

## 魚類疾病의 研究技法과 臨床檢査(I)

허 강 준\*

### 1. 病魚의 採捕 및 運搬

#### 1) 病魚診斷의 原則

첫째 질병은 물고기가 살아있는 경우에만 발생을 하므로 우선 살아있는 상태를 충분히 관찰해야만 한다.

둘째 병어와 病的環境과는 불가분의 밀접한 관계가 있다.

셋째 병어를 사육지에서 관찰하는가 또는 격리수조에서 관찰하는가에 따라 일장일단이 있으나 한마디로 결정할 수는 없다. 즉, 격리수조에 수용하는 경우에는 관찰을 충분히 할 수 있고, 치료도 철저히 행할 수 있다는 이점이 있으나 사망하기 쉽다는 결점이 있는데 그 원인으로서 는 다음 사항이 영향을 미친다.

- ① 병어를 포획하는 방법이 나쁜 경우
- ② 병어의 운반방법이 나쁜 경우
- ③ 격리수조내에서의 사육방법이 나쁜 경우

#### 2) 病魚의 採捕

손그물 등으로 한참 쫓아다니다가 물고기를 잡는 방법은 가장 좋지 않은 방법이다. 병어가 눈치채기 전에 잡는 것이 가장 좋은 방법이라 하겠다.

- ① 병어의 주위에 있는 물과 함께 가만히 떠올린다.
- ② 손그물을 사용할 때는 될 수 있는대로 부드러운 망사로 만든 것을 사용하며 결코 쫓아다 녀서는 안되며 병어의 바로 앞에 그물을 집어넣 든가 또는 큰 비닐봉지를 담구어서 그 안으로 집어넣어 건져올린다.

#### 3) 病魚의 運搬方法

건강한 물고기의 운반에 있어서도 많은 문제 점이 있으므로 병어의 운반은 더욱 신중히 해야 할 필요가 있다.

- ① 병어의 수가 많은 경우에는 한 마리씩 따로 비닐주머니 안에 수용할 것
- ② 환경의 급변은 피할 것
- ③ 운반도중에는 직사광선을 피할 것
- ④ 장거리 운반의 경우에는  
가. 산소가스를 집어 넣어 새지 않게 막는다.  
나. 병의 증상에 따라서는 마취를 시킨다.  
다. 이온교환 수지에 의해 배설물을 흡착시킨다.  
라. 얼음 또는 드라이아이스로 수온의 상승을 막는다.

이상의 방법을 완벽하게 행한다 하더라도 건강한 물고기의 운반은 24시간이 한계이므로 병어의 경우는 현지에서 진단 및 치료를 행하는 것이 안전하다. 경우에 따라서는 중증어의 치료는 단념하고 다른 건강한 물고기의 감염을 방지하는데 전념하는 편이 나올 때도 있다.

#### 4) 病魚의 飼育法

- ① 마취를 하여 운반한 경우에는 도착후 바로 깨끗한 물로 옮기고 마취로부터 깨어나게 할 것. 단지, 이 경우에 수온의 차이에 특히 주의 를 해야 한다.
- ② 수온의 급변은 절대적으로 피할 것. 수조내에 병어를 수용한 비닐봉지 채로 넣어서 수온이 거의 균일하게 되었을 때 비닐봉지로부터 수조내로 옮겨 놓는다.
- ③ 병어를 수조 내로 옮겼어도 대부분의 경우

\* 충북대학교 농과대학 수의학과

에는 바닥에 가라앉거나 옆으로 드러누워 버리는 경우가 많다. 이와같은 경우에는 수조의 바닥으로부터 조금씩 배수를 하며 위에서는 신선한 물을 보급해 줄 필요가 있다. 그 이유는 밀의 물은 위의 물보다 용존산소가 적으며 또 병원세균이나 그 밖의 질병의 원인이 될 수 있는 요인이 많이 함유되어 있기 때문이다. 또한 옆으로 드러누운 병어에서는 아가미덮개의 개폐에 의한 호흡운동을 편안히 시켜주기 위해서 어체의 좌우 양측에 돌등을 고여서 어체를 세워주는 처치가 필요하다.

④ 산소보급은 충분히 하여 줄 것

⑤ 0.5~1.0% 정도의 식염을 녹여 주는 것으로 의외로 효과가 있다.

⑥ 먹이를 줄 필요는 없다. 이와같은 증상의 병어는 대개 식욕이 없고 오히려 먹이가 물 밑에 가라앉아 수질을 악화시키는 결과가 된다. 또 소량을 먹는다 할지라도 섭취한 먹이를 소화 흡수시키기 위해서는 여분의 산소를 소비할 필요가 있어 체력을 소모시키는 결과가 된다.

### 5) 病魚의 麻醉

어류의 마취에 대해서는 뒤에 기술하였으므로 여기에서는 병어를 진찰하고 치료를 하는데 있어 마취가 어찌서 필요한지 마취를 필요로 하는 경우만을 들어보기로 한다.

- ① 병어의 정밀검사를 행할 경우
- ② 주사나 약의 강제 경구 투여를 행할 경우
- ③ 체표에 약을 도포할 때
- ④ 닳벌레, 물이 등의 외부기생충을 구제할 때
- ⑤ 외과적 수술을 행할 경우

또한 마취를 하는 것이 위험하다고 예측되는 증상의 물고기는 소위 중중어로서 예후는 불량하다고 생각해도 좋다.

### 6) 死魚의 運搬法

사망한 물고기라 하더라도 그 취급은 조심스럽게 해야만 한다. 특히 중요한 것은 실험실로 가져가서 세균검사 등을 행할 경우에는 조직의 신선함을 잃지 않도록 배려를 해야만 한다.

① 극히 단시간에 가져갈 수 있는 거리라 해도 반드시 얼음에 넣어서 가져갈 것

② 포르말린을 사용하는 경우에는 어체 또는 장기에 메스로 자국을 내던가 주사기로 조직내에 포르말린액을 주입한다.

③ 보통 포르말린에 고정을 하는 경우에는 10% 포르말린액을 만들어서 그 안에 넣든가, 미리 10% 식염수를 만들어 두었다가 이 용액을 물 대신에 사용하면 나중에 조직표본을 만들 경우에 조직의 고정상태가 좋아진다.

④ 사망한 물고기만을 가져가지 말고 어체에 부착되어 있는 물질 또는 물 밑에 저류하여 있는 먹이찌꺼기 등도 함께 가져가 검사해야만 한다.

## 2. 細菌의 檢出法

魚病細菌은 기본적으로는 고등동물의 세균과 같으나 그 대부분이 잘 알려지지 않은 종류이다. 病性診斷의 확신을 피하기 위해서는 자주 세균분리를 하지 않으면 안되는데 이 경우에는 수중환형이라고 하는 특수성을 고려하지 않으면 안된다. 왜냐하면 어류의 세균은 普通動物인 어류의 生理와 밀접한 관계를 갖고 있기 때문이다. 구체적인 예를 들면 어떤 종류의 병원세균은 低水温時에는 병원성을 발휘하지 않으나 수온이 상승함에 따라 맹렬한 병원성을 발휘한다. 세균의 검출에 앞서서 중요한 사항은 공시어가 살아 있어야 한다는 것이다. 사망어에서는 각 조직의 안으로 세균이 급속히 침입하기 때문에 사망어는 세균검출의 대상이 될 수 없다. 活魚로부터 검사재료를 채취하는 경우에는 머리 부분을 자르거나 마취제의 과량투여에 의해 물고기를 죽인 후 체표면을 소독하고 난 뒤 부검을 하여 내장장기를 잘라 내어 검사재료를 채취한다. 세균배양을 행하는 경우에는 메스를 가스불꽃으로 구워 멸균한 후 노출된 장기를 절개하든가, 接種用의 백금이 등을 사용하여 채취장기 부분에 삽입하여 떼어낸다. 얻어진 접종물은 배지위에 도말하며 배양온도는 검사 목적의 세균류에 따라 다르기 때문에 임상적으로 나타난 병원체로 의심되는 것을 추측하여 적당한 배양온도를 결정한다. 菌血症을 나타내는 질병에서는 심장이나 신장이 검사재료를 채취할 수 있는 특정의 기관이다. 어체의 체표로부터 시료를 채취하는 것은 기술적으로 매우 곤란한 경우가 많

다. 왜냐하면 체표면에는 이차적으로 寄生性的 세균, 진균류의 침입을 받는 경우가 많으므로 일차 병원미생물을 덮어 씌워 증식하여 이를 공존하는 이차적 병원미생물을 제거하지 않으면 안되기 때문이다.

세균검사에는 현미경검사와 배양시험이 있다.

#### 1) 현미경에 의해 직접 세균을 검출하는 방법

우선 조심스럽게 부검을 하여 환부조직, 각장기조직, 혈액의 도말표본을 만든다. 즉, 깨끗한 슬라이드글라스 위에 조직의 단면을 직접 도말하며 될 수 있는대로 이때 또 다른 기구를 사용하지 않도록 한다. 도말한 표본은 공기중에서 건조시키며 때로는 화염고정을 할 경우도 있다.

염색제는 메틸렌블루, 석탄산폭신, 석탄산겐치아나 바이올렛, 김자액(혈액염색)을 사용하며 염색한 표본은 油浸렌즈를 사용하여 검경한다. 세균이 존재하면 구형, 막대모양 등의 일정한 모양을 한 상이 검출된다. 농도가 높은 검체에서는 미리 생리식염수 한방울을 슬라이드글라스위에 떨어뜨려 그 위에 검체를 올려놓고 혼합하여 카바글라스를 덮는다. 검경을 할 때는 반사경을 평면경으로 해서 집광기를 내리던가 오목렌즈로 해서 집광기를 빼던가 하여 될 수 있으면 광산량을 적게해서 보는게 좋다. 이상과 같은 단순검사 만으로 대개의 경우는 알 수 있으나 더욱 정밀한 검사를 필요로 하는 경우에는 다음과 같은 檢鏡을 행한다.

#### 2) 懸滴標本檢査法

이 방법은 세균의 運動을 검사하는데 편리한 방법이다. 오목유리의 움푹한 곳의 주위에 바세린을 도포한 후 검체가 있는 시료액을 카바글라스위에 한방울 떨어뜨려 이를 거꾸로 해서 오목유리의 움푹한 곳에 덮어 씌우고 가볍게 눌러서 바세린으로 봉하여 검경한다. 이 방법은 숙련되지 않으면 초점을 맞추기가 매우 곤란하다.

#### 3) 默汁法

형태적으로 특징이 있는 세균을 검출할 때 매우 편리한 방법이다. 어병세균에서는 眞菌檢出時에 이용되며 사람이나 육생동물의 경우에는 스피로헤테나 莢膜을 갖는 세균의 검출에 사용된다. 슬라이드글라스위에 양질의 목즙을 백금

이로 한방울 떨어뜨린 후 검체를 혼합하여 카바글라스로 덮고 공기중에서 건조한다.

#### 4) 暗視野照射法

암시야 집광기를 사용하여 광선을 카바글라스위에 全反射시켜 시야를 暗黑으로 한 뒤 屈抵光線을 비추어 나온 세균상을 보는 방법으로 스피로헤테 검출에 유효하다.

#### 5) 細菌培養法

세균배양법은 배양기간이 길고, 병원균의 분리 동정에 어려움이 많으나 어병의 확정진단의 수단으로 많이 사용된다. 우선 병어를 무균적으로 해부한 뒤 적출한 組織塊를 무균적으로 처리된 유발 안에 넣고 잘게 부순 후 소량의 멸균증류수나 생리식염수를 넣어 液狀으로 한다. 백금이로 이를 한천평판배지위에 도말한다. 조작중에는 공기중에 부유하고 있는 雜菌이 배지면에 부착하지 않도록 petri dish의 조작법에 주의를 해야 한다. 도말한 재료는 배지의 전표면에 평균적으로 도말하는 것이 중요하다.

세균수가 많다고 생각되어질 때는 위와 같은 방법보다는 직접 백금이로 재료내에 찢어넣어 이를 배지위에 도말하는게 좋다. 배양온도는 20~25℃ 정도가 무난하다. 배지의 종류는 여러가지가 시판되고 있는데 우선 최초로 사용하는 배지는 普通寒天培地로 하는데 대개의 균이 이 배지에서 배양이 가능하다. 표 5-4는 어병에 주로 이용되는 배지의 종류와 검출을 목표로 하는 세균과 시료의 종류를 비교해 보았다.

#### 6) 復元實驗(人工感染實驗)

순수하게 분리하여 얻은 균을 건강한 물고기에 접종하여 원래의 병어와 같은 증상이 나타나는가 않는가를 조사하는 실험이다. 接種材料는 한천배지에 배양된 균을 수확하여 멸균 생리식염수에 희석하거나 또는 액체배지에 배양한 것을 사용한다. 접종방법에 피하, 근육, 혈관내, 복강내에 주사 또는 피부에 도포, 소화관내 주입, 먹이에 섞어서 주는 방법 등이 있다. 본 실험에 의하여 시험어가 發病하여 그 증상이 자연발생어의 그것과 동일하고 시험어로부터 접종균과 동일한 균이 분리, 회수된다면 조사한 질병이 세균성 질병으로 분리한 균은 그 질병의 병

표 1. 배지별 검출목표균과 시료

	시 료			목표균
	아 가 미 ( 분 비 물 )	체 표 액 ( 분 비 물 )	혈 분 변 ( 국 소 ( 개 양 ) 부 검 재 료 ( 간 · 신 장 )	
Cytophaga agar	○	○	○	○
TY agar	○	○	○	○
보통 한천		○	○	○ ○ ○
Trypticsoy agar		○	○	○ ○ ○
Macconkey agar			○ ○	○
DCLS agar			○ ○	○
Sabouraud 한천	○		○	

\* 배양온도는 20~25℃로 3일간 배양한다.

원균임이 인정된다.

### 7) 滑走細菌의 確認

어병의 병원세균 중에는 하나의 屬으로서 활주세균이라고 하는 세균이 있다. 이 균은 수의 영역에서는 익숙하지 않은 균이나 어병에 있어서는 자주 출현하는 어병을 연구하는데 있어 중요한 세균의 하나이다. 활주 세균의 존재를 확인하는데는 檢鏡法과 培養法이 있다.

검경법은 활주세균이 長桿菌이므로 염색을 하지 않고도 현미경으로 관찰할 수 있다. 배양법은 보통한천배지를 사용하지 않고, Cytophage 한천배지(tryptom 0.05%, yeast extract 0.05%, beef extract 0.02%, sodium acetate 0.02%, bacto-agar 1%, pH 7.2)나 TY 한천배지가 배양에 적합하다. 발육최적온도는 5~30℃로 범위가 넓고 고온에서 발육이 잘 되는 편이다. 배지위에서는 황색이나 등색의 집락을 이루고 주변이 나무뿌리 모양이나 파도 모양을 나타낸다. 또 표면에는 주름이 있다. 어병세균 중에서 가장 흔하다고 여겨지는 Gram음성균의 성상에 관해서 표 5-5에 일람표를 나타내었다.

## 3. 寄生蟲의 檢査法

어체의 체표면에 기생하고 있는 소위 外部寄

生蟲의 존재는 보통 점액 등이 이상적으로 분비되므로 육안적으로도 어느 정도는 기생충의 所在을 의심할 수가 있으나 확진을 위해서는 국소로부터 점액을 채취하여 검경할 필요가 있다. 또 물고기의 체내에 기생하는 内部寄生蟲의 검출은 분변을 채취하여 蟲卵檢査를 행해 확인할 수 있으나 실제로는 곤란한 경우가 많다. 기생충의 종류에 따라서는 염색을 하지 않고도 확인할 수 있는 것도 있지만 자세한 검사를 위해서는 Giemsa's stain이나 hematoxylin 등으로 염색을 하는 것이 좋다.

### 1) 寄生蟲의 採集과 檢査

소화관내에 기생하고 있는 기생충은 검사용기에 미리 생리식염수 또는 수돗물을 넣고, 그 안에 소화관을 넣어 가위로 잘라 소화관을 열고 물로 씻는다. 검경배울은 저배율이 좋은데 보통 100~400배로 보는 것이 좋다.

신장이나 간장 등에 기생하고 있는 線蟲은 위와 같은 방법으로 채취한다. 吸蟲類의 피낭유충의 검사는 lactophenol액의 미량을 첨가한 후 힘을 가해 피낭유충을 분리한다. lactophenol액의 조성은 다음과 같다.

Glycerin	2
Lactate	1
Tartrate	1
Distilled water	1

### 2) 寄生蟲標本의 관찰요령

① 흡충, 조충의 배설계의 관찰은 그 배설관의 走行, 分肢狀態, 종말세포의 위치를 확인한다.

② 조충의 두부에 鉤이 있는 경우에는 그 형태, 크기, 수 등을 조사할 필요가 있으며 그러기 위해서는 두부를 옆으로 절단하여 위에서부터 관찰해야만 한다. 또 口吸盤의 주위에 刺가 있는 흡충은 세게 눌러서 검사한다.

③ 흡충의 생식선 부속기관의 관계를 알기 위해서는 충체를 세게 눌러서 검사한다.

④ 충체로부터 나온 충란은 수중에서 카바글라스를 덮어 압력이 가해지지 않도록 해서 검경한다.

⑤ lactophenol 액으로 봉입한 충체 표본을 만들어 두면 고정된 충체가 투명하게 되므로 검사하기 쉽다.

표 2. Gram 陰性 好氣性菌의 性狀(1)

	形	運 動 性 (鞭 毛)	嫌 氣 條 件 下 에 서 의 發 育	치 토 크 롬 · 옥 사 다 제	TSI			SIM			V P 半 流 動	시 몬 즈 · 구 연 酸 臨	페 닐 · 알 라 닌	손 퓨 — 好 氣	레 이 푸 嫌 氣	硝 酸 臨 還 元	리 진 脫 炭 酸	
					斜 面 / 高 層	가 스 生 成	硫 化 水 素	硫 化 水 素	인 들 性	運 動 性								
<i>Escherichia coli</i>	R	d (周)	+	-	A/A	+	-	-	+	d	-	-	-	-	+	+	+	KCN(-)
<i>Edwardsiella tarda</i>	R	+	+	-	-/A	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	크실로스 (-) 안니톨 (-)
<i>Citobacter</i>	R	+	+	-	d/A	+	d	d	d	+	-	-	+	-	+	+	-	크실로스 (+) 안니톨 (+)
<i>Salmonella</i>	R	+	+	-	-/A	d	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	크실로스 (+) 안니톨
<i>Shigella</i>	R	-	+	-	-/A	-	-	-	d	-	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>Klebsiella</i>	R	-	+	-	d/A	+	-	-	d	-	-	d	d	-	+	+	+	d
<i>Enterobacter</i>	R	+	+	-	A/A	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	d
<i>Hafnia</i>	R	+	+	-	A/A	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+
<i>Serratia</i>	R	+	+	-	A/A	d	-	-	-	+	-	d	+	-	+	+	+	+
<i>Proteus</i>	R	+	-	-	d/A	+	d	d	d	+	+	d	d	+	+	+	+	d
<i>Yersinia</i>	R	d	-	-	d/A	-	d	d	-	d	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>ERBbacterium</i>	R	+	+	-	-/A	-	-	-	-	+	-	-	d	-	+	+	+	+
<i>Pasteurella piscicida</i>	R	-	+	+	-/A	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	0/129 (+) 만니톨 (-)
<i>Neisseria</i>	S	-	-	+	-/-	-	d	d	-	-	-	-	-	d	-	d	-	

표 2. Gram 陰性 好氣性菌의 性狀(2)

	形	運 動 性 ( 鞭 毛 )	嫌 氣 條 件 下 에 서 의 發 育	치 도 크 름 · 육 사 다 계	TSI			SIM			V P 半 流 動	시 몬 즈 · 구 연 酸 臨 d	페 닐 · 알 라 닌 d	손 류 · 好 氣 嫌 氣 d	레 이 푸 · 嫌 氣 d	硝 酸 還 元 d	리 진 脫 炭 酸
					斜 面 / 高 層	가 스 生 成	硫 化 水 素	硫 化 水 素	인 동 성	運 動 性							
<i>Moraxella</i>	R	-	-	+	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
<i>Acinetobacter</i>	R	-	-	-	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
○ <i>anguillarum</i>	R	+	+	+	d/A	-	-	-	+	+	-	+	d	+	+	-	
<i>parahaemo lyticus</i>	R	+	+	+	-/A	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	0/129(+) (노보비오신(+))
<i>algimolyticus</i>	R	+	+	+	A/A	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	NaCl 0%에서 發育(-)
<i>fisheri</i>	R	+	+	+	d/A	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	인노시트(-) 안니톨 (+)
○ <i>hydrophila</i>	R	+	+	+	d/A	d	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	부탄디올 (+)
○ <i>punctata</i>	R	+	+	+	d/A	d	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	부탄디올 (-)
<i>satmunicida</i>	R	-	+	+	-/A	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	R	+	+	+	-/A	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	0/129(+) NaCl 0% (+) 인노시트(+) 만니톨 (-)
<i>Photobacterium</i>	R	-	+	d	A/A	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	0/129(+) NaCl 0%(-)
<i>Eucribacterium</i>	R	+	+	+	A/A	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	
○ <i>fluorescens</i>	R	+	d	+	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	젤라친 (+) 카제인 (+)
<i>putida</i>	R	+	-	+	-/-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	d	젤라친 (-) 카제인 (-)

*Vibrio Aeromonas*

표 2. Gram 陰性 好氣性菌의 性狀(3)

	形	運動性(鞭毛)	嫌氣條件下에서의發育	치토 크롬 · 옥시 다제	TSI			SIM				V	시몬즈 · 구연酸臨	페닐 · 알라닌	손 · 푸 · 호氣	레 · 이 · 푸 · 혐氣	硝酸 · 還元	리 · 진 · 炭酸
					斜面 / 高層	가 스 生 成	硫 化 水 素	硫 化 水 素	인 醇 性	運 動 性	I P A							
<i>Pseudomonas</i>	<i>chloraphis</i>	R	+	+	-/-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	젤라친 (+)	
	<i>anguilliseptica</i>	R	+	+	-/-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	젤라친 (+)	
<i>Flavobacterium</i>	R	d	-	+	-/-	-	-	-	d	-	-	-	d	-	d			
<i>Alcaligenes</i>	R	+	-	+	-/-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	젤라친 (-)	
<i>Chromobacterium</i>	R	+	d	+	d/d	-	-	-	-	+	-	-	d	d	d	+	-	

○ : 魚病菌, R : ●菌, S : 球菌, 周 : 周毛性, 極 : 極毛性, + : 陽性, - : 陰性, d : 種 또는 株間的 變動, A : 酸產生

⑥ 표본이 오래되면 복잡한 분지를 나타낸 배설관이나 鉤가 여러개 있는 것으로 고정후에 관찰이 불가능하게 되므로 가능하면 사진을 찍어 두는 것이 좋다.

3) 固定標本을 만들때의 주의사항

① 충체를 깨끗이 하고 먼지 등의 부착물을 떼어내야 한다.

② 고정액은 끓지않을 정도로 가온해서 사용하면 충체가 심하게 수축하는 결점을 방지할 수

있다. 線蟲이나 鉤頭蟲의 고정에는 일반적으로 70% alcohol을 끓지 않을 정도로 가온하여 그 안에 충체를 넣어 고정한다.

③ alcohol로 고정한 표본은 hematoxylin으로 염색한다. 단 선충의 경우는 염색을 하지 않는다. 그외에 조직절편을 작성할 때의 주의할 점을 살펴보면 大型吸蟲의 경우에는 0.1~0.5mm의 두께로 자르며 일반적으로 連續切片이 필요하다. 包埋에는 cedar oil이나 parafin을 사용한다.