

3종의 연어과 어류와 수정란으로부터 분리한 물곰팡이병 원인 진균의 분류와 약물 효과

지보영 · 이덕찬[†] · 김나영* · 정승희 · 박수일*
국립수산과학원 병리연구팀, *부경대학교 수산생명의학과

Identification and chemotherapeutic effects of the fungi from three salmonid species and their eggs

Bo Young Jee, Deok Chan Lee[†], Na Young Kim*, Sung Hee Jung and Soo Il Park*

Pathology Team, National Fisheries Research and Development Institute, Busan 618-902, Korea

*Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

Four strains of water mold, ChS-E0511, RaT-E0511, RaT-A0512 and MaS-F0512, were isolated from salmonid fish and/or their eggs taken from culture farms in Yangyang, Milyang and Pyeongchang, Korea in 2005. Descriptions of their morphological aspects, the results of the phylogenetic analysis conducted, and the sequence of the small sub-unit 18S rRNAs of the isolates confirmed that they all belong to the species *Saprolegnia parasitica*. Only one species, ChS-E0511, which was isolated from fertilized eggs of the chum salmon, was classified as part of the *S. parasitica* Group 1 according to its oogonia and gemmae production. The chemotherapeutic effects of various chemicals on the ChS-E0511 strain were assessed from the inhibitory effects of growth in GY media and the relative ratio of eyed eggs to fertilized eggs of the rainbow trout. Malchite green, a prohibited substance in food animals, was better than others, such as the *Opuntia ficus-indica* extract, 2-bronopol, and sodium chloride. These results suggest that the fungi isolated from salmonids and/or their eggs identified as *S. parasitica* were composed of more than two groups. These isolates will be useful in an intensive evaluation of therapeutic agents.

Key words: Salmonids, Fungal disease, *Saprolegnia parasitica*, Gemmae, Chemotherapeutic effect

진균 (fungus)은 일반적으로 곰팡이, 효모, 버섯 등을 총칭하여 일컬으며, 진균세포는 2중막의 핵과 미토콘드리아 등 분화된 세포내 소기관을 가지는 진핵미생물 (eukaryotic microorganism)이다. 주요 성분인 chitin과 β -glucan에 의하여 비후된 세포벽을 가지는 점이 원충류나 점균류 등과 다른 점이며, 형태에 따라 크게 효모 (yeast) 또는 효모양 진균 (yeast-like fungus)의 체세포가 단세포인 부류와 신장된 막대형의 사상구조 즉 균사 (hypha)로 이루어진 사상균 (mold)

및 버섯 (mushroom)의 두 가지로 나뉜다.

어류의 진균증은 자연산이나 양식 어류 및 그 난에 수생균류가 기생하여 생기는 질병으로 그 원인체는 다양한데 주로 진균문의 편모균아문, 접합균아문 또는 불완전균아문 등에 속하는 것으로 알려져 있으나 편모균아문의 난균강 (Oomycetes), 수생균목 (*Saprolegniales*), 수생균과 (*Saprolegniaceae*)에 포함된 균류가 담수어의 수생균병 원인체로 널리 알려져 있다 (Noga, 1993; Diéguez-Urbeondo *et al.*, 1994; Hussein *et*

[†]Corresponding Author : Deok Chan Lee, Tel : 051-720-2488,
Fax : 051-720-2498, E-mail : chanii-lee@hanmail.net

al., 2001; Yanong, 2003). 난균문 (Division Oomyceta)은 대단히 방대하며 이질적으로 구성된 그룹으로서 약 500-800종이 여기에 속하며 이 중 부생성 난균류는 다양한 곳에 서식하나 특히, 담수성 원형동물, 무척추/척추동물 및 해조류에 기생하기도 한다 (Moore-Landecker, 1996). 물곰팡이목 (Order Saprolegniales)은 6개의 과 (Family)로 나누어지며 그 중에서도 Family Saprolegniaceae와 Family Leptomitaceae를 구성하는 균종이 흔히 관찰되고, 물이나 토양 중의 식물체 또는 동물체에 부생성을 나타내며 흔히 물곰팡이 (water mold)라고 한다 (이 등, 1994). 이들 목 (order)에 해당하는 균군의 생식기관인 조정기와 조란기의 형태, 즉 조란기와 결합하는 조정기의 위치와 수, 조란기 내에 형성되는 난구의 수, 배열 및 치우침 정도에 따라 속 및 종을 결정하는데 중요한 분류기준이 된다 (이 등, 1994). 또한 최근에는 세균에서와 마찬가지로 곰팡이에서도 small subunit (SSU) 18S rRNA 염기서열에 의한 계통발생학적 평가가 적용되고 있다 (Leclere et al., 2000; Suzuki et al., 2004).

*Saprolegnia parasitica*는 독성이 강하여 연어과 어류 saprolegniasis의 중요한 병원체로서 알려져 있고 (Neish, 1977; Willoughby and Pickering, 1977; Hatai and Hoshiai, 1992a; Diéguez-Uribeondo et al., 1994; Whisler, 1996; Lopez-Doriga and Martinaz, 1998; Bruno and Wood, 1999; Hussein et al., 2001), *S. diclina*와 구별되며 coho salmon에서 분리한 *S. diclina* type I 과는 동일종으로 판단된다 (Willoughby, 1978). 뿐만 아니라 미국에서는 메기류 'winter kill'의 원인체로서 50% 이상의 폐사를 유발하기도 한다 (Bruno and Wood, 1999). 담수어에 많은 피해를 유발하는 병원체임에도 불구하고, 최근 물곰팡이 질병에 대한 치료제로서의 화학약품에 대한 사용이 엄격해지고 있는데 특히, malachite green은 2002년부터 전세계적으로 사용이 금지되고 있으며 이로 인하여 질병의 확산이 급격히 이루어지고 있다. 그러므로 saprolegniasis에 대한 치료대책이 필요

하며 적절한 치료를 위하여 발병과 관련한 병원체의 정확한 분류와 특성의 구명은 매우 중요할 것으로 판단되지만, 국내에서의 수생진균에 대한 이전의 연구는 뱀장어 수생진균에 관한 연구 등 단편적인 연구뿐이며 체계적인 연구와 이에 대한 보고는 미미하고 미흡한 실정이다 (Min et al., 1990).

2005년 11월과 12월에 걸쳐 어종과 감염 대상이 다른 상황에서 물곰팡이성 질병이 전국의 여러 곳에서 발생하여 많은 피해가 발생하였다. 그러므로 본 연구에서는 연어 수정란, 무지개송어 수정란 및 성어 그리고 산천어 자어 등 연어과 어류에 발병한 물곰팡이성 질병 원인체를 분리하여, 형태학적 및 유전학적 분류를 통하여 국내 곰팡이성 질병 원인균의 주요 종을 확인하고자 하였으며, 국내 분리 균주에 대하여 *in vivo* 및 *in vitro*에서의 다양한 약물 치료효과를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

어류 및 균주

국내 3개 지역에서 4종의 물곰팡이 균주를 양식 중인 연어과 어류와 수정란에서 분리하여 실험에 사용하였다. 강원도 양양의 연어 (*Oncorhynchus keta*) 수정란, 경남 밀양의 무지개송어 (*O. mykiss*) 수정란, 강원도 평창의 무지개송어 성어 및 산천어 (*O. masou*) 자어로부터 육안적으로 물곰팡이에 대한 감염증을 나타내는 개체로부터 각각 분리하였다 (Table 1).

배양 및 배양배지

균주의 분리에는 Sabouraud dextrose agar (SDA, Difco) 및 glucose-yeast extract agar (GY agar; 1% glucose, 0.25% yeast extract, 1.5% agar)에 penicillin & streptomycin이 첨가된 배지를 사용하였으며, 이후의 배양과 실험에서는 GY agar를 사용하였다.

Table 1. Water mold isolates from salmonid fishes and eggs with saprolegniosis used in the present study

Isolates	Date (mm/yy)	Origin	Region
ChS-E0511	11/2005	Chum salmon, <i>O. keta</i> egg	Yangyang, Gangwon
RaT-E0511	11/2005	Rainbow trout, <i>O. mykiss</i> egg	Milyang, Gyeongnam
RaT-A0512	12/2005	Rainbow trout, <i>O. mykiss</i> adult	Pyeongchang, Gangwon
MaS-F0512	12/2005	Masou salmon, <i>O. masou</i> fry	Pyeongchang, Gangwon

형태학적 시험

분리된 균주는 Willoughby (1985), Hatai 등 (1990) 및 Stueland 등 (2005)의 방법에 따라 실험을 하였다. 무성생식에 대한 실험은 곰팡이가 성장한 GY agar를 8 mm의 블록으로 잘라서 새로운 배지에 옮겨 심은 후 1주일간 배양하였다. 이 균주를 위와 동일한 방법으로 새로운 GY 평판배지와 예비실험 결과 형태학적 변화를 유도하는 것으로 판단된 povidone (60 ppm)이 첨가된 GY 평판배지에 옮긴 하루 후부터 20일간 수시로 lactophenol cotton blue (LPCB, Fluka) 염색액으로 염색하여 현미경 (Zeiss, Germany)으로 관찰하였다.

유성생식에 대한 관찰은 순수분리된 시험균주를 지름 8 mm의 블록으로 잘라서 GY agar에 접종하여 5°C에서 성장시키고 성장된 균사를 배양 5, 10, 15 및 20일째에 LPCB 염색액으로 염색하여 현미경 (Zeiss, Germany)으로 관찰하였다.

계통학적 분석

미생물의 진화계통 연구에 유용한 marker로 이용되고 있는 리보솜 small subunit (SSU) rRNA의 염기서열 분석은 18S rRNA용 primer (forward, E21f: 5'-ATC TGG TTG ATC CTG CCA GT-3'; revers, E1778r: 5'-AAT GAT CCT TCC GCA GGT TC-3')를 사용하여 SSU rDNA를 증폭하였으며 (Suzuki *et al.*, 2004), 염기서열 결정을 위한 sequencing은 Bioneer (Korea)에 의뢰하

였고 결과는 GenBank accession에 기초하여 phylogenetic tree를 작성하였다.

약물효과 측정

사용한 약제와 처리방법은 Table 2에 나타내었다. 이들 약제의 효과를 측정하기 위하여 *in vitro*와 *in vivo*에서 실험을 수행하였다. 즉, *in vitro* 실험은 GY agar에서 1주일간 배양한 지름 8 mm 균주 조각을 각종 화학물질이 농도별로 첨가된 GY broth (Corning tube, 15ml)에 넣고 15°C에서 배양하면서 1, 3 및 6일째에 곰팡이 균사가 성장한 높이를 mm 단위로 측정하였다. 또한 *in vivo* 실험에서는 예비실험 결과 효과가 있는 것으로 판단된 약물 농도를 선정하여 Table 2에서와 같이 다양한 농도의 약물과 처리 조건으로 무지개송어 수정란에 처리하여 아래 식과 같이 발안율 (the rate of eyed egg, %)과 상대발안율 (the relative ratio of eyed egg, %)로서 약물효과를 평가하였다. 사용한 무지개송어 발안란은 2006년 12월에 경상남도 수산자원연구소 밀양지소에서 생산된 수정란을 18,000-25,000 fertilized eggs/PVC tray에 수용하였으며 실험기간 동안 500 L/hr의 담수 (10 ± 2°C)를 공급하였다.

발안율 (%) = (발안란의 수 / 사용된 수정란의 수) × 100

상대발안율 (%) = [1 - (실험구의 비발안율 / 대조구의 비발안율)] × 100

Table 2. The chemicals and treatment conditions used for the *in vivo* and *in vitro* experiments on the efficacy agent of the *Saprolegnia* ChS-E0511 strain from chum salmon, *O. keta* eggs with saprolegniosis

Chemicals	Entity	Treatment and concentrations	
		<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
Malachite green oxalate ¹⁾	fungicide/antiseptic	0, 1, 10, 20 ppm	3 ppm for 30min bath, every three days
MBT-01108 ²⁾	microbicide	0, 50, 100, 200 ppm	50 ppm for 30min bath, every three days
2-bromopropyl (15% sol.) ³⁾	microbicide	0, 80, 100, 200, 400 ppm	80 ppm for 30min bath, every three days
Sodium chlorite	fungicide	0, 1, 2, 3 %	10 ppm for 30min bath, every three days
Iodine (10% sol.) ⁴⁾	disinfectant	0, 40, 160, 320 ppm	100 ppm for 1 hr flow-bath, every three days
CIO ₂ (2.5% sol.) ⁵⁾	disinfectant	0, 20, 200, 400 ppm	5 ppm for 30min bath, every other day
Formalin (37% formaldehyde sol.)	disinfectant	0, 10, 30, 50 ppm	120 ppm for 1 hr flow-bath, every three days

¹⁾ C₃₃H₃₄N₄O₂ (927.10, arylmethane dye; Sigma Chem.).

²⁾ *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* Makino methanol extract, Opuntiamycin (쑤, 마이크로바이오텍, Korea). The extract showed a broad spectrum of anti-microbial activity against pathogenic organisms, including antibiotics resistant bacteria, yeast and fungi (Kim *et al.*, 2005).

³⁾ C₃H₆BrNO₄ (MW: 199.99, white crystalline powder; Ningbo Free Trade Zone Wuzhou International Co., Ltd., China); synonyms: 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol; 2-nitro-2-bromo-1,3-propanediol; 2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol.

⁴⁾ Samyang Anipharm Co., Ltd. (Korea). For fishery.

⁵⁾ Handong Co., Ltd. (Korea). For fishery.

결 과

형태학적 관찰

GY 평판 배지에 배양된 4종의 곰팡이 균주는 솜털형 (cottony)의 백색 집락으로 자라며, 장기

간 (20°C, 3주 이상) 또는 약물 (povidone 등)을 첨가한 배지에 배양하면 주름형의 집락 (rugose topography)을 형성하기도 하였는데, 이 균사를 현미경으로 관찰하면 균사가 나선형으로 꼬여서 성장하는 것이 관찰되었다 (Fig. 1). 또한

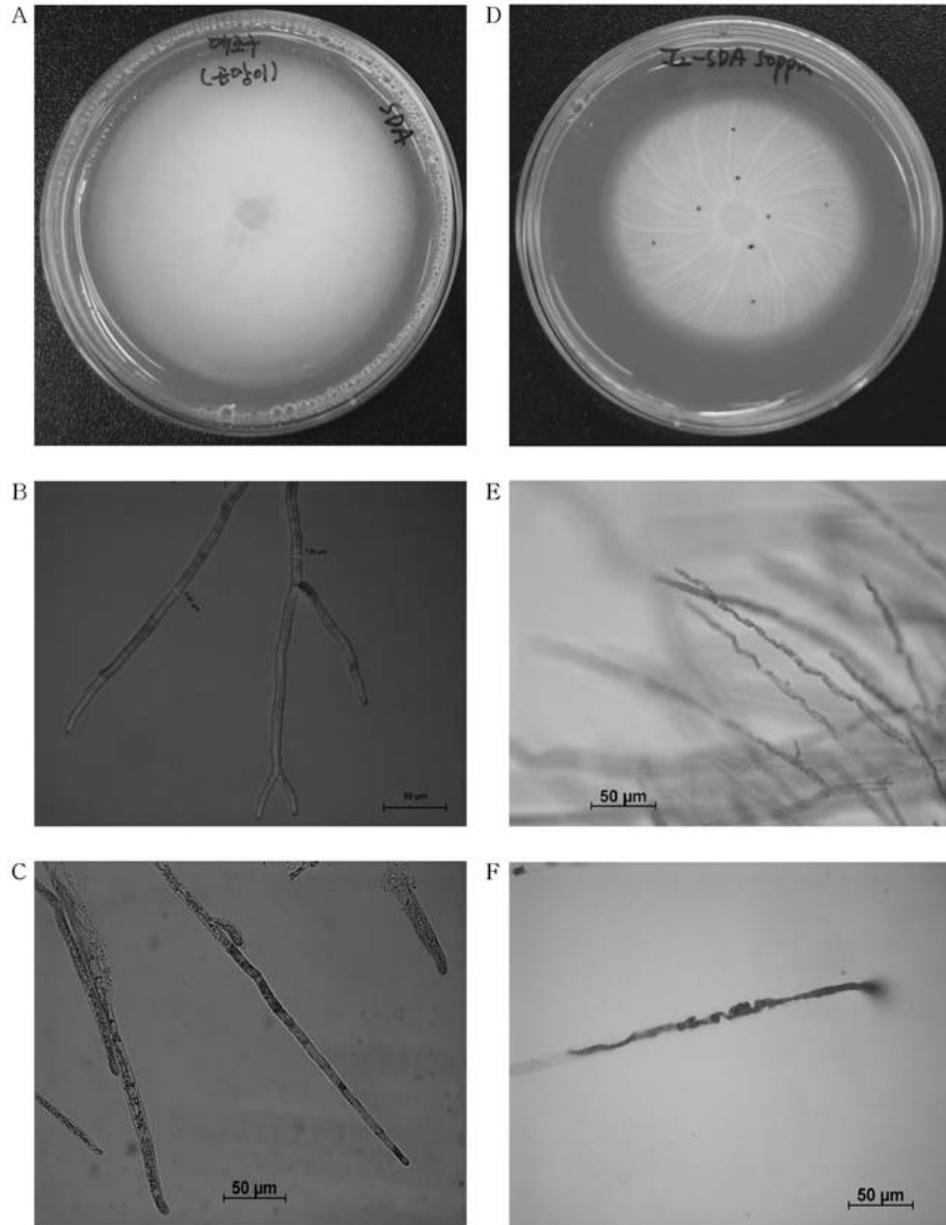


Fig. 1. The *Saprolegnia parasitica* RaT-E0511 strain that screwed hyphae appeared on GY agar with 50 ppm of 10% iodine solution. The left column (A, B and C) shows the results for the non-treated control group, and the right column (D, E and F) shows the results for the 4-day-old culture grown in a iodine-containing medium at 15°C.

Table 3. Morphological characteristics of *Saprolegnia* spp. isolated from salmonid fishes and eggs with saprolegniosis in Korea

Tests	Isolates			
	ChS-E0511	RaT-E0511	RaT-A0512	MaS-F0512
Colonial texture	cottony	cottony	cottony	cottony
Colonial topography	rarely, rugous	rarely, rugous	rarely, rugous	rarely, rugous
Colonial color (on GY agar)	white	white	white	white
Hyphae	aseptic	aseptic	aseptic	aseptic
Sexual stages				
Oogonia formation (5°C)	+	-	-	-
Oogonial shape	elongated	·	·	·
Antheridial branches	monoclinous	·	·	·
Gemmae formation	+(1~7)	-	-	-
Identification	<i>S. parasitica</i>	<i>S. parasitica</i>	<i>S. parasitica</i>	<i>S. parasitica</i>

4종의 곰팡이 모두 무격벽 균사 (aseptic hyphae)를 가지는 것으로 확인되었다 (Table 3).

무성생식의 관찰

시험 균주들의 무성생식 과정을 관찰한 결과, 유주자낭과 그 내에 운동성을 가지는 포자 (유주자)의 존재가 관찰되었다. 유주자의 유출은 선단에 머물지 않고 유출되는 형이며, 재생되는 유주자는 유주자낭 내를 관통하는 내부관통형 (internal proliferation)으로 확인되었다. 곰팡이가 성장한 배지 조각을 옮긴 새 평판배지에서 약 3일이 경과하면 균사 내에 기포양의 구형 내용물이 다수 형성되었다. 연어 수정란으로부터 분리된 Ch-E0511 균주는 모균사체로부터 무성아 (無性芽, gemmae)를 형성하며, 성장함에 따라 무성아는 격벽을 가지는 고리형 (chain form)으로 신장되어 최대 10개까지 신장된 형태가 관찰되었다. 무성아 내의 세포질은 매우 밀도가 높은 것으로 확인되며, 오목한 삼각프리즘 형태를 가지는 세

포질과 세포벽 사이에 균사 내에서 관찰되는 것과 같은 한개 또는 다수의 기포양 물질이 관찰되었다 (Fig. 2, arrows).

유성생식의 관찰

곰팡이를 접종한 배지를 5°C에서 배양하여 유성생식기를 관찰한 결과, 배양 2주 후에 연어 수정란으로부터 분리된 Ch-E0511 균주는 신장된 형 (elongated form)의 조란기 (oogonia)를 형성하였다. 그러나 나머지 3균주, RaT-E0511, RaT-A0512 및 MaS-F0512는 조란기를 형성하지 않는 것으로 확인되었다.

계통학적 분석

무지개송어 수정란과 성어, 산천어 그리고 연어 수정란으로부터 분리된 곰팡이들의 SSU rDNA 증폭에 의한 sequencing 결과를 바탕으로 phylogenetic analysis를 한 결과, ChS-E0511과 나머지 3균주 (RaT-E0511, RaT-A0512 및 MaS-

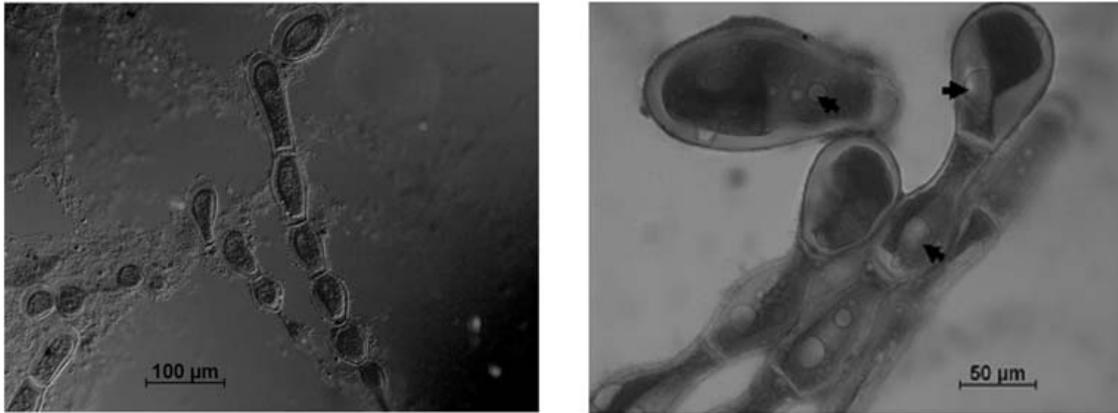


Fig. 2. The gemmae formation of the *S. parasitica* ChS-E0511 strain on the GY agar plate (10 days old at 5°C). At the top of the figure is a photograph of the gemmae taken with a tentatively differential interference contrast (DIC) microscope, and at the bottom is a picture of the gemmae taken with a light microscope. The arrows point to cellular structures presumed as air bubbles.



Fig. 3. Phylogenetic tree of *Saprolegnia* based on small-subunit (SSU) 18S rRNA sequence homology. The scale represents 0.02 nt substitutions per position.

Table 4. Chemotherapeutic effects on *in vitro* and *in vivo* conditions against *S. parasitica* ChS-E0511 strain from chum salmon, *O. keta* eggs with saprolegniosis

Chemicals	<i>in vitro</i>			<i>in vivo</i>			
	Concentrations	Day(s) after seed (height, mm)			Capacity (eggs)	The rate of eyed-egg (%) ¹⁾	The relative ratio-of eyed egg (%) ²⁾
		1	3	6			
Malachite green oxalate	0 ppm	7	28	>60	18,000	84.8	70.59
	1 ppm	5	12	37			
	10 ppm	0	0	8			
	20 ppm	0	0	0			
MBT-01108	0 ppm	8	33	>6	18,000	77.5	56.47
	50 ppm	6	32	52			
	100 ppm	0	24	50			
	200 ppm	0	0	0			
Bronopol (15%)	0 ppm	8	33	>60	18,000	73.3	48.35
	80 ppm	4	23	43			
	100 ppm	2	10	35			
	200 ppm	0	9	14			
	400 ppm	0	0	0			
Sodium chloride	0 %	7	28	>60	18,000	61.0	24.56
	1 %	5	12	>60			
	2 %	0	8	18			
	3 %	0	0	0			
Povidin (10% iodine)	0 ppm	9	33	>60	25,000	21.9	21.67
	40 ppm	7	34	>60			
	160 ppm	8	33	>60			
	320 ppm	7	33	>60			
U.F.O (2% ClO ₂)	0 ppm	9	33	>60	25,000	9.1	8.82
	20 ppm	5	35	>60			
	200 ppm	7	33	>60			
	400 pm	5	34	>60			
Formalin (37% formaldehyde)	0 ppm	6	35	>60	25,000	19.4	19.15
	10 ppm	0	23	54			
	30 ppm	0	17	50			
	50 ppm	0	0	0			
Control (<i>in vivo</i>)				25,000	0.3	0	

¹⁾ The rate of eyed-egg (%) = (the No. of eyed-egg / the No. of used fertilized egg) × 100.²⁾ The relative ratio of eyed-egg (%) = [1-(the rate of non-eyed-egg in tested / the rate of non-eyed-egg in control)] × 100.

F0512)와는 약간의 차이를 나타내지만 공통적으로 *S. parasitica*로 동정되었다 (Fig. 3).

약물효과 측정

약물 효과 측정을 위한 *in vitro* 실험에서 사용 약물 중 사용금지 약물인 malachite green은 1 ppm의 농도에서 효과가 나타나기 시작하여 20 ppm에서는 6일 경과 후에도 곰팡이의 성장을 억제하는 효과가 있었으며, MBT 01108도 200 ppm에서 곰팡이의 성장을 완전히 억제하였다. 무지개송어의 수정란을 이용한 *in vivo* 실험에서 대조구의 발안율은 0.3%에 불과하였으나 약물을 사용한 실험구의 경우 발안율이 9.1~84.8%로 다양하게 나타났으며, 사용한 약제 중 malachite green이 84.8%의 상대발안율을 보였으며, 사용 시험 농도에서 MBT 01108, 2-bromopol, sodium chloride, 10% Iodine 용액, formalin 및 2.5% ClO₂ 액 등의 순으로 상대발안율이 높았다 (Table 4).

고 찰

국내의 경우 곰팡이성 질병과 관련한 보고 사례는 소수에 불과한 실정이며, 그 또한 일본 유래 균주 (*S. diclina* type I)에 의한 뱀장어 감염 사례에 대한 보고였다 (Min *et al.*, 1990). 그러나 연어과 어류에서 물곰팡이에 의한 질병이 지속적으로 나타난 것으로 보고 있지만 그에 대한 국내의 연구는 전무한 실정이다.

본 연구에서는 2005년 11월과 12월에 연어 수정란 (ChS-E0511, 강원 양양), 무지개송어 수정란 (RaT-E0511, 경남 밀양) 및 성어 (RaT-A0512, 강원 평창) 그리고 산천어 자어 (MaS-F0512, 강원 평창) 등의 연어과 어류로부터 물곰팡이를 분리하였다. 실험에 사용한 4 균주의 집락형은 모두 백색의 솜털형이었으며 기중균사를 가지는 것으로 확인되었으며 현미경으로 균사를 확인한 결과 무격벽 균사를 가지고 있었다. 이러한 결과들에 비추어 4종의 실험균주는 모두 *Sapro-*

legnia sp.의 형태와 동일한 것으로 판단되었다 (Noga, 1993; Moore-Landecker, 1996). 이들 균주를 GY 배지에 접종하여 배양하면 주름이 형성되지 않으나 균주에 따라서는 배양기간이 길어지거나 일부 약물 (Povidon 등)을 첨가하게 되면 약간의 나선형을 가지는 주름이 형성되는 것으로 확인되었고, 주름을 형성하는 시기에 균사를 관찰해보면 균사가 꼬여있는 모양이 확인되었다. 이러한 꼬임 현상은 일정 농도 이상의 NaCl (0.07 M 이상)에서도 나타나는 것으로 알려져 있다 (Ali, 2005).

연어과 어류에서 분리한 4종의 시험균주 중 연어 수정란에서 분리한 ChS-E0511 균주만이 조란기를 형성하는 것으로 관찰되었다 (Table 3). ChS-E0511 균주는 GY agar (5°C)에 배양 약 15일 이후부터 조란기의 발생이 관찰되었으며 그 형태는 신장된 형 (elongated oogonium)으로 관찰되었다. 이러한 형태는 Yuasa and Hatai (1995)가 보고한 *S. parasitica* NJM 9302 (pejerrey, *Odonthestes bonariensis*로부터 분리 균주)가 형성한 조란기와 유사하였다. 그러나 chum salmon과 sockeye salmon을 포함한 다양한 어류 병소로부터 분리된 많은 *Saprolegnia*가 유성생식기를 형성하지 않았으며 (Yuasa and Hatai, 1995; Hussein *et al.*, 2001), 고온 (15-20°C) 보다는 상대적으로 저온 (5°C)에서 오히려 잘 형성하였다 (Noga, 1993; Stueland *et al.*, 2005).

무성생식기인 무성아 (gemmae)는 격벽으로 나누어진 균사조각으로 불규칙한 형태를 하며, 높은 밀도의 세포질을 가진다. 이들은 모균사체로부터 형성되며 주변환경이 적합할 때 새로운 균사체를 형성한다. 무성아는 발아관을 형성하여 발아하며, 발아 후 유주자 또는 조란기의 역할을 하기도 한다 (Moore-Landecker, 1996). 실험 균주 중 ChS-E0511 균주에만 나타나는 무성아는 발생 초기에 세포질의 밀도가 매우 높은 하나의 원형으로 나타나며 시간이 경과할수록 균사 반대쪽으로 무성아가 사슬형태로 신장되어 최대 10개의 연쇄사슬형이 관찰되었다. 이러한

무성아의 형성은 Yuasa and Hatai (1995)와 Ali (2005)의 결과와 유사하며 이러한 특성에 비추어 *S. parasitica* group 1에 포함되는 균주일 것으로 생각되며, ChS-E0511 이외에 RaT-E0511, RaT-A0512 및 MaS-F0512는 *S. parasitica* group 2 또는 3에 해당하는 것으로 판단된다 (Yuasa and Hatai, 1995). 또한 무성아의 각 분절 내에 공기주머니로 의심되는 둥근 방울이 관찰되었는데 이는 아마도 균사의 부유나 무성생식포자의 방출을 위한 압력을 가하는 역할을 하는 것으로 추정되며, 무성아끼리의 융합도 관찰되었다. Yuasa and Hatai (1995)는 1985년부터 1993년까지 일본의 각지의 여러 어종으로부터 분리된 25종의 *Saprolegnia* spp. 중 15종의 *S. parasitica*에 대하여 그룹화를 한 결과 3개의 그룹으로 나누어 졌으며 이들 중 무성아를 형성하는 것은 group 1형으로서 무지개송어에 대한 감염 실험 결과 독성도 가장 강한 것으로 확인되었다. 그러므로 무성아의 형성은 균주의 분류 기준으로서 뿐만 아니라 병원성과도 관련이 있는 것으로 알려져 있으므로 본 연구의 4 균주에 대한 병원성 평가가 이루어 져야 할 것으로 사료된다.

미생물의 계통발생학적 연구에 유용한 marker 인 small subunit (SSU) rRNA의 염기서열 분석에 의하여 4종의 시험균주에 대한 연관성을 조사한 결과, ChS-E0511과 다른 3종의 균주에서 약간의 차이는 있었으나 4종 모두 *S. parasitica*로 확인되었다 (Fig. 3). 이러한 계통발생학적 분석에 의한 곰팡이 종의 분류는 Saprolegniaceae (*Saprolegnia*, *Achlya*, *Pythium* 등)에서 최근에 사용되는 빈도가 높아지고 있으며 새로운 균주의 분류학적 위치 구명에도 사용되고 있다 (Paul *et al.*, 1999; Leclere *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2003; Amal *et al.*, 2006; Steciow *et al.*, 2007).

물곰팡이병의 효과적인 치료제로 알려진 malachite green (Alderman, 1982 & 1985; Bailey, 1983; Bruno and Wood, 1999; Willoughby and Roberts, 1992)는 고온에서의 어류 (Hlavěk and Bulkley, 1980; Alderman and Polglase, 1984; Al-

derman, 1985)와 인체 위험성이 있을 것으로 간주되어 사용금지 약물로 지정되었다 (Allen *et al.*, 1994). Malachite green은 *S. parasitica*에 감염된 어류의 치료에 효과가 있는데 0.25 ppm에서 유주자와 포자를 살해할 수 있으며 (Willoughby and Roberts, 1992), 5 ppm에서 제어 효과를 가진다 (Lilley and Inglis, 1997). Sodium chloride는 3%의 농도에서 억제효과는 있으며 (Marking *et al.*, 1994; Lilley and Inglis, 1997), formalin 50 ppm 이상은 *S. parasitica*에 감염된 무지개송어의 치료제로서 효과가 있는 것으로 알려져 있다 (Marking *et al.*, 1994; Fitzpatrick *et al.*, 1995; Mitchell and Collins, 1997; Bruno and Wood, 1999; Giesecker *et al.*, 2006). 손바닥선인장 추출물인 MBT-01108은 항균 및 항곰팡이 활성을 나타내는 물질을 함유하고 있으며 (Kim *et al.*, 2005), bronopol은 의약품, 화장품 또는 샴푸 등에 첨가되는 항산화제로 널리 사용되며 세균과 *Saprolegnia* 증식에 대한 제어 효과가 있는 것으로 알려져 있다 (Dunnett and Telling, 1984; Pottinger and Day, 1999; Branson, 2002; Treasurer *et al.*, 2005). *In vitro* 실험 결과에서 malachite green, sodium chloride 및 formalin은 위의 여러 연구자의 실험 결과와 같거나 또는 유사한 것으로 판단된다. 무지개송어의 발안란을 이용한 *in vivo* 실험에서 malachite green 3 ppm 및 sodium chloride 10 ppm은 물곰팡이의 제어에 효과가 있을 것으로 판단되지만, formalin 120 ppm 처리의 효과는 기존의 연구자들의 보고와는 달리 다소 낮은 것으로 판단된다. MBT-01108과 2-bronopol의 *in vitro* 및 *in vivo* 실험에서 10% iodine 용액, 2.5% ClO₂ 용액 및 formalin 등에 비하여 현장 적용 가능성이 있는 것으로 판단되므로 이들 약물의 인체 및 어류에 대한 영향 탐색이 지속적으로 필요할 것으로 사료된다.

이상의 실험 결과에서 국내 4지역의 3가지 어종과 수정란으로부터 분리된 물곰팡이는 *S. parasitica*로 동정되었으며, 이 중 연어 수정란으로부터 분리한 곰팡이 (ChS-E0511)는 무성생식과

유성생식 그리고 유전학적 상동성에서 나머지 3 균주 (RaT-E0511, RaT-A0512 및 MaS-F0512)와 약간의 차이를 보였다. 어류에서 분리되는 *S. parasitica*는 *S. diclina*에 비하여 병원성이 강하며, *S. parasitica* 내에서도 group 1형의 병원성이 강한 것으로 알려져 있어 (Hatai and Hoshiai, 1992b & 1993; Yuasa and Hatai, 1995; Stueland *et al.*, 2005) 조사한 4종의 곰팡이에 대한 더욱 다양한 조사가 필요하며, 이후의 연구에서는 국내 외의 다른 균주들과의 비교를 통하여 국내로의 유입 여부를 확인하고, 각 분리균주의 연어과 어류를 대상으로 하여 숙주 감수성에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다. 또한 물곰팡이를 제어하기 위한 약물의 사용에 있어 측정 환경에 따른 결과가 다양하므로 국내 실정에 맞는 다양한 시험이 이루어져야 할 것으로 사료된다.

요 약

2005년 11월과 12월에 걸쳐 연어 수정란 (ChS-E0511, 강원 양양), 무지개송어 수정란 (RaT-E0511, 경남 밀양), 무지개 송어 성어 (RaT-A0512, 강원 평창) 및 산천어 자어 (MaS-F0512, 강원 평창)에서 물곰팡이를 분리하였다. 분리 곰팡이의 분류 결과, 형태학적 및 유전학적 연구를 통하여 4종 모두 *Saprolegnia parasitica*로 확인 되었으며, 연어 수정란으로부터 분리된 ChS-E0511 균주는 조란기 (oogonia)와 무성아 (gemmae)를 형성하므로 *S. parasitica* group 1으로 분류되었다. 분리균주인 ChS-E0511을 이용하여 다양한 약물의 성장 억제 효과를 측정한 결과, 사용금지 약물인 malchite green에 대한 약물 효과가 높게 나타났으며, 손바닥선인장 (*Opuntia ficus-indica*) 추출물 (MBT-01108), 2-bronopol (BNP) 및 sodium chloride 등에 대한 무지개송어 수정란의 상대발아율이 높게 나타났다. 본 연구의 결과, 국내 연어과 어류의 질병과 관련한 곰팡이는 *S. parasitica*로서 2가지 이상의 group으로 구분되며 다양한 약물들에 대한 평가가 지속

적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Alderman, D.J.: *In vitro* testing of fisheries chemotherapeutants. J. Fish Dis., 5: 113-123, 1982.
- Alderman, D.J.: Malachite green: a review. J. Fish Dis., 8: 289-298, 1985.
- Alderman, D.J. and Polglase, J.L.: A comparative investigation of the effects of fungicides on *Saprolegnia parasitica* and *Aphanomyces astaci*. Transactions of the British Mycological Society, 83: 313-318, 1984.
- Ali, E.H.: Morphological and biochemical alterations of oomycete fish pathogen *Saprolegnia parasitica* as affected by salinity, ascorbic acid and their synergistic action. Mycopathologia, 159: 231-243, 2005.
- Allen, J. L., Gofus, J.E. and Meinertz, J.R.: Determination of malachite green residues in the eggs, fry, and adult muscle-tissue of rainbow-trout (*Oncorhynchus mykiss*). J. Ass. Official Analytical Chemist. Int., 77: 553-557, 1994.
- Amal, E.A., Aïcha, E.A. and Bernard, P.: *Achlya abortispora*, a new Oomycete isolated from water samples taken from a water reservoir Morocco. Cur. Microbiol., 53: 60-67, 2006.
- Bailey, T.A.: Method for *in vivo* screening of aquatic fungicides. J. Fish Dis., 6: 91-100, 1983.
- Branson, E.: Efficacy of bronopol against infection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with the fungus *Saprolegnia* species, Vet. Rec., 151: 539-541, 2002.
- Bruno, D.W. and Wood, B.P.: *Saprolegnia* and other oomycetes. In Fish Diseases and Disorders. Edited by: Wood, P. T. K. and Bruno, D. W.. Wallingford, UK, CAB International,

- 3: 599-659, 1999.
- Diéguez-Uribeondo, J., Cerenius, L. and Söderhäll, K.: *Saprolegnia parasitica* and its virulence on three different species of freshwater crayfish. *Aquaculture*, 120: 219-222, 1994.
- Diéguez-Uribeondo, J., Cerenius, L. and Söderhäll, K.: Physiological characterisation of *Saprolegnia parasitica* isolates from brown trout. *Aquaculture*, 140: 247-257, 1996.
- Dunnett, P.C. and Telling, G.M.: Study of the fate of bronopol and the effects of antioxidants on N-nitrosamine formation in shampoos and skin creams. *Int. J. Cosmet. Sci.*, 6: 241-247, 1984.
- Fitzpatrick, M.S., Schreck, C.B. and Chitwood, R.L.: Evaluation of three candidate fungicides for treatment of adult spring chinook salmon. *Prog. Fish-Cul.*, 57: 153-155, 1995.
- Gaikowski, M.P., Rach, J.J. and Ramsay, R.: Acute toxicity of hydrogen peroxide treatments to selected lifestages of cold-, cool-, and warmwater fish. *Aquaculture*, 178: 191-207, 1999.
- Giesecker, C.M., Serfling, S.G. and Reimschuessel, R.: Formalin treatment to reduce mortality associated with *Saprolegnia parasitica* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 253: 120-129, 2006.
- Hatai, K. and Hoshinai, G.I.: Saprolegniasis in cultured coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Fish Pathol.*, 27: 233-234, 1992a.
- Hatai, K. and Hoshinai, G.I.: Mass mortality in cultured coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) due to *Saprolegnia parasitica* Coker. *J. Wildl. Dis.*, 28: 532-536, 1992b.
- Hatai, K. and Hoshinai, G.I.: Characteristics of two *Saprolegnia* species isolated from coho salmon with Saprolegniasis. *J. Aquat. Anim. Health*, 5: 115-118, 1993.
- Hatai, K., Willoughby, L.G. and Beakes, G.W.: Some characteristics of *Saprolegnia* obtained from fish hatcheries in Japan. *Mycological Research*, 94: 182-190, 1990.
- Hlavek, R.R. and Bulkley, R.V.: Effects of malachite green on leucocyte abundance in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.*, 17: 431-444, 1980.
- Hussein, M.M., Hatai, K. and Namura, T.: Saprolegniasis in salmonids and fishes their eggs in Japan. *J. Wildl. Dis.*, 37: 204-207, 2001.
- Kim, H.N., Kwon, D.H., Kim, H.Y. and Jun, H.K.: Antimicrobial activities of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* Makino methanol extract. *J. Life Sci.*, 15: 279-286, 2005.
- Leclere, M.C., Guillot, J. and Deville, M.: Taxonomic and phylogenetic analysis of *Saprolegniaceae* (Oomycetes) inferred from LSU rDNA and ITS sequence comparisons. *Antonie van Leeuwenhoek*, 77: 369-377, 2000.
- Lilley, J.H. and Inglis, V.: Comparative effects of various antibiotics, fungicides and disinfectants on *Aphanomyces invaderis* and other saprolegniaceous fungi. *Aquaculture Research*, 28: 461-469, 1997.
- Lopez-Doriga, M.V. and Martinaz, J.L.: Ultrastructure of fish cells involved in cellular defense against *Saprolegnia* infections: Evidence of non-leucocytic nature. *Dis. Aquat. Org.*, 32: 111-117, 1998.
- Lumsden, J.S., Ostland, V.E. and Ferguson, H.W.: Use of hydrogen peroxide to treat experimentally induced bacterial gill disease in rainbow trout. *J. Aquat. Anim. Health*, 10: 230-240, 1998.
- Marking, L.L., Rach, J.J. and Schreier, T.M.: Evaluation of antifungal agents for fish culture. *Prog. Fish Culturist*, 56: 225-231, 1994.
- Min, H.K., Park, N.Y. and Hatai, K.: Experimental

- infection with *Saprolegnia diclina* type I in eels (*Anguilla japonica*). J. Fish Pathol., 3: 61-67, 1990 (in Korean).
- Mitchell, A.J. and Collins, C.B.: Review of the therapeutic uses of hydrogen peroxide in fish production. Aquacul. Mag., 23: 74-79, 1997.
- Moore-Landecker, E.: Fundamentals of the fungi, 4th ed. (기초균류학, 2004, 박희문, 신현동, 오덕철, 윤권상, 이종규 공역). 월드사이언스, pp.33-80, 1996.
- Neish, G.A.: Observation on saprolegniasis of adult sockeye salmon, *Onchorhynchus nerka* (Walbaum). J. Fish Biol., 10: 513-522, 1977.
- Noga, E.J.: Water mold infections of freshwater fish: Recent advances. In, Annual Review of Fish Diseases, Pergamon Press Ltd., pp.291-304, 1993.
- Paul, B., Galland, D. and Masih, I.: *Pythium prolatum* isolated from soil in the Burgundy region: a new record for Europe. FEMS Microbiol. Lett., 173: 69-75, 1999.
- Pottinger, T.G. and Day, J.G.: A *Saprolegnia parasitica* challenge system for rainbow trout: assessment of Pyceze as an anti-fungal agent for both fish and ova. Dis. Aquat. Org., 36: 129-141, 1999.
- Singh, K.K., Mathew, R., Masih, I.E. and Paul, B.: ITS region of the rRNA of *Pythium rhizosacharum* sp. nov. isolated from sugarcane roots: taxonomy and comparison with related species. FEMS Microbiol. Lett., 221: 233-236, 2003.
- Steciow, M.M., Paul, A. and Bala, K.: *Saprolegnia bulbosa* sp. nov. isolated from an Argentine stream: taxonomy and comparison with related species. FEMS Microbiol. Lett., 268: 225-230, 2007.
- Speare, D.J. and Arsenault, G.J.: Effects of intermittent hydrogen peroxide exposure on growth and columnaris disease of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 54: 2653-2658, 1997.
- Suzuki, K., Hiraishi, A. and Yokota, A.: Biseibutsuno Bunrui Doutei Jikkenhou. Springer-Verlag Tokyo, Inc., Japan, pp.58-74, 2004.
- Stueland, S., Hatai, K. and Skaar, I.: Morphological and physiological characteristics of *Saprolegnia* spp. strains pathogenic to Atlantic salmon, *Salmo salar* L. J. Fish Dis., 28: 445-453, 2005.
- Treasurer, J.W., Cochrane, E. and Grant, A.: Surface disinfection of cod *Gadus morhua* and haddock *Melanogrammus aeglefinus* eggs with bronopol. Aquaculture, 250: 27-35, 2005.
- Whisler, H.C.: Identification of *Saprolegnia* spp. pathogenic in chinook salmon. Washington, D.C., US Department Energy, p.43, 1996.
- Willoughby, L.G.: Saprolegniasis of salmonid fish in Windermere: A critical analysis. J. Fish Dis., 1: 51-67, 1978.
- Willoughby, L.G.: Rapid preliminary screening of *Saprolegnia* on fish. J. Fish Dis., 8: 473-476, 1985.
- Willoughby, L.G. and Pickering, A.D.: Viable Saprolegniaceae spores on the epidermis of the salmonid fish *Salmo trutta* and *Salmo alpinus*. Trans. Br. Mycol. Soc., 68: 91-95, 1977.
- Willoughby, L.G. and Roberts, R.J.: Towards strategic use of fungicides against *Saprolegnia parasitica* in salmonid fish hatcheries. J. Fish Dis., 15: 1-13, 1992.
- Yanong, R.P.: Fungal diseases of fish. Vet. Clin. North. Am. Exot. Anim. Pract., 6: 377-400, 2003.
- Yuasa, K. and Hatai, K.: Relationship between pathogenicity of *Saprolegnia* spp. isolation to

rainbow trout and their biological characteristics. *Fish Pathol.*, 30: 101-106, 1995.
이재동, 정영기, 주우홍: 균학연구. 세종출판사, pp.107-144, 1994.

Manuscript Received : March 19, 2007

Revision Accepted : August 7, 2007

Responsible Editorial Member : Joon-Ki Jeong
(Pukyong Univ.)