

# 수인성 구리 급성노출에 의한 향어(*Cyprinus carpio nudus*)의 혈액학적 성상 및 혈장성분의 독성영향

조아현 · 홍수민 · 정지호 · 은지수 · 주창훈 · 김준환\*

선문대학교 수산생명의학과

## Toxic Effects of Waterborne Copper Exposure on the Hematological Parameters and Plasma Components of Mirror Carp *Cyprinus carpio nudus*

A-Hyun Jo, Su-Min Hong, Ji-ho Jeong, Ji-Su Eun, Chang-Hoon Joo and Jun-Hwan Kim\*

Sun Moon University, Department of Aquatic Life and Medical Science, Asan 31460, Korea

Mirror carp *Cyprinus carpio nudus* (weight 42.0±3.8 g, length 14.3±0.4 cm) were exposed to different concentrations of waterborne copper (0, 100, 200, 400, 800, and 1,600 µg Cu<sup>2+</sup>·L<sup>-1</sup>) at 20.3°C for 96 h. The lethal concentration 50 of waterborne copper was 1,176.45 µg Cu<sup>2+</sup>·L<sup>-1</sup>. Among hematological parameters, red blood cell count was significantly decreased, whereas there were no significant changes in the hemoglobin concentration and hematocrit value. Among the inorganic plasma components, calcium was significantly decreased following copper exposure. Conversely, organic plasma components such as glucose and total protein were significantly increased. Similarly, enzymatic components, such as aspartate transaminase, alanine transaminase, and alkaline phosphatase, were also significantly increased. These findings suggest that the copper exposure is detrimental to the survival rates and physiology of *C. carpio nudus*.

Keywords: Copper exposure, LC<sub>50</sub>, Hematological parameters, Plasma components, Mirror carp

### 서론

구리는 자연계에 가장 많이 존재하는 전이금속 중 하나이며, 어류의 필수미량 원소로 생물의 결합조직 형성, 신경전달물질 생합성, 이온 항상성 유지 등 다양한 세포기능에 작용하는 물질이다(Mendelsohn et al., 2006; Azevedo et al., 2021). 하지만, 수중의 구리는 케이블, 전자장치, 방부제, 살충제, 페인트 및 비료 첨가제 등 다양한 산업 폐수로 인해 수중 생태계에 영향농도 이상으로 존재할 수 있으며, 이는 수중 생태계에 직접적인 독성으로 작용할 수 있다(Mazon et al., 2002; Simonato et al., 2016). 높은 수준의 구리는 어류의 아가미에 과도한 축적을 일으켜 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase를 억제하여 나트륨(Na<sup>+</sup>) 및 염화(Cl<sup>-</sup>) 이온의 항상성 교란을 유발할 수 있으며, 심각한 이온 손실은 심정지 및 폐사를 유발할 수 있다(Blanchard and Grosell, 2006;

Crémazy et al., 2016). 또한, 구리는 어류의 감각상피에서 축적을 일으켜, 뇌의 감각기능에 영향을 미쳐 식욕, 시력, 후각, 인지 등 다양한 신경 및 행동학적 장애를 유발할 있다(Pilehvar et al., 2020). 특히 담수어류에서는 해산어류와는 다른 삼투조절 작용으로 인해 수인성 구리 노출은 아가미 조직에 빠르게 축적이 나타날 수 있으며, 체내로 들어온 구리 이온은 순환계를 통해 간, 신장 및 근육과 같은 주요 조직에 흡수되어 생체 주요기능에 독성을 유발할 수 있다(Liu et al., 2010; Eyeckmans et al., 2011).

반수치사농도(lethal concentration 50%, LC<sub>50</sub>)는 독성 노출 실험에서 독성물질의 급성노출에 의해 실험 어류의 50%를 폐사시키는 농도로, 이는 독성물질의 생태위해성 정도를 평가하는 중요한 지표이며, 아급성 및 만성 실험을 위한 독성기준 농도를 산정하는데 필요한 기준점을 제시한다(Linbo et al., 2009; Ulah et al., 2016). 특히, 구리는 어류의 필수미량원소이며 금속

\*Corresponding author: Tel: +82. 41. 530. 2206 Fax: +82. 41. 530.2917

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.2021.0954>

Korean J Fish Aquat Sci 54(6), 954-964, December 2021

Received 14 October 2021; Revised 3 December 2021; Accepted 6 December 2021

저자 직위: 조아현(대학생), 홍수민(대학생), 정지호(대학생), 은지수(대학생), 주창훈(대학생), 김준환(교수)

독성을 유발하는 독성으로 모두 작용할 수 있으며, 영양소와 독성의 농도 범위는 매우 좁기 때문에 수인성 구리 노출에 따른 독성기준을 제시하는 것은 중요하다(Santore et al., 2001). 따라서 수인성 구리 급성 노출에 따른 반수치사농도는 수인성 구리 노출에 대한 독성 정도를 제시해 줄 수 있을 것이며, 담수 생태계에서 영향농도에 대한 기준을 마련해 줄 것이다.

수인성 구리는 담수 어류의 아가미를 통해 빠르게 축적이 일어나며, 빠르게 순환계로 흡수되어 어류의 생리적 영향을 줄 수 있다(Akbary et al., 2018). 따라서, 혈액학적 성상은 수인성 구리 노출에 따른 어류의 독성이 발현되는 직접적인 요소이며, 이를 통해 수인성 구리가 어류에게 미치는 독성을 평가하는 민감하고 신뢰성 있는 기준을 제시해 줄 것이다(Kim and Kang, 2004; Yu et al., 2021). 수인성 구리의 노출은 어류의 아가미 조직을 주요 표적장기로 하여 적혈구 분해 및 혈구 손상을 유발하여 이온조절 항상성 붕괴 및 산소공급 장애를 통한 저산소증을 일으킬 수 있다(Sampaio et al., 2008). 반면, 수인성 구리는 필수미량원소로 헤모글로빈 합성에도 관여하여 적혈구 형성과 과도하게 자극하여, 적혈구 용해와는 반대의 영향도 나타날 수 있다(Mazon et al., 2002). 따라서, 수인성 구리 노출에 따른 혈액학적 성상 및 혈장성분의 변화는 수인성 구리 노출에 따른 빈혈, 저산소증 및 독성생리를 나타내는 주요한 지표로 이용할 수 있을 것이다(Priya et al., 2015).

향어(mirror carp *Cyprinus carpio nudus*)는 높은 사료 효율과 빠른 성장으로 인해 전 세계적으로 가장 많이 양식되는 담수 어종이다(Tokur et al., 2006; Li et al., 2019). 또한 향어는 우리나라에서 부드러운 육질과 높은 영양성분으로 인해 보양식으로 높은 선호도를 가진 어종이기도 하며, 다양한 수산물 가공을 이용하여 식품 산업적인 높은 가능성을 지니고 있다(Du et al., 2020). 우리나라에서 향어는 주요 담수 생태 종이며 양식어종이지만, 수인성 구리 급성 노출에 따른 향어의 독성 영향 농도 및 기준지표에 대한 연구는 거의 이루어지지 않고 있다. 수인성 구리 급성 노출에 따른 혈액학적 성상에 대한 독성영향은 많은 담수어종에서 밝혀져 있으며, 향어에서도 유사한 독성영향이 나타날 것으로 판단이 되며, 구리 노출에 따른 독성에 대한 정확한 기준지표가 필요하다. 따라서 본 연구의 목적은 수인성 구리 급성 노출에 따른 향어의 반수치사농도를 확인하여 수인성 구리 독성에 대한 기준지표 설정과 혈액학적 성상 및 혈장성분의 변화를 통해 수인성 구리 급성 노출에 따른 독성생리를 확인하고 사육환경 지침 마련을 위한 기초자료로 활용하는 데 있다.

## 재료 및 방법

### 실험어 및 실험환경

본 실험에 이용된 향어(무게  $42.0 \pm 3.8$  g, 전장  $14.3 \pm 0.4$  cm)는 아산 인근의 종묘생산장에서 분양 받아 실험실 환경에서 사육 양성한 개체를 이용하였다. 실험은 실험 전 2주간 실험실 환경에서 순치를 실시하였으며, 실험수조는 30 L 유리 사각수조를 이용하여, 5개의 농도구간(0, 100, 200, 400, 800 및 1,600  $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{L}$ )으로 96시간 급성 노출을 실시하였다. 실험은 총 50 마리(구리 농도구간 5개  $\times$  실험구간 당 5마리  $\times$  반복구 2개)를 이용하여 급성 노출을 진행하였으며, 실험 기간 중 수질(수온, 용존산소 및 pH)은 휴대용 수질 분석기(YSI-Professnal plus; YSI Inc., Yellow Springs, OH, USA)를 이용하여 측정하였으며, 암모니아, 아질산, 질산 및 인산염은 수질환경분석법(Ministry of Oceans and Fisheries, Sejong, Korea)을 이용하여 분석을 실시하였다(Table 1). 본 연구에서 구리 급성 노출은 염화구리[CuCl<sub>2</sub>, Copper (II) chloride]를 이용하여, 표준원액 10,000 mg Cu<sup>2+</sup>/L를 만들었으며 각 수조에 농도에 맞게 급성 노출을 실시하였으며, 구리 농도구간 별 실제 구리 농도는 Table 2와 같다.

### 반수치사농도(LC<sub>50</sub>)

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

### 혈액성상

혈액학적 분석은 수인성 구리 급성 노출 96시간 후 살아있는

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

Item	Value
Temperature (°C)	20.3±0.4
pH	8.10±0.09
Dissolved Oxygen (mg/L)	6.19±0.18
Ammonia (µg/L)	0.54±0.13
Nitrite (µg/L)	0.35±0.21
Nitrate (mg/L)	0.16±0.03
Phosphate (µg/L)	11.3±0.7

Table 2. Analyzed waterborne copper concentration ( $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{L}$ ) from each source

Copper concentrations	Copper concentration ( $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{L}$ )				
	Control	100	200	400	800
Measured copper concentrations	0.09	104.2	201.7	392.4	807.2

개체를 이용하여 채혈을 실시하였다. 혈액은 대조구-400 µg Cu<sup>2+</sup>/L에서 10마리 샘플링을 실시했으며, 800 µg Cu<sup>2+</sup>/L에서 7마리 샘플링을 실시하였다. 채혈은 헤파린(Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) 처리된 주사기를 사용하였으며, 채혈 직후 헤모글로빈(hemoglobin), 적혈구 용적(hematocrit) 및 적혈구수(red blood cell count, RBC count)를 즉시 분석하였다. Hemoglobin 수치는 임상용 kit (Asan Pharm. Co., Ltd., Seoul, Korea)를 이용하여 Cyan-methemoglobin법으로 측정하였다. Hematocrit는 모세관 내로 혈액을 넣어, Microhematocrit centrifuge (VS-12000; Hanil Scientific Inc., Gimpo, 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(mean corpuscular volume, MCV), 평균적혈구혈색소량(mean corpuscular hemoglobin, MCH) 및 평균적혈구헤모글로빈농도(mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC)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 구리 급성 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 Xylydyl blue-I법에 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 이용하였다. 혈장 효소활성으로 AST (aspartate aminotransferase), ALT (alanine aminotransminase) 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.

### 통계분석 방법

본 실험분석은 수인성 구리 각 농도구간에서 10마리를 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

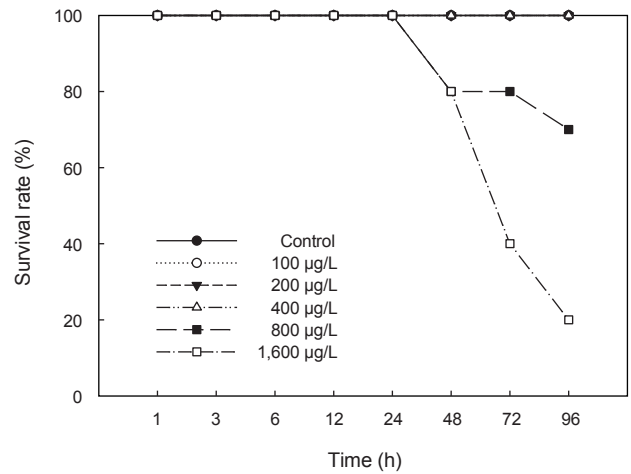


Fig. 1. Survival rate of mirror carp *Cyprinus carpio nudus* exposed to waterborne copper for 96 h.

range test를 통해 P<0.05일 때 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

### 동물실험윤리 승인

본 실험은 선문대학교 동물실험윤리위원회를 통해 실험방법 및 진행이 동물실험윤리에 적합하다는 승인(SM-2021-06-01)을 통해 연구가 수행되었으며, 연구 참가자들은 동물복지 및 동물실험에 대한 교육을 받았다.

### 결 과

#### 생존율 및 반수치사농도(LC<sub>50</sub>)

수인성 구리 급성 노출에 따른 향어의 생존율은 Fig. 1에 나타내었다. 대조구에서 400 µg Cu<sup>2+</sup>/L의 노출에서는 폐사 개체

Table 3. Lethal concentration (LC<sub>50</sub>) of mirror carp *Cyprinus carpio nudus* exposed to waterborne copper for 96 h

Probability	95% confidence limits estimate (mg/L)
0.01	199.20
0.10	638.09
0.20	822.901
0.30	956.16
0.40	1,070.02
0.50	1,176.45
0.60	1,282.87
0.70	1,396.73
0.80	1,529.99
0.90	1,714.80
0.99	2,153.69

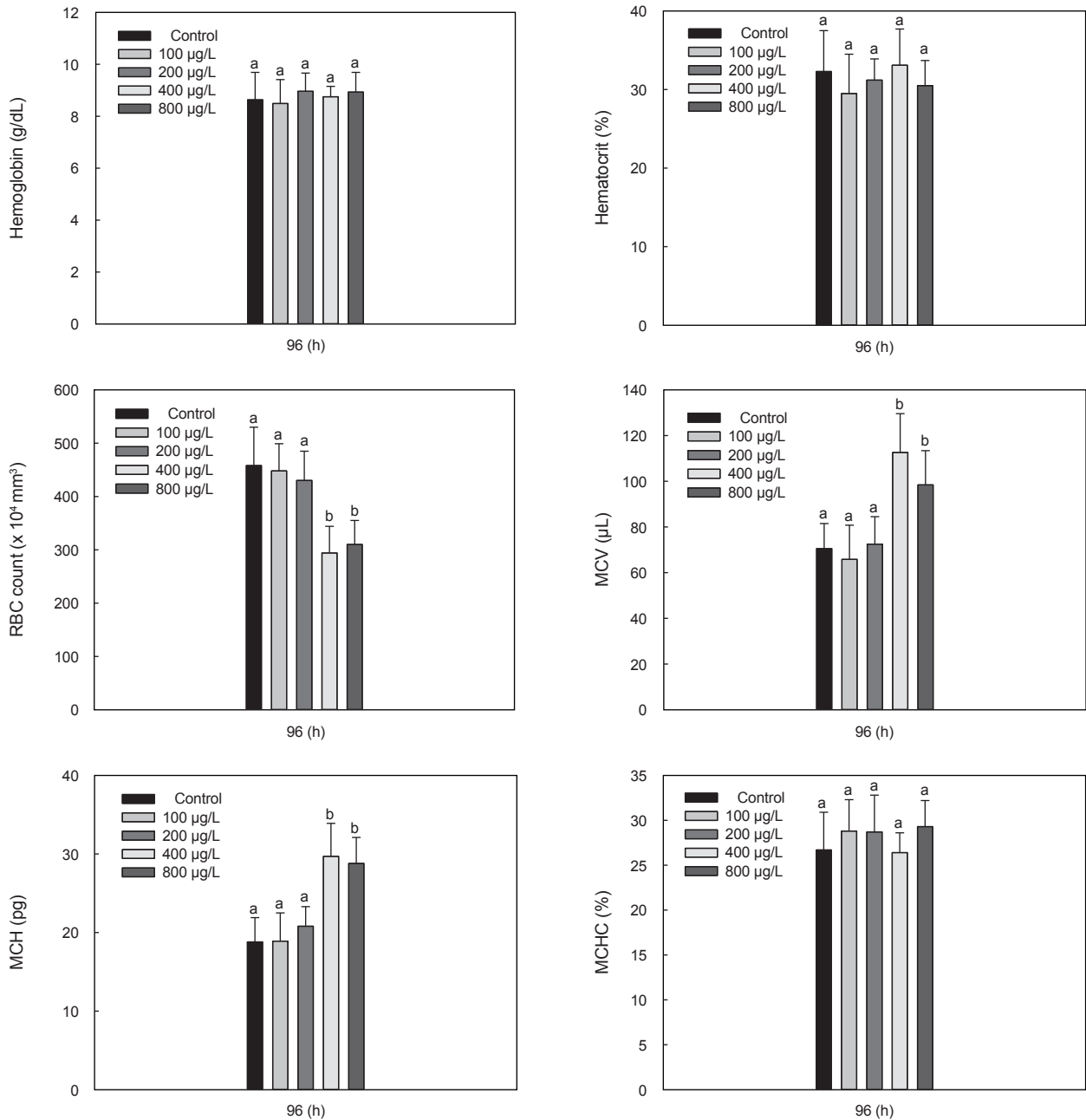


Fig. 2. Hematological parameters of mirror carp *Cyprinus carpio nudus* exposed to waterborne copper for 96 h. Values with different letters indicate significantly different ( $P < 0.05$ ) after one-way ANOVA following Tukey's multiple range test.

는 없었으며, 800 µg Cu<sup>2+</sup>/L의 노출에서는 노출 48시간부터 폐사 개체가 발생하기 시작하여 노출 96시간 뒤 30%가 폐사하였다. 1,600 µg Cu<sup>2+</sup>/L의 노출에서도 노출 48시간부터 폐사 개체가 발생하기 시작하여 노출 96시간 뒤 80%가 폐사하였다. 수인성 구리 노출에 따른 향어의 반수치사농도(LC<sub>50</sub>)는 Table 3에 나타내었다. 수인성 구리 노출에 따른 향어의 반수치사농도는 1,176.45 µg Cu<sup>2+</sup>/L로 나타났다.

### 혈액학적 증상

수인성 구리 급성 노출에 따른 향어의 혈액학적 성상은 Fig. 2에 나타내었다. 향어의 hemoglobin concentration과 hematocrit value는 수인성 구리 노출에 의해 유의적인 변화는 나타나지 않았다. 하지만 RBC count는 400 µg Cu<sup>2+</sup>/L 이상의 수인성 구리 노출에 의해 유의적으로 감소하였다( $P < 0.05$ ). Hemoglo-

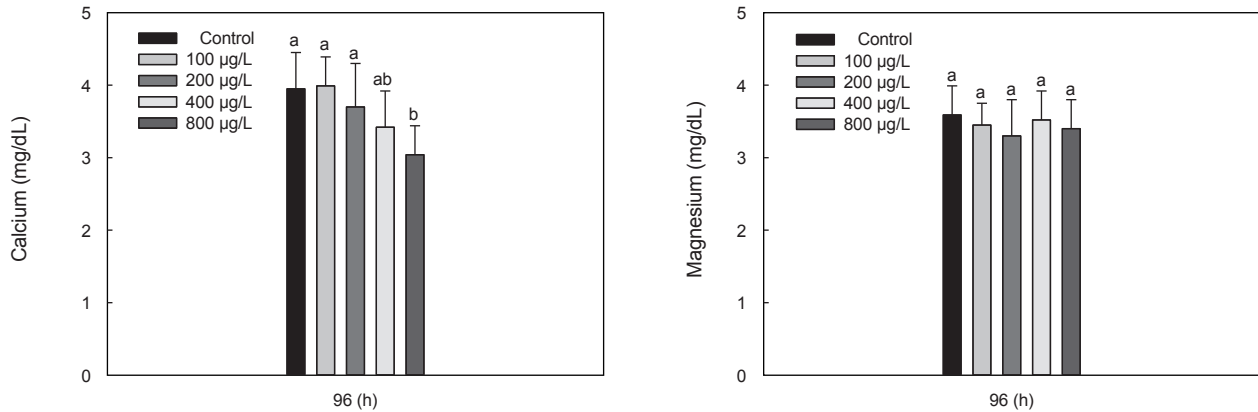


Fig. 3. Inorganic plasma components of mirror carp *Cyprinus carpio nudus* exposed to waterborne copper for 96 h. Values with different letters indicate significantly different ( $P<0.05$ ) after one-way ANOVA following Tukey’s multiple range test.

bin, hematocrit 및 RBC count 결과를 바탕으로 MCV ( $\mu\text{L}$ ) 및 MCH (pg)은 수인성 구리  $400 \mu\text{g Cu}^{2+}/\text{L}$  이상의 농도에서 유의적으로 증가하였다( $P<0.05$ ). 하지만, MCHC (%)는 수인성 구리 노출에 따른 유의적인 변화는 나타나지 않았다.

혈장 성분

수인성 구리 급성 노출에 따른 향어의 혈장 무기성분은 Fig. 3에 나타내었다. 혈장 calcium은  $800 \mu\text{g Cu}^{2+}/\text{L}$ 의 수인성 구리 노출에 의해 유의적으로 감소하였다( $P<0.05$ ). 하지만, 혈장 magnesium은 수인성 구리 노출에 따른 유의적인 변화는 나타나지 않았다.

수인성 구리 급성 노출에 따른 향어의 혈장 유기성분은 Fig. 4에 나타내었다. 혈장 glucose는  $200 \mu\text{g Cu}^{2+}/\text{L}$  이상의 수인성 구리 노출에 의해 유의적으로 증가하였으며, 증가하는 경향은 농도 의존적으로 더욱 높게 나타났다( $P<0.05$ ). 혈장 cholesterol은 수인성 구리 노출에 따른 유의적인 변화는 나타나지 않았다. 혈장 total protein은  $800 \mu\text{g Cu}^{2+}/\text{L}$ 의 수인성 구리 노출에 의해 유의적으로 증가하였다( $P<0.05$ ).

수인성 구리 급성 노출에 따른 향어의 혈장 효소성분은 Fig. 5에 나타내었다. 혈장 AST는  $100 \mu\text{g Cu}^{2+}/\text{L}$  이상의 수인성 구

리 노출에 의해 유의적으로 증가하였다( $P<0.05$ ). 혈장 ALT 역시  $100 \mu\text{g Cu}^{2+}/\text{L}$  이상의 수인성 구리 노출에 의해 유의적으로 증가하였다( $P<0.05$ ). 혈장 ALP는  $800 \mu\text{g Cu}^{2+}/\text{L}$ 의 수인성 구리 노출에 의해 유의적으로 증가하였다( $P<0.05$ ).

고 찰

수인성 구리의 급성 노출은 담수 생태계에 다양한 생물에게 독성으로 작용할 수 있으며 어류는 수생태계 대표적인 지표종이며 먹이사슬 최상위에 있어 먹이 농축을 통해 독성 급성 노출에 따른 영향을 가장 많이 받는다(Kamunde et al., 2002). 구리는 유럽지역 강에 존재하며 광범위한 사용으로 수생태계에 많은 영향을 미치며, 낮게는  $1.3\text{-}17.5 \mu\text{g Cu}^{2+}/\text{L}$ 에서  $100 \mu\text{g Cu}^{2+}/\text{L}$  이상인 곳도 존재한다(Real et al., 2003). 수중에 높은 수준의 구리 급성 노출은 생물에게 치명적인 독성으로 작용하며, 대량 폐사를 유발할 수 있다(Gopi et al., 2019) (Table 4). Vieira et al. (2009)는 common goby *Pomatoschistus microps*의 수인성 구리의 96시간 급성노출에서  $25 \mu\text{g Cu}^{2+}/\text{L}$ 의 농도에서는 폐사는 나타나지 않았지만,  $1,600 \mu\text{g Cu}^{2+}/\text{L}$ 에서는 100% 폐사를 나타내었다고 보고했다.

Meng et al. (2018)에 따르면 수인성 구리 급성 노출에 따른

Table 4. Lethal concentration ( $LC_{50}$ ) of comparative fish species exposed to waterborne copper for 96 h

Fish	Length (cm)	Weight (g)	Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )	Lethal concentration ( $LC_{50}$ )
<i>Cyprinus carpio</i>	-	$10.10\pm 0.01$	$25\pm 1$	$1,420 \mu\text{g Cu}^{2+}/\text{L}$
<i>Prochilodus lineatus</i>	$9.8\pm 1.2$	$10.1\pm 3.5$	$20.9\pm 0.8$	$29 \mu\text{g Cu}^{2+}/\text{L}$
<i>Labeo rohita</i>	-	$14.47\pm 0.43$	30	$33.41 \text{ mg Cu}^{2+}/\text{L}$
<i>Ctenopharyngodon Idella</i>	-	$10.58\pm 0.33$		$21.36 \text{ mg Cu}^{2+}/\text{L}$
<i>Cirrhina mrigala</i>	-	$11.28\pm 0.67$		$17.17 \text{ mg Cu}^{2+}/\text{L}$
<i>Catla catla</i>	-	$19.66\pm 0.24$		$16.85 \text{ mg Cu}^{2+}/\text{L}$
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	-	$64.2\pm 28.3$		$17\pm 1$

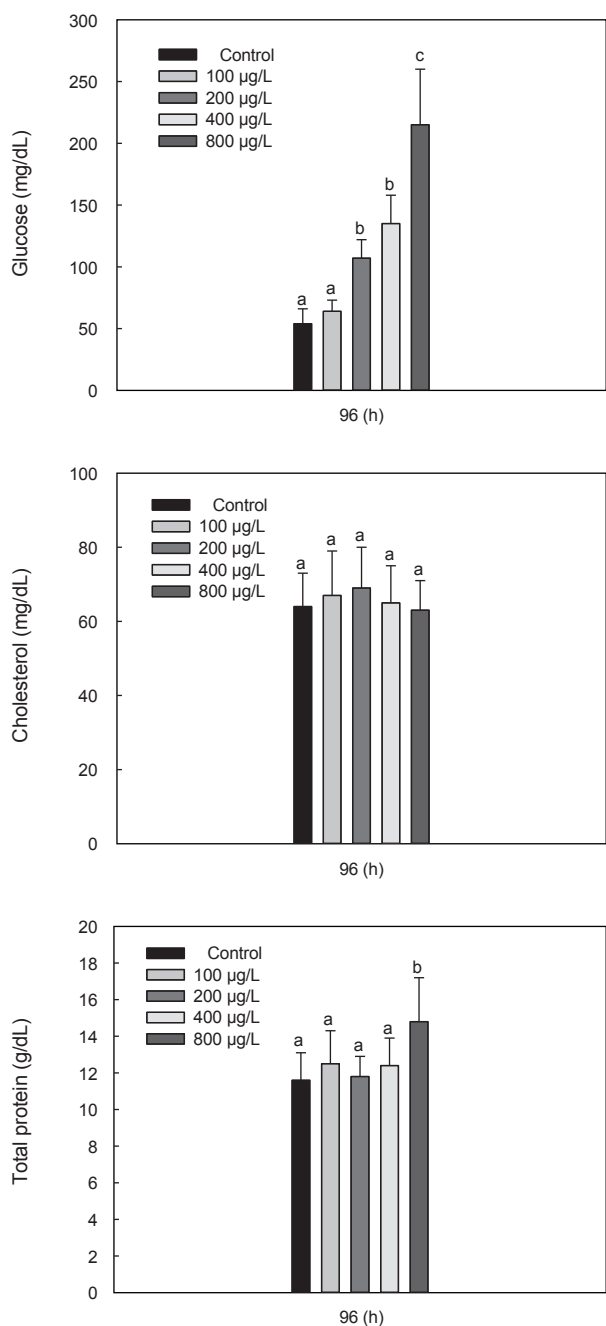


Fig. 4. Organic plasma components of mirror carp *Cyprinus carpio nudus* exposed to waterborne copper for 96 h. Values with different letters indicate significantly different ( $P < 0.05$ ) after one-way ANOVA following Tukey's multiple range test.

잉어(*Cyprinus carpio*)의 96시간 반수치사농도는 본 연구와 비슷한 1,420 µg Cu<sup>2+</sup>/L으로 보고했다. Simonato et al. (2016)는 수인성 구리 급성 노출에 따른 streaked prochilod *Prochilodus lineatus*의 반수치사농도는 29 µg Cu<sup>2+</sup>/L라고 보고하였

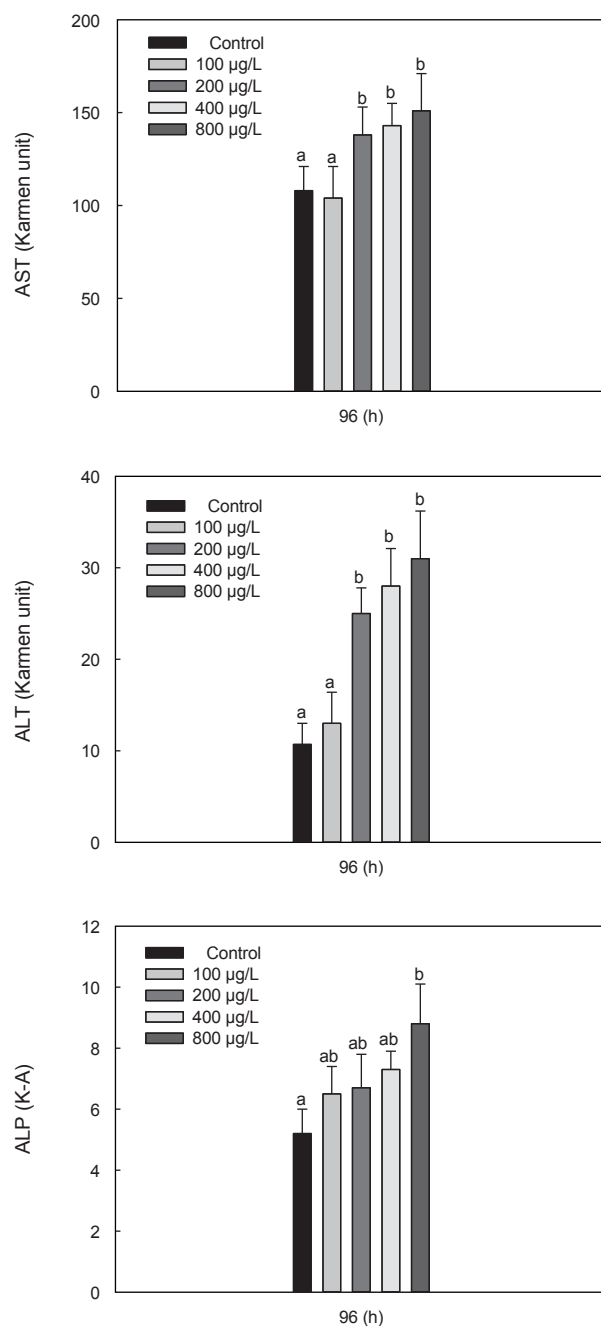


Fig. 5. Enzymatic plasma components of mirror carp *Cyprinus carpio nudus* exposed to waterborne copper for 96 h. Values with different letters indicate significantly different ( $P < 0.05$ ) after one-way ANOVA following Tukey's multiple range test.

다. Kousar and Javed (2015) 또한 rohu *Labeo rohita*, grass carp *Ctenopharyngodon Idella*, Mrigal *Cirrhina mrigala* 및 Catla *Catla catla*에서 내성한계 이상의 수인성 구리 급성 노출로 인한 폐사를 보고했으며, 96시간 반수치사농도는 각 33.41

mg Cu<sup>2+</sup>/L, 21.36 mg Cu<sup>2+</sup>/L, 17.17 mg Cu<sup>2+</sup>/L 및 16.85 mg Cu<sup>2+</sup>/L라고 보고했다. De Boeck et al. (2004)는 무지개 송어 (*Oncorhynchus mykiss*)에서 구리 급성 노출에 따른 96시간 반수치사농도는 210 µg Cu<sup>2+</sup>/L라고 보고했다. 본 연구에서 수인성 구리 급성 노출에 따른 향어의 폐사는 800 µg Cu<sup>2+</sup>/L에서 나타나기 시작하여 1,600 µg Cu<sup>2+</sup>/L의 급성 노출에서 80%의 폐사를 유발하여 96시간 수인성 구리 급성 노출에 따른 향어의 반수치사농도는 1,176.45 µg Cu<sup>2+</sup>/L로 나타났다. 수인성 구리 급성 노출에 따른 반수치사농도는 어종에 따른 민감도의 차이를 나타내는 것으로 나타났다. 향후 수인성 구리 급성 노출에 따른 정확한 독성을 평가하기 위해 구리의 분자 입자크기, 어종, 생물 크기, 성, 노출환경 등 다양한 생물학적 요소 및 환경적 요소를 복합적인 접근이 이루어져야 할 것이다.

수인성 구리에 노출된 어류는 아가미를 통해 체내로 흡수되며 상피세포 곤봉화와 같은 아가미 형태학적 변화를 유발하며 이로 인해 혈액 내 저산소증, 가스교환 및 이온교환 등의 혈액학적 성상에 직접적인 영향을 미칠 수 있다(Kim et al., 2019). 특히 혈액학적 성상은 어류의 건강상태를 평가하는 중요한 지표로 이용되기 때문에 독성노출에 따른 영향을 평가하기 위한 민감하고 신뢰할 수 있는 지표이다(Carvalho and Fernandes, 2006). Hemoglobin은 2개의 α-형 사슬과 β-형 사슬로 구성되어 있으며 활성조직에서 대사를 위해 산소와 이온을 전달하는 기능을 한다(Zhou et al., 2016). 일반적으로 아치사 농도의 독성물질 노출은 어류의 심각한 아가미 손상과 함께 hemoglobin, hematocrit 및 RBC count를 감소시키며, Simonato et al. (2016)은 수인성 구리에 노출된 streaked prochilod *P. lineatus*에서도 이러한 결과를 보고했다. Hoseini et al. (2018)는 구리 독성에 따른 혈액학적 성상의 감소는 독성노출에 따른 산화에 의한 것일 수 있다고 보고했다. Rajabierabadi et al. (2020)는 3주간 구리에 아급성으로 노출된 잉어(*C. carpio*)의 RBC 감소 및 hemoglobin 감소를 보고했으며, 이는 구리독성으로 인한 어류의 적혈구 용혈 및 hemoglobin 감소로 인한 빈혈을 유발했음을 의미한다. 반면, Hoyle et al. (2007)는 먹이를 통한 30일간의 구리 만성 노출이 African walking catfish *Clarias gariepinus*의 hemoglobin, hematocrit 및 RBC count에는 유의적인 변화를 나타내지 않았으며, 이는 구리 노출에 따른 혈액성상의 영향이 제한적으로 나타날 수 있음을 의미한다.

본 연구에서 수인성 구리 급성 노출에 따른 향어의 hemoglobin 및 hematocrit는 유의적인 변화는 나타나지 않았지만, RBC count에서는 유의적 감소가 나타났다. 본 실험에서 수인성 구리 급성 노출에도 헤모글로빈 수치는 유의적 변화 없이 유지되었으며, 이는 철 대사 및 heme 합성을 방해하는데 제한적으로 영향을 미치지 않았음을 의미한다. 그리고 RBC count 값이 유의적으로 감소하였음에도 hematocrit 수치가 유지되는 것은 적혈구 세포의 swelling 현상이 일어났음을 의미한다. 그리고 RBC count의 유의적 감소는 산화촉진제로 구리가 적혈구 세포 막을

공격하고 용혈을 유발했을 가능성이 있음을 나타낸다. MCV는 적혈구 생성 동안 비정상적/정상적인 세포분열을 반영하기 때문에, MCV의 증가는 저산소 상태로 인한 거대적혈구 빈혈을 초래하는 적혈구의 팽창을 의미하며, Wani and Sikdar-Bar (2013)는 90일간 구리 만성 노출에 의한 African sharptooth catfish *C. gariepinus*의 MCV의 유의적 증가를 보고하였다. 본 연구에서 수인성 급성 노출에 의한 향어의 MCV 및 MCH 수치에서 유의적 증가를 나타내어 적혈구 용적이 증가했음을 나타내며, 적혈구혈색소량 역시 증가했음을 의미한다.

어류의 혈장 무기성분은 혈액 내 삼투압을 일정하게 유지하는 역할을 하며, 수인성 구리 노출은 어류의 혈액학적 성상뿐만 아니라 어류 혈장 이온성분의 조성에도 변화를 유발하여 삼투조절 실패 및 이온조절 교란을 초래할 수 있다(Baek et al., 2014). 혈장 calcium은 아가미 조직에서 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 및 Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger에서 효소활성과 연관이 있으며, 혈장 magnesium은 에너지대사와 단백질 합성에도 영향을 미치며 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase 및 Na-K-Cl cotransporter의 보조인자로 이용된다(Kim et al., 2021a). Taylor et al. (2000)는 30일간 수인성 구리 만성 노출에 따른 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*)의 혈장 calcium의 유의적 감소를 보고했다. Kim and Kang (2004) 역시 먹이를 통한 60일간 구리의 만성 노출이 조피볼락(*Sebastes schlegelii*)의 혈장 magnesium에 유의적 증가를 보고하였다. 본 연구에서 수인성 구리 급성 노출은 향어의 혈장 calcium의 유의적 감소를 나타내었으며, 이는 수인성 구리 급성 노출에 따른 삼투교란 및 실패 등의 영향을 미쳤음을 의미한다. 하지만, 혈장 magnesium에서는 유의적 변화는 나타나지 않아 수인성 구리 급성 노출에 따른 혈장 삼투조절에 대한 독성영향은 제한적으로 나타났음을 의미한다.

혈장 유기성분 중 혈장 glucose는 다양한 환경 독성 노출에 의한 스트레스를 평가하기 위한 주요한 지표이며, 환경 스트레스 노출 시 어류의 탄수화물 대사과정의 증가로 인해 일반적으로 상승하기 때문에 어류 스트레스 및 건강 상태를 판단할 수 있다(Kim et al., 2021b). Monteiro et al. (2005)는 틸라피아(*Oreochromis niloticus*)의 혈장 glucose가 21일간 수인성 구리의 아급성 노출에서 노출 시간과 농도 사이의 높은 상관관계를 나타내며 유의적으로 증가했다고 보고했다(Monteiro et al., 2005). Heydarnejad et al. (2013)는 30일간 구리 만성 노출에 따른 무지개송어(*O. mykiss*)의 혈장 glucose의 유의적 증가를 보고했으며, 이는 조직 단백질과 아미노산으로부터 glycogen 분해 및 glucose 합성에 의한 것으로 주장했다. Canli and Canli (2015) 역시 30일간 구리에 만성 노출된 어류에서 급속 스트레스에 의해 탄수화물 대사를 교란하고 혈장 glucose 증가를 유발할 수 있다고 주장했다. 본 연구에서 수인성 구리에 급성 노출된 향어의 혈장 glucose는 유의적으로 증가했으며, 이는 혈액시스템 내의 corticosteroid 및 catecholamine 농도의 증가로 인해 유발될 수 있으며, 이러한 증가는 수인성 구리 노출에 따른 독성을 해

독하기 위해 간 조직의 글리코겐 분해에 의한 것으로 판단된다.

혈장 cholesterol은 모든 스테로이드 호르몬의 전구체이며, 세포막에서 구조를 지탱하는 역할을 하는 주요 성분이다(Kim et al., 2020). Kim et al. (2020)는 2주간 암모니아 아급성 노출에 따른 대왕범바리(*Epinephelus lanceolatus*♂ × *Epinephelus fuscoguttatus*♀)의 혈장 cholesterol의 증가를 보고했으며, 이는 독성 노출에 따른 간 및 신장 등 주요조직의 기능장애를 유발하여 혈장으로 cholesterol 방출에 따른 결과라고 주장했다. 혈장 cholesterol은 다양한 독성 노출에 의한 지질생화학의 파괴로 인해 변화가 나타날 수 있지만, 본 연구에서 수인성 구리 급성 노출에 따른 향어의 혈장 cholesterol은 유의적 변화는 나타나지 않았다.

혈장 total protein은 어류의 대사 건강을 평가하는 중요한 지표로 어류 체내 체액 누출 방지 및 항상성 유지뿐만 아니라 금속 이온대사에 관여하는 ceruloplasmin과 transferrin과 같은 대사단백질로서 역할을 한다(Firat and Kargin, 2010). 단백질 합성은 주로 간 조직에서 일어나기 때문에 간 손상, 흡수 감소 및 단백질 손실로 인한 변화가 나타날 수 있다(Canlı and Canli, 2015). 본 연구에서 수인성 구리에 급성 노출된 향어의 혈장 total protein은 유의적으로 증가하였다. Abdel-Tawwab et al. (2007)는 독성물질의 영향으로 인한 간 세포 및 기타 기관의 손상으로 인해 혈장 total protein의 일시적인 증가가 나타날 수 있다고 주장했으며, 1주일간 구리 독성에 아급성으로 노출된 African catfish *C. gariepinus*의 혈장 total protein의 증가를 보고했다. Hoseini et al. (2014)는 독성물질 노출에 의한 어류의 단백질 수준의 증가는 phosphorylcholine과 glycoprotein을 통해 손상된 조직 표면에 결합하여 자가면역에 대한 보호 반응에 의한 것일 수 있다고 주장했다.

혈장 효소성분인 AST, ALT 및 ALP는 다양한 독성 물질 노출 시 어류의 간 손상과 밀접한 연관이 있어 간 독성을 평가하는 주요한 지표로 이용된다. AST는 심장, 간 및 RBC를 포함한 많은 조직에서 발견되며, ALT는 어류 간에서 고농도로 발견되는 효소이다(Hoseini et al., 2018). Rajabiesterabadi et al. (2020)는 AST 및 ALT는 간 세포에서 고농도로 발견되며 3주간 구리에 아급성으로 노출된 잉어(*C. carpio*)에서 구리 노출에 따른 간의 해독 및 배설을 위해 유의적인 증가가 나타났다고 보고했다. 본 연구에서 수인성 구리 급성 노출에 의한 향어의 혈장 AST 및 ALT는 유의적으로 증가하였다. Karan et al. (1998)는 96시간 구리 급성 노출된 잉어(*Cyprinus carpio*)의 혈장 AST 및 ALT가 증가했다고 보고했으며, 이는 구리노출에 의한 간 조직의 손상의 결과일 수 있다고 주장했다. Firat et al. (2011) 역시 21일간 구리에 아급성으로 노출된 킬리피아(*O. niloticus*)의 혈장 AST 및 ALT의 증가를 보고했으며, 이는 독성물질에 의해 간 세포에서 조직손상의 형태로 세포 내 효소가 세포에서 혈장으로 방출되어 나타났을 것이라고 주장했으며, 이는 구리 노출에 의한 간의 퇴행성 변화 및 기능저하를 의미한다. 혈장 ALP

는 nucleotides, proteins 및 alkaloids 등의 여러 분자에서 인산기를 제거하는 가수분해효소로 어류의 독성노출에 의한 간 조직 손상 및 기능장애를 평가하는 지표로 많이 이용된다(Oh et al., 2020). 본 연구에서 수인성 구리의 노출에 의해 향어의 혈장 ALP는 유의적 증가를 나타내었다. Heydarnejad et al. (2013)는 30일간 구리에 만성 노출된 무지개송어(*O. mykiss*)의 혈장 ALP의 유의적 증가를 보고하였다. 본 연구에서 수인성 구리 급성 노출에 의해 향어의 혈장 효소성분인 AST, ALT 및 ALP의 유의적 증가가 나타나는 것을 확인했으며, 이러한 결과를 통해 수인성 구리가 향어의 간 조직에 표적 독성으로 작용하여 조직 손상 및 기능장애를 유발했을 것으로 판단된다.

본 실험에서 높은 수준의 수인성 구리(> 800 µg Cu<sup>2+</sup>/L)의 급성노출은 향어의 높은 폐사를 유발하였으며, 수인성 구리 노출에 따른 향어의 96시간 반수치사농도는 1,176.45 µg Cu<sup>2+</sup>/L로 나타났다. 본 실험에서 400 µg Cu<sup>2+</sup>/L이상의 수인성 구리의 노출은 향어의 적혈구 수, 평균적혈구용적 및 평균적혈구색소량 등의 혈액학적 성상의 유의적 변화를 나타내었으며, 200 또는 400 µg Cu<sup>2+</sup>/L이상의 수인성 구리의 노출은 향어의 calcium, glucose, total protein, AST, ALT 및 ALP 등 혈장성분의 변화를 초래하였다. 따라서 영향농도 이상의 수인성 구리는 향어의 혈액생리에 직접적인 영향을 미치며, 한계농도 이상의 수인성 구리의 노출은 항상성 붕괴로 인해 폐사를 초래함을 확인하였다. 향후 수인성 구리의 독성에 영향을 미치는 다양한 환경적 요인에 대한 추가적인 연구를 수행을 통해 정확한 구리 독성 기준지표를 확립해야 할 것이다.

## References

- Abdel-Tawwab M, Mousa MA and Abbass FE. 2007. Growth performance and physiological response of African catfish, *Clarias gariepinus* (B.) fed organic selenium prior to the exposure to environmental copper toxicity. *Aquaculture* 272, 335-345. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.09.004>.
- Akbary P, Yarahmadi SS and Jahanbakhshi A. 2018. Hematological, hepatic enzymes' activity and oxidative stress responses of gray mullet *Mugil cephalus* after sub-acute exposure to copper oxide. *Environ Sci Poll Res* 25, 1800-1808. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0582-1>.
- Azevedo ACB, Bozza DA, Doria HB, Osório FHT, Corcini CD, Pereira FA and Ribeiro CO. 2021. Low levels of inorganic copper impair reproduction parameters in *Oreochromis niloticus* after chronic exposure. *Aquaculture* 545, 737186. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737186>.
- Baeck S, Min E and Kang JC. 2014. Combined effects of copper and temperature on hematological constituents in the rock fish, *Sebastes schlegeli*. *J Fish Pathol* 27, 57-65. <https://doi.org/10.7847/jfp.2014.27.1.057>.
- Blanchard J and Grosell M. 2006. Copper toxicity across salinities from freshwater to seawater in the euryhaline fish



- Fundulus heteroclitus*: is copper an ionoregulatory toxicant in high salinities?. *Aquat Toxicol* 80, 131-139. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.08.001>.
- Canli EG and Canli M. 2015. Low water conductivity increases the effects of copper on the serum parameters in fish *Oreochromis niloticus*. *Environ Toxicol Pharmacol* 39, 606-613. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.12.019>.
- 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>.
- Crémazy A, Wood CM, Smith DS, Ferreira MS, Johannsson OE, Giacomini M and Val AL. 2016. Investigating copper toxicity in the tropical fish cardinal tetra *Paracheirodon axelrodi* in natural Amazonian waters: Measurements, modeling, and reality. *Aquat Toxicol* 180, 353-363.
- Boeck De G, Meeus W, Coen De W and Blust R. 2004. Tissue-specific Cu bioaccumulation patterns and differences in sensitivity to waterborne Cu in three freshwater fish: rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, common carp *Cyprinus carpio*, and gibel carp *Carassius auratus gibelio*. *Aquat Toxicol* 70, 179-188. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.07.001>.
- Du X, Chang P, Tian J, Kong B, Sun F and Xia X. 2020. Effect of ice structuring protein on the quality, thermal stability and oxidation of mirror carp (*Cyprinus carpio* L.) induced by freeze-thaw cycles. *LWT-Food Sci Technol* 124, 109140. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109140>.
- Eyckmans M, Celis N, Horemans N, Blust R and Boeck De G. 2011. Exposure to waterborne copper reveals differences in oxidative stress response in three freshwater fish species. *Aquat Toxicol* 103, 112-120. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.02.010>.
- Firat Ö 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>.
- Firat Ö, Cogun HY, Yüzereroğlu TA, Gök G, Firat Ö, Kargin F and Kötemen Y. 2011. A comparative study on the effects of a pesticide (cypermethrin) and two metals (copper, lead) to serum biochemistry of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish Physiol Biochem* 37, 657-666. <https://doi.org/10.1007/s10695-011-9466-3>.
- Gopi N, Vijayakumar S, Thaya R, Govindarajan M, Alharbi NS, Kadaikunnan S and Vaseeharan B. 2019. Chronic exposure of *Oreochromis niloticus* to sub-lethal copper concentrations: effects on growth, antioxidant, non-enzymatic antioxidant, oxidative stress and non-specific immune responses. *J Trace Elem Med Biol* 55, 170-179. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2019.06.011>.
- Heydarnejad MS, Khosravian-hemami M, Nematollahi A and Rahnama S. 2013. Effects of copper at sublethal concentrations on growth and biochemical parameters in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Int Rev Hydrobiol* 98, 71-79. <https://doi.org/10.1002/iroh.201201443>.
- Hoseini SM, Hedayati A and Ghelichpour M. 2014. Plasma metabolites, ions and thyroid hormones levels, and hepatic enzymes' activity in Caspian roach *Rutilus rutilus caspicus* exposed to waterborne manganese. *Ecotoxicol Environ Saf* 107, 84-89. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.05.002>.
- Hoseini SM, Hoseinifar SH and Doan HV. 2018. Effect of dietary eucalyptol on stress markers, enzyme activities and immune indicators in serum and haematological characteristics of common carp *Cyprinus carpio* exposed to toxic concentration of ambient copper. *Aquac Res* 49, 3045-3054. <https://doi.org/10.1111/are.13765>.
- Hoyle I, Shaw BJ and Handy RD. 2007. Dietary copper exposure in the African walking catfish *Clarias gariepinus*: Transient osmoregulatory disturbances and oxidative stress. *Aquat Toxicol* 83, 62-72. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.03.014>.
- Kamunde C, Clayton C and Wood CM. 2002. Waterborne vs. dietary copper uptake in rainbow trout and the effects of previous waterborne copper exposure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283, R69-R78. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00016.2002>.
- Karan V, Vitorović S, Tutundžić V and Poleksić V. 1998. Functional enzymes activity and gill histology of carp after copper sulfate exposure and recovery. *Ecotoxicol Environ Saf* 40, 49-55. <https://doi.org/10.1006/eesa.1998.1641>.
- Kim SG and Kang JC. 2004. Effect of dietary copper exposure on accumulation, growth and hematological parameters of the juvenile rockfish, *Sebastes schlegeli*. *Mar Environ Res* 58, 65-82. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2003.12.004>.
- Kim JH, Cho JH, Kim SR and Hur YB. 2020. 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>.
- Kim JH, Choi H, Sung G, Seo SA, Kim KI, Kang YJ and Kang JC. 2019. Toxic effects on hematological parameters and oxidative stress in juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* exposed to waterborne zinc. *Aquac Rep* 15, 100225. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2019.100225>.
- Kim JH, Kim SR, Kim SK and Kang HW. 2021a. Effects of pH changes on blood physiology, antioxidant responses and Ig M of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquac Rep* 21, 100790. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100790>.
- Kim JH, Yu YB and Choi JH. 2021b. Toxic effects on bioaccumulation, hematological parameters, oxidative stress, immune responses and neurotoxicity in fish exposed to microplastics: A review. *J Hazard Mater* 413, 125423. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125423>.

- org/10.1016/j.jhazmat.2021.125423.
- Kousar S and Javed M. 2015. Studies on induction of nuclear abnormalities in peripheral blood erythrocytes of fish exposed to copper. *Turk J Fish Aquat Sci* 15, 879-886. [https://doi.org/10.4194/1303-2712-v15\\_4\\_11](https://doi.org/10.4194/1303-2712-v15_4_11).
- Li F, Wang B, Kong B, Shi S and Xia X. 2019. Decreased gelling properties of protein in mirror carp *Cyprinus carpio* are due to protein aggregation and structure deterioration when subjected to freeze-thaw cycles. *Food Hydrocoll* 97, 105223. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105223>.
- Linbo TL, Baldwin DH, McIntyre JK and Scholz NL. 2009. Effects of water hardness, alkalinity, and dissolved organic carbon on the toxicity of copper to the lateral line of developing fish. *Environ Toxicol Chem* 28, 1455-1461. <https://doi.org/10.1897/08-283.1>.
- Liu XJ, Luo Z, Xiong BX, Liu X, Zhao YH, Hu GF and Lv GJ. 2010. Effect of waterborne copper exposure on growth, hepatic enzymatic activities and histology in *Synechogobius hasta*. *Ecotoxicol Environ Saf* 73, 1286-1291. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.06.019>.
- Mazon AF, Monteiro EAS, Pinheiro GHD and Fernandez MN. 2002. Hematological and physiological changes induced by short-term exposure to copper in the freshwater fish, *Prochilodus scrofa*. *Braz J Biol* 62, 621-631. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842002000400010>.
- Mendelsohn BA, Yin C, Johnson SL, Wilm TP, Solnica-Krezel L and Gitlin JD. 2006. Atp7a determines a hierarchy of copper metabolism essential for notochord development. *Cell Metab* 4, 155-162. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.05.001>.
- Meng XL, Li S, Qin CB, Zhu ZX, Hu WP, Yang LP and Nie GX. 2018. Intestinal microbiota and lipid metabolism responses in the common carp (*Cyprinus carpio* L.) following copper exposure. *Ecotoxicol Environ Saf* 160, 257-264. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.05.050>.
- Monteiro SM, Mancera JM, Fontainhas-Fernandes A and Sousa M. 2005. Copper induced alterations of biochemical parameters in the gill and plasma of *Oreochromis niloticus*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 141, 375-383. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2005.08.002>.
- Oh MH, Kim JY, Kim SR, Kim SK and Kim JH. 2020. Hematological parameters and stress responses of olive flounder *Paralichthys olivaceus* by acute pH change. *Korean J Fish Aquatic Sci* 53, 733-739. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2020.0733>.
- Pilehvar A, Town RM and Blust R. 2020. The effect of copper on behaviour, memory, and associative learning ability of zebrafish *Danio rerio*. *Ecotoxicol Environ Saf* 188, 109900. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109900>.
- Priya KK, Ramesh M, Saravanan M and Ponpandian N. 2015. Ecological risk assessment of silicon dioxide nanoparticles in a freshwater fish *Labeo rohita*: Hematology, ionoregulation and gill Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase activity. *Ecotoxicol Environ Saf* 120, 295-302. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.05.032>.
- Rajabiesterabadi H, Hoseini SM, Fazelan Z, Hoseinifar SH and Doan HV. 2020. Effects of dietary turmeric administration on stress, immune, antioxidant and inflammatory responses of common carp *Cyprinus carpio* during copper exposure. *Aquac Nutr* 26, 1143-1153. <https://doi.org/10.1111/anu.13071>.
- Real M, Munoz I, Guasch H, Navarro E and Sabater S. 2003. The effect of copper exposure on a simple aquatic food chain. *Aquat Toxicol* 63, 283-291. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(02\)00187-X](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(02)00187-X).
- Sampaio FG, de Lima Boijink C, Oba ET, dos Santos LRB, Kalinin AL and Rantin FT. 2008. Antioxidant defenses and biochemical changes in pacu *Piaractus mesopotamicus* in response to single and combined copper and hypoxia exposure. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 147, 43-51. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.07.009>.
- Santore RC, Di Toro DM, Paquin PR, Allen HE and Meyer JS. 2001. Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 2. Application to acute copper toxicity in freshwater fish and Daphnia. *Environ Toxicol Chem* 20, 2397-2402. <https://doi.org/10.1002/etc.5620201035>.
- Simonato JD, Mela M, Doria HB, Guiloski IC, Randi MA, Carvalho PS and Martinez CB. 2016. Biomarkers of waterborne copper exposure in the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Aquat Toxicol* 170, 31-41. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.11.012>.
- Taylor LN, McGeer JC, Wood CM and McDonald DG. 2000. Physiological effects of chronic copper exposure to rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in hard and soft water: evaluation of chronic indicators. *Environ Toxicol Chem* 19, 2298-2308. <https://doi.org/10.1002/etc.5620190920>.
- Tokur B, Ozkütük S, Atici E, Ozyurt G and Ozyurt CE. 2006. Chemical and sensory quality changes of fish fingers, made from mirror carp (*Cyprinus carpio* L., 1758), during frozen storage (-18°C). *Food Chem* 99, 335-341. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.044>.
- Ullah A, Rehman HU, Awais S, Ahsan M, Sardar AM, Muhammad N and Saeed K. 2016. Investigation of acute toxicity and LC<sub>50</sub> value of Cu for a fish *Oreochromis niloticus*. *J Entomol Zool Stud* 4, 605-607.
- Vieira LR, Gravato C, Soares AMVM, Morgado F and Guilhermino L. 2009. Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: linking biomarkers to behaviour. *Chemosphere* 76, 1416-1427. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.06.005>.
- Wani AA and Sikdar-Bar M. 2013. Efficacy of taurine and garlic extract in modulating the alterations in haematological parameters induced by long-term exposure to copper sulphate in *Clarias gariepinus*. *GERF Bull Biosci* 4, 1-10.
- Yu J, Xiao Y, Wang Y, Xu S, Zhou L, Li J and Li X. 2021.

Chronic nitrate exposure cause alteration of blood physiological parameters, redox status and apoptosis of juvenile turbot *Scophthalmus maximus*. Environ Pollut 283, 117103. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117103>.

Zhou XY, Zhang T, Ren L, Wu JJ, Wang W and Liu JX. 2016. Copper elevated embryonic hemoglobin through reactive oxygen species during zebrafish erythrocyte maturation. Aquat Toxicol 175, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.03.008>.