

4종류의 동해방지제에 침지한 진주조개, *Pinctada fucata martensii*와 참굴, *Crassostrea gigas* 담륜자의 생존율

최윤희 · 장영진
부경대학교 수산과학대학 양식학과

Survival Rates of Trochophores from Pearl Oyster, *Pinctada fucata martensii* and Pacific Oyster, *Crassostrea gigas* Immersed in Four Kinds of Cryoprotectant

Youn Hee CHOI and Young Jin CHANG

Department of Aquaculture, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

Experiments were carried out to evaluate the tolerance of trochophores for pearl oyster, *Pinctada fucata martensii* and Pacific oyster, *Crassostrea gigas* using different concentrations of cryoprotectants : dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylene glycol, glycerol and 1,2-propanediol. Each cryoprotectant with different concentrations was exposed for 5, 10, 15 and 20 minutes of immersion time. Survival rates were increased with decreased concentrations of cryoprotectant and decreased immersion time, and these differed from types of cryoprotectant. Survival rates of Pacific oyster trochophores were higher in DMSO and ethylene glycol, while those of pearl oyster trochophores were higher in glycerol and 1,2-propanediol. In case of trochophores from Pacific oyster, when 0.2 M sucrose was added in each cryoprotectant, the survival rates were increased significantly.

Key words: pearl oyster, Pacific oyster, trochophore, cryoprotectant, survival rate

서 론

동물의 발생배 냉동보존에 영향을 주는 여러 요인들 가운데 동해방지제의 선정은 냉동보존 효과를 높이는 데 매우 중요하다. 지금까지 동해방지제에 관한 연구는 포유류인 가축의 발생배 냉동보존에서 dimethyl sulfoxide (DMSO) (Somsasen et al., 1995), ethylene glycol (Cseh et al., 1997), glycerol (Shelton, 1992; Sakul et al., 1993), propylene glycol (Tervit and Gold, 1984; Schiewe et al., 1991) 및 glycerol에 sucrose를 혼합한 것 (Shelton, 1992) 등을 이용하여 각 동해방지제의 효과에 관한 것이 대부분이었다. 이들 연구에서는 냉동보존 후 발생배의 생존율에 중점을 두어 동해방지제에 대한 내성을 평가한 것으로, 냉동보존하기 전에 동해방지제가 발생배에 미치는 영향에 관한 연구자료는 거의 없다.

한편, 수산동물 배를 이용한 동해방지제의 평가에 관한 연구에서는 Suzuki et al. (1995)이 무지개송어, *Salmo gairdneri*, pejerrey, *Odontheistes bonariensis*, 잉어, *Cyprinus carpio*와 medaka, *Oryzias latipes*의 발생배를 1~5 M DMSO에 침지한 결과, 고농도일 수록 독성이 높아진다고 하였고, Renard and Cochard (1989)는 참굴, *Crassostrea gigas*, 바지락, *Ruditapes philippinarum*과 king scallop, *Pecten maximus*의 2~4세포기의 발생배를 이용한 동해방지제에 대한 실험에서 methanol의 독성이 가장 낮았다고 하였다. 한편 Chao et al. (1994)은 참굴의 초기배를 사용하여 동해방지제별 내성을 연구한 결과, DMSO가 가장 높은 생존율을 보였다고 하였다. 이러한 연구는 어패류 배의 냉동보존 기술개발을 위한 기반적인 지식이 됨에도 불구하고, 국내에서는 이러한 연구가

전혀 이루어지지 않고 있는 실정이다.

그러므로 본 연구에서는 조개류 양식에서 매우 중요한 위치를 점하고 있는 진주조개, *Pinctada fucata martensii*와 참굴의 발생배 중 섬모로 움직이기 때문에 생사 판별이 쉬우며, 난황흡수가 거의 종료되어 냉동보존에 유리한 담륜자 (trochophore)를 4종류의 동해방지제에 농도별, 시간별로 침지하여 생존율을 평가하였다.

재료 및 방법

채란용 어미 조개인 진주조개와 참굴은 남해안 통영해역의 양식장에서 채집하였으며, 이후 껍질에 붙어있는 이물질을 제거한 후 계측하였고, 그 크기는 각각 각장 63.7 ± 4.4 mm, 59.5 ± 10.1 mm, 전중 45.2 ± 7.6 g, 103.0 ± 34.5 g이었다. 알과 정자의 채취를 위해 암수 어미의 비율을 5:1로 하고, 진주조개에서는 간출과 수온자극을 병용하여 산란을 유발하였다. 참굴에서는 충분히 성숙한 암수 생식소 부위를 얇게 저민 다음, 미리 준비해 둔 여과 해수에 풀어 암수 별도로 채란·채정하였다. 인공수정과정 세란(洗卵)에는 25 μ m 필터로 1차 여과한 다음 150 ppm 차아염소산나트륨으로 소독한 깨끗한 해수를 사용하였다. 이후 발생배의 50%가 담륜자로 되었을 때, 운동성이 가장 활발한 것만을 실험재료로 사용하였다.

동해방지제의 독성이 진주조개와 참굴의 담륜자에 미치는 영향을 파악하기 위해, 인공해수를 희석액으로 하고, 여기에 4종류의 동해방지제 즉, DMSO, ethylene glycol, glycerol 및 1,2-propanediol을 최종농도 0.01, 0.1, 1.0과 2.0 M이 되도록 혼합한 다음, 동해

¹NaCl 2.7 g + KCl 0.07 g + CaCl₂ 0.12 g + MgCl₂ 0.46 g + NaHCO₃ 0.05 g + 증류수 100 ml

방지제별 농도별로 담륜자를 침지하였다. 이후 5분 간격으로 20분 동안 담륜자의 생사여부를 관찰하였다. 이때 섬모운동에 의해 움직이는 담륜자를 살아있는 것으로 하여, 광학현미경(×100)으로 그 수를 헤아려 각각의 생존율을 산정하였으며, 각 실험은 3 반복으로 설정하여 실시하였다.

또한 일반적인 희석제로 알려져 있는 sucrose가 동해방지제의 독성 완화에 미치는 효과를 파악하기 위하여, 인공해수에 녹여 만든 0.2 M sucrose에 DMSO, ethylene glycol, glycerol 및 1,2-propanediol을 첨가하여, 최종 농도 0.01, 0.1, 1.0과 2.0 M이 되도록 하였다. 이들 각각의 용액에 참굴 담륜자를 침지하여 전술한 방법과 같이 5~20분 동안 5분 간격으로 생존율을 조사하였다.

각 실험결과에서 3반복 자료의 평균을 구하였으며, 이를 Computer Program Statistix 3.1 (Analytical Software, St. Paul, MN, USA)로 ANOVA와 LSD (Least Significant Difference)를 실시하여 평균간의 유의성 ($P=0.05$)을 검정하였다.

결 과

1. DMSO

0.01, 0.1, 1.0 및 2.0 M의 DMSO에 진주조개와 참굴의 담륜자를 침지한 다음 경과시간에 따른 생존율을 비교한 결과, 두 종 모두 시간이 경과할수록 생존율이 감소하는 경향을 보였다. 특히 진주조개의 담륜자는 농도가 가장 높은 2.0 M에서 침지시간 5분 이내에 모두 폐사하였으며, 1.0 M에서는 15분부터 급격히 감소하여 농도가 낮은 0.01~0.1 M에 비해 유의하게 생존율이 낮아졌다 ($P < 0.05$) (Fig. 1-A).

참굴에서는 진주조개의 담륜자와 달리 농도가 높은 2.0 M에서도 실험종료 때까지 $30.9 \pm 1.8\%$ 의 생존율을 보여 진주조개에 비해 DMSO에 대한 내성이 높았다. 또한 농도가 높아질수록 담륜자의 생존율이 유의하게 감소하여 진주조개의 담륜자와 같은 경향을 보였다 ($P < 0.05$) (Fig. 1-B). 그러나 희석제인 0.2 M sucrose를 첨가하였을 때는 담륜자의 생존율이 월등히 높아져, 0.01~1.0 M에서 96.8~100%, 2.0 M에서는 생존율이 86.0~92.6%였다 ($P < 0.05$) (Fig. 1-C).

2. Ethylene glycol

진주조개 담륜자를 2.0 M ethylene glycol에 5~20분 침지하였을 때, 18.5~30.5%의 생존율을 보여 0.01~1.0 M에 비해 유의하게 낮았다 ($P < 0.05$). 0.01~1.0 M에서는 농도별, 침지시간별 생존율에 유의차가 나타나지 않았으나 ($P > 0.05$), 시간이 경과할수록 생존율이 감소하는 경향이였다 (Fig. 2-A).

가장 높은 실험농도인 2.0 M에서 참굴 담륜자를 5~20분 침지한 결과, 54.8~69.4%의 생존율을 보여 진주조개에 비해 높은 값을 나타내었다 (Fig. 2-B). 또한 0.2 M sucrose를 첨가하였을 때, 참굴 담륜자는 농도가 가장 낮은 0.01 M에서 실험종료 때까지 100%의 생존율을 유지하였고, 농도가 가장 높은 2.0 M에서는 5~20분이 경과하는 동안 63.0~89.6%의 생존율을 보여, sucrose를 첨가하지 않았을 때 보다 유의하게 높은 값을 나타냈다 ($P < 0.05$) (Fig. 2-C).

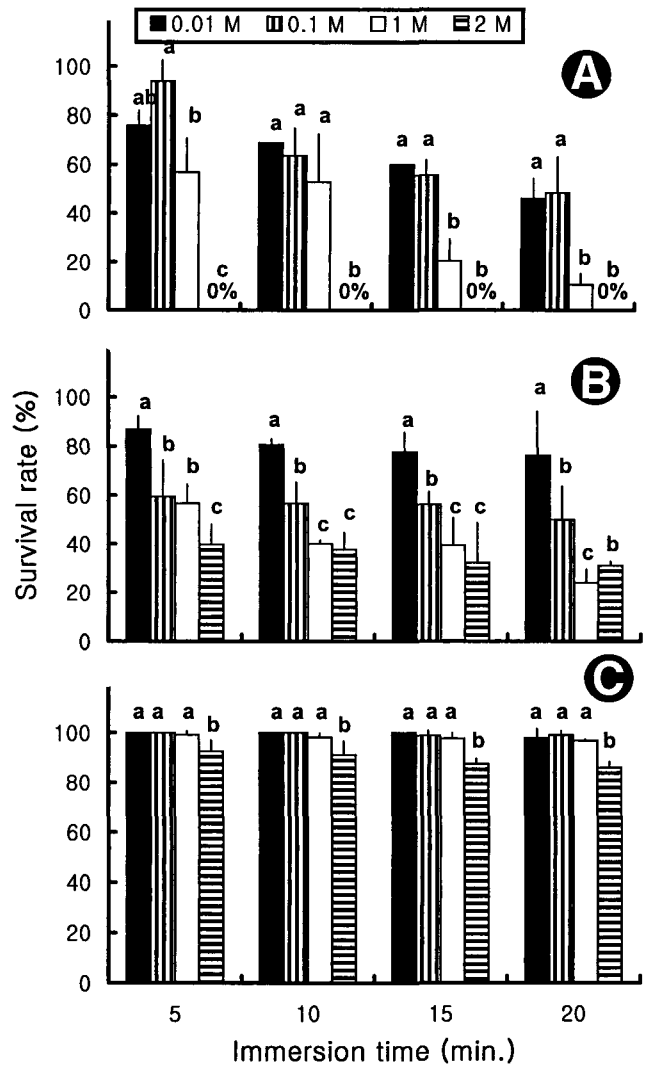


Fig. 1. Effects of DMSO on survival rates of trochophores from pearl oyster (A), Pacific oyster (B) and Pacific oyster with addition of 0.2 M sucrose (C). Different alphabetic letters on the bars in a immersion time of a figure are significantly different ($P < 0.05$).

3. Glycerol

2종의 담륜자 모두 침지시간이 길어질수록 생존율이 낮아짐으로써 다른 동해방지제와 같은 경향을 나타냈다. 진주조개의 담륜자는 glycerol의 농도가 높을수록 생존율이 감소하였으며, 2.0 M에서는 생존율 23.1~46.4%로 DMSO와 ethylene glycol에 비해 다소 높은 값을 보였다 (Fig. 3-A).

참굴의 담륜자는 0.01~0.1 M에 침지후 5분 동안 86.2~89.4%의 생존율을 보여 농도별로 유의차를 보이지 않았으나 ($P > 0.05$), 20분이 경과하였을 때의 생존율은 45.2~58.6% 범위로서 농도별로 유의한 생존율 차이를 나타냈다 ($P < 0.05$). 특히 농도가 높은 2.0 M의 경우에는 침지시간 5분째 $19.1 \pm 1.3\%$ 의 생존율을 보이다가 10분부터는 급속히 감소하여 20분이 경과했을 때는 $1.9 \pm 2.6\%$ 의 생존율을 보임으로써, 진주조개의 담륜자에 비해 glycerol에

대한 내성이 약한 것을 알 수 있었다 (Fig. 3-B). 0.2 M sucrose를 첨가하였을 경우 참굴 담륜자의 생존율은 DMSO와 유사한 경향을 나타내었다. 0.01~1.0 M에서는 94.7~100%, 2.0 M에서는 55.7~87.1%의 생존율을 보임으로써, sucrose를 첨가하지 않았을 때보다 생존율이 유의하게 증가하여 sucrose가 생존율을 높이는 중요한 요인임을 알 수 있었다 (Fig. 3-C).

4. 1,2-propanediol

1,2-propanediol의 각 농도에서 시간이 경과할수록 진주조개 담륜자의 생존율은 감소하였으나, 농도별 생존율 사이에는 유의차를 보이지 않았다 ($P>0.05$). 특히 농도가 높은 2.0 M에서는 실험종료 시 $45.4 \pm 0.2\%$ 의 생존율을 보여, DMSO, ethylene glycol 및 glycerol 보다 높은 값을 나타내었다 (Fig. 4-A).

참굴의 담륜자를 1.0 M과 2.0 M 1,2-propanediol에 침지하였을 때,

6.4~19.4%와 0~1.1%의 생존율을 보였다. 이 값은 다른 동해방지제 뿐만 아니라 진주조개에 비해서도 유의하게 낮은 값이었다 ($P<0.05$) (Fig. 4-B). 그러나 0.2 M sucrose를 첨가하였을 때는 담륜자의 생존율이 유의하게 높아져서 0.01~1.0 M에서는 87.6~100%의 높은 생존율을 얻을 수 있었다. 이에 반해 농도가 가장 높은 2.0 M에서는 56.6~73.3%로 다소 낮았으나, sucrose를 첨가하지 않았을 때의 생존율인 0~1.1%에 비해서는 매우 높았다 (Fig. 4-C).

고찰

동해방지제 독성에 대한 발생배의 내성은 살아있는 세포를 냉동보존하기 위한 적정 방법을 파악하는 데 중요한 요인이 된다. 특히 평형시간 (equilibration time) 동안 낮은 온도에서 동해방지

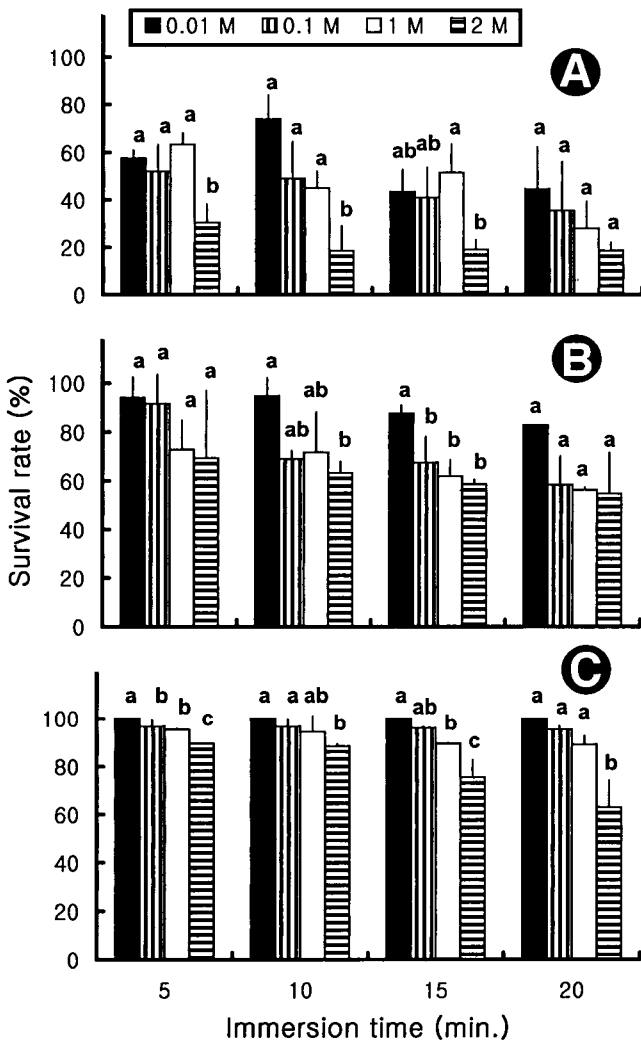


Fig. 2. Effects of ethylene glycol on survival rates of trochophores from pearl oyster (A), Pacific oyster (B) and Pacific oyster with addition of 0.2 M sucrose (C). Different alphabetic letters on the bars in a immersion time of a figure are significantly different ($P<0.05$).

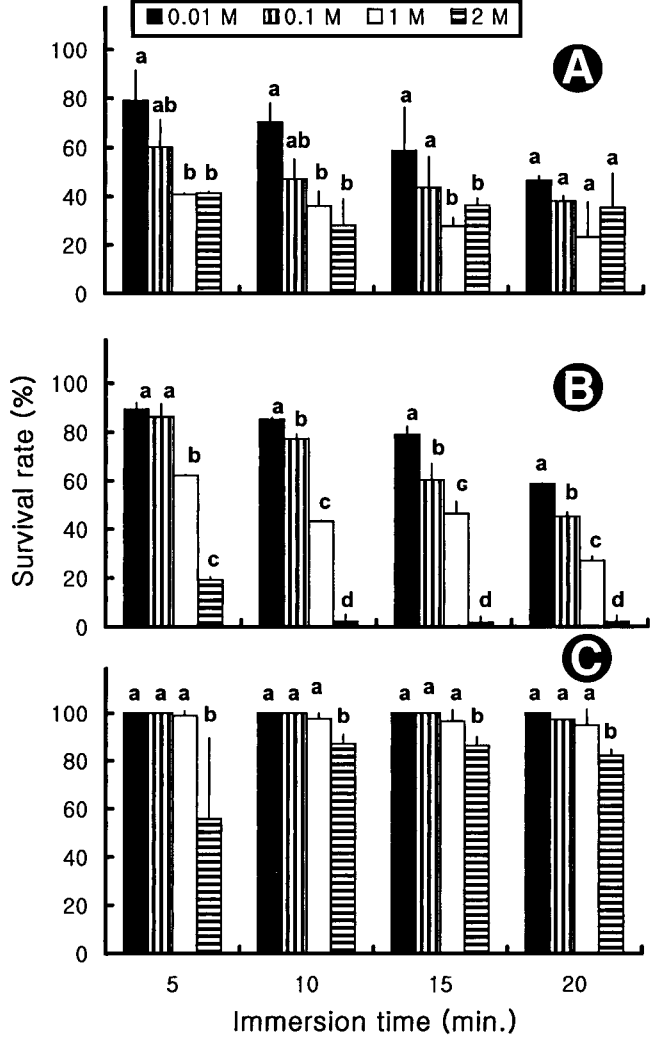


Fig. 3. Effects of glycerol on survival rates of trochophores from pearl oyster (A), Pacific oyster (B) and Pacific oyster with addition of 0.2 M sucrose (C). Different alphabetic letters on the bars in a immersion time of a figure are significantly different ($P<0.05$).

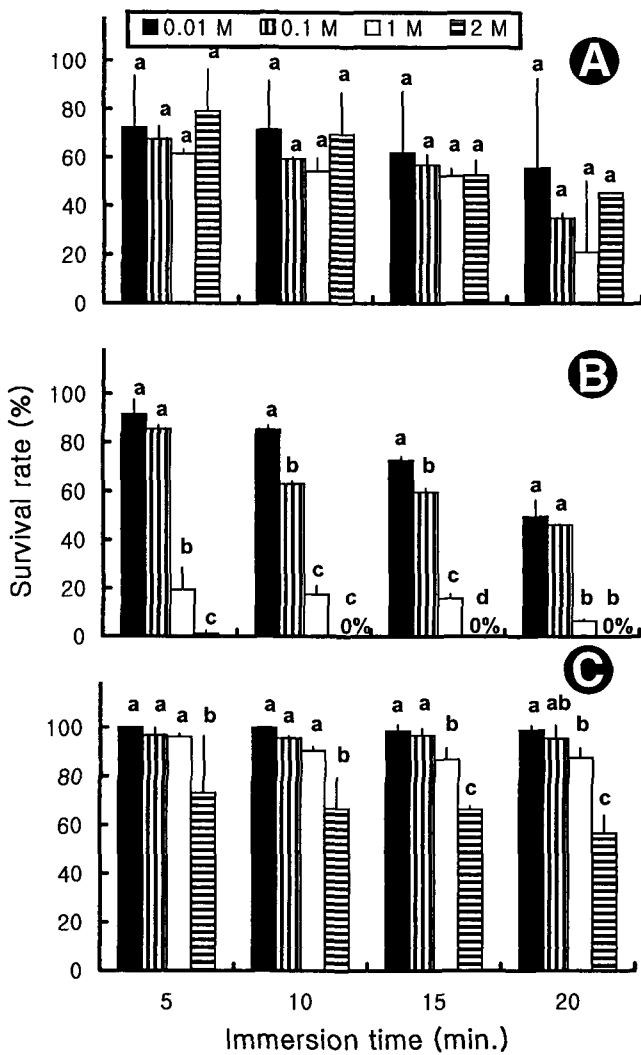


Fig. 4. Effects of 1,2-propanediol on survival rates of trochophores from pearl oyster (A), Pacific oyster (B) and Pacific oyster with addition of 0.2 M sucrose (C). Different alphabetic letters on the bars in a immersion time of a figure are significantly different ($P < 0.05$).

제에 노출할 때 동해방지제의 독성을 감소시킨다는 보고가 있다 (Kasai et al., 1981). 본 연구에서 동해방지제로 DMSO, ethylene glycol, glycerol과 1,2-propanediol을 사용하였을 때, 담륜자의 생존율은 농도가 높아질수록 시간이 경과할수록 감소하였다. 특히 2.0 M DMSO에 침지하였을 때, 진주조개의 담륜자는 모두 폐사하였으나, 참굴에서는 침지시간 20분까지 30.9~39.6%의 생존율을 보여 진주조개의 담륜자 보다 동해방지제에 대하여 강한 내성을 보였다. 이 결과는 참굴의 담륜자가 다른 조개류에 비해 DMSO에 대해 강한 내성을 나타낸다는 Renard and Cochard (1989)와 Lin et al. (1993)의 연구결과와 부합되고 있다. 바지락의 배에서는 DMSO와 glycerol을 각각 0.5, 1.0, 1.5 및 2.0 M의 농도로 사용하였을 때 생존율이 감소하였으나, king scallop의 배에서는 DMSO, ethylene glycol, glycerol 및 1,2-propanediol을 사용하였을 경우,

농도에 관계없이 배가 생존하지 않는다는 것이 밝혀져 (Renard and Cochard, 1989), 종에 따라 동해방지제에 대한 내성이 다를 수 있다.

Renard and Cochard (1989)는 동해방지제의 독성으로 인한 배와 유생의 손상이 동해방지제의 높은 삼투압과 생화학적 영향에 의한 것으로 동해방지제의 분자량과 관계가 있다고 하였다. 또 그들은 동해방지제의 투과속도가 분자량에 반비례하므로, 고분자이면서 투과속도가 가장 느린 glycerol은 참굴의 배에 적합하지 않다고 하였다. Liu and Robinson (1997)도 glycerol은 참굴의 담륜자에 높은 독성을 나타내어 부적합한 것으로 보고하였으며, 본 연구에서도 2.0 M glycerol을 동해방지제로 하여 참굴의 담륜자를 침지하였을 때 1.6%로 매우 낮은 생존율을 보여 다른 연구자와 같은 결과를 나타냈다. 그러나 여기에 0.2 M sucrose를 첨가하였을 때는 82.0%로 높은 생존율을 나타내어 sucrose 첨가가 동해방지제의 독성완화에 효과가 있음을 알 수 있었다. DMSO의 경우에서도 1.0 M에서 참굴 담륜자는 침지시간에 따라 23.9~56.5%의 낮은 생존율을 보인 반면, 0.2 M sucrose를 첨가하였을 때는 96.8~99.1%의 극히 높은 생존율을 나타냈다. 이는 sucrose나 trehalose와 같은 당류가 세포막을 안정시켜 (Renard, 1991), 동해방지제로 인해 받는 발생배의 삼투압 충격을 완화시키는 것으로 판단된다. 즉, 해수는 1,000 mOsm/kg의 삼투질농도를 가지지만 본 연구에 사용된 동해방지제는 최저 1,210.3 mOsm/kg에서 최고 3,000 mOsm/kg 이상을 나타내어, 세포가 동해방지제에 노출되면 세포막이 파괴될 가능성이 높다. 이러한 삼투압 충격을 완화시키기 위한 중화제가 필요한데, sucrose와 같은 당류가 세포막 외부에서 삼투압 충격을 완화시키는 것으로 보여진다. Renard and Cochard (1989)는 냉동전 동해방지제 독성을 완화시키는 중화제를 첨가하면 냉동시 발생하는 동해방지제의 독성을 충분히 감소시킨다고 보고하였다. 이러한 중화제인 sucrose의 효과는 수서동물은 아니지만, 포유류인 생쥐 (Cseh et al., 1997)와 말 (Hochi et al., 1996)에서도 입증된 바 있다.

요 약

조개류 유생의 동해방지제 독성에 대한 내성을 평가하기 위해 진주조개, *Pinctada fucata martensii*와 참굴, *Crassostrea gigas*의 담륜자를 4종류의 동해방지제에 침지하여 생존율을 조사하였다. 실험에 사용된 동해방지제는 각각 0.01~2.0 M의 DMSO, ethylene glycol, glycerol 과 1,2-propanediol이었으며, 침지시간은 5~20분으로 설정하였다.

모든 동해방지제에 진주조개와 참굴 담륜자를 침지하였을 때, 농도가 낮을수록 침지시간이 짧을수록 생존율이 높아지는 경향을 보였으며, 동해방지제의 종류에 따라 담륜자의 생존율이 다르게 나타났다. DMSO와 ethylene glycol에서는 참굴 담륜자의 생존율이, glycerol과 1,2-propanediol에서는 진주조개 담륜자의 생존율이 상대적으로 높게 나타났다. 그러나 참굴에서는 4종류의 동해방지제에 0.2 M sucrose를 첨가하였을 때 생존율이 유의하게 높아졌다.

참 고 문 헌

- Chao, N.H., C.P. Chiang, H.W. Hsu, C.T. Tsai and T.T. Lin. 1994. Toxicity tolerance of oyster embryos to selected cryoprotectants. *Aquat. Living Resour.* 7, 99~104.
- Cseh, S., J. Corselli, S.L. Nehlsin-Cannarella, L.L. Bailey and A.A. Szalay. 1997. The effect of quick-freezing in ethylene glycol on morphological survival and in vitro development of mouse embryos frozen at different preimplantation stages. *Theriogenology*, 48, 43~50.
- Hochi, S., K. Maruyama and N. Oguri. 1996. Direct transfer of equine blastocysts frozen-thawed in the presence of ethylene glycol and sucrose. *Theriogenology* 46, 1217~1224.
- Kasai, M., K. Niwa and A. Iritani. 1981. Effects of various cryoprotective agents on the survival of unfrozen mouse embryos. *J. Reprod. Fertil.*, 63, 175~180.
- Lin, T.T., H.T. Tung and N.H. Chao. 1993. Cryopreservation of oyster embryos with conventional freezing procedure and vitrification. *Cryobiology*, 30, 614~615.
- Liu, X. and A.M. Robinson. 1997. Impact of cryoprotectants dimethyl sulfoxide, ethylene glycol, methanol, glycerol, sucrose and polyvinylpyrrolidone on oyster (*Crassostrea gigas*) embryos before freezing. *J. Shell. Research*, 16, 310p.
- Renard, P. 1991. Cooling and freezing tolerances in embryos of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: methanol and sucrose effects. *Aquaculture* 92, 43~57.
- Renard, P. and J.C. Cochard. 1989. Effect of various cryoprotectants on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg, Manila clam, *Ruditapes philippinarum* Reeve and king scallop, *Pecten maximus* (L) embryo: Influence of the biochemical and osmotic effects. *Cryo-letters*, 10, 169~180.
- Sakul, H., G.E. Bradford, R.H. Bondurant, G.B. Anderson and S.E. Donahue. 1993. Cryopreservation of embryos as means of germ plasm conservation in sheep. *Theriogenology*, 39, 401~409.
- Schiewe, M.C., W.F. Rall, L.D. Stuart and D.E. Wildt. 1991. Analysis of cryoprotectant, cooling rate and in situ dilution using conventional freezing or vitrification for cryopreserving sheep embryos. *Theriogenology*, 36, 279~293.
- Shelton, J.N. 1992. Factors affecting viability of fresh and frozen-thawed sheep demi-embryos. *Theriogenology*, 37, 713~721.
- Somgsasen, N., B.C. Buckrell, C. Plante and S.P. Leibo. 1995. In vitro and in vivo survival of cryopreserved sheep embryos. *Cryobiology*, 32, 78~91.
- Suzuki, T., H. Komada, R. Takai, K. Arai and T.T. Kozima. 1995. Relation between toxicity of cryoprotectant DMSO and its concentration in several fish embryos. *Fish. Sci.*, 6, 193~197.
- Tervit, H.R. and P.G. Gold. 1984. Deep-freezing of sheep embryos. *Theriogenology*, 21, 268 p.

 1999년 4월 17일 접수

1999년 7월 5일 수리