

양식 넙치에서 분리된 스쿠티카섬모충 *Philasterides dicentrarchi*의 생물학적 특성

진창남¹, 강현실, 이창훈², 이영돈, 이제희, 허문수*

¹목포지방해양수산청 진도해양수산사무소, 제주대학교 해양과학부, ²국립수산과학원 제주수산연구소

Biological Characteristics of Scuticociliate, *Philasterides dicentrarchi* Isolated from Cultured Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus*

Chang-Nam Jin¹, Hyun-Sil Kang, Chang-Hoon Lee², Young-Don Lee,
Jehee Lee and Moon-Soo Heo*

¹Jindo Maritime Affairs and Fisheries Office, Chonnam 539-802, Korea
Faculty of Marine Science, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea
²Jeju Fisheries Resource Institute NFRKE, Jeju 690-102, Korea

Biological characteristics of *Philasteridies dicentrarchi* (Ciliophora:Scuticociliate) isolated from the cultured olive flounder *Paralichthys olivaceus* was determined out by culture, growth conditions, and *in vitro* relief effect of chemical compounds. The scuticociliate has an active propagation ability by utilizing organic matters obtained from cell strain, bacteria, assorted feed, brain tissue and rotifer tissue. The ciliate achieved population growth activity under the conditions of 5~45 ppt in salinity and pH 6-9. The ciliate had survived and propagated under the water temperature ranging 10~30°C, but active growth was observed in the temperature ranges of 10~25°C. Therapeutic trials were performed with formalin and hydrogen peroxide. The extermination time of the parasites with formalin was in 30 minutes both at 300 and 400 ppm, 60 minutes at 200 ppm, 90 minutes at 100 ppm, and 120 minutes at 50 ppm, respectively. In hydrogen peroxide treatments extermination time was 60 minutes in 300 ppm, 90 minutes in 200 ppm, and 150 minutes at 150 ppm and 100 ppm concentrations.

Key words: Scuticociliate, *Philasterides dicentrarchi*, Olive flounder, Growth conditions, Relief effect

서 론

채찍섬모충목(Scuticociliatida)에 속하는 스쿠티카충은 최근 양식산업이 발달하면서 해산어류 등의 양식생물에 감염되어 피해를 입히는 기생충으로 널리 알려져 있다. 수족관의 놀래기에 감염되는 *Uronema marinum* (Cheung et al., 1980), 대서양의 연어에 기생하는 *Tetrahyena* sp. (Ferugson et al., 1987), 호주에서 양식하는 Southern bluefin tuna에 기생하는 *U. nigricans* (Munday et al., 1997), 지중해 연안의 양식 농어와 스페인 북부 연안에서 양식하는 터봇에 기생하는 *Philasterides dicentrarchi* (Dragesco et al., 1995; Iglesias et al., 2001) 등 다양한 어종에 많은 종류의 스쿠티카충 감염사례가 보고되고 있다.

우리나라에서는 1990년대 들어 육상수조를 이용한 넙치양식이 증가하면서 양식넙치에 스쿠티카충이 감염되기 시작하였으며, 최근 들어서는 육상 넙치양식장에서 가장 문제가 되는 질병중의

하나이다(Lee et al., 2001; Jin et al., 2003). 양식넙치에는 *U. marinum*, *P. dicentrarchi*, *Pseudocohnilembus persalinus*, *Miamiensis avidus* 등 여러 종류의 스쿠티카충이 감염되는 것으로 보고되고 있다(Jee et al., 2001; Kim et al., 2004a, b; Jung et al., 2005). 스쿠티카섬모충의 종 분류는 형태와 크기가 유사하여 어려움이 있는데, Jung et al. (2007)은 18s SSU rRNA와 형태학적 관찰을 통하여 *P. dicentrarchi*와 *M. avidus*가 동일종인 것으로 보고한 바 있다. 넙치뿐만 아니라 유럽의 육상양식장에서 양식되는 터봇에도 *P. dicentrarchi*가 감염될 경우 뇌와 내부 장기에 침투하여 많은 피해를 입히고 있다(Iglesias et al., 2001).

스쿠티카충이 양식어류에 감염될 경우 양식현장에서는 화학물 약육에 의존하고 있으나 체내에 침투할 경우 사실상 치료가 어려운 것으로 알려져 있다(乙竹·松理, 1986; 吉水等, 1993). 따라서 감염예방이 중요하며, 피해를 줄이기 위해서는 다각적인 연구와 접근이 필요한 것으로 보인다.

양식현장에서 넙치에 감염되는 스쿠티카충을 관찰해보면 형태적으로 다양한 종류가 관찰되나 어체조직이나 뇌 속에 침투하

*Corresponding author: msheo@cheju.ac.kr

여 치명적인 피해를 입히는 종은 형태적으로 *P. dicentrarchi*인 경우가 많은 것으로 보인다. 본 연구는 이와 같이 양식넙치에 많은 피해를 입히는 것으로 추정되는 *P. dicentrarchi*의 증식환경과 생육조건, 화합물에 의한 구제효과 등을 조사하였다.

재료 및 방법

실험 스쿠티카충

제주대학교 해양과학대학 해양생물공학과에서 제주도 북제주군 지역의 육상양식장에서 양식중인 넙치 치어(14 cm)의 뇌에서 분리하여 silver carbonate와 silver nitrate 방법에 따라 염색 후 형태적 관찰 및 분자계통학적 동정공정을 거쳐 *P. dicentrarchi*로 동정된 스쿠티카충을 분양받아 실험에 이용하였다.

배양

*P. dicentrarchi*의 증식환경을 파악하기 위해 어류주화세포와 세균, 그리고 양식현장에서 스쿠티카충의 숙주나 먹이로 추정되는 물질을 이용하여 배양하였으며, 반복 실험구는 설정하지 않았다.

1) 세포주를 이용한 배양

어류주화세포 Chinook salmon embryo-214 (CHSE-214)를 12 well plate에 1 mL (2×10^5 cells/mL) 분주한 후 *P. dicentrarchi*를 접종시켜 배양하였다. 총 접종은 CHSE-214 세포주에서 배양시킨 충을 1.0×10^3 cells/mL 농도로 하였으며, 15°C incubator에서 2주간 배양하였다. 어류주화세포 CHSE-214는 modified Eagle's medium에 10%의 FBS 및 항생제 penicillin (Gibco, USA) 100 IU와 streptomycin (Gibco, USA)을 100 µg/mL 농도로 각각 첨가하였다.

2) 세균을 이용한 배양

배양배지는 Provasoli et al. (1957)의 Millport S 용액(NaCl 1.5 g, MgCl₂·6H₂O 0.25 g, KCl 0.04 g, CaSO₄ 0.012 g/distilled water 100 mL)에 BHI (Brain Heart Infusion) broth (Merck, Germany) 배지를 0.1% 첨가한 후 121°C에서 15분간 멸균시켜 Millport BHI 배지(pH 7.2)를 제작하였다. 제작된 Millport BHI 배지를 25 mL의 cell culture flask (Nunc, Denmark)에 10 mL 분주하고 충의 먹이로 넙치 피부에서 분리된 비브리오균, *Vibrio lentus*를 3.0×10^8 cells/mL 농도로 접종시켜 지속적으로 균이 증식되면서 충의 먹이가 되도록 하였다. 먹이로 사용한 *V. lentus*는 넙치 치어 피부에서 분리된 균으로 예비실험을 통하여 충이 섭이하여 양호하게 증식되는 균주를 선발하였다. 먹이 균의 접종량은 Crosbie and Munday (1999)의 배양방법을 기준하였으나 충의 배양조건 등은 예비실험을 통하여 충이 충분히 균을 포식

하면서 지속적으로 생육이 가능한 조건을 찾아서 정하였다. 충의 접종과 배양 온도, 기간 등은 세포주를 이용한 배양과 같은 조건으로 하였다.

3) 넙치 뇌조직을 이용한 배양

배지는 멸균 Millport S 용액을 25 mL의 cell culture flask (Nunc, Denmark)에 20 mL 분주하고 충의 먹이로 건강된 넙치 뇌조직을 배양액 mL당 0.25 mg을 마쇄하여 첨가하였다. 첨가한 뇌조직의 양은 사전에 예비실험을 통하여 충분히 충이 섭이하고 증식 가능한 양으로 정하였다(pH 7.2). 배양액에는 배양기간 동안에 세균의 증식을 막기 위해 항생제 penicillin (Gibco, USA) 100 IU와 streptomycin (Gibco, USA)을 100 µg/mL 농도로 첨가하였다. 충의 접종과 배양 온도, 기간 등은 세포주를 이용한 배양과 같은 조건으로 하였다.

4) 로티퍼 조직을 이용한 배양

넙치 뇌조직을 이용한 배양과 같은 조건에서 뇌조직 대신 로티퍼를 첨가하여 제조하였다. 해산 크로렐라로 배양한 로티퍼, *Brachionus rotundiformis*를 멸균해수로 3회 세척한 후 물기를 제거하고 -70°C에 냉동 보관한 후 먹이로 이용하였다. Millport S 용액에 냉동된 로티퍼 0.5 mg/mL 혼합하여 배양용액(pH 7.2)을 제조했는데, 로티퍼의 양은 사전에 예비실험을 통하여 충분히 충이 섭이하고 증식 가능한 양으로 정하였다. 충의 접종과 배양 온도, 기간 등은 세포주를 이용한 배양과 같은 조건으로 하였다.

5) 배합사료를 이용한 배양

넙치 뇌조직을 이용한 배양과 같은 조건에서 뇌조직 대신 충의 먹이로 H사의 넙치 치어 배합사료(Ø 0.5~0.6 mm, extruded pellet, Table 1)를 Millport S 용액에 1 mg/mL 첨가하여 배지를 제조하였다(pH 7.2). 배지에 혼합하는 치어 배합사료의 양은 사전에 예비실험을 통하여 충이 충분히 섭이하고 증식 가능한 양으로 정하였으며, 충의 접종과 배양 온도, 기간 등은 세포주를 이용한 배양과 같은 조건으로 하였다.

6) 스쿠티카충 계수

배지 종류별 배양과정의 스쿠티카충 계수는 접종 후 2일마다 하였으며, 계수 일자별 계수시점은 최초 접종시 접종시간을 기준하여 ±1시간 내에 실시하였다. 계수방법은 배양배지 6 µL를 pipetting하여 counting chamber 위에서 glutaraldehyde (Sigma, USA) 1% 용액을 소량 첨가하여 충을 고정한 후 cover glass (18×18 mm)로 덮어 광학 현미경(Olympus, BX 50, Japan) 200 배율로 계수한 후 cells/mL로 환산하였다.

생육 환경

*P. dicentrarchi*의 생육환경 조건을 파악하기 위해 온도, pH 및

Table 1. Composition of the experimental diets (extruded pellet)

(Unit: g)

Diets form	Diets size (Ø mm)	Component (diets per 100 g)					
		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

염분농도 등을 각각 다른 조건에서 배양하면서 생육상태를 관찰하였다. 실험구별로 층의 운동성과 형태변화, 증식 여부를 관찰하고 배양시간 경과에 따라 증식(+++), 생존(++), 감소(+), 사망(-) 등으로 구분하였다.

1) 온도

멸균 지하해수에 BHI 배지(Merck, Germany)를 0.1% 첨가하여 기본배지(SW BHI)를 제작하였다. 25 mL의 cell culture flask (Nunc, Denmark)에 SW BHI 배지를 10 mL 분주하고 층의 먹이로 *V. lentus* 균을 1.0×10^8 cells/mL 농도로, *P. dicentrarchi*는 3.0×10^3 cell/mL 농도로 접종한 후 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35°C에서 배양하면서 11일 동안 생육상태를 관찰하였다(pH 7.2). 생육상태는 배지 종류별 배양시 측정방법과 같은 방법으로 하였다.

2) pH

온도별 생육실험과 같은 조건에서 1 N NaOH (Merck, Germany)와 1 N HCl (Merck, Germany)을 사용하여 배양배지의 초발 pH를 5, 6, 7, 8, 9, 10으로 설정한 후 온도별 생육실험과 같은 방법으로 *V. lentus* 균을 먹이로 하여 15°C에서 11일 동안 생육상태를 관찰하였다.

3) NaCl

염분 농도에 따른 생육상태는 MS BHI (Merck, Germany)배지를 기본으로 NaCl (Merck, Germany)을 실험구별로 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 및 60 ppt 농도로 첨가한 후 (pH 7.2), 온도별 생육실험과 같은 방법으로 *V. lentus* 균을 먹이로 하여 15°C에서 11일 동안 생육상태를 관찰하였다.

화합물의 *in vitro* 구제효과

1) 구제 화합물 및 방법

국내외에서 치료제로 가장 많이 사용되는 포르말린(Merck, Germany)과 과산화수소(Merck, Germany)를 이용하여 *in vitro* 구제실험을 하였다. 실험방법은 멸균 지하해수에 화합물을 희석한 후 약육처리를 하였는데, Ø 87 mm petri dish에 멸균 지하해수와 화합물을 희석한 용액 20 mL를 분주한 다음 비브리오균을 먹이로 배양된 *P. dicentrarchi*를 1.0×10^4 cells/mL 농도로 접종시켰다. 구제효과는 화합물의 농도별로 180분 동안 약육을 하

면서 시간경과에 따른 층의 운동성과 형태적 변화를 현미경 (Olympus, BX 50, Japan) 400 배율로 관찰하였다.

화합물의 종류별 약육처리 농도는 포르말린 50, 100, 200, 300 및 400 ppm, 그리고 과산화수소 25, 50, 100, 150, 200 및 300 ppm으로 하였다.

2) 구제효과 판정

약육처리 후 시간경과에 따른 층의 운동성과 형태적 변화를 Novotny et al. (1996)의 효과측정 방법에 따라 판정하였다. 약육처리 시간 180분 동안 30분 단위로 농도별 시간 경과에 따른 운동성과 형태적 변화를 5단계의 score로 구분하였다(Table 2).

결 과

배 양

1) 세포주를 이용한 배양

*P. dicentrarchi*는 세포를 먹이로 활발히 증식하였는데 배양 직후부터 지수증식이 이루어졌으며, 배양 10일째에 4.8×10^5 cells/mL로 160배로 증식하여 최고 밀도에 도달하였다. 최고 밀도에 도달한 이후에는 폐사가 이루어지면서 밀도가 떨어졌다(Fig. 1).

2) 세균을 이용한 배양

배양기간 동안 세균을 먹이로 활발히 증식하면서 전형적인 포

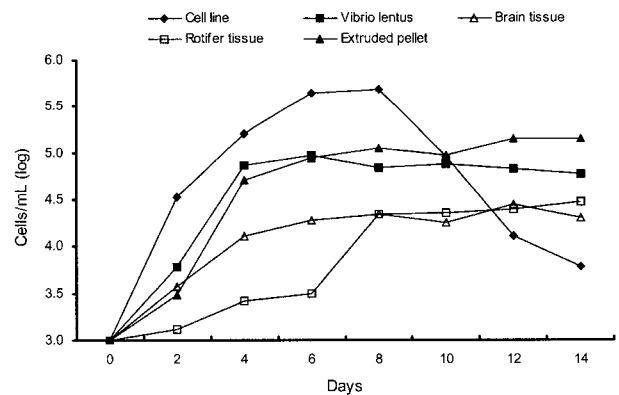


Fig. 1. Growth curves of the *P. dicentrarchi* in different media.

Table 2. Scoring system for appraising the effects of various compounds on motility and morphology of *P. dicentrarchi*

Score	Interpretation
Morphology	
4	No change; cells elliptical
3	Less than 50% of cells round or irregular shape
2	Approximately 50% of cells round or irregular shape
1	More than 50% of cells round or irregular and lysis evident
0	Extensive lysis with few cells intact
Motility	
4	No effect; motility normal
3	Motility slowed in more than 50% of ciliates
2	Approximately 50% of ciliates stationary, but cilia still beating
1	More than 50% of ciliates stationary and cilia still beating
0	No sign of motility or cilia movement

식자와 피포식자의 관계를 보였다. 배양 6일째에 9.2×10^4 cells/mL로 증식하여 처음 접종시보다 30배 이상 증식하여 최고 밀도에 도달하였다(Fig. 1). 배양기간 동안 먹이 균의 밀도는 $1.0 \times 10^8 \sim 2.3 \times 10^9$ cells/mL를 유지하였다.

3) 넙치 뇌조직을 이용한 배양

넙치 뇌조직을 먹이로 해서도 활발히 증식하였다. 배양 4일째부터 10^4 cells/mL 이상으로 증식하였으며, 배양 14일째에 2.9×10^4 cells/mL로 최고 밀도에 도달하여 접종시보다 10배 정도로 증식하였다. 전반적으로 최고밀도 수준에서 장기간 생존하였다(Fig. 1).

4) 로티퍼 조직을 이용한 배양

로티퍼 조직을 먹이로 한 증식은 넙치 뇌조직을 먹이로 한 증식과 비슷한 양상을 보였으나 지수 증식이 이루어지는 시기가 늦었다. 배양 8일째부터 지수증식이 이루어졌으며, 배양 14일째에 3×10^4 cells/mL로 접종시 밀도보다 10배로 증식하여 최고 밀도에 도달하였다(Fig. 1).

5) 배합사료를 이용한 배양

넙치 치어용 배합사료를 먹이로 하여 활발히 증식하였는데 배양 8일째에 10^5 cells/mL를 넘어서 33배로 증식하였으며, 배양 12일째에 1.4×10^4 cells/mL로 46배 증식하여 최고 밀도를 보였다. 10^5 cells/mL 이상으로 증식된 후에도 지속적으로 고밀도를 유지하였다(Fig. 1).

생육 환경

1) 온도

10~30°C 범위에서 생존 및 증식이 이루어졌으며, 활발한 증

식은 10~25°C 범위에서 이루어졌다. 30°C에서는 접종 후 4일간 증식 후 감소하기 시작하여 7일후 전량 폐사하였다. 5°C에서는 접종 후 감소하기 시작하여 3일 후 전량 폐사하였으며, 1°C와 35°C에서는 접종직후 전량 폐사하였다(Table 3).

2) pH

pH 6~9까지 생존 및 증식을 하였으며 pH 7~8 범위에서 활발한 증식이 이루어졌다. pH 5 및 pH 10에서는 접종 후 폐사하였다(Table 4).

3) NaCl

5~50 ppt 범위에서 생존이 가능하였으며, 증식은 5~45 ppt 범위에서 이루어졌다. 증식이 시작되는 시기는 5 ppt에서는 3일 후부터 이루어졌으며, 10~30 ppt 범위에서는 접종 1일 후부터 증식이 이루어졌다. 35~45 ppt에서는 배양 후 4일 경부터 증식이 가능했으나 활발한 증식은 5~30 ppt 범위에서 이루어졌다. 50 ppt에서는 10일 이상 생존하였으나 증식은 이루어지지 않았으며, 55 ppt에서는 개체수가 감소 후 5일 만에 전량 폐사하였다. 1 ppt와 60 ppt에서는 접종 후 전량 폐사하였다. 전반적으로 광염성을 보였으나 저염분에 잘 적응하는 특성을 보였다(Table 5).

화합물의 *in vitro* 구제효과

1) 포르말린

포르말린 약욕시 약욕시간 경과에 따른 *P. dicentrarchi*의 형태적 변화는 크지 않았다. 30분 약욕시 200 ppm 이상 농도에서 형태변화가 나타나기 시작했는데, 400 ppm에서 60분 약욕으로 절반 정도가, 90분 약욕으로 대부분의 세포가 구형화 되거나 변

Table 3. Effect of temperature concentration on the growth of *P. dicentrarchi* isolated from cultured olive flounder

Temp. (°C)	Days after cultivation									
	0	1	2	3	4	5	7	9	11	
1	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-
10	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
15	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
20	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
25	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++
30	++	+++	+++	+++	+++	+	-	-	-	-
35	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+++, Growth; ++, No change; +, Decrease; -, Death.

Table 4. Effect of pH concentration on the growth of a *P. dicentrarchi* isolated from cultured olive flounder

pH	Days after cultivation (15°C)									
	0	1	2	3	4	5	7	9	11	
5	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
7	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
8	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
9	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
10	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+++, Growth; ++, No change; +, Decrease; -, Death.

Table 5. Effect of NaCl concentration on the growth of a *P. dicentrarchi* isolated from cultured olive flounder

NaCl (ppt)	Days after cultivation (15°C)									
	0	1	2	3	4	5	7	9	11	
1	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
10	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
15	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
20	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
25	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
30	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
35	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
40	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
45	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
50	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
55	++	++	+	+	+	-	-	-	-	-
60	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+++, Growth; ++, No change; +, Decrease; -, Death.

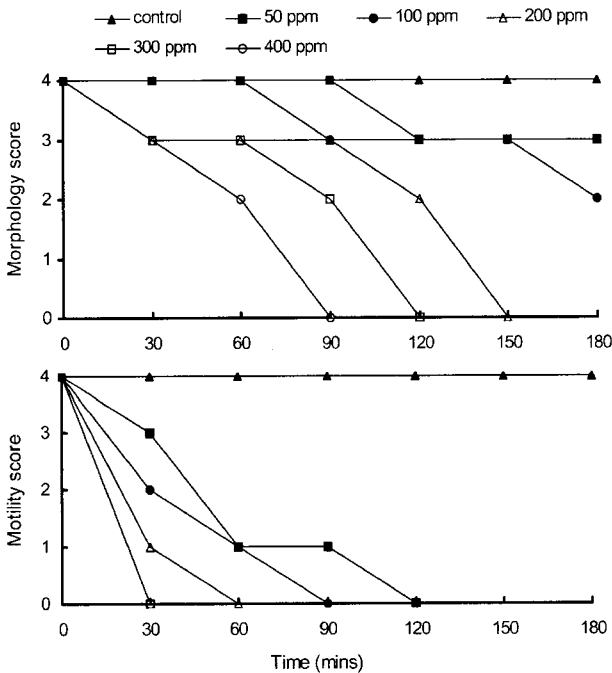


Fig. 2. Observed effects of a range of concentrations of formalin of morphology and motility.

형을 일으켰다. 200 및 300 ppm에서는 150분 약육으로 대부분의 세포가 변형되었으며, 100 ppm에서는 180분 약육으로 절반 정도가, 50 ppm에서는 180분 약육으로 일부 개체의 세포가 변형되었다.

포르말린 약육에 의한 운동성의 변화는 형태적 변화보다 뚜렷이 나타났는데 300, 400 ppm 모두 30분 약육으로 운동성을 완전히 상실하였다. 200 ppm에서 60분, 100 ppm에서 90분, 50 ppm에서 120분 만에 각각 운동성을 완전히 상실하여 구제효과를 보였다(Fig. 2).

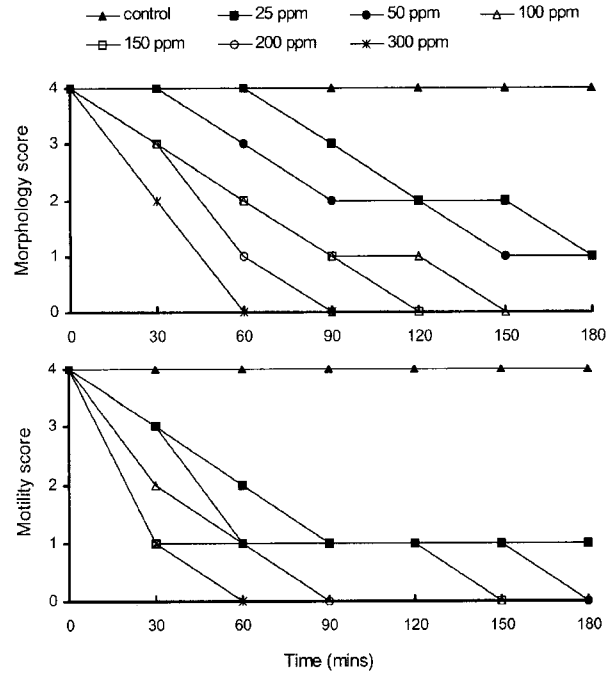


Fig. 3. Observed effects of a range of concentrations of hydrogen peroxide of morphology and motility.

2) 과산화수소

과산화수소 약육에 따른 *P. dicentrarchi*의 형태적 변화는 300 ppm에서 30분 약육시 50% 정도가 세포 변형을 일으키거나 세포막이 파괴되었으며, 60분 약육으로 대부분의 세포가 변형되거나 세포막이 파괴되었다. 200 ppm에 90분, 150 ppm에 120분, 100 ppm에 150분 약육으로 대부분의 세포가 변형되거나 세포막이 파괴되었으며, 50 ppm에서는 180분 약육으로 50% 정도의 개체가 세포변형을 일으켰다.

과산화수소 약육에 의한 운동성의 변화는 포르말린 약육과 마

찬가지로 형태적 변화보다 빠르게 나타났다. 150, 200, 300 ppm 처리구 모두 30분 약육으로 유영력을 상실하였으나 섬모운동은 지속되었다. 300 ppm에서 60분 약육으로 섬모운동까지 완전히 상실하였으며, 200 ppm에서는 90분, 150 ppm과 100 ppm에서는 각각 150분 만에 운동성을 완전히 상실하였다. 50 ppm에서는 60분 약육으로 유영력을 상실하였으나 섬모운동은 180분 후에 정지되었다. 25 ppm에서는 180분 약육으로 유영력은 상실했으나 섬모운동은 지속되었다(Fig. 3).

고 찰

스쿠티카충이 유기물을 이용하여 증식하는 사실은 잘 알려져 있는데, Iglesias et al. (2001)은 스쿠티카충이 세균, 미세조류, 원생동물 등을 섭이한다고 하였으며, Crosbie and Munday (1999)는 Southern bluefin tuna에 감염되는 스쿠티카섬모충, *U. nigricans*를 비브리오균을 먹이로 하여 최고 8.8×10^4 cells/mL 밀도까지 배양하여 본 연구와 비슷한 결과를 보였다. 일반적으로 먹이 균 농도가 10^8 cells/mL 이상일 경우 활발히 증식하는 것으로 보인다. 균을 먹이로 한 배양시 배양액에 첨가하는 배지의 양에 따라서 균의 증식량이 달라지며 스쿠티카충의 증식상태도 달라지는데 BHI 배지나 peptone 등 세균배양 배지를 대략 0.1% 전후로 첨가할 경우 먹이 세균이 증식하는 양과 이를 섭이하는 스쿠티카충이 균형을 이루며 지수증식이 가능한 것으로 판단된다.

양식현장에서 넙치종묘 생산시 자치어에 배합사료 투여후 수조저면에 침적된 사료에서 스쿠티카충이 활발히 증식하는 것이 관찰되며, 넙치의 뇌조직에 침투하여 다량 증식하고, 로티퍼 사체에서도 스쿠티카충이 증식되는 것이 관찰되어 치어용 배합사료와 뇌조직, 로티퍼 조직 등을 이용한 증식과정을 관찰하였다. 지금까지 배합사료, 뇌조직, 로티퍼 조직을 이용한 배양 과정에 대해서는 보고된 바 없어 예비실험을 통하여 증식 가능한 농도를 정하였다. 배양결과 전 실험구 모두 활발히 증식하였으나 특히 어류 주화세포, 세균, 치어용 배합사료 등을 먹이로 하여 10^5 cells/mL 내외의 고밀도로 증식하였다. Iglesias et al (2003)은 FBS와 lipids가 포함된 L-15 medium을 이용하여 *P. dicentrarchi*를 10^5 cells/mL 내외로 배양한바 있다. 이 결과 등을 종합해볼 때 *P. dicentrarchi*는 세포나 조직, 지질, 세균, 배합사료와 같은 다양한 유기물을 이용하여 활발히 증식하는 것으로 판단된다. 또한 양식 넙치는 유기물이 많이 축적되는 육상수조의 저면에 착저하여 서식하므로 이 충이 감염될 기회가 많은 것으로 보인다.

Crosbie and Munday (1999)는 Southern bluefin tuna, *Thunnus macoyii*에 감염되는 *U. nigricans*의 성장범위가 수온 10~25°C, 염분농도 15~35 ppt로 보고했다. 비슷한 결과로서 Cheung et al. (1980)은 수족관내 해산 관상어에 감염되는 *U. marinum*이 염분농도 21~31 ppt, 수온 8~28°C 범위에서 나타난다고 보고하였다. 이들 연구결과와 비교해볼 때 *P. dicentrarchi*는 *Uronema* sp.에 비해 증식범위는 비슷하나 염분농도는 광염성인 것으로 보인다.

Iglesias et al. (2003)의 실험에서는 양식 터렛에서 분리한 *P. dicentrarchi* 배양실험에서 pH 7.2, 수온 18~23°C, 염분농도 10 ppt에서 양호하게 배양되었다. 본 연구에서도 10~25°C 범위에서 활발히 증식이 이루어져 비슷한 결과를 나타내었으며, 염분농도와 pH에서도 비슷한 결과를 보였다. 또한 Lee and Ha(1997)는 제주지역의 양식넙치에서 분리한 스쿠티카충이 20~25°C 범위에서 배양이 잘된다고 하였는데 대체로 본 연구의 배양 적수온과 일치하였다. 전반적으로 *P. dicentrarchi*는 광염, 광온성으로 환경에 대한 적응력이 매우 높았으며, 염분농도는 저염분에, 온도는 고온에 잘 적응하는 특성을 보였다.

스쿠티카충은 넙치뿐만 아니라 육상양식장에서 양식되는 터렛과 농어 등 많은 어종에 감염되고 있으며, 특히 *P. dicentrarchi*는 감염어의 체내 침투능력이 뛰어나 피해가 크다(Iglesias et al., 2002, 2003). 스쿠티카충에 대하여 화합물이나 화학요법제를 이용한 구제 연구가 진행되고 있는데, Paramá et al. (2004)은 다양한 antiprotozoal 제재를 이용하여 *in vitro* 구제효과를 screen한 결과 fluoroquinolone계의 norfloxacin과 lomefloxacin 등의 항균제도 구제효과가 있다고 하였다. 이외에도 Iglesias et al. (2002)은 *in vitro* 구제실험 결과 포르말린 약육시 최소 치사농도가 62 ppm/24 h이며 doxycycline hyclate도 구제효과가 있다고 하였다. 이렇게 다양한 화학요법제에 구제효과를 보이고 있으나 양식어류에 감염된 경우 전염성이 높고 내부 기관에 침투하므로 완치가 어렵다(Iglesias et al., 2003). 현재까지는 감염이 되면 화합물 약육에 의한 치료가 가장 많이 이용되고 있는데, Crosbie and Munday (1999)는 화합물을 이용한 *in vitro* 구제실험에서 운동성을 완전히 상실한 시기를 사실상 충이 죽은 시기로 단정했다. 이 기준에 따르면 *P. dicentrarchi*는 포르말린은 300 ppm에 30분, 200 ppm에 60분, 100 ppm에 90분, 50 ppm에 120분 만에 구제효과가 있는 것으로 나타났다. 포르말린 약육시 운동성은 농도에 따른 처리시간 별로 뚜렷이 구제효과가 구분되었으나 형태적 변화는 뚜렷이 구분되지 않았다. 반면에 과산화수소 처리구는 형태적으로 처리농도별 시간 경과에 따라 score가 뚜렷이 구분되었다. 세포가 변형되거나 세포벽이 파괴되는 경우를 기준한 과산화수소의 구제효과는 300 ppm에 60분, 200 ppm에 90분, 150 ppm에 120분 100 ppm에 150분 약육으로 구제효과가 있다고 볼 수 있다. Crosbie and Munday (1999)의 *U. nigricans*에 대한 *in vitro* 구제실험에서 포르말린은 200 ppm에서 30분 이내, 100 ppm에서 60분 약육으로 구제효과를 보였으며, 과산화수소인 경우 500 ppm 이상에서 30분 이내, 250 ppm에서 60분 만에 구제되었다. 본 실험 결과와 비교하여 큰 차이가 없었으나 *U. nigricans*에 비해 *P. dicentrarchi*가 이들 화합물에 대한 저항력이 다소 높은 것으로 나타났다. Jee and Jo (2002)의 *in vivo* 구제실험에서는 넙치 치어에 초기감염인 경우 포르말린과 과산화수소 각 100 ppm/1 h/2 d~4 d 약육치료로 구제효과가 있었으며, 중증인 경우는 치료효과가 없었다. 본 실험의 결과보다 비교적 저농도에서 반복 약육치료로 구제효과를 보였는데 이와 같은 결과

를 종합해 볼 때 저농도에서도 반복 약욕처리를 해줄 경우 치료 효과를 높일 수 있을 것으로 추정된다.

넙치 치어에 대한 포르말린과 과산화수소의 독성실험결과를 보면 Park et al. (1995)은 전장 6.1 cm의 치어인 경우 포르말린에 대한 1시간-LC₅₀은 2,520 ppm, 2시간-LC₅₀은 1,610 ppm, 4시간-LC₅₀은 868 ppm, 24시간-LC₅₀은 141 ppm으로 보고한 바 있으며, Jung and Kim(1998)은 전장 4.7 cm 치어의 24, 48, 72, 96시간-LC₅₀이 각각 212, 182, 162, 146 ppm으로 보고한 바 있다. Ryu et al. (1998)은 전장 17.6 cm 소형 넙치에 대한 포르말린과 과산화수소의 24시간-LC₅₀은 각각 321.65 ppm과 395.97 ppm으로 보고하였다. 어체의 크기나 실험조건에 따라 다소 차이는 있으나 이들 연구결과를 종합해 볼 때 포르말린과 과산화수소를 넙치에 사용하는데 별 문제가 없는 것으로 보인다. 그러나 과산화수소인 경우 양식현장에서 넙치에 150 ppm/1 h 이상의 농도에서 수회 반복 약욕할 경우 스트레스 증상이 나타나는 경우가 관찰되므로 양식현장에서 과산화수소 사용에 대한 추가 연구가 필요한 것으로 보인다.

요 약

양식넙치에서 분리된 스키티카섬모충 *P. dicentrarchi*에 대한 생물학적 특성을 규명하기 위해 배양, 생육환경, 화합물의 *in vitro* 구제실험 등을 실시하였다. *P. dicentrarchi* 배양실험 결과 세포, 세균, 넙치치어 배합사료, 뇌 조직과 로티퍼 조직 등의 유기물을 먹이로 활발히 증식하였다. 생육환경 조건은 염분농도 5~45 ppt, pH 6~9 범위에서 증식이 이루어졌으며, 온도는 10~30°C 범위에서 생존 및 증식이 가능하나 10~25°C 범위에서 활발한 증식이 이루어졌다.

*P. dicentrarchi*의 화합물 구제실험 결과 포르말린 300, 400 ppm에 30분, 200 ppm에 60분, 100 ppm에 90분, 50 ppm에서 120분 만에 구제효과를 보였다. 과산화수소 약욕에 따른 구제효과는 300 ppm에서 60분, 200 ppm에서 90분 만에 구제효과를 보였으며, 150 ppm 처리구와 100 ppm 처리구에서는 150분 만에 각각 운동성을 완전히 상실하여 구제효과를 보였다.

참고문헌

- Cheung, P. J., R. F. Nigrelli and G. D. Ruggieri, 1980. 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.
- Crosbie, P. B. B. and B. L. Munday, 1999. Environmental factors and chemical agents affecting the growth of the pathogenic marine ciliate *Uronema nigricans*. *Dis. Aquat. Org.*, 36, 213-219.
- Dragesco, A., J. Dragesco, F. Coste, C. Gasc, B. Romestand, J. C. Raymond. and G. Bouix, 1995. *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.
- Ferguson, H. W., B. D. Hicks, D. H. Lynn and V. E. Ostland, 1987. Cranial ulceration in Atlantic salmon *Salmo salar* associated with *Tetrahymena* sp. *Dis. Aquat. Org.*, 2, 191-195.
- Iglesias, R., A. Paramá, M. F. Alvarez, J. Leiro and M. L. Sanmartín, 2002. Antiprotozoals effective *in vitro* against the scuticociliate fish pathogen *Philasterides dicentrarchi*. *Dis. Aquat. Org.*, 49, 191-197.
- Iglesias, R., A. Paramá, M. F. Alvarez, J. Leiro, C. Aja and M. L. Sanmartín, 2003. *In vitro* growth requirements for the fish pathogen *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora, Scuticociliatida). *Vet. Parasitol.*, 111, 19-30.
- Iglesias, R., A. Paramá, M. F. Alvarez, J. Leiro, J. Fernández and M. L. Sanmartín, 2001. *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora, Scuticociliatida) as the causative agent of scuticociliatosis in farmed turbot *Scophthalmus maximus* in Galicia (NW Spain). *Dis. Aquat. Org.*, 46, 47-55.
- Jee, B. Y. and M. R. Jo, 2002. Trials for the control of scuticociliatosis in the cultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) by bath treatment. *J. Fish Pathol.*, 15, 93-97.
- Jee, B. Y., Y. C. Kim and M. S. Park, 2001. Morphology and biology of parasite responsible for scuticociliatosis of cultured olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Dis. Aquat. Org.*, 47, 49-55.
- Jin, C. N., C. H. Lee, S. P. Oh, Y. U. Jung, C. B. Song, J. Lee and M. S. Heo, 2003. Scuticociliatosis in flounder farms of Jeju island. *J. Fish Pathol.*, 16, 135-138.
- Jung, S. H. and J. W. Kim, 1998. The lethal concentration (LC₅₀) and lethal time (LT₅₀) of formalin on olive flounder fingerlings, *Paralichthys olivaceus*. *Bull. Nat. Fish. Res. Dev. Inst.* 54, 125-129.
- Jung, S. J., S. I. Kitamura, J. Y. Song, I. Y. Joung and M. J. Oh, 2005. Complete small subunit rRNA gene sequence of the scuticociliate *Miamiensis avidus* pathogenic to olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Dis. Aquat. Org.*, 64, 159-162.
- Jung, S. J., S. I. Kitamura, J. Y. Song, and M. J. Oh, 2007. *Miamiensis avidus* (Ciliophora: Scuticociliatida) causes systemic infection of olive flounder *Paralichthys olivaceus* and is a senior synonym of *Philasterides dicentrarchi*. *Dis. Aquat. Org.*, 73, 227-234.
- Kim, S. M., J. B. Cho, S. K. Kim, Y. K. Nam and K. H. Kim, 2004a. Occurrence of scuticociliatosis in olive flounder *Paralichthys olivaceus* by *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora: Scuticociliatida). *Dis. Aquat. Org.*, 62, 233-238.
- Kim, S. M., J. B. Cho, E. H. Lee, S. R. Kwon, S. K. Kim, Y. K. Nam and K. H. Kim, 2004b. *Pseudocohnilembus persalinus* (Ciliophora: Scuticociliatida) is an additional species causing scuticociliatosis in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Dis. Aquat. Org.*, 62, 239-244.
- Lee, C. H., Y. J. Kang, D. S. Ha and Y. D. Lee, 2001. Occurrence and histopathological observation of scuticociliatosis in the cultured olive flounder, *Paralichthys Olivaceus*. *Bull. Natl. Fish. Res. Dev. Inst. Korea*, 59, 68-73.
- Lee, C. H. and D. S. Ha, 1997. Culture characteristics and division

- process of scuticociliate *in vitro*. J. Fish Pathol., 10(2), 177-186.
- Munday, B. L., P. J. O'Donoghue, M. Watts, K. Rough and T. Hawkesford, 1997. Fetal encephalitis due to the scuticociliate *Uronema nigricans* in sea-cage, southern bluefin tuna *Thunnus maccoyii*. Dis. Aquat. Org., 30, 17-25.
- Novotny, M. J., R. J. Cawthorn and B. Despres, 1996. *In vitro* effects of chemotherapeutants on the lobster parasite *Anophryoides haemophila*. Dis. Aquat. Org., 24, 233-237.
- Paramá, A., R. Iglesias, F. Álvarez, J. M. Leiro, J. M. Quintela, C. Peinador, L. González, R. Riguera and M. L. Sanmartín, 2004. *In vitro* efficacy of new antiprotozoals against *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora, Scuticociliatida). Dis. Aquat. Org., 62, 97-102.
- Park, I. S., H. B. Kim, M. S. kim and C. W. Park, 1995. Acute toxicity effects of formaline to flounder, *Paralichthys olivaceus*. J. Fish Pathol., 8(1), 57-67.
- Provasoli, L., J. J. A. Mclaughlin and M. R. Droop, 1957. The development of artificial media for marine algae. Arch. Microbiol., 25, 392-428.
- Ryu, H. Y., J. D. Bang, C. Lee, J. M. Shim and B. S. Kim, 1998. Effects of acute toxicity of chemical treatments on the cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. J. Aquaculture, 11(2), 223-230.
- 吉水 守, 日向進一, 吳明株, 生駒 三奈子, 木村喬久, 森 立成, 野村哲一, 繪面 良男, 1993. ヒラメ(*Paralichthys olivaceus*)의 스쿠-ティカ感染症.-스쿠-ティカ 纖毛의培養性狀・藥劑感受性・病原性-. J. Fish Pathol., 6(2), 193-206.
- 乙竹 充, 松里 壽彦, 1986. ヒラメ*Paralichthys olivaceus*稚魚의 스쿠-ティカ纖毛(膜口類)症. Bull. Natl. Res. Aquaculture, 9, 65-68.

원고접수 : 2007년 3월 12일

수정본 수리 : 2007년 5월 1일