

유카추출물과 didecyldimethylammonium chloride를 주성분으로 하는 살균소독제 아쿠아 팜세이프의 어류병원체에 대한 살균 효과

서정수 · 전은지 · 황지연 · 정승희 · 박명애* · 이성민** · 이은혜†

국립수산물품질관리원 병리연구과, *수산물방역과, **우성양행

Biocidal effect to fish pathogens of Aqua farmsafe[®] composed of yucca extract and didecyldimethylammonium chloride

Jung Soo Seo, Eun Ji Jeon, Jee Youn Hwang, Sung Hee Jung, Myoung Ae Park*,
Sung Min Lee**, Eun Hye Lee†

Pathology Division, National Fisheries Research & Development Institute (NFRDI), Busan 619-705, Korea

*Aquatic Life Disease Control Division, NFRDI, Busan 619-705, Korea

**Woosung Co. Ltd, Daejeon Korea

In this study, the disinfectant efficacy of Aqua farmsafe[®], composed of didecyldimethylammonium chloride (DDAC) and yucca extract was evaluated against *Salmonella typhimurium* and fish pathogens. Determination of the anti-microbial or anti-viral efficacy of the disinfectant was based on Animal, Plant and Fisheries Quarantine and Inspection Agency Regulation No. 2011-26, Korea. Anti-bacterial efficacy test by broth dilution method was used to determine the lowest effective dilution of the disinfectant following exposure to test bacteria for 30 min at 4°C. Aqua farmsafe and test bacteria or virus were diluted with distilled water (DW), standard hard water (SW) or organic matter dilution (OM) according to treatment condition. Under the our results, disinfectant efficacy of Aqua farmsafe[®] possesses 30~40 fold against fish pathogens including bacteria and virus compared to that on animal pathogenic bacteria, *S. typhimurim*. As the efficacy of Aqua farmsafe[®] against fish pathogen was investigated *in vitro*, a controlled field trial is required to determine whether the use of Aqua farmsafe[®] will be able to reduce fish diseases.

Key words : didecyldimethylammonium chloride, yucca extract, disinfectant, anti-bacterial efficacy test, anti-viral efficacy test

수산양식산업의 발달과 연안의 오염으로 한층 증가되고 있는 어류 질병문제는 우리나라 수산업이 직면한 주요 현안문제 중 하나이다. 이러한 질병은 양식생물의 누적 폐사로 인한 직접적인 경제적 피해와

더불어 수산용 약제의 사용 증가와 관리 인력 비용 증가 등 제반 생산비용을 증가시켜 수산생물 생산성을 저하시킴으로서 심각한 경제적 피해를 유발하고 있다. 최근 질병의 발생 후 항생제를 이용한 치료보다 질병예방 및 차단에 관심이 높아지면서 양식현장에서 다양한 소독제의 사용이 증가하고 있는 실정이다 (박 등, 2008).

†Corresponding Author : Eun Hye Lee, PhD

Pathology Division, NFRDI, South Korea

Tel.: +82-51-720-2493; Fax.: 82-52-720-2498

E-mail: lehyaho@daum.net

국내에서 허가된 양식장용 소독제는 11종 17개 제품 (2011 수산용의약품 제품요약해설집) 이며 대부분이 화학제제를 기반으로 하여 품목허가 후 판매되고 있는 실정이다.

수산용으로 품목허가 신청 중인 살균소독제 ‘아쿠아 팜세이프 (Aqua farmsafe®)’는 양이온 암모니움 화합물인 didecyltrimethylammonium chloride (DDAC) 와 유카추출물(Yucca extract)을 주요성분으로 하는 살균 및 살바이러스 소독제로서, 어류 양식장에 상재하는 병원성 세균, 바이러스등의 살균소독, 그리고 운반용 차량등의 살균 및 소독을 목적으로 생산된 제품이다.

DDAC는 4급 암모늄으로 세균의 세포벽에 빠르게 흡수하여 강한 살균력을 지니는 물질로 알려져 있다 (Ioannou *et al.*, 2007). DDAC는 산업현장 및 농업현장, 병원, 축사 및 실생활에서 광범위하게 사용되는 물질이다 (Gosselin *et al.*, 1984; Henderson, 1992). 유카추출물은 용설란과에 속하는 식물인 *Yucca schidigera*로부터 추출한 천연물질로 항진균 및 항균활성이 뛰어난 물질로 알려져 있다 (길 등, 1994). 또한, 유카추출물은 어류 및 새우양식장의 암모니아 오염 저감 및 양식생 산력을 증진시키는 능력을 가졌다고 알려져 있다 (Santacruz-Reyes and Chien, 2012; Tidwell *et al.*, 1992).

본 연구에서는 DDAC 및 유카추출물을 기반으로 만들어진 아쿠아 팜세이프®를 농림수산검역검사본부 고시 2011-26호, 소독제 효력시험지침에 기초하여 아쿠아 팜세이프의 소독효력능을 확인하고자 수행하였다.

재료 및 방법

대상 균종 및 균주

표준균주인 *Salmonella typhimurium* ATCC 14028

은 ATCC로부터 분양받아 사용하였으며, 넘치로부터 분리하여 국립수산물학원 병리연구과에 보관중인 세균 4종 *Edwardsiella tarda* KCTC 11145BP (1주), *Vibrio harveyi* KCCM 40866 (1주), *Streptococcus iniae* KCTC11634BP (1주), *Streptococcus parauberis* KCTC11980BP (1주) 및 어류바이러스 1종 Viral hemorrhagic septicemia virus KCTC12153BP을 대상으로 본 연구에 사용하였다. 또한, 본 실험에 사용된 세균의 농도는 1×10^8 CFU/ml 이상이 되도록 하여 사용하였으며, 바이러스의 경우는 대조군의 바이러스 감염량에 비하여 소독제 처리군의 바이러스 감염량이 $10^{4.0}$ TCID₅₀/ml 이상 사멸 또는 불활화가 인정되는 희석농도로 이용하였다.

소독제 제조

국내에서 품목허가를 받기위해 제조된 아쿠아 팜세이프® ((주)우성양행, 한국)는 용량 1L에 didecyltrimethylammonium chloride (DDAC) 50 g, 유카추출물 (Yucca extract) 및 ethanol로 구성되어 있으며, 소독제는 실온의 어두운 곳에서 보관하였으며, 사용시 희석 및 사용법은 농림수산검역검사본부 고시 2011-26호, 소독제 효력시험지침에 따라 수행하였다.

소독제 희석액 준비

소독제 희석액은 소독제 효력지침에 따라 다양한 희석액을 제작하였다. 간단히 설명하면 경수 (SW)는 증류수 (DW) 1L에 CaCl₂ 0.305g과 MgCl₂ · 6H₂O 0.139g (w/v)를 녹여 제조한 후, 고압멸균 (121℃, 15분)하여 4℃에 보관하며 사용하였다. 유기물 (OM) 희석액은 세균 검사용일 경우는 효모추출물 (yeast extract) 20%가 함유되도록 경수에 용해한 다음 고압멸균 (121℃, 15분)하여 4℃에 보관하면서, 사용 시에는 경수로 4배 희석하여 효모추출물 5% 함량의 유기

물 희석액으로 만들되, 1N 수산화나트륨 (NaOH)으로 pH 7.0이 되도록 조정하였다. 바이러스의 경우는 1% (v/v) 소태아혈청 (fetal bovine serum; FBS)을 함유하도록 멸균된 경수에 용해하여 사용하였다.

소독제 처리 과정

소독효력평가를 위하여 소독대상 병원체를 함유한 증류수 희석액 (DW), 경수 (SW) 희석액 또는 유기물 (OM) 희석액을 동량의 소독제를 함유한 증류수, 경수 희석액 및 유기물 희석액과 각각 동량 혼합한 후, 4°C에서 30분간 처리하여 Table 1과 같은 조건하에서 소독제 효력을 평가하였다.

간단히 설명하면, 공시 균주인 *S. typhimurium*에 대한 희석은 DW 조건의 경우는 증류수에 각각 1/40부터 단계 희석비율로, SW 조건의 경우는 경수에 각각 1/50부터 단계 희석비율로, OM 조건의 경우는 세균용 5% 유기물 희석액에 각각 1/10부터 단계 희석 비율로 소독제를 혼합하였다. 주요 어병세균인 4종 (*E. tarda*, *V. harveyi*, *S. iniae*, *S. parauberis*)에 대하여서는 DW에 각각 1/2,400부터 단계 희석비율로, SW조건의 경우는 경수에 각각 1/1,800부터 단계 희석비율로, OM 조건의 경우는 세균용 5% 유기물 희석액에 각각 1/600부

터 단계 희석 비율로 소독제를 혼합하였다. 주요 어병 바이러스인 Viral hemorrhagic septicemia virus에 대하여서는 증류수 및 경수 조건의 경우는 1/2,700부터 단계 희석비율로 유기물 조건의 경우는 1/1,300부터 단계 희석비율로 소독제를 혼합하였다. 각 반응 (4°C, 30분)이 끝난 후, 소독제를 중화한 후, 각 소독제 희석 별로 5개의 영양배지에서 배양하여 2일 동안 세균 증식여부를 판별하거나, 바이러스의 경우는 미리 96 well에 키워둔 EPC 주화세포에 3 반복씩 접종하여 5일 동안 세포내의 세포변성효과 여부를 판정하여 유효희석배수로 결정하였다. 세균의 증식여부 판정 및 소독제의 유효희석배수 결정은 5개의 동일 소독제 희석배수의 배지에서 2개 이상 증식이 인정되지 않는 최종 소독희석단계를 유효희석배수로 하며, 최종 유효희석배수는 20%의 오차범위내의 3회 반복 실험결과와 중위수 (median)로 하였다. 바이러스의 경우는 대조군의 바이러스 감염량에 비하여 소독제 처리군의 바이러스 감염량이 $10^{4.0}$ TCID₅₀/ml 이상 사멸 또는 불활화가 인정되는 희석농도를 유효농도로 하고, 최종 유효희석배수는 3반복 실험결과와 중위수로 하였다.

Table 1. Experimental design for the determination of the biocidal efficacy of aqua farmsafe

Treatment condition	Contents according to treatment condition ^a				
	DW	SW	OM	Disinfectant	Pathogen
Distilled water (DW) condition	+	-	-	+	+
Standard hard water (SW) condition	-	+	-	+	+
Organic matter (OM) condition	-	+	+	+	+
Bacteria control	-	+	-	-	+
DW control	+	-	-	-	+

^a: +, presence; -, absence

결 과

공시균주, 어병세균 4종에 대하여 5회 반복실험을 통해 분석한 유효 희석 농도별 소독 효과는 Fig. 1에서 나타내었다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 축산에서 주요한 질병 병원체인 살모넬라균 (*S. typhimurium*)을 표준 균주로 정하여 아쿠아 팜세이프의 유효희석농도는 증류수에서는 평균 60배, 경수조건하에서는 평균 70배, 유기물조건하에서는 평균 40배로 나타났다. 주요 어병세균 4종을 대상으로 측정하였을시에는 증류수 (DW) 조건하에서는 2,000 ~ 3,600배로, 경수 (SW) 조건하에서는 2,200 ~ 3,000배로, 유기물하에서는 *E. tarda*, *V. harveyi*, *S. iniae*는 1,800배, *S. parauberis*는 800배 유효희석농도에서 소독효과가 나타났다.

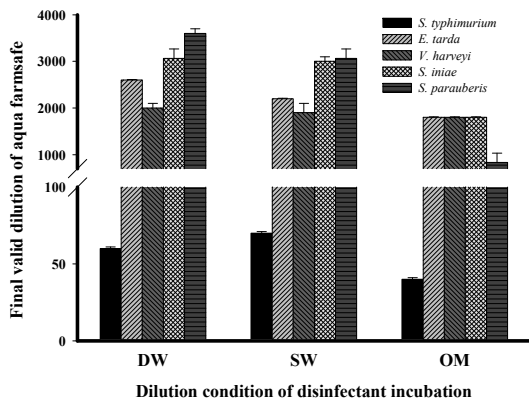


Fig. 1. Antibacterial efficacy of aqua farmsafe solution against *Salmonella typhimurium* and fish bacteria
Abbreviation; DW, distilled water; SW, standard hard water; OM, organic matter

주요 어병바이러스인 바이러스성 출혈성 패혈증 (VHSV)에 대한 아쿠아 팜세이프의 소독효과를 조사하였다. 증류수, 경수 및 유기물 조건하에서 VHSV에 대하여 소독 효과는 증류수에서는 3,600배, 경수는 3,300배, 유기물하에서는 2,000배로 나타났다 (Fig. 2).

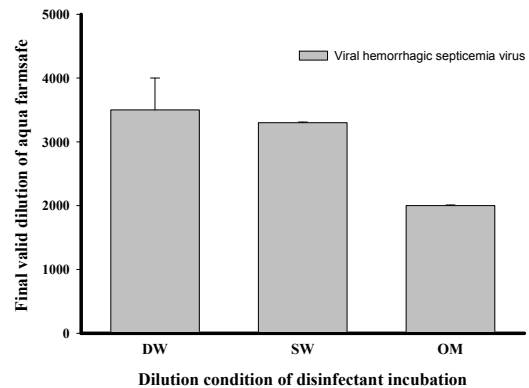


Fig. 2. Antiviral efficacy of aqua farmsafe solution against viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV)
Abbreviation; DW, distilled water; SW, standard hard water; OM, organic matter

고 찰

본 연구에서 아쿠아 팜세이프®는 어류 양식장의 방역 및 질병차단을 위한 소독제로서 사용하기 위해 개발되었다. 아쿠아 팜세이프®의 주요성분인 DDAC는 의약분야, 식품산업 및 환경산업 분야에 걸쳐 효과적인 소독제로서 이용되고 있으며 (Gosselin *et al.*, 1984; Henderson, 1992), 유가 추출물의 경우는 식음료, 환경 방부제 및 다양한 산업현장에서 이용되고 있다 (Irish G, 2000).

공시균주인 *S. typhimurium*은 돼지축사, 소 및 인체의 식중독 질병을 일으키는 주요한 세균으로 알려져 있다 (Katsuda *et al.*, 2006; Sharan *et al.*, 2011). 공시균주를 이용하여 5회 반복실험을 통하여 아쿠아 팜세이프의 유효농도별 소독 희석효과를 측정하였을시에 증류수에서는 60배, 경수는 70배, 유기물하에서는 40배로 나타났다. 그에 반해, 양식어류의 주요 어류 질병 병원체인 4종에 대하여 5회 반복실험을 통해 분석한 유효 희석 농도별 소독 효과는 병원체별로 약간의 상이한 점이 나타나, 대체적으로 공시균주

에 비하여 30~40배 이상 높은 희석농도에서 소독효과를 나타내었으므로 그만큼 어병세균에 대한 소독효능이 더 좋은 것으로 보아진다. 이는 공시균주인 경우는 37°C 배양조건에 따라 수행하였으나, 어병세균의 경우는 25°C의 적정 배양조건에 의한 실험결과에 따라 차이가 나는 것으로 보아진다. 이런 점은 최근에 품목허가 받은 수산용 소독제의 경우 일반세균에 대한 희석배수보다 어병세균에 대한 희석배수가 보통 10배 이상 차이가 남에서 알 수 있다 (2011 수산용의약품 제품해설집). 일반적으로 소독제는 세균에 대한 소독 효과가 증류수, 경수, 유기물 조건으로 갈수록 희석 농도가 높아지는 이유는 경수 및 유기물내의 성분들이 소독효과를 방해하는 것으로 보아진다. 또한, 병원체별로 증류수 조건하에서 소독효과를 조사하였을시에 그람음성세균인 에드워드스균과 비브리오균에 대한 소독효과는 각각 2,000배, 2,600배 유효희석농도로 나타나나, 그람양성 세균인 연쇄구균에 대한 소독효과는 각각 3,000배, 3,600배 유효희석농도로 나타나며 이러한 차이는 DDAC의 세균에 대한 기작의 차이로 보아진다 (Ioannou *et al.*, 2007).

넙치 양식현장에서 가장 큰 피해를 입히는 것으로 알려진 바이러스성 출혈성 패혈증(VHS)을 유발하는 원인체인 VHSV에 대한 소독 효과는 증류수에서는 3,600배, 경수는 3,300배, 유기물하에서는 2,000배 희석으로 나타났다 (Fig. 2). DDAC와 다른 종류의 4급 암모늄을 주성분으로 하여 가축용 소독제인 Citra-kill®의 인체 바이러스인 Avian Influenza Virus의 소독효과를 조사한 논문에서 증류수조건하에서는 2,000배로 나타난다 (Cha *et al.*, 2012). 그러나, 이러한 결과들은 유효성분의 종류 및 함량에 따라 많은 차이가 날 수 있으므로 비교하기는 힘들다고 본다. 더불어, 소독제 효력지침에 따른 실험 및 분석

방법으로 조사하였을 때의 아쿠아 팜세이프의 소독 효과는 어병세균보다 VHSV에 대하여 더 높게 나타남을 알 수 있었다.

이번 연구의 결과는 *in vitro* 실험방법에 따른 소독효과를 측정한 것으로서 실제 양식현장에서의 결과를 유추하기에는 많은 문제점을 안고 있다. 따라서, 소독제 효력지침에 따른 유기물(OM) 조건하의 실험결과를 바탕으로 하여 어류양식장, 수조, 배관, 뜰채, 그물, 물차 등에 적용할 수 있을 지에 대한 추가 연구가 필요하다고 보아지며 향후 양식현장의 야외적용시험을 통해 실제 적용에 따른 효과를 확인할 필요가 있을 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 4급 암모늄에 속하는 didecyltrimethylammonium chloride (DDAC)와 유카추출물 (Yucca extract)의 합제인 아쿠아 팜세이프®의 어류 질병 병원체에 대한 살균효과를 확인하기 위하여 농림수산검역검사본부의 소독제 효력시험 중 세균 및 바이러스 소독제 효력시험에 따라 수행하였다. 소독제와 병원체를 증류수, 경수 그리고 유기물 조건에서 반응시킨 후, 중화액을 이용하여 중화시킨 다음, 중화된 용액을 배지 및 주화세포에서 접종시켜 세균의 성장 및 세포 변성효과를 통해 소독제의 효력배수를 결정하였다. 본 연구의 결과, 아쿠아 팜세이프®는 식중독을 일으키는 공시균주 살모넬라균 (*S. typhimurim*)에 비하여, 어병세균이 30~40배 이상 높은 희석농도에서 소독효과를 나타내었으며, VHSV에 대하여서는 2,000~3,600배의 유효한 효력배수를 나타내었다. 따라서, 향후, 야외적용시험을 통해 실제 적용에 따른 효과를 확인할 필요가 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 국립수산물과학원 연구비 지원으로 수행되었습니다.

참고문헌

- Cha, C.-N., Lee, Y.-E., Kang, I.-J., Yoo, C.-Y., Park, E.K., An, S., Kim, S., and Lee, H.-J.: Antiviral Efficacy of Citra-kill[®], Disinfectant Solution Against Avian Influenza Virus. J. Fd Hyg. Safety. 27: 18~23, 2012.
- Katsuda, K., Kohmoto, M., Kawashima, K. and Tsunemitsu, H.: Frequency of enteropathogen detection in sucking and weaned pigs with diarrhea in Japan. J. Vet. Diagn. Invest. 18: 350-354, 2006.
- Sharan, R., Chhibber, S. and Reed, R.H.: A murine model to study the antibacterial effect of copper on infectivity of *Salmonella Enterica Serovar Typhimurium*. Int. J. Environ. Res. Public Health, 8: 21-36, 2011.
- Irish, G.: Agaves, Yuccas, and Related Plants: a Gardener's Guide. Timber Press. 18, 2000.
- Ioannou, C.J., Hanlon, G.W. and Denyer S.P.: Action of disinfectant quaternary ammonium compounds against *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother., 51: 296-206, 2007.
- Gosselin, R.E., Hodge, H.C. and Braddock, J.E.: Clinical Toxicology of Commercial Products. 5th Edition. Williams & Wilkins, Baltimore, MD. 1984.
- Henderson, N.D.: A review of the environmental impact and toxic affects of DDAC. Canadian Cataloguing in Publication Data, 1-45, 1992.
- Santacruz-Reys, R.A. and Chien, Y.: The potential of *Yucca schidigera* extract to reduce the ammonia pollution from shrimp farming. Biores. Tech. 113: 311-314, 2012.
- Tidwell, J.H., Webster, C.D., Clark, J.A. and Yancey, D.H.: Effects of *Yucca schidigera* extract on water quality and fish growth in recirculating-water aquaculture systems. The Prog. Fish-Culturist 54: 196-201. 1992.
- 길지용, 조남기, 김범석, 이상락, 맹원재: Yucca extract의 첨가가 사료와 축분의 in vitro 발효성상 및 젖소의 유생산성에 미치는 영향. 한국동물자원학회지, 36:698-700, 1994.
- 박경희, 김석렬, 강소영, 정성주, 오명주: 시판소독제의 넙치 *Paralichthys olivaceus*, 조피볼락 *Sebastes pachycephalus*, 감성돔 *Acanthopagus schlegelii*에 대한 독성. 한국양식학회. 21: 7-12, 2008.
- 농림수산식품부 국립수산물과학원 병리연구과: 2011 수산용의약품 제품요약 해설집.

Manuscript Received : April 08, 2013

Revised : July 17, 2013

Accepted : August 09, 2013