



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

박사학위논문

양식 넙치에 감염되는 스쿠티카섬모충
*Philasterides dicentrarchi*에 관한 연구



제주대학교 대학원

해양생물공학과

진 창 남

2006년 12월

양식 넙치에 감염되는 스쿠티카섬모충
*Philasterides dicentrarchi*에 관한 연구

지도교수 허 문 수

진 창 남

이 논문을 이학 박사학위 논문으로 제출함

2006 년 12 월

진창남의 이학박사 학위논문을 인준함

심사위원장 송 춘 복 (인)

위 원 이 창 훈 (인)

위 원 이 영 돈 (인)

위 원 이 제 희 (인)

위 원 허 문 수 (인)

제주대학교 대학원

2006 년 12 월

Studies on Scuticociliate, *Philasterides dicentrarchi*
Infected in Cultured Flounder, *Paralichthys olivaceus*

Chang-Nam Jin
(Supervised by professor Moon-Soo Heo)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement
for the degree of Doctor of Science

Department of Marine Biotechnology

GRADUATE SCHOOL

CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

Dec. 2006

목 차

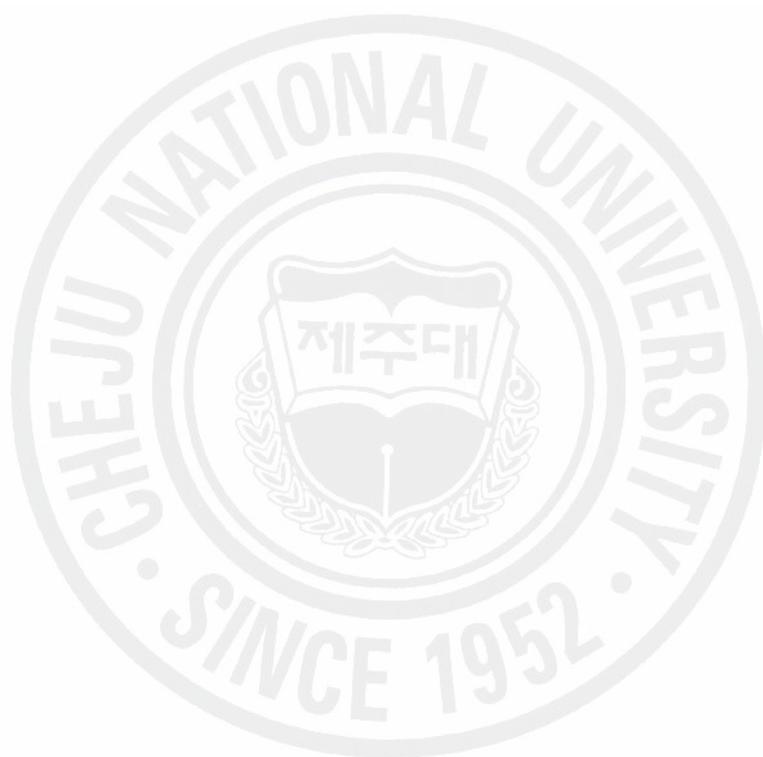
목 차	i
Summary	vi
I. 서 론	1
II. 넙치 양식장의 스키테카증 발병동향	5
1. 재료 및 방법	5
1) 연도별 발병동향	5
2) 월별 발병동향	5
3) 주요 세균성 질병의 혼합감염	5
4) 스키테카증 진단	5
5) 기타질병 진단	6
2. 결 과	6
1) 연도별 발병동향	6
2) 월별 발병동향	9
3) 주요 세균성 질병의 혼합감염	10
3. 고 찰	12
III. <i>Philasterides dicentrarchi</i> 의 생물학적 특성	14
1. 재료 및 방법	14
1) 스키테카충 분리	14
2) 동 정	14
(1) 형태적 분석	14
(2) 유전적 분석	14
3) 배 양	15
(1) 세포주를 이용한 배양	15

(2) 세균을 이용한 배양	16
(3) 넙치 뇌 조직을 이용한 배양	16
(4) 로티퍼 조직을 이용한 배양	16
(5) 배합사료를 이용한 배양	17
(6) 스쿠티카충 계수	18
4) 생육 환경	18
(1) 온도	18
(2) pH	18
(3) NaCl	19
2. 결 과	19
1) 동 정	19
(1) 형태적 분석	19
(2) 유전적 분석	24
2) 생육 특성	28
(1) 세포주를 이용한 배양	28
(2) 세균을 이용한 배양	28
(3) 넙치 뇌 조직을 이용한 배양	28
(4) 로티퍼 조직을 이용한 배양	28
(5) 배합사료를 이용한 배양	28
4) 생육 환경	30
(1) 온도	30
(2) pH	30
(3) NaCl	30
3. 고 찰	34
IV. 병원성	37
1. 재료 및 방법	37
1) 실험 방법	37

2) 스킨카충	37
3) 실험어	37
4) 실험 수조	38
5) 스킨카충 배양 및 접종	39
6) 스킨카충 계수	39
7) 감염률 조사	39
8) 폐사율 조사	40
9) 감염 스킨카충 재분리 및 유전적 검토	40
10) 2차 감염 세균성 질병	41
2. 결 과	41
1) 감염률	41
(1) 수조내 <i>P. dicentrarchi</i> 증식	41
(2) 3 cm 그룹	42
(3) 5 cm 그룹	42
(4) 감염 상태	46
2) 폐사율	50
(1) 수조내 <i>P. dicentrarchi</i> 증식	50
(2) 3 cm 그룹	50
(3) 5 cm 그룹	50
3) 감염 스킨카충 재분리 및 유전적 검토	54
4) 2차 감염 세균성 질병	57
3. 고 찰	59
V. 어체내 침투경로	62
1. 재료 및 방법	62
1) 조사 방법	62

2) 외부감염 관찰	62
3) 내부감염 관찰	62
4) 어체내 침투경로 확인	63
2. 결 과	63
1) 꼬리지느러미를 통한 침투	63
2) 등지느러미와 뒷지느러미를 통한 침투	67
(1) 지느러미 기부근육 침투	67
(2) 등지느러미를 통한 척추부위 침투	70
(3) 뒷지느러미를 통한 척추부위 침투	70
(4) 지느러미를 통한 등 부위 근육 침투	70
3) 두부 침투	75
4) 아가미 및 혈관 침투	80
(1) 주둥이를 통한 아가미 침투	80
(2) 아가미 뚜껑을 통한 침투	80
(3) 아가미 혈관 및 심장 침투	80
5) 복강 침투	84
3. 고 찰	87
V. 화합물의 구제효과	92
1. 재료 및 방법	92
1) 스쿠티카충	92
2) 화합물 및 실험방법	92
3) 구제효과 판정	93
2. 결 과	94
1) 포르말린	94
2) 과산화수소	94

3) Jenoclean	95
3. 고찰	100
VII. 종합 고찰	102
요약	106
참고 문헌	109



Summary

Scuticociliatosis has been infamous for one of the most damaging diseases in flounder farms, showing more than 40% infection rates including mixed infection with viral and bacterial diseases. The present study has aimed to find suitable ways of minimizing the damages against the ciliates by investigating the infection routes and treatment methods. The ciliate isolated from the brain of juvenile flounder was identified as *Philasteridies discentrachi* by the morphological and genetic examinations, and investigated biological characters also. Since the ciliate showed distinctive pathogenic symptoms in juvenile flounder injected artificially with the pathogen, infection routes and treatment trials were also examined *in vitro*.

The prevalence of the Scuticociliatosis in inland flounder farms in Jeju island was surveyed for ten years from 1995 to 2004. The occurrence ratio had maintained as less than 10% until mid 1990s, and shown increasing trends from year 1998. The ratio was equivalent to over 40% of overall disease occurrences in flounder farms since year 2000. The monthly infection rates by the ciliate indicated relatively higher levels from May to September, and mixed infection phenomena with bacterial disease of *Vibriosis* were common.

The Scuticociliates has active propagation ability by utilizing organic matters obtained from cell strain, bacteria, assorted feed, brain tissue and rotifer tissue. The ciliate expressed 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 ranges from 10~30°C showing

active growth capability of 10~25°C temperature range.

To investigate its pathogenicity, the parasite was injected into two groups of flounder juveniles (3 and 5 cm in total length) and observed infection rate, time to brain invasion, and mortality of specimen. Smaller experimental group of 3 cm in total length had shown 40.0 and 90.1% infection rates 4 days and 24 days later, respectively. Larger group of 5 cm in total length had proved relatively late infection rates than in smaller group, showing only 20% infection rate at 8 days after inoculation, and 42% at 16 days. However the rate increased markedly as 81% at 24 days. But no infection observed at control group while test period. The days until invading to brain were 14 days and 20 days in both groups showing faster penetration in smaller fish.

The ciliate had resulted in fatal casualties especially in smaller fish. The 3 cm fish group infected with ciliates was shown first mortality at 5 days after inoculation and fatal mortality of 95.6% 28 days later. The 5 cm group fish was observed first mortality on 18 days after inoculation and 71% mortality 28 days later. But ciliate infection and mortality of specimen were not shown in control groups in both size experimental groups.

When the infection route traced by histopathological examination on artificially inoculated flounder, the ciliate had mainly gone through soft subcutaneous tissue such as caudal fin, mouth, and skin.

The infection into caudal fin was initiated from the capillary vessel which distributed along the caudal fin membrane and soft ray and flowed into caudal peduncle. And the ciliate finally reached into brain through vertebra and spinal cord, and propagated rapidly. Infiltration from the dorsal and anal fins was started from the capillary vessel of fin rays, same as in the infection route from the caudal fin, destroyed fin membrane, and infiltrated into base muscle of the fin rays. The ciliate who

penetrated into muscle had propagated by various methods such as necrotic symptoms of muscle from fins, propagation along the vertebra by infiltration into spinal column vertebra from muscle attached with neural spine and hemal arch, and infiltration into muscle from subcutaneous tissue of fins.

The infection route through the head part was mainly initiated in oral part. The parasite had infiltrated into soft tissue of jaw as well as mouth, and spreaded into whole head tissue including eyes. Once the ciliate penetrated into eyes, it reached up to brain through optic nerve system. Some ciliate that did not succeed in passing into eyes could reach on brain from cranium through neural arch. After infiltrating into brain of the specimen, the ciliate had spreaded over the whole brain and proliferated up to tail part through spinal cord along the subcutaneous tissue of meninges.

The infection route through the gill was observed on mouth at first stages. The ciliate moved to oral cavity after infiltration into mouth, then propagated in large quantities at soft oral cavity wall. Finally the ciliate reached into gill arch and filament. Some ciliate passed through the soft part of the operculum and reached to the gill.

Other infiltration route was observed in anal or ventral fin, and moved to body surface and propagated to anus in large quantities. Also ciliates are infiltrated into abdominal cavity through anus. Some ciliates pass through into both intestine wall and pancreas tissue.

Therapeutic experiments were tried with three kinds of chemical compounds of formalin, hydrogen peroxide, and Jenoclean (Bio-Resource, Korea). The extermination time of the parasites with formalin was at 30 minutes both in 300 ppm and 400 ppm, 60 minutes in 200 ppm, 90 minutes in 100 ppm, and 120 minutes in 50 ppm concentrations. In hydrogen peroxide treatments the time showed at 60 minutes in 300 ppm, 90 minutes

in 200 ppm, and 150 minutes at 150 ppm and 100 ppm concentrations. And the ciliate was terminated after 90 minutes in 500 ppm, 120 minutes in 400 ppm, 150 minutes in 300 ppm of Jenoclean.



I. 서 론

섬모충의 일종인 스키테카충은 Thompson and Moewus (1964)에 의해 해산 어류인 해마에 기생하는 것이 처음 보고 된 이후 많은 해산동물에 기생하고 있는 것이 밝혀지고 있다. 해산 스키테카충의 분류학적 위치는 원생동물계 (Protista), 섬모충문(Ciliophora), 소막충강(Oligohymenophorea), 막구충아강 (Hamenostomatia), 채찍섬모충목(Scuticociliatida)으로 분류되며 현재까지 수십 여종이 알려져 있다(Evans and Corliss, 1964; Small, 1967; Corliss, 1968). 스키테카충의 계통발생학적 분류는 Evans and Corliss(1964)가 시작한 이후 Small (1967), Corliss (1968) 등에 의해 분류체계가 확립되었으나 형태적인 변이가 많아 분류에 어려움이 많다(Song, 1991). 그러나 최근에는 분자생물학의 발달에 따라 유전적 분류가 활발히 이루어지고 있다.

통상 채찍섬모충목에 속하는 스키테카충은 최근 양식산업이 발달하면서 해산 양식생물에 감염되어 피해를 입히는 기생충으로 널리 알려져 있다. *Ichthyophthirius multifiliis*, *Cryptocarion irritans*와 같은 절대성 기생충으로 알려진 섬모충과는 달리 해양계에서 세균이나 유기물을 섭이하며 독자적으로 잘 적응하는 포식자로서 환경조건에 따라 해산동물에 기생하는 조건성 기생충이다(Ototake and Matsusato, 1986; Iglesias et al., 2001; Perez-Uz and Guinea, 2001).

스쿠테카충은 수족관에서 사육되는 놀래기 등에 감염되는 *Uronema marinum* (Cheung et al., 1980), 지중해 연안의 양식 농어와 스페인 북부 연안에서 양식하는 터봇에 기생하는 *Philasterides dicentrarchi* (Dragesco et al., 1995; Iglesias et al., 2001), 호주에서 양식하는 Southern bluefin tuna에 기생하는 *Uronema nigricans* (Munday et al., 1997), 해마에 기생하는 *Miamiensis avidus* (Thompson and Moewus, 1964), 대서양 연어에 기생하는 *Tetrahymena* sp. (Ferugson et al., 1987), Sand whiting 에 감염되는

Uronema sp. (Gill and Callinan, 1997) 등 다양한 어종에 많은 종류의 감염사례가 보고되고 있다. 어류뿐만 아니라 American lobster에 감염되어 범퍼카 질병을 일으키는 *Anophryoides haemophila* (Cawthorn et al., 1996; Novotny et al., 1996), 불가사리에 감염되는 *Orchitophyra stellarum* (Byrne et al., 1997), 또 이와 유사한 유전적 특징을 보이는 Norway lobster에 감염 스쿠티카충(Small et al., 2005), 파래 조각에서 분리된 cyst와 ciliate의 다중생활사를 갖는 *Urocryptum tortum* (Perez-Uz and Guinea, 2001) 등 다양한 해양생물에서 분리되고 있어, 해양동물에 기생하거나 독자적으로 해양 유기물을 이용하여 생육하면서 폭 넓게 분포하고 있는 것으로 보인다.

국외에서는 이와 같이 해양동물에 기생하는 병원체로서 많이 보고되어 왔으나 국내에서는 1980년대 이전에 해상 가두리에서만 양식이 이루어질 때는 감염사례가 보고된바 없다. 그러나 1980년대 말에 육상수조를 이용한 넙치양식이 시작되면서 양식넙치에 스쿠티카충이 감염되기 시작하였다(Lee et al., 1994; Lee et al., 2001; Jin et al., 2003a).

넙치 양식은 일본에서는 1977년부터 시작되어 1980년대에 들어서 본격적으로 확대되었으며(日本水産學會, 2003), 우리나라에서는 1986년 제주도에서 넙치양식이 시작된 후 1990년대 들어 전국적으로 양식시설이 꾸준히 증가하였다(해양수산부, 2002, 2006). 특히 제주도는 넙치양식에 최적의 조건을 갖추고 있는데 2005년도인 경우 전국 양식넙치 생산량의 50%를 상회하는 20,370 톤을 생산하였으며, 5,300톤의 활 넙치가 일본으로 수출되어 외국 시장에서도 품질을 인정받고 있다(해양수산부, 2006; 제주특별자치도, 2006). 그렇지만 넙치양식장이 증가하고 장기간 양식이 이루어지면서 질병 또한 증가하고 있는데, 주로 세균성 질병과 기생충성 질병이 많이 발병되고 있다(진, 2002). 양식넙치에 감염되는 세균성 질병으로는 비브리오팀, 연쇄구균증, 활주세균증, 에드워드병 등이 주로 발병되고 있으며(Lee and Ha, 1991; 李와 河, 1995; Oh et al., 1998; Kim et al., 2001; Heo et al., 2001; Kim and Kim, 2003; Baeck et al., 2006), 기생충성 질병으로는 백점병, 익티오보도증, 트리코디나증, 스쿠티카충, 아메바증 등이 주로 발병되고 육상수조의 특성상 넙치에는 백점병과 스쿠티카

증에 의한 피해가 크다(Jee et al., 1997; 田, 2005). 특히 최근 들어서는 스쿠티카충 감염에 의한 피해가 증가하고 있으며 육상 넙치양식장에서 가장 문제가 되는 질병중의 하나이다(Jin et al., 2003a).

양식넙치에 감염되는 스쿠티카충은 1986년 일본의 乙竹와 松里에 의해 감염사례가 보고된 후 Yoshinaga and Nakazoe (1993)에 의해 배양 및 증식온도, 吉水 등(1993)에 의해 발병동향과 배양·약제 감수성·병원성, Lee 등(1994)과 Lee 등(2001)에 의해 병리조직학적 관찰 등이 보고되었다. 이외에도 발병동향(Lee et al., 2001; Jin et al., 2003a), 감염경로(Jin et al., 2003b), 화합물 등에 의한 구제(Choi et al., 1997; Jee et al., 2002; Jee and Jo, 2002) 등 다양한 연구가 있었다. 또한 제주도 지역의 양식 넙치에서 지금까지 보고된 스쿠티카충과는 다르게 ciliate 와 cyst의 다중생활사를 갖고 있는 스쿠티카충의 감염사례도 있으며(Jin et al., 2005), 남제주 지역의 육상 양식장에서 양식되는 자주복에도 감염이 되고 있다(Kang et al., 2005a; Kang et al., 2005b). 최근 들어서는 양식넙치에 감염되는 스쿠티카충에 대한 형태학적, 유전학적 동정이 활발히 이루어지고 있는데 *U. marinum*, *P. dicentrarchi*, *Pseudocohnilembus persalinus*, *M. avidus* 등이 보고된바 있다(Jee et al., 2001; Kim et al., 2004; Kim et al., 2004a; Kim et al., 2004b; Jung et al., 2005). 유럽에서 넙치와 비슷한 방법으로 육상에서 양식되는 터בות에 감염되는 스쿠티카충은 막구충, Hymenostomata (Dykova and Figueras, 1994)와 *P. dicentrarchi* (Iglesias et al., 2001) 등이 보고된바 있다. 특히 *P. dicentrarchi* 가 감염될 경우 터בות의 뇌와 내부 장기에 침투하므로 치료가 어려우며 일부 수조에서는 양식중인 터בות을 전량 폐사시킨 사례도 있다(Iglesias et al., 2001). 육상양식장은 스쿠티카충과 같은 미생물이 쉽게 유입되고 수조저면의 유기물을 이용하여 활발한 생육이 가능하므로(吉水 등, 1993; Choi et al., 1997; Jin et al., 2003b) 수조에서 양식하는 넙치, 터בות, 복어, 기타 관상어류 등에 감염이 잘 되며 많은 피해를 입히고 있다. 특히 넙치와 터בות은 육상수조의 저면에 착저하여 서식하므로 저면에서 주로 생육하는 스쿠티카충과 직접 접촉이 되므로 쉽게 감염이 되는 것으로 보인다.

스쿠티카충은 외부에도 기생하지만 양식어류의 안구, 뇌, 아가미 조직, 내부 장기 등에도 침투하여 피해를 입히므로 내부기생충이라 할 수 있으며(Iglesias et al., 2002), 양식넙치인 경우 치어기에 많이 감염되므로 스쿠티카충에 의해 손상된 조직을 통해서 비브리오균이 혼합 감염되어 피해를 증가시킨다(Lee et al., 2001; 진, 2002). 이런 이유로 스쿠티카충이 일단 발병되면 치료를 하더라도 완치가 어려우며 지속적으로 재발하게 된다(Jin et al., 2003a).

치어기에 감염될 경우 양식현장에서는 화합물 약육에 의존하고 있으나 체내에 침투할 경우 사실상 치료가 어려운 것으로 알려져 있다(乙竹과 松理, 1986; 吉水 등, 1993; 田, 2000). 그 동안 스쿠티카충 감염시 치료제로는 포르말린 약육이 효과가 있는 것으로 알려져 있으며(田, 1992, 2000, 2005; Jee and Jo, 2002), 양식 현장에서도 감염시 포르말린 약육 처리를 했으나 최근 들어서는 과산화수소 약육에 의한 치료도 많이 이루어지고 있다. 이외에도 기생충 구제제로 널리 알려진 niclosamide, oxyclozanide, bithinol sulfoxide 등 몇 가지 화합물과 doxycycline hyclate 등 일부 항생제인 경우도 *in vitro* 실험에서 살충 효과가 있는 것으로 밝혀지고 있으나 양식현장에서 실용화되고 있지는 못한 실정이다(Iglesias et al., 2002; Iglesias et al., 2003). 따라서 양식 넙치에 스쿠티카충이 일단 감염되면 완치가 어려우므로 감염예방이 중요하며 스쿠티카충의 피해를 줄이기 위해서는 다각적인 연구와 접근이 필요한 것으로 보인다.

본 연구는 이와 같이 양식 넙치에 많은 피해를 입히는 스쿠티카충에 대하여 최근 10년 동안 제주지역의 발병동향을 조사하였다. 그리고 감염어의 뇌에서 스쿠티카충을 분리하여 형태적, 유전적 검토를 거쳐 *Philasterides dicentrarchi*로 동정하였으며 이 충에 대해 생육환경 등의 생물학적 특성을 조사하였다. 또한 이 충을 넙치 치어에 인위 감염시켜 병원성을 확인하였으며, 감염예방을 위한 자료를 제공하기 위해 조직학적 관찰을 통해 어체내 침투경로를 밝히고 화합물의 종류별로 *in vitro* 구제실험을 실시하였다.

이상과 같이 양식 넙치 치어에 감염되어 피해를 입히는 스쿠티카충의 발병 동향과 생물학적 특성, 병원성 및 어체내 침투경로, 화합물에 의한 구제효과 등의 연구를 통해서 스쿠티카충의 예방과 치료를 위한 자료를 제공코자 한다.

II. 넙치 양식장의 스쿠티카증 발병동향

1. 재료 및 방법

1) 연도별 발병동향

지리적으로 격리되어 다른 지역의 양식환경과 구별되는 제주도지역 넙치양식장을 대상으로 1995년부터 2004년도까지 최근 10년 동안 양식장 기술지도시 어병진료를 실시한 자료를 토대로 스쿠티카증의 발병동향을 분석하였다.

2) 월별 발병동향

2000년부터 2004년까지 최근 5년 동안 월별 스쿠티카증의 총 발병건수를 합산한 후 월별 평균 발병건수를 산출하였다.

3) 주요 세균성질병의 혼합감염

스쿠티카증과 주요 세균성 질병과의 혼합 감염이나 상호 관련성을 파악하기 위해 2002년부터 2004년까지 최근 3년 동안의 스쿠티카증과 넙치에 감염되는 주요 세균성 질병의 혼합감염 상황을 조사하였다. 조사 대상은 넙치에 주로 감염되는 세균성 질병인 비브리오팀, 활주세균증, 연쇄구균증, 에드워드병이 단독으로 스쿠티카증과 혼합감염된 경우로 한정하여 분석하였다.

4) 스쿠티카증 진단

스쿠티카증의 감염진단은 기본적으로 다른 기생충 검사와 같은 방법으로 검사하였는데, 병어의 아가미, 피부, 궤양부위 등을 절취하여 현미경 100~400배율로 스쿠티카증의 감염여부를 관찰하였다. 이외에도 특별히 염증이 나타나거나 감염증상을 보일 경우 근육, 안구, 뇌, 기타 내부 장기 등을 검정하여 감

염여부를 확인하였다.

5) 기타질병 진단

그 밖에 질병은 주로 기생충성, 세균성, 바이러스성 질병 등에 대해 일반적인 검사방법에 따라 진단했으며 필요시 영양성 질병과 환경성 질병에 대해서도 조사하였다. 세균성 질병인 경우는 병어의 간, 신장, 비장, 생식소, 환부 등에서 BHIA (Brain Heart Infusion Agar, Merck, Germany) 배지나 TSA (Tryptic Soy Agar, Merck, Germany) 배지를 이용하여 균을 1차 분리하였다. 분리된 균을 25~28℃ incubator에서 24시간 배양한 후 TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Sucrose, Merck, Germany), SS agar (Salmonella Shigella, Merck, Germany) 등의 선택배지 배양 및 colony의 상태, 운동성, 형태, 그람 염색 등을 실시하여 간이 진단하였으며, 필요시에는 API 동정 kit (bioMerieux, France) 을 이용하여 병원균을 동정하였다.

바이러스성 질병인 경우 외부증상과 폐사율 등을 감안하여 바이러스 감염으로 판단될 경우 PCR 분석을 통해서 진단하였다. 검사는 넙치에 주로 감염되는 Vira virus, Rhabdo virus, Herpes virus, Lymphosystis virus, Irido virus, Viral Haemorrhagic Septicemia virus (VHSV), Viral nervous necrosis (VNN) 등 7 종류의 virus를 대상으로 하였다. 이외의 다른 질병은 일반적인 진단방법에 따라 수행하였으며, 모든 검사자료는 data-base화하여 분석하였다.

2. 결 과

1) 연도별 발병동향

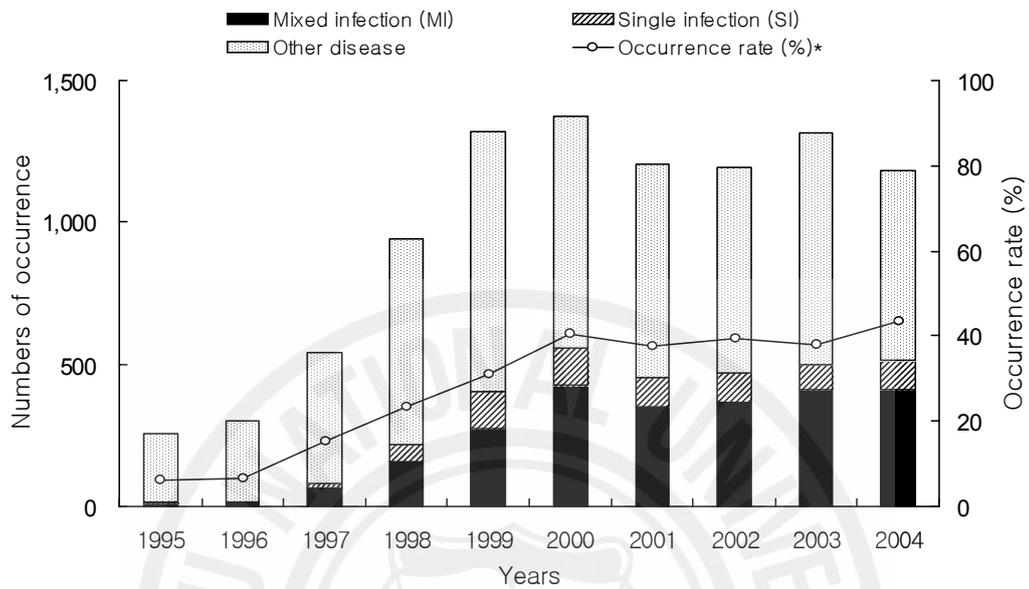
제주지역 넙치양식장의 스쿠티카증 발병상황은 1996년도까지는 스쿠티카충 단독 혹은 복합감염 비율이 전체 어병 발병건수의 10% 이내로 낮았다. 그러나 1997년도부터는 급격히 스쿠티카증의 발병건수나 전체 발병건수 대비 스쿠티카증의 발병 비율이 증가하였는데 1997년에는 82건 15.2%, 1998년에는 218

건 23.2%, 1999년 407건 30%로 증가한 이후 연간 454~559건을 유지하고 있다. 총 어병 발병건수 대비 스쿠티카증 발병률도 2000년도에 40.6 % 높아진 이후 지속적으로 40% 전후의 높은 발병률을 유지하고 있다(Table 1, Fig. 1).

Table 1. Occurrence of single and mixed infection by scuticociliates and main bacteria in the cultured flounder of Jeju Island from 1995 to 2004

	Year									
	'95	'96	'97	'98	'99	'00	'01	'02	'03	'04
Total occurrence of diseases (TO)	260	299	541	939	1,319	1,376	1,206	1,196	1,313	1,183
Single infection (SI)	7	3	19	60	131	130	103	108	84	105
Mixed infection (MI)	9	16	63	158	276	429	351	365	413	410
Occurrence rate(%)*	6.2	6.4	15.2	23.2	30.9	40.6	37.6	39.5	37.9	43.5

* Occurrence rate = (SI+MI)/TO×100.



* Occurrence rate, $(MI+SI) \div (OD+MI+SI) \times 100$.

Fig. 1. Occurrence of single and mixed infection by scuticociliates and other disease in the cultured flounder of Jeju Island from 1995 to 2004.

2) 월별 발병동향

2000년부터 2004년까지 5년 동안의 월별 스쿠티카증의 평균 발병동향은 연중 지속적으로 발병되고 있으나 고수온기로 접어드는 7월이 평균 80건으로 가장 많이 발병되었으며 8월 69건, 6월 54건으로 주로 여름철에 많이 발병되었다. 발병이 적은 시기는 1월로 평균 24건이었으며 다음에 2월 26건순으로 저수온기에 적게 발병되었다(Fig. 2).

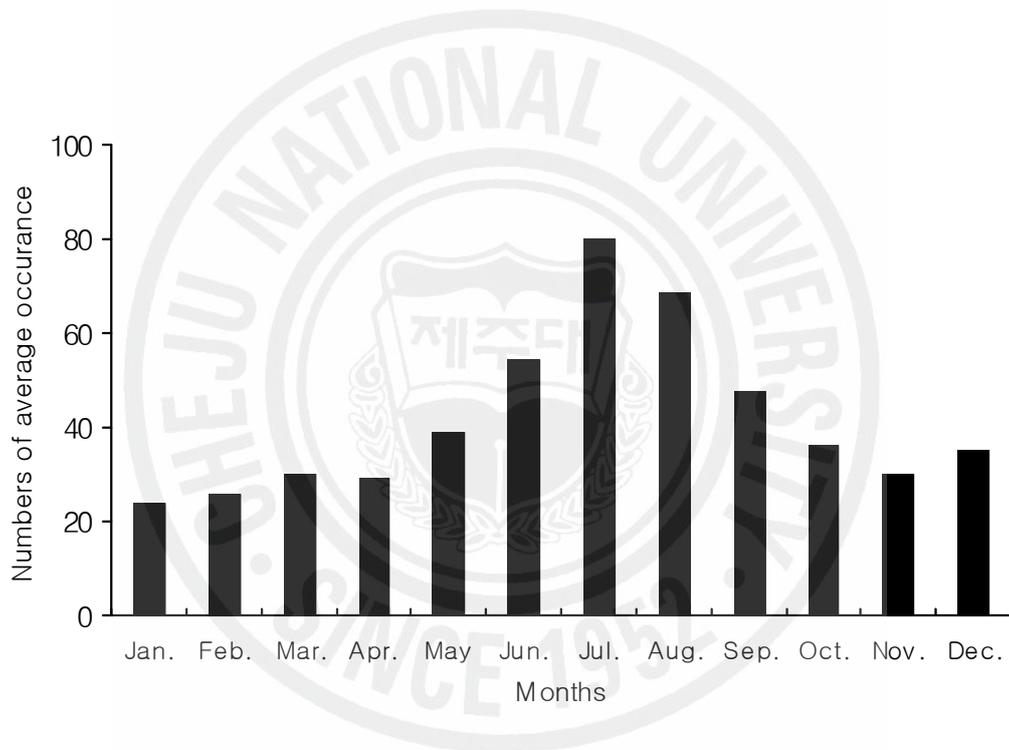


Fig. 2. Monthly average occurrence of scuticociliatosis in flounder farms of Jeju island from 2000 to 2004.

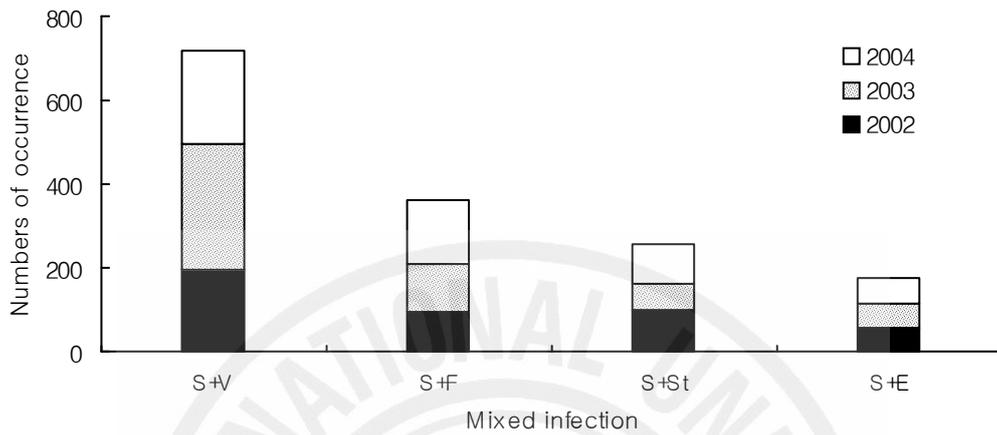
3) 주요 세균성 질병의 혼합감염

2002년부터 2004년까지 3년 동안 조사한 스키투티카증과 주요 세균성 질병의 혼합감염(스쿠티카증 + 세균성 단독질병)은 비브리오병과 혼합감염이 731건, 48%로 가장 많았으며, 다음으로 활주세균증 363건, 24%, 연쇄구균증 257건, 17%, 에드워드병 174건 11% 순으로 스키투티카증과 혼합감염 되는 세균성 질병은 주로 비브리오병인 것으로 나타났다(Table 2, Fig. 3).

Table 2. Occurrence of mixed infection by scuticociliates and main bacteria in the cultured flounder in Jeju Island from 2002 to 2004.

Years	S + V	S + F	S + St	S + E
Total	721 (48%)	363 (24%)	257 (17%)	174 (11%)
2002	194 (43%)	96 (22%)	99 (22%)	58 (13%)
2003	300 (56%)	112 (21%)	65 (12%)	56 (11%)
2004	227 (42%)	155 (29%)	93 (17%)	60 (12%)

※ S+V: Scuticociliate+*Vibrio* sp., S+F: Scuticociliate+*Flexibacter* sp., S+St: Scuticociliate+*Streptococcus* sp., S+E: Scuticociliate+ *Edwardsiella* sp.



※ S+V: Scuticociliate+*Vibrio* sp., S+F: Scuticociliate+*Flexibacter* sp., S+St: Scuticociliate+*Streptococcus* sp., S+E: Scuticociliate+*Edwardsiella* sp.

Fig. 3. Occurrence of mixed infection by scuticociliates and bacteria in the cultured flounder in Jeju Island from 2002 to 2004.

3. 고 찰

양식넙치에 발병되는 스쿠티카증은 1986년 일본에서 최초로 감염사례가 보고되었으나(乙竹와 松里) 제주도 지역에서는 1991년도에 처음으로 확인되었다(Jin et al., 2003a, 李와 河, 1995). 그렇지만 1997년도까지는 전체 발병되는 질병 가운데 대략 10% 내외로 다른 질병에 비해서 크게 문제시 되지 않았다. 그러나 1998년도부터 급격히 증가하여 발병률이 30%를 넘어서고 피해가 증가하면서 양식넙치 질병 가운데 중요한 비중을 차지하게 되었다. 2000년 이후에는 연간 총 발병건수가 1,200~1,400건으로 연도별로 차이가 있으나 스쿠티카증의 발병 비율은 전체 발병건수 대비 40% 정도를 꾸준히 유지하고 있다. 스쿠티카증 단독 감염보다는 주로 세균성 질병과 혼합감염이 증가하는 추세를 보이고 있는데 이는 발병양상이 복잡해지고 있으며, 스쿠티카증 감염 후 2차 세균 감염이 증가하고 있음을 시사해 주고 있다. 혼합감염 되는 세균성 질병은 비브리오병이 가장 많았는데, 田(2000, 2005)은 수중에 널리 분포하는 비브리오균이 기생충 감염 후 손상된 조직을 통해서 쉽게 2차 감염된다고 하였다. 또한 스쿠티카증이나 비브리오병이 모두 치어기에 주로 감염되는 질병(田, 2000)인 점도 하나의 원인인 것으로 보인다. 연쇄구균증이나 에드워드병인 경우 전체 발병건수도 비브리오병보다 적지만 주로 성어기에 발병되고 있으므로 치어기에 발병되는 스쿠티카증과 혼합감염이 적은 것으로 추정된다.

월별 스쿠티카증의 발병동향은 연중 꾸준히 발병되고 있으나 발병이 가장 많이 되는 시기는 초여름으로 나타났다. 제주도지역 양식장은 대부분 연중 17℃ 내외의 지하해수를 혼합 사용하여 여름철에도 사육수온을 23℃ 내외, 겨울철에는 14℃ 이상을 유지하고 있다. 따라서 계절적인 환경변화가 크지 않아 스쿠티카증 뿐만 아니라 다른 질병도 연중 발병되는 환경으로 보인다(Oh et al., 1998). Jee 등(2001)은 넙치에 감염되는 *U. marinum*의 증식범위가 6~30℃로 넓으며, Lee 등(1995)은 양식넙치에서 분리한 스쿠티카증이 20~25℃ 범위에서 배양이 잘된다고 하였다. 또한 Iglesias 등(2003)의 연구에 따르면 양

식 터벗에서 분리한 *P. dicentrarchi* 가 13, 18, 23℃의 배양온도 중 23℃에서 가장 양호하게 배양되었다. 이와 같은 결과를 종합해 볼 때 양식넙치에 감염되는 스쿠티카충의 증식 적수온이 제주도내 양식장의 초여름 사육수온인 22~23℃와 일치하는 것도 여름철에 발병이 많이 이루어지는 원인 중에 하나로 추정된다. 이외에도 여름철에는 사료섭이가 활발하므로 많은 양의 사료를 투여하고 있으며 그만큼 수조 저면에 유기물이 침적되어 스쿠티카충의 생육에 적합한 환경이 조성되기 때문으로 추정된다.



Ⅲ. *Philasterides dicentrarchi*의 생물학적 특성

1. 재료 및 방법

1) 스퀴티카충 분리

실험에 이용한 스퀴티카충은 제주도 북제주군 지역 육상 넙치양식장의 넙치 치어 뇌에서 분리하였다. 머리 부분에 스퀴티카충 감염증상을 보이는 전장 14 cm 치어의 뇌를 무균적으로 적출하여 70% ethanol에 30초간 담구어 뇌조직 표면을 멸균한 후 멸균 해수에 5회 세척하였다. 다음에 \varnothing 87 mm petri dish에 멸균해수 20 ml를 채우고 적출한 뇌조직을 절개하여 뇌 속에 감염된 스퀴티카충과 뇌조직 100 mg을 같이 풀어 넣어 15°C에서 초대 배양하였다. 배양 5일후 스퀴티카충을 2차로 순수 분리하여 25 ml의 cell culture flask (Nunc, Denmark)에서 멸균해수와 넙치 뇌조직을 이용하여 2차 배양한 후 CHSE-214 세포주에 접종시켜 배양하면서 실험에 이용하였다. 스퀴티카충 배양 중 세균의 증식을 억제하기 위해 모든 배지에 항생제인 penicillin (Gibco, USA) 100 IU와 streptomycin (Gibco, USA)을 100 μ g/ml 농도로 첨가하였다.

2) 동 정

(1) 형태적 분석

분리된 스퀴티카충의 infraciliature, silverline system 관찰을 하기 위해 Corliss (1953)와 Ma (2003) 등에 의한 silver carbonate와 silver nitrate 방법에 따라 염색 후 현미경으로 관찰하였다.

(2) 유전적 분석

분리된 스퀴티카충의 genomic DNA를 분리하기 위해 CHSE-214에 재접종하고 15°C에서 5일간 배양하였다. 접종한 스퀴티카충이 완전히 세포주를 섭취하였을 때 배양액 1.5 ml를 1,500 rpm에서 10 분간 원심분리하여 pellet을 수

집하였다. 수집된 pellet에 proteinase K와 lysis buffer (Qiagen, Germany)를 처리하여 genomic DNA를 분리하였다.

스쿠티카충의 유전학적 분석에는 small subunit (SSU) rRNA 서열을 증폭하기 위해 Scu18F 5'-AACCTGGTTGATCYTGCCAGTA-3', Scu18R5'-GATCYWTCTGCAGGTTTCACCTAC-3'를 제작하였고, PCR 반응은 100 ng의 genomic DNA, dNTPs, 10× Ex taq polymerase buffer, 0.5 unit의 Ex taq polymerase (Takara, Japan)를 혼합액에 증류수를 가하여 최종부피 50 μ l로 맞추고 Takara PCR thermal cycler (Takara, Japan)를 사용하여 증폭하였다. SSU rRNA의 증폭은 94°C, 3분간 pre-denaturation, 94°C에서 30 초간 denaturation, 55°C에서 35 초간 annealing, 72°C에서 2 분간 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. 염기서열 분석결과 얻어진 data를 BLAST program 및 CLUSTAL W 프로그램을 이용하여 분자계통학적 동정을 실시하였으며, 이때 NCBI의 GeBank data-base의 염기서열과 비교하였다.

3) 배 양

분리된 스쿠티카충의 생육조건을 파악하기 위해 일반적으로 알려진 배양방법과 양식현장에서 스쿠티카충의 숙주나 먹이로 추정되는 물질을 이용하여 배양하였다.

(1) 세포주를 이용한 배양

어류주화세포 Chinook salmon embryo-214 (CHSE-214)를 12 well plate에 각 1 ml 분주한 후 스쿠티카충을 접종시켜 배양하였다. 접종은 CHSE-214 세포주에서 배양시킨 스쿠티카충을 1.0×10^3 cell ml⁻¹ 농도로 하였으며, 15°C incubator에서 2 주간 배양하였다. 어류주화세포 CHSE-214는 modified Eagle's medium에 10% FBS 및 항생제 penicillin (Gibco, USA) 100 IU와

streptomycin (Gibco, USA)을 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 각각 첨가하였다.

(2) 세균을 이용한 배양

배양배지는 Provasoli 등(1957)의 Millport S 용액(NaCl 1.5 g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g, KCl 0.04 g, CaSO_4 0.012 g/distilled water 100 ml)에 BHI (Brain Heart Infusion) broth (Merck, Germany) 배지를 0.1% 첨가한 후 12 $^{\circ}\text{C}$ 에서 15분간 멸균시켜 Millport BHI 배지를 제작하였다(pH 7.2). 제작된 Millport BHI 배지를 25 ml의 cell culture flask (Nunc, Denmark)에 10 ml 분주하고 스쿠티카충의 먹이로 넙치 피부에서 분리된 *Vibrio lentus*를 3.0×10^8 cell ml^{-1} 농도로 접종시켜 지속적으로 균이 증식되면서 스쿠티카충의 먹이가 되도록 하였다. 먹이로 사용한 *Vibrio lentus*는 넙치 치어 피부에서 분리된 균으로 예비실험을 통하여 스쿠티카충이 섭이하여 양호하게 증식되는 균주를 선발하였다. 먹이 균의 접종량은 Crosbie and Munday (1999)의 배양방법을 기준하였으나 스쿠티카충의 배양조건 등은 예비실험을 통하여 충이 충분히 균을 포식하면서 지속적으로 생육이 가능한 조건을 찾아서 정하였다. 스쿠티카충의 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)에 20 ml 분주하고 충의 먹이로 건강한 넙치 뇌조직을 배양액 ml 당 0.25 mg을 마쇄하여 첨가하였다. 첨가한 뇌조직의 양은 사전에 예비실험을 통하여 충분히 스쿠티카충이 섭이하고 증식 가능한 양으로 정하였다(pH 7.2). 배양액에는 배양 중 세균의 증식을 막기 위해 항생제 penicillin (Gibco, USA) 100 IU와 streptomycin (Gibco, USA)을 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 첨가하였다. 스쿠티카충의 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 첨가하

여 제조하였다. 해산 chlorella로 배양한 로티퍼, *Brachionus rotundiformis*를 멸균해수로 3회 세척한 후 물기를 어느 정도 제거하고 -70℃에 냉동 보관한 후 먹이로 이용하였다. Millport S 용액에 ml 당 냉동된 로티퍼 0.5 mg을 혼합하여 배양 용액을 제조했는데, 로티퍼의 양은 사전에 예비실험을 통하여 충분히 스쿠티카충이 섭이하고 증식 가능한 양으로 정하였다(pH 7.2). 스쿠티카충의 접종과 배양 온도, 기간 등은 세포주를 이용한 배양과 같은 조건으로 하였다.

(5) 배합사료를 이용한 배양

넙치 뇌조직을 이용한 배양과 같은 조건에서 뇌조직 대신 H사의 넙치 치어 배합사료(Ø 0.5~0.6 mm, extrude pellet, EP, Table 3)를 충의 먹이로 Millport S 용액 ml당 1 mg을 참가하여 배지를 제조하였다. 배지에 혼합하는 치어사료의 양은 사전에 예비실험을 통하여 충이 충분히 섭이하고 증식 가능한 양으로 정하였으며(pH 7.2), 스쿠티카충의 접종과 배양 온도, 기간 등은 세포주를 이용한 배양과 같은 조건으로 하였다.

Table 3. Composition of the experimental diets.

(Unit: g)

Diets form	Diets size (Ømm)	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

(6) 스쿠티카충 계수

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

4) 생육 환경

*P. dicentrarchi*의 생육환경 조건을 파악하기 위해 온도, pH 및 염분농도 등을 각각 다른 조건에서 배양하면서 생육 상태를 관찰하였다. 실험구별로 스쿠티카충의 운동성과 형태변화, 증식 여부를 관찰하고 배양 시간 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 스쿠티카충의 먹이로 *V. lentus* 균을 1.0×10^8 cell ml^{-1} 농도로, 스쿠티카충은 3.0×10^3 cell ml^{-1} 농도로 접종한 후 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 $^{\circ}\text{C}$ 에서 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 $^{\circ}\text{C}$ 에서 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, 60 ppt 농도로 첨가한 후(pH 7.2), 온도별 생육시험과 같은 방법으로 *V. lentus* 균을 먹이로 하여 15°C에서 11일 동안 생육상태를 관찰하였다.

2. 결 과

1) 동 정

(1) 형태적 분석

분리된 스키투리카충은 뾰족한 선단과 둥근 후부를 갖는 물방울 또는 난형을 하고 있으며 세포질은 많은 식포와 막대형의 크리스탈로 가득 차 있다. 후부에는 수축포가 위치하며, 한 개의 꼬리 섬모를 갖고 있다. 구부기관은 구부강의 왼쪽에 3개의 소막(membranelle)과 오른쪽에 두개로 나누어진 파동막(bipartate paroral membrane)을 갖고 있다. 제1소막(membranelle 1, M1)은 침극으로부터 떨어져 있으며, 2개의 열을 갖고 있는 방추형 또는 삼각형 형태를 하고 있다. 제2소막(membranelle 2, M2)은 M1의 뒤에 위치하며 M1보다 길이가 길고 사다리꼴 형태를 하고 있으며, 제3소막(membranelle 3, M3)은 작고 M2에 가깝게 위치하고 있다. 파동막(Paroral membrane)은 M3 근처에서 대개 연결되어 있으며, 두 부분인 제1파동막(PM1)과 제2파동막(PM2)로 나누어지고 있다. PM1은 M2의 앞까지 신장되어 있고 PM2는 입 주변부를 둘러싸고 있다. 섬모열은 대개 13개를 갖고 있으며 구부강을 제외하고 선단과 후부에 길게 배열되어 있다. 특히 마지막 섬모열은 M1을 따라서 앞 또는 중간부에서 종결되고 있으며, 마지막 섬모열의 silverline은 caudal cilium complex을 지나

7번째와 8번째 섬모열 사이에 연결되어 있다. 제2 섬모열의 후부에는 수축공이 위치하고 있으며 항문은 첫 번째와 마지막 섬모열 사이의 후부에 불규칙한 형태를 갖고 있다(Fig. 1). 충체의 선단에 구형 또는 타원체의 한 개의 대핵과 소핵을 갖고 있다. 이외에도 일반적으로 형태적 분류시 이용되는 특징들을 기준에 보고된 스쿠티카충의 형태적 특징과 비교한 결과 Dragesco 등(1995)의 *Philasterides dicentrarchi*와 동일한 형태적 특징을 보였다. 이외에도 Thomson and Moewus (1964), Song (2000) 등이 보고한 *M. avidus*와도 동일한 특성을 나타내었다(Table 4, 5).



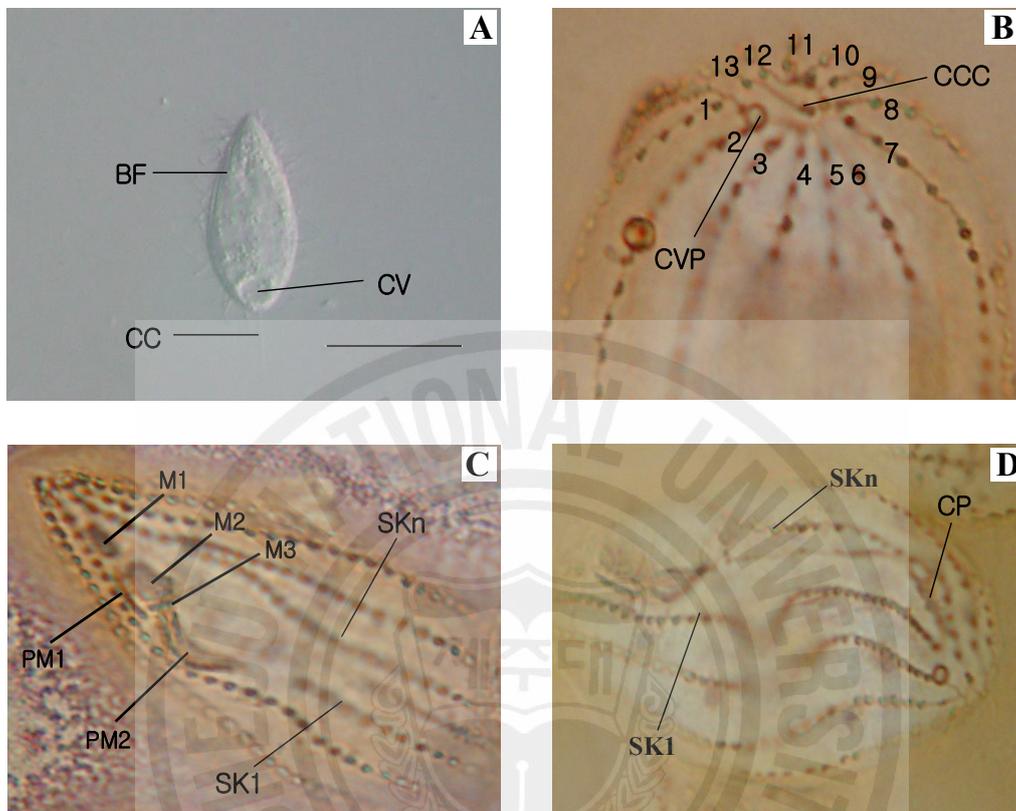


Fig. 4. Silver impregnated specimens of *Philasterides dicentrarchi*, A: *in vivo*, B: caudal view of silverline, C: infraciliature of baccal field, D: ventral view of silverline. BF: buccal field, CC: caudal cilium, CCC: caudal cilium complex, CP: cytopyge, CV: contractile vacuole, CVP: contractile vacuole pore, M1 · M2 · M3: membranelle 1 · 2 · 3, PM 1 · 2: paroral membrane 1 · 2, SK1 · SKn: somatic kinety 1 · somatic kinety n, scale bar= 20 μ m.

Table 4. Morphometric characterisation of three population of *Philasterides dicentrarchi*

(Unit: μm)

Character	Min	Max	Mean	SD	n
Body length	32.7	43.7	37.9	2.67	39
Body width	19.6	28.8	24.4	2.36	39
Number of somatic kineties	12	14	13	0.61	35
Length of buccal field*	14.6	18.5	16.5	1.11	34
Length of membranelle 1	2.8	4	3.3	0.28	30
Length of membranelle 2	2.8	3.9	3.3	0.29	30
Length of membranelle 3	0.5	1.2	0.8	0.19	30
Length of paroral membrane 1	4.1	6.1	4.9	0.51	29
Length of paroral membrane 2	4	7.4	5.8	0.79	27
Length of macronucleus	6	8.7	7.4	0.71	35
Width of macronucleus	5.7	9	7.3	0.72	35
Width of micronucleus	1.2	2.3	1.9	0.24	25

* n: number of samples, SD: standard deviation.

Distance: from apex to posterior end of paroral membrane.

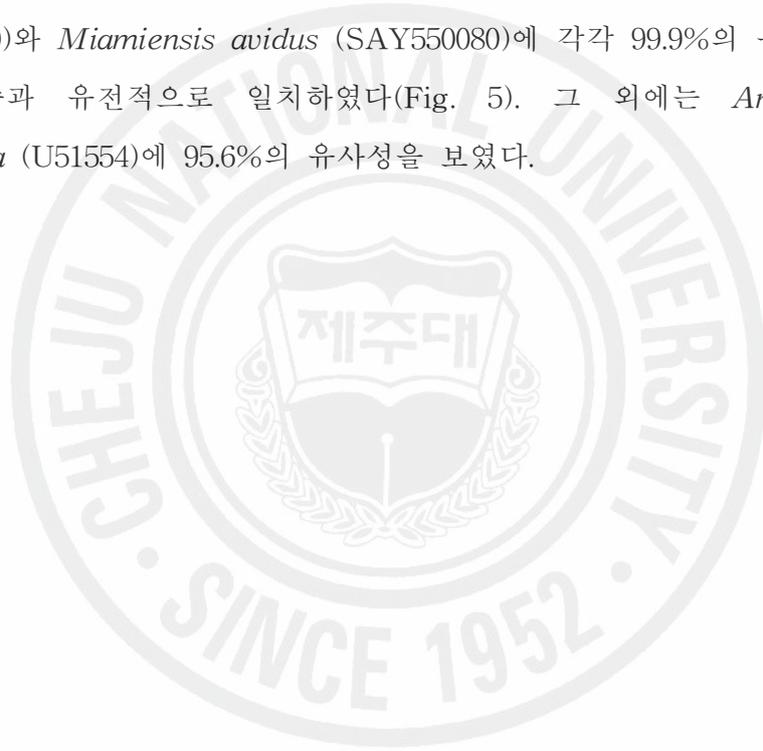
Table. 5. Morphological comparison of *Philasterides dicentrarchi* from the present study and literatures

Character	Present study	<i>Philasterides dicentrarchi</i>	<i>M. avidus</i> (from 2 strains)	<i>M. avidus</i>
Body length × length (μm) <i>in vivo</i>	22-34 × 10-21	30-42 × 10-22	-	30-45 × 20-35
Body length × length (μm) fixed	37.9 × 24.4	23-45 × 11-20 26-40 × 12-25	31.9 × 16.1 39.9 × 20.1	28-41 × 23-32
No. of somatic kineties	12-14	13-15	10-12 10-13	13-14
Length of buccal field/ body length	About 1/2	About 1/3-2/5	About 1/2	2/5-1/2
Length of M1* (μm)	3.33	ca. 2-3	2.6 3.0	ca. 3-4
Length of M2** (μm)	3.34	ca. 2-4	2.8 3.6	ca. 3-4
Life style	Ectoparasite, Histophagous	Ectoparasite, Histophagous	Ectoparasite, Histophagous	Ectoparasite, Histophagous
Position of CVP***	End of SK2	End of SK2	End of SK2	End of SK2
Host	Flounder	Sea bass	Sea horse	Flatfish
Sample location	Jeju, Korea	(?), France	Miami, USA	Qingdao, China
Data source	Original	Dragesco et al.(1995)	Thomson and Moewus (1964)	Song et al. (2000)

* M1, membranelle 1; ** M2, membranelle 2; *** CVP, contractile vacuole pore.

(2) 유전적 분석

스쿠티카충에 감염된 넙치로부터 분리된 스쿠티카충의 유전적 분석을 위해 SSU rRNA를 PCR 증폭한 결과, 약 1760bp의 산물이 증폭되었다. 증폭된 산물을 클로닝 과정을 수행하여 완전한 염기서열을 결정하였다. 그 결과 넙치에서 분리된 스쿠티카충의 SSU rRNA는 유전자 증폭에 사용된 primer의 서열을 포함하여 1759 bp로 확인되었으며, 유전자내의 GC 비율은 44%였다. 데이터베이스내에 등록되어 있는 유전자들에 대하여 염기서열 비교 결과 넙치에서 분리된 스쿠티카충의 SSU rRNA 유전자 서열은 *Philasterides dicentrarchi* (AY642280)와 *Miamiensis avidus* (SAY550080)에 각각 99.9%의 유사성을 보여 두 종과 유전적으로 일치하였다(Fig. 5). 그 외에는 *Anophyroides haemophila* (U51554)에 95.6%의 유사성을 보였다.



clone 1
AY642280
AY550080
AACCTGGTTGATCCTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAAGCCATGCATGTCT
AACCTGGTTGATCCTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAAGCCATGCATGTCT
-ACCTGGTTGATCCTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAAGCCATGCATGTCT

clone 1
AY642280
AY550080
AAGTATAAATAGTATACAGTGAACACTGCGAATGGCTCATTAAAACAGTTATAGTTTATTT
AAGTATAAATAGTATACAGTGAACACTGCGAATGGCTCATTAAAACAGTTATAGTTTATTT
AAGTATAAATAGTATACAGTGAACACTGCGAATGGCTCATTAAAACAGTTATAGTTTATTT

clone 1
AY642280
AY550080
GATAATGGAAAGCTACATGGATAACCGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCTGTCAAAC
GATAATGGAAAGCTACATGGATAACCGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCTGTCAAAC
GATAATGGAAAGCTACATGGATAACCGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCTGTCAAAC

clone 1
AY642280
AY550080
CCGACCTTTGGAAGGGTTGTATTATTAGATATTAAGCCAATATTCC TTCGGGICTATTG
CCGACCTTTGGAAGGGTTGTATTATTAGATATTAAGCCAATATTCC TTCGGGICTATTG
CCGACCTTTGGAAGGGTTGTATTATTAGATATTAAGCCAATATTCC TTCGGGICTATTG

clone 1
AY642280
AY550080
TGGTGAATCATAGTAACTGATCGAATCTCTTACGAGATAAATCAITCAAGTTTCTGCC
TGGTGAATCATAGTAACTGATCGAATCTCTTACGAGATAAATCAITCAAGTTTCTGCC
TGGTGAATCATAGTAACTGATCGAATCTCTTACGAGATAAATCAITCAAGTTTCTGCC

clone 1
AY642280
AY550080
TATCAGCTTTCGATGGTAGTGTATTGGACTACCATGGCAGTCACGGGTAACGGAGAATTA
TATCAGCTTTCGATGGTAGTGTATTGGACTACCATGGCAGTCACGGGTAACGGAGAATTA
TATCAGCTTTCGATGGTAGTGTATTGGACTACCATGGCAGTCACGGGTAACGGAGAATTA

clone 1
AY642280
AY550080
GGGTTGCGTTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGG
GGGTTGCGTTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGG
GGGTTGCGTTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGG

clone 1
AY642280
AY550080
CGCGTAAATTACCAATCCTGATTCAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAACCTGGGGGC
CGCGTAAATTACCAATCCTGATTCAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAACCTGGGGGC
CGCGTAAATTACCAATCCTGATTCAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAACCTGGGGGC

clone 1
AY642280
AY550080
CTCACGGCCTTACGGGATTGTAATGAGAACAATTTAAACGACTTAACGAGGAACAATTGG
CTCACGGCCTTACGGGATTGTAATGAGAACAATTTAAACGACTTAACGAGGAACAATTGG
CTCACGGCCTTACGGGATTGTAATGAGAACAATTTAAACGACTTAACGAGGAACAATTGG

clone 1
AY642280
AY550080
AGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTT
AGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTT
AGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTT

clone 1
AY642280
AY550080
GTTGCAGTAAAAAGCTCGTAGTTGA-CTTCTGCATGTGCCAGTTCTGG-CTTCGGTCA
GTTGCAGTAAAAAGCTCGTAGTTGA-CTTCTGCATGTGCCAGTTCTGG-CTTCGGTCA
GTTGCAGTAAAAAGCTCGTAGTTGA-CTTCTGCATGTGCCAGTTCTGG-CTTCGGTCA

clone 1
 AY642280
 AY550080
 AGCTGTGGTGTATGCATCCGCTTGCAAAGCTAGACCGGTCTTCATTGATCGACTAGTGG
 -GCTGTGGTGTATGCATCCGCTTGCAAAGCTAGACCGGTCTTCATTGATCGACTAGTGG
 AGCTGTGGTGTATGCATCCGCTTGCAAAGCTAGACCGGTCTTCATTGATCGACTAGTGG

clone 1
 AY642280
 AY550080
 GTAGGCTCTTACCTTGAAAAAATTAGAGTGTTTCAGGCAGGCAATGGCTCGAATACATT
 GTAGGCTCTTACCTTGAAAAAATTAGAGTGTTTCAGGCAGGCAATGGCTCGAATACATT
 GTAGGCTCTTACCTTGAAAAAATTAGAGTGTTTCAGGCAGGCAATGGCTCGAATACATT

clone 1
 AY642280
 AY550080
 AGCATGGAATAATGGAATAGGACTTTTGTCCATTTGGTTGGTTATTGGACATAAGTAATG
 AGCATGGAATAATGGAATAGGACTTTTGTCCATTTGGTTGGTTATTGGACATAAGTAATG
 AGCATGGAATAATGGAATAGGACTTTTGTCCATTTGGTTGGTTATTGGACATAAGTAATG

clone 1
 AY642280
 AY550080
 ATTTAAAGGGACAGTTGGGGGCATTAGTATTTAATTGTCAGAGGTGAAATCTTGGATT
 ATTTAAAGGGACAGTTGGGGGCATTAGTATTTAATTGTCAGAGGTGAAATCTTGGATT
 ATTTAAAGGGACAGTTGGGGGCATTAGTATTTAATTGTCAGAGGTGAAATCTTGGATT

clone 1
 AY642280
 AY550080
 ATTTAAAGACTAAGTATGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTATTAAATCAAGAACGAA
 ATTTAAAGACTAAGTATGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTATTAAATCAAGAACGAA
 ATTTAAAGACTAAGTATGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTATTAAATCAAGAACGAA

clone 1
 AY642280
 AY550080
 AGTTAGGGGATCAAAGACGATCAGATACCGTCCTAGTCTTAACTATAAACTATACCGACT
 AGTTAGGGGATCAAAGACGATCAGATACCGTCCTAGTCTTAACTATAAACTATACCGACT
 AGTTAGGGGATCAAAGACGATCAGATACCGTCCTAGTCTTAACTATAAACTATACCGACT

clone 1
 AY642280
 AY550080
 CGGAATCGGACCGGCTTATAAAACTGGTTCGCGCCGATGAGAAATCAAAGTCTTTGGG
 CGGAATCGGACCGGCTTATAAAACTGGTTCGCGCCGATGAGAAATCAAAGTCTTTGGG
 CGGAATCGGACCGGCTTATAAAACTGGTTCGCGCCGATGAGAAATCAAAGTCTTTGGG

clone 1
 AY642280
 AY550080
 TTCTGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACC
 TTCTGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACC
 TTCTGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACC

clone 1
 AY642280
 AY550080
 AGGCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAACTTACCAGGTCCAAACAT
 AGGCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAACTTACCAGGTCCAAACAT
 AGGCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAACTTACCAGGTCCAAACAT

clone 1
 AY642280
 AY550080
 GGGTGGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGT
 GGGTGGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGT
 GGGTGGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGT

clone 1
AY642280
AY550080
TCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGGTTAATTCCGTTAACGAACGAGACCTTAACCTGC
TCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGGTTAATTCCGTTAACGAACGAGACCTTAACCTGC
TCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGGTTAATTCCGTTAACGAACGAGACCTTAACCTGC

clone 1
AY642280
AY550080
TAAATAGTACGTTGATGCACAATGGCGTTACTTCTTAGAGGGACTATGCGCTTTGAAAC
TAAATAGTACGTTGATGCACAATGGCGTTACTTCTTAGAGGGACTATGCGCTTTGAAAC
TAAATAGTACGTTGATGCACAATGGCGTTACTTCTTAGAGGGACTATGCGCTTTGAAAC

clone 1
AY642280
AY550080
GCATGGAAGTTTGAGGCAATAACAGGTCGTGATGCCCTTAGATGTCCTGGGCCGCACGC
GCATGGAAGTTTGAGGCAATAACAGGTCGTGATGCCCTTAGATGTCCTGGGCCGCACGC
GCATGGAAGTTTGAGGCAATAACAGGTCGTGATGCCCTTAGATGTCCTGGGCCGCACGC

clone 1
AY642280
AY550080
GCGCTACAATGACTCGCTCAGAAAGTACTTCCTGGTCCGGAAGGATTCGGTAAATCTTTT
GCGCTACAATGACTCGCTCAGAAAGTACTTCCTGGTCCGGAAGGATTCGGTAAATCTTTT
GCGCTACAATGACTCGCTCAGAAAGTACTTCCTGGTCCGGAAGGATTCGGTAAATCTTTT

clone 1
AY642280
AY550080
AAATACGAGTCGTGTTAGGGATCGATCTTTGTAATTATGGATCTTGAACGAGGAATGCCT
AAATACGAGTCGTGTTAGGGATCGATCTTTGTAATTATGGATCTTGAACGAGGAATGCCT
AAATACGAGTCGTGTTAGGGATCGATCTTTGTAATTATGGATCTTGAACGAGGAATGCCT

clone 1
AY642280
AY550080
AGTAAGTGC AAGTCATCAGCTTGTACTGATTACGTCCCTGCCCTTGTACACACCGCCCCG
AGTAAGTGC AAGTCATCAGCTTGTACTGATTACGTCCCTGCCCTTGTACACACCGCCCCG
AGTAAGTGC AAGTCATCAGCTTGTACTGATTACGTCCCTGCCCTTGTACACACCGCCCCG

clone 1
AY642280
AY550080
TCGCTCCTACCGATTTTCGAGTGATCCGGTGAACCTTCTGGACTGAGCACGCTTGCCTGAA
TCGCTCCTACCGATTTTCGAGTGATCCGGTGAACCTTCTGGACTGAGCACGCTTGCCTGAA
TCGCTCCTACCGATTTTCGAGTGATCCGGTGAACCTTCTGGACTGAGCACGCTTGCCTGAA

clone 1
AY642280
AY550080
CGGGAAGTTAAGTAAACCTAATCACTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTA
CGGGAAGTTAAGTAAACCTAATCACTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTA
CGGGAAGTTAAGTAAACCTAATCACTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTA

clone 1
AY642280
AY550080
GGTGAACCTGCAGAAAGATC-
GGTGAACCTGCAGATGGATCA
GGTGAACCTGCAGAAGGATCA

Fig. 5. Complete sequences of small subunit rRNA gene from isolated ciliate (clone 1) with *P. dicentrarchi* (AY642280) and *M. avidus* (AY550080).

2) 생육 특성

(1) 세포주를 이용한 배양

세포주를 먹이로 활발히 증식하였는데 접종 직후부터 지수증식이 이루어졌으며, 접종 후 10일째에 4.8×10^5 cell ml⁻¹로 160 배로 증식하여 최고 밀도에 도달하였다. 그러나 최고 밀도에 도달한 이후에는 급격히 밀도가 떨어졌다 (Fig. 6).

(2) 세균을 이용한 배양

배양기간 동안 스키테카충은 세균을 먹이로 활발히 증식하면서 전형적인 포식자와 피포식자의 관계를 보였다. 배양 6일째에 9.2×10^4 cell ml⁻¹로 증식하여 처음 접종 농도에서 30배 이상 증식하여 최고 밀도에 도달했다 (Fig. 6). 배양기간 동안의 먹이 균의 밀도는 $1.0 \times 10^8 \sim 2.3 \times 10^9$ cell ml⁻¹ 농도를 유지하였다.

(3) 넙치 뇌조직을 이용한 배양

넙치 뇌조직을 먹이로 해서도 활발히 증식하였다. 배양 4일째부터 ml당 10,000 cell 이상으로 증식하였으며, 배양 후 14일째에 2.9×10^4 cell ml⁻¹로 최고 밀도를 보여 접종시보다 10배 정도로 증식하였다. 전반적으로 최고 밀도 수준에서 장기간 생존하였다 (Fig. 6).

(4) 로티퍼 조직을 이용한 배양

로티퍼 조직을 먹이로 한 증식은 넙치 뇌조직을 먹이로 한 증식과 비슷한 양상을 보였으나 지수 증식이 이루어지는 시기가 늦었다. 배양 후 8일째부터 지수증식이 이루어졌으며 접종 후 14일째에 3×10^4 cell ml⁻¹로 접종시 밀도보다 10배로 증식하여 최고 밀도에 도달하였다 (Fig. 6).

(5) 배합사료를 이용한 배양

넙치 치어용 배합사료를 먹이로 활발히 증식하였는데 배양 후 8일째에 ml

당 100,000 cell을 넘어서 33배로 증식하였으며, 접종 후 12일 쯤에 1.4×10^4 cell ml^{-1} 로 46배로 증식하여 최고 밀도를 보였다. 10^5 cell ml^{-1} 이상으로 증식된 후에도 지속적으로 고밀도를 유지하였다(Fig. 6).

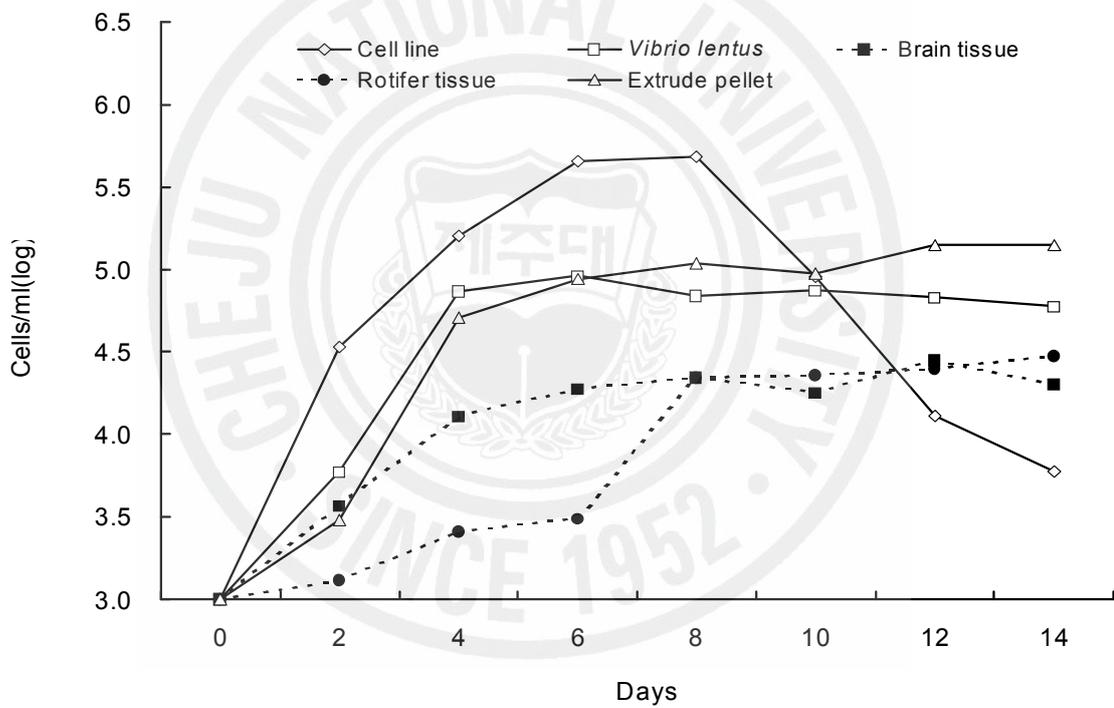


Fig. 6. Growth curves of the *P. dicentrarchi* in different media.

3) 생육 환경

(1) 온도

10~30℃ 범위에서 생존 및 증식이 이루어졌으며, 활발한 증식은 10~25℃ 범위에서 이루어졌다. 30℃에서는 접종 후 4일간 증식 후 감소하기 시작하여 7일후 전량 폐사하였다. 5℃에서는 접종 후 감소하기 시작하여 3일 후 전량 폐사하였으며, 1℃와 35℃에서는 접종직후 전량 폐사하였다. 전반적으로 광온성을 보였으나 고온에 잘 적응하는 특성을 보였다(Table 6).

(2) pH

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

(3) NaCl

5~50 ppt 범위에서 생존이 가능하였으며 증식은 5~45 ppt 범위에서 이루어졌다. 증식이 시작되는 시기는 5 ppt에서는 3일 후부터 증식이 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 8).

Table 6. 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 7. 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 8. 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.

3. 고 찰

스쿠티카충의 형태 및 발생학적 특성을 규명하기 위해 silver impregnation 또는 protargol 방법을 이용하고 있는데 분리된 스쿠티카충은 형태적으로 Dragesco 등(1995)의 *Philasterides dicentrarchi*와 충체의 크기와 섬모열수, 소막의 길이, 수축포 위치 등 형태적 특징이 일치하였다. 또한 유럽에서 양식되는 터봇에 감염되는 *P. dicentrarchi* (Iglesias et al., 2001, Iglesias et al., 2001)와 감염증상이나 병원성 등이 일치하여 이 종으로 동정하였다.

이외에도 Thomson and Moewus(1964), Song 등(2000)이 분류한 *M. avidus* 와도 형태적 특징이 일치하였는데, 일부 중에서는 phenetic adaptation에 의한 유사한 형태학적 특징을 보여 재해석 또는 junior synonym과 같은 계통분류학적 분류키의 혼선을 일으키고 있다(Chen and Song, 2002; Shang et al., 2003). 이런 이유로 ribosome의 구성원의 하나로 진화학상으로 높은 염기서열 보존성과 상대적으로 짧은 서열을 갖고 있는 SSU rRNA 서열을 분석하여 모호한 분류체계에 의한 섬모충 사이의 동정 및 비교를 위해 광범위하게 이용되고 있다. 본 연구에서 분리된 스쿠티카충에 대한 형태적 분석과 더불어 SSU rRNA 서열 분석결과, Kim 등(2004)이 넙치에서 분리한 *P. dicentrarchi*와 Jung 등(2005)이 넙치에서 분리한 *M. avidus*와 일치하였다. 또한 Song and Wilbert (2000)와 Paramá 등(2006)의 보고에서도 형태적, 유전적 분석결과 두 종이 동일종으로 보고한 바 있어 앞으로 이들에 대한 분류체계가 정립되어야 할 것으로 보인다.

스쿠티카충은 유기물을 이용하여 증식하는 사실은 잘 알려져 있는데, 특히 종묘생산 과정이나 육상 넙치양식장의 저면에서 유기물을 이용하여 증식한다(추, 1988; Jin et al., 2003b). 수조 저면의 유기물은 양식어류의 배설물도 있겠지만 사료찌꺼기가 주로 침적되며, 특히 치어기에는 사료 섞이 후 잔량이 바닥에 많이 침적되고 이를 이용하여 충이 증식하는 것으로 추정되어 배합사료를 이용하여 생육실험을 하였다. 또한 종묘생산장의 로티퍼 사체에도 스쿠티

카충이 생육하는 경우가 관찰되고, 스쿠티카충이 양식넙치 치어의 뇌에 침투하는 경우가 많아 로티퍼와 뇌조직을 먹이로 생육실험을 하였다. 이외에도 기존에 배양법으로 알려진 세균과 세포주를 이용한 실험도 병행하였다. 그 결과 세포주, 세균, 뇌조직, 로티퍼, 배합사료 모두 스쿠티카 생육에 적합한 것으로 나타났다. 종묘 생산과정에서 자·치어의 먹이인 로티퍼와 배합사료를 이용하여 스쿠티카충이 활발히 증식하는 것은 그만큼 치어기에 스쿠티카충에 감염될 기회가 많다는 것을 시사해 주고 있다. Iglesias et al. (2001)은 스쿠티카충이 세균, 미세조류, 원생동물 등을 섭이한다고 하였으며, Crosbie and Munday (1999)는 bluefin tuna에 감염되는 스쿠티카섬모충, *Uronema nigricans*를 비브리오균을 먹이로 하여 최고 8.8×10^4 cell ml⁻¹ 밀도까지 배양하여 본 연구와 비슷한 결과를 보였는데, 먹이 균 농도가 10^8 cell ml⁻¹ 이상일 경우 활발히 증식하는 것으로 보인다. 균을 먹이로 한 배양시 배양액에 첨가하는 배지의 양에 따라서 균의 증식량이 달라지며 스쿠티카충의 배양도 달라지는데 BHI 배지나 peptone 등 세균배양 배지를 대략 0.1% 전후로 첨가할 경우 먹이 세균이 증식하는 양과 충이 균형을 이루며 지수증식이 가능한 것으로 판단된다. Yoshinaga and Nakazoe (1997)는 스쿠티카충 배양시 진탕배양보다는 정체배양이, 밝은 조건보다는 어두운 조건에서 배양이 잘된다는 연구결과를 바탕으로 본 실험에서는 빛이 없는 어두운 곳에서 정체배양을 하였다.

Crosbie and Munday (1999)는 Southern bluefin tuna, *Thunnus macoyii*에 감염되는 *Uronema nigricans*의 성장범위가 수온 10~25℃, 염분농도 15~35 ppt로 보고했다. 비슷한 결과로서 Cheung 등(1980)은 수족관내 해산 관상어에 감염되는 *U. marinum*이 염분농도 21~31 ppt, 수온 8~28℃ 범위에서 나타난다고 보고하였다. Jee 등(2000)은 넙치에 감염되는 *U. marinum*의 증식범위가 6~30℃로 보고하였는데 *P. dicentrarchi*는 *U. marinum*에 비해 증식범위는 비슷하나 염분농도는 광염성인 것으로 보인다. Iglesias 등(2003)의 실험에서는 양식 터벗에서 분리한 *P. dicentrarchi* 배양실험에서 pH 7.2, 수온 18~23℃, 염분농도 10 ppt에서 양호하게 배양되었다. 본 연구에서도 10~25℃ 범위에서

활발히 증식이 이루어져 비슷한 결과를 나타내었으며, 염분농도와 pH에서도 Iglesias 등의 실험결과와 비슷하였다. 또한 Lee 등(1997)은 제주지역의 양식넙치에서 분리한 스쿠티카충이 20~25℃ 범위에서 배양이 잘된다고 하였는데 대체로 본 연구의 배양 적수온과 일치하였다. 전반적으로 광염, 광온성으로 환경에 대한 적응력이 매우 높았으며, 염분농도는 저염분에, 온도는 고온에 잘 적응하는 특성을 보였다. *P. dicentrarchi*가 이와 같이 환경에 대한 적응력이 높고 유기물을 이용하여 쉽게 증식되므로 양식어류에 쉽게 감염될 뿐만 아니라 치료가 어려운 것으로 사료된다.



IV. 병 원 성

1. 재료 및 방법

1) 실험 방법

*Philasterides dicentrarchi*를 넙치 치어에 인위 감염시킨 후 시간 경과에 따른 감염률과 폐사율을 조사하였다. 감염률과 폐사율 실험구에서 각각 3 cm 그룹과 5 cm 그룹의 실험구로 구분하여 총 4개의 실험구로 구분하였다. 각각의 실험구와 동일한 조건에서 충을 접종하지 않은 대조구를 설정하여 실험구와 비교하였다.

2) 스쿠티카충

제주도 북제주군 지역 육장양식장에서 양식중인 넙치 치어(14 cm)의 뇌에서 분리 후 *P. dicentrarchi*로 동정된 충을 대량 배양시켜 각 실험구의 넙치 치어에 인위감염 시켰다.

3) 실험어

인위감염 실험어는 제주도 북제주군 구좌읍 지역의 종묘생산장에서 생산된 넙치 종묘로서 스쿠티카충이나 기타 질병에 감염되지 않은 건강한 치어를 이용하였다. 이들 실험어는 3 cm 그룹(전장 평균: 3.2 cm, 범위: 2.7~3.6 cm)과 5 cm 그룹(전장 평균: 5.4 cm, 범위: 4.5~6.4 cm)으로 나누어 실내사육수조에 수용하여 인위적으로 접종시킨 스쿠티카충이 감염되도록 하였다.

실험어의 크기 측정은 실험어를 직접 측정할 경우 측정에 따른 스트레스로 실험 결과에 영향을 줄 우려가 있어 실험어와 같은 그룹의 다른 치어 20 마리를 무작위 추출 후 측정하였다.

4) 실험 수조

인위감염 실험 수조는 Fig. 7과 같이 43 cm × 63 cm × 25 cm 의 4각 수조를 인위 감염 사육조와 여과조로 나누었다. 사육조는 43 cm × 43 cm × 25 cm, 여과조는 43 cm × 20 cm × 25 cm 이며 수심은 20 cm로 하였다. 사육조 수량은 37 L, 여과조를 포함한 총 수량은 50 L이며 사육수는 지하해수를 80℃에서 20분 동안 가열하여 살균·살충 후 이용하였다. 순환여과재는 상층은 \varnothing 6~8 mm, 저층은 \varnothing 4~6 mm의 가는 자갈을 이용했으며 여과조 위 층은 스폰지를 덮어 사육조에서 lifting된 사육수가 여과조 전면에 분산된 후 물리적, 생물학적 여과가 이루어지도록 했다. 사육수의 순환은 air lifter를 이용하여 시간당 1.5 회 자체순환 시켰으며, 2일 마다 10%씩 새로운 사육수로 교환 및 증발량을 보충해 주었다. 실험기간 중 실험수조 수온은 환경의 변화를 줄이기 위해 종묘생산 수온보다 낮은 15℃(±1.5℃)로 설정하였다.

실험어 수용량은 종묘배양장에서 동일 수면적에 수용하는 양을 기준하여 5 cm 그룹은 1/2에 해당하는 100 마리를, 3 cm 그룹은 저항력이 약한 점을 고려하여 1/3에 해당하는 160 마리를 각각 수용하였다.

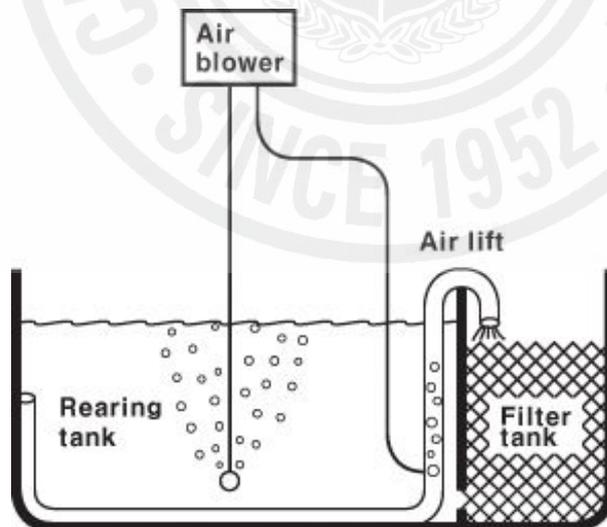


Fig. 7. Schematic diagram of experimental tank.

5) 스키테카충 배양 및 접종

인위감염을 위한 *P. dicentrarchi*의 배양은 종묘생산장의 사육수조 저면과 비슷한 환경에서 배양한 후 접종하였다. 배지는 25 ml cell culture flask (Nunc, Denmark)에 멸균해수 20 ml를 채우고 “제3장 생물학적 특성”의 배양시 이용했던 넙치 치어사료(\varnothing 0.5~0.6 mm, Table 1)를 충의 먹이로 배양해수 ml당 1 mg을 첨가하였다. 또한 배양중 세균의 증식을 억제하기 위해 배지에 항생제 penicillin (Gibco, USA) 100 IU와 streptomycin (Gibco, USA)을 100 μ g/ml 농도로 첨가하였다. 스키테카충의 접종은 CHSE-214 세포주에 순수 배양된 충을 배양액에 3.0×10^3 cell ml⁻¹ 농도로 접종 후 15°C에서 7일 동안 9.8×10^4 cell ml⁻¹ 농도로 증식시켜 접종하였다.

접종 및 실험어 방양은 먼저 실험수조에 사육해수를 채우고 5일 동안 순환여과시키며 여과세균을 배양시켰다. 다음에 수조 저면에 섬모충의 먹이로 *in vitro* 배양시 이용했던 넙치 치어 배합사료를 실험구당 2 g을 마쇄하여 살포하였다. 살포한 충의 먹이가 저면에 충분히 가라앉은 후 충을 접종하였는데, 접종량은 사육수 ml당 100 cell 기준하여 실험구별 총 3.7×10^6 cell을 접종하였다. 대조구에는 스키테카충을 배양하지 않은 배지를 동일량 살포하였다. 스키테카충 접종 2일 후 스키테카충이 저면에서 증식을 확인한 후 실험어를 방양하여 저면에서 증식된 충이 치어에 감염되도록 하였다. 실험기간 중 넙치 치어 배합사료를 2일 마다 수조당 0.2 g씩 분쇄하여 투여해서 충이 저면에서 지속적으로 생육할 수 있도록 하였다.

6) 스키테카충 계수

스키테카충의 계수는 “제3장 생물학적 특성”의 계수방법과 같은 방법으로 실시하였다.

7) 감염률 조사

감염률 조사는 4일 간격으로 구간을 나누어 구간별마다 무작위로 10 마리씩 추출하여 현미경으로 피부, 지느러미, 아가미 등 조직 일부를 절취하여 감염여

부를 조사하였다. 또한 폐사한 개체에 대해서도 감염여부를 모두 확인하여 구간별로 생존어의 감염률과 폐사어의 감염어수를 합하여 구간별 총 감염어수를 환산하고 구간 총감염률(구간별 총감염어수/구간시작 생존어수)을 구하였다. 감염 기준은 스쿠티카충이 피부나 지느러미, 아가미 등의 조직 속에 침투한 경우로 하였으며, 인위감염 후 폐사어는 폐사시마다 전량을, 생존어는 4일 간격으로 무작위로 10 마리씩 추출하고 현미경으로 검경하여 감염여부 및 최초 감염부위 등을 확인하였다. 현미경 검경은 40 배율과 100, 200, 400 배율로 지느러미, 피부, 아가미, 주둥이 등의 최초 감염부위를 검사하였다.

감염어의 조직학적인 관찰은 감염된 치어를 Bouin's 용액에 고정한 다음에 일반적인 조직표본 검사방법에 따라 파라핀에 봉입한 후 5 μm 두께의 조직표본을 만들었다. 다음에 Haematoxylin-Eosin 염색을 하여 현미경으로 감염위치를 확인하였다.

8) 폐사율 조사

폐사율 조사는 매일 폐사되는 개체수를 조사하여 4일 단위로 구간별 폐사량과 구간별 폐사율을 집계하였다. 그리고 각 구간별 폐사량을 합산하여 누적폐사율을 구하였다.

9) 감염 스쿠티카충 재분리 및 유전적 검토

각 실험구별 실험어에 감염된 스쿠티카충이 처음에 접종시킨 충과 동일 충 인지를 확인하기 위해 유전학적 분석을 수행하였다. 먼저 인위 감염어의 뇌를 무균적으로 적출하여 70% ethanol에 30초간 담구어 뇌조직 표면을 멸균한 후 멸균 해수에 5회 세척하였다. 다음에 \varnothing 87 mm petri dish에 멸균해수 20 ml를 채우고 적출한 뇌 조직을 절개하여 뇌 속에 감염된 스쿠티카충과 뇌조직 100 mg을 같이 풀어 넣어 15°C에서 초대 배양하였다. 초대 배양된 스쿠티카충을 CHSE -214에 재접종하고 15°C에서 5일간 배양한 후 동정을 위해 사용한 방법과 동일하게 SSU rRNA 유전자를 PCR 증폭하였다. 분리된 충의 18S rRNA gene에 대한 염기서열 분석결과 얻어진 data를 BLAST program 및

CLUSTAL W 프로그램을 이용하여 분자계통학적 동정을 실시하였으며, 이때 NCBI의 GeBank data-base의 염기서열과 비교하였다.

10) 2차 감염 세균성 질병

인위감염에 의해 폐사된 실험어로부터 2차 감염세균 분리를 위해 스쿠티카충 감염부위와 복강, 간 신장조직을 TSA (Tryptic Soy Agar, Merck, Germany)나 BHIA (Brain Heart Infusion Agar, Merck, Germany)에 도말한 후 25 °C에서 24시간 배양 후 우점한 colony를 순수 분리하였다. 순수 분리된 균주의 동정은 16Sr RNA gene의 염기서열 분석을 통한 분자생물학적 방법을 이용하였다. 분리 배양된 균주를 Extractor genome kit (TOYOBO, Japan)를 이용하여 제조회사의 방법에 따라 total DNA를 분리하였다. 분리된 DNA를 template로 하여 27F (5'-AGAGTTTG ATCCTGGCTCA-3'), 1522R (5'-AAGGAGGTGATCCARCC GCA-3) primer set을 이용하여 PCR반응을 수행하였으며, 이때 PCR 조건은 95°C에서 5분간 변성 후 95°C 1분, 55°C 1분, 72°C 1분의 주기로 33회 반복한 후 최종 72°C에서 10분간 확장하였다. 증폭된 유전자 산물을 TOPO TA Cloning kit (Invitrogen, USA)를 이용하여 제조회사의 방법에 따라 클로닝을 실시한 후 염기서열 분석에 이용하였다. 분석된 염기서열은 NCBI의 GeBank의 Blast search 및 custal W program을 이용하여 동정하였다. 이때 비교균주의 염기서열은 Thompson 등(2004)이 보고한 표준균주의 염기서열을 대상으로 하였다.

2. 결과

1) 감염률

(1) 수조내 *P. dicentrarchi* 증식

시험관에서 배양시킨 *P. dicentrarchi*를 각 실험수조별로 사육수 ml당 1.0×10^2 cell 농도로 접종시킨 직후부터 활발히 증식하였는데, 3 cm 그룹은 접종 후 6일째부터 $1.4 \times 10^3 \sim 2.5 \times 10^3$ cell ml⁻¹ 밀도로, 5 cm 그룹은 $1.7 \times 10^3 \sim 2.5 \times 10^3$ cell ml⁻¹ 밀도로 증식하여 두 실험구 모두 ml당 2,000 cell 내외의 밀도를 유지하였다. 중충인 경우도 실험구별 큰 차이가 없이 ml당 70~193 cell의 낮은 밀도를 유지하였다(Fig. 8). 실험수조에는 스쿠티카충 외에도 몇 종류의 섬모충이 일부 증식하였으나 스쿠티카충 외의 병원성 섬모충은 발견되지 않았다.

(2) 3 cm 그룹

충 접종 후 4일째 실험구의 조사 표본어 10 마리 중 4 마리가 감염되어 40%의 감염률을 보였다. 구간별 감염률은 접종 8일째(2구간)에 57.3%, 12일째(3구간) 70%로 증가하였으며 마지막 구간(24일째)에는 총 감염률이 90.1%로 대부분의 실험어가 감염되었다(Table 9, Fig. 9). 실험어의 폐사는 5일째부터 나타나기 시작했으며 폐사어는 전량 스쿠티카충에 감염된 상태였다. 반면에 대조구에서는 스쿠티카충 감염이 없었으며 실험기간 중 4 마리가 폐사하였다.

(3) 5 cm 그룹

이 그룹은 3 cm 그룹에 비해서 초기 감염률이 현저히 낮았는데 접종 후 4일째(1구간)까지는 감염되지 않았다. 접종 후 8일째(2구간)에 20%의 감염률을 보였으며 폐사어는 접종 후 14일째에 처음으로 나타났다. 접종 후 16일(4구간)까지는 감염율이 42%로 매우 완만하게 진행되었으나 그 이후에는 감염률 및 감염어의 폐사량이 급격히 증가하였으며, 24일째(6구간)에는 구간 감염률이 81%를 달했다(Table 9, Fig. 9). 대조구에서는 스쿠티카충이 감염되지 않았으며, 폐사 개체도 없었다.

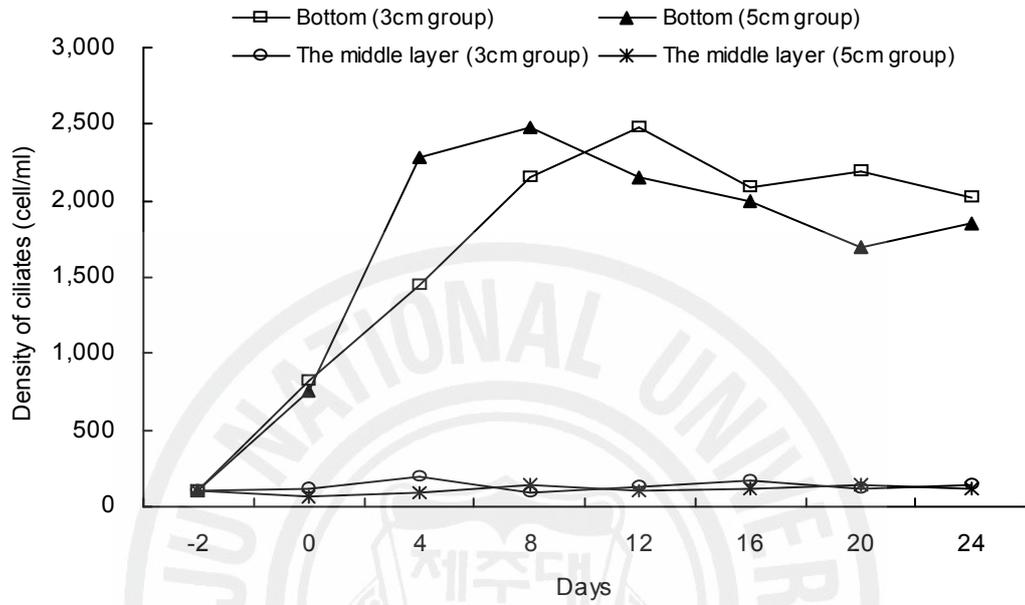


Fig. 8. *P. dicentrarchi* density at the bottom and middle layer of experimental tank according to incubation days.

Table 9. Infection of scuticociliates, *P. dicentrarchi* on the experimental group and control group in flounder according to incubation days

(Unit : individual)

Days after infection of scuticociliates			0	4	8	12	16	20	24	
3 cm group	Experimental	Survival	Infection	-	4	5	6	7	7	5
		fish	Non infection	-	6	5	4	3	3	1
		Death	Infection	-	-	22	35	23	19	5
		fish	Non infection	-	-	-	-	-	-	-
	Control	Survival	Infection	-	-	-	-	-	-	-
		fish	Non infection	10	10	10	10	10	10	10
		Death	Infection	-	-	-	-	-	-	-
		fish	Non infection	-	-	-	-	1	2	1
5 cm group	Experimental	Survival	Infection	-	-	2	2	4	5	7
		fish	Non infection	-	10	8	8	6	5	3
		Death	Infection	-	-	-	-	3	26	6
		fish	Non infection	-	-	-	-	-	-	-
	Control	Survival	Infection	-	-	-	-	-	-	-
		fish	Non infection	10	10	10	10	10	10	10
		Death	Infection	-	-	-	-	-	-	-
		fish	Non infection	-	-	-	-	-	-	-

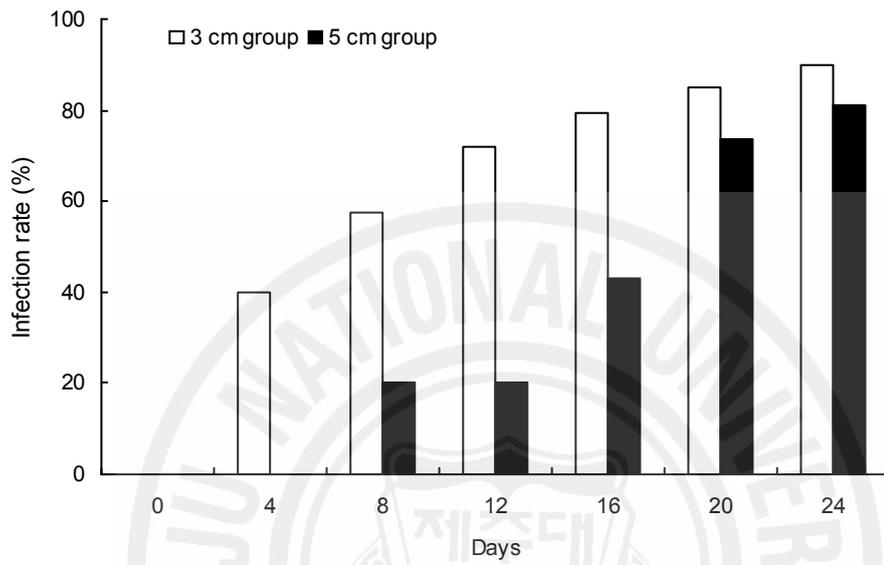


Fig. 9. Infection rates of scuticociliates, *P. dicentrarchi* of the 3 cm and 5 cm groups fish by section.

(4) 감염 상태

*P. dicentrarchi*의 감염은 3 cm 그룹이 5 cm 그룹에 비해 빠르게 이루어졌으나 감염과정은 비슷한 양상을 보였다. 감염어의 외부증상은 3 cm 그룹인 경우 체색흑화 외에 특별한 증상이 나타나지 않았으며, 육안으로 피부나 지느러미 궤양증상이 나타나기 전에 폐사하였다(Fig. 10). 그러나 조직학적 관찰결과 피부나 조직의 괴사가 확인되었다. 5 cm 그룹은 체색흑화 외에도 피부궤양이나 지느러미 궤양 등의 외부 증상을 나타내는 개체가 많았다(Fig. 11). 최초 감염은 주로 지느러미에 감염되어 지느러미 조직을 괴사시켰으며 뇌에도 침투하였다(Fig. 12). 이외에도 근육 조직과 아가미, 복강 등에도 침투하였다(Fig. 13).



Fig. 10. External features of the 3 cm group fish infected with *P. dicentrarchi* after experimental infection.



Fig. 11. External features of flounder of 5 cm group fish infected with *P. dicentrarchi* after experimental infection, (A) skin tissue lesion, (B) caudal fin tissue lesion (arrow).

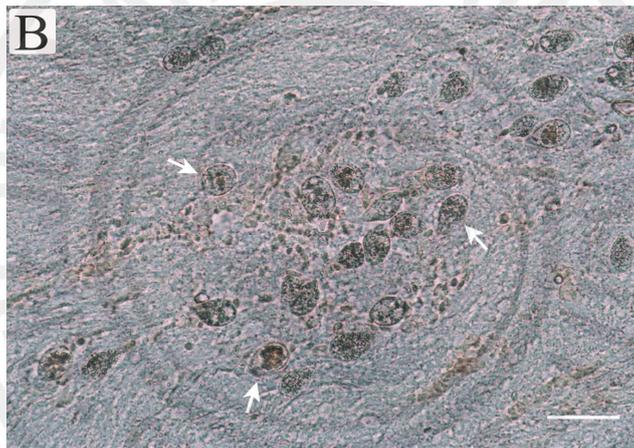
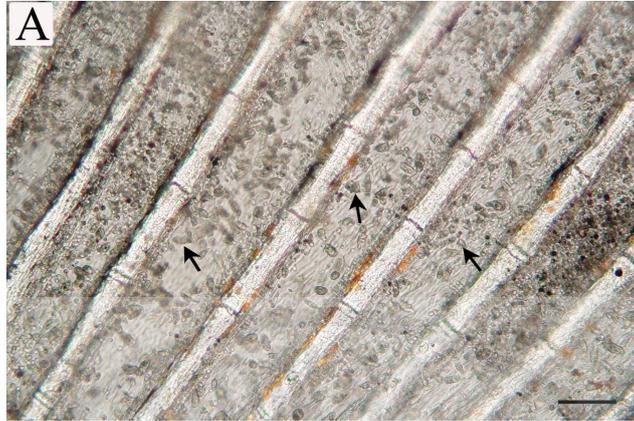


Fig. 12. Photograph of *P. dicentrarchi* (arrows) infiltrated into the dorsal fin (A) and brain (B) in flounder. Scale bar= 100 μm .

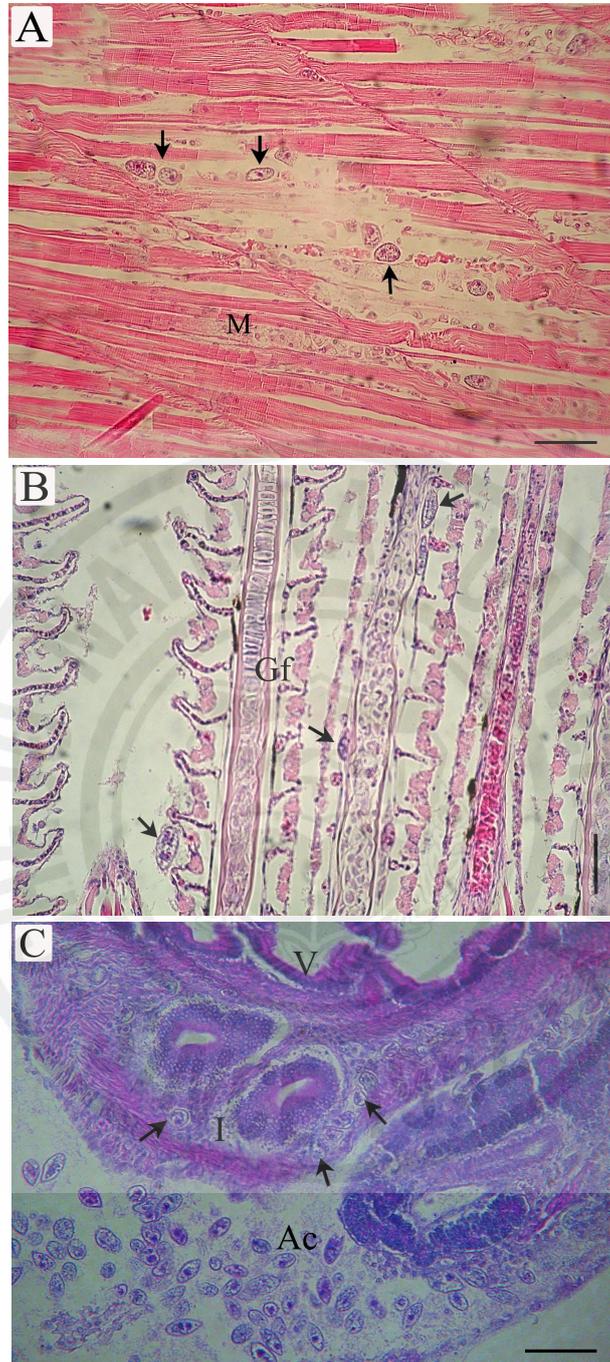


Fig. 13. Light micrograph of the muscle (A), gill (B) and abdominal cavity (C) in the infected flounder showing *P. dicentrarchi* (arrows), Ac: abdominal cavity, Gf: gill filament, Iw: intestine wall, M: muscle, V: villus. HE stain. Scale bar= 50 μ m.

2) 폐사율

(1) 수조내 *P. dicentrarchi* 증식

폐사율 실험구의 *P. dicentrarchi* 접종 후 저면의 생육상태는 감염률 실험구의 생육 상태와 비슷한 양상을 보였다. 총 접종 후 2일이 경과하여 실험어를 방양할 때의 수조 저면 총 밀도는 $6.3 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^3$ cell ml⁻¹ 범위로 실험구별 큰 차이가 없었으며, 총 접종 후 6일째(2구간)부터는 $1.4 \times 10^3 \sim 2.5 \times 10^3$ cell ml⁻¹ 범위로 ml당 2,000 cell 내외의 밀도를 유지하였다. 반면에 증충인 경우는 ml당 100~200 cell 내외로 매우 낮은 밀도였으며(Fig. 14), 대조구에서는 스쿠티카충이 없었다. 모든 수조에서 몇 종류의 섬모충이 발견되었으나 병원성 섬모충은 없었다.

(2) 3 cm 그룹

3 cm 그룹의 *P. dicentrarchi* 감염에 의한 폐사는 치명적이었다. 접종 후 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. 접종 후 28일 만에 폐사율이 95.6%로 대부분이 폐사하였으며, 폐사체에는 전량 스쿠티카충이 감염된 상태였다. 접종 후 14일 째에 폐사어에서 충이 뇌까지 침투한 것이 확인되었다(Fig. 15). 대조구에서는 28일간의 실험기간중 4.4%의 폐사율을 보였으나 스쿠티카충의 감염은 없었다.

(3) 5 cm 그룹

5 cm 그룹인 경우는 3 cm 그룹에 비해서 폐사율이 현저히 낮았는데 실험구에 총 접종 후 16일(4구간)까지는 폐사 개체가 없었으나 5구간(17~20일)부터 폐사되기 시작했다. 그러나 폐사율은 3 cm 그룹에 비해 완만하게 상승하였으며 3 cm 그룹이 대부분 폐사된 28일(4구간)째에는 71%가 폐사되어 3 cm 그룹에 비해 폐사율이 현저히 낮았다(Fig. 16). 대조구에서는 실험기간 동안 폐사체가 없었으며 스쿠티카충의 감염도 없었다.

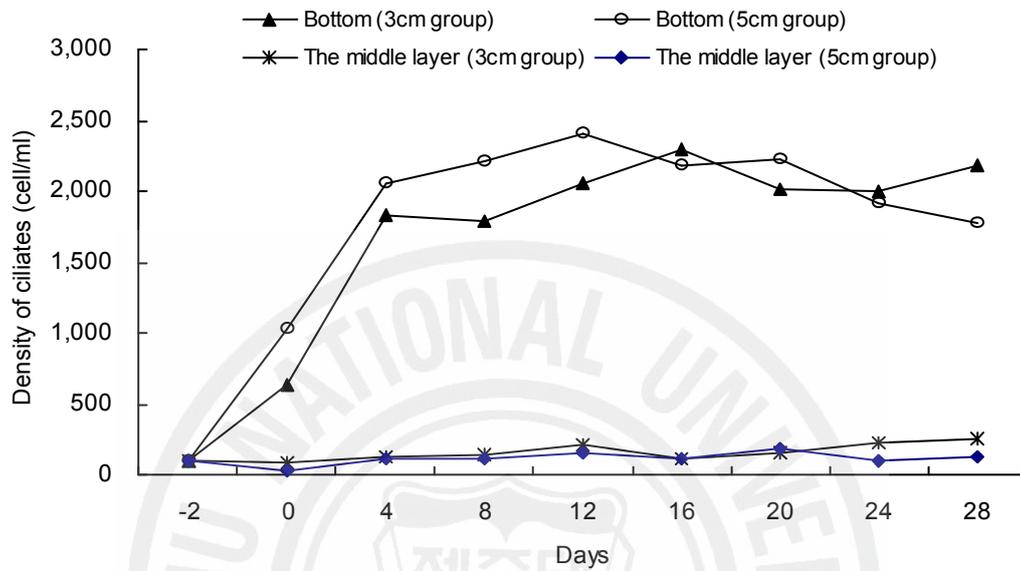


Fig. 14. Ciliate density at the bottom and middle layer of experimental tank according to incubation days.

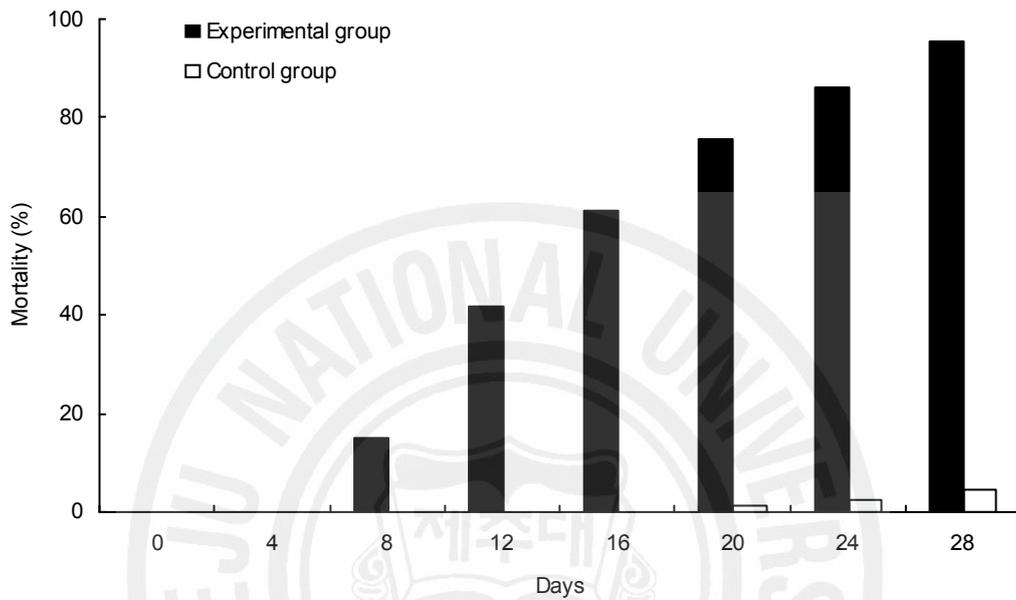


Fig. 15. Accumulative mortality on experimental infection and control groups of 3 cm flounder by *P. dicentrarchi*.

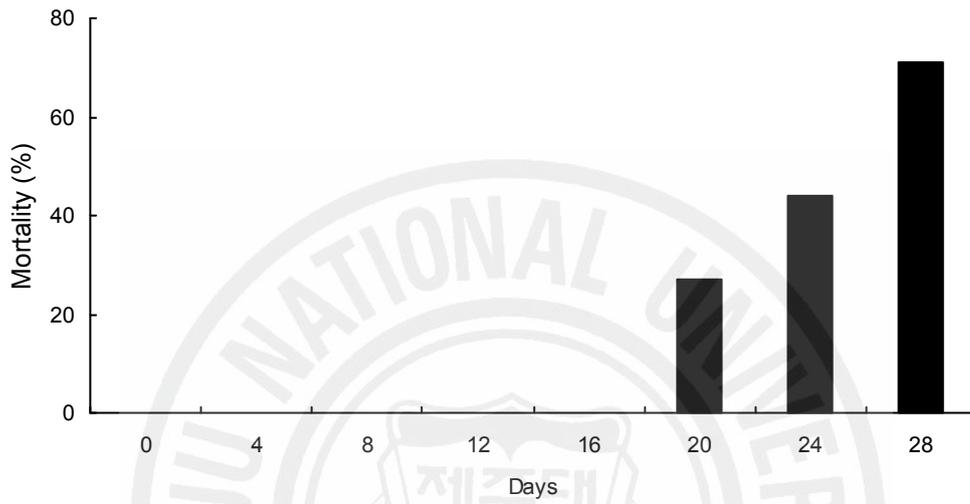


Fig. 16. Accumulative mortality on experimental infection of 5 cm flounder by *P. dicentrarchi*.

3) 감염 스쿠리카충 재분리 및 유전적 검토

각 실험구별로 인위 감염된 실험어의 뇌에서 재분리된 스쿠리카충의 genomic DNA를 분리한 후 18S rRNA를 증폭하였다. 그 결과 3 cm와 5 cm 그룹 모두 약 1760 bp가 증폭되었다. 각 그룹에서 분석된 18S rRNA 서열을 이전의 분석 결과와 비교한 결과, 5 cm 그룹은 100%, 3 cm 그룹은 99.94%의 염기서열 상동성을 보여 재분리된 스쿠리카충이 초기 접종한 *P. dicentrarchi*와 동일한 종임을 확인하였다(Table 10, Fig. 17).



Table 10. Levels of 18S rRNA sequence similarity for inoculated strain and re-isolated strains after artificial infection, and representatives of some related taxa

	% Similarity												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1. Inoculated strain	-	99.9	100	100	100	95.6	94.8	94.4	94.4	94	94.3	93.3	87.3
2. Re-isolated strain 1	0.0006	-	99.9	99.9	99.9	95.5	94.7	94.4	94.3	93.9	94.2	93.2	87.2
3. Re-isolated strain 2	0.0000	0.0006	-	100	100	95.6	94.8	94.4	94.4	94	94.3	93.3	87.3
4. AY550080	0.0000	0.0006	0.0000	-	100	95.6	94.8	94.4	94.4	94	94.3	93.3	87.3
5. AY642280	0.0000	0.0006	0.0000	0.0000	-	95.6	94.8	94.4	94.4	94	94.3	93.4	87.3
6. U51554	0.0445	0.0451	0.0445	0.0445	0.0445	-	95.4	95.3	95	94.7	95	94	86.7
7. AY212807	0.0520	0.0526	0.0520	0.0520	0.0520	0.0456	-	98.9	98.8	98.2	95.4	93.8	87.4
8. AY541688	0.0557	0.0563	0.0557	0.0557	0.0557	0.0469	0.0110	-	99.2	99	95.1	93.4	87.4
9. AY541685	0.0564	0.0570	0.0564	0.0564	0.0564	0.0500	0.0121	0.0081	-	98.6	94.8	93.5	97.2
10. AY541686	0.0601	0.0607	0.0600	0.0600	0.0601	0.0530	0.0180	0.0098	0.0145	-	94.6	93.2	86.9
11. AF527756	0.0570	0.0576	0.0569	0.0569	0.0570	0.0501	0.0457	0.0487	0.0525	0.0537	-	93	87.6
12. AY103189	0.0670	0.0676	0.0670	0.0670	0.0664	0.0600	0.0624	0.0654	0.0649	0.0685	0.0700	-	86.4
13. U97111	0.1272	0.1279	0.1272	0.1272	0.1272	0.1326	0.1265	0.1265	0.1279	0.1306	0.1240	0.1358	-

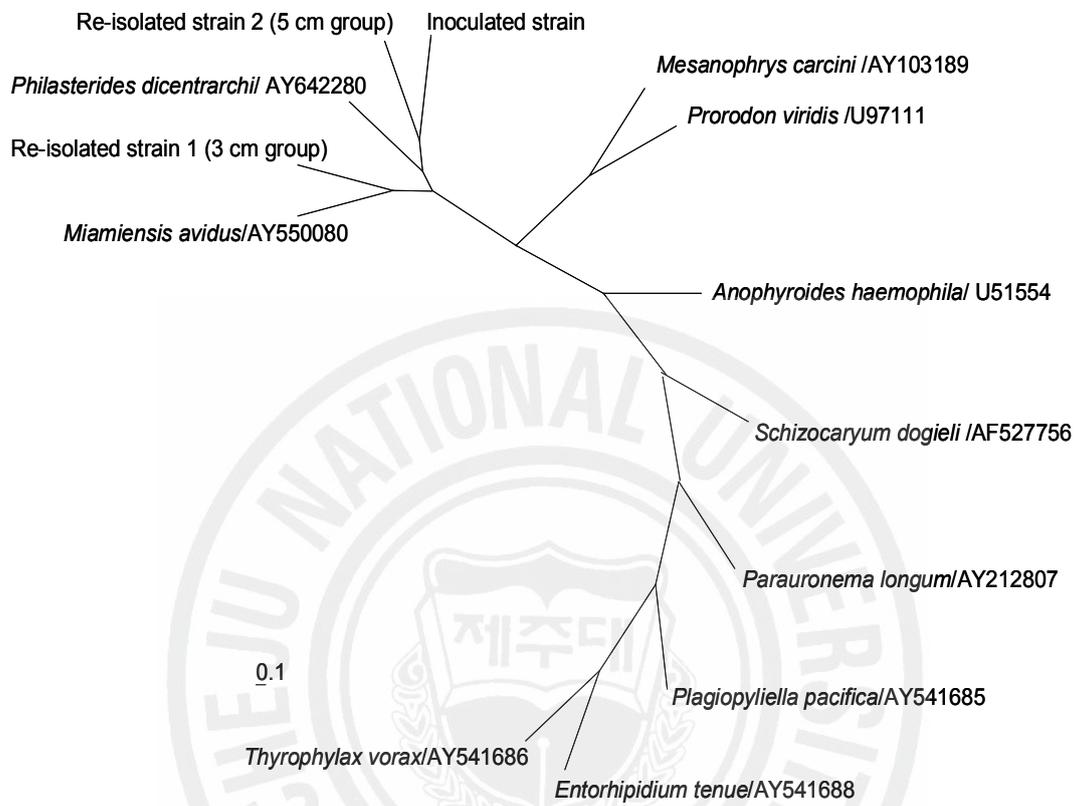


Fig. 17. Phylogenetic tree based on 18S rRNA gene sequences showing the positions of inoculated strain and re-isolated strains after artificial infection and the representatives of some other related taxa. Scale bar represents 0.1 substitution per nucleotide position.

4) 2차 감염 세균성 질병

인위 감염에 의해 폐사된 치어에서 분리된 세균 4균주(JIN01, JIN02, JIN03, JIN04)에 대한 16S rRNA 분석을 통한 동정 결과 각각 *Vibrio chagasii* LMG 2135(Accession NO. AJ316199)와 99.9%, *Vibrio pomeroyi* LMG 20537(Accession NO. AJ491290)와 99.6%, *Vibrio tasmaniensis* LMG 20012(Accession NO. AJ316192)와 99.6%, *Vibrio ichthyenteri* LMG 19664(Accession NO. AJ437192)와 99.6%의 상동성을 나타내었다. 따라서 혼합 감염된 비브리오균은 각각 *V. chagasii*, *V. pomeroyi*, *V. tasmaniensis*, *V. ichthyenteri*로 동정되었다(Fig. 18).



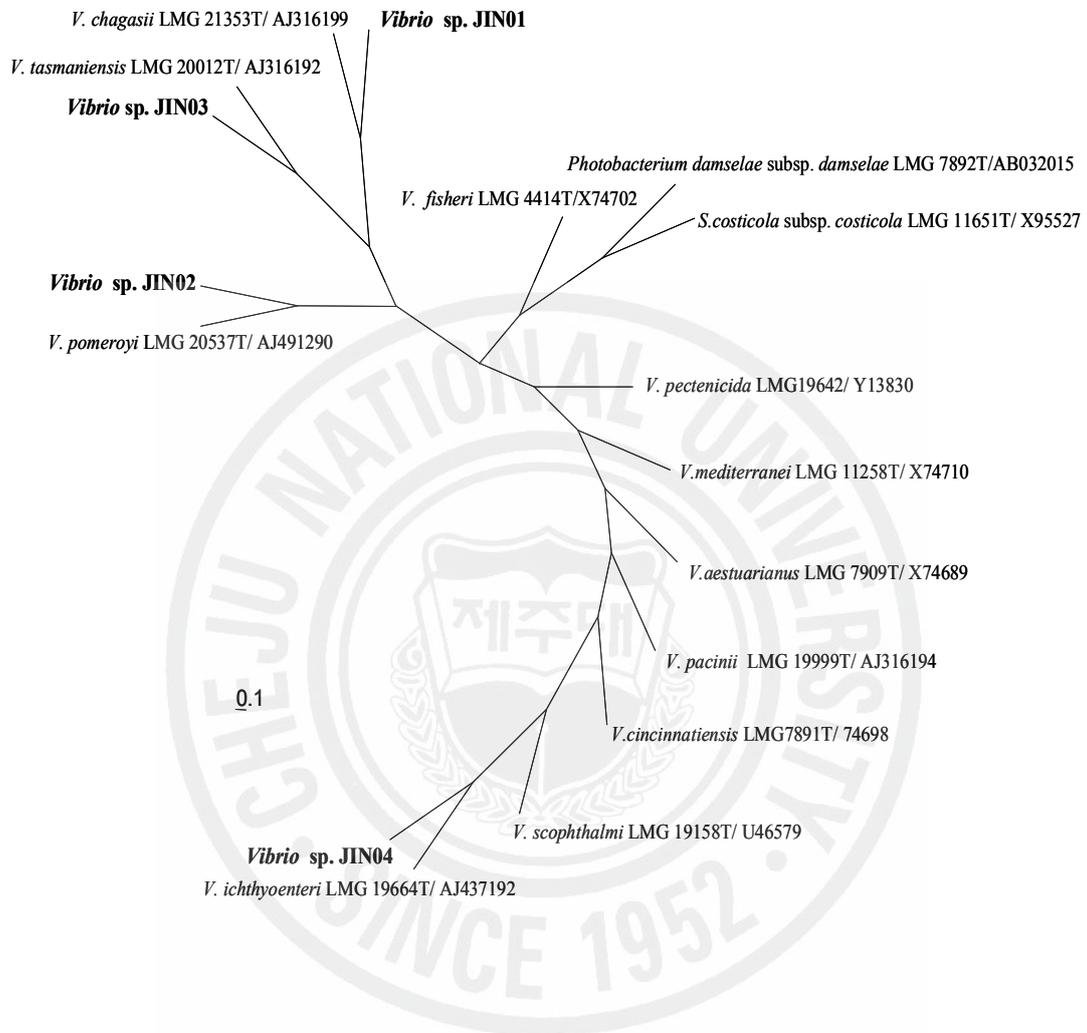


Fig. 18. A strict consensus tree based on 16S rDNA sequences comparing isolated strain with type strains.

3. 고찰

*P. dicentrarchi*의 실험수조내 생육상황은 접종 6일 후 저면에서는 사육수 ml당 2,000 cell 내외로 증식하였으나 중층에는 ml당 300 cell 미만의 낮은 밀도를 유지하여 저면의 유기물이 중요한 요소임을 알 수 있었다. Choi 등(1997)은 넙치양식 수조에서 스쿠티카충의 밀도가 저면은 최고 7.3×10^2 cell ml⁻¹, 중층은 최고 ml당 4.1 cell로 보고하였는데 본 실험의 인위감염을 위한 층 배양과 비슷한 양상을 보였다. 수조 저면에는 여러 가지 유기물이 침적되어 스쿠티카충 생육에 적합한 환경이며, 이중에서도 넙치 치어의 초기사료가 스쿠티카충 번식에 중요한 요인으로 사료된다.

스쿠티카충 접종 후의 감염률은 3 cm 그룹인 경우 실험 시작 4일 만에 40%가 감염되었는데, 감염어는 미감염어에 비해 특별히 건강이 나쁘거나 개체 크기 등에 차이가 없는 것으로 보아 치어기에는 수조 저면에서 스쿠티카충과 접촉이 이루어지면 쉽게 어체 조직으로 침투가 가능한 것으로 보인다. Mizuno (1993)는 넙치에 기생하는 스쿠티카충은 뇌 속까지 침투하므로 치료에 어려움이 많다고 하였으며, 넙치의 장이나 간장, 비장, 신장, 생식소 등의 내부기관까지 침투하여 세포들을 변성 또는 괴사 시킨다(Lee et al., 2001; Jin et al., 2003b). 또한 넙치 외에도 육상수조에서 양식하는 자주복의 아가미와 뇌, 신장, 비장 등의 주요 장기에 침투하는 것으로 보고된바 있다(Kang et al., 2005a). 본 연구에서도 주로 지느러미와 주둥이 부분을 통해서 체내로 감염되었으며, 근육과 아가미, 복강, 척수, 안구, 뇌 등 내부 장기에 침투하여 위의 연구와 비슷한 감염상태를 보여 양식넙치의 체내에 침투하는 스쿠티카충이 *P. dicentrarchi*인 경우가 많을 것으로 추정된다. 이와 같이 *P. dicentrarchi*가 어체내에 침투하여 피해를 입히므로 내부기생충으로 정의하기도 한다(Iglesias et al., 2003). 유럽의 육상양식장에서 양식하는 터봇에 *P. dicentrarchi*가 감염될 경우 안구, 뇌, 내부장기 등에 침투하여 치명적인 피해를 입히며, 일부 수조에서는 양식중인 터봇을 전량 폐사시킬 정도로 병원성이 높다(Iglesias et al., 2001). Paramá 등(2003)이 터봇의 *P. dicentrarchi* 인위감염 시험결과 비장, 구강, 아가미, 근육,

뇌 등에 감염되어 터봇의 감염부위도 본 연구의 넙치와 비슷하였는데, 이는 터봇이나 넙치에 이 충이 침투하는 메커니즘이 비슷하기 때문인 것으로 사료된다. 실제로 양식현장에서 넙치에 감염된 스쿠티카충을 검사해보면 대부분 형태적으로 *P. dicentrarchi*의 특징을 보이고 있으며, 본 연구의 *P. dicentrarchi*의 체내 침투능력을 감안하면 터봇뿐만 아니라 넙치나 자주복 등에 이 충이 심각한 피해를 입히고 있음을 시사하는 것으로 보인다.

본 실험에서 3 cm 그룹과 5 cm 그룹의 실험구가 동일한 환경조건이라고 할 수는 없으나 비슷한 조건에서 인위감염에 의한 폐사율도 감염율과 마찬가지로 3 cm 그룹이 5 cm 그룹에 비해 현저히 높았다. 이는 넙치의 크기가 작을수록 저항력이 약하여 충이 쉽게 침투하고 폐사가 이루어지는 것으로 판단된다. Jin 등(2003a)의 보고에서도 스쿠티카충이 7 cm 이하의 양식넙치 치어에 감염된 경우 평균 53.8 %의 폐사율을 보였으나 7 cm 이상 크기에 감염된 경우는 13.2 %의 폐사율을 보여 어체가 성장할수록 스쿠티카충에 대한 저항력이 높아진다고 하였다. 두 실험 그룹의 감염어 외부증상도 뚜렷한 차이를 보였는데 3 cm 그룹인 경우 스쿠티카충이 조직 속에 침투하더라도 체색이 검어지는 증상 외에는 특별한 외부 증상이 나타나기 전에 폐사하였다. 그러나 5 cm 그룹인 경우 충 감염 후 근육 조직에 침투하여 궤양이 상당히 진행된 후 폐사하는 개체도 상당수 있었다. 이와 같은 결과는 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. 5 cm 그룹의 대조구는 실험기간 동안 폐사어가 없었으나 3 cm 그룹은 대조구에서도 4.4%의 폐사율을 보였는데 통상적인 감도로 사료된다.

두 실험그룹과 대조구의 폐사어 내부장기와 궤양부위에서 4종의 *Vibrio* 균이 검출되었는데, 16S rRNA 분석 결과 Thompson 등(2004)이 보고한 표준균주의 *V. chagasii*, *V. pomeroyi*, *V. tasmaniensis*, *V. ichthyoenteri* 등과 일치하였다. 비브리오 균은 일반적으로 스쿠티카충과 같은 기생충 감염 후 2차 감염되는 경우가 많으며 넙치의 자어에서 성어까지 감염된다(Lee et al., 2001; 田, 2005). *V. ichthyoenteri*는 치어기 질병으로 알려져 있으나(田, 2005) 나며

지 3 종의 비브리오균의 병원성에 대한 연구도 필요한 것으로 보인다.

현재 Scuticociliatida에 속하는 섬모충의 18S rRNA에 대한 partial 또는 complete 서열이 활발히 결정되고 있으며(Shang et al., 2003; Kim et al., 2004a, 2004b; Jung et al., 2005), 본 연구에서도 동일종에 의한 감염 유무를 확인하기 위하여 rRNA 유전자를 이용하여 수행하였다. 그 결과 접종시킨 *P. dicentrarchi*와 감염된 스쿠티카충이 동일종임을 확인할 수 있었다. 5 cm 그룹은 접종시킨 *P. dicentrarchi*와 재분리된 충의 염기서열이 100% 일치하였으나 3 cm 그룹인 경우 재분리된 충이 접종시킨 *P. dicentrarchi*와 99.94%의 상동성을 보였다. 이와 같이 염기서열이 0.06% 상이한 것은 염기서열 결정시의 sequencing error에 의한 결과로 판단된다.



V. 어체내 침투경로

1. 재료 및 방법

1) 조사 방법

감염률 및 폐사율 실험구에서 *P. dicentrarchi*를 인위 감염시킨 3 cm, 5 cm 그룹의 실험어를 대상으로 폐사어는 폐사 직후 전량을, 생존어는 4일 간격으로 무작위로 추출한 10 마리를 현미경 검경과 조직학적 관찰을 통하여 감염 경로를 확인하였다.

2) 외부감염 관찰

인위 감염시킨 감염어의 지느러미, 피부, 아가미, 주둥이 등 주로 감염되는 부위를 확인하였는데, 1차 체표 감염상태를 현미경 40, 100 배율로 관찰하였으며, 감염이 확인된 부위의 조직을 절취하여 일반적인 기생충 검사방법에 따라 현미경(Olympus, BX 50, Japan) 100, 200, 400 배율로 관찰하였다.

3) 내부감염 관찰

1차 현미경 검경을 통해서 감염이 확인된 감염어에 대한 조직학적인 관찰을 통하여 조직이나 기관내에 감염된 위치를 파악하였다. 1차 외부감염이 확인된 실험어 가운데 3 cm 그룹은 감염어 전체를, 5 cm 그룹은 주 감염 부위를 절단하여 Bouin's 용액에 고정한 후 일반적인 조직표본 검사방법에 따라 파라핀에 봉입한 후 5 μ m 두께의 조직표본을 만들었다. 다음에 조직표본을 Haematoxylin-Eosin 염색 후 현미경(Zeiss, Axioscope 2 plus, Germany) 100, 200, 400 배율로 감염위치를 확인하였다. 촬영은 디지털 카메라 Cyber-shot 5.0 (Sony, Japan)으로 하였다.

4) 어체내 침투경로 확인

침투경로 파악은 현미경 관찰과 조직학적인 관찰을 통하여 스쿠티카층의 감염과 이동, 분포상태를 관찰한 후 분포 위치와 상태에 따라 확산 또는 이동하는 방향을 파악하였다. 감염어의 각 부위와 기관의 명칭은 金(1989)에 따랐다.

2. 결 과

1) 꼬리지느러미를 통한 침투

*P. dicentrarchi*의 최초감염은 주로 지느러미 막이나 모세혈관, 주둥이 피부 등 부드러운 체표 조직에 감염된 후 체내로 침투하였다.

꼬리지느러미를 통한 감염과정은 꼬리지느러미 막이나 지느러미 연조를 따라 분포하는 모세혈관에 최초로 침투한 후 모세혈관 내에서 빠르게 이동하였으며(Fig. 19-A·B), 시간이 경과함에 따라 지느러미 조직을 괴사시켰다(Fig. 19-C). 꼬리지느러미 모세혈관이나 지느러미 막에 침투한 충은 미병부로 이행되었으며(Fig. 19-D), 미골과 평행으로 분포하는 근조직을 따라 척추에 도달하였다(Fig. 20-A·B). 척추에 도달한 충은 신경궁문에 침투하여 척수와 척추사이 또는 척수의 피하조직에 침투하여 뇌로 이행되었다(Fig. 20-C·D, Fig. 21-A·B). 뇌에 도달한 충은 뇌에서 다량 증식하였으며 감염어는 폐사되었다.(Fig. 21-C), 스쿠티카충이 꼬리지느러미를 통하여 뇌에 도달한 후 폐사된 감염어는 꼬리지느러미 괴사와 체색흑화 등의 외부증상을 보였다(Fig. 21-D).

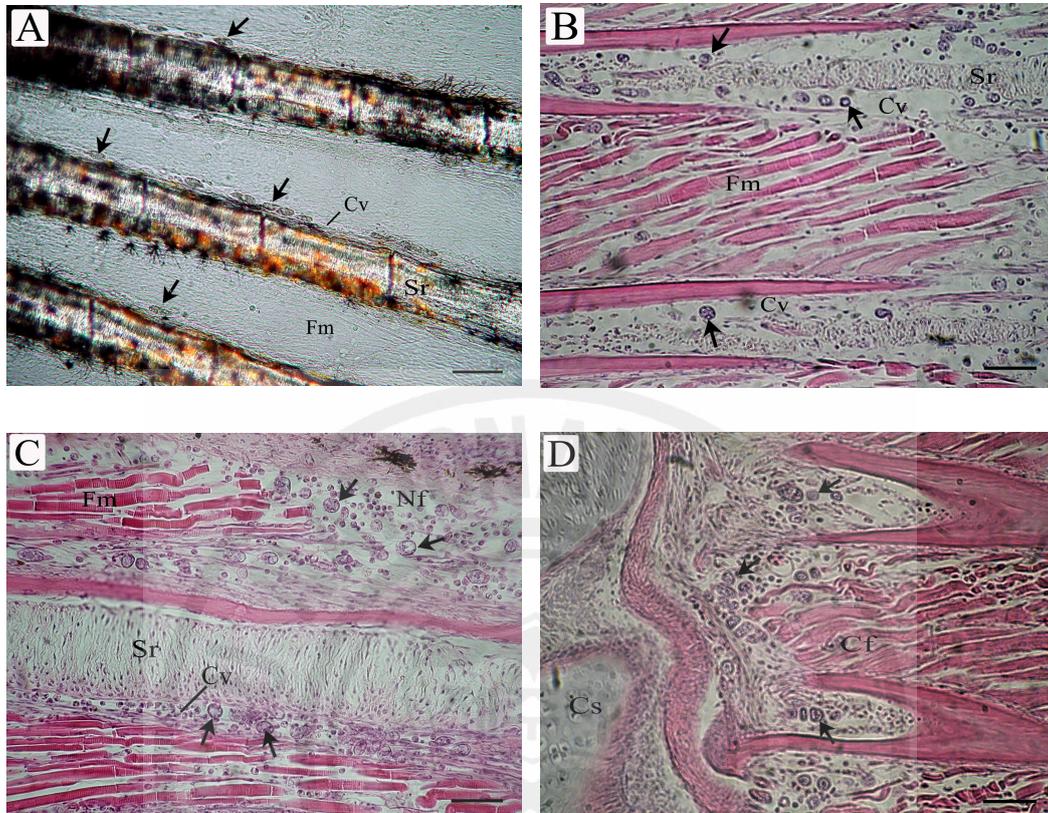


Fig. 19. A number of ciliates (arrows) are infected to caudal fin of flounder, (A) photograph of ciliates infiltrated into capillary vessel in ray of dorsal fin, (B) light micrograph of the caudal fin in the infected flounder showing numerous ciliates that have invaded capillary vessel of the fin tissue, (C) light micrograph of necrosis tissue of the fin ray in the infected flounder showing numerous ciliates in the fin tissue, (D) light micrograph of ciliates infiltrated into the caudal skeleton from caudal fin, Cf: caudal fin, Cs: caudal skeleton, Cv: capillary vessel, Fm: fin membrane, Nf: necrosis fin membrane, Sr: soft ray, HE stain. Scale bar= 50 μ m.

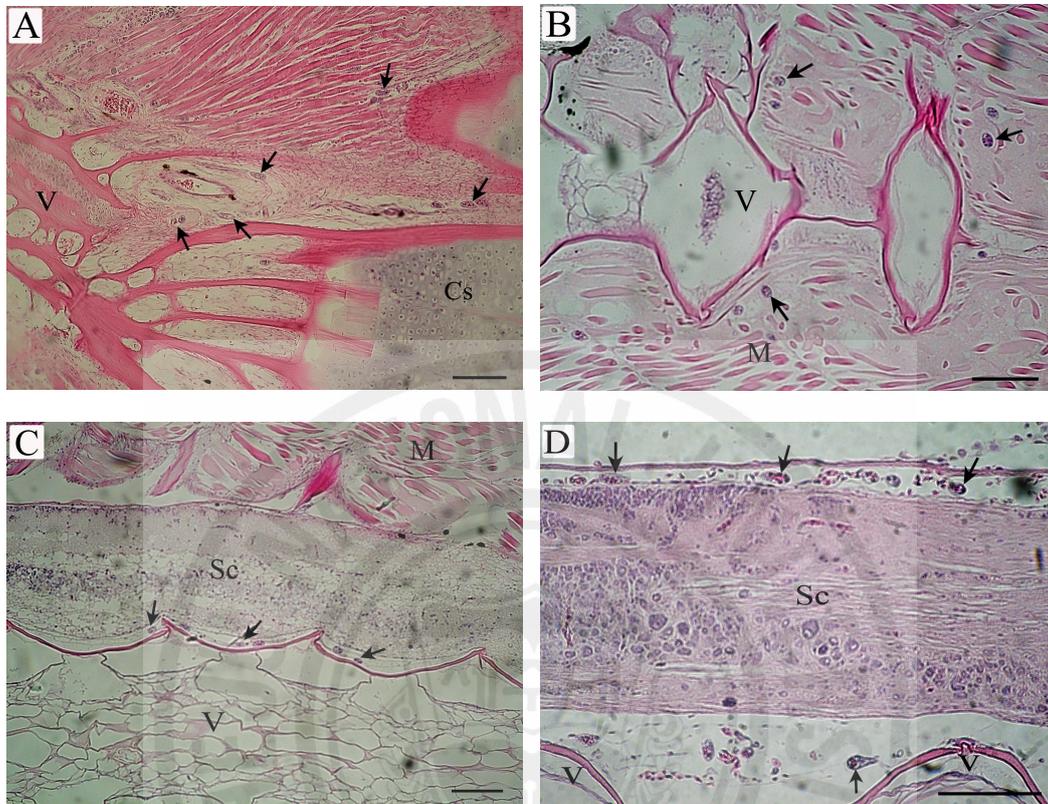


Fig. 20. Light micrograph of ciliates (arrows) are infiltrated into spinal cord after infection in fin ray of flounder, (A) light micrograph of ciliates are moved to vertebra from caudal skeleton of flounder, (B) light micrograph of ciliates are reached to vertebra of flounder, (C) light micrograph of ciliates are moved to brain from vertebra and spinal cord after infiltration into vertebra of flounder, (D) light micrograph of ciliates are moved to brain from subcutaneous tissue of spinal cord, Cs: caudal skeleton, M: muscle, Sc: spinal cord, V: vertebra, HE stain. Scale bar= 100 μ m.

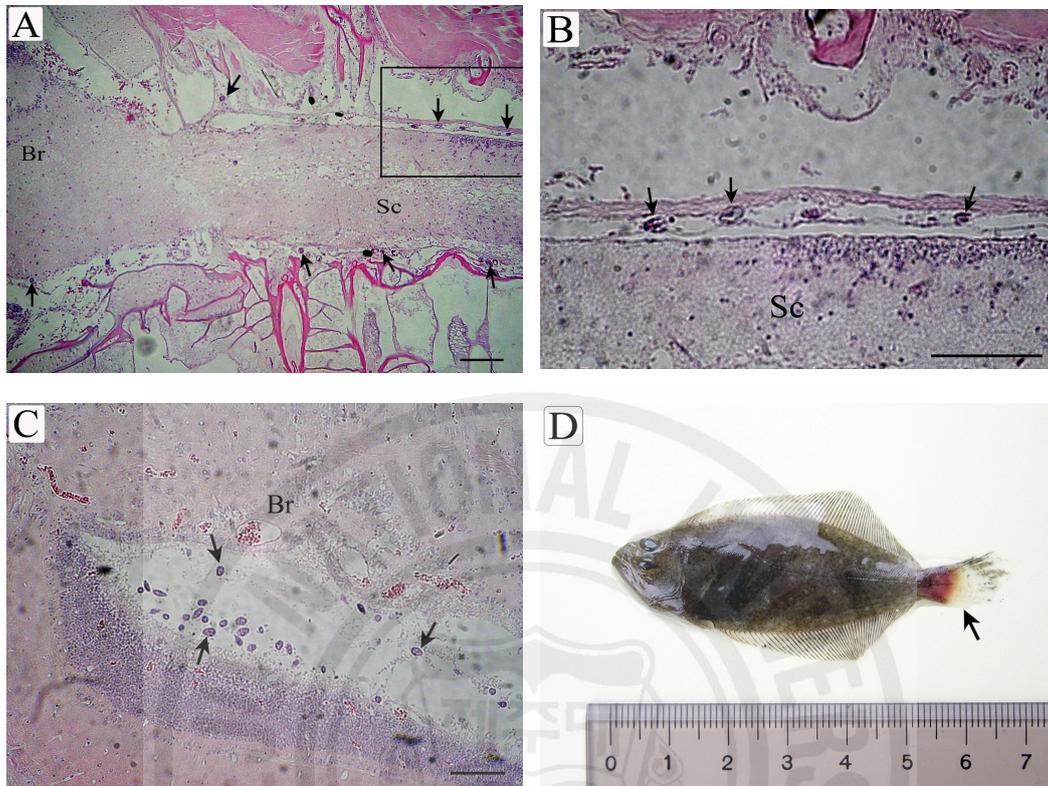


Fig. 21. A number of ciliates (arrows) are reached to brain along spinal cord, (A) light micrograph of ciliates are reached to brain, (B) photograph on the tetragonal part of figure A, (C) light micrograph of ciliates are propagated after infiltration into the brain along spinal cord, (D) External features of infected flounder by ciliates, Br: brain, Sc: spinal cord, HE stain. Scale bar= 100 μ m.

2) 등지느러미와 뒷지느러미를 통한 침투

*P. dicentrarchi*의 등지느러미와 뒷지느러미를 통한 감염은 꼬리지느러미와 마찬가지로 지느러미 막에 침투하여 지느러미 막을 괴사시키고, 지느러미 모세혈관을 통하여 지느러미 기부 근육으로 침투하였다. 어체의 근육으로 옮겨간 후에는 침투 경로가 몇 가지로 나누어 졌는데, 지느러미에서 근육으로 침투하여 근육을 괴사시키는 경로, 지느러미에서 신경극 및 혈관극과 평행으로 분포하는 근조직의 경계면을 따라 척추로 침투하여 척추골을 따라 확산되는 경로, 지느러미 표피를 따라 체표로 이동한 후 근육으로 침투하는 경로 등이었다.

(1) 지느러미 기부근육 침투

*P. dicentrarchi*의 지느러미에서 근육으로 침투하는 경로는 지느러미 막이나 지느러미 모세혈관을 통하여 지느러미 기부 근육에 침투하였다. 지느러미 막에 감염된 경우 지느러미 막 조직을 괴사시키는 하나 근육 쪽으로 빠르게 확산되지는 않았다(Fig. 22-A). 그러나 지느러미 연조를 따라 분포하는 모세혈관에 침투한 경우는 모세혈관을 따라서 빠르게 근육으로 이동하였다(Fig. 22-B). 일단 지느러미에 감염된 후에는 시간이 경과함에 따라 지느러미 조직을 괴사시키며 대량으로 증식하였으며, 근육으로 침투하였다(Fig. 22-C). 근육내 확산은 근육 결을 가로질러 이동하기 보다는 근육 결을 따라 확산되면서 조직을 괴사시켰으며, 괴사된 조직에서 대량으로 증식하였다(Fig. 23-A). 괴사되지 않은 건강한 조직에서도 근육 경계면을 따라 확산되었다(Fig. 23-B). 지느러미 기부 조직과 근육에 침투하여 조직을 괴사시키는 경우는 시간이 경과함에 따라 지느러미와 피부의 궤양, 출혈 등의 전형적인 스쿠티카충 감염증상을 보였다(Fig. 23-C).

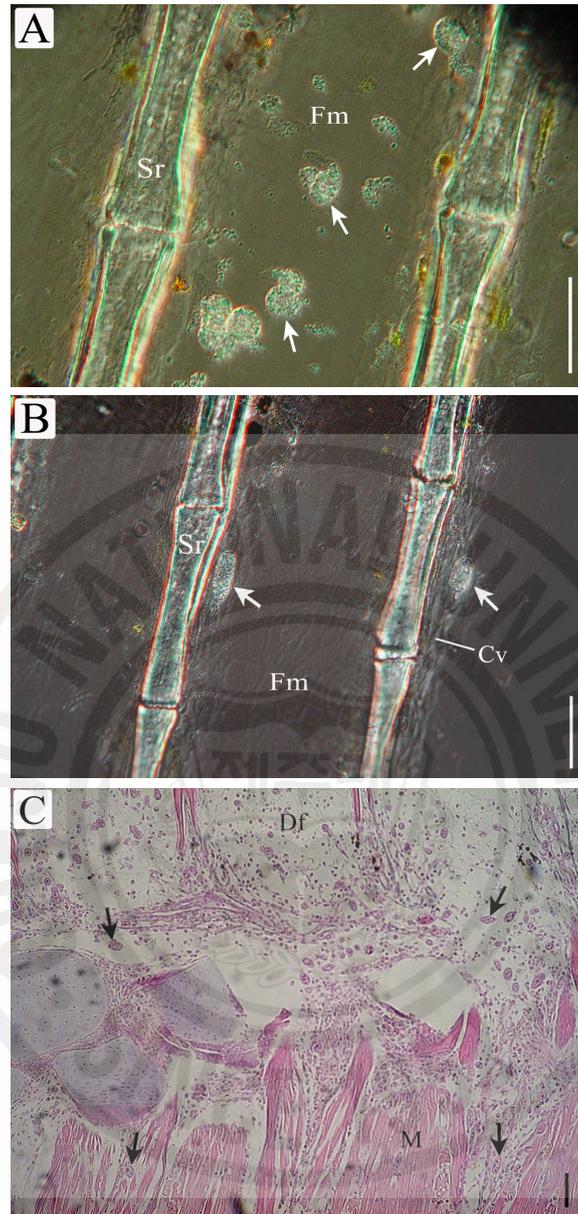


Fig. 22. A number of ciliates (arrows) are infiltrated into the muscle tissue through the dorsal fin of flounder, (A) photograph of ciliates infiltrated into soft ray of the dorsal fin of flounder, (B) photograph of ciliates infiltrated into the capillary vessel of dorsal fin, (C) light photograph of ciliates infiltrated into the muscle tissue, Cv: capillary vessel, Df: dorsal fin, Fm: fin membrane, M: muscle, Sr: soft ray, HE stain. Scale bar= 50 μ m.

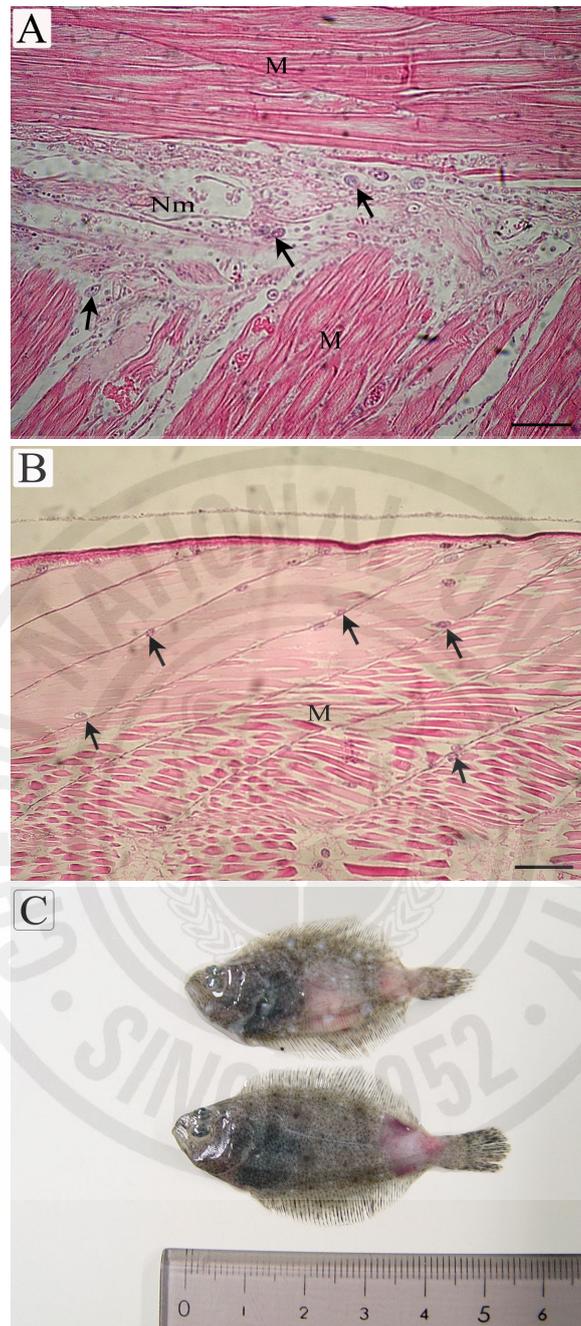


Fig. 23. A number of ciliates (arrows) are infected to muscle of flounder, (A) light micrograph of ciliates are spreaded to muscle texture after infiltration into the muscle of flounder, (B) light micrograph of ciliates are moved to muscle border, (C) external features of infected flounder, M: muscle, Nm: necrosis muscle, HE stain. Scale bar= 100 μ m.

(2) 등지느러미를 통한 척추부위 침투

인위감염 후 *P. dicentrarchi*는 등지느러미를 통해서 척추부위와 척수에도 침투하였는데, 등지느러미를 통해서 지느러미 기부근육에 침투한 후 신경극과 신경극을 따라 평행으로 분포하는 근육의 경계면이나 근육 결을 따라 이동하였다(Fig. 24-A). 척추부분에 도달한 후 척추와 근육의 경계면을 따라서 머리나 꼬리 쪽으로 확산되었으며(Fig. 24-B), 신경궁문내 척수에도 침투하였다(Fig. 24-C).

(3) 뒷지느러미를 통한 척추부위 침투

*P. dicentrarchi*가 뒷지느러미를 통하여 척추부위에 침투하는 경로는 등지느러미를 통하여 척추에 침투하는 경로와 비슷하였다. 뒷지느러미를 통하여 지느러미 기부 근육에 침투한 후 혈관극과 혈관극을 따라 분포하는 근육의 경계면이나 혈관과 근육의 경계면을 따라 척추로 이동하였다(Fig. 25-A). 척추부분에 도달한 후에는 척추와 평행으로 분포하는 근조직을 따라서 머리나 꼬리 쪽으로 확산되었다(Fig. 25-B). 또한 혈도궁문에도 침투하여 혈관 외벽을 따라 두부나 꼬리 쪽으로 확산되었다(Fig. 25-C).

이외에도 늑골을 따라 분포하는 근조직을 따라 신장부위까지 침투하였으며(Fig. 26-A), 척추와 신장 막의 경계면을 따라 확산되었다(Fig. 26-B). 신장 주변에 침투한 후 신장막을 따라 증식 및 이동이 이루어졌으나 신장조직으로 침투한 경우는 관찰되지 않았다.

(4) 지느러미를 통한 등 부위 근육 침투

지느러미 표피를 타고 체표로 이동한 경우는 체표를 뚫고 근육으로 침투하였으며(Fig. 27-A), 시간이 경과함에 근육을 괴사시키면서 대량으로 증식하였다(Fig. 27-B, C). 체표 침투 후 시간이 경과하면서 감염어는 감염부위 근 조직이 지속적으로 괴사되어 피부궤양과 궤양부위 출혈 등의 외부증상이 나타났다(Fig. 27-D).

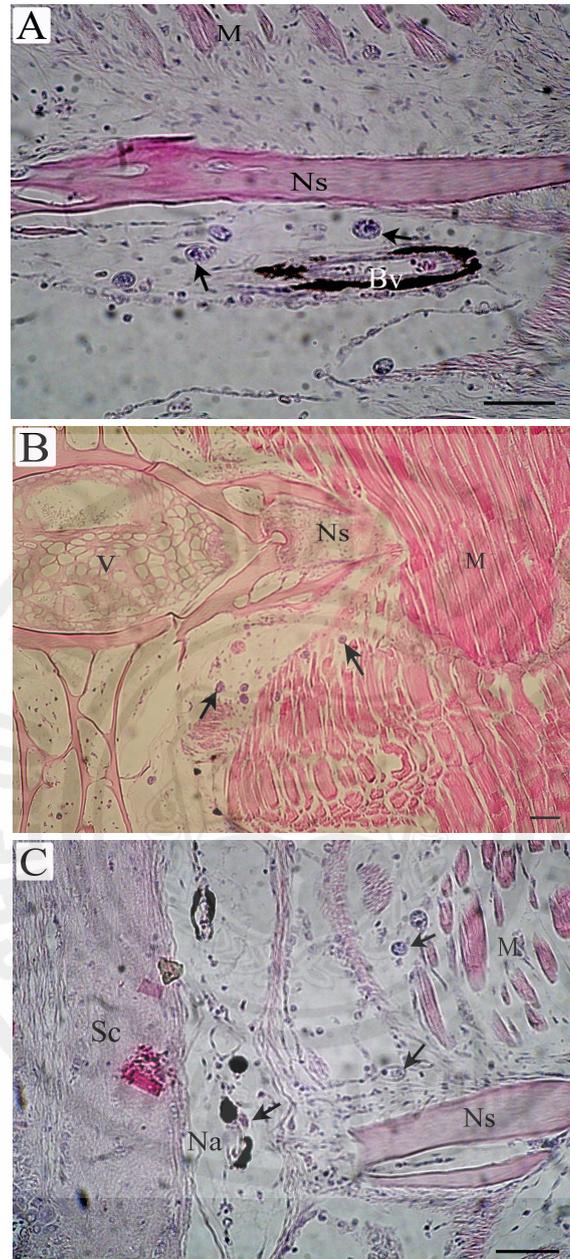


Fig. 24. Ciliates (arrows) are moved to the vertebra through the muscle of flounder, (A) light micrograph of ciliates are moved to the vertebra, (B) light micrograph of ciliates are reached to the vertebra, (C) light micrograph of ciliates are infiltrated into the neural arch of vertebra of flounder, Bv: blood vessel, M: muscle, Na: neural arch, Ns: neural spine, Sc: spinal cord, V: vertebra, HE stain. Scale bar= 50 μ m.

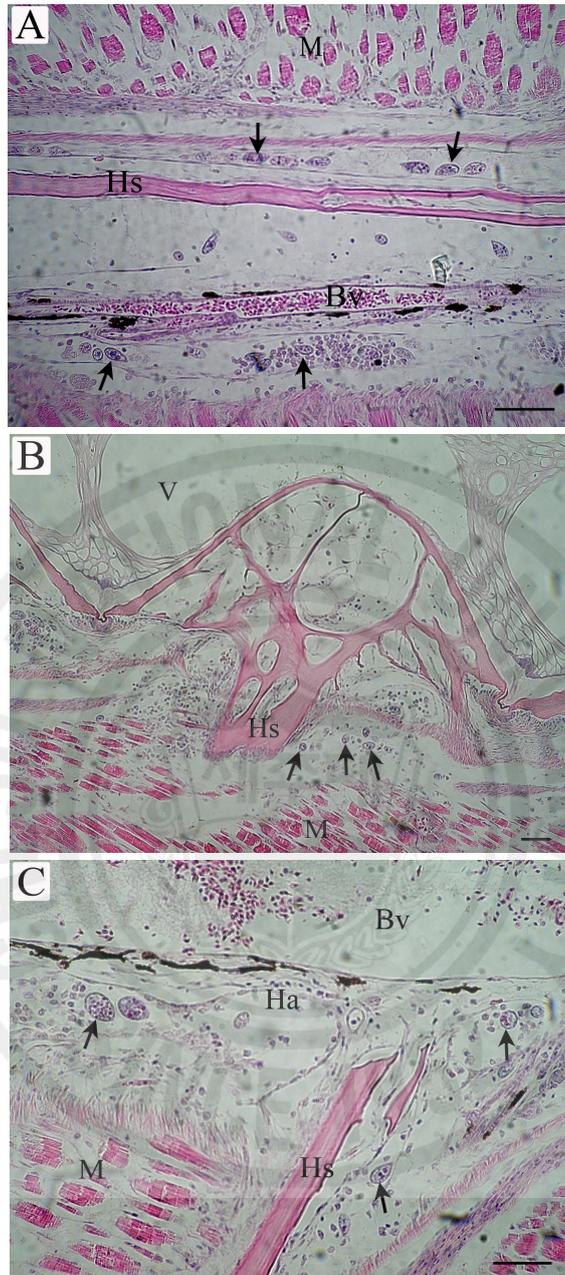


Fig. 25. Light micrograph of the vertebra in infected flounder showing ciliates (arrows) that have invaded vertebra tissue after infiltration into fin ray, (A) ciliates are moved to vertebra tissue along muscle, (B) ciliates are reached to vertebra along hemal spine, (C) ciliates are moved to hemal arch after infiltration in blood vessel, Bv: blood vessel, Ha: hemal arch, Hs: hemal spine, M: muscle, V: vertebra, HE stain. Scale bar= 50 μ m,

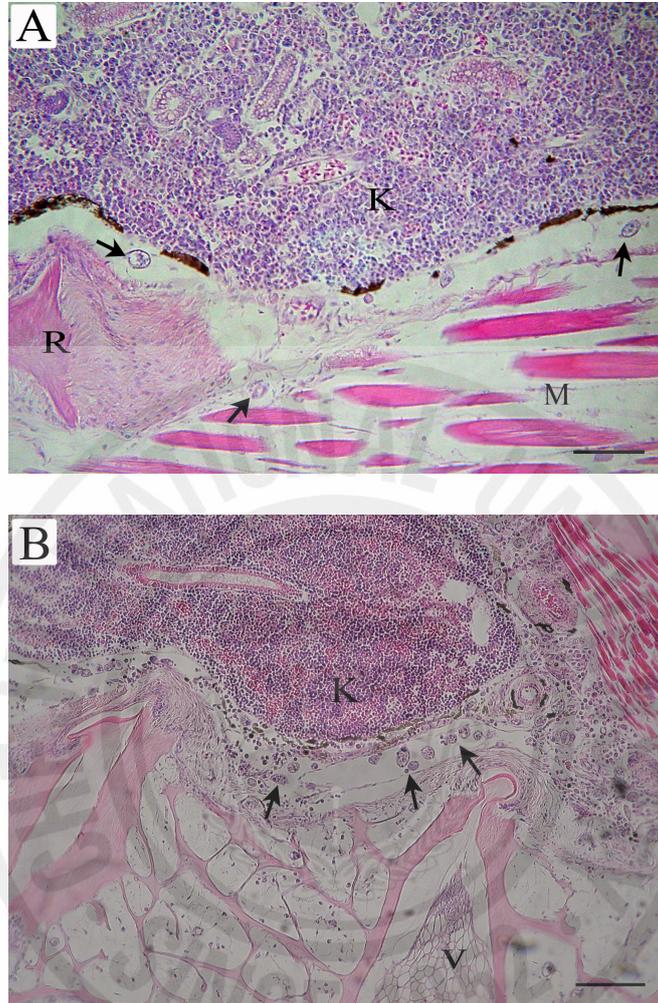


Fig. 26. Light micrograph of the kidney in the infected flounder showing ciliates (arrows) that have invaded into the kidney tissue, (A) ciliates are reached to kidney, (B) ciliates are propagated in quantities between vertebra and kidney, K: kidney, M: muscle, R: rib, V: vertebra, HE stain. Scale bar= 100 μ m.

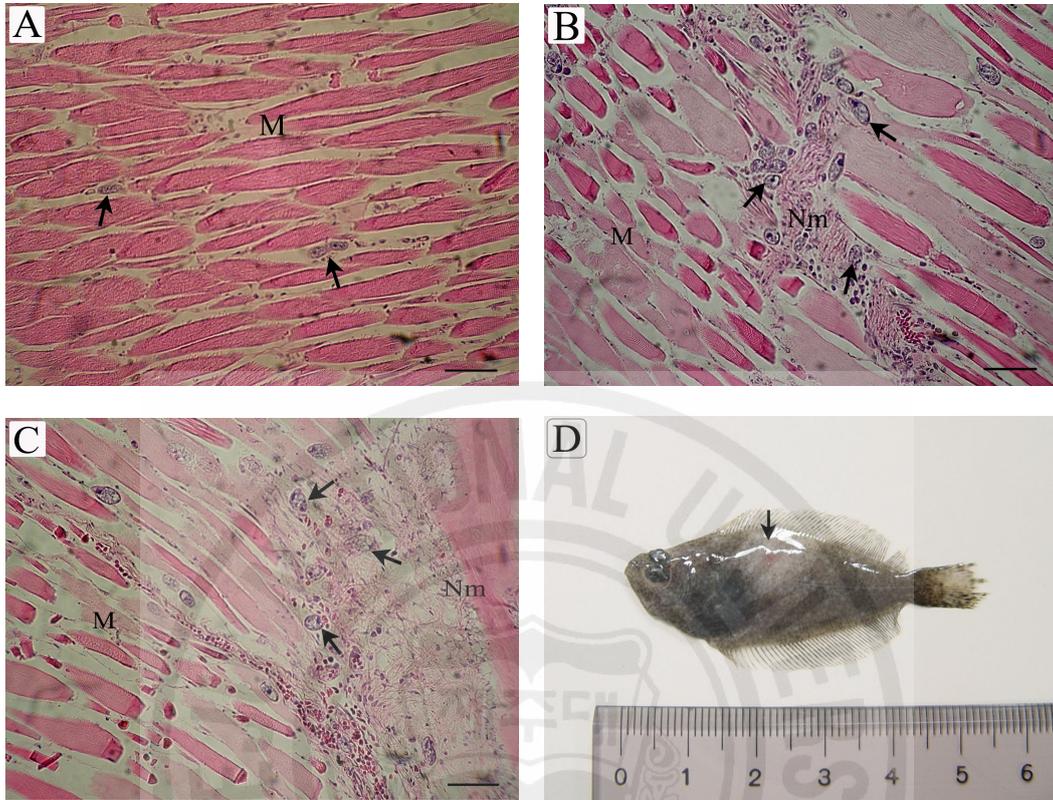


Fig. 27. Light micrograph of the muscle in the infected flounder showing ciliates (arrows) that invaded muscle tissue, (A) ciliates first infiltration into muscle, (B) early necrosis state after muscle infiltration, (C) heavy necrosis state after muscle infiltration, (D) External features of infected muscle in flounder, M: muscle, Nm: necrosis muscle, HE stain. Scale bar= 50 μ m.

3) 두부 침투

*P. dicentrarchi*의 머리 부분 최초 감염은 주로 주둥이 부분을 통해서 감염된 후(Fig. 28-A) 두부골격과 이를 덮고 있는 근조직 사이로 두부 전체에 확산되었으며(Fig. 28-B·C), 대량으로 증식하였다. 두부 골격과 근조직을 따라 안구에도 침투하였는데 각막 내에서 섬모충이 활발히 활동하였다(Fig. 29-A). 안구에 침투한 후에는 시신경과 혈관벽을 따라서 뇌로 이행되었다(Fig. 29-B·C). 안구를 통한 뇌 침입 외에도 두부에 감염된 경우 두부골격과 근조직을 따라 두개골 외벽에 도달한 후 두개골과 근조직 사이에서 증식하며 확산되었으며(Fig. 30-A·B), 두개골 외벽에서 뇌와 연결되는 신경공을 통해서 뇌로 침투한 후(Fig. 30-C) 대량으로 증식하면서 뇌 전체로 확산되었다(Fig. 30-D)

뇌에 침투한 스키테카충은 대량으로 증식하면서 뇌막 피하조직을 따라 척수로 이행되었는데(Fig. 31-A), 이 경우 꼬리지느러미에 감염된 후 척수를 통하여 뇌로 이행된 경로와 역방향인 꼬리 쪽으로 이행되었다. 척수로 이행된 충은 척수 조직에도 침투하나 주로 척수막 피하 조직을 따라 꼬리 쪽으로 확산되었다(Fig. 31-B·C).

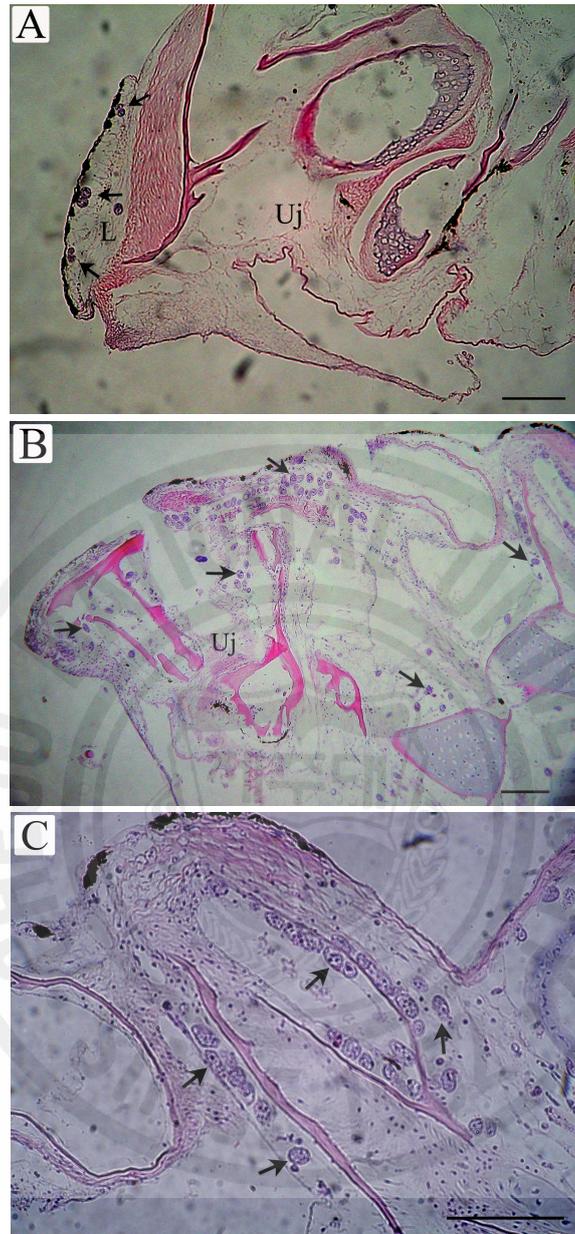


Fig. 28. Light micrograph of the mouth in the infected flounder showing ciliates (arrows), (A) early infection state of upper jaw, (B) ciliates spreaded along head skeleton, (C) enlarged photograph of ciliates moved to head skeleton and muscle tissue, L: lip, Uj: upper jaw, HE stain. Scale bar= 100 μ m.

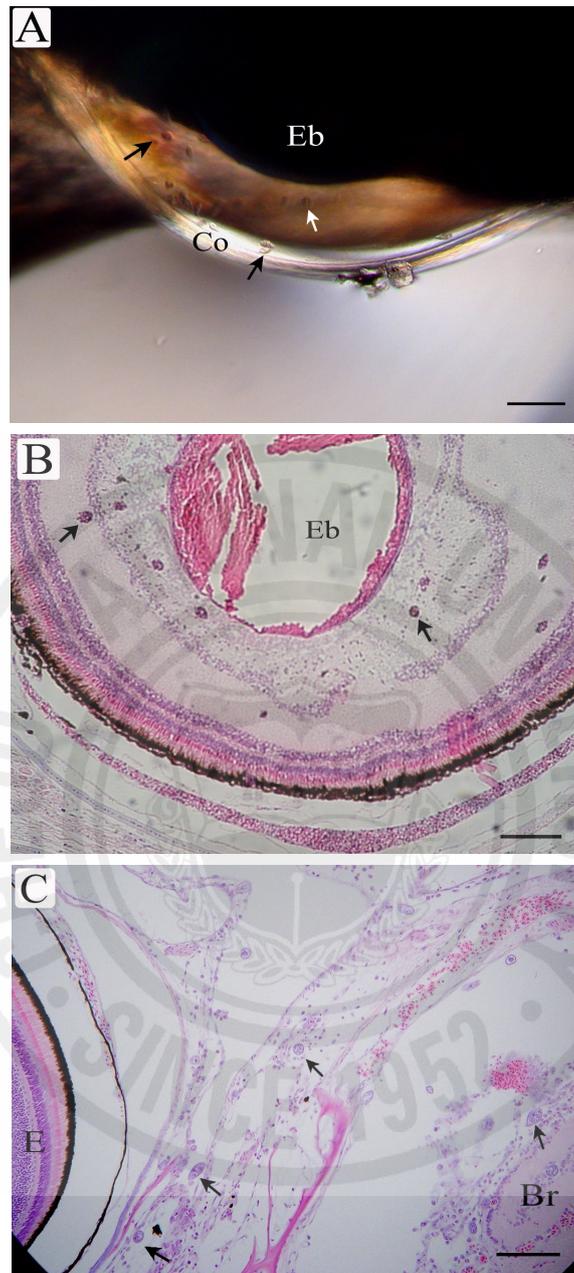


Fig. 29. Light micrograph of the eye in the infected flounder showing ciliates (arrows) that have invaded eye tissue, (A) photograph of ciliates are infiltrated into the cornea of eye, (B) ciliates are infiltrated into eye, (C) ciliates are moved to brain along optic nerve of eye, Br: brain, Co: cornea, E: eye, Eb: eye ball, HE stain. Scale bar= 100 μ m.

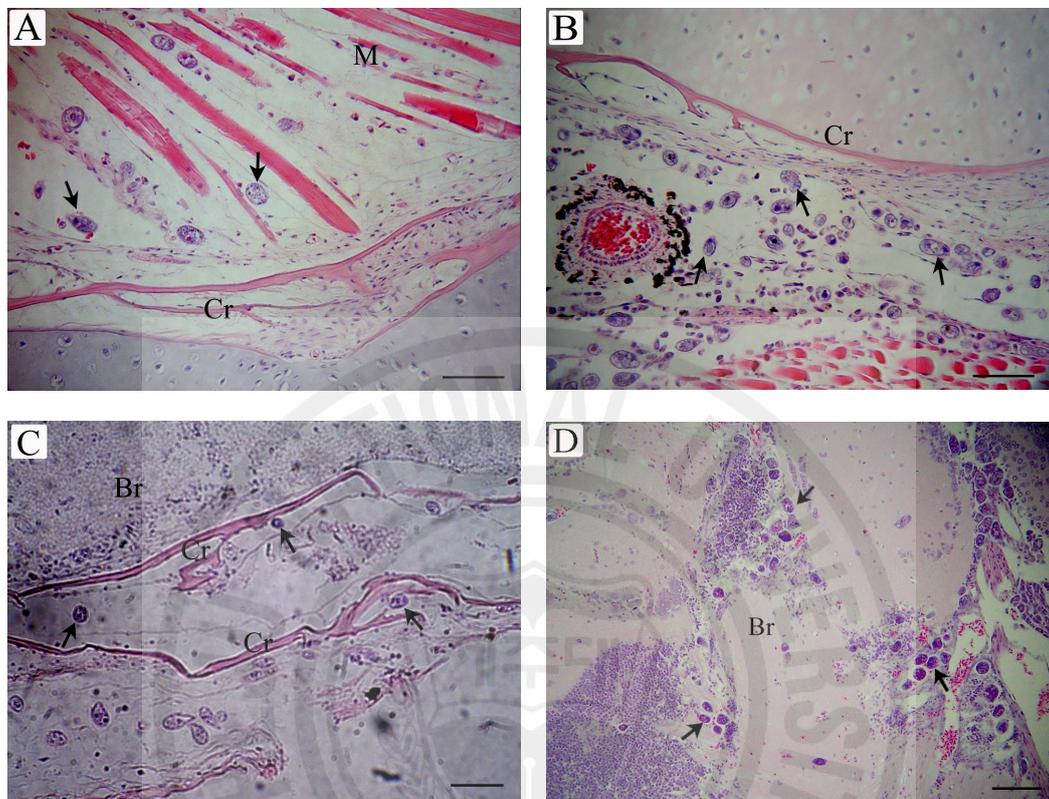


Fig. 30. Light micrograph of the brain in the infected flounder showing ciliates (arrows) that have invaded into the brain tissue, (A) ciliates are reached to cranium outside along muscle tissue from upper part of cranium, (B) ciliates are reached to cranium outside along muscle tissue from below part of cranium, (C) ciliates are moved to brain along nerve groove from cranium outside, (D) ciliates are propagated in the brain, Br: brain, Cr: cranium, M: muscle, HE stain. Scale bar= 50 μ m.

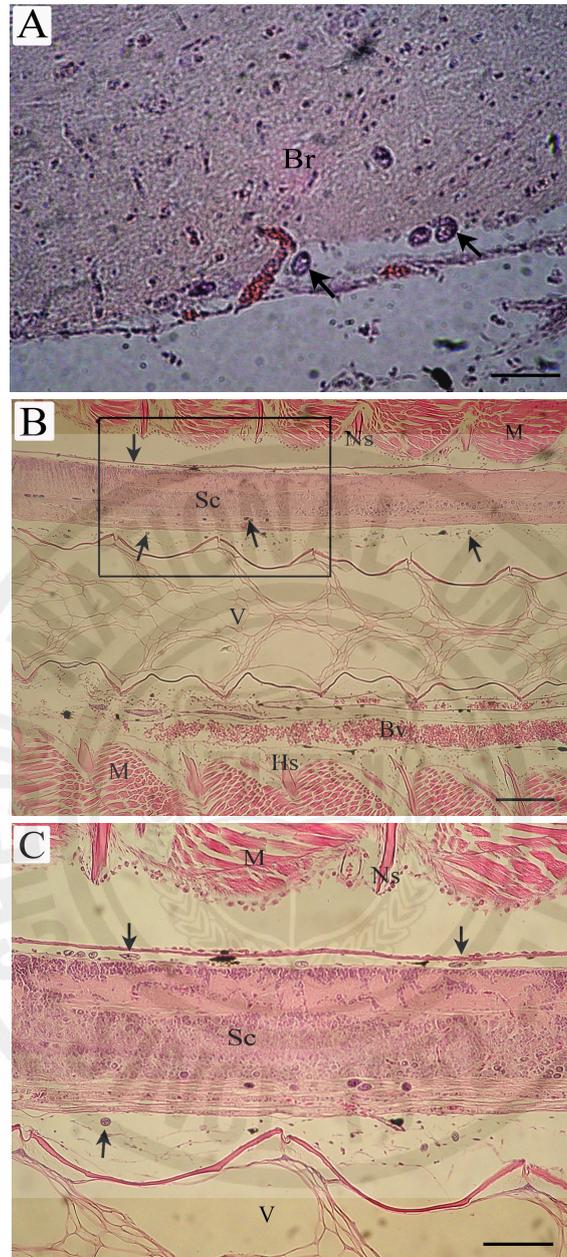


Fig. 31. Light micrograph of the brain in the infected flounder showing ciliates (arrows) that have invaded into the brain, (A) ciliates are moved to spinal cord along subcutaneous tissue of brain, (B) ciliates are moved to spinal cord from brain, (C) Enlarged photograph on the tetragonal part of figure B, Br: brain, Bv: blood vessel, M: muscle, Ns: neural spine, Sc: spinal cord, V: vertebra, Hs: hemal spine, HE stain. Scale bar= A: 50 μm , B: 200 μm . C: 100 μm .

4) 아가미 및 혈관 침투

(1) 주둥이를 통한 아가미 침투

*P. dicentrarchi*가 아가미로 침투하는 과정은 주둥이에 감염된 후 구강으로 이행되어 부드러운 연조직인 구강벽에 다량 증식하였다(Fig. 32-A·B). 구강에서 증식된 충은 구강의 표피조직을 따라 새궁으로 이행되어 새궁조직에서 대량 증식하였으며, 새엽으로 이행되었다(Fig. 32-C·D).

주둥이를 통해서 침투한 후 구강에서 증식하고 아가미로 이행되더라도 식도를 통해서 위로 침투하는 경우는 관찰되지 않았다.

(2) 아가미 뚜껑을 통한 침투

*P. dicentrarchi*의 아가미 감염은 주둥이뿐만 아니라 아가미뚜껑의 부드러운 조직인 아가미 막을 통해서도 감염이 되었으며, 아가미 뚜껑의 피부조직을 따라 아가미로 이행되었다(Fig. 33-A·B). 아가미 뚜껑에 감염된 후 아가미 뚜껑의 근 조직에 침투하여 다량으로 증식하면서 조직을 괴사시키는 경우도 있었으며(Fig. 33-C), 아가미 새엽으로 이행된 후 새엽의 상피조직과 모세혈관에 침투하여 새관을 확장시켜 고착시켰다. 증상이 진행됨에 따라 새관들이 괴사되고 고착되어 새엽 전체가 곤봉화 되었다(Fig. 33-D).

(3) 아가미 혈관 및 심장 침투

아가미에 침투한 *P. dicentrarchi*는 새엽과 새궁 조직을 괴사시키면서 혈관에 침투하였으며(Fig. 34-A), 아가미와 심장을 연결하는 혈관(Fig. 34-B)과 심장을 둘러싸는 위심강(Fig. 34-C)에 침투하였다. 또한 심장에도 침투하였으나(Fig. 34-D) 심장의 근조직에 침투한 경우는 관찰되지 않았고 심장내 혈액에서 매우 낮은 밀도로 분포하였다. 전반적으로 혈관과 위심강, 심장내의 충 밀도는 다른 조직에 비해 매우 낮게 분포하였다.

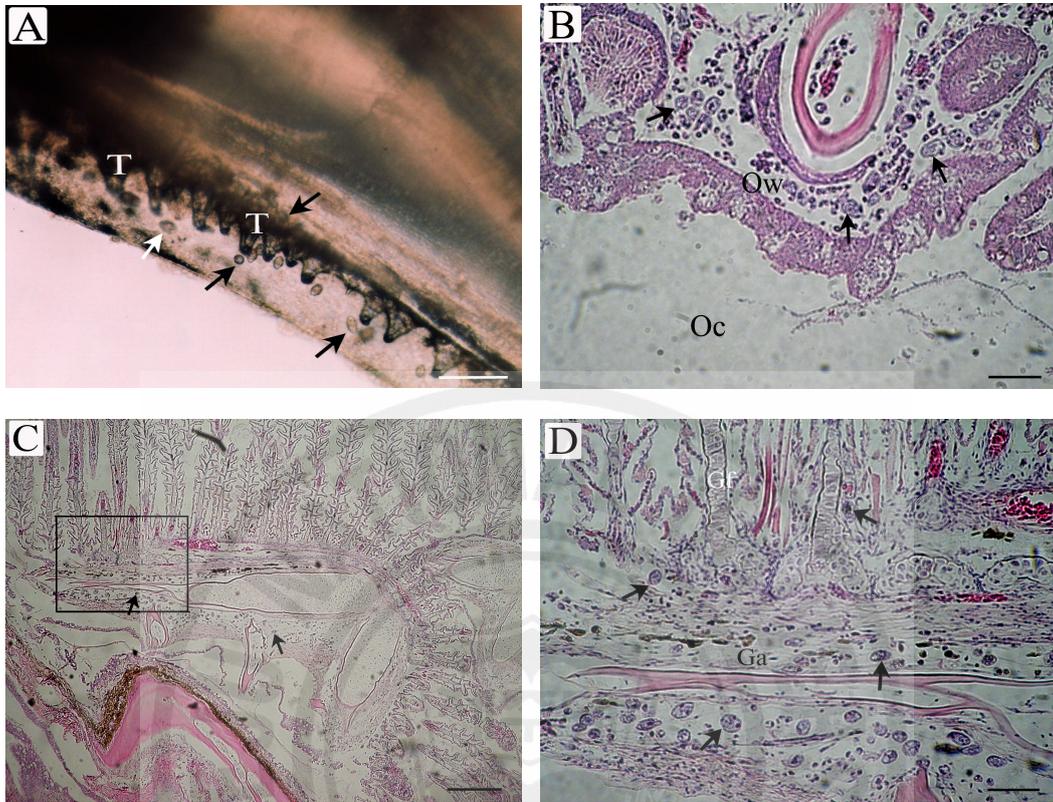


Fig. 32. Light micrograph of the gill in the infected flounder showing ciliates (arrows) that have invaded into the gill tissue, (A) photograph of ciliates are infected in jaw of flounder, (B) ciliates are spreaded to oral cavity wall from jaw, (C) ciliates are spreaded to gill arch and gill filament from jaw, (D) Enlarged photograph on the tetragonal part of figure C, Ga: gill arch, Gf: gill filament, Oc: oral cavity, Ow: oral cavity wall, T: tooth, HE stain. Scale bar= A: 100 μm , B · D: 50 μm . C: 200 μm .

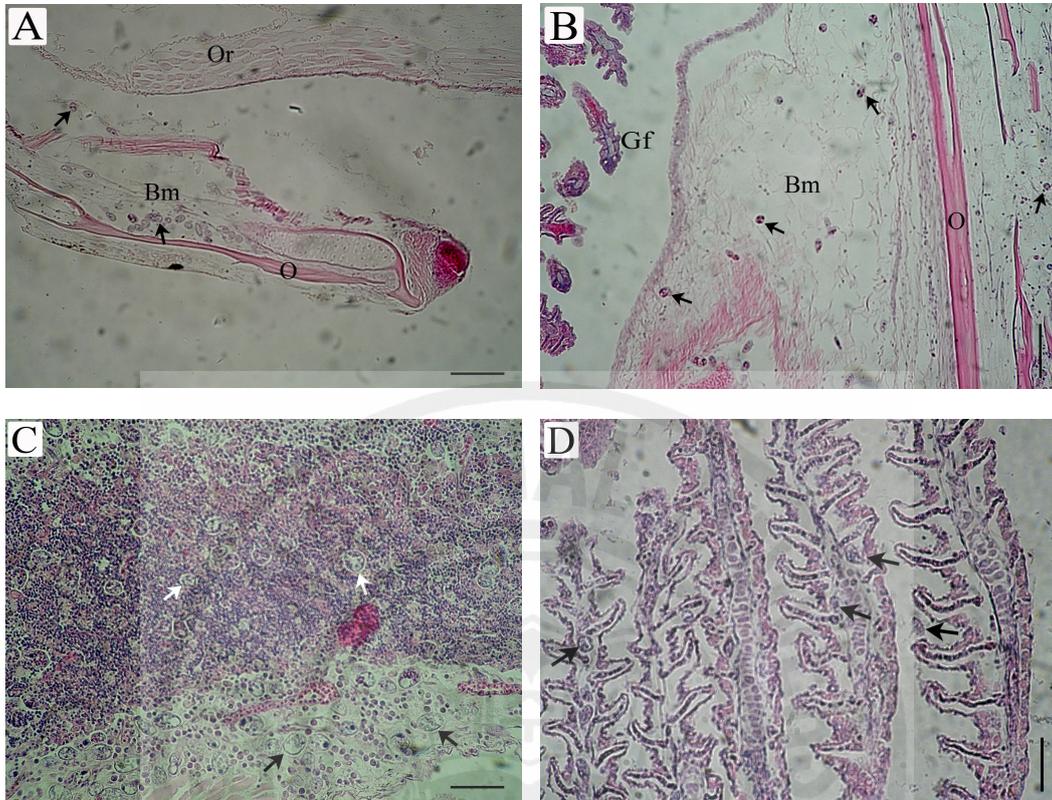


Fig. 33. Light micrograph of gill in the infected flounder showing ciliates (arrows) that have invaded into the gill tissue, (A) ciliates are infiltrated into branchial membrane of opercular region to gill, (B) ciliates are spreaded to opercular region of gill, (C) photograph of ciliates are infiltrated opercular region of gill (D) gill filament tissue are destroyed by ciliates, Bm: branchial membrane, Gf: gill filament, O: opercular, Or: opercular region, HE stain. Scale bar= A · B 200 μm , C · D: 100 μm .

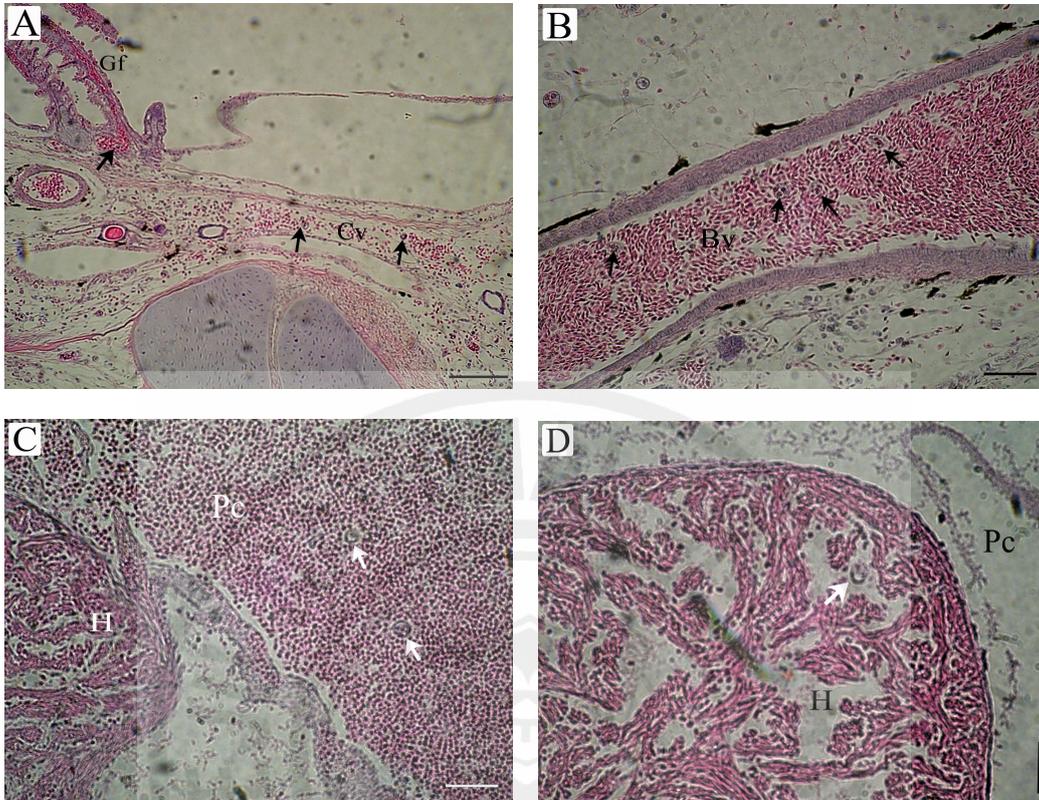


Fig. 34. Light micrograph of blood vessel and heart in the infected flounder showing ciliates (arrows), (A) ciliates infiltrated into capillary vessel of gill, (B) ciliates infiltrated into blood vessel connective to gill and heart, (C) ciliates infiltrated into pericardial cavity, (D) ciliates infiltrated into heart, Bv: blood vessel, Cv: capillary vessel, Gf: gill filament, H: heart, Pc: pericardial cavity, HE stain. Scale bar= A: 200 μm , B · C · D: 100 μm .

5) 복강 침투

*P. dicentrarchi*가 복강으로 침투하는 경로는 뒷지느러미나 배지느러미에 감염된 후(Fig. 35-A) 체표를 따라 이동하면서 항문주위에서 다량으로 증식하였으며, 항문을 통하여 복강으로 침투하였다(Fig. 35-B). 복강에 침투한 스키테카충은 다량으로 증식하였으며, 장벽(Fig. 35-D)과 췌장(Fig. 36-A), 복강 쪽의 신장 외막과 신장 조직사이에 침투한 경우도 있었다(Fig. 36-B). 요도관에 침투한 후 신장으로 이행되는 경우도 있었는데(Fig. 36-C), 신장막의 외측에 도달하였으나(Fig. 36-D) 신장조직에 침투한 경우는 관찰되지 않았다.



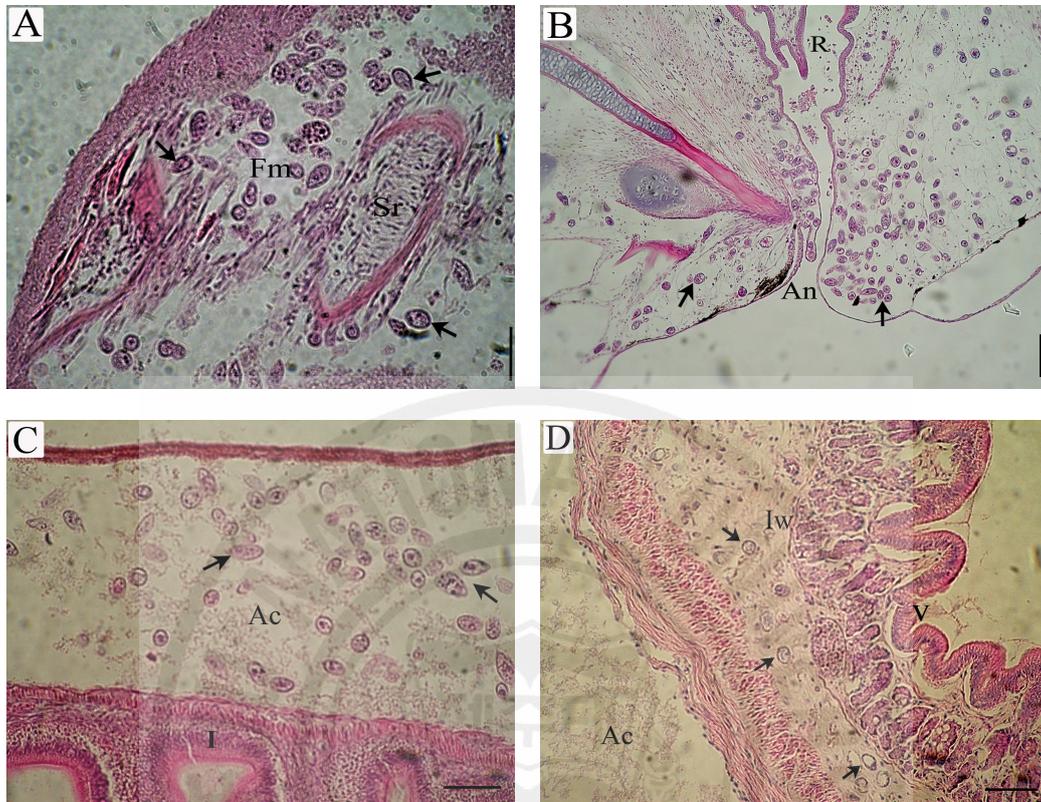


Fig. 35. Light micrograph of abdominal cavity in the infected flounder showing ciliates (arrows) that have invaded into the abdominal cavity tissue, (A) ciliates are infected early in ventral fin of flounder, (B) ciliates are spread to anus along skin tissue from ventral fin, (C) ciliates are infiltrated into abdominal cavity along anus, (D) ciliates are infiltrated into intestine wall, Ac: abdominal cavity, An: anus, Fm: fin membrane I: intestine, Iw: intestine wall, R: rectum, Sr: soft ray, V: villus, HE stain. Scale bar= A · C: 50 μm , B · D: 100 μm .

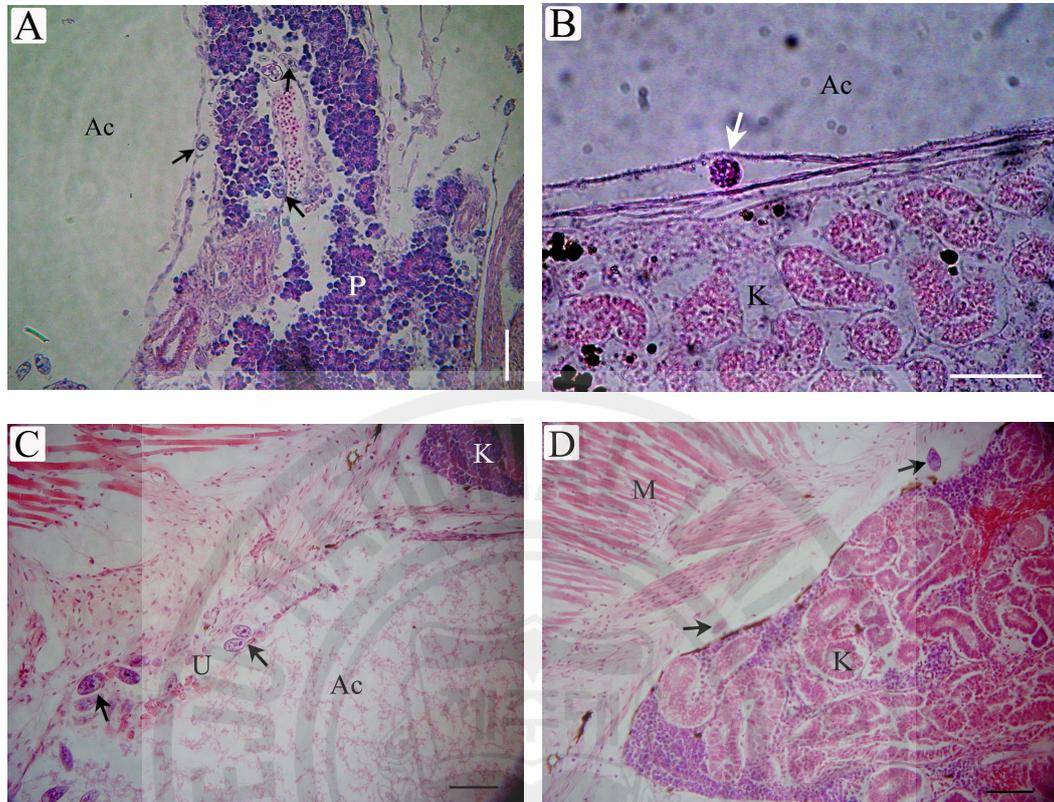


Fig. 36. Light micrograph of kidney in the infected flounder showing ciliates (arrows) that have invaded into the pancreas and kidney, (A) ciliates are infiltrated into pancreas, (B) ciliates are infiltrated into kidney membrane, (C) ciliates are infiltrated into urethra, (D) ciliates are infiltrated between kidney and muscle through urethra, Ac: abdominal cavity, K: kidney, M: muscle, P: pancreas, U: Urethra, HE stain. Scale bar = 50 μ m.

3. 고 찰

*P. dicentrarchi*의 어체 체표 감염과정이나 이동 등은 인위감염 시킨 후 감염어의 체표를 현미경으로 관찰함으로써 가능하였다. 그러나 어체내에서 이동이나 침투 경로는 직접 현미경으로 관찰하기가 사실상 불가능하며 조직학적인 관찰을 통하여 파악할 수밖에 없다. 본 연구에서 조직학적 관찰을 통해서 *P. dicentrarchi*의 침투위치나 분포상태를 파악하고 이에 따라 이동이나 확산되는 방향을 판단하였는데, 충의 분포상태나 밀도에 따라 이동경로를 확인하는데 큰 문제는 없었다.

스쿠티카충의 녀치 치어에 최초 감염은 지느러미를 통해서 많이 이루어지는 것으로 보고 되었는데(Jin et al., 2003b) 본 연구에서도 인위 접종 후 감염은 지느러미를 통한 경우가 많았다. 부드러운 지느러미 막 조직은 충이 쉽게 침투할 수 있기 때문인 것으로 보이며, 지느러미가 충이 다량으로 서식하고 있는 저면에 밀착돼 있어 더욱 쉽게 감염되는 것으로 추정된다. 스쿠티카충이 지느러미에 감염된 후 지느러미 조직을 괴사시키며 점차 근육 쪽으로 괴사부위를 확장시키는 경우도 있으나 근육으로 빠른 침투는 모세혈관을 통해서 이루어졌다.

지(국립수산진흥원, 2000)에 의하면 녀치 치어의 꼬리에 침투한 경우 뇌 조직으로 확산되었다고 했는데, 본 연구에서 꼬리지느러미를 통해서 미골과 척추에 도달한 후 척수조직을 통해서 뇌로 이동하여 지의 연구결과와 일치하였다. 실제로 양식현장에서도 녀치 치어의 꼬리지느러미에 스쿠티카충이 감염되어 괴사된 경우 대부분 뇌에서 충이 검출되고 있어 이 경로가 뇌로 침투하는 중요한 경로의 하나로 판단된다. 뇌에 충이 침투한 경우 병세가 진행됨에 따라 체색이 검어지고 활력이 현저히 떨어진 후 저면에서 폐사하였다. 일반적으로 체색흑화는 녀치 치어에 스쿠티카충이나 트리코디충, 익티오보도충과 같은 기생충이나 병원균, 바이러스 감염 등 대부분의 질병 감염시 나타나는 주요 증상이다(田, 2000; 2005). 따라서 체색흑화는 어체의 스트레스로 인한 외부 증

상이라 할 수 있다. 이 실험에서 *P. dicentrarchi*가 실험어의 꼬리지느러미를 통해서 척수, 뇌로 침투한 경우가 피부나 지느러미 등 외부에 감염된 경우보다 더욱 뚜렷이 체색이 흑화되었는데 이는 외부감염보다 더 심한 damage를 받기 때문인 것으로 보인다. 이렇게 꼬리지느러미에 감염된 후 척수 조직을 통하여 뇌로 이행되는 과정은 주요 감염 경로이기는 하나 이 실험에서 꼬리를 통한 뇌 감염은 머리 부분에 감염된 후 뇌에 침투하는 경우보다 훨씬 적게 관찰되었다.

이 충이 근육에 침투한 후 괴사되지 않은 근육내에서도 근육의 경계면을 따라 광범위하게 분포하고 있어 근육결이나 근육의 경계면을 따라 빠르게 확산되는 것을 확인할 수 있었다. 반면에 근육을 종단하여 이동 하는 것은 매우 느리게 진행되거나 어려운 것으로 관찰되었다. 이와 같은 결과로 보아 이 충 감염 후 광범위한 근육괴사가 나타나는 것은 근육 결이나 근육과 근육의 경계면을 따라 빠르게 이동하여 감염부위가 확대되기 때문인 것으로 보인다. Iglesias 등(2001)은 터봇에 감염된 *P. dicentrarchi*가 효소를 이용하여 감염어 조직내 이동 가능성을 제기한바 있다. *P. dicentrarchi*의 감염 후 조직을 괴사시키며 광범위한 궤양을 형성하는 등의 외부증상을 감안 할 때 단백질 분해능력이 있는 것으로 보이나 충의 이동은 근조직을 분해시키며 이동하기 보다는 근조직의 경계면, 즉 근조 사이에서 이동하는 것으로 보인다. 지느러미 조직뿐만 아니라 지느러미 표면에서 체표로 쉽게 이동이 이루어졌으며 체표를 이동해 다니다가 조직 속으로 침투하여 표피조직을 괴사시켰다. Lee 등(1994)은 스쿠티카충의 침입으로 피부의 소성결합조직을 변성시키며, Lee 등(2001)도 넙치에 스쿠티카충의 침입으로 피부 조직을 심하게 변성 또는 괴사시킨다고 하였는데 증상이 이들 연구와 비슷하게 나타나 동일 스쿠티카충에 의한 감염으로 추정된다.

체표 감염이나 감염 후의 궤양은 배 부분보다는 주로 등 부위에 주로 나타났다. 복부 쪽이 충이 밀집돼 있는 수조 바닥과 밀착하고 있어 등 부위보다 쉽게 감염될 것으로 보이나 반대로 등 부위 근육에 주로 침투하였으며, 양식 현장에서도 스쿠티카충 감염에 의한 궤양은 주로 등 부위에 나타나고 있다.

본 연구에서 실험어의 복부보다 등 부위 근육에 충이 많이 침투하는 이유를 규명할 수는 없었으나 복부 쪽이 충 감염에 강한 방어기능을 가지고 있기 때문인 것으로 보인다. 양식중인 넙치에서도 심한 스트레스를 받아 방어기능이 떨어졌을 경우 활주세균이나 비브리오균이 집중적으로 등 부위에 감염되어 궤양을 형성하는 것도 이와 같이 복부와 등 부위의 방어기능에 차이가 있기 때문인 것으로 추정된다.

꼬리지느러미 감염 후 척추골과 척수에 침입하는 경우 외에 등지느러미나 배지느러미에 감염된 경우도 신경극이나 혈관극을 따라 평행으로 분포하는 근조직을 통하여 척추나 척수에 침투하였다. 또한 주둥이를 통해서 두부에 감염된 경우도 두부 골격과 근육의 경계면을 따라 뇌 쪽으로 이동하였다. 따라서 어체의 어느 부위든 골격과 근조직 또는 조직과 조직의 경계면은 충이 쉽게 이동하는 통로로 보인다. 일단 주둥이에서 두부 골격과 근조직을 따라 안구까지 침투한 후에는 신경조직을 따라 뇌로 침투할 수 있으며, 안구에 침투하지 않더라도 두부에 감염되면 골격과 근조직 사이로 쉽게 두개골까지 도달할 수 있어 뇌에 침투가 가능한 것으로 보인다. 양식어장에서 스쿠티카충에 감염된 넙치 치어 중 두부에 감염되어 증상이 심한 개체는 대부분 뇌까지 침투한 경우가 많아 안구에서 시신경을 통하지 않더라도 이와 같은 경로로 쉽게 뇌로 침투할 수 있음을 보여주고 있다.

뇌에서도 뇌막의 피하조직에서 쉽게 이동하는 것으로 보이며 척수로 이행되었는데, 꼬리지느러미에 감염된 후 척수를 통하여 뇌로 이행되는 경로와 반대로 뇌에서 척수를 통하여 꼬리지느러미 쪽으로 확산되었다. 따라서 두부, 꼬리지느러미, 등지느러미, 뒷지느러미 등 외부기관에 침투한 충은 척추와 척수를 통하여 유기적으로 이동이 가능한 것으로 보인다. 인위 감염 후 주둥이에 감염된 경우 뇌를 거쳐 척수에 도달한 시점에 실험어는 폐사하였다. 또한 꼬리지느러미에 감염된 경우는 척수를 통해서 뇌까지 도달한 시점에 각각 감염어가 폐사되어 뇌와 척수에 침투할 경우 쉽게 폐사가 이루어지는 것으로 보인다.

Iglesias 등(2001)은 양식 터봇의 아가미에 *P. dicentrarchi* 가 감염될 경우

상피조직을 확장시켜 새관들을 협착시켰으며, 아가미 모세혈관에 침투하여 다량으로 증식된 스쿠티카충은 아가미 혈액의 흐름을 방해하여 결과적으로 산소 흡수와 운반을 차단하므로 이를 중요한 폐사 원인의 하나로 단정하였다. 또한 Kang 등(2005a)과 康(2000)은 스쿠티카충이 자주복의 아가미에 감염된 경우 새관과 새관 사이를 융합시킴으로써 새엽이 곤봉화된다고 하였다. 본 실험에서도 아가미 새엽에 감염된 후 새관의 확장과 협착, 괴사 증상이 나타나 자주복이나 터봇의 감염 증상과 유사하게 진행되었다. 그렇지만 폐사어는 대부분 아가미 새엽이 괴사되는 경우가 많아 아가미 혈액의 흐름을 방해하기보다는 아가미 조직 자체의 괴사로 인한 호흡곤란이 주 폐사원인으로 추정된다. 이외에도 스쿠티카충의 아가미 감염은 잘 알려져 있는데 Lee 등(1994)과 Jin 등(2003b)의 연구에서도 미동정 스쿠티카충이 넙치 치어의 아가미 새궁 혈관에 침입한다고 하였다. 본 연구에서도 아가미 새엽의 모세혈관과 새궁의 혈관 등에 다량 침투하였으나 혈관전체를 조직학적으로 관찰하기가 어려워 혈관내 이동 경로를 구체적으로 확인하기가 어려웠다. 그러나 아가미 모세혈관과 아가미와 심장을 연결하는 혈관, 심장에 충이 분포하는 것으로 보아 아가미나 새궁의 모세혈관을 통해서 아가미와 심장을 연결하는 혈관으로 이행하여 심장으로 침투하는 것으로 추정된다. 심장내에서는 혈액에 분포하는 경우만 관찰되었는데, 이는 심장조직을 직접 뚫고 침입하는 것보다 아가미와 연결된 혈관을 통해서 침투하는 것을 시사하는 것으로 보인다. Lee 등(1994)은 넙치 치어에 감염된 스쿠티카충이 혈관이나 임파관으로 이행하여 단시간 내에 심부조직으로 확산되는 것으로 추정한바 있으며, Iglesias 등(2001)은 *P. dicentrarchi*가 감염된 터봇의 꼬리정맥에서 채혈한 혈액에서 이 충을 분리하여 혈액을 통한 광범위한 확산 가능성을 제시하였다. 그러나 본 연구에서는 아가미와 심장부분의 혈관을 통한 이동은 확인할 수 있었으나 아가미를 제외 하고는 충의 밀도가 매우 낮았으며, 다른 기관의 혈관내 감염을 확인할 수 없었다. 또한 양식 현장에서 스쿠티카충에 감염된 넙치가 내부 장기에 감염되는 경우가 적음 점 등을 감안할 때 혈관 침투가 가능하기는 하나 혈관을 통한 광범위한 확산 가능성은 낮은 것으로 보인다.

주둥이에 감염된 *P. dicentrarchi*는 구강벽에서 다량으로 증식하며 아가미로 이행되기는 하나 식도를 통해서 위로 이행되지 않았다. 복강에 감염된 경우에도 장의 외벽에는 침투하였으나 장내에서는 발견되지 않았으며, 항문을 통해서도 직장에는 일부 관찰되었으나 장으로 이행되지는 않았다. 따라서 위와 장내에서는 이 충이 서식할 수 없는 것으로 보인다. 그렇지만 복강에서는 대량으로 증식하여 복강도 이 충의 증식에 적합한 조건으로 나타났는데, Paramá 등(2003)이 *P. dicentrarchi*를 양식 터봇의 복강에 주사하여 인위 감염시킨 결과 복강내 생육이 활발히 이루어져 본 실험결과와 일치하였다. 복강내에 증식하면서 췌장과 장벽에 침투하였으나 간이나 비장 신장 조직내에서는 관찰되지 않았다. 위나 장은 이 충이 충분히 침투할 조건이 되었으나 침투하지 못한 것에 비해 간, 신장, 비장 조직 등은 침투하지 못하여 서식하지 않는 것인지, 아니면 위나 장처럼 생육자체가 불가능한 것인지는 확인할 수 없었다. 전반적으로 치어의 내부기관 조직에 쉽게 침투하여 조직을 파괴시켜 폐사시키므로 체표 등 외부감염보다는 내부감염에 의한 피해가 많은 것으로 보인다. 이와 같은 이유로 Iglesias 등(2003)은 스쿠티카충을 내부기생충으로 정의한바 있으며 화합물 등의 약용으로 구제하기가 어렵다고 하였다.

인위감염 후 어체내 침투경로는 어체의 크기에 관계없이 비슷한 양상을 보였으나 체내에 감염된 후 이동은 어체가 클수록 많은 시간이 소요되었다. 이는 어체의 크기가 작을수록 조직이 약하여 쉽게 이동이 가능하며, 어체가 클수록 조직내 침투나 이동이 어렵기 때문인 것으로 사료된다. 양식현장에서도 넙치가 전장 25 cm 이상으로 성장하면 스쿠티카충 감염에 의해 대량 폐사되지 않는 것으로 알려져 있어(Jin et al., 2003a) 어체의 크기에 따라 이 충의 침투 양상이나 병원성이 달라지는 것으로 보인다.

VI. 화합물의 구제효과

1. 재료 및 방법

1) 스쿠티카충

넙치에서 분리된 *P. dicentrarchi*를 배양하여 구제실험에 이용하였다. 멸균 해수에 BHI (Merck, Germany) 배지를 0.1% 첨가한 SW BHI 배지를 제작한 후 비브리오균(*Vibrio lentus*)을 1.0×10^8 cell ml⁻¹ 농도로 접종하여 균이 지속적으로 증식하면서 중의 먹이가 되도록 하였다(pH 7.2). 배양을 위한 충 접종은 CHSE-214 세포주에서 순수 배양된 *P. dicentrarchi*를 배지에 3.0×10^3 cell ml⁻¹ 농도로 접종한 후 15°C incubator에서 4일 동안 배양하여 구제실험에 이용하였다. 구제실험 시점은 중의 지수증식이 이루어진 후 활동이 활발한 최고밀도에 도달 시점을 기준하였는데, 9.7×10^4 cell ml⁻¹ 농도로 증식된 직후에 구제실험에 이용하였다.

2) 화합물 및 실험방법

비브리오균을 먹이로 배양된 스쿠티카충을 포르말린(Merck, Germany)과 과산화수소(Merck, Germany), 그리고 스쿠티카충 치료제로 개발중에 있는 광물성 제품 Jenoclean (Bio-Resource, Korea)을 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 배양된 스쿠티카충을 1.0×10^4 cell ml⁻¹ 농도로 접종시켰다. 구제효과는 화합물의 농도별로 약육을 실시한 후 시간경과에 따른 중의 운동성과 형태적 변화를 현미경(Olympus, BX 50, Japan) 400 배율로 관찰하였다.

화합물의 종류별 약육처리 농도는 포르말린 50, 100, 200, 300, 400 ppm, 과

산화수소 25, 50, 100, 150, 200, 300 ppm, Jenoclean 50, 100, 200, 300, 400, 500 ppm으로 설정하였다.

3) 구제효과 판정

약육처리 후 시간경과에 따른 충의 운동성과 형태적 변화를 Novotny 등 (1996)과 Crosbie and Munday (1999)의 효과측정 방법에 따라 측정하였다. 약육처리 는 총 180분 동안 실시했는데 30분 단위로 농도별 시간 경과에 따른 운동성과 형태적 변화를 5단계의 score로 구분하였다(Table 11).

Table 11. 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

2. 결 과

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 변형을 일으켰다. 200, 300 ppm에서는 150분 약욕으로 대부분의 세포가 변형되었으며, 100 ppm에서는 180분 약욕으로 절반정도가, 50 ppm에서는 180분 약욕으로 일부 개체의 세포가 변형되었다.

포르말린 약욕에 의한 운동성의 변화는 형태적 변화보다 뚜렷이 나타났는데 300, 400 ppm 모두 30분 약욕으로 운동성을 완전히 상실하였다. 200 ppm에서 60분, 100 ppm에서 90분, 50 ppm에서 120분 만에 각각 운동성을 완전히 상실하여 구제효과를 보였다(Fig. 37).

2) 과산화수소

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

과산화수소 약욕에 의한 운동성의 변화는 포르말린 약욕과 마찬가지로 형태적 변화보다 빠르게 나타났다. 150, 200, 300 ppm 처리구 모두 30분 약욕으로 수영력을 상실하였으나 섬모운동은 지속되었다. 300 ppm에서 60분 약욕으로 섬모운동까지 완전히 상실하였으며, 200 ppm에서는 90분, 150 ppm과 100 ppm에서는 각각 150분 만에 운동성을 완전히 상실하였다. 50 ppm에서는 60분 약욕으로 수영력을 상실하였으나 섬모운동은 180분 후에 정지되었다. 25

ppm에서는 180분 약육으로 유영력은 상실했으나 섬모운동은 지속되었다(Fig. 38).

3) Jenoclean

Jenoclean 약육에 따른 형태적 변화는 농도별 처리시간에 따라 뚜렷한 차이를 보였다. 500 ppm에서 60분 약육시 50% 이상의 세포가 구형화 되거나 세포벽이 파괴되었으며, 90분 약육으로 대부분의 세포막이 파괴되었다. 400 ppm 처리구는 90분 약육으로 50% 이상 구형화되거나 세포막이 파괴되었으며, 120분 약육으로 대부분의 세포벽이 파괴되었다. 300 ppm 처리구에서는 60분 약육으로 50% 정도의 세포가 변형되거나 세포막이 파괴되었으며, 150분 약육으로 대부분의 세포가 변형되거나 세포막이 파괴되었다. 200 ppm에서는 90분 약육으로 50% 정도가 세포변형 또는 세포막이 파괴되었으며, 150분 약육으로 대부분의 세포가 변형되거나 세포막이 파괴되었다. 100 ppm에서는 180분 약육으로 50% 이상의 개체가 세포변형이나 세포막이 파괴되었으며, 50 ppm에서는 180분 약육으로 50% 정도가 세포변형을 일으켰다.

세포막 변형은 주로 층의 아래쪽 수축포 주변의 세포벽이 팽창하며 돌출되었으며, 옆 부분이 팽창하여 파괴되는 경우도 있었으며 형태적인 변화가 없이 세포벽이 전체적으로 용해되는 경우도 있었다(Fig. 39, 40).

Jenoclean 약육 처리에 의한 운동성은 500 ppm 처리구인 경우 30분 약육으로 유영력을 상실했으며 90분 약육으로 섬모운동까지 정지되었다. 400 ppm과 300 ppm 에서는 500 ppm 처리구와 마찬가지로 30분 약육으로 유영력을 상실했으나, 섬모운동은 120분 후에 완전히 정지되었다. 200, 100, 50 ppm 처리구에서는 180분 약육 후 유영력은 완전히 상실했으나 섬모운동은 지속되었다(Fig. 39).

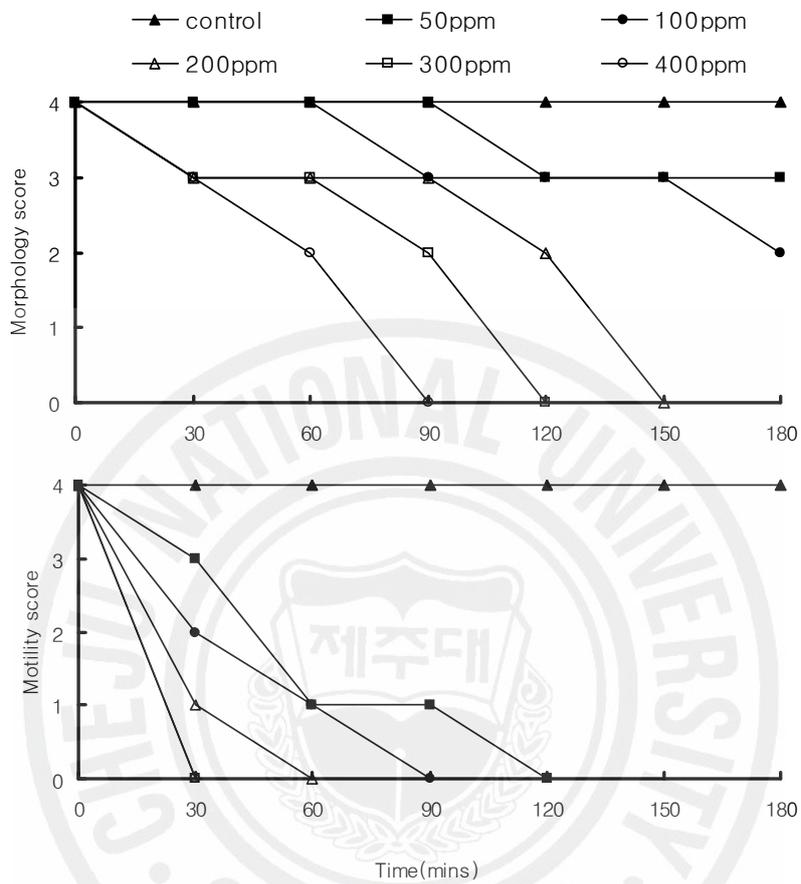


Fig. 37. Observed effects of a range of concentrations of formalin of morphology and motility.

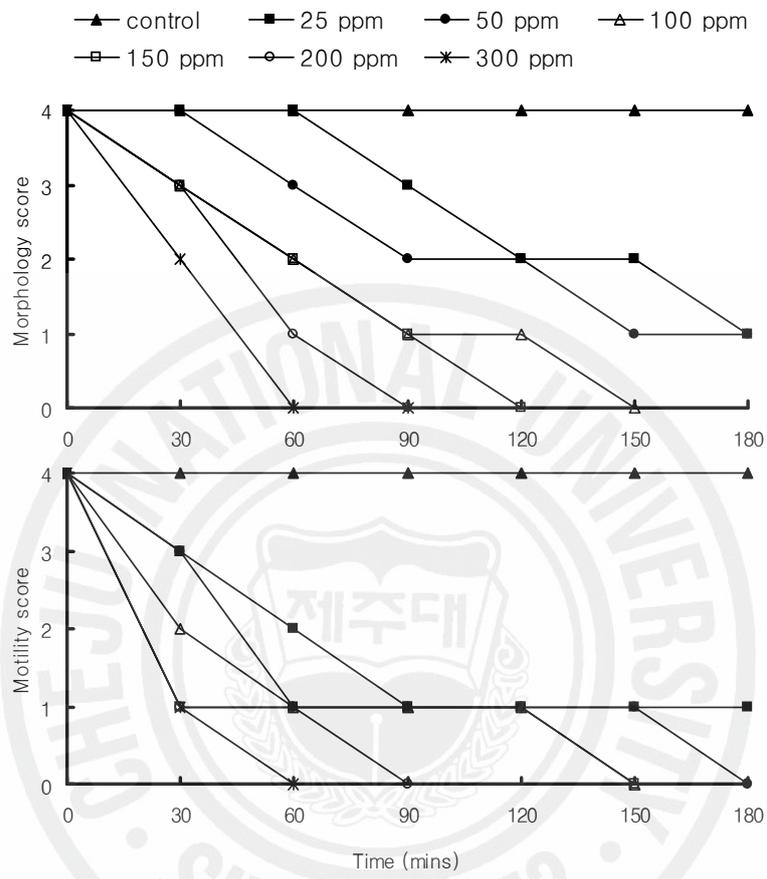


Fig. 38. Observed effects of a range of concentrations of hydrogen peroxide of morphology and motility.

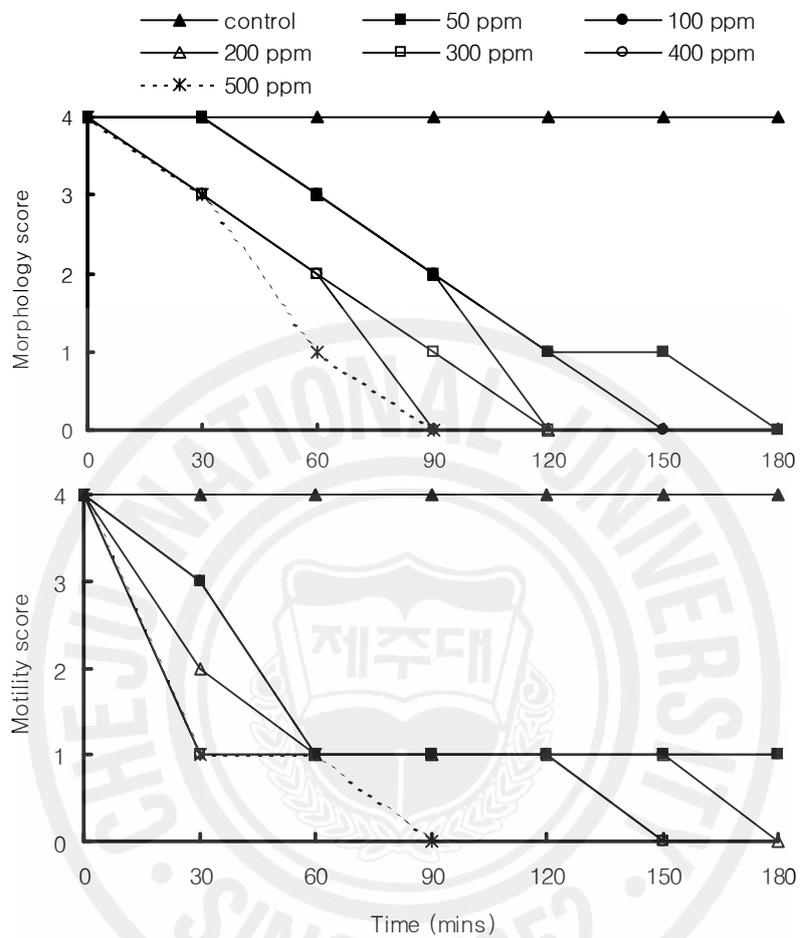


Fig. 39. Observed effects of a range of concentrations of Jenoclean of morphology and motility.

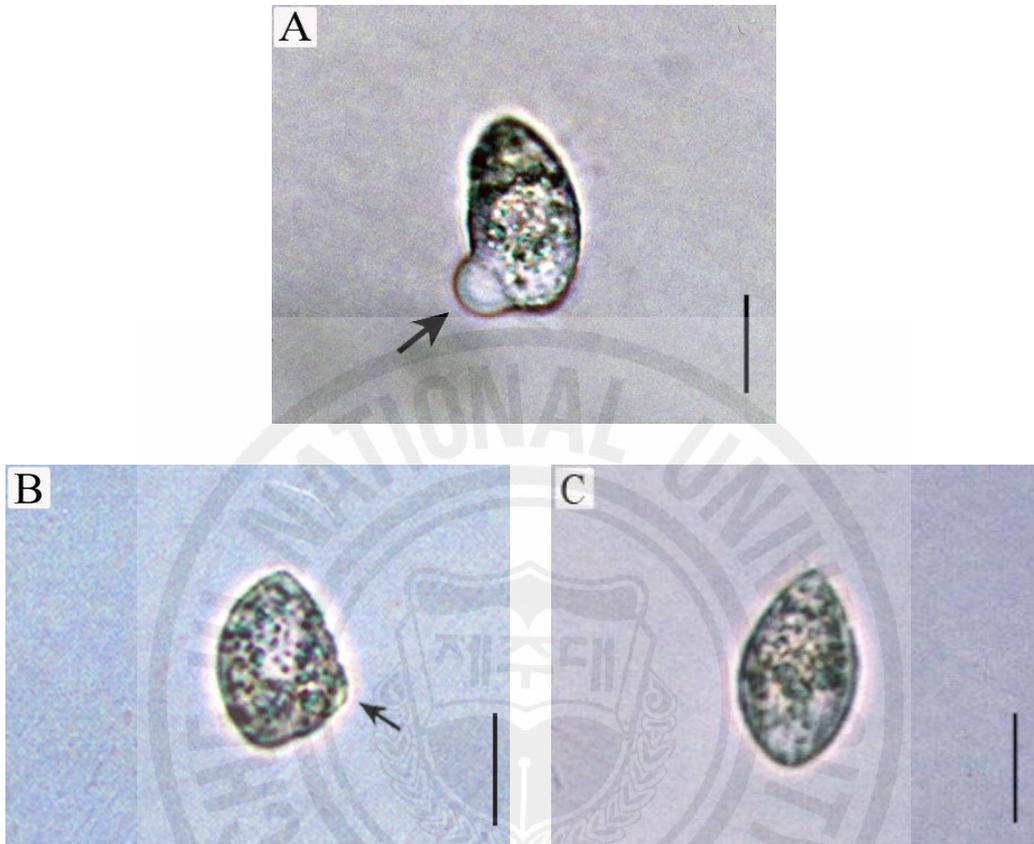


Fig. 40. Cell membrane lysis of ciliates after Jenoclean bathing, (A) an under part of cell, (B) a side part of cell, (C) the whole of cell. Scale bar= 20 μm .

3. 고찰

스쿠티카충은 넙치뿐만 아니라 육상양식장에서 양식되는 터봇과 농어 등 많은 어종에 감염되고 있으며, 특히 *P. dicentrarchi* 는 감염어의 체내 침투능력이 뛰어나 피해가 크다(Iglesias et al., 2002, Iglesias et al., 2003). 그 동안 화합물을 이용한 구제실험 등 많은 연구가 진행되고 있는데 Paramá 등(2005)은 기존에 치료제로 널리 이용 되어온 formalin 외에도 glutaraldehyde에 chitosan microsphere나 미량의 BCD (beta-cyclodextrin)를 첨가하여 구제효과를 높일 수 있다고 하였으며, Paramá 등(2004)은 다양한 antiprotozoal 제제를 이용한 구제효과 screen 결과 fluoroquinolone계의 norfloxacin과 lomefloxacin 등의 항균제도 구제효과가 있다고 하였다. 이외에도 Iglesias 등(2002)은 doxycycline hyclate에 구제효과가 있다고 하였다. 이렇게 다양한 화합물에 구제효과를 보이고 있으나 양식어류에 감염된 경우 높은 전염성과 내부 기관에 침투하므로 화합요법 처리로는 완치가 어렵다(Iglesias et al., 2003, 田, 2005).

Crosbie and Munday(1999)는 화합물을 이용한 구제실험에서 운동성을 완전히 상실한 시기를 사실상 충이 죽은 시기로 단정했다. 이 기준에 따르면 본 스쿠티카충은 포르말린은 300 ppm에 30분, 200 ppm에 60분, 100 ppm에 90분, 50 ppm에 120분 만에 구제효과가 있는 것으로 나타났다. 그러나 포르말린 약욕시 운동성은 농도에 따른 약욕시간 별로 뚜렷이 구제효과가 구분되었으나 형태적 변화는 뚜렷이 구분되지 않았다. 반면에 과산화수소 처리구는 형태적으로 뚜렷이 처리농도 및 시간에 따라 score가 구분되었다. 세포가 변형되거나 세포벽이 파괴되는 경우를 기준한 과산화수소의 구제효과는 300 ppm에 60분, 200 ppm에 90분, 150 ppm에 120분 100 ppm에 150분 약욕으로 구제효과가 있다고 볼 수 있다. 일반적으로 과산화수소는 수중에서 분해되며, 분해된 후 유독성 물질이 아니므로 식품이나 의약품 등으로 많이 이용될 뿐만 아니라 외국에서도 양식어류 치료용으로 널리 이용되고 있다. 그렇지만 현장에서 양

식넙치는 과산화수소에 처리시 심한 스트레스 증상을 보이는 경우가 많아 앞으로 과산화수소 약욕시 넙치의 스트레스에 대한 연구가 필요한 것으로 보인다. Jee 등(2002)의 *U. marinum*은 과산화수소 200 ppm, 포르말린 100 ppm 처리시 4시간 내에 모두 구제되었다고 하였다. Crosbie와 Munday (1999)는 *U. nigricans*의 *in vitro* 구제실험에서 포르말린 200 ppm에 60분, 100 ppm에 120 약욕으로 구제되며, 과산화수소는 500 ppm에 30분, 250 ppm에 60분 약욕으로 구제되었다. 이들 결과와 비교해 볼 때 두 화합물에 의한 구제시 *Uronema* 충보다는 다소 내성이 높은 것으로 나타났으나 큰 차이는 없는 것으로 보인다. 또한 스쿠티카충 감염어 치료실험에서도 감염된 넙치 치어의 병세가 심하지 않은 경우는 포르말린은 100 ppm에, 과산화수소는 33.3 ppm에 1일 1시간씩 2~4일간 약욕으로 구제효과를 보였으나 증상이 심한 경우는 효과가 없다고 하였으며(Jee and Jo, 2002), 田(2000)은 감염 넙치에 포르말린 200 ppm에 1일 1시간씩 7일 정도 반복 약욕처리로 효과를 볼 수 있다고 하였다. 일반적으로 현장에서 낮은 농도에서 여러 번 반복 처리시 효과가 있는 것으로 알려져 있으나 완치는 어려운 실정이다.

포르말린 사용시 소비자들의 인식이나 위생문제로, 과산화수소 약욕은 어체의 스트레스 등의 문제에 따라 그 동안 많은 대체약품 개발이 시도되고 있다. Jenoclean은 이와 같은 대체약품으로 광물성 및 구연산(3%)을 원료로 제조된 제품으로 살충효과가 인정되어 구제농도 설정 등을 위해 *in vitro* 구제실험을 하였다. 구제실험 결과 400 ppm 이상에서 90분, 200~300 ppm에서는 120분 처리로 구제 효과가 뚜렷이 나타났다. 약욕 처리시 세포가 변형되거나 세포막이 파괴되는 과정에서도 지속적으로 섬모운동을 하는 것이 관찰되어 이 제품이 독성보다는 물리적인 작용으로 세포막을 파괴시키는 것으로 보이나 감염어에 대한 현장구제와 안전성 실험 등이 필요한 것으로 판단된다.

스쿠티카충은 일단 체내에 감염되면 약욕처리에 의한 치료에는 한계가 있으므로 치어기, 특히 종묘생산과정에서 감염되지 않도록 보다 세심한 관리가 필요한 것으로 사료된다.

VII. 종합 고찰

기생충성 질병을 일으키는 스쿠티카충은 해양에서 자유유영하고 세균이나 유기물, 조직 등 다양한 유기체를 섭이하며, 기회가 되면 피기생체에 침투하여 조직, 혈액 등을 섭이하는 조건성 기생충이다. 따라서 절대성 기생충인 백점충 등과는 다른 생활사를 가지고 있으며 독자적으로 해양환경에 잘 적응하고 있다(Iglesias et al., 2001; Ototake and Matsusato, 1986; Perez-Uz and Guinea, 2001). 이와 같은 적응력은 해양계에 널리 분포하고 그 때문에 양식어류에 감염 기회가 많은 것으로 사료된다. 특히 육상수조식 양식장은 일정한 장소에서 지속적으로 연안 해수를 취수하고 사육수를 배출하고 있으므로 그만큼 주변에 스쿠티카충이 서식할 기회가 많고 사육수조에 유입될 가능성도 많은 것으로 보인다. 또한 사육수조 저면에는 풍부한 유기물이 침적돼 있으며, 양식 넙치가 저면에 밀집돼 있으므로 이 충의 서식이나 어체내 침투에 이상적인 조건이라 할 수 있다(Choi, 1997, Jin et al., 2003b). 이런 이유로 수조에서 양식되는 어류에 많이 감염되며, 특히 넙치나 터봇과 같이 저면에 착저하여 서식하는 어종에 많은 피해를 입히는 것으로 사료된다.

1995년부터 2004년까지 최근 10년 동안의 제주도내 스쿠티카충 발병동향을 보면 최근 들어 스쿠티카충과 다른 세균성질병이 혼합 감염되어 발병양상이 복잡해지는 것으로 나타났다. 이는 스쿠티카충 뿐만 아니라 다른 세균성 질병이나 바이러스, 기타 기생충 감염도 발병양상이 복잡해지고 있음을 시사하는 것으로 보인다.

스쿠티카충 중에서도 유럽의 양식 터봇에 피해를 입히는 *P. dicentrarchi*가 어체내 침투능력이 매우 뛰어난 것으로 보고 되고 있는데, 아가미 모세혈관, 근육, 복강, 위장, 간장, 비장, 신장, 장벽 등 내부장기에 깊숙이 침투하므로 그 피해가 크고 치료가 어렵다(Iglesias et al., 2001). 그동안 일본과 우리나라의 육상 양식장에서도 양식넙치가 스쿠티카충 감염에 의해서 이와 비슷한 증상을

보이며 많은 피해를 입고 있는데, 감염되는 스키테카충은 몇 종류가 보고 되어있다(Jee et al., 2001; Jung et al., 2005; Kim et al., 2004; Kim et al., 2004a; Kim et al., 2004b).

스쿠테카충은 세균이나 세포, 뇌 조직 등을 섭이하며 생육이 가능한 것으로 보고된바 있는데(Jee et al., 2001; Crosbie and Munday, 1999; 吉水 등, 1993; Parker, 1976; Leiro et al., 2004), 본 연구에서도 *P. dicentrarchi*가 이들 유기물은 물론이고 치어사료와 같은 유기물을 섭취하며 생육할 수 있는 것으로 나타났다. 이들 유기물은 넙치 종묘생산시 수조저면에 침적되거나 밀집돼 있는 물질들로 양식수조 저면은 이 충의 서식에 적합한 조건이라 할 수 있다. 또한 스키테카충은 로티퍼 배양시 로티퍼 사체나 살아있는 로티퍼에도 침투하여 종묘사육수조에 유입될 수 있으므로(Lee and Ha, 1997; Jin et al., 2003a) 종묘생산시 감염예방을 위해서는 우선 순수 배양된 로티퍼를 이용해야하며, 종묘배양과정에서 로티퍼를 종묘생산장 상호간에 분양도 금지해야 할 것으로 보인다. 대부분의 종묘생산장은 깨끗한 지하해수를 이용하고 있으므로 방역시스템을 개선한다면 치어기에 스키테카충의 감염을 훨씬 줄일 수 있을 것으로 판단된다. 이 외에도 스키테카충은 환경에 대한 적응력이 뛰어나므로 양식어장의 전반적인 환경 관리도 중요할 것으로 보인다.

Paramá 등(2003)은 양식 터בות에 *P. dicentrarchi*를 인위 감염시키고 침투경로를 조사하였는데, 그 실험에서 구강, 비강, 직장의 주입이나 침지에 의해서는 감염이 안 되었으며 상처를 입힌 후 침지하거나 근육이나 복강 주사로 인위감염에 성공한바 있다. 이와 같은 결과는 이 충이 침투력이 강하기는 하나 건강한 조직에는 쉽게 침투하지 못하는 것을 시사하는 것으로 보인다.

양식현장에서는 터בות과 넙치에 스키테카충 감염이 많고 또 많은 피해를 입고 있으나 인위 감염은 쉽게 이루어지지 않은 이유는 스키테카충을 체내 주입이나 주사, 용액 침지 등 강제적인 감염을 유도했기 때문으로 추정된다. 인위 감염시에는 실험어를 방양하기 전에 수조 저면에 충분히 스키테카충을 배양시킨 후 실험어를 방양할 경우 자연적인 인위감염이 가능할 것으로 판단된다. 본 연구에서 *P. dicentrarchi*를 넙치 치어에 인위 감염시킨 결과 체내에

쉽게 침투하며 치명적인 피해를 입히는 것으로 나타나 스쿠티카증을 유발하는 주요 종으로 보인다.

넙치에 침투하는 루트는 몇 가지가 있었으나 최초 감염부위는 모두 조직이 부드럽고 약하여 쉽게 침투 가능한 부위였다. 그러나 일단 조직 속에 침투한 후에는 근육결과 근조직 경계면을 따라 확산되고, 골격과 골격을 따라 분포하는 근조직 사이로 장거리 이동이 가능하였다. 특히 어체의 중심부에 있는 척추나 척수를 중심으로 전신을 유기적으로 이동이 가능한 것으로 나타났는데 그만큼 체내 이동이 용이하고 치명적인 피해를 입힐 수 있음을 나타낸다고 할 수 있다. Paramá 등(2003)은 양식 터봇의 체내에서 스쿠티카충이 단백질 분해 효소에 의한 이동 가능성을 제기한 바 있으나 본 실험에서는 조직과 조직 사이에서 쉽게 이동을 하는 것으로 나타났다. 또한 이 충의 넙치 치어 감염이나 체내 침투는 어체 크기가 작을수록 쉽고 빠르게 이루어졌으며, 폐사 또한 많이 나타났는데 치어기에 조직이 연약하므로 쉽게 침투가 가능하기 때문인 것으로 보인다. 이와 같은 이유로 스쿠티카충이 감염될 경우 치어기에 피해가 많은 것으로 보이며, 비브리오균이 혼합 감염되어 피해를 가중시키는 것으로 판단된다. Lee 등(2001)과 Jin 등(2003a)의 연구에서도 스쿠티카충과 혼합감염되는 병원성 세균으로 비브리오균이 가장 많은 것으로 보고한 바 있으며, 본 연구에서도 비브리오균이 가장 많이 혼합 감염되는 것으로 나타나 비브리오균의 치료도 중요할 것으로 보인다. 또한 2차 감염된 균에 의해 분해된 조직도 스쿠티카충이 섭이하는데 도움이 되는 것으로 보여 균과 충이 상호 보완적 관계를 유지하면서 증식하고 있는 것으로 보인다.

아가미 새엽과 새궁의 모세혈관에 충이 침입하고 또 아가미와 심장을 연결하는 혈관에서도 충이 침투한 것으로 보아 아가미 모세혈관을 통해서 심장으로 침투하는 것으로 보이나 조직학적으로 혈관내 이동경로를 전반적으로 관찰할 수는 없었다. Paramá 등(2003)의 연구에서도 스쿠티카충에 감염된 터봇에서 혈관내 침투가 관찰되어 혈관을 통한 체내 확산 가능성을 제기한바 있으며, Lee 등(1994)도 넙치 치어에 감염된 스쿠티카충이 혈관을 통한 내부장기 침투 가능성을 제기한 바 있다. 그러나 본 연구에서는 아가미나 지느러미 모

세혈관 등에 침투하고 아가미 주변 혈관에도 침투하였으나 혈관을 통하여 장거리 이동을 하거나 다른 기관으로 확산되는 경우는 관찰되지 않았다. 이는 스쿠티카충이 어류의 적혈구를 섭취하기는 하나(Dragesco et al., 1995) 혈관 속은 영양적인 문제 등으로 증식이 쉽게 이루어지지 않거나 또 다른 이유로 생육에 적합하지 않은 환경으로 추정된다. 앞으로 혈관내에서 스쿠티카충의 생육이나 이동에 관해서는 추가연구가 필요한 것으로 사료된다.

*P. dicentrarchi*를 구제하기 위한 *in vitro* 실험에서 포르말린의 구제효과는 다른 종류의 스쿠티카충과 비슷한 농도인 300 ppm에 30분, 200 ppm에 60분, 100 ppm에 90분 약육으로 효과가 있었으며, 통상 현장에서 약육 처리하는데 큰 문제가 없는 것으로 보인다. 그렇지만 과산화수소는 300 ppm에 60분, 200 ppm에 90분, 150 ppm에 120분 100 ppm에 150분 약육으로 구제효과가 있는 것으로 나타나 현장에서 약육 처리하는 50 ppm에 1시간 약육보다 훨씬 높은 농도와 시간을 요하고 있어 주의가 요망된다. 일반적으로 현장에서 과산화수소 약육시 100 ppm 이상의 농도에서 1시간 이상 약육시 심한 스트레스 증상을 보이는 경우가 많으므로 향후 과산화수소 약육이 넙치에 미치는 영향에 대한 조사가 필요한 것으로 보인다. 그 동안 현장에서 많이 이용되었던 포르말린이나 과산화수소의 대체 약품으로 개발중인 Jenoclean은 200~300 ppm에 120분 약육처리로 뚜렷한 효과를 볼 수 있어 현장에서 구제제로 사용이 가능할 것으로 보이나 약육시나 약육 후 어체와 환경에 미치는 영향과 약육시 해수용해 등 지속적인 연구가 필요한 것으로 보인다. 일단 스쿠티카충이 체내에 침투한 경우는 치료가 어려우며(田, 2000), 감염어 구제실험에서도 감염 상태가 심하지 않은 경우는 포르말린, 과산화수소, 담수욕 등으로 구제효과를 볼 수 있으나 병세가 악화된 경우는 치료효과가 없었다(Jee and Jo, 2002). 따라서 감염시 화합물에 의한 구제는 감염초기에 어체 표피에 감염된 충이나 사육수조에 서식하는 충을 구제하여 피해를 줄이는 수단이라 할 수 있다. 그러므로 감염을 사전에 예방하는 것이 중요한데, 종묘생산이나 치어기에 보다 위생적인 관리가 필요하며, 백신이나 다양한 치료제 개발을 위한 지속적인 연구가 필요한 것으로 사료된다.

요 약

스쿠티카충은 넙치양식장에서 발병되는 전체 질병 가운데 혼합감염 포함 40% 정도의 발병률을 보이고 있어 양식넙치에 가장 문제가 되는 질병중의 하나이다. 본 연구는 이와 같이 육상수조에서 양식되는 넙치에 감염되어 많은 피해를 입히고 있는 스쿠티카충의 감염예방과 치료를 위한 자료를 제공코자 수행하였다. 먼저 이 질병의 발병동향을 파악하기 위해 최근 10년 동안 제주 지역 넙치양식장의 스쿠티카충 발병현황 등을 조사하였다. 다음에 스쿠티카충이 감염된 넙치의 뇌에서 스쿠티카충을 분리하여 *Philasterides dicentrarchi*로 동정하였으며 생육환경 등의 생물학적 특성을 조사하였다. 그리고 넙치 치어에 인위감염 시험을 거쳐 이 충의 병원성을 확인하였으며, 감염예방과 치료 자료를 제공하기 위해 어체내 감염과정을 밝히고 화합물의 종류별 *in vitro* 구제실험을 실시하였다.

1995년부터 2004년까지 최근 10년 동안 제주지역 넙치양식장의 스쿠티카충 발병동향을 조사한 결과 1998년도부터는 급격히 발병비율이 증가하여 2000년도 이후에는 연간 발병건수는 500건 내외, 총 발병건수 대비 스쿠티카충 발병률은 40% 전후로 높아졌다. 월별 발병동향은 5월에서 9월까지 많이 발병되었으며, 혼합 감염되는 세균성질병은 비브리오병이 가장 많았다.

양식넙치 치어의 뇌에서 스쿠티카충을 분리하고 형태적·유전적 검토 결과 *P. dicentrarchi*로 동정되었으며, 세포, 세균, 넙치치어 배합사료, 뇌 조직과 로티퍼 조직 등의 유기물을 먹이로 활발히 증식하였다. 생육환경은 염분농도 5~45 ppt, pH 6~9 범위에서 증식이 이루어졌으며, 온도는 10~30℃ 범위에서 생존 및 증식이 가능하나 10~25℃ 범위에서 활발한 증식이 이루어졌다.

이 스쿠티카충의 병원성을 밝히기 위해 넙치 치어 3 cm 그룹과 5 cm 그룹에 인위 감염시킨 후 감염에 따른 감염율과 폐사율 등의 병원성을 조사하였다. 감염률 시험결과 3 cm 그룹인 경우 4일째에 40%가 감염되었으며, 24일째에는 감염률이 90.1%로 대부분의 실험어가 감염되었다. 5 cm 그룹은 접종 후 8일째

최초로 20%의 감염률을 보여 3 cm 그룹에 비해서 초기 감염률이 낮았으나 24 일째에는 81%에 달했다. 뇌 침투는 3 cm 그룹은 총 접종 후 14일 만에, 5 cm 그룹은 20일 만에 각각 확인되어 어체가 작을수록 뇌에 침투가 빨리 이루어졌다.

폐사율 실험결과, 이 스쿠티카충 감염에 의한 3 cm 그룹의 피해는 치명적이었다. 접종 후 5일째부터 폐사가 시작되었으며, 28일 만에 95.6%의 높은 폐사율을 보였다. 5 cm 그룹은 인위 접종 후 18일째에 처음으로 폐사되기 시작하였으며, 28일 동안 71%가 폐사하여 3 cm 그룹에 비해 폐사율이 낮았다.

인위 감염시킨 실험어를 병리조직학적 관찰을 통하여 어체 감염경로를 확인한 결과 최초 감염은 주로 지느러미나 머리 부분의 부드러운 조직에 감염된 후 체내로 침투하였다.

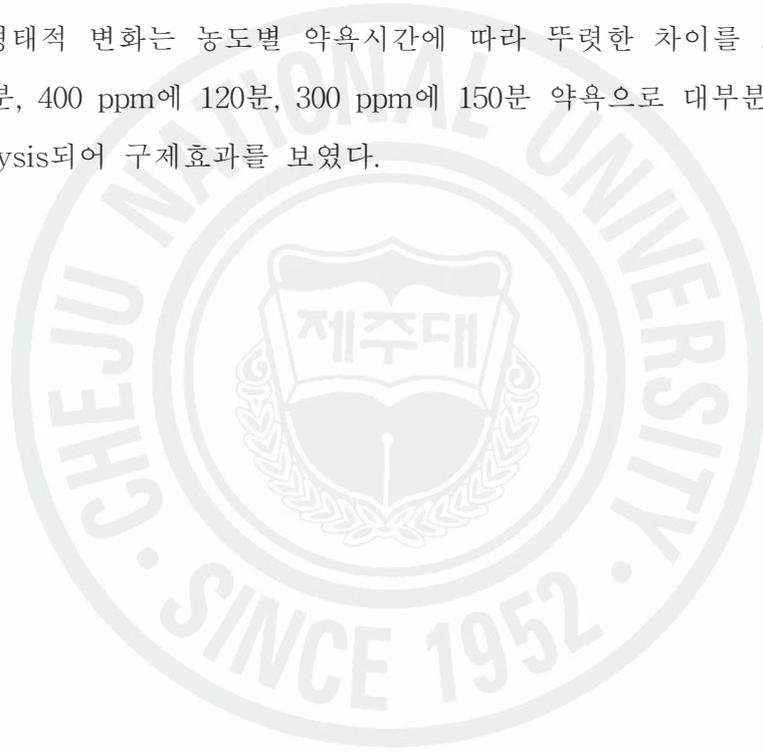
꼬리지느러미를 통한 감염과정은 꼬리지느러미 막과 모세혈관을 따라 미병부로 침투하였으며, 척추골과 척수에 침투한 후 척수 피하조직을 따라 뇌에 도달하였다. 등지느러미와 뒷지느러미를 통한 침투는 최초에 지느러미 모세혈관이나 지느러미 막에 침투한 후 지느러미 기부 근육으로 침투하였다. 그 후 지느러미 기부 근육을 피사시키거나 신경극이나 혈관극과 평행으로 분포하는 근조직을 따라 척추 부위로 침투하였다. 이외에도 지느러미 표피를 따라 체표로 이동한 후 근육으로 침투하는 경우도 있었다.

두부 감염은 주로 주둥이를 통해서 감염된 후 두부 골격과 이를 덮고 있는 근조직 사이로 두부 전체에 확산되었으며 안구에도 침투하였다. 안구 침투 후 시신경을 따라서 뇌로 침투하였으며, 안구에 침투하지 않은 경우에도 두부에 감염되어 두개골 외벽에 도달한 후 신경공을 통해서 뇌로 침투하였다. 뇌에 침투한 후에는 뇌 전체로 확산되고 척수로 이행된 후 꼬리 쪽으로 이행되었다.

아가미로 감염되는 과정은 주둥이에 감염된 후 구강으로 이행하여 부드러운 연조직인 구강벽에 증식하였으며, 구강의 표피조직을 따라 세궁으로 이행된 후 새엽의 상피조직과 모세혈관에 침투하였다. 이외에도 아가미뚜껑의 부드러운 피부조직에 감염된 후 아가미 뚜껑 피부조직을 따라 아가미로 이행되었다.

이외에 복강에도 침투하였는데 뒷지느러미나 배지느러미에 감염된 후 체표를 따라 이동하면서 항문주위에서 다량으로 증식하였으며, 항문을 통하여 복강으로 침투하였다.

이 층에 대한 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, 150 ppm 처리구와 100 ppm 처리구에서는 150분 만에 각각 운동성을 완전히 상실하여 효과를 보였다. 새로운 구제제로 개발되고 있는 Jenoclean 약욕에 따른 형태적 변화는 농도별 약욕시간에 따라 뚜렷한 차이를 보였다. 500 ppm에 90분, 400 ppm에 120분, 300 ppm에 150분 약욕으로 대부분 세포가 변형되거나 lysis되어 구제효과를 보였다.



참 고 문 헌

- Baeck, G. W., J. H. Kim, D. K. Gomez and S. C. Park. 2006. Isolation and characterization of *Streptococcus* sp. from diseased flounder (*Paralichthys olivaceus*) in Jeju Island. J. Vet. Sci., 7(1) : 53~58.
- Byrne, M., A. Cerra, T. Nishigaki and M. Hoshi. 1997. Infestation of the testes of the Japanese sea star *Asterias amurensis* by the ciliate *Orchitophyra stellarum*: a caution against the use of this ciliate for biological control. Dis. Aquat. Org., 28 : 235~230.
- Cawthorn, R. J., D. H. Lynn, B. Despres, R. MacMillan, R. Maloney, M. Loughlin and R. Bayer. 1996. Description of *Anophryoides haemophila* n. sp. (Scuticociliatida: Orchitophryidae), a pathogen of American lobsters *Homarus americanus*. Dis. Aquat. Org., 24 : 143~148.
- Chen, Z and W. Song. 2002. Phylogenetic positions of *Aspidisca steini* and *Euplotes vannus* within the order Euplotida (Hypotrichia: Ciliophora) inferred from complete small subunit ribosomal RNA gene sequences. Acta Protozool, 41 : 1~9.
- 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.
- Choi, S. D., J. M. Kim, S. Y. Kim, Y. C. Jo, K. K. Choi and H. C. Yang. 1997. Study on distribution and extermination of scuticociliatids parasitizing to Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* in southern

- Korea. J. Fish Pathol., 10(1) : 21~29.
- Corliss, J. O. 1953. Silver impregnation of ciliated protozoa by the Chatton-Lwoff technic. Stain. technol. 28 : 97~100.
- Corliss, J. O. 1968. The value of ontogenetic data in reconstructing protozoan phylogenies. Trans. Am. Microsc. Soc., 87 : 1~20.
- 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.
- Dykova, I. and A. Figueras. 1994. Histopathological changes in turbot *Scophthalmus maximus* due to a histophagous ciliate. Dis. Aquat. Org., 18 : 5~9.
- Evans, F. R. and J. O. Corliss. 1964. Morphogenesis in the hymenostome ciliate *Pseudocohnilembus persalinus* and its taxonomic and phylogenetic implications. J. Protozool., 11 : 353~370.
- 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.
- Gill, P. A. and R. B. Callinan. 1997. Ulcerative dermatitis associated with *Uronema* sp. infection of farmed sand whiting *sillago ciliata*. Aust. Vet. J., 75 : 357.
- Heo, M. S., C. B. Bok, J. Lee, I. K. Yeo, U. J. Jeon, J. J. Lee, S. C. Chung, K. W. Lee, S. Rho, K. S. Choi and Y. D. Lee. 2001. Characteristics of β -Streptococcus spp. Isolated in Cultured Flounder (*Paralichthys olivaceus*) of Jeju Island. J. Korean Fish. Soc. 34(4) : 365~369.
- 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(2) : 93~97.

- Jee, B. Y., M. R. Jo, J. W. Kim and M. S. Park. 2002. *In vitro* efficacy of formalin, hydrogen peroxide and copper sulfate on the scuticociliate *Uronema marinum* at low salinity. J. Fish Pathol., 15(3) : 111~115.
- Jee, B. Y., K. H. Kim and S. I. Park. 1997. Cryptocaryoniasis of cultured flounder, *Paralichthys olivaceus* in low temperatures. J. Fish Pathol., 10(2) : 97~111.
- 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. 2003a. Scuticociliatosis in flounder farms of Jeju island. J. Fish Pathol., 16(2) : 135~138.
- Jin, C. N., C. H. Lee, S. P. Oh, O. S. Na and M. S. Heo. 2003b. Infection route of scuticociliates in the juvenile of the cultured flounder, *Paralichthys olivaceus*. J. Fish Pathol., 16 : 13~21.
- Jin, C. N., H. S. Kang, G. T. Park, J. Lee, Y. D. Lee, W. B. Choi and M. S. Heo. 2005. Biological characteristics of Scuticociliate with a polymorphic life cycle of ciliate and cyst isolated from cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. J. Fish Pathol., 18(1) : 19~28.
- 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.

Kang, B. S., H. B. Go, S. J. Kim, O. S. Na, C. H. Lee, S. Y. Kim, J. Lee and Y. D. Lee. 2005a. 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.

Kang, B. S., H. B. Go, S. J. Kim, O. S. Na, C. H. Lee, S. Y. Kim, J. Lee and Y. D. Lee. 2005b. Distribution of Scuticociliates Infiltrated into the Internal Tissues and Organs of Tiger Puffer, *Takifugu rubripes*. J. Fish Pathol., 18(1) : 99~103.

Kim, J. H. and E. H. Kim. 2003. Diversity of the Streptococcal Strains Isolated from Diseased Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*). J. Kor. Fish. Soc. 36(6) : 654~660.

Kim, J. S., S. Rho and M. S. Heo. 2001. Spatial and Temporal Occurrence of *Edwardsiella tarda* at Flounder Farms in Jeju. Korean J. Environ. Biol. 19(2) : 173~181.

Kim, S. M., L. H. Lee and K. H. Kim. 2004. Differentiation of Three Scuticociliatosis Causing Species in Olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) by Multiplex PCR. J. Fish Pathol., 17(2) : 145~149.

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. and D. S. Ha. 1991. A streptococcal Disease of Cultured Flounder, *Paralichthys olivaceus*. J. Fish Pathol., 4(2) : 71~77.
- Lee, C. H. and D. S. Ha. 1997. Culture characteristics and division process of scuticociliate *in vitro*. J. Fish Pathol., 10(2) : 177~186.
- 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, J. B., S. Rho and C. B. Song. 1995. The biological and biochemical characteristics of a *Vibrio* sp., causative agent of intestinal necrosis of flounder larvae (*Paralichthys olivaceus*). J. Fish Pathol., 8(2) : 99~109.
- Lee, N. S., J. H. Park, K. S. Han and M. D. Huh. 1994. Histopathological changes in fingerlings of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, with sever scuticociliatosis. J. Fish Pathol., 7(2) : 151~160.
- Leiro, J., J. A. Arranz, R. iglesias, F. M. Ubeira and M. L. Sanmartín. 2004. Effects of the histiophagous ciliate *Philasterides dicentrarchi* on turbot phagocyte responses. Fish & Shellfish Immunology, 17 : 27~39.
- Ma, H., J. K. Choi and W. Song. 2003. An improved silver carbonate impregnation for marines ciliated protozoa. Acta protozoologica, 42 :

161~164.

Mizuno, Y. 1993. Control methods of diseased Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, used in fish farm in Japan. J. Fish Pathol., 6 : 219~231.

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.

Oh, S. P., D. H. Kim., J. J. Lee and C. H. Lee. 1998. Bacterial Diseases in Flounder Farms of Cheju Island. J. Fish Pathol., 11(1) : 23~27.

Ototake, M. and T. Matsusato. 1986. Notes on scuticociliata infection of cultured juvenile flounder *Paralichthys olivaceus*. Bull. Natl. Res. Aquaculture, 9 : 65~68.

Paramá, A., M. F. Arranz, M. L. Álvarez, M. L. Sanmartin and J. Lero. 2006. Ultrastructure and phylogeny of *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora, Scuticociliatia) from farmed turbot in NW Spain. Parasitology, 132 : 555-564.

Paramá, A., R. Iglesias, F. Álvarez, J. M. Leiro, J. M. Quintela, C. Peinador, L. González, R. Riguera, M. L. Sanmartín. 2004. *In vitro* efficacy of new antiprotozoals against *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora, Scuticociliatida). Dis. Aquat. Org., 62 : 97~102.

- Paramá, A., R. Iglesias, M. F. Álvarez, J. Leiro, C. Aja and M. L. Sanmartín. 2003. *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora, Scuticociliatida): experimental infection and possible routes of entry in farmed turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, 217 : 73~80.
- Parker, J. G. 1976. CULTURAL CHARACTERISTICS OF THE MARINE CILIATED PROTOZOAN, URONEMA MARINUM Dujardin. *J. exp. mar. Biol.*, 24 : 213~226.
- Perez-Uz, B. and A. Guinea. 2001. Morphology and Infraciliature of a Marine Scuticociliate with a Polymorphic Life Cycle: *Urocryptum tortum* n. gen., n. comb. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 48(3) : 338~347.
- Provasoli, L., J. J. A. McLaughlin and M. R. Droop. 1957. The development of artificial media for marine algae. *Arch. Mikrobiol.*, 25 : 392~429.
- Shang, H., W. Song and A. Warren. 2003. Phylogenetic positions of two ciliates, *Paranophrys magna* and *Mesanophrys carcini* (Ciliophora: Oligohymenophorea), within the subclass scuticociliatia inferred from complete small subunit rRNA gene sequences. *Acta Protozool.*, 42 : 171~181.
- Small, E. B. 1967. The Scuticociliatida, a new order of the class Ciliata (Phylum Protozoa, Subphylum Ciliophora). *Trans. Am. Microsc. Soc.*, 86 : 345~370.
- Small, H. J., D. M. Neil, A. C. Taylor, K. Bateman and G. H. Coombs. 2005. A parasitic scuticociliate infection in the Norway lobster (*Nephrops norvegicus*). *Journal of INVERTEBRATE PATHOLOGY*,

(in press)

Song, W. and N. Wilbert. 2000. Redefinition and redescription of some marine scuticoliate from China, with report of a new species, *Metanophrys sinensis* nov.spec. (Ciliophora, Scuticociliatida). Zoologischer Anzeiger. 239 : 45-74.

Song, W. B. 1991. Morphology and morphogenesis of the fresh-water scuticociliate *Uronema nigricans* (Muller, 1786). Acta Zool. Sin., 37 : 233~243.

Thompson, F. L., T. Iida and J. Swings. 2004. Biodiversity of Vibrios. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2004 : 403~431.

Thompson, J. C. and L. Moewus. 1964. *Miamiensis avidus* n. g., n. sp., a marine facultative parasite in the ciliate order hymenostomatida. J. Protozool., 11 : 378~381.

Yoshinaga, T. and J. Nakazoe. 1993. Isolation and *in vitro* Cultivation of Unidentified Ciliate Causing Scuticociliatosis in Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*). Kyobyō kenkyū, 28(3) : 131~134.

Yoshinaga, T. and J. Nakazoe. 1997. Effects and Rotation Culture on the *In Vitro* Growth of a Ciliate Causing the Scuticociliatosis of Japanese Flounder. Fish Pathology. 32(4) : 227~228.

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*)のスクーティカ感染症.-スクーテ

- ィカ 纖毛虫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 스크-ティカ纖毛虫(膜口類)症. *Bull. Natl. Res. Aquaculture*, 9 : 65~68.
- 日本水産學會. 2003. 日本水産學會70年史, pp. 59~67.
- 康法勢. 2000. 스크티카섬모충에 감염된 자주복 *Takifugu rubripes*의 병리조직학적 연구. 제주대학교 박사학위 논문, pp. 63.
- 국립수산진흥원. 2000. 어병예방 및 치료대책, pp. 103~119.
- 金容億, 1989, 魚類學 總論. 太和出版社, pp. 16~158.
- 李昌薰・河東洙. 1995. 養殖生物 疾病診斷研究. 南海研究所事業報告書, pp. 211~215.
- 田世圭. 1992. 海産養殖魚類의 疾病. 한국수산신보사, pp. 48~100.
- 田世圭. 2000. 海産養殖魚類의 疾病-海産魚編, 한국수산신보사, pp. 89~93.
- 田世圭. 2005. 넙치의 질병과 치료, 한국수산신문사, pp. 137~190.
- 제주특별자치도. 2006. 2006년도 해양수산현황, pp. 40.
- 진창남. 2002. 양식넙치, *Paralichthys olivaceus* 치어의 스크티카충 감염경로. 제주대학교 석사학위 논문, pp. 8~36.

추연동. 1998. 넙치(*Paralichthys olivaceus*)에 기생하는 스쿠티카충의 증식과 감염에 관한 연구. 여수수산대학교 석사학위 논문, pp. 7~10.

해양수산부. 2002. 전국 수산기술 보급사업 평가회의 주제발표 자료집, pp. 3~30.

해양수산부. 2006, 2005. 어류양식 현황조사. pp. 61~144.



감사의 글

부족함이 많은 제가 뒤 늦게 학업을 재개하면서 배움의 시기가 지나버렸다는 조바심과 교수님과 학우들에게 누를 끼치는 건 아닌가하는 걱정이 앞섰습니다. 다행히 헌신적으로 지도해주신 교수님들과 많은 주위 분들의 도움으로 이 논문을 완성할 수 있었습니다.

우선 이 논문을 완성할 수 있도록 지도해 주신 허문수 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 또한 이 논문을 세심하게 다듬어 주시고 심사해 주신 송춘복 교수님, 이영돈 교수님, 이제희 교수님과 국립수산물품질관리원 이창훈 박사님께 깊은 감사를 드립니다. 그리고 언제나 변함없는 격려와 가르침을 주신 정상철 교수님, 이기완 교수님, 노 섬 교수님, 여인규 교수님, 전유진 교수님께도 감사를 드립니다. 그리고 자주 뵙지 못하지만 언제나 변함없는 사랑으로 지도해 주시는 조재운 교수님께 감사드립니다.

바쁜 직장에서 이 논문이 완성될 수 있도록 많은 배려와 도움을 주신 목포지방해양수산청 김규진 청장님을 비롯하여 완도해양수산사무소 고길룡 소장님과 직원 여러분께도 감사를 드립니다.

언제나 변함없이 격려해 주시고 성원해 주신 해양수산부 부원찬 총무과장님과 조재현 수산경영과장님, 고인철 전 제주지방해양수산청장님께도 깊은 감사의 말씀을 드립니다. 그리고 지금은 소속을 달리하고 있지만 제주지방해양수산청에서 오랜 시간 고락을 함께했던 김대환 과장님을 비롯하여 최영진, 송윤경, 정성필, 장근수, 오상필 계장님과 고경호, 김원평, 이정호 주임님, 김종수 박사님께도 감사드립니다.

업무에 바쁜 가운데도 헌신적인 도움을 주신 수산과학원 제주수산연구소 이정희 소장님, 남해수산연구소 한석중 양식팀장님, 병리연구팀 박명애 연구관님과 최희정 연구원님, 제주도 해양수산자원연구소 강봉조 박사님께 깊이 감사드리며, 제주대학교 해양과환경연구소 송영보 박사님과 이치훈 박사님께도 고마운 말씀을 드립니다.

뒤늦게 대학원을 다니면서 어려움이 많았지만 이를 극복할 수 있도록 많은 도움을 주었던 강현실 학우와 품질검사원 고대회 계장님, 제주도 해양수산자원연구소 양병규 연구사를 비롯한 미생물 실험실의 장영환·정용욱·강철영·문영건·김만철·장태원·김주상·김민주·문현식·김윤범·강선경·전봉근·손정호·박동민 후배님과 해양생물공학과 학우들께 감사드리며 함께했던 배움의 시간들을 가슴속에 소중히 간직하겠습니다.

항상 옆에서 용기를 주셨던 문태연 선배님, 실험과정에서 여러 차례의 시행착오와 실패 속에서 건강한 넘치 종묘를 제공하여 성공적으로 실험을 마칠 수 있게 해준 고성종 사장, 형제이자 친구인 창우와 고응순 동문회장을 비롯한 많은 친구들의 도움과 우정은 영원토록 잊지 않겠습니다.

끝없는 사랑으로 저를 키워주신 어머니와 형님, 형수님, 조카 승호, 승환, 민정이와 이 기쁨을 나누고자 합니다. 그리고 처남 가족들과 처제와 동서들, 어려운 여건 속에서도 변함없는 후원자이자 삶의 동반자인 아내와, 학업을 시작할 때는 어린 학생이었으나 지금은 어느새 직장인과 대학생·고등학생으로 자란 승희·주희·희종이와 기쁨을 같이 하고자 합니다.

끝으로 한평생 이 자식을 위해 희생해 주시고 사랑으로 키워주신 그리운 아버지 영전에 이 논문을 받칩니다.