



저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 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](#)

이 학 석 사 학 위 논 문

바이오플락수 (Biofloc water)와 질화세균 및
이스라엘잉어, *Cyprinus carpio nudus*의
면역 반응



2014년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 명 의 학 과

김 남 은

이 학 석 사 학 위 논 문

바이오플락수 (Biofloc water)와 질화세균 및
이스라엘잉어, *Cyprinus carpio nudus*의
면역 반응

지도교수 박 수 일

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함.

2014년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 명 의 학 과

김 남 은

김남은의 이학석사 학위논문을 인준함.

2014년 2월



주	심	약학박사	정 준 기 (인)
위	원	이학박사	김 도 형 (인)
위	원	농학박사	박 수 일 (인)

목 차

목차	i
Abstract	iii
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	3
1. 바이오플락수 (Biofloc water)	3
2. 종속영양 질화세균의 분리 및 동정	3
2.1. 종속영양 질화세균의 분리	3
2.2. 종속영양 질화세균의 아질산 환원능 측정	3
2.3. 종속영양 질화세균의 염기서열 분석	4
2.3.1. 세균의 genomic DNA의 분리	4
2.3.2. Primer의 설계	4
2.3.3. PCR과 PCR products 추출	4
2.3.4. DNA sequencing	4
2.3.5. 염기서열의 비교 분석	4
3. 시험어	5
4. 성장에 미치는 영향 조사	5
5. 수질 분석	5
6. 사육수 내 세균수 변화 조사	6
7. Hematocrit	6
8. 혈청 생화학 성분 분석	6
9. 바이오플락수 내 사육에 따른 시험어의 면역반응 조사	6
10. 혈청, 장 점액, 체표 점액의 분리와 보존	6
11. 시험어의 혈청 lysozyme 활성 조사	7
12. 시험어의 장 점액 lysozyme 활성 조사	7
13. 시험어의 체표 점액 lysozyme 활성 조사	7
14. 시험어의 신장 대식세포 Nitroblue tetrazolium (NBT) 환원 시험	8
14.1. 어류 식세포의 분리	8
14.2. NBT 환원 시험용 자극물의 조제	8
14.3. NBT 환원 시험	8

15. 혈청 내 MPO 활성	9
16. 통계학적 분석	9
III. 결과	10
1. 종속영양 질화세균의 분리	10
2. 성장에 미치는 영향 조사	11
2.1. 평균 전장 조사	11
2.2. 평균 체중 조사	12
3. 수질 분석	13
4. 사육수 내 세균수 변화	16
5. Hematocrit	17
6. 혈청 생화학 성분 분석	18
6.1. AST	18
6.2. ALT	19
7. 혈청 lysozyme 활성	20
8. 체표 점액 lysozyme 활성	21
9. 장 점액 lysozyme 활성	22
10. 신장 대식세포 NBT 환원능	23
11. 혈청 내 MPO 활성	24
IV. 고찰	25
V. 요약	30
VI. 감사의 글	31
VII. 참고 문헌	34

Nitrifying bacteria and immune response of Israel carp, *Cyprinus carpio nudus*, from Biofloc water

Nameun Kim

Department of Aquatic Life Medicine, The Graduate School,
Pukyong National University

Abstract

Biofloc technology in recent time has obtained values in aquaculture management, both in water quality and feeding. Moreover, biofloc technology has potential to control pathogenic bacteria and improve immune response of cultured fish. This study was conducted to identify of heterotrophic nitrifying bacteria in biofloc water, and to investigate the effect of biofloc water on the non-specific immune response and physiological change of Israel carp, *Cyprinus carpio nudus*.

The experiment was performed for 28 days. Heterotrophic nitrifying bacteria were isolated from biofloc water, and three species were identified by 16s rRNA sequence analysis; *Acinetobacter bouvetii*, *Acinetobacter tjernbergiae* and *Lactococcus lactis*. In tested groups, the values of ammonia-nitrogen were maintained stable until day 7. Total culturable bacteria count also had showed steady until day 7, and then the bacteria count increased continuously until day 28. The values of average body weight and length gain of tested fish were increased compared with those of control groups. The effect of biofloc water on the physiological parameters of tested fish showed no significant differences with the control group in the hematocrit, AST and ALT. But, gut mucus lysozyme activity and NBT reduction ability were significantly higher than control group on day 7.

I. 서론

우리 나라의 이스라엘잉어 양식은 1973년에 이스라엘에서 처음 도입되어 양식하기 시작하였다. 이스라엘잉어는 동양계 잉어보다 성장이 빠르고 육질이 단단하며 비린내와 같은 역한 냄새가 나지 않아 소비자들이 선호하였다. 이후 1980년대부터 이스라엘잉어의 양식이 성행하였다. 최근에는 낚시터 등에서 이스라엘잉어의 수요가 늘었으나, 1998년부터 가두리가 철거되어 이스라엘잉어 양식에 어려움을 겪고 있다. 이러한 수요에 대한 공급을 충족하기 위하여 이스라엘잉어를 전량 중국에서 수입하고 있다. 그 수입량은 2011년 1,893톤, 2012년 1,744톤, 2013년 2,214톤에 달하며, 그에 반해 국내 이스라엘잉어 양식은 2011년 1,434톤, 2012년 1,737톤으로 국내 양식 생산량이 계속해서 증가하고 있으나, 중국에서 수입되는 이스라엘잉어의 수입량에 달하지 못한다. 하지만 2013년 해수부가 실시한 ‘중국 수산물 생산·가공시설 현지 위생점검 결과’에 따르면 최근 5년간 중국의 수출 업체 10곳 중 8곳이 위생기준 위반을 하였으며, 계속해서 중국 수입 수산물에서 유해물질이 검출되는 등, 중국 수입 수산물에 대한 식품 안전에 대한 위험 부담이 있다. 그러므로 국내 양식 생산량의 증가와 안정이 시급하다.

최근에는 환경에 손상을 입히지 않고, 작은 면적에서 고밀도 사육이 가능한 친환경적인 새로운 양식 방법이 대두되었는데, 그것이 바이오플락 기술 (Biofloc technology)이다. 바이오플락 기술은 기존의 순환여과방식 (recirculating aquaculture system, RAS)과는 다르게, 별도의 여과조가 존재하지 않는다. 바이오플락 기술에서 중요한 것은 어류에게 독성을 일으키는 무기 질소원을 제거하기 위해, 사육수조 내의 탄소/질소 비율 (Carbon/Nitrogen ratio, CN ratio)을 조절하는 것이다. 탄소와 질소가 액체 안에서 균형을 잘 이루면, 암모니아와 기타 질소원들이 세균의 생물량으로 전환된다 (Schneider *et al.*, 2005). 양식 못에 탄수화물을 추가함으로써, 종속영양 세균들의 성장이 촉진되고, 질소가 미생물의 단백질로 흡수된다 (Avnimelech, 1999). 이러한 원리로 양식 못의 유해한 질소성 물질을 제거하여, 사육수조 내에서 사육수 비교환 혹은 제한적 교환 방식으로 사육이 가능하며 또한 고밀도로 사육이 가능하다.

이러한 바이오플락 내에는 다양한 질화세균군 및 종속영양세균이 존재하며, 이

세균들이 탄소원을 에너지로 하여 사육수의 질소화합물을 제거한다. Zhao *et al.* (2012)는 sucrose를 탄소원으로 사용한 Biofloc에서 denaturing gradient gel electrophoresis를 이용하여 바이오플락 내에 존재하는 세균의 군집을 확인한 결과 *Bacillus subtilis*, *Actinobacterium*, *Roseobacter* sp.와 같은 종속영양세균이 분리되었다고 보고하였다. 또한 장 (2011)은 새우 양식 biofloc에서 세균의 군집을 확인한 결과, *Microbacterium* spp., *Cyclobacterium linum*, *Vibrio* spp. 등 여러 종속영양세균을 분리하였다고 한다. 이와 같이 바이오플락 내에는 다양한 종속영양세균이 존재하므로, 독립영양 질화세균에 의한 질소화합물의 제거뿐만 아니라 종속영양세균 또한 매우 큰 영향을 줄 것으로 생각된다.

바이오플락은 사육수 내에 미생물 플락 (Microbial floc)을 형성한다. 플락은 조류, 세균, 원생동물, 먹지 않은 먹이와 배설물 같은 유기 물질의 혼합체이다 (Hargreaves, 2013). 이러한 플락은 어류와 새우를 위한 먹이원으로 사용된다. 여러 연구자들은 다양한 어종에서 바이오플락의 먹이로서 가치를 평가하였는데, *Litopenaeus vannamei* (Burford *et al.*, 2004), *Macrobrachium rosenbergii* postlarvae (Crab *et al.*, 2010b), Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Azim *et al.*, 2008) 등에서 확인하였다. Schryver (2008)는 Nile tilapia 양식장에 바이오플락 기술을 적용하여 사료비를 절감 하였을 때 약 10%의 이익을 더 얻을 수 있다고 제시하였다.

본 연구에서는 바이오플락수 내 종속영양세균을 분리하여 분리 세균의 아질산 환원능의 확인을 통해 종속영양 질화 세균을 분리 동정하고, 나아가 바이오플락수에 이스라엘잉어를 사육 시 성장, 생리학적 변화, 비특이적 면역 반응에 미치는 영향을 분석함으로써 바이오플락 수를 이용한 이스라엘잉어의 양식 가능성을 알아보고, 바이오플락수 내 질소 화합물 분해에 관여하는 세균에 관한 자료를 얻고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 바이오플락수 (Biofloc water)

본 실험에서 사용한 바이오플락 사육수는 충남 서천군에 위치한 아쿠아프라임 양식장에서 제공받았다. 제공받은 바이오플락은 메기를 사용하여 만들었으며, 바이오플락 시험원수의 수질 측정 결과를 Table 1에 정리하였다.

Table 1. The values of biofloc water qualities

Parameters	Values
NH ₃ -N	0 mg/L
NO ₂ -N	0 mg/L
NO ₃ -N	44.3 mg/L
pH	6.24
Temperature	25℃
Dissolved oxygen	9.31 mg/L
Salinity	0‰

2. 종속영양 질화세균의 분리 및 동정

2.1. 종속영양 질화세균의 분리

바이오플락 시험구의 양식수를 0.5% agar를 첨가한 Nutrient agar (NA, Difco)에 도말하여 27℃에서 24~48시간 동안 배양하였다. 배양 배지에 자란 콜로니들을 형태에 따라 구분하여 분리하였다. 분리된 세균을 동일한 배양 배지에 계대 배양하여 유지하였다.

2.2. 종속영양 질화세균의 아질산 환원능 측정

분리된 세균을 KNO₂ 첨가 액체 배지에 접종하여 27℃에서 150rpm으로 24~48시간 동안 진탕 배양하였다. 이후, 수질분석 kit [㈜ Humas]를 사용하여 배지 내 아질산의 감소량을 측정하였다.

2.3. 종속영양 질화세균의 염기서열 분석

2.3.1. 세균의 genomic DNA의 분리

분리 세균의 동정을 위하여 염기서열을 분석하였다. 분리균을 각각 5ml의 Nutrient broth에 접종하고 27℃에서 150rpm으로 24시간 진탕 배양하였다. 그 후 6,000rpm에서 5분간 원심 분리하여 상정액을 제거한 다음 High pure PCR product preparation kit (Roche)를 사용하여 genomic DNA를 분리하였다.

2.3.2. Primer의 설계

본 실험에서는 기 보고된 universal bacterial primer를 사용하였다. 사용된 primer의 염기 배열과 증폭 산물의 크기를 Table 2에 나타내었다.

2.3.3. PCR과 PCR products 추출

PCR은 PCR PreMix (Bioneer)를 사용하였고, Thermal cycler (Perkin-Elmer)로 수행하였으며 조건은 Table 3에 나타내었다. 1% agarose gel에 0.01% Etidium Bromide (EtBr: 1mg/ml)을 혼합하고 60V에서 30분간 전기 영동한 후 UV transilluminator 상에서 확인하고 PCR 산물에 해당하는 부분을 칼로 절취하여 gel의 무게를 측정하였다. 그 절취된 gel을 Gene all Gel SV를 이용하여 PCR products를 정제하였다.

2.3.4. DNA sequencing

분리된 PCR products는 (주)제노텍에 DNA sequencing을 의뢰하여 16s rRNA의 염기서열을 분석하였다.

2.3.5. 염기서열의 비교 분석

해독한 염기 서열은 Genetyx program을 사용하여 조합하였으며, Nation Center for Biotechnology Information (NCBI)에서 제공되는 BLAST program으로 이미 밝혀져 있는 균주들의 16S rRNA와 비교 분석하였다.

Table 2. PCR primers used to amplify 16S rRNA

	Orient	Sequence (5' to 3')
Primer	27F	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG
	1492R	TACG GYT ACC TTG TTA CGA CTT

Table 3. Condition of reaction step and PCR cycle

	Temperature (°C)	Reaction Time	Cycle (s)
Pre-denaturation	94	5 min	1
Denaturation	94	30 sec	
Annealing	55	30 sec	30
Extension	72	90 sec	
Post-extension	72	7 min	1

3. 시험어

경상남도 밀양 소재의 경상남도 수산자원연구소 민물고기연구센터에서 분양받은 평균 어체중 $60.2 \pm 12.17\text{g}$, 평균 전장 $16.29 \pm 1.22\text{cm}$ 의 이스라엘잉어 (*Cyprinus carpio nudus*)를 5일 간 순치시킨 후 실험에 사용하였다. 실험 기간 동안의 사육 수온은 $22.7 \pm 1.54^\circ\text{C}$, 용존 산소는 $9.6 \pm 0.51\text{mg/L}$ 이었다.

실험은 환수 대조구, 무환수 대조구 및 바이오플락수 시험구로 나누었다. 각 시험구는 250L의 원형 수조에 100L의 사육수를 채우고, 20마리씩 시험어를 넣었다. 대조구는 3일에 1번 사육수의 30%를 환수하였고, 무환수 대조구와 시험구는 환수하지 않았다. 실험 기간 동안 사료를 어체중 당 3%를 투여하였다.

4. 성장에 미치는 영향 조사

바이오플락수가 성장에 미치는 영향을 조사하기 위하여 실험 기간 동안 대조구와 시험구의 평균 전장 (cm)과 체중 (g)을 측정하였다.

5. 수질 분석

실험 기간 동안, 암모니아-질소 ($\text{NH}_3\text{-N}$), 아질산-질소 ($\text{NO}_2\text{-N}$), 질산-질소

(NO₃-N)의 변화를 관찰하기 위해 수질 분석을 실시하였다. 수질 측정은 수질 분석 kit [(주) Humas]를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 수행하였다.

6. 사육수 내 세균수 변화 조사

실험 기간 동안 대조구와 시험구의 세균수 변화를 관찰하기 위하여 NA 평판 배지에 대조구와 시험구 사육수를 도말하여 27℃, 48시간 동안 배양하였다. 이후 colony를 계수하여 사육수 내 세균수를 조사하였다.

7. Hematocrit

각 시험구별 시험어의 미부 정맥으로부터 혈액을 1ml 일회용 주사기 (26G × 1/2, 정립)로 채혈한 후, heparinized capillary tube (Sigma)에 혈액을 채운 다음, 12,000×g, 5 분간 원심 분리하여 hematocrit치를 측정하였다. 시험어의 hematocrit 수치는 전체 혈액량에 대한 적혈구 용적을 percentage (%)로 환산하였다.

8. 혈청 생화학 성분 분석

바이오플라크수 내의 사육이 시험어의 생리 기능에 미치는 영향을 조사하기 위해 혈청 성분을 분석하였다. 조사 항목은 Aspartate aminotransferase (AST)량과 Alanine aminotransferase (ALT)량으로서 Reitman-Frankel 법으로 측정하였으며 모두 시판되는 kit (Asan Pharm Co., Ltd)를 이용하였다.

9. 바이오플라크수 내 사육에 따른 시험어의 면역반응 조사

바이오플라크수 시험구에 사육하면서 1일, 3일, 7일, 14일, 28일 쯤마다 여러 가지 지표에 관한 분석 시험을 실시하였다. 시험은 혈청, 장 점액, 체표 점액 lysozyme, 두신 macrophage의 NBT 환원능, 혈청 MPO 활성을 조사하였다.

10. 혈청, 장 점액, 체표 점액의 분리와 보존

실험에 사용한 혈청은 시험어를 MS-222로 5분간 마취시킨 후 1ml 일회용 주사기 (26G × 1/2, 정립)로 미부 정맥에서 채혈하여 분리하였다. 채취한 혈액은 1시간 실온에 방치한 다음 4℃에서 2시간 두어 혈병을 수축시킨 후 4℃,

6,000rpm에서 10분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였다.

장 점액의 경우 장을 무균적으로 절취해 petridish에 놓고 0.1M PBS (pH 7.2)로 세척하여 장 안의 내용물을 제거하고 장 점액을 해부용 칼등으로 긁어서 모았다. 모은 장 점액에 4배 양의 0.1M PBS (pH 7.2)를 넣고 마쇄한 후 4℃에서 10,000×g로 20분 동안 원심 분리한 다음 상정액을 사용하였다.

체표 점액은 paper towel로 시험어의 체표 수분을 제거하고 나서 slide glass로 시험어의 체표 점액을 긁어 채취한 후, 시료 5배 양의 0.005M PBS (pH 7.4)를 넣고 마쇄하였다. 이를 12,000×g, 20분 동안 4℃에서 원심 분리하여 상정액을 사용하였다.

위의 방법으로 분리된 혈청, 장 점액, 체표 점액은 -70℃에서 보관하면서 여러 가지 실험에 사용하였다.

11. 시험어의 혈청 lysozyme 활성 조사

혈청 내의 lysozyme 활성 측정은 Lange *et al.* (2001)의 방법을 이용하였다. 96 well plate (Costar)의 각 well에 100 μ l의 PBS (pH 6.2)를 첨가하고 동량의 혈청을 첨가하여 2배로 4단계 희석하였다. *Micrococcus lysodeikticus* 균액은 PBS (pH 6.0)를 이용하여 0.4mg/ml의 농도로 제조하였다. 이 균액 100 μ l를 혈청이 희석된 각 well에 첨가하고, 20℃에서 배양하며 30초 후에 측정하고 5분 간격으로 30분까지 540nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조구로서 hen egg lysozyme (Sigma)을, 음성 대조구로서 PBS (pH 6.2)를 사용하였으며, lysozyme 활성은 1분당 흡광도 0.001을 감소시키는 값을 1unit로 정의하고 ml당 activity로 환산하였다.

12. 시험어의 장 점액 lysozyme 활성 조사

장 점액 내의 lysozyme 활성 측정은 Kim *et al.* (2006)의 방법을 변용하여 측정하였으며 혈청 lysozyme 측정과 동일한 방법을 사용하였다.

13. 시험어의 체표 점액 lysozyme 활성 조사

체표 점액 내의 lysozyme 활성 측정은 Takahashi *et al.* (1986)의 방법을 변용하여 측정하였으며 혈청 lysozyme 측정과 동일한 방법을 사용하였다.

14. 시험어의 신장 대식세포 Nitroblue tetrazolium (NBT) 환원 시험

14.1. 어류 식세포의 분리

시험어의 미부 정맥에서 채혈하여 가능한 한 순환 혈액을 제거한 뒤 복강을 해부하여 두신을 무균적으로 분리하였다. 이것을 2% penicillin/streptomycin과 1% heparin이 함유된 L-15 medium을 소량 분주한 petridish에서 nylon mesh에 통과시킨 세포 현탁액을 준비하였다. 이 세포 현탁액을 34%, 54% percoll 용액을 중층시켜 놓은 시험관에 조심스럽게 중층시킨 후 4℃, 600×g에서 30분간 원심 분리하여 백혈구를 분리하였다. 분리된 백혈구는 2% fetal bovine serum (FBS)가 함유된 L-15 medium으로 3회 세척한 다음 0.1% FBS가 함유된 L-15 medium에 세포를 재현탁하여 0.1% trypan blue에서 viability를 관찰한 후 1×10^6 cells/ml의 농도로 조정하였다. 조정된 세포액을 96-well cell culture plate에 각각 100ul씩 분주한 다음 20℃에서 2시간 부착시킨 후 비부착 세포를 제거하여 시험용 식세포를 준비하였다.

14.2. NBT 환원 시험용 자극물의 조제

Zymosan (Sigma Chemical Co.) 0.02g에 FBS 1ml를 첨가하여 20℃에서, 30분간 반응시켰다. 반응시킨 zymosan을 3,000rpm에서 10분간 원심 분리하여 상정액을 제거하였다. 옅소닌화된 zymosan을 L-15 medium으로 세척한 후 상정액을 버리고 NBT 1mg/ml L-15 medium로 조정된 NBT 용액을 넣어 총 10ml가 되게 하였다.

14.3. NBT 환원 시험

식세포가 부착된 96-well tissue culture plate에 옅소닌화된 zymosan이 첨가된 NBT 용액을 100ul씩 첨가하여 25℃, 30분 동안 반응시켰다. 반응 후 상정액을 버리고 5% FBS가 첨가된 L-15 medium으로 세척한 다음 100% methanol로 10분간 고정시켰다. 고정된 세포를 70% methanol로 2회 세척한 후 건조시켰다. 각 well에 2M KOH 용액 120ul와 dimethyl sulfoxide (DMSO) 용

액 140ul를 첨가한 후 630nm에서 흡광도를 측정하였다. Blank는 zymosan이 첨가되지 않은 NBT 용액으로 처리한 식세포의 값을 사용하였다.

15. 혈청 내 MPO 활성

혈청 내 MPO 활성은 Quade and Roth (1997)의 방법을 이용하여 분석하였다. HBSS 용액을 96-well plates에 80ul씩 분주한 다음 혈청 20ul를 넣은 후 50ul 20mM 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine hydrochloride (TMB) 용액과 50ul 5mM H_2O_2 용액을 넣고, 2분간 반응시킨 후 4M H_2SO_4 용액을 35ul 첨가하여 microplate reader로 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

16. 통계학적 분석

시험구와 대조구 사이의 통계학적 유의성은 Student's *t*-test를 실시하였고, *p*-value가 0.05 미만일 때 유의성이 있는 것으로 간주하였다.



Ⅲ. 결과

1. 종속영양 질화세균의 분리

바이오플락수 시료의 종속영양 질화세균을 확인하기 위하여 세균을 분리하였다. Colony의 형태를 기준으로 선별한 균주를 대상으로 아질산 환원능을 측정하였으며, 16s rRNA로 염기서열 분석한 결과 *Acinetobacter bouvetii*, *Acinetobacter tjernbergiae* 및 *Lactococcus lactis* 로 동정되었다.

Table 4. Identification of isolated heterotrophic nitrifying bacteria from biofloc water sample

Heterotrophic nitrifying bacteria	
No.	Isolates
1	<i>Acinetobacter bouvetii</i>
2	<i>Acinetobacter tjernbergiae</i>
3	<i>Lactococcus lactis</i>

2. 성장에 미치는 영향 조사

2.1. 평균 전장 조사

28일의 시험 기간 동안 바이오플락수가 성장에 미치는 영향을 조사하기 위하여 대조구와 시험구의 시험어 평균 전장 (cm)을 측정한 결과를 Fig. 1에 나타내었다.

전장을 조사한 결과, 시험구에서 대조구보다 더 높은 전장 증가를 보였으나 시험구와 대조구 사이에 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

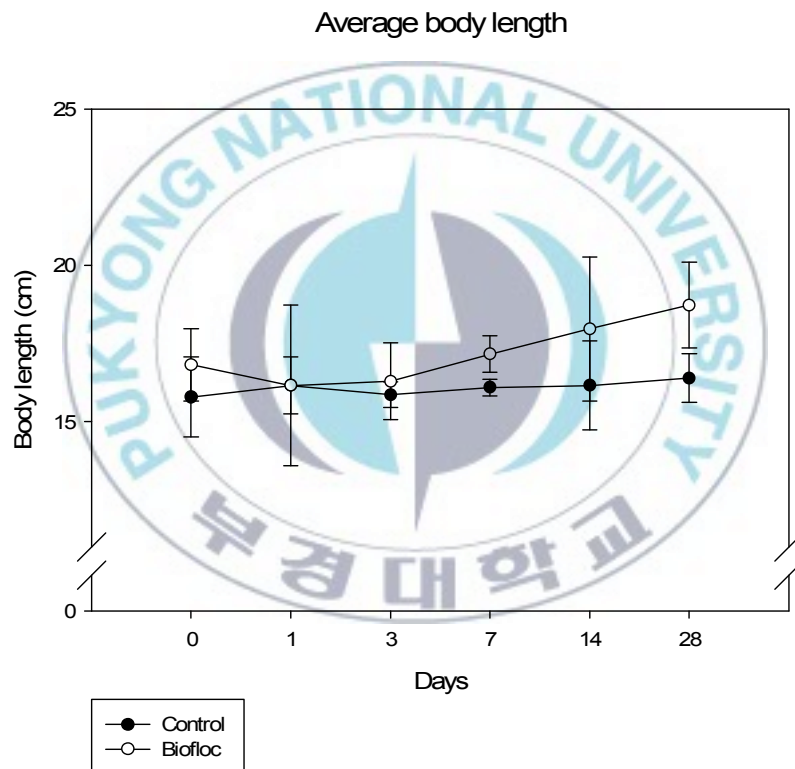


Fig. 1. Change of the average body length in Israel carp, *Cyprinus carpio nudus*, in the control and tested biofloc water.

2.2. 평균 체중 조사

28일의 시험 기간 동안 바이오플락수가 성장에 미치는 영향을 조사하기 위하여 대조구와 바이오플락수 시험구 시험어의 평균 체중 (g) 측정 결과를 Fig. 2에 나타내었다.

체중을 조사한 결과, 시험구에서 대조구보다 더 높은 체중 증가를 보였다. 하지만 시험구와 대조구 사이에 유의적인 차이는 나타내지 않았다.

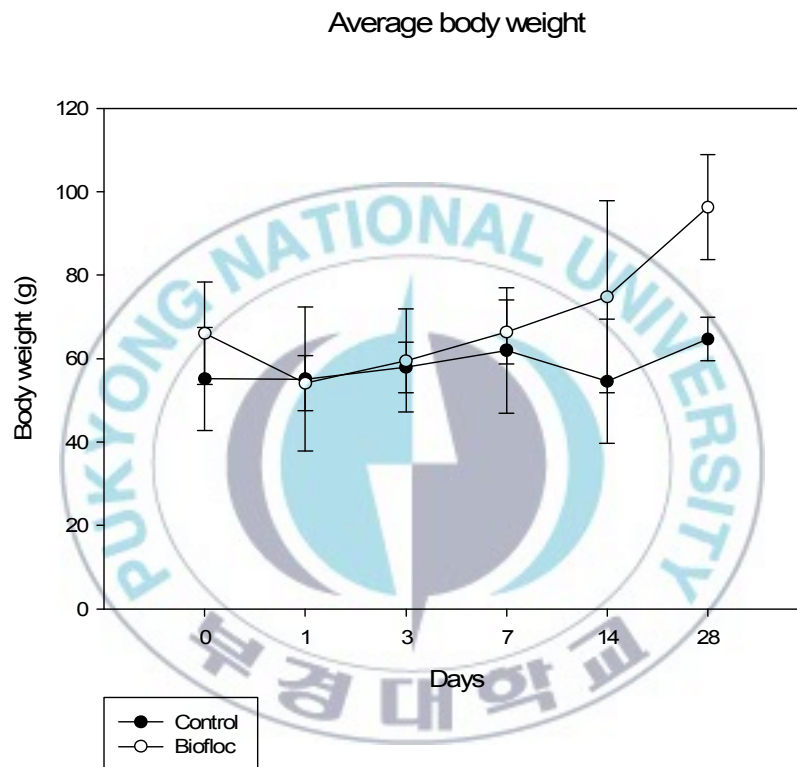


Fig. 2. Change of the average body weight in Israel carp, *Cyprinus carpio nudus*, in the control and tested biofloc water.

3. 수질 분석

시험 기간 동안 대조구와 바이오플락수 시험구에서 측정한 암모니아-질소, 아질산-질소, 질산-질소의 결과를 Fig. 3~5에 나타내었다.

수질 분석에서는 환수 대조구, 무환수 대조구 및 바이오플락수 시험구를 비교하였다. 무환수 대조구에서 측정한 암모니아-질소는 3일 안에 26.7 mg/L에 달하며, 7일 째 54.8 mg/L에 달하였다. 또한 아질산-질소와 질산-질소의 측정 결과 3일 째 낮은 값을 유지 하였으나, 7일 째 높은 값을 나타냈다.

암모니아-질소 ($\text{NH}_3\text{-N}$)는 바이오플락수 시험구에서 7일 이후 계속해서 증가하는 추세를 보이며, 28일째 94.1 mg/L를 나타내었다. 대조구에서는 3일에 가장 높은 값 (26.7 mg/L)을 나타낸 후 감소하는 추세를 보였으며, 7일 이후 시험구보다 낮은 수치를 유지하였다 (Fig. 3).

아질산-질소 ($\text{NO}_2\text{-N}$)는 시험구에서는 시험 기간 동안 계속 낮은 값을 유지하였다 (0.02 ~ 0.267 mg/L). 대조구에서는 21일에 가장 높은 값 (24.6mg/L)을 나타낸 후 28일 째 감소하였다 (Fig. 4).

질산-질소 ($\text{NO}_3\text{-N}$)는 시험구에서 시험 기간 동안 계속해서 증가하였다 (49.578 ~ 205.891 mg/L). 대조구에서는 21일에 가장 높은 값 (216.4 mg/L)를 나타낸 후 28일 째 감소하였다 (Fig. 5).

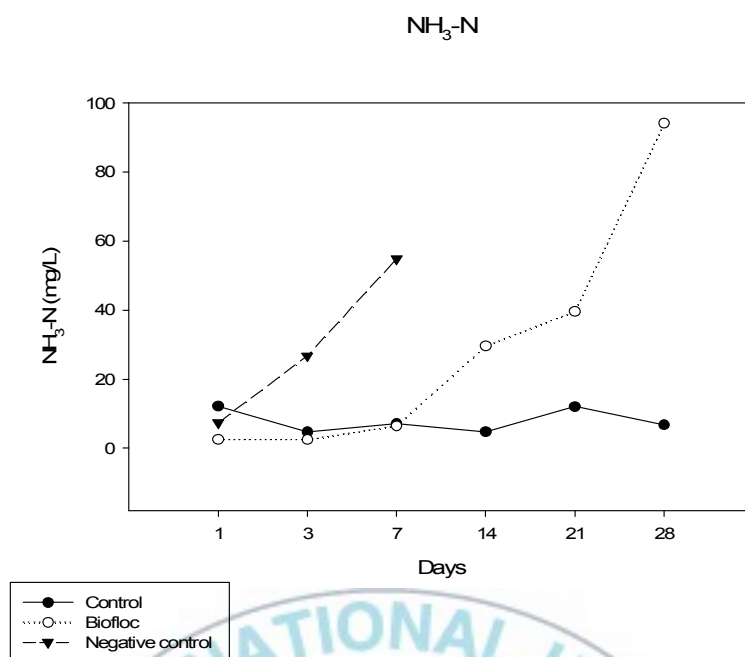


Fig. 3. The concentration of ammonia-nitrogen during experimental period in the control and tested biofloc water.

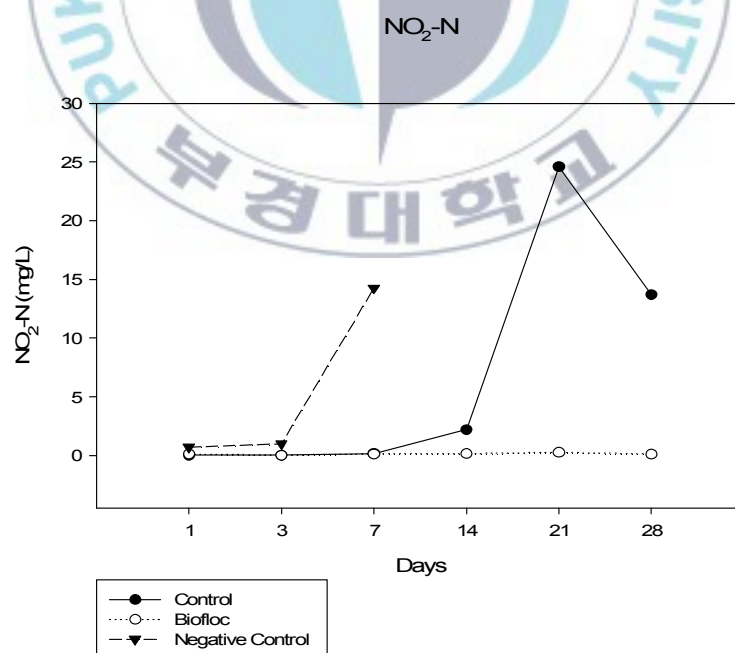


Fig. 4. The concentration of nitrite-nitrogen during experimental period in the control and tested biofloc water.

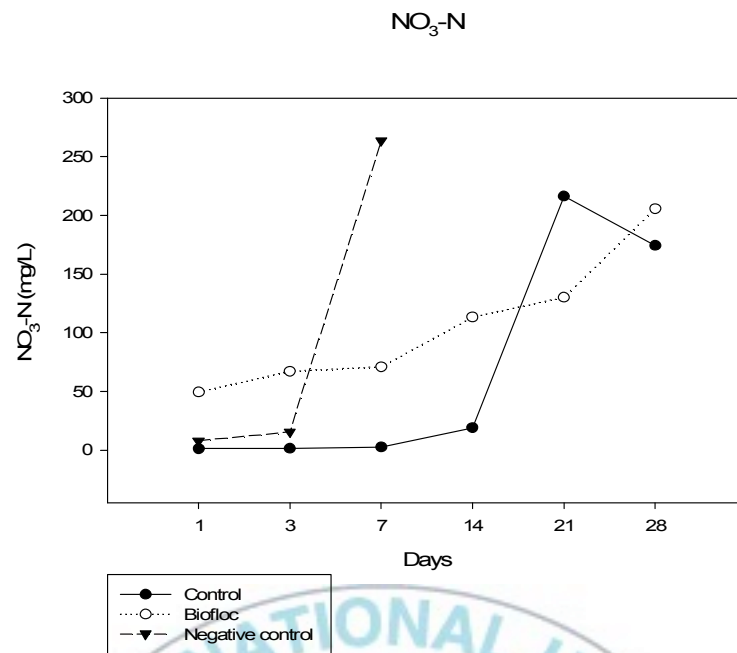


Fig. 5. The concentration of nitrate-nitrogen during experimental period in the control and tested biofloc water.

4. 사육수 내 세균수 변화

시험 기간 동안 대조구와 바이오플락수 시험구의 사육수 내 세균수 변화를 알아보고자 평판배지에 도말하여 조사한 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 7일 이후 바이오플락수 시험구에서 세균수가 급증하였으나 대조구에서는 낮은 세균수 상태를 유지하였다.

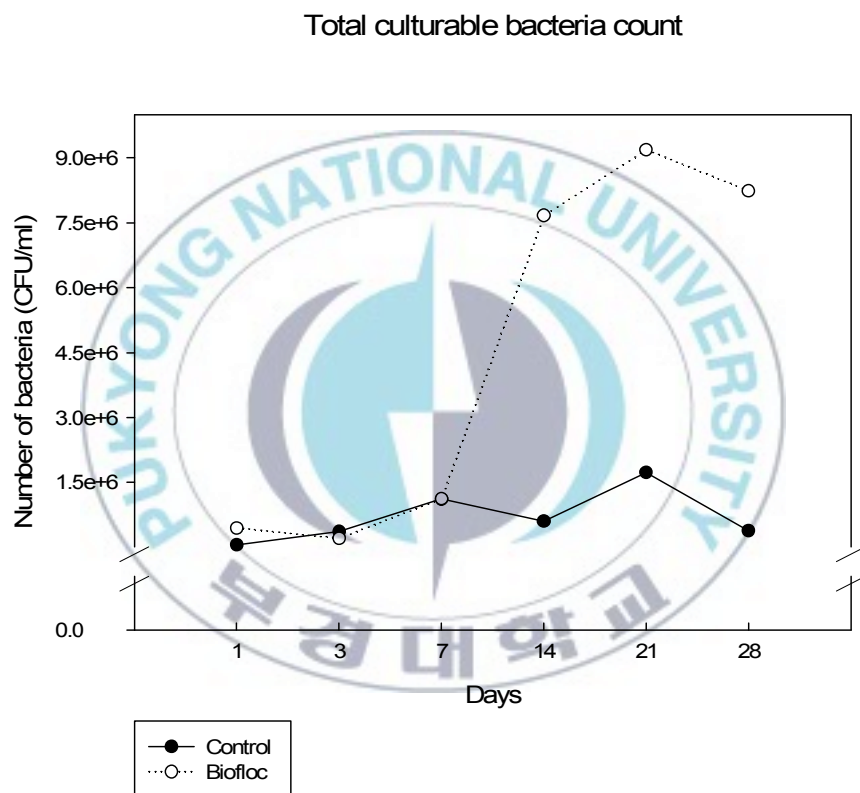


Fig. 6. The number of total culturable bacteria in the control and tested biofloc water.

5. Hematocrit

시험 기간 동안 대조구와 바이오플락수 시험구에 사육한 시험어의 hematocrit 치를 조사한 결과는 Fig. 7과 같다. 시험 기간 동안 대조구와 시험구 모두에서 시험 시작 1일째와 비교하여 모두 증가하였다. 대조구와 시험구 사이의 유의적인 차이는 없었다.

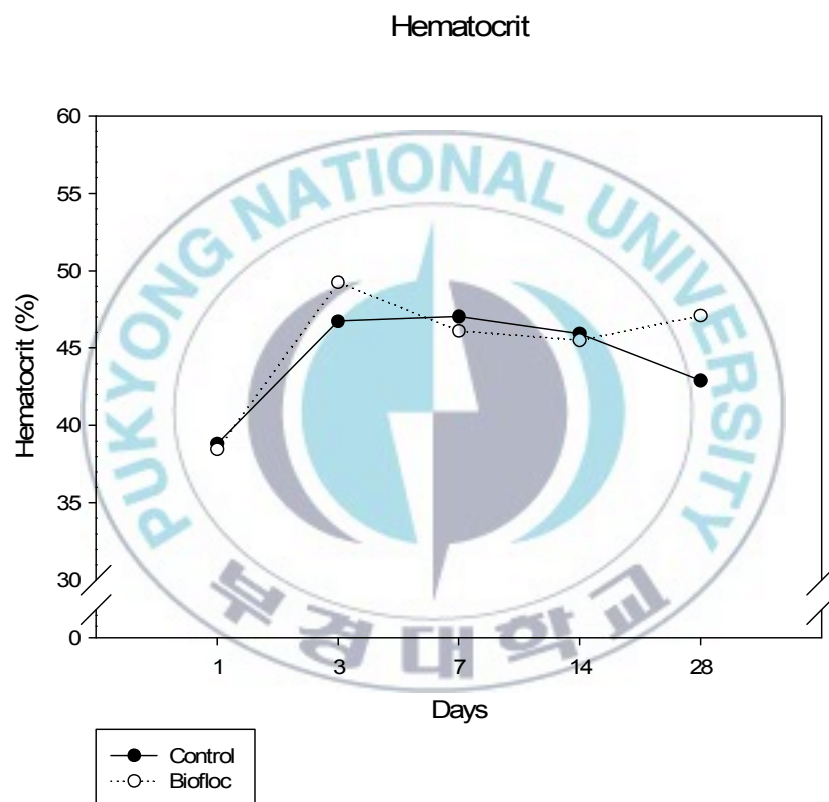


Fig. 7. Changes of Hematocrit of Israel carp, *Cyprinus carpio nudus*, in the control and tested biofloc water.

6. 혈청 생화학 성분 분석

6.1. Aspartate aminotransferase (AST)

대조구와 바이오플락수 시험구에 28일 동안 사육하면서 이스라엘잉어의 혈청 내 AST 변화를 조사한 결과를 Fig. 8에 나타내었다.

AST 값의 범위는 46.14 ~ 94.16 IU/L 이었으며, 혈청 중의 AST 농도는 시험 시작 1일째에 가장 높은 값을 나타내었다가 점차 감소하는 추세를 보였다. 시험 기간 동안 대조구와 시험구 사이의 AST 농도에 유의성 있는 차이를 보이지 않았다.

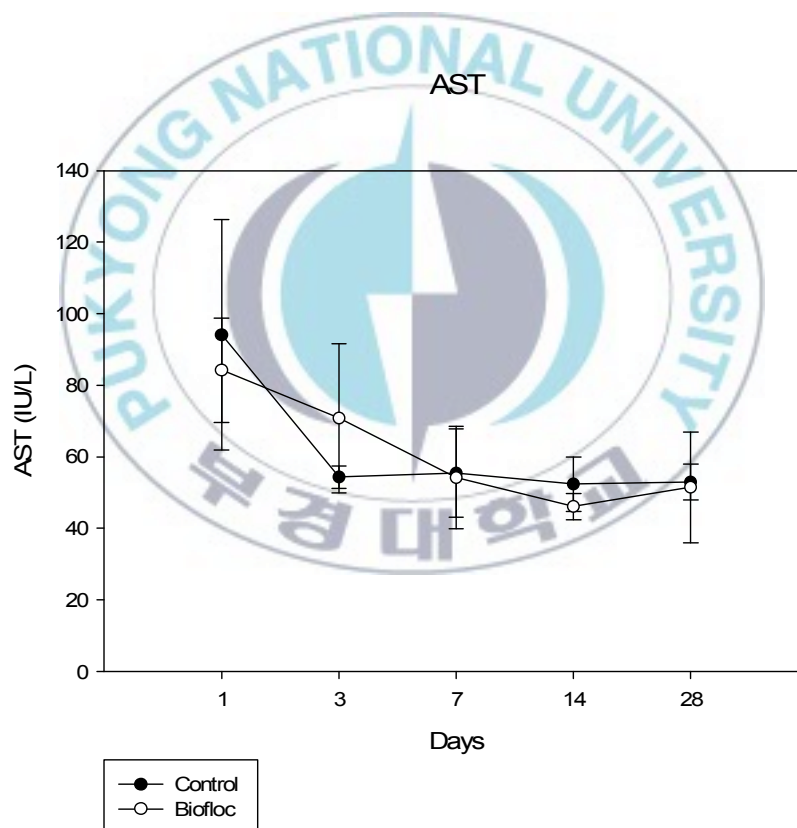


Fig. 8. Changes of the AST in sera of Israel carp, *Cyprinus carpio nudus*, in the control and tested biofloc water.

6.2. Alanine aminotransferase (ALT)

대조구와 바이오플락수 시험구에 28일 동안 사육하면서 이스라엘잉어의 혈청 내 ALT 변화를 조사한 결과를 Fig. 9에 나타내었다.

ALT 값의 범위는 4.20 ~ 12.92 IU/L 이며, 혈청 중의 ALT 농도는 시험 기간 동안 시험구에서 점차 증가하는 추세를 보였다. 시험 기간 동안 대조구와 시험구 사이의 ALT 농도가 유의성 있는 차이를 보이지 않았다.

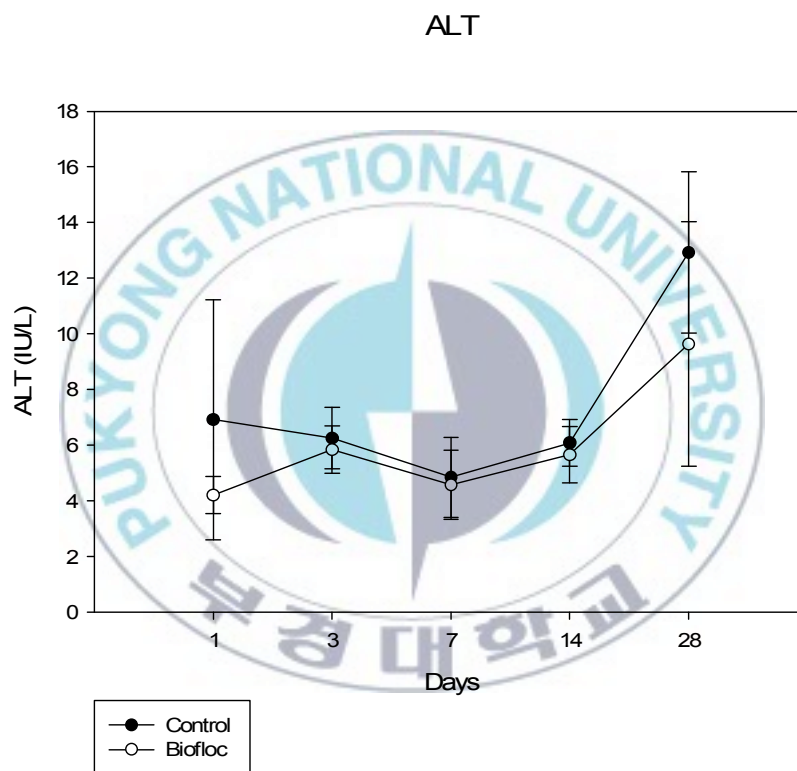


Fig. 9. Changes of the ALT in sera of Israel carp, *Cyprinus carpio nudus*, in the control and tested biofloc water.

7. 혈청 lysozyme 활성

대조구와 바이오플락수 시험구에 28일 동안 사육하면서 이스라엘잉어의 혈청 lysozyme 활성을 조사한 결과를 Fig. 10에 나타내었다.

혈청 lysozyme 활성은 모든 실험 기간 동안 대조구와 시험구 사이에 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

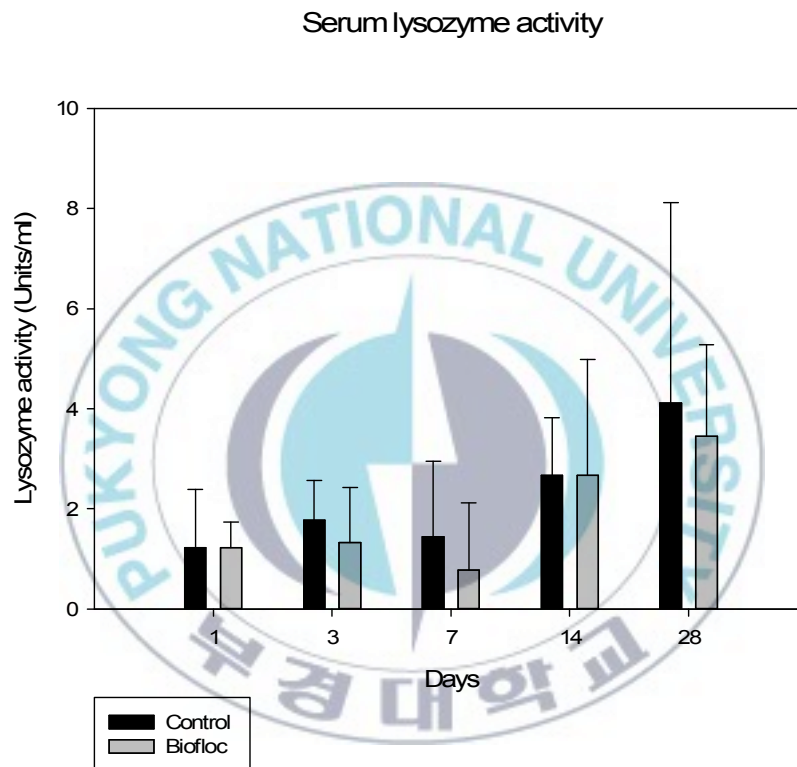


Fig. 10. Lysozyme activities in the sera of Israel carp, *Cyprinus carpio nudus*, in the control and tested biofloc water.

8. 체표 점액 lysozyme 활성

대조구와 바이오플락수 시험구에 28일 동안 사육하면서 이스라엘잉어 체표 점액 lysozyme 활성을 조사한 결과를 Fig. 11에 나타내었다.

체표 점액 lysozyme 활성은 모든 시험 기간 동안 대조구와 시험구 사이의 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

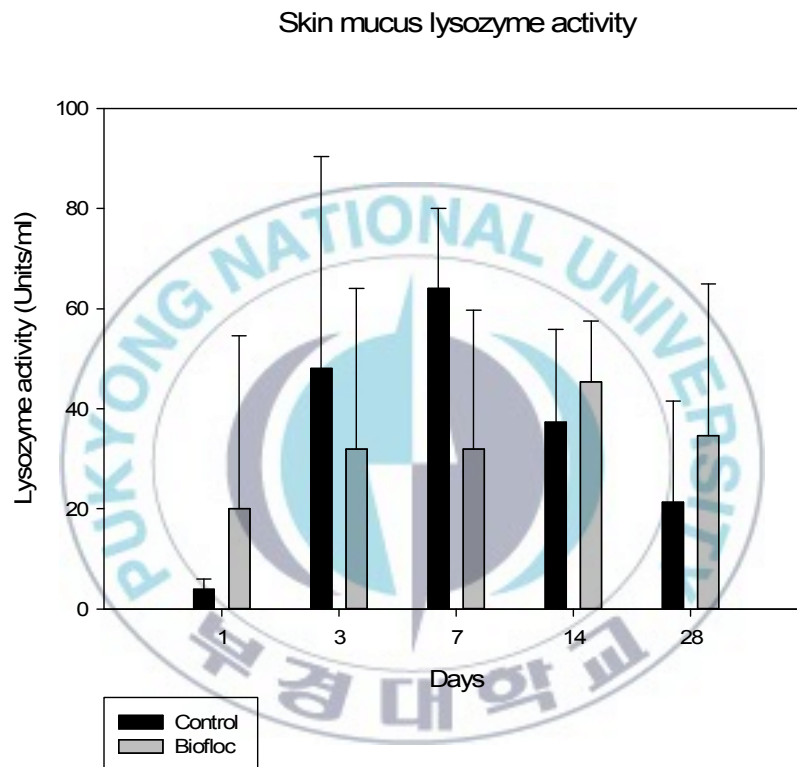


Fig. 11. Lysozyme activities in the skin mucus of Israel carp, *Cyprinus carpio nudus*, in the control and tested biofloc water.

9. 장 점액 lysozyme 활성

대조구와 바이오플락수 시험구에 28일 동안 사육하면서 이스라엘잉어의 장 점액 lysozyme 활성을 조사한 결과를 Fig. 12에 나타내었다.

장 점액 lysozyme 활성은 7일 째 시험구에서 대조구에 비해 유의적인 차이를 나타내었다.

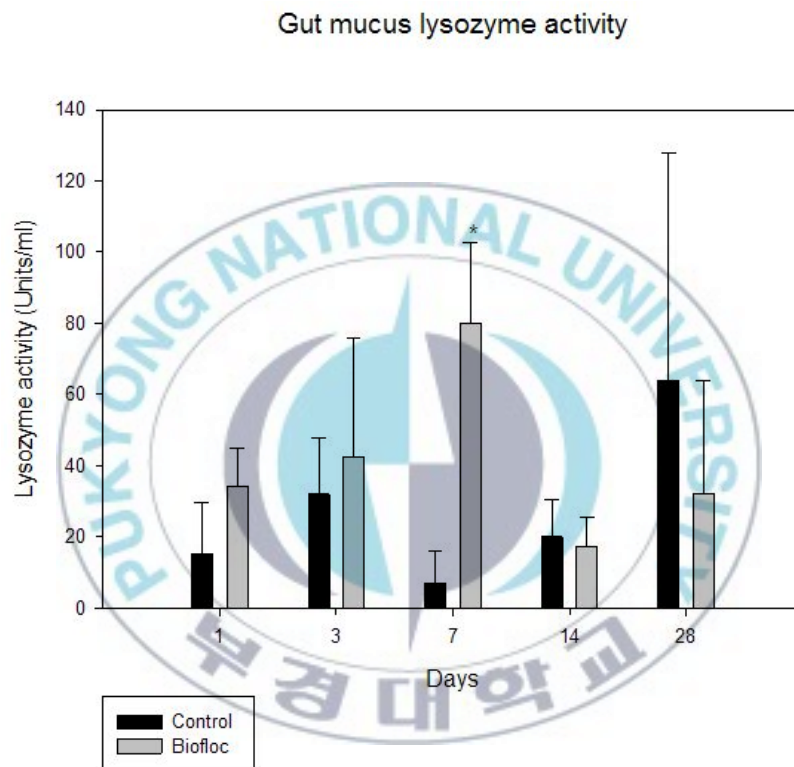


Fig. 12. Lysozyme activities in the gut mucus of Israel carp, *Cyprinus carpio nudus*, in the control and tested biofloc water. *Significant difference, $P < 0.05$ compared with the value of control group.

10. 신장 대식세포 NBT 환원능

대조구와 바이오플락수 시험구에 28일간 사육하면서 이스라엘잉어의 두신에서 분리한 대식세포의 NBT 환원량을 측정한 결과를 Fig. 13에 나타내었다.

두신 식세포 활성은 7일 째에 시험구에서 대조구에 비해 유의적인 차이를 나타내었다.

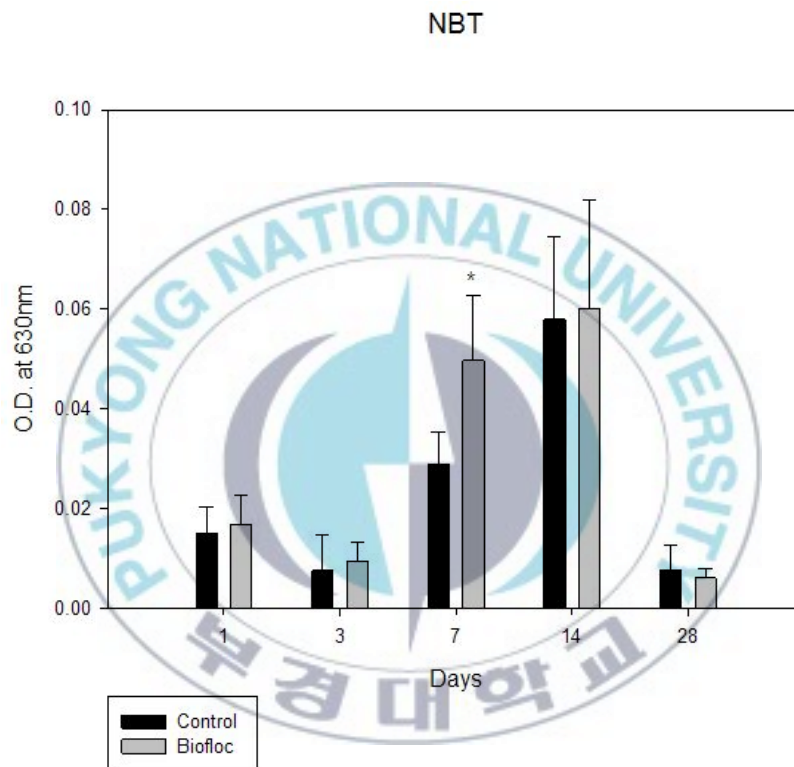


Fig. 13. Reduction of NBT in head kidney macrophage isolated from Israel carp, *Cyprinus carpio nudus*, in the control and tested biofloc water. *Significant difference, $P < 0.05$ compared with the value of control group.

11. 혈청 내 myeloperoxidase (MPO) 활성

바이오플락수 시험구에 28일간 사육하는 동안 이스라엘잉어의 혈청 내 MPO 활성을 측정한 결과를 Fig. 14에 나타내었다.

혈청 내 MPO 활성은 실험 기간 동안 대조구와 시험구 사이에서 유의적인 차이를 나타나지 않았다.

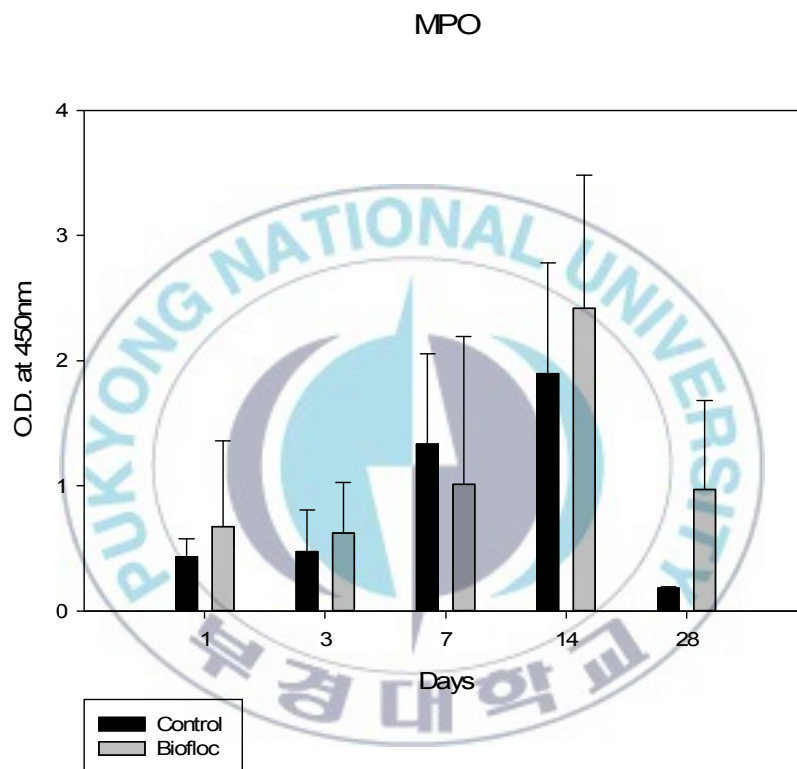


Fig. 14. MPO activities in sera of Israel carp, *Cyprinus carpio nudus*, in the control and tested biofloc water.

IV. 고찰

잉어류의 양식 생산이 우리 나라 식량 공급에 중요한 의미를 가지고 있으며 어가의 소득 증대에도 크게 기여할 수 있다는 것은 주지의 사실이다. 거의 사라지고 있는 잉어의 양식을 다시 활성화시키기 위해서는 환경에 무해하며 위생적인 양식 기술 개발이 선결 문제라 생각된다.

본 연구에서는 이러한 문제점에 주목하여 바이오플락 시스템을 이용한 양식 기술 개발을 염두에 두고 이에 관련된 기초 자료를 얻고자 하였다. 이를 위해 바이오플락 시스템에서 그 역할의 중심이 되는 미생물 중 아질산 환원 세균을 확인하여 바이오플락 안정에 기여하는 세균의 종류를 알아보고, 바이오플락수에 28일간 이스라엘잉어를 사육하였을 때 바이오플락수 수질의 변화와 어체의 면역 반응의 변화를 관찰하여 이스라엘잉어를 바이오플락수에 적용 시 어체에 미치는 영향을 알아보았다.

바이오플락수 내에 존재하는 종속 영양형 아질산 환원 세균을 알아보기 위하여 평판배지 배양법으로 세균의 분리를 시도한 결과 *Acinetobacter bouvetii*, *Acinetobacter tjernbergiae* 및 *Lactococcus lactis* 등과 같은 3종의 세균이 분리되었다. Hu and Kung (2000)은 하수처리 시스템에서 종속 영양 질화 세균을 분리하였는데, 본 연구에서 분리된 2종의 속과 동일한 *Acinetobacter* sp.가 분리되었다. 또한 sequencing batch reactor의 미생물총을 DGGE로 분석한 연구 (Su *et al.*, 2012)와, river bioreactor를 모의 실험하여 미생물총을 DGGE로 분석한 연구 (Xu *et al.*, 2012)에서 *Lactococcus lactis*가 분리되었다. 또한 Yao *et al.* (2013)은 Sludge에서 분리된 *Acinetobacter* sp. HA2 균주가 암모니아, 아질산, 질산을 효과적으로 제거한다고 발표하였다. 따라서 본 실험에서 분리된 3종의 세균이 바이오플락 내에서 존재하며 암모니아의 산화 및 아질산 환원에 기여하여 바이오플락의 수질 안정에 기여할 것으로 생각된다. 본 실험에서 분리된 세균은 아주 일부분으로, 이외에도 다수의 자가영양세균이나 본 실험에서 사용한 배지에서는 배양되지 않은 많은 세균 군이 복합적으로 사육수 내 유해물질 분해에 관여할 것으로 생각된다.

시험구별 수질의 변화 정도를 알고자, 환수를 해주는 대조구와 무환수 환경에 있는 바이오플락과 비교하기 위하여 무환수 대조구인 negative control을 별도

로 설정하였다. 그 결과, 무환수 대조구에서는 수질이 단기간에 악화되어 7일 이후 시험어가 모두 사망하여 실험을 지속할 수 없는 상태에 이르렀다. 따라서 대조구는 3일에 1회 환수를 해 주어 시험어의 생육에 영향을 미치지 않은 수질 상태를 유지시키고자 하였다. 암모니아-질소는 대조구에서 그 값이 6.76 ~ 12.05 mg/L로 비교적 낮은 값을 유지하였다. 이는 대조구를 3일마다 환수했기 때문으로 생각된다. 바이오플락수 시험구에서는 1일에서 7일까지 낮은 값을 유지하였으나, 7일 이후 암모니아-질소가 점점 증가하여 실험 마지막 날인 28일 쯤 94.1 mg/L를 나타냈다. 이는 바이오플락수의 수질 상태가 변한 것으로서, 바이오플락 세균총의 변화와 연관성을 생각할 수 있다.

바이오플락 시험구의 세균수의 변화를 관찰하기 위하여 총 배양 가능한 세균수를 계수한 결과 시험 개시 후 7일까지는 비교적 안정적인 세균수를 유지하다가, 이후 세균수가 증가하기 시작하여 9.18×10^6 CFU/ml까지 증가하였다. 이는 7일까지 바이오플락이 비교적 안정적으로 유지되었으나, 이후 바이오플락의 안정에 영향을 끼치는 세균 군집 혹은 세균수가 변하면서 바이오플락 내 세균의 급증과 함께 암모니아-질소의 증가를 나타낸 것으로 생각된다. 본 연구에서 바이오플락 총 세균군의 구성을 직접적으로 조사하지는 않았으나, 바이오플락 시험구 내 존재하는 세균 수의 변동이 수질의 변화에 어떤 영향을 미쳤을 것이라는 점을 인정할 수 있을 것으로 생각된다. 한편 대조구의 세균수가 변동 폭이 작은 것으로 보아 환수를 통해 비교적 일정한 세균수를 유지할 수 있었던 것으로 생각된다.

아질산-질소는 대조구에서 14일까지 낮은 값을 유지하였으며, 21일 쯤 24.6 mg/L를 나타낸 뒤 28일 쯤에는 감소하였다. 이는 3일에 1번씩 대조구를 환수해주었으나, 그 환수량이 적어 아질산-질소의 축적으로 21일 쯤 폭등하였다고 생각된다. 바이오플락수 시험구에서 아질산-질소는 계속해서 낮은 값을 나타냈으며 0.02 ~ 0.17 mg/L의 값을 나타냈다.

질산-질소는 대조구에서 아질산-질소와 비슷한 경향을 나타내었다. 14일 이후 값이 크게 증가하여 205.89 mg/L를 나타낸 후 28일 쯤 감소하였다. 바이오플락수 시험구에서는 계속해서 점진적으로 질산이 증가하였다. 바이오플락수 시험구의 이러한 경향은 이전의 다른 바이오플락수 연구들에서도 나타났다 (Zhao *et al.*, 2012; Azim *et al.*, 2008; Ray *et al.*, 2011). 본 연구에서는 탈질작용을 하는 *Acinetobacter* sp.가 분리되었으나, 본 세균의 탈질능이 확실하지 않으며 바

이오플락 내 세균 군집에서 본 세균이 차지하는 비율이 명확하지 않다. 질산 축적을 해소하기 위해서는 본 연구에서 분리된 것과 같은 탈질 세균의 유지가 중요할 것으로 생각된다.

다음으로 바이오플락수 시험구에 잉어를 적용 시 어류 생리 기능에 미치는 영향으로 hematocrit와 AST, ALT를 조사하였다.

본 실험에서 hematocrit 값의 범위는 대조구에서 37.5 ~ 47.03%, 시험구에서 37.29 ~ 49.23 %를 나타냈다. 두 구간 사이에서 유의적인 차이가 없었다. 박 (2011)의 연구와 Ghiraldelli *et al.* (2006)의 연구에서 제시된 정상 수치인 $36.8 \pm 6.2 \%$, $37.4 \pm 4.7 \%$ 와 비슷한 수치로 어체 건강에 유해하지 않는 것으로 판단된다.

어류의 혈청 효소인 AST와 ALT는 간 세포속에 함유되어 있는 효소로서 간의 손상 지표가 되며 약물의 대사에서 간 조직의 장애가 있을 시 문제가 된다 (Garrido *et al.*, 1990). 본 실험에서 AST와 ALT 값의 범위는 46.14 ~ 94.16, 4.20 ~ 12.92 IU/L 으로 나타났으며, 대조구와 바이오플락수 시험구 사이의 유의적인 차이는 없었다. 이러한 수치는 전 등 (1989), 정 등 (2011)이 제시한 정상 수치에 포함되거나 낮은 수치로 나타났다. 그러므로 AST와 ALT 분석 결과 어체 건강에 문제가 없는 것으로 사료된다.

따라서, 혈청 생화학적 분석을 통한 결과를 보았을 때 대조구와 시험구 사이에 유의성 있는 차이가 나타나지 않고 그 수치가 정상 범위 내에 있으므로, 바이오플락수에 이스라엘잉어를 사육하더라도 생리활성에 영향을 주지 않는 것으로 판단된다.

실험 기간 동안 이스라엘잉어의 평균 성장을 관찰한 결과 대조구에 비하여 바이오플락수 시험구에서 평균 전장과 체중 모두 더 높은 값을 나타내어, 바이오플락수가 어체의 성장에 좋은 효과를 주는 것으로 생각된다. 바이오플락수가 추가 먹이원으로서 성장에 미치는 영향에 관한 연구는 새우 양식과 관련된 것이 많다. Zhao *et al.* (2012)은 *Marsupenaeus japonicus* juvenile을 biofloc 수에 적용한 결과, 대조구에 비하여 41.3%의 높은 새우 생산량을 얻었다고 보고하였다. 그 외에도 *Litopenaeus vannamei* (Burford *et al.*, 2004; Samocha *et al.*, 2007), *Macrobrachium rosenbergii* postlarvae (Crab *et al.*, 2010b)에서도 유사한 결과를 보고하였다. 새우 이외에도, Nile tilapia에서 35%의 crude protein이 함유된 사료를 먹인 대조구와 바이오플락수 시험구의 성장률을 비교하

였을 때, 유의적인 차이는 없었으나 바이오플락수 시험구의 성장률이 대조구에 비하여 더 높은 수치를 나타냈다 (Azim and Little, 2008). 이러한 성장 증가는 바이오플락이 추가 먹이원으로 작용하여 더 높은 성장을 나타내는 것으로 밝혀졌다 (Avnimelech, 1994; Burford and Lorenzen, 2004). 본 연구의 바이오플락수 시험구에서도 더 높은 성장을 나타내므로, 이스라엘잉어에 대해서도 바이오플락이 추가 먹이원의 기능을 하고 있을 것으로 나타나서 이스라엘잉어를 바이오플락수 양식에 적용하면 보다 높은 생산량과 사료 절감의 효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

바이오플락의 양식 생물에 대한 방어력 증강 효과에 관련된 연구로서, Xu *et al.* (2013)은 *Litopenaeus vannamei*의 juvenile을 바이오플락수에 30일 동안 양식하였을 때, antioxidant status와 세포성 면역 반응의 증가를 확인하였다. 또한, 바이오플락은 병원성 질병에 대해 억제력을 나타낸다. Crab (2010a)은 *Artemia fransiscana*의 양식수에 바이오플락을 적용하였을 때, 병원성의 *Vibrio harveyi*에 대한 저항성을 나타내었다고 보고하였다. 또, Zhao *et al.* (2012)는 *M. japonicus*를 적용시킨 바이오플락 양식수를 PCR-DGGE를 사용하여 세균을 분석하였을 때, 우점종이 *Bacillus* sp.로 확인되어, 병원성 억제 가능성을 확인하였다. 그 외에도 바이오플락수를 적용한 red tilapia에서 phagocytic index가 증가했다는 연구 결과가 있다 (Agustinus and Ekasari, 2010). 이러한 연구 결과들로부터 바이오플락이 양식수 내의 병원성 미생물을 억제할 뿐만 아니라, 양식 생물에게 면역력을 증강시키는 효과의 가능성이 있다는 것을 알 수 있다. 본 연구에서는 바이오플락수 적용 시 어류의 면역에 미치는 영향을 알아보기로 하여 어류의 비특이적 면역계 중 체액성 면역 인자로서 lysozyme 활성을 조사하였으며, 세포성 인자로서 식세포의 활성 산소를 NBT 환원으로 확인하였으며, 호중구에서 분비되는 MPO를 평가하였다.

어류의 lysozyme은 점액, 혈청 등에 들어있으며 특히 백혈구와 백혈구가 풍부한 조직인 신장, 비장, 장 등에 포함되어 있고 macrophage와 호중구가 주된 생산 세포로 알려져 있다 (Murray and Fletcher, 1976). 본 실험에서 혈청 lysozyme과 체표 점액 lysozyme 활성을 조사한 결과, 대조구와 시험구 사이에 유의적인 차이가 없었다. 하지만 장 점액 lysozyme의 경우, 7일째 대조구에 비해 시험구에서 높은 장 점액 활성을 나타냈다. 이러한 결과는 NBT 환원능에서도 나타났다. NBT 활성 또한 7일차에 대조구와 비교하여 시험구에서 높은 환원

능을 나타냈다. MPO는 산소 호흡폭발 중에, 대개 호중구의 아주르친화성 과립에 의해 방출되어 병원체를 사멸시키는 효소이다 (Wang *et al.*, 2008). 혈청 내 MPO 활성을 조사한 결과 대조구와 시험구 비교시 유의적인 차이를 나타내지 않았으므로 MPO 활성에는 영향을 주지 않는 것으로 사료된다.

본 실험에서는 바이오플락 내 존재하는 세균으로 *Lactococcus lactics*가 분리되었는데, 이 세균은 여러 이전 연구에서 probiotics로 밝혀져 있다. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)에서 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CLFP 100을 probiotics로 사용하였을 때, 두신 leukocyte의 식세포 활성과 혈청의 보체 활성이 높아졌으나, lysozyme 활성에서는 차이를 보이지 않았다 (Balcázar, 2007). 또한 Kim and Austin (2006)은 rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum)에서 *Carnobacterium maltaromaticum* B26와 *Carnobacterium divergens* B33의 probiotic 효과에 관하여 연구한 결과, B26 균주의 경우 두신의 leukocyte 식세포 활성이 증가하였으며, 또한 lysozyme 활성에서는 혈청과 장 점액 lysozyme 모두 활성이 증가하였음을 밝혔다. 본 연구에서도 또한 장 점액 lysozyme 활성과 두신 leukocyte 활성의 지표인 NBT가 증가하였으므로, 바이오플락이 probiotics로 작용하여, 면역 활성을 나타낸 것으로 생각된다. 하지만 그 활성이 7일째에 그치며, 이후 활성이 나타나지 않는 것은 바이오플락 내 존재하는 세균 구성이 변하여, probiotic 세균의 유지가 되지 않은 것으로 판단된다. 그러므로 바이오플락 내 존재하는 probiotic 세균의 유지가 바이오플락 양식 어류의 면역력을 활성화하는데 중요할 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합하여, 이스라엘잉어를 바이오플락수에 적용 시 성장이 빨라지고 생리적인 부작용이 없으므로, 이스라엘잉어가 바이오플락수 양식에 적합한 어종이며 바이오플락수 양식이 가능함을 확인하였다. 또한, 바이오플락이 안정적인 상태일 때 수질이 안정적으로 유지되며, 비특이적 면역에서 증강 효과가 있는 것으로 나타났다. 그러므로 안정적인 바이오플락에서 이스라엘잉어를 양식 하면 면역능이 향상되어 병원체에 대한 저항성이 강할 것으로 사료된다. 하지만, 본 실험에서 바이오플락은 7일 이후 안정성을 잃어 바이오플락의 수질과 세균수가 급변하였으며 이스라엘잉어의 면역력 증강도 7일 이후 차이를 보이지 않았으므로 바이오플락을 지속적으로 안정시키는 것이 중요한 과제일 것으로 생각된다.

V. 요약

본 연구에서는 바이오플락수 내에 존재하는 종속영양 질화세균을 동정하고, 바이오플락수를 이스라엘잉어, *Cyprinus carpio nudus*에 적용할 때 면역 반응에 미치는 영향을 분석함으로써 바이오플락수가 이스라엘잉어의 생리학적, 면역학적 변화를 알아보고자 하였다. 바이오플락 양식수 속의 질화세균 동정을 위해 배지 배양법으로 세균을 분리하고 아질산 환원능을 측정하여 환원능이 있는 세균만을 선택하여 16s rRNA로 동정하였다. 또한 동일한 양식수에 이스라엘잉어를 사육하며 28일간 생리 변화, 비특이적 세포성 면역 반응 및 체액성 면역 반응의 변화를 조사하였다. 실험 기간 동안 암모니아-질소, 아질산-질소, 질산-질소를 측정하였으며, 양식수 내 총 세균수 조사와 함께 시험어의 평균 체중과 전장을 측정하였다.

바이오플락수 내 종속영양 질화세균 동정 결과 *Acinetobacter* 두 종과 *Lactococcus lactis*가 분리되었다. 시험어의 평균 전장과 체중은 대조구와 비교하여 유의적인 차이는 없었으나, 대조구에 비해 높은 성장을 나타냈다. 실험 기간 동안 수질 분석 결과, 시험구에서 암모니아-질소는 7일까지 안정을 유지한 후 계속해서 증가하였고, 이러한 추세는 배양 가능한 총 세균수의 결과에서도 나타났다. 시험구의 이스라엘잉어의 생리에 미치는 영향을 조사한 결과 혈액 성상에서 대조구와 차이를 보이지 않았다. 비특이적 면역 반응 시험 결과 장 점액 lysozyme과 NBT 환원능 시험 결과에서 7일째 대조구와 비교하여 높은 활성을 나타냈다.

이상의 결과로부터, 바이오플락수에 이스라엘잉어를 적용시켰을 때 성장이 빨라지고 생리적인 악영향을 끼치지 않으므로 이스라엘잉어가 바이오플락 양식 대 상종으로 적합한 것을 확인하였다. 그리고 바이오플락이 안정적으로 유지될 때 어류의 비특이적 면역에 증강 효과가 있어, 이스라엘잉어를 바이오플락수로 양식하는 것이 성장 촉진과 면역력 증강의 장점이 있을 것으로 사료된다.

VI. 감사의 글

어떻게 이 글을 쓸 수 있는지 모르겠습니다. 스스로에 대해 끊임없이 의심하고 비판하고 생각할 수 있는 기회였습니다. 앞이 잘 보이지 않는 험난한 길에 앞장서서 올바른 길로 이끌어 주신 지도교수 박수일 교수님께 깊은 존경과 감사의 인사를 드리며, 교수님의 제자로 이렇게 학위를 받을 수 있음에 감사하고 스스로가 자랑스럽습니다. 바쁜 시간을 내주시어 부족한 논문을 바로 잡아주신 정준기 교수님, 하나하나 세세하게 논문을 지도해주신 김도형 교수님께 감사드립니다. 학부시절부터 대학원까지 많은 가르침을 주신 정현도 교수님, 허민도 교수님, 강주찬 교수님, 김기홍 교수님께도 감사드립니다. 또한 많은 관심과 조언해주신 자원생물학과 유명숙 교수님, 경상대학교 박찬일 교수님께도 감사드립니다.

2009년 실험실 생활을 시작하여 지금까지 많은 선배님들께 도움을 받았습니다. 선생님이 자리를 비우실 때 저희를 보살펴주신 실험실 대부 이덕찬 선배님, 저에게 실험에 대해 하나하나 자세하게 알려주신 김이경 선배님, 실험실 생활의 롤모델이 되어 주셨던 원경미 선배님, 함께 수업을 들으며 동고동락해주셨던 이수정 선배님, 실험실을 방문해 주실 때마다 많은 가르침을 주셨던 강명석 선배님, 지보영 선배님, 조미영 선배님, 이재일 선배님, 한현자 선배님, 최현숙 선배님, 김현정 선배님 외 여러 선배님들께도 감사드립니다. 제주도에서 너무나도 즐거운 시간을 보낼 수 있도록 해 주신 강진영 선배님과 내외분들, 바다 넘어 제주도에서 저희를 항상 걱정해주신 고석형 선배님, 먼 땅에서 힘내서 공부하고 있을 손새봄 선배님께도 감사드립니다. 실험실 생활의 기초를 가르쳐주신 황분옥 선배님, 대연동 실험실 옆자리에서 많은 것을 가르쳐주신 박효진 선배님, 실험실 바로 윗 선배로서 많은 가르침을 주신 전미희 선배님께도 감사드립니다. 지금은 중국의 대학에서 교수로 열심히 근무하고 계실 Qiao Guo 박사님께도 깊은 감사의 말씀 전합니다.

본 논문의 소재를 제공해 주신 아쿠아프라임의 유병화 선배님, 실험어를 흔쾌히 제공해주신 경상남도 수산자원연구소 민물고기연구센터 박경대 소장님과 조혜진 선배님, 실험어 사육에 중요한 사료를 제공해주신 정종아 선배님, 김전진 선배님께 특별히 감사드립니다. 선배님들이 아니었다면 졸업하지 못하였습니다. 정말 감사드립니다.

대연동 실험실을 떠나 새로운 기장 연구소에서 저희를 이끌어주신 우승호 선배님께 감사드립니다. 실험과 생활 모두에 있어서 많은 조언해 주신 식품의약품 안전처 이은혜 박사님께도 감사드립니다. 대학원 생활 동안 실습을 통해 넓치 양식에 있어서 많은 것을 가르쳐 주시고 못한 후배들을 신경써주신 대홍수산 문제석 선배님과 내외분들께도 감사드립니다. 또한 연구소 수조 관리에 힘써주시고 함께 재미있는 생활이 되도록 해 주신 해양생물학과 이제현 선배님께 감사드립니다. 먼저 떠났지만 새로운 기장 연구소에서 함께 실험실 생활을 했던 친언니같은 김수현 선배님과 동기가 봐도 귀여운 이소정 학우님께 감사드립니다. 함께 연구하느라 수고한 김민경 선배님께도 감사합니다. 새로운 기장 연구소에서 많은 도움을 주신 박종순 전 계장님과 전태언 박사님을 비롯한 수산과학연구소 식구들과 엄용환 조교님께도 감사의 말씀 드립니다. 멀리 떨어져 있는 기장 연구소를 배려해주어 많은 도움을 주었던 승선실습 메이트 김선영 조교님과 대학원 담당으로 고생이 많으신 김우리 조교님께 매우 감사드립니다. 논문으로 눈코 뜰 새 없이 바쁠 때 세척까지 도와주며 많은 도움을 준 김보성 선배님, 황세명 학우님, 이성주 후배님에게 특별히 감사드립니다. 함께 양식장 실습하며 많은 가르침을 주신 김민수 선배님, 논문에 대해서 많은 지적과 관심을 주신 김준환 선배님께도 감사드립니다. 힘들지만 누구보다 열심히 연구하고 있을 07학번 동기 석사후보생들과 그 외 대학원생 분들에게도 감사드리며, 피시케어 사업으로 학교에 갈 때마다 편하게 대해 준 병리방 식구들에게도 감사드립니다. 그리고 힘든 식사생활 동안 좋은 단백질원을 제공해주신 토비야 사장님과 회식때마다 좋은 음식으로 대접해주신 해마수산 이남철, 김귀옥사장님께도 감사드립니다.

올해 함께 졸업하는 예비 작가 너나들이 수연이, 다시 학교로 돌아가서 열심히 연구할 정은이, 먼저 졸업해서 열심히 일하고 있는 지혜, 제일 먼저 유부녀가 될 다연이, 대학 시절 옆에서 많은 도움을 준 희은이, 그리고 미성숙한 정신을 울곧게 만들어주어 논문에 집중할 수 있도록 도와준 박일호군에게도 고맙고 감사한 마음 전합니다. 그리고 식사생활 동안 옆에서 하나부터 열까지 싫은 내색 없이 전부 도와주며 진정으로 동고동락했던 파트너이자 동거인인 김아란 학우님께 깊은 감사드립니다.

집에서 늘 고생하시는 할머니, 항상 울곧은 모습으로 응원해주신 아버지, 식사 생활동안 정신적, 육체적인 버팀목이 되어주신 어머니, 사랑하는 분신 1호 영은이 언니와 사랑하는 분신 2호 동생 민경이, 그리고 살아계셨다면 누구보다도

더 기뻐하셨을 할아버지에게 정말로 감사드립니다.

앞으로 나아갈 일만 남았습니다. 불온전하고 미숙한 저를 아끼고 보살펴주신 모든 분들께 이장을 빌어 감사드리며 앞으로 이것을 토대로 더 나은 연구자가 되겠습니다. 감사합니다.



VII. 참고 문헌

- Agustinus, F. W. and J. Ekasari (2010). Microbial abundance and diversity in water, and immune parameters of red tilapia reared in bioflocs system with different fish density (25 fish/m³, 50 fish/m³, and 100 fish/m³). *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 9(2), 157-167.
- Arnold, S. J., F. E. Coman, C. J. Jackson and S. A. Groves (2009). High-intensity, zero water-exchange production of juvenile tiger shrimp, *Penaeus monodon*: An evaluation of artificial substrates and stocking density. *Aquaculture*, 293, 42-48.
- Avnimelech, Y. (1999). Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture*, 176, 227-235.
- Azim, M. E. and D. C. Little (2008). The biofloc technology (BFT) in indoor tanks: Water quality, biofloc composition, and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 283, 29-35.
- Badway, J. A. and M. L. Karnovsky (1980). Active oxygen species and the function of phagocytic leukocytes. *Annual review of biochemistry*, 49, 695-726.
- Balcázar, J. L., I. De Blas, I. Ruiz-Zarzuela, D. Vendrell, O. Gironés and J. L. Muzquiz (2007). Enhancement of the immune response and protection induced by probiotic lactic acid bacteria against furunculosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 51(1), 185-193.
- Brunt, J., A. Newaj-Fyzul and B. Austin (2007). The development of probiotics for the control of multiple bacterial diseases of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 30, 573-579.
- Burford, M. A. and K. Lorenzen (2004). Modeling nitrogen dynamics in intensive shrimp ponds: the role of sediments remineralization.

- Aquaculture, 229, 129–145.
- Burford, M. A., P. J. Thompson, R. P. McIntosh, R. H. Bauman and D. C. Pearson (2004). The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high-intensity, zero exchange system. Aquaculture, 232, 525–537.
- Crab, R., A. Lambert, T. Defoirdt, P. Bossier, and W. Verstraete (2010a). The application of bioflocs technology to protect brine shrimp (*Artemia franciscana*) from pathogenic *Vibrio harveyi*. Journal of Applied Microbiology, 109, 1643–1649.
- Crab, R., B. Chielens, M. Wille, P. Bossier and W. Verstraete (2010b). The effect of different carbon sources on the nutritional value of bioflocs, a feed for *Macrobrachium rosenbergii* postlarvae. Aquaculture Research, 41, 559–567.
- Crab, R., T. Defoirdt, P. Bossier and W. Verstraete (2012). Biofloc technology in aquaculture: beneficial effects and future challenges. Aquaculture, 356–357, 351–356.
- De Schryver, P., R. Crab, T. Defoirdt, N. Boon and W. Verstraete (2008). The basics of bio-flocs technology: the added value for aquaculture. Aquaculture, 277, 125–137.
- Emerenciano, M., E. L. C. Ballester, R. O. Cavalli and W. Wasielesky (2011). Effect of biofloc technology (BFT) on the early postlarval stage of pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis*: growth performance, floc composition and salinity stress tolerance. Aquaculture International, 19, 891–901.
- Garrido, L. G., R. M. Chapuli and A. V. Andres (1990). Serum cholesterol and triglyceride levels in *Scylliorhinus canicula* (L.) during sexual maturation. Journal of Fish Biology, 36, 499–509.
- Ghiraldelli, L., M. L. Martins, M. M. Yamashita and G. T. Jeronimo (2006). Ectoparasites influence on the haematological parameters of Nile tilapia and carp cultured in the State of Santa Catarina, South Brazil. Journal of Fisheries and Aquatic Science, 1(3), 270–276.

- Hargreaves, J. A. (2013). Bioflocs production system for aquaculture, Southern Regional Aquaculture Center (SRAC), Publication No. 4503.
- Hu, T. L. and K. T. (2000). Study of heterotrophic nitrifying bacteria from wastewater treatment systems treating acrylonitrile, butadiene and styrene resin wastewater. *Water Science and Technology*, 42(3,4), 315–321.
- Kim, D. H. and B. Austin (2006). Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. *Fish & Shellfish Immunology*, 21, 513–524.
- Kumari, K. and P. K. Sahoo (2005). Effects of cyclophosphamide on the immune system and disease resistance of Asian catfish *Clarias batrachus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 19, 307–316.
- Lange, S., B. K. Gudmundsdottir and B. Magnadottir (2001). Humoral immune parameters of cultured Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 11, 523–535.
- Miles, A. A. and S. S. Misra (1938). The estimation of the bacterial power of the blood. *Journal of Hygiene*, 38, 732–749.
- Mishra, J. K., T. M. Samocha, S. Patnaik, M. Speed, R. L. Gandy and A. Ali (2000). Performance of an intensive nursery system for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, under limited discharge condition. *Aquacultural Engineering*, 38, 2–15.
- Murray, C. K. and T. C. Fletcher (1976). The immunohistochemical localization of lysozyme in plaice (*Pleuronectes platessa* L.) tissues. *Journal of Fish Biology*, 9, 329–334.
- Palic, D., C. B. Andreasen, B. W. Menzen and J. A. Roth (2005). A rapid, direct assay to measure degranulation of primary granules in neutrophils from kidney of fathead minnow (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820). *Fish & Shellfish Immunology*, 19, 217–227.
- Papen, H. and R. von Berg (1998). A most probable number method (MPN) for the estimation of cell numbers of heterotrophic nitrifying bacteria in soil. *Plant and Soil*, 199, 123–130.

- Quade, M. J. and J. A. Roth (1997). A rapid, direct assay to measure degranulation of bovine neutrophil primary granules. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 58, 239-248.
- Quellette, A. J. and M. E. Selsted (1996). Paneth cell defensins : endogenous peptide components of intestinal host defense. *The FASEB Journal*, 10(11), 1280-1289.
- Ray, A. J., K. S. Dillon and J. M. Lotz (2011). Water quality dynamics and shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production in intensive, mesohaline culture systems with two levels of biofloc management. *Aquacultural Engineering*, 45(3), 127-136.
- Samocha, T. M., S. Patnaik, M. Speed, A. M. Ali, J. M. Burger, R. V. Almeida, Z. Ayub, M. Harisanto, A. Horowitz and D. L. Brock (2007). Use of molasses as carbon source in limited discharge nursery and grow-out systems for *Litopenaeus vannamei*. *Aquacultural Engineering*, 36(2), 184-191.
- Schneider, O., V. Sereti, E. Hver. Eding and J. A. J. Verreth (2005). Analysis of nutrient flows in integrated intensive aquaculture systems. *Aquacultural Engineering*, 32, 379-401.
- Secombes, C. H. and T. C. Fletcher (1992). The role of phagocytes in protective mechanism of fish. *Annu. Rev. Fish Dis.*, 2, 53-71.
- Su, C., L. Zhu, C. Zhang, X. Qi, Y. Guo and R. Gao (2012). Microbial community of aerobic granules for ammonium and sulphide removal in a sequencing batch reactor. *Biotechnology Letters*, 34, 883-888.
- Takahashi, Y., T. Itami and K. Konegawa (1986). Enzymatic properties of partially purified lysozyme from the skin mucus of carp (*Cyprinus carpio nudus*). *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 52(7), 1209-1214.
- Wang, Y. B., Z. Q. Tian, J. T. Yao and W. Li (2008). Effect of probiotics, *Enterococcus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. *Aquaculture*, 277(3-4), 203-207.
- Xu, W. J. and L. Q. Pan (2013). Enhancement of immune response and

- antioxidant status of *Litopenaeus vannamei* juvenile in biofloc-based culture tanks manipulating high C/N ratio of feed input. *Aquaculture*, 412-413, 117-124.
- Xu, X. Y., L. J. Feng, L. Zhu, J. Xu, W. Ding and H. Y. Qi (2012). Biofilm formation and microbial community analysis of the simulated river bioreactor for contaminated source water remediation. *Environmental Science And Pollution Research*, 19, 1584-1593.
- Yao, S., J. R. Ni, T. Ma and C. Li (2013). Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification at low temperature by a newly isolated bacterium, *Acinetobacter* sp. HA2. *Bioresource Technology*, 139, 80-86.
- Zhao, P., J. Huang, X. H. Wang, X. L. Song, C. H. Yang, X. G. Zhang and G. C. Wang (2012). The application of bioflocs technology in high-intensive, zero exchange farming systems of *Marsupenaeus japonicus*. *Aquaculture*, 354-355, 97-106.
- 박관하 (2011). 잉어(*Cyprinus carpio*)에서 어류 구충제에 대한 N-acetylcysteine (NAC)의 독성 저감 효과. *한수지*, 44(5), 484-489.
- 장인권 (2011). BFT를 이용한 친환경 고생산성 새우양식기술개발, 국립수산물과학원 사업보고서, TR-2011-AQ-027.
- 전세규, 오명주 (1989). 혈액성상에 따르는 양식어의 건강진단. *한국어병학회지*, 2(1), 19-29.
- 정승희, 서정수, 김진도, 최혜승, 박명애 (2011). 수산 양식어류의 혈액검사에 사용된 건식 자동생화학 분석기 (FUJIDRI-CHEM 3000) 의 활용 가능성. *한국어병학회지*, 24(3), 247-254.