



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](#)

이 학 석 사 학 위 논 문

저질의 높이 변화에 따른 미꾸리,
*Misgurnus Anguillicaudatus*의
혈액학적 성상, 항산화 및 생리학적
변화

2023년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수산생명의학과

김빛슬여울에든가오름

이 학 석 사 학 위 논 문

저질의 높이 변화에 따른 미꾸리,
*Misgurnus Anguillicaudatus*의
혈액학적 성상, 항산화 및 생리학적
변화

지도교수 강 주 찬

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함.

2023년 2 월

부 경 대 학 교 대 학 원

수산생명의학과

김빛술여울에든가오름

김빛솔여울에든가오름의 이학석사
학위논문을 인준함.

2023 년 2 월 17 일



위 원 장	이학박사	김 광 일 (인)
위 원	이학박사	김 기 홍 (인)
위 원	이학박사	강 주 찬 (인)

목 차

목 차	i
Abstract	ii
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	6
1. 실험어 및 실험환경	6
2. 저질 성분	7
3. 생존률 및 성장률	8
4. 수질 및 저질 분석	9
5. 혈액학적 분석	10
6. 항산화효소 분석	11
7. Cortisol activity	12
8. Heat Shock protein 70 activity	12
9. 유의성 검정	12
III. 결과	13
1. 생존률	13
2. 성장률	15
3. 수질 및 저질 환경	17
4. 혈액학적 분석	19
5. 항산화효소 분석	24
5-1. SOD	24
5-2. CAT	28
6. Cortisol 분석	32
7. Heat shock protein 70 분석	34
IV. 고찰	38
요 약	46
참고문헌	47

Alterations of hematological, antioxidant and physiological response in
pond loach, *misgurnus anguillicaudatus* by height of muddy sediment

Kim bit sol Ye Ul E Den Ka Orem

Abstract

In order to confirm changes in hematological, antioxidant and psychological stress response of pond loach following exposure to different muddy sediment height each water tank, centimeter levels of 0, 3, 6, 9, 12 cm for 4 weeks were exposed pond loach, *misgurnus anguillicaudatus* (length 8.75 ± 1.75 cm, weight 10.52 ± 1.62 g). survival rate significantly increase above 6 cm height of sediment. Growth factor not show significantly changed. All water tank environment factor, ammonia, nitrate, phosphate, COD of sediment did not show significantly changed.

Hematological marker of RBC count, Hemoglobin, Hematocrits did not showed a significantly changed. Plasma organic component glucose decreased at 9 cm at 2 weeks, and at 6 cm at 4 weeks, but total protein did not show significant changed. Plasma enzymes, GOT and GPT, show significant decrease at 9 cm at 4 weeks. Plasma minerals calcium and magnesium did not show significant changes. Antioxidant response was analyzed using liver, gills and intestine. SOD observed significant decrease at liver and gill tissue. but did not show observed changed at intestine. stress hormone Cortisol show decrease above 3 cm at 4 week. HSP70 (Heat shock protein 70) observed significant decrease liver, gill and intestine.

In conclusion, muddy sediment induce to relive stress to pond loach, *misgurnus anguillicaudatus*.

I.서론

2022년 현재 1인당 수산물 소비량은 연평균 1-2%의 증가세를 보이고 있으나 국내의 내수면어업 생산량은 감소하고 있는 추세이다. 이에 대해서는 다양한 이유가 있으나, 사육 기간과 경제성의 이유로 국내 생산은 하락하고 많은 양을 수입에 의존하고 있다. 미꾸리(*Misgurnus anguillicaudatus*)는 동아시아지역에서 전통적으로 양식해오던 소형 담수어류이며, 우리나라에서도 추어탕을 비롯한 다양한 기호식품으로 사용되고 있다. 미꾸리는 내수면어업 생산실적 상위 10위의 품종이나(해양수산부, 2020)이다. 2021년 소비량은 총 9,154톤이지만 국내 양식 생산량은 678톤으로 총소비량의 7%에 불과하며 나머지 93%의 대부분은 모두 수입에 의존하고 있는 실정이다.(해양수산부, 2020) 특히 미꾸리는 실내 양식이 까다로워 국내에 있는 대부분의 미꾸리 양식장은 노지에 있으나, 노지 양식의 경우 기온, 영양염류, 환경오염 등 인간이 제어 불가능한 자연환경에 영향을 많기에(Liu et al., 2021), 사육자의 인공적인 제어가 어려운 면이 존재한다. 미꾸리의 양식을 위한 유전 공학적(Kim et al., 1993) 및 개량에 관한 연구(Kim et al., 2012)는 많았으나 실내 사육의 환경적인 요건에 관한 연구는 많지 않은 실정이다. 미꾸리는 타 어류와는 다르게 장호흡이 가능하고(Brian and Warren, 1987) 겨울철 논에서 월동하는 등(Michiaki et al., 1999) 타 어류에 비해 저질환경의 유무가 중요하다고 보여진다. 노지 양식장과 실내 양식장의 환경적인 차이점 중 하나는 수계내의 저질의 유무라고 판단되어 실내 수조에 저질의 높이에 따른 환경 차이를 만들고 본 연구를 수행하였다. 저질은 담수계에서 영양염의 순환에서 중요한 역할을 하고 저질의 pH의

변화에 따라 빈산소를 발생시키거나 영양염류의 불균형으로 인하여 적조현상이 일으킬 수 있기에, 담수계에서는 저질 또한 수산생물의 생태에 영향을 주는 하나의 요소이다(Boyd et al 1994). 또한 저서층에 존재하는 장애물이나 자갈층에 몸을 숨기는 도피 행동처가 되거나 알을 낳는 생식 활동을 하는 매개체로 쓰이며 어류의 생태적인 면에서도 영향을 미친다(Ardiwinata et al., 1957). 이러한 저질의 상태를 분석하는 기본적인 지표로는 저질에 존재하는 유기물이 산화될 때 소비되는 화학적 산소요구량(Chemical Oxygen Demand)을 사용한다(Rovert R.W and William J.S., 1986).

수계에서 암모니아와 아질산은 자연환경에서 유래하는 대표적인 독성물질이다. 이러한 질소 화합물은 외부에서 유입되기도 하지만, 수계에서는 사료의 형태로 유입되거나 어류의 배설물 혹은 저질퇴적물에서 유리되기도 한다(John A.H et al., 1998). 암모니아는 어류의 신경계에 영향을 주어서 과호흡, 평형감각 상실로 인한 선회운동, 경련을 일으키며 이러한 독성이 심할수록 폐사에 이르게 만든다. 또한 어류의 혈액과 조직 내의 NH_3 의 상승은 어류 혈액 내의 pH를 상승시켜서 물질 반응 대사의 하락과 함께 내부장기와 조직에 손상을 주게 된다(Tomasso J.R et al., 1980). 질소순환과정에서 암모니아는 *Nitrosomonas*와 *Nitrobactor*라는 박테리아에 의해서 질산염으로 분해되는 과정 중에 아질산으로 변하는데, 아질산은 어류의 체내에서 헤모글로빈과 결합하여 산소결핍을 유도하여 어류에게 스트레스를 유발하여(J.Person et al., 1998) 어류의 성장과 생존률에 영향을 주는 것으로 알려져 있다(Nebeker A V and Schytema G.S., 2000). 이러한 질소화합물들은 어체에 직접적인 영향을 주기도 하지만, 인산염과 함께 부영양화를 일으켜서 수질 환경에 악영향을 미친다(Susana P et al., 2017). 따라서 본 연구를 수행하면서 수질의 환경적인 지표를 관찰하기 위해 수중의 질소 화

합물과 인산염, 저질의 COD를 측정하였다.

어류는 먹이를 급이하여 에너지를 얻고 이를 생체활동에 필요한 신진대사와 어체의 성장 활동에 이용한다. 외부 환경으로부터 스트레스를 받으면 이에 대응하기 위해 카테콜아민을 분비하여 교감신경을 활성화시킨다. 이는 외부요인에 기민하게 대처하기 위해 심혈관계와 호흡계의 작용을 증진하고 간과 근육의 글리코겐 분해를 촉진해 저하된 혈당을 회복시키기 위해 인슐린이 합성된다(A.D pickering et al., 1993). 이러한 일련의 활동으로 성장률이 저하되기 때문에 외부 환경적인 요인의 스트레스는 성장호르몬의 교란을 야기시켜 성장에 방해요인으로 작용하게 되므로, 성장률은 어류의 스트레스 반응을 볼 수 있는 하나의 지표로 사용된다.

외부 스트레스에 반응하기 위해 뇌하수체에서는 부신피질자극호르몬(ACTH)이 분비되고 ACTH와 뇌하수체 성장호르몬(GH)은 스트레스 호르몬인 코르티솔(Cortisol)을 분비하게 된다. 코르티솔은 체내의 혈당을 높여 탄수화물을 비롯한 에너지를 대사시키는 역할을 하여, 체내의 스트레스 반응에 대응하는 역할을 하기에 어류의 급성, 만성적인 스트레스를 정량적으로 측정할 수 있는 대표적인 스트레스 지표이다.(Ellis et al., 2012)

어류는 외부의 스트레스에 반응하여 내외부적인 요인으로 인하여 혈액학적 성상인 RBC Count, 헤모글로빈 농도(Hb)와 혈장 성분에 변화가 일어난다. 외부 독성물질이 체내에 유입되거나 서식지에 저산소 환경이 되어 스트레스 요인으로 작용할 때 RBC의 숫자와 Hb의 농도가 높아진다(Leonard et al., 1999) 수질 오염에 따른 호흡작용의 장애나 급격한 수중 온도 변화에 있어서도 혈액학적 성상에 영향을 주기에 이는 어류의 스트레스와 건강 상태를 확인하는데 중요한 지표가 될 수 있다. 혈장 성분인 GOT(Glutamic oxaloacetic transaminase)와 GPT(Glutamic pyruvic transaminase)는 간세포에 존재하는 아미노기전달효소(transaminase)며, 간세포에서 옥살로아세

트산과 글루타민산을 아스파르트산과 α -케토글루타르산으로 바꿔주는 아미노산 대사에 관여하는 효소이다. 간세포가 손상을 받으면 이 GOT와 GPT가 혈류 내로 방출되게 되는데, 이를 측정하여 체내의 스트레스 반응의 지표로 사용할 수 있다(Hooda and Upadhyay., 2014).

외부 환경의 변화는 어류에게 스트레스로 작용하며, 이로 인해 O_2^- , H_2O_2 , $HO^\cdot$ 와 같은 활성산소를 발생시킬 수 있다. 스트레스로 인한 활성산소의 증가는 세포의 산원환원 균형(redox balance)을 붕괴시키며 세포막 손상과 같은 산화적 손상을 유발하게 된다. 어류는 산화스트레스를 예방하고 활성산소로 인한 체내의 기능 저하를 방어하기 위해 Superoxide dismutase(SOD), Catalase(CAT)와 같은 항산화효소(Antioxidant enzymes)를 가지고 있다. SOD는 산소가 전자를 받아서 불안정한 상태인 $O_2^\cdot$ (Superoxide free radical)에 작용하여 이를 과산화수소로 환원시키는 작용을 하며, CAT는 이를 물과 산소로 변환시키는 역할을 하여 체내에 생성되는 활성산소의 독성을 저해시킨다(Martinez-Alvarez et al., 2005). 이러한 항산화효소의 발현 정도는 스트레스 반응을 통하여 형성된 활성산소에 따라 그 수치가 변하기 때문에, 어류의 스트레스 지수를 측정하는 지표로 사용될 수 있다.

Heat shock protein 70 (HSP 70)은 세포 내부에 존재하는 단백질 중 하나로서 높은 열을 받거나 세포가 자극받았을 시 이 단백질의 아미노기가 변성되기에 Heat shock protein이라고 불린다. 높은 온도나 충격을 받았을 때도 변성이 되지만 세포 내부에 스트레스가 가해졌을 때도 선행적으로 변하기에 스트레스 반응을 확인하는 지표로 사용되고 있는 단백질이다(Powers D.A et al., 1991).

미꾸리 양식에 있어서 노지 양식지의 시설설치에 대한 매뉴얼은 존재하지만 못 내부의 환경적 요인에 대해서는 정량적인 데이터가 부족한 상황

다. 또한 실내 양식의 경우에도 높은 폐사율 때문에 몇몇 연구시설을 제외하고는 소수의 양식어가만 존재하는 상황이다. 특히 미꾸리의 경우 특정 원인균에 의하기보다는 다양한 원인으로 폐사하는 경우가 많아, 환경적인 요인과 스트레스 저감을 통한 면역력의 강화가 폐사율을 낮추는 데 일조할 수 있을 것이다. 따라서 본 연구는 미꾸리 양식 조건의 정량적인 수치와 실내 양식 가능성을 위하여, 환경변화에 따른 스트레스 지수의 감소를 알아보고자 실내 수조에 저질의 높이를 다르게 배치한 후 미꾸리 개체가 받는 스트레스를 다양한 생체 지표를 사용하여 분석하였다.



II. 재료 및 방법

1. 실험어 및 실험환경

본 실험에 사용한 실험어, 미꾸리(*Misgurnus Anguillicatus*)는 경기도 양평군의 미꾸리 양식장에서 구매하였으며, 전장 8.75 ± 1.75 , 체중 10.52 ± 1.62 의 어류로 250L 원형 수조에서 7일 순치하여 외관상으로 질병이 관찰되지 않는 개체를 선별하여 실험에 사용하였다. 순치 후 25L 사각 수조에 20마리씩 사육하였으며, 우성사료에서 나온 미꾸라지 사료를 어 2일에 1회, 어체중의 1%만큼 급이하였다. 실험 기간 사육 수온은 21 플러스마이너스 0.8도, 12시간 간격으로 광주기를 조절하였으며 광량은 $700 \text{ lux} \pm 40$ 으로 조절하였다. 환수는 주 1회 10L의 환수율로 진행하였다. 실험에 사용한 수질 성분은 Table.1과 같다.

Table 1. The Chemical components of seawater and experimental condition used in the experiments

Item	Value
Temperature	21.08 ± 1.35
pH	7.54 ± 0.22
Dissolved Oxygen(mg/L)	7.21 ± 0.41
Ammonia(ug/L)	8.2 ± 0.4
Nitrite(ug/L)	6.5 ± 0.2
Nitrate(ug/L)	4.0 ± 0.86

2. 저질 성분

저질 성분은 부산농업기술센터에 의뢰하여(IPC,) 측정하였으며 그 구성성분표는 아래와 같다.

Table 1. The Chemical components of muddy sediment experimental condition used in the experiments

item	measurement	value
SiO ₂	%	54.7
Al ₂ O ₃		24.9
Fe ₂ O ₃		7.3
CaO		0.14
MgO		0.71
K ₂ O		1.66
Na ₂ O		0.04
TiO		0.78
MnO		0.02
P ₂ O ₅		0.07
Cu		0.002
Cr		0.01
Cd	mg/kg	-
Pb		1.56
As		0.1

3. 생존률 및 성장률

실험어의 생존률은 각 2주차와 4주차에 생존 개체의 수를 측정하여 나타내었다.

실험어 순치 후 미꾸리의 전장과 체중을 측정하였고, 사료 급여 후 2주와 4주에 각각 전장과 체중을 측정하였다. 일일체중성장률(Daily weight gain), 일일전장성장률(Daily length gain)를 측정하였다. 생존률과 성장률의 측정 방법은 다음과 같다.

- Survival rate(%) = (Fish number of day / Total fish number) * 100
- Daily Weight gain = (Final weight - Initial weight)/day
- Daily Length gain = (Final Length - Initial length)/day



4. 수질 분석

4-1. 암모니아성 질소

수중에 존재하는 암모니아를 측정하기 위해 염기성 차아염소산용액을 사육수와 산화 반응시켜 모노크로아민을 생성하였다. 이를 페놀과 차아염소산과 반응시켜 생성되는 인도페놀(Molins et al., 2006)의 흡광도를 분광광도계에서 640nm로 흡광도를 측정하였으며 standard curve를 이용하여 결과값을 나타내었다.

4-2. 아질산성 질소

수중에 존재하는 아질산성 질소를 측정하기 위해 술퍼닐아미드를 첨가한 후 이를 나프틸에틸렌디아미드와 반응시킨다. 이로 생성된 아조화합물을 분광광도계에서 543nm으로 흡광도를 측정하였으며 standard curve를 이용하여 결과값을 나타내었다

4-3. 아질산성 질소

수중의 인산염을 측정하기 위해 사육수를 몰리브덴산 암모늄과 타타르산안티모닐칼륨과 반응시켜서 안티모닐-인산몰리브덴 착화합물(antimony-phosphomolybdate complex)를 생성한다. 이를 분광광도계에서 885nm으로 흡광도를 측정하였으며 standard curve를 이용하여 결과값을 나타내었다.

5. 혈액학적 분석

혈액 채취는 실험어의 혈액 응고를 막기 위하여 Heparin-Na(5000LU., 중외제약)을 처리한 1ml 1회용 주사기를 이용하여 실험어의 미부정맥에서 채취하였다. 채취한 혈액으로는 RBC(Red blood cell) count, Hb(Hemoglobin) 농도를 채취하였다.

RBC Count는 Hedrick's solution으로 400배 희석을 시킨 후 Hemocytometer(Improved Neubauer, Germany)를 이용하여 광학현미경으로 촬영하여 계수를 한 후, 희석 배수를 다시 곱하여서 계산하였다. Hb 농도는 임상용 Kit(Asan Pharm. co., Ltd.)를 이용하여 Cyan-Methemoglobin 법으로 측정하였다. 채취한 혈액을 혈청내 무기성분, 유기성분, 효소활성의 변화를 관찰하기 위하여 4C, 3000G에서 5분간 원심분리를 진행하여 혈청을 분리하였고, 분리한 혈청은 실험 전까지 -75C에서 보관하였다.

유기성분으로는 혈당(Glucose)을 측정하였으며, 혈당은 GOD/POD technique을 사용하여 분석하였다. 혈청 내 효소활성으로는 GOT(Glutamic oxalate transaminase), GPT(glutamic pyruvate transaminase)를 측정하였으며, Reiman-Frankel technique에 의한 임상용 kit(Asan Pharm, Co., Ltd)를 이용하였다.

무기성분으로는 칼슘(Calcium), 마그네슘(Magnesium)을 측정하였으며, 칼슘은 OCPC(Orthocresolphthalein complexone) 방법을 이용하였고, 마그네슘은 Xylidyl blue- 1 technique을 이용한 임상용 kit(Asan Pharm. Co., Ltd)를 이용하였다,

6. 항산화효소 분석

분석을 위하여 간과 아가미, 장을 채취한 후 조직을 Washing buffer(0.1M KCL, pH 7.4)를 이용하여 세척하였다. 세척 후 간, 아가미 무게와 Homogenizing buffer(0.1M KCL, pH7.4)의 비율이 1:10이 되도록 넣어준 후, Teflon glass homogenizer (099CK4424, Glass-Col, Germany)를 사용하여 균질화하였다. 균질액은 4℃, 10000G에서 30분동안 원심분리를 진행한 후 상층액을 분리하여 실험에 사용하였다.

조직의 단백질 함량을 측정하기 위하여 bradford(1976) 방법을 이용한 Bio-rad prtein assay kit(Bio-rad laboratories gmbH%, munich, germany)를 사용하여 측정하였다.

6-1. Superoxide dismutase(SOD)

SOD 활성은 WST-1의 환원반응에 대한 50% inhibitor rate로 측정하는 SOD assay kit- WST(Dojindo co., Japan)를 사용하여 분석하였다. 1 unit은 WST-1과 superoxide 음이온의 환원 반응을 50% 억제하는 시료 용액 중의 효소의 양으로 나타내었으며, SOD activit는 unit/mg protein 으로 나타내었다.

6-2. Catalase(CAT)

CAT활성은 Oxiselect Catalase Assay Kit(Cell biolabs, inc.)를 사용하여 분석하였다. 과산화수소와 대응대는 생성물인 Quinonimine de pling 생성물을 흡과도 520nm에서 분광광도계를 이용하여 측정하였다. 1분당 과산화수소 1um를 분해하는 효소의 양을 CAT의 1 unit으로 나타내었으며, CAT activity는 unit/mg protein으로 나타내었다.

7. Cortisol activity

코르티졸 활성을 확인하기 위하여 Fish cortisol ELISA Kit(Mybiosource, USA)를 사용하였다. 경쟁적 효소 면역반응을 이용하여 혈장 성분 내의 코르티졸 성분이 Horseradish peroxide(HRP)와 goat-anti-rabbit antibody와 반응하는 성질을 이용하여 450nm의 분광광도계로 측정 후 표준 샘플에 따른 검량선에 따라 분석하였다.

8. Heat shock Protein 70 분석

Heat shock protein 70 (HSP70)의 활성을 확인하기 위하여 HSP ELISA Kit(Mybiosource, USA)를 사용하였으며 간, 아가미, 장 조직액 샘플로 측정하였다.

샘플과 키트 내의 HRP conjugate reagent와 Chromogen Solution을 반응시켜 450nm의 분광광도계로 측정 후 키트에 표준 샘플에 따른 검량선에 따라 분석하였다.

9. 유의성 검정

실험 분석 결과에 대하여 통계적인 유의성은 SPSS 통계 프로그램을 사용하여 나타내었고, ANOVA test를 실시하여 tukey's range test를 통하여 $P < 0.05$ 일 때 유의성이 있다고 간주하였다.

Ⅲ.결과

1. 생존률(Survival rate)

저질의 높이 차이에 따른 미꾸리의 생존률은 Fig.1에 나타내었다. 생존률은 2주차에서는 유의적인 변화가 나타나지 않았으나 4주차에서는 6cm 이상부터 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다.



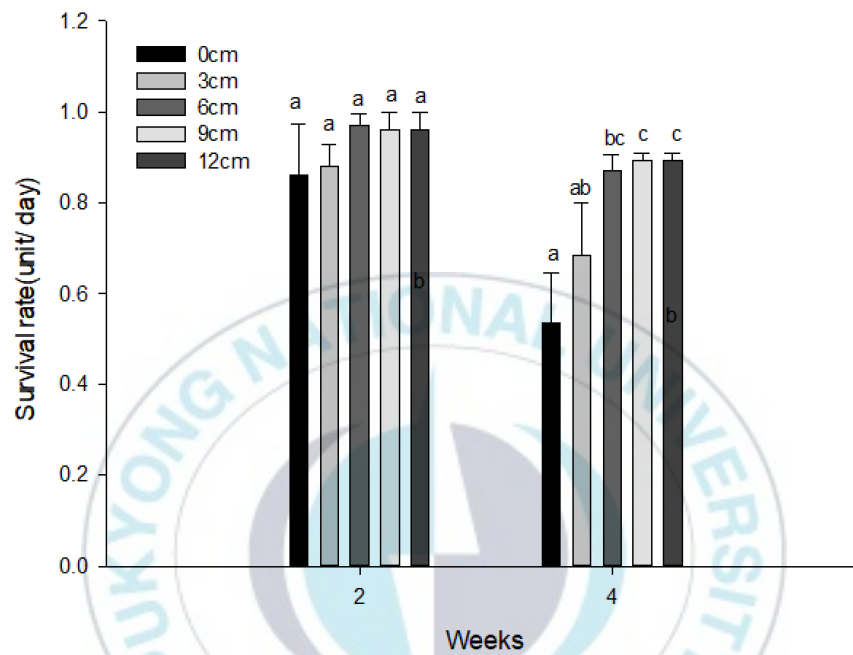


Fig 1. Survival rate of *Misgurnus anguillicaudatus* exposed to the different muddy sediment height for 4 weeks. Value with different superscript are significantly different in 4 weeks ($P < 0.05$) as determined by Tukey's range test.

2. 성장률(Growth Factor)

저질의 높이 차이에 따른 미꾸리의 성장률 Fig2-3.에 나타내었다. 성장률은 유의적인 변화가 나타나지 않았다.



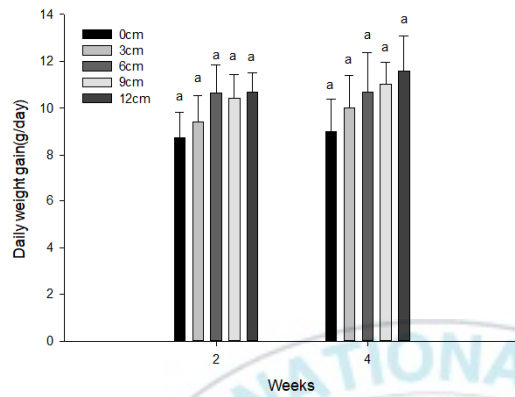


Fig 2. Daily weight gain of misgurnus anguillicaudatus exposed to the different muddy sediment height for 4 weeks. Value with different superscript are not significantly different.

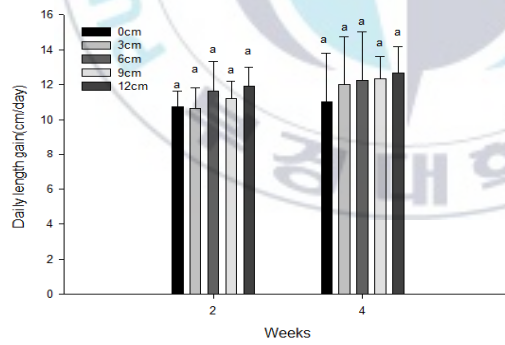


Fig 3. Daily length gain of misgurnus anguillicaudatus exposed to the different muddy sediment height for 4 weeks. Value with different superscript are not significantly different.

3. 수질 및 저질 환경 변화

저질의 높이 차이에 따른 암모니아, 아질산, 질산염의 유의적인 변화는 Fig.4-7에 나타내었다. 수질 및 저질의 환경적인 변화는 나타나지 않았다. 저질 COD도 유의적인 변화가 나타나지 않았다.



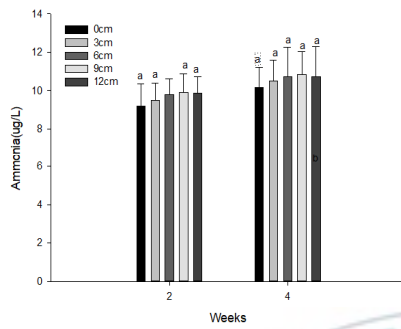


Fig 4. Ammonia density of misgurnus anguillicaudatus exposed to the different muddy sediment height for 4 weeks. Value with different superscript are not significantly different.

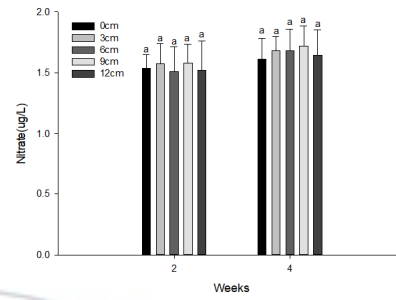


Fig 5. Nitrate density of misgurnus anguillicaudatus exposed to the different muddy sediment height for 4 weeks. Value with different superscript are not significantly different.

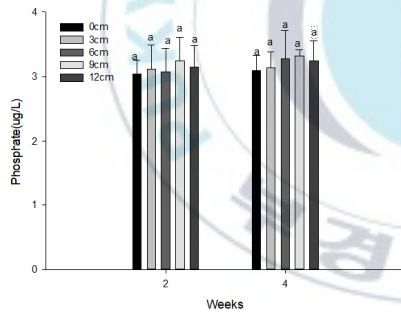


Fig 6. Phosphate density of misgurnus anguillicaudatus exposed to the different muddy sediment height for 4 weeks. Value with different superscript are not significantly different.

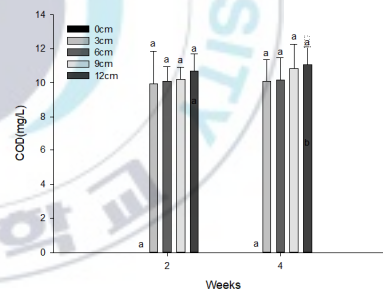


Fig 7. Sediment COD density of misgurnus anguillicaudatus exposed to the different muddy sediment height for 4 weeks. Value with different superscript are not significantly different.

4. 혈액학적 분석

저질의 높이 차이에 대한 미꾸리의 Hematocrit, Red blood cell count, hemoglobin의 변화를 Table. 3에 나타내었으며 각각 저질의 높이 차이에 대한 미꾸리의 혈청 성분 변화를 Table. 4-6에 나타내었다.

혈액학적 정상인 Hematocrit, RBC count, Hb에 대하여 저질의 높이 차이로 인한 유의적인 변화는 나타나지 않았다.

혈청 내 무기성분으로는 칼슘과 마그네슘을 분석하였으며, 2주차, 4주차 모두 유의적인 변화는 나타나지 않았다.

혈청 내 유기성분으로는 글루코즈와 총단백질을 분석하였다. 글루코즈는 2주차의 9cm 구간에서 유의적인 변화가 나타났으며 4주차에서는 6cm 구간에서부터 유의적인 변화가 나타났으나 총단백질에서는 2주차와 4주차 모두 유의적인 변화가 나타나지 않았다.

혈청 내 효소 활성 성분으로는 GOT와 GPT를 분석하였다. 효소 활성은 2주차에서는 유의적인 변화가 나타나지 않았으나 4주차에서는 9cm 구간에서 유의적인 변화가 나타나었다.

Table.3 Change of RBC Count and Hemoglobin in Loach, *Misgurnus Anguillicaudatus* exposed to different height muddy sediment

Parameters	Period (weeks)	muddy sediment height(cm)				
		0	3	6	9	12
RBC Count (x10/mm ³)	2	7.82±0.39 ^a	7.87±0.24 ^a	7.85±0.37 ^a	7.89±0.31 ^a	7.89±0.29 ^a
	4	8.24±0.19 ^a	8.24±0.26 ^a	8.30±0.20 ^a	8.39±0.29 ^a	8.40±0.23 ^a
Hematocrit (%)	2	0.35±0.01 ^a	0.37±0.03 ^a	0.37±0.02 ^a	0.38±0.01 ^a	0.40±0.02 ^a
	4	0.36±0.02 ^a	0.38±0.02 ^a	0.42±0.03 ^a	0.39±0.03 ^a	0.41±0.01 ^a
Hemoglobin (g/dL)	2	5.44±0.50 ^a	5.13±1.33 ^a	4.84±0.22 ^a	4.90±0.14 ^a	4.92±0.16 ^a
	4	5.39±0.59 ^a	5.37±0.60 ^a	5.18±0.42 ^a	5.12±0.25 ^a	5.01±0.31 ^a

Value are mean ±S.D values with a different letter are significantly different from other at 2 weeks and at 4 weeks(P <0.05) as determined by tukey's range test.

Table. 4 Change of Calcium, Magnesium in Mud loach, *Misgurnus Anguillicaudatus* exposed to different height muddy sediment

Parameters	Period (weeks)	muddy sediment height(cm)				
		0	3	6	9	12
Calcium (mg/dL)	2	7.82±0.39 ^a	7.87±0.24 ^a	7.85±0.37 ^a	7.89±0.31 ^a	7.89±0.29 ^a
	4	8.24±0.19 ^a	8.24±0.26 ^a	8.30±0.20 ^a	8.39±0.29 ^a	8.40±0.23 ^a
Magnesium (mg/dL)	2	5.44±0.50 ^a	5.13±1.33 ^a	4.84±0.22 ^a	4.90±0.14 ^a	4.92±0.16 ^a
	4	5.39±0.59 ^a	5.37±0.60 ^a	5.18±0.42 ^a	5.12±0.25 ^a	5.01±0.31 ^a

Value are mean ±S.D values with a different letter are significantly different from other at 2 weeks and at 4 weeks(P <0.05) as determined by tukey's range test

Table 5. Change of Glucose, total protein in loach, *Misgurnus Anguillicaudatus* exposed to different height muddy sediment

Parameters	Period (weeks)	muddy sediment height(cm)				
		0	3	6	9	12
Glucose (mg/dL)	2	47.62±2.98 ^a	47.12±3.27 ^a	46.95±2.06 ^a	38.23±3.12 ^b	35.99±2.02 ^b
	4	48.41±2.88 ^a	42.15±2.98 ^{ab}	37.32±3.08 ^b	36.94±3.19 ^b	35.67±3.71 ^b
Total protein (g/dL)	2	3.25±0.35 ^a	3.28±0.21 ^a	3.53±0.36 ^a	3.51±0.27 ^a	3.50±0.31 ^a
	4	3.42±0.50 ^a	3.94±0.45 ^a	3.47±0.63 ^a	3.32±0.12 ^a	3.31±0.32 ^a

Value are mean ±S.D. Value with a different letter are significantly different from others at 2 weeks and at 4 weeks (P<0.05) as determined by tukey's range test

Table 6. Change of GOT, GPT in loach, *Misgurnus Anguillicaudatus* exposed to different height muddy sediment

Parameters	Period (weeks)	muddy sediment height(cm)				
		0	3	6	9	12
GOT (mg/dL)	2	29.65±5.59 ^a	28.95±2.05 ^a	25.20±2.04 ^a	24.85±2.21 ^a	24.59±1.71 ^a
	4	34.75±3.47 ^a	29.30±3.68 ^{ab}	27.27±4.69 ^{ab}	23.98±3.87 ^b	24.10±2.74 ^b
GPT (g/dL)	2	32.28±2.05 ^a	29.01±2.86 ^a	26.21±2.43 ^a	25.58±2.61 ^a	25.76±3.29 ^a
	4	33.34±2.29 ^a	29.89±1.08 ^{ab}	28.36±2.57 ^{ab}	25.68±2.23 ^b	25.06±1.76 ^b

Value are mean ±S.D. Value with a different letter are significantly different from others at 2 weeks and at 4 weeks (P<0.05) as determined by tukey's range test

5. 항산화 효소 분석

5.1 Superoxide dismutase(SOD)

저질의 높이 차이에 따른 미꾸리의 간, 아가미, 장내의 SOD 활성은 Fig. 8-10에 나타내었다.

간 내 SOD 활성은 2주차의 9cm 구간에서 유의적인 감소가 나타나었고, 4주차의 9cm 구간에서 유의적으로 감소함이 나타났다. 아가미에서도 2주차와 4주차 모두 9cm 구간에서 유의적으로 감소함이 나타났다.

장에서는 유의적인 변화가 나타나지 않았다.



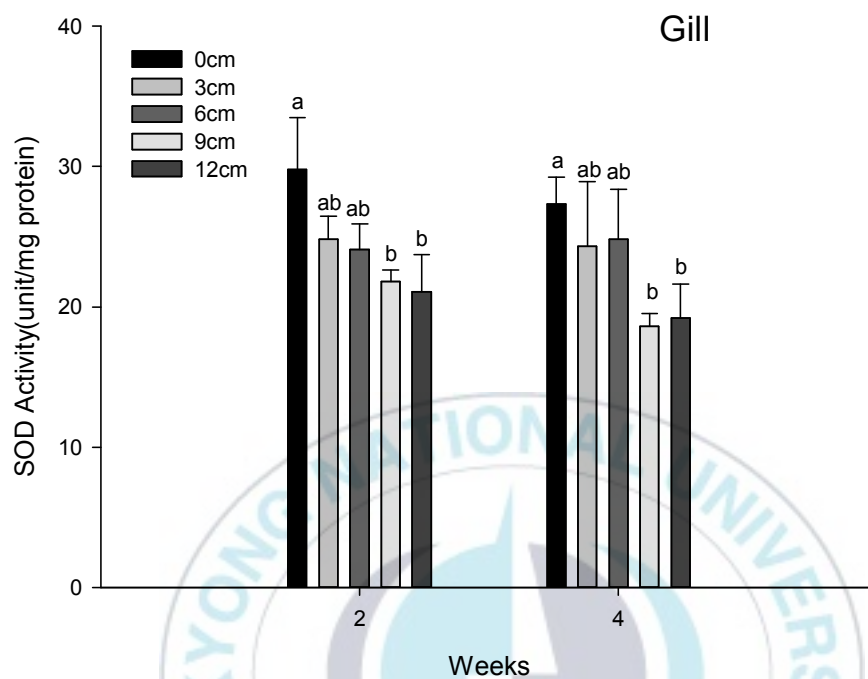


Fig 9. SOD activity in gill of *Misgurnus anguillicaudatus* exposed to the different muddy sediment height for 4 weeks. Value with different superscript are significantly different in 2 and 4 weeks ($P < 0.05$) as determined by tukey's range test.

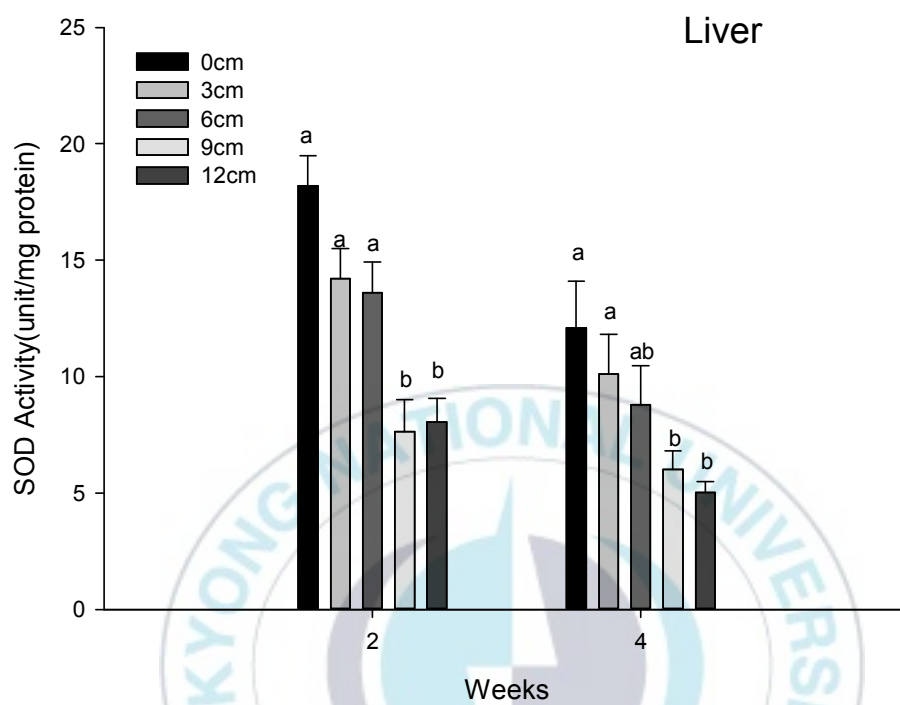


Fig 8. SOD activity in liver of *misgurnus anguillicaudatus* exposed to the different muddy sediment height for 4 weeks. Value with different superscript are significantly different in 2 and 4 weeks($P < 0.05$) as determined by tukey's range test.

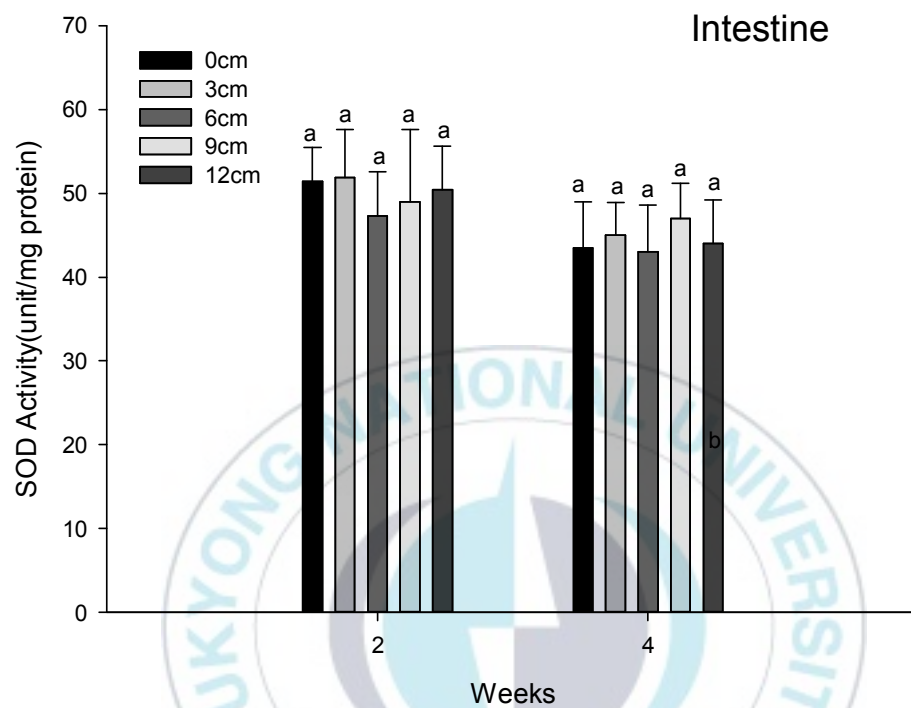


Fig 10. SOD activity in intestine of *Misgurnus anguillicaudatus* exposed to the different muddy sediment height for 4 weeks. Value with different superscript are significantly different in 2 and 4 weeks ($P < 0.05$) as determined by Tukey's range test.

5.2 Catalase(CAT)

저질의 높이 차이에 따른 미꾸리의 간, 아가미, 장내의 CAT 활성은 Fig. 11-13 에 나타내었다.

간 내 CAT 활성은 2주차의 9cm 구간에서 유의적인 감소가 나타나었고, 4주차의 9cm 구간에서 유의적으로 감소함이 나타났다. 아가미에서도 2주차와 4주차 모두 9cm 구간에서 유의적으로 감소함이 나타났다.

장에서는 유의적인 변화가 나타나지 않았다.



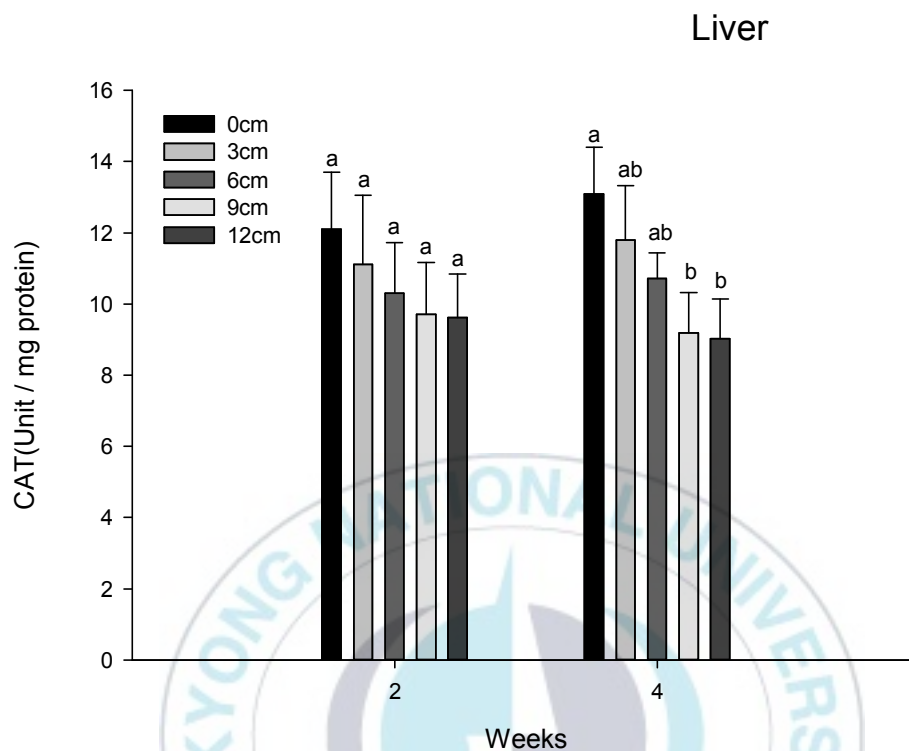


Fig 11. CAT activity in liver of misgurnus anguillicaudatus exposed to the different muddy sediment height for 4 weeks. Value with different superscript are significantly different in 4 weeks($P < 0.05$) as determined by tukey's range test.

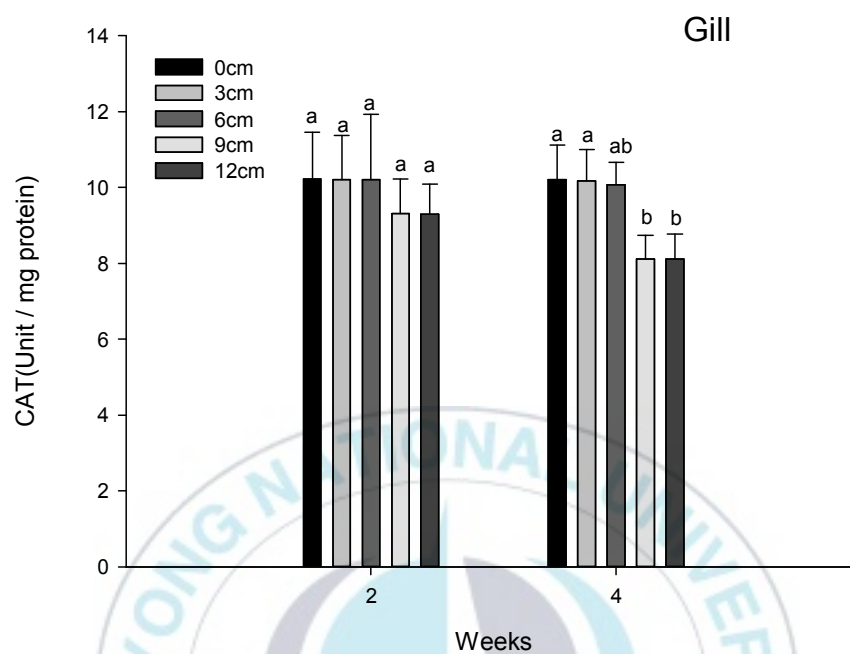


Fig 12. CAT activity in gill of *misgurnus anguillicaudatus* exposed to the different muddy sediment height for 4 weeks. Value with different superscript are not significantly different.

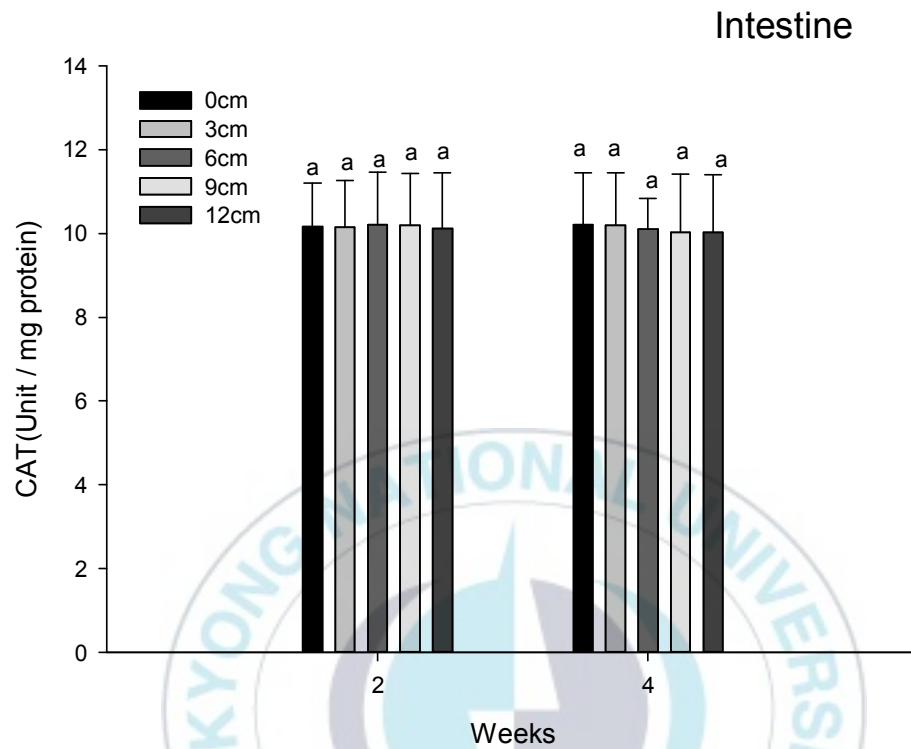


Fig 13. CAT activity in liver of *Misgurnus anguillicaudatus* exposed to the different muddy sediment height for 4 weeks. Value with different superscript are not significantly different.

6. Cortisol activity

저질의 높이 차이에 따른 미꾸리의 cortisol 활성은 Fig.14에 나타내었다.

Cortisol 활성은 2주차에는 유의적인 변화가 나타나지 않았으나, 4주차의 3cm 구간에서 유의적으로 감소함이 나타났다.



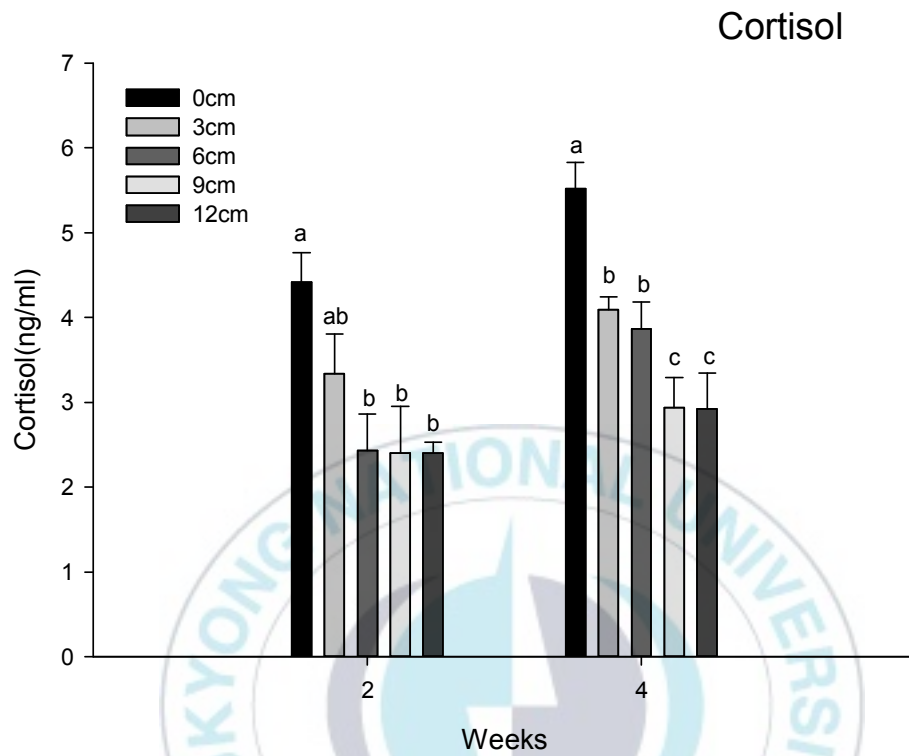


Fig 14. Cortisol activity of misgurnus anguillicaudatus exposed to the different muddy sediment height for 4 weeks. Value with different superscript are significantly different in 4 weeks($P < 0.05$) as determined by tukey's range test

7. Heat shock protein 70 activity

저질의 높이 차이에 따른 미꾸리의 간, 아가미, 장내의 CAT 활성은 Fig. 15-17에 나타내었다.

간 내 Heat shock protein 70의 활성은 2주차의 6cm 구간에서 유의적인 감소가 나타나였고, 4주차의 3cm 구간에서 유의적으로 감소함이 나타났다. 아가미에서는 2주차에서는 유의적인 변화가 나타나지 않았으나, 4주차의 9cm 구간에서 유의적으로 감소함이 나타났다.

장에서는 2주차와 4주차의 9cm 구간에서 유의적인 감소가 나타났다.



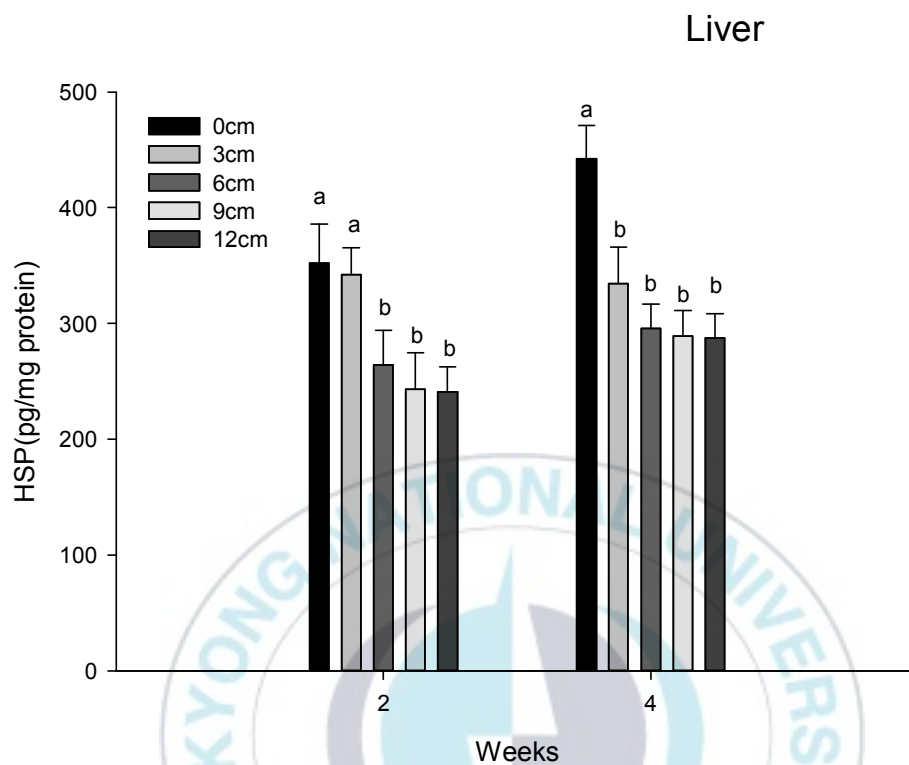


Fig 15. HSP70 activity in liver of *misgurnus anguillicaudatus* exposed to the different muddy sediment height for 4 weeks. Value with different superscript are significantly different in 2 and 4 weeks($P < 0.05$) as determined by tukey's range test.

Gill

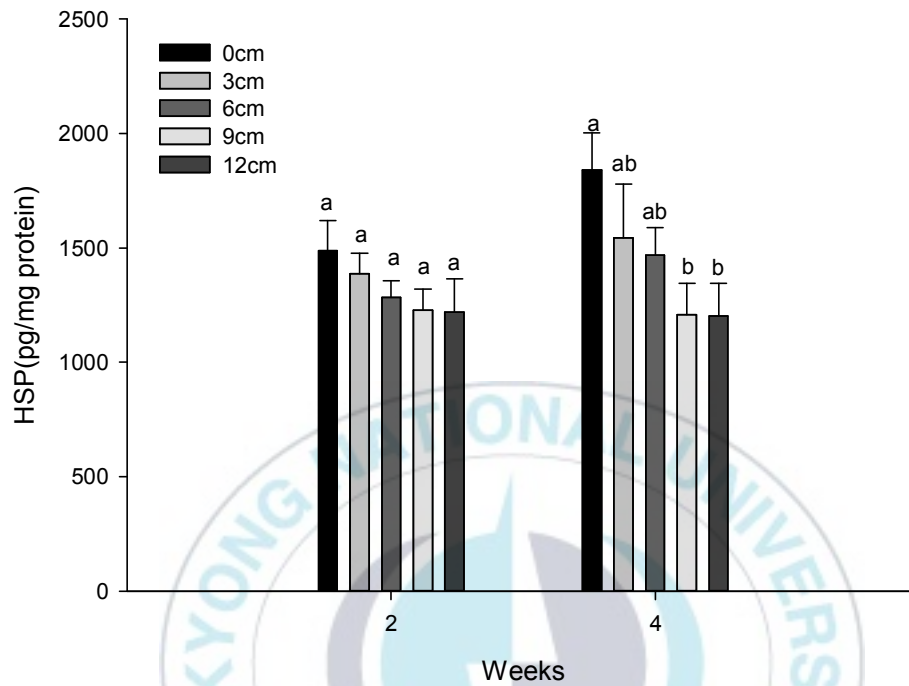


Fig 16. HSP70 activity in gill of *Misgurnus anguillicaudatus* exposed to the different muddy sediment height for 4 weeks. Value with different superscript are significantly different in 4 weeks ($P < 0.05$) as determined by Tukey's range test.

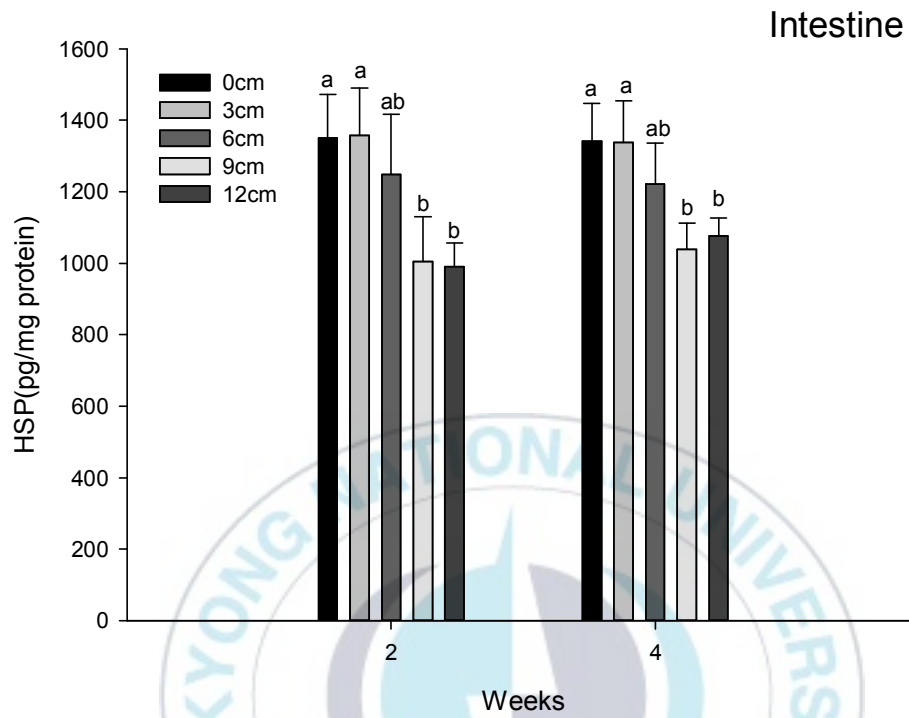


Fig 17. HSP70 activity in intestine of *Misgurnus anguillicaudatus* exposed to the different muddy sediment height for 4 weeks. Value with different superscript are significantly different in 2 and 4 weeks($P < 0.05$) as determined by Tukey's range test.

IV.고찰

아가미를 이용하여 수중에서 호흡하는 대부분 어류와는 달리 미꾸리는 장 호흡을 하며, 생활사적 특징으로는 저질 층에 파고들어서 숨는 경향을 보이는데 이는 포식자를 피하기 위하고, 겨울철의 동면을 위함이라 사료된다(Corfield et al., 2007). 이러한 특성 때문에 주 서식지는 깊은 하천보다는 수류가 약하고 수위가 낮은 곳을 선호하고, 아시아 지역에서는 논과 그 주변의 도랑에서 주로 관찰되고 있다(Katano et al., 2001). 미꾸리가 땅을 파고드는 깊이는 미꾸리가 있는 곳의 퇴적물들의 수직적 생물 교란을 통한 연구(Gang et al., 2008)에서 최대 7.5cm에서 4.5cm까지 보고되고 있는데 논농업 형태에 따른 미꾸리 서식 분포에서는 흙으로 된 배수로로 연결된 논에서의 발생 확률이 인공펌프나 인공적인 관개수로로만 이어져 있는 논보다 높은 것으로 나타나고 있으며 서식 선호의 주요 요인으로 ‘하천과 이어져 있는 자연 상태의 배수로(흙으로 구성)’가 나타났다(Kano et al., 2010). 미꾸리의 서식환경을 조사한 연구에서는 미꾸리의 서식조건에는 둠병의 유무가 존재하지 않는 곳보다 4배 이상 높다고 나타나고 보고되고 있다(Jung et al., 2010). 또한 월동기간이 아닌 낙수기에 미꾸리의 도피경로를 조사한 결과 배수로를 따라 이동하기보다는 둠병으로 이동하는 것으로 보고되고 있는 것으로 보아 흙이 있는 공간을 선호하는 것으로 보인다. 하지만 논 바닥을 파고 들어가기보다는 둠병으로 이동하는 경향을 보였는데 이러한 행동 요인에 대해서는 표식 스트레스로 인하여 바닥을 파고 들어가는 힘이 부족한지에 대하여는 추가적인 연구가 필요하다(Kim et al., 2011). 논과 그 주변이 아닌 북미나 유럽지역으로 퍼져나가 강 지역에 서식하고 있는 미꾸라지류들도 유속이 느리고 주변에 물이 고여있는 웅덩이가 존재

하는 지역에 많은 수가 관찰되어 진다고 보고된다(Jon et al., 2007). 이처럼 미꾸리의 생태에 있어서 저질층의 존재는 먹이 채집 및 유리한 서식조건이라고 보고 되어진다(Liu et al., 1998).

특히 유속이 느린 호수나 웅덩이, 논, 늪지와 같은 생태조건에서는 저서층에 플랑크톤을 비롯하여 여러 먹이생물이 서식하여 어류의 풍부한 먹이원의 서식지이고(Nakamura anaerobic 박테리아의 환경 조성에도 중요한 역할을 미친다. Bacillus와 같은 박테리아는 프로바이오틱스로도 활용되어 독성을 가진 암모니아 화합물의 제거에 긍정적인 영향을 미쳐서 전반적인 수질개선 및 어류의 서식환경을 향상 시킬 수 있다(Oyd et al., 1999). 또한 저질 환경 자체 있어서는 새우 양식장 내의 저질 조성과 화학적 성분에 관한 연구(Munsiri et al., 1996)가 있다.

이러한 저질층의 양식장 환경과 자연환경의 차이에서는 화학적 조성에서 큰 차이가 나지 않는다면 양식에 있어에서도 비슷한 생산성을 나타낸다는 보고가 있다. 또한 양식장 저질에 환경에 관해서는 저질내의 산소가 고갈되면 저질내의 호기성 분해 작용이 감소하여 저질 내에서 독성이 있는 화합물이 생산될 수 있고, 이러한 혐기성 조건은 양식어류에게도 영향을 미칠 수 있어서, 저질내의 산소 호기 및 슬러지의 과도한 퇴적을 막기 위한 수류 조정, 산소 포기 및 준설 등의 작업들로 적정한 환경 관리가 필요하다. 본 연구에서는 사육 기간이 4주로 비교적 길지 않았고, 양식장 환경에 비하여 밀식도가 높지 않아서, 저질의 COD의 변화가 나타나지 않았다고 사료 된다.

Selye의 정의에 따르면 스트레스는 ‘항상성의 변화에 적응하기 위한 신체의 반응’이라고 하며, 이러한 스트레스로 인하여 신체가 변화하는 것을 GAS(General adaptation syndrome)이라고 명명하고 총 4가지의 단계적 변화로 나누었으며, 스트레스 단계의 마지막은 개체의 사망에 이를 수 있다

고 하였다(Elizabeth et al., 1992). 특히 수온, pH, 용존산소 등과 같은 직접적인 환경적인 요인 외에도 수류나 은신처의 유무 같은 종별 특이성에 따른 간접적인 환경요인들도 어류의 스트레스 반응을 유발시켜 신진대사 및 면역력의 저하, 병원체 발현 증가를 일으켜 생존률의 저하를 일으킬 수 있다(Protz et al., 2006). 본 연구에서는 4주차에서는 저질의 6cm 구간부터 유의적인 생존률 증가가 나타났기에, 이러한 저질 층의 유무가 개체의 생존률의 영향을 준다고 사료된다.

미꾸라지 양식에 있어서 전장 $9.5 \pm 1.4\text{cm}$, 체중 $4.0 \pm 2.2\text{g}$ 의 치어를 입식하여 약 4개월 동안 전장 $12.6 \pm 1.7\text{cm}$, 체중 $12.01 \pm 5.5\text{g}$ 으로 성장시켜 출하되었다고 보고되었다. 본 실험에서도 성장률에 있어서 유의적이지는 않으나 저질 존재의 유무에 따라 성장률의 약 9.6%의 증가가 관측되었다. 본 연구는 4주의 기간으로 진행되었기에, 성장률의 유의적인 변화를 관찰하기 어려웠다고 사료되고, 추후 성장률의 관찰을 위해서는 사육 기간을 길게 하여 추가적인 연구가 필요하다고 사료된다.

혈액학적 성상 분석 또한 스트레스 지표를 확인하는 자료로 많이 활용된다. 환경적인 변화나 외부의 변화로 인한 체내 항상성을 보존하기 위해 나오는 효소와 적혈구 반응을 통하여 어류가 받는 스트레스 지표로 사용될 수 있다.(Helene and Gerard., 1996) 혈액의 헤모글로빈 함량은 신진대사와 산소 이용률과 관련이 있고, RBC Count와 헤마토크리트, 헤모글로빈은 어류가 외부 오염물질이나 수온의 상승으로 인한 용존산소 부족으로 인한 빈혈 등을 측정할 수 있는 지표로 사용된다. 스트레스 상황에 오래 놓일수록 적혈구의 숫자는 증가하나 그 내부 비율에 있어서, 성숙 적혈구의 숫자가 줄어들고 미성숙 적혈구가 많아지는 경향을 보인다. (Houston et al., 1996) 본 연구에서는 RBC Count, Ht, Hb의 숫자의 유의적인 변화는 나타나지 않았다. 이는 어류의 적혈구 수치는 외부 오염물질과 용존산소가 아닌 다

른 환경적 요인에 있어서는 어류의 보상 기전에 따라서 다소 안정적으로 나타난다는 연구 결과와도 부합한다(Witeska et al., 2005).

혈청 내 무기물질로는 칼슘과 마그네슘을 분석하였다. 칼슘과 마그네슘은 어류 조직에서 이온 조절을 위한 매개 물질 및 어류 혈액 내에서 삼투압 조절 및 항상성 유지를 위해서 사용된다(Carl et al., 1985). 본 연구에서는 칼슘과 마그네슘의 유의적인 변화는 나타나지 않았다. 칼슘과 마그네슘 농도의 변화는 농약이나 중금속과 같은 외부 오염물질이 체내에 유입되었을 때 발생하는 기능장애 및 신장 손상이 있을 시에 뚜렷하게 관찰된다는 보고가 있는데(Logaswamy et al., 2007), 이는 다른 외부요인으로 인한 어류의 기능 손상은 미비하다고 사료된다. 혈청 내 유기물질로는 글루코스와 총단백질을 분석하였다. 어류가 스트레스를 받으면 체내에서 이에 대응하기 위해 교감신경계가 에너지를 발생시키며 일종의 흥분상태인 fight-or-flight 상태로 돌입한다. 이때 체내의 글루코스 농도는 증가하기 시작하기에 어류의 스트레스 반응을 측정하기에 좋은 지표 중 하나로 사용된다(Morgan and Iwama, 1997). 총단백질은 혈청 내에서 알부민과 글로불린을 갖고 있어 삼투 조절 및 pH 조절에 중요한 역할을 하며(Gopal et al., 1997) 혈청 내 총단백질이 적은 개체일수록 오염된 환경에서 생존률이 떨어졌다는 결과가 있어, 면역체계와도 밀접한 관계가 있다고 간주된다(Bouck and ball, 1967). 본 연구에서 혈청 내의 글루코스는 2주차 9cm 구간에서 유의적인 감소가 보였고, 4주차에서는 6cm 구간부터 유의적인 감소를 나타냈다. 총단백질의 경우 유의적인 변화가 관찰되지 않았다.

또 다른 스트레스에 대한 지표로써 혈청 내의 GOT(glutamic oxaloacetic transaminase)와 GPT(glutamic pyruvic transaminase)를 분석하였다. 이 두 효소는 아미노산을 형성하는 효소 중 하나이며, 특히 간에서 분비가 많이 되어 있어 스트레스로 인한 세포 손상이나 간 손상 시 배출이 증가하게

되어, 세포와 간에 있는 이 효소가 혈액으로 분비가 된다. 특히 이 효소 중 GPT는 어류에 있어서 환경변화에 더욱 민감하게 반응한다는 보고가 있다 (Jeney et al., 1991). 본 연구에서 GOT와 GPT는 모두 4주차의 9cm에서부터 유의적으로 감소함이 나타나였으며, 2주차와 비교하였을 때도 그 수치가 다른 농도와 비슷함에 있어서, 9cm에서도 스트레스 작용으로 인한 간 세포의 손상이 적다고 사료된다.

혈장 코르티솔은 어류에서 스트레스 반응의 정량적 측정의 방법으로 가장 널리 사용되어온 호르몬 중 하나이다.(Pickering et al., 1993)

어류에서의 시상하부-뇌하수체-신장부속(HPI, Hypothalamus-Pituitary Interrenal)축의 대부분의 환경적인 스트레스 반응에 대하여 반응하며, 이러한 스트레스 반응에 따른 최종 부산물로 신간체에서 분비되는 호르몬이 코르티솔이다. 어류는 스트레스 신호를 받으면 뇌의 시상하부(Hypothalamus)에서 CRH를 뇌하수체(Pituitary)로 분비하며 뇌하수체는 ACTH를 분비하여 신간체(Interrenal)를 자극하며 이 곳에서 외부 자극에 대항하기 위한 에너지 전환 및 포도당 신생합성(Gluconeogenic) 과정에서 분비되며 담수 어에서는 삼투압 조절 과정에도 관여하며, 물고기의 이온 균형을 맞추는 데에도 도움을 준다. 급성적인 스트레스에서도 증가하지만, 만성적인 스트레스 상황에서도 적게는 며칠부터 많게는 몇 주까지 그 수치가 증가한 상태로 유지될 수 있으며, 무지개송어를 낚은 pH에 노출했을 때나(Brown et al., 1984) 만성적인 스트레스 상태를 주기 위해 지속적인 포획 스트레스와 밀식 스트레스 주었을 때도(Athanasios et al., 2021) 코르티솔 농도가 몇 주간 지속되는 것으로 보고되었다. 본 연구에서는 4주차에서 자질이 없을 때와 저질이 처음 존재하는 3cm 구간에서의 코르티솔의 유의적인 변화가 관찰되고 저질의 높이가 높을수록 수치가 낮아지는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 저질의 존재가 스트레스 반응을 낮추는 데에 긍정적인 역할을 한

다고 사료 된다. 특히 어류에게는 피난처를 찾기 위한 움직임과 활동성의 증가도 직접적인 스트레스 요인으로 작용하는데(Morgan et al., 1997) 미꾸리가 속으로 파고들 만한 충분한 저질층의 높이가 9cm 이상이라고 사료된다.

생물체는 생존에 필요한 에너지를 얻기 위하여 영양분을 분해하는 과정을 거치는데, 이런 대사활동에서 필수적으로 산소를 이용한다. 생물체의 정상적인 대사 과정에서도 미토콘드리아 내부의 전자전달계(Electron-transport chain)의 전자들이 산소 분자로 빠져나가며 O_2^- , H_2O_2 , HO와 같은 부산물들이 형성되는데, 이런 부산물들을 활성산소라고 부른다. 이러한 활성산소들은 반응성이 높아 체내의 여러 부분을 산화시켜 세포의 구조 변성과 기능 마비 등의 독성으로 작용하고, 온도나 오염물질 같은 여러 외부요인에 따라서 증가할 수 있다(Lushchak et al., 2006)

환경적인 변화로 인한 스트레스 인자는 또한 어류에게 산화스트레스를 일으켜 활성산소의 증가를 나타나게 할 수 있다. 생명체는 생명 활동을 위해서 호흡 활동을 하게 되는데, 호기성 조건 아래에서 소비되는 산소의 대부분은 세포의 미토콘드리아 전자전달계(Mitochondrial electron-transport chain)의 사이토크롬 산화효소에 의해서 대부분 물로 환원된다(Skulachev et al., 2012). 하지만 그중 일부는 물로 환원되지 않고 전자만 전달받아서 Free Radical로 전환되며, 이 Free radical은 체내의 다른 세포의 구성요소들인 지질, 탄수화물, 단백질, 핵산들과 산화반응을 일으켜 이들 세포에 손상을 줄 수 있다(Lushchak VI et al., 2016). 이러한 활성산소에 의한 피해작용을 막기 위한 방어기작으로써 SOD(Superoxidase)와 CAT(Catalase)라는 산화 방지 효소들을 가지고 있으며, 이 효소들은 활성산소를 직접적으로 환원시켜 체내에 독성을 가지기 전에 산소와 물로 만든다(Lushchak VI et al., 2011a). 어류의 아가미는 외부와의 가스교환 및 삼투 조절, 이온

과 산-염기 조절 및 배설, 질소 부산물들과 H_2O_2 제거(Wilhelm et al., 1994)의 역할을 한다. 농약과 같은 오염물질이나 중금속과 같은 오염물질은 아가미의 기능 저하를 일으켜 산화스트레스를 유발하지만(Nunes et al., 2015) 수온 변화와 같은 환경적인 변화에서도 스트레스의 하나의 요인으로 작용한다(Bin et al., 2018). 이러한 외부 스트레스의 지표 중 하나로써 본 연구에서는 대표적인 항산화효소인 SOD와 CAT를 분석하였다. SOD와 CAT는 간과 아가미에서는 모두 9cm 높이에서 유의적으로 감소함이 관찰되었다. 이는 저질의 높이가 미꾸리에게 환경적인 스트레스를 경감시킨다고 사료된다. 장의 경우에는 모두 유의적인 변화가 나타나지 않았는데 장에서의 항산화효소의 변화는 주로 중금속과 같은 오염물 혹은 암모니아의 독성으로 인한 변화에서 보고되거나(Shidong et al., 2021) 어류의 건강증진을 위한 물질을 투여하였을 때 긍정적으로 보고되었다.(Zheng et al., 2018) 미꾸리의 장호흡은 수온이 올라가서 용존산소가 부족해졌을 때 활발해지고 평상시에는 아가미의 호흡률의 약 3% 미만의 가스 교환비를 보이는데(BRIAN R. McMAHON), 본 연구에서의 환경적인 변화는 미꾸리의 장에서의 항산화효소 발현에는 큰 영향을 끼치지 않은 것으로 사료된다. 또한 어류를 포함한 다양한 동물군의 스트레스 지표로 사용되는 HSP70(GEORGE K et al., 1998)의 간, 아가미 장 조직의 유의적 변화는 저질의 높이 차이가 어류의 스트레스 반응에 영향을 끼친다고 볼 수 있다. 본 연구에서 미꾸리의 스트레스를 최소화하기 위한 저질의 높이는 혈액학적 성상, 항산화효소, 코르티솔 및 HSP70의 유의적인 변화가 나타나는 9cm 이상으로 관찰된다. 9cm와 12cm 구간에서는 유의적인 변화가 보이지 않은 것으로 보아 미꾸리에게 일정 수준 이상의 저질의 높이에서는 환경적인 스트레스가 비슷한 것으로 나타났다. 본 연구에서는 황토를 크기별로 분류하여 사용하였지만, 토양의 특성에 주목하여 다양한 성분의 토양이나

혹은 토양을 대체할 수 있는 다른 도피처가 될 수 있는 물질이 존재하는 환경에서도 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다. 혈액학적 성상 및 조직 샘플, 성장률을 고려하여 8.5cm 내외의 개체를 선별해서 실험하였으나, 노지로 이식하는 치어의 크기는 대략 5~6cm이며, 일반적인 미꾸리의 출하 크기는 12cm 내외의 것이 선호되기에 어체의 크기, 수온, 광량 등 다른 여러 조건과 출하 시의 미꾸리의 포획이나 도피 방지, 수류 및 잉여 사료와 밀식 등 양식장에서의 양식 환경시 실질적인 변수를 고려한 조건 아래에서도 추가적인 실험이 필요할 것으로 사료된다.



요 약

저질의 높이 차이에 따른 미꾸리의 스트레스 반응을 알아보기 위하여 미꾸리(평균 전장 $8.75 \pm 1.75\text{cm}$, 평균 체중 $10.52 \pm 1.62\text{g}$)를 저질의 높이를 3, 6, 9, 12cm로 설정하여 4주 동안 사육시키며 혈액학적, 항산화, 생리적 변화를 관찰하였다. 모든 수조에서의 환경적인 변화인 암모니아, 아질산, 인산염, 저질 COD의 유의적인 변화는 관찰되지 않았다. 생존률은 6cm 이상에서 유의적인 증가가 관찰되었다. 성장률은 유의적인 변화가 나타나지 않았다. 혈액학적 정상인 RBC count, 헤모글로빈, 헤마토크리트에서는 유의적인 변화가 관찰되지 않았다. 혈장 유기성분인 글루코스는 유의적인 변화를 나타내었으며, 혈장 효소 성분인 GOT, GPT도 유의적인 변화를 나타내었다. 저질의 높이 변화는 혈액학적 성상의 변화를 나타내었다. 간, 아가미, 장에서의 SOD와 CAT와 같은 항산화효소는 스트레스 지표로 작용되는데 간과 아가미에서는 유의적인 변화가 관찰되었고, 장에서는 유의적인 변화가 관찰되지 않았다. 스트레스 호르몬인 코르티졸은 유의적인 변화가 관찰되었다. 스트레스 지표로 사용되는 HSP70은 간, 아가미, 장에서 유의적인 변화가 관찰되었다.

참고문헌

2020년 수산물 생산 및 유통산업 실태조사 - 해양수산부

2021년 어업별 품종별 통계 - 해양수산부

Gang, S., Yan, F., & Gang, D. (2008). The effects of *Misgurnus anguillicaudatus* bioturbation on the vertical distribution of sediment particles in paddy field. *Agricultural Science and Technology*.

Liu, X., Shao, Z., Cheng, G., Lu, S., Gu, Z., Zhu, H., Shen, H., Wang, J. and Chen, X. (2021), Ecological engineering in pond aquaculture: a review from the whole-process perspective in China. *Rev. Aquacult.*, 13: 1060-1076

Dong Soo KIM, Choong Hwan NOH, Yoon Kwan NAM.(1993).Induction of Tetraploid Cyprinid Loach, *Misgurnus anguillicaudatus*.*JOURNAL OF AQUACULTURE*,6(1),55-62.

Dong Soo Kim, Seung Ki By. (2012). Cytogenetic Analysis of Reciprocal Hybrids Reveals a Robertsonian Translocation between Mud Loach (*Misgurnus mizolepis*) and Cyprinid Loach (*M. anguillicaudatus*). *Korean Journal of Ichthyology*, 24(1), 1-10.

Iwama, G. K., Thomas, P. T., Forsyth, R. B., & Vijayan, M. M. (1998). Heat shock protein expression in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 8(1), 35-56.

McMAHON, B. R., & BURGGREN, W. W. (1987). Respiratory physiology of intestinal air breathing in the teleost fish *Misgurnus anguillicaudatus*. *Journal*

of Experimental Biology, 133(1), 371-393.

Tanaka, M. (1999). Influence of different aquatic habitats on distribution and population density of *Misgurnus anguillicaudatus* in paddy fields. Japanese Journal of Ichthyology, 46(2), 75-81.

Boyd, C.E., Tanner, M.E., Madkour, M. and Masuda, K. (1994), Chemical Characteristics of Bottom Soils from Freshwater and Brackishwater Aquaculture Ponds. Journal of the World Aquaculture Society, 25: 517-534.

Ardiwinata, R. O. (1957). Fish culture on paddy fields in Indonesia. Proceedings of the Indo-Pacific Fisheries Council, 7, 119-154.

Walker, R. R., & Snodgrass, W. J. (1986). Model for sediment oxygen demand in lakes. Journal of Environmental Engineering, 112(1), 25-43.

Hargreaves, J. A. (1998). Nitrogen biogeochemistry of aquaculture ponds. Aquaculture, 166(3-4), 181-212.

Tomasso, J. R., Goudie, C., Simco, B., & Davis, K. (1980). Effects of environmental pH and calcium on ammonia toxicity in channel catfish. Transactions of the American Fisheries Society, 109(2), 229 - 234.

Boyd, C. E., & Massaut, L. (1999). Risks associated with the use of chemicals in pond aquaculture. Aquacultural engineering, 20(2), 113-132.

Le Ruyet, J. P., Boeuf, G., Infante, J. Z., Helgason, S., & Le Roux, A. (1998). Short-term physiological changes in turbot and seabream juveniles exposed

to exogenous ammonia. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 119(2), 511–518.

Nebeker, A. V., & Schuytema, G. S. (2000). Effects of ammonium sulfate on growth of larval Northwestern salamanders, red-legged and pacific treefrog tadpoles, and juvenile fathead minnows. *Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology*, 64(2).

Boeykens, S. P., Piol, M. N., Legal, L. S., Saralegui, A. B., & Vázquez, C. (2017). Eutrophication decrease: phosphate adsorption processes in presence of nitrates. *Journal of Environmental Management*, 203, 888–895.

Pickering, A. D. (1993). Growth and stress in fish production. In *Genetics in aquaculture* (pp. 51–63). Elsevier.

Leonard, J. B., & McCormick, S. D. (1999). Effects of migration distance on whole-body and tissue-specific energy use in American shad (*Alosa sapidissima*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 56(7), 1159–1171.

Tomasso, J. R., Goudie, C. A., Simco, B. A., & Davis, K. B. (1980). Effects of environmental pH and calcium on ammonia toxicity in channel catfish. *Transactions of the American Fisheries Society*, 109(2), 229–234.

Le Ruyet, J. P., Boeuf, G., Infante, J. Z., Helgason, S., & Le Roux, A. (1998). Short-term physiological changes in turbot and seabream juveniles exposed to exogenous ammonia. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 119(2), 511–518.

Pickering, A. D. (1993). Growth and stress in fish production. In *Genetics in aquaculture* (pp. 51–63). Elsevier.

Leonard, J. B., & McCormick, S. D. (1999). Effects of migration distance on whole-body and tissue-specific energy use in American shad (*Alosa sapidissima*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 56(7), 1159–1171.

Houston, A. H., Roberts, W. C., & Kennington, J. A. (1996). Hematological response in fish: pronephric and splenic involvements in the goldfish, *Carassius auratus* L. *Fish Physiology and Biochemistry*, 15(6), 481–489.

Hooda, O. K., & Upadhyay, R. C. (2014). Physiological responses, growth rate and blood metabolites under feed restriction and thermal exposure in kids. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 10(2), 214–227.

Lushchak, V. I., & Bagnyukova, T. V. (2006). Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 2. Antioxidant and associated enzymes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 143(1), 36–41.

Martínez-Álvarez, R. M., Morales, A. E., & Sanz, A. (2005). Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 15(1), 75–88.

Koban, M., Yip, A. A., Agellon, L. B., & Powers, D. A. (1991). Molecular adaptation to environmental temperature: heat-shock response of the eurythermal teleost *Fundulus heteroclitus*. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol*, 1(1), 1–17.

Iwama, G. K., Thomas, P. T., Forsyth, R. B., & Vijayan, M. M. (1998). Heat shock protein expression in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*,

8(1), 35-56.

Molins-Legua, C., Meseguer-Lloret, S., Moliner-Martinez, Y., & Campíns-Falcó, P. (2006). A guide for selecting the most appropriate method for ammonium determination in water analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 25(3), 282-290.

Diggles, B., Jubb, C., McDowall, R. M., Moore, A., Richards, A., & Rowe, D. K. (2007). Review of the impacts of introduced aquarium fish species that have established wild populations in Australia. Prepared for the Australian Government Department of Environment and Water Resources.

Katano, O., Hosoya, K., Iguchi, K. I., & Aonuma, Y. (2001). Comparison of fish fauna among three types of rice fields in the Chikuma River basin. *Japanese Journal of Ichthyology*, 48(1), 19-25.

Kano, Y., Kawaguchi, Y., Yamashita, T., & Shimatani, Y. (2010). Distribution of the oriental weatherloach, *Misgurnus anguillicaudatus*, in paddy fields and its implications for conservation in Sado Island, Japan. *Ichthyological research*, 57(2), 180-188.

Jeong, M. R. (2010). A study of habitat environmental characteristics of mudfish inhabited in rice field (Doctoral dissertation, MS thesis, Korea National University of Education, Chung-buk, Korea).

Kim, J. O., Shin, H. S., Yoo, J. H., Lee, S. H., Jang, K. S., & Kim, B. C. (2011). Functional evaluation of small-scale pond at paddy field as a shelter for mudfish during midsummer drainage period. *Korean Journal of Environmental Agriculture*, 30(1), 37-42.

Harding, J. S., Norton, D. A., & McIntosh, A. R. (2007). Persistence of a significant population of rare Canterbury mudfish (*Neochanna burrowsius*) in

a hydrologically isolated catchment.

Liu, J., & Cai, Q. (1998). Integrated aquaculture in Chinese lakes and paddy fields. *Ecological Engineering*, 11(1-4), 49-59.

Munsiri, P., Boyd, C. E., Teichert-Coddington, D., & Hajek, B. F. (1996). Texture and chemical composition of soils from shrimp ponds near Choluteca, Honduras. *Aquaculture International*, 4(2), 157-168.

Johnson, E. O., Kamilaris, T. C., Chrousos, G. P., & Gold, P. W. (1992). Mechanisms of stress: a dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 16(2), 115-130.

Portz, D. E., Woodley, C. M., & Cech, J. J. (2006). Stress-associated impacts of short-term holding on fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 16(2), 125-170.

Roche, H., & Bogé, G. (1996). Fish blood parameters as a potential tool for identification of stress caused by environmental factors and chemical intoxication. *Marine environmental research*, 41(1), 27-43.

Houston, A. H., Roberts, W. C., & Kennington, J. A. (1996). Hematological response in fish: pronephric and splenic involvements in the goldfish, *Carassius auratus* L. *Fish Physiology and Biochemistry*, 15(6), 481-489.

Witeska, M. (2005). Stress in fish-hematological and immunological effects of heavy metals. *Electronic journal of ichthyology*, 1(1), 35-41.

Haux, C., Sjöbeck, M. L., & Larsson, Å. (1985). Physiological stress responses in a wild fish population of perch (*Perca fluviatilis*) after capture and during

- subsequent recovery. *Marine Environmental Research*, 15(2), 77-95.
- Logaswamy, S., Radha, G., Subhashini, S., & Logankumar, K. (2007). Alterations in the levels of ions in blood and liver of freshwater fish, *Cyprinus carpio* var. *communis* exposed to dimethoate. *Environmental monitoring and assessment*, 131(1), 439-444.
- Morgan, J. D., & Iwama, G. K. (1981). Measurements of stressed states in the field. *Fish Stress and Health in Aquaculture*, 62, 247.
- Lockridge, K. A. (1981). *Fish stress and health in aquaculture* (Vol. 62). Cambridge University Press.
- Gopal, V., Parvathy, S., & Balasubramanian, P. R. (1997). Effect of heavy metals on the blood protein biochemistry of the fish *Cyprinus carpio* and its use as a bio-indicator of pollution stress. *Environmental monitoring and assessment*, 48(2), 117-124.
- Bouck, G. R., & Ball, R. C. (1967). Distribution of low mobility proteins in the blood of fishes. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 24(3), 695-697.
- Jeney, G., Nemcsok, J., Jeney, Z. S., & Olah, J. (1992). Acute effect of sublethal ammonia concentrations on common carp (*Cyprinus carpio* L.). II. Effect of ammonia on blood plasma transaminases (GOT, GPT), G1DH enzyme activity, and ATP value. *Aquaculture*, 104(1-2), 149-156.
- Pickering, A. D. (1993). Growth and stress in fish production. In *Genetics in aquaculture* (pp. 51-63). Elsevier.
- Brown, S. B., Eales, J. G., Evans, R. E., & Hara, T. J. (1984). Interrenal, thyroidal, and carbohydrate responses of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to environmental acidification. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic*

Sciences, 41(1), 36-45.

Samaras, A., Dimitroglou, A., Kollias, S., Skouradakis, G., Papadakis, I. E., & Pavlidis, M. (2021). Cortisol concentration in scales is a valid indicator for the assessment of chronic stress in European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Aquaculture*, 545, 737257.

Morgan, J. D., & Iwama, G. K. (1981). Measurements of stressed states in the field. *Fish Stress and Health in Aquaculture*, 62, 247.

Nakano, K., Takemura, A., Nakamura, S., Nakano, Y., & Iwama, G. K. (2004). Changes in the cellular and organismal stress responses of the subtropical fish, the Indo-Pacific sergeant, *Abudefduf vaigiensis*, due to the 1997 - 1998 El Nino/Southern Oscillation. *Environmental Biology of Fishes*, 70(4), 321-329.

Skulachev, V. P. (2012). Mitochondria-targeted antioxidants as promising drugs for treatment of age-related brain diseases. *Journal of Alzheimer's Disease*, 28(2), 283-289.

Lushchak, V. I. (2016). Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach. *Fish physiology and biochemistry*, 42(2), 711-747.

Lushchak, V. I. (2011). Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 153(2), 175-190.

Wilhelm-Filho, D., Gonzalez-Flecha, B., & Boveris, A. (1994). Gill diffusion as a physiological mechanism for hydrogen peroxide elimination by fish. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research= Revista Brasileira de Pesquisas Medicas e Biologicas*, 27(12), 2879-2882.

Nunes, B., Caldeira, C., Pereira, J. L., Gonçalves, F., & Correia, A. T. (2015). Perturbations in ROS-related processes of the fish *Gambusia holbrooki* after acute and chronic exposures to the metals copper and cadmium. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(5), 3756–3765.

Wen, B., Jin, S. R., Chen, Z. Z., & Gao, J. Z. (2018). Physiological responses to cold stress in the gills of discus fish (*Symphysodon aequifasciatus*) revealed by conventional biochemical assays and GC-TOF-MS metabolomics. *Science of the Total Environment*, 640, 1372–1381.

Wang, S., Meng, F., Liu, Y., Xia, S., & Wang, R. (2021). Exogenous inositol ameliorates the effects of acute ammonia toxicity on intestinal oxidative status, immune response, apoptosis, and tight junction barriers of great blue-spotted mudskippers (*Boleophthalmus pectinirostris*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 240, 108911.

Zheng, L., Wei, H., Yu, H., Xing, Q., Zou, Y., Zhou, Y., & Peng, J. (2018). Fish skin gelatin hydrolysate production by ginger powder induces glutathione synthesis to prevent hydrogen peroxide induced intestinal oxidative stress via the Pept1-p62-Nrf2 cascade. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(44), 11601–11611.

Ellis, T., Yildiz, H. Y., López-Olmeda, J., Spedicato, M. T., Tort, L., Overli, O., & Martins, C. I. (2012). Cortisol and finfish welfare. *Fish physiology and biochemistry*, 38(1), 163–188.