

멍게, *Halocynthia roretzi* 물렁증의 원인충인 *Azumiobodo hoyamushi*의 살충효과 평가를 위한 현미경계수법과 alamar blue assay 비교

이재근 · 전승렬 · 박경일 · 최상훈 · 박관하†

군산대학교 해양과학대학 수산생명의학과

Comparison of microscopic counting and alamar blue assay to evaluate anti-protozoal effects against *Azumiobodo hoyamushi* that causes soft tunic syndrome to *Halocynthia roretzi*

Jae-Geun Lee, Seung-Ryul Zeon, Kyung-Il Park, Sang-Hoon Choi and Kwan Ha Park†

Department of Aquatic Life Medicine, Kunsan National University, 573-701, Korea

The edible ascidian, *Halocynthia roretzi* is a commercially important fisheries resource in Korea. However, there have been outbreaks of mass mortality due to soft tunic syndrome. It was discovered recently that the cause of death is infection by a protozoan parasite *Azumiobodo hoyamushi*. Alamar blue assay and microscopic counting were used to estimate anti-protozoal effects of 20 drugs having different action mechanisms. Through comparison of alamar blue assay and microscopic counting, 6 drugs were found to be potential in protozoan-killing effects: amphotericin B, formalin, hydrogen peroxide, bithionol, benzalkonium chloride, bronopol (24hr-EC₅₀ ≤ 20 μg/ml). The preliminary data can be used as a basis to develop anti-protozoal agents against *A. hoyamushi*.

Key words : *Halocynthia roretzi*, *Azumiobodo hoyamushi*, microscopy, alamar blue and anti-protozoal drugs

멍게, *Halocynthia roretzi*는 불포화 알코올인 cynthiol이 내는 독특한 맛 때문에 옛날부터 우리나라 사람들이 즐겨 먹어오던 해산물로서 그 수요가 날로 증가하고 있다. 하지만 1990년대부터 우리나라 남해안 지역의 멍게가 동절기 및 봄철에 대량 폐사하여 경제적으로 큰 손실을 주고 있으며, 이 대량 폐사의 원인으로는 물렁증 (soft tunic syndrome)으로 보고된 바 있다. 물렁증의 주요 증상으로는 피막섬유질다발 (tunic fiber bundle)이 분해되어 피막이 얇아지고 연화

되어 폐사하는 것으로 알려져 있다 (홍 등, 2000). 일본에서도 물렁증으로 대량 폐사하는 멍게 때문에 경제적으로 큰 피해를 입고 있다 (Hirose *et al.*, 2009).

최근 일본 연구진이 물렁증 증상을 보인 양식 멍게에서 분리한 편모충을 멍게에 공격실험한 결과, 감염된 멍게에서 물렁증이 유발되었다고 보고하였다 (Kumagai *et al.*, 2010). 이 편모충은 *in vitro*에서 순수 배양되었고 kinetoplastea, neobodonida의 *Azumiobodo hoyamushi*로 동정되었다 (Kumagai *et al.*, 2011; Hirose *et al.*, 2012). 국내 통영산 양식 멍게에서도 이 *A. hoyamushi*가 발견되었으며 (신 등, 2011), 아직까지

†Corresponding author: Kwan Ha Park

Tel : +82-63-469-1885

Email : khpark@kunsan.ac.kr

*A. hoyamushi*에 유효한 약제에 대해서는 아직 알려진 바 없다.

*In vitro*내에서 생물체의 독성을 측정하는 방법으로는 직접법과 간접법이 사용되고 있다. 직접법은 현미경계수법이 있으며 간접법으로는 화학물을 첨가하여 생물체의 증식 및 효소활성 등을 측정하는 방법이 있다. 본 연구진은 *in vitro*에서 *A. hoyamushi*의 형태적 변화를 기반으로 하는 현미경계수법을 보고한바 있다 (Park *et al.*, 2013). 간접적으로 측정하는 방법 중 하나인 alamar blue assay는 산화환원 지시약인 alamar blue (resazurin)이 살아있는 세포의 미토콘드리아내 효소활성 등에 의해 resorufin으로 환원되어 나타나는 비색 및 형광량의 변화로 세포의 생존을 측정하는 방법이다. 이 측정법은 동물세포 (Nociari *et al.*, 1998), 세균 (Franzblau *et al.*, 1998), 기생충 (Ráz *et al.*, 1997), 곰팡이 (Ingroff *et al.*, 1997) 등 다양한 생물체에 대한 화학물의 독성을 평가하는데 사용되고 있다.

본 연구는 *in vitro*에서 아직 살충효과를 측정하는 방법이 알려지지 않은 멧게의 물렁증 원인충인 *A. hoyamushi*에 대해 간접적 측정방법인 alamar blue assay의 측정 가능성을 제시하고 20종의 화학물에 대해 현미경계수법과 alamar blue assay를 비교하여 *A. hoyamushi*에 유효한 화학물을 확인하고자 수행하였다.

재료 및 방법

A. hoyamushi 배양

*A. hoyamushi*는 물렁증에 감염된 멧게에서 순수 분리하여 MEM에 배양하였다 (신 등, 2011). 즉 10% Eagle's minimal essential medium (MEM, Gibco, USA)에 3.5% sea salt (Sigma, USA), 2.5% fetal bovine serum

(FBS, Sigma, USA), 5 mM HEPES (Sigma, USA), 2 mM L-glutamine (Sigma, USA), penicillin-streptomycin mixture (Sigma, USA)를 penicillin 100 units/ml, streptomycin 100 μ g/ml의 농도로 첨가한 후 0.45 μ m filter paper를 이용해 여과한 배지에 *A. hoyamushi*를 배양하였다.

시약구입 및 제조

시험 화학물은 임의적으로 5가지로 분류하여 *A. hoyamushi*에 대한 살충 효과를 평가하였다. 즉 항원충제, 항생제 및 항진균제, 산화제 및 환원제, 할로겐화물, 기타화학물이다 (Table 1). 시약은 Sigma사에서

Table 1. Classification of drugs used for anti-parasitic efficacy test

Classes	Drugs	Test concentrations (mg/L)
Antiparasitics	quinine	20-200
	metronidazole	1-100
	albendazole	1-100
	fumagillin	1-20
Antibiotics and antifungals	amphotericin B	0.1-40
	ketoconazole	12.5-100
	paromomycin	1-100
	nalidixic acid	1-100
Oxidants and reductants	sulfamonomethoxine	1-100
	formalin	0.1-500
	potassium monopersulfate	1-100
	hydrogen peroxide	0.05-5
Halogens	potassium permanganate	1-100
	bithionol	0.5-200
	povidone iodine	10-500
Others	chloramine T	1.25-200
	chlorine dioxide	0.5-250
	benzalkonium chloride	1.25-40
	citric acid	1-100
	bronopol	0.1-10

chloramine T hydrate, bronopol, potassium monosulfate salt, fumagillin (from *Aspergillus fumigatus*), albendazole, citric acid, quinine, potassium permanganate, metronidazole, nalidixic acid, amphotericin B, poly (vinylpyrrolidone)-iodine complex, paromomycin sulfate salt, benzalkonium chloride, sulfamonomethoxine, ketoconazole을 구입하였다. Hydrogen peroxide, formaldehyde solution은 Junsei (Japan)에서 구입하였으며 chlorine dioxide은 캐모피아 (Korea)에서 구입하였다. Bithionol은 TCI (Japan)에서 구입하였다.

물에 난용성화합물인 albendazole, quinine, fumagillin은 dimethyl sulfoxide에 녹인 후 증류수로 희석하여 사용하였다. Nalidixic acid와 bithionol은 증류수에 sodium hydroxide를 소량 첨가하여 녹인 후 사용하였고 ketoconazole은 증류수에 hydrogen chloride를 소량 첨가하여 녹여 제조하였다. Chlorine dioxide는 1000 mg/L으로 제조된 수산용 소독제를 사용하였고 이외의 화합물은 증류수에 녹여 제조하였다. 희석시 MEM를 이용하였으며 시험에 사용한 농도에서 DMSO는 1%이하였고 pH는 6.8~8.2범위였다. 모든 화합물의 순도는 100%로 보정하여 사용하였다.

Alamar blue의 시간별 환원량 평가

Alamar blue assay로 *A. hoyamushi*의 생존이 측정가능한지 알아보기 위해 0.5×10^6 cells/ml 농도의 *A. hoyamushi* 배양액 200 μ l에 alamar blue (Invitrogen, UK) 20 μ l를 형광용 96 well-plate에 첨가한 후 15°C에서 배양하였다. 0, 1, 6, 12, 24시간 별로 fluorescence spectrophotometer (Spectra Max, GEMIN XS, Molecular Device)를 이용해 형광값을 측정하였다. Excitation wavelength는 540 nm이었고 emission wavelength는 580 nm이었다. 시험은 5회 반복하였다.

시간별 signal/background (S/B) 비는 0시간의 형광값을 background값으로 한 후 시간별로 증가하는 형광값을 signal값으로 하여 비를 계산하였다.

Alamar blue assay를 이용한 살충효과 평가

A. hoyamushi (1×10^6 cells/ml) 100 μ l에 시험용액 100 μ l를 형광용 96 well-plate에 넣은 후 alamar blue 20 μ l를 첨가하여 24시간 동안 15°C에서 배양하였다. 화합물의 평가농도는 Table 1의 농도범위로 평가하였으며 MEM으로 2배씩 희석하여 fluorescence spectrophotometer로 형광값을 측정하였다. Excitation wavelength는 540 nm이었고 emission wavelength는 580 nm이었다. 대조군의 형광값과 실험군의 형광값의 비로 *A. hoyamushi*의 생존율을 평가하였다. 시험은 3회 반복하였다.

현미경계수법을 이용한 살충효과 평가

현미경계수법은 Park *et al.* (2013)의 방법으로 하였다. 즉 *A. hoyamushi* (5×10^4 cells/ml) 1 ml에 시험용액 1 ml을 12 well-plate에 넣은 후 24시간 동안 15°C에서 배양한 후 역상현미경을 이용하여 무작위로 200 마리씩 측정하여 평가하였다. 평가기준은 생존, 형태 이상, 사망 이었다. 형태이상과 사망으로 측정된 기생충의 합을 화합물에 영향을 받은 것으로 계산하였다. 화합물의 평가농도는 MEM으로 2배씩 희석하여 Table 1의 농도범위에서 평가하였으며 3회 반복하여 살충효과를 평가하였다.

데이터 분석

화합물에 대한 반수영향농도 (median effective concentration, EC₅₀)의 값은 Graphpad Prism (version 4, Prism, USA)을 이용하여 평가하였다.

결 과

Alamar blue의 시간별 환원량 평가

*A. hoyamushi*의 배양시간에 따른 alamar blue의 환원량 변화는 Fig. 1에 나타났다. Alamar blue의 환원량은 시간이 경과함에 따라 직선적으로 증가하였다. 기울기는 37.8이었으며 R^2 은 0.9932이었다. 시간별 S/B비는 각각 1.3, 1.8, 2.6, 3.9 : 1이었다.

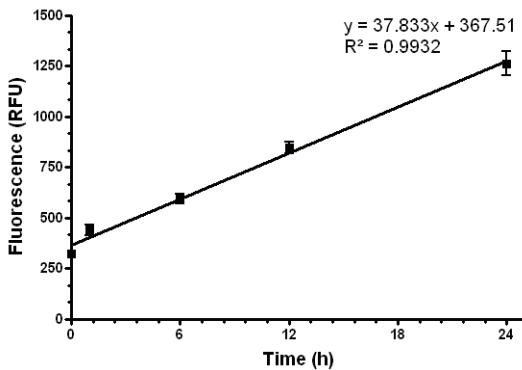


Fig. 1. Change in alamar blue fluorescence intensity vs. expose period.

Alamar blue assay의 살충효과 평가

Alamar blue assay를 이용한 *A. hoyamushi*의 살충효과는 총 20개의 시험 화합물 중 11종의 화합물에서 감수성을 보였다 (Fig. 2). *A. hoyamushi*에 강력한 살충효과를 보인 화합물은 hydrogen peroxide, bronopol, amphotericin B이었으며 각각 0.62, 4.23, 8.16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 24hr- EC_{50} 값을 얻었다. Benzalkonium chloride, bithionol, formalin, chlorine dioxide, ketoconazole은 $10 \leq 24\text{hr-EC}_{50} \leq 25 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이었으며 quinine, povidone iodine, chloramine T는 $50 \leq 24\text{hr-EC}_{50} \leq 200 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이었다. 나머지 화합물은 시험농도범위에서 살충효과를 보이지 않았다.

현미경계수법을 이용한 살충효과 평가

현미경계수법을 이용한 *A. hoyamushi*의 살충효과에서도 총 20개의 시험 화합물 중 11종의 화합물에서 감수성을 보였다 (Fig. 2). *A. hoyamushi*에 강력한 살충효과를 보인 화합물은 hydrogen peroxide, formalin, bronopol, chlorine dioxide, bithionol이었으며 각각 0.32, 0.73, 1.24, 3.76, 7.37 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 24hr- EC_{50} 값을 얻었다. Benzalkonium chloride, chloramine T, ketoconazole, amphotericin B은 $10 \leq 24\text{hr-EC}_{50} \leq 25 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이었으며 quinine, povidone iodine은 $25 \leq 24\text{hr-EC}_{50} \leq 100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이었다. 나머지 화합물은 시험농도범위에서 살충효과를 보이지 않았다.

Alamar blue assay와 현미경계수법의 살충효과 비교

Alamar blue assay와 현미경계수법은 시험농도범위에서 11종의 화합물에 대해 *A. hoyamushi*에 감수성을 보였으며 amphotericin B를 제외한 모든 유효화합물에서 현미경계수법이 alamar blue assay보다 더 낮은 24hr- EC_{50} 값을 얻었다. 두 측정법의 EC_{50} 값 비 (alamar blue assay/ microscopic counting)의 차이는 amphotericin B, hydrogen peroxide, povidone iodine, benzalkonium chloride는 ≤ 2 였으며 quinine, ketoconazole, bithionol, chloramine T, chlorine dioxide, bronopol은 ≤ 5 이었다. Formalin은 26.3으로 가장 큰 비의 차이를 보였다.

고 찰

명계 물렁증의 원인충인 *A. hoyamushi*의 유효한 약제나 살충효과를 측정하는 방법에 대해서는 아직 알려진바 없다. 이에 본 연구진은 화합물에 노출된 *A. hoyamushi*의 형태적 변화를 기반으로 *A. hoyamushi*의 현미경계수법을 제시한바 있다 (Park et al., 2013).

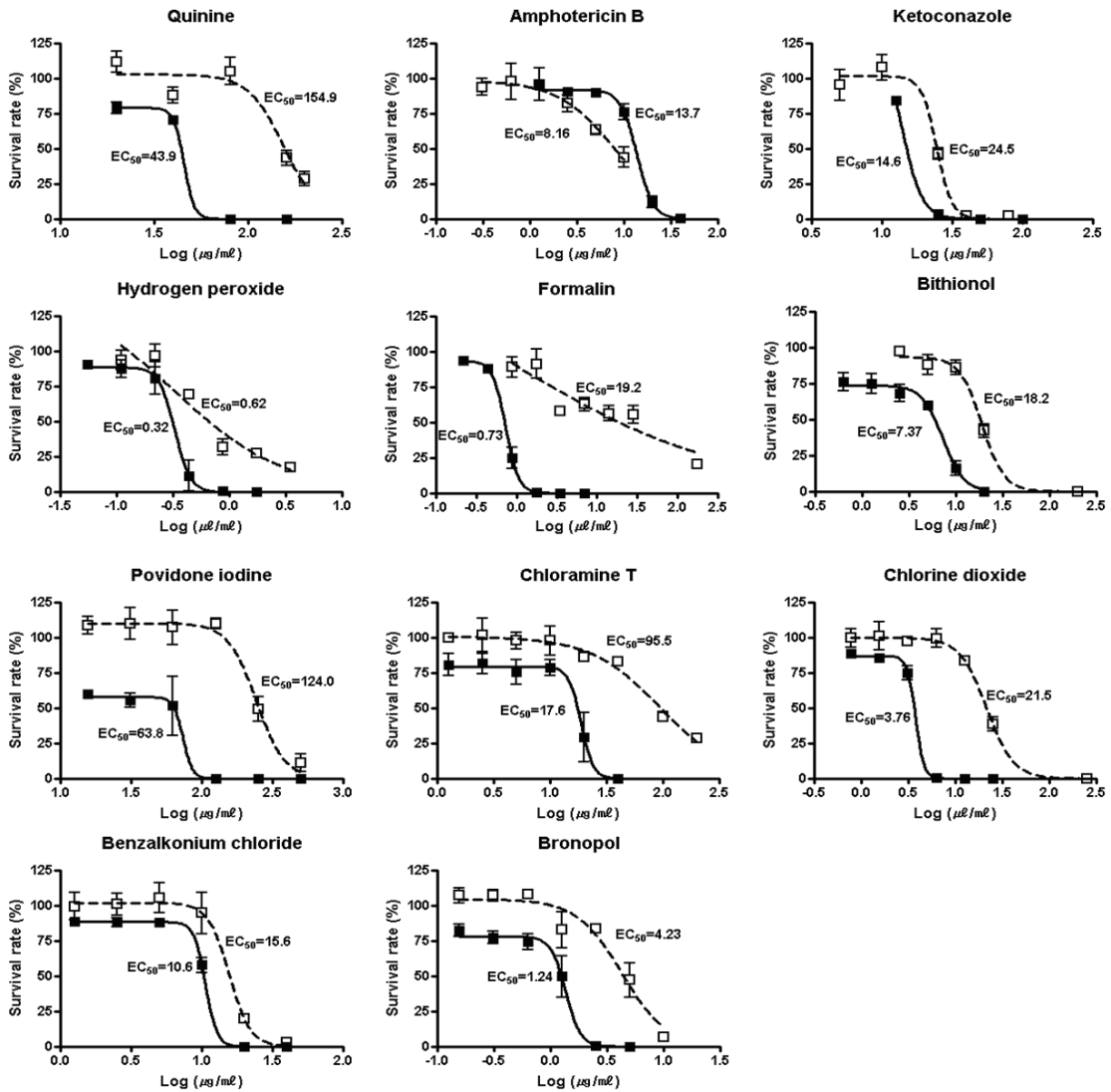


Fig. 2. *In vitro* 24hr-anti-protozoal efficacy of test drugs. Data are mean \pm S.D. Ineffective drugs are not shown. Part of microscopic data quoted from Park *et al.* (2013)

□ Alamar blue reduction assay, ■ Microscopic counting

현미경계수법은 방추형 모양의 *A. hoyamushi*가 유효 화합물에 노출되었을 때에는 구형의 모양으로 변하는 현상이 관찰되었으며 fast green exclusion test로 확인한 결과, 구형모양의 *A. hoyamushi*는 fast green에 염색이 된 개체(사망한 충)와 염색이 되지 않은 개체(생존한 충)가 모두 발견되었다. 이러한 형태적 차이

를 바탕으로 구형모양의 충과 사망한 충의 합을 화합물에 영향을 받는 개체로 판단하고 20종의 화합물에 대해 살충효과를 평가하였다.

*In vitro*에서 세포의 증식을 평가하기 위한 간접적인 측정방법으로는 [^3H]thymidine incorporation assay, ATP bioluminescence assay, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-

2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay, alamar blue assay 등이 사용되어 왔다. 그 중 alamar blue assay는 다른 측정법에 비해 시험법이 간단하며 세포에 독성을 미치지 않고 형광과 비색정량 모두에서 측정이 가능하다는 점에서 동물세포, 세균, 곰팡이, 기생충 등 다양한 생물체에서 독성을 평가하는데 이용되고 있다. 본 연구는 *A. hoyamushi*가 alamar blue를 환원시키는 지에 대해 알아보기 위해 시간별로 형광값의 변화량을 측정하였으며 시간별로 높은 상관관계를 가지는 형광값을 얻었으나 배양 24시간 후의 S/B비가 3.9 : 1로 나타났다. Hamid *et al.* (2004)는 인간의 간암유래세포인 HepG2세포주 2×10^4 cells/well에 최종 농도가 10%가 되게 alamar blue를 넣고 5시간 배양 후의 S/B비가 26 : 1이라 보고하였으며 Rüz *et al.* (1997)는 5×10^5 cells/well의 편모충 *Trypanosoma brucei rhodesiense*와 *T. b. gambiense*에 최종 농도 10%가 되게 alamar blue를 넣고 2시간 배양 후의 S/B비가 각각 15 : 1, 3 : 1이라고 보고하였다. 시험생물이 달라 직접적인 비교는 어렵지만 상대적으로 *A. hoyamushi*는 24시간을 배양했음에도 불구하고 낮은 S/B비를 얻었으며 이는 *A. hoyamushi*가 소량의 alamar blue만을 환원시키는 것으로 판단된다. Alamar blue를 이용하여 *A. hoyamushi*의 살충효과를 판단하기 위해서는 최소 24시간 이상의 배양시간이 필요할 것으로 생각된다.

Alamar blue assay와 현미경계수법을 이용하여 *A. hoyamushi*에 대한 20종의 화합물에 대한 24시간 살충효과를 평가한 결과 11종의 화합물에 대해 효과를 보였으며, 두 측정법 모두에서 강한 살충효과를 보이는 화합물은 항진균제인 amphotericin B, 산화제 및 환원제인 formalin, hydrogen peroxide, bithionol, 기타 약물인 benzalkonium chloride, bronopol로 나타났다 (24hr-EC₅₀ ≤ 20 µg/ml). 이들 화합물은 *Leishmania*

donovani (amphotericin B), *Ichthyobodo spp.* (formalin, hydrogen peroxide, bithionol), *Neoparamoeba spp.* (bithionol), *Cryptocaryon irritans* (benzalkonium chloride), *Ichthyophthirius multifiliis* (bronopol) 등에 살충효과가 있다고 보고되었으며 (Saha *et al.*, 1986; Ostland *et al.*, 1995; Russo *et al.*, 2007; Florent *et al.*, 2007, 2010; Hirazawa *et al.*, 2003; shinn *et al.*, 2012), 일부는 국내에서 수산용의약품으로 판매되고 있다는 점에서 멧게의 물렁증 치료에 유용한 물질로 생각되지만 *in vivo* 조건에서의 효과가 확인되지 않았기 때문에 추가적인 연구가 필요할 것이다.

Alamar blue assay와 현미경계수법의 24hr-EC₅₀값을 비교해 보면 살충효과가 있는 대부분의 화합물에서 alamar blue assay에 비해 현미경계수법이 더 낮은 24hr-EC₅₀값을 얻었다. Mansour and Bickle (2010)는 형태변화에 따른 현미경 측정법과 alamar blue assay를 이용하여 *Schistosoma mansoni*의 7일간 살충효과를 비교 평가하였고 alamar blue assay가 현미경계수법에 비해 덜 민감한 값을 얻었다고 보고하였다. 본 연구 또한 amphotericin B를 제외한 모든 유효화합물에서 현미경계수법이 alamar blue assay 보다 더 낮은 24hr-EC₅₀값을 얻었다. 이와 같은 결과는 alamar blue assay가 효소의 산화/환원 반응에 의해 형성되는 resorufin의 양에 의해 평가되기 때문이라 생각된다. Formalin에 대한 alamar blue assay와 현미경계수법의 24h-EC₅₀값의 비는 26.3 : 1로 다른 시험화합물에 비해 큰 차이를 보였으며, 이는 강력한 환원제인 formalin이 alamar blue의 환원에 영향을 미쳐 둔감한 값이 측정됐을 것으로 생각되나 formalin에 alamar blue를 첨가했을 때 formalin이 직접 alamar blue를 환원시키는 현상은 관찰되지 않았다 (data not shown).

본 연구결과를 요약하면, 멧게 물렁증의 원인충인

*A. hoyamushi*는 배양시간에 따라 지속적으로 alamar blue를 환원시켰으며 *in vitro*에서 alamar blue assay와 현미경계수법을 비교하여 amphotericin B, formalin, hydrogen peroxide, bithionol, benzalkonium chloride, bronopol이 *A. hoyamushi*에 강한 살충효과가 있는 것으로 확인하였다. 두 측정법 모두 대부분의 화합물에서 비슷한 결과를 얻었다는 점에서 *A. hoyamushi*의 살충효과를 측정하는데 좋은 방법으로 생각되지만, formalin처럼 두 측정법에서 큰 차이를 보이는 화합물도 존재하기 때문에 상호보완해서 사용해야 할 것이다. 이러한 연구결과를 바탕으로 향후 화합물의 병용투여 및 멍게에 대한 *in vivo*시험 등의 연구를 통해 멍게의 물렁증에 효과적인 치료법이 개발될 것으로 기대된다.

사사

본 연구는 2013년도 군산대학교 수산과학연구소 학술연구비 지원에 의하여 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

참고문헌

Florent R. L., Becker J. A. and Powell M. D.: Efficacy of bithionol as an oral treatment for amoebic gill disease in Atlantic salmon *Salmo Salar*(L.). *Aquaculture.*, 270:15-22, 2007.

Florent R. L., Becker J. A. and Powell M. D.: *In vitro* toxicity of bithionol and bithionol sulphoxide to *Neoparamoeba spp.*, the causative agent of amoebic gill disease (AGD). *Dis. Aquat. Org.*, 91:259-262, 2010.

Franzblau S. G., Witzig R. S., Mclaughlin J. C., Torres

P., Madico G., Hernandez A., Degnan M. T., Cook M. B., Quenzer V. K., Ferguson R. M. and Gilman R. H.: Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate alamar blue assay. *J. Clin. Microbiol.*, 36:362-366, 1998.

Hamid R., Rotshteyn Y., Rabadi L., Parikh R. and Bullock P.: Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. *Toxicol. In Vitro.*, 18:703-710, 2004.

Hirazawa N., Goto T. and Shirasu K.: Killing effect of various treatments on the monogenean *Heterobothrium okamotoi* eggs and oncomiracidia and the ciliate *Cryptocaryon irritans* cysts and theronts. *Aquaculture.*, 223:1-13, 2003.

Hirose E., Ohtake S. I. and Azumi K.: Morphological characterization of the tunic in the edible ascidian, *Halocynthia roretzi* (Drasche), with remarks on 'soft tunic syndrome' in aquaculture. *J. Fish Dis.*, 32:433-445, 2009

Hirose H., Nozawa A., Kumagai A. and Kitamura S.: *Azumiobodo hoyamushi* gen. nov. et sp. nov. (Euglenozoa, Kinetoplastea, Neobodonida): A pathogenic kinetoplastid causing the soft tunic syndrome in ascidian aquaculture. *Dis. Aquat. Organ.*, 97:227-236, 2012.

Kumagai A., Suto A., Ito H., Tanabe T., Takahashi K., Kamaishi T. and Miwa S.: Mass mortality of cultured ascidians *Halocynthia roretzi* associated with softening of the tunic and flagellate-like cells. *Dis. Aquat. Organ.*, 90:223-234, 2010.

Kumagai A., Suto A., Ito H., Tanabe T., Song J. Y., Kitamura S. I., Hirose E., Kamaishi T. and Miwa S.: Soft

- tunic syndrome in the edible ascidian *Halocynthia roretzi* is caused by a kinetoplastid protist. Dis. Aquat. Organ., 95:153-161, 2011.
- Mansour N. R. and Bickle Q. D.: Comparison of microscopy and alamar blue reduction in a larval based assay for schistosome drug screening. PLoS Negl. Trop. Dis. 4: e795, 2010.
- Nociari M. M., Shalev A., Benias P. and Russo C.: A novel one-step, highly sensitive fluorometric assay to evaluate cell-mediated cytotoxicity. J. Immunol. methods., 213:157-167, 1998.
- Ostland V. E., Byrne P. J., Speare D. J., Thorburn M. A., Cook A., Morrison D. and Ferguson H.W.: Comparison of formalin and chloramine-T for control of a mixed gill infection (bacterial gill disease and ichthyobodiasis) in rainbow trout. J. Aquat. Anim. Health., 7:118-123, 1995.
- Park K. H., Zeon S. R., Lee J. G., Choi S. H., Shin Y. K. and Park K. I.: *In vitro* and *in vivo* efficacy of drugs against the protozoan parasite *Azumiobodo hoyamushi* that causes soft tunic syndrome in the edible ascidian *Halocynthia roretzi*. J. Fish Dis., in press, 2013
- Räz B., Iten M., Bühler Y. G., Kaminsky R. and Brun R.: The alamar blue® assay to determine drug sensitivity of african trypanosomes (*T.b. rhodesiense* and *T.b. gambiense*) *in vitro*. Acta Trop., 68:139-147, 1997.
- Russo R., Curtis E. W. and Yanong R. P. E.: Preliminary investigations of hydrogen peroxide treatment of selected ornamental fishes and efficacy against external bacteria and parasites in green swordtails.
- Saha A. K., Mukherjee T. and Bhaduri A.: Mechanism of action of amphotericin B on *Leishmania donovani* Promastigotes. Mol. Biochem. Parasitol., 19:195-200, 1986.
- Shinn A. P., Picón-Camacho S. M., Bron J. E., Conway D., Yoon G. H., Guo F. C. and Taylor N. G. H.: The anti-protozoal activity of bronopol on the key life-stages of *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet, 1876 (Ciliophora). Vet. Parasitol., 186:229-236, 2012.
- 신윤경, 김현중, 박경일, 최민순, 전제천, 김응오: 통영산 물렁증 멧게 피막의 편모충 감염. 한국어병학회지, 24:197-204, 2011.
- 홍정표, 김영섭, 허성범: 온도 자극 및 수용밀도에 따른 우렁쉥이 폐사. 한국양식학회지, 13:285-293, 2000.

Manuscript Received : November 5, 2012

Revised : April 1, 2013

Accepted : April 2, 2013