

## 염분 농도에 따른 어린 돌기해삼, *Apostichopus japonicus*의 생존 및 피부계의 조직학적 변화

김태익 · 박민우 · 조재권 · 손맹현 · 진영국<sup>†</sup>  
(국립수산과학원 남서해수산연구소)

### Survival and Histological Change of Integumentary System of the Juvenile Sea Cucumber, *Apostichopus japonicus* Exposed to Various Salinity Concentrations

Tae-Ik KIM · Min-Woo PARK · Jae-Kwon CHO · Maeng-Hyun SON · Young-Guk JIN<sup>†</sup>  
(Southwest Sea Fisheries Research Institute, NFRDI)

#### Abstract

Juvenile sea cucumber, *Apostichopus japonicus*(wet weight 1.0±0.2 g, n=250) acclimated to environmental conditions(17°C, 33 psu) during 4 weeks for observation of survival and structural variation of integumentary system according to various salinity concentration. After that, it was exposed 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 psu in 96h, and recovered during 7 days. In this results, The 96-h lethal concentration(LC50) for sea cucumber was a salinity of 21.05 psu. Integumentary system of the sea cucumber exposed to below the salinity of 20 psu mainly observed thickness reduction of epidermal layer, nucleus condensation of epithelial cells, decreased of mucous cells and loose arrangement of connective tissue in dermal layer. Integumentary system of the sea cucumber exposed a salinity of 40 psu mainly observed nucleus hypertrophy of epithelial cells, increase of mucous cells and tight arrangement of connective tissue in dermal layer. Also, observed secretory cells showing the alcian blue(pH 2.5) positive. During 96-h exposure, this cells decreased after increase below the salinity of 20 psu but increased in the salinity of 40 psu compared with 25-35 psu.

**Key words :** *Apostichopus japonicus*, salinity, survival, integumentary system

#### I. 서론

해삼은 불가사리, 성게 등과 같은 극피동물문(ECHINODERMATA)에 속하는 종류로 약용성이 높아 어업인들의 주요 소득원 중 하나이다. 최근 중국의 해삼 수요량이 증가하면서 국내 해삼의 수출이 증가하고 있어 경제적으로 중요성이 커지

고 있다. 그러나 국내 해삼의 생산량은 집중호우 등 환경적 영향이나 어린 개체의 무분별한 어획 등에 의해 자원량이 급격히 감소하고 있는 실정이다(Ministry of Oceans and fisheries, 2012). 이를 해결하기 위해선 먼저 수온, 용존산소, 염분 등 국내 서식 해삼의 적정 서식환경을 파악한 후 이에 따른 관리방안 수립이 필요하지만, 국외

<sup>†</sup> Corresponding author : 061-690-8976, jyg4j@hanmail.net

\* 이 연구는 국립수산과학원 남서해수산연구소 “전북 가두리 양식 생산성 향상 및 표준화 연구 (RP-2013-AQ-192)” 과제의 일환으로 추진되었습니다.

(Kinne, 1963 ; Chen, 2004 ; Yuan et al., 2006)에 비해 국내의 경우 체계적인 기초연구가 부족한 실정이다. 그 중에서 염분은 해삼을 비롯해 해양 무척추동물들의 생존, 발달, 생리학적 반응 및 분포 등에 있어 가장 중요한 요인 중 하나이며(Re et al., 2005 ; Verween et al., 2007), 집단폐사의 원인이 될 수 있다(Kashenko, 2000 ; Dong et al., 2008 ; Li and Li, 2010).

이에 본 연구에서는 다양한 염분 농도가 어린 돌기해삼의 생존과 외부환경의 변화에 직접적으로 반응하는 피부계에 어떠한 영향을 미치는지 관찰하여, 환경변화와 관련된 기초자료를 제공하고자 한다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

본 연구에 사용한 어린 돌기해삼, *Apostichopus japonicus*는 2011년 10월에 전라남도 완도군의 종묘생산업체에서 구입하였다. 구입 후 17°C, 33 psu의 해수에서 4주간 순치시킨 다음 습중량 1.0±0.2 g의 어린 해삼 250개체를 실험에 이용하였다.

### 2. 실험 방법

#### 가. 실험농도 및 기간

실험 염분농도는 증류수와 천일염을 이용하여 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 및 40 psu로 설정하였다. 수온은 17°C로 유지하였고, 96시간 동안 다양한 염분에 노출 시킨 후 자연해수(17°C, 33 psu)에 7일 동안 수용하여 생존 여부를 관찰하였다. 실험기간 동안 먹이공급과 산소공급은 하지 않았으며, 실험해수는 매일 오전 11시에 전량 교환하였다.

#### 나. 생존율

생존율은 노출시간 및 회복일수에 따른 누적사망률을 생존율로 환산하였으며, SPSS 10.0 (SPSS,

Inc., Chicago, IL) 통계 프로그램을 이용하여 분석하였다. 노출에 따른 치사농도(Lethal Concentration LC)는 probit model을 이용하여 반수치사농도(96-h LC50)를 구하였다.

#### 다. 조직학적 방법

매일 실험해수를 교환하기 전 실험농도별로 2-3마리의 생존개체를 Bouin's fluid에 고정하였다. 조직학적 관찰을 위한 표본은 노출기간은 24시간마다, 회복기간은 격일로 채집하였다. 고정된 시료들은 파라핀 절편법에 의해 4-5 µm 두께로 연속절편 하였다. 그 후 AB-PAS(pH 2.5) 반응을 실시하여 광학현미경 관찰용 조직표본을 개체 당 10장씩 제작하였으며, 장당 10부분의 조직절편(100절편/개체)을 image measurement system(FOCUS technology, 2005)이 부착된 광학현미경(Olympus, CX31)으로 분석하였다. 진피층 내 분비세포의 분포(분비세포 면적/진피층 면적)는 실험구 당 100 지점씩 3회 반복 측정하여 백분율(%)로 나타냈다.

## III. 결과

### 1. 생존율

17°C에서 0 psu와 5 psu의 염분농도에 노출된 돌기해삼은 [Fig. 1]과 같이 24시간 내에 전 개체가 사망하였다. 10 psu의 염분농도에 노출된 개체들은 24시간에 50%, 48시간에 0%의 생존율을 보였다. 15 psu의 염분농도에 노출된 개체들은 노출 24시간까지는 전 개체가 생존하였으나, 노출 48시간에 50%로 감소한 후 72시간에 전 개체가 사망하였다. 20 psu의 염분농도에 노출된 개체들은 노출 72시간에 90%, 96시간에 70%의 생존율을 보였으나, 회복 2일(40%)부터 점차 감소하여 회복 5일에 전 개체가 사망하였다. 25 psu, 30 psu 및 35 psu에 노출된 개체들은 96시간 노출 및 회복 7일 동안 생존에 영향을 받지 않았다. 40 psu의 염분농도에 노출된 개체들은 96시간 노출에서는 사망개체가 관찰되지 않았지만,

회복 6일부터 생존율의 감소를 보였으며, 회복 7일에 70%를 나타냈다. 염분 농도별 노출에 따른 해삼의 반수치사농도(LC50)는 21.05 psu(confidence limits; 18.92 psu-23.31 psu)로 나타났다.

## 2. 피부계의 조직학적 변화

돌기해삼의 피부계는 [Fig. 2]와 같이 상피층은 상피세포들이 주로 분포하는 가운데 점액세포, 파립세포 등의 분비세포들이 관찰되었다[Fig. 2. A]. 진피층은 콜라겐섬유들이 불규칙하게 배열되어 있는 가운데 상피층과 가까운 부분은 성긴 구조를 하고 있었고, 내부로 내려갈수록 치밀한 구조를 하고 있었다[Fig. 3. A]. 또한 진피층에서는 alcian blue(pH 2.5)에 양성반응을 보이는 분비세포들이 군데군데 무리지어 분포하고 있었다[Fig. 4. A].

10-20 psu의 염분농도에 노출된 개체들은 대조구에 비해 상피층의 두께가 감소하였으며, 상피세포 핵 응축, 괴사 및 분비세포 감소가 관찰되었다[Fig. 2. B, C]. 40 psu의 염분농도에 노출된 개체들은 10-20 psu에 노출된 개체들과는 다르게 상피세포 비대, 분비세포 증가가 나타났다[Fig. 2. D]. 25-35 psu의 염분 농도에 노출된 개체들은 대조구와 별다른 차이를 보이지 않았다.

진피층의 콜라겐섬유는 10-20 psu에 노출된 개체들의 경우 대조구에 비해 드문드문 배열된 조직상이 도처에서 관찰되었고[Fig. 3. B, C], 40 psu에 노출된 개체들은 이와는 다르게 진피층 대부분이 치밀한 구조를 하고 있었다[Fig. 3. D]. 25-35 psu의 염분 농도에 노출된 개체들의 진피층은 상피층과 마찬가지로 대조구와 별다른 차이를 보이지 않았다.

Alcian blue(pH 2.5)에 양성반응을 보이는 분비세포들은 20 psu의 염분 농도에 노출된 개체들의 경우 노출 24시간에는 진피층 내 분포비율이 0.0054%로 증가하였다가 이후 점차 감소하여 노출 96시간에 0.0014%, 회복 3일에 0.0009%를 나

타냈다[Fig. 4. B, C] [Fig. 5]. 25-35 psu의 염분농도에 노출된 개체들은 노출 0시간 0.0019%와 비교해 노출 96시간에 0.0020%, 회복 7일에 0.0020%로 별다른 차이를 보이지 않았다[Fig. 5]. 40 psu의 염분 농도에 노출된 개체들은 꾸준한 증가로 인해 노출 96시간에 0.0093%로 증가하였고[Fig. 4. D], 회복일수에 따라 감소하는 경향을 보였지만, 회복 7일째에도 0.0040%로 다소 높게 나타났다 [Fig. 5].

## IV. 고찰

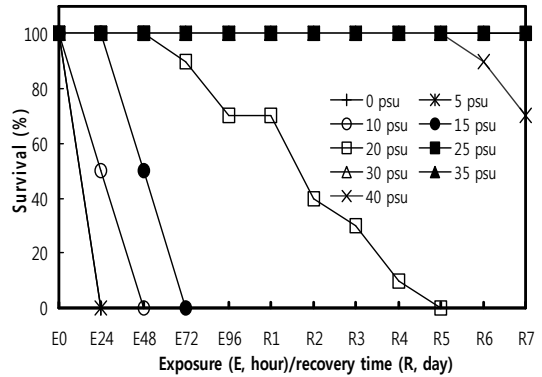
해삼은 서식지의 염분이 서서히 감소되었을 때 생존에 적합한 환경을 찾아 이동하지만, 장마철 집중호우 후 급격한 염분 감소로 인해 대량폐사가 나타난다(Liao, 1997 ; Dong et al., 2008). 때문에 특별한 삼투조절기관이 부족하거나 광범위한 염분 변동에 견딜 수 없는 협염성동물로 여겨져 왔지만(Shirley and Stickle, 1982), 최근 해삼이 체강의 불투조절 및 세포 내 삼투조절에 의해 22-38 psu의 염분에서 생존 가능성이 보고되었다(Yuan et al., 2010). 또한 Meiyang et al. (2010)은 습증량  $0.46 \pm 0.17$  g인 개체들의 경우 점진적 염분 변화에 넓은 내성을 보인 반면 급격한 염분변화는 좁은 내성 범위를 보이고, 저염분에 순응된 개체들일수록 광범위한 내성범위를 보여 삼투조절이 가능성을 보고하였다.

염분 농도에 따른 돌기해삼의 생존은 23°C, 30 psu에 순응된  $0.43 \pm 0.11$  g 개체들을 6시간 동안 2.5 psu 간격으로 염분 농도를 떨어뜨린 결과, 20 psu에서는 46.7%, 25 psu에서는 66.7%로 나타났으며(Meng et al., 2011), 17°C, 32 psu에 순응된  $2.56 \pm 0.08$  g의 개체들에서는 22-38 psu에서 60일 동안 실험한 결과 모든 실험 농도에서 100%의 생존율을 보였다(Zhang et al., 2011). 본 연구 결과에서는 17°C, 33 psu에 순응된  $1.0 \pm 0.2$  g의 개체들 중 20 psu 이하와 40 psu의 농도에 노출된

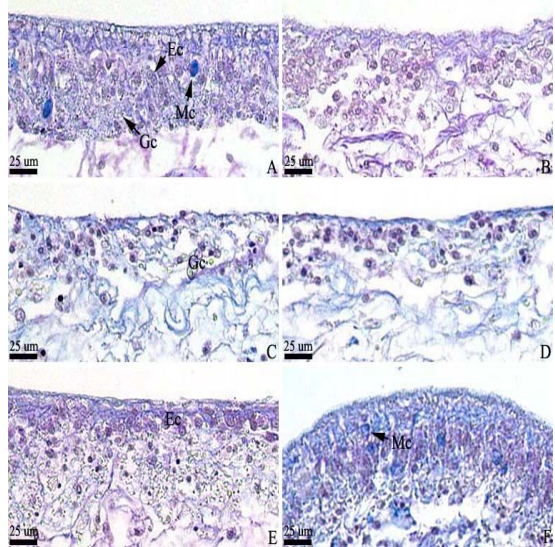
개체들에서 생존에 영향이 있는 것으로 나타났다. 염분 농도에 따른 해삼의 생존율이 다양한 결과를 보이는 이유는 개체의 크기, 순응 수온 및 염분 그리고 노출시간 등 다양한 조건에 따른 차이일 것으로 보인다.

외부 환경에 대한 일차적 방어기관인 피부계는 수온, 염분, 중금속 등 다양한 환경변화에 따라 상피층의 두께 감소, 상피세포의 괴사, 분비세포의 증가 및 감소 그리고 결합조직의 변화 등 여러 가지 구조적 이상을 보인다(Ingram, 1980 ; Roy et al., 1993 ; Iger et al., 1994). 본 연구결과 역시 저염분인 20 psu 이하에 노출된 개체들은 상피세포 핵 응축, 상피층 두께 감소, 점액세포의 소멸이 나타났으며, 고염분인 40 psu에 노출된 개체들은 상피세포 비대 및 점액세포 증가 현상이 관찰되어 염분농도에 따른 구조적 이상이 생존과 관련이 있으며, 저염분일수록 더욱 밀접한 관련성을 갖는 것으로 보인다. 특히 진피층 결합조직의 경우 저염분과 고염분이 뚜렷한 차이를 보이고 있었으며, alcian blue에 양성반응을 보이는 분비세포 역시 염분 농도에 따라 분포비율에서 차이를 보였다. 저염분과 고염분에서 나타난 분비세포의 분포 변화는 생존율과 피부계의 조직학적 변화와도 어느 정도 상관성을 가지고 있었다. 본 결과에서 나타난 것처럼 진피층 내 alcian blue에 양성반응을 보이는 분비세포는 Stichopin-containing cell과 매우 유사한 것으로 보인다(Tamori et al., 2007). 이 세포는 stichopin이라 불리는 면역활성물질을 포함하고 있는 내분비세포이며, 해삼 진피층을 포함한 다양한 결합조직에 분포한다. 또한 체벽 근육의 수축이나 체벽 내 결합조직의 강도변화에 영향을 주는 물질을 함유하고 있는 것으로 알려져 있고 toluidine blue에 양성반응을 나타낸다(Tamori et al., 2007). 본 결과에서 alcian blue에 양성반응을 보이는 분비세포의 증가 및 감소는 기존 보고와 같이 해삼의 수축 및 이완 그리고 회복 등에 밀접하게 관여하는 것으로 보이지만, 추후 다양한 연구가 수행된다

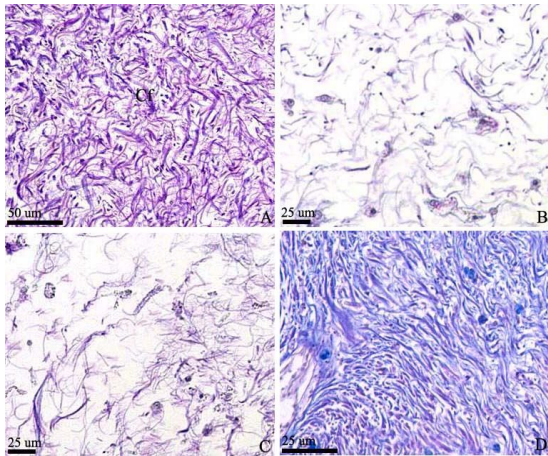
면 정확한 결론을 얻을 수 있을 것으로 판단된다.



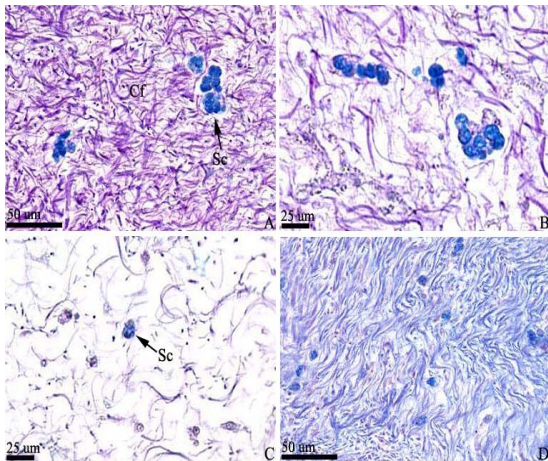
[Fig. 1] Survival rate of the juvenile sea cucumber, *Apostichopus japonicus* exposed to various salinity concentration



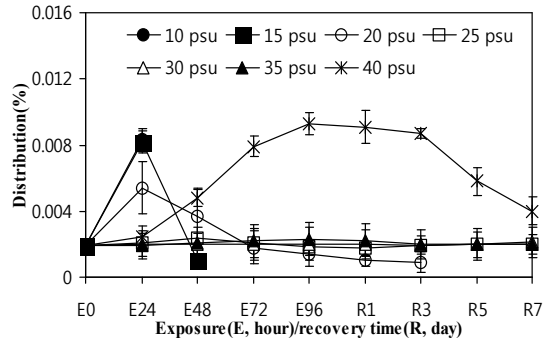
[Fig. 2] Histological variation of epidermal layer of the juvenile sea cucumber, *Apostichopus japonicus* exposed to various salinity concentration. A: control. B: 10 psu(24h exposure). C: 15 psu(24h exposure). D: 15 psu(48h exposure). E: 20 psu(96h exposure). F: 40 psu(96h exposure). Ec: epithelial cell, Gc: granular cell, Mc: mucous cell. AB-PAS(pH 2.5) reaction



[Fig. 3] Histological variation of dermal layer of the juvenile sea cucumber, *Apostichopus japonicus* exposed to various salinity concentration. A: Control. B: 15 psu(48h exposure). C: 20 psu(96h exposure). D: 40 psu(96h exposure). Cf: collagen fiber. AB-PAS(pH 2.5) reaction



[Fig. 4] Secretory cell(Sc) of dermal layer of the juvenile sea cucumber, *Apostichopus japonicus* exposed to various salinity concentration. A: Control. B: 20 psu(24h exposure). C: 20 psu(96h exposure). D: 40 psu(96h exposure). Cf: collagen fiber. AB-PAS(pH 2.5) reaction



[Fig. 5] Distribution of secretory cell(Sc) showing the alcian blue(pH 2.5) positive in dermal layer of the juvenile sea cucumber, *Apostichopus japonicus* exposed to various salinity concentration

## V. 요약

다양한 염분 농도에 따른 어린 돌기해삼의 생존과 피부계의 구조적 이상을 관찰하였다. 돌기해삼의 크기 및 수는 습중량  $1.0 \pm 0.2$  g, 250 개체였다. 실험농도는 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 및 40 psu 였으며, 96시간 노출 후 7일간 일반해수에서 회복과정을 통해 생존을 관찰하였다. 그 결과 25-35 psu에 노출된 개체들은 모두 100%의 생존율을 보였으며, LC50은 21.05 psu로 나타났다. 돌기해삼의 피부계는 20 psu 이하의 염분 농도에 노출된 개체들의 경우 상피층 두께 감소, 상피세포 핵 응축, 점액세포 감소 및 진피층 결합조직의 성긴 배열 등이 주로 관찰되었다. 하지만 이와는 반대로 40 psu의 염분 농도에 노출된 개체들은 상피세포 핵의 비대, 점액세포 증가 및 진피층 결합조직의 치밀배열 등이 나타났다. 진피층에서 관찰된 alcian blue(pH 2.5) 양성 분비세포들은 20 psu 이하에서는 노출 24시간 내에 대조구에 비해 급격한 증가 및 감소폭을 보였다. 40 psu에서는 노출시간이 길어질수록 증가한 후 회복일수에 따른 감소경향을 보였다.

## Reference

- Chen, J. X.(2004). Present status and prospects of sea cucumber industry in China. In: Lovatelli, A. · Conand, C. · Purcell, S. · Uthicke, S. · Hamel, J. F. · Mercier, A. (Eds.), ASCAM, FAO, Rome 25~38.
- Dong, Y. W. · Dong, S. L. & Meng, X. L.(2008). Effects of thermal and osmotic stress on growth, osmoregulation and Hsp70 in sea cucumber, *Apostichopus japonicus* Selenka, *Aquaculture*, 276, 179~186.
- Iger, Y. R. · Lock, A. C. · Meij, J. C. · Van der & Wendelaar Bonga, S. E.(1994). Effects of water-borne cadmium on the skin of the common carp, *Cyprinus carpio*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 26, 342~350.
- Ingram, G. A.(1980). Substances involved in the natural resistance of fish to infection- a review, *J. Fish. Biol.*, 16, 23~60.
- Kashenko, S.(2000). Acclimation of the sea cucumber, *Apostichopus japonicus* to decreased salinity at the blastula and gastrula stage: its effect on the desalination resistance of larvae at subsequent stages of development, *Rus. J. Mar. Biol.*, 26, 422~426.
- Kinne, O.(1963). The effects of temperature and salinity on marine and brackish water animals, I. Temperature. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, 1, 301~340.
- Li, L. & Li, Q.(2010). Effects of stocking density, temperature, and salinity on larval survival and growth of the red race of the sea cucumber, *Apostichopus japonicus*(Selenka), *Aquaculture Int.*, 18, 447~460.
- Liao, Y. L.(1997). *Fauna Sinica: Phylum Echinodermata Class Holothuroidea*, Science Press, Beijing, 21~37.
- Meiyan, H. · Qi, L. & Li, L.(2010). Effect of salinity and temperature on salinity tolerance of the sea cucumber, *Apostichopus japonicus*, *Fish. Sci.*, 76, 267~273.
- Meng, X. L. · Dong, Y. W. · Dong, S. L. · Yu, S. S. & Zhou, X.(2011). Mortality of the sea cucumber, *Apostichopus japonicus* Selenka, exposed to acute salinity decrease and related physiological responses: Osmoregulation and heat shock protein expression, *Aquaculture*, 316, 88~92.
- Re, A. D. · Diaz, F. · Sierra, E. · Rodriguez, J. & Perez, E.(2005). Effect of salinity and temperature on thermal tolerance of brown shrimp, *Farfantepenaeus aztecus* (Ives) (Crustacea, Penaeidae), *J. Therm. Biol.*, 30, 618~622.
- Roy, U. K. · Gupta, A. K. & Chakrabarti, P.(1993). Deleterious effect of zinc on the skin of *Notopterus notopterus* (Pallas), *J. Freshwat. Biol.*, 5, 191~196.
- Shirley, T. C. & Stickle, W. B.(1982). Responses of *leptasterias hexactis* (Echinodermata: Asteroidea) to low salinity. I. Nitrogen metabolism, respiration and energy budget, *Mar. Biol.*, 69, 155~163.
- Tamori, M. · Saha, A. K. · Matsuno, A. · Noskor, S. C. · Koizumi, O. · Kobayakawa, Y. · Nakajima, Y. · Motokawa, T.(2007). Stichopin-containing nerves and secretory cells specific to connective tissues of the sea cucumber, *Proc. R. Soc. Bio.*, 274, 2279~2285.
- Verween, A. · Vincx, M. & Degraer, S.(2007). The effect of temperature and salinity on the survival of *Mytilopsis leucophaeata* larvae (Mollusca, Bivalvia): the search for environmental limits, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 348, 111~120.
- Yuan, X. T. · Yang, H. S. · Wang, L. L. · Zhou, Y. & Gabr, H. R.(2010). Effects of salinity on energy budget in pondcultured sea cucumber, *Apostichopus japonicus*(Selenka) (Echinodermata: Holothuroidea), *Aquaculture*, 306, 348~351.
- Yuan, X. T. · Yang, H. S. · Zhou, Y. · Mao, Y. Z. · Zhang, T. & Liu, Y.(2006). Salinity effect on respiration and excretion of sea cucumber, *Apostichopus japonicus* (Selenka), *Oceanol. Limnol. Sin.*, 37, 348~354.
- Zhang, P. · Dong, S. · Wang, F. · Wang, H. · Gao, W. · Yan, Y.(2011). Effect of salinity on growth and energy budget of red and green colour variant sea cucumber, *Apostichopus japonicus* (Selenka), *Aquaculture Res.*, 1~9.

- 
- 논문접수일 : 2013년 10월 24일
  - 심사완료일 : 1차 - 2013년 12월 03일
  - 게재확정일 : 2013년 12월 04일