

숯침가 사료투여가 넙치의 면역반응에 미치는 영향

권문경[†] · 이윤호 · 박상언 · 김봉석* · 박수일**

국립수산과학원 동해수산연구소 *생명공학연구원, **부경대학교 수산생명의학과

The effects of charcoal in diet on the immune responses of flounder, *Paralichthys olivaceus*

Mun-Gyeong Kwon[†], Yun-Ho Lee, Sang-Un Park, Bong-Seok Kim*, Soo-Il Park**

East Sea Fisheries Research Institute, National Fisheries Research & Development Institute,

*Biotechnology Research Center, NFRDI,

**Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University

The charcoal effects on the immune responses of flounder, *Paralichthys olivaceus* were studied. Fish were fed an experimental diet supplemented with 1%, 3% or 5% of charcoal to a commercial diet. Several factors such as weight gain, hematological parameters, nonspecific immune responses and resistance against *Edwardsiella tarda* were evaluated 4 and 8 weeks after the administration. The changes of body weight and lysozyme activities were not significant among tested groups. But cholesterol and total protein concentration in the blood were significantly lower in the 5% supplemented group than in the control. The production of superoxide by macrophage from the head kidney, examined by NBT reduction, was significantly higher in the 3% charcoal supplemented groups than in the control. The survival rate after an artificial challenge with 1×10^7 cells of *E. tarda* per fish was significantly the highest in the 3% charcoal supplemented group.

서론

동해안 어류 양식장에서의 고밀도 집약적 양식과 고수온기의 냉수대 발생은 어류에 스트레스로 작용하여 많은 질병을 발생시키고 있으며, 질병으로 인한 폐사율은 전체 사육량의 12% 전후로 매년 증가하는 추세에 있다(방 등, 1997). 발병 후의 어류 질병에 대한 일반적인 대책인 약물 치료는 약제의 선택 및 치료 기간 등에 따라 비용이 크게 달라질 뿐만 아니라 경우에 따라서는 과도한 비용이 소요되며(문 등, 1998), 이외에도 내성균의 출현 등으로 양식어의 세균성 질병에 대한 치료 효과가 잘 나타나지 않는다는 어려움이 있다(Kwon *et al.*, 1999). 또한, 넙치 양식장에서는 저밀도 사육으로 사육 조건을

개선하여 질병을 예방하고자 하였지만, 그 효과는 일반적으로 높지 않았다(水野, 1993).

이런 어려움과 관련하여, 세균성 질병에 대한 치료 대책과는 별도로 사료에 유용물질을 첨가하여 어류의 항병력을 개선시켜 질병을 예방하고자 하는 예방 대책에 많은 관심이 쏠리고 있다. Satoh *et al.*(1987)은 미역을 참돔에 투여하였을 때 *Pasteurella piscicida*에 대하여, Matuso and Miyazono(1993)는 peptidoglycan을 어류에 투여하였을 때 *Vibrio anguillarum*에 대하여, Nakagawa *et al.*(1981)은 Chlorella-extract를 수산동물에 투여하였을 때 *Vibrio anguillarum*에 대하여 저항력이 증가되었다고 보고하였다.

한편, 최근에 와서 숯의 새로운 특성이 밝혀지면서 숯에 관하여 많은 관심이 모이고 있다. 숯

[†]Corresponding Author

에는 칼슘, 칼륨, 인, 나트륨 등 5대 미네랄 외에 구리, 아연, 망간, 마그네슘, 크롬 등이 함유되어 있어 미네랄 성분이 전체의 2~3%를 차지하며, 참나무숯은 미네랄 성분 중 칼슘이 40%, 칼륨이 20%가 함유되어 있어 알칼리 성분이 약 60%가 되며, 표면의 많은 구멍은 물이 공기와 접촉되는 면적을 넓게 하여 수질 정화제로 이용되고 있다.

따라서, 본 연구에서는 가축에서 정장제로서 활용되고 있지만 어류에서는 아직 시험되지 않은 숯의 사료첨가제로서의 효과를 조사하기 위하여 넙치에 숯을 첨가한 사료를 8주간 투여하면서 성장 및 면역증강에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

실험어

경북 포항 소재 사설 양어장에서 구입한 평균 어체중 18 g의 넙치를 260 l 수조에 40마리씩 수용하였으며, 사육수는 분당 4 l 가 교환되도록 조정하였다. 모든 실험구는 2반복으로 수행하였으며, 실험기간 중의 수온은 21.1 ± 1.45 °C, 비중은 1.024 ± 0.001 이었다.

실험용 사료 제작 및 투여 방법

시판되는 넙치용 분말 사료와 생사료를 각각 50%씩 혼합한 후, 각 사료에 숯 분말(대한목탄)을 1%, 3%, 5%가 되도록 첨가하여 펠렛(첨가 사료)으로 제작하였다. 첨가 사료는 8주동안 일일 어체중의 4%를 3회에 나누어 투여하였으며, 투여한 사료 양을 측정하여 사료계수를 구하였다.

성장도 조사

실험용 넙치에 첨가 사료를 투여한 후 4주 간격으로 실험어의 전체 무게를 측정하여 증중량을 구하였다.

혈액 생화학적 성분 분석

넙치의 미부정맥에서 헤파린 처리된 주사기로 시험구별로 3마리씩 채혈하여 혈액의 생화학적 성상을 분석하였다. 글루코스, 총콜레스테롤, GOT (glutamate oxalo-acetate transaminase), GPT (glutamate pyruvate transaminase) 농도는 전혈을 이용하여 혈액자동분석기(Boehringer Mannheim, Germany)를 사용하여 분석하였으며, Total protein은 혈청을 분리하여 Biuret 법으로 측정(Asan pharm Co., LTD.)하였다.

어류 식세포의 활성 산소 측정

넙치의 두신을 무균적으로 분리하여 2% fetal calf serum, 1% penicillin과 streptomycin 및 0.2% heparin이 함유된 L-15 medium에서 40 μ m nylon membrane을 통과시켜 세포 현탁액을 준비하였다. 준비된 세포 현탁액을 51% percoll에 중층시킨 후 3,000rpm에서 25분간 원심분리하여 백혈구를 분리하였다. 분리된 백혈구는 0.1% trypan blue에서 viability를 관찰 한 후 2×10^6 cells/ml의 농도로 조정하여 microculture well에 분주한 다음 20°C에서 2시간 부착시켜 상등액을 제거한 후 3회 세척하여 식세포를 준비하였다. 흡소닌화된 zymosan을 nitroblue tetrazolium(NBT) 용액에 현탁시킨 후 식세포가 부착된 microculture well에 NBT 용액을 100 μ l 씩 첨가하여 20°C, 30분 동안 반응시킨 다음 100% methanol로 고정시켰다. 각 well에 2M KOH 용액 120 μ l와 dimethyl sulphoxide(DMSO) 140 μ l를 첨가한 후 630nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 blank는 2M KOH와 DMSO의 혼합 용액을 사용하였다.

혈청의 라이소자임 활성 조사

라이소자임 활성은 Parry *et al.*(1965)의 turbidimetric method를 이용하여 측정하였다. 즉, *Micrococcus lysodeikticus* (0.2 mg/ml) 현탁액(pH 6.2) 950 μ l와 혈청 50 μ l를 혼합하여 25°C에 30초 및 4분 30초 반응시킨 후 530nm에서 흡광도

를 측정하였다. 라이소자임 활성은 units/ml로 나타내었으며, 1 unit는 흡광도 값이 0.001/min 감소한 값으로 표시했다.

세균 공격 실험

숯 첨가사료 투여가 넙치의 항병력에 미치는 영향을 조사하기 위하여 병원성 세균인 *Edwardsiella tarda* FSW910410 균주로 공격실험을 하였다. 즉, 시험 균주는 TSA 배지에서 27°C, 24시간 배양한 후 집균하여, 멸균생리식염수로 1×10^8 cfu/ml (OD 600nm=0.3)이 되도록 현탁시켜 넙치의 복강에 0.1 ml씩 주사하였다.

통계 처리

결과의 통계 처리는 SPSS (SPSS Inc., 1997) program으로 ANOVA-test를 실시하여 Duncan's multiple range test (Duncan, 1955)로 평균간의 유의성을 검정하였다.

결 과

성장도 조사

숯 첨가사료(1%, 3%, 5%)를 투여하면서 증중량을 조사한 결과, 4주째 대조구의 증중량은 평균 12.36 g으로 숯첨가 사료 투여구의 증중량 8.76~10.28 g 보다 높게 나타났지만 유의적인 차이는 보이지 않았다. 사료투여 8주째 대조구의 증중량은 평균 23.64 g이며, 숯 1%첨가 사료투여구는 25.94 g, 숯 3% 첨가 사료투여구는 23.48 g, 숯 5% 첨가사료투여구는 23.27 g으로, 숯 1% 첨가 사료투여구에서 다소 높게 나타났지만, 유의적인 차이는 보이지 않았다(Fig. 1). 그러나, 사료계수는 숯첨가 사료를 8주간 투여했을 때 대조구가 1.96, 1% 첨가구 1.67, 3% 첨가구 1.82와 5% 첨가구 1.78로 첨가구 모두 대조구보다 낮게 나타났으며, 1% 첨가구가 가장 양호하게 나타났다.

혈액의 생화학적 성분 분석

숯 첨가사료를 8주 동안 투여하면서 혈액 성분(GOT, GPT, Cholesterol, Glucose, Total protein) 분석을 한 결과, 4주 간 투여 후에는 숯 첨가사료 투여에 의한 유의적인 차이는 없었다 ($p>0.05$). 그러나 사료 투여 8주 후에 혈액성분을 분석한 결과, 콜레스테롤 성분이 숯 5% 첨가사료 투여구에서 대조구에 비하여 유의적으로 낮게 나타났으며($p<0.05$), Total protein은 숯 3% 및 5% 첨가구에서 대조구에 비하여 유의적으로 낮게 나타났으며($p<0.05$)(Table 1), 반복구 사이에는 유의적인 차는 보이지 않았다.

식세포의 활성 산소 측정

숯 첨가사료를 8주간 투여하면서 어류의 비특이적 면역계 중 세포성 면역을 담당하는 식세포의 활성 산소를 측정하였다. 그 결과, 시험 시작 후 4주째에는 대조구와 첨가 사료 투여구 사이에 유의적인 차이를 보이지 않았지만, 시험 시작 후 8주째의 대조구는 0.3 ± 0.09 , 1% 첨가구는 0.688 ± 0.06 , 3% 첨가구는 0.825 ± 0.08 , 5% 첨가구는 0.275 ± 0.11 로 대조구에 비하여 숯 1%와 3% 첨가 사료 투여구에서 유의적으로 높게 나타났으며(Fig. 2), 반복구 사이에는 유의적인 차는 보이지 않았다.

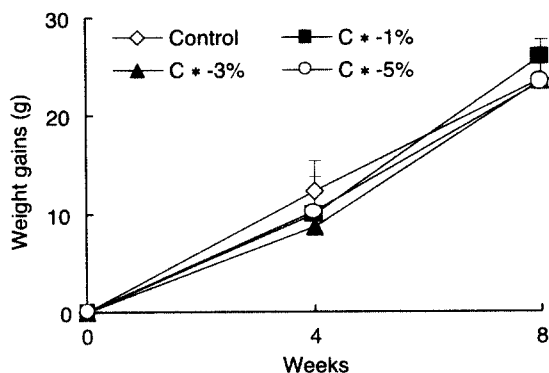


Fig. 1. Changes of the weight gain in the juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed a commercial diet supplemented with 1%, 3%, or 5% charcoal for 8 weeks.

C* , charcoal

Table 1. Blood chemistry of juvenile flounder fed on charcoal supplemented feeds

		GOT ² (U/ℓ)	GPT ³ (U/ℓ)	Cholesterol(mg/dℓ)	Total protein (g/dℓ)	Glucose(mg/dℓ)
0 weeks		32.6±4.76	9.9±3.54	214±12.89	5.7±0.90	18.0±2.41
4 weeks	control	39.4±7.92	12.1±4.48	216.3±6.65	5.4±0.84	16.4±1.06
	1%	44.3±1.41	7.4±2.33	209.1±21.21	5.8±0.11	15.5±0.71
	C* 3%	34.1±3.07	9.2±2.33	209.5±2.12	5.7±0.17	16.5±0.49
	5%	29.0±6.48	9.8±2.39	195.8±32.53	6.0±0.41	13.4±0.64
8 weeks	control	24.9±5.61	7.8±2.56	221.9±10.96 ^b	6.6±0.29 ^b	16.4±0.99
	1%	18.5±2.86	5.7±2.12	224.3±2.62 ^b	5.9±0.31 ^{a*}	22.4±1.14
	C* 3%	28.4±4.89	13.2±3.46	211.3±12.43 ^b	5.5±0.22 ^a	13.2±3.41
	5%	25.5±5.78	10.2±3.36	172.0±2.12 ^a	5.7±0.14 ^a	13.1±1.55

¹ Values (mean±SE of three replications) in the same column not sharing a common superscript are significantly different (P<0.05).

² Glutamic-oxaloacetic acid transaminase

³ Glutamate pyruvate transaminase

C*, charcoal

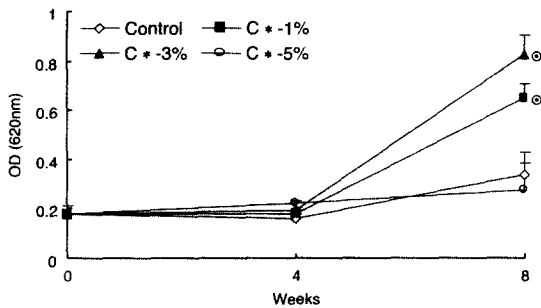


Fig. 2. NBT reduction of macrophage in the head kidney of the juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed a commercial diet supplemented with 1%, 3%, or 5% charcoal for 8 weeks.

C*, charcoal; ◎, significant difference from control, p<0.05

혈청의 라이소자임 활성 조사

숫 첨가 사료를 8주간 투여하면서 어류의 비특이적 면역계 중 체액성 면역의 일종인 라이소자임의 활성을 측정하였다. 그 결과 실험 시작 후 4주째 대조구는 265±17 units/ml, 1% 첨가구는 257±23 units/ml, 3% 첨가구는 280±15 units/ml, 5% 첨가구는 246±18 units/ml로 대조구와 첨가구 사이에 유의적인 차이는 보이지 않았다. 실험 시작 후 8주째의 라이소자임 활성이 4주째에 비하여 모든 실험구에서 높은 경향을

나타냈지만, 대조구는 310±22 units/ml, 1% 첨가구는 302±14 units/ml, 3% 첨가구는 325±10 units/ml, 5% 첨가구는 310±19 units/ml로, 95% 유의수준에서 대조구와 사료첨가구 간에 유의적인 차는 보이지 않았으며(Fig. 3), 반복구 사이에도 유의적인 차는 보이지 않았다.

세균 공격 실험

숫 첨가 사료를 8주간 투여한 다음 병원성 세균에 대한 항병력의 변화를 조사하기 위하여 *E. tarda*를 복강 주사한 후 생존율을 구하였다. 세균 공격 실험 결과, 모든 폐사어에서는 *E. tarda*균이 분리되었다. 그리고 복강 주사 2일째부터 폐사가 나타나기 시작하여 6일 동안 대조구의 생존율은 20%이었지만, 숫 첨가구에서는 높은 생존율을 보였으며, 그 중에서도 숫 3% 첨가구에서 가장 높은 생존율이 나타났다(Fig. 4).

고찰

본 연구에서는 어류 양식에서 숫의 활용 가능성을 검토하고자 숫이 넙치의 성장 및 면역 증강 효과에 미치는 영향을 조사하였다.

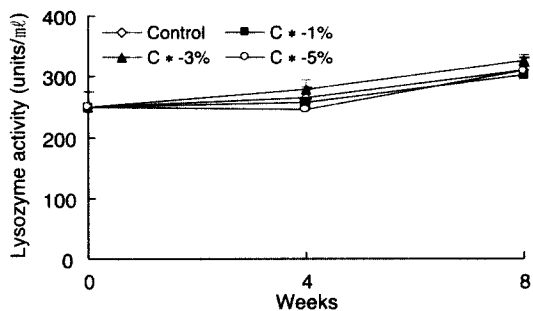


Fig. 3. Lysozyme activity in the serum from the juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed a commercial diet supplemented with 1%, 3%, or 5% charcoal for 8 weeks.

C* , charcoal

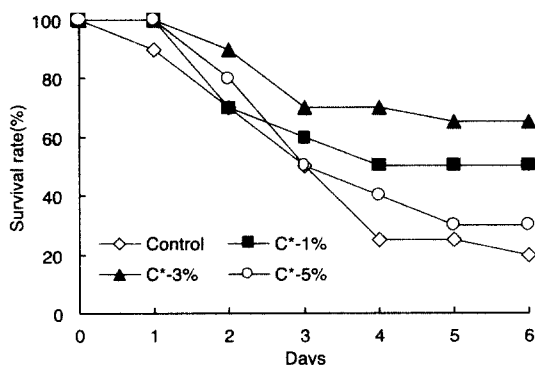


Fig. 4. Survival rate of the juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed a commercial diet supplemented with 1%, 3%, or 5% charcoal for 8 weeks.

C* , charcoal

숯첨가 사료 투여에 따른 어체의 성장을 조사한 결과, 1차 측정(실험 개시 후 4주)에서 유의적인 차이는 없었지만 대조구가 첨가구보다 빠른 성장을 나타내었으며, 최종 측정(실험 개시 후 8주)에서는 1% 숯첨가구에서 가장 빠른 성장과 함께 사료계수 또한 가장 양호하게 나타났다. 1차 측정에서 첨가구의 넙치 성장이 떨어진 것은 숯의 첨가로 인한 먹이에 대한 기호성 저하에 따른 섭식량 감소 때문으로 생각되며, 시간이 경과하면서 첨가구의 사료 섭식량이 증가하며 최종 측정 시 1% 첨가구에서 사료계수가 가장 높게 나타났다. 어류에서 숯의 영양적인

면역에 대한 연구는 아직 이루어지지 않았지만, 숯에 함유되어 있는 미네랄 성분에 대한 연구는 보고된 바가 있다. 그 예로 Jain *et al.*(1994)은 크롬(Cr)이 잉어의 성장에 효과가 있다고 하였으며, Hertz *et al.*(1989)과 Shiao and Chen(1993)은 크롬이 잉어와 틸라피아의 탄수화물의 이용률을 높인다고 하였지만, 육식성 어종인 channel catfish(Ng and Wilson, 1997)와 gilthead sea bream(Fernandez *et al.*, 1999)에서는 크롬이 glucose나 유기물 이용을 개선시키지 못한다는 보고에서 처럼 미네랄 성분의 이용성은 어종에 따라 차이가 있기 때문에 숯의 어체 활용에 대한 연구는 앞으로 더욱 필요할 것으로 생각된다.

숯 첨가 사료 공급 후 혈액 생화학적 변화를 조사한 결과, 사료공급 후 4주까지는 모든 실험구에서 유의적인 차이를 나타내지 않았지만, 8주간 투여하였을 때 cholesterol은 5% 숯 첨가구, total protein은 3%와 5% 숯 첨가구에서 대조구에 비하여 유의적으로 낮게 나타났다. 따라서, 장기간(8주 이상) 투여 시 숯은 어체 내의 지방과 단백질 찌꺼기를 흡착, 배설하여 cholesterol 수치를 저하시킨 것으로 생각되며, 적절한 농도로 적정 기간 투여 시 cholesterol 수치를 저하시켜 생리상태를 개선하는 효과를 나타낼 수 있을 것으로 생각된다.

또한, 숯 첨가 사료 투여가 넙치의 면역능에 미치는 영향을 조사하기 위하여 어류의 비특이적 면역계 중 세포성 면역을 담당하는 식세포의 활성화와 체액성 면역계를 담당하는 라이소자임 활성을 조사하였다.

식세포는 병원체가 침입하여 자극하면 활성 산소(O₂)와 같은 reactive oxygen species (ROS)를 생산하는데, 이 물질들은 강력한 살균 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Ellis, 1999). *in vitro*에서 구기자, 오미자 및 인삼 추출물이 나일틸라피아(*Oreochromis niloticus*) 식세포의 활성화 산소 생성량을 증가시켰고(Shon, 1999), 알로에는 넙치 백혈구의 호흡 폭발능을 증가시켰다(Kim *et al.*, 1999). 그리고 숯에도 미량 함유되어

있는 미네랄의 일종인 크롬을 사료에 첨가하여 6주간 투여하였을 때 대조구인 1540ppb 투여구에 비하여 2340ppb, 4110ppb 투여구에서 식세포의 활성 산소 및 식작용능이 높게 나타났으며 (Gatta *et al.*, 2001), 본 연구에서도 숯 1%와 3% 첨가 사료를 투여한 실험구에서 식세포의 높은 활성이 나타난 것으로 보아 숯에 함유되어 있는 미네랄 성분은 어류의 비특이적 세포성 면역 기능 증강에 중요한 역할을 할 것으로 기대된다.

어류 혈청 중의 라이소자임은 세균 세포벽의 삼투압 작용에 손상을 주어 용균시키며, 라이소자임의 존재 부위와 활성은 어종에 따라 다른 것으로 알려져 있다. 라이소자임은 많은 어류에서 정균 효과가 있으며 (Grinde, 1989), Kim *et al.* (1992)은 넙치의 라이소자임이 *Micrococcus luteus*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens*, *Streptococcus epidermis*에 대하여 높은 정균 효과가 있으며, 실제 생체 내에서는 보체나 식세포 등과 협력하여 훨씬 높은 용균 효과를 보일 것이라고 하였다. Park *et al.* (1996)은 한국산 메기 (*Silurus asotus*)에 β -glucan을 접종하였을 때, Kwon *et al.* (1999)은 구기자를 나일틸라피아에 투여하였을 때, Gatta *et al.* (2001)은 크롬을 사료에 고농도(4110ppb)로 첨가하였을 때 라이소자임 활성이 높게 나타난다고 하였으나, 본 실험에서는 숯 첨가 사료 투여 후 라이소자임 활성에서는 변화가 나타나지 않아 어류의 비특이적 체액성 면역기능의 증강 효과는 확인하지 못하였다.

그러나, 어병세균인 *E. tarda*로 공격 실험한 결과, 숯 3% 첨가구에서 가장 높은 생존율을 나타내었으며, 이것은 식세포의 활성 산소가 증가한 시험구와 일치하므로 식세포의 활성이 병원성 세균에 대한 방어에 중요한 역할을 한 것으로 생각된다. Lall *et al.* (1985)은 대서양연어의 사료에 요오드(I)와 불소(F)를 첨가하였을 때 세균성 신장병의 감염율이 떨어졌다고 보고하였으며, Kiron *et al.* (1993)은 아연(Zn)을 무지개송어의 먹이에 첨가하였을 때 natural-killer cells의 cytotox-

icity가 대조구의 5.07%에 비하여 첨가구에서 16.96%로 높게 나타났다고 하였다. 그리고 숯에도 함유되어 있는 칼슘을 Scarpa *et al.* (1992)은 channel catfish의 사료에 첨가하여 투여한 후 *Aeromonas hydrophila*를 복강주사하였을 때 칼슘을 결핍시킨 시험구(사료의 0.02%)에서는 50%, 칼슘을 첨가한 시험구(사료의 2.5%)에서는 16.7%의 폐사가 나타났다고 보고하였으며, 이것은 숯첨가 사료투여구에서 *E. tarda*균에 대한 저항력이 높은 것과 같은 결과를 나타내었다.

본 연구의 결과에서처럼 성장 및 면역능 시험 결과, 성장에서는 1% 숯첨가구, 면역능 및 방어능에서는 3% 숯첨가구에서 가장 우수하게 나타난 것으로 보아 숯의 농도 및 적절한 투여 기간에 대한 연구가 깊이 있게 이루어진다면 숯 첨가에 의한 넙치 성장 및 병원성 세균에 대한 저항력 향상에 효과가 있을 것으로 생각된다.

요약

숯첨가 사료 투여가 넙치에 미치는 영향을 알기 위하여, 넙치에 숯 1%, 3%, 5% 첨가사료를 8주간 투여하면서 성장, 혈액성분, 비특이적면역능을 분석하였으며 어병세균인 *Edwardsiella tarda* 균의 공격 시험에 대한 방어능을 조사하였다.

숯 첨가 사료 투여는 넙치의 성장과 라이소자임 활성에서는 유의적인 차이를 나타내지 못했지만, 5% 숯첨가구에서 혈액 중의 total protein과 cholesterol의 농도가 대조구에 비하여 낮게 나타났다. 그리고, 숯 3% 첨가구에서 두신 식세포의 활성 및 병원성 세균인 *E. tarda*에 대한 방어능도 가장 높게 나타났다.

참고 문헌

- Duncan, D. B. : Multiple-range and multiple F tests. *Biometrics*, 11 : 1-42, 1955.
- Ellis, A. E. : Immunity to bacteria in fish. *Fish &*

- Shellfish Immunol., 9 : 291-308, 1999.
- Fernandez, F., Miquel, A. G., Martinez, R., Serra, E., Guinea, J., Narbaiza, F. J., Caseras, A. and Banante, I. V. : Dietary chromium oxide does not affect the utilization of organic compounds but can alter the utilization of mineral salts in gilthead sea bream *Sparus aurata*. J. of Nutrition, 129 : 1053-1059, 1999.
- Gatta, P. P., Thompson, K. D., Smullen, R., Piva, A., Test, S. and Adams, A. : Dietary organic chromium supplementation and its effect on the immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish & Shellfish Immunol., 11 : 371-382, 2001.
- Grinde, B. : Lysozyme from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, as an antibacterial agent against fish pathogens. J. Fish Dis., 12 : 95-104, 1989.
- Hertz, Y., Madar, Z., Hefner, B. and Gertler, A. : Glucose metabolism in the common carp (*Cyprinus carpio* L.) : the effects of cobalt and chromium. Aquaculture, 76 : 255-267, 1989.
- Jain, K. K., Shinha, A., Srivastava, P. P. and Berendra, D. K. : Chromium an efficient growth enhancer in Indian major carp, *Labeo rohita*. Aquaculture in the Tropics, 9 : 49-54, 1994.
- Kim, J. W., Park, S. I. and Chun, S. K. : Purification and antibacterial effect of lysozyme from flounder, *Paralichthys olivaceus*. J. Fish Pathol., 5 : 87-92, 1992. (in Korean)
- Kim, K. H., Hwang, Y. J. and Bai, S. C. : In vitro effect of aloe on the respiratory burst activity of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) leucocytes. J. Fish Pathol., 12 : 1-6, 1999.
- Kiron, V., Gunji, A., Okamoto, N., Satoh, S., Ikeda, Y. and Watanabe, T. : Dietary nutrient dependent variations on natural-killer activity of the leucocytes of rainbow trout. Gyobyo kenkyu, 28 : 71-76, 1993.
- Kwon, M. G., Kim, Y. C., Shon, Y. C. and Park, S. I. : The dietary effects of kugija, *Lycium chinense*, on immune responses of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, to *Edwardsiella tarda*. J. Fish Pathol., 12 : 73-81, 1999. (in Korean)
- Lall, S. P., Paterson, W. D., Hines, J. A. and Adams, N. J. : Control of bacterial kidney disease in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., by dietary modification. J. Fish Diseases, 8 : 113-124, 1985.
- Matuso, K. and Miyazono, I. : The influence of long-term administration of peptidoglycan on disease resistance and growth of juvenile rainbow trout. Nippon Suisan gakkashi, 59 : 1377-1379, 1993.
- Nakagawa, H., Kasahara, S., Uno, E., Minami, T. and Akira, K. : Effect of *Chlorella-extract* supplement in diet on resisting power against disease of cultures ayu. Aquaculture, 29 : 109-116, 1981.
- Ng, W. and Wilson, R. P. : Chromic oxide inclusion in the diet does not affect glucose utilization or chromium retention by channel catfish, *Ictalurus punctatus*. J. of Nutrition, 127 : 2357-2362, 1997.
- Park, S. W., Kim, Y. G. and Choi, D. L. : Increase in phagocytic activity of peripheral neutrophil and lysozyme activity of blood serum in Korea catfish (*Silurus asotus*) intraperitoneally injected with β -glucan. J. Fish Pathol., 9 : 87-93, 1996. (in Korean)
- Parry, R. M., Chandau, R. C. and Shahani, R. M. : A rapid and sensitive assay of muramidase. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 119 : 384-386, 1965.
- Satoch, K., Nakagawa, H. and Kasahara, S. : Effect

- of ulva meal supplementation on disease resistance of red seabream. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53 : 1115-1120, 1987.
- Scarpa, J., Gatlin, D. M. and Lewis, D. H. : Effects of dietary zinc and calcium on select immune functions of channel catfish. *J. of Aquatic Animal Health*, 4 : 24-31, 1992.
- Shiau, S. Y. and Chen, M. J. : Carbohydrate utilization by tilapia(*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) as influenced by different chromium sources. *J. of Nutrition*, 123 : 1747-1753, 1993.
- Shon, Y. C. : Effects of medical herb stuff extracts and mitogens on the activation of kidney macrophage in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Master thesis, Pukyong National University, Korea, pp63, 1999.
- SPSS Inc. : SPSS Base 7.5 for Window, SPSS Inc., 444N. Michigan Avenue, Chicago, IL, 60611, 1997.
- 문태석, 김봉석, 하재이 : 어류 양식장 질병 예방에 관한 연구. 동해수산연구소 사업보고서, 231-241, 1998.
- 방종득, 류호영, 이 주, 김봉석 : 어류 양식장 질병 예방에 관한 연구. 동해수산연구소 사업보고서, 203-219, 1997.
- 水野芳嗣 : 現場におけるヒラメの疾病對策. *한국어병학회지*, 6 : 219-231, 1993.