



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](#)

이학석사 학위논문

조피볼락, *Sebastes schlegeli*의
생리·생화학적 변동에 미치는
구리 및 온도의 복합적 영향



2012년 2월

부경대학교 대학원

수산생명의학과

백수경

이학석사 학위논문

조피볼락, *Sebastes schlegeli*의
생리·생화학적 변동에 미치는
구리 및 온도의 복합적 영향

지도교수 강 주 찬

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함

2012년 2월

부경대학교 대학원

수산생명의학과

백 수 경

백수경의 이학석사 학위논문을 인준함.

2012년 2월



주	심	농학박사	허민도	인
위	원	이학박사	정현도	인
위	원	이학박사	강주찬	인

목 차

Abstract	iii
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	6
1. 실험어	6
2. 실험조건	7
3. 전혈	9
4. 혈청	9
5. 조피블락의 콜티졸 (Cortisol) 분석	10
6. 생화학적 분석	10
6-1. GSH	10
6-2. GST	11
6-3. GPx	11
6-4. GR	11
6-5. SOD	12
6-6. Protein	12
7. 유의성 검정	12
III. 결 과	13
1. 혈액성상	13
2. 혈청 내 성분 분석	15
3. 조피블락의 콜티졸 (Cortisol) 농도 변화	21

4. 생화학적 분석	23
4-1. GSH	23
4-2. GST	27
4-3. GPx	31
4-4. GR	35
4-5. SOD	39
IV. 고찰	43
V. 요약	51
VI. 감사의 글	52
VII. 참고문헌	54



Combined effect of Cu and temperature on physiological and biochemical
change of rock fish, *Sebastes schlegeli*

Su Kyong Baeck

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

Abstract

Copper (Cu) is an essential metal for all organisms including fish. It has an important role in metabolism and its concentration is well regulated. However, Cu is one of the most toxic metals to fish and affects various blood parameters, growth, behavior, enzyme activity, and reproduction.

Exposed to this toxicant, fish is under stress, and consequently, it can also affect ability to maintain homeostasis.

This study was conducted to investigate effects on hematological parameters and oxidative stress and concentration of cortisol in rock fish, *Sebastes schlegeli* exposed copper for 4 days. Temperature condition was 18°C, 23°C and 28°C, copper concentration was 100ppm, 200ppm, respectively.

The RBC count and Ht were significantly decreased in exposed rock fish compared to control group.

The rock fish exposed to all copper concentration started to increase significantly in serum calcium. Serum magnesium started to increase significantly

to all copper concentration but a little decreased at 23°C.

Although serum total protein concentrations was significantly increased compared to the control group at copper concentration 100ppm, serum glucose concentration was found to be significantly increased over the control group. A significant increment of GOT, GPT and LDH activities in the rock fish serum was noticed at all temperature conditions.

GSH and GST activities in the rock fish serum was increased in liver, gill and kidney, GPx activities was decreased. GR activities was increased in liver and gill however, significance was confirmed only in kidney.

In Summary, copper can lead to stress to fish, homeostasis was wrecked in metabolic processes.



I. 서론

2007년 발생한 삼성-Hebel Spirit호 원유 유출사고를 비롯하여, 1967년의 Torrey Canyon호 사고와 1978년 Amoco Cadiz호 사고 같은 대형 유조선의 기름유출사고와 인구증가와 더불어 급속한 산업화, 도시화에 따른 공장폐수, 농업폐수, 슬러지(sludge)들이 연안으로 유입되면서 해양생태계의 환경오염은 큰 문제가 되고 있다. 해양생태계는 더 이상 오염원에 대한 자연의 자정작용만으로 유지, 보존되기 어려워졌으며, 오염물질이 수서생태계에 축적, 잔류함에 따라 나타나는 여러 가지 영향은 상당 기간 동안 지속될 것이다. 인류가 발전해 오면서 발견되거나 인위적으로 만들어 내는 다양한 물질과 화학물질의 종류는 엄청나며 매년 새로운 화학물질과 독성물질이 추가되고 있다. 이러한 물질 중에는 중금속도 포함되는데 금속 중 비중이 4~5 이상인 모든 금속류를 중금속이라 한다. 중금속 중 아연, 철, 구리, 코발트 등과 같은 금속은 인체 내에 생체의 정상적인 구성 성분이며, 생리 기능을 유지하며 물질대사에 관여하는 효소의 보조인자로 작용한다 (Great and Bebianno, 2004). 그러나 중금속은 비록 미량일지라도 수중생물에 농축, 축적이 가능하며, 특히 어류에 급·만성 독성을 가지고 있는 독성 물질들은 연안 해역으로 유입된 후 장·단기적으로 해양생태계에 여러 가지 영향을 미칠 수 있다. 먹이연쇄를 통해 인체에까지 영향을 끼치므로 중금속에 의한 수서생물의 오염은 인류의 공중보건에도 직결되는 심각한 문제가 될 수 있다 (Friberg and Vostal, 1972).

구리는 (원자기호: Cu, 원자번호: 29번, 비중: 8.65, 녹는점: 1,083℃) 각종 전기 전자 제품 제조에 이용되고, 다양한 합금의 원료, 열전기전도율이 뛰어나므로 전선이나 열선, 화학촉매제, 선체 부착생물 방지용 도료제조, 조류부착방지제 및 목재 보존 재료의 다양한 용도로 쓰이고 있으며 (Clark, 1996) 양어지와 부화장의 질병치료에도 효

과가 있음이 알려지면서 양어장에서도 종종 사용하고 있다 (Tucker, 1985). 황산구리의 경우 상업적으로 개조된 어장에서 살조제로서 널리 사용되었으며, 어류의 병원성 원생동물인 기생충에 대해서 효과적으로 처리되어 많이 사용된다. 또한 구리는 모든 생물에게 필수적인 미량원소로, 건강한 성인의 체내에는 약 80 mg의 구리가 존재한다. 동물에서는 근육, 간, 뇌를 비롯하여 여러 조직에 널리 존재한다. 생체 내에서 구리는 많은 종류의 구리 단백질 또는 구리 효소로 존재하며, 전자전달, 산소운반, 산화환원 등에서 광범위하고 중요한 기능을 담당한다. 아즐린이나 플라스토시아닌 등의 짙은 청색을 띠는 청색 구리 단백질은 세균이나 엽록체의 전자전달을 담당하며, 갑각류나 연체동물의 호흡색소인 헤모시아닌의 중요한 성분으로, 동물의 hemoglobin 내부의 철과 마찬가지로 산소를 운반하는 역할을 한다 (Zolla *et al.*, 1984).

그러나 고농도로 존재하게 될 경우에는 독성을 나타내며, 일반적으로 구리는 경골어류에 높은 독성이 있는 것으로 알려져 있다 (Perschbacher and Wurts, 1999). 특히 어류는 물이라는 환경적 취약성을 가지고 있으며, 아가미는 수중 환경의 구리가 들어가는 주요한 표적기관이 되기 때문에 구리 독성의 mechanism은 주로 아가미에 집중된다. 게다가 구리 노출은 이온 수송 장애를 일으키고 가스교환 과정에서 이온 및 삼투조절장애, 호흡과 산-염기 장애를 일으킨다. 또한 세포사이에 있는 단백질 조직을 변형시키고 직접적으로 효소를 변성시키거나 간접적으로 활성산소를 야기 시킨다. 중요한 세포 독성역할로 ROS (reactive oxygen radical)가 생성되는데 O_2^- (superoxide anion), H_2O_2 (hydrogen peroxide), OH^- (hydroxyl radical) 등이 포함된다. 산화적 스트레스가 초래되면 DNA의 손상, 세포내의 유리 칼슘과 철 이온 농도의 증가, 세포막의 이온 수송계 손상, 단백질 손상, 지질과 산화를 포함한 세포대사의 심각한 이상을 초래하게 된다. 생체 내에서 지질의 산화는 돌연변이를 일으키거나 효소를 불활성화시키며 세포막의 유동성을 감소시키고 막 단백질의 기능을 저하시킨다. 핵산의 경우는 염기나 당의 부가 생성물 합성, 단일 혹은 이중나선의 파괴, 다른 분자들의 교차결합

을 초래하고, 단백질이 산화되면 아미노산의 산화적부가물 생성, 단백질-단백 간의 교차 결합 펩타이드 분열 등이 초래될 수 있다 (Valavanidis *et al.*, 2006).

이처럼 다양한 용도로 사용된 구리는 환경 유입에 있어서 필연적이고, 해수로 유입되는 구리의 양이 증가하면서 많은 수생동물에 영향을 끼치게 되었다. 또한 우리나라는 고밀도 집약적인 어류양식이 행해지고 있어, 해양환경을 악화시킬 뿐만 아니라 어류에게도 여러 가지 스트레스 요인으로 작용하여 각종 질병을 유발시키고 있다 (Lee *et al.*, 2002).

스트레스는 어떤 상황에서 주어지는 외적 혹은 내적 요구가 유기체의 능력 범위를 넘어설 때 발생하는 생리적·심리적 적응 과정으로, 일반적으로 스트레스의 개념은 자극으로서의 스트레스, 반응으로서의 스트레스, 개인과 환경 간의 역동적인 상호 작용으로서의 스트레스 등 크게 세 가지로 나눌 수 있다. 어류에서 스트레스는 항상성이라는 역학적인 평형이 내적 외적 자극으로 인해 피해를 받거나 방해를 받는 상태를 말한다 (Chrousos and Gold, 1992).

스트레스를 일으키는 요인에는 온도 및 탁도와 같은 물리적 환경이나, 낮은 수중의 수소이온 농도 (pH), 중금속, 유기 오염 물질에 의한 수질오염 (Smet and Blust, 2001), 밀식, 선별, 이동 등 양식 환경에서 발생하는 여러 가지 문제들이 영향을 미칠 수 있다.

스트레스는 어류의 카테콜아민과 콜티졸을 과다 분비하는 내분비 반응을 유도함으로써 비축된 에너지원의 빠른 소비를 유발하여 (Barton and Iwama, 1991; Pickering *et al.*, 1993) 성장을 둔화시킬 수 있으며 (Pickering, 1990), 어체에 생화학적인 작용을 가함으로써 건강도에도 영향을 미칠 수 있다 (Specker and Schreck, 1980).

스트레스에 대하여 어체는 일반적으로 1, 2 및 3차의 반응을 나타내는데, 1차 반응에서는 혈중 카테콜아민과 코르티코스테로이드의 빠른 교환이 일어난다. 이는 스트레스로 인한 건강상태에 적응하려는 어류의 반응이며, 이 적응반응이 과도하면 어체에

해로운 2, 3차 반응으로 이어지게 된다 (Mazeud *et al.*, 1977).

스트레스에 대한 생리적 반응의 종류는 다양하지만 여기서는 스트레스의 1차적 반응 지표인 혈중 cortisol 호르몬 (Iger *et al.* 1995)의 농도변화를 조사하고자 한다. 어류에서 콜티졸 (cortisol) 같은 일차적인 반응 호르몬의 측정에 의한 정량은 스트레스에 대한 영향을 판단하기 위해서 사용 된다 (Gamperl *et al.*, 1994).

혈장에서 콜티졸과 카테콜아민의 분비는 일반적으로 쉽게 측정할 수 있는 신뢰성 있는 스트레스 지표이며, 스트레스를 받지 않은 상태에서는 매우 낮은 상태이지만 급성적인 스트레스가 유도되면 정상적인 상태보다 증가한다. 하지만 수질이라는 특정한 환경에 있을 때에는 정상적인 상태보다 낮게 측정되는 경우도 있다 (Pickering *et al.*, 1982; Barton and Iwama, 1991).

콜티졸은 시상하부-뇌하수체-간신선 (hypothalamus-pituitary-interrenal axis, HPI axis)에 의해 자극되고 분비되는 corticosteorid hormone의 대표적인 구성요소이며, 직접적 간접적으로 에너지 대사에 관여하고 (Vijayan and Moon, 1994; Vijayan *et al.*, 1994, 1996, 1997), 이온과 삼투조절 (McCormick, 1995), 면역기능에 중요한 역할을 한다 (Wendelaar Bonga, 1997). 그리고, 탄수화물, 단백질, 지질대사에 관여하며 간에서 글루코즈의 생성에 관여한다. 콜티졸의 농도가 스트레스 상황 하에서 항상 증가하는 것은 아니다 (Maule *et al.*, 1993).

조피볼락, *Sebastes schlegeli*은 우리나라 연안에 서식하는 대표적인 난태생 어류이다. 체외에 알을 낳아서 번식하는 난생어류와 달리 이 종은 약 50일간의 임신기간을 거친 후 (Yamada and Kusakari, 1991) 작은 새끼 물고기를 출산한다. 출산 시기는 4~6월, 수온이 15~16℃ 전후되는 4~6월경에 연안의 암초지대에서 전장 7 mm 전후되는 새끼를 낳는다. 포란수는 전장 33~37 cm(3년생)은 2만~6만개, 42~45 cm(6년생)은 약 10만~19만개, 58 cm는 약 41만개이다. 주로 어류를 잡아먹으며, 그 외 새우, 게류 등 갑각류와 오징어류 등도 포식한다. 밤에는 흩어져 중층이나 표층으로 떠

올라 그다지 활동을 하지 않으나, 낮에는 가라 앉아 무리를 지어 활발히 활동하고, 특히 아침, 저녁에 왕성한 활동을 보인다. 이 종은 또한 성장이 빠르고 겨울철 저수 온에도 강하여 넙치와 더불어 우리나라 대표적인 해산 양식어종으로 개발되어 있다. 뿐만 아니라 우리나라 전 연안에 분포하여 환경생태학적 중요성도 높다.

급격한 온도의 변화는 항상성 유지에 필요한 생체 내 대사와 혈액성상, 호르몬 분비에 변화를 일으킨다. 이러한 변화는 어류의 생존, 성장, 생식, 삼투작용 등에 큰 영향을 나타내며, 갑작스런 온도의 상승과 하강은 섭이, 성장, 생식, 면역 등에 영향을 줄 수 있다 (Barton and Iwama, 1991).

현재 구리의 축적에 따른 패류 (참굴, 갈굴, 백합, 진주 담치, 우렁챙이)에 관한 연구들이 주로 이루어지고 있고, 어류 (방어, 돌돔)와 곤쟁이의 급성과 만성독성에 대한 보고가 있으나 구리에 의한 스트레스 반응과 독성에 관한 연구는 미비한 실정이다.

따라서, 본 연구는 조피볼락 양식 과정과 연안오염으로 인해 발생할 수 있는 온도, 구리노출에 대한 스트레스 반응을 검토하고, 혈액성상, 혈중 호르몬의 변화, 글루타치온 (GSH)과 그와 관련된 효소 (GST, GR)와 항산화효소 (GPx, SOD)의 활성을 조사하고 생화학적 반응을 검토하여 환경 생태분석, 모니터링 및 수질오염의 지표로 사용될 수 있으며, 수서 생물의 중금속에 대한 이해와 피해 예방의 기준을 마련하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 실험어

본 실험에 사용한 실험어 조피볼락, *Sebastes schlegeli*은 경상남도 고성 양식장에서 구입한 전장 13.29 ± 1.03 cm, 체중 29.76 ± 1.04 g인 어류로, 실험실에서 일주일 이상 순치시킨 후 외관상 질병의 증세가 없는 건강한 개체를 선별하여 $39 \times 54 \times 30$ 40 L 유리 수조에 각 12 마리씩 9 구간으로 입식하였다.



2. 실험 조건

사육수는 대형 수조에 받은 후, 하루 이상 폭기시켜 수온을 일정하게 유지시킨 후 환수하였다. 온도 변화는 Electronic thermostat (MS701-H, Mink, Korea) 히터기를 사용하였으며, Heat shock를 주기 위해서 18℃, 23℃, 28℃로 유지시켰다.

수질은 Table 1에 나타내었다.

구리의 표준 용액은 Copper (II) Sulfate minimum 99% (sigma, F. W. : 159.6) 로 만들어 사용하였으며 노출구간은 급성독성 실험을 통하여 각 온도의 농도는 100ppm, 200ppm으로 설정하였다.

시료채취는 온도 shock에 의한 반응을 보기위해 노출 4일 후에 채취하였고, 오류와 오차 범위를 줄이기 위해 2번 반복 실험 하였다. 각 실험마다 전장, 체중을 측정하고, 조직 내 생화학적인 변동을 알아보기 위해 실험어에서 간, 신장, 아가미를 채취하였다.



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

Item	Value
Temperature (°C)	18.0 ± 2
pH	8.10 ± 0.3
Salinity (‰)	33.1 ± 0.5
Dissolved Oxygen (mg/L)	6.9 ± 0.5
Chemical Oxygen Demand (μg/L)	1.32 ± 0.4
Ammonia (μg/L)	12.58 ± 1.6
Nitrite (μg/L)	1.33 ± 1.5
Nitrate (μg/L)	10.55 ± 0.5



3. 전혈

실험어는 Ethyl p-aminobenzoate (Sigma chemical, St. Louis, MO)으로 마취시킨 뒤, 혈액응고를 막기 위해 heparine-Na (5,000 I. U., 중외제약)을 처리한 주사기를 사용하여 미부정맥에서 채혈하였다.

채혈한 즉시 적혈구 수 (Red Blood Cell count), hemoglobin (Hb) 및 hematocrit (Ht)를 측정하였다. 적혈구수는 Hendrick's diluting solution으로 혈액을 1 : 200으로 희석한 후, hemo-cytometer (Improved Neubauer, Germany)를 이용하여 광학 현미경으로 계수하였다.

혈중 Hb 농도는 시판되고 있는 임상용 kit (Sigma Co., USA)를 이용하여 Cyan-methemoglobin법으로 측정하였으며, Ht은 hematocrit 모세관으로 혈액을 채혈한 후, microgematocrit centrifuge (HAWKSLEY AND SONS Ltd., England)에서 12,000 rpm으로 5 분간 원심분리한 다음 판독관 (Micro-Haematocrit reader, HAWKSLEY AND SONS, England)으로 측정하였다.

4. 혈청

채취한 혈액은 4℃, 6000 rpm으로 5 분간 원심분리하여 (MICRO 22R, Hettich, Germany) 혈청을 분리하였다.

혈청의 무기성분은 칼슘 (calcium)은 Arsenazo III법, 마그네슘(magnesium) 측정은 Xylidyl blue- I 법을 사용하였다 (Asan Pharm Co., Ltd).

혈청의 유기성분의 변화는 총단백질 (total protein)과 글루코즈 (glucose)의 변동을 조사하였으며 각각 Biuret법, GOD/POD법을 사용하는 임상용 키트 (Asan Pharm. Co., Ltd)를 사용하여 측정하였다.

혈청 중 효소 활성의 변화는 GOT (glutamic oxalate transaminase), GPT (glutamic pyruvate transaminase)를 측정하였다. GOT와 GPT는 Reitman-Frankel법으로 측정하였다.

5. 조피블락의 콜티졸 (Cortisol) 분석

혈액을 상온에서 20분간 방치한 뒤, 원심분리 ($12000 \times g$, 25분)에 의해 혈장을 추출하여 -70°C 에 보관하면서 콜티졸 (cortisol)의 분석에 사용하였다. 콜티졸 추출은 조피블락 혈장 $250 \mu\text{l}$ 에 3 ml의 헥산을 첨가하여 강하게 혼합한 후 5~10분간 안정시킨 뒤, -70°C 의 냉동고에서 20분간 결빙시킨 뒤 에테르 층 (free steroids)을 시험관에 옮겨 진공원심분리기로 건조 시켰다. 위의 과정을 2회 반복한 뒤 완전 건조된 스테로이드 추출물은 0.1% gel-PBS buffer (pH=7.5)에 다시 용해한 후 방사면역측정법 (RIA-Radioimmunoassay)으로 분석하였다. 본 실험에 사용된 방사선 표지 cortisol은 [1, 2, 6, 7- ^3H] cortisol (Amersham)이며, cortisol 항체는 Sigma (Anticortisol, antibody produced in rabbit) 제품을 사용하였다.

6. 생화학적 분석

간, 신장, 아가미 조직은 효소 활성 등을 측정하게 위해 먼저 washing buffer (0.1 M KCl, pH 7.4)로 세척하였다. 세척 후, 각 조직은 homogenizing buffer (0.1 M K_2HPO_4 , 0.15 M KCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA and 0.1 mM PMSF)를 이용하여 teflon-glass homogenizer (099CK4424, Glass-Col, Germany)로 균질화 하였다. 이것을 4°C 에서 $12,000 \times g$ 로 25 분간 원심분리하여 상등액을 얻은 후 실험 전까지 -75°C (MDF-U53V, SANYO Electric Co. Ltd., Japan)에 보관하였다.

6-1. GSH (Glutathione level)

총 글루타치온 (GSH) 함량은 Richardson and Murphy (1975)의 방법에 의하여 측정되었다. 일정 시료에 0.01 M 5, 5'-dithiobis, 2-nitrobenzoic acid (DTNB), 0.1 M PBS buffer (pH 8.0)을 첨가하여 파장 412 nm에서 측정하였다 (Zenyth 200, Anthos Labtec Instruments GmbH, Austria). GSH 함량 계산은 10 nM reduced glutathione

standard solution을 사용한 검량선을 바탕으로 측정하였다.

6-2. GST (Glutathione S-transferase)

GST 효소 활성은 Habig *et al.* (1974)의 방법을 응용하여 측정하였다. 일정량의 시료에 0.2 M potassium phosphate (pH 6.5)와 증류수를 넣어 혼합시킨 뒤 10 mM GSH와 10 mM CDNB를 첨가한다. 실온에서 1분 정도 반응 시킨 뒤에 분광광도계 (Zenyth 200, Anthos Labtec Instruments GmbH, Austria)를 사용하여 파장 340 nm에서 5분동안 30초 단위로 증가하는 값을 측정하여 활성을 nmol/min/mg protein으로 표시하였다.

6-3. GPx (Glutathione peroxidase)

GPx 효소는 Bell *et al.* (1985)의 방법으로 수정한 것으로 H₂O₂를 기질로, sodium azide를 catalase 억제제로 사용하였다. 시료에 1 mM GSH, 0.1 mM NADPH, 0.5U GSH-reductase, 1 mM EDTA, 2 mM sodium azide 및 50 mM 인산완충용액 (pH 7.4)이 포함된 혼합용액을 가한 후 5분 동안 20°C에서 배양하였다. 반응은 2.5 mM H₂O₂를 넣는 동시에 시작되었다. NADPH가 산화되는 비율은 340 nm에서 4분 동안 20초 단위로 분광광도계 (Zenyth 200, Anthos Labtec Instruments GmbH, Austria)로 측정하였고, 단위는 nmol/min/mg protein으로 표시하였다.

6-4. GR (Glutathione reductase)

GR 효소는 Beutler (1984)의 방법을 통하여 측정하였다. 시료에 1 mM EDTA가 포함된 potassium phosphate (pH 7.5), 2 mM oxidized glutathione(GSSEG) 및 3 nM DTNB를 첨가한다. 반응은 당일 조제한 NADPH의 첨가로 시작한다. NADPH가 산화형 글루타치온 (GSSG)을 환원형 글루타치온 (GSH)으로 환원시킨 후, DTNB에

의하여 발색된 용액을 분광 흡광도 412 nm에서 30초 단위로 4분 동안 측정하였고 (Zenyth 200, Anthos Labtec Instruments GmbH, Austria), 단위는 nmol/min/mg protein 으로 표시하였다.

6-5. SOD (Superoxide dismutase)

SOD 활성은 각각의 조직시료를 0.1 M PBS buffer로 단계희석하여 시판되는 SOD Assay Kit-WST (Dojindo Laboratories. Co., Japan)로 분광흡광도 450 nm에서 측정하였다. SOD 1 unit은 WST*의 붕괴율을 50% 억제하는 Cu, Zn-SOD의 양을 나타낸다.

* WST = 2-(4-Iodophenyl)-3-(4nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt)

6-6. Protein

조직의 단백질 함량의 측정은 Bradford (1976) 방법으로 측정하였다. Bovine gamma globulin (Sigma, USA)을 사용하여 표준 검량선을 작성하였다.

7. 유의성 검정

결과의 통계처리는 SPSS 통계 프로그램 (SPSS Inc.)을 이용하여 ANOVA test를 실시한 후에 사후 다중비교로서 Tukey-Kramer method를 통해 평균간의 유의성 ($P < 0.05$)을 비교하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 혈청분석

1-1. 혈액성상

구리에 노출된 조피볼락의 혈액 성상의 변화는 Table 2에 나타내었다. Ht (Heamatocrit)은 18℃, 23℃의 경우 control, 100ppm, 200ppm의 모든 구간에서 감소하는 경향은 나타났으나 유의성은 관찰되지 않았고, 28℃에서는 100ppm, 200ppm의 농도구간에서 유의성이 나타났다.

RBC (Red Blood Cells) count의 경우 18℃에서는 100ppm, 200ppm 농도구간에서 유의적 감소가 나타났고, 23℃에서는 200ppm 구간에서만 유의적 감소가 나타났고, 28℃에서는 Control, 100ppm, 200ppm 모든 구간에서 감소하는 경향은 관찰되었으나 유의성은 나타나지 않았다.

Hb (hemoglobin)의 경우, 18℃에서는 전반적으로 Control, 100ppm, 200ppm 구간의 농도에 따라 증가하는 경향이 나타났으나 유의성은 관찰되지 않았고, 23℃, 28℃구간에서도 마찬가지로 증가하였고, 100ppm 구간에서 최고 값을 나타냈으나 유의성은 나타나지 않았다.

Table 2. Hematological data from rock fish exposed 100ppm and 200ppm at 18°C, 23°C and 28°C for 4 days

		control	100ppm	200ppm
Hematocrit (%)	18 °C	47.33±3.17 ^a	36.66±5.78 ^a	39.00±1.0 ^a
	23 °C	39.00±5.85 ^a	37.33±1.66 ^a	40.66±1.20 ^a
	28 °C	33.00±1.73 ^a	26.33±3.05 ^{ab}	25.66±2.84 ^b
RBC ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	18 °C	551.66±58.11 ^b	463.33±31.79 ^{ab}	328.33±8.81 ^a
	23 °C	498.33±45.12 ^a	498.33±24.55 ^a	618.33±13.0 ^b
	28 °C	468.33±7.63 ^a	388.33±82.51 ^a	435±52.67 ^a
Hemoglobin (g/dL)	18 °C	28.45±1.68 ^a	35.04±2.41 ^a	43.09±10.72 ^a
	23 °C	31.64±3.26 ^a	35.58±1.96 ^a	34.41±0.24 ^a
	28 °C	34.78±0.67 ^a	44.12±8.61 ^a	36.02±9.30 ^a

Values are means \pm S. E. (n=5). Values with different superscript are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Tukey-Kramer method.

2. 혈청 내 성분 분석

2-1. 혈액무기성분

혈청 무기성분의 변화는 Table 3에 나타내었다. 혈청 내 칼슘 (calcium)의 농도는 18℃, 23℃에서는 100ppm, 200ppm에서 모두 유의적 증가를 나타냈으며, 28℃에서는 200ppm 구간에서 유의적 증가를 나타냈다.

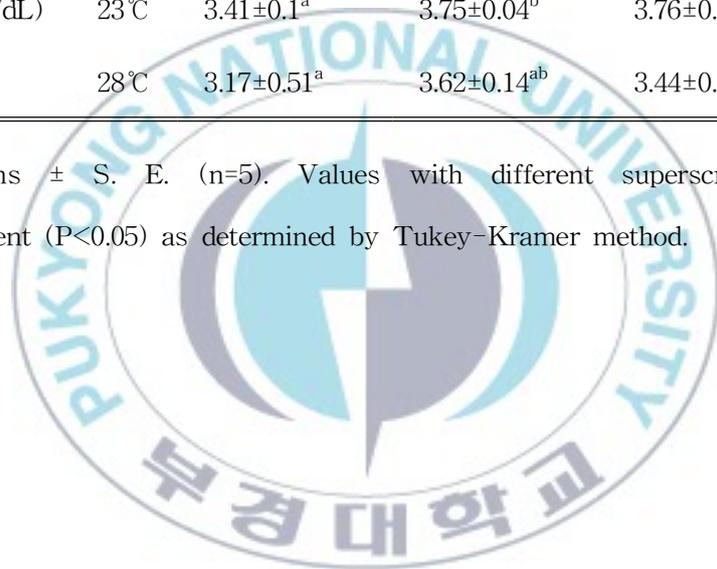
마그네슘 (magnesium)의 경우는 18℃, 23℃, 28℃에서 control과 비교하였을 때, 100ppm과 200ppm 농도 구간에서 모두 유의적인 증가가 나타났으나 100ppm과 200ppm 농도 사이에서는 유의성이 나타나지 않았다.



Table 3. Changes of plasma calcium and magnesium in rock fish exposed to various concentrations of copper for 4 days

		control	100ppm	200ppm
Calcium (mg/dL)	18°C	8.58±0.18 ^a	10.47±0.25 ^b	11.96±0.19 ^c
	23°C	9.82±0.08 ^a	10.58±0.15 ^b	11.69±0.14 ^c
	28°C	10.2±0.92 ^a	10.5±3.2 ^a	13.1±1.65 ^b
Magnesium (mg/dL)	18°C	3.45±0.13 ^a	3.60±0.03 ^{ab}	3.84±0.67 ^b
	23°C	3.41±0.1 ^a	3.75±0.04 ^b	3.76±0.08 ^b
	28°C	3.17±0.51 ^a	3.62±0.14 ^{ab}	3.44±0.66 ^b

Values are means ± S. E. (n=5). Values with different superscript are significantly different (P<0.05) as determined by Tukey-Kramer method.



2-2. 혈액유기성분

혈액 유기성분의 변화는 Table 4에 나타내었다. 총 단백질 (total protein)의 경우 18℃, 100ppm, 200ppm 농도 구간에서 유의적 증가를 나타냈으며, 23℃구간에서는 100ppm, 200ppm 구간에서 모두 유의적 증가를 나타냈으나, 농도간의 유의성은 관찰되지 않았다. 28℃에서는 18℃와 마찬가지로 100ppm, 200ppm의 모든 구간에서 유의적 증가가 나타났다.

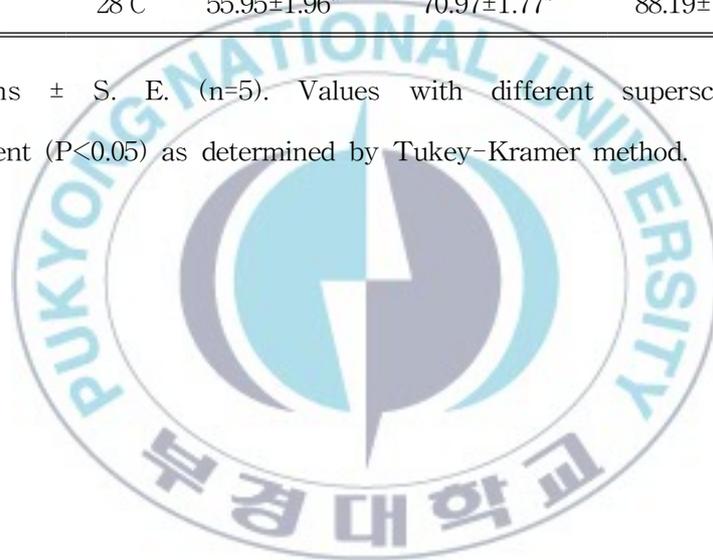
글루코즈 (glucose)의 경우에는 18℃에서는 100ppm, 200ppm농도 구간에서 유의적 증가가 나타났으나 농도간의 유의성은 관찰되지 않았고, 23℃에서는 200ppm 농도 구간에서만 유의적 증가가 관찰되었고, 28℃에서는 Control과 비교하였을 때 100ppm, 200ppm 농도구간 모두에서 유의적 증가가 나타났다.



Table 4. Changes of plasma total protein and glucose in rock fish exposed to various concentrations of copper for 4 days

		control	100ppm	200ppm
total protein (g/dL)	18°C	5.42±0.99 ^a	6.39±0.12 ^b	7.27±0.15 ^c
	23°C	6.45±0.18 ^a	7.75±0.28 ^b	8.00±0.10 ^b
	28°C	7.15±0.16 ^a	8.18±0.14 ^b	8.95±0.28 ^c
glucose (g/dL)	18°C	37.69±0.43 ^a	44.08±1.41 ^b	47.15±1.87 ^b
	23°C	59.15±0.56 ^a	58.57±1.27 ^a	62.76±0.99 ^b
	28°C	55.95±1.96 ^a	70.97±1.77 ^b	88.19±1.26 ^c

Values are means ± S. E. (n=5). Values with different superscript are significantly different (P<0.05) as determined by Tukey-Kramer method.



2-3. 혈청 효소 성분

각각 다른 온도와 농도의 구리에 노출된 조피볼락의 혈청 효소 성분으로는 GOT (Glutamic oxaloacetic transaminase), GPT (Glutamic pyruvic transaminase), LDH (Lactate dehydrogenase)를 측정하였고, 그 결과는 Table 5에 나타내었다.

GOT의 경우 18℃, 23, 28℃의 모든 온도에서 Control과 비교하여 100ppm, 200ppm 구간에서 유의적 증가가 관찰되었다.

GPT의 경우 GOT와 마찬가지로 18℃, 23℃, 28℃에서는 control과 비교하여 100ppm, 200ppm 구간에서 모두 유의적 증가가 나타났다.

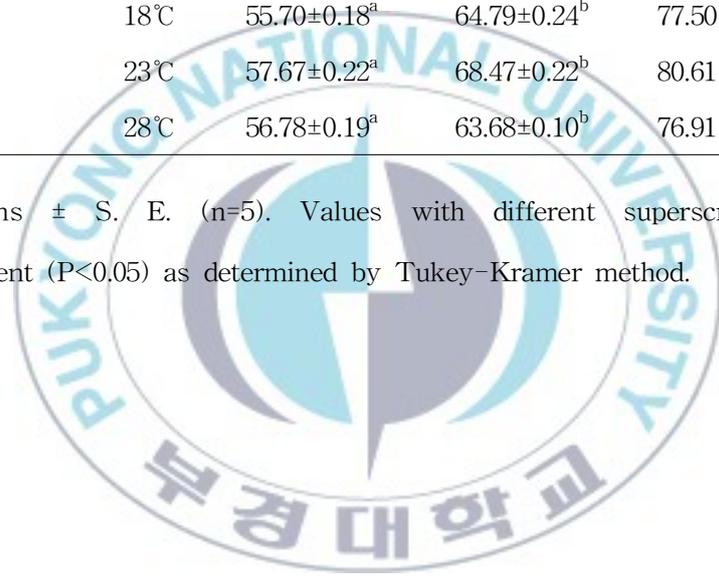
LDH의 경우 18℃, 23℃, 28℃에서 control과 비교하였을 때 100ppm, 200ppm 모든 구간에서 유의적인 증가를 나타냈다.



Table 5. Changes of plasma GOT, GPT and LDH in rock fish exposed to various concentrations of copper for 4 days

		control	100ppm	200ppm
GOT (karmen unit)	18°C	40.63±0.48 ^a	57.35±0.29 ^b	88.29±0.33 ^c
	23°C	55.78±0.32 ^a	60.74±0.19 ^b	67.72±0.66 ^c
	28°C	42.77±0.36 ^a	47.76±0.22 ^b	53.66±0.75 ^c
GTP (karmen unit)	18°C	30.96±0.06 ^a	36.44±0.26 ^b	42.65±0.25 ^c
	23°C	31.16±0.25 ^a	38.77±0.29 ^b	44.21±0.42 ^c
	28°C	34.82±0.12 ^a	39.89±0.36 ^b	42.52±0.27 ^c
LDH (IU/L)	18°C	55.70±0.18 ^a	64.79±0.24 ^b	77.50±0.18 ^c
	23°C	57.67±0.22 ^a	68.47±0.22 ^b	80.61±0.12 ^c
	28°C	56.78±0.19 ^a	63.68±0.10 ^b	76.91±0.22 ^c

Values are means ± S. E. (n=5). Values with different superscript are significantly different (P<0.05) as determined by Tukey-Kramer method.



3. 조피블락의 콜티졸 (cortisol) 농도 변화

구리에 노출된 조피블락의 콜티졸 농도 변화는 Fig. 1에 나타내었다. 18℃에서는 control과 비교하여 100ppm, 200ppm 구간에서 모두 유의적인 증가가 나타났다. 23℃에서는 control과 비교하였을 때 100ppm, 200ppm의 모든 농도 구간에서 유의성이 관찰되지 않았다. 마지막으로 28℃구간에서는 100ppm, 200ppm 농도구간에서 모두 증가하는 경향이 나타났으며 100ppm농도 구간에서 가장 높은 값을 나타내었다.



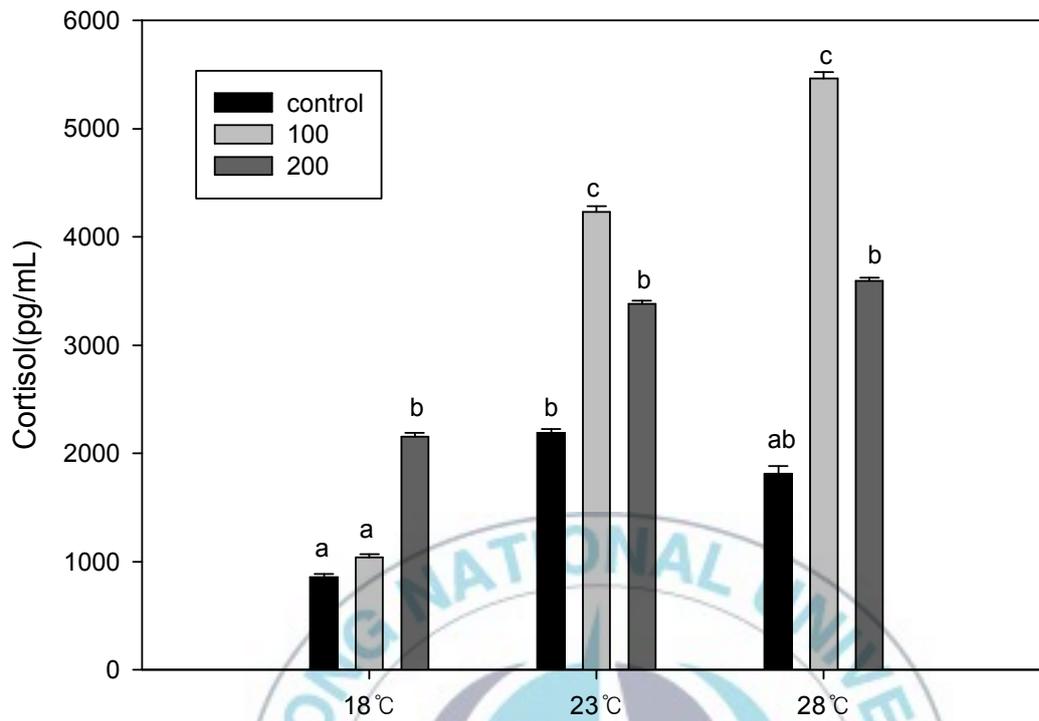


Figure 1. Cortisol level in the plasma of rock fish, *Sebastes schlegeli* exposed to the different concentrations of copper at 18°C, 23°C, 28°C in seawater. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Tukey-Kramer method.

4. 생화학적 분석

4-1. 총 글루타치온 (GSH) 함량

구리에 노출된 조피볼락의 GSH의 함량은 Fig. 2~4에 나타내었고, control에 비하여 증가한 것으로 나타났다.

먼저 간에서의 GSH의 함량은 18℃, 23℃, 28℃의 모든 구간에서 control에 비해서 100ppm, 200ppm 모든 농도에서 유의적인 증가가 나타났고, 100ppm농도 구간에서 최고 값을 나타내었다.

아기미의 경우 18℃에서는 100ppm, 200ppm의 농도구간에서 모두 증가하였고, 유의성을 나타냈다. 23℃에서도 100ppm, 200ppm의 모든 구간에서 유의적 증가 관찰되었으며, 100ppm 농도구간에서 최고 값을 나타내었다. 28℃에서는 100ppm, 200ppm 모든 구간에서 유의적 증가가 관찰되었다.

마지막으로 신장의 경우 18℃에서는 control과 비교하였을 때 100ppm, 200ppm 모든 구간에서 유의적 증가가 나타났고, 23℃에서는 Control과 비교하였을 때 100ppm, 200ppm모든 구간에서 유의적 증가가 나타났으나 농도간의 유의성은 관찰되지 않았다, 28℃에서는 control과 비교하였을 때 100ppm, 200ppm 모두 유의적 증가가 관찰되었다.

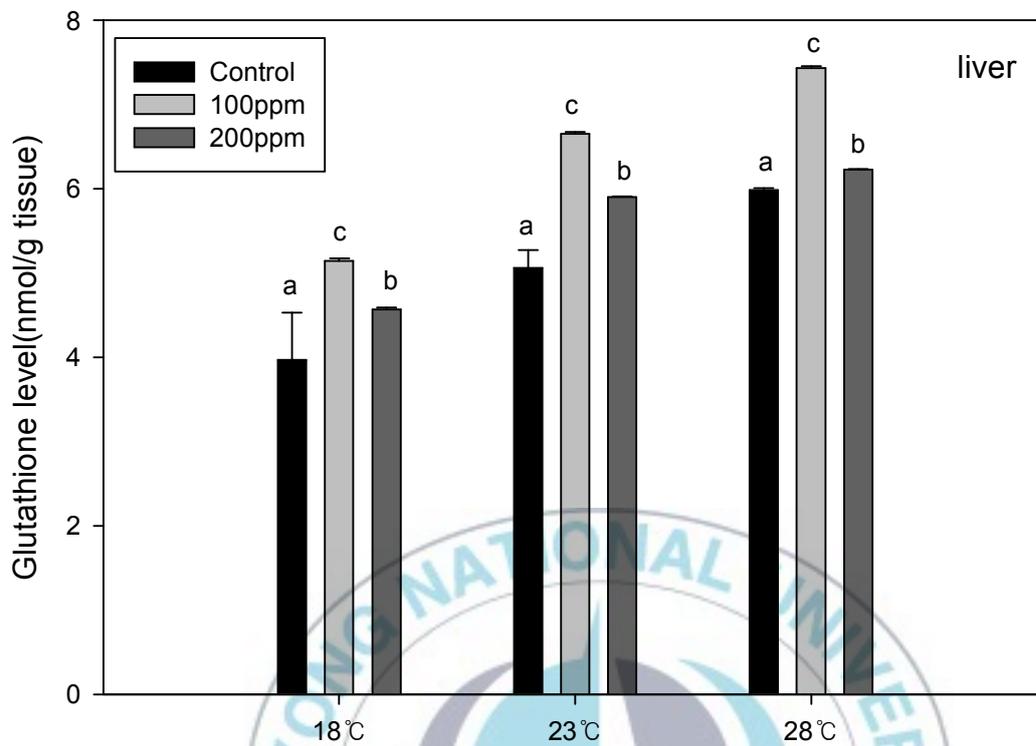


Figure 2. Glutathione reductase activity in the liver of rock fish, *Sebastes schlegeli* exposed to the different concentrations of copper at 18°C, 23°C, 28°C in seawater. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Tukey-Kramer method.

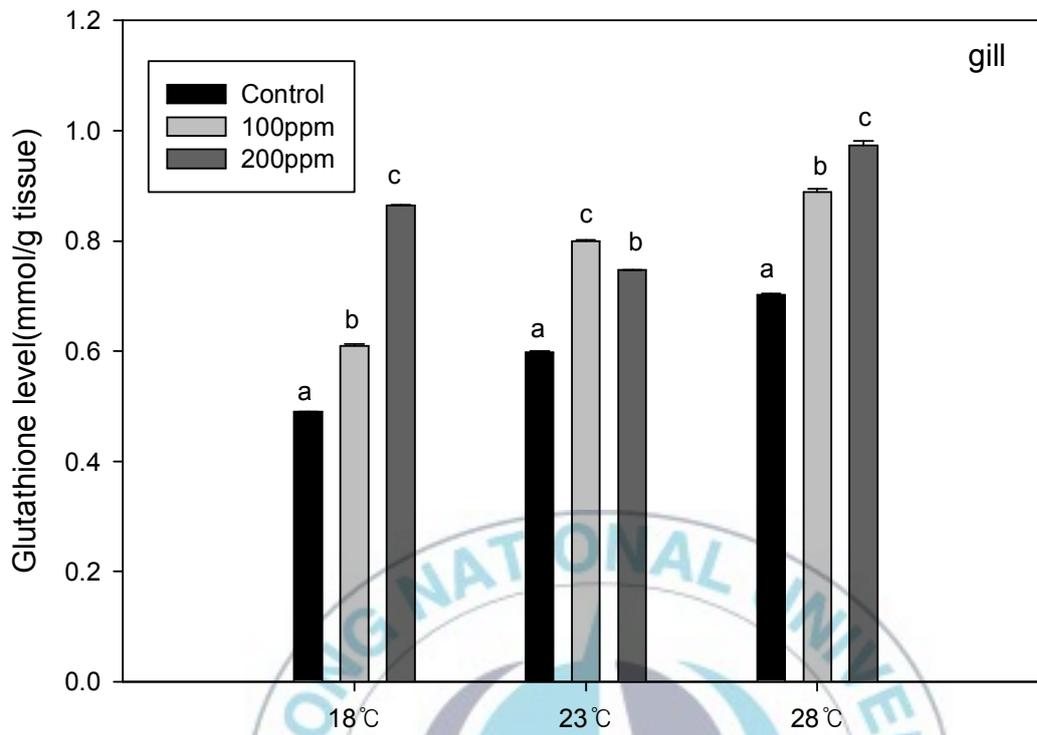


Figure 3. Glutathione reductase activity in the gill of rock fish, *Sebastes schlegeli* exposed to the different concentrations of copper at 18°C, 23°C, 28°C in seawater. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Tukey-Kramer method.

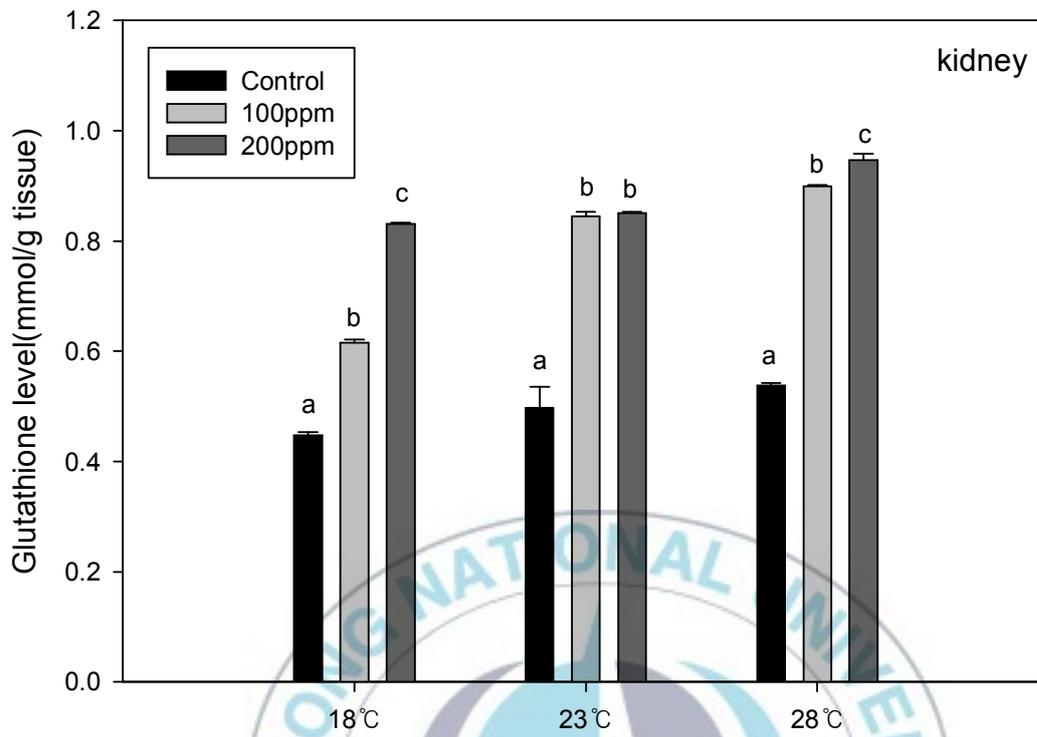


Figure 4. Glutathione reductase activity in the kidney of rock fish, *Sebastes schlegeli* exposed to the different concentrations of copper at 18°C, 23°C, 28°C in seawater. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Tukey–Kramer method.

4-2. Glutathione S-transferase (GST)

구리에 노출된 조피볼락의 간에 나타난 GST 효소의 활성은 Fig. 5에 나타내었고, 아가미에서의 활성은 Fig. 6에, 신장에서의 활성은 Fig. 7에 나타내었다.

GST의 경우 간, 아가미, 신장의 모든 조직의 18℃, 23℃, 28℃ 100ppm, 200ppm의 모든 농도 구간에서 Control과 비교 하였을 때 모두 유의적으로 증가하는 경향이 관찰되었다.



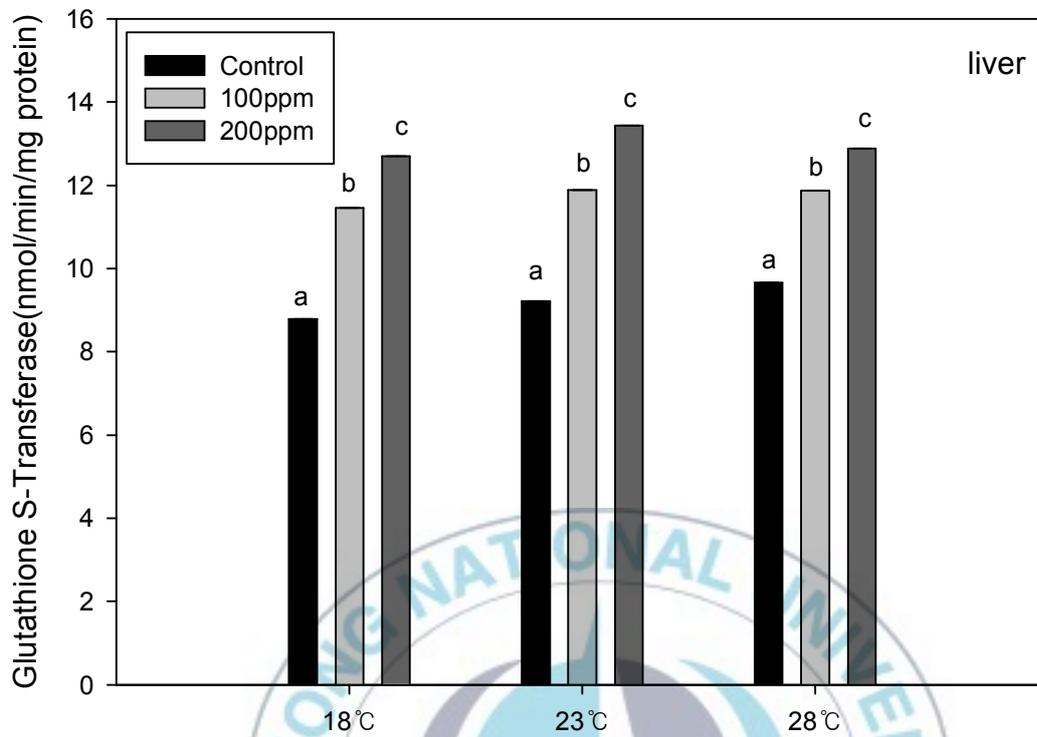


Figure 5. Glutathione S-Transferase activity in the liver of rock fish, *Sebastes schlegeli* exposed to the different concentrations of copper at 18°C, 23°C, 28°C in seawater. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Tukey-Kramer method.

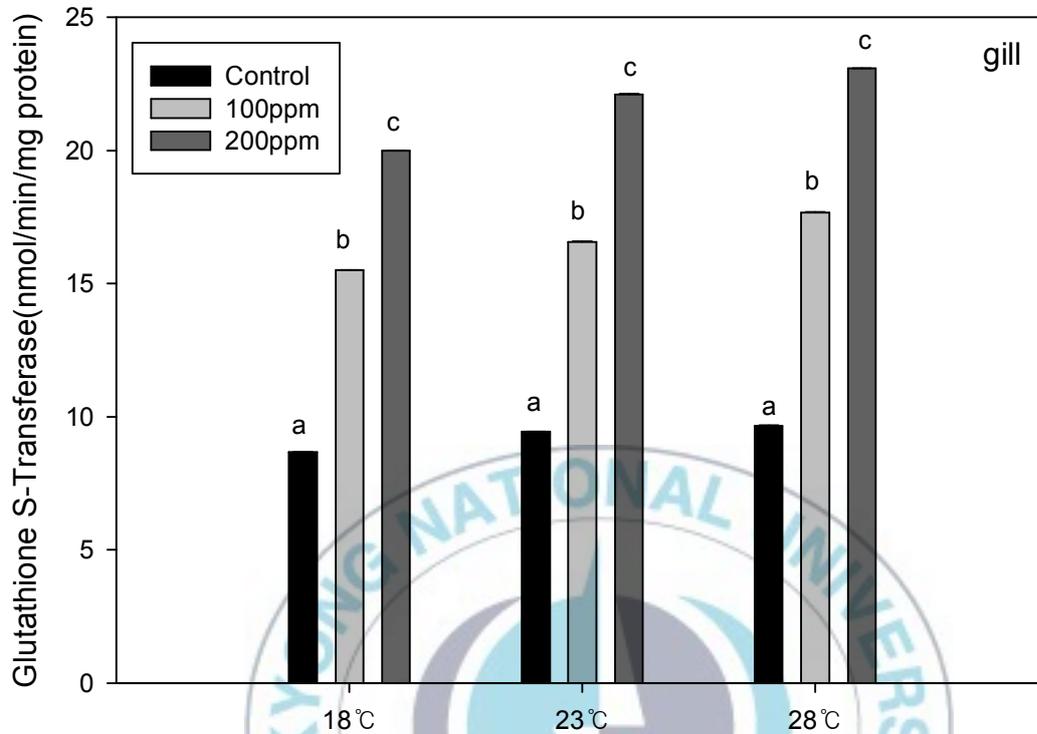


Figure 6. Glutathione S-Transferase activity in the gill of rock fish, *Sebastes schlegeli* exposed to the different concentrations of copper at 18°C, 23°C, 28°C in seawater. Vertical bar donotes a standard error. Values with different superscript are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Tukey-Kramer method.

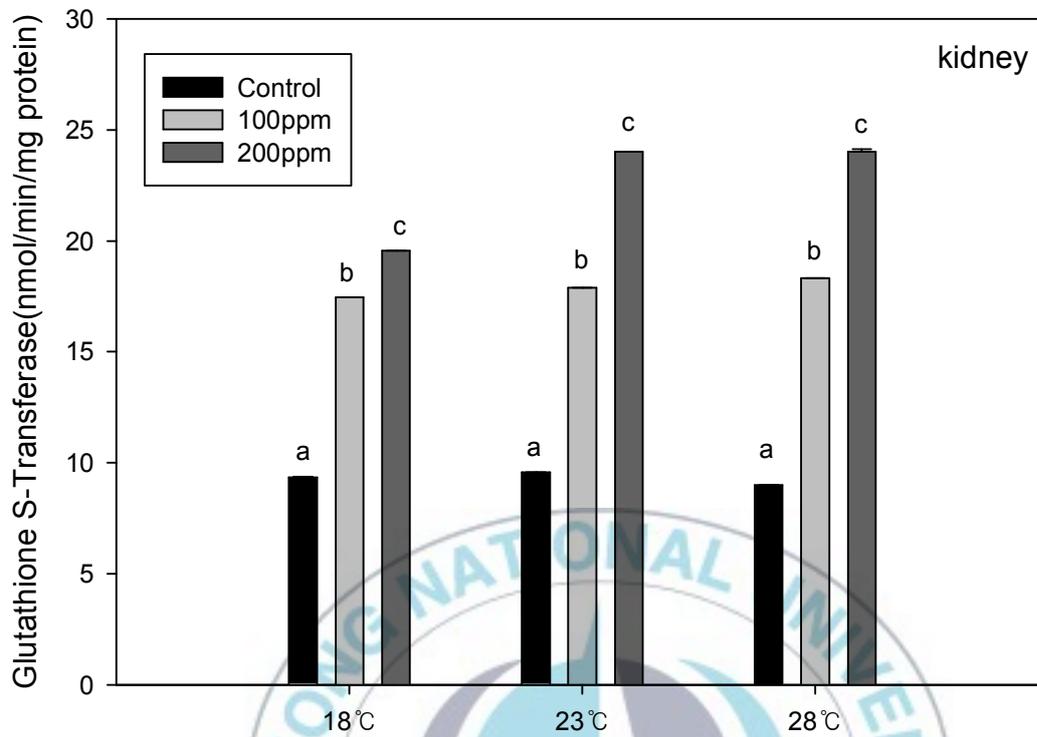


Figure 7. Glutathione S-Transferase activity in the kidney of rock fish, *Sebastes schlegeli* exposed to the different concentrations of copper at 18°C, 23°C, 28°C in seawater. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Tukey-Kramer method.

4-3. Glutathione peroxidase (GPx)

GPx 효소의 활성은 간에서 18°C, 23°C, 28°C의 100ppm, 200ppm 모든 구간에서 유의적 감소가 관찰되었다.

아가미의 활성은 간과 마찬가지로 18°C, 23°C, 28°C에서는 control과 비교하였을 때 100ppm, 200ppm 모든 구간에서 유의적 감소가 나타났으며, 28°C에서는 Control과 비교하였을 때 모든 구간에서 유의적 감소가 나타났으나, 100ppm구간에서 감소했다가 200ppm구간에서 증가하는 경향이 관찰되었다.

마지막으로 신장에서는 18°C에서는 200ppm 구간에서만 유의적 감소가 나타났으며, control과 100ppm의 농도 구간에서는 변화가 관찰되지 않았다. 23°C에서는 control과 비교하였을 때 100ppm, 200ppm 농도구간에서 모두 유의적 감소가 나타났다. 28°C에서는 Control과 비교하였을 때 100ppm, 200ppm 모든 농도 구간에서 유의적 감소가 나타났으나, 100ppm, 200ppm농도 사이에서는 유의성이 관찰되지 않았다.

위의 모든 결과는 Fig. 8~10에 나타내었다.



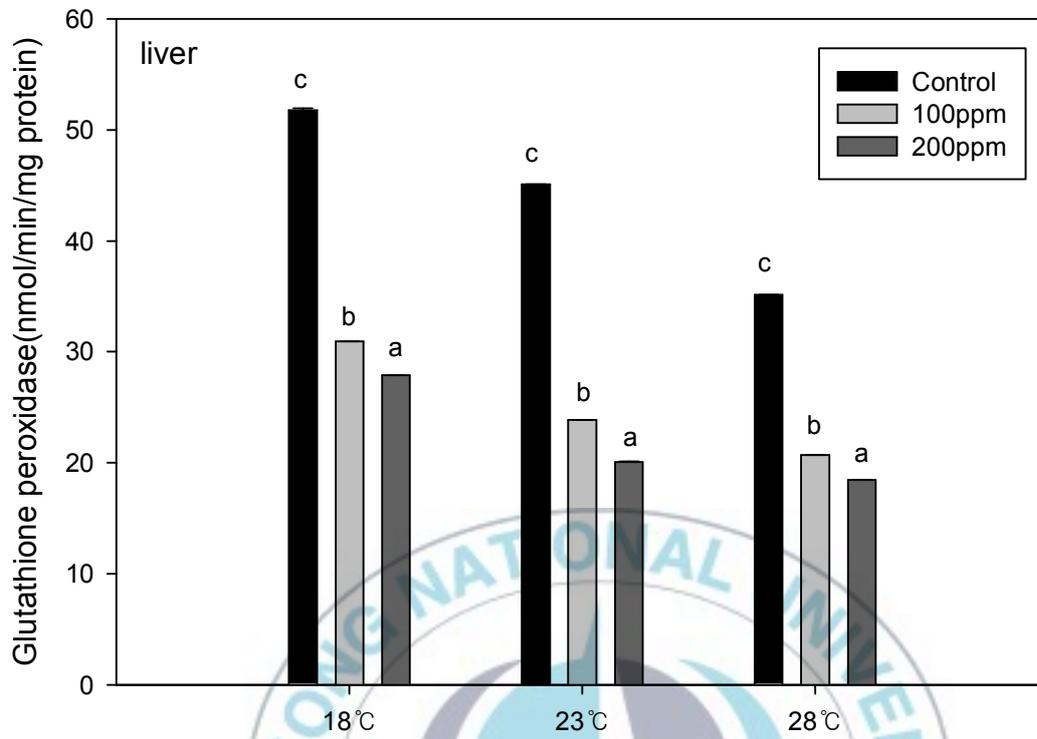


Figure 8. Glutathione peroxidase activity in the liver of rock fish, *Sebastes schlegeli* exposed to the different concentrations of copper at 18°C, 23°C, 28°C in seawater. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Tukey-Kramer method.

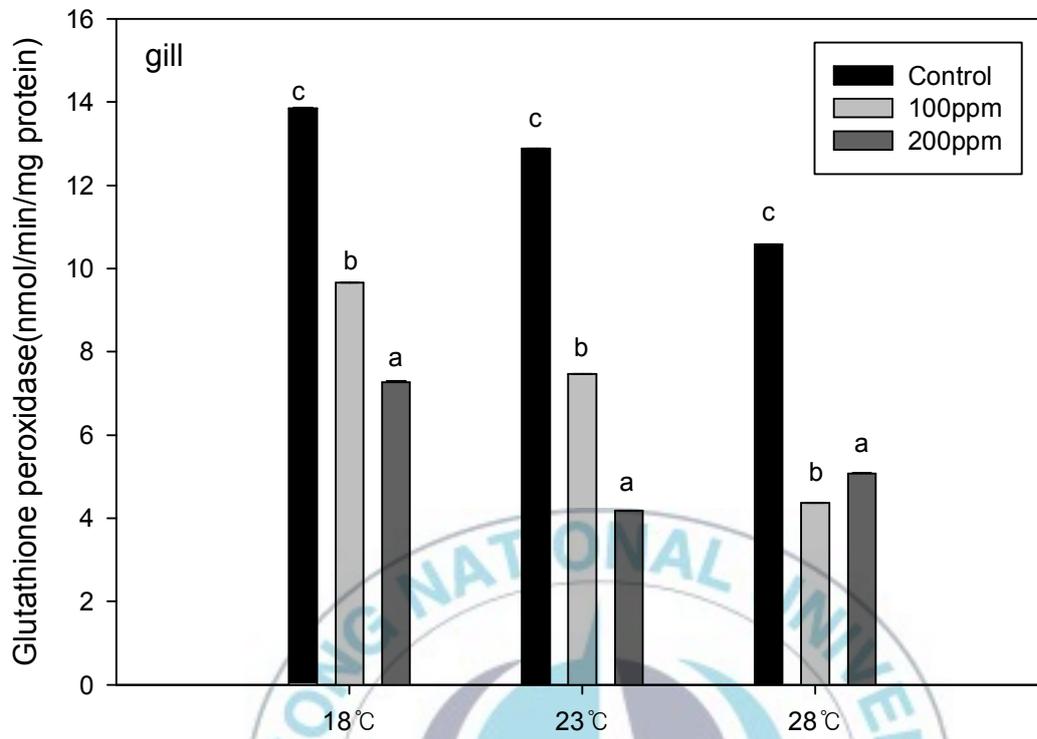


Figure 9. Glutathione peroxidase activity in the gill of rock fish, *Sebastes schlegeli* exposed to the different concentrations of copper at 18°C, 23°C, 28°C in seawater. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Tukey-Kramer method.

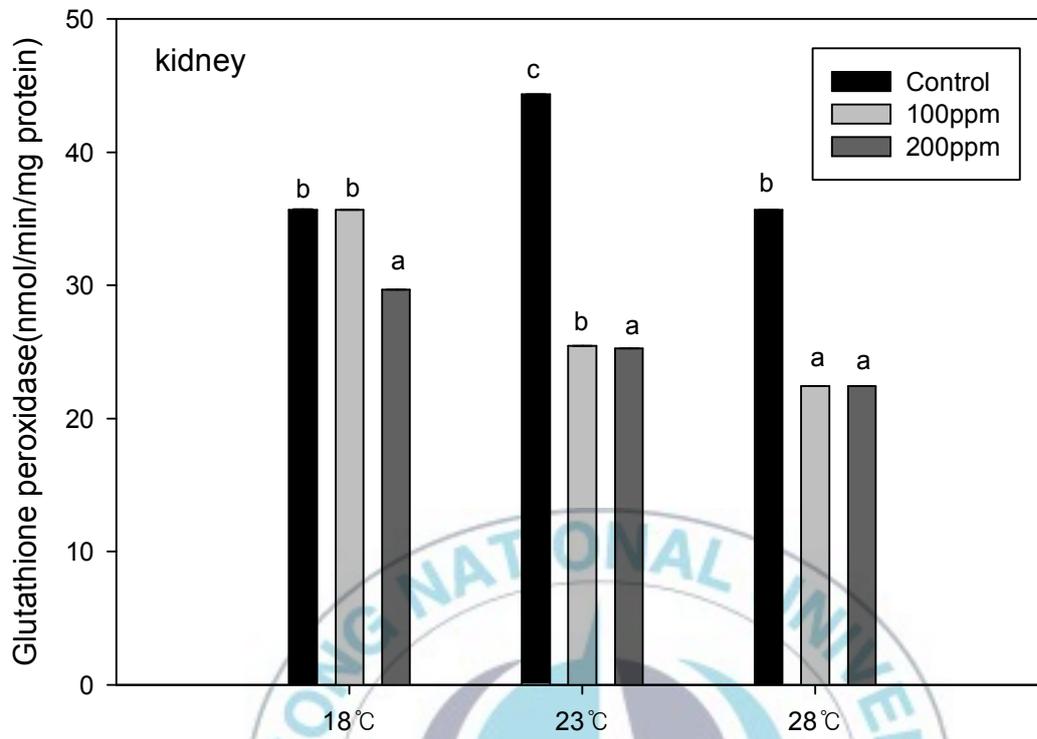


Figure 10. Glutathione peroxidase activity in the kidney of rock fish, *Sebastes schlegeli* exposed to the different concentrations of copper at 18°C, 23°C, 28°C in seawater. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly different ($P<0.05$) as determined by Tukey-Kramer method.

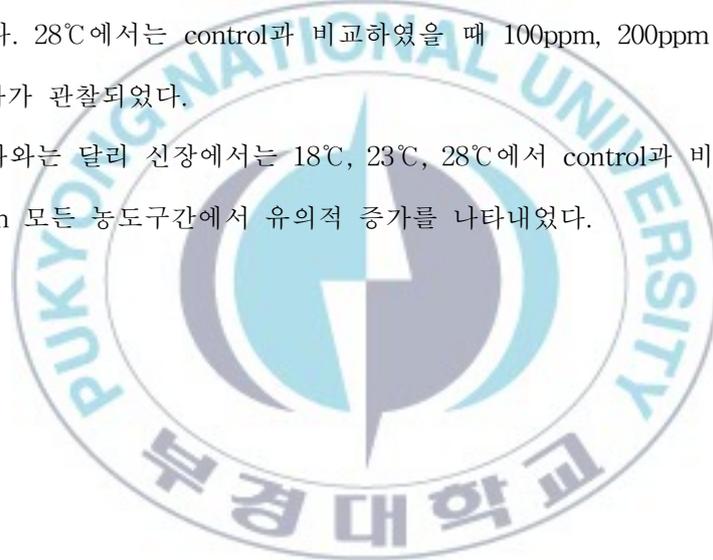
4-4. Glutathione reductase (GR)

구리에 노출된 조피볼락의 GR 효소의 활성을 관찰하였고, 그 결과는 Fig. 11~13에 나타내었다.

간에서의 활성은 18℃에서는 100ppm, 200ppm 모든 농도구간에서 유의적 증가가 관찰되었다. 23℃에서도 Control과 비교하였을 때 100ppm, 200ppm 모든 농도구간에서 유의적 증가는 나타났으나 Control과 100ppm 농도 사이에서 유의성은 관찰되지 않았다. 28℃에서는 control과 비교하여 100ppm 농도구간에서는 유의적 감소가 관찰되었고, 200ppm농도 구간과의 비교에서는 유의적 변화가 관찰되지 않았다.

아가미의 경우 18℃ 100ppm, 200ppm농도 구간에서 모두 유의적 증가가 나타났으며, 23℃의 경우 100ppm, 200ppm모든 구간에서 증가하는 경향은 나타났으나 유의성은 관찰되지 않았다. 28℃에서는 control과 비교하였을 때 100ppm, 200ppm 모든 구간에서 유의적 증가가 관찰되었다.

그러나 위의 결과와는 달리 신장에서는 18℃, 23℃, 28℃에서 control과 비교하였을 때 100ppm, 200ppm 모든 농도구간에서 유의적 증가를 나타내었다.



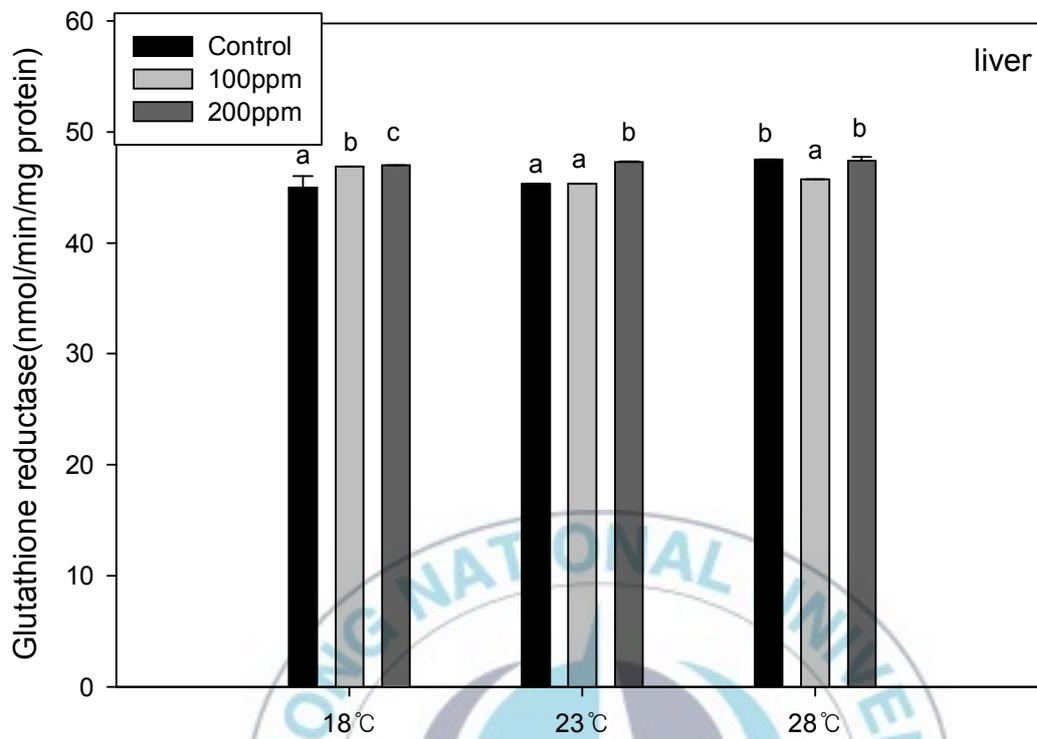


Figure 11. Glutathione reductase activity in the liver of rock fish, *Sebastes schlegeli* exposed to the different concentrations of copper at 18°C, 23°C, 28°C in seawater. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Tukey-Kramer method.

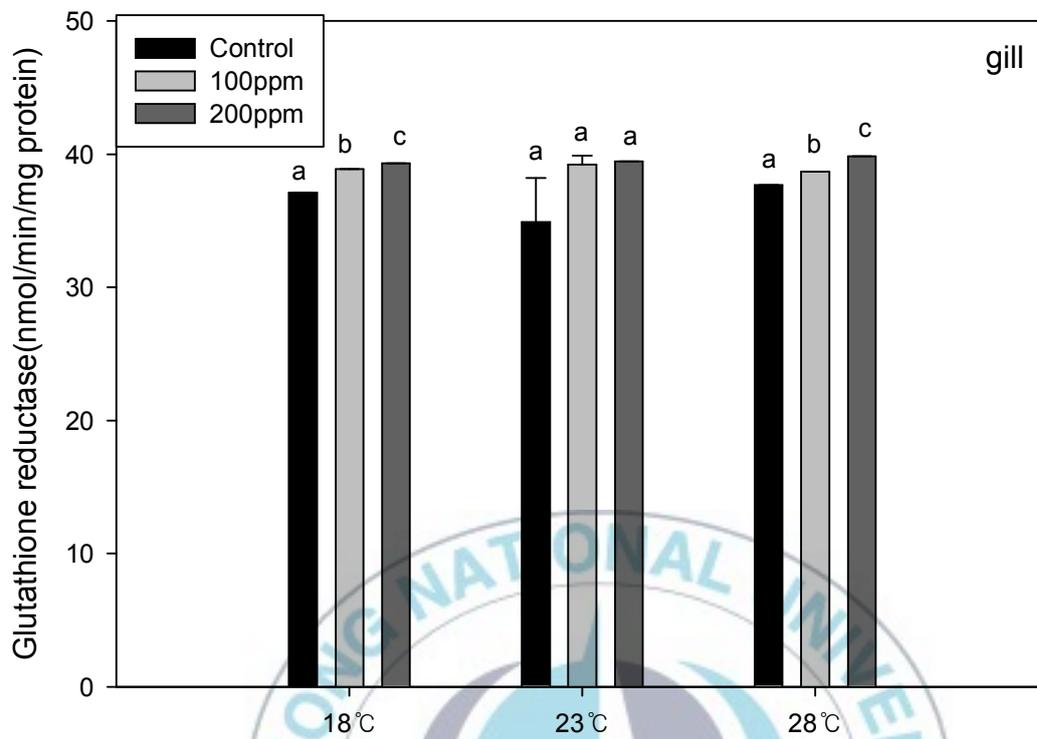


Figure 12. Glutathione reductase activity in the gill of rock fish, *Sebastes schlegeli* exposed to the different concentrations of copper at 18°C, 23°C, 28°C in seawater. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Tukey-Kramer method.

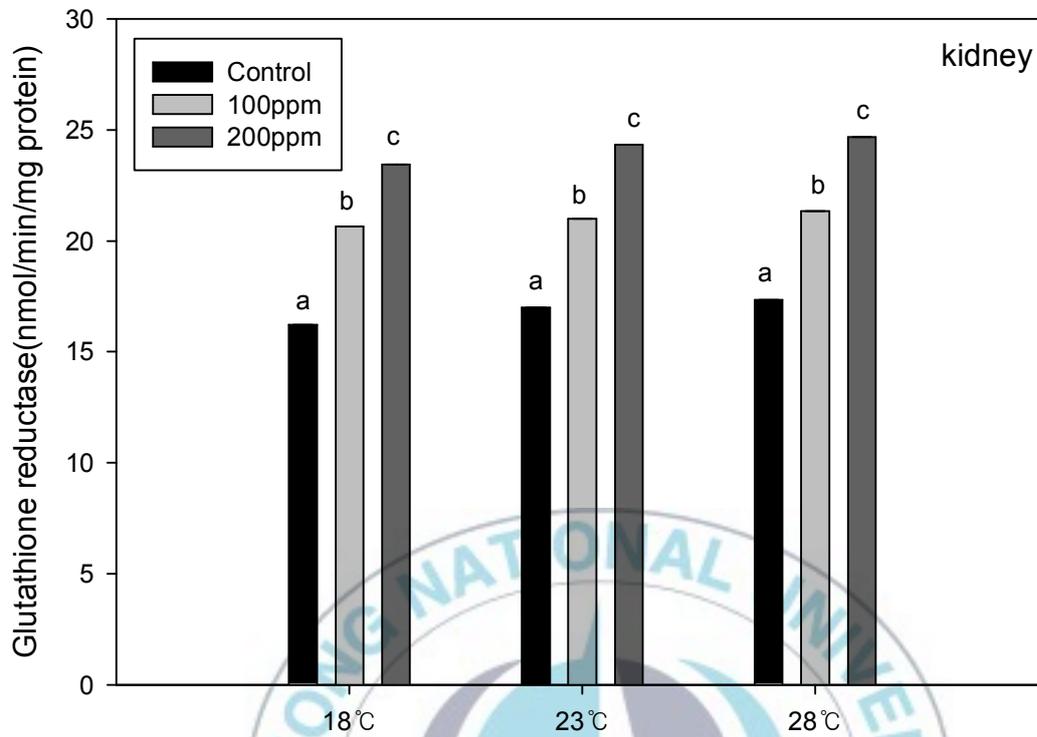


Figure 13. Glutathione reductase activity in the kidney of rock fish, *Sebastes schlegeli* exposed to the different concentrations of copper at 18°C, 23°C, 28°C in seawater. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Tukey-Kramer method.

4-5. Superoxide dismutase (SOD)

이물질 해독에서 활성산소를 제거하는데 주요한 효소인 SOD의 활성은 Fig. 14~16에 나타내었다.

간에서의 SOD의 활성은 18℃, 23℃에서는 Control과 비교하였을 때 100ppm, 200ppm의 모든 농도 구간에서 유의적 감소가 나타났다. 28℃에서는 Control과 비교하였을 때 100ppm구간에서는 유의적인 증가가, 200ppm 구간에서는 유의적인 감소가 관찰되었다.

아가미의 활성은 18℃, 23℃에서 Control과 비교하였을 때 100ppm 농도 구간에서는 유의적인 증가가 관찰되었고, 200ppm 농도 구간에서는 Control과 비교하였을 때 유의적인 감소가 나타났다. 28℃에서는 control과 비교하여 100ppm, 200ppm 모든 구간에서 유의적 감소가 나타났다.

신장에서의 활성은 18℃의 100ppm, 200ppm 농도에서 Control과 비교하였을 때 유의적 증가가 관찰되었으며, 100ppm 농도구간에서 최고 값을 나타내었다. 23℃, 28℃의 경우 Control과 100ppm 농도 구간을 비교하였을 때 유의적 증가가 관찰되었으며, 200ppm 농도구간에서는 유의적 감소가 나타났다.



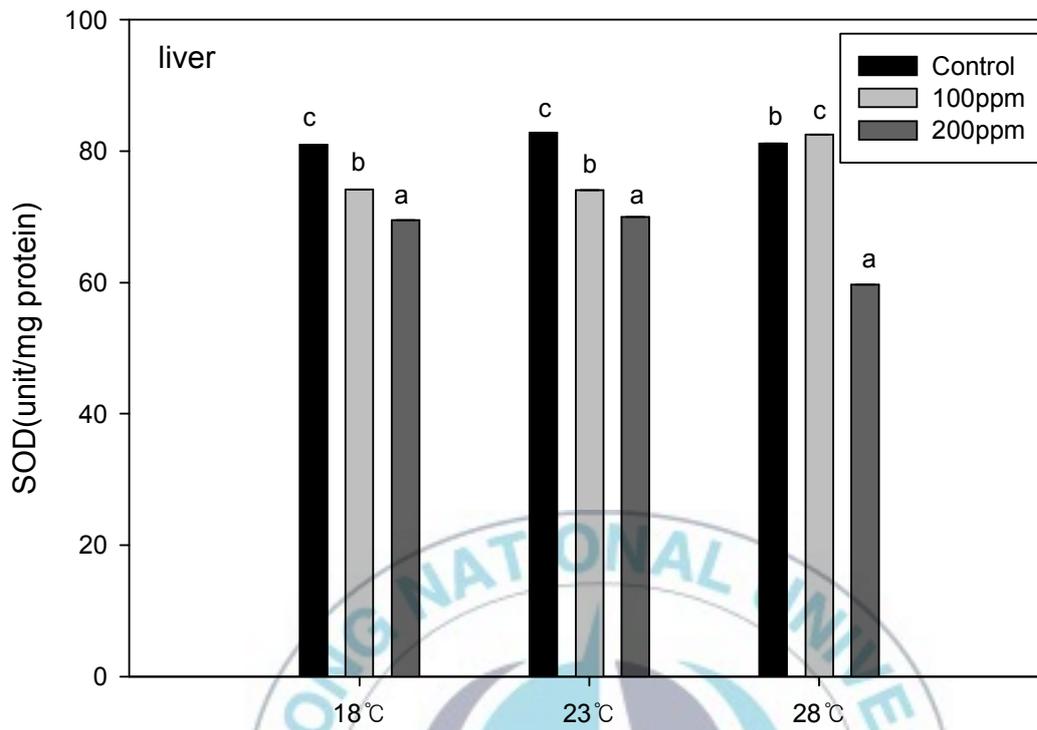


Figure 14. Change of SOD in liver rock fish, *Sebastes schlegeli* exposed to the different concentrations of copper at 18°C, 23°C, 28°C in seawater. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Tukey-Kramer method.

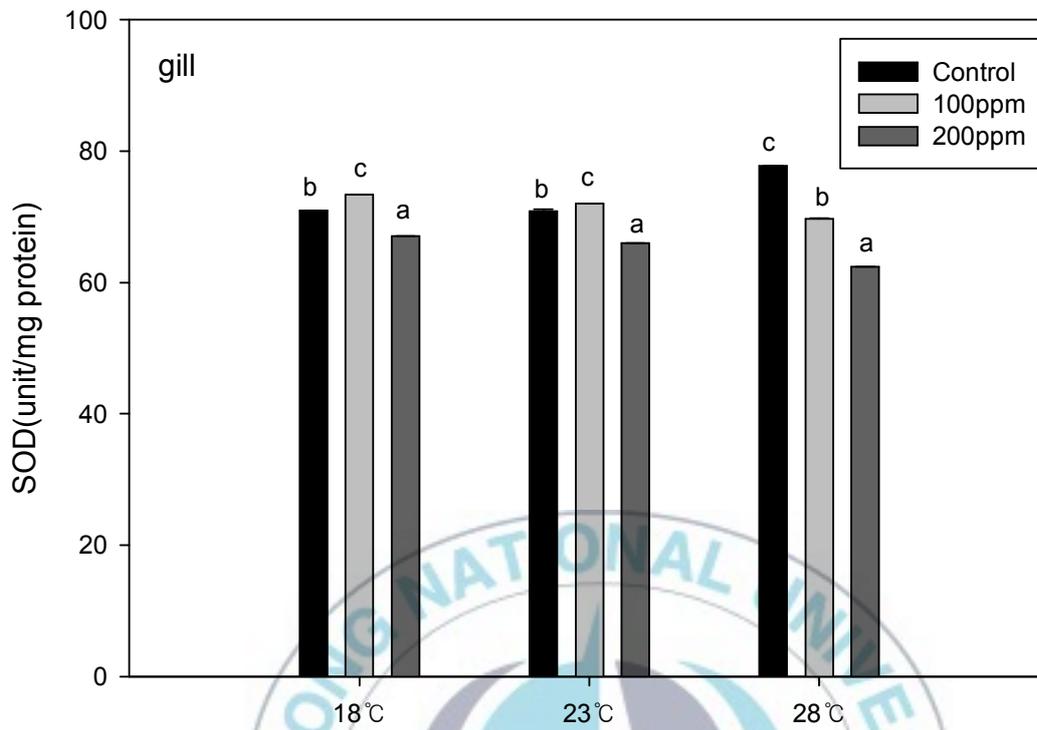


Figure 15. Change of SOD in gill rock fish, *Sebastes schlegeli* exposed to the different concentrations of copper at 18°C, 23°C, 28°C in seawater. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Tukey-Kramer method.

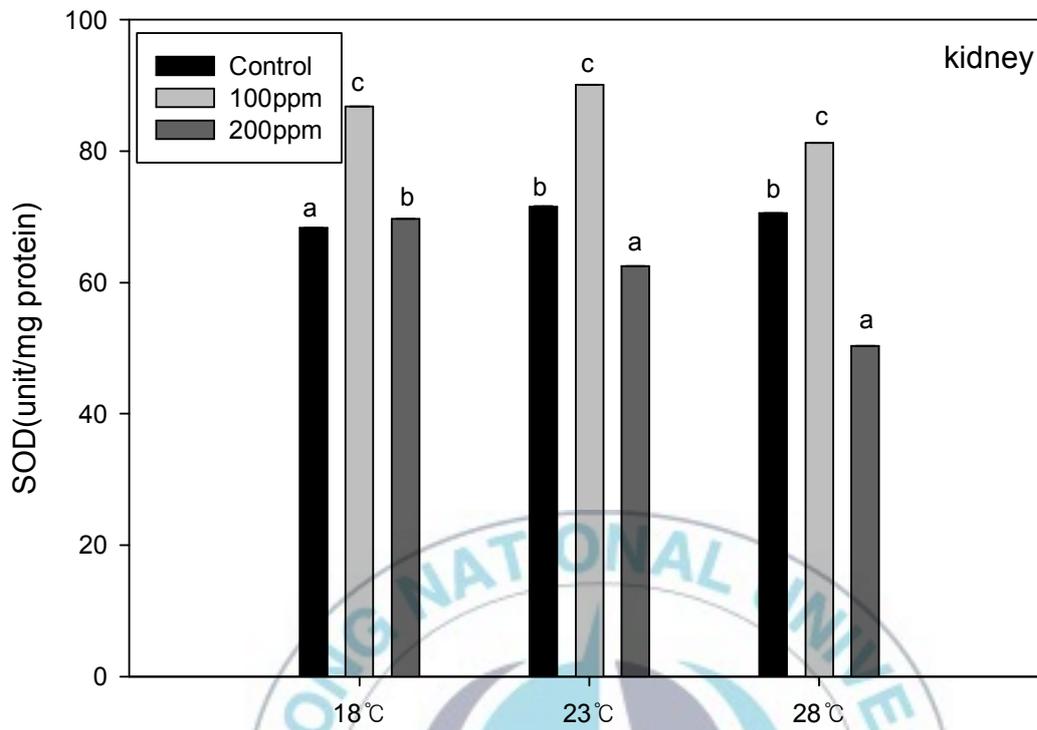


Figure 16. Change of SOD in kidney rock fish, *Sebastes schlegeli* exposed to the different concentrations of copper at 18°C, 23°C, 28°C in seawater. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Tukey-Kramer method.

IV. 고 찰

생태학적 위해성은 특정한 화학물질과 혼합된 화학물질의 노출 (exposure)과 유해성 (hazard)에 있어서 동등하게 적용될 때 나타난다 (Landis and Yu, 1999). 생태계는 보통의 경우에 각종 금속 및 오염물질에 노출되어있다. 미량의 금속이 생태계에 배출되면 이는 먹이사슬을 경유해서 결국 최종소비자인 인간에게 영향을 미치게 된다.

금속은 생체 내에서 분해되지 않기 때문에 독성이 쉽게 발현하므로 비중이 큰 중금속일수록 독성이 강하다. 일반적으로 중금속의 산화물은 수용성이 낮아 독성발현은 침입한 부위에서 강하게 나타난다. 따라서 어류의 경우 일부분은 피부로 침입하고 대부분은 아가미를 경유하므로 호흡 기관에 타격을 받게 되는 것이다. 그리고 미량의 중금속에 장기간 노출 될 경우 중금속과 핵산의 염기, 인산 등과 결합하여 핵산의 수복효소의 기능을 저하시켜 어류의 항상성을 무너뜨리고 기형 또는 암 발생의 원인이 되기도 한다 (Kiane, 1993, Yamashita *et al.*, 1990, Black and Bauman, 1991).

구리는 척추동물 내 많은 수의 생물학적 반응을 수반하는 필수원소이며, 또한 이온 수송과 산화효소반응 그리고 헤모글로빈 합성을 포함한다. 구리는 수중 내 산소의 환원을 촉매하는 cytochrome c oxidase의 구성 물질이며, 이것은 세포호흡에 있어서 중요한 단계로 작용한다. 그러나 필요이상의 농도에 노출되면 세포 내부의 구조적 이상 또는 생체 기능의 장애를 일으킬 수 있다. 사람의 경우 구리 결합단백질은 신경적 증상 (멘케스병, 윌슨병)과 같은 결핍이상 그리고 신경퇴행성 질환 (알츠하이머병)에서의 금속이온 항상성의 지속과 유지에 있어서 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다.

구리의 수서생물에서의 작용 메카니즘에 관한 연구는 경골어류에 의하여 많이 알

려져 있으며 (Taylor *et al.*, 1996; Clearwater *et al.*, 2002), 어류 내 연속적인 세포학적 그리고 생리학적 변화에서 급성 독성 노출에 관한 연구들이 주로 수행되고 있다 (Handy, 2003). 또한 전 세계적으로 수서동물에 대한 구리의 독성 연구를 살펴보면 Zyadah와 Abdel-Baky (2000)는 일부 수서생물에서 구리 노출 시간이 길고 농도가 높을수록 사망률이 높아진다는 것을 연구하였으며, 또한 가재류 (*Combarus bartonii*), 틸라피아 (*Oreochromis mossambicus*), 돛류 (*Sparus sarba*), 무지개송어 (*Oncorhynchus mykiss*) 그리고 잉어 (*Cyprinus carpio*)에 대한 구리 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).

구리에 노출된 실험어의 혈액성상을 보면 Ht는 18°C, 23°C의 모든 구간에서는 유의적 변화는 나타나지 않았고, 28°C에서는 100ppm, 200ppm 농도 구간에서는 유의적인 감소가 관찰되었다.

RBC는 18°C, 23°C에서는 유의적 감소와 증가가 관찰되었으나 28°C의 100ppm, 200ppm의 농도에서는 유의적인 변화가 나타나지 않았다. 헤모글로빈의 경우는 18°C, 23°C, 28°C의 100ppm, 200ppm 모든 농도 구간에서 유의적인 변화는 관찰되지 않았다.

RBC는 영양소, 산소, 노폐물 등을 배출하는 기능을 하는데 본 연구의 결과로 보아 이는 구리에 의해 아기미가 손상되어 기능이 저하된 것으로 판단되며 이로 인해 산소결핍이 유도되거나 비정상적혈구의 생성 또는 RBC가 용해되어 빈혈이 일어난 것으로 판단된다 (Nemcsók and Borss., 1982). 또한 적혈구가 조혈기관으로부터 나오게 되는데 체내에서 용혈이 나타남으로 미성숙된 적혈구가 조혈기관으로부터 나오면서 Ht이 감소하는 경향이 나타나게 된다 (Bhagwant and Bhikajee, 2000). 이 상태에서 정상적인 적혈구가 증가하면 헤모글로빈의 양이 증가하게 되는데 이것은 산소가 결

필되면서 조직에 산소를 공급하기 위한 것으로 생각된다.

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

혈장의 무기성분으로는 칼슘과 마그네슘이 있는데 혈청 내 칼슘 (calcium)의 농도는 18℃, 23℃에서는 100ppm, 200ppm에서 모두 유의적 증가를 나타냈으며, 28℃에서는 200ppm 구간에서 유의적 증가를 나타냈다. 마그네슘 (magnesium)의 경우는 18℃, 23℃, 28℃에서 control과 비교하였을 때, 100ppm과 200ppm 농도 구간에서 모두 유의적인 증가가 나타났으나 100ppm과 200ppm 농도 사이에서는 유의성이 나타나지 않았다. 칼슘과 마그네슘은 혈장 내에서 삼투압을 일정하게 유지시켜 주는 역할을 하는데, 칼슘과 마그네슘의 농도변화는 혈액 삼투압 조절능력이 영향을 받았다는 것을 추측할 수 있다 (Waring *et al.*, 1992; 허 등, 2001).

또한 본 연구에서는 혈청의 유기성분으로는 총단백질, 글루코즈를 조사하였다. 혈청의 총 단백질은 전반적인 건강상태의 지표이다. 혈청내의 수분 변동과 단백질 분해 효소의 활성증가에 의해 단백질이 양이 증가하거나 감소하는 경우에는 단백질의 합성, 분해, 흡수에 이상이 올 수 있다. 총 단백질 (total protein)의 경우 18℃, 100ppm, 200ppm 농도 구간에서 유의적 증가를 나타냈으며, 23℃구간에서는 100ppm, 200ppm 구간에서 모두 유의적 증가를 나타냈으나, 농도간의 유효성은 관찰되지 않았다. 28℃에서는 18℃와 마찬가지로 100ppm, 200ppm의 모든 구간에서 유의적 증가가 나타났다.

글루코즈 (glucose)의 경우에는 18℃에서는 100ppm, 200ppm농도 구간에서 유의적 증가가 나타났으나 농도간의 유의성은 관찰되지 않았고, 23℃에서는 200ppm 농도 구간에서만 유의적 증가가 관찰되었고, 28℃에서는 Control과 비교하였을 때 100ppm, 200ppm 농도구간 모두에서 유의적 증가가 나타났다.

혈청 중의 효소 성분으로는 GOT, GPT는 간 세포의 변성이나 괴사를 반영하는 효소로서 간 장애의 조기진단에 불가결한 요소로 간 조직 손상 시 다량 혈중으로 유출되기 때문에 간 손상정도를 나타내는 지표로 널리 사용되고 있다 (Takeda *et al.*, 1964). LDH는 젖산을 분해하고, 재합성하는 효소이며, 일반적으로 어체가 스트레스를 받으면 젖산이 생성되어 혈액이 산성화 될 수 있고, 이렇게 되면 산소급수에 문제가 발생 할 수 있다. 이번 실험에서는 GOT, GPT, LDH 모두 18°C, 23°C, 28°C에서 Control과 비교하여 100ppm, 200ppm 구간에서 모두 유의적 증가가 관찰되었다. 이러한 결과를 조합해 보면 어류가 온도와 구리에 의해 스트레스를 받은 것으로 판단된다.

스트레스 반응은 기본적으로 생존을 위한 적응이지만, 지나치게 활성화 되거나 만성적으로 오랜기간 지속되면 신체적인 손상이 올 수 있다 (유와 우, 2001).

콜티졸은 스트레스에 대한 정도를 평가하기 위해 가장 널리 사용되고 있는 지표이다 (Gamperl *et al.*, 1994). 콜티졸은 seawater hormone 이라고 불리기도 하며 이온과 삼투 조절에 중요한 역할을 한다 (Chester Jones, 1980; Perry and Laurent, 1989).

이번 연구에서는 18°C에서 control과 비교하여 100ppm, 200ppm 구간에서 모두 유의적인 증가가 나타났다. 23°C에서는 control과 비교하였을 때 100ppm, 200ppm의 모든 농도 구간에서 유의성이 관찰되지 않았다. 마지막으로 28°C구간에서는 100ppm, 200ppm 농도구간에서 모두 증가하는 경향이 나타났으나 100ppm농도 구간에서 가장 높은 값을 나타내었다.

콜티졸의 농도가 스트레스 상황에서 항상 증가하는 것은 아닌데 면역 기능의 감소와 질병에 대한 저항력이 감소되었을 때, 오염물질이 콜티졸의 반응을 둔감시킬 때 나타난다 (Maule *et al.*, 1993; Pickering *et al.*, 1982).

스트레스를 받은 어류에서는 콜티졸 이외에 높은 젖산과, 글루코즈의 변화량이 조사된다 (Van Raaij *et al.*, 1996). 혈중에서 증가된 젖산은 gluconeogenesis로 글루코

즈의 생산과 간의 LDH 활성의 부수적인 증가는 젓산을 이용한 간의 능력이 스트레스를 받은 어류에서 증가했다는 것을 제시하는데 (Soldatov, 1996), 반드시 젓산 농도와 콜티졸, 카테콜라민의 농도가 반드시 정비례하는 것은 아니다.

GSH는 유황을 가지는 비단백질성 항산화물질로 외인성 물질의 해독과 배설 등의 중요한 기능을 수행하고, 이런 물질로 인해 유발되는 산화스트레스반응에 대하여 세포를 보호하는 방어기작에서 가장 먼저 관여하는 것으로 알려져 있다 (Hasspielar *et al.*, 1994; Otto and Moon, 1995). 일반적으로 오염원에 노출 되었을 때 GSH가 증가하는 것으로 알려져 있지만 심한 산화스트레스 반응으로 어체의 viability에 장애가 생기면 GSH의 함량이 감소 될 수 있다 (장 등, 2001). 이번 실험에서 GSH 함량을 분석한 결과 간에서의 GSH의 함량은 18℃, 23℃, 28℃의 모든 구간에서 control에 비해서 100ppm, 200ppm 모든 농도에서 유의적인 증가가 나타났고, 100ppm농도 구간에서 최고 값을 나타내었다. 아가미의 경우 18℃에서는 100ppm, 200ppm의 농도구간에서 모두 증가하였고, 유의성을 나타냈다. 23℃에서도 100ppm, 200ppm의 모든 구간에서 유의적 증가 관찰되었으며, 100ppm 농도구간에서 최고 값을 나타내었다. 28℃에서는 100ppm, 200ppm 모든 구간에서 유의적 증가가 관찰되었다. 신장의 경우 18℃에서는 control과 비교하였을 때 100ppm, 200ppm 모든 구간에서 유의적 증가가 나타났고, 23℃에서는 Control과 비교하였을 때 100ppm, 200ppm모든 구간에서 유의적 증가가 나타났으나 농도간의 유의성은 관찰되지 않았다. 28℃에서는 control과 비교하였을 때 100ppm, 200ppm 모두 유의적 증가가 관찰되었다. 이러한 결과는 생체내로 들어온 구리가 독성물질로 인지되어 구리를 배설하기 위한 방어기작으로 생각되어진다.

글루타치온과 관련된 효소로는 GST, GR, GPx가 있으며 산화 스트레스와 관련하여 외인성 물질을 해독하는 효소로 환경적 영향을 나타낸다고 알려져 있다 (Rodriguez *et al.*, 1993; Livingstone, 1998). GST는 산화적 손상으로부터 개체를 보호하는 역할을 하며, 세포수송과 해독화 작용에 있어서 매우 중요한 기능을 수행하

고, 방어 작용을 담당하는 것으로 알려져 있다 (Fournier *et al.*, 1992). 본 실험에서는 GST의 경우 간, 아가미, 신장의 모든 조직의 18°C, 23°C, 28°C 100ppm, 200ppm의 모든 농도 구간에서 Control과 비교 하였을 때 모두 유의적으로 증가하는 경향이 관찰되었다. 상대적으로 수온이 증가하면 호흡 빈도가 증가 하게 되고, 이로 인해 구리의 흡수를 가속화시킬 수 있다.

구리의 경우 저온보다 고온에서 증가된 산소소비로 인하여 독성이 증가하였다는 연구가 보고된 바 있으며 (Carvalho and Fernades, 2005), 온도와 구리의 농도가 증가할수록 독성이 증가한다는 연구도 보고되고 있다.

GPx 효소의 활성은 간에서 18°C, 23°C, 28°C의 100ppm, 200ppm 모든 구간에서 유의적 감소가 관찰되었다. 아가미의 활성은 간과 마찬가지로 18°C, 23°C, 28°C에서는 control과 비교하였을 때 100ppm, 200ppm 모든 구간에서 유의적 감소가 나타났으며, 28°C에서는 Control과 비교하였을 때 모든 구간에서 유의적 감소가 나타났으나, 100ppm구간에서 감소했다가 200ppm구간에서 증가하는 경향이 관찰되었다. 신장에서는 18°C에서는 200ppm 구간에서만 유의적 감소가 나타났으며, control과 100ppm의 농도 구간에서는 변화가 관찰되지 않았다. 23°C에서는 control과 비교하였을 때 100ppm, 200ppm 농도구간에서 모두 유의적 감소가 나타났다. 28°C에서는 Control과 비교하였을 때 100ppm, 200ppm 모든 농도 구간에서 유의적 감소가 나타났으나, 100ppm, 200ppm농도 사이에서는 유의성이 관찰되지 않았다.

GR의 경우 간에서의 활성은 18°C에서는 100ppm, 200ppm 모든 농도구간에서 유의적 증가가 관찰되었다. 23°C에서도 Control과 비교하였을 때 100ppm, 200ppm 모든 농도구간에서 유의적 증가는 나타났으나 Control과 100ppm 농도 사이에서는 유의성이 관찰되지 않았다. 28°C에서는 control과 비교하여 100ppm 농도구간에서는 유의적 감소가 관찰되었고, 200ppm농도 구간과의 비교에서는 유의적 변화가 관찰되지 않았다. 아가미의 경우 18°C 100ppm, 200ppm농도 구간에서 모두 유의적 증가가 나타났으

며, 23℃의 경우 100ppm, 200ppm 모든 구간에서 증가하는 경향은 나타났으나 유의성은 관찰되지 않았다. 28℃에서는 control과 비교하였을 때 100ppm, 200ppm 모든 구간에서 유의적 증가가 관찰되었다. 신장의 경우 위의 결과와는 달리 18℃, 23℃, 28℃에서 control과 비교하였을 때 100ppm, 200ppm 모든 농도구간에서 유의적 증가를 나타내었다.

GPx는 어체의 산화스트레스로 인한 방어기작으로 생성된 과산화수소의 환원을 촉매하고 환원제로 사용하여 과산화수소를 알콜로 환원시키므로 활성산소의 생성을 막는다.

GR은 NADPH를 NADP⁺로 산화시킴으로써, 산화형 글루타치온 (GSSG)을 환원형 글루타치온 (GSH)을 환원시키는 역할을 한다 (Worthington and Rosemeyer, 1974). 따라서 GR은 GSH와 GSSG의 균형을 유지하는데 중요한 역할을 하게 된다 (Winston and Di Giulio, 1991).

구리 스트레스로 인해 발생된 활성산소는 SOD에 의해 과산화수소로 변환되어 해독화가 진행되는데 (Nebot *et al.*, 1993), 간과 아가미에서의 SOD는 간의 경우 18℃, 23℃에서는 Control과 비교하였을 때 100ppm, 200ppm의 모든 농도 구간에서 유의적 감소가 나타났다. 28℃에서는 Control과 비교하였을 때 100ppm구간에서는 유의적인 증가가, 200ppm 구간에서는 유의적인 감소가 관찰되었다. 아가미의 활성은 18℃, 23℃에서 Control과 비교하였을 때 100ppm 농도 구간에서는 유의적인 증가가 관찰되었고, 200ppm 농도 구간에서는 Control과 비교하였을 때 유의적인 감소가 나타났다. 28℃에서는 control과 비교하여 100ppm, 200ppm 모든 구간에서 유의적 감소가 나타났다. 신장에서의 활성은 18℃의 100ppm, 200ppm 농도에서 Control과 비교하였을 때 유의적 증가가 관찰되었으며, 100ppm 농도구간에서 최고 값을 나타내었다. 23℃, 28℃의 경우 Control과 100ppm 농도 구간을 비교하였을 때 유의적 증가가 관찰되었으며, 200ppm 농도구간에서는 유의적 감소가 나타났다.

이는 구리노출에 의한 손상을 최소화 시키려는 방어기작에 따른 생리작용으로 추정된다. 대부분의 연구에서 SOD는 중금속이나 독성물질에 노출되면 활성이 증가한다고 하나, 구리와 아연에 노출 되었을 때 SOD 활성이 감소되었다는 연구가 보고된 바 있다 (Kroll *et al.* 1995, Shaheen *et al.*, 1995). 높은 농도 구간에서 SOD 활성이 감소한 것은 노출 (exposure)과 유해성 (hazard)의 균형이 무너져 조피불락의 어체가 스트레스로 인한 방어기작의 한계를 넘어서 손상 단계로 넘어간 것이라 생각된다.

최근 일본 원자력 연구소의 방사능사고와 그로 인한 방사성 물질로 인해 연안의 해수가 오염되면서 인류의 보건과 건강에 대한 직접적인 영향이 나타나면서 건강과 수산물에 대한 관심이 높아지고 있다. 조피불락은 넙치와 더불어 우리나라에서 가장 많이 양식하고 소비하는 수산물이며, 우리나라는 일본과 더불어 세계적으로 1인당 수산물 소비량이 많은 국가이며, 최근 국민소득수준의 향상에 따라 건강증진에 대한 국민의 관심이 급속도로 높아지고 있어 육류보다 수산물을 통한 단백질 섭취가 늘어나고 있는 추세이다.

어류가 자연 생태계에서 주 먹이로 이용하는 다모류, 이매패류, 복족류, 게류 그리고 조류에서 높은 농도의 구리 축적이 보고되기도 하였는데 (Bryan, 1976), 이는 먹이연쇄를 통해 인류의 건강에 해를 끼칠 수 있다.

조피불락은 구리에 대한 내성이 낮기 때문에 광산 폐수나 선박 도료, 공장폐수의 유입으로 인한 구리의 오염은 주의할 필요가 있으며 (최와 키나에, 1994), 온도와 축적에 관한 연구, 혹은 각 환경에서 나타날 수 있는 독성에 관한 전반적인 평가, 양식 과정에서 발생할 수 있는 여러 스트레스 환경 등에 관한 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

V. 요 약

구리(Cu)는 모든 생물에게 필요한 미량원소이지만, 중금속에 속하기 때문에 비록 미량일지라도 수중생물에 농축, 축적이 가능하며, 특히 어류에 급·만성 독성을 일으키고 장·단기적으로 해양생태계에 여러 가지 영향을 미칠 수 있고, 어체의 혈액성상, 성장, 행동, 효소활동, 축적 등을 일으킬 수 있고 먹이연쇄를 통해 인체에까지 영향을 미치므로 수생물의 오염은 인류의 공중보건에도 직결되는 심각한 문제가 될 수도 있다.

혈액성상의 변화는 Ht (Heamatocrit), RBC (Red Blood Cells) count, Hb (hemoglobin)을 조사하였다. Ht, RBC count의 경우 18℃, 23℃, 28℃의 경우 control, 100ppm, 200ppm의 모든 구간에서 대체적으로 감소하는 경향이 나타났으며, Hb의 경우, 18℃, 23℃, 28℃에서 control, 100ppm, 200ppm의 모든 구간에서 대체적으로 증가하는 경향이 관찰되었다.

혈액 무기성분 중 혈청 내 칼슘 (calcium), 마그네슘 (magnesium)의 농도는 18℃, 23℃, 28℃의 100ppm, 200ppm에서 모두 유의적 증가를 나타냈다.

총 단백질 (total protein)의 경우 18℃, 23℃, 28℃에서 Control과 비교했을 때 100ppm, 200ppm 모든 농도 구간에서 유의적 증가를 나타냈고, 글루코즈(glucose)도 총 단백질과 마찬가지로 18℃, 23℃, 28℃ 100ppm, 200ppm 모든 농도 구간에서 유의적 증가를 나타냈다.

혈청효소성분인 GOT, GPT, LDH는 모든 구간에서 모두 유의적인 증가가 나타났다. 혈장 콜티졸과 항산화 작용을 하는 GSH, GST는 간, 아가미, 신장에서 모두 증가하였고, GPx의 활성은 간, 아가미, 신장에서 모두 감소하였다. GR은 간과 신장에서는 모든 구간에서 유의적 증가를 나타냈으나 신장의 23℃ 100ppm, 200ppm 농도 구간에서는 유의성이 관찰되지 않았다.

VI. 감사의 글

살다보면 바람 부는 날도 있습니다. 두 어깨에 맨 짐이 무거워 그만 내려놓고 싶은 날도 있습니다. 때론 세상에 홀로 버려진 듯 외로워 슬퍼집니다. 그럼에도 다시 웃을 수 있는 건 저마다 마음속에 희망의 씨앗이 있기 때문이겠지요. 논문이 나오기까지 많은 일들이 있었지만 마무리 잘 할 수 있도록 도움 주신 많은 분들께 감사의 말씀을 전하고자 합니다.

먼저 항상 사랑과 관심으로 이끌어 주신 지도교수님이신 강주찬 교수님께 감사의 말씀을 전하고 싶습니다. 또한 논문이 나오기까지 바쁘신 중에도 부족한 논문을 정성껏 다듬어 주신 허민도 교수님과 정현도 교수님께도 무한한 감사를 드립니다. 또한 학부 때부터 언제나 관심 가져주시고 많은 가르침을 주신 박수일 교수님, 정준기 교수님, 김기홍 교수님께도 깊은 감사의 말씀을 전합니다.

실험실 생활을 한지도 어느덧 5년이라는 시간이 지났습니다. 5년이라는 시간이 어떻게 보면 짧은 시간이지만 제 인생의 5분의 1을 차지하는 오랜 시간이기도 합니다. 그 오랜 시간을 생활해 오면서 항상 귀여워 해주시고 좋은 말씀 많이 해주시는 석우 선배와 상규 선배, 일하느라 바쁜 와중에도 귀찮은 내색 없이 가르쳐 주던 영주 선배, 여학생이 드문(?) 실험실에서 친언니처럼 챙겨주시고 많은 것을 가르쳐 주신 은영 언니, 심적으로 의지되는 섬세한 희주 선배, 실험하면서 많은 것을 알려준 용석 선배, 실험실 방장 동재 선배, 실험실 생활하면서 가장 즐거웠고(?) 많은 자료를 준 지원이 언니, 후배의 귀찮은 부탁도 군소리 없이 들어준 준환 선배, 듬직한 동기 태영이, 밤새 힘든 실험 도와준 민영이, 공부하러 다시 돌아온 민수 선배, 귀여운 악덕(?) 트레이너 형준 선배, 항상 열심히 하는 대욱 선배와 형준이, 실험실 새로 들어와 적응 중인 진석이와 정현이, 용주, 인기에게도 감사의 말씀을 전하고 싶습니다. 그 외에도 이름을

일일이 나열하지는 못하지만 실험실이 앞서 거쳐 가셨던 많은 선배님들에게도 감사의 마음을 전하고자 합니다. 모든 사람이 똑같이 살 필요도 없지만, 그렇다고 똑같이 살지 않기 위해 억지로 발버둥 칠 필요도 없습니다. 저는 특별하고 한적한 오솔길을 찾는 대신 많은 인생선배들이 걸어간 길을 택하기로 했습니다. 삶의 비밀은 그 보편적인 길에 더 많이 묻혀 있을 것이라 확신하고 있기 때문입니다.

그리고 함께 졸업하는 졸업동기인 병리방 동규선배, 진단방 기원언니, 기방 병철선배, 학부 때부터 예뻐해 주시고 챙겨주시고 많은 도움 주신 예방방 분옥언니, 그 외 도움 주신 엄용환 선배와 보성이에게도 감사드립니다.

그리고 함께 학교 생활했던 06학번 동기들과 함께 졸업했으면 더 좋았을 민경이와 투정도 받아주고 얘기도 잘 들어주는 유미와 세희에게도 고마움을 전하고 싶습니다. 늘 곁에서 힘이 되어주는 많은 친구들에게도 고맙다는 말을 하고 싶습니다. 또한 한국에서 학교생활 할 때에도 일본이라는 낯선 나라에 가있을 때에도 늘 잊지 않고 챙겨주던 두미, 고은, 지영, 슬기, 숙영에게도 고맙다는 말을 하고 싶습니다.

논문이 나오기까지 많은 배려를 해주신 협성 검정의 자상한 송근배 상무님, 카리스마 이안열 부장님과 최성권 부장님, 컴퓨터 능력자 김정운 차장님, 시크 박경찬 과장님, 적응 잘하고 생활 할 수 있도록 친언니 오빠처럼 챙겨주신 임도영 대리님, 동근오빠, 승민오빠, 유진언니, 경미언니와 두 귀염둥이 미선이, 명아, 엄마 같은 룸메이트 소현에게도 감사의 말을 전하고 싶습니다.

마지막으로 세상에서 가장 사랑하는 가족들에게 고마움을 전하고 싶습니다. 새벽마다 저를 위해서 기도해 주시는 할머니, 항상 사랑으로 보살펴 주시고 지켜봐 주시고 운전 기사노릇까지 열심히 해주신 부모님, 늦은 밤에도 심부름 해주던 듕직한 동생 승훈에게도 감사드립니다.

제가 할 수 있는 것은 최선을 다하게 해주시고, 제가 할 수 없는 것은 체념 할 줄 아는 용기를 주시며, 이 둘을 구분할 수 있는 지혜를 주소서. 감사합니다.

VII. 참고문헌

- Barton, B. A. and G. K. Iwama (1991). Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Ann. Rev. Fish Dis.*, 1, 3-26.
- Bell, J. G., C. B. Cowey, J. W. Adron and A. M. Shanks (1985). Some effects of vitamin e and selenium deprivation on tissue enzyme levels and indices of tissue peroxidation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Br. J. Nutr.*, 53, 149-157.
- Beutler E. (1984). *Red Cell Metabolism: Manual of Biochemical Methods* (3rd ed.). Grune Stratton, Inc., Orlando, FL 32887, London.
- Bhagwant, S. and M. Bhikajee (2000). Induction of hypochromic macrocytic anaemia in *Oreochromis hybrid* (Cichlidae) exposed to 100 mg/L (sublethal dose) of aluminium. *Science and Technology, Research Journal*, 5, 9-20.
- Black, J. J. and P. C. Bauman (1991). Carcinogens and cancers in freshwater fishes. *Environ. Health Perspect*, 90, 27-33.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
- Bryan, G. W. (1976). Some aspects of heavy metal tolerance in aquatic organisms. *In: Effects of Pollutants on Aquatic Organisms* (ed. A. P. M Lockwood). Cambridge University Press, New York, pp. 7-34.

- Carvalho, C. S. and M. N. Fernandes (2006). Effect of temperature on copper toxicity and hematological responses in the neotropical fish *Prochilodus scrofa* at low and high pH. *Aquaculture*, 251, 109-117.
- 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.
- Chester Jones, I. and W. Mosley (1980). The interrenal gland in Pisces. Part I. Structure. *In*: I. General, comparative and clinical endocrinology of the adrenal cortex, vol. III (eds. I. Chester Jones and I. W. Henderson). Academic Press, London, pp. 395-472.
- Chrousos, G. P. and P. W. Gold (1992). The concepts of stress and stress system disorders: Overview of physical and behavioural homeostasis. *J. Am. Med. Assoc.*, 267, 1244-1252.
- Clark, R. B. (1996). Metals. *In*: Marine Pollution. Oxford University Press, Oxford, New York, pp. 74-77.
- Clearwater, S. J., A. M. Farag and J. S. Meyer (2002). Bioavailability and toxicity of dietborne copper zinc to fish. *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, 132, 269-313.
- Flik, G., X. J. H. X. Stouthart, F. A. T. Spanings, R. A. C. Look, 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.
- Fournier, D., J. M. Bride, M. Poirie, J. B. Berge and F.W. Jr. Plapp (1992). Insect glutathione S-transferases: Biochemical characteristics of the

- major forms from houseflies susceptible and resistant to insecticides. J. Biol. Chem., 267, 1840-1845.
- Friberg, I. and J. Vostal (1972). Mercury in the environment: An epidemiological and toxicological appraisal (eds. L. Friberg and J. Vostal). CRS Press, Cleveland, pp. 29-90.
- Gamperl, A. K., M. M. Vijayan and R. G. Boutilier (1994). Experimental control of stress hormone levels in fishes: techniques and applications. Rev. Fish Biol. Fish., 4, 215-255.
- Great, F. and M. J. Bebianno (2004). Does zinc produce reactive oxygen species in *Ruditapes decussatus*? Ecotoxicol. Environ. Saf., 57, 339-409.
- Habig, W. H., M. J. Pabst and W. B. Jakoby (1974). Glutathione-S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J. Biol. Chem., 249, 7130-7139.
- Handy, R. D. (2003). Chronic effects of copper exposure versus endocrine toxicity: two sides of the same toxicological process? Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol., 135, 25-38.
- Hasspielar, B. M., J. V. Behar, R. T. Di Giulio (1994). Glutathione dependant defense in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and brown bullhead (*Ameiurus nebulosus*). Ecotoxicol. Environ. Saf., 28, 82-90.
- Iger, Y., P. H. Balm, M., H. A. Jenner and S. E. Wendelaar Bonga (1995). Cortisol induces stress-related changes in the skin of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Gen. Comp. Endocrinol., 97, 188-198.
- Kinae, N. (1993). Evaluation of environmental water qualities and fish tumors. Water and Waste, 35, 51-60.

- Kroll, J. S., P. R. Langford, K. E. Wilks and A. D. Keil (1995) Bacterial [Cu,Zn]-superoxide dismutase: phylogenetically distinct from the eukaryotic enzyme, and not so rare after all! *Microbiology*, 141, 2271-2279.
- Landis, W. G. and M. H. Yu (1999). Introduction to environmental toxicology (2nd ed). Lewis Publishers, 1-19.
- Lee, S. M., C. S. Park and J. C. Bang (2002). Dietary protein requirement of young Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* fed isocaloric diets. *Fisheries Science*, 68, 158-164.
- Livingstone, D. R. (2001). Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.*, 42, 656-666.
- Marr, J. C. A., J. Lipton, D. Cacela, J. A. Hansen, H. L. Bergman, J. S. Meyer and C. Hogstrand (1996). Relationship between copper exposure duration, tissue copper concentration, and rainbow trout growth. *Aquat. Toxicol.*, 36, 17-30.
- Mazeaud, M. M., F. Mazeaud, and E. M. Donaldson (1977). Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review. *Trans. Ame. Fish. Soc.*, 106, 201-212.
- Maule, A. G., C. B. Schreck and C. Sharpe (1993). Seasonal changes in cortisol sensitivity and glucocorticoid receptor affinity and number in leukocytes of coho salmon. *Fish Physiol. Biochem.*, 10, 497-506.
- McCormick, S. D. (1995). Hormonal control of gill Na^+ , K^+ -ATPase and chloride cell function. *In: Cellular and molecular approaches to fish*

- ionic regulation (Fish physiology XIV, ed. C. M. Wood and T. J. Shuttleworth). San Diego, C. A., Academic Press, pp. 285-315.
- 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. 2: tissue specific metal accumulation. *Aquat, Toxicol.*, 50, 245-256.
- Nebot, C., M. Moutet, P. Huet, J. Z. Xu, J. C. Yadan and J. Chaudiere (1993). Spectrophotometric assay of superoxide dismutase activity based on the activated autoxidation of a tetracyclic catechol. *Anal Biochem.*, 214, 442-451.
- Nemcsók, J. and L. Boross (1982). Comparative studies on the sensitivity of different fish species to metal pollution. *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.*, 33, 23-27.
- 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. Part C: Comp. Pharmacol. Toxicol.*, 111, 369-380.
- Otto, D. M. E. and T. W. Moon (1995). 3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl effects on antioxidant enzymes and GSH status in different tissues of rainbow trout. *Pharmacol. Toxicol.*, 77, 281-287.
- Perry, S. F. and P. L. Laurent (1989). Adaptational responses of rainbow trout to lowered external NaCl concentration: Contribution of the branchial chloride cell. *J. exp. Biol.*, 147, 147-168.
- Perschbacher, P. W. and W. A. Wurts (1999). Effect of calcium and

- magnesium hardness on acute copper toxicity to juvenile channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture*, 172, 275-280.
- Pickering, A. D., T. G. Pottinger and P. Christie (1982). Recovery of the brown trout (*salmo trutta L.*) from acute handling stress; a time-course study. *J. Fish Biol.*, 41, 709-716.
- Pickering, A. D. (1990). Stress the suppression of somatic growth in teleost fish. *In: Progress in Comparative Endocrinology* (eds. A. Epple, C. G. Scanes and M. H. Stetson). Wiley-Liss, New York, pp. 473-479.
- Pickering, H. W., K. Cho and E. Nystrom (1993). Microscopic and local probe method for studying crevice corrosion and its application to iron and stainless steel. *Corrosion Science*, 35, 775-781, 783.
- Richardson, R. J. and Murphy, S. D. (1975). Effect of glutathione depletion on tissue deposition of methylmercury in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 31, 505-519.
- Rodriguez, A., J. Peinado and C. Pueyo (1993). Biochemical indicators of oxidative stress in fish from polluted littoral areas. *Can. J. Fish Aqua. Sci.*, 50, 2568-2573.
- Shaheen, A. A. and A. A. el-Fattah (1995). Effect of dietary zinc on lipid peroxidation, glutathione, protein thiols levels and superoxide dismutase activity in rat tissues. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 27, 89-95.
- 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.

- Specker, J. L. and C. B. Schreck (1980). Stress responses to transportation and fitness for marine survival in coho salmon (*Oncorhynchus kitsuch*) smolts. *Can. J. Fish Aqua. Sci.*, 37, 765-769.
- Smet, H. D. and R. Blust (2001). Stress responses and changes in protein metabolism in carp *Cyprinus carpio* during cadmium exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 48, 255-262.
- Soldatov, A. A. (1996). The effect of hypoxia on red blood cells of flounder: A morphologic and autoradiographic study. *J. fish. Biol.*, 3, 321-238
- Takeda, Y., A. Ichihara, H. Tanioka and H. Inoue (1964). The Biochemistry of animal cells: I. The effect of corticosteroids on leakage of enzymes from dispersed rat liver cells. *J. Biol. Chem.*, 239, 3590-3596.
- Taylor, E. W., M. W. Beaumont, P. J. Butler, J. Mair and M. S. I. Mujallid (1996). Lethal and sub-lethal effects of copper on fish: A role for ammonia toxicity? *In: Toxicology of aquatic pollution* (ed. E. W. Taylor). University of Birmingham, Cambridge University Press, pp. 85-114.
- Tucker, C. S. (1985). Water quality. *In: Channel catfish culture* (ed. C. S. Tucker). Elsevier, Amsterdam, pp. 135-227.
- Valavanidis, A., T. Vlahogianni, M. Dassenakis and M. Scoullas (2006), Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 64, 178-189.
- Van Raaij, M. T. M., G. E. E. J. M. Van den Thillart, G. J. Vianen, D. S. S. Pit, P. H. M. Balm and A. B. Steffens (1996). Substrate mobilisation and hormonal changes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* L.) and

- common carp (*Cyprinus carpio* L.) during deep hypoxia and subsequent recovery. J. Comp. Physiol. B, 166, 443-452.
- Vijayan, M. M. and T. W. Moon (1994). The stress response and the plasma disappearance of corticosteroid and glucose in a marine teleost, the sea raven. Can. J. Zool., 72, 376-386.
- Vijayan, M. M., C. Pereria and T. M. Moon (1994). Hormonal stimulation of hepatocyte metabolism in rainbow trout following acute handling stress. Comp. Biochem. Physiol. C, 108, 321-329.
- Vijayan, M. M., C. Pereira, E. G. Grau and G. K. Iwama (1997). Metabolic responses associated with confinement stress in tilapia: the role of cortisol. Comp. Biochem. Physiol. C, 116, 89-95.
- Vijayan, M. M., J. D. Morgan, T. Sakamoto, E. G. Grau and G. K. Iwama (1996). Food-deprivation affects seawater acclimation in tilapia: hormonal and metabolic changes. J. Exp. Biol., 199, 2467-2475.
- Waring, C. P., R. M. Stagg and M. G. Poxton (1992). The effects of handling on flounder (*Platichthys flesus* L.) and Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). J. Fish Biol., 41, 131-144.
- Wendelaar Bonga, S. E. (1997). The stress response in fish. Physiol. Rev., 77, 591-625.
- Winston, G. W. and R. T. Di Giulio (1991). Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. Aquat. Toxicol., 19, 137-161.
- 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.

- Worthington, D. J. and M. A. Rosemeyer (1974) Human glutathione reductase: Purification of the crystalline enzyme from erythrocytes. *Eur. J. Biochem.*, 48, 167 - 177.
- Yamada, J. and M. Kurasaki (1991) Staging and the time course of embryonic development in kurosoi, *Sebastes schlegeli*. *Environ. Biol. Fish*, 30, 103-110.
- Yamashita, M., N. Kinae, I. Kimura, H. Ishida, H. Kumai and G. Nakamura (1990). The croaker (*Nibea mitsukurii*) and the sea catfish (*Plotosus anguillaris*): Useful biomarkers of coastal pollution. *In: Biomarkers of Environmental Contamination* (eds. J. F. McCarthy and L. R. Shugart). Lewis Publishers, Florida, pp. 73-84.
- Zyadah, M. A. and T. E. Abdel-Baky (2000). Toxicity and bioaccumulation of copper, zinc, and cadmium in some aquatic organisms. *Bull. Environ. Contamin. Toxicol.*, 64, 740-747.
- Zolla, L., L. Calabrese and M. Burnori (1984). Distribution of copper atoms and binding of carbon monoxide in partially copper-depleted hemocyanin. *Biochim. Biophys. Acta.*, 788, 206-213.
- 유범희, 우종민 (2001). 스트레스의 신경생물학적 이해. *정신신체의학학회지*, 9, 1-12.
- 장영진, 허준욱, 임한규, 이종관 (2001). 수온의 급하강과 급상승이 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)와 쥐노래미 (*Hexagrammos otakii*)에 미치는 스트레스. *한국수산학회지*, 34, 91-97.
- 허준욱, 장영진, 강덕영, 이복규 (2001). 순환여과 사육시스템에서 급격한 염분변화에 따른 송어 (*Mugil cephalus*)와 틸라피아 (*Oreochromis niloticus*) 치어의

아가미 조직과 체성분 변화. 한국수산학회지, 34, 51-56.

최문술, 키나에 나오히데 (1994). Micropollutants가 연안 생물에 미치는 독성효과에
관한 연구: 1. 어류에 미치는 독성. 한국수산과학회지, 27, 529-534.

