The Korean Journal of Microbiology, Vol. 44, No. 1, March 2008, p. 49-55
Copyright©2008, The Microbiological Society of Korea

Real-Time PCR을 이용한 해수 존재 흰반점 바이러스의 정량 및 양식 환경인자와의 상관관계 분석

송재호 · 추여진 · 조장천*

인하대학교 자연과학대학 생명해양과학부

흰반점 바이러스(white spot syndrome virus, WSSV)는 양식산 새우에 감염하여 대량폐사를 일으키는 전염성이 매우 강한 병원성 바이러스이다. 본 연구에서는 강화도에 위치한 대하(*Fenneropenaeus chinensis*) 양식장의 양식수와 양식장으로 유입되는 해수에서 WSSV를 막여과법을 이용하여 농축하였으며, 새롭게 디자인한 primer와 Taqman probe를 사용하여 정량 실시간 PCR (quantitative real-time PCR, QRT-PCR)을 적용하여 WSSV를 정량하였다. 농도표준을 사용한 QRT-PCR 결과, 제작된 primer와 probe를 이용하여 WSSV가 정확하고 민감하게 검출됨을 확인하였다. 해수에 존재하는 WSSV와 물리화학적, 생물학적 환경요인간의 상관관계를 도출하기 위하여 양식수와 해수 유입수에서 대하 양식기간인 2007년 6월부터 9월까지 총 8회에 거쳐 다양한 환경요인을 분석하였다. 양식수 1 L에 존재하는 WSSV의 양은 3,814-121,545 copy였으며, 이는 분원성 enterococci (r^2=0.9, p=0.02), 엽록소 *a* (r^2=0.8, p=0.03), 생화학적 산소요구량(r^2=0.8, p=0.07)과 상관관계를 나타내었다. 결론적으로 본 연구에서 정립된 WSSV의 농축법 및 QRT-PCR 방법은 해수에 존재하는 WSSV를 정량하는데 효과적이었으며, 해수에 존재하는 WSSV의 양은 물리화학적 환경요인보다 생물학적 환경요인과 밀접한 관련을 보였다.

Key words □ ***Fenneropenaeus chinensis*, quantitative real-time PCR, shrimp farm, white spot syndrome virus**

흰반점 바이러스(White Spot Syndrome Virus, WSSV)는 동아시아와 동남아시아 및 북아메리카의 연안에서 대규모로 양식되는 새우에 감염하여 대량폐사를 일으키는 원인 바이러스이며 전염성이 매우 강한 특징을 보인다(11). 흰반점 바이러스는 이중나선형 DNA 바이러스로서 길이는 약 275 nm, 넓이는 약 120 nm인 막대모양의 형태이며(30), 유전체의 크기는 약 290~305 kb에 이른다(27, 32). 전통적으로 WSSV는 Baculoviridae에 속하는 것으로 오랜 기간 동안 알려져 왔으나(12), 최근의 비교 유전체학적 분석 결과 이 바이러스는 새로운 과(family)인 Whispoviridae에 속하는 Whispovirus라고 제안되었다(26).

1990년대 초 아시아에서 WSSV에 의한 양식 새우의 대량폐사가 처음 보고된 이래로 WSSV는 새우 양식을 산업화하고 있는 많은 나라에서 양식 산업에 큰 피해를 야기시켜 왔다. WSSV에 감염된 새우는 외골격에 흰색의 반점이 나타나는 특징을 나타내며, 감염 후 3~10일 안에 100%의 치사율을 보인다(7). 국내에서도 1993년 WSSV로 인한 새우의 대량폐사가 최초로 보고된 이래 WSSV에 의한 대하(*Fenneropenaeus chinensis*) 양식의 피해는 해마다 증가하고 있지만 새우양식이 국가 기반산업인 중국, 대만, 동남아시아 국가에 비해 연구가 매우 부족한 실정이다(17).

강한 전염성으로 인한 감염 후 조기 대량 폐사의 문제 때문에, WSSV에 대한 실용적 연구는 감염여부를 조기에 진단하는 방법의 개발이 주를 이루었다. WSSV를 효과적으로 검출하기 위하여 PCR(21, 25), 유전자 탐침을 이용한 *in situ* hybridization (5), 면역학적 방법(4, 23) 등이 개발 되었으나 민감도와 정량화라는 점에서는 다소 제약이 있다. 최근에는 이러한 단점을 극복하고자 enterovirus의 검출에 많이 이용된 정량 실시간 핵산증폭(Quantitative Real-time PCR, QRT-PCR) 방법이 WSSV 검출에 적용되었다(9, 10). SYBR Green 형광시료나 Taqman probe를 주로 사용하는 QRT-PCR 방법은 실시간으로 증폭된 핵산의 양을 정량하여 신속하게 WSSV의 존재 및 양을 검출할 수 있어서 외국의 경우 대규모 새우 양식장에서 진단에 사용되고 있다. 그러나 PCR, QRT-PCR, 면역항체 이용법들과 같은 WSSV 검출 방법은 주로 새우의 조직에서 WSSV의 검출에 사용되어 새우의 WSSV 감염 여부의 진단에만 적용되어 왔고, 실제 WSSV가 서식하는 해수 및 양식수에서의 WSSV의 검출에는 사용되지 않았다.

WSSV의 감염경로와 감염요인에 대한 연구로서 새우의 모체로부터 바이러스가 전달되는 수직적 전염뿐만 아니라 질병발생 및 중간숙주 및 양식환경 요인과의 관계에 주목하는 수평적 전염에 대한 연구는 지속적으로 수행되어 왔다(18, 19, 20). 특히 양식수의 환경요인과 새우의 집단 발병은 밀접한 관계가 있는 것으로 나타났으며 전반적인 연구결과는 새우가 WSSV에 감염되었다 하더라도 수환경이 양호하면 대량폐사에는 이르지 않는 것으로 밝혀졌다. 그러나 연구의 대부분은 새우 조직 내의 WSSV의 존재 유무와 환경요인과의 관계에 대한 연구로서, 양식수에 존재하는 바이러스 및 환경요인과의 관계에 대해서는 연구가 전혀 없

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-32-860-7711, Fax: 82-32-232-0541
E-mail: chojc@inha.ac.kr

Table 1. Sequences of primers and probe used for PCR and Real-Time PCR

Name	Sequence (5' → 3')	Size	Reference
W1	TGATTCTGCATCCAGCTC	824 bp	Yang *et al*. (31)
W2	GCACGGTCAACATGTCT		Yang *et al*. (31)
WSV1	TATGGATGAAGACACTTGGAATTC	79 bp	This study
WSV2	GCTGTTCTTCTTCTTCTTCTGC		This study
probe	FAM-TCCTCCTCCAGCAACGCCCCA-BHQ1		This study

는 실정이다. 이러한 점에 기초하여 본 연구에서는 실제 양식수에 존재하는 WSSV의 양과 양식수 환경요인과의 관계를 파악하고자 하였다. 이를 위하여 우선 해수에 존재하는 WSSV를 QRT-PCR 방법을 이용하여 효율적으로 검출, 정량하는 방법을 정립하였으며 여러가지 물리, 화학, 생물학적 환경요인과 WSSV와의 상관관계를 분석하였다.

재료 및 방법

시료의 채취 및 보관

연구대상 시료는 강화도 길상면에 위치한 대하(*Fenneropenaeus chinensis*) 양식장(37º38'23"N, 126º31'39"E)의 양식수와 양식장의 원수로 사용되는 유입 해수로 정하였다(Fig. 1). 2007년 6월 12일부터 2007년 9월 20일까지 2주 간격으로 총 8회 시료를 채취하였고 시료 채취 시간은 오전 10시~11시로 일치시켰다. 양식장 내의 양식수와 양식장으로 유입되는 유입 해수 10 L를 멸균된 폴리에틸렌 채수병에 채수하였으며 냉장상태에 유의하여 실험실로 즉시 운반하였다. 물리화학적 환경요인 및 생물학적 요인은 현장 또는 실험실로 운반한 즉시 측정하였다.

물리 · 화학적 환경요인의 측정

온도 및 염분은 현장에서 수질측정기(YSI Model 30)을 이용하여 측정하였으며 시료 채취기간 동안의 일별 기온의 변화는 기상청의 기후자료를 참고하였다. 용존산소(DO), 생화학적 산소요구량(BOD), 엽록소 *a* (chlorophyll *a*), 아질산 질소(nitrite-N), 암모니아 질소(ammonium-N), 인산 인(phosphate-P), 규산 규소(silicate-Si)의 측정은 해양환경공정시험방법(1) 및 표준방법(2)을 따랐다. 질산 질소(nitrate-N)는 salicylic acid 방법(15)을 적용하여 측정하였다.

세균학적 요인의 분석

종속영양세균은 Marine agar 배지(MA; Difco, USA)를 사용, 주입평판법으로 접종하여 20ºC에서 7일 동안 배양한 다음 30~300개 범위 내에 형성된 콜로니 수를 계수하여 평균을 구하였다. 병원성 세균 및 병원성 세균 존재의 지표로 사용하고 있는 지표세균(indicator bacteria)으로서 총 대장균군(total coliforms), 분원성 대장균군(fecal coliforms), 분원성 enterococci, *Vibrio* spp.의 배양 및 정량은 cellulose acetate 여과막(0.45 μm pore size, Millipore)을 사용한 막여과법(membrane filtration)을 이용하였다

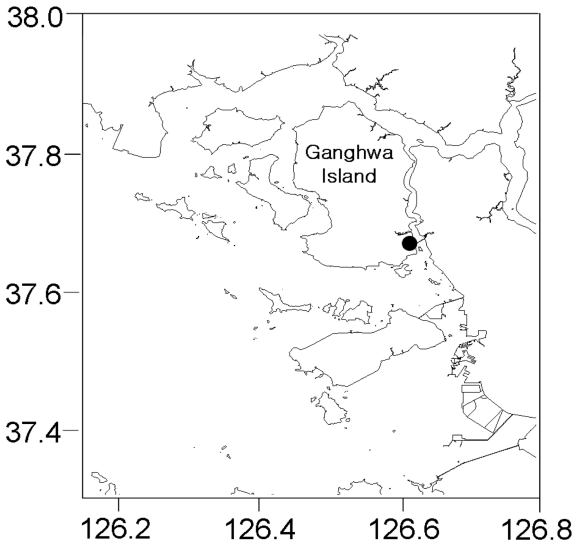

Fig. 1. A geographic map showing the study area. Closed circle represents the sampling site.

(2). 총 대장균군, 분원성 대장균군, 분원성 enterococci, *Vibrio* spp.의 검출을 위한 선택배지로는 각각 m-Endo LES agar, m-FC agar, m-*Enterococcus* agar, thiosulfate citrate bile sucrose (TCBS) agar (Difco, USA)를 이용하였다.

바이러스 농축 및 핵산 추출

해수에 들어 있는 바이러스의 농축은 Katayama 등(16)과 Choo (6)에 의하여 제시된 방법을 변형하여 사용하였다. 해수 500 ml을 GF/C (Whatman, 1.2 μm pore size, UK) 여과막에 전여과한 후 여과액을 다시 음이온으로 충전된 HA 여과막(0.45 μm pore size, Millipore)에 여과하여 바이러스가 여과막에 흡착되도록 하였다. 이후 GF/C와 HA 여과막에 0.5 mM H_2SO_4를 첨가하여 양이온들을 씻어낸 후 여과막에 1 mM NaOH 10 ml을 첨가하여 농축된 바이러스를 회수하였다. 회수한 즉시 50 mM H_2SO_4로 농축액을 중화하고 TE 완충용액으로 안정화시킨 다음 Vivaspin (Sartorius, UK) 컬럼을 사용하여 최종적으로 200 μl로 농축하였다. 바이러스 농축액으로부터 DNeasy tissue kit (Qiagen, USA)를 사용하여 제조사의 방법에 따라 바이러스 핵산을 추출하였다. 추출된 핵산은 이후 QRT-PCR의 주형으로 사용되었으며, GF/C 여과막과 HA 여과막에서 정량된 WSSV의 copy

수를 합산하여 해수 속에 존재하는 바이러스 양을 계산하였다.

QRT-PCR에 사용되는 WSSV 농도표준의 제작

2006년 8월에 흰반점 질병(white spot syndrome disease)을 보인 흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*, white leg shrimp)를 수거하여 WSSV 농도표준의 제작을 위한 시료로 사용하였다. 새우의 부속지(pleopod)와 아가미 조직 25 mg에서 High Pure viral RNA Kit (Roche, USA)로 핵산을 추출하였다. 추출된 핵산을 주형으로 하여 Yang (31)에 의해 발표된 primer (W1, W2; Table 1)를 사용하여 PCR을 수행한 다음, 1.5% agarose 젤을 이용하여 전기영동을 수행하였다. 증폭된 825 bp의 PCR 산물을 agarose 젤에서 자른 다음, Qiagen PCR purification kit를 이용하여 정제하였다. 정제된 825 bp의 PCR 산물을 TaKaRa Perfect-T cloning kit (TaKaRa, Japan)를 사용하여 제조사의 방법에 따라 *Escherichia coli* DH5에 형질전환시켜 WSSV-inserted plasmid를 제작하였다. WSSV의 증폭산물이 클로닝 된 클론을 확인 후 이 클론을 액체 LB 배지에서 18시간 배양한 다음, Plasmid Miniprep kit (DyneBio, Korea)로 plasmid를 추출하였다. 추출한 plasmid의 260 nm 흡광도를 측정하여 DNA 농도를 계산하였으며 plasmid copy 수로 환산하였다. Copy 수가 결정된 이 plasmid는 이후 QRT-PCR을 위한 WSSV 농도표준으로 사용되었다.

QRT-PCR

QRT-PCR에 사용될 primer와 Taqman probe는 확보한 WSSV 클론의 염기서열을 기초로 하여 79 bp의 산물을 증폭할 수 있도록 제작되었다(Table 1). Taqman probe의 reporter dye로는 5'에 6-carboxyfluorescein (FAM)을 적용하였고, quencher dye로는 BHQ-1 dark quencher를 3'에 사용하였다. QRT-PCR은 Bio-rad 사의 Mini opticon (Bio-Rad, USA)을 사용하였다. QRT-PCR 반응 용액은 2× IQ supermix (Bio-Rad, USA) 10 µl, primer 및 probe 각각 300 nM, template 5 µl 에 증류수를 첨가하여 20 µl로 하였다. QRT-PCR 조건은 94°C에서 3분간 반응 후, 94°C에서 15초 동안 denaturing, 60°C에서 1분 동안 annealing-extension, 이후 형광반응을 관찰하는 과정을 45회 반복 수행하는 것으로 설정하였다. 모든 QRT-PCR에 WSSV 농도표준 DNA를 10^5 copy부터 10^0 copy까지 1/10으로 연속 희석하여 농도표준 그래프를 확보하였으며 Mini Opticon 3 (Bio-rad, USA) 프로그램에서 생성된 농도표준 그래프를 기초로 해수에 존재하는 WSSV의 농도를 계산하였다.

결과 및 고찰

QRT-PCR을 이용한 해수 존재 WSSV의 정량

본 연구에서는 WSSV에 감염된 새우의 부속지로부터 WSSV의 nucleocapsid 단백질(VP35)을 증폭하여 825 bp의 PCR 산물을 확보할 수 있었으며, 이 PCR 산물의 클로닝을 이용하여 WSSV의 정량을 위한 절대표준농도(absolute standard concentration)을 계산할 수 있었다. WSSV nucleocapsid 유전자의 클론으로부터 7.56×10^9 copies/µl 농도의 WSSV 절대표준을 확보하여 QRT-PCR에 사용하였다. 이 WSSV 절대표준을 1/10로 연속 희석하여 QRT-PCR의 표준농도곡선을 구하였을 때, $\log_{10}$ (WSSV copies)와 Ct (cycle number of threshold)값의 관계는 표준농도곡선에서 상관계수(r^2) 0.9966으로 매우 높게 나타나 제작된 primer와 Taqman probe가 QRT-PCR에 효과적으로 적용될 수 있음이 확인되었다(Fig. 2). 해수에 존재하는 WSSV를 정량하기 위한 QRT-PCR에 이 절대표준은 매번 사용되었으며 항상 $\log_{10}$ (WSSV copies)과 Ct 값의 상관계수는 0.99를 상회하였다.

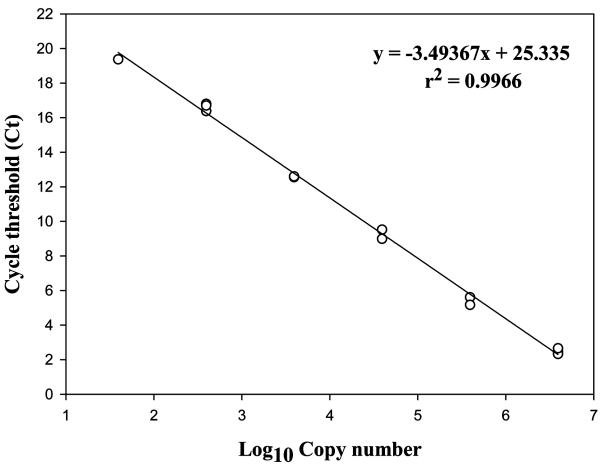

Fig. 2. Linear relationship between C_t values and the dilution of the plasmid DNA of WSSV samples in the quantitative real-time PCR assay. C_t; cycle number of threshold.

QRT-PCR을 해수에서 바이러스를 농축한 시료에 적용하였을 때, 양식수와 유입 해수에서 WSSV를 검출하고 정량할 수 있었으며 시료 채취기간의 WSSV의 분포는 Fig. 3에 제시되어 있다. 새우 양식장의 원수로 쓰이는 유입수에서도 매번 WSSV가 검출되었으며 그 농도는 4.12×10^3~5.03×10^4 copies/L였다. 새우 양식장 내 양식수에서는 6월 초의 시료를 제외하고는 모두 유입수보다 WSSV의 농도가 높게 검출되었으며 그 농도는 3.81×10^3~1.22×10^5 copies/L였다(Fig. 3A). 특히 7월 10일에 양식수와 유입수 모두 WSSV의 양이 급격히 증가하였는데, 이 때 BOD, 엽록소 *a*, 분원성 enterococci도 같은 양상으로 증가되는 현상이 관찰되어 WSSV의 분포가 여러 생물학적 환경요인과 깊은 관계가 있음을 보여 주었다(Fig. 3).

해수 환경요인의 변화 및 WSSV와의 연관성

WSSV의 강한 전염성과 감염된 후 빠른 시일 안에 대량폐사를 일으키는 특징으로 인해 WSSV에 의한 감염을 검출하는 방법에 대해서는 지속적인 연구가 이루어져 왔으며(13, 21, 24, 29), 그 결과 최근에는 양식장의 환경 인자인 온도, 염분, pH, 용존산소 및 영양염류의 변동이 갑각류 면역체계에 영향을 주어 WSSV 감염을 쉽게 하는 것으로 보고되었다(20, 28). WSSV의 감염과 환경요인이 밀접한 관계를 나타낸다면, 양식수에 존재하

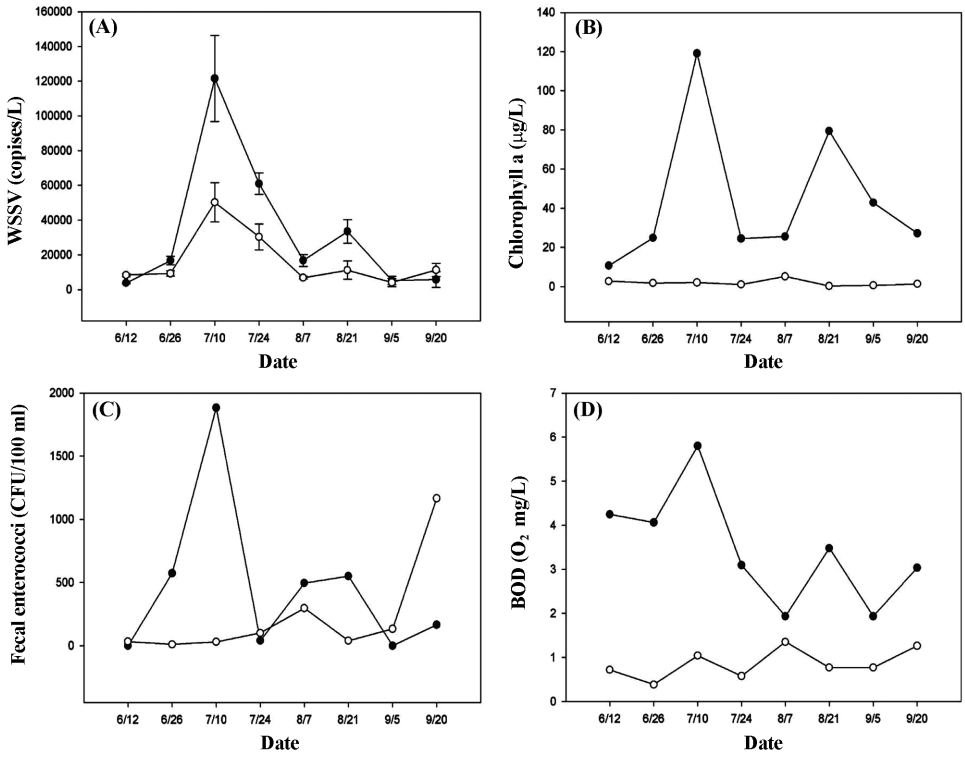

Fig. 3. Variation of WSSV copy numbers (A), chlorophyll *a* (B), BOD (C), and fecal enterococci (D) during the study period. (●) aquaculturing seawater, (○) influent seawater. Error bars represent standard deviations.

는 WSSV의 농도와 환경요인과의 관계도 존재할 것이라 판단되어 본 연구에서는 해수의 환경요인의 변화와 해수에 존재하는 WSSV 양에 대한 관계를 분석하고자 하였다. 이 연구에서 조사한 물리화학적 요인 및 생물학적 요인은 총 13개로서 이들의 시료별, 시료채취 기간별 변화는 Fig. 3과 Table 2에 정리되어 있다.

여러 환경요인들 중에서 수온은 갑각류의 탈피, 성장, 생체 대사작용에 직접적으로 영향을 주므로 갑각류 양식에서 매우 중요한 환경요인이라 알려져 있다(14). 수온은 두 곳 모두 8월 21일에 가장 높았고, 양식수는 24~29ºC, 유입수는 이보다 약간 낮은 21~26ºC을 유지하였다. 양식수의 수온은 대하의 성장에 적합하다고 알려진 20~30ºC (14)가 조사기간 동안 유지되었다. 급격한 수온의 변화는 새우의 면역력을 약화시켜 감염률을 높이는 데 수온이 급속히 상승하는 시기인 6월 중순에서 7월 중순 사이와 수온이 급격하게 떨어지는 9월경에 발병률이 높은 것으로 알려져 있다. 이 연구에서는 2주일 간격으로 수온을 측정하여 급격한 수온의 변화를 감지하지는 못하였지만 기상청의 기온 자료에 따르면 7월 9일과 11일 사이에 약 8ºC의 기온 하강이 있었다. 이러한 급격한 기온의 하강은 WSSV의 양이 최고에 달했던 7월 10일에 급격한 수온의 변화를 야기시켜 WSSV의 감염률을 높이고 또 이 결과 감염된 새우로부터 다시 WSSV가 방출되어 해수 시료 내에 WSSV의 양이 증가했을 것이라 예측할 수 있다. 염분은 하계 집중호우가 발생하는 7월과 8월 사이에 감소하는 경향을 보였다. 유입수의 염분은 강수량의 변화와 일치하는 양상을 보였으나 내수면에 위치한 양식장은 급격한 염분의 변화를 방지하기 위하여 연속식이 아닌 정치식으로 운영되어 일정기간 동안 해수를 가둔 후에 수질이 악화되는 경우 유입수로 교환하기 때문에 해수 유입수보다 변화의 폭이 적었다. 대하는 넓은 범위의 염분에서도 양식이 가능한 광염성(20)의 특징을 나타내므로 양식수의 염분은 대하의 생장에 적합하였다고 판단된다.

용존산소는 9월 하순을 제외하고는 양식수 및 해수 유입수에서 모두 약 4~6 mg/L를 나타냈다. 엽록소 *a*는 양식수에서 7월에 급격한 증가를 보였으며(Fig. 3B), 유입수에서는 매우 낮은 농도로 검출되었다. BOD의 변화 역시 엽록소 *a*의 변화패턴과 유사하게 7월에 급격한 증가를 나타냈으며, 해수 유입수에서는 약 0.5~1.3 mg/L으로 사육수보다는 낮은 수치를 보였다(Fig. 3D). BOD 및 엽록소 *a*의 결과로 보아 유입수의 유기물 증가의 원인은 식물플랑크톤의 대발생으로 사료되었다.

영양염류의 농도는 전반적으로 양식수보다 유입수에서 대부분 높았으며 규산 규소의 경우 양식수에서는 검출되지 않았다(Table 2). 이는 양식수 내의 엽록소 *a*의 양이 유입수보다 월등히 높았던 사실로 비추어 보아, 양식수 내의 식물플랑크톤이 영양염류를 생장에 사용한 결과이며, 특히 규조류(diatom)에 의한 규산 규소의 이용이 매우 활발하였던 결과라 추정할 수 있다(3, 8). 한편 양식수에서 암모니아 질소, 아질산 질소, 질산 질소의 변화는 Lorenzen 등(22)이 예측한 고밀도 새우양식의 모델과 같은 양상

Table 2. Variation of physicochemical and biological parameters in aquaculturing seawater and influent seawater

		Jun.10	Jun.24	Jul.10	Jul.24	Aug.7	Aug.21	Sep.5	Sep.20
Aquaculturing seawater	Temperature (°C)	26.1	25.6	26.7	26.3	26.8	29.2	24.6	23.7
	Salinity (psu)	22.5	23.3	21.3	20.1	19.3	17.2	17.3	16.1
	Dissolved oxygen (O_2 mg/L)	-	6.0	4.5	6.6	5.2	5.8	5.0	7.6
	Heterotrophic plate count (CFU/ml)	7.3×10^3	1.7×10^4	4.8×10^3	3.1×10^4	2.9×10^4	5.5×10^4	3.0×10^4	4.4×10^3
	PO_4-P (μM)	0.6	0.8	ND	ND	0.8	0.6	2.3	0.3
	NH_4-N (μM)	4.5	6.0	4.7	4.5	8.6	28.1	109.4	104.7
	NO_2-N (μM)	ND	ND	ND	ND	0.6	3.3	7.7	12.8
	NO_3-N (μM)	20.4	9.1	9.6	12.8	15.6	17.8	12.8	15.1
	SiO_3-Si (μM)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Total coliforms (CFU/100 ml)	1.0×10^1	1.6×10^3	3.0×10^2	3.3×10^2	6.5×10^2	3.3×10^1	ND	ND
	Fecal coliforms (CFU/100 ml)	ND	66	50	30	30	66	ND	66
	Fecal enterococci (CFU/100 ml)	ND	5.7×10^2	1.8×10^3	4.0×10^1	5.0×10^2	5.5×10^2	ND	1.7×10^2
	Vibrio spp. (CFU/100 ml)	2.5×10^3	1.3×10^3	1.8×10^3	5.0×10^3	7.4×10^3	6.4×10^3	5.6×10^3	6.4×10^3
Influent seawater	Temperature (°C)	21.4	26.0	25.7	24.6	25.4	26.3	24.0	21.8
	Salinity (psu)	16.6	12.0	11.0	9.5	5.6	10.0	10.1	7.4
	Dissolved oxygen (O_2 mg/L)	-	5.7	5.8	4.2	6.6	5.5	5.0	9.6
	Heterotrophic plate count (CFU/ml)	8.8×10^2	6.1×10^2	4.5×10^3	2.4×10^3	9.3×10^2	1.5×10^3	1.5×10^3	3.0×10^2
	PO_4-P (μM)	1.4	17	1.7	2.3	1.3	1.5	2.0	2.5
	NH_4-N (μM)	4.1	8.7	4.9	11.5	11.7	9.5	9.3	27.8
	NO_2-N (μM)	1.2	4.3	4.7	6.9	4.8	2.4	1.7	2.6
	NO_3-N (μM)	26.7	36.0	29.0	27.0	21.2	19.3	10.8	6.2
	SiO_3-Si (μM)	ND	ND	3.6	31.1	27.2	27.2	40.3	14.0
	Total coliforms (CFU/100 ml)	4.8×10^2	3.0×10^2	4.7×10^2	ND	4.0×10^3	6.0×10^2	5.0×10^2	ND
	Fecal coliforms (CFU/100 ml)	1.0×10^2	8.8×10^1	2.7×10^2	4.7×10^2	4.7×10^3	4.7×10^2	1.0×10^2	1.2×10^4
	Fecal enterococci (CFU/100 ml)	3.3×10^1	1.0×10^1	3.0×10^1	1.0×10^2	3.0×10^2	4.0×10^1	1.3×10^2	1.2×10^3
	Vibrio spp. (CFU/100 ml)	1.3×10^3	7.0×10^2	2.5×10^2	1.9×10^2	4.4×10^2	3.3×10^2	4.4×10^2	1.8×10^2

ND; not detected, -; not determined

을 보였으나, 전반적으로 WSSV의 양과 큰 상관관계를 보이지는 않았다. 종속영양세균, 총 대장균군, 분원성 대장균군, 분원성 enterococci, *Vibrio* spp.의 변화는 Table 2에 제시되어 있다. 이들 세균은 인체유해 병원성 세균 및 지표세균으로서 인체에 유해한 세균의 지표로 사용된다. 분원성 enterococci를 제외하고는 WSSV의 분포와 이들 지표세균 분포 사이의 상관관계는 변화의 추이로 보아 그리 크지 않은 것으로 판단되었다.

본 연구에서 측정된 모든 물리화학적 환경요인과 생물학적 요인을 WSSV의 변화양상과 그래프를 그려서 확인하였을 때 양식수 내의 WSSV의 분포와 유사한 분포양상을 보이는 요인에는 BOD, 엽록소 *a*, 분원성 enterococci가 포함되었다(Fig. 3). WSSV의 양과 각 환경요인들간에 상관관계를 분석한 결과 WSSV의 양과 BOD, 엽록소 *a*, 분원성 enterococci 사이에는 실질적인 상관관계가 있는 것으로 분석되었다. WSSV의 양은 BOD와 Pearson correlation coefficient 0.67 (p=0.067)을 나타내었으며, 엽록소 *a*와는 0.79 (p=0.025), 분원성 enterococci와는 0.82 (p=0.017)를 나타내었다. 한편 다른 항목들의 유의확률은 모두 0.16~0.97로 나타나 WSSV의 양과 직접적인 관련이 없는 것으로 판단되었다. 최근에 WSSV의 감염경로에 대한 연구로부터 식물플랑크톤이 바이러스의 중간 숙주임을 보고된 바 있는데(19), 본 연구결과는 이러한 사실을 뒷받침해주는 결과라 볼 수 있다. 본 연구결과는 한 곳의 정점에서 대하양식이 이루어지는 한 시기의 결과를 대상으로 이루어진 것이므로 이를 일반화하기에는 무리가 따른다. 그러나 본 연구의 결과는 WSSV와 이들 환경요인간의 관계를 집중적으로 연구할 수 있는 토대가 될 수 있을 것이며 새우 조직 내의 WSSV를 검출하는 연구만이 아니라 WSSV의 주요한 서식환경인 해수에서의 WSSV의 양에 대한 장기적인 모니터링의 필요성을 제시하고 있다. 본 연구를 통해 정립된 해수에 존재하는 WSSV의 농축방법과 정량 PCR 방법은 신속하게 양식수에 존재하는 WSSV의 양을 파악하여 새우질병의 가능성

을 사전에 인지할 수 있도록 하여 대응책을 모색하는 데에 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 말

본 연구는 산업자원부의 인하대학교 서해연안환경연구센터 (RIC) 사업 연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

1. 해양수산부. 2005. 해양환경공정시험방법.
2. APHA. 1995. Standard methods for the examination of water and wastewater, 19th ed. American Public Health Association, New York, N.Y., USA.
3. Azam, F. 1974. Silicic acid uptake in diatoms studied with [^{68}Ge]germanic acid as a tracer. *Planta* 121, 205-212.
4. Chang, C.F., M.S. Su, H.Y. Chen, and I.C. Liao. 2003. Dietary β-1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. *Fish Shellfish Immunol.* 15, 297-310.
5. Chang, P.S., H.C. Chen, and Y.C. Wang. 1998. Detection of white spot syndrome associated baculovirus in experimentally infected wild shrimp, crab and lobsters by *in situ* hybridization. *Aquaculture* 164, 233-242.
6. Choo, Y.-J. 2005. Ph. D. thesis. Prevalence of enteric viruses in oysters and oyster-harvesting environments. Seoul Nat'l University, Seoul
7. Chou, H.Y., C.Y. Huang, C.H. Wang, H.C. Chiang, and C.F. Lo. 1995. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Dis. Aquat. Org.* 23, 165-173.
8. Darley, W.M. and B.E. Volcani. 1969. Role of silicon in diatom metabolism, A silicon requirement for deoxyribonucleic acid synthesis in the diatom *Cylindrotheca fusiformis* Reimann and Lewin. *Exp. Cell Res.* 58, 334-342.
9. Dhar, A.K., M.M. Roux, and K.R. Klimpel. 2001. Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and white spot virus in shrimp using real-time quantitative PCR and SYBR green chemistry. *J. Clin. Microbiol.* 39, 2835-2845.
10. Durand, S.V. and D.V. Lightner. 2002. Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp. *J. Fish Dis.* 25, 381-389.
11. Flegel, T.W. 1997. Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 13, 433-442.
12. Francki, R.I.B., C.M. Fauquet, D.L. Knudson, and F. Brown. 1991. Classification and nomenclature of viruses: Fifth report of the international committee on taxonomy of viruses, p. 1-450. Springer-Verlag, New York, N.Y., USA.
13. Hameed, A.S.S., V. Parameswaran, S.S. Musthaq, R. Sudhakaran, G. Balasubramanian, and K. Yoganandhan. 2005. A simple PCR procedure to detect white spot syndrome virus (WSSV) of shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricious). *Aquacult. Int.* 13, 441-450.
14. Hennig, O.L. and E.R. Andreatta. 1998. Effect of temperature in an intensive nursery system for *Penaeus paulensis* (Perez Farfante, 1967). *Aquaculture* 164, 167-172.
15. Kalff, J. and E. Bentzen. 1984. A method for the analysis of total nitrogen in natural waters. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 41, 815-819.
16. Katayama, H., A. Shimasaki, and S. Ohgaki. 2002. Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and norwalk virus from coastal seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1033-1039.
17. Kim, Y.J. and M.J. OH. 2004. Characteristics of white spot syndrome virus (WSSV) infected shrimp (*Penaeus chinensis*). *Bull. Fish. Sci. Inst., Yosu Nat'l Univ.* 13, 16-22.
18. Le Moullac, G. and P. Haffner. 2000. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. *Aquaculture* 191, 121-131.
19. Liu, B., Z.M. Yu, X.X. Song, and Y.Q. Guan. 2007. Studies on the transmission of WSSV (white spot syndrome virus) in juvenile *Marsupenaeus japonicus* via marine microalgae. *J. Invertebr. Pathol.* 95, 87-92.
20. Liu, B., Z.M. Yu, X.X. Song, Y.Q. Guan, X.F. Jian, and J.F. He. 2006. The effect of acute salinity change on white spot syndrome (WSS) outbreaks in *Fenneropenaeus chinensis*. *Aquaculture* 253, 163-170.
21. Lo, C.F., C.H. Ho, S.E. Peng, C.H. Chen, H.C. Hsu, Y.L. Chiu, C.F. Chang, K.F. Liu, M.S. Su, C.H. Wang, and G.H. Kou. 1996. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. *Dis. Aquat. Org.* 27, 215-225.
22. Lorenzen, K., J. Struve, and V.J. Cowan. 1997. Impact of farming intensity and water management on nitrogen dynamics in intensive pond culture: A mathematical model applied to Thai commercial shrimp farms. *Aquaculture Res.* 28, 493-507.
23. Lu, Y., L.M. Tapay, and P.C. Loh. 1996. Development of a nitrocellulose-enzyme immunoassay for the detection of yellow-head virus from penaeid shrimp. *J. Fish Dis.* 19, 9-13.
24. Rosenberg, R. 2000. World shrimp farming 2000. *Shrimp News International* 13, 1-324.
25. Tapay, L.M., E.C.B. Nadala, and P.C. Loh. 1999. A polymerase chain reaction protocol for the detection of various geographical isolates of White Spot Virus. *J. Virol. Methods* 82, 39-43.
26. Van Hulten, M.C.W., M.F. Tsai, C.A. Schipper, C.F. Lo, G.H. Kou, and J.M. Vlak. 2000. Analysis of a genomic segment of white spot syndrome virus of shrimp containing ribonucleotide reductase genes and repeat regions. *J. Gen. Virol.* 81, 307-316.
27. Van Hulten, M.C.W., J. Witteveldt, S. Peters, N. Kloosterboer, R. Tarchini, M. Fiers, H. Sandbrink, R.K. Lankhorst, and J.M. Vlak. 2001. The white spot syndrome virus DNA genome sequence. *Virology* 286, 7-22.
28. Verghese, B., E.V. Radhakrishnan, and A. Padhi. 2007. Effect of environmental parameters on immune response of the Indian spiny lobster, *Panulirus homarus* (Linnaeus, 1758). *Fish Shellfish Immunol.* 23, 928-936.
29. Wang, Y.C., C.F. Lo, P.S. Chang, and G.H. Kou. 1998. Experimental infection of white spot baculovirus in some cultured and wild decapods in Taiwan. *Aquaculture* 164, 221-231.
30. Wongteerasupaya, C., J.E. Vickers, S. Sriurairatana, G.L. Nash, A. Akarajamorn, V. Boonsaeng, S. Panyim, A. Tassanakajon, B. Withyachumnarnkul, and T.W. Flegel. 1995. A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.* 21, 69-77.
31. Yang, B., X.L. Song, J. Huang, C.Y. Shi, Q.H. Liu, and L. Liu. 2006. A single-step multiplex PCR for simultaneous detection of white spot syndrome virus and infectious hypodermal and hae-

matopoietic necrosis virus in penaeid shrimp. *J. Fish Dis.* 29, 301-305.
32. Yang, F., J. He, X.H. Lin, Q. Li, D. Pan, X.B. Zhang, and X. Xu. 2001. Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus. *J. Virol.* 75, 11811-11820.

(Received March 10, 2008/Accepted March 17, 2008)

ABSTRACT : Quantification of White Spot Syndrome Virus (WSSV) in Seawaters Using Real-Time PCR and Correlation Analyses between WSSV and Environmental Parameters

Jaeho Song, Yoe-Jin Choo, and Jang-Cheon Cho* (Division of Biology and Ocean Sciences, Inha University, Incheon 402-751, Republic of Korea)

White Spot Syndrome Virus (WSSV) is one of the most virulent viral agents in the penaeid shrimp culture industry. In this study, WSSV in a *Fenneropenaeus chinensis* shrimp farm and an adjacent seawater were concentrated using a membrane filtration and quantified using the quantitative real-time PCR (QRT-PCR) method with newly designed primers and Taqman probe. Sensitivity of primers and probe was proven by WSSV standard curve assay in QRT-PCR. In order to demonstrate the relationship between WSSV and environmental parameters, physicochemical and biological parameters of the farm and influent seawaters were monitored from June to September, 2007. The abundance of WSSV ranged 3,814-121,546 copies per 1 liter of seawater, which was correlated with fecal enterococci (r^2=0.9, p=0.02), chlorophyll *a* (r^2=0.8, p=0.03) and BOD_5 (r^2=0.8, p=0.07). Subsequently, it is concluded that the QRT-PCR method using Taqman probe established in this study was efficient to clarify the quantification of WSSV in seawaters. Statistical analyses of environmental parameters obtained in this study also showed that the abundance of WSSV was correlated with several biological parameters rather than physicochemical parameters.