

암모니아 노출에 따른 조피볼락 (*Sebastes schlegeli*)의 생리학적 반응

민병화* · 박미선 · 신윤경 · 도용현 · 명정인

국립수산과학원 전략양식연구소 양식관리과

Physiological Responses in Korean Rockfish (*Sebastes schlegeli*) Exposed to Ammonia

Byung Hwa Min*, Mi Seon Park, Yun Kyung Shin, Yong Hyun Do and Jeong-In Myeong

Aquaculture Management Division, National Fisheries Research & Development Institute, Busan 619-705 Korea

Abstract - The aim of the present study was to assess the effects of ammonia on physiological responses in Korean rockfish (*Sebastes schlegeli*). Interestingly, no mortality were observed when the specimens (301.1 ± 8.0 g) were exposed to five levels of un-ionized ammonia (NH_3) (control, 1, 2, 4, 8 mg L^{-1}) for 3 hours. Furthermore, a significantly higher increase in gill Na^+/K^+ -ATPase (NKA) pump activity with was detected due to the ammonia exposure. The activity of the fishes were found to be 4 and 8 mg L^{-1} NH_3 , which was significantly high compared to normal 1 mg L^{-1} NH_3 . Although ammonia exposure had no effect on plasma Cl^- , exposure to both 4 and 8 mg L^{-1} NH_3 , however it led to increase in the plasma Na^+ , K^+ and osmolality levels. Also, prolong ammonia exposure cause increase of plasma cortisol and glucose levels. The increase in glucose was accompanied by an increase in cortisol. The fish exposed to 4 and 8 mg L^{-1} NH_3 showed significantly higher hematocrit than control group than those exposed to 1 and 2 mg L^{-1} NH_3 . The intensity of cell damage increased with the increase concentration and exposure to ammonia. Furthermore, hyperplasia, separation and epithelial necrosis were also observed in gill tissues. Taken together, the results showed that direction of changes to the investigated parameters can be used to determine the physiological responses of Korean rockfish to ammonia.

Key words : Korean rockfish, *Sebastes schlegeli*, ammonia exposure, physiological responses, gill Na^+/K^+ -ATPase activity

서 론

암모니아 독성은 수서동물, 특히 어류에게 보편적인 문제로 되어오고 있다. 암모니아는 어류가 주로 아가미를 통해 배출하는 주요 질소화합물로 암모니아의 생성

은 단백질 섭취량, 대사효율과 같은 요인에 크게 좌우되며, 이러한 요인조차 중 특이적이며, 염분, 수온, pH, 외부의 암모니아 농도에 의해 영향을 받는다 (Randall and Tsui 2002). 집약적 어류양식 시스템에서 고밀도 사육, 먹이공급, 환수량 부족은 암모니아 농도를 높이며, 이로 인해 넙치 (*Paralichthys olivaceus*) (Kim *et al.* 1997), 조피볼락 (*Sebastes schlegeli*) (Chin *et al.* 1998), gilthead seabream (*Sparus aurata*) (Wajsbrot *et al.* 1993), 터봇 (*Scoph-*

* Corresponding author: Byung Hwa Min, Tel. 051-720-2432, Fax. 051-720-2439, E-mail. pkmh@korea.kr

thalmus maximus) (Foss *et al.* 2009), 유럽농어 (*Dicentrarchus labrax*) (Dosdat *et al.* 2003), 붕어 (*Carassius auratus*) (Sinha *et al.* 2012)와 같은 양식어류 성장에 악영향을 미친다. 또한 수중의 고농도 (high environmental ammonia, HEA) 암모니아는 어류의 혈장 암모니아 농도 (Wilson and Taylor 1992)와 어체 암모니아 함량을 증가시킨다 (Paley *et al.* 1993). HEA는 어류의 스트레스 요인으로 작용하여 1차적 반응으로 혈장 코티졸 상승을 유발하며 (Knoph and Olssen 1994), 이는 2차적으로 글리코겐합성, 당신생합성 (Wendelaar Bonga 1997) 뿐만 아니라 단백질 이화작용 (Mommensen *et al.* 1999)과 암모니아 생성 (Randall and Tsui 2002)을 촉진시킨다. 이 외에도 아가미 상피의 과증식 (Benli *et al.* 2008), 삼투압조절 혼란 (Person-Le Ruyet *et al.* 2003), 호르몬 조절 변화 (Dosdat *et al.* 2003) 등 여러 측면에서 부정적인 영향을 미치며, 과민반응, 코마상태, 경련 및 폐사에 이르게 한다 (Ip *et al.* 2001).

어류 체내의 암모니아는 아가미를 통해 외부로 배출되지만, HEA 조건에서는 아가미를 통한 암모니아 배출이 감소하며, 반대로 내부로의 암모니아 유입이 일어난다. 경골어류 및 다른 수서동물의 아가미는 암모늄 이온 수송에 의한 암모니아 항상성 유지와 관련된 여러 이온 수송체와 메커니즘을 가지고 있다 (Evans *et al.* 1999, 2005). 아가미의 Na⁺/K⁺-ATPase (일명 Na⁺ pump로도 불리움)는 삼투압조절과 직접적으로 관여하며, 또한 K⁺와 NH₄⁺는 수화반경 (hydrated radius)이 동일하기 때문에 Na⁺/K⁺-ATPase는 K⁺ 대신 NH₄⁺를 혈액에서 아가미 상피로 펌핑하는 중요한 역할을 한다 (Randall *et al.* 1999; Alam and Frankel 2006). Na⁺/K⁺-ATPase에 의해 아가미 상피로 들어온 NH₄⁺는 Na⁺/NH₄⁺-교환체를 통해 Na⁺와 교환된다 (Evans *et al.* 2005). 따라서 Na⁺/K⁺-ATPase는 체내의 NH₄⁺와 외부 환경의 Na⁺를 교환하는 추진력을 제공하므로, 암모니아 오염에 대한 중요한 지표로 활용할 수 있다.

본 연구에서는 우리나라에서 주요 양식대상종인 조피볼락에 대상으로 HEA에 급성 노출시켰을 때, 그 생리학적 반응으로 아가미 Na⁺/K⁺-ATPase 활성, 호르몬적 변화 등을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험어 및 암모니아 노출

국립수산과학원 (부산시 기장군) 15톤 콘크리트 사각수조에서 사육중인 조피볼락 (평균 전장 26.9±0.3 cm, 체

Table 1. Experimental groups based on ammonia concentration

Total nitrogen (mg L ⁻¹)	NH ₄ ⁺ (mg L ⁻¹)	NH ₃ (mg L ⁻¹)	Groups of exp.
0	5	0.37	Control
5	12	0.95	1 mg L ⁻¹
20	27	2.13	2 mg L ⁻¹
50	58	4.07	4 mg L ⁻¹
100	112	7.93	8 mg L ⁻¹

중 301.1±8.0 g) 중 40마리를 무작위로 잡아 5개의 유수식 FRP 수조 (수용적 300 L)에 각각 8마리씩을 수용하여 7일간 적응시켰다. 이 기간 동안 수온은 15±0.3°C, 염분은 33.5‰였으며, 하루에 2회 상업용 배합사료를 공급하였으나, 암모니아 노출 24시간 전부터는 절식시켰다.

암모니아에 대한 생리학적 반응을 조사하기 위하여, 실험어가 수용된 각 수조를 지수상태로 전환시킨 다음, NH₄Cl (Junsei, Japan)을 첨가하여 총 질소의 양이 각각 0, 5, 20, 50, 100 mg L⁻¹이 되도록 하였다. 이 후 각 수조의 pH 및 NH₄⁺를 측정하여 이온화 되지 않은 상태인 NH₃를 아래 식으로 계산하였으며, 계산된 NH₃ 농도를 바탕으로 총 5개의 실험구 (대조구, 1, 2, 4, 8 mg L⁻¹구)를 설정하였다 (Table 1).

$$\text{NH}_3 (\text{mg L}^{-1}) = [\text{NH}_4^+ (10^{\text{pH}}) (17/14)] / [(K_b/K_w) + 10^{\text{pH}}]$$
, 여기서 K_b: 암모니아 평형방정식의 이온화상수, K_w: 물의 이온화 상수

실험어의 암모니아 노출은 3시간으로 하였으며, DO는 6 mg L⁻¹ 이상이 유지되도록 에어레이션을 해 주었다. 실험기간 동안 모든 실험어는 생존하였다.

2. 혈액 및 조직 샘플링

암모니아 노출에 따른 혈액 및 조직 샘플링은 각 실험구의 모든 실험어를 대상으로 실시하였다. 실험어를 150 ppm의 tricaine methanesulphanate (MS-222, Sigma, USA)로 마취한 다음, heparin sodium 처리된 주사기 (3 mL)로 실험어의 미부혈관으로부터 혈액을 채취하여 일부는 Ht 측정에 사용하였으며, 나머지는 원심분리 (4°C, 10000 rpm, 15분)후 혈장을 분리하여 분석전까지 -80°C의 초저온 냉동고에 보관하였다. 아가미 Na⁺/K⁺-ATPase (NKA) 활성을 조사하기 위하여, 실험어 아가미의 새변 (왼쪽, 2번째)을 절취하여 액체질소 (-196°C)에서 급속 냉동시킨 다음 -80°C에 보관하였다. 또한 아가미의 조직학적 변화를 관찰하기 위하여 새변의 일부를 10% 중성포르말린에 고정하였다.

3. 혈액 분석

1) Hematocrit (Ht)

Ht는 혈액을 모세유리관(Hirschmann, Germany)에 넣어 원심분리(10,000 rpm, 10분) 하여 Ht 측정판(MICRO-HAEMATOCRIT READER, Hawksley, Co, UK)으로 측정하였다.

2) 혈장 코티졸

혈장 코티졸은 cortisol EIA kit (Oxford, USA)를 사용하여 효소면역분석(enzyme immunoassay, EIA)로 측정하였으며, 간략히 설명하자면 다음과 같다: ethyl ether를 사용하여 혈장 100 μ L로부터 cortisol을 추출한 후, 유기상(organic phase)을 분리 하여 이를 N_2 가스로 증발시켰다. 잔여물을 100 μ L의 추출 buffer에 녹인 뒤, 이중 10 μ L를 다시 990 μ L의 추출 buffer에 더하여 100배로 희석시켜 이를 샘플로 사용하였다. 샘플 또는 표준용액 50 μ L를 microplate에 2반복으로 넣은 후, 동량의 Cortisol-HRP Conjugate를 첨가하여 1시간 동안 상온에서 두었다. Microplate를 세척한 후, 150 μ L TMB 기질을 각 well에 넣은 후 30분 동안 반응시켜, microplate reader (ThermoScientific MultiskanSpectrum, Thermo, Finlan)로 650 nm에서 값을 측정하였다. 코티졸의 분석시 Inter-assay coefficients of variation (CV) 및 Intra-assay CV는 각각 12.1% 및 7.2%이었다.

3) 혈장 암모니아, 글루코스, 이온 및 삼투질농도

혈장의 암모니아, 글루코스, Na^+ , Cl^- 은 생화학자동분석기(Dry-chem 4000i, Fujifilm, Japan)로, 삼투질농도는 삼투압측정기(Vapro 5520, WESCOR, USA)로 측정하였다.

4. Na^+/K^+ -ATPase (NKA) 활성 분석

아가미 NKA 활성은 Hwang *et al.* (1989)의 방법을 변형하여 측정하였다. 냉동된 새변 절편(약 20~25 mg)을 SEI 용액(200 mM Sucrose, 5 mM Na_2 EDTA, 100 mM Imidazole-Hcl buffer, pH 7.6)으로 녹여 washing한 후, SEI 용액(SEI+0.1% sodium deoxycholate) 1 mL에 조직을 넣어 호모제나이저(Pro 200, Pro Scientific Co., USA)로 균질화하였다. 원심분리(4°C, 6000 rpm, 5분)하여 얻은 상층액의 10 μ L를 각각 Reaction mixture A (125 mM NaCl, 75 mM KCl, 7.5 mM $MgCl_2$, 5 mM Na_2 ATP, 100 mM Imidazole-Hcl buffer, pH 7.6)와 Reaction mixture B (mixture A+10 mM ouabain)의 200 μ L와 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후, 30% trichloroacetic acid 50 μ L를 넣어 반응을 중지시켰다. NKA 측정을 위한 모든 시약은 Sigma

(USA) 제품을 사용하였다. Ouabain 유무에 따른 무기인 함량은 Phosphate Colorimetric Assay Kit (BioVision, USA)를 사용하여 650 nm에서 측정하였으며, 조직내 단백질 함량은 Pierce BCA Protein kit (Thermo, USA)로 측정하였다. 최종 NKA 활성은 μ mol Pi mg^{-1} protein h^{-1} 로 나타내었다.

5. 아가미의 조직학적 관찰

10% 중성포르말린에 고정된 아가미 조직은 상법에 따라 파라핀으로 포매하여 5 μ m 두께로 절편한 후, haematoxylin-eosin으로 염색하여 광학현미경(Axioskop 2 plus: Carl Zeiss, Jena, Germany)과 화상분석시스템(AxioVision Rel., ver 4.6, Germany)으로 관찰하였다.

6. 통계 분석

실험결과의 자료값은 평균±표준오차로 나타내었으며, SPSS 통계프로그램(ver. 17.0)을 사용하여 one way-ANOVA 및 Duncan's multiple range test로 유의성을 검정하였다($P < 0.05$).

결 과

1. 혈장 암모니아 농도

조피볼락의 혈장 암모니아 농도는 외부의 암모니아가 증가함에 따라 높아지는 것으로 나타났으나, 4 $mg L^{-1}$ 구와 8 $mg L^{-1}$ 구에서는 유의한 차이가 없었다(Fig. 1).

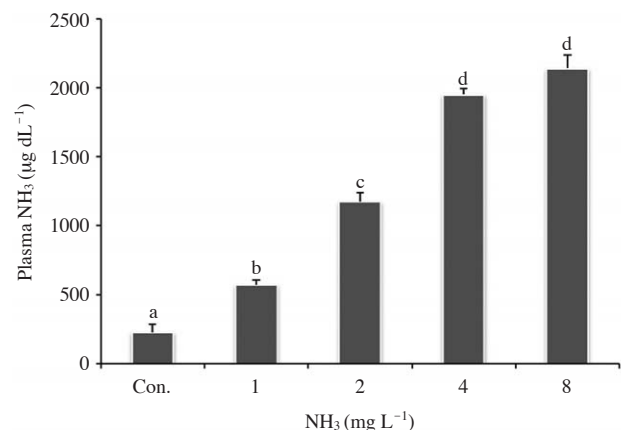


Fig. 1. Levels of plasma NH_3 in Korean rockfish, *Sebastes schlegeli* exposed to ammonia. Values are mean SEM ($n=8$). Different alphabet indicate significant difference ($P < 0.05$).

Table 2. Levels of plasma Na⁺, K⁺, Cl⁻ and osmolality in Korean rockfish, *Sebastes schlegeli* exposed to ammonia

Groups (NH ₃ , mg L ⁻¹)	Na ⁺ (mmol L ⁻¹)	K ⁺ (mmol L ⁻¹)	Cl ⁻ (mmol L ⁻¹)	Osmolality (mOsm kg ⁻¹)
Con.	164.7 ± 1.5 ^a	3.5 ± 0.2 ^a	160.3 ± 2.3	322.7 ± 9.8 ^a
1	162.5 ± 1.4 ^a	3.6 ± 0.2 ^a	159.0 ± 2.1	332.5 ± 3.8 ^a
2	161.7 ± 2.5 ^a	3.5 ± 0.2 ^a	159.2 ± 2.3	334.5 ± 2.6 ^a
4	180.3 ± 1.9 ^b	4.2 ± 0.2 ^b	156.0 ± 3.1	400.0 ± 25.8 ^b
8	178.0 ± 6.1 ^b	4.4 ± 0.1 ^b	155.5 ± 9.4	426.0 ± 19.9 ^b

Values are mean SEM (n=8). Different alphabet indicate significant difference (P < 0.05).

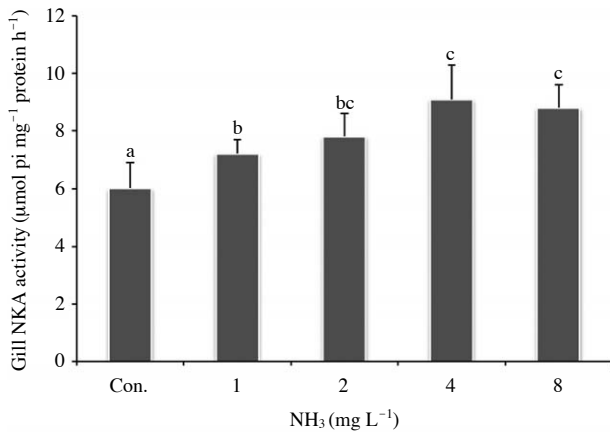


Fig. 2. Levels of gill NKA activity in Korean rockfish, *Sebastes schlegeli* exposed to ammonia. Values are mean SEM (n=8). Different alphabet indicate significant difference (P < 0.05).

2. 아가미 NKA 활성

조피볼락 NKA 활성은 모든 실험구가 대조구보다 유의하게 높았으며, 실험구의 암모니아 농도가 높아질수록 아가미 NKA 활성 또한 증가하는 경향을 보였다. 특히 4 및 8 mg L⁻¹구의 NKA 활성은 대조구보다 약 50% 높았다 (Fig. 2).

3. 혈장 Na⁺, K⁺, Cl⁻ 및 삼투질농도

조피볼락의 혈장 Na⁺ 및 K⁺은 1 및 2 mg L⁻¹구에서는 대조구와 차이를 보이지 않았으나, 4 및 8 mg L⁻¹구는 다른 실험구에 비하여 유의하게 높았다. 그러나 Cl⁻는 모든 실험구에서 차이를 보이지 않았다. 삼투질의 농도의 경우, Na⁺ 및 K⁺와 동일한 변화를 보였다 (Table 2).

4. 혈장 코티졸 및 글루코스 농도

암모니아 노출에 따른 조피볼락의 혈장 코티졸 및 글루코스는 Fig. 3에 나타내었다. 코티졸의 경우, 1 mg L⁻¹구는 대조구에 비해 3배, 2 mg L⁻¹구는 4배, 4 mg L⁻¹구는 5.2배, 8 mg L⁻¹구는 6.6배 높은 것으로 나타났다. 혈

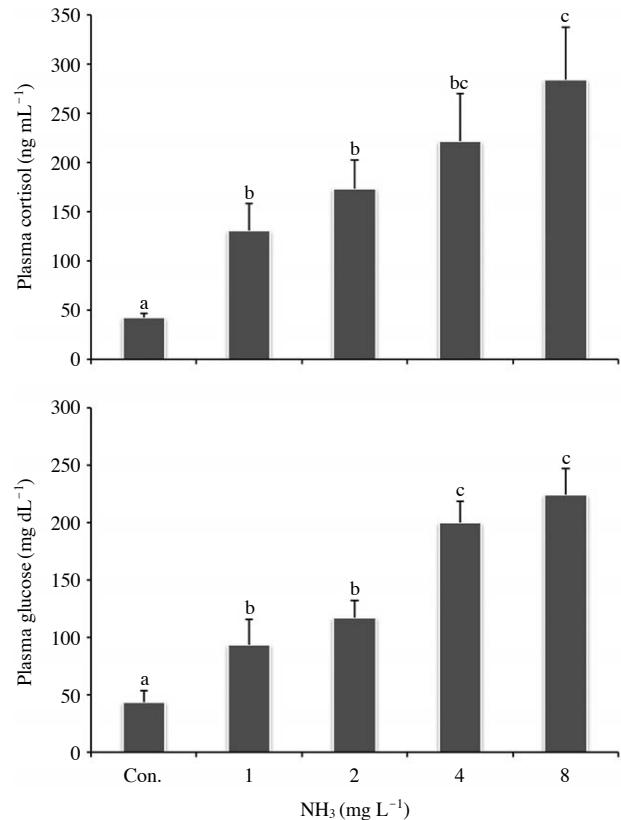


Fig. 3. Levels of plasma cortisol and glucose in Korean rockfish, *Sebastes schlegeli* exposed to ammonia. Values are mean SEM (n=8). Different alphabet indicate significant difference (P < 0.05).

장 글루코스 또한 실험구 암모니아 농도에 대하여 그 변화가 코티졸과 유사한 것으로 나타났다.

5. Ht

조피볼락의 Ht는 대조구 및 1, 2 mg L⁻¹구에서는 32.8 ± 28~34.8 ± 1.3%로 서로간 유의한 차이가 없었으나, 4, 8 mg L⁻¹구에서는 각각 42.3 ± 1.2%, 43.0 ± 1.0%로 나머지 실험구보다 유의하게 높았다 (Fig. 4).

6. 아가미의 조직학적 변화

암모니아에 따른 조피볼락 아가미의 조직학적 변화는 Fig. 5 및 Table 3에 나타내었다. 1 mg L⁻¹구에서는 대조

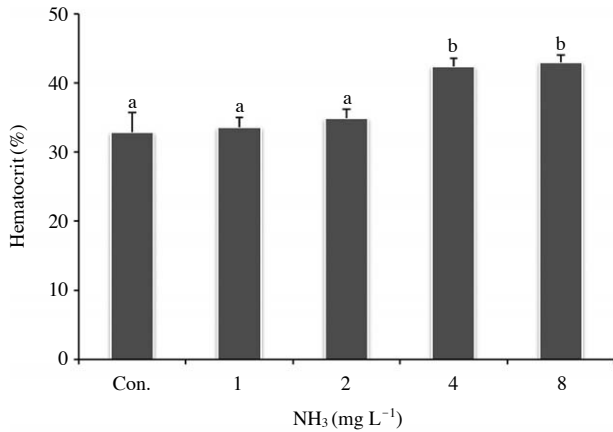


Fig. 4. Levels of hematocrit in Korean rockfish, *Sebastes schlegeli* exposed to ammonia. Values are mean SEM ($n=8$). Different alphabet indicate significant difference ($P<0.05$).

구(Fig. 5A)와 마찬가지로 정상적인 아가미의 형태가 유지되고 있었으나, 새변에서는 상피세포의 과증식(epithelial hyperplasia)이 관찰되었다(Fig. 5B). 2 mg L⁻¹구에서는 상피세포 과증식과 더불어, 2차새변의 끝이 비대해지는 곤봉화(club-shaped lamella) 현상이 나타났다(Fig. 5C). 4 및 8 mg L⁻¹구에서는 대부분 2차새변의 상피가 분리되어 부종이 형성되었으며, 또한 괴사된 상피세포가 상당수 관찰되었다(Fig. 5D).

Table 3. Summarized histological responses in the gills of Korean rockfish, *Sebastes schlegeli* exposed to ammonia for 3 hours

Groups (NH ₃ , mg L ⁻¹)	epithelial hyperplasia	club-shaped lamella	epithelial separation	epithelial necrosis
con.	—	—	—	—
1	+++	+	—	—
2	+++	++	—	—
4	+	++	+++	+
8	+	+	+++	++

—: none, +: mild, ++: moderate, +++: severe.

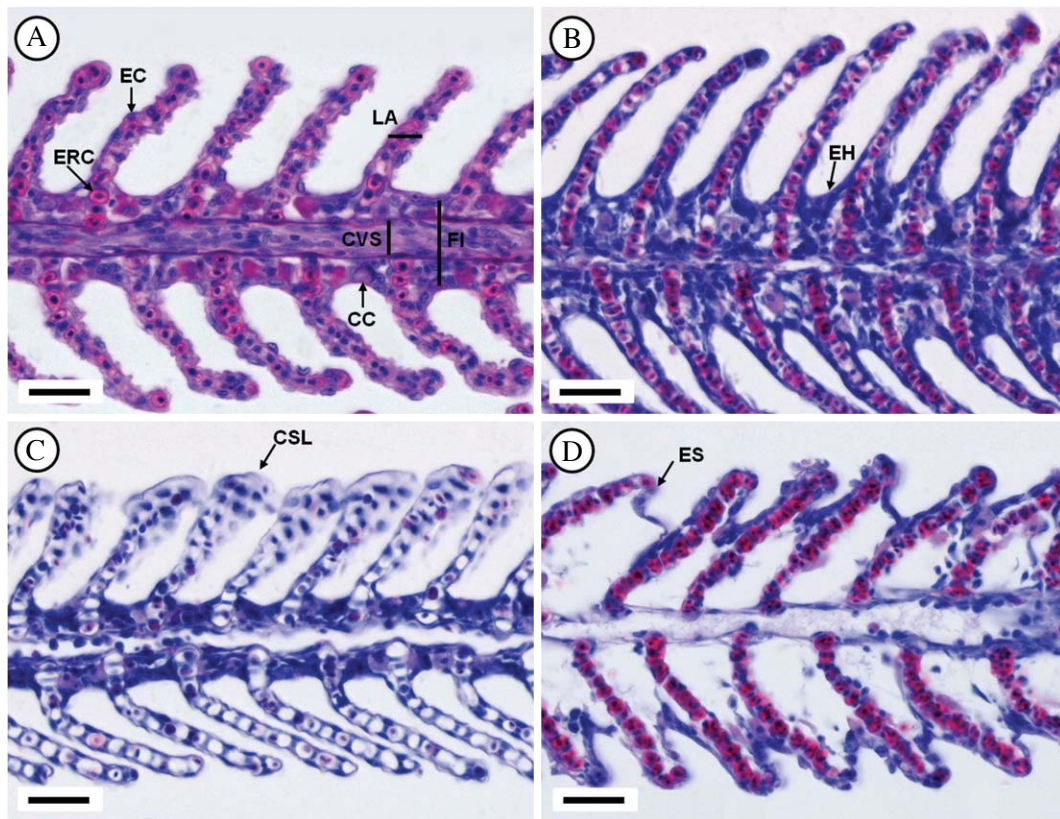


Fig. 5. Gill tissue of Korean rockfish, *Sebastes schlegeli* exposed to ammonia. (A) control, (B) 1 mg L⁻¹, (C) 2 mg L⁻¹, (D) 4 and 8 mg L⁻¹. CC: chloride cell, CSL: club-shaped lamella, CVS: central venous sinus, EC: epithelial cell, EH: epithelial hyperplasia, ES: epithelial separation, ERC: erythrocyte, FI: filament, La: lamella. Bars: 25 μm. H&E, ×400.

고찰

일반적으로 담수어와 해수어의 암모니아 배출 메커니즘은 구분된다. 담수어에서는 첫째 체내의 NH_3 는 아가미 상피에서 수동확산에 의해 직접수중으로 빠져나가며, 둘째 아가미에서 나온 NH_3 와 H^+ 가 아가미와 접한 물(gill water)에서 NH_4^+ 가 되어 수중(Bulk water)으로 배출된다. 조피볼락과 같은 해수어는 어체의 NH_3 를 아가미 상피세포와 상피세포사이의 밀착연접을 통해 수동확산으로 배출하며, 또한 NH_4^+ 는 상피세포 밀착연접을 통한 확산뿐만 아니라 상피에서 2가지의 능동수송에 의해 배출된다. 첫째 혈액내 NH_4^+ 는 Na^+/K^+ -ATPase(NKA)에 의해 K^+ 대신 상피로 이동하게 되며, 둘째 상피로 들어온 NH_4^+ 는 $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ -교환체에 수중으로 배출된다(Wilkie 2002). 어류는 이러한 메커니즘을 통해 체내의 암모니아를 배출하는데, 외부 환경의 암모니아 농도가 어체보다 높을 경우, 수중의 암모니아가 확산으로 인해 체내로 유입되어 체내의 암모니아 배출은 능동적인 수송에 의존할 수밖에 없는 상태가 된다. 본 연구에서는 외부의 암모니아 농도가 높아질수록 실험어의 혈중 암모니아는 증가하는 것으로 나타났다. 그러나 4 및 8 mg L^{-1} 구의 혈중 암모니아 농도가 각각 1950 $\mu\text{g dL}^{-1}$, 2140 $\mu\text{g dL}^{-1}$ 로 큰 차이가 없었는데, 이는 혈액내 암모니아가 수용될 수 있는 양(대략 2000 $\mu\text{g dL}^{-1}$)이 정해져 있음을 알 수 있다. 혈중 암모니아의 증가는 외부에서 유입되는 암모니아 양이 능동 수송으로 배출하는 양보다 많기 때문인 것으로 보인다. 본 연구에서 암모니아의 능동 배출은 NKA 활성을 통해 알 수 있는데, NKA 활성 증가는 체내의 암모니아 농도가 대조구의 수준을 넘어서는 시점부터 나타난 것으로 보여지며, 체내의 암모니아 농도가 높아질수록 NKA 활성의 증가가 높아지는 것은 체내의 암모니아 농도를 감소시키기 위한 생리적 반응으로 보인다. 이처럼 외부의 암모니아 농도가 높을수록 NKA 활성의 증가는 여러 경골어류에서 보고되고 있다(Alam and Frankel 2006; Chew *et al.* 2014).

본 연구에서 암모니아 노출에 따른 혈장 이온 및 삼투질농도를 조사한 결과, Na^+ 의 경우 4 및 8 mg L^{-1} 구에서는 대조구 및 1, 2 mg L^{-1} 구 보다 상승하였는데, 이러한 이유는 다음과 같이 추정된다. 첫째 체내의 암모니아 농도가 높아질수록 능동 배출이 많아지는데, 이때 $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ -교환체를 통해 Na^+ 의 유입이 많아졌기 때문일 수 있으며, 둘째 실제로 4 및 8 mg L^{-1} 구에서 아가미의 상피 분리 및 괴사가 되는 등 손상이 나타나 Na^+ 의 배출에 장애가 발생하였기 때문으로도 볼 수 있다. 본 연구와는 반대로

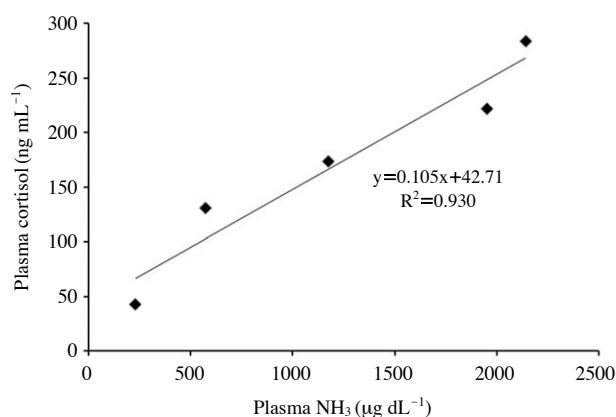


Fig. 6. Relationship between plasma ammonia and plasma cortisol in Korean rockfish, *Sebastes schlegeli* exposed to ammonia.

터봇을 고농도 암모니아에 노출하였을 때 혈장 Na^+ 가 오히려 감소하는 결과가 나타났으며, 이에 대하여 저자들은 외부에 고농도의 NH_4^+ 가 존재할 때 $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ -교환체가 Na^+ 를 유입하지 못하고 다시 NH_4^+ 유입되기 때문이라고 설명하고 있다(Person-Le Ruyet 2003). 이러한 가능성들을 고려해 보면, 본 연구에서는 모든 실험구에서 암모니아 노출 3시간 이전에 이미 Na^+ 의 감소가 나타났으며, 이후에 고농도일수록 아가미 손상이 빠르게 진행되어 삼투압 장애가 일어났을 가능성도 배제할 수는 없다. 혈장 K^+ 의 경우 4 및 8 mg L^{-1} 구가 1 및 2 mg L^{-1} 구보다 농도가 높은 이유는 체내의 NH_4^+ 를 배출하기 위하여 4 및 8 mg L^{-1} 구에서 아가미 NKA의 활성이 더 높아져 이로 인해 혈액의 K^+ 대신 NH_4^+ 를 상피세포로 유입시켜 혈액내 K^+ 가 상대적으로 많아졌기 때문인 것으로 해석해 볼 수 있다.

코티졸은 시상하부-뇌하수체-간신선 축에서 생성되는 호르몬으로 스트레스 반응 뿐만 아니라 삼투압조절 및 에너지 대사에 있어 중추적인 역할을 한다(Wendelaar Bonga 1997; McCormick 2001). 본 연구에서는 모든 실험구에서 코티졸 농도가 증가하였는데, 이처럼 고농도 암모니아 노출에 따른 코티졸 증가는 연어과 어류를 비롯한 여러 어종에서도 보고되고 있다(Ortega *et al.* 2005; Tsui *et al.* 2009; Wood and Nawata 2011). Ortega *et al.* (2005)는 고농도 암모니아에 노출된 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*)에서 혈장 코티졸과 암모니아 농도는 선형관계에 있다고 하였는데, 본 연구에서도 혈장 암모니아 농도가 높아질수록 혈장 코티졸이 상승하는 선형의 관계를 확인할 수 있었다(Fig. 6).

스트레스 반응에 의한 코티졸은 당신생합성(gluconeogenesis)을 중재하는 역할을 하며, 이로 인한 혈중 글루

코스의 상승은 스트레스로 인해 상승된 에너지 요구량을 보충하는 것으로 알려져 있다(Vijayan *et al.* 1997). 여러 스트레스 요인에 대한 혈장 코티졸 및 글루코스의 동반상승은 이미 많은 어종에서 보고된 바 있으며(Barton and Schreck 1987; Robertson *et al.* 1988; Olsen *et al.* 1995), 본 연구에서도 암모니아 노출시 이들의 동반상승이 뚜렷하게 나타났다.

일반적으로 혈액학적 parameters (Ht, Hb 및 백혈구수 등)의 변화는 스트레스의 2차적 반응으로 나타난다(Barton and Iwama 1991). Ht는 혈중의 적혈구 용적을 나타내며 어종에 따라 매우 다르게 나타난다. 본 연구에서는 암모니아 노출시 혈장 코티졸 및 글루코스의 상승을 고려해볼 때, Ht의 상승 또한 예상해 볼 수 있었으나, 4 및 8 mg L⁻¹구에서만 상승이 나타났다. 대서양 연어에서도 암모니아 노출시 Ht의 상승이 나타나고 있지만(Fivelstad *et al.* 1993), darkbarbel catfish (*Pelteobagrus vachelli*)에서는 암모니아 노출에 따른 Ht 변화는 없었으며(Li *et al.* 2014), 또한 대서양 연어에서는 오히려 고농도에서 Ht이 감소한다고 나타나고 보고된 바 있다(Knoph and Thorud 1996). 따라서 암모니아 노출에 따른 Ht 변화는 어종에 따라 다르게 나타나며, 심지어 같은 어종이라도 크기, 수온, 염분 등에 따라 달라질 수 있으므로, 아직까지 암모니아에 대한 스트레스 지표로 Ht를 사용하기에는 다소 어려움이 있는 것으로 보인다.

이상의 결과를 종합해 보면, 수중의 고농도 암모니아는 확산에 의해 단시간내에 어체로 유입되며, 체내의 암모니아 농도가 높아질수록 어체는 아가미 NKA 활성을 높여 암모니아를 수중으로 배출하는 것으로 나타났다. 그러나 외부의 고농도 암모니아가 지속될 경우, 유입되는 암모니아 양이 배출되는 암모니아 보다 많아지게 되어 최종적으로 체내의 암모니아 축적이 발생되며, 이는 어체의 스트레스를 유발하는 요인으로 추정된다.

적 요

본 연구에서는 암모니아 노출에 따른 조피볼락의 생리학적 반응을 조사하고자 아가미 Na⁺/K⁺-ATPase (NKA) 활성을 비롯한 혈장 parameters를 분석하였다. 실험구의 암모니아 농도는 대조구(자연해수), 1, 2, 4, 8 mg L⁻¹였으며, 조피볼락을 각각의 실험구에 3시간동안 노출한 다음 혈액 및 아가미 조직을 샘플링하였다. 실험구의 암모니아 농도가 높아질수록 혈장 암모니아 농도가 증가하였으며, 아가미 NKA 활성 또한 증가하는 경향을 보였다.

혈장 Cl⁻를 제외한 외부의 암모니아 영향을 받지 않았으나, 4, 8 mg L⁻¹구의 Na⁺, K⁺ 및 삼투질농도는 대조구 및 1, 2 mg L⁻¹구보다 유의하게 높았다. 암모니아 노출에 따른 조피볼락의 혈장 코티졸은 암모니아 농도와 선형관계를 보였으며, 혈장 글루코스 또한 코티졸과 동반상승하는 것으로 나타났다. 1, 2 mg L⁻¹구의 hematocrit는 대조구와 차이를 보이지 않았으나, 4, 8 mg L⁻¹구는 나머지 실험구보다 유의하게 높았다. 암모니아 농도가 높을수록 아가미 조직 손상은 심하였으며, 특히 4, 8 mg L⁻¹구에서는 상피세포의 과증식, 분리, 괴사 및 2차생변의 곤봉화(club-shaped lamella) 현상이 관찰되었다.

사 사

이 연구는 국립수산물과학원 수산연구사업(해역특화 생태통합양식 기술 개발: 14-AQ-72)의 지원에 의해 수행되었습니다.

REFERENCES

- Alam M and TL Frankel. 2006. Gill ATPase activities of silver perch, *Bidyanus bidyanus* (Mitchell), and golden perch, *Macquaria ambigua* (Richardson): effects of environmental salt and ammonia. *Aquaculture* 251:118-133.
- Barton BA and CB Schreck. 1987. Influence of acclimation temperature on interrenal and carbohydrate stress responses in juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquaculture* 62:299-310.
- Barton BA and GK 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.
- Benli ACK, G Koksak and A Ozkul. 2008. Sublethal ammonia exposure of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.): effects on gill, liver and kidney histology. *Chemosphere* 72:1355-1358.
- Chew SF, KC Hiong, SP Lam, SW Ong, WL Wee, WP Wong and YK IP. 2014. Functional roles of Na⁺/K⁺-ATPase in active ammonia excretion and seawater acclimation in the giant mudskipper, *Periophthalmodon schlosseri*. *Front. Physiol.* doi: 10.3389/fphys.2014.00158.
- Chin P, YK Shin, HK Kim, JS Lee and HS Kim. 1998. Biological study on the increment of survival rate during early life cycle in the rockfish, *Sebastes schlegeli*. I. Effects of ammonia on survival and growth of the larvae and juveniles stages. *Korean J. Ichthyol.* 10:98-105.

- 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.
- Evans DH, PM Piermarini and KP Choe. 2005. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiol. Rev.* 85:97-177.
- Evans DH, PM Piermarini and WTW Potts. 1999. Ionic transport in the fish gill epithelium. *J. Exp. Zool.* 283:641-652.
- Fivelstad S, H Kallevik, HM Iversen, T Møretrø, K Våge and M Binde. 1993. Sublethal effects of ammonia in soft water on Atlantic salmon smolts at a low temperature. *Aquacult. Int.* 1:157-169.
- Foss A, AK Imsland, B Roth, E Schram and SO Stefansson. 2009. Effects of chronic and periodic exposure to ammonia on growth and blood physiology in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* 296:45-50.
- Hwang PP, CM Sun and SM Wu. 1989. Changes of plasma osmolality, chloride concentration and gill Na-K-ATPase activity in tilapia *Oreochromis mossambicus* during seawater acclimation. *Mar. Biol.* 100, 295-299.
- Ip YK and SF Chew and DJ Randall. 2001. Ammonia toxicity, tolerance and excretion. pp. 109-148. In *Fish Physiology, Nitrogen Excretion* (Wright PA and PM Anderson eds.). Academic Press, New York, USA.
- Kim HS, HY Kim and P Chin. 1997. Effect of ammonia on survival and growth of the flounder larva, *Paralichthys olivaceus*. *J. Korean Fish. Soc.* 30:488-495.
- Knoph MB and K Thorud. 1996. Toxicity of Ammonia to Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) in Seawater-effects on plasma osmolality, ion, ammonia, urea and glucose levels and hematologic parameters. *Comp. Biochem. Physiol.* 113:375-381.
- Knoph MB and YA Olsen. 1994. Subacute toxicity of ammonia to Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in seawater: effects on water and salt balance, plasma cortisol and plasma ammonia levels. *Aquat. Toxicol.* 30:295-310.
- Li M, N Yu, JG Qin, E Li, Z Du and L Chen. 2014. Effects of ammonia stress, dietary linseed oil and *Edwardsiella ictaluri* challenge on juvenile darkbarbel catfish *Pelteobagrus vachelli*. *Fish Shellfish Immunol.* 38:158-165.
- McCormick SD. 2001. Endocrine control of osmoregulation in teleost fish. *Am. Zool.* 41:781-794.
- Mommsen TP, MM Vijayan and TW Moon. 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Rev. Fish Biol. Fisher.* 9:211-268.
- Olsen YA, IE Einarsdottir and KJ Nilssen. 1995. Metomidate anaesthesia in Atlantic salmon, *Salmo salar*, prevents plasma cortisol increase during stress. *Aquaculture* 134:155-168.
- Ortega VA, KJ Renner and NJ Bernier. 2005. Appetite-suppressing effects of ammonia exposure in rainbow trout associated with regional and temporal activation of brain monoaminergic and CRF systems. *J. Exp. Biol.* 208:1855-1866.
- 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 DJ and TKN Tsui. 2002. Ammonia toxicity in fish. *Mar. Pollut. Bull.* 45:17-23.
- Randall DJ, JM Wilson, KW Peng, TWK Kok, SSL Kuah, SF Chew, TJ Lam and YK Ip. 1999. The mudskipper, *Periophthalmodon schlosseri*, actively transports NH_4^+ against a concentration gradient. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 277:1562-1567.
- Robertson L, P Thomas and CR Arnold. 1988. Plasma cortisol and secondary stress responses of cultured red drum (*Sciaenops ocellatus*) to several transportation procedures. *Aquaculture* 68:115-130.
- Sinha AK, HJ Liew, M Diricx, R Blust and G De Boeck. 2012. The interactive effects of ammonia exposure, nutritional status and exercise on metabolic and physiological responses in goldfish (*Carassius auratus* L.). *Aquat. Toxicol.* 109:33-46.
- Tsui TKN, CYC Hung, CM Nawata, JM Wilson, PA Wright and CM Wood. 2009. Ammonia transport in cultured gill epithelium of freshwater rainbow trout: the importance of Rhesus glycoproteins and the presence of an apical $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ exchange complex. *J. Exp. Biol.* 212:878-892.
- Vijayan MM, CE Pereira, G Grau and GK Iwama. 1997. Metabolic responses associated with confinement stress in tilapia: the role of cortisol. *Comp. Biochem. Physiol.* 116C:89-95.
- Wajsbrodt N, A Gasith, A Diamant and DM Popper. 1993. Chronic toxicity of ammonia to juvenile gilthead seabream *Sparus aurata* and related histopathological effects. *J. Fish Biol.* 43:321-328.
- Wendelaar Bonga SE. 1997. The stress response in fish. *Physiol. Rev.* 77:591-625.
- Wilkie MP. 2002. Ammonia excretion and urea handling by fish gills: Present understanding and future research challenges. *J. Exp. Zool.* 293:284-301.
- Wilson RW and EW Taylor. 1992. Transbranchial ammonia gradients and acidbase responses to high external ammonia in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) acclimated to different salinities. *J. Exp. Biol.* 166:95-112.
- Wood CM and CM Nawata. 2011. A nose-to-nose comparison

of the physiological and molecular responses of rainbow trout to high environmental ammonia in seawater versus freshwater. *J. Exp. Biol.* 214:3557-3569.

Received: 3 December 2014

Revised: 8 December 2014

Revision accepted: 9 December 2014