

적정 수송 조건하의 활어용 컨테이너 내 참전복(*Haliotis discus hannai*)의 생존 및 생리 변화 구명

양성진 · 전제천 · 강희웅 · 박노백 · 민병화^{1*}

국립수산과학원 양식관리과, ¹동해수산연구소 양식산업과

Survival Rates and Physiological Response of Pacific Abalone *Haliotis discus hannai* Held in Live Fish Containers

Sung Jin Yang, Je-Cheon Jun, Hee Woong Kang, Noh Back Park and Byung Hwa Min^{1*}

Aquaculture Management Division, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Korea

¹Aquaculture Industry Research Division, East Sea Fisheries Research Institute, Gangneung 25435, Korea

This study investigated survival rates and physiological responses in Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*) to 18 days of containment in live fish containers (8°C, 34 psu). The investigation was divided into three periods: before, during, and recovery after transportation. The overall survival rate was greater than 99%. Glucose, aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) rose immediately on the first day of containment, but then gradually returned to normal levels. NH₃ continued to rise after the first day, but during the recovery period it decreased to a level not significantly different from that of the control group. Na⁺ and osmolality did not show any abnormal changes. After recovery, superoxide dismutase (SOD) was not significantly different from control. Abalone in the experimental group had lower glutathione reductase (GR) than control. The hyalinocyte ratio fell immediately after confinement, but then gradually increased until it reached a normal level. The ratios of apoptotic and necrotic cells indicated no specific variations in hemocyte viability. Histological changes in the epidermal layer and muscle layer of the foot were not significantly different from those seen in the control group. The experimental data obtained in this study suggest that live fish containers may be used for transport of Pacific abalone without significantly impacting their physiology or survival rates.

Key words: Pacific abalone, *Haliotis discus hannai*, Live-fish container, Survival, Stress response

서론

활수산물은 주로 한국과 일본 등에서 제한적으로 소비되어왔지만, 최근 들어 보다 많은 국가에서 선호하는 식품으로 소비되고 있어 국가 간의 활수산물 교역량도 크게 증대될 전망이다. 활수산물 수입 또는 수출은 주로 항공기나 선박을 이용하여 이루어지고 있다. 항공 수송은 신속하다는 장점이 있지만 수송비가 비싸며 수송 품종이 제한적인 단점이 있다(Piper et al., 1982; Berka, 1986). 반면, 선박 수송은 항공수송에 비해 비용이 저렴하며, 대량으로 수송할 수 있는 장점이 있지만 수송시간이 길다는 단점이 있다.

활어패를 장시간 수송할 경우 수송생물의 대사작용으로 인해 수질이 점차 악화되며, 수중에 대사 산물인 암모니아 및 이산화탄소 농도가 일정범위를 초과하게 되면 그 독성으로 수송생물

은 폐사하게 된다(Wedemeyer, 1996; King, 2009). 또한, 배출된 배설물에서 발생된 미세 부유물질은 수송어류의 아가미에 직접적인 손상을 입히기도 한다(Harmon, 2009). 더구나 수송 스트레스로 인해 수송전보다 수송생물의 대사량이 약 3배 가량 높기 때문에 운반수의 수질은 빨리 악화된다(Froese, 1988).

이를 해결하기 위해서는 활어패류의 대사량을 낮게 유지시킨 채 운반할 수 있는 기술이 필요하며, 이에 대한 연구로 한국에서는 2012년 활어의 저온수송이 가능한 선박용 컨테이너가 개발되었다. 그러나 수송 생물의 임계수온과 같은 생리 특성을 고려하지 못한 장시간의 저온 수송은 대상생물에게 극심한 스트레스 요인으로 작용하여 이들의 생리 활성을 떨어뜨리거나 폐사를 유발하므로(Wedemeyer, 1996; Harmon, 2009), 수송생물의 안정적인 수송을 위해서는 이들의 적정수송 조건의 탐색이 선행되어야 한다.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2018.0238>



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Korean J Fish Aquat Sci 51(3) 238-247, June 2018

Received 30 March 2018; Revised 13 April 2018; Accepted 3 May 2018

*Corresponding author: Tel: +82. 33. 660. 8542 Fax: +82. 33. 661. 8514

E-mail address: pkmbh@Korea.kr

일반적으로 대사량은 수온에 비례하므로, 수송 시 대사량을 줄이기 위해서는 수온을 낮추어야 한다. 그러나, 저온에 대한 임계점이나 생리학적 반응은 어종에 따라 다양하게 나타나 수송하는 대상에 따른 적정 수송 온도 구멍이 우선시 되어야 한다. 예를 들어 전복과 같은 무척추동물의 경우 brown crab *Cancer Pagurus*는 2-10°C (Fotedar and Evans, 2011), lobster *Panulirus cygnus*와 European lobster *Homarus gammarus*는 각각 12-15°C와 5-10°C (Whiteley and Taylor, 1992)가 수송에 적합한 수온으로 나타났다.

우리나라에서 참전복(*Haliotis discus hannai*)의 양식 생산량은 2000년에 20톤이었던 것이 2017년도에는 16,027톤으로 급격하게 증가하였다. 생산량은 전체 패류 양식 생산량 중 3.7%에 불과하지만, 생산금액은 5,773억원으로 전체 생산 금액의 63.9%의 비중을 차지하는 고부가가치 품종이다(MOF, 2017). 이러한 상황을 고려해서 수산물 수출전략품종으로 지정되어 해외로 수출하기 위한 장거리 수송에 관한 연구가 이루어졌으며, 그 결과 참전복의 적정 수송 수온이 8-10°C로 구명되었다(Yang et al., 2014). 하지만 보다 안정적인 수송을 위해선 구멍된 조건으로 참전복을 실제 수송용 컨테이너에 수용하였을 때 참전복의 건강도에 대한 모니터링이 필요하다. 일반적으로 수서동물의 Glucose, AST (aspartate aminotransferase), ALT (alanine aminotransferase), NH₃ 등의 혈액성상은 건강도와 관련이 있으며(Davis and Parker, 1990; Van et al., 1996), 스트레스에 의해 항산화효소(Zoysa et al., 2009), hemocyte population (Hégaret et al., 2003) 및 hemocyte mortality (Kiss, 2010), 그리고 조직학적 변화(Gosling, 2004)와 같은 생리적 변화가 발생하므로 이를 건강도 측정 지표로 사용이 가능하다.

따라서 본 연구는 앞서 구멍된 수송조건이 참전복 장거리 수송 시 적합한지 최종적으로 확인하기 위해 실제 수송용 컨테이너 수조에 참전복을 장시간 수용하여 생존율 및 다양한 생리변화를 조사하여 수송 중과 수송 후 회복 시 폐사 발생 및 건강도 이상 여부를 파악하고자 하였다.

재료 및 방법

실험 생물 및 실험 조건

실험을 위하여 참전복(각장 7.5±0.4 cm, 전중 54.0±7.0 g)을 경남 통영에 소재한 양식장(May, 2014)에서 구입하여 거제 수협 수산물 종합가공공장(거제시 사등면)으로 옮겨와 유수식 콘크리트 수조에서 수온 15±1°C, 염분 33.5±0.5 psu의 조건으로 2주간 순치시킨 후 실험에 사용하였다. 장거리 수송 시 참전복의 건강도를 모니터링하기 위하여 실제 수송용 컨테이너와 동일한 구조의 여과기, 냉각기, 산소발생기 등이 설치된 시험 수조(1 톤)를 제작하여 실험에 사용하였다. 실제 활어용 컨테이너 수송 시를 가정하여 2주간 순치시킨 참전복을 수송 전 대조구로 사용하였으며, 활어용 컨테이너에 참전복(143 kg, 약 2,860마

리)을 수용한 후, 적정 수송 조건(8°C, 34±0.5 psu)으로 14일간 유지시켜 수송 기간으로 설정하였다. 또한 14일 후 수조의 수온을 서서히 원래의 수온(15°C)으로 회복시켜 4일 동안 수용하였으며 이를 회복기간으로 설정하였다. 산소는 에어레이션을 충분히 하여 공급하였으며, 부착된 센서로 용존산소의 포화농도를 90% 이상으로 유지시켰다. 매일 부착기질에서 탈락되어 있는 전복 중 인위적인 자극을 가하여 발근육의 수축반응이 없는 개체를 확인하여 생존율을 조사하였으며, 실험기간 동안 전복은 99% 이상 생존하였다.

혈림프액 채취

수송 전(대조구)과 0일 째(수송 직후), 7일 째, 14일 째 그리고 18일 째(회복 4일) 전복을 15마리씩 무작위로 잡아 혈림프액을 채취하였다. 혈림프액은 3 mL 주사기(26 G)를 이용하여 입분봉에서 약 1 cm 밑 발근육 내부의 cephalic arterial sinus에서 채취하였다. 채취한 혈림프액은 즉시 얼음에 보관하여 실험실로 옮겨와 분석에 사용하였다. 혈림프액의 일부는 hemocyte population, hemocyte mortality 조사를 위해 즉시 분석에 사용하였으며, 나머지는 원심분리(14,000 g, 4°C, 10분) 후 상층액만 따로 분리하여 혈림프액 성상 및 antioxidant enzyme 분석을 위해 -80°C에 보관하였다.

혈림프액 성상 및 antioxidant enzyme 분석

혈림프액의 glucose, NH₃, AST, ALT와 이온(Na⁺)은 건식임상화학자동분석장치(FUJI DRI-CHEM 4000i, Japan)를 이용하여 측정하였다. 삼투질 농도는 Vapor Pressure Osmometer (Wescor Co., USA)로 측정하였다.

혈림프액의 SOD (superoxide dismutase) activity는 SOD assay kit (Cayman chemical company, USA)를 이용하여 tetrazolium salt로 xanthine oxidase과 hypoxanthine에 의해 생성되는 superoxide radicals을 검출하는 방법으로 측정하였다. 간략히 설명하자면, Standard solution과 희석된 혈림프액을 지정된 well에 각각 10 µL씩 넣고, 희석된 radical detector를 200 µL씩 첨가하였다. 여기에 희석된 xanthine oxidase solution을 20 µL씩 첨가하여 30분간 반응시킨 후(room temperature, dark), microplate-reader (Bio-Tek, USA)를 이용해서 440 nm로 OD (optical density)값을 측정하였다. Standard curve의 linear regression analysis으로부터 얻어진 공식에 의해 SOD activity를 계산하였으며, SOD의 1 unit은 superoxide radical이 50% dismutation 될 때 필요한 효소의 양으로 정의하였다.

혈림프액의 glutathione 함량은 glutathione assay kit (Cayman chemical company, USA)를 사용해서 분석하였다. Standard solution과 혈림프액을 well에 각각 50 µL씩 넣은 뒤 준비한 assay cocktail (MES buffer 11.25 mL + reconstituted cofactor mixture 0.45 mL + reconstituted enzyme mixture 2.1 mL + water 2.3 mL + reconstituted DTNB 0.45 mL)을 150 µL씩 첨가하였다. 10분간 반응시킨 후(room temperature, dark), 405

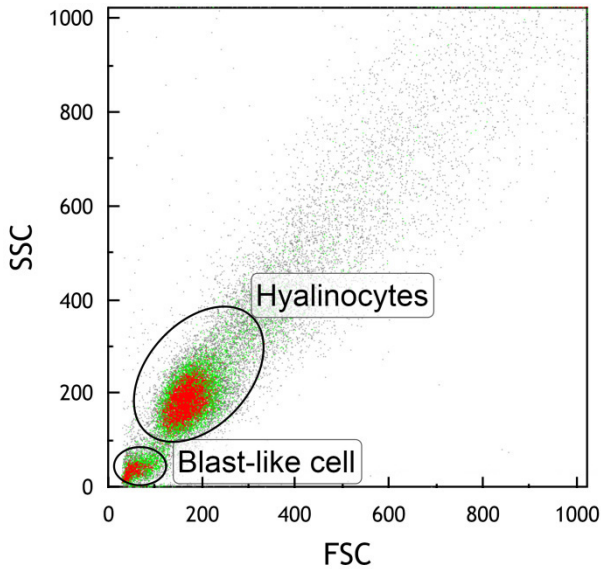


Fig. 1. Flow cytometric determination of the hemocyte populations of abalone *Haliotis discus hannai*. Two populations of hemocytes were distinguishable in abalone: blast-like cells and hyalinocytes. Representative results of 15 abalone individuals. SSC, side scatter; FSC, forward scatter.

nm로 OD값을 측정하여 standard curve로부터 glutathione 함량을 계산하였다.

유세포 분석

혈림프액의 hemocyte population 및 hemocyte mortality는 flow cytometry (Gallios flow cytometry, Beckman Coulter, USA)로 분석하였다. Hemocyte population은 200 μ L의 혈림프액을 동일량의 3% 포르말린으로 고정시킨 후, SYBR green I (Sigma, USA)을 첨가하여 실온에서 90분간 반응시켰다. 이후 flow cytometry의 FL-1 detector를 이용하여 SYBR green I에 염색된 혈구만을 선택하여 forward scatter (FSC) detector와 slide scatter (SSC) detector를 이용하여 혈구의 크기와 내부 밀도에 따라 분류하였다(Fig. 1). Hemocyte mortality는 PE Annexin V apoptosis detection kit (BD Pharmingen™, USA)를 사용하여 혈구를 PE Annexin V와 7-Amino-Actinomycin (7-AAD)로 이중염색을 하여 측정하였다. 간략히 설명하자면 먼저 혈구수를 10^6 - 10^7 cells/ml로 맞추기 위해 혈림프액 내 혈구수를 hemocytometer를 이용하여 측정 후 binding buffer [0.1 M HEPES/NaOH (pH 7.4), 1.4 M NaCl, 25 mM CaCl₂]로 희석시켰다. 희석된 혈림프액 100 μ L에 PE Annexin V와 7-AAD를 각각 5 μ L씩 첨가한 후 15분간 반응시켰다(dark, room temperature). 이후 binding buffer 400 μ L를 첨가하여 flow cytometry로 1시간 이내에 염색 유무를 분석하여 live cells (염색 반응 없음), apoptotic cells (Annexin V에 염색), ne-

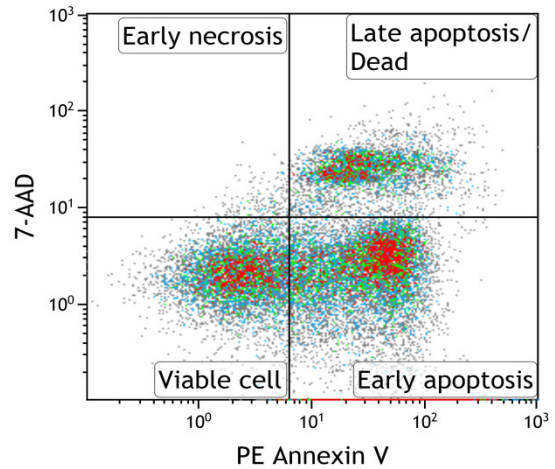


Fig. 2. Flow cytometric analysis of 7-AAD and PE Annexin V staining for discrimination of apoptosis and necrosis of hemocytes of abalone *Haliotis discus hannai*. Representative results of 15 abalone individuals. PE, Phycoerythrin.

rotic cells (7-AAD에 염색)로 구분하였다(Fig. 2).

조직학적 분석

실험시간에 따른 조직변화를 알아보기 위해 실험 개시(대조구), 실험 7일째 및 실험 종료 시(Day 14) 대조구와 실험구 전복의 발근육 조직을 적출하여 조직학적 분석을 실시하였다. 광학현미경 조직표본 제작은 적출한 시료들을 10% 중성포르말린 용액에 24시간 동안 고정하고, 1 mm 두께로 잘라다시 10% 중성포르말린 용액에 24시간 동안 재고정 한 후 24시간 동안 흐르는 물에 수세하였다. 그 후 표본조직가공기(Leica, Germany)를 이용하여 70%, 80%, 90%, 95%, 100% 순으로 1시간씩 단계별 ethanol 탈수과정을 거친 후 paraplant (McCormick, USA)에 2시간 동안 침투시켜 파라핀 포매기(Leica EG 1150H, Germany)를 이용해 포매를 하였다. 포매된 시료는 microtome (RM2235, Leica, Germany)을 이용하여 4 μ m 두께로 연속 절편하여 조직표본을 제작한 후 harris hematoxylin-eosin Y (H-E) 대비 염색을 하여 광학현미경(Carl Zeiss, DE/Axioscope A1)으로 관찰하였다.

통계 처리

실험의 결과 값은 평균 \pm 표준편차로 나타내었으며, 대조구 및 실험구간 유의성($P < 0.05$)은 SPSS program (Ver. 17.0)을 사용하여 One-way ANOVA test로 검증하였다.

결 과

혈림프액 성상

참전복의 혈림프액 성분 변화는 Fig. 3에 나타내었다. Glucose

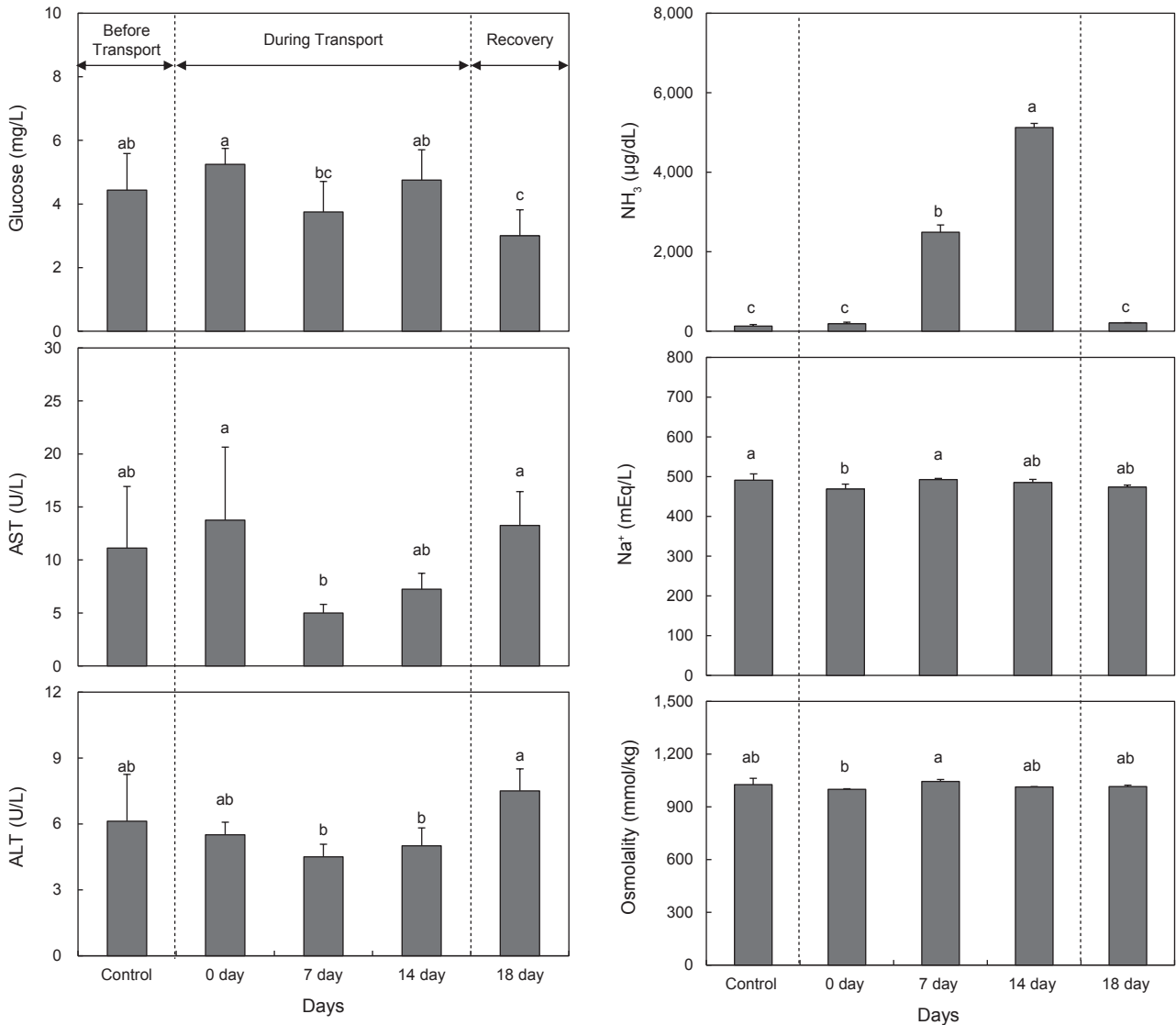


Fig. 3. Change of hemolymph parameters of Pacific abalone *Haliotis discus hannai* in live fish-container for 18 days (14 days experiment period+4 days recovery period). AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase. Values are presented as mean±standard deviation; For each day, n=15. Different small letters mean significant difference (P<0.05).

는 활어용 컨테이너 수용 직후(0 일째) 5.3 ± 0.5 mg/dL로 대조구의 4.1 ± 1.2 mg/dL보다 유의하게 증가하였지만 실험 7일째 부터 다시 낮아져 14일째와 그 이후 회복기에는 대조구와 유의한 차이가 없거나 낮았다(P<0.05). AST는 0일 째 13.8 ± 6.9 U/L로 대조구에 비해 유의하게 증가하였지만 점차 낮아져 14일째는 유의한 차이가 없었으나 회복기에는 13.3 ± 3.2 U/L로 다소 상승하였다(P<0.05). ALT는 0일 째 (5.5 ± 0.6 U/L)에는 대조구 (6.1 ± 2.1 U/L)와 유의한 차이가 없었고, 시간이 경과함에 따라 낮아졌지만 회복 후 7.5 ± 1.0 U/L로 유의하게 증가하여 AST와 비슷한 경향이 나타났다.

NH₃는 실험기간 동안 계속 증가하여 14일째 5126 ± 104 µg/dL로 대조구의 130 ± 39 µg/dL에 비해 약 36배 가량 높게 나타났다. 회복 후에는 208 ± 11 µg/dL로 다시 낮아져 대조구와 유의한 차이가 없었다. Na⁺는 0일 째 실험구가 469 ± 13 mEq/L로 대조구(491 ± 16 mEq/L)보다 유의하게 낮았으나(P<0.05), 그 이후로 큰 차이가 없었다. 삼투압은 Na⁺와 유사한 경향이 나타났다.

Antioxidant enzyme

SOD 활성은 0일 째부터 7일째까지는 대조구(1.08 ± 0.16 U/

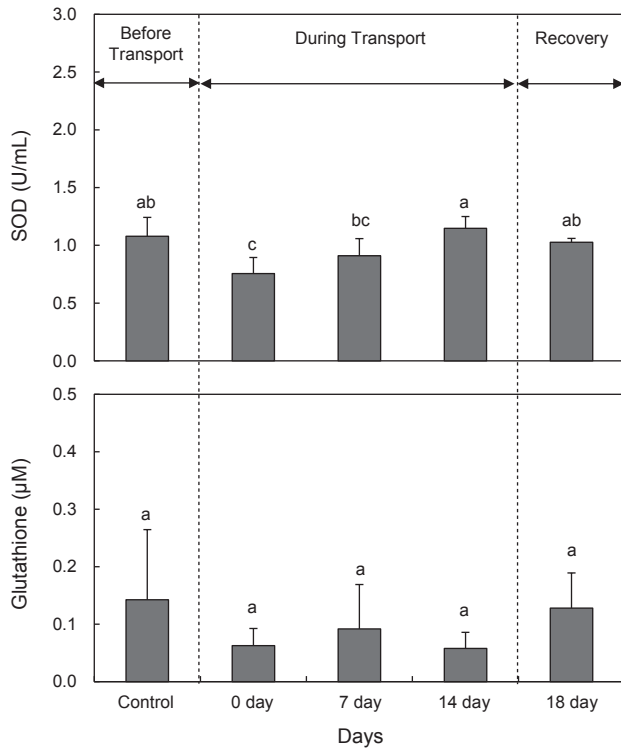


Fig. 4. Change of SOD and glutathione activity in the hemolymph of Pacific abalone *Haliotis discus hannai* in live fish-container for 18 days (14 days experiment period+4 days recovery period). SOD, superoxide dismutase. Values are presented as mean±standard deviation; For each day, n=15. Different small letters mean significant difference (P<0.05).

mL)에 비해 유의하게 낮아졌지만 14일째 1.15 ± 0.10 U/mL으로 유의하게 높았으며(P<0.05), 이후 회복기에는 다시 낮아져 1.03 ± 0.03 U/mL으로 대조구와 차이가 없었다. Glutathione은 전 실험기간동안 대조구와 실험구간 유의한 차이가 없었다(Fig. 4).

Hemocyte population

Hemocyte population 비율 변화는 Fig. 5에 나타내었다. blast-like cell 비율은 0일째 $16.4 \pm 2.3\%$ 로 대조구($6.1 \pm 1.8\%$)에 비해 급격히 증가하였지만 시간이 경과함에 따라 점차 낮아져 14일째부터 대조구와 유의한 차이가 없거나 낮았다(P<0.05). Hyalinocyte 비율은 0일째 $83.6 \pm 2.3\%$ 로 대조구($93.9 \pm 1.8\%$)보다 낮았지만 시간이 경과함에 따라 다시 높아져 14일째 대조구와 유의한 차이가 없었다(P<0.05).

Hemocyte mortality

Hemocyte mortality 변화는 Fig. 6에 나타내었다. 0일째, 7일째, 14일째 viable cell비율이 29.2-31.7%로 대조구

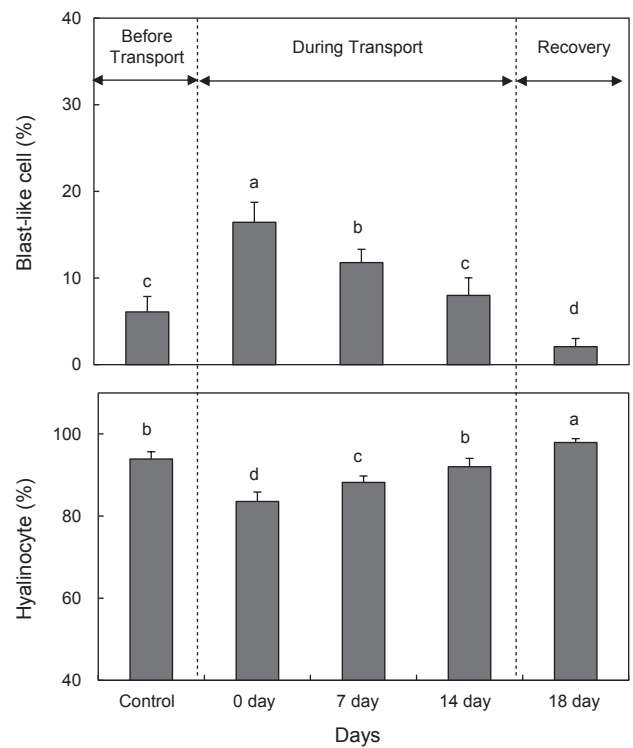


Fig. 5. Change of hemocyte population in Pacific abalone *Haliotis discus hannai* in live fish-container for 18 days (14 days experiment period+4 days recovery period). Values are presented as mean±standard deviation; For each day, n=15. Different small letters mean significant difference (P<0.05).

($20.6 \pm 3.0\%$)에 비해 유의하게 높았으며(P<0.05), 회복기에는 $14.6 \pm 6.4\%$ 로 대조구와 차이가 없었다. Apoptotic cell의 비율은 0일째 7일째 63.4 ± 2.5 - $65.1 \pm 3.1\%$ 로 대조구($75.4 \pm 3.4\%$)에 비해 유의하게 낮았으며, 14일째는 $69.9 \pm 24.0\%$ 로 대조구와 유의한 차이가 없었으나 회복기에는 $81.9 \pm 9.6\%$ 으로 가장 높았다(P<0.05). Necrotic cell의 비율은 실험구에서 14일째 $1.0 \pm 0.3\%$ 로 유의하게 낮게 나타났으며(P<0.05) 나머지 기간 동안은 대조구와 유의한 차이가 없었다.

조직학적 변화

대조구와 7일째, 14일째 참전복의 발 상피층과 근육층의 조직학적 변화를 Fig. 7과 Fig. 8에 나타내었다. 대조구 전복 발의 상피층은 단층의 원주형 상피로 구성되어 있었으며, 상피세포의 핵은 세포의 기저부에 존재하고 있었다. 상피층에는 상피세포 이외에 타원형의 점액세포도 관찰되었다. 전복 발의 근육층은 가로와 세로로 교차된 근섬유다발들이 조밀하게 분포하고 있었다. 실험 7일째와 14일째의 조직학적 변화를 살펴보면 실험구의 발 상피층과 근육층의 조직학적 변화는 실험개시기와 비교하였을 때 뚜렷한 차이가 관찰되지 않았다.

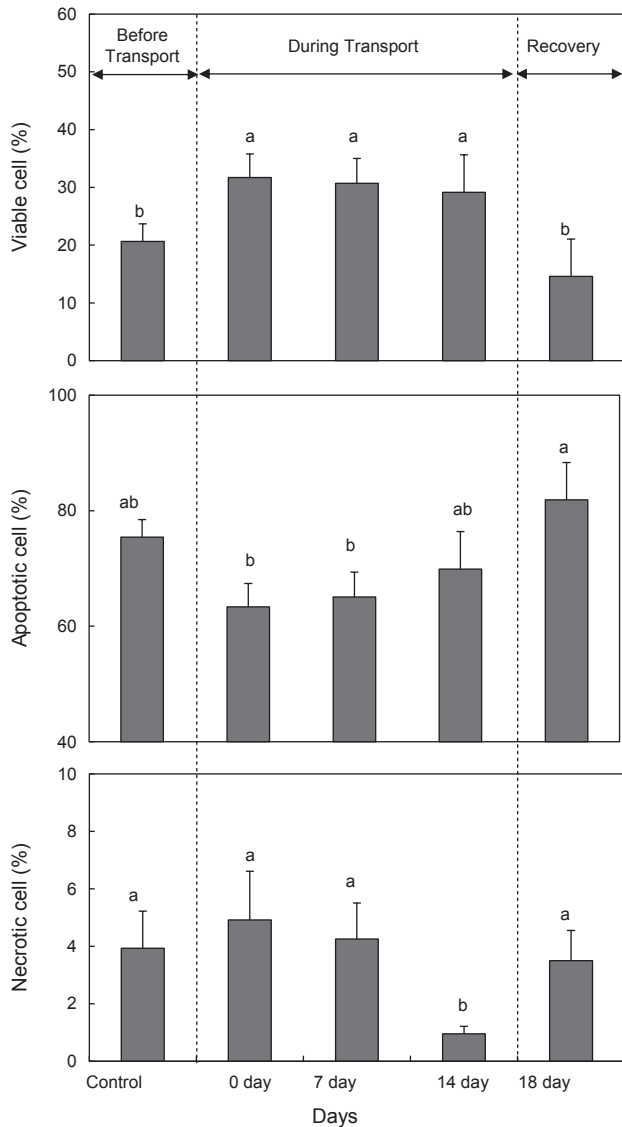


Fig. 6. Change of hemocyte mortality in Pacific abalone *Haliotis discus hannai* in live fish-container for 18 days (14 days experiment period+4 days recovery period). Values are presented as mean±standard deviation; For each day, n=15. Different small letters mean significant difference (P<0.05).

고찰

수생생물은 환경 변화에 의해 스트레스를 받게 될 경우 혈액 성분 변화, 면역력 감소 및 조직변형과 같은 다양한 생리적 변화가 일어나며 이러한 생리적 변화는 스트레스 지표로 사용이 가능하여 생물의 건강도를 판단할 수 있다(Davis and Parker, 1990; Van et al., 1996; Souza and Scemes, 2000). 해양생물은 여러 스트레스 요인으로부터 항상성을 유지하기 위해 에너지

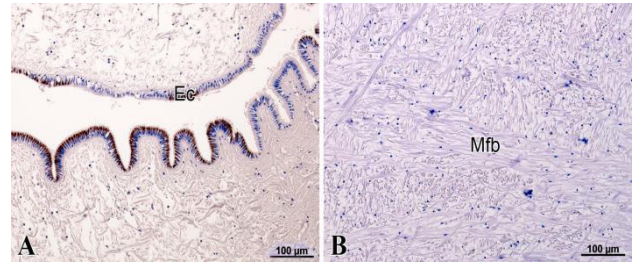


Fig. 7. Microscopic image of a histological section of Pacific abalone *Haliotis discus hannai* at initial experiment. A, epidermal layer; B, foot muscular layer; Ec, epidermal cell; Mfb, muscle fiber bundle.

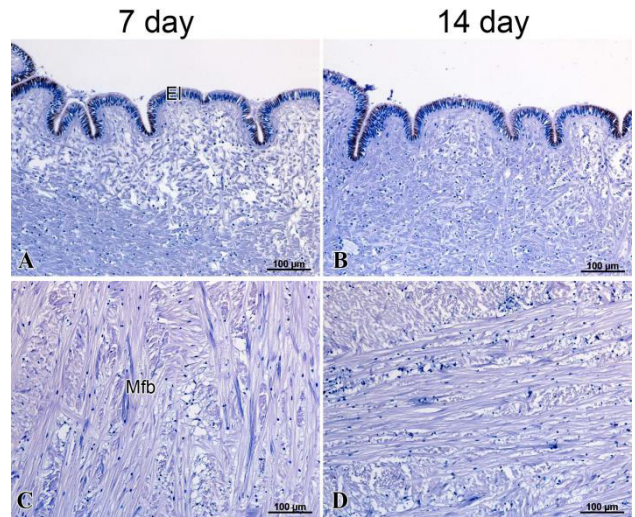


Fig. 8. Microscopic image of a histological section of Pacific abalone *Haliotis discus hannai*. A, epidermal layer (7 days); B, epidermal layer (14 days); C, foot muscular layer (7 days); D, foot muscular layer (14 days); El, epidermal layer; Mfb, muscle fiber bundle.

사용한다(Vijayan et al., 1996). 패류의 경우에도 스트레스를 받을 시 항상성 유지를 위한 에너지 요구가 높아져 glucose 농도가 상승하게 되므로 스트레스 지표로 사용이 된다(Gustafon et al, 2005).

수송 시 선별과 선적 과정은 수송생물에게 스트레스를 유발하여 수송 시 폐사와 건강도 하락에 영향을 주게 되어 문제로 작용하지만 본 연구에서 전복의 경우는 활어용 컨테이너에 수송 직후인 0일째 glucose의 농도가 5.3 ± 0.5 mg/dL로 대조구 (4.4 ± 1.2 mg/dL)에 비해 차이가 거의 없었다. 이는 부착성인 전복은 유영성인 어류에 비해 수송 초기 핸들링에 의한 스트레스가 적게 작용하는 것으로 여겨져, 어류에 비해 경우 수송이 더 안정적일 것으로 사료된다.

아민기 전이효소의 일종인 AST와 ALT는 간 조직에 손상이

생길 시 혈중으로 유출되어 농도가 상승하며, 패류에서는 혈림프액으로 유출되므로 간 기능을 반영하는 지표로 사용된다 (Smith and Ramos 1980; Casillas et al., 1982). 전복과 같은 해산패류인 피조개(*Scapharca broughtonii*)와 개량조개(*Macra chinensis*)의 경우 스트레스를 받을 경우 혈림프액의 AST와 ALT 농도가 증가하는 것으로 보고되었다(An and Choi, 2010; Ryu, 2014). 본 연구에서는 혈림프액 내 AST와 ALT 농도는 0 일째와 7일째 대조구에 비해 다소 낮아졌지만 그 차이가 크지 않고, 회복기에는 다시 대조구와 유의한 차이가 없어 이는 저온 조건에 의한 일시적인 현상으로 보이며, 본 연구의 수송방법 및 조건은 전복의 간기능을 저하에 영향을 끼치지 않을 것 사료된다.

Randall and Tsui (2002)은 수서생물의 경우 간기능이 저하되어 NH₃가 원활하게 배출되지 못할 경우 체내에 축적되어 혈액 내 NH₃ 농도가 증가한다고 보고하였다. 본 연구에서 실험구의 경우는 NH₃ 농도가 7일째부터 대조구에 비해 18-36배가량 높게 나타났다. 하지만 간기능 지표인 AST와 ALT의 유의한 차이는 없는 것으로 나타나 이러한 NH₃ 농도 상승은 활어용 컨테이너 내 참전복의 대사작용에 의한 운반수의 NH₃ 농도 상승 때문인 것으로 여겨진다. Evan et al. (2005)는 NH₃ 농도가 생물체 내부에 비해 외부가 더 높을 경우 내부로 NH₃가 유입된다고 보고하였으며, 조피볼락의 경우도 혈장 NH₃ 농도는 사육수의 NH₃ 농도가 증가함에 따라 높아진다고 보고된 바 있다(Min et al., 2014). 본 연구에서 실험구의 혈림프액 내의 NH₃가 대조구보다 높았지만, 실험기간 동안 폐사가 발생하지 않았고, 회복 이후 실험구의 NH₃ 농도가 대조구와 비슷한 수준으로 낮아져 본 실험에 사용된 수송용 컨테이너 수조의 일시적인 운반수의 NH₃ 농도 상승은 전복의 건강도에 크게 영향을 끼치지 않아 장거리 수송에 문제가 없는 것으로 사료된다.

해산 패류의 경우의 생리적 한계 범위를 벗어난 스트레스를 받게 되면 이온 및 삼투조절에 문제가 발생한다(Hildreth and stickle, 1980; Cheng et al., 2002). 본 연구에서는 이온 및 삼투질 농도는 실험 기간 동안 대조구와 실험구가 비슷하게 나타나 수송 후 전복의 이온 및 삼투질 조절 능력에 장애가 없을 것으로 사료 된다.

일반적으로 생물은 스트레스를 받게 되면 체내에 oxygen free radical이 생성된다. Oxygen free radical는 산화력이 매우 강하여 아미노산을 산화시켜 단백질 기능을 저하시키거나 핵산과 세포막을 손상시켜 생리적 기능 장애의 원인으로 작용한다(Anderson et al., 1992). Oxygen free radical에 대한 체내 방어기작으로 antioxidant enzyme이 생성되며 이로 인해 oxygen free radical이 제거된다. 이러한 antioxidant enzyme로는 SOD, catalase, glutathione이 있다(Roch, 1999). SOD에 의해 free radical이 생물에 무해한 O₂와 H₂O₂로 분해되고, H₂O₂는 다시 catalase에 의해 O₂와 H₂O로 분해가 되며, 이때 미처 분해되지 못한 나머지 H₂O₂는 glutathione에 의해 분해가 되어 최종적으로

로 oxygen free radical이 제거되게 된다(Nordberg and Amer, 2001). 따라서 수서생물도 스트레스를 받게 되면 antioxidant enzyme 활성이 높아지기 때문에 혈중 antioxidant enzyme 농도는 스트레스 지표로 사용된다(Farombi et al., 2007; Zoysa et al., 2009). South African abalone *Haliotis midae*의 경우 hyperoxia상태일 때 정상보다 glutathione peroxidase의 활성이 높게 나타났으며(Vosloo et al., 2013), 참전복의 경우도 수온 스트레스를 받을 경우 SOD활성이 높게 나타났다(Kim et al., 2005). 본 연구에서 SOD 활성은 14일째 대조구에 비해 유의하게 높았으나 나머지 실험기간에는 대조구에 비해 유의하게 낮았으며, 회복 이후 대조구와 차이가 없었으며, 또한 glutathione 농도도 전 실험기간 동안 대조구와 유의한 차이가 없는 것으로 나타나 본 논문의 수송방법 및 조건은 참전복에게 oxidative stress를 유발하지 않는 것으로 사료된다.

Portz et al. (2006)는 수송 스트레스로 인한 면역력 저하로 수송 이후 수송생물의 폐사가 발생할 수 있으며, 이러한 현상을 delayed mortality syndrome이라 한다(Harmon, 2009). 따라서 성공적인 장거리 수송을 위해서는 수송 후 도착지에 전복을 하역한 후 폐사가 발생하지 않아야 하며, 이를 위해서는 수송과정 중 전복의 면역력 저하 여부 확인도 매우 중요하다.

전복과 같은 연체동물은 개방혈관계로 혈구세포가 혈림프액 안에서 조직 사이를 자유롭게 순환하며 소화와 영양분 이동, 손상된 폐각과 조직의 치유 뿐만 아니라 체내 세포성 면역 반응에 중추적인 역할을 한다(Donaghy et al., 2010). 패류의 혈구는 크게 무과립구와 과립구로 분류되어지며, 식균 작용과 같은 면역 기능을 담당 하기 때문에 면역력에 따라 혈구의 개체군이 변한다(Bly et al., 1990; Hégaret et al., 2003). 많은 연구에서 굴, 담치, 가리비 등과 같은 다양한 해산 이대패류에서는 hemocyte population 중 granulocyte가 면역 기능을 담당하는 것으로 보고되고 있지만(Carballal et al. 1997; Hine, 1999), granulocyte 없이 hyalinocyte만 존재하는 종에서는 hyalinocyte가 면역을 담당하는 것으로 보고되고 있어(Donaghy et al., 2010), hyalinocyte만 존재하는 참전복의 경우는 hyalinocyte비율을 면역력의 지표로 사용이 가능할 것으로 여겨진다. 본 연구에서 직후(0일째)부터 7일째까지 hyalinocyte 비율이 실험 전(대조구)에 비해 유의하게 감소하였지만 시간이 경과함에 따라 서서히 실험 전으로 회복되는 경향을 보였다. 이는 갑자기 저온상태에 노출되어 생기는 현상으로 생각되며, 실험기간 동안 생존율이 99%이상 이었고, 14일째 hyalinocyte 비율이 대조구와 차이가 없는 것으로 보아 8℃의 수온에서 면역력이 저하될 수 있으나 이는 환경변화에 따른 일시적인 현상이므로 참전복의 면역력에 지속적으로 악영향을 끼치지 않을 것으로 사료된다.

또한 패류의 건강도는 혈구의 사멸률을 통해서도 평가할 수 있는데, 혈구 사멸은 크게 apoptosis와 necrosis로 구분할 수 있다(Kiss, 2010; Park et al., 2012). Apoptosis는 ATP를 소모하여 관련 유전자에 의해 세포막이 파괴되고 염색체의 응축이 일

어나 단편화된 세포 조각들이 주변의 식세포에 제거되는 것을 뜻한다. 반면, necrosis는 독성 및 외부환경의 변화에 따른 물리적인 충격에 의해 세포가 터져 죽게 되면서 염증을 동반 하는 것을 말한다(Martello and Tjeerdema, 2001; Ray et al., 2013).

이러한 혈구 사멸은 중금속이나 세균 감염 그리고 극심한 환경 스트레스에 의해 촉진되며, 물리적 충격이나 외부환경 악화 등 의해 괴사된 세포가 많아져 조직 내 염증이 많아지거나, 세포자살의 유도주기가 빨라져 정상세포로 대체하는 과정이 세포 사멸 속도를 따라가지 못할 경우 hemocyte viability가 낮아져 세포 손상 및 면역 기능 저하가 나타난다(Fournier et al., 2001). 본 연구에서는 apoptotic cell의 비율은 0일째와 7일째 대조구에 비해 유의하게 낮게 나타났으며, necrotic cell의 비율도 대조구에 비해 높게 나타나 본 논문의 수송방법 및 조건은 수송 과정 중 참전복의 hemocyte viability에 영향을 끼치지 않는 것으로 사료된다.

일반적으로 생물은 스트레스에 노출되면 조직학적 변형이 일어난다. 패류의 경우도 발근육 상피층 변형 및 근섬유의 수축과 근육층 내의 혈림프동 팽창 등의 조직학적 변형이 나타난다(Gosling, 2004). 본 연구에서 7일 째와 14일 째 실험구의 발상피층과 근육층을 실험 개시 시와 비교했을 때 뚜렷한 조직학적 차이가 나타나지 않았다.

본 실험 결과를 종합해보면 생존율은 99% 이상으로 높게 나타났으며, 혈림프액 성상, 혈구 건강도 그리고 조직병리학적으로 특이한 변화가 나타나지 않아 수송용 활어 컨테이너를 이용한 8℃의 조건은 참전복 장거리 수송에 적합한 것으로 사료된다. 하지만 운반에 10-12일 가량 걸리는 미국 남서부 지역뿐만 아니라 더 먼 지역까지 수출 지역을 늘리기 위해서 수송 가능 기간을 더욱 늘릴 수 있는 방법이 연구되어야 하며, 현재의 수송량을 늘려 3톤 이상의 장거리 수송방식에 대한 연구가 추후 더 필요할 것으로 생각된다.

사 사

본 연구는 국립수산물연구원 수산과학연구사업(R2018005)의 지원에 의해 수행되었습니다.

References

- An MI and Choi CY. 2010. Activity of antioxidant enzymes and physiological responses in ark shell, *Scapharca broughtonii*, exposed to thermal and osmotic stress: Effect on hemolymph and biochemical parameters. *Comp Biochem Physiol B* 155, 34-42. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2009.09.008>.
- Anderson RS, Payner KT and Bureson EM. 1992. Increased reactive oxygen intermediate production by hemocytes withdrawn from *Crassostrea virginica* infected with *Perkinsus marinus*. *Biol Bull* 183, 476-48. <http://dx.doi.org/10.2307/1542024>.
- Berka R. 1986. The transport of live fish. A review. FAO Report, EIFAC Technical paper 48, United Nation, Rome, Italy, 52.
- Bly JE, Miller NW and Clem LW. 1990. A monoclonal antibody specific for neutrophils in normal and stressed channel catfish. *Dev Comp Immun* 14, 211-221. [http://dx.doi.org/10.1016/0145-305X\(90\)90092-S](http://dx.doi.org/10.1016/0145-305X(90)90092-S).
- Carballal MJ, Lopez C, Azevedo C and Villalba A. 1997. In vitro study of phagocytic ability of *Mytilus galloprovincialis* Lmk haemocytes. *Fish Shellfish Immunol* 7, 403-416. <http://dx.doi.org/10.1006/fsim.1997.0094>.
- Casillas E, Sundquist J and Ames WE. 1982. Optimization of assay conditions for, and the selected tissue distribution of, alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase of english sole, *Parophrys vetulus* Girard. *J fish Biol* 21, 197-204. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8649.1982.tb03999.x>.
- Cheng W, Yeh SP, Wang CS and Chen JC. 2002. Osmotic and ionic changes in Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* at different salinity levels. *Aquaculture* 203, 349-357. [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00606-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00606-8).
- Davis KB and Parker NC. 1990. Physiological stress in striped bass: Effect of acclimation temperature. *Aquaculture* 91, 349-358. [http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486\(90\)90199-W](http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486(90)90199-W).
- Donaghy L, Hong HK, Lambert C, Park HS, Shim WJ and Choi KS. 2010. First characterisation of the populations and immune-related activities of hemocytes from two edible gastropod species, the disk abalone, *Haliotis discus discus* and spiny top shell, *Turbo cornutus*. *Fish Shellfish Immunol* 28, 87-97. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2009.10.006>.
- Evans DH, Piermarini PM and Choe KP. 2005. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiol Rev* 85, 97-177. <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00050.2003>.
- Farombi EO, Adelowo OA, Ajimoko YR. 2007. Biomarkers of oxidative stress and heavy metal levels as indicators of environmental pollution in African cat fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun river. *Int J Environ Res Public Health* 4, 158-165. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph2007040011>.
- Fournier M, Pellerin J, Clermont Y, Morin Y and Brousseau P. 2001. Effects of in vivo exposure of *Mya arenaria* to organic and inorganic mercury on phagocytic activity of hemocytes. *Toxicology* 161, 201-211. [http://dx.doi.org/10.1016/S0300-483X\(00\)00387-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0300-483X(00)00387-5).
- Fotadar S and Evans L. 2011. Health management during handling and live transport of crustaceans: A review. *J Invert Pathol* 106, 143-152. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2010.09.011>.
- Froese R. 1988. Relationship between body weight and loading densities in fish transport using the plastic bag method. *Aqua Res* 19, 257-281. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2109.1988.tb00430.x>.
- Gosling E. 2004. Bivalve molluscs: Biology, Ecology and Cul-

- ture. Blackwell Science, Oxford, UK, 443.
- Gustafson LL, Stoskopf MK, Shower W, Cope G, Eads C, Linnehan R, Kwak TJ, Andersen B and Levine JF. 2005. Reference ranges for hemolymph chemistries from *Elliptio complanata* of North Carolina. *Dis Aquat Org* 65, 167-176.
- Harmon TS. 2009. Methods for reducing stressors and maintain water quality associated with live fish transport in tanks: a review of the basics. *Rev Aquacult* 1, 58-66. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1753-5131.2008.01003.x>.
- Hégaret H, Wikfors GH and Soudant P. 2003. Flow-cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation II. Haemocyte functions: aggregation, viability, phagocytosis, and respiratory burst. *J Exp Mar Biol Ecol* 293, 249-265. [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-0981\(03\)00235-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-0981(03)00235-1).
- Hildreth JE and Stickle WB. 1980. The effects of temperature and salinity on the osmotic composition of the southern oyster Drill, *Thais Haemastoma*. *Biol Bull* 159, 148-161. <http://dx.doi.org/10.2307/1541015>.
- Hine PM. 1999. The inter-relationships of bivalve haemocytes. *Fish Shellfish Immunol* 9, 367-385. <http://dx.doi.org/10.1006/fsim.1998.0205>.
- Kim TH, Yang MH, Choe MK, Han SJ and Yeo IK. 2005. Physiological Studies on Acute Water-temperature Stress of Juvenile Abalone, *Haliotis discus hannai*. *J Aquaculture* 18, 7-12.
- King HR. 2009. Fish transport in the aquaculture sector: An overview of the road transport of Atlantic salmon in Tasmania. *J Vet Behav* 4, 163-168. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jveb.2008.09.034>.
- Kiss T. 2010. Apoptosis and its functional significance in molluscs. *Apoptosis* 15, 313-321. <http://dx.doi.org/10.1007/s10495-009-0446-3>.
- Martello LB and Tjeerdema RS. 2001. Combined effects of pentachlorophenol and salinity stress on chemiluminescence activity in two species of abalone. *Aquat Toxicol* 51, 351-362. [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-445X\(00\)00110-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-445X(00)00110-7).
- Min BH, Park MS, Shin YK, Do YH and Myeong JI. 2014. Physiological responses in Korean rockfish (*Sebastes schlegeli*) exposed to ammonia. *Korean J Environ Biol* 34, 344-352. <http://dx.doi.org/10.11626/KJEB.2014.32.4.344>.
- MOF (Ministry of Oceans and Fisheries). 2017. Statistic Database for Fishery Production Survey. Retrieved from <http://stat.mof.go.kr/portal/cate/partStat.do> on Nov 15, 2017.
- Nordberg J and Arnér ESJ. 2001. Reactive oxygen species, antioxidants and mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 31, 1287-1312. [http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00724-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00724-9).
- Park KI, Donaghy L, Kang HS, Hong HK, Kim YO and Choi KS. 2012. Assessment of immune parameters of Manila clam *Ruditapes philippinarum* in different physiological conditions using flow cytometry. *Ocean Sci J* 47, 19-26. <http://dx.doi.org/10.1007/s12601-012-0002-x>.
- Piper RG, McElwain IB, Orme LE, McCraren, JP, Fowler LG and Leonard JR. 1982. Fish hatchery management. U.S. Fish and Wildlife service, Washington DC, U.S.A., 517.
- Portz DE, Woodley CM and Cech JJ Jr. 2006. Stress-associated impacts of short-term holing on fishes. *Rev Fish Biol Fish* 16, 125-170. <http://dx.doi.org/10.1007/s11160-006-9012-z>.
- Randall DJ and Tsui TKN. 2002. Ammonia toxicity in fish. *Mar Pollut Bull* 45, 17-23. [https://dx.doi.org/10.1016/S0025-326X\(02\)00227-8](https://dx.doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00227-8).
- Ray M, Bhunia AS, Bhunia NS and Ray S. 2013. Density shift, morphological damage, Lysosomal fragility and apoptosis of hemocytes of Indian molluscs exposed to pyrethroid pesticides. *Fish Shellfish Immunol* 35, 499-512. <https://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2013.05.008>.
- Roch P. 1999. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrate. *Aquaculture* 172, 125-145. [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00439-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00439-6).
- Ryu JH. 2014. Studies on physiological Activity of Adult shell, Egg Development and Larval Cryopreservation in Surf Clam *Macra chinensis* for its Species Conservation. Master thesis, Pukyong National University, Busan, Korea.
- Smith AC and F Ramos. 1980. Automated chemical analysis in fish health assessment. *J Fish Biol* 17, 445-450. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8649.1980.tb02777.x>.
- Souza MM and Scemes E. 2000. Volume changes in cardiac ventricles from *Aphysia brasiliiana* upon exposure to hypotonic shock. *Comp Biochem Phys A* 127, 99-111. [http://doi.org/10.1016/S1095-6433\(00\)00243-9](http://doi.org/10.1016/S1095-6433(00)00243-9).
- Van Raaij MTM, Van den Thillart GEEJM, Vianen GJ, Pit DSS, Balm, PHM and Steffens AB. 1996. Substrate mobilization and hormonal changes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* L.) and common carp (*Cyprinus carpio* L.) during deep hypoxia and subsequent recovery. *J Comp Physiol* 166, 443-452. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02337889>.
- Vigayan MM, Mommsen TP, Glemet HC and Moon TW. 1996. Metabolic effects of cortisol treatment in a marine teleost, the sea raven. *J Exp Biol* 199, 1509-1514.
- Vosloo A, Laas A and Vosloo D. 2013. Differential responses of juvenile and adult South African abalone (*Haliotis midae* Linnaeus) to low and high oxygen level. *Comp Biochem Phys A* 164, 192-199. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.09.002>.
- Wedemeyer GA. 1996. Transportation and handling of salmonids. In: Principles of Salmonid Culture. Pennel W and Barton B, eds. Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 727-758.
- Whiteley NM and Taylor EW. 1992. Oxygen and acid-base disturbances in the hemolymph of the lobster *Homarus gammarus* during commercial transport and storage. *J Crustacean Biol* 12, 19-30. <https://dx.doi.org/10.2307/1548715>.
- Yang SJ, Myeong JI, Park JJ and Shin YK. 2014. Optimal environmental condition of live container for long distance trans-

- port in live abalone *Haliotis discus hannai*. Korean J Malacol 30, 363-370. <https://dx.doi.org/10.9710/kjm.2014.30.4.363>.
- Zoysa MD, Whang IS, Lee YD, Lee SK, Lee JS and Lee JH. 2009. Transcriptional analysis of antioxidant and immune defense genes in disk abalone (*Haliotis discus discus*) during thermal, low-salinity and hypoxic stress. Comp Biochem Phys B 154, 387-395. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2009.08.002>.