

양식 어류와 이들 난에 대한 항곰팡이성 약물들의 효과 비교

지보영 · 이덕찬*
국립수산과학원 병리연구과

Comparative Efficacy of Antifungal Agents for Aquaculture Fish and their Eggs

Bo Young JEE and Deok Chan LEE*
Pathology Division, National Fisheries Research & Development Institute,
Busan 619-902, Korea

In fresh water fish hatcheries and farms, Saprolegniales often cause serious mortality to the fish and their eggs. Malachite green is an effective antifungal agent, but is carcinogenic to fish and humans. Alternative antifungal agents are needed. Presently, we tested various concentrations of MBT-01108 (*Opuntia ficus-indica* extracts) alone and in combination with bronopol, formalin and sodium chloride (MBT-01108 mixture) on *in vitro* mycelial growth and *in vivo* remediation of adult eel, *Anguilla japonica*, infected with *Saprolegnia* sp. and fertilized eggs of chum salmon, *Oncorhynchus keta*, to evaluate the compounds' antifungal efficacy on eyed-egg and hatching rates. MBT-01108 mixtures incorporating bronopol and formalin at respective concentrations of 50 and 30 parts per million (ppm), and 100 and 20 ppm were most effective in controlling *Saprolegnia in vitro* and *in vivo* ($P < 0.05$). Repeated daily exposures to 50 ppm and 100 ppm MBT-01108 were more effective than exposure every 2-3 days post-fertilization for the inhibition of *Saprolegnia* infection of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* eggs as compared with control (0 ppm).

Key words: Antifungal agent, Fungal disease, MBT-01108, *Saprolegnia parasitica*

서 론

어류의 물곰팡이성 질병은 편모균아문의 난균강(Oomycetes), 수생균(또는 물곰팡이)목(Saprolegniales), 수생균과(Saprolegniaceae)에 포함된 균류가 담수어 및 그 난에 기생함으로써 발병하는데, 물곰팡이목(Order Saprolegniales)의 6개 과(Family) 중에서 Family Saprolegniaceae를 구성하는 균종이 물곰팡이성 질병과 관련하여 흔히 관찰된다(Noga, 1993; Diéguez-Urbeondo et al., 1994; Hussein et al., 2001; Yanong, 2003).

연어과 어류 saprolegniosis의 중요한 병원체인 *Saprolegnia parasitica*는 병원성이 강한 것으로 알려져 있고(Willoughby and Pickering, 1977; Hatai and Hoshiai, 1992; Diéguez-Urbeondo et al., 1994; Lopez-Doriga and Martinaz, 1998; Hussein et al., 2001), coho salmon에서 분리한 *S. diclina* type I과는 동일종으로 판단된다(Willoughby, 1978). 뿐만 아니라 미국에서는 메기류 'winter kill'의 원인체로서 50% 이상의 폐사를 유발하기도 한다(Bruno and Wood, 1999). 이에 비하여 *S. diclina*는 2차 유주포자의 표면에 갈고리가 없어 비교적 병원성이 약하거나 오수생물(saprobic species)로 알려져 있으나 연어과 어류의 내장진균 중 원인체가 되기도 한다(Bly et al., 1992; Pickering et al., 1979; Diéguez-Urbeondo et al., 2007).

Order Saprolegniales에 속하는 물곰팡이류는 담수어에 많은 피해를 유발하는 병원체임에도 불구하고, 최근 물곰팡이 질병에 대한 치료제로서의 화학약품에 대한 사용이 엄격해지고 있는데 특히, malachite green은 인체 유해성의 가능성이 확인되어 전 세계적으로 사용이 금지되고 있으며 이로 인하여 물곰팡이성 질병의 확산이 급격히 이루어지고 있다(Alderman, 1985; Allen et al., 1994). 그러므로 물곰팡이성 질병의 치료를 위한 어류와 인체에 유해성이 없는 약품의 선정과 개발은 중요하지만 아직까지 malachite green에 준하는 효과적인 약물은 알려져 있지 않다. 최근 Jee et al. (2007)은 다양한 약물을 연어 수정란의 물곰팡이병 원인체인 *Saprolegnia parasitica*에 처리한 결과, MBT-01108 (손바닥선인장, *Opuntia ficus-indica* 추출물; 이하 'MBT')과 bronopol ($C_3H_6BrNO_4$; 15% 농도 용액)이 수정란의 발안율(각각 73.3 및 77.5%)과 상대발안율(각각 48.35 및 56.47%) 측정에서 효과적이라고 하였다. 이러한 결과는 물곰팡이성 질병의 치료제 또는 제어제로서의 가능성이 있는 것으로 판단되지만 이들 물질에 대한 연구가 매우 부족하므로 다양한 약물의 혼합에 의한 상승효과를 평가할 필요성이 있을 것이다.

본 연구에서는 담수어 양식 현장에서 발생하는 물곰팡이성 질병의 효과적 제어와 관련한 천연신소재 약물 개발을 위하여, 뱀장어, 연어 및 무지개송어 등을 대상으로 하여 실용 가능한 약물의 구제효과를 확인하고자 하였다. 약물의 구제효과 실험은 1) *in vitro* 및 *in vivo*에서 뱀장어 수생균에 대한

*Corresponding author: chani-lee@nfrdi.go.kr

MBT 단독 및 혼합물 (bronopol, formalin 및 sodium chloride와 혼합)의 항진균 효과 조사, 2) 연어 수정란의 발안시기와 부화시기에 발생하는 수생균에 대한 MBT 및 혼합물의 항진균 효과 조사, 그리고 3) 무지개송어 수정란의 수정 후 발안시기까지 MBT의 반복처리에 의한 수생균 제어 효과 조사 등의 부분으로 나누어 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

어류, 어란 및 균주

뱀장어 (*Anguilla japonica*), 연어 (*Oncorhynchus keta*) 및 무지개송어 (*O. mykiss*) 등 3종의 담수어를 대상으로 약물효능 시험을 수행하였다. 뱀장어는 남부내수면연구소에 사육중인 평균 102.3±13.9 g 크기의 어류를 사용하였으며, 연어와 무지개송어는 영동내수면연구소에서 채집된 어류로부터 얻은 수정란을 대상으로 발안율과 부화율을 측정함으로써 그 효과를 비교하였다. 또한 사용된 곰팡이는 Willoughby (1985)와 Hatai et al. (1990)의 방법에 따라 실험 대상 어류로부터 순수분리한 후 실온 및 동결하여 보관하였다 (Table 1).

약 물

사용한 약물은 중 MBT-01108 (*Opuntia ficus-indica* var. *saboten* Makino methanol extract)은 마이크로바이오텍 (Korea) 으로부터 구입하였으며, 흰색의 결정 분말 형태인 bronopol (C₃H₆BrNO₄; MW., 199.99; synonyms: 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol; 2-nitro-2-bromo-1,3-propanediol; 2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol)은 Ningbo Free Trade Zone Wuzhou International Co., Ltd. (China)로부터 구입하였다. 또한 sodium chloride (NaCl; MW., 58.44)와 Formalin (formaldehyde solution min. 37%)은 각각 Junsei (Japan)와 Merck (Germany)로부터 구입하였다.

In vitro 수생균에 대한 MBT 및 혼합물의 효능 조사
뱀장어

시험 약물인 MBT, bronopol (15% 용액), formalin (formaldehyde 37% sol.) 및 sodium chloride (NaCl)의 단일 농도에 대한 반복실험을 수행하여 곰팡이 제어에 효과적인 농도를 조사하고, 이 결과에 준하여 Sabouraud dextrose broth (SDB, DB)에 각 약물을 단독 또는 혼합하여 조제하였다 (Table 2). 조제된 약물의 각 용액은 멸균된 screw tube에 10 mL씩 여과멸

균 (0.45 μm; Sartorius, Germany)하여 분주하였다. 뱀장어로부터 순수분리 하여 SDA 배지에서 배양 (15℃)한 수생균 배양 조각 (φ 8 mm)을 접종하고 15℃에서 5일간 배양하며 성장한 높이로서 발육도를 평가하였다 (Table 2).

In vivo 수생균에 대한 MBT 혼합물의 효능조사
뱀장어

수생균에 자연 감염된 뱀장어를 10 마리씩 무작위로 4개구의 두 그룹으로 나누어 500 L 크기의 PVC 수조에 수용하고 MBT를 200 ppm 농도로 1일 2시간 씩 2회 약욕한 후, 약물 미처리구를 대조로 하여 폐사량 차이를 확인하였다. 실험기간 동안 물은 흘러주지 않고 산소 공급만을 하였으며, 수온은 15-17℃ 이었다 (Table 2).

연 어

2006년 11월 영동내수면연구소에서 채란한 연어 수정란 20,000립씩을 24 L 크기의 원통형 부화기에 3반복구로 넣고 유수량을 180 L/min으로 유지하였다. 발안 전까지 3일에 1회, 30분간 정치상태로 MBT, bronopol, formalin 및 sodium chloride 단독 및 혼합물을 Table 2에서와 같이 처리하였다. 약물 처리에 의한 결과는 아래 식과 같이 수정란의 발안율 (eyed-egg rate)과 부화율 (hatching rate)을 약물 미처리구를 대조로 하여 비교하였다 (Table 2).

$$\text{발안율 (\%)} = (\text{발안란의 수} / \text{사용된 수정란의 수}) \times 100$$

$$\text{부화율 (\%)} = (\text{부화 개체} / \text{사용된 수정란의 수}) \times 100$$

무지개송어

2007년 12월 영동내수면연구소에서 채란한 무지개송어 수정란 5,000립씩을 24 L 크기의 원통형 부화기에 3반복구로 넣고 유수량을 180 L/min으로 유지하였다. 발안 전까지 매일, 2일 및 3일에 1회씩, 30분간 정치상태로 MBT (50 및 100 ppm)를 처리하였다. 약물 처리에 의한 결과는 수정란의 발안율과 상대발안율 (relative eyed-egg rate)을 약물 미처리구를 대조로 하여 비교하였다 (Table 2).

$$\text{상대발안율 (\%)} = [1 - (\text{실험구의 비발안율} / \text{대조구의 비발안율})] \times 100$$

통계처리

In vitro 및 in vivo 시험구 사이의 유의차는 SigmaPlot (8.0 version)을 이용하여 t-test로 검정하였다 (P<0.05).

Table 1. Used fungal strains in this study

Objective Fishes	Fungal species		
	Isolation from:	Genus name	Storage No. ¹⁾
Eel	Eel, <i>Anguilla japonica</i> adult	<i>Saprolegnia</i> sp.	²⁾
Chum salmon	Chum salmon, <i>Oncorhynchus keta</i> egg	<i>S. parasitica</i>	FP9001 (ChS-E0511)
Rainbow trout	Rainbow trout, <i>O. mykiss</i> adult	<i>S. parasitica</i>	FP9003 (RaT-A0512)

¹⁾The isolated fungi are kept at 'Pathology Division, National Fisheries Research and Development Institute (NFRDI)' in Busan, Korea.

²⁾Missing strain.

Table 2. Chemicals and treatment conditions on *in vitro* and *in vivo* for control of *Saprolegnia* infection from eel adults, and chum salmon and rainbow trout eggs

Objective Fishes	Chemicals	Treatment and concentrations	
		<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
Eel	MBT ¹⁾ only (ppm)	50, 100	
	Bronopol ²⁾ only (ppm)	20, 30	
	Formalin only (ppm)	100, 200	
	NaCl only (%)	1, 1.5	
	MBT (ppm)+Bronopol (ppm)	50+50, 10+90, 90+10, 100+100	MBT only; 200 ppm for 2 hr bath per day (2 times/day)
	MBT (ppm)+NaCl (%)	10+1	
	MBT (ppm)+formalin (ppm)	10+90, 50+30	
	Bronopol (ppm)+NaCl (%)	10+1	
	Bronopol (ppm)+formalin (ppm)	10+90, 100+20	
Formalin (ppm)+NaCl (%)	30+1		
MBT only		50	
Bronopol only (ppm)		100	
Formalin only (ppm)		20, 30	
Chum salmon	NaCl only (%)	-	1
	MBT(ppm)+NaCl(%)	-	10+1
	MBT(ppm)+formalin(ppm)	-	50+30
	Bronopol(ppm)+formalin(ppm)	-	100+20
	Formalin(ppm)+NaCl(%)	-	30+1
Rainbow trout	MBT only (ppm)	-	50, 100

¹⁾=MBT-01108, *Opuntia ficus-indica* extracts.

²⁾C₃H₆BrNO₄ (mw., 199.99); synonyms: 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol; 2-nitro-2-bromo-1,3-propanediol; 2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol, 15% solution.

결 과

뱀장어 수생균에 대한 MBT 및 혼합물의 효능 조사

뱀장어에서 분리된 *Saprolegnia* sp. 균주에 대한 MBT 및 혼합물의 효과에 대한 *in vitro* 실험에서 4종의 약물 단독처리 보다는 약물을 서로 혼합하여 처리하였을 때 효과가 높은 것으로 확인되었다 (Table 3). MBT 단독처리 보다는 sodium chloride (1%)나 formalin (30 및 90 ppm)을 혼합할 경우 물곰팡이의 성장 저지에 유효한 효과를 나타내었으며, bronopol (50 및 100 ppm)의 첨가에서도 성장을 억제하는 것으로 나타났다. 또한 bronopol, formalin 및 sodium chloride 끼리의 혼합에서도 물곰팡이의 성장을 억제하는 것으로 확인되었다. 물곰팡이에 자연 감염된 뱀장어를 대상으로 구제실험을 한 결과 MBT 200 ppm을 1일 2회 반복 처리하여 10일 경과 후, 대조구가 전량 폐사한 것에 비하여 약물 처리구는 100% 생존하였다 (Table 3).

연어 수생균에 대한 MBT 및 혼합물의 효능조사

연어 수정란에 약물 단독 및 혼합물로 처리하였을 때의 결과는 Table 4에 나타내었다. 처리 약물인 bronopol 100 ppm에 formalin 20 ppm의 농도로 첨가하였거나 MBT 50 ppm에 formalin 30 ppm을 첨가하였을 때 발안율과 부화율이 각각 80.2% 및 73.6%, 그리고 79.3% 및 70.6%로 높게 나타났다 ($P<0.05$).

무지개송어 수생균에 대한 MBT 효능조사

무지개송어 수정란을 원통형 부화기에 넣은 후 MBT를 1, 2 및 3일 간격으로 반복 처리하였을 때 발안율과 상대발안율을 측정된 결과는 Table 5에 나타내었다. 시험 약물인 MBT 50 및 100 ppm의 처리는 발안율을 높이는 데 영향을 미치는 것으로 나타났다. 매일 또는 2일 간격으로 실험 약물을 반복처리하는 것이 효과적이며, 그 중에서 매일 50 ppm의 농도로 반복 처리하였을 때의 발안율과 대조구에 대한 상대발안율이 각각 31.8%와 91.8%로 가장 높게 나타났다 ($P<0.05$).

고 찰

Saprolegniaceae Kütz. ex Warm.은 Oomycetes에 속하는 water moulds로 분류되며 (Seymour, 1970), 담수어와 이들의 난뿐만 아니라 갑각류와 양서류에서도 피해를 입히는 기생성 물곰팡이이다 (Willoughby, 1978; Hatai et al., 1990; Cerenius and Söderhäll, 1992; Kiesecker et al., 2001). 이들 물곰팡이병의 치료제로 알려진 malachite green은 0.5 ppm 이하의 농도에서도 *Saprolegnia*의 유주자와 포자를 살해하거나 성장을 억제할 수 있는 것으로 알려져 있으나 (Alderman, 1982 & 1985; Yuasa and Hatai, 1995; Bruno and Wood, 1999), 물곰팡이 제어효과에도 불구하고 어류의 기형발생 (Meyer et al., 1983), 난과 어체에 축적 (Meinertz et al., 1995) 및 발암성의 성질 (Doerge et al., 1998) 등을 나타내는 것으로 알려져 있고, 이로 인한 인체

Table 3. *In vitro* mycelial growth degree after treatments of the various concentration of chemicals and mixed chemicals, and *in vivo* curative value of eel infected with *Saprolegnia* sp. by exposure of the MBT-01108. The letters a, b, c, d and e denote groups with significantly different means ($P<0.05$)

	Chemicals	Concentrations	Growth degree (cm, \pm S.D.)
<i>in vitro</i>	MBT only (ppm)	50	5.7 \pm 0.25 ^a
		100	4.3 \pm 1.52 ^{abc}
	Bronopol only (ppm)	100	6.0 \pm 0.00 ^a
		200	1.0 \pm 1.28 ^d
	Formalin only (ppm)	20	5.2 \pm 1.00 ^a
		30	5.0 \pm 1.32 ^a
	NaCl only (%)	1	4.0 \pm 2.00 ^{abc}
		1.5	0.5 \pm 0.50 ^d
	MBT (ppm)+Bronopol (ppm)	50+50	2.0 \pm 1.73 ^{bcd}
		10+90	4.3 \pm 0.45 ^{ab}
		90+10	4.4 \pm 0.15 ^{ab}
		100+100	2.9 \pm 0.32 ^c
	MBT (ppm)+NaCl (%)	10+1	2.2 \pm 0.11 ^d
	MBT (ppm)+formalin (ppm)	10+90	0 ^{de}
		50+30	0 ^{de}
Bronopol (ppm)+NaCl (%)	10+1	1.4 \pm 1.20 ^{cd}	
Bronopol (ppm)+formalin (ppm)	10+90	0 ^{de}	
	100+20	0 ^{de}	
Formalin (ppm)+NaCl (%)	30+1	0 ^{de}	
Control	0	5.9 \pm 0.17 ^a	
			Survival rate ¹⁾ (%)
<i>in vivo</i>	MBT only (ppm)	200	100
	Control	0	0

¹⁾The data are monitored for ten days.

Table 4. Eyed-egg and hatching rate by treatment of the each concentration of MBT-01108 and mixed chemicals to the fertilized chum salmon eggs. Asterisk indicated differences significant at $P<0.05$

Chemicals	Concentrations	Eyed-egg rate (%) ¹⁾	Relative eyed- egg rate (%) ²⁾	Hatching rate (%) ³⁾
MBT only (ppm)	50	67.0		53.0
Bronopol only (ppm)	100	67.7	0.4	53.4
Formalin only (ppm)	20	68.5		58.3*
	30	66.7	1.6	57.1
NaCl only (%)	1	64.2		56.1
MBT (ppm)+NaCl (%)	10+1	62.5		49.1
MBT (ppm)+formalin (ppm)	50+30	79.3*	15.1	70.6*
Bronopol (ppm)+formalin (ppm)	100+20	80.2*	15.9	73.6*
Formalin (ppm)+NaCl (%)	30+1	63.6		54.4
Control	0	67.4	-	54.9

¹⁾Eyed-egg rate (%)=(the No. of eyed-egg / the No. of used fertilized eggs) \times 100.

²⁾Relative eyed-egg rate (%)=[1-(the rate of non eyed-egg in control / the rate of non-eyed-egg in tested)] \times 100.

³⁾Hatching rate (%)=(the No. of hatching eggs / the No. of total counting eggs) \times 100.

유해성의 가능성이 확인되어 식용어에 대한 사용금지 약물로 지정되었다 (Alderman, 1985; Allen et al., 1994). 어류와 어란의 Saprolegniosis에 효과적인 malachite green을 대체하기 위하여 acetic acid (Marking et al., 1994), bronopol (Espeland and Hansen, 2004; Aller-Gancedo and Fregeneda-Grandes, 2007),

formalin (Marking et al., 1994; Giesecker et al., 2006), hydrogen peroxide (Gaikowski et al., 1999; Arndt et al., 2001) 및 sodium chloride (Marking et al., 1994; Khodabandeh and Abtahi, 2006) 등의 사용에 대한 실험들이 이루어지고 있으나 아직 그 효과와 효과에 대한 연구가 부족한 실정이다.

Table 5. Eyed-egg and relative eyed-egg rate by cure interval from the each concentration of MBT-01108 to the fertilized rainbow trout eggs. Asterisk indicated differences significant at $P < 0.05$

Cure interval (days)	MBT Concentrations (ppm)	Eyed-egg rate (%)	relative eyed-egg rate (%)
1	50	31.8*	91.8
	100	21.7*	88.0
	0 (control)	2.6	-
2	50	20.8*	61.1
	100	19.0*	57.4
	0 (control)	8.1	-
3	50	21.3*	54.0
	100	11.6	15.5
	0 (control)	9.8	-

¹Eyed-egg rate (%) = (the No. of eyed-egg / the No. of used fertilized eggs) × 100.

²Relative eyed-egg rate (%) = [1 - (the rate of non-eyed-egg in control / the rate of non-eyed-egg in tested)] × 100.

국내에서는 물곰팡이의 분류와 특성, 그리고 제어 약제와 관련한 연구의 결과는 거의 보고된 바 없으나, Jee et al. (2007)이 최근 연어 수정란에 발생하는 물곰팡이병 원인 진균을 *S. parasitica* group 1으로 분류하였으며, 무지개송어와 산천어 등의 국내 연어과 어류에서 분리되는 진균군도 *S. parasitica*에 포함된다고 국내 분리 균주에 대한 최초 보고를 하였다. 또한 동일 보고에서 sodium chloride나 formalin 등의 화학물질에 대해서 뿐만 아니라 항균활성이 있는 것으로 알려진 손바닥선인장 (*Opuntia ficus-indica* var. *saboten Makino*)의 methanol 추출물인 MBT-01108 (Kim et al., 2005)과 소독제인 bronopol ($C_3H_6BrNO_4$, 15% solution; Espeland and Hansen, 2004) 등이 *in vitro* 실험에서 물곰팡이 성장을 억제하며, 무지개송어의 발안란을 이용한 *in vivo* 실험에도 효과가 있어 물곰팡이 제어제로서의 가능성이 있다고 하였다.

본 연구에서 뱀장어 유래 물곰팡이에 대한 *in vitro* 및 *in vivo* 실험과 연어 및 무지개송어 수정란에 착생하는 곰팡이 제어를 위한 약물효과를 천연물질인 MBT를 중심으로 bronopol, formalin 및 sodium chloride 등을 단독 및 혼합 처리함으로써 효과를 실험하였다. 본 실험에 사용된 약물 중 bronopol (Standing Committee on the Food Chain and Animal Health, 1990)은 EU에 의하여 독성이 낮은 물질로 분류되었으며, formalin은 FDA의 Center for Veterinary Medicine (CVM)에 의하여 'Drugs Approved for Use in Aquaculture'로 되어있고 (<http://www.fda.gov/cvm/drugsapprovedaqua.htm>), sodium chloride는 FDA (2002)에 의하여 'low regulatory approval'로 지정되었다.

뱀장어에서 분리된 *Saprolegnia* 균주에 대한 *in vitro* 실험에서 MBT (10-100 ppm)와 bronopol (10-100 ppm) 각각에 sodium chloride (1%)나 formalin (20-90 ppm)을 각각 혼합하여 사용할 때 효과가 있었으며, sodium chloride (1%)와 formalin (30 ppm)을 혼합하여 사용할 경우에도 각각을 단독으로 사용할 때보다 효과가 좋은 것으로 확인되었다. MBT에 대한 *in vitro* 실험에서 연어 수정란 유래 *S. parasitica*의 성장을 억제하는 유효농도는 100 ppm으로 나타났다 (Jee et al., 2007). 또한 bronopol

은 80 ppm이상의 농도에서 균사의 성장을 억제하며 (Jee et al., 2007), 50 mg/L에서 brown trout, *Salmo trutta* 수정란의 발안율과 부화율을 높이는 것으로 알려져 있다 (Treasurer et al., 2005; Aller-Gancedo and Fregeneda-Grandes, 2007). 항곰팡이제로서의 formalin은 12.5 mg/L에서 *Saprolegnia* 포자와 균사의 성장을 억제하는 것으로 나타났으며 (Bly et al., 1996), sodium chloride는 35,000 mg/L에서 유효한 곰팡이 제어능이 나타난다고 하였다 (Khodabandeh and Abtahi, 2006). 그러므로 2가지 이상의 항곰팡이제 혼합물을 처리할 경우 단일 약물처리 보다 효과적인 억제 능력이 있는 것으로 사료된다. 또한 이미 *Saprolegnia* sp.에 감염된 뱀장어를 대상으로 하여 200 ppm의 MBT를 투여한 실험구는 대조구의 전량 폐사에 비하여 10일 후까지 100% 생존하였는데, 이는 MBT가 가지는 세균 살해능 (Kim et al., 2005)이 *Saprolegnia* sp.에도 작용하는 것으로 사료된다.

어류의 수정란에 물곰팡이가 착생하여 피해를 입히는 경우는 많은 것으로 알려져 있으며 (Alderman, 1982; Hussein et al., 2001), 국내에서도 많이 발병하고 있으나 구체적인 연구 결과에 의한 보고는 거의 없는 실정이다. 연어 수정란에 자연적으로 발생하는 물곰팡이를 제어하기 위하여 수정 후 발안기까지 3일 1회, 1회 30분간 MBT를 주로 하여 bronopol, formalin 및 sodium chloride를 단독 또는 혼합하여 반복 처리한 결과, bronopol 100 ppm과 formalin 20 ppm을 혼합 투여하였을 때, 또는 MBT 50 ppm과 formalin 30 ppm을 혼합 투여하였을 때 발안율 (각각 80.2%와 79.3%)과 부화율 (각각 73.6%와 70.6%)이 대조구 및 다른 실험구에 대하여 유의하게 높았다. 또한 무지개송어 수정란을 대상으로 하여 물곰팡이 제어를 위하여 1, 2 및 3일 간격으로 MBT를 반복 처리하였을 때의 효과를 확인하였다. 2일 및 3일 간격보다는 매일 50 ppm의 농도로 반복 처리하였을 때 발안율이 31.8%로 높았다. Oono et al. (2007)은 50-100 mg/L bronopol을 매일 처리할 때 대조구에 비하여 발안율은 유의적으로 증가한다고 하였고, Jee et al. (2007)은 연어 수정란에 MBT를 처리하였을 때 대조구에 대한 상대발안율 (56.47%)이 높음을 보고하였으며, Ali (2005)는

ascorbic acid 5.68 mM과 NaCl 및 NaCl 용액을 첨가하여 혼합액으로 처리하였을 때 단독처리보다는 무성 (colony growth, sporangia formation, sporangia realease 및 gemmae formation) 및 유성 (oogonia 및 antheridia formation) 생식의 여러 단계를 억제한다고 하였다. 이러한 결과들에 의하여 손바닥선인장 추출물인 MBT는 단독으로 또는 다른 유효약제와 혼합하여 사용할 경우 곰팡이 제어제로서 유효할 것으로 판단된다. 그러나 MBT 100 ppm의 처리에서도 50 ppm 처리 실험과 유사한 경향을 보였으나 발안율은 낮은 것으로 확인되었는데 이러한 결과는 고농도의 MBT는 어류의 수정란에 독성을 나타내는 것으로 판단되므로 어류의 안전성에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

손바닥선인장 메탄올 추출물인 MBT-01108을 이용하여 order Saprolegniales에 속하는 물곰팡이를 제어하기 위하여 50-100 ppm의 농도가 적당한 것으로 판단된다. 그리고 보다 효과적인 물곰팡이 제어를 위하여 MBT를 중심으로 약물처리를 할 경우, MBT-01108 단독처리 보다는 이미 알려진 항곰팡이성 물질인 bronopol, formalin 및 sodium chloride 등과 혼합처리하는 것이 보다 효과적이며, 어류 및 이들 난의 약물에 대한 안전성을 고려한다면 사용 MBT-01108의 농도는 50 ppm 전후에서 매일 반복 처리하는 것이 효과적일 것으로 판단된다.

사 사

본 연구는 국립수산과학원 (양식생물질병방제 연구, RP-2009-AQ-010)의 지원에 의하여 수행되었습니다.

참 고 문 헌

- Alderman, D.J. 1982. *In vitro* testing of fisheries chemotherapeutants. J. Fish Dis., 5, 113-123.
- Alderman, D.J. 1985. Malachite green: a review. J. Fish Dis., 8, 289-298.
- Ali, E.H. 2005. Morphological and biochemical alterations of oomycete fish pathogen *Saprolegnia parasitica* as affected by salinity, ascorbic acid and their synergistic action. Mycopathologia, 159, 231-243.
- Allen, J.L., J.E. Gofus and J.R. Meinertz. 1994. Determination of malachite green residues in the eggs, fry, and adult muscle-tissue of rainbow-trout (*Oncorhynchus mykiss*). J. Assoc. Offic. Anal. Chemist. Int., 77, 553-557.
- Aller-Gancedo, J.M. and J.M. Fregeneda-Grandes. 2007. Comparative efficacy of Pyceze® (bronopol) in controlling mortality of brown trout *Salmo trutta* eggs. Aquaculture Res., 38, 618-624.
- Arndt, R.E., E.J. Wagner and M.D. Routledge. 2001. Reducing or withholding Hydrogen peroxide treatment during a critical stage of rainbow trout development: Effects on eyed eggs, hatch, deformities and fungal control. N. Am. J. Aquatcul., 63, 161-166.
- Bly, J.E., L.A. Lawson, D.J. Dale, A.J. Szalai, R.M. Durborow and L.W. Clem. 1992. Winter saprolegniosis in channel catfish. Dis. Aquat. Org., 13, 155-164.
- Bly, J.E., S.M.A. Quiniou, L.A. Lawson and L.W. Clem. 1996. Therapeutic and prophylactic measures for winter saprolegniosis in channel catfish. Dis. Aquat. Org., 24, 25-33.
- Bruno, D.W. and B.P. Wood. 1999. *Saprolegnia* and other oomycetes. In: Fish Diseases and Disorders. Wood, P.T.K. and Bruno, D.W. eds. Wallingford, UK, CAB International, 3, 599-659.
- Cerenius, L. and K. Söderhäll. 1992. Crayfish diseases and crayfish as vectors for important diseases. Finfish Fish. Res., 14, 125-133.
- Diéguez-Uribeondo, J., L. Cerenius and K. Söderhäll. 1994. *Saprolegnia parasitica* and its virulence on three different species of freshwater crayfish. Aquaculture, 120, 219-222.
- Diéguez-Uribeondo, J., J.M. Fregeneda-Grandes, L. Cerenius, E. Pérez-Iniesta, J.M. Aller-Gancedo, M.T. Telleria, K. Söderhäll and M.P. Martín. 2007. Re-evaluation of the enigmatic species complex *Saprolegnia diclina-Saprolegnia parasitica* based on morphological, physiological and molecular data. Fungal Gen. Biol., 44, 585-601.
- Doerge, D.R., M.I. Churchwell, T.A. Gehring, M.Y. Pu, and S.M. Plakas. 1998. Analysis of malachite green and metabolite in fish using liquid chromatography atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. Chem. Res. Toxicol., 11, 1098-1104.
- Espeland, S. and P.E. Hansen. 2004. Prevention of *Saprolegnia* on rainbow trout eggs. BSc thesis, University of the Faroe Islands, Tórshavn, Faroe Islands.
- FDA (Food and Drug Administration). 2002. Part C, Enforcement Priorities. In Enforcement priorities for drug use in aquaculture USA. http://www.fda.gov/cvm/index/policy_proced/4200.pdf.
- Gaikowski, M.P., J.J. Rach and R. Ramsay. 1999. Acute toxicity of hydrogen peroxide treatments to selected lifestages of cold-, cool-, and warmwater fish. Aquaculture, 178, 191-207.
- Gieseker, C.M., S.G. Serfling and R. Reimschuessel. 2006. Formalin treatment to reduce mortality associated with *Saprolegnia parasitica* in rainbow trout,

- Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 253, 120-129.
- Hatai, K. and G.I. Hoshinai. 1992. Saprolegniasis in cultured coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Fish Pathol.*, 27, 233-234.
- Hatai, K., L.G. Willoughby and G.W. Beakes. 1990. Some characteristic of *Saprolegnia* obtained from fish hatcheries in Japan. *Mycol. Res.*, 94, 182-190.
- Hussein, M.M., K. Hatai and T. Namura. 2001. Saprolegniasis in salmonides and fishes their eggs in Japan. *J. Wildl. Dis.*, 37, 204-207.
- Jee, B.Y., D.C. Lee, N.Y. Kim, S.H. Jung and S.I. Park. 2007. Identification and chemotherapeutic effects of the fungi from three salmonid species and their eggs. *J. Fish Pathol.*, 20, 147-160.
- Khodabandeh, S. and B. Abtahi. 2006. Effects of sodium chloride, formalin and iodine on the hatching success of common carp, *Cyprinus carpio*, eggs. *J. Appl. Ichthyol.*, 22, 54-56.
- Kiesecker, J.M., A.R. Blaustein and L.K. Belden. 2001. Complex causes of amphibian population declines. *Nature*, 410, 681-684.
- Kim, H.N., D.H. Kwon, H.Y. Kim and H.K. Jun. 2005. Antimicrobial activities of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* Makino methanol extract. *J. Life Sci.*, 15, 279-286.
- Marking, L.L., J.J. Rach and T.M. Schreier. 1994. Evaluation of antifungal agents for fish culture. *Prog. Fish-Cult.*, 56, 225-231.
- Meinertz, J.R., G.R. Stehly, W.H. Gingerich and J.L. Allen. 1995. Residues of [¹⁴C]-malachite green in eggs and fry of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), after treatment of eggs. *J. Fish Dis.*, 18, 239-147.
- Meyer, F.P. and T.A. Jorgenson. 1983. Teratological and other effects of malachite green on development of rainbow trout and rabbits. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 112, 818-824.
- Noga, E.J. 1993. Water mold infections of freshwater fish: Recent advances. In: *Annual Review of Fish Diseases*, Pergamon Press Ltd., 291-304.
- Oono, H., K. Hatai, M. Miura, N. Tuchida and T. Kiryu. 2007. The use of bronopol to control fungal infection in rainbow trout eggs. *Biocontrol. Sci.*, 12, 55-57.
- Pickering, A.D., L.G. Willoughby and C.B. McGrory. 1979. Fine structure of secondary zoospore cyst cases of *Saprolegnia* isolates from infected fish. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 72, 427-436.
- Seymour, R.L. 1970. The genus *Saprolegnia*. *Nova Hedwigia (Beih.)*, 19, 1-124.
- Standing Committee on the Food Chain and Animal Health. 1990. http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/coun_reg_2377_90_en.pdf
- Treasurer, J.W., E. Cochrane and A. Grant. 2005. Surface disinfection of cod *Gadus morhua* and haddock *Melanogrammus aeglefinus* eggs with Bronopol. *Aquaculture*, 250, 27-35.
- Willoughby, L.G. 1978. Saprolegniasis of salmonid fish in Windermere: A critical analysis. *J. Fish Dis.*, 1, 51-67.
- Willoughby, L.G. 1985. Rapid preliminary screening of *Saprolegnia* on fish. *J. Fish Dis.*, 8, 473-476.
- Willoughby, L.G. and A.D. Pickering. 1977. Viable Saprolegniaceae spores on the epidermis of the salmonid fish *Salmo trutta* and *Salmo alpinus*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 68, 91-95.
- Yanong, R.P. 2003. Fungal diseases of fish. *Vet. Clin. North. Am. Exot. Anim. Pract.*, 6, 377-400.
- Yuasa, K. and K. Hatai. 1995. Relationship between pathogenicity of *Saprolegnia* spp. isolation to rainbow trout and their biological characteristics. *Fish Pathol.*, 30, 101-106.

2008년 12월 5일 접수
2009년 2월 20일 수리