

스쿠티카섬모충의 배양 및 분열

이창훈[†]·하동수

국립수산진흥원 남해수산연구소 제주분소

양식넙치에서 분리한 스쿠티카섬모충을 배양배지(P2Y1-DW배지)를 사용하여 순수분리한 후 배양온도에 의한 성장시험, 6종류 배양배지에서의 성장시험, 약제감수성시험을 하였다. 배양온도시험에서는 25℃에서 1.50×10^3 충체/ml로 가장 좋았고, 15℃가 1.03×10^2 충체/ml로 가장 낮았다. 6종류의 배양배지에서의 성장시험에서는 3일째에 P1Y1-S배지가 2.6×10^4 충체/ml로 가장 좋았으며 DW배지에서가 2.0×10^2 충체/ml로 가장 낮았다. 5일째에는 배양배지 모두 감소하는 경향을 나타내었다. 스쿠티카섬모충의 분열방법은 앞부분을 밑으로 부착한 후 형태가 점점 서양배모양으로 변하고 시간이 경과함에 따라 2개의 세포로 분열하여 유영하다가 성충크기인 40 μ m로 되는데 부착개시부터 성충까지 소요되는 시간은 대략 3시간 전후였다.

Key words : Scuticociliata, *In vitro*, Culture medium

넙치질병을 일으키는 기생충성질병 중 치료하기 힘든 질병은 백점충과 스쿠티카섬모충으로 알려져 있다. 백점충은 감염부위가 체표나 아가미에 기생하지만 스쿠티카섬모충은 체표와 아가미뿐만 아니라 내장기관인 신장, 횡장 및 뇌조직에 기생하므로 치료하는데 어려움이 많다(乙竹, 1986; 水野, 1991). 이 충은 넙치의 먹이생물인 로티퍼에도 검출되고 있으며, 또한 넙치치어에서 성어에 이르기까지 발병하고 있어서 조기에 발견하지 못하면 치료하는데 어려울 뿐만 아니라 대량폐사를 초래하고 있다. 이 충에 대한 대책을 검토하기 위하여 Yoshinaga et al.(1993)은 배양배지종류에 따른 배양시험과 온도에 따른 성장시험을 하였고, 吉水 등(1993)은

시험관 내에서의 본 충에 대한 증식, 최적배양 온도, 최적식염농도에 관하여 보고하였다. 본 연구에서는 이 섬모충의 생활사를 구명하기 위한 일환으로 배양 및 분열과정을 밝히고 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

스쿠티카섬모충 분리 및 배양

스쿠티카섬모충에 감염된 것으로 보이는 넙치병어를 해부하여 뇌조직을 슬라이드위에 놓고 현미경($\times 200$ 배)하에서 검경하여 감염개체의 뇌조직을 적출하고 여과멸균한 10ml 용 시험관

[†]Corresponding author

Table 1. Formulae of the media used

	P1Y1-DW	P1Y1-SW	P1Y1-S	DW	SW	S
Proteose peptone(g)	1	1	1			
Yeast extract(g)	1	1	1			
DW(ml)	100			100		
SW(ml)		100			100	
Millport S(ml)			100			100

- Each medium was adjusted to pH 7.2 by 1N NaOH and autoclaved.
- Millport S(Provasoli *et al.*, 1957): NaCl 6.0g, MgCl₂ 1.0g, KCl 0.6g, CaSO₄ 0.048g/100ml
- DW : Distilled water, SW : Sea water

에서 Yoshinaga *et al.* (1993)에 준하여 분리, 배양하였다.

스쿠티카섬모충의 *in vitro*에서 각종 배양배지에 의한 성장시험

P2Y1-DW(proteose 2g, yeast extract 1g, distilled water 100ml)에서 순수 배양한 스쿠티카섬모충(BR 96620)의 배양액(1.1×10^6 충체/ml)을 1ml씩 6종류를 달리한 배양배지에서 23℃로 배양하여 1, 3, 5일째에 각각 1ml씩 취하여 10% 포르말린에 고정, 3회에 걸쳐 혈구계산반으로 측정치를 평균하여 산출하였다(Table 1).

스쿠티카섬모충의 *in vitro*에서 최적온도시험

P1Y1-SW배양배지에 1일간 자란 스쿠티카섬모충(BR96620)의 배양액(1.0×10^6 충체/ml)을 1ml 접종한 후 15, 20, 23, 25℃에서 5일간 배양하면서 접종후 1, 3, 5일째마다 0.1ml씩 취하여 10% 포르말린에 고정, 3회에 걸쳐 혈구계산반으로 측정치를 평균하여 산출하여 최적성장온도를 조사하였다.

로티퍼 체내의 스쿠티카섬모충의 감염

넙치종묘생산업체에서 먹이생물로 사용하고 있는 로티퍼에 대하여 스쿠티카섬모충의 감염 여부를 조사한 바, 1996년 9월 10일 의뢰한 시료의 채수중에 스쿠티카섬모충이 다수 감염된 것이 확인되어 이 시료를 1ml 취하여 슬라이드 글라스 위에 얹어 놓고 로티퍼 체내로의 감염 과정을 조사하였다.

스쿠티카섬모충의 분열상황

조제한 P1Y1-SW 배양배지에서 자란 스쿠티카섬모충(BR-990620)을 홀슬라이드 위에 0.1ml 얹어 놓고 분열과정을 조사하였다.

결 과

스쿠티카섬모충의 *in vitro*에서 각종 배양배지에 의한 성장시험

P2Y1-Dw(proteose 2g, yeast extract 1g, distilled water 100ml)에서 순수 배양한 스쿠티

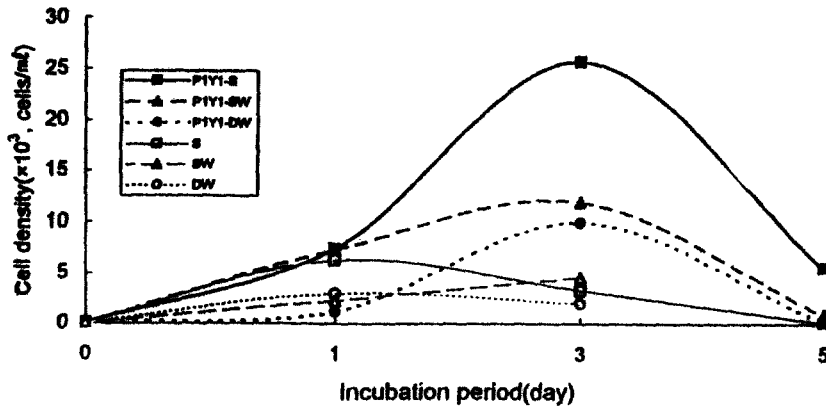


Fig. 1. Growth curves of the ciliate in different media.

카섬모충(BR96620)의 배양액(1.1×10^2 충체/ml)을 6종류 다른 배양배지에서 5일간 배양한 성장 시험결과는 Fig.1과 같다. 1일째에 P1Y1-S배지와 P1Y1-SW배지가 각각 7.4×10^3 충체/ml와 7.3×10^3 충체/ml로 다른 배지에서보다 약간 높게 나타났다. 3일째에 P1Y1-S 배지가 2.6×10^4 충체/ml로 가장 양호하였고 다음으로 P1Y1-SW배지가 1.2×10^4 충체/ml였다. 5일째에는 P1Y1-S배지가 5.6×10^3 충체/ml로 감소하였고 P1Y1-SW배지에서도 3.0×10^2 충체/ml로 감소하였다. 그의

배지에서는 배양 1일째에 약간 증가하다가 서서히 감소하는 경향을 보였다.

스쿠티카섬모충의 *in vitro*에서의 최적온도시험

P1Y1-SW배양배지에 자란 스쿠티카섬모충(BR96620)의 배양액(1.0×10^2 충체/ml)의 최적온도시험 결과는 Fig. 2와 같다. 25℃에서가 1.50×10^3 충체/ml로 가장 좋았으며, 23℃에서는 1.20×10^3 충체/ml으로 양호한 반면 15℃와 30℃에서

Fig. 2. Effect of temperature on the growth of the ciliate. The cell densities after 3-day incubation are shown.

Plate 1. ① : Scuticociliata detected at sediment solution in rotifer tank(X40), ② : Scuticociliata invaded in cilia part of rotifer(X40), ③ : Scuticociliata before infection of rotifer body(X200), ④ : Scuticociliata infected in rotifer(X100).

Plate 2. ① : Scuticociliata purely cultured in P1Y1-S medium(X40), ② : A condition attached from the lower part of anterior part of scuticociliata(X200), ③ : Scuticociliata actively moving from side to side(X200), ④ : A condition of rightly standing being attached with the anterior part of scuticociliata toward the lower part(X200).

Plate 3, ① : Scuticociliata gradually increasing size(X200), ② : Scuticociliata became depressed little by little(X200), ③ : Scuticociliata became the western pear pattern(X200), ④ : Scuticociliata just before division(X200).

Plate 4. ① : Scuticociliata actively moving just before division(X200), ② : Scuticociliata divided into two cells(X200), ③ : Scuticociliata actively moving after division into two cells(X200), ④ : An adult cell at thirty minutes after division(X200).

는 1.03×10^2 충체/ml, 1.42×10^2 충체/ml로 거의 성장하지 않았다.

로티퍼 체내의 스쿠티카섬모충의 감염

넙치양식장에서 먹이생물로 이용하고 있는 로티퍼를 대상으로 체내의 감염여부를 조사하였다. 로티퍼배양조내의 침전액내에는 스쿠티카섬모충이 다수 기생하고 있는 것이 관찰되었다(Plate 1-①). 로티퍼체내로의 감염방법은 살아 있는 로티퍼의 섬모부위(앞부분)의 옆부분을 통하여 체내에 침입(Plate 1-②), 감염하려는 상태를 나타내고 있으며(Plate 1-③), 로티퍼 체내에 감염하여 체내에 기생하고 있다(Plate 1-④).

스쿠티카섬모충의 *in vitro*에서의 분열과정

배양배지(P2Y1-S배지)에서 순수배양한 스쿠티카섬모충이 다수 관찰되며(Plate 2-①), 여기에 자란 스쿠티카섬모충을 1마리를 택하여 분열과정을 관찰하였다. 충체의 크기는 $40\mu\text{m}$ 로 앞부분을 밑으로 부착한 상태이며(Plate 2-②), 2~3분간 부착한 상태로 있다가 좌우로 활발히 움직이고 있으며(Plate 2-③) 앞부분을 밑으로 부착하여 뒷부분이 바로 서있는 상태를 나타내고 있으며(Plate 2-④), 이때의 크기는 $20\mu\text{m}$ 였다. 뒷부분의 크기가 점점 커져서 $30\mu\text{m}$ 정도로 되면서(Plate 3-①), 중앙부분이 약간 함몰되기 시작한다(Plate 3-②). 함몰상태가 점점 진행되면서 서양배모양을 나타내고 있으며 움직임도 활발해지고 또한 크기도 점점 커진다(Plate 3-③). 계속 활발히 움직이다가 함몰상태가 더 심해져 두 세포가 분열하려는 상태를 나타내고 있으며(Plate 3-④), 점점 활발히 움직이면서 마치 두 세포가 붙어있는 모습을 나타낸다(Plate 4-①). 2~3분간 계속 활발히 좌우로 움직이다

가 두세포가 분열하려고 하고 있다(Plate 4-②). 이때의 상태를 보면 함몰된 부위에서 분열세포는 앞부분으로 나타난다. 두세포로 분열후 활발히 움직이고 있으며(Plate 4-③), 이때의 크기는 각각 $20\mu\text{m}$ 였다. 분열한 세포는 30분후 성충의 모습을 나타내고 있으며(Plate 4-④), 이때의 크기는 $40\mu\text{m}$ 였다. 분열과정은 앞부분을 밑으로 부착후 성충크기로 소요되는 시간은 대략 3시간 정도였다.

고 찰

넙치에 기생하는 스쿠티카섬모충은 넙치종묘 생산시 먹이생물로 이용되고 있는 로티퍼사육조 내에서부터 치자어 및 성어에 이르기까지 감염되어 막대한 피해를 주고 있다. 이 섬모충은 표피, 아가미, 내장기관 뿐만아니라 뇌조직에 까지 기생하기 때문에 치료하는데 대단히 어려움이 많다(乙竹 등 1986, 水野 1991). 따라서 이 충에 대한 생활사를 구명하기 위한 일환으로 Yoshinaga et al.(1993)은 배양배지(proteose peptone, yeast extract 첨가한 배지)를 사용하여 스쿠티카섬모충을 순수분리하여 clone화하고 배양실험 등을 행하였고, 吉水 등(1993)은 MEM-10배지에서 배양한 CHSE-214에 접종하여 스쿠티카섬모충을 clone화하여 배양성상등 생리실험을 행하였다. Yoshinaga et al.(1993)은 6종류 배양배지를 달리하여 7일간 배양한 결과 P2Y1-1/2S배지가 3일째에 가장 좋았으며 5일 이후부터는 서서히 감소된다고 하였다. 이러한 감소요인은 K^+ , Ca^{++} 또는 Mg^{++} 등 필수미네랄의 첨가에 따라 차이가 생긴다고 하였는데 본 실험에서는 Yoshinaga et al.(1993)의 배양배지 조성을 변형하여 배양배지를 달리하여 배양한 결과 P2Y1-S배지에서는 3일째에 비슷한 결과를 나타내었으나 5일째에는 급격히 감소되는 경향을

나타내어 약간의 차이점이 있었다. 이러한 차이점은 Yoshinaga *et al.*(1993)가 언급한 필수미네랄(K^+ , Ca^{2+} 또는 Mg^{2+})의 첨가여부에 따라 차이가 생기지 않나 여겨진다. 또한 사용한 6종류 배양배지 중 proteose peptone과 yeast extract를 첨가한 배지가 첨가하지 않은 배지보다 성장이 양호한 결과를 얻은 사실은 현재 제주도 내 넙치종묘배양장 일부에서는 넙치 먹이생물인 rotifer를 배양할때 yeast를 첨가하여 배양하고 있으며 이러한 종묘배양장에서는 스쿠티카섬모충이 검출되는 경우가 많은 것과 관련이 있는 듯 하다. Yoshinaga *et al.*(1993)은 온도별 증식시험에서는 25℃에서 가장 좋았으며 적정온도는 22.5~27.5℃라고 하였다. 吉水 등(1993)은 15~30℃가 적정온도이며 최적증식온도는 25℃라고 하였다. 본 실험에서는 25℃가 가장 좋았으며 적정온도도 20~25℃ 범위이며, 15, 30℃인 경우 증식이 잘 되지 않은 온도였다. 따라서 Yoshinaga *et al.*(1993)가 보고한 것과 비교하였을 때 비슷한 결과를 나타내었으나 吉水 등(1993)과는 고온범위에서 약간의 차이가 있었다. 스쿠티카섬모충에 대한 생활사를 구명하기 위한 일환으로 이 층의 분열방법을 조사한 결과 배양배지(PLY1-S배지)에서 순수배양한 스쿠티카섬모충은 서양배모양으로 함입되면서 2개의 딸세포를 형성하여 분열되는데 분열된 1개 세포는 20μm의 크기였으며 분열후 심하게 유

영하다가 30분후 성충의 크기인 40μm로 성장하였다. 이 층은 부착개시시부터 성충의 크기에 이르는 시간을 대략 3시간으로 여겨진다.

참 고 문 헌

- Provasoli, L., Mclaughlin, J.J.A. and Droop, M.R. : The development of artificial media for marine algae. Arch. Mikrobiol., 25:392-428, 1957.
- Yoshinaga, T and Natazoe, J. : Isolation and *in vitro* cultivation of an unidentified ciliate causing scuticociliatosis in Japanese flounder(*Paralichthys olivaceus*) : 魚病研究, 28(3) : 131~134, 1993.
- 水野芳嗣 : ヒウメのスク-チカ症-現場での發生狀況と對策 について. 養植, 28(3) : 78~82, 1991.
- 乙竹 充, 松里壽彦 : ヒウメ *Paralichthys olivaceus* 稚魚のスク-チカ 纖毛蟲(膜口類)症. 養殖年報, 9:65~68, 1986.
- 吉水 守・日向進一・吳明柱・生駒三奈子・木村 喬久・森 立成・野村哲一・繪面良男 : (*Paralichthys olivaceus*)의スク-チカ 感染症 纖毛蟲:スクチカ 培養性狀, 藥劑感受性, 病原性 : J. Fish Pathol., 6(2) : 205~208, 1993

Culture characteristics and division process of scuticociliata *in vitro*

Chang Hoon Lee and Dong Soo Ha

Cheju Branch, South Sea Fisheries Research Institute, NFRDA, Cheju 690-192, Korea

To establish effectively for isolation and cultivation and cultivation of scuticociliata, we tried to culture scuticociliata using culture medium(P2Y1-DW medium). The number of scuticociliata reached 1.5×10^3 cells/ml at the temperature of 25℃ in 3 days, but 1.03×10^2 cells/ml at 15℃. In P1Y1-S medium growth reached 2.6×10^4 cells/ml in 3 days, but the number in DW medium was the lowest with 2.0×10^2 cells/ml. In all these media, the number decreased after 5 days. As the method of the parasite's division, after attaching the anterior part of the body, its shape gradually changed to a western pear-like appearance. The parasite completely divided into two cells, then freely swam and became an adult cell, size of 40 μ m in size within about 3 hours from attaching.

Key words : Scuticociliata, *In vitro*, Culture medium