

적조생물구제농도의 Sodium Hypochlorite (NaOCl)의 노출에 따른 조피볼락 및 바지락의 조직학적 영향

한조희, 김영석, 허민도¹, 정해진², 박관하

군산대학교 해양생명의학과, ¹부경대학교 수산생명의학과, ²군산대학교 해양정보과학과

Histological Effect of Sodium Hypochlorite (NaOCl), Exposed at Red Tide-killing Concentrations, in Rockfish and Little Neck Clam

Jo-Hee Han, Young-Suk Kim, Min-Do Huh¹, Hae-Jin Jeong² and Kwan Ha Park

Departments of Marine Biomedical Sciences and ²Ocean Information Science,
Kunsan National University, Kunsan, Chonbuk 573-702, Korea

¹Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

ABSTRACT

In a previous study by Kim *et al.* (2000), sodium hypochlorite (NaOCl) has been demonstrated to be effective against algae that cause red tides. To secure the environmental safety of the chemical in practical use, effect of NaOCl, at concentrations required for algicidal activity, on the histology of rockfish and little neck clam was examined. When the animals were exposed to NaOCl at concentrations of 0.5 or 2 ppm for 1 hr, there was no exposure-associated histological change in either animal. As the experimental exposure condition was set in consideration of the use, our results provide safety information necessary for practical application to marine fields.

Key words : Sodium hypochlorite, Red tide, Rockfish, Little neck clam

서 론

차아염소산나트륨 (NaOCl; sodium hypochlorite)은 주로 물이나 기구를 소독하기 위한 목적으로 사용되는 산화제이다. NaOCl은 세균 (Raphael *et al.*, 1981), 바이러스 (Brown, 1981), 원생동물과 기생충 (국립수산진흥원, 1977; Larvi, 1991) 등에 대해서 살멸작용을 발휘하기 때문에 광범위한 생물에 대한 구제물질로 유용하며 패류독을 해독하는 작용 (Chin, 1970)도 있다. 최근 NaOCl은 적조를

일으키는 생물들인 *Cochlodinium polykrikoides*, *Gymnodinium sanguineum*, *Lingulodinium polyedrum* 등을 0.5 ppm의 농도로 수분 내에 살멸시키는 것이 확인되었으며 (Kim *et al.*, 2000), 이에 따라 적조의 발생시 현장에서 해수를 직접 전기분해하여 NaOCl을 생성시켜줌으로써 적조를 구제할 수 있는 방법에 대한 연구가 진행중이다.

모든 약제 또는 물리적 처리방법에서 적조생물을 살멸시키는 것이 가장 중요하지만 그 처리방법이 환경 특히 생물에 영향을 미치지 않는 가도 반드시 고려해야 할 중요한 사항이다. 특히 이 연

구에서 검토한 약제인 NaOCl이 비특이적인 산화 소독제이기 때문에 고농도 또는 장시간 생물이 노출되면 어떤 생물이든 상당한 영향을 미치는 것은 분명한 사실이다. 예를 들어 해산어류인 조기류에서 높은 농도의 NaOCl이 아가미의 조직학적 손상을 유발함이 관찰되었다 (Middaugh *et al.*, 1981).

그러나 NaOCl의 사용목적인 적조생물의 구제에 필요한 노출시간이 비교적 짧기 때문에 전기분해장치에 의해 생성된 NaOCl이 적조생물을 단시간에 살멸시킨 후에는 적용해역으로부터 확산·소실되는 것으로 판단되고 있다. 따라서 환경생물에 대한 영향을 평가하려면 적조를 구제할 수 있는 특정농도에서 특정기간의 노출에 따른 영향을 평가하는 것으로서 충분한 것으로 사료된다.

적조가 발생하였을 때 인공양식장에서 사육중인 어류들에서 단시간내에 대량폐사 현상이 발생하는 것이 커다란 사회적 문제가 되고 있으며, 적조구제의 중요한 목적 중의 하나가 인공사육장의 양식어를 보호하고자하는 데에 있다. 따라서 NaOCl을 사용할 것으로 예상되는 대상 해역으로 고려될 수 있는 지역은 해상가두리가 설치된 지역이며 이 때 가두리에 사육중인 어류들이 NaOCl에 노출될 가능성이 높다. 조피볼락은 대표적인 양식 어종으로서 적조가 발생하는 남해안과 서해안의 해역에서 많이 양식하고 있는 어종이다. 또한 바지락은 동해안을 제외한 우리나라 전 해역의 조간대에 서식하는 패류로서 한국인이 가장 많이 먹는 대표적인 식용패류라고 볼 수 있을 것이다. 이 연구에서는 적조생물에 유효한 농도보다 다소 높은 농도와 약간 긴 노출시간동안 조피볼락 및 바지락을 실험실에서 NaOCl에 노출시켰을 때 조직상의 변화가 나타나는가를 검토했다.

재료 및 방법

1. 실험용 동물

바지락 및 조피볼락은 육안적으로 볼 때 건강한 상태로 입수하여 실험실에서 3~4일간 순치시킨 후 시험에 사용하였다. 전 시험기간 중 수온은 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 로 유지하였으며 air pump로 폭기하였다.

동물은 $40 \times 25 \times 18$ cm의 직사각형 polycarbonate 투명수조에 해수를 4 liter채우고 사용하였으며 시험 중 피검물질의 파괴를 방지하기 위하여 광을 차단하였다. 시험에 사용한 동물의 중량(바지락은 패각을 포함)은 각각 조피볼락 3.0~5.5 g, 바지락 6~15 g을 사용하였다.

2. NaOCl의 조제

시험에 사용한 NaOCl은 소형 전기분해장치(포항산업과학연구원 제공)를 사용하여 생성시키고 역가를 검정(1,200~1,800 ppm)한 후의 용액을 농도측정 24시간 이내에 사용하였다.

3. 사망동물의 판정

조피볼락은 막대기를 사용한 자극에 대해 자극하였을 때 움직이거나 호흡활동을 생사의 기준으로 하였다. 바지락은 입출수공의 노출과 수조를 자극하였을 때의 나타나는 폐각활동을 생존의 기준으로 하였으며 판단이 어려운 개체는 시험종류 후 신선한 해수로 옮겨서 동일반응을 관찰하였다. 그래도 판단하기 어려운 바지락은 강제로 개각을 시도하여 열리는가로 판단하였다.

4. 병리조직학적 검사

동물의 조직절편을 제작하기 위해 조피볼락은 아가미, 근육(+피부), 간췌장, 신장 및 비장을 적출하여 Bouin's solution에, 바지락은 소화맹낭(+생식소)와 심장부 위의 두 부분으로 나누어서 Davidson's fixative solution에 각각 1시간 고정하였다. 모든 조직은 파라핀 포매기로 포매하여 microtome을 이용 $4 \sim 5 \mu\text{m}$ 의 두께로 절편을 만들어서 hematoxylin-eosin으로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

1. 조피볼락 및 바지락에서의 급성독성

조피볼락이나 바지락에서 병리조직학적 연구를 위해 NaOCl에 1시간 노출한 경우 0.5 및 2 ppm 모두에서 사망동물은 발견되지 않았다 (Table 1). 이 결과는 최소한 적조구제에 필요한 노출농도

Table 1. Survivorship of rockfish and little neck clam exposed to NaOCl

Organism	NaOCl (ppm)	Number of animals	Survivorship (%)	
			30 min	1 hr
Rockfish	Control	10	100	100
	0.5 ppm	10	100	100
	2 ppm	10	100	100
Little neck clam	Control	7	100	100
	0.5 ppm	7	100	100
	2 ppm	7	100	100

및 시간내에서는 급성적인 독성은 현저하지 않음을 시사한다. NaOCl을 현장에 적용하고자 할 때 사용되는 전기분해장치는 0.5~1.0 ppm 정도의 농도로 생산되도록 조절할 수 있지만 국지적으로 또는 순간적으로 2.0 ppm까지의 고농도에 이르더라도 조피볼락이나 바지락이 즉시 사망할 가능성은 없다고 판단된다.

이 시험에서 사용한 농도는 병리조직학적 변화 유무를 검정하기 위해서 설정한 것이며 이 보다 높은 농도인 5 ppm 이상에서는 1시간 노출로 치사하는 조피볼락이 발생하였다(미발표 자료). 그러나 바지락에서는 20 ppm으로 1시간 노출하였을 때에도 치사하는 동물이 발생하지 않았다.

2. 병리조직학적 시험

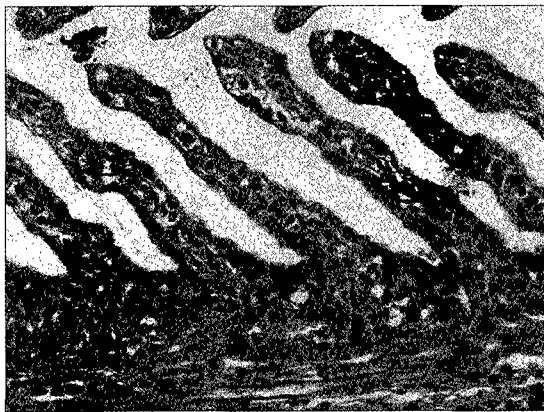
조피볼락을 0.5 ppm 또는 2 ppm의 NaOCl에 1시간 동안 노출시켰을 때 검정한 5개의 주요 장기에서 노출과 관련된 이상이 관찰되지 않았다(Figs. 1, 2). 바지락에서도 0.5 및 2 ppm으로 1시간 동안 노출시킨 후의 조직을 검사한 결과 노출과 관련된 병리학적 변화는 전혀 관찰되지 않았다(Figs. 3, 4). 이는 적조 구제에 필요한 비교적 단시간의 NaOCl 노출이 조피볼락과 바지락 모두에서 2 ppm까지 조직학적 손상을 유발하지 않음을 증명한다.

본 연구와 별도로 수행된 연구에서 조피볼락을 NaOCl로 1시간 노출시키고 혈액학적 및 혈장생화학적 변수를 측정하였을 때 2 ppm 이상의 농도에서 glucose의 농도가 현저히 상승하는 것이 발견된 바 있다(미발표결과). Glucose는 거의 모든 종류의 stress에 의해서 신속히 증가하는 변수이

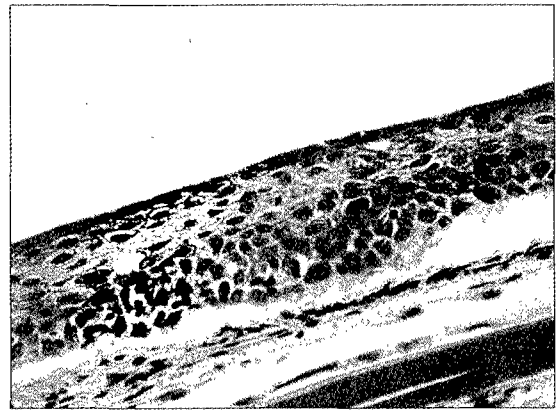
다. 보통 어류의 glucose는 stress 자극에 따른 시상하부-뇌하수체-간신선의 활성화(Wedemeyer and McLeay, 1981; Donaldson *et al.*, 1984)의 결과 다양한 환경오염물질이 이런 반응을 유발한다(예, Alkindi *et al.*, 1996). 이 시험에서 발견된 증가현상도 NaOCl이 가진 냄새 또는 화학적 자극성에 의한 stress의 결과로 나타난 것으로 추정된다. 그러나 2 ppm에서 다른 생화학변수나 병리조직학적 변화가 발견되지 않은 것으로 미루어 급성적으로 나타난 이 glucose의 변화는 NaOCl의 소실 후에는 사라질 것으로 판단된다. 따라서 2 ppm의 NaOCl이 비록 치사까지는 일으키지 않지만 어류에 상당한 stress를 가하는 것이 분명하다. 보통 glucose의 변화와 같은 생화학적 변화는 조직학적 변화와 같은 기질적 변화보다는 일찍 일어나기 때문에 이 독성 시험에서 조직학적 변화가 관찰되지 않았다고 생각된다. 그러나 만약 노출시간을 충분히 연장시킨다면 조직상에서도 변화가 관찰될 것으로 예상된다.

어류에 대한 NaOCl의 독성은 소수의 논문에서 다루어진 바 있다. 해산어인 spot(*Leiostomus xanthurus*)의 치어를 1.0 및 1.4 ppm의 농도로 48시간 동안 노출시켜도 치사동물이 발생하지 않았으나 1.6~3.2 ppm의 농도에서는 치사하는 동물이 관찰되었다(Middaugh *et al.*, 1980). 동일한 연구(Middaugh *et al.*, 1980)에서 NaOCl을 노출하는 동안 아가미의 호흡운동이 현저히 증가되었으며 이 현상이 낮은 농도의 경우는 신속히 회복되지만 높은 농도에서는 회복되지 않고 노출종료시까지 지속되는 것이 관찰되었다. 한편 높은 농도는 아가미 상피세포의 탈락이나 박피를 유발함이 확인되었다. Zebrafish의 치어를 chlorine (NaOCl로 5.25%) 1 ppm의 농도로 반복해 노출시키면, 동일종 어류의 부화이전의 난을 노출시켰을 때보다 매우 민감하게 반응하는데 이는 알보다는 생리적활성이 상대적으로 높은 치어가 이온의 출입이 활발하게 수행하고 있기 때문이라고 추정한다(Yoshida and Cohen, 1976).

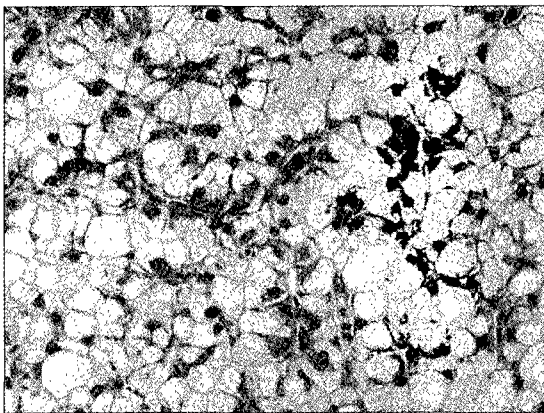
어류는 일반적으로 NaOCl 대해서 비교적 예민하지만 패류는 상당히 내성을 가지고 있다고 생각된다. 본인들의 별도의 시험에서 굴, 바지락 등을 20 ppm 이상으로 1시간 노출시켜도 치사동물이 전혀 발견되지 않았다(미발표자료). 이와 비슷하게



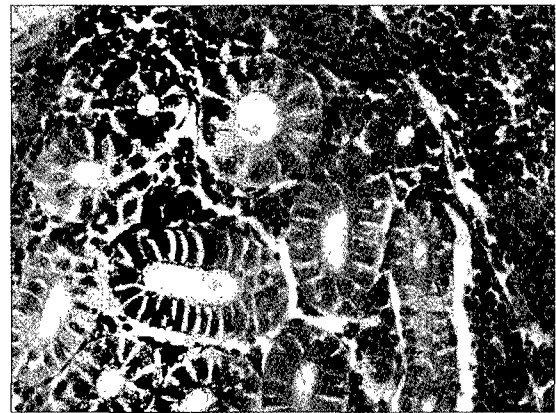
Gill ×400



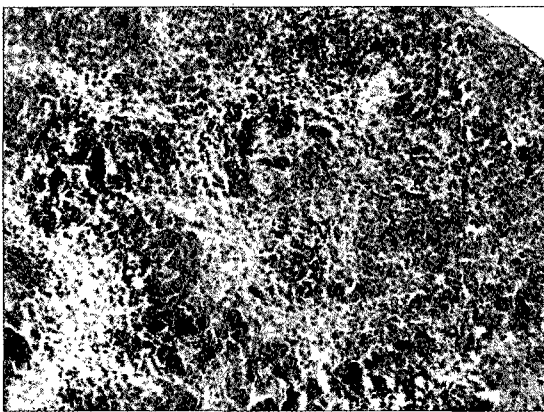
Skin ×400



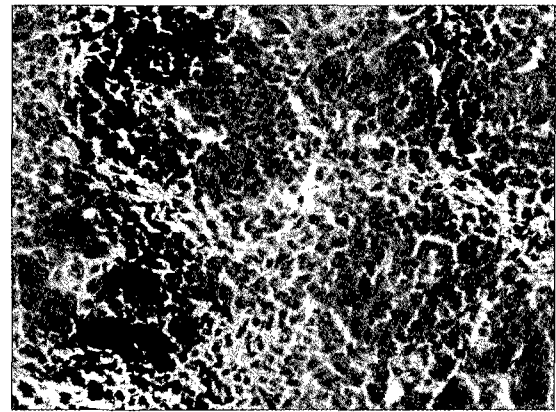
Liver ×400



Body-kidney ×200



Spleen ×100



Spleen ×200

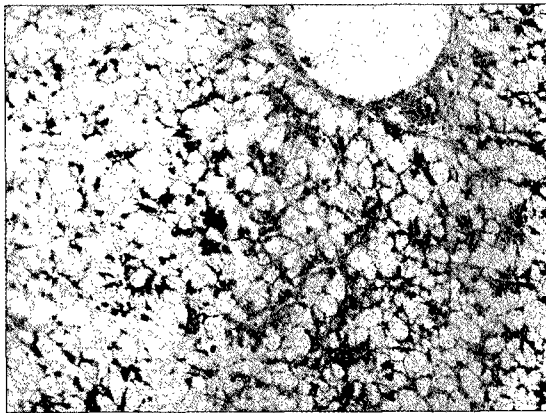
Fig. 1. Histology of control rockfish.



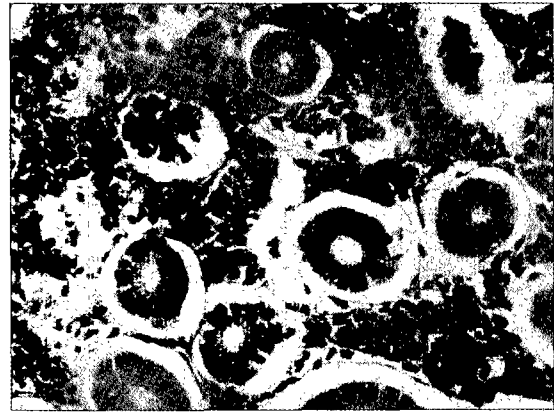
Gill × 400



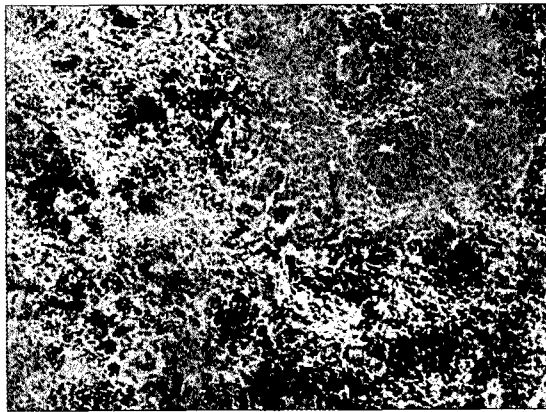
Skin × 400



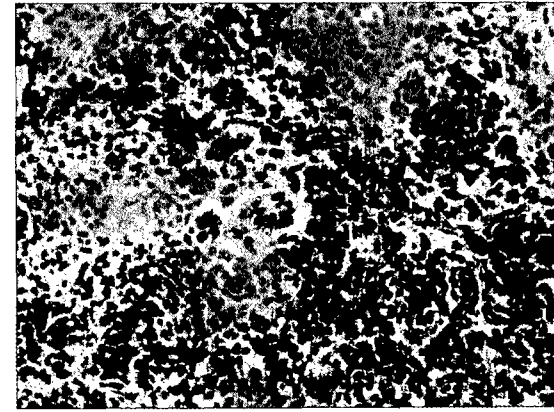
Liver × 200



Body-kidney × 200



Spleen × 100



Spleen × 200

Fig. 2. Histology of NaOCl-exposed (2 ppm, 1 hr) rockfish.

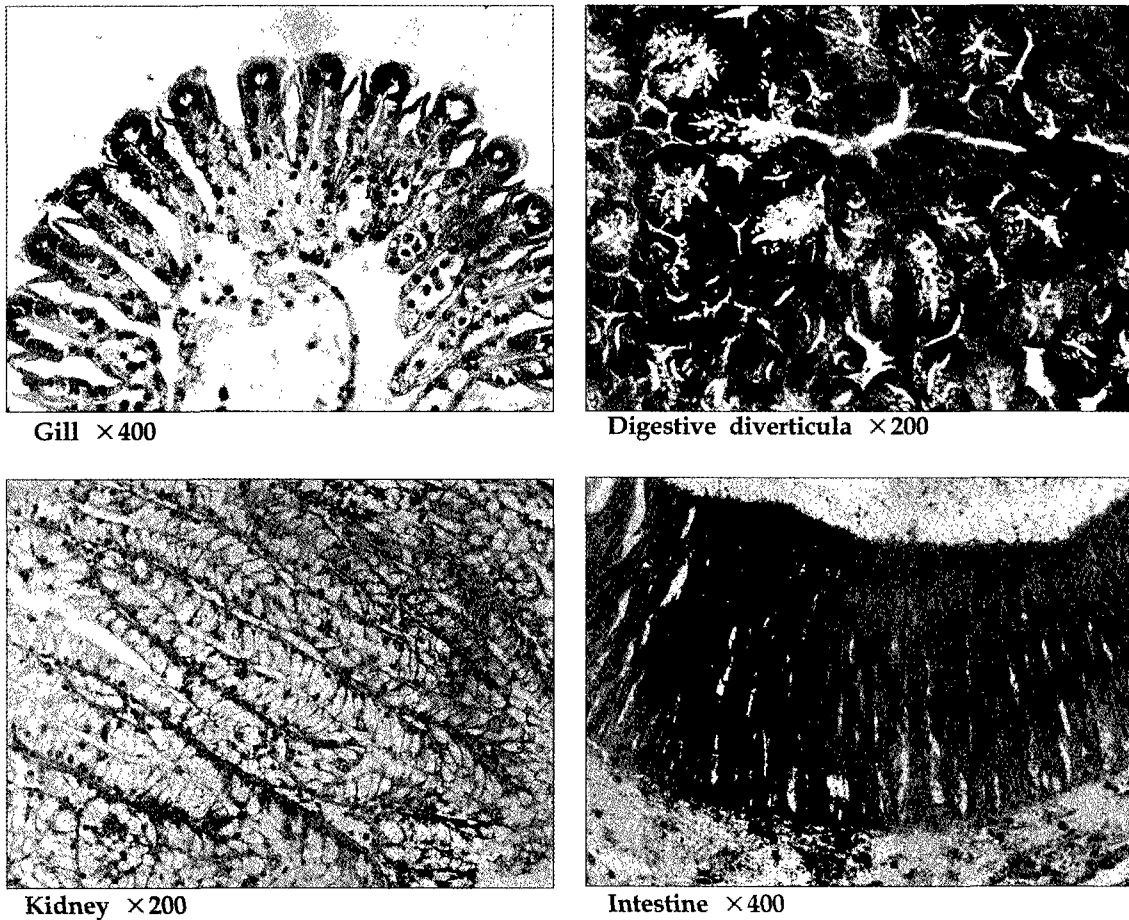


Fig. 3. Histology of control little neck clam.

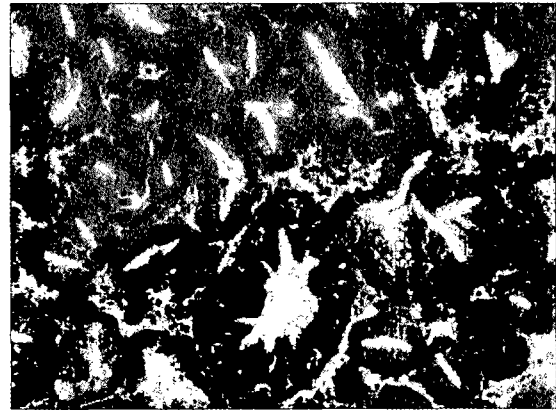
Walker and Ram (1994)은 담수패류인 zebra mussel (*Dreissena polymorpha*)의 24시간 LC_{50} 은 10 ppm <math><LC_{50}</math> <math><100\text{ ppm}</math>였다고 보고하고 있다. 또한 Kim and Lee (1988)는 화력발전소의 냉각수로부터 배출되는 독성성분의 하나인 NaOCl이 환경생물에 미치는 영향을 확인하기 위하여 진주담치와 굴의 난부화과정에 미치는 영향을 시험하였다. 이 때 15 ppm 이상의 농도에서 발생이나 생존율의 저하를 유발함이 관찰되었다. 또한 이들 (Kim and Lee, 1988)은 노출 후 굴, 담치 및 바지락에서 5 ppm 이상으로 48시간 이상 노출시키면 상피세포의 박리, 공포의 생성, 난의 용해나 소화낭의 퇴축 등 조직에 독성학적변화가 나타나는 것을 확인하였다. 따라서 본 연구의 시험조건인 2 ppm, 1시간의 노

출에서 바지락조직의 변화를 관찰할 수 없었음은 Kim and Lee (1988)의 결과와 일치한다고 볼 수 있다. 한편 NaOCl을 8 ppm으로 노출하면 동물성플랑크톤 단계의 담치유생을 완전히 치사시키며 낮은 농도(1 ppm)에서는 유생의 유영능력 및 포복(crawling)행동에 영향을 미칠 수 있다 (Thompson *et al.*, 1997). 이와 같이 높은 농도 또는 장기간의 노출로 패류에서도 분명히 독성이 나타나지만, 본 연구에서 설정한 적조구제조건에서는 아무런 조직학적 변화가 관찰되지 않았기 때문에 사용농도를 일정범위내로 잘 통제한다면 패류에도 커다란 문제를 유발하지 않을 것으로 판단된다.

어류 및 패류이외의 수생생물에 대해서도 매우 소구의 논문에서 NaOCl의 독성에 대한 다루고



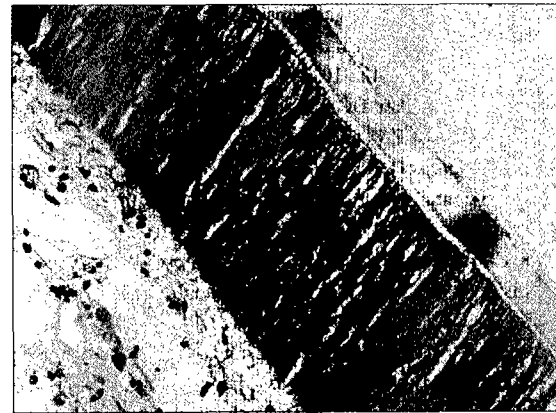
Gill ×200



Digestive diverticula ×200



Kidney ×400



Intestine ×400

Fig. 4. Histology of NaOCl-exposed (2 ppm, 1 hr) little neck clam.

있다. 예를 들어 NaOCl을 0.1~1.95%의 농도로 성게류 (*Echinometra mathaei*)와 연체동물의 일종인 *Stylocheilus longicauda*의 유생, 또는 식물성플랑크톤 (*Chaetoceros gracilis*, *Dunaliella tertiolecta*)에 96시간동안 노출시키면 50%의 치사를 유발할 수 있다 (Best *et al.*, 1981). 한편 요각류 *Mesocyclops*와 모기유충에 대한 NaOCl의 급성독성은 LC₅₀가 0.47~1.35 ppm범위인 것으로 보고되어 있다 (Brown *et al.*, 1994). 또 이 물질의 작용기전인 유리염소의 발생으로 인해 세포의 여러 가지 구성성분에 손상을 미칠 가능성이 있으며, 이로 인해 생물에서의 DNA 손상이 영원 (newt) 유생 (Gauthier *et al.*, 1989)와 해산 서관충 (tubeworm; Dixon *et al.*, 1999)에서 증명된 바 있다.

결론적으로 본 연구에서는 적조생물을 구제하는 효과가 있는 농도인 0.5 ppm 및 그 농도의 4배에 해당하는 2 ppm의 NaOCl로 충분한 노출시간 (적조살멸조건 : 0.5 ppm, 30분) 이상으로 조피볼락 및 바지락에 노출하였을 때 중요한 장기에 대한 조직학적 변화가 전혀 관찰되지 않았다. 이 결과는 산업적으로 중요한 이들 어류 및 패류가 적조구제를 위해 투입되는 NaOCl에 대한 예상 노출 조건하에서 조직학적으로 우려할 만한 피해를 입을 가능성은 없음을 시사한다.

감사의 글

본 연구를 위해 연구비를 지원해 준 포항산업

과학연구원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Alkindi, AYK, Brown JA, Waring CP and Collins JE. Endocrine, osmoregulatory, respiratory and haematological parameters in flounder exposed to the water soluble fraction of crude oil. *J. Fish Biol.* 1990; 49 : 1291-1305.
- Best BR, Braley RD, Marsh JA Jr and Matlock DB. Effect of chlorine on some coral reef phytoplankters and invertebrate larvae. The reef and man. Proceedings of the Fourth International Coral Reef Symposium. vol. I : 1981; 169-172.
- Brown TT. Laboratory evaluation of selected disinfectants as virucidal agents against porcine parvovirus, pseudorabies virus, and transmissible gastroenteritis virus. *Am. J. Vet. Res.* 1981; 42 : 1033-1036.
- Brown MD, Walker DO, Hendrikz JK, Gabral CP, Araujo DB, Ribeiro ZM and Kay BM. Chlorine tolerance of *Mesocyclops (Cyclopoida : Cyclopidae)* copepods and three container-breeding species of mosquitoes. *Environ. Entomol.* 1994; 23 : 1245-1249.
- Chin CD. Neutralization of shellfish poison by chemical disinfectant. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1970; 16 : 430-433.
- Dixon DR, Wilson JT, Pascoe PL and Parry JM. Anaphase aberrations in the embryos of the marine tubeworm *Pomatoceros lamarckii (Polychaeta : Serpulidae)* : a new *in vivo* test assay for detecting aneuploids and clastogens in the marine environment. *Mutagenesis* 1999; 14 : 375-383.
- Donalson EM, Fagerlund UHM and McBride JR. Aspects of the endocrine stress response to pollutants in salmonids, in Carnis VW, Hodson PV and Nriagu JO (ed) : *Contaminants Effects on Fisheries*. New York : Wiley 1984; 213-221.
- Gauthier L, Levi Y and Jaylet A. Evaluation of the clastogenicity of water treated with sodium hypochlorite or monochloramine using a micronucleus test in newt larvae (*Pleurodeles waltl*). *Mutagenesis* 1989; 4 : 170-173.
- Hipkiss AR, Worthington VC, Himsworth DT and Herwig W. Protective effects of canosine against protective protein modification mediated by malondialdehyde and hypochlorite. *Biochem. Biophys. Acta* 1998; 1380 : 46-54.
- Kim HR, Kim KI, Kim DS, Park KS, Hong TH. and Jeong HJ. Developing a method of controlling the outbreak and maintenance of red tides using NaOCl produced by electrolysis of natural seawater. Conference Abstract Book, The 9th International Conference on Harmful Algal Blooms, Feb. 7-11, 2000, Tasmania, Australia. pp. 28.
- Kim SY and Lee TY. The effects of pollutants effluents from a steam-power plant on coastal bivalves. *Ocean Res.* 1988; 10;47-65.
- Larvi '91. Spec. Pub. Eur. Aquacult. Soc. #15, Mass use of hypochlorite to control protozoa in *Chlorella* culture 1991; 95-97.
- Middaugh DP, Burnett LE and Couch JA. Toxicological and physiological responses of the fish, *Leiostomus xanthurus*, exposed to chlorine produced oxidants. *Estuaries* 3; 1980 : 132-141.
- Raphael D, Wong TA, Hoodnik R and Borden BG. The effect of temperature on the bactericidal efficiency of sodium hypochlorite. *J. Endod.* 1981; 7 : 330-334.
- Thompson IS, Seed R, Richardson CA, Hui L and Walker G. Effects of low level chlorination on the recruitment, behaviour and shell growth of *Mytilus edulis* Linnaeus in power station cooling water. *Ecol. Mar. Molluscs.* 1997; 61 (sup. 2) : 77-85.
- Walker JU and Ram JL. Effects of deionized water on sensitivity of zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) to toxic chemicals. *Comp. Biochem. Physiol. C* 1994; 107 : 353-358.
- Wedemeyer GA and McLeay DJ. Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressors, in Pickering AD (ed) : *Stress and Fish*. New York; Academic Press 1981; 247-275.
- Yoshida SF and Cohen GM. Effect of intermittent chlorination on developing zebrafish embryos (*Brachydanio rerio*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1976; 24 : 703-710.
- 국립수산진흥원. Studies on the polyclad *Turbellaria* of Korea. 3. The extermination experiment of polyclads in the solution of salt (NaCl) and sodium hypochlorite (NaOCl) 국립수산진흥원보 1977; 17 : 35-52.