

pH의 급성 변화에 따른 넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 혈액학적 성상 및 스트레스 반응

오민혁 · 김준영 · 김석렬¹ · 김수경¹ · 김준환^{1*}

군산대학교 해양생명과학과, ¹서해수산연구소 양식산업과

Hematological Parameters and Stress Responses of Olive Flounder *Paralichthys olivaceus* by Acute pH Change

Min Hyeok Oh, Jun Young Kim, Seok-Ryel Kim¹, Su Kyoung Kim¹ and Jun-Hwan Kim^{1*}

Marine Life Science, Kunsan National University, Kunsan 54150, Korea

¹West Sea Fisheries Research Institute, National Institute of Fisheries Science, Taean 32132, Korea

Olive flounder *Paralichthys olivaceus* (total weight 216.4±14.6 g, total length 28.4±1.7 cm) were exposed to different pH levels (3, 4, 5, 6, 7, 8, and 9) for 96 h. At pH 4, hemoglobin decreased significantly, while plasma calcium, glucose, cholesterol, and ALP increased significantly. Exposure to pH 4 also induced stress responses, as evidenced by a significant decrease in heat shock protein 70 (HSP 70) and a significant increase in cortisol. The results of this study indicate that acute exposure to acidic or alkaline pH (pH 3 or 9) induced significant mortality, while exposure to pH 4 significantly affected hematological parameters and stress responses in *P. olivaceus*.

Keywords: Olive flounder, pH, LC₅₀, Hematological parameter, Stress response

서 론

수중의 수소이온농도를 나타내는 지표로서 pH는 질소대사과정 후 배출되어 이온화된 NH₄⁺가 NH₃로 변하는 과정에서 방출되는 H⁺에 의하여 pH가 낮아지며, 양식장에서 조류 및 식물, 세균에 의한 광합성 작용으로 수중의 CO₂ 및 alkaline과 같은 화학성분의 상호작용을 통해 pH는 상승한다(Wurts, 2003). pH는 7을 기준으로 알칼리성과 산성으로 구분되는데, 일반적인 어류의 사육 pH 범위는 6.5-9.0 (약산성-약알칼리성)이고, 평균 혈중 pH는 7.4로 중성이다(Wurts, 2003). 그러나 다양한 환경요인에 의하여 pH는 급격하게 변화할 수 있고 내성 범위를 벗어나면 어류의 심각한 스트레스 또는 폐사를 유발한다(Packer and Dunson, 1970).

수중 pH의 변화는 어류의 생리적 변화를 유발하여 아가미 이온교환 증가 및 감소와 혈장 pH의 변화, 혈중 이온 농도(Na⁺ 및 Cl⁻)의 변화를 유발한다(Scott et al., 2005). 산성의 pH는 담수 어류의 이온수송세포 및 점액 생성에 영향을 주고, 아가미 구조의 변형 및 점액 과다 분비로 인한 질식을 유발하며, zebra fish,

*Danio rerio*의 Cl⁻ 흡수를 억제하고 혈장 Cl⁻ 농도를 낮출 수 있다(Kwong et al., 2014). 반대로, 알칼리의 pH는 어류의 아가미를 포함한 주요 조직 세포막 변형을 유발하고, 세포의 tight junction 변형을 초래한다(Kumai et al., 2011; Zahangir et al., 2015). 또한 pH 9.5의 알칼리성 수중에 노출된 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*)는 아가미를 통해 유입되는 Cl⁻ 및 Na⁺이 감소하면서 암모니아 배출과 아가미를 통한 이온교환 과정을 손상시켜 어류에게 영향을 미친다(Laurent et al., 2000). 그리고 산성의 낮은 pH 조건의 스트레스는 어류 혈장 스테로이드 호르몬에 영향을 주어 암컷의 테스토스테론의 증가를 유발할 수 있다(Zelennikov et al., 1999). 급격한 pH의 변화(pH 3.5의 산성 또는 pH 11.0의 알칼리성)는 어류의 산-염기 및 이온 조절 손상, 암모니아 배출 문제와 같은 심각한 스트레스로 인해, 치명적인 독성으로 작용하여 폐사를 유발한다(van Dijk et al., 1993; Das et al., 2006).

혈액학적 성상은 어류의 건강 상태를 평가하는 주요한 지표로서 pH와 같은 환경적 요인 및 독성 물질 노출 등 다양한 스트레스 요인에 의해 영향을 받는다(Ghanbari et al., 2012). 급

*Corresponding author: Tel: +82. 41. 675. 3773 Fax: +82. 41. 675. 7077

E-mail address: junhwan1982@hanmail.net



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2020.0733>

Korean J Fish Aquat Sci 53(5), 733-739, October 2020

Received 8 May 2020; Revised 22 June 2020; Accepted 14 July 2020

저자 직위: 오민혁(대학생), 김준영(대학생), 김석렬(연구사), 김수경(연구관), 김준환(연구사)

격한 pH변화는 어류 혈액 내 pH변화를 초래하며, 대사에 필요한 주요 이온 및 삼투압 조절을 교란하는데, 이는 신경전달물질인 catecholamine 및 cyclic adenosine monophosphate 활성을 과하게 유발하며 과민성 장애를 초래하고 독성으로 작용한다(Ghanbari et al., 2012). 또한 혈액 pH변화는 hemoglobin 및 hematocrit 감소와 저산소증에 의한 질식을 유발하며, 조혈세포 손상에 따른 적혈구 용해 및 적혈구 감소를 유발한다(Carvalho and Fernandes, 2006).

어류의 heat shock protein 70 (HSP 70)은 일반적인 스트레스 요인에 의해 유도되는 단백질로 환경스트레스에 대한 주요한 지표로 이용된다(Kim and Kang, 2016a). Zhou et al. (2015)은 pH의 급격한 변화는 스트레스 요인으로 작용하여 HSP 70과 HSP 90과 같은 heat shock proteins에 변화를 유발한다고 주장하였다. 어류의 스트레스 반응을 평가하기 위한 스트레스 지표인 cortisol은 스트레스 호르몬으로 알려져 있으며, 스트레스와 관련된 고혈당 반응에서 중요한 역할을 한다(Vijayan et al., 1997). 따라서, HSP 70 및 cortisol과 같은 스트레스 지표는 pH 변화에 따른 어류의 독성 영향을 평가하는 기준을 제시해 줄 것이다.

넙치(*Paralichthys olivaceus*)는 성장이 빠르고 고밀도 사육이 가능한 특성을 지닌 어종으로, 국내에서 가장 많이 생산되고 있는 양식 어종 중 하나이다(Hur et al., 2007). 일반적인 넙치 육상 양식장의 pH는 7-8 수준으로 유지 운영된다. 하지만, 특정 친환경양식시스템인 바이오플락 및 순환여과시스템에서는 암모니아 질산화 과정에 의해 pH가 꾸준히 감소하여 pH 6 이하로 내려갈 수도 있다. pH의 급격한 변화는 양식 생물에게 독성으로 영향을 미칠 수 있어, 사육 양성에 필요한 생물의 적정 pH 범위의 기준 지표가 필요하다(Ip et al., 2001). 따라서 본 연구의 목적은 넙치의 pH 변화에 따른 혈액성상 및 스트레스 반응의 변화를 통해 적정 사육 pH기준을 확립하고 사육 지침을 마련하는데 있다.

재료 및 방법

실험어 및 실험환경

본 실험에 이용된 넙치(무게 216.4 ± 14.6 g, 전장 28.4 ± 1.7 cm)는 태안 인근의 중묘생산장에서 분양 받았다. 실험은 사육 해수에서 2주간 순화 후 실시하였고, 실험수조는 100 L 원형 수조(50 L 물량)를 이용하였으며, 농도구 7개에서 1개의 농도구 간(수조) 당 6마리, 총 42마리를 입식하여 진행하였다. 실험 기간 중 수질(수온, 용존산소, 염분 및 pH)은 휴대용 수질 분석기(YSI-Professnal plus, YSI Inc., Ohio, USA)를 이용하여 매일 측정하였으며, 암모니아, 아질산 및 질산은 분석용 키트(Merck & Co., Inc., Kenilworth, NJ, USA)를 이용하여 측정하였다(Table 1). 본 연구에서 pH는 HCl 및 NaOH를 이용하여 pH 3, 4, 5, 6, 7, 8 및 9를 맞추어 주었으며, 하루 3회 pH 측정하여 지

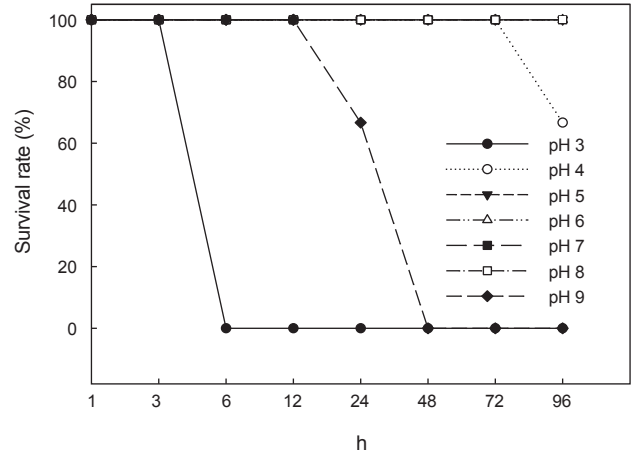


Fig. 1. Survival rate of olive flounder *Paralichthys olivaceus* exposed to different pH levels for 96 h.

속적으로 보정해 주었다. pH 농도 구간별 실제 pH 및 알칼리도는 Table 2와 같다. 노출 96시간 후 살아있는 모든 개체(구간 당 6마리)의 혈액을 sampling하여 분석하였다. 96시간 노출 후 생존율은 Fig. 1과 같으며 생존 개체를 바탕으로 혈액 성분, 혈장 성분 분석 및 스트레스 반응을 측정하였다.

혈액성상

혈액학적 분석은 pH 변화 96시간 후 살아있는 개체의 채혈을 실시하였다. 채혈은 헤파린(Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) 처리된 주사기를 하였으며, 채혈 직후 적혈구 용적(Hc-

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

Item	Value
Temperature (°C)	20.3±0.6
pH	7.41±0.13
Salinity (‰)	32.1±0.3
Dissolved Oxygen (mg/L)	8.36±0.42
Ammonia (mg/L)	0.05±0.02
Nitrite (mg/L)	0.11±0.03
Nitrate (mg/L)	0.23±0.08

Table 2. Analyzed pH concentrations from each source

pH concentrations	pH concentrations							
	3	4	5	6	7	8	9	
Measured pH concentrations	3.03	4.03	5.02	6.05	7.04	8.01	8.95	
Measured Alkalinity (mg/L)	5	15	30	60	110	150	195	

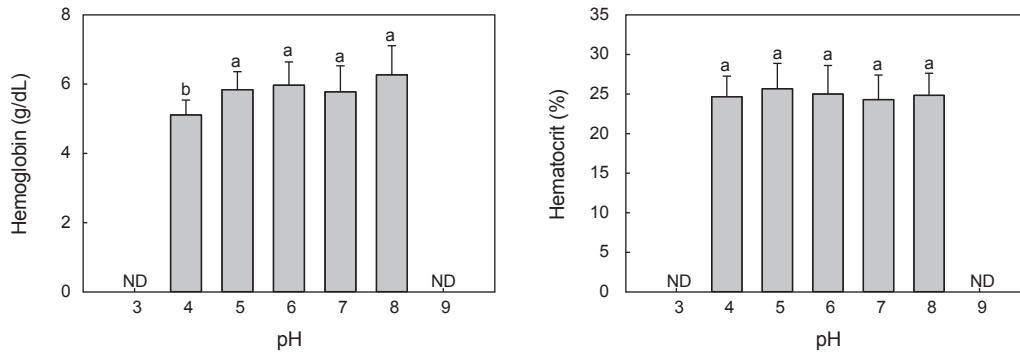


Fig. 2. Hematological parameters such as hematocrit and hemoglobin of olive flounder *Paralichthys olivaceus* exposed to different pH levels for 96 h. Values with different superscript are significantly different ($P<0.05$) as determined by Tukey's multiple range test. ND, no data by 100% mortality.

matocrit)과 헤모글로빈(Hemoglobin)을 측정하였다. Hematocrit는 모세관 내로 혈액을 넣어, Microhematocrit centrifuge (VS-12000, VISION SCIENTIFIC Co., Ltd., Daejeon, Korea)에서 12,000 rpm, 10분간 원심분리 후 Micro-hematocrit reader를 이용하여 측정하였다. Hemoglobin 수치는 임상용 kit (Asan Pharm. Co., Ltd., Seoul, Korea)를 이용하여 Cyanmethemoglobin법으로 측정하였다.

혈장 성분 분석

pH 노출에 따른 혈장 성분의 변화를 분석하기 위해 채취한 혈액을 4°C에서 3000 g로 15분간 원심분리 후 혈장을 분리하였다. 혈장 무기성분으로 칼슘(calcium), 마그네슘(magnesium)을 측정하였다. 칼슘은 OCPC법, 마그네슘은 Xylidyl blue-I법에 따라 임상용 kit (Asan Pharm. Co., Ltd., Seoul, Korea)를 이용하여 측정하였다. 혈장 유기성분으로 혈당(glucose), 콜레스테롤(cholesterol) 및 총 단백질(total protein)을 측정하였다. 혈당은 GOD/POD법, 콜레스테롤은 비색법, 총 단백질은 Biuret법에 의해 시판되고 있는 임상용 kit를 이용하였다. 혈장 효소 활성으로 ALP (alkaline phosphatase)를 측정하였다. ALP는 King-King법으로 500 nm에서 임상용 kit를 이용하여 분석하였다.

스트레스 반응

혈장 Heat shock protein 70은 monoclonal antibody enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 분석 키트(MyBioSource, Inc., San Diego, CA, USA)로 이용하여 분석하였으며, 실험 방법은 표준, 샘플 및 블랭크 well을 설정하고 각 well에 50 µL (표준, 샘플 및 샘플 희석제)을 넣은 후, 각 well에 100 µL의 HRP-conjugate 시약을 첨가하고, 스트립으로 덮고 37°C에서 60분 동안 배양한다. 이후 플레이트를 4회 세척하고, chromogen A 시약을 50 µL 및 chromogen B 시약 50 µL를 각각의 well에 순차적으로 첨가하였다. 부드럽게 혼합 한 다음 빛으로

부터 보호하여 37°C에서 5 분 동안 배양한 뒤, 각 well에 50 µL의 stop solution을 첨가하고, 15분 이내에 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

혈장 cortisol 농도는 Kim and Kang (2016b)을 참조하여 ELISA 정량 키트(Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale, NY, USA)로 측정하였다. 먼저, anti-Mouse Ig G를 well plate에 100 µL 표준(156, 313, 625, 1250, 2500, 5,000 pg/mL) 및 100 µL 샘플을 추가한 뒤, 50 µL의 assay buffer, 50 µL의 blue conjugate 및 50 µL의 yellow antibody를 차례로 넣어준다. 그 후, plate를 실온에서 500 rpm으로 2시간 동안 incubate한다. 그런 다음 우물 내용물을 비우고 400 µL wash solution을 3번 첨가하여 세척하고 수분이 나타나지 않을 때까지 건조한 뒤, 5 µL blue conjugate와 200 µL pNpp substrate solution을 추가한다. 흔들지 않고 실온에서 1시간 동안 배양 후, 50 µL stop solution을 추가하고 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계분석 방법

본 실험분석은 노출물질 별 농도에 따른 각 6마리를 분석에 이용하였고, 모든 실험은 3반복 분석으로 이루어졌다. 본 실험의 대조구는 pH 7-8수준의 자연해수 수준을 기준으로 유의한 변화를 통계 분석하였다. 실험 분석 결과에 대한 통계학적 유의성은 SPSS 통계 프로그램(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 ANOVA test를 실시하여 Tukey's multiple range test를 통해 $P<0.05$ 일 때 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결과 및 고찰

혈액학적 성상

pH 변화 96시간 후의 넙치 혈액 성상의 변화는 Fig. 2에 나타내었다. pH 변화에 의한 넙치 hemoglobin 농도는 pH 4 (5.11 ± 0.43)에서 pH 7 (5.78 ± 0.75) 및 pH 8 (6.27 ± 0.84)에

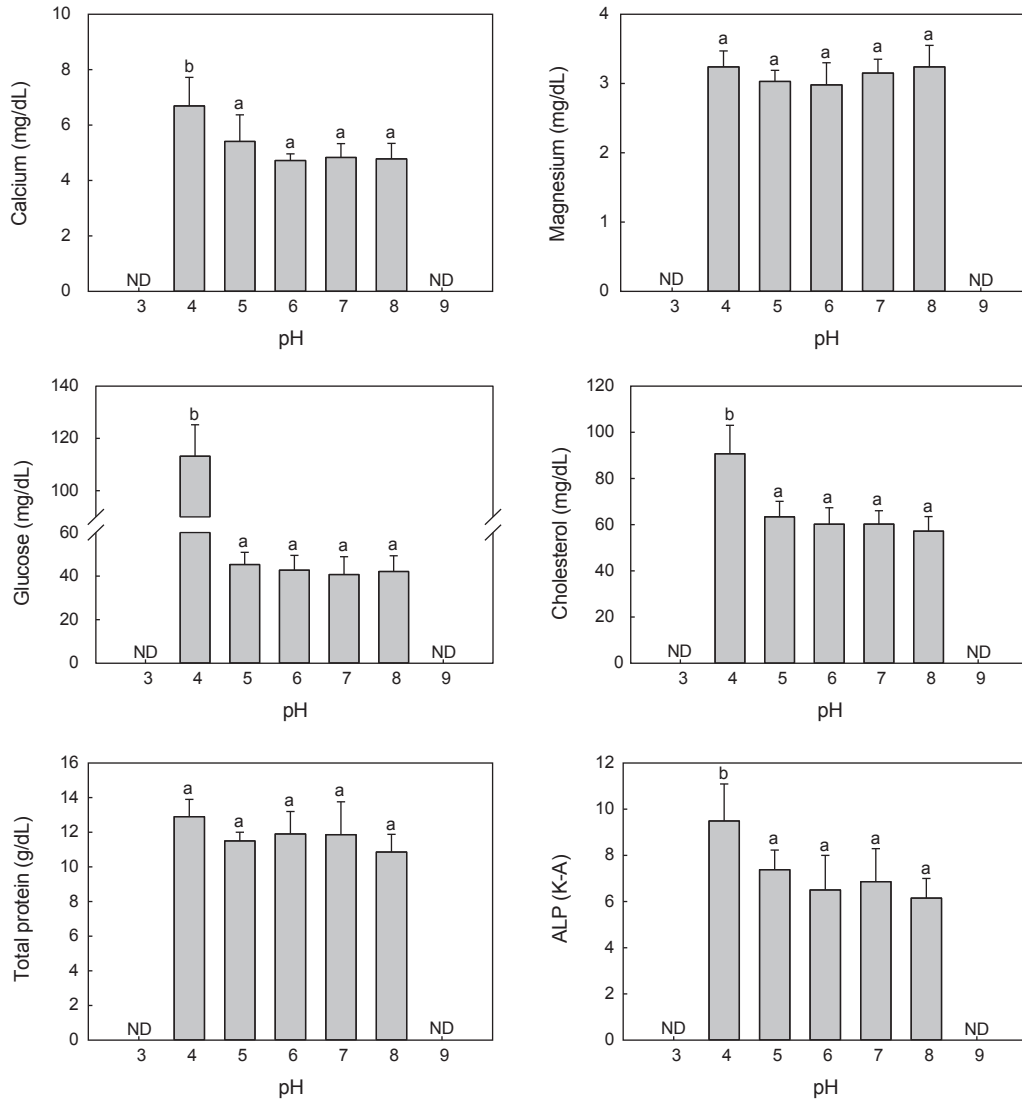


Fig. 3. Plasma components of olive flounder *Paralichthys olivaceus* exposed to different pH levels for 96 hours. Values with different super-script are significantly different ($P<0.05$) as determined by Tukey's multiple range test. ND, no data by 100% mortality.

비해 유의하게 감소하였다($P<0.05$). Hematocrit 수치는 pH 농도에 의한 유의한 차이는 관찰되지 않았다($P<0.05$).

산성 및 알칼리성 환경에서 혈액 hemoglobin의 감소는 적혈구 세포 용해 및 신장의 조절 활성의 감소에 의해 나타날 수 있다. Sawhney and Johal (2000)은 낮은 pH의 변화(pH 6.5 및 8.5)는 미숙 적혈구 발생으로 조절 기능을 자극하여 손실된 적혈구의 산소운반능력을 보상할 수 있지만, 높은 pH의 변화(pH 5.5 및 9.0)는 극한의 스트레스로 인해 방어 메커니즘의 붕괴로 hemoglobin의 감소를 유발할 수 있다고 주장했다. 본 연구에서, 산성 노출에 따른 넵치 hemoglobin의 유의한 감소는 pH의 급격한 변화에 따른 혈액 산소 운반 능력의 감소를 의미하며, 이는 급격한 산성의 pH가 호흡기 스트레스로 작용할 수 있

음을 나타낸다. Hematocrit은 어류의 생리적 건강상태를 나타내는 주요한 지표 중 하나이다(Kim et al., 2020a). 혈액의 pH 변화는 적혈구 hydration 및 dehydration을 동반할 수 있으며, 혈액 가스 및 HCO_3^- 값으로 인해 hematocrit은 변화될 수 있다(Andrewartha et al., 2011). 하지만, 본 연구에서 pH 변화에 따른 적혈구 용적의 유의한 변화는 나타나지 않았다. 이는 본 연구에서 pH의 변화가 적혈구 용적에서는 제한적인 영향을 나타냄을 의미한다.

혈장 성분

pH 농도 별 96시간 노출에 의한 넵치 혈장 성분의 변화는 Fig. 3에 나타내었다. 혈장 무기 성분인 calcium은 pH 4에서 유의하

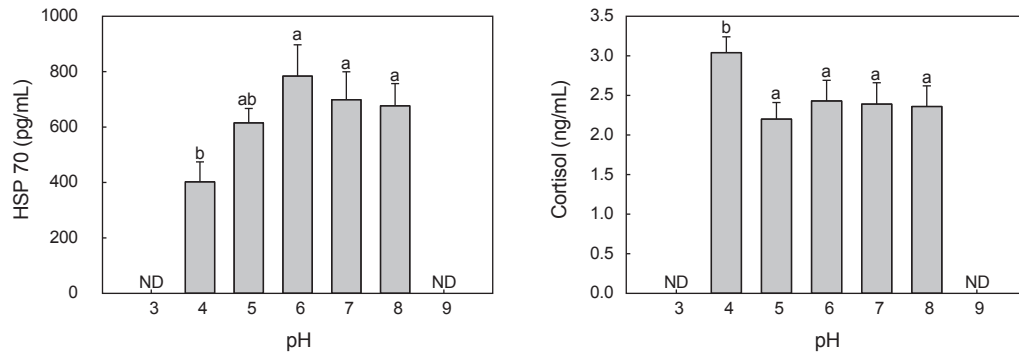


Fig. 4. Stress responses such as HSP 70 and cortisol of olive flounder *Paralichthys olivaceus* exposed to different pH levels for 96 h. Values with different superscript are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Tukey's multiple range test. ND, no data by 100% mortality.

게 증가하였다($P < 0.05$). 하지만, 혈장 magnesium은 유의한 변화는 나타나지 않았다($P < 0.05$). 혈장 유기 성분인 glucose 및 cholesterol은 모두 pH 4에서 유의하게 증가하였다($P < 0.05$). 혈장 total protein은 유의한 변화는 없었다($P < 0.05$). 혈장 효소 성분인 ALP는 pH 4에서 유의하게 증가하였다($P < 0.05$).

어류 혈장 이온 성분인 calcium과 magnesium은 환경 스트레스에 따른 어류 혈액 내 삼투 조절 등의 영향을 평가하는 주요한 성분이다(Kim et al., 2020a). 본 연구에서 넙치 혈장 magnesium은 유의한 변화는 나타나지 않았지만, 혈장 calcium 수치는 산성의 pH 4에서 유의하게 증가하였다. Vuorinen et al. (2004)는 낮은 pH에 의한 산성화된 환경이 어류의 혈액 생리 및 다양한 혈장 성분에 영향을 미칠 수 있음을 보고했다. 본 연구에서 낮은 pH의 노출은 넙치의 이온 성분의 변화를 유발하여 적절한 삼투 기능의 문제를 유발할 수 있음을 나타낸다.

어류 혈장 glucose는 어류의 스트레스를 평가하는 주요한 지표이며, glucagon 및 cortisol과 같은 호르몬 간의 복잡한 상호작용을 통해 조절된다(Yang and Chen, 2003; Agrahari et al., 2007a). Das et al. (2006)은 pH 8.5이상의 알칼리성 또는 pH 6.5 이하의 산성은 Indian major carps (catla *Catla catla*와 mrigal *Cirrhinus mrigala*)의 혈장 glucose의 유의한 증가를 유발했다고 보고했다. 본 연구에서 산성의 pH는 넙치의 glucose 수치를 유의하게 증가시켰으며, 이는 스트레스 상황에 의한 gluconeogenesis에 의한 증가로 판단된다. 혈중 cholesterol은 세포막의 필수 구조 성분으로, 혈장 내 지질 단백질 및 스테로이드 호르몬 필수 구조 성분이며, 급격한 pH변화와 같은 환경 스트레스에 의해 영향을 받을 수 있다(Yang and Chen, 2003; Agrahari et al., 2007b). 본 실험에서 산성의 pH로 인하여 넙치 혈장 cholesterol이 유의하게 증가시켰으며, 이는 pH 변화에 의한 스트레스 반응에 의한 것으로 판단된다. Kim et al. (2020b) 역시 암모니아 노출에 따른 넙치 혈장콜레스테롤 증가를 보고했으며, 이는 환경스트레스가 넙치의 간 및 신장 기능장애훈을 초래하여 혈류로 콜레스테롤 방출에 따른 증가로 판단된다고 보고했다.

혈장 total protein은 정상적인 삼투압 및 일정한 pH를 유지하

는데 관여하며, 다양한 스트레스에 따른 어류의 건강상태를 평가하는 지표로 이용된다(Guo et al., 2010). Das et al. (2006)은 pH의 변화는 혈장 total protein의 유의한 감소를 보고 하였다. 하지만, 본 연구에서 pH 변화에 의한 넙치 혈장 total protein의 유의한 변화는 나타나지 않아, 본 연구에서 pH의 변화가 넙치 혈장 total protein 성분에 미치는 영향은 제한적인 것으로 판단된다. 혈장 ALP (alkaline phosphatase)는 인산 분해 효소이며, 간 췌장 조직 손상 및 기능 장애에 대한 독성을 평가하는 지표로 활용된다(Wan et al., 2014). 본 연구에서 산성(pH 4)의 환경에서 넙치 혈장 ALP의 유의한 증가가 나타났으며, 이는 산성 노출이 넙치의 간 기능에 영향을 미칠 수 있음을 나타낸다.

스트레스 반응

pH 농도 별 96시간 노출에 의한 넙치 혈장 스트레스 반응의 변화는 Fig. 4에 나타내었다. 혈장 HSP 70은 pH 4 (402.4 ± 72.3)에서 pH 7 (698.6 ± 101.5) 및 pH 8 (676.8 ± 80.1)에 비해 유의하게 감소하였다($P < 0.05$). 반면, 혈장 cortisol은 pH 4 (3.0 ± 0.2)에서 pH 7 (2.39 ± 0.27) 및 pH 8 (2.36 ± 0.26)에 비해 유의하게 증가하였다($P < 0.05$).

급격한 pH의 변화는 폐사 및 혈액학적 성상에 영향을 주었으며, 이러한 성상의 영향은 넙치의 스트레스 반응에도 영향을 주었을 것이다. 본 연구에서 스트레스 지표를 평가하기 위한 HSP 70은 낮은 pH 4에서 유의한 감소를 나타내었다. 이는 높은 스트레스 반응에 의한 방어 메커니즘의 손상에 의한 감소로 판단된다. Wan et al. (2014)는 급격한 pH 변화에 의해 juvenile *Megalobrama amblycephala*의 HSP 70은 초기 급격히 증가하지만, 방어 메커니즘을 초과한 스트레스에서 세포막 구조 및 간 단백질의 변이를 초래하여 HSP 합성 중단에 의한 감소가 나타났었다고 보고했다. 어류는 스트레스 반응 중 hypothalamus pituitary interrenal axis의 활성을 강화하여 catecholamine 분비를 증가시키고 혈장 cortisol의 증가 등 생화학적 변화를 유발한다(Kim et al., 2000). 본 연구에서 pH 4의 산성 노출은 넙치 혈장 cortisol의 유의한 증가를 나타내었다. Wan et al. (2014)

는 pH 스트레스에 의해 juvenile *Megalobrama amblycephala*의 혈장 cortisol의 초기 증가를 보고했다. Ogawa et al. (2001) 역시 낮은 pH 노출에 의한 산스트레스는 carp *Cyprinus carpio*의 혈장 cortisol의 유의한 증가를 유발했다고 보고하였다. 본 연구에서 스트레스 반응은 증가 또는 감소를 보였으며, 이는 pH 변화에 의한 스트레스 방어 메커니즘의 자극 또는 억제를 나타낸다. Celi et al. (2012)은 어류 체내의 cortisol 수준이 HSPs의 변화와 밀접한 연관이 있으며, HSPs의 변화에 영향을 줄 수 있음을 주장했다. Bertotto et al. (2011)은 수온 스트레스에 의한 sea bass *Dicentrarchus labrax*의 cortisol과 HSP 70의 동반 상승을 보고했다. 하지만, Kim et al. (2020b)은 넙치 암모니아 내성 한계를 벗어난 암모니아 노출은 오히려 HSP 70의 감소를 유발할 수 있음을 보고했다. 본 연구의 낮은 pH에 의한 cortisol과 HSP 70의 상반된 결과가 나타났으며, HSP 70에서 오히려 감소를 나타낸 것은 방어 메커니즘을 벗어난 pH에 의한 기능의 소실로 판단된다.

본 실험에서 급격한 pH의 변화는 혈액 성분 및 혈장 성분에 변화를 초래하였다. 또한 pH 변화에 의한 스트레스 반응에도 변화를 나타내었다. 또한 pH 4의 산성의 노출은 넙치 혈액 hemoglobin의 유의한 감소 및 혈장 calcium, glucose, cholesterol 및 ALT의 유의한 증가를 나타내었다. 또한 스트레스 지표인 HSP 70에서 유의한 억제 및 cortisol에서 유의한 증가를 유발했다. 본 실험의 결과 pH 4 수준의 산성은 넙치의 혈액학적 성상 및 스트레스 반응에 영향을 줄 수 있으며, 급격한 변화 pH 3 및 pH 9는 폐사를 유발할 수 있음을 나타낸다. 일반 해수에서는 pH는 완충 작용이 있어 큰 변화는 나타나지 않지만, 바이오플락과 같은 폐쇄식 양식기법에서는 꾸준한 변화가 나타날 수 있다. 따라서 본 연구의 결과는 넙치의 급성 pH 내성 한계 기준을 제시하여 줄 것이다.

사 사

이 논문은 2020년 국립수산물학원 '바이오플락을 이용한 해수양식 기술개발(대하, 넙치) (R2020012)'의 지원으로 수행된 연구입니다.

References

- Agrahari S, Pandey KC and Gopal K. 2007a. Biochemical alteration induced by monocrotophos in the blood plasma of fish, *Channa punctatus* (Bloch). *Pestic Biochem Physiol* 88, 268-272. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2007.01.001>.
- Agrahari S, Pandey KC and Gopal K. 2007b. Biochemical alteration induced by monocrotophos in the blood plasma of fish, *Channa punctatus* (Bloch). *Pestic Biochem Physiol* 88, 268-272. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2007.01.001>.
- Andrewartha SJ, Tazawa H and Burggren WW. 2011. Hematocrit and blood osmolality in developing chicken embryos *Gallus gallus*: in vivo and in vitro regulation. *Respir Physiol Neurobiol* 179, 142-150. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2011.07.010>.
- Bertotto D, Poltronieri C, Negrato E, Richard J, Pascoli F, Simontacchi C and Radaelli G. 2011. Whole body cortisol and expression of HSP70, IGF-I and MSTN in early development of sea bass subjected to heat shock. *Gen Comp Endocr* 174, 44-50. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.08.003>.
- Carvalho CS and Fernandes MN. 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. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.05.018>.
- Celi M, Vazzana M, Sanfratello MA and Parrinello N. 2012. Elevated cortisol modulates Hsp70 and Hsp90 gene expression and protein in sea bass head kidney and isolated leukocytes. *Gen Comp Endocr* 175, 424-431. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.11.037>.
- Das PC, Ayyappan S and Jena JK. 2006. Haematological changes in the three Indian major carps, *Catla catla* (Hamilton), *Labeo rohita* (Hamilton) and *Cirrhinus mrigala* (Hamilton) exposed to acidic and alkaline water pH. *Aquaculture* 256, 80-87. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.02.019>.
- Ghanbari M, Jami M, Domig KJ and Kneifel W. 2012. Long-term effects of water pH changes on hematological parameters in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Afr J Biotechnol* 11, 3153-3159. <http://doi.org/10.5897/AJB10.1244>.
- Guo SL, Guan RZ, Feng JJ and Chen CQ. 2010. Influences of blood and biochemical parameters on American eels *Anguilla rostrata* challenged by *Aeromonas hydrophila*. *J Jimei Univ Nat Sci* 15, 93-97. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1007-7405.2010.02.003>.
- Hur JW, Park IS and Chang YJ. 2007. Physiological responses of the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, to a series stress during the transportation process. *Ichthyol Res* 54, 32-37. <https://doi.org/10.1007/s10228-006-0370-2>.
- Ip YK, Chew SF and Randall DJ. 2001. Ammonia toxicity, tolerance, and excretion. *Fish Physiol* 20, 109-148. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(01\)20005-3](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(01)20005-3).
- Kim JH and Kang JC. 2016a. The immune responses and expression of metallothionein (MT) gene and heat shock protein 70 (HSP 70) in juvenile rockfish, *Sebastes schlegelii*, exposed to waterborne arsenic (As³⁺). *Environ Toxicol Pharmacol* 47, 136-141. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.09.018>.
- Kim JH and Kang JC. 2016b. The toxic effects on the stress and immune responses in juvenile rockfish, *Sebastes schlegelii* exposed to hexavalent chromium. *Environ Toxicol Pharmacol* 43, 128-133. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.03.008>.
- Kim JH, Sohn S, Kim SK and Hur YB. 2020a. Effects on hematological parameters, antioxidant and immune responses, AChE, and stress indicators of olive flounders, *Paralichthys olivaceus*, raised in bio-floc and seawater challenged by

- Edwardsiella tarda*. Fish Shellfish Immunol 97, 194-203. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.12.011>.
- Kim JH, Cho JH, Kim SR, Hur YB. 2020b. Toxic effects of waterborne ammonia exposure on hematological parameters, oxidative stress and stress indicators of juvenile hybrid grouper, *Epinephelus lanceolatus* ♂ × *Epinephelus fuscoguttatus* ♀. Environ Toxicol Pharmacol 80, 103453. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103453>.
- Kumai Y, Bahubeshi A, Steele S and Perry SF. 2011. Strategies for maintaining Na⁺ balance in zebrafish (*Danio rerio*) during prolonged exposure to acidic water. Comp Biochem Physiol A 160, 52-62. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.05.001>.
- Kwong RW, Kumai Y and Perry SF. 2014. The physiology of fish at low pH: the zebrafish as a model system. J Exp Biol 217, 651-662. <http://doi.org/10.1242/jeb.091603>.
- Laurent P, Wilkie MP, Chevalier C and Wood CM. 2000. The effect of highly alkaline water (pH 9.5) on the morphology and morphometry of chloride cells and pavement cells in the gills of the freshwater rainbow trout: relationship to ionic transport and ammonia excretion. Can J Zool 78, 307-319. <https://doi.org/10.1139/z99-207>.
- Ogawa K, Ito F, Nagae M, Nishimura T, Yamaguchi M and Ishimatsu A. 2001. Effects of acid stress on reproductive functions in immature carp, *Cyprinus carpio*. Water Air Soil Pollut 130, 887-892. <https://doi.org/10.1023/A:1013803517375>.
- Packer RK and Dunson WA. 1970. Effects of low environmental pH on blood pH and sodium balance of brook trout. J Exp Zool 174, 65-71. <https://doi.org/10.1002/jez.1401740107>.
- Sawhney AK and Johal MS. 2000. Erythrocyte alterations induced by malathion in *Channa punctatus* (Bloch). Bull Environ Contam Toxicol 64, 398-405. <https://doi.org/10.1007/s001280000014>.
- Scott DM, Lucas MC and Wilson RW. 2005. The effect of high pH on ion balance, nitrogen excretion and behavior in freshwater fish from an eutrophic lake: a laboratory and field study. Aquat Toxicol 73, 31-43. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.12.013>.
- van Dijk PLM, van den Thillart GEEJM, Balm P and Bonga SW. 1993. The influence of gradual water acidification on the acid/base status and plasma hormone levels in carp. J Fish Biol 42 661-671. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1993.tb00375.x>.
- Vijayan MM, Pereira C, Grau EG and Iwama GK. 1997. Metabolic responses associated with confinement stress in tilapia: the role of cortisol. Comp Biochem Physiol C 116, 89-95. [https://doi.org/10.1016/S0742-8413\(96\)00124-7](https://doi.org/10.1016/S0742-8413(96)00124-7).
- Vuorinen PJ, Keinänen M, Lappalainen A, Peuranen S and Rask M. 2004. Physiological status of whitefish (*Coregonus lavaretus pallasii*) prior to spawning in lakes of differing acidity. Aquat Sci 66, 305-314. <https://doi.org/10.1007/s00027-004-0696-7>.
- Wan J, Ge X, Liu B, Xie J, Cui S, Zhou M, Silei X and Chen R. 2014. Effect of dietary vitamin C on non-specific immunity and mRNA expression of three heat shock proteins (HSPs) in juvenile *Megalobrama amblycephala* under pH stress. Aquaculture 434, 325-333. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.08.043>.
- Wurts WA. 2003. Daily pH cycle and ammonia toxicity. J World Aquacult Soc 34, 20-21.
- Yang JL and Chen HC. 2003. Effects of gallium on common carp *Cyprinus carpio*: acute test, serum biochemistry, and erythrocyte morphology. Chemosphere 53, 877-882. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00657-X](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00657-X).
- Zelennikov OV, Mosyagina MV and Fedorov KE. 1999. Oogenesis inhibition, plasma steroid levels, and morphometric changes in the hypophysis in Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedti* Brandt) exposed to low environmental pH. Aquat Toxicol 46, 33-42. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(98\)00113-1](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(98)00113-1).
- Zahangir MM, Haque F, Mostakim GM and Islam MS. 2015. Secondary stress responses of zebrafish to different pH: evaluation in a seasonal manner. Aquac Rep 2, 91-96. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2015.08.008>.
- Zhou C, Lin H, Huang Z, Wang J, Wang Y and Yu W. 2015. Effects of dietary soybean isoflavones on non-specific immune responses and hepatic antioxidant abilities and mRNA expression of two heat shock proteins (HSPs) in juvenile golden pompano *Trachinotus ovatus* under pH stress. Fish Shellfish Immunol 47, 1043-1053. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.10.036>.