

이산화염소 (ClO₂)의 간헐적 처리에 따른 넙치, *Paralichthys olivaceus* 호흡대사율의 경시적 변화

김흥윤[†]

여수대학교 수산생명의학과

Serial Changes in the Rate of Respiratory Metabolism of Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus* Exposed to Intermittent Chlorination of Chlorine Dioxide (ClO₂)

Heung-Yun Kim[†]

Department of Aqualife Medicine, Yosu National University, Yeosu 550-749, Korea

The present study was investigated the effects of chlorine dioxide (ClO₂) on the respiratory metabolism of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) intermittently exposed to seawater chlorinated by ClO₂. Oxygen consumption of flounder before and after once or twice ClO₂-treatment with 12 hr- or/and 24 hr-interval were serially measured with automatic intermittent-flow respirometer system (AIRS). The oxygen consumption rates of flounder exposed to 0.10 and 0.20 ppm ClO₂ were not different from the control fish prior to the once or twice chlorinations. On the other hand, the respiratory metabolic rates of flounder exposed to 0.30 ppm ClO₂ were significantly increased 15% and 22~23% after the once and twice chlorinations compared to the control fish, respectively. The flounder exposed to 0.40 and 0.50 ppm ClO₂ died within 4 hr and 1 hr, respectively. The elevation of respiratory metabolism in flounder exposed to 0.30 ppm ClO₂ and above is considered due to physiological stress caused by ClO₂ exposure.

Key words : Chlorine dioxide, *Paralichthys olivaceus*, Intermittent exposure, Oxygen consumption

서 론

포르말린, malachite green 및 염소계 소독제 (chloramine-T, dichloramine, monochloramine, hypochlorous acid, hypochlorite ion)는 각국의 사용 허가여부와 관계없이 관행적으로 양식어류의 세균성 질병 치료, 사육수의 병원체 살균 및 예방제로서 많이 사용되어 왔다 (Brook and Bartos, 1984; Gerundo *et al.*, 1991; Thorburn and Moccia, 1993; Powell and Perry, 1996; Speare *et al.*, 1996). 이들 중에서 포르말린과 malachite green은 일부 국가에서 수산용으로 사용이 규제되고

있으며, 염소계는 가수분해 산물인 free chlorine (주로 hypochlorous acid, HOCl과 hypochlorite ion, OCl⁻)이 유기물이나 암모니아와 반응하여 발암성의 trihalomethane (THM)과 chloramine을 생성하여 환경 및 보건 위해성이 있는 것으로 알려져 있다 (Travis and Heath, 1981; Wan *et al.*, 2000, Juli *et al.*, 1997b). 이산화염소 (ClO₂)는 liquid chlorine (Cl₂)에 비해 산화능이 2.5배나 높은 광범위 소독제이고 수중에 투입되면 가수분해 반응없이 분자상태로 세균 세포막을 투과하여 살균작용을 나타내며, THM과 chloramine이 생성되지 않아 최근에는 음용수 살균제로 활용되

[†]Corresponding Author : Heung-Yun Kim, Tel : 061-659-3174
Fax : 061-659-3174, hykim@yosu.ac.kr

고 있다 (Juli *et al.*, 1997a, b; Chanda, 1998).

수산양식장 사육수의 염소처리 방법은, 어류가 치사하지 않는 농도 범위에서, 비교적 고농도에 의한 일회성 처리 보다는 저농도에서 일정 주기로 반복 처리하여 살균효과를 높이는 방식을 적용하고 있다 (Thorburn and Moccia, 1993). 담수 어류의 세균성 아가미병 예방과 치료제로 많이 사용되는 chloramine-T에 반복 노출된 무지개송어 (*Oncorhynchus mykiss*)의 경우 산소분압이 낮은 환경에서는 생리적 저해성이 많으며, 산소분압이 높은 환경에서는 아가미의 점액분비 및 점액세포의 수가 증가하지만 혈액과 환경수간에 가스 확산거리와 관계있는 상피세포의 두께가 얇아져 가스의 확산제한을 상쇄시켜줌으로서 호흡가스 교환에는 장애가 없었다고 하였다 (Powell and Perry, 1997; Powell *et al.*, 1998). 이에 반해 Bass and Heath (1977)와 Travis and Heath (1981)는 free chlorine과 monochloramine (NH_2Cl)에 하루 3회 간헐적으로 노출된 무지개송어 (*Salmo gairdneri*) 동맥혈의 산소분압과 혈액 hematocrit (Ht), hemoglobin (Hb) 및 Hb에 대한 methemoglobin 비율을 조사한 결과, 간헐적인 염소노출은 *S. gairdneri*의 생리상태에 미치는 영향을 가중시킨다고 보고하였다. 수산양식장 사육수의 ClO_2 소독과 관련된 연구는 감염 해산어 유래 병원세균의 살균효과 (Park *et al.*, 2003)와 일회성 처리에 노출된 넙치의 생존과 생리적 반응 (Kim and Kim, 2003) 등에 관한 보고가 있을 뿐이며, 간헐적인 ClO_2 처리가 양식어류에 미치는 영향에 대해서는 거의 알려져 있지 않다.

용존 독성물질이 수서생물에 미치는 생리적 저해성을 파악하는 수단으로서는 동물 생리기능의 총체적 지표가 되는 호흡 대사율을 조사하여 그 영향을 평가하는 방법이 많이 사용되고 있다 (Kim *et al.*, 1996; Harris *et al.*, 1998; Brodeur *et al.*, 2001; Webb *et al.*, 2001). 그러나 용존 독성물질에 노출된 수서생물의 호흡대사율을 경시적으로 조사하기 위해서는 시수내 시험생물의 대사산물 축적에 의한 생리적 스트레스가 배제

되어야 하고, 수온과 산소포화도는 연속적인 반복측정 동안 일정하게 구배되는 조건이 유지되어야 한다 (Davis *et al.*, 1992). Wrona and Davis (1984)와 Harris *et al.* (1999)는 환경수의 산소포화도가 낮아지면 시험생물의 호흡률이 현저하게 감소되는 현상을 보고하였으며, 호흡측정 방법에 따라서는 시험생물의 포획과 호흡병 투입, 일정시간 노출 후 수류교반과 산소정량 과정에 수반되는 물리적 자극 등은 호흡률 증감을 초래하는 요인으로 작용할 수 있다고 생각된다.

본 연구는 사육해수에 ClO_2 가 간헐적으로 처리될 때 넙치의 호흡대사율에 미치는 영향을 파악하기 위하여, 자동 호흡측정 장치 (automatic intermittent-flow respirometer system, AIRS)로서 3분간의 산소소비량을 연속 6분 간격으로 ClO_2 처리전후 각각 24시간 동안 측정하였다.

재료 및 방법

실험어

실험어인 넙치, *Paralichthys olivaceus*는 육상 수조식 양식장에서 분양받은 것을 실내 항온사육실로 운반하여 FRP 원형수조 (용량, 1 m³)에 수용하였다. 벽이는 시판되는 넙치용 부상사료를 공급하였고, 수온을 20°C로 조절하여 실험수온에 순치시켰다. 호흡측정 24시간 전에는 비슷한 크기의 넙치 5마리를 포획하여 수온 20°C의 차광수조 (용량, 60 L)로 옮겨서 절식시켰으며, 실험개시 전야에는 사육수를 동일수온의 미공여과 해수 (공경, 0.2 μm)로 전량 교환하였다. 호흡대사율 측정에는 개체크기에 따른 비체중 호흡률 차이가 적도록 넙치 5마리 가운데 비슷한 크기 3마리를 선별하여 호흡실에 수용하였다 (Table 1, 2).

ClO_2 stock solution 제조 및 수질 측정

실험에 사용한 ClO_2 는 4°C에 냉장보관중인 원액 (assay 5%, 순도 99%)의 유효농도를 Park *et al.* (2003)의 방법으로 측정한 다음 초순수를 희

석하여 제조한 0.01% ClO₂ stock solution (99.4 ± 0.3 ppm, n=5)을 냉장보관하며 실험에 사용하였고, ClO₂ stock solution은 10일마다 제조하였다. 시수의 수온, 염분 및 pH는 수질분석기 (YSI 58 and 85, USA)와 pH meter (Methrom 704, Swiss)로서, 총암모니아 질소는 Solorzano (1969)의 phenolhypochlorite법으로 측정하였다.

호흡측정과 장치

ClO₂ 처리해수에 노출된 넙치의 호흡대사율은 자동 호흡측정 장치로 측정하였다 (Fig. 1). 호흡 측정용 해수는 시수내 세균 증식과 이들에 의한 산소소모를 막기 위하여 이중막 (input 0.45 μ m, output 0.2 μ m)의 capsule filter (Sartobran P, Germany)로 여과한 것을 사용하였고. 호흡실 (Φ 16 cm \times 7.5 cm)에는 수온 20°C의 여과해수를 채우고 실험어 3마리를 넣은 뒤 뚜껑을 밀폐하였다.

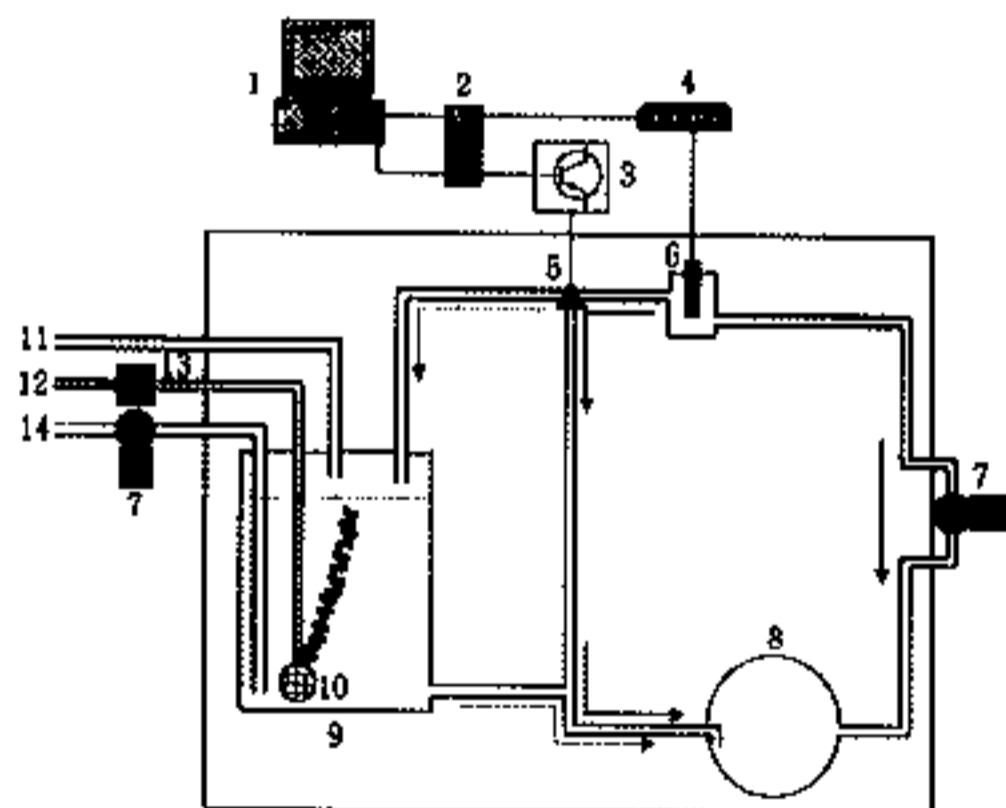


Fig. 1. Schematic diagram of automatic intermittent-flow respirometer system (AIRS) used to measure oxygen consumption of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. The measuring system except peristaltic pump was installed in low temperature incubator. Dotted- and solid-line arrows in the equipments indicate circular course during measurement period and water exchange, respectively. 1: Personal computer for control and data storage, 2: AD/DA converter, 3: Control driver of solenoid valve, 4: Dissolved oxygen (DO) meter, 5: 3-way solenoid valve, 6: Oxygen and temperature electrode chamber, 7: Peristaltic pump, 8: Respiratory chamber, 9: Reservoir container, 10: Air-stone, 11: Air exhaust tube, 12: Air supply tube, 13: Cotton and charcoal air filter, 14: ClO₂ input tube.

호흡 측정 장치내 기포는 peristaltic pump (PP, Eyela RP-1000)로서 시수를 환수 순환시켜 저장조로 배출시켰고, 순환수류의 방향은 personal computer (PC)에서 연속 3분마다 송출되는 전기 신호가 AD/DA convertor (AX5621H)와 solenoid valve control driver를 거쳐 3-way solenoid valve (Burkert 131, Germany) 작동을 제어하여 바뀌게 하였다. PP를 제외한 각종 장치는 저온배양기 (Eyela LT1-1000SD)속에 설치하였고, 호흡률 측정은 20°C 항온과 암소조건에서 실시하였다. 순환시수의 DO는 누수가 없도록 개조된 산소전극 (YSI 5905)과 산소검량기 (YSI 58)에서 송출되는 0~1 V (accuracy: $\pm 0.4\%$ of full scale in YSI 58 Manual) 전압을 분해능이 1.9×10^{-2} mV (= 0.38 μ g O₂/L)인 AD convertor로 수신하였다. 넙치의 산소소모에 의한 DO 차이는 수류가 폐쇄 및 환수 순환경로로 전환되기 직전 각각 3초 동안에 감지된 100 data/sec의 DO 평균치와 그 차이로부터 자동으로 계산된 값이 실시간으로 PC에 display되고, 저장되었다. 개체당 1시간의 산소소모량 (mg O₂/indi./hr)을 산소용적량 (ml O₂/indi./hr)으로 바꾸는 데는 변환계수 0.7을 나누어 산출하였다 (APHA, 1981).

ClO₂ 처리

호흡실에 실험어를 수용한 후 3시간 동안은 실험어의 그물뜨기, 호흡실의 수류흐름 및 갑작스런 암소 환경에 접한 실험어의 안정을 위해 환수순환 상태를 유지하였고, 이어서 각 실험마다 24시간 동안은 ClO₂ 처리전의 호흡률을 측정하였다. 순환시수의 ClO₂ 처리는 DC power supply의 on-off signal을 관찰하여 수류가 폐쇄 순환으로 바뀌기 1분전에 ClO₂ 주입관과 연결된 PP를 작동하여 시수를 300 ml 가량 배출한 뒤 총 순환수량 10 L에 대해 ClO₂ 농도가 0.10, 0.20, 0.30, 0.40 및 0.50 ppm (nominal concentration)으로 구배되도록 적량의 0.01% ClO₂ stock solution을 시수에 섞어서 주입하였다. 1회의 ClO₂ 처리에 노출된 넙치의 호흡률은 실험개시 후 24시간

째 순환시수에 ClO₂를 처리한 뒤 수류가 폐쇄 순환으로 전환되는 시점부터 24시간 동안 측정하였다. 2회의 ClO₂ 처리는 실험개시 후 24시간이 지난 뒤 1회 및 1회 처리 후 12시간과 24시간 간격의 chlorination 실험구로 구분해서 각각 1회 처리하였다. 각 실험에서 chlorination 종료 후 12분 째와 실험개시 후 매 24시간이 경과한 시점에서 3분간 환수순환 동안에는 PP를 가동하여 ClO₂-free seawater를 5 L씩 교환하였다. 실험종료 후에는 실험어 크기를 어체 측정판으로 측정하고 다음 어체 표면의 습기를 여과지로 제거하여 생체중량을, 90°C에서 24시간 건조하여 건조중량을 측정하였다.

통계처리

실시간으로 저장된 호흡측정 data는 Origin (version 6.0) 프로그램으로 loading하여 ClO₂ 노출전후 호흡률의 평균값 차이 유무를 t-test하였다. 호흡 측정결과는 건조체중 g당 1시간에 소비한 산소량, 비체중 호흡률 (weight-specific respiration rate, ml O₂/g, dry wt./hr)로 표시하였다.

결 과

대조군의 호흡대사율

수온 20°C의 ClO₂-free seawater에 24시간 절식시킨 넙치를 수용하여 연속 6분 간격으로 측정한 비체중 호흡률은 Fig. 2와 같다. 전장 13.1 ±

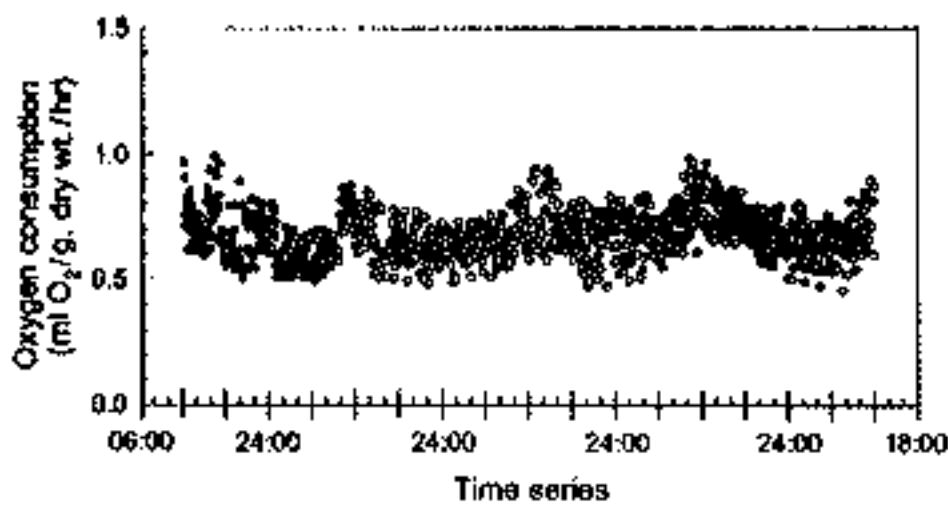


Fig. 2. The rates of weight-specific respiratory metabolism of 3 olive flounders, *Paralichthys olivaceus* maintained to ClO₂-free seawater. Open circles indicate the mean rate during 3 min.

0.2 cm인 넙치의 호흡률은 0.459~1.037 ml O₂/g, dry wt./hr의 범위를 나타내었고, 하루 중에는 11:00~13:00 시간대에 호흡대사율이 다소 상승하는 경향을 보였으며, 총 평균 호흡률은 0.680 ± 0.097 ml O₂/g, dry wt./hr이었다 (Table 1). ClO₂-free seawater에서 4일간 측정한 호흡률의 총 평균값은 ClO₂ 처리수에 간헐적으로 노출된 같은 크기의 실험군이 수온 20°C와 동일기간 동안의 절식상태가 반영된 대사활성 평균치, 대조군의 표준대사율로 간주하였다 (Table 1).

ClO₂ 1회 처리시의 호흡대사율

ClO₂-free seawater에 넙치를 각각 3마리씩 수용하여 24시간 동안 호흡 대사율을 측정한 다음, 순환시수의 ClO₂ 농도가 0.10, 0.20, 0.30, 0.40 및 0.50 ppm이 되도록 1회 처리한 뒤 12분이 경

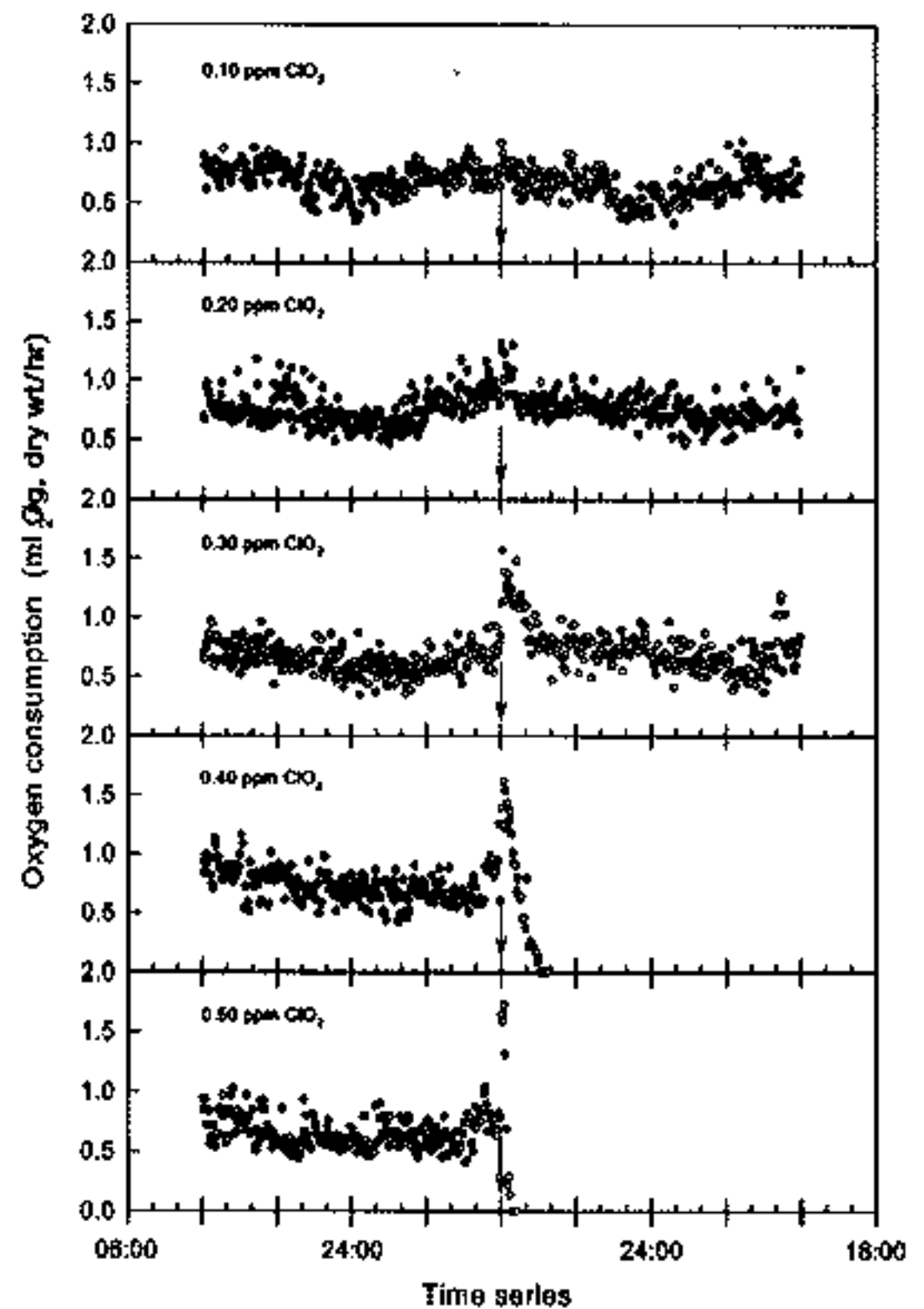


Fig. 3. The respiratory metabolic rate of the flounder before and after exposure to seawater chlorinated by different concentrations of ClO₂. Arrows indicate chlorination.

Table 1. The respiratory metabolic rates of the flounder, *P. olivaceus* before and after exposure to seawater chlorinated by chlorine dioxide (ClO₂) on 24 hr after experiment initiation. Oxygen consumption of the flounder was measured for 24 hr before and after chlorination, respectively.

	ClO ₂ concentration (ppm) ¹⁾					
	Control	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50
No. of measured fish ²⁾	3	3	3	3	3	3
Mean total length (cm)	13.1±0.26	12.9±0.24	13.4±0.19	13.1±0.18	12.8±0.22	13.6±0.17
Mean dry weight (g)	4.64±0.21	4.75±0.29	4.78±0.22	4.92±0.23	4.45±0.17	5.11±0.24
Water temperature (°C)	19.8±0.01	19.9±0.01	19.8±0.01	19.7±0.01	19.9±0.01	19.8±0.01
Salinity (ppt)	31.7±0.04	31.5±0.03	31.4±0.03	32.0±0.02	31.6±0.04	31.5±0.03
Oxygen saturation (%)	93.8-86.2	93.3-85.5	94.1-85.9	93.1-83.6	93.7-82.8	93.2-83.0
Total ammonia (mg N/L) ³⁾	0.05	0.08	0.07	0.05	0.08	0.08
Flow rate (ml/min)	850	850	850	850	850	850
Measurement interval (min)	3	3	3	3	3	3
No. of measurement (A+B)	960	240+240	240+240	240+240	240+20 ⁴⁾	240+5 ⁵⁾
Chamber volume (ml)	1,620	1,620	1,620	1,620	1,620	1,620
Mean oxygen consumption (ml O ₂ /g, dry wt/hr)						
Before ClO ₂ exposure (A)	0.680±0.097	0.706±0.115	0.757±0.142	0.646±0.118	0.739±0.142	0.659±0.130
After ClO ₂ exposure (B)	-	0.688±0.129	0.774±0.132	0.742±0.196	0.979±0.383	0.951±0.423
Percent increase in oxygen consumption ⁶⁾	-	≤0	≤0	14.9 ⁷⁾	32.5 ⁷⁾	44.3 ⁷⁾

¹⁾ Nominal concentration chlorinated by 0.01% ClO₂ stock solution (measured concentration = 99.4±0.3 ppm ClO₂, n=5) in total circular seawater of 10 L. Circular seawater in the AIRS was exchanged with ClO₂-free seawater of 5 L on 12 min and 24 hr after chlorination and experiment initiation, respectively.

²⁾ All fish were not fed 24 hr before maintaining in the respiratory chamber (RC) and then were acclimated to the exposure of sudden darkness and circular water-flow in the RC for 3 hr prior to measuring of oxygen uptake.

³⁾ Maximum level of total ammonia in circular seawater on 24 hr after experiment initiation.

^{4,5)} Limited to measurements of 20 and 5 times in 2 and 0.5 hr after chlorinations.

⁶⁾ (B-A)/A × 100.

⁷⁾ P<0.05 by Student's *t*-test.

과한 시점에 총 순환수의 1/2를 ClO₂-free seawater로 교환하여 24시간에 걸쳐 호흡률의 경시적인 변화를 조사하였다 (Fig. 3). 0.10 ppm에 노출된 넙치의 호흡대사율은 ClO₂ 처리 전에 동일 실험군에서 측정된 24시간 총 평균 호흡률과 비슷한 값을 보였으며, 0.20 ppm에서는 ClO₂ 처리 직후에 일시적으로 호흡률이 증가하는 현상을 보였지만 0.10 ppm ClO₂ 노출군과 같은 경향을 나타내었다. 0.30 ppm 노출군은 chlorination 직후에 최고 1.572 ml O₂/g, dry wt./hr로 증가하여 약 2시간 동안은 높은 대사율을 유지하였고, 노출 후 24시간 동안 총 평균 호흡률은 노출전 실험군에 비해 14.9% 증가하였다 (Table 1). 0.40과 0.50 ppm에 노출된 것은 ClO₂ 처리 후 각각 1시간과 30분간에 걸쳐 호흡률이 급격하게 증가하였으나 0.40 ppm에서는 ClO₂ 처리 후 4시간 이내에, 0.50 ppm에서는 1시간 내에 모든 개체가 사망함으로써 호흡률은 0에 도달하였다.

ClO₂ 2회 처리시의 호흡대사율

12 hr-interval chlorination

실험개시 후 24시간째에 0.10, 0.20 및 0.30 ppm이 되도록 ClO₂를 처리하고, 12시간이 경과한 다음 같은 농도로 1회 반복 처리하면서 넙치의 호흡률을 연속 6분 주기로 측정한 결과는 Fig. 4에 나타내었다. 0.10 ppm에서는 ClO₂ 처리에 따른 호흡률 변화가 관찰되지 않았고, 0.20 ppm에서는 1회와 2회째 모두 chlorination 직후에 호흡률이 증가하는 현상을 보였으나 ClO₂ 처리전의 총 평균 호흡률과 비슷한 수준을 보였다. 0.30 ppm 노출군은 1회 chlorination 후에는 약 2시간 동안 호흡대사율이 상승하였지만 12시간이 경과한 뒤 2회째 chlorination되면 호흡대사율 증가는 약 6시간 전후로 지속되었고, 노출군의 평균 호흡률은 ClO₂ 처리 전의 동일 실험군에서 측정된 24시간 평균값에 비해 23.3% 증가하였다 (Table 2).

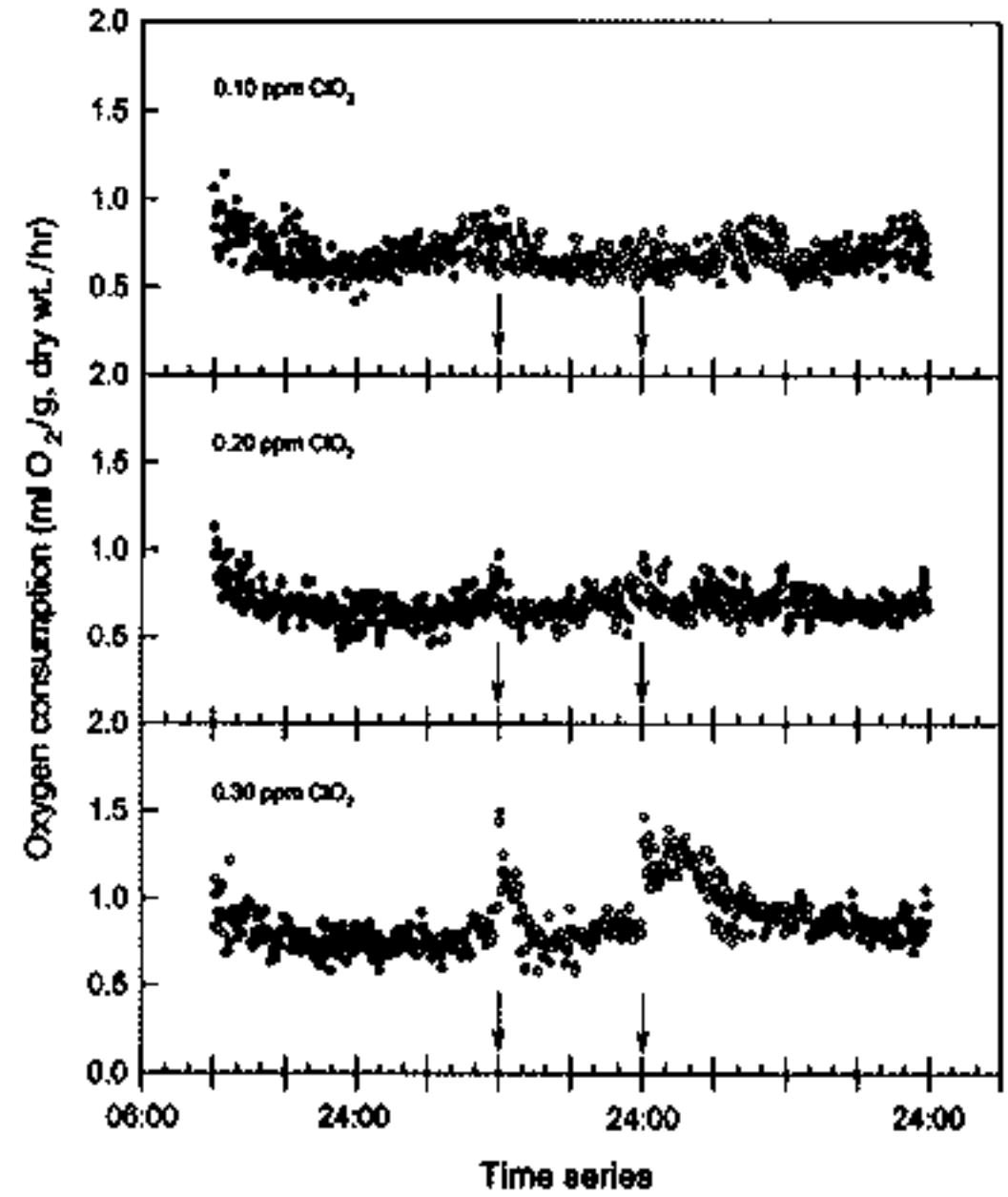


Fig. 4. The respiratory metabolic rate of the flounder, *P. olivaceus* before and after exposure to seawater chlorinated by different concentrations of chlorine dioxide (ClO₂) in twice at 12 hr-interval. Arrows represent chlorination.

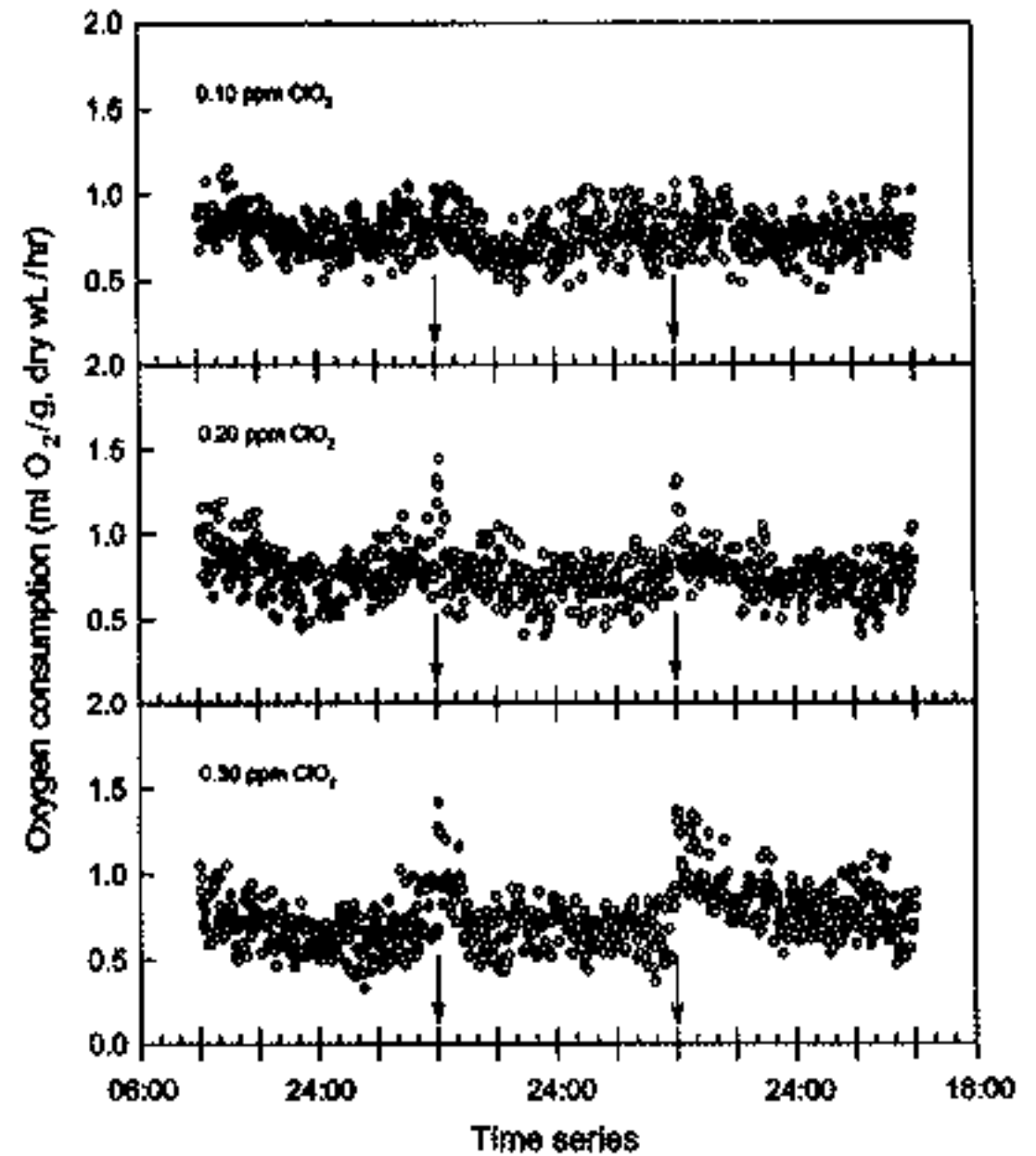


Fig. 5. The respiratory metabolic rate of the flounder, *P. olivaceus* before and after exposure to seawater chlorinated by different concentrations of chlorine dioxide (ClO₂) in twice at 24 hr-interval. Arrows represent chlorination.

Table 2. The respiratory metabolic rate of the flounder, *P. olivaceus* before and after exposure to seawater chlorinated by different concentrations of chlorine dioxide (ClO₂) in twice at 12 hr- and 24 hr-intervals, respectively.

	ClO ₂ concentration (ppm) ¹⁾					
	Chlorination at 12 hr-interval			Chlorination at 24 hr-interval		
	0.10	0.20	0.30	0.1	0.2	0.3
No. of measured fish ²⁾	3	3	3	3	3	3
Mean total length (cm)	13.8±0.21	13.4±0.27	13.2±0.18	13.4±0.29	13.6±0.24	13.8±0.23
Mean dry weight (g)	5.25±0.23	4.87±0.31	5.11±0.14	4.98±0.27	5.02±0.19	4.91±0.20
Water temperature (°C)	19.8±0.01	19.7±0.01	19.9±0.01	19.6±0.01	19.7±0.01	19.9±0.01
Salinity (ppt)	31.7±0.04	32.3±0.02	32.1±0.03	32.4±0.02	32.0±0.03	32.3±0.04
Oxygen saturation (%)	94.9-86.3	94.1-85.8	93.2-82.7	94.6-85.2	93.7-84.9	93.0-82.3
Total ammonia (mg N/L) ³⁾	0.04	0.06	0.05	0.08	0.07	0.09
Flow rate (ml/min)	850	850	850	850	850	850
Measurement interval (min)	3	3	3	3	3	3
No. of measurement (A+B)	240+240	240+240	240+240	240+240	240+240	240+240
Chamber volume (ml)	1,620	1,620	1,620	1,620	1,620	1,620
Mean oxygen consumption (ml O ₂ /g, dry wt./hr)						
Before ClO ₂ exposure (A)	0.696±0.110	0.676±0.105	0.779±0.092	0.786±0.110	0.793±0.146	0.681±0.142
After ClO ₂ exposure (B)	0.689±0.087	0.670±0.079	0.961±0.163	0.771±0.113	0.761±0.123	0.834±0.168
Percent increase in oxygen consumption ⁴⁾	≤0	≤0	23.3 ⁵⁾	≤0	≤0	22.4 ⁵⁾

¹⁾ Nominal concentration in the total circular seawater of 10 L chlorinated by 0.01% ClO₂ stock solution (measured concentration = 99.4 ± 0.3 ppm ClO₂, n=5). Circular seawater in the AIRS was exchanged with ClO₂-free seawater of 5 L on each 24 hr and 12 min after experiment initiation and chlorination, respectively.

²⁾ All fish were not fed for 24 hr before maintaining in the respiratory chamber (RC) and then were acclimated to the exposure of sudden darkness and circular water flow in the RC for 3 hr prior to measuring of oxygen uptake.

³⁾ Maximum level of total ammonia nitrogen of circular seawater in the AIRS on each 24 hr after experiment initiation.

⁴⁾ (B-A)/A × 100.

⁵⁾ P<0.05 by Student's *t*-test.

24 hr-interval chlorination

순환시수의 ClO_2 농도가 0.10, 0.20 및 0.30 ppm이 되도록 24시간 간격으로 두 번 chlorination하면서 호흡대사율을 측정된 결과는 Fig. 5와 같다. 0.10과 0.20 ppm에서는 두 번의 ClO_2 처리에 노출된 실험군의 24시간 총 평균 호흡률은 노출 전과 비교하여 호흡대사율 증가는 없는 것으로 나타났다 (Table 2). 0.30 ppm에서는 1회 처리에 비해 2회 처리에 노출되면 호흡률 상승이 지속되는 기간은 현저하게 길어졌으며, 두 번의 chlorination에 노출된 후 넙치의 총 평균 호흡률은 노출 전과 비교하여 22.4% 증가하는 결과를 나타내었다.

고 찰

염소제에 노출된 어류의 생리적 및 병리적 현상으로는 염소제가 어류 구강과 아가미를 자극하면 아가미 조직을 보호하기 위한 방어기작으로 과량의 점액이 분비되며 (Bass and Heath, 1977; Mallatt, 1985), 아가미가 손상되는 유형은 상피세포의 이상증식, 과비대 및 괴사가 진행되고, 세포막 기저부로부터 상피세포 박리와 증생, 그리고 상피세포 백관계의 혈관 확장증 등이 관찰된다 (Middaugh *et al.*, 1980). 아가미 새엽을 덮는 점액질과 상피세포층이 두꺼워지면 산소 확산 감소 및 호흡가스의 확산거리가 길어져 어류에는 호흡장애가 초래된다 (Powell *et al.*, 1994). 아치사 농도의 염소제에 급성 또는 반복적으로 노출된 어류는 여박현상 (bradycardia)을 보이고, 혈액 Ht와 아가미 환류량 및 환류빈도가 증가하는 데 (Bass and Heath, 1977), 이는 염소제에 노출된 어류의 체조직에 더 많은 산소를 공급하기 위한 일차적인 적응반응으로 보고하였다 (Black and McCarthy, 1990).

본 실험에서 ClO_2 처리수에 1회 노출된 넙치는 시수에 처리된 ClO_2 농도에 따라 호흡대사율의 변동 패턴은 3가지 형태로 구분되었다. 시수 중의 ClO_2 농도가 0.10~0.50 ppm으로 구배되었

을 때, 0.10과 0.20 ppm에서는 chlorination 전후 24시간 동안 넙치의 비체중 호흡률은 차이가 없었고, 0.30 ppm 노출군은 노출전의 실험군과 비교하여 14.9% 증가하였다 (Table 1). 이에 반해 0.40과 0.50 ppm에서는 ClO_2 처리직후에 호흡률이 현저하게 상승하였으나 시간이 경과하면서 ClO_2 처리전 비체중 호흡률 범위 이하로 낮아졌으며, ClO_2 처리 후 각각 4시간과 1시간 이내에 실험어는 모두 치사하였다. 이러한 결과는 ClO_2 처리수에 노출된 넙치의 생존율 조사 (Kim and Kim, 2003)에서 넙치 치사가 유발되는 ClO_2 잔류농도, 치사 역치농도 (lethal-threshold concentration, LTD)는 $0.27 \pm 0.02 \sim 0.34 \pm 0.03$ ppm 범위에 존재한다는 결과와 부합하였으나 실험어 크기, 수온 및 절식상태가 비슷한 조건에서 ClO_2 농도별로 1회 노출시킨 넙치의 생존율 측정치와 비교하면 치사가 다소 빠르게 진행된 것으로 나타났다. 본 실험에서는 미공여과 해수에 대해 암소조건에서 chlorination함으로써 유기물 농도가 낮은 해수는 높은 해수에 비해 (Kim and Kim, 2003), 암소에서는 일광 조건에 비해 (Park *et al.*, 2003) ClO_2 환원이 느리게 진행되는 점을 감안하면 넙치 치사를 초래하는 ClO_2 의 LTD가 오래 지속되어 나타난 현상으로 생각된다.

ClO_2 가 어류에 미치는 독성기작은 거의 알려져 있지 않다. Junli *et al.* (1997b)은 수중에 ClO_2 가 처리되면 농도구배 차이에 의한 확산기작으로 ClO_2 가 세균의 세포막을 투과하여 세포막과 원형질 성분을 산화시켜 강한 살균력을 가진다고 하였다. 그리고 Buckley *et al.* (1976)은 free chlorine에 노출된 어류는 아가미 손상에 의해 저산소 스트레스가 연속될 때 체내 저장 탄수화물을 즉시 가용할 수 있음에도 불구하고 혈중 무기염류의 항상성 유지를 위하여 능동수송 기작에 필요한 적량의 에너지를 공급할 수 없다고 하였다. 이렇듯 0.40과 0.50 ppm에 노출된 넙치가 ClO_2 처리직후에는 호흡률이 상승하였다가 이후 급격히 감소하면서 치사하는 것은 아가미 상피세포로 투과된 ClO_2 의 산화과정에 생긴 아

가미 손상으로 인한 호흡기능 부전과 극심한 삼투질 불균형 (Kim and Kim, 2003)이 넙치 치사에 상승작용을 일으킨 것으로 추정된다.

Bass and Heath (1977)는 0.4 ppm의 free chlorine에 8시간 간격으로 하루 3회 노출된 *S. gairdneri*에서는 0.5 ppm에 노출된 개체와는 달리 여박현상, 환류량 및 coughing rate가 염소처리 간기 (inter-chlorination period)에는 정상치로 회복되는 경향을 보인다고 하였다. 그리고 Powell and Perry (1997)는 환경수의 산소분압이 낮은 조건에서는 *O. mykiss*의 아가미 환류빈도와 동맥혈의 pH는 증가하고, 동맥혈의 산소 분압 (Po₂)과 이산화탄소 분압 (Pco₂)은 감소하는 반면에 산소분압이 높은 환경에서는 동맥혈의 pH가 감소하고 Po₂와 Pco₂는 증가하는 것을 확인하였다. 그러나 환경수의 산소분압이 높은 조건에서, 가수분해 과정에 OCl⁻로 해리되는 chloramine-T의 초기농도를 9 ppm (= 0.2 ppm free chlorine)으로 처리하여 1시간 노출시킨 *O. mykiss*는 아가미 환류빈도는 유의하게 증가하였지만 동맥혈의 Po₂와 Pco₂ 및 pH는 변화가 없었다. 이들은 chloramine-T 노출어의 환류빈도가 증가하는 것은 아가미에 분비된 점액으로 인해 초래되는 이산화탄소의 확산 장애에 대한 생리적 보상작용으로 추정하였으며, Powell and Perry (1996)는 산소포화 조건에서 chloramine-T 9 ppm에 1시간 노출된 *O. mykiss*는 아가미 상피세포의 손상과 상피세포를 덮는 점액이 많아지면 아가미를 통한 산소교환 보다는 이산화탄소 교환이 심각하게 영향을 받는다고 하였다.

넙치가 수용된 여과해수에 12시간과 24시간 주기로 각각 2회에 걸쳐 ClO₂를 처리하여 호흡률을 경시적으로 조사한 바 (Fig. 4, 5), 0.10과 0.20 ppm에 노출된 넙치의 호흡률은 대조군과 차이는 없었으며, 0.30 ppm 노출군은 2회째 ClO₂가 처리된 후에는 호흡대사율이 1회째에 비해 증가하였다 (Table 1, 2). 0.30 ppm 노출군에서 보이는 호흡률 증가는 아치사 농도에 반복 노출된 넙치가 생리적 스트레스 상승에 대응하여 체내

항상성을 유지하기 위한 일련의 기작으로 저장 탄수화물의 대사촉진 및 혈당 상승과 더불어 체내 가용 에너지를 확보하기 위한 생리적인 적응 반응의 결과로 여겨진다.

염소제가 어류의 호흡기능에 미치는 부수적인 영향으로는 염소처리수내 free chlorine이 용존 암모니아와 반응하여 생성된 chloramine이 Hb를 methemoglobin으로 산화시켜 호흡대사능이 감소하는 현상은 잘 알려져 있다 (Travis and Heath, 1981; Heath, 1995). 한편, Powell *et al.* (1994)은 염소제의 치사 독성은 염소제 종류, 노출시간 및 어종에 따라 다를 뿐 아니라 수온, pH, 유기물 농도와 같은 수질요인에 따라 다르다고 하였다. Brooks and Bartos (1984)는 *S. gairdneri*, emerald shiners, *Natropis atherinoides* 및 channel catfish, *Ictalurus punctatus*의 내성 상한 온도인 20, 23, 25°C에서 monochloramine (NH₂Cl), dichloramine (NHCl₂), HOCl 및 OCl⁻에 대해 어종별로 치사독성을 조사하였다. *I. punctatus*의 경우 15분 노출동안 반수치사농도 (15 min-LC₅₀)는 각각 0.99, 0.34, 0.26 및 1.27 ppm, 그리고 15분 노출동안 실험어류의 1%가 치사하는 농도 (15 min-LC₁)는 각각 0.74, 0.24, 0.21 및 0.76 ppm으로서 치사독성은 HOCl이 가장 높았다. 또한 시험한 염소제 4종에 대한 어종별 민감도는 *N. atherinoides*가 *I. punctatus*의 1.8배, *S. gairdneri*에 비해서는 3.3배 민감한 것으로 조사되어 양식장 사육수의 염소처리 과정에는 총 잔류염소 (total residual chlorine, TRC) 농도를 위시하여 염소제 종류, 어종 및 노출시간에 대한 세심한 주의가 필요하다고 지적하였다. Brooks and Seegert (1977)는 어류가 염소제에 노출되면 수온이 높고 pH가 낮을수록 치사독성이 강하게 작용하는 데 수온 10°C와 15°C에서 염소처리한 담수의 TRC 가운데 free chlorine의 조성비율은 각각 75%와 50%, *S. gairdneri*에 대한 30 min-LC₅₀은 각각 0.99와 0.94 ppm TRC이며, Powell *et al.* (1994)은 pH 6.5에서 chloramine-T의 *O. mykiss*에 대한 치사농은 pH가 9.5인 조건에 비

해 6배 증가한다고 하였다.

ClO₂는 살균능이 강하며, chlorination 과정에 분해산물에 의한 환경 및 보건 위해성이 없는 것으로 알려져 있으나 (Juli *et al.*, 1997b) 전술된 염소제가 어류에 미치는 free chlorine 유효농도와 비교하여 볼 때 넙치에 대한 치사능이 높은 것으로 나타났다. ClO₂ 농도별로 노출시킨 넙치 호흡대사율의 경시적 측정치로부터 0.40 ppm 이상에서는 ClO₂ 처리수에 일회성으로 단기간 노출되더라도 호흡기능 부전은 심각하였다. 0.30 ppm에서는 12시간 또는 24시간 주기로 2회에 걸쳐 간헐적으로 노출되면 1회 노출군에 비해 생리적 스트레스가 가중된 결과로 추정되는 호흡대사율 상승이 현저하게 지속되는 현상을 나타내었다. 이러한 점에서 ClO₂ 농도별 chlorination 시간 주기와 노출시간 및 환경수의 산소포화도 등에 따른 생리적 변화에 대해서는 보다 세밀한 검토가 필요한 것으로 판단되었다.

요 약

사육해수에 이산화염소 (ClO₂)가 간헐적으로 처리되었을 때 넙치의 호흡대사율에 미치는 영향을 파악하기 위하여, 넙치가 수용된 여과해수에 24시간째에 1회, 그리고 1회 처리 후 12시간과 24시간 간격으로 구분한 실험구에 ClO₂를 1회 반복 처리하면서 chlorination 전후 매 3분간의 호흡량을 연속 6분 간격으로 각각 24시간 측정하였다. 수온 20°C의 ClO₂-free seawater에서 960회 측정된 넙치의 비체중 호흡률 범위는 0.459~1.037 ml O₂/g, dry wt./hr이었고, 총 평균 호흡률은 0.680±0.097 ml O₂/g, dry wt./hr이었다. 0.1과 0.2 ppm ClO₂로 1회 및 2회 처리에 노출된 넙치의 24시간 총 평균 호흡대사율은 ClO₂ 처리 전 동일 실험군의 호흡률 평균치와 비슷한 값을 보였다. 0.30 ppm에 1회 노출된 넙치는 chlorination 전의 비체중 호흡률 평균치에 비해 14.9%, 1회 처리 후 12시간과 24시간 간격으로 1회 반복 처리한 해수에 노출된 것은 각각 23.3%와

22.4% 증가하였다. 0.40과 0.50 ppm ClO₂에 일회성으로 노출된 것은 ClO₂ 처리직후 각각 1시간과 30분간에 걸쳐 호흡률이 급격하게 증가하였으나 0.40 ppm에서는 ClO₂ 처리 후 4시간, 0.50 ppm에서는 1시간 내에 모든 개체가 사망하였다.

참 고 문 헌

- APHA : Standard method for the examination of water and wastewater, 15th ed. American Public Health Association, Washington, DC., 1981.
- Bass, M. L. and Heath, A. G. : Cardiovascular and respiratory changes in rainbow trout, *Salmo gairdneri*, exposed intermittently to chlorine. *Wat. Res.*, 15 : 497-502, 1977.
- Black, M. C. and McCarthy, J. F. : Effects of sublethal exposure to chlorine on the uptake of polychlorinated biphenyl congeners by rainbow trout, *Salmo gairdneri* (Richardson). *Aquat. Toxicol.*, 17 : 275-290, 1990.
- Brodeur, J. C., Dixon D. G. and McKinley, R. S. : Inhibition of oxygen consumption by pentachlorophenol and tetrachloroguaiacol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Aquat. Toxicol.*, 54 : 143-148, 2001.
- Brooks, A. S. and Bartos, J. M. : Effects of free and combined chlorine and duration on rainbow trout, channel catfish, and emerald shiners. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 113 : 786-793, 1984.
- Brooks, A. S. and Seegert, G. L. : The effects of intermittent chlorination on rainbow trout and yellow perch. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 106 : 278-286, 1977.
- Buckley, J. A., Whitmore, C. M. and Matsuda, R. I. : Changes in blood chemistry and blood cell morphology in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) following exposure to sublethal level of total chlorine in municipal waste-

- water. J. Fish. Res. Board Can., 34 : 1034-1039, 1977.
- Chanda, S. : Chlorine dioxide. In *Encyclopedia of toxicology*, Vol I, pp. 307-308. ed., Wexler, P., Academic Press, New York, 1998.
- Davies, R. W., Wrona, F. J. and Kalarani, V.: Assessment of activity-specific metabolism of aquatic organisms: An improved system. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 49 : 1142-1148, 1992.
- Gerundo, N., Alderman, D. J., Clifom-Hadley, R. S. and Feist, S. W. : Pathological effects of repeated doses of malachite green: a preliminary study. J. Fish Dis., 14 : 521-532, 1991.
- Harris, J. O., Magurie, G. B., Edwards, S. J. and Hindrum, S. M. : Effect of ammonia on the growth rate and oxygen consumption of juvenile greenlip abalone, *Haliotis laevis* Donovan. Aquaculture, 160 : 259-272, 1998.
- Harris, J. O., Magurie, G. B., Edwards, S. J. and Johns, D. R.: Low dissolved oxygen reduces growth rate and oxygen consumption rate of juvenile greenlip abalone, *Haliotis laevis* Donovan. Aquaculture, 174:265-278, 1999.
- Heath, A. G. : Water pollution and fish physiology. CRC Press, New York, 359 pp., 1995.
- Junli, H., Li, W., Nenqi, R. Li, L. X. Fun, S. R. and Guanle, Y. : Disinfection effect of chlorine dioxide on viruses, algae and animal planktons in water. Wat. Res., 31(3) : 455-460, 1997a.
- Junli, H., Li, W., Nenqi, R., Li, L. X., Fang, M. and Juli : Disinfection effect of chlorine dioxide on bacteria in water. Wat. Res., 31(3) : 607-613, 1997b.
- Kim, W. S., Jeon, J. K., Lee, S. H. and Huh, H. T. : Effects of pentachlorophenol (PCP) on the oxygen consumption rate of the river puffer fish *Takifugu obscurus*. Mar. Ecol. Prog. Ser., 143 : 9-14, 1996.
- Kim, H. Y. and Kim, J. D. : Survival and physiological response of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* exposed to seawater chlorinated by chlorine dioxide. J. of Aquaculture, 16(3) : in press, 2003.
- Mallatt, J. : Fish gill structure changes induced by toxicants and other irritants: A statistical review. Can. J. Fish Aquat. Sci., 42 : 630-648, 1985.
- Middaugh, D. P., Burnett, I. E. and Couch, J. A. : Toxicology and physiology responses of the fish, *Leiostomus xanthurus*, exposed to chlorine produced oxidants. Estuaries, 3 : 132-141, 1980.
- Park, K. H., Oh, M. J. and Kim, H. Y. : Disinfection effect of chlorine dioxide on pathogenic bacteria from marine fish. J. of Aquaculture, 16(2) : 118-123, 2003.
- Powell, M. D., Spcare, D. J. and MacNair, N. : Effects of intermittent chloramine-T exposure on growth, serum biochemistry, and fin condition of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Can. J. Fish. Aquat. Sci., 51 : 1728-1736, 1994.
- Powell, M. D. and Perry, S. F. : Respiratory and acid-base disturbances in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) blood during exposure to chloramine-T, paratoluenesulphonamide, and hypochlorite. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 53 : 701-708, 1996.
- Powell, M. D. and Perry, S. F. : Respiratory and acid-base disturbances in rainbow trout blood during exposure to chloramine-T under hypoxia and hyperoxia. J. Fish Biol., 50 : 418-423, 1997.
- Powell, M. D., Haman, F., Wright, G. M. and Perry, S. F. : Response of rainbow trout

- (*Oncorhynchus mykiss*) to a graded hypoxia following repeated intermittent exposure to chloramine-T. *Aquaculture*, 165 : 27-39, 1998.
- Solomano, L. : Determination of ammonia in natural waters by the phenolhypochlorite method. *Limnol. Oceanogr.*, 14 : 799-801, 1969.
- Speare, D. J., Goff, G., MacIsaac, P., Wecherkiwsky, J. and MacNair, N. : Effects of formalin and chloramine-T treatments on oxygen consumption of juvenile salmonids. *J. Aquatic Anim. Health*, 8 : 285-291, 1996.
- Thorburn, M. A. and Moccia, R. D. : Use of chemotherapeutics on trout farm in Ontario. *J. Aquatic Anim. Health*, 5 : 85-91, 1993.
- Travis, T. W. and Heath, A. G. : Some physiological responses of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to intermittent monochloramine exposure. *Wat. Res.*, 15 : 977-983, 1981.
- Wan, M. T., Watts, R. G. and Cheng, W. : Acute toxicity of inorganic chloramines to *Daphnia magna* in two types of dilution Water. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 65 : 147-152, 2000.
- Webb, N. A., Shaw, J. R., Morgan, J., Hogstrand, C. and Wood, C. M. : Acute and chronic physiological effects of silver exposure in three marine teleosts. *Aquat. Toxicol.*, 54 : 161-178, 2001.
- Wrona, F. J. and Davies, R. W. : An Improved flow-through respirometer for aquatic macroinvertebrate bioenergetic research. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 41 : 380-385. 1992.

Manuscript Received : May 4, 2003

Revision Accepted : June 23, 2003

Responsible Editorial Member : Joon-Ki Chung
(Pukyong Univ.)