

환경친화성 계면활성제를 이용한 어병균의 살균효과

최 상 원 · 정 관 용 · 오 남 희 · 김 은 영 · 방 정 환 · 김 정 우* · 여 문 환**
여수대학교 화학공학과 · 서남대학교 화학과* · 서남대학교 의과대학 생리학교실**
서남대학교 생물학과***
(1999년 11월 20일 접수)

Disinfectant Effects of Ecological Familiar Surfactant against Fish Pathogens

Sang-Won Choi, Kuan-Yong Jeong, Nam-Hee Oh, Eun-Young Kim, Jeong-Hwan Bang*,
Jung-Woo Kim** and Moon-Hwan Yeo***

Dept. of Chemical Engineering, Yosu National University, Yosu, 550-749, Korea

*Dept. of Chemistry Seonam University, Namwon, 590-711, Korea

**Dept. of Physiology College of medicine Seonam University, Namwon, 590-711, Korea

***Dept. of Biology Seonam University, Namwon, 590-711, Korea

(Manuscript received 20 November, 1999)

The antibacterial effect amino acid-copper(II) surfactant on fish pathogens was studied. Fish pathogens of *Edwardsiella tarda*, *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus* sp. were selected, cultured in nutrient agar and adjusted at $2 \times 10^5 \sim 10^6$ CFU/ml in phosphate buffer saline before the addition of amino acid-copper(II) surfactant with different concentrations. All tested pathogens died within 1 hour with 1 ppm of amino acid-copper(II) surfactant. In comparison with formalin and ET, amino acid-copper(II) surfactant was more effective in antibacterial capacity.

Key words: amino acid-copper(II) surfactant, disinfectant, fish pathogens

1. 서 론

어류 양식장에 심각한 피해를 입히고 있는 세균성 질병인 에드워드, 비브리오 및 연쇄구균, 에어로모나스균 등의 어병균들은 여러 환경조건의 경로로부터 감염되는데, 가장 확실한 경로는 수 환경으로부터 어류에 직접 감염되어 어병을 발생시킨다고 알려졌다. 이들 세균성 어병균은 특히 고수온기인 6~10월에 집중적으로 발병하며, 그 원인은 대량사육 및 시설관리의 부실에 따른 수 환경의 악화이며, 이들에 의한 피해는 날로 늘어가는 추세이다. 심지어 이로 인한 대량 폐사로 양식업이 도산하는 경우가 있다. 또한 넙치 종묘생산에서 초기에 대량 폐사를 유발하는 장관백탁증도 초기먹이생물인 로티퍼에 비브리오균의 오염에 따른 대량 폐사임이 알려져 있다.¹⁾

양식현장에서 이들 어병균과 몇 가지 원충성 기생충의 살균소독제로 가장 일반적으로 사용되는 약품은 포르말린으로 이는 살균 효과는 뛰어나다고 알려져 있으나 어류자체에 독성을 유발할 뿐만 아니라 공기 중에 기화하면 사람의 눈과 피부에 자극을 주거나 호흡기 질환을

일으킬 수 있다. 또한 저온상태에서 오랫동안 방치하였을 때 그리고 해수중의 중탄산염과 결합하였을 때에는 쉽게 중합하여 파라 포르말데하이드라는 백색결정체를 형성하여 양식어류의 아가미나 여러 조직에 악영향을 미치는 것으로 보고되었다.²⁾ 이와 같이 포르말린의 효과와 독성은 몇몇 어종을 대상으로 연구되었으며,^{2~4)} 몇 종의 항생제와 함께 어체 내 잔존여부도 연구되었다.^{5~7)} 그러므로 양식장에서 사용되는 포르말린의 대체제로는 어체에 안전하며, 사용자에게 해가 없으면서 살균소독 효과를 극대화할 수 있는 물질의 개발이 요구된다. 또한 소독제로서 여러 종류의 구리계 또는 구리계의 혼합제제가 일반적으로 사용되고 있다. 그러나 이들은 고농도의 구리를 포함하고 있으므로, 반복 사용시 수환경에 매우 좋지않은 영향을 미치게 된다.

기존에 알려진 많은 살균제들 중 최근에는 양쪽성 성질을 띤 아미노산과 그 유도체의 연구가 활발히 진행되고 있으며, 아미노산과 금속을 착물 상태로 합성하여 살균제로 이용하고 있다.^{8~9)} 살균소독제의 하나로 개발된 아미노산 구리 착물은 기존에 알려진 Tego형과 유사한

제면활성제로서 양쪽성 비누의 단점인 그람음성균에도 살균력이 뛰어나고, 역성비누의 단백질, 혈청, 림프액 등의 단백질과 불용성 침전을 형성하는 단점을 해결하였다.

따라서 본 실험은 살균소독제의 응용분야의 한 방편으로 양식장에 수 환경의 소독살균제로서의 가능성을 검증코자 양식어류에는 안전하며, 기존에 사용되는 살균소독제보다 효과가 큰 아미노산 구리 착물계의 살균소독제를 이용한 양식어류 항균 제제 물질로서 적용가능성을 조사하였다.

2. 실험재료 및 방법

2.1. 실험 어병균 배양

본 살균실험에 사용된 어병균인 *Edwardsiella tarda*, *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus* sp.는 여수대 생물공학과 김진만 교수로부터 기증받아 Nutrient agar에 1%(w/v) NaCl를 첨가한 배지에서 계대 배양하여 사용하였다.

2.2. 어병균의 배양에 따른 살균실험

본 실험에 사용된 살균소독제는 여수대 벤처기업인 (주) 하나로부터 기증 받았으며, 아미노산 구리(II) 착물 형태인 살균소독제의 합성과 기본적인 살균성이 조사하였다.¹⁰⁾

살균실험을 위한 어병균의 계대 배양을 위하여 Nutrient agar(NB)에 1%(w/v)의 NaCl을 첨가한 배지(NBN)를 해수를 습윤 멸균 한 후 사용하였으며, 세균수의 판정을 위한 도말 배양 배지로는 NBN 한천배지를 기본 배지로 사용하였다.

수 환경 조건에서 본 배양을 위한 아미노산-구리(II) 착물을 Phosphate Buffer Saline(PBS, pH 7.4)이나 멸균 해수에 첨가하여 구리 최종농도가 1ppm, 5ppm, 10ppm의 농도 범위가 되게 하였다. 대표적인 어병균인 *Edwardsiella tarda*, *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus* sp.을 $10^5 \sim 10^6$ CFU/ml의 농도로 조절한 후 적정농도 아미노산 구리(II) 착물을 첨가하여 30°C에서 80 rpm으로 24시간동안 진탕 배양하였다. 균의 집락수의 판정은 배양 경과 시간에 따라 1시간, 3시간 및 6시간 후 균을 채취하여 NBN 고체 배지에 도말하여 30°C 세균배양기에서 시간경과에 따른 살균효과를 조사하였다. 이들 살균효과는 NBN 고체배지에 나타난 집락수로 판정하였다. 대조군으로는 기존에 현장에서 사용되고 있는 중성 포르말린(Sigma Co.), ET(구리계의 시장제품)을 다양한 농도 조건으로 조정하여 처리하였다.

2.3. 온도변화에 따른 살균보존

아미노산-구리(II) 착물이 온도의 변화에 따라 동일한 살균력을 보유 하는가를 측정하였다. 저온에서의 살균력은 살균제를 -20°C에서 72시간동안 냉동 후 해동하여 사용하였고, 고온에서의 살균력은 121°C 15기압에서 20분 동안 습윤 멸균한 후 사용하였으며, 실온에서의 실험도 시료와 동일 농도 조건(0~10ppm)에서 처리하였다.

3. 결 과

3.1. 아미노산 구리(II) 착물 처리 후 시간과 농도에 따른 살균효과

합성한 아미노산 구리(II) 착물을 살균소독제로서 양식장에 적용하기 위하여 고수온기에 집중적으로 양식현장에서 발병하는 대표적인 어병균을 살균실험에 적용 하였다. 이들 어병균들은 대량 폐사를 일으키는 세균성 질병인 *Edwardsiella tarda*, *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus* sp. 등으로 이들 어병균에 아미노산 구리(II) 착물을 처리하였을 때 시간 경과에 따른 사멸농도를 조사하였다. 그 결과는 Fig. 1과 같다.

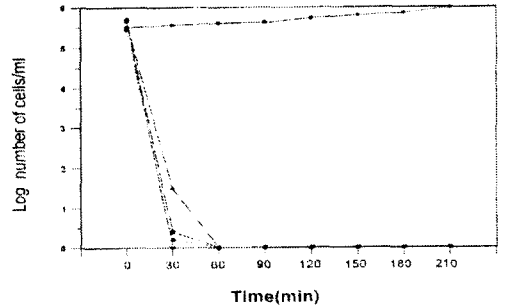


Fig. 1. Antibacterial effects of treatment with 1 ppm amino acid-copper(II) surfactant on various fish pathogenic bacteria. ●-●: control, ▼-▼: *Edwardsiella tarda*, ■-■: *Aeromonas hydrophila*, ▲-▲: *Streptococcus* sp., ▲-▲: *Vibrio anguillarum*.

양식어류에서 복수증을 유발하는 *Edwardsiella tarda*의 사멸효과는 어병균 $10^4 \sim 10^5$ CFU/ml의 농도조건에서 1ppm 이상의 농도로 처리하였을 때 30분 경과 후 95%의 사멸율과 1시간 경과 후에는 100%의 사멸효과를 나

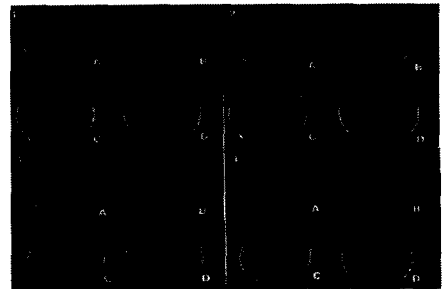


Fig. 2. Changes of fish pathogenic bacteria colonies on nutrient agar treated by amino acid-copper(II) surfactant, after one hour. A: control, B: amino acid-copper(II) surfactant(10 ppm), C: amino acid-copper(II) surfactant(1 ppm), D: ET(10 ppm), 1: *Edwardsiella tarda*, 2: *Streptococcus* sp., 3: *Aeromonas hydrophila*, 4: *Vibrio anguillarum*.

타냈다(Fig. 1. 과 Fig. 2-1 C).

뱀장어에서 기적병을 일으키는 *Aeromonas hydrophila* 균과 연쇄구균증을 유발하는 *Streptococcus* sp.균도 1ppm 이상의 농도에서는 1시간 경과 후 100%의 살균효과를 나타냈다(Fig 2-2 C와 Fig. 2-3 C). 비브리오증을 유발하는 *Vibrio anguillarum*은 다른 어병균에 비하여 살균력이 다소 감소하는 경향을 보였다.

즉, 아미노산 구리(II) 착물을 처리하고, 30분 경과 후 1ppm의 농도 조건에서 80%의 사멸율(Fig. 1)을 나타냈으나, 1시간 경과 후에는 다른 어병균과 동일하게 100%의 사멸율을 보였다. 각 어병균의 실험시 대조군으로 사용된 ET는 동일 농도인 1ppm의 조건에서 전혀 살균력을 발휘하지 못하였다(Fig. 2 D). 또한 대조군으로 사용된 포르말린과 ET를 처리하였을 때 시간경과에 따른 어병균의 사멸효과는 아미노산 구리(II) 착물(Fig. 3 B)보다 높은 농도조건에서도 실험군보다 살균효과가 떨어짐을 알 수 있었다(Fig. 3 C, D).

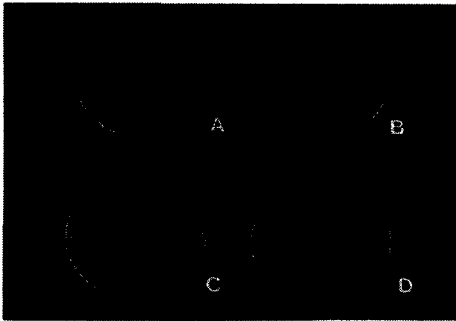


Fig. 3. Effects on *Edwardsiella tarda* grown on nutrient agar by the treatment of amino acid-copper(II) surfactant and various disinfectants with 5 ppm, after one hour. A: control, B: amino acid-copper(II) surfactant, C: ET, D: formalin.

3.2. 온도의 변화에 따른 살균력 보존 효과

포르말린처럼 저온에서 물성이 변하여 어류에 직접적인 피해를 유발하는지를 알아보고 또한 고온 같은 온도 범위에서 살균력의 보존상태를 알아보고자 하였다.

아미노산 구리(II) 착물을 저온과 고온상태에서 보관하였을 때 본 제품의 살균력의 보존능력을 알아보고자 실험한 결과 모든 어병균의 살균 실험에서 온도의 변화와 무관하게 1ppm의 농도조건에서 1시간 안에 100%의 살균력을 보존하였다(Fig. 4).

4. 고 찰

양식어류를 건강한 개체로 키우기 위해서는 여러 가지 조건들이 관여를 한다. 이중에서 양식장의 수 환경 개선은 매우 중요하다고 할 수 있다. 양식어류가 각종 어병균에 노출이 되었을 때 감염되는 확율은 매우 높고, 또한 이들의 적절한 소독이 이루어지지 않고 있어 양식업의 성패가 좌우될 수 있다. 따라서 살균소독제로 개발중에

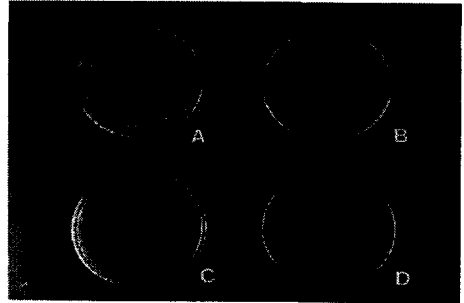


Fig. 4. Effects of various temperatures on *Edwardsiella tarda* grown on nutrient agar containing 1ppm of amino acid-copper(II). A: control, B: room temperature, 4 months), C: 121°C, 15 min, D: - 80°C, 72hr.

있는 제품인 아미노산 구리(II) 착물을 직접 어병균에 적용해 봄으로서 기존에 널리 알려져 있는 살균소독제보다 효과가 증대되고, 어류에도 안전하며, 상용화된 포르말린, 고농도 구리계등의 독성 소독제의 대체제로서의 가능성을 조사하였다.

본 실험에 사용된 살균소독제는 기존에 알려진 어느 소독제보다 안정하고 저농도(1ppm 이상)에서 어병균을 1시간 이내에 전멸시킬 수 있다. 특히 양식 현장에서 사용시 포르말린이나 고농도 구리계(ET 등)등과는 달리 살균제의 사용량을 크게 절감함으로써 사람 또는 대상어류에 대한 피해의 우려가 상대적으로 적다. 어병균에 대해 살균소독 효과는 1ppm의 농도조건에서도 살균력을 발휘하여 1시간 이내에는 100%가 사멸되었다(Fig. 1, 2). 이것은 포르말린이 30%의 고농도이고, 현재 일반적으로 이용되는 ET는 아미노산 구리(II) 착물보다 구리농도에서 5배 이상 높은 농도를 갖고 있음으로 동일량의 사용으로 이들보다 훨씬 뛰어난 효과(Fig. 3)를 보여 주었다. 따라서 아미노산 구리(II) 착물 사용시 보다 매우 적은 구리를 투여하여도 높은 살균력을 유지함으로써, 구리에 의한 독성을 크게 줄일 수 있게 된다.

살균소독제가 갖추어야 할 많은 조건 중에서 오랜기간 보관을 하거나 온도 변화조건에서 물성이 변하지 않아야 한다. 포르말린처럼 장기간 보관과 저온에서 백색결정을 형성하여 물성이 변하는 것²⁾과는 대조적으로 고온이나 저온에서 육안적으로 전혀 변화가 없었으며, 살균력도 그대로 보존됨으로서 기존에 알려진 소독살균제보다 환경의 변화에 덜 민감함을 알 수 있었다(Fig. 4). 이것은 아미노산 구리(II) 착물이 살균소독제로서 장기간 보관 및 어떤 온도조건에서도 살균력을 충분히 발휘할 수 있음을 입증한다.

결과로 부터 합성된 살균소독제는 오염된 양식어의 초기먹이 생물(로티퍼 등)의 살균소독, 수 환경에서 각종 어병균의 살균소독에 의한 예방과 치료 등에 응용할 수 있을 것일 본다. 또한 기존에 널리 사용되고 있는 포르말린이나 고농도 구리계 소독제 및 기존 과다 사용되고 있는 항생제 대체 살균소독제로서의 충분한 가치가 있다

고 사료되었다.

5. 결 론

본 실험에 사용된 아미노산 구리(II) 착물은 그 원액의 구리 농도를 10,000ppm 으로 조정하여 사용하였다. 항균력 실험을 위한 어병균은 *Edwardsiella tarda*, *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus* sp를 사용하였다. 어병균은 1% NaCl nutrient agar에서 배양을 하였으며, PBS에 균수를 $2 \times 10^5 \sim 10^6$ 개체 균수로 조정하였으며, 아미노산 구리(II) 착물 농도를 0, 1, 5, 10ppm으로 조정하였다. 이들 어병균 모두 아미노산 구리(II) 착물에 대한 살균력이 우수함을 입증할 수 있었다.

이러한 연구결과는 본 연구로부터의 제품인 아미노산 구리(II) 착물의 살균제가 기존의 일반적인 독성 살균제인 포르말린이나 고농도 구리계(ET 등)등을 대체할 수 있는 친환경적 성능을 보유함을 확인할 수 있었다

감사의 글

본 연구는 환경부 G7 과제중인 축산가공 및 피혁 산업폐기물 중의 폐단백질을 원료로 하는 환경친화성의 고성능, 저가의, 염소계 대체용 살균성 계면활성제의 개발의 일부결과이며, 어병균주를 기증해 주신 여수대 김진만 교수님께 감사드립니다.

참 고 문 헌

- 1) Kiyokuni, M. and Y. Hideki, Uptake of bacteria by rotifer, 1987, Nippon Suisan Gakkaishi, 53(11), 2091.
- 2) Rucker, R. R., W. G. Taylor and D. P. Toney, 1963, Formalin in the hatchery. Progressive Fish-Culturist, 25, 203-207.
- 3) Smith C. E. and R. G. Piper, 1972, Pathological

effects in for malin-treated rainbow trout (*Salmo gairdneri*), J. Fish. Res. Bd Canada, 29, 328-329.

- 4) Wedemeyer G. and W. T. Yasutake 1974, Stress of formalin treatment in juvenile spring chinook salmon(*Oncorhynchus tshawytscha*) and steelhead trout(*Salmo gairdneri*), J. Fish. Res. BD. Canada, 31, 179-184.
- 5) Samuelsen O. B. 1989, Degradation of oxytetracycline in seawater at two different temperature and light intensities and the persistence of oxytetracycline in the sediment from a fish farm, Aquaculture, 83, 7-16.
- 6) Bjorklund, H. and G. Bylund. 1990, Temperature related absorption and excretion of oxytetracycline in rainbow trout(*Salmo gairdneri*), Aquaculture, 78, 363-372.
- 7) Cho J. K. and H. C. Yang 1996, Determination of formaldehyde residue and histopathological observation in formalin and neutral formalin treated Korean rockfish(*Sebastes schlegeli*), J. Fish Pathol. 9(2), 157-168.
- 8) Inami T; Yamashita S. WO97/30057; Antibacterial amino acids, inorganic salts thereof and process for the precipitation and use thereof.
- 9) Mioshi Yashi K. K(Miyo), JP09143009; Antibacterial agent comprising metal salt of amino acid derivative useful providing antibacterial property to water, cosmetic, resins, and paints as well as to sands and ceramic powders.
- 10) 이상태, 1999, 가축처리 공정으로 부터의 폐기물을 이용한 환경친화성 계면활성제 개발, 여수대 대학원 석사논문.