

양식 어류에 있어서 황산동(copper sulfate pentahydrate)의 안전성과 살균효과에 대한 연구

허 강 준

충북대학교 수의과대학 수의학과 어류질병학연구소
(1996년 6월 24일 접수)

Antibacterial efficacy and safety of copper sulfate pentahydrate to cultured fish

Gang-joon Heo

Laboratory of Aquatic Animal Diseases,
Department of Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine,
Chungbuk National University

(Received Jun 24, 1996)

Abstract : Antibacterial efficacy and safety of copper sulfate pentahydrate (5% solution) was evaluated in laboratory and field studies for disinfection of some fish bacterial pathogens in cultured fish, flounder(*Paralichthys olivaceus*), mirror carp(*Cyprinus carpio*), gold fish(*Carrassius auratus*) and eel(*Anguilla japonica*). Dipping of fishes for acute toxicity was performed for a period of 48h, and the TLm value(median tolerance limit) were 4.0ppm in mirror carp and flounder, 4.4ppm in rainbow trout, and 10.0ppm in gold fish. After exposure below than TLm value for 1 month, no side effects and histopathological changes were observed.

The test drug were shown high antibacterial activities against most bacterial pathogens by exposure in the laboratory and field trials. However, *Aeromonas salmonicida* showed a resistance to the dosage. We can prevent outbreaks of bacterial diseases of fish by the dosage of 1ppm for 6hr and the test drug is thought to be used effectively and widely as a disinfectant against most bacterial fish pathogens.

Key words : copper sulfate pentahydrate, antibacterial efficacy, safety, fish bacterial pathogens, cultured fish.

서 론

황산동(copper sulfate pentahydrate)은 250℃에서 일정한 무

게가 될 때까지 건조해서 정량할 때 황산구리 CuSO₄(151.61)를 98.5~100.5% 함유하며, 청색 또는 감청색을 띠는 큰 삼사정계(triclinic) 결정, 청색을 띠는 파립 또는 밝은 청색을 띠는 분말이다. 냄새는 없으며 건조한 공기중에서 천천

Adress reprint requests to Dr. Gang-Joon Heo, Laboratory of Aquatic Animal Diseases, College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 360-763, Korea.

히 풍해되고 풍해하면 색깔이 회고무래해진다. 황산동은 묽은 용액상태로서는 수렴효과와 진균박멸 효과를 발휘하고 진한 용액의 상태로서는 부식작용을 한다. 또한 이러한 황산동을 주성분으로 하는 황산동은 염소의 효능을 더욱 효과적으로 처리할 수 있는 특성이 있으며, 냄새와 맛이 전혀 없기 때문에 모든 수처리 분야에서 염소계의약품보다 더욱 안전하고 편리하다¹.

황산동은 copper를 특수용해제로 킬레이트화한 제제로 수질정화 및 대장균 등과 같은 유해세균의 발육을 억제하는 음수 소독제로 사용상 매우 안전하며 그 효과가 우수한 새로운 소독제로서, 탈독성화된 황산과 구리 이온과 배위결합물을 산성 킬레이트제에 용해시킨 화합물로, 피부독성 및 경구독성 등급이 3급으로 인체와 동·식물에 무해하며, 물과의 친화성이 탁월하여 별도의 교환이나 혼합없이도 신속하고 균일하게 분산되며, 물 속의 무·유기물들과 결합, 이들의 분해작용을 일으킨다고 알려져 있다².

본 연구에서는 살균 소독제로서 그 효능이 우수하다고 알려진 황산동제제(copper sulfate pentahydrate, Cu 5% 함유)를 사용하여 양식어류 및 관상어류에 있어서 가장 문제되는 것으로 알려진 중요 병원성 세균을 대상으로 실험실에서의 적용 농도별 및 시간별로 살균력을 측정하여 본 약제의 효능과 함께 유효농도 및 적용시간을 검토하고, 현장에서 양식어류가 사육되고 있는 사육용수를 대상으로 본 제제의 효능과 함께 유효농도 및 적용시간을 검토하고, 마지막으로 양식어류를 대상으로 본 제제에 대한 독성시험을 통한 안전성 시험을 행하여 본 약제가 수산용 살균 소독제로서의 적용여부를 연구하고자 하였다.

재료 및 방법

공시약제의 성분 : 본 연구에 사용된 공시약제는 copper sulfate pentahydrate(CuSO₄ · 5H₂O ; Hahn Sung Vetpharm Inc., Korea)을 함유하는 액상제제(Cu 5%(w/v))로서, 종류수에 잘 용해되고 청색의 성상을 나타내며 그 잔량은 부형제(정제수)로 하였다.

사육 수조 : 각 공시어는 실험실에서, 그 크기에 따라 수조의 크기를 정하여 수용하고, 공기 주입기, 순환 여과장치, 주수 및 배수시설 그리고 형광등이 설치된 수조에서 사육하였다. 또한 현장에서의 효능시험을 위하여 각

공시어 별로 양어장을 1개소 이상 선정하여 시험을 행하였다.

무지개송어는 지하수를 사육수로 하는 우수식 양어장에서 금붕어는 가온한 비닐하우스내 양어장의 순환여과식으로 사육되는 양어장에서, 이스라엘잉어는 인공담의 가두리에서, 그리고 넙치는 해안에 인접한 육상 종묘배양장에서 실험을 하였다.

그리고 각 공시어종의 실험실 사육조건은 사육수온은 그 범위가 넙치 및 금붕어 그리고 이스라엘잉어는 17±2℃, 그리고 무지개송어는 15±2℃으로 유지하며, pH는 6.8~8.2로 그리고 용존산소량(dissolved oxygen)은 4.5~5.8로 유지시키며, 암모니아 농도는 모든 공시어종에서 20ppm 이하가 되도록 하며, 이를 위해 관상어와 넙치의 육상수조에서는 환수율을 10~20%로 하였다.

공시어종 : 건강한 무지개송어(*Salmo gairdneri*)와 넙치(*Paralichthys olivaceus*), 이스라엘잉어(*Cyprinus caprio*), 그리고 금붕어(*Carassius auratus*)의 4종의 양식어류를 사육하고 있는 양식장을 각각 선택하여, 어종별로 매회 무작위로 500마리씩 채집하여 실험실에서의 검사에 사용하였고, 양식현장에서의 살균효능 시험을 위해서는 양식장의 두 어군을 시험군과 대조군으로 설정하여 실험을 행하였다³.

실험실에서의 검사에 사용하는 공시어는 양식장으로부터 무작위로 채집하여, 산소를 주입한 용기에 넣어 가져와서 연구실의 사육수조에서 5일간 이상 안정시켜 적응시킨 후 시험에 사용하였다.

또한 공시어로 사용된 물고기는 건강한 것만을 선별하여 실험에 사용하였다. 임의로 채집된 물고기는 유영상태와 외관적 소견을 세밀히 검사하여 세균성 질병이나 기생충성 질병에 감염되지 않은 것으로 하였다.

공시균종 : 양식어류의 주요 세균성 질병의 원인균의 국내분리주(6균주)를 택하여 공시균주로 하였다. 공시된 균종은 비브리오병의 *Vibrio anguillarum*, 절창병의 *Aero-*

Table 1. Bacterial strains used in this study

Species	Strains*	Year	Source fish	Country
<i>Vibrio anguillarum</i>	HEO926	1992	Eel	Korea
<i>Aeromonas salmonicida</i>	HEO923	1992	Mirror carp	Korea
<i>Streptococcus sp.</i>	HEO933	1993	Flounder	Korea
<i>Edwardsiella tarda</i>	HEO931	1993	Flounder	Korea
<i>Aeromonas hydrophila</i>	HEO928	1992	Mirror carp	Korea
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	HEO912	1991	Gold Fish	Korea

* Heo and Lee (1994)⁴.

monas salmonicida, 연쇄구균종의 *Streptococcus* sp., 에드와드병의 *Edwardsiella tarda*, 에로모나스증의 *Aeromonas hydrophila*, 그리고 슈도모나스병의 *Pseudomonas fluorescens* 로 계 6균종을 사용하였다. 공시된 각 균주의 분리년도 및 어종 그리고 분리지역은 다음과 같다(Table 1).

실험실에서의 농도별 살균 효능 시험

1) 배양접종물의 준비 : 본 실험에 사용된 어병세균은 본 실험실에서 10% glycerol을 함유한 배지에 넣어 -76℃로 냉동된 일반적인 공시균주를 해동시켜 무균상태에서 TSA배지(단, *P. fluorescens*, *V. anguillarum*은 2% NaCl을 첨가한 TSA배지)에 도말하고 24시간 정도 25℃에서 배양시켰다. 이러한 균집락을 2차 계대시킨 후, 형성된 각각의 균집락 중에서 육안적으로 보아 동일해 보이는 집락 5개를 멸균시킨 백금으로 따서 TSB(trypic soy broth) 배양액에 접종시켰다. 접종된 TSB배양액을 다시 25℃에서 24시간 정도 배양시킨 것을 실험에 사용하였다.

2) 세균수의 측정 : 배양액의 탁도를 측정하기 위해 McFarland standard No. 5를 알려진 방법에 따라 제조하였다. McFarland Standard No. 5는 대략 ml당 세균수 10^6 개를 나타내며 위의 세균접종액과 McFarland standard No. 5용액을 각각 같은 크기의 시험관에 동일한 양을 넣고 stirrer로 잘 부유시켜 spectrophotometer로 540nm에서 흡광도를 비교, 측정하였다. 흡광도가 표준용액과 같지 않을 경우에 세균부유액을 희석하는 배지로서는 BSG(buffered saline with gelatin)를 사용하였으며 제조법은 일본 화학요법 학회(日本化學療法學會)에서 정한 방법에 의하여 행하였다.

3) 공시약제 희석액의 준비 : 최종적으로 농도를 0.1, 0.5, 1, 2, 4, 8ppm으로 하였고, 본 실험에서는 약제를 멸균된 PBS에 희석하고 바로 공시균주(6균종)와 반응시켰다. 즉, 배양액의 세균을 2×10^6 CFU/ml로 조정하여 준비한 후, 멸균된 담수로 본 약제를 희석하여 최종농도가 각각 0.1, 0.5, 1, 2, 4, 8ppm 되게 조정한 용액과 균액을 각각 1ml씩 취하여 시간별(5, 10, 30분, 1시간, 6시간, 24시간)로 반응시킨 후, 100 μ l을 취하여 TSA배지에 도말하고 배양기에서 25℃, 48시간 배양하여 세균집락기로 세균수를 측정하였다.

현장에서의 살균 효능시험 : 실험실에서의 효능시험 결과 정해진 본 약제의 용량과 용법에 의해, 각 공시어종의 양식 현장에서 이스라엘잉어는 *V. anguillarum*과 *A. hydrophila*, 무지개송어는 *A. salmonicida*와 *A. hydrophila*,

넙치는 *Streptococcus* sp.과 *E. tarda*, 그리고 금붕어는 *A. salmonicida*와 *A. hydrophila*를 대상으로 하여 사육용수를 채취하여 살균효능 시험을 행하였다⁵⁻⁷. 즉, 양식현장의 최종단계의 배수구에서 일정한 용량(1L)의 사육용수를 취하여 1ml당 평균 세균수를 측정하여 본 약제의 사용 전을 대조군으로 하고, 본 약제를 1ppm 농도로 6시간 노출시킨 것을 시험군으로 하여, 실험실에서의 효능시험과 동일한 방법으로 세균수를 측정하여 세균의 감소여부를 비교, 측정하였다.

금성 독성시험 : 본 약제를 예비실험결과 나타난 반수치사량으로, 추천량의 10배 희석계열의 용량이 희석된 수조에 공시어 20마리씩을 넣어 48시간동안 노출시킨 후에 다도로프법에 의하여 반수생존농도(TLm_{48h}; median tolerance limit = LC₅₀)를 결정하였다. 그리고 공시어의 외관 및 부검소견과 병리조직학적 분석을 행하여 그 변화를 관찰한다^{8,9}.

아급성 독성시험 : 본 약제의 반수생존농도의 약 1/2~1/5 용량(2ppm)을 사육수조에 희석한 후, 30일동안 농도를 유지하며 환수를 하면서 섭이, 성장, 폐사상황 등을 관찰하고, 질병의 발생유무, 수질변화를 살펴며, 물같이 후에는 공시약제를 넣어 항상 일정농도를 유지시켰다. 실험후 생존한 물고기를 부검하여 병리조직학적 검사 등을 통하여, 그 안전성을 검토하였다.

병리조직학적 관찰 : 시험후, 공시어를 두경부 절단에 의하여 죽살한 후 어체의 두경부를 횡절단하여, 이를 10% 포르말린 완충용액에 24시간 고정한 후, 8% 개미산 수용액(formic acid : HCOOH)을 사용하여 산 탈회처리를 하였다. 에틸알코올 탈수과정을 거쳐 파라핀 포매를 한 후 4~5 μ m의 파라핀 조직절편을 제작하여 hematoxylin and eosin (H & E)염색을 실시한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

결 과

실험실에서의 공시약제의 농도별 및 시간별 살균효능 시험

1) *Aeromonas salmonicida* : 무지개송어에 있어서 절창병의 원인균인 *A. salmonicida*에 대한 공시약제의 살균력을 알아본 결과 *A. salmonicida*는 4ppm 농도와 8ppm 농도에서 30분정도 노출된 후에 균이 완전히 살균됨을 알 수 있었다. Table 2에서와 같이 colony의 수가 2ppm 미만의

농도에서는 모두 적용시간별로 전부 1,000개 이상으로 나타나 살균효과가 없었지만 2ppm에서는 1시간 이상 공시 약제에 노출되었을 때 colony가 감소함이 관찰되었다.

Table 2. Efficacy of copper sulfate pentahydrate on *Aeromonas salmonicida*

Time/ Concentration(ppm)	0.1	0.5	1	2	4	8
5	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	17 ^a
10	>1000	>1000	>1000	>1000	882	638
30 min	>1000	>1000	>1000	>1000	-	-
1	>1000	>1000	>1000	826	-	-
6	>1000	>1000	>1000	24	-	-
24 hr	>1000	>1000	>1000	-	-	-

a : Number of colony per one petri dish.
b : Colony was not observed.

2) *Aeromonas hydrophila* : 이스라엘잉어나 금붕어에 있어서 폐양병 발생의 원인균인 *A. hydrophila*에 대한 공시 약제의 살균력을 알아본 결과 *A. hydrophila*는 실험상 최소 농도인 0.1ppm에서는 6시간이상에서, 0.5ppm에서는 6시간이상, 1ppm에서는 6시간이상, 2ppm 농도에서는 6시간이상에서 4ppm 농도에서는 30분이상에서 그리고 8ppm에서는 처음부터 *A. hydrophila*균이 완전히 살균되는 것이 관찰되었다(Table 3). *A. hydrophila*균은 공시약제의 낮은 농도에도 쉽게 살균효과를 나타내었으며, 노출 시간도 6시간정도면 가장 낮은 농도에서 살균효과가 크게 나타나는 것을 알 수 있었다.

Table 3. Efficacy of copper sulfate pentahydrate on *Aeromonas hydrophila*

Time/ Concentration(ppm)	0.1	0.5	1	2	4	8
5	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	37 ^a
10	>1000	>1000	>1000	>1000	762	- ^b
30 min	>1000	>1000	>1000	>1000	4	-
1	>1000	>1000	>1000	>1000	-	-
6	4	-	-	-	-	-
24 hr	-	-	-	-	-	-

a : Number of colony per one petri dish.
b : Colony was not observed.

3) *Pseudomonas fluorescense* : 이스라엘잉어에서 문제시되는 슈도모나스병의 원인균인 *P. fluorescense*에 대한 공시약제의 살균력을 알아본 결과 *P.*는 실험상 최소농도인 0.1ppm에서는 24시간이상에서, 0.5ppm에서는 6시간이상, 1ppm에서는 6시간이상, 2ppm 농도에서는 6시간이상에서, 4ppm 농도에서는 1시간이상에서 그리고 8ppm에서

는 4ppm과 마찬가지로 1시간이상 노출되었을 때 *P. fluorescense*균이 완전히 살균되는 것이 관찰되었다(Table 4). *P. fluorescense*균은 공시약제의 낮은 농도에도 쉽게 살균효과를 나타내었으며 노출시간도 6시간 정도면 낮은 농도에서 살균효과가 크게 나타나는 것을 알 수 있었다.

Table 4. Efficacy of copper sulfate pentahydrate on *Pseudomonas fluorescense*

Time/ Concentration(ppm)	0.1	0.5	1	2	4	8
5	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
10	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
30 min	>1000	>1000	>1000	>1000	960	320 ^a
1	>1000	>1000	>1000	>1000	-	- ^b
6	>1000	-	-	-	-	-
24 hr	788	-	-	-	-	-

a : Number of colony per one petri dish.
b : Colony was not observed.

4) *Edwardsiella tarda* : 넙치 및 뱀장어 등의 어종에 있어서 에드워드병의 원인균인 *E. tarda*균에 대한 공시 약제의 살균력을 알아본 결과 *E. tarda*균은 0.5ppm에서는 24시간이상 1ppm에서는 6시간이상, 2ppm 농도에서는 6시간이상에서, 4ppm 농도에서는 6시간이상에서 그리고 8ppm에서는 1시간이상 노출되었을 때 *E. tarda*균이 완전히 살균되는 것이 관찰되었다(Table 5). *E. tarda*균은 공시 약제의 낮은 농도에도 쉽게 살균효과를 나타내었으며, 노출시간도 24시간 정도면 낮은 농도에서 살균효과가 크게 나타나는 것을 알 수 있었다.

Table 5. Efficacy of copper sulfate pentahydrate on *Edwardsiella tarda*

Time/ Concentration(ppm)	0.1	0.5	1	2	4	8
5	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
10	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	980 ^a
30 min	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	488
1	>1000	>1000	>1000	>1000	456	- ^b
6	>1000	808	1	-	-	-
24 hr	>1000	-	-	-	-	-

a : Number of colony per one petri dish.
b : Colony was not observed.

5) *Vibrio anguillarum* : 뱀장어를 비롯한 다른 어종에 있어서 비브리오병의 원인균인 *V. anguillarum*에 대한 공시 약제의 살균력을 알아본 결과 *V. anguillarum*균은 0.5ppm에서는 6시간이상, 1ppm에서는 1시간이상, 2ppm 농도에서는 1시간이상에서, 4ppm 농도에서는 5분 이상

에서 그리고 8ppm에서는 균이 노출되는 즉시 살균되는 것이 관찰되었다(Table 6). *V. anguillarum*균은 공시약제의 낮은 농도에도 쉽게 살균효과를 나타내었으며 노출 시간도 0.5ppm에서 6시간 정도면 살균효과가 크게 나타나는 것을 알 수 있었다. 그리고 *V. anguillarum*은 다른 균들과는 달리 노출시간보다는 약제의 농도에 의하여 살균효과가 크게 다름이 인정되었다.

Table 6. Efficacy of copper sulfate pentahydrate on *Vibrio anguillarum*

Time/ Concentration(ppm)	0.1	0.5	1	2	4	8
5	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000 ^a	- ^b
10	>1000	>1000	>1000	>1000	-	-
30 min	>1000	>1000	>1000	>1000	-	-
1	>1000	>1000	-	-	-	-
6	>1000	-	-	-	-	-
24 hr	>1000	-	-	-	-	-

a : Number of colony per one petri dish.
b : Colony was not observed.

6) *Streptococcus* sp. : 넙치 등의 어종에 있어서 연쇄 구균증의 원인균인 *Streptococcus* sp.에 대한 공시약제의 살균력을 알아본 결과 *Streptococcus* sp.은 0.5ppm에서는 24시간이상, 1ppm에서는 6시간이상, 2ppm 농도에서는 6시간이상에서, 4ppm 농도에서는 1시간이상에서 그리고 8ppm에서는 노출된지 5분 정도가 지난 후에 살균되는 것이 관찰되었다(Table 7). *Streptococcus* sp.균은 공시약제의 낮은 농도에도 쉽게 살균효과를 나타내었으며, 노출 시간도 0.5ppm에서 24시간 정도면 살균효과가 크게 나타나는 것을 알 수 있었다. 그리고 *Streptococcus* sp.은 노출시간이 길수록 그리고 농도가 높을 수록 살균효과가 크게 나타났다.

Table 7. Efficacy of copper sulfate pentahydrate on *Streptococcus* sp.

Time/ Concentration(ppm)	0.1	0.5	1	2	4	8
5	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	- ^b
10	>1000	>1000	>1000	>1000	882 ^a	-
30 min	>1000	>1000	>1000	>1000	112	-
1	>1000	>1000	>1000	>1000	-	-
6	>1000	720	-	-	-	-
24 hr	>1000	-	-	-	-	-

a : Number of colony per one petri dish.
b : Colony was not observed.

현장에서의 살균 효능 시험 : 무지개송어, 이스라엘잉어

어, 넙치 그리고 금붕어를 사육하고 있는 양식장으로 부터 사육수를 채취하여, 이로부터 분리된 어병세균에 대한 황산동의 살균효능을 측정한 결과 Table 8에서와 같이 무지개송어 양식장에서 분리된 균은 *A. hydrophila*와 *A. salmonicida*였으며, 이 사육수를 1ppm의 황산동에서 6시간동안 노출시킨 후 세균수를 측정하여본 결과 *A. hydrophila*는 검출되지 않았으며 *A. salmonicida*는 균수의 현저한 감소가 인정되었다. 총균수에 있어서도 세균수의 현저한 감소가 인정되었다.

넙치를 양식하는 양식장에서 사육수를 채취하여 균을 분리해낸 결과, 분리된 균은 *E. tarda*와 *Streptococcus* sp.였으며, 이 사육수를 1ppm의 황산동에서 6시간동안 노출시킨 후에는 총균수의 현저한 감소와 함께 두 병원균은 검출되지 않았다. 금붕어를 사육하는 양어장에서 사육수를 채취하여 균을 분리해낸 결과 분리된 균은 *A. hydrophila*와 *A. salmonicida*였으며, 이 사육수를 1ppm의 황산동에서 6시간동안 노출시킨 후에는 Table 10과 같이 총균수의 현저한 감소와 함께 두 병원균은 검출되지 않았다. 그리고 이스라엘잉어를 사육하는 양어장에서 사육수를 채취하여 균을 분리해낸 결과 분리된 균은 *A. hydrophila*와 *V. anguillarum*였으며, 이 사육수를 1ppm의 황산동에서 6시간동안 노출시킨 후에는 Table 11과 같이 총균수의 현저한 감소와 함께 두 병원균은 검출되지 않았다.

Table 8. Efficacy of copper sulfate pentahydrate on bacterial pathogens in the water of aquacultured farm

Fish	Bacterial pathogens	Bacterial conc.	Bacterial conc.
		before exposure (CFU/ml)	after exposure (CFU/ml)
Rainbow trout	<i>Aeromonas salmonicida</i>	3.5×10^3	1.2×10^2
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	2.6×10^2	-
	total bacteria	6.4×10^5	4.2×10^2
	<i>Edwardsiella tarda</i>	7.2×10^4	-
Flounder	<i>Streptococcus</i> sp.	1.6×10^3	-
	total bacteria	7.5×10^0	2.1×10^2
	<i>Aeromonas salmonicida</i>	2.2×10^3	-
Gold fish	<i>Aeromonas hydrophila</i>	8.1×10^4	-
	total bacteria	3.2×10^0	4.6×10^2
	<i>Vibrio anguillarum</i>	3.1×10^3	-
Mirror carp	<i>Aeromonas hydrophila</i>	2.0×10^3	-
	total bacteria	5.2×10^0	6.7×10^2

금성 독성 : 10리터들이 수조에서 이스라엘잉어, 금붕어, 무지개송어 그리고 넙치를 각 20마리씩을 한 군으로 하여, 각 농도별로 시험약제를 수조에 회석하여 공시어를

48시간동안 사육한 결과 이스라엘잉어의 본 공시약제에 대한 TLm_{48h} 값은 4.0ppm이었으며 금붕어는 10.0ppm, 무지개송어는 4.4ppm 그리고 넙치는 4.0ppm이었다.

추천용량 정도의 농도에서는 별다른 외부소견의 이상을 관찰할 수 없었으나 반수생존농도(TLm_{48h}) 이상의 농도의 약제에 노출되었을 경우, 모든 공시어종에서 점액분비가 증가하는 경향을 나타내었다. 공시약제의 농도에 따라 아가미와 체표에서의 점액분비량은 증가하는 경향이 있었으며, 유영상황과는 별다른 상관관계를 보이지는 않았다. 대조군과 비교하여 아가미덮개의 운동이 점차 완만해졌으며, 아가미와 아가미덮개에 충혈소견이 관찰되었다. 그리고 폐사직전에는 아가미덮개의 운동이 정지된 상태로 수조바닥에 드러누워 있었으며, 자극에 의해서만 약간의 미동이 있었을 뿐 운동기능의 마비증세와 호흡부전으로 인하여 폐사하는 모습을 관찰할 수 있었다.

모든 공시어종에서 TLm_{48h} 값 이하의 농도에서는 아가미를 비롯한 모든 장기에서 별다른 병리학적 소견이 관찰되지 않았다. 특히 본 공시약제의 추천 용량의 농도에서는 아가미와 신장, 간장 등의 장기에서 모두 정상적인 소견이 인정되었다.

반수생존농도 이상의 약제에 노출되어 폐사한 공시어에 있어서의 병리조직학적 소견으로서는 먼저 아가미의 경우를 들면 새박판 기저부의 상피세포의 주의할 만한 증생과 상피세포의 부종으로 인한 탈락이 관찰되었다(Fig 1 ; 이스라엘잉어). 공시약제의 농도가 증가함에 따라 상피세포는 수적으로도 증가했지만 세포 자체의 부종도 함께 관찰되었다. 심한 경우에는 상피세포가 완전히 새박판으로부터 분리되어 새박판 사이에 존재하고 있는 것도 있었다.

다음으로 신장에서도 반수 생존농도 이상의 약제에 노출되어 폐사한 어체의 경우 병변이 인정되었다. 즉, 세뇨관 상피세포의 비대로 인한 세뇨관 강의 폐쇄가 관찰되었으며, 실질세포와 세뇨관 상피세포의 구조적 변형도 보였다(Fig 2 ; 무지개송어). 그리고 체표의 병리조직 소견으로는 점액분비세포의 증가와 체표 주위에 백혈구 침착 그리고 체표의 상피층의 탈락이 관찰되었다(Fig 3 ; 이스라엘잉어). 점액분비세포는 미성숙세포 단계에서 세포변성이 일어났으며, 상피층의 탈락은 많은 개체에서 점액층이 근육층으로부터 분리되는 소견으로 관찰되었다.

아급성독성 : 이스라엘잉어의 경우, 본 약제의 반수생존농도의 1/2값인 2ppm 농도에 1개월간 침지시켰으나 실험종료일까지 폐사가 인정되지 않았다. 1개월동안 침지시키는 동안에 이스라엘잉어는 대조군의 외관소견과 유사한 형태를 나타내었고 급성독성시험에서 볼 수 있었던 점액분비와 같은 증상은 관찰할 수 없었다. 그리고 실험 도중에 급이되는 사료의 섭취정도는 대조군과 동일하게 활발하게 나타났으며 그로 인한 사육용수의 오염으로 2일에 1회 정도 환수가 필요하였다. 넙치, 무지개송어 그리고 금붕어에서도 반수생존농도의 1/2~1/5 값인 2ppm 농도에 침지시켜 동일한 방법으로 관찰하였으나, 이스라엘잉어와 같이 별다른 이상을 나타내지 않았다.

1개월간 노출된 이스라엘잉어의 병리학적 소견을 관찰한 결과 이스라엘잉어는 아가미에 있어서 경미한 새박판 상피세포 증생과 상피세포의 위축을 나타내었으나 유의할 만한 정도는 아니었다. 아가미 이외에 간장, 신장, 장관 그리고 뇌조직 등도 관찰한 결과, 병리학적 소견은 정상 이스라엘잉어의 조직소견을 나타내었다.

고 찰

양식산업의 생산성 향상을 위하여 어패류 질병의 예방이 가장 필수적인 것 중의 하나로 사료된다. 질병예방을 위하여 양식장의 수온이나 용존산소 등의 무생물학적 수질관리가 필수적이며, 또한 영양관리도 어패류의 성장 뿐만아니라 질병예방에도 매우 중요한 요소로 알려져 있다. 그러나 수질관리와 영양관리만으로 모든 어패류 질병을 막을 수 없는 것이 현실이다. 따라서 양식수, 양식 기자체 및 양식 어패류 외부의 소독 또는 살균, 불특정 질병의 예방 목적으로 백신의 투여 등 적극적인 질병관리가 행해지고 있으나 이를 위하여 효과적인 제품의 개발과 적절한 사용이 전제되어야 한다고 사료된다.

현재 국내의 수산분야에서 사용되고 있는 소독 및 살균제는 적당한 수산용 소독제가 개발되어 있지 않아서 일반 가축용 소독제나 공업용 물질을 정확한 사용지침이나 안전성의 확보가 되어 있지 않은 상태에서 무분별하게 사용되고 있는 실정이다. 따라서 그 효능이 우수하고 안전성이 확보된 수산용 소독제의 개발이 필요한 것으로 사료된다¹⁰.

황산동은 단일 약제 효능에 있어서 복합적이고 지속적인 사용용도가 다양할 뿐아니라 기존의 약품들이

갖고 있는 유해성 및 자극성이 없다. 그리고 주위환경과 수중내에 만연해 있는 세균들(살모넬라, 파스튜렐라, 비브리오균, 포도상구균 및 기타 병원성 미생물과 곰팡이, 윌츨, 규조류, 청조류 등의 각종 조류)을 효과적으로 없애 주므로 쾌적한 환경(수질)개선을 할 수 있다¹¹.

황산동은 저수지, 못, 수영장 등에 있는 미생물의 90~98%까지 처리하며 또한 다른 어떤 약품보다 경제적인 처리가 가능하다. 황산동은 액체로서 사용이 간편하다. 처리수역에 직접 붓거나 살포하여 간편히 처리할 수 있다. 사용지시에 따라 적정량을 사용시에 수목과 동물에 무해하며 잔류물이 생기지 않는다. 구리는 대부분의 동물에게 필수영양소이며 일상의 음식물에서 결핍되기 쉽다. 구리의 부족분이 대부분의 음식물속에 영양소로써 통상 첨가된다. 예를 들어, 황산동로 처리된 음식은 필요한 구리의 훌륭한 공급원이 된다. 또한 사용지시에 따라 적정량이 사용되었을 때는 사람이나 동·식물이 필요로 하는 구리량을 절대 초과하지 않게 된다.

살균제 및 해조 처리제의 효능 외에 황산동은 일정기간동안 저수지, 연못 등의 바닥에 침전되어 있는 구리 오염물을 킬레이트시킨다. 이러한 구리 오염물들은 과거의 황산동이 사용되었던 지역에서 발생된다. 따라서 환경에 대한 황산동의 역할은 살균 및 해조 처리효율을 높이며 처리경비를 절감시키고 또한 환경적으로 큰 도움이 되는 것이다. 실험실에서의 공시약제의 농도별 및 시간별 살균효능시험 결과, 본 약제를 *A salmonicida*균에 대하여 사용하고자 할 때에는 2ppm 농도가 되게 수중에 살포하여 1시간이상 약욕하거나 연못 및 어구, 장비의 소독 등에 이용할 경우에는 2~4ppm 농도에서 1시간정도 침지하면 효과적일 것으로 사료된다.

본 약제를 *A hydrophila*균에 대하여 어병의 예방 혹은 연못의 살균을 목적으로 사용하기 위해서는 0.1ppm에서 6시간 노출로도 살균효과를 나타내지만 같은 농도로 희석한 약제에서 하룻밤 동안 소독하고자 하는 대상물을 침지시켜 노출시킨다면 보다 더욱 확실한 살균효과를 기대할 수 있으며, 어체에 대한 안전성도 있다고 사료된다.

본 약제를 *P fluorescense*균에 대하여 어체의 예방 혹은 연못의 살균을 목적으로 사용하기 위해서는 0.5ppm에서 6시간 노출로도 살균효과를 나타내지만 같은 농도로 희석한 약제에서 하룻밤 동안 소독하고자 하는 대상물을 침지시켜 노출시킨다면 보다 더욱 확실한 살균효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

본 약제를 *E tarda*균에 대하여 어체의 예방 혹은 연못의 살균을 목적으로 사용하기 위해서는 0.5ppm으로 희석한 약제에서 하룻밤 동안 소독하고자 하는 대상물을 침지시켜 노출시킨다면 보다 더욱 확실한 살균효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다. 에드워드병의 예방 및 치료에는 광범위항생제가 사용되고 있으나 예방차원에서 양식장의 기자재, 수조, 어체외부 등을 정기적으로 소독하면 본 *E tarda*로 인한 어체의 피해를 줄일 수 있을 것으로 기대하며, 본 약제는 양식업처 이외에도 여러 어종의 에드워드병에 적용할 수 있으리라 생각된다.

본 약제를 *V anguillarum*균에 대하여 어체의 예방 혹은 연못의 살균을 목적으로 사용하기 위해서는 0.5ppm으로 희석한 약제에서 하룻밤 동안 소독하고자 하는 대상물을 침지시켜 노출시키거나 1ppm 정도의 농도에서 단시간 예를 들어 1시간 정도 노출시킨다면 보다 더욱 확실한 살균효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다. 비브리오병의 예방 및 치료에는 광범위 항생제가 사용되고 있으나 내성균의 산생으로 인하여 여러 가지 심각한 문제가 야기되고 있다.

마지막으로, 본 약제를 *Streptococcus sp.*균에 대하여 어체의 예방 혹은 연못의 살균을 목적으로 사용하기 위해서는 0.5ppm으로 희석한 약제에서 하룻밤 동안 소독하고자 하는 대상물을 침지시켜 노출시키거나 1ppm 정도의 농도에서 6시간 정도 노출시킨다면 보다 더욱 확실한 살균효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다. 연쇄구균의 감염원은 해수중의 연쇄구균과 냉동사료에 오염되어 있는 연쇄구균으로 알려져 있다. 따라서 본 약제를 연쇄구균에 대해서 효과적으로 사용하기 위해서는 해수의 관리와 함께 사료의 관리가 이루어지면 더욱 예방효과가 좋을 것으로 사료된다.

현장에서의 살균 효능시험에서 사육수로 부터 분리해낸 균은 후에 실험실 검사를 통해서 정확한 균형을 확인하였다. 그리고 사육수로 부터 분리된 균은 각 어종에 따라 균수가 다르게 검출되었는데 어종에 따라서 각각의 사육환경이 다르기 때문에 균수가 틀리게 검출되었다고 사료된다. 예를 들면 무지개송어의 경우에는 균수가 적게 검출되는 것을 알 수 있었는데, 이것은 사육환경이 청정하고 사육수가 지하수이기 때문에 오염원에 노출되는 시간이 적어서 균수가 적게 검출되었다고 사료된다. 따라서 현장에서의 효능검사를 실시한 결과 본 약제의 추천용량과 용법인 1ppm의 황산동을 6시간동안 사육수에 노출(약

결 론

육)시키게 되면, 사육수의 대부분의 어병세균이 사멸되거나 현저히 감소됨을 인정되었으며, 양식장의 사육수 소독에 적합한 소독제임이 확인되었다.

본 약제에 대한 독성시험에서 사용량과 반수생존농도 차이가 크지 않아 1ppm 단위씩만으로도 결과의 차이가 크게 나타났는데, 이는 본 약제를 사용할 때 사용농도를 정확히 지켜야 어체에 미치는 독성으로 인한 손실을 줄일 수 있으리라 사료된다. 또한, 폐사의 원인은 우선적으로 새박판 상피세포의 증생으로 인한 호흡면적의 감소로 인한 호흡곤란으로 사망한다고 사료된다. 또한 신장의 세포용해 등의 변성으로 인한 대사장해도 폐사의 원인으로 사료된다.

따라서 독성시험결과 본 약제의 추천용량인 1ppm에 노출되었을 경우, 모든 공시어종에서 외관적으로 유의할 만한 변화가 나타나지 않았으며, 병리학적으로도 전혀 이상이 없음이 인정되었다. 그리고 1ppm 정도의 황산동에 장기간(1개월 정도) 노출되었을 때에도, 이스라엘잉어에 미치는 병리학적 변화는 없는 것으로 사료되며, 추천용량에서의 장시간 사용에 있어서도 안전성이 입증되었다¹².

본 약제의 추천용량 이하에서의 용량단계별의 어체의 변화 즉, 증제량에 미치는 영향, 혈액화학적 변화 그리고 조직병리학적 변화를 더욱 연구하여 제품이 개발되어, 양식에 있어서 이의 적절한 선택과 사용을 하게 된다면 이를 소독제로서 안심하고 사용할 수 있을 것이며, 양식어류의 어병에 의한 폐사를 감소, 내성균의 감소 그리고 저항력의 증가로 인해 국내 양식업의 생산성 향상과 발전을 꾀할 수 있다고 생각한다.

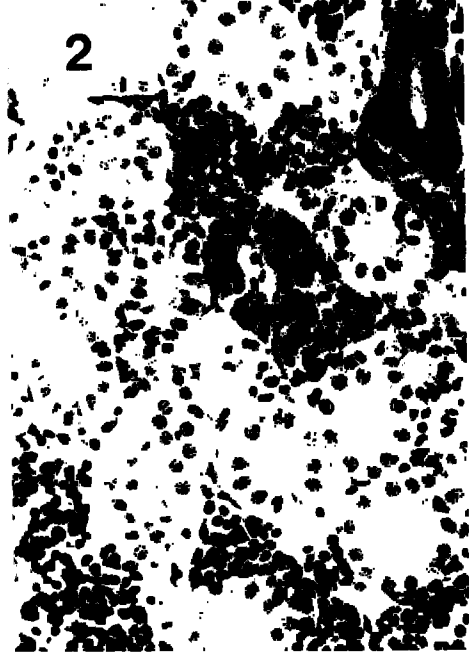
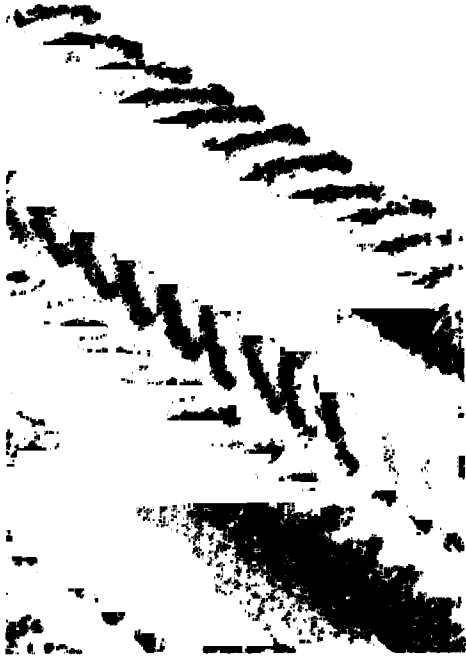
금성독성시험 결과 본 약제에 대한 이스라엘잉어의 TLm_{48h} 값은 4.0ppm이었으며 금붕어는 10.0ppm, 무지개송어는 4.4ppm 그리고 넙치는 4.0ppm이었다. 폐사한 공시어의 병리조직학적 소견으로서는 새박판 상피세포의 증생으로 인한 호흡면적의 감소와 신장의 세포용해 등의 소견이 인정되었다. 아급성 독성시험에 있어서 각 공시어종의 반수생존농도의 1/2~1/5 농도인 2ppm으로 1개월동안 공시어를 침지시키며 사육한 결과 모든 공시어는 대조군의 외관소견과 유사한 형태를 나타내었고, 병리학적 소견은 정상 공시어의 조직소견과 동일하였다.

각 어병세균에 대한 살균 효능 시험에서는, 대부분의 어병세균에 대하여 1ppm 이상의 농도로 6시간이상 노출시킨다면 보다 더욱 확실한 살균효과를 기대할 수 있을 것으로 사료되었다. 다만 *A. salmonicida*의 경우에는 2ppm 이상의 농도에서의 1시간이상 노출해야만 살균효과가 인정되었다. 또한, 양식장으로 부터 사육수를 채취하여, 이로 부터 분리된 어병세균에 대한 황산동의 살균 효능을 연구한 결과, 같은 농도로 사육수에서 대부분의 어병세균이 검출되지 않았으며 총균수에 있어서도 세균수의 현저한 감소가 인정되었다. 그러므로 현장에서 본 약제의 추천용량과 용법인 1ppm의 황산동을 6시간동안 사육수에 노출(약육)시키게 되면 사육수의 대부분의 어병세균이 사멸되거나 현저히 감소됨을 인정되었으며, 양식장의 사육수 소독에 적합한 소독제임이 확인되었다.

결론적으로 본 약제는 양식어류에 있어서 질병의 예방 및 양어장의 수조 또는 기구의 소독이나 질병의 치료를 위하여 1ppm의 황산동을 6시간 동안 사육수에 노출(약육)시키게 되면 매우 효과적일 것으로 사료된다.

Legends for figures

- Fig 1. Light photomicrograph of gill of mirror carp treated in water diluted by copper sulfate pentahydrate(4.0ppm) for 48hrs. Swelling of epithelial cells gill lamella and hyperplasia of basal cells of second gill lamella of mirror carp. $\times 400$, H & E stain.
- Fig 2. Light photomicrograph of kidney of rainbow trout treated in water diluted by copper sulfate pentahydrate(4.4ppm) for 48hrs. Lytic degeneration and vacuolation of kidney epithelial cells are appeared in rainbow trout. $\times 400$, H & E stain.
- Fig 3. Light photomicrograph of the skin of mirror carp treated in water diluted by copper sulfate pentahydrate(4.0ppm) for 48hrs. Swelling of mucous cells exist in the epidermis. $\times 400$, H & E stain.



참 고 문 헌

1. Bailar JC, Copper In ; Massey, ed. *Comprehensive Inorganic Chemistry*, Vol 3. Oxford:Pergamon Press Co, 1-78, 1973.
2. Browning E. Toxicity of Industrial Metals, 2nd ed. New York ; Appleton Century Crofts, 145-152, 1969.
3. Drummond RA, Spoor WA, Osion GF. Some short-term indicators of sublethal effects of copper on brook trout, *Salvelinus fontinalis*. *J Fish Res Board Can*, 30: 698-701, 1973.
4. Heo GJ, Lee JH. A study on efficacy and safty of gentamicin to bacterial diseases in cultured fish, *Cyprinus carpio* and *Paralichthys olivaceus*. *Kor J Vet Publ Hlth*, 18:327-338, 1994.
5. Hjeltnes B, Anderson K, Egidius E. Multiple antibiotic resistance to *Aeromonas salmonicida*. *Bull. Europ. As-soc. Fish pathol.* 7:85, 1987.
6. Nagatsugawa T. A streptococcal disease of cultured young flounders. *Fish Pathol*, 17:281-285, 1983.
7. Nagatsugawa T. *Edwardsiella tarda* isolated from cultured young flounders. *Fish Pathol*, 18:99-101, 1983.
8. Amdur M, Doull J, Klassen CD. In ; Casarett and Doull's Toxicology. 4th ed. New York:Pergamon Press Co, 693-694, 1983.
9. U. S., EPA(Environmental Protection Agency). Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms. EPA, 3rd ed. EPA, 4-85, 1985.
10. Heo GJ, Shin KS, Lee MH. Diseases of aquaculture animals and prevenion of drug residues. *Kor J Food Hygiene*, 7:S7-S19, 1992.
11. Scott NT. Essential inorganic elements. *Nutri. Chick*, pp. 340-341, 1986.
12. Park JM. In "Methods of residues in animal food", Seoul:Sangrok Press Co, 32-44, 1991.