

넙치(*Paralichthys olivaceus*) 구강에 기생하는 *Neoheterobothrium hirame*의 형태 및 감염어의 병리조직

이범석 · 김정호* · 김태호** · 정성주†

전남대학교 수산생명의학과, *강릉원주대학교 해양자원육성학과,
**전남대학교 해양생산관리학과

Morphology of *Neoheterobothrium hirame* parasitic in the oral cavity of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) and histopathology of diseased fish

Beom-Seok Lee, Jeong-Ho Kim*, Taeho Kim** and Sung-Ju Jung†

Department of Aqualife Medicine, Chonnam National University, Yeosu 59626, Korea
*Department of Marine Bioscience, Gangneung-Wonju National University, Gangneung 25457, Korea
**Division of Culture Contents, Chonnam National University, Yeosu 59626, Korea

A disease that manifested severe anemia of the gills occurred in the olive flounder (*Paralichthys olivaceus*), which was cultured for 5-6 months with a recirculation water system in the laboratory. Microscopic observations showed immature parasite in the gills and mature adults in the oral cavity. The matured parasite was 5.60-9.32 (7.42) mm in total length, with 4 pairs of clamps on the pedunculated haptor, which was separated from the body proper by a long isthmus. From the morphological observations of the larvae, it was identified as *Neoheterobothrium hirame* belonging to the monogenea. The average hematocrite of infected fish was $10.3 \pm 2.8\%$, significantly lower than that of normal flounder $31.4 \pm 4.2\%$. Histopathologically, fish infected with *N. hirame* exhibited reduced numbers of erythrocytes in blood vessels of the gill filament and lamellae, reduced red pulp area of the spleen, and hepatocyte atrophy. From the above results, the cause of severe anemia in olive flounder was identified as *N. hirame* infection. This study shows an example where the growth of pathogens can be a problem in the recirculation system due to low water exchange rate.

Key words: olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, parasite, monogenea, *Neoheterobothrium hirame*, anemia

서 론

국내 양식 산업의 대표종인 넙치(*Paralichthys*

olivaceus)는 그 생산량이 연간 43,400톤에 생산액으로는 4,308억원에 달하여 경제적으로 중요한 어종이다(2019년, 국가통계포털). 넙치는 육상수조식으로 제주와 완도에서 대규모로 양식되고 있는데 양식과정에서 다양한 병원체에 노출되어 폐사가 발생하고 있다. 주요 폐사원인은 스킨카중,

†Corresponding author: Sung-Ju Jung
Tel: +82-61-659-7175, Fax: +82-61-659-7179
E-mail: sungju@chonnam.ac.kr

여윌증, 바이러스성출혈성패혈증으로 넙치 양식장에서 연간 21-30%정도의 폐사가 발생하는 것으로 추정된다(Shim et al., 2019). 그 중에서 기생충성 질병으로 넙치에서 크게 문제가 되는 것으로 스쿠티카증, 여윌증, 쿠도아증을 들 수 있으며 이들은 넙치에 폐사를 일으키거나, 여윌게 하거나, 혹은 넙치를 먹은 사람에게 설사를 일으킨다(Jung et al., 2007; Shin et al., 2018; Kawai et al., 2012). 그 외에 백점병, 트리코티나병, 익티오보도증을 비롯한 다양한 기생충성 질병이 넙치에서 검출되고 있다(Jung et al., 2012). 빈도는 적으나 넙치에서 발생하는 기생충성 질병의 원인체로 *Neoheterobothrium hirame*가 있는데 이는 흡충류 중 단생강(monogenea) 속하며, 넙치의 아가미와 구강 부분에 기생하여 혈액을 섭취하는 기생충으로 최초로 일본에서 보고되었다(Ogawa, 1999). 한편, 국내에서는 Hayward et al. (2001)에 의하여 제주의 육상수조식과 여수의 가두리 양식장 넙치에서 최초로 보고되어 있고, Jang et al. (2007)의 연구에서 충남 태안군 소재의 넙치 종묘장에서 구입한 넙치에서 검출된 보고가 있으나 그 이후 보고된 바가 없다.

본 연구는 자외선살균기가 부착된 순환여과식 실험시설에서 사육하던 넙치에서 아가미의 심한 빈혈증상을 보인 개체에서 발견한 흡충에 대하여 기술하고자 한다. 아가미와 입천정에 부착한 흡충을 떼어내어 형태학적관찰을 통하여 *N. hirame* 로 동정하였고 적혈구용적 측정과 조직학적 관찰로 넙치에 대한 해작용에 대하여 알아보하고자 하였다.

재료 및 방법

자연발병어

1차 발생은 2018년 5월 충청남도 태안군의 종묘 양식장에서 구입한 넙치(9.2±0.6 cm, 5.8±1.0 g)를 순환여과식으로 사육하는 과정에서 6개월이 경과한 시점에 발생하였다. 구입 한 넙치는 20 L 수조 10개에 20마리씩 나누어 넣었으며, 사육조는 500 L의 생물학적 여과조와 연결하여 총 수량 700 L로 순환여과시스템으로 사육하였다. 사육수는 65 mWs/cm²의 자외선 소독장치 (Badasarang P4000, Dongyang eng, Korea)로 2시간이상 반복 순환시킨 후

사육수의 교환에 사용하였다. 이와는 별도로 생물학적 여과조에서 사육조로 들어가는 순환수에도 자외선 살균장치를 설치하여 자외선 조사량 32 mWs/cm² (Badasarang P1000, Dongyang eng, Korea)로 소독하면서 넙치를 사육하였다. 수온은 20±1℃로 유지하였으며, 사료는 매일 어체 중의 1%미만으로 공급하여 성장을 억제하면서 사육하였다.

2차 발생은 충청남도 태안군의 종묘 양식장에서 2019년 10월 구입한 넙치(7.94±0.68 cm, 4.53±1.14 g)를 사육하던 중 5개월이 경과한 시점에서 확인되었다. 250 L의 수조 7개를 1,300 L의 생물학적 여과조와 연결한 총 수량 3,050L의 순환여과시스템으로 사육하였다. 사육수는 65 mWs/cm²의 자외선 소독장치(Badasarang P4000, Dongyang eng, Korea)로 2시간이상 반복 순환시켜 소독한 것을 사용하였다. 생물학적 여과조에서 사육조로 들어가는 순환수는 자외선 조사량 32 mWs/cm² (Badasarang P1000, Dongyang eng, Korea)의 장치 2개를 연결하여 소독하였다. 수온은 15-20℃의 범위였으며 사료는 매일 어체 중의 2%를 급이하였다.

기생충 관찰

염색표본의 제작을 위하여 넙치의 구강에서 기생하고 있는 성충을 해수로 적신 붓으로 구강에서 탈락 시킨 후 슬라이드글라스 위에 올렸다. 인산완충액(Phosphate-buffered saline, PBS pH 7.0)을 분주하여 습윤 표본을 제작하여 광학 현미경과 실제 현미경으로 관찰하였다.

염색표본 제작을 위하여 충을 슬라이드글라스에 올린다음 충이 납작해지지 않도록 거름종이를 충의 좌우에 나란히 올려놓은 다음 커버글라스를 덮은 후 실로 고정하여 충체를 평평하게 만들었다. 실로 고정한 성충을 AFA용액(70% Ethanol: Formalin: Acetic acid, 20: 1: 1)에 24시간 고정하였다. 고정된 시료는 70% ethanol에 세척한 후 Alum Carmine(Sigma, USA)용액에 24시간 염색하였다. 염색된 시료를 염산 1%를 포함한 70% 에탄올에 내부구조가 확실하게 보일 때까지 탈색하였다. 탈색한 시료를 70%~100% 에탄올로 각 1시간씩 탈수를 진행하였다. 탈수 후 페놀-자일렌(1:1), 자일렌으로 각 1시간씩 투명화하였고, 광학 현미경과 실제 현

미경으로 관찰하였다.

적혈구 용적 검사

정상어와 병어 각각 10마리의 미부혈관을 절단하여 모세관으로 혈액을 채취하였으며, 적혈구 용적을 원심분리기(Nasco Korea, Korea)를 이용해 원심분리(12,000 RPM, 5분)하여 구하였다. 정상어의 경우 같은 양식장에서 같은 시기에 구매하여 동일한 형태의 순환여과시스템에서 사육 중이던 넙치를 사용하였다.

병리조직학적 검사

각 장기에 대한 육안적 검사를 진행하였으며, 구강 및 아가미, 간, 신장, 비장, 위, 장을 절취하여 10% 인산완충 포르말린에 48시간 고정하였다. 고정된 장기를 70%에서 100%까지 에탄올로 탈수하였으며, 자일렌으로 투명화하여 파라핀을 침투시켜 포매하였다. 마이크로톰(Shandon AS325 rotary microtome, UK)을 이용하여 4-5 µm 두께로 절편을 제작하여 Hematoxylin - Eosin 염색법으로 표본을 염색한 후 광학 현미경으로 관찰하였다.

결 과

병어의 임상증상

병어의 경우 정상 넙치에 비해 야위는 것 외에 외견상 증상은 없었다. 섭이활동과 유영상태도 정상적이었으며 폐사도 발생하지 않은 상태에서 다른 실험을 위한 목적으로 샘플링을 하는 과정에서 아가미의 심한 빈혈을 발견하게 되었다. 아가미는 심한 빈혈에 의해 하얗게 변색되며 간은 크기가 작아지고 색깔은 퇴색되어 있었다. 입천정 부분에는 육안으로도 관찰이 가능한 성충 5-6마리의 기생이 관찰되었다(Fig. 1A and B).

아가미를 광학 현미경으로 관찰 시 한 쌍의 파악기를 가진 유충과 세 쌍의 파악기와 한 쌍의 미성숙한 파악기를 가진 미성숙 성충이 관찰되었다 (Fig. 1C and D).

충의 형태학적 관찰

충(n=8)의 각 기관의 길이를 측정된 결과를 Table

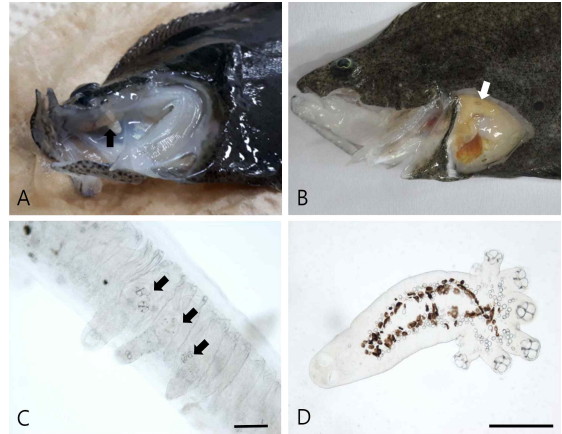


Fig. 1. Clinical signs and gill wet mount of a Olive flounder infected with *N. hirame*. (A) Pale gills and an adult parasite (arrow) in the buccal cavity; (B) Pale and atrophied liver (arrow) due to malnutrition; (C) Immature parasites (arrows) attached to the gill lamellae; (D) Immature parasite attached to the gill. Scale bar: 100 µm.

1에 나타내었으며 평균값은 괄호 안에 표시하였다. 충의 체장은 5.60-9.32(7.42) mm이며 방추형 몸의 길이는 3.83-6.32(4.98) mm, 정소부분의 최대 너비는 0.89-2.05(1.37) mm이며 isthmus의 길이와 너비는 각각 0.89-2.05(1.37), 0.40-0.63(0.52) mm였다. 부착기의 길이는 0.97-1.75(1.33) mm, 너비는 1.02-1.61(1.30) mm이며 방추형 몸에서부터 연결된 isthmus의 끝부분에 꽃자루 모양으로 존재하였다(Fig. 2A). 부착기의 끝에는 8개의 파악기가 있으며 첫 번째 파악기 한 쌍의 길이는 0.209-0.294(0.247) mm, 너비는 0.211-0.283(0.240) mm이며 두 번째 쌍의 길이는 0.213-0.300(0.259) mm, 너비는 0.209-0.299(0.262) mm였다. 세 번째 쌍의 길이는 0.203-0.304(0.257) mm, 너비는 0.211-0.294(0.245) mm이며 마지막 네 번째 쌍의 길이는 0.210-0.257(0.240) mm, 너비는 0.180-0.254(0.224) mm였다(Fig. 2B). 두 번째 쌍과 세 번째 쌍이 유의하게 다른 두 쌍보다 크게 측정되었다.

1쌍의 구강 흡반의 길이는 0.074-0.095(0.087) mm, 너비는 0.049-0.069 (0.059) mm였다. 인후는 넓고 짧은 전방부와 원통형의 후방부로 이루어져 있으며 길이는 0.105-0.141(0.126) mm, 너비는 0.085-

Table 1. Length and width for each organ of *N. hirame* adult. length/width (mm, n=8)

| Parasite | B | Bp | M | H | C1 | C2 | C3 | C4 | I | Os | P | Co |
|----------|------|------|------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| NO.1 | 8.64 | 5.38 | 2.29 | 1.75/1.44 | 0.27/0.25 | 0.28/0.27 | 0.28/0.25 | 0.26/0.24 | 1.53/0.51 | 0.09/0.06 | 0.14/0.15 | 0.05/0.15 |
| NO.2 | 6.39 | 4.68 | 1.41 | 1.31/1.08 | 0.23/0.22 | 0.25/0.24 | 0.25/0.23 | 0.22/0.20 | 0.89/0.63 | 0.08/0.06 | 0.11/0.08 | 0.04/0.08 |
| NO.3 | 5.60 | 3.83 | 1.43 | 1.12/1.24 | 0.22/0.21 | 0.21/0.20 | 0.21/0.21 | 0.21/0.18 | 0.97/0.60 | 0.07/0.05 | 0.11/0.08 | 0.05/0.08 |
| NO.4 | 9.32 | 6.32 | 1.75 | 1.56/1.50 | 0.29/0.28 | 0.30/0.29 | 0.28/0.29 | 0.25/0.24 | 1.75/0.58 | 0.09/0.06 | 0.14/0.10 | 0.05/0.08 |
| NO.5 | 6.85 | 4.39 | 2.45 | 1.42/1.61 | 0.27/0.28 | 0.29/0.29 | 0.30/0.29 | 0.26/0.25 | 1.18/0.61 | 0.08/0.05 | 0.13/0.08 | 0.04/0.07 |
| NO.6 | 8.46 | 5.90 | 1.97 | 1.36/1.38 | 0.25/0.23 | 0.25/0.25 | 0.27/0.24 | 0.23/0.21 | 1.54/0.51 | 0.08/0.05 | 0.13/0.10 | 0.06/0.07 |
| NO.7 | 8.11 | 5.17 | 1.84 | 1.16/1.14 | 0.20/0.21 | 0.23/0.24 | 0.23/0.23 | 0.23/0.22 | 2.05/0.34 | 0.09/0.06 | 0.13/0.10 | 0.04/0.09 |
| NO.8 | 6.05 | 4.18 | 1.67 | 0.97/1.02 | 0.21/0.21 | 0.23/0.22 | 0.20/0.19 | - | 1.07/0.40 | 0.08/0.04 | 0.10/0.09 | 0.05/0.08 |
| Average | 7.42 | 4.98 | 1.85 | 1.33/1.30 | 0.24/0.24 | 0.25/0.26 | 0.25/0.24 | 0.24/0.22 | 1.37/0.52 | 0.08/0.05 | 0.12/0.10 | 0.05/0.09 |

B: Body, Bp: Body proper, M: Maximum width at level of testes, H: Haptor, C1~4: Clamp, I: Isthmus, Os: Oral sucker, P: Pharynx, Co: Copulatory organ

0.152 (0.101) mm였다(Fig. 2C). 난소는 정소 바로 앞에 위치하며 양쪽 끝이 접힌 C 자 모양으로 관찰

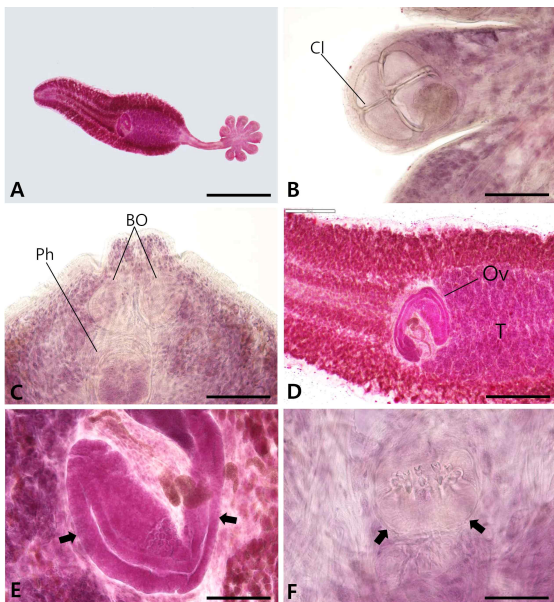


Fig. 2. Alum carmine stained *N. hirame* was observed with optical and dissection microscope. (A) Whole parasite; (B) A clamp (Cl); (C) Buccal organ (BO) and pharynx (Ph) are observed body of adult parasite; (D) The ovary (Ov) containing eggs and its long oviduct and testes (T) hundreds in number, sometimes over lapping with each other occupying inside of main intestinal branches in posterior half of body proper; (E) Ovarian complex (arrows); (F) Male copulatory organ (arrows) of parasite.

되었다(Fig. 2D). 난형성장의 기본 구조는 Mehlis' gland이며 난황장관과 수란관에서 분화된 genito-intestinal이 통합되어 형성 된다(Fig. 2E). 교접기는 근육이 많은 기저부분과 근육이 적은 근위부분으로 구성되어 있으며 길이는 0.041-0.057(0.051) mm, 0.078-0.152(0.093) mm였다(Fig. 2F).

적혈구 용적

병어와 정상 넙치 10마리씩 적혈구 용적을 비교한 결과 정상 넙치는 평균 31.4±4.2%였으며 병어의 경우 평균 10.3±2.8%로 *N. hirame*에 감염된 넙치의 경우 적혈구 용적이 현저히 감소하였다(Fig. 3).

병리조직표본 소견

*N. hirame*에 감염된 넙치는 아가미 세엽의 혈관

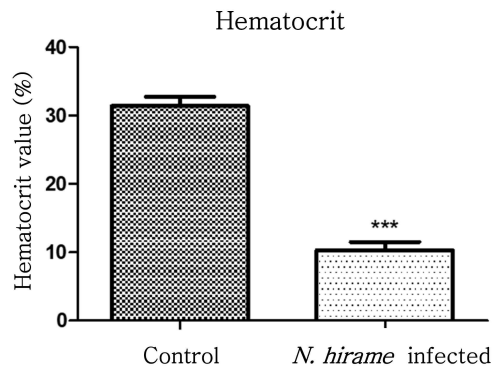


Fig. 3. Hematocrit of *N. hirame* infected and normal fish exhibiting 10.3±2.8% and 31.4±4.2%, respectively (n=10).

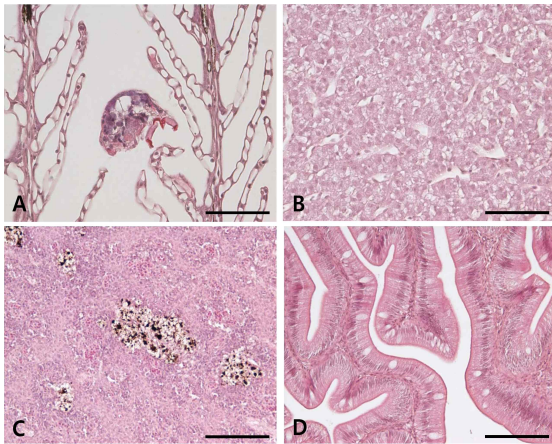


Fig. 4. Histological sections of Olive flounder infected with *N. hirame*. (A) Young parasite attached to the gill lamellae by means of a pair of clamps. (B) Atrophied hepatocytes. (C) Decreased red pulp area in the spleen. (D) Normal appearance of intestine. Scale bar: A and B = 25 μ m, C and D = 50 μ m.

을 채우는 적혈구가 감소하고 유충의 기생이 관찰되었으며 비장의 조직의 적수(red pulp)영역의 감소와 백수(white pulp) 영역의 증가가 관찰되었다. 또한, 간 조직의 간세포에서는 위축과 유충의 확장이 관찰되었다(Fig. 4). 그 외 장, 심장, 신장에서는 이상이 관찰되지 않았다.

고 찰

넙치의 구강과 아가미에 기생하는 *N. hirame*는 1999년 Ogawa에 의해서 최초로 일본에서 보고되었으며 이후 후속 연구에 따르면 여러 지역의 자연산 및 양식산 넙치에서의 감염되어 1993년 3.1%에서 1998년 89%의 감염률을 나타내면서 북해도를 제외한 일본 전역으로 퍼졌는데 기생충의 기생 증가 원인으로 감염어의 이동과 자연산 숙주의 이동에 의한 것으로 보고되었다(Ogawa et al., 1999; Anshary et al., 2001a; Anshary et al., 2001b; Anshary et al., 2002; Tomiyama et al., 2004). 국내에서는 2000년 7월 여수의 넙치 가두리 양식장에서 6마리 검사어 중에서 1마리, 2000년 9월 제주 남원지역의 육상수조식 양식장에서 30마리 중 1마리에서 *N. hirame*의 유충이 아가미에서 관찰되었고 이들은

기생충조사 과정에서 관찰되었고 빈혈이 보이는 개체가 섞여 있었으나 폐사가 발생하지는 않았다(Hayward et al., 2001). *N. hirame*에 의하여 일부 폐사가 발생한 것으로 보고된 것은 2006년 5월 태안의 넙치 종묘배양장으로 30톤 크기의 원형콘크리트수조에서 1일 2회의 비교적 낮은 환수량으로 사육하던 넙치 치어에서 발생하였다(Jang et al., 2007). 그러므로 우리나라의 제주, 남해안 및 서해안에 이미 분포하고 있을 것으로 생각되며 일본에서 자연계의 가자미목 어류를 통해 *N. hirame*이 우리나라로 유입되었을 가능성이 제기되었다(Hayward et al., 2001). 그러나 다양한 넙치 질병모니터링의 결과를 보고한 논문에서 2006년 태안의 종묘배양장에서 폐사발생 이후 *N. hirame*이 폐사의 원인으로 지목된 적은 없다(Jee et al., 2014; Shim et al., 2019). 그러므로 우리나라의 여러 지역에서 검출이 되고 있기는 하지만 넙치의 주요한 폐사원인은 아닌 것으로 판단된다.

*N. hirame*를 명명한 Ogawa의 연구에서 *N. hirame*와 가장 형태학적으로 유사한 종은 *N. affine* (Linton, 1898)라고 하였다. 두 종은 체형에 의해서 구분되어지며 *N. affine*의 전장의 길이와 방추형 몸통의 길이의 비율 및 전장의 길이와 isthmus의 길이의 비율은 각각 0.34-0.51 및 0.38-0.52이며 *N. hirame*의 경우 각각 0.62-0.70 및 0.14-0.24로 *N. hirame*은 *N. affine*에 비하여 비교적 큰 전장과 짧은 isthmus를 가진다(Ogawa, 1999). 하지만 *N. hirame*는 *N. affine*와 연조직(soft-tissue)인 전장과 몸통의 길이의 비율과 isthmus의 길이의 비율만이 차이가 나므로 동일종일수도 있을 가능성이 제기되기도 하였다. 본 연구실에서 사육중인 넙치에서 관찰된 충의 길이를 측정된 결과와 Ogawa(1999)의 연구에서 측정된 충의 길이를 비교해본 결과 Ogawa의 충에 비하여 본 연구에서 측정된 충은 비교적 작지만 전장의 길이와 방추형 몸통의 길이의 비율 및 전장의 길이와 isthmus의 길이의 비율은 각각 평균 0.67 및 0.18로 *N. affine*보다는 *N. hirame*와 유사하였다. 또한 파악기의 크기가 두 번째 쌍과 세 번째 쌍이 제일 크며, 방추형 몸통, 부착기의 형태, 파악기의 개수, 난소의 형태가 *N. hirame*와 일치하여 사육중인 넙치에서 관찰된 충은 형태학적으로 *N. hirame*

로 판단하였다. 본 논문에 결과를 포함하지는 않았으나 분자생물학적 동정을 병행하여 진행한 결과 실험에 사용한 층의 18S rRNA는 보고된 *N. hirame*의 18S rRNA(GenBank Acc. No. AB162424.1)와 99.23% 일치하였으며 ITS 영역은 *N. hirame*의 ITS 영역(GenBank Acc. No. FJ480934.1)과 100% 일치하였다. 이로부터 본 연구의 형태학적특징과 더불어 rRNA도 *N. hirame*와 상동성이 아주 높았으므로 넙치에 심한 빈혈을 유발하였던 흡충은 *N. hirame*로 판단하였다. 추가로 *N. hirame*의 미토콘드리아의 전체염기서열은 보고하였다(Kim et al., 2020).

감염된 넙치의 아가미에서는 한 쌍의 파악기를 가진 유충과 세 쌍의 파악기와 한 쌍의 미성숙한 파악기를 가진 미성숙 성충이 관찰되었다. 층은 4쌍의 파악기를 가지고 생식기관이 발달하기 시작할 때 까지 아가미에 기생하다가 완전히 성숙하게 되면 구강으로 이동하여 교미를 하는 것으로 보고되어 있으며 흡혈은 아가미에 부착하고 있는 단계에서 심각하게 일어나는 것으로 추측되고 있다(Anshary and Ogawa, 2001). 층이 기생한 넙치의 아가미는 흰색으로 변해 있었고 적혈구 용적은 정상 넙치에 비하여 1/3이하로 낮은 수치를 나타내며 병리조직학적으로 아가미 혈관 내 적혈구 감소, 비장의 red pulp 영역의 감소 등 심각한 빈혈증상을 보이며 장의 경우 정상의 조직상을 보이고 있어 영양소 흡수에는 문제가 없어 보이지만 간 조직의 간세포에서 위축이 관찰되는 것으로 보아 영양분의 축적이 일어나지 않는 것으로 판단된다. 발병상황과 어체의 상태를 종합하면 심각한 빈혈에 영양 결핍 상태이긴 하지만 층이 감염되더라도 섭이활동이나 유영은 정상적이었으며 폐사가 발생하지도 않았다. 그러나 일본에서 2000년대 초기 자연산 넙치에서 발병이 유행했을 때는 폐사율이 높았고, Anshary et al.(2002)은 일본의 돛토리 현에서 자연산 넙치가 급격히 감소한 것은 *N. hirame*의 감염으로 인한 빈혈 때문일 수 있다고 고찰했다. 본 연구에서는 층에 의한 폐사가 발생하기 전에 폐기하거나 치료하였으므로 최종 폐사율을 확인할 수는 없었지만 적혈구 용적이 1/3로 감소한 것으로 보아 어체의 저항력이 급격히 감소한 것은 분명하며 다양한 병원체의 2차 감염에 취약할 것으로 판단된다.

병이 발생한 넙치는 태안 소재의 동일한 종묘배양장에서 구매한 것으로 2018년 5월 구매한 것은 사육수온 20±1℃에서 사육하던 6개월째에, 2019년 10월 구매한 것은 사육수온 15-20℃에서 사육하던 5개월째에 *N. hirame*의 기생을 확인하였다. 1, 2차 발병어는 모두 실험실의 폐쇄된 환경에서 백신실험을 위하여 사육하던 넙치로 순환여과식으로 사육하면서 1-2주일에 1회 사육수를 교환하면서 다른 질병이 없이 안정적으로 관리하던 실험어들이다. 병이 발생한 시기에 생물학적 여과조의 거름망에 다수의 *N. hirame*의 난이 영커져서 관찰되었으며 사육수의 교환량이 적어 *N. hirame*의 유충이 순환수조내에서 증식하여 그 수가 증가하여 발병한 것으로 생각된다. 1차 발병어는 증상이 심하여 모두 폐기하였으며, 2차 발병어는 5개월이 지난 시점에 발견하여 8%소금물에 1분간 처리하고 사육수는 모두 염소로 소독하였고 사료에 종합비타민과 철분제를 섞어 어체중의 2%로 급이함으로써 3주 후 적혈구 용적이 정상으로 회복된 것을 확인하였다.

국내에서 넙치는 해산어류 중 가장 많이 생산되는 어종으로 대부분이 육상수조식 양식장에서 유수식으로 사육하고 있는데 최근 친환경 양식에 관심이 높아지고 외부에서의 병원체의 유입을 최소화하고 일정한 수질에서 사육하기 위하여 물리학적 및 생물학적 여과장치를 사용한 순환여과식 양식으로 전환하려고 하는 움직임이 있다. 순환여과식 양식에서는 병원체가 유입될 경우 병원체가 밖으로 배출되지 않고 사육조와 여과조를 순환하면서 그 수가 증가하게 되므로 사육수의 살균이 중요하다. 유입수를 살균하는 방식으로는 UV, 여과, 오존, 전기분해, 열 처리 등에 대하여 국내외적으로 연구가 되어있다(Whipple and Rohovec, 1994; Pascho et al., 1995; Chang et al., 1998; Lee et al., 2013). 그 중 본 질병이 발생했던 순환여과시스템에서 사용했던 UV 처리 방법은 후처리 없이 바로 양식용수로 사용가능하여 세계적으로 많이 이용되는 방법이다. 자외선의 조사량은 mWs/cm² (또는 mJ/cm²) 단위로 표현하는데 스키타카층의 경우 200 mWs/cm² 이상의 자외선 조사량에서 불활화되며 myxozoa의 경우 40 mWs/cm² 이상의 자외선 조사

량에서 불활화 된다(Kasai, 2002; Cobcroft, 2013; Kang et al., 2015). 하지만 현재까지 *N. hirame*가 속한 그룹인 monogenea의 난을 불활성 되기 위한 자외선 조사량에 대한 연구는 없다. 본 연구에서 발병한 수조에서 사용한 사육수는 1.5톤 탱크에서 65 mWs/cm²로 2시간이상 반복순환시켜 1차 소독한 것이다. 또한 넙치를 사육하는 순환여과시스템에는 32 mWs/cm² 자외선 살균장치가 총 수량 700 L에 부착된 것과 32mWs/cm² 자외선 살균장치 2대가 총 수량 3,050L에 부착된 것 모두에서 발병하여 본 실험에서 사용한 자외선의 조사량으로는 monogenea의 난을 불활성화 시키기는 어려운 것으로 생각된다. 연구에서 발견된 *N. hirame*는 실험실에서 순환여과식 수조에서 넙치를 사육 중에 발견한 것으로 일반적인 육상수조식 양식시스템이었다면 계속 새로운 사육수가 유입되고 배출되므로 난에서 부화한 자충이 어체에 부착하기 전에 씻겨나감으로써 숙주를 만날 기회가 줄어들어 질병을 일으키지 않았을 가능성이 크다. 그러나 비록 아가미에서 유충이 관찰되는 정도이고 성충으로 성장하여 심각한 빈혈을 유발하지는 않더라도 우리나라 남해안과 서해안의 자연계에 이미 분포하고 있으므로 주의가 필요하다. 또한, 앞으로 새로운 수처리 시스템을 도입한 순환여과식 양식을 넙치에 적용하게 될 경우 *N. hirame*처럼 문제가 되지 않던 병이 새로운 이슈로 떠오르면서 질병의 발병패턴이 변할 가능성이 있으므로 사육시스템에 적합한 사육수 소독시설의 설치를 고려한 질병관리가 요구된다.

요 약

실험실에서 순환여과시스템으로 5-6개월 사육 하던 넙치 치어에서 아가미의 심한 빈혈을 나타내는 질병이 발생하였다. 현미경관찰에서 아가미에서는 유충이, 입천정에서는 성숙한 성충이 관찰되었다. 성충의 체장은 5.60-9.32 mm이며 방추형 몸의 길이는 3.83-6.32 mm, 부착기는 방추형 몸에서부터 연결된 isthmus의 끝부분에 꽃자루 모양으로 존재하였고 부착기의 끝에는 8개의 파악기가 있었다. 충의 형태학적 관찰로부터 단생류에 속하는 *Neoheterobothrium hirame*로 동정하였다. 감염어의

적혈구용적는 평균 10.3±2.8%로 정상 넙치의 31.4 ±4.2%보다 현저히 낮았다. 병리조직학적으로 *N. hirame*에 감염 된 넙치는 아가미 새판과 새엽을 흐르는 혈관내의 적혈구가 감소하고 비장의 적수(red pulp) 영역이 감소되고 간세포는 위축이 관찰되었다. 이상의 결과로부터 넙치에 심한 빈혈을 일으킨 원인은 *N. hirame*인 것을 밝혔다. 이 연구는 순환여과식 사육시스템에서는 사육수의 교환이 적으므로 소독장치가 충분하지 못할 경우 병원체의 증식이 문제가 될 수 있는 예를 보이고 있다.

감사의 글

이 논문은 2020년 해양수산부 재원으로 해양수산과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 연구임(스마트 수산양식 연구센터).

References

- Anshary, H. and Ogawa, K.: Microhabitats and mode of attachment of *Neoheterobothrium hirame*, a monogenean parasite of Japanese flounder. *Fish Pathology*, 36(1): 21-26, 2001.
- Anshary, H., Ogawa, K., Higuchi, M. and Fujii, T.: A study of long-term changes in summer infection levels of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* with the monogenean *Neoheterobothrium hirame* in the central Sea of Japan, with an application of a new technique for collecting small parasites from the gill filaments. *Fish Pathology*, 36(1): 27-32, 2001.
- Anshary H, Yamamoto E, Miyanaga T. and Ogawa K.: Infection Dynamics of the Monogenean *Neoheterobothrium hirame* Among Young Wild Japanese Flounder in the Western Sea of Japan. *Fish Pathology*. 37(3): 131-140, 2002.
- Chang, P. S., Chen, L. J. and Wang, Y. C.: The effect of ultraviolet irradiation, heat, pH, ozone, salinity and chemical disinfectants on the infectivity of white spot syndrome baculovirus. *Aquaculture*, 166: 1-17, 1998.
- Cho, M.Y. and Kim, J.W. Monitoring of bacteria and parasites in cultured olive flounder, black rockfish, red sea bream and shrimp during summer period in Korea from 2007 to 2011. *Journal of Fish Pathology*, 25: 231-241, 2012.
- Cobcroft, J. M. and Battaglene, S. C.: Ultraviolet irradi-

- ation is an effective alternative to ozonation as a sea water treatment to prevent *Kudoa neurophila* (Myxozoa: Myxosporaea) infection of striped trumpeter, *Latris lineata* (Forster). *Journal of fish diseases*, 36(1): 57-65, 2013.
- Hayward, C. J., Kim, J. H. and Heo, G. J.: Spread of *Neoheterobothrium hirame* (Monogenea), a serious pest of olive flounder *Paralichthys olivaceus*, to Korea. *Diseases of aquatic organisms*, 45(3): 209-213, 2001.
- Jang, H., Moon, J-S., Kim, J-Y., Joh, S-J. and Son, S-W.: Occurrence and elimination of *Neoheterobothrium* infection from cultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) in the western coast of Korea. *Korean Journal of Veterinary Research*, 47(3): 299-302, 2007.
- Jee, B. Y., Shin, K. W., Lee, D. W., Kim, Y. J. and Lee, M. K.: Monitoring of the mortalities and medications in the inland farms of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, in South Korea. *Journal of Fish Pathology*, 27(1): 77-83, 2014.
- Jung, S. H., Choi, H-S., Do, J-W., Kim, M. S., Kwon, M-G., Seo, J. S., Hwang, J. Y., Kim, S-R., Cho, Y-R., Kim, J. D., Park, M. A., Jee, B-Y., Cho, M. Y. and Kim, J. W.: Monitoring of bacteria and parasites in cultured olive flounder, black rockfish, red sea bream and shrimp during summer period in Korea from 2007 to 2011. *Journal of Fish Pathology*, 25(3): 231-241, 2012.
- Jung, S. J., Kitamura, S. I., Song, J. Y., and Oh, M. J.: *Miamiensis avidus* (Ciliophora: Scuticociliatida) causes systemic infection of olive flounder *Paralichthys olivaceus* and is a senior synonym of *Philasterides dicentrarchi*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 73(3): 227-234, 2007.
- Kang, B. J., Jang, Y. H., Jhon, B. K., Park, B. H. and Shin D. H.: Effect of UV disinfection following mechanical filtration for influent seawater on decrease in disease outbreak of juvenile olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Journal of Fish Pathology*, 28(3): 125-131, 2015.
- Kasai, H., Osawa, S., Kobayashi, T. and Yoshimizu, M.: Prevention of scuticociliatosis in Japanese flounder by treatment of water-supply with a high quality UV lamp. *Fish Pathology*, 37(4): 199-200, 2002.
- Kawai, T., Sekizuka, T., Yahata, Y., Kuroda, M., Kume da, Y., Iijima, Y., Kamata, Y., Sugita-Konishi, Y. and Ohnishi, T.: Identification of *Kudoa septempunctata* as the causative agent of novel food poisoning outbreaks in Japan by consumption of *Paralichthys olivaceus* in raw fish. *Clinical Infectious Diseases*, 54(8): 1046-1052, 2012.
- Kim, J. H., Lee, B. S. and Jung, S. J.: The complete mitochondrial genome of *Neoheterobothrium hirame* (Platyhelminthes: Monogenea) from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Mitochondrial DNA Part B*, 5(2): 1408-1409, 2020.
- Kim, S. M., Jun, L. J., Park, M., Jung, S. H., Jeong, H. D., & Jeong, J. B.: Monitoring of emaciation disease in cultured olive flounder *Paralichthys olivaceus* in Jeju (2010-2013), Korea. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 48(5): 719-724, 2015.
- Lee, H. J., Yu, H., Oh, E-K. Shin, S. B., Park, K., Kim, J. H.: Germicidal effect of electrolyzed seawater on live fish and shellfish. *Korean Journal Fisheries and Aquatic Sciences*, 46(5): 534-539, 2013.
- Linton, E.: Notes on trematode parasites of fishes. US Government Printing Office 20: 507-548, 1898.
- Ogawa, K.: *Neoheterobothrium hirame* sp. nov. (Monogenea: Diclidophoridae) from the buccal cavity wall of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish Pathology*, 34(4): 195-201, 1999.
- Pascho, R. J., Landolt, M. L. and Ongerth, J. E.: Inactivation of *Renibacterium salmoninarum* by free chlorine. *Aquaculture*, 131: 165-175, 1995.
- Shim, J. D., Hwang, S. D., Jang, S. Y., Kim, T. W. and Jeong, J. M.: Monitoring of the mortalities in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) farms of Korea. *Journal of Fish Pathology*, 32(1): 29-35, 2019.
- Shin, S. P., Sohn, H. C., Jin, C. N., Kang, B. J., and Lee, J. (2018). Molecular diagnostics for verifying an ectiological agent of emaciation disease in cultured olive flounder *Paralichthys olivaceus* in Korea. *Aquaculture*, 493: 18-25, 2018.
- Tomiyama, T., Watanabe, M. and Ebe, K. I.: Infection dynamics of *Neoheterobothrium hirame* in Japanese flounder in the Joban Sea, eastern Japan. *Fish Pathology*, 39(4): 197-202, 2004.
- Whipple, M. J. and Rohovec, J. S.: The effect of heat and low pH on selected viral and bacterial fish pathogens. *Aquaculture*, 123: 179-189, 1994.