

Clove Oil의 붕어(*Carassius auratus*) 혈액 및 혈액화학치에 대한 영향

고경남¹ · 정태성² · 허강준^{1,*}

¹충북대학교 수의과대학 및 동물의학연구소, ²경상대학교 수의과대학
(게재승인: 2007년 12월 11일)

Effects of clove oil on haematology and blood chemistry in crucian carp (*Carassius auratus*)

Kyoung-Nam Kho¹, Tae-Sung Jung², Gang-Joon Heo^{1,*}

¹College of Veterinary Medicine and Research Institute of Veterinary Medicine,
Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

²College of Veterinary Medicine,
Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

(Accepted: December 11, 2007)

Abstract : To determine the effects of anesthesia to clove oil on the secondary stress indices, changes in haematological and blood chemistry were monitored in healthy crucian carps (*Carassius auratus*). 24 fishes were divided into three groups, and blood was collected before anaesthesia (control group), immediately after anaesthesia at a concentration of 30 mg/l clove oil (anaesthetized group), and 24 h after anaesthesia (recovered group). The anesthesia to clove oil significantly increased glucose in anaesthetized group, and constantly decreased lactate dehydrogenase in anaesthetized group and recovered group. However, clove oil had not effect on other biochemical indices. These results suggests that the anesthetic use of clove oil at a concentration of 30 mg/l does not cause irreversible damage in carp.

Key words : clove oil, crucian carp (*Carassius auratus*), haematology and blood chemistry

서 론

수생동물에 있어서 마취제는 손으로 다루거나 분류하고 표식을 할 때, 인공수정을 할 때, 그리고 외과적인 수술 시에 스트레스 향진을 막기 위해 빈번히 사용되고 있다 [28, 31]. 또한 마취는 수생동물에 외상이나 스트레스를 주지 않고 실험에 이용하거나, 다수의 개체를 장시간에 걸쳐 운반하기 위하여 사용되기도 한다 [34]. 수생동물의 마취에 있어서 MS-222(tricaine), benzocaine, methomidate, quinaldine sulphate, 그리고 clove oil 등의 마취제를 이용한 침지법이 흔히 사용된다. 하지만 스트레스 향진을 막기 위한 마취제의 남용은 섭이량의 감소와 그에 따른 체중감소, 면역계 질환을 유도한다 [8, 16].

따라서 수생동물에 있어서 마취제는 반드시 효과적이

고, 안전하며, 경제적이어야 하며 [17]. 또한 마취제는 3분에서 15분 사이 진정작용이 나타나고, 깨끗한 물에 입수된 후 10분 안에 회복하여 정상적인 유영을 하여야 하며, 마취되었던 어류는 모두 생존하여야 그 효능이 적합하다고 판단될 수 있다 [5, 13, 27]. 이외에도 수생동물에 쓰이는 마취제는 물에 쉽게 용해되어야 하며, 마취 유도시간이 짧고, 안전역 또한 높아서 임의로 마취의 강도가 높아졌을 때 자연회복이 가능하여야 한다 [7, 9]. 그리고 체내에 잔류되지 않아 수생동물과 인체에 모두 안전하여야 한다 [33].

Clove oil은 최근에 알려진 효과적이며 안전하고 다루기 쉬운 마취제중 하나이다. 흑갈색의 액체 상태로 clove tree(*Eugenia aromatica*)의 꽃, 줄기, 잎에서 추출된 활성 물질로서 [35], eugenol(4-allyl-2-methoxyphenol)을 중량의

*Corresponding author: Gang-Joon Heo

College of Veterinary Medicine and Research Institute of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea
[Tel : +82-43-261-2617, Fax : +82-43-267-3150, E-mail : gjheo@cbu.ac.kr]

70-90% 함유하고 있으며, 특유의 향과 맛을 나타내는 다양한 테르펜 화합물로 이루어져 있다 [33].

현재 FDA에 의해 clove oil은 발암성과 유전자 변형을 일으키지 않으며 [25], “일반적으로 안전하게 여겨지는 물질”로 분류되어 1,500 ppm 이하는 사람에게 무해하다고 인정되었다 [29, 37].

어류에서 clove oil의 마취제로써의 작용은 주로 아가미를 통해 흡수되어 prostaglandin H(PHS)의 합성을 저해하여 진통 작용을 나타내고, 빠르게 대사되어 혈액과 조직에서 제거된다 [14]. 그리고 근육조직에 존재하는 대사산물은 어류와 다른 동물들에게 독성이나 유전자 변형을 일으키지 않으므로 [23], 식품으로 소비되기 전 휴약기간을 필요로 하지 않는다 [11].

어류의 경우 화학물질에 노출될 경우, 이는 스트레스 요인으로 작용하여 물고기의 내분비 작용에 변화를 주게 되고, 이차적으로 혈액에 영향을 미쳐 혈액화학수치에 변화가 오게 되는데, 이를 이용하여 수계 환경의 바이오모니터링에서 매우 유용한 방법으로 사용되고 있다 [3, 4, 15, 26]. 그러나 어류에 있어서 clove oil의 혈액학 및 혈액화학치의 변화에 대한 연구는 아직 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 우리나라 하천 수계의 대표적인 담수어종이라고 할 수 있는 붕어(*Carassius auratus*)의 혈액학 및 혈액화학적 수치를 측정함으로써 clove oil의 붕어에 대한 독성학적인 영향을 평가하고자 한다.

재료 및 방법

공시약제

공시약제로는 eugenol(4-allyl-2-methoxyphenol)을 70-90% 함유하는 clove oil을 사용하였다(Sigma-Aldrich, USA).

공시어종

붕어(*Carassius auratus*)의 2006년도에 부화한 수컷 성어(평균 전체장 : 26.06 ± 0.94 cm, 평균체중 : 292.50 ± 19.45 g)를 충북 진천의 관상어양식조합에서 6월말 분양 받아 수조 내에서 일주일간 적응시켰다. 또한 적응 기간 동안 사료는 담수어용 사료(EP 6호; 대한사료, 대한민국)를 1일 1회 투여하였고, 시험을 시작하기 24시간 전부터 절식시켜서 사용하였다.

시험수조

각 공시어는 시험 시작 전까지 공기주입장치와 순환여과장치, 온도조절기, 그리고 형광등이 설치된 200 리터의 유리수조에서 사육하였으며, 수조의 수온은 21.5 ± 0.5°C로 유지하였다.

침지 및 채혈

3개의 유리수조(80리터)에 8마리씩의 공시어를 넣어 마취군(anesthetized group)과 회복군(recovered group) 수조에는 clove oil을 30 ml/l의 농도로 희석하여 침지하였다. 마취군의 경우 마취가 이루어진 직후 미정맥(caudal vein)에서 헤파린으로 처리한 주사기로 채혈하였고, 회복군의 경우는 마취 후 회복수조로 이동해 24 시간 후 같은 방법으로 채혈하였으며, 대조군(control group)의 경우 마취 처리를 하지 않고 채혈이 이루어졌다. 채혈된 혈액분석용 혈액은 분석 전까지 냉장보관하였고, 혈청분석용 혈액은 3,000 rpm에서 8분간 원심분리하여 상층의 혈청만 수집한 후 분석 전까지 냉동보관하였다.

혈액학 및 혈액화학적 분석

혈액학 및 혈액화학적 분석은 아래와 같이 시행하였다. 즉, RBC(red blood cell) count와 WBC(white blood cell) count는 임상혈액학적 표준방법으로 시행하였다 [1]. 그리고 PCV(packed cell volume)는 microhaematocrit 법으로 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 측정하였다. 또한 Hb은 시안헤모글로빈법을 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 구하였고, mean corpuscular volume(MCV), mean corpuscular haemoglobin(MCH)과 mean corpuscular haemoglobin concentration(MCHC)은 임상혈액학적 표준방법으로 구하였다.

또한, total protein, albumin, aspartate aminotransferase(AST), alanine aminotransferase(ALT), alkaline phosphatase(ALP), creatinine, glucose, bilirubin, LDH, calcium, inorganic phosphorus(IP), 그리고 magnesium의 혈청화학적 항목은 자동혈청화학분석기(Pronto evolution; BPC Biosed, Italy)를 사용하였으며, 시약은 아산제약(Korea)의 제품을 사용하였다.

결과 분석

KS 검정(Kolmogorov-Smirnov)으로 모든 항목에 대하여 일차적으로 정규성(normality)을 검토하였다. 군 간 차이는 분산분석의 Dunnett 검정으로 분석하였으며 $p < 0.05$ 에서 유의성을 판단하였다(SPSS, USA).

결 과

혈액학적 분석

Clove oil의 마취에 의한 붕어의 혈액학적 수치의 변화는 Table 1과 같다. 30 ml/l 농도로 마취하였을 경우 마취군과 회복군 모두에서 유의적인 혈액학적 변화가 나타나지 않았다.

Table 1. Change of haematological parameters in crucian carp (*Carassius auratus*) after anesthesia by clove oil

	Control (n = 8)	Clove oil	
		Anesthetized (n = 8)	Recovered (n = 8)
Body Weight (g)	292.50 ± 19.45	283.75 ± 14.57	271.25 ± 18.46
RBC (× 10 ⁴ /μl)	124.37 ± 21.11	136.87 ± 20.84	123.00 ± 28.29
Hb (g/l)	14.43 ± 1.75	13.74 ± 1.58	14.43 ± 0.80
PCV (%)	37.37 ± 3.54	41.75 ± 5.28	36.50 ± 3.50
WBC (× 10 ⁴ /μl)	0.38 ± 0.08	0.46 ± 0.11	0.60 ± 0.30
Red blood cell indices			
MCV (fl)	300.47 ± 81.82	305.03 ± 87.04	293.08 ± 103.32
MCH (pg)	116.02 ± 34.77	100.38 ± 27.46	117.31 ± 35.35
MCHC (g/dl)	38.61 ± 8.41	32.91 ± 8.07	39.53 ± 6.04

Results are shown as the mean SD.

Table 2. Change of blood serum chemistry in crucian carp (*Carassius auratus*) after anesthesia by clove oil

	Control (n = 8)	Clove oil	
		Anesthetized (n = 8)	Recovered (n = 8)
Total protein (g/dl)	3.68 ± 0.32	3.96 ± 0.37	3.57 ± 0.19
Albumin (g/dl)	2.42 ± 1.56	1.38 ± 0.18	1.71 ± 0.23
AST (IU/l)	944.37 ± 525.41	911.62 ± 192.11	917.00 ± 155.81
ALT (IU/l)	47.50 ± 19.55	49.87 ± 16.80	57.62 ± 29.49
ALP (IU/l)	92.37 ± 18.29	95.87 ± 27.46	96.74 ± 36.24
Creatinine (mg/dl)	0.48 ± 0.17	0.48 ± 0.11	0.53 ± 0.22
Glucose (mg/dl)	333.75 ± 112.02	483.50 ± 118.89*	272.00 ± 146.57
Total bilirubin (mg/dl)	0.30 ± 0.11	0.31 ± 0.12	0.33 ± 0.14
LDH (IU/l)	1022.62 ± 357.19	900.75 ± 521.64	416.77 ± 147.35*
Calcium (mg/dl)	10.92 ± 1.77	12.80 ± 1.98	11.42 ± 2.43
IP (mg/dl)	2.95 ± 1.00	3.92 ± 0.65	3.43 ± 0.81
Magnesium (mg/dl)	2.13 ± 0.98	1.68 ± 0.22	2.67 ± 1.37

Results are shown as the mean SD.

*Significantly different from control at $p < 0.05$.

혈액화학적 분석

Clove oil의 마취에 의한 붕어의 혈액화학적 수치의 변화는 Table 2와 같다. 30 ml/l 농도로 마취효과가 나타날 때까지 침지하였을 시에, 마취군의 glucose 농도가 유의적으로 증가하였으나, 회복군에서는 대조군에 비해 유의적인 차이가 없었다. Lactate dehydrogenase 농도는 회복군에서 유의적으로 감소하였다. 그러나 그 밖의 검사 항목에서는 마취군과 회복군 모두에서 유의적인 변화가 나타나지 않았다.

고 찰

어류에 있어서 혈액학 및 혈액화학적 평가는 포유류 등의 고등 척추동물과 달리 채혈 시의 환경과 방법에 따

라 같은 어종과 연령이라 할지라도 혈액학 및 혈액화학적 측정 결과가 달라 절대적인 참고값(reference range)이 존재하지 않으며, 대신 시험 목적에 따라 같은 측정 조건 하에서 대조군과 실험군을 상대적으로 평가하고 있다.

혈액학 및 혈액화학적 평가에 있어서 RBC, WBC, Hb, 그리고 PCV는 어류에서 독성물질에 대한 생리적 스트레스의 척도로 사용되며 [20, 40], ALT, AST, LDH, 그리고 ALP는 독성물질로 인한 간장의 손상을 나타내고, creatinine, calcium, IP, 그리고 magnesium은 독성물질로 인한 신장의 손상을 나타낸다고 알려져 있다 [4, 10]. 또한 total protein, albumin, 그리고 glucose는 스트레스 에너지의 소비를 지시하며, bilirubin은 간과 담관의 손상을 나타낸다고 알려져 있다 [4, 20, 22].

지금까지 어류에서 수송, 선별, 채혈 및 수술 시 사용되는 마취제에 관한 연구는 주로 마취효과와 독성평가를 위주로 이루어져 왔다. 그러나 어류에서 clove oil에 의한 혈액학 및 혈액화학적 평가는 아직 다양한 어종에 있어서 이루어지지 않고 있다.

Clove oil을 사용하여 어린 chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*)을 마취하였을 경우 PCV의 감소를 나타내었으나, 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*)와 잉어(*Cyprinus carpio*)에서는 유의적인 변화가 나타나지 않았다 [20, 22]. 본 연구에서 혈액학적 수치에 있어서 마취군에서 RBC, PCV가 약간 증가하는 경향을 보였는데, 이는 마취제에 의한 스트레스로 인해 혈중 catecholamine 농도가 증가되고 [30], 이로 인해 비장이 수축됨에 따라 비장 내에 저장되어있던 적혈구가 방출되기 때문으로 생각된다 [2, 12]. 아가미 호흡의 감소로 인한 저산소증은 적혈구의 확장을 일으켜 PCV의 증가를 일으킨다고도 알려져 있다 [19]. 또한 Hb과 MCV는 변화가 없었으나, 마취군에서 MCH와 MCHC가 약간 감소하였는데, 이는 혈액 내 적혈구가 혈액소 농도가 낮은 미성숙 상태라는 것을 뒷받침해 준다 [36]. 그러나 이러한 변화들은 유의성을 나타낼 정도는 아니었으며, 회복군에서는 모두 대조군과 같은 수준으로 회복 되었다.

스트레스와 관련된 혈액화학적 수치에 관해서는, 무지개송어에서 마취 시 일시적으로 glucose 농도가 상승하였고 [38], 대서양연어(*Salmo salar*)에서는 glucose 농도의 변화는 없었으나, lactate와 cortisol 농도가 증가하였고 [18], 잉어에서는 glucose 농도가 증가한다고 알려져 있다 [39]. 본 연구에서는 glucose가 마취군에서 유의적인 증가를 나타내었으며, total protein 또한 증가하는 경향을 나타내었으나 유의적인 차이를 보이지는 않았다. 그러나 회복군에서는 모두 대조군과 유사한 수치를 나타내었다. 물고기는 스트레스 하에서 증가된 생리적 활동성을 지탱하기 위해 protein을 동원한다고 하며 [21], glucose는 스트레스 반응 시 나타나는 전형적인 2차적 생리 반응으로써 초기의 신속한 증가는 스트레스 반응에 의해 증가된 catecholamine에 의해 간에 저장된 glycogen이 glucose로 분해되기 때문이고 [6], 그 이후 지속되는 것은 glucocorticoids에 의한 gluconeogenesis 때문이라고 알려져 있다 [32].

AST, ALT, ALP, LDH, 그리고 total bilirubin 수치의 증가는 물고기에서 독성물질에 의해 간장의 손상을 지시하는 항목으로 사용되어 지며 [4], creatinine, magnesium, IP, 그리고 calcium과 같은 수치의 증가는 잠재적으로 물고기의 신장 손상을 지시한다는 보고가 있다 [10]. 무지개송어와 잉어에서 clove oil에 의한 마취 시 이들 항목의 유의적인 변화가 나타나지 않았으며 [38, 39], 본

연구에서도 유의적인 변화가 나타나지 않았다.

이상과 같이 본 연구에서도 적정 마취 유효농도의 clove oil로 마취하였을 경우 다른 어종에서와 마찬가지로 붕어에 있어서도 마취 직후 약간의 스트레스 반응만 일어난 뒤 회복되며, 다른 변화는 일으키지 않는 것을 확인할 수 있었다.

따라서 현재 양식 현장에서 주로 사용되고 있는 benzocaine 이나 MS-222 등의 기존의 마취제가 구입 단가가 높거나 안전성이 떨어지는데 비해 clove oil은 다른 마취제에 비해 마취효과 뿐만 아니라 어류에 미치는 독성작용이 없을 뿐만 아니라 생리적 스트레스 반응도 거의 일으키지 않으므로 기존의 마취제를 대체하여 이용할 수 있는 적절한 마취제로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2007년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

참고문헌

1. 강정부, 권오덕, 김덕환, 김두, 나기정, 양만표, 윤화영, 이경갑, 이근우, 이정길, 이주목, 이창우, 이체용, 정병현, 한홍윤. 수의임상병리. pp. 46-319, 기전연구사, 서울, 2004.
2. Abrahamsson T, Nilsson S. Effects of nerve sectioning and drugs on the catecholamine content in the spleen of the cod, *Gadus morhua*. Comp Biochem Physiol C 1975, **51**, 223-231.
3. Adam SM. Status and use of biological indications for evaluating in effects of stress on fish. In: Adams SM (ed.). Biological Indications of Stress in Fish. pp. 1-8, American Fisheries Society, Bethesda, 1990.
4. Asztalos B, Nemcsók G, Benedeczky I, Gabriel R, Szabó A, Refaie OJ. The effects of pesticides on some biochemical parameters of carp (*Cyprinus carpio* L.). Arch Environ Contam Toxicol 1990, **19**, 275-282.
5. Bonath K. Narkose der Reptilien, Amphibien und Fische. p. 359, Verlag Paul Parvey, Berlin, 1997.
6. Birnbaum MJ, Schultz J, Fain JN. Hormone-stimulated glycogenolysis in isolated goldfish hepatocytes. Am J Physiol 1976, **231**, 191-197.
7. Brown D, Fleming N, Balls M. Hormonal control of glucose production by Amphiuma means liver in organ culture. Gen Comp Endocrinol 1975, **27**, 380-388.
8. Brown LA. Tropical fish medicine. Anesthesia in fish. Vet Clin North Am Small Anim Pract 1988, **18**, 317-

- 330.
9. **Brozova V, Svobodova Z.** Anaesthetics for fish. Bull Vurh Vodnany 1986, **20**, 36-40.
 10. **Casillas E, Myers M, Ames WE.** Relationship of serum chemistry values to liver and kidney histopathology in English sole (*Parophrys vetulus*) after acute exposure to carbon tetrachloride. Aquatic Toxicology 1983, **3**, 61-78.
 11. **Cho GK, Heath DD.** Comparison of tricaine methanesulphonate (MS222) and clove oil anaesthesia effects on the physiology of juvenile chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). Aquac Res 2000, **31**, 537-546.
 12. **Ferreira JT, Smit GL, Schoonbee HJ.** Haematological evaluation of the anaesthetic benzocaine hydrochloride in the freshwater fish *Cyprinus carpio* L. J Fish Biol 1981, **18**, 291-297.
 13. **Ferreira JT, Schoonbee HJ, Smit GL.** The uptake of the anaesthetic benzocaine hydrochloride by the gills and the skin of three freshwater fish species. J Fish Biol 1984, **25**, 35-41.
 14. **Fischer IU, von Unruh GE, Dengler HJ.** The metabolism of eugenol in man. Xenobiotica 1990, **20**, 209-222.
 15. **Folmar LC.** Effects of chemical contaminants on blood chemistry of teleost fish: A bibliography and synopsis of selected effects. Environ Toxicol Chem 1993, **12**, 337-375.
 16. **Gomulka P, Antychowicz J.** Anaesthetics used in fish. Medycyna Wet 1999, **55**, 89-93.
 17. **Guilderhus PA, Marking LL.** Comparative efficacy of 16 anaesthetic chemicals on rainbow trout. North Am J Fish Manage 1987, **7**, 288-292.
 18. **Iversen M, Finstad B, Mckinley RS, Eliassen RA.** The efficacy of metomidate, clove oil, agui-S and benzoak as anaesthetics in Atlantic salmon stress-reducing capacity. Aquaculture 2003, **221**, 549-566.
 19. **Iwama GK, McGeer JC, Pawluk MP.** The effects of five fish anesthetics on acid-base balance, hematocrit, blood gases, cortisol, and adrenaline in rainbow trout. Can J Zool 1989, **67**, 2065-2073.
 20. **Jee JH, Min EY, Park HJ, Lee OH, Keum YH, Kim SM, Woo SH, Park SI, Kang JC.** Pentachlorophenol impact assessment of haematological parameters in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. J Fish Pathol 2005, **18**, 81-91.
 21. **Jung SH, Sim DS, Park MS, Jo QT, Kim Y.** Effects of formalin on haematological and blood chemistry in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). Aquac Res 2003, **34**, 1269-1275.
 22. **Kakuta I, Namba K, Uematsu K, Murachi S.** Physiological response of the fish, cyprinus carpio, to formalin exposure - I. Effects of formalin on urine flow, heart rate, respiration. Comp Biochem Physiol C 1991, **100**, 405-411.
 23. **Liu EH, Gibson DM.** Visualization of peroxidase isozymes with eugenol, a noncarcinogenic substrate. Anal Biochem 1977, **79**, 597-601.
 24. **Marking LL, Meyer FP.** Are better anaesthetics needed in fisheries? Fisheries 1985, **10**, 2-5.
 25. **Maura A, Pino A, Ricci R.** Negative evidence in vivo of DNA-damaging, mutagenic and chromosomal effects of eugenol. Mutat Res 1989, **227**, 125-129.
 26. **McDonald DG, Miligan CL.** Chemical properties of the blood. In: Hoar WS, Randall DJ (eds.). Fish Physiology. pp. 55-133, Academic Press, San Diego, 1992.
 27. **McFarland WN.** The use of anaesthetics for the handling and the transport of fishes. Calif Fish Game 1960, **46**, 407-431.
 28. **Myszkowski L, Kaminski R, Wolnicki J.** Response of juvenile tench *Tinca tinca* (L.) to the anaesthetic 2-phenoxyethanol. J Appl Ichthyol 2003, **19**, 142-145.
 29. **Nagababu E, Lakshmaiah N.** Inhibitory effect of eugenol on non-enzymatic lipid peroxidation in rat liver mitochondria. Biochem Pharmacol 1992, **43**, 2393-2400.
 30. **Nakano T, Tomlinson N.** Catecholamine and carbohydrate concentrations in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in relation to physical disturbance. J Fish Res Bd Can 1967, **24**, 1701-1715.
 31. **Peters G, Nüßgen A, Raabe A, Mück A.** Social stress induces structural and functional alterations of phagocytes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Shellfish Immunol 1991, **1**, 17-31.
 32. **Robertson L, Thomas P, Arnold CR, Trant JM.** Plasma cortisol and secondary stress responses of red drum to handling, transport, rearing density, and a disease outbreak. Prog Fish Cult 1987, **49**, 1-12.
 33. **Ross LG, Ross B.** Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals. 2nd ed. p. 159, Blackwell Science, Oxford, 1999.
 34. **Scoettger RA, Julin AM.** Efficacy of MS-222 as an anesthetic on four salmonids. U.S. Fish and Wildlife

- Service Investigation in Fish Control 13, Washington DC, 1967.
35. **Soto CG, Burhanuddin S.** Clove oil as a fish anaesthetic for measuring length and weight of rabbitfish (*Siganus lineatus*). *Aquaculture* 1995, **136**, 149-152.
 36. **Tort L, Torres P.** The effects of sublethal concentrations of cadmium on haematological parameters in the dogfish, *Scyliorhinus canicula*. *J Fish Biol* 1988, **32**, 277-282.
 37. **US Food and Drug Administration.** Review of eugenol and related substances in flavor usage. In: Harmon JE, Gross AG (eds.). *The Scientific Literature*. University of Chicago Press, Chicago, 1978.
 38. **Velišek J, Svobodová Z, Piačková V.** Effects of clove oil anaesthesia on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Acta Vet Brno* 2005, **74**, 139-146.
 39. **Velišek J, Velišek J, Svobodova Z, Piackova V, Groch L, Nepejchalova L.** Effects of clove oil anaesthesia on common carp (*Cyprinus carpio* L.) *Vet Med-Czech* 2005, **50**, 269-275.
 40. **Wedermeyer G.** The stress of formalin treatments in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *J Fish Research Board Canada* 1971, **28**, 1899-1904.