

암모니아 급성노출에 의한 바이오플락 사육 넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 혈액학적 성상 및 항산화반응의 변화

김준환* · 김기욱 · 배선헌 · 김수경 · 김수경 · 김종현

국립수산과학원 서해수산연구소

Alterations in Hematological Parameters and Antioxidant Responses in the Biofloc-reared Flatfish *Paralichthys olivaceus* Following Ammonia Exposure

Jun-Hwan Kim*, Ki Wook Kim, Sun-Hye Bae, Su-Kyoung Kim, Su Kyoung Kim and Jong-Hyun Kim
West Sea Fisheries Research Institute, National Institute of Fisheries Science, Taean 32132, Korea

Flatfish *Paralichthys olivaceus* raised in biofloc system (mean length 27.6±3.1 cm, mean weight 280.4±26.5 g) were exposed for to different concentrations of ammonia (0, 8, 16, 32, and 64 mg NH₄⁺/L) for 7 days. Following ammonia exposure, hematological parameters such as hemoglobin and hematocrit were significantly reduced. Plasma components such as magnesium, glucose, aspartate aminotransferase (AST), and alanine aminotransaminase (ALT) were significantly altered by ammonia exposure, whereas there were no significant changes in calcium, cholesterol, or total protein. Antioxidant responses, such as superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) levels were significantly elevated following ammonia exposure. The results of this study indicate that ammonia exposure induces significant changes in hematological parameters and antioxidant responses in biofloc-reared *Paralichthys olivaceus* as a toxic response.

Key words: *Paralichthys olivaceus*, Ammonia, Hematological parameter, Antioxidant response, Biofloc

서 론

수계환경에서 암모니아는 농업 폐수 및 폐기물 분해 뿐만 아니라, 양식장에서 남은 사료 및 생물의 배설물 등을 통해서 자연적으로 발생하는 물질이다(Randall and Tsui, 2002; Kim et al., 2017a). 특히, 암모니아는 수산양식에서 유해한 질소 대사산물의 하나로 어류의 질소성 배설물 배출량의 60-80%를 차지한다(Eddy, 2005). 높은 농도의 암모니아 노출은 수계 생물에게 치명적이며, 일반적으로 고밀도의 양식장환경에서 많이 발생할 수 있다. 높은 수준의 암모니아 노출은 수중생물의 중추신경계에 독성을 발휘할 뿐만 아니라, 호흡곤란, 평형상실, 경련, 삼투 및 이온조절 실패와 과민반응 등을 유발한다(Kim et al., 2015).

일반적으로 암모니아(NH₃)는 비극성이며, 지질에 쉽게 용해되기 때문에, 이온형태의 암모니아(NH₄⁺) 보다 매우 높은 독성을 나타낸다. 하지만, 암모늄 이온(NH₄⁺) 역시, Na⁺-K⁺ ATPase와 Na⁺/K⁺/2Cl⁻ 공동 수송에서 칼륨이온(K⁺) 이온을 대체함으

로써 어류의 수분조절 및 이온 균형에 영향을 미치며, 이러한 신경세포의 전기 화학적 구배교란에 의해 흥분, 과잉행동 유발, 경련과 사망을 초래한다(Roumieh et al., 2013). 또한, 높은 농도의 암모니아는 신경독성을 일으켜 세포의 사멸과 정상세포 간의 신호전달을 조절하는 N-methyl-D-aspartate (NMDA) 수용체를 과활성화 시켜, Ca²⁺와 Na⁺ 유입을 유발하고, 세포 내 Ca²⁺는 Ca²⁺-의존성 효소를 활성화시키고, 결국 세포사멸을 초래한다(Randall and Tsui, 2002).

혈액학적 성상은 유독 물질의 영향을 평가하기 위한 독성학 및 환경 연구에서 생리적 변화를 판단하는 중요한 지표로 많이 이용되고 있다(Kim and Kang, 2014). 수중 환경의 암모니아 노출에 따른 수중 생물 체내에 증가된 암모니아 분자는 산소를 대신하고, 헤모글로빈(hemoglobin)과 높은 친화력을 나타내어, 무산소 상태 및 혈중 암모니아 농도 증가 등 혈액학적 성상에 영향을 미친다(Das et al., 2004). 따라서, 헤모글로빈(hemoglobin)과 적혈구용적(hematocrit)와 같은 혈액성상 및 다양

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2017.0750>



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.

Korean J Fish Aquat Sci 50(6) 750-755, December 2017

Received 8 October 2017; Revised 25 October 2017; Accepted 1 November 2017

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

E-mail address: junhwan1982@korea.kr

한 혈장성분에 대한 분석은 암모니아 독성에 따른 생물의 생리적 변화를 평가하는 좋은 지표가 될 것이다.

독성물질에 노출된 수중생물은 활성산소 발생으로 인한 산화스트레스를 받는다(Kim and Kang, 2016a). 산화되어 손상된 단백질은 효소의 활성을 저해하고 신진대사를 변화시킨다. 암모니아는 중추신경계에 작용하여 N-Methyl-D-aspartic acid (NMDA) 수용체 활성화에 의한 글루타민의 누적을 초래하며, 이는 nitric oxide (NO), reactive oxygen species (ROS) 및 reactive nitrogen speices (RNS)의 과잉 생산하며 산화스트레스를 유발하는 것으로 나타났다(Norenberg et al., 2007; Hegazi et al., 2010). 따라서 암모니아 노출에 따른 산화스트레스에 대한 방어기작인 항산화효소의 활성은 암모니아 산화스트레스와 독성을 평가하는 기준이 될 것이다.

바이오플라크 양식생물의 사육용수를 환수하지 않고, 수중의 유용미생물을 이용하여 암모니아와 아질산과 같은 유해한 질소 화합물을 제거하는 미래 친환경 양식기술로 각광 받고 있다 (Day et al., 2016). 바이오플라크 기술은 새우 종에서 많은 연구를 통해 양식기법이 마련되었지만, 어류인 넙치에 대한 연구는 시작단계이다. 바이오플라크를 이용한 넙치 양식기술 개발에서 가장 기본적인 필수적인 요소는 사육환경 지킴 마련이다. 그 중 양식장 환경에서 자연적으로 발생하는 암모니아에 대한 기준 및 지표 마련은 무엇보다 시급한 과제이다. 우리나라 어류양식 산업에서 넙치의 중요성, 수중 암모니아의 독성영향 및 사육환경 지킴 마련 등의 중요성을 고려해볼 때, 본 실험에서 조사하고자 하는 암모니아 노출에 따른 넙치의 혈액성상 및 항산화효소의 변화는 암모니아 독성에 대한 사육기준 마련 및 암모니아 독성 정도를 판단하는 의미 있는 지표가 될 것이다.

재료 및 방법

실험어 및 실험환경

평균 무게 6.8 ± 1.1 g의 치어를 분양 받아, 바이오플라크 사육환

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

Item	Value
Temperature (°C)	22.2±0.5
pH	8.09±0.10
Salinity (PSU)	33.8±0.5
Dissolved oxygen (mg/L)	7.25±0.21

Table 2. Analyzed ammonia concentrations (mg/L) from each source

	Exposure concentration (mg/L)				
	0	8.0	16.0	32.0	64.0
Nominal ammonia concentrations					
Measured ammonia concentrations	0.38±0.21	7.58±0.47	15.67±0.85	30.36±1.03	65.33±3.71

경에서 6개월간 양식한 넙치(평균 체장 27.6 ± 3.1 cm, 평균 체중 280.4 ± 26.5 g)를 본 실험에 사용하였다. 바이오플라크 사육수는 물 만들기 초기에는 주기적으로 당밀을 공급하였으며, 물이 안정화 된 이후로는 넙치의 생리적 특성에 맞춰, 타가영양보다는 자가영양이 우세하도록 유지하였다. 노출에 사용된 암모니아는 NH_4Cl (Sigma Chemical, St. Louis, MO, $\geq 99.0\%$)를 이용하여, 암모니아 표준원액 $10,000 \text{ mg NH}_4^+/\text{L}$ 를 제조 후, 0, 8, 16, 32 및 $64 \text{ mg NH}_4^+/\text{L}$ 의 농도로 노출하였다. 실험어는 150 L 원형수조에 각 5마리씩 총 25마리를 수용하였고, 노출환경 및 노출 수조의 실제 암모니아 농도는 Table 1-2와 같다. 사전 노출실험을 실시하여, 바이오플라크 사육수에 의한 암모니아의 감소 시간을 확인한 결과, 3일째 암모니아 농도의 감소가 확인되었다. 따라서, 바이오플라크 사육수에 의한 암모니아 제거효과에 대한 간섭을 막기 위해, 사육수는 2일에 한번 완전 환수 후, 암모니아 농도를 다시 조정하여 노출실험을 실시하였다. 암모니아 노출 후, 실제 측정된 암모니아 농도는 해양환경공정시험기준 (2010)에 따라 측정하였다. 실험 완료 후, 생종개체는 동물실험 윤리에 따라 ethyl-3-aminobenzoate methanesulfonate salt를 이용하여 완전 마취하여 채혈 및 조직을 분리하였다.

혈액학적 성상 및 혈장성분

혈액은 헤파린 처리한 1 mL 일회용 주사기를 이용하여, 미부정맥에서 채혈 후 분석하였다. 혈액학적 성상인 hemoglobin 농도는 임상용 kit (Asan Pharm. Co., Ltd)를 이용하여 Cyanmethemoglobin법으로 측정하였으며, hematocrit는 모세관 내로 혈액을 넣어, Microhematocrit centrifuge (VS-12000, 한국)에서 12,000 rpm, 10분간 원심분리 후 Micro-hematocrit reader를 이용하여 측정하였다.

혈장 성분 분석을 위해 채취한 혈액은 4°C에서 10,000 rpm로 10분간 원심분리 후, 혈장을 분리하였다. 혈장 무기성분으로 calcium과 magnesium을 측정하였다. Calcium은 OCPC법, magnesium은 Xylidyl blue-I법에 따라 임상용 kit (Asan Pharm. Co., Ltd)를 이용하여 측정하였다. 혈장 유기성분으로 glucose, cholesterol, total protein을 측정하였다. Glucose는 GOD/POD법, cholesterol은 enzyme method, total protein은 Biuret법에 따라 임상용 kit (Asan Pharm. Co., Ltd)를 이용하여 측정하였다. 혈장효소 성분인 AST (Aspartate aminotransferase), ALT (Alanine aminotransminase), 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.

항산화반응

항산화반응을 확인하기 위해 항산화효소인 superoxide dismutase (SOD)와 catalase (CAT)를 분석하였다. 항산화효소를 측정하기 위해, 간과 아가미 조직을 분리 후, 0.1 M PBS (phosphate buffer solution)로 조직 중량의 10배 PBS (0.1 M phosphate buffer solution)로 균질화 하였다. 균질화한 뒤 4°C에서 10,000 rpm로 30분간 원심분리하여 상등액을 분석에 사용하였다. SOD 활성은 WST-1의 환원반응에 대한 50% 억제 비율을 측정하는 방법의 SOD assay kit (Sigma Chemical, St. Louis, MO)를 이용하여 측정하였다(Kim and Kang, 2015a). CAT 활성은 CAT assay kit (Sigma Chemical, St. Louis, MO)를 이용하여 측정하였다(Kim and Kang, 2017a). 각 조직의 단백질 농도는 bovine plasma albumin (Sigma Chemical, St. Louis, MO)을 기준으로 하여 Bradford's method (1976)를 사용하여 측정하였다.

통계분석 방법

실험 분석 결과에 대한 통계학적 유의성은 SPSS 통계 프로그램(SPSS Inc.)을 이용하여 ANOVA test를 실시하고, 사후검정으로 Duncan's multiple range test를 통해 P<0.05일 때 유의성이 있는 것으로 간주하였다. 64 mg NH₄⁺/L 구간은 생존율 20% (1마리)로 유의성 검정을 위한 최소 개체수가 되지 않아 검정에는 제외하였다.

결 과

혈액학적 성상 및 혈장성분

암모니아 노출에 따른 바이오플라크 사육 넙치의 혈액학적 성상 및 혈장성분의 변화는 Fig. 1에 나타내었다. 혈액학적 성상인 hemoglobin 농도와 hematocrit 수치는 암모니아 32 mg NH₄⁺/L의 노출에서 유의적으로 감소하였다(P<0.05). 혈장 무기성분인 calcium은 암모니아 노출에 의해 유의적 변화는 나타나지

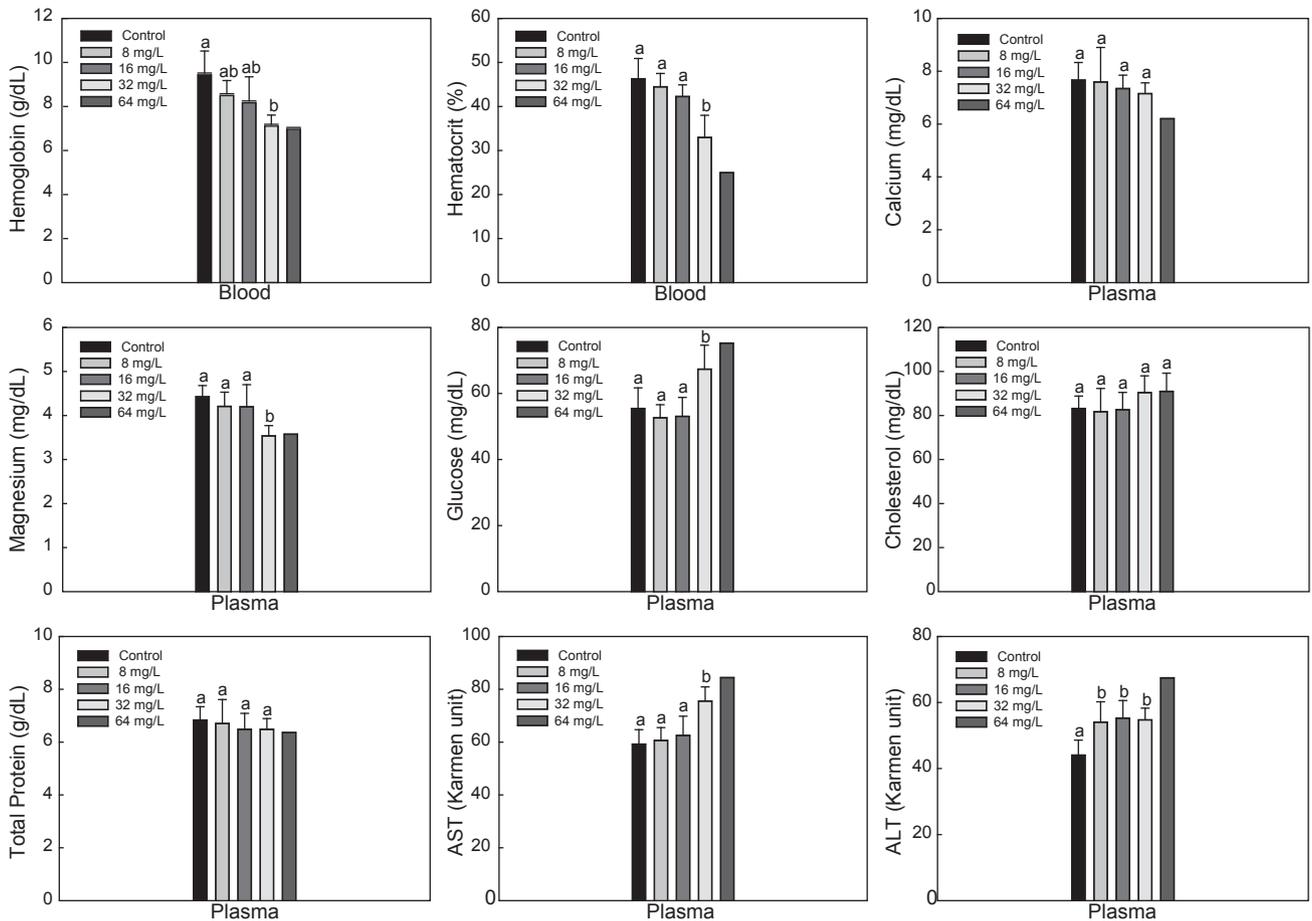


Fig. 1. Hematological parameters (hematocrit, hemoglobin, calcium, magnesium, glucose, cholesterol, total protein, AST and ALT) of flatfish *Paralichthys olivaceus* exposed to ammonia for 7 days. Values with different superscript are significantly different (P<0.05) as determined by Duncan's multiple range test. AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransaminase.

않았지만, magnesium에서는 32 mg NH₄⁺/L의 노출에서 유의적으로 감소하였다(P<0.05). 혈장 유기성분인 glucose 역시 32 mg NH₄⁺/L의 노출에서 유의적인 증가를 나타내었다(P<0.05). 하지만, cholesterol과 total protein은 유의적인 변화는 없었다. 혈장 효소성분인 AST는 암모니아 32 mg NH₄⁺/L의 노출에서 유의적으로 증가하였으며, ALT는 8 mg NH₄⁺/L의 노출에서 유의적인 증가를 나타내었다(P<0.05).

항산화반응

암모니아 노출에 따른 바이오플라크 사육 넙치의 항산화효소인 SOD와 CAT 활성의 변화는 Fig. 2에 나타내었다. 간 조직의 SOD 활성은 암모니아 16 mg NH₄⁺/L 이상의 노출에서 유의적으로 증가하였다(P<0.05). 아가미 조직의 SOD 활성은 암모니아 32 mg NH₄⁺/L의 노출에서 유의적으로 증가하였다(P<0.05). 간 조직의 CAT 활성은 암모니아 16 mg NH₄⁺/L 이상의 노출에서 유의적으로 증가하였으며(P<0.05), 아가미 조직의 CAT 활성은 암모니아 32 mg NH₄⁺/L의 노출에서 유의적으로 증가하였다(P<0.05).

고찰

암모니아는 질소대사과정의 결과물로 약 92%의 질소가 암모니아로 배출된다(Rama and Manjabhat, 2014). 혈액학적 성상의 변화는 스트레스에 의한 생리적 반응으로 나타나며, 높은 농도의 암모니아 노출은 암모니아와 헤모글로빈의 친화도를 증가시켜, 적혈구수 및 적혈구 용적 및 헤모글로빈의 감소를 유발할 수 있다(Kim et al., 2017b). 본 연구에서, 암모니아에 노출된 flatfish *Paralichthys olivaceus*의 hemoglobin 농도와 hematocrit 수치에서 유의적 감소가 나타났으며, 이는 암모니아 노출에 의한 저산소 상태에서 조혈세포 손상에 따른 것으로 판단된다. Das et al. (2004) 역시 아치사 농도의 암모니아에 노출된 mrigal *Cirrhinus mrigala*에서 hemoglobin 수치의 유의적 감소를 보고하였으며, 이는 아가미 상피를 관통하는 삼투조절의 손상으로 인한 혈액희석(hemodilution) 또는 조혈 기능의 감소 및 고갈이라고 보고했다.

혈장의 무기성분인 calcium과 magnesium은 삼투압 변화를 나타내는 주요한 지표이며, 다양한 환경변화에 의해 증가하거나 감소할 수 있다(Kim and Kang, 2014). 본 연구에서, 암모

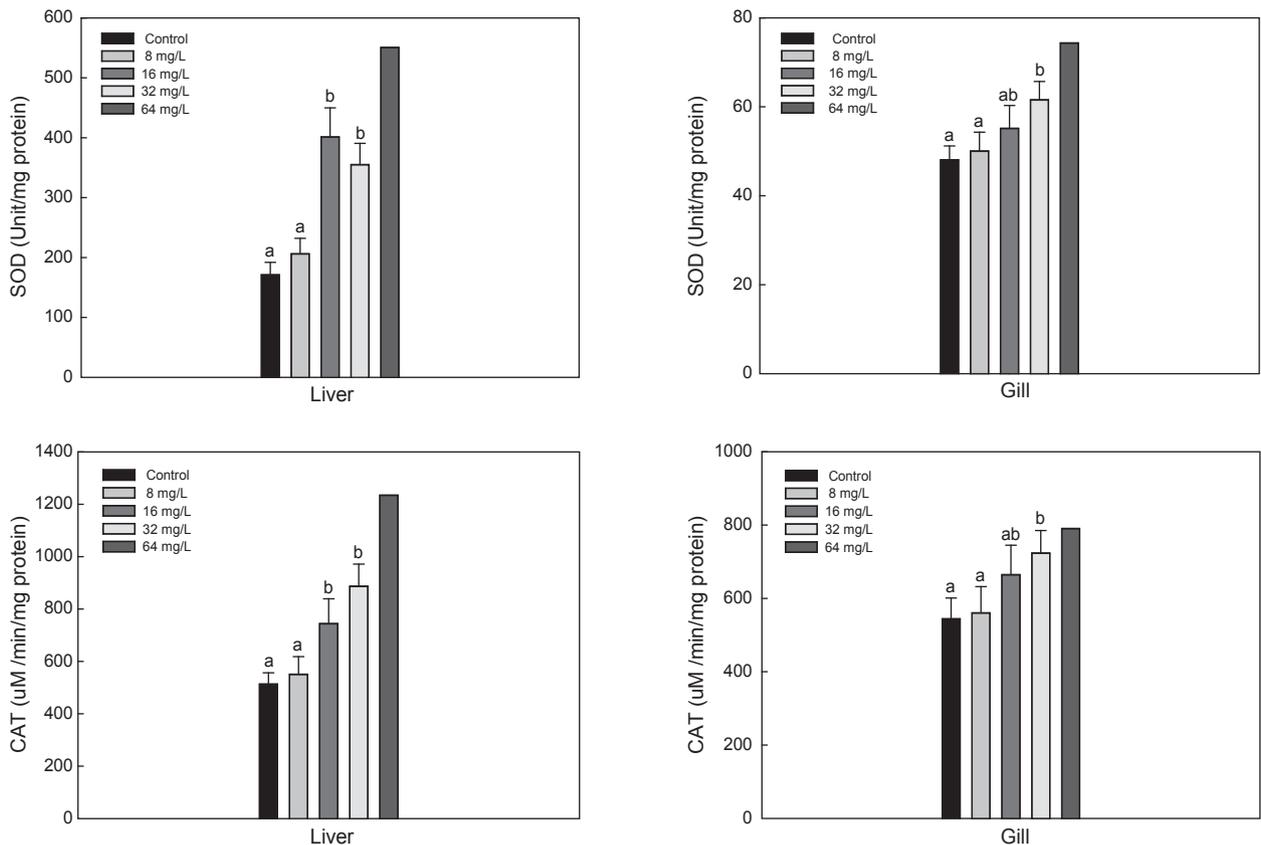


Fig. 2. Antioxidant responses (SOD and CAT activity) of flatfish *Paralichthys olivaceus* exposed to ammonia for 7 days. Values with different superscript are significantly different (P<0.05) as determined by Duncan's multiple range test. SOD, superoxide dismutase; CAT, catalase.

니아 노출은 *P. olivaceus*의 혈장 magnesium의 유의적 감소를 초래하였으며, 이는 암모니아 노출로 인한 이온조절 변화에 의한 것으로 판단된다. Kim et al. (2017b) 역시 암모니아 노출된 sablefish *Anoplopoma fimbria*에서 calcium과 magnesium의 유의적인 감소를 보고하였다.

외부 독성물질 노출에 따른 스트레스에 의한 혈중 glucose의 증가는 많은 연구에서 보고되었다(Kim and Kang, 2014; Kim and Kang, 2015b; Kim and Kang, 2016b). 이러한 glucose의 증가는 어류에 가해지는 스트레스가 catecholamine의 분비를 활성화시키기 위해 adrenaline과 nor-adrenaline을 방출시키고, 분비된 catecholamine은 간에서 glycogen이 glucose로의 전환을 증가시키기 때문이다. 본 연구에서, 암모니아 노출은 *P. olivaceus*의 혈장 glucose의 유의적 증가를 초래하였다. 혈중 cholesterol은 세포막의 중요한 구성성분이며, 모든 스테로이드 호르몬의 전구체이며, 스트레스 지표로 주로 사용된다(Firat and Kargin, 2010). 하지만, 본 연구에서 암모니아 노출에 따른 *P. olivaceus* 혈장 cholesterol의 유의적 변화는 관찰되지 않았다. Das et al. (2004)은 암모니아 노출된 mirgal *Cirrhinus mrigala*에서 조직 손상에 의한 혈중 protein의 감소를 보고한 바 있으나, 본 실험에서는 암모니아 노출에 따른 혈중 total protein의 유의적 변화는 나타나지 않았다.

혈중 AST (aspartate aminotransferase) 와 ALT (alanine aminotransferase)는 간세포 손상을 판단하는 중요한 지표이며, 암모니아 노출에 대한 해독에 중요한 역할을 한다(Lemaire et al., 1991; Rama and Manjabhat, 2014). 본 실험에서 암모니아의 노출은 *P. olivaceus*에서 AST 및 ALT의 유의적인 증가를 초래하였다. 많은 연구에서 암모니아 노출에 따른 carp *Cyprinus carpio*; black sea bream *Acanthopagrus schlegelii*; sablefish *Anoplopoma fimbria*의 AST와 ALT 유의적 증가를 보고 하였으며(Jeney et al., 1992; Kwon and Chang, 1996; Kim et al., 2017b), 이러한 혈장 효소의 증가는 조직 괴사에 따른 것으로 판단된다.

높은 수준의 암모니아 노출은 세포의 생화학 및 생리학적 변화를 유발하고, 과다한 활성산소를 발생시켜 산화적 손상을 야기한다(Kosenko et al., 1997). SOD (superoxide dismutase)는 산화스트레스에 대한 1차 방어기작으로 산화스트레스를 유발하는 superoxide radical을 과산화수소(H_2O_2)와 산소(O_2)로 분해시키는 대표적인 항산화효소 중 하나이다. 그리고 CAT (catalase)는 과산화수소(H_2O_2)를 물과 산소로 분해를 촉매하는 항산화효소이다. 항산화효소는 생물의 항산화상태를 나타내기에, 산화스트레스에 대한 바이오마커 역할을 하며, SOD와 CAT 활성은 수생생물의 항산화 방어 상태의 지표로 사용된다(Rama and Manjabhat, 2014). 본 실험에서 암모니아의 노출은 *P. olivaceus*의 간과 아가미 조직의 SOD와 CAT 효소의 활성을 유의적으로 증가시켰다. Cheng et al. (2015)는 암모니아 노출에 의한 pufferfish *Takifugu obscurus* 세포의 reactive oxygen

species (ROS) 증가를 통해 암모니아 노출이 산화스트레스를 유발 함을 확인하였다. 또한 Kim et al. (2015)는 암모니아에 노출된 rockfish *Sebastes schlegelii*의 SOD와 CAT의 유의적 증가를 보고한 바 있다.

생물에서 독성물질의 노출은 ROS 생성을 자극하고, 이로 인한 ROS의 증가는 산화적 손상을 야기하며, 이는 어류의 오염물질이 매개하는 독성 메커니즘과 관련이 있다. 그리고 산화스트레스는 ROS 생성이 항산화 기능의 방어능력을 초과할 때 발생한다(Kim and Kang, 2017b; Kim et al., 2017c). 본 연구에서 *P. olivaceus*의 암모니아 노출은 항산화효소의 증가를 유발 함을 확인하였다.

본 실험에서 바이오플락 사육수에서 사육된 *P. olivaceus*의 암모니아 노출은 $32 \text{ mg NH}_4^+/\text{L}$ 에서 유의적인 혈액학적 성상의 변화를 초래하였으며, $16 \text{ mg NH}_4^+/\text{L}$ 이상의 농도에서 유의적인 항산화효소의 변화를 나타내었다. 이러한 결과는 바이오플락 사육수에서 생물을 양성하는 과정에서 사육지표에 대한 기준을 제시해 줄 것이다. 향후 일반 유수식에서 사육된 넙치와 바이오플락에서 사육된 넙치의 암모니아 노출에 따른 비교분석 실험을 통한 실험을 통해 사육수 환경에 따른 비교분석도 수행 되어야 할 것이다.

사 사

이 논문은 2017년 국립수산과학원 ‘해산 새우류양식 바이오플락 기술(BFT) 다변화 연구(R2017016)’의 지원으로 수행된 연구입니다. 본 연구 수행에 도움을 주신 조영록 박사님, 권세안 연구원, 김현수 연구원에게 감사의 인사 드립니다.

References

- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Cheng CH, Yang FF, Ling RZ, Liao SA, Miao YT, Ye CX and Wang AL. 2015. Effects of ammonia exposure on apoptosis, oxidative stress and immune response in pufferfish (*Takifugu obscurus*). *Aquat Toxicol* 164, 61-71. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.04.004>.
- Das PC, Ayyappan S, Jena JK and Das BK. 2004. Acute toxicity of ammonia and its sub-lethal effects on selected haematological and enzymatic parameters of mirgal, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). *Aquacult Res* 35, 134-143. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.00994.x>.
- Day SB, Salie K and Stander HB. 2016. A growth comparison among three commercial tilapia species in a biofloc system. *Aquacult Int* 24, 1309-1322. <https://doi.org/10.1007/s10499-016-9986-z>.
- Eddy FB. 2005. Ammonia in estuaries and effects on fish. *J*

- Fish Biol 67, 1495-1513. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2005.00930.x>.
- Firat O and Kargin F. 2010. Individual and combined effects of heavy metals on serum biochemistry of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Arch Environ Contam Toxicol 58, 151-157. <https://doi.org/10.1007/s00244-009-9344-5>.
- Hegazi MM, Attia ZI and Ashour OA. 2010. Oxidative stress and antioxidant enzymes in liver and white muscle of Nile tilapia juvenile in chronic ammonia exposure. Aquat Toxicol 99, 118-125. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.04.007>.
- Jeney G, Nemcsok J, Jeney Z and Olah J. 1992. Acute effect of sublethal ammonia concentrations on common carp (*Cyprinus carpio* L.). II. Effect of ammonia on blood plasma trasaminases (GOT, GPT), G1DH enzyme activity, and ATP value. Aquaculture 104, 149-156. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(92\)90145-B](https://doi.org/10.1016/0044-8486(92)90145-B).
- Kim JH and Kang JC. 2014. The selenium accumulation and its effect on growth, and haematological parameters in red sea bream, *Pagrus major*, exposed to waterborne selenium. Ecotoxicol Environ Saf 104, 96-102. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.02.010>.
- Kim JH and Kang JC. 2015a. Oxidative stress, neurotoxicity, and non-specific immune responses in juvenile red sea bream, *Pagrus major*, exposed to different waterborne selenium concentrations. Chemosphere 135, 46-52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.03.062>.
- Kim JH and Kang JC. 2015b. The lead accumulation and hematological findings in juvenile rock fish *Sebastes schlegelii* exposed to the dietary lead (II) concentrations. Ecotoxicol Environ Saf 115, 33-39. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.02.009>.
- Kim SH, Kim JH, Park MA, Hwang SD and Kang JC. 2015. The toxic effects of ammonia exposure on antioxidant and immune responses in Rockfish, *Sebastes schlegelii* during thermal stress. Environ Toxicol Pharmacol 40, 954-959. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.10.006>.
- Kim JH and Kang JC. 2016a. Oxidative stress, neurotoxicity, and metallothionein (MT) gene expression in juvenile rock fish *Sebastes schlegelii* under the different levels of dietary chromium (Cr⁶⁺) exposure. Ecotoxicol Environ Saf 125, 78-84. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.12.001>.
- Kim JH and Kang JC. 2016b. The chromium accumulation and its physiological effects in juvenile rockfish, *Sebastes schlegelii*, exposed to different levels of dietary chromium (Cr⁶⁺) concentrations. Environ Toxicol Pharmacol 41, 152-158. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.12.001>.
- Kim JH and Kang JC. 2017a. Growth performance, oxidative stress, and non-specific immune responses in juvenile sablefish, *Anoplopoma fimbria*, by changes of water temperature and salinity. Fish Physiol Biochem 43, 1421-1431. <https://doi.org/10.1007/s10695-017-0382-z>.
- Kim JH and Kang JC. 2017b. Effects of sub-chronic exposure to lead (Pb) and ascorbic acid in juvenile rockfish: Antioxidant responses, MT gene expression, and neurotransmitters. Chemosphere 171, 520-527. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.094>.
- Kim JH, Park HJ, Hwang IK, Han JM, Kim DH, Oh CW, Lee JS and Kang JC. 2017a. Toxic effects of juvenile sablefish, *Anoplopoma fimbria* by ammonia exposure at different water temperature. Environ Toxicol Pharmacol 54, 169-176. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.07.008>.
- Kim JH, Park HJ, Hwang IK, Han JM, Kim DH, Oh CW, Lee JS and Kang JC. 2017b. Alterations of growth performance, hematological parameters, and plasma constituents in the sablefish, *Anoplopoma fimbria* depending on ammonia concentrations. Fish Aquat Sci 20, 20:4. <https://doi.org/10.1186/s41240-017-0049-9>.
- Kim JH, Oh CW and Kang JC. 2017c. Antioxidant responses, neurotoxicity, and metallothionein gene expression in juvenile Korean rockfish *Sebastes schlegelii* under dietary lead exposure. J Aquat Anim Health 27, 112-119. <http://dx.doi.org/10.1080/08997659.2017.1307286>.
- Kosenko E, Kaminsky M, Kaminsky A, Valencia M, Lee L, Hermenegildo C and Felipe V. 1997. Superoxide production and antioxidant enzymes in ammonia intoxication in rats. Free Radical Res 27, 637-644. <http://dx.doi.org/10.3109/10715769709097867>.
- Kwon JY and Chang YJ. 1996. Effects of ammonia concentration on histological and physiological status in black seabream (*Acanthopagrus schlegelii*). Korean J Fish Aquat Sci 29, 828-836.
- Lemaire P, Drai P, Mathieu A, Lemaire S, Carriere S, Giudicelli J and Lafaurie M. 1991. Changes with different diets in plasma enzymes (GOT, GPT, LDH, ALP) and plasma lipids (cholesterol, triglycerides) of sea-bass (*Dicentrarchus labrax*). Aquaculture 93, 63-75. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(91\)90205-L](https://doi.org/10.1016/0044-8486(91)90205-L).
- Norenberg MD, Jayakumar AR, Rao KVR and Panickar KS. 2007. New concepts in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling. Metab Brain Dis 22, 219-234. <https://doi.org/10.1007/s11011-007-9062-5>.
- Rama S, Manjabhat SN. 2014. Protective effect of shrimp carotenoids against ammonia stress in common carp, *Cyprinus carpio*. Ecotoxicol Environ Saf 107, 207-213. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.06.016>.
- Randall DJ and Tsui TKN. 2002. Ammonia toxicity in fish. Mar Pollut Bull 45, 17-23. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(02\)00227-8](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00227-8).
- Roumieh R, Barakat A, Abdelmeguid NE, Ghanawi J and Saoud, IP. 2013. Acute and chronic effects of aqueous ammonia on marbled spinefoot rabbitfish, *Siganus rivulatus* (Forsskal 1775). Aquacult Res 44, 1777-1790. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2012.03188.x>.