

퍼킨서스편모충 (*Perkinsus olseni*) 의 휴면포자와 유주자 형성에 수온과 염분이 미치는 영향

김현중, 방인석¹, 박경일

군산대학교 해양과학대학 수산생명의학과

¹호서대학교 자연과학대학 생명과학과, 기초과학연구소

Effects of water temperature and salinity on the formation of prezoosporangia and zoosporangia of the protozoan parasite, *Perkinsus olseni*, isolated from the Manila clam *Ruditapes philippinarum* on the west coast of Korea

Hyon-Joong Kim, In-Seok Bang¹, and Kyung-Il Park

Department of Aquatic Life Medicine, College of Ocean Science and Technology, Kunsan National University, Gunsan 573-701, Republic of Korea

¹Department of Biological Science and the Research Institute for Basic Sciences, Hoseo University, Asan 336-795, Republic of Korea

ABSTRACT

The genus *Perkinsus* are parasitic protozoans that cause massive inflammatory responses in infected marine shellfish worldwide. This ultimately leads to great economic losses. This study examined the effects of water temperature and salinity on the formation of prezoosporangia and zoosporangia in order to understand the ecology of the pathogens. The induction of prezoosporangia from trophozoites occurred readily at higher water temperatures (20 and 30°C) and they had larger diameters than those incubated at lower temperatures (4 and 10°C). The formation of zoospores in prezoosporangia was also strongly influenced by water temperature and salinity; prezoosporangia exposed to water temperatures of 20 and 30°C and salinities of 20 and 30 ppt had high rates of zoosporulation, while no or very low rates of zoosporulation were observed at temperatures below 10°C or salinity below 10 ppt. Our data will be useful for the development of strategies to counter *P. olseni* proliferation in Korean waters.

Key Words: *Ruditapes philippinarum*, *Perkinsus olseni*, zoosporulation, salinity, water temperature

서론

퍼킨서스편모충 속 생물들은 해산 연체동물 체내에 기생하는 원생동물로서 북미, 유럽, 오세아니아 및 아시아 등지에서 상업적으로 중요한 굴, 바지락, 가리비 등의 폐사를 일으키는 기생생물로 알려져 있다 (Kinne, 1983). 현재 *Perkinsus*

spp.의 분류학적 체계는 명확히 정립되어 있지 않으나 최근의 분자생물학적 방법을 이용한 분석에 의하면 퍼킨서스편모충 문, 퍼킨서스편모충 강, 퍼킨서스편모충 목, 퍼킨서스편모충 과, 퍼킨서스편모충 속으로 분류 되는 것으로 보고되고 있다 (Norén *et al.*, 1999; Choi *et al.*, 2005). 현재까지 약 70여 종의 해산연체동물에서 *P. marinus*, *P. olseni*, *P. chesapeakei* (= *P. andrewsi*), *P. mediterraneus*, *P. qugwadi* 등 5종이 검출되고 있으며, 특히 이들 중 *P. olseni* 는 숙주 특이성이 높지 않은 종으로 알려져 있다 (Perkins, 1996; Villalba *et al.*, 2004). 국내에서는 Choi and Park (1997) 에 의해 바지락과 살조개에서 검출되었으며, 분자생물학적 유사성을 검사한 결과 호주와 유럽에서 발견된 *P. olseni*

Received June 15, 2010; Revised July 5, 2010; Accepted July 19, 2010

Corresponding author: Kyung-Il Park

Tel: +82 (63) 469-1882 e-mail: kipark@kunsan.ac.kr

1225-3480/24356

와 동일종으로 조사되었다 (Park *et al.*, 2006). 특히 바지락의 경우 우리나라 남·서해안에 서식하는 대부분의 개체군이 매우 높은 감염도와 감염율을 보이고 있어 이 지역에서 발생하는 바지락 대량 폐사와의 연관성에 대한 조사가 진행되고 있다 (Park and Choi, 2001).

지금까지 알려진 *Perkinsus* 속 기생충의 생활사는 숙주 내에서는 영양체 단계 (trophozoites 또는 schizogony) 로 존재하며, 이분법에 의해 증식한다. 이때 숙주에 의한 방어 기작의 일환으로 영양체 주변에 다수의 혈구가 집중된 결절이 관측되기도 한다. 한편 숙주가 사망함으로써 조직이 분해되어 무산소 환경이 형성되면 성숙한 영양체는 그 크기가 증가되면서 휴면포자 단계 (hypnospore 또는 prezoosporangium) 가 되며, 이후 해수에 유리되면 유주자 형성과정 (zoosporulation) 을 거쳐 운동성이 강한 편모를 가진 유주자 (zoospore) 가 된다. 이들은 해수 중으로 방출되면서 새로운 숙주를 감염시키는 것으로 알려져 있다 (Auzoux-Bordenave *et al.*, 1995). 새로운 숙주로 전이된 유주자는 편모와 apical complex가 소실되면서 다시 미숙한 영양체로 변이되는 것으로 추정되고 있다 (Perkins, 1996).

Perkinsus spp.의 시공간적 분포는 수온과 염분의 영향을 직접적으로 받는다 (Villalba *et al.*, 2004). 여러 환경 요인 중 고수온과 고염분에서 감염율과 감염도의 증가가 실험실 환경과 실제 숙주 서식지에서의 연구를 통하여 관찰되고 있으며, 이러한 현상은 *Perkinsus* spp.의 분포를 결정짓는 중요한 요인으로 분석되고 있다. 그러나 이와 같은 결과의 대부분은 미국 대서양에 분포하는 대서양굴 (*Crassostrea virginica*) 을 숙주로 삼는 *P. marinus*를 조사함으로써 얻은 결과이며, 타 *Perkinsus* spp.의 경우 이들의 분포에 미치는 해양환경에 관한 연구는 빈약한 실정이다. 특히 우리나라 바지락에서 검출되는 *P. olsenii*의 경우 유럽과 호주의 *P. olsenii*나 미국 대서양의 *P. marinus*와 비교하여 지리적 원근성을 감안할 때 생태학적 특성의 규명은 매우 중요하다.

이와 관련하여 Ahn and Kim (2001) 은 우리나라 바지락에서 분리된 *Perkinsus* sp.의 경우 *P. marinus*와 마찬가지로 고수온과 고염분의 환경에서 유주자 형성이 보다 조기에 나타남을 보고한 바 있으며, 특히 겨울철과 여름철에 각각 형성된 휴면포자의 유주자 형성과 방출은 수온에 대한 의존성이 상이하게 나타남을 보고하였다. 따라서 본 연구는 우리나라 서해안에 분포하는 퍼킨서스편모충의 생활사 중 감염에 중요한 역할을 하는 휴면포자와 유주자 형성에 미치는 수온과 염분의 영향을 조사함으로써 이 기생충의 생태학적 특성을 조사하고 이를 바탕으로 구제 대책을 수립하는데 기초 자료로 활용하기 위하여 실시되었다.

재료 및 방법

1. 시료

본 연구에 사용된 *P. olsenii*의 숙주인 바지락은 충청남도 태안군 남면 신온리에서 2010년 4월에 채집하여 Ice box에 냉장보관 하여 실험실로 옮겨 분석하였다.

2. 휴면포자 형성에 수온이 미치는 영향

휴면포자의 유도는 15 ml conical tube에 Wilson-Ormond *et al.* (1993) 의 방법에 따라 제조된 Ray's Fluid Thioglycollate Medium (RFTM) 10 ml, Chloramphenicol solution과 Nystatin solution 20 μ l, 바지락 아가미 1 g을 넣고 각각 4, 10, 20, 30 $^{\circ}$ C의 암실에서 배양 하면서 배양 후 1, 2, 4, 7, 14일 째 휴면포자의 발생과 성장을 관찰하였다. 휴면포자의 확인은 RFTM에서 배양된 시료를 Lugol's Iodine으로 염색한 후 2M NaOH로 녹여 광학현미경을 통해 관찰하는 방법을 사용하였다. 휴면포자의 직경은 이미지 분석 프로그램 (Motiv Images Plus 2.0) 을 이용하여 측정하였다. 매 관찰 시 휴면포자 100개를 무작위로 선택하여 측정하였다.

3. 유주자 형성 중 각 세포분열 단계별 소요시간

유주자 형성을 유도하기 위하여 바지락 아가미를 RFTM에 넣고 25 $^{\circ}$ C의 암실에서 2일간 배양하였다. RFTM에서 꺼낸 아가미 조직은 면도칼을 이용하여 잘게 분쇄한 후 100 μ m와 50 μ m의 망목을 통과시켜 바지락 아가미 조직으로부터 휴면포자를 순수 분리하였다. 순수분리된 휴면포자는 Petri dish에 30 ppt 로 조절된 여과멸균 해수 10 ml와 섞은 후 20 $^{\circ}$ C의 암실에서 배양 하면서 이들 중 1개의 휴면포자만을 선택하여 세포분열부터 유주자 방출 종료 시 까지 1시간 간격으로 위상차 현미경 (Olympus) 을 이용하여 유주자 형성 과정에서 나타나는 각 세포분열 단계의 소요 시간을 측정하였다.

4. 유주자 형성 과정에 수온과 염분이 미치는 영향

수온이 유주자 형성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 3.과 같은 방법으로 휴면포자를 순수분리 한 후, Petri dish에 30 ppt로 조절된 멸균여과 해수 10 ml에 휴면포자 100 μ l를 넣고 4, 10, 20, 30 $^{\circ}$ C의 암실에서 배양하였다. 한편, 염분이 유주자 형성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 5, 10, 20, 30 ppt로 조절된 멸균여과 해수를 Petri dish에 각각 10 ml씩 넣고 순수 분리한 휴면포자 100 μ l를 첨가 한 후 20 $^{\circ}$ C의 암실에서 배양하였다. 그 후 무작위로 약 100 여개의 휴면포자를 선택하여 각 세포의 세포발달 단계 (휴면포자, 핵 비대, 2 세포기, 4 세포기, 8 세포기, 16 세포기, 32 세포기, 64 세포기 이상, 유주자 방출 중, 방출 종료) 를 결정하였다. 이 때 수온에 따른 유주자 형성과정 측정은 배양 후 3일간은 3시간 간격,

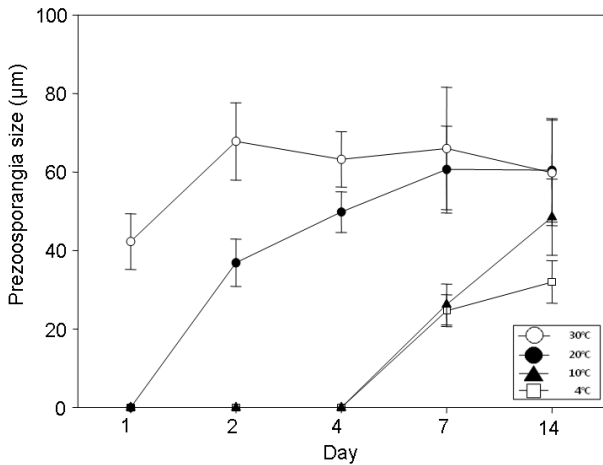


Fig. 1. Growth of prezoosporangia incubated at different water temperature for 14 days.

4일째부터는 12시간 간격으로 9일간 측정하였으며, 염분에 따른 유주자 형성은 배양 개시 후 4일간은 3시간 간격, 5일째부터는 6시간 간격으로 15일간 측정하였다.

결과 및 고찰

실험 결과 퍼킨스스핀모충 휴면포자의 형성은 수온의 영향을 크게 받는 것으로 나타나 수온이 높을수록 영양체에서 휴면포자로의 전환이 빨리 일어났고, 유도된 휴면포자의 직경 역시 큰 것으로 조사되었다 (Fig. 1). 30°C에서 배양된 영양체의 경우 배양 1일 후 휴면포자로 유도 되었으며, 이 때 평균 직경은 42.2 µm 였고, 이 크기는 조사 종료 시까지 유지됨으로써 배양 2일 후 최대 직경까지 성장하였음을 나타냈다. 그러나 20°C에서는 2일이 경과 후에 휴면포자가 형성되었으며, 평균 직경은 36.8 µm에 불과하였고, 배양 후 7일이 경과 한 후 30°C에서 배양된 휴면포자와 그 직경이 유사하게 성장하였다. 10°C와 4°C에서 배양된 영양체는 7일째에서야 휴면포자로 전환 되었으며, 조사 14일째 평균 직경은 각각 48.2 µm 와 32.6 µm에 불과 하였다.

퍼킨스스핀모충 유주자 형성과정의 세포분열은 휴면포자에서 핵비대 (nucleus enlargement) 단계로 넘어 가는데 약 2일이 소요 되었으며, 핵비대 단계에서부터 2 세포기, 4 세포기, 8 세포기, 16 세포기, 32 세포기, 64 세포기 까지는 단계별로 약 1시간이 소요 되었다. 64 세포기 부터 유주자 방출을 시작하기 까지는 약 24시간이 소요되었으며, 방출을 시작하여 종료 시 까지는 약 1시간이 소요되었다. 따라서 해수에 유린된 휴면포자가 25 °C의 수온에서 유주자를 완전히 방출하는데 까지 약 3-4일 정도 소요되는 것으로 관측되었다.

유주자 형성 시 수온과 염분의 영향을 조사한 결과 P.

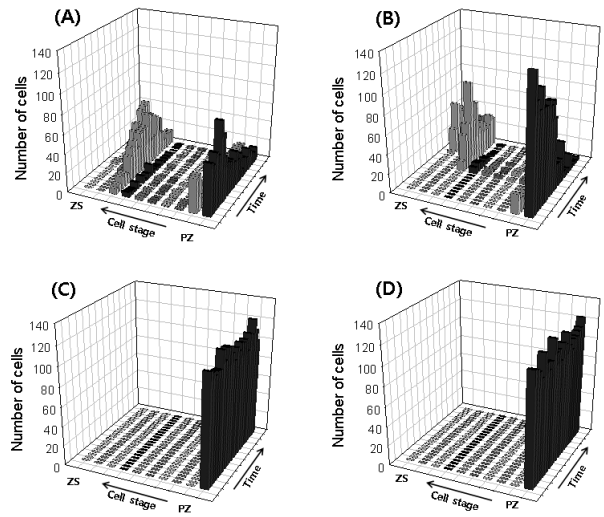


Fig. 2. Development of zoosporangia incubated at 30°C (A), 20°C (B), 10°C (C) and 4°C (D). ZS, zoospore; PZ, prezoosporangia.

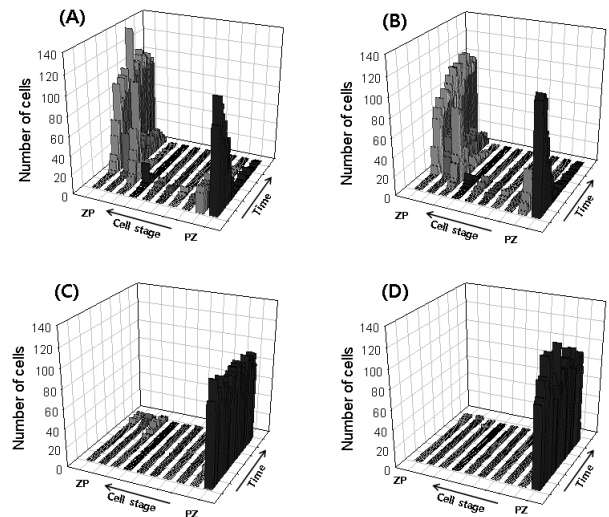


Fig. 3. Development of zoosporangia incubated at 30 ppt (A), 20 ppt (B), 10 ppt (C) and 5 ppt (D). ZS, zoospore; PZ, prezoosporangia.

olseni의 유주자 형성에 수온과 염분이 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다 (Fig. 2, 3, 4). 수온이 미치는 영향에 대한 실험에서는 30°C에서 해수에 배양한지 2일 후에 핵비대와 세포분열을 시작한 개체들이 관찰 되었으며 3일째에 50%이상의 세포가 분열을 하였고, 배양 8일째에는 약 70%이상의 세포에서 유주자가 방출되었다. 20°C에서는 2일째에 핵비대 현상이 관찰되었으나 배양 4일째에서야 세포분열이 시작 되었고, 5일째에 50% 이상의 세포가 분열 하였으며, 8일째에 90%이상의

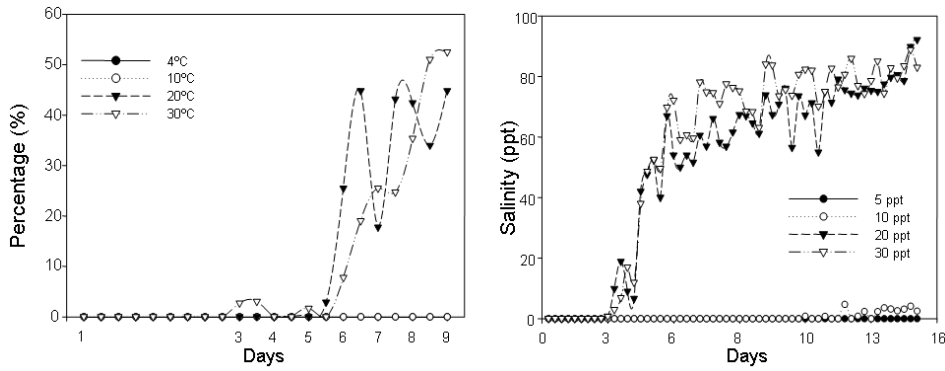


Fig. 4. Percentages of prezoosporangia completed discharging all zoospores.

세포에서 유주자가 방출 되었다. 반면, 10°C와 4°C에서는 실험 종료 시까지 세포 분열이 관찰되지 않았다. 본 연구 결과 수온 20°C에서 배양된 *P. olseni* 유주자 방출은 30°C 보다 늦게 시작 되었으며, 실험종료시 유주자 방출 역시 30°C에서 조기에 완료되었다. Ahn and Kim (2001) 에 의하면 20°C보다는 30°C에서 더 높은 유주자 방출 현상을 보고한 바 있어 본 연구와 동일한 결과를 나타내었다.

염분이 유주자 형성에 미치는 영향에 대한 실험에서는 30 ppt와 20 ppt에서 유사한 결과가 관찰되었다. 배양 1일째에 핵비대 현상이 관찰 되었으며, 약 2일 경과 후부터 세포분열 중인 개체들이 관찰되었고 4일째부터 유주자 방출이 시작되었다. 배양 7일째부터 90% 이상의 휴면포자에서 유주자 형성을 위한 세포분열이 확인되었다. 유주자 방출을 종료한 휴면포자들도 배양 4일째부터 관찰되기 시작하여 5일째에는 약 50%의 휴면포자가 방출을 종료하였고 이 비율은 점차 증가하여 실험이 종료된 배양 15일째에는 80-90%의 휴면포자가 유주자의 방출을 종료하였다 (Fig. 4). 그러나 10 ppt에서는 7일째부터 세포분열이 관찰 되었으며 12일째에 유주자 형성이 관찰되었고, 5 ppt에서는 14일째부터 세포분열과 유주자 형성이 관찰 되었다. 10 ppt에서 유주자 형성중인 휴면포자는 3-10개였으며, 5 ppt에서는 1-5 개 정도로 소수에 불과 하였다 (Fig. 3). 또한 10 ppt에서는 배양 10일경 최초의 유주자 방출 완료 개체가 나타났으며, 실험 종료시에는 방출 종료개체가 3-5개체로 전체 휴면포자 중 3-4%를 차지하였다. 그러나 5 ppt에서 배양된 휴면포자인 경우 방출 완료 개체는 전혀 관찰 되지 않았다 (Fig. 4). 따라서 퍼킨서스편모충의 유주자 형성은 염분의 변화에 영향을 받으며 높은 염분에서 보다 활발한 세포분열과 높은 비율의 유주자 방출이 이루어지는 것으로 조사되었다. 이와 같은 결과는 Ahn and Kim (2001) 이 보고한 결과와 매우 유사한 것으로써 당시 염분 5ppt와 10ppt에서 배양된 하계 시료의 경우 15일간의 배양 실험에서 유주자가 일부 형성이 되었지만 방출이 전혀 이루어지 않은 것으로 조사되었다.

본 연구결과와 Ahn and Kim (2001) 의 연구 결과를 종합해 볼 때 우리나라 바지락에서 검출되고 있는 *P. olseni*는 타 *Perkinsus* spp.와 마찬가지로 고수온과 고염분의 환경에서 세포분열이 활성화 되는 것으로 결론지을 수 있다. 그러나 *P. marinus*의 경우 18°C이하에서는 유주자 형성이 이루어지지 않으며 (Perkins, 1966; Chu and Greene, 1989), *P. olseni*의 경우에도 24°C 이상에서는 유주자가 형성 되었으나 14°C 이하에서는 형성되지 않음이 보고되었다 (Auzoux-Bordenave *et al.*, 1995). 염분의 영향을 조사한 결과 6 ppt에서 배양된 *P. marinus*의 경우 유주자 형성이 저해됨이 보고되었고 (Chu and Greene, 1989), *P. olseni*의 경우에도 25-30 ppt에서 유주자 형성이 활발히 일어난 반면 5 ppt에서는 유주자 발생이 관찰되지 않았다 (Auzoux-Bordenave, *et al.*, 1995). 이러한 보고에 의거하여 일반적으로 12-15 ppt의 염분은 *Perkinsus*-free 지역으로 간주 되고 있다 (Villalba *et al.*, 2004). 이상의 결과를 살펴보면 *Perkinsus* spp.의 유주자 형성은 수온과 염분이 중요하게 작용하는 것으로 밝혀졌으나 유주자 형성이 불활화 되는 수온과 염분 조건은 *Perkinsus* 종마다 다소 상이한 결과를 보였으며, 같은 *P. olseni*라 할지라도 유럽에서 검출된 종과 아시아에서 검출된 종은 유주자 형성 조건이 일부 다를 수 있음이 제시되었다. 특히 Ahn and Kim (2001) 이 보고한 바와 같이 계절에 따라 같은 환경 조건에도 다르게 반응함이 관찰됨으로써 *Perkinsus* spp.는 종과 지역 및 계절에 따라 상이한 수온 및 염분에 대한 적응력을 가진 것으로 판단된다.

이상과 같이 실험실내에서 관측된 *Perkinsus* spp.의 수온과 염분에 대한 반응 외에도 Burreson and Ragone Calvo (1996) 은 미국 Chesapeake 만 일대에서 1980-1990년대 *P. marinus*의 감염율과 수온 및 염분의 변화와의 관계를 조사한 결과 고수온 및 고염분의 해양환경에서 높은 감염율을 나타낸 사실을 확인하였고, Ford (1996) 은 *P. marinus*의 감염이 지속적으로 미국 동북부 지역에서 북상하는 경향을 보고하면

서 지구 온난화로 인한 수온의 상승이 이러한 감염의 전파를 야기하는 것으로 추정하였다. 이러한 연구는 *Perkinsus* spp. 가 실험실내 환경뿐만 아니라 실제 해양환경에서도 수온과 염분의 변화에 민감하게 반응하고 있음을 확인시켜 주는 것이며, 수온과 염분은 *Perkinsus* spp.의 구제 대책을 수립하는데 중요하게 간주되는 항목이다 (Villalba *et al.*, 2004). 따라서 국내에서 검출되는 *P. olseni*의 생태학적 특징에 대한 명확한 이해는 이 기생충의 전파를 저감시키거나 또는 예측하며, 나아가 구제 대책을 수립하는데 중요한 요인이므로 이에 대한 보다 심도 있는 연구가 요망된다.

요 약

퍼킨서스편모충 *P. olseni*는 우리나라 바지락의 대부분이 감염되어 있으며 극심한 염증을 유발하는 우리나라 바지락의 대표적 기생충이다. 본 연구에서는 퍼킨서스편모충의 생태학적 특성을 조사하고자 영양체에서 휴면포자로 전환되는 과정과 유주자를 형성하는 과정에서 수온과 염분이 미치는 영향을 조사하였다. 조사결과 영양체에서 휴면포자로의 유도는 수온이 높을수록 유도율이 높고 휴면포자의 직경이 커지는 현상이 관찰되었다. 또한 유주자 형성은 고수온, 고염분의 환경에서 잘 형성됨으로써 10℃이하에서는 유주자 발생이 이루어지지 않으며, 10 ppt에서는 유주자 형성이 급격히 감소하고 5 ppt에서는 유주자 발생이 이루어지지 않음이 확인되었다. 이러한 퍼킨서스편모충의 생태학적 정보는 이 질병의 구제 대책 수립에 중요한 정보를 제공할 수 있을 것으로 기대된다.

사 사

본 연구는 한국연구재단 기초연구사업 (2010-0013304)의 지원에 의해 수행되었습니다.

REFERENCES

- Ahn, K.J. and Kim, K.-H. (2001) Effect of temperature and salinity in vitro zoosporulation of *Perkinsus* sp. in Manila clams *Ruditapes philippinarum*. *Disease of Aquatic Organisms*, **48**: 43-46.
- Auzoux-Bordenave, S., Vigario, A.M., Ruano, F., Domart-Coulon, I. and Doumenc, D. (1995) *In vitro* sporulation of the clam pathogen *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) under various environmental conditions. *Journal of Shellfish Research*. **14**: 469-475.
- Burreson, E.M. and Ragone Calvo, L.M. (1996) Epizootiology of *Perkinsus marinus* disease of oysters in Chesapeake Bay, with emphasis on data since 1985. *Journal of Shellfish Research*. **15**: 17-34.
- Choi, K.-S. and Park, K.-I. (1997) Report on the occurrence of *Perkinsus* sp. in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum* in Korea. *Journal of Aquaculture*, **10**: 227-237.
- Choi, K.-S., Park, K.-I., Cho, M. and Soudant, P. (2005) Diagnosis, Pathology, and Taxonomy of *Perkinsus* sp. Isolated from the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Korea. *Journal of Aquaculture*, **18**: 207-214.
- Chu, F. and Greene, K.H. (1989) Effect of temperature and salinity on *in vitro* culture of the oyster pathogen, *Perkinsus marinus* (Apicomplexa: Perkinsea). *Journal of Invertebrate Pathology*, **53**: 260-268.
- Ford, S.E. (1996) Range extension by the oyster parasite *Perkinsus marinus* into the northeastern united states; response to climate change? *Journal of Shellfish Research*, **15**: 45-56.
- Kinne, O. (1983) Diseases of marine animals. *Biologische Anstalt Helgol and Hamburg*, Germany.
- Norén, F., Moestrup, Ø. and Rehnstam-Holm, A.-S. (1999) *Parvilucifera infectans* Noren et Moestrup gen. et sp. nov. (Perkinsozoa phylum nov.): a parasitic flagellate capable of killing toxic microalgae. *European Journal of Protistology*, **35**: 233-254.
- Park, K.-I. and Choi, K.-S. (2001) Spatial distribution and infection intensity of the protozoan parasite *Perkinsus* sp. in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Korea. *Aquaculture*, **203**: 9-22.
- Perkins, F.O. (1966) Life histories of *Dermocystidium marinum*, an oyster pathogen. Ph.D. dissertation, Florida State University, Tallahassee.
- Perkins, F.O. (1996) The structure of *Perkinsus marinus* (Mackin, Owen and Collier, 1950) Levine, 1978 with comments on taxonomy and phylogeny of *Perkinsus* spp. *Journal of Shellfish Research*, **15**: 67-87.
- Park, K.-I., Ngo, T.T.T., Choi, S.-D. and Choi, K.-S. (2006) Occurrence of the protozoan parasite *Perkinsus olseni* in the Venus clam *Protothaca jedoensis* from the south coast of Korea. *Journal of Invertebrate Pathology*, **93**: 81-87.
- Villalba, A., Reece, K.S., Camino, M.C., Casas, S.M. and Figueras, A. (2004) Perkinsosis in molluscs: A review. *Aquatic Living Resources*, **17**: 411-432.
- Wilson-Ormond, E.A., Powell, E.N., Choi, K.-S. and Song, J. (1993) *Perkinsus marinus* assay. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA **71**: 11.79-11.84.