

이산화염소(ClO_2) 처리해수에 노출된 넙치, *Paralichthys olivaceus*의 생존과 생리적 반응

김흥윤* · 김진도¹

여수대학교 수산생명의학과

¹국립수산과학원 여수수산종묘시험장

Survival and Physiological Response of Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus* Exposed to Seawater Chlorinated by Chlorine Dioxide (ClO_2)

Heung-Yun Kim* and Jin-Do Kim¹

Department of Aqualife Medicine, Yeosu National University, Yeosu 550-749, Korea
¹Yeosu Marine Hatchery, NFRDI, Yeosu 556-906, Korea

This study was conducted to estimate the effects of residual chlorine dioxide (ClO_2) in chlorinated seawater on survival and physiological responses (hematocrit: Ht, hemoglobin: Hb, serum electrolyte and glucose levels, and osmolality) of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. All the flounders were exposed for 10 min to different concentrations of residual ClO_2 just after chlorination for 1 min in each experimental aquarium (EA). ClO_2 -free seawater was continuously supplied to each EA after 10 min exposure to ClO_2 . By means of probit analysis, the median lethal times (LT_{50} , min) of flounder exposed to 0.43 and 0.51 ppm ClO_2 were at 103 and 32 min, respectively. In the range from 0.34 to 0.51 ppm ClO_2 , the values of Ht, Hb, electrolytes and osmolality of fish exposed to ClO_2 were significantly elevated as elapsed time and residual concentrations of ClO_2 increased after chlorination. The levels of Ht, Hb, electrolytes and osmolality in flounder exposed to 0.27 ppm ClO_2 were not significantly different compared to control fish, which were maintained in ClO_2 -free seawater; however, the levels of serum glucose were significantly increased with elapse times.

Keywords: Chlorine dioxide, Olive flounder, Survival, LT_{50} , Physiological response

서 론

염소계 소독제(chloramine-T, dichloramine, monochloramine, hypochlorous acid 및 hypochlorite ion)는 수용성으로서 산화력이 강하고, 햇빛에 쉽게 분해되는 화학적인 특성 때문에 포르말린과 더불어 오래전부터 양식어류의 세균성 질병 치료, 사육수의 병원체 살균 및 예방제로서 많이 사용되었으며(Thorburn and Moccia, 1993; Powell and Perry, 1996; Speare et al., 1996), 음용수의 살균과 발전소 냉각계통의 antifouling agent 등으로 다양하게 활용되어 왔다(Hall et al., 1981; Heath, 1995). 소독용 염소제는 크게 차아염소산(HOCl)계의 나트륨, 칼륨 및 칼슘염 종류와 이산화염소(ClO_2)로 대별할 수 있으며, 이들의 세균 불

활화 기작은 세포막의 파괴, 분해 및 핵산 손상 등에 의해 일어난다(Bass and Heath, 1977; American Public Health Association, 1995). 그러나 염소제가 수중에 투입되면 화학적 성질에는 다소 차이를 보이는데 차아염소산제가 수중에 처리되면 가수분해가 되면서 일차적으로 독성이 강한 free chlorine (FC)이 생성되고, 이것이 용존 암모니아와 반응하면 FC에 비해 오래 잔류되는 chloramine계의 combined chlorine이 생성된다. 이들 부산물이 어류에 미치는 저해성을 보면, FC는 주로 아가미 조직의 손상을 유발하고, combined chlorine은 적혈구 hemoglobin을 methemoglobin으로 산화하여 빈혈증을 초래하며, 또한 발암성 물질인 것으로 알려져 있다(Travis and Heath, 1981; Heath, 1995). 이런 점으로 인해 미국 환경보호청에서는 음용수 등의 소독제로서 ClO_2 사용을 권장하고 있다(Chanda, 1998).

ClO_2 는 수중에 처리 시에 가수분해 되지 않아 분자상태로 존

*Corresponding author: hykim@yosu.ac.kr

재하고, 광분해가 빠르게 일어나는 광범위 소독제로 보고되어 있다(Junli et al., 1997a, b). 수산 양식장용 염소 소독제는 수중에 투입된 뒤 어류에 미치는 저해성이 적으면서 살균력이 높은 것이 효과적이라 할 수 있으며, 사육용수에 처리할 때에는 병원생물에 대한 유효 살균농도와 함께 양식생물에 미치는 영향 농도 및 안전농도에 대한 이해가 선결되어야 한다. 최근 국내에서 양식장 살균제로 ClO_2 가 많이 사용되고 있으며, 수중 병원체 살균과 어병 예방을 위해 일정농도로 ClO_2 를 투입하여 양식생물의 발병 방지를 기대하지만 과량 사용에 의한 양식생물의 폐사위험도 상존한다고 볼 수 있다. 현재까지 양어용수 소독과 관련한 ClO_2 연구는 해산어류 병원세균의 살균효과를 조사한 Park et al. (2003)의 보고 외에는 거의 알려져 있지 않다.

본 연구는 유수식 사육수조에 넙치 치어를 수용한 다음 해수에 ClO_2 를 농도별로 처리하여 10분간 노출시킨 뒤 실험구에 여과해수를 유수하면서 넙치의 생존과 생리상태에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

실험어

실험어는 종묘생산에서 성어로 사육되어지는 과정이 주로 육상수조식 양식장에서 이루어지는 넙치(*Paralichthys olivaceus*)를 사용하였다. 실험어는 경남 통영시 옥지도와 전남 영광군에 소재하는 넙치 양식장에서 분양받아 실험실로 운반하여 총 순환수량 7톤의 순환여과식 FRP 사육수조(용량, 1 m³)에 분산시

켜 수용한 다음 수온을 20°C 전후로 조절하고, 시판되는 넙치용 부상사료를 공급하며 2주간 사육하였다. 실험어 크기는 생존율 조사에 전장 12.1±1.4 cm의 것을, 그리고 ClO_2 처리해수에 노출된 실험어의 생리적 반응 조사에는 적량의 혈액 확보 및 채혈이 용이하도록 전장 18.7±1.2 cm의 넙치를 각각 사용하였다.

ClO_2 노출실험 장치

ClO_2 처리해수에 10분간 노출된 넙치의 생존율과 생리적 반응 조사에 사용된 노출실험 장치는 항온실에 설치되었다(Fig. 1). 대조구와 실험구(용량, 200 L)에는 수온 20°C의 실험실 조건에 순치시킨 실험어를 실험개시 48시간 전에 수용한 다음 절식상태로 유지하여서 어류 배설산물에 의한 실험구내 ClO_2 농도 및 섭식에 따른 혈액성상의 변화가 적도록 하였다. ClO_2 농도 및 경과시간별 노출실험은 실험어가 실험종료까지 일회성 취급이 되도록 다음과 같이 실시하였다. 실험수온대로 조절된 2개의 저수탱크(Ø 1.3 m×1.7 m)내 해수는 전기펌프로서서 카드리쉬 필터(공경, 5 µm)를 거쳐 해수저장조로 유수되게 하였으며, 저장조의 최상단부에는 수위조절용 부이식 전원개폐 스위치(SZM-Z15-G14, Korea)를 장치하였다. 저장조의 최대수위는 부이를 매달고 있는 로프길이를 조정하여 저장탱크 상단부에 설치된 overflow 배수구 지름의 약 1/2 높이로 유지하였다. 과량의 여과해수는 저장탱크 배수구를 통해 대조구로 overflow되도록 하였으며, 각 실험구에는 단위시간당 비슷한 량의 여과해수가 ClO_2 혼합조를 경유하여 실험구로 흘러가도록 하였다. 각

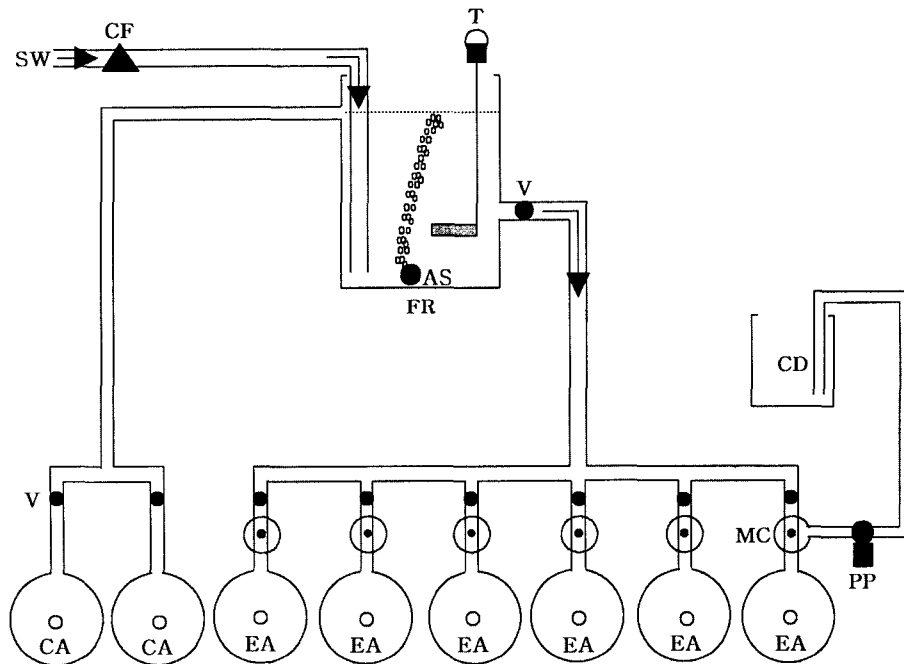


Fig. 1. Schematic diagram of equipments used in the exposure test of chlorine dioxide (ClO_2). AS: air stone, CA: control aquaria (×2), CD: 0.10% ClO_2 stock solution, CF: cartridge filter, EA: experimental aquaria (×2), FR: filtered-seawater reservoir, MC: ClO_2 mixing chambers, PP: peristaltic pump, SW: seawater. T: thermostat. V: PVC valves.

실험구는 사육수 배출시에 실험어 유입을 방지하면서 저수량이 표시된 수위조절용 이중 스탠드 파이프를, 실험구 상부에는 실험어의 물리적 자극을 줄이기 위해 차광막을 설치하였으며, 공기공급은 130~150 ml/min으로 주입하였다.

ClO₂ 농도구배

실험구의 ClO₂ 농도구배는 냉장보관중인 ClO₂ 원액(assay, 5%; 순도, 99%)의 유효농도를 측정 후 초순수로서 0.10% stock solution을 제조하여 사용하였다. 실험개시 때에는 실험어가 수용된 실험구의 배수밸브를 열어 사육수를 150 L 표시선까지 배출시켜서 수조저면의 침전물을 제거하였고, 이어서 여과해수를 약 30 L 보충하여 수질분석용 시수를 채수하였다. 그 후 약 1분간 peristaltic pump (Eyela-1000)로 0.10% ClO₂를 공급해 여과해수와 혼합되어 실험구에 유수되도록 하였다. 사육수량이 200 L 표시선에 이르면 여과해수 공급을 중지한 다음 폭기 상태에서 곧바로 시수를 채수하여 100 ml 채수병에 약 80%를 채워 냉동보관하였고, 10분이 경과하면 실험구에 여과해수를 유수하였다.

사육수질과 ClO₂ 농도 측정

ClO₂ 처리 후 잔류농도는 수질 조건에 따라 변동될 수 있으므로 사육수질을 조사하였다. 수온, 용존산소 및 염분은 수질분석기(YSI 85 및 YSI 58)로, pH는 pH meter (Methrom 704)로서, 부유물질(SS) 농도와 화학적 산소요구량(COD)은 해양환경공정시험방법(해양수산부, 1998)에 준해 측정하였다. 실험어가 수용된 사육수에 1분간에 걸쳐 ClO₂를 처리한 직후 시수 중에 잔류하는 ClO₂ 농도는 냉동보관한 시수를 ion chromatography (Dionex-600, USA)로 정량하였다. 측정은 용매로서 2.7 mM Na₂CO₃와 1 mM NaHCO₃를, flow rate는 1.2 ml/min으로 조정하여 ClO₂ 회색액 10 µl을 guard column (IonPac AG14)에 주입하여 main column (IonPac AS14-4 mm)을 통과시켰고, 추출된 ClO₂는 detector (AMMS-ICE)로 검출하였다.

부유물질(SS) 농도별 ClO₂ 처리수의 잔류농도 변화

수온 20°C에서 SS 농도가 각각 다른 해수에 1분에 걸쳐 ClO₂ 처리를 종료한 직후의 초기농도를 기준으로 시간경과에 따라 시수에 잔류하는 ClO₂ 농도를 triplicate로 실내에서 조사하였다. 각 실험구에는 130~150 ml/min으로 공기를 주입하였으며, 실험어는 수용되지 않았다.

생존율과 반수치사시간(LT₅₀)

넙치를 ClO₂ 농도별로 10분간 노출시킨 뒤 경과시간에 따른 생존율은 3회에 걸쳐 실험하였다. 실험어(전장, 12.1±1.4 cm)는 실험개시 48시간 전에 대조구와 실험구당 20마리씩 수용하여 절식상태로 유지하였다. 측정은 실험구에 약 1분에 걸쳐 ClO₂ 처리를 완료한 직후의 평균 농도(0.07±0.04, 0.13±0.04, 0.27

±0.02, 0.34±0.03, 0.43±0.04 및 0.51±0.03 ppm)에 각각 10분간 노출시킨 다음 여과해수를 공급하면서 24시간 동안 사망한 개체수를 관찰해서 생존율과 LT₅₀을 조사하였다.

혈액 성상 및 혈청 성분 분석

ClO₂ 처리해수에 노출된 넙치의 생리적 반응 측정은, 설정농도 0.05와 0.10 ppm의 저농도구는 ClO₂ 처리직후 시수내 잔류농도가 평균농도의 ±20% 범위를 초과(Table 1)함으로써 독성 영향시험 결과의 유효농도로 산정하기 어렵기 때문에(Rand et al., 1995), 대조구(0 ppm)를 포함하여 평균농도 0.27±0.02, 0.34±0.03, 0.43±0.04 및 0.51±0.03 ppm ClO₂에 대해서만 실시되었다. 실험구에는 실험개시 48시간 전에 실험구당 넙치(전장, 18.7±1.2 cm)를 5마리씩 수용하여 절식상태로 유지하였고, 1분간의 ClO₂ 처리직전 시간을 기준으로 경과시간(0, 0.5, 1, 2, 3, 4 및 6 h)별로 실험구를 구분하여 duplicate로 실험하였다. 실험어는 ClO₂ 처리 후 10분간 노출시킨 뒤 여과해수를 유수하면서 채혈시간에 이르면 각 실험구당 생존개체 모두를 동시에 포획하였고, 각 개체는 포획에서 채혈종료까지 1분 내에 미병부혈관에서 채혈하였다. 혈액 중 일부는 항응고제(10% EDTA-2Na)를 처리한 뒤 4°C에 냉장보관하였고, 24시간 내에 적혈구 용적비(hematocrit; Ht)와 혈색소 함량(hemoglobin; Hb)을 각각 microhematocrit법과 cyanmethemoglobin 상법으로 분석하였다. 혈액의 나머지는 원심분리용 튜브(용량, 1.5 ml)에 넣어 실온에서 30분 방치한 뒤 5,000 rpm에서 10분간 원심분리한 혈청을 -70°C에 보관하여 다음 항목을 분석하였다. 혈청 sodium (Na⁺) 및 chloride ion (Cl⁻) 농도는 전해질 분석기(FUGI DRI-CHEM 800)로, 삼투질 농도는 삼투압측정기(Osmomat-030)로, glucose 농도는 혈청에 o-Toluidine 시약(Sigma 635)을 첨가해서 10분간 중탕 가열한 뒤 방냉하여 생성된 청록색 복합물을 630 nm에서 분광광도계(Shimadzu-1204)로서 흡광도를 측정하여 glucose 표준용액(Sigma 14-11)에 대한 검량선으로부터 산출하였다. 한편, 생리적 반응 조사의 대조구는 실험개시 48시간 전에 수조당 넙치를 5마리씩 절식상태로 수용하여 두었다가 48시간이 경과된 시점을 기준으로 0, 2, 4 및 6시간째에 전술한 방법으로 채혈하였다(Table 1).

통계처리

반수치사시간(LT₅₀) 및 95% 신뢰한계 LT₅₀ 범위는 ClO₂ 농도별로 측정된 생존율을 SPSS 통계패키지(version 10.0)로 probit 분석하였다. 생리적 반응 실험의 결과치는 ClO₂ 농도 및 경과시간별 duplicate 실험구의 넙치 10마리 중에서 채혈에 걸린 시간이 기준을 초과하였거나 적량의 혈액이 확보되지 않은 것은 제외하여 각각의 결과는 n=8로 처리되었다. 다만 0.51 ppm에서는 1시간째 생존개체 2마리로부터, 0.43 ppm에서는 경과시간 2, 3, 4 및 6시간째에 각각 5, 4, 5 및 3마리가 채혈되었다. 통계처리는 one-way ANOVA 및 일원배치 분산분석(Turkey-test)에 의

Table 1. Water quality and concentrations of residual chlorine dioxide (ClO₂) in each experimental aquarium (EA) before and just after chlorination in 1 min. The duplicate experiments of physiological responses of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) exposed to each mean concentrations of ClO₂ were conducted separately from the survival test.

	Expected concentration of ClO ₂ just after chlorination (ppm)						
	Control (0)	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50
Temperature (°C)	19.9±0.2	19.9±0.2	19.9±0.2	19.9±0.2	19.9±0.2	19.9±0.2	19.9±0.2
Salinity (ppt)	30.7±0.3	30.±0.3	30.7±0.3	30.7±0.3	30.7±0.3	30.7±0.3	30.7±0.3
pH	8.13±0.12	8.12±0.09	8.11±0.09	8.07±0.08	8.05±0.10	8.07±0.07	8.04±0.09
Dissolved oxygen (DO, ppm)	6.51±0.24	6.63±0.19	6.47±0.17	6.35±0.21	5.97±0.29	6.02±0.19	6.22±0.19
Chemical oxygen demand (COD, ppm)	0.52±0.03	0.51±0.06	0.48±0.10	0.49±0.07	0.43±0.09	0.44±0.08	0.47±0.08
Suspended solids (SS, ppm)	3.17±0.45	2.98±0.21	2.36±0.15	2.54±0.21	2.17±0.28	2.10±0.15	1.92±0.11
Tested No. of survival experiment ¹⁾	3	3	3	3	3	3	3
No. of EA used in physiological response test ²⁾	4 ³⁾	0	0	12	12	12	12
No. of residual ClO ₂ determination just after chlorination	0	3	3	9	9	9	9
Measured ClO ₂ concentration (ppm)	ND ⁴⁾	0.07±0.04 ⁵⁾	0.13±0.04 ⁵⁾	0.27±0.02	0.34±0.03	0.43±0.04	0.51±0.03

¹⁾20 flounders (total length, 12.1±1.4 cm) in each EA were maintained and not fed 48 h prior to initiation of the experiment.

²⁾5 flounders (total length, 18.7±1.2 cm) in each EA were maintained and not fed 48 h prior to initiation of the experiment. Blood was collected on 0, 0.5, 1, 2, 3, 4 and 6 h of elapse time, each value of blood parameters was represented as the mean value (n=8) with elapse times in Fig. 5, 6 and 7 except 1 h (n=2) at 0.51 ppm, and 2 (n=5), 3 (n=4), 4 (n=5) and 6 h (n=3) at 0.43 ppm.

³⁾Blood was collected on 0, 2, 4 and 6 h of elapse time, each value of blood parameters was represented as control by means of the gross mean value (n=18) with ClO₂ concentrations in Fig. 5, 6 and 7.

⁴⁾Not determined.

⁵⁾Not applied for measuring the physiological response because of the instability of residual ClO₂ concentrations just after chlorination at low levels.

해 ClO₂ 농도별 대조군과 ClO₂ 처리해수에 노출된 실험군 간에 유의성을 검정하였다.

결 과

ClO₂ 평균농도 및 부유물질(SS) 농도별 ClO₂ 처리수의 잔류농도 변화

ClO₂ 처리직전 각 실험구의 수질은 COD가 평균 0.43±0.09~0.52±0.03 ppm, SS가 1.92±0.11~3.17±0.45 ppm으로 비교적 균일한 값을 보였으며, 실험구에 1분에 걸쳐 ClO₂ 처리를 종료한 직후, 경과시간 0인 시점에 각 실험구의 해수에 잔류하는 ClO₂ 농도는 실측농도±0.02~0.04 ppm의 범위로 구배되었다 (Table 1).

SS 농도가 각각 다른 해수에 ClO₂ 처리직후의 잔류농도를 기준으로 시간경과에 따라 ClO₂ 농도변화를 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. ClO₂ 잔류 농도는 SS가 높은 해수에서 시간이 경과할수록 빠르게 감소하였다. SS가 8.71±0.09 ppm인 자연해수는 ClO₂ 처리직후 시수중의 잔류 농도는 0.41±0.04 ppm이었고, 그 후 5분이 지나면 0.24±0.02 ppm으로 감소하였다. SS가 3.19±0.04 ppm인 해수는 ClO₂ 처리직후 4.00±0.03 ppm에서 5분이 경과하면 0.32±0.02 ppm으로, 1시간째에는 0.08±0.01 ppm이 잔류하였다.

생존율과 반수치사시간(LT₅₀)

넙치가 수용된 실험구에 ClO₂를 농도별로 처리(0.07~0.51

ppm)하여 10분 동안 노출시킨 뒤 여과해수를 유수하면서 넙치의 생존율을 조사한 바(Fig. 3), 대조구와 0.07, 0.13 및 0.27 ppm ClO₂에서는 사망하는 개체가 없었다. 0.51 ppm의 경우 노출 후 90분이 지나면 모든 개체가 사망하였으며, 0.43 ppm에서는 1시간째 생존율이 85.0±3.5%, 3시간 경과 후에는 13.3±6.0%가 생존하였다. 또한 0.34 ppm에서는 실험어가 6시간이 지나면 8.0±2.4%의 사망개체가 발생하였으나 이후 24시간까지는 치사하는 개체가 없었다.

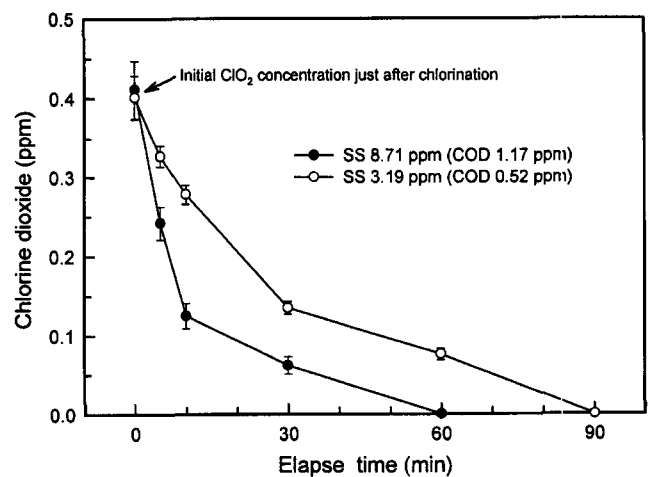


Fig. 2. Changes in the residual concentrations of chlorine dioxide (ClO₂) in chlorinated seawater with different concentrations of suspended solids (SS) at 20°C. Chlorinated-seawater was continuously aerated at the rate of 130~150 ml/min. The values are mean±S.E. (n=3).

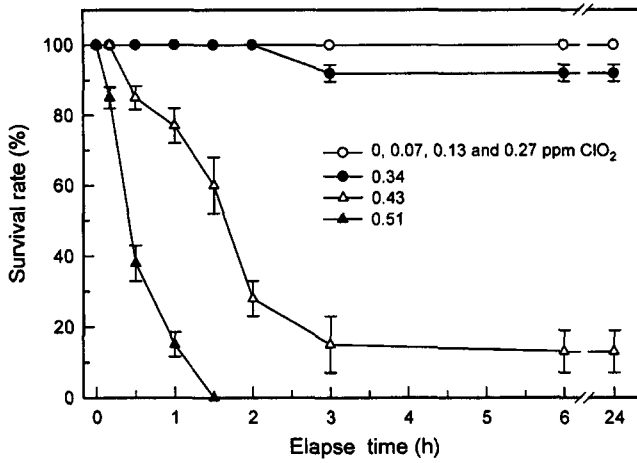


Fig. 3. Survival rates of flounder exposed to different concentrations of chlorine dioxide (ClO₂) with elapse times on zero time just after chlorination. The values are mean±S.E. (n=3).

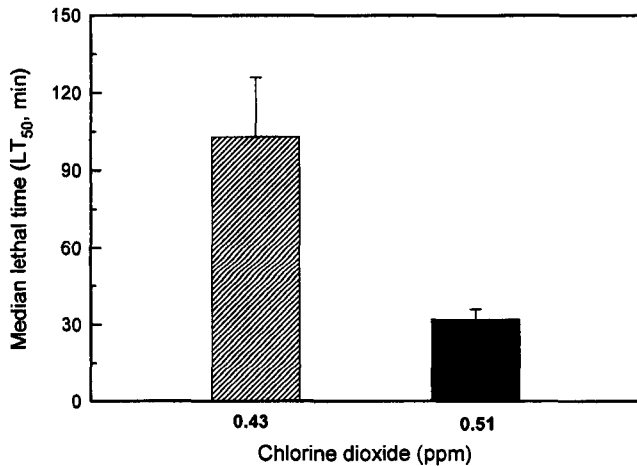


Fig. 4. Median lethal times (LT₅₀) of flounder exposed to different concentrations of chlorine dioxide at 20°C. The bars represent LT₅₀±95% confidence limit of LT₅₀.

ClO₂ 농도별 생존율 결과치로부터 LT₅₀과 95% 신뢰한계 LT₅₀ 범위를 probit 분석으로 구해본 결과(Fig. 4), 잔류농도 0.43과 0.51 ppm의 ClO₂ 처리 해수에 노출된 넙치의 LT₅₀은 각각 103분과 32분이었고, 95% 신뢰한계 LT₅₀ 범위는 각각 83분~129분과 28분~36분으로 산출되었다.

ClO₂에 노출된 넙치의 생리적 반응

Hematocrit (Ht)와 hemoglobin (Hb) 농도

넙치가 수용된 실험구에 ClO₂를 농도별로 처리(0.27, 0.34, 0.43 및 0.51 ppm)하여 10분간 유지한 뒤 여과해수를 공급하면서 시간경과에 따라 채혈한 넙치의 Ht와 Hb를 조사하여 Fig. 5에 나타내었다. ClO₂ 0.43 ppm에서는 2시간이 경과하면서 대조군에 비해 Ht가 유의하게 증가하였으며(P<0.05), 3시간 후에는 32.4±1.8%로서 대조군의 23.7±1.1%에 비해 현저하게 증

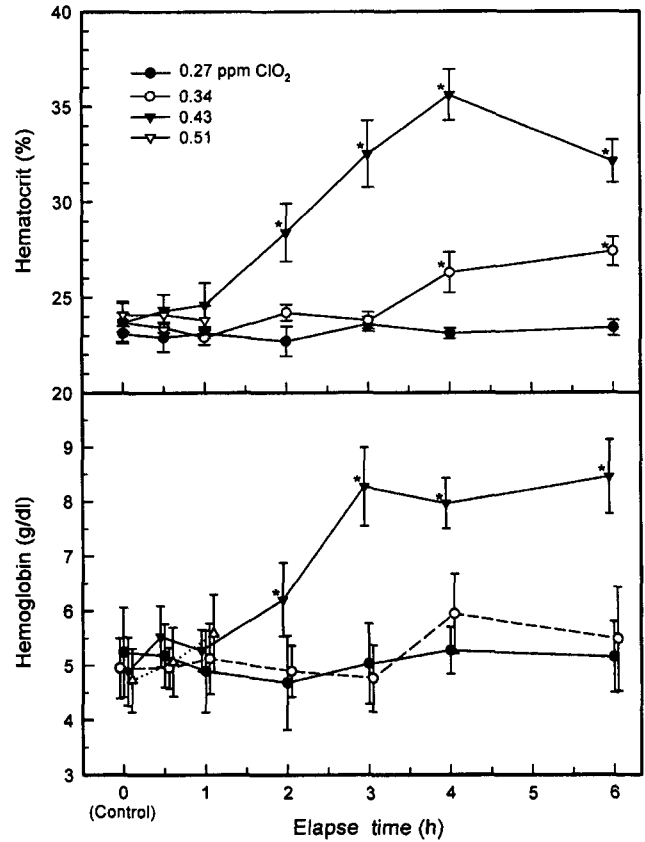


Fig. 5. Blood hematocrit and hemoglobin levels of flounder exposed to different concentrations of chlorine dioxide (ClO₂) over time. Asterisks point out significant difference between the ClO₂-exposed fish and control fish (P<0.05).

가하였다. 또한 0.34 ppm에서는 4시간이 지나면서 Ht가 증가하였고, 0.27 ppm에 노출된 실험어의 Ht는 실험기간 동안 대조군과 유의한 차이는 없었다(P>0.05). 0.51 ppm ClO₂에서는 2회 반복 실험구에서 생존한 실험어 2마리로부터 노출 후 1시간째의 Ht 변화를 확인할 수 없었다.

ClO₂ 처리해수에 노출된 넙치의 혈액 Hb는 Ht와 비슷하게 변동하는 경향을 보였으며, 0.27 ppm에서는 대조군과 비교하여 유의한 차는 없는 것으로 나타났다(Fig. 5). 그러나 0.34 ppm에 유지된 개체는 4시간이 경과한 시점에 다소 증가하였으며, 0.43 ppm에서는 2시간이 지나면 Hb는 유의하게 증가하였다. 그리고 0.51 ppm에 노출된 실험어는 ClO₂ 처리 후 1시간째 생존한 실험어 2마리의 평균치는 대조군과 차이가 없었다.

혈청 전해질

넙치의 혈청 전해질 농도를 조사한 결과는 Fig. 6과 같다. ClO₂ 농도별 대조군의 혈청 sodium (Na⁺)과 chloride ion (Cl⁻) 농도는 각각 169.0±6.2~176.4±8.5 mEq/L 및 138.2±6.7~152.1±9.4 mEq/L의 범위였으나 ClO₂ 농도가 높고, 시간이 지날수록 혈청 Na⁺와 Cl⁻ 농도는 현저하게 증가하였다. 0.51 ppm ClO₂의 경우 30분이 경과하면서 혈청 Na⁺ 농도는 402.0±11.9 mEq/

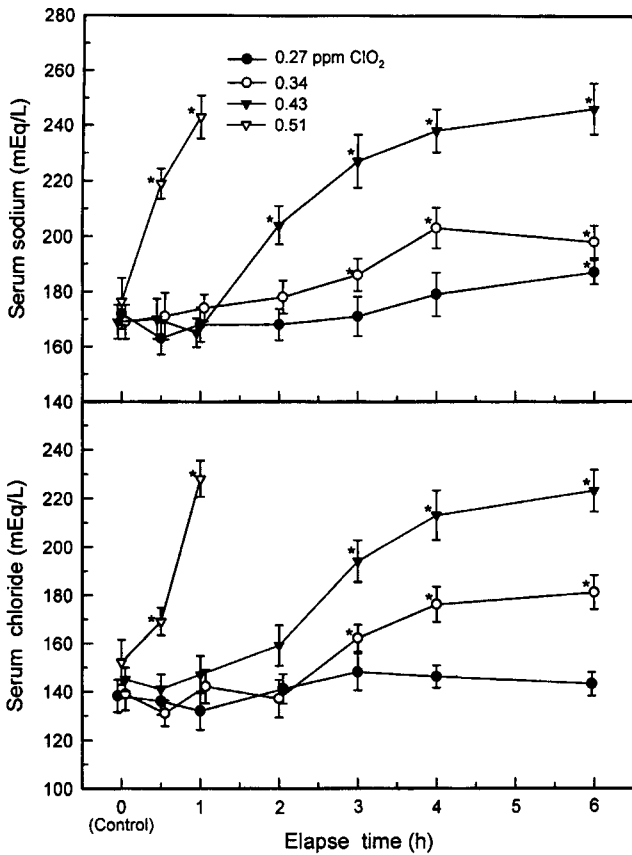


Fig. 6. The levels of serum sodium (Na⁺) and chloride (Cl⁻) ions in flounder exposed to different concentrations of chlorine dioxide over time. Asterisks point out significant difference between the ClO₂-exposed fish and control fish ($P < 0.05$).

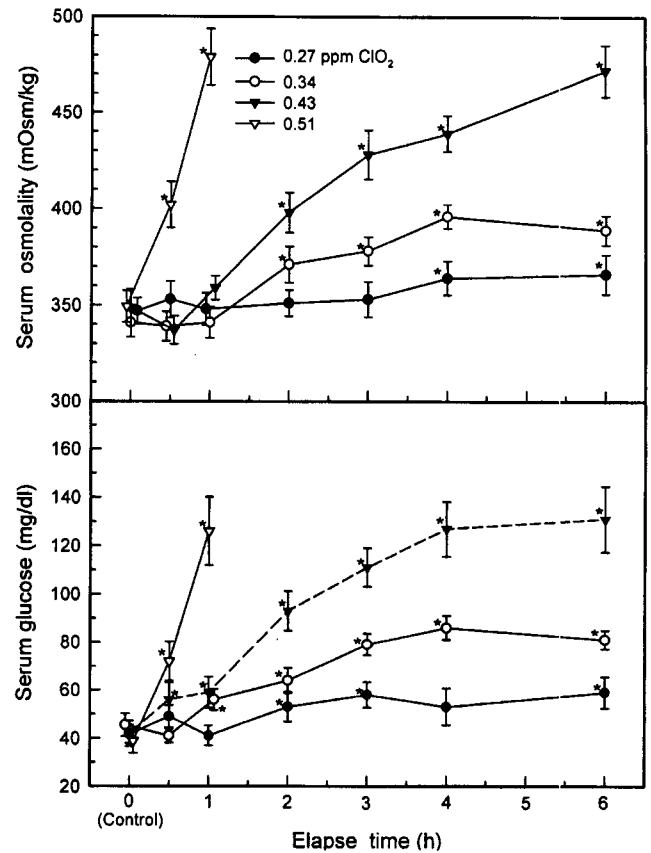


Fig. 7. The levels of serum osmolality and glucose in flounder exposed to different concentrations of chlorine dioxide (ClO₂) with elapse times. Asterisks point out significant difference between the ClO₂-exposed fish and control fish ($P < 0.05$).

L로 증가하여 1시간째의 생존개체는 479.1 ± 14.6 mEq/L이었다. 0.34와 0.43 ppm ClO₂에서는 각각 3시간과 2시간이 지나면 대조군에 비해 전해질 농도가 증가하였으며, 0.27 ppm에 노출된 실험어의 혈청 Na⁺는 6시간이 지나면 대조군과 차이를 보였으나 Cl⁻는 유의한 차가 없었다.

혈청 삼투질 및 glucose 농도

혈청 삼투질 농도는 대조군이 $338.7 \pm 9.6 \sim 352.2 \pm 8.1$ mOsm/kg이었으나 ClO₂ 농도가 높고 노출 후 시간이 지날수록 급격하게 증가하였다(Fig. 7). 0.51 ppm에서 실험어가 ClO₂ 처리해수에 10분간 노출된 뒤 30분이 경과하면 약 400 mOsm/kg 수준으로 증가하였고, 1시간째 치사직전의 것은 삼투질 농도가 480 mOsm/kg에 근접하였다. 0.34와 0.43 ppm에서는 2시간이 경과하면 삼투질 농도가 유의하게 증가하였고, 0.27 ppm에서는 4시간이 경과하면 증가하는 경향을 나타내었다. ClO₂ 농도별 혈청 glucose 농도를 보면(Fig. 7), 실험전후 여과해수에 수용된 대조군의 glucose 농도는 $35.8 \pm 5.0 \sim 45.4 \pm 4.7$ mg/dl의 범위였다. 0.43과 0.51 ppm에서는 각각 ClO₂ 처리 후 30분에, 0.34 ppm의 실험어는 1시간째에, 그리고 0.27 ppm에서는 2시간이 지나면 대조군에 비해 혈당이 유의하게 상승하였다.

고 찰

수서생물에 미치는 유해물질의 치사독성은 노출시간별 반수 치사농도(LC₅₀)로 비교할 수 있으며, LC₅₀이나 아치사 농도를 알기 위해서는, 대조군을 포함한 6개 이상의 농도 설정구에서 일정시간 노출동안 적어도 시험생물의 50% 이상에서 100% 미만이 생존 또는 치사하는 농도구를 각각 1개씩 포함해서 최소한 3개 농도구가 얻어져야 probit 분석으로 산출이 가능하다(Rand et al., 1995). 본 연구에서는 넘치 치어가 ClO₂에 10분간 노출된 후 24시간이 경과하는 동안까지 0.34 ppm에서는 평균 8.0%가 치사하였으나 0.27 ppm에서는 사망하는 기체가 없었고(Fig. 3), 0.1 ppm 전후로 등차 농도구배가 되도록 설정한 실험에서 평균농도 0.43과 0.51 ppm ClO₂의 반수치사시간(LT50)만을 probit 분석으로 구할 수 있었다(Fig. 4). 이것은 넘치 치어가 ClO₂ 처리직후의 잔류농도 0.05~0.51 ppm 범위에서 10분간 노출된 후에 보이는 치사역치 농도(lethal-threshold concentration, LTD)는 0.27~0.34 ppm의 범위에서 아주 좁은 폭으로 존재한다고 볼 수 있다. ClO₂는 해수 중에 잔류하는 SS 및 COD 농도가 높을수록 빨리 환원되는 결과를 보였다(Fig. 2). 수중에 유

기물 농도가 높으면 이들을 산화시키는 과정에 산화제인 ClO₂가 환원되어 잔류농도는 빨리 감소되고 이로 인해 어류에 미치는 ClO₂ 치사독성은 낮아져서 양식생물에는 폐사피해가 발생하지 않을 수 있다. 반면에, 사육수중 유기물 농도가 상대적으로 낮은 조건에서는 같은 농도로 처리되었더라도 전자보다 높은 농도의 ClO₂가 장시간 잔류하게 되고 LTD 지속시간도 길어져 어류가 폐사하는 위험이 따를 수 있다고 여겨진다.

용존 독성물이 어류의 혈액 성상에 미치는 영향을 보면, 독성 중금속과 원유 수용성 분획(WSF)에 노출되면 체내에 유입된 독물이 조혈작용을 저해하여 비교적 단기간에도 Ht와 Hb가 감소하고(Fletcher and White, 1986; Alkindi et al., 1996), 염소처리수내 free chlorine 및 오존과 같은 강한 산화제에 노출된 어류에서는 상반되는 결과도 보고되어 있다(Wedemeyer et al., 1979; Travis and Heath, 1981; Kim et al., 1999). 본 실험의 넙치는 ClO₂ 처리수에 10분간 유지된 후 시간이 경과할수록 Ht, Hb, 전해질, 삼투질 농도와 혈청 glucose는 급격히 증가하였다(Fig. 5~7). 이러한 현상은 ClO₂의 화학적 특성 및 강력한 산화제의 일종인 오존에 노출된 어류에 대한 연구로부터 다음 2가지 기작에 의한다고 설명할 수 있다. 먼저, Junli et al. (1997b)에 따르면 ClO₂는 수용액내에서 분자상태로 세균 세포막을 쉽게 투과하여 세포막과 원형질 성분을 산화시키는 기작으로 강한 소독력을 가진다고 하였고, Wedemeyer et al. (1979)은 오존 처리수중 잔류오존은 무지개송어 (*Salmo gairdneri*) 아가미와 환경수간의 농도구배 차이에 의해 아가미로 확산되어 아가미 조직에 손상을 초래한다고 보고하였다. 따라서 수중에 잔류하는 ClO₂와 넙치 아가미 상피세포 간에는 농도구배 차이에 의해 상피세포 속으로 ClO₂가 확산되고, 고농도일수록 잔류 ClO₂는 단기간에 다량 확산되었을 것으로 생각된다. 다음으로, 오존처리 해수에 수용된 넙치는 잔류오존 25 ppb에 96시간 급성으로 노출되었을 때(Kim et al., 1999), 무지개송어는 잔류오존 7 ppb에 수 주간 유지되었을 때(Wedemeyer et al., 1979) 아가미 상피세포가 괴사 또는 박리되는 것이 관찰되었다. 또한 오존에 노출된 무지개송어의 있어서 혈중 Ht와 Hb가 단기간에 증가하는 것은 호흡곤란에 따른 급속한 조혈기작으로 적혈구수가 증가하였기 보다는 오존 환원과정에 손상된 아가미를 통해 혈중 수분 상실로 인해 상대적으로 Ht와 Hb 값이 상승한 것으로 보고하였다. 그러므로 ClO₂ 농도가 높았던 실험구의 넙치는 손상된 아가미를 통해 혈중 수분이 상실되어 Ht와 Hb가 증가하였다고 생각된다.

해산 경골어류의 체액은 환경수인 해수에 비해 저장액이기 때문에 아가미 상피세포를 통하여 쉽게 물을 상실하게 된다. 어류는 상실한 체내 수분을 보충하기 위하여 해수를 마시고 물과 함께 흡수된 과잉의 염류는 신장과 아가미 상피세포에서 능동 수송기작으로 신속하게 배출함으로써 전해질 및 삼투질 농도를 일정하게 유지한다(Wood and Shuttleworth, 1995). ClO₂ 처리수에 노출된 넙치가 아치사 상태로 이행되는 혈중 과나트륨증

(hypernatremia) 및 과염소증(hyperchloremia) 발현시점은 0.51 ppm ClO₂의 경우 30분이 경과하면서 혈청 Na⁺ 농도가 증가하여 적어도 1시간 이내에, 0.43 ppm에서는 3~4시간 범위인 것으로 나타났다. 따라서 0.34 ppm 이상의 ClO₂에 노출된 넙치는 손상된 아가미 상피세포를 통한 고장성 전해질의 혈중 유입과 탈수현상에 의한 수분상실, 그리고 유입된 염류에 대한 어류의 삼투조절 기능의 부전 등에 의해 어체가 항상성을 유지하는데 실패하여 결국에는 사망하였다고 볼 수 있다.

혈청 glucose 농도는 ClO₂ 잔류농도가 높을수록 빠른 시간에 상승하였으며, 본 실험에서 ClO₂ 처리 직후의 최저 농도, 0.27 ppm ClO₂에서는 4시간이 지나면 혈당이 대조군에 비해 높은 값을 보였다(Fig. 7). Vijayan and Moon (1994)는 어류에 물리, 화학적 stress가 가해지면 혈중 cortisol이 상승하고, cortisol은 간의 glucose 신합성 (gluconeogenesis)을 촉진함으로써 혈당이 신속히 상승한다고 하였고, 또한 어류가 받는 stress는 그 강도가 강할수록 크면서 장기간 지속되고, 회복시간 역시 오래 걸리는 것은 일반적 현상으로 잘 알려져 있다(Thomas, 1990; Pickering, 1992; Tsuzuki et al., 2001). 이러한 사실로 미루어 본 실험의 넙치가 0.27 ppm ClO₂에 10분간에 걸쳐 일회성으로 노출되더라도 어체에는 stress로 작용할 수 있음을 의미한다.

Park et al. (2003)은 감염 넙치에서 분리된 *Vibrio anguillarum*, *Edwardsiella tarda*, *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp.를 대상으로 0.455, 0.246 및 0.129 ppm ClO₂에서 30초~10분간 ClO₂ 처리한 바 *Staphylococcus* sp.는 0.455 ppm, *V. anguillarum*과 *E. tarda*는 0.246 ppm, *Streptococcus* sp.는 0.129 ppm ClO₂에서 30초 전후로 처리하는 조건이 가장 효과적임을 제시하였다. 그리고, *V. anguillarum*의 경우 0.129 ppm에서 5분 이상 처리하면 균증이 완전히 저해되지만 *E. tarda*는 같은 농도에서 5~10분간 처리하더라도 10시간 후에는 생잔균의 증식이 확인되어 양식장 사육수의 ClO₂ 처리에는 어류에 치사를 유발하지 않는 농도범위에서 살균대상 병원생물의 ClO₂ 처리농도 및 어류의 노출시간을 고려해야 한다고 하였다. 한편, 소독처리에 사용하는 ClO₂의 순도 즉, 불순물(ClO₂, ClO₃ 등)의 함유정도에 따라 양식어류에 대한 ClO₂의 치사독성과 저해성은 다르게 나타날 것으로 예상된다. 암모니아 배설균인 어류의 경우 수중에 배설되는 암모니아가 ClO₂ 처리 시에 이들 불순물과 반응하여 chloramine으로 변화될 수 있으며(Bass and Heath, 1977; Travis and Heath, 1981; Heath, 1995), 이것이 양식어류에 빈혈증을 유발하는 등 유해영향을 초래할 수 있기 때문이다.

이상과 같이, 해수에 ClO₂를 농도별로 처리해서 넙치 치어를 일회성으로 10분간 노출시켜 생존율과 생리상태의 변화를 조사한 결과, 고농도의 ClO₂ 처리해수는 치사독성이 강하며, ClO₂ 처리직후의 잔류농도가 0.27 ppm 이하로 처리될 때 넙치 치어의 생존과 생리상태에 미치는 위해성이 적을 것으로 평가되었으며, 특히 SS를 포함한 유기물 농도와 같은 수질조건은 ClO₂ 처리 시에 반드시 고려되어야 사항으로 생각된다.

요 약

수는 20°C에서 넙치가 수용된 실험구에 ClO₂를 농도별로 처리하여 10분간 노출시킨 다음 해수를 유수하면서 넙치의 생존과 생리상태에 미치는 영향을 조사하였다. ClO₂ 처리직후의 잔류농도 0.51 ppm에서는 90분이 지나면 모든 개체가 사망하였고, 0.43 ppm에서는 3시간 후의 생존율이 13.3%, 0.34 ppm에서는 24시간이 경과하는 동안 평균 92.0%가 생존하였으며, 0.43과 0.51 ppm에서 넙치의 반수치사시간(LT₅₀)은 각각 103분과 32분이었다. 0.34~0.51 ppm ClO₂에 노출된 넙치의 Ht, Hb 및 혈청 전해질과 삼투질 농도는 ClO₂ 농도가 높고 노출 후 시간이 지날수록 대조군에 비해 유의하게 높은 값을 나타내었다. 0.27 ppm의 경우 Ht, Hb 및 혈청 전해질과 삼투질 농도는 대조군과 차이는 없었으나 혈청 glucose 농도는 ClO₂ 노출 후 시간이 경과할수록 높아지는 현상을 보여 주었다. 또한 SS 농도가 높은 해수는 SS가 낮은 해수에 비해 잔류 ClO₂가 빠르게 환원되었다.

감사의 글

이 논문은 1999년도 한국학술진흥재단의 연구비(KRF-99-003-H00006)에 의해 연구된 결과의 일부이며, 연구비를 지원해 준 한국학술진흥재단에 감사드립니다.

참고문헌

- Alkindi, A. Y. A., J. A. Brown, C. P. Waring and J. E. Collins, 1996. Endocrine, osmoregulatory, respiratory and haematological parameters in flounder exposed to the water soluble fraction of crude oil. *J. Fish. Biol.*, **49**: 1291-1305.
- American Public Health Association, 1995. Standard methods for the examination of water and wastewater, 19th ed. American Public Health Association, Washington, DC.
- Bass, M. L. and A. G. Heath, 1977. Cardiovascular and respiratory changes in rainbow trout, *Salmo gairdneri*, exposed intermittently to chlorine. *Wat. Res.*, **15**: 497-502.
- Chanda, S., 1998. Chlorine dioxide. (in) Encyclopedia of toxicology, (ed.), P. Wexler, Academic Press, New York, Vol. I, pp. 307-308.
- Fletcher, T. C. and S. White, 1986. Nephrotoxic and hematological effects of mercuric chloride in the plaice (*Pleuronectes platessa* L.). *Aquat. Toxicol.*, **8**: 77-84.
- Hall, L. W., D. T. Burton and L. Liden, 1981. An interpretative literature analysis evaluating the effects of power plant chlorination on freshwater organisms. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* **9**: 1-12.
- Heath, A. G., 1995. Water pollution and fish physiology. CRC Press, New York, 359 pp.
- Kim, H. Y., M. J. Oh and S. J. Jung, 1999. Acute toxicity of ozone on survival and physiological conditions of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J. Fish Pathol.*, **12**(1): 32-41.
- Junli, H., W. Li, R. Nenqi, L. X. Li, S. R. Fun and Y. Guanle, 1997a. Disinfection effect of chlorine dioxide on viruses, algae and animal planktons in water. *Wat. Res.*, **31**(3): 455-460.
- Junli, H., W. Li, R. Nenqi, L. X. Li, M. Fang and Juli, 1997b. Disinfection effect of chlorine dioxide on bacteria in water. *Wat. Res.*, **31**(3): 607-613.
- Park, K. H., M. J. Oh and H. Y. Kim, 2003. Disinfection effect of chlorine dioxide on pathogenic bacteria from marine fish. *J. of Aquaculture*, **16**(2): 118-123.
- Pickering, A. D., 1992. Rainbow trout husbandry: management of the stress response. *Aquaculture*, **100**: 125-139.
- Powell, M. D. and S. F. Perry, 1996. 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.
- Rand, G. M., P. G. Wells and L. S. McCary, 1995. Introduction to aquatic toxicology. (in) Fundamentals of aquatic toxicology, 2nd Ed., (ed.), G. M. Rand, Taylor & Francis, Philadelphia, pp. 3-66.
- Speare, D. J., G. Goff, P. MacIsaac, J. Wecherkiwsky and N. MacNair, 1996. Effects of formalin and chloramine-T treatments on oxygen consumption of juvenile salmonids. *J. Aquatic Anim. Health*, **8**: 285-291.
- Thomas, P., 1990. Molecular and biochemical responses of fish to stressors and their potential use in environmental monitoring. (in) Biological indicators of stress in fish, American Fisheries Society Symposium 8, (ed.), S. M. Adams, American Fisheries Society, Maryland, pp. 9-28.
- Thorburn, M. A. and R. D. Moccia, 1993. Use of chemotherapeutics on trout farm in Ontario. *J. Aquatic Anim. Health*, **5**: 85-91.
- Travis, T. W. and A. G. Heath, 1981. Some physiological responses of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to intermittent monochloramine exposure. *Wat. Res.*, **15**: 977-983.
- Tsuzuki, M. Y., K. Ogawa and C. A. Strussmann, 2001. Physiological responses during stress and subsequent recovery at different salinities in adult pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *Aquaculture*, **200**: 349-362.
- Vijayan, M. M. and T. W. Moon, 1994. The stress response and plasma disappearance of corticostereoid and glucose in a marine teleost the sea raven. *Can. J. Zool.*, **72**: 379-386.
- Wedemeyer, G. A., N. C. Nelson, and W. T. Yasutake, 1979. Physiological and biochemical aspects of ozone toxicity to rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish. Res. Board. Can.*, **36**: 605-614.
- Wood, C. M. and T. J. Shuttleworth, 1995. Cellular and molecular approaches to fish ionic regulation. Academic Press, San Diego, pp. 352-352.
- 해양수산부, 1998. 해양환경공정시험방법. 해양수산부(고시 제 1998-4호), 서울, 317 pp.

원고접수 : 2003년 4월 11일

수정본 수리 : 2003년 6월 24일

책임편집위원 : 강덕영