

양식 가숭어(*Chelon haematocheilus*)에서 최초로 분리된 갈고리벌레과 Cymothoids의 특성 연구

서한길* · 오명주** · 조미영*** · 한현자*** †

*국립수산과학원 남해수산연구소 양식산업과

**전남대학교 수산생명의학과

***국립수산과학원 병리연구과

First report and characteristics study of Cymothoids isolated from cultured flathead grey mullet (*Chelon haematocheilus*)

Han-Gill Seo*, Myung-Joo Oh**, Miyoung Cho*** and Hyun-Ja Han***

*Aquaculture Industry Division, South Sea Fisheries Research Institute,
National Institute of Fisheries Science, Yeosu, Korea

**Department of Aqualife Medicine, Chonnam National University, Yeosu, Korea

***Pathology Research Division, National Institute of Fisheries Science, Busan, Korea

Mullet is an important marine aquaculture fish species in Korea, with a total of 7,237 tons produced as of 2022, making it the 5th most produced marine aquaculture fish species. In this study, ectoparasites presumed to be isopods were discovered in the fins of farmed flathead grey mullet (average weight 550 g), and the characteristics of the parasites were confirmed. The length of the parasite was 5 to 18 mm, and 3 to 7 parasites were infected per fish. To analyze the characteristics of the parasites, molecular biological identification and phylogenetic analysis were performed using the cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, and it was confirmed to be most closely related to *Nerocila japonica* in the *Cymothoidae* family. To confirm the parasite control effect, a direct exposure drug sensitivity test was conducted on five types of aquatic drugs and fresh water, trichlorfon was confirmed to be effective.

Key words: Flathead grey mullet, Isopoda, Cymothoids, cytochrome c oxidase subunit I (COI), Trichlorfon

숭어목(Order *Mugiliformes*) 숭어과(Family *Mugilidae*)에 속하는 숭어류는 우수한 삼투조절 능력을 지니고 있으며(Odum, 1970), 생활사 중 많은 시기를 염분 변화가 심한 기수지역에서 서식하는 광염

성 어종으로서(Thomson, 1968), 우리나라 전 연안과 일본, 중국 등 전 세계 온대 및 열대지역에 넓게 분포하고 있다(NIFS, 2004). 국내 생산량은 2010년 4,657톤에서 2021년 10,352톤까지 증가하였으며, 2022년도 기준으로는 전국 해산양식어류 총 생산량 90,545톤 중 7,237톤(8%)이 생산되어 다섯 번째로 많이 양식되고 있다(KOSIS, 2022). 국내 주요

†Corresponding author: Hyun-Ja Han
Tel: +82-51-720-2480, Fax: +82-51-720-2498
E-mail: hjhan77@korea.kr

송어류 어종으로는 참송어(*Mugil cephalus*), 가송어(*Chelon haematocheilus*) 및 등줄송어(*Chelon affinis*) 등이 있는데, 그중에서도 가송어는 뒷지느러미의 연줄 수와 두부 골조 등의 특징으로 속간 분류가 가능하다(Lee et al., 1994).

안정적인 해산어류의 양식을 위해서는 종묘생산 기술과 양성기술이 수반되어야 하며, 양식생물의 꾸준한 건강 및 질병 관리가 필요하다. 하지만 신종 질병의 발생과 사육환경의 급변 등으로 인해 양식 경제성이 지속적으로 악화되고 있는 실정이다. 송어류에 감염이 보고된 병원체는 *Lactococcus garvieae* (Han et al., 2015), *Amyloodinium* sp. (Park et al., 2006), *Myxobolus episquamalis* (Kim et al., 2013), Viral hemorrhagic septicemia virus (Kim et al., 2004) 및 Nervous necrosis virus (Cha et al., 2005)가 있다. 이 중에서도 특히 기생충의 감염은 체표 또는 아가미 등에 부착하여 건강도 악화 또는 이상유영을 일으키며, 궤양 등 상처를 통한 세균의 2차 감염으로 직·간접적 폐사를 유발하기도 한다.

기생충 중에서도 등각류는 담수, 기수 및 해수 등 다양한 서식지에서 발견되며 전 세계적으로 약 10,000종 이상이 보고되어 있다. 그 중에서 갈고리벌레과(*Cymothoidae* family)에 속하는 *Cymothoids*는 40속, 380여종에 이르는데 10 mm 이하의 크기부터 50 mm 이상의 크기까지 다양하다. *Cymothoids*는 최초 아시아와 아프리카의 담수 환경에서 발견되었으나, 현재는 극지를 제외한 전 해양에서 발견되어 전 세계적으로 가장 많이 알려진 등각류이다(Smit et al., 2014). 대부분 수심 200 m 이내

서 서식하는 숙주에 감염되지만, 수심 500 m 아래에서 서식하는 숙주에 감염되는 종도 10여종에 이른다(Ahyong et al., 2011). 국내에서는 약 120여종의 등각류가 다양한 환경에서 보고되었으며, 그 중 약 80여종이 해양성으로 알려져 있다(Kim, 2020).

본 연구에서는 남해안에서 양식중인 가송어의 지느러미에 등각류로 추정되는 외부 기생충이 확인되어 중합효소연쇄반응(PCR) 분석을 통해 분자생물 동정과 계통수 분석을 수행하였으며, 약물의 구충 효과를 확인하는 등 병원체의 특성에 대해 연구하였다.

2022년 2월, 남해안의 해상가두리 양식장에서 사육중인 가송어의 지느러미에 외부 기생충이 확인되었다(Fig. 1). 당시 현장 수온은 12°C 였으며, 가송어의 기생충 감염율은 약 10% 가량으로 확인되었다. 기생충의 감염이 육안으로 확인된 실험어 10마리를 채집 후 냉장상태로 실험실로 운반하였다. 실험어의 계측 결과 평균 37.6±1.0 cm, 564±49.6 g 이었으며, 임상검사 결과 1마리에서 경증의 두부 궤양이 확인되었으나 내부 증상은 확인되지 않았으며, 신장과 비장 조직을 대상으로 Brain Heart Infusion Agar (BHIA) 및 Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose Agar (TCBS)배지에 세균 배양을 수행하였으나(25°C 항온배양) colony는 확인되지 않았다. 또한 바이러스(Viral hemorrhagic septicemia virus, HIRAME rhabdovirus, Marine Birnavirus, Nervous necrosis virus, Red seabream Iridovirus) 검출을 위한 PCR 결과 음성으로 확인되었다(data not shown).

가송어의 체표에 부착되어 있는 기생충의 감염

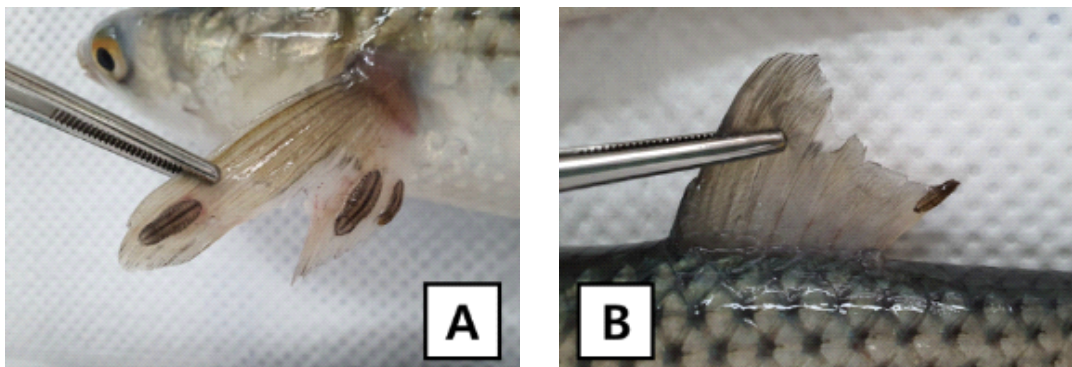


Fig. 1. Flathead grey mullet (*Chelon haematocheilus*) infected with Isopods (A) (B).

Table 1. Primer set used in this study for PCR amplification

Gene	Primer	Nucleotide sequence	PCR product size(bp)
mitochondrion	NMmt-F	5'-AAATGGAAGGTTCGGATGAAA-3'	301
	NMmt-R	5'-CATCGAGGTCGCAAACACTACTC-3'	
cytochrome c oxidase subunit I (COI)	NJC-F	5'-TTGGGCAGGTATCGTAGGAG-3'	305
	NJC-R	5'-ATCCTGTTCTCCTGCTCCCTCT-3'	

개체 수를 확인한 결과 3~7개체로 어류 1마리당 평균 4.4개체로 확인되었으며, 분리된 기생충의 길이는 5~18 mm로 확인되었다. 해당 기생충의 종 동정을 위하여 DNA를 추출하였고, cytochrome c oxidase subunit I (COI) 유전자를 증폭시킬 수 있는 primer set를 제작하였으며(Table 1), 95°C(30초), 58°C(30초), 72°C(30초)를 30회 반복하는 조건으로 PCR 증폭을 실시하였다. PCR product를 1.5% agarose gel 상에서 전기영동한 결과 COI 유전자의 증폭이 확인되었으며, 염기서열 분석을 통해 종 동정을 실시하였다. 염기서열의 분석을 위해 BioEdit 및 MEGA 11 program을 사용하였으며, National Center for Biotechnology Information (NCBI)에서 제공하는 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)을 이용하여 기존에 보고된 기생충 유전자와의 상동성 분석을 실시한 결과, 해당 기생충은 *Isopoda* 목(Order) *Cymothoidae* 과(Family) *Nerocila* 속(Genus) *Japonica* 종(Species)과 가장 상동성이 높은 것으로 확인되었다(Accession No. LC160329, 99.66% 일치). 본 연구에서 분리한 가숭어 유래 Cymothoids sp. COI nucleotide sequence (292 bp)는 NCBI GenBank에 등재하였다(Accession No. OR633209). 분석이 완료된 염기서열은 GenBank에 등재된 *Cymothoidae* 과(Family) 유전자 19종들과의 계통수 분석을 통해 유전적 유연관계를 확인하였다. MEGA 11 program의 근린결합분석(neighbor-joining analysis, 1,000 rounds of bootstrap)을 통하여 계통수 분석을 실시한 결과, *Nerocila japonica*와 동일한 그룹에 속하는 것을 확인하였다(Fig. 2).

분자 생물 중 분류 및 동정을 위한 유전자 마커로는 ribosomal RNA (rRNA), mitochondrial DNA (mt DNA) 및 microsatellite DNA 등이 있는데(Seo et al., 2015), mtDNA는 고변이성 유전자로서 종의 진화적 유연관계를 분석하는데 용이하다. 그 중에

서도 COI 유전자는 다양한 해양 무척추동물들의 유전자 연구에 사용되는 등 마커로 활용되고 있다(Edmands et al., 1996). 본 연구에서도 COI 유전자를 사용하여 염기서열을 분석한 결과 *Nerocila japonica*와 가장 상동성이 높은 것으로 확인되었으나, 보다 정확한 종의 동정을 위해서는 향후 다른 유전자를 활용한 분자생물학적 동정과 함께 형태학적 동정이 필요할 것으로 생각된다.

기생충에 대한 약물의 구충효과를 확인하기 위하여 기생충을 안전하게 숙주로부터 분리하였고, 현재 국내에서 수산용 구충제 및 소독제로 허가되어 있는 다섯 종류의 약물과 담수에 대한 감수성 실험을 실시하였다. 실험에 사용한 약물은 povidon iodine, trichlorfon, praziquantel, formalin 및 hydrogen peroxide 이었으며, 3% 로 염분 농도를 조절한 phosphate buffered saline (PBS)를 사용하여 각 약물의 권장사용 농도(저농도)와 5배 높은 농도(고농도)로 구분하여 약물 직접 노출 실험을 실시하였다(Table 2). 기생충은 각 그룹당 3마리씩 사용하였으며, 약물 및 담수에 대한 기생충의 활동 변화 및 폐사 여부를 시간 경과에 따라 비교분석 하였다. 최종 결과 판정은 활동을 완전히 멈춘 폐사 여부로 판단하였으며, 노출 후 60분 이내에 전체 폐사를 나타낸 경우 높은 효과(high effect)로, 130분 이내에 전체 폐사를 나타낸 경우 일반 효과(normal effect)로, 130분 이후에도 일부가 생존한 경우 낮은 효과(low effect)로, 130분 이후에도 전체가 생존한 경우 효과 없음(no effect)으로 판정하였다. 실험 결과 trichlorfon 그룹에서는 저농도와 고농도 모두 빠른 사멸 효과가 확인되었으며, povidon iodine과 formalin 고농도 그룹에서도 사멸효과가 각각 확인된 반면, hydrogen peroxide 그룹에서는 전혀 효과가 확인되지 않았다(Table 3).

Trichlorfon은 수산생물의 외부 및 내부 기생충



Fig. 2. Neighbor-joining analysis of Isopoda cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene sequence from flathead grey mullet (*Chelon haematocheilus*).

Table 2. Selection of drug concentration to confirm anthelmintic effect

Concentration \ Drug	Povidon Iodine	Trichlorfon	Praziquantel	Formalin	Hydrogen peroxide	Freshwater
Recommended concentration (ppm)	1,000	0.5-1	500-800	100-200	100-200	-
Low concentration (ppm)	1,000	0.5	500	100	100	0 psu
High concentration (ppm)	5,000	2.5	2,500	500	500	-

구제를 위해 사용되고 있는 유기인산염 살충제이며, 골격근의 시냅스 및 신경근 접합부에서 acetylcholine-esterase (AChE) 활성을 억제하여 유기체의 항산화 방어 시스템을 변경시킨다(Jo, 2021). 하지만 trichlorfon을 과도하게 사용하게 되면 생물의 영양능력 장애, 산화적 스트레스 유발, 면역 기능의 저하 등 생리적 부작용을 유발하여 질병에 쉽게 감염되기도 한다. Trichlorfon은 고수온, pH 5.5 이하, 햇빛 또는 폭기된 물 등으로 인해 급속하게 분해되어 dichlorvos라는 독성 물질을 발생시키는데, trichlorfon과 dichlorvos가 고농도로 농축되면, 중독

을 일으키고 인간 적혈구에 손상을 줄 수 있다. 위와 같은 위험성 때문에 식품농업기구(FAO)와 세계보건기구(WHO)에서는 규제 기준을 확립하고 있다(Woo, 2016).

기존에 보고된 승어류에 대한 Cymothoids 감염 사례로는 조지아(Georgia)의 승어류에서 *Nerocila lanceolata*, 텍사스(Texas)의 *Mugil cephalus*에서 *N. acuminata*, 파나마(Panama) 서부 해안의 *M. hospes*에서 *Indusa carinata*, 인도(India)의 *M. ophueseni*에서 *I. malayi*와 *I. ophueseni*, 멕시코(Mexico)의 *M. hospes*에서 *Meinertia gilberti* (Paperna et al., 1981),

Table 3. Result of drug sensitivity of the parasite with freshwater

Drug Concentration	Povidon Iodine	Trichlorfon	Praziquantel	Formalin	Hydrogen peroxide	Freshwater
Low concentration	X ¹⁾	⊙	X	△	X	△
	(3 / 3) ²⁾ '130 ³⁾	(0 / 3) '45	(3 / 3) '130↑	(1 / 3) '130↑	(3 / 3) '130↑	(1 / 3) '130↑
High concentration	○	⊙	△	○	X	-
	(0 / 3) '125	(0 / 3) '44	(2 / 3) '130↑	(0 / 3) '63	(3 / 3) '130↑	-

- 1) Drug sensitivity effect(⊙: high effect, ○: normal effect, △: low effect, X: no effect)
- 2) Drug sensitivity for terminate parasites(survival isopods number/3)
- 3) Drug sensitivity during time('minutes)

서부 지중해(프랑스, 이탈리아, 튀니스)의 *M. cephalus*, *M. auratus*, *M. capito* 및 *M. chelo*에서 *N. orbigny* (Trilles, 1965)가 있다. Cymothoids는 암컷의 복부에 위치한 육아낭(marsupium)으로 자신의 유생을 기르는 낭하상목(*Peracarida*)에 속한다. 수컷으로 탈피한 자충은 이후 암컷으로 성전환을 하며, 성별에 따른 충의 크기는 암컷이 수컷보다 더 크고, 암컷의 특징으로는 부착기가 강해 숙주에 잘 부착한다(Paperna et al., 1981; Smit et al., 2014; Kim, 2020). 본 연구에서 분리된 등각류의 길이는 5~18 mm로 확인되었는데, 암수의 구분을 별도로 수행하지는 않았다. 본 연구에서 채집한 가숭어는 해상가두리 양식장에서 돌돔과 혼합양식 중이었으나, 오직 가숭어에서만 Cymothoids의 감염이 확인되었으므로, 돌돔에 비해 가숭어에 대한 숙주 특이성이 높은 것으로 추정된다.

등각류의 최근 감염 보고에 의하면 인도(India)의 청어(Whitefin wolf-herring, *Chirocentrus nudus*) 체표에서 *N. phaiopleura*의 감염이 확인되었으며(감염률 3.2%), 체표의 상처에서 세균(*Streptococcus aureus* 및 *Escherichia coli*)이 검출되었다(Raja et al., 2014). 또한 이집트(Egypt)에서는 틸라피아(*Tilapia*, *Tilapia zilli*)의 아가미에 *N. orbigny*의 감염이 확인되었으며(감염률 25%) 아가미 출혈, 이상유영 및 여嵬과 함께 폐사까지 확인되었다(Abdel-Latif, 2016). 본 연구에서 기생충을 확인했을 당시에는 수온이 낮아 등각류의 감염으로 인한 다른 질병의 2차 감염 또는 폐사가 발생하지는 않았으나, 향후 기생충의 구제 없이 수온 상승기 또

는 고수온기를 맞게 된다면 숭어의 건강을 지속적으로 악화시켜 피해가 발생할 수 있을 것이라 판단된다. 수산용으로 국내 승인되어 시판 중인 trichlorfon제제의 용법과 용량은 잉어와 뱀장어만으로 국한되어 있으며, 실제 해상어류 양식현장에서 사용하기에는 용법과 용량이 설정되어 있지 않은 실정이다. 따라서 향후 숭어 등 해상가두리 어류에 적용이 가능하도록 잔류허용기준에 대한 추가 연구를 통해 약물 안전성과 식품으로서의 안정성을 보장해야 할 것으로 보인다.

요 약

본 연구를 통해 한국의 양식 가숭어에서 최초로 분리된 등각류는 *Nerocila japonica*와 가장 근연한 종으로 확인되었으나, 향후 형태학적 분류 등 명확한 종 동정이 추가로 필요할 것으로 판단되며, 약물의 직접 노출에 의한 구충 효과를 확인한 결과 trichlorfon이 가장 효과가 있는 것으로 확인되었다.

사 사

본 연구는 국립수산과학원(수산생물 질병 특성 연구, R2023051)의 지원에 의해 수행되었습니다.

References

Abdel-Latif, H.M.R. Cymothoid parasite, *Nerocila orbigny* inflicts great losses on *Tilapia zilli* in lake qarun at El-fayoum province. Intern. J. Innov. Stud.

- Aquat. Biol. Fisher., 2(3), 1-9, 2016. <http://dx.doi.org/10.20431/2454-7670.0203001>
- Ahyong S.T., Lowry J.K., Alonso M., Bamber R.N., Boxshall G.A., Castro P., Gerken S., Karaman G.S., Goy J.W., Jones D.S., Meland K., Rogers D.C. and Svavarsson J. Animal Biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness. *Zootaxa.*, 3148, 165-191, 2011. <http://dx.doi.org/10.20431/2454-7670.0203001>
- Cha S.J. Genetic characteristics of nodaviruses isolated from cultured fishes in Korea. Ph.D. dissertation, Ulsan University, 2005.
- Edmands S., Moberg P.E. and Burton R.S. Allozyme and mitochondrial DNA evidence of population subdivision in the purple sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Mar Biol.*, 126, 443-450, 1996. <https://doi.org/10.1007/BF00354626>
- Han H.J., Lee N.S., Kim M.S. and Jung S.H. An outbreak of *Lactococcus garvieae* infection in cage-cultured Red lip Mullet *Chelon haematocheilus* with green liver syndrome. *Fish Aquat Sci.*, 18(3), 333-339, 2015. <http://dx.doi.org/10.5657/FAS.2015.0333>
- Jo H.H. Studies on residual amounts and toxicity in the eel(*Anguilla japonica*) following exposure to trichlorfon. Master dissertation, Pukyong National University, 2021.
- Kim S.H. A systematic study of the Isopods (Crustacea, Peracarida) from Korea. Ph.D. dissertation, Chosun University, 2020.
- Kim S.M. and Park S.I. Detection of viral hemorrhagic septicemia virus(VHSV) in wild marine fishes in the coastal region of Korea. *J. Fish Pathol.*, 1(1), 1-10, 2004.
- Kim W.S., Kim J.H., Jang M.S., Jung S.J. and Oh M.J. Infection of wild mullet (*Mugil cephalus*) with *Myxobolus episquamalis* in Korea. *Parasitol Res.*, 112, 447-451, 2013. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-012-3075-7>
- KOSIS (Korean Statistical Information Service). Statistic database for fisheries production and aquaculture production. Retrieved from <https://kosis.kr/index/index.do> on 2022.
- NIFS. Commercial fishes of the coastal & offshore waters in Korea. 77-78, 2004.
- Lee C.L. and Joo D.S. Synopsis of family Mugilidae (Perciformes) from Korea. *Bull. Korean Fish. Soc.*, 27(6), 814-824, 1994.
- Odum W.E. Utilization of the direct grazing and plant detritus food chains by the striped mullet, *Mugil cephalus*. 222-240, 1970.
- Paperna I. and Robin M., Parasites and diseases of mullets (Mugilidae). Faculty publications from the Harold W. Manter Laboratory of Parasitology, 579, 1981. https://digitalcommons.unl.edu/parasitologyfa_cpubs/579
- Park S.W., Yu J.H. and Lee C.H. *Amyloodinium* sp. infestation in Mullet (*Mugil cephalus*) cultured in a pond on land. *J. Fish Pathol.*, 19(1), 7-15, 2006.
- Raja K., Vijayakumar R., Karthikeyan V., Saravanakumar A., Sindhuja K. and Gopalakrishnan A. Occurrence of isopod *Nerocila phaiopleura* infestation on Whitefin wolf-herring (*Chirocentrus nudus*) from southeast coast of India. *J. Parasit. Dis.*, 38(2), 205-207, 2014. <http://dx.doi.org/10.1007/s12639-012-0224-y>
- Seo H.G., Seo J.S., Ryu M.K., Lee E.H., Jung S.H. and Han H.J. Molecular identification and development of a PCR assay for the detection of a philometrid nematode in Rockfish *Sebastes schlegeli*. *Korean J Fish Aquat Sci.*, 48(5), 731-738, 2015. <http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2015.0731>
- Smit N.J., Bruce N.L. and Hadfield K.A. Global diversity of fish parasitic isopod crustaceans of the family Cymothoidae. *Int. J. Parasitol.*, 188-197, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijppaw.2014.03.004>
- Thomson J.M. The grey mullets. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, 4, 301-305, 1968.
- Trilles J.P. Specificite parasitaire chez les isopodes *Cymothoidae* mediterraneens. *Vie Milieu.*, 15(1), 105-16, 1965. <https://hal.sorbonne-universite.fr/hal-02938597>
- Woo S.J. Simultaneous determination of trichlorfon and dichlorvos residues in Olive Founder (*Paralichthys olivaceus*) by LC-MS/MS : Validation and application to pharmacokinetic study. Master dissertation, Pukyong National University, 2016.

Manuscript Received : Oct 12 2023

Revised : Oct 26 2023

Accepted : Oct 31 2023