

## 양식 넙치, *Paralichthys olivaceus*에서 분리된 스쿠티카 섬모충 *Philasterides dicentrarchi*의 병원성

진창남\* · 강현실 · 이창훈\*\* · 강선경 · 이영돈 · 이제희 · 허문수†

\*제주지방해양수산청, \*\*국립수산과학원 제주수산연구소, 제주대학교 해양과학대학 해양과학부

## The Pathogenicity of Scuticociliate *Philasterides dicentrarchi* Isolated from Cultured Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus*

Chang-Nam Jin \*, Hyun-Sil Kang, Chang-Hoon Lee \*\*, Sun kyoung Kang, Young-Don Lee, Jehee Lee and Moon-Soo Heo †

\*Jeju Regional Maritime Affairs and Fisheries Office, Jeju 690-704

\*\*Jeju Fisheries Resource Institute NFRKE, Jeju 690-102

Faculty of Marine Science, Cheju National University, Jeju 690-756

In previous study, scuticociliate *P. dicentrarchi* was isolated from farmed flounder during the december 2004 to april 2005. Pathogenicity, mortality and infection symptom were studied using 3 cm and 5 cm groups of juvenile flounder.

The ciliates were exponentially increased from bottom layer of the experimental tanks, which propagated within 2000 cells/ml ( $1.4 \times 10^3$  cell  $\text{mL}^{-1} \sim 2.5 \times 10^3$  cell  $\text{mL}^{-1}$ ) after 6 days of inoculation. The middle layer was maintained within 300 cells/ml.

Both 3 cm and 5 cm groups were infected with ciliates, mainly 3 cm group showed high mortality during the experimental period. The death of 3 cm group was started from 5 days and showed 95.6% of mortality after 28 days of first inoculation. The control group showed 4.4% of mortality however, we could not observed any ciliates.

The death of 5 cm group was started later than 3 cm group after 18 days of first inoculation. The total mortality was 71% during 28 days. No mortality and infection symptoms were observed in the control.

We also studied SSU rRNA gene of ciliates which, re-isolated from infected flounder of experimental groups. When SSU rRNA in this study compared with previous data showed that the identified strain of both previous and present study was same.

*Key words: Philasterides dicentrarchi, Scuticociliate, Paralichthys olivaceus.*

최근 들어 스쿠티카충은 한국과 일본의 육상 수조식 양식장에서 양식되는 주요 해산어인 넙치에 많이 감염되고 있으며 (Otake and Matsusato, 1986; Mizuno, 1993; Lee *et al.*, 2001), 육상 넙치양식장 증가에 따라 스쿠티카충의 발병과 피해가 증가하고 있다 (Lee *et al.*, 2001; Jin *et al.*, 2003). 특히 치어기의 넙치에 스쿠티카충이 감염

될 경우 아가미와 체표뿐만 아니라 안구, 뇌, 내부 장기 등에 침투하므로 양식현장에서 가장 어려움을 겪는 질병의 하나이다 (Mizuno, 1993; Lee *et al.*, 2001; Jin *et al.*, 2003). 스쿠티카충은 넙치 외에도 많은 해산 양식어류와 관상어에 감염되어 피해를 입히고 있는데 southern bluefin tuna, 대서양 연어, 농어, 티벳 등 다양한 어종에

†Corresponding Author : Moon-Soo Heo, Tel : 064-754-3473,  
Fax : 064-756-3493, E-mail : msheo@cheju.ac.kr

감염되고 있으며, *Uronema* 속 (Cheung *et al.* 1980, Bassler 1983, Gill and Callinan 1997, Munday *et al.* 1997)과 *Miamiensis* 속 (Thompson and Moewus 1964), *Tetrahymena* 속 (Ferguson *et al.* 1987), *Philasterides* 속 (Dragesco *et al.* 1995, Iglesias *et al.* 2001)에 속하는 종들이 보고되고 있다. 특히 넙치와 비슷한 방법으로 유럽에서 양식되는 터뷰에 *Philasterides dicentrarchi* 충이 감염될 경우 뇌, 근육, 내부 장기 등에 침투하므로 치료가 어렵고 치명적인 피해를 입히고 있으며 (Iglesias *et al.*, 2001), 제주도 지역의 육상양식장에서 양식되는 제주복에서도 미동정 스쿠티카충이 감염되어 피해를 입히고 있다 (Kang *et al.*, 2005).

현재까지 육상 수조에서 양식되는 넙치에 많은 스쿠티카충 감염사례가 보고되고 있으나, 정확한 종 동정이 이루어지지 않아 스쿠티카충의 종류별 발병 또는 피해상황에 대한 정보가 부족한 실정이었다. 최근 들어서는 넙치에 감염되는 스쿠티카충의 형태적, 유전적 동정이 이루어져 *Pseudocohnilembus persalinus*, *Miamiensis avidus*, *Uronema marinum*, *P. dicentrarchi* 등이 보고되고 있다 (Jee *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2004; Jung *et al.*, 2005). 육상 넙치양식장에서 스쿠티카섬모충 감염어를 검사해보면 다양한 형태적 특징을 보이는 스쿠티카충들이 관찰되고 있다. 그러나 치어기에 안구나 뇌 등에 침투하여 치명적인 피해를 입히는 충은 형태적으로 *P. dicentrarchi*와 비슷한 특징을 가지고 있는 경우가 많아 이 충이 양식넙치의 치어에 많은 피해를 입히는 것으로 추정되고 있다. 본 연구는 넙치 치어기에 많이 감염되는 것으로 추정되는 것으로 추정되는 *P. dicentrarchi* 충을 넙치 치어에 인위 감염시켜 병원성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 스쿠티카충 *Philasterides dicentrarchi*

제주도 북제주군 지역의 육상양식장에서 양식

중인 넙치 치어 (14 cm)의 뇌에서 분리된 스쿠티카 섬모충 *P. dicentrarchi*를 제주대학교 해양과 학대학 해양생물공학과에서 분양 받아 실험에 이용하였다.

### 인위감염 실험어

인위 감염 실험어는 제주도 북제주군 구좌읍 지역의 종묘생산장에서 생산된 넙치종묘로서 스쿠티카충이나 기타 질병에 감염되지 않은 건강한 치어를 이용하였다. 이들 실험어는 3 cm 그룹 (평균 3.2 cm 범위 : 2.7~3.6 cm)과 5 cm 그룹 (평균 5.4 cm, 범위 : 4.5~6.4 cm)으로 나누어 실내사육수조에서 사육하면서 스쿠티카충을 인위 노출시켜 인위감염을 유도하였다.

### 실험구 및 실험수조

인위 감염 실험 수조는 Fig. 1과 같이 43 cm × 63 cm × 25 cm 의 4각 FRP 수조에 인위 감염 사육조와 여과조로 나누었다. 사육조는 43 cm × 43 cm × 25 cm, 여과조는 43 cm × 20 cm × 25 cm 크기로, 수심은 20 cm로 하였다 (Fig. 1). 사육조 수량은 37 L, 여과조를 포함한 총 수량은 50 L로 하였으며, 사육수는 지하해수를 80°C에서 20분 동안 가열하여 살균·살충 후 이용하였다. 순환여과제는 상층은  $\varnothing$  6~8 mm, 저층은  $\varnothing$  4~6 mm의

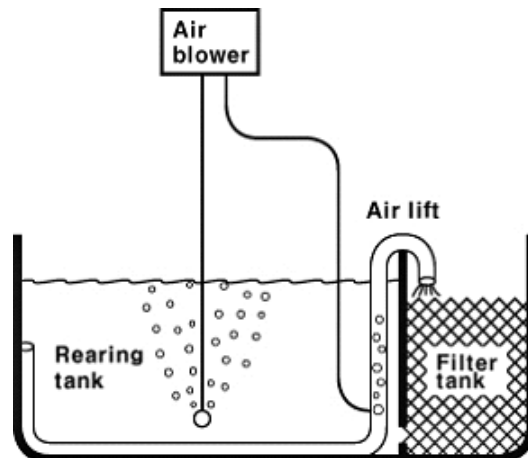


Fig. 1. Schematic diagram of experimental tank

굵은 모래를 이용했으며 여과조 위층은 스폰지를 덮어 사육조에서 리프팅된 사육수가 여과조 전면에 분산된 후 물리적, 생물학적 여과가 이루어지도록 했다. 사육수의 순환은 에어리프트를 이용하여 시간당 1.5 회전 시켰다.

위와 같은 실험수조를 각각 3 cm 그룹과 5 cm 그룹으로 나누어 각 그룹별 폐사율 실험구 및 대조구를 설정하였다. 5 cm 그룹은 실험수조당 100 마리를, 3 cm 그룹은 실험수조당 각 160 마리를 수용하였다. 실험어 수용량은 종묘배양장에서 동일 수면적에 수용하는 양을 기준하여 5 cm 그룹은 1/2을, 3 cm 그룹은 1/3을 수용하였다.

***P. dicentrarchi* 층의 배양 및 접종**

인위감염을 위한 *P. dicentrarchi* 층의 배양은 종묘생산장의 사육수조 저면과 비슷한 환경에서 배양한 후 접종하였는데, 배지는 cell culture flask (20 ml)에 멸균해수 20 ml에 H사의 Ø 0.5 ~ 0.6 mm의 초기 넙치 치어사료 (Table 1) 1 mg/ml, penicillin과 streptomycin을 100 IU 첨가하여 제조하였다. 여기에 CHSE-214 (chinook salmon embryo) 세포주에 순수 배양중인 스쿠티카층을  $3.0 \times 10^3$  cell/ml 농도로 접종하여 15°C, 7일간 배양하여  $9.8 \times 10^4$  cell/ml로 증식시켜 사용하였다.

배양된 섬모충을 실험수조에 접종하기 위해 멸균 사육해수를 채우고 5일간 순환여과 시킨 후, 수조 저면에 섬모충의 먹이로 넙치치어 배합 사료를 실험수조당 2 g씩 마쇄하여 뿌려주었다. 여기에 사육수 ml 당 층 100 cell을 기준하여 배

양된 스쿠티카층  $3.7 \times 10^6$  cell을 각 실험수조에 접종하고 대조구에는 섬모충이 없는 배양 배지만 동일량 첨가하였다. 층 접종 2일째 섬모충 증식을 확인하고 나서 넙치 치어를 각 실험수조에 방양하였으며, 실험 2일 간격으로 수조당 0.2 g의 마쇄 넙치 사료를 투입하여 실험어 섭이 및 층의 생육에 이용하였다. 또한 물의 오염을 방지하기 위해 사육수는 2일 간격으로 10%의 상층수를 교환하였다.

**스쿠티카층의 계수**

배양과정의 스쿠티카층 계수는 배양배지 6 µl를 pipetting하여 counting chamber 위에 떨어뜨리고 glutaraldehyde 1% 용액을 소량 첨가하여 층을 고정한 후 커버글라스 (18 × 18 mm)로 덮어 광학 현미경 (Olympus BX 50, × 100)으로 계수하였다. 감염수조에 접종시킨 층의 계수는 저층과 상층의 사육수를 100 µl pipetting하여 counting chamber 위에 떨어뜨리고 glutaraldehyde 1% 용액으로 층을 고정한 후 광학 현미경 (Olympus BX 50, × 100)으로 계수하였다.

**스쿠티카층의 감염 상태 확인**

실험기간 동안 각 실험구로부터 스쿠티카층 감염에 의해 폐사된 실험어를 채집하여 현미경으로 각 장기 및 조직을 검사했다. 조직 검사는 감염어를 Bouin's 용액에 고정하여 일반적인 조직표본 검사방법에 따라 파라핀에 봉입한 후 5 µm 두께의 조직표본을 만들어 Haematoxylin-Eosin 염색을 하여 현미경으로 관찰하였다.

**Table 1.** Composition of the experimental diets

(Unit : g)

| Diets form | Diets size (Ø mm) | Component (diets per 100g) |           |                 |           |     |     |
|------------|-------------------|----------------------------|-----------|-----------------|-----------|-----|-----|
|            |                   | Crude protein              | Crude fat | Crude cellulose | Crude ash | Ca  | P   |
| Granule    | 0.5~0.6           | 52.0                       | 12.0      | 7.0             | 20.0      | 1.0 | 2.7 |

### 감염층의 재분리 및 유전학적 분석

각 실험구별 스쿠티카층에 감염된 폐사어가 동일 층에 의한 감염 유무를 확인하기 위해 유전학적 분석을 수행하였다. 층의 재분리는 먼저 뇌에 감염되어 폐사된 실험어의 뇌를 절취하여 70% 알코올에 10초간 처리하고 멸균해수로 washing 하였다. 다음에 뇌 조직을 절개하여 멸균해수에서 뇌 조직을 이용하여 초대배양 하였으며, 초대 배양된 섬모층의 genomic DNA를 분리하기 위해 CHSE-214에 재접종하고 15°C, 5일간 배양하였다. 스쿠티카층이 완전히 세포주를 섭취하였을 때 배양액 1.5 ml를 1,500 rpm, 10분간 원심분리하여 pellet을 수집하였다. 수집된 pellet에 proteinase K와 lysis buffer를 처리하여 genomic DNA를 분리하였다(Qiagen, Germany).

섬모층의 유전학적 분석에는 small subunit (SSU) rRNA 서열을 증폭하기 위해 Scv18F 5'-AACCTGGTTGATCYTGCCAGTA-3', Scv18R 5'-GATCYWTCTGCAGGTTACCTAC-3'를 제작하였고, PCR 반응은 100 ng의 genomic DNA, dNTPs, 10 × Ex taq polymerase buffer, 0.5 unit의 Ex taq polymerase (Takara, Japan) 혼합액에 증류수를 가하여 최종부피 50 µl로 맞추고 Takara PCR thermal cycler (Takara, Japan)를 사용하여 증폭하였다. SSU rRNA의 증폭은 94°C, 3분간 predenaturation, 94°C에서 30초간 denaturation, 55°C에서 35초간 annealing, 72°C에서 2분간 extension을 30회 반복하고, 마지막 72°C에서 5분간 extension을 수행하였다. 증폭된 PCR 산물의 크기는 1% agarose gel 전기영동을 수행하여 확인하였다. 증폭된 PCR 산물은 pBluescript II SK(-) 벡터에 클로닝하여 plasmid DNA를 분리하고 (주)마크로젠에 의뢰하여 SSU rRNA의 염기서열을 결정하였다.

### 폐사율 조사

폐사율 조사는 각 실험구별로 매일 폐사되는 개체를 조사하여 4일 단위로 구간별 폐사량과

구간별 폐사율 집계하였다. 다음에 각 구간별 폐사량을 합산하여 누적폐사율을 구하였다.

### 2차 감염 세균조사

인위 감염에 의해 폐사된 치어의 섬모층 감염에 의한 궤사 부위와 복강, 아가미 등에서 2차 감염된 병원균을 TSA Agar, BHI Agar 배지에 내용물을 도말한 후 25°C, 24시간 배양하여 유전학적 동정과정을 수행하였다.

## 결 과

### 인위감염 수조의 스쿠티카층 밀도

각 실험수조에 스쿠티카층 접종 후 저면의 초기 넘치 치어사료를 먹이로 활발히 증식하였으며 실험구별 섬모층의 생육은 비슷한 패턴을 보였다. 섬모층 접종 2일 경과 후 실험어 방양시 실험수조 저면의 섬모층 밀도는  $6.3 \times 10^2$  cell/ml ~  $1.0 \times 10^3$  cell/ml 범위로 실험구별 큰 차이가 없었으며, 섬모층 접종 6일째 (2구간)부터는  $1.4 \times 10^3$  cell/ml ~  $2.5 \times 10^3$  cell/ml 범위로 ml당 2,000 cell 내외의 밀도를 유지하였다. 반면에 중층인 경우는 ml당 100 ~ 200 cell 내외의 매우 낮은 분포를 보였으며 (Fig. 2), 대조구에서는 층이 관찰되지 않았다.

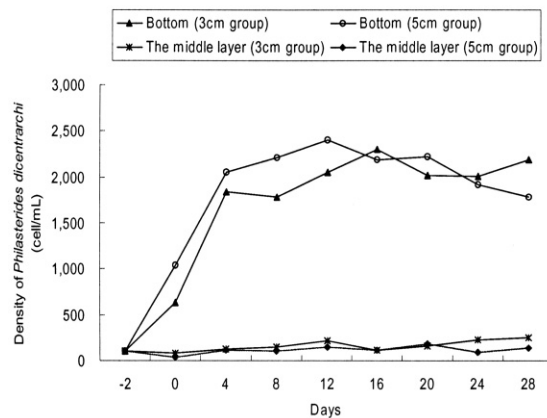


Fig. 2. Ciliate density at the bottom layer and middle layer of experimental tank according to incubation days.

인위 감염에 의한 폐사

3 cm 그룹의 *P. dicentrarchi* 층 감염에 의한 폐사는 치명적이었다. 3 cm 그룹의 실험구는 접종 4일째 (1구간)까지는 폐사 개체가 나타나지 않았으나 5일째부터 폐사되기 시작하여 2구간 (5~8일째)까지의 폐사율은 15%로 비교적 낮았다. 그러나 3구간 (9~12일)에는 누적폐사율이 40%를 넘어서면서 급격히 폐사율이 증가하였다 (Fig. 3). 접종 28일 만에 폐사율이 95.6%로 대부분의 실험어가 폐사하였으며 폐사체에는 전량 스쿠티카 섬모충 감염이 확인되었다. 감염 5일째 폐사어가 관찰되기 시작한 이후 어체의 감염 부위를 확인한 결과, 실험 14일째 감염 어체의 뇌 조직 내 섬모충의 감염을 확인하였다 (Fig. 9). 이

와는 달리 3 cm 그룹의 대조구는 28일간의 실험 기간 중 4.4%의 폐사율을 보였으나 스쿠티카층에 의한 감염은 확인되지 않았다.

5 cm 그룹의 실험구는 3 cm 그룹에 비해서 폐사율이 현저히 낮았는데 실험구에 층 접종 후 16일 (4구간)까지는 폐사 개체가 없었으나 5구간 (17~20일)부터 폐사되기 시작했다. 그러나 폐사율은 3 cm 그룹에 비해 완만하게 진행되었으며 3 cm 그룹이 대부분 폐사된 28일 (4구간)째에는 71%가 폐사되어 3 cm 그룹에 비해 본 섬모충 감염에 따른 폐사율이 현저히 낮았다 (Fig. 4). 대조구에서는 실험기간동안 폐사체가 없었으며 스쿠티카층의 감염도 없었다.

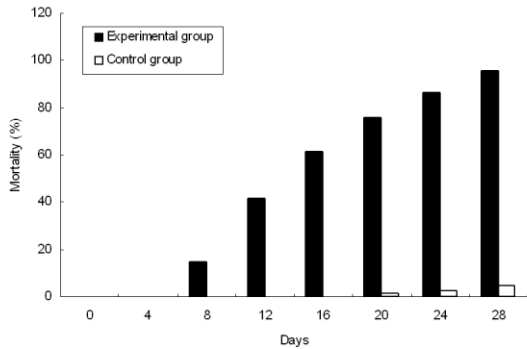


Fig. 3. Accumulative mortality on experimental infection and control groups of 3 cm flounder by *P. dicentrarchi*.

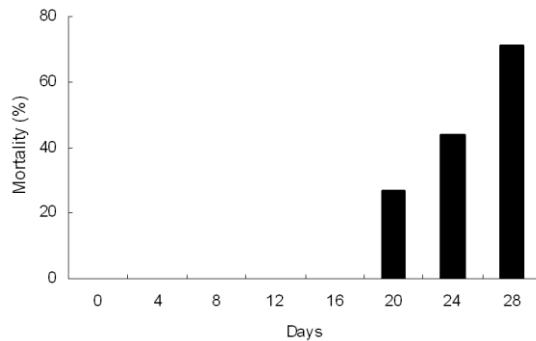


Fig. 4. Accumulative mortality on experimental infection of 5 cm flounder by *P. dicentrarchi*.

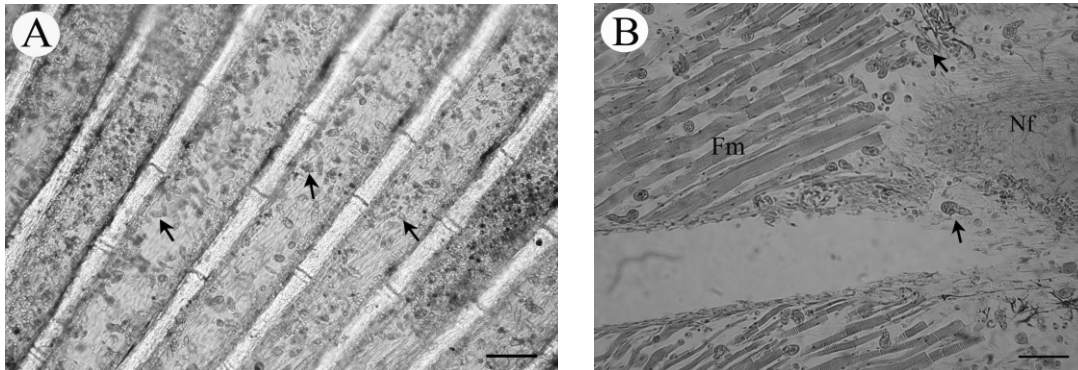


Fig. 5. A number of ciliates are infected to fin of flounder. (A) Photograph of ciliates (arrows) infiltrated into the fin ray of dorsal fin in flounder. Scale bar = 100  $\mu\text{m}$ . (B) Light micrograph of the caudal fin in the infected flounder showing numerous ciliates (arrows) that have invaded this fin tissue. Note that the areas of severe tissue necrosis surrounding the invading ciliates, Fm: fin membrane, Nf: necrosis fin membrane. HE staining. Scale bar = 50  $\mu\text{m}$ .

### 스쿠티카 섬모충에 의한 실험어의 감염 상태 및 증상

실험어의 층에 대한 감염은 3 cm 그룹과 5 cm 그룹이 비슷한 양상을 보였다. 주 감염 부위는 지느러미 (Fig. 5), 피부 및 근육 (Fig. 6), 아가미의 표피 및 조직 (Fig. 7), 안구 (Fig. 8), 뇌 (Fig. 9) 등이었다. 3 cm 그룹은 인위감염에 의한 폐사어는 병리조직학적 증상이 지느러미·근육패사가 이루어지기는 했으나 육안으로 확인될 정도는 아니었으며 체색흑화가 주 증상이었다 (Fig. 10A). 그러나 5 cm 그룹은 지느러미나 피부 껍사, 조직괴양, 체색흑화 등의 다양한 외부증상을 보였다 (Fig. 10B).

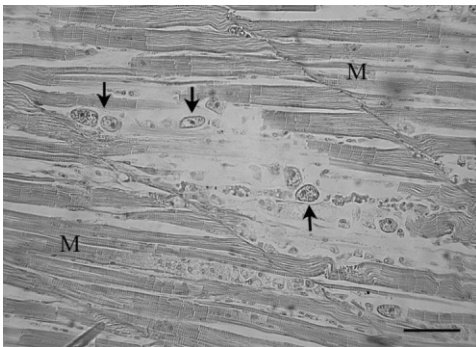


Fig. 6. Light micrograph of the muscle in the infected flounder showing ciliates (arrows) that have invaded this muscle tissue. Note that the areas of severe tissue lysis surrounding the invading ciliates, M: muscle. HE staining. Scale bar = 50  $\mu\text{m}$ .

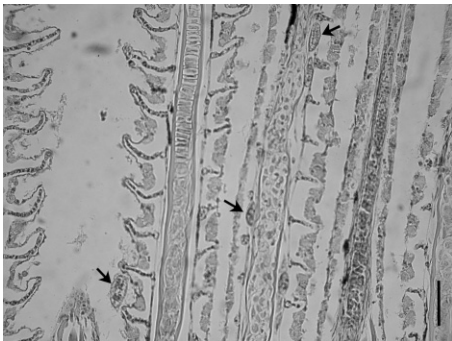


Fig. 7. Light micrograph of the gill in the infected flounder showing ciliates (arrows) that have invaded into the gill filament tissue. HE staining. Scale bar = 50  $\mu\text{m}$ .

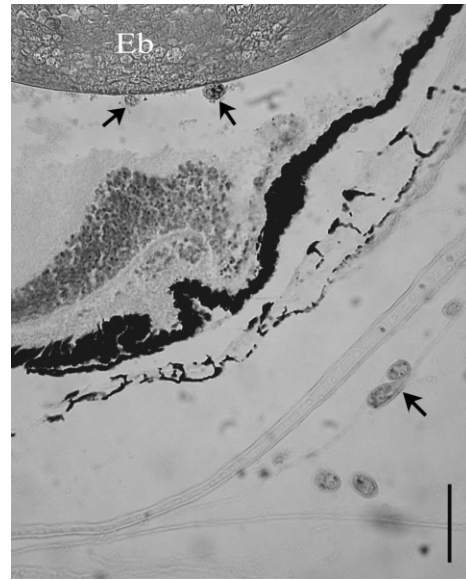


Fig. 8. Light micrograph of eye in the infected flounder showing ciliates (arrows) that have invaded into the vitreous cavity of eye tissue, Eb; eye ball. HE staining. Scale bar = 50  $\mu\text{m}$ .

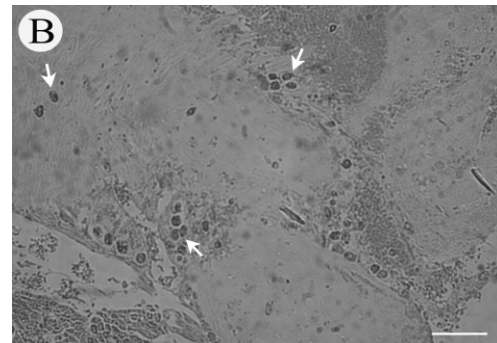
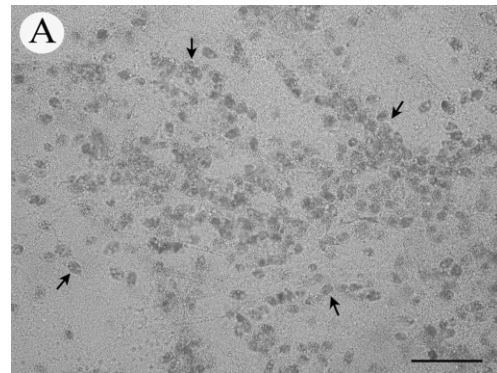


Fig. 9. Photograph of scuticociliates, *P. dicentrarchi* (arrows) are infected to the brain of flounder. (A) Microscopic observation, (B) Light microscopic observation, HE staining. Scale bar = 100  $\mu\text{m}$ .

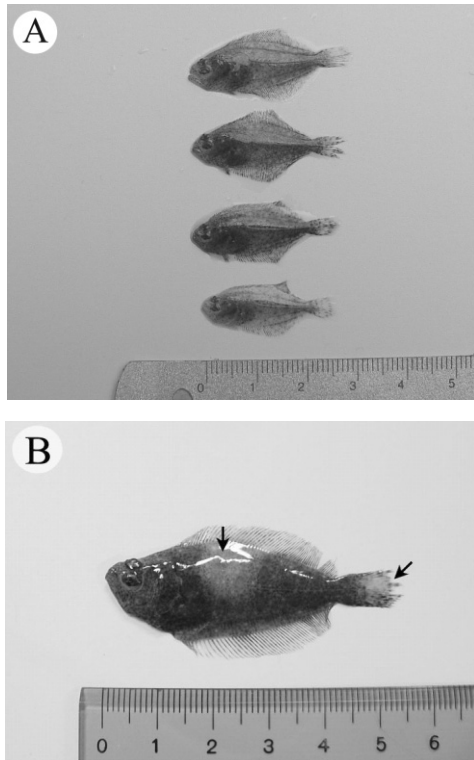


Fig. 10. External features of infected flounder infected with ciliates. (A) The flounder of 3 cm in size. (B) The flounder of 5 cm in size.

#### 인위 감염어의 스쿠티카충 재분리 및 유전적 검토

실험구별 스쿠티카충에 감염된 폐사어의 뇌로부터 스쿠티카충을 분리하고 초기 섬모충과 동일종인지를 확인하기 위해 ribosome의 구성 유전자의 하나인 SSU rRNA의 염기서열을 증폭하여 확인하였다.

3 cm 그룹과 5 cm 그룹에서 재분리된 스쿠티카 섬모충으로부터 genomic DNA를 분리하여 SSU rRNA를 PCR 증폭하여 전기영동 결과 약 1760 bp의 산물이 증폭되었다. 이들 산물을 클로닝 과정을 거쳐 염기서열을 분석한 결과, 각 실험구의 SSU rRNA는 PCR 증폭시 사용된 forward와 reverse primer 서열을 포함하여 1759 bp로 확인되었다. 각 실험구의 SSU rRNA 서열을 이전 연구에서 분석된 SSU rRNA (자료 나타내지 않음) 서열과 비교시 99.8~100%의 염기서열 identity

를 나타내었다. 이로써, 본 감염 실험에서 재분리된 섬모충의 유전학적 분석결과 초기 집종 충과 동일 섬모충에 의한 감염임을 확인하였다.

#### 혼합 감염균 조사

두 실험구의 스쿠티카충 감염에 의해 폐사된 개체와 대조구의 폐사어로부터 간 신장, 비장 조직 등에서 *Vibrio ichthyoenteri* 균 및 *Vibrio. sp.* 균이 검출되었다.

## 고 찰

한국과 일본에서 넙치양식이 발달하면서 스쿠티카충이 양식넙치에 감염되어 질병을 유발하였는데 1986년에 Ototake 와 Matsusato에 의해 보고된 이후 많은 감염사례가 국내·외에서 보고되고 있으며 (Mizuno, 1993; Lee *et al.*, 2001), 1990년 이후 국내 넙치양식장의 증가에 따라 스쿠티카충의 발병과 피해가 증가하고 있다 (Lee *et al.* 2001). Jin 등 (2003)에 의하면 양식장에서 미동정 스쿠티카충이 7 cm 미만의 넙치 치어에 감염된 경우 평균 53.8%의 폐사율을 보였으며 최고 87.5%의 폐사율을 기록한 경우가 있으나 넙치에 감염되는 스쿠티카충의 종 동정이 이루어지지 않아 스쿠티카충의 종별 발병상황이나 피해상황에 대해서는 보고된 바 없다. 그러나 유럽에서는 *P. dicentrarchi* 섬모충이 육상수조에 양식하는 터봇에 감염되어 많은 피해를 입히는 것으로 보고되고 있으며, 수조내 양식중인 터봇을 100% 폐사시킨 경우도 있다 (Iglesias *et al.*, 2001). 침투경로로는 구강, 비강, 지느러미, 아가미 등 다양한 경로를 통해 (Paramá *et al.*, 2003) 안구·뇌·내부 장기 등의 기관까지 침투하는 것으로 보고되었다.

최근 들어서는 넙치에 감염되는 스쿠티카충의 형태적, 유전적 분석에 의해 종 단위의 동정이 이루어지고 있는데 넙치에 감염되는 *P. dicentrarchi*는 Kim 등 (2004)에 의해 최초로 보고된 바 있다. 본 실험에서 넙치 치어에 *P. dicentrarchi*를 인위 감염시킨 결과 치명적인 피해를 입히는

것으로 나타나 터봇과 마찬가지로 양식넙치에 감염되어 많은 피해를 입히는 스쿠티카충은 *P. dicentrarchi*일 가능성이 높은 것으로 추정된다.

본 섬모충의 실험수조내 생육상황은 총 접종 6일 후 저면에서는 사육수  $\text{m}\ell$ 당 2,000 cell 내외로 증식하였으나 중층에는  $\text{m}\ell$ 당 300 cell 미만의 낮은 밀도를 유지하여 저면의 유기물이 중요한 요소임을 알 수 있었다. Chi 등 (1997)은 넙치양식 수조에서 스쿠티카충의 밀도가 저면은 최고  $7.3 \times 10^3 \text{ cell}/\text{m}\ell$  중층은 최고 4.1  $\text{cell}/\text{m}\ell$ 로 보고하였는데 본 실험의 인위감염을 위한 총 배양과 비슷한 양상을 보였다. 또한 섬모충 접종을 위한 *in vitro* 배양에서도 넙치 치어사료를 먹이로 하여  $10^5 \text{ cell}/\text{m}\ell$  가까이 증식하였는데, 수조내 유기물 중에서도 넙치치어의 초기사료가 본 섬모충 번식에 중요한 요인으로 사료된다.

섬모충의 농도가 저면 사육수  $\text{m}\ell$ 당 2,000 cell 내외에서 치어에 쉽게 감염되며 폐사가 이루어지나 폐사율은 어체의 저항력에 따라 달라지는 것으로 보인다. 즉 비슷한 섬모충 밀도에서 5 cm 그룹에 비해 3 cm 그룹의 폐사율이 현저히 많았는데 이는 넙치의 크기가 작을수록 조직이 연약하고 저항력이 약하여 섬모충이 쉽게 침투하기 때문인 것으로 사료된다. 또한 5 cm 그룹의 대조구는 실험기간 동안 폐사어가 없었으나 3 cm 그룹은 4.4%의 폐사율을 보였다. 일반적으로 넙치 종묘배양시 3 cm 크기인 경우 월 5% 이상의 감모율을 감안하면 정상적인 감모율로 사료된다.

두 실험 그룹의 감염어 외부증상도 뚜렷한 차이를 보였는데 3 cm 그룹인 경우 충체가 조직 속에 침투하더라도 체색이 검어지는 것 외에 외부 궤양 등의 증상이 나타나기 전에 폐사하였다. 그러나 5 cm 그룹인 경우 총 감염후 근육 조직에 침투하여 궤양이 상당히 진행된 후 폐사하는 개체도 상당수 있었다. 이는 3 cm 그룹인 경우 궤양이 형성될 정도로 병세가 진행되기 전에 이미 폐사가 이루어지나 5 cm 그룹인 경우 어느 정도 궤양이 나타날 정도로 증상이 악화되어도 생존이 가능하기 때문인 것으로 보인다.

두 실험그룹 모두 폐사어의 간, 신장, 비장 등 내부 장기에 대한 세균 감염 유무를 확인한 결과 *Vibrio ichthyoenteri*와 *Vibrio sp.*가 검출되었으며 대조구의 폐사어에도 이들 비브리오균이 검출되었는데, 이들 세균의 혼합감염도 폐사의 일부 원인이 된 것으로 추정된다. Jin 등 (2003)에 의하면 스쿠티카 감염후 2차 비브리오균 및 활주세균 감염이 많다고 하였는데 본 실험어의 비브리오균 감염 또한 스쿠티카충의 어체조직 궤사에 따라 쉽게 2차 감염된 것으로 보인다.

*P. dicentrarchi*충은 어체의 체내에 침투하여 피해를 입히므로 (Iglesias *et al.*, 2003) 약육 등에 의해서 구제가 어려워 감염예방이 중요한 과제라 할 수 있다. 넙치 종묘를 생산하는 수조의 저면은 *P. dicentrarchi*의 생육에 알맞은 환경이므로 치어기 감염예방 또는 감염 억제를 위해서는 사육수조 바닥환경을 깨끗이 해주는 것이 중요할 것으로 보이며 2차로 감염되는 비브리오균의 치료도 병행해야할 것으로 보인다.

지난 수십 년 동안 scuticociliate의 분류와 분류체계는 형태학과 발생학적 특성에 기초를 두어 많은 연구들이 이루어지고 있지만 그룹내 여러 taxa 사이의 계통발생학적 관계가 여전히 모호하게 남아있다 (Shang *et al.*, 2003). 이런 이유로 최근 들어 여러 섬모충의 분류체계를 재해석하기 위한 방법의 하나로 SSU rRNA 염기서열 결정이 활발히 이루어지고 있다. 본 연구에서도 감염어에 접종시킨 충을 재분리하고 동일 섬모충에 의한 감염을 확인하기 위하여 SSU rRNA를 이용한 유전학적 분석을 수행하여, 동일 섬모충에 의한 감염을 확인하였다.

## 요 약

2004년 12월부터 2005년 4월까지 양식넙치에서 분리된 스쿠티카 섬모충 *P. dicentrarchi*를 넙치 치어 3 cm 그룹과 5 cm 그룹에 인위 감염시킨 후 감염에 따른 폐사율 등의 병원성을 조사하였다.



소형 수조에 스쿠티카충 *P. dicentrarchi*를 접종시킨 결과 수조저면에서 활발히 증식하였으며 접종 후 6일째부터  $1.4 \times 10^3$  cell/ml ~  $2.5 \times 10^3$  cell/ml 범위로 ml당 2,000 cell 내외의 밀도로 증식하였다. 반면에 증충인 경우는 ml당 300 cell 이하의 낮은 밀도를 유지하였다.

수조저면에 *P. dicentrarchi* 충을 증식시킨 후 넙치치어를 방양한 결과 3 cm 그룹과 5 cm 그룹 모두 배양시킨 충에 감염되었으며, 충 감염에 의한 폐사는 3 cm 그룹인 경우 치명적이었다. 접종 후 5일째부터 폐사가 시작되었으며, 28일 만에 95.6%의 높은 폐사율을 보였다. 대조구에서는 실험기간 동안 4.4% 폐사율을 보였으나 스쿠티카충은 검출되지 않았다.

5 cm 그룹은 접종 후 18일째에 처음으로 폐사되기 시작하여 3 cm 그룹에 비해 폐사 진행이 현저히 늦었다. 이 그룹은 스쿠티카충의 인위 접종 후 28일 동안 71%가 폐사하여 3 cm 그룹에 비해 폐사율이 낮았다. 5 cm 그룹의 대조구에서는 실험기간 동안 폐사가 없었으며 스쿠티카충의 감염도 없었다.

모든 실험구의 폐사어에서 인위 감염시킨 충을 재분리하여 SSU rRNA에 대한 유전학적 분석결과, 처음 접종시킨 *P. dicentrarchi*와 각 실험구별 재분리된 섬모충의 SSU rRNA 유전자가 일치하여 동일 섬모충에 의한 감염임이 확인되었다.

### 감사의 글

이 연구는 산자부 지역전략 산업 석·박사 연구인력 양성사업에 의해 수행되었습니다. 또한 본 연구의 강선경은 2005년도 제주대학교 Brain Korea 21 사업에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### 참고 문헌

Bassleer, G.: *Uronema marinum*, a new and com-

mon parasite on tropical salt-water fishes. *Freshw. Mar. Aquar.*, 6: 78-79, 1983.

Cheung, P. J., Nigrelli, R. F. and Ruggieri, G. D.: Studies on the morphology of *Uronema marinum* Dujardin (Ciliata: Uronematidae) with a description of the histopathology of the infection in marine fishes. *J. Fish Dis.*, 3: 295-303, 1980.

Choi, S. D., Kim, J. M., Kim, S. Y., Jo, Y. C., Choi, K. K. and Yang, H. C.: Study on distribution and extermination of scuticociliatids parasitizing to Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* in southern Korea. *J. Fish Pathol.*, 10(1): 21-29, 1997.

Dragesco, A., Dragesco, J., Coste F., Gasc, C., Romestand, B., Raymond, J. C. and Bouix G.: *Philasterides dicentrarchi*, n. sp. (Ciliophora, Scuticociliatida), a histophagous opportunistic parasite of *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758), a reared marine fish. *Europ. J. Protistol.*, 31: 327 ~340, 1995.

Ferguson, H. W., Hicks, B. D., Lynn, D. H. and Ostland, V. E.: Cranial ulceration in Atlantic salmon *Salmo salar* associated with *Tetrahymena* sp. *Dis. Aquat. Org.*, 2: 191-195, 1987

Gill, P. A. and Callinan, R. B.: Ulcerative dermatitis associated with *Uronema* sp. infection of farmed sand whiting *sillago ciliata*. *Aust. Vet. J.*, 75: 357, 1997.

Iglesias, R., Paramá, A., Alvarez, M. F., Leiro, J., Aja, C. and Sanmartín, M. L.: In vitro growth requirements for the fish pathogen *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora, Scuticociliatida). *Vet. Parasitol.*, 111: 19-30, 2003.

Iglesias, R., Paramá, A., Alvarez, M. F., Leiro, J., Fernández, J. and Sanmartín, M. L.: *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora, Scuticocili-

- atida) as the causative agent of scuticociliatosis in farmed turbot *Scophthalmus maximus* in Galicia (NW Spain). Dis. Aquat. Org., 46: 47-55, 2001.
- Jee, B. Y., Kim, Y. C. and Park, M. S.: Morphology and biology of parasite responsible for scuticociliatosis of cultured olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Dis. Aquat. Org., 47: 49-55, 2001.
- Jin, C. N., Lee, C. H., Oh, S. P., Jung, Y. U., Song, C. B., Lee, J. and Heo, M. S.: Scuticociliatosis in Flounder Farms of Jeju Island. J. Fish Pathol., 16(2): 135-138, 2003.
- Jin, C. N., Lee, C. H., Oh, S. P., Na, O. S. and Heo, M. S.: Infection Route of Scuticociliates in the Juvenile of the cultured Flounder, *Paralichthys olivaceus*. J. Fish Pathol., 16(1): 13-21, 2003.
- Jung, S. J., Kitamura, S. I., Song, J. Y., Joung, I. Y. and Oh M. J.: Complete small subunit rRNA gene sequence of the scuticociliate *Miamiensis avidus* pathogenic to olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Dis. Aquat. Org., 64: 159-162, 2005.
- Kang, B. S., Go, H. B., Kim, S. J. Na, O. S., Lee, C. H., Kim, S. Y., Lee, J. and Lee, Y. D.: External Symptoms of Tiger Puffer, *Takifugu rubripes* Infected with Scuticociliates and Distribution of the Scuticociliates in the Skin, Gill and Blood Vessel. J. Fish Pathol., 18(1): 29-37, 2005.
- Kim, S. M., Cho, J. B., Kim, S. K., Nam, Y. K. and Kim, K. H.: Occurrence of scuticociliatosis in olive flounder *Paralichthys olivaceus* by *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora: Scuticociliatida). Dis. Aquat. Org., 62: 233-238, 2004.
- Kim, S. M., Cho, J. B., Lee, E. H., Kwon, S. R., Kim, S. K., Nam Y. K. and Kim, K. H.: *Pseudocohnilembus persalinus* (Ciliophora: Scuticociliatida) is an additional species causing scuticociliatosis in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Dis. Aquat. Org., 62: 239-244, 2004.
- Lee, C. H., Kang, Y. J., Ha, D. S. and Lee, Y. D.: Occurrence and Histopathological Observation of Scuticociliatosis in the Cultured Olive Flounder, *Paralichthys Olivaceus*. Bull. Natl. Fish. Res. Dev. Inst. Korea., 59: 68-73, 2001.
- Mizuno, Y.: Control methods of diseased Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, used in fish farm in Japan. J. Fish Pathol., 6: 219 ~231, 1993.
- Munday, B. L., O'Donoghue, P. J., Watts, M., Rough, K. and Hawkesford, T.: Fetal encephalitis due to the scuticociliate *Urone-ma nigricans* in sea-cage, southern bluefin tuna *Thunnus maccoyii*. Dis. Aquat. Org., 30: 17-25, 1997.
- Ototake, M. and Matsusato, T.: Notes on Scuticociliata infection of cultured juvenile flounder *Paralichthys olivaceus*. Bull. Natl. Res. Aquacult., 9: 65-68, 1986.
- Paramá, A., Iglesias, R., Álvarez, M.F., Leiro, J., Aja C. and Sanmartín M. L.: *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora, Scuticociliatida): experimental infection and possible routes of entry in farmed turbot (*Scophthalmus maximus*). Aquaculture 217: 73-80, 2003.
- Shang, H., Song, W. and Warren, A.: Phylogenetic positions of two ciliates, *Paranophrys magna* and *Mesanophrys carcini* (Ciliophora: Oligohemenophorea), within the subclass scuticociliatia inferred from complete small subunit rRNA gene sequences. Acta Protozool. 42: 171-181, 2003.
- Thompson, J. C. and Moewus, L.: *Miamiensis*

*avidus* n. g., n. sp., a Marine Facultative Parasite in the Ciliate Order Hymenostomatida. J. Protozool., 11(3): 378-381, 1964.

---

Manuscript Received : March 14, 2006

Revision Accepted : May 5, 2006

Responsible Editorial Member : Ki-Hong Kim  
(Pukyong Univ.)