

수온 변동 자극이 양식 넙치, *Paralichthys olivaceus*의 비특이적 생체 방어에 미치는 영향

이덕찬[†] · 김도형* · 김수미 · 강명석** · 홍미주*** · 김현정*** · 박수일

부경대학교 수산과학연구소, *부경대학교 대학원 해양산업공학과, **부경대학교 산업대학원 수산양식학과,
***부경대학교 수산생명의학과

Effects of stress induced by changes of water temperature on the non-specific defense mechanism in cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus*

Deok-Chan Lee[†], Do-Hyung Kim*, Su-Mi Kim, Myong-Seok Kang**,

Mi-Ju Hong***, Hyun-Jeong Kim*** and Soo-Il Park

Institute of Fisheries Sciences, Pukyong National University, Busan 612-021, Korea

*Interdisciplinary Program of Ocean Industrial Engineering, Graduate School, Pukyong National University,
Busan 608-737, Korea

**Department of Aquaculture, Graduate School of Industry, Pukyong National University,
Busan 608-737, Korea

***Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

This study was performed to know the effects of stress induced by the daily fluctuation of water temperature from 18°C to 25°C up and down for 30 days on the defence mechanism of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. To make clear the temperature stress on the defense mechanism of the tested fish, several factors of immune response such as counting of leucocyte appearance in peripheral blood, phagocytic activity in whole blood cells, nitroblue tetrazolium(NBT) reduction, chemiluminescence(CL) response, and lysozyme activity were investigated at 28 days after giving the change of water temperature. The fish was controlled under the none feeding condition during experimental period. Mortality of the tested fish was rapidly increased up to 22% within the first one week of the experimental period without any additional stress factors. The number of neutrophil of peripheral blood in the tested group was significantly higher than the control group at the 2nd week, but the number of lymphocyte was significantly lower than the control group at the 1st and 3rd day of the experimental period, respectively. In the NBT reduction test, the activity of macrophage in the control group fish was the highest on the 7th day while that in the tested group was on the 3rd day. Also, the phagocytosis of tested group against formalin killed cells was retarded compared with the control. CL response of the tested group was significantly lower from 2nd to 5th day of the experimental period than the control. The lysozyme activity of tested group was remained higher during the experimental period than the control. Even though the tested fish showed different results in some non-specific factors of immune responses between tested and control group fish, olive flounder seems highly adaptable in repeated water temperature change in condition after one week under the given temperature fluctuation range.

Key words : Stress, *Paralichthys olivaceus*, Nitroblue tetrazolium(NBT) reduction, Chemiluminescence(CL) response, Immune response

[†]Corresponding Author

고등 척추동물과 마찬가지로 하등 척추동물인 어류도 여러 가지 요인들로부터 stress를 받는 것으로 알려져 있으며(Schreck, 1996) stress가 가중되면 질병에 대한 감수성도 증가하게 된다(Snieszko, 1974; Angelidis *et al.*, 1987; Peters *et al.*, 1988; Maulc *et al.*, 1989; Mazur and Iwama, 1993a; Wise, 1993; Iwama *et al.*, 1997). Stress 요인으로는 handling(Strange *et al.*, 1977; Barton and Schreck, 1987; Moraes and Bidinotto, 2000), 사육 밀도(Wedemeyer and Mcleay, 1981; Mazur and Iwama, 1993b), 수질(Smart, 1981), 수온(Strange *et al.*, 1977; 장 등, 1999), 염분(Brown *et al.*, 2001) 및 화학물질(Baier-Anderson and Anderson, 2000) 등이 있다. Stress가 어류의 생체 방어능에 미치는 영향에 관해서는 다양한 연구 결과가 알려져 있으며, 그 반응은 stress의 종류에 따라서도 다르게 나타남을 알 수 있다. 일반적으로 어류에 가해지는 stress는 순환 림프구의 수를 감소시키고 항체 생성 작용을 억제하여 질병에 대한 생체 방어 능력의 저하를 초래할 수 있다(Ellis, 1981; Miller and Tripp, 1982; Ellsaesser and Clem, 1986; Mazur and Iwama, 1993b). 어류에서 면역억제를 유도하는 stress 관련 기작은 아직 분명하지 않으나 내분비계를 통하여 매개되는 것으로 알려져 있는데 stress에 의하여 증가되는 cortisol은 림프구에 의한 interleukin-like factors의 유리를 억제하며(Kaattari and Tripp, 1987; Tripp *et al.*, 1987; Schreck, 1996), stress와 cortisol은 림프구의 corticosteroid receptors의 친화력을 변화시킨다(Maule and Schreck, 1991). 또한, stress는 세균 세포를 용해시키는 체액성 생체 방어 물질인 lysozyme의 활성을 감소시킨다(Mock and Peters, 1990).

넙치(*Paralichthys olivaceus*)는 우리나라의 육상수조식 양식장에서 사육되는 가장 대표적인 어종으로서 높은 밀도 사육이 가능하고, 성장이 빠르다는 장점이 있어(김, 1993) 양어가들에게 인기가 높다. 그러므로 넙치의 주요 양식 방법

인 육상수조식 양식은 동해, 서해 및 남해에 걸쳐 분포하고 있다. 그렇지만 동해의 경우 고유지형이나 해류의 특성으로 인하여 수온의 급격한 변화가 남해나 서해보다 심하기 때문에 사육 중인 넙치의 식욕부진과 성장불량을 초래하고, 심하면 대량폐사까지 유발한다고 알려져 있다. 그러나, 이 어종에 있어서 수온 변동이 생체 방어에 미치는 영향에 관해서는 과학적인 조사가 이루어진 것이 없는 실정이다.

본 연구에서는, 이러한 양식장 환경의 특성을 염두에 두고 넙치의 일반적인 적수온으로 알려진 범위 내에서의 급격한 수온 변화가 사육 중인 넙치의 생체 방어력에 미치는 영향을 다양한 생체 방어능의 지표 인자를 측정함으로써 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

실험어와 실험구

실험어로 사용된 넙치는 경북 포항 소재 양어장으로부터 구입하였으며, 실험어의 크기는 평균 체중 60.7 g, 평균 전장 18.3 cm이었다. 온도 변화에 대한 실험은 크게 두 가지로 나누어 시행하였다. 하나는 온도 자극에 대한 면역반응의 지표를 조사하기 위한 것이고, 나머지 하나는 안정실험구로서 온도 자극이 실험어의 생존에 미치는 영향을 알아보기 위한 것이다. 전자의 실험에는 각각 2조씩의 실험구와 대조구를 두고 각 실험구에 45마리의 넙치를 수용하였으며, FRP 수조(350 l)를 사용하였다. 후자의 실험구는 별도로 설치한 실험구인 수온 자극 실험구와 대조구에 대해서는 실험 기간 동안의 폐사율 발생 등 여러 가지 상태 변화를 관찰하였다. 실험어는 실험용 수조에서 1주일간 순치한 후 사용하였으며, 모든 실험은 3회 반복하였다. 그리고 실험어에 대해 수온 변화 외의 다른 stress 요인을 줄이기 위하여 실험 기간 동안 먹이를 공급하지 않았다.

실험기간 동안의 염분농도는 $31.8 \pm 0.5\%$ 이었다.

수온의 변화

수온은 냉각기(삼성, AS-518)와 가온용 전기 heater를 사용하여 매일 7°C 의 상승과 하강을 반복하는 방법으로 변화를 주었다. 즉, 실험구는 18°C 로 유지된 수온을 12시간 이내에 25°C 까지 상승시킨 후 이를 다시 12시간 이내에 18°C 로 하강시키는 방법으로 수온 자극을 주었으며 30일간의 실험 기간 동안 매일 반복하였다. 대조구의 수온은 실험 기간 동안 18°C 로 일정하게 유지하였다.

시료 채취와 폐사율 조사

① 시료의 채취

실험에 사용된 낚치는 0, 1, 2, 3, 5, 7, 14, 21 및 28일에 실험구와 대조구에서 각각 3~5마리씩 무작위로 채포하여 아미노안식향산 에틸로 마취시킨 다음 각각의 실험에 사용하였다.

② 폐사율 조사

실험 도중에 발생하는 실험어의 폐사 현상은 일간폐사량과 누적폐사율로써 나타내었다. 즉, 각각 45마리씩 수용된 실험구와 대조구에서 출현하는 폐사 개체는 매일 조사하였으며, 측정기간은 온도 변화를 주기 시작한 후 30일간 이었다.

말초혈액 중 철구수의 조사

말초혈액 중 백혈구수의 변화를 측정하기 위하여 마취제로 마취시킨 실험어의 미병부로부터 채혈하였다. 채혈한 혈액은 May-Grunwald Giemsa 염색법으로 염색한 다음 현미경 관찰법으로 적혈구 5,000 세포 당 호중구, 림프구 및 전구를 계수하였다.

식균율 및 식균지수의 조사

① Formalin killed cell(FKC)의 제작

식세포의 식균능을 측정하기 위한 실험 FKC 균액은 *Escherichia coli* ATCC 25922 균주를 이용하여 제작하였다. 간략하게 설명하면, 균주를 tryptic soy broth (TSB)에 27°C , 36시간 배양한 후 formalin 0.5% (v/v)을 첨가하여 하룻밤 방치하였다. 이 균액을 원심 분리($7,000 \times g$, 30min)하고 멸균 생리 식염수로 3회 세척한 후 100 mg/ml 의 농도가 되도록 제현탁하여 냉장고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

② 식균율과 식균지수의 조사

식균능의 실험에는 실험어의 whole blood를 사용하였으며 실험어의 미병부로부터 heparin(Sigma Co.)이 처리된 주사기로 어체당 0.5 ml 씩 채혈하였다. 채혈한 혈액은 siliconized tube에 넣고, 100 mg/ml 의 농도로 준비된 FKC $30 \mu\text{l}$ 를 첨가하였다. 20°C 로 유지된 water-bath에서 0.5, 3 및 6 시간 동안 반응시킨 후 각 반응 시간 별로 시료를 채취하여 slide glass에 도말한 다음 May-Grunwald Giemsa 염색법으로 염색하고 검경하였다.

식세포에 대한 식균율과 식균지수를 아래 식을 이용하여 구하였다.

$$\text{식균율}(\%) = \left[\frac{\text{식균작용을 한 식세포의 수}}{\text{관찰한 식세포의 수}} \right] \times 100$$

$$\text{식균지수} = \frac{\text{식균한 식세포의 총 식균수}}{\text{관찰한 식세포의 수}}$$

식세포의 활성 산소 측정

① Macrophage의 준비

식세포의 활성 산소 변화를 측정하기 위하여 가능한 한 낚치의 순환 혈액을 제거한 후 복부를 절개하여 신장을 무균적으로 절취하였다. 이 시료를 2% fetal bovine serum(FBS, Sigma Chemical Co.), penicillin/streptomycin액(Sigma Chemical Co.) 100 units/ml 및 heparin 10 units/ml 가 함유된 Leibovits-15(L-15) culture medium 1 ml 를 분주해 둔 1회용 소형 petridish에 넣고 시료를 잘

게 분쇄한 후 nylon membrane을 통과시켜 세포 현탁액을 준비하였다. 이 현탁액으로부터 Santarem and Figueras(1995)에 따라 백혈구 층을 분리하였다.

분리된 백혈구층을 2% FBS가 첨가된 L-15 medium으로 3회 세척한 후 1×10^6 cells/ml의 농도로 실험용 세포 현탁액을 준비하였다. 이것을 96-well tissue culture plate의 각 well에 각각 100 μ l씩 분주한 다음 18°C에서 2시간 동안 부착시켰다.

② 자극물의 조제

자극물로는 Whyte *et al.* (1989)의 방법에 따라 opsonized zymosan을 준비하였다. zymosan(Sigma Chemical Co.) 0.02g에 FBS 1ml를 첨가하여 20°C에서 30분간 반응시켰다. 이것을 멸균 Hank's balanced salt solution(HBSS) ml 당 nitro blue tetrazolium(NBT) 이 0.1 mg으로 조정된 용액 10 ml에 첨가하였다.

③ NBT 환원능 시험

NBT 환원능 실험은 장과 김(1996)의 방법에 따랐다. Blank는 zymosan이 첨가되지 않은 NBT 용액으로 처리된 식세포의 흡광도 값을 사용하였다.

NBT 환원 값은 zymosan을 첨가한 시료의 흡광도 측정치에서 첨가하지 않은 시료의 흡광도 측정치를 뺀 값을 사용하였다.

Chemiluminescence(CL) response

① Macrophage의 준비

시료로 사용할 macrophage의 준비에서 식세포의 분리는 활성 산소 측정에서와 동일한 방법으로 시행하였다.

② 자극물의 조제

자극물의 조제는 Secombes(1990)의 방법에 따라 실시하였다. 제작된 zymosan pellet을 10 ml의 녀치 혈청에 넣고 25°C에서 30분간 opsonin화하였다. opsonized zymosan을 PBS로 세척한 후 상정액을 버리고 50 ml의 PBS로 1 mg/ml의 농도로

제작하여 4°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

③ CL response

녀치 macrophage의 CL response 실험은 Stave *et al.*(1983)의 방법을 변형하여 실시하였다. 즉, 1×10^6 cells/ml의 농도로 조정된 macrophage를 polypropylene tube에 400 μ l씩 분주한 다음 실험에 사용하였으며, luminol은 Scott and Kleisius(1981)의 방법에 따라 준비하였다. 400 μ l의 세포와 700 μ l의 luminol working solution을 10분간 반응시킨 후 준비한 zymosan solution 300 μ l를 첨가하여 luminometer(LKB 1251, BioOrbit)로 측정하였다. 측정 시간은 50분간이었으며 각 시료에 대한 peak 값과 평균값을 구하였다.

점액 및 혈청 중 lysozyme의 용균능 측정

실험어의 체표 점액 및 혈청 중의 lysozyme 용균능은 각각 Takahashi *et al.*(1986)의 방법을 사용한 김(1992)의 방법과 Ellis(1990)의 turbidimetric assay법을 이용하여 측정하였다.

통계학적 유의성 검정

대조구와 실험구 사이의 통계학적 유의성($P \leq 0.05$)은 Student's *t*-test로 검정하였다. 다만 말초혈액 중의 백혈구 수에 대한 통계학적 유의성은 paired Student's *t*-test로 검정하여 대조구에 대한 *P* value로 나타내었으며, $P \leq 0.05$ 일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

안정 시험구의 폐사체 출현

안정 실험구의 실험에서 온도 변화를 주기 시작한지 2일째부터 폐사 어체가 출현하기 시작하여 7일 이내에 다수의 폐사 어체가 관찰되었다. 특히, Fig. 1에서와 같이 실험 시작 7일째에 이미 18%에 이르는 높은 폐사율을 나타내어 대조구와 뚜렷한 차이를 보였다.

30일간의 누적폐사율은 대조구의 4.4%에 비하여 실험구가 22.2%로서 큰 차이를 나타내었다.

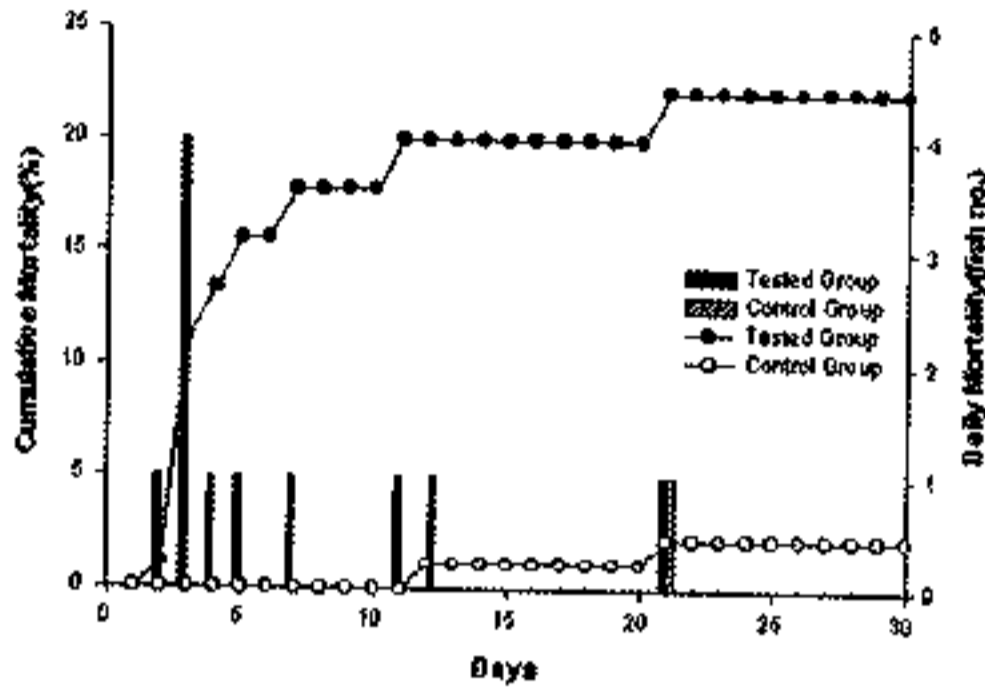


Fig. 1. Cumulative mortality(●, ○) and daily mortality(■, ▨) induced by impact of water temperature fluctuation in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*.

말초혈액 중 혈구수

적혈구 5,000 cell에 대한 백혈구 수의 변화는 Table 1에 나타내었다. 호중구의 경우, 대조구는 7일째 이후 안정된 수치를 보이며, 14일째에 유의적 증가를 보였다($P \leq 0.022$). 실험 기간 동안에 실험구의 최대 및 최소 호중구 수는 각각 10.85 세포와 3.20 세포이었으며, 대조구는 각각 6.69 세포와 2.69 세포로 나타나 수온 자극을 받은 실험어의 순환 혈중 호중구 수가 높은 상태

로 유지되었다.

수온 변화의 지속 일수에 따른 림프구의 변화에서 대조구는 2일째에 가장 높은 51.77 세포가 관찰되었으며 14일째에 가장 낮은 16.67 세포가 관찰되었다. 실험구에서는 림프구의 수가 12.56~31.58 세포로 나타나서 대조구에 비하여 순환 혈중 림프구의 수가 상대적으로 낮은 상태로 유지되었다.

전구는 온도 변화 2일째에 실험구가 대조구에 비하여 유의적 감소 현상을 보였으며($P \leq 0.05$), 그 외의 조사에서는 유사한 수치를 보였다.

식균율 및 식균지수

식균율 및 식균지수에 관한 실험 결과는 Fig. 2(A와 B)에 나타내었다. 수온 자극 3일 및 14일째의 식균율은 대조구 보다 실험구에서 높게 나타났다. 수온 변화 3일째 대조구의 식균율은 0.5 시간째에 24.4%로 실험구 보다 높았으나, 시간의 경과에 따라서 감소하는 경향을 보였다. 실험구의 식균율은 0.5시간째에 0% 이었으나 3시간째까지 급격하게 증가하여 약 80.6%를 나타낸 후 6시간째에 감소하는 경향을 나타내었으며, 식작용 실험 시작 후 3시간째에는 대조구에 비하여 유의적 차이를 나타내었다($P \leq 0.05$). 수

Table 1. Effects of stress induced by repeated changes of water temperature on leucocyte numbers in peripheral blood of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*

| Cell type | Division | Leucocyte numbers(cells/5,000 red blood cells) | | | | | | | |
|--------------|----------|--|---------|---------|---------|---------|----------|----------|----------|
| | | 0 day | 1st day | 2nd day | 3rd day | 7th day | 14th day | 21st day | 28th day |
| Neutrophils | Control | 3.10 | 3.56 | 6.69 | 5.45 | 3.10 | 2.69 | 13.71 | 3.60 |
| | Test | | 5.43 | 3.20 | 6.25 | 6.90 | 10.85 | 6.75 | 4.60 |
| | P value | - | 0.431 | 0.267 | 0.330 | 0.296 | 0.022 | 0.136 | 0.581 |
| Lymphocytes | Control | 21.40 | 21.85 | 51.77 | 28.00 | 33.57 | 16.67 | 24.60 | 18.00 |
| | Test | | 31.58 | 19.08 | 12.56 | 22.67 | 25.00 | 20.22 | 21.00 |
| | P value | - | 0.064 | 0.001 | 0.020 | 0.475 | 0.114 | 0.494 | 0.679 |
| Thrombocytes | Control | 2.10 | 5.14 | 4.92 | 0.60 | 1.14 | 1.20 | 0.90 | 1.00 |
| | Test | | 3.43 | 1.38 | 0.2 | 1.00 | 1.10 | 0.44 | 0.80 |
| | P value | - | 0.550 | 0.002 | 0.241 | 0.890 | 0.904 | 0.640 | 0.833 |

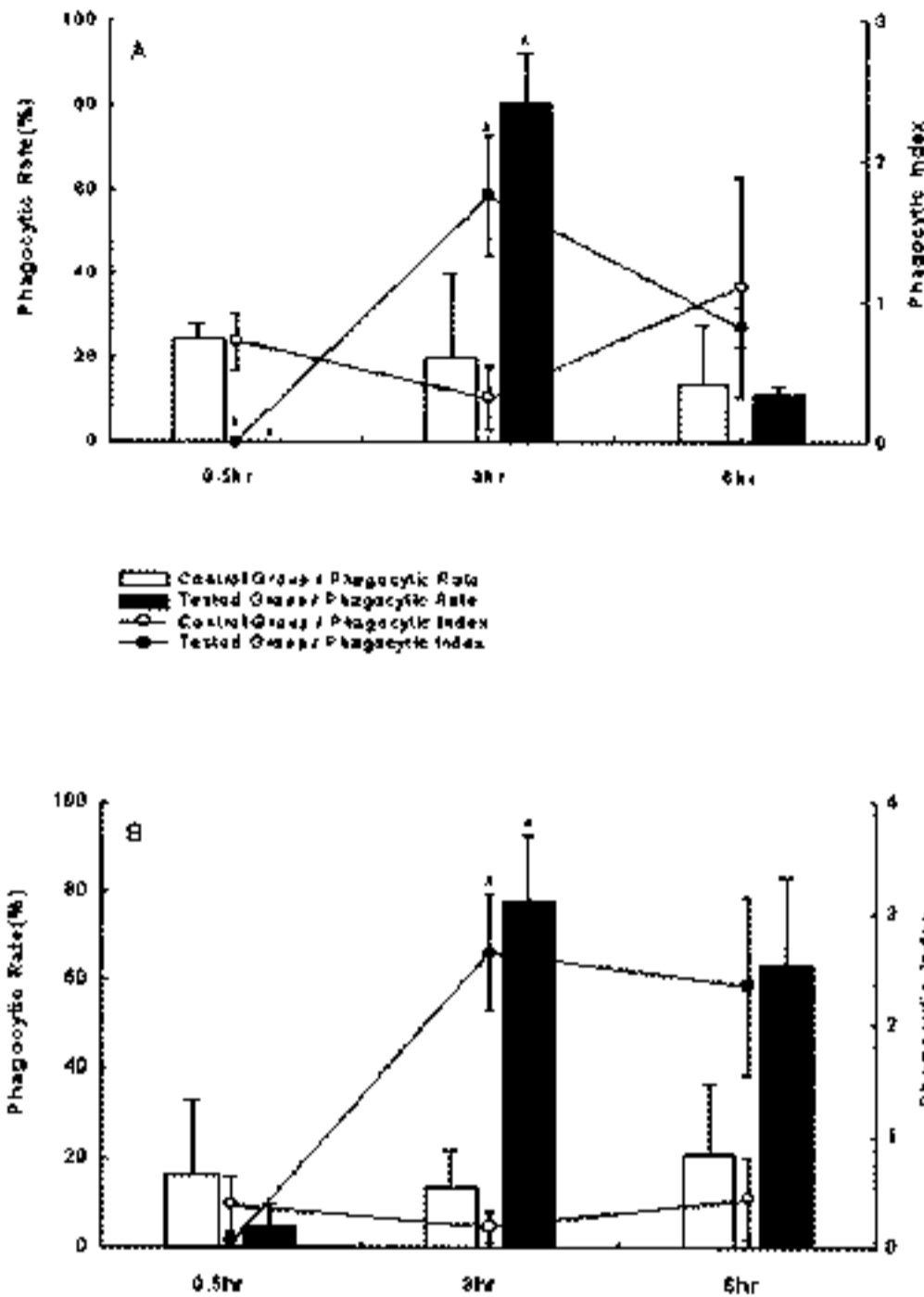


Fig. 2. Effects of stress induced by repeated water temperature changes on phagocytic rate and phagocytic index of macrophages in peripheral blood of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, blood at 3rd day(A) and 14th day(B). Asterisk indicates a significant difference from the control group.

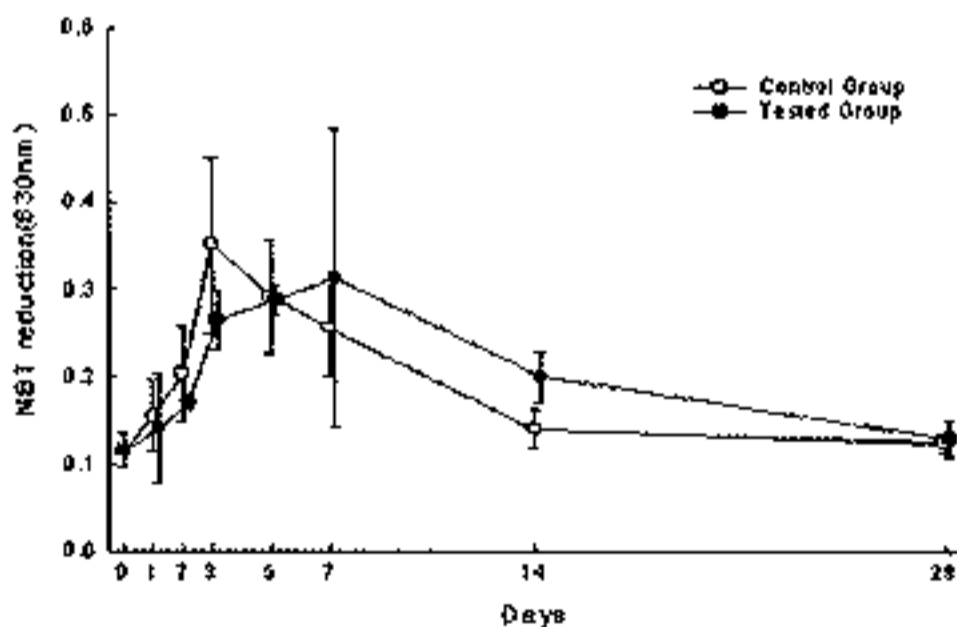


Fig. 3. Effects of stress induced by repeated water temperature changes on NBT reduction of macrophages of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*.

온 자극을 시작한지 14일째 대조구의 식균율은 0.5시간째에 16.7%이었으며, 이후 시간의 경과에 따라서 약간 감소하였다가 6시간째 증가하

는 경향을 보였다. 한편, 실험구의 식균율은 0.5 시간째에 5.0%이었으며 3시간째에 급격하게 증가하여 약 78.1%를 나타낸 후 6시간째에 감소하는 경향을 나타내었으며, 실험 시작 후 3시간째에는 대조구에 비하여 유의적 차이를 나타내었다($P \leq 0.05$).

식균지수 또한 식균율의 변화와 비슷한 경향을 보였는데, 3일째와 14일째의 실험구는 3시간째에 가장 높은 식균지수를 나타내었으며, 대조구는 0.5시간째 이후 감소하였다가 다시 6시간째에 증가하는 경향을 보였다.

한편 대조구의 식균율과 식균지수는 각각 0~37.1%와 0.05~1.89의 범위로 실험 기간에 따른 큰 변동은 없었다.

식세포의 활성 산소 환원능

온도 변화 경과 일수에 따른 활성 산소의 환원능을 조사한 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 실험구 및 대조구의 값 모두 3일이나 7일째까지 증가한 후 서서히 감소되는 경향을 나타내었다. 그러나, 실험구의 활성 산소 환원능이 수온 자극 후 3일째까지는 대조구에 비하여 낮은 수치를 보여 이 기간 동안 식세포의 활성이 저하되는 것으로 나타났다. 실험구는 7일째에 최대값을 나타내며, 대조구는 3일째에 최대값을 나타내었으나, 95% 신뢰구간에서 실험 기간 동안 유의적 차이를 나타내지 않았다.

CL response

수온 자극 후의 경과 일수에 따른 CL 반응을 측정하여 그 결과를 50분간 측정된 값의 최대값과 평균치를 구한 결과는 Fig. 4(A와 B)에 나타내었다.

CL 반응의 최대값(Fig. 4, A)은 실험 기간 동안 불규칙적으로 변동하고 있지만 수온 자극 후 5일째까지는 실험구의 CL값이 대조구에 비하여 현저하게 낮은 것으로 나타났으며 이 기간 동안에 나타나는 대조구와 실험구의 CL값은 유의적

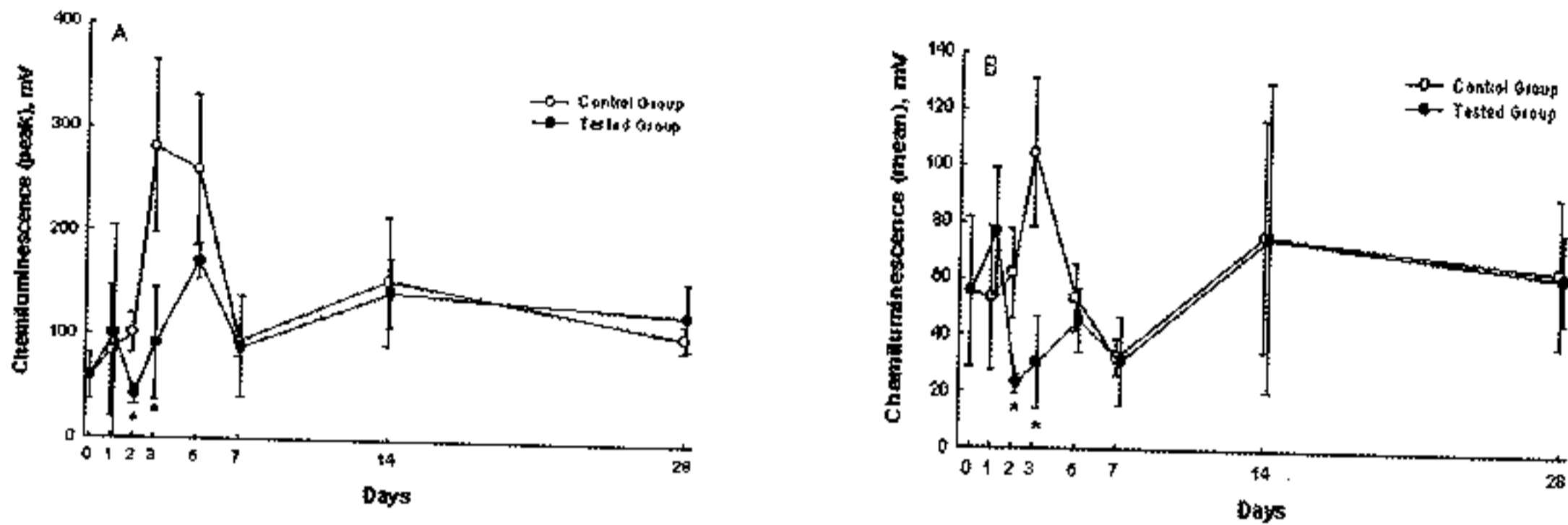


Fig. 4. Effects of stress induced by repeated water temperature changes on chemiluminescence activity(A, peak; B, mean) of macrophages of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Asterisk indicates a significant difference from the control group.

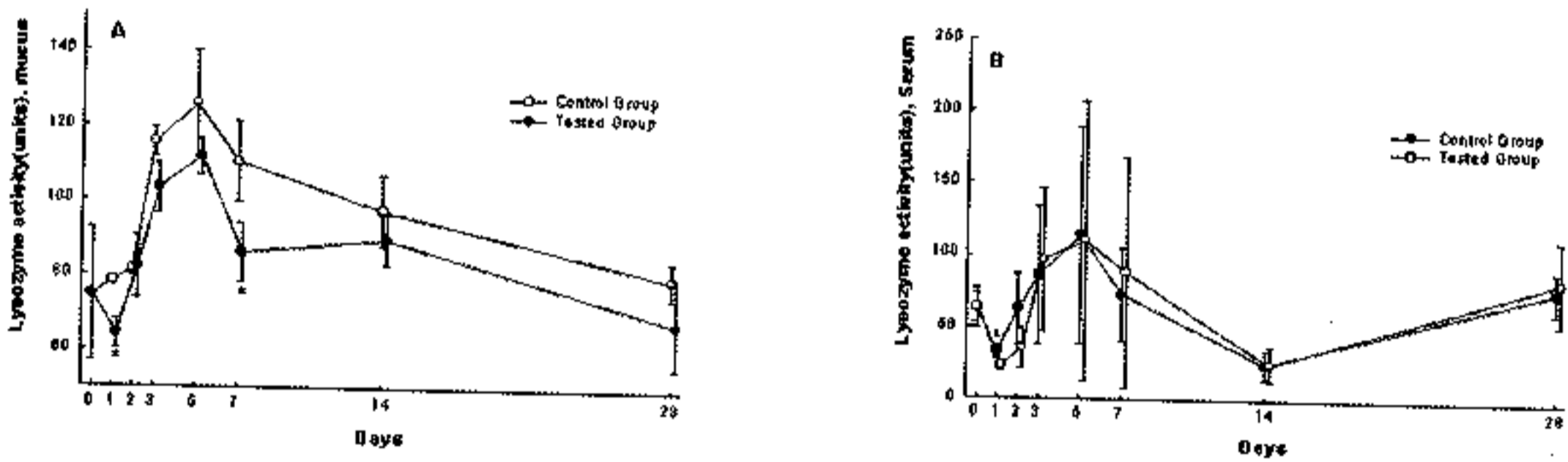


Fig. 5. Effects of stress induced by repeated water temperature changes on lysozyme activity in skin mucus(A) and in blood serum(B) of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Asterisk indicates a significant difference from the control group.

인 차이가 인정되었다($P \leq 0.05$).

CL 반응의 평균치(Fig. 4, B)도 최대값과 유사한 경향을 가지며, 2일과 3일째에 실험구가 대조구에 대하여 유의적인 값을 나타내었다($P \leq 0.05$).

체표 점액 및 혈청 중 lysozyme의 용균능

온도 변화 경과 일수에 따른 점액 및 혈청 lysozyme의 용균능을 조사한 결과는 각각 Fig. 5(A와 B)에 나타내었다.

실험 기간 동안 체표 점액의 lysozyme 용균능(Fig. 5, A)은 실험구와 대조구 사이에 유의적 차이가 있었으며, 특히 수온 자극 후 1일 및 7일째에는 $P \leq 0.05$ 에서 유의성 차이가 관찰되었다.

또한 실험 전 기간을 통하여 대조구의 lysozyme 용균능은 실험구에 비하여 높은 상태로 유지되고 있었다.

그러나 혈청 중의 lysozyme 용균능(Fig. 5, B)은 실험 기간 동안 수온 자극 1일째를 제외하고 실험구와 대조구 사이에 유의적 차이를 보이지 않았으며 실험 초기에는 개체들 간의 용균능 차이가 심함을 알 수 있었다.

고 찰

지속적인 수온 변동이 넙치의 생존에 미치는 영향을 알아본 안정실험구 실험에서 실험 개시 1주일 이내에 대조구에서는 폐사가 없었으나 실

험구에서는 이미 2일째부터 폐사가 발생하였으며, 실험종료시까지의 누적폐사율은 대조구의 4.4%에 비하여 실험구는 22.2%로서 큰 차이를 나타내었다. Barton and Schreck(1987)은 chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) 치어를 고온(21.0°C)에서 200 g/l 의 밀도로 수용하면 12시간째부터 폐사가 발생하기 시작하여 72시간째 누적폐사율이 100%가 되며, 저온(7.5°C)에서도 12시간 및 24시간째에 약 20%의 폐사가 일어난다고 하였다. 이러한 현상이 발생하는 이유가 본 실험의 온도 자극과는 다르지만, 장기간 동안 동일한 형태의 자극이 지속되면 폐사가 중지되는 것으로 나타나서 어떤 stress가 양식 어류에 미치는 pattern은 비슷하며 또한 어느 정도 자극의 수준이 반복되면 적응 가능성을 시사하고 있는 것으로 생각된다. 다만 이번 실험의 수온 변화 범위가 18~25°C로 넘치의 적정 사육 온도에 속하는 점(김, 1993)을 감안한다면, 이 수온 범위를 벗어난 보다 고수온 영역에서의 변화는 양식 어류에 대한 더 많은 피해를 유발할 가능성이 있는 것으로 사료된다.

수온 자극 시간 경과에 따른 백혈구수의 변화 조사에서 호중구는 실험구가 대조구 보다 다소 높은 출현율을 보였으나, 림프구는 대조구에 비하여 실험구가 현저하게 감소된 것으로 나타났다. Ellsaesser and Clem(1986)은 channel catfish를 수송하면 18시간 후 leucocytes가 감소하게 되는데 림프구는 감소하지만 호중구는 증가한다고 한 것과 같이 stress를 받은 어류의 초기 반응으로 나타나는 현상이라 생각된다. 그리고 Ellis(1981)는 stress를 받은 어류에서는 순환 혈액중의 림프구 수가 감소되므로 특이적 방어능이 저하된다고 하였다. 그러므로 본 실험에서 림프구의 감소 현상이 관찰된 것은 수온 변동에 의한 자극이 넘치에 큰 stress 요인으로 작용하는 것을 반영한 결과로 생각된다.

식균율과 식균지수에 대한 영향 시험에서 수온 자극을 준 실험구의 식균율과 식균지수가 식

작용 시험 반응 시간 동안 높게 나타났다. 하지만 실험 초기의 생체 방어에서는 대조구의 식세포가 더욱 적극적으로 식작용에 관여한다는 사실이 관찰되었다.

식세포의 능력을 측정하는 방법으로 NBT의 환원량을 조사하는데 이 방법은 미생물 살해 기전 역할을 하는 세포 내 O_2^- 의 양을 측정하는 방법이다. 수온 변화 시간 경과에 따른 NBT 환원량은 실험구와 대조구에서 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다.

식세포의 능력을 판정하는 다른 방법인 CL 반응 시험은 식세포의 호흡폭발(respiratory burst)이 singlet oxygen(1O_2)의 생성과 관련한 light energy를 측정하는 것으로서, luminol-enhanced chemiluminescence는 MPO(myelo-peroxidase)- H_2O_2 -halide system을 유도하게 된다(Metcalf et al., 1986). 이러한 살해기전을 나타내는 CL 반응은 그 활성이 온도 자극 2일 및 3일째의 실험구에서 유의적으로 낮게 나타났다. 이러한 현상은 수온이 급격하게 변하면 그 즉시 넘치 식세포의 살균 활성이 약화된다는 것을 반영하는 것으로 생각된다.

식세포의 살해 능력을 조사하기 위한 NBT reduction 실험과 CL response 실험의 결과를 비교해보면 전자보다 후자에서 살해능의 유의적 차이를 볼 수 있다. 이러한 결과는 넘치의 식세포가 세균이나 바이러스 등의 이물질을 살해할 때 superoxide anion(O_2^-)의 생성을 이용하는 기전보다는 H_2O_2 와 halide ions를 이용한 catalyze 또는 세포나 미생물의 halogenation에 의한 살해능이 강하거나, 온도 자극에 의한 stress가 O_2^- 의 생성보다는 catalyze나 halogenation에 의한 살해능을 억제시킬 수 있음을 시사하는 것으로 생각된다. 이와 같이, 식세포의 식균작용과 살균작용에 관한 실험 결과를 정리해보면, 수온 변동 자극 실험구의 식세포가 대조구에 비하여 식균작용이 실험 기간 동안 지속적으로 높게 나타난 것과 관련하여 생각하면, 반드시 실험구의 식세

포가 식균 활성이 높다고 판단하기보다는 오히려 세포의 살균, 소화작용이 저하되어 식균된 세균이 분해되지 않아서 지속적으로 관찰되고 있을 가능성도 배제할 수 없다.

Lysozyme은 macrophage가 생산하는 효소로서 주로 그람 양성균의 세포벽을 파괴하는 기능을 가지는데, 넙치의 경우 혈청뿐만 아니라 점액에서의 활성이 매우 높은 것으로 알려져 있다 (김, 1992). 본 연구에서 수온 변동 자극 일수에 따른 lysozyme 활성을 점액과 혈청에서 측정된 결과, 점액 lysozyme의 활성은 실험 기간 동안 높게 나타났으며 1일, 3일 및 7일째에 유의적으로 차이를 나타내었다. 그러나 혈청 lysozyme의 활성은 실험 기간 동안 실험구와 대조구에서 유사한 수준을 나타내었다. 그러므로 수온 변화에 의한 스트레스는 넙치의 경우 체표 및 장관에서의 생체 방어 기구인 점액 lysozyme의 활성에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

본 연구에서 각종 parameter에 대한 측정치가 실험시작 초기의 실험구와 대조구 사이에서 크게 차이가 났다. 이러한 현상으로 볼 때, 넙치의 경우 수온 자극의 영향이 자극 초기에 크게 나타나며 이후 시간이 경과함에 따라 이에 적응하는 현상을 반영하는 것으로 생각된다.

결론적으로, 수온의 변동은 그 자체만으로 넙치의 폐사 원인이 될 수 있으며, 혈구 조성의 변화와 같은 생리적인 장애를 유발하는 것을 알 수 있었다. 그리고, 주로 수온 변동 자극 초기인 약 1주일 이내는 식세포의 살균능 저하, 점액 lysozyme의 용균능 약화 등 생체 방어능의 저하 현상을 초래하며 이러한 현상들이 복합적으로 작용을 하게되어 수온 변화의 초기 폐사 유발에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

요 약

본 연구는 넙치에 대한 수온 변동 자극의 영향을 생체 방어적인 측면에서 검토하고자 하였

다. 수온 변동 자극은 매일 18°C에서 25°C까지 상승과 하강을 반복하는 방법을 사용하였으며 그 기간은 30일간 지속하였다. 실험어는 온도 변화를 주기 시작한 후 28일째까지 무작위로 채포하여 말초혈액 중의 백혈구 수, 전혈의 식작용능, 활성산소 환원능, chemiluminescence (CL) response 및 lysozyme 용균능과 같은 각종 비특이적 생체방어와 관련한 실험을 수행하였다.

수온 변동 자극을 주기 시작한 후 1일째부터 시작하여 1주일 이내에 약 18%의 넙치가 폐사하였으며 이후에는 대조구와 유사하였다. 또한, 수온 변동 자극을 준 실험구의 호중구 수는 2주째에 유의적인 증가를 보였으며, 림프구 수는 2일과 3일째에 감소하였으나 1주째부터 대조구와 유사한 수준으로 회복되었다. 실험구에서는 식작용 결과 식균율과 식균지수에서 이물질 투여 후의 반응이 늦게 나타났다. 식세포의 활성을 조사한 NBT reduction 실험에서는 실험 기간 동안 대조구와 유사한 경향을 나타내었다. 또한, CL response의 경우, 실험구는 온도 변동 자극 초기에 대조구에 비하여 유의적으로 낮았다. 그리고, 식세포가 분비하는 용균성 효소인 점액 내 lysozyme의 활성은 실험 기간 동안 실험구에서 낮게 나타나는 경향을 보였다.

이러한 여러 가지 비특이적 생체 방어 반응의 저하 현상은 수온 변동 자극 초기에 나타났으며, 1주일 정도 지속하면 그 환경에 적응하는 것을 알 수 있었다. 그리고 이러한 현상은 이들이 초기 폐사 발생과 어떤 상관 관계에 있는 것으로 생각되었다.

참 고 문 헌

- Angelidis, P., Baudin-Laurencin, F. and Youinou, P. : Stress in rainbow trout, *Salmo gairdneri*: effects upon phagocyte chemiluminescence, circulating leucocytes and susceptibility to *Aeromonas salmonicida*. J. Fish Biol., 31

- (Supplement A) : 113-122, 1987.
- Baier-Anderson, C. and Anderson, R. S. : Suppression of superoxide production by chlorothalonil in striped bass (*Morone saxatilis*) macrophage: the role of cellular sulfhydryls and oxidative stress. *Aquat. Toxicol.*, 50 : 85-96, 2000.
- Barton, B. A. and Schreck, C. B. : Influence of acclimation temperature on interrenal and carbohydrate stress responses in juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquaculture*, 62 : 299-310, 1987.
- Brown, J. A., Moore, W. M. and Quabius, E. S. : Physiological effects of saline water on zander. *J. Fish Biol.*, 59 : 1544-1555, 2001.
- Ellis, A. E. : Stress and the modulation of defence mechanisms in fish. In: *Stress and Fish* (ed. by Pickering, A. D.), pp. 147-169. Academic Press, London, 1981.
- Ellis, A. E. : Lysozyme assay. In: *Techniques in Fish Immunology*. Fish Immunology Technical Communication no.1 (eds. by Stolen, J. S., Fletcher, T. C., Anderson, D. P., Roberston, B. S. and van Muiswinkel, W. B.), pp. 101-103, SOS publications, 1990.
- Ellsaesser, C. F. and Clem, L. W. : Haematological and immunological changes in channel catfish stressed by handling and transport. *J. Fish Biol.*, 28 : 511-521, 1986.
- Iwama, G. K., Pickering, A. D., Sumpter, J. P. and Schreck, C. B. : *Fish Stress and Health in Aquaculture*. Cambridge University Press, 1997.
- Kaattari, S. L. and Tripp, R. A. : Cellular mechanism of glucocorticoid immunosuppression in salmon. *J. Fish Biol. (Supplement A)*, 31 : 129-132, 1987.
- Maule, A. G. and Schreck, C. B. : Stress and cortisol treatment changed affinity and number of glucocorticoid receptors in leukocytes and gill of coho salmon. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 84 : 83-93, 1991.
- Maule, A. G., Tripp, R. A., Kaattari, S. L. and Schreck, C. B. : Stress immune function and disease resistance in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *J. Endocrinol.*, 120 : 135-142, 1989.
- Mazur, C. F. and Iwama, G. K. : Effect of handling and stocking density on hematocrit, plasma cortisol, and survival in wild and hatchery-reared chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquaculture*, 112 : 291-299, 1993a.
- Mazur, C. F. and Iwama, G. K. : Handling and crowding stress reduces number of plaque-forming cells in Atlantic salmon. *J. Aquat. Animal Health*, 5 : 98-101, 1993b.
- Metcalf, J. A., Gallin, J. I., Nauseef, W. M. and Root, R. K. : *Laboratory manual of neutrophil function*. pp. 87-143, Raven Press, 1986.
- Miller, N. W. and Tripp, M. R. : An immunoinhibitory substance in the serum of laboratory held killifish, *Fundulus heteroclitus* L. *J. Fish Biol.*, 20 : 309-316, 1982.
- Mock, A. and Peters, G. : Lysozyme activity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*(Walbaum), stressed by handling, transport and water pollution. *J. Fish Biol.*, 37 : 873-885, 1990.
- Moraes, G. and Bidinotto, P. M. : Metabolic impact of handling on *Pseudoplatystoma coruscans*, a widespread teleost fish. In: *Stress in Fish; Symposium Proceedings* (eds. by Barton, B., Pottinger, T., Iwama, G. and MacKinlay, D.), pp. 89-100, International congress on the biology of fish, 2000.

- Peters, G., Faisal, M., Lang, T. and Ahmed, I. : Stress caused by social interaction and its effect on susceptibility to *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Dis. Aquat. Org., 4 : 83-89, 1988.
- Santarem, H. M. and Figueras, A. : Leucocyte numbers and phagocytic activity in turbot *Scophthalmus maximus* following immunization with *Vibrio damsela* and *Pasteurella piscicida* O-antigen bacterins. Dis. Aquat. Org., 23 : 213-220, 1995.
- Schreck, C. B. : Immunomodulation: endogenous factors. In: The fish immune system; Organism, pathogen, and environment (eds. by Iwama, G. and Nakanishi, T.), pp. 311-337, Academic Press, San Diego, 1996.
- Scott, A. L. and Klesius, P. H. : Chemiluminescence: A novel analysis of phagocytosis in fish. Dev. Biol. Stand., 49 : 243-254, 1981.
- Secombes, C. J. : Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity. Tech. Fish Immunol., pp. 137-154, 1990.
- Smart, G. R. : Aspects of water quality producing stress in intensive fish culture. In: Stress and Fish (ed. by Pickering, A. D.), pp.277-293, Academic Press, London, 1981.
- Snieszko, S. F. : The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. J. Fish Biol., 6 : 197-208, 1974.
- Strange, R. J., Schreck, C. B. and Golden, J. T. : Corticoid stress responses to handling and temperature in salmonids. Trans. Am. Fish. Soc., 106 : 213-217, 1977.
- Stave, J. W., Roberson, B. S. and Hetrick, F. M. : Chemiluminescence of phagocytic cells isolated from the pronephros of striped bass. Dev. Comp. Immunol., 7 : 269-276, 1983.
- Takahashi, Y., Itami, T. and Konegawa, K. : Enzymatic properties of partially lysozyme from the skin mucus of carp. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 52 : 1209-1214, 1986.
- Tripp, R. A., Maule, A. G., Schreck, C. B. and Kaattari, S. L. : Cortisol-mediated suppression of salmonid lymphocyte response *in vitro*. Dev. Comp. Immunol., 11 : 565-576, 1987.
- Wedemeyer, G. A. and McLeay, D. J. : Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressors. In: Stress and Fish (ed. by Pickering, A. D.), pp. 247-275, Academic Press, London, 1981.
- Wise, D. J. : Effects of stress on susceptibility of naive Channel Catfish in immersion challenge with *Edwardsiella ictaluri*. J. Aquat. Animal Health, 5 : 92-97, 1993.
- Whyte, S. K., Chappell, L. H. and Secombes, C. J. : Cytotoxic reaction of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, macrophages for larvae of the eye fluke, *Diplostomum spathaceum* (Digenia). J. Fish Biol., 35 : 333-345, 1989.
- 김인배 : 어류양식. pp. 323-329, 신흥출판사, 1993.
- 김진우, 박수일, 전세규 : 양식넙치로 부터의 lysozyme 정제와 어류 병원성 세균에 대한 정균작용. 한국어병학회지, 5 : 87-92, 1992.
- 장선일, 김강주 : 세포학 및 면역학 실험노트. pp. 179-182, 원광대학교 출판국, 1996.
- 장영진, 박명룡, 강덕영, 이복규 : 양식넙치 (*Paralichthys olivaceus*)의 생리에 미치는 연속적인 수온 급강하의 영향. 한국수산학회지, 32 : 601-606, 1999.