

수온변화에 따른 참굴 *Crassostrea gigas* 산소소비 및 혈림프 성분 변화

김기태¹, 고민균², 변순규¹, 류준형³

¹국립수산과학원 동해수산연구소, ²군산대학교 해양생명응용과학부, ³메릴랜드대 볼티모어 카운티 캠퍼스 해양생명공학과

Oxygen Consumption and Hemolymph Composition Change in Water Temperature of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*

Ki Tae Kim¹, Min Gyun Ko², Soon-Gyu Byun¹ and Jun Hyung Ryu³

¹East Sea Fisheries Research Institute NIFS, Gangneung 25435, Korea

²Faculty of Marine Applied Bioscience, Kunsan National University, 558 Daehak-ro, Gunsan, Jeonbuk 54150, Korea

³Department of Marine Biotechnology and Institute of Marine and Environmental Technology, University of Maryland Baltimore Country, 701 E. Pratt Street, Baltimore, Maryland 21202, USA

ABSTRACT

This study was performed to oxygen consumption and hemolymph composition of Pacific oyster of according to water temperature. Oxygen consumption of Pacific oyster was increased with rising water temperature. Ammonia excretion was significantly increased with rising water temperature. The oxygen consumption R^2 value was 0.9765, indicating a high correlation (Q^{10}). Na^+ K^+ and Cl^- concentrations of hemolymph were significantly increased with 25°C water temperature. There was no significant difference in the values of glucose. Levels of hemolymph alanine aminotransferase (ALT) were significantly increased with 25°C water temperature.

Key words: *Crassostrea gigas*, oxygen consumption, ammonia excretion, pacific oyster

서 론

최근 지구 온난화의 영향으로 인한 수온 상승은 외국에 비해 그 상승률은 매우 가파르며 국지적인 집중 강우 등의 이상 해황과 육지 오염원의 지속적인 유입에 연안 해양환경은 점차 악화되고 있다. 또한 이상 수온으로 양식생물의 대량 폐사가 빈번히 발생하고 있으며 해양환경의 끊임없는 변화로 인해 해양생물의 생리, 번식현상 및 환경요인 변화에 따라 생리적 기능과 활성을 꾸준히 조사해야 할 필요성이 제기되고 있다. 한편 수서생물에 있어 수온과 염분은 산소소비율 및 암모니아 질소

배설율에 직접적인 영향을 미친다. 특히 번식시기는 건강한 알과 정자를 생산하기 위해 산란시기에는 압박하여 생리활성이 높아야 하는데 이는 생체 대사율이 생리활성과 밀접한 관계에 있으며, 대사율은 수온에 직접적으로 영향을 받고, 개체크기에 반비례한다고 알려져 있다 (Fry, 1971; Dabrowski, 1986). 또한 사육 환경수의 용존산소 농도는 수온과 생물의 수용밀도에 반비례한다고 알려져 있다 (Piper *et al.*, 1982). 그러므로 산소의 고갈과 독성대사 부산물의 생성은 양식장 환경에서 양식생물의 수용밀도를 제한하는 주요 요인이 되기도 한다. 그리고 산소농도의 감소는 성장 감소를 초래하고 (Brett, 1979), 주요 대사산물인 암모니아 질소는 생물의 서식밀도와 공급하는 먹이양에 따라 증가하므로, 이온화 되지 않은 암모니아 (NH_3)가 증가할수록 독성이 강해져 생물에게 영향을 미친다. 암모니아 (NH_3)는 50-200 $\mu g/L$ 의 농도 범위에서는 어패류의 성장을 감소시키는 것으로 알려지고 있다 (Colt and Armstrong, 1981). 또한 수온이나 염분 등 사육환경의 변화에 따른 패류의 산소소비는 패각의 성장이나 먹이생물의 섭식, 생물의 에너지 활용 및 대사활동 에너지 측면에서 매우 중요한 위치를 점하고 있다 (Boucher and Renata, 1988; His *et*

Received: june 21, 2021; Revised: june 25, 2021; Accepted: june 30, 2021

Corresponding author: Jun Hyung Ryu
Tel: +1 (410) 234-8877, e-mail: rjh@umbc.edu
1225-3480/24790

This is an Open Access Article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License with permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproducibility in any medium, provided the original work is properly cited.

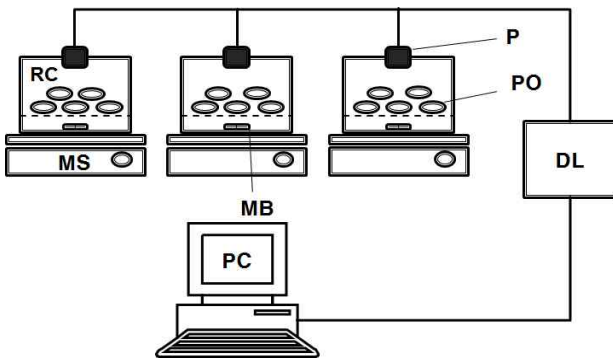


Fig. 1. Schematic diagram of oxygen consumption measuring system. **PO**: Pacific oyster, **DL**: data logger, **MB**: magnetic bar, **MS**: magnetic stirrer, **P**: probe, **PC**: personal computer, **RC**: respiratory chamber.

al., 1989; Hartwell *et al.*, 1991). 한편 패류 산소소비 및 대사활성과 관련되는 혈림프 (hemolymph) 정상 역시 모패의 생리활성을 평가하는데 중요한 척도가 되고 있으며 국내에서는 동족 산소소비 연구 (Lee, 1996), 굴 대사율 (Shin *et al.*, 2008), 개량조개 저염분 생리적 반응 (Ryu *et al.*, 2017) 등 알려져 있으나 연구는 미진한 실정이다. 최근 고수온 및 냉수 대 등 이상 수온이 빈번하게 발생함에 따라 생리활성이 저하되고 번식시기 등 폐사가 빈번하게 발생함에 따라 본 연구에서 수온변화에 따른 참굴의 산소소비 및 암모니아의 변화를 관찰하고 생물의 대사활동과 혈림프 성상의 미치는 영향을 파악하여 기초자료를 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 산소소비 및 암모니아 배설

산소소비량을 조사하기 위해 양식산 참굴을 40개체를 아이스박스에 수용하여 실험실로 수송하였다. 패각에 붙어 있는 이물질과 기타 생물을 제거한 후 패류 사육시스템에서 하루 동안 적응시킨 다음 실험에 사용하였다. 모패의 크기는 각장 6.1 ± 0.3 cm, 각고 11.0 ± 0.3 cm, 전중 34.0 ± 1.4 g, 육중 116.0 ± 4.3 g이었다.

수온에 따른 산소소비량을 조사하기 위하여 밀폐지수식 산소소비 측정장치 (Fig. 1) 를 사용하였다. 아크릴로 만든 호흡실 (183 mm × 133 mm × 160 mm) 의 윗부분에 직경 67 mm의 구멍을 뚫어 산소 probe를 고정하였다, 그리고 호흡실 내부의 공기가 제거하기 위해 5 mm 구멍을 뚫어 투명 비닐관을 연결하였다.

산소소비량 값의 측정은 호흡실 내의 상단 부분에 고정된 산소 probe를 통해 매 10분 간격으로 측정하였으며, 그 결과 값은 6 channel multi data logger system (Oxyguard,

Denmark) 을 통해 컴퓨터에 자동 저장되었다.

산소소비량 측정에서 실험 수온은 15, 20 및 25°C에서 수행하였으며 실험 전 12시간동안 강하게 폭기하여 95% 전후의 산소포화도에 충분히 이르게 한 후 사용하였다. 각 수온 조건에서 해수를 채운 호흡실에는 모패를 5개체씩 수용하였고, 교반기를 활용하여 호흡실 내의 물이 정체하지 않도록 유지 시켜 주었다. 수온 유지는 다단배양기 (Taitec, Japan) 내에서 수온 설정에 따라 실험에 진행 하였다. 모든 실험은 수중에 산소포화도가 80% 이하로 감소하지 않는 4-5시간 이내 폐사가 발생하지 않는 상태에서 실시하였다. 실험 종료 후, 참굴을 해부해 연체부 (soft part) 를 드라이오븐에서 건조 (80°C, 24시간) 시킨 뒤, 건조량을 측정하여 이를 바탕으로 아래의 계산식 (Wi and Chang, 1976) 에 따라 산소소비량 (oxygen consumption, OC) 을 구하였다.

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

OC : 산소소비량 ($\text{mg O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$)

C_i, C_t : 측정개시 및 t 시간 후의 용존산소 ($\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$)

t : 측정시간 (hour)

V : 용기 내의 수량 (L)

W : 연체부의 건조량 (kg)

수온별 조건에서의 암모니아 배설량을 조사하기 위해, 산소 소비 측정 전과 후 채수한 실험용수의 암모니아 농도를 phenolphthalein법 (Solorzano, 1969) 에 따라 분광광도계 (Ultrospec 3300 pro, UK) 를 이용하여 측정하였다. 이를 바탕으로 Leung *et al.* (1999) 의 방법을 변형하여 아래 계산식에 의해 암모니아 배설량 (ammonia excretion, AE) 을 구하였다.

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

AE : 암모니아 배설량 ($\text{mg NH}_4\text{-N kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$)

C_i, C_t : 측정개시 및 t 시간 후의 암모니아 ($\text{mg NH}_4\text{-N L}^{-1}$)

t : 측정시간 (hour)

V : 용기 내의 수량 (L)

W : 연체부의 건조량 (kg)

2. 혈림프 정상

수온별 혈림프 정상 분석에 사용한 참굴은 앞선 산소소비 실험이 종료된 후 사용하였다. 실험이 종료된 참굴의 패각근을 절제 후 개각하여 고여 있는 해수와 체액을 제거하였다. 그리고 0.5 mL syringe를 사용하여 위심강 (pericardial cavity)

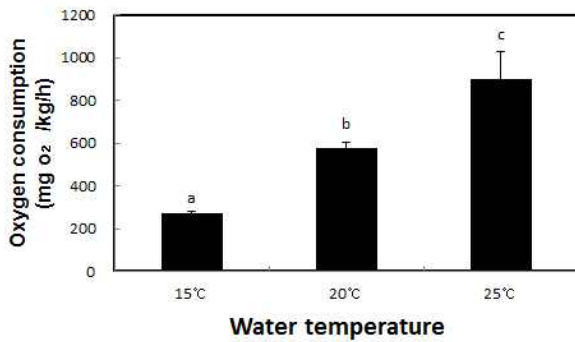


Fig. 2. Oxygen consumption of Pacific oyster *Crassostrea gigas* in different water temperatures. Each value represents mean ± S.E. Different alphabetic letters on the bars indicate significant difference ($P < 0.05$).

으로부터 0.5 mL 혈림프를 채취하였다.

혈림프 성분 분석을 위해 원심분리 (10,000 × g, 4°C, 10분) 를 하였으며, 혈림프는 각각의 이온 (Na⁺, K⁺, Cl⁻, Ca²⁺ 및 Mg²⁺), Glucose, 단백질, 콜레스테롤, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) 및 lactate dehydrogenase (LDH) 를 혈액분석기 (Fujifilm Dri-Chem NX500i, Japan) 로 분석하였다.

3. 통계처리

실험 결과의 값 (mean ± S.E.) 사이의 유의차 유무는 SAS 통계패키지 (ver. 9.1) 에 의한 One-way ANOVA test를 실시하고 최소 유의차 유무를 검정하였다.

결 과

1. 산소소비 및 암모니아 배설

수온변화에 따른 참굴의 산소소비량은 각각 15°C (269.9 ± 9.1 mg O₂/kg/h), 20°C (578.6 ± 26.8 mg O₂/kg/h), 25°C (898.1 ± 1316 mg O₂/kg/h) 로 나타났다. 수온이 상승할수록 산소소비량 또한 증가하였다 (Fig. 2).

Q₁₀ 값은 15-20°C범위에서 4.6, 15-20°C의 범위에서 2.4였으며, 지수함수식의 기울기 값 (b) 는 0.1202였다. 산소소비 경향의 기울기 R₂ 값은 0.9765으로 높은 상관관계를 보여주었다 (Fig. 3).

참굴 암모니아 배설량은 각각 15°C (12.1 ± 0.5 NH₄-N/kg/h), 20°C (20.3 ± 1.4 NH₄-N/kg/h), 25°C (45.3 ± 4.8 NH₄-N/kg/h) 나타났다. 즉, 수온이 높아질수록 암모니아 배설량은 유의하게 증가하는 경향을 나타냈다 (Fig. 4).

각 수온조건에서 산소소비량과 암모니아 배설량 결과 값으로 반영한 O:N 원자비는 Fig. 5와 같다. 수온 15, 20, 25°C의

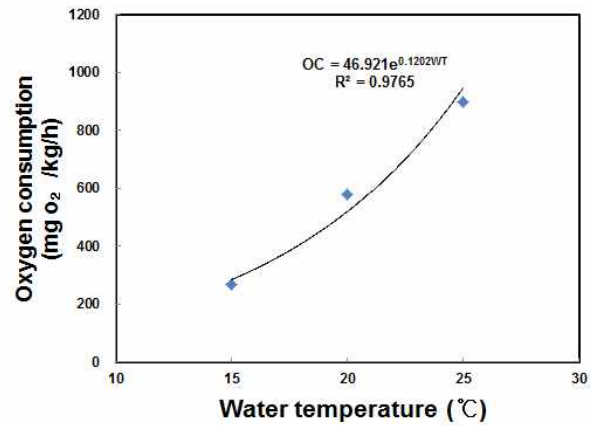


Fig. 3. Oxygen consumption (OC) of Pacific oyster *Crassostrea gigas* in different water temperatures. WT: water temperatures.

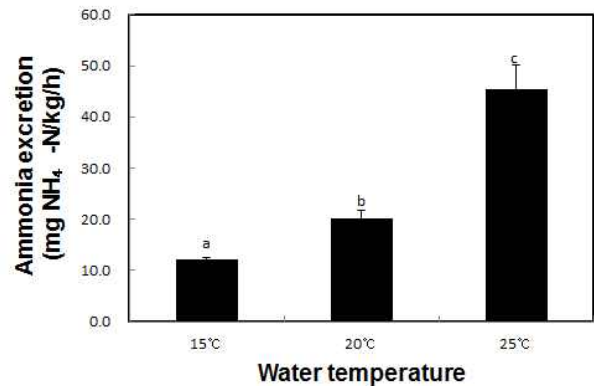


Fig. 4. Ammonia excretions of Pacific oyster *Crassostrea gigas* in different water temperatures. Each value represents mean ± S.E. Different alphabetic letters on the bars indicate significant difference ($P < 0.05$).

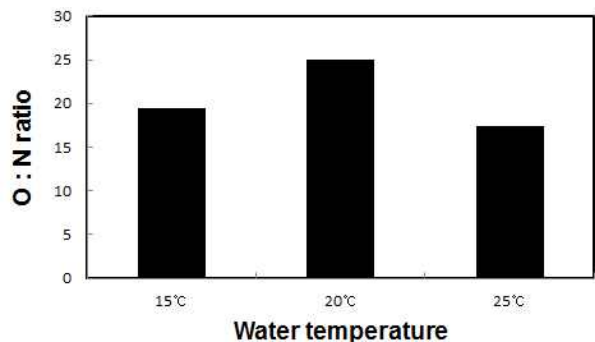


Fig. 5. Atomic O:N ratio variations of Pacific oyster *Crassostrea gigas* in different water temperatures.

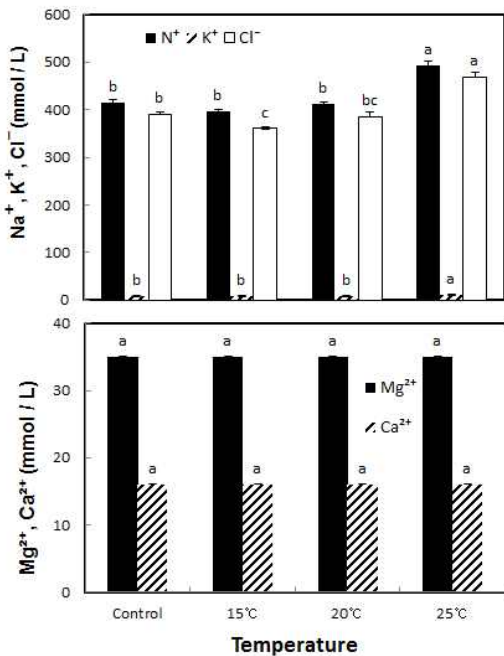


Fig. 6. Levels of hemolymph sodium, potassium, chloride, magnesium and calcium concentration of Pacific oyster *Crassostrea gigas* in water temperatures experiment. Each value represents mean ± S.E. Different alphabetic letters on the bars indicate significant difference ($P < 0.05$).

값은 각각 19.5, 25.0 및 17.3으로 나타났고, 15°C와 25°C에서 O:N 원자비의 값은 비슷하였으나 20°C에서는 상승하는 경향을 나타내었다.

2. 헴림프 정상

수온 15, 20 및 25°C의 참굴 헴림프의 삼투질농도는 (Na⁺, K⁺, Cl⁻, Ca²⁺ 및 Mg²⁺) Fig. 6에 나타내었다. Na⁺ 농도는 15°C 및 20°C에서 각각 396.7 ± 3.3, 411.7 ± 4.4 mmol/L로 대조구 413.3 ± 6.7 mmol/L과 유사한 값을 나타내었으나 25°C에서 493.3 ± 9.3 mmol/L로 증가하는 경향을 보였다. K⁺ 농도는 15°C 및 20°C에서 각각 8.7 ± 0.3, 8.2 ± 0.2 mmol/L로 대조구 8.3 ± 0.3 mmol/L과 비슷한 경향을 나타내었고 25°C에서 10.7 ± 0.3로 유의하게 증가하였다. Cl⁻ 농도 또한 15°C에서 360 ± 10.0 mmol/L로 대조구 390 ± 5.0 mmol/L에 비해 유의하게 낮았으며 20°C에서는 385 ± 10.0 mmol/L로 대조구와 유사하였다. 25°C에서는 468.3 ± 10.1 mmol/L로 유의하게 증가하였다. Ca²⁺ 및 Mg²⁺ 값은 유의한 차이가 없었다.

Glucose 농도는 Fig. 7에서 보는데와 같이 15°C, 20°C 및 25°C에서 1.3 ± 0.3, 2.3 ± 0.9 및 1.0 ± 0 mg/dL로 대조구 1.7 ± 0.3 mg/dL에 비해 증가하거나 낮아졌으며, 유의한 차이

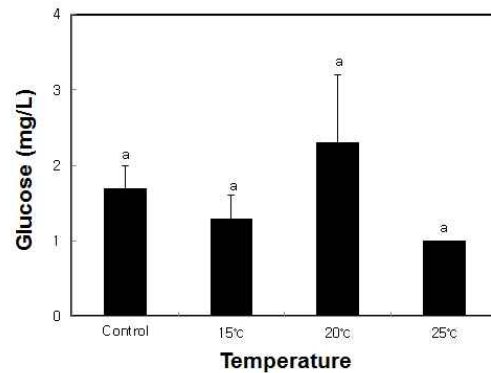


Fig. 7. Levels of hemolymph glucose concentration of Pacific oyster *Crassostrea gigas* in water temperatures experiment. Each value represents mean ± S.E. Different alphabetic letters on the bars indicate significant difference ($P < 0.05$).

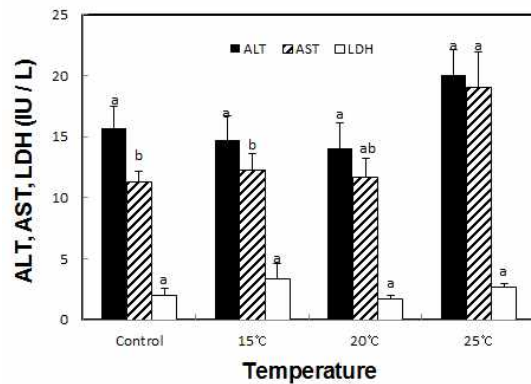


Fig. 7. Levels of hemolymph ALT, AST and LDH concentration of Pacific oyster *Crassostrea gigas* in water temperature experiment. Each value represents mean ± S.E. Different alphabetic letters on the bars indicate significant difference ($P < 0.05$).

는 없었다.

ALT 농도는 15°C 및 20°C에서 각각 14.7 ± 2.0 및 14.0 ± 2.1 IU/L로 대조구 15.7 ± 1.8 IU/L와 차이가 없었고, 25°C에서는 19.0 ± 2.1 IU/L로 증가하였으나, 유의한 차이는 없었다. AST 농도도 ALT와 유사한 경향을 나타내었으며, 15°C 및 20°C에서 각각 12.3 ± 1.3 및 11.7 ± 1.5 IU/L로 대조구 11.3 ± 0.9 IU/L와 유사하였으며, 25°C에서 19.0 ± 1.0 IU/L로 유의하게 증가하는 경향을 보여주었다. LDH는 수온 15°C, 20°C 및 25°C에서 3.3 ± 1.3, 1.7 ± 0.3 및 2.7 ± 0.3로 유의한 차이는 없었다 (Fig. 8).

고 찰

대사율을 조사하기 위해 측정된 여러 가지 요소 중 산소소비율, 암모니아 배설량과 O:N 원자비는 패류의 대사율을 판단하는데 있어 활용할 수 있는 중요한 지표이며 수온, 염분, 용존산소, 먹이섭취, 질병 및 개체크기 등에 의해 영향을 받는다.

수온에 따른 참굴의 산소소비량은 15-25°C의 범위에서 수온의 증가에 따라 유의하게 증가하였으며 암모니아 배설량은 수온별 실험에서 수온이 높을수록 증가하였다. 이는 변온동물의 일반적인 생리적 특성을 반영하였다. Q_{10} 값은 수온 15-20°C에서 4.6, 20-25°C는 2.3으로 나타났는데 Q_{10} 값은 온도변화에 적응하기 위한 동물의 대사량으로서 온도 상승으로 인한 체내 효소반응과 더불어 생리학적 작용으로 유발되는 에너지 요구량을 나타낸다. 각 실험별 수온 상승시 20-25°C 보다 15-20°C에서의 Q_{10} 값이 높았는데 이는 수온 상승이 상대적으로 스트레스로 작용하는 것으로 판단된다.

O:N 원자비는 에너지 대사에서 단백질 이용지표로 활용되고 있으며, 단백질 대사가 많아질수록 감소한다 (Bayne and Thompson, 1970). 또한 순수단백질이 이용될 경우 최소의 O:N 원자비는 7이고, 탄수화물과 지질이 이화될 경우에는 더욱 높은 값을 제시한다 (Mayzaud and Conover, 1988). 본 실험에서 O:N 원자비는 20°C (25.0) 에서 가장 높았고 15°C (19.5) 및 25°C (17.3) 에서는 상대적으로 낮았다. 일반적으로 수온 15°C-20°C에서 굴의 성장과 성숙이 이루어지는 시기이고 탄수화물과 지질을 이용하여 원자비 값이 상대적으로 높았으며 25°C에서 원자비 값의 상대적 감소는 일시적인 수온 스트레스 및 단백질대사의 비중이 증가했기 때문인 것으로 판단된다.

수온별 혈림프 성상의 변화는 수온 25°C 일 때 유의하게 상승하였는데, 이는 수온 증가로 인한 대사활동이 증가함으로써 체내 혈림프 공급의 증가로 Na^+ , Cl^- 의 값이 상승한 것으로 추측된다.

글루코스는 어류에서 스트레스 지표로 활용되고 있으며, 패류에서 글루코스 상승은 여분의 에너지원이 필요하다고 여겨지는 스트레스에 대한 반응에서 기인한다고 알려져 있다 (Gustafon *et al.*, 2005). 본 연구에서는 20°C에서 O:N 원자비 또한 20°C에서 증가하였는데 이는 온도변화에 적응하기 위한 동물의 대사량으로서, 온도 상승으로 인한 체내 효소반응과 생리학적 작용으로 유발된 에너지 요구량에 의해 글루코스 값이 상승하였던 것으로 추측된다.

ALT, AST 및 LDH는 인간 및 포유류의 간 기능 검사에서 주요한 지표로 활용되며, ALT와 AST는 패류의 혈림프 내에 미량으로 평소 존재한다고 알려져있으며, 조직의 염증 및 조직 손상이나 수온변화에 따라 혈중으로 유리되어 상승하는 것으로 알려져 있다 (Casillas *et al.*, 1982). 본 연구에서 수온이

25°C일 때 ALT는 다른 수온에 비해 상승하였고, AST는 유의하게 상승하였는데, 이는 수온증가에 따른 환경변화에 의해 증가한 것으로 추측된다. 따라서 본 실험의 결과는 수온이 증가함에 따라 생체 대사율이 증가하는 변온동물의 생리적 특성을 나타내었으며, O:N 원자비의 경향은 15°C-20°C에서 탄수화물 지질 등을 활용하여 굴의 성장과 성숙이 이루어지는 시기인 것으로 판단되어진다. 혈림프 성상은 건강도에 있어 주요한 지표로서 활용되며 향후 염분, 밀도 등 다양한 환경요인의 영향에 따른 생리변화 연구가 필요할 것으로 판단된다.

요 약

수온변화에 따른 참굴의 산소소비활성 및 혈림프 성상의 생리적 반응을 조사하였다. 수온이 증가할수록 산소소비량은 유의하게 증가하였다. Q_{10} 값 지수함수식의 기울기 (b) 는 0.1202로 나타났다. 또한 산소소비 경향의 기울기 값에 대한 R_2 값은 0.9765로 상관관계 높았다. O:N 원자비는 20°C (25.0) 에서 가장 높았고 15°C (19.5) 및 25°C (17.3) 에서는 상대적으로 낮았다. 혈림프 삼투질농도는 Na^+ , K^+ , Cl^- 은 수온이 증가함에 따라 유의하게 증가하였다. Glucose 농도는 대조구 1.7 ± 0.3 mg/dL에 비해 증가하거나 낮아졌으며, 유의한 차이는 없었다.

ALT 농도는 25°C에서 20.0 ± 2.1 IU/L로 증가하였으며 AST 농도도 ALT와 유사한 경향을 나타내었으나, 25°C에서 $19.0 \pm$ IU/L로 유의하게 증가하였다.

사 사

이 논문은 2021년도 국립수산물과학원 수산과학연구사업 (R2021006) 의 지원으로 수행된 연구이며 연구지원에 감사드립니다.

REFERENCES

- Bayne, B.L and Thompson, R.J. (1970) Some physiological consequences of keeping *Mytilus edulis* in the laboratory. *Helgoländer wiss. Meeressunters*, **20**: 526-552.
- Boucher, G and B.R. Renata. (1988) In measurement of respiratory metabolism and nitrogen fluxes at the interface of oyster beds. *Mar. Ecol. Proc. Ser.*, **44**: 229-238.
- Brett, J.R. (1979) Environmental factors and growth. *In*; Fish Physiology, Vol. 8. (ed. by Hoar, W.S., Randall, D.J. and Brett, J.R.) pp. 599-675. Academic Press, New York.
- Casillas E, J Sundquist and WE Ames. (1982)

- Optimization of assay conditions for, and the selected tissue distribution of, alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase of English sole, *Parophrys vetulus* Girard. *J. Fish Biol.*, **21**: 197-204.
- Colt, J.E. and Armstrong, D.A. (1981) Nitrogen toxicity to fish, crustaceans and mollusks. *In*; Proceedings of the Bio-Engineering Symposium for Fish Culture. (ed. by Allen, L.J. and Kinney, E.C.) pp. 39-42. American Fisheries Society, Fish Culture Section, Bethesda, MD.
- Dabrowski, K.R. (1986) Active metabolism in larval and juvenile fish: ontogenetic changes, effect of water temperature and fasting. *Fish Physiology and Biochemistry*, **1**: 125-144.
- Fry, F.E.J. (1971) The effects of the environmental factors on the physiology of fish. *In*; Fish Physiology, Vol. 6. (ed. by Hoar, W.S. and Randall, D.J.) pp. 1-98. Academic Press, New York.
- Gustafson, L.L., M.K. Stoskopf, W. Showers, G. Cope, C. Eads, R. Linnehan, T.J. Kwak, B. Anderson and J.F. Levine. (2005) Reference ranges for hemolymph chemistries from *Elliptio complanata* of North Carolina. *Dis. Aquat. Org.*, **65**: 167-176.
- His, E., R. Robert and A. Dinet. (1989) Combined effects of temperature and salinity on fed and starved larvae of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* and Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol.*, **100**: 455-463.
- Leung, K.M.Y., J.C.W. Chu and R.S.S. (1999) Effects of body weight water temperature and ration size on ammonia excretion by the areolated grouper (*Epinephelus areolatus*) and mangrove snapper (*Lutjanus argentimaculatus*). *Aquaculture*, **170**: 215-227.
- Pipe RK and JA Coles. (1995) Environmental contaminants influencing immune function in marine bivalve molluscs. *Fish Shellfish Immunol.*, **5**: 581-595.
- Ryu, JH, BH Min and KT Kim. (2017) Physiological Responses of Sunray Surf Clam, *Macra chinensis* in Low Salinities *Kor. J. Malacol.*, **33**(2): 63-71.
- Solorzano, L. (1969) Determination of ammonia natural waters by the phenolhypochlorite method. *Limnology Oceanography*, **14**: 799-801.
- Shin, YK, YB, Hur, JI Myeong and Sik Lee. (2002) Seasonal changes of biochemical composition in cultured bivalves. *Kor. J. oMalacol.*, **18**(1): 1-8.
- Wi, J.H. and Y.J. Chang. (1976) A basic study on transport of live fish (1). *Bull. Fish. Res. Dev. Agency*, **15**: 91-108.