한국어병학회지 제 12 권 제 1 호(1999)
J. Fish Pathol., 12(1) : 32~41 (1999)

넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 생존과 생리상태에 미치는 오존의 급성 독성

김홍윤* · 오명주 · 정성주

여수대학교 어병학과

오존처리 해수중에 함유하는 잔류 옥시던트(TRO)가 양식 넙치의 생존, 혈액성상과 삼투질 농도, 산소소비 및 아가미 조직에 미치는 독성 영향을 조사하였다. TRO에 노출된 넙치의 48-hr 및 96-hr LC_{50}은 각각 26.4와 22.3 ppb이었고, 47 ppb에서는 3시간 이내에 모두 치사하였으나 13 ppb에서는 96시간 동안 폐사발생이 없었다. TRO 24~39 ppb 농도범위에 노출된 넙치의 hematocrit, 헤모글로빈, 적혈구 수, 혈중 sodium과 chloride 이온 및 삼투압 농도는 TRO 농도가 높을수록 유의하게 증가하였고, 아가미 조직은 아가미 상피층이 모세혈관으로부터 박리되고, 괴사와 상피세포의 증생이 관찰되었다. 산소소비율은 TRO 농도가 높고, 노출이 계속될수록 감소하였다. 13 ppb에서는 아가미 조직과 생리상태에 미치는 변화는 관찰되지 않았으나 혈당은 유의하게 증가하였다. 그러나 활성탄으로 TRO를 제거한 대조구에서는 오존의 독성 영향은 관찰되지 않았다. 잔류오존에 노출된 넙치는 삼투질 농도의 생리적 불균형 및 아가미 손상과 상피세포의 증생에 의한 산소섭취 부족이 치사를 유발하는 것으로 나타났다. 본 연구의 결과 해산어 양식장에서 오존을 사용할 경우에는 오존처리수중의 TRO는 제거하여야 하며, 비록 저농도라도 장기간 노출되면 양식어류의 생존과 생리상태에 미치는 영향은 현저할 것으로 평가되었다.

Key words: Ozone toxicity, Flounder, LC_{50}, Hematological parameter, Osmolality, Gill epithelium, Oxygen consumption

수산양식기술이 발달하고 양식품종이 다양화되면서 국내 양식 생산량은 크게 증가하고 있으며, 이와 함께 담수 및 해산어 양식과정에서 각종 질병 발병에 의한 대량 폐사도 빈발하고 있다. 양식생물의 질병 원인은 병원체의 감염, 사육수질과 같은 환경적 요인과 영양적 불균형에 따른 생리기능 저하 등으로 대별할 수 있으며(Sindermann, 1996), 환경수에 상존하는 병원체를 인위적으로 관리하면서 사육수질을 개선시키는 것은 생산성을 높이는 효과적인 방법이 될 수 있다.

오존은 산화력이 강하고 살균효과가 높은 화학적 특성 때문에 폐수내 각종 유기물 분해와 살균처리에 널리 이용되고 있으며, 산업적으로는 오존의 잔류독성을 이용한 발전소 냉각 시스템 부착생물 제거(Leynen *et al.*, 1998), 식품의 살균 소독 등 다양하게 활용되고 있다. 또한 해수를 오존 처리하면 브롬이온과 반응하면서 암모니아 질화효율이 높아 순환여과식 양식장의 수질관리(Honn and Cavin, 1976; Haag, 1984, Ozawa *et al.*, 1990; 임, 1997) 뿐만 아니라 수계 병원생물 살균을 통한 질병 방역법으로써의 활용에 관한 연구도 수행되고 있다(Itoh *et al.*, 1997; Yoshimizu *et al.*, 1995).

그러나, 오존처리 해수에 함유하는 잔류 옥시단트(total residual oxidants, TRO)는 독성이 강하고 담수에 비해 장시간 잔류하므로(Yoshimizu *et al.*, 1995), 해산 양식생물에 직접 노출되면 치사 위험이 매우 높다. 최근, 국내 일부 해산어 양식장에서도 해수를 오존처리하여 사용하면서 TRO에 의한 폐사 피해가 발생하고 있으나, 현재까지 해산 양식어류에 미치는 TRO 독성에 관한 체계적인 연구는 거의 수행되어 있지 않다.

본 연구는 오존처리 해수중의 잔류 오존이 양식생물의 생존과 생리상태에 미치는 급성 독성 영향을 구명하기 위하여, 육상수조식 양식 주종인 넙치를 잔류오존농도별로 노출시켜서 반수치사농도, 혈액성상, 혈중 전해질과 삼투질 농도, 산소소비 및 아가미 조직에 미치는 급성 독성 영향을 조사하였다.

*Corresponding author

재료 및 방법

실험어류

실험에 사용한 넙치(*Paralichthys olivaceus*)는 1998년 12월부터 1999년 5월까지 전남 여수시 돌산읍 소재 육상수조식 넙치 양식장에서 분양받아 실험실로 운반하였다. 실험어는 수온을 20°C로 조절한 실험실 순환여과식 FRP 사육조(용량, 250 *l*) 4개에 분산시켜 수용하고, 시판되는 넙치용 부상사료를 공급하며 2주간 사육하면서 순치시켰다. 실험에 사용한 개체의 크기는 반수치사농도 측정에는 전장 12~15 cm, 다른 항목별 측정에는 전장 16~19 cm이었고, 배설물에 의한 사육수내 잔류 옥시던트 농도 변화를 줄이기 위하여 측정 전에 48시간 절식시켰다.

실험장치

본 실험에 사용한 장치는 재순환 여과식으로서 Fig. 1과 같으며, 실온을 약 20°C로 조절한 항온실에 설치하였다. 공기발생기(AC)에서 나온 압축공기는 수분 제거기(AD)를 통과하면서 공기중의 수분을 제거시킨 다음 무성 방전식 오존발생기(OG, 남경어드밴스사)에 주입하여 발생한 오존가스를 접촉조(OR)에서 폭기 반응시켰다. 오존가스가 해수에 폭기되면서 생성된 잔류 오존농도는 실험동안 약 100 ppb가 유지되도록 공기 주입량과 오존발생기 전압을 조절하였고, 접촉조의 오존처리수는 유량조절 밸브, 실험구(EA), 집수관을 통과하여 모래여과조(SF), 집수조(R), 활성탄처리조(AF) 및 접촉조를 재순환시켰다. 항목별 실험에 앞서 순환시스템의 해수는 전량 신선한 해수로 교환하였고, 총 순환 수량은 약 1톤, 각 실험구는 하루 30~48회전으로 환수되었다. 실험개시 후 실험구의 잔류오존 농도가 설정 농도에 이르는 소요시간은 3시간 이내였다.

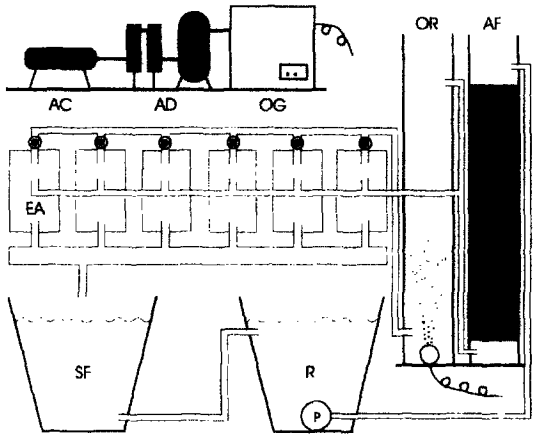

Fig. 1. Schematic diagram of equipment used in ozone toxicity test. AC: air compressor, AD: air dryer, AF: activated carbon filter, EA: experimental aquarium, OG: ozone generator, OR: ozone reactor, R: reservoir, P: pump, SF: sand filter.

사육수질과 잔류오존 측정

오존처리 해수중의 잔류오존 농도는 수온, pH, 용존 유기물과 수질 조건에 따라 변동될 수 있음으로(임, 1997) 실험어 투입 후 6시간까지는 2시간 간격으로, 이후에는 매일 4회(09, 13, 17, 21시) 측정하였다. 각 실험구의 TRO 정량은 Indigo colorimetric method(APHA, 1995)에 준하여, 수온, 용존산소 및 염분은 수질분석기(YSI 85)로, 사육수의 pH와 삼투질농도는 pH meter(Methrom 704) 및 삼투압측정기(Osmomat-030)로 측정하였고, 화학적 산소요구량(COD)은 해양환경공정시험방법(해양수산부, 1998)에 준하여 정량하였다.

반수치사농도(LC_{50})

TRO 농도(0, 13, 19, 24, 29, 35, 40, 47 ppb)를 다르게 조절한 실험구에 실험어를 각각 10마리씩 투입한 다음 96시간 동안 경과시간별로 폐사한 개체수를 관찰하였다. 폐사 판정은 아가미 개폐운동이 정지된 실험어중에서 유리봉으로 자극하여 반응이 없는 개체를 기준으로 하였다. 반수치사농도(LC_{50})는 TRO 농도별로 반복 실험한 폐사율 측정치를 SPSS-probit 분석으로 계산하였다.

혈액 성상 및 혈청 성분 분석

TRO 농도별로 노출시킨 실험어를 경과시간에 따라 3마리씩 무작위 추출한 즉시 미부 동맥에서 일회용 주사기로 채혈하였다. 채혈한 혈액중 일부는 혈액성상을 조사하기 위하여 항응고제, heparin-Na(Sigma, 100.000 units, 25 mg/ml)을 처리하여 4°C에 냉장 보관하면서 20시간 이내 각 분석에 사용하였고, 혈액의 나머지는 1.5 ml 원심분리용 튜브에 주입하여 실온에서 30분간 방치한 다음 3,000 rpm에서 15분간 원심하여 혈청을 분리하였

Table 1. Water quality of each experimental aquarium during ozone toxicity test.

Item	Experimental aquarium				
	Control	Exp-1	Exp-2	Exp-3	Exp-4
Temp. (°C)	20.1±0.2	20.1±0.2	20.1±0.2	20.1±0.2	20.1±0.2
Salinity (‰)	31.4±0.3	31.4±0.3	31.4±0.3	31.4±0.3	31.4±0.3
pH	8.17±0.12 (8.12~8.24)	8.12±0.14 (8.05~8.20)	8.14±0.09 (7.97~8.21)	8.05±0.13 (7.91~8.17)	7.99±0.13 (7.86~8.12)
DO (mg O_2/l)	5.42±0.21	5.44±0.19	5.72±0.32	5.97±0.29	6.02±0.19
COD (mg/l)	0.52±0.11	0.55±0.08	0.50±0.12	0.48±0.14	0.54±0.20
TRO* (ppb)	≤0	13.2±2.1 (11.7~14.2)	24.1±1.7 (22.8~25.7)	33.4±1.5 (31.0~34.6)	39.4±1.9 (37.5~42.1)
Osmolality (mOsm/kg)	947.3±7.4	947.3±7.4	947.3±7.4	947.3±7.4	947.3±7.4

*Total residual oxidants
Data expressed in mean ± S. E. (range in parenthesis)

다. 혈청은 동결보관하면서 채혈 후 7일 이내에 혈청 성분을 분석하였다.

적혈구 수(red blood cell count, RBC)는 항응고 처리한 전혈을 적혈구 희석 피펫에 취한 다음 Hayem's 용액으로 희석시켜 Thoma hemocytometer를 사용하여 계수하였다. Hemoglobin량(Hb)은 cyanmethemoglobin 법으로, hematocrit(Hct)는 모세관법에 의한 microhematocrit 법으로 측정하였다. 혈청 삼투질농도는 삼투압측정기(Osmomat-030)로, glucose와 chloride 이온 농도는 TRACE 표준시약을 사용하여 혈액분석기(Chiron Express Plus)로 정량하였고, sodium 이온은 혈청을 0.1 N 염산과 10% $LaCl_3$로 희석시켜 원자흡광분광광도계(Shimadzu, AA6501)로 정량하였다.

산소소비

잔류 오존에 노출된 넙치의 산소소비율을 경시적으로 조사하였다. 실험어는 개체크기에 따른 비체중 산소소비율(weight-specific oxygen consumption) 차이를 고려하여 같은 크기의 개체를 육안선별하여 TRO 농도를 달리한 실험구에 노출시켰으며(Table 1), 경과시간별로 호흡 검량장치(Fig. 2)를 사용하여 산소소비율을 측정하였다. 시험수는 검량장치의 저장조에 1 μm 필터로 여과한 여과해수를 10 l 넣고, 휴대용 오존발생기(World Clean Co., Model Tico)로서 각 실험구별 TRO 농도에 근접하도록 오존 처리하였다. 호흡 검량장치는 호흡실과 산소 측정실로 구성하였다. 호흡실에 시험수를 채우고 실험어를 각각 한 마리씩 투입한 다음 peristaltic pump(Eyela RP-1000)를 사용하여 약 100 ml/min 유량으로 30분간 환수하면서 실험어를 안정시켰다. 산소소비 측정 동안에는 환수를 중지하여 호흡실과 측정실 사이를 유량 150 ml/min 정도로 폐쇄 순환시키면서 DO meter(YSI 58 형)로서 용존산소량을 15분간 측정하였고, 산소분압의 영향을 줄이기 위하여 5분간 환수 후 반복 측정한 결과로부터 비체중 산소소비율(ml O_2/kg, wet wt/hr)을 산출하였다. 측정이 끝난 실험어는 어체 측정판으로 전장을 계측하고, 체표면의 습기를

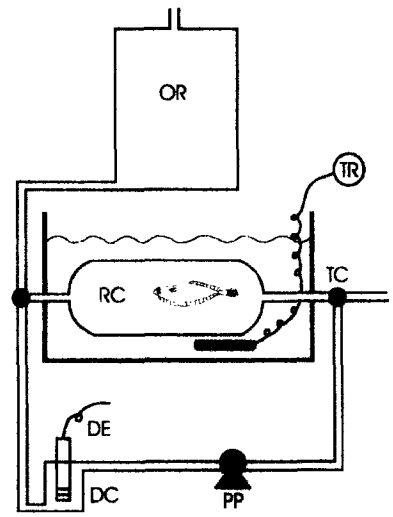

Fig. 2. Apparatus for determination of the oxygen consumption. DC: DO measuring chamber, DE: DO meter electrode, PP: peristaltic pump, OR: ozonized-water reservoir, RC: respiration chamber, TC, three-way cock, TR: temperature regulator.

여과지로 제거하여 체중을 칭량하였다. 산소소비율의 측정시 수온은 20.1±0.2℃, 시험수의 염분은 31.2~31.8‰이었다. 모든 측정 결과에 대한 유의성은 ANOVA 분석법으로 검정하였고, 결과는 mean ±S.E.로 표시하였다.

조직학적 연구

잔류오존 0, 13, 24, 33, 39 ppb에 노출시킨 실험구에서 24, 48, 72, 96시간 경과 후에 무작위로 2마리씩 채포하여, 조직학적 검사용 시료로 사용하였다. 시험어의 아가미는 10 % 포르말린에 고정한 후, 12.5 % EDTA·2Na에 5일간 탈회하여, 상법에 따라 탈수와 투명을 거쳐 파라핀으로 포매했다. 파라핀 블록은 마이크로톰으로 4 μm의 두께로 잘라, Mayer의 hematoxylin과 eosin으로 염색한 후 현미경으로 관찰하였다.

결 과

오존처리 해수의 수질

실험구의 잔류 오존농도는 설정농도±1.5~2.1 ppb 범위를 나타내어 비교적 안정농도로 유지되었고, 활성탄 처리조를 거친 대조구에서는 잔류 오존이 검출되지 않았다(Table 1). 사육수의 수질을 조사한 바 TRO 농도에 영향을 미치는 COD의 경우 실험구별로 차이는 없었으며, 용존산소는 TRO 농도가 높은 실험구에서, pH는 낮은 실험구에서 약간 높은 값을 보였다. 사육해수의 삼투질 농도는 평균 947 mOsm/kg이었다.

반수치사농도(LC_{50})

TRO 농도별로 96시간 노출시킨 넙치의 반수치사 농도(LC_{50})를 산출한 결과는 Fig. 3과 같다. 측정기간 동안 대조구 및 13 ppb 노출군의 생존율은 100 %였고, 잔류오존 47 ppb에서는 노출 후 3시간 이내에 모든 개체가 폐사하였다. LC_{50}은 노출시간이 경과함에 따라 점차 낮아졌으나 72시간 이후에는 22.3~23.5 ppb 범위에서 거의 평행하여 잔류오존은 노출 초기에 치사 독성이 높은 것으로 나타났다. TRO에 노출된 넙치의 48시간과 96시간 LC_{50}은 각각 26.4와 22.3 ppb이었다.

혈액 성상 및 혈청 성분

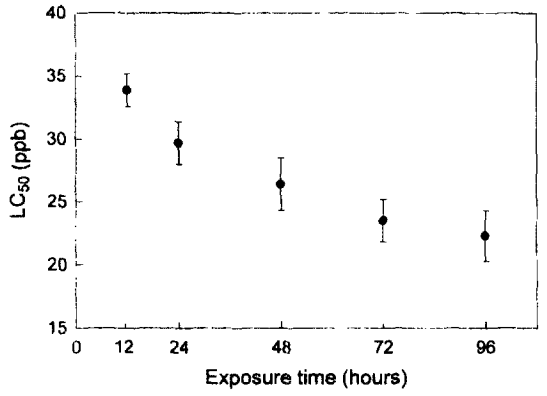

Fig. 3. LC50 of the flounder exposed to residual oxidant at 20℃. Vertical bars show 95% confidence limit interval.

넙치를 TRO에 노출시켜 경과시간별로 채혈한 혈액의 hematocrit(Hct, %), 헤모글로빈 농도(Hb, g/100 ml)를 조사하였다(Fig. 4). Fig. 4의 빗금 부분은 실험실에서 2주간 적응시킨 넙치 15 개체에서 측정한 정상치(normal range) 범위를 각각 표시하였다.

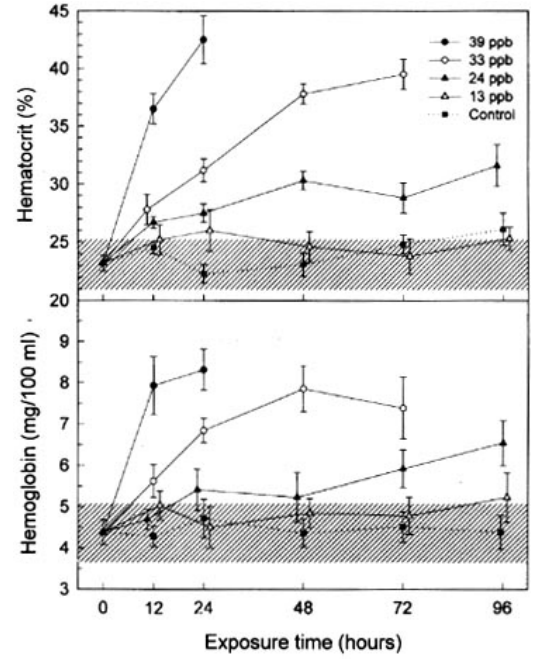

Fig. 4. Hematocrit, and hemoglobin concentration of the flounder exposed to different concentrations of residual oxidants at 20℃. Values are mean±S.E. Dashed area represents normal range of 15 fish cultured in the laboratory for 2 weeks.

TRO 농도 33~39 ppb 노출군의 Hct는 12시간이 경과하면 대조군에 비하여 유의하게 높았으며 ($P < 0.01$), 24 ppb에 노출된 실험군은 시간이 경과함에 따라 지속적으로 상승하는 경향을 보였다. 13 ppb 실험군의 Hct 경시변화는 대조군과 유의한 차이가 없었다. 혈액 Hb 함량은 잔류오존 39 ppb에서는 노출 후 12시간이 지나면 급격하게 증가하여 24시간째에 가장 높았지만 이후 실험어는 모두 폐사하였다. 33 ppb 실험군은 노출시간이 48시간에 이르면 최대치를 보였고, 72시간이 경과하면서 헤모글로빈 량이 감소하는 결과를 보였다.

적혈구 수(RBC, 10^4 cell/mm^3)는 전반적으로 Hct와 유사한 경향을 보였지만 13 ppb와 24 ppb에서는 적혈구 수에 있어서 경시 변동이 많은 경향을 보인 반면, 고농도에서는 노출이 지속될수록 RBC 증가현상이 뚜렷하였다(Table 2).

넙치의 혈청 전해질과 삼투질 농도를 조사한 결과를 보면(Fig. 5), 정상어의 혈청 sodium과 chloride 이온 농도는 각각 163-179 mEq/l와 140-157 mEq/l 범위였으나, 잔류 오존농도가 높고 노출이 길어질수록 혈중 전해질 농도는 현저하게 증가하였다. 오존에 노출된 넙치에서 혈중 고혈당증상 및 저혈당증상이 발현되는 시간은 33과 39 ppb에서는 12시간을 전후하여 24시간 이내인 것으로 나타났다. 24 ppb에서는 96시간 노출동안 sodium과 chloride 이온 농도는 점차 상승하였고, 13 ppb 노출군은 96시간이 경과하는 동안 대조군과 유의한 차이는 없었다($P > 0.05$).

혈청 삼투질 농도는 정상치가 316~342 mOsm/kg 범위였으나 TRO 농도가 높고, 노출시간이 경과함에 따라 현저하게 증가하였다(Fig. 5). 아가미 개폐운동이 지속되고 있지만 치사 직전에 도달한 개체의 삼투질 농도는 460 mOsm/kg을 상회하였고, 33 ppb에 72시간 노출되면 471 mOsm/kg, 이후 노출시간이 경과하면서 모두 폐사하였다. 13 ppb 노출군에서는 정상치 범위에서 변동하였지만 대조군과 차이는 없는 것으로 나타났다.

한편, 혈청 glucose 농도(mg/100 ml)의 경시적인 변화는 TRO에 노출시킨 모든 실험구에서 노출이 지속되고 TRO 농도가 높을수록 증가하였다(Fig. 6). 정상어의 혈중 glucose 농도 범위는 27~52 mg 이었고, 잔류 오존 39 ppb에서는 노출 후 12시간째에 116 mg, 24시간이 경과하면서 149 mg으로

Table 2. Red blood cell count of the flounder exposed to different concentrations of residual oxidants at 20°C. Values are mean ± S.E.

TRO conc. (ppb)	Red blood cell count (10^4 cell/mm^3)			
	24-hr exposure	48-hr exposure	72-hr exposure	96-hr exposure
0	335 ± 24	347 ± 26	364 ± 27	344 ± 33
13	362 ± 41	327 ± 35	349 ± 30	358 ± 24
24	346 ± 29	349 ± 22	374 ± 34	416 ± 31*
33	359 ± 37	421 ± 29*	437 ± 36*	ND**
39	404 ± 26*	441 ± 37*	ND**	ND**

*$P < 0.05$ relative to mean value of control group with respect to exposure time.
**ND : not determined.

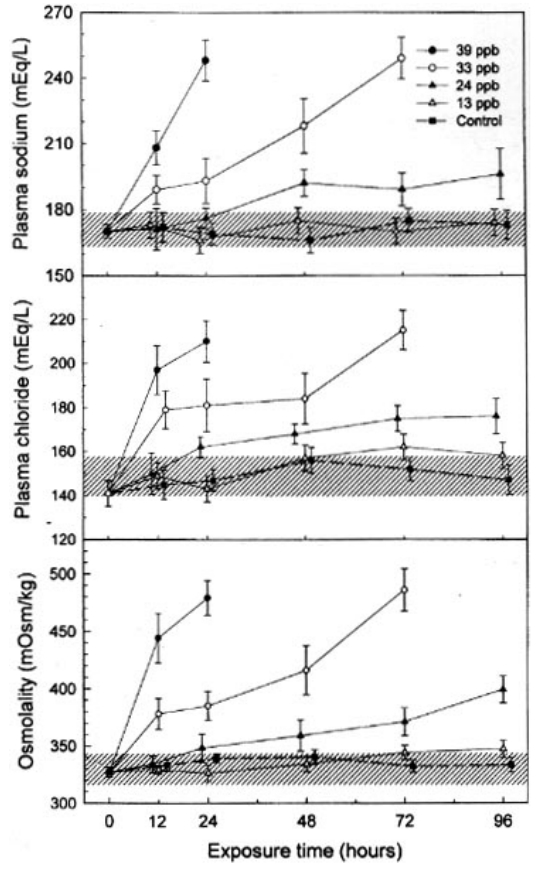

Fig. 5. Blood electrolyte and osmolality of the flounder exposed to different concentrations of residual ozone at 20°C. Values are mean ± S.E. Dashed area represents normal range of 15 fish cultured in the laboratory for 2 weeks.

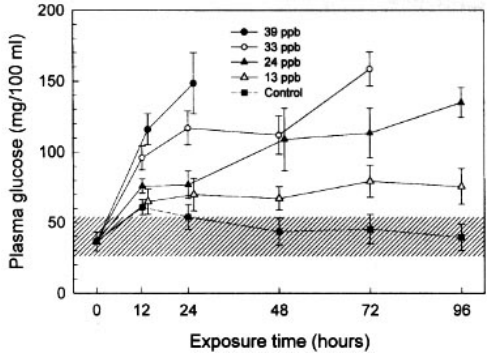

Fig. 6. Changes in blood glucose of the flounder exposed to different concentrations of residual ozone at 20℃. Values are mean±S.E. Dashed area represents normal range of 15 fish cultured in the laboratory for 2 weeks.

상승하였다. 24 ppb에 노출된 실험군에서는 24시간이 지나면 혈중 고혈당 증상이 현저하였고, 13 ppb 노출군의 혈중 glucose 농도는 대조군에 비하여 유의하게 높았다($P < 0.05$).

산소소비

TRO 농도 및 경과시간별로 노출시킨 넙치를 같은 농도의 TRO를 유지시킨 호흡 검량장치에 넣어 산소소비량을 측정한 결과는 Table 3에 나타내었다.

대조군의 비체중 산소소비율은 평균 93.5 ml O_2/kg·hr 범위였고, 실험기간 동안 절식에 의하여 산소소비율이 점차 감소하였으나 TRO에 노출된 실험군의 산소소비율과는 뚜렷한 차이를 보였다. 잔류오존 39 ppb에 24시간 노출된 개체는 같은 시간대에 측정한 대조군 산소소비율을 기준으로 38% 감소하였고, 33 ppb에 48시간 노출된 개체는 32%, 78시간 노출군은 46% 감소하였다. 24 ppb에서는 노출 후 72시간이 지나면서 산소소비율이 유의하게 낮아지는 경향을 보인 반면에 13 ppb에 노출된 개체에서는 대조군에 비하여 산소소비량이 다소 많았다.

Table 3. Oxygen consumption rates of the flounder exposed to different concentrations of residual oxidants at 20°C. Values are mean±S.E.

TRO conc. (ppb)	Oxygen consumption (ml O_2/kg · hr)			
	24-hr exposure	48-hr exposure	72-hr exposure	96-hr exposure
0	107.8±6.3	95.1±7.5	87.6±8.4	83.6±6.2
13	101.3±5.8	112.6±8.3	96.4±8.7	93.5±7.0
24	95.6±7.2	87.0±9.8	73.4±7.9*	64.4±6.9*
33	78.4±5.3*	64.7±7.5*	47.5±9.6*	ND**
39	66.8±8.1*	41.5±6.4*	ND**	ND**

*$P < 0.05$ relative to mean value of respective control group with different exposure time
**ND : not determined.

조직학적 연구

아가미의 조직학적 변화는 잔류오존 농도와 노출시간에 따라 현저한 차이를 보였다. 잔류오존 39 ppb에 24시간, 33 ppb에서 48시간 노출 후 폐사한 개체의 아가미는 급성독성의 전형적인 조직학적 변화가 관찰되었다. 상피세포층은 아가미 혈관으로부터 심하게 박리되고, 상피세포에는 괴사와 심한 부종이 관찰되었다(Fig. 7B). 33 ppb에 72시간 노출 후 사망한 것은 혈관으로부터의 상피세포층의 박리는 48시간 후에 폐사한 것과 비슷한 정도로 관찰되었지만, 상피세포의 부종과 괴사는 적었으며 아가미 상피는 약간 증생하고 있었다(Fig. 7C). 또한, 33 ppb에 96시간 노출 후 생존하였던 개체의 경우에서는 현저한 아가미 상피세포의 증생이 특징적으로 관찰되었다(Fig. 7D). TRO 25 ppb에 96시간 노출된 생존 개체는 아가미 상피세포의 증생이 모든 새판에서 보였으나, 33 ppb 노출군에 비하여 심하지는 않았으며, 증생은 새판과 새판사이의 기저부에서 많이 관찰되었다(Fig. 7E). 13 ppb에서 96시간 노출된 생존 개체는 상피세포의 매우 약한 증생이 보이긴 했지만, 대조군과 유사하여 오존의 영향은 관찰되지 않았다(Fig. 7F).

고 찰

수중 오존의 용해도는 10 mg/l이고, 온도가 상승하면 급속히 산소로 분해되지만(이, 1995), 용존가스성분에 대한 수서생물의 독성실험에서는 온도를 일정하게 유지하므로 치사농도는 실험생물의 성장단계, 대사 강도 및 활동성과 같은 생태적인 차이에 많은 영향을 받는다(Heath, 1995). Wedemeyer *et al.*(1979)은 수온 10°C에서 오존에 노출시킨 무지개 송어의 48시간과 96시간 LC_{50}은 각각

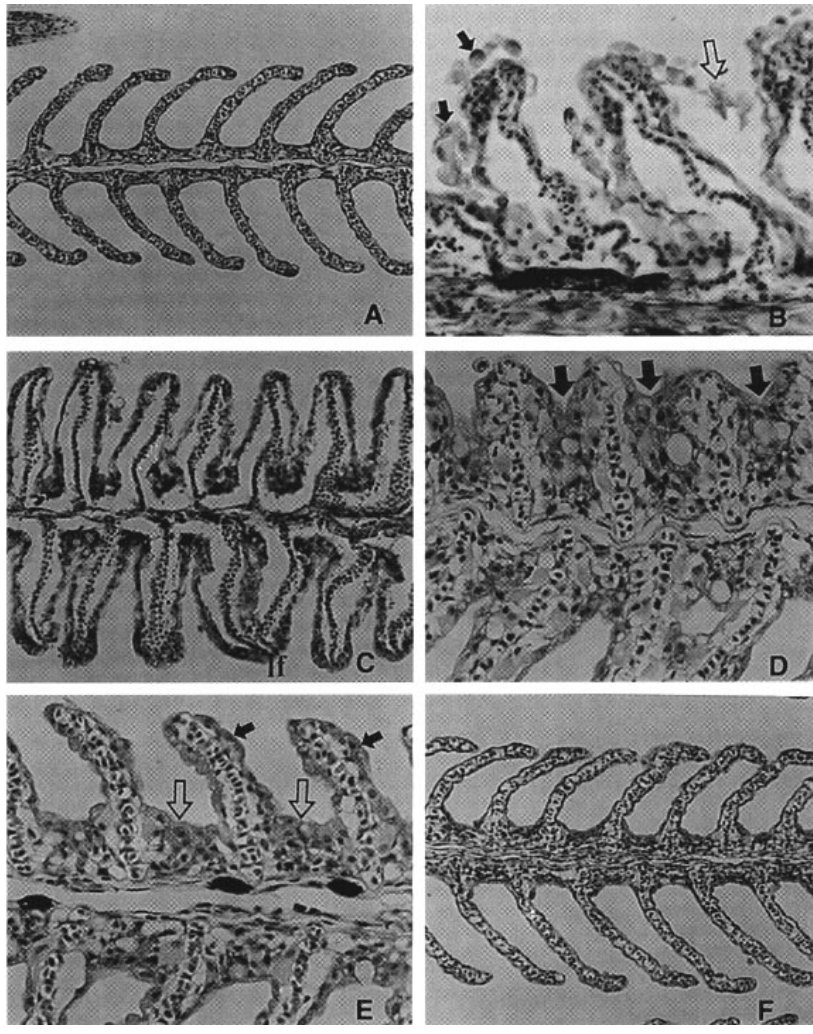

Fig. 7. Histological section of gills exposed to different concentrations of residual oxidant.
A : Control fish exposed to ozone-free water (× 200).
B : Dead fish exposed to 33 ppb for 48 hours. The epithelial layer lifted away from the capillary bed with edema (dark arrows) and necrosis (empty arrow) of the epithelial cells (× 400).
C : Dead fish exposed to 33 ppb for 72 hours. Gill lamellar shows lamella fusion (lf) and severe epithelial lifting (× 200).
D : Survived fish exposed to 33 ppb for 96 hours. Severe hyperplasia of gill epithelium leading to fusion of lamella (arrows), (× 400).
E : Survived fish exposed to 25 ppb for 96 hours. Gill lamella exhibit hyperplasia of epithelial cells (dark arrows) and inter-lamella cells at the base of lamella (empty arrows), (× 400).
F : Survived fish exposed to 13 ppb for 96 hours. Gill shows no significant changes (× 200).

10.2와 9.3 ppb이고, 치사를 유발하지 않는 농도는 8 ppb 이하가 될 것으로 보고하였다. Leynen *et al.*(1998)은 수온 27~32°C에서 *Cyprinus carpio*, *Leuciscus idus*, *Clarias gariepinus* 치어 및 *Daphnia magna*에 대한 48시간 LC_{50}은 평균 35 ppb 이고, *D. magna*에 대한 NOEC(no observable effects concentration)는 11 ppb로서 수서생물에 미치는 잔류오존 치사독성은 매우 높다는 것을 지적하였다. 수온 20°C에서 오존에 노출시킨 넙치의 48시간과 96시간 LC50은 각각 26.4와 22.3 ppb,

치사독성은 노출 초기에 강하게 작용하는 것으로 나타났으며, 13.2 ppb에서는 96시간 노출동안 치사 개체를 관찰 할 수 없었다. 본 실험의 결과 넙치의 TRO 치사농도는 무지개 송어에 비하여 높았는데 넙치는 섭식할 경우를 제외하고는 활동성이 적고, 유영능이 강한 다른 어종에 비하여 대사강도가 낮음으로(Kikuchi *et al.*, 1990) 잔류오존에 대한 내성이 다소 높게 나타난 것으로 생각된다.

어류가 환경수와 가장 광범위하게 접촉하는 부위는 아가미이므로 사육수중에 잔류하는 독성물에 의해 일차적으로 영향을 받는 것은 아가미라 할 수 있다. 본 연구에서 넙치의 아가미 조직은 TRO 농도와 노출시간에 따라 현저한 차이를 보였다. 잔류오존에 노출된 개체에서 아가미 상피세포층은 모세혈관에서 심하게 박리되고, 아가미 상피는 괴사되어 있었다. 33 ppb에서는 96시간까지 생존한 개체도 있었는 데, 이러한 개체는 아가미 상피에 심한 증생이 관찰되어, 아가미를 통한 산소공급이 어려울 것으로 사료되었으며, 아가미의 손상과 증생의 정도는 산소소비율의 감소와 일치된 경향을 나타내었다. 또한, 고농도에서는 아가미 상피세포에 부종을 일으키고 있는 세포가 다수 관찰되었고, 이는 삼투조절 능력의 상실을 반영하는 것으로서, 고농도의 TRO에 노출된 개체의 혈중 전해질과 삼투질 농도는 현저하게 증가하였다.

용존 독성물이 어류의 혈액 성상에 미치는 유형으로는 수은과 같은 독성 중금속과 원유 수용성 분획(WSF)에 노출되면 체내에 유입된 독성물이 조혈작용을 저해하여 비교적 단기간에도 hematocrit(Hct), hemoglobin 농도(Hb)와 적혈구 수(RBC)는 감소하는가 하면(Alkindi *et al.*, 1996; Fletcher and White, 1985), chlorine 및 오존과 같은 강한 산화제에 노출된 어류에서는 상반되는 결과들을 보이고 있다(Wedemeyer *et al.*, 1979). 본 실험의 넙치는 TRO 농도가 높고, 치사 농도 범위에서 노출이 지속될수록 혈액 Hct, Hb 농도, RBC, 혈중 전해질 농도와 삼투질 농도는 증가하였다. 넙치는 잔류오존 농도가 높을수록 단시간에 아가미 상피세포 손상이 현저한 것으로 볼 때(Fig. 7), 급속한 조혈작용에 의한 적혈구 수 증가보다는, 손상된 아가미를 통한 혈중 수분의 다량 탈수(dehydration)에 인하여 상대적으로 Hct, Hb 및 RBC 등이 증가한 것으로 추정된다. 또한, 오존에 노출된 사람의 경우 적혈구의 산소결합 및 산소수송능이 약화된다는 보고(Kindya and Chan, 1976)가 있으나 오존이 해수중의 여러 이온과 화학반응을 통하여 생성된 산물이 Hb를 methemoglobin으로 산화시키는 가에 대해서는 알려져 있지 않다. 일반적으로, 혈액의 산소 결합 및 산소 수송능은 헤모글로빈의 산소친화능과 농도에 비례하므로 혈중 헤모글로빈 농도가 상승하면 산소소비량이 증가할 것이다. 그러나 잔류오존에 노출된 넙치에서는 산소소비 감소경향이 현저하였던 바 Hct, Hb 농도, RBC 증가는 탈수에 의해 단위용적당 혈구세포가 농축됨으로서 나타난 현상으로 여겨지며, 산소소비율이 감소하는 것은 아가미 상피세포 손상에 의해 산소흡수 능력이 저하되어 결국에는 동맥혈의 산소장력이 낮아진 결과로 생각된다.

한편, 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 아가미 상피세포에서 능동수송기작으로 배출함으로서 전해질 및 삼투농도를 일정하게 유지한다(Wood and Shuttleworth, 1995). 염분 약 31‰인 실험해수의 sodium과 chloride 이온의 평균 농도는 각각 513과 457 mEq/l이었고, 넙치 혈액은 각각 172와 154 mEq/l로서, Sim *et al.*(1998)이 보고한 평균치에 비하여 약간 높았다. 넙치 혈액과 해수 삼투질 농도는 평균 334와 947 mOsm/kg로서 혈액은 환경수에 비해 약 3배 저장액이었다. 환경수에 비하여 혈액이 고장성인 무지개송어는 오존 노출 후 전해질 농도가 현저하게 감소한 반면에 오존에 노출된 넙치의 혈중 전해질과 삼투질 농도는 증가하였다. 넙치에서 보이는 혈중 전해질과 삼투질 농도 증가는 1) 손상된 아가미를 통하여 고상성 전해질의 혈액내 유입, 2) 탈수에 의한 혈중 수분상실, 3) 과잉의 염류에 대한 아가미 상피세포의 삼투조절 능력 상실 등에 의한 것으로 생각된다. 잔류 오존 33과 39 ppb에 노출된 넙치의 삼투질 농도와 생존율과의 관계로부터, 혈액 삼투질 농도가 324에서 460 mOsm/kg으로 증가하면 삼투압의 생리적 불균형이 생존을 크게 위협하는 것으로 보여진다.

잔류오존 13 ppb에 96시간 노출된 넙치는 폐사 발생이 없고, 혈액 성상, 전해질과 삼투질 농

도에 유의한 변화가 없었으나 혈당은 대조군에 비하여 유의하게 높아지는 경향을 보였다. 어류에게 물리, 화학적 stress가 가해지면 혈중 cortisol이 상승하고, cortisol은 간의 포도당 신합성(gluconeogenesis)을 촉진시켜 혈당이 상승한다고 보고되어 있다(Vijayan and Moon, 1994). 그러므로 넙치가 비교적 저농도의 잔류오존에 노출되더라도 TRO가 stress 요인으로 작용하며, 노출이 장기간 계속되면 성장과 생존에 미치는 생리적 저해 영향은 클 것으로 생각된다.

결론적으로, 오존처리 해수중 잔류 옥시단트는 넙치에 대하여 치사독성이 강하고, 생리상태에 미치는 저해성이 매우 높았다. 따라서 해산어 양식장 사육수의 병원체 방역 및 수질개선을 위한 오존처리 시스템 사용시에는 오존 처리수내 잔류 옥시단트(TRO)를 제거해야 하며, 비록 저농도일지라도 TRO 제거없이 사육수로 사용한다면 양식생물의 폐사 피해가 많을 것으로 판단된다.

사 사

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

참고문헌

Alkindi, A. Y. A., Browm, J. A., Waring, C. P. and Collins, J. E.: Endocrine, osmoregulatory, respiratory and haematological parameters in flounder exposed to the water soluble fraction of crude oil. J. Fish. Biol., 49: 1291-1305, 1996.

APHA, AWWA, WPCF: Ozone (residual)-Indigo colorimetric method, In Standard Method for the Examination of Water and Wastewater, 4.104-4.106, 19th ed., Andrew, D. E., Lerorse S. C., and Arnold, APHA, Washington, 1995.

Block, R. M.: Physiological response of estuarine organisms to chlorine, Chesapeake Sci., 18: 158-164, 1977.

Fletcher, T. C. and White, A.: Nephrotoxic and hematological effects of mercuric chloride in the plaice (*Pleuronectes platessa* L.). Aquat. Toxicol., 8: 77-84, 1986.

Haag, W. R., Hoigne, J. and Bader, H. : Improved ammonia oxidation by ozone in the presence of bromide ion during water treatment. Water Research, 18(9): 1125-1128, 1984.

Heath, A. G. : Water pollution and fish physiology. pp. 141-162, CRC Press, New York, 1995.

Honn, K. V. and Chavin, W. : Utility of ozone treatment in the maintenance of water quality in a closed marine system. Mar. Biol., 34: 210-219, 1976.

Itoh S., Yoshimizu, M. and Ezura, Y. : Disinfectant effects of low level of total residual oxidant in artificial seawater on fish pathogenic microorganisms. Nippon Suisan Gakkaishi, 63: 97-102, 1997.

Kikuchi, K., Takeda, S., Honda, H. and Kiyono, M.: Oxygen consumption and nitrogenous excretion of starved Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Nippon Suisan Gakkaishi 56, 1891.

Kindya, R. J. and Chan, P. C. : Effects of ozone on erythrocyte membrane adenosine triphosphate. Biochem. Biophys. Acta, 429: 608-625, 1977.

Leynen, M., Duviver, L., Girboux, P. and Ollevier, F. : Toxicity of ozone to fish larvae and *Daphnia magna*. Ecotoxicol. Environ. Safety, 41(2): 176-179, 1998.

Ozawa, T., Yotsumoto, H., Sasaki, T. and Nakayama, S. : Ozonation in seawater-applicability of ozone for recycled hatchery cultivation. In Proceeding of the 1990 IOA and 9th Ozone World Congress, 2: 257-266, 1990.

Sim, D. S., Jung, S. H. and Oh, M. J. : Hematological studies on the olive flounder *Paralichthys olivaceus* reared in the landbase-seawater tank system. Bull. Nat. Res. Dev. Inst., 54: 115-123, 1998.

Sindermann, C. J. : Ocean pollution-effects on living resources and humans. In Marine Science Series, pp. 9-27, CRC Press, New York, 1995.

Vijayan, M. M. and Moon, T. W. : The stress response and plasma disappearance of corticostreiod and glucose in a marine teleost the sea raven. Can. J. Zool. 72: 379-386, 1994.

Wedemeyer, G. A., Nelson, N. C. and Yasutake, W. T. : Physiological and biochemical aspects of ozone toxicity to rainbow trout (*Salmo gairdneri*). J. Fish. Res. Board. Can., 36: 605-614, 1979.

Wood, C. M. and Shuttleworth, T. J. : Cellular and molecular approaches to fish ionic regulation, pp. 352-352. Acamdemic Press, San Diego, 1995.

Yoshimizu, 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. Schariff, M., Arthur J. R. and Subasianghe (eds), Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, 203-209, 1995.

이현동: 브롬이온 존재하에서 오존에 의한 암모니아성 질소의 산화에 관한 연구. 한국수질보전학회지, 11(3): 163-174, 1995.

임진숙: 순환여과시스템에서 오존을 이용한 암모니아성 질소의 탈질화 연구. pp. 53, 제주대학교 석사학위논문, 1997.

해양수산부: 해양환경공정시험방법. pp. 33-34, 1998.

Acute Toxicity of Ozone on Survival and Physiological Conditions of Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus*

Heung-Yun Kim, Myung-Joo Oh and Sung-Ju Jung

Department of Fish Pathology, Yosu National University, Yosu 550-749, Korea

Ozonization for rearing seawater in land-based culture system has recently been utilized for disinfection of pathogenic microorganisms and improvement of water quality. This study was conducted to examine the effects of total residual oxidants (TRO) in ozone-treated seawater on survival, blood parameters, osmolality and oxygen consumption, and gill tissue of the flounder, *Paralichthys olivaceus*. Experiments were carried out with the starved flounder of 12~19 cm in total length at 20°C. The 48-hr and 96-hr LC_{50} for the flounder amounts to 26.4 ppb and 22.3 ppb, respectively. With increase of TRO concentration from 24 to 39 ppb, the values of hematocrit, hemoglobin concentration, red blood cell count and osmolality of the flounder with respect to exposure time were significantly elevated, however, the oxygen consumption rates decreased. In the case of the fish exposed to 13 ppb for 96 hrs, blood glucose increased with an elapse of exposure time, while survival rate was 100%. Death apparently resulted by massive destruction of gill lamellar epithelium, severe osmotic imbalance and the lack of oxygen uptake. The results of this experiment indicated that to protect aquaculture organisms, the ozone-treated seawater should not contain any residual oxidants, and that relatively long-term exposure to TRO of low concentration can impact on survival and physiological conditions of the flounder.

Key words : Ozone toxicity, Flounder, LC_{50}, Hematological parameter, Osmolality, Gill epithelium, Oxygen consumption