

## 초음파와 microbubble 처리가 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*)의 혈청성분 및 선천성 면역에 미치는 영향

김진영\* · 박종빈\* · 박정수\* · 김우성\*\* · 김학수\*\* · 권세련\*, \*\*\* †

\*선문대학교 수산생명의학과

\*\*선문대학교 환경생명화학공학과

\*\*\*유전체 기반 바이오IT 융합연구소

### Effects of ultrasonic and microbubble treatment on serum components and innate immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Jin-Young Kim\*, Jong-Bin Park\*, Jeong Su Park\*, Woo-Seoung Kim\*\*,  
Hak Soo Kim\*\* and Se Ryun Kwon\*, \*\*\* †

\*Department of Aquatic Life Medical Sciences, Sunmoon University, Asan 31460, Korea

\*\*Department of Environmental and Bio-Chemical Engineering, Sunmoon University, Asan 31460, Korea

\*\*\*Genome-based BioIT Convergence Institute, Asan 31460, Korea

Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) were treated with ultrasonic (40kHz) and microbubble. The organic serum components, glucose were decreased compared to control at microbubble single treatment (M) and ultrasonic treatment (UL), but glucose concentrations in fish serum of all experimental groups analyzed in this study were also within the normal range. The organic serum components, cholesterol and total protein were no significant change by ultrasonic and microbubble treatment. There were no significant changes in the lysozyme activity on ultrasonic and microbubble treatment. Serum bactericidal activity decreased on ultrasonic single treatment (UL) compared to the control ( $P < 0.05$ ), but the numbers of bacterial colonies were significantly lower than those in the negative (PBS). The results of this study indicate that ultrasonic and microbubble treatment did not have a critical effect on the serum composition and innate immunity of *O. mykiss*, and that it is a way to do not significant stress on the fish body as a countermeasure against sea lice.

**Key words:** *Oncorhynchus mykiss*, Ultrasonic, Microbubble, Serum components, Innate immunity

물리(sea lice)는 *Lepeophtheirus* 속과 *Caligus* 속의 기생성 요각류를 포함하며, 대서양연어(*Salmo salar*) 및 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*) 양식 산업에 큰 피해를 주고 있다(Cárcamo *et al.*, 2011;

Fields *et al.*, 2018). 숙주의 피부에 부착 기생하여 점액, 조직 및 혈액을 먹고 상처를 생성하여 2차 감염을 유발하며, 결과적으로 질병 치료로 인한 생산 비용이 증가하여 경제적 손실을 일으킨다(Barker *et al.*, 2019; Montory *et al.*, 2018). 이러한 피해를 방지하기 위해 emamectin benzoate 및 deltamethrin과 같은 화학요법제가 주로 사용되고 있으

†Corresponding author: Se Ryun Kwon  
Tel: +82-41-530-2289, Fax: +82-41-530-2917  
E-mail: srkwon@sunmoon.ac.kr

나, 지속적 사용으로 인해 기생충이 약제에 대한 내성을 가지는 등의 부작용이 발생하고 있다(Arriagada *et al.*, 2018; Bravo *et al.*, 2013; Whyte *et al.*, 2014). 최근에는 수온을 높여 물이를 제거하는 열처리 방법이 사용되고 있으나, 처리 과정 시 어류에 스트레스를 유발한다고 보고되었다(Dessen *et al.*, 2019).

Microbubble은 기포 직경이 50  $\mu\text{m}$  이하의 미세한 기포로 짧은 시간에서의 압축과 파괴의 연쇄 반응을 반복하여 기체 용해효과, 자기 가압효과, 대전효과 등의 물리·화학적 특성을 가지고 있어 수산양식, 수질 정화 및 살균 시스템 등에 적용되고 있다(Jung and Jung, 2016; Kwon *et al.*, 2012). 초음파의 영향은 주로 기포에서 비롯되는데, 기포의 붕괴는 표면 에너지, 액체의 운동 에너지를 열 및 화학 에너지로 전환하여 막대한 양의 에너지를 생성한다(Shchukin *et al.*, 2011). 초음파 처리는 박테리아 및 플랑크톤을 사멸하는데 사용될 수 있으며(Skjelvareid *et al.*, 2018), 물이 기생을 줄이기 위한 예방법으로도 제안되었다(Solvang and Hagemann, 2018). 하지만, 어류 체표에 부착된 물이를 제거하기 위한 초음파의 사용은 어류에게 스트레스 원인으로 작용할 수 있으며(Schack *et al.*, 2008), 외부 요인에 의한 스트레스는 어류의 체내 대사 및 생리 상태를 변화시키고 선천성 면역력을 저하시킬 수 있다(Jeon *et al.*, 2000).

초음파에 의한 어류 체표의 영향에 대한 많은 연구가 발표되었지만(Frenkel *et al.*, 1999; 2000; Krasovitski *et al.*, 2011; Maruvada *et al.*, 2004), 초음파와 microbubble 처리 시 어류가 받는 스트레스 및 선천성 면역의 영향에 대한 연구는 잘 알려져

있지 않다. 따라서 본 연구에서는 초음파와 microbubble을 이용한 물이 구제법이 어체에 사용하기에 안전한 방법인지를 알아보기 위해 초음파와 microbubble 처리에 따른 무지개송어의 혈청성분 및 선천성 면역의 변화에 대해 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 실험어 및 처리 조건

본 실험에 사용한 실험어는 평균 무게 318.1 $\pm$ 81.5 g, 평균 전장 31.2 $\pm$ 3.1 cm의 무지개송어를 통해 소재의 양식장에서 구매하여 사육수 수온 18°C, 용존산소(DO) 8.5ppm 조건에서 2주간 순치 후 실험에 사용하였다. 무지개송어를 2-phenoxyethanol (Junsei, Japan)로 마취 후 20 L 수조에 옮겨 microbubble (산소용해기, PMGO-0.3T, PURETECH, Korea)과 초음파 처리(Ultrasonic, JAC 4020, JINWOO-ALEX, Korea)를 각각 30초간 실시하였다. 각 실험구 마다 무지개송어 3마리씩 사용하였고 상세한 실험 조건은 Table 1에 제시하였다. 초음파 및 microbubble 처리 직후 어체의 외형을 관찰한 후 혈액을 채취하였다.

### 혈청성분 분석

초음파에 따른 혈청성분을 분석하기 위해 채취한 혈액을 실온에서 2시간 동안 방치 후 15시간 동안 냉장보관 한 다음 4°C에서 6,000  $\times$  g 로 5분간 원심분리 후 혈청을 분리하였다. 혈청 유기성분으로 혈당(glucose), 콜레스테롤(cholesterol) 및 총 단백질(total protein)을 측정하였다. 혈당은 GOD/POD법, 콜레스테롤은 비색법, 총 단백질은 Biuret

Table 1. Ultrasonic and microbubble conditions in this experiment

Group name	Test condition
Control	None
M*	Microbubble for 30 sec
UL**	Ultrasonic 40kHz, 280W for 30 sec
UH***	Ultrasonic 40kHz, 400W for 30 sec
M + UL	Microbubble for 30 sec + Ultrasonic 40kHz, 280W for 30 sec
M + UH	Microbubble for 30 sec + Ultrasonic 40kHz, 400W for 30 sec

\*: Microbubble treatment for 30 sec, \*\*: Low intensity ultrasonic treatment at 40kHz, 280W for 30 sec, \*\*\*: High intensity ultrasonic treatment at 40kHz, 400W for 30 sec

법에 의해 시판되고 있는 임상용 kit (Asan Pharm Co., Korea)를 이용하여 분석하였다. 모든 실험은 2반복으로 진행되었다.

**Lysozyme activity**

혈청 lysozyme 활성은 turbidimetric method를 이용하여 측정하였다. *Micrococcus lysodeikticus* 현탁액(0.2 mg/mL, 0.05 M sodium phosphate buffer, pH 6.2) 100 µL와 혈청 10 µL를 혼합하여 25°C에서 반응시킨 후 30초 및 4분 30초에 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. Lysozyme 활성은 units/mL로 나타내었으며, 1 unit은 흡광도 값이 0.001/min 감소한 값으로 표시하였다. 실험은 2반복으로 진행되었다.

**Bactericidal activity**

*Aeromonas salmonicida*를 1% NaCl이 첨가된 tryptic soy broth (TSB, BD)로 25°C에서 optical density (OD600) 값이 1.0이 되도록 배양한 다음 배양액을 4°C에서 6,500 × g로 10분간 원심분리 후, 멸균 PBS로 3회 세척하고 1 × 10<sup>8</sup> CFU/ml의 농도로 조정하였다. *A. salmonicida* 현탁액 50 µL와 혈청 50 µL를 혼합하여 실온에서 1시간 배양 후 반응 혼합물을 PBS로 희석하여 1% NaCl이 첨가된 tryptic soy agar (TSA, BD)에 50 µl 도말 하고 25°C에서 48시간 동안 배양 후 집락을 계수하였다. 실험은 2반복으로 진행되었다.

**통계분석 방법**

통계적 유의성은 SPSS Version 23.0 (SPSS Inc.) 통계프로그램을 사용하여 분석 하였다. Student's t-test를 사용하여 데이터를 분석하였고, P<0.05는 통계적으로 유의 한 것으로 간주되었다.

**결과 및 고찰**

물이 구제를 위한 초음파 처리의 영향에 대한 연구는 여러 연구자에 의해 수행된 바 있다(Skjelvar- eid *et al.*, 2018; Solvang and Hagemann, 2018; Svendsen *et al.*, 2018). Svendsen *et al.* (2018)의 연구에서 28kHz에서 20초 이상 처리 시 물이 유생의 생존율이 20%였고 60초 처리 시에는 0%의 생존율을 보인다고 보고하였으므로, 본 실험에서는 28kHz 보다 높은 주파수인 40kHz 에서 실험을 진행하였다. 또한 초음파와 microbubble 혼용 처리가 어류에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위해 초음파 및 microbubble 처리에 따른 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*)의 스트레스 영향을 평가하였다.

일반적으로 무지개송어의 혈청 성분은 스트레스로 인하여 변화되는 것으로 알려져 있어(Kubilay and Uluköy, 2002; Yarahmadi *et al.*, 2016; Yeganeh *et al.*, 2015), 본 연구에서 혈청 glucose, cholesterol 및 total protein을 분석하였다(Fig. 1). 어류의 혈중 glucose는 환경 스트레스에 민감하게 반응하여 주요 스트레스 지표로 사용되며, 혈중 glucose의 증가

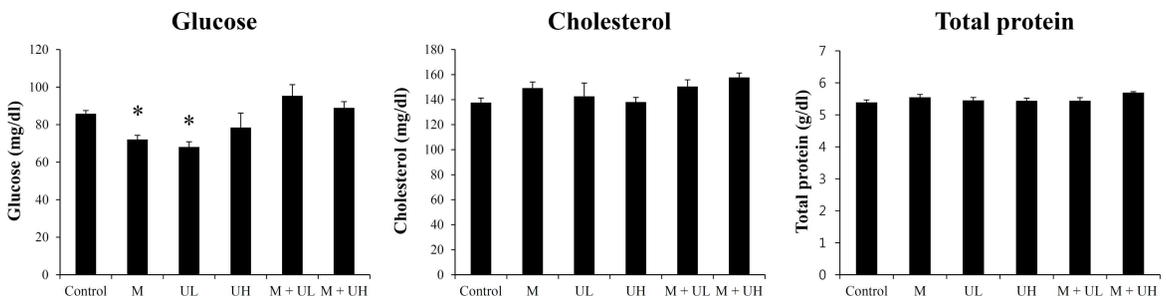


Fig. 1. Change of organic serum components (glucose, cholesterol, and total protein) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after treatment of ultrasonic and microbubble. Asterisk (\*) means that there is statistical significance (P<0.05) to the control. M, microbubble treatment for 30 sec; UL, low intensity ultrasonic treatment at 40kHz, 280W for 30 sec; UH, high intensity ultrasonic treatment at 40kHz, 400W for 30 sec; M + UL, microbubble and low intensity ultrasonic treatment at 40kHz, 280W for 30 sec; M + UH, microbubble and high intensity ultrasonic treatment at 40kHz, 400W for 30 sec.

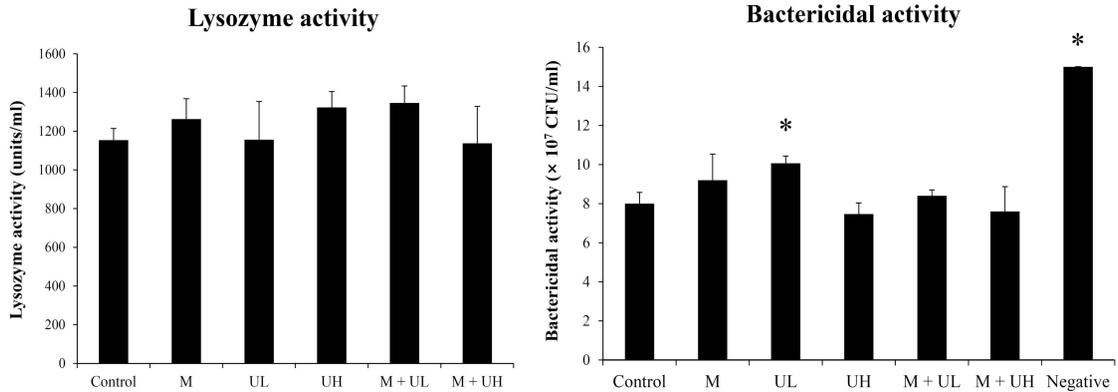


Fig. 2. Change of innate immunity (lysozyme activity, bactericidal activity) in rainbow trout, after treatment to ultrasonic and microbubble. In negative, phosphate buffer saline (PBS) was used instead of fish serum. Asterisk (\*) means that there is statistical significance ( $P < 0.05$ ) to the control. M, microbubble treatment for 30 sec; UL, low intensity ultrasonic treatment at 40kHz, 280W for 30 sec; UH, high intensity ultrasonic treatment at 40kHz, 400W for 30 sec; M + UL, microbubble and low intensity ultrasonic treatment at 40kHz, 280W for 30 sec; M + UH, microbubble and high intensity ultrasonic treatment at 40kHz, 400W for 30 sec.

는 스트레스에 노출된 어류가 대사작용을 하여 나타나는 특징적인 반응이다(Kim and Kang, 2016; Trenzado *et al.*, 2006). 본 실험에서는 혈중 glucose는 microbubble 단독 처리 실험구(M)와 초음파 단독 처리 실험구(UL)에서 대조구에 비해 유의적 감소를 나타내었으나( $P < 0.05$ ), Talas and Gulhan (2009)과 Wozny *et al.* (2011)의 연구에서 무지개송어 정상 개체의 혈중 glucose의 수치는 약 60~110 mg/dL로 제시되어 있으므로, 본 연구에서 분석된 모든 실험구의 어류 혈청의 glucose 농도도 정상 범위에 속하는 수치로 확인되었다. 혈중 cholesterol은 세포막 필수 구성 성분이며 스테로이드 호르몬의 합성에 중요한 전구체이기 때문에 스트레스 지표로 주로 사용된다(Kim *et al.*, 2017). Cakici and Aydin (2006)는 오염수에 노출된 무지개송어의 혈중 cholesterol 수치의 증가를 보고한 바 있으나, Ming *et al.* (2012)은 고수온에 노출된 잉어과에 속하는 *Megalobrama amblycephala*의 혈중 cholesterol 수치의 유의적 변화는 관찰되지 않았다고 보고하였다. 본 실험에서도 초음파 및 microbubble 처리에 따른 무지개송어의 혈중 cholesterol 수치의 유의적 변화는 나타나지 않았다. 혈중 total protein은 대사 및 영양상태를 판단하는 유용한 지표이며(Ming *et al.*, 2012), 스트레스를 받을 시 cortisol의 단백질 이화

작용으로 혈중 total protein의 증가로 이어질 수 있다(Kortan *et al.*, 2011). 하지만, 본 실험에서는 초음파 및 microbubble 처리에 따른 혈중 total protein의 유의적 변화는 나타나지 않았다.

면역체계는 여러 물질 또는 과정에 의해 영향을 받거나 변할 수 있기 때문에(Biller-Takahashi *et al.*, 2013), 본 실험에서는 초음파 및 microbubble 처리 후 무지개송어의 선천성 면역의 변화를 조사하였으며, 선천성 면역 지표로 혈청 lysozyme activity와 bactericidal activity를 분석하였다(Fig. 2). Lysozyme은 호중구와 대식세포에서 발생하는 어류의 주요 선천적 면역 인자 중 하나이며 혈액과 점액으로 분비되어 세균 침입에 대한 초기 방어 역할을 수행한다. 일반적으로 급성 스트레스는 어류의 혈중 lysozyme 활성을 증가시키는 원인이 되며, 만성 스트레스는 lysozyme 활성을 감소시킬 수 있다(Kim *et al.*, 2018; Ming *et al.*, 2012). 본 실험에서는 초음파에 따른 무지개송어의 혈중 lysozyme 활성을 측정된 결과 대조구에 비해 유의적 변화는 나타나지 않았다. 혈청 bactericidal activity는 어류에서 주요 살균 메커니즘이며 선천성 면역을 평가하는데 중요한 지표로 사용된다(Biller-Takahashi *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016). 본 실험에서는 초음파에 따른 무지개송어의 혈중 bactericidal activity를 측정하

결과 초음파 단독 처리 실험구(UL)에서 대조구에 비해 유의적 차이를 나타내었으나( $P < 0.05$ ), negative 실험구(PBS)에 비해 수치가 현저히 낮은 것으로 보아 어체의 혈중 살균능력에 큰 영향을 미치지 않았다고 생각된다.

본 연구에서 무지개송어의 혈청 성분(glucose, cholesterol, total protein)과 선천성 면역(lysozyme activity, bactericidal activity) 분석 결과, 초음파와 microbubble을 처리하는 것이 물이에 대한 대책으로서 어류에게 큰 스트레스를 미치지 않는 방법이라는 것을 제시하고 있다.

## 사 사

이 논문은 2019년 정부(S2714821: Ultrasonic-microbubble을 이용한 연어양식장 기생충 제거 시스템 개발)의 지원으로 수행된 연구임.

## References

- Arriagada, G., Sanchez, J., Stryhn, H., Vanderstichel, R., Campistó, J. L., Ibarra, R. and St-Hilaire, S.: A multivariable assessment of the spatio-temporal distribution of pyrethroids performance on the sea lice *Caligus rogercresseyi* in Chile. *Spat. Spatiotemporal Epidemiol.*, 26:1-13, 2018.
- Barker, S. E., Bricknell, I. R., Covello, J., Purcell, S., Fast, M. D., Wolters, W. and Bouchard, D. A.: Sea lice, *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer 1837), infected Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) are more susceptible to infectious salmon anemia virus. *PLoS One.*, 14:e0209178, 2019.
- Biller-Takahashi, J. D., Takahashi, L. S., Pilarski, F., Sebastião, F. A. and Urbinati, E. C.: Serum bactericidal activity as indicator of innate immunity in pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 65:1745-1751, 2013.
- Bravo, S., Nuñez, M. and Silva, M. T.: Efficacy of the treatments used for the control of *Caligus rogercresseyi* infecting Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in a new fish-farming location in Region XI, Chile. *J. Fish. Dis.*, 36:221-228, 2013.
- Cakici, H. and Aydin, S.: Changes in Blood Parameters of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) after Physical Pollution. *J Appl. Anim. Res.*, 29:77-80, 2006.
- Cárcamo, J. G., Aguilar, M. N., Barrientos, C. A., Carreño, C. F., Quezada, C. A., Bustos, C., Manríquez, R. A., Avendaño-Herrera, R. and Yañez, A. J.: Effect of emamectin benzoate on transcriptional expression of cytochromes P450 and the multidrug transporters (Pgp and MRP1) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and the sea lice *Caligus rogercresseyi*. *Aquaculture.*, 321:207-215, 2011.
- Dessen, J. E., Mørkøre, T., Bildøy, J. I., Johnsen, S. N., Poppe, L. T., Hatlen, B., Thomassen, M. S. and Rørvik, K. A.: Increased dietary protein-to-lipid ratio improves survival during naturally occurring pancreas disease in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish. Dis.*, 42:21-34, 2019.
- Fields, D. M., Skiftesvik, A. B. and Browman, H. I.: Behavioural responses of infective-stage copepodids of the salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*, Copepoda: Caligidae) to host-related sensory cues. *J. Fish. Dis.*, 41:875-884, 2018.
- Frenkel, V., Kimmel, E. and Iger, Y.: Ultrasound-induced cavitation damage to external epithelia of fish skin. *Ultrasound. Med. Biol.*, 25:1295-1303, 1999.
- Frenkel, V., Kimmel, E. and Iger, Y.: Ultrasound-induced intercellular space widening in fish epidermis. *Ultrasound. Med. Biol.*, 26:473-480, 2000.
- Good, C., Davidson, J., Welsh, C., Snekvik, K. and Summerfelt, S.: The effects of ozonation on performance, health and welfare of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in low-exchange water recirculation aquaculture systems. *Aquacultural Eng.*, 44:97-102, 2011.
- Jeon, J. K., Kim, P. K., Park, Y. J., Myoung, J. G. and Kim, J. M.: Stress responses of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, to transport in fresh water or salt water. *J. Korean. Fish. Soc.*, 32(2):119-123, 2000.
- Jung, J. O. and Jung, Y. J.: Industrial Wastewater Treatment Containing High Concentration of Ammonia with Low Energy Micro-Bubble Reactor. *J. Wetland. Res.*, 18:286-291, 2016.
- Kim, J. H. and Kang, J. C.: The chromium accumulation and its physiological effects in juvenile rockfish, *Sebastes schlegelii*, exposed to different levels of dietary chromium ( $Cr^{6+}$ ) concentrations. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 41:152-158, 2016.
- Kim, J. H., Kim, K. W., Bae, S. H., Kim, S. K., Kim, S. K. and Kim, J. H.: Alterations in Hematological Parameters and Antioxidant Responses in the Biofloc-reared Flatfish *Paralichthys olivaceus* Following Ammonia Exposure. *Korean. J. Fish. Aquat. Sci.*, 50(6):750-755, 2017.
- Kim, K. H., Hong, S. W., Moon, H. N. and Yeo, I. K.:

- Physiological Responses of the Chicken Grunt *Parastipoma trilineatum* to High Water Temperature Stress. *Korean. J. Fish. Aquat. Sci.*, 51(6):714-719, 2018.
- Kortan, J., Blahova, J., Kruzikova, K. and Adamek, Z.: Stress responses of carp pond fish stock upon hunting activities of the great cormorant (*Phalacrocorax carbo sinensis* L.). *Aquacultures Res.*, 42:322-330, 2011.
- Krasovitski, B., Frenkel, V., Shoham, S. and Kimmel, E.: Intramembrane cavitation as a unifying mechanism of ultrasound-induced bioeffects. *PNAS.*, 108:3258-3263, 2011.
- Kubilay, A. and Uluköy, G.: The Effects of Acute Stress on Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Tur. J. Zool.*, 26:249-254, 2002.
- Kwon, T. K., Yu, M., Kim, K. T. and Jin, B. D.: Evaluation of Physiological Response during Full-bath using Micro Bubble. *Proc. Kor. Soc. Prec. Eng. Conf.*, 901-902, 2012.
- Maruvada, S. and Hynynen, K.: Optical monitoring of ultrasound-induced bioeffects in glass catfish. *Ultrasound. Med. Biol.*, 30:67-74, 2004.
- Ming, J., Xie, J., Xu, P., Ge, X., Liu, W. and Ye, J.: Effects of emodin and vitamin C on growth performance, biochemical parameters and two HSP70s mRNA expression of Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala* Yih) under high temperature stress. *Fish. Shellfish. Immunol.*, 32:651-661, 2012.
- Montory, J. A., Cumillaf, J. P., Cubillos, V. M., Paschke, K., Uribina, M. A. and Gebauer, P.: Early development of the ectoparasite *Caligus rogercresseyi* under combined salinity and temperature gradients. *Aquaculture.*, 486:68-74, 2018.
- Orun, I., Talas, Z. S., Gulhan, M. F. and Erdogan, K.: Role of propolis on biochemical and hematological parameters of *Oncorhynchus mykiss* exposed to cypermethrin. *J. Survey Fis. Sci.*, 1(1):21-35, 2014.
- Schack, H. B., Malte, H. and Madsen, P. T.: The responses of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) to ultrasound-emitting predators: stress, behavioural changes or debilitation?. *J. Exp. Biol.*, 211:2079-2096, 2008.
- Shchukin, D. G., Skorb, E., Belova, V. and Möhwald, H.: Ultrasonic Cavitation at Solid Surfaces. *Advanced Materials.*, 23:1922-1934, 2011.
- Skjelvareid, M. H., Breiland, M. S. W. and Mortensen, A.: Ultrasound as potential inhibitor of salmon louse infestation-A small-scale study. *Aquaculture Res.*, 49:2684-2692, 2018.
- Solvang, T. and Hagemann, A.: A machine vision system for zooplankton behavioural studies: a case study on the phototactic behaviour of sea lice (*Lepeophtheirus salmonis*) during sound and ultrasound stimuli. *J. Exp. Biol.*, 221:jeb183277, 2018.
- Svendsen, E., Dahle, S. W., Hagemann, A., Birkevold, J., Delacroix, S. and Andersen, A. B.: Effect of ultrasonic cavitation on small and large organism for water disinfection during fish transport. *Aquaculture Res.*, 49:1166-1175, 2018.
- Talas, Z. S. and Gulhan, M. F.: Effects of various propolis concentrations on biochemical and hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 72:1994-1998, 2009.
- Trenzado, C. E., Morales, A. E. and Higuera, M.: Physiological effects of crowding in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, selected for low and high stress responsiveness. *Aquaculture.*, 258:583-593, 2006.
- Wang, E., Chen, X., Wang, K., Wang, J., Chen, D., Geng, Y., Lai, W. and Wei, X.: Plant polysaccharides used as immunostimulants enhance innate immune response and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* infection in fish. *Fish. Shellfish. Immunol.*, 59:196-202, 2016.
- Whyte, S. K., Westcott, J. D., Jimenez, D., Revie, C. W. and Larry Hammell, K.: Assessment of sea lice (*Lepeophtheirus salmonis*) management in New Brunswick, Canada using deltamethrin (AlphaMax®) through clinical field treatment and laboratory bioassay responses. *Aquaculture.*, 422-423:54-62, 2014.
- Woźny, M., Brzuzan, P., Gusiatiń, M., Jakimiuk, E., Dobosz, S. and Kuźmiński, H.: Influence of zearalenone on selected biochemical parameters in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Pol. J. Vet. Sci.*, 15:221-225, 2012.
- Yarahmadi, P., Miandare, H.K., Fayaz, S. and Caipang, C.M.A.: Increased stocking density causes changes in expression of selected stress- and immune-related genes, humoral innate immune parameters and stress responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish. Shellfish. Immunol.*, 48:43-53, 2016.
- Yeganeh, S., Teimouri, M. and Amirkolaie, A.K.: Dietary effects of *Spirulina platensis* on hematological and serum biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Res. Vet. Sci.*, 101:84-88, 2015.

---

Manuscript Received : Oct 31, 2019

Revised : Dec 6, 2019

Accepted : Dec 11, 2019