

오존처리법에 의한 양어용수 살균에 대하여 I. 해산어류 병원세균의 오존 감수성

오명주[†] · 김홍윤 · 조현서*

여수대학교 어병학과, *여수대학교 해양학과

해수중 잔류옥시던트(TRO) 농도를 0.1, 0.3 및 0.5 mg/liter로 조정하고 시간 경과에 따른 농도의 안정성을 관찰한 결과 0.1 mg/liter의 경우 측정 20분까지는 변화를 보이지 않았고, 0.3 및 0.5 mg/liter 에서는 1시간 경과시까지 안정하였다. 해수를 오존처리하여 해수중에 생성되는 TRO를 이용하여 해산어류 병원세균인 *Edwardsiella tarda*, *Vibrio* sp., *Streptococcus* sp., *Staphylococcus* sp.에 대한 살균효과를 실험한 결과 0.1 mg/liter에서 3분간의 처리로 99.9% 이상, 0.3~0.5 mg/liter에서는 30초에서 1분간의 반응시간으로 99.99% 이상이 살균되어졌다.

Key words : Ozonization, Disinfectant effect, Fish pathogenic Bacteria, Sea water

폐쇄된 양식수계에서 생활하는 어류는 다양한 병원체들과 함께 같은 환경에서 생존해야 함으로 항상 그들의 감염에 의한 발병 위험을 가지고 있다. 수산 양식장에서의 질병 발생은 병원체를 보유하고 있는 일부 어류로부터 기인되거나 사육수 등의 서식환경에 병원체가 유입되어 발생할 경우도 있고, 영양을 공급하기 위한 먹이로부터 오염에 의해 공급되어지기도 한다(Muroga, 1995).

양식생물의 질병에 대한 방역법으로 채란용 친어의 병원체 보유의 유무 및 병원체 감염 경력의 파악과 같은 건강상태의 조사를 위시하여, 난의 소독, 사육용수의 살균, 사육시설의 소독을 통한 병원체의 침입경로 차단방법 등을 생각할 수 있다(Watanebe and Yoshimizu, 1998).

오존 살균법은 병원 미생물을 살균시키는 효력이 탁월할 뿐 아니라 병원체의 관리 능력이 뛰어나고 저단가의 장점을 가지고 있어 식품의 보존 등에도 이용되어지고 있다(Naito, 1991). 일반적으로 세균이 오존 처리로 인해 불활성화 되어지는 요인으로는 오존 처리에 의한 세균 세포벽 및 세포막의 파괴 또는 분해, 혹은 핵산의 손상에 의한 경우가 있다(Mudd and Freeman, 1977).

오존 처리에 따른 어류 병원체의 살균 효과에

대한 연구로 Yosimizu 등(1995), Itoh 등(1996), Itoh 등(1997) 및 Watanabe and Yoshimizu(1998)의 보고가 있다. 이들 연구에서 살균효과 실험의 대상으로 삼고 있는 세균은 주로 담수산 어종의 병원균으로 해산어 양식장에서 발생되어지는 병원 세균에 대한 처리 효과의 검토가 필요하다.

본 연구는 해산어에서 분리되어지는 어류 병원 세균을 대상으로 오존 처리법에 따른 불활성화 효과를 실험실내에서 확인하여 유효한 처리농도 및 조건을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

오존발생장치

오존처리 실험장치는 공기압축기, 수분제거기, 유분제거기, 오존발생기, 접촉조 및 활성탄처리기로 구성하였다(Fig. 1). 원료 가스는 압축산소를 사용하지 않고 일반공기를 가압하여 수분 및 유분제거 장치를 통과 시킨 것을 사용하였다. 오존발생기는 무성방전식 오존발생장치(남경어드밴스사)를 사용하였다. 전 처리된 공기를 사용하여 발생시킨 오존 가스는 가스세척병중의 해수에서 분산시켜 옥시던트(oxidant)를 생성시켰다.

[†]Corresponding author

Fig. 1. Schematic illustration of seawater ozonization utilized in this study.

TRO 농도의 측정법 및 해수중 잔류옥시던트 농도의 안정성

자연해수를 0.45 um millipore filter로 여과멸균한 후 공기세척병에 넣고 오존 발생기를 거쳐서 나온 가스를 분산시키면서 0, 30초, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10분간의 반응 후 실온에서 5분간 방치시켜 수중의 오존 함유 가스가 육안적으로 관찰되지 않음을 확인한 후 수중에 생성되어진 잔류옥시던트농도(total residual oxidant, TRO)를 측정하여 오존 반응시간에 따른 처리수중 TRO 농도의 검량선을 작성하였다. 잔류옥시던트 농도의 측정은 iodometry method(Sugita *et al.*, 1992)로 행했다. 오존처리수 50 ml에 1 N의 황산을 가하여 pH를 7로 조절한 후 1% KI 용액을 2 ml 첨가하였다. 그 후 1%의 starch solution을 250 µl 가하여 발색시키고, 0.001 N Na₂S₂O₃ 용액으로 free iodine을 적정하였다. 적정은 푸른색이 없어지는 시점까지로 하였다. 얻어진 적정량은 다음 식에 의하여 잔류옥시던트농도로 계산했다.

$$\text{잔류옥시던트농도(mg/l)} = aF \times (1000/X) \times 0.024$$

a: 적정량(ml)

F: 0.001 N Na₂S₂O₃ 용액 factor

X: 해수시료(ml)

0.024: 0.001 N Na₂S₂O₃ 용액 1 ml에

오존 0.024 mg 상당.

TRO 농도가 약 0.1, 0.3, 0.5 mg/liter로 되는데 요구되는 반응시간을 산정하고 살균효과 실험에 사용할 오존처리수를 조제하였다. 각각의 농도로 조정된 해수중 잔류옥시던트 농도의 안정성을 확인

하기 위하여 시간경과에 따른 농도의 변화를 조사하였다.

세균 및 세균배양

오존 처리수의 잔류옥시던트 농도 및 반응시간에 따른 살균효과 실험을 위하여 여수 인근 넉치 양식장의 병어에서 분리하여 세균성어병신속진단메뉴얼(1994) 및 시판의 세균동정용 kit(API system) 등을 사용하여 속 단위까지 동정한 후 연구실에 보존중인 *Edwardsiella tarda*, *Vibrio* sp., *Streptococcus* sp. 및 조피볼락에서 분리한 *Staphylococcus* sp.를 배양하여 실험균으로 사용하였고, Yoshimizu 등(1995)의 *Vibrio anguillarum*(NCMB6) 및 *Streptococcus* sp.(S-538)에 대해 동일한 방법으로 행하여 처리효과를 비교하였다. 세균 배양을 위한 배지로 *Edwardsiella tarda*, *Vibrio* sp. 및 *Vibrio anguillarum*(NCMB6)은 1.5% NaCl 첨가 nutrient broth 배지, *Streptococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp.(S-538)균은 1.5% NaCl 첨가 brain heart infusion(BHI) broth 배지를 사용하였다. 각각의 세균은 접종 후 25°C에서 3일간 shaking incubation하고, 1500×g에서 20분간 원심분리하였다. 상동액을 제거하고 세균 침전물을 PBS로 현탁하여 1500×g로 20분간 재원심하여 세척하였다. 세척된 균체를 PBS로 희석하고 균수를 조정하여 실험에 사용하였다. 한편, 실험 세균의 생균수 확인을 위한 배지로서 *Edwardsiella tarda*, *Vibrio* sp. 및 *Vibrio anguillarum*(NCMB6)은 1.5% NaCl 첨가 nutrient agar plate 배지, *Streptococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp.(S-538)균은 1.5% NaCl 첨가 BHI agar plate 배지를 사용하

였다.

오존처리에 따른 살균효과

각각의 실험용세균 현탁액을 잔류옥시던트 농도가 0.1, 0.3 및 0.5 mg/liter되게 조제한 오존처리수에 1% 혼합하여 20°C에서 일정 시간동안 반응시켰다. 반응의 종료는 BHI broth로 오존처리 반응수와 1:1의 비율이 되게 처리하여 행하였다. 대조구는 오존 무처리의 여과해수에 실험용 세균을 가하여 동일한 방법으로 처리하였다. 반응을 정지시킨 후의 반응액내 생균수는 시험관 희석법에 의한 colony count법으로 확인하여 오존처리에 의해 해수중에 생성되어진 잔류옥시던트의 농도 및 반응시간에 따른 세균별 살균 효과를 비교하였다.

결과 및 고찰

해수중 잔류옥시던트 농도의 안정성

자연해수를 여과한 후 오존 가스를 분산시키고 일정시간 방치로 안정화시켜 실험에 사용할 농도의 오존처리수를 제조하는데 요구되는 반응시간을 검량선 작성을 통하여 결정하였다. 본 실험에서 사용한 오존발생기 시스템의 옥시던트 생성 범위는 0.84 mg/liter/10 min이었고, 30초에서 4분간의 처리시간으로 실험용 오존처리수(0.1~0.5 mg/liter)를 제작할 수 있었다(data not shown).

자연해수의 오존처리에 따른 수중 잔류옥시던트 농도의 안정성을 확인한 결과를 Table 1에 나타내었다.

자연해수를 0.45 µm Millipore filter로 여과한 후 오존가스를 분산시켜 수중 잔류옥시던트농도를 약 0.1, 0.3 및 0.5 mg/liter(실험group I, II 및 III)가 되게 반응시킨 후, 수중의 잔류옥시던트농도의 변화를 관찰한 결과 0.1 mg/liter group의 경우 개

시시의 농도인 0.13 mg/liter가 5분에서 20분을 경과한 후까지는 큰 변화를 보이지 않았으며, 그 후 2시간 경과 후의 수중 잔류옥시던트 농도는 초기농도의 50% 수준인 0.07 mg/liter로 점차 저하되는 경향을 보였다. 0.3 및 0.5 mg/liter 범위의 잔류옥시던트 농도 실험구에서는 시간경과에 따른 약간의 농도 감소는 나타났으나 실험 개 1시간 경과 시까지의 처리수중의 농도는 안정적으로 유지됨을 확인할 수 있었다. Itoh 등(1997)은 자연해수중의 오존처리에 따른 잔류옥시던트 농도의 안정성을 확인한 바 있는데 자연해수를 사용한 경우 0.1 mg/liter의 수중잔류옥시던트 농도가 측정 5분 이후에는 검출할 수 없는 정도의 농도로 저하되어짐을 확인하였다고 보고하고, 0.1 mg/ml 이하 농도 범위에서의 자연해수를 이용한 잔류옥시던트의 제균 효과실험이 부적합하여 인공해수를 이용한 연구의 필요성을 제안하고 있다. 하지만 본 연구에서는 0.3 및 0.5 mg/liter의 농도 범위뿐만 아니라 동일한 범위인 0.1 mg/liter의 농도범위에서도 그와 달리 자연해수를 이용하더라도 제균효과 실험에 요구되는 시간인 0-20분 범위에서의 옥시던트농도의 안정성을 확인할 수 있었다. Itoh 등의 경우 수중 옥시던트 농도의 측정 개시 점을 오존 가스 반응직후에 설정하고 있고, 해수 중에 포함되어 있을 수 있는 고형 유기물 등의 제거를 행하지 않고 측정함으로써 저농도에서의 수중 잔류옥시던트의 안정성을 확인하지 못한 것으로 판단된다.

오존처리에 따른 해산어 병원세균의 살균효과

해수를 오존처리하여 해수중 잔류옥시던트 농도에 따른 감염 해산어 유래의 *Edwardsiella tarda*, *Vibrio* sp., *Streptococcus* sp., *Staphylococcus* sp.에 대한 살균효과를 *Vibrio anguillarum*(NCMB6), *Streptococcus* sp.(S-538)와 비교하여 실험한 결과

Table 1. Stability of total residual oxidant (TRO) concentrations in ozonized sea water after 10 minute of storage at room temperature

Tested group of TROs concentration	Treatment time (minute)							
	0	5	10	20	30	60	90	120
I(0.1*)	0.13*	0.11	0.09	0.10	0.08	0.08	0.07	0.07
II(0.3)	0.34	0.34	0.30	0.32	0.30	0.30	0.28	0.25
III(0.5)	0.52	0.50	0.50	0.51	0.50	0.50	0.45	0.41

*TROs concentration, mg/liter

를 Table 2 및 Table 3에 나타내었다.

연쇄구균감염증의 증상을 나타내는 감염 넙치에서 분리한 *Streptococcus* sp.와 조피볼락의 세균성 선회병 증상어에서 분리한 *Staphylococcus* sp.에 대한 오존처리에 의해 해수중에 생성시킨 잔류옥시던트의 살균능을 0.14, 0.32, 0.53 mg/liter의 TRO 농도 조건에서 30초간 처리 단위로 실험하였다. *Streptococcus* sp.의 경우 0.5 및 0.3 mg/liter 농도군에서는 $10^{4.8}$ CFU/ml이었던 실험용균이 30초간 처리로 검출개체가 나타나지 않아 99.99% 이상의 살균율을 보인 것으로 판단된다. 0.1 mg/liter 처리조건의 경우 60초간의 처리에서 $10^{1.8}$ CFU/ml의 생균수가 검출되어 99.9% 살균 효과가 있었다. 동일한 처리조건에서의 *Staphylococcus* sp. 실험에서는 0.14 mg/liter 농도에서는 120초 처리로,

0.32, 0.53 mg/liter 농도에서는 각각 60초와 30초 처리로서 균수를 99.99% 이상 살균할 수 있었다 (Table 2). 이러한 결과는 Yoshimizu 등(1995)이 살균효과를 검정하는데 사용한 *Streptococcus* sp. 538균주를 배양하여 0.14, 0.32, 0.53 mg/liter의 잔류옥시던트 농도범위에서 얻은 60초, 30초 및 30초 처리에 의해 99.99% 이상의 제균율이 얻어진 것과 비교하여 보았을 때, 남해안 해산어류로부터 분리한 세균의 살균을 위한 TRO 처리농도 및 처리시간의 조건이 약간 높기는 하지만 99.9% 이상의 살균을 위한 조건에는 큰 차이가 없었으며, 이를 종합하여 볼 때 해산어에서 분리되어지는 그램 양성균의 구균류인 *Streptococcus* 혹은 *Staphylococcus* 균의 99.99% 이상의 살균을 위해 0.1 mg/liter의 농도조건에서는 2분, 0.3 mg/liter의 농도조건에서는

Table 2. Effects of total residual oxidant concentrations produced by ozonization on reduction rate of viable counts of Gram positive fish pathogenic bacteria

Bacteria Isolation sources Tested cell (LogCFU/ml)	TRO concentration (mg/liter)	Treatment time (second)	Reduction rate (%)
<i>Streptococcus</i> sp. Flounder, Wando 4.8	0.14	60	99.9
	0.32	30	>99.99
	0.53	30	>99.99
<i>Staphylococcus</i> sp. Rockfish, Yosu 4.3	0.14	120	>99.9
	0.32	60	>99.99
	0.53	30	>99.99
<i>Streptococcus</i> sp. 538 4.5	0.14	60	>99.9
	0.32	30	>99.99
	0.53	30	>99.99

Table 3. Effects of total residual oxidant concentrations produced by ozonization on reduction rate of viable counts of Gram negative fish pathogenic bacteria

Bacteria Isolation sources Tested cell (LogCFU/ml)	TRO concentration (mg/liter)	Treatment time (second)	Reduction rate (%)
<i>Edwardsiella tarda</i> Flounder, Yosu 4.3	0.12	180	99.8
	0.34	60	>99.99
	0.50	30	>99.99
<i>Vibrio</i> sp. Flounder, Namhae 4.0	0.12	180	99.9
	0.34	60	>99.99
	0.50	30	>99.99
<i>Vibrio</i> sp. Red seabream, Tongyoung 4.3	0.12	120	99.9
	0.34	30	>99.99
	0.50	30	>99.99
<i>Vibrio anguillarum</i> NCMB6 4.1	0.12	90	99.9
	0.34	60	>99.99
	0.50	30	>99.99

1분 그리고 0.5 mg/liter의 농도에서는 30초간의 처리가 필요한 것으로 확인되었다.

남해안 여수 연안의 해산어 가두리양식장에서 사육중에 발병한 넙치로부터 분리한 *Edwardsiella tarda*, 남해도의 넙치 종묘생산장에서 장관백탁증 증상으로 폐사되는 병어로부터 분리되어진 *Vibrio* 속 세균 및 통영 연안의 양식장에서 복부팽만증으로 폐사되어지는 참돔에서 분리되어진 *Vibrio* 속 세균을 대상으로, 그램양성균을 대상으로 행한 실험과 동일한 방법으로 잔류옥시던트의 살균효과를 확인하였다. 본 실험에 있어서의 실제 처리수중 잔류옥시던트 농도는 0.12, 0.34, 0.50 mg/liter이었고, 살균효과와 비교를 위하여 *Vibrio anguillarum* NCMB6에 대한 효과 실험도 동시에 행하였다. 넙치에서 분리된 *E. tarda* 및 장관백탁증 원인 *Vibrio*속 세균의 경우 0.5 및 0.3 mg/liter 농도군에서는 각각 $10^{4.3}$ CFU/ml 및 $10^{4.0}$ CFU/ml이었던 실험균이 30초 및 60초간의 처리에 의해 99.99% 이상의 살균율을 보였다. 또한 0.1 mg/liter 처리조건의 경우 *E. tarda*에서는 180초간의 처리에서 $10^{1.6}$ CFU/ml의 생균수가 검출되어 99.8% 살균 효과가 있었고, *Vibrio* sp.에서는 몇 개의 colony만이 나타나 99.9%의 살균효과가 있는 것으로 판정하였다. 또한 동일한 처리조건에서의 참돔 유래의 *Vibrio* sp. 실험에서는 0.12 mg/liter 농도에서는 120초 처리로 균수를 99.9%, 0.34, 0.50 mg/liter 농도에서는 모두 30초 처리로서 99.99% 이상 살균되었다(Table 3). 이러한 결과는 *V. anguillarum*을 배양하여 0.12, 0.34, 0.50 mg/liter의 잔류옥시던트 농도범위 실험을 통하여 얻은 살균효과와 유사하였다. 따라서 해산어에서 분리되어지는 그램 음성의 간균인 *Vibrio*속 세균 및 *E. tarda*의 99.99% 이상 살균을 위해 0.3 mg/liter의 농도조건에서는 1분, 0.5 mg/liter의 농도에서는 30초간의 처리가 필요한 것으로 확인되었다.

Itoh 등(1997)은 유기물을 제거한 인공해수를 사용하여 *Vibrio anguillarum* 및 3종류의 담수산 어류 유래의 *Aeromonas* 속 세균에 대한 저농도 옥시던트(0.1 mg/liter)에 의한 살균효과를 조사하여 60초간의 살균처리에 의해 99.9% 이상의 제균을 확인한 바 있다. 본 연구의 실험조건에서 그램 양성세균 및 음성세균 관계없이 그와 동일한 0.1 mg/liter 농도 범위의 살균 효과 실험을 통하여 1분에

서 3분간의 노출에 의해 99.8에서 99.9%의 살균 효과가 검정되었다. 하지만 살균율이 정점에 달한 이후의 처리시간에 따른 균수 변동에는 유의성이 나타나지 않았는데, 이것은 미량이지만 하지만 균체 및 배양액의 첨가로 인해 반응시간중의 처리수내의 잔류옥시던트 농도가 감소되어짐으로써 나타난 결과로 사용해수의 종류와 무관한 실험 조건의 한계로 생각된다.

이상의 결과로써, 해수중의 병원성 세균의 살균을 위한 오존처리 시스템을 이용하여 방역을 행하는 경우에 있어서 0.3에서 0.5 mg/liter의 농도로 1분간의 반응 조건을 유지시키는 것이 가장 이상적이며, 저농도의 처리조건(0.1 mg/liter 범위)이라 하더라도 오존발생기의 지속적인 가동에 의한 농도의 유지가 되어져 해수중의 병원체와 옥시던트와의 반응시간이 최소 3분 이상으로 설정될 수 있다면 양어용수 중의 병원세균을 관리할 수 있다고 판단된다.

사 사

이 논문은 1997년도 G-7환경공학기술개발사업 연구비에 의해 수행되었습니다. 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Itoh, S., Yoshimizu, M., Oh, M.J., Hyuuga, S., Watanabe, K., Hayakawa, Y. and Ezura, Y.: Effects of ozonized seawater on bacterial pollution and survival of cultured flounders. *Suisanzoushoku*, 44(4): 457-463, 1996.
- Itoh, S., Yoshimizu, M. and Ezura, Y.: Disinfectant effects of low level of total residual oxidants in artificial seawater on fish pathogenic microorganisms. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 63(1): 97-102, 1997.
- Mudd, J.B. and Freeman, B.A.: Biochemical effects of environmental pollutants, S.D. Lee Ed. (Ann Arbor Science Pub., Michigan), 1977.
- Muroga, K.: Viral and bacterial diseases in larval and juvenile marine fish and shellfish. *Fish Pathol.*, 30(1): 71-85, 1995.
- Naito, S.: Studies on utilization of ozone in fish preservation. *Nippon Shikuhin Koryo Gakkaishi*. 38(4): 360-367, 1991.
- Sugita, H., Hayashi, K., Asai, T., Mitsuya, T., Amanuma, K., Maruyama, C. and Deguchi, Y.: Spectrophotometric method for determination of total residual oxidants in sea water. *Suisanzoushoku*, 40: 45-50, 1992.

Watanebe, K. and Yoshimizu, M.: Disinfection of equipments for aquaculture and fertilized eggs by ozonated seawater. *Fish Pathol.*, 33(3): 145-146, 1998.

Yosimizu, M., Hyuga, S., Oh, M.J., Itoh, S., Ezura, Y. and Minura, G.: Disinfectant effect of oxidant produced by ozonization of sea water on fish pathogenic

viruses, bacteria and ciliata. In *Diseases in Asian Aquaculture II*. M. Schariff, J.R. Arthur and R.P. Subasinghe, Manila, pp. 203-209, 1995.

세균성어병신속진단메뉴얼: 일본국 수산청 양식연구소 병리부 편저. 1994.

Disinfection of Culture Water Supply by Ozonization

I. Susceptibility of Some Fish-pathogenic Bacteria Isolated from Cultured Marine Fish

Myung-Joo Oh, Houg-Yoon Kim and Hyun-Soh Cho*

Department of Fish Pathology, Yosu National University

**Department of Oceanography, Yosu National University*

The disinfectant effects of total residual oxidants (TROs) produced by ozonization of natural sea water were investigated against fish pathogenic bacteria isolated from flounder and red seabream. The concentration of 0.1 mg TROs/liter was stable for 20 min in filtered natural seawater, and those of 0.3 and 0.5 mg TROs/liter were also stable for more 1 hr. Disinfectant effects of TRO against *Edwardsiella tarda*, *Vibrio* sp., *Streptococcus* sp. and *Staphylococcus* sp. were observed with a concentration of 0.1 mg/liter for 180 sec, and the treatment killed more than 99.9% of bacterial cells. With TROs of 0.3 to 0.5 mg/liter, the viable cells of the bacteria were reduced by more than 99.99% in 60 sec.

Key words : Ozonization, Disinfectant effect, Fish pathogenic Bacteria, Sea water