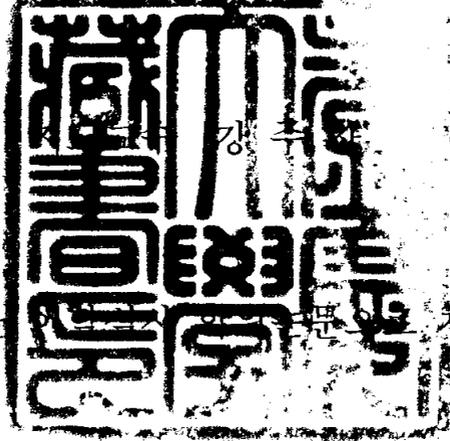


2003
2월
21일

이학석사 학위논문

구리 (Cu)의 사료 첨가에 따른
조피볼락, *Sebastes schlegeli*의 생리적

변화



이 논문을 본 대학 강추 본 대학 출판 부 출 함

2003년 2월

부경대학교 대학원

어 병 학 과

김 상 규

김상규의 이학석사 학위논문을 인준함.

2002年 12月 26日

주 심 농학박사 박수일



위 원 약학박사 정준기



위 원 이학박사 강주찬



목 차

목차	i
Abstract	ii
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	6
1. 실험어	6
2. 실험 환경	6
3. 실험 사료 및 사료 투여	6
4. 성장률 측정	7
5. 혈액 성분	9
6. 혈청 성분	10
7. 간 조직 표본 제작과 관찰	11
8. 유의성 검정	11
III. 결 과	12
1. 성장에 미치는 영향	12
2. 혈액 성분	20
3. 혈청 성분	20
4. 간 조직의 변화	27
IV. 고 찰	29
V. 요 약	35
VI. 감사의 글	37
VII. 참 고 문 헌	38

Physiological changes of black rockfish, *Sebastes schlegeli* on dietary copper

Sang-Gyu Kim

*Department of Fish Pathology, Graduate School
Pukyong National University*

Abstract

The toxic effects of dietary copper on growth, hematological parameters and lesion of hepatic tissue for black rockfish, *Sebastes schlegeli* were investigated for 60 days on experimental diets containing 0 (control), 50, 250 and 500 mg/kg.

Length and weight daily growth rate of black rockfish exposed to dietary Cu was significantly ($P < 0.05$) decreased after 30 days and growth rates were significantly decreased ≥ 250 mg/kg compared to controls. Feed efficiency was significantly reduced at these dietary Cu concentration. Fulton's condition factor (CF) was affected significantly in fish after 60 days at 50 mg/kg and after 20 days exposure to ≥ 250 mg/kg and then liver somatic index (LSI) was significant changes in fish after 50 days exposure to 250 mg/kg.

Hematological parameters were measured on hemoglobin, hematocrit, red blood cell (RBC) count, total protein, glucose, magnesium, calcium, glutamic oxalate transaminase (GOT) and glutamic pyruvate transaminase (GPT) in fish exposed to Cu concentration. RBC count of black rockfish exposed to dietary Cu was no significant difference from controls. Hemoglobin (Hb) and Hematocrit (Hct) of fish exposed to dietary Cu were significantly changes after 30 days at dietary Cu concentration.

Serum magnesium (Mg) and Calcium (Ca) of black rockfish exposed to dietary Cu was no significant difference from controls, but on the other hand total protein and glucose were affected significantly after 40 days from highly dietary Cu concentration. GOT and GPT activity of black rockfish exposed to dietary Cu was significant changes after 40 days from 500 mg/kg compared to controls.

In the primary exposed stage, the effect of hepatic tissue in black rockfish exposed to dietary Cu was observed enlargement of hepatocytes nuclei, activity of hepatic cells and the swelling of hepatic cells and capillary. While exposed time and concentration were

increased, the obvious granulation, irregular shape and necrosis of hepatic cells were observed.

It was observed granule degeneration and necrosis a part of cells in hepatic tissue after 60 days at 250 mg/kg and after 40 days at 500 mg/kg.

I. 서론

금속은 해수의 자연성분이며 토양과 암석의 풍화, 채광활동이나 화산 폭발 등으로부터 유래되었으나, 산업의 발달과 인구의 증가로 환경오염과 자연 생태계를 파괴하는 주요 원인이 된다. 연안환경으로 유출되는 금속은 산업구조의 변천과 더불어 금속 오염원의 종류에 있어서도 복잡하고 다양한 형태로 변모되며, 산업폐수나 산업폐기물의 형태로 자연환경에 노출된 금속은 직접적으로 또는 여러 가지 변화를 거치면서 간접적으로 생물체내에 흡수된다 (Bryan, 1976).

이러한 금속은 생물체내에 흡수되어 생물체들의 정상적인 생명활동을 유지하는데 이용되기도 하지만 독성작용을 하기도 한다. 그 중 한 종류는 정상적인 생화학적 반응과정에 필수적인 구리 (Cu), 아연 (Zn), 철 (Fe), 망간 (Mn) 등이며, 이 금속들은 필수 미량원소이지만 그 농도가 높아지면 세포의 구조적 이상 및 생화학적 기능의 장애로 인한 여러 측면의 생리화학적 불균형이 나타나 생물에게 독성 영향을 끼치게 된다. 또한 다른 한 종류는 어떤 확실한 생화학적 기능을 가지지 않는 금속들로서 카드뮴 (Cd), 수은 (Hg), 크롬 (Cr), 납 (Pb)등으로 이들은 수생생물에게 치명적인 독성 영향을 준다 (Viarengo, 1985).

현재 Cu를 이용하는 용도는 전기 통신 자재, 합금의 원료, 화학 촉매제, 선박용 부착 방지 도료, 조류부착방지제 및 목재 보존 재료의 다양한 용도로 사용되고 있다 (Clark, 1992). 산업의 발달로 인한 Cu 사용 증가는 자연생태계의 Cu의 양을 증가시키고 그로인한 독성이 수중생물에 미치는 영향은 점점 더 늘어나고 있다. 어류가 자연생태계에서 주 먹이로 이용하는 다모류, 이매패류, 복족류, 게

류 그리고 해조류에서 높은 농도의 Cu 축적이 보고 되기도 하였다 (Bryan, 1976). 특히 Cu는 십각류, 복족류, 두족류 등에 함량이 매우 높은데 이는 호흡 색소인 hemocyanin이 Cu를 함유하고 있기 때문이다. 예를 들면 과량의 Cu가 저장되는 경우 낙지류의 일종인 *Octopus vulgaris*의 간에서 4,800 ppm (Rocca, 1969), 닭새우류인 *Homarus gammarus*의 간 채장에는 2,000ppm의 Cu가 축적되었음이 조사되기도 하였고 (Bryan, 1964, 1968), 또한 굴도 과량의 Cu를 유주혈구에 저장하는데 20,000 ppm이 검출되기도 하였다 (Rainbow, 1990). 이러한 생물들은 Cu에 대한 내성이 강한 개체가 있을 수도 있으며 오염해역에 이동하는 동안 거의 치사 한계 농도의 Cu에 대하여 내성이 생겼을 수도 있다.

비록 먹이 노출이 수중 노출보다 독성영향이 낮게 나타날지라도 (Lundebye et al. 1999) 자연 상태의 어류에 있어서 중요한 오염 경로가 된다 (Dallinger and Kautzky, 1985). 또한 Cu는 Hg, Ag 다음으로 많은 해양생물에 독성이 있는 중금속이며 높은 농도에 노출이 될 가능성이 높다. 그 대표적인 예가 일반적으로 사용하는 선박의 외부 및 그물 망 등에 부착생물 부착 방지 도료에 Cu 성분이 많이 포함되어 있으며 먹이 사슬에 의해 높은 농도의 Cu에 노출 될 수 있다.

최근 전 세계적으로 수서동물에 대한 Cu의 독성 연구를 살펴보면 Zyadah and Abdel-Baky (2000)는 일부 수서생물에서 Cu 노출 시간이 길고 농도가 높을수록 사망률이 높아진다는 것을 연구하였으며, 또한 가재류 (*Cambarus bartonii*), 틸라피아 (*Oreochromis mossambicus*), 도류 (*Sparus sarba*), 무지개송어 (*Oncorhynchus mykiss*) 그리고 잉어 (*Cyprinus carpio*)에 대한 Cu 노출에 따른 사망률, 성장 그리고 생리학적 변화에 대하여 연구되어졌다 (Nussey et al. 1995; Marr et al. 1996; Wong et al. 1999; McGeer et al. 2000; Sherba et al. 2000; Flik et al 2002).

그러나 Cu의 대한 대부분의 연구는 수중 노출 상태에 관한 것 일뿐, 먹이 노출 상태의 연구에 대해서는 미미하며 보고 된 연구도 담수어종에 관한 것이 주종을 이루고 있다. 수중 노출 상태에서는 주로 아가미를 통하여 흡수되며 그 흡수된 중금속은 간이나 신장에서 해독 및 배설이 되고 그 외 조직으로 축적 혹은 재분배 된다 (Roesijadi and Robinson, 1994). 먹이 노출 상태는 주로 장에서 흡수되어 Cu가 보조인자인 효소를 함유한 적혈구와 같은 Cu가 많은 성분들에 의해 아가미 및 그 외 조직에 축적되는 것으로 추정하고 있다 (Lundebye et al., 1999). 또한 먹이 노출 상태로의 체내 유입에서 아가미와 비교하여 장 조직에 Cu 함량이 더 많이 증가하는 특징이 있다 (Handy, 1992). 최근 먹이 노출 상태의 Cu에 대한 연구는 연어 (*Salmo salar* L.)에서 Berntssen et al. (1999a)의 Cu 독성 수준에 대한 연구, Berntssen et al. (1999b)의 성장, 사료효율 및 영양단계에 대한 연구 그리고 Lundebye et al. (1999)의 생화학적·생리학적인 연구가 있다. 그리고 다른 어종인 경우 Handy et al. (1999)이 무지개송어 (*O. mykiss*)에서 혈액화학 및 성장에 대한 연구 그리고 Allinson et al. (2000)이 가재류 (*Cherax destructor*)에 대하여 연구하였다.

따라서 국내에서도 연안의 Cu에 대한 독성연구를 하고 있지만, 참굴 (*Crassostrea gigas*), 갈굴 (*Crassostrea rivularis*), 백합 (*Meretrix lusoria*), 진주담치 (*Mytilus edulis*), 참굴 (*Crassostrea gigas*,) 그리고 우렁쟁이 (*Halocynthia roretzi*) (Cho and Kim, 1971; Park and Kim, 1979; Choi et al., 1992; Kim et al., 2001) 등의 축적에 대한 연구가 주로 이루어지고 있으며 그 외에 방어 (*Seriola quinqueradiata*)와 돌돔 (*Oplegnathus fasciatus*)의 급성독성 (Park and Kim, 1979)과 곤쟁이 (*Neomysis awatschenis*)의 생존, 성장에 미치는 만성독성 (Kang et al.,

1997) 등에 대한 보고가 있으나 Cu의 장기 노출에 따른 해산어류의 만성 독성, 특히 먹이 오염에 의한 노출의 만성 독성에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 그리고 사료내 Cu 독성에 대한 연구는 대부분 1990년 이후에 이루어지고 있으나 아직 확실한 독성 영향을 평가하기가 부족하며 앞으로 더욱더 많은 연구가 이루어져야 한다.

또한 혈액학적 연구는 스트레스를 유발하는 유해물질들에 의하여 그 구성이 변동되므로 오염물질로 인한 각종 스트레스를 받은 어류의 혈액학적 성상 (haematological parameters)의 변화로 환경의 오염수준을 감지 할 수 있다. 그 예로 일반적인 인체 진단학 (human diagnostics)에서 널리 이용되는 혈청 내 전이 효소인 glutamic oxalate transaminase (GOT)와 glutamic pyruvate transaminase (GPT)를 들 수 있다. 이들 효소는 정상적인 조건하에서는 간의 세포막, 세포질 및 미토콘드리아 내에서 발견되지만, 세포가 손상을 입게 되거나 붕괴되었을 때에는 혈액으로 빠져 나오게 되어 혈청 내 활성이 상당히 증가하게 된다 (Bell, 1968; Sakamoto and Yone, 1978; Shich, 1978; Smith and Ramos, 1980).

또한 오염물질의 독성피해에 대한 민감한 지표로서 어류의 간을 생각할 수 있다. Lee et al. (2001)에 따르면 Cu노출은 간 조직에서 간 세포의 핵응축, 세포질의 혼탁 및 과립변성 등의 손상이 나타났는데, 이와 같은 현상은 Cu에 축적된 간 조직 등의 손상에서 나타나는 식육부진의 일부 원인일수 있다고 보고하였다 (De Boeck et al., 1997).

조피볼락 (*Sebastes schlegeli*)은 양볼락과에 속하는 난태생 어류로 우럭으로 불리며 비교적 낮은 수온에 서식이 가능하고 우리나라 남서해안, 일본 북해도 이남의 연안 그리고 중국 북부 연안에 분포하며 서식 수층은 저층이며 암초사이

에 살고 활동성이 적은 정착성 어류로 성장이 빠르고 저 수온에 강하여 양식 대상 어종으로서 산업적으로 가치가 높은 어류이다. 그리고 다른 어종에 비해 이동범위가 좁기 때문에 연안 또는 내만 지역에서 Cu와 같은 중금속에 노출시 많은 영향을 받는 것으로 생각되어 실험종으로 선택하였다. 따라서 본 연구는 Cu의 독성에 대한 성장, 혈액변동 및 간 조직에 미치는 영향을 관찰하고, 이를 바탕으로 Cu에 대한 독성 수준을 평가하여 Cu에 대한 양식어류와 수산자원 그리고 환경의 생태 분석에 대한 기초 자료로 활용하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험어

본 실험에 사용한 실험어는 경남 소재 수산종묘 배양장으로부터 조피볼락 (*S. schlegelii*)을 분양받아 유수식 실험 조건에서 4주 이상 순치시켰고, 외관상 질병의 증세가 나타나지 않는 건강한 개체들을 선별하여 체장 11.83 ± 0.03 cm, 체중 26.02 ± 0.23 g의 개체를 골라 실험에 사용하였다.

2. 실험 환경

본 실험은 부경대학교 수산과학연구소에서 시행하였으며, 실험 수조의 용량은 150 L 이고 1.2 L/min의 유속을 유지하는 유수식 방법을 사용하였다. 또한 한 수조를 4구획으로 나누어 사육하였고, 실험에 사용한 사육수의 수질은 Table 1에 나타내었다.

3. 실험 사료 및 사료 투여

실험에 사용한 기본 사료는 시판되는 조피볼락용 분말 사료 (천호제일사료, 한국)이었으며 사료의 조성은 Table 2와 같다. 실험 사료는 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

(Aldrich Chemical Co., USA)를 증류수에 녹이고, 오징어 간유 (이화유지, 한국)와 함께 기본 사료에 혼합한 것을 말하며 혼합기를 이용하여 잘 섞은 후 압출 성형기로써 펠렛화하고 24시간 건조 후에 냉동 보관하였다.

실험 사료에는 사료 kg 당 0, 50, 250, 500 mg의 Cu가 함유되게 하였고, 실험 기간 중 매일 각 농도별 시험구에 어체중 2%의 실험 사료를 먹였으며 실험기간은 총 60일이었다.

4. 성장률 측정

실험어는 각각의 농도별 시험구에서 실험 시작 후 10일 단위로 실험어의 전장과 체장을 측정하고, 체중을 전자저울 (HF-3000GD, A&D Company, Ltd., Japan)로 측정하여 다음과 같은 공식으로 DGR (일일성장률), CF (비만도 지수), growth rate (성장률), feed efficiency (사료 효율) 및 LSI (간 중량 지수)를 산출하였다.

일일성장률

$$DGR (\%) = \{[\ln (W_2) - \ln (W_1)] / (T_2 - T_1)\} \times 100$$

where W_1 and W_2 are mean body length and weight at the time when the first and second sample were taken (T_1 and T_2)

Table 1. Chemical analysis of the water used in bioassays

Item	Value
Temperature (°C)	18
pH	8.6
Dissolved oxygen (mg/ℓ)	6.8
NH ₄ ⁺ -N (μg-at N/ℓ)	1.41
NO ₂ -N (μg-at N/ℓ)	0.10
NO ₃ ⁻ -N (μg-at N/ℓ)	7.91
PO ₄ ³⁻ -P (μg-at P/ℓ)	0.63
COD (mg/ℓ)	1.2

Table 2. Composition of the experimental diet

Ingredient	Content (%)
Crude Protein	48.0
Crude Lipid	5.0
Carbohydrate	4.0
Crude ash	15.0
Calcium	1.0
Phosphorus	2.7
Copper	N.D.

N.D., not detected.

비만도 지수 (%)

$$CF (\%) = (W/L^3) \times 100$$

W = wet body weight (g), L = total length (cm)

성장률 (%)

$$\text{growth rate } (\%) = \{(W_f - W_i) / W_i\} \times 100$$

W_f = Length and Weight at the end of experiment

W_i = Length and Weight at the beginning of experiment

사료 효율 (%)

$$\text{Feed efficiency } (\%) = \{\text{Weight gain (g)} / \text{Feed intake (g)}\} \times 100$$

또한 간에 미치는 Cu의 영향을 파악하기 위하여 간 중량 지수를 계산하였다.

간 중량 지수 (%)

$$LSI (\%) = (\text{Liver wet weight} / \text{Total body wet weight}) \times 100$$

5. 혈액 성상

혈액은 혈액 응고 방지제인 heparin-Na (25,000 I.U., 중외제약)을 처리한 1ml 1회용 주사기를 사용하여 꼬리정맥 (caudal vein)으로부터 채혈하였다. 채혈한 혈액을 사용하여 적혈구 (Red Blood Cell)수, hemoglobin (Hb) 및 hematocrit (Hct)를

측정하였다 (Brown, 1980). 적혈구 수는 Hendrick's diluting solution으로 혈액을 1:200으로 희석한 후, hemocytometer (Improved Neubauer, Germany)를 이용하여 광학 현미경하에서 계수하였다. 혈중 Hb는 시판되고 있는 임상용 kit (Sigma Co.)를 이용하여 Cyan-methemoglobin법으로, Hct 값은 Hct용 모세관을 사용하여, microhematocrit centrifuge (Model; 01501, HAWKSLEY AND SONS Ltd., England)로 12,000rpm, 5분간 원심분리한 다음 판독판으로 측정하였다.

6. 혈청 성분

채취한 혈액을 1시간 동안 실온에 방치한 다음 4℃에서 2시간 동안 둔 후 6,000rpm, 5분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청은 냉장 보관하고, 8시간 이내에 분석하였다.

혈청내 무기성분으로서는 양적 변동을 조사하였다. 혈청 중 Mg의 정량은 Xylidyl blue method로 비색 정량하였고, Ca의 정량은 OCPC (o-cresolphthalein-complexon)법으로 시판되고 있는 임상용 kit (Asan Pharm. Co., Ltd.)를 사용하여 정량하였다.

혈청 중 유기성분 변화는 total protein, glucose의 변동을 조사하였다. total protein은 Biuret법으로, glucose는 GOD/POD법으로 임상용 kit (Asan Pharm. Co., Ltd.)를 사용하였다.

혈청 중 효소 활성의 변화로서는 GOT 및 GPT를 조사하였다. GOT와 GPT는 Reitman-Frankel법으로 임상용 kit (Asan Pharm. Co., Ltd.)를 사용하였다.

7. 간 조직 표본 제작과 관찰

Cu 노출에 의한 간 조직의 병변을 알기 위하여 상법에 따라 hematoxylin-eosin (H-E)으로 염색한 후 광학 현미경으로 관찰하였다.

8. 유의성 검정

결과의 통계적 처리는 SPSS 통계 프로그램 (SPSS Inc.)을 이용하여 ANOVA test를 실시한 후하였으며 사후 다중비교는 최소 유의성 검정 (Least-significance difference test)으로 평균간의 유의성 ($P < 0.05$)을 검정하였다.

Ⅲ. 결과

1. 성장에 미치는 영향

시간의 경과에 따른 전장 및 체중의 일일성장율은 Fig. 1~2에 나타났다. 전장의 일일성장률은 Cu를 경구 투여한지 30일째 Cu 500 mg/kg 시험구에서 유의하게 감소하기 시작하였으며, 40일 이후에는 모든 시험구에서 유의하게 감소하였다. 체중의 일일성장률은 Cu 250 mg/kg 이상의 시험구에서는 30일까지 급격히 감소하였으나 30일 이후부터 유의한 감소추세가 완만해졌다. 또한 40일 이후부터는 Cu 50 mg/kg의 시험구에도 유의한 감소를 보이기 시작하였다.

60일 후의 Cu의 투여가 실험어의 성장에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실험 사료 투여 후 60일째에 실험어에 대한 전장과 체중의 성장률을 조사한 결과는 Fig.3~4에 나타났다. 전장의 성장률은 Cu 250 mg/kg 이상의 시험구에서 유의한 감소가 관찰되었으며, 체중의 성장률도 Cu 농도가 높을수록 점점 감소되는 경향이 관찰되었고, 그중에서도 Cu 250mg/kg 이상인 시험구에서 유의하게 감소하였다.

비만도 지수는 전체적으로 볼 때 Cu 농도가 높을수록, 시간이 지날수록 감소하는 경향을 나타내고 있다. 내조구에 비교하였을 때 노출 20일째 Cu 250 mg/kg 이상의 시험구에서 유의적인 차이를 나타냈고, Cu 50 mg/kg의 시험구에서는 60일째 유의한 차이가 있었다 (Table 3).

사료 효율은 Cu 농도가 증가함에 따라 감소하는 경향을 나타내었으며 내조구에 비해 모든 시험구에서 유의한 감소를 보였다 (Fig. 5).

간 중량 지수는 Cu 250 mg/kg의 시험구에서만 50일 이후 유의한 차이를 나타내는 것이 특이적인 현상 이었다 (Table 3).

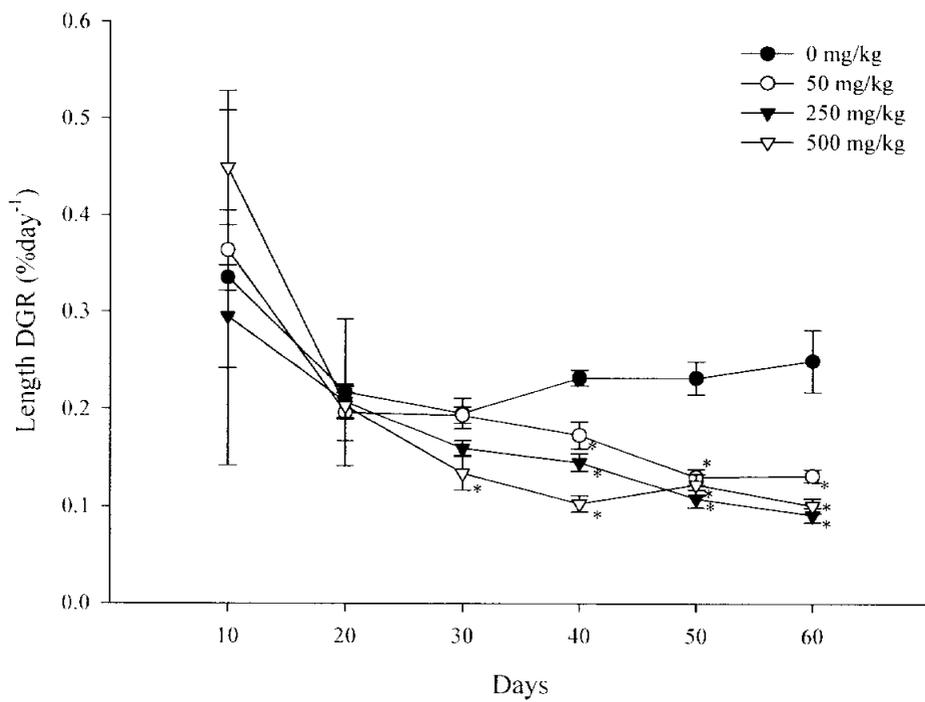


Fig. 1. Length daily growth rate of black rockfish, *Sebastes schlegelii* exposed to dietary Cu for 60 days. Vertical bar denotes a standard error. * Indicated a significant difference from control ($P < 0.05$).

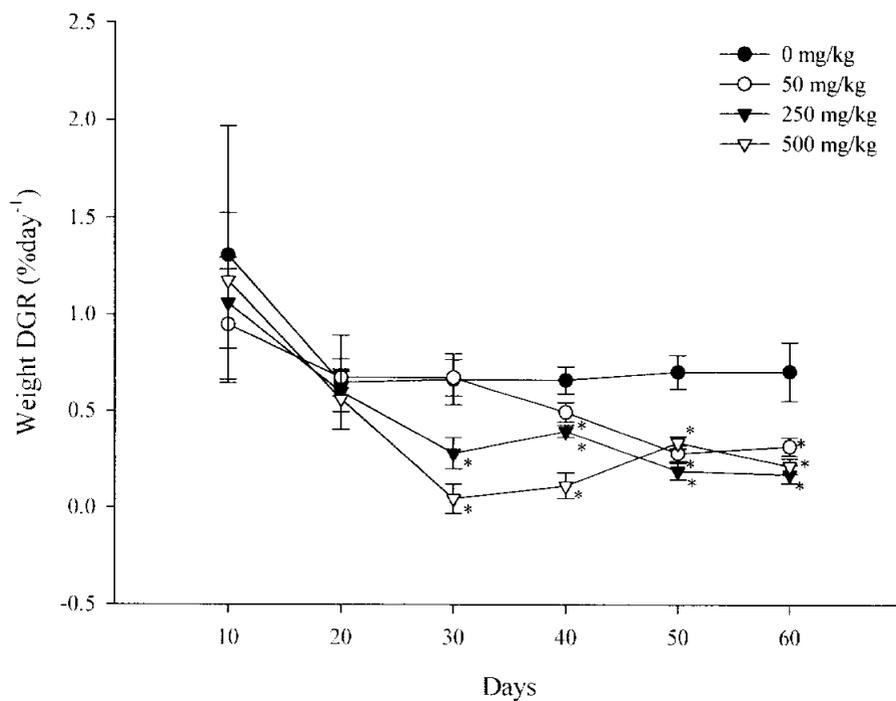


Fig. 2. Rate of daily weight gain of black rockfish, *Sebastes schlegelii* exposed to dietary Cu for 60 days. Vertical bar denotes a standard error. * Indicated a significant difference from control ($P < 0.05$).

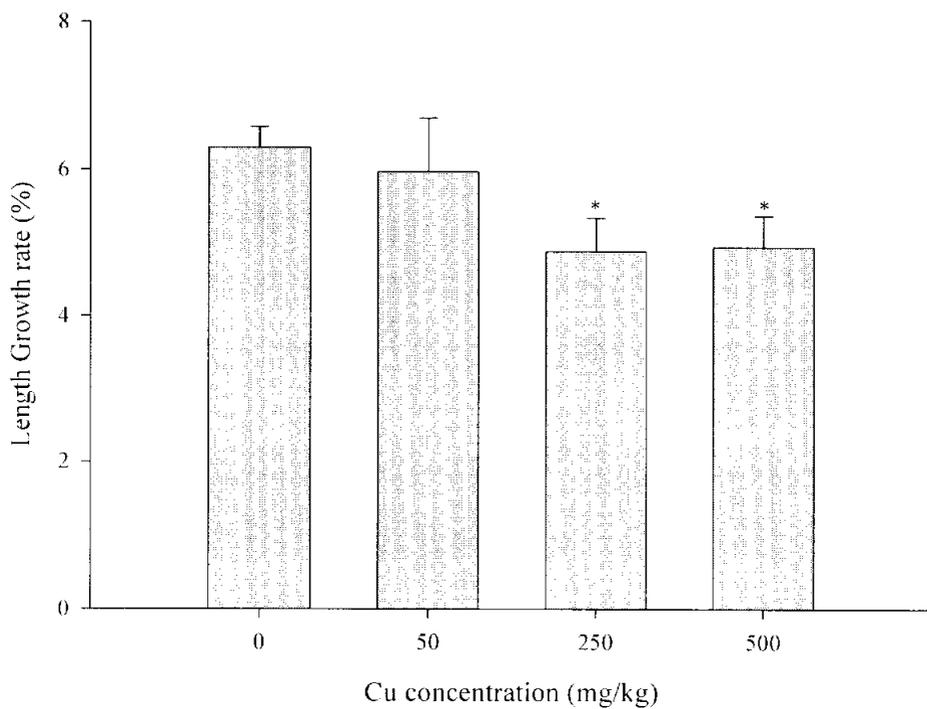


Fig. 3. Length growth rate of black rockfish, *Sebastes schlegeli* exposed to dietary Cu for 60 days. Vertical bar denotes a standard error. * Indicated a significant difference from control ($P < 0.05$).

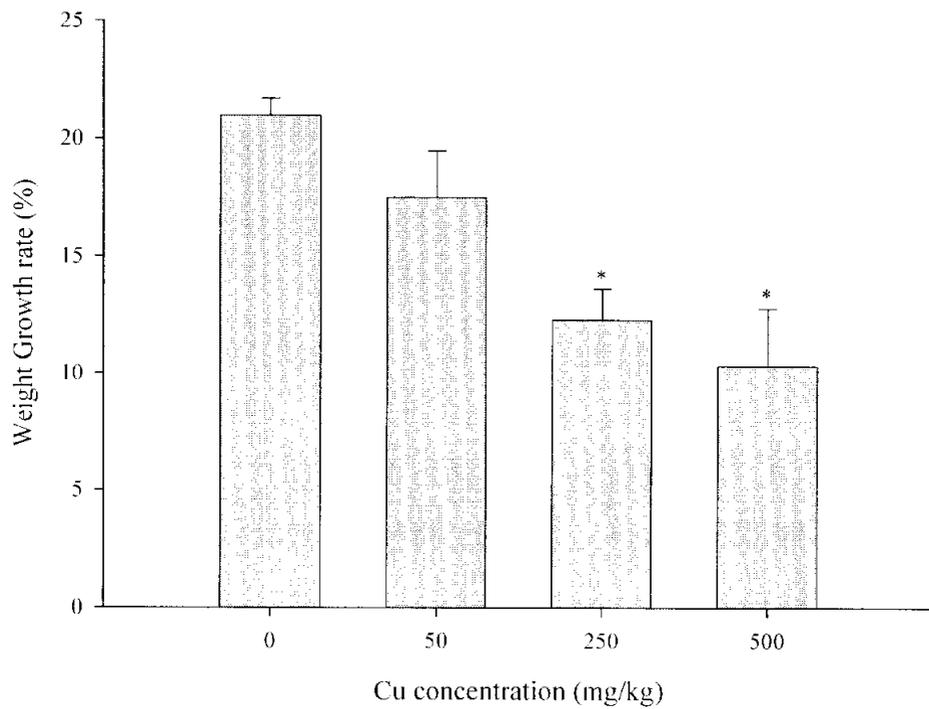


Fig. 4. Rate of weight gain of black rockfish, *Sebastes schlegeli* exposed to dietary Cu for 60 days. Vertical bar denotes a standard error. * Indicated a significant difference from control (P<0.05).

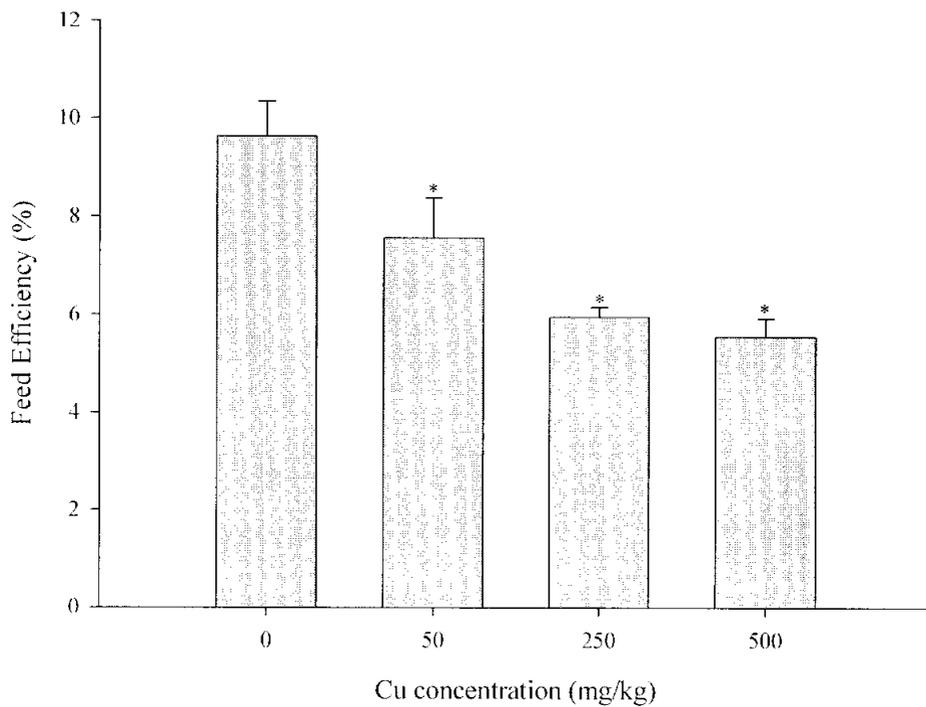


Fig. 5. Feed efficiency of black rockfish, *Sebastes schlegeli* exposed to dietary Cu for 60 days. Vertical bar denotes a standard error. * Indicated a significant difference from control ($P < 0.05$).

Table 3. Condition factor and Liver Somatic Index (LSI) of black rockfish, *Sebastes schlegeli* exposed to dietary Cu for 60 days (mean±S.E.¹)

Days	Cu concentration(mg/kg)				
	0	50	250	500	
CF	10	2.66±0.07	2.64±0.05	2.74±0.05	2.86±0.10
	20	2.59±0.04	2.64±0.03	2.76±0.06*	2.79±0.06*
	30	2.60±0.05	2.62±0.05	2.58±0.05	2.46±0.06
	40	2.58±0.05	2.55±0.02	2.58±0.03	2.51±0.04
	50	2.54±0.05	2.43±0.04	2.59±0.04	2.61±0.02
	60	2.63±0.10	2.43±0.05*	2.55±0.03	2.45±0.04
LSI	10	2.82±0.18	2.87±0.21	3.16±0.16	3.18±0.10
	20	3.17±0.15	3.14±0.11	3.27±0.12	3.32±0.15
	30	3.48±0.15	3.72±0.17	3.66±0.26	3.67±0.23
	40	4.01±0.14	3.51±0.19	3.65±0.14	3.53±0.18
	50	4.05±0.23	3.77±0.17	4.84±0.15*	3.78±0.10
	60	3.65±0.19	3.66±0.18	4.48±0.17 [†]	3.36±0.23

* Indicated a significant difference from control (P<0.05).

[†] Standard error.

2. 혈액 성상

Cu 노출에 따른 혈액 성상의 변화를 알기 위하여 적혈구 수, Hb 및 Hct에 대하여 측정한 결과는 Table 4에 나타났다. 적혈구 수는 모든 Cu 농도별 시험구에서 대조구에 비해 조금 감소하는 경향을 보였으나, 대조구 혹은 Cu 농도별 시험구 사이에 유의한 차이는 인정되지 않았다. 혈액 중 Hb 농도는 Cu 투여량이 증가하고 투여 시간이 경과함에 따라 감소하기 시작하였으며, Cu 250 mg/kg 이상인 시험구에서는 40일 이후, 50 mg/kg의 시험구에서는 50일 이후 유의한 감소를 보였다. Hct 값은 Cu 투여량의 증가와 투여 시간이 지속됨에 따라 감소하기 시작하여 Cu 250 mg/kg 이상의 시험구에서 30일 이후, 50 mg/kg의 시험구에서는 40일 이후부터 유의한 감소를 나타냈다.

3. 혈청 성분

Cu 노출 후 혈청 내 무기성분 중 Mg과 Ca의 변동을 조사한 결과 모든 시험구에서 대조구에 비해 조금의 변화는 나타났으나 대조구와 시험구 사이에 유의한 차이는 인정되지 않았다 (Table 5).

또한 혈청 내 유기성분의 변화를 알고자 total protein과 glucose의 양을 조사한 결과를 Fig. 8~9에 나타내었다. total protein 변화는 대조구에 비해 노출 40일째 Cu 500 mg/kg의 시험구에서 2.28 g/dl로 유의한 감소를 보였고, 50일째 Cu 250 mg/kg 이상의 시험구에서 2.36과 2.27 g/dl로 유의하게 감소하였으며, 60일째 모든 Cu의 농도별 시험구에서 2.46, 2.32 및 2.27 g/dl 로 유의차가 관찰되었다.

Table 4. The mean hematological parameters in the blood of black rockfish, *Sebastes schlegeli* exposed to dietary Cu for 60 days (mean±S.E.¹)

Days	Conc. (mg/kg)	RBC count (×10 ⁴ /mm ³)	Hemoglobin (g/dℓ)	Hematocrit (%)
10	0	208±15	13.9±0.6	31.9±0.8
	50	203±20	13.3±0.4	29.5±1.3
	250	199±12	13.1±0.1	32.5±0.5
	500	199±7	13.2±1.0	29.3±0.7
20	0	200±19	13.7±0.3	30.5±1.0
	50	181±5	13.3±0.2	28.3±0.6
	250	190±17	12.6±0.1	31.2±0.2
	500	172±2	12.5±0.8	29.3±1.3
30	0	197±2	13.6±0.1	27.5±0.3
	50	185±16	12.8±0.3	27.8±0.5
	250	188±18	12.0±1.2	26.1±0.3 [*]
	500	173±10	11.8±0.8	25.3±0.6 [*]
40	0	203±6	13.5±0.4	31.0±0.3
	50	194±8	12.6±0.3	26.5±0.7 [*]
	250	185±9	11.3±0.2 [*]	25.5±0.6 [*]
	500	169±31	11.3±0.1 [*]	24.8±0.4 [*]
50	0	206±6	14.0±0.1	30.8±0.3
	50	196±16	11.3±0.2 [*]	25.8±0.4 [*]
	250	191±34	10.4±0.3 [*]	25.3±0.6 [*]
	500	158±10	10.4±0.2 [*]	23.3±0.1 [*]
60	0	204±5	13.8±0.4	30.5±0.6
	50	175±17	9.5±0.3 [*]	25.4±0.7 [*]
	250	195±16	9.0±0.2 [*]	25.3±0.8 [*]
	500	189±29	8.7±0.4 [*]	22.4±0.9 [*]

* Indicated a significant difference from control (P<0.05).

¹ Standard error.

glucose 농도는 대조구에 비해 노출 50일째 Cu 250 mg/kg 이상 시험구에서 226

과 220 mg/dl 로 유의한 증가를 보였고, 60일째 Cu 500 mg/kg 시험구에서 238 mg/dl 로 유의하게 증가하였다($P < 0.05$).

Cu 노출로 인한 혈청 내 효소 활성의 변화를 알고자 GOT와 GPT를 지표로 조사한 결과를 Fig. 10~11에 나타냈다. 혈청 내 GOT는 노출 40일 이후 Cu 500 mg/kg 시험구에서, 60일째는 모든 Cu의 농도별 시험구에서 유의한 증가를 나타냈다. GPT는 노출 40일째 Cu 500 mg/kg 시험구에서 유의적인 증가를 볼 수 있었으나, GOT와는 달리 50일째 모든 Cu 농도별 시험구에서 그리고 60일째는 Cu 250 mg/kg 이상의 시험구에서 유의한 증가를 관찰할 수 있었다.

Table 5. Change of Mg and Ca in the serum of black rockfish, *Sebastes schlegeli* exposed by different dietary Cu concentration for 60 days (mean \pm S.E.¹)

Cu conc. (mg/kg)	Mg (mg/dl)	Ca (mg/dl)
0	3.16 \pm 0.23	13.20 \pm 0.11
50	3.49 \pm 0.49	13.70 \pm 0.15
250	3.79 \pm 0.50	13.24 \pm 0.27
500	3.51 \pm 0.51	13.44 \pm 0.21

¹ Standard error.

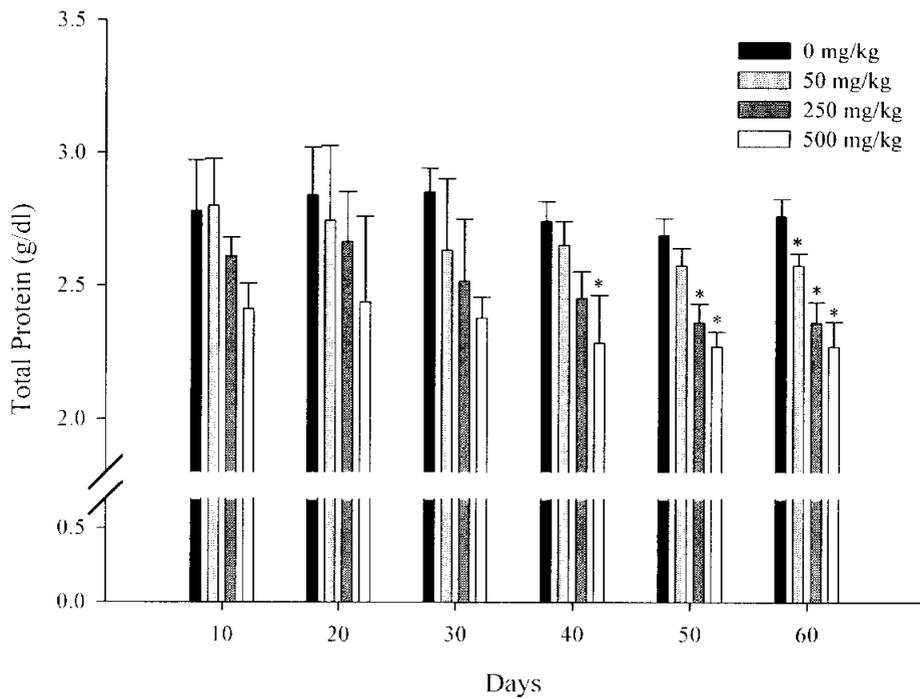


Fig. 8. Change of total protein in the serum of black rockfish, *Sebastes schlegeli* exposed by different dietary Cu concentration for 60 days. Vertical bar denotes a standard error. * Indicated a significant difference from control ($P < 0.05$).

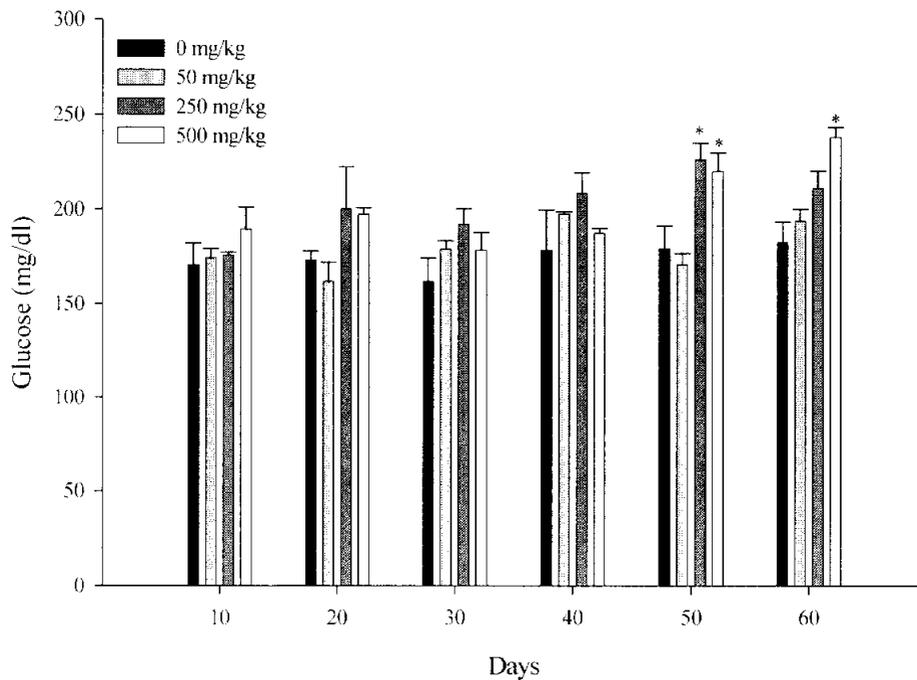


Fig. 9. Change of glucose in the serum of black rockfish, *Sebastes schlegeli* exposed by different dietary Cu concentration for 60 days. Vertical bar denotes a standard error. * Indicated a significant difference from control ($P < 0.05$).

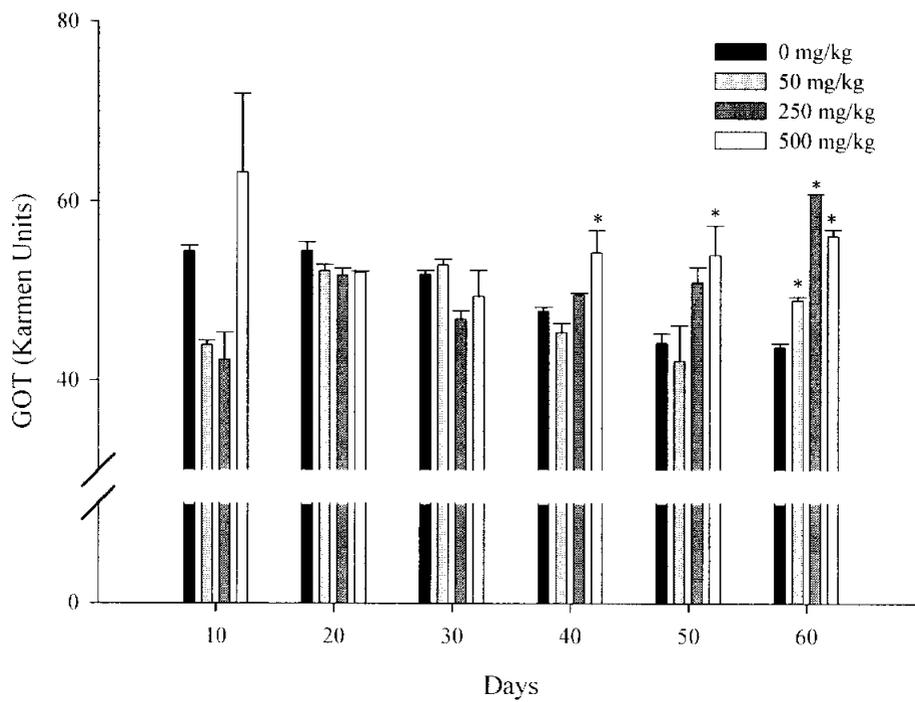


Fig. 10. Change of GOT in the serum of black rockfish, *Sebastes schlegeli* exposed by different dietary Cu concentration for 60 days. * Indicated a significant difference from control ($P < 0.05$).

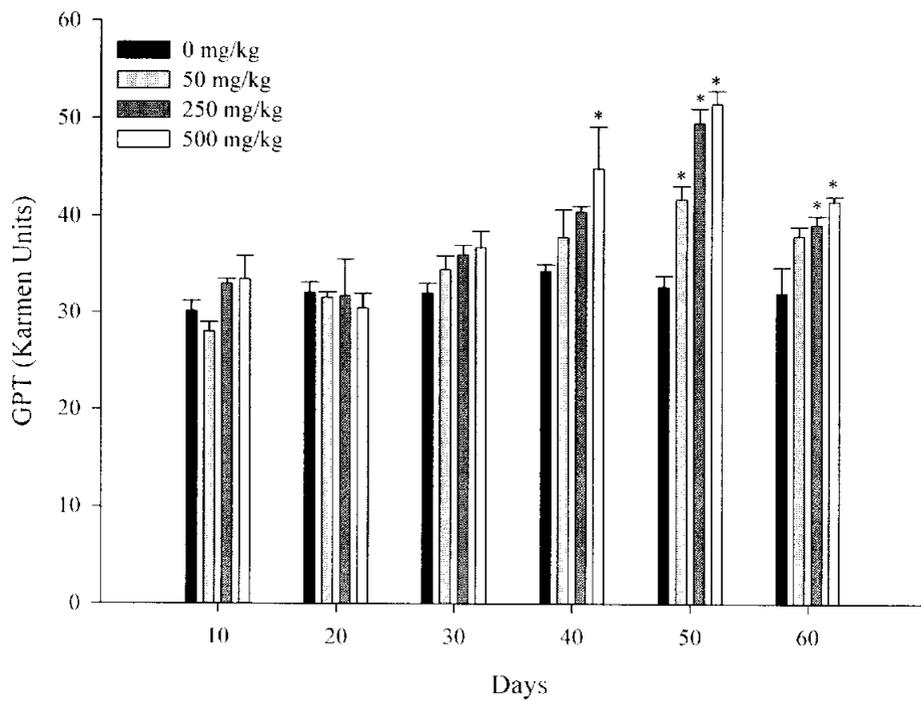


Fig. 11. Change of GPT in the serum of black rockfish, *Sebastes schlegeli* exposed by different dietary Cu concentration for 60 days. * Indicated a significant difference from control ($P < 0.05$).

4. 간 조직의 변화

대조구 시험어의 간 세포들은 둥근 다각형으로 핵은 매우 뚜렷하였고 각각의 간 세포삭을 하나의 구조 단위로 모여 있으며, 간 조직의 여러 부위에서 모세혈관이 확인되었다 (Fig. 12, A). 노출 10일째 Cu 50 mg/kg 시험구에서 시험어의 간 조직은 세포 핵의 팽창과 세포의 활성화 및 모세혈관의 팽창이 일부 관찰되었으며, 노출 30일째 Cu 250 mg/kg 시험구에서 뚜렷하게 관찰 할 수 있었다 (Fig. 12, B and C). 노출 40일째 Cu 250 mg/kg 시험구의 시험어에서 모세혈관이 더욱더 팽창 되었고, 간 세포의 형태가 불규칙 해지기 시작하였으며 일부 간 세포 내 세포질의 혼탁 현상이 나타났다 (Fig. 12, D). 노출 60일째 Cu 250 mg/kg 시험구와 노출 50일째 Cu 500 mg/kg 시험구에서 시험어 개체들의 간 조직에서 간 세포의 과립변성과 괴사된 조직상이 일부 관찰되었다 (Fig. 12, E). 노출 60일째 Cu 500 mg/kg 시험구에서는 간 세포의 과립변성과 괴사된 조직상이 더 뚜렷하게 나타났다 (Fig. 12, F).

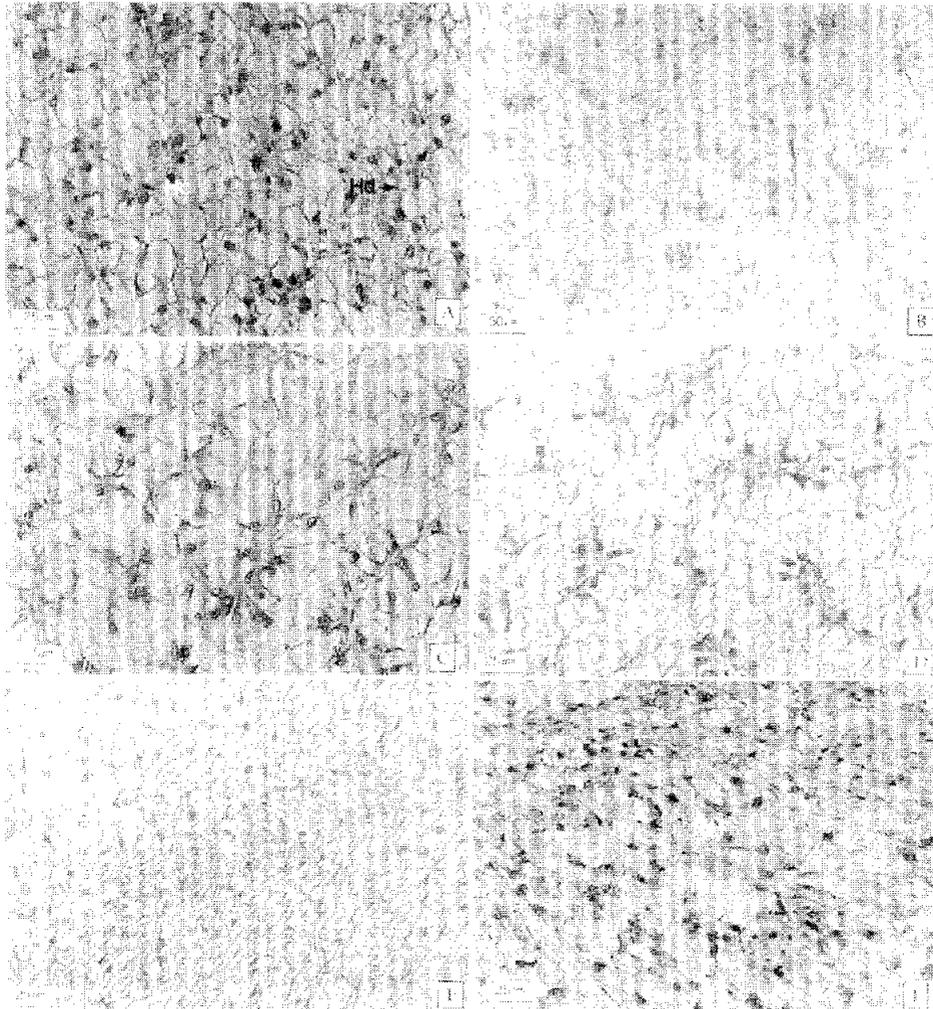


Fig. 12. Histological changes of liver of the black rockfish, *Sebastes schlegeli* exposed to dietary Cu. A, Control. The hepatic cord and hepatic cell; B, Cu 250 mg/kg/30days. The liver tissue showed enlargement of hepatocytes nuclei and the swelling of hepatic cells and of capillary; C, The magnification of figure B; D, Cu 250 mg/kg/40days. The liver tissue showed the swelling of capillary and cellular disarray; E, Cu 500 mg/kg/50days. The liver tissue showed some the granulation and necrosis of hepatic cells; F, Cu 500 mg/kg/60days. The liver tissue showed obvious the granulation and necrosis of hepatic cells. Abbreviations: Hc, hepatic cell; Hd; hepatic cord; N, necrosis.

IV. 고찰

필수 미량 금속은 생물체내에 흡수되어 생물체들의 정상적인 생명활동을 유지하는데 이용되기도 하지만, 그 농도가 일정 수준 이상으로 높아지면 세포의 구조적 이상 및 생체 기능의 장애로 여러 측면에서 생리학적 불균형이 나타나 독성 영향을 끼치게 된다. 예를 들면 무지개송어 (*O. mykiss*) 와 터봇 (*Scophthalmus maximus* (Linnaeus))에서 30 ~ 3000 mg/kg의 Zn이 함유된 건식사료를 먹었을 때 독성의 증거를 찾을 수 없었다 (Ogino and Yang, 1978; Wekell et al., 1983, 1986; Knox et al., 1984; Spry et al., 1988; Overmell et al., 1988a, b; Mount et al., 1994; Kóck and Bucher, 1997). 그러나 잉어 (*C. carpio*), 구피 (*P. reticulata*) 및 나일틸라피아 (*O. niloticus*)에서는 Zn에 대한 독성이 증명되었다 (Clearwater et al., 2002). 또한 Kang et al. (2001)이 넙치 (*P. olivaceus*)에 대한 Fe의 혈액학적 연구에서 Fe가 미량원소로서 영양학적인 면에서 중요성이 인정되지만 과다하여 독성 작용이 있음을 관찰하였고, Lee et al. (2001)도 Cu에 대한 넙치 (*P. olivaceus*)의 조직 병변을 보고하였다.

성장률에 있어서 Cu의 경우 Lanno et al. (1985)은 700 mg/kg이 함유된 사료를 먹었을 때 무지개송어 (*O. mykiss*)에서 성장 감소가 나타남을 보고하였다. Clearwater et al. (2002)은 어린 연어에서 34와 641 mg/kg 농도의 Cu가 함유된 건식사료를 먹었을 때 장내 세포 증식, 장내 apoptosis 그리고 장내 metallothionein 수준의 증가와 성장률의 감소에 대한 유의성을 보고하였다. 하지만 연어에 대한 Cu 연구에서 Berntssen et al. (1999b)은 Cu 35 mg/kg 투여구에서 성장이 촉진되는 경향이 있음을 밝혔고, Lorentzen et al. (1998)도 5 ~ 10 mg/kg

정도에서는 성장이 촉진된다고 보고하였다. 본 연구에서의 노출 기간에 따른 일일성장률은 대조구에 비교하였을 때 노출 40일째부터 모든 Cu 농도별 시험구에서 유의한 감소를 나타내었다. 또한 노출 농도에 따른 성장률은 Cu 250 mg/kg 이상 투여한 시험구에서만 유의한 감소가 관찰되었다. 비만도 지수는 노출 20일째 Cu 250 mg/kg 이상, 그리고 60일째 Cu 50 mg/kg에서 유의한 차이가 있었다. 사료 효율은 60일 동안 시험 사료를 투여한 후 대조구와 비교하였을 때 Cu 함량이 높을수록 점점 낮아져서 모든 Cu 투여 시험구에서 유의한 변화를 나타내었다. De Boeck et al. (1997)은 낮은 농도의 Cu에 노출 시켰을 때 사료소비는 증가하지만 성장률은 증가하지 않았으며, Cu의 첨가 농도가 높을수록 사료소비가 감소하는 것을 관찰하였다. 이상의 결과로부터 사료내 Cu가 조피볼락이 연어나 무지개송어 (*O. mykiss*)와 비슷하게 50 mg/kg 이상의 농도에서 독성 영향을 받는 것을 알 수 있었다.

간 중량 지수에 대한 조사결과 Cu 노출에 따라 간 중량 지수가 감소하는 경향이 나타났으며 노출 50일 이후부터 Cu 250 mg/kg 시험구에서 유의한 변화가 있었다. Norris et al. (2000)은 중금속에 오염된 물에 서식하는 송어류 (*Salmo trutta*)가 깨끗한 물에 서식하는 송어류 보다 간 중량 지수가 감소한다는 조사결과를 보고하였다. Gravato and Santos (2002)는 β -Naphthoflavone에 수중 노출된 농어류 (*Dicentrarchus labrax*)의 간 중량 지수는 노출 농도가 높아질수록 증가한다고 하였다. 이와 같이 오염물질에 노출된 어류의 간 중량 지수는 간 세포의 팽창 및 괴사에 의해 변화될 수 있다. 따라서 본 연구 결과에서 나타난 Cu 250 mg/kg를 투여한 시험구에 간 중량 지수가 증가한 것은 간 세포 팽창에 의한 것으로 보아 Cu가 간에 독성 작용을 일으켰을 것으로 생각된다.

혈액은 스트레스를 유발하는 오염물질들에 의하여 그 구성이 변동되므로 어류의 혈액학적인 변수 (hemtological parameters)에 대한 연구는 환경의 오염 수준을 감시하는 유용한 수단으로서 연구되고 있다 (Chandrasekar and Jayabalan, 1993).

Cu에 노출된 조피볼락에서의 적혈구 수는 전체적으로 시간이 흐를수록 Cu 농도가 높을수록 감소하는 경향이 있었으나 유의한 차이를 발견하지 못하였고, Hb 농도는 노출 40일째 이후 Cu 노출에 따른 감소가 나타났다. 그리고 Hct의 변화는 30일째부터 Cu 노출에 영향을 받아 유의한 감소를 보였다. 이러한 변화는 stress로 인해 체내에서 용혈이 나타나고 이것으로 인하여 미성숙 된 적혈구가 조혈기관으로부터 나오기 때문에 Hb와 Hct가 감소하는 현상이 나타나게 되며, 정상적인 적혈구가 증가하면 Hb와 Hct가 증가하게 되지만 미성숙한 적혈구는 혈액 내에서 증가함에도 불구하고 Hb와 Hct가 감소 할 수 있다 (Bhagwant and Bhikajee, 2000). 또한 Hb와 Hct의 감소에 대한보고는 사료내 Cu에 만성적으로 노출된 어류의 연구에서 Hb 농도와 Hct 변화에 대한 증가를 보고한 결과와 유사하였고 (Handy et al., 1999, Dethloff et al., 1999). 또한 Cd에 노출된 무지개송어 (*O. mykiss*)의 영향을 본 연구에서의 Hct의 감소를 나타낸 보고가 있다 (Ricard et al., 1998). 송어과 어류에 살충제와 중금속 노출 (Goel and Gupta, 1985; Chandrasekar and Jayabalan, 1993)시 stress 조건으로 혈액의 Hct가 전반적으로 감소한다는 연구가 있다. Nussey et al. (1995)의 경우 틸라피아에 대한 Cu 영향 연구에서 적혈구 수와 Hct에서 감소하는 결과를 조사한 보고가 있다. 이것은 Cu 노출에 의한 조혈기능을 하는 간과 신장의 anoxic 상태에 이르러 손상 또는 사망하는 개체가 생겨나거나 이로 인해 hemolytic anemia가 생겨 적혈구 수,

Hb 및 Hct가 감소하는 원인이 된다 (Sorensen, 1991). 이러한 결과에서 보면 Cu의 독성은 적혈구를 용혈 시켜 미성숙한 적혈구를 방출하게 함으로서 Cu 50 mg/kg 이상 시험구에서 Hb와 Hct에 영향을 줄 수 있다고 생각되어 진다.

사료로 인한 Cu 노출의 영향을 조사한 실험에서 혈청 중 무기성분인 Mg 및 Ca의 변동을 조사한 결과 유의한 변화가 나타나지 않으므로 중금속은 아니지만 생물에게 큰 독성이 있는 PCBs 등에 노출된 사례에서도 Mg과 Ca이 정상적 범위를 벗어났다는 보고 (Leatherland and Sonstegard, 1981)와는 달리 Cu 투여가 시험어의 무기 성분 에 미치는 영향은 거의 없는 것으로 생각되었다.

본 실험에서의 혈청 중의 total protein 및 glucose의 변동을 조사한 결과 Cu 노출시 total protein의 변동은 노출 40일째 Cu 500 mg/kg, Cu 250 mg/kg 이상 시험구에서 50일째, 모든 시험구에서 60일째부터 유의한 감소를 나타내었다. 이것은 Cu 노출이 carbohydrate metabolism을 활성화 시키고, protein의 catabolism과 glyconeogenesis를 자극하여 glucose의 합성을 유발하지만 이러한 기작에 의해서 Total protein이 감소한다고 볼 수 있다 (Pelgrom et al. 1995). 이와 같은 결과는 무지개송어 (*O. mykiss*)에서 사료를 통한 Cu의 만성적 영향에 대한 연구 (Handy et al., 1999)에서 찾을 수 있다. 또한 Cu에 노출된 송어류 (*Salvelinus fontinalis*)의 혈액 변화를 연구한 논문 (McKim et al., 1970)에서의 결과와 유사하다. Cu 노출에 따른 glucose의 변동은 노출 50일째 Cu 250 mg/kg 이상 시험구, 60일째 Cu 500 mg/kg 시험구에서 유의한 변화가 있었는데, 이와 관련한 연구에서 메기류 (*Ictalurus nebulosus* Lesueur)와 무지개송어 (*O. mykiss*)에서 종종 1회 반응 형태의 Cu 노출시 glucose의 증가가 관찰되지만 (Christensen et al., 1972; Laurén and McDonald, 1985; Nemcsók and Hughes, 1988) 이것은 1회 반응 형태의 일시적인

관찰이다 (Dethloff et al., 1999). 또한 혈청 glucose 농도가 올라가는 것은 carbohydrate metabolism의 활성화를 암시한다 (Pelgrom et al., 1995). 이러한 연구 결과에서 250 mg/kg 이상의 농도에서 Cu의 독성적인 영향을 받았다고 사료되어 진다.

Cu의 경구 투여 시험에 의한 조피볼락의 혈청 중의 GOT, GPT 변동을 조사한 결과, GOT의 활성을 대조구와 비교해 보면 노출 40일 이후 Cu 500 mg/kg 시험구에서 그리고 60일째 모든 시험구에서 유의하게 증가하였다. GPT의 활성은 Cu 50 mg/kg 시험구에서 노출 50일째, Cu 250 mg/kg 시험구에서 50일 이후 그리고 Cu 500 mg/kg 시험구에서 40일 이후 각각 유의한 변화가 관찰되었다. 이러한 현상은 Cu 독성에 의한 간 조직의 손상으로 인한 간 조직 내 GOT, GPT가 삼출되어 혈액 내 농도가 증가한 결과라고 생각 할 수 있다. 이와 관련한 연구로 송어류에 Cu를 노출 시켰을 때의 GOT 변화 (McKim et al., 1970)와 잉어 (*C. carpio*)에 Cd을 노출시켰을 때의 간 내의 GOT·GPT양의 변화 (De la Torre et al., 2000) 그리고 감성돔류 (*Sparus aurata*)에서 Cd 노출시 혈청 GOT·GPT 에 대한 연구 (Vaglio and Landriscina, 1999)가 있다. 이것으로 보아 사료내 Cu가 간 효소 활성에 미치는 영향이 50 mg/kg 이상에서 나타나고, 최고 농도에서 40일째부터 독성 영향이 나타난다고 생각되어 진다.

혈청 GOT와 GPT 활성은 간 세포의 변성이나 괴사를 반영하는 효소로서 간 장애의 조기진단에 불가결한 요소로 간 조직 손상 시 다량 혈중으로 유출되기 때문에 혈청의 간 기능 지표 효소 활성도로써 잘 알려져 있다 (Takeda et al., 1964). 척추동물의 간은 중금속의 저장과 1차적으로 해독 작용을 수행하는 생전환 (biotransformation)의 주요기관으로서 (Brown et al., 1984; Olsson et al., 1989),

연안오염지역을 생물 모니터링 (biomonitoring) 할 수 있는 대표적인 기관으로 알려져 있다 (Von Landwust et al., 1996; Broeg et al., 1999). Thophon et al. (2003)은 카드뮴에 노출된 흰바다 농어, *Lates calcarifer*의 간 조직에서 간 세포의 활성이 나타나고, Ptashynski et al. (2002)는 Ni에 노출된 송어류 (*Coregonus clupeaformis*)가 Ni 노출 농도 1000 $\mu\text{g/g}$ 에서 간 세포 괴사 등의 병변을 관찰하였으며, Lee et al. (2001)도 Cu의 수중 노출에 따라 넙치 (*P. olivaceus*) 간 세포의 핵 팽창, 간 세포의 활성화, 세포질 혼탁 및 괴사 현상이 나타남을 보고하였다.

본 연구에서 GOT와 GPT의 혈중 농도가 Cu 투여에 따라 상승하는 것을 볼 수 있듯이, 60일간의 Cu 투여함으로 인하여 시험어의 간 조직 병변이 나타나고 Cu의 투여량이 많아짐에 따라 간 세포의 활성, 간 세포 내 세포질의 혼탁 현상, 불규칙한 간 세포의 형태, 간 세포의 과립변성 및 괴사의 정도가 심화됨을 확인할 수 있었다. 이러한 일련의 변화를 분석 검토하여 본 실험에서는 Cu 50 mg/kg 이상 시험구에서 60일 이상 투여하면 시험어의 간 기능 및 조직에 영향을 주는 것으로 판단되었다.

이상의 결과와 논의로부터 Cu의 투여량이 50 mg/kg 이상에서 조피볼락의 체내로 흡수 되었을 때 여러 가지 생리적 측면에서 영향을 받을 것으로 생각된다. 즉 성장, 사료효율, 혈액성상 및 혈청 성분의 변화를 일으키며, 간 조직의 병변 현상이 관찰 되었다. 따라서 연안 등지에 서식하는 어류의 경우 먹이 등을 통해 50 mg/kg 이상의 Cu가 60일 이상 체내로 유입 될 경우 생리적 손상 등을 통해 자원감소가 초래될 것으로 예상된다.

V. 요약

사료를 통한 Cu에 대한 조피볼락 (*S. schlegeli*)에 미치는 독성 영향을 파악하기 위하여 Cu 50, 250 및 500 mg/kg로 60일 동안 실험을 실시하여 그들의 성장, 혈액학적인 반응 및 간 조직의 병변을 조사하였다.

Cu 투여에 의한 조피볼락의 전장과 체중의 일일성장률은 노출 30일 이후부터 유의적 감소 ($P < 0.05$)가 나타나기 시작하였고, 성장률은 Cu 250 mg/kg 이상 시험구에서 유의하게 감소하였다. 또한 사료 효율은 모든 농도의 시험구에서 유의한 변화가 있었다. 비만도 지수는 노출 60일째 Cu 50 mg/kg 시험구에서, 노출 20일째 Cu 250 mg/kg 이상의 시험구에서 유의한 영향이 나타났으며, 간 중량 지수는 노출 50일 이후 Cu 250 mg/kg 시험구에서 유의한 변화가 관찰되었다.

Cu의 노출로 인한 혈액 구성에 미치는 영향을 조사한 결과, 적혈구 수는 전 실험기간 동안 모든 시험구에서 유의한 변화가 없었지만, Hb 농도와 Hct는 노출 30일째 이후부터 유의하게 조사되기 시작하였다.

Cu에 노출된 어류의 혈청 내 무기 성분은 Mg과 Ca의 변동을 조사하였는데 유의한 변화는 관찰되지 않았으며, 혈청 유기 성분 중 total protein과 glucose는 노출 40일 이후 높은 Cu 농도에서부터 유의적 변화가 조사되었다.

Cu 노출로 인한 혈청 내 효소 활성은 GOT와 GPT에서는 노출 40일 이후 Cu 500 mg/kg 시험구에서부터 유의한 증가가 관찰되었다.

Cu 노출에 의한 시험어의 간 조직 영향은 노출 초기에 간 세포 핵의 팽창과 세포의 활성화 및 모세혈관의 팽창이 관찰되었으며, 노출 시간이 늘어나고 노출 농도가 높을수록 간 세포의 과립변성, 불규칙한 형태 및 괴사된 조직상이 관찰

되었다.

이것으로 Cu는 조피볼락에 있어서 독성이 관찰되며, Cu 50 mg/kg 이상의 농도에서 오랜 시간 노출 되었을 때 생리학적 영향들이 조사되었다.

VI. 감사의 글

항상 이맘때면 가슴 한 부분이 비어있는 듯한 느낌을 받습니다. 제가 지금 까지 잘 해왔는지 그리고 더 잘 할 수 있었는데 하는 반성도 생기고 앞으로 더 열심히 해야겠다는 다짐도 생겨납니다. 부족하나마 석사 과정을 마치고 이렇듯 한편의 논문을 만들기 위해서 옆에서 도와주시고 격려해 주신 고마운 분들께 감사의 마음을 전하고자 이 글을 씁니다.

제가 가야 할 길의 방향을 잡지 못하고 방황하고 있을 때 저의 손을 잡아 주시고 제가 오늘의 결실을 얻기까지 학문으로 마음으로 이끌어 주시고 미래를 생각할 수 있게 해주신 강주찬 교수님께 진심으로 감사드립니다. 항상 뒤에서 제가 잘 하고 있는지 잘 못 하는지를 지켜봐 주시고, 제 논문이 완성되기까지 관심을 가져 주시고 충고해 주신 박수일 교수님, 정준기 교수님, 정현도 교수님, 김기홍 교수님, 허민도 교수님께도 진심으로 감사드립니다.

지금의 나를 만들기 위해 항상 도움과 충고를 잊지 않고 옆에 있어준 수권환 경학 실험실원들에게 감사의 마음을 전합니다. 먼저 대선배님으로서 항상 친형님처럼 충고를 아끼지 않으신 김재원, 황운기 선배님, 언제나 후배에 대한 배려를 아끼지 않고 실험에 대한 관심과 조언을 해주신 지정훈 선배님, 후배를 생각하는 마음과 언제나 변함없는 관심을 가져준 장석우, 이근의 선배님, 언제나 떠들썩하지만 마음만은 누구보다 따뜻한 박대국 선배님, 언제나 실험실의 만언니로 후배들에게 살하는 민은영 후배님, 항상 열심히 하는 모습에 배울 것이 많은 최은정 후배님, 소리 없이 자기 자리를 지키는 것 같지만 언제나 자기 할 일에 최선을 다하는 송승엽 후배님, 항상 밝은 모습으로 실험실을 밝게 만들고 믿음직한 이영주 후배님, 언제나 웃음을 잃지 않고 열심히 부지런히 실험실 일을 도맡아 하는 금유화, 이채영, 이민경, 배미옥, 성선미, 강병욱, 박희주 후배님들, 실험실을 떠나 있지만 항상 후배들이 필요로 할 때면 옆에서 도와주시고, 힘들 때 옆에서 웃음을 잃지 않게 해주고, 실험을 하는데 있어서 불심양면으로 도와주신 구자근, 조규석 선배님, 그리고 이 실험을 처음부터 끝까지 같이 하면서 저의 실수를 감싸 주기도 하고 논문을 쓰는데 조언을 잊지 않고, 항상 관심을 베풀어 주신 김성길 선배님께 진심으로 감사한 마음을 전합니다. 또한 옆에서 지켜봐 주시고 도와주신 우승호 선배님과 천하제일 사료에 이상윤 선배님께 감사하고, 항상 친구로 옆에 있어준 상환이에게 고맙다는 마음을 전합니다.

언제나 제가 공부하는데 힘을 북돋워 준 고향에 있는 친구들과 저를 아는 모든 분들께 감사의 마음을 전하고, 격려와 관심으로 아껴준 큰형님, 큰형수님, 누나, 병상에 누워계신 매형, 작은형님 그리고 여섯 명의 조카들에게 사랑한다는 말을 전하고 싶습니다. 마지막으로 언제나 믿음과 사랑으로 지금의 제가 있게 만들어주신 아버지, 어머니께 이 논문을 바칩니다.

VII. 참고문헌

- Allinson, G., L.J.B. Laurenson, G. Pistone, F. Stagnitti and P.L. Jones, 2000. Effects of dietary copper on the Australian freshwater crayfish *cherax destructor*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 46, 117-123.
- Bell, G.R., 1968. Distribution of transaminase (amine transferases) in the tissue of pacific salmon (*Oncorhynchus*) with emphasis on the properties and diagnostic use of glutamic oxalacetic transaminases. *J. Fish. Res. Board Can.*, 25, 1247-1268.
- Berntssen, M.H.G., K. Hylland, S.E. Wendelaar Bonga and A. Maage, 1999a. Toxic levels of dietary copper in atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr. *Aquat. Toxicol.*, 46, 87-99.
- Berntssen, M.H.G., A.K. Lundebye and A. Maage, 1999b. Effects of elevated dietary copper concentrations on growth, feed utilisation and nutritional status of atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fry. *Aquaculture*, 174, 167-181.
- Bhagwant, S. and M. Bhikajee, 2000. Induction of hypochromic macrocytic anaemia in *Oreochromis* hybrid (Cichlidae) exposed to 100mg/L (sublethal dose) of aluminium. *Science and Technology, Research Journal, University of Mauritius*, 5, 9-20.
- Brown, B.A., 1980. Routine hematology procedures. In *Hematology: Principles & Procedures*. Lea & Febiger, Philadelphia, pp. 71-112.
- Brown, D.A., S.M. Bay, J.F. Alfafara, G.P. Hershelman and K.D. Rosenthal, 1984. Detoxification / toxification of cadmium in scorpionfish (*Scorpaena guttata*):

- acute exposure. *Aquat. Toxicol.*, 5, 93-107.
- Broeg, K., S. Zander, A. Diamant, G. Krüner, I. Paperna, and H.V. Westernhagen, 1999. The use of fish metabolic, pathological and parasitological indices in pollution monitoring. I. North Sea. *Helgoland Marine Res.*, 53, 171-194.
- Bryan, G.W., 1964. Zinc regulation in the lobster *Homarus vulgaris*. I. Tissue zinc and copper concentrations. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 44, 549-562.
- Bryan, G.W., 1968. Concentrations of zinc and copper in the tissues of decapod crustaceans. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 48, 303-321.
- Bryan, G.W., 1976. Heavy metal contamination in the sea. In *Marine Pollution*, R. Johnston, eds., Academic Press, New York, pp 185-302.
- Chandrasekar, S. and N. Jayabalan, 1993. Hematological responses of the common carp, *Cyprinus carpio* L. exposed to the pesticide endosulfan. *Asian Fish. Sci.*, 6, 331-340.
- Cho Y.K. and C.K. Kim, 1971. Accumulation of heavy metal in shellfish. I. On the copper content in green oysters. *J. Korean Fish. Soc.* 4, 61-65.
- Choi H.G., J.S. Park and P.Y. Lee, 1992. Study on the heavy metal concentration in mussel and oyster from the Korean coastal water. *J. Korean Fish. Soc.*, 25, 485-494.
- Christensen, G.M., J.M. McKim, W.A. Brungs and E.P. Hunt, 1972. Changes in the blood of the brown bullhead (*Ictalurus nebulosus* Lesueur) following short and long term exposure to copper (II). *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 23, 417-427.
- Clark R.B., 1992. V. Metal. In *Marine pollution*, Oxford university press, New York. pp 74-77.
- Clearwater S.J., A.M. Farag and J.S. Meyer, 2002. Bioavailability and toxicity of dietborne

- copper and zinc to fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 132C, 269-313.
- Dallinger, R. and H. Kautzky, 1985. The importance of contaminated food for the uptake of heavy metals by rainbow trout (*Salmo gairdneri*): a field study. *Oecologia*, 67, 82-89.
- De Boeck, G., A. Vlaeminck and R. Blust, 1997. Effects of sublethal copper exposure on copper accumulation, food consumption, growth, energy stores, and nucleic acid content in common carp. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 33, 415-422.
- De la Torre, F.R., A. Salibián and L. Ferrari, 2000. Biomarkers assessment in juvenile *Cyprinus carpio* exposed to waterborne cadmium. *Environ. Pollut.*, 109, 277-282.
- Dethloff, G.M., D. Schlenk, S. Khan and H.C. Bailey, 1999. The effect of copper on blood and biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 36, 415-423.
- Flik, G., X.J.H.X. Stouthart, F.A.T. Spanings, R.A.C. Lock, J.C. Fenwick and S.E. Wendelaar Bonga, 2002. Stress response to waterborne Cu during early life stages of carp, *Cyprinus carpio*. *Aquat. Toxicol.* 56, 167-176.
- Goel, K.A. and K. Gupta, 1985. Haematobiochemical characteristics of *Heteropneustes fossilis* under the stress of zinc. *Indian J. Fish.*, 32, 256-260.
- Gravato, C. and M.A. Santos, 2002. Liver phase I and phase II enzymatic induction and genotoxic responses of β -Naphthoflavone water-exposed sea bass. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 52, 62-68.
- Handy, R.D., 1992. The assessment of episodic metal pollution. II. The effects of cadmium

- and copper enriched diets on tissue contaminant analysis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Arch. Environ. Contam. Toxicol., 22, 82-87.
- Handy, R.D., D.W. Sims, A. Giles, H.A. Campbell and M.M. Musonda, 1999. Metabolic trade-off between locomotion and detoxification for maintenance of blood chemistry and growth parameters by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during chronic dietary exposure to copper. Aquat. Toxicol., 47, 23-41.
- Kang J.C., H.Y. Kim and P. Chin, 1997. Toxicity of copper, cadmium and chromium on survival, growth and oxygen consumption of the mysid, *Neomysis awatschensis*. J. Korean Fish. Soc., 30, 874-881.
- Kang J.C., J.H. Jee and K.S. Cho, 2001. Hemochemical changes in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* exposed to various iron concentrations. J. Fish Pathol., 14, 37-45.
- Kim S.G., H.S. Kwak, C.I. Chol and J.C. Kang, 2001. Accumulation of heavy metals by sea squirt, *Halocynthia roretzi*. J. Korean Fish. Soc., 34, 125-130.
- Knox, D., C.B. Cowey and J.W. Adron, 1984. Effects of dietary zinc intake upon copper metabolism in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Aquaculture, 40, 199-207.
- Köck, G. and F. Bucher, 1997. Accumulation of zinc in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after waterborne and dietary exposure. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 58, 305-310.
- Lanno, R.P., S.J. Slinger and J.W. Hilton, 1985. Effects of ascorbic acid on dietary copper in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). Aquaculture, 49, 269-287.
- Laurén, D.J. and D.G. McDonald, 1985. Effects of copper on branchial

- ionoregulation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. J. Comp. Physiol. 155B, 635-644.
- Leatherland, J.F. and R.A. Sonstegard, 1981. Effect of dietary mirex and PCBs on calcium and magnesium metabolism in rainbow trout, *Salmo gairdneri* and coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*; A comparison with great lakes coho salmon. Comp. Biochem. Physiol. 69C, 345-351.
- Lee J.S., J.C. Kang, Y.K. Shin, K.H. Ma and P. Chin, 2001. Histological responses of the flounder, *Paralichthys olivaceus* exposed to copper. J. Fish Pathol., 14, 81-90.
- Lorentzen, M., A. Maage and K. Julshamn, 1998. Supplementing copper to a fish meal based diet fed to atlantic salmon parr affects liver copper and selenium concentrations. Aquacult. Nutr., 4, 67-77.
- Lundebye, A.K., M.H.G. Berntssen, S.E. Wendelaar Bonga and A. Maage, 1999. Biochemical and physiological responses in atlantic salmon (*Salmo salar*) following dietary exposure to copper and cadmium. Mar. Poll. Bull., 39, 137-144.
- Marr, J.C.A., J. Lipton, D. Cacela, J.A. Hansen, H.L. Bergman, J.S. Meyer and C. Hogstrand, 1996. Relationships between copper exposure duration, tissue copper concentration, and rainbow trout growth. Aquat. Toxicol., 36, 17-30.
- McGeer, J.C., C. Szebedinszky, D.G. McDonald, and C.M. Wood, 2000. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout. 1: Iono-regulatory disturbance and metabolic costs. Aquat. Toxicol. 50, 231-243.
- McKim, J.M., G.M. Christensen and E.P. Hunt, 1970. Changes in the blood of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) after short-term and long-term exposure to copper. J. Fish. Res.

Bd. Canada, 27, 1883-1889.

- Mount, D.R., A.K. Barth, T.D. Garrison, K.A. Barten and J.R. Hokett, 1994. Dietary and waterborne exposure of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to copper, cadmium, lead and zinc using a live diet. *Environ. Toxicol. Chem.*, 13, 2031-2041.
- Nemcsók, J.G. and G.M. Hughes, 1988. The effect of copper sulphate on some biochemical parameters of rainbow trout. *Environ. Pollut.*, 49, 77-85.
- Norris, D.O., J.M. Camp, T.A. Maldonado and J.D. Woodling, 2000. Some aspects of hepatic function in feral brown trout, *Salmo trutta*, living in metal contaminated water. *Comp. Biochem. Physiol.*, 127C, 71-78.
- Nussey, G., J.H.J. Van Vuren and H.H. du Preez, 1995. Effect of copper on the haematology and osmoregulation of the Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae). *Comp. Biochem. Physiol.*, 111C, 369-380.
- Ogino, C. and G.Y. Yang, 1978. Requirement of rainbow trout for dietary zinc. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 44, 1015-1018.
- Olsson, P.E., A. Larsson, S. Maage, C. Haux, K. Bonham, M. Zafarullah and L. Gedamu, 1989. Induction of metallothionein synthesis in rainbow trout, *Salmo gairdneri*, during long-term exposure to water borne cadmium. *Fish Physiol. Biochem.*, 6, 221-229.
- Overnell, J., T.C. Fletcher and R. McIntosh, 1988a. Factors affecting hepatic metallothionein levels in marine flatfish. *Mar. Environ. Res.*, 24, 155-158.
- Overnell, J., T.C. Fletcher and R. McIntosh, 1988b. The apparent lack of effect of supplementary dietary zinc on zinc metabolism and metallothionein concentrations in

- the turbot, *Scophthalmus maximus* (Linnaeus). J. Fish Biol., 33, 563-570.
- Park J.S. and H.G. Kim, 1979. Bioassays on marine organisms. II. Acute toxicity test of mercury, copper and cadmium to clam, *Meretrix lusoria*. J. Korean Fish. Soc. 12, 113-117.
- Park J.S. and H.G. Kim, 1979. Bioassays on marine organisms. III. Acute toxicity test of mercury, copper, cadmium and to yellowtail, *Seriola quinqueradiata* and rock bream, *Oplegnathus fasciatus*. J. Korean Fish. Soc. 12: 119-123.
- Pelgrom, A.M.G.J., R.A.C. Lock, P.H.M. Balm and S.E. Wendelaar Bonga, 1995. Integrated physiological response of tilapia, *Oreochromis mossambicus*, to sublethal copper exposure. Aquat. Toxicol., 32, 303-320.
- Ptashynski, M.D., R.M. Pedlar, R.E. Evans, C.L. Baron and J.F. Klaverkamp, 2002. Toxicology of dietary nickel in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). Aquat. Toxicol., 58, 229-247.
- Rainbow, P.S., 1990. Heavy metal levels in marine invertebrates. In *Heavy Metals in the Marine Environment*, R.W. Furness and P.S. Rainbow, eds., CRC Press, Florida, pp 67-80.
- Ricard, A.C., C. Daniel, P. Anderson and A. Hontela, 1998. Effects of subchronic exposure to cadmium chloride on endocrine and metabolic functions in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 34, 377-381.
- Rocca, E., 1969. Copper distribution in *Octopus vulgaris* Lam. hepatopancreas. Comp. Biochem. Physiol. 28, 67-82

- Roesijadi, G. and W.E. Robinsion, 1994. Metal regulation in aquatic animals : Mechanisms of uptake, accumulation, and release, In *Aquatic Toxicology*, D.C. Malins and G.K. Ostrander, eds., Lewis Puvlishers, Boca Raton, pp 387-420.
- Sakamoto, S. and Y. Yone, 1978. Effect of starvation on hematological characteristics, and content of chemical components and activities of enzymes in blood serum of red sea bream. *J. Fac. Agric. Kyushu Univ.*, 23, 63-69.
- Sherba, M., D.W. Dunham and H.H. Harvey, 2000. Sublethal copper toxicity and food response in the freshwater crayfish, *Cambarus bartonii* (Cambaridae, Decapoda, Crustacea). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 46, 329-333.
- Shich, M.S., 1978. Changes of blood enzymes in brook trout induced by infection with *Aeromonas salmonicida*. *J. Fish Biol.*, 11, 13-18.
- Smith, A.C. and F. Ramos, 1980. Automated chemical analysis in fish health assessment. *J. Fish Biol.*, 17, 445-450.
- Sorensen, E.M.B., 1991. Copper. In *Metal Poisoning in Fish*, CRC Press, Boston, pp 235-284.
- Spry, D.J., P.V. Hodson and C.M. Wood, 1988. Relative contributions of dietary and waterborne zinc in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 45, 32-41.
- Takeda, Y., A. Ichihara, H. Tanioka and H. Inowe, 1964. The effect of corticosteroids on leakage of enzyme from dispersed rat liver cell. *J. Biol. Chem.*, 239, 3590-3596.
- Thophon, S., M. Kruatrachue, E.S. Upatham, P. Pokethitiyook, S. Sahaphong and S.

- Jaritkhuan, 2003. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. *Environ. Pollut.*, 121, 307-320.
- Vaglio, A. and C. Landriscina, 1999. Changes in liver enzyme activity in the teleost *Sparus aurata* in response to cadmium intoxication. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 43, 111-116.
- Viarengo, A., 1985. Biochemical effects of trace metals. *Mar. Pollut. Bull.*, 16, 153-158
- Von Landwust, C., S. Holst, H. Moller, K. Anders, M. Momme, N. Von Neuhoff, W. Scharenberg, N. Weis, K. Lee, A. Kohler-Gunther, P. Cameron, F. Brauer, J.J. Pluta, R. Kruse, U. Ballin, K. Soffker, and V. Dethlefsen, 1996. *Fischkrankheiten in der Nordsee. Umweltbundesamt Nr. 106 03 900, UBA Texte 57/96, Umweltbundesamt Berlin, pp 1-557.*
- Wekell, J.C., K.D. Shearer and C.R. Houle, 1983. High zinc supplementation of rainbow trout diets. *Prog. Fish-Cult.*, 45, 144-147.
- Wekell, J.C., K.D. Shearer and E.J. Gauglitz, 1986. Zinc supplementation of trout diets: tissue indicators of body zinc status. *Prog. Fish-Cult.*, 48, 205-212
- Wong, P.P.K., L.M. Chu and C.K. Wong, 1999. Study of toxicity and bioaccumulation of copper in the silver sea bream *Sparus sarba*. *Environ. Int.*, 25, 417-422.
- Zyadah, M.A., T.E. Abdel-Baky, 2000. Toxicity and bioaccumulation of copper, zinc, and cadmium in some aquatic organisms. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 64, 740-747.