

원유의 WSF (Water Soluble Fraction)가 넙치, *Paralichthys olivaceus*의 초기생활사에 미치는 영향

신윤경, 조기채¹, 장덕종², 진영국^{*}

국립수산과학원 남해수산연구소, ¹국립수산과학원 서해수산연구소
²전남대학교 해양경찰학과

Effect of Crude Oil on Early Life Stage of the Flounder, *Paralichthys olivaceus*

Yun Kyung Shin, Kee Chae Cho¹, Deg Jong Jang² and Young Guk Jin^{*}

South Sea Fisheries Research Institute, NFRDI, Yeosu 556-823, Korea

¹West Sea Fisheries Research Institute, NFRDI, Incheon 400-420, Korea

²Chonnam National University, Maritime Police Science, Yeosu 550-749, Korea

ABSTRACT

This study was carried out to investigate the toxic effect of WSF (water soluble fraction) in crude oil on the hatch, survival rate, abnormality and physiological activity of fertilized eggs and early larvae in *Paralichthys olivaceus*. The time required in hatching the fertilized eggs exposure to crude oil was 50.8 ~ 53.2 hours both in control group and experimental group, showing no significant difference ($p > 0.05$). The hatching rate in the control group was more than 80% in 1.9 $\mu\text{g/mL}$ WSF concentration, but hatching rate was less than 55.7% in below of 3.9 $\mu\text{g/mL}$ WSF concentration, showing significant difference ($p < 0.05$). The survival rate on the 3rd day of early larval stage was 61.96% with 1.9 $\mu\text{g/mL}$ WSF, 11.1% with 3.9 $\mu\text{g/mL}$ WSF, and they all died with other concentration levels. The oxygen consumption rate in experimental groups was lower than control group. The heart rate (no./min) was 47.4 ~ 52.8 before hatching and there was no significant difference between control group and experimental group, but heart rate reduced with the decrease of WSF concentration after hatching. The abnormality was 1.1% in the control group whereas 36.7% with 3.9 $\mu\text{g/mL}$ WSF, and abnormality was mostly comprised of incomplete spinal formation and spinal curvature. The results of this study suggest that even low concentration to WSF affects the early development of the flounder, *Paralichthys olivaceus*.

Key words : crude oil, *Paralichthys olivaceus*, survival, respiration, abnormality

서 론

^{*} To whom correspondence should be addressed.
Tel: +82-61-690-8974, Fax: +82-61-685-9073
E-mail: jyg4j@hanmail.net

유류는 해마다 약 500만 톤 정도가 해양환경에 유출되는데 (Neff, 1990), 석유산업의 발달에 따라

그 유출량은 더욱 증가하고 있다. 유류오염의 가장 중요한 요인인 유조선 사고는 1967년 영국 남서해안에서 발생한 토리캐넌호 유출사고, 1989년 미국 알래스카에서 발생한 엑스발데즈호 유출사고, 1997년 일본에서 발생한 나호드카 유출사고 그리고 1999년 프랑스 연안에서 발생한 에리카호 유출사고 등 크고 작은 사건들이 빈번하게 발생하고 있다. 국내에서도 1995년 시프린스호 사고 및 2007년 허베이스피리트호 사고를 비롯해 다수의 사례가 보고되고 있다.

원유유출 사고로 인한 가장 큰 피해는 유출 시 해류나 조류에 의해 연안으로 확산되어 해양생태계와 인근 양식생물들을 포함한 해양생물의 생존 및 성장 등에 악영향을 미친다. 원유는 다양한 탄화수소, 질소 및 산소 화합물 그리고 중금속 등 여러가지 화합물로 구성되며(Wake, 2005), 유출된 유류성분 중 일부는 휘발성으로 공기 중으로 날아가지만, 나프탈렌 등과 같은 다환방향족탄화수소(polycyclic aromatic hydrocarbons: PAHs)는 해수에 용해되어 수용성의 독성물질(WSF: water soluble fraction)로 전환된다. 이러한 독성물질은 해양생물들에게 있어 다양한 급성 및 아급성 영향을 나타내는 것으로 알려져 있으며(Kennedy and Farrell, 2005), 어류 자어 및 치어의 경우에 조직병리학적 및 유전학적 손상의 한 원인이 된다(Brown *et al.*, 1996; Carls *et al.*, 1999). 또한 어류에게 심각한 스트레스로서 작용하며, 면역체계에 영향을 주고(Alkindi *et al.*, 1996), 골격 및 안면기형의 한 원인으로 보고되고 있다(Incardona *et al.*, 2004).

국내에서 발생하는 유류오염사고가 해양생태계에 미치는 영향을 파악하기 위해서는 고부가가치 산업 중 하나인 양식생물들에 대한 연구가 우선 절실히 필요하다. 하지만 유류가 해양생물들에게 미치는 영향에 대한 보고들은 주로 국외에서 연구된 것들이 대부분을 차지하고 있으며, 국내의 경우 원유가 백합, *Meretrix lusoria*(Lee *et al.*, 1975)과 곤쟁이, *Neomysis awatschensis*(Ahn and Chin, 1986)의 발생과 호흡에 미치는 독성에 관한 연구, 양식 어류의 전기 자어기에 미치는 원유 수용성 성분의 영향(Chang *et al.*, 2000) 등 국외에 비해 극히 소수가 보고되고 있어 해양생태계를 관리하고 보전하기 위한 자료는 많지 않은 실정이다.

따라서 본 연구는 양식생물로서 주요한 위치를

차지하고 있는 넙치, *Paralichthys olivaceus*의 수정란을 이용하여 유류의 수용성 성분인 WSF의 농도에 따른 부화소요시간, 생존율, 호흡, 심장박동수의 변화 및 기형율을 조사하였고, 유류오염이 해양생태계 및 양식생물들을 비롯한 다양한 해양생물에게 미치는 영향을 파악하는 데 그 기초자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

넙치 수정란은 국립수산물과학원 육종연구센터에서 분양받은 난경 0.93 ± 0.02 mm 크기였으며, 실험농도별 평균 4,031 cell을 실험에 이용하였다. 노출 실험은 수정 직후부터 부화 후 3일까지 진행하였다. 실험용기는 3L 유리 비이커를 사용하여 3회 반복실험을 하였다. 실험용액은 두바이산 원유를 사용하였으며, Paine *et al.* (1992)의 방법을 참고하여, 원유:해수=1:9로 24시간 혼합한 다음 분액팔찌기에 24시간 방치한 후 분리된 유막층 아래의 수용액을 추출하여 WSF로 사용하였다. 실험용액의 농도는 gas chromatography를 이용하여 분석하였으며, 이때 total petroleum hydrocarbons (TPH)의 농도는 $19.84 \mu\text{g/mL}$ 이었다. 이것을 원액농도로 설정하였으며(Ahn and Chin, 1986; Carmel and Douglas, 2002), 실험농도는 실험원액을 증류수로 희석하여 60, 40, 20, 10%로 조제하였고, TPH 농도를 이용하여 WSF 11.9, 7.9, 3.9, $1.9 \pm 0.3 \mu\text{g/mL}$ 로 설정하여 사용하였다. 실험방법은 지수식으로 실시하였으며, WSF의 휘발성을 최소화하기 위하여 실험용 비이커를 비닐랩을 이용하여 밀폐하였고, 24시간 간격으로 새로운 용액으로 교환하였다. 실험기간 동안 수온은 20°C , 염분은 33.0 ± 0.5 psu를 유지하였다.

부화소요시간은 각 농도구에서 최소 50% 이상의 부화율을 나타내는 시점을 기준으로 하였으며, 생존율의 계산은 전체 개체수에서 누적사망개체수를 뺀 값을 생존율로 환산하였다. 또한 각 농도별로 부화 전과 부화 후의 심장박동수를 광학현미경을 이용하여 조사하였다. 심장박동수는 농도별 30개체를 개체별로 측정하였으며, 빛의 영향을 최소화하기 위해 육안으로 식별일 가능한 정도로 현미경의 조리개를 낮추어 분당 박동수를 관찰한 후 평균값을 계산하였다. 산소소비율은 부화 후 1일에 각 노

출 농도구를 대상으로 산소검량기 (Microx TX3, Germany)를 이용하여 실험 전후의 용존산소의 차이로 계산하였다. 기형율은 부화 후 3일까지 각 노출농도에서 나타나는 개체들을 백분율 (%)로 나타내었다. 실험농도에 따른 반수치사농도 (LC₅₀)는 Probit법 (Finney, 1971)에 의해 분석하였으며, 각 실험의 자료는 SPSS 통계패키지에 의해 분산분석과 Duncan의 다중검정을 실시하여 유의차 유무를 검정하였다.

결 과

1. 부화 소요시간 및 부화율

각 실험농도별 넙치 수정란의 부화소요시간 및 부화율을 Table 1에 나타내었다. 부화 소요시간은 실험대조구의 경우 평균 51시간이었으며, WSF 1.9와 3.9 µg/mL에 노출된 개체들은 평균 50.83시간, 7.9 µg/mL에 노출된 개체들은 평균 52.68시간 그리고 11.9 µg/mL의 WSF에 노출된 개체들은 평균 53.24시간으로 대조구에 비해 7.9 µg/mL 이상의 WSF에 노출된 개체들에서 부화소요시간이 현저히 차이가 났다. 부화율의 경우 대조구와 1.9 µg/mL의 WSF에 노출된 개체들은 모두 80% 이상의 부화율을 나타냈으며, 3.9 µg/mL WSF에서 55.72, 7.9 µg/mL WSF에서 48.00 그리고 11.9 µg/mL WSF에서는 39.47%로 나타나 3.9 µg/mL WSF 이상의 농도에서 부화율의 감소가 유의한 수준으로 나타났다 (P < 0.05).

2. 생존

각 실험농도별 생존율은 Fig. 1과 같이 부화기에 대조구 및 1.9 µg/mL WSF에서 82~84%, 3.9 µg/mL WSF에서 58.49%를 나타내었으며, 7.9 µg/mL WSF 이상의 농도에서는 50% 이하를 나타냈다. 한편 부화 후 3일까지의 생존율은 대조구와 1.9 µg/mL WSF 농도에서 각각 68.4%와 61.9%으로 유사하였다 그러나 3.9 µg/mL WSF 이상부터 생존율은 급격히 감소하기 시작하여 부화 후 2일째 7.9 µg/mL WSF 이상의 농도에서 모두 사망하여 부화 후 2일 동안의 LC₅₀은 2.17 µg/mL (신뢰한계 1.5370 ~ 2.6511 µg/mL)로 나타났다.

Table 1. Hatching time and hatching rate of fertilized egg of the flounder, *Paralichthys olivaceus* exposed to water soluble fraction (WSF) from crude oil

Exposure concentration (µg/mL)	Hatching time (hr)	Hatching rate (%)
Control	51.00	80.48
1.9	50.83	85.58
3.9	50.83	55.72
7.9	52.68	48.00
11.9	53.24	39.47

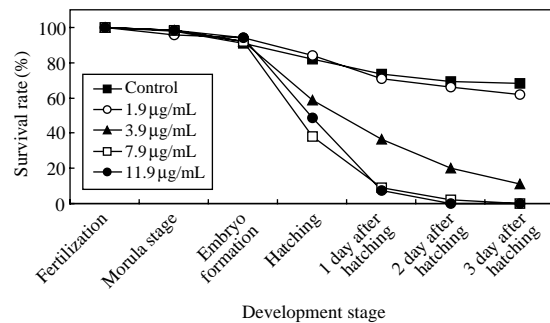


Fig. 1. Survival rate of the flounder, *Paralichthys olivaceus* exposed to water soluble fraction (WSF) from crude oil.

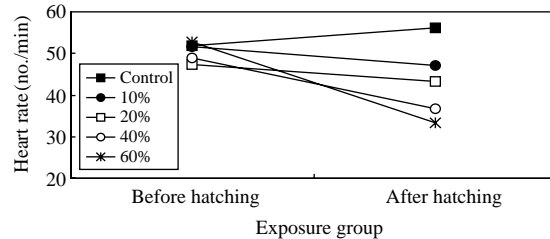


Fig. 2. Heart rate of before hatching and after hatching of the flounder, *Paralichthys olivaceus* exposed to water soluble fraction (WSF) from crude oil.

3. 심장박동수

WSF의 각 실험농도에 노출시킨 넙치수정란의 부화 전과 부화 후의 심장박동수의 변화를 Fig. 2에 나타내었다. 심장박동수는 부화 전 1분 동안 47~52회로 대조구와 모든 실험농도구에서 유의한 차이를 보이지 않았다 (P > 0.05). 그러나 부화 후의

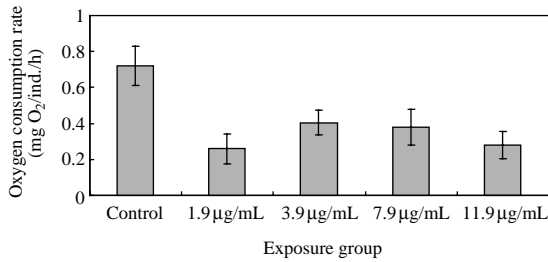


Fig. 3. Oxygen consumption rate of hatched larvae of the flounder, *Paralichthys olivaceus* exposed to water soluble fraction (WSF) from crude oil.

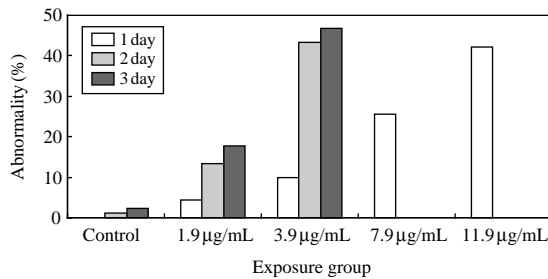


Fig. 4. Abnormality of hatched larvae of the flounder, *Paralichthys olivaceus* exposed to water soluble fraction (WSF) from crude oil.

경우, 대조구에서는 부화 전에 비해 1분 동안의 심장박동수는 7~8회 증가하였으나, 모든 실험 농도구에서는 감소하는 경향을 보여 대조구와 각 실험 농도구간에 유의한 차이를 나타내었다 ($P < 0.05$).

4. 산소소비율

부화 후 1일째 각 실험농도별 산소소비율의 반응을 Fig. 3에 나타내었다. 대조구의 산소소비율은 $0.72 \text{ mg O}_2/\text{ind./h}$ 으로 실험농도구에 비해 41~63% 높게 나타났다. 반면 WSF 1.9 µg/mL 이상의 농도에서는 $0.26 \sim 0.4 \text{ mg O}_2/\text{ind./h}$ 으로 실험농도구간에 유사한 경향을 보였으며, 대조구와 실험농도구간 산소소비율의 유의한 차이를 나타내었다 ($p < 0.05$).

5. 기형율

WSF에 노출시킨 넙치 수정란의 부화 후 기형율을 Fig. 4에 나타내었다. 대조구의 경우 부화 후 1일에는 기형개체가 관찰되지 않았으며, 부화 후 2일과 3일에 각각 1.11과 2.22%의 기형율을 나타내었다. 1.9 µg/mL WSF의 경우 부화 후 1일에는 4.44%를 나타냈으며, 부화 후 3일에는 17.78%를 나타내었다. 3.9 µg/mL WSF에서는 부화 후 3일에

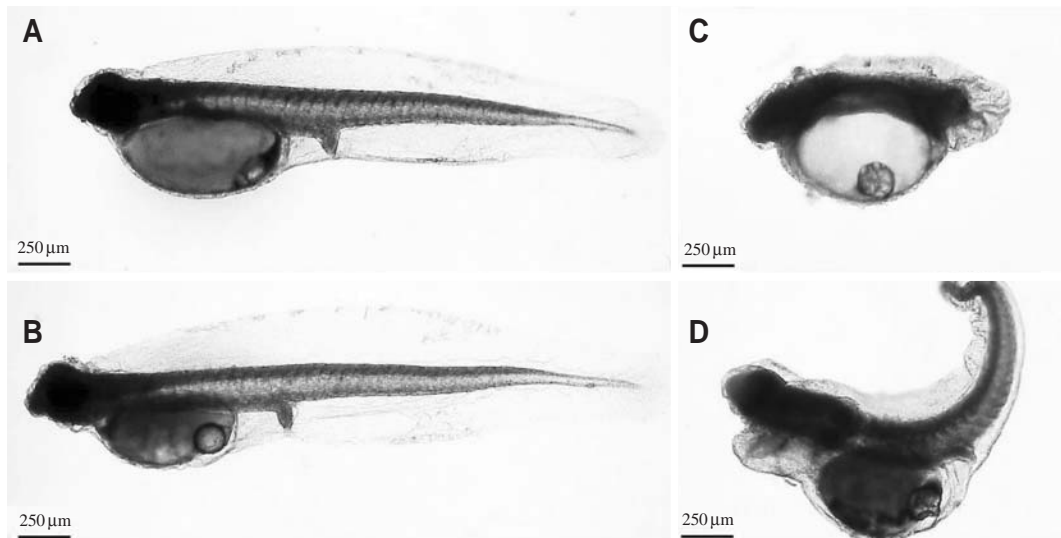


Fig. 5. Abnormality of hatched larvae of the flounder, *Paralichthys olivaceus* exposed to water soluble fraction (WSF) from crude oil. A: Control of 1 day after hatching. B: Control of 2 day after hatching. C: Crude oil (WSF) exposure group. Note the hypoplasia of spinal. D: Crude oil (WSF) exposure group. Note the spinal curvature.

46.67%의 기형율을 나타내었으며, 7.9 µg/mL WSF에서는 부화 후 1일에 25.56%의 기형율을 나타내었으나, 부화 후 2일에는 기형개체가 관찰되지 않고 모두 폐사하였다. 또한 11.9 µg/mL WSF에서는 부화 후 1일에 기형율 42.22%를 보인 후 모두 사망하였으며, 기형율은 WSF의 농도의존적 증가현상을 보였다.

Fig. 5는 부화 후 2일 동안 넙치자어의 기형현상을 사진으로 나타낸 것이다. 실험대조구의 경우 부화 후 1일에 일직선으로 뻗은 척추와 척추 마디 및 지느러미가 뚜렷하게 관찰되었고(Fig. 5A), 부화 후 2일에는 지느러미가 더욱 발달함과 동시에 난황의 약 80%가 흡수되었다(Fig. 5B). 관찰된 기형의 형태는 주로 안면부 및 척추의 형성부전(Fig. 5C)과 척추만곡(Fig. 5D) 현상이 두드러지게 관찰되었고, 기형을 가진 개체들은 실험대조구에 비해 부화 후 경과일수에 따른 난황의 흡수가 느리게 관찰되었다.

고 찰

오염물질은 일반적으로 어류의 부화속도를 늦추거나 부화율을 감소시키는 것으로 보고되고 있으며(Ackermann *et al.*, 2002; Ishibashi *et al.*, 2006), 그 중 유류에 의한 오염은 어류의 생활사 중 초기발생단계에 민감한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Shales, 1989; Norcross *et al.*, 1996). 유류가 부화시간에 미치는 영향에 대해서는 다수의 연구자들이 부화를 촉진시키거나 지연시키는 결과들을 보고하고 있으며(Smith and Cameron, 1979; Hannah *et al.*, 1982), 유류에 함유된 hydrocarbons을 이용한 독성실험에서 rainbowfish, *Melanotaenia fluviatilis* 수정란의 부화율은 0.5 mg/L 이상의 농도에서 감소되며(Carmel and Douglas, 2002), spotted halibut, *Verasper variegatus*에서도 부화율의 감소를 보고하고 있다(Yasunori *et al.*, 2008). 이와 같은 부화 시간 및 부화율의 저하는 대사활성의 감소에 기인하며, 이는 곧 부화 후 자어의 성장저하와 관련된다는 보고(Smith and Cameron, 1979)는 본 연구의 3.9 µg/mL WSF에서 부화율이 현저히 감소하는 결과와 유사하였다. 유류의 수용성 성분이 어류의 초기발생단계 동안 생존율을 감소시킨다는 보고는 대

부분 공통적으로 나타나고 있다(Carls *et al.*, 1999; Heintz *et al.*, 2000; Yasunori *et al.*, 2008). 유류에 의한 자어의 반수치사농도(LC₅₀)는 유류 성분 중 나프탈렌(Paine *et al.*, 1992)의 경우 rainbow trout, *Oncrohynchus mykiss*와 largemouth bass, *Micropterus salmoides*의 난은 0.12 mg/L, 자어는 0.68 mg/L로 보고되고 있다(Rowe *et al.*, 1983). 본 연구결과에서 부화 후 2일 동안 넙치의 LC₅₀은 2.17 µg/mL로 위에서 보고된 rainbow trout, *Oncrohynchus mykiss*와 largemouth bass, *Micropterus salmoides*와 비교해 높게 나타났으나, 어종 및 어종의 생리적 상태에 따라 다르게 나타날 것으로 여겨진다. 유류에 노출된 어류들의 초기생활사 동안 생존율의 감소는 각 부위에서 나타나는 부종이 그 원인 중 하나로 보고되고 있으며(Carls *et al.*, 1999; Carmel and Douglas, 2002), 이 부종은 어류에 있어 성장 지연의 원인이 될 것으로 여겨진다.

본 연구에서 나타난 심장 박동수의 감소는 그 연구 결과들을 찾아보기가 쉽지 않다. 하지만, 원유에 노출된 초기발생단계의 개체들에서 심장의 부종 및 기형 등이 나타난다는 보고들을 볼 때(Heintz *et al.*, 1999; Carmel and Douglas, 2002; Incardona *et al.*, 2004; Yasunori *et al.*, 2008), 이러한 증상이 심장박동수의 감소뿐만 아니라 산소소비율의 감소에 영향을 미치는 것으로 보여진다.

산소소비율은 수서동물의 대사지표로서 이용되며, 생리적 활성도를 추정할 수 있다(Sastry and Vargo, 1977). 부화 후 1일째 넙치자어의 산소소비율은 대조구에 비해 현저히 감소하였는데 이는 생리적으로 스트레스를 겪고 있는 생물에서 여러 가지 형태로 변화(Sastry and Vargo, 1977)한다는 점에 비추어 볼 때, 노출된 스트레스에 대사율을 감소시키며 저항하는 반응이거나 혹은 스트레스에 의해 생리적 장애를 받고 있는 것으로 추정되며, 이는 심장박동의 감소 요인과도 관련된 것으로 여겨진다.

기존 연구 결과들은 원유에 노출된 생물들에게서 다양한 기형 현상이 나타난다고 보고하고 있다(von Westernhagen, 1988; Heintz *et al.*, 1999; Incardona *et al.*, 2004). Yasunori *et al.* (2008)은 spotted halibut, *Verasper variegatus* 수정란을 원유에 노출한 결과 안면부 발달 결함, 전기 자어로의 발달 결함 및 신경계 발달 결함 등을 보고하였으며, 이러

한 결과는 원유에 노출된 pink salmon, *Oncorhynchus gorbuscha* 자어에서 나타난 골격, 심장 및 안면부 기형 (Heintz *et al.*, 1999), rainbowfish, *Melanotaenia fluviatilis* 자어에서 나타난 심낭 부종 및 비정상적인 턱 발달 (Carmel and Douglas, 2002) 등 과도 일치하는 결과를 보여준다. 본 연구결과에서도 원유에 노출된 개체들에서 안면부 기형, 척추만곡, 척추 형성부전 및 이로 인한 척수의 발달 결함 등 기존 보고들과 유사한 결과들이 관찰되었다.

따라서 본 연구결과로 볼 때 유류는 비교적 저농도에 노출되더라도 어류의 초기발생단계에 심각한 영향을 초래할 것으로 여겨지며, 이미 영향을 받은 개체들은 회복이 어려울 것으로 여겨진다.

요 약

원유의 WSF가 넙치의 수정란 및 자어발생에 미치는 독성영향을 알아보기 위하여 유류의 농도에 따른 부화소요시간, 부화율, 생존율, 호흡, 심장박동수의 변화 및 기형율 등을 조사하였다. 부화소요시간은 대조구와 실험농도구간에 유의한 차이를 보이지 않았다 ($p > 0.05$). 부화율은 대조구와 1.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ WSF에서 80% 이상이었으나, 3.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ WSF 이상에서는 55.7% 이하로 나타나 유의한 차이를 보였다 ($p < 0.05$). 한편 부화 후 3일 동안의 생존율은 농도의존적 감소현상을 나타내었다. 산소소비율은 대조구에 비해 낮게 나타났으며, 심장박동수는 대조구의 경우 부화 전에 비해 부화한 후 다소 증가하였으나, WSF 노출구에서는 감소하는 현상을 나타내었다. 기형율은 WSF 농도증가에 따라 증가하였으며, 주로 척추만곡과 척추형성부전의 현상을 보였다.

감사의 글

이 연구는 국립수산물과학원 '태안어장 정밀조사 및 양식어장 복원사업 (RP-2009-AQ-023)'의 지원에 의해 운영되었습니다.

참 고 문 헌

Ackermann GE, Schwaiger J, Negele RD and Fent K. Effects

of long-term nonylphenol exposure on gonadal development and biomarkers of estrogenicity in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, *Aquat Toxicol* 2002; 60: 203-221.

Ahn KW and Chin P. Acute toxicity of Kuwait crude oil (WSF) to Mysid, *Neomysis awatschensis*, *Bull Korean Fish Soc* 1986; 19(6): 599-607.

Alkindi AYA, Brown JA, Waring CP and Collins J. Endocrine, osmoregulatory, respiratory and haematological parameters in flounder exposed to the water-soluble fraction of crude oil, *J Fish Biol* 1996; 49: 1291-1305.

Brown ED, Bake TT, Hose JE, Kocan RM, Marty GD, McGurk MD, Norcross BL and Short JW. Injury to the early life history stages of Pacific herring in Prince William Sound after the Exxon Valdez oil spill, *Am Fish Soc Symp* 1996; 18: 448-462.

Carls MG, Rice SD and Hose JE. Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part I. Low-level exposure during incubation causes malformations, genetic damage, and mortality in larval Pacific herring, *Clupea pallasii*, *Environ Toxicol Chem* 1999; 18: 481-493.

Carmel AP and Douglas AH. Toxicity testing of crude oil and related compounds using early life stages of the crimson-spotted rainbowfish, *Melanotaenia fluviatilis*, *Ecotoxicol Environ Saf* 2002; 52: 180-189.

Chang YJ, Lee KH, Kang DY and Chin P. Effects of the water soluble fraction from Kuwait crude oil on the early larval stages of three cultured fish species, *J Aquaculture* 2000; 13: 69-78.

Finney DJ. *Probit Analysis*. 3rd ed. London: Cambridge University Press, 1971.

Hannah JB, Hose JE, Landolt ML, Miller BS, Felton SP and Iwaoka WT. Benzo(a)pyrene-induced morphologic and development abnormalities in rainbow trout, *Arch Environ Contam Toxicol* 1982; 11: 727-734.

Heintz RA, Hhort JW and Rice SD. Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part II. Increased mortality of pink salmon, *Oncorhynchus gorbuscha* embryos incubating downstream from weathered Exxon Valdez crude oil, *Environ Toxicol Chem* 1999; 18: 494-503.

Heintz RA, Rice SD, Wertheimer AC, Bradshaw RF, Throver FP, Joyce JE and Short JW. Delayed effects on growth and marine survival of pink salmon, *Oncorhynchus gorbuscha* after exposure to crude oil during embryonic development, *Mar Ecol Pro Ser* 2000; 208: 205-216.

Incardona JP, Collier TK and Scholz NL. 2004. Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocar-

- bons, *Toxicol Appl Pharmacol* 2004; 196: 191-205.
- Ishibashi H, Hirano M, Matsumura N, Watanabe N, Takao Y and Arizono K. Reproductive effects and bioconcentration of 4-nonylphenol in medaka fish, *Oryzias latipes*, *Chemosphere* 2006; 65: 1019-1026.
- Kennedy CJ and Farrell AP. Ion homeostasis and interregional stress responses in juvenile Pacific herring, *Clupea pallasi*, exposed to the water-soluble fraction of crude oil, *J Experi Mar Biol Ecol* 2005; 323: 43-56.
- Lee BD, Lee TY and Chin P. Effects of crude oil ingredients on the development and oxygen uptake of hard clam, *Meretrix lusoria* (RODING), *Publ Inst Mar Sci Nat Fish Univ Pusan* 1975; 8: 31-38.
- Neff JM. Composition and fate of petroleum and spill treating agents in the marine environment. *Sea Mammals and Oil: Confronting Risks*, Academic Press, London, 1990; pp. 1-32.
- Norcross B, Hose J, Frandsen M and Brown E. Distribution, abundance, morphological condition, and cytogenetic abnormalities of larval herring in Prince William Sound, Alaska, following the Exxon Valdez oil spill, *Can J Fish Aquat Sci* 1996; 53: 2376-2387.
- Paine MD, Leggett WC, McRuer JK and Frank KT. Effects of Hibernia crude oil on capelin, *Mallotus villosus* embryos and larvae, *Mar Environ Res* 1992; 33: 159-187.
- Rowe D, Sprague J, Heming T and Brown I. Sublethal effects of treated liquid effluent from a petroleum refinery, *Aquat Toxicol* 1983; 3: 149-156.
- Sastry AN and Vargo SL. Variations in the physiological responses of crustacean larvae to temperature. In: Vernberg FJ, Calabrese A, Thurberg FP and Vernberg WB (eds.), *Physiological response of marine biota to pollutants*, Academic Press, New York, 1977; pp. 410-424.
- Shales S. 1989. Biological and ecological effects of oils. In: Green J and Treett M(eds.), *The Fate and effects of oil in freshwater*, British Petroleum Co and Elsevier Applied Science, London, New York, 1989; pp. 81-106.
- Smith RL and Cameron JA. Effects of water soluble fraction of Prudhoe Bay crude oil on embryonic development of Pacific Herring, *Trans Am fish Soc* 1979; 108: 70-75.
- von Westernhagen H. Sublethal effects of pollutants on fish eggs and larvae. In: Hoar W and Randall D (eds.), *Fish Physiology*, Academic Press, San Diego, 1988; pp. 253-345.
- Wake H. Oil refineries: a review of their ecological impacts on the aquatic environment, *Estuarine Coastal She Sci* 2005; 62: 131-140.
- Yasunori M, Kitamura SI, Nakayama K, Matsuoka S and Sakaguchi H. Effects of heavy oil in the developing spotted halibut, *Verasper variegatus*, *Mar Poll bull* 2008; 57: 524-528.