

3종의 식물 추출물에 의한 백점충의 *in vitro* 구제효과

김진도 · 김이청[†] · 정승희 · 서정수 · 박성우^{**}

국립수산과학원 병리연구과, * 국립수산과학원 전략연구단, **군산대학교 수산생명의학과

In vitro eliminative effects three sorts of herbal extracts of against *Ichthyophthirius multifiliis*

Jin Do Kim, Yi Cheong Kim^{*†}, Sung Hee Jung, Jung Soo Seo and Sung Woo Park^{**}

Pathology division, Aquaculture Research Institute, NFRDI, Busan 619-705, Korea

*New Strategy Research Center, NFRDI, Busan 619-705, Korea

**Department of Aquatic Life Medicine, Kunsan National University, Kunsan 573-702, Korea

The *in-vitro* eliminative effects of against three types of herbal extract and formalin *Ichthyophthirius multifiliis* were examined. All parasites were killed within one hour after exposure to the 500 fold dilution of the complex herb extract whereas the 10 fold dilution of the fertilized solution of *Salvia plebeia* R. Br. killed all parasites within one hour after exposure. The 5,000 fold dilution of the extracts of *Ginkgo biloba* leaves killed all parasites within one hour after exposure. As a comparative agent, formalin killed all parasites within one hour at 100 ppm. As the results, the extracts of *Ginkgo biloba* leaves extracts have the most eliminative ability against the parasite. No differences were found among different parasite density in eliminative effects of the three types of herbal extracts and formalin. Also there were no changes in the fish gill tissues after exposure for two hours to the 5,000 fold dilution of the extract of *Ginkgo biloba* leaves.

Key words : Eliminative effect, *Ichthyophthirius multifiliis*, Herbal extracts

담수어의 백점충 (*Ichthyophthirius multifiliis*) 은 전 세계적으로 온대 및 열대어류에 있어서 오래전부터 알려진 주요 병원성 기생충이다. 특히 양식어류에 감염되었을 시에는 짧은 시간 내에 대량폐사를 일으켜 큰 피해를 입히는 것으로 알려져 있다 (Matthews, 1994). 국내의 담수어류양식에서는 백점병에 의한 피해의 비중은 높지 않으나, 연중으로 빈발하여 고질적인 질병으로 알려져 있다 (지 등, 1996). 특히 무지

개송어 (*Oncorhynchus mykiss*) 양식에 있어서 백점충에 의한 피해가 심하지만, 적절한 치료약품의 선택이 어려울 뿐 아니라, 치료약품에 의해 구제되었다 하더라도 일정한 시기가 되면 또다시 만연하여 피해를 일으킨다. 양식 어류에 있어서 백점충에 관한 면역학적 연구, 화학요법에 의한 치료에 관한 연구는 계속해서 보고되고 있다 (Buchmann *et al.*, 2001; Luzardo-A'lvarez *et al.*, 2003; Alberto, 2003; Paivi *et al.*, 2005). 그러나 현재 국내에서는 백점병의 예방 및 치료에 관한 뚜렷한 대책은 아직까지 확립되지 않았으며, 수산용 포르말린이 대량폐사를 방지하기 위한 유일

[†]Corresponding author : Yi Cheong Kim

Tel : +82-51-720-2170 Fax : +82-51-720-2456

E-mail : yckim@nfrdi.go.kr

한 약제이다.

최근 수산 양식업계에 있어서도 친환경적인 양식 기술개발, 양식 어류의 식품으로서의 안전성 등이 요구됨에 따라 질병의 치료를 위해 사용되는 약품의 원료에 있어서도 친환경적 천연제재의 개발이 필요하게 되었다. 따라서 이러한 천연의 생약제제를 어류 질병의 치료에 이용하기위한 연구가 국내 및 국외에서 많은 보고가 되고 있다 (조 등, 2002; 최, 2004; Rajendiran *et al.*, 2008, Ming *et al.*, 2009). 또한 백점병의 치료에 관한 연구로서는 물리적인 여과에 의한 충체의 제거 또는 환경조절에 의한 백점병의 구제에 관한 연구 (Rasmus and Kurt, 2009), 열대 식물인 papaya 및 velvet bean 추출물에 의한 치료 연구 (Ekanem *et al.*, 2004) 등이 있다.

본 연구에서는 국내에서 쉽게 얻어질 수 있는 천연 식물의 추출물을 이용한 무지개 송어의 백점충 구제 효과를 밝히고자 황금, 고삼, 금은화, 자소엽, 동과자 및 굴피의 6종류 생약제를 사용한 복합생약제, 여지초 및 은행잎 추출액의 백점충에 대한 시험관 내에서의 살충효과를 조사하였다.

재료 및 방법

백점충의 확보

시험에 사용된 백점충은 무지개송어로부터 검출된 충체를 사용하였다. 충의 보존은 심하게 감염된 시험어 (평균 체장 7.8cm, 평균체중 5.9g) 3마리를 건강한 시험어 (평균 체장 8.3cm, 체중 6.2g) 10마리를 사각 아크릴 수조 (유효수량 28 L) 를 동거시켜 자연 재감염되게 하였다. 감염용 수조에는 FISH COOLER (대일냉각, 한국) 를 설치하여 무지개송어 양식장에서 백점병이 잘 발생하는 수온인 17°C를 유지하도록 조절하였다. 수조 내에서의 다른 기생충 및 세균의

감염을 방지하기 위하여 먹이는 공급하지 않았다.

약제의 종류 및 농도

약제의 종류는 복합생약제, 여지초, 은행잎, 포르말린의 4가지의 종류를 시험에 사용하였다. 복합생약제는 이 등 (2010) 의 방법에 따라 제조된 추출물의 원액을 국립수산과학원 병리연구과로부터 분양받아 이를 희석하여 사용하였다.

여지초의 발효액은 시중에서 판매되는 원재료와 설탕을 1:1.2의 비율로 조제하여 2년간 발효시킨 원액을 구입하여 사용하였다. 은행잎 추출물은 이 등 (2005) 의 방법에 따라 제조한 것을 원분말로 하여 희석해서 사용하였으며 대조약품으로서 포르말린은 실험용 특급시약을 원액으로 하여 사용하였다.

약제의 농도별 살충효과

시험 약제는 멸균지하수를 사용하여 복합생약제는 100배, 200배, 500배, 1,000배의 희석액, 여지초 추출액은 10배, 50배, 100배, 200배 및 500배의 희석액, 은행잎 추출액은 100배, 1,000배, 5,000배 및 10,000배의 희석액을 제조하였으며, 포르말린은 50ppm, 100ppm, 150ppm 및 200ppm의 시험액을 제조하였다.

충체의 확보는 육안적으로 체표에 백색 반점이 확인되는 심하게 감염된 무지개송어의 치어 5마리를 2 L의 비커에 수용하여 에어브로와로 폭기시킨 다음, 어체로부터 떨어져나와 바닥에 가라앉은 시스트를 형성한 tomont를 스포이드로 조심스럽게 전량을 수거하였다. 수거된 tomonts는 지하수를 담은 페트리 디쉬에 수용하여 17°C의 인큐베이터에서 일정시간 동안 배양하면서 세포분열이 되어 theront가 수중에 방출되기를 기다렸다가 방출되어 활력이 왕성한 theront의 수를 혈구계산판으로 계수하여 지하수로 600ind./ml의 밀도가 되도록 조정하였다.

24well plate의 각 well에 충이 60마리 포함된 배양액 100 μ 를 먼저 넣은 다음, 다시 약물희석액 100 μ 을 채워 농도를 맞추었다. 살충효과의 판정은 각 약제의 농도별로 시간의 경과에 따라 충의 사멸 여부를 관찰하였다. 충의 사멸여부의 판단은 100배 배육의 현미경하에서 충체가 섬모가 움직임이 없이 힘없이 떠나는 단계를 사멸한 것으로 판단하였다.

은행잎추출물에 대한 충체의 밀도별 살충효과 충체의 각각 다른 밀도에 따른 살충효과를 알아보기 위하여 은행잎 추출물의 희석농도를 5,000배로 고정하여 충체의 밀도를 ml당 100, 200, 400마리가 되게 조절하여 밀도별 살충효과를 관찰하였다. 충체의 사멸여부는 약제의 농도별 시험에서와 같은 방법으로 판단하였다.

은행잎추출물 약육처리후의 아가미 조직변화

은행잎 추출물에 대한 어류의 아가미 조직의 변화를 관찰하고자 무지개송어 치어 (평균 체장 8.1cm, 평균체중 5.8g) 각각 3마리씩을 2개의 5L 원형플라스틱수조에 수용하여 한 수조에는 은행잎 추출물 5,000배 희석액을 2시간 동안 약육처리하였으며, 한 수조에는 약육 처리를 하지 않았다. 은행잎 추출물로 2시간 처리한 후, 처리구와 비처리구 시험어의 아가미 조직 변화를 관찰하였다. 조직 표본의 제작은 상법에 따라 실시하였으며, 염색은 H-E 염색을 실시하였다.

결과 및 고찰

시험관 내에서의 각 약제의 농도별 백점충에 대한 살충효과에 대한 결과는 Fig. 1~4와 같다. 복합생약제의 경우, 제조된 원액의 100, 200, 500배까지 희석하여 시험을 실시하였다. 그 결과 100배의 희석액에

서는 10분 이내에, 500배의 희석액에서도 1시간 이내에 충이 전부 사멸되었다 (Fig. 1). 그러므로 500배의 희석액으로 어류를 직접 약육시킨다면 구제효과를 볼 수 있을 것으로 예상되었다. 또한 이 약제는 이미 일부 어류 병원체에 대한 사멸효과가 입증된 것으로서 (이 등, 2010) 약제 내의 어떤 성분이 주로 충의 사멸에 관여하는지는 앞으로 구명되어야 할 것으로 생각된다.

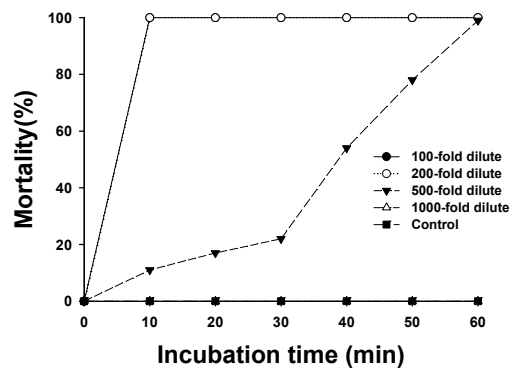


Fig. 1. The eliminative effect on *Ichthyophthirius multifiliis* in different concentrations of complex herbs extracts.

여지초 (*Salvia plebeia* R. Br.) 는 정혈, 이노, 해독, 소염, 소종, 항균작용의 효능을 가지고 있는 식물로 알려져 있다 (배 등, 2007). 그러나 Fig. 2에서 나타난 바와 같이 어류의 백점충에 대한 살충효과는 미미하였다. 10배의 희석액에서만 10분 이내에 충을 사멸시켰으며, 200배의 희석액에서는 1시간이 경과하여도 충의 50% 이상이 생존하였다. 배 등 (2007) 은 여지초의 추출물이 암세포의 증식억제 및 면역세포의 활성화를 유도한다고 보고하였지만, 본 시험에 있어서는 백점충에 대한 살충효과를 확인할 수 없었다. 따라서 여지초 원액을 경구적으로 투여하거나 또는 그 제조 과정에 관한 재검토가 필요하다고 생각되었다.

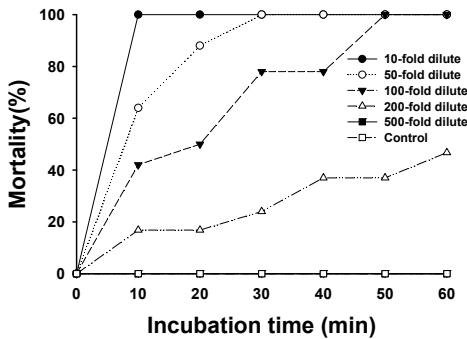


Fig. 2. The eliminative effects on *Ichthyophthirius multifiliis* in different concentrations of *Plebeiae Herba* (*Salvia plebeia* R. Br) extracts.

은행잎 추출물의 백점충에 대한 살충효과에 대한 결과는 이번 연구에서 시험된 3가지 약제 중 가장 우수하게 나타났다 (Fig. 3). 은행잎 추출물은 5,000배의 희석액에서도 1시간 이내에 100%의 살충효과를 나타내었다. 따라서 백점충에 감염된 어류에 이로서 약욕을 실시한다면 짧은 시간 내에 충이 구제될 수 있을 것이라고 생각된다.

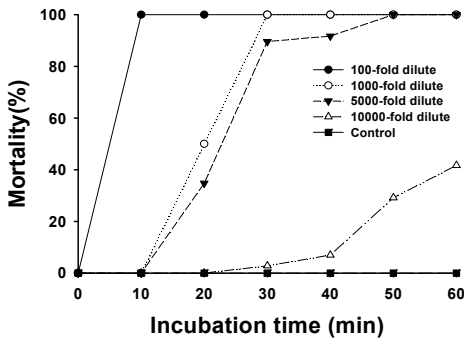


Fig. 3. The eliminative effects on *Ichthyophthirius multifiliis* in different concentrations of *Ginkgo biloba* leaves extracts.

은행잎 추출물은 점박이 응애, 진딧물 등의 충에 살충효과가 있는 것으로 알려져 있다 (이 등 2005). 또한 추출된 약제 성분이 안정된 상태로서 물에 잘

녹아 충의 사멸에 쉽게 효과를 나타내었던 것으로 추정된다. 이 등 (2005) 은 은행잎의 살충성분을 HPLC를 이용하여 분석한 결과, Terpene계 화합물인 bilobalide와 ginkgolide A, B임을 입증하였다. 그러나 이를 실용화하기 위해서는 정제과정중의 어체에 독성을 나타낼 수 있는 성분의 제거 방법, 이러한 정제법의 난이성의 해결, 약제로서의 생산시 경제성 등을 충분히 고려하여야 할 것으로 생각된다.

대조약품으로서 포르말린의 시험관 내의 백점충에 대한 결과는 Fig. 4와 같다. 포르말린은 어류의 양식장에서 일반적으로 사용되고 있는 농도에서 1시간 이내에 충이 모두 사멸하였다. 이는 이미 포르말린은 어류의 기생충의 구제에 충분한 효과를 나타낸다는 사실을 입증한다. 그러나 이 약제는 미약한 독성 때문에 심하게 감염되어 저항력이 떨어진 어류들에 있어서는 폐사의 우려가 있어 양식 어업인들은 약해가 거의 없는 제제를 요구하고 있다. 이러한 점을 해결하기 위해서는 앞으로 백점충의 감염의 정도를 누구나 쉽고 빠르게 판단할 수 있는 방법의 개발과 살충의 효과를 확실하게 낼 수 있는 포르말린의 농도 등이 구명되어야 할 것으로 생각된다.

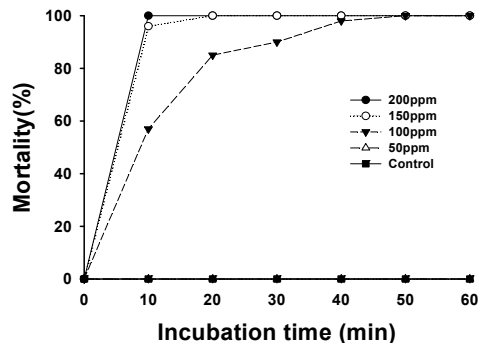


Fig. 4. The eliminative effects on *Ichthyophthirius multifiliis* in different concentrations of formalin.

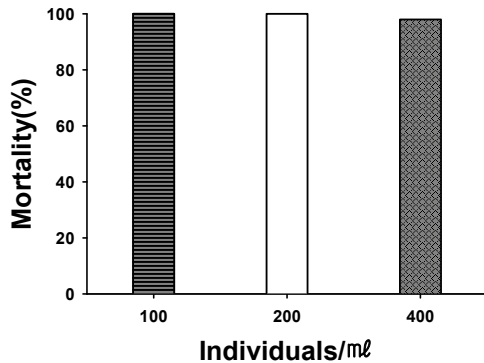


Fig. 5. Mortality of *Ichthyophthirius multifiliis* after exposure to the 5,000-fold dilution of the extract of *Ginkgo biloba* leaves for 1 hour at different density of the parasites.

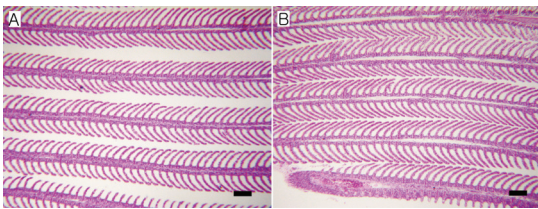


Fig. 6. Microphotographs of rainbow trout gills after exposure to the 5,000-fold dilution of the extract of *Ginkgo biloba* leaves for 1 hour (A). B: control. HE. Bars indicate 20 μ m

이번 시험에서 살충효과가 높다고 생각되는 은행잎 추출물의 5,000배 희석액에 대한 증체의 농도별로 살충효과시험을 실시한 결과, ml당 100마리 및 200마리의 밀도에서는 1시간 이내에 100% 사멸되었으며, ml당 400마리의 농도에서는 98%의 사멸효과를 나타내었다. 따라서 ml당 400마리의 농도까지는 사멸효과가 있을 것으로 생각되며, 이는 증체의 감염이 심해도 구제의 효과는 충분히 나타낼 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 실제로 양식수조에서 적용하였을 시에는 어체의 저항성, 사육수의 조건, 약제의 조건에 따라 많은 변수가 있을 수도 있다고 생각된다.

은행잎 추출물이 어류의 아가미에 손상을 일으키는지에 대한 조직학적인 관찰을 실시한 결과, 은행잎

추출물 약욕처리구와 비처리구 간의 아가미 조직의 차이는 거의 없는 것으로 나타났다. 따라서 어류에 이를 사용하였을 시의 어류의 아가미 조직 손상에 의한 생리적인 장애는 없을 것으로 생각된다.

앞으로 이 추출물에 대한 생체적인 연구를 실시함으로써 양식어장에서 실제로 적용하였을 시에 나타날 수 있는 요인에 대한 보완이 필요할 것으로 생각되며, 어류의 성장 및 대사에 미치는 영향에 대한 부분도 검토되어야 할 것으로 생각된다.

요 약

3종의 식물성 추출물 및 포르말린의 시험관 내에서의 백점증에 대한 살충효과를 조사하였다. 복합생약제는 500배 희석액에서 1시간 이내에 증을 완전히 죽일 수 있었으나, 여지초발효액은 100배의 희석액에서 1시간 이내에 모든 증을 죽일 수 있었다. 은행잎 추출물은 5,000배의 희석액으로 1시간 이내에 모든 증을 죽일 수 있었다. 대조약제로서 포르말린은 100ppm의 농도로 1시간 이내에 증을 모두 죽일 수 있었다. 이 결과로 은행잎 추출물이 살충효과가 가장 좋았다. 증체의 밀도에 따른 살충효과와의 차이는 없었다. 또한 은행잎 추출물의 5,000배 희석액으로 2시간 동안 약욕한 후의 어류의 아가미 조직에 있어서 변화가 없었다.

감사의 글

본 연구는 국립수산과학원 연구비 지원 (RP-2011-AQ-069) 으로 수행되었습니다.

참고문헌

- Alberto J. V.: Applications and needs of fish and shellfish cell culture for disease control in aquaculture. Reviews in fish biology and fisheries, 13: 111-140, 2003.
- Buchmann K. , Sigh J., Nielsen C. V., Dalgaard M.: Host responses against the fish parasitizing ciliate *Ichthyophthirius multifiliis*. Vet. Parasitol., 100: 105-116, 2001.
- Ekanem, A.P., Obiekezie, A., Kloas, W., Knopf, K.: Effects of extracts of *Mucana pruriens*(Fabaceae) and *Carica papaya* (Caricaceae) against the protozoan fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. Parasitol. Res., 92: 361-366, 2004.
- Ewing, M. S., Ewing, S. A. and Kokan, K. M. : *Ichthyophthirius multifiliis* (Ciliophora): Population studies suggest reproduction in host epithelium. J. Protozool., 35: 549-552, 1988.
- Ewing M. S. and Kocan K. M.: Invasion and Development Strategies of *Ichthyophthirius multifiliis*, a parasitic ciliate of Fish. Parasitology Today, 100: 204-208, 1992.
- Luzardo-A'lvarez, A., Martinez-Mazagatos J., Santamarina-Ferna'ndez M. T., Otero-Espinar F. J., and Blanco-Me'ndez J. : Oral pharmacological treatments for Ichthyophthiriosis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 220: 15-25, 2003.
- Mathews, R.A.: Parasitic Diseases of Fish, pp. 17-42, Tresaith, UK: Samara Publishing, 1994.
- Ming Chao Yu, Zhuo Jia Li, Hei Zhao Lin, Guo Liang Wen, Shen Ma: Effects of dietary medicinal herbs and *Bacillus* on survival, growth, body composition, and digestive enzyme activity of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture Intl., 17: 377-384, 2009.
- Paivi R. K., Mika R. , Anna-liisa M. K., Lotta-Riina S., Heikki M., and Baltonen E. T.: Treatment of ichthyophthiriasis after malachite green. I. Concrete tanks at salmonid farms. Dis. Aquat. Org., 64: 69-76, 2005.
- Rajendiran A., Natarajan E., Subramanian P.: Control of *Aeromonas hydrophila* Infection in Spotted Snakehead, *Channa punctatus*, by *Solanum nigrum* L., a Medicinal Plant. J. World Aquaculture Soc., 39(3): 375-383, 2008.
- Rasmus D. Heinecke, Kurt Buchmann: Control of *Ichthyophthirius multifiliis* using a combination of water filtration and sodium percarbonate: Dose-response studies. Aquaculture. 288: 32-35, 2009
- 배만중, 예은주, 김수정, 김재명, 이성태, 박은마, 여지초의 *in vitro* 항암효과 및 면역세포 활성화에 미치는 영향. J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr., 36(4): 377-382, 2007.
- 이남실, 정승희, 지보영: 생약재 5종 열수추출물의 어류 병원체에 대한 *in-vitro* 약효와 선택한 한 종(황금)의 넙치에서의 항균효능과 독성시험. 한국어병학회지, 23(1): 137-143, 2010.
- 이인화, 설명수, 박종대: 점박이응애(*Tetranichus urticae*), 목화진딧물(*Aphis gossypii*)과 복숭아 흑진딧물(*Myzus persicae*)에 대한 은행잎 추출물의 살충 및 기피효과. J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem., 48(2): 150-154, 2005.
- 조미라, 김진우, 김동수: 어류질병세균에 대한 천연식물 및 망태버섯 (*Dicyophora indusiata*) 추출물의 항균활성. 한국수산학회지, 35: 578-582, 2002.
- 지보영, 김기홍, 박수일, 백점충, *Ichthyophthirius multifiliis*의 발달단계별 특성. 한국어병학회지, 9(1): 21-31, 1996.

최혜승: 오배자 추출물이 어병세균에 대한 항균력 및
어류에 대한 생리반응. 부경대학교 대학원 박사
학위논문, pp. 3~21, 2004.

Manuscript Received : July 26, 2011

Revised : November 7, 2011

Accepted : November 10, 2011