

## 양식 바지락, *Ruditapes philippinarum*의 *Perkinsus* sp. 검출현황과 현장조사

박성우<sup>†</sup> · 이경희 · 최동립<sup>\*</sup>

<sup>†</sup>군산대학교 · 목포지방해양수산청 · <sup>\*</sup>국립수산과학원

## Prevalence and Detection of *Perkinsus* sp. infection in the Manila clams, *Ruditapes philippinarum*

Sung-Woo Park<sup>†</sup>, Kyung-Hee Lee and Dong-Lim Choi<sup>\*</sup>

<sup>†</sup>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  
<sup>\*</sup>Pathology Team, National Fisheries Research and Development Institute, Busan 619-902, Korea

Hemacolor stain, histopathological observation and FTM incubation assay were applied to detect *Perkinsus* sp. infection in Manila clams (*Ruditapes philippinarum*) taken from culture beds at Tean and Gochang from March 2002 to August 2003. The prevalency was 100% in the clams from Gochang and 20~70% from Tean. Of the three methods, histopathological observation was the most effective to detect the infection. And the parasites was most abundant in gills.

When PCR assay was applied to detect *Perkinsus* sp. for four species of Mollusc such as manila clam, surf clam (*Macraa veneriformis*), oyster (*Crassostrea gigas*) and Thomas' rapa whelk (*Rapana venosa*) taken from Tean and Gochang from April to July 2004, the parasites were detected from all the species at the infection rates of 95%, 62%, 46.9% and 10% in that order. The infection rate was much higher in the species burrowing in the bottom sediments than those attaching on the tidal rock. The results suggest that *Perkinsus* sp. may affect almost all the molluscs inhabiting western coastal areas of Korea.

*Key words* : *Ruditapes philippinarum*, *Perkinsus* sp. PCR

원충류인 *Perkinsus* sp.는 이매패류의 폐사와 깊은 관계를 가지고 있는 것으로 알려져 있으며, 포르투갈과 스페인 (Azevedo, 1989, Figueras *et al.*, 1992, 1996; Sagrista *et al.*, 1995, 1996; Cigarría *et al.*, 1997), 일본 (Hamaguchi *et al.*, 1998)에 분포하는 바지락류 (*Ruditapes decussatus*, *R. philippinarum*)와 북중미 굴의 폐사원인으로 보고되고 있다 (Anderew, 1996; Burreson and Ronone Calvo, 1996; Soniat, 1996). 우리나라에서 양식되고 있는 바지락인 Manila clam에서도

*Perkinsus* sp.가 감염되어 결합조직과 상피세포 약화, 개체에 따라 농양을 형성하며 폐사하는 주요원인으로 추정되고 있다 (Choi and Park, 1997; Choi *et al.*, 1998; Park *et al.*, 1999).

*Perkinsus* sp.의 감염을 확인하기 위한 방법으로는 종래의 병리조직학적 방법과 Ray's fluid thioglycolate medium (FTM)에 조직편을 넣어서 배양하는 방법이 주로 사용되고 있다 (Chagot *et al.*, 1987; Navas *et al.*, 1992; Rordiguez and Navas, 1995). 그러나 이러한 방법은 시간이 많이 소모

<sup>†</sup>Corresponding Author : Sung-Woo Park, Tel : 063-469-1884,  
E-mail : psw@kunsan.ac.kr

될 뿐 아니라 결과에 주관적 분석이 가해지기 때문에 분자생물학적 기법을 사용한 Polymerase chain reaction법 (PCR법)이 개발되어 감염의 확인에 사용되고 있다 (Marsh *et al.*, 1995; Hamaguchi *et al.*, 1998).

본 연구에서는 서해안의 충남 태안과 전북 고창 지역에서 양식되는 바지락의 계절별 감염상황을 조직절편을 병리조직학적으로 검사하는 재래적 방법과 신속검출을 위한 Hemacolor 염색 및 FTM에 배양하여 hypnospore를 확인하는 방법과 병행하여 PCR법으로 *Perkinsus* sp.의 감염상황을 조사하였다. 또한 같은 지역에서 채취한 바지락, 동죽 (*Macrta veneriformis*), 굴 (*Crasostrea gigas*) 및 피빨고둥 (*Rapana venosa*)을 대상으로 현장조사한 결과를 보고한다.

## 재료 및 방법

### 패류

충남 태안군 피도와 전북 고창군 심원면 소재의 1개소를 선정하여 (Fig. 1), 각 지역에서가로 세로 1m 씩 정방형의 3개소 설치하여 수온과 비중을 측정하고 시료 채취시 마다 모두 채집하여 각장과 중량을 측정하였으며, 이와는 다른 곳에서 임의로 패류를 채취하여 얼음 상자에 채워서 실험실로 운반하여 사용하였다.

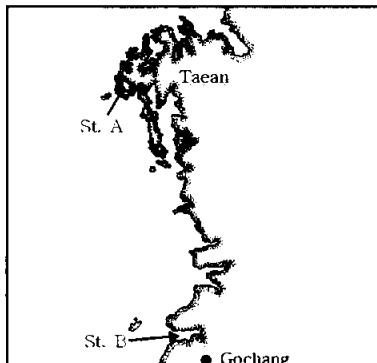


Fig. 1. Map showing two sampling stations (St. A in Taean and St. B in Gochang).

### 도말표본의 Hemacolor 염색

바지락의 패각근을 절단한 다음 각정 부위에서 발쪽으로 소화관 맹낭 정중앙을 잘라내어 여과지로 수분을 제거한 후 슬라이드 도말표본을 만들었다. 이 때 패각근은 별도로 잘라내어 같은 방법으로 도말표본을 만들었다. 슬라이드 도말표본은 공기 중에 건조시킨 다음 Hemacolor (Merck)로 제조사의 지시에 따라 염색한 후 봉입하여 400~800배의 현미경으로 기생충의 감염 여부를 확인하였다.

### 병리조직학적 검사

해부용 칼로 패각을 절단하여 패액을 버린 다음 10% 포르말린 해수액에 30분간 고정하여 조직을 굳힌 다음 소화관 맹낭의 정중앙을 잘라 양분하고 다시 두께를 5 mm 정도로 절단 후 Davidson액에 12~24시간 고정하였다. 이 때 부착근은 별도로 절단하여 같은 방법으로 고정하였다. 알콜로 탈수한 다음 상법에 따라 파라핀 포매한 후 4  $\mu$ m 의 조직절편을 만들어 H-E 염색 후 현미경하에서 관찰하였다.

### FTM 배양에 의한 검출

Ray(1966)의 방법에 따라 실시하였으며, 멸균한 Ray의 Fluid thioglycollate medium (FTM)에 생체시료를 넣고 실온 암흑에서 3~7일간 배양하여 시료액을 버리고 생체시료에 루골액을 떨어뜨린 후 청색의 감염 충체를 판정하였다. 루골액은 potassium iodide 6 g과 iodine 4 g을 증류수 100 ml에 녹여 저장액으로 하고, 사용할 때에는 저장액 1 ml를 증류수 25 ml로 희석시켜 사용하였다.

### PCR을 이용한 *Perkinsus* sp.의 검출

시료의 아가미를 절취하여 ACCUPREP kit (Bioneer Co.)를 사용하여 DNA를 추출하였다. Primers는 Pk5S (5'-cgt cga ata cac cgg at-3', 5'-tag tcc atc gtc acc a-3')를 사용하였다.

DNA는 DNA thermal cycler (GeneAmp PCR System 9700, PE Applied Biosystems, USA)를 이용하여 증폭시켰다. 즉 Tag DNA polymerase 1 U, dNTPs 250  $\mu$ M, Tris-HCl, pH 9.0 10 mM, KCl 40 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM과 dye가 혼합된 PCR Pre-Mix (AccuPower, Bioneer, Korea)에 primer pair 1  $\mu$ l, DW 16  $\mu$ l, DNA template 1  $\mu$ l를 첨가하여 혼합한 다음 조건에서 DNA를 증폭시켰다. PCR 조건은 initial denaturation (94 °C, 5min), denaturation (94 °C, 30sec), annealing (54 °C, 45sec)과 extension (72 °C, 45sec) 및 final extension (72 °C, 5min)의 조건으로 25 cycles 반복하였다. 증폭된 DNA 18  $\mu$ l를 TAE electrophoresis buffer (40 mM Tris, 20 mM acetate, 2 mM EDTA)에 용해시킨 1.5% agaros gel 상에서 전기영동하여 자외선 램프 하에서 밴드를 확인하였다.

### PCR 산물의 염기서열 확인

전기영동하여 확인한 PCR 산물에 해당되는 부분을 agarose gel에서 칼로 절취하여 잘라내어 QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen, USA)로 PCR 산물을 정제하였다. 정제된 DNA는 pGEM-T easy vector (Promega, pGEM-T easy vector system, USA)에 ligase buffer 5  $\mu$ l, pGEM-T easy vector 1  $\mu$ l, PCR 산물 2  $\mu$ l, T4 DNA ligase 1  $\mu$ l, Deionized water 1  $\mu$ l를 혼합하여 실온에서 벡터에 삽입하였다. PCR product를 함유한 plasmid를 JM109 (Takara, Japan) competent cell에 heat shock 방법으로 transformation하여 2% (w/v) X-gal 40  $\mu$ l, 20% (w/v) IPTG solution 7  $\mu$ l, ampicillin 50  $\mu$ l/ml이 포함된 LB agar plate에 도말하여 37 °C에서 18시간 배양한 후 PCR 산물 유전자가 삽입된 백색 집락을 선택하였다. 이 집락을 50  $\mu$ l/ml Ampicillin (Sigma, USA)이 첨가된 LB broth에서 대량 배양한 후 원심분리하여 수확한 시험균으로부터 plasmid DNA를 EcoRI으로 절단하여 inserted DNA의 유무와 크기를 확인하였다. 분리한 plasmid는 Sanger *et al.* (1977)의 방법으로 염기서열을 분석하였고, automatic

sequencer (ABI 377, USA)를 사용하여 T7 universal primer와 Sp6 universal primer로 염기서열을 분석하였다. 분석된 염기서열은 GeneBank의 Blast 검색을 통하여 이미 등록된 유전자의 염기서열과 비교하였다.

### 현장조사

2004년 4월부터 7월까지 태안과 고창 지역에서 서식하는 바지락, 동죽, 굴 및 피빨고둥의 아가미를 절취한 다음 DNA를 추출하여 PCR법으로 조사하였다. PCR은 아가미에서 ACCUPREP kit (Bioneer Co.)로 상법에 따라 DNA를 추출한 다음 DNA thermal cycler (GeneAmp PCR System 9700, PE Applied Biosystems, USA)에 증폭시킨 후 전기영동하여 자외선 램프 하에서 밴드를 확인하였다.

### 결과 및 고찰

바지락 (*R. philippinarum*)은 우리나라 패류 생산량의 큰 비중을 차지하는 종으로 1912년부터 경기도에서 양식이 시작된 이래 지속적인 생산 증가를 나타내었으나 '90년대 이후 서식환경의 악화 및 밀식으로 인하여 그 생산량이 급격히 감소하고 있는 실정이다. 또한 여름철 고수온기 대량폐사가 자주 발생하여 바지락 생산에 큰 타격을 주고 있는데, 이것은 고수온기에 의한 생리적 스트레스, 양식환경의 악화 및 *Perkinsus* sp. 감염으로 인하여 폐사한 것으로 보고되고 있다.

양식장 환경과 바지락의 성장은 2001년 12월과 2002년 3월, 6월, 8월, 11월, 2003년 1월 3월 6월 및 9월 조사지역의 수온은 Table 1. 에 표시한 것처럼 태안이 각각 7.0 °C, 11.0 °C, 25.0 °C, 28.0 °C, 10.5 °C, 5.5 °C, 13.5 °C, 25.0 °C, 27.0 °C 이었으며, 고창 지역의 수온은 각각 5.4 °C, 15.0 °C, 24.0 °C, 26.0 °C, 8.8 °C, 1.6 °C, 6.5 °C, 22.0 °C, 25.0 °C 이었다. 한편 조사기간의 비중은 태안 지역이 각각 1.027, 1.026, 1.022, 1.009, 1.257, 1.026, 1.025, 1.026, 1.008 이었으며, 고창 지역은 각각

**Table 1.** Water temperature, salinity and shell size of the clams in two culturing beds for Manila clams

Date	Locations					
	Taeam			Gochang		
	WT(°C)	Salinity	Shell size (mm)	WT(°C)	Salinity	Shell size (mm)
Dec. 2001	7.0	1.027	26.59±3.14	5.4	1.025	31.34±3.36
Mar. 2002	11.0	1.026	27.30±2.86	15.0	1.024	32.25±3.67
Jun.	25.0	1.022	28.39±2.29	24.0	1.028	33.87±3.84
Aug.	28.0	1.009	28.27±2.62	26.0	1.017	34.58±3.25
Nov.	10.5	1.257	28.95±2.50	8.8	1.025	35.87±3.16
Jan. 2003	5.5	1.026	29.39±2.90	1.6	1.026	30.34±2.85
Mar.	13.5	1.025	30.57±2.18	6.5	1.026	34.59±3.11
Jun.	25.0	1.026	31.37±2.02	22.0	1.020	33.24±1.61
Sep.	27.0	1.008	32.24±2.47	25.0	1.018	33.89±2.01

1.025, 1.024, 1.028, 1.017, 1.025, 1.026, 1.026, 1.020, 1.018 이었다. 2001년 12월과 2002년 3월, 6월, 8월, 11월, 2003년 1월, 3월, 6월 및 9월 태안 지역의 각장은 각각 26.59±3.14 mm, 27.30±2.86 mm, 28.39±2.29 mm, 28.27±2.62 mm, 28.95±2.50 mm, 29.39±2.90 mm, 30.57±2.18 mm, 31.37±2.02

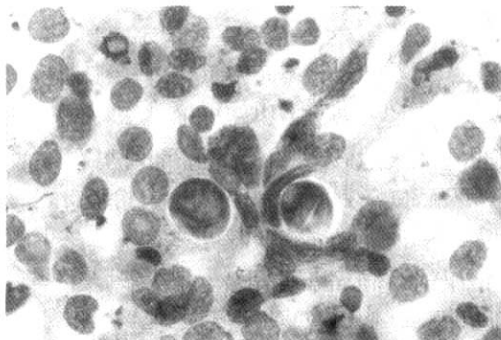


Fig. 2. Trophozoites of *Perkinsus* sp. stained with hemacolor showing an eccentric nucleus and a characteristic large vacuole in the cytoplasm. ×400.

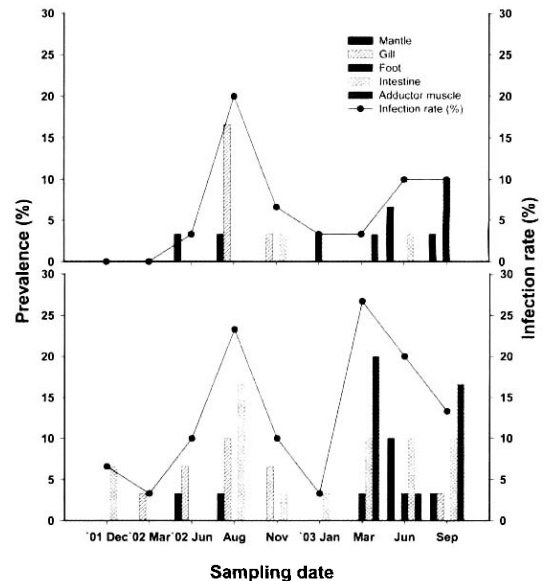


Fig. 3. Seasonal prevalence (%) of *Perkinsus* sp. in the organ stamps of the clams (n=30) stained with hemacolor solution. Clams were taken from the culturing beds in Taeam (upper) and Gochang (lower) from Nov. 2002 to Sep. 2003.

mm 그리고  $32.24 \pm 2.47$  mm 이었다. 고창지역은 2001년 12월과 2002년 3월, 6월, 8월, 11월, 2003년 1월, 3월, 6월 및 9월의 고창지역의 각장은 각각  $31.34 \pm 3.36$  mm,  $32.25 \pm 3.67$  mm,  $33.87 \pm 3.84$  mm,  $34.58 \pm 3.25$  mm,  $35.87 \pm 3.16$  mm,  $30.34 \pm 2.85$  mm,  $34.59 \pm 3.11$  mm,  $33.24 \pm 1.61$  mm 그리고  $33.89 \pm 2.01$  mm로 고창 지역의 성장이 양호하였다.

바지락의 *Perkinsus* sp. 감염을 관찰하기 위한 도말표본의 Hemacolor 염색시 외투막, 아가미, 발, 소화관 및 패각근에서 1개의 공포가 한쪽으로 치우쳐 있는 영양체가 발견되었다 (Fig. 2). 조직별 감염율을 보면 태안 지역은 아가미, 외투막 및 발에서 감염율이 높았고, 고창 지역은 아가미, 장 및 패각근에서 높게 나타났는데 아가미는 2 지역 모두 높은 감염율을 보였다. 한편 월별 감염율은 여름철에는 높고 겨울철에는 낮은 경향이 있었지만 고창지역은 수온이 상승하기 전인 초봄에도 감염율이 높았다 (Fig. 3).

Hemacolor 염색법은 비교적 단시간에 간단하게 검사할 수 있는 장점이 있지만, 감염초기에는 검출이 용이하지 않기 때문에 (Choi *et al.* 1998), FTM 배양법이나 병리조직학적 검사에 비해 효율성이 낮았지만 신속진단으로는 유용한 방법이라 사료된다.

병리조직학적 검사에서 *Perkinsus* sp.의 영양

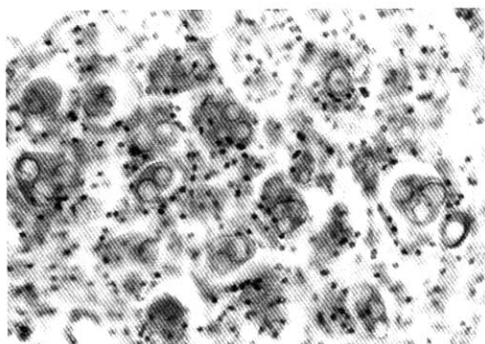


Fig. 4. Trophozoites of *Perkinsus* sp. in the mantle of the Manila clam detected with the conventional histopathological method. Note some trophozoites with a large eccentric vacuoles in the connective tissue. H-E,  $\times 400$ .

체는 아가미, 발, 외투막, 소화관 및 부착근에서 모두 검출되었으며, 각 기관의 결합 조직내에 1~12 cells의 trophozoites가 에오진호성과 무염색의 원형 또는 선상의 cyst 유사 구조물 내에 집합체를 이루고 있었다 (Fig. 4). 지역별 감염율을 보면 태안 지역은 2002년 8월에 처음으로 검출되기 시작하여 11월에 최고치에 달한 다음 점차 감소하기 시작하였지만, 이듬해 3월부터 다시 상승하기 시작하였다. 고창 지역은 2002년부터는 계절 및 월별에 관계없이 항상 100% 검출되었다. 검출 장기별로 보면 태안 지역은 조사 초기에는 아가미와 소화관에서의 검출율이 높았지만 점차 외투막과 발에서의 검출율도 높아졌다. 고창 지역은 아가미, 외투막 및 소화관에서의 검출율이 높은 경향이 있었다 (Fig. 5).

병리조직학적 검사는 조직절편 제작에 시간이 소요되는 단점이 있지만, 각 조직별 감염율을 조사한 결과 Hemacolor 염색법이나 FTM 배양법보다 감염율이 높게 나타나 감염상황 특히 감염율

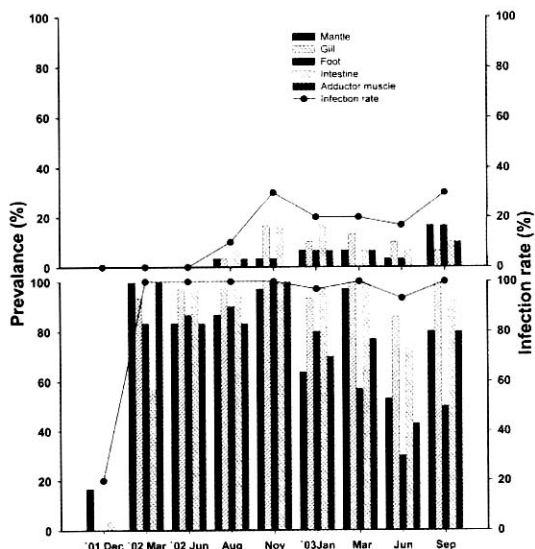


Fig. 5. Seasonal prevalence (%) of *Perkinsus* sp. in the tissues of clams (n=10) detected with the conventional histopathological method. The same clams were used in Fig. 4. Upper, Taean; lower, Gochang.

을 조사하는 방법으로는 가장 효과적인 방법으로 판단되었다. 또한 감염율이 비교적 낮은 태안 지역은 바지락 조직별로 영양채 관찰이 곤란한 경우도 있었지만, 감염율이 높은 고창 지역에서는 거의 모든 기관에서 비슷하게 검출되었다. Hamaguchi *et al.* (1998)은 심한 감염을 나타내는 개체에서는 육안으로도 조직표면에 흰반점으로 관찰될 정도라고 보고하였다.

조직을 절취하여 FTM에 배양한 다음 루골액을 떨어뜨리면 청색, 감청색 또는 녹색으로 염색되는 원형의 층체 hypnospore가 발견되었으며 (Fig. 6), 2 지역에서 채취한 바지락 10 개체의 월별 및 조직별 검출율은 Fig. 7에 나타내었다. 기생충의 검출율은 지역적으로는 고창 지역이 태안 지역에 비해 훨씬 높았으며, 부위별로는 외투막, 아가미, 폐각근에서의 검출율이 높았고, 그 중에서 아가미의 검출율이 항상 높았다. 또 계절별로는 태안 지역이 3월부터 감염율이 높아져서 저수온기에 낮아지는 경향을 보였지만 고창 지역에서는 연중 100% 감염되어 있는 것으로 나타났다.

Rodriguez and Navas (1995)는 감염이 확인된 개체에서 혈림프, 아가미 및 내장조직을 FTM에 배양한 결과 혈림프는 69%, 아가미는 90%, 그 외 조직은 95%가 양성반응을 나타내었다. 또한,

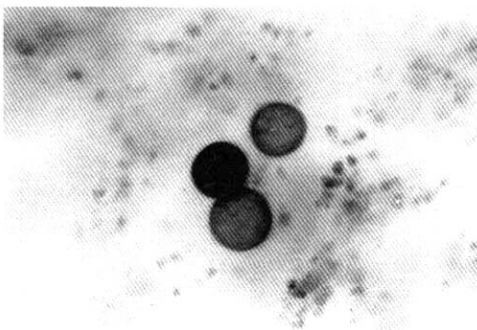


Fig. 6. Hypnospores of *Perkinsus* sp. after incubation of Manila clam mantle in Ray's fluid thioglycolate medium (RFTM). The spores are stained large dark blue cells with Lugol's iodine.  $\times 400$ .

음성개체의 FTM 배양시 혈림프, 아가미 및 나머지 조직에 양성반응을 나타내어 FTM 배양법으로 진단하기에 가장 적합한 조직은 아가미라고 주장하였다. 본 연구에서도 외투막, 아가미, 폐각근에서의 검출율이 높았으며, 그 중에서 아가미의 검출율이 항상 높게 나타나 이들의 결과와 일치하였다.

FTM 배양법 (Ray, 1966)은 *Perkinsus* sp. 진단의 표준방법으로 이용되고 있으나 (Choi *et al.*, 1989; Perkins, 1996; Gauthier and Fisher, 1990), Almeida *et al.* (1999)은 해양에 서식하는 와편모조류인 *Alexandrium* sp., *Ceratium* sp. 등도 양성반응을 나타내는 것으로 보고하였다. 그러나 조직에 따라 많은 차이가 있다는 것이 증명되었고, 현재에도 가장 많이 활용되고 있다.

고창과 태안 지역에서 채취한 바지락을 Hemacolor 염색, 병리조직학적 방법 및 Ray의 조직배양법에 의한 검사 결과를 종합하여 2지역의 월별 감염율을 표시하면 Fig. 8과 같다. 즉 고창 지역은 조사를 시작한 2001년 12월에는 감

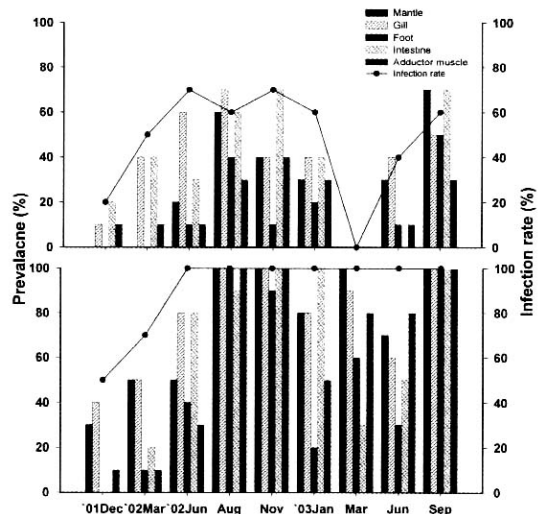


Fig. 7. Seasonal prevalence (%) of *Perkinsus* sp. in the clams (n=10) tissues from Taean (Upper) and Gochang (lower). The organs of ten clams from each location were dissected out and the prevalence was determined by standard Ray's FTM assay.

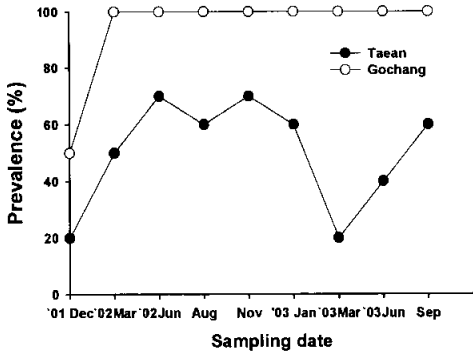


Fig. 8. Seasonal prevalence (%) of *Perkinsus* sp. in the clams from Taean and Gochang from Dec. 2001 to Sep. 2003.

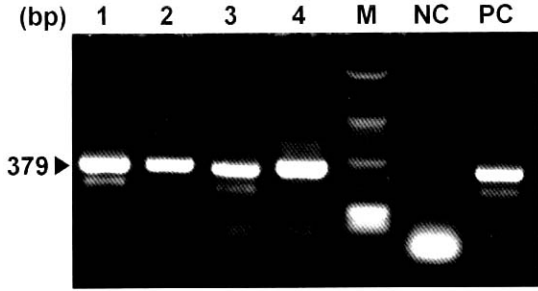


Fig. 9. Detection of *Perkinsus* sp. in clam by PCR amplification. The specimens were taken from the costal area of Taean and Gochang. 1, surf clam (*Mectra veneriformis*); 2, Manila clam (*Ruditapes philippinarum*); 3, Oyster (*Crasostrea gigas*); 4, Thomas's rapa whelk (*Rapana venosa*); M, size marker; NC, negative control; PC, positive control.

```

P. atlanticus: 1      cgtcgaatacacccggatcccatccgaactccgaagttaagcggcgcaaggcccggatagt 60
                   |||
Sbjct:           17      cgtcgaatacacccggatcccatccgaactccgaagttaagcggcgcaaggcccggatagt 76

P. atlanticus: 61      actggggtgggggaccgccgggaagtccttagggtgctgctggtctcttttaaatcgc 120
                   |||
Sbjct:           77      actggggtgggggaccgccgggaagtccttagggtgctgctggtctcttttaaatcgc 136

P. atlanticus: 121     actcatggcttgtgcatgctgcaagccccggagccccctggacaatggtatcccagct 180
                   |||
Sbjct:           137     actcatggcttgtgcatgctgcaagccccggagccccctggacaatggtatcccagct 196

P. atlanticus: 181     caacaacgagcaacagtgctatggcaagtagtcactagagagccaagtcgacaatctct 240
                   |||
Sbjct:           197     caacaacgagcaacagtgctatggcaagtagtcactagagagccaagtcgacaatctct 256

P. atlanticus: 241     acaacattgtccaaggggaaagggggcgcggaagttgacctgcagcagagggaaaag 300
                   |||
Sbjct:           257     acaacattgtccaaggggaaagggggcgcggaagttgacctgcagcagagggaaaag 316

P. atlanticus: 301     atgctgagtttgtgacccccactttgocacttggogaagttgacttgcaggcgagg 360
                   |||
Sbjct:           317     atgctgagtttgtgacccccactttgocacttggogaagttgacttgcaggcgagg 376

P. atlanticus: 361     gtaaaagatgctatggttggttgcggacca 390
                   |||
Sbjct:           377     gtaaaagatgctatggttggttgcggacca 406
    
```

Fig. 10. Partial sequence of *Perkinsus atlanticus* 5S ribosomal RNA. The sequence of isolated parasite by this study are same with the sequence of *Perkinsus atlanticus* 5S ribosomal RNA in Genebank (Accession number AF140295).

염율이 50% 였으나 2002년 3월부터 2003년 9월 까지 100%가 감염되었다. 한편 태안 지역은 2001년 12월 20%, 2002년 3월은 50%, 2002년 6월 70%, 동년 8월은 60%, 11월에는 70%, 2003년 1월에 60%, 3월에는 20%, 6월에는 40%, 6월에는 60%로 동계에는 감염율이 낮아지고 하계에는 감염율이 높은 경향을 나타내었다.

바지락의 아가미에서 분리한 template DNA로부터 Pk5S primer를 이용한 PCR 결과 379bp의 산물이 얻어졌다 (Fig. 9). 검출된 PCR 산물의 염기서열 분석에서는 Pk5S primer에 의한 산물은 GeneBank에 등록된 Accession number AF140295인 *Perkinsus atlanticus*의 5S ribosomal RNA gene과 100% 상동성을 나타내었다 (Fig. 10).

2004년 4월부터 7월까지 태안과 고창 지역에 분포하고 있는 바지락, 동족, 굴 및 피빨고둥의 아가미에서 DNA를 추출하여 PCR 반응을 시킨 결과 Fig. 9와 같이 시료로 사용한 모든 패류에서 *Perkinsus* sp.가 검출되었다. 각 패류에서의 검출상황은 Fig. 11에 나타낸 것처럼 태안 지역

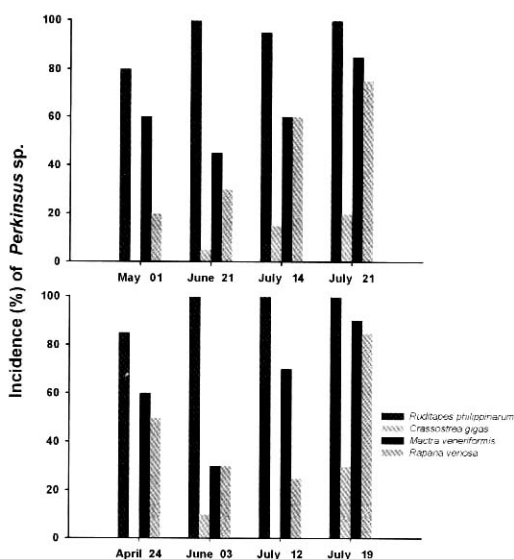


Fig. 11. Incidence (%) of *Perkinsus* sp. detected by PCR amplification. The specimens were taken from the coastal area of Taean (upper) and Gochang (lower). Twenty individuals were used each trial.

에서 채집한 바지락은 80~100%, 동족은 45~85%, 굴은 0~20%, 피빨고둥은 20~75% 감염된 것으로 나타나, 바지락의 감염율이 가장 높았고 이어서 동족, 피빨고둥, 굴 순으로 감염율이 높았다. 한편 고창 지역에서 채집한 시료의 경우 바지락은 85~100%, 동족은 30~90%, 굴은 0~30%, 피빨고둥은 25~85%로 태안과 마찬가지로 바지락의 감염율이 가장 높게 나타났고 동족, 피빨고둥 및 굴의 순으로 감염율이 높아 태안에서 채집한 시료의 감염상황과 유사하였다. PCR법으로 조사한 2 지역의 평균감염율은 바지락이 95.0%, 동족은 62.5%, 피빨고둥은 46.9%, 굴은 10.0% 순으로 나타났다. 이러한 감염율은 패류의 서식환경과 관련이 있음을 알 수 있는데 갯벌에서 서식하는 바지락과 동족이 암반에 부착하여 서식하는 굴과 피빨고둥에 비해 감염율이 높게 나타났다. 이러한 경향으로 보아 서해안에 서식하는 거의 모든 패류에 *Perkinsus* sp. 감염이 만연되어 있으며, 갯벌에 서식하는 패류일수록 감염율이 높을 것으로 추정된다.

본 연구의 결과를 종합하면 *Perkinsus* sp.의 감염을 조사는 종래의 병리조직학적 검사가 가장 효과적이며, 기관별로는 아가미가 가장 효율적이라 판단된다. 또 태안과 고창 지역 모두 감염되어 있었으며, 감염율이 낮은 태안에서는 동계에 감염율이 낮아지는 경향이 있었지만, 심한 감염이 확인된 고창 지역은 계절적 변화와는 관계없이 언제나 감염율이 높았다. 또한 바지락, 동족, 굴 및 피빨고둥을 대상으로 실시한 PCR법의 경우 검출율이 높았으며, 다른 패류에서도 감염을 확인할 수 있는 유용한 방법으로 판단되었다.

## 요 약

2002년 3월부터 2003년 9월까지 태안과 고창 지역에서 채취한 바지락을 Hemacolor 염색, 병리조직학적 방법 및 FTM 배양법으로 *Perkinsus* sp.의 감염율을 조사하였다. 검출방법에 따라 감염율에 차이가 있었지만, 고창 지역은 100%로



계절적 변화가 없었다, 그러나 태안 지역은 동계에는 낮아지고 하계에는 감염율이 증가하는 경향으로 20~70%의 감염율을 나타내었다. 조사 방법 중에서 병리조직학적 검사방법이 감염율이 가장 높아 효과적인 조사 방법이었으며, 검사 조직으로는 아가미를 사용한 경우가 가장 감염율이 높았다.

2004년 4월부터 7월까지 태안과 고창 지역에 분포하고 있는 동죽, 바지락, 굴 및 피빨고둥의 아가미에서 DNA를 추출하여 PCR 반응을 시킨 결과 모든 패류에서 *Perkinsus* sp.가 검출되었다. 2 지역의 평균 감염율은 바지락 95.0%, 동죽 62.5%, 피빨고둥 46.9%, 굴 10.0%로 갯벌에 서식하는 종이 암반에 부착하여 서식하는 종보다 감염율이 높게 나타났다. 이러한 결과로 보아 서해안에 서식하는 거의 모든 패류에 *Perkinsus* sp.가 감염되어 있을 것으로 추정된다. 또한, PCR법의 경우 다른 패류에서도 감염을 확인할 수 있는 유용한 방법으로 판단되었다.

## 감사의 글

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

## 참고 문헌

- Almeida, M., Berthe, F., Thebault, A. and Dinis, M. T.: Whole clam culture as a quantitative diagnostic procedure of *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) in clams *Ruditapes decussatus*. *Aquaculture*, 177: 325-332, 1999.
- Andrew, J. D.: History of *Perkinsus marinus*, a pathogen of oysters in Chesapeake Bay 1950~1984. *J. Shellfish Res.*, 15: 13-16, 1996.
- Azevedo, C.: Fine structure of *Perkinsus atlanticus* n sp. (Apicomplexa, Perkinsea) parasite of the clam *Ruditapes decussatus* from Portugal. *J. Parasitol.*, 75: 627-635, 1989.
- Burreson, E. M. and Ragone Calvo, L. M.: Epizootiology of *Perkinsus marinus* disease of oyster in Chesapeake Bay, with emphasis on data since 1985. *J. Shellfish Res.*, 15: 17-34, 1996.
- Chagot, D., Comps M., Boulo, V., Ruano, F. and Grizel, H.: Histological study of a cellular reaction in *Ruditapes decussatus* infected by a protozoan. *Aquaculture*, 67: 260-261, 1987.
- Cigarria, J., Rodriguez, C. and Fernandes, J. M.: Impact of *Perkinsus* sp. in Manila clams, *Ruditapes philippinarum* beds. *Dis. Aquat. Org.*, 29: 117-120, 1997.
- Choi, D.-L., Kwon, J.-N. and Park, S.-W.: Infection and rapid detection of *Perkinsus* sp. in cultured baby neck clam, *Ruditapes philippinarum* from western coast of Korea. *Kor. J. Fish Pathol.*, 11: 69-76, 1998.
- Choi, K. S. and Park, K. I.: Report of the occurrence of *Perkinsus* sp. in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum* in Korea. *J. Aaqucult.*, 9: 227-237, 1997.
- Choi, K. S., Wilson, E. A., Lewis, D. H., Powell, E. N. and Ray, S. M.: The energetic cost of *Perkinsus marinus* parasitism in oysters: quantification of the thioglycolate method. *J. Shellfish Res.* 8: 125-131, 1989.
- Gauthier, J. D and Fisher, W. S.: Hemolymph assay for diagnosis of *Perkinsus marinus* in oysters *Crassostrea virginica*. *J. Shellfish Res.*, 9: 367-371, 1990.
- Figueras, A., Robledo, J. A. F. and Novoa, B.: Occurrence of haplosporidian and *Perkinsus*-like infection in carpet-shell clams, *Ruditapes decussatus* (Linnaeus,

- 1758) of the Rio de Vigo (Galicia, NW, Spain). *J. Shellfish Res.*, 11: 377-382, 1992.
- Hamaguchi, M., Suzuki, N., Usuki, H. and Ishioka, K.: *Perkinsus* protozoan infection in short-neck clam *Tapes (Ruditapes philippinarum)* in Japna. *Fish Pathol.*, 33: 473-480, 1998.
- Marsh, A. G., Gauthier, J. D., and Vasta, G. R.: A semiquantitative PCR assay for assessing *Perkinsus marinus* infections in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *J. Parasitol.*, 81: 577-583, 1995.
- Navas, J. I., Castillo, M.C., Vera, P. and Ruiz-Rico, M.: Principal parasites observed in clams, *Ruditapes decussatus* (L.), *Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeve), *Venerupis pulchella* (Montagu) and *Venerupis aureus* (Gmelin), from the Huelva coast (S. W. Spain). *Aquaculture*, 107: 193-199, 1992.
- Park, K. I., Choi, K. S., and Choi, J. W.: Epizootiology of *Perkinsus* sp. found in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum* in Komsoe bay, Korea. *J. Kor. Soc.*, 32(3): 303-309, 1999.
- Perkins, F. O.: The structure of *Perkinsus marinus* (Mackin, Owen and Collier, 1950) Levine, 1978 with comments on taxonomy and phylogeny of *Perkinsus* spp. *J. Shellfish Res.*, 15: 67-87, 1996.
- Ray, S. M.: A review of the culture method for detecting *Dermocystidium marinum* with suggested modifications and precautions. *Proc. Natl. Shellfish Assoc.*, 54: 55-69, 1966.
- Rodriguea, F. and Navas, J. I.: A comparison of gill and hemolymph assays for the thioglycolate diagnosis of *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) in clams, *Ruditapes decussatus* (L.) and *Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeve). *Aquaculture*, 132: 145-152, 1995.
- Sagrita, E., Durfort, M. and Azevedo, C.: *Perkinsus* sp. (Phylum Apicomplexa) in Mediterranean clam *Ruditapes semidecussatus*. Ultrastructural observations of the cellular response of the host. *Aquaculture*. 132: 153-160, 1996.
- Sagrita, E., Durfort, M. and Azevedo, C.: Ultrastructural data on the life cycle of the parasite, *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa), on the clams, *Ruditapes philippinarum*, in the Mediterranean. *Sci. Mar.*, 60: 283-288, 1996.
- Soniat, T. M.: Epizootiology of *Perkinsus marinus* disease of eastern oysters in Gulf of Mexico. *J. Shellfish Res.*, 15: 35-43, 1996.

---

Manuscript Received : March 16, 2005

Revision Accepted : April 11, 2005

Responsible Editorial Member : Sung-Ju Jung  
(Yosu Univ.)