

반순환여과시스템에서 오존 유래 잔류산화물 농도에 따른 넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 성장과 생리학적 변화

정상명 · 박우근 · 박정환¹ · 김재원 · 김병기*

강원도립대학교 해양양식식품과, ¹부경대학교 해양바이오신소재학과

Growth Performance and Physiological Changes of Olive Flounder *Paralichthys olivaceus* by Concentration of Ozone Produced Oxidants in Semi-RAS

Sangmyung Jung, Woogeun Park, Jeonghwan Park¹, Jaewon Kim and Pyong-kih Kim*

Department of Aquaculture and Seafood, Gangwon State University, Gangneung 25425, Korea

¹Department of Marine Bio-Materials and Aquaculture, Pukyong National University, Busan 48547, Korea

This study investigated the effects of ozone-produced oxidants (OPO) on the growth, hematology, and histology of olive flounder *Paralichthys olivaceus* (average weight 500 g), raised in an ozonated semi-recirculating aquaculture system. The system was ozonated to maintained OPO concentrations of 0.004 (Control), 0.014 (OPO15), and 0.025 (OPO25) mg Cl₂/L in culture tanks for 26 days. The specific growth rate, feed conversion ratio, and survival rate did not significantly differ among the groups (P>0.05), while the daily feeding rate decreased OPO-dose-dependently (P<0.05). OPO appeared to affect the gill, hepatopancreas, and kidney tissues of fish from ozonated tanks. Hematologically, OPO affected some blood indices. The levels of chloride, glucose, glutamic oxaloacetic transaminase, and glutamic pyruvic transaminase were significantly increased in the ozonated groups, while the total cholesterol and cortisol decreased dose-dependently. These results imply that long-term exposure of olive flounder to an OPO concentration ≥ 0.014 mg Cl₂/L might result in damage to the gill, hepatopancreas, and kidney tissues and cause physiological stress, albeit with no apparent short-term effects on growth or survival.

Key word: Ozone, Ozone-produced oxidants, Semi-RAS, Hematology, Histology

서 론

넙치(*Paralichthys olivaceus*)는 우리나라 해산어류 양식산업에서 중요한 위치를 차지하고 있으며, 양식넙치의 약 60%가 생산되는 제주도에서는 중요 산업으로 자리 잡고 있다(KOSIS, 2018). 제주도 남동부 연안은 지하해수의 활용이 용이하여 자연스럽게 양식장의 밀집화가 이루어졌으며, 넙치의 서식생태를 고려하여 사육과 시설관리가 용이한 육상수조에서 유수식으로 넙치를 사육하고 있다(Kim and Kang, 2011). 그러나 밀식과 점진적으로 증가하는 질병 발생으로 환수량이 점차 증가하였다. 결국 지하해수의 적극적인 활용과 환수량의 증가 등의

대응은 운영 경비의 증가시켜 수익성은 감소하였고(Park et al., 2014a), 연안해수의 자가오염을 마저 일으키고 있다(Roh et al., 2018). 또 다른 대응방안인 사육수의 재사용은 운영경비 절감에는 도움이 될 수 있으나, 재사용된 사육수에 혼재된 잔여사료와 분변은 사육수질을 크게 악화시키며, 오히려 질병확산에 기여한다. 하물며 배출수 오염물질총량은 기존과 차이가 없어 연안해수의 자가오염을 방지하기는 어렵다. 따라서 최근에는 사육수의 수온, 수질 그리고 병원성 미생물의 관리가 용이한 순환여과시스템의 도입이 검토되고 있다. 순환여과시스템은 독립적으로 통제된 양식 환경의 조성이 가능하고, 수온 및 수질의 급격한 변화에 적극적으로 대응할 수 있다. 또한 제주도의 경우 사

*Corresponding author: Tel: +82. 33. 660. 8221 Fax: +82. 33. 660. 8225

E-mail address: pkkim@gw.ac.kr



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2018.0688>

Korean J Fish Aquat Sci 51(6), 688-696, December 2018

Received 21 November 2018; Revised 5 December 2018; Accepted 14 December 2018

저자 직위: 정상명(연구원), 박우근(연구원), 박정환(교수), 김재원(교수), 김병기(교수)

육수의 일간 환수량은 시설 수량 대비 15-30배(NFRDI, 2016)인 것을 감안하면 순환여과시스템은 비교적 적은 환수량으로 넙치의 육성이 가능하며, 오염물질의 수처리가 가능하여 연안의 자가오염을 방지할 수 있다. 순환여과시스템의 양식생물의 질병에 대응하는 방법 중에서 오존산화법이 널리 활용되고 있으며, 오존은 상태 불안정성으로 인한 자가분해성 산화반응과 ozone produced oxidants (OPO)와 같은 2차 산화물들의 연쇄적 산화작용으로 효과가 나타난다(Haag and Hoigne, 1984). 순환여과시스템에 오존의 적용은 북미 및 북서 유럽지역을 중심으로 지속적으로 증가하고 있으며(Sharrer and Summerfelt, 2007; Davidson et al., 2011), 순환여과시스템에 널리 적용되는 공정들(Sedimentation, Foam fractionation, Biological filter)과 병용 시 사육수의 고형물질 제거 성능이 향상되는 것으로 보고되고 있다(Krumins et al., 2001; Park et al., 2011, Schroeder et al., 2015). 또한 오존은 병원성 미생물과 바이러스의 사멸능력이 탁월하고(Liltved et al., 2006; Sharrer and Summerfelt, 2007; Jensen et al., 2011; Cobcroft and Battaglene, 2013), 질소화합물의 감소효과가 있는 것으로 보고되어 있다(Tango and Gagnon, 2003; Schroeder et al., 2011; Wold et al., 2014). 그럼에도 불구하고 해수에서 오존 처리시 발생하는 OPO는 독성이 매우 강하고 장시간 동안 잔류하여 양식생물에게 유해한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Paller and Heidinger, 1980; Oh et al., 1999; Ritola et al., 2002; Reiser et al., 2011). 따라서 양식용수 중에 포함된 병원성 미생물을 질병 예방 차원의 유효성 있는 수준으로 낮춰 운전하려면 상대적으로 양식 생물에 대한 안전성 확보가 더욱 어려워진다. 또한 양식어종마다 OPO에 대한 내성이 상이하여 생물 위해성의 공정 표준화가 어려우며, 수질 환경에 따라 그 효과와 메커니즘의 차이가 있어 명확한 활용 방법을 제시하지 못하고 있다. 오존을 순환여과시스템의 수처리 성능 향상과 질병 대응에 적절하게 사용한다면 양식 생산성 향상에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료되나, 국내의 경우 상업적 목적의 해산 어류 양식장에 안정적으로 활용한 사례가 매우 적어 양식어민들이 현장의 도입에 대한 우려가 상존하고 있다. 따라서 본 연구는 오존이 적용된 상업적인 반순환여과시스템(semi-RAS)에서 넙치를 장기간 사육하면서 성장 효과와 주요 장기 및 혈액 성분의 생리학적 변화를 조사하여 실제 넙치양식 산업에 적용 가능한 적정농도를 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

사육시스템

사육용 순환여과시스템은 Fig. 1과 같이 poly-propylene (PP) 원형사육수조(ø 4 m × H 1 m, 2개), 살수식 생물여과조(ø 1.6 m × H 2 m, 1개, 직경 2-3 mm 스티로폼 비드 여과매질로 이용), 거품분리기(ø 0.9 m × H 2.5 m, 1개) 및 침전조(ø 0.7 m × H 1.2 m, 1개)로 구성하였다. 일간 보충 수량은 시설 수량(총 35 m³)의

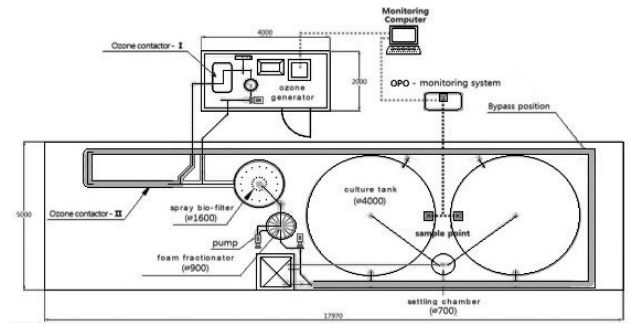


Fig. 1. Experimental semi-RAS system.

3배로, 내부 순환율은 일간 24회전으로 각각 설정하였다.

오존시스템과 주입 농도

오존은 산소발생기(Aqua 7L, Oxus, Gapyeong, Korea)에서 생성된 순도 95%이상의 고순도 산소를 수냉식 오존발생기(OZN-100, Ozone Engineering, Incheon, Korea)에 공급하여 발생시켰으며, 생산된 오존은 내부 순환수와 연결된 용해기(SUS316, Ozone Engineering, Incheon, Korea)로 용해하였다. 오존이 용해된 내부순환수는 저수조에서 전체 내부순환수와 혼합된 후 사육조로 유입되도록 하였다. 오존시스템의 오존 주입 농도와 주입 시간은 사육수조내의 OPO 농도를 기준으로 조절하였다. 수중 OPO 농도는 DPD (N,N-diethyl-p-phenylenediamine) 발색법을 이용하여(CLX online residual oxidant and chlorine monitor, 0-10 mg Cl₂/L) 측정하였다(Buchan et al., 2005). 사육수의 오존주입 운전농도는 Oh et al. (1999)와 Park et al. (2018)의 결과를 참고하여 OPO 농도기준으로 0.004 ± 0.005 mg Cl₂/L (Control), 0.014 ± 0.009 mg Cl₂/L (OPO15), 0.025 ± 0.010 mg Cl₂/L (OPO25)가 되도록 유지하였다(P < 0.05). 오존 주입량은 사육수내 OPO 농도를 90초 간격(일간 960회)으로 측정하여 오존발생기에 반영하여 자동 제어하였다.

어류의 수용 및 사육 조건

평균 체중 500 g 크기의 넙치를 실험 수조에 2반복으로 수용하고 실험을 실시하였다. 실제 넙치 육성시 성장이 빠르며 질병에 노출되기 쉬운 하절기의 양식현장에 부합하는 실험환경을 조성하고자, 수용 밀도는 상업적 수준인 수조당 20 kg/m²으로 수용하고, 총 어체 중량이 각각 250 kg이 되도록 하였다. 일간 2회(09:00, 18:00) 실험사료(광어블루칩 상품사료, Woosung, Daejeon, Korea)를 만복 공급하였으며, 각각의 실험구는 동일한 시설에서 26일간씩 반복으로 진행하였다. 각 실험구의 사육 환경은 Table 1과 같으며, 수질항목은 사료 공급 30분 후 휴대용 수질측정기(Pro series, YSI Inc., Yellow Springs, USA)를 사용하여 측정하였다.

성장지표와 생존율

OPO 농도가 넙치에 미치는 영향을 조사하기 위해 실험 종료 시에 사료계수($FCR = \text{Dry feed intake} / \text{Fish weight gain}$), 일간 사료섭취율($DFI = \text{Dry feed intake} \times 100 / [(\text{initial wt.} + \text{final wt.} + \text{dead fish wt.}) / 2] \times \text{days fed, \% / day}$), 일간성장률($SGR = [(\text{In total Wt}_{\text{end}} - \text{In total Wt}_{\text{initial}}) / \text{days}] \times 100, \% / \text{day}$) 그리고 생존율($\text{Survival rate} = (\text{final number} / \text{initial number}) \times 100, \%$)을 산출하였다. 또한 각 실험구 당 20마리씩 ID Chip (FDX-B 12 mm implantable tag, TROVAN, North Ferriby, UK)을 각 개체에 삽입하였고, Reader (LID-560ISO Pocket Reader, TROVAN, North Ferriby, UK)를 이용하여 개체의 일간성장률($iSGR = [(\text{In individual Wt}_{\text{end}} - \text{In individual Wt}_{\text{initial}}) / \text{days}] \times 100, \% / \text{day}$)을 산출하였다.

주요장기의 조직학적 분석

각 실험구의 최종 실험종료일에 수집된 5마리의 넙치에서 아가미, 신장, 간을 절취하고 광학현미경을 이용하여 오존 주입에 따른 각 기관의 조직학적인 차이를 관찰하였다. 각 어체를 해부하여 각 기관별(아가미, 신장, 간)로 bouin's solution에 일정시간 고정 후, 각 기관계를 광학현미경(BX-100, Leica, Wetzlar, Germany)으로 관찰하기 위하여 파라핀 포매법을 이용하여 표본을 제작하였다.

혈액 조성

실험 종료 시 혈액 조성 조사를 위하여 채혈 1일전에 절식하였으며, 넙치 25마리를 각 실험구에서 무작위로 선발하여 미부정

맥에서 채혈하였다. 채혈된 혈액은 냉장고에서 3시간 동안 응고한 후 원심분리기(MF 300, Hanil sci., Seoul, Korea, 3,000 rpm, 10 min)를 이용하여 상등부의 혈장(Serum)을 수집하였다. 수집한 혈장을 이용하여 osmolality, sodium, potassium, chloride, glucose, total protein, triglyceride, total cholesterol, glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), glutamic pyruvic transaminase (GPT), cortisol을 측정하였다.

통계처리

본 실험에 대한 결과는 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 로 나타내었고, SPSS Ver. 16.0 프로그램을 사용해 One-way ANOVA로 검증한 후, $P < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test로 유의성을 비교하였다. Correlation method는 동 프로그램을 사용하여 simple correlation analysis로 검증하였으며, Pearson correlation coefficient를 이용하여 OPO 노출농도와 혈액성분간의 관련성을 조사하였다.

결 과

성장 효과

OPO 농도에 따른 넙치의 성장 효과는 Table 2에 나타내었다. 실험에 사용한 넙치에서는 OPO 노출농도에 따라 FCR, SGR, iSGR, 생존율은 유의하게 차이가 없었다($P > 0.05$). 그러나 iSGR은 P 값이 0.052로 나타나 0.1 신뢰수준에서는 OPO15에서 0.82 ± 0.55 로 $0.45 \pm 0.55\% / \text{day}$ 의 개체 일간 성장률을 보인 OPO25 실험구에 비해 높았던 반면 대조구와는 차이가 없었다

Table 1. Water environment for the experiment

	Water temp. (°C)	DO (mg/L)	Salinity (psu)	pH	OPO ¹ (mg Cl ₂ /L)
Control	24.0±1.2	8.9±1.2	31.6±0.2	7.3±0.3	0.004±0.005 ^a
OPO15 ²	20.0±2.1	8.4±1.0	31.5±0.4	7.2±0.5	0.014±0.009 ^b
OPO25 ³	22.5±0.5	7.8±1.0	31.2±0.6	7.3±0.4	0.025±0.010 ^c

¹OPO was measured with Residual Chlorine meter (CLX Online Residual Oxidant and Chlorine Monitor, USA). And Values in each row with the different superscripts are significantly different ($P < 0.05$). ²OPO concentration of 0.014±0.009 mg Cl₂/L or 0.036±0.025 mg Br₂/L.

³OPO concentration of 0.025±0.010 mg Cl₂/L or 0.056±0.025 mg Br₂/L. DO, Dissolved oxygen; OPO, Ozone produced oxidants.

Table 2. Growth performance of olive flounder *Paralichthys olivaceus* reared with 3 different OPO concentrations for 26 days

		Experimental groups			P value
		Control	OPO15	OPO25	
FCR	-	2.06±0.06	1.79±0.29	2.95±2.26	0.686
DFI	%/day	0.88±0.06 ^a	1.05±0.14 ^a	0.44±0.08 ^b	0.021
SGR	%/day	0.43±0.02	0.60±0.18	0.29±0.20	0.201
iSGR	%/day	0.77±0.38	0.82±0.55	0.45±0.55	0.052
Survival rate	%	94.23±1.95	94.23±1.19	69.00±17.00	0.150

Values in each row with the different superscripts are significantly different ($P < 0.05$). FCR, Feed conversion ratio; DFI, Daily feed intake; SGR, Specific growth rate; iSGR, Individual specific growth rate; OPO, Ozone produced oxidants.



Fig. 2. Histological changes of the gill of olive flounder *Paralichthys olivaceus* depending on the ozone injection rates. A: Control. Showing the gill lamellae (GI). B: OPO15 group. H-E section showing the clubbed type of gill lamellae. C: OPO25 group. Note the hypertrophy and the epithelial cell lifting of gill lamellae. OPO, Ozone produced oxidants.

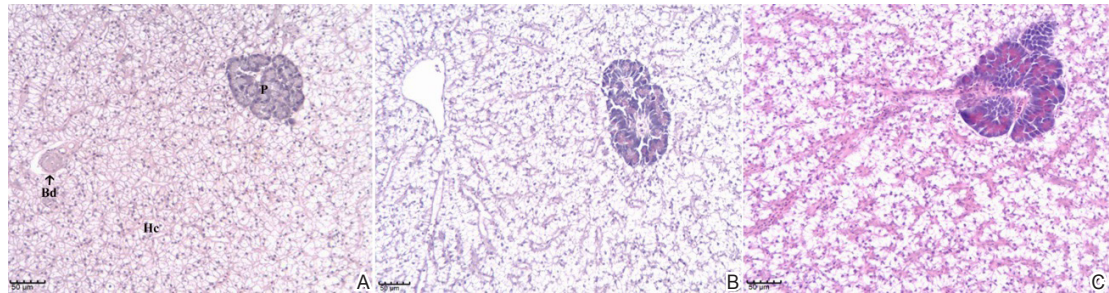


Fig. 3. Histological changes of the liver of olive flounder *Paralichthys olivaceus* depending on the ozone injection rates. A: Control. Note the hepatic cell (Hc), pancreas (P) and bile duct (Bd). B: OPO15 group. a little degeneration of hepatic cells and zymogen granules. C: OPO25 group. Note the degeneration of hepatic cells and the abnormal type of pancreas. OPO, Ozone produced oxidants.

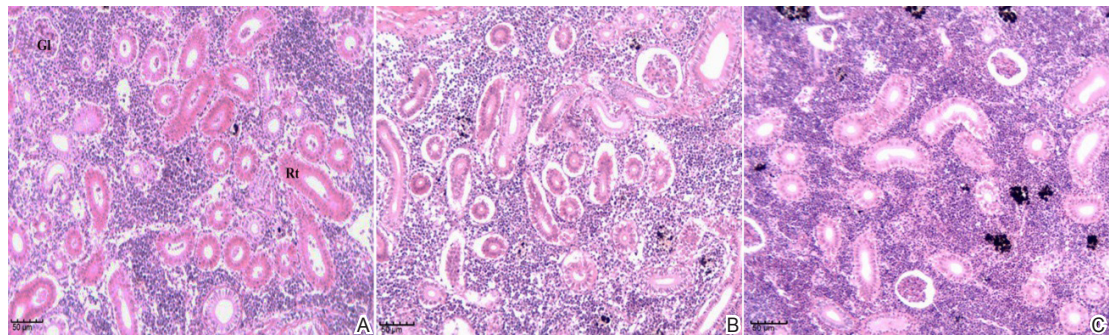


Fig. 4. Histological changes of the kidney of olive flounder *Paralichthys olivaceus* depending on the ozone injection rates. A: Control. Note normal glomerulus (Gl) and renal tubule (Rt). B: OPO15 group. Note a little activated melano-macrophagocytes and the hypertrophied epithelia of renal tubules. D: OPO25 group. Section showing the deformation and degeneration of glomerulus and renal tubule.

Fig. 5 Blood analysis of olive flounder *Paralichthys olivaceus* reared at different OPO concentration. OPO, Ozone produced oxidants.

($P < 0.1$). 또한 DFI도 OPO15에서 $1.05 \pm 0.14\%/day$ 로 OPO25보다 높았고 대조구와는 차이가 없었다($P < 0.05$).

주요 장기조직의 변화

OPO에 노출된 넙치의 주요장기조직의 변화를 Fig. 2-4에 나

타내었다. 아가미, 간췌장, 신장의 조직학적인 변화가 대조구에서는 관찰되지 않았으나, OPO15 실험구의 아가미 조직의 표피세포에서 넓은 범위의 부종이 관찰되었으며, 새판이 비대하여 곤봉화되었다. 그리고 일부 새판이 과다 증식되어 융합되어 있었다. 간췌장은 비대되어 있었고 효소 분비 과립이 퇴화되는

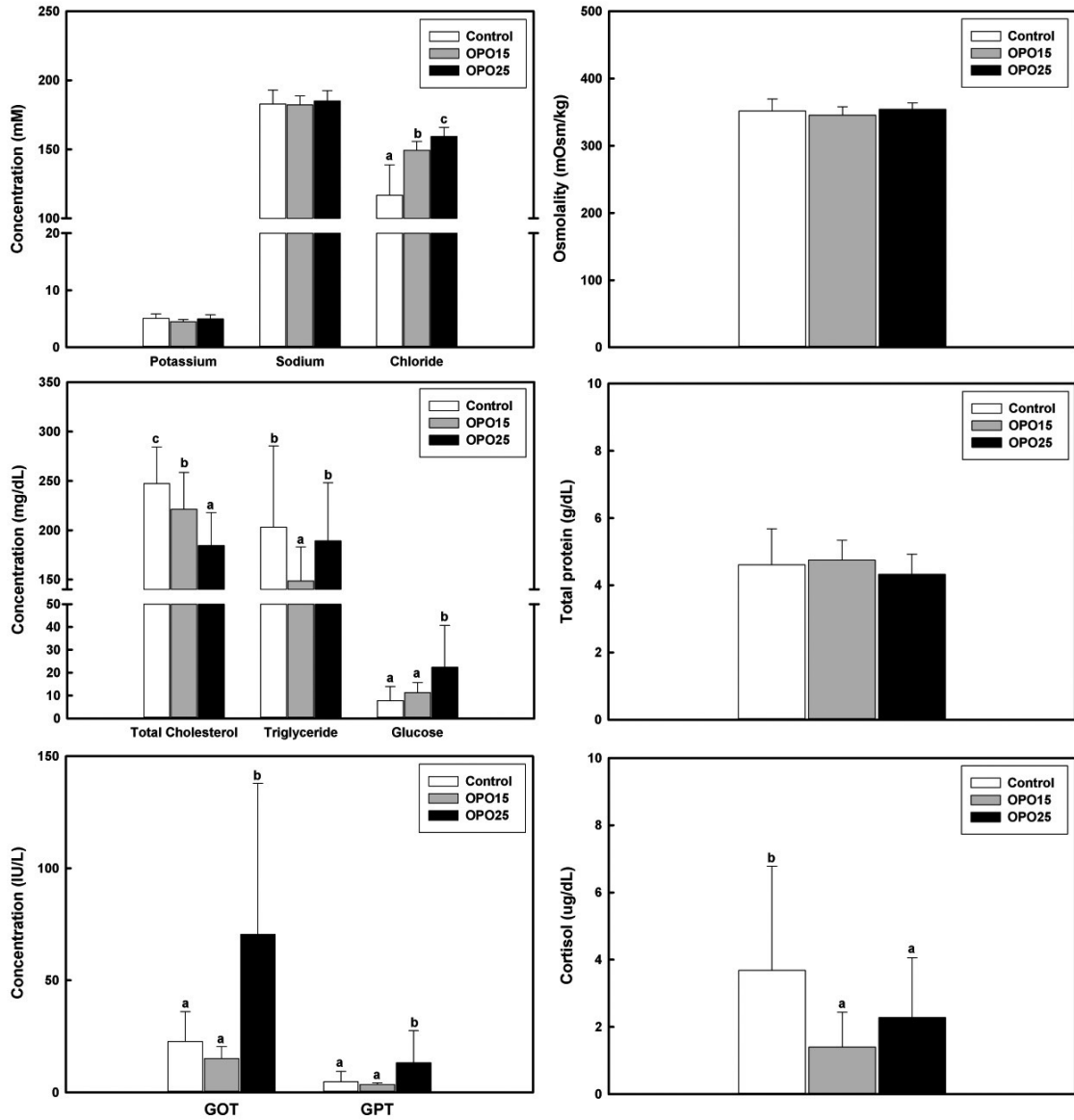


Fig. 5. Blood analysis of olive flounder *Paralichthys olivaceus* reared at different OPO concentration. OPO, Ozone produced oxidants; GOT, Glutamic oxaloacetic transaminase; GPT, Glutamic pyruvic transaminase.

것으로 나타났으며, 신장 조직에서 신관의 표피가 약간 비대해져 있었다. OPO25 실험구에서는 새관이 심각하게 융합되어 표피세포가 용기되고 심하게 괴사되어 있었으며, 간에서 담낭 세포의 퇴화 현상이 관찰되었다. 신장은 신관이 상당히 비대하였으며, 일부 신관조직이 융합되었다. 대조구와 비교한 OPO 노출 실험구들의 주요 장기에서 비정상적인 변화가 관찰되었다.

혈액조성 변화

OPO 농도에 따른 넙치 주요 혈액성분의 변화는 Fig. 5와 같다. 혈액 성분 중 전해질 항목에서 osmolality, sodium, potas-

sium은 유의적인 차이가 없었다($P>0.05$). 그러나 혈장 중 큰 구성비를 가지며 대표적인 음이온인 chloride는 대조구에서 116.7 ± 22.0 mM, OPO15에서 149.4 ± 6.3 mM, OPO25에서 159.4 ± 6.5 mM로 OPO 농도 의존적으로 증가하였다($P<0.05$). 에너지 지표에서는 total protein은 유의적 차이가 없었으나 ($P>0.05$), total cholesterol은 대조구, OPO15, OPO25에서 각각 247.0 ± 36.7 , 221.3 ± 37.4 , 184.4 ± 33.4 mg/dL로 OPO 농도가 증가하면서 감소하였다($P<0.05$). glucose의 경우, 대조구, OPO15, OPO25에서 각각 7.7 ± 6.2 , 11.3 ± 4.3 , 22.4 ± 18.2 mg/dL로 OPO 농도 의존적으로 증가하였다($P<0.05$). 그러나,

triglyceride는 대조구에서 203.2 ± 82.3 mg/dL, OPO15에서 148.5 ± 34.6 mg/dL, OPO25 189.2 ± 59.0 mg/dL로 OPO15에서 가장 낮았다($P < 0.05$). GOT와 GPT는 대조구와 OPO15에서는 유의적인 차이가 없었다. 그러나 OPO25에서는 각각 70.5 ± 67.3 IU/L와 13.2 ± 14.2 IU/L으로 유의하게 높았다($P < 0.05$). 스트레스 지표인 cortisol은 오존을 주입한 실험구에서 유의적인 차이가 나타났다($P < 0.05$). 대조구는 3.7 ± 3.1 μ g/dL, OPO15는 1.4 ± 1.0 μ g/dL 그리고 OPO25는 2.3 ± 1.7 μ g/dL로 나타났으며, 그 중 OPO15에서 가장 낮은 값을 보였다($P < 0.05$). OPO 농도와 혈액 성분간의 상관도를 나타낸 결과는 Table. 3에 나타내었다. Pearson correlation coefficient의 결과에 의하면 osmolality, sodium, potassium, total protein, triglyceride는 관계성이 없었으며, 반면에 chloride, total cholesterol, glucose, GOT, GPT 그리고 cortisol은 OPO 농도 의존적인 관련성이 있는 것으로 나타났다.

고 찰

본 연구에서는 오존산화법을 적용한 순환여과시스템을 이용하여 상업적 수준의 넙치 양식을 하면 일어나는 OPO 노출의 영향을 성장 효과와 주요 장기 그리고 혈액지표의 변화로 비교하였다. 오존과 상업적인 넙치 양식장의 사육수의 용존 Bromine (Br)의 높은 반응성으로 오존의 형태유지가 어려우며, OPO (주로 OHBr)와 같은 2차 산화물질을 시작으로 생성된 순차적 부생성물들이 지속적인 살균 및 산화 기능을 유지한다. 이러한 과정에서 OPO는 양식수에 존재하는 유기물, 병원성 미생물, 질소 화합물 등과 다양한 요인 등과 반응하고, 동시에 양식생물에게도 피해를 주는 양면적인 부작용을 보인다(Von Gunten, 2003).

Table 3. The OPO concentration-dependent correlation of olive flounder *Paralichthys olivaceus* blood indicators (n=75)

	Average	Standard deviation	Pearson correlation coefficient	Probability of significance
Osmolality	350.23	14.15	0.040	0.760
Sodium	183.36	8.03	0.101	0.394
Potassium	4.82	0.69	-0.113	0.400
Chloride	142.20	22.65	0.792	0.000
Total protein	4.56	0.79	-0.126	0.286
Triglyceride	180.56	64.96	-0.119	0.345
Total cholesterol	216.32	43.60	-0.573	0.000
Glucose	14.55	13.21	0.482	0.000
GOT	36.27	46.62	0.385	0.001
GPT	7.17	9.63	0.331	0.004
Cortisol	2.50	2.34	-0.281	0.028

OPO, Ozone produced oxidants; GOT, Glutamic oxaloacetic transaminase; GPT, glutamic pyruvic transaminase.

이와 같은 부작용에 의하여 본 연구의 넙치의 DFI는 OPO 농도가 상승에 따라 유의적으로 감소하였다. Li et al. (2015)에 의하면 순환여과시스템에서 오존의 과도한 영향을 받은 European seabass (*Dicentrarchus labrax*)는 DFI 및 FCR이 저하되었다고 하며, Park et al. (2018) 또한 고농도 오존에 노출된 넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 DFI가 감소하였음을 보고하였다. 본 실험에서도 비슷한 경향이 나타나 OPO 0.014 mg Cl₂/L의 저농도에서는 DFI가 증가하였으나, OPO 0.025 mg Cl₂/L에서 급격하게 감소하였다($P < 0.05$). Park et al. (2018)의 결과 ORP 기준으로 400 mV 이상에서 DFI가 감소하였고, 이를 OPO 값으로 환산($Y = 0.0016X - 4.1288E^{-6}X^2 + 3.7356E^{-9}X^3 - 0.1953$, $R^2 = 0.9971$)하면 약 0.013 mg Cl₂/L 이상으로 본 연구 보다 낮은 혹은 비슷한 농도에서도 성장 감소 효과가 나타났다. 본 연구의 수온 조건(20-24°C)과 어체 크기(380-452.8 g)가 비슷한 Kim et al. (2014)의 결과에 따르면 반복 DFI는 0.9 %/day 이며 적정 DFI는 0.74 %/day 이다. 이를 본 연구의 결과와 비교하면 Control과 OPO15의 결과는 반복 DFI와 비슷하였고 적정 DFI보다는 높았다. 반면 OPO25의 결과는 반복 DFI 과 적정 DFI 보다 크게 낮아 오존영향이 있는 것으로 보여진다. 이외의 성장지표에서는 대부분 유의적인 차이가 나타나지는 않았으나, iSGR의 OPO15에서 유의적으로 상승한 것으로 나타났다($P < 0.1$). Good et al. (2011)은 ORP 250 mV 수준으로 오존을 주입한 담수 RAS에서 무지개 송어(*Oncorhynchus mykiss*)의 SGR이 상승하는 것으로 보고 하였으며, Powell et al. (2015)은 사육수조 내에서 OPO 0.017-0.037 mg Cl₂/L를 유지한 결과, 터붓(*Psetta maxima*)의 WG, DFI, FCR 모두 개선되는 것으로 나타났다. 적정수준의 오존이 주입된 보고들과 본 연구의 결과를 고려하면 적정수준의 오존주입은 성장효과를 개선할 수 있을 것으로 사료된다. 본 연구의 목적이 적정수준의 범위로 사육수 내 병원성 미생물을 관리함으로 예방효과를 나타내면서, 양식생물의 안전성 확보이므로 대조구와 OPO15간의 차이가 없는 것은 긍정적인 의미가 있다. 생존율의 경우, 모든 실험구에서 유의적인 차이는 나타나지 않았으나($P > 0.05$), OPO25에서 감소되는 경향은 뚜렷하였다. 기존의 단기간 OPO 노출 사육실험에 따르면 터붓(*Psetta maxima*, L.)은 OPO 0.06 mg Cl₂/L 그리고 감성돔(*Acanthopagrus schlegelii*)은 OPO 0.15 mg Cl₂/L에서 안정적인 생존을 보였다(Reiser et al., 2011; Park et al., 2013). 그러나 넙치(*Paralichthys olivaceus*)를 대상으로 한 Kim et al. (1999)의 OPO 단기독성 결과 따르면 0.047 mg Cl₂/L에서는 전 개체가 3시간 이내에 전량 폐사하였고, 반면 0.013 mg Cl₂/L에서 96 시간 이상 안정적으로 생존하여 넙치(*Paralichthys olivaceus*)는 다른 어종에 비하여 OPO 내성이 비교적 약한 것으로 판단된다. 본 연구의 성장효과만을 고려한다면 0.014 mg Cl₂/L 이하에서는 긍정적인 효과가 있다. 그러나 주요장기의 조직과 혈액 조성의 결과에서는 오존의 영향이 비교적 명확하게 나타났다. 어류의 아가미는 기능적인 특성으로 표면적이 넓고 대부분 상

피세포로 구성되어 있어 환경변화에 민감하게 반응하며(Lee et al., 1997), 외부유래 영양인자에 의한 성장저하 및 혈중 전해질의 변동은 대부분 아가미로부터 유래되는 것으로 추측되고 있다(Paller and Heidinger, 1980; Fivelstad et al., 2003; Stiller et al., 2015). OPO 노출에 따른 아가미 조직의 관찰 결과(Fig. 2), OPO에 노출된 넙치의 아가미 상피세포가 손상 또는 곤봉화와 같은 부종이 다수 발생되었으며, 그 결과로 주기능인 가스 교환과 삼투압조절이 원활하게 이루어지지 않았을 것으로 유추할 수 있다. 특히 염류세포의 이온수송 능력에도 변화를 일으켰을 것으로 사료되는데, 혈중 전해질 지표들의 결과와 일치하고 있다. 혈중 적혈구의 CO₂ 가스교환 메커니즘의 Cl⁻ shift에 사용된 후 혈액으로 용출되는 chloride와 외부에서 체내로 유입되는 chloride의 체외배출이 OPO 노출에 의하여 염류세포의 기능저하로 혈장 내 축적이 된 것으로 사료된다(Karnaky, 1986). 혈장내 chloride 농도 상승은 염류세포 내 이온수송과 능동전하 그리고 혈장의 이온균형의 변화를 가져올 것이며, 혈장 내 sodium과 potassium에 영향을 줄 것이다. 그러나 본 결과에서는 chloride 외에는 유의적인 차이가 나타나지 않았다(P>0.05). 유의적인 차이가 없는 sodium의 결과는 해수 진골어류의 특정 기관인 염류세포와 accessory 세포간의 세포간극을 이용한 체외배출기능은 큰 영향을 받지 않은 것으로 사료된다(Karnaky, 1986). 그러나 cortisol과의 관계도 간과할 수 없는 요소이다. 일반적으로 cortisol은 체내 에너지를 필요로 하는 다양한 생리학적 기능에 관여(Mommensen et al., 1999)하고 있으며, 외부 스트레스에 의한 급격한 변동(Barton and Iwama, 1991)이 나타나고, 이후 환경 적응에 따라 안정화 된다(Jeon et al., 2000; Park et al., 2014b; Kim et al., 2005). 이러한 cortisol의 변동 특성을 고려하면 각 실험구의 종료시점에 채혈된 혈장의 cortisol은 OPO에 노출 되어 발생된 스트레스의 지표로서 활용보다는 염류세포의 분화 및 Na⁺, K⁺-ATPase의 촉진을 일으키는 호르몬으로 기능하여 Na⁺ 배출능력을 상승시키는 체내 항상성 지표로 의미가 있다고 판단된다(Pierson et al., 2004). 그러나 본 실험의 결과 sodium의 경우 유의적 차이가 없어 cortisol과 무관하였거나, 변동특성에 따라 이미 영향을 받아 sodium 배출능력이 증가되어 안정한 것으로 추정할 수 있다. chloride의 큰 변화에도 불구하고 혈중 전해질의 총괄성을 대변하는 osmolality는 모든 실험구에서 비슷한 수준의 농도를 나타내고 있어 OPO 노출에 영향을 적응 혹은 에너지를 소비하며 최소한의 항상성을 유지하고 있는 것으로 사료된다. 진골어류는 단백질을 주요 에너지원으로 사용하여 당의 이용은 비교적 적으나, cortisol 증가에 의한 글루코스 신생합성(gluconeogenesis)으로 당의 농도가 상승(Wedwmeier et al., 1979)하여 외부 스트레스로부터 체내 항상성을 유지할 수 있도록 해준다(Vijayan and Tan, 1997). 이러한 발현 특성은 glucose를 스트레스의 지표로서 사용할 수 있게 하는 근거이다. glucose는 OPO의 노출농도 증가에 따라 상승하였으나, OPO 노출 후 26일이 지난 결과이고 cortisol의

변동 특성을 고려한다면 cortisol의 영향만으로 glucose의 증가하여 체내 항상성 유지를 위하여 높은 농도를 유지하는 것을 설명하기에는 다소 무리가 있다. 다만 실험과정에서 OPO 노출에 따라 넙치의 활동량이 감소한 것이 목측된 것으로 미루어 볼 때, 대사활동 및 운동호흡을 위한 에너지 소비감소의 영향일 수도 있으며(Lang et al., 1987), glucose를 정상수준으로 회복하게 하는 간장 및 근육으로 글리코겐 저장 및 지질 형성능력이 저하되어 증가된 것으로도 의심할 수 있다. 이러한 의심은 OPO 노출된 실험구의 total cholesterol과 triglyceride의 혈중 농도가 대조구 보다 낮게 형성된 것과 간장의 조직의 괴사 및 용착 그리고 GOT, GPT의 상승과 일치하지만, 혈액성분간의 양론적인 차이가 있어 불분명하다. total protein 또한 cortisol의 영향을 받아 변화하는 것으로 알려져 있으나(Van der Boon et al., 1991), 본 실험구간의 큰 차이가 없어 혈액에서 근육, 간장 그리고 아가미를 통한 배출과 소화기관에서의 공급이 OPO 노출농도에 따라 큰 영향이 없는 것으로 추측되며, OPO 노출농도 구간에서는 최소한의 기초 단백질 대사는 작동하는 것으로 사료된다. 간장의 건강지표로서 아민기 전이효소인 GOT와 GPT는 OPO25에서 모두 급격하게 상승하였다. 아직 넙치의 혈중 GOT, GPT의 적정 기준은 제시되어 있지 않다. 그러나 일반적으로 간장의 건강도와 직접적으로 관련되어 있으며, 일반적으로 값의 상대적인 상승은 간 건강도가 저하되는 것으로 판단되고 있다. 간장 조직관찰의 결과와 GOT, GPT 상승과 일치하고 있으며 OPO 노출에 따라 간장조직이 손상된 것으로 판단된다. Pearson correlation coefficient의 결과에 의하면 OPO 노출농도에 따른 넙치의 혈장 지표 중 chloride, total cholesterol, glucose, GOT, GPT 그리고 cortisol 순서로 관련성이 있고 유의미한 경향이 나타났으며(Table. 3), 관련된 주요장기에서도 기관손상이 관찰되어 결과가 서로 일치하는 것으로 나타났다. 다음과 같은 결과들을 종합적으로 미루어보면 주요장기는 OPO의 과도한 노출(OPO25)에 의하여 손상되며, 혈장 구성성분의 변화가 체내 항상성 유지를 위한 에너지 소비의 증가로 성장의 저하로 유발할 수 있을 것으로 유추할 수 있다. 그러나 성장지표만을 기준으로 고려한다면 OPO15에서는 대조구보다 다소 개선되어 극도의 기능손실은 일어나지 않은 것으로 사료된다. 반면에 OPO25는 SGR, iSGR, DFI 그리고 생존율의 급격한 저하와 혈액조성의 변화가 뚜렷하게 나타남에 따라 다소 위험성이 내재되어 있는 것으로 판단된다. 결론적으로 상업적인 반순환여과시스템에서 사용되는 넙치의 오존 적용 기준은 사육수조 내 기준으로 OPO 농도기준 0.014 mg Cl₂/L이하로 유지할 수 있도록 운전하는 것이 넙치에게 오존에 의한 큰 부작용 없이 안전하게 활용할 수 있을 것이며, 오존살균시스템이 적용된 순환여과시스템을 해산어류양식에 활용하기 위해서는 대상어종의 OPO에 대한 생리학적 내성 수준과 오존이 사육수 수질환경에 주는 영향 등을 충분히 고려해야 할 필요가 있다고 판단된다.

사 사

이 논문은 2016년부터 3년간 해양수산부 재원으로 한국해양과학기술진흥원(KIMST)의 지원을 받아 수행된 연구입니다(해수순환여과 요소기술을 통합한 산업형 표준모델 개발).

References

- Buchan KAH, Martin-Robichaud DJ and Benfey TJ. 2005. Measurement of dissolved ozone in sea water A comparison of methods. *Aquac Eng* 33, 225-231. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2005.02.002>.
- Barton BA and Iwama GK. 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annu Rev Fish Dis* 1, 3-26. [https://doi.org/10.1016/0959-8030\(91\)90019-G](https://doi.org/10.1016/0959-8030(91)90019-G).
- Cobcroft JM and Battaglene SC. 2013. Ultraviolet irradiation is an effective alternative to ozonation as a sea water treatment to prevent *Kudoa neurophila* (Myxozoa: Myxosporea) infection of striped trumpeter, *Latris lineata* (Forster). *J Fish Dis* 36, 57-65. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2761.2012.01413.x>.
- Davidson J, Good C, Welsh CF and Summerfelt ST. 2011. The effects of ozone and water exchange rates on water quality and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* performance in replicated water recirculating systems. *Aquac Eng* 44, 80-96. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2011.04.001>.
- Fivelstad S, Waagbø R, Zeitz SF, Hosfeld ACD, Olsen AB and Stefansson SO. 2003. A major water quality problem in smolt farms: combined effects of carbon dioxide, reduced pH and aluminium on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts: physiology and growth. *Aquaculture* 215, 339-357. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00197-7](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00197-7).
- Good C, Davidson J, Welsh C, Snekvik KR and Summerfelt ST. 2011. The effects of ozonation on performance, health and welfare of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in low-exchange water recirculation aquaculture systems. *Aquac Eng* 44, 97-102. <http://doi:10.1016/j.aquaeng.2011.04.003>.
- Haag W and Hoigne J. 1984. Kinetics and products of the reactions of ozone with various forms of chlorine and bromide in water. *Ozone Sci Eng* 6, 103-114. <http://dx.doi.org/10.1080/0191951848551009>.
- Jeon JK, Kim PK, Myoung JG and Kim JM. 2000. Changes of serum cortisol concentration and stress responses in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) to netting. *J Kor Fish Soc* 33, 115-118.
- Jensen MA, Ritar AJ, Burke CM and Ward LR. 2011. Seawater ozonation and formalin disinfection for the larval culture of eastern rock lobster, *Jasus* (*Sagmariasus*) *verreauxi*, phyllosoma. *Aquaculture* 318, 213-222. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2011.05.001>.
- Kim HY, Oh MJ and Jung SJ. 1999. Acute Toxicity of Ozone on Survival and Physiological Conditions of Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J Fish Pathol* 12, 32-41.
- Kim JO and Kang SK. 2011. Economic Impact Effect Analysis of Flounder Aquaculture Industry in Jeju. *J Fish Bus Adm* 42, 85-96.
- Kim PK, Kim Y and Jeon JK. 2005. Use of Dietary Salt to Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) for Increasing Seawater Adaptability. *J Aquaculture* 18, 69-75.
- Kim SS, Kim KW, Kim KD, Lee BJ, Han HS, Kim JW Bai SC and Lee KJ. 2014. Optimum Feeding Rate for Sub-adult Olive Flounder (384 g) *Paralichthys olivaceus* Fed Practical Extruded Pellets at Optimum Water Temperatures (20-24.5°C). *Korean J Fish Aquat Sci* 47, 582-587. <http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2014.0582>.
- Karnaky KJ. 1986. Structure and function of the chloride cell of *Fundulus heteroclitus* and other teleosts. *Integr Comp Biol* 26, 209-224. <https://doi.org/10.1093/icb/26.1.209>.
- KOSIS (Korean Statistical Information Service). 2018. Research on fish aquaculture trends. Retrieved from http://kosis.kr/statHtml/statHtml.do?orgId=101&tblId=DT_1EZ0008&vw_cd=MT_ZTITLE&list_id=F38&seqNo=&lang_mode=ko&language=kor&obj_var_id=&itm_id=&conn_path=MT_ZTITLE on Nov 20, 2018.
- Krumins V, Ebeling JM and Wheaton FW. 2001. Ozone's effects on power-law particle size distribution in recirculating aquaculture systems. *Aquac Eng* 25, 13-24. [https://doi.org/10.1016/S0144-8609\(01\)00064-4](https://doi.org/10.1016/S0144-8609(01)00064-4).
- Lang T, Peters G, Hoffmann R and Meyer E. 1987. Experimental investigations on the toxicity of ammonia-effects on ventilation frequency, growth, epidermal mucous cells, and gill structure of rainbow-trout *Salmo gairdneri*. *Dis Aquat Org* 3, 159-165.
- Lee YC, Chang YJ and Lee BK. 1997. Osmoregulation capability of juvenile grey mullets (*Mugil cephalus*) with the different salinities. *Korean J Fish Aquat Sci* 30, 216-224.
- Liltved H, Vogelsang C, Modahl I and Dannevig BH. 2006. High resistance of fish pathogenic viruses to UV irradiation and ozonated seawater. *Aquac Eng* 34, 72-82. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2005.05.002>.
- Li X, Przybyla C, Triplet S, Liu Y and Blancheton JP. 2015. Long-term effects of moderate elevation of oxidation-reduction potential on European seabass (*Dicentrarchus labrax*) in recirculating aquaculture systems. *Aquac Eng* 64, 15-19. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2014.11.006>.
- Mommsen TP, Vijayan MM and Moon TW. 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Rev Fish Biol Fish* 9, 211-268. <https://doi.org/10.1023/A:1008924418720>.
- NFRDI (National Institute of Fisheries Science). 2016. Standard manual of Olive Flounder culture. Retrieved from <http://www.nifs.go.kr/adms/ebook/flatfish/index.html#page=50> on Sep 7, 2018.

- Oh MJ, HY Kim and HS Cho. 1999. Disinfection of culture water supply by ozonization : 1. Susceptibility of some fish-pathogenic bacteria isolated from culture marine fish. *J Fish Pathol* 12, 32-41.
- Paller MH and RC Heidinger. 1980. Mechanisms of delayed ozone toxicity to bluegill *Lepomis macrochirus* rafinesque. *Environ. Pollut* 22, 226-239. [https://doi.org/10.1016/0143-1471\(80\)90017-3](https://doi.org/10.1016/0143-1471(80)90017-3).
- Park J, Kim Y, Kim PK and Daniels HV. 2011. Effects of two different ozone doses on seawater recirculating systems for black sea bream *Acanthopagrus schlegeli* (Bleeker): removal of solids and bacteria by foam fractionation. *Aquac Eng* 44, 19-24. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2010.11.001>.
- Park J, Kim PK, Lim T and Daniels HV. 2013. Ozonation seawater recirculating system for black seabream *Acanthopagrus schlegelii* (Bleeker): Effects on solids, bacteria, water clarity, and color. *Aquac Eng* 55, 1-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaeng.2013.01.002>.
- Park NB, Lee HY, Kim SM and Lee JS. 2014a. Nitrification and Denitrification of land-base fish farm wastewater using an anaerobic upflow biological aerated filter. *Korean J Fish Aquat Sci* 47, 622-629. <http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2014.0622>.
- Park SD, Kim PK and Jeon JK. 2014b. Effect of Ammonia Concentration in Rearing Water on Growth and Blood Components of the Parrotfish *Oplegnathus fasciatus*. *Korean J Fish Aquat Sci* 47, 840-846. <http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2014.0840>.
- Park SD, Kim YH, Park J and Kim PK. 2018. Changes in Water Quality and Bacterial Compositions in Culture Water of an Ozonated Flounder Farm. *Korean J Environ Biol* 36, 90-97. <https://doi.org/10.11626/KJEB.2018.36.1.090>.
- Pierson PM, Lamers A, Flik G and Mayer-Gostan N. 2004. The stress axis, stanniocalcin, and ion balance in rainbow trout. *Gen Comp Endocrinol* 137, 263-271. <http://doi:10.1016/j.ygcen.2004.03.010>.
- Powell A, Chingombe P, Lupatsch I, Shields RJ and Lloyd R. 2015. The effect of ozone on water quality and survival of turbot (*Psetta maxima*) maintained in a recirculating aquaculture system. *Aquac Eng* 64, 20-24. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaeng.2014.11.005>.
- Reiser S, Wuertz S, Schroeder JP, Kloas W and Hanel R. 2011. Risks of seawater ozonation in recirculation aquaculture - Effects of oxidative stress on animal welfare of juvenile turbot (*Psetta maxima*, L.). *Aquat Toxicol* 105, 508-517. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.08.004>.
- Ritola O, Peters LD, Livingstone DR and Lindstrom-Seppa P. 2002. Effects of *in vitro* exposure to ozone and/or hyperoxia on superoxide dismutase, catalase, glutathione and lipid peroxidation in red blood cells and plasma of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquac Res* 33, 165-175. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2002.00649.x>.
- Roh HJ, Lim YJ, Kim A, Kim NE, Kim Y, Park NB, Hwang JY, Kwon MG and Kim DH. 2018. Distribution of Indicator Bacteria in Seawater off the Coast of Jeju Island. *Korean J Fish Aquat Sci* 51, 450-455. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2018.0450>.
- Schroeder JP, Croot PL, Von Dewitz B, Waller U and Hanel R. 2011. Potential and limitations of ozone for the removal of ammonia, nitrite, and yellow substances in marine recirculating aquaculture systems. *Aquac Eng* 45, 35-41. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2011.06.001>.
- Schroeder JP, Klatt SF, Schlachter M, Zablotski Y, Keuter S, Spieck E and Schulz C. 2015. Impact of ozonation and residual ozone-produced oxidants on the nitrification performance of moving-bed biofilters from marine recirculating aquaculture systems. *Aquac Eng* 65, 27-36. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2014.10.008>.
- Sharrer MJ and Summerfelt ST. 2007. Ozonation followed by ultraviolet irradiation provides effective bacteria inactivation in a freshwater recirculating system. *Aquac Eng* 37, 180-191. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2007.05.001>.
- Stiller KT, Vanselow KH, Moran D, Bojens G, Voigt W, Meyer S and Schulz C. 2015. The effect of carbon dioxide on growth and metabolism in juvenile turbot *Scophthalmus maximus* L. *Aquaculture* 444, 143-150. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.04.001>.
- Tango MS and Gagnon GA. 2003. Impact of ozonation on water quality in marine recirculation systems. *Aquac Eng* 29, 125-137. [https://doi.org/10.1016/S0144-8609\(03\)00061-X](https://doi.org/10.1016/S0144-8609(03)00061-X).
- Van Der Boon J, Van Den Thillart GEEJM and Addink ADF. 1991. The effects of cortisol administration on intermediary metabolism in teleost fish. *Comp Biochem Physiol A Physiol*, 47-53. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(91\)90182-C](https://doi.org/10.1016/0300-9629(91)90182-C).
- Von Gunten U. 2003. Ozonation of drinking water: Part II. Disinfection and by-product formation in presence of bromide, iodide or chlorine. *Water Res* 37, 1469-1487. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00458-X](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00458-X).
- Vijayan V and Tan CE. 1997. Developing human biliary system in three dimensions. *Dev Biol* 249, 389-398. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(199711\)249:3<389::AID-DEV10>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(199711)249:3<389::AID-DEV10>3.0.CO;2-K).
- Wedemeyer GA, Nelson NC and Yasutake WI. 1979. Physiological and biochemical aspects of ozone toxicity to rainbow-trout (*Salmo gairdneri*). *Can J Fish Aquat Sci* 36, 605-614.
- Wold PA, Holan AB, Qie G, Attramadal K, Bakke I, Vadstein O and Leiknes T. 2014. Effects of membrane filtration on bacterial number and microbial diversity in marine recirculating aquaculture system (RAS) for Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) production. *Aquaculture* 422-423, 69-77. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.11.019>.