

구피(*Poecilia reticulata*)에서 수산용의약품 oxolinic acid, neomycin-oxytetracycline, florfenicol의 급성독성 및 *Aeromonas salmonicida*에 대한 약효 평가

배준성* · 이채원* · 양찬영* · 정은하* · 김아름* · 채영식* · 박정진** · 박관하*[†]

*전라북도 군산시 대학로 558 군산대학교 해양과학대학 수산생명의학과

** (주)삼양애니팜

The acute toxicity and efficacy evaluation against *Aeromonas salmonicida* of aquatic drugs oxolinic acid, neomycin-oxytetracycline, and florfenicol in guppy (*Poecilia reticulata*)

Jun Sung Bae*, Chae Won Lee*, Chan Yeong Yang*, Eun Ha Jeong*, Areum Kim*, Young-Sik Chae*, Jung-Jin Park** and Kwan Ha Park*[†]

*Departments of Aquatic Life Medicine, College of Ocean Science and Technology, Kunsan National University, Gunsan City, Jeollabuk-do, Republic of Korea

**Samyang anipharm co.,ltd., 6-5, Tongil-ro 83-gil, Enpyeong-gu, Seoul, Korea

This study evaluated the acute toxicity induced by oxolinic acid (OA), neomycin-oxytetracycline combination (NEO-OTC) and florfenicol (FF) administered to guppy (*Poecilia reticulata*) by comparing standard formulations with commercial preparations (COOaqua curinpotion, COOaqua terafinpotion and COOaqua profenpotion, respectively) for ornamental fish at concentrations of 2-4%. NEO-OTC exhibited the highest acute toxicity in guppy, with no difference observed between the pstandard formulation and commercial preparation (LC₅₀ = 126.08 mg/L and 112.44 mg/L, respectively). OA acute toxicity was assessed in the form of sodium salt, with an LC₅₀ of 504.61 mg/L for the standard formulation and a slightly increased toxicity of 316.11 mg/L for the commercial preparation. In contrast, no mortality was observed during the 96-hour exposure period with the standard formulation in the form of oxolinic acid. The acute toxicity of FF was measured to be above 1,000 mg/L for the standard formulation; however, the commercial preparation significantly increased to 158.53 mg/L. These results indicate that toxicity can significantly increase in commercial formulations, especially those with low levels of active ingredients. This is presumed to be attributed to the organic solvents or solubilizing agents present in the commercial preparations, which may enhance toxicity. Additionally, guppy infected with *Aeromonas salmonicida* were effectively protected against mortality by administering OA, NEO-OTC and FF at concentrations of 50 mg/L, 100 mg/L and 15 mg/L, respectively, for 2 hours and at half the dose for 24 hours. This result indicates that liquid formulations containing low concentrations of antibiotics may partially increase toxicity, but there is no problem in effectively treating diseases in ornamental fish.

Key words: Guppy, Acute toxicity, LC₅₀, Antibiotic

[†]Corresponding author: Kwan Ha Park
Tel: +82-63-469-1885, Fax: +82-63-463-9493
E-mail: khpark@kunsan.ac.kr

서 론

어류의 의약품 투여는 건강을 유지하고 질병을 예방 및 치료하는 데 중요한 역할을 한다. 의약품 투여 방법은 어류의 특성과 환경에 따라 다양하게 적용되며, 그중에서도 경구투여와 약욕투여가 산업적으로 주요한 방법이다. 경구투여는 자발적인 섭취가 필요하기 때문에 질병감염이나 운반과 같은 스트레스 조건에서는 사용이 제한된다. 그러나 투여 방법이 편리하며 다수의 개체에 일시적으로 투여할 수 있기 때문에 양식어류에서 가장 보편적으로 사용되었다(Black, 2000). 관상어에서는 주로 운반 후 창상 발생이나 질병 감염과 같은 먹이 섭취가 불가능한 소수의 개체를 대상으로 사용되기 때문에 약욕투여법이 주요한 투여 방법이며, 옥소린산(OA), 네오마이신-옥시테트라사이클린 복합제(NEO-OTC) 및 플로르페니콜(FF)이 관상어용 수산용의약품으로 승인되었다(NIQS, 2022). 어류의 아가미는 호흡기관으로서 기능적으로 특히 중요하며, 사육수에 직접 노출되어 있어 수중 유해인자에 쉽게 영향을 받는다(Huh and Jeong, 1993). 관상어류는 대부분 사육 규모가 작으며 소수의 개체를 치료하기 때문에 항생제의 농도가 낮은 제제는 정확한 용량을 투여하기에 매우 편리한 특징을 가지고 있다. 부형제는 의약품을 제제화할 때 제품의 중량, 흡수, 안정성, 용매 등의 목적으로 사용되며, 특히 제품 내 활성원료(API, active pharmaceutical ingredients) 함량을 조절한다(Abrantes *et al.*, 2016). 약리학적으로 부형제는 불활성인 것으로 간주되어 사용되지만, 약물과 상호작용하여 화학적 및 물리적 영향을 미칠 수 있다(Kedzierewicz *et al.*, 1993; Richards *et al.*, 1996; Gavatur *et al.*, 2004; Fathima *et al.*, 2011).

본 연구는 대표적인 관상어류인 구피(*Poecilia reticulata*)에서 OA, NEO-OTC 및 FF의 급성독성을 평가하였다. 특히 API 함량이 2-4%로 매우 낮은 상업용 제제의 급성독성을 평가하여 표준품과의 96시간 반수치사농도(96h-LC₅₀)를 비교하였다. 또한 적절한 투여 시간 및 용량을 결정하기 위하여 단시간(2시간)과 장시간(24시간) 노출에 따른 에로모나스병 치료 효능을 평가하였다.

재료 및 방법

시약 및 재료

본 연구에서 공시한 시험항생제는 oxolinic acid ($\geq 95\%$, CAS No. 14698-29-4), sodium oxolate ($\geq 95\%$, CAS No. 59587-08-5), neomycin sulfate ($\geq 95\%$, CAS No. 1405-10-3), oxytetracycline hydrochloride ($\geq 95\%$, CAS No. 2058-46-0) 그리고 florfenicol ($\geq 98\%$, CAS No. 73231-34-2)이다. Oxolinic acid, neomycin sulfate 및 oxytetracycline hydrochloride는 Sigma사(MO, USA), florfenicol은 TCI사(Tokyo, Japan), sodium oxolate는 삼양애니팜사(Seoul, Korea)에서 입수하였다. 공시 항생제의 대조 시험으로 사용한 상업용 제제는 삼양애니팜사의 쿠아쿠아큐어린포션(sodium oxolate, 2%) 및 쿠아쿠아테라핀포션(neomycin sulfate, 4% 및 oxytetracycline hydrochloride 4%)을 산제 형태로, 쿠아쿠아프로펜포션(flорfenicol, 3%)을 액제 형태로 사용하였다. 산제의 부형제는 glucose (70%), lactose hydrate (29.5%) 및 powdered corn syrup (0.5%)으로, 액제의 부형제는 propylene glycol (94%), polysorbate 80 (3%), N-methylpyrrolidone (2%) 및 butylated hydroxy toluene (1%)으로 조성되었다. Brain-heart infusion broth (BHI), brain-heart infusion agar (BHIA)는 Difco (MD, USA)에서, 그 외의 모든 시약은 Sigma사(MO, USA)에서 ASC 등급을 구매하여 사용하였다.

시험 어류

전라북도에서 관상어로 판매되고 있는 체중 0.5-1.0 g의 구피를 입수하여 사용하였다. 구피는 먹이 섭취가 활발하고, 외관상 기형이나, 유영에 이상이 없는 건강한 개체들로 선별하여 45 cm (L) × 90 cm (W) × 40 cm (H) 순환여과식(약 120 L) 수조에서 2주간 순치하였다. 사육수는 매일 12:00 마다 YSI 556mps (YSI, Ohio, USA)로 측정하며 수온 24±3°C, D.O. 5-6 mg/L, pH 7.0-8.0를 유지하였다.

급성독성 평가

구피에서 OA, NEO-OTC 및 FF 약욕투여에 따른 급성독성은 표준품 및 상업용 제제로 평가하였다.

즉 5L의 사육수조에서 96시간 동안 사육수를 교환하지 않는 지수식 시험(static test)방법으로 노출하였으며, 96h-LC₅₀으로 급성독성을 평가하였다(Lee *et al.*, 2015). 시험어는 각 용량마다 10마리씩 평가하였으며, 유영과 아가미 움직임이 없는 개체는 치사어로 판단하여 즉시 사육수에서 제거하였다. 급성독성시험을 위하여 공시한 모든 항생제 농도는 활성성분의 함량을 보정하였으며, Table 1, 2에서 처럼 3-1,000 mg/L 범위로 설정하였다. OA 표준품은 sodium염 형태(sodium oxolinic acid)와 oxolinic acid 형태 두가지로 평가되었으며, NEO-OTC 표준품은 NEO 및 OTC를 1:1 (W/W) 비율로 각각 사육수에 용해하여 투여하였다. FF 표준품은 소량의 DMSO에 용해하여(최종적으로 사육수의 0.2% 이하) 투여하였다. 상업용 제품은 모두 사육수에 용해하여 투여하였다.

시험 균주

구피에서 *in vivo* 효능 평가에 사용된 *A. salmoni-*

*cida*는 16s ribosomal DNA의 염기서열이 NCBI GenBank database에 등록된 ATCC 27013와 query cover 99%, percent identity 100%임을 BLAST를 이용하여 확인하였다. *A. salmonicida*는 BHI로 28°C에서 24시간 동안 배양하였으며, BHIA 평판배지에서 30-300개의 집락을 형성하는 농도를 3반복 측정하여 CFU를 결정하였다.

인위 감염 및 항병능 평가

구피에 *A. salmonicida*를 인위적으로 감염시키기 위하여 BHI에 배양된 *A. salmonicida*를 4,000 RPM, 15분간 원심분리한 뒤 상층액을 제거하고 집균된 것을 별도의 감염수조(5 L)에서 예비 병원성 시험으로 얻어진 감염농도인 4.4×10^7 CFU/mL가 되도록 분주하였다. 구피는 48시간 동안 침지감염한 뒤 본래의 수조에 수용하였다. 24시간 뒤 별도의 수조(5 L)에서 OA, NEO-OTC 및 FF 상업용 제제를 약용투여하여 14일간 누적폐사율을 평가하였다. 약용투여는 OA, NEO-OTC 및 FF를 각각 50 mg/L,

Table 1. Acute toxicity of standard antibiotics in guppy following bath administration. n=10.

Antibiotic	Compound	Con. (mg/L)	Mortality (%)			
			24h	48h	72h	96h
OA	Oxolinic acid	1,000	0	0	0	0
		3	0	0	0	0
		10	0	0	0	0
		32	0	0	0	0
		100	0	0	0	0
		316	20	20	20	20
		1,000	90	90	90	90
NEO-OTC	Neomycin sulfate, oxytetracycline hydrochloride (1:1 W/W)	3	0	0	0	0
		10	0	0	0	0
		32	0	0	0	0
		100	0	0	10	30
		316	0	30	90	100
		1,000	100	100	100	100
FF	Florfenicol	3	0	0	0	0
		10	0	0	0	0
		32	0	0	0	0
		100	0	0	0	0
		316	0	0	0	0
		1,000	10	10	10	10

Mortality (%) = death number/total number × 100.

Table 2. Acute toxicity of commercial antibiotics in guppy following bath administration. n=10.

Antibiotic	Compound	Con. (mg/L)	Mortality (%)			
			24h	48h	72h	96h
OA (API 2%, powder)	Sodium oxolate	3	0	0	0	0
		10	0	0	0	0
		32	0	0	0	0
		100	0	0	0	0
		316	40	50	50	50
		1,000	100	100	100	100
NEO-OTC (API 4%, powder)	Neomycin sulfate, oxytetracycline hydrochloride (1:1 W/W)	3	0	0	0	0
		10	0	0	0	0
		32	0	0	0	0
		100	0	0	0	40
		316	0	0	100	100
		1,000	80	100	100	100
FF (API 3%, liquid)	Florfenicol	3	0	0	0	0
		10	0	0	0	0
		32	0	0	0	0
		100	10	10	10	10
		316	100	100	100	100
		1,000	100	100	100	100

Mortality (%) = death number/total number × 100.

100 mg/L 및 15 mg/L 농도로 2시간 동안 수행하였다. 또한 장기간 약욕투여에 따른 유효성을 평가하기 위하여 그 절반의 용량으로 24시간동안 약욕투여하였다. 투여 종료 후 본래의 사육수조에서 총 14일간 누적폐사율을 측정하였다.

통계학적 처리

96h-LC₅₀ 및 95% 신뢰한계 값은 United States Environmental Protection Agency (EPA, USA)의 probit 및 Trimmed Spearman Karber (TSK) 통계법을 사용하여 도출하였다. 에로모나스병 치료 효능은 GraphPad Prism version 5.0 program (GraphPad Software Inc., CA, USA)을 사용하여 Mantel-Cox의 log-rank test로 유의성을 평가하였다.

결 과

구피에서 약욕투여에 따른 급성독성 평가

구피에서 OA, NEO-OTC 및 FF 약욕투여에 따른 급성독성을 표준품으로 평가한 결과는 Table 1과

같다. 96시간 동안 oxolinic acid에 노출된 구피는 최고 평가농도인 1,000 mg/L에서도 모든 개체가 생존하였다. 반면 sodium oxolate에 노출된 구피는 100 mg/L 이하의 농도에서 모든 개체가 생존하였으나, 316 mg/L에서 20%, 1,000 mg/L에서 90% 폐사하였다. 96시간 동안 NEO-OTC에 노출된 구피는 32 mg/L 이하의 농도에서 모든 개체가 생존하였으며, 100 mg/L에서 30%, 316 mg/L 이상의 농도에서 100% 폐사하였다. 96시간 동안 FF에 노출된 구피는 316 mg/L 이하의 농도에서 모든 개체가 생존하였으며, 1,000 mg/L에서는 10%만이 폐사하였다. 구피에서 OA, NEO-OTC 및 FF의 급성독성을 상업용 제제로 평가한 결과는 Table 2와 같다. OA 및 NEO-OTC는 표준품과 유사한 독성을 보였다. OA 및 NEO-OTC는 각각 100 mg/L 및 32 mg/L 이하의 농도에서 96시간 동안 모든 개체가 생존하였으며, 1,000 mg/L 및 316 mg/L에서 모든 개체가 폐사하였다. FF는 표준품과 달리 상업용 제제에서 급성독성이 현저히 증가하였다. 96시간 동안 32 mg/L 이하의 농도에서는 모든 개체가 생존하였으

Table 3. 96h-LC₅₀ of standard antibiotics in guppy following bath administration.

Standard antibiotic	96h-LC ₅₀ (mg/L)		
	Concentration	95% confidence limits	
		Lower	Upper
OA	504.61	327.69	777.07
NEO-OTC	126.08	90.48	175.71
FF	>1,000	-	-

Table 4. 96h-LC₅₀ of commercial antibiotics in guppy following bath administration.

Commercial antibiotic	96h-LC ₅₀ (mg/L)		
	Concentration	95% confidence limits	
		Lower	Upper
OA	316.11	219.65	454.94
NEO-OTC	112.44	78.86	160.33
FF	158.53	127.58	197.00

나, 100 mg/L에서는 10% 폐사하였다. 316 mg/L 이상의 농도에서는 24시간 동안 100% 폐사하였다.

구피에서 OA, NEO-OTC 및 FF의 96h-LC₅₀은 다음과 같다(Table 3, 4). OA 표준품(sodium oxolinic acid) 및 상업용 제제의 96h-LC₅₀은 각각 504.61 mg/L 및 316.11 mg/L이었으며, 95% 신뢰한계 범위는 각각 327.69-777.07 mg/L 및 219.65-454.94 mg/L로 도출

되었다. NEO-OTC 표준품 및 상업용 제제의 96h-LC₅₀은 각각 126.08 mg/L 및 112.44 mg/L이었으며, 95% 신뢰한계 범위는 각각 90.48-175.71 mg/L 및 78.86-160.33 mg/L로 도출되었다. FF 표준품 및 상업용 제제의 96h-LC₅₀은 각각 >1,000 mg/L 및 158.53 mg/L이었으며, 상업용 제제의 95% 신뢰한계 범위는 127.58-197.00 mg/L로 도출되었다.

구피에서 *A. salmonicida* 감염에 대한 항병능 평가

구피에서 OA, NEO-OTC 및 FF 약욕투여에 따른 *A. salmonicida*증 방어 효능은 각각 50 mg/L, 100 mg/L 및 15 mg/L 농도로 2시간, 25 mg/L, 50 mg/L 및 7.5 mg/L 농도로 24시간 동안 투여하여 평가하였으며, 그 결과는 다음과 같다. 대조군은 3-4일에 사망하기 시작하여 14일간 85%-90% 폐사하였다. 대조적으로 OA 50 mg/L, NEO-OTC 100 mg/L 및 FF 15 mg/L 농도로 2시간 동안 약욕투여한 경우 유의미하게($P < 0.0001$) 폐사를 방어하였으며, relative percentage survival (RPS)는 각각 94.4%, 88.2% 및 94.4%로 측정되었다. 마찬가지로 OA 25 mg/L, NEO-OTC 50 mg/L 및 FF 7.5 mg/L 농도로 24시간 동안 약욕투여한 경우 유의미하게($P < 0.0001$) 폐사를 방어하였으며, RPS는 각각 94.4%, 100% 및 94.4%로 측정되었다(Table 5).

Table 5. Effects of commercial antibiotics on mortality of guppy artificially infected with *A. salmonicida*. n=20.

	Groups	Mortality (%)	RPS* (%)	P-value**
OA	Control	90	N.A.	N.A.
	50 mg/L, 2h	5	94.4	<0.0001
	25 mg/L, 24h	5	94.4	<0.0001
	Negative control	0	100.0	N.A.
NEO-OTC	Control	85	N.A.	N.A.
	100 mg/L, 2h	10	88.2	<0.0001
	50 mg/L, 24h	0	100.0	<0.0001
	Negative control	0	100.0	N.A.
FF	Control	90	N.A.	N.A.
	15 mg/L, 2h	5	94.4	<0.0001
	7.5 mg/L, 24h	5	94.4	<0.0001
	Negative control	0	100.0	N.A.

*Relative percentage survival (% RPS) = 1 - [mortality (%) / control mortality (%)] × 100.

**Kaplan-Meijer curves and log-rank test.

N.A., not applicable.

고 찰

어류 양식에서는 일반적으로 한번에 많은 어류에게 투여할 수 있는 경구투여가 사용되며(Black, 2000), 현재 기허가된 수산용의약품은 대부분 넙치(*Paralichthys olivaceus*), 뱀장어(*Anguilla japonica*)와 같은 양식어류에서 경구투여를 대상으로 승인되었다. 관상어류는 약용투여가 주된 투여경로이며, 열대어, 냉수어, 해수어 등 사육되는 종류가 다양하지만, 관상어류를 대상으로 평가한 수산용의약품의 연구는 매우 미비한 실정이다. 본 연구에서는 대표적인 관상어류인 구피에서 OA, NEO-OTC 및 FF의 급성독성을 96h-LC₅₀으로 평가하였으며, API 함량이 2-4%로 매우 낮은 상업용 제제와 급성독성을 비교하였다. 또한 *A. salmonicida*에 감염된 구피에서 폐사 방어를 평가하였다. 구피에서 OA, NEO-OTC 및 FF 표준품의 급성독성은 NEO-OTC, OA 및 FF 순서로, NEO-OTC의 독성이 가장 높았으며, 96h-LC₅₀은 각각 126.08 mg/L, 504.61 mg/L 및 >1,000 mg/L로 측정되었다. 반면에 상업용 제제의 96h-LC₅₀은 표준품과 비교하여 NEO-OTC는 차이를 보이지 않았고(112.44 mg/L), OA는 다소 증가하였으며(316.11 mg/L), FF는 현저히 증가하였다(158.53 mg/L). OA 및 NEO-OTC 상업용 제제는 산제로서 독성이 존재하지 않는 glucose 및 lactose hydrate가 부형제의 대부분을 차지하였고, powdered corn syrup이 소량 첨가되었다. 다만, OA 상업용 제제에서 96h-LC₅₀이 다소 증가한 것은 활성성분이 2%로 매우 낮아 사육수에 당류가 과도하게 용해된 것이 원인으로 추측된다(1,000 mg/L 농도 평가시 사육수 중 당류는 약 5%). FF 상업용 제제는 액제 형태로서 표준품과 비교하여 독성이 현저히 증가되었다(96시간 동안 표준품 및 상업용 제제가 1,000 mg/L에서 각각 10% 및 100% 폐사). 어류에서 FF의 LC₅₀은 pacu (*Piaractus mesopotamicus*)에서 1,000 mg/L 이상(48h-LC₅₀), Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) larvae에서 349.94 mg/L (96h-LC₅₀)로 급성독성이 낮은 것으로 알려져 있다(Carraschi *et al.*, 2011; Mattioli *et al.*, 2020). 본 연구에서도 표준품의 96h-LC₅₀은 1,000 mg/L 이상으로 측정되었다. 항생제를 용해하기 위하여 사용된 계

면활성제와 같은 용매는 어류나 아가미세포에 독성을 유발한다(Na and Hong, 1998; Tanneberger *et al.*, 2010; Sandbacka *et al.*, 2000; Levet *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2017). FF 상업용 제제에 사용된 용매는 propylene glycol이 함량의 대부분을 차지하며, N-methylpyrrolidone, polysorbate 80 및 butylated hydroxy toluene이 소량 첨가되었다. 수생생물에 대한 propylene glycol의 독성은 순수한 물질보다 공기방빙 및 제빙액으로 상용화된 제제에서 독성이 상승된다고 알려져 있다(Kent *et al.*, 1999). 물벼룩(*Ceriodaphnia dubia*) 및 어류(*Pimephales promelas*)에서 propylene glycol 표준품의 LC₅₀은 각각 18,340 mg/L (48h-LC₅₀) 및 55,770 mg/L (96h-LC₅₀)으로 측정되었지만, 상업용 제제의 LC₅₀은 각각 1,020 mg/L (48h-LC₅₀) 및 710 mg/L (96h-LC₅₀)으로 현저히 증가하였다(Pillard, 1995). FF 상업용 제제에서의 현저한 급성독성의 증가는 아마도 상업용 제제에 함유된 유기용매나 용해보조제가 독성을 강화시키는 것으로 추측된다.

수생생물에서 OTC 및 NEO의 급성독성은 시험생물, 성장 단계, 환경에 따라 매우 상이하다. OTC의 급성독성은 미세조류에서 0.207-11.18 mg/L (EC₅₀), Nile tilapia larvae에서 3.45 mg/L (LC₅₀), zebrafish 배아에서 127.6 mg/L (EC₅₀)로 보고되었으며, 갑각류와 어류 성체에서는 비교적 안전하여 알테미아에서 806 mg/L (LC₅₀), catfish에서 663.8 mg/L (LC₅₀), zebrafish에서 시험 최고농도인 900 mg/L 까지도 폐사하지 않는다고 보고되었다(Lützhøft *et al.*, 1998; Ferreira *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2013; Pandit *et al.*, 2020; Takeshita *et al.*, 2022). NEO의 급성독성은 *Moina macrocopa*, *Daphnia magna*에서 22.9-56.0 mg/L (48h-EC₅₀), 어류(juvenile *Oryzias latipes*)에서 40일간 노출시켰을 때 성장 무영향농도 및 무영향농도는 각각 11 mg/L 및 0.87 mg/L로 보고되었다(Park and Choi, 2008; Lee *et al.*, 2021). Juvenile *Oryzias latipes* (10-14 days post-hatching)에서 NEO 및 OTC의 독성을 비교하였을 때 96h-LC₅₀이 각각 80.8 mg/L 및 110.1 mg/L으로 유사하였다. 불행하게도 어류에서 NEO-OTC 병용투여로 인한 독성 변화는 보고된 바가 없으며, 본 연구에서도 NEO 및 OTC의 개별적인 독성은 평가하지 않았기 때문

에 병용투여로 인한 독성의 변화는 알지 못하였다. 본 연구에서 NEO-OTC 복합제의 96h-LC₅₀은 126.08 mg/L로 측정되었으나, 24시간 동안 316 mg/L 이하의 농도에서는 폐사한 개체가 발견되지 않았다. NEO-OTC의 독성은 생물종과 환경에 따라 상이하지만, 72시간 이상의 장기간 약욕은 예상하지 못한 독성을 가져올 수 있으며, 특히 자치어기와 같은 단계에서의 투여는 주의해야 할 것으로 생각된다. OA는 일반적으로 물에 대한 용해도가 3.2 mg/L (20°C)로 매우 낮으며, LC₅₀은 10 mg/L 이상으로 알려져 있다. 본 연구에서도 oxolinic acid를 1,000 mg/L 농도로 투여하였을 때는 96시간 동안 모든 구피가 생존하였다. 그러나 수산용의약품으로 사용되는 OA는 sodium염 형태로 사용되며, 316 mg/L 이상의 농도에서 구피가 폐사하기 시작하였다. 특히 모든 폐사는 OA가 용출되기 전인 24시간 동안 발생하였다. 일반적으로 어류에서 OA는 200 mg/L 이하로 사용되지만(Samuelsen, 1997; Noga, 2010; Samuelsen, 2003), 용해도가 낮은 의약품에서 염의 형태에 따른 용해도의 차이는 약욕투여에서의 시간, 독성, 효능에 중요한 요인으로 고려해야 할 것이다.

OA, NEO-OTC 및 FF는 모두 양식어류에서 에로모나스병 치료를 목적으로, 경구투여 혹은 약욕투여로 흔히 사용된다. OA는 old quinolone 계열의 항생제로서 Gram 음성균에 효과적이며, 약욕투여 시 일반적으로 25 mg/L로 단시간(15분), 3-200 mg/L로 장시간(8-72시간) 사용된다(Barry *et al.*, 1984; Samuelsen, 1997; Noga, 2010). NEO는 aminoglycoside 계열의 항생제로서 mycobacteria에 효과적이기 때문에 결핵 치료에 사용되었다(Waksman and Lechevalier, 1949). 또한 호기성 조건의 Gram 음성균에 효과적이며, OTC와 병용투여 시 각각의 상이한 항균범위를 보완할 뿐 아니라 2배 이상으로 효능이 상승되어 광범위하게 적용할 수 있다(Williams, 1971; Williams, 1985). 특히 NEO-OTC는 현재 NEO 2 : OTC 3의 비율만이 승인되어 있으나 과거 1 : 1의 비율이 승인되어 사용되었다(NFRDI, 2008). FF는 chloramphenicol 계열의 항생제로서 thiamphenicol의 불소화 유도체로 Gram 음성, 일부 혐기성 박테리아에 작용하여 광범위한 항균

작용을 보인다(Ehrlich *et al.*, 1947; Fukui *et al.*, 1987; Dowling, 2013). 일반적으로는 경구투여로 사용되거나 약욕투여에 따른 약동학, 잔류, 에로모나스병 치료 효능 등이 보고되었다(Junior *et al.*, 2021; Shiroma *et al.*, 2021). 본 연구에서는 에로모나스병 치료에 흔히 사용되는 OA, NEO-OTC 및 FF를 관상어류에서 약욕투여로 사용하기 위하여 용량 및 노출 시간에 따른 효능을 평가하였다. 투여 용량은 급성독성 평가 결과 24시간 동안 폐사가 발생하지 않은 용량을 기준으로, 즉 OA는 100 mg/L 이하, NEO-OTC는 316 mg/L 이하, FF는 32 mg/L 이하로 설정하였다. OA, NEO-OTC 및 FF는 각각 50 mg/L, 100 mg/L 및 15 mg/L 농도로 2시간, 25 mg/L, 50 mg/L 및 7.5 mg/L 농도로 24시간 약욕투여하여 폐사 방어를 평가하였다. 그 결과 모든 용량과 시간에서 현저한 폐사 방어 효능을 보였다 ($P < 0.0001$). 이 결과는 OA, NEO-OTC 및 FF가 관상어에서 약욕투여로 에로모나스병을 효과적으로 방어할 수 있음을 보여주며, 낮은 농도의 항생제를 포함한 액상제제가 부분적으로 독성을 증가시키는 하지만 효과적으로 관상어의 질병을 치료하기에는 문제가 없음을 의미한다.

요 약

본 연구는 구피(*Poecilia reticulata*)에서 oxolinic acid (OA), neomycin-oxytetracycline 복합제(NEO-OTC) 및 florfenicol (FF)의 급성독성을 96시간 동안 약욕투여하여 96h-LC₅₀으로 평가하였다. 또한 활성성분 함량이 2-4%로 낮은 상업용 제제의 급성독성을 평가하여 표준품과 비교하고, 에로모나스병에 대한 치료 효능을 평가하였다. 구피에서의 급성독성은 NEO-OTC가 126.08 mg/L로 가장 높았다. OA는 염의 형태에 따라서 급성독성의 결과가 크게 상이하였다. Oxolinic acid 형태는 최고 농도인 1,000 mg/L에서도 모든 개체가 생존한 반면, 수산용의약품으로 사용되는 sodium염 형태는 96h-LC₅₀이 504.61 mg/L로 도출되었다. 특히 모든 폐사는 OA가 용출되기 전인 24시간 이내에 발생하였다. FF의 급성독성은 매우 낮아 96h-LC₅₀이 1,000 mg/L 이상으로 도출되었다. 본 연구에서 평가한 OA 및

NEO-OTC 상업용 제제는 산제 형태로, FF 상업용 제제는 액제 형태로 사용되었다. 부형제는 산제의 경우 glucose 및 lactose hydrate가 함량의 대부분을 차지하며, powdered corn syrup이 소량 첨가되었다. 액제의 경우 propylene glycol이 함량의 대부분을 차지하며, *N*-methylpyrrolidone, polysorbate 80, butylated hydroxy toluene이 소량 첨가되었다. OA 및 NEO-OTC 상업용 제제의 급성독성은 표준품과 큰 차이를 보이지 않았지만, FF 상업용 제제는 현저하게 급성독성이 증가하였고, 그 이유는 아마도 상업용 제제에 함유된 유기용매나 용해보조제가 독성을 강화시키는 것으로 추측된다. OA, NEO-OTC 및 FF 약육투여는 단시간(2시간) 약육투여시 각각 50 mg/L, 100 mg/L 및 15 mg/L 농도로, 장시간(24시간) 약육투여시 각각 25 mg/L, 50 mg/L 및 7.5 mg/L 농도로 에로모나스병을 유의미하게 방어하였다. 이 결과는 급성독성이 발견되지 않는 용량 범위에서 에로모나스병 치료를 위한 용량 및 시간을 제시하였으며, 낮은 농도의 항생제를 포함한 액상제제가 부분적으로 독성을 증가시키기는 하지만 효과적으로 관상어의 질병을 치료하기에는 문제가 없음을 의미한다.

References

- Abrantes, C. G., Duarte, D. and Reis, C. P.: An overview of pharmaceutical excipients: safe or not safe?. *Journal of pharmaceutical sciences*, 105(7), 2019-2026, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.03.019>
- Barry, A. L., Jones, R. N., Thornsberrry, C., Ayers, L. W., Gerlach, E. H. and Sommers, H. M.: Antibacterial activities of ciprofloxacin, norfloxacin, oxolinic acid, cinoxacin, and nalidixic acid. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 25(5), 633-637, 1984. <https://doi.org/10.1128/aac.25.5.633>
- Black, M. C.: Routes of administration for chemical agents. In *The laboratory fish*. Academic Press, 2000. <https://doi.org/10.1016/B978-012529650-2/50040-8>
- Carraschi, S. P., Shiohiri, N. S., Venturini, F. P., da Cruz, C., Gírio, A. C. F. and Machado Neto, J. G.: Acute Toxicity and Environmental Risk of Oxytetracycline and Florfenicol Antibiotics to Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Boletim do Instituto de Pesca Sao Paulo*, 37(2), 115-122, 2011.
- Dowling, P. M.: Chloramphenicol, thiamphenicol, and florfenicol. *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*, 269-277, 2013. <https://doi.org/10.1002/9781118675014.ch16>
- Ehrlich, J., Bartz, Q. R., Smith, R. M., Joslyn, D. A. and Burkholder, P. R.: Chloromycetin, a new antibiotic from a soil actinomycete. *Science*, 106(2757), 417-417, 1947. <https://doi.org/10.1126/science.106.2757.417>
- Fathima, N., Mamatha, T., Qureshi, H. K., Anitha, N. and Rao, J. V. Drug-excipient interaction and its importance in dosage form development. *Journal of applied pharmaceutical science*, 1(6), 66-71, 2011.
- Fukui, H., Fujihara, Y. and Kano, T.: *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of florfenicol, a new fluorinated analog of thiamphenicol, against fish pathogens. *Fish Pathology*, 22(4), 201-207, 1987. <https://doi.org/10.3147/jsfp.22.201>
- Gavatur, R., Vernuri, N. M. and Chrzan, Z.: Use of Isothermal Microcalorimetry in Pharmaceutical Preformulation Studies Part III. Evaluation of excipient compatibility of a new chemical entity. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 78(1), 2004. <https://doi.org/10.1023/B:JTAN.0000042154.13588.19>
- Ferreira, C. S. G., Nunes, B. A., de Melo Henriques-Almeida, J. M. and Guilhermino, L.: Acute toxicity of oxytetracycline and florfenicol to the microalgae *Tetraselmis chuii* and to the crustacean *Artemia parthenogenetica*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 67(3), 452-458, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.10.006>
- Huh, M. D. and Jeong, H. D.: The histological structure and the pathological lesions of gill in teleosts. *Korean Journal of Fish Pathology*, 6(1), 65-70, 1993.
- Junior, G. B., de Souza, C. F., da Silva, H. N., Bianchini, A. E., Rodrigues, P., da Costa, S. T., Heinzmann, B. M., Cargnelutti, J. F. and Baldisserotto, B.: Combined effect of florfenicol with linalool via bath in combating *Aeromonas hydrophila* infection in silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Aquaculture*, 545, 737247, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737247>
- Kedzierewicz, F., Zinutti, C., Hoffman, M. and Maincent, P.: Bioavailability study of tolbutamide β -cyclodextrin inclusion compounds, solid dispersions and bulk powder. *International journal of pharmaceuticals*, 94(1-3), 69-74, 1993. <https://doi.org/10.1016/>

- 0378-5173(93)90010-D
- Kent, R. A., Andersen, D., Caux, P. Y. and Teed, S.: Canadian water quality guidelines for glycols – An ecotoxicological review of glycols and associated aircraft anti-icing and deicing fluids. *Environmental Toxicology: An International Journal*, 14(5), 481-522, 1999. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-7278\(199912\)14:5<481::AID-TOX5>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-7278(199912)14:5<481::AID-TOX5>3.0.CO;2-8)
- Lee, J. Y., Kang, Y. J. and Kim, H.: The Verify of Environmental Toxicity of Foam Extinguishing Agents by Fish-Acute Toxicity Test. *Journal of the Korean Society of Safety*, 30(4), 51-55, 2015. <https://doi.org/10.14346/JKOSOS.2015.30.4.51>
- Lee, S., Kim, C., Liu, X., Lee, S., Kho, Y., Kim, W. K., Kim, P. and Choi, K.: Ecological risk assessment of amoxicillin, enrofloxacin, and neomycin: are their current levels in the freshwater environment safe?. *Toxics*, 9(8), 196, 2021. <https://doi.org/10.3390/toxics9080196>
- Levet, A., Bordes, C., Clément, Y., Mignon, P., Morell, C., Chermette, H., Marote, P. and Lantéri, P. Acute aquatic toxicity of organic solvents modeled by QSARs. *Journal of molecular modeling*, 22, 1-14, 2016. <https://doi.org/10.1007/s00894-016-3156-0>
- Lützhøft, H. C. H., Halling-Sørensen, B. and Jørgensen, S. E.: Algal toxicity of antibacterial agents applied in Danish fish farming. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 36, 1-6, 1999. <https://doi.org/10.1007/s002449900435>
- Mattioli, C. C., Chiste, B. M., Takeshita, N. A., Jonsson, C. M., Ferracini, V. L. and Hisano, H.: Acute Toxicity and Risk Assessment of Florfenicol for Nile Tilapia Larvae. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 105, 721-727, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00128-020-03013-6>
- Na, Y. K. and Hong, H. S.: The Tissue Injury and Repair by Antibiotics Intramuscular Injection following mixed with Saline and Distilled Water in Rat. *Kyunpook University Medical Journal*, 39(1), 103-111, 1998.
- Noga, E. J.: fish diseases-diagnosis and treatment, 2nd ed., John Wiley and Sons Publications, Ames, Iowa, USA, 2010.
- Samuelsen, O. B.: Efficacy of bath-administered flumequine and oxolinic acid in the treatment of vibriosis in small Atlantic halibut. *Journal of Aquatic Animal Health*, 9(2), 127-131, 1997. [https://doi.org/10.1577/1548-8667\(1997\)009<0127:E0BFAFA>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8667(1997)009<0127:E0BFAFA>2.3.CO;2)
- Oliveira, R., McDonough, S., Ladewig, J. C., Soares, A. M., Nogueira, A. J. and Domingues, I.: Effects of oxytetracycline and amoxicillin on development and biomarkers activities of zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental toxicology and pharmacology*, 36(3), 903-912, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.07.019>
- Pandit, D. N. and Priya, K.: Assessment of Toxic Nature and Safe dose of Oxytetracycline and Garlic to an Indian Air-breathing Catfish, *Clarias batrachus* (Linnaeus). *Ind. J. Pure App. Biosci*, 8(2), 33-37, 2020. <http://dx.doi.org/10.18782/2582-2845.8019>
- Pillard, D. A.: Comparative toxicity of formulated glycol deicers and pure ethylene and propylene glycol to *Ceriodaphnia dubia* and *Pimephales promelas*. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 14(2), 311-315, 1995. <https://doi.org/10.1002/etc.5620140217>
- Park, S. and Choi, K.: Hazard assessment of commonly used agricultural antibiotics on aquatic ecosystems. *Ecotoxicology*, 17, 526-538, 2008. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0209-x>
- Richards, R. M. E., Xing, J. Z. and Mackay, K. M.: Excipient interaction with cetylpyridinium chloride activity in tablet based lozenges. *Pharmaceutical research*, 13, 1258-1264, 1996. <https://doi.org/10.1023/A:1016084824877>
- Samuelsen, O. B.: Administration of the antibacterial agents flumequine and oxolinic acid to small turbot (*Scophthalmus maximus* L.) by bath. *Journal of Applied Ichthyology*, 19(1), 55-58, 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0426.2003.00352.x>
- Sandbacka, M., Christianson, I. and Isomaa, B.: The acute toxicity of surfactants on fish cells, *Daphnia magna* and fish – a comparative study. *Toxicology in vitro*, 14(1), 61-68, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0887-2333\(99\)00083-1](https://doi.org/10.1016/S0887-2333(99)00083-1)
- Shiroma, L. S., Bottoli, C. B. G., Jonsson, C. M. and Queiroz, S. C.: Exposure of tilapia (*Oreochromis niloticus*) to the antibiotic florfenicol in water: determination of the bioconcentration factor and the withdrawal period. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 39026-39034, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-13327-5>
- Sun, H., Yang, R., Wang, J., Yang, X., Tu, J., Xie, L., Li, C., Lao, Q. and Sun, C. Component-based biocompatibility and safety evaluation of polysorbate 80. *RSC advances*, 7(25), 15127-15138, 2017. <https://doi.org/10.1039/c6ra27242h>
- Takeshita, N. A., Chiste, B. M., Jonsson, C. M., Mattioli, C. C. and Hisano, H.: Acute toxicity, risk assessment

- and exposure of Nile tilapia larvae after stress to sub-lethal concentrations of oxytetracycline, *Research square*, 2022. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1930839/v1>
- Tanneberger, K., Rico-Rico, A., Kramer, N. I., Busser, F. J., Hermens, J. L. and Schirmer, K.: Effects of solvents and dosing procedure on chemical toxicity in cell-based in vitro assays. *Environmental science and technology*, 44(12), 4775-4781, 2010. <https://doi.org/10.1021/es100045y>
- Waksman, S. A. and Lechevalier, H. A.: Neomycin, a new antibiotic active against streptomycin-resistant bacteria, including tuberculosis organisms. *Science*, 109(2830), 305-307, 1949. <https://doi.org/10.1126/science.109.2830.305>
- Williams, B. J.: Factors which influence synergism by neomycin and oxytetracycline. *Applied microbiology*, 21(4), 668-672, 1971. <https://doi.org/10.1128/am.21.4.668-672.1971>
- Williams, B. J.: The effects of neomycin and oxytetracycline alone or combined upon the incidence of salmonellosis in broiler chickens. *Poultry Science*, 64(8), 1455-1457, 1985. <https://doi.org/10.3382/ps.0641455>
- NIQS (National Fisheries Products Quality Management Service), 수산용의약품 제품 요약 해설집, 32, 2022.
- NFRDI (National Fisheries Research and Development Institute), 수산용 의약품 사용안내, 2008.

Manuscript Received : Nov 20 2023

Revised : Dec 08 2023

Accepted : Dec 14 2023