

일산화질소 (nitric oxide) 정량을 통한 바지락 (*Ruditapes philippinarum*) 의 흔들림 스트레스 측정

박경일

군산대학교 해양과학대학 수산생명의학과

Variation of nitric oxide concentrations in response to shaking stress in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*

Kyung-Il Park

Department of Aquatic Life Medicine, Kunsan National University, Gunsan, 573-701, Republic of Korea

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effects of shaking stress in the hemolymph of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* by quantification of nitric oxide (NO) levels. The clams were divided into 3 groups as follows: clams placed in a plain container (control), clams injected with nitro-L-arginine methyl ester (NAME, an NO inhibitor), and clams in a container filled with nylon fiber at a density of 1 kg/m³. Subsequently, each group was placed in sea water and shaken at 100 rpm for 6 h. The concentration of NO was quantified by using DAF assay and Griess assay. Both the assays showed that while shaking significantly increased the NO concentration, the NO inhibitor reduced the NO concentration in the hemolymph of the clams tested. In addition, the nylon fiber, which was used as a filler, effectively prevented the increase in NO concentration. This result suggests that measurement of NO concentration is a useful tool for evaluation of physiological stress in marine bivalves. In addition, it should be considered that a filler is necessary when dredge fishing or the suspended clam culture method is developed.

Key words: nitric oxide, immune response, *Ruditapes philippinarum*, stress, clam culture

서 론

바지락 (*Ruditapes philippinarum*) 은 수산업적으로 중요한 위치를 차지하는 해산 이매패로서 우리나라 서·남해안에 널리 분포하는 종이다. 바지락 생산은 조간대의 갯벌에 종패를 살포한 후 수확하는 천해양식과 조하대의 바지락을 기구를 이용하여 채취하는 일반해면어업으로 나뉜다. 바지락 천해양식의 경우 2011년 현재 약 2만6천여 톤을 생산하고 있으나 이는 1990년대 초반 약 5만여 톤의 생산량에 비해 1/2수준으로 매년 그 생산량의 변화가 크며 (KOISIS, 2013), 이러한 생산

량의 변화는 봄철과 가을철 대량 폐사와 서식지 환경악화 및 조간대 매립으로 인한 서식지 면적의 감소에 기인한 것으로 추정된다 (NFRDI, 2011). 한편 조하대의 바지락을 채취하는 일반 해면어업의 생산성은 2008년 이후 매년 약 1-2만 톤의 생산량을 유지하고 있어 경제적으로 천해양식에 버금가는 중요성을 갖고 있다(KOISIS, 2013). 따라서 바지락 생산 방식이 조간대 천해양식으로 집중되어 있는 현재 상황을 타개하고 안정적인 바지락 생산을 위해서는 조하대 서식 바지락의 대량 생산 방법에 대한 적극적인 기술 개발이 필요하다.

조하대 바지락의 수확은 우리나라의 경우 근해형망 (dredge) 에 의한 채취가 주를 이루며, 형망에 수류분사장치를 부착하여 수확 효과를 높인 어구 (hydraulic dredge) 가 미국과 유럽을 중심으로 이용되고 있다 (Frogliia, 1989; Hauton *et al.*, 2003). 형망에 의한 바지락의 해면어업 외에도 최근 들어 해산 이매패의 수하식 양성에 대한 관심이 점점 하고 있다. 간조 시 공기 중에 노출되어 먹이 섭취가 불가능한 천해 조간대 양식과는 달리 수하식 양성 방법은 24시간동안 지속적으로 먹이 섭취가 가능한 장점을 갖고 있으며, 또한 등

Received: February 15, 2013; Accepted: March 9, 2013
Corresponding author : Kyung-Il Park
Tel: +82 (63) 469-1882 e-mail: kipark@kunsan.ac.kr
1225-3480/24465

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License with permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproducibility in any medium, provided the original work is properly cited.

절기와 하절기에 간조 시 급격한 온도변화에 노출되는 조간대 (Lee *et al.*, 2005) 와는 달리 계절과 관계없이 물리적으로 안정된 서식환경을 제공하는 장점이 있다. 수하식 양생법을 적용한 이매패 사육은 빠른 성장, 높은 비만도와 낮은 폐사율을 나타내는 것으로 알려져 있다 (Boscolo *et al.*, 2003; Pais *et al.*, 2006).

그러나 형광에 의한 채취는 그 과정에서 생물에 다양한 형태의 생리학적/생화학적 변화를 유발하며, 수하식 양생 역시 밀물과 썰물, 조류나 태풍 등의 영향으로 조간대의 잠입 환경과는 달리 유동성이 강한 환경을 제공하기 때문에 흔들림 스트레스에 노출 될 수 있을 것으로 판단된다. 현재까지의 연구에 의하면 해산 이매패는 흔들림 스트레스에 노출될 경우 여과율, 호흡율, 성장률 및 생존율이 감소하는 것으로 알려져 있다 (Marin *et al.*, 2005; Moschino *et al.*, 2008). 또한 혈액중의 스트레스 호르몬인 catecholamine의 분비가 증가하고 (Lacoste *et al.*, 2001b), *Vibrio splendidus*에 대한 감수성이 증가하는 것으로 알려져 있다 (Lacoste *et al.*, 2001a).

일산화질소 (nitric oxide, NO) 는 심혈관, 신경 및 면역계 내의 세포질과 세포 간 신호전달에 관여하는 분자로 주로 대식세포의 nitric oxide synthase (NOS) 에 의해 합성되어 생체 내에서 항균작용, 면역조절, 염증유도 등의 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Palmer *et al.*, 1987; Bogdan, 2001; Aktan, 2004; Menaka *et al.*, 2009). 그러나 과도한 NO 형성은 세포독성을 유발함으로써 염증발생으로 인한 병리적 효과가 있는 것으로 보고되고 있다 (Cirino *et al.*, 2006). 따라서 생체 내 NO 농도의 변화는 생리적 특성을 나타내는 주요 지표로 이용되고 있다. 최근 들어 무척추동물 또한 척추동물의 NO 발생 기작과 유사한 기작에 의해 NO가 발생하는 것으로 밝혀짐에 따라 (Colasanti and Venturini, 1998) 생체 내 NO량의 급격한 변화는 무척추동물의 생리적 변화를 인지할 수 있는 마커로서 중요하게 인식되고 있다.

따라서 본 연구는 바지락 혈림프액의 NO량을 DAF assay와 Griess assay를 이용해 측정함으로써 바지락이 흔들림에 노출될 때 나타나는 생리적 스트레스를 진단하기 위한 기술 개발을 목적으로 수행되었다.

재료 및 방법

1. 바지락

실험에 사용된 바지락은 경북 울진군에서 채집 후 4°C에서 보관하여 실험실로 운반하였다. 바지락 (평균 각장 약 40 mm, 평균 각고 30 mm) 은 실험 전까지 수온 20°C와 염분 30 psu에서 사육되었으며, 먹이로는 매일 *Isochrysis sp.*와 *Chlorella sp.*를 1:1로 혼합하여 약 2.14×10^8 cell/l를 공급하였다.

2. 흔들림 스트레스

바지락 중 45개체를 무작위로 선택하여 각각 15개체씩 3개의 그룹으로 나눈 후 Group A는 가로 25 cm x 세로 18 cm x 높이 7.5 cm이고, 두께 0.3 cm인 플라스틱 상자의 육면 전체가 다수의 통공이 형성된 케이지 내부에 바지락을 넣었다. Group B의 경우 Group A와 동일한 조건을 조성한 후 바지락에 NO 형성 억제제 (nitric oxide synthase inhibitor) 인 nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) 를 Kang *et al.* (2006) 의 방법에 따라 20 μ M로 희석하여 50 μ l씩 바지락의 심장에 주사하였다 (Jeffroy and Pillard, 2011). 그룹 C의 경우 Group A와 동일한 조건을 조성한 후 수조에 나일론 섬유사를 1 kg/m³ 밀도로 충전하여 바지락이 움직이지 않도록 하였다. 이후 모든 바지락은 교반기 (LabTech shaking incubator LSI-3016R) 에서 100 rpm의 속도로 6 시간동안 흔들림에 노출시켰다.

3. DAF assay

3개 그룹의 바지락의 후폐각근에서 혈림프를 추출한 뒤, 혈구계수판 (Mrienfeld, Germany) 을 이용하여 혈구의 수를 측정한 후 marine saline (12 mM CaCl₂·2H₂O, 11 mM KCl, 26 mM MgCl₂·6H₂O, 45 mM Tris-HCl, 6.45 mM NaCl, pH 7.4) 을 이용하여 혈구 1×10^6 cells/ml로 희석하였다. 그 후 DAF assay를 이용하여 NO농도의 차이를 비교하였다. NO 정량은 NO 정량 키트인 nitric oxide synthase detection system, fluorimetric (Sigma, FCSNOS1) 을 이용하였다. 간략히 설명하면 혈림프액 1 ml에 250 μ M의 DAF-2 10 μ l를 넣어 최종 2.5 μ M을 만들고 여기서 20 μ l를 슬라이드 글라스에 놓은 다음 형광현미경 (Olympus BX43, U-FBW filter) 하에서 이미지분석프로그램 (Image J, NIH) 을 이용하여 fluorescence brightness value (BV) 값을 측정하였다 (Ferreira and Rasband, 2012). 이때 사진 촬영은 노출값 1,500으로 고정하였으며, 바지락 1개체 당 50개 혈구 세포의 평균 BV를 바지락 한 개체의 NO 농도로 결정하였다. 각 Group 당 3개체의 바지락을 실험에 이용하였다.

4. Griess assay

3개 그룹의 바지락 혈구를 1×10^6 cells/ml의 농도로 맞춘 후 Griess assay를 이용하여 각 그룹의 NO 농도를 측정하였다. NO는 Nitrate/Nitrite Colormetric Assay Kit (Caymanchem, 780001) 를 이용하여 측정하였다. 측정 방법은 혈림프액 80 μ l에 nitrate reductase enzyme cofactor mixture 10 μ l와 nitrate reductase enzyme 10 μ l를 혼합 후 1시간 동안 실온에서 incubation하여 NO₃⁻을 NO₂⁻이온으로 변환한 뒤 Griess reagent R1 (1%

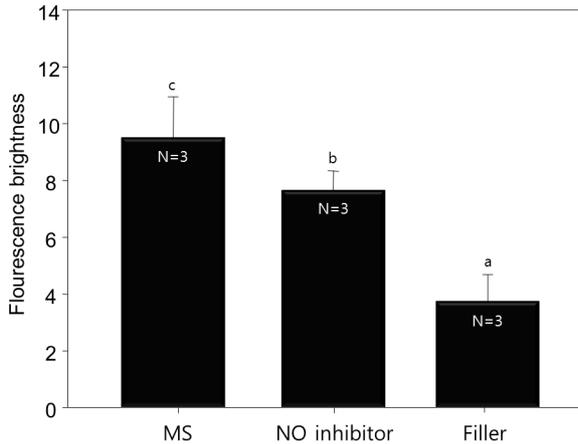


Fig. 1. Comparison of the nitrite levels in the hemolymph of the Manila clams exposed to mechanical stress for 6 h measured using DAF assay. During shaking, clams belonging to Group A were exposed to mechanical stress, while clams belonging to Group B were injected with nitro-L-arginine methyl ester (NAME), and clams belonging to Group C were protected from shaking using a nylon filler.

Sulfonamide) 50 μ l와 Griess reagent R2 (0.1% nitro-L-arginine methyl ester, NAME) 50 μ l를 첨가하여 혼합물을 제조하였다. 이를 실온에서 10분간 incubation 한 후 UV Spectrophotometer (Nanoquant infinite M200, Techan) 를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 결과는 아질산염 (NO_2^-) 이온 농도로 나타내었다. 각 Group 당 8개체의 바지락을 실험에 이용하였다.

5. 통계

모든 실험값은 평균±표준편차로 표시했고, 본 연구에서 사용된 3개 그룹의 평균 형광량과 NO 농도의 차이는 통계프로그램인 SPSS 10.0의 one-way ANOVA와 Duncan의 사후 분석을 수행하였으며, $p < 0.05$ 인 경우 유의한 것으로 판단하였다.

결 과

1. DAF assay

DAF assay에 의해 측정된 바지락 혈구의 형광량은 흔들림에 노출된 경우 (Group A) 9.499 ± 1.365 BV ($n = 3$) 였으나, 흔들림+NAME (NO 저해제) 를 주입한 경우 (Group B) 7.650 ± 0.641 BV ($n = 3$) 로 감소하였고, 흔들림이 방지된 경우 (Group C) 형광량은 3.749 ± 1.042 BV ($n = 3$) 로 감소하였다 (Fig. 1, $p < 0.05$).

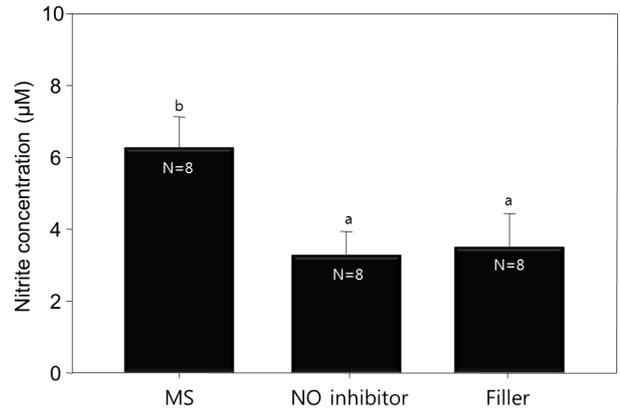


Fig. 2. Comparison of the nitrite levels in the hemolymph of the Manila clams exposed to mechanical stress for 6 h measured using Griess assay. During shaking, clams belonging to Group A were exposed to mechanical stress, while clams belonging to Group B were injected with nitro-L-arginine methyl ester (NAME), and clams belonging to Group C were protected from shaking using a nylon filler.

2. Griess assay

Griess assay를 이용하여 혈림프액의 NO 농도를 측정하고 흔들림에 노출된 그룹(Group A) 은 6.261 ± 0.866 μ M ($n = 8$) 였으나, 흔들림+NAME (NO 저해제) 인 경우 (Group B) 3.494 ± 0.938 μ M ($n = 8$) 로 감소하였고, 흔들림을 방지한 그룹 (Group C) 에서도 NO 농도가 3.268 ± 0.665 μ M ($n = 8$) 로 감소하였다 (Fig. 2, $p < 0.05$).

고 찰

본 연구는 수중의 흔들림이 바지락에 스트레스로 작용하는지를 조사하기 위하여 바지락 혈림프액 내 일산화질소량 (NO) 을 측정함으로써 바지락의 생리적 반응을 측정하고자 하였다. 이를 위하여 바지락을 3개 그룹으로 나누어 첫째 그룹은 대조군으로써 흔들림을 방지한 그룹, 두 번째는 L-NAME를 바지락 심장에 주사하여 흔들림이 발생하더라도 L-arginine 기질과 NOS가 반응하지 않아 NO 생성을 억제한 그룹, 세 번째는 바지락이 들어 있는 상자 내부에 나일론 섬유사를 충전하여 흔들림을 방지한 그룹으로 나누고 흔들림 스트레스를 조성한 다음 혈림프액을 추출한 후 DAF assay와 Griess assay를 이용하여 NO량을 측정하였다. 실험결과 DAF assay와 Griess assay 모두 흔들림에 의해 NO량이 유의하게 증가하였고, 반대로 충전제가 삽입되어 흔들림이 억제되거나 NAME에 의해 NO 생성이 억제된 실험군의 경우 NO량이 감소하였다. 따라서 바지락은 흔들림에 의해 생리적으로 부정적인 반응

이 발생함이 본 연구를 통하여 확인되었다.

NO는 대식세포의 L-arginine에서 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 합성되어 항균작용, 면역조절 및 염증유도 등의 역할을 함으로써 생체 내 생리적 반응을 조절하는 것으로 알려져 있다 (Palmer *et al.*, 1987; Menaka *et al.*, 2009). NO를 생산하는 NOS는 neuronal NOS (nNOS), inducible NOS (iNOS), endothelial NOS (eNOS) 등 3가지 종류의 형태가 존재하며, 이들은 L-arginine을 기질로 NADPH를 이용하여 NO를 합성한다. 그 중 eNOS와 nNOS는 receptor 자극에 의해 소량의 NO를 합성하지만, 이와는 대조적으로 iNOS는 염증 자극 시 pro-inflammatory cytokine (IL-1, TNF, endotoxin 및 LPS)에 의해 발현이 증가하고, 이렇게 증가된 iNOS에 의해 많은 양의 NO가 지속적으로 생산되어 원래 소량으로 일정하게 유지되던 체내의 NO를 상승시킨다 (Moncada *et al.*, 1991; Aktan, 2004). 이렇게 대량으로 생성된 NO는 Pro-inflammatory enzyme인 Cyclooxygenase를 활성화 시키고, 항박테리아 활성을 증가시키며, 혈액 관류 (tissue perfusion)를 향상시킨다 (Plamer *et al.*, 1987). 따라서 NOS에 의해 증가된 NO는 대부분 염증에 의해 유발된 것으로 판단된다 (Moncada *et al.*, 1991; Zamora *et al.*, 2000; Skaleric *et al.*, 2006). 그러나 해산 이매패의 NO 생성 기작에 관한 연구는 매우 빈약한 실정으로 NO 생성과 염증과의 연관성은 명확히 밝혀진 바 없으나, 최근 연구에 의하면 바지락은 염증유도물질인 LPS에 의해 NO량이 유의하게 증가하거나, 반대로 염증 억제물질 (non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)인 ibuprofen과 diclofenac에 의해 감소함이 관찰됨에 따라 NO량과 염증과의 연관성은 척추동물과 마찬가지로 매우 밀접한 관계가 있는 것으로 판단된다 (Park, unpublished data). 따라서 본 연구에서 측정된 바와 같이 흔들림 스트레스에 노출된 바지락 혈구의 NO량 변화는 척추동물의 예와 마찬가지로 염증에 의해 유발된 것으로 추정된다.

본 연구에서 NO 정량을 위해 사용된 방법은 DAF assay와 Griess assay로 먼저, DAF assay는 4,5-Diamino-fluorescein diacetate (DAF-2DA)를 세포와 반응시킬 경우 세포내로 침투하여 세포내에 존재하는 esterase에 의해 DAF-2가 된 후 세포가 생성하는 NO와 선택적으로 반응하여 Triazolo-fluorescein (DAF-2T)이라는 형광물질이 되는 원리를 이용하여 세포내에 생성되는 NO를 육안적 관찰 또는 이때 생성되는 형광량을 정량하는 방식이다 (Kojima *et al.*, 1998, Navarro-Antolin *et al.*, 2001). 형광량 정량은 혈구의 형광 이미지를 이미지 분석 프로그램인 Image J를 이용하여 측정하였다. 이 프로그램은 NIH에서 배포하는 Software로서 촬영한 사진의 단위 pixel을 RGB table 값에 근거하여 분석하

는 프로그램이다. 즉, 각 세포의 형광영역만을 선택한 후 발광 값을 측정하여 그 평균을 비교할 수 있다. 이때의 형광 값은 혈구 세포 하나당 해당 범위의 pixel들이 나타내는 RGB model값의 평균 ($(Red + Green + Blue) / 3 / Area$)으로 계산된다 (Ferreira and Rasband, 2012). 본 연구 결과, DAF assay는 개별 세포내에서 생성되는 NO를 정량할 수 있기 때문에 흔들림 스트레스에 의해 변화되는 해산 연체동물의 생리적 반응을 세포수준에서 정량할 수 있는 기술로써 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

세포에서 생성된 후 체액 내에 유리된 일산화질소 (NO)는 산소와 반응해 NO_2 와 NO_3^- 의 이온으로 존재하게 되는데 총 NO의 생성량은 NO_2 과 NO_3^- 을 합산하여 추정할 수 있다 (Knowles and Moncada, 1992; Feldman *et al.*, 1993; Eich *et al.*, 1996; Sun *et al.*, 2003). Griess assay는 생체 내의 NO_3^- 를 카드뮴 (Cd)이나 Bacterial nitrate reductase를 이용하여 NO_2^- 로 환원 후 NO_2^- 를 Sulfanilamide와 N-naphthyl-ethylenediamine을 이용하여 안정된 아조 화합물로 만들어 이를 측정하는 방식이다. 이 때 생성된 아조 화합물은 파장 540 nm에서 흡광량 측정을 이용한 정량이 가능하다. 이 기술을 이용하여 생리적 변화를 측정하며 나아가 척추동물의 경우 생체 내 NO 농도의 주된 변동은 iNOS에 의한 염증량의 변화에 기인하는 점을 감안하여 염증정량을 위한 기술로 이용되고 있다 (Green *et al.*, 1982; Gillam *et al.*, 1993; Verdon *et al.*, 1995; Vodovotz, 1996; Guevara *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 2003). 실제로 Gagne *et al.* (2005; 2008)에 의하면 Griess assay를 이용해 민물산 담치류 (*Elliptio complanata*)의 혈림프에서 수질오염에 따른 염증정량을 수행 바 있다. 또한 논우렁이류 (*Viviparus spp.*)의 혈림프에 염증유발물질인 LPS, 포도상구균 (*Staphylococcus aureus*), 흡충 (*Schistosoma mansoni*)의 sporocyst 등을 노출시켰을 때 NO량이 증가됨이 보고된 바 있고 (Conte and Ottaviani, 1995; Franchini *et al.*, 1995; Hahn *et al.*, 2001), 바지락속 이매패인 (*Ruditapes decussatus*)이 비브리오 (*Vibrio tapetis*)에 감염 시 NO량의 증가가 보고된 바 있다 (Taffala *et al.*, 2003). 따라서 연체동물의 NO 농도의 변화는 병원성 생물의 감염과 수질 오염 등 다양한 요인에 의해 발생함이 보고됨으로써 NO 농도의 측정은 연체동물의 비특이적 면역반응을 진단하는데 유용한 도구로 이용되고 있다.

흔들림 스트레스를 측정하기 위하여 Lacoste *et al.* (2001b)은 본 연구와 유사하게 굴 (*Crassostrea gigas*)을 100 rpm의 흔들림에 노출시켰을 때 비브리오에 대한 감수성과 폐사율이 증가하였으며, 또한 신경내분비물질 (neuroendocrine)인 noradrenaline이 상승하였음을 보고하였다. 특히 신경내분비

물질의 경우 흔들림 자극이 시작된 지 5분 만에 상승한 것을 감안할 때 스트레스를 인지할 수 있는 매우 민감한 측정법으로 사료된다. 본 연구에서는 시간에 따른 NO량의 변화를 측정하지 않음으로써 스트레스에 대한 민감성을 신경내분비물질 측정법과 비교하기는 어려우나 NO 측정은 경제적이며 신속하게 측정할 수 있다는 장점이 있다.

결론적으로, 본 연구 결과 흔들림은 바지락의 NO 농도를 상승시킴으로써 면역반응에 부정적 영향을 끼쳐 스트레스로 작용 할 수 있음을 DAF assay와 Griess assay를 이용하여 확인하였다. 특히 흔들림 스트레스에 대한 대책으로 충전제를 삽입한 경우 NO 농도가 증가하지 않은 사실을 감안 할 때 바지락 수하 양식 시 흔들림을 방지할 수 있는 충전제 등의 사용이 고려되어야 할 것으로 판단된다.

요 약

본 연구는 바지락이 흔들림 스트레스에 노출될 경우 나타나는 생리적 변화를 측정하기 위하여 일산화질소량 (NO) 을 측정하였다. 이를 위하여 흔들림 방지 장치가 없는 그룹, NAME (NO 저해제) 를 주사한 그룹, 나일론 섬유 충전제 (밀도 1 kg/m³) 로 흔들림이 방지된 그룹 등 총 3개 그룹으로 나눈 후 교반기에서 100 rpm으로 6시간동안 교반 한 후 DAF assay와 Griess assay를 이용하여 바지락 혈림프액의 NO 농도를 측정하였다. 조사결과 흔들림 스트레스에 노출된 바지락에서 NO 농도가 급격히 증가하였고 반면 NO 저해제가 주입된 바지락에서는 NO 농도가 감소하였다. 또한 흔들림 방지 장치가 들어간 그룹에서 NO 농도가 감소함이 확인되었다. 이러한 결과는 DAF assay와 Griess assay 실험에서 모두 동일하게 나타났다. 결론적으로 NO 측정은 바지락의 생리적 스트레스를 측정하는데 유용한 방법임이 확인되었으며, 형광에 의한 바지락 채취시나 수하식으로 양식할 경우 흔들림에 의한 스트레스를 방지할 수단이 필요함을 시사하였다.

사 사

이 논문은 2008학년도 군산대학교 신입교수 연구비 지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

Reference

Aktan, F. (2004) iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sciences*, 75: 639-653.
 Bogdan, C. (2001) Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunology*, 2: 907-916.
 Boscolo, R., Cornello, M. and Giovanardi, O. (2003) Condition index and air survival time to compare three kinds of Manila clam *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve) farming systems. *Aquaculture*

International, 11: 243-254.
 Cirino, G., Distrutti, E. and Wallace, J. (2006) Nitric oxide and inflammation. *Inflammation and Allergy-Drugs Targets*, 5: 115-119.
 Colasanti, M. and Venturini, G. (1998) Nitric oxide in invertebrates. *Molecular Neurobiology*, 17: 157-174.
 Conte, A. and Ottaviani, E. (1995) Nitric oxide synthase activity in molluscan hemocytes. *FEBS Letters*, 365: 120-124.
 Eich, R.F., Li, T., Lemon, D.D., Doherty, D.H., Curry, S.R., Aitken, J.F., Mathews, A.J., Johnson, K.A., Smith, R. D., Phillips, G.N.Jr and Olson, J.S. (1996) Mechanism of NO-induced oxidation of myoglobin and hemoglobin. *Biochemistry*, 35: 6976-6983.
 Franchini, A., Fontanili, P. and Ottaviani, E. (1995) Invertebrate immunocytes: relationship between phagocytosis and nitric oxide production. *Comparative Biochemistry and Physiology (B)*, 110: 403-407.
 Ferreira, T. and Rasband, W.S. (2012) ImageJ User Guide - IJ 1.46r, imagej.nih.gov/ij/docs/guide/
 Feldman, P.L., Griffith, O.W. and Stuehr, D.J. (1993) The surprising life of nitric oxide. *Chemical and Engineering News*, 71: 26-38.
 Froggia, C. (1989) Clam fisheries with hydraulic dredges in the Adriatic sea. *In*: Caddy, J. F. (ed.), *Marine Invertebrate Fisheries: Their Assessment and Management*. Wiley & Sons, Inc. pp. 507-521.
 Gagné, F., André, C., Cejka, P., Hausler, R., Fournier, M. and Blaise, C. (2008) Immunotoxic effects on freshwater mussels of a primary-treated wastewater before and after ozonation: a pilot plant study. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 69: 366-73.
 Gagne, F., Berube, E., Fournier, M. and Blaise, C. (2005) Inflammatory properties of municipal effluents to *Elliptio complanata* mussels: lack of effects from anti-inflammatory drugs. *Comparative Biochemistry and Physiology (C)*, 141: 332-337.
 Gillam, M.B., Sherman, M.P., Griscavage, J.M. and Ignarro, L.J. (1993) A spectrophotometric assay for nitrate using NADPH oxidation by Aspergillus nitrate reductase. *Analytical Biochemistry*, 212: 359-365.
 Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S. and Tannenbaum, S.R. (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological samples. *Analytical Biochemistry*, 126: 131-138.
 Guevara, I., Iwanejko, J., Dembinska-Kiec, A., Pankiewicz, J., Wanat, A., Anna, P., Golabek, I., Bartus, S., Malczewska-Malec, M. and Szczudlik A. (1998) Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Clinica Chimica Acta*, 274: 177-188.
 Hahn, U.K., Bender, R.C. and Bayne, C.J. (2001) Involvement of nitric oxide in killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*. *The Journal of Parasitology*,

87: 778–785

- Hauton, C., Hall-Spencer, J.M and Moore, P.G. (2001) An experimental study of the ecological impacts of hydraulic bivalve dredging on maerl. *ICES Journal of Marine Science*, **60**: 381-392.
- Jeffroy, F. and Paillard, C. (2011) Involvement of nitric oxide in the in vitro interaction between Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, hemocytes and the bacterium *Vibrio tapetis*. *Fish & Shellfish Immunology*, **31**: 1137 - 1141.
- Kang, Y.S., Kim, Y.M., Park, K.I., Cho, S.K. Choi, K.S and Cho, M.J. (2006) Analysis of EST and lectin expressions in hemocytes of Manila clams (*Ruditapes philippinarum*) (Bivalvia: Mollusca) infected with *Perkinsus olseni*. *Developmental and Comparative Immunology*, **30**: 1119 - 1131.
- Kojima, H., Sakurai, K., Kikuchi, K., Kawahara, S., Kirino, Y., Nagoshi, H., Hirata, Y. and Nagano, T. (1998) Development of a fluorescent indicator for nitric oxide based on the fluorescein chromophore. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **46**: 373-5
- KOISIS. (2013) <http://kosis.kr/>
- Knowles, R.G. and Moncada, S. (1992) Nitric oxide as a signal in blood vessels. *Trends In Biochemical Sciences*, **17**: 399-402.
- Lacoste, A., Jalabert, F., Malham, S.K., Cueff, A. and Poulet, S.A. (2001a) Stress and Stress-Induced Neuroendocrine Changes Increase the Susceptibility of Juvenile Oysters (*Crassostrea gigas*) to *Vibrio splendidus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**: 2304-2309.
- Lacoste, A., Malham, S.K., Cueff, A. and Poulet, S.A. (2001b) Stress-induced catecholamine changes in the hemolymph of the oyster *Crassostrea gigas*. *General Comparative Endocrinology*, **122**: 181-188.
- Lee, S.H., Yang, K.H., You, K.W., Kim, Y.G., and Choi, H.Y. (2005) Structure and Variation of Tidal Flat Temperature in Gomsu Bay, West Coast of Korea. *Journal of the Oceanological Society of Korea*, **10**: 100-112.
- Marin, M.G., Moschino, V., Meneghetti, F. and Da Ros, L. (2005) Effects of mechanical stress in under-sized clams, *Tapes philippinarum*: a laboratory approach. *Aquaculture International*, **13**: 75-88.
- Menaka, K.B., Ramesh, A., Thomas, B. and Kumari, N.S. (2009) Estimation of nitric oxide as an inflammatory maker in periodontitis. *Journal of Indian Society of Periodontology*, **13**: 75-78.
- Moncada, S., Palmer, R.M.J. and Higgs, E.A. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological Review*, **43**: 109-142.
- Moschino, V., Chicharo, L.M.Z. and Marin, M.G. (2008) Effects of hydraulic dredging on the physiological responses of the target species *Chamelea gallina* (Mollusca: Bivalvia): laboratory experiments and field surveys. *Scientia Marina*, **72**: 493-501
- Navarro-Antolin, J. and Lamas, S. (2001) Nitrosative stress by cyclosporin A in the endothelium: studies with the NO-sensitive probe diaminofluorescein-2/ diacetate using flow cytometry. *Nephrology Dialysis Transplantation*, **16**: 6-9.
- NFRDI (2011) A Study on the Stability of Aquaculture in Manila Clam, *Ruditapes philippinarum*. Report of NFRDI, pp. 80.
- Pais, A., Chessa, L.A., Serra, S. and Ruiu, A. (2006) An alternative suspended culture method for the Mediterranean carpet clam, *Tapes decussatus* (L.) in the Calich lagoon (North western Sardinia). *Biologia Marina Mediterranea*, **13**: 134-135.
- Palmer, R.M.J., Ferrige, A.G. and Moncada, S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium derived relaxing factor. *Nature*, **327**: 524-526.
- Skaleric, U., Gaspirc, B., McCartney-Francis, N., Masera, A. and Wahl, S.M. (2006) Proinflammatory and Antimicrobial Nitric oxide in gingival fluid of Diabetic patients with Periodontal disease. *Infection and Immunity*, **74**: 7010-7013.
- Sun, J., Zhang, X., Broderick, M. and Fein, H. (2003) Measurement of Nitric Oxide Production in Biological Systems by Using Griess Reaction Assay. *Sensors*, **3**: 276-284.
- Taffala, C., Gomez-Leon, J., Novoa, B. and Figueras, A. (2003). Nitrite oxide production by carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) hemocytes. *Developmental and Comparative Immunology*, **27**: 197-205
- Verdon, C.P., Burton, B.A. and Prior, R.L. (1995) Sample pretreatment with nitrate reductase and glucose-6-phosphate dehydrogenase quantitatively reduces nitrate while avoiding interference by NADP+ when the Griess Reaction is used to assay for nitrite. *Analytical Biochemistry*, **224**: 502-508.
- Vodovotz, Y. (1996) Modified microassay for serum nitrite and nitrate. *Biotechniques*, **20**: 390-394.
- Zamora, R., Vodovotz, Y. and Billiar, T.R. (2000) Inducible nitric oxide synthase and inflammatory disease. *Molecular Medicine*, **6**: 347-373.