

넙치, *Paralichthys olivaceus*의 수온 자극 스트레스에 대한 사료첨가제 투여 효과

권문경[†] · 박상언 · 방종득 · 조병열* · 이상민** · 박수일***

국립수산과학원 동해수산연구소, *포항지방해양수산청 영덕수산기술관리소,

강릉대학교 해양생명공학부, *부경대학교 수산생명의학과

The effects of supplementary diets on the water temperature stress in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*

Mun-Gyeong Kwon[†], Sang Un Park, Jong Duek Bang, Byong-Youl Cho*,
Sang-Min Lee** and Soo-Il Park***

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

*Yeong-duk Fisheries Technology Institute, Pohang Regional Maritime Affairs and Fisheries office

**Faculty of Marine Bioscience & Technology, Kangnung National University

***Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University

The effect of each dietary supplements (Undaria 5%, Undaria 10%, Obosan 0.5%, Wasabi leaf 2%, Wasabi stem 2%) on the water temperature fluctuation in juvenile olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) was investigated. The response to stress was assessed in terms of effects on haematological and immunological, and resistance against *Edwardsiella tarda* infection. Plasma glucose and cortisol levels were significantly lower in 5% undaria and 2% wasabi leaf supplement groups than the controls after the first change of water temperature ($P < 0.05$). The plasma lysozyme activities and the survival rates from *E. tarda* infection were significantly higher in the 5% undaria supplement groups than the control ($P < 0.05$). These results suggest that the 5% undaria supplement seems to be contributable to the increased disease resistance on olive flounder.

Key word: Water temperature, Stress, Supplemented diets, Immunology, Haematology

우리 나라의 고밀도 집약적 어류양식법은 양식장 환경을 악화시킬 뿐만 아니라 여러 가지 스트레스 요인으로 작용하여 각종 질병들의 발생에 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며, 동해안 연안 해역에서 연중 출현하는 냉수대 또는 고수온 등의 수온 변화는 어류의 생리 기능에 심각한 장애를 줄 정도로 큰 스트레스로 작용한다 (이 등, 2002).

어류가 스트레스에 노출 시 나타나는 생리반응은 1차, 2차, 3차 반응으로 구분할 수 있다 (Mazeaud *et al.*, 1977; Wedemeyer and McLeay,

1981). 1차 반응은 내분비계의 활성을 증가시켜 catecholamine과 glucocorticoid의 분비를 촉진하여 2차 반응을 유도하며, 2차 반응에서는 신진대사와 혈액학적 성상에 변화가 나타난다 (Barton and Iwama, 1991). 또한, 2차 반응은 3차 반응을 유도하여 어체의 생리기능 악화 (Thompson *et al.*, 1993), 면역능 억제를 유발하여 질병에 대한 저항력을 저하시킨다 (Pickering, 1989). 스트레스는 어류의 비특이적 면역계에 영향을 미쳐 *in vitro*에서 식세포의 호흡폭발능 (Stave and Robertson, 1985), *in vivo*에서 식세포의 식작용능

[†]Corresponding author : Mun-Gyeong Kwon, Tel : 033-661-8504,
Fax : 033-661-8514, E-mail : shellk@hanmail.net

(Ainsworth *et al.*, 1991)을 억제하였으며, 특이적 면역계의 림프구의 항체 생성 및 mitogen 반응을 저하시켰다 (Ellsaesser and Clem, 1986; Kaattari and Tripp, 1987). 스트레스 자극에 의해 증가된 콜티졸의 농도는 혈구분포에 영향을 미쳐 순환백혈구수를 감소시키고(Pickering and Pottinger, 1987), 백혈구 구성에 영향을 미쳐 림프구 감소증과 호중구증가증을 유발하게 된다 (Pickering *et al.*, 1982; Ellsaesser and Clem, 1987).

그러나, 최근에는 어류의 생리상태를 개선하기 위하여 사료에 유용물질을 첨가하는 연구가 이루어지고 있으며, 특히 스트레스에 의한 어류의 생리 악화 상태를 개선하기 위해서 비타민 C의 투여 농도를 높이는 연구도 이루어지고 있다 (Jaffa, 1989; Hardie *et al.*, 1991).

본 연구에서는 수온 스트레스에 의한 면역 저하 상태를 개선시키기 위하여 사료첨가제로서 어류의 병원성 미생물의 증식을 저해하는 효과가 있다고 알려진 고추냉이 (Jang *et al.*, 1992; Shin *et al.*, 2000)의 잎, 줄기, 미역 분말 및 어보산 등을 투여하여 넙치의 항병력 향상에 미치는 효과를 조사 연구하였다.

재료 및 방법

실험사료

실험사료의 기본조성은 Lee *et al.* (2002)에 따라 단백질원으로는 북양어분을 사용하여 함량이 46% 전후가 되도록 하였으며, 탄수화물원으로는 소맥분과 알파전분, 지질원으로는 오징어 간유를 사용하였다. 그리고, 미역 분말, 어보산 및 고추냉이의 첨가효과를 조사하기 위하여 건조 미역분말 5% 및 10%, 어보산 0.5%, 고추냉이의 잎과 줄기를 각각 2%씩 첨가하였고, 대조사료에는 소맥분을 첨가하여 실험사료를 설계하였다 (Table 1). 설계된 원료들을 혼합한 후 원료 100 g 당 물 40 g을 첨가하여 펠렛 제조기로 실험사료를 성형하였으며 실온에서 24시간 건조

한 다음 -30°C에 보관하면서, 60일간 하루에 2회 반복 투여하였다.

실험어 및 사육관리

실험어는 260 L 용량의 수조에 평균 전중 8.4 g의 넙치 치어를 30마리씩 수용하였으며, 수온 18°C인 사육수를 분당 4 L로 유수되도록 조정하였다. 모든 실험은 3반복으로 수행하였다.

수온스트레스 시험

모든 실험어에 2개월간 실험사료를 투여한 후 수온조절장치로 분당 0.4°C를 25분간 하강 또는 상승시켜 10°C의 변화를 주었으며, 스트레스 기간에도 같은 실험사료를 투여하였다. 수온스트레스는 1, 2, 3차에 걸쳐서 주었으며 1차 수온 자극은 18°C에 사육 중이던 실험어를 8°C, 2차 수온 자극은 1차 수온 자극 후 8°C에 사육 중이던 실험어를 18°C, 3차 수온 자극은 2차 수온 자극 후 18°C에 사육 중이던 실험어를 8°C로 수온 자극을 준 후 각각의 수온에서 1주일간 사육하면서 각종 지표 측정에 사용하였다.

혈액의 생화학적 분석

넙치 사육수의 수온 자극 후 0.04일 (5시간), 1일, 3일, 7일째 미부 정맥에서 헤파린 처리된 주사기로 채혈하여 혈액 생화학적 분석을 하였다. 헤마토크리트치는 capillary tube에 혈액을 채운 후 8,000 rpm으로 5분간 원심 분리하여 측정하였으며, 혈장의 글루코스, 총콜레스테롤 및 GOT (glutamic-oxaloacetic acid transaminase) 농도는 혈액자동분석기 (Boehringer Mannheim Reflotron, Germany)를 사용하여 분석하였다.

혈액 cortisol 분석

혈중 cortisol 농도는 Lou *et al.* (1984)의 방법에 따라 Rabbit anti-Cortisol-3 -CMO -BSA 항체 (Cosmo-Bio Co. Ltd., Tokyo, Japan), standard cortisol (Steraloids Inc., Wilton, NH, USA) 및 방사선

Table 1. Ingredients and proximate analysis(%) of the diets

| | Diets | | | | | |
|--|---------|---------------|----------------|-----------------------------|-------------------|-------------------|
| | Control | Undaria 5% | Undaria 10% | Obosan ⁴ 0.5% | Wasabi leaf 2% | Wasabi stem 2% |
| <i>Ingredients(g/100g)</i> | | | | | | |
| White fish meal | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 |
| Potato starch | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Wheat flour | 22.5 | 17.5 | 12.5 | 22.0 | 20.5 | 20.5 |
| Squid liver oil | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Wasabi leaf | | | | | 2 | |
| Wasabi stem | | | | | | 2 |
| Undaria powder | | 5 | 10 | | | |
| Obosan | | | | 0.5 | | |
| Vitamin mix. ¹ | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Mineral mix. ² | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Choline salt | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| <i>Proximate analysis (% dry matter basis)</i> | | | | | | |
| Crude protein | 45.6 | 45.5 | 46.5 | 45.0 | 45.8 | 45.2 |
| Crude lipid | 7.5 | 7.9 | 7.7 | 7.6 | 7.8 | 7.8 |
| n-3HUFA ³ | 1.4 | 1.4 | 1.4 | 1.4 | 1.4 | 1.47 |

¹ Vitamin premix contained the following amount which were diluted in cellulose (g/kg premix): L-ascorbic acid, 121.2; DL-tocopheryl acetate, 18.8; thiamin hydrochloride, 2.7; riboflavin, 9.1; pyridoxine hydrochloride, 1.8; niacin, 36.4; Ca-D-pantothenate, 12.7; myo-inositol, 181.8; D-biotin, 0.27; folic acid, 0.68; p-aminobenzoic acid, 18.2; menadione, 1.8; retinyl acetate, 0.73; cholecalciferol, 0.003; cyanocobalamin, 0.0031.

² Mineral premix contained the following ingredients (g/kg premix): MgSO₄ · 7H₂O, 80.0; NaH₂PO₄ · 2H₂O, 370.0; KCl, 130.0; Ferric citrate, 40.0; ZnSO₄ · 7H₂O, 20.0; Ca-lactate, 356.5; CuCl₂ · 2H₂O, 0.2; AlCl₃ · 6H₂O, 0.15; KI, 0.15; Na₂Se₂O₃, 0.01; MnSO₄ · H₂O, 2.0; CoCl₂ · 6H₂O, 1.0.

³ Highly unsaturated fatty acids (C ≥ 20).

⁴ Provided by Sung-Am Co., Seoul, Korea.

표지 [1,2,6,7-³H]-Cortisol (Amersham Life Science, England)를 사용하여 국립수산물품질관리원 수산생명물질정보센터에서 방사선면역측정법 (radioimmunoassay)으로 측정하였다.

Cortisol의 최소 검출량은 22.5 pg/ml 이었으며, intra-assay와 inter-assay 사이의 변동계수는 각각 2.8%(n=5)와 8.1%(n=6)이었다. 11-deoxycortisol, cortisone 및 corticosterone과 cortisol 항체의 교차율은 각각 16.3%, 2.9% 및 3.3%이었으며, andro-

gens, estrogens 및 progestins는 0.01%이하의 교차율을 나타내었다.

혈장의 라이소자임 활성 조사

혈장의 라이소자임 활성 분석은 수은 자극 후 0.04일 (5시간), 1일, 3일, 7일째 미부 정맥에서 헤파린 처리된 주사기로 채혈한 후, Parry *et al.* (1965)의 turbidimetric method를 이용하여 측정하였다. *Micrococcus lysodeikticus* (0.2 mg/ml) 현

탁액 (pH 6.2) 950 μ l와 혈청 50 μ l를 혼합하여 25°C에 30초 및 4분 30초간 반응시킨 후 530nm에서 흡광도를 측정하였다. lysozyme activity는 units/ml로 나타내었으며, 1 unit는 흡광도 값이 0.001/min 감소한 양을 기준으로 하였다.

세균공격실험

첨가제 투여가 수온 스트레스를 받은 넙치의 병원성 세균에 대한 저항력에 미치는 영향을 조사하기 위하여 어류 병원성 세균인 *Edwardsiella tarda* FSW910410을 공격실험에 사용하였다. 시험 균주는 TSA (tryptic soy agar) 배지에서 27°C, 24시간 배양한 후 집균한 다음 멸균생리식염수에 1×10^8 CFU/ml (OD 600nm=0.3)이 되도록 현탁시켜 넙치의 복강에 0.1 ml씩 주사하였다.

통계처리

결과의 통계처리는 ANOVA-test를 실시하여 Duncan's multiple range test (Duncan, 1955)로 평균간의 유의성을 SPSS Version 10 (SPSS, Michigan Avenue, Chicago, IL, USA, 1997) program을 사용하여 95%수준에서 검정하였다.

결 과

사료 첨가제가 어류의 수온 변동 자극에 미치

는 효과를 분석하기 위하여 혈액 중 몇 가지 생리학적 지표의 변화를 조사하였다. 혈중의 글루코스 농도 (Fig. 1)는 1차 수온 변동 후 5시간째 모든 시험구는 48.3~59.3 g/dL로 높은 농도를 나타낸 후 1일째 급격히 하강하였으며, 미역 5% 첨가구는 대조구에 비하여 유의하게 낮게 나타났다 ($P < 0.05$). 8°C에서 18°C로 상승시킨 2차 수온 변동 후 5시간째는 1차 수온 변동 5시간째보다 낮은 값을 나타내었으며, 대조구에 비하여 고추냉이 잎 2% 첨가구에서 유의하게 더 낮게 나타났다 ($P < 0.05$). 3차 수온 변동 후 5시간째는 모든 실험구에서 2차 수온 변동 5시간째보다 낮은 값을 나타내었으며, 이후 안정된 경향을 보였다.

수온 변동 자극 이후 혈액 중의 총콜레스테롤 농도 (Fig. 2)와 헤마토크리트를 분석한 결과 (Fig. 3), 수온충격에 대해 첨가제 종류에 따른 유의한 차이는 보이지 않았다.

수온 변동 자극 후 콜티졸 농도를 측정한 결과 (Fig. 4), 1차 수온 변동 후 5시간째 급격히 증가하여 대조구는 23.4 ng/ml로 미역 5%, 고추냉이 잎 2% 첨가구의 9.5 ng/ml에 비하여 유의하게 높게 나타났다 ($P < 0.05$). 그리고, 1일째부터 급격히 낮아져 7일째는 스트레스 이전과 같은 수준의 값을 나타내었다. 2차 수온 변동 자극을 준 결과, 1차 수온 변동 5시간째에 비하여

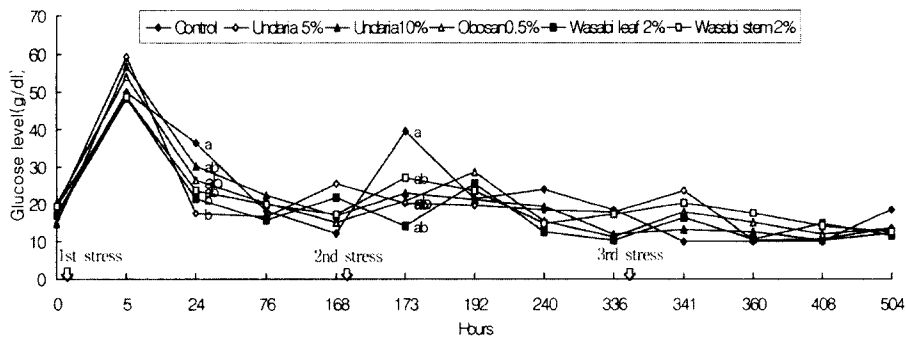


Fig. 1. Changes of plasma glucose under water temperature stress in the juvenile olive flounder fed on each supplemented diets. Alphabetic superscripts indicate statistics significances between treatments ($P < 0.05$). The 1st stress; water temperature changed 18°C to 8°C, The 2nd stress; water temperature changed 8°C to 18°C, The 3rd stress; water temperature changed 18°C to 8°C.

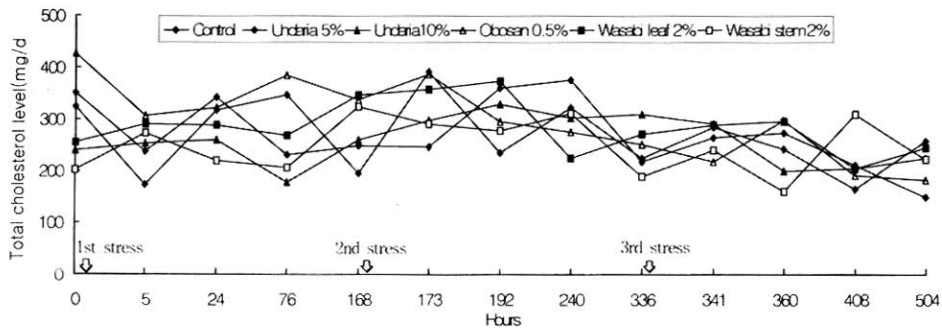


Fig. 2. Changes of total plasma cholesterol under water temperature stress in the juvenile olive flounder fed on each supplemented diets. The 1st stress; water temperature changed 18°C to 8°C, The 2nd stress; water temperature changed 8°C to 18°C, The 3rd stress; water temperature changed 18°C to 8°C.

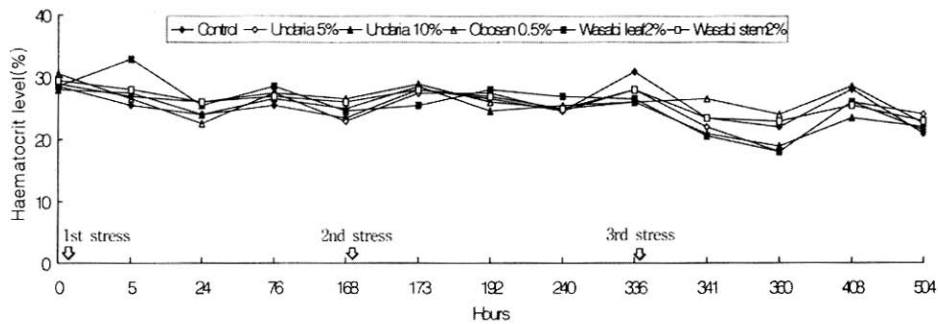


Fig. 3. Changes of haematocrits under water temperature stress in the juvenile olive flounder fed on each supplemented diets. The 1st stress; water temperature changed 18°C to 8°C, The 2nd stress; water temperature changed 8°C to 18°C, The 3rd stress; water temperature changed 18°C to 8°C.

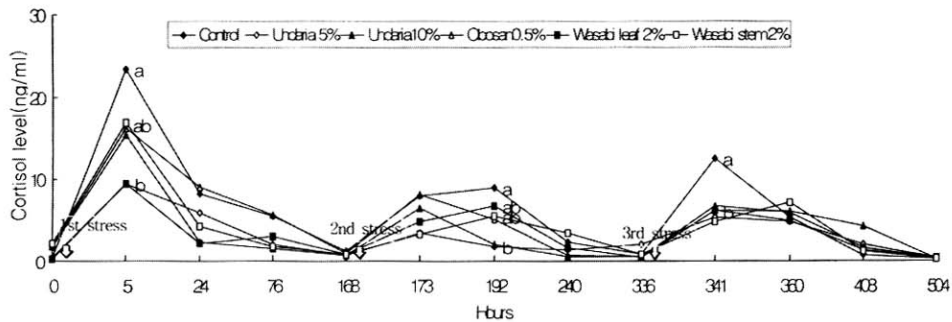


Fig. 4. Changes of plasma cortisol under water temperature stress in the juvenile olive flounder fed on supplemented diets. Alphabetic superscripts indicate statistic significances between treatments(P<0.05). The 1st stress; water temperature changed 18°C to 8°C, The 2nd stress; water temperature changed 8°C to 18°C, The 3rd stress; water temperature changed 18°C to 8°C.

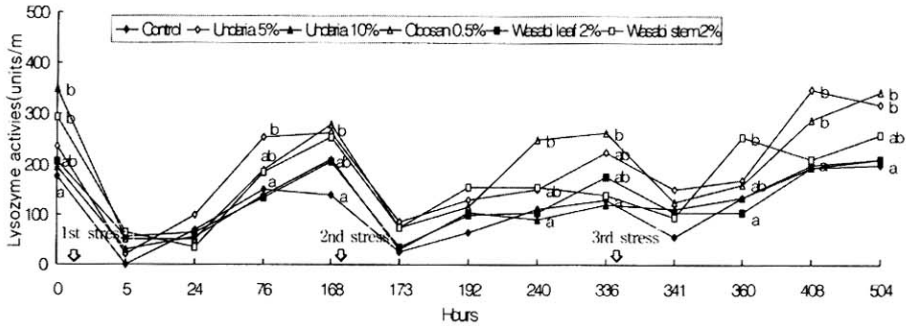


Fig. 5. Changes of plasma lysozyme activity under water temperature stress in the juvenile olive flounder fed on supplemented diets. Alphabetic superscripts indicate statistic significances between treatments($P<0.05$). The 1st stress; water temperature changed 18°C to 8°C, The 2nd stress; water temperature changed 8°C to 18°C, The 3rd stress; water temperature changed 18°C to 8°C.

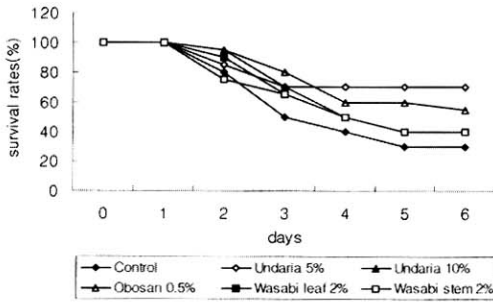


Fig. 6. Survival rates of juvenile flounder challenged with *Edwardsiella tarda* under water temperature stress in the juvenile flounder fed on supplemented diets.

사료첨가제를 2개월간 투여 후, 3회에 걸쳐 수온 변동을 준 넙치에 어병세균인 *Edwardsiella tarda* FSW910410을 1.0×10^7 CFU/fish를 복강주사 하여 6일간 관찰하였다(Fig. 6). 공격 실험 결과, 대조구에서는 복강 주사 2일째부터 폐사가 나타나기 시작하여 6일 동안 30%의 생존율을 나타내었지만, 미역 5% 첨가구에서는 70%, 어보산 0.5% 첨가구에서 55%의 높은 생존율을 나타내었다.

고찰

콜티졸의 농도는 낮게 나타났으며, 미역 5%와 미역 10% 첨가구는 대조구에 비하여 유의하게 낮게 나타난 후 계속 안정된 값을 나타내었다. 3차 수온 변동 후의 콜티졸 농도는 1차 수온 변동 시보다 낮은 값을 나타내었다.

수온 스트레스 후 어류의 비특이적 면역계 중 체액성 면역을 담당하는 라이소자임 활성을 분석한 결과(Fig. 5), 1차와 2차 수온 변동 자극을 준 후 5시간 쯤 활성이 가장 낮았으며, 자극 후 3일째의 미역 5% 첨가구가 다른 실험구에 비해 유의하게 높은 활성을 나타내었으며 ($P<0.05$), 3차 수온 자극 후에는 미역 5% 첨가구와 어보산 0.5% 첨가구가 다른 실험구에 비하여 유의하게 높은 활성을 나타냄을 알 수 있었다 ($P<0.05$).

척추동물에서 스트레스는 외부의 자극에 의하여 어떤 생물체의 항상성 유지가 방해받는 것을 의미하며, 스트레스 인자에 의해 동물의 생리 상태가 변하는 것을 스트레스 반응이라고 한다. 스트레스 반응은 특정의 스트레스 인자에 대해서 어종 간에는 물론 같은 어종 내에서도 계절, 발달 단계에 따라 매우 다양하다 (Reddy and Leatherland, 1998).

모든 척추동물은 주어진 환경의 변화를 생리학적 범위 내에서 조절하여 일정한 수준의 혈액 성상을 유지하려고 하며, 환경의 변화에 대한 저항성의 상한선과 하한선을 넘으면 폐사하게 되지만 (Reddy and Leatherland, 1998), 양식장 환경에서는 수질상태, 과밀식, 수온변화, han-

dling, 병원체 등 많은 스트레스 인자가 존재하여 어류의 항상성 유지를 방해한다.

생체의 스트레스 반응 중 혈액의 글루코스는 측정이 용이하고, 2차 스트레스 반응의 가장 대표적인 지표 (Wedemeyer *et al.*, 1990)로서 혈당 증가 시 3차 스트레스 반응인 면역능 저하를 유도한다.

본 실험에서 18°C에 사육 중이던 넙치에 수온을 10°C하강하여 8°C에서 사육을 시작한 5시간째 모든 실험구에서 글루코스 농도가 증가한 이후 점차 감소하여 수온 스트레스에 대하여 넙치가 점차적으로 적응한 것으로 생각된다. 이후 2차 수온 변동 1일째 미역 5% 첨가구에서 대조구에 비하여 유의하게 낮게 나타나, 미역 5% 첨가는 수온스트레스에 의한 3차 스트레스 반응인 면역능 저하를 완화시킬 수 있을 것으로 생각된다. 그리고, 3차 수온 변동은 1차 수온 변동 후보다 글루코스 농도가 안정적으로 나타나 수온 변화에 대하여 1차 수온 변동보다 어류의 생리학적인 면에서 영향이 적은 것으로 생각되며, 점차적으로 적응하는 것을 알 수 있다.

스트레스 실험은 대부분 내분비계의 반응으로 호르몬 분비와 신진대사의 변화를 측정하였다 (Reddy and Leatherland, 1998).

스트레스 반응은 콜티졸 농도를 증가시키고 그 부작용으로 면역억제를 유도하여 비특이적 면역계의 라이소자임과 보체에 의한 혈청 살균능과 식세포와 다른 백혈구에 의한 식작용능을 저하시켰다 (Wedemeyer, 1997). 예로 잉어를 저산소 기아, 고염분에 노출 시 혈청 중의 살균능이 감소하였으며 (Hajji *et al.*, 1990), 무지개송어는 수송 후 24시간 동안 라이소자임 활성이 떨어졌다 (Moeck and Peters, 1990). 본 실험에서도 1차 수온 변동 5시간째 콜티졸 농도가 급격히 증가함과 동시에 라이소자임 활성은 급격히 저하하였다. 그리고, 모든 시험구에서 3차 수온 변동 0.04일 째는 1차 수온 변동 5시간째보다 콜티졸 농도가 낮게 나타났으며, 같은 시기에 라이소자임 활성은 1차 수온 변동 시보다 높게 나

타났다. 또한, 3차 수온 변동 5시간째 콜티졸 농도는 미역 5% 첨가구와 어보산 0.5% 첨가 사료투여구는 대조구에 비하여 유의하게 낮게 나타났으며, 라이소자임 활성은 유의하게 높게 나타나 미역 5% 첨가와 어보산 0.5% 첨가는 스트레스에 대해서 어류가 항상성을 유지하는데 좋은 영향을 주어 방어능 향상에 도움을 줄 것으로 기대된다.

본 실험에서 사료첨가제를 2개월간 투여 후 3차에 걸쳐 수온 스트레스를 가한 넙치에 어병세균인 *E. tarda*로 세균 공격 시험을 한 결과, 대조구에서는 70%의 폐사율을 나타내었으나, 스트레스 상태에서 낮은 콜티졸 농도와 높은 라이소자임이 활성을 나타낸 미역 5% 첨가구와 어보산 0.5% 첨가구에서는 생존율이 높게 나타났다. 스트레스에 의하여 콜티졸 농도 증가 시 Pickering and Duston (1983)은 brown trout (*Salmo trutta*)이 곰팡이성 질병 감염, Pickering and Pottinger (1989)은 brown trout (*S. trutta*)이 세균성 질병의 감염에 대한 감수성 높아졌다고 하였고, Woo *et al.* (1987)은 무지개송어에 콜티졸을 주사하였을 때 기생충인 *Cryptobia salmositica*의 감염에 대한 감수성이 높아지고 대조구에 비하여 항체가 낮게 나타났다고 하였다.

수온 급변에 의한 어류의 면역능 저하로 질병에 대한 감수성이 증가된 시기에 이와 같은 첨가제를 투여함으로써 질병에 대한 방어능을 높일 수 있을 것으로 기대되며, 최적의 투여기간과 투여시기에 대한 연구는 앞으로 이루어져야 된다고 생각한다.

요 약

본 연구는 넙치의 수온 스트레스에 대한 사료첨가제 (미역 5%, 미역 10%, 어보산 0.5%, 고추냉이 잎 2%, 고추냉이 줄기 2%)의 영향을 혈액학적, 면역학적 측면과 *Edwardsiella tarda*를 사용하여 질병에 대한 저항성으로서 평가하였다. 혈장의 글루코스와 콜티졸 농도는 1차 수온 변

동 후 대조구에 비하여 미역 5%와 고추냉이잎 2% 첨가구에서 유의적으로 낮게 나타났다($P<0.05$). 1차 수온 변동 후 혈장 라이소자임 활성과 *E. tarda*의 공격 시험 후 생존율은 미역 5% 첨가구에서 대조구에 비하여 유의적으로 높게 나타났다($P<0.05$). 본 실험 결과 미역 5% 첨가 사료 투여는 넙치의 스트레스 상태에서 질병 감염에 대한 저항성을 높일 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Ainsworth, A.J., Dexiang, C. and Waterstrat, P.R. : High physiological concentrations of cortisol in vivo can initiate phagocyte suppression. *J. Aquat. Anim. Health*, 3 : 41-47, 1991.
- Barton, B.B. and Iwama, G.K. : Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases*, 1 : 3-26, 1991.
- Duncan, D.B. : Multiple-range and multiple F tests. *Biometrics*, 11 : 1-42, 1955.
- Ellsaesser, C.E. and Clem, L.W. : Haematological and immunological changes in channel catfish stressed by handling and transport. *J. Fish Biol.*, 28 : 511-521, 1986.
- Ellsaesser, C.E. and Clem, L.W. : Cortisol induced haematologic and immunologic changes in channel catfish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 87A : 405-408, 1987.
- Hajii, N., Sugita, H., Ishii, S. and Deguchi, Y. : Serum bactericidal activity of carp(*Cyprinus carpio*) under supposed stressful rearing conditions. *Bull. Coll. Agr. Vet. Med.*, 47 : 50-54, 1990.
- Hardie, L.J., Fletcher, T.C. and Secombes, C.J. : The effect of dietary vitamin C on the immune response of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 95 : 201-214, 1991.
- Jaffa, M. : Vitamin C can curb those stress associated losses. *Fish Farmer*, November/ December, 12 : 18-19, 1989.
- Jang, S.I., Jo, J.Y. and Lee, J.S. : Effects of vitamins and glycyrrhizin added to oxidized diets on the growth and on the resistance to *Edwardsiella* infection of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *J. Aquacult.*, 5 : 143-155, 1992.
- Kattari, S.L. and Tripp, R.A. : Cellular mechanisms of glucocorticoid immunosuppression in salmon. *J. Fish Biol.*, 31A : 129-132, 1987.
- Lee, S. M., Park, C.S. and Bang, J.C. : Dietary protein requirement of young Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* fed isocaloric diets. *Fisheries Science*, 68 : 158-164, 2002.
- Mazeaud, M.M., Mazeaud, F. and Donaldson, E.M. : Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 106 : 201-212, 1977.
- Moeck, A. and Peters, G. : Lysozyme activity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), stressed by handling, transport, and water pollution. *J. Fish Biol.*, 37 : 873-885, 1990.
- 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.
- Pickering, A.D. and Duston, J. : Administration of cortisol to brown trout, *Salmo trutta* L. and its effects on the susceptibility to *Saprolegnia* infection and furunculosis. *J. Fish Biol.*, 21 : 163-175, 1983.
- Pickering, A.D. and Pottinger, T.G. : Crowding produces prolonged leucopenia in salmonid fish. *J. Fish Biol.*, 30 : 701-712, 1987.

- Pickering, A.D. and Pottinger, T.G. : Stress responses and diseases resistance in salmonid fish: effects of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish Physiol. Biochem.*, 7 : 253-258, 1989.
- Pickering, A.D., Pottinger, T.G. and Christie, P. : Recovery of the brown trout, *Salmo trutta* L., from acute handling stress: a time course study. *J. Fish Biol.*, 20 : 229-244, 1982.
- Pickering, A.D. : Stress responses and disease resistance in farmed fish. In: *Aqua Nor 87*, conferences 2 and 3, Trondheim, Norway, 35-49, 1989.
- Ready, P.K. and Leatherland, J.F. : *Fish Diseases and Disorders*, 2 : 279-301, 1998.
- Shin I.S., Masuda, H. and Kinae, N. : Inhibitory effect of Sawa-wasabi (*Wasabia japonica*) on the growth of fish pathogenic bacteria. *J. East Coastal Research*, 11 : 65-74, 2000.
- SPSS Inc. : *SPSS Base 7.5 for Window*, SPSS Inc., 444N. Michigan Avenue, Chicago, IL, 6061, 1997.
- Stave, J.W. and Roberson, B.S. : Hydrocortisone suppresses the chemiluminescent response of striped bass phagocytes. *Dev. Comp. Immunol.*, 9 : 77-84, 1985.
- Thompson, I., White, A., Fletcher, T.C., Houlihan, D.F. and Secombes, C.J. : The effect of stress on the immune response of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets containing different amounts of vitamin C. *Aquaculture*, 114 : 1-18, 1993.
- Wedemeyer, G. and McLeay, D.J. : Methods of determine the tolerance of fishes to environmental stressors. In *Stress in Fish*. pp. 247-275, Pickering, A.D., Academic Press, London, 1981.
- Wedemeyer, G.A., Barton, B.A. and McLeay, D.J. : Stress and acclimation. In *Methods for Fish Biology*. pp. 451-489, Schreck, C.B. and Moyle, P.B., American Fisheries Society, Bechesda, Maryland, 1990.
- Wedemeyer, G.A. : Effects of rearing conditions on the health and physiological quality of fish in intensive culture. In *Fish stress and Health in Aquaculture*, pp. 35-71, Iwama, G.K., Pickering, A.D. and Schreck, C.B. Cambridge Univ. Press, New York, 1997.
- Woo, P.T.K., Leatherland, J.F. and Lee, M.S. : *Cryptobia salmsitica*: cortisol increase the susceptibility of *Salmo gairdneri* Richardson to experimental cryptobiosis. *J. Fish Diseases*, 10 : 75-83, 1987.
- 이덕찬, 김도형, 김수미, 강명석, 홍미주, 김현정, 박수일 : 수온변동 자극이 양식 넙치 *Paralichthys olivaceus*의 비특이적 생체 방어에 미치는 영향. *J. Fish Pathol.*, 15 : 65-75, 2002.

Manuscript Received : September 18, 2003

Revision Accepted : November 23, 2003

Responsible Editorial Member : Joon-Ki Chung
(Pukyong Univ.)