

과망간산칼륨, 안정화이산화염소, 포르말린, 황산동이 넙치
(*Paralichthys olivaceus*) 적혈구에 미치는 시험관내
용혈작용 및 메트헤모글로빈 생성 효과

정승희[†] · 김진우
국립수산과학원 병리연구팀

***In Vitro* Hemolysis and Methemoglobin Formation in Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*) Erythrocytes Induced by Potassium Permanganate, Stabilized Chlorine Dioxide, Formalin and Copper Sulphate**

Sung Hee Jung[†] and Jin Woo Kim

Pathology Team, National Fisheries Research & Development Institute,
408-1 Shirang Gijang, Busan 619-900, Korea

In Vitro hemolysis and methemoglobin (MetHb) formation in olive flounder erythrocytes were investigated using potassium permanganate (KMnO₄) ranging from 2 to 250 ppm, stabilized chlorine dioxide (S-CIO₂) ranging from 3.13 to 400 ppm, formalin (37% formaldehyde) ranging from 31.3 to 2,000 ppm and copper sulphate (CuSO₄) ranging from 0.04 to 5 ppm. Remarkable hemolysis was found to be induced at KMnO₄ concentrations of 31.3~250 ppm and CuSO₄ concentrations of 0.63~5 ppm. On the other hand, MetHb formation could not be found at the same treatment concentrations. It is suggested that the cell-damaging system of KMnO₄ may be similar from that of CuSO₄ in the erythrocytes of olive flounder. Remarkable hemolysis and MetHb formation were found to be induced at S-CIO₂ concentrations of more than 25 ppm and 6.25 ppm, respectively. Only S-CIO₂ showed both hemolysis and MetHb formation among the chemicals used in the present study. Formalin did not provoke hemolysis at the highest concentration of 2,000 ppm but induced MetHb formation at ranging from 250 to 2,000 ppm. These findings reveal that the mechanism involved in formalin-induced cell-damaging effects differs from that induced by S-CIO₂ to olive flounder erythrocytes compared with KMnO₄ and CuSO₄.

Key words : Olive flounder, Erythrocytes, Hemolysis, Methemoglobin, Formalin, Potassium Permanganate, Copper Sulphate, Stabilized Chlorine Dioxide

염화아민, 황산동, chlorinated wastewater, linear alkylbenzene sulfonate에 노출된 어류는 용혈작용 (hemolysis)이 높게 일어나고 (Buckley 1977; Herwig, 1982; Gwoździński *et al.*, 1992; Fujiwara, 1997), 과산화수소, 아질산, 아질산나트륨, 염소,

황화물, dichlorone, hydroxylamine, n-butyl mercap-ton은 어류의 methemoglobin (MetHb) 생성을 증가시키는 것으로 보고되었다 (Mather-Mihaich and Di-Giulio, 1986; Andaya and Giulio, 1987; Bartlett *et al.*, 1987; Nichols and Weber, 1989;

[†]Corresponding Author : Sung Hee Jung, Tel : 051-720-2490,
Fax : 051-720-2498, E-mail : immu@nfrdi.re.kr

Mazik *et al.*, 1991; Powell and Perry, 1997; Grosell and Jensen, 2000; Affonso *et al.*, 2002; Avilez *et al.*, 2004). 한편 아질산, 염소 및 과산화수소는 어류에 있어 높은 MetHb 생성을 일으킴과 동시에 용혈성 빈혈 (hemolytic anemia)을 초래한다고 보고되었다 (Zeitoun, 1977; Scarano *et al.*, 1984; Wang and Degao, 1989; Kawatsu *et al.*, 1991; Ferreira da Costa *et al.*, 2004). 따라서 MetHb 생성과 용혈작용은 적혈구의 cell damage 효과를 나타내는 좋은 측정 모델이며 서로 매우 비례적인 관계라고 예상되었다. 그러나 잉어 (*Cyprinus carpio*) 적혈구에 대하여 높은 MetHb 생성을 일으킨 Hypoxanthine-Xanthine Oxidase (HXO)는 용혈작용을 전혀 초래하지 않았다 (Kawatsu *et al.*, 1991). 이와 같이 어류 질병 치료에 사용되고 있는 화학약품을 대상으로 MetHb 생성과 용혈작용을 동시에 측정함으로써 적혈구의 cell damage 효과를 조사한 보고는 거의 없다.

과망간산칼륨, 이산화염소, 포르말린, 황산동은 어류 양식장에서 오랜 기간 질병 치료약제로 사용되어 왔다 (전, 1996; Karan *et al.*, 1998; Ryu *et al.*, 1998; Rydlo, 1999; Yacoob *et al.*, 2002; Thomas-Jinju and Goodwin, 2004). 본 연구는 이들 화학약품을 대상으로 넙치 적혈구의 cell damage에 미치는 영향을 알아보고자 *in vitro* 용혈작용과 MetHb 생성을 조사하였다.

재료 및 방법

넙치 혈구 부유액

건강한 양식 넙치 (390~480 g)를 0.015% 3-aminobenzoic acid ethyl ester (Sigma Chemical, USA)로 마취시켜 미병부에서 헤파린 처리한 주사기 (23G)로써 2 mL 까지 채혈하여, 50 mL 원심관에 넣고 30 mL의 BSS (Balanced Salt Solution: KH_2PO_4 122 mg/mL, Na_2HPO_4 14.0 mg/mL, CaCl_2 140 mg/mL, KCl 400 mg/mL, MgSO_4 98 mg/mL, NaCl 8,000 mg/mL, Glucose 1,000 mg/mL, NaHCO_3 350 mg/mL)를 첨가해서 잘 교

반하였다. 2,000 rpm (4°C), 5분간 원심분리하여 상층액을 버린 뒤에 이 세척과정을 2회 반복하여 최종적으로 30 mL의 BSS를 첨가해서 냉장 보관하였다. 이 혈구 부유액은 실험 직전에 제작하였으므로 냉장보관에 따른 소요 시간은 30분을 넘기지 않았고, 본 실험에는 모두 analytical grade의 시약을 사용하였다.

실험 약품의 농도별 반응액

과망간산칼륨 (KMnO_4 , Kanto chemical, Japan), 포르말린 (37% formaldehyde, HCHO, Kishida Chemical, Japan), 황산동 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Junsei chemical, Japan) 및 상품으로 시판되고 있는 안정화이산화염소 용액 (Stabilized ClO_2 , S- ClO_2 , 5% 수용액, 참신산업 주)의 stock solution을 BSS로 용해하여 만들었다. 이를 2단계 배수희석한 뒤에 최종으로 KMnO_4 2~250 ppm, S- ClO_2 3.13~400 ppm, HCHO 31.3~2,000 ppm, CuSO_4 0.04~5 ppm이 되도록 제작하였다.

넙치 적혈구의 *in vitro* 용혈작용과 MetHb 생성

각 시험약품의 농도별 반응액에 2.5 mL의 넙치 혈구 부유액을 첨가하여 25°C 부란기에서 3시간 동안 정치 배양시켰다 (대조구는 2.5 mL의 BSS를 사용함). 2,000 rpm (4°C), 5분간 원심분리하여 먼저 상층액을 잘 분취하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다[A₅₄₀]. 그리고 침전한 혈구 cells에 8 mL의 M/60 phosphate buffer (KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 , pH 6.6)을 첨가하여 잘 교반해서 2,000 rpm (4°C), 5분간 원심분리하였다. 다시 상층액 3 mL를 취해 540 nm [B₅₄₀] 및 630 nm [C₆₃₀]에서 각 흡광도를 측정하였다. 여기에 40 μL 의 10% KCN 용액을 넣고 630 nm [D₆₃₀]에서 흡광도를 측정하였다. 한편 다른 상층액×3 mL를 다시 취해 이번에는 100 μL 의 10% $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 용액을 넣고 630 nm [E₆₃₀]에서 흡광도를 측정하였고, 마지막으로 40 μL 의 10% KCN 용액을 넣고 630 nm [F₆₃₀]에서 흡광도를 측정하였다.

넙치 적혈구의 100% 용혈액

2.5 mL의 넙치 혈구 부유액을 두개의 원심관에 각각 넣고 2,000 rpm (4°C), 5분간 원심분리하여 상층액은 버린다. 먼저 한개 원심관의 침전한 혈구 cells에 5 mL의 M/60 phosphate buffer를 첨가하여 잘 교반하면서 세척하고 2,000 rpm (4°C) 5분간 원심분리한 후 상층액을 취해 540 nm[G₅₄₀]에서 흡광도를 측정하였다. 나머지 원심관의 침전한 혈구 cells에 8 mL의 M/60 phosphate buffer를 넣고 잘 교반해서 2,000 rpm (4°C), 5분간 원심분리한 후 상층액을 취해 540 nm[H₅₄₀]에서 흡광도를 측정하였다.

용혈작용 및 MetHb 생성 계산식

위에서 측정한 흡광도 값 [A₅₄₀]~[H₅₄₀]을 아래의 계산식에 적용하여 시험 약품의 넘치 적혈구에 대한 용혈작용과 MetHb 생성 값을 산출하였다. 이 계산식은 Kawatsu *et al.* (1991)의 방법에 따랐다.

$$\text{용혈작용 (\%)} = \frac{A_{540}}{A_{540} + B'_{540}} \times 100$$

$$\rightarrow B'_{540} = B_{540} \times (G_{540} / H_{540})$$

$$\text{MetHb 생성 (\%)} = \frac{C_{630} - D'_{630}}{E'_{630} - F'_{630}} \times 100$$

$$\rightarrow D'_{630} = D_{630} \times 1.013 ; E'_{630} = E_{630} \times 1.033 ; F'_{630} = F_{630} \times 1.047$$

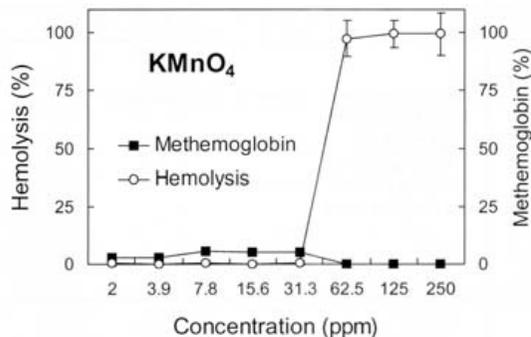


Fig. 1. *In vitro* hemolysis and methemoglobin formation in olive flounder erythrocytes with different concentrations of potassium permanganate (KMnO₄). Each symbol with a vertical bar represents mean ± SD (n=5).

결 과

과망간산칼륨의 용혈작용은 2.0 ppm~31.3 ppm에서 0~0.4%로 거의 없었으나, 62.5 ppm~250 ppm에서 급격히 증가하여 97.4%~99.5%로 매우 높은 값을 보였다. 그러나 MetHb 생성은 2.0 ppm~250 ppm에서 2.6%~5.2%로 미약하였다 (Fig. 1).

안정화이산화염소의 용혈작용은 3.13 ppm~25 ppm에서 1%~2.3%로 미약하였으나, 50 ppm~400 ppm에서 비교적 증가하여 74.1%~75.1%를 나타내었다. MetHb 생성은 3.13 ppm~6.25 ppm에서 0~10.3%로 낮았으나, 12.5 ppm~50 ppm에서 급격히 증가하여 40.6%~100%, 50 ppm~400 ppm에서 거의 100%를 나타내었다 (Fig. 2).

포르말린의 용혈작용은 31.3 ppm~2,000 ppm에서 0.3%~1.7%로 거의 없었다. MetHb 생성은 31.3 ppm~250 ppm에서 3.7%~5.3%로 미약하였으며, 500 ppm~2,000 ppm에서 12.8%~30.4%의 값을 나타내었다 (Fig. 3).

황산동의 용혈작용은 0.04 ppm~0.63 ppm에서 0~1.0%로 거의 없었으나, 1.25 ppm~5 ppm에서 급격하게 증가하여 25%~81.5%를 나타내었다. 반면에 MetHb 생성은 0.04 ppm~5 ppm에서 0~2.5%로 거의 없었다 (Fig. 4).

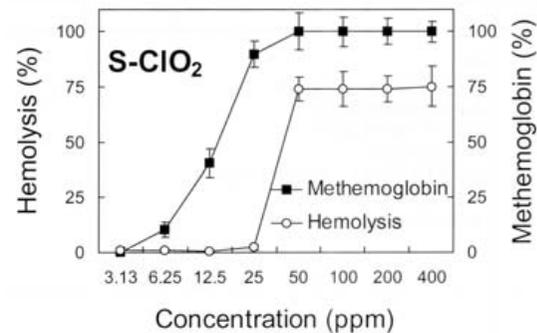


Fig. 2. *In vitro* hemolysis and methemoglobin formation in olive flounder erythrocytes with different concentrations of stabilized chlorine dioxide (S-ClO₂). Each symbol with a vertical bar represents mean ± SD (n=5).

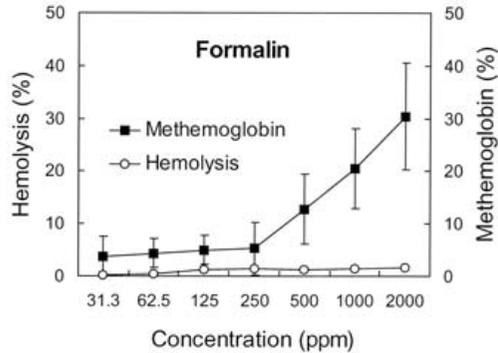


Fig. 3. *In vitro* hemolysis and methemoglobin formation in olive flounder erythrocytes with different concentrations of formalin (37% formaldehyde, HCHO). Each symbol with a vertical bar represents mean \pm SD (n=5).

고 찰

용혈은 어떠한 원인으로 인해 적혈구가 파괴됨으로써 세포내로 hemoglobin이 유출하는 현상이다. 용혈성 빈혈을 유발하는 화학약품은 대부분 “active oxygen”에 속하며 (Kawatsu *et al.*, 1991), 이는 적혈구 막의 phospholipides가 fatty acid hydroperoxides를 형성하기 때문이라고 한다 (Soldatov and Parfenova, 2001). 한편 MetHb은 적혈구가 지닌 hemoglobin 중의 Fe²⁺이 산화되어 Fe³⁺로 변하는 것으로 산소와의 결합능력을 상실한다 (Avilez *et al.*, 2004). 따라서 용혈작용과 MetHb 생성은 어류 혈액의 산소운반 능력을 크게 감소시킴으로써 결국 폐사를 초래하게 될 것이다. 용혈작용과 MetHb 생성의 증가를 동시에 초래하는 화학약품을 어류에 사용할 경우는 매우 신중할 필요가 있겠다.

Kawatsu *et al.* (1991)은 과산화수소 (H₂O₂)와 Hypoxanthine-xanthine Oxidase (HXO)를 이용하여 잉어 (*Cyprinus carpio*) 적혈구에 대한 *in vitro* 용혈작용과 MetHb 생성을 조사하였다. 그 결과, H₂O₂는 용혈작용과 MetHb 생성이 모두 높게 나타났으나 HXO의 경우 MetHb 생성은 높았으나 용혈작용은 전혀 없었다. 본 연구에서 안정화이산화염소는 H₂O₂와 동일한 결과 (Fig. 2)를 나타

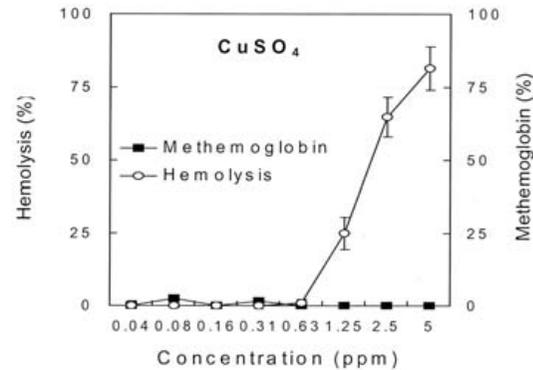


Fig. 4. *In vitro* hemolysis and methemoglobin formation in olive flounder erythrocytes with different concentrations of copper sulphate (CuSO₄). Each symbol with a vertical bar represents mean \pm SD (n=5).

내었으므로 이들의 어류 적혈구에 대한 cell damage system은 매우 유사하다고 생각된다. 반면에 포르말린 (Fig. 3)은 MetHb 생성은 일부 있었으나 용혈작용이 전혀 없었으므로 HXO의 출현경향과 다소 비슷하였다. 한편 과망간산칼륨 (Fig. 1)과 황산동 (Fig. 4)은 높은 용혈작용을 보였으나 MetHb 생성은 전혀 없었기 때문에 HXO, 과산화수소 및 안정화이산화염소와는 또 다른 형태의 mechanism이 존재하는 것으로 추정되어 진다. 과망간산칼륨과 황산동은 넘치 적혈구에 대하여 유사한 cell damage system을 가지고 있는 것으로 나타났다. 그렇지만 이들이 왜 이와 같이 서로 다른 용혈작용과 MetHb 생성 결과를 보였는지 금후 더 깊이 연구되어야 할 것이다.

포르말린은 어류에서 기생충 구제용으로 추천되는 상한 농도인 300 ppm (Schnick *et al.*, 1997; FDA, 1998; 전, 1992) 까지 용혈작용과 MetHb 생성이 거의 없었다. 한편 어류 수정란의 소득에 권장되는 2,000 ppm의 고농도 (FDA, 1998)에서도 용혈작용은 거의 없었고 MetHb 생성도 비교적 낮았다. 포르말린은 본 실험에 사용한 다른 화학약품에 비하여 고농도에서도 용혈작용과 MetHb 생성이 낮게 출현하였다. 따라서 포르말린의 이와 같은 결과를 미루어 사용자가 자칫

고농도로 사용하더라도 어류에 대량폐사를 유발시킬 실수가 상대적으로 낮아 현장에서 관습적으로 오래기간 사용되어 온 것은 아닐까 하고 추측하였다. 황산동은 담수어류에서 기생충 구제를 위해 권장되는 농도가 0.5 ppm인데 본 실험에서 0.04 ppm~0.63 ppm 까지 용혈작용 및 MetHb 생성이 거의 발생하지 않았다. 한편 0.63 ppm 이상의 농도에서는 황산동의 사용에 따른 용혈의 위험성은 주의해야 하겠으나 MetHb 생성의 위험성은 전혀 없었다. 과망간산칼륨은 2 ppm~31.3 ppm 까지 용혈작용과 MetHb 생성이 모두 거의 없었고, 31.3 ppm~62.5 ppm 사이에서 용혈작용이 급격하게 높아졌으나 MetHb 생성은 전혀 없었다. 따라서 31.3 ppm 이상의 농도에서는 과망간산칼륨의 사용에 따른 용혈의 위험성을 주의해야 하겠다. 과망간산칼륨이 담수어류에서 기생충 구제제로 권장되는 농도가 50 ppm인 점을 감안한다면 이 농도의 사용에는 용혈의 위험성을 주의해야 할 것이다. 안정화이산화염소는 본 실험에서 사용된 약품 가운데 유일하게 용혈작용 및 MetHb 생성을 모두 나타내었다. 안정화이산화염소는 3.13 ppm~12.5 ppm 사이에서 MetHb 생성이 완만하게 증가하였으나 용혈작용은 전혀 없었고, 50 ppm부터는 용혈작용이 급격히 상승하여 양쪽이 높은 값을 나타내었으므로 대략 12.5 ppm 까지는 사용상 커다란 위험성이 없을 것으로 생각된다. 안정화이산화염소의 사용에 따른 용혈의 위험성은 25 ppm 이상, MetHb 생성의 위험성은 6.25 ppm 이상의 농도에서 각각 주의해야 하겠다. 그렇지만 본 실험에서는 이들 화학약품의 *in vitro* 결과만으로써 용혈작용 및 MetHb 생성의 위험성을 언급하였으므로 실제 이러한 농도가 넘치에 치명적인 위험성을 초래하는지는 금후 더 많은 연구가 필요할 것이다.

본 실험에서 용혈작용과 MetHb 생성 가운데 어느 쪽이 더 어류에 위험을 초래하는지 구체적으로 증명할 수는 없었으나, 사용된 화학약품을 동일한 농도 범위 안에서 넘치 적혈구의 cell damage에 대한 사용 위험도는 황산동 > 과망간

산칼륨 > 안정화이산화염소 > 포르말린의 순서로 예상된다.

요 약

과망간산칼륨 (KMnO₄), 안정화이산화염소 (S-CIO₂, 3% 수용액), 포르말린 (37% formaldehyde), 황산동 (CuSO₄)을 이용하여 넘치 적혈구의 cell damage에 미치는 효과를 알아보고자 *in vitro* 용혈작용과 methemoglobin (MetHb) 생성을 조사하였다. 실험의 농도는 과망간산칼륨 2~250 ppm, 안정화이산화염소 3.13~400 ppm, 포르말린 31.3~2,000 ppm, 황산동 0.04~5 ppm 이었다. 과망간산칼륨은 31.3~250 ppm, 황산동은 0.63~5 ppm에서 현저한 용혈작용을 나타내었으나 이와는 반대로 MetHb 생성은 전혀 없었다. 따라서 과망간산칼륨과 황산동은 넘치 적혈구에 대한 cell damage system이 매우 유사한 것으로 생각되었다. 안정화이산화염소의 경우, 용혈작용은 25 ppm 이상의 농도에서 그리고 MetHb 생성은 6.25 ppm 이상의 농도에서 높게 증가하였다. 본 실험에서 유일하게 용혈작용과 MetHb 생성을 양쪽 다 현저하게 나타내었다. 포르말린은 2,000 ppm의 고농도에서도 용혈작용은 없었으며, MetHb 생성은 250~2,000 ppm에서 완만하게 증가하였다. 따라서 안정화이산화염소와 포르말린은 넘치 적혈구에 대하여 과망간산칼륨 및 황산동과는 또 다른 cell damage system을 가지고 있는 것으로 나타났다.

감사의 글

이 연구는 국립수산과학원(기생충 구제제의 안전성 연구, RP-2005-AQ-023)의 지원에 의해 운영되었습니다.

참고 문헌

Affonso, E. G., Polez, V. L. P., Corrêa, C. F.,

- Mazon, A. F., Araújo, M. R. R. and Moraes, G.: Blood parameter and metabolites in the teleost fish *Colossoma macropomum* exposed to sulfide or hypoxia. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 133: 375-382, 2002.
- Andaya, A. A. and Di-Giulio, R. T.: Acute toxicities and hematological effects of two substituted naphthoquinones in channel catfish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 16: 233-238, 1987.
- Avilez, I. M., Altran, A. E., Aguiar, L. H. and Moraes, G.: Hematological responses of the neotropical teleost matrinxã (*Brycon cephalus*) to environmental nitrite. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 139: 135-139, 2004.
- Bartlett, G. R., Schwantes, A. R. and Val, A. L.: Studies on the influence of nitrite on methemoglobin formation in Amazon fishes. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 86: 449-456, 1987.
- Buckley, J. A.: Heinz body hemolytic anemia in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) exposed to chlorinated wastewater. *J. Fish Res. Board Can.*, 34: 215-224, 1977.
- FDA: Certain Other Dosage Form New Animal Drugs; Formalin Solution. Code of Federal Regulations, 21 CFR Part 529.1030, June 18, 1998.
- Ferreira da Costa, O. T., dos Santos Ferreira, D. J., Presti Mendonca, F. L. and Fernandes, M. N.: Susceptibility of the Amazonian fish, *Colossoma macropomum* (Serrasalminae), to short-term exposure to nitrite. *Aquaculture*, 232: 627-636, 2004.
- Fujiwara, K. I.: Mechanism of acute toxicity of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) in carp. *Sci. Rep. Shiga. Prefect. Fish Exp. Stn.*, 46: 39-48, 1997.
- Grosell, M. and Jensen, F. B.: Uptake and effects of nitrite in the marine teleost fish *Platichthys flesus*. *Aquat. Toxicol.*, 50: 97-107, 2000.
- Gwoździński, K., Roche, H. and Pérès, G.: The comparison of the effects of heavy metal ions on the antioxidant enzyme activities in human and fish *Dicentrarchus labrax* erythrocytes. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 102: 57-60, 1992.
- Herwig, N.: Toxic chloramine induced intravascular hemolytic anemia in fish. *USA Freshwat. Mar. Aquar.*, 5: 11-13, 1982.
- Karan, V., Vitorović, S., Tutundžić, V. and Poleksić, V.: Functional enzymes activity and gill histology of carp after copper sulfate exposure and recovery. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 40: 49-55, 1998.
- Kawatsu, H., Yamazaki, T. and Miyamori, E.: In vitro hemolysis and methemoglobin induced by hydrogen peroxide and hypoxanthine-wanthine oxidase. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 57: 2299-2305, 1991.
- Mather-Mihaich E. and Giulio, R. T. D.: Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde, glutathion and methemoglobin concentrations in channel catfish exposed to def and N-butyl mercaptan. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 85: 427-432, 1986.
- Mazik, P. M., Hinman, M. L., Winkelmann, D. A., Klaine, S. J., Simco, B. A. and Parker, N. C.: Influence of nitrite and chloride concentrations on survival and hematological profiles of striped bass. *Trans. Am. Fish Soc.*, 120: 247-254, 1991.
- Nichols, J. W. and Weber, L. J.: Oxidation of cardiac myoglobin *in vivo* by sodium nitrite or hydroxylamine. *Arch. Toxicol.*, 63: 484-488, 1989.
- Powell, M. D. and Perry, S. F.: Respiratory and acid-base pathophysiology of hydrogen per-

- oxide in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquat. Toxicol.*, 37: 99-112, 1997.
- Ryu, H. Y., Bang, J. D., Lee, C., Shim, J. M. and Kim, B. S.: Effects of toxicity of chemical treatments on the cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J. Aquat.*, 11: 223-230, 1998.
- Rydlo, M.: Experiments on the control of Costiasis (Ichthyobodiasis). *Oesterr. Fisch.*, 52: 92-96, 1999.
- Scarano, G., Saroglia, M. G., Gray, R. H. and Tibaldi, E.: Hematological responses of sea bass *Dicentrarchus labrax* to sublethal nitrite exposures. *Trans. Am. Fish Soc.*, 113: 360-364, 1984.
- Schnick, R. A., Alderman, D. J., Armstrong, R., Gouvello, R. L., Ishihara, S., Lacierda, E. C., Percival, S. and Roth, M.: Worldwide aquaculture drug and vaccine registration progress. Workshop at the EAFP Eighth International Conference on Diseases of Fosh and Shellfish, Edinburgh, Scotland, September pp. 14-19, 1997.
- Soldatov, A. A. and Parfenova, I. A.: The methemoglobin blood level and stability of circulating erythrocytes of the rockfish *Scopaena porcus* to osmotic shock under conditions of experimental hypoxia. *J. Evolut. Bioch. and Phys.*, 37: 622-625, 2001.
- Thomas-JinJu, S. and Goodwin, A. E.: Acute columnaris infection in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque): efficacy of practical treatments for warmwater aquaculture ponds. *J. Fish Dis.*, 27: 23-28, 2004.
- Wang, H. and Degao, H.: Toxicity of nitrite to grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) in ponds and its way of prevention. *J. Fish China*, 13: 207-214, 1989.
- Yacoob, S. Y., Anraku, K., Archdale, M. V., Matsuoka, T. and Kiyohara, S.: Exposure of taste buds to potassium permanganate and formalin suppresses the gustatory neural response in the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus). *Aquacult. Res.*, 33: 445-453, 2002.
- Zeitoun, I. H.: The effect of chlorine toxicity on certain blood parameters of adult rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Environ. Biol. Fishes*, 1: 189-195, 1977.
- 전세규: 해산양식어류의 질병. 한국수산신보사, pp. 47-51, 1992.
- 전세규: 담수산 양식어류의 질병. 한국수산신보사, pp. 51-272, 1996.

Manuscript Received : May 10, 2005

Revision Accepted : July 09, 2005

Responsible Editorial Member : Ju-Chan Kang
(Pukyong Univ.)