

에탄올에 대한 참돔 *Pagrus major*의 행동 및 생리학적 반응

박진우 · 장영진*† · 김기태* · 권준영

선문대학교 수산생명의학과, *부경대학교 해양바이오신소재학과

Behavioral and Physiological Responses of Juvenile Red Seabream *Pagrus major* exposed to Ethanol Seawater

Jin Woo Park, Young Jin Chang*†, Ki Tae Kim* and Joon Yeong Kwon

Department of Aquatic Life Medical Science, Sunmoon University, Asan 336-708, Korea

*Department of Marine Bio-materials and Aquaculture, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

Behavioral and physiological responses of juvenile red seabream (*Pagrus major*) to different concentrations of ethanol were investigated. No swimming and no reaction to touching by a wooden stick was observed at 0.6% ethanol group in behavioral response, and survival rate was 100% after 5 hours of treatment. Red blood cell count, hematocrit and hemoglobin levels in plasma were not significantly different among all groups. AST activities in plasma significantly decreased as ethanol concentration increased. On the contrary, ALT activities in plasma significantly increased as ethanol concentration increased. Cortisol level in plasma was the lowest in 0.6% ethanol group. Glucose levels in plasma increased significantly when ethanol concentration increased more than 0.4%. Oxygen consumption of fish in 0.6% ethanol seawater was constantly lower than that of fish in control seawater from 2 hours after the exposure to ethanol seawater until the end of experiment.

Key words : Ethanol seawater, Red seabream, Stress response

자연상태에서 자라는 어류는 인위적 스트레스를 받지 않고 자유롭게 생활하는 가운데 번식·성장하면서 생존한다. 그러나 전생활사가 사람에게 의해 관리되는 양식어류는 크고 작은 인위적 스트레스를 끊임없이 받으면서 살고 있다. 어류가 스트레스를 받으면 체내대사 및 생리상태가 변화한다 (Clarke *et al.*, 1981; Berg *et al.*, 1992). 이는 생산성을 떨어뜨리는 원인이 될 뿐 아니라, 어류의 질병 저항성 약화로 인한 약제비용의 상승 및 어가하락의

요인이 되기도 한다. 따라서 양식생산 및 유통과정에서는 이와 같은 인위적 스트레스를 최소화하려는 노력이 이루어지고 있다.

양식어류의 외부스트레스는 크게 환경스트레스, 질병스트레스, 이동스트레스 등으로 나눌 수 있고 이러한 스트레스는 활어의 생산 및 유통과정에서 어쩔 수 없이 발생한다. 외부스트레스에 관한 연구로는 염분 (Robertson *et al.*, 1987), 수온 (Strange *et al.*, 1977; Davis *et al.*, 1984), 밀도 (Specker and Schreck, 1980) 및 수송시간 (Barton *et al.*, 1980; Davis and Parker, 1986) 등에 관한 것이며, 이들의 복합적

†Corresponding Author: Young Jin Chang

Tel : +82-51-629-5915

E-mail : yjchang@pknu.ac.kr

인 스트레스에 대하여 연구가 이루어진 바 있다. 그러나 어류생산관리 과정에서 필연적으로 발생하는 외부스트레스를 줄이는 데는 한계가 있기 때문에 스트레스에 대한 어류의 민감도를 낮추는 방법에 대한 관심이 요구된다.

본 연구에서는 살균, 대사촉진 및 취기효과를 나타내는 에탄올 (ethyl alcohol, C_2H_5OH)에서 그 가능성을 찾고자 하였다. 에탄올은 사람이 마시는 술의 주된 성분일 뿐만 아니라 살균 및 소독기능도 있어 의과학 분야에서 구강세척제 및 살균제로도 활용된다. 또한 일본에서는 고베 소 (Kobe beef)의 잃어버린 입맛을 돋우어 주는 목적으로 맥주와 청주를 사용하고 있다. 사람의 경우 적당한 음주는 소화계통 내의 각종 소화액 분비를 촉진하여 위장의 소화와 섭취능력을 향상시킨다. 더불어, 사람이 술을 마시면 긴장이 완화되는 취기효과를 나타낸다. 그러나 수산양식 분야에서는 아직 에탄올의 활용에 대한 연구시도가 이루어진 바 없다. 상술한 바와 같은 에탄올의 효과는 수산양식 분야에서 어류의 질병예방, 성장촉진, 스트레스 저감 등 많은 부분에서 활용될 가능성이 있다. 그러나 지금까지 에탄올에 대한 어류의 반응을 연구한 모든 논문들은 발생배 (embryo)에 대한 독성 또는 성어에 있어서의 행동변화에 초점을 맞추었으며, 어체내의 혈액 및 생리상태의 변화를 조사한 논문을 찾는 것은 불가능할 정도이다.

따라서 본 연구에서는 주요 양식종의 하나인 참돔 치어를 대상으로 에탄올에 대한 혈액학적 및 생리학적 반응을 조사하였으며, 이 중에서 치명적 독성을 나타내지 않는 안전 농도를 파악하고 그 농도에서의 체내 대사율 감소 여부를 밝혔다.

재료 및 방법

1. 실험어와 에탄올

실험어는 경남수산자원연구소에서 종묘 생산된 참돔치어 500마리를 연구실의 순환여과 사육시스템 내 3개의 원형수조 (수용적 220 L)에 수용하여 3개월 동안 사육 후 실험에 사용하였다. 실험어의 크기는 전장 10.7 ± 1.1 cm, 체중 38.9 ± 9.8 g이었다. 실험에 사용된 에탄올 (C_2H_5OH , Samchun Chemicals Co., Korea)은 연구용으로 판매되는 것으로 농도는 99.9%였다.

2. 에탄올 침지농도별 어체 반응

사각플라스틱 수조 ($55 \times 48 \times 30$ cm) 5개에 각각 30 L의 해수를 넣고 실험어를 20마리 씩 수용하였다. 실험어는 수질악화에 의한 스트레스를 줄이기 위해 실험 전 24시간 절식시켰다. 실험어 수용 후 곧 바로 5개의 수조에 각각 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0%의 농도가 되도록 에탄올을 첨가하였다. 침지실험은 5시간 동안 진행되었고 실험종료 시까지 지속적으로 산소를 공급하여 주었다. 실험개시 후 5시간 동안 어체의 행동반응을 관찰하여 Table 1과 같이 5단계로 구분하였다. 행동반응 단계 판정을 위해 에탄올에 의한 취기 (마취)효과의 지표가 될 수 있는 유영상태 및 외부지극에 대한 반응의 변화와, 어류 대사활동 변동의 지표가 될 수 있는 호흡수를 조사하였다. 각 단계는 동일 실험구내 실험어의 80% 이상이 해당 행동단계에 도달한 경우로 하였다.

3. 채혈 및 혈액분석

실험 5시간 후 각 농도구에서 실험어 12마리씩을 잡아내어 마취없이 미부혈관에서 30초 이내에 혈액을 채취하였다. 채혈 시 heparin sodium 처리된 주사기 (1 mL)를 사용하였다. 채취한 혈액의 일부를 원심분리 ($5,600 \times g$, 5분)하여 얻은 혈장은 분석 전까지 $-72^\circ C$ 에

보관하였다. 혈장의 코티졸 농도는 Donaldson (1981)의 방사면역측정법 (RIA)에 따라 코티졸 RIA kit (DSL, USA)와 Gamma Counter (Cobra II 5010, Hewlett Packard Co., USA)를 이용하여 측정하였다. 혈장 글루코스, AST (Aspartate aminotransferase), ALT (Alanine aminotransferase) 농도는 생화학 자동분석기 (Advid 1650, JEOL Co., Japan)로 분석하였다. 혈장 에탄올 농도의 분석은 Bucher and Redetzki (1951)의 enzymatic assay에 근거하여 제조된 ethanol 분석 kit (Cobas Integra 6000, Roche, Switzerland)를 이용하여 실시하였다. 분석 과정을 간단히 정리하면 에탄올이 포함되어 있는 sample에 NAD^+ 와 에탄올 분해효소인 alcohol dehydrogenase (ADH)를 첨가하여 에탄올 분해를 유도하고, 분해 시 발생한 acetaldehyde, NADH 및 H^+ 중 NADH의 양을 340 nm에서 흡광도를 측정하여 구해내었다 (에탄올 분석과정에서 생성된 NADH의 양은 에탄올의 양에 정비례한다-Bucher and Redetzki, 1951). 나머지 혈액은 채혈 직후에 자동혈액분석기 (Excell 500, USA)를 사용하여 적혈구용적비 (hematocrit, Ht), 적혈구수 (red blood cell count, RBC), 혈색소농도 (hemoglobin, Hb)를 분석하였다. 실험은 3반복으로 실시하였다.

4. 에탄올 침지 및 회복 시 경과시간별 혈중 에탄올 농도 변화

침지 및 회복과정 중 실험어의 혈중에탄올 농도 변화를 알아보기 위해 에탄올 농도별 침지실험에서 R2 (Table 1)의 행동반응을 유도한 농도를 선택하여 실험어를 5시간 동안 침지시켰다. 침지 후 매시간 채혈하여 혈중에탄올 농도를 측정하였으며, 회복을 위해 침지 5시간 후 일반해수로 실험어를 옮겨왔다. 회복시간 동안에도 매시간 채혈하여 혈중에탄올 농도를 측정하였다. 이때 채혈한 실험어는 수조로부터 격리하여 중복채혈이 되지 않도록 하였다.

Table 1. Stages of behavioral responses in juvenile red seabream *Pagrus major* dipped in ethanol seawater

Stage	Behavioral response	Activity level
R0	Fast swimming, Respond to touching by a wooden stick, 90-100 breaths/min	Control
R1	Slow swimming, Respond to touching by a wooden stick, 80-90 breaths/min	Rearable
R2	No swimming, Not respond to touching by a wooden stick, Partial loss of balance, 80-90 breaths/min	Transportable
R3	Pop up occasionally, Not respond to touching by a wooden stick, Total loss of balance, 120-130 breaths/min	Before death
R4	Death	Dead

R0~R4: Stages of behavioral responses.

5. 에탄올 침지 시 산소소비량 측정

산소소비실험에 사용된 실험어는 사료섭취에 의한 호흡수 및 산소소비량의 변화를 최소화하기 위하여 실험개시 전 24시간 동안 절식시킨 후 밀폐순환 유수식 산소소비 측정장치 (OxyGuard 6, Denmark)내의 호흡실로 신속히 옮겨졌다. 실험은 호흡실에서 12시간 이상 적응시킨 후 진행하였다. 농도별 침지실험에서 R2 (Table 1)의 행동반응을 보인 에탄올 농도 구와 에탄올을 넣지 않은 일반해수구로 나누어, 각각의 실험구에 실험어를 3마리씩 수용하여 5시간 동안 산소소비량을 측정하였다.

실험용수의 용존산소량은 유입수실과 유출수실에 각각 부착되어 있는 용존산소 센서에서 10분 간격으로 자동측정하여 컴퓨터에 입력되도록 하였다. 실험어의 산소소비량은 10분 간격으로 측정된 유입수와 유출수의 용존산소량을 토대로 계산된 단위체중당 산소소비량 ($mg O_2 \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$)의 평균값으로 나타냈다.

단위체중당 산소소비량 ($mg O_2 \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$) = $\{(Ci - Co) \times F \times 60\} / W$

C_i = 유입수의 용존산소량, mg L⁻¹; C_o = 유출수의 용존산소량, mg L⁻¹; F = 유량, L min⁻¹; W = 어체총중량, kg이다.

6. 통계처리

각 실험구로부터 얻어진 평균 값 (mean±SE) 사이의 통계학적 유의성은 SPSS-통계패키지 (version 10.1)를 이용하여 one-way ANOVA 및 Duncan's multiple range test로 검정하였다. 단, 에탄올 처리 유무에 따른 산소소비량의 변화에 대한 통계학적 검정에서는, 실험 시 경과시간에 따라 산소소비량이 영향을 받을 수 있어서, two-way ANOVA를 먼저 실시하였다. 그리고 이 분석에서 에탄올 처리 (유무)와 경과 시간 (1-6시간) 사이의 유의한 상호작용이 확인되어, 각 시간대별 에탄올 처리 효과를 검정하기 위한 6가지 group ANOVAs (one-way)와 산소소비량에 미치는 시간경과의 독립적 효과를 파악하기 위한 두 가지 group ANOVAs (one-way)를 추가로 실시하였다. 시간경과 효과는 group ANOVA 후 Duncan's multiple range test로 다시 사후 검정하였다.

결 과

1. 에탄올 침지농도별 어체반응

에탄올 침지농도별 어체의 반응을 Table 1의 행동 반응 기준에 따라 구분한 결과는 Table 2와 같다. 0.2% 에탄올해수구 (0.2%구), 0.4%구에서 실험어는 5시간 동안 R0의 상태를 유지하면서 100%의 생존율을 나타냈다. 0.6%구에서는 2시간 이후 R1의 반응을 나타냈고 4시간 이후부터는 R2의 반응을 보였지만 5시간 후 생존율은 100%를 나타냈다. 반면에 0.8%구에서는 침지 2시간 이후 실험어의 10%가 R3의 상태를 보이면서 불안한 유평을 하는 것을 관찰할 수 있었

다. 3시간째는 50% 이상이 R3의 행동을 보였고 4시간 이후에는 80% 이상 R3상태를 보이면서 폐사개체도 관찰되었다. 5시간 후 생존율은 20%를 나타냈다. 1.0%구에서도 0.8%구와 마찬가지로 2시간 후 실험어 10%이상 R3의 반응을 보였고, 폐사개체는 0.8%구보다 빠른 침지 3시간 이후부터 발생하여 5시간 후에는 1.0%구의 모든 실험어가 폐사하였다.

Table 2. Behavioral responses in juvenile red seabream to different concentrations of ethanol for 5 hours

Ethanol conc. (%)	Behavioral responses				
	1-h	2-h	3-h	4-h	5-h
0.0	R0	R0	R0	R0	R0
0.2	R0	R0	R0	R0	R0
0.4	R0	R0	R0	R0	R0
0.6	R0	R0	R1	R2	R2
0.8	R2	R3	R3	R3	R4
1.0	R2	R3	R3	R4	R4

conc. : concentraion

2. 에탄올 침지농도별 혈액성상 및 생존율

에탄올 농도별 실험어의 혈장 에탄올 농도는 Table 3과 같다. 혈장 에탄올 농도는 실험해수의 에탄올 농도와 일치하지는 않았지만 에탄올첨가 농도의 증가에 따라 유의하게 증가하였다.

에탄올 침지농도별 실험에서 RBC는 0.4%구에서 $3.43 \pm 0.20 \times 10^6$ cell/ μ L로 가장 높았고, 1.0%구에서 $3.17 \pm 0.07 \times 10^6$ cell/ μ L로 가장 낮았다. Ht는 1.0%구에서 $43.0 \pm 4.0\%$ 로 가장 높았고, 0.2%구에서 $39.8 \pm 2.3\%$ 로 가장 낮은 값을 보였다. Hb는 0.4%구에서 19.2 ± 0.8 g/dL로 가장 높은 수치를 나타냈으며, 에탄올을 첨가하지 않은 0%구에서 17.4 ± 1.2 g/dL로 가장 낮게 나타났다. 그러나 모든 실험구의 RBC, Ht, 및 Hb는 에탄올 농도차이에 따른 유의한 차이를 보이지 않았다.

Table 3. Ethanol concentrations in the plasma of juvenile red seabream *Pagrus major* dipped in the seawater with different ethanol concentrations after 5 hours

Ethanol conc. (%)	Plasma ethanol conc. (%)	Ethanol conc. in the experimental seawater (%)
0.0	0.0±0.001 ^a	0.0±0.001 ^a
0.2	0.139±0.001 ^b	0.189±0.002 ^b
0.4	0.255±0.001 ^c	0.373±0.001 ^c
0.6	0.385±0.020 ^d	0.413±0.007 ^d
0.8	0.510±0.073 ^e	0.686±0.024 ^e
1.0	0.598±0.001 ^e	0.828±0.005 ^f

The values are mean±SD. Means within each item followed by the same alphabetic letter are not significantly different (P<0.05).
conc. : concentraion

AST는 에탄올 농도의 증가에 따라 유의하게 감소하는 경향을 보였다. 에탄올을 첨가하지 않은 0%구에서 34.5±9.5 IU/L로 가장 높은 값을 나타냈고 0.4%

구부터 에탄올 농도의 증가에 따라 유의한 감소를 보이면서 1.0%구에서 5.5±5.2 IU/L로 가장 낮은 값을 나타냈다 (Fig. 1).

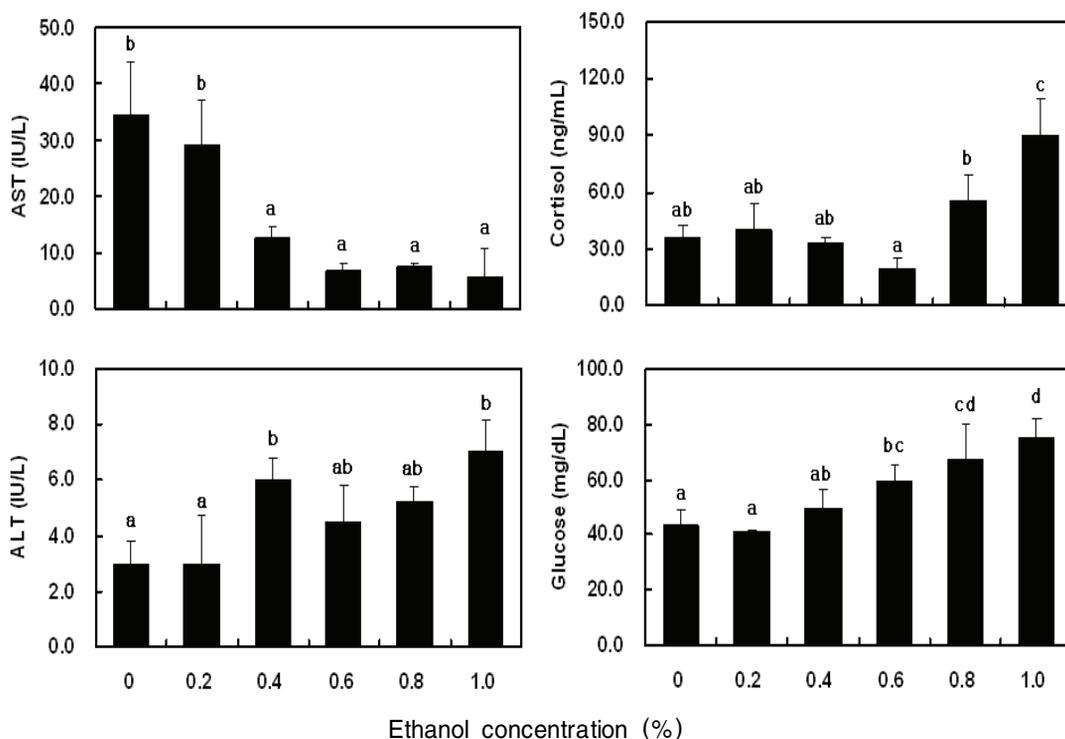


Fig. 1. Changes of AST, ALT, cortisol and glucose levels in the plasma of juvenile red seabream *Pagrus major* dipped in the seawater with different ethanol concentrations. Different alphabetic letters on each column indicate significant difference (P<0.05).

ALT는 에탄올 농도의 증가에 따라 유의한 증가를 나타냈다. 0%와 0.2%구에서 각각 3.0 ± 0.8 IU/L, 3.0 ± 1.7 IU/L로 낮은 수준을 보였고, 0.6%와 0.8%구는 0%, 0.2%구와 비교시 약간의 증가를 나타냈다. 0.4%와 1.0%구에서는 0%와 0.2%구와 비교하여 유의한 증가를 보이면서 1.0%구에서 7.0 ± 1.2 IU/L로 가장 높은 값을 나타냈다 (Fig. 1).

혈장 코티졸 농도는 0.8~1.0%구에서 0~0.6%구와 비교하여 유의하게 높았는데 (Fig. 1), 0.6%구에서 19.55 ± 5.28 ng/mL로 가장 낮은 값을 나타냈고 1.0%의 에탄올 농도에서 90.43 ± 18.93 ng/mL로 가장 높은 값을 나타냈다. 혈장 글루코스는 에탄올 농도가 낮은 0, 0.2%구에서 각각 43.5 ± 5.5 mg/dL과 41.3 ± 0.5 mg/dL로 낮은 수준을 나타냈고, 0.4%구부터 에탄올 농도의 증가에 따라 유의한 증가를 나타내면서, 1.0%구에서 75.0 ± 7.0 mg/dL로 가장 높은 값을 나타냈다 (Fig. 1).

실험종료 시 생존율은 0.8%구에서 20%를 나타냈고 1.0%구에서는 0%의 생존율을 나타냈다. 0~0.6%구에서는 100%의 생존율을 나타냈다.

3. 에탄올 침지시간별 혈장에탄올 농도변화

혈장 에탄올의 농도변화는 Fig. 2와 같다. 5시간 동안 0.6%구에 침지된 실험어의 혈장 에탄올 농도는 매시간 마다 유의하게 증가하였다 ($P < 0.05$). 0.6%구에서 5시간 침지 후 일반해수에 옮겨진 실험어의 혈장 에탄올의 농도는 시간경과에 따라 유의하게 감소하는 경향을 보였다 ($P < 0.05$). 에탄올 침지종료 후 혈장 에탄올 농도는 빠르게 감소하여 침지 이전과 비슷한 수준으로 회복되는 경향을 보였다.

4. 에탄올 침지 시 산소소비량

실험어의 산소소비량은 실험 개시 후 시간경과에 따라 유의하게 감소하는 경향을 보였으며, 특히 에탄

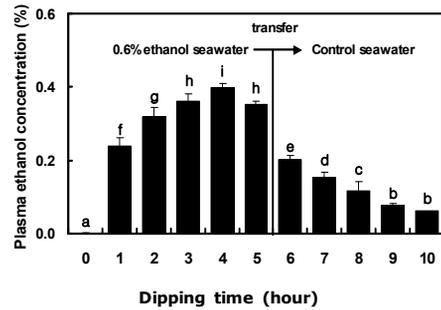


Fig. 2. Changes of plasma ethanol concentration of juvenile red seabream *Pagrus major* during the exposure to 0.6% ethanol seawater and the recovery in the control seawater. Same alphabetic letters are not significantly different ($P < 0.05$).

올해수(0.6%)에 침지한 실험어의 경우는 일반해수에 침지한 실험어보다 시간경과에 따라 산소소비량이 더 큰 폭으로 감소하였다 (Table 4, Fig. 3) (Two-way ANOVA, $P < 0.0001$). 이처럼 통계처리 결과 실험어의 산소소비에 미치는 에탄올처리 유무와 경과시간의 상호작용이 뚜렷하여 (Table 4) (Two-way ANOVA, $P < 0.0001$), 추가적으로 요인별 group ANOVA를 실시한 결과 에탄올 처리에 의한 효과가 나타나는 시간대가 명확하게 드러났다. 경과 시간대별 산소소비 경향은 시작단계 (beginning), 안정단계 (adjusting) 그리고 에탄올 효과 발현기 (effect of ethanol)로 구분되었다 (Fig. 3). 단위체중당 산소소비는 0.6% 에탄올해수에 침지한 실험어와 일반해수에 침지한 실험어에서 각각 50.7 ± 8.1 mg $O_2 \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$, 102 ± 13.1 mg $O_2 \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$ 로 일반해수에 침지된 실험어가 0.6% 에탄올해수에 침지된 실험어에 비해 전체적으로 2배가량 유의하게 많은 산소를 소비하였다. 에탄올해수에 침지된 실험어는 실험개시 2시간 후부터 종료 시까지 지속적으로 산소를 적게 소비하였고, 일반해수에 침지된 실험어는 동일기간 동안 에탄올 해수에 침지한 실험어보다 유의하게 많은 산소를 소비하였다 (Duncan's multiple range test, $P < 0.05$).

Table 4. Results of two-way ANOVA for the effects of ethanol treatment and elapsed time on the oxygen consumption of juvenile red seabream *Pagrus major*

Sources of variation	d.f.	SS	MS	F value
Ethanol treatment (E)	1	21346.945	21346.945	173.260***
Time (T)	5	74088.522	14817.704	120.266***
E × T	5	12000.288	2400.058	19.480***

*** P<0.0001

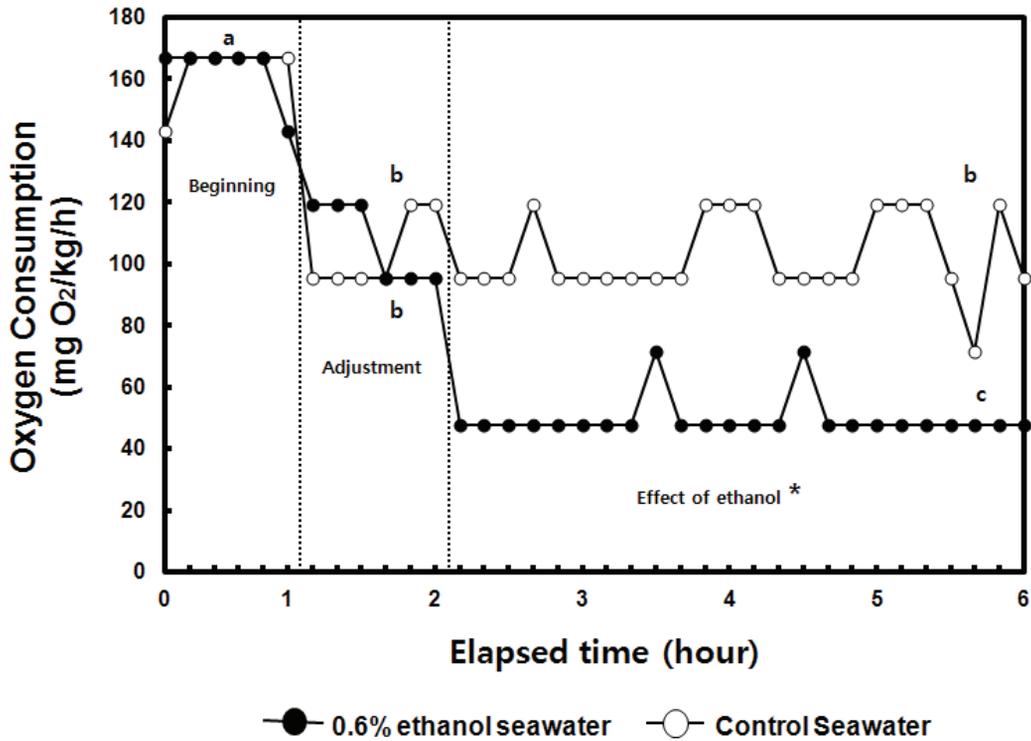


Fig. 3. Comparison of oxygen consumptions between the two groups of juvenile red seabream *Pagrus major* exposed to 0.6% ethanol seawater and control seawater. Pattern of oxygen consumptions was divided into 3 phases (Beginning, Adjustment and Effect of ethanol) after two-way ANOVA and subsequent group ANOVAs (one-way). * indicates significant difference between ethanol seawater group and control group within the respective phase (one-way ANOVA, P<0.001). Different alphabetic letters within each group (ethanol seawater group or control seawater group) indicate significant difference between the phases (Duncan's multiple range test, P<0.05).

고 찰

어체에서 마취효과는 스트레스 반응, 물질 대사율, 산소소비, 아가미 호흡, 심장박동 등을 감소시킨다

(Bourne, 1984; Summerfelt and Smith, 1990). 또한, 스트레스로부터 일어나는 생리학적 반응을 감소시킬 뿐만 아니라, 어류가 받는 피해를 최소화시킬 수 있도록 도와준다 (Weber *et al.*, 2009). 이와 같은 특성을

지닌 마취제는 값이 싸고 사용 시 안전하고 취급이 용이해야 한다. 그러나 마취제의 사용은 소비자에게 거부감을 유발하여 식용을 목적으로 하는 어류에는 사용하기 어려운 점이 있다.

본 연구에서 에탄올해수에 침지된 실험어는 취기 반응을 나타냈다. 에탄올 침지농도별 실험에서 0.2%, 0.4%구에서는 대조구와 비교하여 행동변화가 크게 차이나지 않았지만, 0.6%구에서는 4시간 후 호흡수, 어체의 움직임, 자극에 대한 반응 등이 감소하였다. 그러나 0.8% 이상의 에탄올해수구에서는 폐사개체가 나타났고, 에탄올의 농도가 높아짐에 따라 폐사율은 더욱 높게 나타났다. 따라서 0.8% 이상의 에탄올 농도는 참돔 치어에게는 폐사를 유발하는 고농도로 생각된다. 환경요인 (온도, pH, 염분)과 생물학적 요인 (어체의 크기, 무게, 어종 등)에 따라 실험결과가 달라질 수 있지만 (Burka *et al.*, 1997; Ross and Ross, 1999) 본 연구에서는 실험기간 동안 모든 실험구의 수질요인에 유의한 차이가 없었다.

실험어 혈장 에탄올 농도는 에탄올 농도 증가에 따라 유의하게 증가하는 경향을 보였으며, 혈장 에탄올 농도 0.35% 이상 0.40% 이하의 수준에서 적당한 취기효과를 관찰할 수 있었다. 미량의 에탄올 첨가에 비해 혈장 에탄올 농도가 높게 나타난 것은 수중환경에서 아가미 피부 등의 경로를 통해 에탄올의 침투가 매우 효율적으로 일어났음을 의미한다.

어류의 혈장 코티졸과 글루코스는 어체가 받는 스트레스의 지표로서 인정되고 있다 (Wedmeyer and Yasutake, 1977). 어류가 외부스트레스를 받게 되면 시상하부-뇌하수체-간신선축의 활성이 높아지며, 이로 인해 코티졸이 혈액으로 분비된다 (Perry and Reid, 1993; Wendelaar Bonga, 1997; Chang and Hur, 1999). 또한 심장 박동, 산소 소비의 증가 및 에너지 동원의 증가로 혈중 글루코스의 상승이 나타난다 (Tomasso

et al., 1980; Carmichael *et al.*, 1984; McDonald and Milligan, 1997). 이러한 반응은 스트레스에 대한 내분비적 반응의 지표로 이용되고 있다. 본 연구에서 참돔 치어의 혈중 코티졸 농도는 0.6%구에서 가장 낮은 수치를 나타냈고 1.0%구에서 가장 높은 값을 나타냈다. 대조구와 비교해 0.2%~0.6%구의 실험어는 스트레스를 받지 않은 상태로 판단되었으며, 0.8% 이상 에탄올첨가구에서는 코티졸의 농도가 대조구와 비교해 유의하게 증가하였고 높은 폐사율을 나타내었다. 이는 0.8% 이상의 에탄올 농도는 참돔 치어에 치명적 스트레스로 작용함을 의미한다. 한편, 혈장의 글루코스는 에탄올 농도의 증가에 따라 유의한 증가를 나타냈고 1.0%구에서 가장 높은 값을 나타냈다. 글루코스 농도의 증가는 스트레스 반응시 나타나는 전형적인 2차 생리화적인 반응으로 스트레스에 대응하기 위해 에너지를 소모하면서 증가하게 된다. 일반 마취제의 경우도 고농도나 장시간의 처리 시 치명적 스트레스 반응을 일으킬 수 있음은 잘 알려진 사실이다.

혈액의 RBC, Ht 및 Hb 등도 스트레스 상태를 반영하는 지표가 된다 (Schreck, 1982). 일반적으로 어류가 스트레스를 받으면 RBC, Ht 및 Hb의 농도는 상승한다. 본 실험에서 혈액의 RBC, Ht 및 Hb는 폐사를 유발한 에탄올해수구를 비롯한 모든 실험구에서 에탄올 농도에 따른 유의한 차이를 보이지 않았다. 이는 RBC, Ht 및 Hb의 변화가 급격한 스트레스 요인보다는 만성적인 스트레스 상황을 더 잘 반영하기 때문일 수 있다 (Morales *et al.*, 2005).

참돔 치어의 혈장 AST활성은 에탄올 농도가 증가함에 따라 유의하게 감소되었고 ALT의 활성은 0% 및 0.2%구를 제외한 모든 실험구에서 증가하는 경향을 보였다. 혈장 전이효소인 AST, ALT는 오염물질에 의한 간, 심장 및 근육 조직 손상의 지표로 사용되고 있으며 (Sakamoto and Yone, 1978; Shich, 1978), 일반

적으로 조직손상이 일어나면 증가하는 경향을 나타낸다 (Casillas and Ames, 1985). 포유류의 경우 에탄올은 몸에 흡수되면 90% 이상 간에서 분해한다. 에탄올에 단기간 노출된 쥐 (mice)에서는 혈중 ALT와 AST 활성의 유의한 증가가 보고되어 있지만 (Zeng *et al.*, 2008) 어류에 대한 에탄올 노출 실험에서 AST와 ALT 활성을 측정하는 것은 본 연구가 최초이다. 참돔 치어는 쥐와는 달리 0.4% 이상의 에탄올 농도에서 AST 활성은 오히려 감소하였고 ALT 활성의 증가도 경미하여 단기간의 에탄올 처리가 조직의 심각한 손상을 초래하지 않은 것으로 해석된다.

지금까지 알코올에 대한 독성 실험을 위해 어류에 사용된 농도들은 1% 전후였으며 (Gerlai *et al.*, 2000; Mathur and Guo, 2011), 심지어 4%의 에탄올에 노출한 경우도 있었다 (MacPhail *et al.*, 2009). Zebrafish 성어의 경우 1% 에탄올에 노출된 이후에도 뚜렷한 독성이 관찰되지 않은 사례도 있다 (Gerlai *et al.*, 2006). 잉어과에 속하는 어류들은 빈 산소 상태의 혐기적 대사 최종산물로 에탄올을 생성하고 이를 아가미를 통해 배설하기도 한다 (Lutz and Nilsson, 1997; Mourik *et al.*, 1982). 본 연구에서 참돔 치어들은 0.8% 이상의 에탄올에 5시간 동안 노출되었을 때 높은 폐사율을 나타내었으나, 0.6% 이하에서는 뚜렷한 스트레스의 징후를 찾을 수 없었다. 이러한 결과들은 어류가 포유동물에 비해 알코올에 대한 내성이 강할 가능성이 있음을 시사한다.

행동반응 및 혈액성상의 결과를 통해 스트레스 반응이 거의 관찰되지 않은 0.6%의 에탄올 농도 (5시간 처리 시)를 본 종에 대한 안전농도로 설정하여, 이 농도에서 대사량의 저하 효과가 나타나는 지를 산소소비율의 측정을 통해 확인하였다. 에탄올 0.6% 구에 침지된 실험어의 산소소비율은 일반해수에 침지된 실험어의 산소소비율 보다 현저히 낮았다. 이는

취기효과로 운동성, 산소소비, 호흡 등 대사활동이 감소되어졌기 때문으로 판단할 수 있다.

에탄올 농도 0.6%의 해수에 침지된 실험어의 혈장 에탄올 농도는 시간경과에 따라 유의한 증가를 나타냈고, 앞선 에탄올 침지농도별 실험에서 적당한 취기효과를 나타낸 혈장 에탄올 0.35% 이상, 0.40% 이하의 농도는 3시간 이상 침지 시 관찰되었다. 또한 이 결과는 R2의 행동반응을 나타낸 시간과 일치하였다. 일반해수로 이동시킨 모든 실험어는 100%의 생존율을 나타내고 대조구와 비교 시 정상적인 영양을 하는 것을 확인할 수 있었다. 일반해수로 이동 후 실험종료 시까지 혈장 에탄올은 유의한 감소를 보였으나 실험종료 시 혈장 에탄올의 농도는 실험 전의 수준으로 완전히 회복하지는 못했다. 비록 실험어의 행동이 정상으로 돌아오기는 하였지만 혈장 에탄올 농도의 완전한 회복에는 5시간 이상이 소모된다는 것을 알 수 있었다.

본 연구는 에탄올 사용에 대한 기초적인 연구로서 에탄올이 어류에게 생리학적으로 어떠한 영향을 미치는지 조사하였으며, 사용 가능한 에탄올농도의 한계점을 확인하였다. 에탄올 사용은 마취제와 비교하여 어류에게 영향을 미치는 시간에는 차이가 있었지만, 에탄올에 의해 유도된 취기효과는 마취제의 마취효과와 유사한 작용을 한다는 것을 확인할 수 있었다. 혈액성상, 행동반응, 생존율, 산소소비율의 결과를 볼 때, 5시간 처리의 경우 0.6% 이하의 에탄올 농도가 참돔 치어에게 안전한 농도이며 0.8% 이상에서는 독성으로 작용하여 생리학적인 장애를 일으키고, 심할 경우 폐사를 유발할 수 있는 농도임을 밝혀내었다. 그러나 고농도로 짧은 시간 (30분 또는 1시간)을 처리하여 원하는 취기효과를 유발할 수 있는 가능성은 여전히 남아 있다. 이상 본 연구의 결과를 바탕으로 보다 안전하고 효율적인 농도 그리고 농도와 처리시간의 복합적 효과 등을 밝혀내기 위한 심화 연구가 요구된다.

요 약

에탄올 0.6% 해수에 5시간 동안 침지한 참돔 치어는 유영행동을 멈추었으며 외부의 물리적 자극에도 반응하지 않는 상태에 도달하였다. 이 농도구에서 생존율은 100%였으며 RBC, hematocrit, Hb 수치는 다른 그룹과 유의한 차이를 보이지 않았다. 혈장 코티졸 농도 또한 0.6% 에탄올 농도에서 가장 낮은 값을 나타냈다. 그러나 0.8% 이상의 에탄올 해수에 침지한 실험어는 심한 스트레스 반응과 높은 폐사율을 보였다. 참돔 치어를 0.6%의 에탄올 해수에 침지시키고 매시간 산소소비량을 측정된 결과, 에탄올해수에 침지된 실험어는 실험개시 2시간 후부터 종료 시까지 지속적으로 일반해수에 침지된 실험어보다 적은 산소를 소비하였다. 이상의 결과들은 에탄올에 의해 유도된 취기효과가 마취제의 마취효과와 비슷하였으며, 5시간 침지 시 혈액성상, 행동반응, 생존율, 산소소비율 등을 종합하여 볼 때, 0.6% 이하의 에탄올 농도가 참돔치어에게 안전한 농도이며, 0.8% 이상에서는 독성으로 작용할 수 있음을 보여준다.

감사의 글

이 논문은 2010학년도 부경대학교(PK-2010-110)의 지원을 받아 수행된 연구임.

참고문헌

- Barton, B.A. and Iwama G.K.: Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis in the response and effects of corticosteroids. *Annu. Rev. Fish. Dis.*, 1: 3-26, 1991.
- Barton, B.A., Peter, R.E. and Paulence, C.R.: Plasma cortisol levels of fingerling rainbow trout (*Salmo gairdneri*) at rest, and subjected to handling, confinement, transport and stocking. *Can. J. Fish. Aquacult. Sci.*, 37: 805-811, 1980.
- Berg, A., Hansen, T. and Stefansson, S.: First feeding of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) under different photoperiods. *J. App. Ichthyol.*, 8: 251-256, 1992.
- Bourne, P.K.: The use of MS-222 (tricaine methanesulphonate) as an anaesthetic for routine blood sampling in three species of marine teleosts. *Aquaculture*, 36: 313-321, 1984.
- Bucher, T., Redetzki, H.: Specific photometric determination of ethyl alcohol based on an enzymatic reaction. *Klin Wschr.*, 29: 615, 1951.
- Burka, J.F., Hammell, K.L., Horsberg, T.E., Johnson, G.R., Rainnie, D.J. and Speare, D.J.: Drugs in salmonid aquaculture a review. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, 20: 333-349, 1997.
- Carmichael, G.J., Tomasso, J.R., Simco, B.A. and Davis, K.B.: Characterization and alleviation of stress associated with hauling largemouth bass. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 113: 778-785, 1984.
- Casillas, E. and Ames, W.: Serum chemistry of diseased English sole, *Parophrys vetulus* Girard, from polluted areas of Puget Sound, Washington. *J. Fish. Dis.*, 8: 437-449, 1985.
- Chang, Y.J. and Hur, J.W.: 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, 1999.
- Clarke, W.C., Shelbourne, J.R. and Brett, J.R.: Effects of

- artificial photoperiod cycles, temperature and salinity on growth and smolting in underyearling coho (*Oncorhynchus kisutch*), chinook (*O. tshawytscha*), and sockeye (*O. nerka*) salmon. *Aquaculture*, 22: 105-116, 1981.
- Davis, K.B., Suttle, M.A. and Parker, N.C.: Biotic and abiotic influences on corticosteroid hormone rhythms in channel catfish. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 113: 414-421, 1984.
- Davis, K.B. and Parker, N.C.: Plasma corticosteroid stress response of fourteen species of warm water fish to transportation. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 115: 495-499. 1986.
- Donaldson, E.M.: The pituitary-interrenal axis as an indicator of stress in fish. pp.11, Academic Press, London, 1981.
- Gerlai, R., Lahav, M., Guo, S. and Rosenthal, A.: Drinks like a fish: zebrafish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 67: 773-782, 2000.
- Gerlai, R.G., Lee, V., Blaser, R.: Effects of acute and chronic ethanol exposure on the behavior of adult zebra fish (*Danio rerio*). *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 85: 752-761, 2006.
- Lutz, P.L. and Nilsson, G.E.: Contrasting strategies for anoxic brain survival-glycolysis up or down. *J. Exp. Biol.*, 200: 411-419, 1997
- MacPhail, R.C., Brooks, J., Hunter, D.L., Padnos, B., Irons, T.D. and Padilla, S.: Locomotion in larval zebrafish: Influence of time of day, lighting and ethanol. *Neurotoxicology*, 30: 52-58, 2009.
- Mathur, P. and Guo, S.: Differences of acute versus chronic ethanol exposure on anxiety-like behavioral responses in zebrafish. *Behav. Brain Res.*, 219: 234-239, 2011.
- McDonald, D.G. and Milligan, C.L.: Ionic, osmotic and acid base regulation in stress. In *Fish stress and Health in Aquaculture* (eds. Iwama, G.W., Pickering, A.D., Sumpter, J.P., Schreck, C.B.), pp. 119-144. Cambridge: University Press, 1997.
- Morales, A.E., Cardenete, G., Abellán, E. and García-Rejón, L.: Stress-related physiological responses to handling in common dentex (*Dentex dentex* Linnaeus, 1758). *Aquacult. Res.*, 36: 33-40, 2005.
- Mourik, J., Raeven, P., Steur, K., Addink, A.D.F.: Anaerobic metabolism of red skeletal muscle of goldfish, *Crassius auratus* (L.). *FEBS Letters*, 137: 111-114, 1982.
- Perry, S.F. and Reid, S.D.: β -adrenergic signal transduction in fish: interactive effects of catecholamines and cortisol. *Fish. Physiol. Biochem.*, 11: 195-203, 1993.
- Robertson, L., Thomas, P., Arnold, C.R. and Trant, J.M.: Plasma cortisol and secondary stress responses of red drum to handling, transport, rearing density, and disease outbreak. *Prog. Fish-Cult.*, 49: 1-12, 1987.
- Ross, L.G. and Ross, B.: *Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals*. pp. 159., Blackwell Science, Oxford, 1999.
- Sakamoto, S. and Yone, Y.: Requirement of red sea bream for dietary iron. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 44: 223-225, 1978.
- Shich, M.S.: Changes of blood enzymes in brook trout induced by infection with *Aeromonas salmonicida*. *J. Fish. Biol.*, 11: 13-18, 1978.
- Schreck, C.B.: Stress and rearing of salmonids. *Aquaculture*,

- 28: 241-249., 1982.
- Specker, J.L. and Schreck, C.B.: Stress response to transportation and fitness for marine survival in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) smolts. Can. J. Fish. Aquacult. Sci., 37: 765-769, 1980.
- Strange, R.J., Schreck, C.B. and Golden, J.T.: Corticoid stress responses to handling and temperature in salmonids. Trans. Ame. Fish. Soc., 106: 213-217, 1977.
- Summerfelt, R.C. and Smith, L.S.: Anesthesia, surgery, and related techniques. In : Methods for Fish Biology (CB Schreck and PB Moyle). Ame. Fish. Soc. Bethesda. Maryland, 213-272, 1990.
- Tomasso, J.R., Davis, K.B., Parker, N.C.: Plasma corticosteroid and electrolyte dynamics of hybrid striped bass (white bass × striped bass) during netting and hauling stress. Proc. World Maricult. Soc., 11: 303-310, 1980.
- Weber, R.A., Peleteiro, J.B., Garcia, Martin, L.O. and Aldegunde, M.: The efficacy of 2-phenoxyethanol, metomidate, clove oil and MS-222 as anaesthetic agents in the Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858). Aquaculture., 288: 147-150, 2009.
- Wedemeyer, G.A. and Yasutake, W.T.: Clinical methods for the assessment of the effects of environmental stress on fish health, pp.89, Fish and Wildlife, Service, Technical, U.S, 1977.
- Wendelaar Bonga, S.E.: The stress response in fish. Physiol. Rev., 77: 591-625, 1997.
- Zeng, T., Zhang, C.L., Zhu, Z.P., Yu, L.H., Zhao, X.L. and Xie, K.Q.: Diallyl trisulfide (DATS) effectively attenuated oxidative stress-mediated liver injury and hepatic mitochondrial dysfunction in acute ethanol-exposed mice. Toxicology, 252: 86-91, 2008.

Manuscript Received : October 26, 2011

Revised : February 24, 2012

Accepted : February 27, 2012