

빨간유글레나, *Euglena rubra* 건조분말의 사료첨가에 따른 나일틸라피아, *Oreochromis niloticus*에서의 영향

이재근 · 이한나 · 김영대 · 최상훈 · 박관하†

군산대학교 해양과학대학 수산생명의학과

Effects of feeding of dried *Euglena rubra* on Nile tilapia *Oreochromis niloticus*

Jae Geun Lee, Han Na Lee, Young Dae Kim, Sang Hoon Choi and Kwan Ha Park†

Department of Aquatic Life Medicine, Kunsan National University, 573-701, Korea

To examine the effects of *Euglena rubra* (*E. rubra*) feeding on Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* were fed diets containing dried powder of *E. rubra* at 0.5 or 2% for 4 weeks. Growth, selected hematological and non-specific immune parameters were assessed at 2 and 4 weeks. There were no significant changes in body weight gain and erythrocyte levels. However a significant and diet *E. rubra* level-related decrease in leukocyte level was noted. Significant increases were observed in respiratory burst activity (nitroblue tetrazolium reduction) and lysozyme activities following *E. rubra* feeding. These results indicate that *E. rubra* could be beneficial to fish, but excess feeding could be toxic.

Key words : *Euglena rubra*, Tilapia, Hematological and innate immune parameters

Euglena rubra (*E. rubra*)는 유글레나속에 속하는 원생동물로 세포질 속에 다량의 적색 색소 hematochrome을 저장하고 있어서 (Johnson, 1939) 빨간유글레나라는 이름으로 불린다. 이 hematochrome은 태양광선이 강할 때 생물체 상부에 넓게 퍼지면서 광에 의한 손상으로부터 자신을 방어하는 독특한 기술을 수행한다. 이때 보통 갈색이던 세포체 덩어리의 색이 밝은 적색으로 변하여 육안 적으로 쉽게 인식되기 때문에 그런 이름으로 불리게 되었다. 또한 *E. rubra*는 체내에 엽록체를 가지고 있어서 광합성을 하면서도, 세포벽이 없고 편모로 유영을 할 수 있기 때문에 식물과 동물의

중간적 특성을 가지고 있다 (Rosowski, 2004).

유글레나속 생물들에 존재하는 생리활성물질에 대해서는 알려진 것이 거의 없지만, 몇 가지 유글레나속은 세포질 내에 β -1,3 glucan으로 구성된 paramylon이라 불리는 과립을 저장하고 있는 것으로 보고되고 있다 (Barsanti *et al.*, 2001). 이 β -1,3 glucan은 비특이적 면역증강작용이 있어서 세균성 감염에 대한 항병성, 항균작용, 항돌연변이 작용, 항암작용 등 유용한 약리 기능을 보유하고 있다고 알려져 있다 (Kusmic *et al.*, 1999; Monfils, 2011). 유글레나속 생물 중 특히 *E. gracilis*는 세포 건조량의 20% 이상이 β -1,3 glucan으로 구성되어 있으며 EPA, DHA, vitamin E 등도 함유하고 있어서 유망한기능성 생물로 인식되고 있다 (Hayashi *et al.*, 1995). 반면 다른 유글레나속의 하나인 *E.*

†Corresponding author : Kwan Ha Park

Tel : +82-63-469-1885

E-mail : khpark@kunsan.ac.kr

*sanguinea*는 euglenophycin이라는 독소를 함유하고 있으며 이 독소는 미국의 North Carolina, South Carolina, Texas, Arkansas, Mississippi 등지에서 발생했던 striped bass, sheepshead, channel catfish 등 어류의 폐사 원인물 질로 보고된 바 있다 (Zimba *et al.*, 2004).

최근 남원지역의 몇몇 노지 양식장에서 *E. rubra*가 증식하였으며, 이때 못에 양식 중인 미꾸리가 *E. rubra*를 먹는 것이 관찰되었다. 유글레나속의 생물들에서는 종류에 따라 어류에 유용한 성분뿐 아니라 유해한 성분도 함유하고 있는 것으로 추정되고 있으나, 특히 *E. rubra*에 대해서는 알려진 바가 전혀 없기 때문에 *E. rubra*를 섭식하는 자체가 어류에 유익하지 아니면 해로운지에 대해서 의문이 발생하였다.

본 연구는 *E. rubra*를 어류에 투여하였을 때 성장, 혈액조성 및 비특이적 면역능에 어떤 영향이 나타나는지 평가하기 위해 나일틸라피아, *Oreochromis niloticus*의 사료에 건조한 *E. rubra*분말을 투여하고 성장, 혈액 및 면역능과 관련된 몇 가지 변수를 평가하였다.

재료 및 방법

시험어류 및 사육조건

체중 35.0 ± 0.3 g의 틸라피아 ($n=180$)를 3개의 군으로 나누어, 대조군, 0.5%군 (5g 유글레나/kg 사료), 2%군 (20g 유글레나/kg 사료)을 설정하였다. 각 군당 60마리를 다시 20마리씩 3개씩의 수조로 나누어 수용하였다. 수량 90L의 유수식 수조 (9L/h)를 사용하였으며 사육수온은 $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 로 유지시켰다. 사육수는 sodium thiosulfate (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 지속적으로 투입하여 탈염소하면서 지속적으로 폭기하여 용존산소를 유지하였다. 광주기는 12시간 점등-12시간 소등으로 하였으며 사료는 체중의 3%

를 하루에 2번 나누어 공급하였다 (9:00, 18:00). 틸라피아를 1주일간 시험환경에 적응시킨 후 *E. rubra*가 첨가된 사료를 투여하였다. 어체시료는 시험시작 2주, 4주 후에 수조당 각각 10 마리씩을 채취하여 분석에 사용하였다. 단 체중의 측정은 2주까지는 전체를, 나머지 4주 후까지 혈액분석을 위해 희생시킨 10마리를 제외한 나머지 전부의 체중을 매주 측정하였다.

Euglena rubra 시료

2009년 여름 전라북도 남원에서 채취한 *E. rubra*는 실험실에서 증류수로 씻은 후 $300 \times \text{g}$ 에서 원심 분리하였다. 고형물을 실온에서 건조시켜 수분을 제거하여 최종적으로 분말형태의 *E. rubra*를 얻었다 (Das *et al.*, 2009). 틸라피아용 배합사료 (CJ Feed, Seoul, South Korea)에 *E. rubra*를 첨가한 후 총 20%의 물을 넣어가면서 잘 혼합하여 반죽형태의 사료를 만들었다. 만들어진 사료는 -20°C 냉동고에 보관하였으며 사료공급 전에 녹여서 공급하였다. 급이량은 수분을 제외한 건조량을 기준으로 하였다. *E. rubra*의 동정은 군산대학교 김영식 교수에게 의뢰하여 확인하였다.

시료채취 및 혈액학적 분석

틸라피아를 2주 및 4주째에 수조당 10마리씩 군당 총 30마리씩 포획하여 수산용마취제 AQUI-S® (AQUI-S New Zealand, Lower Hutt, New Zealand)로 마취시킨 후 미부혈관에서 채혈하였다. 혈액학적 분석은 hematocrit (Ht), red blood cell (RBC) count, white blood cell (WBC) count를 측정하였다. 채혈한 혈액의 일부에 heparin을 가하여 hematocrit, RBC 및 WBC의 측정에 사용하였으며 나머지는 heparin 처리 없이 혈청의 분리에 사용하였다. Hematocrit치는 microhematocrit 방법으로, RBC 및 WBC는 Thomas hemocytometer (Marienfeld, Lauda Königshofen, Germany)를 이용해

광학현미경 400배율로 각각 측정하였다. 남은 혈액은 원심분리 (1000 × g, 5 min, 4°C) 하여 혈청을 분리하여 분석 시까지 -70°C에 보관하였다. 채혈 후 어류를 개복하여 신장을 적출하여 respiratory burst activity의 측정에 사용하였다.

Lysozyme activity

Turbidometric method를 이용하여 용균능을 분석하였다 (Engstand *et al.*, 1992). 즉, 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 6.2) 에 *Micrococcus lysodeikticus* cells (0.2mg/ml, Sigma) 을 넣어 혼합액을 제조하였다. 이 혼합액 275µl와 어류혈청 25µl를 96-well U-shaped bottom plate에 넣고 37°C에서 효소분석기 (EL-808 Model, BIO-TEK, Winooski, Vermont, USA) 를 이용해 450nm에서의 흡광도를 4분간 측정하였다. 1분당 0.001의 흡광도 감소를 유발하는 효소량을 1unit으로 하였다.

Respiratory burst activity

틸라피아 두신에서 무균적으로 백혈구를 분리하여 nitroblue tetrazolium (NBT) reduction assay를 이용해 분석하였다 (Ai *et al.*, 2007). 농도 0.5%의 trypan blue (Sigma) 를 이용하여 백혈구의 생존율을 확인한 후 세포수를 1×10⁶cells/ml로 Dulbecco's Modified Eagle's Medium에 부유하였다. 분리한 두신 백혈구를 96-well U-shaped bottom plate에 100µl씩 넣고 25°C에서 2시간 동안 세포를 부착하였다. 미부착된 세포를 phosphate buffered saline로 3회 세척하여 제거하였다. NBT 용액 (0.1%, Sigma) 100µl를 세포에 가하고 1시간 동안 배양하였다. Absolute methanol (Hayman, Witham, Essex, England) 을 이용해 세포를 고정한 후 다시 absolute methanol (Hayman) 로 3회 세척하였다. Plate 내의 수분을 공기 중에서 날린 후 2N KOH 용액 120µl와 dimethyl sulfoxide (Kanto Chemical Co.,

Tokyo, Japan) 140µl를 넣어 침전되어 있는 formazan을 용해하였다. 형성된 formazan을 측정하기 위해 plate reader (EL-808, BIO-TEK) 를 이용하여 650nm에서의 흡광도를 측정하였다.

통계처리

Data는 평균과 표준편차 (mean ± S.D.) 로 표현하였으며 유의성 점검에는 one-way analysis of variance를 이용하였다. 이 분산분석에서 유의성이 있는 경우 Student-Newman-Keul's test로 각 군 사이의 유의성을 검정하였다. 유의성의 판단 기준은 P < 0.05로 하였다.

결과 및 고찰

이 연구에서 *E. rubra* 건조분말을 사료에 0.5 또는 2.0%의 수준으로 함유시켜 틸라피아에 4주간 공급하였을 때, 성장에는 유의성 있는 변화를 초래하지 않았으나 혈액학적 변수와 비특이적 면역능의 변수에는 영향을 미침을 보여주고 있다. 본 논문에서 보고하는 결과는 비록 기초적인 자료이기는 하지만, 이 담수조류가 어류 양식장에서 발생할 수 있을 뿐 아니라 아직까지 *E. rubra*가 어류에 미치는 영향에 대한 보고가 전혀 없는 상황에서 중요한 의미를 갖는다.

Fig 1에서 보는 바와 같이 4주간 사육 후 틸라피아의 체중은 개시시의 1.4~1.5배 수준으로 증가하였고 이 증가에 *E. rubra*는 유의적인 영향을 미치지 않았다. 유글레나류를 양식생물의 영양원으로 활용할 목적으로 수행한 Hayashi *et al.* (1995) 의 연구에서, *E. gracilis*를 단백질원으로 보리새우, *Penaeus japonicus*에 투여하였을 때 20.5%까지에서도 성장의 저해는 유발하지 않았다고 보고하였다. 시험한 유글레나의 종류 및 양식 종에서의 차이 때문에 직접적인 비교는 어렵지만 대체적으로 유글레나가 아주 강력한 독소

를 함유하는 것 같지는 않다. 현재의 결과를 보면 2.0%를 첨가한 군에서는 비록 통계학적 유의성은 발견되지 않았으나 대조군에 비해 성장이 저하된 경향은 있었다. 따라서 0.5% 수준의 시료투여는 안전한 것으로 볼 수 있으나 함유 농도를 증가시키고 장기간 사육시에는 어류 성장에 장애를 초래할 가능성이 남아 있음을 시사한다.

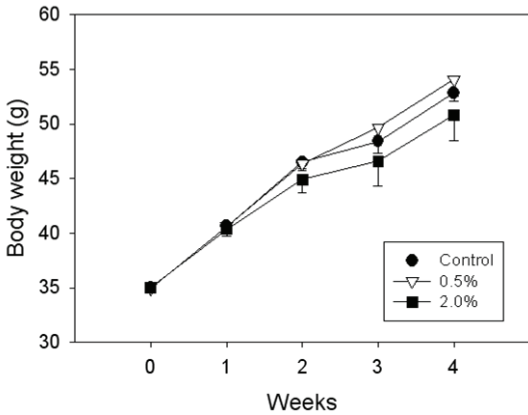


Fig. 1. Body weight change during the experiment (0~2 weeks: n=60, 3~4 weeks: n=30, Values are mean ± S.E.)

어류의 혈액성상은 영양, 건강상태 및 스트레스 정도를 평가하는 지표로 흔히 이용된다. Fig. 2는 시료를 투여한 틸라피아의 혈액학적 지표의 변화를 보여주고 있다. 이 실험에서 *E. rubra* 0.5% 첨가한 군에서 4주 후에, 또 2.0%를 첨가한 군에서는 2주 이후부터 감소된 WBC 수치를 얻었으며, 사료 내 농도 및 투여기간에 관련한 WBC의 일관성 있는 감소가 어떤 의미를 갖는지에 대해서는 추가적인 연구가 필요하다. 보통 WBC 수의 감소는 lymphocyte 생산 및 유리억제의 결과로 나타나지만 *E. rubra*의 중요한 독성으로 해석하여야 할 것인지 아닌지는 현재로서는 확실히 알 수가 없다. 한편 hematocrit치는 0.5%군의 4주차에서만 유의적으로 대조군보다 높은 값을 얻었으며

RBC는 모든 시험군에서 변화를 보이지 않았다. Hematocrit의 증가에도 불구하고 RBC 증가는 나타나지 않는 경우 적혈구의 팽윤 (swelling) 현상으로 해석되지만, 이러한 변화가 2.0% 투여군에서는 나타나지 않아 전체적으로는 큰 의미가 없는 것으로 생각된다.

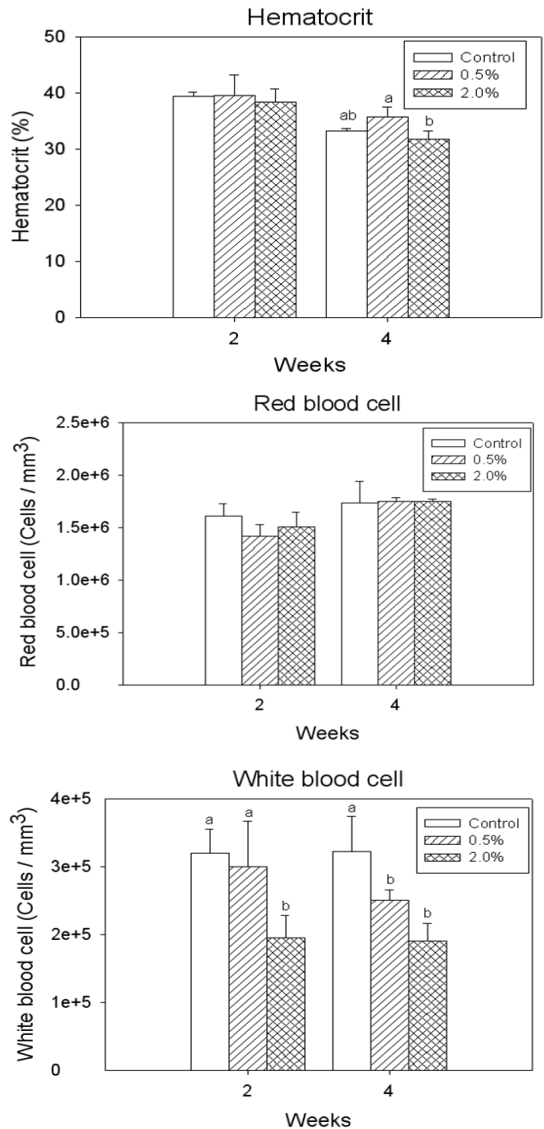
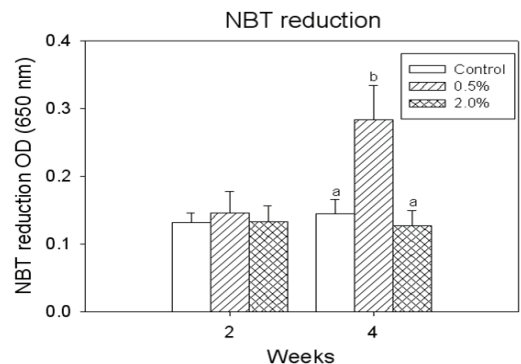


Fig. 2. Blood parameters (Ht, WBC, RBC) of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* fed *E. rubra*-supplemented diet for 4 weeks (n=30). Values are mean ± S.E.. Mean values bearing same super-script are not statistically significant (P > 0.05).

어류의 respiratory activity (이 연구에서는 NBT 환원능으로 측정) 및 lysozyme 효소활성은 비특이적 면역능의 척도로 사용된다 (Alexander and Ingraham, 1992). Fig. 3에서는 시험사로 투여 후의 NBT 환원능 및 lysozyme 활성변화를 보여주고 있다. *E. rubra* 0.5%를 투여한 군에서 4주 후 NBT 환원량이 유의적으로 높은 것을 확인하였다. 그러나 2.0%군에서는 유의성 있는 차이가 발견되지 않았다. 한편 lysozyme 활성은 0.5%군에서 2주부터, 2.0%군에서는 4주 후에 각각 대조군에 비해 높은 활성을 보였다. 여기에서 측정된 두 가지 변수는 공통적으로 비특이적 면역능의 지표이기는 하지만 이들의 변화가 항상 동일하게 나타나지는 않는다. 예를 들어 NBT 활성의 증가시 반드시 lysozyme의 활성이 증가하지는 않으며 반대의 경우도 마찬가지이다 (Bols *et al.*, 2001). 그러나 여기서 측정된 두 변수가 전반적으로 증가하는 방향으로 변화한 것으로부터, *E. rubra*는 비특이적 면역능을 증강시킨다고 추정하는 것이 가능한 것이다. 현재 까지 보고된 유일한 유클레나속을 이용한 어류면역능에 대한 연구에서 Das *et al.* (2009) 은 *E. viridis*를 rohu, *Labeo rohita*에 투여한 결과, NBT 환원능 및 lysozyme의 활성이 증가하였다고 보고하였다. 그들은 또한 *Aeromonas hydrophila*에 대한 감염시험에서 *E. viridis*를 투여한 군에서 대조군에 비해 높은 생존율을 관찰하였다. 본 연구에서 시험한 *E. rubra*나 Das 등의 연구에서 사용한 *E. viridis* 모두 어떤 세포성분이 비특이적 면역능을 증강시키는지 전혀 알려진 바 없다. 그러나 유클레나속은 공통적으로 β -1,3 glucan을 주성분으로 하는 paramylon을 함유한 것이 알려져 있고 또 β -1,3 glucan이 어류의 비특이적 면역능을 자극하는 것이 아주 잘 규명 (Dalmo and Bogwald, 2008) 되어 있기 때문에 두 종의 유클레나에서 모두가 성분이 결정적인 역할을 하는 것으로 추정된다.

본 연구에서 *E. rubra* 투여 후에 나타나는 respiratory burst 반응이나 lysozyme 활성의 증가현상을 비특이적 면역능의 증강으로 볼 수가 있으나, 오히려 이와 반대로 독성에 stress에 대한 대응반응으로 볼 수도 있을 것이다 (Bols *et al.*, 2001). 예를 들어 중금속에 대한 만성독성반응의 일환으로 lysozyme의 활성이나 respiratory burst 반응의 증가가 보고되고 있기 때문이다 (Muhvich *et al.*, 1995; Sanchez-Dardon *et al.*, 1999). *E. rubra*의 독성에 관하여 보고가 없어서 현재로서는 판단하기는 어렵지만, 다른 유클레나속에서 발견되는 독성물질의 존재에 관한 보고로부터 유추하면 *E. rubra*에 아직 보고되지 독성물질의 존재 가능성을 배제할 수 없을 것이다. 예를 들어 Zimba *et al.* (2010) 은 *E. sanguinea*에서 euglenophycin이라는 독소를 분리 동정하였으며 이는 0.25~0.5mg/L 농도에서 channel catfish를 4시간 이내에 폐사시킨다고 보고한 바 있다. 따라서 본 연구의 관찰된 WBC의 감소는 *E. rubra*에 함유된 독소의 영향일 수 있으며, 이에 관한 추가연구가 필요한 것으로 사료된다.



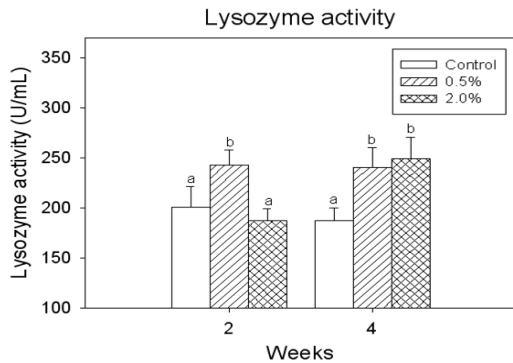


Fig. 3. NBT reduction of phagocytes in the head kidney and lysozyme activity in the serum of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* fed with *E. rubra*-supplemented diet for 4 weeks (n=30). Values are mean \pm S.E. Mean values bearing same super-script are not statistically significant ($P > 0.05$).

본 연구 결과를 요약하면 *E. rubra*가 0.5% 첨가된 군은 비특이적 면역이 증가되는 효과를 보였으나 2.0% 첨가된 군에서는 그 효과가 분명하지 않을 뿐 아니라 부작용으로 추정되는 반응이 더 명확해지는 경향을 보여주었다. 따라서 양식장에 소량 발생하는 *E. rubra*를 어류가 섭이하는 것은 항병성의 증가 등에서 다소 유리할 것으로 판단되나 지나치게 이상 증식할 때는 어류가 먹지 못하도록 제거하는 것이 좋다고 판단된다. 향후 더 다양한 어종과 투여 농도에 대한 연구를 통해서 유용한 결과가 얻어질 것으로 기대된다.

참고문헌

- Ai, Q., Mai, K., Zhang, L., Tan, B., Zhang, W., Xu, W. and Li, H.: Effects of dietary β -1, 3 glucan on innate immune response of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Fish Shellfish Immunol.*, 22: 394-402, 2007.
- Alexander, J.B. and Ingraham, G.A.: Noncellular nonspecific defence mechanisms of fish. *Ann. Rev. Fish Dis.* 2:249-279, 1992.
- Barsanti, L., Vismara, R., Passarelli, V. and Gualtieri, P.: Paramylon (β -1,3-glucan) content in wild type and WZSL mutant of *Euglena gracilis*: Effects of growth conditions. *J. Appl. Phycol.*, 13: 59-65, 2001.
- Bols, N.C., Brubacher, J.L., Ganassin, R.C. and Lee, L.E.J.: Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Dev. Comp. Immunol.* 25: 853-873, 2001.
- Dalmo, R.A. and Bogwald, J.: β -Glucan as conductors of immune symphonies. *Fish Shellfish Immunol.*, 25: 384-396, 2008.
- Das, B.K., Pradhan, J. and Sahu, S.: The effect of *Euglena viridis* on immune response of rohu, *Labeo rohita* (Ham). *Fish Shellfish Immunol.*, 26: 871-876, 2009.
- Engstand, R.E., Robertsen, B. and Frivold, E.: Yeast glucan induces increase in lysozyme and complement mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. *Fish Shellfish Immunol.*, 2: 287-297, 1992.
- Hayashi, M., Toda, K., Kanazawa, A., Yamatoya H. and Kitaokas S.: Supplemental effects of *Euglena gracilis* in a casein diet for *Penaeus japonicus*. *Asian Fish. Sci.*, 8: 201-209, 1995.
- Johnson, P.: A study of *Euglena rubra* Hardy 1911. *Am. Microscop. Soc.*, 58: 42-48, 1939.
- Kusmic, C., Barsacchi, R., Barsanti, L., Gualtieri, P. and Passarelli V.: *Euglena gracilis* as source of the antioxidant vitamin E: effects of culture conditions in the wild strain and in the natural mutant WZSL. *J. Appl. Phycol.*, 10: 555-559, 1999.
- Monfils, A.K., Triemer, R.E. and Bellairs, E.F.: Characterization of paramylon morphological diversity in photosynthetic euglenoids (*Euglenales*, *Euglenophyta*). *Phycologia*, 50: 156-169, 2011.

- Muhvich, A.G., Jones, R.T., Kane, A.S., Anderson, R.S. and Reimscheuessel, R.: Effects of chronic copper exposure on the macrophage chemiluminescent response and gill histology in goldfish (*Carassius auratus* L.). *Fish Shellfish Immunol.*, 5: 251-264, 1995.
- Rosowski, J. R.: Photosynthetic euglenoids: In *Freshwater Algae of North America*, pp.382-422, Elsevier Science, USA, 2004.
- Sanchez-Dardon, J., Viccia, I., Hontela, A., Chilminczyk, S., Dunier, M., Boermans, H., Blakely, B. and Fournier, M.: Immunomodulation by heavy metals tested individually or in mixtures in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed *in vivo*: *Environ. Toxicol. Chem.*, 18: 1492-1497, 1999.
- Zimba, P.V., Moeller, P.D., Beauchesne, K., Lane, H.E. and Triemer, R.E.: Identification of euglenophycin: a toxin found in certain euglenoids. *Toxicon*, 55:100-104, 2010.
- Zimba, P.V., Rowan, M. and Triemer, R.: Identification of euglenoid algae that produce ichthyotoxin(s). *J. Fish Dis.*, 27:115-117, 2004.

Manuscript Received : June 10, 2011

Revised : September 7, 2011

Accepted : October 20, 2011