

급격한 수온 스트레스에 따른 전복, *Haliotis discus hannai* 치패의 생리학적 연구

김태형, 양문휴, 최미경¹, 한석중¹, 여인규*

제주대학교 해양과학대학 해양과학부

¹국립수산과학원 패류육종연구센터

Physiological Studies on Acute Water-temperature Stress of Juvenile Abalone, *Haliotis discus hannai*

Tae-Hyung Kim, Moon-Hyu Yang, Mi-Kyung Choe¹, Seok-Jung Han¹ and In-Kyu Yeo*

Faculty of Applied Marine Science, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea

¹Shellfish Genetic & Breeding Research Center, Jeju 695-835, Korea

This study was conducted to investigate antioxidant enzyme activity (catalase and superoxide dismutase) and Heat Shock Protein 70 (HSP70) mRNA variation in hepatopancreas of abalone (*Haliotis discus hannai*) cultured under several acute water temperatures. Abalones were cultured at 10, 15, 20, 25 and 30°C, for 0, 6, 12, 24 and 48 hours, respectively. The HSP70 mRNA expression in hepatopancreas was more increased at 30°C compared to those at 10, 15, 20 (control) and 25°C. The superoxide dismutase (SOD) activity was increased in hepatopancreas at all water temperature conditions compared to the control (20°C). The SOD activity at high water temperature (25 and 30°C) tended to be increased after 12 hours, and was increased immediately after exposure to low water temperature (10 and 15°C), and then was recovered to starting level after the increase. Also, catalase (CAT) activity in hepatopancreas was increased in all the groups except for at 10°C than the control (20°C). Survival rate of abalone was 100% at 10, 15, 20 and 25°C, but 92% at 30°C. Thus, according to our study, when abalone is appeared at 20°C, defense mechanism against stress at low water temperature can be accelerated to be stabilized at about 5°C. In the case of exposure of abalone to high water temperature, antioxidant enzyme and HSP70 expression were increased due to elevated physiological stimulation factor, such as temperature.

Keywords: Abalone, *Haliotis discus hannai*, Temperature, HSP70, Superoxid dismutase (SOD), Catalase (CAT)

서 론

최근 급속한 공업화에 따른 수온 상승은 연안해역의 발전소, 제철공장, LNG 저장기로부터 냉·온배수의 연안해역 방류 및 다양한 화학물질이 수계로 유입됨에 따라 이루어지고 이로 인해 연안환경의 오염이 심화되고 있으며, 수온 상승이 유발되어 연안 자원량이 급속도로 감소되고 있다(Kim and Kim, 2001). 또한 이러한 환경의 변화는 적조의 발생 및 연안 서식종의 변화 등 다양한 생태계의 변화를 유발시킬 뿐만 아니라 양식 산업에 큰 피해를 입히고 있다.

산업발달에 따른 환경적 변화는 해양 생물들에게는 많은 물리·화학적 스트레스 요인으로 작용을 한다. 특히, 복족류인 전복과 같이 이동성이 매우 제한적인 패류에 있어서는 어류와 달

리 급격한 환경 변화에 대처하는 능력이 매우 부족하다고 여겨진다.

현재까지 패류에 있어서의 스트레스에 관한 연구는 온도, 염분, 용존산소, 수용밀도 등 물리적 스트레스와 일부 화학적 스트레스에 관한 연구가 이루어져 있으며, 이러한 스트레스는 질병에 대한 내성을 감소시키고, 성장률의 감소, 먹이 섭취율의 감소 및 호흡 대사율의 변화를 유발한다고 알려져 있다(Agnar and Albert, 2003; Brown et al., 1995; Harris et al., 1998, 1999; Chen and Chen, 2000; Laughlin and Linden, 1983; Laughlin and Neff, 1980, 1981; Maule et al., 1989; Pedro et al., 2004; Tsuchiya, 1983; Cheng et al., 2004). 하지만 이러한 연구는 양식산업을 위한 기초 연구에 그치고 있어 패류에 있어서의 스트레스에 대한 생리학적 반응 및 적응 메커니즘을 이해하기에는 부족한 점이 많다. 따라서 이러한 패류가 생태계에서 겪게 되는 환경 스트레스 등과 같은 변화에 의해 야기되는 생리적 변화 등에 관한 연구가 실질하게 요구되어진다.

*Corresponding author: ikye99@cheju.ac.kr

일반적으로 스트레스를 받게 되면 생체내에 활성산소(superoxide, hydrogen peroxide, peroxy radical, hydroxy radical 등)가 발생하는 것으로 알려져 있다. 활성산소는 생체 내에서 다른 물질과 결합하려는 화학적 산화력이 강해서 세포나 기관의 막을 공격하여 세포의 기능을 손상시킨다(Ferraris et al., 2002). 이러한 활성산소에 대하여 체내에서는 항산화효소인 superoxide dismutase (SOD) 및 catalase (CAT) 등을 생성하여 세포기능 손상을 막는 것으로 알려져 있고(Chance et al., 1979; Wendel and Feuerstein, 1981), 이러한 항산화효소는 온도 변화에 의해 효소 활성이 증가 하는 것으로 보고되고 있다(Parihar et al., 1996; Parihar et al., 1997). 또한, 이와 유사한 결과로 해산어류인 넙치(*Paralichthys olivaceus*)에서도 온도 변화에 따라 2 h에서 4 h까지 SOD 및 CAT가 증가하였다는 연구결과가 있다(Yang and Yeo, 2004). 이처럼 항산화 효소의 활성은 생체내의 스트레스 반응과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다.

한편, 최근 환경변화로 인한 스트레스 반응은 세포레벨의 분자생물학적인 방법에 의해 연구되어지고 있다(Snyder et al., 2001). 수온 변화와 같은 외부의 열 충격은 생체 내 중요한 방어 기작으로서 열충격단백질(Heat Shock Protein, HSP)을 생성 시키게 되고, 생성된 HSP는 세포내에서 합성된 단백질의 정확한 3차 구조를 유지시켜 주는 것으로 알려져 있다(Welch, 1991; Young et al., 1993). 이러한 HSP는 분자 구조의 크기에 따라 여러 종류가 있으며, 이 중에서 가장 활발히 연구되어지고 있는 것이 분자량 70 kDa의 HSP70 이다.

따라서 본 연구에서는 패류 중에서도 전 세계적으로 고부가 가치를 창출하는 중요한 수산자원인 전복을 이용하여 급격한 수온변화에 따른 생리학적 반응을 간부위의 조직을 이용하여 HSP70 mRNA의 발현과 항산화효소인 SOD 및 CAT 등을 측정하여 스트레스에 대한 생리학적 지표를 설정하고자 본 연구를 실시하였다.

재료 및 방법

실험전복

실험에 사용된 전복, *Haliotis discus hannai*는 제주수산연구소 패류육종연구센터에서 분양받은 평균 각장 3.95±0.03 cm, 각고 0.88±0.01 cm, 각폭 2.58±0.02 cm, 전중량 8.88±0.25 g인 개체를 사용하였다. 실험 전복은 미리 20°C에서 2개월 동안 사육하며 순치시킨 후 순환여과가 가능한 30 L 규모의 수조로 옮겨 10, 15, 20(대조구), 25 및 30°C의 수온 스트레스를 각각 주었으며, 이 때 염분농도는 30.0±0.5‰을 유지시켰고 PVC파이프(Ø 20 cm, L 20 cm)를 세로로 절단한 은신처(shelter)를 넣어서 공기를 공급하였다. 예비 사육기간에 먹이는 다시마를 충분히 공급하였으며, 실험구당 30마리의 전복을 실험에 사용하였고, 실험개시 후 각 수조에 넣어진 사육수의 수온이 목표치에 도달한 순간을 0 h로 정하여 0, 6, 12, 24 및 48 h째에 각각

5마리의 전복으로부터 간부위의 조직 샘플을 채취하여 -70°C로 보관하여 분석에 이용하였다.

항산화효소 측정

항산화효소는 간부위를 적출하여 SOD 및 CAT를 각각 분석하였다. 간부위를 적출 후 약 0.1 g을 0.9% NaCl에 3회 세척한 다음 KCl (1.17%)을 함유한 100 mM phosphate buffer (pH 7.4)를 첨가하여 균질화하였다. 균질화된 시료는 원심분리(1,000 rpm, 15 min, 4°C)에 의해 지방 및 침전물을 제거하였다. 균질액은 다시 원심분리(13,000 rpm, 20 min, 4°C)한 후 상등액을 항산화 효소 측정용 시료로 사용하였다.

SOD는 pyrogallol의 자동 산화율이 억제되는 양을 측정하는 Marklund and Marklund (1974)의 방법으로 측정하였으며, 50 mM phosphate buffer (pH 8.24) 1.3 ml에 간장 균질액 25 µl을 넣은 후 45 µl의 3 mM pyrogallol 용액을 첨가하여 spectrophotometer를 이용하여 325 nm의 파장에서 측정하였고, 효소활성의 1단위는 반응액 중의 pyrogallol의 산화를 50% 억제하는 효소의 양으로 정하였다. CAT활성도 측정은 H₂O₂를 기질로 사용하여 spectrophotometer에 의해 240 nm 파장에서 H₂O₂가 환원되어 감소하는 흡광도로써 효소 활성도를 측정하는 Nelson and Kiesow (1972)의 방법에 의하여 측정하였으며, 효소 활성도의 단위는 1 분간에 1 mg의 단백질이 반응하여 환원시킨 H₂O₂를 nmol로 나타내었다. 단백질 함량은 Lowry et al. (1951)의 방법에 따라 표준 단백질로서 BSA (bovine serum albumin)를 사용하여 spectrophotometer를 이용 540 nm에서 측정하였다.

RT-PCR 분석

동결된 간부위 조직에서 total RNA를 (주)Bioneer tissue RNA prep mate kit를 사용하여 추출하였다. 추출된 total RNA는 -70°C에서 보관하여 실험에 사용하였으며, PROMEGA사의 cDNA합성 kit인 ImProm-II™ reverse transcriptase kit A3800을 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 PROMEGA사의 Taq DNA polymerase in storage buffer B kit을 사용하여 증폭하였다. cDNA를 증폭시키기 위하여 cDNA 2 µl, 10×PCR buffer 5 µl, MgCl₂ (25 mM) 3 µl, dNTP (10 mM) 1 µl, primer (sense) 1 µl (50 pmol), antisense 1 µl (50 pmol), Taq DNA polymerase 0.5 µl 및 Nuclease-Free water 36.5 µl를 혼합하여 94°C에서 5분간 pre-denaturation 시켜준 후 94°C에서 1분간 denaturation, 50°C에서 45초간 annealing, 72°C에서 1분간 extension 조건으로 30회 증폭하고, 이 후 72°C에서 5분간 더 반응시켰다. HSP70 mRNA에 대한 oligonucleotide primer를 제작하여 (주)Bioneer에서 합성주문하였고, 양성대조로 사용하기 위해 β-actin mRNA를 제작하였다(Table 1). PCR로 증폭된 산물은 1% agarose gel에서 100V로 전기영동하여 분리하였으며, 100bp DNA ladder를 size marker로 사용하여 UV transilluminator하에서 사진을 촬영하여 이미지 분석 프로그램(Labworks 4.5)을

Table 1. Oligonucleotide of primers for heat shock protein70 and β -actin

RNA species	Expected size	Primer sequence
β -actin mRNA	520 bp	5'-GACHCAGATCATGTTTGARACC-3' 5'-CCTTCTGCATRCGGTCAGC-3'
HSP70 mRNA	400 bp	5'-CAGGACTTCTTCAACGGCAAG-3' 5'-GTGCTCTTGTCACAGCTGA-3'

bp: base pairs

이용하여 mRNA의 발현량을 정량하였다.

생존율 측정

실험개시 후, 0, 6, 12, 24 및 48 h째에 폐사한 개체를 각각 조사하였다. 폐사 개체의 계수는 은신처(shelter)와 수조 벽면에 부착능력이 없고, 유리봉으로 발과 촉수를 자극하여도 반응이 없는 개체를 선택하여 조사하였다.

통계처리

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

결 과

수온자극에 의한 생존율의 변화

급격한 수온 스트레스에 따른 생존율에서는 대조구(20°C)를 비롯한 다른 실험구(10, 15 및 25°C)에서는 실험종료시 까지 폐사된 개체가 발견되지 않아 100%의 생존율을 나타내었으나, 30°C 실험구에서만 12 h 이후 폐사된 개체가 발견되었고, 최종적으로 2마리가 폐사하여 92%의 생존율을 나타내었다(Fig. 1).

항산화효소 변화

급격한 수온 스트레스에 따른 SOD 활성은 시간이 경과함에 따라 모든 실험구(10, 15, 25 및 30°C)에서 대조구(20°C)보다 높게 나타났으며, 특히, 10 및 15°C 실험구에서는 12 h째까지

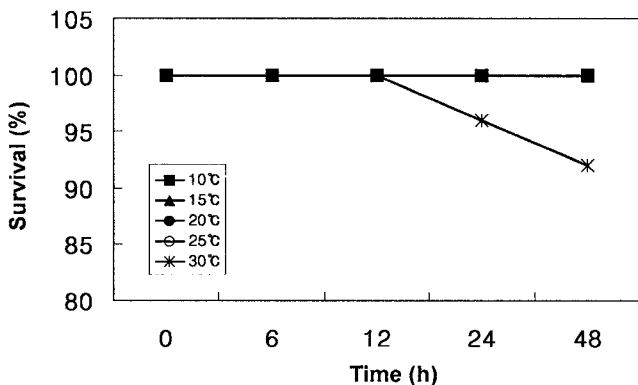


Fig. 1. Survival rates of the juvenile abalone, *Haliotis discus hannai* exposed to acute Water-temperature stress.

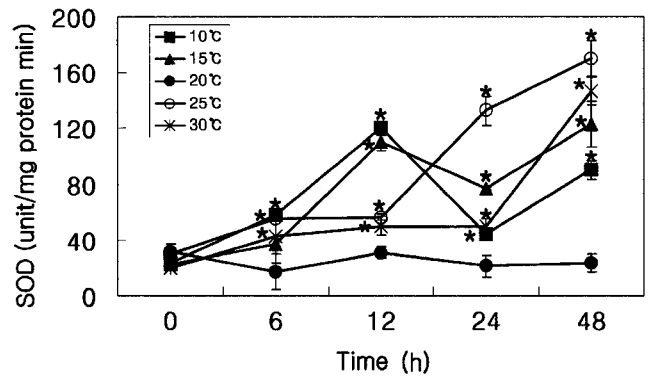


Fig. 2. Changes of superoxide dismutase (SOD) activity in juvenile abalone, *Haliotis discus hannai* exposed to acute Water-temperature stress. * $P < 0.05$ as compared to control (20°C).

급격한 활성 증가를 보이다가 24 h째에 감소하였고 48 h째에는 다시 증가하는 경향을 보였다. 25°C 실험구에서는 12 h째까지는 큰 활성의 증가를 보이지 않았으나 12 h 이후 급격히 증가하여 48 h째에 모든 실험구와 비교하여 가장 높은 수치를 나타내었고, 30°C 실험구에서는 24 h째까지는 뚜렷한 활성의 변화를 보이지 않다가 24 h 이후 급격한 활성의 증가를 나타내었다(Fig. 2, $P < 0.05$). CAT효소 활성의 경우는 0 h째에서는 모든 실험구가(10, 15, 25 및 30°C)가 대조구보다 낮은 활성을 나타내었으나, 시간이 경과함에 따라 10°C 실험구를 제외한 모든 실험구(15, 25 및 30°C)에서 대조구와 비교했을 때 높은 활성을 나타내었다. 15°C의 경우 6 h째까지 급격한 활성의 증가를 보였으며 6 h째 이후에는 큰 폭의 변동을 나타내지는 않았고, 25와 30°C의 경우에는 시간이 경과함에 따라서 활성이 꾸준히 증가하는 경향을 나타내었고, 특히 30°C의 경우에는 24 h째 이후로 급격한 활성의 증가를 나타내었다(Fig. 3, $P < 0.05$).

수온변화 시간에 따른 HSP70 mRNA의 양적 변화

급격한 수온 스트레스에 따른 HSP70의 변화를 관찰하기 위하여 수온과 시간대 별로 간부위의 조직에서 샘플을 적출하여 RT-PCR을 실시하였다. 그 결과 RT-PCR를 통한 HSP70 mRNA의 발현은 30°C에서는 대조구에 비하여 모든 실험기간동안 HSP70 mRNA가 강하게 발현되는 것이 확인되었다. 그러나 25°C에서는 뚜렷한 HSP70 mRNA의 발현이 나타나지 않았으며, 10°C의 경우 0 h째와 12 h째에 HSP70 mRNA가 약하게 발현되었으며, 15°C의 경우 0 h째에 HSP70 mRNA가 약하게 발

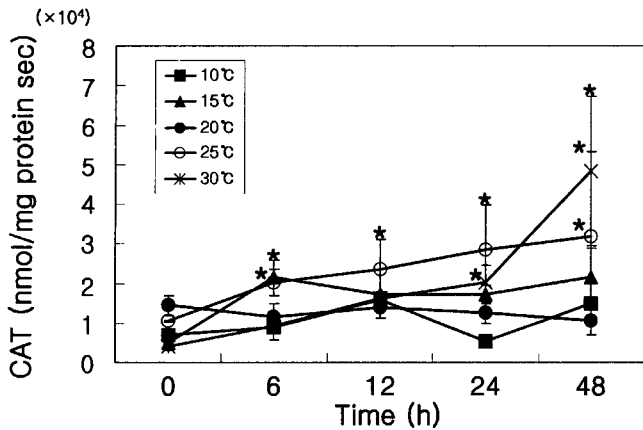


Fig. 3. Changes of catalase (CAT) activity in juvenile abalone, *Haliotis discus hannai* exposed to acute Water-temperature stress. *P<0.05 as compared to control (20°C).

현되었다(Fig. 4). 가장 뚜렷한 HSP70 mRNA의 발현을 나타낸 30°C에서의 발현정도를 β-actin mRNA를 기준으로 나타낸 결과, HSP70 mRNA 발현량은 12 h째 까지 상승하다가 12 h째 이후에는 증가되지 않고 지속적으로 유지되는 경향을 나타내었다(Fig. 5).

고찰

전복을 20°C에서 2개월간 순치시킨 후, 순응수온별(10, 15, 20(대조구), 25 및 30°C)에서 적응기간별(0, 6, 12, 24 및 48 h) 생존율을 조사한 결과 30°C 실험구에서만 12 h 이후 2마리가 폐사하였다. 이는 30°C 고수온에서는 20°C에서 순치된 개체라도 12 h째부터 생리적인 한계점에 도달하고 있음을 간접적으로 보여주는 것으로 판단된다.

또한 본 실험에서는 스트레스와 대사의 지표로 많이 사용되는 혈액 샘플(Cho et al., 2002; Vijayan and Moon, 1994)을 전복의 심장 옆 혈관에서 주사기를 이용하여 채취한 뒤, 원심 분리를 통한 혈림프(Hemolymph)를 수거하여 급격한 수온 스트레스에 따른 글루코오스 및 혈당의 변화를 관찰 하였으나 개체

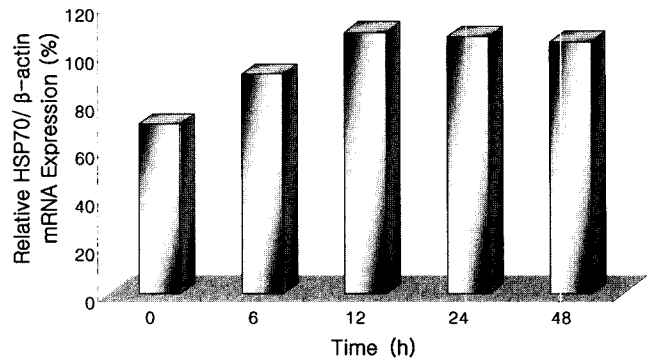


Fig. 5. Effect of acute Water-temperature (30°C) stress on HSP-70 mRNA of hepatopancreas in juvenile abalone (*Haliotis discus hannai*).

간의 차이가 크게 나타나 스트레스에 대한 일관성 있는 결과를 나타내지 않았다(Data not shown).

스트레스에 의해 발생하는 활성산소는 어떤 유해물질이나 약물 등에 노출되었을 때 병적 상태에서는 이들이 과다하게 생성되어 조직에 치명적인 손상을 입힐 수 있다(Goldberg and Stern, 1977; Simon et al., 1981; Moody and Hassan, 1982). 이런 생체에서 발생하는 활성산소에 의한 단백질, 핵산 및 생체막 손상은 SOD 및 CAT 등 항산화효소에 의해 방어된다. 항산화효소의 방어 기작을 보면 SOD 및 CAT는 활성산소를 보다 안정된 물질로 환원시키는데, 그 중 SOD는 superoxide radical (O₂⁻)를 H₂O₂와 O₂ (2O₂⁻+2H⁺→H₂O₂+O₂)로 전환시키며, 이 전환된 H₂O₂를 CAT가 O₂와 H₂O (2H₂O₂→2H₂O+O₂)로 분해하여 활성산소를 형성하기 전에 생체에 무해한 분자들로 전환시킨다(Forman and Fridovich, 1973). 일반적으로 어류에서 이러한 항산화효소는 어종, 조직 및 계절에 따라 항산화 활성이 변화하는 것으로 알려져 있다(Aksnes and Njaa, 1981; Gabryelak et al., 1983; Wdzieczak et al., 1981). 또한 Parihar et al. (1996, 1997)는 온도 증가에 의한 스트레스로 실험 후 4 h까지 SOD 효소활성 등이 증가한다고 보고하였다. 본 실험에서는 패류인 전복을 이용하여 실험한 결과, SOD의 경우 모든 실험구에서는 증가하는 경향을 나타내었으나, 고수온에서 12 h 이후 급격한 상승을 나

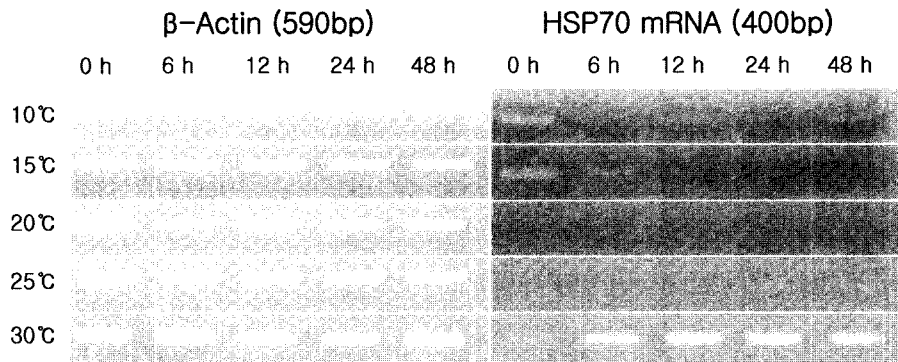


Fig. 4. Effect of acute Water-temperature stress on β-Actin mRNA and HSP-70 mRNA of hepatopancreas in juvenile abalone (*Haliotis discus hannai*).

타내었고, 저수온에서는 수온 스트레스 자극 직후에 증가한 후 감소하는 경향을 나타내었다. CAT에 있어서는 고수온에 있어서 지속적인 상승을 나타내었다. 이상의 결과를 보면 20°C에서 순치된 전복에서의 항산화효소는 저수온으로의 급격한 변화가 보다 빠른 생리적인 순응을 위해 작용하는 데 반하여 고수온에서는 스트레스 초기의 변화에는 생리적인 순응 반응이 나타나지 않지만 12 h 이후에는 급격한 스트레스로 작용하여 순응하기 위해 작용하는 것으로 판단된다. 그러나 이러한 급격한 생리적인 순응에도 불구하고 30°C 이상의 수온에서는 생리적인 방어 기작을 능가하여 폐사에 이르게 하는 것으로 판단된다.

한편, 분자레벨에서의 스트레스 지표로 널리 사용되어지고 있는 HSP70 mRNA의 발현은 30°C의 실험구에서만 모든 시간대(0, 6, 12, 24 및 48 h)에서 HSP70 mRNA가 강하게 발현되었다. 10 및 15°C 실험구의 경우에는 설정 수온에 도달하는 0 h째에 HSP70 mRNA가 약하게 발현되었다. 이러한 결과는 전복이 급격한 수온 스트레스에 의한 HSP70의 발현은 저수온으로의 변화에서는 생리적으로 스트레스에 대한 빠른 순응을 하는 것으로 판단되나, 10°C 이상의 수온 상승이 이루어졌을 때에는 HSP70의 발현량이 급속도로 증가 되어 HSP의 생성 기작이 급속도로 진행되고 이러한 스트레스가 12 h 이상 지속될 경우 생리학적 방어 기작이 한계에 도달하여 폐사에 이르게 될 것으로 추정된다.

또한, Snyder et al. (2001)는 31°C에서 1 h의 열충격을 가한 전복의 소화샘을 Western blot 한 결과 세 개의 밴드(HSP67, HSP70 및 HSP74)가 나타난다고 보고하고 있다. 본 연구진에서 아가미 샘플을 이용하여 HSP70의 항체를 사용한 결과에서도 30°C 실험구의 Western blot의 결과에서 HSP70의 밴드 외에 HSP67 및 HSP74가 확인되었다(Data not shown). 이처럼 전복의 다양한 장기에서 HSP의 발현이 이루어지는 것을 알 수 있으며, Amro et al. (2003)은 참굴, *Crassostrea gigas*에서 수온 내성을 증가시키기 위하여 HSP 계열 단백질이 발현되는 것으로 보고하고 있어, 전복에서도 HSP의 발현이 수온 내성에 깊이 관여 하는 것으로 추측된다.

이상의 결과로, 20°C에서 순치된 전복은 저수온 스트레스에 대한 생리학적 방어기작이 약 5°C 내외의 고수온 스트레스에 대한 생리학적 방어기작과 비교하여 보다 빠르게 작용하여 순응하는 것으로 나타나며, 일정 수온 이상의 고수온에 노출되었을 경우 생체 내 과도한 생리학적 방어기작이 작용하여 항산화효소 및 HSP 발현을 증가시키는 것으로 판단된다. 그러나, 이러한 변화에 대한 종합적인 검토를 위해서는 좀 더 장기간에 걸친 연구와 각 장기간의 발현 양상에 대한 세부적인 연구가 추가되어야 할 것으로 판단된다.

요 약

본 연구는 전복, *Haliotis discus hannai* 치패를 이용하여 급격한 수온변화 스트레스에 따른 간부위에서의 항산화효소 및

HSP70 mRNA의 변화를 조사하였다. 실험구는 10, 15, 20(대조구), 25 및 30°C로 설정하였으며, 측정 시간은 0, 6, 12, 24 및 48 h 후에 측정 하였다. 그 결과 HSP70 mRNA의 발현은 다른 실험구들과 비교하여 30°C 실험구에서만 유의적으로 높게 발현되었으며, SOD의 경우 모든 실험구에서는 증가하는 경향을 나타내었으나, 고수온에서 12 h 이후 급격한 상승을 나타내었고, 저수온에서는 수온 스트레스 자극 직후에 증가한 후 회복되는 경향을 나타내었다. CAT에서는 실험 개시 후부터 고수온 실험구에서 지속적인 상승을 나타내었다. 실험기간 중의 생존율은 30°C 실험구를 제외한 모든 실험구에서 100%의 생존율을 나타내었으며, 30°C 실험구에서는 92%의 생존율을 나타내었다. 이상의 결과로, 20°C에서 순치된 전복은 저수온 스트레스에 대한 생리학적 방어기작이 약 5°C 내외의 고수온 스트레스에 대한 생리학적 방어기작과 비교하여 보다 빠르게 작용하여 안정화하는 것으로 나타났으며, 일정 수온 이상의 고수온에 노출되었을 경우에는 생체 내 과도한 생리학적 방어 기작이 작용하여 항산화효소 및 HSP70의 발현이 증가하는 것으로 나타났다.

사 사

이 논문은 2004년도 제주대학교 두뇌한국21 사업에 의하여 연구되었으며, 연구비를 지원하여 주신 데 대하여 깊이 감사드립니다.

참고문헌

- Agnar S. and K. I. Albert, 2003. Size dependent variation in optimum growth temperature of red abalone (*Haliotis rufescens*). *Aquaculture*, 224, 353-362.
- Aksnes, A. and L. R. Njaa, 1981. Catalase, Glutathione peroxidase and superoxide dismutase in different fish species. *comp. Biochem. Physiol.*, 69B, 893-896.
- Amro M. H., D. P. Cheney and G. N. Cherr, 2003. Phenotypic plasticity of HSP70 and HSP70 gene expression in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): Implications for thermal limits and induction of thermal tolerance. *Biol. Bull.* 205, 160-169.
- Brown, P. B., K. A. Willson, J. E. Wetzel II and B. Hoene, 1995. Increased densities result in reduced weight gain of crayfish *Orconectes virilis*. *J. World Aquacul. Soc.* 26, 165-171.
- Chance, B., H. Sice and A. Boveris, 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.*, 59, 527-605.
- Chen, J. C. and W. C. Chen, 2000. Salinity tolerance of *Haliotis diversicolor supertexta* at different salinity and temperature levels. *Aquaculture*, 181, 191-203.
- Cheng W., I. S. Hsiao, C. H. Hsu and J. C. Chen, 2004. Change in water temperature on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology*. 17, 235-243.
- Cho, K. S., E. Y. Min and J. C. Kang, 2002. Changes of haema-

- tological constituents in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* to HCB and PCBs. J. Kor. Fish. Soc., 35, 110–114.
- Ferraris, M., S. Radice, P. Catalani, M. Francolini, L. Marabini and E. Chiesara, 2002. Early oxidative damage in primary cultured trout hepatocytes: a time course study. Aquatic Toxicology, 59, 283–296.
- Forman, H. J. and I. Fridovich, 1973. Superoxide dismutase: A comparison of rate constant. Arch. Biochem. Biophys., 158, 396p
- Gabryelak, T., M. Piatrowska, W. Leyko and G. Peres, 1983. Seasonal variation in the activities of peroxide metabolism enzymes in erythrocytes of freshwater fish species. Comp. Biochem. Physiol., 75C, 383–385.
- Goldberg, B. and A. Stern, 1977. The role of the superoxide anion as a toxic species in the erythrocyte. Arch. Biochem. Biophys., 178, 218–225.
- Harris, J. O., G. B. Maguire, S. J. Edwards and D. R. Johns, 1999. Low dissolved oxygen reduces growth rate and oxygen consumption rate of juvenile greenlip abalone, *Haliotis laevis* Donovan. Aquaculture, 174, 265–278.
- Harris, J. O., G. B. Maguire, S. J. Edwards and S. M. Hindrum, 1998. Effect of ammonia on growth and oxygen consumption rate for juvenile greenlip abalone, *Haliotis laevis* Donovan. Aquaculture, 160, 259–272.
- Kim, J. K. and J. H. Kim, 2001. Diffusion modeling of cold discharge on coastal waters. J. Fish. Mar. Sci. Edu., 13, 132–145.
- Laughlin, R. B. and J. M. Neff, 1980. Influence of temperature, salinity, and phenanthrene (a petroleum derived hydrocarbon) on the respiration of larval mud crabs *Rhithropanopeus harristii*. Est. Coast. Mar. Sci., 10, 655–669.
- Laughlin, R. B. and J. M. Neff, 1981. Ontogeny of respiratory and growth responses of larval mud crabs *Rhithropanopeus harristii* exposed to different temperatures, salinities, and naphthalene concentrations. Mar. Ecol. Prog. Ser., 5, 319–332.
- Laughlin, R. B. and O. Linden, 1983. Oil pollution and Baltic mysid: Acute and chronic effects of the water soluble fractions of light fuel oil on the mysid shrimp *Neomysis integer*. Mar. Ecol. Prog. Ser., 12, 29–41.
- Lowry, O. H., N. J. Rosenbrought., A. L. Farr and R. J. Randall, 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265–275.
- Marklund, S. and G. Marklund, 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the antioxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur. J. Biochem., 47, 469–474.
- Maule, A. G., R. A. Tripp, S. L. Kaattari and C. B. Schreck, 1989. Stress alters immune function and disease resistance in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). J. Endocrinol., 120, 135–142.
- Moody, C. S. and H. M. Hassan, 1982. Mutagenicity of oxygen free radicals. Proc. Natl. Acad. Sci., 79, 2855–2859.
- Nelson D. P. and L. A. Kiesow, 1972. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). Anal Biochem. 49, 474–478.
- Parihar, M. S., A. K. Dubey, T. Javeri and P. Prakash, 1996. Changes in lipid peroxidation, superoxide dismutase activity, ascorbic acid and phospholipid content in liver of freshwater catfish *Heteropneustes fossilis* exposed to elevated temperature. J. Therm. Biol., 21, 323–330.
- Parihar, M. S., T. Javeri, T. Hemnani, A. K. Dubey and P. Prakash, 1997. Responses of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and reduced glutathione antioxidant defenses in gills of the freshwater catfish (*Heteropneustes fossilis*) to short-term elevated temperature. J. Therm. Biol., 22, 151–156.
- Pedro E. S., O. Lucia, M. Mario, and B. Horacio, 2004. Effect of temperature on oxygen consumption and ammonia excretion in the Calafia mother-of-pearl oyster, *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856). Aquaculture, 229, 377–387.
- Simon, R. H., C. H. Scoggin and D. Patterson, 1981. Hydrogen peroxide causes the fatal injury to human fibroblasts exposed to oxygen radicals. J. Biol. Chem., 256, 7181–7186.
- Snyder, M. J., E. Givertz and E. P. Mulder, 2001. Induction of marine mollusk stress proteins by chemical or physical stress. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 41, 22–29.
- Tsuchiya, M., 1983. Mass mortality in a population of the mussel *Mytilus edulis* L. caused by high temperature on rocky shores. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 66, 101–111.
- Vijayan, M. M. and T. W. Moon, 1994. The stress response and plasma disappearance of corticosterone and glucose in a marine teleost sea raven. Can. J. Zool., 72, 379–386.
- Wdzieczak, J., G. Zalesna., A. Bartowiak, H. Witas and W. Leyko, 1981. Comparative studies on superoxide dismutase, catalase and peroxidase level in erythrocytes of different fish species. Comp. Biochem. Physiol., 68B, 357–358.
- Welch, W. J., 1991. The role of heat-shock proteins as molecular chaperones. Curr. Opin. Cell Biol., 3, 1033–1038.
- Wendel, A. and S. Feuerstein, 1981. Drug-induced lipid peroxidation in mice-I. Modulation by monooxygenase activity, glutathione and selenium status. Biochem Pharmacol., 30, 2513–2520.
- Yang, J. H. and I. K. Yeo, 2004. Physiological studies on acute water-temperature stress of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Kor. J. Ichthyol., 16, 19–26.
- Young, D., E. Roman., C. Moreno., R. O'Brien and W. Born, 1993. Molecular chaperones and the immune response. Phyl. Trans. R. Soc. London, 339B, 363–367.

원고접수 : 2004년 12월 8일

수정본 수리 : 2005년 1월 16일