \times 10^6$  cells/ml로 조정된 CHSE-214 cell 부유액을 24-well tissue culture

plate의 각 well당 1 ml씩 분주하여 1일간 배양한 후 methyl cellulose MEM법(Kamei *et al.*, 1987)으로 각각의 시료액내의 바이러스 감염가를 plaque assay에 의한 PFU(plaque forming unit) count법으로 측정하여 비교하였다.

#### 바이러스 농축법 및 농축효율

해수중 바이러스를 효과적으로 농축하기 위한 방법으로 중공사한의외과막(Daelim Co. PAN 100,000)과 centicon(Millipore Co. Plus-20)을 이용하여 Fig. 1에서와 같은 과정을 이용한 바이러스 농축과정을 설정하고 그 효과를 검토하였다.

본 실험에서의 바이러스 농축을 위해 사용한 농축 단계를 간단히 요약하면, 우선 20 l 조사용 해수를 Plankton net(pore size: 50 µm)를 이용하여 막에 손상을 줄 수 있는 부유물을 제거하는 전여과 과정을 거친 후, PAN(Polyacrylonitrile) 재질의 분획분자량 100,000이며 순수투과도가 7 l/hr이고, 모듈의 크기 내경/외경이 1.2/2.0 mm×320 mm의 중공사막을 사용압력 2 kg/cm<sup>2</sup>이 되게 peristatic pump를 이용하여 가압하고, 분자크기 0.005~0.5 µm 범위의 해수내 입자를 1차 농축하였다. 호스안에 농축된 액은 자연압에 의해 멸균된 500 ml 삼각플라스크에 수집하였으며, 수집된 1차농축액을 분획분자량 100,000이며 membranes의 재질이 polyethersulfone로서 그 유효면적이 10.33 cm<sup>2</sup>이며 Minimum final concentrate volume이 100 µl로 제작되어진 centricon(Centricon Plus-20(Biomax-100). Millipore Co.)을 이용하여 원심분리법으로 2차 농축을 행하는 과정으로 설계하였다.

이와같은 농축장치를 이용한 바이러스 농축효율

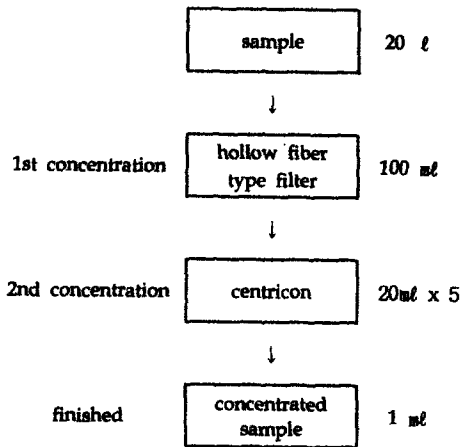


Fig. 2. Diagram of concentrative process of viruses.

의 확인을 위하여 5회에 걸쳐 여수 인근의 해산어 양식장 사육수로 사용하는 모래여과해수를 실험실로 채수하여 1차 농축장치로 사용할 증공사막 장치로 여과한 해수 20l에 미리 준비된  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/ml의 수치를 나타내는 MABV-NF4 바이러스액 1 ml를 희석하여 각각의 농축 단계에서 얻어지는 농축액내의 바이러스양을 상기의 바이러스 titration법(TCID<sub>50</sub> 및 PFU)을 이용하여 확인하고 그 농축효율을 평가하였다.

**결 과**

**해수 농축율**

20 l의 해수중에 1 ml의 바이러스액을 투여하여 잘 희석 시킨 후, 플랑크톤 넷을 이용하여 전여과하고, 얻어진 바이러스 농축을 검사용 바이러스 희석 해수를 증공사막이 장치된 1차 농축장치를 이용하여 연속 농축한 결과 3시간 이내에 20 l 전 해수를 농축할 수 있었다. 1차 농축을 통하여 얻어진 농축액 총량은 100 ml로서 원수 대비 200배의 농축도를 얻을 수 있었다. 1차 농축에서 얻은 해수 내 바이러스 농축액을 20 ml 용량의 centricon

Table 1. Concentrating efficiency of ultrafilter of hollow fiber type and centricon

	Concentration volume	Concentrated ratio	Concentrating method
1st	20 L ⇒ 100 ml	1:200	ultrafiltration
2nd	100 ml ⇒ 1 ml	1:100	centricon
Total	20 L ⇒ 1 ml	1:20,000	

Plus-20에 20 ml씩 분주하여 실온에서 3000 rpm으로 20분 원심분리하는 방법으로 최종농축을 행하여 최종 농축액 1 ml를 얻었다. 이는 원 해수시료에 비교하여 보았을 때, 최종농축율이 1:20,000배의 농축율로 계산되어졌다(Fig. 2, Table 1). 농축에 소요되는 시간은 1 샘플당 3시간 30분이었다.

**바이러스농축효과**

MABV를 이용한 해수내 바이러스 농축 효율의 결과를 Table 2에 나타내었다. 본 농축법으로 20 l의 여과 해수에 희석한  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/ml의 MABV NF-4 바이러스는 1차 농축 직전의 희석 해수중에서  $10^{2.685}$  TCID<sub>50</sub>/ml로 희석되어져 있었는데, 증공사 한외여과막에 의한 1차 농축 후 얻어진 100 ml 농축액 내에서는  $10^{4.965}$  TCID<sub>50</sub>/ml를 나타내었다. 이를 계산하면 1차 해수 농축에 의한 해수량 (20 l에서 100 ml)의 농축율인 200배에 비하여 약간 낮은 정도이기는 하지만 190.54배의 해수중 바이러스가 1차 해수 농축에 의해 얻어졌다. centricon을 이용한 2차 농축에서는 최종 1 ml로 농축되어진 농축액내에  $10^{6.975}$  TCID<sub>50</sub>/ml의 바이러스 감염가가 확인되어져 최초의 해수 내에 존재한  $10^{2.685}$  TCID<sub>50</sub>/ml와 비교하였을때 19,500배의 바이러스 농축율을 나타내었다. 이를 최초 20 l 해수내의 바이러스 감염량인  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/20 l에 대한 회수율로 계산하면 94.4%가 2차의 농축과정을 통하여 회수되어졌음을 나타낸다. 이러한 결과는 플라크시험법으로 행한 실험의 결과에서도 유사하게 나타났는데, 최초의 20 l 해수내에 희석량인  $10^{7.16}$  PFU/

Table 2. Recovered efficiency of concentrated MABV NF-4

Initial titer	Step	Starting	1st concentration	2nd (Final) concentration	Recovery efficiency
$10^7$ TCID <sub>50</sub> /20 L		$10^{2.685}$ /ml	$10^{4.965}$ /ml	$10^{6.975}$ /ml	94.4%
$10^{7.16}$ PFU/20 L		$10^{2.857}$ /ml	$10^{5.086}$ /ml	$10^{7.108}$ /ml	88.7%

20의 바이러스에 의한 플라크형성가(PFU)와 비교하였을 때 2차에 걸친 최종 농축에 의한 플라크형성가가  $10^{7.108}$  PFU/ml로서 88.7%의 농축에 의한 회수효율을 나타내었다.

## 고 찰

본 실험에서 사용한 중공사 한외여과막은 압력차를 추진력으로 하며 분획분자량으로 그 성능을 나타내며 농축가능 분자의 크기 범위는 0.005-0.5  $\mu\text{m}$ 로서, 일반적으로 당류, 단백질 등의 생체물질, 고분자 물질의 분리에 주로 사용한다(지와 남, 1995). MABV는 virion size가 60-80 nm로 다른 병원성바이러스보다 상대적으로 작은 편으로 중공사 한외여과막 및 centricon의 성능을 확인하기에 적당할 것으로 판단하였다. 본 연구에서 중공사한외여과막 및 centricon을 이용한 2단계의 농축과정을 통하여 해수내 MABV 바이러스 농축효과를 검토한 결과, 최초 대비 20,000배의 농축 해수내 내에서 약 90%이상의 바이러스를 회수 가능한 매우 효과적인 농축방법임이 확인되어졌다. 수계의 바이러스는 세균보다 적은 수로 수중에 분포하지만 세균에 비하여 환경에서 오래 생존할 수 있고(Grabow *et al.*, 1984), 저농도의 염소처리와 같은 정수 처리에 의해서도 제거되지 않을 가능성이 높으며(Bitton *et al.*, 1986), 적은 수로도 감염의 가능성이 높아(Gerba *et al.*, 1990), 수계 바이러스에 의한 오염을 파악하기 위한 연구의 필요성이 식품미생물 및 환경미생물학자들에 의해 제시되고 있으며, 관련 연구가 수행되어지고 있다(Dahiling and Wright, 1986; Armon *et al.*, 1984). 국내의 경우 이 & 김(1999)이 담수 환경수내의 인간의 장염 바이러스 검출법을 소개하고 있는데 그에 따르면 담수중의 장염바이러스의 농축 및 검출법으로 흡탈착/PEG 침전법 및 PCR검출법이 가장 유효하다고 하였고, 이러한 방법을 이용한 환경수계 조사에서 국내의 담수 수계내에 바이러스의 오염이 광범위하게 나타남을 확인하였다. 그러나 이 방법도 바이러스의 침전과 재부유를 반복하는 농축과정을 고려할 때 농축과정에서 바이러스 입자의 소실이 많이 일어날 수 있음을 시사하며, 바이러스 회수율에 대하여서는 언급하지 않았다.

어류 병원바이러스의 농축에 대한 보고로서,

McAllister & Bebak(1997)은 1-MDS filter에 의한 하천수 내에서의 IPNV 농축에서 바이러스의 유무를 확인하였을 뿐 바이러스의 회수율은 보고하지 않았다. 그러나, 1-MDS filter법을 보고한 Maheshkumar(1991a)등은 자연 담수계의 IPNV 농축율을 300배 이상으로 할 수 있으며, 회수율도 90% 이상으로 농축할 수 있는 수계 바이러스의 농축법을 보고하고 있다. 지금까지의 바이러스 농축에 관한 연구는 pH 차를 이용한 유기산 농축법이 대부분을 차지하고 있으나, Croci 등(1993)은 농축법에 흔히 사용되고 있는 유기산 농축법의 경우, 급격한 pH 변화를 수반하는 실험과정 때문에 바이러스가 불활성화 될 가능성이 높아 회수율이 상대적으로 떨어진다고 보고하였다. 본 연구에서 채택한 바이러스 농축법의 특징은 시료에 유기산 등의 전처리가 필요치 않고, 시료 내 큰 입자나 부유물만 제거시키면 농축이 가능하며 virus에 손상을 주는 요인을 현저하게 줄인 점과, 시료의 양에 제한 받지 않고 농축가능하며 filter는 사용 후 0.1 N NaOH로 처리해 주면 물리적인 손상이 가해지지 않는 한 연속 사용 가능하다는 장점이 있다. 결론적으로 본 연구에서 바이러스 농축에 사용한 중공사 한외여과막과 centricon의 성능은 지금까지 연구되어진 다른 농축법보다 효과적이며, 광범위하게 적용가능할 것으로 판단되어져, 양식장 환경수 및 연안 해양수계내 어류병원바이러스의 동태 파악 및 감염성 질병 확산 등의 예측에 활용되어질 수 있을 것으로 생각된다.

## 사 사

이 논문은 1999년도 한국학술진흥재단의 연구비(KRF-99-041-H00007)에 의하여 지원되었음.

## 참고문헌

- Armon, R., Kott, Y., and Neeman, I.: Fhost cells as sorption matrix for virus concentration from water. *Appl. & Environ. Microb.* 47, 1337-1340. 1984.
- Bitton, G., Farrah, S. R., Montague, C. L., and Akin, E. W.: Viruses in drinking water. *Environ. Sci. Tech.* 20, 216-222. 1986.
- Croci, L., De Medici, D., Divizia, M., Gabrieli, R., Toti, L., and Pana, A.: Recovery of poliovirus type 1 from

- experimentally contaminated shellfish: evaluation of different methods. *Wat. Sci. Tech.* 27(3/4), 105-109. 1993.
- Dahling, D. R., Phirke, P. M., Wright, B. A., and Saf-fernam, R. S.: Use of bituminous coal as an alternative technique for field concentration of waterborne viruses. *Appl. & Environ. Microb.* 49, 1222-1225. 1985.
- Gerba, C. P., and Rose, J. B.: Viruses in source and drinking water, p. 380-396, In McFeters, G. A. (ed.), *Drinking water microbiology*. Springer-Verlag New York Inc., New York. 1990.
- Grabow, W. O. K., Coubrough, P., Hilner, C., and Bateman, B.W.: Inactivation of hepatitis A virus, other enteric viruses and indicator organisms in water by chlorine. *Wat. Sci. Tech.* 17, 657-664. 1984.
- Kamei, Y., Yoshimizu, M., and Kimura, T.: Plaque assay of *Onchorhynchus masou* virus. *Fish Pathol.*, 22, 147-152. 1987.
- Kimura, T., and Yoshimizu, M.: Preservation of fish pathogenic viruses. *Bull Jap. Fed. Culture Col.*, 4(1), 1-8. 1988.
- Maheshkumar, S., Goyal, S. M., Peterson, R. B., and Economon, P.: Method for the concentration of infectious pancreatic necrosis virus from hatchery water. *J. of Virol. Meth.* 31, 211-218. 1991.
- Maheshkumar, S.: Concentration and detection of pathogens in aquaculture. *Science & Engineering.* 51, 152. 1991.
- McAllister, P. E., and Bebak, J.: Infectious pancreatic necrosis virus in the environment; Relationship to effluent from aquaculture facilities. *J. of Fish Dis.* 20, 201-207. 1997.
- Oh, M. J.: Fish diseases of cultured marine fishes. *Kor. Aquaculture.* 11, 63-66. 1999.
- Oh, M. J., and Jung, S. J.: Viral diseases of fish in Korean mariculture. In: "Proceeding of the fifth international symposium on the efficient application and preservation of marine biological resources. p 25-32. 1999.
- Oh, M. J., Jung, S. J., and Kim, H. R.: Biological and serological characteristics of birnavirus isolated from cultured Japanese flounder in 1999. *J. Fish Pathol.*, 12(1), 56-62. 1999b.
- Puig, M., Jofre, J., Lucena, F., Allard, A., Wadell, G., and Girones, R.: Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by nested PCR amplification. 60, 2963-2970. 1994.
- Reed, J. L., and Muench, H.: A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.*, 27, 493-497. 1938.
- Wolf, K.: *Fish viruses and fish viral diseases*, Comstock Pub. Associates, Cornell Univ. Press. Lodon. pp 477, 1988.
- Wommack, K. E., Hill, R., and Colwell, R.: A simple method for the concentration of viruses from natural water samples. *J. of Microb. Methods.* 22, 57-67. 1995.
- 이승현, 김상중: 수계바이러스 검출에 PCR을 이용하기 위한 효과적인 농축기법. *Kor. J. Microbiol.*, 35: 41-46, 1999.
- 지은상, 남기열: 막분리개론, 도서출판대도, p391. 1995.

## **A Simple Method for the Concentration of Fish Pathogenic Virus in Sea Water**

**Myung-Joo Oh, Suk-Ryul Kim, Sung-Ju Jung, Hyeung-Rak Kim\*,  
Heung-Yoon Kim and In-Kyu Yeo\*\***

*Department of Fish Pathology, Yosu National University*

*\*Department of Food Science & Biotechnology, Pukyung National University*

*\*\*Department of Marine Biotechnology, Cheju National University*

A method was developed for concentrating fish pathogenic virus from sea water using membrane ultrafiltration system and centricon. The method consists of passing large volumes (Ca. 20 liter) of sea water through ultrafiltration (PAN) filter followed by cross-flow filtration method and centrifugation use the centricon (Plus-20). This procedure permitted the processing of 20 liter of sea water which resulted in a 20,000-fold reduction in the volume of water and greater than 90% recovery of the seeded MABV.

---

*Key words* : Virus concentration, Ultrafiltration, Sea water, Fish virus, Marine birnavirus