

아질산 노출이 흰다리새우, *Litopenaeus vannamei*의 생존율 및 독성 생리에 미치는 영향

김수경* · 김석렬**,***†

¹국립수산과학원 서해수산연구소, ²공주대학교 스마트수산자원학과
³농수산생명과학연구소

Effects of nitrite exposure on survival and physiology of white leg shrimp, *Litopenaeus vannamei*

Su Kyoung Kim* and Seok-Ryel Kim**,***†

*West Sea Fisheries Research Institute, National Institute of Fisheries Science, Taean, 32132, Republic of Korea

**Dept. of Smart Fisheries Resources Science, Kongju National University, Yesan, 32439, Korea

***Agriculture and Fisheries Life Science Research Institute

Juveniles of the white leg shrimp *Litopenaeus vannamei* (Weight 0.18±0.08 g) were exposed to nitrite-N at 0, 25, 50, 100, 200 and 400 mg/L for 72 hours, and the lethal concentration, hemolymph and genes regulation were evaluated. The lethal concentration 50 (LC₅₀) of *L. vannamei* exposed to nitrite-N was 141.2 mg/L at 25°C and 33 psu. In Total protein, total cholesterol, and BUN in hemolymph temporarily increased after the start of the experiment and then stabilized, but glucose, an indicator of stress, decreased over time in the entire experimental group, and creatines, an indicator of tissue damage, decreased with nitrite concentration until the first 12 hours. The genes of immune-related showed that masquerade-like serine proteinase(Mas) increased at 50 and 400 ppm for 24 hours, and then gradually decreased depending on concentration. In the case of prophenoloxidase, it was highest at 400 ppm for 40 hours, and other genes(Ras-related nuclear protein, Masquerade-like serine proteinase, proPO-activating enzyme) showed a response for 48 hours and then gradually decreased. The results of this study indicate that exposure to nitrite can affect the survival and hematological physiology of *L. vannamei*.

Key words: *L. vannamei*, Nitrite, Hemolymph, Immune

서 론

흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*)는 국내 양식

대하(*Fenneropenaeus chinensis*)의 대안으로 2003년 미국 하와이로부터 도입되어 현재는 새우양식의 주요 품종으로 자리 잡았고, 2021년 양식생산량은 약 9,545톤으로 우리나라 양식새우 생산에 대부분을 차지하고 있다(KOSIS, 2022). 최근 들어 노지 2모작 양식을 위해 3월부터 새우종자를 바이오플

†Corresponding author: Seokryel Kim
Tel: +82-41-330-1141, Fax: +82-41-330-1172
E-mail: seokryel@kongju.ac.kr

락(Biofloc Technology, BFT) 기술을 이용하여 그린 하우스 시설에서 중간육성을 하는 곳이 많아졌다.

바이오플락을 이용한 양식방법은 양식 사육 과정에서 발생하는 배설물과 사료찌꺼기 등을 미생물총을 활용하여 제거하고 수질을 안정화하여 생물이 살아갈 수 있는 수준으로 유지 한다(Yu et al., 2023). 또한 무환수 및 반환수로 환경에 대한 통제가 가능하여 외부로부터 유입되는 질병을 차단할 수 있기 때문에 항생제 등 약품을 전혀 쓰지 않는 친환경적 생산이 가능토록 한다. 이처럼 BFT는 사육용수의 환수 없이 유해물질을 제거할 수 있는 친환경 양식기술로 보급 확산되고 있다(Day et al., 2016; Kim et al., 2014). BFT는 미생물의 질화과정을 이용하여 양식에서 발생하는 독성 있는 암모니아와 아질산을 제거하는데, BFT 사육수가 불안정한 경우 사육수에는 아질산이 높은 농도로 유지되기도 한다.

아질산은 양식생물이 배출한 암모니아의 산화과정 또는 질산염의 환원 과정으로부터 생성되는 중간산물이고, 일반적으로 해양환경에서는 수중생물에게 영향을 미치는 0.5 $\mu\text{mol/l}$ 이하의 농도로 유지된다(Zhang et al., 2022; Moon et al., 2015). 그러나 사육수의 교환이 거의 없는 지수식 양식장이나 고밀도로 양식 환경에서는 높은 수준으로 증가할 수 있고, 이는 수산생물 체내로 흡수되어 독성으로 작용하기도 한다(Cheng et al., 2019; Jia et al., 2016). 아질산 이온(NO_2^-)은 수중생물의 아가미 조직에서 염화물(Cl^-)/중탄산염(HCO_3^-)이온과 친화성을 가지기 때문에, 염화이온(Cl^-)과 동일한 부위에서 경쟁적으로 작용하여 삼투 장애를 초래할 수 있다. 흰다리새우의 사육과정에서 배설되는 암모니아, 아질산은 pH에 따라 독성으로 작용하여 제거되지 않을 경우 새우에게 스트레스와 대량폐사를 일으키는 원인으로 작용하기도 한다(Li et al., 2019; Tseng and chen, 2004; Le Mouillac and Haffner, 2000). 수중에서의 아질산 노출은 아가미 이온교환을 통해 순환기계로 유입되어 혈액 내의 산염기 불균형 및 이온 항상성 교란을 유발할 수 있다. 또한, 혈액 내의 아질산은 혈구의 산소와 반응하여 혈중 산소 농도의 감소를 유발할 수 있다(Zhang et al., 2021; Gutiérrez et al., 2019). 최근 국내에서

흰다리새우 2모작, 초기 생존율 향상, 성장촉진, 초기 사육관리 효율성 등의 이유로 BFT를 이용한 실내 중간육성 방법이 확산되고 있다. 그러나 BFT 양성 초기 타가영양세균들의 활성화와 사육수의 안정화되기 전 높은 아질산에 의한 피해가 다수 발생하였다. 하지만, 아질산 급성 노출에 따른 흰다리새우의 독성 영향에 대한 연구는 국내에서 거의 이루어지지 않았다. 이에 본 연구에서는 아질산 노출에 따른 흰다리새우의 영향을 검토하기 위해 흰다리새우의 아질염에 대한 반수치사농도, 혈액학적 성상 및 혈장 성분을 통해 아질산 노출에 따른 독성 내성한계를 제시하고 생리적 영향을 확인하는 데 있다.

재료 및 방법

실험설계

반수치사농도(Lethal concentration, LC_{50}) 실험에 사용한 흰다리새우는 평균체중 0.18 \pm 0.08 g 유생을 사용하였다. 10 L 아크릴 수조를 사용하였으며, 실험구는 여과 해수에 아질산염을 0, 25, 50, 100, 200 및 400 mg/L의 농도로 설정하고, 어린새우를 수조 당 100마리씩 수용하였다. 실험은 72시간 수조 별 폐사 유무를 확인하고, 폐사 개체는 제거해주었다. 72시간 후 아질산 노출에 따른 최종 폐사 개체를 바탕으로 통계프로그램(SPSS Inc, IL, USA, probit model)을 이용하여 반수치사농도 수치를 산출하였다.

체액분석

체액분석은 각 실험구마다 9마리씩 무작위로 선택하여 무게를 측정하고 한 마리씩 증류수 3 mL에 넣어 마쇄 한 후 원심분리(8,000 rpm, 10분, 4°C)하여 상등액을 혈액분석기(Fuji Dri-Chem, 3500i, Japan)로 total protein(TP), total cholesterol(TCH), glucose(GLU), triglyceride(TG), creatine(CRE), 혈중 요소성 질소(BUN), Na^+ , K^+ , Cl^- 를 측정 하였다. 실험구간의 시료 크기에 따른 오차를 줄이기 위하여 측정된 시료의 무게로 각 분석값을 환산하였다. 즉 mg/dL와 mEq/L를 mg/g으로 환산하여 비교하였다.

사육수 수질 측정

실험기간 사육수 수질변화는 수온, 염분, 용존산소(DO), pH는 수질측정기(YSI EXO 2, Yellow Springs Instrument Co., Inc., USA)로 매일 측정하였다. 아질산은 해양공정시험법을 이용하여 분석하였다.

면역 관련 유전자 분석

quantitative Real-Time PCR로 각 농도별 면역관련 유전자의 발현을 비교하기 위해 primer와 probe를 제작하였고, 표적 유전자와 GenBank accession 번호는 Table 1에 나타내었다. 시료는 실험이 끝나고 각 농도별 실험구에서 3마리의 어린새우를 랜덤 채취하여 액체질소에 넣고 RNA 추출에 사용할 때까지 -80°C에 보관하였다. RNeasy Mini Kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)로 총 RNA를 추출한 후 DNase I(Qiagen, Valencia, CA, USA)로 정제하여 template로 사용하였다. TaqMan qRT-PCR법을 이용하여 prophenoloxidase(proPO), masquerade-like serine proteinase(Mas), ras-related nuclear protein(Ran)와 proPO-activating enzyme(PPAE) 4개 면역 관련 유전자의 mRNA 발현량을 조사하였다(Kim et al., 2014). 상대적인 발현은 β -actin 비교 역치 사이클 방법($2^{-\Delta\Delta CT}$ method, Livak and Schmittgen, 2001)에 따라 결정하

였다.

통계처리

통계처리는 SPSS(Statistical Package for Social Science, version 13. software) 통계프로그램으로 실험구간의 일원 분산분석(one-way ANOVA, Turkey's honest test($p < 0.05$))에서 유의성검증을 실시하였다.

결과 및 고찰

수질환경변화

실험기간 동안 실험구간 용존산소는 5.3-5.5 mg/L, 염분은 33.1-33.4 psu, pH는 8.0-8.1, 온도는 25.5-26.8°C 범위로 흰다리새우 생존 가능 범위를 유지하였고, 수조별 수질환경 값은 Table 2에 표시하였다. 흰다리새우 생존 가능 범위의 환경조건으로는 성장 적정수온은 28°C이고, 하한 수온으로 13°C에서 성장, 먹이활동과 유영중단 및 폐사로 이어질 수 있는 수온이고(Wang et al., 2019), 수온이 낮아지면 체내에서는 간췌장의 분비세포 수와 부피가 크게 증가하고, 세노관 내강이 확장되면, 상피세포 층이 얇아지는데, 수온을 다시 적정수온까지 올리면 대사물질이나 유전자 발현량 모두 정상수준으로 회복됨이 확인되어, 흰다리새우는 일정 수준의

Table 1. Immune related genes primers and probes sequences

Primers	Primer sequence(5'→3')	Accession No. & Remarks
proPO1-RT- F	CGAGGGTGGAGAAGCTAGACA	JX644447, present study
proPO1-RT- R	CCGGAGTTGCTGATAGTCAGTTT	JX644447, present study
proPO1-RT- P*	TGGCGCATTCCCATCAAGGACG	JX644447, present study
Ran-RT- F	CCAAGAGAAATTGGGAGGTCTTC	JX644455, Kim et al., 2014
Ran-RT- R	GGAACATTCTGTACGTGACTCTAG	JX644455, Kim et al., 2014
Ran-RT- P*	ATGTTACTACATCCAGGCCACTGTGC	JX644455, Kim et al., 2014
Mas-RT- F	TGGGATTGCTCCGCACA	JX644444, present study
Mas-RT- R	ATTCGCCCCCTGGAAGAT	JX644444, present study
Mas-RT- P*	CCCCGTCTGCTTGCCTTCTCAGG	JX644444, present study
PPAE-RT- F	GGTGACGGTGCCCATCTG	JX644446, present study
PPAE-RT- R	CGCACAGCTGCTTGTTCGAT	JX644446, present study
PPAE-RT- P*	CTTGCACGACGCCTACGAACAGAA	JX644446, present study
β -actin-RT- F	CCGAGCGTGGCTACACCTT	present study
β -actin-RT- R	GCACAGCTTCTCCTTGATGTCA	present study
β -actin-RT- P*	CCACCGCCGAGCGAGAAATCG	present study

*probe

Table 2. Water quality in trial tanks for lethal concentration 50% during 72 h

Concentration (NO ₂ mg/L)	DO (mg/L)	Salinity (psu)	pH	Temperature (°C)
0	5.5	33.1	8.0	25.6
25	5.5	33.3	8.1	25.5
50	5.4	33.3	8.1	25.7
100	5.3	33.3	8.1	26.3
200	5.3	33.4	8.1	26.7
400	5.3	33.2	8.1	26.8

온도 변동에 적응할 수 있음이 확인되었다. 염분 조건에서는 3-32 psu까지 적응 할 수 있고(Li et al., 2008), pH는 6.65-9.81 범위까지 생존 가능하지만, 적정 pH는 8.14-8.31이며(Han et al., 2018a), 용존산소는 0.8~3.5 mg/L 범위이면 심각하거나 어느 정도 저산소증 피해를 입을 수 있고, 정상 용존산소 범위는 6.4~7.5 mg/L(Han et al., 2018b)로 제시되어 있다. 본 연구에서의 환경조건은 적정 환경수준에서 수행되었음을 확인할 수 있다.

생존율과 반수치사농도(LC₅₀)

아질산 농도에 따른 노출 72h 후 생존율은 100 mg/L NO₂-N 이하에서는 95%의 생존율을, 200 mg/L NO₂-N 농도에서는 31%, 400 mg/L NO₂-N 농도에서는 2%의 생존율을 보여(Fig. 1) 반수치사농도는 6h은 437.7 mg/L, 12h은 402.9 mg/L, 24h은 285.7 mg/L, 48h은 244.3 mg/L, 72h은 180.2 mg/L로 Table 3에 나타내었다. 조금 큰 개체(3~5g)의 24h 반수치사농도는 848 mg/L로 아질산에 대한 내성이 3배정도 높게 나타나(Data not shown), 성장에 따라 아질산에 대한 내성이 높게 나타났다. Lin과 Chen(2003)의 연구에서 제시한 흰다리새우의 아질산에 대한 반수치사농도는 염분이 15, 25와 35 psu 일 때 염분

Table 3. Lethal concentration 50% of *L. vannamei* exposed to nitrite (NO₂).

Exposure time	NO ₂ concentration (mg/L)
6 h	437.7
12 h	402.9
24 h	285.7
48 h	244.3
72 h	180.2

이 증가할수록 아질산에 대한 반수치사농도가 높게 나타났고, 크기가 56±9.6 mm(3.96±1.42 g)의 경우, 35 psu에서 24h, 48h 및 72h LC₅₀는 각각 521, 424 및 375 mg/L로 유사한 결과를 보였다. 본 연구에서 아질산염에 대한 흰다리새우 72 h LC₅₀은 180.2 mg/L 보였는데, 이는 흰다리새우가 대하, 홍다리얼룩새우(*Penaeus monodon*), 인도새우(*Penaeus penicillatus*), 및 곧은뿔중하(*Metapenaeus ensis*) 등에 비해 아질산염에 대한 내성이 더 강한 것으로 나타났다(Table 4, Chen and Lei, 1990; Chen et al., 1990a, Chen et al., 1990b; Chen and Lin, 1991). 이들 결과를 종합하여 흰다리새우 치어 사육시 아질산염에 대한 안전수준은 18°C, 35 psu의 경우 25.7 mg/L 이하로 판단하였다.

체액분석

아질산염 농도별 체내 이온비율 분석결과 K⁺ 이온은 농도별, 시간별 이온간 차이는 나타나지 않았으나, 혈림프 내 Na⁺, Cl⁻은 시간이 경과할수록 높아지는 추세를 보였으며 대조구보다 높은 값을 보였고, 72시간 400 ppm농도에서 전 개체가 폐사하였다(Fig. 1, 2). 보리새우(*P. japonicus*)의 경우 아질산염의 농도에 반비례하여 Na⁺와 Cl⁻ 이온 농도는 감소하는 경향을 보인다고 보고되었으나(Cheng and Chen, 1998), 본 연구 흰다리새우에서는 Na⁺와 Cl⁻가 아질산 농도에 비례하여 증가하고 400 mg/L에서는 전량 폐사하여 체내에 Na⁺와 Cl⁻량이 증가

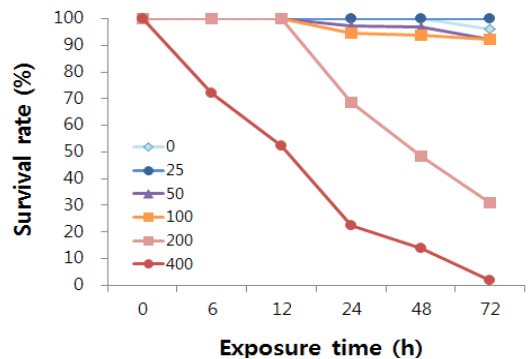


Fig. 1. Survival rate of *L. vannamei* (B.W 0.11~0.29 g) under different nitrite (NO₂) concentration (0, 25, 50, 100, 200 and 400 mg/L).

Table 4. The 96-h LC₅₀ of nitrite-N on several species of penaeid juveniles

Species(size)	Salinity (psu)	Nitrite-N (mg/L)	Reference
<i>Fenneropenaeus chinensis</i> (39.6 mm)	33	37.71	Chen et al.(1990a)
<i>Penaeus monodon</i> (35.4 mm)	20	54.76	Chen and Lei(1990)
<i>Penaeus penicillatus</i> (38.5-47.5 mm)	25	38.52	Chen and Lin(1991)
<i>Metapenaeus ensis</i> (14.0 mm)	25	50.71	Chen at al.(1990b)
<i>Litopenaeus vannamei</i> (56 mm)	35	321.7	Lin and Chen(2003)
<i>Litopenaeus vannamei</i> (3.3 g)	30	10.6	Valencia- Castaneda et al.(2019)
<i>Litopenaeus vannamei</i> (0.18±0.08 g), (72h)	33	180.2	This study

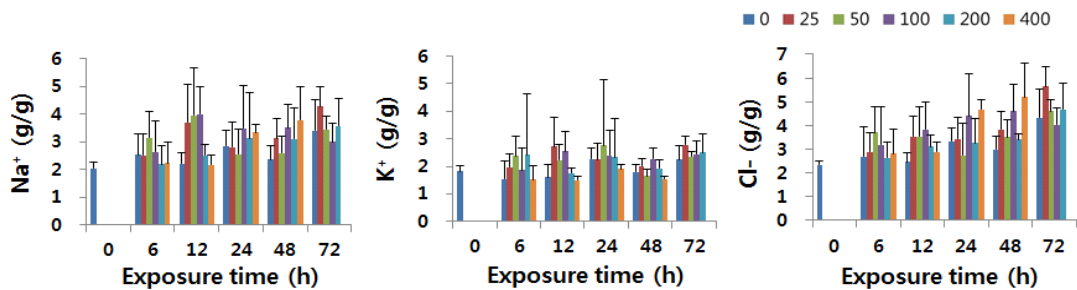


Fig. 2. Ions changes (Na⁺, K⁺ and Cl⁻) in hemolymph of *L. vannamei* exposed to different NO₂ concentrations.

하면서 폐사에 영향을 미친 것으로 사료된다(Fig. 2). 혈액분석결과를 Fig. 3에 나타내었다. 총 단백질(TP), 총콜레스테롤(TCH), 혈중요소성질소(BUN)는 실험시작 후 일시적으로 높아지다가 안정화 되

었다. 스트레스 지표인 글루코스는 전체 실험구가 시간이 지남에 따라 감소하였으며, 조직손상도 지표인 creatine은 초기 12시간까지는 아질산 농도에 의한 차이를 보이지 않았으나 24시간, 48시간에는

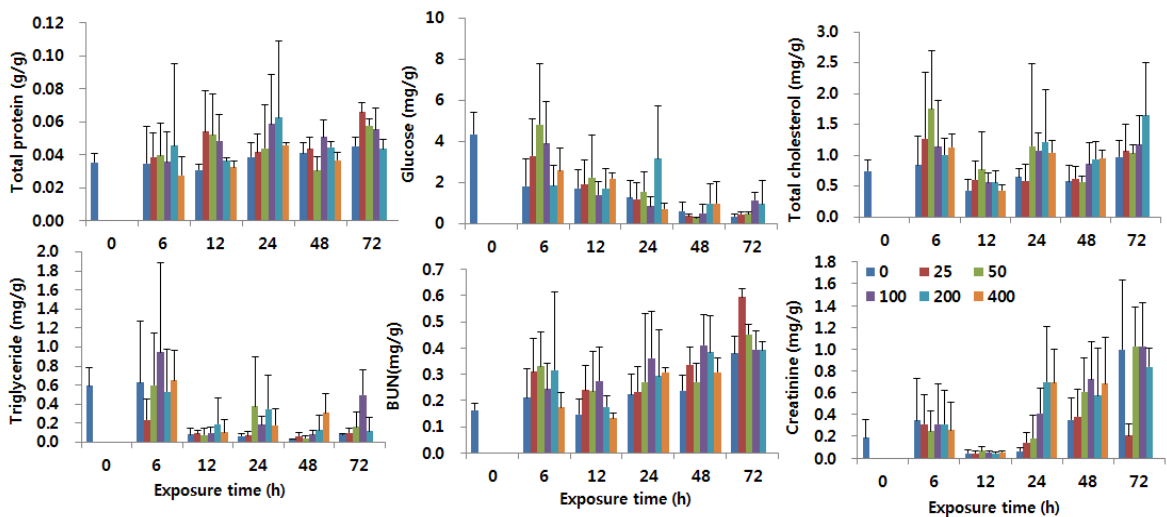


Fig. 3. Changes of hemolymph compositions (TP, TCH, GLU, TG, BUN, CRE) of *L. vannamei* exposed to different NO₂ concentrations. The error bars represents the standard deviation. The use of a small letter denotes significant differences between experimental groups (p<0.05).

아질산 농도에 비례하여 증가하였다. *P. japonicus*의 경우 아질산염의 농도에 반비례하여 혈액내 총 단백질, total free amino acid는 감소하였고, Urea는 농도에 비례하여 증가하는 추세를 보였다(Cheng and Chen, 1998). Li 등(2019)의 연구에서는 혈림프에서 아질산염 수준이 용량 의존적으로 크게 증가하였고, 옥시헤모시아닌 함량이 시간이 증가할수록 크게 감소하였다. 또한 글리코겐의 농도도 대조군에 비교하여 감소한 것으로 나타났다. 반면 triglyceride(TG) 함량은 농도 의존적으로 증가하였다. 이들 결과는 아질산염 스트레스에 노출되면 혈림프 내 아질산염 농도가 증가하고 oxygenation과 헤모시아닌 합성이 감소하여 조직 저산소증이 발생하여 혐기성 대사가 가속화되고 호기성 대사가 억제될 수 있음을 보고하였다. 결과적으로 양식 시스템에서 아질산염 스트레스는 흰다리새우의 헤모시아닌 합성과 에너지 대사에 영향을 미쳐 폐사에 이르게 할 수 있음을 시사한다.

면역관련유전자 분석

면역관련유전자 분석결과에서는 MAS가 24시간 50, 400 ppm에서 증가하여 이후 농도별로 감소하였고, proPO는 40시간 400 ppm에서 가장 높게

나타났으며 다른 유전자들도 48시간 반응을 보인 후 낮아졌다(Fig. 4). 본 연구에서 선정된 proPO, PPAE, Mas 및 Ran 4개 유전자는 새우의 비특이적 면역반응과 관련이 있는 것으로 알려져 있다(Franco & Gloria, 2000; Lee et al., 2002; Han & Zhang, 2007). 새우 면역반응에서 PPAE는 proPO를 자극하여 PO를 활성화시키고 PO는 phenol을 quinone으로 변환시켜 멜라닌을 생성하여 주요 병원체에 대응하는 것으로 알려져 있다(Amparyup et al., 2013). 본 연구에서도 PPAE와 proPO가 동시 up-regulation되는 양상을 보였는데 이는 아질산염이 체내에 증가하면서 이물질로 인식하고 면역반응을 보인 것으로 사료된다. PPAE는 proPO 시스템의 필수 분자로 알려져 있으며, proPO는 세균 감염에 대한 새우 방어 메커니즘에서 매우 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어 있다(Amparyup & Charoensapri, 2009). Jang 등(2011)은 *L. vannamei*의 PPAE를 동정 결과 *P. monodon*의 PPAE과 94% 유사함과 PPAE 발현이 비브리오 감염부위 아가미에서 유의하게 증가하고 작용한다는 것을 보고하였는데 이는 세균 감염에 따른 새우 체내 면역반응에 따른 것으로 해석하였다. Cerenius와 Soderhall(2004)은 비활성 proPO zymogen이 PPAE라고 하는 clip domain serine pro-

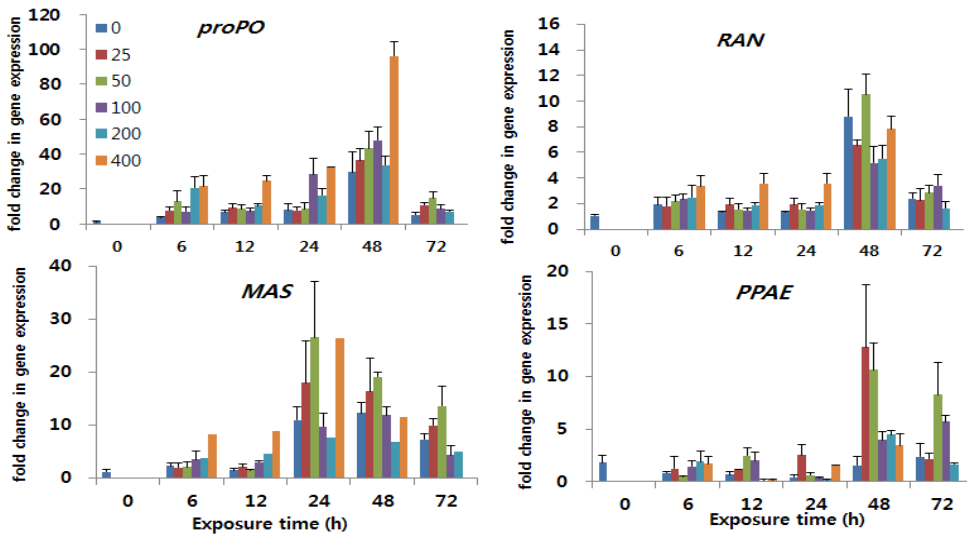


Fig. 4. Expression of immune related genes(proPO, RAN, MAS, PPAE) in different NO₂ concentrations. The transcription levels were detected by TaqMan qRT-PCR. Gene expression level was normalized to β-actin (±SD, N=9, P<0.05).

teinase(Clip-SP)에 의해 active phenoloxidase(PO)로 전환되는 것을 확인하였다. 이 과정들은 곤충과 갑각류의 면역관련 pathway에 잘 정립되어 있다 (Kwon et al., 2000; Sritunyalucksana & Soderhall, 2000; Wang et al., 2001). Mas는 곤충 PPAF(N-말단 클립 도메인 및 C-말단 세린 단백질분해효소 유사 도메인)의 구조적 특성 대부분을 가지고 있는 유사 세린 단백질 분해효소 동족체로 알려져 있고, 세균 감염시 면역에 관여한다(Amparyup et al., 2007). WSSV에 감염된 *M. japonicus*에서 Ran 유전자가 up-regulate 되는 것으로 보고되었으며, 이는 Ran 단백질이 새우의 항바이러스 면역에 관여함을 시사하였다(Han & Zhang, 2007). 아질산 농도에 따라 흰다리새우 체내 proPO, PPAE, Mas 및 Ran 유전자의 up-regulation은 아질산 노출 환경에서 관찰되었다. 이러한 결과는 *L. vannamei*의 아질산 노출 환경이 면역 관련 유전자의 발현을 up-regulation에 관여할 수 있음을 시사한다.

References

- Amparyup P. and Charoensapsri W., Two prophenoloxidases are important for the survival of *Vibrio harveyi* challenged shrimp *Penaeus monodon*. Dev. Comp. Immunol., 2009. 33:247-256. DOI: 10.1016/j.dci.2008.09.003.
- Amparyup P., Jitvaropas R., Pulssook N. and Tassanakajon A., Molecular cloning, characterization and expression of a masquerade-like serine proteinase homologue from black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Fish Shellfish Immunol., 2007. 33:247-256. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.07.004.
- Chen J.C. and Lei S.C., Toxicities of ammonia and nitrite to *Penaeus monodon* juveniles. J. World Aquac. Soc., 1990. 21, 300-306. doi.org/10.1016/0044-8486(90)90305-7.
- Chen J.C. and Lin C.Y., Lethal effects of ammonia and nitrite on *Penaeus penicillatus* juveniles at two salinity levels. Comp. Biochem. Physiol., 1991. 100C: 466-482. https://doi.org/10.1016/0742-8413(91)90026-P.
- Chen J.C., Liu P.C. and Nan F.H., Lethal effect of nitrite to juvenile *Metapenaeus ensis*. J. Fish. Soc. Taiwan, 1990b. 17:109-115. doi.org/10.1111/j.1749-7345.1991.tb00716.x.
- Chen J.C., Ting Y.Y., Lin J.N. and Lin M.N., Lethal effects of ammonia and nitrite on *Penaeus chinensis* juveniles. Mar. Biol., 1990a. 107:427-431. https://link.springer.com/article/10.1007/BF01313424.
- Cheng C.H., Su Y.L., Ma H.L., Deng Y.Q., Feng J., Chen X.L. and Guo Z.X., Nitrite-induced oxidative stress, histopathology, and transcriptome changes in the mud crab(*Scylla paramamosain*). Isr. J. Aquac., 2019. 71:1626-1637. https://doi.org/10.46989/001c.20956.
- Cheng S.Y. and Chen J.C., Effects of nitrite exposure on the hemolymph electrolyte, respiratory protein and free amino acid levels and water content of *Penaeus japonicus*. Aquatic Toxicology. 1998. 44: 129-139. https://doi.org/10.1016/S0166-445X(98)00064-2.
- Day S.B., Salie K. and Stander H.B., A growth comparison among three commercial tilapia species in a biofloc system. Aquacult. Int., 2016. 24:1309-1322. https://doi.org/10.1007/s10499-016-9986-z.
- Francisco V.A. and Gloria Y.P., Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. Aquaculture, 2000. 191:13-21. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00416-6.
- Gutiérrez X.A., Kolarevic J., Takle H., Baeverfjord G., Ytteborg E. and Fyhn Terjesen B., Effects of chronic sub-lethal nitrite exposure at high water chloride concentration on Atlantic salmon(*Salmo salar*, Linnaeus 1758) parr. Aquac. Res., 2019. 50:2687-2697. https://doi.org/10.1111/are.14226.
- Han F. and Zhang X., Characterization of a ras-related nuclear protein(Ran protein) up-regulated in shrimp antiviral immunity. Fish Shellfish Immunol., 2007. 23:937-944. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.01.022.
- Han S.Y., Wang B.J., Liu M., Wang M.Q., Jiang K.Y., and Liu X.W., Adaptation of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* to gradual changes to a low-pH environment. Ecotoxicol. Environ. Saf., 2018a. 149: 203-210. https://doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.11.052
- Han S.Y., Wang M.Q., Liu M., Wang B.J., Jiang K.Y., and Wang L., Comparative sensitivity of the hepatopancreas and midgut in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* to oxidative stress under cyclic serious/medium hypoxia. Aquaculture 2018b. 490:44-52. doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.02.021.
- Jang I.K., Pang Z., Yu J., Kim S.K., Seo H.C. and Cho Y.R., Selectively enhanced expression of phenoloxidase activating enzyme 1(PPAE1) at a bacteria clearance site in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. BMC Immunol., 2011. 12:70. DOI: 10.1186/1471-2172-12-70.
- Jia R., Liu B.L., Han C., Huang B. and Lei J.L., The

- physiological performance and immune response of juvenile turbot(*Scophthalmus maximus*) to nitrite exposure. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, 2004, 138:3-10. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2016.01.002>.
- Kim S.K., Pang Z., Seo H.C., Cho Y.R., Samocha T. and Jang I.K., Effect of bioflocs on growth and immune activity of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* postlarvae. *Aquacul. Res.*, 2014, 45:362-371. <https://doi.org/10.1111/are.12319>.
- Korean Statistical Information Service, <http://www.kosis.kr>. 2022
- Kwon T.H., Kim M.S., Choi H.W., Joo C.H., Cho M.Y. and Lee B.L., A masquerade-like serine proteinase homologue is necessary for phenoloxidase activity in the coleopteran insect, *Holotrichia diomphaliolarvae*. *Eur. J. Biochem.*, 2000, 267:6188-6196. doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01695.x.
- Le Moullac G. and Haffner P., Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. *Aquaculture*, 2000, 191:121-131. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00422-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00422-1).
- Lee K.Y., Zhang R., Kim M.S., Park J.W., Park H.Y. and Kawabata S.I., A zymogen form of masquerade-like serine proteinase homologue is cleaved during pro-phenoloxidase activation by Ca^{2+} in coleopteran and *Tenebrio molitor* larvae. *Eur. J. Biochem.*, 2002, 269:4375-4383. doi: 10.1046/j.1432-1033.2002.03155.x.
- Li E., Chen L., Zeng C., Yu N., Xiong Z., and Chen X., Comparison of digestive and antioxidant enzymes activities, haemolymph oxyhemocyanin contents and hepatopancreas histology of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at various salinities. *Aquaculture*, 2008, 274:80-86. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.11.001.
- Li Z.S., Ma S., Shan H.W., Wang T. and Xiao W., Responses of hemocyanin and energy metabolism to acute nitrite stress in juveniles of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2019, 186: 109753. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109753>.
- Lin Y.C. and Chen J.C., Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei*(Boone) juveniles at different salinity levels. *Aquaculture*, 2003, 224:193-201. doi: 10.1016/S0044-8486(03)00220-5.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 2001, 25:402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Moon C.R., Rho T.K., Kang D.J., Kahng S.H., Cho S.R., Kim E.S., Lee J.M., Park E.J. and Shin J.S. 2010 Inter-laboratory comparison study on nutrient analysis in seawater. *J. Kor. Soci. Oceanogr.* 2015, 21(1): 63-70 <https://doi.org/10.7850/jkso.2015.20.1.63>.
- Sritunyalucksana K. and Soderhall K., The proPO and clotting system in crustaceans. *Aquaculture*, 2000, 191:53-69. DOI: 10.1016/S0044-8486(00)00411-7.
- Tseng I.T. and Chen J.C., The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under nitrite stress. *Fish Shellfish Immunol.*, 2004, 17:325-333. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.04.010>.
- Valencia-Castañeda G., Frías-Espéricueta M.G., Vane-gas-Pérez R.C., Chávez-Sánchez M.C. and Páez-Osuna F., Toxicity of ammonia, nitrite and nitrate to *Litopenaeus vannamei* juveniles in low-salinity water in single and ternary exposure experiments and their environmental implications. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 2019, 70:103193. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.05.002>.
- Wang J., Qu Y., Yan M., Li J., Jou J. and Fan L., Physiological responses of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* to temperature fluctuation in low-salinity water. *Front. Physiol.*, 2019, 13:01025. doi.org/10.3389/fphys.2019.01025.
- Wang R., Lee S.Y., Cerenius L. and Soderhall K., Properties of the prophenoloxidase activating enzyme of the freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. *Eur. J. Biochem.*, 2001, 268:895-902. DOI: 10.1046/j.1432-1327.2001.01945.x
- Yu Y.B., Choi J.H., Lee J.H., Jo A.H., Lee K.M. and Kim J.H., Biofloc technology in fish aquaculture: A Review. *Antioxidants*, 2023, 12:398. <https://doi.org/10.3390/antiox12020398>.
- Zhang H., Fang D., Mei J., Xie J. and Qiu W., A preliminary study on the effects of nitrite exposure on hematological parameters, oxidative stress, and immune-related responses in pearl gentian grouper. *Fishes*, 2022, 7(5):235. <https://doi.org/10.3390/fishes7050235>.
- Zhang Y., Liang X.F., He S. and Li L., Effects of long-term low-concentration nitrite exposure and detoxification on growth performance, antioxidant capacities, and immune responses in Chinese perch (*Siniperca chuatsi*). *Aquaculture*, 2021, 533:736123. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736123>.

Manuscript Received : Nov 20 2023

Revised : Nov 27 2023

Accepted : Dec 05 2023