

## 과산화수소의 이스라엘잉어 (*Cyprinus carpio*)에 대한 독성 및 세균과 기생충 제거 효과

김명석<sup>†</sup> · 조지영\* · 김대희\*\* · 전형주\*\* · 김응오\*\*\*

국립수산과학원 병리연구과, \*순천향대학교 해양생명공학과, \*\*국립수산과학원 중부내수면연구소,  
\*\*\*국립수산과학원 남해수산연구소

## Toxicity, antibacterial and parasiticidal effects of hydrogen peroxide for israel carp (*Cyprinus carpio*)

Myoung Sug Kim<sup>†</sup>, Ji Young Cho\*, Dae-Hee Kim\*\*, Hyoung Joo Jeon\*\* and Eung-Oh Kim\*\*\*

Pathology Team, National Fisheries Research and Development Institute, Busan 619-902, Korea

\*Department of Marine biotechnology, Soonchunhyang University, Asan 336-745, Korea

\*\*Central Regional Inland Fisheries Research Institute, NFRDI, Gapyeong-gun 477-810, Korea

\*\*\*South Sea Fisheries Research Institute, NFRDI, Yesou 556-823, Korea

To investigate the effect of hydrogen peroxide in israel carp, *Cyprinus carpio*, toxicity and microbial activities were determined. For hydrogen peroxide toxicity test, the median lethal concentration (LC<sub>50</sub>) to israel carps *Cyprinus carpio* (average weight 0.44 g) by acute toxicity was determined after 24 hour treatment. All israel carp were alive in 24 hours treatment at 80  $\mu\text{l/l}$  concentration and LC<sub>50</sub> value was 148.9  $\mu\text{l/l}$ . For biocidal activities of hydrogen peroxide, remove of parasite and growth inhibition of pathogenic bacteria were determined. The parasite *Trichodina* sp. infected on the skin and gills of israel carps (average weight 0.1 g) was completely eliminated at 40  $\mu\text{l/l}$  of hydrogen peroxide treatment for 24 hour. Most of the minimum inhibitory concentrations (MICs) against 30 fish pathogenic bacteria were less than 40  $\mu\text{l/l}$ .

**Key words:** *Cyprinus carpio*, Hydrogen peroxide, EC<sub>50</sub>, LC<sub>50</sub>, *Trichodina* sp., MIC

세계적으로 분포하고 있고 50여 국가에서 널리 양식되고 있는 잉어과 어류는 한국에서 담수 어 양식 생산량의 26,760톤 중 1,918톤으로 7.2%를 차지하고 있고 (2007 어업생산통계) 최근에는 수산 자원량을 늘리기 위해 강과 호소에 방류하는 품종 중의 하나이다.

이스라엘잉어 (*Cyprinus carpio*)와 같은 잉어과 어류는 양식기간 중에 섬모충, 편모충, 흡충과 같은 여러 종류의 기생충에 감염된다. 섬모충인 트리코디나 (*Trichodina* sp.)는 배쪽에서 보면 원형이고 옆에서 보면 반구형으로 중앙부가

약간 볼록한 모양을 하고 있으며 담수와 해수에 널리 분포하고 있고 어류의 체표와 아가미에 쉽게 감염된다. 트리코디나충은 만성적인 발병 또는 폐사를 일으키며 (Hoffmann, 1978) 심한 감염의 경우에 식욕부진이 생기고 자치어에서 높은 폐사가 생기며 어병 세균의 2차 감염에 의해 폐사를 일으키기도 하고 (Edward, 2000) 대구에 기생하여 폐사를 일으키기도 하여 (Khan, 2004) 적절한 치료법이 필요하다.

잉어과 어류를 양식하는 양식장은 강과 호소로 연결되어 있어 어류를 양식하는 기간 중에

<sup>†</sup>Corresponding Author : Myoung Sug Kim, Tel : 051-720-2476  
Fax : 051-720-2498, E-mail : mskim@nfrdi.go.kr

발생하는 질병의 치료를 위해 사용되는 약품들은 양식장의 배출수와 함께 자연수계로 유입되어 비의도적으로 자연 생태계에 영향을 미치게 되기 때문에 친환경적인 약품의 사용이 필요하다. 특히 강과 호소는 식수원으로 사용되기도 하기 때문에 사용 약품의 선정에 보다 엄격한 기준이 필요하다.

담수어류의 외부 기생충을 구제하기 위해 관습적으로 사용되어온 공업용 포르말린, 메틸렌블루, 과망간산칼륨, 공업용 과산화수소 등의 화학물질은 국내에서 승인 받지 않은 약품이며 이들 약품의 사용은 환경오염, 인체유해성의 문제를 발생시킬 수 있다. 삼투압의 차이를 이용한 염분욕은 담수 기생충을 구제할 수 있는 효과적인 방법으로 사용되기도 하지만 (Edward, 2000) 외부 기생충을 구제할 수 있는 효과적인 약품은 현재까지 없는 실정으로 환경친화적인 약품의 개발이 필요하다.

과산화수소 ( $H_2O_2$ )는 물 ( $H_2O$ )과 산소 ( $O_2$ )로 분해되어 환경친화적인 물질로 알려져 있으며, 수질정화, 곰팡이 방지, 살충제로 사용되고 있고 희석된 과산화수소는 의료용으로도 사용되고 있다. 과산화수소는 대서양연어의 세균성 질병 (Rach *et al.*, 2000), 기생충성 질병의 치료 (Treasurer and Grant, 1997)를 위해 사용되고 있으며 2007년에 미국 FDA (Food and Drug Administration)로부터 수산용 약품으로 승인받아 사용되고 있고 일본에서 농어목 및 복어목 어류의 외부기생충을 구제하기 위해 과산화수소가 정식으로 허가를 받아 구충제로 사용되고 있어 국내에서도 사용대상 어종에 대한 효능과 안전성이 확인되면 수산용 약품으로 승인 받아 사용될 수 있을 것이라 생각된다.

이스라엘잉어에 대한 과산화수소의 안전성과 효능에 대해서 알려져 있지 않으므로 이번 연구에서는 과산화수소의 이스라엘잉어에 대한 급성독성을 조사하여 안전한 사용농도를 설정하고 치어기에 대량 기생하여 피해를 일으키는 트리

코디나의 살충효과와 2차 감염을 일으킬 수 있는 수중 세균의 살균효과에 대하여 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 실험어

어류에 대한 과산화수소의 독성시험에 국립수산과학원 중부내수면연구소에서 생산한 평균체중 0.44 g의 이스라엘잉어 치어를 사용하였고 살충력 조사를 위한 *in vivo* 시험에 사용한 시험어는 트리코디나에 자연적으로 감염된 평균체중 0.1 g의 이스라엘잉어를 사용하였다.

### 과산화수소의 반수치사농도

시약용 과산화수소 (Junsei, 35%)를 원액으로 하여 이스라엘잉어에 대한 반수치사농도 (median lethal concentration,  $LC_{50}$ )를 구하였다. 이스라엘잉어를 수량 20 L, 수온  $22.5 \pm 1^\circ C$ , pH 6.5, DO 6 mg/L 이상의 조건에 10마리씩 수용하고 과산화수소 농도를 0~400  $\mu l/l$  로 조절하여 시간별 사망률을 확인하였다. 반수치사농도는 Finney (1971)의 probit 분석법에 의해 구하였다.

### 과산화수소의 살균효과

과산화수소의 살균효과를 조사하기 위하여 에로모나스속 세균을 포함한 30 균주에 대하여 broth dilution 법 (Amsterdam, 1996)에 의하여 MIC (minimal inhibitory concentration) 값을 측정하였다. 또한 과산화수소 존재하의 세균수 변화를 측정하기 위하여 과산화수소를 멸균 증류수 또는 TSB (tryptic soy broth)로 0~40  $\mu l/l$  의 농도가 되도록 희석한 후 *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966을 접종하고 세균 수 변화를 조사하였다.

### 과산화수소의 기생충 구제효능

트리코디나에 자연적으로 감염된 이스라엘잉어를 수온  $24 \pm 1^\circ C$ 에서 과산화수소 0~40  $\mu l/l$  의 농도로 24시간 동안 1회 약욕 후 트리코디나

수의 변화를 조사하였다. 실험어에 감염되어 있는 트리코디나 수를 확인하기 위해 과산화수소로 약육하기 전에 트리코디나에 감염된 이스라엘잉어를 무작위로 10마리 선정하고 각각을 1 ml의 70 % 에탄올이 담긴 tube에 넣고 1분간 vortex 하여 체표와 아가미에 있는 기생충을 떨어뜨렸다. 탈락된 기생충이 포함된 에탄올은 바닥이 평평한 24 well plate에 옮기고 도립현미경으로 검경하여 기생충 수를 측정하였다. 각각의 실험구는 100 L 수량의 수조에 50마리씩 수용하고 과산화수소로 약육하였으며 약육 후에 실험어를 무작위로 10마리씩 선정하여 동일한 방법으로 외부 기생충 수를 측정하였다. EC<sub>50</sub> (Median effective concentration)은 기생충의 50%가 탈락하는 농도를 Probit 법으로 계산하여 구하였다.

통계 분석

결과의 통계적 처리는 SigmaPlot을 이용하여 student's t-test로 실시하였으며, P<0.05 일 때 유의한 차이가 있는 것으로 간주하였다.

결 과

과산화수소의 급성독성과 반수치사농도

과산화수소의 농도별 시험구에 침지된 이스라엘잉어는 300 µl/l 이상의 농도에서 1시간 이후부터 폐사가 발생하였고 400 µl/l 에서 3시간

경과 후 100% 폐사하였고 300 µl/l 에서 6시간, 200 µl/l 에서 12시간 안에 100% 폐사하였다. 24시간 경과 후 160 µl/l 에서는 60%가 폐사하였고 120 µl/l 에서는 10%가 폐사하였으나 80 µl/l 에서는 24시간 안에 폐사가 일어나지 않았다 (Fig. 1). Probit 법에 의해 계산된 과산화수소의 이스라엘잉어에 대한 24시간 LC<sub>50</sub>은 148.9 µl/l 이었다.

어병세균에 대한 살균력

과산화수소에 대한 어병 세균의 최소억제농도는 14 균주는 20 µl/l, 7 균주는 10 µl/l, 6 균주는 5 ml/l, 2 균주는 2.5 µl/l, 1 균주는 40 µl/l 으로 총 30 균주 중 29 균주의 최소억제농도가 20

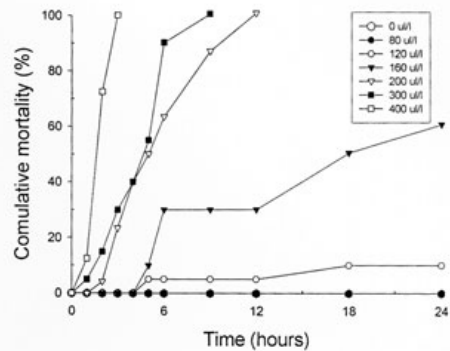


Fig. 1. The cumulative mortality of israel carp, *Cyprinus carpio*, fingerlings exposed to various concentrations of hydrogen peroxide for 24 hours

Table 1. Distribution of MICs of hydrogen peroxide against fish pathogenic bacteria

Con.(ml/l)	Strains	<i>Aeromonas</i>		Others	sub-total
		<i>sobria</i>	<i>hydrophila</i>		
2.5		2	0	0	2
5		4	1	1*	6
10		6	1	0	7
20		9	2	3**	14
40		0	1	0	1
sub-Total		21	5	4	30

\* : *Aeromonas* sp.

\*\* : *Pseudomonas* sp., *Edwardsiella tarda* and *Vibrio* sp.

$\mu\text{l/l}$  이하였다 (Table 1).  $1 \times 10^6$  cfu/ml의 *A. hydrophila* ATCC 7966을 접종한 과산화수소가 없는 멸균 증류수에서 6시간 후 세균수는  $3 \times 10^5$  cfu/ml이 분리되었으나  $20 \mu\text{l/l}$  이상의 과산화수소가 첨가된 멸균 증류수에서 1시간 후 완전 사멸하였고  $10 \mu\text{l/l}$  에서는 3시간 후 살아있는 *A. hydrophila*가 검출되지 않았다 (Fig. 2).  $1 \times 10^6$  cfu/ml의 *A. hydrophila* ATCC 7966를 접종한 TSB와 과산화수소를 첨가한 TSB에서 6시간 후의 세균 수는 과산화수소가 첨가되지 않은 TSB에서  $4.4 \times 10^{10}$  cfu/ml로 세균수가 증가하였으나  $10 \mu\text{l/l}$  의 과산화수소가 첨가된 TSB에서는  $6.2 \times 10^5$  cfu/ml,  $20 \mu\text{l/l}$  에서  $1.1 \times 10^5$  cfu/ml,  $40 \mu\text{l/l}$  에서  $5.1 \times 10^3$  cfu/ml로 균수가 감소하였다 (Fig. 3).

#### 과산화수소에 의한 기생충 탈락율

과산화수소로 약육하기 전의 이스라엘잉어는 평균 491마리 (표준편차 105)의 트리코디나에 감염되어 있었으며 (n=10) 24시간 후 과산화수소로 약육을 하지 않은 대조구에서 (n=10) 평균 506마리 (표준편차 193)가 관찰되어 유의적인 차이가 없었다 ( $P>0.05$ ).  $1.25 \mu\text{l/l}$  의 과산화수소를 약육한 실험구의 기생충 수는 409.2 ( $\pm 134.4$ )마리로 대조구와 유의적인 차이가 없었으나 ( $P>0.05$ )  $2.5 \mu\text{l/l}$  이상의 과산화수소를 처리한 실험구들은 대조구와 유의적인 차이가 있었

으며 ( $P<0.05$ )  $5 \mu\text{l/l}$  이상의 과산화수소를 처리한 실험구에서 50% 이상의 트리코디나가 탈락하였다. 약육 후 트리코디나 수는  $2.5 \mu\text{l/l}$  처리구에서 316 ( $\pm 112.2$ )마리,  $5 \mu\text{l/l}$  처리구에서 197 ( $\pm 93.9$ )마리,  $10 \mu\text{l/l}$  처리구에서 13 ( $\pm 9.5$ )마리,  $20 \mu\text{l/l}$  처리구에서 1.7 ( $\pm 1.6$ )마리가 관찰되었고  $40 \mu\text{l/l}$  처리구에서 한 마리도 관찰되지 않았다 (Fig. 4). 약육 후 이스라엘 잉어 치어에 감염된 트리코디나의 24시간  $\text{EC}_{50}$  은  $3.2 \mu\text{l/l}$  이었다.

## 고 찰

과산화수소는 어병 미생물의 제거에 사용되어 왔는데 채널메기 알에 기생하는 수생균을 과산화수소로 처리하여 부화율을 높일 수 있었다고 하며 (Rach *et al.*, 2003) 세균성 아가미병에 의한 양식어류의 폐사를 치료할 수 있었다고 보고되었다 (Rach, 2000). 과산화수소는 살충제로 사용되기도 하지만 기생충 종류에 따라 효능의 차이가 있다고 보고되어 있다. 과산화수소는 무지개송어 (*Oncorhynchus mykiss*)와 잉어 (*Cyprinus carpio*)의 *Ichthyophthirius multifiliis*에 의한 ichthyophthiriasis 치료에 효과적이지 않다고 하였으나 (Lahnsteiner, 2007) 과산화수소는 대서양 연어에 기생한 물이의 제거에 효과적이었다고 하였다 (Treasurer and Grant, 1997). 이번 연구에서

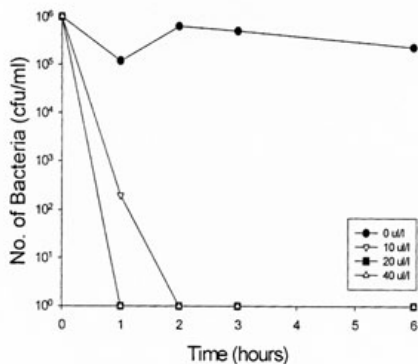


Fig. 2. The cell number of *Aeromonas hydrophila* during hydrogen peroxide treatment at various concentrations.

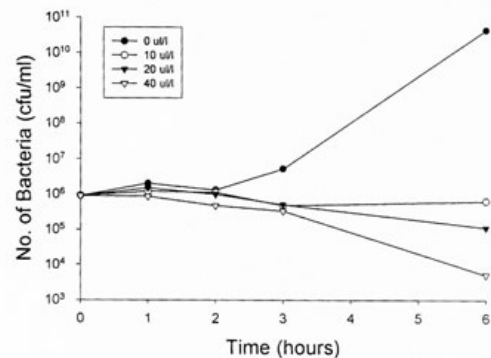


Fig. 3. Growth of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 in fresh medium after hydrogen peroxide treatment.

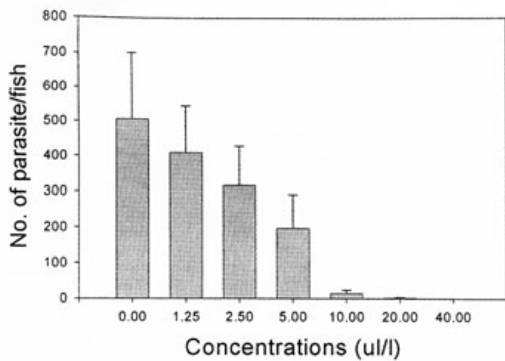


Fig. 4. Number of *Trichodina* sp. in infected israel carps after 24h of hydrogen peroxide treatment at various concentrations (n=10). Statistical comparisons were carried out using SigmaPlot computer software ( $P < 0.05$ ) and presented as mean. Error bar stands for mean  $\pm$  standard error.

이스라엘잉어에 기생된 트리코디나는  $10 \mu\text{l/l}$  과산화수소로 1회 약욕하는 것으로 97% 이상 제거되었는데 이것은 트리코디나가 아가미와 체표에 기생하여 과산화수소에 쉽게 노출되기 때문이라고 생각이 된다.

과산화수소는 생체 내에서도 자연적으로 생기는 물질이지만 고농도의 과산화수소는 독성과 강한 자극성이 있으므로 매우 조심스럽게 다루어야 한다. 그러나 피부 조직 내 생체축매에 의해 분해되어 생성된 산소가 피부 소독 작용을 하기 때문에 저농도의 2.5 ~ 3% 과산화수소는 피부 상처를 소독하는 의약품으로 사용되고 있다. 어류에 있어서  $200 \mu\text{l/l}$  의 과산화수소를 60분간 약욕하여 무지개송어의 외부 columnaris 치료에 효과가 있다고 (Speare and Arsenault, 1997) 보고된바 있는데, 이번 연구에서 대부분의 세균들은  $10 \mu\text{l/l}$  이하의 과산화수소에 사멸이 되었고 Fig. 3과 같이 영양성분이 많은 배지에서도  $20 \mu\text{l/l}$  이상에서 세균수가 감소하여 기생충 구제를 위한 과산화수소 사용하였을 때 부수적으로는 수중의 세균수를 감소시켜 2차 감염 기회를 줄일 수 있을 것이라 생각된다. 그러나 과산화수소에 대한 *Staphylococcus aureus*의 최소발육억제농도는  $50 \mu\text{l/l}$  이었고 *Bacillus*

*cerueus*의 최소발육억제농도는  $75 \mu\text{l/l}$  이어서 (장 등, 2005) 세균에 따라 최소억제농도가 차이가 있을 수 있다.

과산화수소가 어류에 미치는 영향에 관해 보고되고 있는데 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)는 과산화수소 처리농도에 따라 혈액의 헤마토크리트, 헤모글로빈 및 적혈구수의 감소가 나타나지만 5시간 후에는 회복된다고 하였고 (최와 여, 2007). 터봇 (*Scophthalmus maximus*)에서 궤양증을 일으키는 점액에 존재하는 *Tenacibaculum maritimum*를  $240 \mu\text{l/l}$  의 과산화수소에서 제거할 수 있지만 스트레스를 증가시키기 때문에 어류를 넣기 전 수조에만 처리해야 한다고 하였다 (Ruben et al., 2006). 무지개송어는  $100 \mu\text{l/l}$  과산화수소에서 병리학적 영향이 거의 없었으나  $500 \mu\text{l/l}$  에서 이차 새변의 swelling, intercellular edema 등의 병리적 변화가 관찰되었고 (Powell and Perry, 1997) 민어과 어류인 kingfish는 과산화수소로 약욕한 경우에 혈청 젖산, 삼투질 농도, pH의 증가와 같은 급성적 영향이 생기지만 단생흡충의 만성적 감염에 의한 것보다 혈청 젖산 및 삼투질 농도의 최고값이 낮아 과산화수소 약욕에 의한 영향이 적다고 하였다 (Mansell et al., 2005). 따라서 이스라엘잉어에 과산화수소를 가능한 낮은 농도로 사용한다면 부작용을 최소화하면서도 치료효과를 거둘 수 있다고 판단된다.

과산화수소의 영향은 수온과 관련이 있어 warm water 어종, cool water 어종, cold water 어종의 순서로 과산화수소에 대해 민감하다고 하였는데 (Mark et al., 1998) 이번 실험에서 이스라엘잉어가 온대성 어종이고 실험 수온이 높았기 때문에 저수온기 또는 이스라엘잉어와 비교하여 저수온에 사는 어종에는 이스라엘잉어에 사용한 것보다 높은 농도를 사용할 수 있을 것으로 생각되며 이와 반대로 고수온에 사는 어종 또는 고수온기에는 낮은 농도를 사용하여야 할 것이라 생각된다.

## 요 약

과산화수소의 이스라엘잉어에 대한 급성독성 시험을 실시하여 반수치사농도 (LC<sub>50</sub>)를 구하고 기생충 제거 효과와 살균력을 조사하였다. 이스라엘잉어 (평균체중 0.44 g)는 80  $\mu\text{l/l}$ 에서 24 시간 동안 폐사가 발생하지 않았으며 24시간 LC<sub>50</sub>은 148.9  $\mu\text{l/l}$  이었다. 이스라엘잉어 (평균 체중 0.1 g)에 기생된 트리코디나는 40  $\mu\text{l/l}$ 의 과산화수소로 1회 약욕 하였을 때 모두 제거되었다. 30종의 어병 임상균주를 사용하여 시험한 결과, 과산화수소에 대한 어병 세균의 최소억제 농도는 거의 40  $\mu\text{l/l}$  보다 낮았으며 과산화수소에 의한 세균 증식 억제 효과를 확인 할 수 있었다.

## 감사의 글

이 연구는 국립수산물학원 (중부지역 내수면 양식기술 개발, RP-2008-AQ-134)의 지원에 의해 운영되었습니다.

## 참 고 문 헌

- Amsterdam, D.: Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media, In Loman, V., ed. Antibiotics in laboratory medicine, 4th ed. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.: 52-111, 1996.
- Edward J.N.: Fish disease. Iowa State University Press. p.367, 2000.
- Finney, D.J.: Probit analysis, 3rd ed., Cambridge Univ. Press, Cambridge, p.333, 1971.
- Hoffman G.L.: Ciliates of freshwater fishes. In Kreier JP, Parasitic protozoa, vol 2, Academic Press, New York, 583-632, 1978.
- Khan, R.A.: Disease outbreaks and mass mortality in cultured Atlantic cod, *Gadus morhua* L., associated with *Trichodina murmanica* (Ciliophora) J. Fish Diseases, 27: 181-184, 2004.
- Lahnsteiner F. and Weismann T.: Treatment of ichthyophthiriasis in rainbow trout and common carp with common and alternative therapeutics. J. Aquatic Anim. Health, 19: 186-194, 2007.
- Mansell B., Powell M.D., Ernst I. and Nowak B.F.: Effects of the gill monogenean *Zeuxapta seriola* (Meserve 1938) and treatment with hydrogen peroxide on pathophysiology of kingfish, *Seriola lalandi* Valenciennes 1833. J. Fish Dis., 28: 253-262, 2005.
- Mark P.G., Jeffery J.R. and Robert Ramsay T.: Acute toxicity of hydrogen peroxide treatments to selected life stages of cold-, cool-, and warm water fish. Aquaculture, 178: 191-207, 1999.
- Powell, M.D. and Perry, S.F.: Respiratory and acid base pathophysiology of hydrogen peroxide in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum. Aquatic Toxicology, 37: 99-112, 1997.
- Rach, J.J., Gaikowski M. P., and Ramsay R.T.: Pivotal dose titration studies to evaluate the efficacy of hydrogen peroxide to control mortalities associated with external *Flavobacter* infections on cultured fish and selected fish hatcheries. Report to the U.S. food and drug administration center for veterinary medicine. February 4, pp. 339, 2000.
- Rach, J.J., Gaikowski, M.P. and Ramsay, T.: Efficacy of hydrogen peroxide to control mortalities associated with bacterial gill disease infections on hatchery-reared salmonids. J. Aquatic Animal Health, 12: 119-127, 2000.
- Rach, J.J., Schreier T.M., Schleis S.M. and Gaikowski M.P.: Efficacy of hydrogen peroxide to control fungus (saprolegniasis) on

- channel catfish eggs (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*, 238: 135-142, 2003.
- Speare D.J., Carvajal V. and Horney B.S.: Growth suppression and branchitis in trout exposed to hydrogen peroxide. *J. Comp. Pathol.*, 120: 391-402, 1999.
- Treasurer, J.W. and Grant, A.: The efficacy of hydrogen peroxide for the treatment of farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L. infested with sea lice (Copepoda: Caligidae). *Aquaculture*, 148: 265-275, 1997.
- 장재선, 고종명, 김용희: *Staphylococcus aureus* 와 *Bacillus cereus*에 대한 유산과 과산화수소의 증식억제 효과. *한국환경보건학회지*, 31: 115-119, 2005.
- 최미경, 여인규: 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)에 서의 과산화수소 ( $H_2O_2$ ) 처리 농도가 생리, 생화학적 반응에 미치는 영향. *한국어병학회지*, 20: 269-279, 2007.
- 어업생산통계, <http://fs.fips.go.kr/> 2007.

---

Manuscript Received : July 30, 2008

Revision Accepted : February 17, 2009

Responsible Editorial Member : Jung, Sung-Ju  
(Chonnam National University)