

양식 바지락, *Ruditapes philippinarum*에 대한 *Vibrio tapetis*의 병원성과 PCR법에 의한 진단

박성우[†] · 이경희

[†]군산대학교 · 목포지방해양수산청

Pathogenicity and PCR detection of *Vibrio tapetis* in Manila clams, *Ruditapes philippinarum*

Sung-Woo Park[†] and Kyung-Hee Lee

[†]Dept. of Aquatic Life Medicine, Kunsan National University, Kunsan 573-701, Korea
Fisheries Management Division, Mokpo Regional Maritime Affairs and Fisheries Office, 530-831, Korea

Pathogenicity of *Vibrio tapetis*, the causative bacterium of “brown ring disease (BRD)” was evaluated in Manila clams (*Ruditapes philippinarum*) by artificially 0.1 ml infection of 1.0×10^5 cells and 1.0×10^8 cells at 20 °C. A PCR assay based on 16S rRNA to detect the bacteria in clam tissues was established.

Accumulative mortality of clams infected with 1.0×10^7 cells and 1.0×10^4 cells per an individual of the bacteria was 67.5% and 7.5%, respectively. However, the deposit of brown pigment in the inner shells by accumulation of chonchiolin was not found. The bacteria were not be able to re-isolate from the infected clams by the conventional agar plate method but were easily detected by PCR assay established in this experiment.

In clams artificially infected with 10 species of *Vibrio*, a 414bp for *V. tapetis* was detected in PCR assay. The specific band in the clams infected with 1.0×10^4 cells per an individual of *V. tapetis* was detected only in gills one day after the infection but never be found in any tissues including gills three days after the infection. In the case of clams infected with 1.0×10^8 cells per an individual of *V. tapetis* the specific band was detected in gills and intestine one day after the infection, in all tissues three days after the infection, and then in gills and adductor muscle nine days after the infection. The PCR assay was applied to detect *V. tapetis* in manila clam, surf clam (*Macra veneriformis*), oyster (*Crassostrea gigas*) and Thomas' rapa whelk (*Rapana venosa*) taken from Taean and Gochang from April to July 2004. The infection rates were detected to 23.1% and 9.4% in the oyster and surf clam, while manila clam and Thomas' rapa whelk were not found.

Key words : *Ruditapes philippinarum*, *Vibrio tapetis*, BRD, PCR

양식 바지락의 *Vibrio*병은 1987년대 프랑스의 서북연안에서 양식중인 바지락 *Ruditapes philippinarum*에 처음 발병하여 스페인과 포르투갈을 중심으로 외투막과 접하는 패각 내부에 갈색의 병소가 형성되는 소위 “brown ring disease (BRD)”가 발생하여 많은 피해를 초래하였다 (Paillard *et al.*, 1994; Paillard and Maes,

1995a, 1995b). 이 원인균은 *Vibrio* 속으로 분류되었지만 기존의 종과는 차이가 났기 때문에 *Vibrio* P1 또는 *Vibrio splendidus*로 명명된 후, *Vibrio tapetis*로 확정되었다 (Castro *et al.*, 1996).

*V. tapetis*의 감염은 바지락류에 한정되며, 패각과 내부에 침입하여 폐사를 일으키는 것으로 밝혀졌으나 (Allam *et al.*, 2002), 감염실험시 바지락

[†]Corresponding Author : Sung-Woo Park, Tel : 063-469-1884,
E-mail : psw@kunsan.ac.kr

류 이외의 다른 패류인 *Crassostrea gigas*와 *Pecten maximus* 등에서도 brown ring이 형성되지는 않지만 감염은 성립하는 것으로 보고되고 있다 (Paillard *et al.*, 1996).

*V. tapetis*의 분리는 Marine agar에 1% mannitol (W/V), 1% bromthymol blue를 첨가하여 평판을 만든 다음 균을 접종하여 20 °C에 일주일간 배양한 후 mannitol의 비분해 때문에 형성되는 푸른색의 띠를 가진 녹색 집락을 선택하여 TCBS와 marine agar에 접종한 다음 각각 20 °C와 30 °C에서 24시간 배양한 다음 TCBS에서 녹색의 집락이 형성되지만 고온에 약하여 marine agar 평판에서 자라지 않는 것을 선택하는 방법도 개발되었다 (Noel *et al.*, 1996). 그러나 몇몇 생화학 성상에 있어 *Vibrio splendidus* biovar II와 유사한 점이 많아 2종을 엄밀히 구분하는 데는 어려움이 있다 (Castro *et al.*, 1992; Jensen *et al.*, 2003). 이러한 점을 보완하기 위하여 원인균을 배양한 다음 항토키혈청을 사용한 슬라이드 응집반응과 간접형광항체법, 단크론항체를 사용하는 Enzyme-linked immunosorbent assay법 (ELISA법)이 면역학적 방법으로 개발되어 있다 (Castro *et al.*, 1995; Noel *et al.*, 1996). 그러나, 최근 Polymerase chain reaction법 (PCR법)이 샘플의 처리, 병원균에 대한 특이성 및 재현성이 높아 어류의 질병진단에 많이 사용되고 있으며, 패류의 세균, 기생충 및 바이러스성 질병의 진단법으로 개발되고 있다 (Kellner-Cousin *et al.*, 1993; Stokes *et al.*, 1995; Atmar *et al.*, 1996; Le Roux *et al.*, 1999; Renault *et al.*, 2000; Arzul *et al.*, 2001; Lipart and Renault, 2002; Novoa *et al.*, 2002; Itoh *et al.*, 2004).

본 연구에서는 바지락에 대한 *V. tapetis*의 병원성을 조사하고, 감염시킨 바지락을 대상으로 PCR법을 사용하여 검출 특이성을 확인한 다음 양식현장에서 채집한 패류에 적용한 결과를 보고한다.

재료 및 방법

병원성

V. tapetis (NCIMB 13622)를 Marine broth 2216 (Difco)에 접종하여 20 °C에 72시간 전 배양하였다. 바지락에 인위감염은 Allam *et al.* (2002)의 방법에 따라 배양균을 멸균해수에 1.0×10^5 cells/ml, 1.0×10^8 cells/ml로 현탁시킨 균액을 제조하였다. 균액의 접종은 바지락을 미리 실온의 공기 중에 12시간 노출시켜 패각을 열게 한 다음 멸균주사기를 사용하여 패류당 균액 0.1 ml 주입하였다. 균액을 주입한 패류는 균액이 조직에 흡수되도록 다시 실온에서 6시간 방치한 다음 수조로 옮겨 10일 동안 사육하면서 누적 폐사율을 구하였다. 대조군은 균액 대신에 멸균해수를 동량 주입하였다. 균 접종 후의 사육수온은 20 ± 0.5 °C를 유지하였다.

DNA 추출 및 primers

Marine agar 2216 (Difco) 한천배지에 20 °C, 24시간 배양한 *V. tapetis*를 수확한 다음 멸균증류수로 2회 원심세척하고 재부유시켜 균부유액을 만들었다. 40 μ l의 균부유액에 10 μ l의 proteinase K (1mg/ml, Sigma)와 50 μ l의 2 \times K buffer (40 mM tris buffer, 0.2% Nonidet P-40, 0.2 mM EDTA, 1% Tween 20, distilled water, pH 8.0)을 혼합하였다. 혼합액을 60 °C에 20분간, 이어서 100 °C에 15분간 처리한 후 얼음 위에서 냉각시킨 다음 8,000rpm에 5분간 원심하여 DNA를 추출하였다. 바지락은 아가미를 절취하여 ACCUPREP kit (Bioneer Co.)를 사용하여 DNA를 추출하였다. Primers는 Genebank의 *V. tapetis* 16S ribosomal RNA gene(Accession number, AY129278)을 이용하여 Fig. 1과 같이 제작하였다.

PCR 및 특이성의 검정

DNA는 DNA thermal cycler (GeneAmp PCR System 9700, PE Applied Biosystems)를 이용하여 증폭시켰다. 즉 Tag DNA polymerase I U, dNTPs 250 μ M, Tris-HCl, pH 9.0 10 mM, KCl 40

```

1 agagtttgat cntggctcag attgaacgct ggccggcaggc ctaacacatg caagtcgagc
61 ggaaacgaga agtagcttgc tacttcggcg tcgagcggcg gacgggtgag taatgcctag

121 gaaattgccc tgatgtgggg gataaccatt ggaaacgatg gctaataccg cataatgcct
181 tcgggccaaa gagggggacc ttcgggcctc tcgcgtcagg atatgcctag gtgggattag
241 ctagtgggtg aggtaatggc tcaccaaggc gacgatccct agctggctcg agaggatgat
301 cagccacact ggaactgaga cacggtccag actcctacgg gaggcagcag tggggaatat
361 tgcacaatgg gcgcaacgct gatgcagcca tgccgcgtgt atgaagaagg ccttcggggt
421 gtaagttact ttcagcagtg aggaaggggt gtacgttaat agcgtgcatc cttgacgtta

481 gctgcagaag aagcacccgc taactccgtg ccagcagccg cggtaatagc gagggtgcga
541 gcgttaatcg gaattactgg gcgtaaacgc catgcagggtg gttcgttaag tcagatgtga
601 aagccccggg ctcaacctcg gaactgcatt taaaactggc gggctagagt actgtagagg
661 ggggtagaat ttcaggtgta gcggtgaaat gcgtagagat ctgaaggaaat accagtggcg
721 aaggcggccc cctggacaga tactgacact cagatgcgaa agcgtgggga gcaaacagga
781 ttagataacc tggtagtcca cgcgtaaac gatgtctact tggaggttgt ggccctgagc
841 cgtggctttc ggagctaacc cgttaagtag accgcctggg gtagtaccgtc gcaagattaa
901 aactcaatg aattgacggg ggcccgcaca agcgggtggag catgtggttt aatcagatgc
961 aacgcgaaga accttaccta ctctgacat cnacagaagc cagcggagac gcaggtgtgc
1021 cttcgggaac tgtaagacag gtgctgcatg gctgtcgtca gctcgtgttg tgaatgttg
1081 ggttaagtcc cgcaacgagc gcaaccctta tccttgtttg ccagcgagta atgtcgggaa
1141 ctccagggag actgccgtg ataaaccgga ggaaggtggg gacgacgtca agtcatcatg
1201 gcccttacga gtagggctac acacgtgcta caatggcgca tacagagggc agccaaccag
1261 cgatggtgag cgaatcccaa aaagtgcgtc gtagtccgga ttggagctcg caactcgact
1321 ccatgaagtc ggaatcgcta gtaatcgtga atcagaatgt cacggtgaat acgttcccgg
1381 gccttgtaca caccgccgt cacaccatgg gagtgggctg caaagaagat aggtagttta
1441 accttccggg gaggacgctt accactttgt ggttc

```

Fig. 1. Nucleotide sequence of *Vibrio tapetis* genomic DNA (Accession number, AY129278) showing the position of the primers used in this study. Primer sets used to 5'-aac gag aag tag ctt gct ac-3' (VtF) and 5'-ggt gta cgt taa tag cgt g-3' (VtR).

Table 1. *Vibrio* stains used for PCR amplification in this study

Species	Strain
<i>V. anguillarum</i>	SG 7701
<i>V. alginolyticus</i>	ALG-1
<i>V. carchariae</i>	ATCC 35084
<i>V. campbellii</i>	ATCC 10801
<i>V. harveyi</i>	ATCC 14126
<i>V. ordalii</i>	ATCC 33509
<i>V. parahaemolyticus</i>	VP-001
<i>V. splendidus</i> biovar I	ATCC 34125
<i>V. splendidus</i> biovar II	ATCC 33789
<i>V. tapetis</i>	NCIMB 13622

mM, MgCl₂ 1.5 mM과 dye가 혼합된 PCR Pre-Mix (AccuPower, Bioneer)에 primer pair를 1 μ l,

DW 16 μ l, DNA template 1 μ l 첨가하여 혼합한 다음 조건에서 DNA를 증폭시켰다. PCR 조건은

Table 2. Specimens used for the detection of *V. tapetis* by PCR

Sampling date	Area	Species		
		Scientific name	Shell length (mm)	Weight with shell (g)
2004 April 24	Gochang	<i>Ruditapes philippinarum</i>	36.76 ± 1.7	1.73 ± 0.2
		<i>Crassostrea gigas</i> *	109.47 ± 14.8	12.39 ± 1.3
		<i>Macra veneriformis</i>	40.57 ± 3.1	2.31 ± 0.1
		<i>Rapana venosa</i>	50.94 ± 4.1	22.47 ± 0.9
May 1	Taeon	<i>Ruditapes philippinarum</i>	36.31 ± 1.8	1.75 ± 0.2
		<i>Crassostrea gigas</i>	75.50 ± 5.9	8.14 ± 0.8
		<i>Macra veneriformis</i>	39.47 ± 2.5	2.38 ± 0.1
		<i>Rapana venosa</i>	60.62 ± 3.5	23.02 ± 0.7
June 3	Gochang	<i>Ruditapes philippinarum</i>	37.20 ± 3.4	1.71 ± 0.1
		<i>Crassostrea gigas</i>	115.18 ± 8	12.35 ± 1.5
		<i>Macra veneriformis</i>	38.64 ± 2.5	2.31 ± 0.1
		<i>Rapana venosa</i>	49.47 ± 4	22.4 ± 1.1
June 21	Taeon	<i>Ruditapes philippinarum</i>	37.10 ± 1.5	1.84 ± 0.2
		<i>Crassostrea gigas</i>	78.03 ± 3.9	8.35 ± 1
		<i>Macra veneriformis</i>	39.56 ± 2.4	2.4 ± 0.2
		<i>Rapana venosa</i>	58.42 ± 3.7	23.08 ± 0.7
July 12	Gochang	<i>Ruditapes philippinarum</i>	32.68 ± 1.7	1.76 ± 0.2
		<i>Crassostrea gigas</i>	110.17 ± 13.6	12.71 ± 1.4
		<i>Macra veneriformis</i>	34.21 ± 2.2	2.3 ± 0.2
		<i>Rapana venosa</i>	67.33 ± 5.3	23.1 ± 1.2
July 14	Taeon	<i>Ruditapes philippinarum</i>	36.35 ± 2.9	1.83 ± 0.2
		<i>Crassostrea gigas</i>	77.44 ± 6.4	8.26 ± 0.4
		<i>Macra veneriformis</i>	35.72 ± 1.4	2.35 ± 0.1
		<i>Rapana venosa</i>	63.46 ± 5.1	23.12 ± 0.8
July 19	Gochang	<i>Ruditapes philippinarum</i>	36.29 ± 2.2	1.78 ± 0.4
		<i>Crassostrea gigas</i>	106.55 ± 12.5	12.76 ± 1
		<i>Macra veneriformis</i>	37.36 ± 2.2	2.3 ± 0.2
		<i>Rapana venosa</i>	69.01 ± 2	23.29 ± 1.6
July 21	Taeon	<i>Ruditapes philippinarum</i>	37.64 ± 2.4	1.98 ± 0.2
		<i>Crassostrea gigas</i>	76.27 ± 8.5	8.16 ± 1.1
		<i>Macra veneriformis</i>	39.1 ± 1.5	2.44 ± 0.3
		<i>Rapana venosa</i>	83.06 ± 4.3	23.57 ± 1.8

* Mean ± SD of Twenty individuals except 15 individuals of *C. gigas* taken in Apr. 24.

initial denaturation (94 °C, 5min), denaturation (94 °C, 30sec), annealing(54 °C, 1min), extension (72 °C, 1.5min), final extension (72 °C, 5min)의 조건으로 25 cycles 반복하였다. 증폭된 DNA 18 μ l를 TAE electrophoresis buffer(40 mM Tris, 20 mM acetate, 2 mM EDTA)에 용해시킨 1.5% agarose gel 상에서 전기영동하여 자외선 램프 하에서 밴드를 확인하였다.

Primer sets와 PCR 조건의 특이성을 Table. 1에 표시한 대조균주를 사용하여 위의 방법에 따라 DNA를 추출한 다음 PCR product를 agarose gel 전기영동하여 밴드의 크기를 비교하였다. 세균은 Marine agar 2216 한천배지에 20 °C, 24시간 전배양한 균을 사용하였다.

PCR법에 의한 *In vitro*에서 *V. tapetis* 진단

접종균과 친화성 높은 조직을 선택하기 위하여 건강한 바지락에 *V. tapetis*를 감염시킨 다음 경시적으로 사육하면서 각 조직을 채취하여 PCR법에 의한 검출 정도를 판정하였다. 즉 30 cm×90 cm×45 cm의 유리수조 2개에 각각 50마리를 넣고 여과해수로 채워 수심 30 cm로 한 다음 통기하면서 25 °C에 2~3일간 순치한 후 사용하였다. 순치시킨 바지락 30마리에 *V. tapetis*를 개체당 1.0×10^4 cells과 1.0×10^8 cells을 접종시킨 후 같은 온도에 사육하면서 1, 3, 5, 7, 9일의 간격으로 4마리의 바지락을 임의로 채취하여 외투막, 아가미, 소화관 및 발의 조직을 절취하였다. 각 조직의 25~50 mg를 1.5 ml 에펜돌프시험관에 옮겨 ACCUPREP kit (Bioneer Co.)를 사용하여 DNA를 추출하였다. 즉 조직이 들어있는 1.5 ml 에펜돌프시험관에 TL Buffer 200 μ l, proteinase K (20 mg/ml) 20 μ l을 첨가하여 60 °C에 1~3시간 방치하는 동안 15분 간격으로 볼텍스 믹스하여 DNA를 추출하였다. 그 후는 위의 *V. tapetis*의 DNA 분리방법과 같은 방법으로 DNA를 추출하였다. 분리된 DNA는 4 °C 또는 -20 °C에 보관하여 사용하였다. *V. tapetis*는 TSA에 25 °C에서 24시간 배양한 균을 멸균해수에 희석시

켜 소정의 농도로 조정하였다.

PCR법의 현장적용

2004년 4월부터 7월까지 충남 태안과 전북 고창 지역에서 채집한 바지락, 동죽 (*Macraa veneriformis*), 굴 (*Crassostrea gigas*) 및 피빨고둥 (*Rapana venosa*)을 채취하여 실험실로 운반한 다음 수도수로 패각을 세척하였다. 시료로 사용한 각 패류 개체의 속성은 Table 2에 나타난 것과 같다. 크기의 측정이 끝난 개체는 개각하여 아가미를 절취한 다음 위의 방법에 준하여 DNA를 추출한 다음 PCR을 실시하여 특이밴드를 확인하여 감염율을 구하였다.

결과 및 고찰

바지락(*R. philippinarum*)은 우리나라 유용패류의 한 종으로 생존력과 번식력이 매우 강하여 간석지나 천해 어디서나 양식이 이루어지고 있다. 그러나 최근 고수온기의 대량폐사 발생으로 그 생산량이 급감하고 있는데, 그 원인은 주로 *Perkinsus* sp.와 brown ring disease (BRD)의 감염을 들 수 있다. BRD의 원인균인 표준균주 *V. tapetis* (NCIMB 13622)를 개체당 1.0×10^4 cells 및 1.0×10^8 cells 접종한 다음 20 °C에서 10일간

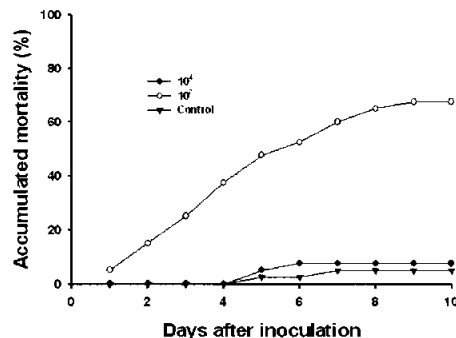


Fig. 2. Accumulated mortality of Manila clams inoculated with different concentrations of *V. tapetis* (NCIMB 13622) the causative agent of brown ring disease at 20 °C. Forty clams were used each trial.

의 누적폐사율은 Fig. 2에 나타내었다. *V. tapetis*를 개체당 1.0×10^7 cells을 접종하였을 때는 40개체 중 27개체가 사망하여 사망률은 67.5%였으며, 개체당 1.0×10^4 cells을 접종하였을 때는 40개체중 3개체가 사망하여 사망률은 7.5%에 불과하였으며, 사망개체에 있어서도 원인균에 의한 특징적인 증상인 패각내면의 conchiolin 침착에 의한 갈색반점도 관찰되지 않았다.

Allam *et al.* (2001)은 같은 바지락류라 할지라도 산지와 종에 따라 BRD 증상의 발현에 차이가 있다고 보고하였다. 즉 프랑스와 미국산 *R. philippinarum*과 프랑스산 *R. decussatus*에 *V. tapetis*를 인위감염시킨 다음 BRD의 발현을 관찰한 결과 *R. philippinarum* 중에서 프랑스산은 100%인 반면 미국산은 52%, 프랑스산 *R. decussatus*로 부터는 37%에서 BRD가 확인되었다고 보고하였다. BRD가 관찰된 개체의 정상 회복률도 프랑스산 *R. philippinarum*이 12%로 제일 낮게 나타났다. 대조로 생리식염수를 접종한 *R. decussatus*는 전혀 BRD가 발견되지 않았지만, 프랑스산 *R. philippinarum*은 17%에서 BRD가 발현되었다고 보고하였다. 이처럼 프랑스산 *R. philippinarum*이 다른 바지락에 비해 BRD의 발현율이 높은 것은 다른 지역이나 종에 비해 탐식능력이 있는 과립구의 비율이 낮기 때문에 자체 방어능의 결여에서 기인된다고 추론하였다.

패류에서 BRD와 유사한 증상은 화학물질, 환경요인 및 기생충의 감염 등 여러 가지 요인에 의해 발생되는 것으로 보고되었다. 즉 Tributyltin은 *Crassostrea gigas*의 shell chamber에 영향을 끼쳐 석회 침착을 방해하며, Diflubenzuron도 *Anodonta cygnea*의 패각 안쪽에 유기물이 축적되는 것을 방해하는 것으로 보고되었다 (Machado *et al.*, 1990). 또 산소 과포화에 의한 가스병도 굴이나 바지락의 패각 안쪽에 conchiolin의 반점을 형성하는 것으로 보고되었다 (Malouf *et al.*, 1972). 봄과 여름철의 대량폐사 후 살아남은 빈사상태의 비단가리비 (*Patinopecten yessoensis*)에도 BRD와 유사한 증상이 발견되며 원인으로는

겨울철의 저수온, 영양결핍, 고밀도 사육 등의 환경요인이 제기되었으며, 다른 요인으로는 여름철 난소의 비정상적인 성숙에 의해서도 유발된다고 보고하였다 (Mori, 1975; Kawamoto, 1985). 또 Termatodes의 감염에 의해서도 사멸된 metacercaria를 석회물질이 덮고 있는 유사한 증상이 나타나며, *Haplosporidium nelsoni* (Farley, 1968)나 곰팡이의 감염 (Raghukumar and Lande, 1988)에 의해서도 발생하는 것으로 보고되고 있다. 본 연구에서 우리나라산 바지락에 *V. tapetis*를 인위감염 시켰을 때도 BRD는 전혀 발현되지 않았는데 이는 환경적 요인과 관계가 있을 것으로 추측된다.

Primer sets (VtF and VtR)를 사용하여 *V. splendidus* biovar I, *V. splendidus* biovar II, *V. harveyi*, *V. campbellii*, *V. carchariae*, *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *V. ordalii*, 및 *V. parahaemolyticus*에서 추출한 DNA를 사용하여 PCR 증폭시킨 다음 agarose gel 전기영동시킨 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 사용한 primer sets와 PCR 조건은 *V. tapetis*에 대해서만 414 bp의 특이밴드가 검출되고 다른 균에서는 확인되지 않았다.

*V. tapetis*를 개체당 1.0×10^4 cells 접종하였을 때 1일 후에는 아가미에서만 특이밴드가 검출되

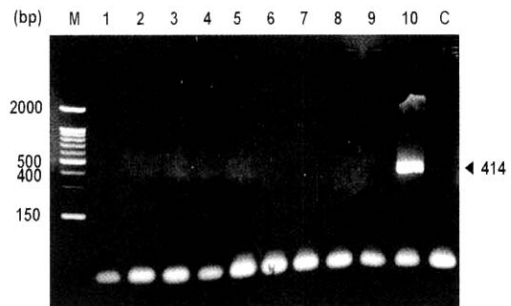


Fig. 3. Specificity of PCR with the primers (VtF and VtR). M, size maker (100-bp ladder); C, distilled water (negative control); 1, *V. splendidus* biovar I; 2, *V. splendidus* biovar II; 3, *V. harveyi* 4, *V. campbellii* 5, *V. carchariae* 6, *V. anguillarum* 7, *V. alginolyticus* 8, *V. ordalii*, 9, *V. parahaemolyticus* 10, *V. tapetis*.

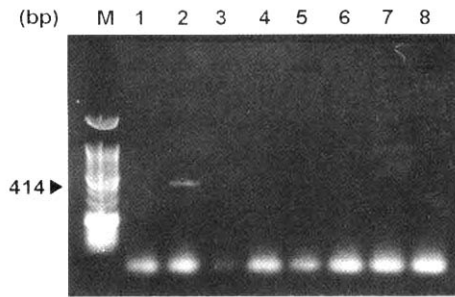


Fig. 4. Application of the specific primers (VtF and VtR) for the detection of *V. tapetis* to different tissues of Manilla clam experimentally infected with 1.0×10^4 cells per an individual. Tissues were taken 1 (1 to 4) and 3 days (5 to 8) after the inoculation. M, size maker; 1 and 5, mantle; 2 and 6, gill; 3 and 7; intestine; 4 and 8, adductor muscle.

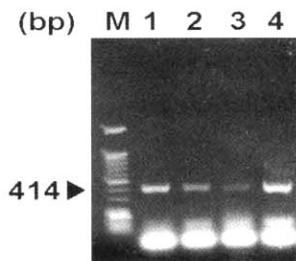


Fig. 5. Application of the specific primers (VtF and VtR) for the detection of *V. tapetis* to different tissues of Manilla clam experimentally infected with 1.0×10^8 cells per an individual. Tissues were taken 5 days after inoculation. M, size maker; 1, mantle; 2, gill; 3; intestine; 4, adductor muscle.

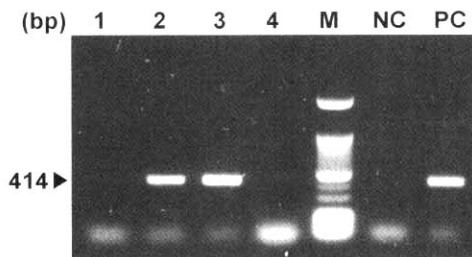


Fig. 6. Detection of *V. tapetis* by PCR amplification. The specimens were taken from the coastal area of Taean and Gochang. 1, Manilla clam (*Ruditapes philippinarum*); 2, surf clam (*Mectra veneriformis*); 3, oyster (*Crassostrea gigas*); 4, Thomas's rapa whelk (*Rapana venosa*); M, size marker; NC, negative control; PC, positive control.

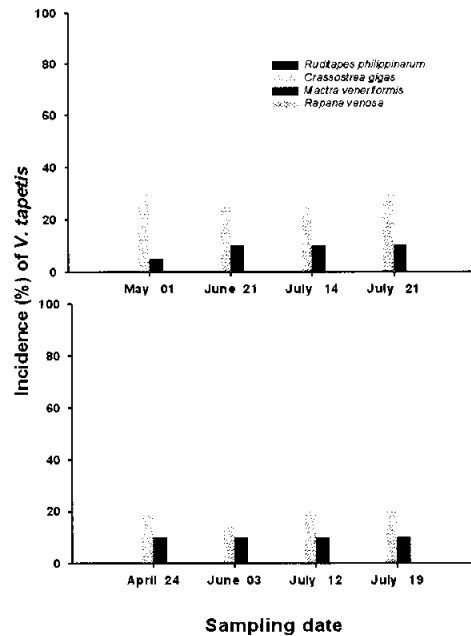


Fig. 7. Incidence (%) of *V. tapetis* detected by PCR amplification. The specimens were taken from the coastal area of Taean (upper) and Gochang (lower). Twenty individuals were used each trial.

있고, 3일 후에는 모든 조직에서 검출되지 않았 으며 그 이후에는 어떠한 조직에서도 검출되지 않았다 (Fig. 4). 한편 개체당 1.0×10^8 cells의 *V. tapetis*를 접종하였을 때는 접종 1일 후에는 아 가미와 소화관에서 밴드가 확인되었지만, 외투 막과 발에서는 검출되지 않았다. 그러나 3일 후 부터는 모든 조직에서 검출되었으며, 5일과 7일 후에는 외투막과 발, 9일 후에는 아가미와 발에 서 검출되었다 (Fig. 5). 본 연구에서 *V. tapetis*의 탐지를 위해 설정한 primer sets와 아가미를 시 료로 한 PCR 조건은 효과적인 것으로 판명되었 으며, 검출을 위한 조직으로는 아가미가 효과적 인 것으로 판단되었다.

2004년 4월부터 7월까지 태안과 고창 지역에 서 채취한 바지락, 동죽, 굴 및 피빨고둥의 아가 미를 시료로 하여 PCR법으로 조사한 *V. tapetis*의 검출상황은 Fig. 6과 Fig. 7과 같다. 태안 지역 에서 채취한 바지락은 0%, 동죽은 5.0~10.0%,

굴은 25~30%, 피빨고둥은 0%가 검출되었다. 한편 고창 지역의 바지락은 0%, 동죽은 10%, 굴은 15~20%, 피빨고둥은 0%가 검출되었다. 2 지역 모두 바지락과 피빨고둥에서는 전혀 검출되지 않은 반면 굴이 23.1%, 동죽이 9.4%가 검출되었다.

본 연구의 결과를 종합하면 BRD의 원인균인 표준균주 *V. tapetis*를 인위감염 시켰을 때 폐사는 발생하지만, 주요증상인 패각내면의 chonchiolin 침착에 의한 갈색반점은 전혀 발현되지 않았다. 이에 *V. tapetis*가 바지락 폐사에는 관계하지만 직접적인 원인일 가능성은 적다는 것을 처음으로 제기하였다. 또한, PCR법은 바지락 이외의 다른 패류에서도 *V. tapetis*의 진단을 위한 효과적인 방법으로 판단되었으며, 검출을 위한 조직으로는 아가미가 가장 좋은 것으로 판단되었다.

요 약

“Brown ring disease (BRD)”의 원인균인 *Vibrio tapetis* (NCIMB 13622)의 바지락(*Ruditapes philippinarum*)에서의 병원성을 조사하고, 바지락 조직 내의 균의 존재를 PCR법으로 진단하였다. 실온에 12시간 노출시킨 바지락 개체당 1.0×10^7 cells과 1.0×10^4 cells의 *V. tapetis*를 멸균주사기를 사용하여 인위감염 시켰을 때의 누적폐사율은 각각 67.5%와 7.5%로 나타났다. 폐사개체에서 BRD의 특징적인 증상인 패각내면의 chonchiolin 침착에 의해 형성되는 갈색반점은 관찰되지 않았으나, PCR법에 의해 균의 존재를 확인할 수 있었다.

10종의 *Vibrio*균을 대상으로 PCR법의 검출 특이성을 조사한 결과 *V. tapetis*에 대해서만 414 bp의 특이밴드가 검출되었다. 또 *V. tapetis*를 개체당 1.0×10^4 cells과 1.0×10^8 cells 접종시킨 다음 사육하면서 경시적으로 균의 동태를 조사한 결과 개체당 1.0×10^4 cells을 접종하였을 때는 1일 후에는 아가미에서만 특이밴드가 검출되었

고, 3일 후에는 모든 조직에서 검출되지 않았다. 한편 개체당 1.0×10^8 cells을 접종하였을 때 1일 후에는 아가미와 소화관, 3일 후에는 모든 조직에서 검출되었으며, 5일과 7일 후에는 외투막과 발, 9일 후에는 아가미와 발에서 검출되어, 검출 장기로는 아가미가 가장 효과적인 것으로 판명되었다.

PCR법으로 태안과 고창 지역의 바지락, 동죽, 굴 및 피빨고둥의 조직내 *V. tapetis*의 존재를 검사한 결과 바지락과 피빨고둥에서는 전혀 검출되지 않은 반면 굴과 동죽에서 각각 23.1%, 와 9.4% 검출되어 바지락 이외의 다른 패류의 진단에도 유용한 방법으로 판단되었다.

감사의 글

본 연구는 2001년 해양수산부 수산특정과정 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Allam, B., Ashton-Alcox, K. A. and Ford, S. E.: Haemocyte parameters associated with resistance to brown ring disease in *Ruditapes* spp. clams. *Dev. & Comp. Immunol.*, 25: 365-375, 2001.
- Allam, B. Paillard, C. and Ford, S. E.: Pathogenicity of *Vibrio tapetis*, the etiologic agent brown ring disease in clams. *Dis. Aquat. Org.*, 48: 221-231, 2002.
- Arzul, I., Renault, T., Lipar, C. and Davison, A. J.: Evidence for interspecies transmission of oyster herpesvirus in marine bivalves. *J. Gen. Virol.*, 82: 865-870, 2001.
- Atmar, R. R., Neill, F. H., Woodley, C. M., Nanger, R., Fout, G. S., Burkhardt, W., Leja, L. and McGovern, E. R.: Collaborative evaluation of a method for the detection of Norwalk

- virus in shellfish tissues by PCR. Appl. Environ. Microbiol., 62: 254-258, 1996.
- Borrego, J. J., Castro, D., Luque, A., Paillare C., Maes, P., Garcia, M. T. and Ventosa, A.: *Vibrio tapetis* nov., the causative agent of the brown ring disease affecting cultured clams. Intl. J. Sys. Bacteriol., 46: 480-484, 1996
- Castro, D., Martinez-Manzanares, E., Luque, A., Fouz, B., Morinigo, M. A., Borrego, J. J. and Toanzo, A. E.: Characterization of strains related to brown ring disease outbreaks in southwestern Spain. Dis. Aquat. Org., 14: 229-236, 1992.
- Castro, D., Luque, A., Santamaria, J. A., Maes, P., Marinez-Manzanares, E. and Borrego J. J.: Development of immunological techniques for the detection of the potential causative agent of the brown ring disease. Aquaculture, 132: 97-104, 1995.
- Castro, D., Santamaria, J. A., Luque, A., Marinez-Manzanares, E. and Borrego, J. J.: Antigenic characterization of the etiological agent of the brown ring disease affecting manila clams. Syst. Appl. Microbiol., 19, 231-239, 1996.
- Farley, C. A.: *Michinia nesoni* (Haplosporidia) disease syndrome in the American oyster *Crassostrea virginica*. J. Protozool., 15: 585-599, 1968.
- Itoh, N., Tun, K. L., Komiyama, H., Ueki, N. and Ogawa, K.: An ovarian infection in the Iwagaki oyster, *Crassostrea nippona*, with the protozoan parasites *Martelliodes chungmuensis*. J. Fish Dis., 27: 311-314, 2004.
- Kawamoto, K.: Gonadal development of cultured scallops, *Patinopecten yessoensis* (Jay) off Rumoi (Hokkaido). Scient. Rep. Hokkaido Fish. Expl. Stn., 31: 9-13, 1985.
- Kellner-Cousin, K., Gall, G. L., Despres, B., Kaghad, M., Legoux, P. and Shire, D.: Genomic DNA cloning of rickettsia-like organisms (RLO) of Saint-Jacques scallop *Pecten maximus*: evaluation of prokaryote diagnosis by hybridization with a non-isotopically labelled probe and by polymerase chain reaction. Dis. Aquat. Org., 15: 145-152, 1993.
- Le Roux, F., Audemard, C., Barnaud A. and Berthe, F.: DNA probes as potential tools for the detection of *Marteilia refringens*. Mar. Biotechnol., 1: 588-597, 1999.
- Lipart, C. and Renault T.: Herpes-like virus detection in infected *Crassostrea gigas* spat using DIG-labelled probes. J. Virol. Method. 101: 1-10, 2002.
- Machado, J., Coimbra, J., Castilho, F. and Sa, C.: Effect of Diflubenzuron on ell formation of the freshwater clam, *Anadonta cygnea*. Archs. Environ. Contam. Toxicol., 19: 35-39, 1990.
- Malouf, R., Keck, R., Maurer, D. and Epifanio, C.: Occurrence of gas-bubble disease in three species of bivalve molluscs. J. Fish. Res. Bd. Can., 29: 588-589, 1972.
- Mori, K.: Seasonal variation in physiological activity of scallops under culture in the coastal waters of Sannriku district, Japan, and a physiological approach of a possible cause of their mass mortality. Bull. Mar. Biol. Stn. Asamushi Tohoku Univ., 15: 59-79, 1975.
- Noel, R., Nicolas, J. L., Boulo, V., Mialhe, E. and Roch P.: Development of colony-blot Elisa assay using monoclonal antibodies to identify *Vibrio* P1 responsible for "brown ring disease": in the clam *Tapes philippinarum*. Aquaculture, 146: 171-178, 1996.
- Novoa, B., Ordas, M. C., and Figueras, A.: Hyperospores detected by RFTM in clam (*Rudi-*

- tapes decussatus*) tissues belong to two different protozoan organisms, *Perkinsus atlanticus* and *Perkinsus*-like organism. *Aquaculture*, 209: 11-18, 2002.
- Paillard, C., Alcox, K., and Ford, S. E.: Changes in hemolymph and extrapallial fluid parameters in the American oyster diseases *Crassostrea virginica* affected by the juvenile oyster disease. *Aquat. Living Resour.*, 9: 145-158, 1996.
- Paillard, C. and Maes, P.: The brown ring disease in the Manila clams, *Ruditapes philippinarum*. 1. Ultrastructural alternations of the periostracal lamina. *J. Invert. Pathol.*, 65: 95-101, 1995a.
- Paillard, C. and Maes, P.: The brown ring disease in the Manila clams, *Ruditapes philippinarum*. 2. Microscopic study of the brown ring syndrome. *J. Invert. Pathol.*, 65: 101-110, 1995b.
- Paillard, C. Maes, P. and Oubella, R.: Brown ring disease in clams. *Annu. Rev. Fish Dis.*, 4: 219-240, 1994.
- Raghukumar, C. and Lande, V.: Shell disease of rock oyster, *Crassostrea cucullata*. *Dis. Aquat. Org.*, 4: 77-41, 1988.
- Renault, T., Le Deuff, R.-M., Lipart, C. and Delsert, C.: Development of a PCR procedure for the detection of a herpes-like virus infecting oysters in France. *J. Virol. Method.*, 88: 41-50, 2000.
- Stokes, N. A., Siddall, M. E. and Burreson, E. M.: Detection of *Haplosporidium nelsoni* (Haplosporidia: Haplosporidiidae) in oysters by PCR amplification. *Dis. Aquat. Org.*, 23: 145-152, 1995.

Manuscript Received : March 16, 2005

Revision Accepted : April 14, 2005

Responsible Editorial Member : Jung-Woo Park
(Ulsan Univ.)