FISHERIES SCIENCE (2006) 72: 28-32

Chum salmon (*Oncorhynchus keta*)난의 물곰팡이에 대한 하이포아염소산 나트륨(NaOCl)의 예방 효과

Chutima KHOMVILAI, Masaaki KASHIWAGI,
Chanin SANGRUNGRUANG and Motoi YOSHIOKA

요 약

Chum salmon의 알이 부화하는 동안 물곰팡이의 감염으로부터 보호하기 위해 알을 10 mg/L 염소농도의 하이포아염소산나트륨(NaOCl) 용액에 매일 15분간 수정란에서부터 발안기까지 처리하였다. 감염된 알의 수 및 발안기 알의 수는 부화 23일째 관찰하였다. 전체의 알에서 감염된 알의 비율은 대조구(11.3;59.3%)보다 NaOCl 처리한 실험구(1.8; 33.4%)에서 유의적으로 낮게 나타났다 (P<0.01). 전체 알에 대한 발안란의 비율은 대조구(66.1:97.5%)보다 NaOCl처리한 실험구(85.9:98.6%)에서 유의적으로 우수한 경향을 보였다(P<0.01). NaOCl의 항균 활성은 알의 생존율을 향상시킨다. 따라서 NaOCl는 chum salmon의 난에 대한 물곰팡이의 감염에 대하여 아주 유용한 항균물질이라고 판단된다.

1. 서 론

Chum salmon은 일본에서 가장 인기가 있으며 상업적으로 중요한 어종이다. 매년 20억보다 더 많은 양의 치어가 연어부화장에서 생산되어 강으로 방류된다. 그러나 부화동안에는 Saprolegniales 목 수생균이 대량 발생하여 알에 대해 치명적인 피해를 가져와 부화하는 동안 대량폐사가 빈번하게 발생된다.[1] 말라카이트그린은 항균 물질로 유용하지만 태아기 기형유발,[2,3] 잔여[4] 및 발암성 물질[5,6]로 작용하여 1991년 미국에서 사용 금지되었으며 2003년 일본에서도 사용 금지되었다. 그러므로 말라카이트그린에 대체한 항균물질의 개발이 필요하며 개발된 항균물질은 효과적인 항균작용 및 환경 또는 살아있는 유기체에 악영향을 미치지 않는 안전한 물질이여야 한다.

이전 연구[7-9]에서, NaOCl는 saprolegniasis를 유발하는 대표적인 병원균 (*Saprolegnia*) 종류들에서 강한 살균제 효과를 나타내며 수생균 감염부터 연어 알을 보호하는데 유용한 물질이라고 보고하였다. 따라서 본 연구에서는 chum salmon의 알에 수생균 감염시 이에 대항하는 하이포아염소산나트륨(NaOCl)의 치료 및 예방 효능에 대해 조사, 평가하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 어란 부화 조건

본 실험은 일본 미야지도의 Tsukidate 연어부화장에서 2004년 10월에서 12월까지 걸쳐 수행되었으며 미수정 알은 하사마 강에서 포획된 5마리 암컷으로부터 얻었다. 5마리 암컷으로부터 얻어진 각 알들은 개별적으로 여러 수컷으로부터 나온 정자를 건식법으로 수정시켜 부화장으로 수송하였으며 45분 정도 소요되었다. 수정된 알은 평균 465(353~613)개의 알을 각 4개의 둥근 용기(직경 70 mm × 깊이 30 mm)에 나누어 담았고 그런 후 둥근 용기는 4개의 원형 수조(길이 1000 mm × 직경75 mm)에 각 수용되었다. 각 원형수조의 주수량은 2 L/min 이며 수온 및 용존산소농도는 각 8.0~14.5℃ 및 12.2~16.0 mg/L 으로 유지하였다.

2.2 NaOCl 효능 실험

상업적인 NaOCl (Wako Pure Chemical, Osaka, Japan)를 실험에 사용하였으며 NaOCl의 항균활성을 측정하기 위해 4개 수조 중 2개 수조에 수정에서 발안기 단계까지 매일 15분간, 10 mg/L 염소농도의 NaOCl를 처리하였다. 균 감염된 알의 수 및 발안된 알의 수는 발안기 단계까지 관찰하였으며 처리된 2개 수조에서 관찰된 자료는 처리하지 않는 다른 2개 수조인 대조구와 비교하였다. 처리하기 전 10 mg/L염소농도의 NaOCl는 다른 수조에 준비하였으며 주수량 2 L/min 인 부화 수조로 25분간 사이펀으로 공급되었다. 염소농도는 DPD (N,N-diethyl- p-phenylenediamine) test kit (Pocket Colorimeter 4670-00, Hack, Loveland, CO, USA)을 사용하여 측정하였으며 실험하는 동안, 부화기내 유입수는 대조구 수조를 제외한 나머지 수조에서

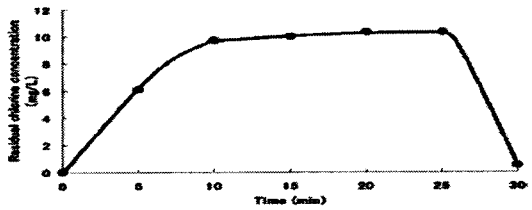

Fig. 1 Changes in residual chlorine concentration of incubation water during NaOCl treatment.

부유 및 흐르도록 유지하였다. NaOCl의 잔류농도는 처리에서 10분까지는 증가되었으며 그 다음의 15분간 평형을 유지하였다(Fig. 1). 부화 수조의 입구 및 출구에서는 염소농도에 대한 차이는 관찰되지 않았다.

부화 23일, 발안기 단계의 발생된 알에서는 NaOCl처리를 중지하였으며 모든 용기에서 균 감염된 알의 수와 발안된 알의 수를 카운트하였다. 여기에서, 균 덩어리(clumps)안에 존재하는 모든 알은 죽거나 살아 있는 것과는 상관없이 감염된 알로 분류하였으며 감염된 알의 비율은 다음과 같은 식으로 계산되었다;all eggs within clumps/total eggs × 100. 이와는 달리, 알에 균 덩어리를 제거하면 알이 발달을 하지만 균 덩어리를 제거하지 못하면 균 덩어리가 산소를 소비하므로 알이 사용할 수 있는 산소가 결핍되어 결국 죽게 만들므로 균 덩어리 안에 살아있는 알은 발안된 알로서 분류하였다. 일반적으로 대부분 연어 부화장에서는 죽은 알의 검사 및 제거는 발안기 단계 이후에 진행되므로 그 이후에서는 균 감염이 잘 발생되지 않는다. 발안된 알의 비율은 다음과 같은 식으로 계산되었다;all live eggs including the live within clumps/total eggs × 100.

2.3 통계분석

NaOCl처리에 따른 정확한 평가를 결정하기 위해, two-way layout (ANOVA) 및 Student's *t*-test로

Table 1 Number and percentage of fungal infected eggs and eyed eggs on day 23 of incubation in NaOCl treatment and the control

	NaOCl							Control						
	Total		Infected egg			Eyed egg		Total		Infected egg			Eyed egg	
Parental female	egg	Clump	Dead	Live	%†	Live	%‡	egg	Clump	Dead	Live	%†	Live	%‡
1 (I**, E[ns])§	455	8	10	25	7.7	420	97.8	486	8	10	75	17.5	397	97.1
	528	4	5	15	3.8	503	98.1	548	6	12	50	11.3	484	97.5
2 (I**, E**)§	406	6	44	49	22.9	306	87.4	413	9	83	162	59.3	164	78.9
	404	13	24	37	15.1	335	92.1	445	25	129	2	51.9	192	66.1
3 (I**, E**)§	613	6	7	25	5.2	579	98.5	598	8	13	120	22.2	431	92.1
	552	8	8	17	4.5	527	98.6	544	7	15	49	11.8	475	96.3
4 (I**, E**)§	398	14	49	84	33.4	258	85.9	413	8	54	87	34.1	257	83.3
	353	11	23	53	21.5	270	91.5	373	19	100	79	48.0	194	73.2
5 (I**, E**)§	437	6	9	26	8.0	402	97.9	508	14	33	111	28.4	362	93.1
	451	2	2	6	1.8	437	98.2	374	10	18	43	16.3	312	94.9
Mean (I**, E**)¶	460	8	18	34	12.4	404	94.6	470	11	47	88	30.1	327	87.3
SD	81	4	17	23	10.5	111	4.9	79	6	43	37	17.5	107	11.2

†Dead and live eggs within clumps/total eggs × 100.
‡All live eggs including those live within clumps/total eggs × 100.
§I and E, respective percentage of infected eggs and eyed eggs; ** and [ns], high significance ($P < 0.01$) and no significance, respectively, between NaOCl and the control as determined by Student's *t*-test for differences between correlated proportions of each female.
¶I and E; **, high significance between NaOCl and the control ($P < 0.01$) as determined by Student's *t*-test for differences between correlated pair of means of all of the five females.

각 실험구들의 유의성을 평가하였으며, 균 감염된 알 및 발안된 알의 비율을 측정하였다.[11] 이 분석들은 통계프로그램(Microsoft Excel version 2002 for Windows)으로 분석하였다.

3. 결 과

3.1 감염된 알의 비율

균 감염된 알들은 모든 용기에서 관찰되었으나 용기 안에 많은 수의 알들이 존재하였다(Table 1). 감염된 알의 비율은 NaOCl처리한 실험구는 1.8~33.4%, NaOCl처리 하지 않은 대조구는 11.3~59.3%로 나타났다.

NaOCl 처리효능 및 친어암컷의 2가지 요인에 대해서는 유의적으로 높게 나타났으나 ($P<0.01$), 이 2개의 요인에 대한 상호적인 작용은 유의적인 차이가 없었다(Table 2).

친어 암컷의 요인에서, 유의적인 차이는 중복된 자료 사이에서 차이 즉, 각 암컷의 알에 대한 품질과 같은 개인적인 차이에 의해 나타난 것이

Table 2 Analysis of variance for the percentage of fungal infected eggs

SV	SS	DF	MS	*F*
NaOCl efficacy	1563.80	1	1563.80	39.26**
Parental female	2868.61	4	717.15	18.00**
Interaction	487.35	4	121.84	3.06[ns]
Error	398.35	10	39.84	
Total	5318.11	19		

**Highly significant ($P < 0.01$).
[ns]Not significant.
SV, source of variation; SS, sum of squares; DF, degrees of freedom; MS, mean squares; *F*, *F* ratio.

라고 판단된다. 감염된 알의 비율에서는 NaOCl처리한 실험구가 NaOCl처리를 하지 않은 대조구보다 유의적으로 낮게 나타났다($P<0.01$, Fig. 2).

5마리의 모든 암컷에 대한 감염된 알의 비율에서는 NaOCl처리한 실험구가 대조구보다 유의적

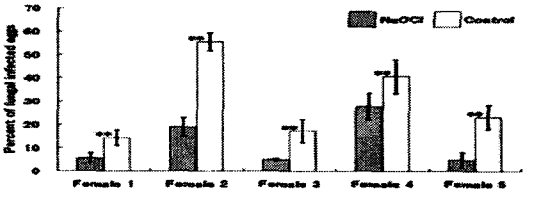

Fig. 2 Average percentage of fungal infected eggs from each parental female in NaOCl treatment and the control. Vertical bars indicate range of duplicated data for individual female. **, high significance next to each control as determined by Student's *t*-test for differences between correlated proportions ($P < 0.01$).

으로 낮게 나타났다(P<0.01, Table 1). 그러므로 알에 NaOCl처리함으로써 균 감염을 예방하고 이에 따른 성장에 효과적이라고 판단된다.

3.2 발안된 알의 비율

5마리 암컷의 발안된 알의 비율은 NaOCl처리한 실험구는 85.9~98.6%, 대조구는 66.1~97.5%의 범위로 나타났다(Table 1). 이 경우도 역시 NaOCl효능 및 친어암컷의 2가지 요인에 대해선 유의적으로 높게 나타났으나 (P<0.01), 이들 사이에 상호적인 관계는 보이지 않았다(Table 3).

발안된 알의 비율에서는 5마리 중 4마리에서 NaOCl처리한 실험구가 대조구보다 더 유의적으로 높게 나타났다(P<0.01, Fig. 3).

(Female 1)실험구는 NaOCl처리한 실험구가 대조구와 유의적인 차이가 없었지만 대조구보다 약간 높게 나타났으며, 모든 5마리 암컷에서 NaOCl처리한 실험구 및 대조구 사이에서 높은 유의적인 차이를 보였다(P<0.01, Table 1). 그러므로 NaOCl의 항균 활성은 알의 생존율을 향상시킨다고 사료된다.

Table 3 Analysis of variance for the percentage of eyed eggs

SV	SS	DF	MS	F
NaOCl efficacy	270.63	1	270.63	15.87**
Parental female	1009.23	4	252.31	14.78**
Interaction	172.60	4	43.15	2.53^{ns}
Error	170.49	10	17.05	
Total	1622.94	19		

**Highly significant (P < 0.01).
^{ns}Not significant.

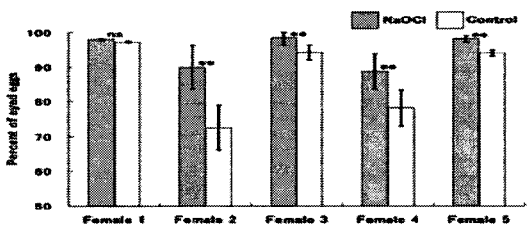

Fig. 3 Average percentage of eyed eggs from each parental female in NaOCl treatment and the control. Vertical bars indicate range of duplicated data of individual female. **, high significance next to each control as determined by Student's t-test for differences between correlated proportions (P < 0.01); ns, no significance against the control.

4. 결 론

균 감염으로부터 연어 알을 보호하기 위해 매 3일마다 60분간, 30 mg/L 염소농도의 NaOCl 및 30 mg/L 농도의 말라카이트그린을 비교한 결과 NaOCl가 말라카이트그린 대체 물질로 유용하다고 보고한 바 있다.[10] 연어 알을 대상으로 매일 15분간 10 mg/L염소농도의 NaOCl를 처리한 결과, NaOCl처리 하지 않은 대조구보다 균 감염으로부터 보호하는 효과가 뛰어나고 성장률 또한 향상시켰다. 또한 처리간격 및 처리기간은 다른 항균물질과 비슷한 경향을 보였다; 1667 mg/L 포르말린[12-15] 및 1000 mg/L 과산화수소[13-18]에서는 연어 알에서 균 감염에 효율적이라고 보고 된 바 있다.그러나 포르말린은 다른 생물의 건강 및 환경에 독성을 야기하며 과산화수소는 강한 부식성을 가지고 있어 이들에 대한 사용은 규제되고 있는 실정이다. 비록 NaOCl에서 발생하는 염소는 연어치어와 같은 수산 생물에 강한 독성을 야기하지만,[19] 이물질은 간단한 aeration, 자연적인 분해, 자외선조사에 의한 광화학적 분해, 중화제사용(예; 티오황산나트륨) 및 활성탄소와 같은 흡수를 통한 여과법[20] 과 같은 많은 염소제거방법으로 쉽게 분해 되어 진다. 더구나, NaOCl는 물공급시 공중위생물질로 사용되기 때문에 인간의 건강에 위험이 적은 영향으로 작용된다. 그러므로 NaOCl는 안전 및 허용능력에 대해 뛰어난 화학물질이라고 사료되며 본 연구에서는 NaOCl는 연어의 알에 대한 물곰팡이 감염에 대항한 유용한 항균 물질이라고 판단된다.

참 고 문 헌

1. Laird L, Needham T. Salmon and Trout Farming. Ellis Horwood, England. 1988.
2. Meyer FP, Jorgenson TA. Teratological and other effects of malachite green on development of rainbow trout and rabbits. Trans. Am. Fish. Soc. 1983; 112: 818-824.
3. Edgell P, Lawseth D, McLean WE, Britton EW. The use of salt solutions to control fungus (Saprolegnia) infestations on salmon eggs. Prog. Fish-Cult. 1993; 55: 48-52.
4. Meinertz JR, Stehly GR, Gingerich WH, Allen JL. Residues of [14C]-malachite green in eggs and fry of rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum), after treatment of eggs. J. Fish Dis. 1995; 18: 239-247.
5. Doerge DR, Churchwell MI, Gehring TA, Pu YM, Plakas SM. Analysis of malachite green and metabolite in fish using liquid chromatography atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. Chem. Res. Toxicol. 1998; 11:1098-1104.
6. Rahkonen R, Koski P, Shinn AP, Wootten R, Valtonen ET, Rahkonen M, Mannermaa-Keranen AL, Suomalainen LR, Rintamaki-kinnuen P, Lankinen Y, Rahkonen R, Jamsa K, Konnttinen E, Kannel R, Grant A, Marshall J, Hunter R, Pylkko P, Eskelinen P. Post malachite green: alternative strategies for fungal infection and white spot disease. Bull. Eur. Assoc. Fish. Pathol. 2002; 22: 152-157.
7. Kashiwagi M, Okumura S, Nakanishi S, Yoshioka M, Ueno R, Hoshiai G, Hatai K. Fungicidal effect of sodium hypochlorite solution on a fish-pathogen Oomycete, Saprolegnia parasitica. Suisanzoshoku 2002; 50: 385-386.
8. Khomvilai C, Karita S, Kashiwagi M, Yoshioka M. Fungicidal effects of sodium hypochlorite solution on Saprolegnia isolated from eggs of chum salmon Oncorhynchus keta. Fish. Sci. 2005; 71: 1188-1190.
9. Khomvilai C, Kashiwagi M, Yoshioka M. Fungicidal efficacy of sodium hypochlorite on a fish-pathogen Oomycetes, Saprolegnia diclina from Thailand. Bull. Fac. Bioresources Mie Univ. 2005; 32: 39-44.
10. Kashiwagi M, Khomvilai C, Okada A, Maekawa Y, Okumura S, Nakanishi S, Yoshioka M. Prevention effect of sodium hypochlorite solution on Saprolegniasis of salmon eggs. Proceedings of the JSPS-NRCT International Symposium. 15-16 December 2003. JSPS-NRCT, Rayong. 2003; 224-231.
11. Guilford JP. Fundamental Statistics in Psychology and Education, 4th edn. McGraw-Hill, New York. 1965.
12. Barnes ME, Sayler WA, Cordes RJ. Use of formalin treatments during incubation of eyed eggs of brown trout. North Am. J. Aquacult. 2001; 63: 333-337.
13. Schreier TM, Rach JJ, Howe GE. Efficacy of formalin, hydrogen peroxide, and sodium chloride on fungal-infected rainbow trout eggs. Aquaculture 1996; 140: 323-331.
14. Waterstrat PR, Marking LL. Clinical evaluation of formalin, hydrogen peroxide, and sodium

chloride for the treatment of Saprolegnia parasitica on fall chinook salmon eggs. Prog. Fish-Cult. 1995; 57: 287-291.

15. Marking LL, Rach JJ, Schreier TM. Evaluation of antifungal agents for fish culture. Prog. Fish-Cult. 1994; 56: 225-231.
16. Barnes ME, Ewing DE, Cordes RJ, Young GL. Observations on hydrogen peroxide control of Saprolegnia spp. during rainbow trout egg incubation. Prog. Fish-Cult. 1998; 60: 67-70.
17. Kitancharoen N, Yamamoto A, Hatai K. Fungicidal effect of hydrogen peroxide and malachite green on fungal infection of rainbow trout eggs. Mycoscience 1997; 38: 375-378.
18. Kitancharoen N, Yamamoto A, Hatai K. Effects of sodium chloride, hydrogen peroxide and malachite green on fungal infection in rainbow trout eggs. Biocont. Sci. 1998; 3: 113-115.
19. Alabaster JS, Lloyd R. Water Quality Criteria for Freshwater Fish. Butterworths, London. 1980.
20. Stickney RR. Encyclopedia of Aquaculture. John Wiley & Sons, New York. 2000.