

능성어 (*Epinephelus septemfasciatus*) 치어의 생존율과 혈액학적 특성 변화에 미치는 암모니아 노출의 영향

김정현 · 박종연 · 이정용 · 이진환 · 황형규 · 조재권*

국립수산과학원 양식관리과

Effects of Ammonia Exposure on Survival Rate and Hematological Characteristics Changes in Juveniles of Sevenband Grouper, *Epinephelus septemfasciatus* by Jung Hyun Kim, Jong Youn Park, Jeong Yong Lee, Jin Hwan Lee, Hyung Kyu Hwang and Jae Kwon Cho* (Aquaculture Management Division, Aquaculture Research Institute, NIFS, Busan 46083, Republic of Korea)

ABSTRACT We investigated that changes of survival rate and hematological factors in sevenband grouper (*Epinephelus septemfasciatus*), exposed to ammonia. First, the fish was exposed and was observed survival rate. We observed the survival rate of the fish when exposed at each ammonia concentrations (0, 0.35, 0.4, 0.5, 0.8 mg/L, NH₃) for 96 hours. The 96-h LC₅₀ (lethal ambient concentration for 50% of the population) of NH₄⁺ and un-ionized ammonia (NH₃) for sevenband grouper were 26.7 and 0.6 mg/L, respectively. Secondly, we exposed the fish to 96-h LC₅₀ ammonia concentration (0.6 mg/L) for 96 hours, then sampled the blood of groupers for analysis of cortisol, glucose, NH₃, GOT, GPT, total protein (TP), electrolytes (Na⁺, Cl⁻) and osmolality in plasma. The plasma cortisol, glucose, GOT and GPT were increased with increasing of elapsed time and ammonia concentration. In addition, the NH₃ and total protein in plasma were significantly increased to 12 hours exposed to ammonia, and then decreased. But, the values were significantly higher than the control. The plasma electrolytes (Na⁺, Cl⁻) and osmolality were decreased with increasing of elapsed time. The results in the present study suggest that the continuous exposure of ammonia to juveniles of sevenband grouper may be a stressor and negative influence.

Key words: Sevenband grouper, ammonia exposure, survival rate, 96-h LC₅₀, hematological characteristics

서 론

최근 어류양식에 있어서 기후변화에 따른 자연재해는 물론 외부 질병으로부터 안전하게 양식할 수 있고 사육수 저감 및 오염배출을 최소화시켜 환경오염을 줄이는 미래 친환경 양식 방법으로 순환여과양식시스템(RAS, recirculating aquaculture system)이 개발되고 있다(Suh *et al.*, 2001; Hutchinson *et al.*, 2004). 순환여과양식시스템은 다양한 수처리 시설을 이용하여 물을 지속적으로 재사용할 수 있어 에너지를 효율적으로 사용할 수 있으며(Suh *et al.*, 2001), 겨울철에도 수온을 유지시키

거나 성장을 지속시킬 수 있는 시스템으로서 연중 안정적으로 어류의 사육에 적합한 시스템이다(Kim, 2011). 하지만 해산 어류 양식의 순환여과양식시스템은 사육수 내 수질환경에 영향을 미치는 총 암모니아성 질소 같은 대사산물을 효과적으로 제거해야 하는 것이 문제점으로 남아있다(Park *et al.*, 2014).

양식 생물에 의해 배설되는 수중의 총 암모니아성 질소(TAN, total ammonia nitrogen)는 주요한 질소 대사산물이며, 양식 어류의 생존에 영향을 주는 요인으로 알려져 있다(Colt and Armstrong, 1981; Foss *et al.*, 2004; Park, 2005). 사육수 내 암모니아 농도가 높을 경우 어류의 체내에 축적되어 독성을 일으키게 되고(Randall and Wright, 1987; Paust *et al.*, 2011), 혈장 암모니아 농도와 암모니아 함량을 증가시켜 스트레스 증

*Corresponding author: Jae Kwon Cho Tel: 82-51-720-2422, Fax: 82-51-720-2419, E-mail: jkcho123@korea.kr

Table 1. Experimental groups based on ammonia concentration

Total nitrogen (mg/L)	NH ₃ (mg/L)	Groups of Exp.	Temperature (°C)	pH	Salinity (‰)
0	0.06	Control	25.3	7.59	33.5
15	0.34	0.35 mg/L	25.2	7.73	33.4
20	0.40	0.4 mg/L	24.8	7.65	33.6
25	0.48	0.5 mg/L	24.7	7.61	33.2
30	0.81	0.8 mg/L	24.9	7.79	33.8

가와 폐사가 발생한다 (Wilson and Taylor, 1992; Paley *et al.*, 1993). 그리고 암모니아 독성은 어체 조직의 구조와 기능, 혈액 성상의 변화, 삼투압조절, 성장 및 번식에 심각한 영향을 미쳐 어류의 생존율을 크게 감소시키는 주요한 원인이 된다고 보고되고 있다 (Russo, 1985; Jeney *et al.*, 1992).

일반적으로 어류는 외부환경 변화 등의 스트레스를 받으면 혈장 코티졸 농도가 증가하고, 글리코겐합성, 당신생합성이 촉진된다 (Knoph and Olssen, 1994; Wendelaar Bonga, 1997). 그 외에도 야가미 호흡의 증가, 평형감 상실, 경련, 먹이 섭취 감소, 삼투압조절 혼란, 이온 균형파괴 및 호르몬 조절이 변화되며 (Meade, 1985; Russo and Thurston, 1991; Dosdat *et al.*, 2003; Person-Le Ruyet *et al.*, 2003; Pan *et al.*, 2011; Roumieh *et al.*, 2013), 지속적으로 노출될 시에는 성장 감소와 폐사에 이르게 된다 (Lang *et al.*, 1987; Ip *et al.*, 2001).

능성어 (*Epinepelus septemfasciatus*)는 농어목 (Perciforms) 바리과 (Serranidae)에 속하는 아열대성 어류로, 아시아 지역에서 고가로 거래되고 있어 최근 산업적으로 부가가치를 높일 수 있는 양식 품종으로 알려져 있으며, 순환여과양식의 대상종으로도 관심을 받고 있다 (Kohno *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2008; Harikrishnan *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2016). 현재까지 능성어에 관한 연구로는 난 발생 및 자치어 형태발달 (Kitajima *et al.*, 1991), 번식생물학적 연구 (Kim *et al.*, 1997), 성전환 유도 (Song *et al.*, 2005), 초기생활사 (Park *et al.*, 2014), 배란유도 (Hong *et al.*, 2015), 수온과 염분의 영향 (Cho *et al.*, 2015) 및 저수온 스트레스 (Park *et al.*, 2016) 등의 많은 연구가 수행되었지만 순환여과양식을 위한 연구는 부족한 실정이다.

본 연구는 능성어를 대상으로 순환여과양식시스템에 적용하는데 문제가 되는 암모니아 농도 기준을 제시하고자 96시간 동안 암모니아 노출에 따른 능성어 치어의 생존율 및 혈액학적 특성 변화를 조사하였다.

재료 및 방법

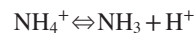
1. 실험어

실험에 사용된 능성어 치어는 국립수산과학원 생물 사육

동에서 500L FRP 원형수조에서 사육 중인 치어로 평균 전장 9.0 ± 0.25 cm, 평균 체중 12.58 ± 0.59 g이었다. 생존율 실험과 시료 분석용으로 총 360마리를 사용하였다. 실험어는 2주 동안 순치시켰고 하루에 2회 상업용 배합사료를 공급하였으며, 실험 시작 7일전부터 절식시켰다.

2. 실험 조건

암모니아 농도별 노출에 따른 생존율 및 96시간 반수치사농도 (96-h LC₅₀)를 조사하기 위해 사전 예비실험을 통해 총 암모니아 질소의 농도를 각각 0, 15, 20, 25, 30 mg/L로 설정하였다. 각 실험구는 플라스틱 사각수조에 여과해수 40 L를 수용하였으며, NH₄Cl (Junsei, Japan)을 첨가하여 실험구별 농도를 조절하였다. 각 실험구에는 실험어를 12마리씩 수용하였으며 지수식으로 유지하였다. 각 수조의 TAN, pH, 수온, 염분을 측정하여 비이온화 암모니아 (NH₃)를 Eshchar *et al.* (2006)에 따라 아래 식으로 계산하였으며, 계산된 NH₃ 농도를 이용하여 총 5개 실험구 (대조구, 0.35, 0.4, 0.5, 0.8 mg/L)를 설정하였다 (Table 1).



$$\text{pK} = 0.09018 + 2727.9 / (T + 273.1) + (0.1552 + 0.0003142T)I$$

$$\text{NH}_3 / \text{TAN} = K_{\text{eq}} / (10^{-\text{pH}} + K_{\text{eq}})$$

$$\text{여기서, } \text{pK} = -\log(K_{\text{eq}}), K_{\text{eq}} = [\text{NH}_3][\text{H}^+] / [\text{NH}_4^+]$$

$$T = \text{temperature (}^\circ\text{C)}$$

$$I = 0.0193 \times S \text{ (S는 염분, psu)}$$

암모니아 노출에 따른 실험어의 경시적인 혈액학적 특성 변화를 조사하기 위해 암모니아를 96-h LC₅₀ 농도로 설정하였다. 각 실험구는 플라스틱 사각수조에 여과해수 40 L를 수용하였으며, NH₄Cl (Junsei, Japan)을 첨가하여 실험구별 농도를 조절하였다. 각 실험구에는 실험어를 15마리씩 수용하였으며 지수식으로 유지하였다. 총 8개 실험구 (0, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96시간)를 설정하였다.

두 실험 모두 실험농도를 유지하기 위해 매일 전량 환수하고 다시 농도를 맞추었으며, 2반복 실험을 하였다. 실험기간 동안 수온은 $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$, 염분은 33.5‰ 및 용존산소량 (DO)은 7.5~9.2 ppm이었다.

3. 생존율 및 반수치사농도(LC₅₀)

생존율과 LC₅₀은 24시간 간격으로 누적 생존율을 구하였으며 실험어의 폐사 확인은 실험어가 수조 저면에 유영능력을 상실하여 어체가 측면된 상태에서 1분 이상 아가미 호흡활동을 중지한 개체를 선택하여 조사하였다. 실험어의 LC₅₀은 통계 프로그램 SPSS의 Ordered Probit Model 분석방법에 의해 분석하였다.

4. 혈액학적 특성 분석

암모니아 노출에 따른 실험어의 혈액학적 특성 변화를 조사하기 위해 96-h LC₅₀ 농도에서 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96시간 간격으로 12마리씩 혈액을 채취를 하였다.

혈액 채취방법은 실험어를 40 L 플라스틱 사각 수조에서 tricaine methan sulphonate (MS-222, Sigma, USA)를 150 ppm의 농도로 마취하였으며, heparin sodium 처리된 주사기 (1 mL)로 실험어의 미부 혈관으로부터 혈액을 추출하여, 원심분리 (4°C, 12000 rpm, 10분) 후 혈장을 추출하여 분석 전까지 -80°C의 초저온 냉동고에 보관하였다.

혈장 코티졸은 Cortisol EIA kit (Oxford, USA)를 사용하여 효소면역분석 (EIA, enzyme immunoassay)로 측정하였으며, 실험 방법은 다음과 같다. 에틸에테르 (ethyl ether)를 사용하여 혈장 100 µL로부터 코티졸을 추출한 후, organic phase를 분리하여 이를 질소 가스로 증발시켰다. 잔여물을 100 µL의 extraction buffer에 녹인 후, 이 중 10 µL를 다시 990 µL의 extraction buffer에 더하여 100배 희석시켜 샘플로 사용하였다. 샘플 또는 표준용액 50 µL를 microplate에 2반복으로 분주한 뒤, 같은 양의 Cortisol-HRP Conjugate를 첨가하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. Microplate를 3번 세척한 후, 150 µL TNB substrate을 각 well에 분주한 후 실온에서 30분 동안 반응시켜, Microplate reader (ThermoScientific MultiskanSpectrum, Thermo, Finlan)로 650 nm에서 흡광도를 측정하였다.

혈장 글루코스, 암모니아 (NH₃), GOT, GPT, 총 단백질 (TP) 및 전해질 이온 (Na⁺, Cl⁻)은 자동 생화학분석기 (Dry-chem 4000i, Fujifilm, Japan)로 측정하였고, 혈장 삼투질 농도는 삼투압측정기 (Vapro 5520, WESCOR Co., USA)로 측정하였다.

5. 통계분석

본 실험에서 얻어진 결과에 대한 통계학적 분석은 SPSS 통계프로그램 (ver. 18.0)을 사용하여 one way-ANOVA test를 통해 Duncan's multiple range test로 평균값 간의 유의성을 검정하였다 (P < 0.05).

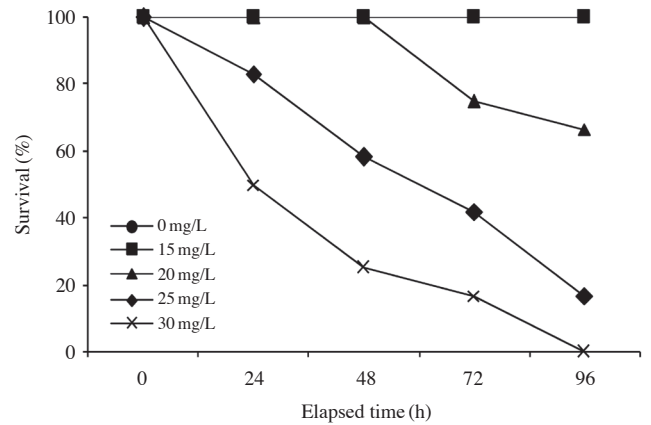


Fig. 1. Survival rate of sevenband grouper, *E. septemfasciatus* exposed to ammonia concentrations for 96 hours.

결 과

1. 생존율 및 반수치사농도(LC₅₀)

수온 25 ± 0.5°C에서 총 암모니아성 질소의 농도 (0, 15, 20, 25, 30 mg/L)에 실험어를 96시간 노출시킨 후 생존율을 조사한 결과, 총 암모니아성 질소의 농도 0 mg/L (대조구)와 15 mg/L 실험구의 생존율은 100%였으나 20 mg/L 실험 구에서는 72시간과 96시간에 각각 3마리, 4마리의 폐사체가 확인되어 생존율은 각각 75.0%, 66.7%로 나타났고, 25 mg/L 실험구에서는 48시간과 96시간에 각각 5마리, 6마리 폐사체가 확인되어 생존율은 각각 58.3%, 16.7%로 나타났으며, 30 mg/L 실험구에서는 24시간에 생존율 50%를 시작으로 96시간에서는 전개체가 폐사하였다 (Fig. 1).

실험어의 총 암모니아성 질소 농도별 실험구에서 LC₅₀을 분석한 결과, 24-h LC₅₀은 32.5 mg/L, 48-h LC₅₀은 30.0 mg/L, 72-h LC₅₀은 27.8 mg/L, 96-h LC₅₀은 26.7 mg/L로 나타났다. 따라서, 실험어의 96-h LC₅₀은 총 암모니아성 질소 농도가 26.7 mg/L, NH₃ 농도는 0.6 mg/L로 나타났다 (Table 2).

2. 코티졸 및 글루코스

암모니아 농도 (96-h LC₅₀: 0.6 mg/L)에 따른 스트레스의 정도를 확인하기 위하여 혈장 코티졸과 글루코스의 변화를 조사한 결과, 혈장 코티졸의 경우 대조구는 63.67 ± 3.80 ng/mL로 나타났으며 12시간에 84.37 ± 3.86 ng/mL로 높은 값을 나타냈으며, 96시간에는 87.16 ± 4.07 ng/mL로 가장 높은 값을 나타냈다. 대조구와 비교하여 실험종료인 96시간까지 유의적으로 높아지는 경향이 나타났다. 혈장 글루코스의 경우 대조구는 67.25 ± 3.33 mg/dL로 나타났으며 12시간까지 121.50 ± 5.35 mg/dL로 높아졌으며 24시간째부터는 105.00 ± 7.62로 감소하였지만 72시간째부터는 점차 높아져서 96시간에는 128.67 ±

Table 2. LC₅₀ values in sevenband grouper, *E. septemfasciatus* exposed to ammonia for 96 hours

Time (h)	Estimate LC ₅₀ (mg/L)	95% confidence limits	
		Lower LC ₅₀ (mg/L)	Upper LC ₅₀ (mg/L)
24	32.5	29.7	47.4
48	30.0	27.9	35.0
72	27.8	25.6	31.7
96	26.7	24.5	30.2

The 96-h LC₅₀ values are expressed in mg/L of total ammonia nitrogen in water with 95% confidence limits in the parentheses.

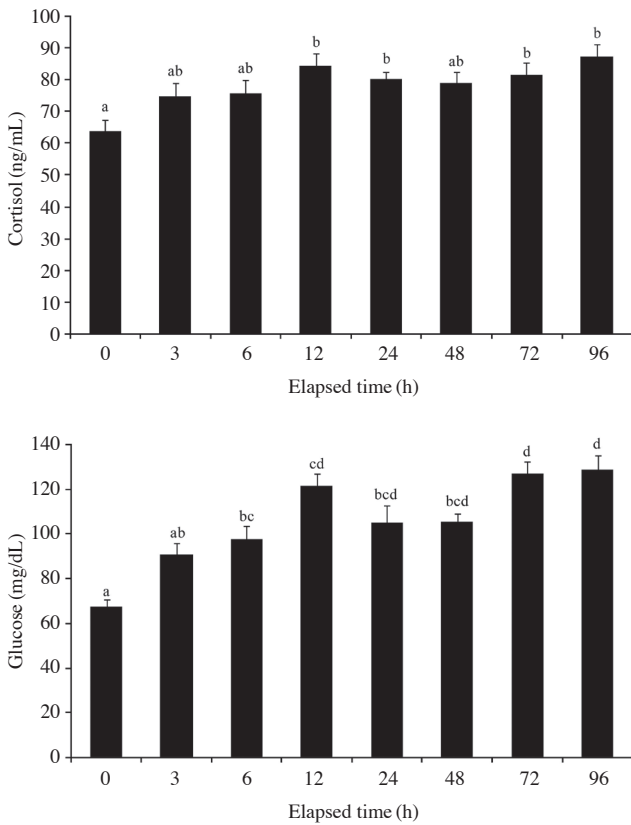


Fig. 2. Levels of plasma cortisol and glucose in sevenband grouper, *E. septemfasciatus* exposed to ammonia for 96 hours. Values are mean ± S.E. Different letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

6.52 mg/dL로 유의적으로 가장 높은 값을 나타내었다. 코티졸과 마찬가지로 대조구와 비교하여 실험종료인 96시간까지 유의적으로 높아지는 경향을 알 수 있었다(Fig. 2).

3. 암모니아 및 총 단백질

혈장 암모니아의 대조구의 농도는 690.00 ± 48.66 µg/dL로 나타났으며 3시간부터 상승하기 시작하여 12시간째까지 3435 ± 90.19 µg/dL로 가장 높은 값을 나타냈으며, 이후에 감소

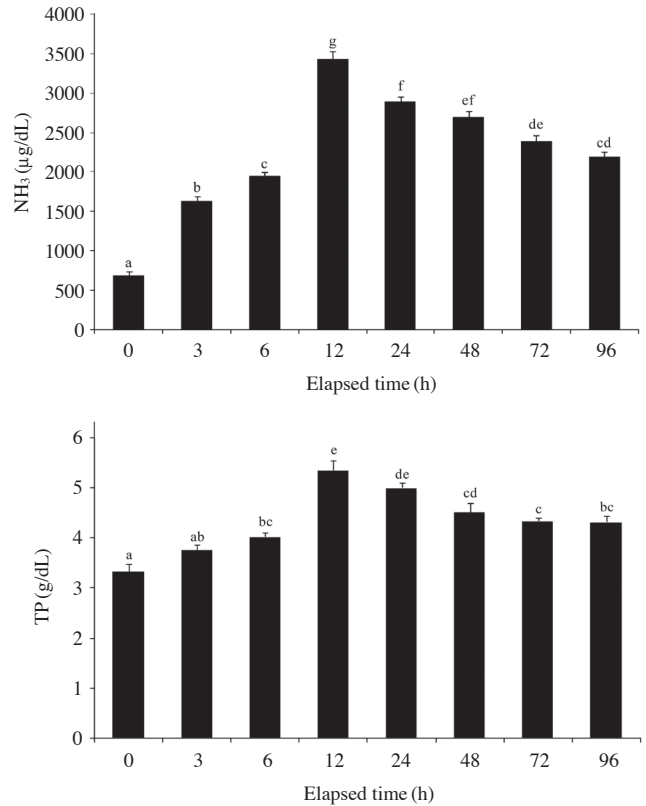


Fig. 3. Levels of plasma NH₃ and TP in sevenband grouper, *E. septemfasciatus* exposed to ammonia for 96 hours. Values are mean ± S.E. Different letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

하는 경향이 나타났으나 대조구와 비교하여 유의적으로 높은 값을 나타내었다. 혈장 총 단백질의 대조구의 농도는 3.34 ± 0.14 g/dL로 나타났으며 암모니아와 마찬가지로 3시간부터 서서히 상승하기 시작하여 12시간에는 5.36 ± 0.20 g/dL로 유의적으로 가장 높은 값을 나타내었다(Fig. 3).

4. GOT 및 GPT

간 기능성 대사효소인 GOT (AST, aspartate transaminiferase)와 GPT (ALT, alanine transaminiferase)의 활성을 조사한 결과, GOT의 대조구 농도는 68.58 ± 4.87 U/L를 나타냈으며 시간이 경과할수록 대조구보다 유의하게 증가하는 경향을 나타내었으며 96시간에는 120.00 ± 8.07 U/L로 가장 높은 값을 나타내었다. GPT의 대조구 농도는 7.25 ± 0.37 U/L을 나타내었으며, GOT와 마찬가지로 시간이 경과함에 따라 대조구보다 유의하게 증가하는 경향을 보였으며, 96시간에는 12.50 ± 0.83 U/L로 가장 높은 값을 나타내었다(Fig. 4).

5. 전해질 이온(Na⁺, Cl⁻) 및 삼투질 농도

암모니아 노출 스트레스에 의한 혈장 Na⁺의 대조구 농도는

고 찰

양식생물의 암모니아 독성에 대한 내성의 지표인 LC₅₀의 농도는 일반적으로 해산어류의 암모니아 96-h LC₅₀ 평균농도 범위는 0.09~3.35 mg/L, 담수어류의 암모니아 96-h LC₅₀ 평균농도 범위는 0.068~2.0 mg/L라고 보고되었으며 (Russo and Thurston, 1991; Handy and Poxton, 1993), 비교적 담수어류에 비해 해산어류의 농도범위가 높은 것을 알 수 있다. 본 연구에서 능성어 치어의 암모니아에 대한 96-h LC₅₀ 농도는 0.6 mg/L를 나타냈으며, 다른 어종의 암모니아에 대한 96-h LC₅₀ 농도는 조피볼락, *Sebastes schlegelii* 0.09 mg/L, 참돔, *Pagrus major* 0.03 mg/L, 얼룩메기, *Ictalurus punctatus* 3.1 mg/L, 무지개송어, *Oncorhynchus mykiss* 0.32 mg/L로 나타나 (Ruffier et al., 1981; Cho and Hur, 1998), 능성어의 암모니아에 대한 내성이 다른 해산어류에 비해 높은 것을 알 수 있었다.

일반적으로 어류는 급격한 환경변화에 적응하기 위해서 혈중의 catecholamine과 corticosteroid의 빠른 교환이 나타나 혈중으로 방출되면 코티졸 농도가 상승하게 되므로, 코티졸은 스트레스 지표로 이용된다 (Mazeaud et al., 1977; Mommsen et al., 1999, Park et al., 2014). 본 연구에서는 암모니아 노출에 따른 능성어의 혈중 코티졸 농도가 증가하였는데, 이와 같이 암모니아 노출에 따른 혈중 코티졸 농도 증가는 대서양연어, *Salmo salar* L. (Knoph and Olsen, 1994), 무지개송어 (Ortega et al., 2005; Tsui et al., 2009; Wood and Nawata, 2011; Liew et al., 2013), 금붕어, *Carassius auratus* (Liew et al., 2013), 비단잉어, *Cyprinus carpio* (Liew et al., 2013), 뱀장어, *Anguilla japonica* (Jo and Kim, 2014), 조피볼락 (Min et al., 2014; Kim et al., 2015) 등의 다양한 어종에서도 보고되고 있다. 하지만 위에 결과와는 반대로 터봇, *Scophthalmus maximus* (Person-Le Ruyet et al., 2003)과 돌돔, *Oplegnathus fasciatus* (Biswas et al., 2008; Park et al., 2014) 등의 어류에서는 암모니아 노출에 따른 혈중 코티졸 농도가 일시적으로 증가하였다가 시간이 경과함에 따라 지속적으로 감소하는 경향으로 보고되었다. 본 연구 결과에서는 암모니아에 노출된 모든 구간의 능성어 혈중 코티졸이 노출 초기인 12시간까지 지속적으로 증가하였으나 이후 48시간 경과시까지 감소하였으며 이후에는 다시 증가하는 경향을 보여 암모니아에 노출된 능성어 치어가 초기에는 강한 스트레스를 받지만, 시간이 경과됨에 따라 환경변화에 대해 일시적인 적응하는 것으로 추측해 볼 수 있다.

어류에서의 스트레스에 의한 혈액 내 코티졸 농도변화는 신경내분비계의 당신생합성 (gluconeogenesis)을 증대하는 역할을 하며, 이로 인한 혈액 내 글루코스의 증가로 스트레스에 의해 증가된 에너지 요구량을 보충해주는 것으로 보고되었다 (Vijayan et al., 1997). 일반적으로 코티졸과 글루코스의 농도는 여러 가지 스트레스에 의해 혈액 내에서 동반상승 한다고 알

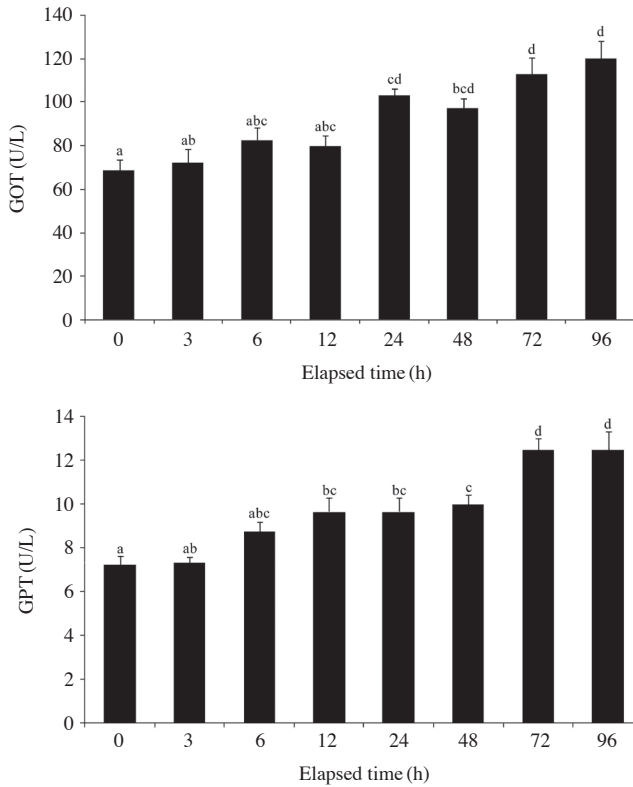


Fig. 4. Levels of plasma GOT and GPT in sevenband grouper, *E. septemfasciatus* exposed to ammonia for 96 hours. Values are mean \pm S.E. Different letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

Table 3. Levels of plasma Na⁺, Cl⁻ and osmolality in sevenband grouper, *E. septemfasciatus* exposed to ammonia for 96 hours

Time (h)	Electrolyte (mEq/L)		Osmolality (mOsm/kg)
	Na ⁺	Cl ⁻	
0	157 \pm 12.5 ^b	139 \pm 8.7 ^{ab}	364 \pm 12.5 ^c
3	142 \pm 9.8 ^{ab}	130 \pm 8.1 ^{ab}	360 \pm 9.5 ^{bc}
6	154 \pm 5.5 ^b	141 \pm 5.2 ^{ab}	397 \pm 5.8 ^c
12	132 \pm 8.1 ^{ab}	132 \pm 7.7 ^{ab}	356 \pm 23.4 ^{bc}
24	124 \pm 4.4 ^{ab}	126 \pm 3.9 ^{ab}	340 \pm 11.3 ^b
48	143 \pm 6.4 ^{ab}	145 \pm 5.7 ^b	395 \pm 5.4 ^{de}
72	126 \pm 5.1 ^{ab}	128 \pm 5.3 ^{ab}	372 \pm 9.2 ^{cd}
96	117 \pm 6.5 ^a	115 \pm 7.4 ^a	302 \pm 6.9 ^a

Values are mean \pm S.E. Different letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

157 \pm 12.5 mEq/L를 나타냈고, 96시간째 117 \pm 6.5 mEq/L로 대조구와 비교하여 유의하게 감소하는 경향을 나타내었다. 혈장 Cl⁻의 대조구 농도는 139 \pm 8.7 mEq/L였으며 48시간 이후 점차 감소하는 경향을 보였지만 대조구와 비교하여 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 혈장 삼투질 농도의 경우 대조구에서는 364 \pm 12.5 mOsm/kg이었고 Na⁺, Cl⁻과 비슷한 경향을 나타냈으며 시간이 지남에 따라 대조구와 비교하여 유의적으로 낮게 나타났음을 알 수 있었다 (Table 3).

려져 있으며 (Barton and Iwama, 1991; Nolan *et al.*, 1999), 이러한 결과는 송어, *Mugil cephalus* (Chang and Hur, 1999), 고등어, *Odontesthes bonariensis* (Tsuzuki *et al.*, 2001), 넙치, *Paralichthys olivaceus* (Chang *et al.*, 2002), 감성돔, *Acanthopagrus schlegeli* (Choi *et al.*, 2006), 조피볼락 (Min *et al.*, 2014) 등에서도 보고되었다. 본 연구의 결과에서도 암모니아 노출에 따른 혈액 내 코티졸과 글루코스가 동반상승하는 것을 볼 수 있었다.

어류는 외부의 암모니아 농도에 노출이 되었을 때 혈장 내의 암모니아 증가는 외부환경에서 유입되는 암모니아 양이 능동적인 수송으로 배출하는 양보다 많기 때문이며 (Min *et al.*, 2014), 여러 경골어류에서도 이와 같은 결과가 보고되고 있다 (Person-Le Ruyet *et al.*, 1995). 하지만 본 연구에서는 암모니아 노출 12시간까지는 급격하게 증가하여 위의 결과들과 동일하게 나타났지만, 24시간부터는 지속적으로 감소하였다. 이러한 결과는 능성어 치어가 암모니아에 지속적으로 노출되면 시간이 경과함에 따라 적응하게 됨으로서 혈장 내 암모니아가 서서히 감소하는 것으로 추측할 수 있었다. 하지만 대조구에 비해서는 혈장 암모니아 농도 차이는 높게 나타났다.

어류의 혈장 내 총 단백질도 마찬가지로 영양 판정, 건강 및 질병 진단에 이용되고 있으며 정상적인 경골어류의 경우에서 약 4~7 g/dL 정도의 농도범위가 나타나고 외부 스트레스 작용에 수치가 상승하는 것으로 보고되었다 (Turner, 1937; Ozaki, 1978; McLeay and Brown, 1979; Yanagisawa and Hashimoto, 1984). 본 연구에서는 대조구 농도는 3.34 ± 0.14 g/dL로 일반적인 경골어류의 혈장 내 총 단백질 농도범위와 크게 차이가 나지 않았으며, 암모니아 노출 12시간까지는 증가하다가 그 이후로는 감소하는 경향을 보였으며, 이러한 결과는 혈장 암모니아 농도의 변화와 일치하는 것을 알 수 있었다.

어류의 혈중으로 유입된 암모니아는 어류의 질소대사를 교란시키며, 간의 손상을 유발하여 GOT와 GPT의 활성을 증가시키는 것으로 알려져 있다 (Michael *et al.*, 1987; Huang and Chen, 2002). 아미노전이효소인 GOT와 GPT는 상당 부분은 손상된 간세포에서 분비되어 혈중으로 방출됨으로 혈장의 GOT와 GPT 활성 측정값은 간 손상의 지표로 널리 이용되고 있다 (Michael *et al.*, 1987). 이전의 Jo and Kim (2014)의 아질산에 노출된 뱀장어의 연구에서도 GOT와 GPT 활성이 증가하는 경향이 보여 본 연구와 비슷한 결과가 나타났다.

전해질 이온은 어류가 급격한 수질환경 변화와 독성물질에 노출되면 삼투압 조절 혼란이 발생함에 따라 혈액 내로 방출되어 농도 변화가 나타나게 된다 (Nolan *et al.*, 1999; Choi *et al.*, 2006). 본 연구에서는 암모니아 노출에 따른 혈장 내의 Na^+ 와 삼투질 농도변화는 일정한 패턴이 유지되지 않았지만 노출 후 시간이 경과함에 따라 유의적인 감소를 나타내었으며, Cl^- 는 유의한 차이를 보이지 않았다. 일반적으로 어류가 어

러 가지 요인에 따른 삼투압 조절 혼란이 발생하면 담수어류는 혈장의 삼투압 농도가 낮아지고, 해산어류는 반대로 높아진다고 알려져 있지만 (Barton and Iwama, 1991), 본 연구에서의 암모니아에 노출된 능성어 치어의 혈장 내 Na^+ 농도의 감소는 대서양 대구, *Gadus morhua* (Remen *et al.*, 2008)와 같이 Na^+ 와 NH_4^+ 사이의 능동 수송의 경쟁에 의해 감소된 것으로 생각된다.

능성어 치어를 대상으로 한 본 연구의 결과로 도출된 총 암모니아성 질소(TAN)에 96시간 노출 시 LC_{50} 농도 26.7 mg/L, 암모니아(NH_3) 농도 0.6 mg/L와 암모니아 노출에 따른 경시적인 혈액학적 특성 변화 조사 결과를 바탕으로 순환 여과양식 시스템을 이용한 안정적인 능성어 양식에 기초자료로 활용할 수 있을 것이며, 향후 만성적인 암모니아 노출에 의한 추가적인 연구가 필요한 것으로 사료된다.

요 약

본 연구는 능성어 (*Epinephelus septemfasciatus*)를 해수 순환여과양식시스템(RAS)에 적용하는데 문제가 되는 암모니아의 농도 기준을 제시하기 위하여 96시간 동안 암모니아 노출에 따른 생존율 및 혈액학적 특성 변화를 조사하였다. 생존율 실험구의 암모니아 농도는 대조구, 0.35, 0.4, 0.5, 0.8 mg/L였으며, 96-h LC_{50} 농도는 0.6 mg/L로 나타났다. 능성어 치어의 암모니아 96-h LC_{50} 농도인 0.6 mg/L에서 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96시간 간격으로 12마리씩 혈액 샘플링을 하였다. 실험구의 암모니아 노출 시간이 경과할수록 혈장 코티졸, 글루코스, GOT 및 GPT 농도가 증가하는 경향을 보였다. 혈장 암모니아와 총 단백질은 암모니아 노출 12시간째까지는 증가하였고 이후로는 감소하였지만, 대조구와 비교하여 유의하게 높은 값을 나타내었다. 또한 혈장 전해질이온(Na^+ , Cl^-)과 삼투압은 감소하는 경향이 관찰되었다.

사 사

본 연구는 국립수산물과학원 “해수 순환여과양식 시스템 기술개발”과제(R2017019)의 연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

REFERENCES

- 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. *Annu. Rev. Fish. Dis.*, 1: 3-26.
- Biswas, A.K., M. Seoka, K. Ueno, A.S. Yong, B.K. Biswas, Y.S.

- Kim and H. Kumai. 2008. Growth performance and physiological responses in striped knifejaw, *Oplegnathus fasciatus*, held under different photoperiods. *Aquaculture*, 279: 42-46.
- Chang, Y.J. and J.W. Hur. 1999. Physiological responses of grey mullet (*Mugil cephalus*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by rapid changes in salinity of rearing water. *Kor. J. Fish. Aquat. Sci.*, 32: 310-316. (in Korean)
- Chang, Y.J., B.H. Min, H.J. Chang and J.W. Hur. 2002. Comparison of blood physiology in black porgy (*Acanthopagrus schlegelii*) cultured in converted freshwater from seawater and seawater from freshwater. *J. Kor. Fish. Soc.*, 35: 595-600. (in Korean)
- Chang, Y.J., B.H. Min and C.Y. Choi. 2007. Black porgy (*Acanthopagrus schlegelii*) prolactin cDNA sequence: mRNA expression and blood physiological responses during freshwater acclimation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 147: 122-128. (in Korean)
- Cho, J.K., C.G. Hong, J.Y. Park, M.H. Son, C.K. Park and J.M. Park. 2015. Effects of water temperature and salinity on the egg development and larvae of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. *Korean J. Ichthyol.*, 27: 21-25. (in Korean)
- Cho, S.H. and S.B. Hur. 1998. Comparison of acute toxicity of ammonia in juvenile Rockfish and Red sea bream. *J. Aquacult.*, 11: 429-435. (in Korean)
- Choi, C.Y., B.H. Min, N.N. Kim, S.H. Cho and Y.J. Chang. 2006. Expression of HSP90, HSP70 mRNA and change of plasma cortisol and glucose during water temperature rising in freshwater adapted black porgy, *Acanthopagrus schlegelii*. *Journal of Aquaculture*, 19: 315-322. (in Korean)
- Colt, J. and Armstrong. 1981. Nitrogen toxicity to crustacean, fish and Mollusca. In: Allen, L.J. and E.C. Kinney (eds.), *Proceeding of the Bio-engineering Symposium for Fish Culture*. America Fisheries Society, Bethesda, MD, U.S.A., pp. 34-37.
- Dosdat, A., J. Person-Le Ruyet, D. Covès, G. Dutto, E. Gasset, A. Le Roux and G. Lemariè. 2003. Effect of chronic exposure to ammonia on growth, food utilization and metabolism of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquat. Living Resour.*, 16: 509-520.
- Eshchar, M., O. Lahav, N. Mozes, A. Peduel and B. Ron. 2006. Intensive fish culture at high ammonium and low pH. *Aquaculture*, 255: 301-313.
- Foss, A., T.H. Siikavuopio, B.S. Saether and T.H. Evensen. 2004. Effect of chronic ammonia exposure on growth in juvenile Atlantic cod. *Aquaculture*, 237: 179-189.
- Handy, R.D. and M.G. Poxton. 1993. Nitrogen pollution in mariculture: toxicity and excretion of nitrogenous compounds by marine fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 3: 205-241.
- Harikrishnan, R., J.S. Kim, C. Balasundaram and M.S. Heo. 2012. Immunomodulatory effects of chitin and chitosan enriched diets in *Epinephelus bruneus* against *Vibrio alginolyticus* infection. *Aquaculture*, 326-329: 46-52.
- Hong, C.G., J.K. Cho, J.Y. Park, M.H. Son, J.M. Park, K.H. Han and H.W. Kang. 2015. Ovulation induction effect of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* by treating hormones. *JFMSE*, 27: 981-989. (in Korean)
- Huang, C.Y. and J.C. Chen. 2002. Effects on acid-base balance, methaemoglobinemia and nitrogen excretion of European eel after exposure to elevated ambient nitrite. *Journal of Fish Biology*, 61: 712-725.
- Hutchinson, W., M. Jeffrey, D. O-Sullivan, D. Casement and S. Clark. 2004. *Recirculating Aquaculture System Minimum Standard for Design, Construction and Management*. South Australia Research and Development Institute.
- Ip, Y.K., C.B. Lim, S.F. Chew, J.M. Wilson and D.J. Randall. 2001. Partial amino acid catabolism leading to the formation of alanine in *Periophthalmadon schlosseri* (mudskipper): a strategy that facilitates the use of amino acids as an energy source during locomotory on land. *J. Exp. Biol.*, 204: 1615-1624.
- Jeney, G., J. Nemesok, Z. Jeney and J. Olah. 1992. Acute effect of sublethal ammonia concentrations on common carp (*Cyprinus carpio* L.) II. Effect of ammonia on blood plasma transaminases (GOT, GPT), GIDH enzyme activity and ATP value. *Aquaculture*, 104: 149-156.
- Jo, S.H. and H.Y. Kim. 2014. Changes in hematological responses and antioxidative enzyme activities of Japanese eel *Anguilla japonica* exposed to elevated ambient nitrite. *Kor. J. Fish. Aquat. Sci.*, 47: 860-868. (in Korean)
- Kim, B.H., K.M. Kim, Y.D. Lee, C.B. Song and S. Rho. 1997. Reproductive biology of the sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* I. The effect of HCG on ovulation induction. *J. Aquacult.*, 10: 55-61. (in Korean)
- Kim, I.S., Y. Choi, C.L. Lee, Y.J. Lee, B.J. Kim and J.H. Kim. 2005. *Illustrated book of Korean fishes*. Kyo-Hak Publishing Co. Ltd. Seoul, pp. 276-286. (in Korean)
- Kim, P.K. 2011. Effects of stocking density and dissolved oxygen concentration on the growth and hematology of the Parrotfish *Oplegnathus fasciatus* in a recirculating aquaculture system (RAS). *Kor. J. Fish. Aquat. Sci.*, 44: 747-752. (in Korean)
- Kim, S.H., J.H. Kim, M.A. Park, S.D. Hwang and J.C. Kang. 2015. The toxic effects of ammonia exposure on antioxidant and immune responses in Rockfish, *Sebastes schlegelii* during thermal stress. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 40: 954-959. (in Korean)
- Kitajima, C., M. Takaya, Y. Tsukashima and T. Arakawa. 1991. Development of eggs, larvae and juvenile of the grouper, *Epinephelus septemfasciatus*, reared in the laboratory. *Japan J. Ichthyol.*, 38: 47-55.
- Knoph, M.B. and Y.A. Olsen. 1994. Subacute toxicity of ammonia to Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in seawater: effects on water and salt balance, plasma cortisol and plasma ammo-

- nia levels. *Aquat. Toxicol.*, 30: 295-310.
- Kohno, H., S. Diani and A. Supriatna. 1993. Morphological development of larval and juvenile grouper, *Epinephelus fuscoguttatus*. *Japan J. Ichthyol.*, 40: 307-316.
- Lang, T., G. Peters, R. Hoffmann and E. Meyer. 1987. Experimental investigations on the toxicity of ammonia-effects on ventilation frequency, growth, epidermal mucous cells, and gill structure of rainbow-trout *Salmo gairdneri*. *Dis. Aquat. Ogr.*, 3: 159-165.
- Liew, H.J., A.K. Sinha, C.M. Nawata, R. Blust, C.M. Wood and G. De Boeck. 2013. Differential responses in ammonia excretion, sodium fluxes and gill permeability explain different sensitivities to acute high environmental ammonia in three freshwater teleosts. *Aquatic Toxicology*, 126: 63-76.
- 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. *Transactions of the American Fisheries Society*, 106: 201-212.
- McLeay, D.J. and D.A. Brown. 1979. Stress and chronic effects of untreated and treated bleached kraft pulpmill effluent on the biochemistry and stamina of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 36: 1049-1059.
- Meade, J.W. 1985. Allowable ammonia for fish culture. *Prog. Fish. Cult.*, 3: 135-145.
- Michael, M.I., A.M. Hilmy, N.A. El-Domiatiy and K. Wershana. 1987. Serum transaminases activity and histopathological changes in *Clarias lazera* chronically exposed to nitrite. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 86: 255-262.
- Min, B.H., M.S. Park, Y.K. Shin, Y.H. Do and J.I. Myeong. 2014. Physiological responses in Korean rockfish (*Sebastes schlegeli*) exposed to ammonia. *Korean J. Environ. Biol.*, 32: 344-352. (in Korean)
- Mommsen, T.P., M.M. Vijayan and T.W. Moon. 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 9: 211-268.
- Nolan, D.T., R.L.J.M. Op't Veld, P.H.M. Balm and S.W. Bonga. 1999. Ambient salinity modulates the response of the tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Peters), to net confinement. *Aquaculture*, 177: 297-309.
- Ortega, V.A., K.J. Renner and N.J. Bernier. 2005. Appetite-suppressing effects of ammonia exposure in rainbow trout associated with regional and temporal activation of brain monoaminergic and CRF systems. *Journal of Experimental Biology*, 208: 1855-1866.
- Ozaki, H. 1978. *Physiology of fish*, Vol. 1, Blood. Circulation. Midori-shobo. Tokyo, 326.
- Paley, R.K., I.D. Twitchen and F.B. Eddy. 1993. Ammonia, Na⁺, K⁺ and Cl⁻ levels in Rainbow trout yolk-sac fry in response to external ammonia. *J. Exp. Biol.*, 180: 273-284.
- Pan, C.H., Y.H. Chien and Y.J. Wang. 2011. Antioxidant defence to ammonia stress of characins (*Hyphessobrycon eques steindachneri*) fed diets supplemented with carotenoids. *Aquacult. Nutr.*, 17: 258-266.
- Park, J. 2005. Design and performance of pilot recirculating aquaculture system for abalone *Haliotis discus hannai*. Ph.D. Thesis, Pukyong National University, Busan, Korea.
- Park, J.M., J.K. Cho, K.H. Han, N.R. Kim, H.K. Hwang, K.M. Kim, J.I. Myeong and M.H. Son. 2014. Early life history of the sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* from Korea. *Dev. Reprod.*, 18: 13-23. (in Korean)
- Park, J.Y., J.M. Park, C.G. Hong, K.M. Kim and J.K. Cho. 2016. Physiological and biochemical response of blood on low temperature stress in sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. *Korean J. Ichthyol.*, 28: 1-8. (in Korean)
- Park, S.D., P.K. Kim and J.K. Jeon. 2014. Effect of ammonia concentration in rearing water on growth and blood components of the Parrotfish *Oplegnathus fasciatus*. *Kor. J. Fish. Aquat. Sci.*, 47: 840-846. (in Korean)
- Paust, L.O., A. Foss and A.K. Imsland. 2011. Effects of chronic and periodic exposure to ammonia on growth, food conversion efficiency and blood physiology in juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture*, 315: 400-406.
- Person-Le Ruyet, J., H. Chartois and L. Quemener. 1995. Comparative acute ammonia toxicity in marine fish and plasma ammonia response. *Aquaculture*, 136: 181-194.
- Person-Le Ruyet, J., A. Lamers, A. Le Roux, A. Severe, G. Boeuf and N. Mayer-Gostan. 2003. Long term ammonia exposure of turbot: effects on plasma parameters. *J. Fish. Biol.*, 62: 879-894.
- Randall, D.J. and P.A. Wright. 1987. Ammonia distribution and excretion in fish. *Fish. Physiol. Biochem.*, 3: 107-120.
- Remen, M., A.K. Imsland, S.O. Stefansson, T.M. Jonassen and A. Foss. 2008. Interactive effects of ammonia and oxygen on growth and physiological status of juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture*, 274: 292-299.
- Roumieh, R., A. Barakat, N.E. Abdelmeguid, J. Ghanawi and I.P. Saoud. 2013. Acute and chronic effects of aqueous ammonia on marbled spinefoot rabbitfish, *Siganus rivulatus* (Forsskal 1775). *Aquacult. Res.*, 44: 1777-1790.
- Ruffier, P.J., W.C. Boyle and J. Kleinschmidt. 1981. Short-term acute bioassays to evaluate ammonia toxicity and effluent standards. *Journal (Water Pollution Control Federation)*, pp. 367-377.
- Russo, R.C. 1985. Ammonia, nitrite and nitrate. In: Rand, G.M. and S.R. Petrocelli (eds.), *Fundamentals of aquatic toxicology*. Hemisphere Publishing, Washington DC, U.S.A., pp. 455-471.
- Russo, R.C. and R.V. Turston. 1991. Toxicity of ammonia, nitrite and nitrate to fishes. *Aquaculture and water quality*. In: Brune, E. and J.R. Tomasso (eds.), *Advances in World Aquaculture*. Vol. 3. The World Aquaculture Society. Louisiana, U.S.A., pp. 58-89.
- Song, Y.B., H.J. Baek, H.B. Kim, K.J. Lee, K. Soyano and Y.D.

- Lee. 2005. Induced sex reversal of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* by 17 α -methyltestosterone. J. Aquaculture, 18: 167-172. (in Korean)
- Song, Y.B., H.J. Baek, H.B. Kim, K. Soyano, S.J. Kim and Y.D. Lee. 2008. Induction of maturation and ovulation with HCG treatment in the sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus*. Kor. J. Aquacult., 2: 96-101. (in Korean)
- Suh, K.H., B.J. Kim and I.G. Jeon. 2001. Design and Development of Intergrated Recirculating Aquaculture System. J. Kor. Fish. Soc., 34: 70-76.
- Tsui, T.K.N., C.Y.C. Hung, C.M. Nawata, J.M. Wilson, P.A. Wright and C.M. Wood. 2009. Ammonia transport in cultured gill epithelium of freshwater rainbow trout: the importance of Rhesus glycoproteins and the presence of an apical Na⁺/NH₄⁺ exchange complex. Journal of Experimental Biology, 212: 878-892.
- Tsuzuki, M.Y., K. Ogawa, C.A. Strussmann, M. Maita and F. Takashima. 2001. Physiological responses during stress and subsequent recovery at different salinities in adult pejerrey *Odontesthes bonariensis*. Aquaculture, 200: 349-362.
- Turner, A.H. 1937. Serum protein measurements in the lower vertebrates. II. In marine teleosts and elasmobranchs. Biological Bulletin, 73: 511-526.
- 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. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, 116: 89-95.
- Wendelaar Bonga, S.E. 1997. The stress response in fish. Physiol. Rev., 77: 591-625.
- Wilson, R.W. and E.W. Taylor. 1992. Transbranchial ammonia gradients and acidbase reponses to high external ammonia in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) acclimated to different salinities. J. Exp. Biol., 166: 95-112.
- Wood, C.M. and C.M. Nawata. 2011. A nose-to-nose comparison of the physiological and molecular responses of rainbow trout to high environmental ammonia in seawater versus freshwater. Journal of Experimental Biology, 214: 3557-3569.
- Yanagisawa, T. and K. Hashimoto. 1984. Plasma albumins in elasmobranchs. Missuishi, 50: 1083.