

아질산에 노출된 뱀장어(*Anguilla japonica*)의 혈액학적 반응과 항산화효소의 활성 변화

조수현 · 김흥윤*

전남대학교 수산생명의학과

Changes in Hematological Responses and Antioxidative Enzyme Activities of Japanese Eel *Anguilla japonica* Exposed to Elevated Ambient Nitrite

Su-Hyun Jo and Heung-Yun Kim*

Department of Aqualife Medicine, Chonnam National University, Yeosu 550-749, Korea

The study was performed to investigate changes in hematological responses and antioxidative enzyme activities (superoxide dismutase, SOD; catalase, CAT) of Japanese eel *Anguilla japonica* following exposure to 0 (control), 2.33, 4.60, 6.64 and 8.78 mM nitrite-N in fresh water for 48 h. Hematological parameters such as plasma nitrite, electrolytes, cortisol, glucose, glutamate oxaloacetate transaminase (GOT), glutamate pyruvate transaminase (GPT), hemoglobin (Hb), methemoglobin (metHb) and NADH-methemoglobin reductase (NMR) were measured. Plasma nitrite, cortisol, metHb and NMR increased directly with increasing ambient nitrite concentration, while Hb content showed a progressive decline. Levels of plasma potassium, GOT and GPT of the eel exposed to 6.64 mM ambient nitrite were significantly higher than the control fish. The activity of SOD and CAT in plasma, gill and liver of the eel following exposure to nitrite were augmented by increasing ambient nitrite. Levels of plasma nitrite, metHb, NMR, cortisol, glucose and antioxidative enzyme activities of the eel exposed to 2.33 mM ambient nitrite were significantly higher than the control fish. This study suggested that the eel acutely exposed to elevated ambient nitrite causes nitrite-induced stress responses, changes in antioxidative enzyme activities and hematological parameters.

Key words: Eel, *Anguilla japonica*, Nitrite, Hematological parameter, Antioxidative enzyme

서론

지수식 및 순환여과식 뱀장어양식장에서는 어류의 빠른 성장과 생산량 증대를 위해 고수온과 고밀도 사육조건에서 과량의 사료가 공급되어 사육수중에는 질소성 대사산물을 포함한 자가오염원의 부하량이 비교적 높다. 담수어류의 아질산 중독은 수중의 암모니아를 아질산(NO_2^-)과 질산(NO_3^-)으로 산화하는 생물여과시스템의 용량 부족, 효율저하 및 기능부진 등에 따른 수계의 질화작용 불균형에 의해 나타나며(Kroupova et al., 2005), 질화작용의 불균형 발생 시에 사육수의 아질산 농도는 1 mM~3.57 mM에 이르기기도 한다(Kamstra et al., 1996; Kroupova et al., 2005). 질화세균에 의한 질화효율은 수온, pH, 용존

산소, 질화세균의 수 및 수중 유해물질(항생물질 등)의 존재 여부에 영향을 받는다(Russo and Thurston, 1991; Jensen, 2003).

양식장 사육수중에 유기물이 축적되면 양식어류에게 만성적인 스트레스를 유발할 수 있는 암모니아, 아질산 및 황화수소와 같은 미생물의 대사산물이 많이 생성된다(Das et al., 2004). 이러한 환경조건에서 초래되는 어체 스트레스는 궁극적으로 어류의 성장저하, 면역억제, 질병발생 및 폐사를 유발한다(Snieszko, 1974; Lewis and Morris 1986). 담수어류에 대한 아질산 독성과 생리적 영향에 관해서는 많이 연구되었으며, 아질산 독성은 어종에 따라 많은 차이가 있다(Lewis and Morris 1986; Haung and Chen, 2002; Jensen, 2003; Tomasso and Grosell, 2005).

<http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2014.0860>



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.

Kor J Fish Aquat Sci 47(6) 860-868, December 2014

Received 2 December 2014; Revised 19 December 2014; Accepted 26 December 2014

*Corresponding author: Tel: +82. 61. 659. 7174 Fax: +82. 61. 659. 7179

E-mail address: hykim@jnu.ac.kr

어류 아가미를 통해 혈액에 유입된 아질산은 적혈구속에 확산되어 hemoglobin (Hb)을 산소결합 능력이 없는 methemoglobin (metHb)으로 산화시켜서 혈액의 산소운반능력이 감소된다(Jensen and Hansen, 2011). 어류 적혈구는 metHb를 기능적 Hb로 재전환하는 NADH-methemoglobin reductase (NMR)를 함유하고 있으며(Huey and Beiting, 1982; Avilez et al., 2004), 메트헤모글로빈혈증의 어류를 nitrite-free water에 유지하면 Hb 비율은 정상적으로 회복된다(Huey et al., 1980; Knudsen and Jensen, 1997). 아질산에 노출된 어류의 Hb와 metHb 농도는 아질산에 의해 생성된 metHb 및 NMR이 metHb을 Hb으로 환원시킨 생리작용의 결과이다(Lewis and Morris, 1986). 따라서 아질산에 노출되어진 뱀장어의 NMR 활성은 수중의 아질산 농도에 따라 차이가 있을 것으로 추정된다.

어류의 혈액학적·면역학적 parameter는 내생적 또는 외생적 환경변화에 따른 생리적 스트레스 반응의 지표로 이용되며(Santos and Pacheco, 1996; Alexander et al., 2012), 특히 혈중 cortisol과 glucose 농도는 스트레스 반응의 일반적인 지표로 많이 활용된다(Iwama et al., 1997; Tsuzuki et al., 2001). 수계 오염원에 노출된 수서생물은 체조직의 산화적 손상을 유발하는 H_2O_2 , O_2^- 및 OH와 같은 활성산소가 증가한다(Livingstone et al., 1990; Livingstone, 2001; Martinez-Alvarez et al., 2005). Superoxide dismutase (SOD)는 O_2^- 를 H_2O_2 로 전환하는 효소로서 세포 항산화제이며, 세포 내외에 존재하는 SOD 함량은 활성산소의 산화적 스트레스에 의해 발생하는 질병 예방에 중요하다(Malstrom et al., 1975). Catalase (CAT)는 호기성 세포에 존재하는 항산화제로서 H_2O_2 해독에 관여하고, SOD와 CAT의 활성도는 수서생물의 환경스트레스에 대한 biomarker로 이용되고 있다(Martinez-Alvarez et al., 2005; Alexander et al., 2012).

아질산에 노출된 어류는 전해질 불균형이 나타나고(Jensen, 2003), 아질산 축적과정에는 골격근과 적혈구의 K^+ 상실에 의해 K^+ 항상성이 교란되어 고칼륨혈증이 야기될 수 있다(Jensen et al., 1987; Jensen, 2003). 또한, 메기류(*Clarias lazera*)와 유럽산뱀장어(*Anguilla anguilla*)는 혈액으로 유입된 아질산이 심장이나 간 조직의 괴사를 초래하여 혈장 glutamate oxaloacetate transaminase (GOT)와 glutamate pyruvate transaminase (GPT)가 증가하였다(Michael et al., 1987; Peakall, 1992; Huang and Chen, 2002).

한편, Amano et al. (1981)은 아질산 2.14 mM에 1개월간 사육된 뱀장어는 모든 개체에서 15-68%의 메트헤모글로빈혈증을 관찰하였다. 그러나 아질산 노출어류에서 혈중 아질산이 최대에 도달하는 기간은 24-48시간이며(Eddy et al., 1983; Aggergaard and Jensen, 2001; Huang and Chen, 2002), 반수치 사농도(LC_{50})는 24시간 이후에도 감소하지만 그 감소율은 낮기 때문에 다른 독성오염원과 같이 아질산에 대한 급성영향시험의 적절한 노출시간은 24-96시간이라고 하였다(Lewis and

Morris, 1986).

본 연구는 국내 내수면 양식장의 양식주종인 뱀장어(*Anguilla japonica*)에 대하여 수온 28.3°C에서 농도별 아질산(0, 2.33, 4.60, 6.64 및 8.78 mM)에 48시간 노출 후에 혈장 아질산 농도, 혈액학적 반응(전해질, Hb, metHb, NMR, GOT, GPT, cortisol 및 glucose)과 항산화효소(CAT, SOD)의 활성 변화를 조사하였다.

재료 및 방법

실험어

실험에 사용된 뱀장어는 양만장에서 사육중인 것(생체중량, 181-207 g)을 실험실로 운반한 다음 원형수조(500 L)에 수용하여 사육하였다. 사육 동안 수온은 $28 \pm 0.5^\circ C$ 로 유지하였고, 먹이는 상품 배합사료를 물로 반죽하여 2일마다 체중의 약 5%를 공급하며 실험조건에 2주간 순치·사육하였다. 모든 실험어는 실험개시 전에 2일간 절식시켰다.

시험용액

시험용수는 수돗물을 저수탱크에 채우고 하룻동안 aeration과 함께 수중펌프로 자외선살균기(P392, Samjee-tech, Korea)를 통과시킨 것을 실험에 사용하였다. 시험용액은 전자저울(Sartorius BP 221S)로 $NaNO_2$ 무게를 달아 시험용수에 희석하여 아질산-질소 용액을 제조하였다. 본 연구에서 적용한 아질산 농도는 Amano et al. (1981)이 뱀장어를 아질산에 1개월간 노출시킨 후 모든 개체에서 메트헤모글로빈혈증(15-68%)이 관찰된 2.14 mM을 최소농도로 삼았으며, 실험시작 시에 아질산 농도별 실험수조(실험구)에서 실측한 아질산 농도는 0 (대조구), 2.33, 4.60, 6.64 및 8.78 mM이었다(Table 1).

노출실험

각 실험구는 뚜껑과 잠금장치가 달린 반투명 플라스틱 사각수조(20 L, $38 \times 25 \times 22$ cm)에 공기공급 장치를 설치하였고, 대조구를 포함한 농도별 실험구는 6반복으로 구성되었다. 노출실험은 시험용액 10 L을 실험구에 채운 다음 실험어를 각각 1마리씩 수용하여 48시간 동안 노출되도록 하였고, 실험어의 탈출을 방지하고 시험용액의 증발을 줄이기 위해서 실험구 뚜껑을 닫고 잠금장치를 하였다.

수질측정

실험구의 아질산 농도는 APHA (1995)의 NED법으로, 수온, pH 및 DO는 수질분석기(YSI 6920, USA)로 측정하였다. 시험용수의 전해질은 ICP/MS (PerkinElmer Nexion 300X)로서, 경도는 Ca^{2+} 과 Mg^{2+} 농도를 ICP/MS로서 측정하여 $CaCO_3$ 등가량으로 환산하는 간접법(APHA, 1995)에 의거하였다.

채혈, 조직 적출 및 적출조직의 전처리

아질산에 48시간 노출시킨 후 실험어 마취는 Chiba et al.

Table 1. Levels of actual ambient nitrite and water quality of experimental chambers. Values are mean±S.E. (n=6). Hardness and electrolytes were measured for dilution water (fresh water) of nitrite

Nitrite-N (mM)	Temp. (°C)	pH	DO (%)	Hardness (mg/L)*	Electrolytes (mg/L)		
					Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻
0 (Control)	28.3	7.44	≥91				
2.33±0.003	28.4	7.41	≥90				
4.60±0.006	28.3	7.38	≥91	7.92±0.06	3.38±0.05	2.65±0.02	6.21±0.03
6.64±0.009	28.4	7.38	≥89				
8.78±0.010	28.3	7.34	≥87				

*as mg equivalent CaCO₃/L.

(2006)이 뱀장어에 적용한 전기마취를 활용하였다. 마취는 실험구 양쪽 끝의 시험용액 속에 240V/AC 승압 전류가 흐르는 전극을 각각 넣은 뒤 30초 동안 전기충격 마취 후 heparinized syringe (23G)로 미병부 혈관에서 혈액을 약 1.5 mL 채취하였다. 채혈액의 1.0 mL은 4°C에서 5,000 rpm으로 5분간 원심분리한 다음 혈장과 침강된 적혈구를 각각 수거하여 -80°C의 deep freezer (DF-8510, Ilshin, Korea)에 두고 혈장 생화학분석 및 NMR 활성 분석시료로 사용하였고, 나머지 혈액은 PCR tube에 주입한 후 냉장보관하며 혈액분석에 사용하였다. 채혈이 끝난 실험어는 전자저울(Sartorius BP 3100S)로 생체중량을 측정 한 후 어체를 해부하여 아가미와 간을 적출하였다. 적출 조직은 해부과정에 묻은 적혈구나 혈액을 제거하기 위해 즉시 냉장 PBS 용액(pH 7.4)으로 헹군 후 chilled conical tube (15 mL)에 담아 -70°C에 보관하였다. CAT의 분석에는 조직 g당 50 mM phosphate buffer (1 mM EDTA, pH 7.0) 냉장액 5 mL를, SOD 분석에는 조직 g당 20 mM HEPES buffer (1 mM EDTA, 210 mM mannitol 및 70 mM sucrose, pH 7.2) 냉장액 5 mL를 주입한 후 homogenizer (Sonopuls HD 2200, Germany)로 균질화하였다. 균질액은 4°C에서 1,500 g로 10분간 원심분리한 후 상층액을 수거하여 CAT와 SOD의 활성 분석에 사용하였다.

Hb

Drabkin's reagent 5 mL에 전혈 20 µL를 주입하여 혼합한 후 실온에 20분간 방치한 다음 분광광도계로 540 nm에서 비색 정량하는 방법으로 분석하였다.

MetHb

혈액 5 µL에 증류수 1 mL을 넣어서 적혈구를 용혈시킨 다음 0.1 M phosphate buffer (pH 6.8)를 0.5 mL 주입하였다. 용혈액은 450 g에서 원심분리한 후 상층액을 600 µL씩 취하여 Matsuoka (1997)의 방법으로 분석하였다.

NMR

혈액 1.0 mL에서 수거된 적혈구를 냉장 생리식염수 10 mL에 부유시켜 1,000 g에서 10분간 원심분리하여 백혈구를 제거하는 세척과정을 3회 반복하여 실시하였다. 세척된 적혈구는 생리

식염수에 재부유시킨 뒤 적혈구 부유액 0.2 mL에 mercaptoethanol EDTA 용액 1.8 mL을 주입한 다음 nitrogen vessel에 넣어 완전히 동결시킨 후 실온에 녹여서 용혈된 것을 NMR 분석시료로 사용하였다. NMR의 활성 분석은 0.12 M ZnCl₂, 6 mM NADH 및 2.4 mM 2,6-dichlorophenolindophenol (DCPIP)을 함유하는 0.2 M Tris·HCl (pH=8.5) 용액에 효소(diaporase) 희석액과 적혈구 용혈액 0.1 mL을 각각 주입하여 600 nm에서 4분간 흡광도 감소치를 측정하였다. NMR 활성도는 25°C에서 1분 동안 DCPIP 1 µM을 환원시킨 효소량을 나타낸다 (Worthington Biochemical, 1993).

혈장 아질산

Griess reagent (Promega G2930) 및 그 manual에 따라 540 nm에서 흡광도를 측정하여 검량선으로부터 혈장 아질산 농도를 산출하였다.

GOT, GPT, glucose 및 전해질

혈장 GOT, GPT, glucose 및 전해질(Na⁺, K⁺, Cl⁻)은 혈액생화학분석기(FUGI- Dricem 3500s)로 측정하였다.

Cortisol

혈장 cortisol은 cortisol ELISA kit (IBL RE52061, Germany)로 분석하였다.

CAT

혈장, 간 및 아가미 조직의 CAT 활성은 CAT assay kit (Cayman chemical, catalog No. 707002)로 분석하였다. 1 unit CAT는 25°C에서 1분당 단백질 1 mg이 반응하여 1.0 nmol의 form-aldehyde를 생성하는 효소량을 나타낸다.

SOD

SOD 활성은 SOD assay kit (Cayman chemical, No. 706002)로 측정하였다. 1 unit SOD는 25°C에서 단백질 mg당 O₂의 50% dismutation에 요구되는 효소량을 나타낸다.

단백질 함량

혈장과 적출 조직의 단백질 함량은 Bradford protein assay kit

(Bio-Rad, No. 500-0202)로 측정하였다.

통계분석

각 분석 결과치는 one-way ANOVA를 실시하여 평균간의 차이를 검정하였다. 이로부터 95% 유의수준에서 그 차이가 인정된 측정치는 SPSS (version 19.0) 통계패키지를 이용하여 Dun-cun's multiple range test를 실시하였다($P<0.05$).

결 과

혈장 아질산

수온 28.3°C에서 아질산(0, 2.33, 4.60, 6.64 및 8.78 mM)에 뱀장어를 48시간 노출시킨 후 혈장 아질산 농도를 측정하였다 (Fig. 1A). 혈장 아질산은 대조구에서 평균 $15.5 \pm 1.38 \mu\text{M}$ 이었으며, 아질산 2.33-6.64 mM에 노출된 실험어의 혈장 아질산은 23.1-62.3 μM 로서 수증의 아질산 농도가 높을수록 혈장에 축적된 아질산이 많았다. 아질산 8.78 mM에 48시간 노출 후 생존 개체의 혈장 아질산 농도는 370.7 μM 이었다.

Hb 및 metHb

아질산 4.60 mM에 노출된 실험어의 Hb 함량은 대조구와 비해 낮은 값을 보여주었고, 수증의 아질산 농도가 높을수록 Hb는 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 1B). Hb중에서 metHb 비율은 대조구에서 평균 3.7%로 측정되었으며, 수증의 아질산 농도가 높을수록 현저하게 증가하였다($P<0.05$). 아질산 6.64 mM에 수용된 뱀장어의 metHb은 56%, 8.78 mM에 48시간 노출 후 생존개체의 metHb은 90%로 관찰되었다(Fig. 1C).

NMR

아질산에 노출된 뱀장어의 NMR 활성을 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. 대조구의 NMR 활성은 $0.019 \pm 0.0014 \text{ U/mg Hb}$ 이었고, 아질산 2.33~6.64 mM에 노출된 뱀장어는 평균 0.084~0.188 U/mg Hb로서 아질산 농도가 높을수록 증가하였다($P<0.05$). 아질산 8.78 mM에 48시간 노출 후의 생존개체는 0.272 U/mg Hb의 활성이 관찰되었다.

혈장 전해질

수온 28.3°C에서 농도별 아질산에 48시간 노출 후 혈장 N^+ , K^+ 및 Cl^- 를 분석하였다(Table 2). 혈장 N^+ 와 Cl^- 는 환경수증의 아질산 농도에 따른 차이는 없었다. 아질산 6.64 mM에 노출된 개체의 혈장 K^+ 농도는 대조구에 비하여 유의하게 높은 값이 관찰되었다($P<0.05$).

Cortisol과 glucose

아질산에 48시간 노출시킨 뱀장어의 혈장 cortisol과 glucose를 분석한 결과는 Table 2와 같다. Cortisol은 환경수증의 아질산 농도가 증가할수록 유의하게 높은 값을 보여주었다

($P<0.05$). Glucose는 농도별 아질산에 노출된 개체는 대조구에 비하여 혈당이 높았지만($P<0.05$), 아질산 노출농도에 따른 차이는 관찰되지 않았다.

GOT와 GPT

아질산 $\leq 4.60 \text{ mM}$ 에 노출된 뱀장어에서는 혈장 GOT와 GPT의 활성 차이는 없었으며(Fig. 3), 6.64 mM에 노출된 개체는 대조구에 비하여 높은 활성을 나타내었다($P<0.05$). 아질산 8.78 mM에 노출 후 생존개체의 GOT와 GPT의 활성은 현저하게 높은 값을 보여주었다.

항산화효소

수온 28.3°C에서 농도별 아질산에 48시간 노출 후 혈장, 아가미 및 간의 CAT와 SOD 활성을 측정한 결과는 Table 3과 같다.

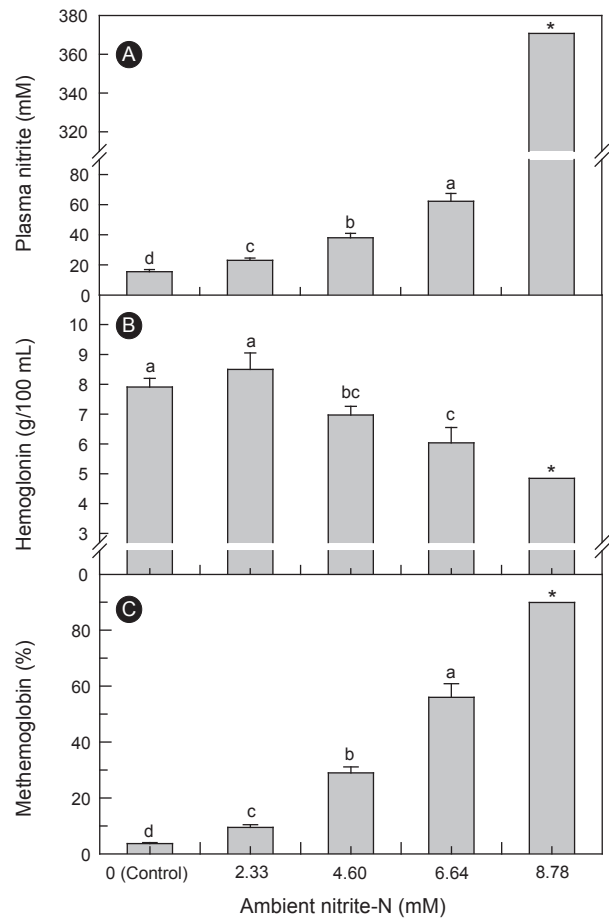


Fig. 1. Levels of plasma nitrite, hemoglobin (Hb) and methemoglobin (metHb) of *Anguilla japonica* exposed to elevated ambient nitrite for 48 h at 28.3°C. Data expressed as mean±S.E. (n=6). Different letters indicate significant differences ($P<0.05$) between nitrite-N concentrations. Asterisks represent that the measurement of one survived fish following 48 h exposure.

Table 2. Levels of plasma electrolyte, cortisol and glucose of *Anguilla japonica* exposed to elevated ambient nitrite for 48 h at 28.3°C. Data expressed as mean±S.E. (n=6). Different letters indicate significant differences ($P<0.05$) between nitrite-N concentrations. Asterisks represent that the measurement of one survived fish following 48 h exposure

Nitrite-N (mM)	Electrolyte (mEq/L)			Cortisol (ng/mL)	Glucose (mg/100 mL)
	Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻		
0 (Control)	141.8±3.27 ^a	3.91±0.20 ^b	145.7±3.37 ^a	3.52±0.58 ^d	64.8±5.63 ^b
2.33	142.3±2.36 ^a	3.47±0.26 ^b	144.2±2.55 ^a	20.28±2.01 ^c	90.0±8.02 ^a
4.60	142.5±2.05 ^a	3.65±0.34 ^b	144.5±2.81 ^a	26.10±1.74 ^b	98.8±7.17 ^a
6.64	146.5±2.74 ^a	4.47±0.21 ^a	148.0±2.70 ^a	65.58±3.89 ^a	95.5±13.18 ^a
8.78	140 [*]	4.5 [*]	142 [*]	195.5 [*]	64 [*]

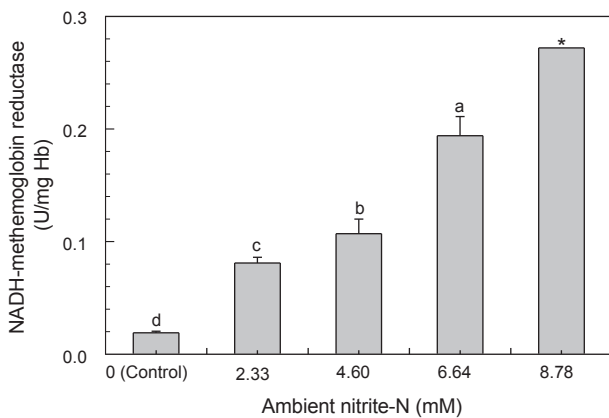


Fig. 2. The activity of NADH-methemoglobin reductase (NMR) in the blood of *Anguilla japonica* exposed to elevated ambient nitrite for 48 h at 28.3°C. Data expressed as mean±S.E. (n=6). Different letters indicate significant differences ($P<0.05$) between nitrite-N concentrations. Asterisk represents that the measurement of one survived fish following 48 h exposure.

아질산 2.33 mM에 노출된 뱀장어의 CAT와 SOD 활성은 대조구에 비하여 유의하게 높았으며, 환경수중의 아질산 농도가 높을수록 증가하였다($P<0.05$). CAT는 혈장과 아가미 조직에서, SOD는 아가미에서 높은 활성을 나타내었다.

고 찰

어류는 환경수중에 아질산이 존재하면 염류세포의 Cl⁻ 흡수부위의 일부가 아질산 흡수부위로 이용되어 혈중에 아질산이 유입된다(Jensen, 2003). 따라서 아질산은 염류세포의 Cl⁻ 흡수과정에서 경쟁자로 작용하고, 이 때문에 수중에 Cl⁻가 일정한 농도로 존재하는 조건에서는 어류의 아질산 흡수 및 아질산 독성이 완화된다(Williams and Eddy, 1986; Madison and Wang, 2006).

경골어류의 혈중 아질산 축적은 담수어에 대하여 많이 연구되었다. 담수산 송어류의 일종인 *Brycon cephalus*는 아질산 0.4

mM에 96시간 노출 후에 혈장 아질산 농도는 2.1 mM (Avilez et al., 2004), 잉어(*Cyprinus carpio*)는 아질산 2 mM에 48시간 노출 후 혈장 아질산 농도는 3 mM (Knudsen and Jensen, 1997), 나일틸라피아(*Oreochromis niloticus*)는 0.1 mM에 48시간 노출 후 0.89~0.95 mM이었다(Yildiz et al., 2006). 이들 어종은 환경수중의 아질산 농도에 비하여 혈장에 고농도로 축적하는 특징을 보이고 있다. 이에 반하여 유럽산뱀장어(*An-*

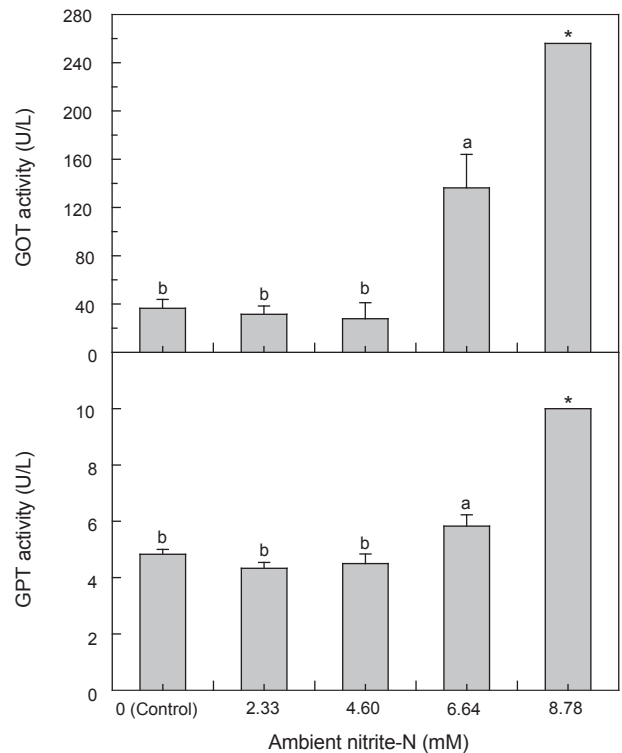


Fig. 3. Activities of glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) and glutamate pyruvate transaminase (GPT) of *Anguilla japonica* exposed to ambient nitrite for 48 h at 28.3°C. Data expressed as mean±S.E. (n=6). Different letters indicate significant differences ($P<0.05$) between nitrite-N concentrations. Asterisk represents that the measurement of one survived fish following 48 h exposure.

Table 3. Antioxidative enzyme activity of *Anguilla japonica* exposed to elevated ambient nitrite for 48 h at 28.3°C. Data expressed as mean±S.E. (n=6). Different letters indicate significant differences ($P<0.05$) between nitrite-N concentrations. Asterisks represent that the measurement of one survived fish following 48 h exposure

Nitrite-N (mM)	Catalase (CAT) ¹			Superoxide dismutase (SOD) ²		
	Plasma	Gill	Liver	Plasma	Gill	Liver
0 (Control)	2.10±0.21 ^c	1.41±0.12 ^c	0.47±0.10 ^c	0.26±0.03 ^c	0.86±0.15 ^d	0.10±0.03 ^c
2.33	2.83±0.33 ^b	2.20±0.14 ^b	0.71±0.14 ^b	0.35±0.01 ^b	3.12±0.23 ^c	0.47±0.06 ^b
4.60	3.66±0.37 ^{ab}	2.62±0.36 ^{ab}	0.91±0.12 ^b	0.52±0.07 ^a	4.70±0.32 ^b	0.61±0.09 ^b
6.64	3.79±0.58 ^a	3.17±0.41 ^a	1.58±0.34 ^a	0.48±0.08 ^a	6.15±0.64 ^a	1.40±0.28 ^a
8.78	1.70 [*]	3.01 [*]	1.31 [*]	0.43 [*]	6.30 [*]	0.51 [*]

¹nmol/min/mg protein at 25°C.

²U/mg protein at 25°C.

guilla anguilla)는 아질산 0.142-1.549 mM에 24시간 노출 후 혈장 아질산 농도는 14-52 µM로서 환경수에 비해 낮은 농도를 축적하였다(Huang and Chen, 2002). 수온 28.3°C에서 아질산 2.33-8.78 mM에 48시간 노출된 뱀장어의 혈장 아질산은 15.3-370.7 µM이었고, 고농도에 노출될수록 혈장 아질산 농도가 증가하였지만 유럽산뱀장어에서와 같이 환경수중의 아질산 농도에 비하여 저농도로 축적되었다(Fig. 1A). 이러한 현상은 아가미를 통해 Cl⁻ 흡수율이 낮은 어류(뱀장어, 블루길, 잉어 등)는 혈액중의 아질산 축적율이 낮고, Cl⁻ 흡수율이 높은 어류(송어, 농어, 차넬메기 등)는 아질산 축적이 많지만 아질산에 대한 내성은 높다는 보고(Williams and Eddy, 1986; Tomasso and Grosell, 2005)에 부합하는 것으로 생각된다.

어류 혈액으로 유입된 아질산은 적혈구의 막단백질을 경유하여 적혈구속에 유입되어 Hb을 metHb으로 산화시킨다(Jensen, 2003). MetHb은 산소결합 능력이 없기 때문에 궁극적으로 혈액의 산소운반 능력이 감소되며, 이로 인하여 초래되는 산소 부족은 어체에 스트레스 요인으로 작용할 수 있다(Kroupova et al., 2005). 어류가 저산소에 대응하는 일반적인 반응은 조혈작용에 의한 적혈구수 증가이며, 이것은 어체내 요구 산소를 일정 수준으로 유지하기 위하여 나타나는 현상이지만(Peterson, 1990), 여러 어종에서는 상반되는 결과도 보고되어 있다(Hilmy et al., 1987; Tucker et al., 1989; Avilez et al., 2004). 본 연구에서 아질산에 노출된 뱀장어의 Hb 함량은 환경수중의 아질산 농도가 높을수록 감소하였다(Fig. 1B). 환경수중의 아질산 농도가 ≥4.60 mM인 조건에서 Hb 함량이 감소하는 현상은 순환혈액중의 적혈구 사멸 증가 및 적혈구의 용해에 기인(Jensen, 1990a; Knudsen and Jensen, 1997)되거나 체내 저산소에 직면한 어류의 조절기능 저하에 의한 것(Gill et al., 1991)으로 생각된다.

아질산에 노출된 어류의 특징적인 반응은 Hb이 산화되어 metHb이 증가하는 현상이며, nitrite-free water에서도 어류는 Hb의 자가산화에 의해 축적이 가능한 량의 metHb을 함유한다(Lewis and Morris, 1986; Kroupova et al., 2005). 뱀장어

는 Hb의 3.7%를 metHb 바탕농도로 함유하였고, 아질산 2.33-6.64 mM에서 48시간 후에는 9.5-56.0%, 8.78 mM에 노출 후 생존 개체는 90%로 나타났다(Fig. 1C). 수온 25.2°C에서 유럽산뱀장어의 metHb 바탕농도는 8.4%, 아질산 0.356-1.549 mM에 24시간 노출 후에는 16.6-45.6% (Huang and Chen, 2002), 그리고 Amano et al. (1981)은 아질산 2.14 mM과 2.86 mM에 1개월간 노출된 뱀장어의 metHb 비율은 각각 15-68% (평균, 38%)와 15-65%(평균, 40%)로 보고하였다. Kiese (1974)는 Hb의 자가산화율은 pH 7일 때 보다 pH 5.7에서 훨씬 높으며, Hb의 50%가 탈산소 되는 낮은 산소분압에서 최대에 이른다 하였다. Huey et al. (1984)은 양식장 사육수의 pH는 양식 어류의 호흡과 수중 호기성 미생물이 배출하는 CO₂에 의해 빠르게 산성화 되지만 질화세균, *Nitrobacter*의 최적 질화작용에 요구되는 pH 범위는 7.5-8.6로 보고하였다. 이러한 점을 감안하면 고수온에서 고밀도로 사육되는 뱀장어의 경우 사육수의 점진적인 산성화와 주기적 또는 장·단기간의 저산소 환경이 초래되는 사육환경에서는 아질산의 독성 영향이 가중될 수 있을 것으로 여겨진다.

뱀장어 적혈구의 NMR 활성을 측정할 바, 대조구에서는 Hb mg당 0.019 U, 아질산 2.33-8.78 mM에 노출된 것은 0.084-0.272 U로서 환경수중의 아질산 농도가 높을수록 NMR 활성이 유의하게 증가하는 현상을 보여주었다(Fig. 2). 어류 적혈구는 metHb을 Hb으로 환원하는 효소인 NMR을 함유하며(Huey et al., 1984), 아질산에 노출된 어류를 nitrite-free water에 두면 NMR의 환원기작에 의해 Hb 함량은 정상수준으로 회복된다(Huey et al., 1980; Knudsen and Jensen, 1997; Lefevre et al., 2011). 열대산 송어류의 *Brycon cephalus*는 아질산에 노출된 후 NMR 활성이 증가하였고(Avilez et al., 2004), 나일틸라피아의 NMR 활성도는 아질산 농도와 노출시간에 영향을 받는다고 하였다(Yildiz et al., 2006).

환경수중의 아질산과 Cl⁻는 아가미에서 동일 흡수경로를 경쟁함에 따라 아질산에 노출 시에는 능동적 Cl⁻ 흡수 부분의 일부는 아질산 흡수 부위로 전환된다(Jensen, 2003). 반면에 저삼

투성 환경수중으로는 Cl⁻의 수동적 유출이 계속되어 Cl⁻ 순손실이 초래되어서 어떤 종에서는 세포의 Cl⁻ 농도가 감소된다(Jensen, 2003). 또한, 아질산 축적과정에는 골격근(Jensen, 1990b; Stormer et al., 1996; Knudsen and Jensen, 1997)과 적혈구 세포(Jensen, 1990a)의 K⁺ 상실에 의하여 K⁺ 항상성이 교란되어 고칼륨혈증이 야기되기도 한다(Jensen et al., 1987; Alexander et al., 2012). 아질산 6.64 mM에 노출된 뱀장어의 혈장 K⁺ 농도는 대조구에 비하여 유의하게 높았으며(Table 2), Na⁺와 Cl⁻는 환경수중의 아질산 농도에 따른 차이가 관찰되지 않았다($P>0.05$).

한편, cortisol과 glucose는 아질산 농도가 높을수록 증가하였다(Table 2). 아질산에 노출된 뱀장어에서 혈장 cortisol의 증가하는 것은 cortisol이 간에서 glucose 신합성을 촉진하여 NMR 활성을 높이도록 유도하는 일련의 생리적 조절반응(Kiese, 1974) 내지는 메트헤모글로빈혈증에 의한 어류의 요구산소 부족에 따른 스트레스 반응으로 생각된다.

혈중으로 유입된 아질산은 어류의 질소대사를 교란시킬 뿐만 아니라 간의 손상을 초래하여 GOT와 GPT 활성이 증가한다(Michael et al., 1987; Haug and Chen, 2002). 이들 아미노기 전이효소의 상당 부분은 손상된 간세포에서 분비되어 혈액으로 방출됨으로 혈장 GOT와 GPT 활성 측정치는 간 손상의 지표로 이용되고 있다(Michael et al., 1987). 아질산 6.64 mM에 노출된 뱀장어는 대조구에 비하여 GOT와 GPT 활성이 증가하였다(Fig. 3). Haug and Chen (2002)은 아질산 0.751 mM에 24 시간 노출된 유럽산뱀장어는 GOT 활성이, 1.547 mM에서는 GPT 활성이 유의하게 증가하는 결과를 보여 주었다.

세포 내외에 존재하는 CAT와 SOD 함량은 활성산소의 산화적 스트레스에 의해 발생하는 질병 예방에 중요하며(Malstrom et al., 1975), 항산화효소의 활성도는 수생생물에 있어서 환경 스트레스에 대한 biomarker로 이용될 수 있다고 하였다(Martinez-Alvarez et al., 2005; Alexander et al., 2012). 아질산 2.33 mM에 48시간 노출된 뱀장어는 CAT와 SOD 활성이 유의하게 높았고, 환경수중의 아질산 농도가 높을수록 이들의 활성은 증가하였다(Table 3). CAT는 간에 비하여 혈장과 아가미에서, SOD는 아가미에서 높은 활성을 나타내었다.

본 연구의 결과, 수온 28.3℃에서 농도별 아질산에 48시간 노출된 뱀장어는 환경수의 아질산 농도가 높을수록 혈장 아질산, metHb 비율, NMR, CAT 및 SOD의 활성은 증가하였고, Hb 함량은 감소하였다. 환경수의 아질산 농도가 ≥ 2.33 mM인 조건에 뱀장어가 급성으로 노출되면 생리적 스트레스 반응과 더불어 혈액학적 parameter와 항산화효소의 활성이 현저하게 변화되는 현상이 관찰되었다.

References

Aggergaard S and Jensen FB. 2001. Cardiovascular changes and physiological response during nitrite exposure

in rainbow trout. J Fish Biol 59, 13-27. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8649.2001.tb02335.x>.

Alexander C, Sahu NP, Pal AK, Dasgupta S and Akhtar MS. 2012. Alterations in serum electrolytes, antioxidative enzymes and haematological parameters of *Labeo rohita* on short-term exposure to sublethal dose of nitrite. Fish Physiol Biochem 38, 1355-1365. <http://dx.doi.org/10.1007/s10695-012-9623-3>.

Amano H, Miyazaki T, Ichioka M, Niwa M and Kubota SS. 1981. Occurrence of nitrite-induced methemoglobinemia in cultured eels. Bull Jap Soc Sci Fish 47, 823.

APHA AWWA WEF. 1995. Standard method for the examination of water and wastewater, 19th ed. American Public Health Association, Washington, DC.

Avilez IM, Altran AE, Aguiar LH and Moraes G. 2004. Hematological responses of the Neotropical teleost matrinxã (*Brycon cephalus*) to environmental nitrite. Comp Biochem Physiol C 139, 135-139. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2004.10.001>.

Chiba H, Hattori T, Yamada H and Iwata M. 2006. Comparison of the effects of chemical anesthesia and electroanesthesia on plasma cortisol levels in the Japanese eel *Anguilla japonica*. Fish Sci 72, 693-695. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1444-2906.2006.01201.x>.

Das PC, Ayyappan S, Jena JK and Das BK. 2004. Nitrite toxicity in *Cirrhinus mrigala* (Ham): Acute toxicity and sublethal effect on selected haematological parameters. Aquaculture 235, 633-644. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.01.020>.

Eddy FB, Kunzlik PA and Bath RN. 1983. Uptake and loss of nitrite from the blood of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in freshwater and in dilute sea water. J Fish Biol 23, 105-116.

Gill TS, Pande J and Tewari H. 1991. Haemopathological changes associated with experimental adicarb poisoning in fish (*Puntius conchoni* Ham.). Bull Environ Contam Toxicol 7, 628-633.

Haug CY and Chen JC. 2002. Effects on acid-base balance, methemoglobinemia and nitrogen excretion of European eel after exposure to elevated ambient nitrite. J Fish Biol 61, 712-725. <http://dx.doi.org/10.1006/jfbi.2002.2094>.

Hilmy AM, El-Domiaty NA and Weshana K. 1987. Acute and chronic toxicity of nitrite to *Clarias lazera*. Comp Biochem Physiol C 86, 247-253.

Huey DW, Simco BA, Criswell DW. 1980. Nitrite induced methaemoglobin formation in channel catfish. Trans Am Fish Soc 109, 558-562.

Huey DW and Beitinger TL. 1982. A hemoglobin reductase system in channel catfish *Ictalurus punctatus*. Can J Zool 60, 1511-1513.

Huey DW, Beitinger TL and Wooten MC. 1984. Nitrite induced methaemoglobin formation and recovery in channel catfish

- (*Ictalurus punctatus*) at three acclimation temperatures. Bull Environ Contam Toxicol 32, 674-681.
- Iwama GK, Pickering AD, Sumpter JP and Schreck CB. 1997. Fish Stress and Health in Aquaculture. Cambridge University Press, New York, U.S.A., 35-71.
- Jensen FB. 1990a. Nitrite and red cell function in carp: control factors for nitrite entry, membrane potassium ion permeation, oxygen affinity and methemoglobin formation. J Exp Biol 152, 149-166.
- Jensen FB. 1990b. Sublethal physiological changes in freshwater crayfish, *Astacus astacus*, exposed to nitrite: haemolymph and muscle tissue electrolyte status, and haemolymph acid-base balance and gas transport. Aquat Toxicol 18, 51-60.
- Jensen FB. 2003. Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals. Comp Biochem Physiol A 135, 9-24. [http://dx.doi.org/10.1016/S1095-6433\(02\)00323-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1095-6433(02)00323-9).
- Jensen FB, Anderson NA and Heisler N. 1987. Effects of nitrite exposed on blood respiratory properties, acid-base and electrolyte regulation in the carp *Cyprinus carpio*. J Comp Physiol B 157, 533-541.
- Jensen FB and Hansen MN. 2011. Differential uptake and metabolism of nitrite in normoxic and hypoxic goldfish. Aquat Toxicol 101, 318-325. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.11.007>.
- Kamstra A, Span JA and van Weerd JH. 1996. The acute toxicity and sublethal effects of nitrite on growth and feed utilization of European eel, *Anguilla anguilla* (L.). Aquacult Res 27, 903-911. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2109.1996.t011-00820.x>.
- Kiese M. 1974. Methaemoglobinaemia: A Comprehensive Treatise. Causes, consequences, and correction of increased contents of ferrihemoglobin in blood. CRC Press, Cleveland, U.S.A., 260 pp.
- Knudsen PK and Jensen FB. 1997. Recovery from nitrite induced methaemoglobinaemia and potassium balance disturbances in carp. Fish Physiol Biochem 16, 1-10. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00004535>.
- Kroupova H, Machova J and Svobodova Z. 2005. Nitrite influence on fish: a review. Vet Med Czech 11, 461-471. <http://vri.cz/docs/vetmed/50-11-461.pdf>.
- Lefevre S, Jensen FB, Huong DTT, Wang T, Phuong NT and Bayley M. 2011. Effects of nitrite exposure on functional haemoglobin levels, bimodal respiration, and swimming performance in the facultative air-breathing fish *Pangasianodon hypophthalmus*. Aquat Toxicol 104, 86-93. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.03.019>.
- Lewis WM and Morris DP. 1986. Toxicity of nitrite to fish: a review. Trans Am Fish Soc 115, 183-195.
- Livingstone DR. 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. Mar Pollut Bull 42, 656-666. [http://dx.doi.org/10.1016/S0025-326X\(01\)00060-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0025-326X(01)00060-1).
- Livingstone DR, Garcia-Martinez P, Michel X, Narbonne JF, O'Hara S, Ribera D and Winston GW. 1990. Oxyradical generation as a pollution-mediated mechanism of toxicity in the common mussel, *Mytilus edulis* L and other molluscs. Funct Ecol 4, 415-424.
- Madison BN and Wang YS. 2006. Haematological responses of acute nitrite exposure in walleye (*Sander vitreus*). Aquat Toxicol. 79, 16-23. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.04.011>.
- Malstrom B, Andersson L and Reinhammer B. 1975. The enzymes. Boyer P. ed. XII B, Academic Press, New York, U.S.A., 553.
- Martinez-Alvarez RM, Amalia E, Morales and Ana S. 2005. Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors; a review. Rev Fish Biol Fish 15, 75-88. <http://dx.doi.org/10.1007/s11160-005-7846-4>.
- Matsuoka T. 1997. Determination of methemoglobin and carboxyhemoglobin in blood by rapid colorimetry. Biol Pharm Bull 20, 1208-1211. <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.20.1208>.
- Michael MI, Hilmy, AM, El-Domiaty NA and Weršana K. 1987. Serum transaminase activity and histopathological changes in *Clarius lazera* chronically exposed to nitrite. Comp Biochem Physiol C 86, 255-262.
- Peakall D. 1992. Animal Biomarkers as Pollution Indicators. Chapman & Hall, London, U.K., 290.
- Peterson MS. 1990. Hypoxia-induced physiological changes in two mangrove swamp fishes: sheepshead minnow, *Cyprinodon variegatus* Lacepede and sailfin molly, *Poecilia latipinna* (Lesueur). Comp Biochem Physiol A 97, 17-21.
- Russo RC and Thurston RV. 1991. Toxicity of ammonia, nitrite and nitrate to fishes. In: Aquaculture and Water Quality. Brune DE and Tomasso JR, eds. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana. U.S.A., 58-89.
- Russo RC, Thurston RV and Emerson K. 1981. Acute toxicity of nitrite to rainbow trout (*Salmo gairdneri*): Effects of pH, nitrite species, and anion species. Can J Fish Aquat Sci 38, 387-393.
- Santos MA and Pacheco M. 1996. *Anguilla anguilla* L. stress biomarkers recovery in clean water and secondary treated pulp mill effluent. Ecotoxicol Environ Saf 35, 96-100. <http://dx.doi.org/10.1006/eesa.1996.0086>.
- Snieszko SF. 1974. The effects of environmental stress on outbreaks of infectious disease of fishes. J Fish Biol 6, 197-208.
- Stormer J, Jensen FB and Rankin JC. 1996. Uptake of nitrite, nitrate, and bromide in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effects on ionic balance. Can J Fish Aquat Sci 53, 1943-1950.
- Tomasso JR and Grosell M. 2005. Physiological basis for large differences in resistance to nitrite among freshwater and freshwater-acclimated euryhaline fishes. Environ Sci Technol 39, 98-102. <http://dx.doi.org/10.1021/es048900t>.

- Tsuzuki MY, Ogawa K and Strussmann CA. 2001. Physiological responses during stress and subsequent recovery at different salinities in adult pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *Aquaculture* 200, 349-362. [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00573-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00573-1).
- Tucker CS, Francis-Floyd R and Bebeau MH. 1989. Nitrite-induced anemia in channel catfish, *Ictalurus punctatus rafinesque*. *Bull Environ Contam Toxicol* 43, 295-301.
- Williams EM and Eddy FB. 1986. Chloride uptake in freshwater teleosts and its relationship to nitrite uptake and toxicity. *J Comp Physiol B* 156, 867-872.
- Worthington Biochemical Corporation. 1993. Worthington Enzyme Manual - Enzymes, Enzymes Reagents and Related Biochemicals. Freehold, New Jersey, USA.
- Yildiz HY, Koksal G, Borazan G and Benli CK. 2006. Nitrite-induced methemoglobinemia in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *J Appl Ichthyol* 22, 427-429. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0426.2006.00761.x>.