

완도해역 수평망식 양식 굴의 기생충 감염 특성

정우건¹, 조상만²

¹경상대학교 해양식품생명의학과, ²군산대학교 해양생명응용과학부

Parasitic infection in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, reared by intertidal rack culture in Wando Coast, Korea

Woo-Geon Jeong¹ and Sang-Man Cho²

¹Department of Seafood and Aquaculture Science & Institute of Marine Industry, Gyeongsan National University, Chonchidaeguk-gil 38, Tongyeong 53064, Korea

²Faculty of Marine applied biosciences, Kunsan National University, Deahak-ro 558, Gunsan 54150, Korea.

ABSTRACT

In the tidal flat oyster rack culture introduced in 2010, we investigated the parasitic infection from November 2015 to June 2017. The water temperature and salinity were ranged from 7.32°C to 27.18°C and from 27.6 psu to 32.7 psu, respectively. From the two serial growth experiments, commercial market sized oysters can be achieved within 18 months, one size group from the 2015 population with 88.67 ± 7.52 mm in shell length, 79.74 ± 13.33 g in total weight in August 2016 and, and the another from the 2016 population with 93.77 ± 12.11 mm in shell length, 78.99 ± 20.84 g in total weight in June 2017, respectively. Sex ratio represented at 1:1 ratio being closed to mature season but some intersex oysters were observed in immature period. Parasitic infection was ranged from 26 to 100% in prevalence and from 1.6 to 4.0 in intensity, which being associated with water temperature and gonad development index. Using the PNA clamping PCR, the parasite was identified as Apicomplexa which including Perkinsiosis pathogen in manila clam. There is no evidence which Apicomplexa can negatively affect cultural performance of oyster but more elaborated studies are necessary to maintain the sustainability of the rack oyster culture in Wando coast, Korea.

Keywords: Pacific oyster, Rack culture, Tidal flat, Apicomplexa, Wando, Parasite infection

서 론

연체동물문, 이매패강, 사새목, 굴과에 속하는 굴 (*Crassostrea gigas*) 은 수하식 양식기술이 보급되며 1970년 대부터 우리나라에서 대표적인 수산물 중 하나로 자리매김하였으나, 40여년간 이어져온 높은 강도의 장기 연작에 의한 환경 변화에 의한 비만저하와 질병발생 등에 의한 단위 생산이 감소되고 있다 (Kusuki, 1979; Cho, 1991; Hwang *et al.*,

2013). 이를 위해 먹이가용성에 기반하는 생태학적 양식을 제안하는 등 생산성 향상을 위한 노력이 이어지고 있다. 그러나 어느 해역에 굴양식이 도입되면 다양한 환경 변화를 수반하게 되고, 질병을 유발하는 다양한 원생생물의 출현은 필연적으로 수반되므로 이에 관한 모니터링은 생산성과 직결될 수 있다 (Forrest *et al.*, 2009).

우리나라의 굴에 관한 질병으로는 난소기생충, herpesvirus (Hwang *et al.*, 2013), *Michinia* sp. 를 포함한 포자충 (Kern, 1976) 등 다양한 기생충이 보고되고 있지만, 아직 생산성에 대한 직접적 연관성에 대해서는 미지수이다. 그러나 외국에서는 기생충의 피해에 의한 자원 및 양식산업의 피해 등이 보고되고 있고 (Barbosa Solomieu *et al.*, 2015), 지구온난화 등에 의한 수온 상승 및 산성화는 이러한 피해를 더욱 가중시킬 가능성이 있으므로, 이에 대한 감시를 더욱 강화할 필요가 있다. 이 연구는 완도 갯벌의 수평망식 양식장에 입식한 굴의 기생충 감염특성을 조사하여 지속 가능한 양식환경 조성을 위한 자료로 제공하고자 하였다.

Received: November 18, 2019; Revised: December 02, 2019;
Accepted: December 06, 2019

Corresponding author: Sang-Man Cho

Tel: +82 (63) 469-1839, e-mail: gigas@kunsan.ac.kr
1225-3480/24749

This is an Open Access Article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License with permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproducibility in any medium, provided the original work is properly cited.



Fig. 1. Sampling site for oyster, *Crassostrea gigas*, reared at tidal flat rack culture on the Coast of Wando Island, Korea.

재료 및 방법

전남 완도 영흥리지선 갯벌에 위치한 양식장에 (34°23'59"N 126°41'45"E) 2015년 11월부터 2017년 6월까지 1-2개월 단위로 기생충 감염빈도를 조사하였다 (Fig. 1). 양식장의 평균조위는 약 1-2시간 노출선에 높이 60-70 cm 시설물을 설치하여 양식망의 수위는 110 cm 정도에 시설하였다 (Han and Cho, 2013). 수질은 다항목 수질측정기 (Horiaba U-52G, Tokyo, Japan) 를 이용하였고, 채취한 굴의 각장, 각고, 전중량 및 육중량을 측정하고, 육질부는 10% 중성포르말린으로 고정시켜 파라핀 포매하여 6 μ m 절편으로 박절하였고, Harris' HE 염색 후 검경하였다 (BX53, Olympus, Tokyo, Japan). 각 조직별로 소화낭낭 증간을 기점으로 최소 5개의 연속 절편 슬라이드를 제작하였다. 각 월별로 성비와 생식소 발달지수 (Gonad development index, GI), 소화낭낭 지수 (Digestive gland atrophy, DGA) (Kang *et al.*, 2010), 기생충 출현빈도 및 감염강도 (개체수/시야) 를 분석하였다.

기생충의 동정을 위하여 소화낭낭 조직 0.5 g을 추출하여 AccuPrep[®] Genomic DNA Extraction kit (Bioneer, Deajeon, Korea) 을 이용하여 상법에 따라 gDNA를 추출하여 정량하였다. PNA clamping PCR은 18S universal primer set (UnivF-15: 5'-CTG CCA GTA GTC ATA TGC-3'; UnivR-1765: 5'-ACC TTG TTA CGA CTT TAC-3')과 PNA probe (5'-Lys-GCT AAA CGC CAC TTG TCC CTC T-3') 을 이용하였고, PCR 반응액은 1X PCR buffer, Optimaze[™] (Transgenomic, Omaha, USA) 1U, 0.5 μ M 프라이머쌍, 0.5 μ M PNA, DNA template

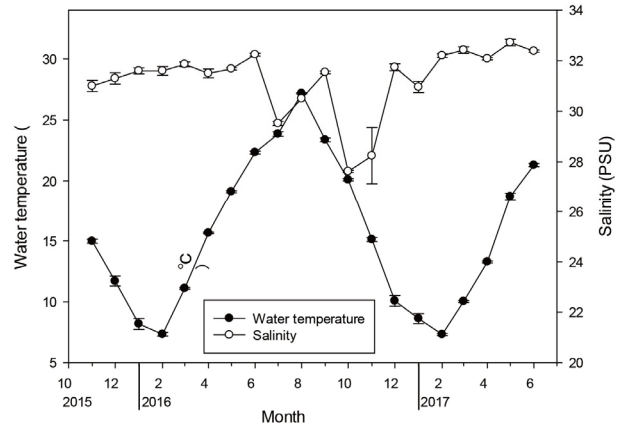


Fig. 2. Monthly variation of water temperature and salinity of seawater at cultural farm in Wando coast, Korea.

10-100 ng을 첨가하고, DNase free water를 20 μ L까지 보충하여 준비하였다. PCR증폭은 GeneAmp[®] 9700 (Applied Bioscience, Foster City, CA) 을 이용하여 95°C에서 4분 후, 94°C (30 sec) → 78.1°C (30sec) → 50.1°C (30 sec) → 72°C (60 sec) 를 25회 반복하였고, 이후 72°C에서 5분간 반응시켰다. 준비된 PCR amplicon은 2% agarose gel 에 100V에서 1시간동안 전기영동 하였다. 500 bp 인근에 있는 밴드를 절취하여 TOPcloner[™] TA Kit (Enzynomics, Deajeon, Korea) 를 이용하여 pDNA를 제조하였다. pDNA는 Plasmid Mini-prep kit (Elpisbio, Deajeon, Korea) 를 이용하여 분리 정제 하였고, 정제된 pDNA는 DNA analyzer (Applied biosystems, ABI3730XL) 를 통해 염기서열 분석 후 (Cosmogentech, Deajeon, Korea), Genebank에서 Blast 검색을 통해 동정을 실시하였다.

한편 기생충 감염과 환경 및 생물학적 특성의 상관관계를 알아보기 위하여 Sigmaplot (Ver 13, Systat Software, Inc.) 을 이용하여 Pearson Correlation analysis를 실시하였다.

결과 및 고찰

조사해역의 수온은 7.32-27.18°C의 범위였고, 염분은 27.6-32.7 psu의 범위였다 (Fig 2). 이 해역의 염분농도와 강우와는 큰 상관성이 없는 것으로 보고되고 있으나 (Jeong and Cho, 2018), 폭우 등에 의한 급작스런 염분농도의 변화 등은 관찰되었다. 해역은 주변 오염원이 많지 않아 매우 안정적인 수질환경을 나타내며, 계절적으로 봄가을에 염양염 결핍되는 것으로 보고하고 있다 (Jeong and Cho, 2018).

2년에 걸친 조사기간 동안 종패 입식은 2015년에는 5월과 2016년 10월 두 번 실시하였다. 2015년에 입식한 굴의 2016

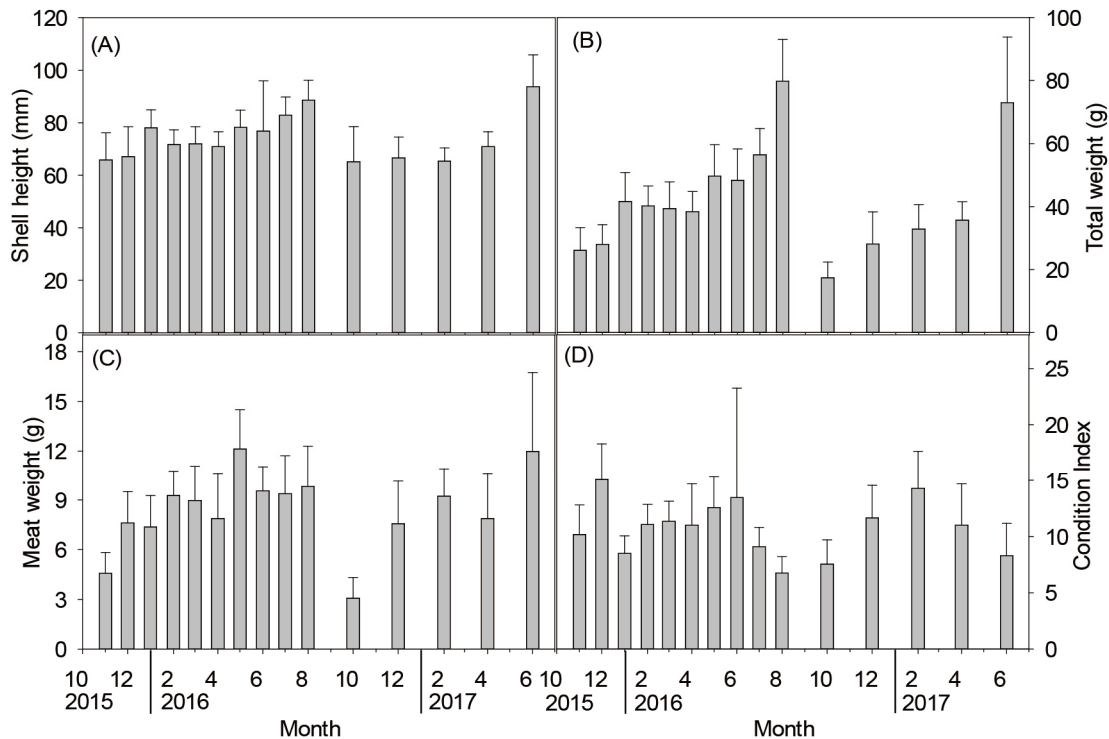


Fig. 3. Monthly variation of shell height (A), total weight (B), meat weight (C) and condition index (D) for the oysters, *Crassostrea gigas*, reared at tidal rack culture in Wando Coast.

년 8월에 88.67 ± 7.52 mm, 전중량은 79.74 ± 13.33 g, 육중량은 9.82 ± 2.47 g으로 성장하였고, 2016년에 입식한 굴은 2017년 6월에 각고 93.77 ± 12.11 mm, 전중 78.99 ± 20.84 g, 육중량 11.98 ± 4.77 g으로 성장하였다. 비만도 지수 (CI)는 6.8-15.1의 범위에서 산란기에 이후 낮아지는 경향을 보였다 (Fig. 3). 우리의 실험에 입식한 굴은 통영지역에서 종패 생산하여 수하식으로 관리하다가 완도지역으로 입식한 것으로 종묘생산 후 약 1년 6개월 이내에 상품크기까지 성장 가능한 것을 재확인하였다 (Han and Cho, 2013). 한편 완도해역의 굴 폐사는 수온 20℃에 이르기 시작하는 6월부터 나타나기 시작하고 2년째의 폐사율이 더 높은 것으로 나타나므로 (Cho *et al.*, 2013), 입식시기를 조절하여 여름철 폐사가 진행되기 전인 5월에 수확 가능 하도록 계획할 필요가 있다.

굴의 생식소를 관찰한 결과, 미성숙기에는 성비가 수컷이 많았지만, 성숙기 이후에는 성비가 1:1에 근접하는 것을 볼 수 있었다. 한편 2016년 봄철에는 2년생 굴에서 성전환이 진행되는 개체를 확인할 수 있었다 (Fig 4A). 완도 조간대 해역에서 양성하는 굴의 산란은 주로 7월에 이뤄지고 있으며, 7월까지 생식소 발달지수가 꾸준히 증가하다가 10월에 최저치를 보인 이후 서서히 회복되는 것으로 나타났다 (Fig 4B). Lee *et al.*

(2010)은 우리나라 통영, 거제, 여수 연안에서 6, 8월에 채집한 굴에서 약 16.25%가 간성체 였다고 보고하였지만, 우리 연구에서는 초기 성숙기에만 간성체가 나타났다. 그들의 연구는 연안에서 채집한 자연산 개체군을 대상으로 하였고, 이는 양식 환경보다는 불안정한 환경에 노출됨으로써 성성숙에 관여하는 호르몬 항상성에 영향을 미침으로써 간성체 출현율이 높아진 것으로 보고되고 있다 (Helen *et al.*, 2003; Andrew *et al.*, 2010).

조사기간 중 소화맹낭지수는 1.90-3.27의 범위였고, 산란기 이후 감소하였다가 10월 이후 증육이 가속되면서 회복되는 패턴을 보였다 (Fig 4C). 우리 양식장이 위치한 군외면 연안의 기초생산력은 대변정기를 제외하고는 200 mgC/m²/day 이하로 서해안과 비슷한 특성을 지는 것으로 알려지고 있지만 (Jeong and Cho, 2018), 조간대의 저서성 플랑크톤 등의 재부유에 의해 먹이가용성은 상대적으로 높은 것으로 보고되고 있으므로 (Cho *et al.*, 2013; An *et al.*, 2017), 이 해역의 먹이가용성은 연안에서 유입되는 영양염에 크게 연동되지 않는 특성을 지니는 것으로 보고되고 있다 (Jeong and Cho, 2018). 이때패류의 소화맹낭은 섭취한 먹이를 소화 흡수하는 기관이므로 결국 먹이가용성과 직접적인 연관이 있지만, 이러

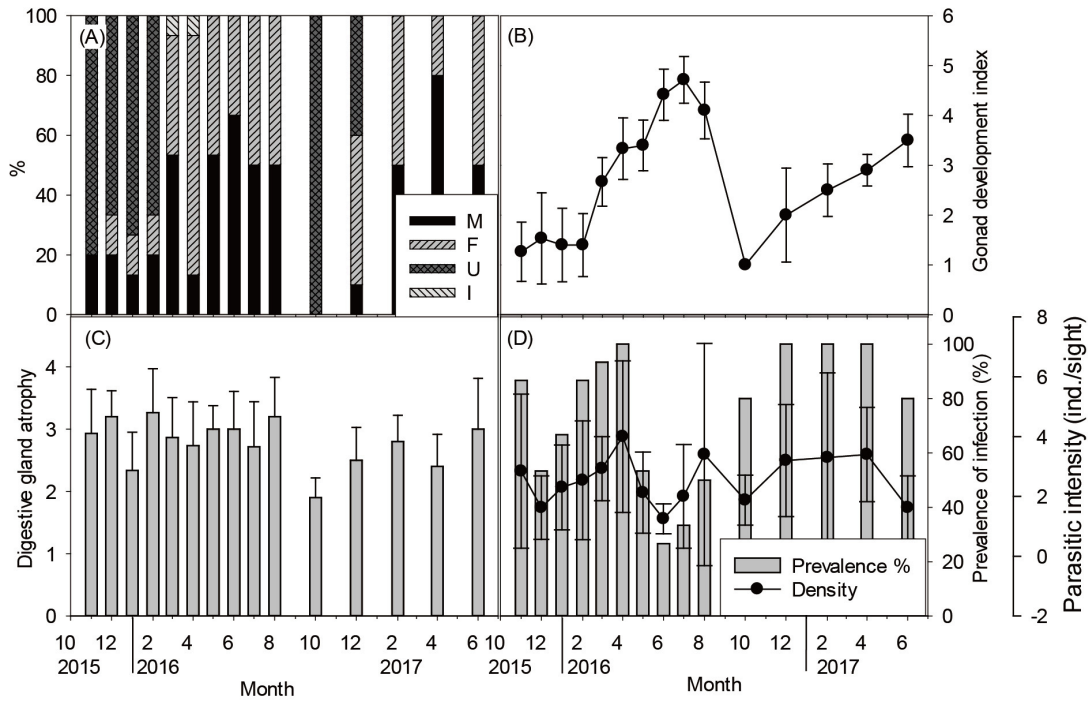


Fig. 4. Monthly variation of sex ratio (A), gonad development index (B), digestive gland atrophy (C), and prevalence and intensity of parasitic infection (D) for the oysters reared at tidal flat rack culture in Wando Coast.

한 질병, 양식밀도, 스트레스 등 다양한 환경요인에 영향을 받을 수 있다. 실제 우리 연구에서는 특정한 패턴 없이 등락을 거듭하였고, 각 조사월별로 유의미한 차이를 보이지 않았다.

기생충의 감염빈도는 26-100%의 범위였고, 감염강도는 평균 1.6-4.0 개체/시야에 해당하였다. 감염빈도나 감염강도는 고수온 산란기에는 낮고 저수온 성장기에는 높았지만 매년 동일한 패턴을 보이지는 않았지만 (Fig. 4D), 수온 ($P = 0.012$)과 생식소속도지수 (GSI, $P = 0.050$)와 역상관계가 나타났다. Audemard *et al.* (2006)는 Chesapeake Bay에서 서식하는 굴의 *Perkinsus marinus* 감염빈도를 조사하니, 2002년에는 20-100% 였던 반면, 2003년에는 26% 이하의 낮은 감염빈도를 보이는 항상 일정한 패턴을 띄지는 않았다. 경남 고성만에서 양식 굴 (*Crassostrea gigas*)의 *Mareiloides chungmuensis*의 감염은 산란기 이후 겨울 동안 점차 증가하는 것으로 보고하였지만 (Thao *et al.*, 2003), 이는 초기 감염된 기생충의 크기가 작아 광학현미경으로 관찰되지 않기 때문으로 알려지고 있다 (Itoh *et al.*, 2002). 이러한 난소기생충 감염은 먹이활동을 통한 여과섭식과정에 유입되므로 먹이가용성과 관련이 있고, 수온, 수중 부유물 및 클로로필 *a* 함량과 높

은 상관관계를 지니는 것으로 판단된다 (Jeong *et al.*, 2005). 또한 소화맹장지수와 특별한 상관관계를 보이지 않는 것은 먹이가용성에 따라 계절성을 띄기 보다는 굴 체내에서 상존하지만, 크기 때문에 광학현미경상으로 관찰이 가능하지 않기 때문으로 판단된다. 감염빈도가 낮았던 여름철의 개체를 대상으로 PCR 기법으로 조사한 결과 약 93%가 감염된 것으로 나타나, Itoh *et al.* (2002)의 연구결과와 일치하였다 (unpublished yet).

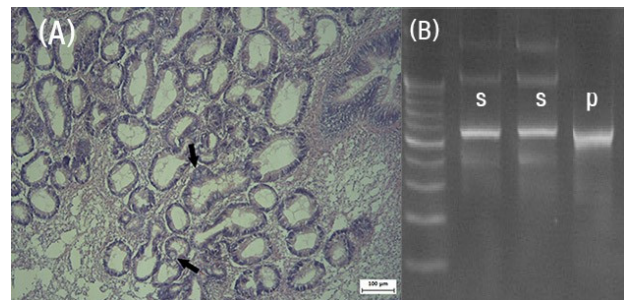


Fig. 5. Histological observation of Apicomplexan protozoan (A) and gel electrophoresis of clamping PCR reaction with PNA blocking probe (B): s: PNA clamping PCR, p: conventional PCR with 18S universal primer set.

Table 1. Analysis of Pearson correlation coefficient between parasitic prevalence and other factors for the oyster, *Crassostrea gigas*, reared at Wando coast (n = 15)

Item	Temperature	Salinity	GSI	DGA	Intensity
Prevalence	-0.632 P = 0.012	0.211 P = 0.450	-0.513 P = 0.050	-0.302 P = 0.275	0.670 P = 0.006

기생충의 동정을 위해 실시한 PNA clamping PCR을 통해 획득한 571 bp의 PCR amplicon은 진핵생물의 포자충류의 침복포자충문 (Apicomplexa) 으로 나타났다. 이 충은 spindle 형태로 길이는 $8.6 \pm 0.5 \mu\text{m}$, 폭은 $2.5 \pm 0.3 \mu\text{m}$ 에 달하고, 편모는 없고 eosinophilic granulocyte는 감염되는 것으로 알려져 있으며, 이때패류의 성장에 영향을 주는지 여부는 아직 밝혀지지 않았다 (Nakayama *et al.*, 1998). 침복포자충문은 Perkinsus 속을 포함하는 분류군으로 바지락 등에서는 이미 우리나라 및 아시아 전역에 널리 감염된 것으로 알려지고 있다 (Cho and Park, 2010). 아직까지 국내 굴에서 Perkinsus의 감염에 대한 보고는 없고, 태안지역의 유류오염 지역의 굴에서 유사한 조직학적 관찰이 보고된 정도이다 (Jun *et al.*, 2011). 그러나 바다식 양식이 성행하는 외국의 사례를 고려해 보면 수평양식이 도입된 해역에서 충분히 감염되었을 우려가 있으며 이에 대한 확실적인 연구가 요구된다. 포자충 감염 강도가 극심한 사례는 많지 않았고, 대부분 낮은 감염강도를 나타내었다. 완도해역의 수평양식 양식굴의 포자충 기생충 감염은 우려할만한 수준은 아니었지만, 여름철 대량폐사 등에 직간접적으로 영향을 주는 것을 고려하면, 향후 이러한 기생충의 영향에 대해 보다 많은 연구가 진행되어야 할 것이다.

요 약

완도해역에 입식한 갯벌굴의 기생충 감염특성을 조사하기 위하여 2015년 11월부터 2017년 6월까지 조직학적 검사를 실시하였다. 이 기간동안 수온은 7.32-27.18°C, 염분은 27.6-32.7 psu의 범위였다. 두 번의 입식을 통해 굴은 약 18개월 이내에 전중 80 g의 상품크기까지 성장 가능하였다. 한편 성비는 미성숙기에는 수컷의 비율이 높고 간혹 간성체가 나타났지만, 성숙기에는 암수비가 1:1에 근접하였다. 소화맹낭에서 관찰된 포자충은 침복포자충문 (Apicomplex) 으로 조사되었고, 감염빈도는 26-100%의 범위였고, 감염강도는 1.6-4.0 개체/시야로 비교적 높지 않았지만, 이 분류군에는 바지락의 Perkinsus 등이 포함되는 것을 고려하면 보다 정밀한 연구를 통해 양식에 미칠 영향에 대해 충분한 검토를 통해 이제 도입기에 있는 수평양식 갯벌굴 양식의 지속가능성을 높이기 위한 연구가 지속되어야 할 것으로 판단된다.

사 사

이 논문은 2017년 해양수산부 재원으로 해양수산과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 연구임 (갯벌참굴 생산성 향상 및 오염저감을 위한 다단양식기술 개발).

REFERENCES

- An, Y.-J., Jo, S.-G., Jeong, W.-G., and Cho, S.-M. (2017) Food selectivity of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, reared at rack culture in tidal flat of the eastern coast of Wando island, Korea. *Korean Journal of Malacology*, **33**: 299-307.
- Andrew, M.N., O'Connor, W.A., Dunstan, R.H., and MacFarlane, G.R. (2010) Exposure to 17 α -ethynylestradiol causes dose and temporally dependent changes in intersex, females and vitellogenin production in the Sydney rock oyster. *Ecotoxicology*, **19**: 1440-1451.
- Audemard, C., Calvo, L.R., Paynter, K., Reece, K., and Burreson, E. (2006) Real-time PCR investigation of parasite ecology: in situ determination of oyster parasite *Perkinsus marinus* transmission dynamics in lower Chesapeake Bay. *Parasitology*, **132**: 827-842.
- Barbosa Solomieu, V., Renault, T., and Travers, M.-A. (2015) Mass mortality in bivalves and the intricate case of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **131**: 2-10.
- Cho, C.-H. (1991) Mariculture and eutrophication in Jinhae bay, Korea. *Marine Pollution Bulletin*, **23**: 275-279.
- Cho, K.-S., and Park, K.-I. (2010) Review on the protozoan parasite *Perkinsus olseni* (Lester and Davis 1981) infection in Asian waters. *Coastal Environmental and Ccosystem Issues of the East China sea*: 269-281.
- Cho, S.-M., Jo, S., Kim, J., and Park, K. (2013) Development of cultural technique for the Pacific oyster rearing at rack culture system in mudflat, Korea. Ministry of Ocean and Fisheries, TRKO201400020198, Gunsan, pp. 251
- Forrest, B.M., Keeley, N.B., Hopkins, G.A., Webb, S.C., and Clement, D.M. (2009) Bivalve aquaculture in estuaries: Review and synthesis of oyster cultivation effects. *Aquaculture*, **298**: 1-15.
- Han, H.S., and Cho, S.-M. (2013) Study on optimal condition for oyster rack culture in terms of tidal

- exposure and rack height in Wando coast, Korea. *Korean Journal of Malacology*, **29**: 43-50.
- Helen, E.N., David, M., Mark, C., and Mike, T. (2003) Long-term and transgenerational effects of nonylphenol exposure at a key stage in the development of *Crassostrea gigas*. Possible endocrine disruption? *Marine Ecology Progress Series*, **256**: 293-300.
- Hwang, J., Park, J., Yu, H., Hur, Y., Arzul, I., Couraleau, Y., and Park, M. (2013) Ostreid herpesvirus 1 infection in farmed Pacific oyster larvae *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Korea. *Journal of Fish Disease*, **36**: 969-972.
- Itoh, N., Oda, T., Ogawa, K., and Wakabayashi, H. (2002) Identification and development of a paramyxean ovarian parasite in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish pathology*, **37**: 23-28.
- Jeong, W.-G., and Cho, S.-M. (2018) Estimation of primary production of the waters around rack oyster farm at Wando, Korea. *Fisheries and Aquatic Sciences*, **21**: 9.
- Jeong, W.-G., Seo, J.-H., Cho, S.-M., and Park, C.-I. (2005) Influence of environmental factors on the prevalence of the ovarian parasite, *Marteilioides chungmuensis*, in *Crassostrea gigas*, cultured in Pukman Bay, Tongyeong. *Korean Journal of Malacology*, **21**: 33-40.
- Jun, J.-C., Kang, S.-W., Baek, M.-K., Jeong, J.-E., Shin, Y.-K., Park, Y.-J., Han, Y.-S., and Lee, Y.-S. (2011) A study on the effects of an artificial oil-spill on the ultrastructural changes in the digestive glands of *Crassostrea gigas*. *Korean Journal of Malacology*, **27**: 77-86.
- Kang, D.-H., Chu, F.-L.E., Yang, H.-S., Lee, C.-H., Koh, H.-B., and Choi, K.-S. (2010) Growth, reproductive condition, and digestive tubule atrophy of Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Gamakman Bay off the southern coast of Korea. *Journal of Shellfish Research*, **29**: 839-846.
- Kern, F.G. (1976) Sporulation of *Minchinia* sp. (Haplosporida, Haplosporidiidae) in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) from the Republic of Korea. *The Journal of Protozoology*, **23**: 498-500.
- Kusuki, Y. (1979) Fundamental studies on the deterioration of oyster growing grounds. *Bulletin of Japanese Society of Scientific Fisheries*, **44**: 971-973.
- Lee, J.S., Lee, Y.G., Kang, S.W., Park, J.S., Lee, D.G., Jeon, M.A., and Ju, S.M. (2010) Intersexuality of *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum* in southern coastal waters of Korea. *Journal of Environmental Toxicology*, **25**: 287-294.
- Nakayama, K., Nishijima, M., and Maruyama, T. (1998) Parasitism by a protozoan in the hemolymph of the Giant clam, *Tridacna crocea*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **71**: 193-198.
- Thao, T.T.N., Franck, C.J.B., and Choi, K.-S. (2003) Prevalence and infection intensity of the ovarian parasite *Marteilioides chungmuensis* during an annual reproductive cycle of the oyster *Crassostrea gigas*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **56**: 259-267.