



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

수산학석사 학위논문

개량조개 *Mactra chinensis*의 종보존을 위한
모패 생리활성, 난발생 및 유생의 냉동보존



2014년 2월

부경대학교 대학원

수산생물학과

류준형

수산학석사 학위논문

개량조개 *Macra chinensis*의 종보존을 위한
모패 생리활성, 난발생 및 유생의 냉동보존

지도교수 장 영 진

이 논문을 수산학석사 학위논문으로 제출함.

2014년 2월

부경대학교 대학원

수 산 생 물 학 과

류 준 형

류준형의 수산학석사 학위논문을 인준함.

2013년 12월 13일



주 심 농 학 박사 공 승 표 (인)

위 원 수 산 학 박사 최 윤 희 (인)

위 원 농 학 박사 장 영 진 (인)

목 차

Abstract	iii
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	5
1. 모패의 생리활성	5
(1) 실험재료	5
(2) 염분별 생존율 및 혈림프 성장	5
(3) 수온 및 염분별 대사율	11
2. 난발생	15
(1) 실험재료	15
(2) 난발생 과정	15
(3) 수온 및 염분별 발생률	16
(4) 수온별 난발생 속도	16
3. 유생의 냉동보존	16
(1) 실험재료	16
(2) CPA 침투·용출후 유생활성지수 및 발생진행률	17
(3) 냉동 및 해동후 생존율	19
4. 통계처리	19
III. 결 과	20
1. 모패의 생리활성	20
(1) 염분별 생존율 및 혈림프 성장	20

(2) 수온 및 염분별 대사율	33
2. 난발생	39
(1) 난발생 과정	39
(2) 수온 및 염분별 발생률	39
(3) 수온별 난발생 속도	39
3. 유생의 냉동보존	44
(1) CPA 침투·용출후 유생활성지수 및 발생진행률	44
(2) 냉동 및 해동후 생존율	48
IV. 고 찰	54
V. 요 약	61
감사의 글	63
참고문헌	65



Studies on Physiological Activity of Adult Shell, Egg Development and
Larval Cryopreservation in Surf Clam *Macra chinensis*
for its Species Conservation

Jun Hyung Ryu

Department of Fisheries Biology, The Graduate School,
Pukyong National University

Abstract

The present research was carried out to investigate the physiological activity of matured adult, egg development and larval cryopreservation in surf clam (*Macra chinensis*) for its species conservation.

The survival rate of matured adult was 92.5% in 30 psu up to 216 h, 65.0% in 20 psu up to 216 h, while in 10 psu, severe mortality was recorded after 48 h and all died up to 96 h.

Total hemocyte count was maintained a consistent level in 30 psu. While in 20 psu, it tended to decrease up to 24 h and afterwards, recovered gradually. In the case of 10 psu, it was increased up to 6 h and tended to decrease later on.

Osmolality of hemolymph was followed similar level with the experimental water after 3 h in 30 and 20 psu respectively, while in 10 psu, it was not completely followed the experimental water up to 48 h. Na^+ and Cl^- concentrations of hemolymph were almost similar with the pattern of osmolality. In the case of K^+ , Ca^{2+} and Mg^{2+} , ionic concentrations of hemolymph were

followed similar level with the experimental water after 3 h in 30 and 20 psu respectively, but in 10 psu, ionic concentrations were increased than the initial level, maintained for a while and afterwards decreased.

Level of hemolymph glucose was recorded to be significantly increased at 72 h in 20 psu. In 10 psu, it was significantly increased at 12 h first and sharply increased at 48 h. However, there were no differences among different experimental groups in total protein and total cholesterol. Levels of hemolymph aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), lactate dehydrogenase (LDH) were significantly increased at 48 h in 10 psu simultaneously.

Oxygen consumption of matured adult significantly increased with rising water temperature and significantly decreased below 20 psu.

Ammonia excretion was significantly increased in 15°C compared to 10°C and there was no significant increase in 20°C.

O:N ratio was recorded to increase in 20°C and tended to decrease with decline of salinity.

Optimum conditions for early egg development were found to be 25°C and 30~35 psu. Required times for each developmental stage were shortened with rising water temperature and 3.22°C was calculated as a biological minimum temperature.

In investigations of optimum CPAs (cryoprotective agents) for larval cryopreservation, ethylene glycol 2.0 M (30 min), dimethyl sulfoxide 1.5 M (10 min) and methanol 2.0 M (20 min) were selected for trochophore, and ethylene glycol 2.0 M (30 min), dimethyl sulfoxide 2.0 M (30 min) and methanol 2.0 M (30 min) were selected for D-shaped larva.

Results of larval cryopreservation showed that the survival rate of 2.37% and 4.72% for post-thawed trochophores and D-shaped larvae, respectively.

I. 서론

한국의 패류양식 생산량은 1980년대 후반 연평균 40만톤에 이르렀다가, 1990년대 후반과 2000년대 초반에는 연평균 20만톤 수준으로 감소하여 쇠퇴기를 겪었으며, 2003년 이후 연평균 35만톤 가량으로 다시 회복되는 추세에 있다.

그러나 패류의 양식생산에 있어 환경오염과 질병, 해적생물, 종묘 확보의 어려움, 근친교배로 인한 유전적 열성화 등 개선해야 할 부분들이 현재 산적해 있으며, 특히 양식용 종묘의 구득이 어려워 양식생산에 큰 걸림돌이 되고 있다. 그 예로 그동안 자연 종묘생산을 해오던 참굴은 채묘부진으로 인해 부족분을 인공종묘로 대체하고 있으며, 피조개, 가리비, 바지락 등과 같이 국내에서 인공종묘 대량생산이 여의치 않은 종들은 상당량을 수입산 종묘에 의존하고 있다(이, 2003; 국립수산과학원, 2008).

따라서 빠른 시일 내에 안정적인 패류 종묘생산 체계가 구축되어야 하며, 보다 효과적인 종묘수급을 가능케 할 방법 또한 요구되고 있다. 그 방법 중 하나로 냉동보존을 들 수 있는데, 패류양식에서 배우자 및 발생배의 냉동보존을 통해 얻을 수 있는 장점은 다음과 같다. 배우자나 발생배를 대량으로 냉동보존해 두면, 언제든지 해동하여 사용할 수 있어 연중 종묘생산이 가능해지며, 종묘생산용 모패의 구득 및 운반의 필요성이 없어진다. 또한, 냉동보존한 패류의 알이나 유생은 고급 어류의 자치어 생산에서 먹이생물로서 이용 가능하고, 우수한 형질을 가진 개체, 멸종위기종 및 토착종의 보존에도 활용할 수 있으며, 연구재료로서의 활용가치도 높다.

생명체의 냉동보존에 관하여는 황소 정자의 냉동보존이 최초로 이루어졌으며(Polge et al., 1949), 이후 다양한 동물들의 배우자 및 발생배를 대상으로 연구가 진행되어 왔다. 포유류에서는 쥐, 소, 돼지, 인간 등에 대한

다수의 연구가 이루어져, 시험관 아기, 우량형질의 가축 생산 등 의학 및 축산 분야에서 냉동보존 기술이 적극적으로 활용되고 있다(Woods et al., 2004; Yoon et al., 1999).

육상동물에 이어 해양동물에 있어서도 어류의 정자를 비롯하여 무척추동물의 정자, 알, 발생배의 냉동보존에 관한 연구가 꾸준히 이루어지고 있다(Chao and Liao, 2001). 그 중 패류의 발생배에 대한 연구는 굴류, 담치류, 진주조개(Choi et al., 2003; Choi and Chang, 2007), 백합(Chao et al., 1997), 북방대합(Choi et al., 2008), 피조개(Jo et al., 2002) 등 다양한 종에서 이루어졌다. 굴류는 Paniagua-Chavez et al. (1998)이 버지니아굴의 담륜자를 해동후 성패로 발달시켰다고 보고한 바 있고, 담치류는 Paredes et al. (2012)이 초록입홍합의 담륜자를 해동후 부착기 유생으로 발달시켰다고 하였다. Wang et al. (2011)도 지중해담치의 D형유생을 해동후 부착기 유생으로 발달시켰다고 보고한 바 있다.

그러나 아직 산업적으로 활용되지는 못하고 있으며, 해동후 낮은 발생진행률, 장기간 보존 시 생존율의 감소, 경제성 등 해결해야 할 과제들이 남아있다. 또한, 성공적인 냉동보존을 위해서는 냉동기술의 개발에 앞서, 건강한 모패와 그로부터 얻어지는 건강한 발생배가 기본적으로 확보되어야 하는 만큼, 적정 모패 관리 조건 및 난발생 조건의 확립이 요구된다.

본 연구에서 재료로 선택한 개량조개 *Macra chinensis* (Fig. 1)는 백합목(Veneroida) 개량조개과(Mactridae)에 속하며, 한국, 일본, 중국, 대만 등지에 널리 분포한다. 한국에서는 주로 동해남부, 서해 및 남해안 조간대로부터 수심 10 m 전후의 모래나 펄에 서식한다(Ryu and Kim, 2001). 산업적으로 중요한 패류인 개량조개는 구득이 용이하고, 산란기가 5~9월까지로 길어 알과 정자를 구하기 쉬우며, 난핵포붕괴(germinal vesicle breakdown) 이전에 수정이 가능하므로, 위와 같은 연구를 수행하기에 적합한 종으로 판단된다.

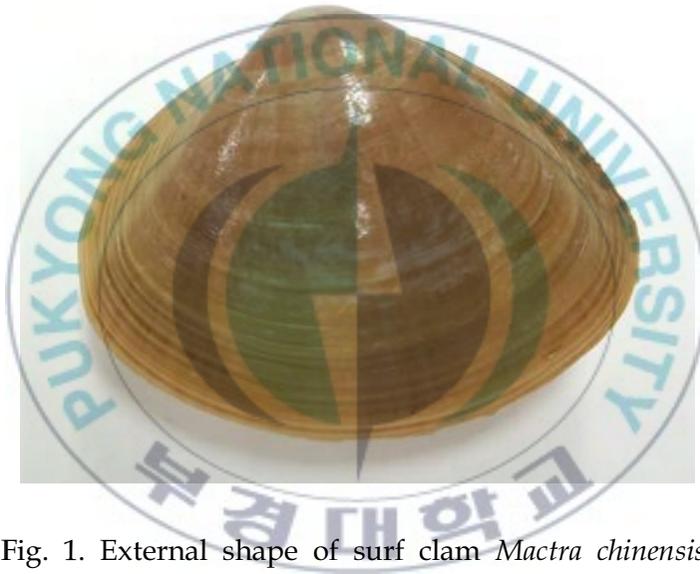


Fig. 1. External shape of surf clam *Mactra chinensis*.

따라서, 개량조개의 종보존을 위한 연구의 일환으로, 환경변화에 따른 모패의 생리활성과 적정 난발생 조건에 대해 조사하였다. 아울러, 건강한 모패로부터 얻은 건강한 발생배를 재료로 하여, 결빙억제제(cryoprotective agent, CPA)의 침투실험 및 냉동보존 실험을 수행하였다.



II. 재료 및 방법

1. 모패의 생리활성

(1) 실험재료

실험용 개량조개는 부산광역시 강서구 명지동 수역(Fig. 2)에서 채집하였다.

염분에 따른 경시별 생존율 및 혈림프 성상을 조사하기 위해, 채집지 인근의 부산광역시수산자원연구소로 운반하여 180 L 지수식 원형수조(15°C, 30 psu)에서 1일간 안정시킨 다음, 실험에 사용하였다. 수온 및 염분별 대사를 분석하기 위하여는, 부경대학교 변식생리학연구실로 운반하여 15°C 및 30 psu로 유지한 순환여과수조(Fig. 3)에 수용해 1일간 안정시킨 후, 실험에 사용하였다.

(2) 염분별 생존율 및 혈림프 성상

1) 생존율

염분 변화에 따른 생존율을 조사하기 위해 30, 20, 10 psu의 해수가 들어있는 180 L 원형수조(수온 15°C) 6개에 20개체씩 총 120개체의 개량조개를 수용하여 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216시간째의 생존율을 조사하였다. 생사여부는 패각을 벌리고 있거나, 막대에 의한 물리적 자극에 반응을 보이지 않는 개체를 죽은 것으로 판단하였다.

실험에 사용한 개량조개의 크기는 Table 1과 같다. 실험용수의 염분조절은 해수와 담수로 하였고, 수질악화를 막기 위해 1일 1회 전량 환수하였으며, 실험은 2반복으로 수행하였다.

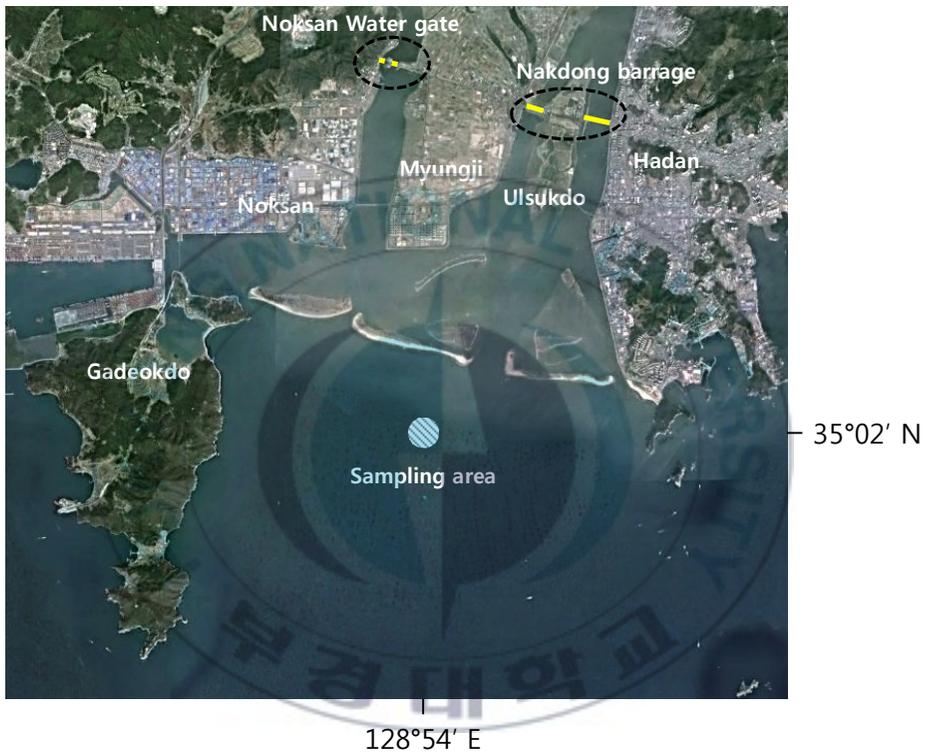


Fig. 2. Map showing sampling area of *Mactra chinensis*.

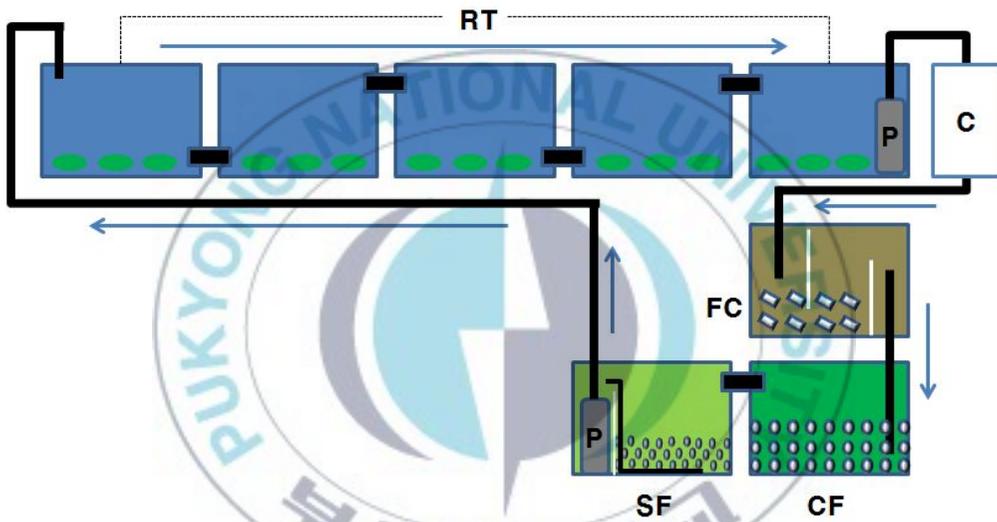


Fig. 3. Recirculation water system for acclimation of *Maetra chinensis*. C: cooler, CF: coral sand filter, FC: filtration cotton, P: pump, RT: rearing tanks, SF: sand filter, Arrows: water flow.

Table 1. Sizes of *Macra chinensis* used in experiments of abrupt changes of salinity

Experiment	Salinity (psu)	SL (mm)	SH (mm)	SW (mm)	TW (g)
Survival	10	60.5±3.9	45.3±4.6	28.7±1.8	40.7±7.5
	20	61.0±3.6	45.4±2.4	28.7±1.8	41.3±7.4
	30	60.4±4.5	45.7±4.9	28.4±2.0	41.0±9.8
Hemolymph property	10	59.7±2.7	44.3±1.9	28.5±1.9	39.8±6.9
	20	59.6±2.8	44.3±2.5	28.9±1.6	41.2±6.7
	30	59.7±4.1	45.0±3.2	29.0±1.9	41.0±6.7

SL: shell length, SH: shell height, SW: shell width, TW: total weight.

2) 혈림프 채취 및 보관

염분 변화에 따른 생리적 변화를 조사하기 위해 30, 20, 10 psu의 해수가 들어있는 180 L 원형수조(수온 15°C)에 각각 45, 45, 130개체씩 총 220개체의 개량조개를 수용하여 실험을 수행하였다. 실험에 사용한 개량조개의 크기는 Table 1과 같다. 실험구와 실험개체수는 생존율 실험 결과에 준하여 설정하였다. 혈림프(hemolymph)는 3, 6, 12, 24, 48, 72시간째에 실험구당 5개체로부터 후폐각근(pm) 부위(Fig. 4)에 1 mL syringe를 삽입하여 채취하였다. 혈구수 조사를 위한 일부를 제외하고 모두 원심분리(10,000×g, 4°C, 10분)하였으며, 그 혈청(supernatant)을 -80°C에 분석 전까지 보관하였다.

3) 혈구수

채취한 혈림프의 일부를 취하여 실험구마다 pooled sample을 만든 후, Bachere et al. (1991)의 개량된 혈액응고방지액(Modified anti-aggregant solution, MAS : glucose 20.8 g, sodium citrate 8.0 g, EDTA 3.36 g, sodium chloride 22.5 g, distilled water 1 L)과 1:3의 비율로 혼합하여 냉장보관하였다. 보관한 sample은 혈구계산판을 이용해 광학현미경(×100~400)으로 12시간 내에 4반복 계수하였다.

4) 혈청 성상

혈청의 삼투질농도는 Vapro Pressure Osmometer (Vapro 5520; Wescor Co., USA)를 이용해 측정하였고, 이온(Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} , Mg^{2+}), 글루코스, 총단백질, 총콜레스테롤, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), lactate dehydrogenase (LDH)는 Biochemistry Autoanalyzer (Fujifilm Dri-Chem 4000i, Japan)로 측정하였다.

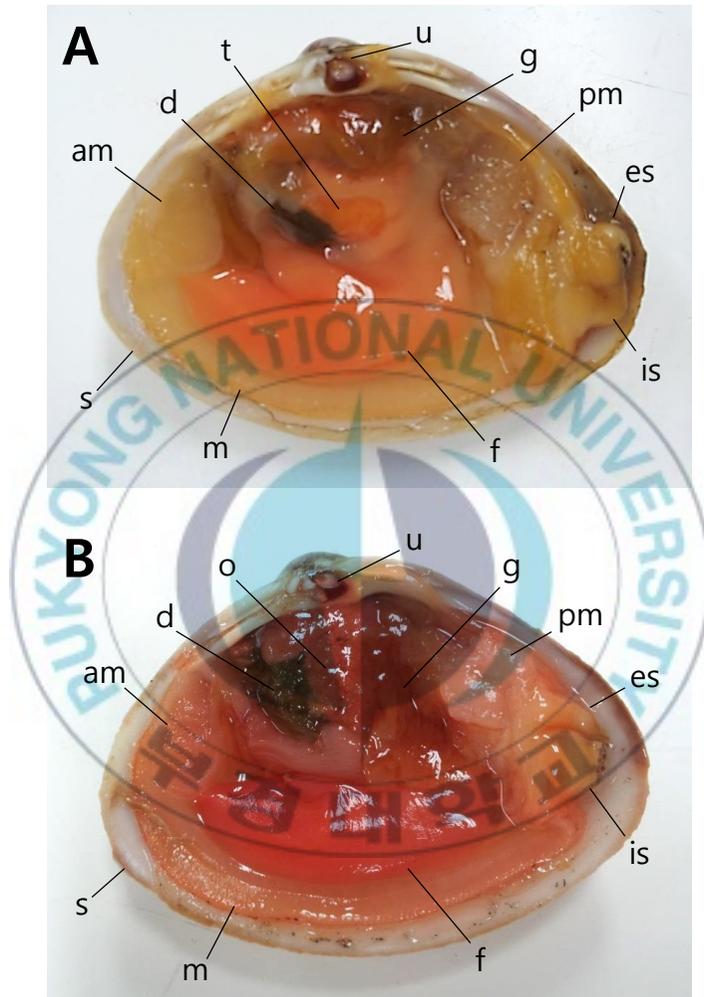


Fig. 4. Anatomy of *Mactra chinensis*. A: male, B, female, am: anterior adductor muscle, d: digestive gland, es: exhalant siphon, f: foot, g: gill, is: inhalant siphon, m: mantle, o: ovary, pm: posterior adductor muscle, s: shell, t: testis, u: umbo.

(3) 수온 및 염분별 대사율

1) 산소소비량

개량조개의 수온 및 염분별 산소소비량을 조사하기 위해 밀폐지수식 산소소비 측정장치(Fig. 5)를 사용하였다. 호흡실(183 mm × 133 mm × 160 mm)은 아크릴로 제작하였고, 윗부분에 직경 67 mm의 구멍을 뚫어 산소 probe를 부착하였다. 또한, 직경 5 mm의 구멍을 뚫어 투명한 비닐관을 연결해 호흡실 내부의 공기가 제거되도록 하였다. 호흡실 내의 용존산소는 윗부분에 부착된 산소 probe를 통해 10분 간격으로 측정되었고, 그 값은 6 channel multi data logger system (Oxyguard, Denmark)을 통해 컴퓨터에 입력되었다.

수온별 실험은 염분 30 psu의 수온 10, 15, 20°C에서 수행하였고, 염분별 실험은 수온 15°C의 염분 30, 20, 10 psu에서 수행하였다. 실험용수는 실험에 앞서 12시간동안 강하게 포기하여 95% 전후의 산소포화도에 이르게 한 후 사용하였다. 실험용수를 채운 호흡실에는 개량조개 3개체씩을 수용하였고, 교반기를 이용해 호흡실 내의 물이 정체하지 않게 하였으며, 수온은 다단배양기(Taitec, Japan) 내에서 각각 설정·유지되도록 하였다. 모든 실험은 폐사가 발생하지 않으면서 동시에 수중 산소포화도가 50% 이하로 감소하지 않는 12시간째까지 수행하였다. 실험 종료후, 개량조개를 해부해 연체부(soft part)를 드라이오븐에서 건조(80°C, 24시간)시킨 뒤, 건조량을 측정하여 이를 바탕으로 아래의 계산식(Wi and Chang, 1976)에 따라 산소소비량(OC)을 구하였다. 실험은 3반복으로 수행하였다. 실험에 사용한 개량조개의 크기는 Table 2에 나타내었다.

$$OC = \frac{(C_t - C_i) \times V}{t \times W}$$

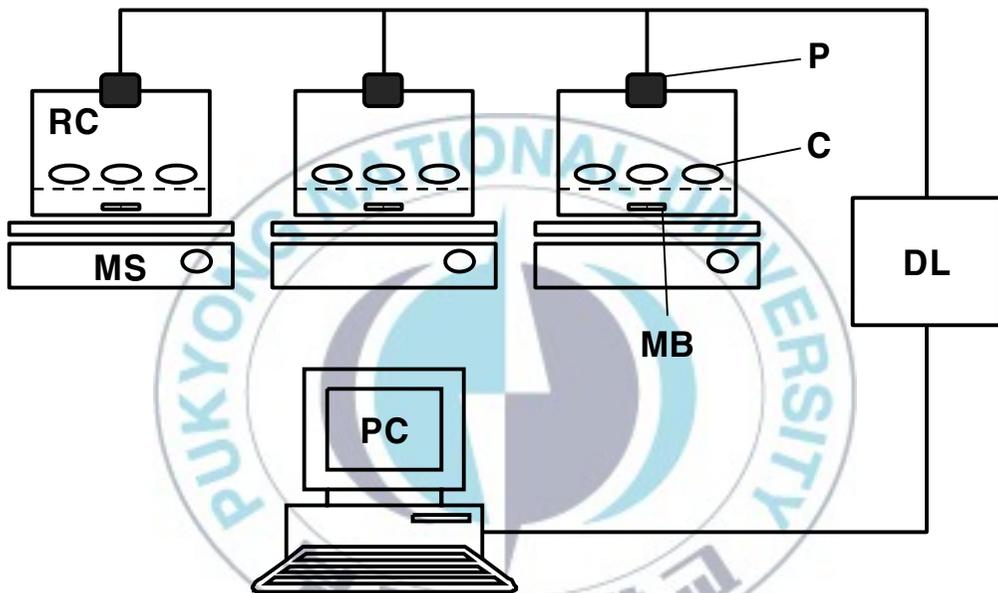


Fig. 5. Schematic diagram of oxygen consumption measuring system. C: clam, DL: data logger, MB: magnetic bar, MS: magnetic stirrer, P: probe, PC: personal computer, RC: respiratory chamber.

Table 2. Sizes of *Mactra chinensis* used in experiments of oxygen consumption and ammonia excretion

Experiment	Condition	SL (mm)	SH (mm)	SW (mm)	TW (g)
Water temperature	10°C	62.0±3.2	46.5±2.4	30.1±1.6	40.3±8.9
	15°C	63.6±2.8	48.6±2.2	31.1±2.0	40.6±7.7
	20°C	61.2±3.9	46.5±4.7	29.2±1.9	41.6±7.9
Salinity	10 psu	63.2±3.3	46.7±2.8	29.5±1.3	44.8±6.2
	20 psu	63.1±3.0	47.0±1.7	29.8±1.6	45.8±6.7
	30 psu	63.4±2.3	47.9±2.2	30.4±1.4	42.4±7.1

SL: shell length, SH: shell height, SW: shell width, TW: total weight.

OC : 산소소비량 (mg O₂/kg/h)

C_i, C_t : 측정개시 및 t시간 후의 용존산소 (mg O₂/L)

t : 측정시간 (hour)

V : 용기 내의 수량 (L)

W : 연체부의 건중량 (kg)

2) 암모니아 배설량

수은 및 염분별 암모니아 배설량을 조사하기 위해, 산소소비 측정 전후에 채수한 실험용수의 암모니아 농도를 phenolhypochlorite법(Solorzano, 1969)에 따라 분광광도계(Ultrospec 3300 pro; Amersham Biosciences, UK)를 이용해 측정하였다. 이를 바탕으로 Leung et al. (1999)의 방법을 변형한 아래 계산식에 따라 암모니아 배설량(AE)을 구하였다. 실험은 3반복으로 수행하였다. 실험에 사용한 개량조개의 크기는 Table 2에 나타내었다.

$$AE = \frac{(C_t - C_i) \times V}{t \times W}$$

AE : 암모니아 배설량 (mg NH₄-N/kg/h)

C_i, C_t : 측정개시 및 t시간 후의 암모니아 (mg NH₄-N/L)

t : 측정시간 (hour)

V : 용기 내의 수량 (L)

W : 연체부의 건중량 (kg)

3) O:N 원자비

수은 및 염분별 O:N 원자비는 산소소비량과 암모니아 배설량을 바탕으로 아래 계산식(Hawkins and Bayne, 1991; Widdows and Johnson, 1988)에 따라 구하였다.

$$O:N = \frac{\text{mg } O_2/\text{ind}/t/16}{\text{mg } NH_4 - N/\text{ind}/t/14}$$

O:N : 산소:질소의 원자비

ind : 개체수

t : 측정시간 (hour)

2. 난발생

(1) 실험재료

난발생 과정, 수온 및 염분별 발생률 및 수온별 난발생 속도를 조사하기 위해, 부산광역시 강서구 명지동 해역에서 채집된 개량조개 모패를 실험실로 운반하여 순환여과수조에서 1일간 안정시킨 후, 산란유발에 사용하였다. 산란유발에 사용한 개량조개 모패 압, 수의 크기는 각각 각장 59.5±3.6 mm, 61.7±4.4 mm 및 전중 41.2±7.4 g, 43.1±9.7 g이었다.

산란유발은 모패를 실험실에서 2시간동안 공기노출 시킨 후, 사육수보다 수온이 약 5°C 높은 해수에 수용하는 순서로 하였다. 알은 알과 정자는 인공수정 후, 여과해수로 세란하여 그 수정란을 각 실험에 사용하였다.

(2) 난발생 과정

개량조개의 난발생 과정을 조사하기 위해, 수정란을 20°C로 유지한 1 L 비커에 수용하였다. 이때, 밀도는 50개/mL로 하였고, 염분은 33 psu로 하였다. 그리고 광학현미경(×100)으로 20분마다 관찰하여, 수정란으로부터 D형유생까지의 난발생 과정을 조사하였다. 수온은 다단배양기를 이용해 조절하였다.

(3) 수온 및 염분별 발생률

개량조개의 수온별 발생률을 조사하기 위해, 수정란을 수온별(15, 20, 25, 30℃)로 각각 1 L 비커에 수용하였다. 이때, 밀도는 50개/mL로 하였고, 염분은 33 psu로 하였다. 수정후 48시간까지, 광학현미경($\times 100$)으로 부화율과 D형유생으로의 발생률을 조사하였다.

이어서 염분별 발생률을 조사하기 위해, 수정란을 염분별(10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 psu)로 각각 1 L 비커에 수용하였다. 이때, 밀도는 50개/mL로 하였고, 수온은 수온별 난발생 실험에서 가장 높은 발생률을 보인 25℃로 유지하였다. 수정 48시간 후, 광학현미경($\times 100$)으로 부화율과 D형유생으로의 발생률을 조사하였다. 수온은 다단배양기를 이용해 조절하였으며, 염분은 증류수와 천일염으로 조절하였다.

(4) 수온별 난발생 속도

개량조개의 수온별 난발생 속도를 조사하기 위해, 수정란을 각 수온별(15, 20, 25, 30℃)로 1 L 비커에 수용하였다. 이때, 밀도는 50개/mL로 하였고, 염분은 33 psu로 하였으며, 수온은 다단배양기 내에서 유지하였다. 각 발생단계에 이르는 시간은 20분 간격으로 검경하여 조사하였고, 각 발생단계는 발생배의 50% 이상이 해당 발생단계에 이른 시점을 기준으로 구분하였다.

3. 유생의 냉동보존

(1) 실험재료

개량조개 담륜자와 D형유생의 냉동보존을 위한 적정 CPA 탐색 및 냉동보존 실험을 위해, 전술한 방법으로 얻은 수정란을 25℃, 33 psu 여과해수

가 담긴 25 L 수조에 50개/mL 밀도로 수용하였다. 수정 16시간 및 24시간 후, 담류자 및 D형유생을 20 μ m 망을 이용하여 수집해 이를 실험에 사용하였다. 담류자와 D형유생의 구득을 위해 사용한 개량조개 모패 압, 수의 크기는 각각 각장 60.5 \pm 0.7 mm, 61.6 \pm 1.2 mm 및 전중 40.0 \pm 2.3 g, 41.1 \pm 3.5 g였다.

(2) CPA 침투·용출후 유생활성지수 및 발생진행률

개량조개 담류자 및 D형유생의 CPA 침투·용출후 유생활성지수와 발생진행률을 조사하기 위해, CPA 침투·용출은 다음과 같은 과정으로 수행하였다. 먼저, CPA 침투를 위해 15 mL tube에 각각의 CPA 액을 채우고, 여기에 담류자 및 D형유생을 각각 투입한 뒤 잘 혼합해 주었고, CPA 용출은 침투를 마친 후 여과해수를 이용해 세척하였다.

유생활성지수는 위와 같은 과정에 따라 담류자와 D형유생 모두 CPA 침투전, 침투후, 용출후의 운동성을 광학현미경(\times 100)으로 검정한 후, Table 3에 따라 그 값을 산정하였다.

발생진행률의 경우, 담류자를 위의 과정에 따라 CPA 침투·용출시킨 후, 20 mL well에 100개/mL의 밀도로 수용하였다. 그리고 12시간 후, 각 well 마다 34% formaldehyde 15 μ L를 첨가해 유생의 운동을 정지시킨 뒤, D형유생으로의 발생진행과 형태이상 여부를 광학현미경(\times 100)으로 검정하였다.

실험에 사용한 CPA액은 인공해수(NaCl 2.7 g, KCl 0.07 g, NaHCO₃ 0.05 g, CaCl₂ 0.12 g, MgCl₂ 0.46 g, Milli-Q water 100 mL)를 기본용액으로 하였다. 또, 세포외성 CPA는 모든 실험구에서 sucrose를 최종농도 0.2 M이 되도록 하였고, 세포내성 CPA는 ethylene glycol (EG), dimethyl sulfoxide (DMSO), methanol (MET)을 각각 사용하였으며, 최종농도는 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 M로 설정하였다. 또한, 침투시간은 10, 20, 30분으로 설정하였다.

Table 3. Numerical method for evaluation of ciliated larval activity index

Index	Score	Motility characteristics
I	4	Larva display spiral movement rapidly
II	3	Larva display spiral movement slowly
III	2	Larva display a little movement
IV	1	Larva display cillial movement only
V	0	Immobile larva

$$\text{LAI} = \text{score} \times \% \text{ motile larvae} / 100$$

(3) 냉동 및 해동후 생존율

개량조개 담륜자 및 D형유생의 냉동보존을 위해, CPA 침투 및 용출실험을 통해서 얻은 결과를 토대로 선정된 적정 CPA를 유생과 혼합한 후, 0.25 mL straw (FHK, Japan)에 봉입하였다. 그리고 이를 프로그램냉동기 (Samwon Freezing Engineering Co., Korea)를 이용해 Initial temperature 0°C → Freezing rate (-1°C/min) → -12°C → Seeding (10 min) → Freezing rate (-1°C/min) → -35°C → Holding (30 min) → LN₂ (-196°C)의 순으로 냉동하였다. 해동은 LN₂ (-196°C) → Fresh water (20°C)의 순으로 하였다.

해동후, 유생을 여과해수와 1:9의 비율로 희석하여 침투된 CPA를 용출시켰고, 광학현미경(×100)으로 생사 여부를 검경하였다.

4. 통계처리

실험결과의 자료값(mean±S.E.) 사이의 유의차 유무는 SPSS 통계패키지 (ver. 18)에 의한 One way-ANOVA 및 Duncan's multiple range test로 검정하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 모패의 생리활성

(1) 염분별 생존율 및 혈림프 성상

1) 생존율

수온 15°C의 30, 20, 10 psu 해수에서 개량조개의 경시별 생존율은 Fig. 6에 나타난 바와 같다.

30 psu에서는 실험 개시후 216시간째에 92.5%가 생존하였고, 20 psu에서는 24시간째부터 폐사가 시작되어, 216시간째에는 65.0%가 생존하였다. 10 psu에서는 24시간째부터 폐사가 시작되었고, 48시간째에 폐사개체가 급격히 증가하여 5.0%만이 생존하였으며, 96시간째에는 모두 폐사하였다.

2) 혈구수

수온 15°C의 30, 20, 10 psu 해수에서 개량조개 혈림프의 혈구수는 Fig. 7에 나타난 바와 같다.

30 psu에서는 실험 개시시(5.3×10^6 cells/mL)로부터 72시간째(5.1×10^6 cells/mL)까지 다소 증감이 있었으나, 평균 5.2×10^6 cells/mL의 수준으로 혈구수가 유지되었다. 20 psu에서는 3시간째에 5.8×10^6 cells/mL로 실험 개시시(5.3×10^6 cells/mL)에 비해 다소 증가했고, 이후 24시간째에 2.8×10^6 cells/mL에 이르기까지 점차 감소하였다. 그러나 이후 다시 증가하여 72시간째에는 5.4×10^6 cells/mL로 실험 개시시의 수준으로 회복되었다. 반면, 10 psu에서는 3시간째에 3.3×10^6 cells/mL로 감소하였다가, 6시간째에는 6.7×10^6 cells/mL로 증가하였다. 이후, 점차 감소하여 48시간째에는 2.2×10^6

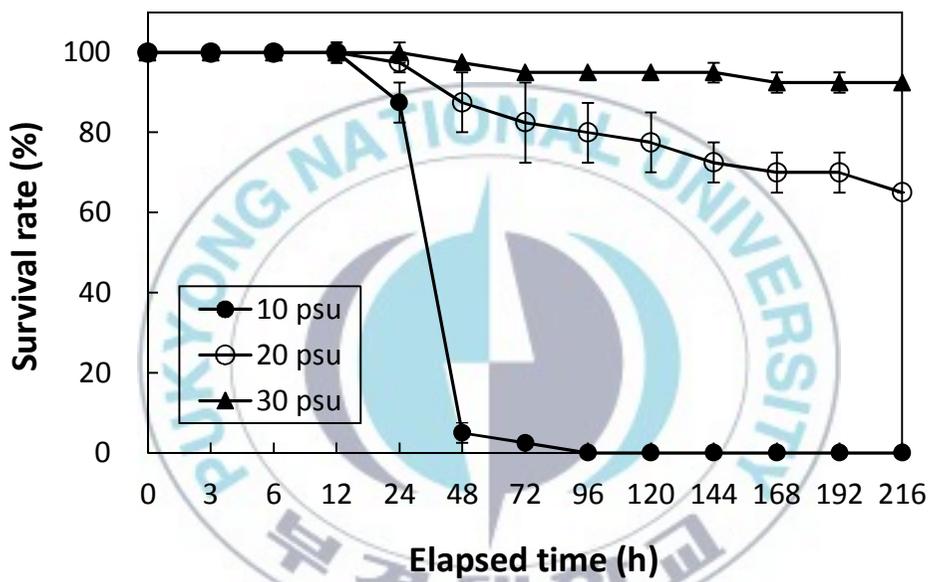


Fig. 6. Survival rates of *Mactra chinensis* after abrupt changes of salinity. Each value represents mean±S.E. (n=2).

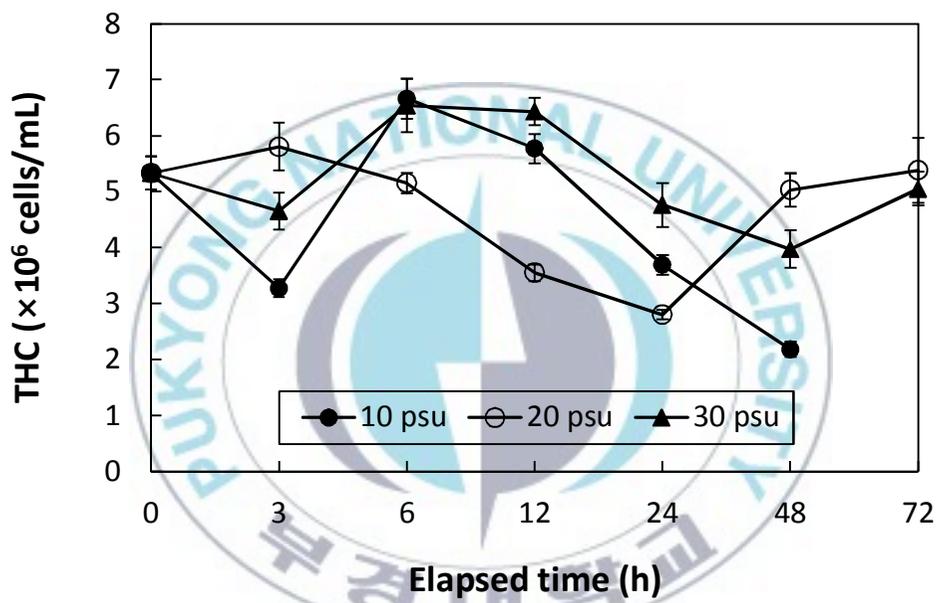


Fig. 7. Total hemocytes counts of *Mactra chinensis* after abrupt changes of salinity. Each value represents mean±S.E. (n=4).

cells/mL으로 감소하였고, 72시간째에는 폐사로 인해 혈림프를 채취할 수 없었다.

3) 혈청 성상

① 삼투질농도

수온 15°C의 30, 20, 10 psu 해수에서 개량조개 혈청의 삼투질농도는 Fig. 8에 나타낸 바와 같다.

30 psu에서는 실험 개시시부터 72시간동안 환경수의 삼투질농도(893.1 mOsm/kg)와 유사한 수준(904~920 mOsm/kg)을 유지하였다. 20 psu에서는 실험 개시후 3시간째부터 환경수의 삼투질농도(597.5 mOsm/kg)와 유사한 수준(605.2±5.23 mOsm/kg)으로 감소하였고, 72시간째까지 594~605 mOsm/kg을 유지하였다. 반면, 10 psu에서는 실험 개시후 3시간째에 845.6±17.7 mOsm/kg의 삼투질농도를 나타내, 환경수의 삼투질농도인 301.9 mOsm/kg 수준으로 감소하지 않았다. 이후 6시간째에 815.0±33.5 mOsm/kg, 12시간째에 794.0±14.6 mOsm/kg, 24시간째에 638.6±87.3 mOsm/kg, 48시간째에 445.8±21.8 mOsm/kg로 점차 감소하여, 10 psu에서는 환경수의 삼투질농도에 곧바로 순응하지 않는 경향을 나타냈다. 72시간째에는 폐사로 인해 혈림프를 채취할 수 없었다.

② 이온 농도

가. Na⁺, K⁺, Cl⁻

수온 15°C의 30, 20, 10 psu 해수에서 개량조개 혈청의 Na⁺, K⁺, Cl⁻ 농도는 Fig. 9에 나타낸 바와 같다.

Na⁺ 농도는 30 psu에서 실험 개시시부터 72시간째까지 환경수의 Na⁺ 농도(442.8 mmol/L)와 유사한 439.0~455.0 mmol/L를 유지하였고, 20 psu에서는 실험 개시후 3시간째부터 Na⁺ 농도가 감소하여 환경수(295.3 mmol

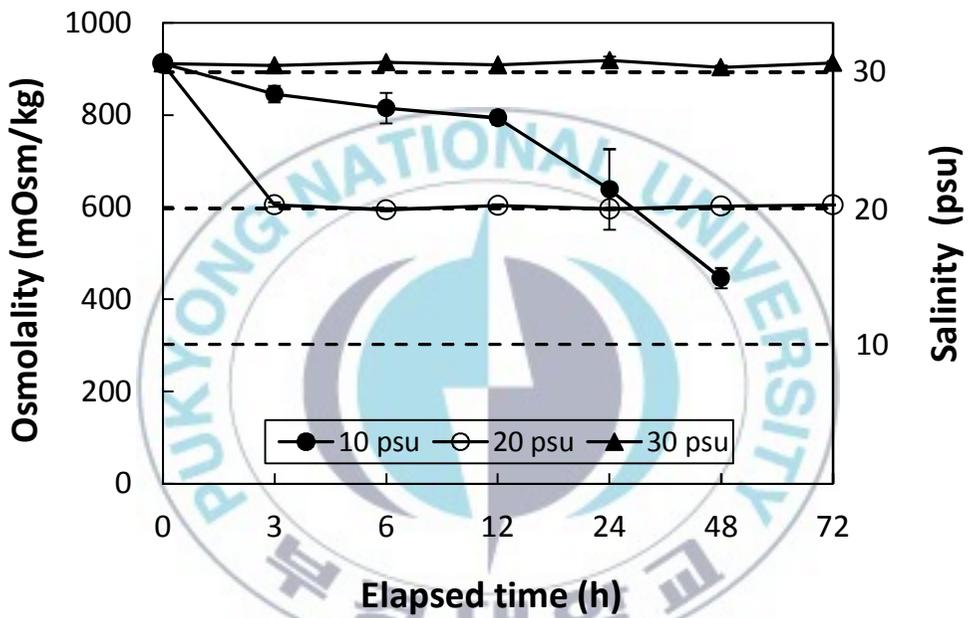


Fig. 8. Levels of hemolymph osmolality of *Mactra chinensis* after abrupt changes of salinity. Each dotted line indicates osmolality of experimental water. Each value represents mean±S.E. (n=5).

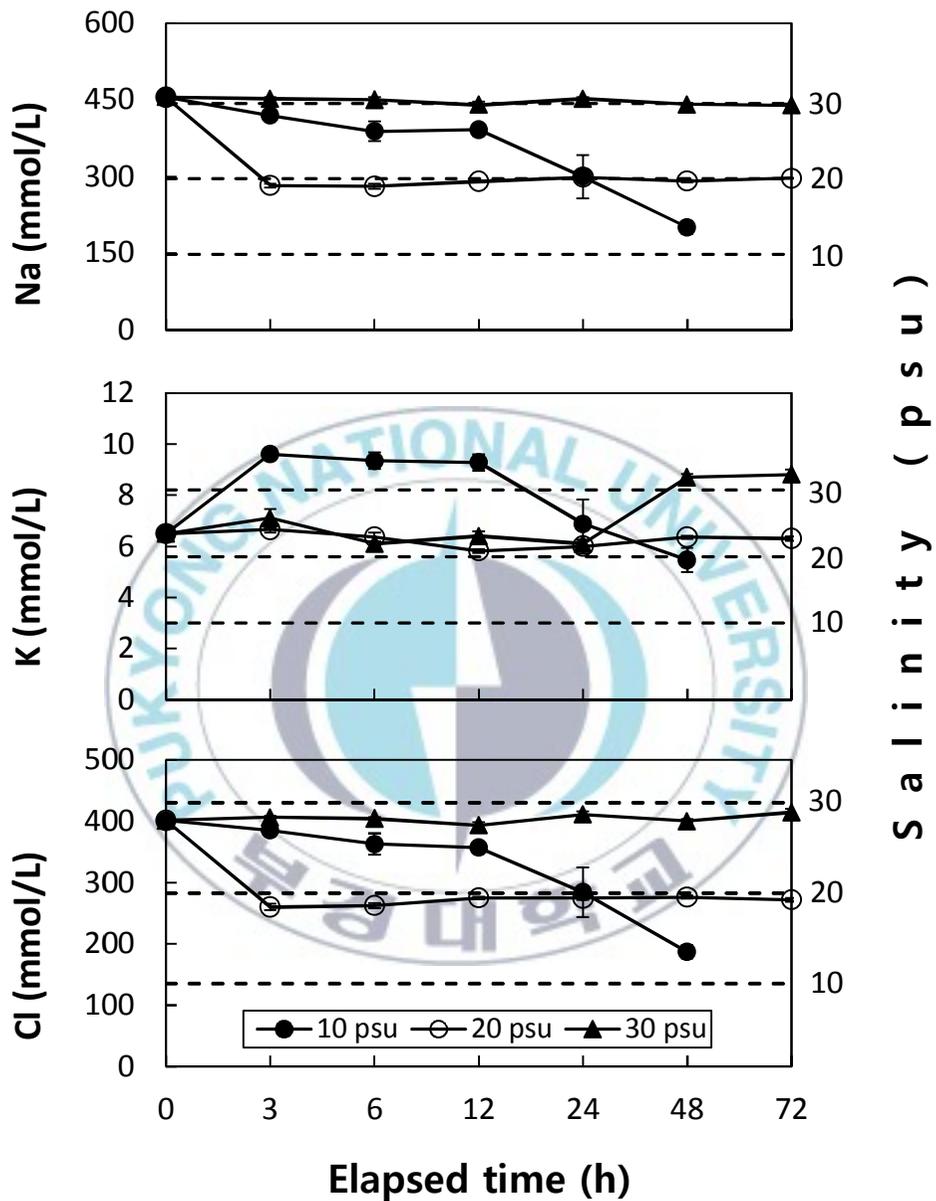


Fig. 9. Levels of hemolymph sodium, potassium and chloride concentrations of *Mactra chinensis* after abrupt changes of salinity. Each dotted line indicates ionic concentration of experimental water. Each value represents mean \pm S.E. (n=5).

/L)와 유사한 282.6 ± 3.8 mmol/L로 되었으며, 이후 72시간째까지 $280.8 \sim 298.8$ mmol/L를 유지하였다. 반면, 10 psu에서는 3시간째에 419.0 ± 7.6 mmol/L로 되어, 환경수(147.8 mmol/L)와 유사한 수준으로 Na^+ 농도가 감소하지 않았다. 이후 12시간째까지 점차 감소하여 391.6 ± 11.6 mmol/L로 되었다가, 24시간째부터 급격히 감소하여 299.4 ± 42.0 mmol/L로 되었으며, 48시간째에 200.2 ± 12.1 mmol/L로 되었다. 즉, 30 및 20 psu에서 Na^+ 농도는 환경수에 순응하는 경향을 나타냈으나, 10 psu에서는 곧바로 순응하지 않는 경향을 나타냈다.

K^+ 농도는 30 psu에서 실험 개시시부터 24시간째까지 $6.1 \sim 7.1$ mmol/L로, 환경수(8.2 mmol/L)에 비해 다소 낮게 나타났고, 48시간 및 72시간째에는 $8.7 \sim 8.8$ mmol/L로 되었다. 20 psu에서는 실험 개시후 3시간째부터 72시간째까지 $5.8 \sim 6.7$ mmol/L를 유지하여, 환경수(5.6 mmol/L)의 K^+ 농도에 비해 다소 높게 나타났다. 반면, 10 psu에서는 3시간째에 K^+ 농도가 9.6 ± 0.2 mmol/L로 상승하여 환경수(3.0 mmol/L) 및 실험 개시시(6.5 ± 0.2 mmol/L)보다 높은 값을 나타냈고, 12시간째까지 $9.3 \sim 9.6$ mmol/L를 유지하였다. 24시간째(6.0 ± 0.9 mmol/L)부터는 감소하기 시작해, 48시간째에는 5.5 ± 0.5 mmol/L로 되었다. 즉, K^+ 농도는 30 및 20 psu에서 환경수보다 다소 낮거나 높은 농도로 순응하는 경향을 나타냈으나, 10 psu에서는 환경수에 순응하지 않는 경향을 나타냈다.

Cl^- 농도는 30 psu에서 실험 개시시부터 72시간째까지 환경수의 Cl^- 농도(430.2 mmol/L)보다 다소 낮은 $399.0 \sim 414.0$ mmol/L를 유지하였다. 20 psu에서는 실험 개시후 3시간째부터 Cl^- 농도가 감소하여 환경수(282.7 mmol/L)보다 다소 낮은 259.8 mmol/L로 되었고, 이로부터 72시간째까지 $259.8 \sim 276.0$ mmol/L를 유지하였다. 반면, 10 psu에서는 3시간째(385.0 ± 9.2 mmol/L)에 환경수(135.2 mmol/L)와 유사한 수준으로 Cl^- 농도가 감소하지 않았고, 12시간째까지 점차 감소하여 356.6 ± 8.0 mmol/L로 되었으며,

이후 급격히 감소해 24시간째에는 284.0 ± 40.65 mmol/L, 48시간째에는 186.6 ± 10.93 mmol/L로 되었다. 즉, 30 및 20 psu에서 Cl⁻ 농도는 환경수보다 다소 낮은 농도로 순응하는 경향을 나타냈고, 10 psu에서는 환경수에 곧바로 순응하지 않는 경향을 나타냈다.

나. Ca²⁺, Mg²⁺

수온 15°C의 30, 20, 10 psu 해수에서 개량조개 혈청의 Ca²⁺, Mg²⁺ 농도는 Fig. 10에 나타낸 바와 같다.

Ca²⁺ 농도는 30 psu에서 실험 개시시부터 72시간째까지 환경수(13.3 mmol/L)와 유사한 11.9~14.4 mmol/L를 유지하였다. 20 psu에서는 실험 개시후 3시간째(10.1 ± 0.1 mmol/L)부터 Ca²⁺ 농도가 감소하여 환경수(9.1 mmol/L)와 유사한 수준으로 되었고, 이로부터 72시간째까지 10.1~11.2 mmol/L를 유지하였다. 반면, 10 psu에서는 3시간째(13.0 ± 0.2 mmol/L)부터 Ca²⁺ 농도가 상승하여 환경수(5.0 mmol/L) 및 실험 개시시(12.3 ± 0.1 mmol/L)보다 높은 값을 나타냈고, 이후 점차 상승하여 24시간째에는 19.5 ± 2.9 mmol/L로 되었으며, 48시간째에는 17.0 ± 1.6 mmol/L으로 감소하였다.

Mg²⁺ 농도는 30 psu에서 실험 개시시부터 72시간째까지 21.0~28.6 mmol/L로, 환경수(29.3 mmol/L)에 비해 다소 낮은 농도를 유지하였다. 20 psu에서는 실험 개시후 3시간째(18.2 ± 0.7 mmol/L)부터 Mg²⁺ 농도가 감소하여 환경수(20.1 mmol/L)와 유사한 수준으로 되었고, 이로부터 72시간째까지 18.2~21.1 mmol/L를 유지하였다. 반면, 10 psu에서는 3시간째(25.0 ± 0.5 mmol/L)부터 Mg²⁺ 농도가 상승하여 환경수(10.9 mmol/L) 및 실험 개시시(23.7 ± 0.3 mmol/L)보다 높은 값을 나타냈다. 이후 점차 상승하여 12시간째에 26.1 ± 0.53 mmol/L로 되었으며, 24시간째(20.9 ± 2.6 mmol/L)부터 감소하여, 48시간째에는 15.3 ± 0.7 mmol/L로 되었다.

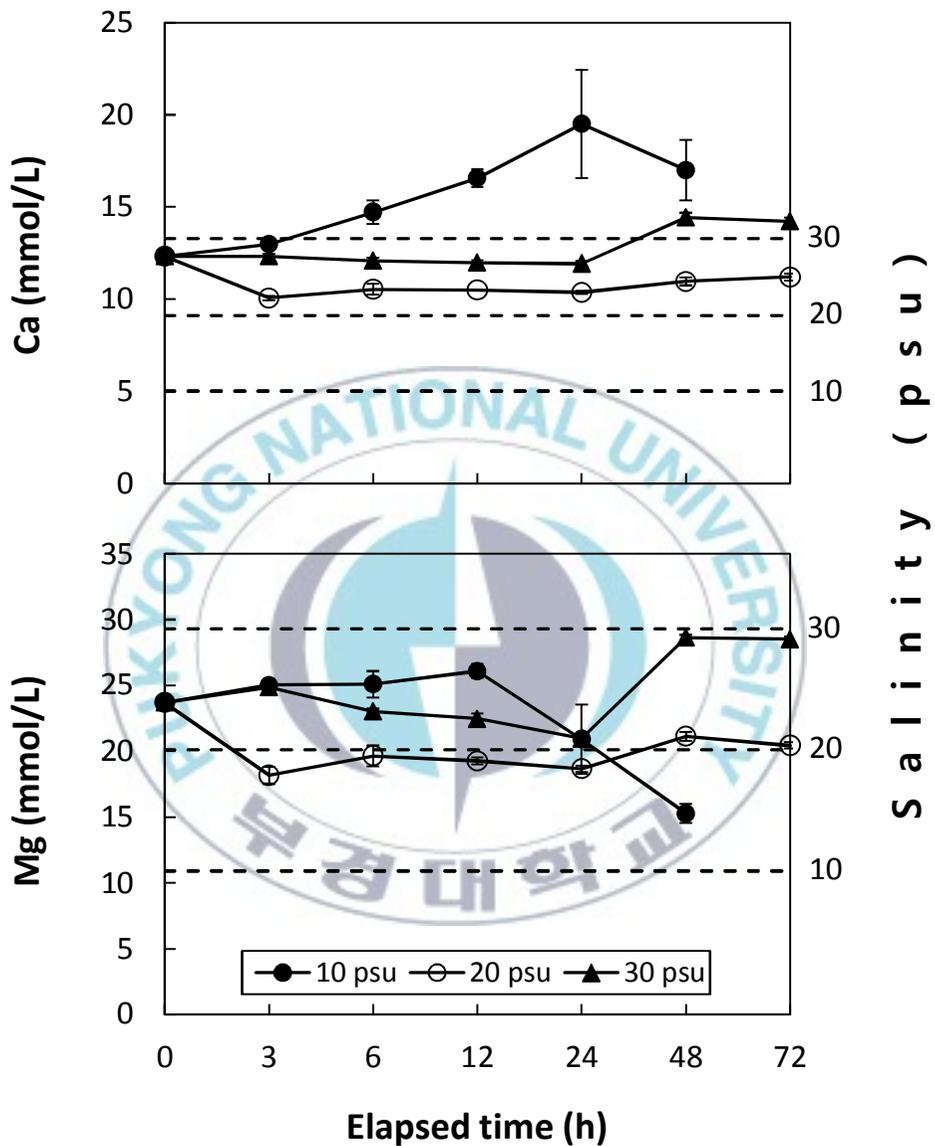


Fig. 10. Levels of hemolymph calcium and magnesium concentrations of *Mactra chinensis* after abrupt changes of salinity. Each dotted line indicates ionic concentration of experimental water. Each value represents mean \pm S.E. (n=5).

즉, Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 농도는 30 및 20 psu에서 환경수보다 다소 높거나 낮은 농도로 순응하는 경향을 나타냈으나, 10 psu에서는 환경수에 곧바로 순응하지 않는 경향을 나타냈다.

③ 글루코스, 총단백질, 총콜레스테롤

수온 15°C의 30, 20, 10 psu 해수에서 개량조개 혈청의 글루코스 농도는 Fig. 11에 나타낸 바와 같다.

30 psu에서는 실험 개시시부터 72시간동안 1.0~1.2 mg/dL를 유지하였고, 20 psu에서는 실험 개시시부터 48시간째까지 1.0~2.0 mg/dL를 유지하다가, 72시간째에 4.4 ± 1.4 mg/dL로 유의하게 증가하였다. 10 psu에서는 실험 개시후 3시간 및 6시간째까지 2.6~3.4 mg/dL를 유지하다가, 12시간째부터 유의하게 증가하여 24시간째까지 3.8~4.0 mg/dL, 48시간째에 9.8 ± 2.2 mg/dL로 급격히 증가하였다. 즉, 염분이 낮을수록, 시간이 경과할수록 글루코스 농도가 상승하는 경향을 나타냈다.

총단백질 및 총콜레스테롤은 모든 실험구에서 0.1 g/dL 및 1.0 mg/dL의 값을 나타내 실험구간의 차이가 나타나지 않았다.

④ AST, ALT, ALP, LDH

수온 15°C의 30, 20, 10 psu 해수에서 개량조개 혈청의 AST, ALT, ALP, LDH는 Fig. 12과 13에 나타낸 바와 같다.

AST는 30 psu에서 실험 개시시부터 72시간째까지 7.0~16.8 IU/L를 유지하였고, 20 psu에서는 실험 개시시부터 72시간째까지 9.8~27.2 IU/L의 값을 나타내 30 psu 실험구와 유의적인 차이를 보이지 않았다. 10 psu에서는 실험 개시후 6시간째까지 9.6~10.2 IU/L를 유지하였으나, 12시간째부터 점차 값이 증가하여 48시간째에 50.2 ± 9.0 IU/L의 값을 나타내, 30 및 20 psu 실험구와 유의적인 차이를 나타냈다.

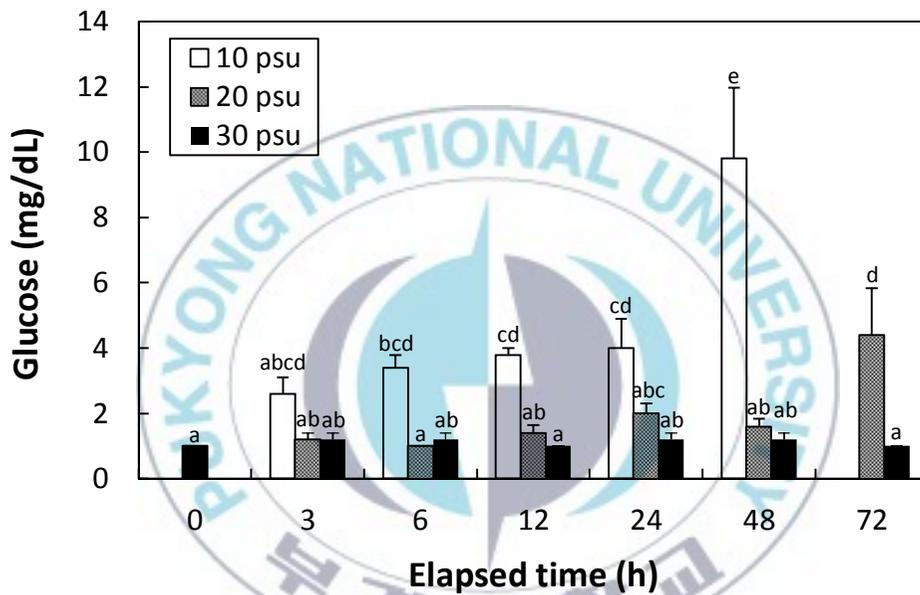


Fig. 11. Levels of hemolymph glucose of *Mactra chinensis* after abrupt changes of salinity. Each value represents mean±S.E. (n=5). Different alphabetic letters on the bars indicate significant differences ($P<0.05$).

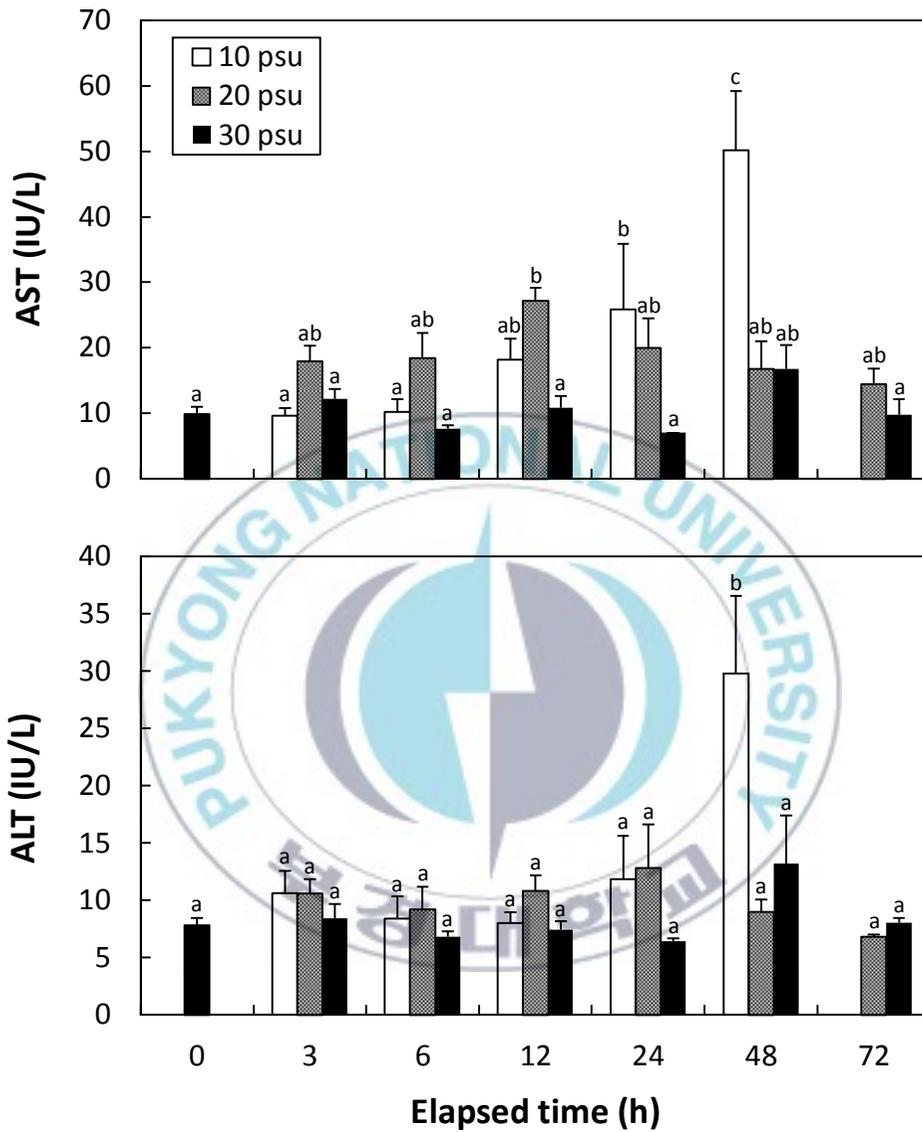


Fig. 12. Levels of hemolymph AST and ALT of *Mactra chinensis* after abrupt changes of salinity. Each value represents mean \pm S.E. (n=5). Different alphabetic letters on the bars indicate significant differences ($P < 0.05$).

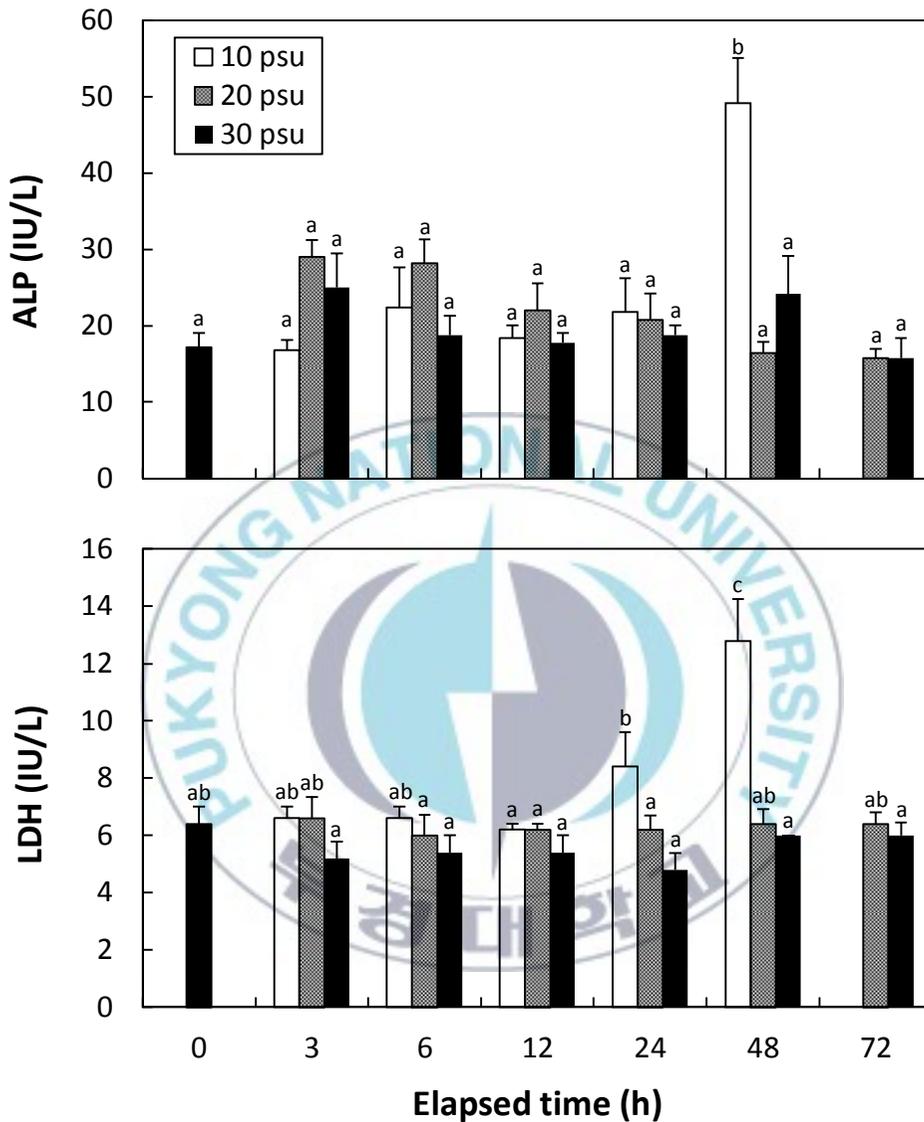


Fig. 13. Levels of hemolymph ALP and LDH of *Mactra chinensis* after abrupt changes of salinity. Each value represents mean±S.E. (n=5). Different alphabetic letters on the bars indicate significant differences ($P < 0.05$).

ALT는 30 psu에서 실험 개시시부터 72시간째까지 6.4~13.2 IU/L를 유지하였고, 20 psu에서는 실험 개시시부터 72시간째까지 6.8~12.8 IU/L를 유지하였다. 10 psu에서는 실험 개시시부터 24시간째까지는 8.0~11.8 IU/L를 유지하였고, 48시간째에 29.8 ± 6.8 IU/L로 유의하게 증가하였다.

ALP는 30 psu에서 실험 개시시부터 72시간째까지 15.8~25.0 IU/L를 유지하였고, 20 psu에서는 실험 개시시부터 72시간째까지 15.8~29.0 IU/L를 유지하였다. 10 psu에서는 실험 개시시부터 24시간째까지는 16.8~21.8 IU/L를 유지하였고, 48시간째에 49.2 ± 5.9 IU/L로 유의하게 증가하였다.

LDH는 30 psu에서 실험 개시시부터 72시간째까지 5.2~6.4 IU/L를 유지하였고, 20 psu에서는 실험 개시시부터 72시간째까지 6.0~6.6 IU/L를 유지하였다. 10 psu에서는 실험 개시시부터 24시간째까지는 6.2~8.4 IU/L를 유지하였고, 48시간째에 12.8 ± 1.5 IU/L로 유의하게 증가하였다.

즉, AST, ALT, ASP, LDH는 공통적으로 10 psu에서 48시간째에 유의하게 증가하는 경향을 보였다.

(2) 수온 및 염분별 대사율

1) 산소소비량

30 psu의 10, 15, 20°C 해수에서 개량조개의 산소소비량은 10°C에서 38.7 ± 2.0 mg O₂/kg/h, 15°C에서 103.6 ± 12.3 mg O₂/kg/h, 20°C에서 218.2 ± 39.7 mg O₂/kg/h였다(Fig. 14). 즉, 수온이 높아질수록 산소소비량이 유의하게 증가하였고, Q₁₀ 값은 10~15°C의 범위에서 7.2, 15~20°C의 범위에서 4.4로 나타났으며, 지수함수식의 기울기(b)는 0.1729로 나타났다. 또한, 산소소비 경향의 기울기 값에 대한 r²은 0.9936으로 높은 상관관계를 나타냈다(Fig. 15).

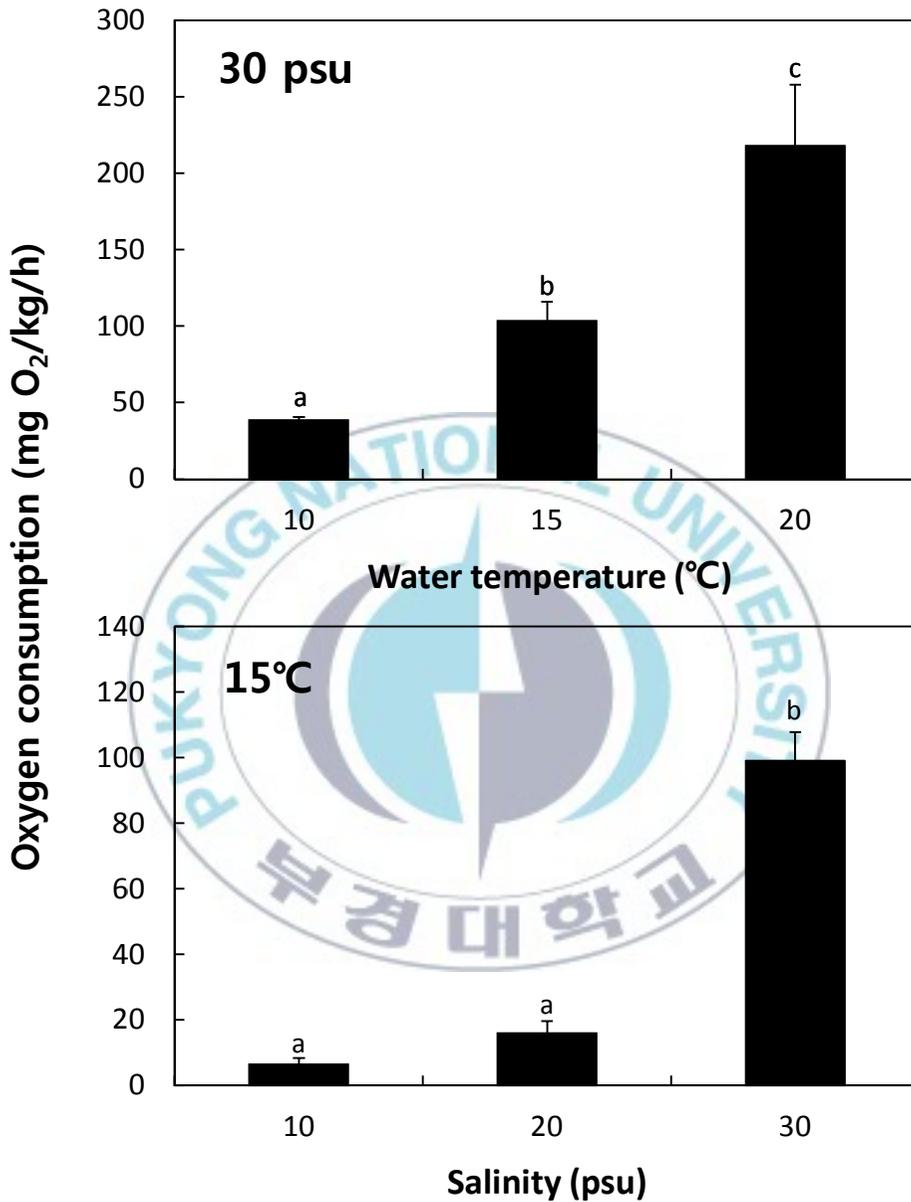


Fig. 14. Oxygen consumptions of *Mactra chinensis* in different water temperatures and salinities. Each value represents mean±S.E. (n=3). Different alphabetic letters on the bars indicate significant differences (P<0.05).

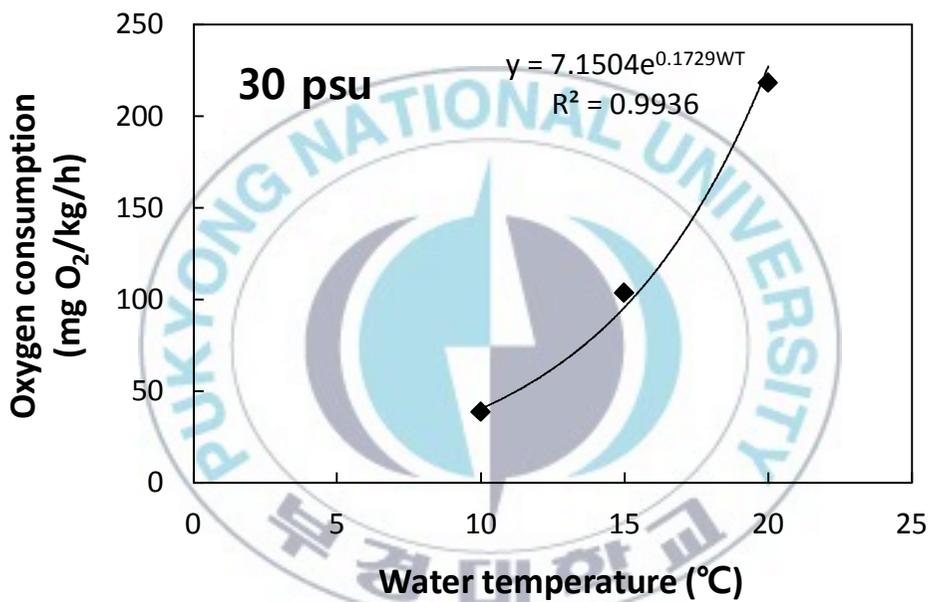


Fig. 15. Oxygen consumptions of *Mactra chinensis* in different water temperatures. WT: water temperature.

15°C의 30, 20, 10 psu 해수에서 개량조개의 산소소비량은 30 psu에서 99.0 ± 8.8 mg O₂/kg/h, 20 psu에서 16.0 ± 3.7 mg O₂/kg/h, 10 psu에서 6.5 ± 1.8 mg O₂/kg/h로 20 및 10 psu에서 유의하게 감소하였다(Fig. 14).

2) 암모니아 배설량

30 psu의 10, 15, 20°C 해수에서 개량조개의 암모니아 배설량은 10°C에서 2.1 ± 0.6 mg NH₄-N/kg/h, 15°C에서 5.5 ± 1.1 mg NH₄-N/kg/h, 20°C에서 3.6 ± 0.1 mg NH₄-N/kg/h 였다(Fig. 16). 15°C에 비해 10°C에서 암모니아 배설량이 유의하게 낮았고, 20°C에서도 15°C에 비해 암모니아 배설량이 감소하였으나, 유의한 차이는 나타나지 않았다.

15°C의 30, 20, 10 psu 해수에서 개량조개의 암모니아 배설량은 30 psu에서 4.9 ± 0.8 mg NH₄-N/kg/h, 20 psu에서 1.3 ± 0.7 mg NH₄-N/kg/h, 10 psu에서 1.0 ± 0.7 mg NH₄-N/kg/h로 20 및 10 psu에서 유의하게 감소하였다(Fig. 16).

3) O:N 원자비

수온 및 염분별 개량조개의 산소소비량과 암모니아 배설량을 바탕으로 구한 O:N 원자비는 Fig. 17과 같다.

30 psu의 10, 15, 20°C 해수에서 O:N 원자비는 10°C에서 17.0, 15°C에서 16.6, 20°C에서 52.2이었다. 10°C와 15°C에서 O:N 원자비가 유사하였고, 20°C에서는 상승하는 경향을 나타냈다.

15°C의 30, 20, 10 psu 해수에서 개량조개의 O:N 원자비는 30 psu에서 17.6, 20 psu에서 11.1, 10 psu에서 4.3이었다. 즉, 염분이 낮아짐에 따라 O:N 원자비는 감소하는 경향을 나타냈다.

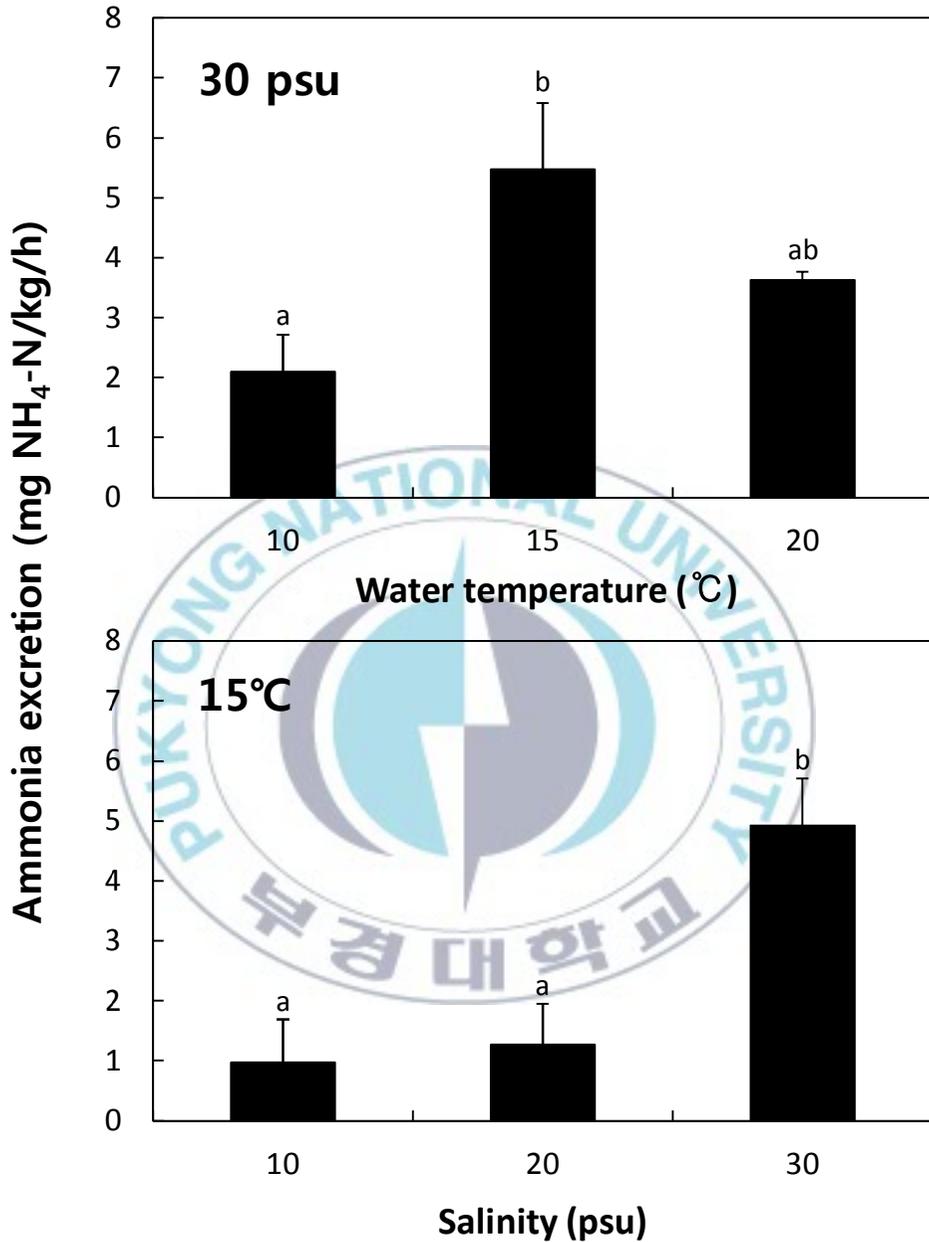


Fig. 16. Ammonia excretions of *Mactra chinensis* in different water temperatures and salinities. Each value represents mean±S.E. (n=3). Different alphabetic letters on the bars indicate significant differences (P<0.05).

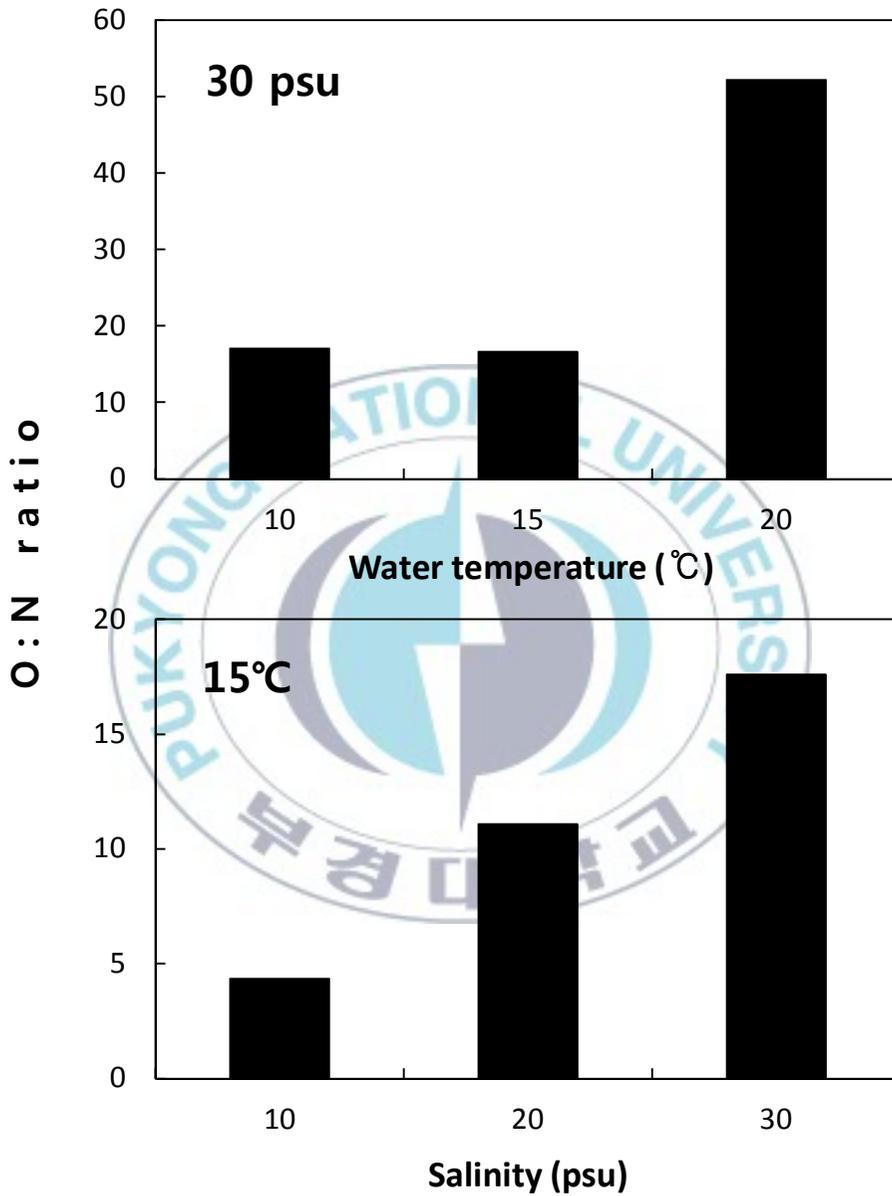


Fig. 17. Atomic O:N ratio variations of *Mactra chinensis* in different water temperatures and salinities.

2. 난발생

(1) 난발생 과정

개량조개 수정란은 분리침성란이었으며, 수정후 난핵포가 소실되었고 이어서 극체가 방출되었다. 이후 난할이 개시되어 2세포, 4세포, 8세포, 16세포, 상실배를 거쳐 포배로 발달하였으며, 이때부터 섬모운동에 의한 회전이 관찰되었다. 포배는 부유생활을 하는 낭배로 발달하였고, 이어서 소화기관이 형성되는 담륜자, 면반과 D형의 유각이 형성되는 D형유생으로 발달하였다(Fig. 18).

(2) 수온 및 염분별 발생률

개량조개 수정란의 수온별 발생률은 Fig. 19에 나타난 바와 같다. 부화율은 15°C에서 97.4±1.4%, 20°C에서 97.7±0.9%, 25°C에서 94.4±1.0%였고, 30°C에서는 0.0%였으며, 30°C를 제외한 실험구간에는 유의한 차이를 보이지 않았다. D형유생으로의 발생률은 15°C에서 44.4±1.4%, 20°C에서 64.0±0.6%, 25°C에서 71.3±0.6%로 나타나 25°C에서 유의하게 높은 발생률을 보였다.

D형유생으로의 발생률이 가장 높은 결과를 나타낸 25°C에서의 염분별 발생률은 Fig. 20에 나타난 바와 같다. 부화율은 10 및 15 psu에서는 0.0%였고, 20 psu에서 85.0±1.9%, 25 psu에서 93.8±1.9%, 30 psu에서 98.1±0.3%, 35 psu에서 98.8±0.4%, 40 psu에서 18.3±1.2%였다. D형유생으로의 발생률은 10, 15 및 20 psu에서는 0.0%, 25 psu에서 46.0±1.8%, 30 psu에서 76.5±1.4%, 35 psu에서 74.7±0.9%, 40 psu에서 0.2±0.2%였으며, 30 및 35 psu에서 유의하게 높은 발생률을 보였다.

(3) 수온별 난발생 속도

개량조개의 수정후 각 발생단계까지의 소요시간은 Table 4에 나타난 바와 같다. 15, 20, 25°C에서는 수온이 높아질수록 각 발생단계까지의 소요

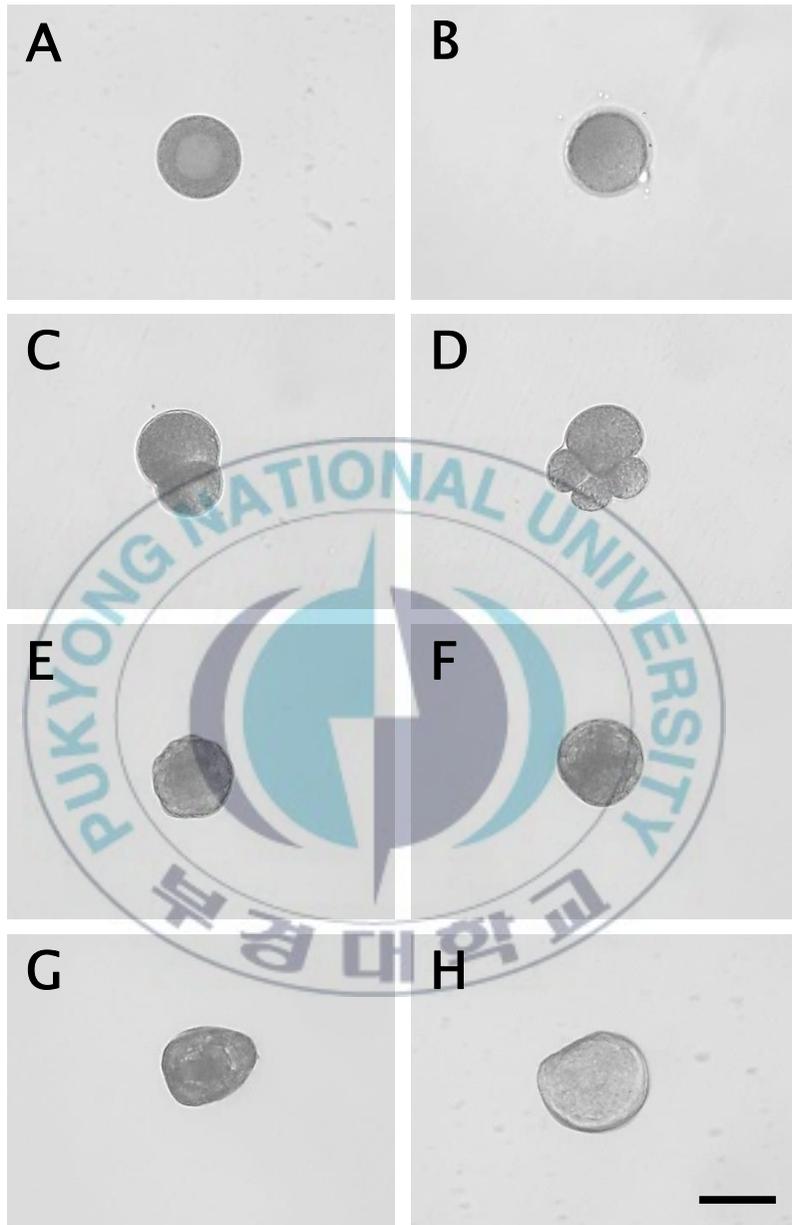


Fig. 18. Early developmental stages of *Mactra chinensis*. A: unfertilized egg, B: 1st polar body stage, C: 2-cell stage, D: 4-cell stage, E: morula stage, F: blastula stage, G: trochophore stage, H: D-shaped larval stage. Bar=50 μ m.

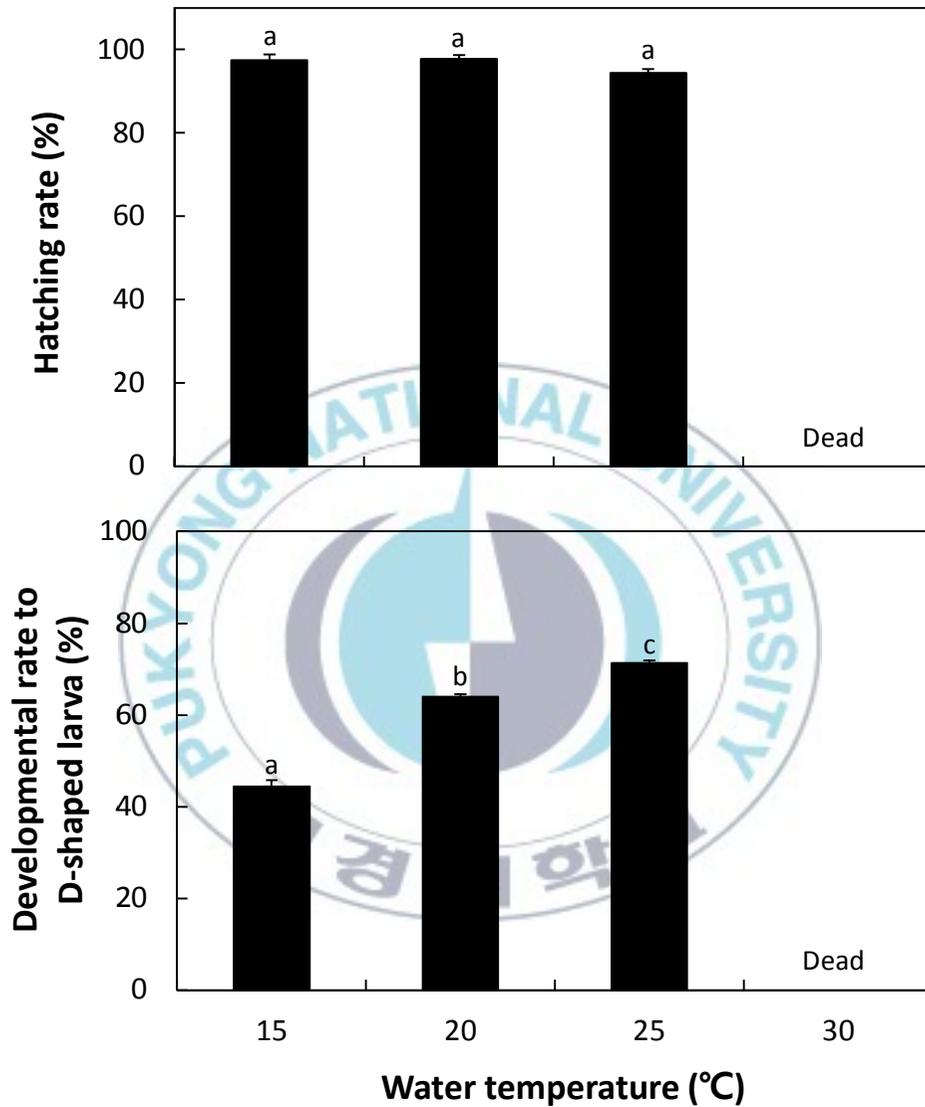


Fig. 19. Hatching rates and developmental rates to D-shaped larva of fertilized egg of *Mactra chinensis* in different water temperatures. Each value represents mean±S.E. (n=3). Different alphabetic letters on the bars indicate significant differences ($P<0.05$).

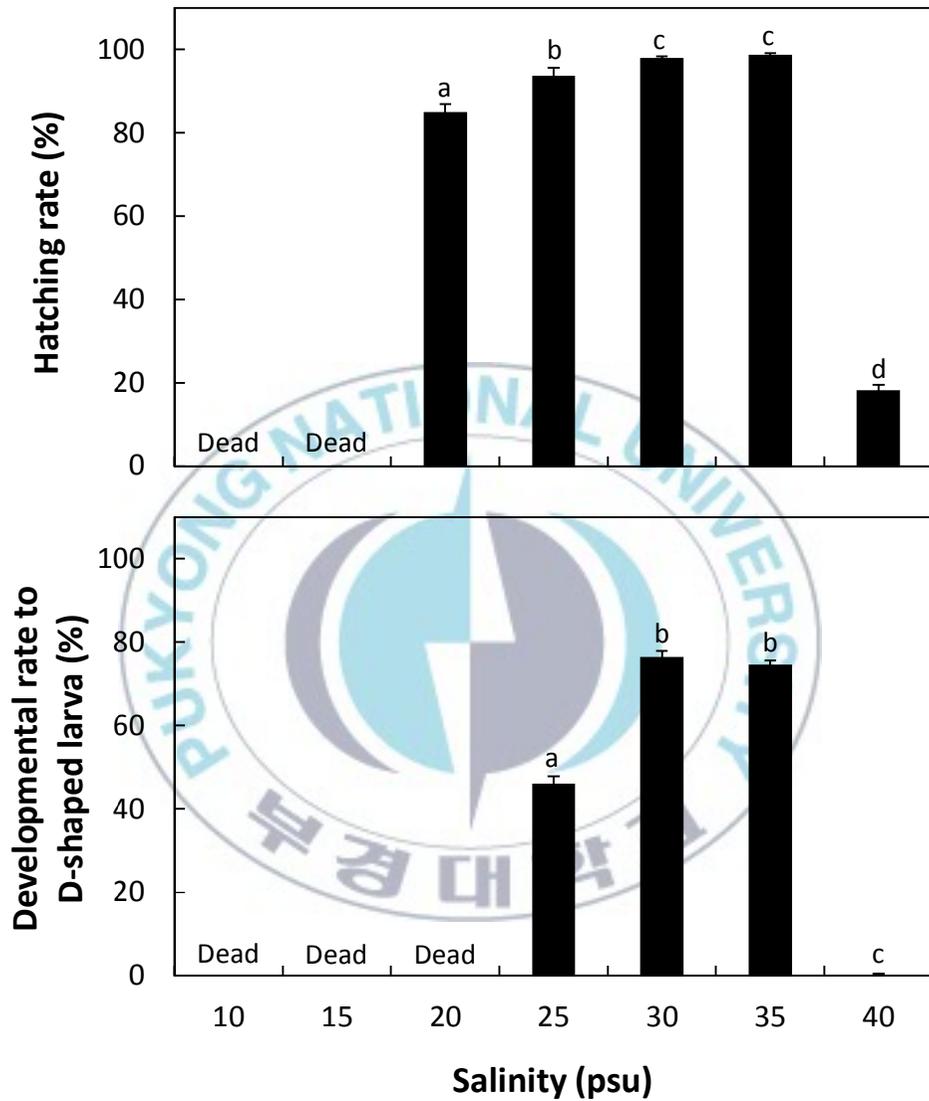


Fig. 20. Hatching rates and developmental rates to D-shaped larva of fertilized egg of *Mactra chinensis* in different salinities. Each value represents mean±S.E. (n=3). Different alphabetic letters on the bars indicate significant differences (P<0.05).

Table 4. The required times (hour:minute) from fertilization to each developmental stage in different water temperatures in *Macra chinensis*

Developmental stage	Elapsed time after fertilization (hour : minute)			
	15°C	20°C	25°C	30°C
2-cell	2:20	1:50	1:30	1:20
4-cell	2:40	2:10	1:50	1:40
8-cell	4:00	2:40	2:20	2:10
16-cell	5:10	3:00	2:40	2:30
Morula	6:10	4:10	3:20	2:50
Blastula	11:30	7:10	6:20	Dead
Trochophore	24:30	14:30	12:30	Dead
D-shaped larva	46:20	26:00	20:10	Dead

시간이 짧았으나, 30℃에서는 상실배 이후 발생이 진행되지 않았다. 수온과 각 발생단계까지의 소요시간을 그림으로 나타냈을 때, 수온별 발생속도는 지수함수적 관계를 나타냈다. Fig. 21에서 X축은 수온, Y축은 소요시간의 역수를 나타내고 있으며, 이로부터 얻어진 수온(WT: ℃)과 각 발생단계별 소요시간(t: hour)의 관계식은 다음과 같았다.

8세포	$1/t = 0.0179WT - 0.0060$ ($R^2 = 0.9518$)
상실배	$1/t = 0.0138WT - 0.0416$ ($R^2 = 0.9948$)
포배	$1/t = 0.0071WT - 0.0137$ ($R^2 = 0.9290$)
담륜자	$1/t = 0.0039WT - 0.0151$ ($R^2 = 0.9402$)
D형유생	$1/t = 0.0028WT - 0.0195$ ($R^2 = 0.9861$)

이들 관계식을 기초로 Y축의 값이 0일 때, 회귀직선이 X축에 접하는 수온, 즉 초기 발생에 있어 난발생이 정지하는 생물학적 영도(biological minimum temperature)는 3.22℃로 산정되었다.

Fig. 22은 수온별로 각 발생단계에 이르기까지의 소요시간과 수온에 대한 회귀직선식과 생물학적 영도를 이용하여 도출한 것이다. X축은 시간, 좌측의 Y축은 각 수온에서 생물학적 영도를 뺀 값의 시간에 따른 적산치이며, 우측의 Y축은 각 발생단계이다.

3. 유생의 냉동보존

(1) CPA 침투·용출후 유생활성지수 및 발생진행률

개량조개 담륜자의 CPA 침투·용출후 유생활성은 Fig. 23에 나타낸 바와 같이, 모든 실험구에서 CPA 침투후 감소하였다가, 용출후에 다시 회복하였다.

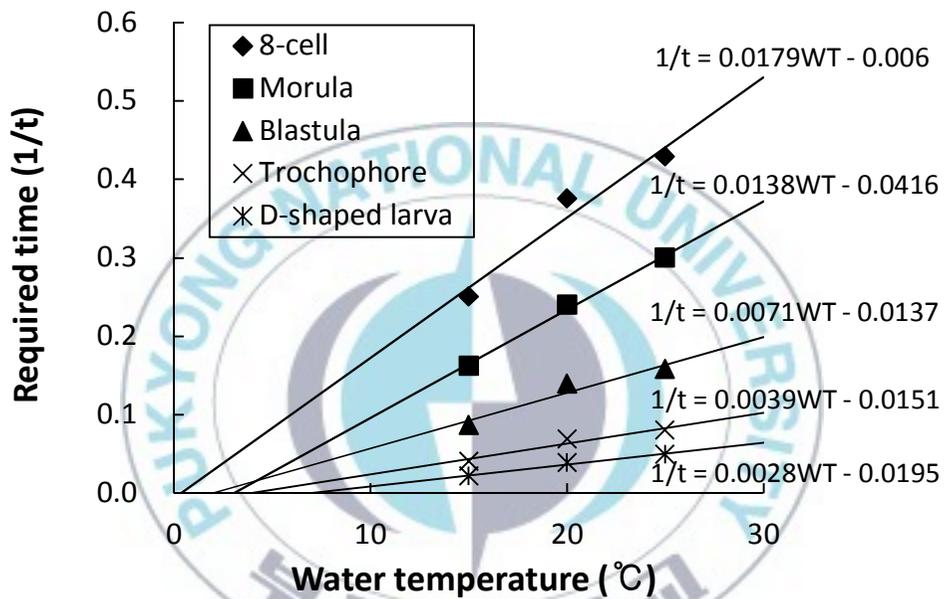


Fig. 21. Relationships between water temperature and required time (1/t; hour) from fertilized egg to each developmental stage of *Mactra chinensis*. t: hour, WT: water temperature.

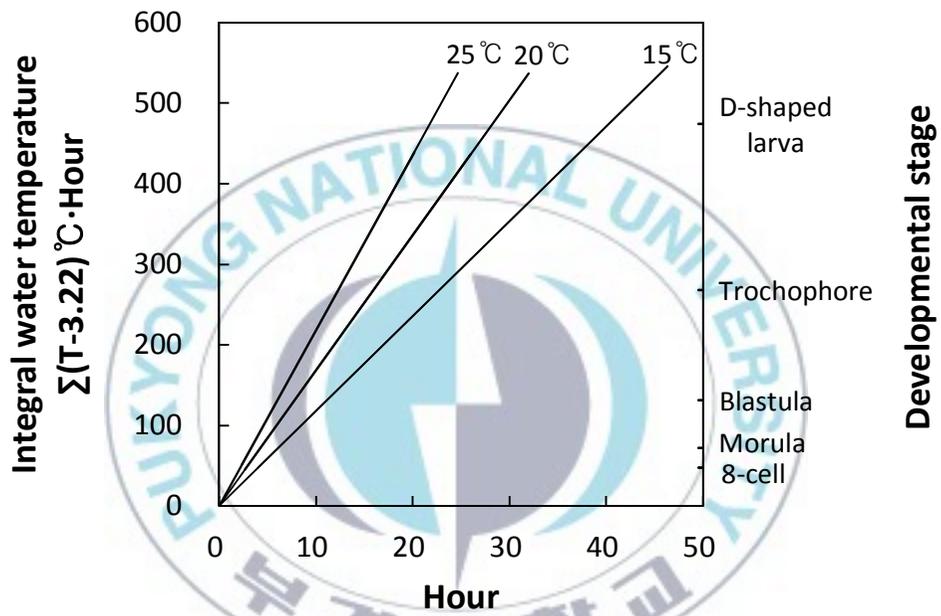


Fig. 22. Relationships between required time from fertilized egg to each developmental stage and accumulated water temperature of *Mactra chinensis*.

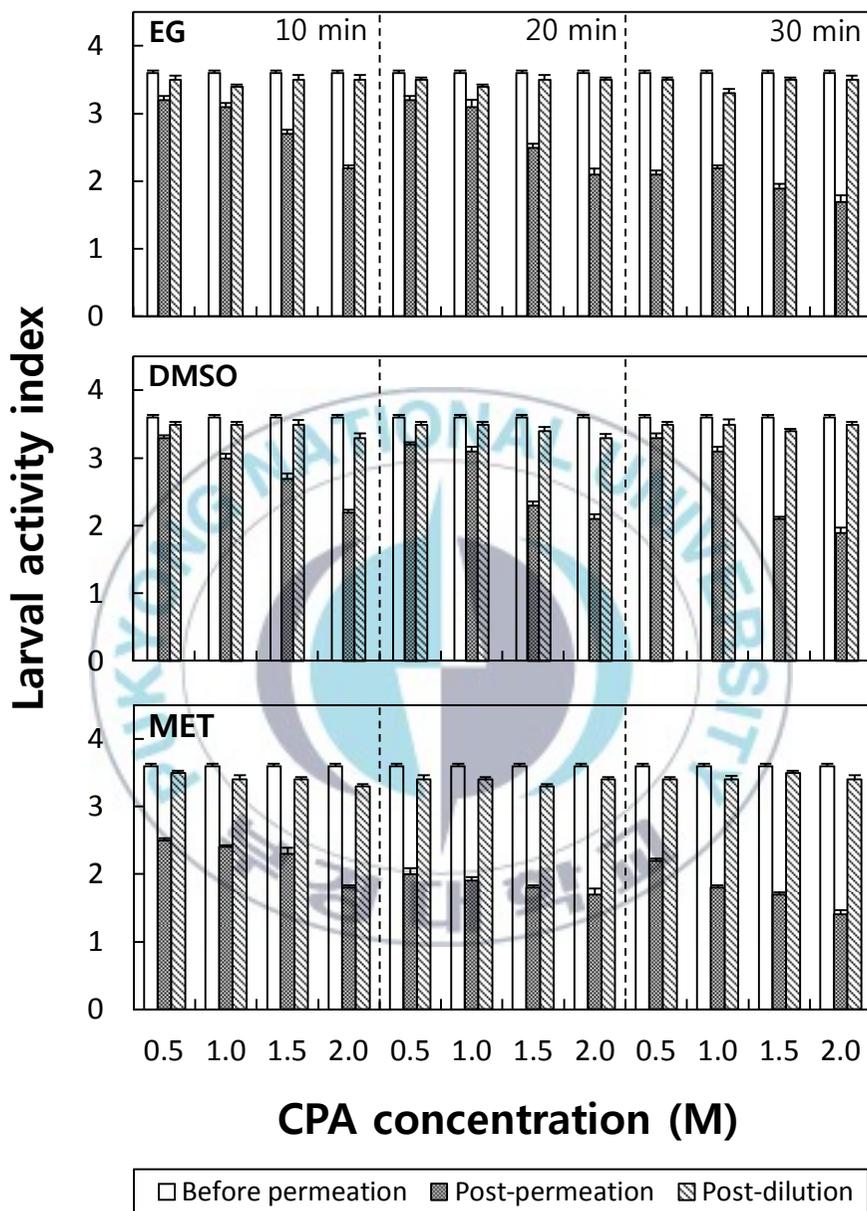


Fig. 23. Larval activity indexes of trochophore before permeation, post-permeation and post-dilution of CPA in *Mactra chinensis*. Each value represents mean±S.E. (n=3).

담륜자의 CPA 침투·용출후 유생의 발생진행률 및 형태이상률은 Fig. 24와 25에 나타낸 바와 같다. 발생진행률은 EG, MET의 모든 농도 및 침투 시간 실험구에서 95% 이상이었고, DMSO에서는 2.0 M 실험구에서 88.5~92.4%의 발생진행률을 나타낸 것 외에, 모든 실험구에서 90% 이상의 발생진행률을 보였다. CPA 침투·용출후의 담륜자로부터 발달한 D형유생 중 일부는 Fig. 26과 같이 유각이 제대로 형성되지 않았다. 그 비율은 EG의 모든 실험구에서 20% 이하로 나타났고, DMSO에서는 20분 이상 침투 실험구 모두에서 50% 이상의 형태이상률을 나타냈으며, 10분 실험구의 0.5, 1.0 및 1.5 M 실험구에서 30% 이하의 형태이상률을 나타냈다. MET에서는 30분 침투의 모든 실험구에서 29.6~32.8%의 형태이상률을 나타냈고, 10 및 20분 침투의 모든 실험구에서 20% 이하의 형태이상률을 나타냈다. 즉, DMSO, MET, EG의 순으로 담륜자에 대한 독성이 더 높은 것으로 나타났고, DMSO는 농도가 높고, 침투 시간이 길어질수록, 담륜자의 정상적인 발생에 영향을 주었으며, MET 역시 침투시간이 길어질수록 유생 발생에 영향을 미치는 것으로 나타났다.

이상의 결과를 바탕으로 담륜자 냉동보존을 위한 적정 CPA는 EG 2.0 M (30분), DMSO 1.5 M (10분), MET 2.0 M (20분)으로 선정하였다.

D형유생의 유생활성은 Fig. 27에 나타낸 바와 같이, 모든 실험구에서 CPA 침투후 감소하였다가, 용출후에 다시 회복하였다. 이에 따라 D형유생의 냉동보존을 위한 적정 CPA는 EG 2.0 M (30분), DMSO 2.0 M (30분), MET 2.0 M (30분)으로 선정하였다.

(2) 냉동 및 해동후 생존율

개량조개 담륜자와 D형유생의 냉동 및 해동후 생존율은 Table 5에 나타낸 것과 같다. 담륜자는 EG 2.0 M (30분) 실험구에서 $2.37 \pm 0.44\%$ 의 생존율을 나타냈고, D형유생은 EG 2.0 M (30분) 실험구에서 $4.72 \pm 0.58\%$ 의 생존율을 나타냈다.

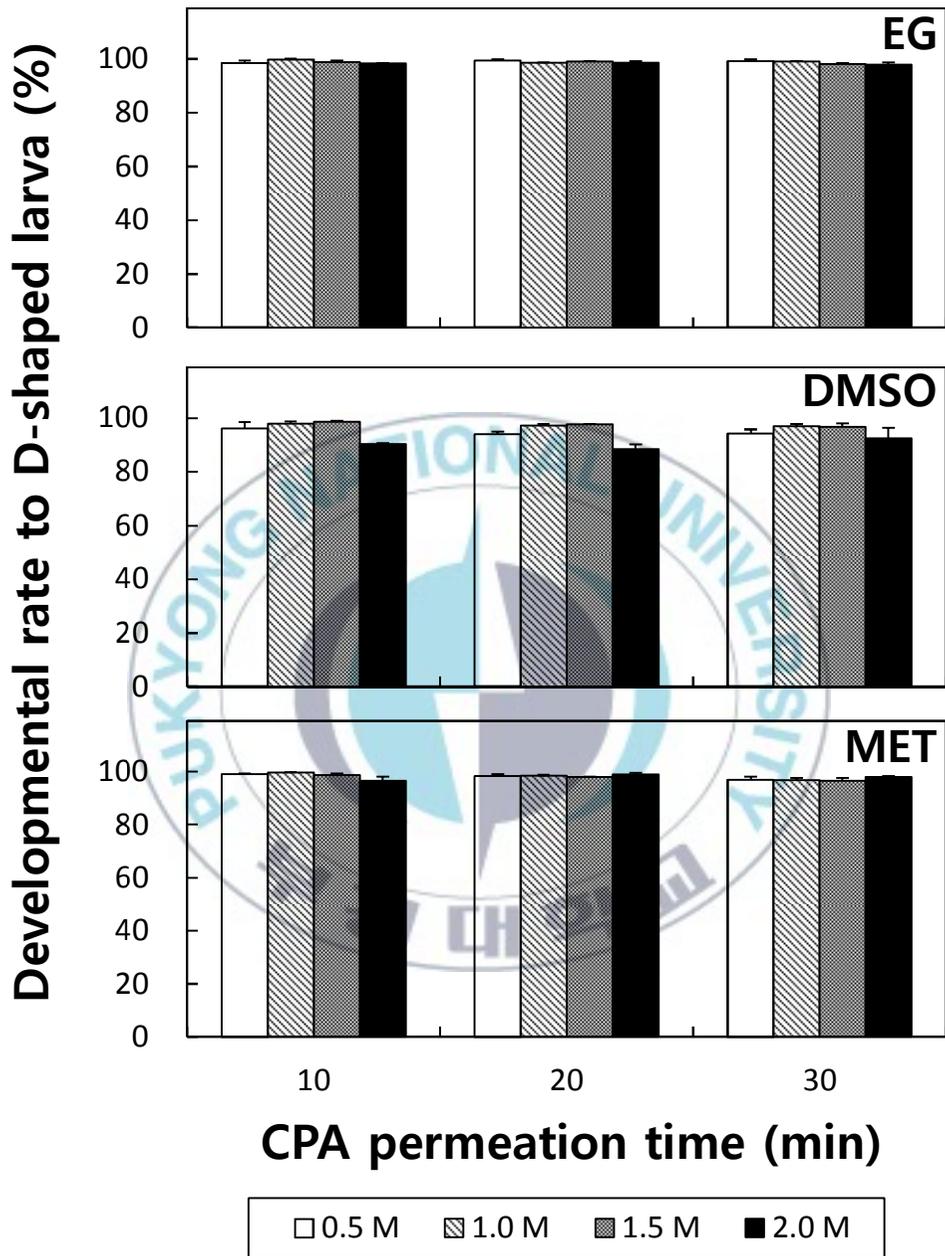


Fig. 24. Developmental rates to D-shaped larva from trochophore post-permeation of CPA in *Macrta chinensis*. Each value represents mean±S.E. (n=3).

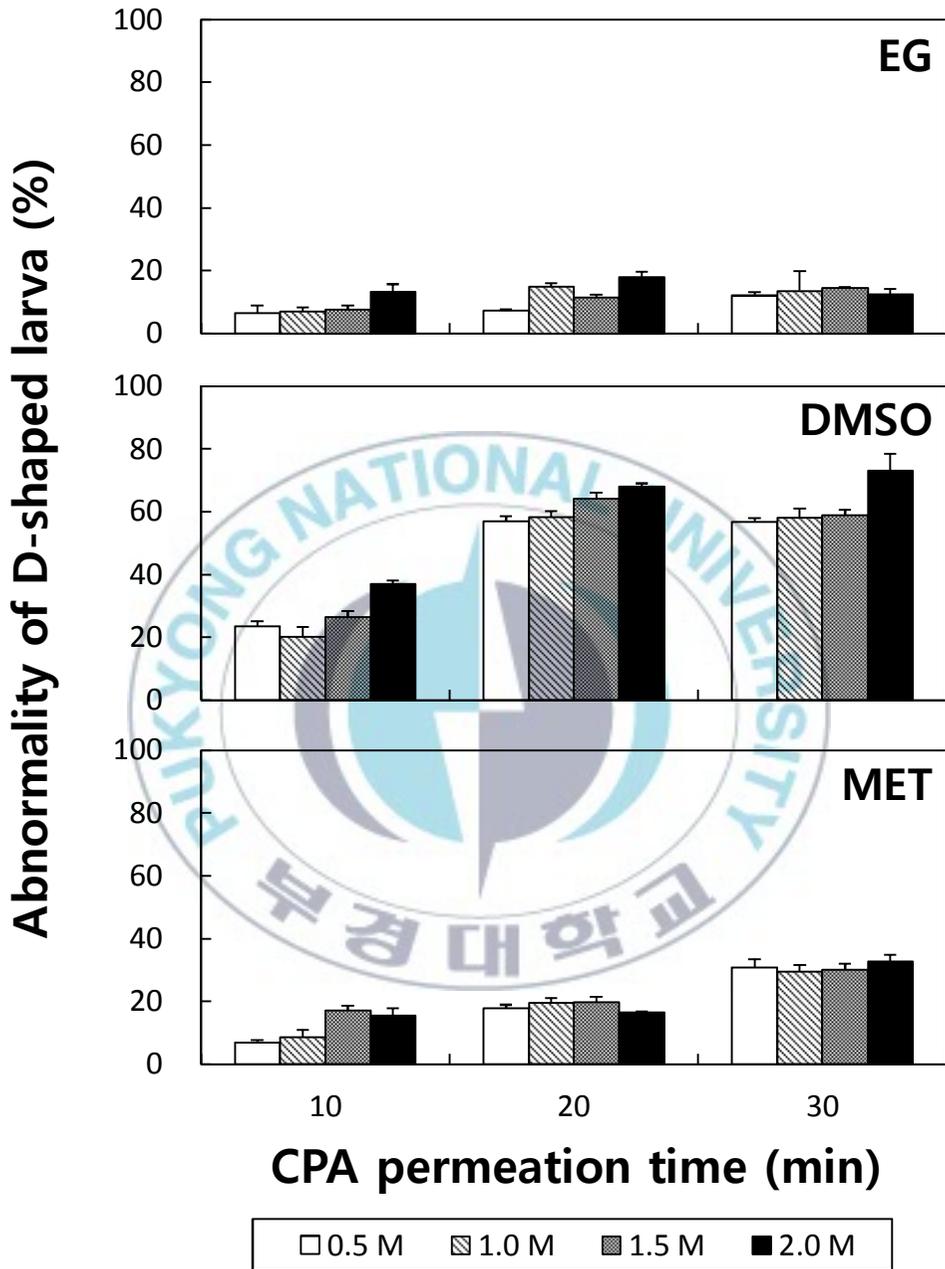


Fig. 25. Abnormalities of D-shaped larva developed from trochophore post-permeation of CPA in *Maetra chinensis*. Each value represents mean \pm S.E. (n=3).

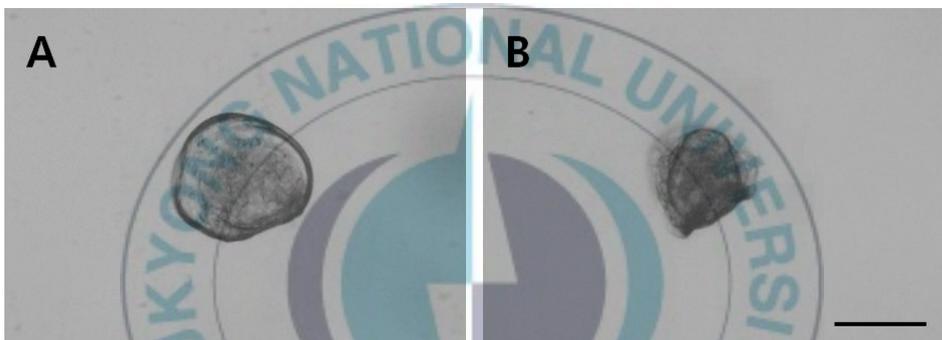


Fig. 26. Normal and abnormal D-shaped larva of *Mactra chinensis*. A: normal D-shaped larva, B: abnormal D-shaped larva. Bar=50 μ m.

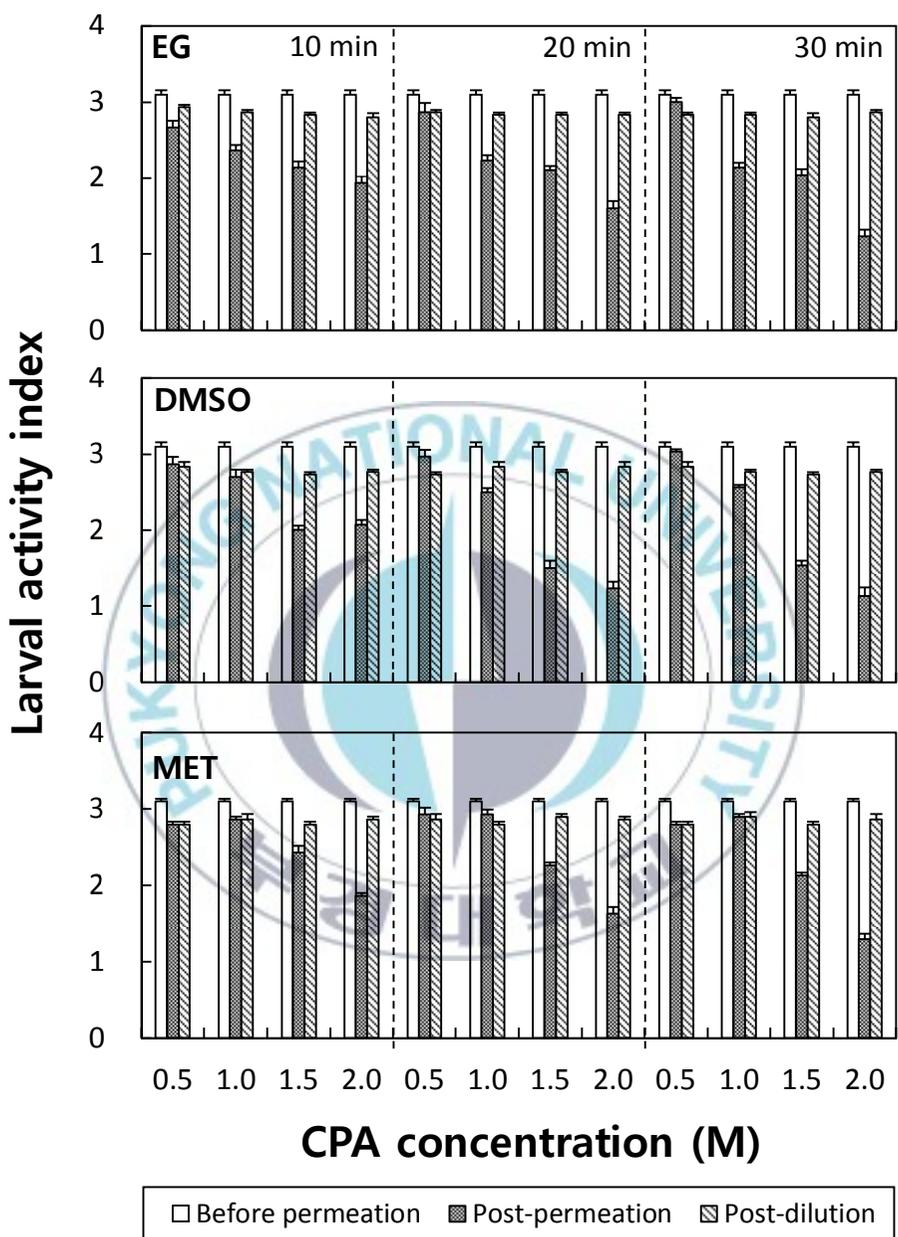


Fig. 27. Larval activity indexes of D-shaped larva before permeation, post-permeation and post-dilution of CPA in *Mactra chinensis*. Each value represents mean±S.E. (n=3).

Table 5. Survival rates of post-thawed trochophore and D-shaped larva of *Macra chinensis*

Developmental stage	CPA	Concentration (M)	Permeation time (min)	Survival rate (%)
Trochophore	EG	2.0	30	2.37±0.44
	DMSO	1.5	10	0.00
	MET	2.0	20	0.00
D-shaped larva	EG	2.0	30	4.72±0.58
	DMSO	2.0	30	0.00
	MET	2.0	30	0.00

Each value represents mean±S.E. (n=3).

IV. 고찰

본 연구에서는 실험재료로 낙동강 하구에서 채집된 개량조개를 사용하였다. 낙동강 하구는 한국의 대표적인 개량조개 산지 중 하나로서, 본래 담수와 해수의 혼합에 인한 염분의 변화가 빈번한 수역이었으나, 1987년 낙동강 하구둑이 준공된 후에는 담수의 유입량이 조절되고 있다. 그러나 강우량이 많은 여름철에는 낙동강 하구둑의 수문을 개방해 다량의 담수를 방류하므로, 주변 수역이 저염분화 될 수 있다(Byun, 2011; Yoon et al., 2008). 또한, 낙동강 하구 수역이 저염분화되는 시기는 개량조개의 산란기인 5~9월과 겹치는데, 서식환경이 급변하면 모패의 생리활성과 난질에 영향을 받을 수 있다.

본연구에서 최종적으로 하고자하는 발생배의 냉동보존에 있어서, 냉동·해동 후 생존과 발생진행에 큰 영향을 미치는 요인 중 하나가 발생배의 질(quality)이므로, 이를 위한 모패 관리 및 난발생의 적정 조건에 대해 조사가 선행될 필요가 있다. 따라서, 먼저 모패의 환경변화에 따른 생존율, 생리활성 및 대사율에 대해 조사하였다.

생존율은 염분이 낮아짐에 따라 감소했는데, 15°C의 20 psu에서는 24시간째부터 폐사하기 시작해 216시간째에 65.0%가 생존하였고, 10 psu에서는 24시간째부터 폐사하기 시작해 48시간째에 폐사가 급격히 증가하였으며, 96시간째에 모두 폐사하였다. 즉, 20 psu에서는 개체간의 차이를 보이나, 저염분 환경에 적응하여 일정기간 동안 생존이 가능한 것으로 보이며, 10 psu에서는 24시간째부터 생존에 치명적인 영향을 받는 것으로 생각된다. Shin et al. (2000)은 바지락(*Ruditapes philippinarum*)을 18°C의 6.4 및 12.8 psu에 노출시켰을 때, 각각 6 및 12일째에 모두 폐사했다고 하였고, Shin et al. (2004)은 홍합(*Mytilus coruscus*) 치패를 15°C의 3.4 psu에 노출시켰을 때, 8일째에 모두 폐사했다고 하였다. 또, Moon and Shin (2010)

은 꼬막(*Tegillarca granosa*)을 25°C의 3.4 psu에 노출시켰을 때, 11일째에 모두 폐사했다고 하였다. 즉, 개량조개는 하구에서도 서식하는 패류이지만, 저염분에 대한 내성이 상대적으로 약한 것으로 보인다.

생리활성의 변화를 조사하기 위해 분석한 혈림프 성상 가운데 혈구수는 이때패류의 주요 면역반응 지표로서 활용되는데, 환경변화와 질병 등에 의해 그 수에 증감이 있을 수 있다(Yu, 2011). 또한, 혈구수의 증가는 혈구의 증식 또는 조직으로부터 혈림프로의 혈구 이동을 의미하고, 감소는 혈구용해 또는 혈림프로부터 주변 조직으로의 혈구 이동을 의미한다고 알려져 있다(Pipe and Coles, 1995). 본 연구에서는 30 psu에서 증감이 있었지만 일정 수준을 유지하였고, 20 psu에서는 24시간째까지 감소하는 경향을 보이다 72시간째에 실험 개시시의 수준을 회복하였으며, 10 psu에서는 6시간째에 증가한 이후, 48시간째에 이르기까지 점차 감소하는 경향을 나타냈다. 즉, 20 psu에서는 저염분으로 인해 조직의 손상이 생겨, 이를 방어하기 위한 작용의 일환으로 24시간째까지 혈구가 조직으로 이동하였다가 이후 회복한 것으로 추정된다. 또한, 10 psu에서는 6시간째에 저염분 스트레스로 인해 혈구가 증식되었고, 이후 손상된 조직으로의 이동이 일어난 것으로 보인다. Matozzo et al. (2007)은 백합과의 일종인 *Chamelea gallina*를 28 psu에 7일간 수용했을 때, 34 psu에 수용한 것에 비해 혈구수가 유의하게 증가했다고 하였고, Reid et al. (2003)은 바지락(*Ruditapes philippinarum*)을 20 psu에 5주간 수용했을 때, 30 psu에 수용한 것에 비해 혈구수가 유의하게 감소했다고 하였다. 또한, Bussell et al. (2010)은 진주담치(*Mytilus edulis*)를 16 psu에 2일간 수용했을 때, 32 psu에 비해 혈구수가 유의하게 감소했다고 하였다. 즉, 저염분에 따른 혈구수의 증감은 염분 및 수용기간에 따라 영향을 받는 것으로 보이며, 종에 따라서도 차이가 있는 것으로 생각된다. 따라서 이에 대한 보다 자세한 연구가 필요할 것으로 판단된다.

삼투질농도는 30 및 20 psu에서 3시간째부터 환경수에 순응하였지만, 10 psu에서는 12시간째까지 서서히 삼투질농도가 감소하다가 이후 감소폭이 커졌으며, 마지막 혈림프 채취구인 48시간째에도 환경수에 완전히 순응하지 않았다. 이온 농도 가운데 Na^+ 및 Cl^- 은 삼투질농도와 같은 경향을 나타냈다. 반면, K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} 의 경우, 30 및 20 psu에서 72시간동안 환경수보다 다소 낮거나 높은 수준을 유지하였지만, 10 psu에서는 실험 개시시보다 농도가 상승하였다가 24시간째를 전후해 점차 감소하는 경향을 나타냈다. 해양 무척추동물은 대부분 삼투순응형(Osmoconformer) 동물로, 체액의 삼투질농도는 종에 따라 적응 및 저항의 범위와 기간이 다르긴 하나 환경수에 순응한다. 그중 폐각을 가진 이매패류의 경우, 갑작스런 염분의 변화시 폐각을 닫아 짧은 기간 동안 수분 및 이온의 출입을 억제할 수 있다(Berger et al., 1997; Shumway, 1977). 즉, 30 및 20 psu에서와 달리 10 psu에서 개량조개는 폐각을 닫고 저염분에 대해 저항한 것으로 보이며, 12시간 이후부터는 저항능력을 잃어 서서히 환경수에 순응한 것으로 보인다.

글루코스는 어류에서 스트레스 지표로 활용되는데, 폐류에서는 글루코스의 상승이 염분의 에너지원이 필요하다고 여겨지는 스트레스에 대한 반응에서 기인한다고 알려져 있다(Gustafon et al., 2005). 본 연구에서는 20 psu에서 72시간째에 유의하게 상승하였고, 10 psu에서는 12시간째부터 유의하게 상승하였다가 48시간째에 급격히 상승하였다. 즉, 20 psu에서는 72시간째부터, 10 psu에서는 12시간째부터 저염분에 대한 스트레스 반응을 보이는 것으로 생각되며, 10 psu에 48시간 이상 노출될 경우 상당한 스트레스를 받는 것으로 보인다.

AST, ALT, ALP, LDH는 인간의 간기능 검사에서 활용되며, 이들 중 AST와 ALT는 폐류의 혈림프 내에 평소 미량 존재하고 있으나, 조직에 염증 및 조직에 손상이 생길시 혈중으로 유리되어 상승하는 것으로 알려

저 있다(Casillas et al., 1982). 또한, LDH는 에너지 생성의 혐기성 경로에서 작용하며, 유해물질에 노출되는 등의 환경변화에 의해서도 상승하는 것으로 알려져 있다(De Coen et al., 2001; Vieira et al., 2008). 본 연구에서 개량조개의 혈림프 내 AST, ALT, ALP, LDH는 모두 10 psu에서 48시간째에 유의하게 상승하였다. 이는 An et al. (2010)이 피조개(*Scapharca broughtonii*)를 25 psu에 수용하였을 때, 35 psu에 수용한 것에 비해 혈림프의 AST 및 ALT 농도가 상승하였다는 결과와 유사하다. 즉, 개량조개 모패는 10 psu의 48시간째에 조직의 손상이 증가했으며, 폐각을 닫은 상태에서 오랜 시간 저염분에 저항하면서 저산소 상태가 되어, 혐기성 경로를 통한 에너지 생성도 증가한 것으로 추정된다.

대사율을 조사하기 위해 측정된 산소소비량, 암모니아 배설량, O:N 원자비는 패류의 대사율을 파악하는데 이용할 수 있는 주요한 지표로서, 수온, 염분, 용존산소, 먹이 섭취, 질병, 개체의 크기 등에 의해 영향을 받는다(정 외, 2008).

산소소비량 측정 실험에서 모패의 산소소비량은 10~20°C의 범위에서 수온의 증가에 따라 유의하게 증가하여 변온동물의 일반적인 생리적 반응을 보였고, Q_{10} 값은 10~15°C에서 7.2, 15~20°C에서 4.4로 나타났다. Q_{10} 값은 온도변화에 적응하기 위한 동물의 대사량으로서, 온도 상승으로 인한 체내 효소반응과 생리학적 작용으로 유발된 에너지 요구량을 나타낸다. 즉, 15~20°C 보다 저온인 10~15°C에서의 수온 상승이 상대적으로 스트레스로 작용하는 것으로 보인다. 염분별로는 10~30 psu의 범위에서 20 psu 이하로 염분이 감소하였을 때, 산소소비량이 유의하게 감소하였다. 그 원인은 20 psu 이하의 저염분에 대해 민감하게 반응하여 폐각을 닫고, 대사를 억제하였기 때문일 것으로 보인다. 이는 Lange (1972)가 이매패류는 염분이 급격하게 변화할 시, 세포용적과 관련한 대사를 감소시키기 위해 즉시 폐각을 닫고 대사를 감소시킨다고 한 것과 부합한다. 또한, 동족

(*Mactra veneriformis*), 바지락(*Ruditapes philippinarum*), 홍합(*Mytilus coruscus*)의 산소소비량이 염분이 낮아질수록 감소하였다고 한 것과는 일치한다(Lee, 1996; Shin et al., 2000; Shin et al., 2004).

암모니아 배설량은 수온별실험에서 15°C에서 10°C에 비해 유의하게 증가하였고, 20°C에서는 10 및 15°C에 비해 유의한 차이가 나타나지 않아, 변온동물의 일반적인 경향과는 다소 차이가 있었다. 염분별로는 20 psu 이하에서 암모니아 배설량이 유의하게 감소하였는데, 이는 저염분에 따라 대사를 억제했기 때문인 것으로 보인다.

O:N 원자비는 에너지 대사에서 단백질 이용지표로 이용되고 있으며, 단백질 대사가 많아질수록 감소한다.(Bayne and Thompson, 1970). 수온별실험에서 O:N 원자비는 10°C (17.0) 및 15°C (16.6)에 비해 20°C (52.5)에서 상승하였다. 이는 10°C 및 15°C에서 단백질대사의 비중이 증가했기 때문인 것으로 보인다. 또한, Bayne (1973)이 30이하의 O:N 원자비는 스트레스를 받은 개체를 나타낸다고 한 것에 비추어 볼 때, 20°C가 모패의 적정 수용조건인 것으로 생각된다. 염분별실험에서는 염분이 낮아질수록 O:N 원자비가 감소하는 경향을 보였는데, 이는 저염분에서 모패가 스트레스를 받았기 때문인 것으로 보인다. 또한, 수온별실험의 20°C 실험구(52.5)를 제외하고 O:N 원자비가 모두 30 이하의 값을 나타냈는데, 이는 산란기에 모패의 단백질대사가 전반적으로 증가한 상태였기 때문일 것으로 생각된다(Shin et al., 2008; Shin et al., 2011),

이상의 결과를 종합하여 봤을 때, 개량조개 모패는 수온별로는 20°C에서 가장 안정적인 대사율을 나타냈다. 염분별로는 20 psu에서는 환경수에 순응하긴 하나, 12시간 동안 대사를 거의 하지 않으며, 72시간째부터는 스트레스로 인해 생존에도 영향을 받는 것으로 보인다. 또한, 10 psu에서는 12시간동안 패각을 닫고 외부와의 물질출입을 억제하면서 환경수에 곧바로 순응하지 않는 경향을 보이며, 대사를 거의 하지 않는다. 12시간째부터

스트레스에 대한 반응을 보이기 시작하며, 24시간째부터는 개체간의 차이가 있으나 체액의 삼투질농도와 전해질 균형이 무너지기 시작한다. 48시간째에는 스트레스에 대한 반응이 더욱 커지며, 거의 모든 개체에서 체액의 삼투질농도와 전해질 균형이 붕괴되고, 조직의 손상이 일어나기 시작해 폐사가 급격히 늘어난다. 따라서 환경수의 염분이 20 psu의 경우 72시간 이상, 10 psu의 경우 12시간 이상 유지될 시, 모패의 생리활성에 상당한 악영향을 미치는 것으로 판단된다.

이어서 양질의 발생배를 얻기 위한 수정란의 적정 부화관리 조건 탐색 실험에서, D형유생으로의 발생률은 25°C에서 가장 높았고, 30~35 psu의 염분범위에서 가장 높게 나타났다. 이는 23°C 및 30~35 psu가 개량조개의 적정 발생 수온 및 염분이라고 한 Min and Kim (2010)의 결과와 부합하였다. 또한, 15~25°C의 범위에서 수온이 높을수록 각 발생단계에 이르는 시간이 짧아졌으며, 생물학적 영도는 3.22°C로 산정되었다. 이 결과는 Min and Kim (2010)이 개량조개에서 보고한 8.0°C와는 차이를 보였는데, 이는 초기 발생단계 관찰값의 차이에서 기인한 것으로 생각된다.

앞선 실험에서 얻은 결과를 바탕으로, 적정 조건에서 얻은 양질의 발생배를 이용해 수행한 적정 CPA 탐색 실험에서는 담류자의 경우, CPA의 농도가 높아질수록, 침투시간이 길어질수록 이후 발달한 D형유생의 형태 이상률이 증가하는 경향을 나타냈다. CPA의 독성은 DMSO, MET, EG의 순으로 강하게 나타났는데, 이는 굴 발생배에 대한 DMSO의 독성이 다른 CPA보다 낮은 것으로 보고한 Chao et al. (1994)의 결과와 상반되었다. 또한, CPA 침투 및 용출에 따른 유생활성지수(LAI)는 용출후 모두 대조구에 가까운 활성을 회복하였다. D형유생의 경우도 마찬가지로 침투 및 용출에 따른 유생활성지수(LAI)는 용출후 모두 대조구에 가까운 활성을 보였다.

이에 따라 냉동보존을 위한 적정 CPA로 담류자는 EG 2.0 M (30분),

DMSO 1.5 M (10분), MET 2.0 M (20분)을, D형유생은 EG 2.0 M (30분), DMSO 2.0 M (30분), MET 2.0 M (30분)을 선정하였다.

선정한 CPA를 사용한 냉동보존 실험에서는 담류자와 D형유생 모두 EG 실험구에서만 해동후 생존하였다. 그러나 생존율이 모두 5% 이하로 나타나 참굴 담류자 75% (Chao et al., 1997), 북방대합 담류자 97% (Chang et al., 2001), 진주조개 D형유생 87% (Choi and Chang, 2003), 피조개 D형유생 52% (Jo et al., 2002) 등의 결과와 비교하였을 때 낮았다. 따라서 추후 냉동속도와 식빙온도 및 해동온도 등에서 보다 자세한 연구가 필요할 것으로 보인다.

결론적으로, 개량조개 모패는 수온 10~20℃의 범위에서는 20℃에서 가장 안정적인 대사작용이 이루어지는 것으로 나타났고, 난발생은 25℃에서 발생률이 가장 높게 나타났다. 염분과 관련해서는 개량조개가 하구에서도 서식하는 종이지만, 모패가 20 psu 이하의 염분에 장시간 노출될시 체액의 삼투압 균형 붕괴 및 그로 인한 스트레스와 조직손상으로 인해 생존과 대사에 영향을 받는 것으로 나타났다. 난발생 역시 25 psu 이하에서 D형유생으로의 발생진행에 지장을 받으므로, 개량조개의 산란기인 5~9월에 다량의 담수유입이 있을 경우, 모패의 생리활성 및 난발생에 상당한 악영향을 미치게 될 것으로 보인다. 최근의 자원 감소도 이와 관련이 있을 것으로 추정되므로, 치패의 방류 위치 선정 등 자원관리에 있어 이러한 점을 고려할 필요가 있을 것으로 판단된다.

또한, 발생배의 냉동보존에 있어 해동후 생존율을 높일 수 있는 적정 CPA, 냉동 및 해동 방법을 탐색할 필요성이 있고, 나아가 개량조개를 비롯한 패류 발생배의 대량 냉동보존기술을 개발하여 이를 자원관리 및 안정적인 패류종묘생산 시스템 개발과 연계한다면, 패류양식산업의 발전에 기여할 수 있을 것으로 생각된다.

V. 요약

본 연구에서는 개량조개의 종보존을 위해 모패의 환경생리활성과 난발생, 유생의 냉동보존에 대해 조사하였다.

염분에 따른 모패의 경시별 생존율은 30 및 20 psu에서 216시간째에 각각 92.5% 및 65.0%였으며, 10 psu에서는 48시간째부터 급격히 폐사가 늘어나 96시간째에 모두 폐사하였다.

혈림프의 혈구수는 30 psu에서 72시간동안 일정 수준을 유지하였고, 20 psu에서는 24시간째까지 점차 감소하는 경향을 보이다 72시간째에 실험 개시시의 수준을 회복하였으며, 10 psu에서는 6시간째에 증가한 이후, 점차 감소하는 경향을 보였다.

혈청의 삼투질농도는 30 및 20 psu에서 3시간째부터 환경수에 순응하였고, 10 psu에서는 48시간째까지 완전히 순응하지 않는 경향을 나타냈다. Na^+ 와 Cl^- 도 삼투질농도와 같은 경향을 나타냈으며, K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} 의 경우, 30 및 20 psu에서 3시간째부터 환경수에 순응한 반면, 10 psu에서는 실험 개시시보다 농도가 상승하였다가 점차 감소하였다.

글루코스는 20 psu에서 72시간째에 유의하게 증가하였고, 10 psu에서는 12시간째부터 유의하게 증가하여 48시간째에 급격히 증가하였다. 총단백질 및 총콜레스테롤은 실험구간 차이가 나타나지 않았다. AST, ALT, ALP, LDH는 10 psu에서 48시간째에 공통적으로 유의하게 증가하였다.

수온 및 염분에 따른 모패의 산소소비량은 수온이 높아질수록 유의하게 증가하였고, 20 psu 이하의 염분에서 유의하게 감소하였다.

암모니아 배설량은 15°C에서 10°C에 비해 유의하게 증가하였고, 20°C에서는 유의한 증가가 나타나지 않았으며, 20 psu 이하의 염분에서 유의하게 감소하였다.

O:N 원자비는 20°C에서 상승하였고, 염분이 낮아질수록 감소하는 경향

을 보였다.

발생에 적합한 수온은 25°C, 염분은 30~35 psu로 나타났고, 난발생은 15, 20, 25°C 에서 수온이 높을수록 각 발생단계에 이르는 걸리는 시간이 짧아졌으며, 생물학적 영도는 3.22°C로 산정되었다.

CPA 침투 및 용출실험 결과, 냉동보존을 위한 적정 CPA는 담류자의 경우 EG 2.0 M (30분), DMSO 1.5 M (10분), MET 2.0 M (20분), D형유생은 EG 2.0 M (30분), DMSO 2.0 M (30분), MET 2.0 M (30분)으로 선정하였고, 냉동 및 해동후 생존율은 담류자에서 2.37%, D형유생에서 4.72%로 나타났다.



감사의 글

학부 4학년에 연구실 문을 두드려 연구실에서 생활을 시작한 것이 오래지 않은 것 같은데, 이제 석사과정을 마무리하며 감사의 글을 적으려 하니 아직 실감이 나지 않습니다. 이 논문을 적기까지 결코 쉽지 않은 과정들이 있었기에, 부족한 제가 무사히 졸업할 수 있도록 도움을 주신 많은 분들께, 진심으로 감사의 뜻을 전해드리고자 합니다.

먼저, 학부의 막바지에 연구실의 문을 두드렸음에도 석사과정을 시작할 수 있도록 기회를 주시고, 약 2년 반의 시간 동안 학문뿐 아니라 인생 전반에 걸쳐 아낌없는 가르침을 내려주신 장영진 교수님께 감사의 말씀을 올립니다.

그리고 바쁘신 와중에도 논문의 심사를 맡아주시고, 제 앞날에 대해 조언을 해주신 공승표 교수님과 최윤희 교수님께도 감사의 말씀을 드립니다. 또, 학부와 석사과정 동안 학문적 가르침을 주신 조재운 교수님, 허성범 교수님, 김동수 교수님, 배승철 교수님, 김창훈 교수님, 김종명 교수님, 남윤권 교수님, 강성민 교수님께도 감사의 뜻을 전합니다.

연구실 생활을 시작한 이래로 많은 조언과 도움을 주신 목포대학교의 임한규 교수님과 국립수산물품질관리원 민병화 박사님 그리고 정민환 박사님께도 깊은 감사를 드립니다. 그리고 지금은 떨어져 있지만, 만날 때마다 선후배 간의 정을 느끼게 해주신 노경언 박사님, 김영수 박사님과 김정우, 정종균, 김원진, 박진우 선배님께도 감사를 드리고, 제 연구실 생활의 시작과 끝을 함께하면서 누구보다 많은 시간과 정을 나누고, 많은 도움을 주기도 하신 김기태 선배님께도 진심으로 감사의 말씀을 드립니다. 또, 연구실이라는 인연으로 국적을 떠나 정을 나누는 탄자니아의 Innocent, 인도네시아의 Vitas, 캄보디아의 Veasna에게도 감사의 뜻을 전합니다.

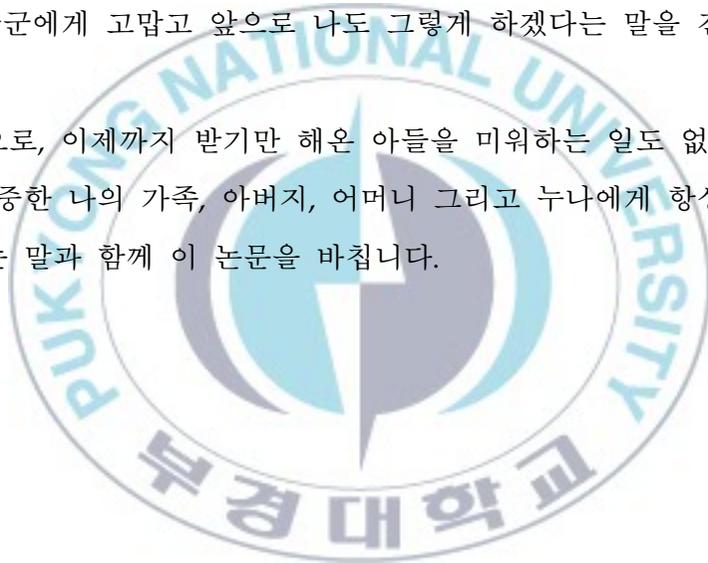
제가 무사히 실험을 마치기까지 큰 도움을 주신 부산 시청의 이국진 선

배님과 부산수산자원연구소의 안신흥 선배님, 지애네 갈미조개 사장님, 국립수산과학원의 도용현 선배님, 양성진 선배님께도 진심으로 감사의 말씀을 드립니다.

비록 다른 연구실에서 생활했지만, 대학원 과정의 고충을 함께 나누고, 때로는 도움을 주기도 한 김민정, 김병수, 김성균, 김초원, 이동욱, 이승한 님에게도 고맙다는 말을 전합니다.

그리고 본인들은 아는지 모르겠지만, 힘이 들 때는 무게를 덜어주고, 기쁠 때는 그 무게를 더해준 친구들인 강대수, 고민균, 고영광, 김대운, 김해용, 조형만군에게 고맙고 앞으로 나도 그렇게 하겠다는 말을 전하고 싶습니다.

마지막으로, 이제까지 받기만 해온 아들을 미워하는 일도 없이 그저 믿어주는 소중한 나의 가족, 아버지, 어머니 그리고 누나에게 항상 감사하고 사랑한다는 말과 함께 이 논문을 바칩니다.



참고문헌

- An, M.I. and Choi, C.Y. 2010. Activity of antioxidant enzymes and physiological responses in ark shell, *Scapharca broughtonii*, exposed to thermal and osmotic stress: Effects on hemolymph and biochemical parameters. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 155, 34~42.
- Bayne, B.L. 1973. The responses of three species of bivalve mollusc to declining oxygen tension at reduced salinity. *Comp. Biochem. Physiol.*, A, 45, 793~806.
- Bayne, B.L. and Thompson, R.J. 1970. Some physiological consequences of keeping *Mytilus edulis* in the laboratory. *Helgoländer wiss. Meeressunters*, 20, 526~552.
- Bachere, E., Hervio, D. and Mialhe, E. 1991. Luminol-dependent chemiluminescence by hemocytes of two marine bivalves, *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. *Dis. Aquat. Org.*, 11, 173~180.
- Berger, V.J. and Kharazova, A.D. 1997. Mechanisms of salinity adaptations in marine molluscs. *Hydrobiol.*, 355, 115~126.
- Bussell, J.A. Gidman, E.A., Causton, D.R., Jones, D.G., Malham, S.K., Jones, M.L.M., Reynolds, B. and Seed, R. 2008. Changes in the immune response and metabolic fingerprint of the mussel, *Mytilus edulis* (Linnaeus) in response to lowered salinity and physical stress. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 358, 78~85.
- Byun, C.H. 2011. Prediction of marine environment changes around the Nakdong river during summer. Master thesis, Korea Maritime Univ., 52 pp.
- Chang, Y.J., Kim, Y.S., Choi, Y.H. and Lee, J.Y. 2001. Survival rates of

- frozen-thawed surf clam *Spisula sachalinensis* larvae in five developmental stages. *Dev. Reprod.*, 5, 35~38.
- Chao, N.H., Chiang, C.P., Hsu, H.W., Tsai, C.T. and Lin, T.T. 1994. Toxicity tolerance of oyster embryos to selected cryoprotectants. *Aquat. Living Res.*, 7, 99~104.
- Chao, N.H. and Liao, I.C. 2001. Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. *Aquaculture*, 197, 161~189.
- Chao, N.H., Lin, T.T., Chen, Y.J., Hsu, H.W. and Liao, I.C. 1997. Cryopreservation of late embryos and early larvae in the oyster and hard clam. *Aquaculture*, 155, 31~44.
- Choi, Y.H. and Chang, Y.J. 2003. The influence of cooling rate, developmental stage and the addition of sugar on the cryopreservation of larvae of the pearl oyster (*Pinctada fucata martensii*). *Cryobiology*, 46, 190~193.
- Choi, Y.H., Jo, P.G., Kim, T.I., Bai, S.C. and Chang, Y.J. 2007. The effects of cryopreservation on fine structures of pearl oyster (*Pinctada fucata martensii*) larvae. *Dev. Reprod.*, 11, 79~84.
- Choi, Y.H., Lee, J.Y. and Chang, Y.J. 2008. The influence of developmental stages and protective additives on cryopreservation of surf clam (*Spisula sachalinensis*) larvae. *J. Environ. Biol.*, 29, 461~463.
- Casillas, E., Sundquist, J. and Ames, W.E. 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.
- De Coen, W.M., Janssen, C.R. and Segner, H. 2001. The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing V. In vivo alterations in the carbohydrate metabolism of *Daphnia magna* exposed to

- sublethal concentrations of mercury and lindane. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 48, 223~234.
- Gustafson, L.L., Stoskopf, M.K., Showers, W., Cope, G., Eads, C., Linnehan, R., Kwak, T.J., Andersen, B. and Levine, J.F. 2005. Reference ranges for hemolymph chemistries from *Elliptio complanata* of North Carolina. *Dis. Aquat. Org.*, 65, 167~176.
- Hawkins, A.J.S and Bayne, B.L. 1991. Nutrition of marine mussels: factors influencing the relative utilizations of protein and energy. *Aquaculture*, 94, 177~196.
- Jo, P.G., Choi, Y.H., Kang, K.H., Kho, K.H., Go, C.S., Kim, B.H., Lim, H.K., Choi, C.Y., Chang, Y.J. 2002. Comparison of cryopreservation effects on D-shaped larvae of arkshell, *Scapharca broughtonii* (Pelecypoda: Acidae) by the kinds of additive and the concentrations of cryoprotectant. *Kor. J. Malacol.*, 18, 77~82.
- Lange, R. 1972. Some recent work on osmotic, ionic and volume regulation in marine animals. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.*, 10, 97~136.
- Lee, J.Y. 1996. Study on the oxygen consumption of surf clam, *Macra veneriformis* Reeve. *J. Kor. Fish. Soc.*, 29, 614~619.
- Leung, K.M.Y, Chu, J.C.W. and Wu, R.S.S. 1999. Effects of body weight water temperature and ration size on ammonia excretion by the areolated grouper (*Epinephelus areolatus*) and mangrove snapper (*Lutjanus argentimaculatus*). *Aquaculture*, 170, 215~227.
- Matozzo, V., Monari, M., Foschi, J., Serrazanetti, G.P., Cattani, O. and Marin, M.G. 2007. Effects of salinity on the clam *Chamelea gallina*. Part I: alterations in immune responses. *Mar. Biol.*, 151, 1051~1058.
- Moon, T.S. and Shin Y.K. 2010. Effect of salinity on survival and metabolism of ark shell, *Tegillarca granosa*. *Kor. J. Malacol.*, 26, 171~177.

- Min, B.H. and Kim, T.J. 2010. Effect of temperature, salinity and density on the egg development of the sunray surf clam, *Macra chinensis*. Kor. J. Malacol., 26, 297~302.
- Paniagua-Chavez, C.G., Buchanan, J.T. and Tiersch, T.R. 1998. Settlement and growth of eastern oysters produced from cryopreserved larvae. Cryo-letters, 19, 283~292.
- Paredes, E., Adams, S.L., Tervit, H.R., Smith, J.F., McGowan, L.T., Gale, S.L., Morrish, J.R. and Watts, E. 2012. Cryopreservation of Greenshell™ mussel (*Perna canaliculus*) trochophore larvae. Cryobiology, 65, 256~262.
- Pipe, R.K. and Coles, J.A. 1995. Environmental contaminants influencing immune function in marine bivalve molluscs. Fish Shellfish Immunol., 5, 581~595.
- Polge, C., Smith, A.U. and Parkes, A.S. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. Nature, 164, 666~676.
- Reid, H.I., Soudant, P., Lambert, C., Paillard, C. and Birkbeck, T.H. 2003. Salinity effects on immune parameters of *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. Dis. Aquat. Org., 56, 249~258.
- Ryu, D.K. and Kim, Y.H. 2001. Management of the hen clam, *Macra chinensis* Philippi, on the coast of Kunsan. I. Age and growth. Kor. J. Malacol., 17, 13~18.
- Saucedo, P.E., Ocampo, L., Monteforte, M. and Bervera, H. 2004. Effect of temperature on oxygen consumption and ammonia excretion in the Calafia mother-of-pearl oyster, *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856). Aquaculture, 229, 377~387.
- Shin, Y.K., Hur, Y.B., Myung, J.I. and Lee, S. 2008. Effect of temperature

- and body size on oxygen consumption and ammonia excretion of oyster, *Crassostrea gigas*. Kor. J. Malacol., 24, 261~267.
- Shin, Y.K., Kim, Y., Chung, E.Y. and Hur, S.B. 2000. Temperature and salinity tolerance of the manila clam, *Ruditapes philippinarum*. J. Kor. Fish. Soc., 33, 213~218.
- Shin, Y.K., Lee, W.C., Kim, S.Y., Jun, J.C. and Kim, E.O. 2011. Variation in physiological energetics of blood cockle *Scapharca subcrenata* (Bivalvia: Arcidae) from Yeosu bay, South coast of Korea. Kor. J. Malacol., 27, 205~211.
- Shin Y.K. and Wi, J.H. 2004. Effects of temperature and salinity on survival and metabolism of the hard shelled mussel *Mytilus coruscus*, Bivalve: Mytilidae. J. Aquacult., 17, 103~108.
- Shumway, S.E. 1977. Effect of salinity fluctuation on the osmotic pressure and Na⁺, Ca²⁺ and Mg²⁺ ion concentrations in the hemolymph of bivalve molluscs. Mar. Biol., 41, 153~177.
- Solorzano, L. 1969. Determination of ammonia natural waters by the phenolhypochlorite method. Limnology Oceanography, 14, 799~801.
- Tervit, H.R., Adams, S.L., Roberts, R.D., McGowan, L.T., Pugh, P.A., Smith, J.F. and Janke, A.R. 2005. Successful cryopreservation of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) oocytes. Cryobiology, 51, 142~151.
- Vieira, L.R., Sousa, A., Frasco, M.F., Lima, I., Morgado, F. and Guilhermino, L. 2008. Acute effects of Benzo[a]pyrene, anthracene and a fuel oil on biomarkers of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae). Sci. Total Environ., 395, 87~100.
- Wang, H., Li, X., Wang, M., Clarke, S., Gluis, M. and Zhang, Z. 2011. Effects of larval cryopreservation on subsequent development of

- the blue mussels, *Mytilus galloprovincialis* Lamarck. *Aquacult. Res.*, 42, 1816~1823.
- Wi, J.H. and Chang, Y.J. 1976. A basic study on transport of live fish (I). *Bull. Fish. Res. Dev. Agency*, 15, 91~108.
- Widdows, J. and Johnson, D. 1988. Physiological energetics of *Mytilus edulis*: Scope for growth. *Mar. Ecol. Progr. Series*, 46, 113~121.
- Woods, E.J., Benson, J.D., Agca, Y. and Critser, J.K. 2004. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology*, 48, 146~156.
- Yoon, H.S., Park, S., Lee, I.C. and Kim, H.T. 2008. Spatiotemporal variations of seawater quality due to the inflow of discharge from Nakdong river barrage. *J. Kor. Soc. Mar. Environ. Engin.*, 11, 78~85.
- Yoon, T.K., Chung, H.M., Lim, J.M. and Cha, K.Y. 1999. Cryopreservation of human embryos. *Kor. J. Obstet. Gynecol.*, 42, 2648~2656.
- Yu, J.H. 2011. Characterization of haemocytes and the effects of various environmental stresses on immune function in the surf clam, *Macra veneriformis* (Bivalvia: Mactridae). Doctor Thesis, Kunsan Nat. Univ., 76 pp.
- 국립수산과학원. 2008. 패류 인공종묘 생산기술 가이드. 153 pp.
- 유성규. 2003. 천해양식. 구덕출판사, 639 pp.
- 이정용. 2003. 동해안 패류양식의 현황과 전망. *한국양식학회*, 15(2), 39~45.
- 정의영, 김진희, 류동기, 박갑만, 박관하, 박성우, 소재귀, 신윤경, 이정식, 이정열, 이창훈, 최진우, 허영백. 2008. 연체동물 이매패류의 생리생태. *바이오사이언스*, 386 pp.
- 통계청. 1970~2012. 어업생산동향조사.
- 한국수정란이식학회. 1995. 소 수정란 이식. 290 pp.