Korean J. Malacol. 27(4): 317-322, 2011

저수온 스트레스에 의한 북방전복, *Haliotis discus hannai*의 생리학적 반응

박철지, 민병화[1], 김관석, 이장욱, 이정호, 노재구, 김현철, 박종원, 명정인

국립수산과학원 육종연구센터, [1]국립수산과학원 동해수산연구소

Physiological responses on Low Water-temperature Stress of Pacific abalone, *Haliotis discus hannai*

Choul-Ji Park, Byung Hwa Min[1], Kwan Sock Kim, Jang Wook Lee, Jeong-Ho Lee, Jae Koo Noh, Hyun Chul Kim, Jong Won Park and Jeong-In Myeong

Genetics and Breeding Research Center, NFRDI, Geoje, 656-842, Korea
[1]East Sea Fisheries Reasearch Institute, NFRDI, Gangneung, 210-861, Korea

ABSTRACT

This study was performed to obtain the basic data on physiological responses of low water temperature stress of the cultured Pacific abalone, *Haliotis discus hannai*. Abalones were exposed at low water temperatures of 7℃ and 4℃. We have investigated survival rate, superoxide dismutase (SOD) activity and total protein (TP) in the abalone by the exposure times (0, 3, 6, 12, 24, 72, 120, 168 and 216 hours). Survival rate of the abalone at 7℃ experiment was 90.8%, whereas at 4℃ experiment was 0% after exposure 10 days. SOD activity was significantly increased until 12 hours after exposure to 4℃, and then was recovered to starting level after 24 hours. However, there was no significant difference between control (12℃) and 7℃ experiments. TP was significantly increased until 216 hours after 24 hours at 4℃ experiment, but 7℃ experiment showed no significant differences compared to control (12℃) experiment. Therefore, *H. discus hannai* was acclimated in low water temperature stress at 7℃, but at 4℃, all abalone died possibly because they exceed the limits of defense ability to too low temperature.

Key words: *Haliotis discus hannai*, Superoxide dismutase (SOD), Total proteins (TP), Low water temperature stress

서 론

우리나라 연안에 서식하는 전복류는 한류계 전복인 북방전복 (*Haliotis discus hannai*), 난류계 대형종인 시볼트 전복 (*H. sieboldii*), 둥근전복 (*H. discus*), 말전복 (*H. gigantea*) 그리고 소형종인 오분자기 (*H. diversicolor aquatilis*) 가 서식하고 있다. 이들 중 북방전복은 우리나라의 전복 양식생산량의 대부분을 차지하고 있으며 2010년에는 양식산 전복 6,228톤을 생산하여 세계 2위의 전복 생산국으로 세계의 주목을 받고 있다 (KNSO, 2011).

Received: October 21, 2011 ; Accepted: December 23, 2011
Corresponding author: Choul Ji Park
Tel: +82 (55) 633-1272 e-mail: Choulji@nfrdi.go.kr
1225-3480/24408

최근 이러한 급격한 생산량의 향상은 해상가두리 양식방법 이용에 따른 생산비 절감 및 대량생산에 필요한 기계 등의 자동화에 의하여 대량생산체제가 구축되어 있기 때문이다. 그러나 해상가두리 양식방법은 최근 급변하는 해양 환경조건에 그대로 노출되어 있는 단점이 있다. 즉, 급변하는 해양 환경변화에 따른 수온 및 염분 등의 환경적 요인의 스트레스를 직접적으로 영향을 받을 수 있기 때문이다. 이러한 환경 스트레스로 인하여 성장, 번식, 대사, 삼투압 조절 등 양식생물의 생리적 변화가 일어날 수 있으며 이러한 스트레스로 인하여 질병 및 폐사 등의 문제점을 유발시킬 수도 있다 (Wedemyer and Mcleay, 1981). 특히, 여름철 고수온 및 겨울철 혹한기 저수온에 따른 환경변화로 인하여 집단폐사가 빈번히 발생하고 있으며 이에 대한 대책도 시급한 실정이다.

일반적으로 스트레스를 받게 되면 생체 내에 활성산소 (superoxide, hydrogen peroxide, peroxyl radical,

hydroxy radical 등) 가 발생하는 것으로 알려져 있다. 활성산소는 생체 내에서 다른 물질과 결합하려는 화학적 산화력이 강해서 세포나 기관의 막을 공격하여 세포의 기능을 손상 시킨다 (Ferraris *et al*., 2002). 이러한 활성산소에 대하여 체내에서는 항산화효소인 superoxide dismutase (SOD) 등을 생성하여 세포기능 손상을 막는 것으로 알려져 있으며 (Chance *et al*., 1979; Wendel and Feuerstein, 1981), 이러한 항산화효소는 온도 변화에 의해 효소활성이 증가하는 것으로 보고되고 있다 (Parihar *et al*., 1996, 1997). 또한 총 단백질 농도는 육상 및 수중생물의 건강도, 스트레스의 주요한 임상지표로 사용되고 있다 (Riche, 2007). 어류에서는 여러 스트레스 요인에 의한 일차반응으로 혈장 cortisol이 상승하게 되며, 이는 스트레스의 이차반응으로 단백질 대사에 있어 혈중 단백질 농도의 상승을 유발한다 (Davidson *et al*., 2000). 이처럼 항산화 효소의 활성 및 총 단백질 농도는 생체내의 스트레스 반응과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 대부분의 연구가 어류를 중심으로 연구되어 있으며 전복을 대상으로 스트레스를 조사한 연구는 미흡한 실정이다 (Cheng *et al*., 2002; Kim *et al*., 2005, 2006; Yang *et al*., 2008).

본 연구는 최근 고부가가치의 양식산업 종으로 부각되고 있는 북방전복 (*H. discus hannai*) 을 대상으로, 겨울철 저수온에 의하여 발생되는 폐사의 원인규명을 위한 생리학적인 반응을 조사하여 저수온 스트레스에 대한 생리학적 지표설정의 기초자료로 활용하기 위하여 수행하였다.

재료 및 방법

1. 실험전복

실험에 사용한 전복은 북방전복 (*H. discus hannai*) 으로 전라남도 완도의 A양식장에서 2008년 4월에 생산하여 해상가두리에서 사육한 2년산 치패로 평균 각장 62.2 ± 3.9 mm, 평균 각폭 42.0 ± 2.7 mm, 평균 중량 29.2 ± 6.6 g이다. 생존율 실험 및 시료분석용으로 사용한 개체는 각각 수온별 120마리로 총 720마리이며 실험에 사용하기 위하여 60일간 거제도에 위치한 국립수산과학원 육종연구센터의 자연해수 수온에 순치시킨 후 사용하였다.

2. 실험환경 및 방법

저수온 스트레스 수온구간은 거제도 육종연구센터의 2월 자연해수 수온 12℃ (대조구) 를 기준으로 7℃ 및 4℃로 하였으며, 염분농도는 33.2 ± 0.5‰, 용존산소량 (DO) 은 10 ± 0.5 ppm을 유지하였다. 실험기간은 10일 동안 실시하였으며, 7℃ 및 4℃ 실험구는 수온조절장치를 이용하여 수온을 일정하게 유지하여 1일 15회전의 유수식으로 실험하였다. 실험기간 동안에는 절식을 하였으며 수온별 각 수조는 사각수조 (1.2 m x 3 m x 0.8 m) 로 수조안에 그물망 가두리를 설치한 후 가두리 안에 전복집 (shelter) 을 넣어서 실험을 실행하였다.

실험방법은 생존율 실험 1set와 시료분석용 1set를 각각 준비하였다. 스트레스 실험방법은 급격한 수온 스트레스를 주기 위하여 수온 12℃에 적응한 전복을 7℃ 및 4℃ 수조에 바로 수용하였으며 이 시점을 기준으로 3, 6, 12, 24, 72, 120, 168 및 216 h째에 각 수온별 실험구 수조에서 살아있는 5개체의 족부부분에 주사기를 이용하여 약 1 ml 의 림프액을 채혈하여 SOD 및 혈액성상 분석에 이용하였다.

3. 생존율

각 수온별 수조에 수용한 전복을 1일 단위로 10일간에 이르기까지 폐사한 개체를 조사하였다. 폐사 개체는 입 부분 및 촉수를 자극하여 반응이 없거나 족부 부분이 평평하게 되어 있는 개체를 선택하여 조사하였다.

4. Superoxide dismutase (SOD) 활성 및 혈액 성상 분석

4℃, 7℃ 및 12℃ 실험구에서 0, 3, 6, 12, 24, 72, 120, 168 및 216 h째에 각 수온별 수조로 부터 살아있는 5개체에서 채혈한 림프액 샘플을 4℃, 600 × g, 10분간 원심 분리하여 림프여액을 준비하였다. 분석은 SOD Assay Kit-WST (Dojindo, Japan) 을 사용하여 SOD activity를 측정하였다. 실험 순서는 림프여액을 96-well plate에 2, 5 및 10배로 희석한 20 μl의 림프여액을 넣고 WST working solution 200 μl와 enzyme working solution 20 μl를 중첩한 후 26℃에서 20분간 교반하여 흡광도 440 nm에서 측정하였다. 대조구인 멸균 증류수의 water-soluble tetrazolium salt가 감소한 값에 각 sample의 water-soluble tetrazolium salt가 감소한 값을 뺀 후 대조구가 감소한 값을 나누어 백분율로 나타낸 SOD activity (inhibition rate %) 가 50이 되는 값을 1 U/ml로 정의하였고, 이때의 희석농도를 대입하여 SOD의 양을 U/ml로 계산하였다. 그런 다음 림프여액의 단백질 농도를 Bradford법 (Bradford, 1976) 으로 측정하여 U/mg로 보정하였다. 그리고 혈장으로부터 글루코스, 삼투질농도, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) 및 총 단백질을 조사하였다. 분석은 분석항목에 따라 분석용 Kit 슬라이드를 이용하여 자동생화학 분석기 (Fuji dry-chem 3500, Fujifilm Co., Japan) 로 측정하였다.

5. 통계처리

각 실험에서 얻어진 자료에 대한 값의 유의차 유무는 SPSS 통계 패키지에 의한 ANOVA로 분석하여 Duncan's multiple range test로 검증하였다.

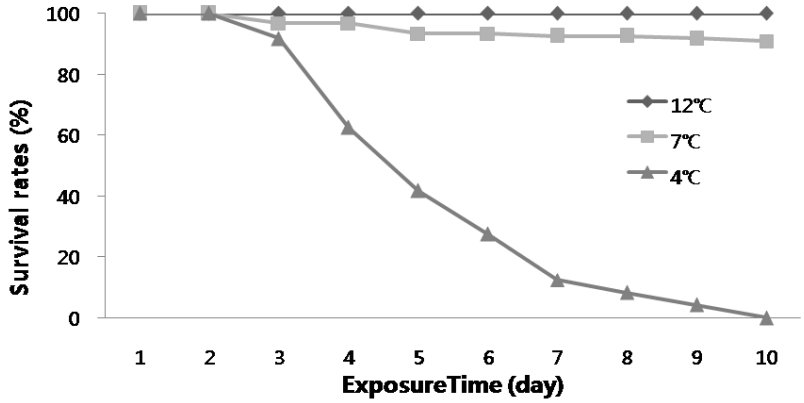

Fig. 1. Survival rates of the abalone, *Haliotis discus hannai*, exposed to low water temperature stress.

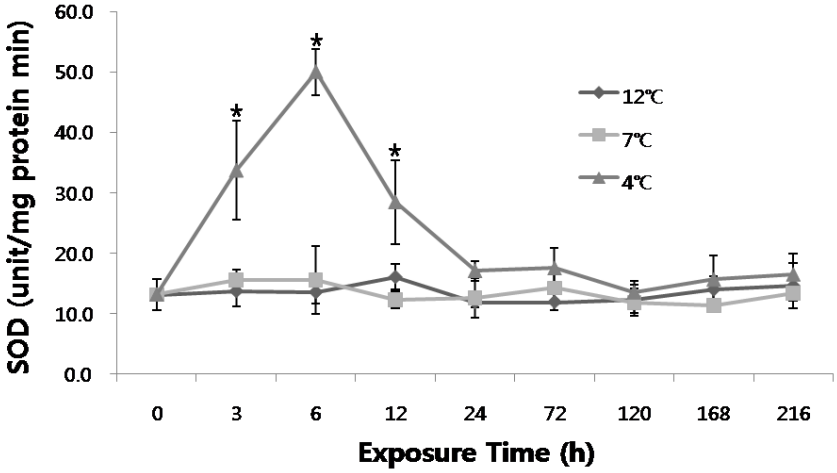

Fig. 2. Changes of superoxide dismutase (SOD) activity in *Haliotis discus hannai* exposed to low water temperature stress. Values represent mean ± SD (n = 5). * P < 0.05 as compared to control (12℃).

결 과

1. 생존율의 변화

저수온에 대한 전복의 스트레스 내성을 조사하기 위하여 실험개시 시점의 자연해수 수온 12℃를 대조구로 하여 7℃ 및 4℃의 저수온에 10일동안 노출시켜 생존율을 조사하였다. 각 수온별 생존율을 보면 대조구 12℃에서는 실험종료 시까지 100%의 생존율을 나타내었으며, 7℃의 실험구는 3일째와 5일째 각각 4마리의 폐사체가 확인 되었으며 10일재까지 90.8%의 생존율을 나타내었다. 반면 4℃의 실험구는 3일째 91.7%를 시작으로 5일재 41.7%를 나타내었으며 10일째 전 개체가 폐사하였다 (Fig. 1).

2. SOD (superoxide dismutase) 의 활성

저수온에 대한 스트레스의 정도를 확인하기 위하여 항산화 효소인 SOD (superoxide dismutase) 의 활성을 조사한 결과 12℃ 대조구는 최저 11.8 ± 0.8 unit/mg에서 최고 14.6 ± 3.8 unit/mg의 범위를 나타내어 시간에 따른 큰 차이는 나타나지 않았다. 또한 7℃ 실험구의 경우에 있어서도 최저 11.8 ± 2.2 unit/mg (120 h) 에서 최고 15.6 ± 5.6 unit/mg (6 h)의 범위를 나타내어 대조구와 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 반면 4℃ 실험구의 경우는 저수온에 노출된 직후부터 급격히 상승하여 3시간째 33.7 ± 8.2 unit/mg, 6시간째 가장 높은 50.0 ± 3.8 unit/mg을 나타내었으며 12시간째까지 대조구와 비교하여 유의적으로 높은 값을 나타내었다. 12시간째

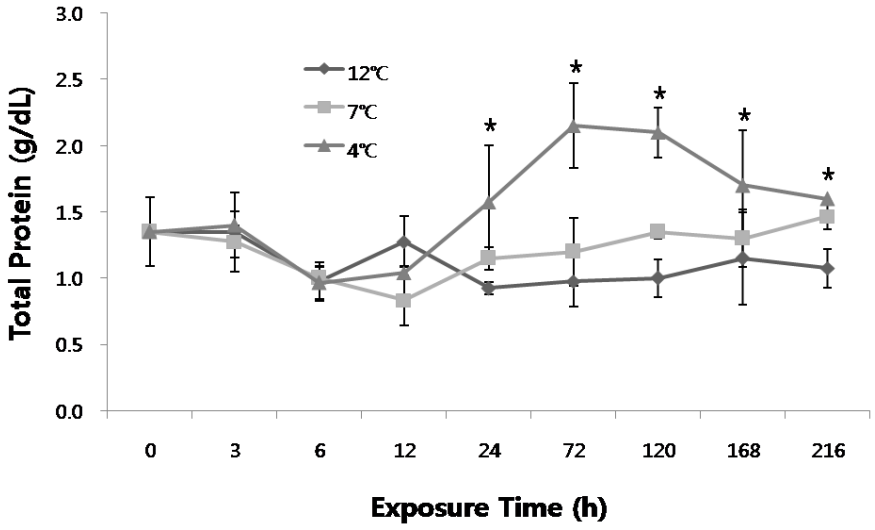

Fig. 3. Total protein (TP) in *Haliotis discus hannai* exposed to low water temperature stress. Values represent mean ± SD (n = 5). * P < 0.05 as compared to control (12℃).

이후부터는 활성이 감소하기 시작하여 실험종료 시까지 대조구와 유의한 차이는 나타나지 않았다 (Fig. 2, P < 0.05).

3. 혈액성상 변화

저수온에 대한 스트레스에 의한 혈액성상 변화를 분석한 결과 글루코스, 삼투질 농도, AST 및 ALT는 12℃ 대조구와 비교하여 7℃ 및 4℃의 실험구의 값은 약간의 변화는 나타났으나 모든 항목에 있어 유의적인 차이는 나타나지 않았다 (data not show). 반면에 총 단백질의 경우 모든 실험구에 있어 저수온에 노출된 후 6시간째까지는 조금 감소하는 경향이 나타났으며 7℃ 실험구는 실험종료 시까지 12℃ 대조구와 유의적 차이는 나타나지 않았다. 반면 4℃ 실험구의 경우는 12시간째부터 상승하기 시작하여 24시간째에 1.6 ± 0.4 g/dL, 72시간째 2.2 ± 0.3 g/dL으로 상승하여 120시간째까지 높은 값을 나타내었으며 이후에 감소하는 경향이 나타났으나 24시간째부터 실험종료인 216시간째까지 대조구와 비교하여 유의적으로 높은 값을 나타내었다 (Fig. 3, P < 0.05).

고 찰

양식생물은 외부환경의 변화에 따라 어느 정도는 스트레스를 극복할 능력을 가지고 있으나, 임계수준을 넘어선 스트레스는 생물의 생리활성을 떨어뜨림으로써 건강도를 약화시킬 수 있다 (Barton and Iwama, 1991). 최근 연안해역의 겨울철 평균 수온이 적정 수온에 비해 매우 낮은 까닭에 온도장해를 입는 경우가 빈번히 발생하고 있으며 이러한 저수온 스트레스는 면역력 약화, 섭이율 저하, 성장지연, 영양상태 악화가 일어나기도 하며, 심한 경우에는 폐사에 이르기도 한다. 특히 연안에서 가두리 양식을 하고 있는 전복의 경우 급변하는 해양환경으로 인하여 집단폐사 등의 문제점을 안고 있다. 때문에 전복이 양식환경에서 겪게 되는 환경스트레스로 발생되는 생리적 변화 등에 관한 연구가 절실하게 요구되어진다.

본 연구에서는 최근 고부가가치의 양식생물로 주목받고 있는 북방전복 (*H. discus hannai*) 을 대상으로 저수온 스트레스로 인한 생리적 반응을 조사하였다. 저수온별 스트레스실험에 의한 생존율을 보면 7℃ 저수온 실험구의 경우 3일째와 5일째 4마리의 폐사를 시작으로 실험종료 시까지 총 11마리의 폐사로 90.8%의 높은 생존율을 나타낸 반면, 4℃의 실험구에서는 3일째 10마리의 폐사를 시작으로 5일재 생존율 41.7%를 나타내었으며 10일째 전 개체가 폐사하였다. 이는 저수온 스트레스로 인하여 3일째 생리적인 한계점에 도달하였다고 추정되어지며 7℃실험구의 경우 높은 생존율을 나타내어 저수온에 대한 생리적 순응능력이 높다고 추정된다. 그러나 4℃실험구의 경우 10일째 120마리 전량폐사로 저수온에 대한 순응능력의 한계를 벗어난 것으로 추정된다.

일반적으로 스트레스를 받게 되면 생체 내에 활성산소가 생성되며 이것은 체내에서 다른 물질과 결합하려는 화학적 산화력이 강해서 세포나 기관의 막을 공격하여 세포의 기능을 손상시킨다 (Simon *et al*., 1981; Moody and Hassan, 1982; Ferraris *et al*., 2002). 그러나 이러한 과잉 생성된 활성산소를 제거하기 위하여 체내에서 만들어지는 것이 항산화물질이며 이를 항산화효소라고 한다. 체내에서 합성되는 항산화효소에는 SOD (Superoxide Dismutase), 카탈라제 (Catalase),

글루타치온 퍼옥시다제 (Glutathione Peroxide), 글루타치온 리덕타제 (Glutathione Reductase), 글루타치온 트랜스퍼라제 (Glutathione Transferase) 가 있다. 이중에서도 SOD는 과잉 생성된 활성산소의 해독을 방지하는데 가장 중요한 역할을 하기 때문에 항산화물질 중 가장 보편적이며 우수한 것으로 알려져 있다. 따라서 저수온 스트레스로 인한 전복의 생리학적 반응을 조사하기 위하여 SOD 활성을 조사하였다. 그 결과 7℃ 실험구의 경우 실험종료 시까지 12℃대조구와 유의한 차이는 나타나지 않았다. 이러한 결과는 90%이상의 생존율을 나타낸 7℃ 저수온 스트레스는 전복에 있어 생리학적 반응에 큰 영향을 미치지 않는다고 생각되어진다. 반면에 4℃ 실험구의 경우는 저수온에 노출된 직후부터 급격히 상승하여 6시간째 가장 높은 값을 나타내었으며 12시간째까지 대조구와 비교하여 유의적으로 높게 나타났다. 이러한 결과는 4℃ 저수온 스트레스는 노출 직후 급격한 생리적 순응반응이 나타났다고 추정된다. 그러나 이러한 급격한 생리적 순응반응에도 불구하고 방어기작의 한계를 벗어나 전량 폐사하게 된 것이라 추정된다. 또한, 건강도 및 스트레스의 주요한 임상지표로 사용되고 있는 총 단백질을 조사한 결과에 있어서도 7℃ 실험구의 경우, 12℃ 대조구와 유의한 차이는 나타나지 않았다. 그러나 4℃ 실험구의 경우는 저수온에 노출된 직후 감소하는 경향을 보이다가 24시간째부터는 급격히 상승하여 72시간째까지 상승한 후 천천히 감소하는 경향을 나타내었으며 실험종료 시까지 대조구와 비교하여 유의적으로 높은 값을 나타내었다. 이러한 결과는 저수온 스트레스로 체내의 단백질 대사에 있어 혈중 단백질 농도가 상승한 것으로 추정된다.

국내에서 전복류를 이용하여 환경스트레스로 발생되는 생리적 변화 등에 관한 연구를 살펴보면, 북방전복 (Kim *et al*., 2005) 및 시볼트전복 (Kim *et al*., 2006) 이 있다. 북방전복의 경우, 48시간동안의 수온 스트레스에 의한 생리적 변화를 HSP70 mRNA의 발현과 항산화효소인 SOD 및 CAT를 조사한 결과, 30℃의 고수온에 노출되었을 경우 생체 내 과도한 생리학적 방어기작이 작용하여 항산화효소 및 HSP 발현이 증가하는 것으로 나타났고 저수온에 노출되었을 경우 SOD는 노출 직후 증가한 후 감소하는 경향을 나타냈으며 HSP 발현은 차이를 나타내지 않았다고 보고하고 있다 (Kim *et al*., 2005). 이러한 결과는 본 연구의 4℃ 실험구의 SOD 활성과 유사한 경향을 나타내고 있으나 노출시간대 별 증감의 차이가 있었다. 이는 Kim *et al*. (2005) 의 실험 온도의 최저수온은 10℃이며 생존율도 100%를 나타내고 있어 저수온 스트레스에 대한 생리적 변화의 정도의 차이가 있다고 생각된다.

이상의 결과로 북방전복 (*H. discus hannai*) 은 7℃의 저수온 스트레스에서는 SOD 활성 및 총 단백질 농도가 대조구와 차이를 나타내지 않는 것으로 보아 다양한 생리적 기작을 이용하여 생존이 가능하다고 생각된다. 반면에 4℃의 저수온 스트레스에서는 SOD 활성이 노출직후에 급격히 상승하여 생리적 순응반응을 나타내고 있으나 방어기작의 한계를 벗어나 생존이 불가능하다고 추정된다. 이러한 전복류의 환경변화에 따른 스트레스의 생리학적 연구의 종합적인 검토를 위해서는 분자레벨에서 파악할 수 있는 세부적인 연구가 추가적으로 필요하다고 생각된다.

요 약

본 연구는 북방전복 (*H. discus hannai*) 의 겨울철 저수온으로 발생하는 폐사원인 규명을 위한 생리학적인 반응을 조사하기 위하여 수온 12℃를 대조구로 7℃ 및 4℃의 실험구를 설정하고 10일간에 걸쳐 생존율, 항산화효소의 활성 및 총 단백질 농도를 측정하였다. 그 결과 7℃ 저수온 실험구에서는 SOD 활성 및 총 단백질 농도가 대조구와 차이를 나타내지 않았으며 생존율은 90.8%를 나타내었다. 반면에 4℃ 저수온 실험구에서는 SOD 활성은 노출직후에 급격히 상승하여 12시간째까지 대조구보다 유의적으로 높게 나타났다. 또한 총 단백질 농도에 있어서는 24시간째부터 실험종료 시까지 대조구보다 유의적으로 높게 나타났으며, 생존율은 3일째 10마리의 폐사를 시작으로 10일째 전 개체가 폐사하였다. 이상의 결과로 북방전복 (*H. discus hannai*) 은 7℃의 저수온 실험구에서는 다양한 생리적 기작을 이용하여 생존이 가능한 반면에 4℃의 저수온 실험구에서는 생리적 순응반응을 나타내고 있으나 방어기작의 한계를 벗어나 생존이 불가능하다고 추정된다.

사 사

본 연구는 국립수산과학원 (육종기술개발, RP-2011-AQ-116) 의 지원에 의해 연구 되었습니다.

참고문헌

Barton, B.A. and Iwama, G.K. (1991) Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis in the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Disease*, **1**: 3-26.

Chance, B., Sice, H. and Boveris, A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiologicla Reviews*, **59**: 527-605.

Cheng, W., Yeh, S.P., Wang C.S. and Chen J.C. (2002) Osmotic and ionic changes in Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertext*a at different salinity leverls. *Aquaculture*, **203**: 349-357.

Davidson, G.W., Davie, P.S., Young, G. and Fowler, R.T. (2000) Physiological responses of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* to crowding and anesthesia with AQUI-STM. *Jounal of World Aquaculture*

Society, **31**: 105-114.

Ferraris, M., Radice, S., Catalani, P., Francolini, M., Marabini, L. and Chiesara, E. (2002) Early oxidative damage in primary cultured trout hepatocytes: a time course study. *Aquatic Toxicology*, **59**: 283-296.

Kim, T.H., Yang, M.H., Choe, M.K., Han, S.J. and Yeu, I.K. (2005) Physiological studies on acute water-temperature stress of juvenile abalone, *Haliotis discus hannai*. *The Korean Journal of Aquaculture*, **18**(1): 7-12.

Kim, T.H., Kim, K.J., Choe, M.K. and Yeu, I.K. (2006) Physiological changes of juvnvile abalone, *Haliotis sieboldii* exposed to acute water-temperature stress. *The Korean Journal of Aquaculture*, **19**(2): 77-83.

KNSO (2011) Korea National Statistical Office. Fishery Production Survey DB, Daejeon, Korea.

Moody, C.S. and Hassan, H.M. (1982) Mutagenicity of oxygen free radicals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **79**: 2855-2859.

Parihar, M.S., Dubey, A.K., Javeri, T. and Prakash, P. (1996) Changes in lipid peroxidation, superoxide dismutase activity, ascorbic acid and phospholipid content in liver of freshwater catfish *heteropneustes fossilis* exposed to elevated temperature. *Jounal of Thermal Biology*, **21**: 323-330.

Parihar, M.S., Javeri, T., Hemnani, T., Dubey, A.K. and Prekash, P. (1997) Respinses of superoxide dis mutate, glutathione peroxidase and reduced glutathione antioxidant defenses in gills of the freshwater catfish (*heteropneustes fossilis*) to short-term elevated temperature. *Journal of Thermal Biology*, **22**: 151-156.

Riche, M. (2007) Analysis of refractometry for determining total plasma protein in hybrid striped bass (*Morone chrysops*×*M. saxatilis*) at various salinities. *Aquaculture*, **264**: 279-284.

Simon, R.H., Scoggin, C.H. and Patterson, D. (1981) Hydrogen peroxide causes the fatal injury to human fibroblast exposed to oxygen radicals. *Journal of Biologicla Chemistry*, **256**: 7181-7186.

Wedemeyer, G.A. and McLeay, D.J. (1981) Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressors. In Stress and Fish A.D. Pickering, ed. Academic Press, London, pp. 247-275.

Wendel, A. and Feuerstein, S. (1981) Drug-induced lipid peroxidation in mice-1. Modulation by monoxygenase activity, glutathione and selenium status. *Biochemical Pharmacology*, **30**: 2513-2550.

Yang, H.S., Park, K.I., Hong, C.H. and Choi, K.S. (2008) Effects of salinity stress on the composition of the free amino acids of the Pacific abalone *Haliotis discus discus*. *The Korean Journal of Aquaculture*, **2**(4): 218-225.