

무지개송어의 해수순치과정에 일어나는 삼투조절세포의 미세구조

윤 종 만

군산대학교 해양과학대학 해양생명의학과

Ultrastructural Change of Osmoregulatory Cells during Seawater Adaptation in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Jong-Man Yoon

Department of Marine Biomedical Science, College of Ocean Science and Technology, Kunsan National University, Kunsan 573-702, Korea

There were observed the histomorphological alterations such as chloride cell hyperplasia, branchial lamellar epithelial separation, the increased cellular turnover of chloride cells, glomerular shrinkage and blood congestion in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during the seawater adaptation.

The ultrastructure by scanning electron microscope (SEM) indicated that the gill secondary lamella of rainbow trout exposed to seawater, were characterized by rough convoluted surfaces during the adaptation. There were observed a large number of mitochondria with the elongate and well-developed cristae in chloride cells exposed to seawater by transmission electron microscope (TEM). The presence of two mitochondria-rich cell types is discussed with regard to their possible role in the hypoosmoregulatory changes which occur during seawater-adaptation. Glomerulus shrinkage and blood congestion were occurred higher in nephrons of seawater-adapted fish than those living in freshwater. Our findings demonstrated that rainbow trout tolerated moderately saline environment and the increased body weight living in seawater was relatively higher than that living in freshwater in spite of histopathological changes.

Key words : Rainbow trout, seawater adaptation, ultrastructure, chloride cell, glomerulus

서 론

담수산 어류를 해수에 순치 적응시키려는 시도가 국내외 여러 나라에서 시도되어져 왔다. Kendall and Dale (1979), Galat *et al.* (1985), Richman *et al.* (1987), Salman and Eddy (1987), Hwang and Wu (1988)이 연어속(*Oncorhynchus*), Yoon *et al.* (1993)은 틸라피아(*Oreochromis*

niloticus), Schwerdtfeger (1979)와 Moon (1995)이 각각 guppy (*Poecilia reticulatus*), Kang *et al.* (1996)이 송사리 (*Orizias latipes*) 그리고 Hur and Chang (1999) 이 송어 (*Mugil cephalus*)와 틸라피아(*Oreochromis niloticus*)를 해수에 순치 적응시키는 과정에 나타나는 여러 기관의 생리적인 변화와 조직적인 변화에 관한 연구를 실시하였다. 이미 연구된 무지개송어의 혈청성분의 변화(Yoon and Lee, 1998) 이외에 폐쇄 순환여과식 사육시스템에서

순치 적응중인 무지개송어의 아가미와 신장 조직부위의 변화를 광학 및 전자현미경을 이용하여 담수에 서식하는 개체와 비교하기 위해서 본 연구를 실시하였다.

재료 및 방법

1. 재료

수온이 $15 \pm 1^\circ\text{C}$, 용존 산소량이 8.5 ± 0.2 ppm, pH 6.8 인 담수에서 정상적인 광주기를 받는 10 m^3 인 탱크에서 사육중인 평균체중이 각각 130 g (smolt), 870 g (adult) 인 무지개송어 (*Oncorhynchus mykiss*) 150마리중 일부 개체를 크기가 1.5 m^3 이고 염분농도가 0~15‰인 해수탱크로 옮겨서 공시어로 이용하였다.

2. 방법

1) Seawater adaptation test

$15 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 수온을 유지시킨 0‰의 담수에 서식하던 무지개송어 (*Oncorhynchus mykiss*) 개체를 각각 2주씩 5‰, 10‰ 그리고 최종적으로 15‰까지 염분농도를 단계적으로 높인 해수에 순치 적응시켰으며, 이주시킨 지 5일 이후부터 사료를 급여하였으며, 행동의 변화를 통해서 각 실험군 개체들의 순치 적응 상태를 관찰하였다. 그리고 혈액내 삼투압의 측정은 osmometer로 측정하였다.

2) 광학현미경적 방법 (LM)

0‰, 5‰, 10‰, 15‰의 염분농도의 담수 및 해수에서 사육된 무지개송어의 아가미, 신장조직을 적출한 후에 Bouin's fluid에 고정, 파라핀에 포매, haematoxylin-eosin 염색과정을 거친 다음에 microtome (Reichert-Jung, USA)으로 박절한 후 $\times 125$, 400배율로 각각 검정하였다. 확인된 신사구체의 크기는 $4/3\pi r^3$ 의 부피공식을 이용하여 측정하였다.

3) 투과전자현미경적 관찰 (TEM)

아가미와 신장조직편을 pH 7.3인 0.1 M 인산완충액이 포함된 2.5% glutaraldehyde 용액에 고정, 1% osmium 용액에 2시간동안 후고정, 여러 가지 농도의 ethanol 용액에 각각 1시간씩 탈수, epon 812 혼합액에 포매시킨 다음 초박절기 (LKB, Bromma, Sweden)로 얇게 박편, uranyl acetate와 lead citrate로 염색한 후에 투과전자현미경 (Jeol, Japan) 으로 70 kV의 전압에서 각각 검정하였다.

4) 주사전자현미경적 관찰 (SEM)

내인성 점액물질을 제거하고 고정시키기 위해서 아가미 조직편을 인산완충액으로 수세, pH 7.4인 2.5% glu-

taraldehyde 용액으로 1.5시간동안 고정, 0.1 M phosphate-sucrose buffer로 3회 수세, 2% OsO_4 -인산완충액-sucrose 용액으로 30분동안 후고정을 거친 다음 여러 가지 농도의 ethanol 용액으로 15분 간격으로 탈수, amyl acetate 용액을 최종농도 100%까지 높여서 2회 정도 15분동안 침지시킨다. Gold-palladium으로 코팅시키고, 주사전자현미경 (Hitachi, Japan)을 이용하여 20 kV의 전압으로 검정하였다.

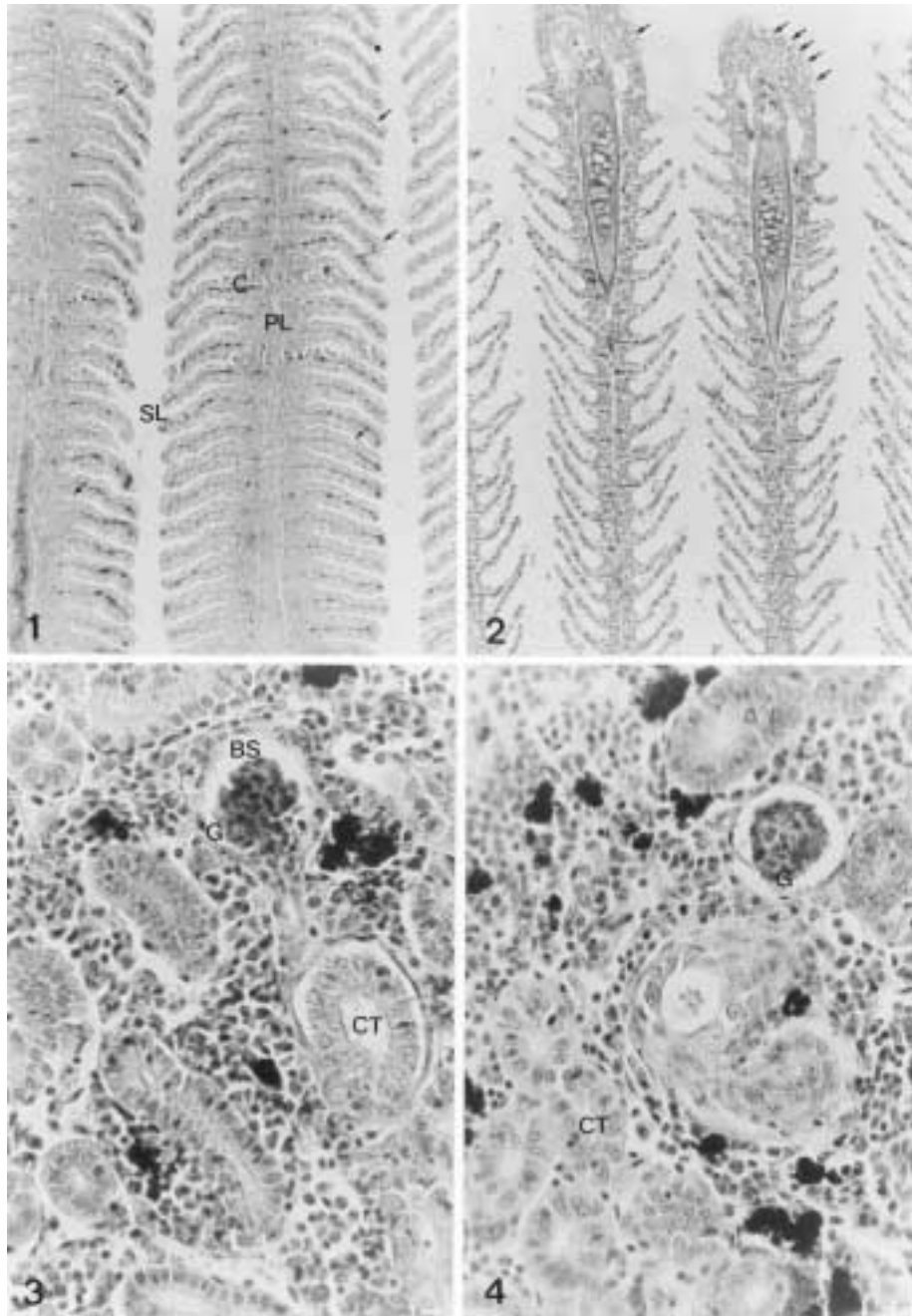
결과 및 고찰

무지개송어의 아가미와 신장의 광학현미경적 변화를 Figs. 1, 2, 3, 4에 각각 나타내었다. Figs. 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12는 각각 투과 및 주사전자현미경에 의한 무지개송어의 아가미 및 신장의 미세구조적 변화를 나타내고 있다.

1. 광학현미경적 변화

담수에 서식하는 무지개 송어 (Fig. 1)와 해수에 서식하는 개체 (Fig. 2)의 아가미 구조를 살펴보면 0‰에서 10‰로 염분농도가 증가할수록 아가미 염세포의 수가 상당히 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 변화는 삼투작용이 왕성해짐에 따라 체내에 축적된 염분 및 무기질을 체외로 배설하기 위해서 염세포의 수가 급증하는 것으로 사료된다. 이것은 알칼리성과 더 밀접한 관련이 있고, 아가미염 상피세포가 분리되는 아가미 조직의 손상은 염분의 농도가 높아지는 해수일수록 이러한 현상이 더 심하게 나타난다는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 여러 단계의 saline-alkalinity에서 서식하던 Lahontan cutthroat trout (*Salmo clarki henshawi*)의 조직을 연구하던 Galat *et al.* (1985)와 해수의 순치과정중에 있는 은연어 (*Oncorhynchus kisutch*) 염세포의 형태와 관련된 있는 삼투조절과 내분비와의 관계를 연구하던 Richman *et al.* (1987)의 결과와 유사하게 나타났다. 또한 사료에 염분을 첨가하였을 때 무지개송어의 염세포의 수와 생리적인 반응을 연구한 Salman and Eddy (1987)의 결과와도 유사하게 나타났으며 이러한 결과는 모든 경골어류에서 일어나는 것으로 사료된다. 그리고 Kang *et al.* (1996)은 염도가 변화함에 따라 나타나는 염세포의 증가를 아포토시스 (apoptosis)라는 현상의 하나라고 주장하였다.

5‰의 염분농도에서 서식하던 개체에서 아가미염 상피세포의 기저막이 손상되는 것이 관찰되었고, 10‰, 15‰의 실험군 개체의 경우에는 일부 개체에서 이러한 손상이 나타났고, 나머지 대부분의 개체에서는 확인되지 않았다. 이러한 결과는 초기 염분농도의 해수에서는 발



Figs. 1-4. **1.** Light micrograph of primary lamella (PL) and secondary lamellae (SL) of control. The secondary lamellae containing capillaries (C) cut transversely to their long axis are located at regular intervals. Goblet cells (arrows) extend even to the base of the secondary lamellar surfaces. $\times 125$. **2.** Light micrograph of gill lamellae of 10% seawater-adapted fish. Some secondary lamellae are damaged. A section of a primary lamella from the midregion reveals that the center consists of blood vessels that supply and drain the capillary beds that enter and leave the secondary lamellae. The tip of a primary lamella is lined with goblet cells (arrows). $\times 125$. **3.** Light micrograph of kidney of control. There were observed some collecting tubules (CT) and glomeruli (G). Note the size of glomerulus and Bowman space (BS). $\times 400$. **4.** Light micrograph of kidney of 15% seawater-adapted fish. The size of glomerulus (G) of seawater-adapted fish is a little smaller than that of control group. $\times 400$.

생되다가 서서히 적응하는 과정에서 치유 및 회복되어 나타나지 않는 것으로 사료된다. 아가미엽의 표피는 염

분농도가 증가할수록 요철상태가 심하게 나타났으며, 이러한 변화는 어류 체내의 수분함량을 항상 일정한 수준

Table 1. Effects of salinity on the glomerular area (μm^2) of nephrons in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Fish	Freshwater-adapted	Seawater-adapted
Mean \pm SD	3576.66 \pm 436.34	1417.91 \pm 135.97*

N = 10 * : Significant difference (P < 0.001)

으로 유지하기 위한 생리적인 현상으로 보이며, Yoon *et al.* (1993)이 연구한 틸라피아(*Oreochromis niloticus*)에서도 이와 유사한 생리적인 변화가 나타났다. 서서히 염분농도를 증가시키면서 어류를 순차 적응시켰을 때 이러한 아가미 염세포의 수가 증가하는 현상을 강한 이온강도의 변화에 따른 스트레스로 인식하지 않고 점진적인 환경의 변화에 적응한 결과 나타난 세포가 특정 기능을 수행하기 위해 구조적인 변화로 대응한 것으로 간주하였다. 또한 이와 같이 서서히 오랜 기간 해수에 적응시켰을 때에는 피사가 나타나지 않고 아포토시스가 진행중인 세포들의 수가 증가한 결과라고 주장하였다 (Pisam *et al.*, 1987; Kang *et al.*, 1996).

담수(Fig. 3) 및 15‰의 해수(Fig. 4)에 서식하는 무지개송어의 신세포 구조로서 해수에 적응된 개체의 신장은 담수에 서식하는 개체보다 신사구체의 수축이 보다 많이 이루어졌으며, 15‰에서 적응된 개체에서는 혈액의 응혈이 심하게 발생되었다. 이러한 변화는 15‰에서 적응된 개체의 평균 신사구체의 부피는 담수에 서식하던 개체의 그것보다 그 크기가 크게 감소되었다(Table 1). 이러한 결과는 해수에 적응된 개체의 신사구체 크기가 감소하였고, 신단위의 핵면적이 담수에 서식하던 개체의 그것보다 작게 나타났다고 보고한 Galat *et al.* (1985), Hwang and Wu (1988) 및 Yoon *et al.* (1993)의 결과와 일치하는 것으로 나타났다. 이러한 신사구체의 수축 및 응혈은 아가미를 통해서 배설되는 수분의 양이 많아서 일어날 수 있는 탈수증상을 예방하는 과정의 하나로써 신장을 통해서 여과되어 오줌으로 배출되는 비율을 낮추어서 체내와 체외 사이에서 일어나는 삼투압을 조절하는 것으로 사료된다. 이것은 Lahontan cutthroat trout의 생리적인 현상을 연구하면서 hypoosmoregulatory system이라고 한 Galat *et al.* (1985)의 결과와 유사하게 나타났다.

2) 주사전자현미경적 변화

담수에서 서식하던 무지개송어의 제1차 및 제2차 아가미엽으로서 표면이 부드럽고 미끈한 형태를 나타내었다(Fig. 5). 해수에 적응된 개체의 제2차 아가미엽으로서 마치 사람의 손가락 지문처럼 일정한 형태를 갖춘

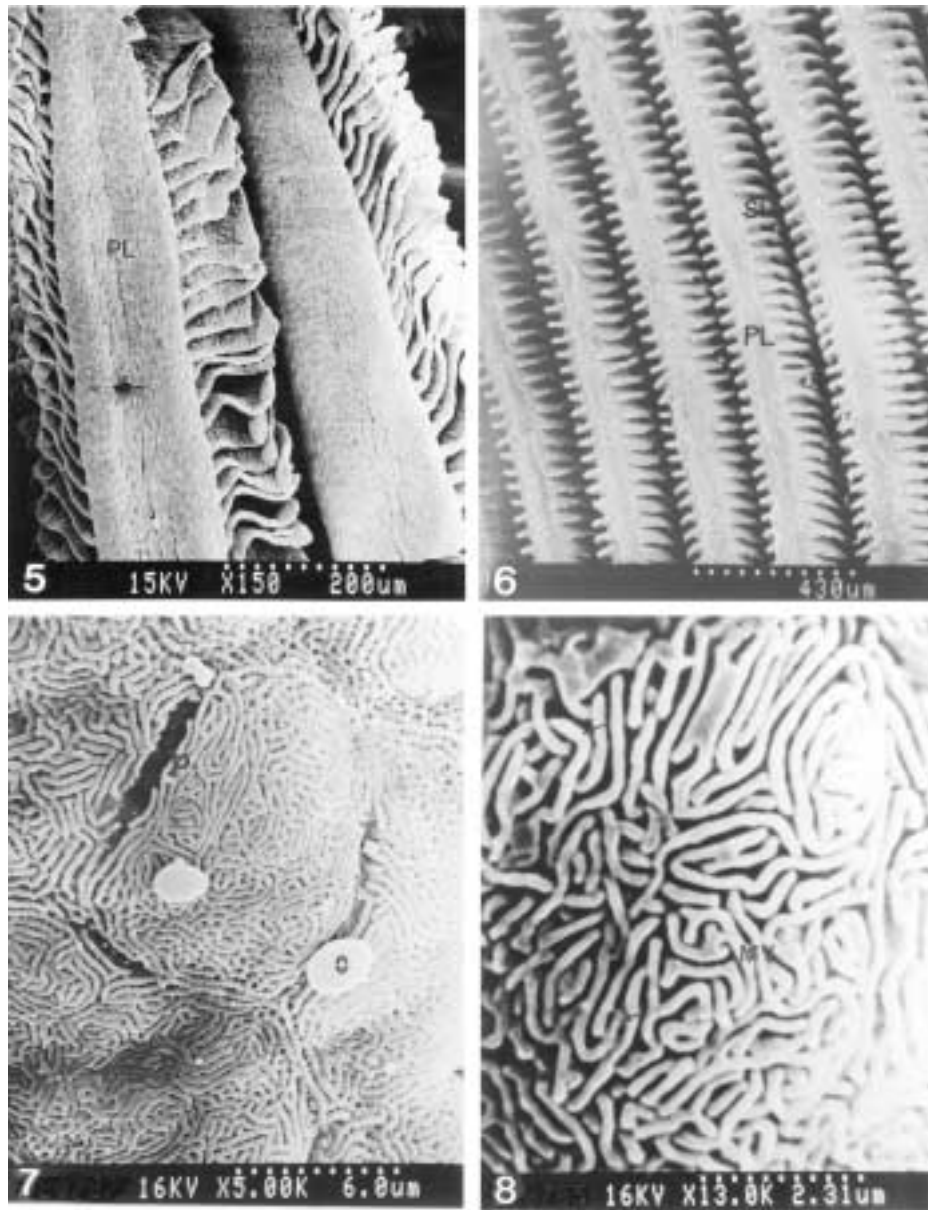
사면체 세포가 규칙적인 배열상태를 나타내었고, 그 내부에는 아가미엽의 표면을 따라 긴 막대기 모양의 주름인 미세융모가 일정하게 배열되어 있었다(Figs. 6, 7 and 8). 해수에 적응된 무지개송어의 제2차 아가미엽에는 담수에 서식하던 개체의 제2차 아가미엽의 그것보다 상대적으로 많이 관찰되었고, 적혈구의 누출된 정도도 높아지는 것이 확인되었다. 갯 잡은 개체의 아가미 표면을 육안으로 살펴볼 때 아가미 표면의 체색이 검붉게 나타난 것이 바로 누출된 적혈구에 의한 것으로 사료된다.

아가미엽 표면의 변화는 주름과 골이 깊게 패인 형태로서 막대기 형태의 긴 주름의 수도 증가하는 것으로 나타나며, 울퉁불퉁한 형태의 구조가 확인되었다. 이러한 변형은 호흡시 가스교환을 용이하게 하기 위해서 적응된 결과로 사료되며, 가스교환의 효율을 높이기 위해서 유속을 완만하게 하기 위한 방법의 일환이라고 하였다(Kendall and Dale, 1979; Richman *et al.*, 1987). 또한 주사전자현미경적 결과는 해수에 적응된 guppy (*Poecilia reticulatus*)의 상피에 있는 pavement cell이 납작해지면서 그 표면적이 담수에 서식하는 어류의 그것보다 2배 이상 증가하였다는 주장과 비교해 볼 때 아가미 표면적과 상피세포의 표면적의 증가는 외부 서식수인 해수에 의해 직접적으로 영향을 받는 부위라는 점에서 그 변화의 방향이 서로 일치하는 경향을 나타내었다(Schwerdtfeger, 1979; Moon, 1995).

3) 투과전자현미경적 변화

담수에 서식하던 개체의 아가미의 미세구조로서 전자와 미토콘드리아의 수가 적은 세포질 구조를 가진 세포(Type I)로 구성되어 있었다(Fig. 9). 해수에 적응된 개체의 경우에는 길고 타원형의 미토콘드리아를 갖는 세포질로 구성된 세포(Type II) 등 2가지 형태의 세포로 구성되어 있다는 것이 확인되었다(Fig. 10). 이와 같이 해수에 적응된 개체에서 긴 타원형의 수많은 미토콘드리아를 갖는 세포질로 구성된 Type II의 세포로 변화가 이루어진다는 결과는 Richman *et al.* (1987), Yoon *et al.* (1993) 그리고 Kang *et al.* (1996)의 연구 결과와 일치하였고, 이러한 결과는 무지개송어와 같이 광염도성 어류가 해수에 적응된 경우 변화된 아가미엽의 염세포의 형태가 마치 해산어의 그것과 유사한 구조적 특징 및 생리적인 기능을 지니는 방향으로 변화되는 것으로 사료된다. 따라서 해수 순차 및 적응실험을 통해서 염세포의 형태는 담수 및 해수환경에 알맞게 변화가 진행된다는 결과를 확인하였다.

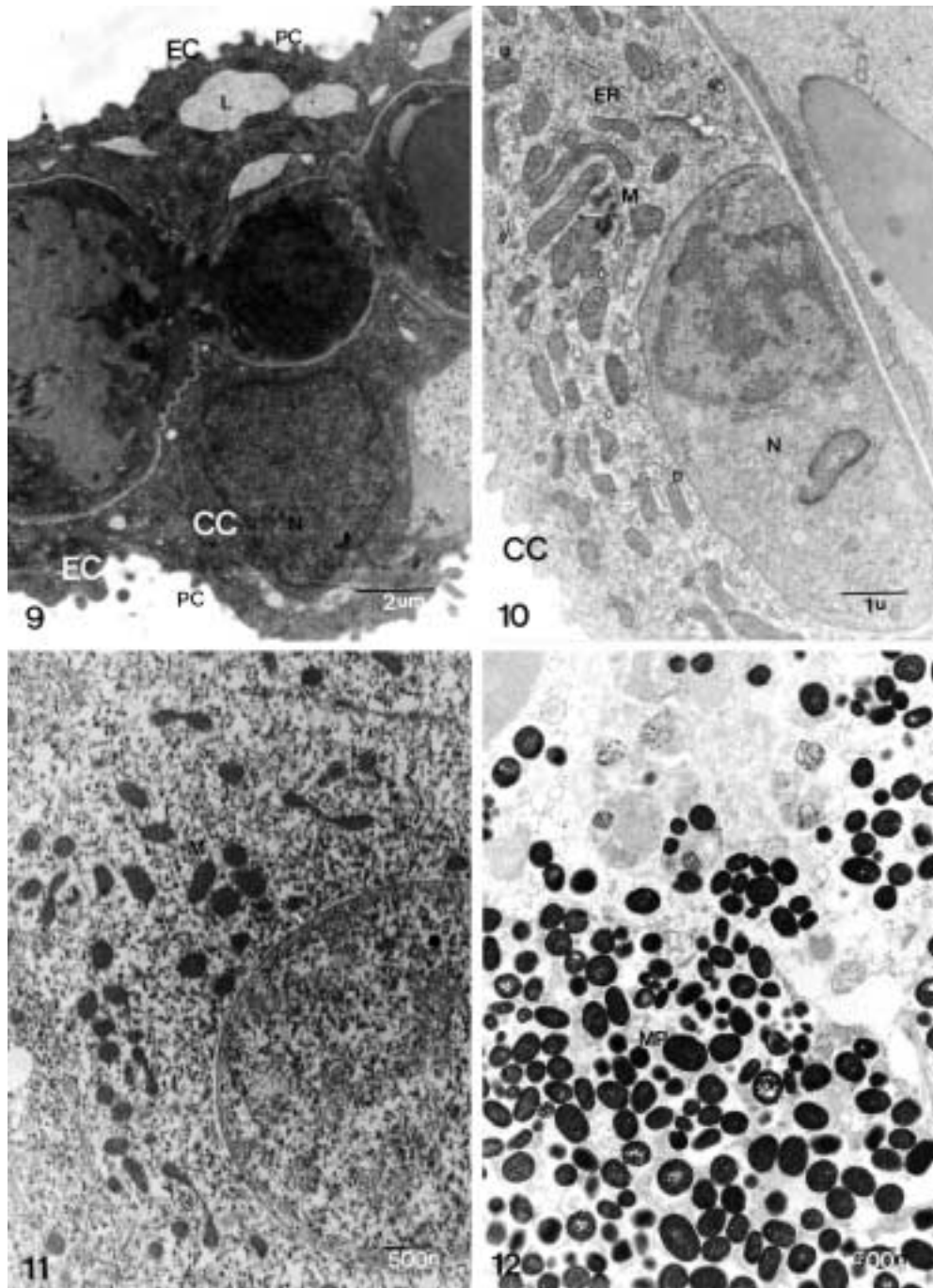
담수에 서식하는 개체의 신장의 미세구조로서 정상적인 핵의 형태를 나타내며 핵 주변에는 많은 수의 등골



Figs. 5-8. 5. Scanning electron micrograph of one primary lamella (PL) and numerous branching secondary lamellae (SL) of freshwater-adapted fish. Scale bar=200 μm . 6. Scanning electron micrograph of primary lamella (PL) and secondary lamellae (SL) of 15% seawater-adapted fish. The length of the secondary lamellae that lengthen progressively to the midpoint of the primary lamella, remains fairly constant to the basal region. Scale bar=430 μm . 7. Scanning electron micrograph of numerous chloride cells and blood cells (\diamond) on primary lamella of 15% seawater-adapted fish. The surface structures of the primary lamella are similar to the fingerprints of a person. A deep pore (P) projects into the interior of the primary lamella and the ridges and grooves continue into the pore's cavity. Wide grooves separate adjacent ridges. Scale bar=6 μm . 8. Magnification of chloride cell with microvilli (MV) and globular shape. Some ridges turn backwards to form a U with another ridge commencing between the arms of the U (arrows). Scale bar=2.31 μm .

고 긴 형태의 미토콘드리아가 확인되었다 (Fig. 11). 해수에 순치 적응된 개체의 신장의 미세구조로서 핵의 크기를 살펴보면 응축되어 그 형태를 확인하기가 어려우며, 핵 주변에는 상당한 수의 멜라닌 색소과립이 있는 것이

관찰되었다 (Fig. 12). 일반적으로 멜라닌 색소과립은 방어체계에서 중요한 기능을 하는 것으로 알려져 있는데 해수에 적응된 개체의 신세포의 핵주변부에 많이 생성되는 것으로 보아 이와 유사한 면역세포의 기능을 수행



Figs. 9-12. **9.** Transmission electron micrograph of secondary lamellae of freshwater-adapted fish. There were observed some chloride cells (CC), pavement cells (PC) and epithelial cells (EC). A chloride cell projects into a lumen (L) enclosed by an epithelial cell. Scale bar=2 μ m. **10.** Transmission electron micrograph of chloride cell in secondary lamellae of seawater-adapted fish. There were observed numerous mitochondria (M), endoplasmic reticulum (ER) and one nucleus (N) in chloride cell (CC). Mitochondria-rich cells have a less electron-dense cytoplasm. Scale bar=1 μ m. **11.** Transmission electron micrograph of kidney tissue in freshwater-adapted fish. A part of kidney cell contains a large number of small mitochondria (M). Scale bar=500 nm. **12.** Transmission electron micrograph of kidney tissue in seawater-adapted fish. A part of kidney cell contains a large number of small melanin pigment-like materials (MP). Scale bar=500 nm.

하는 것으로 사료된다 (Park *et al.*, 1995).

적 요

양어장에서 염분농도가 각각 5%, 10%, 15%의 1.5 m³인 사육조에서 순치 적응된 평균 체중이 130 g인 smolt 단계의 치어와 870 g인 성어의 무지개송어 (*Oncorhynchus mykiss*) 총 150마리를 공시어로 이용하여 아가미 및 신장의 미세구조의 변화를 알기 위해서 광학 및 전자현미경으로 관찰하여 얻어진 결과는 다음과 같다. 해수에 순치 적응된 무지개송어에서 아가미엽의 비대와 아가미엽 상피세포의 분리 그리고 신사구체의 수축, 신장의 응혈 등의 조직학적 변화가 나타났다.

해수에 순치 적응된 개체의 삼투압은 담수에 서식하는 개체의 삼투압보다 높게 나타나서 평균 300 m Osmol 이상으로 나타났다. 삼투압의 증가는 염분과 무기질의 배출효율을 높이기 위해서 혹은 체내의 삼투압의 균형을 맞추기 위해서 삼투압이 증가하는 것으로 사료된다. 아가미엽의 염세포가 증가하는 발생 정도는 염분농도의 증가와 더불어 높게 나타났고, 아가미엽 표면은 염분농도가 높아질수록 요철상태가 심한 구조로 나타났으며, 길게 변형된 미토콘드리아가 관찰되었다. 무지개송어는 조직병리학적 변화에도 불구하고 해수에 순치 적응하는 것으로 나타났다.

사 사

이 논문은 군산대학교 수산과학연구소에서 출연한 학술연구비(2000년)에 의하여 연구되었음. 그리고 많은 조언을 해주신 심사위원께 감사드립니다.

인 용 문 헌

Galat, D.L., G. Post, T.J. Keefe and G.R. Bouck. 1985. Histological changes in the gill, kidney and liver of Lahontan cutthroat trout, *Salmo clarki henshawi*, living in lakes of different salinity-alkalinity. *J. Fish. Biol.*, 27 : 533~552.

Hur, J.W. and Y.J. Chang. 1999. Physiological responses of grey mullet (*Mugil cephalus*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by gradual change in salinity of rearing

water. *J. Aquaculture*, 12(4) : 283~292.

Hwang, P.P. and S.M. Wu. 1988. Salinity effects on cytomorphological parameters of the kidney in the euryhaline teleost *Oreochromis mossambicus* Peters. *J. Fish. Biol.*, 33 : 89~95.

Kang, W.S., Y.H. Moon, J.W. Han and H.H. Kim. 1996. Apoptosis in chloride cells of killifish (*Orizias latipes*) gills adapted to the seawater. *Korean J. Electron Microscopy*, 26(3) : 369~377.

Kendall, M. and J.E. Dale. 1979. Scanning and transmission electron microscopic observations of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) gill. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 36 : 1072~1079.

Moon, Y.W. 1995. Ultrastructural changes of the epidermis of guppy (*Poecilia reticulatus*) scale adapted to the seawater. *Korean J. Electron Microscopy*, 25(4) : 104~114.

Park, H.Y., J.M. Yoon, K.N. Chang and H.T. Huh. 1995. *Fish Biology*, p. 130~131.

Pisam, M., A. Caroff and A. Rambourg. 1987. Two types of chloride cells in the gill epithelium of a freshwater-adapted euryhaline fish, *Lebistes reticulatus*: Their modification during adaptation to seawater. *Amer. J. Anat.*, 179 : 40~50.

Richman III, N.H., S.T. De Diaz, R.S. Nishioka, P. Prunet and H.A. Bern. 1987. Osmoregulatory and endocrine relationships with chloride cell morphology and density during smoltification in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture*, 60 : 265~285.

Salman, N.A. and F.B. Eddy. 1987. Response of chloride cell numbers and gill Na⁺/K⁺ ATPase activity of freshwater rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) to salt feedings. *Aquaculture*, 61 : 41~48.

Schwerdtfeger, W.K. 1979. Morphometrical studies of the ultrastructure of the epidermis of the guppy, *Poecilia reticulatus* Peters, following adaptation to seawater and treatment with prolactin. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 38 : 476~483.

Yoon, J.M., K.Y. Cho and H.Y. Park. 1993. Light and electron microscopy of gill and kidney on adaptation of tilapia (*Oreochromis niloticus*) in the various salinities. *Korean J. Electron Microscopy*, 23(2) : 1~10.

Yoon, J.M. and K.H. Lee. 1998. Serum component levels and electrophoretic patterns on adaptation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in the various salinities. *J. Fish. Pathol.*, 11(1) : 1~11.