

# 수인성 암모니아 급성노출에 의한 향어, *Cyprinus carpio nudus*의 반수치사농도, 혈액학적 성상 및 혈장성분의 영향

정지호 · 은지수 · 주창훈 · 조아현 · 홍수민 · 김준환<sup>†</sup>

선문대학교 수산생명의학과

## Effects on lethal concentration 50%, hematological parameters and plasma components of mirror carp, *Cyprinus carpio nudus* exposed to waterborne ammonia

Ji-Ho Jeong, Ji-Su Eun, Chang-Hoon Joo, A-Hyun Jo,  
Su-Min Hong and Jun-Hwan Kim<sup>†</sup>

Sun Moon University, Department of Aquatic Life and Medical Science, Asan, Korea

Mirror carp, *Cyprinus carpio nudus* (weight 26.2±3.1 g, length 11.8±0.5 cm) were exposed to waterborne total ammonia nitrogen (TAN) at 0, 2, 4, 8, 16, 32, 64 and 128 mg TAN/L. The lethal concentration 50 (LC<sub>50</sub>) of mirror carp, *C. carpio nudus* exposed to waterborne ammonia was 60.38 mg TAN/L. The red blood cell (RBC) count was significantly reduced by ammonia exposure, whereas there was no significant changes in the hemoglobin concentration and hematocrit value. In the plasma components, glucose, total protein, aspartate aminotransferase (AST) and alkaline phosphatase (ALP) were significantly increased by ammonia exposure. The results of this study suggest that the ammonia exposure to *C. carpio nudus* affects the survival rates, hematological parameters and plasma components as toxicity.

**Key words:** Ammonia exposure, LC<sub>50</sub>, Hematological parameters, Plasma components, Mirror carp

### 서 론

암모니아는 생물학적 질소 고정 및 유기물의 대사분해로 인해 자연적으로 발생하고, 도시 하수 배출 및 농업 유출수로 수계로 유입될 수 있다(Fan et al., 2021). 암모니아는 어류의 단백질 대사로 발생하는 질소 노폐물의 중간 산물로, 암모니아는 과도한 사료공급, 높은 사육밀도와 같은 양식장 관

리 문제로 인하여 사육수 내에 높은 수준으로 증가될 수 있다(Yousefi et al., 2021a; Wright and Wood, 2012). 암모니아가 수중에 높은 수준으로 존재하면, 생물의 어체 내로 흡수되어 수중 생물에게 독성으로 작용할 수 있다(Yousefi et al., 2021b; Wilkie, 1997).

수계에 존재하는 높은 수준의 암모니아는 수산생물의 특정 장기에 축적을 일으킬 수 있고 이러한 암모니아 축적은 수산생물의 성장률, 사료 효율 및 생존율을 감소시킨다(Magouz et al., 2021). 또한 암모니아 노출은 수산생물의 무기력증, 경련, 평형

<sup>†</sup>Corresponding author: Jun-Hwan Kim  
Tel: +82-41-530-2206  
E-mail: junhwan1982@hanmail.net

상실, 측면 유영, 선회 유영 등의 신경 장애를 유발한다(zeitoun et al., 2016). 암모니아는 수산생물의 아가미를 통해 체내로 유입되고, 아가미 조직의 병리학적 변형을 유발하며 호흡량을 증가시키고 아가미 상피를 손상시킬 수 있다(Fan et al., 2021). 아가미를 통해 유입된 암모니아는 어류의 간, 신장, 비장 및 갑상선 조직에 손상을 유발하고, 순환계에 유입된 암모니아는 염증 반응을 일으켜 면역저하 및 교란을 일으킨다(Yang et al., 2010; Yousefi et al., 2021b).

반수치사농도(LC<sub>50</sub>, Lethal Concentration 50%)는 독성 노출 실험 조건에서 독성 물질에 의한 실험어의 50% 폐사를 일으키는 농도로, 급성 독성 노출 실험에서 많이 이용되는 지표이다(Morales et al., 2021). 독성영향은 수온, pH 및 경도와 같은 수질환경적 요인과 독성물질이 가지고 있는 화학적 특성, 그리고 생물의 종, 크기, 성별 및 발달단계와 같은 생물학적 요인에 의해 영향을 받는다(Bu-Olayan and Thomas, 2008). LC<sub>50</sub>은 독성물질에 대한 실험어의 민감도를 나타내며 수치가 높을수록 독성물질에 대한 생물의 내성한계가 높다는 것을 의미한다(Gu et al., 2021). 따라서 LC<sub>50</sub>을 이용해 독성물질의 절대적인 독성영향 평가를 할 수 있으며, 생물 종의 차이에 따른 상대적 독성영향에 대한 평가도 가능하다.

어류의 혈액학적 성상은 어류의 상태를 나타내는 생리학적 지표로 사용되며, 어류의 건강 상태를 파악하고 독성 물질에 노출된 물고기의 구조적, 기능적 상태를 진단하는 데 사용될 수 있다(Debbarma et al., 2021; Seriani et al., 2011). 혈액학적 성상은 연령, 성별과 같은 생물학적 요인, 영양 상태 뿐만 아니라, 독성물질의 노출 및 병원체 감염 등에 의한 스트레스에 의해 영향을 받을 수 있다(Molayemraftar et al., 2022). 높은 수준의 암모니아는 어류의 혈액과 조직의 암모니아 수치를 증가시켜 혈액 pH 상승, 삼투압 장애, 조직의 산소 소비 증가를 야기한다(Sherif et al., 2014). 또한 암모니아는 무산소적 해당과정을 유도하여 젖산의 축적을 유발하고 헤모글로빈의 산소 결합 용량을 방해하여 저산소증을 유발할 수 있다(Molayemraftar et al., 2022).

향어(Mirror carp, *Cyprinus carpio nudus*)는 우리나라에서 이스라엘 잉어, 가죽 잉어 등으로 불리며 성장이 빠르고 질병에 대한 저항성이 강해 가장 많이 양식되고 있는 내수면 양식 어종 중 하나이다(Lee et al., 2015). 수중에 존재하는 높은 수준의 암모니아는 수산생물에게 치명적인 독성으로 작용하여 대량폐사를 유발할 수 있다(Yu et al., 2021). 하지만 암모니아 급성노출에 따른 향어의 독성기준 지표에 대한 연구는 거의 이루어지지 않고 있다. 따라서 본연구의 목적은 수인성 암모니아 노출에 따른 향어의 혈액학적 성상 및 혈장 성분의 변화를 통해 생리적 기준 지표를 제시하고 반수치사농도의 확인을 통해 암모니아 독성에 대한 내성 한계에 기준지표를 마련하는 데 있다.

## 재료 및 방법

### 실험어 및 실험환경

본 실험에 이용된 향어(무게 26.2±3.1 g, 전장 11.8 ±0.5 cm)는 아산 인근의 종묘생산장에서 분양 받아 실험실 환경에서 사육 양성한 개체를 이용하였다. 실험은 실험 전 2주간 실험실 환경에서 순치를 실시하였으며, 실험수조는 30L 유리 사각수조를 이용하여, 8개의 농도구간(0, 2, 4, 8, 16, 32, 64 및 128 mg TAN(total ammonia nitrogen)/L)으로 96시간 급성 노출을 실시하였다. 실험은 총 80마리(암모니아 농도구간 8개 x 실험구간 당 5마리 x 반복구 2개)를 이용하여 노출을 진행하였으며, 실험 기간 중 수질(수온, 용존산소 및 pH)은 휴대용 수질 분석기(YSI-Professional plus, YSI Inc., USA)를 이용하여 측정하였으며, 암모니아, 아질산, 질산 및 인산염은 해양환경공정시험방법(해양수산부)을 이용하여 분석을 실시하였다(Table 1). 본 연구에서 암모니아 노출은 염화암모늄(NH<sub>4</sub>Cl, Ammonium chloride)를 이용하여, 표준원액 10,000 mg TAN/L를 만들었으며 각 수조에 농도에 맞게 노출을 실시하였으며, 실험 시작 암모니아 농도구간 별 실제 암모니아 농도는 Table 2와 같다. 본 연구에서 노출은 지수식으로 표준원액을 각 암모니아 농도 구간에 희석(수돗물)하여 만들어서 주었으며, aeration을 통해 충분한 산소를 원활히 공급해 주었다. 96

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

Item	Value
Temperature (°C)	17.3±0.3
pH	7.71±0.05
Dissolved oxygen (mg/L)	7.36±0.30
Ammonia (µg/L)	1.05±0.52
Nitrite (µg/L)	5.1±0.21
Nitrate (mg/L)	0.49±0.03
Phosphate (µg/L)	7.6±0.4

시간 급성 시간과 충분한 낮은 사육 밀도로 인해 별도의 환수는 실시하지 않았다.

**반수치사농도(LC50)**

수인성 암모니아 노출에 의한 반수치사농도를 확인하기 위해, 암모니아 노출 후 0, 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 및 96시간 수조 별 폐사 유무를 확인하였으며, 폐사 개체는 관찰 즉시 제거해주었다. 96시간 후 암모니아 노출에 의한 최종 폐사 개체를 바탕으로 통계프로그램(SPSS Inc, Chicago, IL, USA, probit model)을 이용하여 반수치사농도 수치를 산출하였다.

**혈액성상**

혈액학적 분석은 반수치사농도 산정을 위한 수인성 암모니아 노출 96시간 후 살아있는 개체를 이용하여 채혈을 실시하였다. 채혈은 헤파린(Sigma chemical, St. Louis, MO, USA) 처리된 주사기를 사용하였으며, 채혈 직후 헤모글로빈(hemoglobin), 적혈구 용적(hematocrit) 및 적혈구수(RBC count)를 즉시 분석하였다. Hemoglobin 수치는 임상용 kit (Asan Pharm. Co., Ltd)를 이용하여 Cyan-methemoglobin법으로 측정하였다. Hematocrit는 모세관 내로 혈액을 넣어, microhematocrit centrifuge (VS-12000, Korea)에서 12,000 rpm, 10분간 원심분리 후 micro-hematocrit reader를 이용하여 측정하였다.

RBC count는 Hendrick’s diluting solution으로 혈액을 400배 희석 후, hemo-cytometer (improved Neubauer, Germany)를 이용하여 광학현미경으로 계수하였다.

Hemoglobin, hematocrit 및 RBC count 결과를 바탕으로 평균적혈구용적(MCV: mean corpuscular volume), 평균적혈구혈색소량(MCH: mean corpuscular hemoglobin) 및 평균적혈구헤모글로빈농도(MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration)는 아래의 방식으로 산출하였다.

$$MCV (\mu L) = \text{hematocrit} (\%) / \text{적혈구수}(10^6 / \mu L) \times 10$$

$$MCH (\text{pg}) = \text{hemoglobin}(\text{g/dL}) / \text{적혈구수}(10^6 / \mu L) \times 10$$

$$MCHC (\%) = \text{hemoglobin}(\text{g/dL}) / \text{hematocrit} (\%) \times 100$$

**혈장성분 분석**

수인성 암모니아 노출에 따른 혈장 성분의 변화를 분석하기 위해 채취한 혈액을 4°C에서 3000 x g로 15분간 원심분리 후 혈장을 분리하였다. 혈장 무기성분으로 칼슘(calcium), 마그네슘(magnesium)을 측정하였다. 칼슘은 OCPC법, 마그네슘은 Xylydyl blue-I 법에 따라 임상용 kit (Asan Pharm. Co., Ltd)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 kit(Asan Pharm. Co., Ltd)를 이용하여 측정하였다. 혈장 효소활성으로 AST (aspartate aminotransferase), ALT (alanine aminotransferase) 및 ALP (alkaline phosphatase)를 측정하였다. AST와 ALT는 505 nm에서 Reitman-Frankel법, ALP는 King-King법으로 500 nm에서 임상용 kit (Asan Pharm. Co., Ltd)를 이용하여 분석하였다.

Table 2. Analyzed waterborne ammonia concentration (mg TAN/L) from each source.

		Ammonia concentration (mg TAN/L)						
Nominal concentrations	Control	2	4	8	16	32	64	128
Measured concentrations	0.01	2.16	3.85	8.26	17.3	34.7	67.3	132.7

### 통계분석

본 실험분석은 수인성 암모니아 각 농도구간에 서 5마리를 분석에 이용하였고, 모든 실험은 3반복 분석으로 이루어졌다. 실험 분석 결과에 대한 통계학적 유의성은 SPSS 통계 프로그램(SPSS Inc.)을 이용하여 ANOVA test를 실시하여 Tukey's multiple range test를 통해  $P < 0.05$  일 때 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

### 동물실험윤리 승인

본 실험은 선문대학교 동물실험윤리위원회를 통해 실험방법 및 진행이 동물실험윤리에 적합하다는 승인(SM-2021-05-01)을 통해 연구가 수행되었다.

## 결 과

### 생존율 및 반수치사농도(LC<sub>50</sub>)

수인성 암모니아 노출에 따른 향어의 생존율은 Fig. 1에 나타내었다. 대조구에서 32 mg TAN/L의 노출에서는 폐사 개체는 발견되지 않았으며, 64 mg TAN/L에서는 노출 12시간부터 폐사가 발생하여 96시간에 5마리 중 4마리가 폐사하여 80% 폐사율이 나타났다. 128 mg TAN/L에서는 노출 3시간부터 폐사가 발생하여 12시간 이후 전량이 폐사하였다. 수인성 암모니아 노출에 따른 향어의 반수치사농도(Lethal concentration 50, LC<sub>50</sub>)는 Table 3에 나타내었다. 수인성 암모니아 노출에 따른 향어의 LC<sub>50</sub>은 60.38 mg TAN/L로 나타났다.

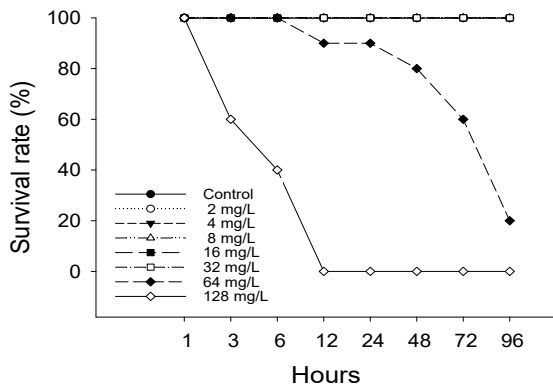


Fig. 1. Survival rate of mirror carp, *Cyprinus carpio nudus* exposed to waterborne ammonia for 96 hours.

Table 3. Lethal concentration (LC<sub>50</sub>) of mirror carp, *Cyprinus carpio nudus* exposed to waterborne ammonia for 48 hours and 96 hours

Probability	48h (mg TAN/L)	96h (mg TAN/L)
0.01	44.61	40.76
0.10	59.26	49.57
0.20	64.01	53.28
0.30	69.16	55.96
0.40	71.70	58.24
0.50	75.01	60.38
0.60	79.32	62.51
0.70	81.87	64.80
0.80	88.01	67.47
0.90	91.76	71.18
0.99	105.42	79.99

### 혈액학적 성상

수인성 암모니아 노출에 따른 향어의 혈액학적 성상은 Fig. 2에 나타내었다. 향어의 hemoglobin concentration과 hematocrit value는 수인성 암모니아 노출에 의해 유의적인 변화는 나타나지 않았다. 하지만 RBC count는 암모니아 2 mg TAN/L 이상의 농도에서 유의적으로 감소하였다( $P < 0.05$ ). Hemoglobin, hematocrit 및 RBC count 결과를 바탕으로 MCV( $\mu$ L) 및 MCH(pg)은 수인성 암모니아 2 mg TAN/L 이상의 농도에서 유의적으로 증가하였다( $P < 0.05$ ). 하지만, MCHC(%)는 수인성 암모니아 노출에 따른 유의적인 변화는 나타나지 않았다.

### 혈장 성분

수인성 암모니아 노출에 따른 향어의 혈장 무기 성분은 Fig. 3에 나타내었다. 혈장 calcium 및 magnesium에서 수인성 암모니아 노출에 따른 유의적인 변화는 나타나지 않았다.

수인성 암모니아 노출에 따른 향어의 혈장 유기 성분은 Fig. 4에 나타내었다. 혈장 glucose는 노출 48시간에서 64 mg TAN/L의 노출농도에서 유의적인 증가를 나타내었지만( $P < 0.05$ ), 노출 96시간에서 유의적 변화는 나타나지 않았다. 혈장 total protein은 암모니아 2 mg TAN/L 이상의 농도에서 유의적인 증가를 나타내었다( $P < 0.05$ ).

수인성 암모니아 노출에 따른 향어의 혈장 효소

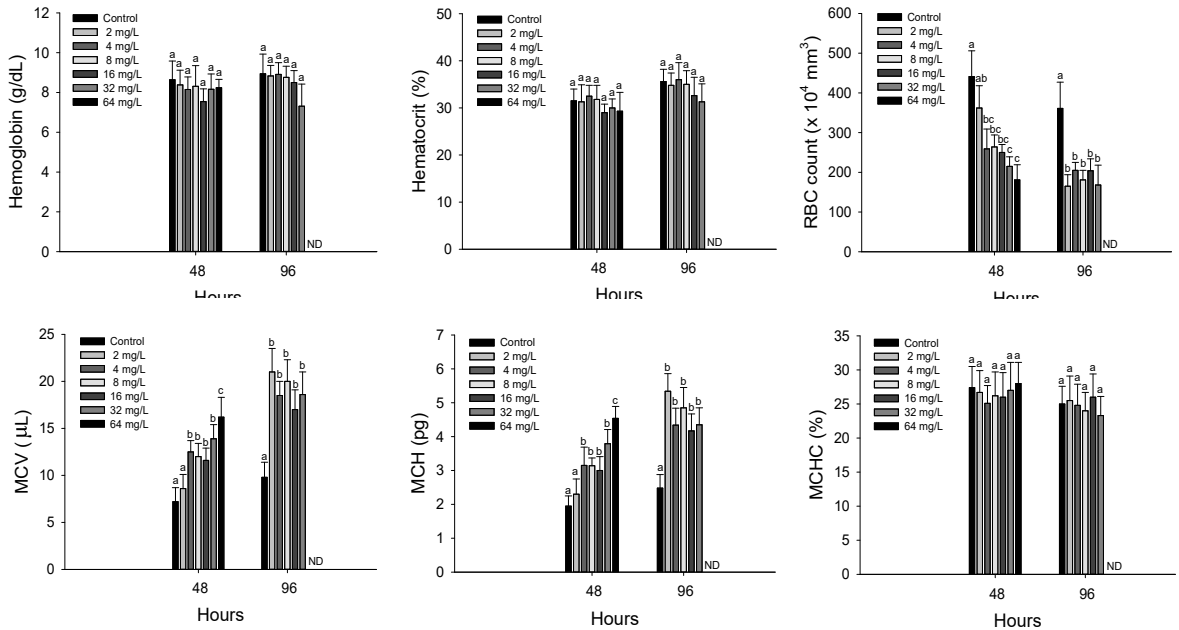


Fig. 2. Hematological parameters of mirror carp, *Cyprinus carpio nudus* exposed to waterborne ammonia for 96 hours. Values with different letters indicate significantly different at 48 and 96 hours ( $P < 0.05$ ) after one-way ANOVA following Tukey's multiple range test.

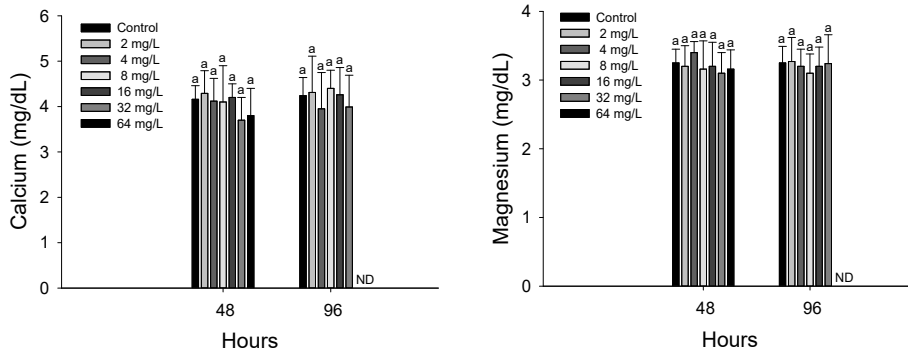


Fig. 3. Inorganic plasma components of mirror carp, *Cyprinus carpio nudus* exposed to waterborne ammonia for 96 hours. Values with different letters indicate significantly different at 48 and 96 hours ( $P < 0.05$ ) after one-way ANOVA following Tukey's multiple range test.

성분은 Fig. 5에 나타내었다. 혈장 AST는 4 mg TAN/L 이상의 수인성 암모니아 노출에 의해 유의적으로 증가하였다( $P < 0.05$ ). 혈장 ALP는 32 mg TAN/L 이상의 수인성 암모니아 노출에 의해 유의적으로 증가하였다( $P < 0.05$ ).

## 고찰

암모니아는 혈액과 조직에 축적되어 수생 동물의 성장률 저하, 신경독성, 면역억제 등의 치명적인 독성으로 작용하여 높은 폐사를 유발한다(Shin et al., 2016). 본 연구에서 수인성 암모니아 노출에 따른 항어의 폐사는 64 mg TAN/L에서부터 나타났

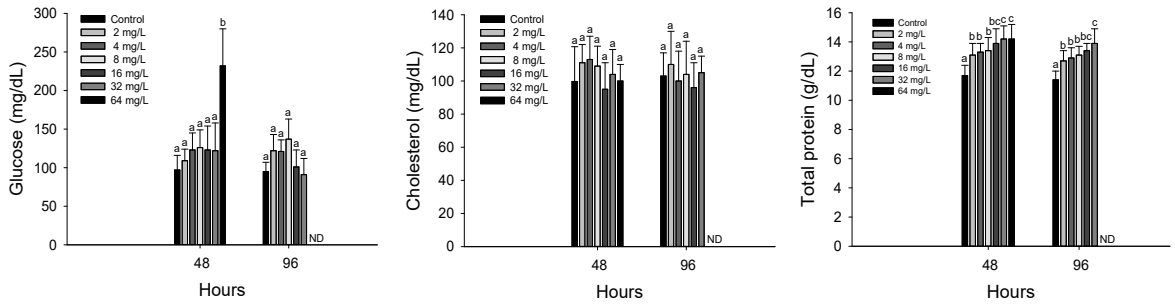


Fig. 4. Organic plasma components of mirror carp, *Cyprinus carpio nudus* exposed to waterborne ammonia for 96 hours. Values with different letters indicate significantly different at 48 and 96 hours ( $P < 0.05$ ) after one-way ANOVA following Tukey's multiple range test.

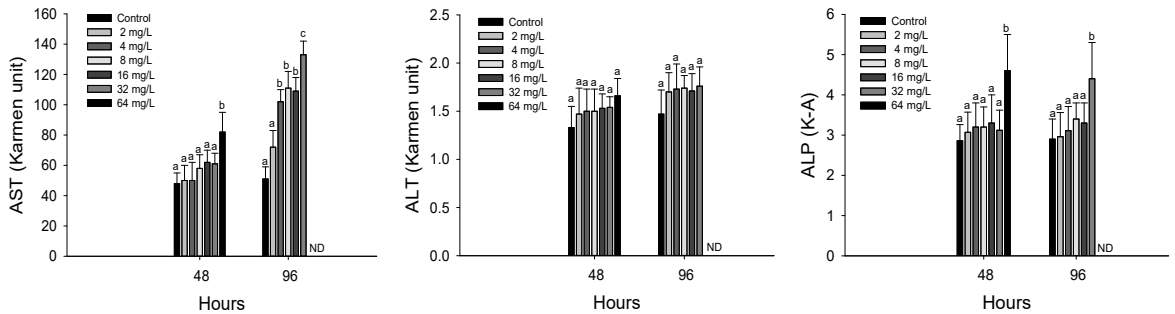


Fig. 5. Enzymatic plasma components of mirror carp, *Cyprinus carpio nudus* exposed to waterborne ammonia for 96 hours. Values with different letters indicate significantly different at 48 and 96 hours ( $P < 0.05$ ) after one-way ANOVA following Tukey's multiple range test.

고, 128 mg TAN/L에서 100% 폐사를 나타냈다. 48 시간 수인성 암모니아 노출에 따른 향어의 반수치 사농도는 75.01 mg TAN/L로 나타났고, 96시간 수인성 암모니아 노출에 따른 향어의 반수치사농도는 60.38 mg TAN/L로 나타났다. Aranda-Morales et al. (2021)은 tropical gar, *Atractosteus tropicus*의 수인성 암모니아의 96시간 급성노출에서 100.20 mg TAN/L의 반수치사농도를 나타내었다고 보고했다. Boudreaux et al. (2007)은 암모니아 급성 노출에 따른 spotted gar, *Lepisosteus oculatus*의 96시간 반수치사농도는 35 mg TAN/L라고 보고하였다. Deguchi et al. (2007) 역시 goldfish, *Carassius auratus*의 수인성 암모니아의 96시간 급성노출에 따른 반수치사농도는 80.11 mg TAN/L로 나타났다고 보고하였다. Bhakta (2006)는 민물고기 4종 [catla, *Catla catla*: 15 mg TAN/L, bata, *Labeo bata*: 10 mg TAN/L, common carp, *Cyprinus carpio*: 25 mg TAN/L 및

tilapia, *Oreochromis mossambica*: 30 mg TAN/L]의 암모니아 노출에 따른 어종 별 암모니아 내성 차이를 보고하였다. 수온, 염분, pH 및 경도와 같은 수질환경적 요인 또한 암모니아 독성에 영향을 미치는 중요한 요인이기 때문에 향후 수질환경적 요인에 따른 암모니아 독성에 대한 추가적인 연구가 이루어져야 할 것이다.

혈액학적 성상은 어류의 건강상태를 평가할 수 있는 지표이며, 독성노출에 따른 어류의 생리학적 영향을 평가할 수 있다(Zhang et al., 2018). Gao et al. (2021)는 급성 암모니아 노출 실험을 통하여 Tiger puffer, *Takifugu rubripes*에서 hemoglobin, hematocrit 및 RBC count의 유의적 감소를 보고하였고, 이로 인한 빈혈 발생을 주장했다. Yang et al. (2010)는 급성 암모니아 노출 실험을 통해 crucian carp, *C. auratus*에서 hemoglobin과 RBC count의 유의적 감소를 보였고, 이는 혈액 내 저산소증

에 의한 것으로 보고하였다. Molayemraftar et al. (2022)는 common carp, *C. carpio*가 암모니아 노출에 의한 hemoglobin과 RBC count의 유의적 감소를 보고하였다. 암모니아 노출은 어류 아가미 기능 손상 및 삼투압 조절 장애 또는 적혈구 형성 조직 및 용혈을 발생시키고 이로 인해 RBC count의 유의적 감소가 나타날 수 있다고 보고하였다. Mangang and Pandey (2021)역시 암모니아에 노출에 의한 pengba, *Osteobrama belangeri*에서 hemoglobin과 hematocrit의 유의적 감소를 보고하였다. 그리고 hemoglobin과 hematocrit의 감소와 함께 MCV, MCH, MCHC의 유의적 감소를 보였고, 이는 독성 노출에 따른 미숙 적혈구의 증가 및 hemoglobin 생산 장애에 의한 것이라 주장하였다. 반면에 Zeitoun et al. (2016)은 암모니아 노출로 인해 Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*에서 MCV 수치의 유의적 증가를 보였고, 이는 암모니아 노출에 따른 혈액성상의 생리적 변화에 따른 적혈구 용적의 증가에 따른 것으로 보고하였다. 본 연구에서 수인성 암모니아 급성 노출에 따른 향어의 hemoglobin과 hematocrit의 감소하는 경향은 나타나지만 유의적 변화는 관찰되지 않았다. 암모니아 노출에 따른 향어의 RBC count는 유의적 감소를 보였으며, MCV 및 MCH는 유의적 증가를 나타냈다. 적혈구 수의 유의적인 감소는 암모니아 노출에 따른 혈액독성으로 인한 세포 용혈에 따른 것으로 판단된다. 적혈구 수가 감소된 것과 대비되게 적혈구 용적에는 유의적인 변화는 나타나지 않았으며, 이는 암모니아 노출에 따른 적혈구 세포의 종창에 의한 것으로 판단된다. Molayemraftar et al. (2022) 역시 급성 암모니아 독성 노출에 의해 적혈구의 종창이 발생할 수 있다고 주장하였다. MCV 및 MCH의 유의적인 증가는 적혈구 용적 및 헤모글로빈 수치에 비해 적혈구 수의 유의적인 감소에 의한 증가로 판단된다. 혈액학적 성장에서 암모니아 노출에 따른 향어, *Cyprinus carpio nudus*의 독성 영향은 제한적으로 나타났지만, 일부 지표에서는 독성으로 작용하여 유의적 변화를 나타내었다. 일반적으로 독성물질 노출에 따른 혈액성상에 대한 변화는 동시적으로 나타나지만, 독성물질의 노출기간, 독성정도 및 생물학적 관계에 따라 순차적으로 나타날 수도 있으며, 이에

따른 결과로 본 연구에서 적혈구 수에서 선택적인 감소가 나타났을 것으로 판단된다.

혈장 무기성분의 calcium과 magnesium은 삼투압 변화에 대한 주요 지표이며, 환경 변화에 의해 증가 또는 감소될 수 있다(Kim et al., 2017a). Paterson et al. (2003)는 암모니아 노출에 따른 Asian sea bass, *Lates calcarifer*의 혈장 무기성분의 calcium과 magnesium의 유의적 증가를 보고하였다. 신장 기능 이상으로 인한 전해질 배출 이상의 삼투압 조절 장애에 따른 것으로 보고하였다. 반면, Shin et al. (2016)는 암모니아에 노출된 rockfish, *Sebastes schlegelii*의 calcium과 magnesium의 유의적 변화는 관찰되지 않았다고 보고하였다. 본 연구 역시 수인성 암모니아 노출에 따른 향어의 혈장 무기성분인 calcium과 magnesium의 유의적 변화는 관찰되지 않았으며, 이는 암모니아 노출에 따른 혈장 무기성분에서는 제한적으로 나타나지 않았음을 의미한다.

혈장 유기성분 중 glucose는 어류의 스트레스로 인한 세포 대사 증가에 의해 에너지 수요를 증가시켜 독성 노출에 의한 어류의 스트레스를 평가할 수 있는 주요한 지표이다(Kim et al., 2017b). Das et al. (2004)는 암모니아 노출 된 mrigal, *Cirrhinus mrigala*에서 혈장 glucose의 유의적 증가를 보고했으며, 이는 암모니아 노출로 인한 스트레스 증가라고 주장하였다. 암모니아 노출에 의한 저산소증은 젖산 대사를 활성화하여 혈장 내 glucose의 증가를 야기한다(Zhao et al., 2020) Barbieri and Bondioli (2015)는 암모니아의 급성 독성 실험에서 pacu, *Piaractus mesopotamicus* 혈장 glucose의 유의적 증가를 보고하였다. 암모니아 노출에 따른 외부스트레스 작용으로 인해 에너지 요구량이 증가함에 따라 간에서 glycogen을 분해하여 혈중 glucose의 증가를 유발할 수 있다(do Carmo Neves et al., 2022). Ananias et al. (2022)은 스트레스 환경에서 어류는 catecholamine 및 corticosteroid를 방출하여 환경에 적응하기 위해 에너지를 제공하므로 혈장 glucose가 증가한다고 주장했다. 본 연구에서는 48시간에서 유의적 증가를 나타냈지만, 96시간의 노출에서는 다시 정상 수준으로 회복되는 경향을 보였다. Abbas (2006) 역시 암모니아 노출에 따른 *C. carpio*의 초기 glucose의 유의적 증가 이후 다시 회복하였

다고 보고했다. 이는 노출 초기 생리적 스트레스로 인한 glucose가 일시적인 증가 후 항상성 회복을 위한 복구라고 판단된다.

혈장 유기성분인 cholesterol은 세포막의 필수 구성 요소이며, 모든 스테로이드 호르몬의 전구물질로 알려져있다(Kumar and Banerjee, 2016). Liu et al. (2021)는 암모니아 노출에 의해 golden pompano, *Trachinotus ovatus* 혈장 cholesterol의 유의적 증가를 보고하였으며, 이는 암모니아 노출로 인한 손상을 억제하기 위한 어류의 대사 활성화의 결과라고 주장하였다. Shalaby et al. (2021) 역시 암모니아 노출에 따른 Nile tilapia, *O. niloticus* 혈장 cholesterol의 유의적 증가를 보고하였다. Cholesterol은 다양한 독성 노출에 의해 간 및 신장의 기능 부전과 스트레스 상황에서 혈장으로 방출되어 증가할 수 있다(Forouhar Vajargah et al., 2019). 혈장 cholesterol의 증가는 스테로이드의 생합성 변화와 지질의 분해, 그리고 미토콘드리아의 손상에 의해 유발될 수 있다(Prakash and Verma, 2019). 하지만 본 연구에서 수인성 암모니아 급성 노출에 따른 향어 혈장 cholesterol의 유의적 변화는 관찰되지 않았으며, 이는 암모니아 노출에 따른 혈장에서의 변화가 혈장 cholesterol에서는 제한적으로 나타나지 않았음을 의미한다.

Total protein은 독성 연구에서 어류의 생리학적 기능을 판단하는데 이용하는 주요 지표이다(Iftikhar and Hashmi, 2021). Shokr (2015)는 암모니아 노출에 따른 Nile tilapia, *O. niloticus* 혈장 total protein의 유의적 감소를 보고하였다. 어류는 외부 환경 스트레스로 인해 증가된 대사작용을 안정적으로 유지하기 위해 에너지원으로 단백질을 이용하여, 혈장 total protein이 감소될 수 있다(Jee et al., 2005). 반면에 Zhao et al. (2021)는 암모니아 노출에 따른 yellow catfish, *Pelteobagrus fulvidraco* 혈장 total protein의 유의적 증가를 보고하였으며, 이는 독성 노출 시 이에 대응하기 위한 방어기작으로 에너지 생산 증가에 의한 것이라고 주장했다. 혈장 total protein은 적혈구 손상에 따른 세포 내용물 방출에 의해 증가될 수 있다(Harikrishnan et al., 2010). Hoseini et al. (2021)은 독성 스트레스에 대한 면역

반응으로 면역 글로불린의 증가에 따른 단기적인 혈장 total protein의 증가를 유발될 수 있다고 주장하였다. 본 연구에서 수인성 암모니아 급성 노출에 따른 향어 혈장 total protein은 유의적 증가를 보였으며, 이는 수인성 암모니아 급성 노출에 대한 면역반응으로 인해 증가한 것으로 판단된다.

혈장 효소 성분은 어류의 건강도를 평가하는 중요한 지표이며, 그중 AST와 ALT는 간과 신장의 손상을 평가하기 위한 지표로 사용된다(Kavitha et al., 2010). ALP는 AST와 ALT 같이 독성 물질 노출에 따른 간 손상지표 관련 효소이며, 신장의 손상을 함께 평가할 수 있다. Carneiro et al. (2022)는 암모니아 노출에 따른 pacu, *P. mesopotamicus* 혈장 AST와 ALT의 유의적 증가를 보고하였고, 이는 암모니아 노출이 간세포의 손상을 일으켜 간 손상지표 관련 효소인 AST와 ALT의 세포 외 방출을 유발했다고 주장했다. Hoseini et al. (2019) 역시 암모니아 노출에 따른 common carp, *C. carpio* 간 손상지표 관련 효소인 AST, ALT 및 ALP의 유의적 증가를 보고하였고, 이는 암모니아 노출로 인해 간 손상지표 관련 효소인 AST와 ALT가 간과 신장에서 높은 농도로 존재하여 조절 기능에 영향을 미칠 수 있음을 나타냈다. 본 연구에서 수인성 암모니아 급성 노출에 따른 향어의 혈장 AST와 ALP는 유의적 증가를 보였고, 이는 수인성 암모니아 급성 노출로 인해 향어의 간, 신장 조직 손상에 따른 것으로 판단된다.

본 실험에서 고농도의 수인성 암모니아(> 64 mg TAN/L)의 급성 노출은 향어의 높은 폐사를 유발하였으며, 수인성 암모니아 노출에 따른 향어의 48시간 반수치사농도는 75.01 mg TAN/L, 96시간 반수치사농도는 60.38 mg TAN/L로 나타났다. 수인성 암모니아 급성 노출은 향어의 혈액학적 성상과 혈장 성분의 유의적 변화를 나타내었다. 본 연구의 결과는 영향농도 이상의 수인성 암모니아 급성 노출은 향어의 생존율, 혈액학적 성상 및 혈장성분에 독성으로 작용하여 생리적 영향을 나타내는 것을 확인하였다. 향후 다양한 환경조건에서의 암모니아 독성연구의 추가적인 연구를 통해 환경조건 별 암모니아의 독성영향에 대한 구명이 필요할 것이다.



## References

- Abbas, H.H.: Acute toxicity of ammonia to common carp fingerlings (*Cyprinus carpio*) at different pH levels. *Pak J Biol Sci* 9: 2215-2221, 2006.
- Ananias, I.D.M.C., de Melo, C.L., Costa, D.C., Ferreira, A.L., Martins, E.D.F.F., Takata, R. and Luz, R.K.: Menthol as anesthetic for juvenile *Lophiosilurus alexandri*: Induction and recovery time, ventilatory frequency, hematology and blood biochemistry. *Aquaculture*, 546:737373, 2022.
- Aranda-Morales, S.A., Peña-Marín, E.S., Jiménez-Martínez, L.D., Martínez-Burguete, T., Martínez-Bautista, G., Álvarez-Villagómez, C.S. and Álvarez-González, C.A.: Expression of ion transport proteins and routine metabolism in juveniles of tropical gar (*Atractosteus tropicus*) exposed to ammonia. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 250:109166, 2021.
- Barbieri, E. and Bondioli, A.C.V.: Acute toxicity of ammonia in Pacu fish (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) at different temperatures levels. *Aquac Res*, 46:565-571, 2015.
- Bhakta, J.N.: Ammonia toxicity to four freshwater fish species: *Catla catla*, *Labeo bata*, *Cyprinus carpio* and *Oreochromis mossambica*. *eJBio*, 2:39-41, 2006.
- Boudreaux, P.J., Ferrara, A.M. and Fontenot, Q.C.: Acute toxicity of ammonia to spotted gar, *Lepisosteus oculatus*, alligator gar, *Atractosteus spatula*, and paddlefish, *Polyodon spathula*. *J World Aquac Soc*, 38:322-325, 2007.
- Bu-Olayan, A.H. and Thomas, B.V.: Trace metals toxicity and bioaccumulation in mudskipper *Periophthalmus waltoni Koumans* 1941 (Gobiidae: Perciformes). *Turk J Fish Aquat Sci*, 8: 215-218, 2008.
- Carneiro, W.F., Castro, T.F.D., Reichel, T., de Castro Uzeda, P.L., Martínez-Palacios, C.A. and Murgas, L.D.S.: Diets containing *Arthrospira platensis* increase growth, modulate lipid metabolism, and reduce oxidative stress in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) exposed to ammonia. *Aquaculture*, 547:737402, 2022.
- Das, P.C., Ayyappan, S., Jena, J.K. and Das, B.K.: Acute toxicity of ammonia and its sub-lethal effects on selected haematological and enzymatic parameters of mrigal, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). *Aquac Res*, 35:134-143, 2004.
- Debbarma, R., Biswas, P. and Singh, S.K.: An integrated biomarker approach to assess the welfare status of *Ompok bimaculatus* (Pabda) in biofloc system with altered C/N ratio and subjected to acute ammonia stress. *Aquaculture*, 545:737184, 2021.
- Deguchi, Y., Toyozumi, T., Masuda, S., Yasuhara, A., Mohri, S., Yamada, M. and Kinai, N.: Evaluation of mutagenic activities of leachates in landfill sites by micronucleus test and comet assay using goldfish. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 627: 178-185, 2007.
- do Carmo Neves, L., e Silva, W.D.S., Ferreira, A.L., Favero, G.C., Beier, S.L., Palheta, G.D.A. and Luz, R.K.: Physiological responses of juvenile *Collossoma macropomum* after different periods of air exposure. *Aquaculture*, 548:737583, 2022.
- Fan, B., Li, J., Wang, X., Chen, J., Gao, X., Li, W. and Liu, Z.: Ammonia spatiotemporal distribution and risk assessment for freshwater species in aquatic ecosystem in China. *Ecotoxicol Environ Saf*, 207: 111541, 2021.
- Forouhar Vajargah, M., Imanpoor, M.R., Shabani, A., Hedayati, A. and Faggio, C.: Effect of long-term exposure of silver nanoparticles on growth indices, hematological and biochemical parameters and gonad histology of male goldfish (*Carassius auratus gibelio*). *Microsc Res Tech*, 82:1224-1230, 2019.
- Gao, X.Q., Fei, F., Huang, B., Meng, X.S., Zhang, T., Zhao, K.F. and Liu, B.L.: Alterations in hematological and biochemical parameters, oxidative stress, and immune response in *Takifugu rubripes* under acute ammonia exposure. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 243:108978, 2021.
- Gu, P., Li, Q., Zhang, W., Gao, Y., Sun, K., Zhou, L. and Zheng, Z.: Biological toxicity of fresh and rotten algae on freshwater fish: LC50, organ damage and antioxidant response. *J Hazard Mater*, 407:124620, 2021.
- Harikrishnan, R., Balasundaram, C. and Heo, M.S.: Herbal supplementation diets on hematology and innate immunity in goldfish against *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol*, 28:354-361, 2010.
- Hoseini, S.M., Mirghaed, A.T., Iri, Y., Hoseinifar, S.H., Van Doan, H. and Reverter, M.: Effects of dietary Russian olive, *Elaeagnus angustifolia*, leaf extract on growth, hematological, immunological, and antioxidant parameters in common carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*, 536:736461, 2021.
- Hoseini, S.M., Yousefi, M., Hoseinifar, S.H. and Van Doan, H.: Antioxidant, enzymatic and hematological responses of common carp (*Cyprinus carpio*) fed with myrcene-or menthol-supplemented diets and exposed to ambient ammonia. *Aquaculture*, 506:246-

- 255, 2019.
- Iftikhar, N. and Hashmi, I.: Assessment of immunohematological, hematological and biochemical responses in cultivable fish *Cyprinus carpio* exposed to an antibiotic sulfamethoxazole (SMX). *J Water Health*, 19:108-119, 2021.
- Jee, J.H., Masroor, F. and Kang, J.C.: Responses of cypermethrin-induced stress in haematological parameters of Korean rockfish, *Sebastes schlegeli* (Hilgen-dorf). *Aquac Res*, 36:898-905, 2005.
- Kavitha, C., Malarvizhi, A., Kumaran, S.S. and Ramesh, M.: Toxicological effects of arsenate exposure on hematological, biochemical and liver transaminases activity in an Indian major carp, *Catla catla*. *Food Chem Toxicol*, 48:2848-2854, 2010.
- Kim, J.H., Park, H.J., Hwang, I.K., Han, J.M., Kim, D. H., Oh, C.W. and Kang, J.C.: Alterations of growth performance, hematological parameters, and plasma constituents in the sablefish, *Anoplopoma fimbria* depending on ammonia concentrations. *Fish Aquatic Sci*, 20:1-6, 2017a.
- Kim, J.H., Park, H.J., Hwang, I.K., Han, J.M., Kim, D. H., Oh, C.W. and Kang, J.C.: Toxic effects of juvenile sablefish, *Anoplopoma fimbria* by ammonia exposure at different water temperature. *Environ Toxicol Pharmacol*, 54:169-176, 2017b.
- Kumar, R. and Banerjee, T.K.: Arsenic induced hematological and biochemical responses in nutritionally important catfish *Clarias batrachus* (L.). *Toxicol Rep*, 3:148-152, 2016.
- Lee, G.H., Harwanto, D., Park, S.M., Choi, J.S., Kim, M.R. and Hong, Y.K.: Hot water extract of leather carp (*Cyprinus carpio nudus*) improves exercise performance in mice. *Prev Nutr Food Sci*, 20:246, 2015.
- Liu, M.J., Guo, H.Y., Zhu, K.C., Liu, B.S., Liu, B., Guo, L. and Zhang, D.C.: Effects of acute ammonia exposure and recovery on the antioxidant response and expression of genes in the Nrf2-Keap1 signaling pathway in the juvenile golden pompano (*Trachinotus ovatus*). *Aquat Toxicol*, 240:105969, 2021.
- Magouz, F.I., Mahmoud, S.A., El-Morsy, R.A., Paray, B.A., Soliman, A.A., Zaineldin, A.I. and Dawood, M.A.: Dietary menthol essential oil enhanced the growth performance, digestive enzyme activity, immune-related genes, and resistance against acute ammonia exposure in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 530:735944, 2021.
- Mangang, Y.A. and Pandey, P.K.: Hemato-biochemical responses and histopathological alterations in the gill and kidney tissues of *Osteobrama belangeri* (Valenciennes, 1844) exposed to different sub-lethal unionized ammonia. *Aquaculture*, 542:736887, 2021.
- Molayemraftar, T., Peyghan, R., Jalali, M.R. and Shahriari, A.: Single and combined effects of ammonia and nitrite on common carp, *Cyprinus carpio*: Toxicity, hematological parameters, antioxidant defenses, acetylcholinesterase, and acid phosphatase activities. *Aquaculture*, 548:737676, 2022.
- Paterson, B.D., Rimmer, M.A., Meikle, G.M. and Semmens, G.L.: Physiological responses of the Asian sea bass, *Lates calcarifer* to water quality deterioration during simulated live transport: acidosis, red-cell swelling, and levels of ions and ammonia in the plasma. *Aquaculture*, 218:717-728, 2003.
- Prakash, S. and Verma, A.K.: Effect of arsenic on lipid metabolism of a fresh water cat fish, *Mystus vittatus*. *Journal of Fisheries and Life Sciences*, 4: 33-35, 2019.
- Seriani, R., de Souza Abessa, D.M., Kirschbaum, A.A., Pereira, C.D. S., Romano, P. and Ranzani-Paiva, M.J.T.: Relationship between water toxicity and hematological changes in *Oreochromis niloticus*. *Braz J Aquat Sci Tech*, 15:47-53, 2011.
- Shalaby, A.M., Khames, M.K., Fathy, A., Ghariieb, A.A. and Abdel-Hamid, E.A.: The Impact of Zeolite on Ammonia Toxicity, Growth Performance and Physiological Status of the Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Egypt J Aquat Biol Fish*, 25:643-663, 2021.
- Shin, K.W., Kim, S.H., Kim, J.H., Hwang, S.D. and Kang, J.C.: Toxic effects of ammonia exposure on growth performance, hematological parameters, and plasma components in rockfish, *Sebastes schlegelii*, during thermal stress. *Fish Aquatic Sci*, 19:1-8, 2016.
- Shokr, E.S.A.: Effect of ammonia stress on blood constituents in Nile tilapia. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences, B. Zoology*, 7:37-44, 2015.
- Wilkie, M.P.: Mechanisms of ammonia excretion across fish gills. *Comp Biochem Physiol A Physiol*, 118:39-50, 1997.
- Wright, P.A. and Wood, C.M.: Seven things fish know about ammonia and we don't. *Respir Physiol Neurobiol*, 184:231-240, 2012.
- Yang, W., Xiang, F., Sun, H., Chen, Y., Minter, E. and Yang, Z.: Changes in the selected hematological parameters and gill Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase activity of juvenile crucian carp *Carassius auratus* during elevated ammonia exposure and the post-exposure recovery. *Biochem Syst Ecol*, 38:557-562, 2010.
- Yousefi, M., Vatnikov, Y.A., Kulikov, E.V., Ahmadifar,

- E., Mirghaed, A.T., Hoseinifar, S.H. and Van Doan, H.: Effects of dietary Hibiscus sabdariffa supplementation on biochemical responses and inflammatory-related genes expression of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, to ammonia toxicity. *Aquaculture*, 533:736095, 2021a.
- Yousefi, M., Abtahi, B., Adineh, H., Hoseinifar, S.H., Taheri Mirghaed, A., Paolucci, M. and Van Doan, H.: Effects of dietary arginine supplementation on cytokine-and antioxidant-related gene expressions in common carp (*Cyprinus carpio*) fingerling during ammonia toxicity. *Aquac Res*, 52:2751-2758, 2021b.
- Yu, H., Yang, L., Li, D. and Chen, Y.: A hybrid intelligent soft computing method for ammonia nitrogen prediction in aquaculture. *Inf Process Agric*, 8:64-74, 2021.
- Zeitoun, M.M., EL-Azrak, K.E.D.M., Zaki, M.A., Nemat-Allah, B.R. and Mehana, E.S.E.: Effects of ammonia toxicity on growth performance, cortisol, glucose and hematological response of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aceh J Animal Sci*, 1:21-28, 2016.
- Zhang, M., Li, M., Wang, R. and Qian, Y.: Effects of acute ammonia toxicity on oxidative stress, immune response and apoptosis of juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* and the mitigation of exogenous taurine. *Fish Shellfish Immunol*, 79:313-320, 2018.
- Zhao, H., Peng, K., Wang, G., Mo, W., Huang, Y. and Cao, J.: Metabolic changes, antioxidant status, immune response and resistance to ammonia stress in juvenile yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) fed diet supplemented with sodium butyrate. *Aquaculture*, 536:736441, 2021.
- Zhao, L., Cui, C., Liu, Q., Sun, J., He, K., Adam, A. A. and Yang, S.: Combined exposure to hypoxia and ammonia aggravated biological effects on glucose metabolism, oxidative stress, inflammation and apoptosis in largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Aquat Toxicol*, 224:105514, 2020.

---

Manuscript Received : Jan 12, 2022

Revised : Mar 18, 2022

Accepted : May 03, 2022