



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

수 산 학 박 사 학 위 논 문

이산화염소(ClO_2)의 급성 생물
독성 및 먹이생물 배양수
살균 효율 평가



부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 물 학 과

이 옥

Thesis for the Degree of Doctor of Fisheries Science

Acute Toxicity of Chlorine Dioxide
(ClO₂) and Its Disinfection Efficiency
to Live Feed Culture



August 2020

Pukyong National University

Department of Fisheries Biology

Ock Lee

수 산 학 박 사 학 위 논 문

이산화염소(ClO_2)의 급성 생물
독성 및 먹이생물 배양수
살균 효율 평가

지도교수 박 정 환

이 논문을 수산학 박사 학위 논문으로 제출함.

2020년 8월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 물 학 과

이 옥

이옥의 수산학박사 학위논문을 인준함.

2020년 8월 28일



위원장 농학박사 김 창 훈



위 원 영양학박사 배 승 철



위 원 수산학박사 윤 지 현



위 원 수산학박사 황 철 희



위 원 수산학박사 박 정 환



목 차

I. 총 서론	1
II. 이산화염소의 급성 생물 독성	5
1. 서론	5
2. 재료 및 방법	7
2.1. 감성돔 및 참돔 치어에 대한 이산화염소의 급성 독성	7
2.1.1. 실험 시스템의 구성 및 이산화염소 주입	7
2.1.2. 실험어류 및 조건	8
2.1.3. 치사농도(LC)의 계산 및 분석 방법	8
2.2. 미세조류(Microalgae)에 대한 이산화염소의 성장저해 독성	10
2.2.1. 실험 생물	10
2.2.2 실험 방법	10
2.3. 로티퍼(<i>Brachionus plicatilis</i>)에 대한 이산화염소의 급성 독성 ..	16
2.3.1. 실험 생물	16
2.3.2. 실험 방법	16
2.4. 알테미아(<i>Artemia salina</i>)에 대한 이산화염소의 급성 독성	19
2.4.1. 실험 생물	19
2.4.2. 실험 방법	19

3. 결과	22
3.1. 감성돔 및 참돔 치어에 대한 이산화염소의 급성 독성	22
3.1.1. 감성돔 치어와 참돔 치어의 생존율	22
3.1.2. 감성돔 치어와 참돔 치어의 치사농도(LC50)	25
3.2. 미세조류(Microalgae)에 대한 이산화염소의 성장저해 독성	30
3.3. 로티퍼(<i>Brachionus plicatilis</i>)에 대한 이산화염소의 급성 독성 ..	36
3.4. 알테미아(<i>Artemia salina</i>)에 대한 이산화염소의 급성 독성	40
4. 고찰	44
4.1. 감성돔 및 참돔 치어에 대한 이산화염소의 급성 독성	44
4.2. 먹이생물에 대한 이산화염소의 급성 독성	48
III. 먹이생물 배양액에 대한 이산화염소의 살균효율	50
1. 서론	50
2. 재료 및 방법	53
2.1. 미세조류 배양액에 대한 이산화염소의 살균효율	53
2.1.1. 실험 생물	53
2.1.2. 실험 방법	53
2.2. 로티퍼 배양액에 대한 이산화염소의 살균효율	55
2.2.1. 이산화염소 농도에 따른 살균효율	55
2.2.2. 로티퍼 배양 밀도에 따른 이산화염소의 살균효율	56
2.2.3. 이산화염소 처리시간에 따른 살균효율	60

2.3. 알테미아의 배양액에 대한 이산화염소의 살균효율	62
2.3.1. 시험 생물	62
2.3.2. 시험 방법	62
3. 결과	64
3.1. 미세조류 배양액에 대한 이산화염소의 살균효율	64
3.1.1. 미세조류 재성장	64
3.1.2. 세균 제어	70
3.2. 로티퍼 배양액에 대한 이산화염소의 살균효율	74
3.2.1. 이산화염소 농도에 따른 살균효율	74
3.2.2. 로티퍼 배양 밀도에 따른 이산화염소의 살균효율	79
3.2.3. 이산화염소 처리시간에 따른 살균효율	84
3.3. 알테미아의 배양액에 대한 이산화염소의 살균효율	86
4. 고찰	89
요약	91
감사의 글	94
참고문헌	96

Abstract

Currently chlorine dioxide (ClO_2) is considered a promising disinfection material for aquaculture uses due to its high solubility and strong oxidative power. This material is, however, easily degradable with the sunlight and not hydrolyzed, barely leaving secondary residual materials in the water. Thus, it is instantly volatile after disinfecting pathogens and likely minimizes the risk to aquatic organisms. Only a few studies on chlorine dioxide were carried out in the field of aquaculture.

This study was designed to find fundamental information on chlorine dioxide to use it practically in the aquaculture field. This study consists of two parts as follows; 1) Experiment 1 - Acute toxicity tests of chlorine dioxide on two different fingerlings of seawater fishes (black seabream, *Acanthopagrus schlegelii* and red seabream, *Pagrus major*) and four different types of live feeds (*Isocrysis galbana*, *Nannochloropsis* sp, *Brachionus plicatilis*, and *Artemia salina*), 2) Experiment 2 - Disinfection efficiency of chlorine dioxide in the culture media for four different types of live feeds (*Isocrysis galbana*, *Nannochloropsis* sp, *Brachionus rotundiformis*, and *Artemia salina*).

In Experiment 1, median lethal concentrations for 96 h (96LC_{50}) were found at 0.14 and 0.24 mg ClO_2/L for black seabream and red seabream, respectively. Based on the specific growth rates of *I. galbana* and *Nannochloropsis* sp., no observed adverse effect levels (NOAEL) were the same with 0.05 mg ClO_2/L , while median effective concentrations (EC_{50}) for those microalgae were estimated as 0.535 and 0.648 mg ClO_2/L . Rotifer (*Brachionus*

plicatilis) showed the same NOAEL as both microalgae, while its 24LC₅₀ was 0.641 mg ClO₂/L similar to the level in *Nonochloropsis sp.* For artemia (*Artemia salina*), 24LC₅₀ and NOAEL were found 5.99 and 2.00 mg ClO₂/L, showing the relatively higher tolerance to chlorine dioxide compared to the other organisms tested.

In Experiment 2, the regrowth rate of *Nonochloropsis sp* was inhibited by 83% compared to control with the treatment concentration of 4 mg ClO₂/L under the concentrations of 0.94 mg TSS/L and 2.67 mg COD/L ($P>0.05$). Its regrowth rate decreased with increasing treatment concentration, showing a 67% reduction to control at 16 mg ClO₂/L, while bacterial growth was inhibited by 98.4%. No inhibition in regrowth of *Nonochloropsis sp.* was observed with 2 mg ClO₂/L, but only a 60% reduction in bacterial growth was found.

In the contrast, the regrowth rate of *I. galbana* under the concentrations of 1.28 mg TSS/L and 2.67 mg COD/L was not inhibited and bacterial growth was successfully inhibited by 95.4% at 8 mg ClO₂/L compared to control. For rotifer (*Brachionus rotundiformis*), no mortality was observed and bacterial growth was successfully inhibited by 97.7% at 16 mg ClO₂/L under the concentrations of 1.62 mg TSS/L and 2.67 mg COD/L. Based on the TSS concentration, the regressions of bacterial inhibition rate for MIC₉₀ and MIC₉₉ were estimated as follows: $Y=7.4481X + 0.8416$ ($R^2=0.9901$), $Y=10.823X + 1.8756$ ($R^2=0.9512$). respectively (Y: bacterial inhibition rate, X: TSS concentration). Artemia (*Artemia salina*) at the culture intensity of 1,000 individuals/mL survived 100% and bacteria were entirely removed at the chlorine dioxide concentration of 50 mg ClO₂/L. Chlorine dioxide appears to

effectively disinfect for live feeds and be promising in aquaculture uses. However, an effective concentration of chlorine dioxide for disinfecting live feeds should be carefully determined, considering that different effects can be manifested according to various factors such as culture intensity of live feeds and demands in culture media.



List of Figures

Fig. 1. Time-course survival rate (mean±SD) of juvenile black seabream <i>Acanthopagrus schlegelii</i> based on the ClO ₂ concentrations	23
Fig. 2. Time-course survival rate(mean±SD) of juvenile red seabream <i>Pagrus major</i> based on the ClO ₂ concentrations	24
Fig. 3. Prediction model for the lethal concentration of ClO ₂ in black seabream <i>Acanthopagrus schlegelii</i> based on the exposure time and mortality probability	26
Fig. 4. Prediction model for the lethal concentration of ClO ₂ in red seabream <i>Pagrus major</i> based on the exposure time and mortality probability	27
Fig. 5. Specific loading rate (daily total feeding rate of ClO ₂ /total fish weight) of ClO ₂ in black seabream <i>Acanthopagrus schlegelii</i> and red seabream <i>Pagrus major</i>	29
Fig. 6. Visual growth comparison of <i>Isochrysis galbana</i> . (Top) Concentration - dependent growth inhibition (mean±SD) of <i>Isochrysis galbana</i> with various ClO ₂ treatment concentrations for 96 h (Bottom)	31
Fig. 7. Visual growth comparison of <i>Nannochloropsis sp.</i> (Top) Concentration - dependent growth inhibition (mean±SD) of <i>Nannochloropsis sp.</i> with various ClO ₂ treatment concentrations for 96 h (Bottom)	33
Fig. 8. Concentration-dependent growth inhibition (mean±SD) of	

<i>Brachionus plicatilis</i> with various ClO ₂ treatment concentrations for 24 h	38
Fig. 9. Concentration-dependent growth inhibition (mean±SD) in <i>Artemia salina</i> with various ClO ₂ treatment concentrations for 24 h	43
Fig. 10. Visual growth comparison of <i>Nannochloropsis sp.</i> with various ClO ₂ treatment concentrations	66
Fig. 11. Bacterial inhibition rates (mean±SD) in <i>Isochrysis galbana</i> culture with various ClO ₂ treatment concentrations	69
Fig. 12. Visual comparison of bacteria colonies in the rotifer(<i>Brachionus rotundiformis</i>) with various ClO ₂ treatment concentrations	78
Fig. 13. The regression for the bacterial control of ClO ₂ depend on the total suspended solids	83
Fig. 14. Counts of bacterial colonies in various ClO ₂ treatment concentrations and treatment times	85
Fig. 15. The effects of ClO ₂ on survival rate (mean±SD) in <i>Artemia salina</i>	87

List of Tables

Table 1. F/2 Medium used for the toxicity test in microalgae (Guillard RRL & Ryther JH, 1962)	12
Table 2. Test conditions for the toxicity test in microalgae (<i>Nannochloropsis sp.</i> and <i>Isochrysis galbana</i>)	13
Table 3. The equation for calculating the specific growth rate (SGR) in microalgae	15
Table 4. Test conditions for the toxicity test in rotifer (<i>Brachionus plicatilis</i>)	18
Table 5. Test conditions for the toxicity test in <i>Artemia salina</i>	21
Table 6. The effect of ClO ₂ concentration on specific growth rate (mean±SD) for 96 h Microalgae toxicity test	34
Table 7. The median effective concentration (EC ₅₀) and no observed adverse effect level (NOAEL) after 96 h treatment of ClO ₂ to microalgae	35
Table 8. The effects of ClO ₂ concentration on the cumulative survival number (mean±SD) and survival rate in rotifer (<i>Brachionus plicatilis</i>)	37
Table 9. The median effective concentration (EC ₅₀) and no observed adverse effect level (NOAEL) of ClO ₂ in rotifer (<i>Brachionus plicatilis</i>)	39
Table 10. Survive rates (mean±SD) in <i>Artemia salina</i> with various ClO ₂ treatment concentrations	41
Table 11. Median lethal concentration (LC ₅₀) and no observed adverse	

effect level (NOAEL) after 24 h treatment of ClO ₂ in <i>Artemia salina</i>	42
Table 12. Experimental ClO ₂ concentrations to confirm the bacterial inhibition efficiency in the commercially used rotifer (<i>Brachionus rotundiformis</i>) culture	58
Table 13. Bacterial inhibition rates in the commercially used rotifer (<i>Brachionus rotundiformis</i>) culture with various ClO ₂ treatment concentrations	59
Table 14. Bacterial inhibition rates in the commercially used rotifer (<i>Brachionus rotundiformis</i>) culture with various ClO ₂ concentrations and treatment times	61
Table 15. Regrowth rates (mean±SD) of <i>Nannochloropsis</i> sp. with various ClO ₂ treatment concentrations	65
Table 16. Regrowth rates (mean±SD) in <i>Isochrysis galbana</i> with various ClO ₂ treatment concentrations	68
Table 17. Bacterial inhibition rates (mean±SD) in <i>Nannochloropsis</i> sp. culture with various ClO ₂ treatment concentrations	71
Table 18. Bacterial inhibition rates (mean±SD) in <i>Isochrysis galbana</i> culture with various ClO ₂ treatment concentrations	73
Table 19. Mortality of the commercially used rotifer (<i>Brachionus rotundiformis</i>) with various ClO ₂ treatment concentrations	75
Table 20. Bacterial inhibition rates (mean±SD) in commercially used rotifer (<i>Brachionus rotundiformis</i>) culture with various ClO ₂ treatment concentrations	77
Table 21. Bacterial inhibition rates in progressively diluted rotifer	

	<i>(Brachionus rotundiformis)</i> culture with various ClO ₂ treatment concentrations	80
Table 22.	Survival rates (mean±SD) of rotifer (<i>Brachionus rotundiformis</i>) in progressively diluted culture with various ClO ₂ treatment concentrations	81
Table 23.	Bacterial inhibition rates (mean±SD) in commercially used <i>Artemia salina</i> with various ClO ₂ treatment concentrations	88



I. 총 서론

국내 수산양식업에서 양식 생물의 질병은 주요 현안문제 중 하나이다. 질병 발생 문제는 양식 생산 전반의 생산 비용 증가로 이어지며 양식 생물의 생산성 및 경제성을 저하시키는 직접적 요인으로 작용한다. 질병에 의한 경제적 손실을 줄이기 위해서는 질병이 발생하였을 때 대처 및 처리도 중요하지만 불필요한 경제적 손실을 방지하기 위해 질병이 발생하지 않도록 조기 예방하는 것이 더욱 중요하다. 주로 많이 이용되는 조기 예방법으로는 백신을 투여하거나 자외선(UV), 오존, 전기분해법 등을 이용하여 양식장 유입수 또는 사육수를 살균하여 병원체를 최소화하는 것이다(Jorquera et al.; 2002; Gullian et al. 2012; Ringø et al. 2014; Spiliotopoulou et al. 2018). 백신 처방의 경우에는 특정 질병 및 어종에 대해서만 사용할 수 있고 직접 어류에게 백신을 투여해야 하는 단점을 지니고 있다. 자외선 살균법, 오존 살균법, 전기분해법은 상대적으로 높은 초기 시설비와 유지보수 비용이 요구된다. 자외선 살균법은 상대적으로 안전하지만 UV 램프 주변에 biofouling 현상, 램프의 성능과 품질이 상이하여 일정한 살균 수준을 유지하는데 노력이 많이 필요하다. 오존과 전기분해법은 강력한 산화력으로 살균 효과가 탁월하여 현장에서 이용되고 있으나, 산화과정 중 양식 생물에 독성이 매우 높은 이차적인 산화산화물이 형성되는 단점이 있으며 양식생물과 여과 미생물에 피해를 줄 수 있다. 특히 오존은 수중에 완전히 용해되지 않고 대기중에 유출될 경우 인체에도 심각한 영향을 줄 수 있으므로 사용상 주의가 따른다(Schroeder et al. 2014; Spiliotopoulou et al. 2018).

이산화염소는 염소와 산소의 이중결합을 가진 유리기 단량체(free radical monomer)로 기체 상태로 상온에 존재한다. 낮은 온도에서 이산

화염소는 액체 상태로 존재하며 물에 용해도가 매우 높아 음용수의 소독, 탈취제, 표백제 등 다양한 산업분야에 이용되고 있다(EPA 1994; Junli et al. 1997a).

또한, 이산화염소는 염소보다 산화력이 약 2.5배 강하며 수중에 유기물 등과 반응한 후 신속하게 환원되어 잔류 산화물을 남기지 않는다. 또한 광분해가 빠르게 진행되어 인체에 미치는 위해성이 상대적으로 염소에 비해 매우 낮다. 세계보건기구(WHO)는 이러한 이산화염소의 안정성을 인정하고 식품첨가물 중 가장 안전한 기준인 A-1 등급으로 분류하고 있다. 따라서 기존에 사용되고 있는 살균 방법에 비해 잔류산화물을 형성하지 않아 생물안전성이 높으며 살균효율도 좋은 이산화염소가 수산용 살균소독제로서도 이용 가능성이 높다(Park et al. 2003).

음용수 등을 대상으로 한 이산화염소의 살균 효과에 대한 연구는 비교적 많이 진행되어 왔으나, 수산양식 목적으로 이산화염소의 살균 효과에 대한 실질적인 연구는 미미하다. 특히 해수 환경에서 이산화염소의 살균 효과에 대한 체계적인 연구가 부족한 실정이다(Junli et al. 1997b; Kim and Kim 2003).

어류 양식장의 경우 살균제 또는 살균장치들은 양식 시스템으로 들어오는 유입수 및 양식 시스템 내 사육수에 적용되어 사육환경 내 질병 발생 요인을 저감하는데 이용된다. UV 살균장치는 한정된 구역 내 자외선을 조사하는 방식으로 이용되고 있어 어체에 직접적인 영향을 주지 않는다. 그러나 화학제를 이용한 살균 방식의 경우 사육수 또는 유입수에 일정 농도를 지속적으로 주입함으로써 수중의 미생물을 불활성화시킨다.

양식장 내부로 들어오는 병원체의 주요 경로 중 하나는 먹이이다. 적절한 보관과 관리가 이루어지면 배합사료를 통해서 병원체가 유입되어 양식 시스템 내 문제를 야기하는 경우는 드물다. 그러나 어류양식에서

초기 종자생산을 하는 동안에는 로티퍼, 알테미아 등과 같은 먹이생물과 로티퍼를 배양을 위해 미세조류가 이용된다. 이 먹이생물들은 살아있는 자연 먹이로서 일정기간 동안 성장이 좋은 고영양 배지에서 배양된다. 이 영양염이 많은 배지에서는 다양한 미생물과 병원체들이 함께 증식하고, 이로 인해 병원체가 먹이생물의 몸체와 내부 기관에 붙어 사육수로 전이될 가능성이 높다. 먹이생물이 종자생산 단계에서 환경 저항성과 면역능이 낮은 어린 자치어에 이용되므로 먹이생물에 의한 심각한 폐사가 발생하기도 한다(Soorgeloos et al. 1986; Dehasque et al. 1991; Rodrivuez et al. 1991). 따라서 먹이생물을 배양 후 어류에게 공급하기 전 별도의 세척 과정을 거치도록 권장되고 있으나, 세척만으로 질병 전이 저감 효과가 크지 않다(Dehaque et al. 1991; Verdonck et al. 1991). 이에 먹이 생물을 자치어에 공급하기 전 소독 및 살균처리를 위해 다양한 화학제가 이용된다.

살균제로 주로 사용되는 화학제들은 강력한 산화력을 기반으로 양식생물에 질병을 유발할 수 있는 다양한 병원체를 죽이거나 불활성화시킨다. 이러한 산화과정에서 화학제가 과량 투입될 경우, 화학제의 잔류로 인해 양식생물과 먹이생물에 직접적인 독성을 나타낼 수 있어 안전 및 효과 농도를 구명하는 것이 중요하다. 이산화염소는 수중에 체류시간이 매우 짧고, 해수 조건에서도 잔류산화물을 남기지 않아 생물 안전성이 높다. 그러나 이산화염소의 양식생물에 대한 독성 및 먹이생물 소독을 위한 적정 농도 또는 적용 기준에 대한 자료가 없다. 따라서 본 연구의 1장에서는 해산어류와 주요한 먹이생물로 이용되는 미세조류, 로티퍼, 알테미아에 이산화염소가 미치는 급성 독성 농도를 구명함으로써 이산화염소를 양식장에 활용하기 위한 기초 자료를 도출하고자 하였다. 본 연구의 2장에서는 이산화염소 처리 농도, 처리시간에 따른 먹이생물 배양액 내 이

산화염소의 미생물 살균효과를 조사하고 실질적인 처리 방안에 대한 기초 자료를 도출하고자 하였다.



II. 이산화염소의 급성 생물 독성

1. 서론

사육수, 유입수 등을 대상으로 한 살균 과정은 오랫동안 양식 산업에 있어서 이용되어 왔다. 대량의 물을 이용하는 유수식이나 순환여과양식 시스템에서는 전통적으로 UV 살균기를 많이 이용하여 왔다. 화학제는 주로 기기류의 세척, 시설 및 장비의 표면 소독 등에 주로 이용된다. UV 살균기는 대량의 물을 처리하게는 적절하나, 조사램프 표면의 biofouling 문제, 주기적인 조사램프의 교체, 높은 전력 소비량 등의 문제를 가지고 있다. 또한 램프 표면의 biofouling 현상으로 인해 지속적인 성능을 담보하기 어려운 경우가 종종 발생한다. 이에 최근 제주도 등에서 차아염소산수(HOCl)과 같은 화학제를 이용하여 유수식 양어장의 유입수를 대량 처리하는 방법이 이용되기도 한다.

화학제는 유입수에 적절한 양의 화학제를 투입하고 혼합하여 유효 농도가 유지되도록 하는 상대적으로 간단한 과정을 거쳐 효과적인 살균작용을 얻을 수 있다. 하지만 차아염소산수의 경우 수중에 브롬 또는 염소 성분과 반응하여 어류에 심각한 독성을 유발하는 2차 잔류 산화물을 형성한다. 이로 인해 살균 과정 후 다시 티오황산나트륨을 투입하는 중화 과정을 거쳐야 하므로 경제적 부담이 가중된다. 이와 달리 이산화염소는 산화과정 이후 별도의 잔류산화물을 생성하지 않아 별도의 중화 과정이 필요없다. 또한 이산화염소는 다른 염소계 소독제에 비해 용해율이 약 10배 정도 높다. 그러나 일반적인 염소 gas는 수중에 투입되면서 가수분해되는 반면, 이산화염소는 용액 내에서 염소 gas 상태로 존재한다. Gas

상태에서 자유기가 물과 반응해서 잔류산화물을 형성할 수 있으나, 염소 gas의 가수분해율에 비해 약 7백만배 이상 느리므로 현실적으로 이산화 염소의 자유기에 의한 잔류산화물의 생성은 거의 없다. 특히 이산화염소는 수중에서 gas 상태로 존재하기 때문에 약간의 물의 유동으로도 쉽게 수중으로부터 제거된다.

따라서 상대적으로 낮은 투입량에서도 효과적인 살균이 가능하고 잔류산화물을 남기지 않는다는 점에서 대규모 양식수를 처리해야 하는 양식 시스템에서 적용 가능성이 있으므로 이와 관련된 기초 자료가 필요하다. 또한 어류양식에 있어서 사육수 또는 원수 내 소독 과정이 환경 적응성과 면역능이 낮은 자치어의 생존 및 성장에 큰 영향을 미치는 종자 생산 과정에서 살균 소독의 과정은 매우 중요하다. 특히 어류 종자생산에 있어서 질병 전달의 주요한 매개체로 작용하는 먹이생물은 자치어에 공급 전 반드시 살균소독의 과정을 거쳐야 한다. 양식장 현장에서 일반적으로 먹이생물은 고밀도로 배양되며, 고밀도 배양환경은 병원체가 서식하기 좋은 환경이다. 따라서 이산화염소의 양식산업에서 적절하게 이용하기 위해서는 이산화염소의 생물 독성에 대한 기초 자료가 필요하다.

따라서, 본 연구에서는 감성돔 치어와 참돔 치어를 대상으로 이산화염소의 독성 영향과 양식 시스템 내 적정 적용 방안에 대한 기초 자료를 도출하고, 대표적인 수산양식 먹이생물 4종을 대상으로 이산화염소에 대한 독성영향 평가를 시행하여 이산화염소를 양식용 살균소독제로 이용하기 위한 살균 및 소독 유효농도를 설정하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 감성돔 및 참돔 치어에 대한 이산화염소의 급성 독성

2.1.1. 실험 시스템의 구성 및 이산화염소 주입

본 실험에서 이용된 시스템은 순환여과시스템으로 3개의 유리 사각수조 (70 L, 0.34×0.6×0.4 m), 생물학적 여과조(0.5×0.48×0.5 m), 저수조 (0.44×0.48×0.5 m), 순환펌프(200 W, UP200W, Hyubshin water design, Seoul, Korea), 수중히터(100 W, Philgreen, Busan, Korea), UV 살균기(9 W, UV-A11W, Periha, GuangDong, China), 브로워(LP-40, Youngnam air pump, Busan, Korea)으로 구성되었으며, 시스템의 총 수량은 413 L이었다.

이산화염소는 다양한 수질조건에 매우 민감하게 반응하고 주입 즉시 환원되므로 지속적인 농도 유지가 어렵다. 따라서 실험 시작 전 아래의 식 (1)을 이용하여 실험구별 목표 이산화염소 농도가 되는 이산화염소 투입량을 결정하고 각 실험구별로 이산화염소를 투입하였다. 투입 후 시간 경과에 따른 손실률을 측정하고 식 (2)를 이용하여 이론적 연속 투입량을 계산하였다. 이론적 필요 투입량을 기준으로 정량펌프(SP-A100, Cheonsei, Ansan, South Korea)를 이용하여 이산화염소를 저수조에 연속적으로 투입하였다. 용존 이산화염소의 농도는 휴대용 광도계(HI96738, HANNA instrument, Limena, Italy)를 이용하여 측정하였다.

이산화염소 투입량(L)

$$= [\text{전체 시스템 수량(L)} \times \text{목표농도(mg ClO}_2\text{/L)}] / [\text{원액농도(mg ClO}_2\text{/L)} - \text{목표농도(mg ClO}_2\text{/L)}] \dots\dots\dots \text{식 (1)}$$

$$\begin{aligned}
 & \text{연속 이산화염소 투입량(mg/min)} \\
 &= \{[\text{전체 시스템 수량(L)} \times \text{목표농도(mg ClO}_2\text{/L)}] / [\text{원액농도(mg ClO}_2\text{/L)} - \text{목표농도(mg ClO}_2\text{/L)}] \times \text{시간당 손실률} \times 1000\} / 60 \\
 & \dots\dots\dots \text{식 (2)}
 \end{aligned}$$

2.1.2 실험어류 및 조건

실험에 이용된 실험 생물인 감성돔 치어와 참돔 치어는 실험 시작 전 1주간 별도의 사육 수조에서 순치하였다. 실험 조건에 적합한 균일한 크기 및 중량의 어류를 선별하여 실험에 이용하였다. 감성돔 치어는 평균 19.4 ± 2.3 g, 10.7 ± 0.4 cm, 참돔 치어는 74.9 ± 8.2 g, 15.9 ± 1.0 cm 이었으며, 각 수조에 30마리씩(시스템 당 90마리) 수용하고 실험을 진행하였다. 목표 이산화염소 농도 기준으로 0.05, 0.10, 0.125, 0.15, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg ClO₂/L가 되도록 실험구를 설정하였고 이산화염소를 공급하지 않은 대조구를 포함하여 총 8개의 조건에서 실험을 실시하였다. 감성돔 치어, 참돔 치어 모두 196시간 동안 이산화염소에 노출되었으며 실험 시작 하루 전부터 실험 종료 시점까지 절식하였다. 시스템 순환 유량은 360 L/hr로 설정하여 일간 회전율은 22회전이였다.

광주기는 12(명):12(암)으로 조절하였으며, 사육 수온은 실내 기온을 조절하여 22~23℃가 되도록 유지하였다. 일간 약 10~20%의 새물을 교환하면서 염분은 30‰로 유지되었으며 pH 7.8~8.1로 유지되도록 하였다. 암모니아질소(<0.5 mg ClO₂/L), 아질산질소(<0.90 mg ClO₂/L)는 어체에 영향이 없는 수준으로 유지되었다.

2.1.3. 치사농도(LC)의 계산 및 분석 방법

24시간 간격으로 누적된 폐사 개체 수를 이용하여 치사 농도를 계산하였

다. 실험 실험어가 수조 저면에 유영능력을 완전히 상실하여 어체가 측면
 된 상태에서 1분 이상 아가미 호흡활동을 중지한 개체를 폐사한 것으로 간
 주하고 계수하였다(Kim et al. 2017). 치사농도는 목표 이산화염소 농도를
 기준으로 Ordered Probit Model 분석방법을 이용하여 분석하였다. 이 방법
 으로 도출한 자료와 회귀식 최적화 프로그램 Table-Curve 3D를 이용하여
 시간 경과와 치사 확률 간의 상관관계에 따른 치사 농도 예상 모델을 도출
 하였다. 또한 목표 농도를 기준으로 감성돔 및 참돔 치어의 어체중 당 이
 산화염소의 일간 투여량을 아래의 식 (3)을 이용하여 계산하였다.

$$\begin{aligned} & \text{어체중 당 일간 이산화염소 투여량(g ClO}_2\text{/kg fish} \cdot \text{day}^{-1}) \\ & = \text{일간 이산화염소 총 투여량(g ClO}_2\text{/day)} / \text{총 어체중(kg)} \dots\dots\dots \text{식 (3)} \end{aligned}$$

2.2. 미세조류(Microalgae)에 대한 이산화염소의 성장저해 독성

본 연구에서는 양식장에서 주로 이용하는 먹이생물인 미세조류 2 종 (*Nannochloropsis* sp. 와 *Isochrysis galbana*)의 이산화염소에 대한 민감도를 확인하고 이산화염소로 인한 성장저해 영향을 알아보기 위하여 독성 영향 평가를 시행하였다.

2.2.1. 실험 생물

실험생물인 *Nannochloropsis* sp. (KMMCC-33) 와 *Isochrysis galbana* (KMMCC-12)은 실험 2주전 부터 실험실로 옮겨와서 정체배양을 하면서 적응시켰으며, 이때 3~4일 간격으로 계대배양 하였다. 계대배양시 배지는 고압멸균기(121℃, 15분)로 가압 멸균한 F/2배지(Table 1)를 사용하였으며 배양환경은 온도 20±1℃, 광량 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ 에서 광주기 24(명) : 0 (암)으로 유지하였다.

2.2.2. 실험 방법

미세조류 성장저해 독성시험은 ASTM E1218 - 04(2012) (Standard Guide for Conducting Static Toxicity Tests with Microalgae) 가이드라인에 따라 실시하였다.

실험은 고압멸균기(121℃, 15분)로 가압 멸균한 F/2배지 20 mL를 따로 멸균한 125mL 삼각플라스크에 넣은 후 *Nannochloropsis* sp. (KMMCC-33) 와 *Isochrysis galbana* (KMMCC-12)를 각각 1×10^4 cell/ml의 농도로 접종하였다. 이후 실험물질인 이산화염소(ClO_2) 액상 제제

(EOTECH, Busan, Korea)를 각각 0, 0.05, 0.5, 1, 2, 4 mg ClO_2/L 의 농도로 처리한 후 멸균된 마개로 밀봉하였다. 밀봉된 플라스크는 온도 $20\pm 1^\circ\text{C}$, 광량 $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$, 광주기 24(명) : 0(암)의 환경에서 96 시간 동안 배양시킨 후 미세조류의 밀도를 확인하였다(Table 2). 모든 실험구는 3반복으로 실험하였다.



Table 1. F/2 Medium used for the toxicity test in microalgae (Guillard RRL & Ryther JH, 1962)

F/2 Medium	
Stocks	per 1 L
(1) NaNO_3	75 g
(2) $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5.65 g
(3) Trace elements (chelated)	
Na_2EDTA	4.16 g
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	3.15 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.01 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.022 g
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.01 g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.18 g
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.006 g
(4) Vitamin mix	
Cyanocobalamin (Vitamin B_{12})	0.0005 g
Thiamine HCl (Vitamin B_1)	0.1 g
Biotin	0.0005 g
Medium	per 1 L seawater
(1) NaNO_3	1.0 ml
(2) $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.0 ml
(3) Trace elements stock solution	1.0 ml
(4) Vitamin mix stock solution	1.0 ml

Table 2. Test conditions for the toxicity test in microalgae
(*Nannochloropsis* sp. and *Isochrysis galbana*)

Content	Details
Species	<i>Nannochloropsis</i> sp. (KMMCC-33) <i>Isochrysis galbana</i> (KMMCC-12)
Test system	Static, non-renewal
Test vessel	125 mL Erlenmeyer flask
Initial cell density	< 10,000 cells/mL
Temperature	20±1 °C
Culture volume	20 mL
Culture medium	F/2 medium
Light quantity	100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$
Photoperiod(Light : Dark)	24 h : 0 h
No. of replicates	3
Rotative velocity	70 rpm
Test period	96 h
Evaluation	Cell growth

이산화염소의 농도는 본 실험에 앞서 예비로 시행된 농도 설정 실험 결과에 따라 미세조류가 100% 성장 저해를 나타내는 최저 농도와 0%의 성장 저해를 나타내는 최대 농도를 선택한 후 본 시험의 이산화염소 농도 구간을 설정하였다.

또한, 결과 확인은 배양 96시간 이후 현미경(BX53, OLYMPUS) 하에서 혈구계산판(hemocytometer)을 이용하여 반복 계수 한 후 비성장률(SGR; specific growth rate)을 계산하여 분석에 사용하였다(Table 3).

계산된 비성장률을 바탕으로 통계분석을 시행하였으며, SPSS 12.0 통계 프로그램을 이용하여 이산화염소에 대한 미세조류의 반수영향농도(EC_{50} ; half maximal effective concentration) 및 무영향농도(NOEL : No Observed Adverse Effect Level) 를 산출하였다. 이때, 반수영향농도는 Probit 회귀분석방법을 이용하였으며, 무영향농도는 One way ANOVA test를 시행하였다.

Table 3. The equation for calculating the specific growth rate (SGR) in microalgae

$$\text{SGR} = \text{LN}(N_t - N_0) / t$$

N_t : Cell density after incubation for t days

N_0 : Initial cell density

t : Incubation period

2.3. 로티퍼(*Brachionus plicatilis*)에 대한 이산화염소의 급성 독성

본 연구는 치어 및 유생 단계의 먹이생물로 이용되는 로티퍼(Rotifer, *Brachionus plicatilis*)에 미치는 이산화염소의 영향을 평가하기 위하여 이산화염소 농도에 따른 로티퍼의 생존율을 조사하였다.

2.3.1. 실험 생물

실험에 사용된 로티퍼는 내구란(BP008, MicroBioTests, Mariakerke, Belgium)을 부화시켜 사용하였으며, 이때 사용한 해수는 멸균 조제 해수로 온도 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, 광량 $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ 의 환경에서 약 24시간 동안 부화시켰다. 부화개체가 관찰되기 시작할 때 이미 부화한 개체는 폐기한 후 다시 부화를 유도하였으며, 다시 부화가 시작 된 후 2시간 이내의 개체를 실험에 이용하였다.

2.3.2. 실험 방법

이산화염소(ClO_2)에 대한 로티퍼의 독성영향을 확인하기 위하여 국제 표준 가이드라인 ASTM E1440 - 91(2012) (Standard Guide for Acute Toxicity Tests with the Rotifer *Brachionus*)에 따라 실험을 시행하였다.

실험은 48 well plate를 이용하여 각 well에 1 ml의 멸균해수를 분주한 후 부화한 지 2시간 이내의 로티퍼를 각 well 당 10마리씩 무작위로 선별하여 수용하였다. 이후 실험물질인 이산화염소를 0, 0.05, 0.5, 1, 2, 4, 8 mg ClO_2/L 의 농도가 되도록 주입한 후 24시간 동안 인큐베이터(AS-BI10, A-Sung Tester, Korea)에 수용하였다. 이때 먹이 공급은 없었으며 온도는

25±1℃에서 빛이 없는 환경을 유지하였으며 모든 실험은 6반복 하였다 (Table 4).

실험 결과는 실험 시작 24시간 후에 현미경을 이용하여 확인하였으며 이때 로티퍼의 생존 개체수를 계수하였다. 생사판단은 유영능력을 상실하고 저면에 정지한 상태에서 약 1분 이상 활동을 중지한 채로 corona의 움직임도 없는 개체를 폐사 개체로 판별하였다.

이산화염소 농도에 따른 로티퍼의 반수치사농도(LC₅₀; lethal concentration for 50% of exposed population) 및 무영향농도(NOAE : No Observed Adverse Effect Level)를 산출하기 위하여 로티퍼 생존 개체수를 바탕으로 SPSS 12.0 프로그램에서 분석하였다. 이때, 반수치사농도는 Probit 회귀식을 이용하였으며, 무영향농도는 One way ANOVA test를 시행하여 등분산성 검정을 위해 Levene 검정을 실시했으며 등분산성이 확보되어 Duncan's multiple range test를 이용하였다.

Table 4. Test conditions for the toxicity test in rotifer (*Brachionus plicatilis*)

Content	Details
Species	<i>Brachionus plicatilis</i>
Test system	Static, non-renewal
Test vessel	48-Well plate (polystyrene)
Organism/well	10 inds. per well
Test solution volume	1 mL/well
Temperature	25±1 °C
Age of test organism	0 to 2 hour old neonates
Photoperiod(Light : Dark)	0 h : 24 h
No. of replicates	6
Feeding	None
Test period	24 h
Evaluation	Survival

2.4. 알테미아(*Artemia salina*)에 대한 이산화염소의 급성 독성

미세조류 및 로티퍼와 함께 양식현장에서 치어의 먹이생물로 많이 이용되는 알테미아(*Artemia salina*)에 이산화염소가 미치는 영향을 평가하기 위하여 급성독성실험을 시행하였다.

2.4.1. 실험 생물

실험은 알테미아 내구란(SEP Art, INVE, Salt lake city, USA)을 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 30‰ 멸균 해수를 이용하여 부화시켰으며 부화한 지 rotifer 실험과 같은 방법으로 2시간 이내의 개체를 무작위 선별하여 사용하였다.

2.4.2. 실험 방법

이산화염소(ClO_2)에 대한 알테미아의 독성영향을 확인하기 위하여 국제 표준 가이드라인 ASTM E1203-98 (Standard Practice for Using Brine Shrimp Nauplii as Food for Test Animals in Aquatic Toxicology)에 따라 실험을 시행하였다.

실험은 6 well plate를 이용하여 각 well에 10 ml의 멸균해수를 분주한 후 부화한 지 2시간 이내의 알테미아를 각 well 당 10마리씩 무작위로 선별하여 수용하였다. 이후 실험물질인 이산화염소를 0, 0.05, 0.5, 1, 2, 4, 8 mg ClO_2/L 의 농도가 되도록 주입한 후 24시간 동안 인큐베이터(AS-BI10, A-Sung Tester, Korea)에 수용하였다. 이때 먹이 공급은 없었으며 온도는 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 빛이 없는 환경을 유지하였으며 모든 실험은 6반복 하였다 (Table. 5).

결과 확인은 이산화염소 투입 24시간 경과 후 알테미아의 폐사체를 확인

하였으며 폐사체 판별은 유영능력을 상실하고 저면에 정지한 상태에서 약 1분간 활동을 중지한 개체로 하였다.

이산화염소 농도에 따른 알테미아의 반수치사농도(LC₅₀; lethal concentration for 50% of exposed population) 및 무영향농도(NOAE : No Observed Adverse Effect Level)를 산출하기 위하여 알테미아 생존 개체수를 SPSS 12.0 프로그램에서 분석하였다. 이때, 반수치사농도는 Probit 회귀분석방법을 이용하였으며, 무영향농도는 One way ANOVA test를 시행하여 등분산성 검정을 위해 Levene 검정을 실시했으며 등분산성이 확보되어 Duncan's multiple range test를 이용하였다.



Table 5. Test conditions for the toxicity test in *Artemia salina*

Content	Details
Species	<i>Artemia salina</i>
Test system	Static, non-renewal
Test vessel	6-Well plate (polystyrene)
Organism/well	10 per well
Test solution volume	10 mL/well
Temperature	25±1 °C
Age of test organism	0 to 2 hour old neonates
Photoperiod(Light : Dark)	0 h : 24 h
No. of replicates	6
Feeding	None
Test period	24 h
Evaluation	Survival

3. 결과

3.1. 감성돔 및 참돔 치어에 대한 이산화염소의 급성 독성

3.1.1. 감성돔 치어와 참돔 치어의 생존율

감성돔 치어와 참돔 치어를 대상으로 실시한 이산화염소의 급성 독성 평가 실험의 생존율 변화 결과를 각각 Fig. 1과 2에 나타내었다. 목표 이산화염소 농도 0, 0.05, 0.1, 0.125 mg ClO_2/L 에 대해 감성돔 치어의 192 시간 동안 최종 생존율은 각각 96, 100, 100, 96%로 나타났다. 그러나 0.15 mg ClO_2/L 농도에서는 72시간, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg ClO_2/L 에서는 24시간 내 모두 폐사하였다. 참돔 치어의 경우에는 목표 이산화염소 농도 0, 0.05, 0.1, 0.125, 0.15, 0.2 mg ClO_2/L 농도에서 최종 생존율은 각각 77.8, 88.9, 88.9, 87.8, 68.9, 63.3%로 나타났으나, 0.3, 0.4, 0.5 mg ClO_2/L 농도에서 각각 120, 48, 24 시간 내 모두 폐사하였다.

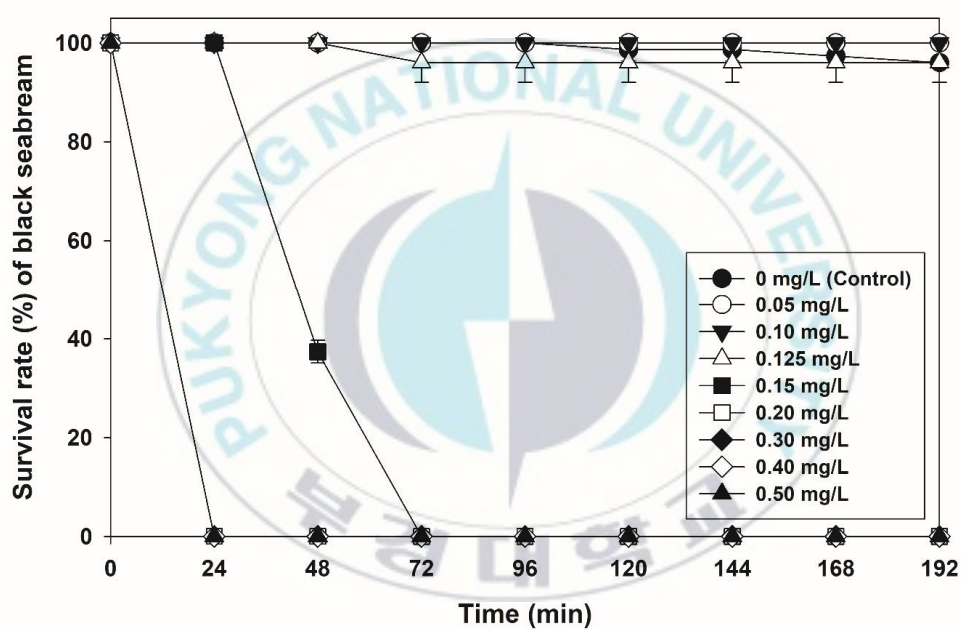


Fig. 1. Time-course survival rate (mean $\pm$ SD) of juvenile black seabream *Acanthopagrus schlegelii* based on the ClO_2 concentrations.

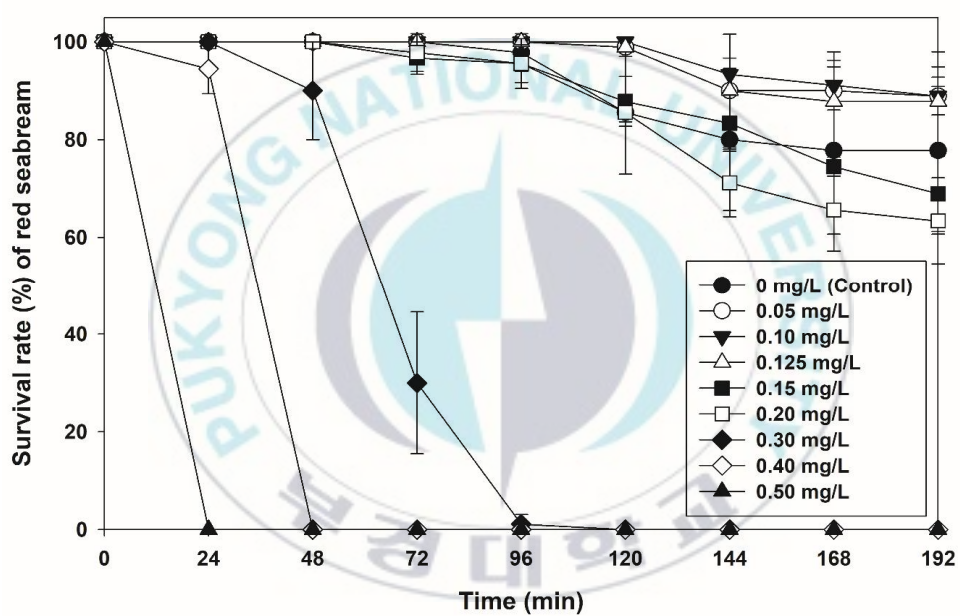


Fig. 2. Time-course survival rate(mean $\pm$ SD) of juvenile red seabream *Pagrus major* based on the ClO_2 concentrations.

3.1.2. 감성돔 치어와 참돔 치어의 치사농도(LC₅₀)

감성돔 치어와 참돔 치어의 시간경과와 치사 확률에 대한 치사 농도 추정 모델을 Fig. 3과 4에 나타내었다. 감성돔과 참돔의 치사 확률 패턴은 유사하게 나타났으나, 어체중의 크기가 상대적으로 컸던 참돔에서 이산화염소에 대해 높은 내성을 나타내었다. 경과시간(X, elapsed time)과 치사 확률(Y)에 대한 치사농도(Z, LC)의 상관관계식은 다음과 같다.

감성돔 치어(개체중 19.4±2.3 g):

$$Z = 0.080 - 5.598/X^{1.5} + 0.129Y \quad (X: 24\sim192\text{시간}, Y: 0\sim1)$$

참돔 치어(개체중 74.9±8.2 g):

$$Z = 0.187 - 1.919/X^{0.5} - 0.275Y \quad (X: 24\sim192\text{시간}, Y: 0\sim1)$$

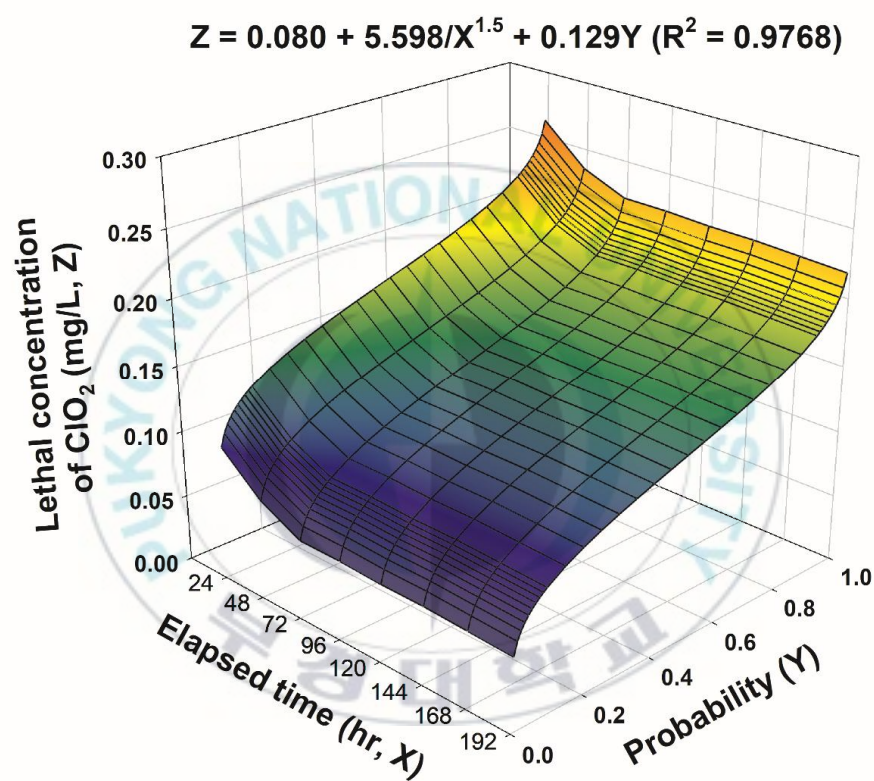


Fig. 3. Prediction model for the lethal concentration of ClO_2 in black seabream *Acanthopagrus schlegelii* based on the exposure time and mortality probability.

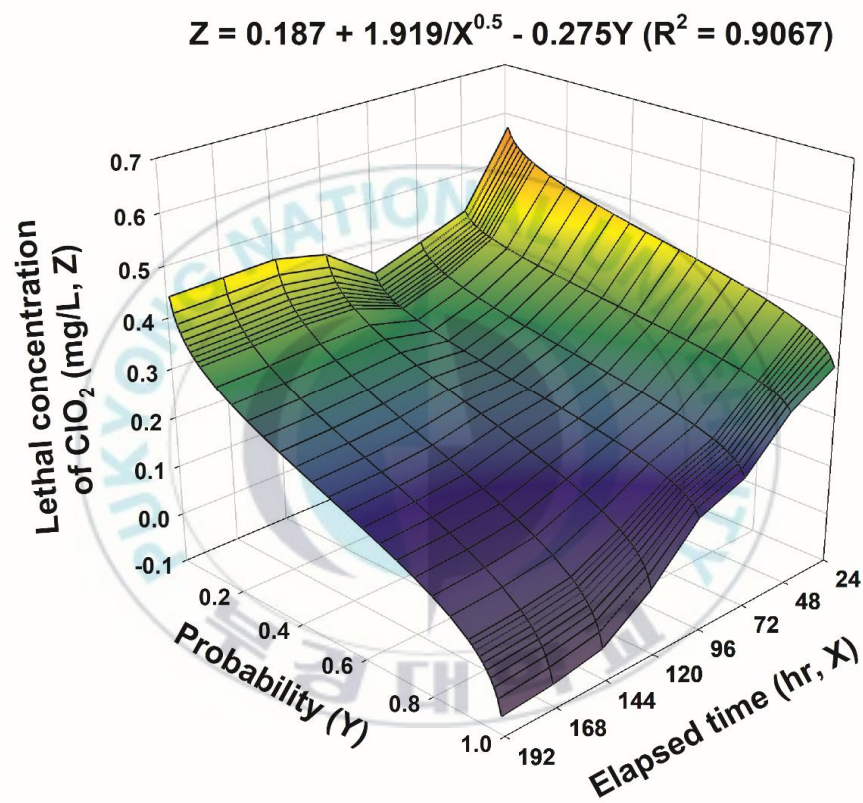


Fig. 4. Prediction model for the lethal concentration of ClO_2 in red seabream *Pagrus major* based on the exposure time and mortality probability.

추정 모델을 토대로, 감성돔 및 참돔 치어의 96시간 반수 치사 농도 (96LC₅₀)는 각각 0.14 및 0.24 mg ClO₂/L 로 나타났다.

목표 이산화염소 농도를 기준으로 감성돔 및 참돔 치어 어체중 당 투여된 이산화염소의 상관관계를 Fig. 5에 나타내었다. 96시간 반수 치사 농도(96LC₅₀)를 기준으로 감성돔 및 참돔 치어에 투여된 일간 이산화염소의 양은 각각 1.3와 1.1 g ClO₂/kg fish · day⁻¹(평균 1.2 ClO₂/kg fish · day⁻¹)로 유사하였다.



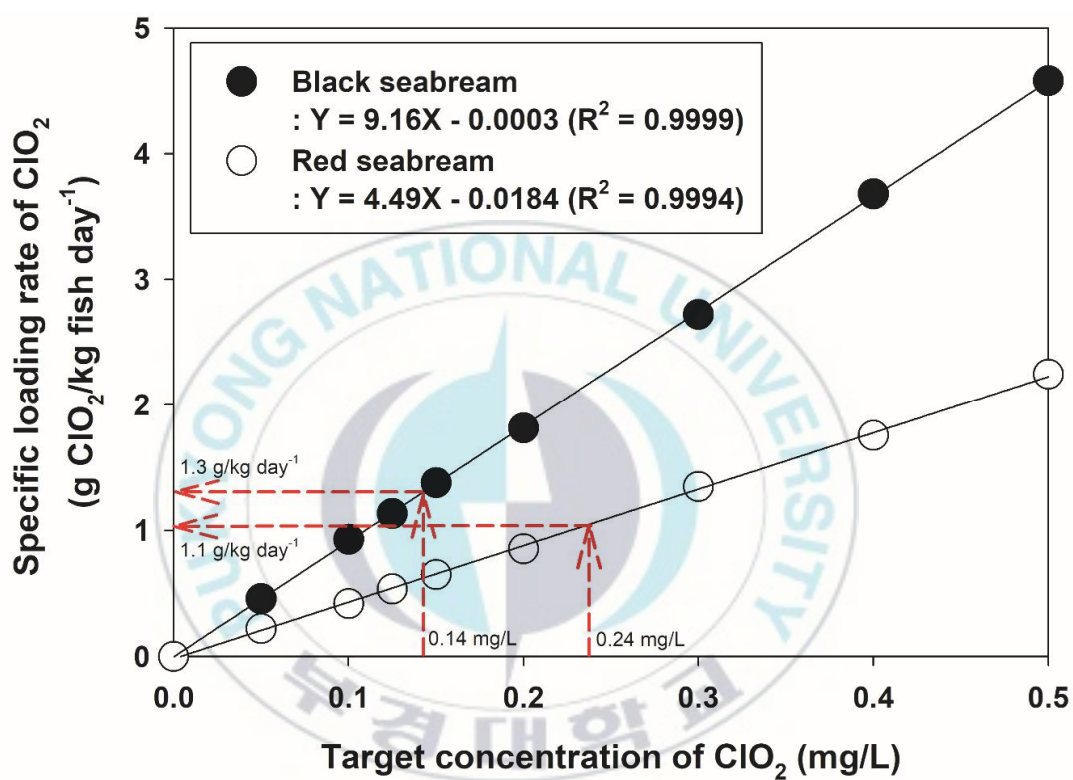


Fig. 5. Specific loading rate (daily total feeding rate of ClO_2 /total fish weight) of ClO_2 in black seabream *Acanthopagrus schlegelii* and red seabream *Pagrus major*.

3.2. 미세조류(Microalgae)에 대한 이산화염소의 성장저해 독성

*Isocrysis galbana*와 *Nannochloropsis* sp. 를 대상으로 시행한 이산화염소의 독성으로 인한 미세조류의 성장률 변화를 확인하기 위해 배양 96 시간의 일간 성장률 결과를 Fig 6과 Table 6에 나타내었다.

이산화염소에 대한 *I. galbana* 의 성장저해 독성시험의 경우 이산화염소를 투입하지 않은 대조구는 초기접종밀도 1×10^4 cells/mL에서 96 시간 이후 $213 \pm 20 \times 10^4$ cells/mL로 약 213배 성장하여 일간성장률(SGR; specific growth rate)이 1.339 ± 0.023 나타났다. 이산화염소 0.05 mg ClO_2/L 구간에서도 이와 유사하게 일간 성장률이 1.346 ± 0.011 로 나타나 대조구와 비교하여 유의적인 성장저해를 나타내지 않았지만 이산화염소를 0.5 mg ClO_2/L 의 농도로 처리한 실험구는 일간성장률이 0.551 ± 0.065 로 대조구에 비해 유의적인 성장 감소를 확인하였다. 또한, 이산화염소의 최고 농도인 4 mg ClO_2/L 에서는 *I. galbana*의 세포가 완전히 사멸하여 미세조류를 관찰할 수 없었다(Table 6).

따라서, *I. galbana* 의 비성장률을 바탕으로 산출된 이산화염소에 대한 *I. galbana* 의 반수영향농도(EC_{50} : Half maximal effective concentration)는 0.535 mg ClO_2/L 였으며 무영향농도(NOAEL : No Observed Adverse Effect Level)는 0.05 mg ClO_2/L 로 산출되었다(Table 7).

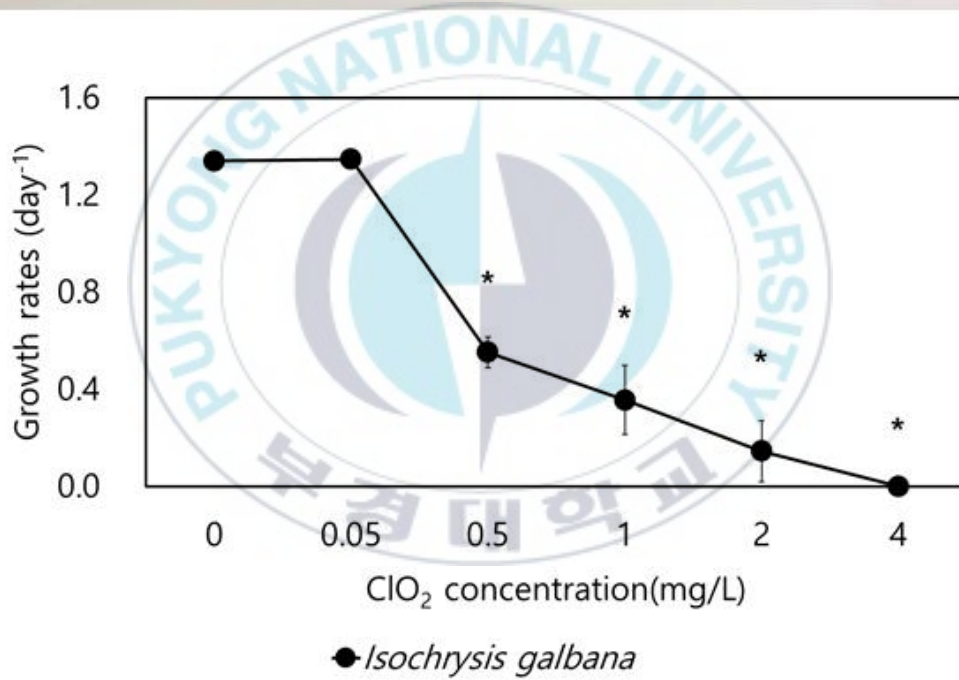
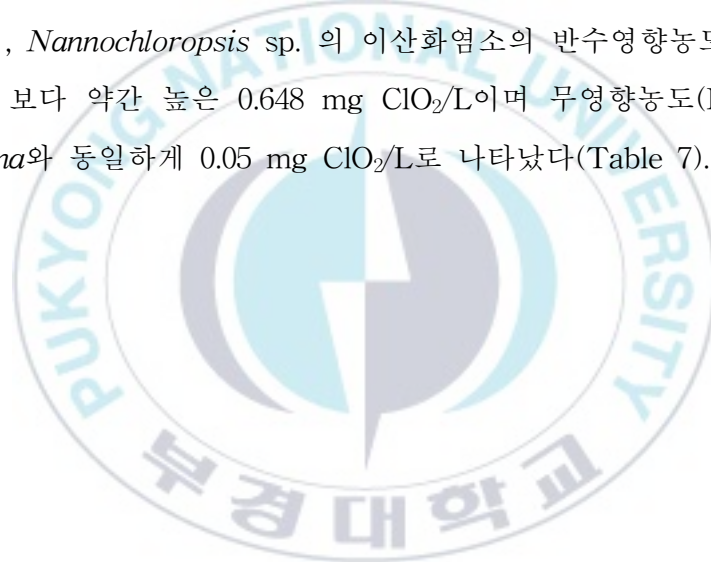


Fig. 6. Visual growth comparison of *Isochrysis galbana*. (Top) Concentration - dependent growth inhibition (mean±SD) of *Isochrysis galbana* with various ClO₂ treatment concentrations for 96 h (Bottom) (Asterisk means they are significantly different with *P*-value of 0.05).

Nannochloropsis sp. 역시 96시간 배양 이후 대조구는 초기 접종농도와 비교하여 약 250 배 정도 성장하여 일간성장률이 1.380 ± 0.005 이었으며 이산화염소 $0.05 \text{ mg ClO}_2/\text{L}$ 에서도 동일하게 250 배 성장하여 1.380 ± 0.005 로 대조구와 비교하여 유의미한 성장 저해를 확인할 수 없었다. 그러나 이산화염소 $0.5 \text{ mg ClO}_2/\text{L}$ 에서는 *Nannochloropsis* sp.의 성장이 크게 저해되어 일간성장률이 0.593 ± 0.169 로 확인되었으며 이산화염소 $4 \text{ mg ClO}_2/\text{L}$ 에서는 *Nannochloropsis* sp. 가 대부분 사멸하였다 (Table 6, Fig. 7).

따라서, *Nannochloropsis* sp. 의 이산화염소의 반수영향농도(EC_{50})은 *I. galbana* 보다 약간 높은 $0.648 \text{ mg ClO}_2/\text{L}$ 이며 무영향농도($NOAEL$) 는 *I. galbana*와 동일하게 $0.05 \text{ mg ClO}_2/\text{L}$ 로 나타났다 (Table 7).



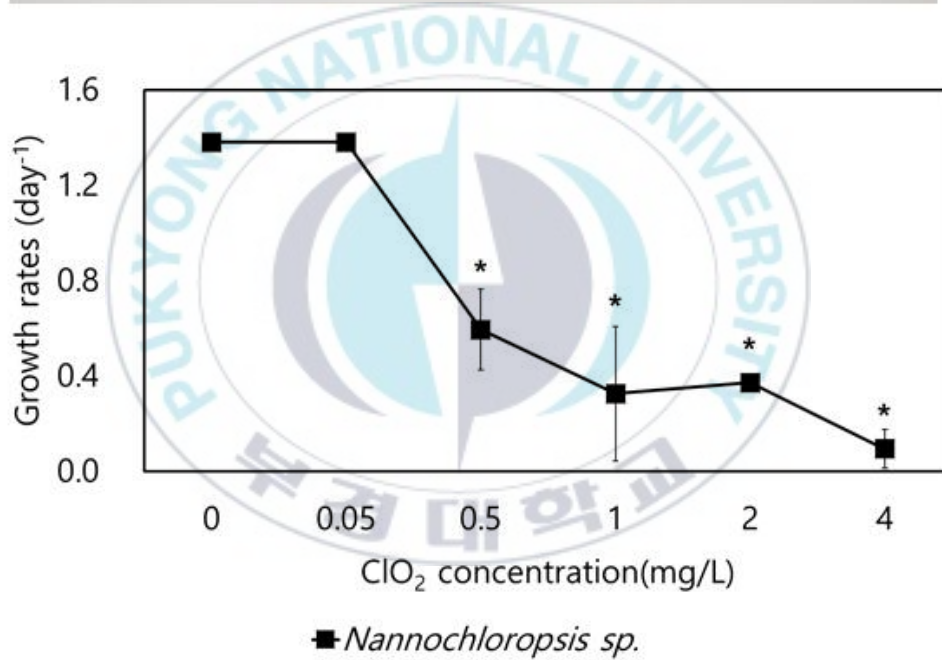
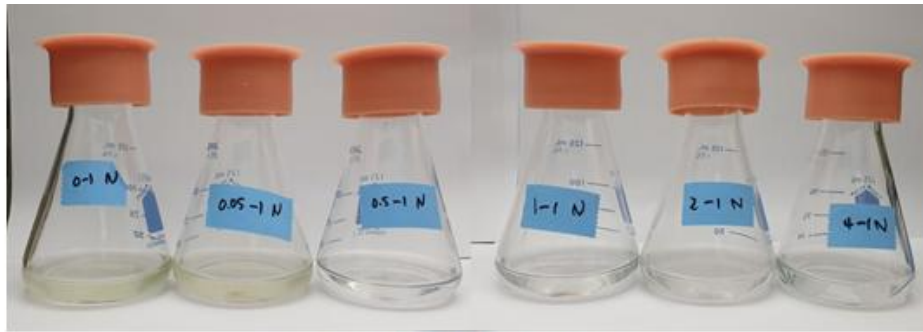


Fig. 7. Visual growth comparison of *Nannochloropsis sp.* (Top) Concentration - dependent growth inhibition (mean±SD) of *Nannochloropsis sp.* bwith various ClO₂ treatemtn concentrations for 96 h (Bottom) (Asterisk means they are significantly different with *P*-value of 0.05).

Table 6. The effect of ClO₂ concentration on specific growth rate (mean±SD) for 96 h Microalgae toxicity test

ClO ₂ concentrations (mg ClO ₂ /L)	Specific growth rates (day ⁻¹)	
	<i>Isochrysis galbana</i>	<i>Nannochloropsis</i> sp.
0	1.339±0.023	1.380±0.005
0.05	1.346±0.011	1.380±0.005
0.5	0.551±0.065	0.593±0.169
1	0.355±0.143	0.300±0.322
2	0.144±0.125	0.371±0.016
4	0.000±0.000	0.000±0.000

Table 7. The median effective concentration (EC₅₀) and no observed adverse effect level (NOAEL) after 96 h treatment of ClO₂ to microalgae

	<i>Isochrysis galbana</i>	<i>Nannochloropsis</i> sp.
EC ₅₀ (mg ClO ₂ /L)	0.535	0.648
NOAEL (mg ClO ₂ /L)	0.05	0.05

3.3. 로티퍼(*Brachionus plicatilis*)에 대한 이산화염소의 급성 독성

이산화염소를 처리하지 않은 대조구에서는 로티퍼의 생존 개체수가 10 ± 0.0 inds/well로 100% 생존하였고 이산화염소 0.05 mg ClO_2/L 에서 생존 개체수가 9.2 ± 0.4 ind./well 로 91.67% 생존하여 통계적으로 유의적인 개체수 감소가 나타나지 않았다. 그러나 이산화염소 0.5 mg ClO_2/L 에서는 8.2 ± 1.2 ind./well 로 81.67% 생존하여 이 농도 구간 이상부터는 로티퍼의 개체수가 유의적으로 감소하였다. 특히, 이산화염소 1 mg ClO_2/L 에서는 로티퍼의 생존 개체수가 0.7 ± 0.7 ind./well 로 대조구 대비 생존율이 6.67%로 급격하게 감소하였고, 이산화염소 2 mg ClO_2/L 이상의 농도 구간에서는 모두 사멸하였다(Table 8, Fig. 8).

따라서, 이산화염소 농도에 따른 로티퍼(*Brachionus plicatilis*)의 생존 개체 수를 통계 분석한 결과, 이산화염소에 의해 로티퍼(*Brachionus plicatilis*)가 50% 치사되는 반수치사농도(LC_{50} ; Lethal Concentration 50%)는 0.641 mg ClO_2/L 로 확인되었고, 로티퍼 생존에 전혀 영향을 끼치지 않은 무치사농도(NOAEL : No Observed Adverse Effect Level)는 0.05 mg ClO_2/L 으로 산출되었다(Table 9).

Table 8. The effects of ClO₂ concentration on the cumulative survival number (mean±SD) and survival rate in rotifer (*Brachionus plicatilis*)

ClO ₂ concentrations (mg ClO ₂ /L)	Cumulative survival number	Cumulative survival rate (%)
0	10.0±0.0	100±0
0.05	9.2±0.4	92±4
0.5	8.2±1.2	82±12
1	0.7±0.7	7±7
2	0.0±0.0	0±0
4	0.0±0.0	0±0
8	0.0±0.0	0±0

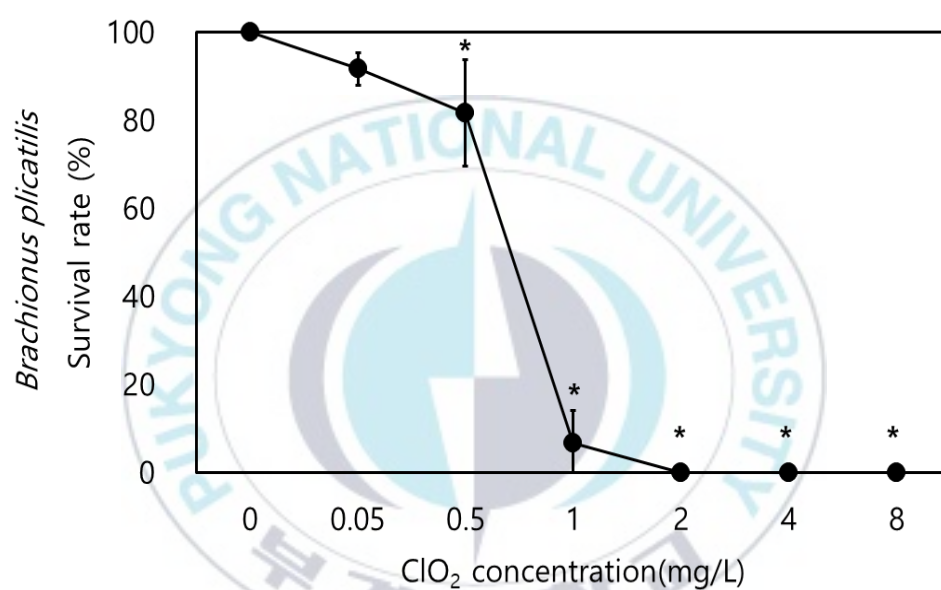


Fig. 8. Concentration-dependent growth inhibition (mean $\pm$ SD) of *Brachionus plicatilis* with various ClO₂ treatment concentrations for 24 h (Asterisk means they are significantly different with *P*-value of 0.05).

Table 9. The median effective concentration (EC₅₀) and no observed adverse effect level (NOAEL) of ClO₂ in rotifer (*Brachionus plicatilis*)

<i>Brachionus plicatilis</i>	
LC ₅₀ (mg ClO ₂ /L)	0.6405
NOAEL(mg ClO ₂ /L)	0.05

3.4. 알테미아(*Artemia salina*)에 대한 이산화 염소의 급성 독성

알테미아(*Artemia salina*)를 대상으로 시행한 이산화염소 0, 0.05, 0.5, 1, 2, 4, 8 mg ClO₂/L에 대한 급성 독성 실험 결과를 Table 10, Table 11, Fig 9에 나타내었다.

대조구를 비롯한 이산화염소 1 mg ClO₂/L까지는 생존 개체수는 10±0 ind./well로 100%의 생존율을 나타내었고 이산화염소 2 mg ClO₂/L에서도 생존 개체수가 9.8±0.4 ind./well로 유의적인 생존 감소를 확인 할 수 없었다.

이산화염소 4 mg ClO₂/L 부터 생존율이 점차 감소하는 추세를 보였으며 최고농도 8 mg ClO₂/L에서는 2.5±1.0 ind./well가 생존하여 약 25%의 생존율을 나타내었다(Table 10).

따라서, 이산화염소에 대한 알테미아(*Artemia salina*).의 반수치사농도(LC₅₀)와 무영향농도(NOAE)는 5.989 mg ClO₂/L, 2 mg ClO₂/L으로 산출되었다(Table 11).

Table 10. Survive rates (mean $\pm$ SD) in *Artemia salina* with various ClO₂ treatment concentrations

ClO ₂ concentrations (mg ClO ₂ /L)	Survival number	Survival rate (%)
0	10.0 $\pm$ 0.0	100 $\pm$ 0
0.05	10.0 $\pm$ 0.0	100 $\pm$ 0
0.5	10.0 $\pm$ 0.0	100 $\pm$ 0
1	10.0 $\pm$ 0.0	100 $\pm$ 0
2	9.8 $\pm$ 0.4	98 $\pm$ 4
4	6.7 $\pm$ 1.1	67 $\pm$ 11
8	2.5 $\pm$ 1.0	25 $\pm$ 10

Table 11. Median lethal concentration (LC₅₀) and no observed adverse effect level (NOAEL) after 24 h treatment of ClO₂ in *Artemia salina*

<i>Artemia salina</i>	
LC ₅₀ (mg ClO ₂ /L)	5.989
NOAEL(mg ClO ₂ /L)	2.00

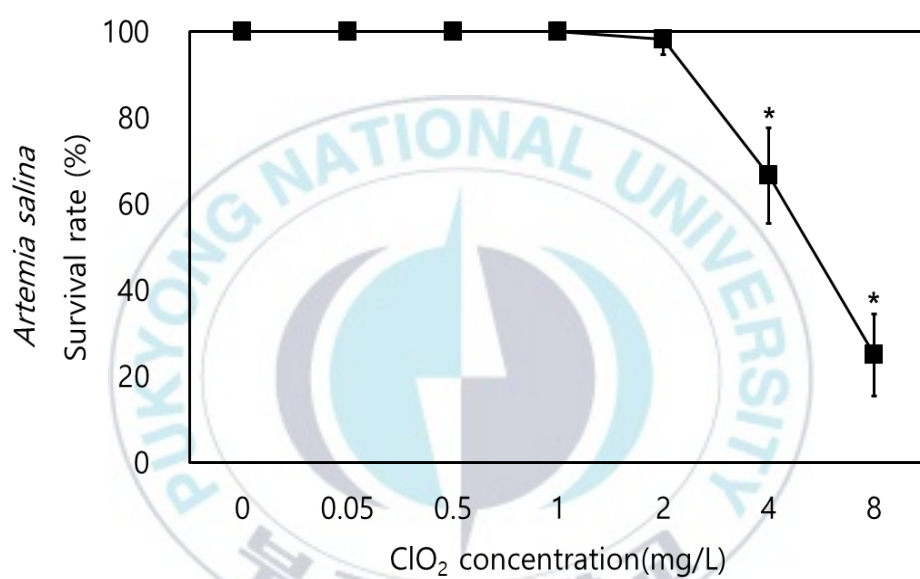


Fig. 9. Concentration-dependent growth inhibition (mean $\pm$ SD) in *Artemia salina* with various ClO_2 treatment concentrations for 24 h (Asterisk means they are significantly different with P -value of 0.05).

4. 고찰

4.1. 감성돔 및 참돔 치어에 대한 이산화염소의 급성 독성

실험에서는 8일간 감성돔 치어와 참돔 치어를 대상으로 이산화염소 노출에 따른 생존율, 치사농도(LC), 어체중 당 이산화염소 투여량 간의 상관관계를 조사하고 이산화염소를 양식 생산 시스템에 살균소독제로 적용하기 위한 기초 자료를 도출하고자 하였다.

목표 이산화염소 기준으로 0.15 mg ClO_2/L 기준 이상 이산화염소를 투입한 실험구에서 감성돔 치어는 24~72시간 내 모두 폐사하였다. 이에 비해 참돔 치어는 0.3 mg ClO_2/L 이상 농도에서 24~120시간 내 모두 폐사하여 같은 농도에 노출된 감성돔 치어에 비해서는 내성이 다소 높았다. 이는 실험에 이용한 참돔 치어가 감성돔 치어에 비해 개체가 크고, 어체의 수용량이 상대적으로 많아 이산화염소의 산화 요구량(demand)이 많았기 때문으로 판단된다. 본 실험에서 도출한 추정 모델을 토대로 감성돔과 참돔의 48시간 반수치사 농도는 각각 0.16과 0.33 mg ClO_2/L 이다. Bae와 Lee (1999)는 5.73~6.14 g 크기의 넙치 치어를 치어를 대상으로 이산화염소의 급성 독성 실험을 실시하였는데, 그 결과 반수치사 농도의 는 33.4 mg ClO_2/L 이었다. 본 실험은 이에 비해 매우 낮은 농도로 나타났는데, 이는 이산화염소의 투여 방법의 차이로 인해 나타난 것으로 보인다. Bae와 Lee (1999)는 실험수에 이산화염소를 1, 10, 100, 1000 mg ClO_2/L 의 농도로 1회 투여하고 48시간동안 생존율을 조사한 반면, 본 논문에서는 지속적으로 이산화염소를 투입하여 이산화염소의 농도를 지속적으로 유지하였다.

이산화염소는 수중의 유기물 등을 산화시키고 환원된다. 따라서 빠르게 환원되는 이산화염소의 특성상 Bae and Lee (1999)의 독성 농도가 양식 시스템 내에서 적용 가능한 방안을 모색하기 위해 일정량을 지속적으로 투입하면서 실험을 진행한 본 실험의 결과보다 높게 나타난 것으로 판단된다. 넙치 치어(전장 12.1 cm)를 대상으로 0.07, 0.13, 0.27, 0.34, 0.43, 0.51 mg ClO_2/L 농도에 10분간 노출시킨 후 24시간 동안 반수치사 시간을 조사한 연구의 경우, 0.43과 0.51 mg ClO_2/L 에서 반수치사 시간은 각각 103분과 32분이었다(Kim and Kim 2003). 감성돔과 참돔 치어의 치사 농도 추정 모델을 노출 시간을 기준으로 수식을 재정리하여 0.43과 0.51 mg ClO_2/L 에 대해 반수치사 농도를 계산하면 각각 약 11분과 3.5분에 해당한다. 이는 노출 시간의 지속성에 의한 차이로 보이며 어종의 차이가 있다고 하더라도 0.43과 0.51 mg ClO_2/L 에 지속적으로 노출될 경우 더 높은 수준으로 독성이 나타날 것으로 판단된다. 무지개송어(개체중 24.7 g)을 대상으로 지수식 방식으로(일일 100% 환수 및 이산화염소 농도 재조정) 이산화염소의 독성을 조사한 연구에서 96시간 반수치사 농도가 8.3 mg ClO_2/L 로 높게 보고된 바 있으며(Svecevicus et al. 2005), 이 연구의 경우 지수식 방식으로 매일 환수 후 이산화염소에 지속적으로 목표 이산화염소 농도에 노출되지 않았을 것으로 보인다. 본 연구에서는 사육수가 순환하는 시스템 내 정량 펌프를 이용하여 이산화염소를 투입하면서 어류가 이산화염소에 지속적으로 노출되게 하였다. 이로 인해 치사농도가 다른 연구에 비해 매우 낮은 구간에서 형성된 것으로 보인다.

이산화염소의 사육수 소독 및 살균제로서 양식 산업에 이용 가능성과 안전성에 대해 지속적으로 논의되고 있다. 그러나 빠른 산화작용으로 인해 지속적으로 농도 유지가 어려워 연구마다 독성 농도가 상이하다. 어종이나 크기에 따른 차이가 독성 농도가 다른 주요한 요인일 수 있다. 그 차이를

인정하더라도 이산화염소의 유효 농도를 일정하게 유지하거나 산업적으로 이용할 만한 일정 기준의 제시가 필요하다. 본 실험에서 생존율 변화에서 보듯이 치사역치 농도(lethal threshold concentration)가 감성돔과 참돔 치어에 있어서 0.15~0.20 mg ClO₂/L와 0.2~0.3 mg ClO₂/L 범위로 매우 좁다. 이는 넙치와 무지개송어를 대상으로 한 연구에서도 유사한 경향을 나타내었다(Kim and Kim 2003; Svecevcius 2005). 즉 이산화염소는 수중의 유기물 등을 산화시키고 빠르게 환원되므로 잔류에 의한 위험성은 낮으나, 수중의 요구량이 낮을 경우 같은 농도라 하더라도 양식 생물에 피해를 초래할 수 있다. 본 실험의 경우에도 이산화염소의 손실율을 감안하여 정량펌프로 이산화염소의 농도를 유지하고자 하였으나, 변동폭이 상당히 높아 농도를 기준으로 이산화염소를 양식 시스템에 적용하는 방안은 실질적이지 않았다. 따라서 본 연구에서는 수용한 총 어체중에 대한 이산화염소의 투여량의 상관관계를 조사하였다. 앞서 언급한 바와 같이 감성돔과 참돔 치어에 대한 96시간 반수치사 농도는 각각 0.14와 0.24 mg ClO₂/L로 서로 달랐다. 그러나 어체중 kg 당 일간 투여한 이산화염소의 양은 1.3과 1.1 g ClO₂/kg fish · day⁻¹ 로 서로 유사하였다. 반수치사 농도의 변화가 작은 144시간 이전 반수치사 농도(24LC₅₀~120LC₅₀)를 기준으로 감성돔과 참돔 간 어체중 kg 당 일간 투여한 이산화염소의 양 역시 매우 유사하였다. 이는 특정 물질의 독성은 어종 또는 어체중에 따라 달라지는 것으로 일반적으로 알려져 있다. 본 연구에서도 참돔이 감성돔에 비해 이산화염소에 대한 내성이 높게 나타났다. 이는 어종 특성과 참돔의 개체 크기가 감성돔에 비해 크기 때문으로 판단된다. 그러나, 본 연구에서는 앞서 언급한 바와 같이 어체중 1 kg 당으로 환산할 경우, 어종과 어체의 크기와 무관하게 일정한 값을 나타내었다. 본 연구에서 이용된 조건으로 어종과 어체중과 무관하게 단위 어체중 당 이산화염소의 독성 효과가 일정하다고 단정하기는

어려우며 보다 세부적인 연구가 필요할 것으로 판단된다. 그러나 이 연구를 통해 어체중에 대한 이산화염소 투입량을 원수 및 사육수 처리 기준으로 이용 가능성을 시사하였다.



4.2. 먹이생물에 대한 이산화염소의 급성 독성

본 실험에서는 양식장 환경에서 대표적으로 사용되고 있는 수산양식 먹이생물 4 종의 이산화염소에 대한 독성 평가를 통해 먹이생물 공급과정에서 발생하는 질병 매개체를 차단하고 통제하는 기초 데이터를 구축하고자 하였다.

미세조류, 로티퍼 및 알테미아의 독성 평가를 실시한 결과 미세조류 2종 (*Isochrysis galbana*, *Nannochloropsis* sp.)과 로티퍼(*Brachionus plicatilis*)의 무영양농도는 이산화염소 농도 0.05 mg ClO₂/L 이었으며, 상대적으로 알테미아(*Artemia salina*)가 2 mg ClO₂/L로 이산화염소에 대한 민감도가 가장 낮았다.

Kim et al. (2003)에 따르면 해수 중에 잔류하는 부유물질 및 COD 농도가 높을수록 잔류 이산화염소가 빠르게 환원되는 특성이 있어 생물에 미치는 영향에도 차이가 있을 것으로 예상되나 여기서 산출된 각 먹이생물에 대한 민감도의 경우 미세조류는 10,000 cells/mL 이하, 로티퍼, 알테미아의 경우 1 well 당 10 마리를 투입하여 낮은 밀도로 실험이 실시되었으므로 다른 방해 물질을 최소화하여 산출된 결과로 생각된다.

Marta et al. (2018)에 따르면, total residual oxidants (TRO)에 대해 *Achnanthes* sp. 는 0.23 mg/L에서 72시간 이후 50% 성장저해를 보였으며 *Navicula pelliculosa* 는 2.79 mg/L에서 50%의 성장저해를 보인다고 보고하고 있다. 담수 미세조류의 경우 Chuang et al. (2009)에서도 0.2 mg/L의 염소 농도에서 생산성에 영향을 미친다는 비슷한 연구결과가 있으며 해수 미세조류의 경우 Lopez-Galindo et al. (2010)는 *Isochrysis galbana* and *Dunaliella salina* 의 TRO에 대한 EC₅₀ 값이 각각 2.91 mg/L 와 1.73 mg/L로 보고되어 종에 따라 독성물질에 대한 민감도의 차이가 큰 것

을 알 수 있다. 이는 본 연구결과와 비교하였을 때 *Isochrysis galbana* 가 이산화염소 0.535 mg/L에서 EC_{50} 으로 산출되어 TRO 에 대한 독성 민감도에 비해서 이산화염소에 더 민감하게 반응한 것으로 보인다.

또한, 로티퍼의 경우 TRO 0.22 mg/L에서 무영향농도(NOEC)였으며, 1.63 mg/L 이상의 높은 수준의 오존에서 로티퍼 시스트가 부화하지 못한다고 보고된 바 있다(Davis and Arnold. 1997). 이는 본 연구 결과에서 로티퍼의 이산화염소에 대한 무치사농도 0.05 mg ClO_2 /L 에 비해 높은 수치지만, 이산화염소 0.5 mg ClO_2 /L 에서도 평균 82%의 생존율을 보인 결과와 비교하면 유사한 수치라 생각된다. 그러나 TRO 보다 오존 처리 후 잔존하는 산화제에 로티퍼가 더 민감하게 반응하여 중화가 필요하다는 결과에 따라 이산화염소 처리 후 배양수에서도 로티퍼 시스트의 부화 및 만성 독성시험의 추가적인 연구가 필요하다고 생각된다.

Wilde et al. (1983)의 연구에서 total residual chlorine (TRC)와 이산화염소의 독성을 *fathead minnows*를 이용하여 비교하였다. 이 실험에서 치어의 경우 TRC는 96시간 LC_{50} 값이 0.08 mg/L, 성어는 0.35 mg/L였으며, 이산화염소는 치어일 때 0.02 mg ClO_2 /L, 성어일 때 0.17 mg ClO_2 /L로 나타났다. 이는 염소에 비해 이산화염소의 독성이 치어기준으로 약 1/4 수준에서 나타난다고 하였다.

더불어, U.S. environmental Protection agency(EPA)에 의하면 이산화염소는 아염소산염, 염소이온으로 이온화되어 이산화염소는 2~4시간 이내 빠르게 환원되어 없어지는 반면 아염소산 이온의 농도는 증가하므로 아염소산이온에 관한 독성의 자료를 반영하였을 때 먹이생물 및 양식생물에 미치는 독성영향을 평가하는데 도움이 될 것으로 판단된다.

III. 먹이생물 배양액에 대한 이산화염소의 살균효율

1. 서론

양식생물을 사육함에 있어 적절한 사육환경을 유지하는 것은 생산성과 관련된 가장 중요한 요소 중 하나이다. 특히, 생물 사육과정에서 발생하는 질병은 성장저해, 생존율 감소 및 일시 폐사 등의 생산성 감소를 초래하며, 약품사용 등 부가적인 생산비용이 요구되므로, 질병발생은 산업적 수산양식에 있어 경제적 손실과 직결되는 문제이다. 따라서 질병 관리는 성공적인 생산을 위한 중요한 요소 중 하나로 작용한다.

질병 발생을 조기에 예방하기 위한 목적으로 생물사육수 및 유입수를 살균처리 하는데, 이때 오존, 열, 자외선 처리 등의 방법이 대표적으로 이용되고 있으며 그 외 살균을 위한 다양한 화학물질이 개발되고 사용되고 있다(Pascho et al. 1995; Yoshimizu et al. 1995; Oh et al. 1999; Ann and Rimstad 2001). 그러나 잔류 오존의 유해성, UV 램프의 biofouling 현상으로 인해 관리상의 문제가 제기되고 있고 일반적으로 사용되는 화학물질은 환경오염을 초래하며, 지방질 조직과 친화성으로 인해 생체 내 흡수, 잔류, 축적에 대한 문제가 있다.

최근에는 이산화염소(ClO_2)와 차아염소산(HOCl)류와 같은 free chlorine 수용제 사용이 증가하는 추세로 안전하고 효과적인 살균소독을 위한 연구가 활발히 진행되고 있다(Park et al. 2003). 특히 이산화염소는 수용성과 강한 산화력을 가지고 있는 동시에 자연광에 의한 분해가 빠르고 가수분해

가 일어나지 않아 어류나 인체에 미치는 위해성이 상대적으로 낮다 (American Public Health Association, 1995, Junli et al. 1997b).

이산화염소는 살균작용은 amino acid의 활성 억제, ribosome의 구조변화, mRNA의 불활성화 등에 의한 세균 내 단백질 합성에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Sogawa et al. 2020). 또한 이산화염소는 phenols 단백질, 아미노산 등과 반응성이 좋다고 보고되어 있어, virus의 단백질을 변화시켜 사멸시키기도 한다. 이외에, 세포막의 단백질, 지방 및 지방산과의 반응을 통한 세포막의 투과성을 변화시켜 세포를 치사시키는 것으로도 보고되었다(Park et al. 2003).

이산화염소가 살균제로의 역할을 하기 위해서는 여러 가지 환경요인에 영향을 받는 것으로 알려져 있는데, 다른 살균제와 같이 농도, 온도, 처리 시간 등이 이산화염소의 살균력에 영향을 주고 있다. 그러나 이산화염소의 살균작용은 pH에 크게 영향을 받지 않기 때문에 다른 살균제에 비해 광범위한 범위에서 효과적이라고 할 수 있다. 하지만 이산화염소는 유기물질이 존재할 경우 살균력이 급격히 감소한다고 보고되어 있어(Kim 2001; Park et al. 2008) 이산화염소의 산업적 응용에는 이러한 부분이 잘 고려되어야 한다.

이렇게 이산화염소의 여러 장점들이 주목을 받고 있으며 살균작용에 관한 많은 연구가 이루어졌음에도 불구하고 외부 환경요인과 이산화염소의 살균작용에 대한 상관관계에 대한 자료는 부족한 상황이다.

이러한 가운데, 최근 여러 연구에서 미세조류가 양식생물의 바이러스성 질병의 전파 매개체가 될 수 있다는 가능성이 보고되고 있으며, 미세조류를 섭이하는 먹이생물을 통해 유생 및 치어에 대한 바이러스성 질병의 전파 가능성이 보고되고 있다(Lambert and Nicolas, 1989; Muroga et al. 1990; Otta et al. 1999). 또한 먹이생물 배양 시스템에서 발생하는 많은 양

의 유기물이 배양수를 오염시키고 병원성 바이러스 증식의 원인이 되는 보고가 있다(Skjermo et al. 1997). 또한 Verdonck et al. (1994), Lopez-Torres and Lizarraga-Partida (2001)는 이러한 오염된 환경에서 배양된 먹이생물은 공급과정에서 양식생물에 대한 바이러스성 질병의 매개체로 질병 전파 가능성이 높아진다고 하였다.

미세조류 외에도 먹이생물로 사용되고 있는 로티퍼와 알테미아의 경우 세균 오염의 심각성은 이미 널리 알려져 있으며, 따라서 이를 살균 처리하여 치어에게 공급 시 치어의 생존율이 향상된다고 보고되어 있으며, 또한 이러한 먹이생물의 오염정도는 치어 및 유생의 생존과 성장에 직접적인 영향을 미친다(Perez Benavente and Gatesoupe 1988)는 보고가 있다. 따라서, 양식생물의 유생 및 자·치어 단계에서 바이러스 및 세균 감염 예방을 위해 먹이생물의 오염을 제어하고 통제하는 다양한 방법이 시도되고 있다(Mzimba and Steinarsson 2013).

따라서, 본 연구에서는 양식장에서 미세조류, 로티퍼, 알테미아 등의 먹이생물 공급 시 사육생물의 질병 원인체 유입을 차단하기 위하여 이산화염소를 응용하고자 하였다. 이에 본 연구에서는 각 먹이생물 별로 이산화염소의 살균 및 소독 유효농도를 설정하기 위하여 실시되었다. 따라서 앞서 실시한 수산양식 먹이생물 4종의 이산화염소에 대한 독성 영향 평가에 대한 결과를 바탕으로 양식 현장에서 사용되는 고밀도의 먹이생물의 살균에 이산화염소를 이용할 수 있는 기반 연구를 실시하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 미세조류 배양액에 대한 이산화염소의 살균효율

2.1.1. 실험 생물

앞서 미세조류 성장저해 독성시험 종으로 사용한 *Nannochloropsis* sp. (KMMCC-33)와 *Isochrysis galbana* (KMMCC-12)를 양식장에서 먹이로 사용되는 수준까지 고밀도로 배양한 후 실험에 사용하였다.

각 먹이생물은 점차적으로 양을 늘려가며 계대배양하여, 현장과 유사한 환경을 유지하였다. 실험에 사용된 생물은 18L 배양용기에서 배양한 미세조류를 이용하였다. 18L 배양용기는 현장과 유사하게 미세조류와 F/2 배지의 양을 1:4로 맞추어 5일에 한번씩 계대배양하면서 유지하였다.

5일 동안 배양된 미세조류는 생물량 및 오염정도를 가늠하기 위하여 흡광도(OD, Optical Density), 총 부유물질(TSS; Total suspended solids) 및 화학적 산소요구량(COD; Chemical Oxygen Demand)을 측정하였다.

흡광도(OD, Optical Density)는 spectrophotometer(Optizen 2120UV UV/Vis Spectrophotometer, Mecasys, Daejeon, Korea)를 이용하여 680nm에서 측정하였으며, 총 부유물질(TSS; Total suspended solids)은 수질공정 시험법에 따라 배양액을 일정량 필터하여 80℃ 드라이오븐에서 24 시간 건조한 후 미리 측정된 필터지 무게를 제외하여 환산하였다. 화학적 산소요구량(COD; Chemical Oxygen Demand)은 수질공정시험법에 따라 알칼리성 과망간산칼륨법을 이용하여 측정하였다.

2.1.2. 실험 방법

이산화염소(ClO_2) 액상 제제(EOTECH, Busan, Korea)에 대한 미세조류

의 성장저해 독성시험에서 산출된 반수치사농도 및 무영양농도를 바탕으로 본 실험의 이산화염소의 농도구간을 0, 0.05, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 mg ClO₂/L로 설정하였다.

양식 현장에서 사용되는 수준으로 고밀도로 배양되어 흡광도(OD_{680nm})가 1.396±0.003, 1.488±0.001로 측정된 *Nannochloropsis* sp. 와 *Isocrysis galbana* 에 목표 농도의 이산화염소를 처리한 후 먹이생물과 세균의 반응을 관찰하였다.

먼저, 이산화염소에 대한 미세조류의 생사 여부를 확인하고자, 이산화염소처리 후 다시 1 mL 씩 샘플하여 원심분리기(Smart 15 Plus Micro Centrifuge, Hanil Science, Daejeon, Korea)에서 3,000 rpm으로 10분 동안 원심분리한 후 상등액을 제거함으로써 세포를 회수하였다. 이렇게 회수된 세포는 20 mL의 고압멸균기(121℃, 15분)로 가압 멸균한 F/2배지에 재접종하였다.

재접종된 미세조류는 온도 20±1℃, 광량 100 μmol·m⁻²·sec⁻¹, 광주기 24(명) : 0(암) 조건에서 96시간 배양 후 spectrophotometer (Optizen 2120UV UV/Vis Spectrophotometer, Mecasys, Daejeon, Korea)를 이용하여 680 nm에서 흡광도를 측정하여 재성장여부를 확인하였다.

더불어, 미세조류의 재성장이 확인된 이산화염소의 최고 농도구간에서 대조구와 비교하여 제균 정도를 확인하기 위하여 Marine agar (BD Difco™, USA) 평판 배지에 이산화염소를 처리한 미세조류 배양액을 도말하여 35±1℃에서 72시간 배양하였으며, 각 배지에 형성된 집락형성단위(CFU, colony-forming unit)를 계수하여 세균 제어 효과를 확인하였다.

2.2. 로티퍼 배양액에 대한 이산화염소의 살균효율

2.2.1. 이산화염소 농도에 따른 살균효율

가. 시험 생물

산업용으로 고밀도로 배양된 로티퍼(*Brachionus rotundiformis*, Aquanet, Tongyeong, Korea)를 구매하여 사용하였으며 생물량 및 오염정도를 가늠하기 위하여 총 부유물질(TSS; Total suspended solids) 및 화학적 산소요구량(COD; Chemical Oxygen Demand)을 측정하였다.

총 부유물질(TSS; Total suspended solids)은 수질공정 시험법에 따라 배양액을 일정량 필터하여 80℃ 드라이오븐에서 24 시간 건조한 후 미리 측정된 필터지 무게를 제외하여 환산하였다. 또한 화학적 산소요구량(COD; Chemical Oxygen Demand) 또한 수질공정시험법에 따라 알칼리성 과망간산칼륨법을 이용하여 측정하였다.

로티퍼 배양액은 전 실험 기간 동안 8회에 걸쳐 구입하였으며 매 구입 시 총 부유물질(TSS; Total suspended solids) 및 화학적 산소요구량(COD; Chemical Oxygen Demand)을 측정하였으며 각각 1.624 ± 0.095 mg/mL, 29.36 ± 1.07 mg ClO_2/L 로 확인되었다.

나. 실험 방법

본 실험은 앞서 실시한 로티퍼 급성독성시험결과를 기준으로하여 이산화염소의 농도를 0, 8, 16, 32, 64 mg ClO_2/L 로 설정하였으며, 이산화염소 처리 이후 로티퍼의 생존에 영향을 주지 않는 최고 농도구간에서의 세균 저해력을 확인하고자 하였다.

이를 위하여, 이산화염소 처리 후 로티퍼의 생사 및 운동 상태를 확인하

여 먹이생물로서의 가치 유지 여부를 확인하였다. 생사판정은 무작위로 선별된 200 마리의 로티퍼 중 유영능력을 상실하고 정지한 상태에서 약 1분간 활동을 중지하고 corona의 기능을 상실한 개체를 폐사 개체로 판별하였다.

더불어, 이산화염소를 처리하지 않은 대조구에 대비하여 로티퍼의 개체수가 유의적으로 감소하지 않은 이산화염소 최대 농도구간에서의 세균 저해력을 확인하기 위하여 Marine agar (BD Difco™, USA) 평판 배지에 이산화염소를 처리한 로티퍼 배양액을 도말하여 $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 72시간 배양하였으며, 각 배지에 형성된 집락형성단위(CFU, colony-forming unit)를 계수하여 대조구 대비 세균 제어 효과를 비교하였다.

2.2.2. 로티퍼 배양 밀도에 따른 이산화염소의 살균 효율

가. 시험 생물

로티퍼 배양의 농도에 따라 이산화염소(ClO_2) 액상 제제(EOTECH, Busan, Korea)에 대한 치사율 및 세균 저해의 정도 차이를 확인하고자 본 실험을 실시하였다.

이전 실험에서 사용된 동일한 로티퍼(*Brachionus rotundiformis*, Aquanet, Tongyeong, Korea)를 구매하여 사용하였으며 총 부유물질(TSS; Total suspended solids) 및 화학적 산소요구량(COD; Chemical Oxygen Demand)은 각각 1.624 ± 0.095 mg/mL, 29.36 ± 1.07 mg/L로 확인되었다.

나. 실험 방법

구입한 고밀도 로티퍼 배양액을 단계별로 원액, 1/10배, 1/100배 희석하였으며 이산화염소의 농도는 각 희석배율에 따라 각기 다르게 설정하였다 (Table 12).

이산화염소에 따른 세균 저해력 확인을 위해 이산화염소 처리 10분 후 Marine agar (BD Difco™, USA) 평판 배지에 도말하여 $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 72시간 배양한 후 각 배지에 형성된 집락수를 세어 집락형성단위(CFU, colony-forming unit)를 계수하였다. 계수된 데이터를 바탕으로 72시간 이후 이산화염소의 농도에 따른 세균 저해력을 다음과 같은 공식(Table 13)을 이용하여 계산하였다.

또한, 산출된 이산화염소 농도에 따른 세균 저해율을 바탕으로 세균이 90% 저해되는 농도(MIC₉₀; Minimum Inhibitory Concentration required to inhibit the growth of 90% of organisms) 및 99% 저해되는 농도를 통계 프로그램(SPSS 12.0 program)을 이용하여 산출하였다.

또한 산출된 MIC₉₀ 및 MIC₉₉의 값을 각 농도에 대비시켜, 총 부유물질에 따른 이산화염소의 세균 저해력에 대한 회귀식을 산출하였다.

더불어, 로티퍼의 밀도에 따라서 이산화염소를 처리한 이후 로티퍼의 치사율을 확인하여 먹이생물로서의 효력을 유지하는 이산화염소의 농도 구간을 확인하였다.

Table 12. Experimental ClO₂ concentrations to confirm the bacterial inhibition efficiency in the commercially used rotifer (*Brachionus rotundiformis*) culture

Rotifer sample		ClO ₂ (mg/L)
Dilution series	Undiluted	0, 12.5, 25, 50, 100
	10 ⁻¹	0, 1.25, 2.5, 10
	10 ⁻²	0.125, 0.25, 0.5, 1

Table 13. Bacterial inhibition rates in the commercially used rotifer (*Brachionus rotundiformis*) culture with various ClO₂ treatment concentrations

Bacterial inhibition rate = $(CFU_c - CFU_0 / CFU_0) \times 100$

CFU_c : Number of colonies according to ClO₂ concentration

CFU₀ : Number of colonies when treated with 0 mg ClO₂/L

2.2.3. 이산화염소 처리시간에 따른 살균효율

본 실험은 이산화염소의 처리 농도와 처리 시간에 따른 세균 저해력 차이를 확인하기 위하여 시행하였다.

실험에 사용된 로티퍼는 앞서 구입한 로티퍼(*Brachionus rotundiformis*, Aquanet, Tongyeong, Korea)를 사용하였으며 총 부유물질(TSS; Total suspended solids)은 1.624 ± 0.095 mg/mL 이었고, 화학적 산소요구량(COD; Chemical Oxygen Demand)는 29.36 ± 1.07 mg/L 이었다.

먼저, 이산화염소의 저농도와 고농도의 이산화염소에서 처리 시간을 달리하여 그 반응을 확인하였으며 (Test A and B, Table 8), 이후 저농도에서는 처리시간을 길게하고 고농도에서는 처리시간을 짧게하여 산술적으로 물질에 노출되는 기횡값을 동일하게 하여(Test C, Table 14) 비교하였다.

이를 위해 저농도인 25 mg ClO_2/L 의 실험구에서는 각각 10분과 20분씩 노출된 실험구 내 세균이 조사되었으며, 고농도인 100 mg ClO_2/L 의 실험구에서는 각각 5분과 10분씩 노출된 실험구 내 세균이 조사되었다. 또한 이산화염소의 살균이 이산화염소 농도와 처리 시간에 비례하는지 확인하기 위해 이산화염소 25 mg ClO_2/L 를 20분 처리한 실험구과 이산화염소 50 mg ClO_2/L 를 10분 처리한 실험구, 이산화염소 100 mg ClO_2/L 를 5분 처리한 실험구, 이산화염소 200 mg ClO_2/L 를 2.5분 처리한 실험군 내 세균이 조사되었다.

각 실험구는 Marine agar (BD Difco™, USA) 평판 배지에 도말하여 35℃ 에서 72시간 배양 후 각 배지에 형성된 집락수를 계수하여 집락형성단위(CFU, colony-forming unit)를 계산하여 세균 저해율을 평가하였다.

Table 14. Bacterial inhibition rates in the commercially used rotifer (*Brachionus rotundiformis*) culture with various ClO₂ concentrations and treatment times

Test	ClO ₂ (mg/L)	Treatment time (min)
A	25	10
	25	20
B	100	5
	100	10
C	25	20
	50	10
	100	5
	200	2.5

2.3. 알테미아의 배양액에 대한 이산화염소의 살균효율

2.3.1. 시험 생물

양식현장에서 먹이생물로 이용되는 수준으로 고밀도로 농축 된 알테미아 (*Artemia salina*)를 이용하였다. 앞서 실험한 알테미아의 독성시험에 이용된 알테미아와 동일한 시스트(SEP Art, INVE, Salt lake city, USA)를 사용하였으며 30‰ 멸균 해수를 이용하여 1리터당 3.5 g의 시스트를 투입하여 부화를 유도하여 현장과 유사한 조건을 유지하였다.

본 실험에 사용된 알테미아(*Artemia salina*)의 밀도는 약 1,000 ind/mL로 생물량 및 오염정도를 가늠하기 위하여 총 부유물질 및 화학적 산소요구량을 측정하였다.

총 부유물질(TSS; Total suspended solids)은 수질공정 시험법에 따라 배양액을 일정량 필터하여 80℃ 드라이오븐에서 24 시간 건조한 후 미리 측정된 필터지 무게를 제외하여 환산하였다. 또한 화학적 산소요구량은 수질공정시험법에 따라 알칼리성 과망간산칼륨법을 이용하여 측정하였다.

2.3.2. 시험 방법

앞서 실시한 알테미아 독성시험결과에 기준으로 이산화염소를 0, 25, 50, 75, 100 mg ClO₂/L 로 처리하여 알테미아의 생존여부를 확인하였으며 알테미아의 생존에 영향을 주지 않는 이산화염소의 최대농도구간에서 세균이 저해되는 정도를 확인하였다.

알테미아의 생사판정은 이산화염소 처리 후 무자위로 선택된 200 마리의 알테미아 중 유영능력을 상실하고 정지한 상태에서 약 1분간 활동을 중지

한 개체를 폐사 개체로 판별하였다.

이산화염소를 처리하지 않은 대조구에 대비하여 알테미아의 개체수가 유의적으로 감소하지 않은 농도구간의 세균 저해력을 확인하기 위하여 Marine agar (BD Difco™, USA) 평판 배지에 이산화염소를 처리한 알테미아 배양액을 도말하여 $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 72시간 배양하였으며, 각 배지에 형성된 집락형성단위(CFU, colony-forming unit)를 계수하여 대조구 대비 세균 저해 효과를 비교하였다.



3. 결과

3.1. 미세조류 배양액에 대한 이산화염소의 살균 효율

3.1.1. 미세조류 재성장

실험에 사용된 *Nannochloropsis* sp.의 흡광도(OD_{680nm})는 1.396 ± 0.003 이었으며, 총 부유물질(TSS; Total suspended solids) 및 화학적 산소요구량(COD; Chemical Oxygen Demand)은 각각 0.942 ± 0.051 mg/mL, 20.06 ± 1.27 mg/L로 측정되었다.

본 실험에서 이산화염소는 각 미세조류에 0, 0.05, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 mg ClO_2 /L로 처리한 후 새로운 배지에 옮겨서 재성장을 관찰하였다. 그 결과 초기 접종 시 흡광도(OD_{680nm})는 0.068 ± 0.008 였으며, 72시간 배양 후 대조구의 흡광도(OD_{680nm})는 0.347 ± 0.003 의 결과를 나타내 정상 성장된 것으로 판단되었으며, 2 mg ClO_2 /L의 이산화염소를 처리한 실험구에서도 재성장 후 흡광도(OD_{680nm}) 값이 0.328 ± 0.005 으로 ANOVA-test 결과 대조구와 비교하여 유의적인 차이를 보이지 않았다. 그러나 4 mg ClO_2 /L의 이산화염소를 처리한 실험구의 재성장 결과값은 대조구의 약 83% 로서 유의적인 재성장 저해가 관찰되었다. 또한 이산화염소의 처리농도가 증가함에 따라 재성장 저해율이 높아져 16 mg ClO_2 /L 에서는 대조구의 67% 정도만 재성장 되었다. 아울러, 32, 64, 128 mg ClO_2 /L 에서는 재접종 시 초기 흡광도(OD_{680nm}) 값보다 낮은 수치로 이산화염소에 의해 미세조류가 사멸한 것으로 판단되었다(Table. 15, Fig 10).

Table 15. Regrowth rates (mean±SD) of *Nannochloropsis* sp. with various ClO₂ treatment concentrations

ClO ₂ concentrations (mg ClO ₂ /L)	OD(680nm)	Regrowth rate(%)
0	0.347±0.003	99.6±0.9
0.05	0.340±0.009	97.6±2.6
0.25	0.346±0.018	99.5±5.2
0.5	0.337±0.010	96.8±2.9
1	0.327±0.010	94.1±2.8
2	0.328±0.005	94.3±1.3
4	0.288±0.016	82.7±4.6
8	0.268±0.008	76.9±2.3
16	0.234±0.001	67.3±0.2
32	0.033±0.006	9.5±1.6
64	0.007±0.001	2.1±0.2
128	0.004±0.004	1.1±1.0



Fig. 10. Visual growth comparison of *Nannochloropsis* sp. with various ClO_2 treatment concentrations.

*Isocrysis galbana*의 경우 실험에 사용된 배양액의 흡광도(OD_{680nm}) 값은 1.488 ± 0.001 이었으며, 이때 총 부유물질 및 화학적 산소요구량이 각각 1.276 ± 0.044 mg/mL, 23.5 ± 3.03 mg/L로 측정되었다.

미세조류 배양액을 이용하여 이산화염소에 대한 재성장 여부를 확인한 결과, 이산화염소 8 mg ClO_2 /L 처리 실험구까지 대조구에 비해 유의적인 성장 저해가 확인되지 않았으나, 이산화염소 16 mg ClO_2 /L 농도에서는 재성장 72시간 이후 흡광도(OD_{680nm})의 값이 0.127 ± 0.012 으로 대조구 0.255 ± 0.003 에 비하여 약 50% 정도만 재성장 되었다.

또한, 32 mg ClO_2 /L 이상의 농도구간에서는 재 접종 시 초기 흡광도 (OD_{680nm})의 0.081 ± 0.008 보다 낮은 수치를 보이므로, 재성장하지 못하고 사멸한 것으로 판단된다(Table. 16, Fig 11).

Table 16. Regrowth rates (mean±SD) in *Isochrysis galbana* with various ClO₂ treatment concentrations

ClO ₂ concentrations (mg ClO ₂ /L)	OD(680nm)	Regrowth rate(%)
0	0.255±0.003	100.0±1.3
0.05	0.258±0.020	100.9±7.9
0.25	0.240±0.011	94.1±4.4
0.5	0.247±0.013	96.6±5.3
1	0.244±0.021	95.4±8.1
2	0.261±0.011	102.2±4.1
4	0.239±0.011	93.5±4.2
8	0.231±0.006	90.6±2.2
16	0.127±0.012	49.6±4.9
32	0.041±0.006	15.9±2.2
64	0.035±0.006	13.7±2.2
128	0.034±0.003	13.3±1.0



Fig. 11. Bacterial inhibition rates (mean $\pm$ SD) in *Isochrysis galbana* culture with various ClO₂ treatment concentrations.

3.1.2. 세균 제어

Nannochloropsis sp.의 총 부유물질 및 화학적 산소요구량이 각각 0.942 ± 0.051 mg/mL, 20.06 ± 1.27 mg ClO_2/L 의 고밀도 배양 상태의 경우 미세조류의 이산화염소 처리 후 재성장이 대조구와 비교하여 유의적 차이가 없었던 농도 중 최고 농도인 2 mg ClO_2/L 에서 대조구 대비 60%의 세균 제어를 확인하였다(Table 17). 수치로는 이산화염소를 처리하지 않은 대조구에서 $88 \pm 22 \times 10^6$ CFU/mL의 세균이 확인된 반면, 이산화염소 2 mg ClO_2/L 처리구에서 $35 \pm 6 \times 10^6$ CFU/mL의 세균이 발생되었다.

그러나 이산화염소 8 mg ClO_2/L 을 처리한 실험구에서는 대조구에 비해 76.9%가 성장하여 유의적으로 성장이 감소되었지만은 세균은 89.2% 제어되었다.

반면, 이산화염소 16 mg ClO_2/L 처리농도에서는 세균이 98.4% 제어되는 결과를 보였지만 대조구에 비해 67.3%만 재성장 되었다.

Table 17. Bacterial inhibition rates (mean±SD) in *Nannochloropsis* sp. culture with various concentration of ClO₂

ClO ₂ concentrations (mg ClO ₂ /L)	Colony-forming unit (CFU/ml)	Bacterial inhibition rate (%)
0	88,333,333±22,501,852	–
1	36,383,333±5,001,333	58.8
2	35,433,333±6,833,984	59.9
4	10,233,333±4,346,646	88.4
8	9,546,667±1,226,808	89.2
16	1,393,333±178,489	98.4
32	430,533±50,576	99.5
64	1,733±759	100

실험에 사용된 *I. galbana*의 총 부유물질 및 화학적 산소요구량이 각각 1.276 ± 0.044 mg/mL, 23.5 ± 3.03 mg/L 였으며 이산화염소에 대한 세균 제어력은 Table 18. 에 나타낸 것 같이 *Nannochloropsis* sp. 에 비해 동일한 이산화염소 농도에서도 더 높은 세균 제거율을 나타내었다(Table 18).

또한, *I. galbana* 는 *Nannochloropsis* sp. 에 비해 더 높은 이산화염소 농도인 8 mg ClO_2 /L 까지 미세조류의 재성장이 저해되지 않았으며 이때 세균은 95.4%가 제어되었다. *I. galbana* 배양액에 이산화염소를 16 mg ClO_2 /L의 농도로 처리하면, 세균은 99% 저해되나 미세조류의 재성장이 대조구에 비해 50% 성장 저해되는 것으로 나타났다.



Table 18. Bacterial inhibition rates (mean±SD) in *Isochrysis galbana* culture with various ClO₂ treatment concentrations

ClO ₂ concentrations (mg ClO ₂ /L)	Colony-forming unit (CFU/ml)	Bacterial inhibition rate (%)
0	225,166,667±37,597,651	–
1	67,233,333±7,749,570	70.1
2	30,483,333±5,177,435	86.5
4	18,550,000±5,125,183	91.8
8	10,446,667±964,642	95.4
16	2,158,333±359,942	99.0
32	464,400±25,398	99.8
64	1,650±867	100

3.2. 로티퍼 배양액에 대한 이산화염소의 살균효율

3.2.1. 이산화염소 농도에 따른 살균효율

양식장에서 먹이생물로 다양하게 이용되고 있는 로티퍼는 시중에 시판되고 있는 제품을 구입하여 로티퍼 배양액 내 세균 제어 가능성에 대해 확인하였다. 로티퍼 배양액은 전 실험 기간동안 8회에 걸쳐 구입하였으며, 매 구입시 로티퍼 배양액 내 총 부유물질 및 화학적 산소요구량을 측정한 결과 각각 1.624 ± 0.095 mg/mL, 29.36 ± 1.07 mg/L로 확인되었다. 로티퍼 배양액은 구입 후 즉시 생존율을 확인하여 폐사개체가 10% 미만인 경우 실험을 진행하였으며 폐사율이 10%가 넘는 경우는 실험을 진행하지 않았다.

실험은 로티퍼 배양액에 이산화염소를 각각 0, 8, 16, 32, 64 mg ClO_2 /L로 처리한 후 로티퍼의 생사를 확인하였다. 그 결과 이산화염소를 처리하지 않은 대조구의 경우 200마리 중 93%가 생존하였으며, 7%는 폐사된 개체로 확인되었을 때, 이산화염소 16 mg ClO_2 /L의 농도까지는 93%가 생존하는 것으로 확인되어 대조구와 비교하여 유의적인 폐사증가가 확인되지 않았다. 반면, 32 mg ClO_2 /L 부터는 유의적으로 개체수가 증가하여 200마리 중 34%가 폐사하였으며, 64 mg ClO_2 /L 에서는 94%가 폐사하였다 (Table 19).

Table 19. Mortality of the commercially used rotifer (*Brachionus rotundiformis*) with various ClO₂ treatment concentrations

ClO ₂ (mg/L)	Live (%)	Death (%)
0	93±1	7±1
8	93±1	7±1
16	94±1	7±1
32	66±5	34±5
64	6±5	94±5

또한, 이산화염소에 의해서 로티퍼의 생존 및 먹이활성도에 영향을 주지 않은 이산화염소 16 mg ClO_2/L 농도 실험구에서의 세균 저해도를 확인한 결과, 대조구에서 $166 \pm 5 \times 10^5$ CFU/mL인 반면 이산화염소 16 mg ClO_2/L 농도의 실험구에서는 $38 \pm 4 \times 10^4$ CFU/mL로 대조구 대비 97.7%의 세균 제어 효과를 확인하였다.

또한, 더 낮은 이산화염소 8 mg ClO_2/L 농도 실험구에서 잔여세균도 $10 \pm 1 \times 10^5$ CFU/mL 로 93.6% 세균 제어가 되었다.

그러나, 로티퍼가 94% 폐사한 이산화염소의 최고 고농도인 64 mg ClO_2/L 에서는 세균이 100% 제어되었다(Table 20, Fig 11).

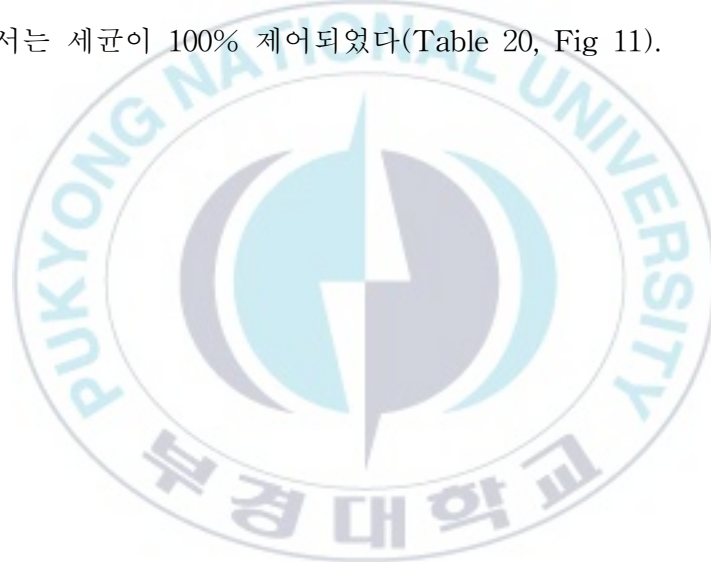


Table 20. Bacterial inhibition rates (mean±SD) in commercially used rotifer (*Brachionus rotundiformis*) culture with various ClO₂ treatment concentrations

ClO ₂ concentrations (mg ClO ₂ /L)	Colony-forming unit (CFU/ml)	Bacterial inhibition rate (%)
0	16,666,667±539,290	–
8	1,063,333±107,510	93.6
16	389,167±44,256	97.7
32	124,833±13,382	99.3
64	0±0	100.0

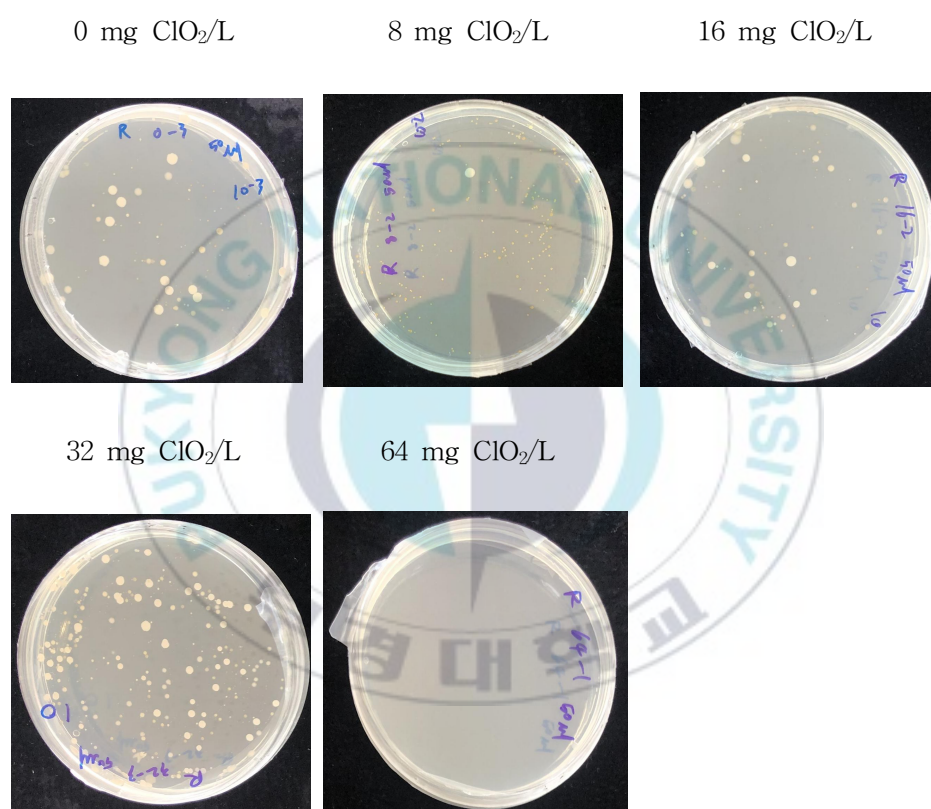


Fig. 12. Visual comparison of bacteria colonies in the rotifer(*Brachionus rotundiformis*) with various ClO₂ treatment concentrations

3.2.2. 로티퍼 배양 밀도에 따른 이산화염소의 살균효율

현장에서 로티퍼를 구입해서 재배양해서 사용하거나, 구입한 로티퍼를 사용하지 않고 자가배양을 하여 로티퍼를 사용하는 경우 로티퍼의 밀도에 따라 세균을 제어하기 위한 이산화염소의 농도가 달라질 수 있는 점에 착안하여 로티퍼 농도에 따른 이산화염소 처리 요구량을 확인하고자 하였다. 따라서 본 실험은 구입한 고밀도 로티퍼 배양액을 각각 원액, 1/10배, 1/100배로 희석하여 이산화염소의 세균 제어력 및 해당 밀도에서 로티퍼의 생존율을 확인하였다(Table 21과 22).

이산화염소를 처리하지 않은 대조구의 경우 세균은 $134 \pm 6 \times 10^6$ CFU/mL 이었으나, 희석하지 않은 로티퍼 배양액에 이산화염소를 12.5 mg ClO_2 /L 처리한 실험구에서는 $62 \pm 4 \times 10^5$ CFU/mL로 약 95%의 세균이 제어된 것을 확인하였다. 또한 이산화염소를 25 mg ClO_2 /L의 농도로 처리하였을 때는 $15 \pm 1 \times 10^5$ CFU/mL로 대조구 대비 약 98%의 세균이 제어되었다. 그러나, 로티퍼 배양액을 1/10배로 희석한 실험구에서 이산화염소를 2.5 mg ClO_2 /L의 농도로 처리하였을 때 $692 \pm 93 \times 10^3$ CFU/mL로 95%로 제어되었으며, 10 mg ClO_2 /L 처리하였을 때 99% 세균이 저해되어 배양액을 희석하지 않은 원액에 비해 이산화염소의 세균 제어력이 더 높아진 것을 확인하였다. 또한, 1/100배 희석된 로티퍼 배양액의 경우, 이산화염소가 0.5 mg ClO_2 /L 일 때 대조구 대비 98%의 세균이 제어되어 로티퍼의 농도에 따라 이산화염소의 세균 제어력이 달라지는 것을 확인하였다. 이때, 로티퍼 배양액을 희석하지 않은 원액에서는 이산화염소 100 mg ClO_2 /L를 처리하였을 때 100%의 로티퍼가 폐사한 반면, 로티퍼 배양액을 1/10배 희석한 실험구에 이산화염소를 1/10의 농도로 적용한 10 mg ClO_2 /L의 이산화염소 실험구에서는 대조구와 유의적인 차이가 없는 생존율을 보였다.

Table 21. Bacterial inhibition rates in progressively diluted rotifer (*Brachionus rotundiformis*) culture with various ClO₂ treatment concentrations

Dilution series of rotifer		ClO ₂ concentrations (mg ClO ₂ /L)	Bacterial control rate (%)	MIC ₉₀ (ClO ₂ mg/L)	MIC ₉₉ (ClO ₂ mg/L)
Dilution series	Undiluted	12.5	95.4	13.22	19.71
		25	98.8		
		50	99.9		
		100	100.0		
	10 ⁻¹	1.25	71.5	2.96	6.57
		2.5	94.8		
		10	99.4		
	10 ⁻²	0.125	0	0.49	0.67
		0.25	67.8		
		0.5	97.6		
		1	97.8		

Table 22. Survival rates (mean±SD) of rotifer (*Brachionus rotundiformis*) in progressively diluted culture with various ClO₂ treatment concentrations

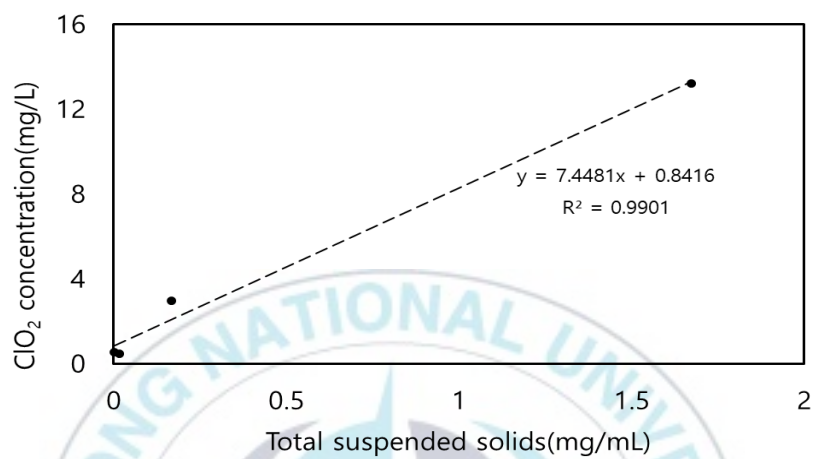
Dilution series of rotifer		ClO ₂ concentrations (mg ClO ₂ /L)	Survival rate (%)	Mortality (%)
Dilution series	Undiluted	0	93±1	7±1
		12.5	88±5	12±5
		25	83±1	17±1
		50	9±2	91±2
		100	0±0	100±0
	10 ⁻¹	1.25	93±1	8±1
		2.5	92±1	9±2
		10	92±2	8±2
	10 ⁻²	0.125	97±1	4±1
		0.25	96±4	4±1
		0.5	95±1	5±1
		1	93±2	7±2

로티퍼 배양액의 총 부유물질(TSS)에 따른 이산화염소의 세균 저해력에 관한 관계식을 회귀분석한 결과 90%의 세균이 제어되는 MIC₉₀ (Minimum Inhibitory Concentration required to inhibit the growth of 90% of organisms)을 나타내는 회귀식은 $Y=7.4481X + 0.8416$ ($R^2=0.9901$)이었고 99%의 세균이 제어되는 MIC₉₉ (Minimum Inhibitory Concentration required to inhibit the growth of 99% of organisms)를 추정 한 직선은 $Y=10.823X + 1.8756$ ($R^2=0.9512$)으로 나타났다(Fig. 13).

이러한 결과를 종합하여 총세균의 99%의 제어를 목표로 할 때, 희석하지 않은 배양액에서 요구되는 이산화염소의 농도는 19.71 mg ClO₂/L 였으며, 10배 희석한 배양액에서 요구되는 이산화염소의 농도는 6.57 mg ClO₂/L로서 이때 전자의 경우는 로티퍼의 생존에 일부 영향이 있을 것으로 예상되나 후자의 경우는 로티퍼의 생존에 영향이 없을 것으로 판단된다.

따라서, 이산화염소에 대한 로티퍼의 민감도는 낮추고 세균의 저해력은 높기 위해서는 로티퍼 배양액을 적절한 비율로 희석하여 낮은 농도의 이산화염소로도 원하는 효과를 얻을 수 있을 것으로 기대된다.

A



B

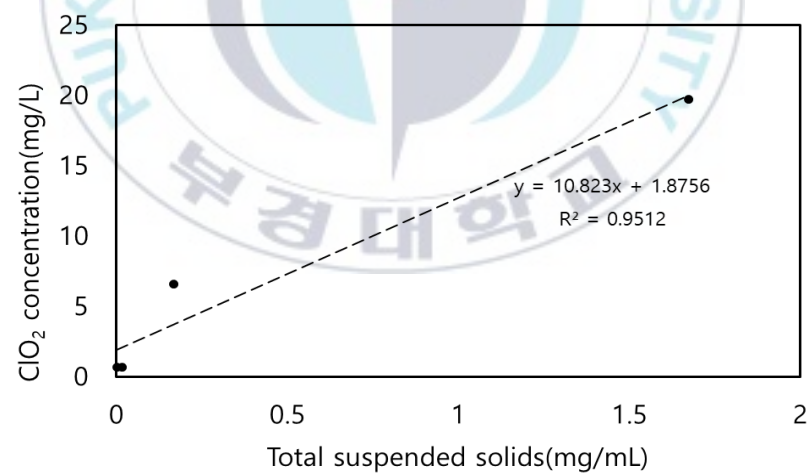


Fig. 13. The regression for the bacterial control of ClO_2 depend on the total suspended solids.

3.2.3. 이산화염소 처리시간에 따른 살균효율

이산화염소를 이용한 세균 조절 방법을 모색하고자 로티퍼의 살균처리에 필요한 적정량의 이산화염소 농도와 처리 시간을 확인하였고 실험 결과는 Fig. 14에 나타내었다.

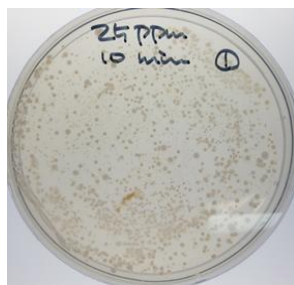
첫 번째로, 이산화염소의 양을 동일하게 하고 처리시간을 변화시킨 후 세균 살균 효과를 확인한 결과 이산화염소 농도 25 mg ClO_2/L 에서 10분간 처리한 실험구(C25-10)와 20분 처리한 실험구(C25-20)의 세균 제어력에는 큰 차이를 확인하지 못했으며(Fig. 14A), 이산화염소 농도 100 mg ClO_2/L 을 5분 처리한 실험구(C100-5)와 10분 처리한 실험구(C100-10)를 비교하였을 때도 처리시간에 비례한 세균 제어효과를 확인할 수 없었다.

두 번째로, 이산화염소의 처리 농도와 시간을 반비례하여 총 처리농도와 처리시간의 곱을 동일하게 설정한 실험에서 또한 동일한 세균 제어 효과를 확인하지 못했다. 다시 말해, 이산화염소 농도 25 mg ClO_2/L 를 20 분간 처리한 실험구(C25-20)와 이산화염소 농도 50 mg ClO_2/L 10분간 처리한 실험구(C50-10) 및 이산화염소 농도 100 mg ClO_2/L 을 5분간 처리한 실험구(C100-5), 그리고 이산화염소 농도 200 mg ClO_2/L 을 2.5분간 처리한 실험구(C200-25) 모두 다른 세균 제어 효과를 나타내었다(Fig. 14C). 이중 처리 시간은 가장 짧았지만 이산화염소의 농도가 가장 높은 200 mg ClO_2/L 에서 세균 제어력이 가장 뛰어났다.

따라서, 일반적인 살균제의 경우 처리 농도와 접촉 시간에 비례하여 살균 효과가 증가되나, 본 실험 결과에 따르면 이산화염소의 경우 처리 시간에 비례해서 살균효과가 증가 하지 않았으며, 이산화염소의 처리 시간에는 관계없이 처리된 농도에 비례하여 세균의 억제효과가 증가되는 것을 확인하였다.

A

C25-10



C25-20

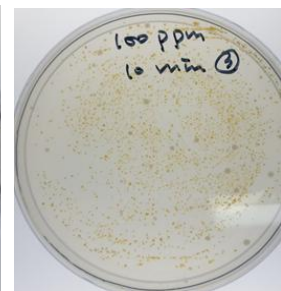


B

C100-5

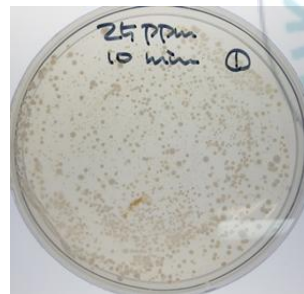


C100-10

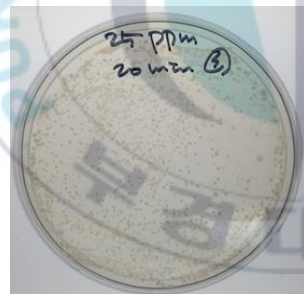


C

C25-10



C25-20



C100-5



C200-2.5

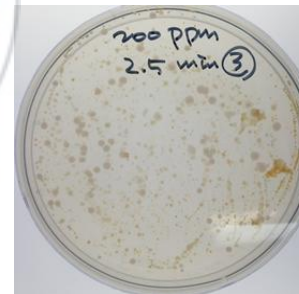


Fig. 14. Counts of bacterial colonies in various ClO_2 treatment concentrations and treatment times.

3.3. 알테미아의 배양액에 대한 이산화염소의 살균효율

본 실험에 사용된 고밀도 알테미아의 총 부유물질(TSS; Total suspended solids)은 2.257 ± 0.135 mg/mL, 화학적 산소요구량(COD; Chemical Oxygen Demand)은 20.38 ± 0.82 mg/L로 확인되었으며, 이산화염소를 각각 0, 25, 50, 75, 100 mg ClO_2/L 처리한 결과는 Fig. 15와 같다.

이산화염소 50 mg ClO_2/L 이하에서는 알테미아가 100% 생존 하였고, 75 mg ClO_2/L 에서 97% 생존율을 보였다. 그러나 100 mg ClO_2/L 처리한 실험구에서는 모두 사멸하여 100% 치사율을 확인하였다.

또한, 이산화염소를 처리한 실험구 내 세균의 잔여량을 확인하였을 때, 이산화염소를 처리하지 않은 대조구에서 $70 \pm 5 \times 10^5$ CFU/mL 이 발생한 것에 비하여 알테미아가 생존한 이산화염소 25와 50 mg ClO_2/L 에서도 세균이 완벽히 제어되었다(Table 23).

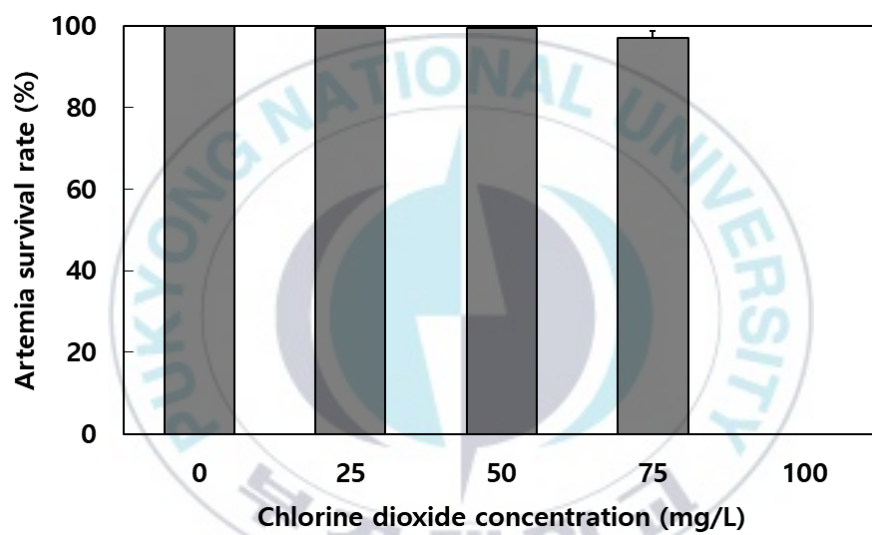


Fig. 15. The effects of ClO₂ on survival rate (mean±SD) in *Artemia salina*.

Table 23. Bacterial inhibition rates (mean±SD) in commercially used *Artemia salina* with various ClO₂ treatment concentrations

ClO ₂ concentrations (mg ClO ₂ /L)	Colony-forming unit (CFU/ml)	Bacterial inhibition rate (%)
0	7,000,000±500,000	–
25	4,150±819	99.9
50	0±0	100.0
75	0±0	100.0
100	0±0	100.0

4. 고찰

본 연구에서 양식장 현장에서 고밀도로 배양된 로티퍼(*B. rotundiformis*)의 경우 총 부유물질이 1.624 ± 0.095 mg/L, 29.36 ± 1.07 mg/L 기준으로 이산화염소 농도 16 mg ClO_2 /L로 처리하였을 때 로티퍼(*B. rotundiformis*)의 생존에는 영향을 주지 않고 세균은 94% 저해할 수 있으며, 알테미아(*A. salina*)의 경우에는 1,000 ind./mL 밀도 기준으로 이산화염소 농도 25 mg ClO_2 /L로 처리할 경우 알테미아(*A. salina*)는 100% 생존하고 세균은 100% 사멸되는 것을 확인하였다.

그러나 고밀도로 배양된 *Nannochloropsis* sp. 경우 성장에 영향을 미치지 않는 이산화염소 농도 2 mg ClO_2 /L 에서 60%의 세균만 제어되었고, *I. galbana* 는 이산화염소 농도 8 mg ClO_2 /L에서 95.4% 세균 제어가 가능하였지만 *I. galbana* 의 채성장에 있어서는 대조구에 비해 90.6% 만 채성장이 되어 목표하는 미생물 제어 수준에 따라 이산화염소의 농도를 달리하여 처리해야 될 것으로 판단된다.

또한, Kim et al. (2003)에 따르면 해수 중에 잔류하는 부유물질 및 COD 농도가 높을수록 잔류 이산화염소가 빠르게 환원되며, 부유물질이 3.19 ± 0.04 mg/L 인 해수에서 이산화염소 처리 직후 4.00 ± 0.03 mg ClO_2 /L 에서 5분이 경과하면 0.32 ± 0.02 mg ClO_2 /L으로, 1시간째에는 0.08 ± 0.01 mg ClO_2 /L이 잔류된다고 보고하였다. 본 연구결과에서도 현장의 먹이생물 상황을 반영하여 고밀도로 배양된 먹이생물은 급성독성시험에서 확인된 반수 치사농도에 비해 훨씬 고농도에서도 생물의 성장 저해 및 치사를 보이지 않았다. 따라서, 수중에 유기물 농도에 따라 수산생물에 미치는 이산화염소

치사 독성이 달라지는 것을 알 수 있었으며 총 유기물질 및 COD와 같은 수질 조건은 이산화염소 처리 시에 반드시 고려되어야 되는 사항으로 생각된다.

그러므로, 본 연구결과에서 도출된 유기물농도에 따른 이산화염소 세균 저해력에 관한 회귀식을 바탕으로 양식장 환경에서 먹이생물의 생존 및 활성에 영향을 미치지 않으면서 세균을 제어하는 적정 농도를 처리함으로서 환경적으로 안전하게 사용할 수 있을 것으로 생각되며 먹이생물을 섭취하는 치어에게 바이러스 및 세균 감염을 예방하여 결과적으로 치어 및 유생의 생존과 성장에 긍정적인 효과를 나타낼 것으로 생각된다.

더불어, 국내에서 일반적으로 사용되는 염소계 소독물질인 차아염소산나트륨의 경우 Jeong et al. (2015) 에 따르면 10 mg ClO_2/L 에서는 거의 대부분의 *Tetraselmis suecica* 가 제거되었으며 *B.plicatilis* 와 *A.salina* 는 20 mg ClO_2/L 에서 부화하지 못했다고 보고하고 있으며, 차아염소산나트륨의 독성을 중화하기 위하여 추가적인 중화제를 투입하였다. 또한, 차아염소산나트륨은 최근 연구에서 유기물 및 미세조류가 성장하면서 수중으로 방출하는 다양한 대사산물들(metabolic substance)과 차아염소산나트륨이 반응하여 인체에 유해한 다양한 부산물(disinfection by-products, DBPs)들이 발생하는 문제점이 제기되고 있는 실정이다(Bond et al. 2011; Henderson et al. 2008; Huang et al. 2008; Huang et al. 2009; Plummer and Edzwald, 2001). 하지만 본 연구결과에서 이산화염소(ClO_2)의 경우 중화제를 사용하지 않았음에도 미세조류의 재성장이 저해되는 결과를 확인하였다. 국립환경과학원(2013)의 정수처리기준 해설서에 의하면 이산화염소는 차아염소산나트륨과 달리 pH의 영향을 받지 않아 유기물이 많고 pH가 높은 경우에는 이산화염소가 염소보다 우수한 소독효과를 보인다는 장점이 있으므로 먹이생물 배양 현장에서 더욱 폭넓은 사용이 기대된다.

요약

양식생물을 사육함에 있어 적절한 사육환경을 유지하는 것은 생산성과 관련된 가장 중요한 요소 중 하나이다. 특히, 양식생물의 질병 관리는 주요 현안문제 중 하나이다. 질병 발생 문제는 양식 생산 전반의 생산 비용 증가로 이어지며 양식 생물의 생산성 및 경제성을 저하시키는 직접적 요인으로 작용한다. 질병이 발생하였을 때 대처 및 처리도 중요하지만 불필요한 경제적 손실을 방지하기 위해 질병이 발생하지 않도록 조기 예방하는 것이 더욱 중요하다.

최근에는 이산화염소가 높은 수용성과 강한 산화력을 가지고 있는 동시에 자연광에 의한 분해가 빠르고 가수분해가 일어나지 않아 어류나 인체에 미치는 위해성이 상대적으로 낮아 살균 소독제로서도 이용 가능성이 높아지는 추세이다.

그러나, 이산화염소에 대한 양식현장에 적용할 만한 체계적인 연구가 부족하며 수산생물에 미치는 기초 독성 평가를 비롯하여 각 생물에 대한 적정 적용 도출이 어려워 양식장 및 산업적 적용이 어려운 실정이다.

따라서, 본 연구는 1) 해산어류 치어 및 먹이생물 4 종의 이산화염소에 대한 급성독성시험을 통해 각 생물의 적정 적용 방안에 대한 기초 자료를 구축하며 2) 먹이생물 배양액에 대한 이산화염소의 살균효율을 도출하여 이산화염소를 양식용 살균소독제로 이용하기 위한 살균 및 소독 유효농도를 설정하고자 하였다.

감성돔 및 참돔 치어의 이산화염소에 대한 급성 독성시험을 실시한 결과, 감성돔 및 참돔 치어의 96시간 반수 치사 농도(96LC₅₀)는 각각 0.14 및 0.24 mg ClO₂/L 로 나타났다. 일반적으로 이론적 무영향농도는 96LC₅₀

의 9% 수준에서 형성되는 것으로 알려져 있다(Tomasso 1994). 이를 기준으로 계산하면 감성돔과 참돔 치어에 장기적으로 영향을 주지 않는 이론적 무영향농도는 각각 약 0.001과 0.005 mg ClO₂/L 예측된다.

먹이생물의 경우 *I. galbana* 및 *Nannochloropsis sp.*의 비성장률을 바탕으로 산출된 무영향농도(NOEL)는 0.05 mg ClO₂/L 였으며, 각각의 반수영향농도(EC₅₀)는 0.535 mg ClO₂/L 와 0.648 mg ClO₂/L로 산출되었다. 로티퍼(*Brachionus plicatilis*)의 경우 무치사농도(NOEL: No Observed Adverse Effect Level)는 미세조류와 동일하게 0.05 mg ClO₂/L 였으나, 반수치사농도(LC₅₀; Lethal Concentration 50%)는 0.641 mg ClO₂/L으로 *Nannochloropsis sp.*와 비슷한 수준으로 확인되었다.

마지막으로 알테미아(*Artemia salina*)의 반수치사농도(LC₅₀)와 무영향농도(NOEL)는 5.989 mg ClO₂/L, 2 mg ClO₂/L으로 먹이생물 중에서 가장 이산화염소에 대한 민감도가 낮은 것으로 확인되었다.

먹이생물 배양액에 대한 이산화염소의 살균효율을 확인한 결과, *Nannochloropsis sp.*의 총 부유물질(TSS; Total suspended solids) 및 화학적 산소요구량(COD; Chemical Oxygen Demand)은 각각 0.942±0.051 mg/mL, 2.67±0.153 mg ClO₂/L 인 고밀도 미세조류 배양액에 4 mg ClO₂/L의 이산화염소를 처리한 실험구가 대조구에 비하여 약 83% 재성장됨으로서 통계적으로 유의한 재성장 저해가 관찰되었다. 또한 이산화염소의 처리 농도가 증가함에 따라 성장 저해율이 높아져 16 mg ClO₂/L 에서는 대조구의 67% 정도만 재성장 되었다. 성장 저해가 일어나지 않은 이산화염소 2 mg ClO₂/L에서는 세균이 60% 제어된 반면, 성장저해가 일어난 이산화염소 16 mg ClO₂/L에서 세균이 98.4% 제어되는 결과를 보였다.

반면, *I. galbana*의 경우 총 부유물질(TSS) 및 화학적 산소요구량(COD)이 각각 1.276±0.044 mg/mL, 2.67±0.153 mg ClO₂/L였으며,

Nannochloropsis sp. 보다 조금 더 높은 이산화염소 농도 8 mg ClO₂/L 까지 미세조류의 재성장이 저해되지 않았으며 이때 세균은 95.4% 제어되었다. *I. galbana* 배양액에 이산화염소를 16 mg ClO₂/L의 농도로 처리하면 세균은 99% 저해되나 미세조류의 재성장이 대조구에 비해 50% 저해되는 것으로 나타났다.

반면, 총 부유물질(TSS; Total Suspended Solids) 및 화학적 산소요구량(COD; Chemical Oxygen Demand)이 각각 1.624±0.095 mg/mL, 2.67±0.153 mg ClO₂/L인 고밀도 배양된 로티퍼의 경우 이산화염소를 처리하였을 때 이산화염소 16 mg ClO₂/L 까지 로티퍼의 폐사가 일어나지 않았으며 대조구 대비 97.7%의 세균 제어 효과를 확인하였다. 더불어, 고밀도 배양된 로티퍼 배양액을 희석하여 이산화염소를 처리한 후 세균 저해력을 확인한 결과를 바탕으로 총 부유물질(TSS)에 따라 90%의 세균이 제어되는 MIC₉₀과 99%의 세균이 제어되는 MIC₉₉의 회귀식을 각각 $Y=7.4481X + 0.8416$ ($R^2=0.9901$), $Y=10.823X + 1.8756$ ($R^2=0.9512$)을 도출하였다.

마지막으로, 1,000 ind./mL 의 알테미아의 경우 이산화염소 50 mg ClO₂/L 이하에서 100% 생존 하였고, 세균 또한 완벽히 제어되어 알테미아의 경우에는 이산화염소의 적용이 가능할 것으로 판단되나 생물 농도 및 배양액의 오염정도에 따라 살균력 및 생물에 미치는 독성 정도가 다를 수 있음을 반드시 고려해서 사용해야 할 것으로 생각된다.

따라서, 본 연구결과로 인해 양식현장에서 미세조류, 로티퍼 및 알테미아 등의 먹이생물 공급 시 사육생물의 질병 원인체 유입을 차단하기 위하여 이산화염소를 적용 할 수 있는 기반이 될 것으로 기대된다.

감사의 글

국립부경대학교 수산학박사 학위를 받기까지 학문에 전념할 수 있도록 가장 가까이에서 기쁨과 슬픔 그리고 고난과 행복을 함께 나누며, 묵묵히 내조해준 사랑하는 아내 김덕순 여사님, 성실함과 인내로 가족 모두에게 항상 사랑과 에너지를 전달하고 희망과 웃음꽃을 선물하며 대학 생활하는 착한 1등 딸 이세빈, 엇그제 아기 같았지만 어느덧 결혼 후 2남 1녀라는 가정의 가장이 된 대견하고 훌륭한 나의 장남 이성민, 그리고 시오, 도규, 도운이를 낳아서 온 가족의 희망의 꽃으로 승화시킨 며느리 하소영, 이 모든 가족 구성원들에게 진심으로 감사의 말씀 드립니다.

이상과 행동이 맞닿은 곳에 성취가 있다는 말을 되새기며 시작했던 학문이 작은 결실을 맺게 되었습니다. 처음 시작할 때의 설렘과 기쁨이 줄고의 본 논문을 마감하는 지금 막중한 책임감이 되었고, 연구 활동은 끝이 아닌 새로운 시작임을 깨우치게 되었습니다.

아주 작은 어촌의 농사꾼의 아들로 태어난 제가 청운의 꿈을 안고 생존 경쟁이 치열한 도시 부산으로 오게 된 지도 어느덧 수십 년이 흘렀습니다. 그간의 긴 세월을 회상해보니, 시간이 어떻게 지나가는지도 모르게 밤낮으로 앞만 보고 달려왔습니다. 어려운 여건 속에서도 개인 사업 경영과 사회 봉사활동을 통해 새로운 것을 배우고 익히며 삶의 가치를 알아가고 있습니다.

오늘의 저 이육이 있기까지 저를 학문의 길로 인도해주시고, 본 논문이 완성되기까지 온화하신 인품과 끝없는 열정으로 지도편달 해주신 박정환 지도교수님께 머리 숙여 감사드립니다. 이 논문이 완성될 수 있도록 항상 용기와 사랑을 주시고 학자로서 학문에 대한 자세와 열정을 가르쳐 주신

김창훈, 배승철, 김종명, 남윤권, 공승표, 최윤희 교수님께도 이 글을 통해 서나마 깊은 감사드립니다.

오늘의 영광스러운 결실을 맺기까지 부족한 저에게 끝없는 사랑과 인내로 부모님과 같은 마음으로 큰 덕을 주시고, 지도 해주신 전라남도 완도군 김부웅, 박엽수, 천익민 前 완도군의회 의장님, 박남철 前부산대학병원장님, 김종식 완도군 약산면 노인 분회장님, 정광열 위원님, 박한수 약산면 번영회장님, 최상휴 완도군 현대흑염소 대표님, 서순오, 서순주, 서석동, 오춘님, 완도골프 대표 황수복 선배님, 이대옥 소안향일운동기념사회 회장님, 이부남 前전라남도의원님, 이명복 前완도군청 총무과장님, 심만섭 前완도읍장님, 김광식 완도군신협조합장님, 부명규, 박기웅, 강판식, 부산 오홍옥, 김옥호, 김준삼, 박복균 선배님, 고향 모도 섬의 문계근, 신학만, 장영성, 문백두, 김승학, 최장진, 황윤익, 김승복, 서정화, 김동철, 추태호, 이영섭, 장영호, 김계선, 서순정 선배님과 함께 이 기쁨을 간직하고 싶습니다. 끝으로 함께 존함을 올리지 못했지만, 저를 아시는 주위 모든 분들과 저의 곁에서 항상 응원해주시고 열정과 사랑을 아끼지 않는 황복연, 박용국, 노송복, 박남철, 박광석, 신창용, 이현중, 문성일, 장승호, 정형준, 이상대, 서상복, 김수길, 서정만, 강성자, 이미순, 민옥순, 황임을, 이금호님께 감사드립니다.

끝으로 항상 곁에서 무게감과 진지함을 일깨워주고 버팀목이 되어주신 집안 작은아버지 이시한, 이시철, 이시천, 이시은, 이시학, 집안 형님 이행, 이현, 이옥원, 이옥일, 이상영님, 장영자 형수님, 집안 동생 이병일, 이병선, 이옥수, 이옥산, 이성일, 이승남, 이원남, 이옥식, 이옥성, 이옥현 등 사랑하는 가족 모두에게 두 손 모아 감사드리며 이 논문을 바칩니다.

참고문헌

- American Public Health Association (APHA), 1995. Standard methods for the examination of water and wastewater, 19th ed. American Public Health Association, Washington, DC.
- Ann, K. and E. Rimstad, 2001. Inactivation of Infectious Salmon Anaemia Virus, Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus and Infectious Pancreatic Necrosis Virus in Water Using UVC Irradiation. Dis. Aqua. org., 48: 1-5.
- ASTM, E1203-98 (Standard Practice for Using Brine Shrimp Nauplii as Food for Test Animals in Aquatic Toxicology)
- ASTM, E1218 - 04. 2012 (Standard Guide for Conducting Static Toxicity Tests with Microalgae)
- ASTM, E1440 - 91. 2012 (Standard Guide for Acute Toxicity Tests with the Rotifer Brachionus)
- Bae, J.H. and Lee. D.S. 1999. Acute toxicity of ClO₂ cultured-flounder (*Paralichthys olivaceus*) and its bacterial efficacy. Korean Journal of the Laboratory Animal Science 15, 87-91 (Korean).
- Bond, T., Huang, J., Templeton, M.R., Graham, N., 2011, Occurrence and control of nitrogenous disinfection by-products in drinking water - a review, Water Res., 45, 4341-4354
- Burton, D.T. 1995. Acute toxicity of continuous, intermittent exposures of chlorite to freshwater invertebrates and fish. WREC-95-04, University of Maryland, Wye Research and Education Center,

Queenstown, MD

- Chuang, Y.L., Yang H.H., Lin H.J. 2009. Effect of a thermal discharge from a nuclear power plant on phytoplankton and periphyton in subtropical coastal waters. *Journal of Sea Research* 61, 97-205
- Croci, L., Suffredini, E., Cozzi, L., Toti, L. 2002. Effects of depuration of molluscs experimentally contaminated with *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* 01 and *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Applied Microbiology* 92, 460 - 465.
- Davis, D.A. and Arnold, C.R. 1997 Tolerance of the rotifer *Brachionus plicatilis* to ozone and total oxidative residuals, *Ozone: Science & Engineering: The Journal of the International Ozone Association*, 19, 457-469
- Environmental Protection Agent (EPA). 1994. Chemical summary for chlorine. Office of Pollution Prevention and Toxics. Cincinnati (OH): U.S. EPA; EPA 749-F-94-010a.
- GomezGil, R.S.B., Abreu-Grobois, F.A., Romero-Jarero, J. and Herrera-Vega, M. 1994. Chemical Disinfection of *Artemia* Nauplii. *Journal of the World Aquaculture Society*, 25, 579 - 583.
- Guillard, R.R.L. and Ryther J.H. 1962 Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervaceae* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.* 8, 229-239.
- Gullian, M, Espinosa-Faller F.J., Núñez A, and López-Barahona, N. 2012. Effect of turbidity on the ultraviolet disinfection performance in recirculating aquaculture systems with low water exchange. *Aquaculture Research* 43, 595-606.

- Harrington, R, Gates D, Ramano R.R., 1989. A review of the uses, chemistry and health effects of ClO_2 and chlorite ion. Final Report, American Chemical Council, Washington, DC
- Henderson, R.K., Baker, A., Parsons, S.A., Jefferson, B. 2008. Characterization of algogenic organic matter extracted from cyanobacteria, green algae and diatoms, *Water Res.*, 42, 3435-3445.
- Hong, Y., Ku, K., Kim, M., Won, M., Chung, K. and Song, K.B. 2008. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* inoculated on chicken by aqueous ClO_2 treatment. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 18, 742 - 745.
- Huang, J., Graham, N. J. D., Templeton, M. R., Zhang, Y., Collins, C. and Nieuwenhuijsen, M. 2008, Evaluation of *Anabaena flos-aquae* as a precursor for trihalomethane and haloacetic acid formation, *Water Sci. Technol. Water Suppl.*, 8, 653-662.
- Huang, J., Graham, N.J.D., Templeton, M.R., Zhang, Y., Collins, C. and Nieuwenhuijsen, M. 2009. A comparison of the role of two blue-green algae in THM and HAA formation, *Water Res.*, 43, 3009- 3018.
- Jeong, M.H., Yun, J.H. and Yang, K. 2015. Application of electrochemically treated seawater as basic culture media for mass cultivation of *Tetraselmis suecica*. *Aquacult Int* 23, 1457 - 1471.
- Jorquera, M., Valencia G., Eguichi M., and Katayose M. 2002. Disinfection of seawater for hatchery aquaculture systems using

- electrolytic water treatment. *Aquaculture* 207, 213–224.
- Junli, H., Li W., Nenqi R., Li L.X., and Fang M. 1997a. Disinfection effect of ClO_2 on bacteria in water. *Water Research* 31, 607–613.
- Junli, H., Li W., Nenqi R., Li L.X., Fun S.R., and Guanle Y. 1997b. Disinfection effect of ClO_2 on viruses, algae and animal planktons in water. *Water Research* 31, 455–460.
- Junli, H., Li W., Nenqi, R., Li, L.X., and Fang M. 1997b. Disinfection effect of ClO_2 on bacteria in water. *Water Research*, 31, 607–613.
- Kim, J.M., Huang, T.S., Marshall, M.R., and Wei, C.I., 1999. ClO_2 treatment of seafoods to reduce bacterial loads. *Journal of Food Science* 64, 1089 - 1093.
- Kim, H.Y. and Kim J.D. 2003. Survival and physiological response of olive flounder *Paralichthys olivaceus* exposed to seawater chlorinated by ClO_2 . *Journal of Aquaculture* 16, 151–158 (Korean).
- Kim, J.M. 2001. Use of ClO_2 as a biocide in the food industry., *Food Indust & Nutr*, 6, 33–39
- Kim, H.Y, and Kim, J.D. 2003. Survival and Physiological Response of Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus* Exposed to Seawater Chlorinated by ClO_2 . *J. of Aquaculture*. Vol. 16, 151–158.
- Kim, J.H., Park J.Y., Lee J.Y., Lee J.H., Hwang H.K. and Cho J.K. 2017. Effects of ammonia exposure on survival rate and hematological characteristics changes in juveniles of sevenband grouper, *Eponephelus septemfasciatus*. *Korean Journal of Ichthyology* 29, 13–21.

- Lambert, C. and Nicolas J.L. 1998. Specific inhibition of chemiluminescent activity by pathogenic *Vibrios* in hemocytes of two marine bivalves: *Pecten maximus* and *Crassostrea gigas*. J. Invertebr. Pathol. 71, 53-63.
- Lopez-Galindo, C., Garrido, M.C., and Casanueva, J.F., Nebot, E., 2010. Degradation models and ecotoxicity in marine waters of two antifouling compounds: Sodium Hypochlorite and an alkylamine surfactant, Science of the Total Environment 408, 1779-1785
- Torres, L. and Partida L. 2001. Bacteria isolated on TCBS media associated with hatched *Artemia* cysts of commercial brands. Aquaculture 194, 11 - 20
- Mzimba, L.M. 2013. The effect of disinfection on survival and feed quality of rotifers (*Brachinous plicatilis*) and brine shrimp (*Artemia salina*). UNU-Fisheries Training Programme. P.O. Box 1390, Skulagata 4, Reykjavik, Iceland.
- Vannoni, M., Creach, V., Barry, J., and Sheahan, D. 2018. Chlorine Toxicity to *Navicula Pelliculosa* and *Achnanthes Spp.* In a Flow-Through System: The Use of Immobilised Microalgae and Variable Chlorophyll Fluorescence. Aquat Toxicol. 202, 80-89.
- Muroga, K., 1990. Bacterial infections of cultured fishes in Japan. In: R. Hirano and I. Hanyu (Editors). The second Asian Fisheries Forum. Asian Fisheries Society, Manila, pp. 963-966.
- National Institute of Environmental Research (NIER), 2013. National Institute of Environmental Research, Incheon Metropolitan City, Korea

- Ogata, N. and Shibata, T. 2008. Protective effect of low-concentration ClO₂ gas against influenza A virus infection. *Journal of General Virology* 89, 60 - 67.
- Oh, M.J, Kim H.Y. and Cho, H.S. 1999. Disinfection of Culture Water Supply by Ozonization I. Susceptibility of Some Fish-Pathogenic Bacteria Isolated From Cultured Marine Fish. *J. Fish Pathol.*, 12, 42-48.
- Otta, S.K., Shubha, G., Joseph, B., Chakraborty, A., Karunasagar, I. and Karunasagar, I. 1999 Polymerase chain reaction (PCR) detection of white spot syndrome virus (WSSV) in cultured and wild crustaceans in India. *Diseases of Aquatic Organisms* 38, 67 - 70.
- Park, K.H., Oh M.J., and Kim H.Y. 2003. Disinfection effect of ClO₂ on pathogenic bacteria from marine fish. *Journal of Fish Pathology* 16, 118-123 (Korean).
- Park, E.J., Gray, P.M., Oh, S.W., Kronenberg, J., Kang, D.H. 2008. Efficacy of FIT Produce Wash and ClO₂ on Pathogen Control in Fresh Potatoes. *Journal of Food Science*, 73(6), M278 - M282.
- Park, K.H, Oh, M.J, and Kim, H.Y.. 2003. Disinfection Effect of ClO₂ on Pathogenic Bacteria from Marine Fish. *J. of Aquaculture*. Vol. 16, 118-123, 2003
- Pascho, R.J., Landolt M.L. and Ongerth, J.E. 1995. Inactivation of *Renibacterium salmoninarum* by free chlorine. *Aquaculture*, 131, 165-175.
- Plummer, J.D. and Edzwald, J. K. 2001. Effect of ozone on algae as precursors for trihalomethane and haloacetic acid production,

- Environ. Sci. Technol., 35, 3661–3668.
- Ringø E., Olsen R.E., Jensen I., Romero J., and Lauzon H.L. 2014. Application of vaccines and dietary supplements in aquaculture: possibilities and challenges. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 24, 1005–1032.
- Schroeder, J.P., Klatt S.F., Schlachter M., Zablotzki Y., Keuter S., Spieck E., and Schulz C.. 2014. Impact of ozonation and residual ozone-produced oxidants on the nitrification performance of moving-bed biofilters from marine recirculating aquaculture systems. *Aquacultural Engineering* 65, 27–36.
- Skjermo, J., Salvesen, I., Øie, G., Olsen, Y., and Vadstein, O. 1997. Microbially matured water: a technique for selection of a non-opportunistic bacterial flora in water that may improve performance of marine larvae. *Aquaculture International*, 5, 13 - 28.
- Sogawa, K., Okawa, R., Yachiku, K., Shiozaki, M., Miura, T., Takayanagi, H., Shibata, T., and Ezoe, S. 2020. Effects of continuous exposure to low concentration of ClO₂ gas on the growth, viability, and maintenance of undifferentiated MSCs in long-term cultures. *Regenerative Therapy*, 14, 184 - 190.
- Spiliotopoulou, A., Rojas-Tirado P., Chhetri R.K., Kaarsholm K.M.S., Martin R., Pedersen P.B., Pedersen R.F., and Andersen H.R. 2018. Ozonation control and effects of ozone on water quality in recirculating aquaculture systems. *Water Research*, 20, 289–298.
- Svecevicius, G., Syvokiene J., Stasiunaite P., and Mickeniene L. 2005.

- Acute and chronic toxicity of ClO_2 and (ClO_2^-) to rainbow trout (*Onchorhynchus mikiss*). Environmental Science and Pollution Research 12, 302-305.
- Verdonck, L., Swings J., Kersters K., Dehasque M., Sorgeloos P., and Leger P. 1994; Variability of the microbial environment of rotifer *Brachionis plicatilis* and *Artemia* production systems. J World Aquacult Soc 25, 55 - 59
- Wilde, E.W., Soracco R.J., Mayack L.A., Shealy R.L., Broadwell T.L., and Steffen R.F., 1983. Comparison of chlorine and ClO_2 toxicity to fathead minnows (*Pimephales promelas*) and bluegill (*Lepomis macrochirus*). Water Res 17, 1327 - 1332
- Blogoslawski, W.J. Perez, C., and Hitchens, C., 1992. Ozone Treatment of Seawater to Control Vibriosis in Mariculture of Penaeid Shrimp, *Penaeus vannamei* in Proceedings of the Third International Symposium on The Use of Ozone in Aquatic Systems. September 8-11, 1992, Greenwich, CT, W.J. Blogoslawski, (Ed.) (Stamford, CT: Intl. Ozone Assoc., Pan American Group, 1992), pp. 131-141
- Yoshimizu, M., Hyuga, S., Itoh, S., Ezura Y., and Minura, S. 1995. Disinfectant effect of oxidant produced by ozonization of sea water on fish pathogenic viruses, bacteria, and ciliata. (in) Disease in Asian Aquaculture II. (ed) M. Schariff, J. R. Arthur and Subasianghe, Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, pp. 203-209.
- Zoni, R., Zanelli, R., Riboldi, E., Bigliardi, L., and Sansebastiano, G.

2007. Investigation on virucidal activity of ClO₂ experimental data on feline calicivirus, HAV and Cocksackie B5. Journal of Preventive Medicine and Hygiene 48, 91 - 95.

