



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](#)



碩士學位論文

제주도내 여윌증상 양식 넙치(*Paralichthys
olivaceus*)의 대량 폐사 원인의 생리학적
접근법에 관한 연구

濟州大學校 大學院

水産生命醫學科

金 昌 秀

2012 年 2 月

제주도내 여윌증상 양식 넙치(*Paralichthys
olivaceus*)의 대량 폐사 원인의 생리학적
접근법에 관한 연구

指導教授 呂寅圭

金昌秀

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2012 年 2 月

左 旼 昔 의 理學 碩士 學位 論文 을 認准 함

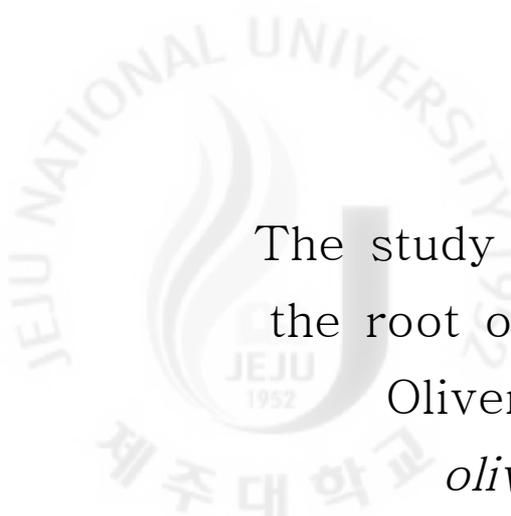
審査委員長 이영돈 (印)

委 員 전려진 (印)

委 員 여인규 (印)

濟州大學校 大學院

2012 年 2 月



The study on physiological approach on
the root of a mass death of emaciated
Oliver Flounder (*Paralichthys
olivaceus*) in Jeju island.

Chang-Su Kim
(Supervised by professor In-Kyu Yeo)

A thesis submitted in partial fulfillment
of the requirement for the degree of
Master of Science

Department of Marine life science
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

February, 2012

목 차

목 차	i
List of Tables.....	iv
List of Figures.....	v
Abstract.....	viii
I. 서 론.....	1
II. 재료 및 방법.....	5
2-1. 넙치 여윌증상의 모니터링	5
2-1-1. 현장 조사 방법.....	5
2-1-2. 세균의 분리 및 배양.....	6
2-2. 넙치의 절식 개체와 여윌증상 넙치의 생리학적 비교분석	7
2-2-1. 시료 채취.....	7
2-2-2. 혈액 생리학적 분석.....	7
2-2-3. 조직학적 분석.....	8
2-2-4. 육질성분의 분석.....	8
2-2-5. 혈액내의 이온농도 변화.....	9
2-2-6. 통계처리.....	9
2-3. 병원성 세균감염에 따른 변화.....	10
2-3-1. 실험어.....	10
2-3-2. 혈액 생리학적 분석.....	10
2-3-3. 넙치 혈청 라이소자임 활성.....	11
2-3-4. 넙치 점액 라이소자임 활성.....	11
2-3-5. 항산화 효소 측정.....	11
2-3-6. 조직학적 분석.....	12
2-3-7. 통계처리.....	12
2-4. 과산화 수소 처리에 의한 효과.....	13
2-4-1. 실험어.....	13
2-4-2. 혈액 생리학적 분석.....	13
2-4-3. 항산화 효소 측정.....	13



2-4-4. 통계처리.....	14
2-5. 병원균 감염후 과산화수소 약육 처리에 의한 효과.....	15
2-5-1. 실험어.....	15
2-5-2. 혈액 생리학적 분석.....	15
2-5-3. 넙치 혈청 라이소자임 활성.....	15
2-5-4. 넙치 점액 라이소자임 활성.....	16
2-5-5. 항산화 효소 측정.....	16
2-5-6. 통계처리.....	16
Ⅲ. 결 과.....	17
3-1. 넙치 여윌증상의 모니터링.....	17
3-1-1. 현장 조사 결과.....	17
3-1-2. 세균의 분리 및 배양.....	20
3-2. 넙치의 절식 개체와 여윌증상 넙치의 생리학적 비교 분석.....	22
3-2-1. 넙치의 외부 형태 관찰 결과.....	22
3-2-2. 혈액 생리학적 분석 결과.....	23
3-2-3. 혈액내의 이온농도 변화.....	26
3-2-4. 조직학적 분석 결과.....	30
3-3. 병원성 세균감염에 따른 변화.....	35
3-3-1. 병원성 실험 결과.....	35
3-3-2. 혈액 생리학적 분석 결과.....	36
3-3-3. 혈청과 점액 Lysozyme activity 분석 결과.....	41
3-3-4. 항산화 효소 측정 결과.....	43
3-3-5. 조직학적 분석 결과.....	45
3-4. 과산화 수소 처리에 의한 효과.....	49
3-4-1. 혈액 생리학적 분석 결과.....	49
3-4-2. 항산화 효소 분석 결과.....	54
3-5. 병원균 감염후 과산화수소 약육 처리에 의한 효과.....	56
3-5-1. 과산화수소 항균성 테스트 결과.....	56
3-5-2. 배지 도말 결과.....	57
3-5-3. 병원균 감염에 따른 과산화수소 약육 넙치의 폐사율 측정 결과...	59
3-5-4. 혈액 생리학적 분석 결과.....	61

3-5-5. 혈청과 점액 Lysozyme activity 분석 결과.....	69
3-5-6. 항산화 효소 측정 결과.....	72
IV. 고찰.....	75
V. 요약.....	84
VI. 감사의 글.....	86
VII. 참고 문헌.....	87

List of tables

Table 1. Monitoring of aqua farms (2011.4 ~ 2011.5).	17
Table 2. Monitoring of aqua farms (2011.6 ~ 2011.7).	18
Table 3. Monitoring of aqua farms (2011.8 ~ 2011.9).	19
Table 4. Monitoring of diseases (2011.4 ~ 2011.5).	21
Table 5. Monitoring of diseases (2011.6 ~ 2011.7).	21
Table 6. Monitoring of diseases (2011.8 ~ 2011.9).	21

List of figures

Fig. 1. Monitoring of aqua farm in Jeju island.	5
Fig. 2. External analysis of olive flounder.	22
Fig. 3. Analysis of alanine amino transferase (ALT) in serum of olive flounder.	24
Fig. 4. Analysis of aspartate amino transferase (AST) in serum of olive flounder.	24
Fig. 5. Analysis of total protein in serum of olive flounder.	25
Fig. 6. Analysis of glucose in serum of olive flounder.	25
Fig. 7. Change of Na ⁺ concentration by starring of olive flounder in serum.	27
Fig. 8. Change of K ⁺ concentration by starring of olive flounder in serum.	27
Fig. 9. Change of Cl ⁻ concentration by starring of olive flounder in serum.	28
Fig. 10. Change of Ca ⁺⁺ concentration by starring of olive flounder in serum.	28
Fig. 11. Change of Mg ⁺⁺ concentration by starring of olive flounder in serum.	29
Fig. 12. Histological features of intestine from control olive flounder (x400, Bar = 20 μ m).	31
Fig. 13. Histological features of intestine from control olive flounder (x200, Bar = 50 μ m).	31
Fig. 14. Histological features of intestine from starved for 3 weeks olive flounder (x400, Bar = 20 μ m).	32
Fig. 15. Histological features of intestine from starved for 3 weeks olive flounder (x200, Bar = 50 μ m).	32
Fig. 16. Histological features of intestine from starved for 5 weeks olive flounder (x400, Bar = 20 μ m).	33
Fig. 17. Histological features of intestine from starved for 5 weeks olive flounder (x200, Bar = 50 μ m).	33
Fig. 18. Histological features of intestine from emaciated olive flounder (x400, Bar = 20 μ m).	34
Fig. 19. Histological features of intestine from emaciated olive flounder (x200, Bar = 50 μ m).	34
Fig. 20. Mortality rate test of <i>Edwardsiella tarda</i> and <i>Vibrio harveyi</i> infection olive flounder.	35
Fig. 21. Change of hematocrit levels by infection of <i>E. tarda</i> and <i>V. harveyi</i> in serum of olive flounder.	37
Fig. 22. Change of aspartate amino transferase levels by infection of <i>E. tarda</i> and <i>V. harveyi</i> in serum of olive flounder.	37
Fig. 23. Change of alanine amino transferase levels by infection of <i>E. tarda</i> and <i>V. harveyi</i> in serum of olive flounder.	38

Fig. 24. Change of cholesterol levels by infection of <i>E. tarda</i> and <i>V. harveyi</i> in serum of olive flounder.	38
Fig. 25. Change of glucose levels by infection of <i>E. tarda</i> and <i>V. harveyi</i> in serum of olive flounder.	39
Fig. 26. Change of total protein levels by infection of <i>E. tarda</i> and <i>V. harveyi</i> in serum of olive flounder.	39
Fig. 27. Change of triglyceride levels by infection of <i>E. tarda</i> and <i>V. harveyi</i> in serum of olive flounder.	40
Fig. 28. Change of serum lysozyme activity levels by infection of <i>E. tarda</i> and <i>V. harveyi</i> in serum of olive flounder.	41
Fig. 29. Change of mucus lysozyme activity levels by infection of <i>E. tarda</i> and <i>V. harveyi</i> in serum of olive flounder.	42
Fig. 30. Change of catalase activity in <i>E. tarda</i> and <i>V. harveyi</i> infection olive flounder.	43
Fig. 31. Change of Superoxide dismutase activity in <i>E. tarda</i> and <i>V. harveyi</i> infection olive flounder.	44
Fig. 32. Histological feature of gill by <i>E. tarda</i> and <i>V. harveyi</i> infection in olive flounder.	46
Fig. 33. Histological feature of intestine by <i>E. tarda</i> and <i>V. harveyi</i> infection in olive flounder.	47
Fig. 34. Histological feature of kidney by <i>E. tarda</i> and <i>V. harveyi</i> infection in olive flounder.	48
Fig. 35. Analysis of hematocrit in serum of olive flounder exposed to a various hydrogen peroxide concentrations.	50
Fig. 36. Analysis of aspartate aminotransferase in serum of olive flounder exposed to a various hydrogen peroxide concentrations.	50
Fig. 37. Analysis of alanine amino transferase in serum of olive flounder exposed to a various hydrogen peroxide concentrations.	51
Fig. 38. Analysis of glucose in serum of olive flounder exposed to a various hydrogen peroxide concentrations.	51
Fig. 39. Analysis of cholesterol in serum of olive flounder exposed to a various hydrogen peroxide concentrations.	52
Fig. 40. Analysis of triglyceride in serum of olive flounder exposed to a various hydrogen peroxide concentrations.	52
Fig. 41. Analysis of total protein in serum of olive flounder exposed to a various hydrogen peroxide concentrations.	53
Fig. 42. Change of catalase activity in olive flounder exposed to a various hydrogen peroxide concentrations.	54

Fig. 43. Change of superoxide dismutase analysis in olive flounder exposed to a various hydrogen peroxide concentrations.	55
Fig. 44. Antimicrobial testing of <i>V. harveyi</i> and <i>E. tarda</i> by hydrogen peroxide. ..	56
Fig. 45. Change of color in TSA, TCBS and SS agar by immersion of a various concentrations of hydrogen peroxide in after infection pathogenic of a <i>V. harveyi</i> olive flounder	58
Fig. 46. Mortality by immersion of a various concentrations of hydrogen peroxide after infection of a <i>V. harveyi</i> in olive flounder.	59
Fig. 47. Mortality by immersion of a various concentrations of hydrogen peroxide after infection of a <i>E. tarda</i> in olive flounder.	60
Fig. 48. Mortality by immersion of a various concentrations of hydrogen peroxide after infection of a <i>V. harveyi</i> + <i>E. tarda</i> in olive flounder.	60
Fig. 49. Hematocrit analysis by immersion of a various concentrations of hydrogen peroxide after infection of a bacteria in olive flounder.	62
Fig. 50. Alanine aminotransferase analysis by immersion of a various concentrations of hydrogen peroxide after infection of a bacteria in olive flounder.	63
Fig. 51. Aspartate aminotransferase analysis by immersion of a various concentrations of hydrogen peroxide after infection of a bacteria in olive flounder.	64
Fig. 52. Glucose by immersion of a various concentrations of hydrogen peroxide after infection of a bacteria in olive flounder.	65
Fig. 53. Total protein by immersion of a various concentrations of hydrogen peroxide after infection of a bacteria in olive flounder.	66
Fig. 54. Cholesterol by immersion of a various concentrations of hydrogen peroxide after infection of a bacteria in olive flounder.	67
Fig. 55. Triglyceride by immersion of a various concentrations of hydrogen peroxide after infection of a bacteria in olive flounder.	68
Fig. 56. Analysis of lysozyme activity in serum by immersion of a various concentrations of hydrogen peroxide after infection of a bacteria in olive flounder.	70
Fig. 57. Analysis of lysozyme activity in mucus by immersion of a various concentrations of hydrogen peroxide after infection of a bacteria in olive flounder.	71
Fig. 58. Analysis of catalase activity by immersion of a various concentrations of hydrogen peroxide after infection of a bacteria in olive flounder.	73
Fig. 59. Analysis of superoxide dismutase activity by immersion of a various concentrations of hydrogen peroxide after infection of a bacteria in olive flounder.	74

Abstract

The primary purpose of these study of physiological approach of the root of a mass death on emaciated olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) in Jeju island. The experiment was executed from 4 methods (monitoring of the aquaculture farm, physiological analysis and histological examination on nutrient deficiency, potential of pathogenic bacteria, effect of hydrogen peroxide) in olive flounder. The first experiment was executed monitoring of the ten aqua farms in Jeju island at september to April 2011. According to results of standard culture method (TSA, SS, TCBS) Virus and bacteria was not found in April~May and August~September, but during June~July, bacteria was found in a few agust farms in TSA and TCBS agar media.

We also investigated the effects of starvation during 5 weeks olive flounder. This study was conducted to investigate hematological analysis, blood ion concentrations, histological examination. As a results, hematological analysis, total protein, glucose concentrations in serum were no significant differences between the starvated groups and the emaciated groups in olive flounder. According to results of blood ion concentration, Na^+ , Cl^- , Ca^{++} was no significant all experimental groups. According to results of histological examination were also no significant all experimental groups.

Moreover, we investigated the effect of infection of pathogenic bacteria. The olive flounder (*Paralichthys olivaceus*), $75.2 \pm 15\text{g}$ used in this experiment was obtained from a commercial fish farms in Jeju island and was injected pathogenic bacteria (1: *Vibrio harveyi*, 2: *Edwardsiella tarda*, 3: *Vibrio harveyi* + *Edwardsiella tarda*).

The mortality rates at 8~10days were 100% to all experimental groups. Histological result were no significant differences between the infected

groups and the emaciated groups.

Also hematological analysis, hematocrit, total protein, glucose concentrations were no significant differences all experimental groups.

Moreover lysozyme activity (serum and mucus), and antioxidant enzymes were also no significant differences all experimental groups.

Finally, we investigated the effects of hydrogen peroxide (100ppm, 300ppm and 500ppm) in olive flounder.

In addition we tested the effects of physiological change by immersion of a various concentrations of hydrogen peroxide after infection of a pathogenic bacteria (1: *Vibrio harveyi*, 2: *Edwardsiella tarda*, 3: *Vibrio harveyi* + *Edwardsiella tarda*) in olive flounder.

The mortality rates at 12days were 60% to infection *V. harveyi* of 500ppm groups, 12days were 100% to infection *E. tarda* of 500ppm groups, 10days were 100% to infection *V. harveyi* + *E. tarda* of 500ppm groups in olive flounder.

Also hematological analysis, cholesterol were similar the emaciated flounder group.

Moreover lysozyme activity (serum and mucus), and antioxidant enzymes were also no significant differences all experimental groups.

These results were suggested that the showing different features to emaciated olive flounder, pathogenic bacteria and such as *V. harveyi*, *E. tarda* infections of results. The considered to possible by taking advantage the monitoring and emaciated olive flounder. the emaciated olive flounder was mass mortality by a new pathogenic infector but was not caused by pathogenic bacteria (*V. harveyi* and *E. tarda*) infector and immersion of hydrogen peroxide.

I. 서론

우리나라의 수산물 생산량은 어업생산량의 증가와 수송방법의 발전, 양식업의 발달에 의해 지속적으로 증가하고 있다. 이 중 양식업은 양식어종의 점차 다양해지고 있으며, 특히 제주 지역의 넙치 양식은 1980년대 후반에 시작되어 지속적으로 성장하여, 국내뿐 아니라 외국으로의 수출을 통해 세계 수출물량의 약 83.6%로 시장점유율 1위를 달성하여 2005년도에 지식경제부로부터 수산분야로서는 유일하게 양식넙치가 세계일류상품으로 등재되었다. 이와 같이 제주산 양식넙치는 그 품질을 인정받아 세계의 많은 소비자층을 확보하여 지역산업에서 중요한 수출 품목으로 인정을 받아 매년 꾸준히 어가소득이 증가하고 있다.

현재 제주 지역에는 약 300개의 양식장이 있으며, 전체 양식 생산량은 22,306톤이며, 이 중 양식넙치의 생산량은 21,892톤으로서 약 98.1%로 제주 지역의 양식넙치는 국내 양식넙치 산업에서 가장 중요한 비중을 차지하고 있다. 그러나 최근 들어 양식넙치의 폐사율은 급격히 증가하여 2010년도에는 50% 이상의 높은 폐사율을 나타내는 것으로 알려졌다 (통계청, 어류양식현황조사 2010). 이러한 원인에는 다양한 요인이 있을 수 있겠으나 크게 두 가지 요인으로 요약하면 사육환경에 의한 요인과 넙치의 질병 감염이 그 원인이라 할 수 있다.

사육 환경에 의한 요인에도 많은 요인이 있을 수 있으나 크게 세가지 요인을 들 수 있다. 첫째 수온은 해산어류의 대사율을 결정하는 중요한 환경 조절인자로서, 어류의 성장, 번식, 대사, 삼투압 조절 및 면역력등 생명 활동에 직접적인 영향을 주는 것으로 알려져 있으며 (Wendelaar Bonha, 1997), 급격한 수온의 변화는 어체 내 생리적 변화를 유발시켜 스트레스를 유발시키는 것으로 알려져 있다 (Barton and Iwama, 1991). 이러한 스트레스는 어류의 건강도를 저하시켜 질병을 유발시키는 요인으로도 작용하게 된다 (Wedemyer and Mcleay, 1981).

둘째 염분의 변화이다. 일반적으로 여름철 제주도 주변해역의 저염분수는 중국 대륙연안수인 양자강 배출수가 주 원인으로 알려져 있다 (Kim and Rho, 1994). 중국 대륙연안수는 하계가 되면 동중국해를 거쳐 확장해 오기 때문에 제주도 주변 해역은 물론 한국 남해 및 동부 남부해역까지 염분 농도를 저하시키고, 해수면의 높이

를 상승시키는 것으로 알려져 있으며 (Kang, 1974; Lim, 1976), 급격히 낮아진 저염분수는 제주도 수산업에 커다란 피해를 끼치는 것으로 알려져 있다. 급격한 염분의 변화는 해산어류의 삼투압 조절에 영향을 주어 이온과 수분 평형의 교란 및 스트레스 등을 유발하여 어체의 생리조건 악화 및 성장 지연을 초래 하는 것으로 알려져 있다 (Singley and Chavin, 1971).

셋째 급격한 용존 산소량의 변화이다. 환경내 용존산소량 (DO)의 수준은 수생환경에서 중요한 요소이며, 변온동물의 전체적인 대사 또는 산소 소비율은 순응하는 환경의 온도에 따라 다르다 (Di Giulio, 1989). 생명체는 산소가 없거나 저산소 조건에 노출되었을 때 에너지 대사율을 감소되거나 ATP 생성과정의 에너지 효율을 조절하고, 산화적 인산화에 의한 ATP 생성은 감소되고 혐기적 ATP 생성 회로인 해당과정이 활성화 되어 산소 유용성에 따라 호기적 대사와 혐기적 대사의 비율이 조절된다고 보고되고 있다 (Hochachka, 1997; Virani, 2000; Rees, 2001).

이와 같은 양식과정 중에 사육 어류가 받을 수 있는 다양한 스트레스 요인은 양식업자의 체내 생리적 불균형이 일어남으로 인하여 생산성을 떨어뜨리는 원인이 될 뿐만 아니라 생리활성이 약화되어 질병에 걸리거나 대량 폐사하는 사례가 빈발하고 있다 (Wardle et al., 1981).

한편, 환경요인 이외의 다른 원인으로는 넙치의 질병 감염에 의한 대량 폐사이다. 질병 감염에 의한 원인으로는 우선, 바이러스성 질병으로 양식 해산 어류의 대량 폐사를 유발하는 질병중 하나이다. 국내산 양식넙치에 주로 발생하는 바이러스 질병으로는 바이러스성 상피증생증 (Viral epithelial hyperplasia disease), 램도바이러스병 (Rhabdoviral disease), 머나바이러스병 (Aquabirnavirus disease), 림포시스티스병 (Lymphocysti disease) 등이 있다. 이러한 바이러스들은 숙주의 특이성, 계절별 수온의 변화에 따른 바이러스 증식조건, 면역력 반응의 조절 변화 등에 의해 질병이 발생된다 (Joong, 1993).

둘째 병원성 세균은 양식어류에 유행하는 질병 중 병원성 세균에 의한 피해가 가장 크다고 알려져 있다 (전, 1988). 국내산 양식넙치에 주로 발생하는 세균성 질병은 streptococcosis, edwardsiellosis 및 vibriosis등이 보고되고 있다 (방 등, 1992; 이 등, 1991; 이 와 하, 1991; 허 등, 2001).

셋째, 기생충성 질병은 주로 어류의 아가미에 기생하여 호흡 장애를 유발하고, 몸

표면이나 내부 장기 등에 기생하며 궤양이나 상처를 입혀 세균등에 의한 2차감염으로 인해 폐사가 나타나게 된다. 이러한 국내산 양식넙치에 주로 발생하는 기생충성 질병으로는 익티오보도 (Ichthyobodo), 스쿠티카섬모충 (scuticociliatosis), 백점병 (white spot disease) 등이 있다.

양식 어류의 생산량을 증대시키기 위하여 고밀도로 사육하거나 필요 이상의 사료 투여 등으로 인하여 양식장의 환경이 점차 악화되어 가고 있는 실정이다. 이러한 환경 조건하에서 양식 어류는 일시적인 양식 관리의 소홀로도 감염성 질병에 대한 감수성이 급격히 증가될 수 있어, 질병에 의한 피해가 늘어날 뿐만 아니라 새로운 질병의 출현 빈도도 높아지고 있는 실정이다 (Barton et al., 1986; Pickering, 1989).

한편, 2007년 제주도내 넙치 양식장에서 체표면이 검어지고 여위어가는 원인 불명의 질병으로 인한 대량폐사가 발생하며 이 증세를 보이는 넙치 양식장에서는 단 기간에 사육 넙치의 20~50%의 대량폐사가 발생하고 있으며 증상을 나타내는 넙치의 상당수가 폐사함으로써 양식장의 심각한 손실을 초래하고 있다. 이러한 여윌 증상은 1990년 중반 이래로, 일본 규슈지방의 자주복 양식장에서 발병되어 큰 타격을 입었으며, 넙치의 여윌증상은 일본의 미야자키현에 있는 넙치 양식장에서 2005년도에 최초로 발견하여 보고 되었으며, 그 넙치 여윌증상의 증상으로는 복부팽창, 직장 탈수, 함몰된 눈과 두개골에서 전형적인 돌출과 같은 외형적 증상을 보였다 (Yasuda et al., 2005). 일본에서는 이러한 여윌증상의 원인체로 점액포자충, *Enteromyxum leei* 와 *Leptotheca fugu* 의 두 종류로 밝혀져 있으며, 어느 쪽이든 한 종류가 기생하는 경우와 2종류 모두 기생하는 경우가 있는 것으로 알려져 있다 (Ogawa and Yokoyama, 2001; Tintun et al., 2002; Yanagida et al., 2004). 그러나 국내의 다양한 연구기관이 여윌증상의 원인에 대하여 조사 하였음에도 불구하고 그 원인은 불분명하다. 따라서 본 연구에서는 새로운 질병 출현에 의한 양식넙치의 대량 폐사 원인을 규명하기 위한 생리화학적 접근법에 관한 연구를 실시하였다. 우선 발생시 대량폐사를 유발하는 여윌증상의 넙치를 기준으로 4~9월까지 10개소의 제주도내 양식장들의 현장 모니터링을 통하여 다양한 질병 원인체를 분석하였고, 이를 바탕으로 검출된 병원성 세균들에 의한 넙치의 생리학적 분석을 통하여 대량폐사의 원인에 대하여 검토를 실시하였다. 또한, 여윌증상의 원인으로 추정할수

있는 단순 영양결핍의 관련성을 조사하기 위하여 절식에 의한 생리학적 및 조직학적 비교분석을 실시 하였다. 마지막으로, 병원성 세균을 제거하기 위한 화학약품의 약육처리와의 관계를 파악하기 위하여 과산화수소의 영향에 대해서도 검토 또한 실시 하였다.

II. 재료 및 방법

2-1. 넙치 여壼증상의 모니터링

2-1-1. 현장 조사 방법

본 실험은 2011년 4월부터 2011년 9월까지 제주도 전 지역 내 10개소 양식장을 선정하여 넙치 5~10마리를 이용하여 실험을 수행하였다. 실험어의 평균 전장은 $21.3 \pm 4\text{cm}$, 평균 무게 $75.2 \pm 15\text{g}$ 이며, 실험 시작 전에 사용한 넙치는 현장에서 직접 받아들 넙치를 안정화시키기 위하여 현장에서 받아들 해수를 사용하여 1일간 순치 시킨 후에 샘플링을 실시하였다.

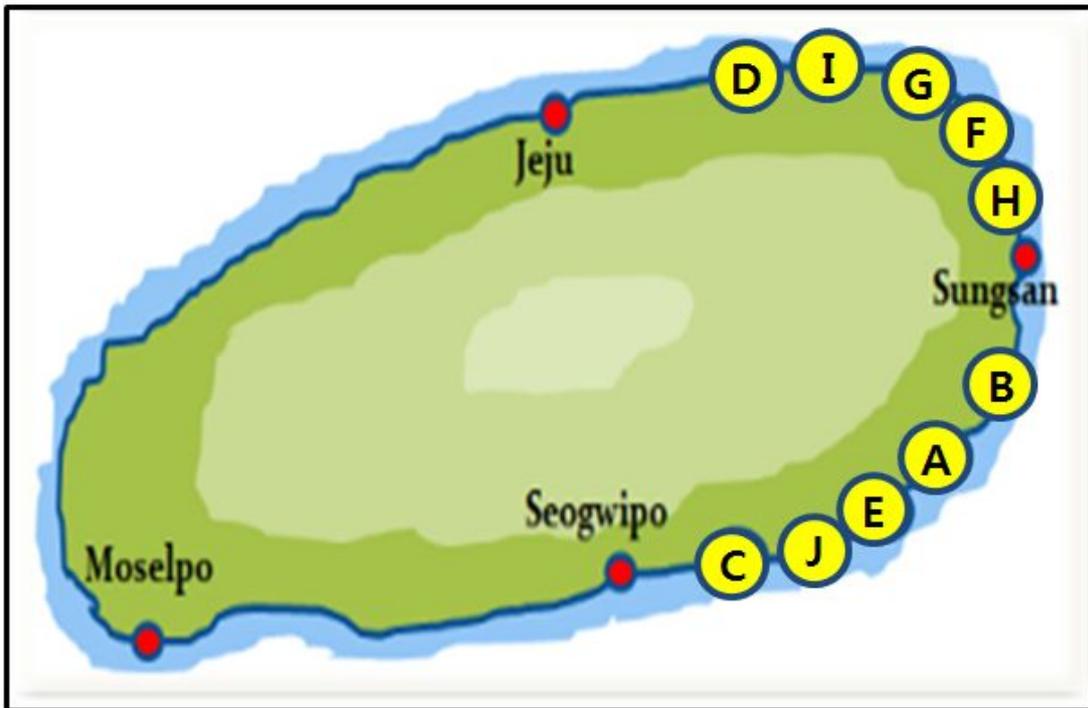


Fig. 1. Monitoring of aqua farm in Jeju island.

2-1-2. 세균의 분리 및 배양

병원균의 분리는 폐사어를 해부후 간, 신장, 비장 조직을 무균적으로 채취하여, 1.5% NaCl 첨가 tryptic soy agar (TSA, Difco), thiosulfate citrate bile sucrose (TCBS, Difco) 및 SS 평판배지에 각각 도말 접종한 후, 25℃에서 24시간 배양한 후 원인균을 확인하였다.

2-2. 넙치의 절식 개체와 여壼증상 넙치의 생리학적 비교분석

2-2-1. 시료 채취

여壼증에 걸린 개체에 대한 영양장애의 혈액학적 비교 분석 및 조직학적 차이에 대한 비교분석을 하기 위하여 절식실험을 실시하였다. 실험에 사용된 넙치는 일본에서 보고된 결과 (Yasuda et al., 2005)를 바탕으로 하여 20~25cm 사이에 있는 개체를 제주도의 양식장에서 공급받아 사용하였으며, 분석 시료는 절식 시작 후, 절식 3주 및 5주 후에 실시하였으며, 혈액, 장 및 근육을 추출하여 분석을 실시하였다.

2-2-2. 혈액 생리학적 분석

여壼증상을 나타내는 넙치의 생리학적 변화를 분석하기 위하여 혈액 내의 혈청을 이용하여 혈액 분석을 실시하였다. 실험어의 미부정맥에서 혈액을 채혈하여 항응고제가 처리되지 않은 원심 분리관에 넣고 실온에 30분간 방치한 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 냉장보관하면서 16시간 이내에 분석하였다. 혈청성분은 자동 혈액분석기를 사용하여 총단백질 (Total protein), 당 (Glucose) 및 간지수인 AST (Aspartate aminotransferase), ALT (Alanine aminotransferase)를 각각 분석하였다.

2-2-3. 조직학적 분석

절식0주 (대조구) 넙치, 절식 3주 넙치, 절식 5주 넙치, 및 여壼 증상을 나타내는 넙치의 장 조직을 각각 어체에서 샘플링을 하여 고정 포매한 후, Bouin's solution 에 일정시간 고정 하였다. 그 후 수세와 탈수과정을 거쳐 파라핀에 포매 후 4~6 μ m 두께로 연속 절편하여 조직표본을 만들었다. 각 기관계를 광학현미경으로 관찰하기 위하여 파라핀 포매법을 이용하여 표본을 제작한 후 haematoxy-eosin으로 비교 염색하였다.

2-2-4. 육질성분의 분석

여壼증 개체의 일반성분 분석과 무기질 함량, 지방산 조성, 총 아미노산, 필수아미노산 및 유리아미노산 함량을 분석함으로써 여壼증이 넙치의 물질대사 및 영양 축적에 어떠한 영향을 미치는 지 알아보기 위하여 실험을 실시하였다. 넙치의 육질 성분은 여壼증 증세의 넙치와 절식실험을 실시한 넙치의 근육을 사용하여 수분, 조회분, 조지방 및 조단백질을 분석하였다. 육질부의 성분 분석방법은 AOAC법 (AOC S Official and Tentative Method, 1990)에 따라서 수분은 105 $^{\circ}$ C 상압건조법으로, 조회분은 550 $^{\circ}$ C 회화로에서 12시간 이상 태운 후 정량하였으며, 조지방은 에테르를 이용한 Soxhlet법 (Soxhlet system 1046, TacatorAB, Sweden)으로, 조단백질은 킬달자동분석장치 (KjeltecTM2300, Foss Co. Ltd, Denmark)를 사용하여 분석하였다.

2-2-5. 혈액내의 이온농도 변화

절식0주 (대조구) 녁치, 절식 3주 녁치, 절식 5주 녁치, 및 여웁 증상을 나타내는 녁치의 미부정맥에서 혈액을 채혈하고, 혈액을 원심분리 (5,600×g, 5분)하여 얻은 혈장은 분석 전까지 초저온 냉동고 (-72℃)에 보관하였다. 혈장 Na⁺, K⁺, Cl⁻ 농도분석은 생화학 자동분석기 (Advid 1650, JEOL Co., Japan)를 사용하여 조사하였다.

2-2-6. 통계처리

각 실험에서 얻어진 자료에 대한 값의 유의차 유무는 SPSS 통계 패키지에 의한 ANOVA로 분석하여(P<0.05). 반복 실험의 결과는 평균 (Mean±SD)으로 나타내었다.

2-3. 병원성 세균감염에 따른 변화

2-3-1. 실험어

평균 체장 15 ± 1 cm, 체중 55 ± 5 g의 건강한 넙치를 제주도의 양식장에서 분양받아 실험실의 사육 수조에서 1주일간 순치시킨 후 실험에 사용하였다. 동정된 *V. harveyi* (JV1) 균주와 *E. tarda* (JE1) 균주는 1% NaCl 첨가 TSB (Tryptic soy broth, USA)에 18~24시간 배양한 후 각각의 균주를 멸균 생리 식염수에 현탁하여 균수를 10^7 CFU/ml로 조절하였다. 넙치 한 마리 당 0.1ml씩 복강 주사하고 시험 기간 동안 수온은 23°C를 유지시켰으며 누적 폐사율을 기록하였다. 대조구의 경우는 동일 조건하에서 멸균 생리 식염수를 0.1ml씩 복강 주사하였다.

2-3-2. 혈액 생리학적 분석

대조구와 *V. harveyi* (JV1) 및 *E. tarda* (JE1) 균주를 각각 복강 주사한 그룹에서 1일, 5일째에 무작위로 선정하여 샘플링을 실시하였다. 미부정맥에서 혈액을 채혈하여, micro-hematocrit 방법 (Brown, 1980)으로 헤마토크리트 (Hematocrit, PCV)를 측정하고, 혈청성분의 분석을 위하여 채혈한 혈액을 항응고제가 처리되지 않은 원심분리관에 넣고 실온에 30분간 방치한 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 냉장보관하면서 16시간 이내에 분석하고, 혈청성분은 자동 혈액분석기를 사용하여 총단백질 (Total protein), 당 (Glucose), 총콜레스테롤 (Total Cholesterol), 중성지방 (Triglyceride; TG) 및 간지수인 AST(Aspartate aminotransferase), ALT (Alanine aminotransferase)를 분석하였다.

2-3-3. 넙치 혈청 Lysozyme activity

넙치에서 분리한 Serum을 각각 15 μ l 씩 96 well plate에 분주한 후 즉시 *M. lysodeikticus* solution을 150 μ l 넣고 450 nm에서 흡광도를 측정한 후 25°C에서 1시간 반응 후 동일한 파장에서 흡광도 값을 얻어 lysis 전 후 흡광도 값 차이를 구한다. Lysozyme의 활성 단위는 분당 0.001의 흡광도 감소를 나타내는 효소의 양으로 정의하였다.

2-3-4. 넙치 점액 Lysozyme activity

넙치에서 분리한 점액을 채취한 후 0.005M PBS (PH7.4)를 첨가 후 원심분리하여 상층액을 수거한다. 점액 상층액을 15 μ l 씩 96 well plate에 분주한 후 즉시 *M. lysodeikticus* solution을 150 μ l 넣고 450 nm에서 흡광도를 측정한 후 25°C에서 1시간 반응 후 동일한 파장에서 흡광도 값을 얻어 lysis 전 후 흡광도 값 차이를 구한다. Lysozyme의 활성 단위는 분당 0.001의 흡광도 감소를 나타내는 효소의 양으로 정의하였다.

2-3-5. 항산화효소 측정

항산화효소는 넙치의 간 부위를 적출하여 SOD 및 CAT를 각각 분석하였다. 간 부위를 적출 후 약 0.1 g을 0.9% NaCl에 3회 세척한 다음 KCl (1.17%)을 함유한 100 mM phosphate buffer (pH 7.4)를 첨가하여 균질화 하였고, 균질화된 시료는 원심분리 (1,000 rpm, 15 min, 4°C)에 의해 지방 및 침전물을 제거하였다. 균질액은 다시 원심분리 (13,000 rpm, 20 min, 4°C)한 후 상층액을 항산화 효소 측정용 시료로 사용하였다. 단백질 함량은 Lowry et al. (1951)의 방법에 따라 표준 단백질로서 BSA (bovine serum albumin)를 사용하여 spectrophotometer를 이용 750 nm에서 측정하였다. SOD는 pyrogallol의 자동 산화율이 억제되는 양을 측정하는

Marklund and Marklund (1974)의 방법으로 측정하였으며, 50 mM phosphate buffer (pH 8.24) 1.3 ml에 균질액 25 μ l을 넣은 후 45 μ l의 3mM progallol 용액을 첨가하여 spectrophotometer를 이용하여 325 nm의 파장에서 측정하였고, 효소 활성의 1 단위는 반응액 중의 pyrogallol의 산화를 50% 억제하는 효소의 양으로 정하였다. CAT활성도 측정은 H₂O₂를 기질로 사용하여 spectrophotometer에 의해 240 nm파장에서 H₂O₂가 환원되어 감소하는 흡광도로서 효소 활성도를 측정하는 Nelson and Kiesow (1972)의 방법에 의하여 측정하였으며, 효소 활성도의 단위는 1분간 1 mg의 단백질이 반응하여 환원시킨 H₂O₂를 nmol로 나타내었다.

2-3-6. 조직학적 분석

어체로부터 간, 신장, 비장, 아가미, 장을 절개하여 Bouin 용액에 24시간 고정하였다. 각 부위를 수세하여 소편을 만들고 Alcohol 농도 구배로 탈수과정, paraffin 포매 과정을 거친 후 블록을 제작하고 마이크로톰으로 5~7 μ m 두께의 절편을 만들어 haematoxy-eosin으로 비교 염색하였다.

2-3-7. 통계처리

각 실험에서 얻어진 자료에 대한 값의 유의차 유무는 SPSS 통계 패키지에 의한 ANOVA로 분석하여 (P<0.05). 반복 실험의 결과는 평균 (Mean \pm SD)으로 나타내었다.

2-4. 과산화 수소 처리에 의한 효과

2-4-1. 실험어

실험에 사용된 넙치는 제주 지역 내 양식장에서 평균체중 56.40 ± 11.00 g, 평균체장 17.8 ± 1.3 cm의 넙치를 받아 왔으며 과산화수소를 0 (대조구), 100, 300 및 500 ppm에서 1시간 약욕처리 후 0, 6, 24, 48, 168 및 312h째에 각각 샘플링을 실시하여 시료를 분석하였다.

2-4-2. 혈액 생리학적 분석

미부정맥에서 혈액을 채혈하여, micro-hematocrit 방법 (Brown, 1980)에 의해 헤마토크리트 (Hematocrit, PCV)를 측정하고, 혈청성분의 분석을 위하여 채혈한 혈액을 항응고제가 처리되지 않은 원심분리관에 넣고 실온에 30분간 방치한 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 냉장보관하면서 16시간 이내에 분석하고. 혈청성분은 자동 혈액분석기를 사용하여 총단백질 (Total protein), 당 (Glucose), 총콜레스테롤 (Total cholesterol), 중성지방 (Triglyceride; TG) 및 간지수인 AST (Aspartate aminotransferase), ALT (Alanine aminotransferase)를 분석하였다.

2-4-3. 항산화효소 측정

항산화효소 측정은 2-3의 병원성 세균감염에 따른 변화에 기술한 것과 동일하게 실시하였다.

2-4-4. 통계처리

각 실험에서 얻어진 자료에 대한 값의 유의차 유무는 SPSS 통계 패키지에 의한 ANOVA로 분석하여 ($P < 0.05$). 반복 실험의 결과는 평균 ($\text{Mean} \pm \text{SD}$)으로 나타내었다.

2-5. 병원균 감염 후 과산화수소 약욕 처리에 의한 효과

2-5-1. 실험어

평균 체장 20 ± 3 cm, 체중 90 ± 10 g의 건강한 넙치를 제주도의 양식장에서 분양받아 실험실의 사육 수조에서 1주일간 순치시킨 후 동정된 *V. harveyi* (JV1) 균주와 *E. tarda* (JE1) 균주 10^5 CFU/ml로 현탁하여 0.1ml씩 복강 주사하였다. 그 후 각 그룹에 맞게 나누어 과산화수소 0ppm, 100ppm, 300ppm 및 500ppm 농도에서 1시간 약욕 후 0h, 6h, 24h, 48h 및 168h에 샘플링을 실시하였다. 폐사율을 확인한 후, 폐사한 개체에서는 해부 후 간, 신장, 비장 조직을 무균적으로 채취하여 각각의 배지에 도말한 후 배양하여 원인균을 확인하였다.

2-5-2. 혈액 생리학적 분석

혈액 생리학적 분석은 2-4의 과산화수소 처리에 의한 효과에 기술한 것과 동일하게 실시하였다.

2-5-3. 넙치 혈청 Lysozyme activity

넙치 혈청에서의 Lysozyme activity 측정은 2-3의 병원성 세균감염에 따른 변화에 기술한 것과 동일하게 실시하였다.

2-5-4. 넙치 점액 Lysozyme activity

넙치 점액에서의 Lysozyme activity 측정은 2-3의 병원성 세균감염에 따른 변화에 기술한 것과 동일하게 실시하였다.

2-5-5. 항산화효소 측정

항산화효소 측정은 2-3의 병원성 세균감염에 따른 변화에 기술한 것과 동일하게 실시하였다.

2-5-6. 통계처리

각 실험에서 얻어진 자료에 대한 값의 유의차 유무는 SPSS 통계 패키지에 의한 ANOVA로 분석하여 ($P < 0.05$). 반복 실험의 결과는 평균 ($\text{Mean} \pm \text{SD}$)으로 나타내었다.

III. 결 과

3-1. 넙치 여윌증상의 모니터링

3-1-1. 현장 조사 결과

4~9월까지 제주 지역 내 10개소 넙치 양식장에서의 모니터링을 실시하여 길이, 무게, 수온, 염분, pH, 사료 및 해수종류를 매달 조사하였다.

Table 1. Monitoring of aqua farms (2011.4 ~ 2011.5)

Aqua Farms	Body Length (Cm)	Body Weight (g)	Water Temperature (°C)	Salinity (‰)	pH	Feed	Water Quality
A	16.5	60	15.5	33.3	7.36	EP	Sw+ Gsw
B	18	59	15.5	33.91	7.72	EP	Sw+ Gsw
C	19	70	17.2	31.03	7.05	MP	Sw+ Gsw
D	15.4	48	17.4	34.5	7.36	MP	Sw+ Gsw

¹Sw : sea water

²Gsw : Ground sea water

Table 2. Monitoring of aqua farms (2011.6 ~ 2011.7)

Aqua Farms	Body Length (Cm)	Body Weight (g)	Water Temperature (°C)	Salinity (‰)	pH	Feed	Water Quality
A	17.7	52.6	16.9	35.1	7.58	EP	Sw+ Gsw
B	18.6	70.1	16.8	34.85	7.45	EP	Sw+ Gsw
C	17.5	62	18.1	31.6	7.15	MP	Sw+ Gsw
D	24.7	152	17.5	34.96	7.36	MP	Sw+ Gsw
E	17.8	54	16.8	29.39	7.04	EP	Sw+ Gsw
F	29	300	17.4	28	7.26	EP	Sw+ Gsw
G	26.25	148.75	16.9	27.01	7.15	EP	Sw+ Gsw
H	25.3	128	17.5	35.34	7.65	MP	Sw+ Gsw
I	24.5	117	17.3	27.4	7.48	EP	Sw+ Gsw
J	19.7	82	16.4	31	7.21	MP	Sw+ Gsw

¹Sw : sea water

²Gsw : Ground sea water

Table 3. Monitoring of aqua farms (2011.8 ~ 2011.9)

Aqua Farms	Body Length (Cm)	Body Weight (g)	Water Temperature (°C)	Salinity (‰)	pH	Feed	Water Quality
A	20	80	23.6	28.1	7.48	EP	Sw+ Gsw
B	19.5	80	23.6	28.6	7.21	EP	Sw+ Gsw
C	13	15	23.8	28.2	7.20	MP	Sw+ Gsw
D	17.5	50	23.1	31.9	7.17	MP	Sw+ Gsw
E	19	60	23.4	28.1	7.10	EP	Sw+ Gsw
F	20	80	23.4	32	7.24	EP	Sw+ Gsw
G	25	200	23.5	31.6	7.20	EP	Sw+ Gsw
H	24.5	125	23.3	29.7	7.57	MP	Sw+ Gsw
I	20.5	104	23.3	30.4	7.17	EP	Sw+ Gsw
J	17	50	23.4	31.4	7.25	MP	Sw+ Gsw

¹Sw : sea water

²Gsw : Ground sea water

3-1-2. 세균의 분리 및 배양

4~5월, 8~9월에는 세균성 박테리아가 발견되지 않았지만 폐사율이 높아지는 6~7월에 F, G, I 및 J 양식장이 SS 배지와 TCBS 배지에서 *V. harveyi* 와 *E. tarda*가 검출 되었다. 이 중 I, J 양식장에서 여윌증상을 나타내는 넙치에 의한 대량폐사가 발생하였다 (Table 5).

Table 4. Monitoring of diseases (2011.4 ~ 2011.5)

Aqua farms	TSA	SS	TCBS	VIRUS
A	-	-	-	-
B	-	-	-	-
C	-	-	-	-
D	-	-	-	-

Table 5. Monitoring of diseases (2011.6 ~ 2011.7)

Aqua farms	TSA	SS	TCBS	VIRUS
A	O	-	-	-
B	O	-	-	-
C	O	-	-	-
D	-	-	-	-
E	-	-	-	-
F	O	-	O	-
G	O	-	O	-
H	-	-	-	-
I	O	O		-
J	O	O	O	-

Table 6. Monitoring of diseases (2011.8 ~ 2011.9)

Aqua farms	TSA	SS	TCBS	VIRUS
A	-	-	-	-
B	-	-	-	-
C	O	-	-	-
D	-	-	-	-
E	-	-	-	-
F	-	-	-	-
G	-	-	-	-
H	O	-	-	-
I	-	-	-	-
J	O	-	-	-

3-2. 넙치의 절식 개체와 여壼증상 넙치의 생리학적 비교분석

3-2-1. 넙치의 외부 형태 관찰 결과

절식 시작 후, 절식 3주, 5주 후 및 여壼 증상을 나타내고 있는 넙치의 외부 형태를 관찰한 결과를 나타내었다. 절식 실험구와 여壼 증상을 나타내는 넙치의 외형분석의 경우 절식 3주째에서는 내장의 크기가 작아진 것을 확인할 수 있었다. 절식 5주째에서도 3주째보다 더욱더 간과 내장기관의 크기가 작아졌다. 이는 절식으로 인하여 장내의 음식물의 감소뿐만이 아니라 몸에 축적돼 있는 에너지를 과도하게 사용하여 기아생태에 직면하였기 때문으로 여겨진다.



Fig. 2. External analysis of olive flounder (A: 0 weeks, B: starved for 3 weeks, C: starved for 5 weeks, D: Emaciated olive Flounder).

3-2-2. 혈액 생리학적 분석 결과

간수치 지수의 하나인 ALT의 경우 절식 3주 후 감소하였다가 5주 후 급격하게 증가한 것을 볼 수 있다. 이러한 결과는 절식 5주째에 간 손상이 일어났기 때문으로 파악된다. 여壼 증상을 나타내는 녁치의 경우에는 대조구 (절식0주)와 절식3주와는 유의적인 변화를 나타내지 않았으나 평균수치가 감소하는 경향을 나타내었다. 절식 실험의 경우, ALT수치는 절식 5주에서 증가하였다. 이러한 결과는 절식이 진행되면서 간 손상에 의한 증가로 인한 것으로 여겨진다 (Fig. 3).

간수치 지수의 하나인 AST의 경우에도, ALT와 마찬가지로 절식이 진행되면서 유의적으로 수치가 증가하는 것을 확인할 수 있다 (Fig. 4).

혈액 내 총 단백질량을 알아보면 절식이 진행되면서 총 단백질은 감소하는 것을 확인할 수 있다. 여壼 증상을 나타내는 개체의 경우 역시 총 단백질량의 감소를 나타내었다 (Fig. 5).

혈액 내 글루코스 양을 살펴보면 절식이 진행되면서 총 단백질량과 동일하게 글루코스양이 감소하는 결과를 나타내고 있다. 여壼 증상을 나타내는 개체에서도 대조구와 비교하여 감소하는 것을 알 수 있다. 이러한 결과는 총 단백질의 감소와 같은 이유로 보인다 (Fig. 6).

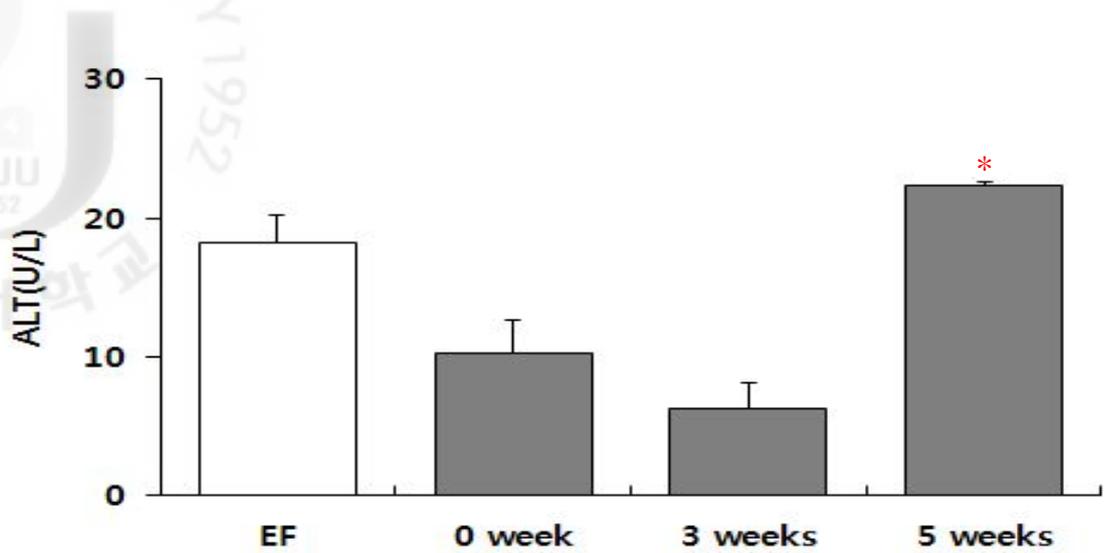


Fig. 3. Analysis of alanine amino transferase (ALT) in serum of olive flounder. Vertical bars indicate standard division; *Significant difference ($P < 0.05$) by ANOVA followed by Dunnet's test compared to the 0 week group. EF : Emaciated olive flounder.

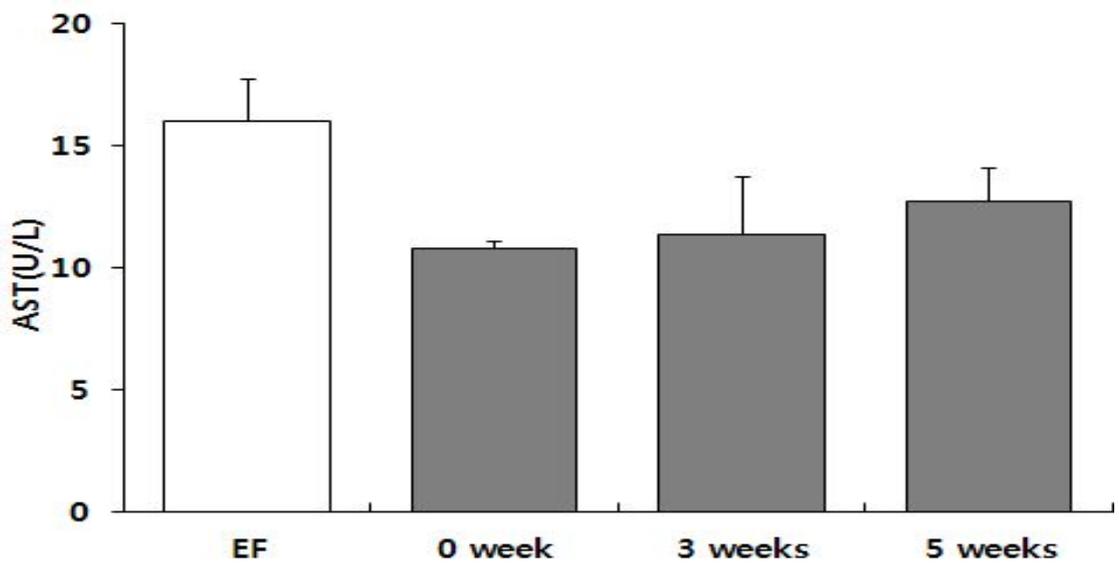


Fig. 4. Analysis of aspartate amino transferase (AST) in serum of olive flounder. Vertical bars indicate standard division; *Significant difference ($P < 0.05$) by ANOVA followed by Dunnet's test compared to the 0 week group. EF : Emaciated olive flounder.

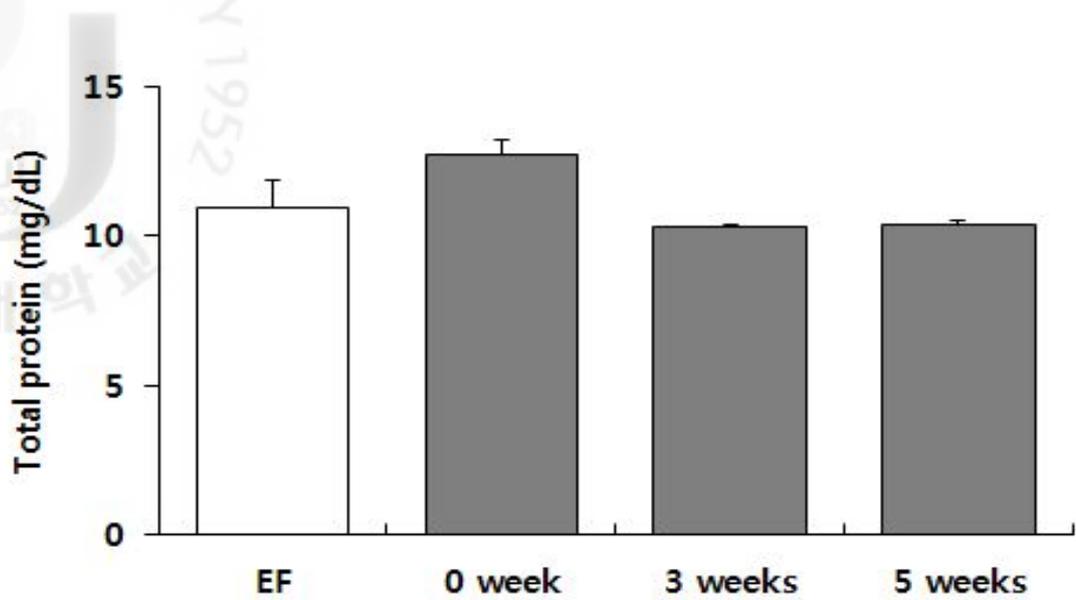


Fig. 5. Analysis of total protein in serum of olive flounder. Vertical bars indicate standard division; *Significant difference ($P < 0.05$) by ANOVA followed by Dunnet's test compared to the 0 week group. EF : Emaciated olive flounder.

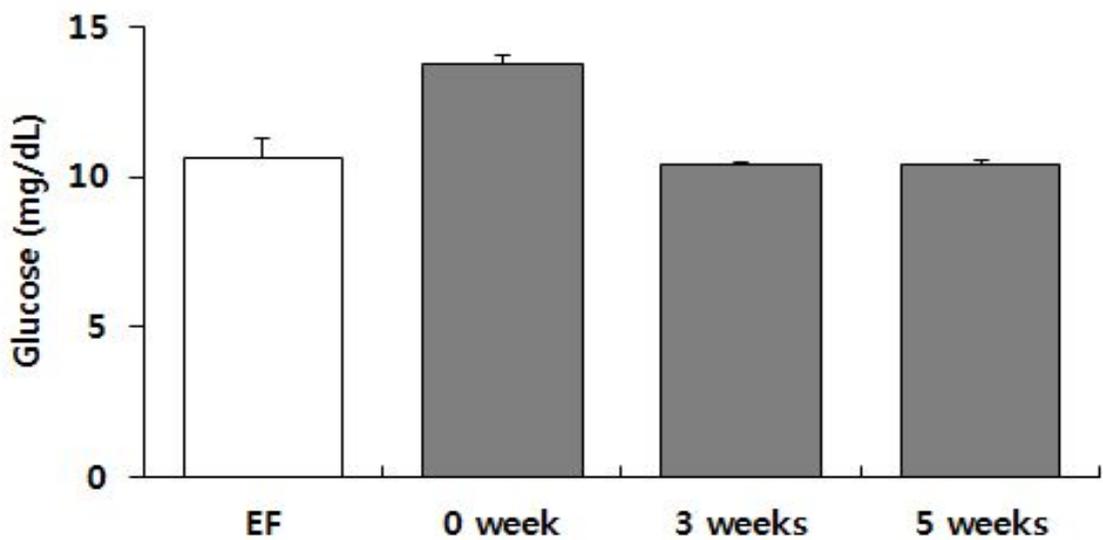


Fig. 6. Analysis of glucose in serum of olive flounder. Vertical bars indicate standard division; *Significant difference ($P < 0.05$) by ANOVA followed by Dunnet's test compared to the 0 week group. EF : Emaciated olive flounder.

3-2-3. 혈액내의 이온농도 변화

혈청중의 나트륨이온 농도는 절식 한 후 3주째 급격히 증가하다 5주에는 다시 대조구의 수치로 회복되는 경향을 보였다 (Fig. 7). 여傭증상의 개체인 경우에는 대조구에 비해서 다소 높게 유지되는 경향을 나타내었다. 일반적으로 해산어에 있어서는 장내에서 나트륨이온을 흡수하고 요를 통하여 배출을 촉진하는 것으로 알려져 있으나 여傭증상에 보이는 장상피의 탈락으로 인하여 나트륨의 수송체계가 붕괴되어 일어나는 것으로 판단된다. 이처럼 지속적인 나트륨이온 농도의 증가는 나트륨배출을 위한 내분비계를 자극하게 되고 이를 통하여 내분비계가 정상적으로 작동하지 못함으로써 어체의 항상성에 문제가 발생할 것으로 추측된다.

칼륨이온의 농도에 있어서도 나트륨이온에서와 같이 절식 3주후에 증가하였다가 다시 감소하여 회복되는 것으로 나타났다 (Fig. 8). 이 때 여傭증상의 개체는 칼륨이온에 있어서는 큰 차이를 나타내지 않는 것으로 나타났다.

음이온인 염소이온의 농도에 있어서도 칼륨이온의 변화와 유사한 결과를 나타내었다 (Fig. 9).

마그네슘의 이온농도에 있어서도 절식을 통하여 이온농도의 상승이 나타났다 (Fig. 11). 그러나 마그네슘 이온 농도의 회복은 1가 이온에 비해 늦어지는 것으로 나타났다. 여傭증상의 개체에 있어서도 대조군에 비해 높은 수치를 나타내는 것으로 나타났다.

한편 칼슘이온농도의 경우에는 모든 실험구에서 거의 유사한 수치를 나타내어 조사한 이온 종류 중 가장 변화가 적게 나타났다 (Fig. 10).

이러한 경향은 여傭증세가 나타날 경우 1가 이온의 흡수 및 배출에 있어서 2가 이온보다 더 많은 영향을 받게되는 것으로 추측된다.

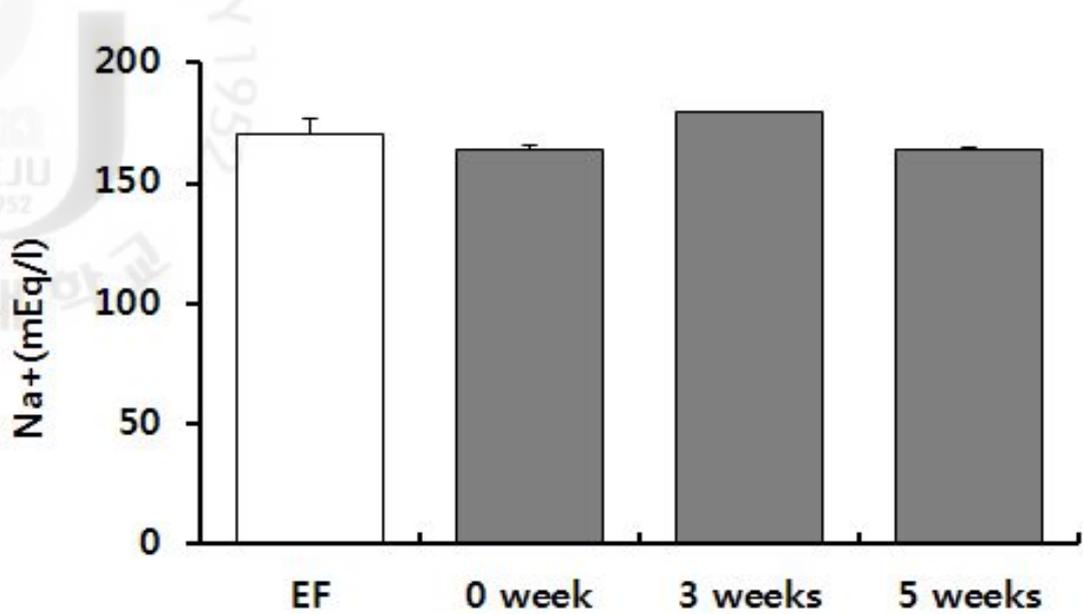


Fig. 7. Change of Na⁺ concentration by starring of olive flounder in serum. Vertical bars indicate standard division; *Significant difference ($P < 0.05$) by ANOVA followed by Dunnet's test compared to the 0 week group. EF : Emaciated olive flounder.

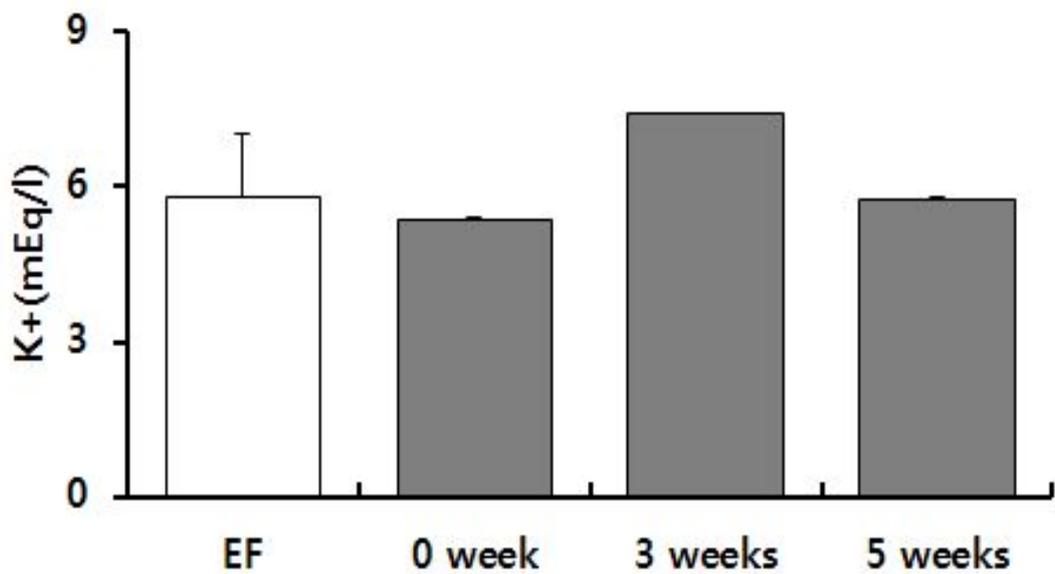


Fig. 8. Change of K⁺ concentration by starring of olive flounder in serum. Vertical bars indicate standard division; *Significant difference ($P < 0.05$) by ANOVA followed by Dunnet's test compared to the 0 week group. EF : Emaciated olive flounder.

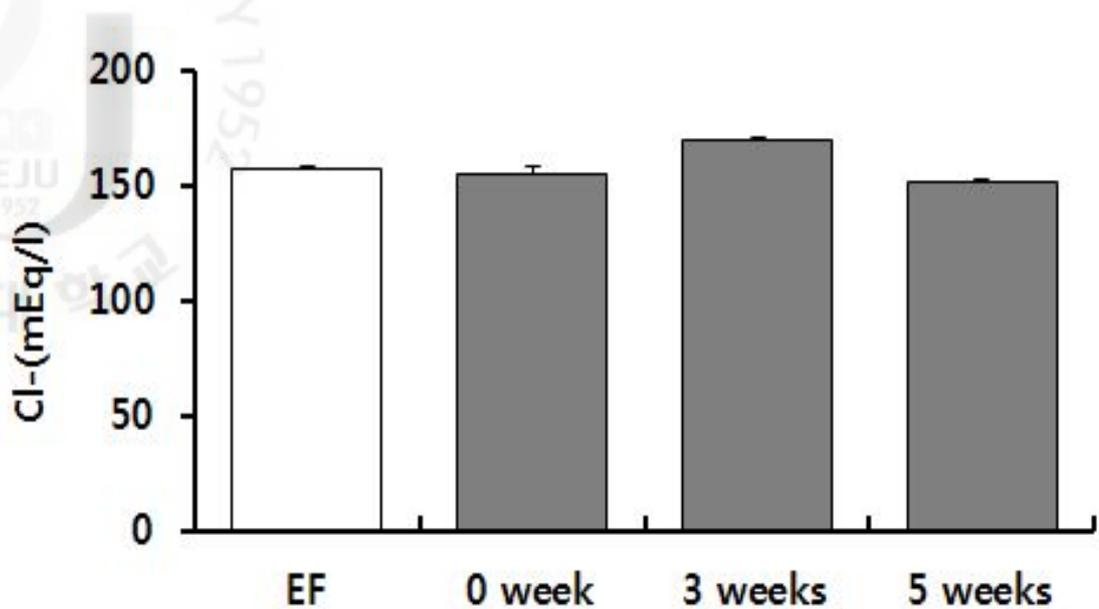


Fig. 9. Change of Cl⁻ concentration by starring of olive flounder in serum. Vertical bars indicate standard division; *Significant difference ($P < 0.05$) by ANOVA followed by Dunnet's test compared to the 0 week group. EF : Emaciated olive flounder.

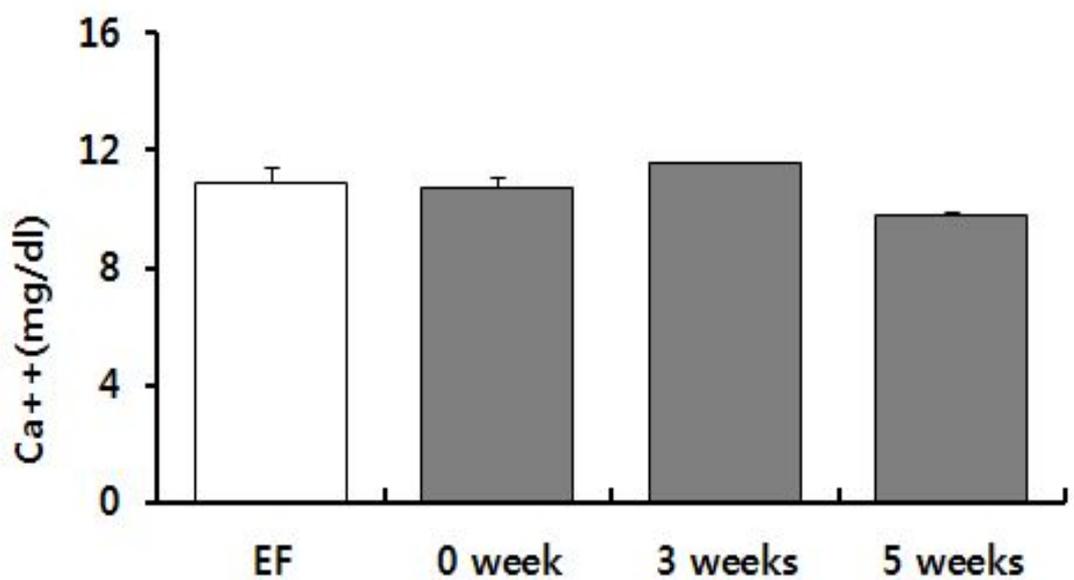


Fig. 10. Change of Ca⁺⁺ concentration by starring of olive flounder in serum. Vertical bars indicate standard division; *Significant difference ($P < 0.05$) by ANOVA followed by Dunnet's test compared to the 0 week group. EF : Emaciated olive flounder.

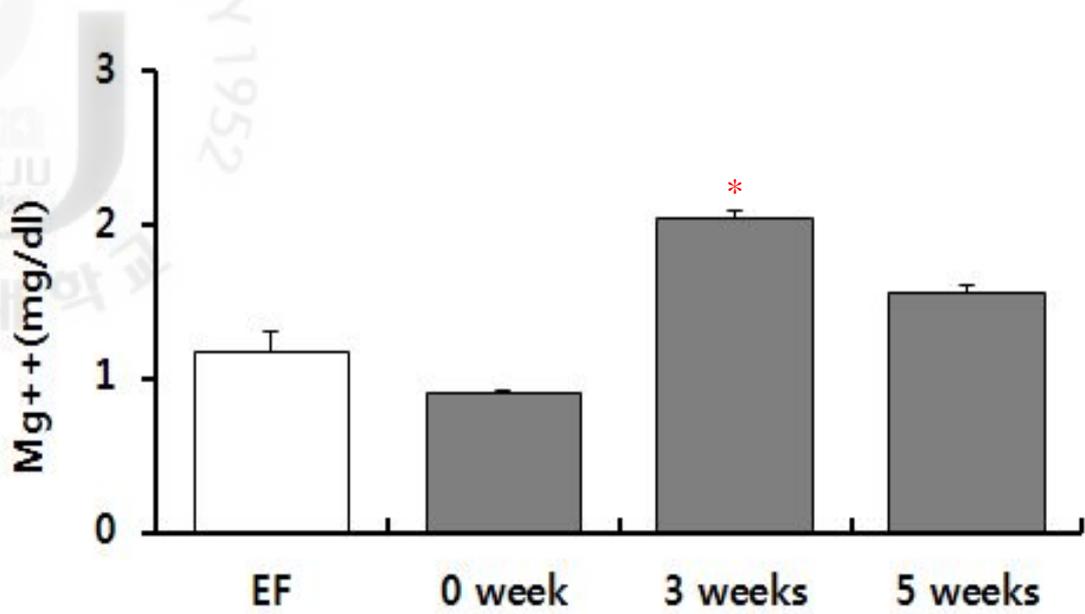


Fig. 11. Change of Mg⁺⁺ concentration by starring of olive flounder in serum. Vertical bars indicate standard division; *Significant difference ($P < 0.05$) by ANOVA followed by Dunnet's test compared to the 0 week group. EF : Emaciated olive flounder.

3-2-4. 조직학적 분석 결과

절식0주 (대조구) 넙치, 절식 3주 넙치, 절식 5주 넙치, 및 여壼 증상을 나타내는 넙치의 장 조직을 관찰한 결과이다 (Fig. 12~19). 절식 3주 넙치의 장관조직을 살펴보면 대조구 넙치와 유의적인 차이점은 없었다 (Fig. 14, 15). 절식 5주 넙치의 장관조직을 대조구의 넙치와 비교해보면 조직에서 부종 및 염증 반응이 관찰되었다 (Fig. 16, 17). 이는 오랜 시간 절식으로 몸에 축적돼 있는 에너지를 과도하게 사용하여 조직이 괴사 하는 것으로 여겨진다. 여壼 증상을 나타내는 넙치의 장관조직을 살펴보면 대조구의 넙치와 비교할 때 장 상피조직이 박리 탈락되어 있고, 상피하 조직에는 염증성 세포의 침윤과 혈관확장도 심한 상태인 것을 관찰할 수 있다. 5주간 절식한 넙치의 장 조직을 보면 염증반응이 나타났으나, 여壼 증세를 보이는 넙치의 장 (Fig. 18, 19)에서 보여지는 바와 같은 조직의 박리 탈락과 같은 현상은 나타나지 않았다. 따라서 여壼 증상을 보이는 넙치가 혈액성상으로는 절식에 의한 영양결핍상태와 유사한 결과를 나타내긴 하였지만 여壼 증세를 보이는 넙치의 장 조직에서 보여지는 바와 같은 박리탈락이 이루어지지 않는 점을 보면 이러한 괴사를 유발하는 병원성 생물체의 관여 혹은 화학물질자극에 의한 가능성이 대두되는 것으로 판단된다.

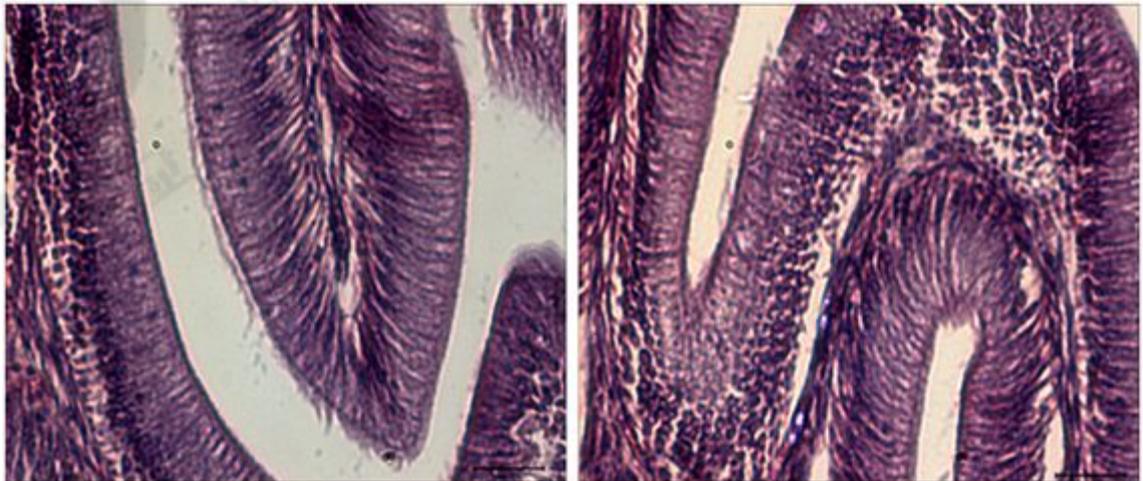


Fig. 12. Histological feature of intestine from control olive flounder (x400, Bar = 20 μ m).

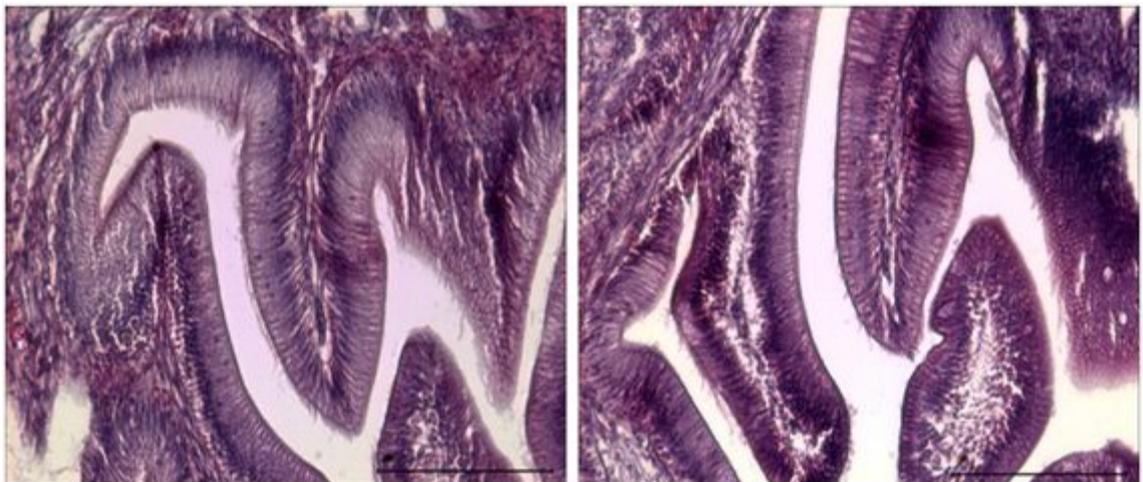


Fig. 13. Histological feature of intestine from control olive flounder (x200, Bar = 50 μ m).

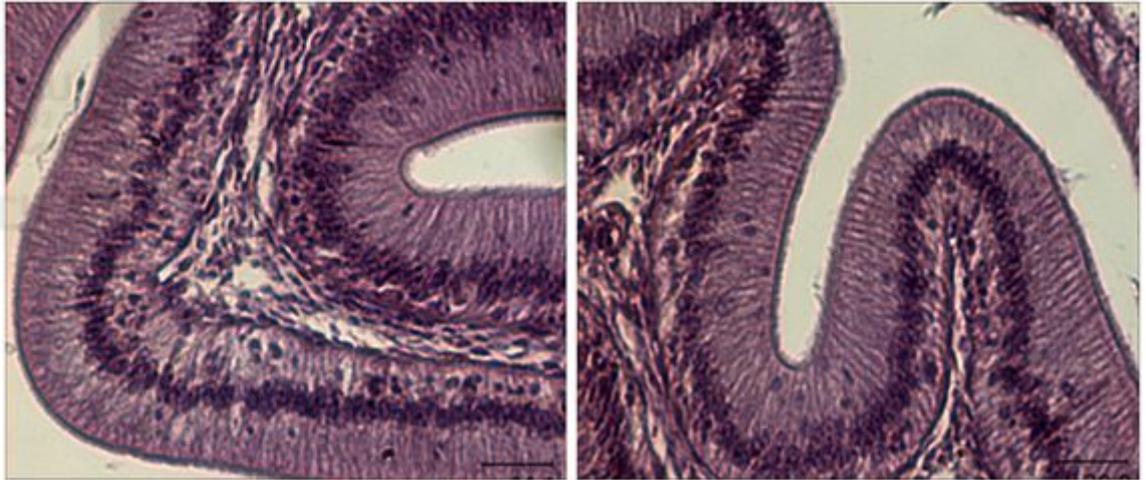


Fig. 14. Histological feature of intestine from starved olive flounder for 3 weeks (x400, Bar = 20 μ m).

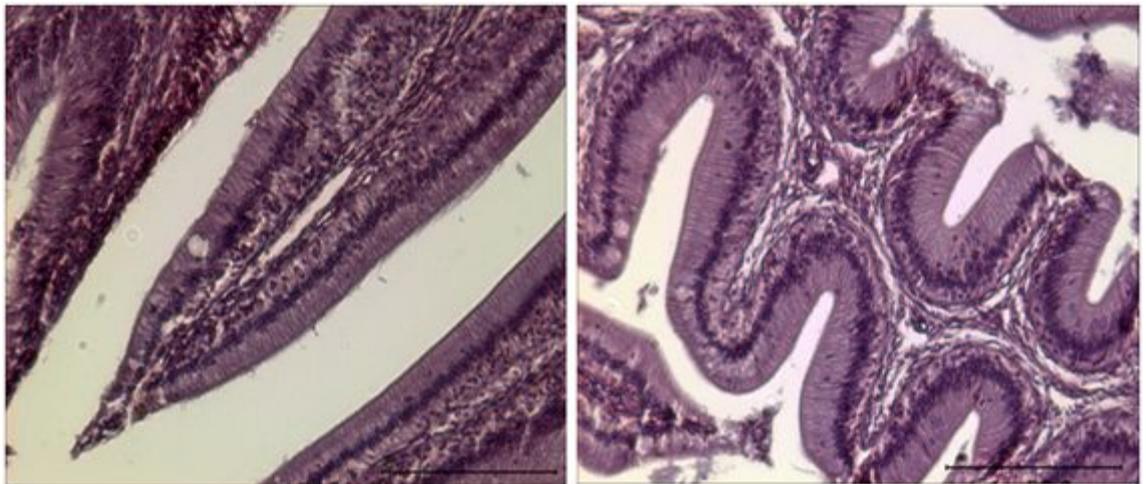


Fig. 15. Histological feature of intestine from olive flounder starved for 3 weeks (x200, Bar = 50 μ m).

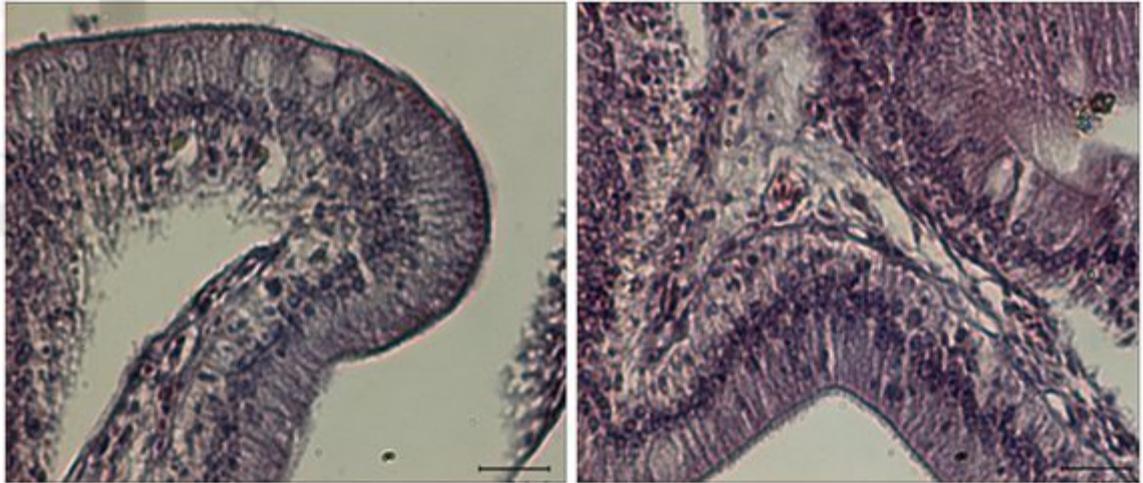


Fig. 16. Histological feature of intestine from olive flounder starved for 5 weeks (x400, Bar = 20 μ m).

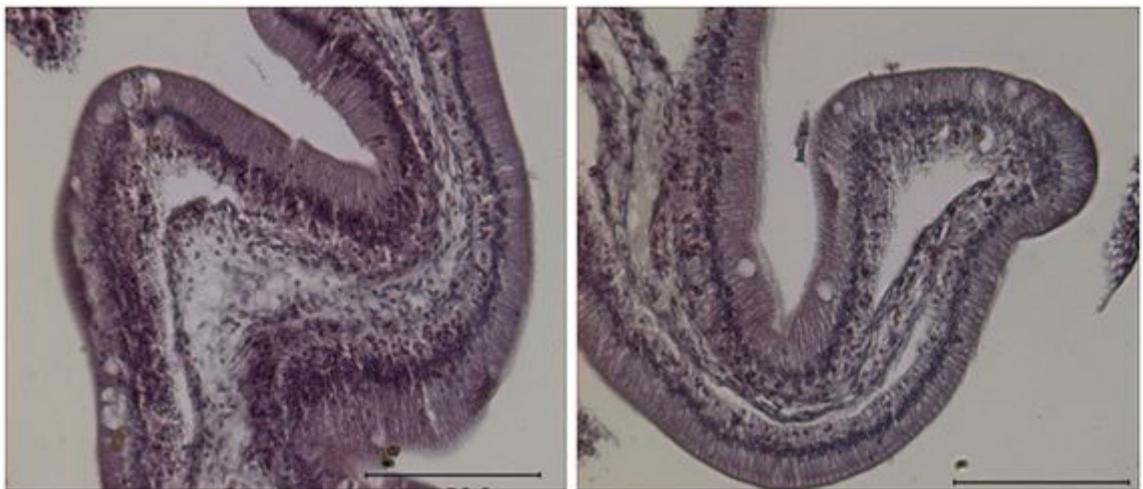


Fig. 17. Histological feature of intestine from olive flounder starved for 5 weeks (x200, Bar = 50 μ m).

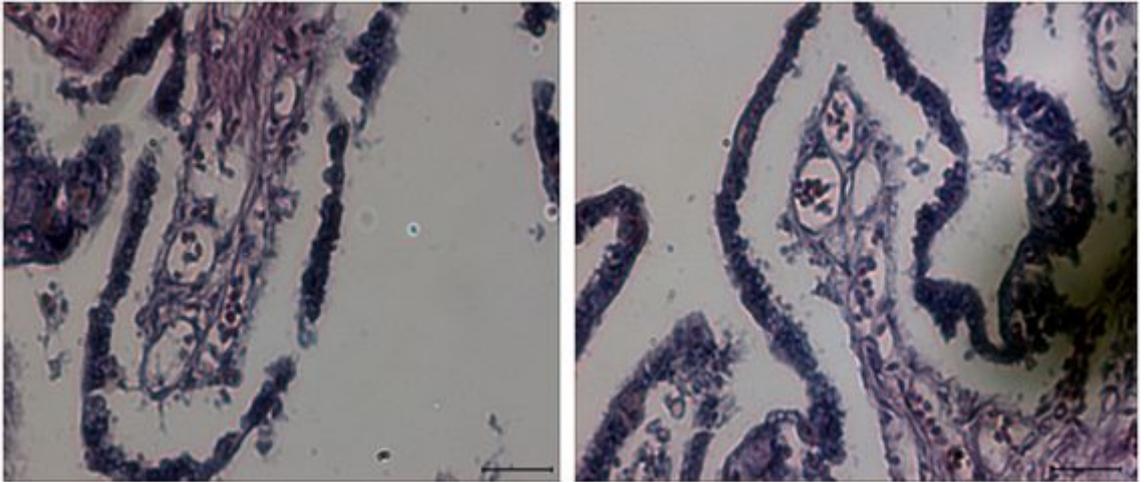


Fig. 18. Histological feature of intestine from emaciated olive flounder (x400, Bar = 20 μ m).

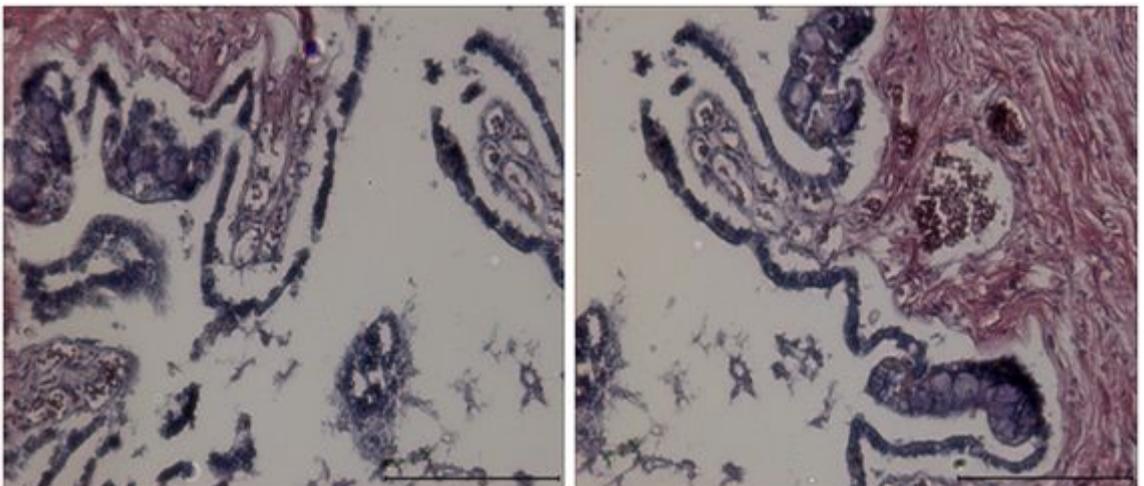


Fig. 19. Histological feature of intestine from emaciated olive flounder (x200, Bar = 50 μ m).

3-3. 병원성 세균감염에 따른 변화

3-3-1. 병원성 실험 결과

본 연구는 분리된 각각의 두 시험 균주와 두 균주의 복합 감염 시 누적 폐사율과 조직학적 변화를 관찰하기 위하여 모두 네 그룹으로 실험을 실시하여 결과를 나타내었다. JV1과 JE1을 복합 감염시킨 실험구에서는 8일째에 모두 폐사하였으며, JV1과 JE1을 단독으로 감염시킨 실험구에서는 각각 11일째와 9일째 100%의 폐사를 보였다. 그러나 대조구에서는 폐사를 일으키지 않았다.

실험 균주를 사용한 시험구의 폐사어 및 생존개체 모두에서 접종균이 재분리되었고, 각각의 선택배지에서도 동일한 성상을 확인할 수 있었다.

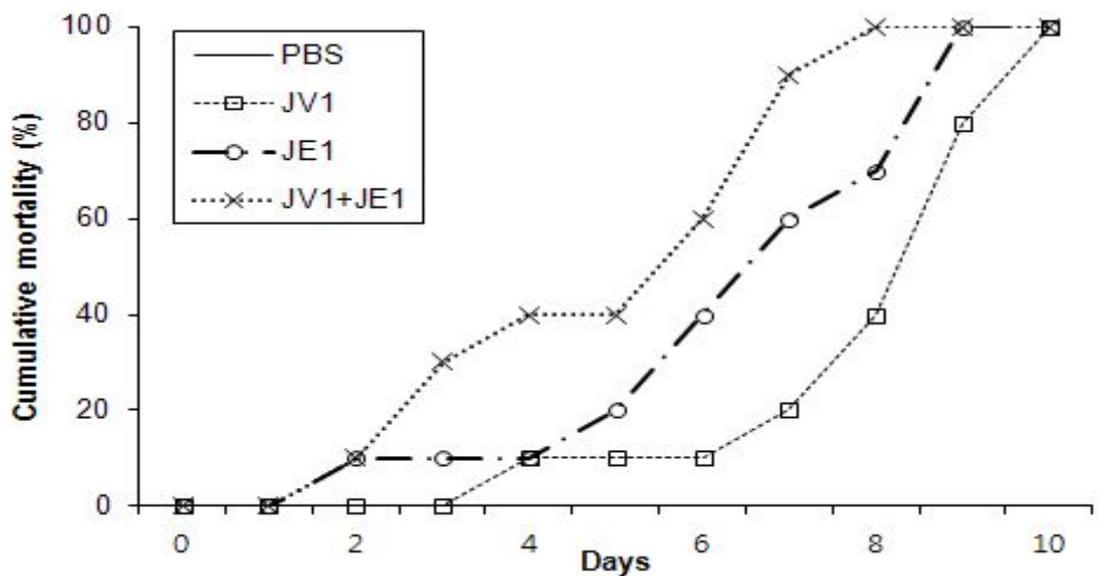


Fig. 20. Mortality rate test of *Edwardsiella tarda* and *Vibrio harveyi* infection olive flounder.

3-3-2. 혈액 생리학적 분석 결과

헤마토크리트 (Hematocrit) 측정 결과 여웬증상 넙치에 비해 JV1과 JE1군 주를 감염시킨 실험구에서 유의적으로 낮은 양상을 나타냈으나 JV1 실험구에서는 시간경과에 따라 감소하는 양상을 나타냈고, JE1과 JV1+JE1를 감염시킨 실험구에서 시간 경과에 따라 증가하는 양상을 나타내었다 (Fig. 21). 간 건강도를 나타내는 ALT (Alanine aminotransferase) 측정 결과 JV1 실험구에서 여웬증상 넙치에 비해 유의적으로 낮은 수치를 나타냈으나 시간경과에 따라 급격히 증가하는 양상을 나타냈다. JE1 실험구에서는 여웬증상 넙치와 유의적으로 유사한 결과를 나타냈다. JV1+JE1를 혼합 감염시킨 실험구에서도 시간경과에 따라 여웬증상 넙치보다 유의적으로 높은 양상을 나타냈다 (Fig. 23). AST (Aspartate aminotransferase) 측정 결과에서도 모든 실험구에서 매우 높은 간 손상을 나타내는 등 여웬증상 넙치와 유사한 양상을 나타냈으며 시간경과에 따라 점차 증가하였다 (Fig. 22). 총 콜레스테롤 (Total Cholesterol) 측정 결과 JE1 실험구에서 여웬증상 넙치와 유의적으로 유사한 양상을 나타냈다. 다른 실험구에서도 여웬증상 넙치에 비해 낮았으나 시간경과에 따라 점차 증가하였다 (Fig. 24). 혈당 (Glucose) 측정 결과 여웬증상 넙치에 비해 정상 넙치와 JV1 실험구에서 처음엔 유사한 결과를 나타냈으나 시간경과에 따라 감소하는 양상을 보이고 있다. JE1 실험구에서는 반대로 시간 경과에 따라 증가하는 것으로 나타났다. 이는 심각한 간의 손상으로 인하여 글리코겐이 분해가 되어 혈액으로 유입되어 글루코스의 수치가 높게 나타나는 것으로 파악된다. JV1+JE를 혼합 감염시킨 실험구에서도 처음엔 여웬증상 넙치에 비해 유의적으로 낮은 수치를 나타내었으나 점차 시간 경과에 따라 수치가 증가하는 양상을 볼 수 있다 (Fig. 25). 총 단백질 (Total protein) 측정 결과 여웬증상 넙치에 비해 모든 실험구에서 유의적으로 낮은 양상을 나타냈다 (Fig. 26). 중성지방 (Triglyceride) 측정 결과 JV1 실험구에서 유의적으로 매우 낮은 수치를 나타내었다. JE1 실험구에서는 1일째엔 여웬증상 넙치와 유사한 결과를 나타내었으나 시간경과에 따라 증가하는 양상을 나타냈다. V1+JE를 혼합 감염시킨 실험결과 여웬증상 넙치에 비해 유의적으로 낮은 수치를 나타냈으나 시간경과에 따라 점차 증가하는 것을 확인할 수 있다 (Fig. 27).

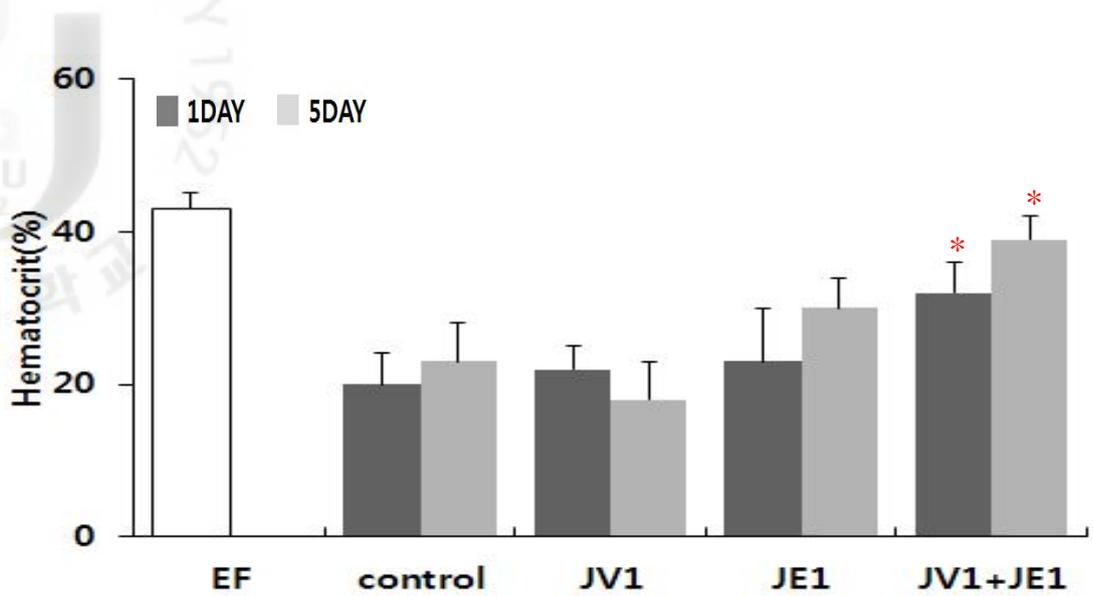


Fig. 21. Change of hematocrit levels by infection of *E. tarda* and *V. harveyi* in serum of olive flounder. Vertical bars indicate standard division; *Significant difference ($P < 0.05$) by ANOVA followed by Dunnet's test compared to the control group. EF : Emaciated olive flounder.

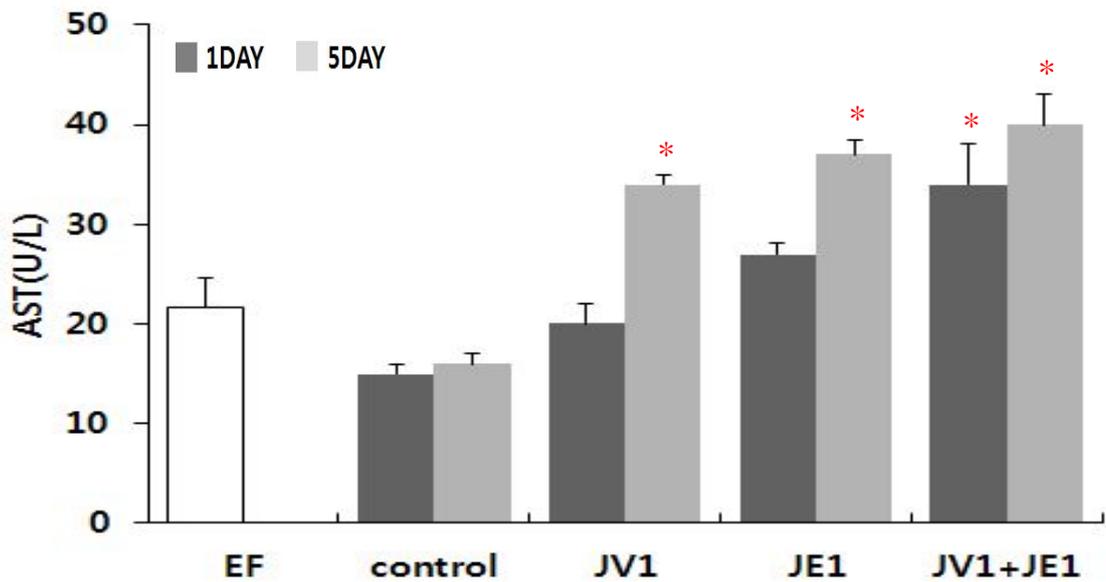


Fig. 22. Change of aspartate amino transferase levels by infection of *E. tarda* and *V. harveyi* in serum of olive flounder. Vertical bars indicate standard division; *Significant difference ($P < 0.05$) by ANOVA followed by Dunnet's test compared to the control group. EF : Emaciated olive flounder.

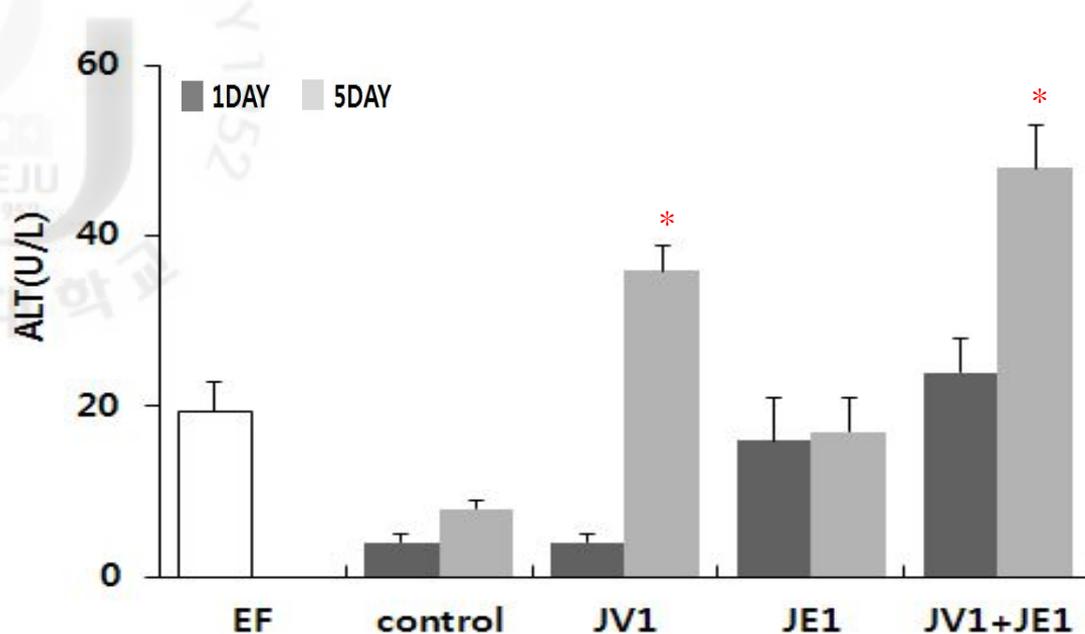


Fig. 23. Change of alanine amino transferase levels by infection of *E. tarda* and *V. harveyi* in serum of olive flounder. Vertical bars indicate standard division; *Significant difference ($P < 0.05$) by ANOVA followed by Dunnet's test compared to the control group. EF : Emaciated olive flounder.

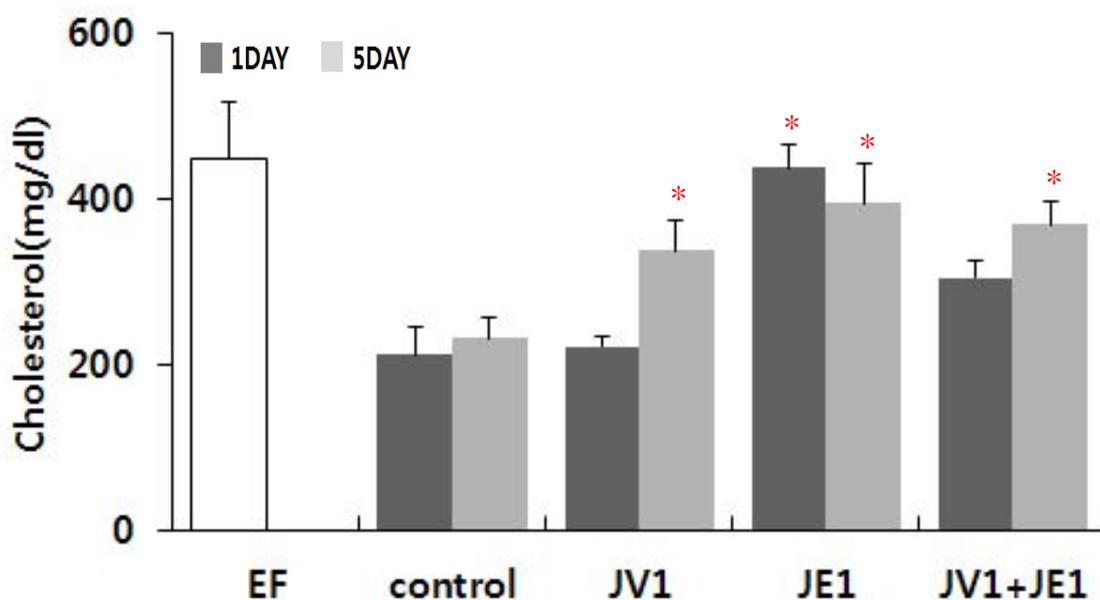


Fig. 24. Change of cholesterol levels by infection of *E. tarda* and *V. harveyi* in serum of olive flounder. Vertical bars indicate standard division; *Significant difference ($P < 0.05$) by ANOVA followed by Dunnet's test compared to the control group. EF : Emaciated olive flounder.

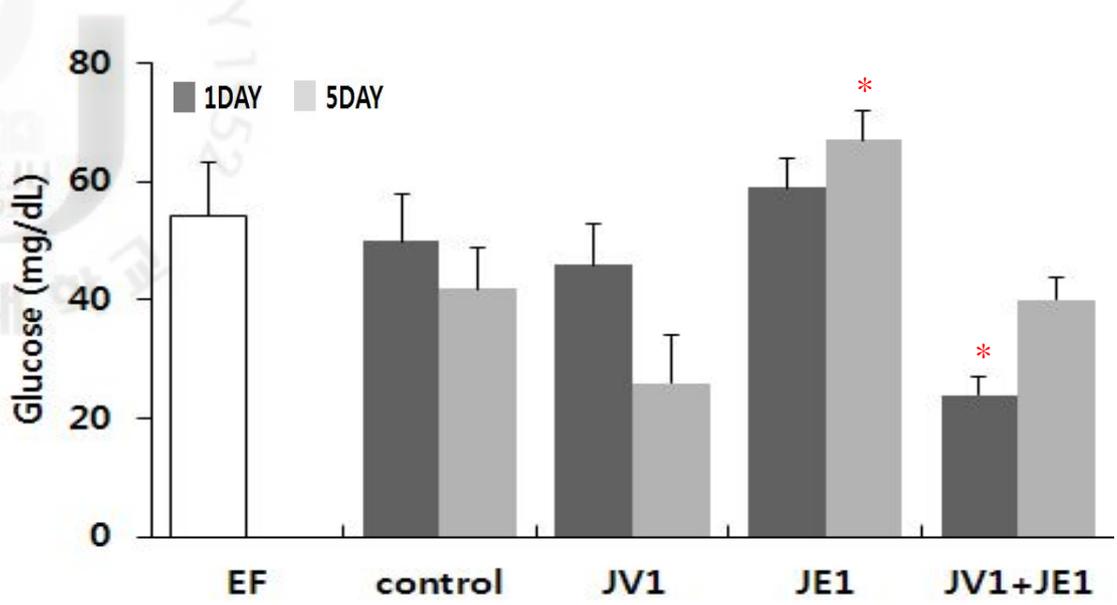


Fig. 25. Change of glucose levels by infection of *E. tarda* and *V. harveyi* in serum of olive flounder. Vertical bars indicate standard division; *Significant difference ($P < 0.05$) by ANOVA followed by Dunnet's test compared to the control group. EF : Emaciated olive flounder.

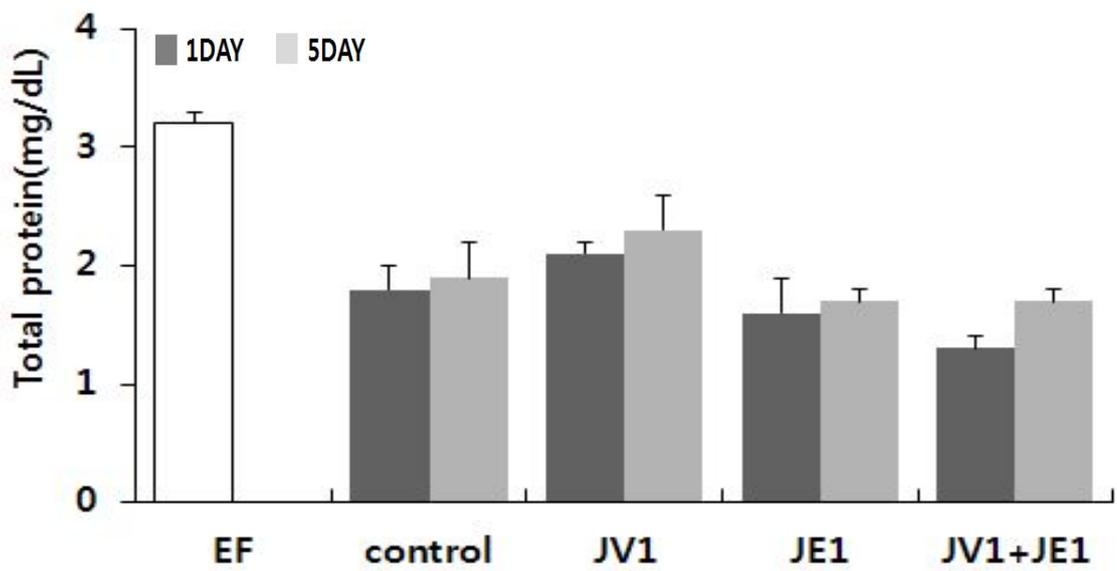


Fig. 26. Change of total protein levels by infection of *E. tarda* and *V. harveyi* in serum of olive flounder. Vertical bars indicate standard division; *Significant difference ($P < 0.05$) by ANOVA followed by Dunnet's test compared to the control group. EF : Emaciated olive flounder.

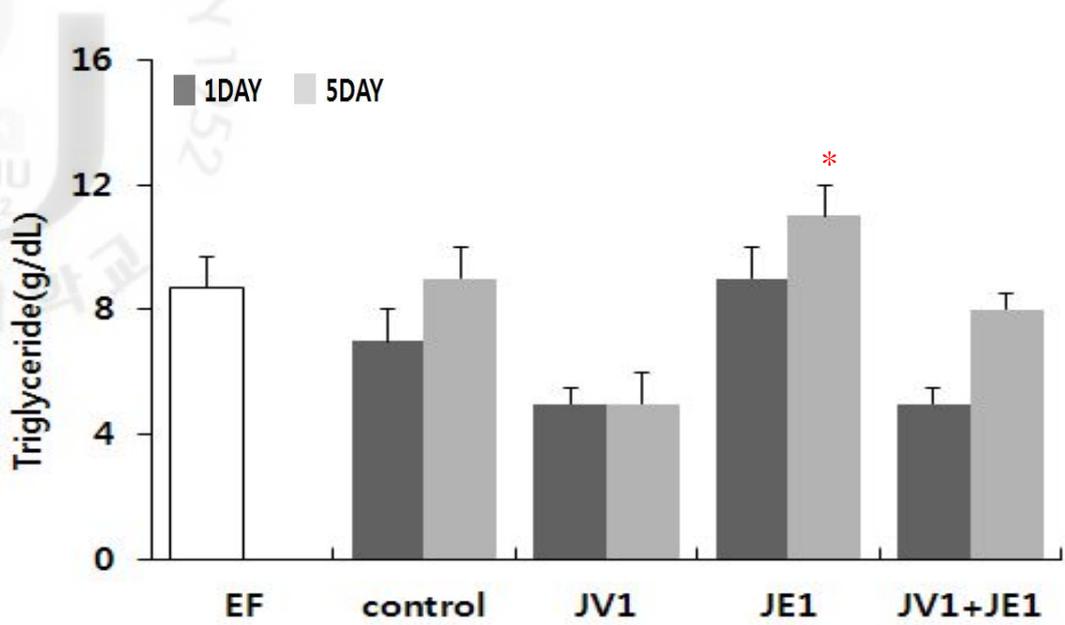


Fig. 27. Change of triglyceride levels by infection of *E. tarda* and *V. harveyi* in serum of olive flounder. Vertical bars indicate standard division; *Significant difference ($P < 0.05$) by ANOVA followed by Dunnet's test compared to the control group. EF : Emaciated olive flounder.

3-3-3. 혈청과 점액 Lysozyme activity

혈청 Lysozyme activity 결과 처음엔 JV1, JE1 및 JV1+JE1 실험구에서 여웬증상 넙치에 비해 면역활성이 떨어지는 양상을 나타냈으나, 시간경과에 따라 유의적으로 증가하는 양상을 나타냈다 (Fig. 28). 점액 Lysozyme activity 측정 결과 혈청 Lysozyme activity 결과와 마찬가지로 JV1, JE1 및 JV1+JE1 그룹에서 여웬증상 그룹보다 유의적으로 낮은 면역 활성을 보이다가 시간이 경과함에 따라 점차 유의적으로 증가하는 양상을 나타냈다 (Fig. 29).

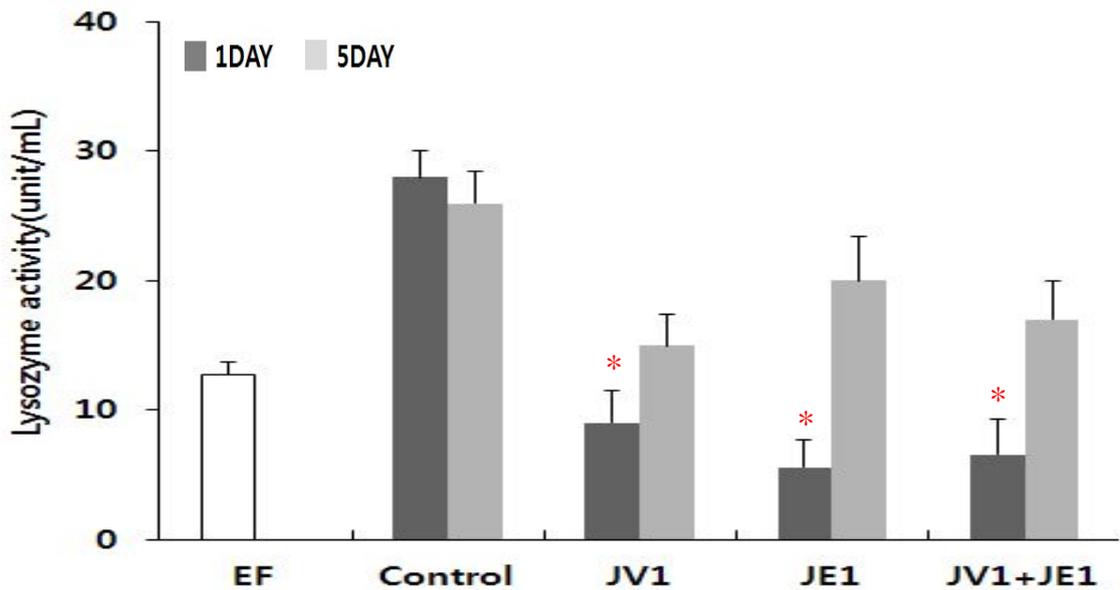


Fig. 28. Change of serum lysozyme activity levels by infection of *E. tarda* and *V. harveyi* in serum of olive flounder. Vertical bars indicate standard division; *Significant difference ($P < 0.05$) by ANOVA followed by Dunnet's test compared to the control group. EF : Emaciated olive flounder.

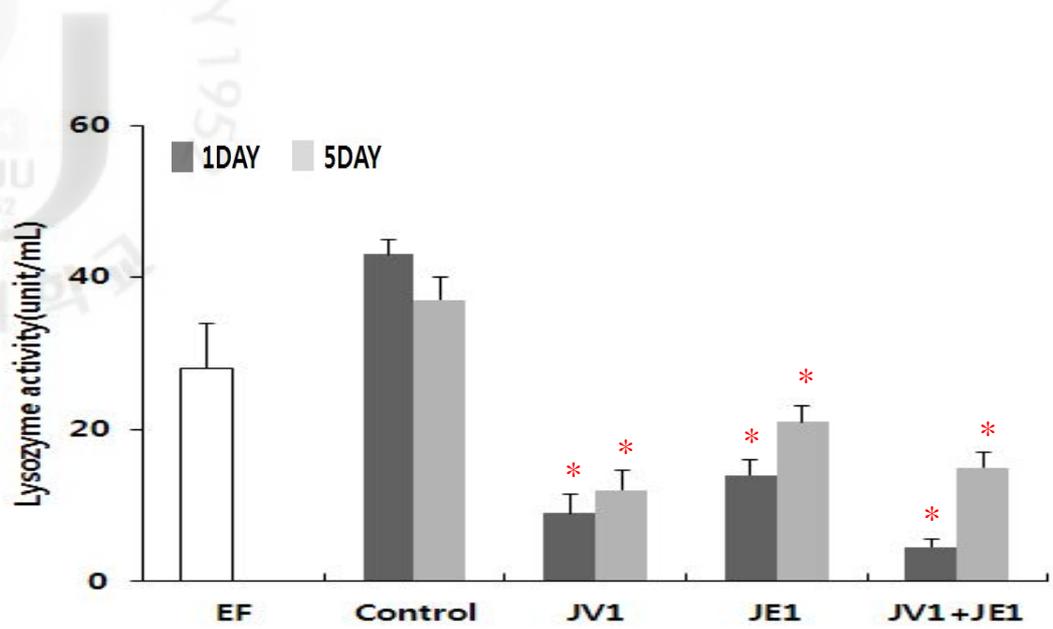


Fig. 29. Change of mucus lysozyme activity levels by infection of *E. tarda* and *V. harveyi* in serum of olive flounder. Vertical bars indicate standard division; *Significant difference ($P < 0.05$) by ANOVA followed by Dunnet's test compared to the control group. EF : Emaciated olive flounder.

3-3-4. 항산화 효소 측정 결과

CAT 측정 결과 JV1, JE1 및 JV1+JE1 실험구에서 시간경과에 따라 점차 증가하는 경향을 보였으며 5일째에는 여嬴증상 넙치와 유사한 결과를 나타내었다 (Fig. 30). SOD 측정 결과 역시 JV1, JE1 및 JV1+JE1 실험구에서 시간경과에 따라 점차 증가하는 경향을 보였으며 5일째 JE1 실험구에서 최고 높은 효소 활성을 보였다 (Fig. 31).

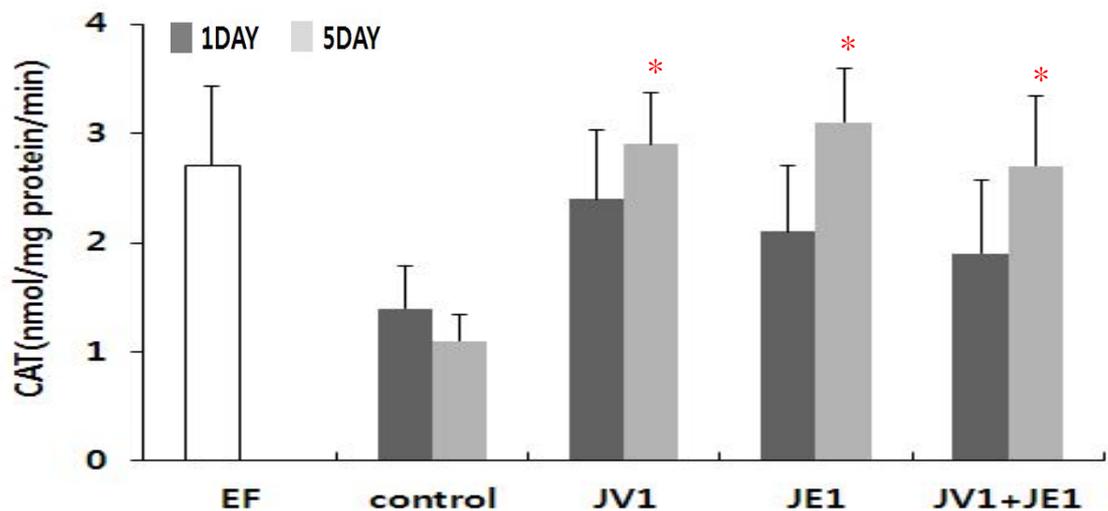


Fig. 30. Change of catalase activity in *E. tarda* and *V. harveyi* infection olive flounder. Vertical bars indicate standard deviation; *Significant difference ($P < 0.05$) by ANOVA followed by Dunnet's test compared to the control group. EF : Emaciated olive flounder.

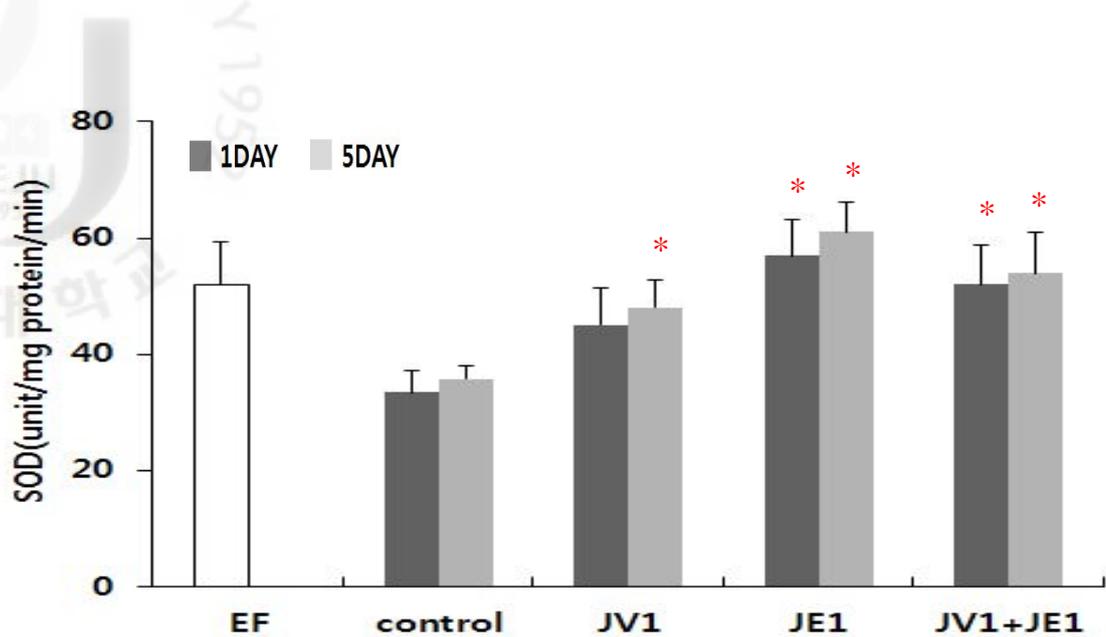


Fig. 31. Change of Superoxide dismutase activity in *E. tarda* and *V. harveyi* infection olive flounder. Vertical bars indicate standard division; *Significant difference ($P < 0.05$) by ANOVA followed by Dunnet's test compared to the control group. EF : Emaciated olive flounder.

3-3-5. 조직학적 분석 결과

각 조직별로 광학현미경적 관찰을 실시하였다. 대조구를 제외한 모든 그룹에서 아가미 모세관확장증이 일어나는 것을 관찰하였으며, Fig. 32의 B, D, E 에서 새변의 내전근 파괴를 관찰 하였다. Fig. 32 E 에서는 점액세포 파괴를 관찰하였다. 여윌증상을 보이는 넙치 (Fig. 32 B)와 JV1 + JE1 (Fig. 32 E)에서 유사하게 파괴된 것을 관찰할 수 있다.

장 조직은 대조구를 제외한 모든 그룹에서 상피조직 탈락 및 파괴를 관찰하였으며, 여윌증상을 보이는 넙치 (Fig. 33 B)와 JV1 + JE1 (Fig. 33 E)에서 장 조직 비대 및 출혈을 관찰하였고, 그 밖에 점액세포, 과립층, 치밀층, 윤주근의 파괴를 관찰하였다.

신장조직에서는 대조구와 JV1만 단독으로 주사한 그룹을 제외한 모든 그룹에서 핵이 관찰되지 않았으며, Fig. 34 A를 제외한 모든 그룹에서 일부가 결정화된 결석으로 막혀 있는 것을 관찰하였다. Fig. 34의 C, D, E 그룹에서 조직탈락 및 파괴를 관찰하였으며, Fig.34 B 및 E 그룹에서 일부가 결정화된 결석으로 막혀 있는 것을 관찰하였다. 이 외의 여윌증상을 보이는 그룹에서 Fig. 34의 C, D, E에서와 같은 조직탈락 및 파괴를 확인할 수 있다.

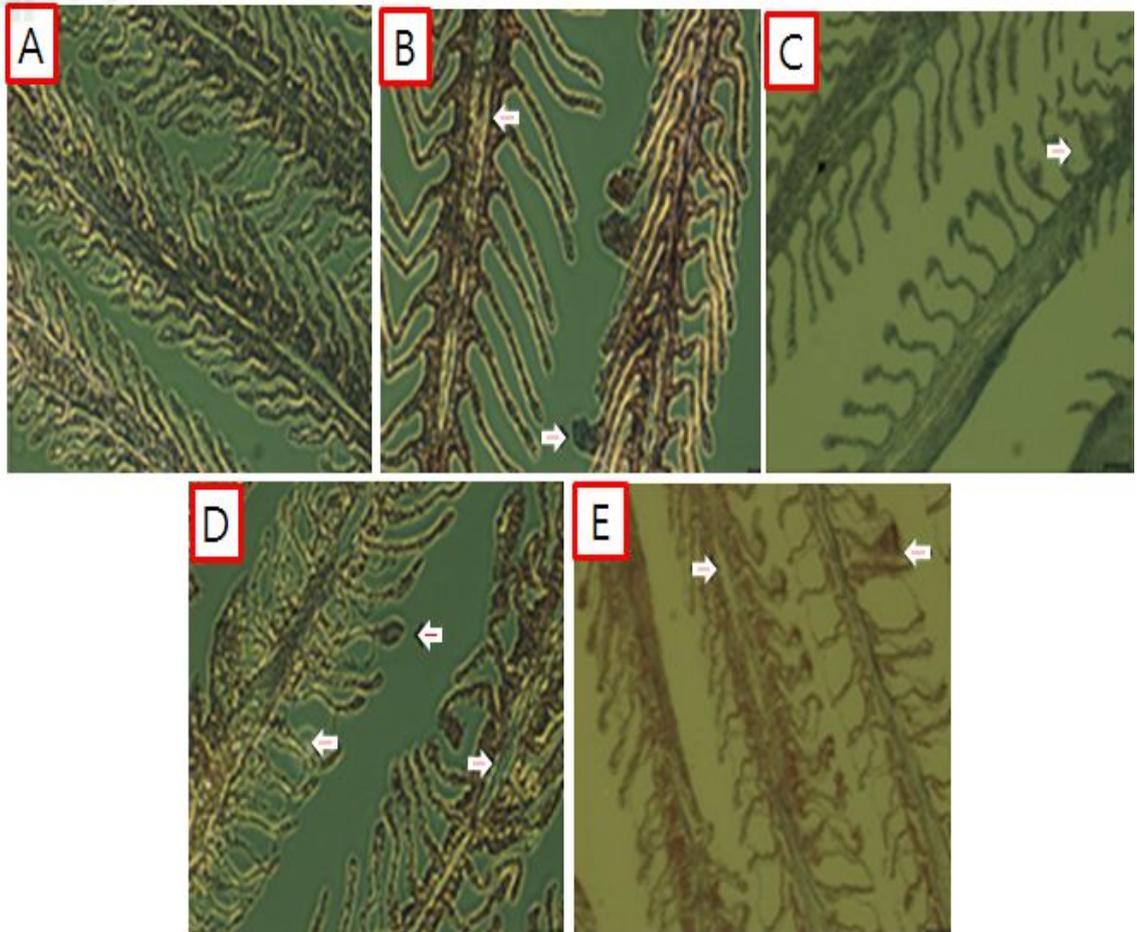


Fig. 32. Histological feature of gill by *E. tarda* and *V. harveyi* infection in olive flounder (A : Control flounder, B: Emaciated flounder, C: Flounder infected by JV1, D: Flounder infected by JE1, E: Flounder infected by JV1+JE1). Bar=10 μ m.

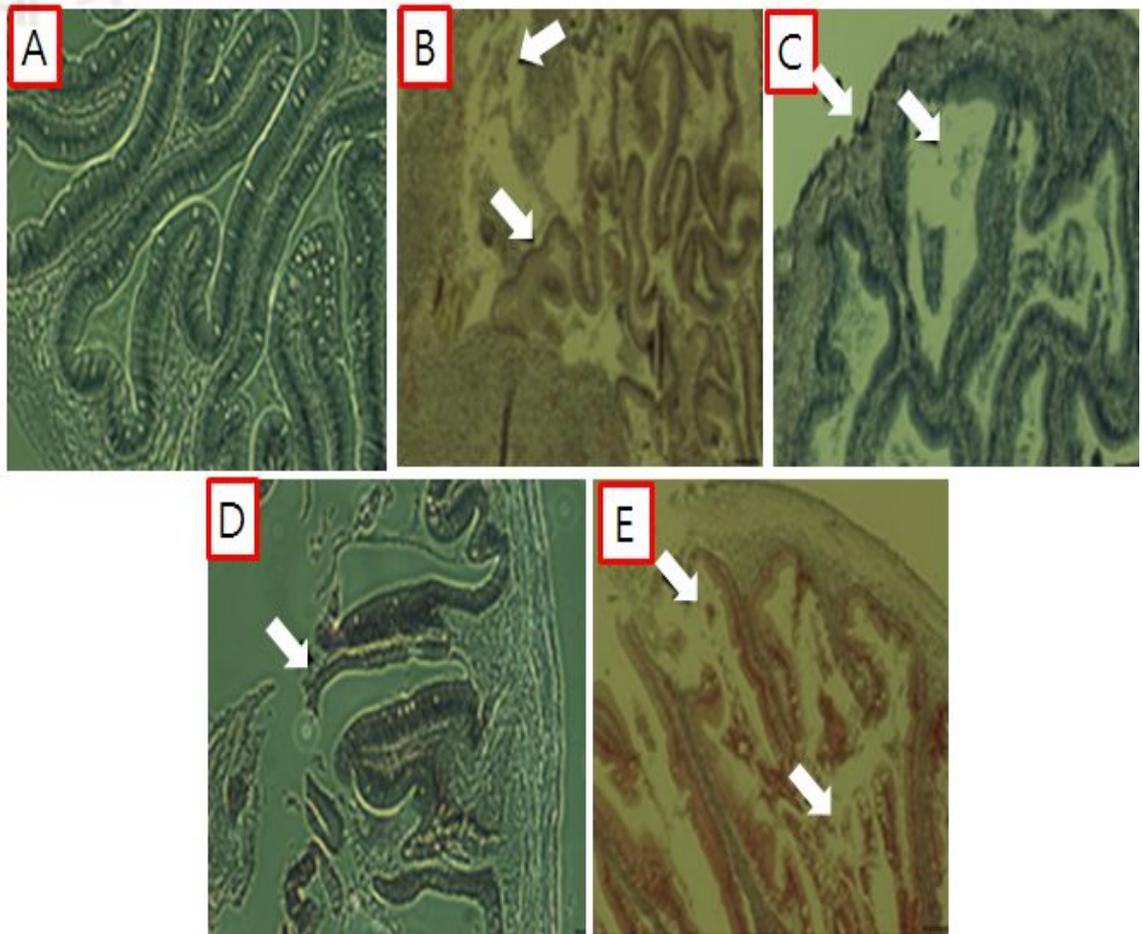


Fig. 33. Histological feature of intestine by *E. tarda* and *V. harveyi* infection in olive flounder (A : Control flounder, B: Emaciated flounder, C: Flounder infected by JV1, D: Flounder infected by JE1, E: Flounder infected by JV1+JE1). Bar=10 μ m.

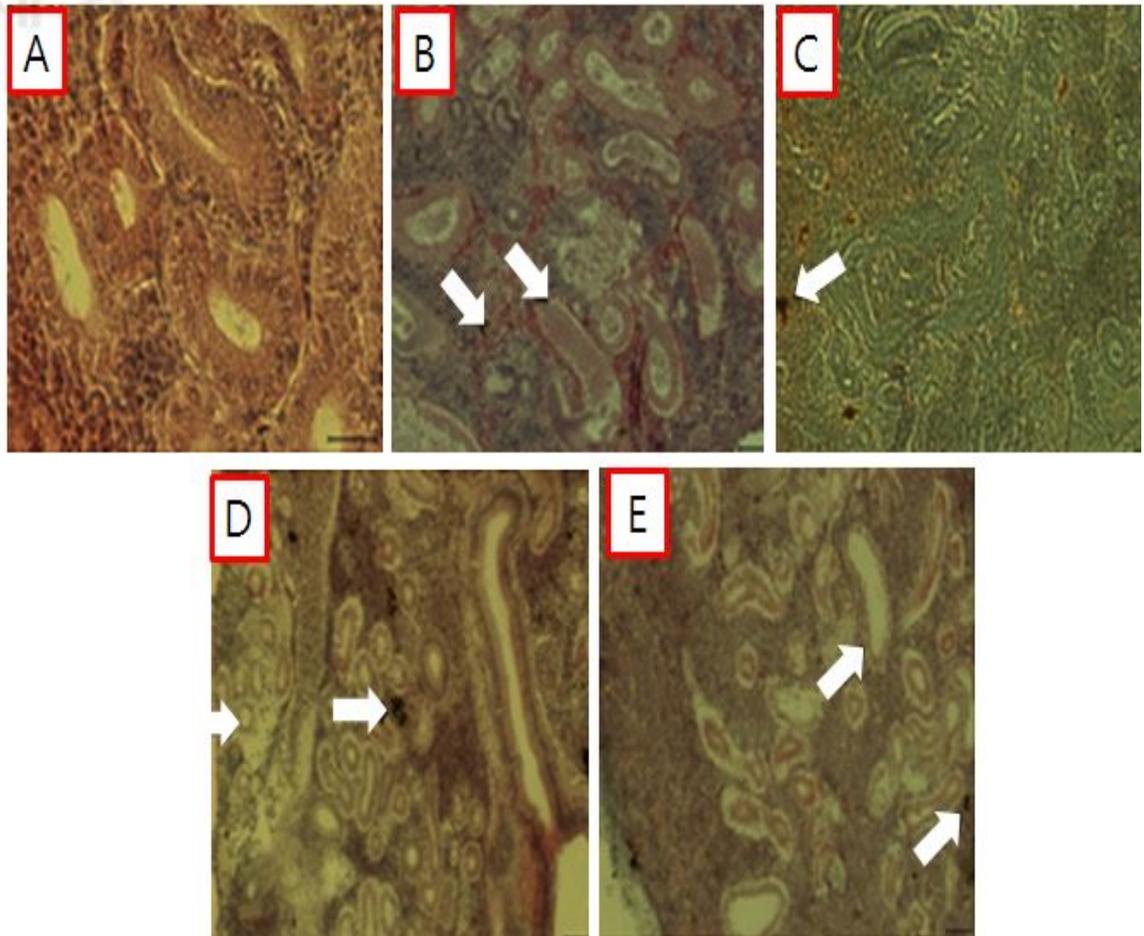


Fig. 34. Histological feature of kidney by *E. tarda* and *V. harveyi* infection in olive flounder (A : Control flounder, B: Emaciated flounder, C: Flounder infected by JV1, D: Flounder infected by JE1, E: Flounder infected by JV1+JE1). Bar=10 μ m.

3-4. 과산화 수소 처리에 의한 효과

3-4-1. 혈액 생리학적 분석결과

어류의 혈액성분은 오염물질등에 대해 매우 민감하게 반응한다고 나와 있다 (Bansal et al., 1979). 이에 따라 사육수중의 병원체 살균을 위하여 양식장에서 주로 사용하는 과산화 수소의 농도별 약육에 따른 넙치의 혈액학적 변화를 살펴 보았다. 헤마토크리트 (Hematocrit)를 측정된 결과 여윌증상 넙치에 비해 유의적으로 낮은 양상을 나타냈으나 시간경과에 따라 증가하는 양상을 나타냈다 (Fig. 35). 간의 건강도를 나타내는 ALT (Alanine aminotransferase) 및 AST(Aspartate aminotransferase) 측정 결과 0h 100, 300ppm에서 여윌증상 넙치와 유의적으로 유사한 결과를 나타냈으나 500ppm에서는 매우 높은 수치를 나타내었다. 6h 이후로 모든 실험구에서 급격히 증가 하였으며 24h 이후로 점차 감소하더니 168h 째에 100ppm을 제외한 나머지 300, 500ppm에서 컨트롤 실험구 보다 유의적으로 비슷한 수치를 나타냈다. 312h 째에 모든 실험구에서 컨트롤 실험구와 유의적으로 유사한 양상을 나타냈다 (Fig. 36, 37). 혈당 (Glucose)측정 결과 여윌증상 넙치에 비해 모든 실험구에서 시간경과에 따라 유의적으로 증가하는 양상을 보이고 있다. 간의 손상으로 인하여 글리코젠이 분해가 되어 혈액으로 유입되어 글루코스의 수치가 높게 나타나는 것으로 파악된다 (Fig. 38). 총 콜레스테롤 (Total Cholesterol)측정 결과 여윌증상 넙치에 비해 모든 실험구에서 유의적으로 낮은 결과를 나타내고 있지만 시간경과에 따라 증가하여 312h 이후로 여윌증상 넙치와 유사한 양상을 나타내고 있다 (Fig. 39). 총 단백질 (Total protein)측정 결과 여윌증상 넙치에 비해 모든 실험구에서 유의적으로 매우 높은 양상을 나타냈다. 하지만 시간경과에 따라 약소하게 감소하는 수치를 나타내고 있다 (Fig. 41). 중성지방 (Triglyceride)측정 결과 여윌증상에 비해 유의적으로 낮은 수치를 나타내고 있지만 시간 경과에 따라 6h째부터 약소하게 증가하다 48h이후 다시 감소하는 양상을 나타냈다 (Fig. 40).

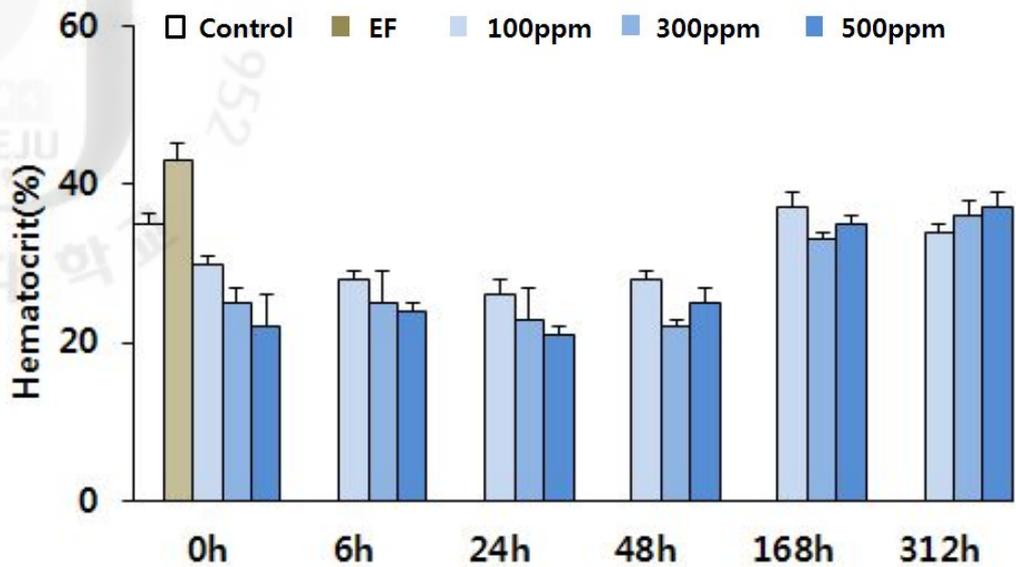


Fig. 35. Analysis of hematocrit in serum of olive flounder exposed to a various hydrogen peroxide concentrations. Vertical bars indicate standard division; *Significant difference ($P < 0.05$) by ANOVA followed by Dunnet's test compared to the control group. EF : Emaciated olive flounder.

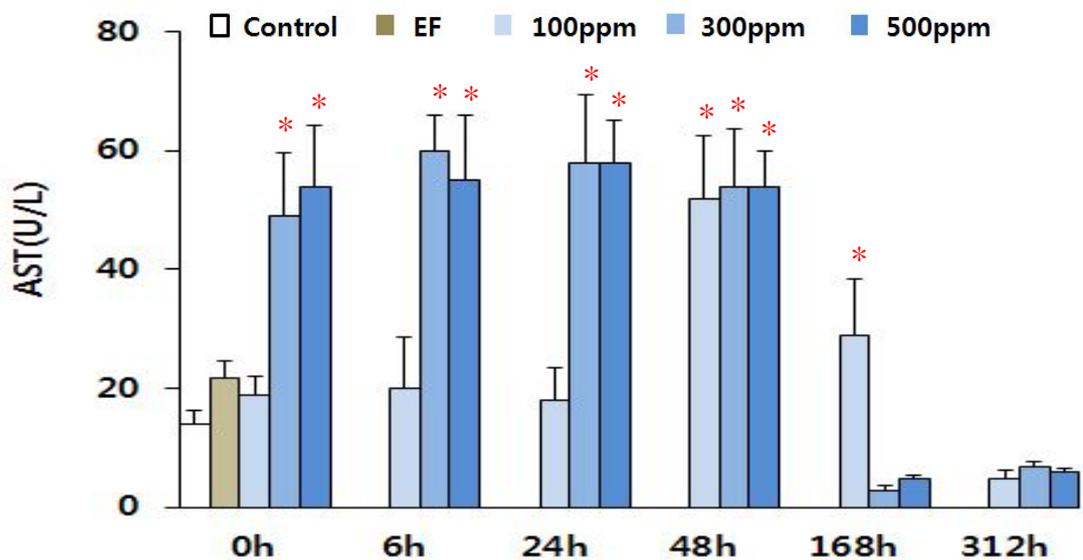


Fig. 36. Analysis of aspeartate aminotransferase in serum of olive flounder exposed to a various hydrogen peroxide concentrations. Vertical bars indicate standard division; *Significant difference ($P < 0.05$) by ANOVA followed by Dunnet's test compared to the control group. EF : Emaciated olive flounder.

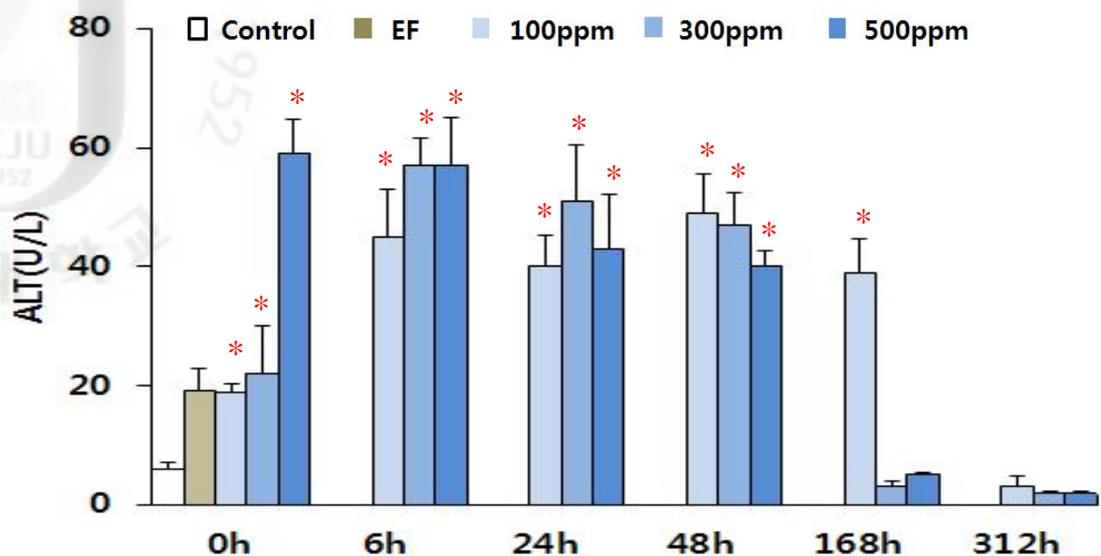


Fig. 37. Analysis of alanine amino transferase in serum of olive flounder exposed to a various hydrogen peroxide concentrations. Vertical bars indicate standard division; *Significant difference ($P < 0.05$) by ANOVA followed by Dunnet's test compared to the control group. EF : Emaciated olive flounder.

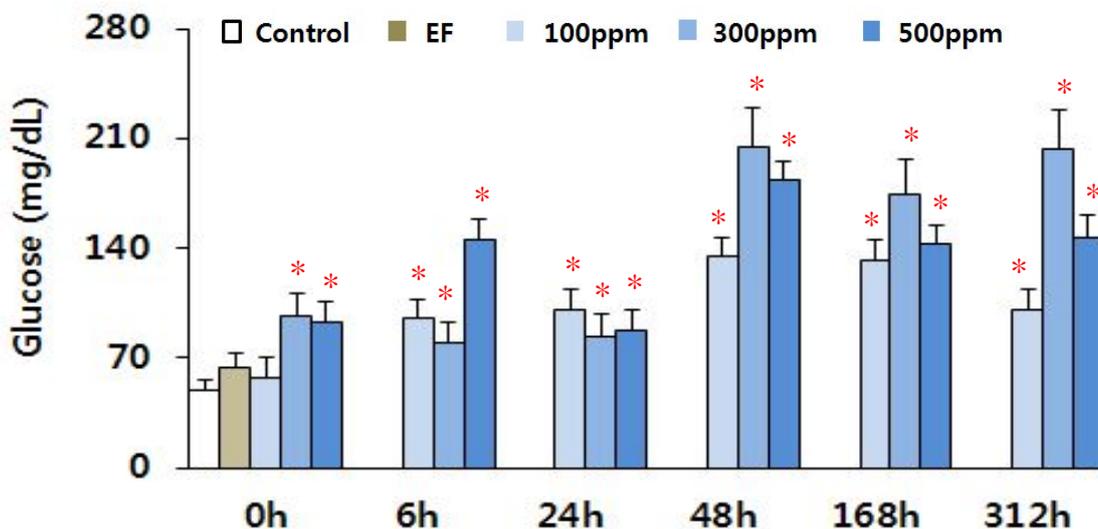


Fig. 38. Analysis of glucose in serum of olive flounder exposed to a various hydrogen peroxide concentrations. Vertical bars indicate standard division; *Significant difference ($P < 0.05$) by ANOVA followed by Dunnet's test compared to the control group. EF : Emaciated olive flounder.

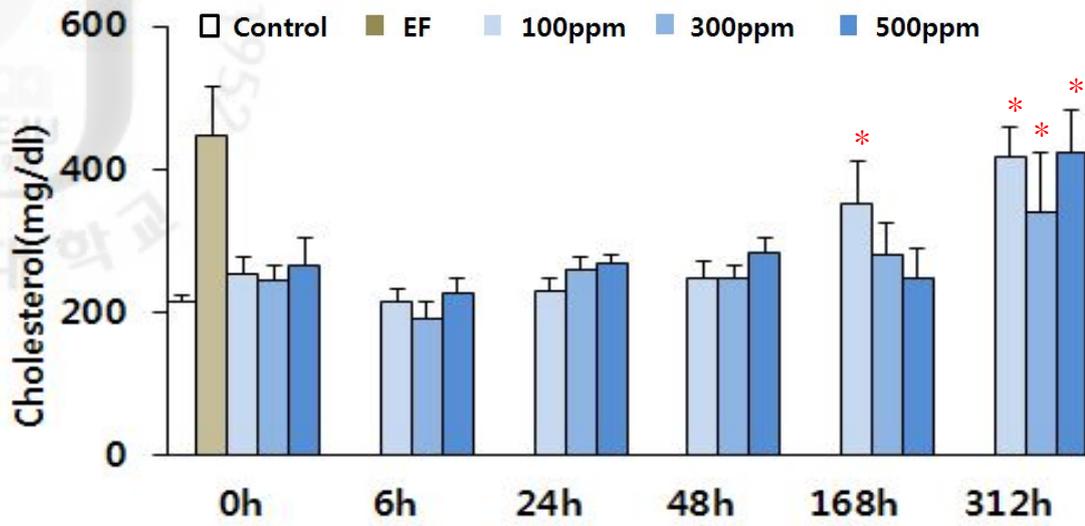


Fig. 39. Analysis of cholesterol in serum of olive flounder exposed to a various hydrogen peroxide concentrations. Vertical bars indicate standard division; *Significant difference ($P < 0.05$) by ANOVA followed by Dunnet's test compared to the control group. EF : Emaciated olive flounder.

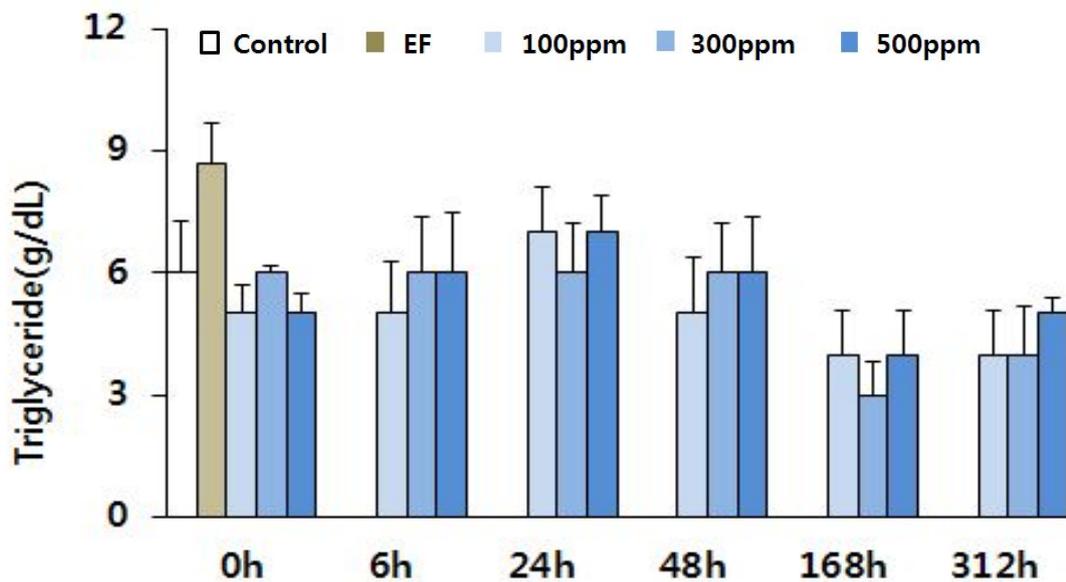


Fig. 40. Analysis of triglyceride in serum of olive flounder exposed to a various hydrogen peroxide concentrations. Vertical bars indicate standard division; *Significant difference ($P < 0.05$) by ANOVA followed by Dunnet's test compared to the control group. EF : Emaciated olive flounder.

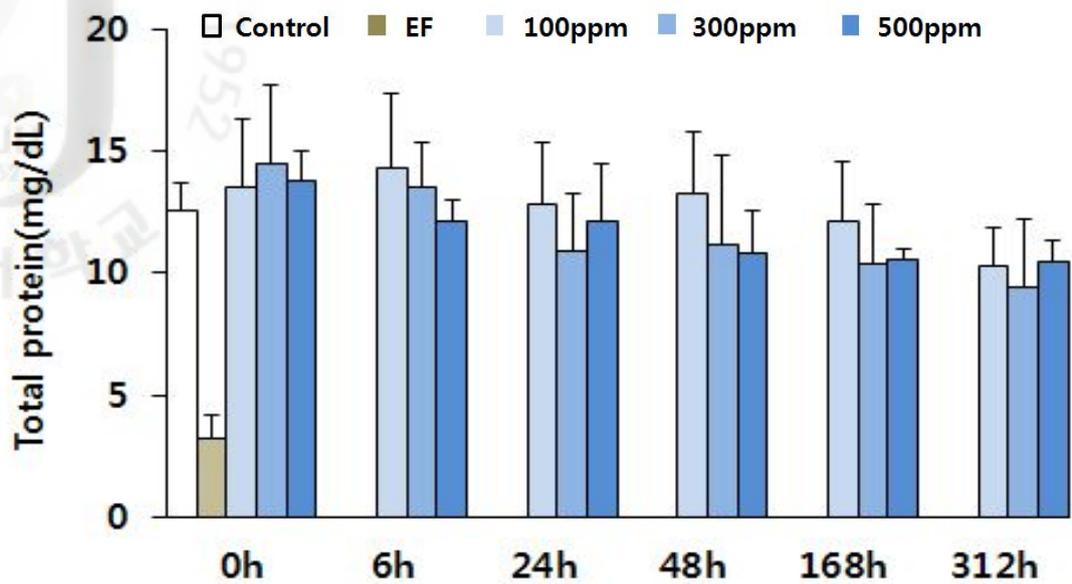


Fig. 41. Analysis of total protein in serum of olive flounder exposed to a various hydrogen peroxide concentrations. Vertical bars indicate standard division; *Significant difference ($P < 0.05$) by ANOVA followed by Dunnet's test compared to the control group. EF : Emaciated olive flounder.

3-4-2. 항산화효소 분석 결과

항산화 효소 측정결과 병원균에 대한 방어 기작으로 항산화 효소인 CAT 와 SOD 효소 활성이 증가 되는 것으로 판단된다, 하지만 시간이 경과함에 따라 CAT 와 SOD 항산화효소 활성이 감소하는 것을 확인 하였다.

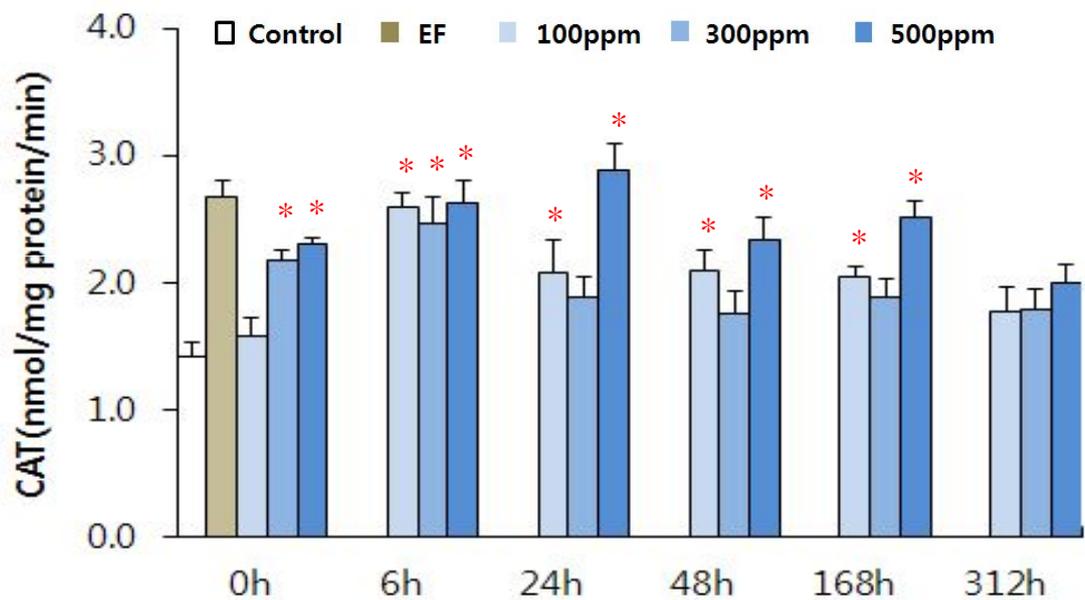


Fig. 42. Change of catalase activity in olive flounder exposed to a various hydrogen peroxide concentrations. Vertical bars indicate standard division; *Significant difference ($P < 0.05$) by ANOVA followed by Dunnet's test compared to the control group. EF : Emaciated olive flounder.

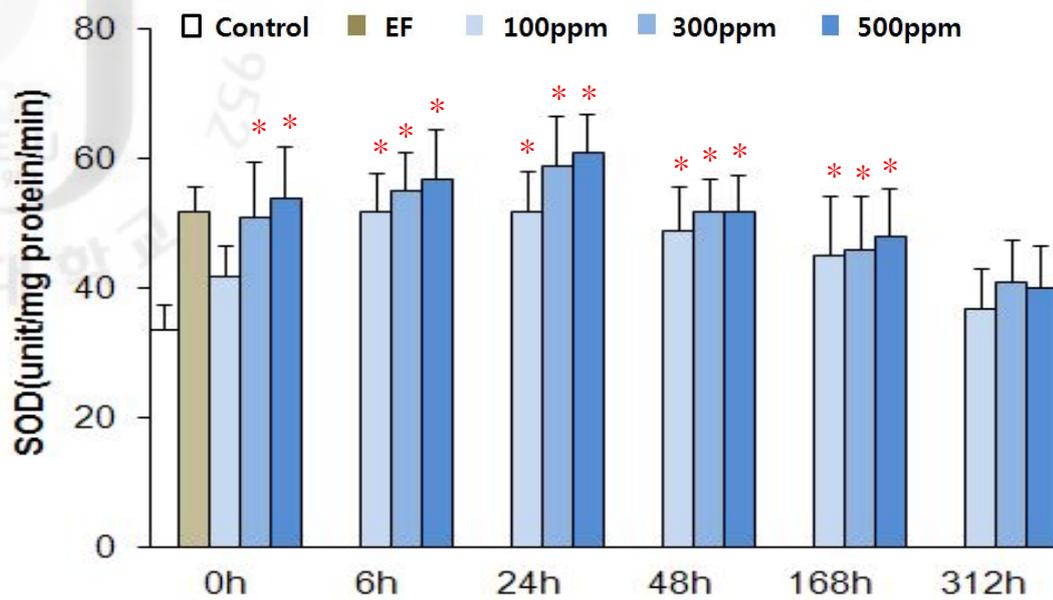


Fig. 43. Change of superoxide dismutase analysis in olive flounder exposed to a various hydrogen peroxide concentrations. Vertical bars indicate standard division; *Significant difference ($P < 0.05$) by ANOVA followed by Dunnet's test compared to the control group. EF : Emaciated olive flounder.

3-5. 병원균 감염 후 과산화수소 약욕 처리에 의한 효과

3-5-1. 과산화수소 항균성 테스트 결과

V. harveyi 및 *E. tarda*에 대한 과산화수소 100, 300, 500ppm의 항균성 테스트 결과 과산화수소 100, 300, 500ppm 모두 *V. harveyi*, *E. tarda* 병원균에 대한 항균성을 갖고 있는 것으로 나타났다. *E. tarda*에서는 500ppm에서 제일 높은 항균성을 나타냈고 *V. harveyi*에서는 300ppm에 비해 500ppm에서 약간 더 높은 항균성을 나타냈다.

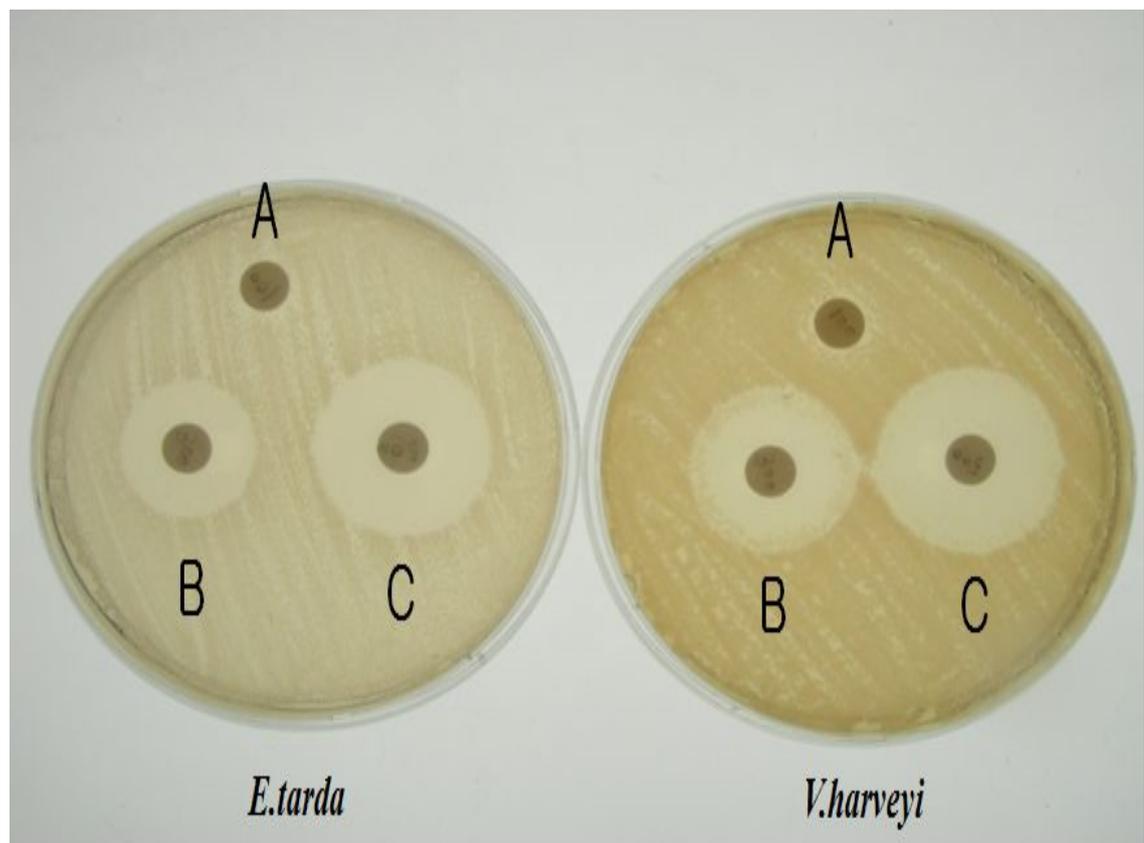
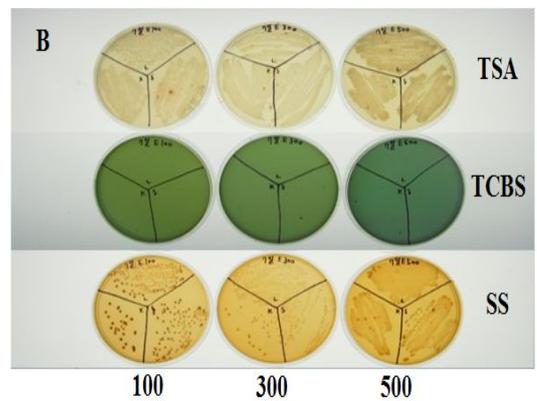
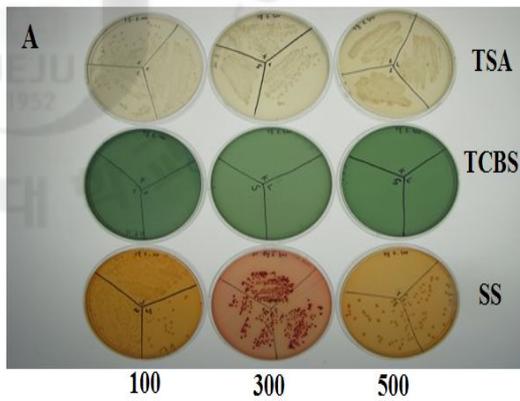


Fig. 44. Antimicrobial testing of *V. harveyi* and *E. tarda* by hydrogen peroxide. (A) 100 ppm (B) 300 ppm (C) 500 ppm

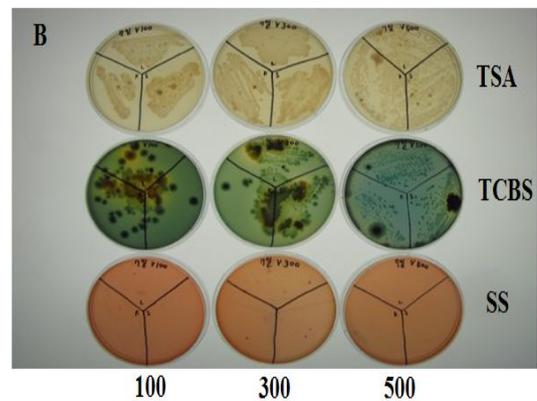
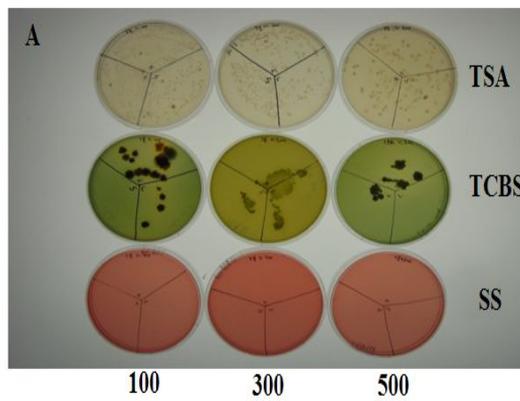
3-5-2. 배지 도말 결과

JV1, JE1 및 JV1+JE1 복합 감염된 넙치의 간, 신장, 비장을 각각 TSA, TCBS 및 SS배지에 도말하여 과산화수소 약육 시간경과에 따른 병원균의 검출량을 측정하였다. TCBS 배지와 SS 배지는 선택배지로서 여러 가지 균이 혼재하는 재료에서 어느 특정한 균을 분리하기 위한 배지로 그 선택하고자 하는 균이 갖는 생화학적인 특징을 이용하고 동시에 그 균에는 무해하고 다른 혼재하는 균에는 유해하게 작용하는 물질을 함유하는 한천배지이다. 따라서 목적으로 하는 세균 이외는 발육이 저지되어 그 균의 특징적인 콜로니 (Colony)의 색깔에 따라 용이하게 목적으로 하는 세균을 선택할 수가 있다. JV1 검출에는 TCBS 한천배지를 JE1 검출에는 SS 한천배지를 사용하였다. JV1 결과를 살펴보면 3일째에 SS 배지 100 ppm에서 300, 500 ppm에 비해 유의적으로 많은 콜로니가 관찰되었으며 7일째에서는 반대로 500 ppm에서 100, 300 ppm에 비해 유의적으로 많은 수의 콜로니가 관찰 되었다. JV1 결과를 살펴보면 3일째에 TCBS 배지 100 ppm에서 300, 500 ppm에 비해 유의적으로 많은 콜로니가 관찰되었으며 7일째에서는 반대로 500 ppm에서 100, 300 ppm에 비해 유의적으로 많은 수의 콜로니가 관찰 되었다. JV1+JE1 결과를 살펴보면 3일째에 TCBS 배지와 SS배지에서 100 ppm에서 300, 500 ppm에 비해 유의적으로 많은 콜로니가 관찰되었으며 7일째에서는 반대로 500 ppm에서 100, 300 ppm에 비해 유의적으로 많은 수의 콜로니가 관찰 되었다. 이는 3일째에는 과산화수소의 약육으로 인한 JV1, JE1 및 JV1+JE1 균에 대한 항균성 때문에 넙치 내에 감염된 병원균을 사멸시켜 500 ppm에서 제일 적게 검출되었지만 7일째에는 과산화수소를 과다하게 약육시킨 500 ppm에서 과산화수소의 독성으로 인하여 넙치 내의 면역력이 저하되어 100 ppm에 비해 300, 500 ppm에서 더 많은 콜로니가 생성된 것으로 파악된다.

E.tarda



V.harveyi



E.Tarda + V.harveyi

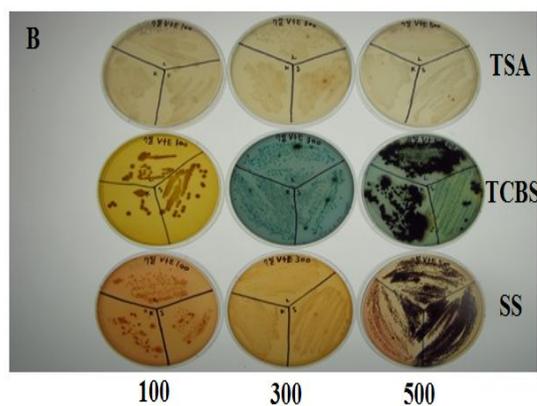
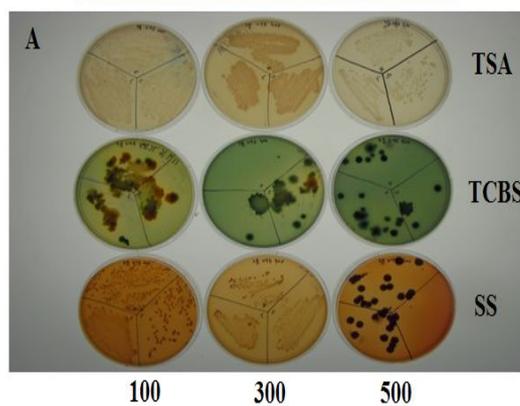


Fig. 45. Change of color in TSA, TCBS and SS agar by immersion of a various concentrations of hydrogen peroxide in after infection pathogenic of a *V. harveyi* olive flounder (*Paralichthys olivaceus*).
(A) : 3 Days, (B) : 7 Days

3-5-3. 병원균 감염에 따른 과산화 수소 약욕 넘치의 폐사율 측정 결과

JV1, JE1 및 JV1+ JE1을 복합 감염시켜 폐사율을 측정한 결과 JV1 실험구 500 ppm에서 12일째에 60% 폐사율을 나타내 100, 300 ppm 보다 높은 폐사율을 나타냈다. JE1 실험구 측정 결과 500 ppm에서 12일째에 100% 폐사율을 나타내 100, 300 ppm 보다 높은 폐사율을 나타냈다. JV1과 JE1을 복합 감염시킨 실험구 측정 결과 500 ppm에서 10일째에 100% 폐사율을 나타내 100, 300 ppm 보다 높은 폐사율을 나타냈다.

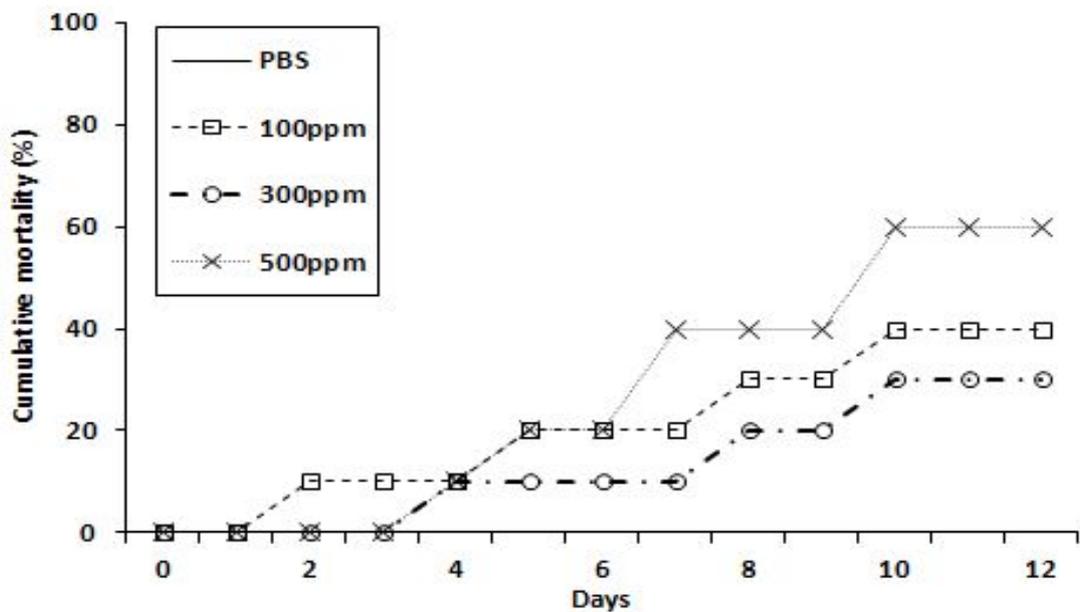


Fig. 46. Mortality by immersion of a various concentrations of hydrogen peroxide after infection of a *V. harveyi* in olive flounder.

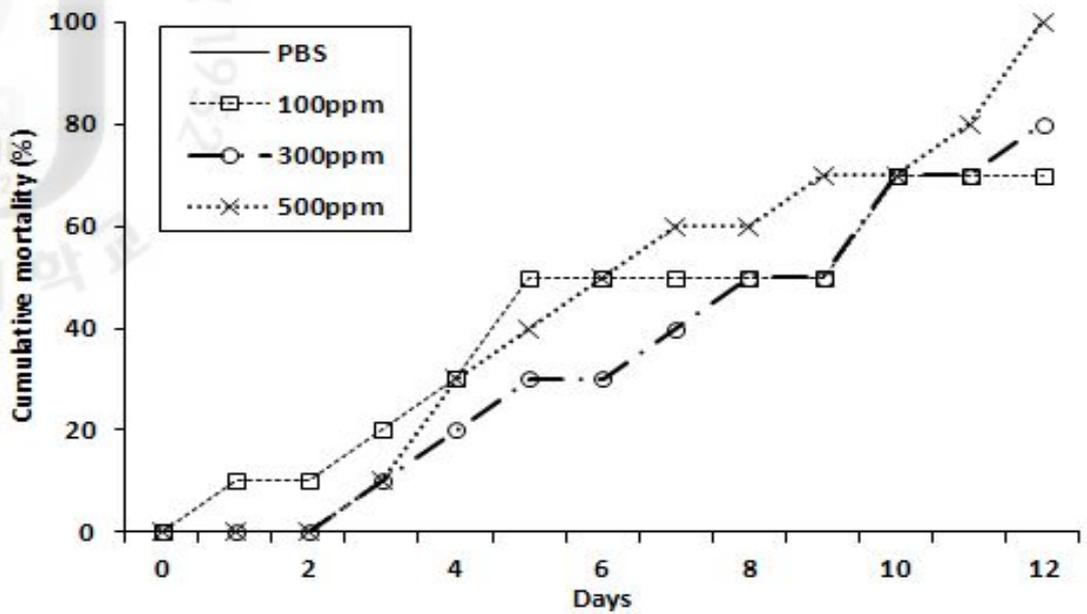


Fig. 47. Mortality by immersion of a various concentrations of hydrogen peroxide after infection of a *E. tarda* in olive flounder.

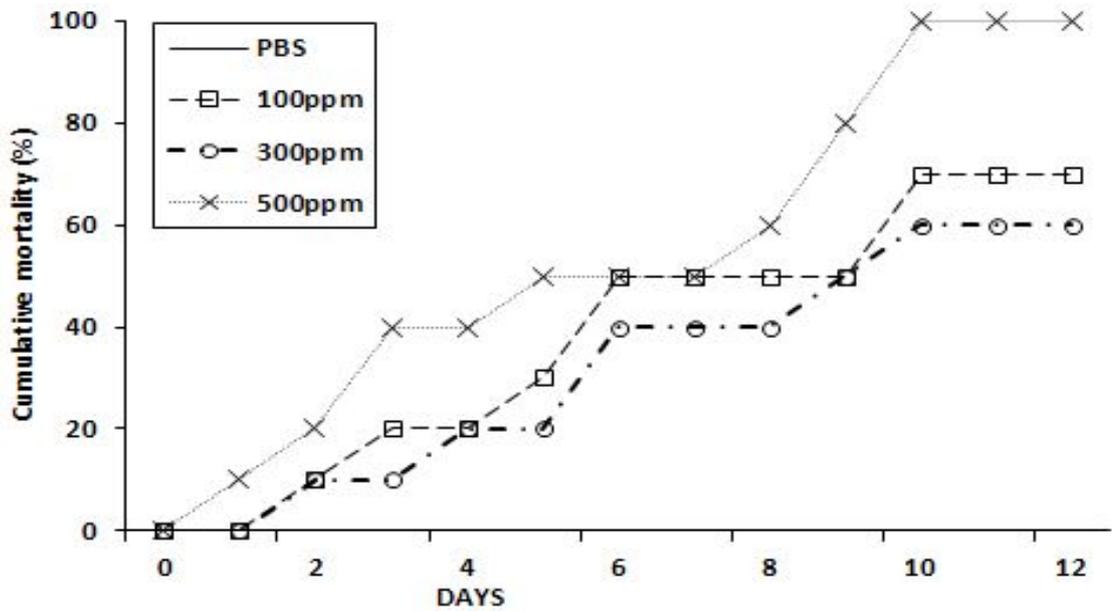


Fig. 48. Mortality by immersion of a various concentrations of hydrogen peroxide after infection of a *V. harveyi + E. tarda* in olive flounder.

3-5-4. 혈액 생리학적 분석결과

헤마토크리트 (Hematocrit) 측정 결과 JV1, JE1 및 JV1+JE1 병원균을 복강 주사한 그룹에서 유의적으로 컨트롤 보다 조금 높게 나타나는 것을 확인할 수 있지만 여壼증상 녁치보다 낮게 나타났다(Fig. 49). 간지수인 AST (Aspartate aminotransferase), ALT (Alanine aminotransferase) 측정 결과에서는 여壼증상 녁치보다 유의적으로 매우 높게 나타나는 양상을 나타냈다. 총단백질 (Total protein) 측정 결과 처음엔 수치가 여壼증상 녁치보다 유의적으로 매우 높게 나타났지만 시간경과에 따라 수치가 안정화되는 양상을 나타냈다. 총콜레스테롤 (Total cholesterol) 측정 결과 JV1 그룹에서는 여壼증상 녁치와 매우 유사한 수치를 나타내고 있으나 다른 그룹에서는 유의적으로 높은 양상을 나타내고 있다. 당 (Glucose) 측정 결과 JV1, JE1 및 JV1+JE1 병원균을 복강 주사한 그룹에서 여壼증상 녁치와 유의적으로 유사한 양상을 나타내고 있으나, JV1+JE1 그룹에서는 시간 경과에 따라 점차 수치가 감소하는 양상을 나타내고 있다. 중성지방 (Triglyceride) 측정 결과 JV1 그룹에서는 여壼증상 그룹보다 유의적으로 낮은 수치를 나타냈지만 JE1 및 JV1+JE1 그룹에서는 0h, 6 h에서는 여壼증상 그룹보다 낮지만 24 h 이후부터 시간이 경과함에 따라 유의적으로 높아지는 양상을 나타냈다.

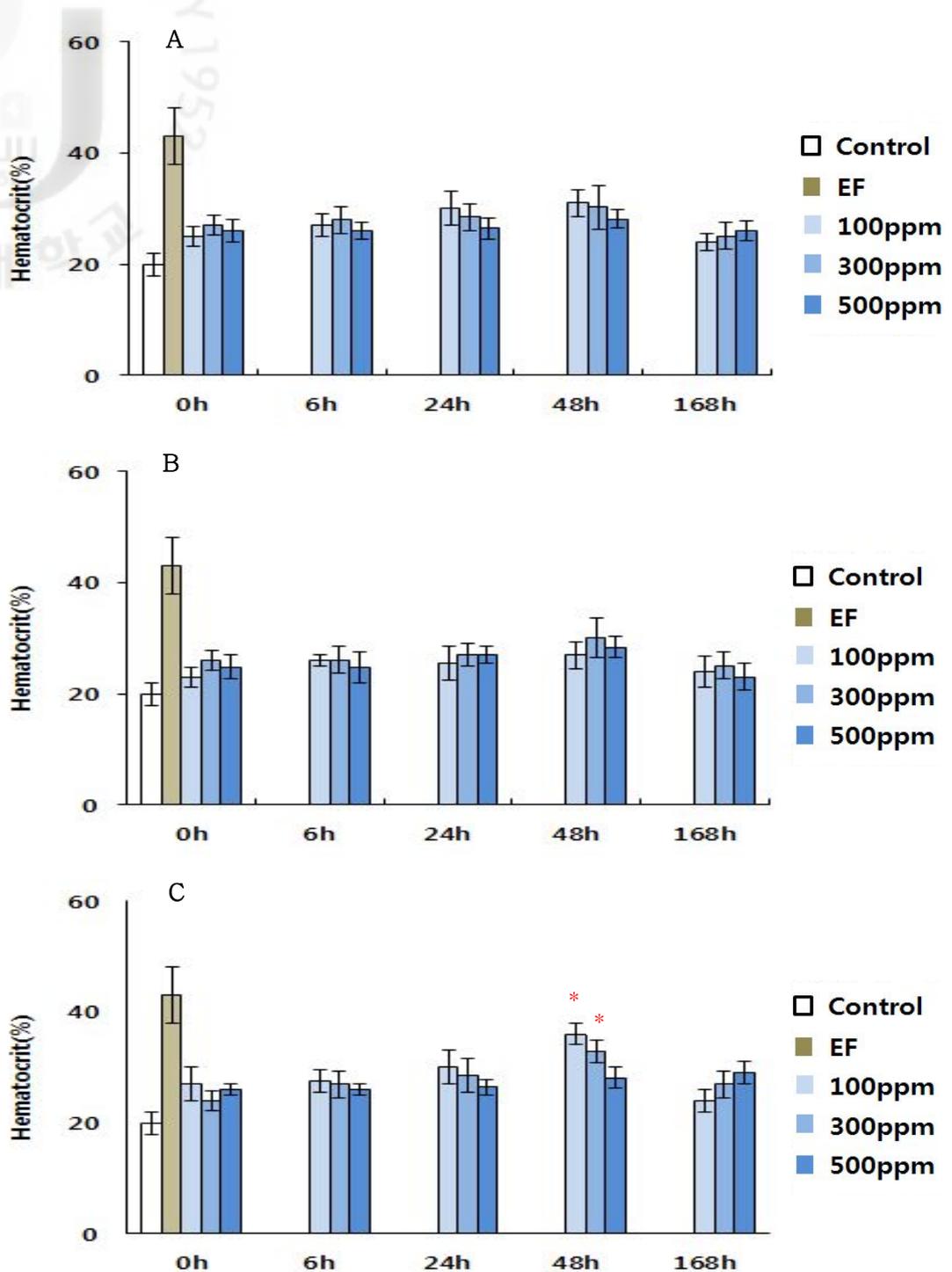


Fig. 49. Hematocrit analysis by immersion of a various concentrations of hydrogen peroxide after infection of a bacteria in olive flounder. Vertical bars indicate standard deviation; *Significant difference ($P < 0.05$) by ANOVA followed by Dunnett's test compared to the control group. (A: JV1, B: JE1, C: JV1+JE1)
 EF : Emaciated olive flounder.

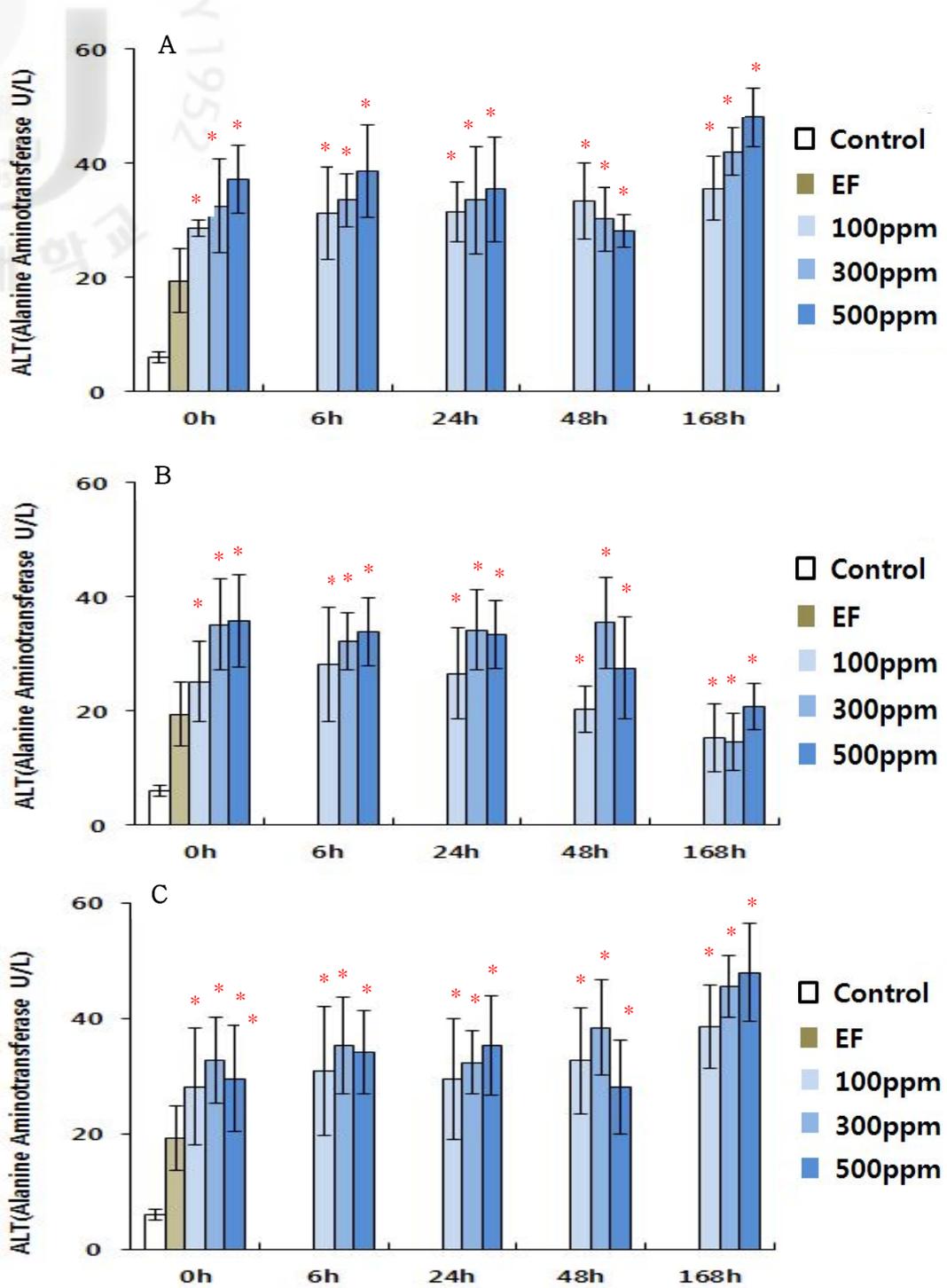


Fig. 50. Alanine aminotransferase analysis by immersion of a various concentrations of hydrogen peroxide after infection of a bacteria in olive flounder. Vertical bars indicate standard division; *Significant difference ($P < 0.05$) by ANOVA followed by Dunnett's test compared to the control group. (A: JV1, B: JE1, C: JV1+JE1) EF : Emaciated olive flounder.

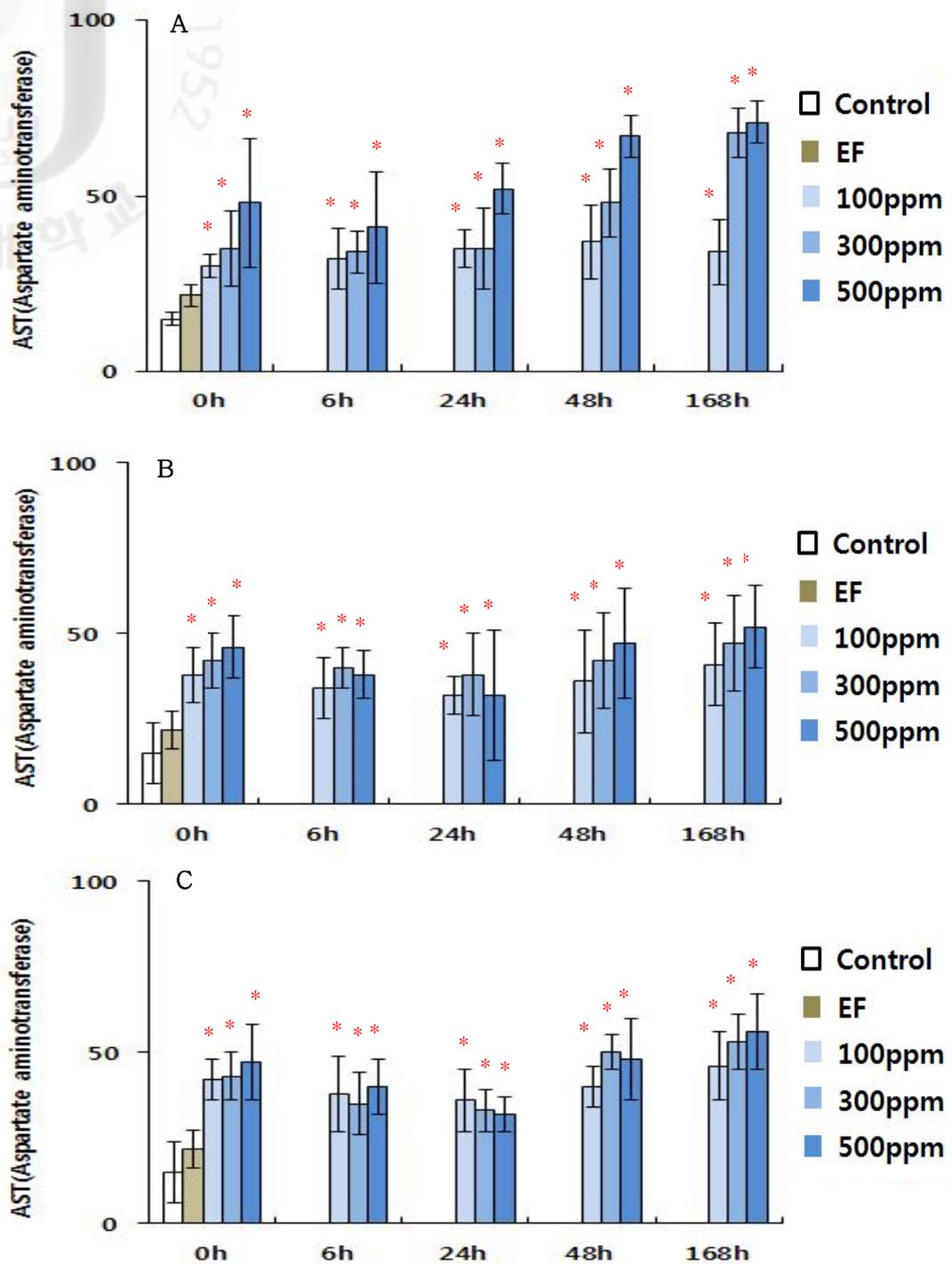


Fig. 51. Aspartate aminotransferase analysis by immersion of a various concentrations of hydrogen peroxide after infection of a bacteria in olive flounder. Vertical bars indicate standard deviation; *Significant difference ($P < 0.05$) by ANOVA followed by Dunnet's test compared to the control group. (A: JV1, B: JE1, C: JV1+JE1) EF : Emaciated olive flounder.

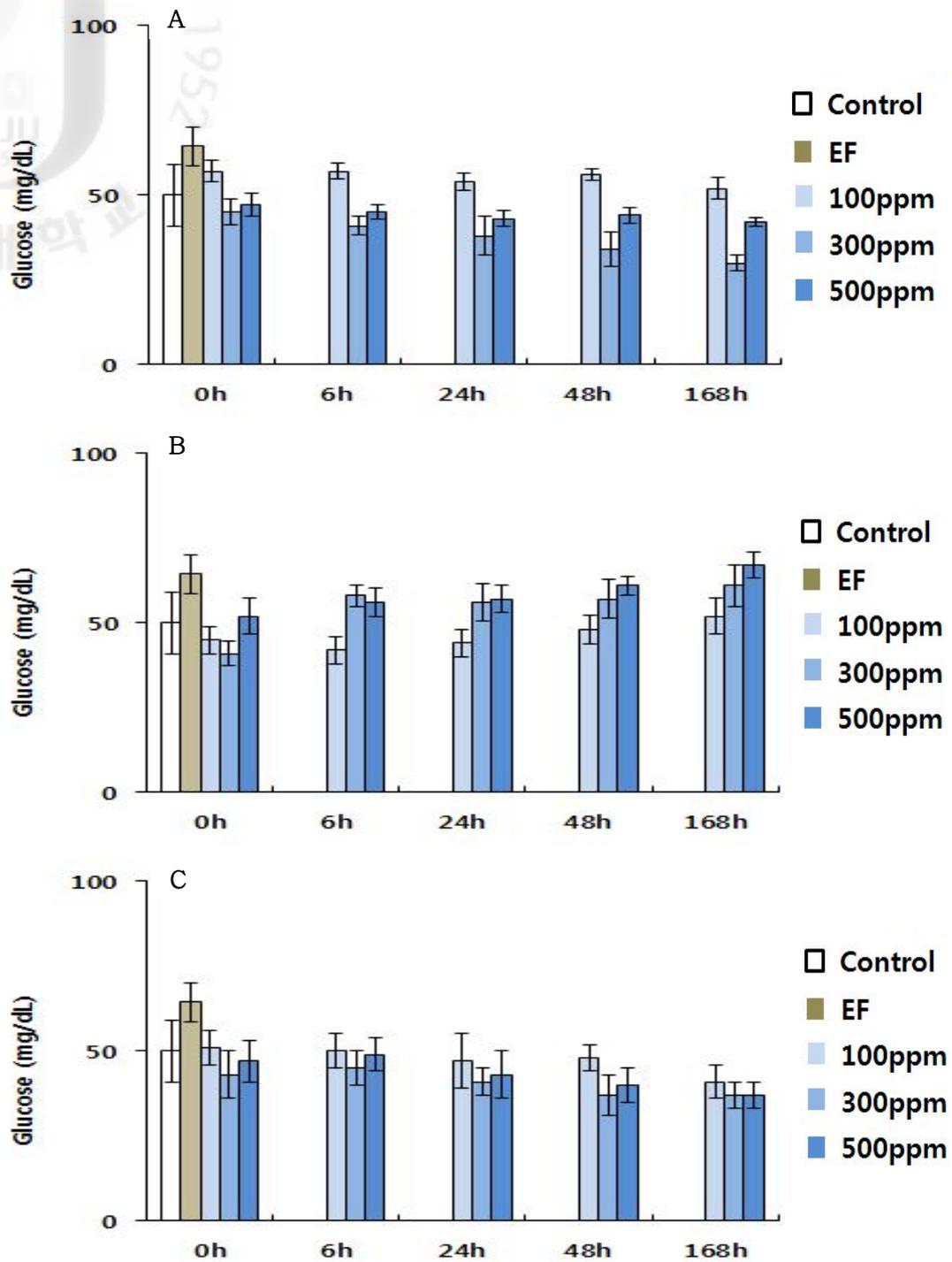


Fig. 52. Glucose by immersion of a various concentrations of hydrogen peroxide after infection of a bacteria in olive flounder. Vertical bars indicate standard division; *Significant difference ($P < 0.05$) by ANOVA followed by Dunnet's test compared to the control group. (A: JV1, B: JE1, C: JV1+JE1)

EF : Emaciated olive flounder.

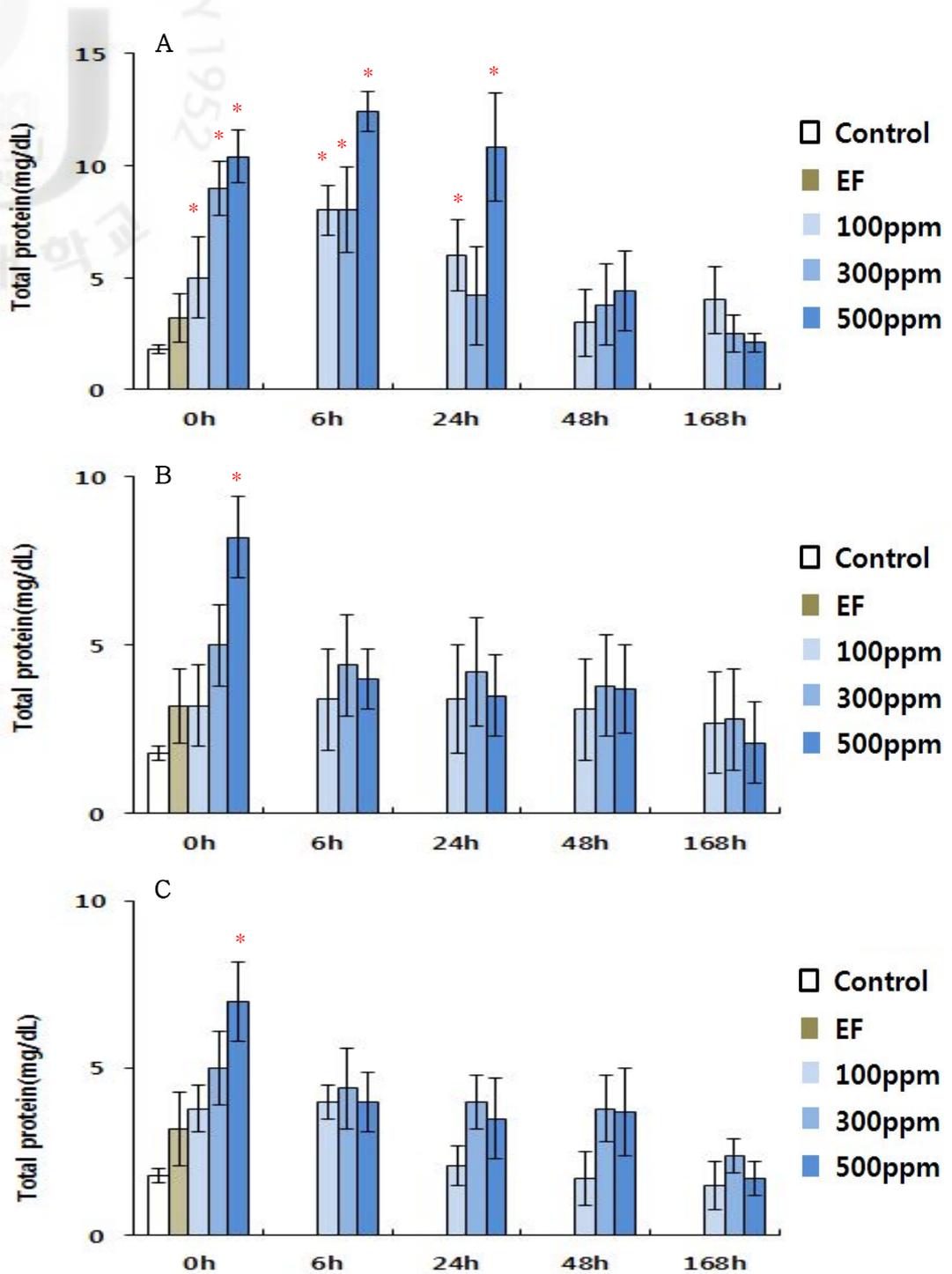


Fig. 53. Total protein by immersion of a various concentrations of hydrogen peroxide after infection of a bacteria in olive flounder. Vertical bars indicate standard division; *Significant difference ($P < 0.05$) by ANOVA followed by Dunnet's test compared to the control group. (A: JV1, B: JE1, C: JV1+JE1)
 EF : Emaciated olive flounder.

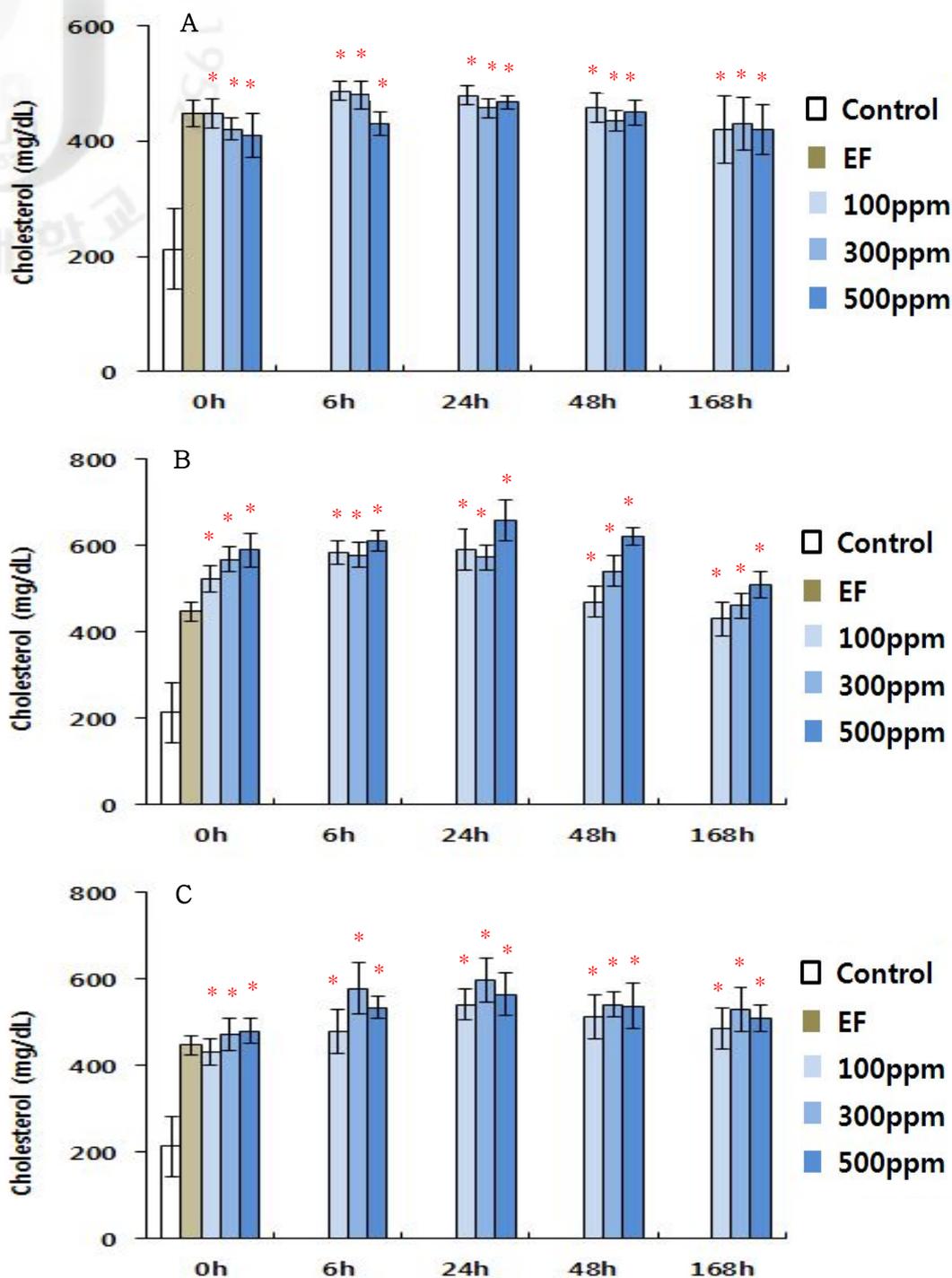


Fig. 54. Cholesterol by immersion of a various concentrations of hydrogen peroxide after infection of a bacteria in olive flounder. Vertical bars indicate standard deviation; *Significant difference ($P < 0.05$) by ANOVA followed by Dunnett's test compared to the control group. (A: JV1, B: JE1, C: JV1+JE1)
 EF : Emaciated olive flounder.

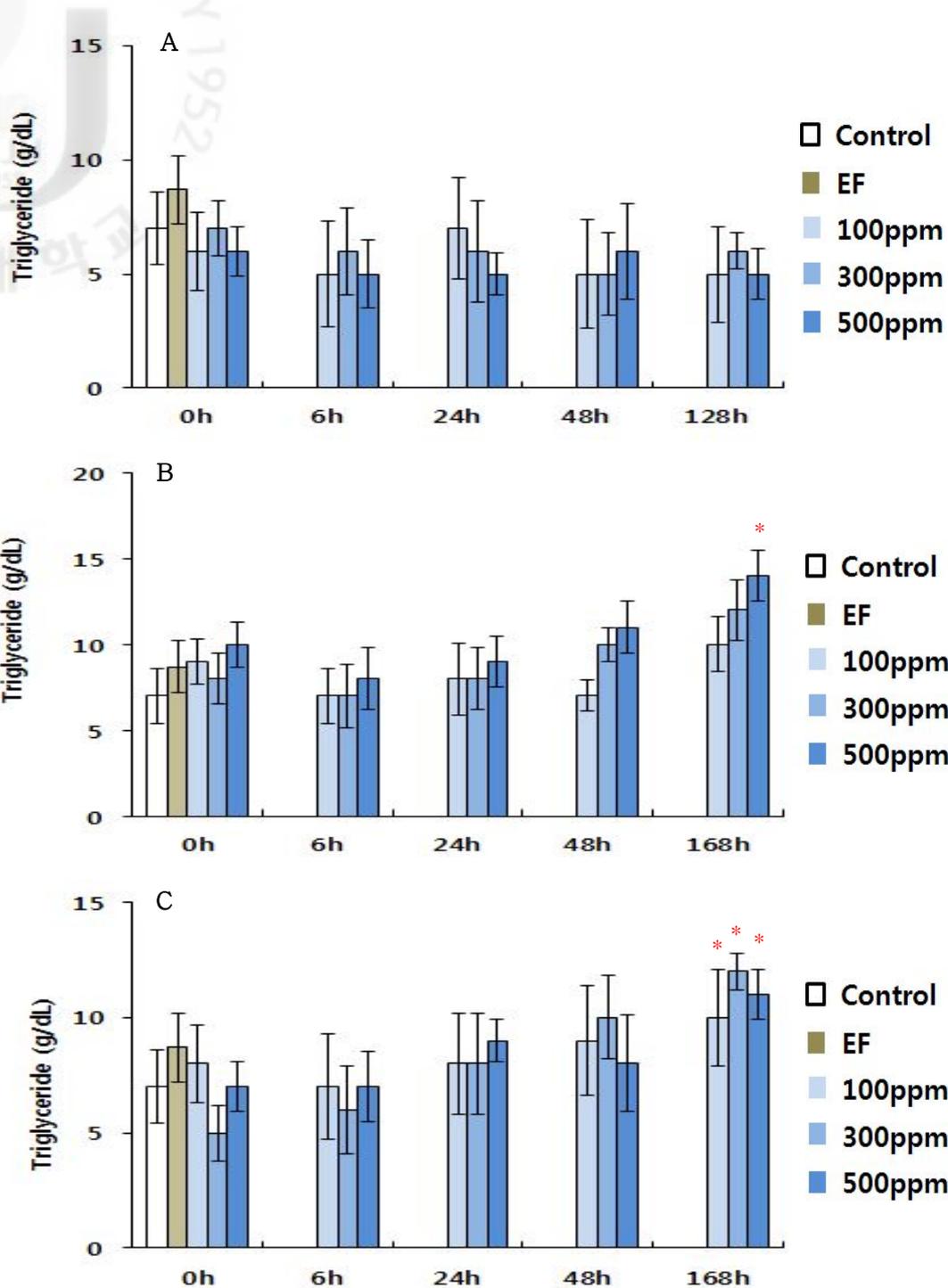


Fig. 55. Triglyceride by immersion of a various concentrations of hydrogen peroxide after infection of a bacteria in olive flounder. Vertical bars indicate standard deviation; *Significant difference ($P < 0.05$) by ANOVA followed by Dunnett's test compared to the control group. (A: JV1, B: JE1, C: JV1+JE1)
 EF : Emaciated olive flounder.

3-5-5. 혈청과 점액 Lysozyme activity 분석 결과

혈청 Lysozyme activity 측정 결과 JE1 및 JV1+JE1 그룹에서 처음엔 면역 활성이 떨어지다가 시간 경과에 따라 점차 증가하는 양상을 나타냈다. 점액 Lysozyme activity 측정 결과에서는 혈청 Lysozyme activity과는 반대로 JE1 및 JV1+JE1 그룹에서 여윈증상 그룹보다 유의적으로 높은 면역 활성을 보이다가 시간이 경과함에 따라 점차 유의적으로 감소하는 양상을 나타냈다.

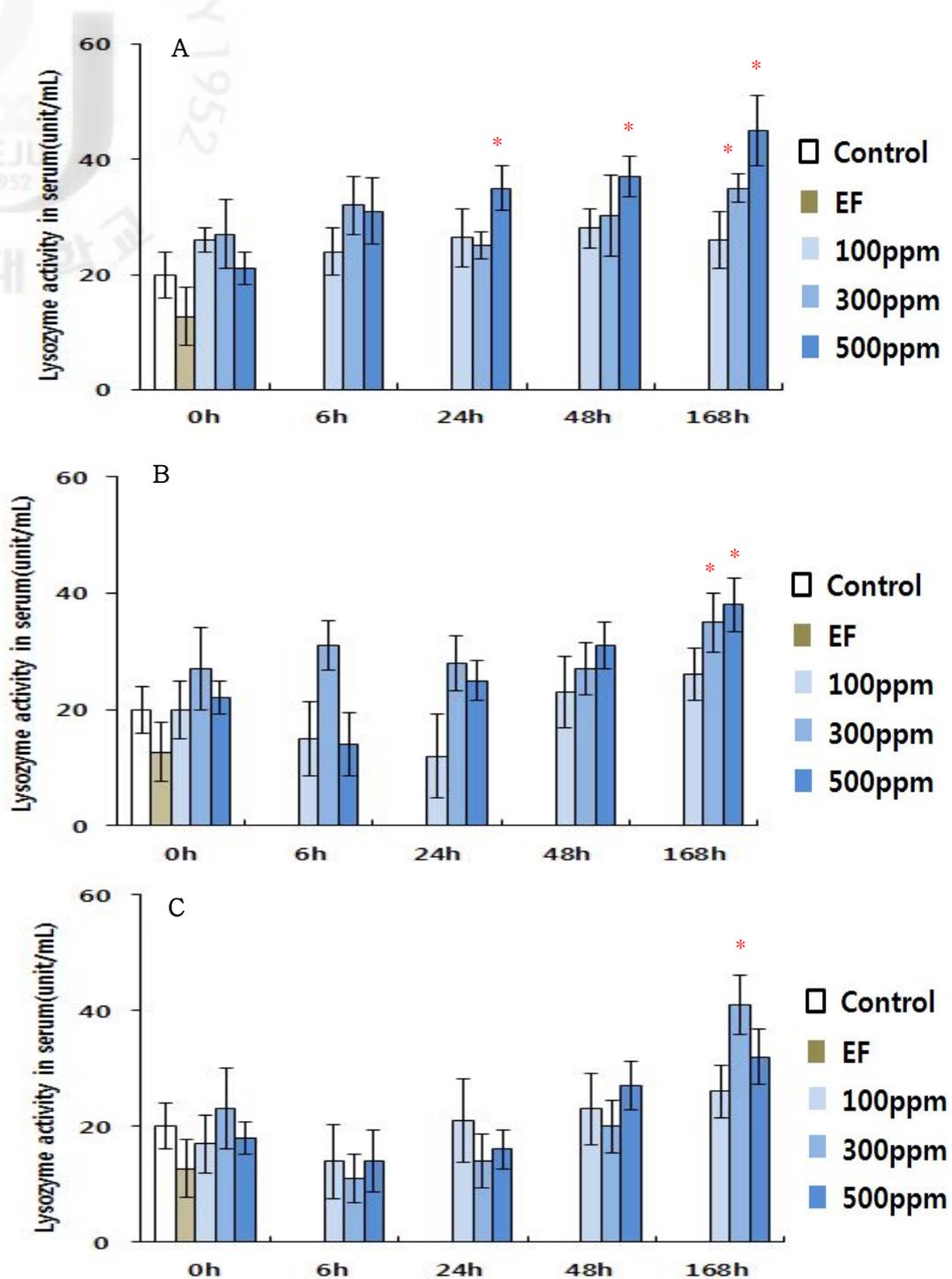


Fig. 56. Analysis of lysozyme activity in serum by immersion of a various concentrations of hydrogen peroxide after infection of a bacteria in olive flounder. Vertical bars indicate standard deviation; *Significant difference ($P < 0.05$) by ANOVA followed by Dunnet's test compared to the control group. (A: JV1, B: JE1, C: JV1+JE1) EF : Emaciated olive flounder.

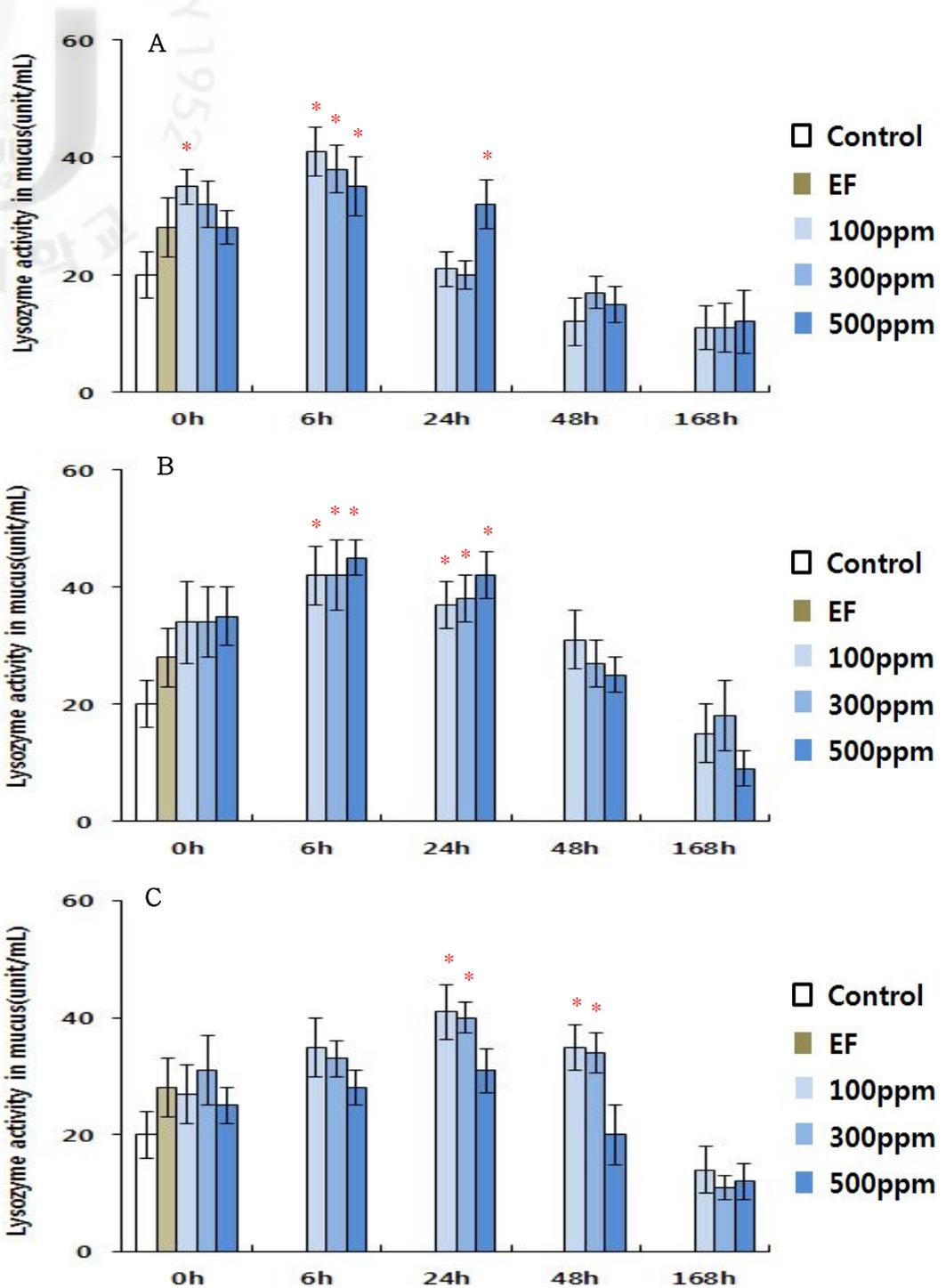


Fig. 57. Analysis of lysozyme activity in mucus by immersion of a various concentrations of hydrogen peroxide after infection of a bacteria in olive flounder. Vertical bars indicate standard deviation; *Significant difference ($P < 0.05$) by ANOVA followed by Dunnett's test compared to the control group. (A: JV1, B: JE1, C: JV1+JE1) EF : Emaciated olive flounder.

3-5-6. 항산화 효소 측정 결과

CAT activity 측정 결과 JV1 실험그룹에서 시간경과에 따라 점차 효소활성이 증가하는 경향을 보이다가 6h째 500ppm 실험구를 제외한 모든 실험구에서 급격하게 감소하는 경향을 나타냈다. JE1 실험그룹에서 0h째 시간 경과에 따라 점차 효소활성이 증가하다 6h째 점차 조금씩 면역 활성이 떨어지는 경향을 보였으나, 500ppm 에서는 시간 경과에 따라 유사한 효소활성 수치를 나타냈다. JV1+JE1 실험그룹에서는 0h째부터 현저하게 증가되는 경향을 보였으며, 6h째 이후로는 시간경과에 따라 500ppm을 제외한 나머지 실험구에서 서서히 감소하는 경향을 나타냈다 (Fig. 58).

SOD activity 측정 결과 JV1 실험그룹에서 대조구에 비해 급격히 높은 수치를 나타냈다. JE1 실험그룹에서는 시간 경과에 따라 점차 효소활성이 증가하는 경향을 보이고 있다. 여壼증상 녁치와 유사한 수치를 나타내고 있다. JV1+JE1 실험그룹에서는 0h째에 급격히 높은 수치를 보이다 24h째 점차 감소하다 48h째 부터는 다시 증가하는 경향을 나타냈다 (Fig. 59). *

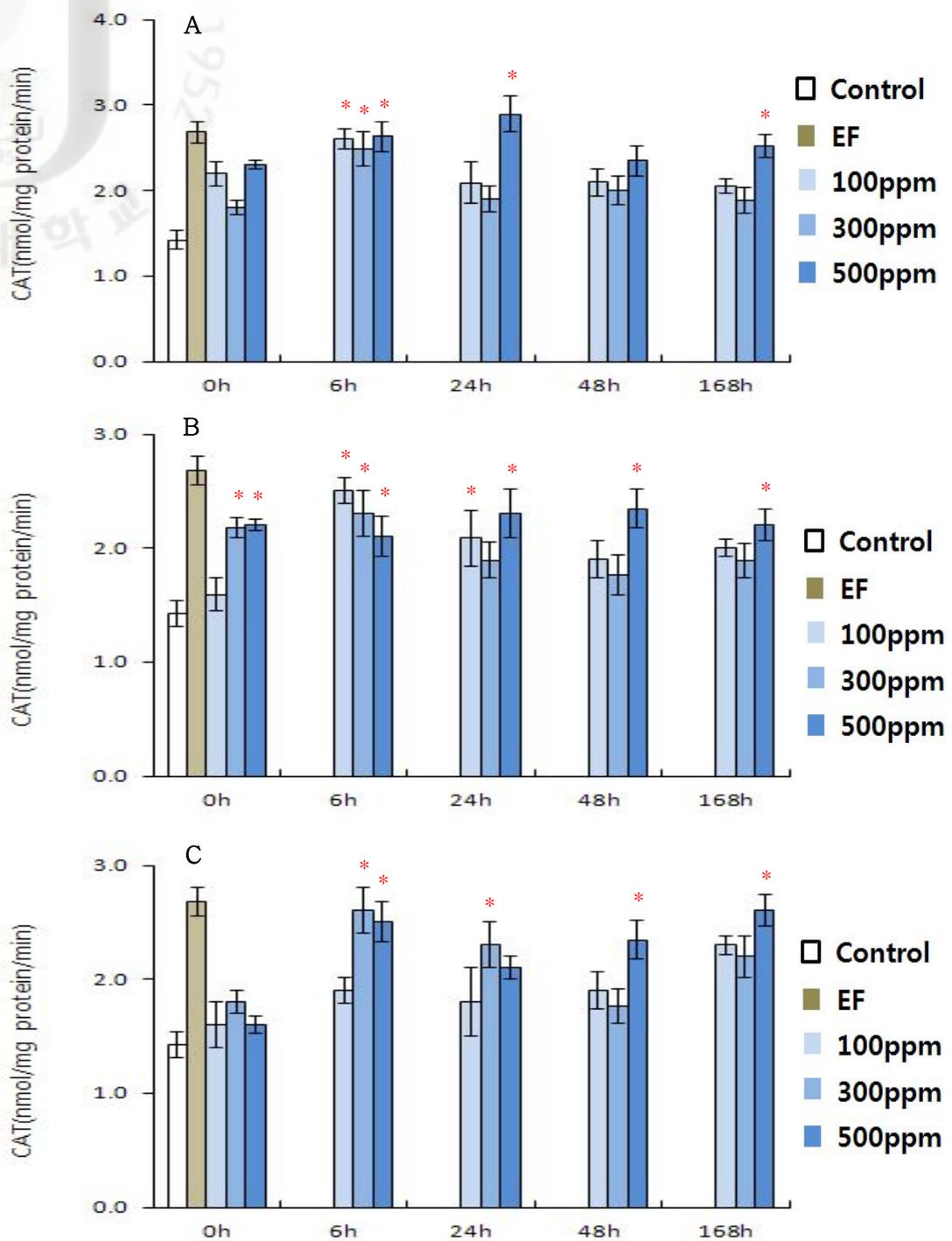


Fig. 58. Analysis of catalase activity by immersion of a various concentrations of hydrogen peroxide after infection of a bacteria in olive flounder. Vertical bars indicate standard deviation; *Significant difference ($P < 0.05$) by ANOVA followed by Dunnet's test compared to the control group. (A: JV1, B: JE1, C: JV1+JE1) EF : Emaciated olive flounder.

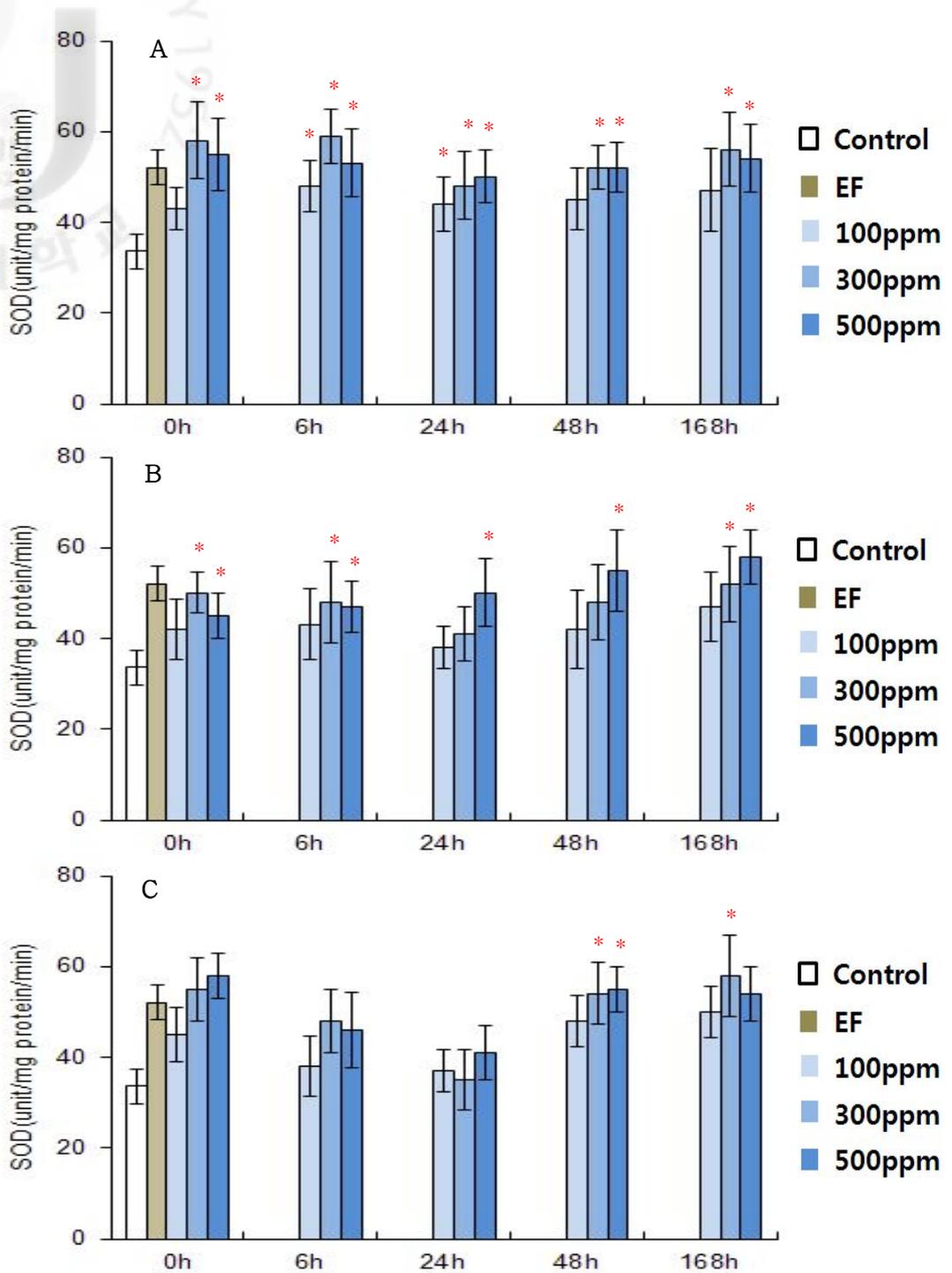


Fig. 59. Analysis of superoxide dismutase activity by immersion of a various concentrations of hydrogen peroxide after infection of a bacteria in olive flounder. Vertical bars indicate standard division; *Significant difference ($P < 0.05$) by ANOVA followed by Dunnet's test compared to the control group. (A: JV1, B: JE1, C: JV1+JE1) EF : Emaciated olive flounder.

IV. 고찰

본 연구에서는 새로운 질병 출현에 의한 양식넙치의 대량 폐사 원인을 규명하기 위한 생리학적인 접근법에 관한 연구를 실시하였다. 우선 발생시 대량폐사를 유발하는 여壼증상의 넙치를 기준으로 2011년 4월에서 2011년 9월까지 10개소의 제주도내 양식장들을 대상으로 유입수로 이용되는 해수, 급이 사료, 수온 및 염분 등 양식장 현장 모니터링을 통하여 다양한 질병의 패턴 및 원인체를 분석하였다. 10개소의 제주도내 양식장에서는 일반해수와 지하해수를 섞어서 사용하고 있으며 넙치의 사료는 EP사료와 MP사료를 사용하였다. 4~5월 평균 수온은 16.4℃, 6~7월 평균 수온은 17.16℃, 8~9월 평균 수온은 23.44℃로 조사 되었다. 조사기간 중 8~9월달이 가장 높은 수온 분포를 나타내었다. 최근 수온 변화의 특징 일간 변화의 폭이 매년 증가하는 것으로 나타났다. 수온에 대한 스트레스가 증가하면 어류에 있어서 성장 및 생존에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 스트레스 작용으로 인해 어류의 카테콜아민과 코르티졸을 과다 분비하는 내분비 반응을 유도하게 되고 이에 따라 비축된 에너지원의 빠른 소비를 유발하여 성장을 둔화시킬 수 있으며, 어체의 생화학적 작용을 가함으로 인하여 면역력을 저하시키는 등 건강도에 영향을 준다고 알려져 있다. (Chang et al., 1999; Barton and Iwama, 1991; Pickering, 1993; Pickering 1990; Specker and Schreck, 1980)

염분 농도의 4~5월 평균 염분은 33.18‰, 6~7월 평균 염분은 31.46‰, 8~9월 평균 염분은 30‰로 조사되었다. 6~7월에 염분농도가 감소하기 시작하더니 8~9월에 가장 낮은 염분농도를 나타냈다. 이는 일반적으로 여름철 장마와 중국 대륙연안수인 양자강 배출수로 인한 요인으로 염분농도가 낮아진다는 Kim and Rho, (1994)의 연구 결과와 일치하며, 급격한 염분의 변화는 해산어류의 삼투압 조절에 영향을 주어 이온과 수분 평형의 교란 및 스트레스 등을 유발하여 어체의 생리조건 악화 및 성장 지연을 초래 하는 것으로 알려져 있다 (Singley and Chavin, 1971).

여壼증상 넙치의 출현은 6월초에서 중순에 걸쳐 나타나는 것으로 파악 되어졌

으며, 이 시기에는 하절기의 수온 상승 시기와 일치하는 것으로 파악되어졌다. 따라서 본 연구에서는 이러한 시기에 있어서의 넙치 폐사의 원인을 규명하기 위하여 폐사어의 조직을 분리하여 5% NaCl 첨가 tryptic soy agar (TSA, Difco), thiosulfate citrate bile sucrose (TCBS, Difco) 및 SS 평판배지에 각각 도말한 후, 25℃에서 24시간 배양한 후 원인균을 확인하였다. 그 결과 4~5월 및 8~9월에는 세균성 박테리아가 검출되지 않았으나, 여윌증상이 나타나는 6~7월에 SS 배지와 TCBS 배지에서 *V. harveyi* 와 *E. tarda* 가 검출 되었다. 이 중 일부 양식장에서는 여윌증상을 나타내는 넙치에 의한 대량폐사가 발생하였다. 6월부터 7월 사이에 세균성 질병을 포함한 질병 발생비율이 높은 것은 수온 상승 등에 의한 수조 내 세균증식과 관련이 있을 것으로 사료되며, 급격한 수온의 상승과 염분의 저하로 인한 스트레스로 인하여 양식넙치의 체내 생리적 불균형이 일어남으로 인하여 생산성을 떨어뜨리는 원인이 될 뿐 아니라 생리활성이 약화되어 질병에 걸리거나 대량 폐사하는 사례가 빈발하는 것으로 알려져 있다 (Wardle et al., 1981).

여윌증상은 1990년 중반 일본의 자주복 양식장에서 처음 발견 하였으며, 양식 자주복은 myxosporean 여윌증상에 의해 상품 가치가 없어져 자주복 양식에 큰 타격을 입었다고 보고되고 있다 (Tin Tun et al., 2000).

여윌증상을 나타내는 자주복 병어의 장관에 기생하는 3종의 점액포자충 *Myxidium fugu*, *Myxidium* sp., *Leptotheca fugu*와 *Myxidium fugu* 및 *Leptotheca fugu*에 기생하는 2종의 미포자충이 확인되었으나, 직접적인 관련성에 대해서는 정확히 밝혀지지 않은 상태이다 (Ogawa and Yokoyama, 2001).

2000년대 초에 일본 가고시마현 양식농가의 참돔 (red sea bream, *Pagrus major*)과 강담돔 (spotted knifejaw, *Oplegnathus punctatus*) 병어의 pathogenic agent를 분리 및 SSU rDNA 서열에 의하여 *E. leei*로 동정 확인하였다 (Yanagida et al., 2008).

상피조직에서 증식된 *Myxidium* sp.은 상피조직과 고유판 (*lamina propria*) 사이에 세포 잔해들의 축적을 포함하는 심각한 병리학적 변화를 유도하며, *Leptotheca fugu* 감염에서, 침윤된 대식세포가 plasmodia 주위를 둘러싸고, 그 결과로 생긴 기생충-대식세포 집합체는 microphage center를 형성하기 위하여

고유관으로 이동하며, 이들 숙주의 반응은 상피조직의 기적막이 상피세포의 분해를 유도함에 따라, 장상피세포의 박리 진행 등 장관조직이 급속하게 붕괴되어, 장관의 흡수능력이 저해되고 탈수증상을 나타내어 여위어 가는 증상을 확인 하였다 (Tin Tun et al., 2002).

넙치 (*Paralichthys olivaceus*)에 대해서는 일본의 미야자키현에 양식장에서 넙치의 Myxosporean 여웬증에 대하여 2005년도에 최초 보고 되었으며, 그 pathogenic agent로 *Enteromyxum leei*를 의심하고 있다 (Hiroshi et al., 2005). 하지만 일본의 자주복과는 달리, 넙치는 다양한 연구기관에서 여웬증상 원인에 대하여 조사하였음에도 불구하고 아직 그 원인은 불분명하다.

여웬증상의 원인으로 추정할 수 있는 단순 영양결핍의 관련성을 조사하기 위하여 일본에서 보고된 결과 (Yasuda et al., 2005)를 바탕으로 하여 실험에 사용된 넙치는 20~25cm 사이에 있는 개체를 제주도의 양식장에서 공급받아 사용하였으며, 분석 시료는 절식 시작 후, 절식 3주 및 5주 후에 실시하여 절식에 의한 생리학적 및 조직학적 비교분석을 실시하였다.

넙치의 절식을 통한 일반영양장애 개체와 여웬증상을 나타내는 넙치의 외부 형태의 차이점을 살펴보면 절식을 통한 일반영양장애 넙치의 대부분이 전체적으로 여위어 있었고, 아가미에서의 빈혈과 두부의 발적이 관찰되었다. 해부 시, 일부 넙치에서 간문맥의 출혈이 관찰되었다. Yasuda et al. (2005)는 여웬 증상을 보이는 넙치는, 전형적인 외형으로 복부팽창, 직장돌출, 움푹한 안구 등을 보고 하였는데, 본 연구에서 관찰된 넙치에서는 외형적으로 여위어가는 것은 유사하였으나 직장돌출과 같은 증상은 나타나지 않고 주로 장기들의 출혈과 두부 발적 등이 주로 발견되었다. 내부 형태를 살펴보면 절식 3주째에서는 내장의 크기가 작아진 것을 확인할 수 있었다. 절식 5주째에서도 3주째보다 더욱더 간과 내장기관의 크기가 작아졌다. 이는 절식으로 인하여 장내의 음식물의 감소뿐만이 아니라 몸에 축적돼 있는 에너지를 과도하게 사용하여 기아생태에 직면하였기 때문으로 여겨진다. 이는 절식을 실시한 기아군이 포식군에 비해 낮은 비만도를 나타낸다는 결과와 유사하게 나타났다 (Weatherley and Gill, 1987). 여웬 증상을 나타내는 넙치의 경우에는 절식과는 달리 간과 내장기관의 축소는 나타나지 않았으나 앞서서도 밝힌 바와 같이 간에서 출혈 등 내장 기관에서 절식과는 다른 양상을

나타내고 있는 것으로 나타났다.

혈액생리학적 분석에서는 Davis & Parker (1990)에 따르면 AST와 ALT는 생체내에서 중요한 당, 지질, 단백질대사에 관여하는 효소로서, 어체의 생리상태가 좋지 않을수록 간의 장애 (Gordon, 1968)가 일어나고 활성이 높아져 혈중 농도가 증가하는 것으로 보고 되었다 (Casillas & Ames, 1985; Rao et al., 1990).

ALT 경우 절식 3주 후 감소하였다가 5주 후 점차 증가하였다. 이는 ALT는 절식에 의해 감소된다는 보고 (Yamamoto, 1988)와 일치하였다, 5주 후 점차 증가 하는 것은 오랜 기간 절식으로 인한 스트레스 로 인하여 증가한 것으로 사료된다.

AST는 절식 후 지속적으로 증가 하였으며, 이는 AST는 절식에 의해 증가한다는 보고 (Nagase, 1976)와 일치 하였다. 여嵬증 개체에서는 두 효소 모두 높은 수치를 유지하였다. 이러한 결과는 단순절식과 여嵬증상간에는 영양학적 대사 과정에 특이적인 차이를 자겨올 수 있는 가능성이 시사된 것으로 보이며 이에 대한 대사관련 효소의 기능에 대한 평가가 이루어져야 할 것으로 보인다. 이상의 결과를 요약하면, 여嵬 증상을 나타내는 개체에서는 AST, ALT 수치가 증가하는 경향을 나타내며, 이러한 원인에 대해서는 간 기능의 저하가 동반되고 에너지 대사에 있어서의 대사관련 효소의 기능저하가 추정되나 이에 대한 영양학적인 분석이 요구되는 것으로 판단된다.

혈액 내 총 단백질은 에너지 대사에 중요한 에너지원으로서 역할을 하고 있다. 혈액 내 총 단백질량을 알아보면 절식이 진행되면서 총 단백질은 감소하는 것을 확인할 수 있고, 여嵬 증상을 나타내는 개체의 경우 역시 총 단백질량의 감소를 나타내고 있는데 이러한 총 단백질의 감소는 먹이 섭취의 감소가 원인이 되어 혈액 내 총 단백질의 양이 감소하는 것으로 파악되며, 여嵬증상의 개체에도 동일한 작용으로 인하여 총 단백질의 양이 감소하는 것으로 판단된다.

혈액 내 글루코스 양을 살펴보면 절식이 진행되면서 총 단백질량과 동일하게 글루코스양이 감소하는 결과를 나타냈으며 이는 글루코스 수치는 절식에 의해 감소된다는 보고 (Yamamoto, 1988)와 일치하였다. 여嵬 증상을 나타내는 개체에서도 대조구와 비교하여 감소하는 것을 알 수 있다. 이러한 결과는 총 단백질의 감소와 같은 이유로 보인다.

혈액내의 이온농도 변화를 보면 절식 및 여윌증 개체간의 이온농도의 변화의 경우, 나트륨, 칼륨 및 염소이온 농도는 절식 한 후 3주째 급격히 증가하다 5주에는 다시 대조구의 수치로 회복되었으며 여윌증상의 개체인 경우에는 대조구에 비해서 다소 높게 유지되는 경향을 나타내었다. 이는 여윌증상을 나타내는 자주 복도 마찬가지로 정상어보다 높은 수치의 염소이온 농도를 나타낸다는 결과와 동일하다 (Ishimatsu et al., 2007). 마그네슘의 이온농도에 있어서도 절식을 통하여 이온농도의 상승이 나타난 한편, 칼슘이온농도의 경우에는 모든 실험구에서 거의 유사한 수치를 나타내, 여윌증세가 나타날 경우 1가 이온의 흡수 및 배출에 있어서 2가 이온보다 더 많은 영향을 받게 되는 것으로 추측된다. 일반적으로 해산어에 있어서는 장내에서 나트륨이온을 흡수하고 요를 통하여 배출을 촉진하는 것으로 알려져 있으나 여윌증상에 보이는 장상피의 탈락으로 인하여 나트륨의 수송체계가 붕괴되어 일어나는 것으로 판단된다. 이처럼 지속적인 나트륨이온 농도의 증가는 나트륨배출을 위한 내분비계를 자극하게 되고 이를 통하여 내분비계가 정상적으로 작동하지 못함으로서 어체의 항상성에 문제가 발생할 것으로 추측된다.

조직학적 분석에서 절식 3주 넘치의 장관조직을 살펴보면 대조구 넘치와 유의적인 차이점은 없었고, 절식 5주 넘치의 장관조직을 대조구의 넘치와 비교해보면 조직에서 부종 및 염증 반응이 관찰되었다. 이는 오랜 시간 절식으로 몸에 축적돼 있는 에너지를 과도하게 사용하여 조직이 괴사 하는 것으로 여겨진다. 여윌증상을 나타내는 넘치의 장관조직을 살펴보면 대조구의 넘치와 비교할 때 장 상피조직이 박리 탈락되어 있고, 상피하조직에는 염증성 세포의 침윤과 혈관확장도 심한 상태인 것을 관찰할 수 있다. 일본에서 보고된 여윌증에 감염된 참돔의 장 상피조직에서는 많은 수의 Myxosporea이 발견되었다고 한다 (Yanagida et al., 2004, 2008).

그러나 일본의 보고와는 다르게 많은 수의 Myxosporea는 발견되지 않았으며, 국내의 넘치에서 나타나는 여윌증의 원인 규명을 위해서는 다각도적인 면에서 장기간의 분석이 이루어져야 할 것이다.

병원성 세균들에 감염된 넘치와 여윌증상을 나타내는 넘치의 생리학적 분석을 통하여 대량폐사의 원인에 대하여 검토를 실시하기 위하여 *V. harveyi* 균주와,

E. tarda 균주 및 *V. harveyi* + *E. tarda* 복합균주를 인위적으로 감염시켜 1일째 5일째에 무작위로 선정하여 샘플링을 실시하였다.

어류의 혈액성분은 영양, 건강상태 및 스트레스 해석의 차원으로 사용이 가능하며, 사료의 필수영양소의 결핍이나 그 어종이 처해있는 서식환경 및 성장에 따라서도 변화된다고 보고되었다 (Garrido et al., 1990; Siddiqui, 1977). 간 손상지수인 ALT AST에서 병원성세균감염의 모든 실험구에서 매우 높은 간 손상을 나타내었으며 이는 어체의 생리상태가 좋지 않을수록 간의 장애가 일어나고 활성이 높아져 혈중 농도가 증가하는 것과 유사한 패턴을 나타내고 있다 (Gordon, 1968; Casillas & Ames, 1985; Rao et al., 1990). 그러나 글루코스 및 총단백질에 있어서는 여傭증개체보다 복합감염구의 실험구가 오히려 낮은 수치를 나타내었다. 글루코스, 총단백질 및 중성지방은 생체내에 영양대사의 중요한 물질로 알려져 있는데 특히 총단백질에 있어서 이처럼 큰 차이를 보인다는 것은 여傭증상의 개체와 병원성 세균 감염의 개체가 생리학적 영양대사에 차이를 가지는 것으로 판단된다.

Lysozyme activity는 살균 및 항염증성 성질을 지니고 있어 흡소닌 및 항기생충 작용, 항바이러스 작용 및 오염물질의 작용 등에 관여함으로써 생체의 방어기작에 다양한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다 (Mohandas, 1985). 혈청 lysozyme 측정 결과 처음엔 *V. harveyi*, *E. tarda* 및 *V. harveyi* + *E. tarda* 실험구에서 여傭증상 념치에 비해 면역활성이 떨어지는 양상을 나타냈으나, 시간경과에 따라 유의적으로 증가하는 양상을 나타냈다. 점액 Lysozyme activity 측정 결과 혈청 Lysozyme activity 결과와 마찬가지로 *V. harveyi*, *E. tarda* 및 *V. harveyi* + *E. tarda* 그룹에서 여傭증상 그룹보다 유의적으로 낮은 면역활성을 보이다가 시간이 경과함에 따라 점차 유의적으로 증가하는 양상을 나타냈다. 이는 여傭증상을 나타내는 개체와 상이한 결과를 나타냈다.

생물에서는 각종 스트레스에 의해 생성된 활성산소는 어떤 유해물질이나 약물 등에 노출되었을 때 병적 상태에서는 이들이 과다하게 생성되어 조직에 치명적인 손상을 입힐 수 있다 (Goldberg and Stern, 1977; Simon et al., 1985; Moody and Hassan, 1982). 이러한 활성산소에 대하여 체내에서는 항산화효소인 superoxide dismutase (SOD)와 catalase (CAT) 등을 생성하여 세포기능

손상을 막는 것으로 알려져 있다. CAT 측정 결과 *V. harveyi*, *E. tarda* 및 *V. harveyi* + *E. tarda* 실험구에서 시간경과에 따라 점차 증가하는 경향을 보였으며 5일째에는 여壼증상 넙치와 유사한 결과를 나타내었다. SOD 측정 결과 역시 *V. harveyi*, *E. tarda* 및 *V. harveyi* + *E. tarda* 실험구에서 시간경과에 따라 점차 증가하는 경향을 보였으며 5일째 *E. tarda* 실험구에서 최고 높은 효소 활성을 보였는데 이는 병원균 감염으로 인한 생리 활성이 떨어졌기 때문으로 파악된다.

조직학적 분석 결과를 살펴보면, 장 상피에서의 조직탈락 및 파괴가 관찰되었으며, 아가미 새변의 내전근 파괴 및 확장 증세들이 관찰되었으며, 신장에서도 일부 결정화된 결석 등이 관찰되어, 여壼증의 개체와 유사한 패턴을 보이는 것으로 나타났다.

마지막으로, 병원성 세균을 제거하기 위한 화학약품의 약육처리와의 관계를 파악하기 위하여 과산화수소 처리에 의한 효과에 대해 알아보면 혈액 생리학적 분석 결과 어류의 혈액성분은 오염물질 등에 대해 매우 민감하게 반응한다고 나와 있다 (Bansal et al., 1979). 헤마토크리트를 측정한 결과 여壼증상 넙치에 비해 낮은 결과를 나타내지만 시간경과에 따라 점차 증가하는 양상을 나타내고 있는데 이는 어류가 독성물질에 노출되었을 때 일반적으로 헤마토크리트와 헤모글로빈 수치가 변동을 일으키는데, 이는 혈액의 PH 변동으로 세포의 삼투이동에 영향을 미치기 때문인 것으로 보고되고 있다 (Milligan and Wood, 1982). 간 손상지수인 ALT, AST 에서는 과산화수소 약육 13일이 지난 후 원상회복되는 현상을 나타내었고, 글루코스에서는 실험 개시전에 비해 유의적으로 높은 수치를 유지 하였다. 여壼증세와 비교하여 보면 과산화수소는 일시적인 손상을 나타내지만 시간 경과에 따라 그 증상이 회복되는 결과를 나타내었으며, 글루코스에 있어서는 지속적으로 상승효과를 유지함으로써 체내의 혈당요구량이 높아지는 것으로 나타났다. 콜레스테롤은 시간경과에 따라 증가하여 여壼증상과 유사한 수치를 나타냈다. 총단백질과 중성지방에 있어서는 과산화수소약육에 따른 변화가 거의 없었으나 여壼증상에 비해서 총단백질은 높은 수치를 중성지방은 낮은 수치를 유지하였다. 이는 일반적으로 어류가 독성물질에 노출되었을 때 장관의 흡수장애, 간 췌장의 손상 및 세뇨관의 재흡수 장애로 인하여 영양대사 기능에

장해를 일으킨다는 결과와 유사하게 나타났다 (Yamawaki et al., 1986 ; Khattak and Hafeez, 1996; Shen et al., 1997). 이러한 결과는 병원성세균의 감염결과와 같이 영양대사에 상당한 차이를 보이는 것으로 판단된다.

한편, 스트레스에 의해 발생하는 활성산소는 내인성 제거제인 SOD와 CAT가 생체에 무해한 분자들로 전환시킨다 (Forman and Fridovich, 1973; Wendel and Feuerstein, 1981). 이러한 항산화 효소는 어류 중, 조직 및 계절에 따라 항산화 효소 활성이 변화하는 것으로 알려져 있다 (Aksnes and njaa, 1981; Wdzieczak et al., 1981; Gabryelak et al., 1983). 카드뮴에 노출된 금붕어, 틸라피아 및 황산동에 노출된 어류에서 SOD 및 CAT 효소 활성이 증가되는 것으로 보고되어 있다 (Pedrajas et al., 1996; Zikic et al., 2001; Basha and Rani, 2003). 본 실험에서도 과산화수소 약육시 SOD 및 CAT 수치가 급격하게 증가하였다가 시간경과에 따라 정상적인 수치로 돌아오는 결과를 나타내었다.

감염실험 직후 과산화수소를 처리하여 복합적인 원인에 대하여 분석한 결과, 간 손상이 감염되지 않은 개체보다 큰 것으로 나타났으며, Lysozyme activity를 제외한 모든 혈액분석항목에서 여웁증에서 보이는 수치보다 높게 나타났다. 이는 질병 감염으로 인한 어체 체내의 생리학적 대사 및 면역학적 기능이 저하되어 있는 상태에서 화학 약품을 처리함으로써 오히려 역효과가 발생하는 결과로 추정된다.

이상의 결과를 요약하여 보면, 제주도내 양식장들의 현장 모니터링을 실시한 결과 여웁증상은 수온이 상승하기 시작하는 6~8월 사이에 주로 발병하는 것으로 확인하였으며, 6~8월 사이에 폐사한 넙치의 조직을 배양하여 관찰한 결과 *V. harveyi* 및 *E. tarda*가 주로 검출 되었다. 이를 바탕으로 검출된 병원성 박테리아와 여웁증상과의 생리학적 비교분석을 한 결과에서는 조직학적으로는 여웁증상 넙치와 유사한 결과를 나타내긴 하였으나, 혈액생리학적 수치에서 다소 상이한 결과를 나타내어 여웁증상은 새로운 병원체에 의한 감염으로 기인할 가능성이 큰 것으로 판단된다. 또한, 단순 영양결핍에 의한 대량폐사인지를 알아본 결과에서는 혈액생리학적 수치에서 여웁증상 넙치와 상이한 결과를 나타내어 영양학적 대사 과정에 특이적인 차이를 가져올 수 있는 가능성이 시사된 것으로 보이며 이에 대한 대사관련 효소의 기능에 대한 평가가 이루어져야 할 것으로 보

이다. 혈액내의 이온농도 측정 역시 여壼증상과 상이한 결과를 나타내었다. 일부 현장에서 제기되고 있는 기존 질병 감염 후 과산화수소 약육에 따른 여壼증의 발생 가능성은 위의 실험결과 여壼증상 넓치와 관련성이 낮은 것으로 판단되며, 면역성에 관련된 Lysozyme activity의 결과에서는 혈청 Lysozyme activity 결과에서는 수치가 높게 나오고 점액 Lysozyme activity 결과에서는 높게 나타나는 결과를 보였는데 이 결과는 여壼증 개체와는 상반된 결과를 나타냈다. 이처럼 생리학적 결과들이 여壼증상을 나타내는 넓치와 상이한 특징을 보이고 있어, 이러한 위의 지표들을 활용하여 기존의 병원체 감염과 여壼증상에 대한 모니터링이 가능할 것으로 판단된다. 향후, 여壼증상에 대한 원인에 대해서는 지속적인 연구를 진행할 예정에 있으며, 이러한 원인규명에 있어서도 본 연구결과의 생리학적 설정 지표가 유용하게 활용될 수 있을 것으로 보인다.

V. 요약

본 실험의 목적은 새로운 질병 출현에 의한 양식넙치의 대량 폐사 원인을 규명하기 위하여 제주도내 양식장들의 현장 모니터링을 실시하였으며 이를 바탕으로 검출된 병원성 세균들에 의한 생리학적 비교분석을 통하여 대량폐사의 원인에 대하여 검토를 실시하였다. 또한, 단순 영양결핍에 의한 대량폐사인지를 파악하기 위하여 질식에 의한 생리학적 및 조직학적 비교분석을 실시하였다. 마지막으로, 병원성 세균을 제거하기 위한 화학약품의 약용처리와의 관계를 파악하기 위하여 과산화수소의 영향에 대해서도 검토를 실시하였다.

제주도내 양식장들의 현장 모니터링 결과 여윌증상의 출현은 조사된 양식장중 6월 중순 3개소에서 각각 발생하였다. 여윌증상을 보인 개체들은 정상개체에 비해 간손상지수인 ALT 및 AST 수치가 높게 나타났으며, 혈중 총단백질 수치는 낮게 나타났다. 양식장 모니터링 결과 병원성 박테리아인 *V. harveyi* 및 *E. tarda*가 검출되었으며, 이에 따라 이 두 종에 의한 여윌증 관련성 여부를 분석하였다. *V. harveyi*, *E. tarda* 및 *V. harveyi* + *E. tarda* 균주를 복합 감염 후 혈액생리학적 분석을 실시한 결과 간손상이 심하게 나타났으며 여윌증상 넙치와 상이한 결과를 나타내었다. 조직학적 분석결과 장 상피조직에서 조직탈락 및 파괴가 관찰되었으며, 아가미 세편의 내전근 파괴 및 확장 증세들이 관찰되었고, 신장에서 일부 결정화된 결석 등이 관찰되어, 여윌증의 개체와 유사한 패턴을 나타냈다. 하지만 혈액생리학적 수치에서는 다소 상이한 결과를 나타내어 여윌증상은 새로운 병원체에 의한 감염으로 기인할 가능성이 큰 것으로 추정된다.

단순 영양결핍에 의한 대량폐사인지를 알아본 결과에서는 혈액생리학적 수치에서 여윌증상 넙치와 상이한 결과를 나타내어 영양학적 대사 과정에 특이적인 차이를 가져올 수 있는 가능성이 시사된 것으로 보이며 이에 대한 대사관련 효소의 기능에 대한 평가가 이루어져야 할 것으로 보인다. 혈액내의 이온농도 측정 역시 여윌증상과 상이한 결과를 나타내어 단순 영양결핍에 의한 여윌증상 유발이 아닌 것으로 판단된다.

과산화수소 처리에 따른 넙치의 혈액생리학적 수치에서 간 손상 수치가 매우

높게 나타났으며, 영양대사의 지수로 판단되는 글루코스, 총단백질양, 중성지방의 결과를 살펴보면, 과산화수소약육에 따른 변화가 거의 없었으나, 여윈증상에 비해 총단백질은 높은 수치를 중성지방은 낮은 수치를 유지하였습니다. 이런 결과는 병원성 박테리아의 감염 후 과산화수소를 약육한 넙치의 결과와 같이 영양대사에 상당한 차이를 보이는 것으로 추정된다.

향후 여윈증상에 대한 원인에 대해서는 지속적인 연구를 진행할 예정에 있으며, 이러한 원인규명에 있어서도 본 연구결과의 생리학적 설정 지표가 유용하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

VI. 감사의 글

제가 이렇게 대학원까지 들어와 논문을 쓰고 석사를 졸업하게 될 줄은 꿈에도 몰랐습니다. 항상 부족하지만 저에게 세심한 가르침으로 지금까지의 길을 걸을 수 있게 많은 격려와 조언을 아끼지 않으시고 지도하여 주신 여인규 교수님에게 고개 숙여 깊은 감사를 드립니다. 또한 바쁘신 일정에도 아랑곳 하지 않고 시간을 할애하여 저의 논문의 심사와 수정을 도와주신 이영돈 교수님과 전려진 박사님께도 깊은 감사의 말씀을 드립니다. 그리고 학부생부터 지금까지 많은 관심과 가르침을 주신 송춘복 교수님, 최광식 교수님, 허문수 교수님, 김기영 교수님, 이제희 교수님, 정준범 교수님, 전유진 교수님, 이승헌 교수님, 정석근 교수님, 이기완 교수님 및 이경준 교수님께도 진심으로 감사의 마음을 드립니다. 학부생부터 대학원 생활동안 항상 옆에서 힘이 되어 주었던 우리 실험실 식구들 중경이, 진이, 혜선이와 진심어린 충고와 격려 등 많은 도움을 주신 문휴형, 정환이형, 태형이형, 경주형, 민석이형 및 경필이 그리고 지금은 떠나서 없지만 실험실 생활동안 많은 추억을 남겨준 수아, 병욱이, 한솔이, 혜나, 혁재 및 은란이에게 이 글을 빌어 진심으로 감사의 인사를 드립니다.

그리고 대학생활동안 항상 저에게 격려와 사랑으로 아껴주었던 만철이형, 맹진이형, 송헌이형, 준상이형, 영득이형, 유철이형, 주상이형, 익수형, 용재형, 하리, 희중이형, 희도형, 현기형, 상혁이형, 성명이형, 석천이형, 창익이형, 원우형, 지혁이형, 민철이, 지훈이형, 진우형, 상우형, 승현이형, 봉근이형, 준석이형, 경임이누나, 은영이, 혜미, 효원이, 병훈이, 소현이, 창희, 승민이, 아름다슬이, 창영이, 동민이, 동휘 및 승현이에게 감사의 마음을 전합니다.

정말로 많은 분들의 도움으로 제가 이 자리에 올라올 수 있었던 것 같습니다. 알게 모르게 많은 도움을 주신 분들에게 이 글을 빌어 감사의 말씀을 드립니다.

끝으로 오늘날에 제가 있기까지 보살펴주시고, 걱정해주시고, 지켜봐주신 사랑하는 아버지 와 어머니 그리고 공부하느라 고생하는 우리 동생 및 든든한 친구들에게 이 논문을 바칩니다. 이 글을 보고 계시는 모든 분들께 감사드리며 항상 건강하시고 좋은 일만 있기를 바랍니다. 그리고 사랑합니다.

VII. 참고 문헌

- Aksnes, A. and L. R. Njaa, 1981. Catalase, Glutathione peroxidase and superoxide dismutase in different fish species. *comp. Biochem. Physiol.*, 69B:893-896.
- AOAC : AOCS Official and Tentative Method. 2nd ed., Am. Oil Chem. Soc., Chicago, Method Cd 8-53 (1990)
- Bansal, S.K., Verma, S.R., Gupta, A.K. and Dalela, R.C.: Physiological dysfunction of the haemopoetic system in a fresh water teleost, *Labeo rohita*, following chronic chlordane exposure. Part I Alteration in certain haematological parameters. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 22:666-673, 1979.
- Barton, B. A. and R. E. Peter, 1982. Plasma cortisol stress response in fingerling rainbow trout, *Salmo goirdneri* Richardson to various transport condition, anaesthesia and cold shock, *J. Fish Bior.*, 20, 39-51.
- Barton, B.A. and G.K. Iwama. 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.
- Basha and Rani, P.S. Basha, A.U. Rani Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (T-ilapia) *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 56 (2003), pp. 218-221
- Brown, B. A., 1980. Routine hematology procedures. (in) B. A. Brown (ed.), *Hematology: Principles and Procedures*. Lea and Febiger, Philadelphia,

pp. 71–112.

Casillas E, Ames (1985) Serum chemistry of diseased English sole, *Parophrys vetulus Girard*, from polluted areas of Puget Sound, Washington. J Fish Dis 8:437–449.

Chang, Y.J. and J.W. Hur. 1999. Physiological responses of grey mullet (*Mugil cephalus*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by rapid changes in salinity of rearing water. J. Korean Fish. Soc., 32 : 310~316 (in Korean).

Davis KB, Parker NC (1990) Physiological stress in striped bass: Effect of acclimation temperature. Aquaculture 91:349–358.

Di Giulio, R. T., P. C. Washburn, R. J. Wenning, G. W. Winston and C. S Jewell. 1989. Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. Environ. Toxicol. Chem. 8, 1103–1123.

Gabryelak, T., Piatrowska, M., Leyko, W. and Peres, G. (1983) Seasonal variation in the activities of peroxide metabolism enzymes in erythrocytes of freshwater fish species. Comp. Biochem. Physiol. 75C, 383–85.

Garrido D, Charvat B, Benito-Moreno RM, Alwen A, Vicente O, Heberle-Bors E (1991) Pollen culture for haploid plant production in tobacco. In: Negrutiu I, Gharti-Chhetri G (eds) A laboratory guide for cellular and molecular plant biology. Birkhäuser, Basel, pp 59–69

Goldberg B, Stern A. The generation of O₂-by the interaction of the hemolytic agent, phenylhydrazine, with human hemoglobin. J Biol

Chem. 1975 Mar 25;250(6):2401-2403.

Gordon RB (1968) Distribution of transaminases (Aminotransferases) in the tissue of the Pacific salmon (*Oncorhynchus*) with emohasis on the properties and diagnostic use of glutamic oxaloacetic transaminase. J Fish Res Bd Can 25:1247-1268.

Forman, H. J., Fridovich, I. Superoxide dismutasea comparison of rate constants Arch. Biochem. Biophys, 158 (1973), pp. 396-400

Hochachka, P. W., S. C. Land, and L. T. Buck. 1997. Oxygen sensing and signal transduction in metabolic defense against hypoxia: lessons from vertebrate facultative anaerobes. Comp. Biochem. Physiol. 118A, 23-29.

Ishimatsu, A., Hayashi, M., Nakane, M. and Sameshima, M. : Pathophysiology of cultured tiger puffer Takifugu rubripes suffering from the Myxosporean emaciation disease. Fish Pathol., 42:211-217, 2007.

Kang, C, J. 1974. A study on the seasonal variation of the water masses in the southern sea of Korea. Bull. Fish. Res. Dev. Agency, 12, 102~121.

Khattak and Hafeez (1996) I.U.D. Khattak, M.A. Hafeez Effect of malathion on blood parameters of the fish, *Cyprinion watsoni* Pak. J. Zool., 28 (1996), pp. 45-49.

Kim I.O. and H.K. Rho. 1994. A study on China Coastal Water appeared in the neighbouring seas of Cheju Island. J. Kor. Fish. Soc., 27(5), 515-528 (in korean).

Lim, D. B. 1976. The movement of waters of the south coast of Korea. J. Oceanogr. Soc. Korea, 11(2), 77~88.

Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur J Biochem. 1974 Sep 16;47(3):469-474.

Milligan, C. L. & Wood, C. M. (1982). Disturbances in haematology, fluid volume distribution and cardiovascular function associated with low environmental pH in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J. exp. Biol.* 99, 397-415.

Mohandas, A., Cheng, T. C. & Cheng, J. B. (1985) Mechanism of lysosomal enzyme release from *Mercenaria mercenaria* granulocytes: a scanning electron microscope study. *J. Invertebr. Pathol.* 46, 189-97.

Moody CS, Hassan HM. Mutagenicity of oxygen free radicals. Proc Natl Acad Sci U S A. 1982 May;79(9):2855-2859.

Nagase, Sumi (1976): Clinico-Biochemical Data on Laboratory Animals A Review, *Exp. Animal*, 25(3), 147-210.

Nelson and Kiesow, 1972 D.P. Nelson, L.A. Kiesow Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 degrees C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV) *Analytical Biochemistry*, 49 (1972), pp. 474-478.

Ogawa, K. and Yokoyama, H.: Emaciation disease of cultured tiger puffer *Takifugu rubripes*. *Bull. Natl. Res. Inst., Suppl.*, 5:65-70, 2001.

Pedrajas JR, López-Barea J, Peinado J. Dieldrin induces peroxisomal enzymes

in fish (*Sparus aurata*) liver. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol.* 1996 Oct;115(2):125-131.

Pickering, A.D., T. G. Pottinger and J. F. Carragher, 1989. Differences in the sensitivity of brown trout, *Salmo trutta*, and rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, to physiological doses of cortisol. *J. Fish Biol.*, 34, 757-768.

Pickering, A.D. 1990. Stress and the Suppression of Somatic Growth in Teleost Fish. *Progress in Comparative Endocrinology*, Wiley Liss.

Pickering, A.D. 1993. Pickering Endocrine induced pathology in stressed salmonid fish. *Fish. Res.*, 17 (1993), pp. 35-40

Rao PP, Joseph KV, Rao KJ (1990) Histopathological and biochemical change in the liver of a fresh water fish exposed to heptachlor. *J Nat Conserv* 2:33-137.

Rees, B. B., F. A. Sudradjat and J. W. Love. 2001. Acclimation to hypoxia increases survival time of zebrafish, *Danio rerio*, during lethal hypoxia. *J. Exp. Zool.* 289, 266-272.

Shen Hong Zhang Qin Xu Ren Wang Guilan (East China Sea Monitoring Center, State Oceanic Administration, Shanghai, 200137); Effects of Petroleum on the Sero proteins of *Tilapia mossambica*[J]; *MARINE ENVIRONMENTAL SCIENCE*; 1997-01.

Siddiqui, A. G. 1977 a. Lake Naivasha (East Africa, Kenya) fishery and its management together with a note on the food habits of fishes. *Biol. Conserv.* 12: 217-228.

Simon M. Secondary iron overload and the haemochromatosis allele. Br J Haematol. 1985 May;60(1):1-5

Singley, J. A. and W. Chavin, 1971. Cortisol levels of normal goldfish, *Carassius auratus* L., and response to osmotic change. Am. Zool., 11 : 653 pp.

Specker, J. L. and C. B. Schreck and J. T. Golden, 1977. Corticoid stress responses to handling and temperature in salmonids, Trans. Am. Fish. Soc., 106 : 213-217

Tin Tun, H. Yokoyama, K. Ogawa and H. Wakabayashi (2000): Myxosporeans and their hyperparasitic microsporeans in the intestine of emaciated tiger puffer. Fish Pathol., 35, 180 H. Yasuda, T. Ooyama, A. Nakamura, K. Iwata, O. Palenzuela and H. Yokoyama 145-156.

Tin Tun, Ogawa, K. and Wakabayashi, H.: Pathological changes induced by three myxosporeans in the intestine of cultured tiger puffer, *Takifugu rubripes* (Temminck and Schlegel). J. Fish Dis., 25:63-72, 2002.

Virani, N. A. and B. B. Rees. 2000. Oxygen consumption, blood lactate and inter-individual variation in the gulf killifish, *Fundulus grandis*, during hypoxia and recovery. Comp. Biochem. Physiol. 126A, 397-405.

Wardle, C.S. 1981. Physiological stress in captive fish. In: Aquarium Systems. Hawkins, A.D., ed. Academic Press, London, pp. 403-414.

Wdzieczak, J., Zalesna, G., Wujec, E. and Peres, G. (1982) Comparative studies on superoxide dismutase, catalase, and peroxidase levels in erythrocytes and livers of different freshwater and marine fish species. Comp. Biochem. Physiol. 73B, 361-65.

Weatherley AH, Gill HS (1987) The biology of fish growth. Academic Press, London, p 443

Wedemeyer, G. A. and D. J. McLeay, 1981. Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressors. (in) A. D. Pickering (ed.), Stress and Fish. Academic Press, London, pp. 247–275.

Wendel A, Feuerstein S. Drug-induced lipid peroxidation in mice-I. Modulation by monooxygenase activity, glutathione and selenium status. *Biochem Pharmacol.* 1981 Sep 15;30(18):2513-2520

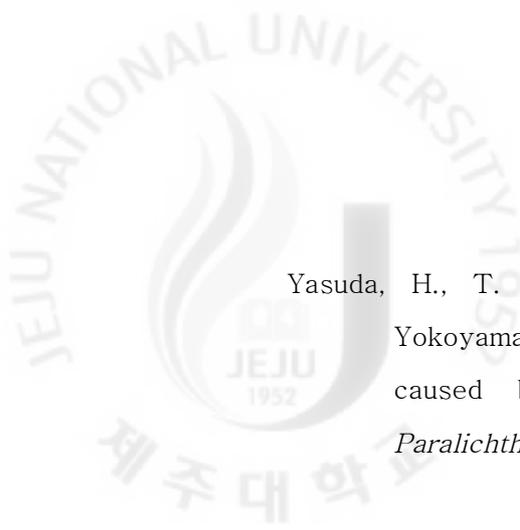
Wendelaar Bonga, S.E. 1997. The stress response in fish. *Physiol., Rev.* 77 : 591~625.

Yamamoto (1988): *Biochemistry of Blood and Urine in Experimental Animals* (Soft Science Inc., Tokyo), p 1-20.

Yamawaki et al., 1986 K. Yamawaki, W. Hashimoto, J. Fujii Koyama, Y. Ikeda, H. Osaki Hematological changes in carp exposed to low cadmium concentrations *Bull. Jpn. Soc. Fish.*, 52 (1986), pp. 459-466.

Yanagida, T., Nomura, Y., Kimura, T., Fukuda, Y., Yokoyama, H. and Ogawa, K.: Molecular and morphological redescriptions of enteric myxozoans, *Enteromyxum leei* (formerly *Myxidium* sp. TP) and *Enteromyxum fugu* comb. n. (syn. *Myxidium fugu*) from cultured tiger puffer. *Fish Pathol.*, 39:137-143, 2004.

Yanagida T, Palenzuela O, Hiraie T, Tanaka S, Yokoyama H, Ogawa K (2008) Myxosporean emaciation disease of cultured red sea bream *Pagrus major* and spotted knifejaw *Oplegnathus punctatus*. *Fish Pathol* 43:45-48.



Yasuda, H., T. Ooyama, A. Nakamura, K. Iwata, O. Palenzuela and H. Yokoyama (2005): Occurrence of the myxosporean emaciation disease caused by *Enteromyxum leei* in cul-tured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Fish Pathol., 40, 175-180.

ZIKIĆ RV, STAJN AS, PAVLOVIĆ SZ, OGNJANOVIĆ BI, SAIČIĆ ZS: Activities of superoxide dismutase and catalase in erythrocytes and plasma transaminases of goldfish (*Carassius auratus gibelio Bloch.*) exposed to cadmium. *Physiol Res* 50: 105-111, 2001.

방중득, 전세규, 박수일, 최윤정(1992). 양식넙치에서 분리된 *Edwardsiella tarda*의 생화학적 및 혈청학적 특성에 관한 연구. 한국어병학회지. 5:29-35.

이창훈, 하동수(1991). 養殖 넙치의 連鎖球菌症. 한국어병학회지. 4:71-77.

이덕찬, 이재일, 박찬일, 박수일(2001). 해산양식어로부터 분리된 연쇄구균 증의 원인균, *Lactococcus garvieae*에 대한 연구. 한국어병학회지. 14:71-80.

전세규(1988). 養殖魚類의 細菌性疾病의 診斷과 對策. 한국어병학회지. 1: 5-30.

통계청, 어류양식현황조사(2010)

허문수, 송춘복, 이제희, 여인규, 전유진, 이정재(2001). 제주산 양식넙치 (*Paralichthys olivaceus*)로부터 분리된 β -용혈성 연쇄구균(β -Streptococcus spp.)의 특성. 한국수산학회지. 34:365-369.