



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학석사 학위논문

구리(Cu) 노출에 의한 전복, *Haliotis*
*discus hannai*의 기관별 축적 및
생화학적 변화



2010년 8월

부경대학교 대학원

수산생명의학과

박희주

이학석사 학위논문

구리(Cu) 노출에 의한 전복, *Haliotis*
*discus hannai*의 기관별 축적 및
생화학적 변화

지도교수 강 주 찬

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함.

2010년 8월

부 경 대 학 교 대 학 원

수산생명의학과

박 희 주

박희주의 이학석사 학위논문을 인준함.

2010년 8월



주심 농학박사 허민도 (인)

위원 약학박사 정준기 (인)

위원 이학박사 강주찬 (인)

목 차

목차	i
Abstract	iii
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	6
1. 실험동물	6
2. 실험조건	7
3. Bioaccumulation 분석	9
4. 성장률 측정	10
5. 생화학 분석	11
5-1. Hepatopancreas의 생화학 분석	11
5-2. Hemolymph의 생화학 분석	21
6. 유의성 검정	13
III. 결과	14
1. 생체 내의 Cu 축적	14
1-1. Hepatopancreas 내의 생체 축적	41
1-2. Muscle 내의 생체 축적	61
1-3. Gill 내의 생체 축적	81
2. 성장률의 분석	20
2-1. WGR 분석	22
2-2. DISL 분석	22
3. Hepatopancreas 생화학 분석	24
3-1. Superoxide dismutase(SOD)	42
3-2. Catalase(CAT)	62

4. Hemolymph 생화학 분석	8
4-1. Phenoloxidase(PO)	8 2
4-2. Hemolymph 내 효소	03
4-3. Hemolymph 내 유기성분	43
4-4. Hemolymph 내 무기성분	63
IV. 고찰	38
V. 요약	48
VI. 감사의 글	44
VII. 참고문헌	45



Bioaccumulation and biochemical changes on the tissues of abalone, *Haliotis discus hannai* exposed to copper

Park Hee Ju

Department of Fish Pathology, Graduate School
Pukyong National University

Abstract

Copper(Cu) is an essential trace element for human and animals for a number of biochemical functions. But Cu can have toxic effects especially on organisms at low ambient levels. The objective of this study was to investigate the effects of exposed Cu on growth, antioxidant enzyme(SOD, CAT) in the hepatopancreas and bioaccumulation of abalone (*Haliotis discus hannai*). Abalone were exposed to various concentration of Cu (0, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g/L}$).

Bioaccumulation of tissues, hepatopancreas, muscles and gills were measured. hepatopancreas and gills Cu concentration of abalone increases to extent during the 4 weeks accumulation time. But muscles showed no significant changes, with respect to control. These data indicate that abalone, *Haliotis discus hannai* hepatopancreas and gills can be considered adequate target tissues for waterborne exposure of Cu.

Weight growth rate of abalone exposed to Cu was significantly decreased in 20 and 40 $\mu\text{g/L}$ groups compared to control. This study revealed that high Cu concentration ($\geq 20\mu\text{g/l}$) reduced growth of abalone. Cu induced significantly elevated SOD, CAT of hepatopancreas showed increasing tendency in 20, 40 $\mu\text{g/L}$.

Hemolymph were measured on total protein, glucose, magnesium, calcium, Aspartate aminotransferase(AST), alanine aminotransferase(ALT) and Alkaline

phosphatase(ALP) in abalone exposed to Cu concentration. Magnesium (Mg), and total protein and glucose of abalone exposed to waterborne Cu was no significant difference from controls, but on the other hand AST, ALT activity and Ca of abalone exposed to waterborne Cu was significant changes after 4 weeks from 20, 40 $\mu\text{g/L}$ compared to controls.

These data indicate that excessive waterborne Cu can affect the toxicity of xenobiotics to abalone through alterations in hepatopancreas and homolymph enzyme systems, and growth rate. Thus, environmental standard of Cu $20\mu\text{g/L}$, should be considered a potential source of variation in toxicological studies with abalone.



I. 서론

지구상에 존재하는 다양한 물질 가운데에는 금속을 비롯하여 수많은 종류의 화학물질과 아직 알려지지 않은 미지의 물질이 존재한다. 이 중 금속은 토양과 해수 중에 자연적으로 존재하고 있는 성분으로 암석의 풍화 및 지각활동과 같은 자연적인 경로나, 각종 산업 활동에서 수반되는 과정 및 인간 활동 등의 인위적인 경로를 통해 수중에 존재하게 된다. 수중으로 유입된 각종 금속들은 직접적으로 또는 여러 가지 형태의 변화를 거치며 간접적으로 생물체내에 흡수 및 이용된다(Bryan, 1976).

생물의 체내로 흡수된 금속들은 다양한 생리적 항상성의 유지와 각종 물질 대사와 관련된 효소의 보조인자로 사용된다(Geret and Bebianno, 2004). 이러한 특성을 가지는 금속으로는 구리(Cu), 철(Fe), 망간(Mn), 아연(Zn), 셀레늄(Se) 등이 있으며 각각의 원소별로 생리적 활동에서 반드시 필요한 부분을 가진다. 반면에 금속 중에는 생체내로 유입되어 생명활동 및 생리현상에 부정적인 영향을 미치는 원소들도 존재한다. 수은(Hg), 카드뮴(Cd), 크롬(Cr), 납(Pb) 등의 경우가 해당하며 이러한 원소들은 아주 미량으로도 치명적인 영향을 미치게 된다(Viarengo, 1985, J.Gorski and D. Nugegoda, 2006). 중금속에 노출된 생물을 먹이로 섭취한 상위단계의 소비생물에서는 생물농축이 일어나며, 이는 장기적이며 강화된 중금속의 독성위험에 노출시키게 된다(Wang and Fisher, 1999).

구리(Cu)는 흔히 동(銅)으로 불리고 있는 붉은 빛을 띠는 금속으로 원자번호 29번, 비중은 8.65로 중금속에 속하며, 녹는점은 1,083°C로 다양한 합금의 재료로 쓰인다. 현재 금속산업에서 중요한 역할을 차지하고 있으며, 화학분야의 촉매제, 열 및 전기전도율이 높으므로 전선이나 열선의 주재료로 쓰이며, 우수한 열전도성과 내식성(耐蝕性)을 이용하여 냄비와 일반 용기로 사용되기도 하며, 선박의 방호제 등으로 폭넓게 사용되고 있다(Clark, 1992). 생물체 중 연체동물·갑각류 등과 같이 푸른 피를 가진 동물의 hemocyanin에 있는 Cu는 붉은 피를 가진 동물의 hemoglobin 내부의 철(Fe)과 마찬가지로 산소를 운반하는 역할을 한다(Lello Zolla et al., 1984). 그러므로 사람 몸속에는 hemoglobin의 형성을 촉진시키기 위해서 미량의 Cu가 존재한다. 해조류에서는 망간, 크

롬, 니켈 및 구리 등 다양한 종류의 미량금속이 함유되어있는 것으로 알려져 있는데, 그 중 Cu 역시 녹조류, 갈조류 및 홍조류에서 모두 함유되어 있는 것으로 보고되었다(김 등, 2005).

증가하는 인구와 산업 활동으로 인해 해수로 유입되는 Cu의 양은 증가하고 있으며, 해수 중에 존재하는 다양한 생물에 대한 Cu의 독성영향은 증가되고 있다. 해양생태계의 하부에 위치한 해조류와 다모류, 이매패류, 복족류 등에서 Cu의 높은 생물농축이 보고되기도 했다(Bryan, 1976). 호흡과정에서 수중의 중금속의 독성영향과 먹이에 의한 생물축적 사이에 독성의 정도 차이가 존재하지만(Lundebye et al. 1999), 갑작스런 해양사고 및 오염된 하천수의 유입 등에 의해 야기되는 급성독성과 만성독성의 영향은 중요한 연구대상으로 볼 수 있을 것이다(J. Gorski and D. Nugegoda, 2006).

우리나라 연안의 해수 및 저질의 중금속 오염조사는 대부분 새만금 및 시화호 등과 같은 외부적 해양 환경의 변화가 야기되는 곳에서 부분적으로 조사되고 있는 실정이다(시화호 해양환경 개선 사업, 해양수산부, 새만금 해양환경부전대책을 위한 조사연구, 해양수산부). 계속되는 해양 오염의 증대와 다양한 오염 경로를 통한 해수 중의 오염물질 유입은 규제되어야 할 사항이다. 해수 중으로 유입된 중금속은 수중에 유리된 상태로 존재하거나 저질에 흡착되어 오랜 기간 잔류하게 된다. 해수에 유리된 중금속들은 호흡을 통해 각종 해양생물에 독성영향을 일으키며, 저질에 흡착된 중금속 성분 역시 저질에 서식하는 다양한 복족류 및 저서 생물에 축적 및 독성을 유발하게 된다(Takaomi Arai, Masaru Maeda, Hiroshi Yamakawa Akiyoshi kamatani and Nobuyuki Miyazaki, 2002). 최근에 이루어지고 있는 연구의 결과에서 Zyadah and abdel-baky(2000)는 수중 생물이 Cu에 노출 될 경우 독성의 영향은 노출 시간과 노출 농도에 정비례하여 폐사율이 증가한다는 연구를 도출하였으며, 그 외에서도 가재류(*Cambarus Bartonii*), 털라피아(*Oreochromis mossambicus*), 돛류(*Sparus aurata*), 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*) 그리고 잉어(*Cypricus carpio*)에 대한 Cu 노출 시의 사망률, 성장 및 생화학적 변화에 대해 연구되었다(Nurrey et al. 1995; Marr et al. 1996; Minghetti et al. 2008; Wong et al. 1999; Mcgeer et al. 2000; Sherba et al. 2000; Flik et al. 2002). 조류(algae)에 있어서의 Cu의 영향은 물질대사에 영향을 주며 성장에 방해

및 억제를 유발하는 것으로 알려 지고 있다(Fernandes and Henriques, 1991; Lidon and Henriques, 1991; Lidon et al., 1993; Ouzounidou, 1994).

어류에 있어 Cu의 사료 섭취 실험은 최초 장을 통해 흡수된 상태에서 간이나 신장에서 해독화 과정과 배설이 진행된다. 그 중 일부는 체내에 축적 혹은 재분배되어진다 (Kim and kang, 2004). 하지만 해수 중의 노출로 Cu를 흡수하는 경우에는 1차적으로 아가미를 거쳐 다른 장기들로 이동하는 것으로 나타난다(Gudrun De Boeck et al., 2004). 체내 축적의 정도는 간과 신장이 높았으나 노출구간의 아가미에서 농도 증가가 큰 폭으로 일어남을 알 수 있다. 해산어류와 더불어 담수어에까지 다양한 Cu 독성 연구가 진행되고 있다. 그에 반해 무척추 동물에 대한 Cu 독성 연구는 미비한 실정이다. 해양 무척추동물 중 일부 진행되어진 독성연구는 대부분 굴류(*Crassostea sp.*)와 담치류(*Mytilus edulis*)의 연구에 그치고 있다 (Jonathan Blanchard et al. 2009; Roy E. Weber et al. 1992).

저서 생물인 전복, *Haliotis discus hannai*는 해양의 저층을 기어서 이동하는 복족류로서 서식지가 Cu와 같은 중금속에 오염 될 경우 직간접적인 영향을 받게 된다. 오염된 먹이나 퇴적물에 노출된 전복과 같은 저서동물들은 체내에 지속적인 중금속의 영향으로 만성독성이 유발되기가 쉽다(Daisuke et al., 2010). 식용으로 쓰이는 연체부와 광택이 나는 패각부는 공예품의 원료로 사용되어 진다. 우리나라의 경우 고부가 가치를 지는 매우 중요한 양식생물자원으로 1970년대 초부터 인공종묘생산에 관한 연구가 시작된 이후 1980년대 이후 국립수산물과학원에 의한 전복 종묘생산기술이 개발되어 대량 생산된 치패를 어민에게 공급하고 있다. 1990년대부터는 어민에게 각광받고 있는 중이다. 2007년도에는 패류 중 가장 생산량이 많은 굴이 478,646ton이었으며 전복은 4,350ton정도로 약 1/8에 그치고 있다. 하지만 어업 생산액에 있어서는 굴의 1306억 원보다 많은 1620억 원으로 전복을 이용한 양식 산업이 고부가 가치산업으로 인식되고 있다(농림수산물식품 주요통계, 2008). 자연산 전복이 희소성으로 인해 고가로 판매되고 있으며 남획으로 자원량이 급감하고 있는 실정이어서, 전복양식에 의한 수요와 공급 비율을 유지가 시급한 실정이다. 천해에서 시행되고 있는 치패의 방류에 의한 자연 양식법은 해역의 청정도가 치패 생육의 중요한 요소이므로 해역의 유류 오염 및 중금속

오염에 대하여 철저한 관리 감독이 필요할 것이다. 오염이 진행되고 있는 상황에서는 오염물질과 해양생물 간의 영향관계를 규명하는 노력이 필요하다.

동물의 체내에 Cu와 같은 외인성 물질이 다량으로 노출될 경우 방어반응으로 superoxide anion, hydrogen peroxide와 같은 활성산소(Reactive oxygen species, ROS)를 제거하고 체외로 배설하기위해 생체 변환을 일으킨다(Barry Halliwell et al., 1995). 체내에서 일어나는 이물질의 생화학적 반응은 크게 제1상 반응(Microsomal enzyme system; mixed function oxidase; monooxygenase)과 제 2상 반응으로 구분된다. 제 1상 반응은 붕괴 및 비합성 반응이라고도 하며, 산화(oxidation)와 환원(reduction) 및 가수분해(hydrolysis)를 통해 물질의 변환을 일으켜 극성기를 생성한다. ROS에 대한 방어기작으로 작용하는 항산화효소에는 superoxide dismutase(SOD), catalase(CAT), gultathione peroxidase, gultation S-transferase 등이 있으며 이들은 세포내에 여러 소기관 및 세포질, 핵 등 다양한 곳에 존재한다(Lopes et al., 2001). SOD는 두 가지의 이성질 효소(Isoenzyme)를 가지는 항산화효소로서 free radical을 H_2O_2 와 O_2 로 아세틸화시킨다. 또한 다른 항산화효소와 같이 작용하여 radical의 직접적인 독성과 이들이 금속이온과 상호작용하여 유독성의 hydroxy radical이 증가하는 것을 방지하는 역할을 하며, 이러한 과정에서 체내의 농도가 증가될 수 있다(Winston and Guilio, 1991, Livingstone et al., 1993; Parihar et al., 1997). CAT는 $2H_2O_2$ 를 $2H_2O$ 와 O_2 로 환원하는 효소로서 과산화물이 세포막에 활성이나 효소활성을 억제하는 것을 막는 역할을 한다(Chance et al., 1979; Wendel and Feuerstein, 1981). 이번 연구에서도 Cu의 노출에 의해 전복의 해독화 과정에서 야기되는 항산화 작용을 살펴보았다.

복족류의 순환계는 개방혈관계로 혈구세포가 모든 조직사이를 순환하면서 상처치유, 패각재생, 영양분의 소화 및 수송, 분비물의 배설을 담당하며, 이물질 침입에 대한 생체방어 등 여러 가지 생리적 역할을 수행한다(Cheng, 1981). Hemolymph내의 혈구들은 phagocytosis를 포함하여 다양한 형태의 면역 기능을 수행하며, 중금속과 같은 환경오염 물질에 의해 영향을 받기도 한다(Exon and Koller, 1986). Hemolymph내의 phenoloxidase는 Cu를 함유하는 산화효소의 하나로 세균이나 기생충과 같은 병원성 미생물 및 이물이 체내로 들어왔을 때 이에 필요한 멜라닌의 합성과 상처 부위의 치유에

중요한 역할을 한다고 알려져 있다(Jonhson et al., 2003). 체내에 흡수된 금속이온은 순환하는 복족류의 hemolymph에 기능적인 변화를 일으킨다(Weifang wang et al., 2007). 이를 바탕으로 아치사 농도의 금속에 노출된 복족류의 hemolymph 성분 분석은 매우 유용한 생태 독성법이라 할 수 있다.

따라서 본 연구는 오염이 일어나기 쉬운 연근해의 암석지대에서 저서 생활을 하는 전복에 아치사 농도의 Cu를 사육수에 인위적으로 노출시켜 반응을 살펴보았다. 노출에 따른 성장의 차이를 조사하였으며, hemolymph와 간체장을 이용한 효소반응 및 성분 변화를 알아보았다. 과다 노출된 Cu의 체내 축적은 일차기관인 아가미와 해독기관인 간체장 및 가식부인 근육으로 나누어 살펴보았다. 이러한 결과를 바탕으로 환경의 생태분석 및 오염의 모니터링에 기초적인 자료로 이용하며 나아가 전복에 관한 생리·생화학적 변화를 이해하는 기초가 되고자 하였다.



II. 재료 및 방법

1. 실험동물

본 실험에 사용한 실험동물은 2009년 10월, 제주특별자치도 소재의 양식장으로부터 전복(*Haliotis discus hannai*)을 분양받아 PVC (52*36*30cm) 시험수조에 농도마다 20마리씩 나누어 20±1℃의 항온항습실에서 10일간 순치하였다. 질병의 징후가 나타나지 않은 각장 50.44±3.0mm, 전중 14.74±2.5g의 전복을 사용하였다.



Map 1. ㉓ 전복 분양 장소 (제주특별자치도 북제주군 애월읍)

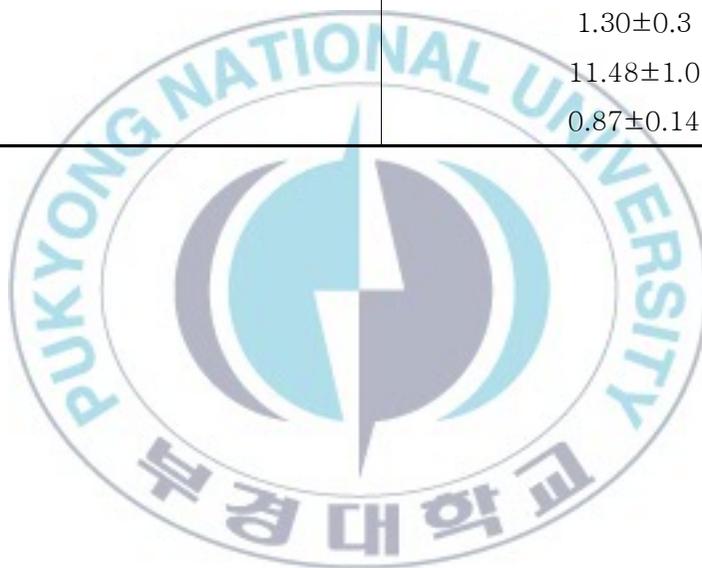
2. 실험조건

수온의 변화에 따른 스트레스를 줄이기 위해 항온항습실($20\pm 1^{\circ}\text{C}$)에서 실험을 실시하였다. 실험방식은 반지수식으로 하루에 한 번씩 환수를 기준으로 하며, 수질 상황에 따라 수시로 교환하였다. 실험에 사용한 해수의 수질은 해양오염공정시험법(해양수산부, 2005)에 따라 측정하였다(Table 1). 먹이는 자연 상태에서 주요 먹이인 갈조류 미역(*Undaria pinnatifida*)을 충분한 양으로 급이 하였다(천해양식, 유성규). 전복의 서식처 및 은신처를 제공하기 위해 각 수조에 직경 20cm인 PVC파이프를 세로로 절단하여 투입하였다.

Cu의 표준용액은 Copper standard solution(Junsei) 1000mg/L를 이용하였다. 노출농도 구간은 급성독성실험과(J. Gorski and D. Nugegoda 2006) 우리나라 해수 중 Cu의 허용 기준치인 0.02mg/L(환경정책 기본법, 1990)을 바탕으로하여 아치사 농도인 5, 10, 20, 및 40 $\mu\text{g/L}$ 로 하였다. 실험기간은 총 4주였으며, 실험시작 후 2주와 4주에 시료 샘플을 채취하였다. 전복은 어류와 달리 은신처에 부착생활을 하기 때문에 부착기질로 부터의 박리과정이 필요하다. 이 때 전복의 스트레스를 최소화하기 위한 마취제로 농업용 요소비료를 사용하였다. 식물플랑크톤을 배양할 때 사용되기도 하는 농업용 비료를 10% 농도로 마취에 이용하였다(Han et al., 2003). 시료는 조직 내 생리·생화학적 변동 파악을 위해 hemolymph와 간체장 및 아가미를 채취하였고, 조직의 Cu 축적을 알아보기 위해 간체장, 아가미 및 근육부분을 이용하였다.

Table 1. The chemical components of seawater and experimental condition used in the experiments.

Item	Value
Temperature(°C)	20.0±1
pH	8.10±0.5
Salinity(‰)	33.5±0.3
Dissolved oxygen(mg/L)	7.1±0.3
Chemical Oxygen Demand(mg/L)	1.13±0.1
Ammonia(mg/L)	12.50±0.7
Nitrite(mg/L)	1.30±0.3
Nitrate(mg/L)	11.48±1.0
Cu(μg/L)	0.87±0.14



3. Bioaccumulation 분석

전복의 조직 중 간체장, 아가미 및 근육부분을 적출하여 분석에 사용하였다. 조직 시료의 분해는 wet digestion method(APHA, 1992)를 이용하였다. 채취한 시료는 동결건조기를 이용하여 하루 동안 말린 후 건조량이 일정하도록 하였다. 1차로 건조된 시료는 각각 3ml의 HNO_3 (suprapur grade, Merck Germany)와 섞어 산에 용해하였다. 그런 다음 2차로 120°C 의 열을 가하여 하루 동안 재 건조시켰다. 질산에 녹은 뒤 다시 건조된 시료는 2% HNO_3 20ml을 첨가하여 membrane filter(Advantec mfs, Ins. $0.2\mu\text{m}$)를 이용하여 필터링하여 보관하였다. Cu의 측정은 유도결합 플라즈마 질량분석기(ICP-MS, Elan-DRc, Perkin-elmer Ltd.)를 이용하여 측정하였으며, Cu의 회수율을 알아보기 위한 CRMs(certified reference materials)로는 ERM-CE278(European Commission)을 이용하였다. 조직 내 함량은 $\mu\text{g/g}$ dry wt로 표현하였다.



4. 성장률 측정

실험개체는 각각의 농도별 실험구에서 실험 개시 후 2주마다 실험개체의 각장을 버니어 캘리퍼스(No. 500, Mitutuyo, Japan)로 측정하였고, 전중은 전자저울(HF-3000GD, A&D Company, Ltd., Japan)로 측정하여 다음과 같은 공식으로 WGR(Weight gain ratio, %)과 DISL(Daily increment in shell length, $\mu\text{m}/\text{day}$)을 조사하였다.

$$\text{WER}(\%) = [(W_m - W_i) / W_m] \times 100$$

$$\text{DISL}(\mu\text{m}/\text{day}) = [(SL_m - SL_i) / d] \times 1,000$$

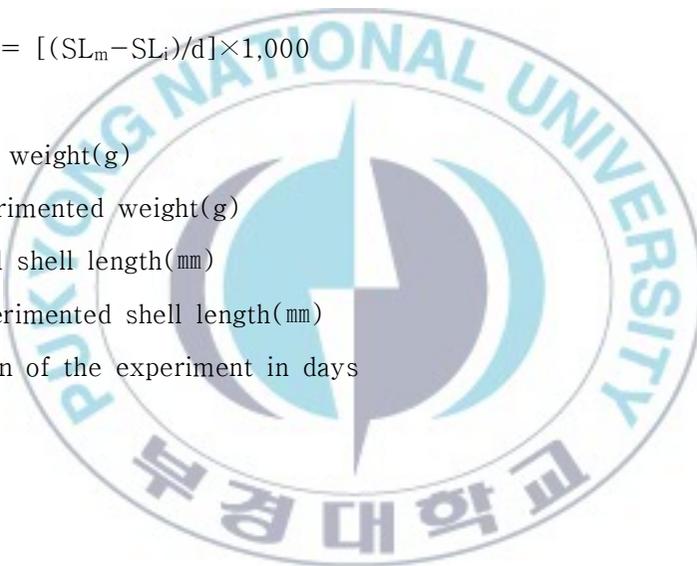
W_i - Initial weight(g)

W_m - Experimented weight(g)

SL_i - Initial shell length(mm)

SL_m - Experimented shell length(mm)

d - Duration of the experiment in days



5. 생화학 분석

5-1. Hepatopancreas의 생화학 분석

항산화효소는 간췌장을 적출하여 SOD(Superoxide dismutase) 및 CAT(Catalase)를 각각 분석하였다. 간췌장 부위를 적출 한 후 약 0.1g을 0.9% NaCl에 3회 세척한 다음 KCl(1.17%)을 함유한 100mM phosphate buffer(pH 7.4)를 첨가하여 teflon-glass homogenizer(099C K4424, Glas-Col)로 균질화하였다. 균질화 된 시료는 1,000rpm, 4℃, 15min의 조건에서 원심 분리하여(Mikro 22R, Hettich zentrifugen Ltd, Germany), 지방 및 침전물을 제거하였다. 균질액은 다시 13,000rpm, 4℃, 20min의 조건에서 원심분리 한 후 상등액을 항산화 효소 측정용 시료로 사용하였다. 상등액은 실험전까지 -75℃ (SW-UF-120, 삼원엔지니어링)에 보관하였다.

SOD는 Dojindo Co.의 SOD Assay Kit-WST를 이용하였다. 분리 보관중인 간췌장 상등액을 5의 배수로 희석하여 각 희석배수에 따른 inhibition rate를 구한 후 spectrophotometer를 이용하여 450nm에서 inhibition curve를 작성한다. 그런 다음 inhibition curve에서 활성이 50% 억제되는 농도를 찾아 계산하였다.

CAT활성도 측정은 H₂O₂를 기질로 사용하여 spectrophotometer에 의해 240nm 파장에서 H₂O₂가 환원되어 감소하는 흡광도로서 효소 활성도의 단위는 1분간에 1mg의 단백질이 반응하여 환원시킨 H₂O₂를 nmol로 나타내었다.

단백질 함량은 Bradford 법을 이용한 Kit(Biorad. Co. Ltd.)를 사용했으며 표준 단백질로서 BSA(bovine serum albumin)를 사용하여 spectrophotometer에서 540nm로 측정하였다.

5-2. Hemolymph의 생화학 분석

Hemocyte의 영김을 방지하기 위해 EDTA (50mM EDTA in PBS, pH7.6)를 처리한 주사기로 심장 옆의 혈관에서 채취 한 뒤, 1,200 ×g에서 10분간 원심분리 후 상등액에서 hemolymph를 획득하였다. 이렇게 얻어진 hemolymph는 효소 및 유기·무기 성분을 분석하기 위해 -75℃에 보관하였다.

Hemolymph 내의 phenoloxidase의 활성은 Ashida and Soderhall(1984)을 이용하였다. 0.2M Tris-HCl buffer (pH. 7.1)에 hemolymph와 10% sodium dodecyl sulfate를 넣고 잘 혼합한 뒤, 15mM L-DOPA(10mM CaCl₂ in 9.5M HCL)를 넣은 뒤 즉시 파장 490nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도 측정 후 28℃ 배양기에서 20분간 반응 시킨 후, 차가운 증류수를 넣어 반응을 정지시켰다. 효소의 최종 계산은 흡광도 값이 0.001/ml 감소한 것을 1unit으로 표시하였다.

Hemolymph 내 효소는 aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) 및 alkaline phosphatase (ALP)를 분석하였다. AST와 ALT는 Reitman-Frankel법을 사용하였으며, ALP는 kind-king법을 이용하여 측정하였다.

Hemolymph 내 유기성분은 총단백질(Total protein)과 glucose의 변화를 측정하였다. 총단백질은 Biuret법을 이용하였으며, glucose는 GOD법으로 측정하였다.

Hemolymph 내 무기성분은 마그네슘(Mg)과 칼슘(Ca)을 측정하였다. 마그네슘의 정량은 Xylidyl blue method로 비색 정량하였고, 칼슘은 OCPC (o-cresolphthalein-complexon)법으로 비색 정량하였다.

모든 hemolymph 내 효소 및 무기·유기 성분의 분석은 임상용 kit(Asan Pharm. CO.)를 사용하였다.

6. 유의성 검정

실험 결과의 통계 처리는 SPSS 통계프로그램 (version 12.0k)을 이용하여 ANOVA test를 실시한 후, 사후 검정은 다중 비교로 Duncan test를 사용하여 각 처리구 사이에 유의성(<0.05 , 95% 수준)을 조사하였다(Zar, 1996).



III. 결 과

1. 생체 내의 Cu 축적

1-1. Hepatopacreas 내의 생체 축적

Cu에 노출시킨 전복의 hepatopacreas 내의 축적량은 Fig. 1에 나타내었다. 유의적인 증가는 기간에 상관없이 $40\mu\text{g/L}$ 농도구간에서 나타났으며, 4주째에 축적량이 조금 더 증가하였다.



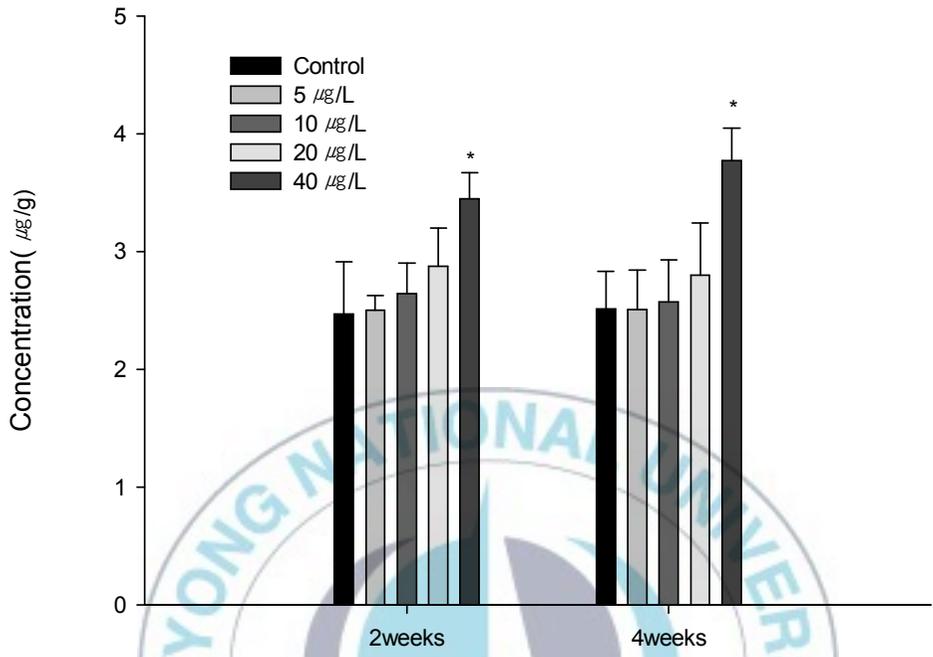


Fig. 1. Mean Cu concentration in a hepatopancreas of abalone, *Haliotis discus hannai* exposed to 5, 10, 20, 40µg/L Cu for 4 weeks. Vertical bar presented standard error (Mean±S.E., N=7). (* indicates significant difference from control value, P<0.05 as determined with Duncan post hoc test.)

1-2. Muscle 내의 생체 축적

Cu에 노출시킨 전복의 muscle 내의 축적량은 Fig. 2에 나타내었다. 모든 실험구간에서 기간 및 농도에 대한 유의적인 변화는 관찰되지 않았다. 하지만 $40\mu\text{g/L}$ 구간에서의 축적량의 증가 경향이 나타났다.



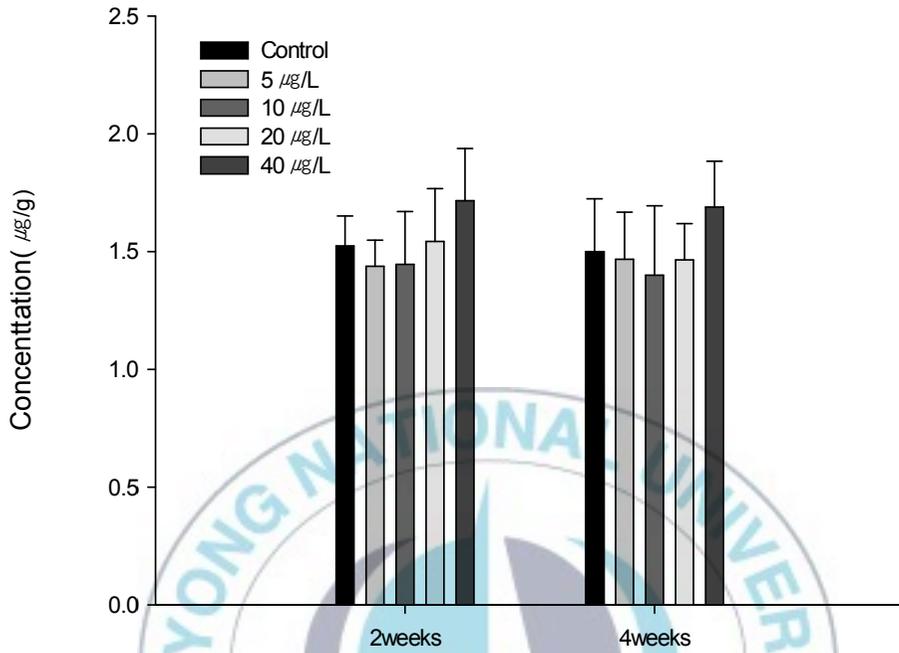


Fig. 2. Mean Cu concentration in a muscle of abalone, *Haliotis discus hannai* exposed to 5, 10, 20, 40µg/L Cu for 4 weeks. Vertical bar presented standard error (Mean±S.E., N=7). (P<0.05 as determined with Duncan post hoc test.)

1-3. Gill 내의 생체 축적

Cu에 노출시킨 전복의 gill 내의 축적은 Fig. 3에 나타내었다. 노출 기간에 따른 차이는 나타나지 않았으나, 노출 농도에 따른 축적량의 차이가 관찰되었다. Cu 20 μ g/L 이상에서 유의한 축적량의 증가는 Fig. 1의 간췌장 축적량과 유사한 형태를 나타내었다.



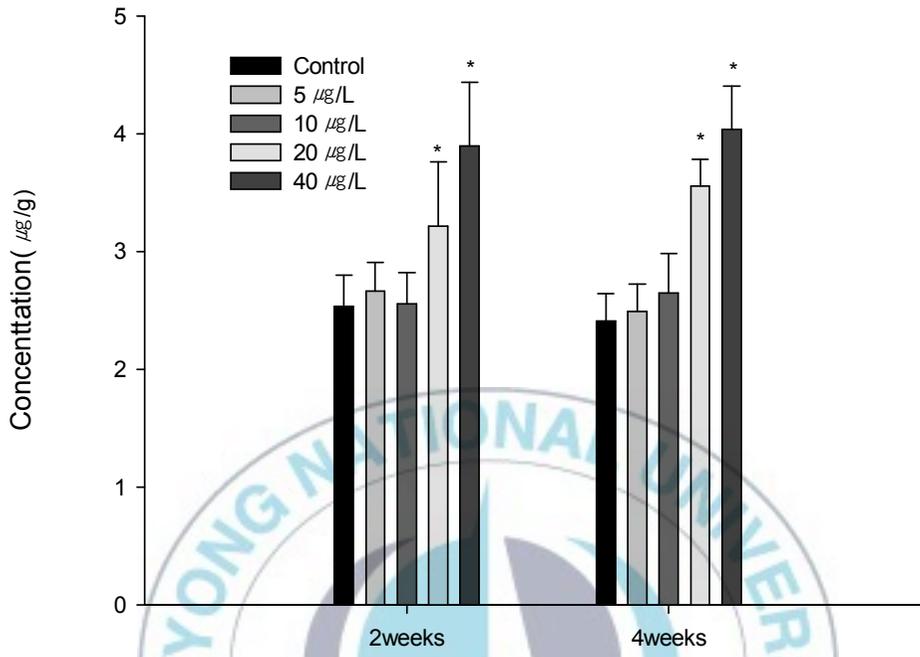


Fig. 3. Mean Cu concentration in a gill of abalone, *Haliotis discus hannai* exposed to 5, 10, 20, 40µg/L Cu for 4 weeks. Vertical bar presented standard error (Mean±S.E., N=7). (* indicates significant difference from control value, P<0.05 as determined with Duncan post hoc test.)

2. 성장률의 변화

2-1. WGR 분석

Cu에 노출시킨 전복의 WER(Weight gain ratio) 변화는 Table 2.에 나타내었다. WER은 노출 4주 후 최고 농도인 $40\mu\text{g/L}$ 에서 유의적인 감소를 보였다. 다른 노출구간에서는 유의성은 보여주지 않았으나, $20\mu\text{g/L}$ 이상의 구간에서 2주부터 감소추세를 나타내었다. $20\mu\text{g/L}$ 이하의 저농도 구간에서는 대조구와 비교하여 기간과 농도에 따른 뚜렷한 경향이 발견되지 않았다.



Table 2. WER in abalone, *Haliotis discus hannai* exposed to Cu for 4 weeks (Mean±S.E., n=7).

Concentration ($\mu\text{g/L}$)	Initial weight(g)	Weight (g)		WGR (%)	
		2weeks	4weeks	2weeks	4weeks
Control	14.71±0.23	15.84±0.22	16.53±0.33	7.68±0.04	11.49±0.12
5	14.80±0.13	15.95±0.07	16.62±0.32	7.77±0.10	11.41±0.12
10	15.05±0.26	16.21±0.31	16.89±0.13	7.71±0.11	11.35±0.25
20	14.26±0.11	15.35±0.21	16.04±0.16	7.64± 0.14	11.30±0.18
40	14.84±0.09	15.94±0.14	16.50±0.18	7.41± 0.10	10.41±0.20*

* indicates significant difference from control (P<0.05)



2-2. DISL 분석

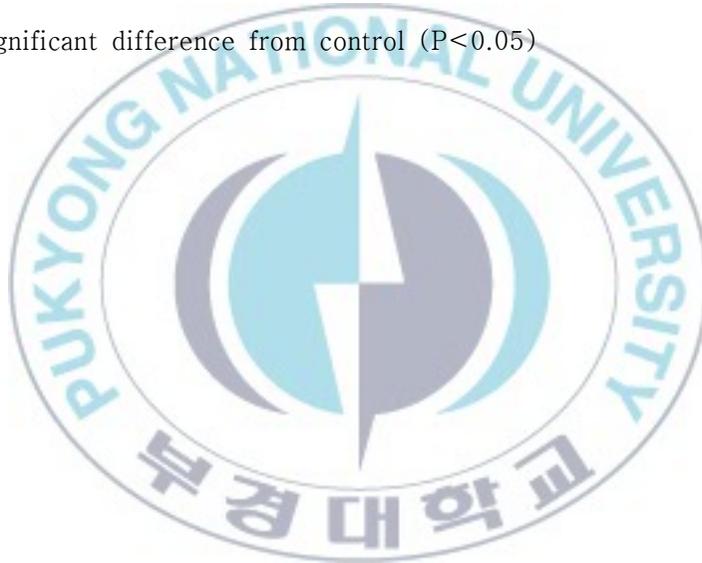
Cu에 노출시킨 전복의 DISL(Daily increment in shell length)의 변화는 Table 3.에 나타내었다. $20\mu\text{g/L}$ 노출구간에서는 4주 후부터 유의적인 감소가 나타나기 시작하며, $40\mu\text{g/L}$ 에서는 노출 2주 후부터 유의적인 감소가 나타났다. 전반적인 경향은 WER과 유사하게 $20\mu\text{g/L}$ 이상의 농도에서 감소추세를 보여주었으며, 그 이하의 농도에서는 뚜렷한 경향이 발견되지 않았다.



Table 3. DISL in abalone, *Haliotis discus hannai* exposed to Cu for 4 weeks (Mean±S.E., n=7).

Concentration ($\mu\text{g/L}$)	Initial shell length(mm)	Shell length (mm)		DISL ($\mu\text{m d}^{-1}$)	
		2weeks	4weeks	2weeks	4weeks
Control	50.03±0.077	50.94±0.21	51.50±0.44	65.00±1.21	52.50±1.11
5	50.17±0.81	51.05±0.61	51.66±0.51	62.86±0.88	53.21±1.31
10	51.33±0.48	52.23±0.52	52.76±0.36	64.29±0.79	51.07±0.79
20	50.22±0.49	51.11±0.31	51.54±0.41	63.57±1.02	47.14±0.92*
40	50.10±0.79	50.89±0.39	51.41±0.71	56.43±1.33*	46.79±0.81*

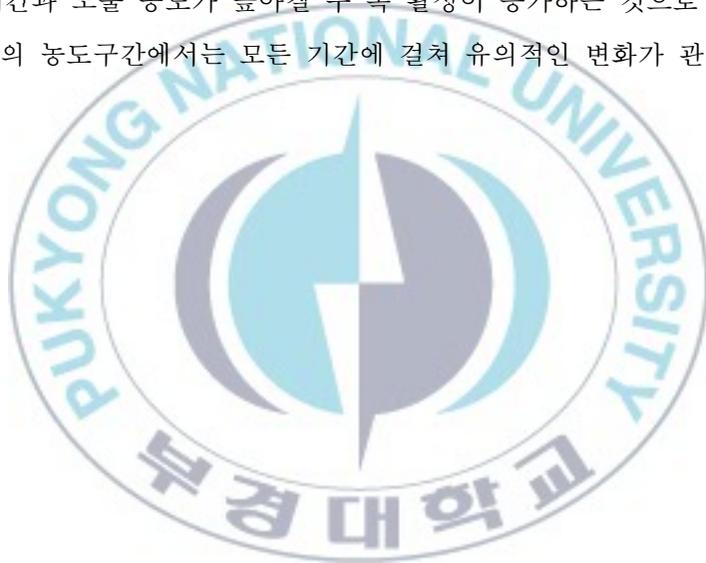
* indicates significant difference from control (P<0.05)



3. Hepatopancreas 생화학 분석

3-1. Superoxide Dismutase(SOD)

Cu에 노출된 전복의 조직 내에서 이물질의 해독과정 중 free radical을 제거하는 주요한 효소인 superoxide dismutase(SOD) 활성변화는 Fig. 4에 나타내었다. $20\mu\text{g/L}$ 이상의 농도에서 노출 2주후부터 급격한 활성 증가를 보이기 시작하였으며, 노출 4주후 최고 농도인 $40\mu\text{g/L}$ 에서 최대 활성을 나타내었다. 유의적인 변화는 2주후 $20\mu\text{g/L}$ 에서 시작되었으며, 노출기간과 노출 농도가 높아질수록 활성이 증가하는 것으로 나타났다. 하지만 $10\mu\text{g/L}$ 이하의 농도구간에서는 모든 기간에 걸쳐 유의적인 변화가 관찰되지 않았다.



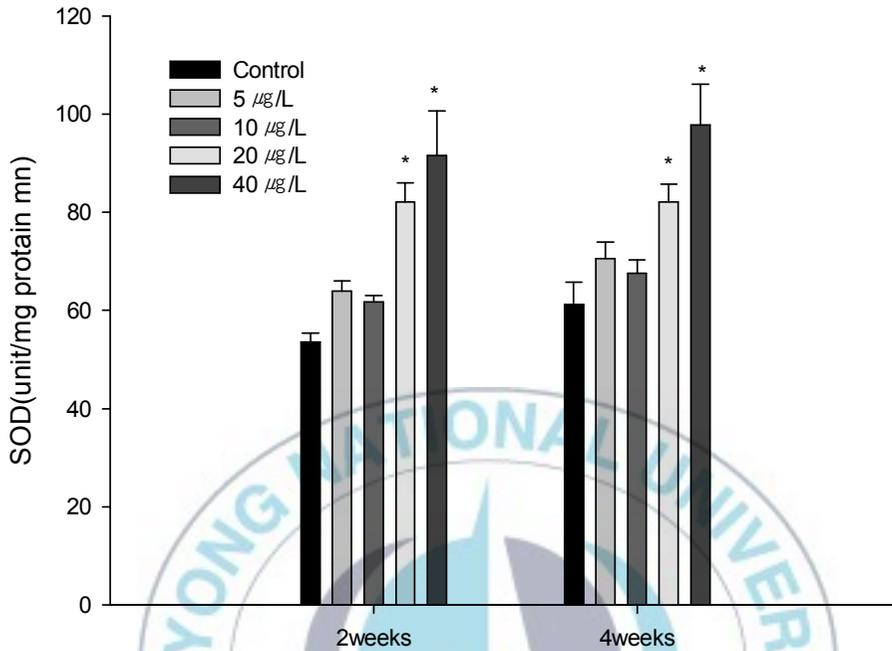


Fig. 4. Changes of SOD in hepatopancreas of abalone, *Haliotis discus hannai* exposed to 5, 10, 20, 40µg/L Cu for 4 weeks. Vertical bar presented standard error (Mean±S.E., N=7, * indicates significant difference from control value, P<0.05 as determined with Duncan post hoc test.)

3-2. Catalase(CAT)

Cu에 노출된 전복의 조직 내에서 이물질의 해독과정 중 free radical을 보다 안정된 물질로 환원시키는 물질로서 과산화수소를 산소분자와 물 분자로 분해하여 독성을 제거하는 역할을 하는 Catalase(CAT)의 활성변화는 Fig. 5에 나타내었다. Cu의 노출기간과 노출 농도에 따른 CAT의 상승 경향이 확인되었다. 2주째와 4주째 모두 40 μ g/L 농도 구간에서 유의적인 상승이 확인되었다.



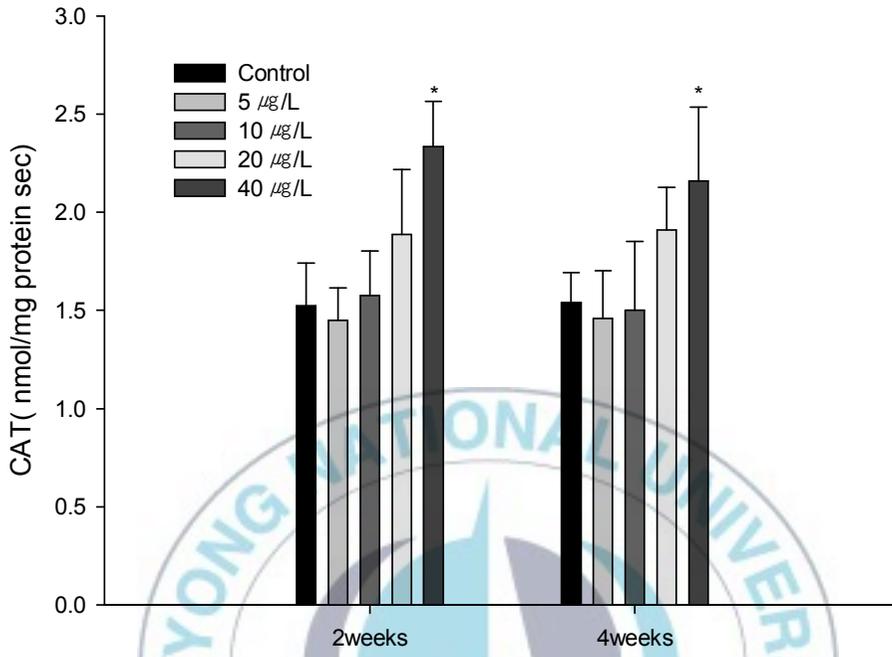


Fig. 5. Changes of CAT in hepatopancreas of abalone, *Haliotis discus hannai* exposed to 5, 10, 20, 40µg/L Cu for 4 weeks. Vertical bar presented standard error (Mean±S.E., N=7, * indicates significant difference from control value, P<0.05 as determined with Duncan post hoc test)

4. Hemolymph 생화학 분석

4-1. Phenoloxidase(PO)

Cu에 노출된 전복의 hemolymph 내 phenoloxidase(PO) 활성의 변화는 Fig. 6에 나타내었다. PO의 활성은 노출 기간에 관계없이 노출 농도가 높아질수록 감소하는 경향을 나타내었다. 농도구간 및 기간에 따른 활성의 차이에서 유의성은 인정되지 않았다.



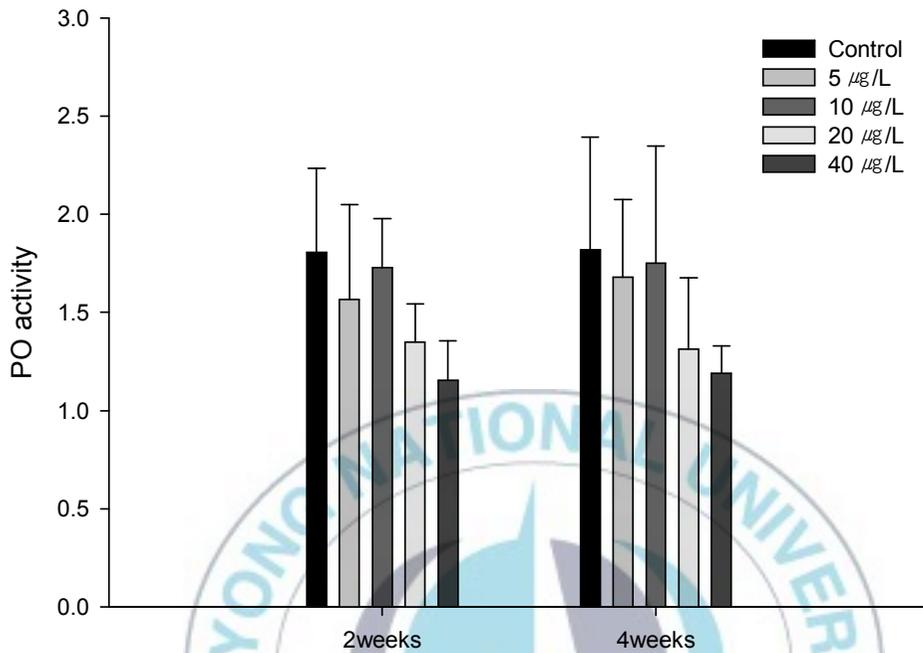


Fig. 6. Changes of PO activity in hemolymph of abalone, *Haliotis discus hannai* exposed to 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g/L}$ Cu for 4 weeks. Vertical bar presented standard error (Mean \pm S.E., N=7, P<0.05 as determined with Duncan post hoc test.)

4-2. Hemolymph 내 효소

Cu에 노출시킨 전복의 hemolymph 내 효소활성 변화를 조사한 결과는 Fig. 6, 7 및 8에서 나타내었다. Aspartate aminotransferase(AST)와 alanine aminotransferase(ALT)는 노출 4주 후, 최고농도인 40 μ g/L에서 대조구에 비해 유의한 증가를 보였다($P < 0.05$). Alkaline phosphatase(ALP)는 노출 4주 후 20, 40 μ g/L에서 대조구에 비해 유의한 증가를 보였다($P < 0.05$). 세 가지 효소 모두 가장 높은 노출 구간인 40 μ g/L에서 4주 후 유의적인 증가가 확인되었다. ALP는 유의성이 4주 후 20 μ g/L부터 나타나 세 가지 효소 중 가장 민감한 것으로 나타났다.



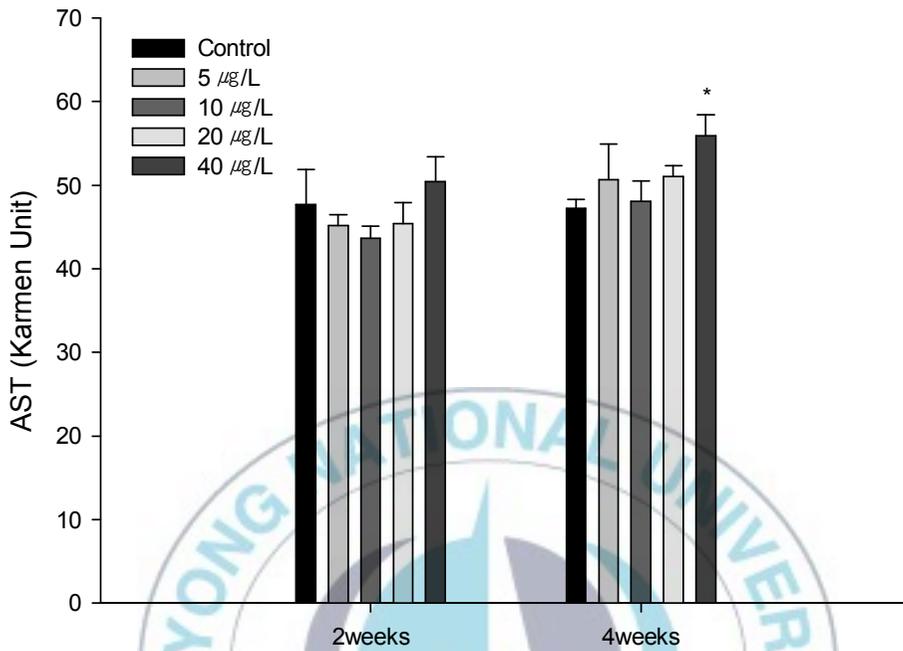


Fig. 6. Changes of AST in hemolymph of abalone, *Haliotis discus hannai* exposed to 5, 10, 20, 40 µg/L Cu for 4 weeks. Vertical bar presented standard error (Mean±S.E., N=7). (* indicates significant difference from control value, P<0.05 as determined with Duncan post hoc test.)

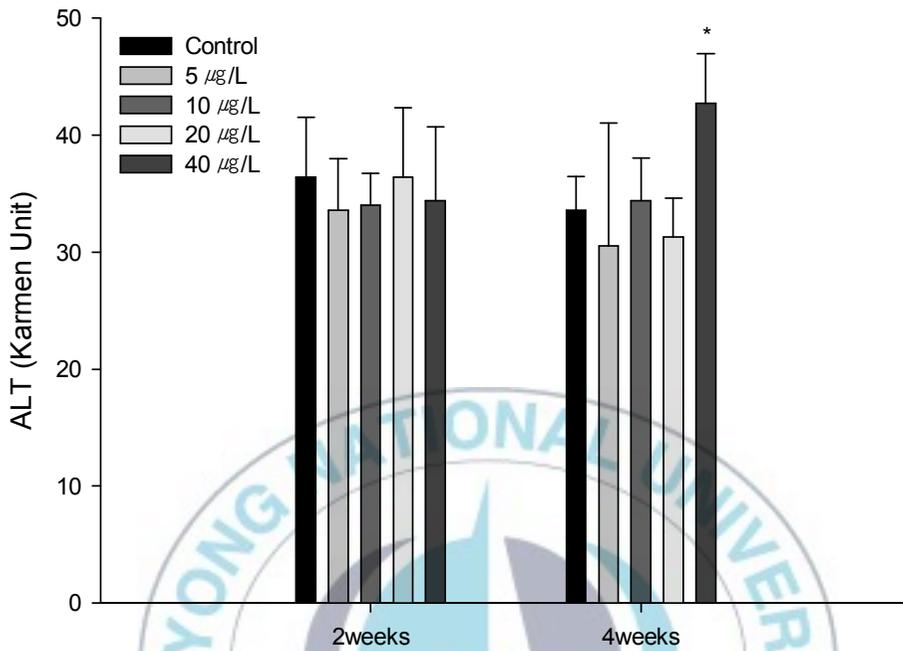


Fig. 7. Changes of ALT in hemolymph of abalone, *Haliotis discus hannai* exposed to 5, 10, 20, 40 µg/L Cu for 4 weeks. Vertical bar presented standard error (Mean±S.E., N=7). (* indicates significant difference from control value, P<0.05 as determined with Duncan post hoc test.)

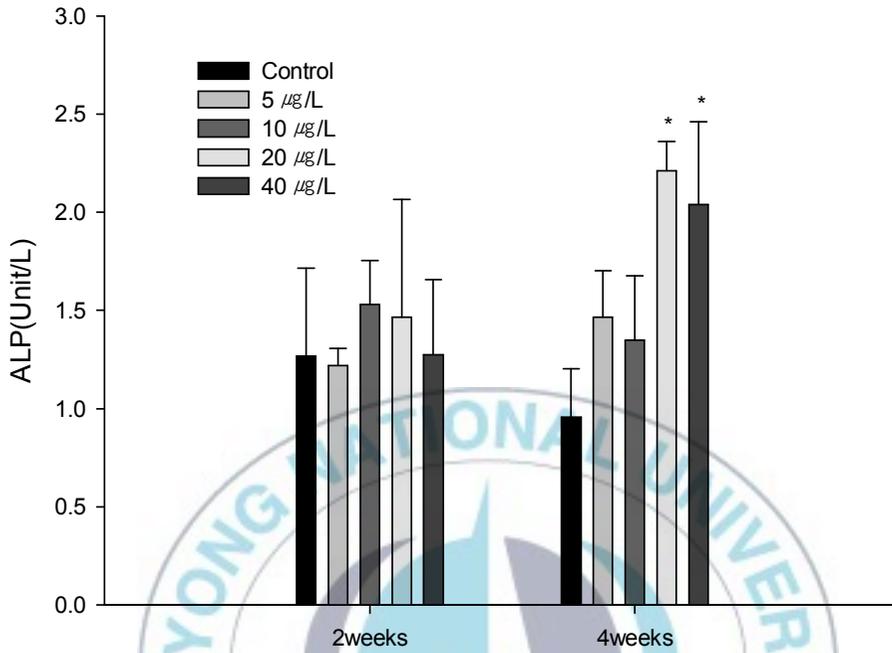


Fig. 8. Changes of ALP activity in hemolymph of abalone, *Haliotis discus hannai* exposed to 5, 10, 20, 40µg/L Cu for 4 weeks. Vertical bar presented standard error (Mean±S.E., N=7). (* indicates significant difference from control value, P<0.05 as determined with Duncan post hoc test.)

4-3. Hemolymph 내 유기성분

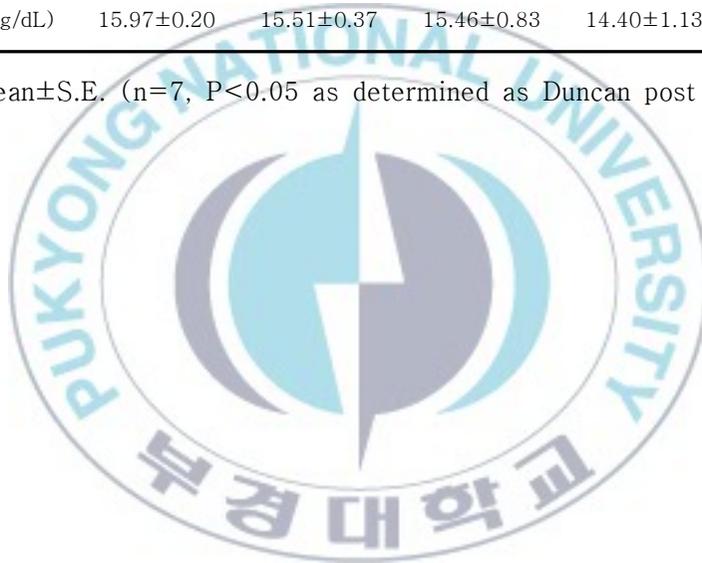
Cu에 노출시킨 전복의 hemolymph 내 유기성분은 Table 4.에 나타내었다. Hemolymph 내 유기 성분은 총단백질(TP)과 글루코즈(GL)를 조사하였다. 총단백질과 글루코즈 모두 유의적인 변화는 보이지 않았다. 하지만, 두 성분 모두 노출농도가 증가할수록 감소하는 경향이 나타났으며, 이는 노출 기간이 길어질수록 감소하는 경향이 커지는 것을 볼 수 있었다.



Table 4. Hemolymph organic chemistries. Abalone, *Haliotis discus hannai* exposed to 5, 10, 20, 40 μ g/L Cu for 4 weeks.

Periods (week)	Parameter	Groups				
		Control	Cu (μ g/L)			
			5	10	20	40
2	TP(g/dL)	0.725 \pm 0.049	0.714 \pm 0.017	0.695 \pm 0.016	0.698 \pm 0.024	0.720 \pm 0.016
	GL(g/dL)	15.08 \pm 0.73	15.40 \pm 0.97	15.42 \pm 0.64	15.59 \pm 1.01	15.40 \pm 0.32
4	TP(g/dL)	0.725 \pm 0.010	0.715 \pm 0.016	0.712 \pm 0.030	0.709 \pm 0.025	0.689 \pm 0.011
	GL(g/dL)	15.97 \pm 0.20	15.51 \pm 0.37	15.46 \pm 0.83	14.40 \pm 1.13	14.13 \pm 0.19

Values are mean \pm S.E. (n=7, P<0.05 as determined as Duncan post hoc test.)



4-4. Hemolymph 내 무기성분

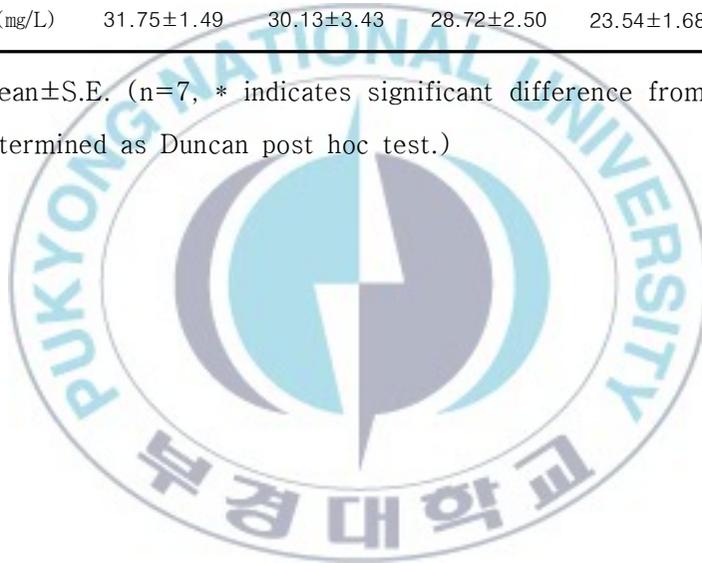
Cu에 노출시킨 전복의 hemolymph 내 무기성분은 Table 5.에 나타내었다. Hemolymph 내 무기성분은 마그네슘(Mg)과 칼슘(Ca)을 조사하였다. 마그네슘은 실험기간 중 유의한 경향이 나타나지 않았으나, 칼슘은 2주째에 20과 40 μ g/L구간에서 유의적인 감소를 나타내었으며, 이는 4주째에도 계속되었다.



Table 5. Hemolymph inorganic chemistries. Abalone, *Haliotis discus hannai* exposed to 5, 10, 20, 40 μ g/L Cu for 4 weeks.

Periods (week)	Parameter	Groups				
		Control	Cu (μ g/L)			
			5	10	20	40
2	Mg(mg/L)	5.76 \pm 0.02	5.74 \pm 0.04	5.72 \pm 0.01	5.77 \pm 0.01	5.72 \pm 0.01
	Ca(mg/L)	33.40 \pm 1.81	36.16 \pm 0.08	31.96 \pm 2.99	26.81 \pm 2.80*	27.89 \pm 3.14*
4	Mg(mg/L)	5.75 \pm 0.01	5.73 \pm 0.01	5.76 \pm 0.02	5.76 \pm 0.01	5.72 \pm 0.03
	Ca(mg/L)	31.75 \pm 1.49	30.13 \pm 3.43	28.72 \pm 2.50	23.54 \pm 1.68*	21.64 \pm 2.86b*

Values are mean \pm S.E. (n=7, * indicates significant difference from control value, P<0.05 as determined as Duncan post hoc test.)



IV. 고 찰

Cu와 같은 필수 미량 금속은 연체동물의 체내에 흡수되어 정상적인 생명활동의 유지와 생리적 반응의 항상성 유지에 이용되기도 하지만, 필요 이상의 농도에 노출될 경우 세포 내부의 구조적 이상을 유발하거나 생체 기능의 장애를 일으켜 생리적 활동에 부정적인 영향을 끼치게 된다(Kawai, 1959; Sutherland et al., 1981). 인간에 있어서는 Cu의 이상 축적에 의해서 멘케스 병과 윌슨 병 등의 신경적 이상증상이 나타나며, 노인성 치매의 주요원인인 알츠하이머 병에서도 뇌의 BBB 투과성에 영향을 일으키는 것으로 밝혀졌다(Strausak et al., 2001). 어류의 경우 Fe이 미량원소로서 영양학적인 측면에서 중요성이 인정되지만 과다할 경우 독성 작용이 있음이 보고되었다(Kang et al., 2001). Zn은 Cd와 함께 노출된 경우 잉어(*C. carpio*)에서 Cd의 독성을 억제하는 역할이 관찰되었으나(K. van. et al. 2007) 과다할 경우 열대어에서 급성 독성이 나타났다(Gomez, 1998). Cu의 경우에도 역시 필수 미량 금속으로서 인간과 동물 모두에 필요하다(Davis and Mertz, 1987; Lall, 2002). 어류에 있어서는 무지개 송어와 잉어(Ogino and Yang, 1980), 차빌메기(Gatlin and Wilson, 1986)와 틸라피아(Shiau and Ning, 2003) 등에 관한 Cu 섭취와 성장사이의 관계를 연구한 바가 있다. Cu의 노출에 따른 어류에서의 성장 감소 및 산화적 스트레스는 무지개 송어(Niyogi et al., 2006)와 잉어(Gert Flik et al., 2002)등에서 보고되었다. Cu에 의한 신경생화학적 영향에 의해 비정상적인 어류 행동연구가 송사리를 대상으로 연구되기도 하였다(Shin et al., 2003). 전복에서 보고된 각종 중금속에 의한 성장의 저해는 카드뮴, 구리, 납, 망간 및 아연에 공통적으로 발생되는 현상이었다(Tacaomi arai et al., 2002).

어류에서 중금속의 축적은 노출기간과 노출농도에 의해 영향을 받으며, 온도, 염분, 해수의 화학적 특징, 어류의 연령이나 대사율 등 여러 가지 요소에 의해 변하게 된다(Pagenkopf, 1983). 해양 무척추 동물 역시 다양한 요인에 의해 중금속 축적이 이루어지며 이는 어류와 마찬가지로 노출기간 및 농도에 큰 영향을 받게 된다(Wen-Xiong Wang, 1999; Jacqueline et al., 2010). Cu이 축적이 발생하는 green mussle에서의 농도

는 $30\mu\text{g/L}$ 에서 조직에 변화가 발생했으며(Chan, 1988), baltic clams (*Macoma balthica*)에서는 $30\sim 40\mu\text{g/L}$, 13일 동안의 변화에서 체내 축적이 나타났다(Ballan-Dufrancais et al., 2001). 이번 연구에서도 간췌장과 아가미에서 유의적인 축적량의 증가가 확인되었으며, 특히 아가미에서는 2주, $20\mu\text{g/L}$ 부터 축적의 증가가 시작되었다. 근육에서는 뚜렷한 경향이 나타나지는 않았다. 이는 근육이 중금속의 축적과는 연관이 없는 기관으로 분류되며, 적절한 농도의 Cu가 유지되는 것을 알 수 있었다. 간췌장과 아가미에서 보이는 축적량의 증가는 pearl oyster를 이용한 Cu 노출 실험의 결과와 유사했다(Gu jing et al., 2006). $0.05\mu\text{M}$ 의 저농도에서는 소화선에서 가장 유의성이 크게 나타났으나, $0.5\mu\text{M}$ 의 고농도에서는 아가미에서 가장 유의성이 높게 나타났다. 생체 기관 중 해수와 직접적으로 연결되는 아가미의 이온 교환 기능이 유의적인 축적량 증가를 가져온다고 사료된다(Rajalakshmi, S. et al., 2005). 본 연구에서는 노출 기간에 따른 차이를 살펴본 WER(증중량, %)을 대조구와 비교하였을 때 Cu $40\mu\text{g/L}$ 의 구간에서 4주 후에 유의한 감소가 발생하였다. 2주 동안의 기간에는 변화가 없었으나, 4주후부터는 고농도로 진행될 수록 성장률의 감소가 나타났다. 이는 Cu의 독성 영향이 시작되면서 다양한 형태의 체내 방어기작이 작동됨으로 인해, 에너지의 소비가 증가하였기 때문으로 판단된다. 또한 각장의 증가를 살펴본 DISL(일일성장률, $\mu\text{m d}^{-1}$)에서는 2주후 Cu $20\mu\text{g/L}$ 시험구에서부터 성장률의 감소가 유의적으로 발생하였다. Cu의 노출 농도가 높을수록 성장에 있어서의 저해가 발생함이 나타났으며, hemolymph내의 Ca 농도 저하와 비교하여 볼 경우, 패각의 주요 구성 물질인 Ca이 Cu와의 교환 작용으로 인해 결핍되는 것을 알 수 있었다.

척추동물이 가지는 간의 기능을 하는 것으로 알려진 무척추동물의 간췌장은 다양한 효소작용의 근원이 된다(George H. Fried et al., 1973). 다양한 원인에 의해 발생하는 활성산소는 노화의 원인이기도 하며, 과다할 경우 조직의 생리적 반응을 저해함이 나타난다(Goldberg and Stern, 1977; Simon et al., 1981; Moody and Hassan, 1982). 과다한 Cu 스트레스로 인해 발생된 활성산소는 SOD에 의해 과산화수소로 변환되어 해독화가 진행된다(Nebot et al., 1993). Cu에 노출시킨 담치(*M. edulis*)에서는 0.02ppm 과 0.2ppm 사이의 농도에서 O_2^- 가 증가함이 관찰되었다(Pipe, 1999). 전복의 SOD는 수온 자극과 같은 외부 스트레스에 의해서도 급격한 활성의 증가를 나타낸다(Kim et al. 2005). 본

실험에서는 2주 20 $\mu\text{g/L}$ 에서부터 유의적인 SOD의 활성증가가 관찰되었다. 이러한 양상은 4주차에도 계속 이어지고 있으며 노출 농도가 10 $\mu\text{g/L}$ 이하에서는 대조구와 비교하여 변화가 없었다. 이는 Cu 노출에 의한 조직 손상을 최소화 하려는 전복의 방어행동에 의해 진행되는 생리작용으로 추정된다.

SOD와 더불어 항산화작용의 하는 효소의 하나인 CAT의 활성은 SOD에 의해 전환된 과산화수소(H_2O_2)를 다시 산소(O_2)와 물(H_2O)로 전환시킨다(Forman and Fridovich, 1973). 본 실험에서 역시 SOD의 활성이 증가하면서 발생된 과산화수소를 CAT가 분해하는 모습을 보여주고 있다. SOD의 활성 이후에 천천히 CAT의 활성이 증가하고 있으며 Cu 20 $\mu\text{g/L}$ 이상 2주째부터 유의성은 없으나 증가폭이 커짐을 확인할 수 있었다. 이는 SOD에서 CAT로 이어지는 단계적인 산화적 스트레스의 저하 시스템을 가정할 수 있다.

무척추동물의 개방혈관계에서는 선천성 면역체계가 주요하며, pro-phenoloxidase를 매개로 하는 멜라닌 자극계는 방어 수단으로 역할을 수행한다. Hemolymph 내에서 합성된 pro-phenoloxidase는 체내의 세균이나 기생충과 같은 미생물 인자나 기타 이물질에 의해 phenoloxidase로 활성화된다. 방어 작용을 담당하는 phenoloxidase는 금속이나 유기용매에 의해 감소한다고 알려져 있다. Cu, 아연, 칼슘과 같은 2가 양이온을 형성하는 금속은 바지락 내의 shlpur기와 결합하여 phenoloxidase의 활성을 저해시키며 (Rishan et al., 2005), 새우류에 48시간동안 Cu를 0.1~0.4ppm으로 노출시켰을 경우 phenoloxidase의 유의적 감소가 발생한다고 한다(Cheng and Wang, 2001). 이번 실험에서도 Cu에 의한 phenoloxidase의 활성 저해가 노출 농도에 반비례하여 감소하는 것으로 나타났다. 유의적인 감소치는 나타나지 않았지만 감소의 경향에서 Cu의 영향임을 확인할 수 있었다.

어류에 있어서의 혈액학적 지표들은 다양한 스트레스에 대해 반응함이 알려져 있다 (Jee et al., 2004). 혈청 중의 AST와 ALT는 사람을 포함한 모든 척추동물뿐만 아니라, 갑각류와 연체동물에 이르기까지 모든 생물에서 검출된다. AST와 ALT는 해당계 효소를 이루는 필수아미노산과 탄수화물 대사에도 중요한 역할을 한다. 평상시에는 혈중에 미량이 존재하고 있으나, 간이나 췌장 등 장기의 조직적 손상이나 이상발생시 혈중으로의 유리량이 증가하는 것으로 알려져 있다(Blasco et al., 1999). 이러한 이유로 생체

내의 병변 정도를 암시하는 좋은 지표로 사용되고 있다(Urooj Ahmed et al., 2001). 이번 연구에서도 AST와 ALT는 노출 4주 후 최고농도인 40 μ g/L에서 대조구와 비교하여 유의적인 증가 값을 나타내었다. 이는 Blasco(1999)의 연구에서 보인 바지락(*R. philippinarum*)의 카드뮴 및 Cu 노출 실험과 유사한 활성증가를 보여준다. 이러한 결과는 아치사 농도의 중금속에 오염된 생물의 스트레스를 반응을 확인하는데 혈액 및 hemolymph를 이용한 AST와 ALT의 측정이 효과적임을 알 수 있다.

ALP는 금속이온에 민감하게 반응하여 금속 중독의 척도로 이용되고 있다(Bogé et al., 1988). 이번 실험에서도 Cu와 반응한 ALP의 수치증가가 확인되었다. Cu 20 μ g/L 농도 이상에서 4주째에 유의적인 증가가 확인되었으며, 이는 앞의 두 효소와 마찬가지로 Cu의 영향에 대한 생체의 방어 기작으로 생각된다.

Hemolymph 내의 유기성분인 총단백질(TP)과 글루코즈(GL)는 일반적으로 대사 과정에서 필수적인 요소로서 스트레스에 의한 체내의 방어 작용에서 사용되어 지기도 한다 (Abdel-Moati, 1992). 이번 연구에서는 대조구와 비교하여 유의적인 변화는 관찰되지 않았지만, 고농도의 노출구로 갈수록 약간의 감소치가 발생됨을 확인했다. 이는 다양한 방어 작용을 일으키는 과정에서 발생한 총단백질 및 글루코즈의 소모로 인한 것이라 사료된다. 독성물질이 체내에 유입 시 제거를 위해서는 많은 에너지를 쓰게 되며, 중요한 에너지원인 탄수화물의 대사와 관련이 깊은 글루코즈가 감소함을 알 수 있다.

Hemolymph 내의 무기성분인 마그네슘(Mg)에서는 모든 실험구간에서 유의적인 변화가 관찰되지 않았으며, 칼슘(Ca)에서는 20 μ g/L의 농도에서부터 유의적인 감소가 나타났다. 이는 다량의 Cu가 체내에 들어옴으로 인하여 칼슘대사가 저해된 것으로 판단된다. 일반적으로 중금속에 노출된 어류에서 상피세포의 막 투과성 변화 및 장관의 흡수 장애로 인한 칼슘 농도의 감소가 보고되었다(Jiro and Yasuo, 1977).

이상의 결과와 논의로부터 Cu의 해수 중 노출량이 해수역 수질 기준인 20 μ g/L 이상 일 때 전복의 생리 및 생화학적인 측면에서 영향을 받는 것으로 판단된다. 과도한 Cu의 노출에서 성장률의 저하, hemolymph 내의 다양한 물질 변화 및 조직 내의 Cu 농축 등이 관찰되었다. 따라서 현재의 해수 중 농도 기준인 Cu 20 μ g/L 이상에서 노출 기간이 길어짐에 따라 전복의 생리화학적 변화가 동반되며, 이를 바탕으로 수질 기준 측정시

에 전복의 생태변화 역시 고려되어야 할 사항이라고 사료된다.



V. 요약

사육수에 노출을 통한 Cu가 전복 *Haliotis discus hannai* 의 기관별 축적 및 생화학적 성장의 변화에 미치는 영향을 조사하기 위해 0 (대조구), 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g/L}$ 농도에 4주간 노출하였다.

실험 기간 중의 조직별 축적에서는 간췌장에서는 노출 기간과 상관없이 40 $\mu\text{g/L}$ 구간에서 유의적인 증가가 확인되었으며, 근육에서는 명확한 경향이 관찰되지 않았다. 아가미에서는 조직 중 가장 영향을 많이 받은 것으로 나타났다. 노출 기간에 상관없이 20 $\mu\text{g/L}$ 이상 구간에서 유의적인 축적량의 증가를 나타내었다.

실험 기간 동안 성장률을 알아본 WER(%)에서는 노출 4주째 40 $\mu\text{g/L}$ 구간에서 유의적인 감소가 나타났으며, DISL($\mu\text{m d}^{-1}$)에서는 2주째 40 $\mu\text{g/L}$ 과 4주째 20 $\mu\text{g/L}$ 이상에서 유의적으로 감소하였다.

간췌장에서 알아본 superoxide dismutase(SOD)는 노출 기간과 관계없이 20 $\mu\text{g/L}$ 이상 농도에서 유의적인 증가가 나타났으며, catalase(CAT)는 40 $\mu\text{g/L}$ 농도에서 유의적 증가가 확인되었다.

체액성 면역을 알아보기 위한 hemolymph 내의 phenoloxidase(PO) 활성은 노출 기간과 상관없이 Cu 농도가 증가 할수록 감소하는 경향이 나타났으며, 유의적이지는 않았다. Aspartate aminotransferase(AST)와 alanine aminotransferase(ALT)는 노출 4주 후, 최고농도인 40 $\mu\text{g/L}$ 에서 대조구에 비해 유의한 증가를 보였다. 하지만 Alkaline phosphatase(ALP)는 노출 4주 후 20, 40 $\mu\text{g/L}$ 에서 대조구에 비해 유의한 증가를 보였다. hemolymph 내의 유기 성분인 total protein(TP)과 glucose(GL)는 실험기간동안 유의적인 증가 및 감소가 발견되지 않았다. 무기성분인 마그네슘(Mg)은 실험기간 중 유의한 경향이 나타나지 않았으나, 칼슘(Ca)은 2주째에 20과 40 $\mu\text{g/L}$ 구간에서 유의적인 감소를 나타내었으며, 이는 4주째에도 계속되었다.

VI. 감사의 글

태양과 바람과 물이 생명을 자라게 하고 열매를 맺게 합니다. 어느 하나만 부족하여도 그 결실을 볼 수 없는 세상이기에 모든 것에 감사하는 삶을 살아야 한다고 생각이 듭니다. 나무를 자라게 하듯, 그리고 그 열매를 맺을 수 있도록 지금까지 부족한 저를 위해 애써주신 많은 분들께 작은 성과로나마 이 논문을 보여드릴 수 있어 진심으로 감사드립니다.

뒤늦게 다시 찾아온 저를 학문적 뒷받침과 인생에 있어서의 조언으로 이끌어주신 지도교수님인 강주찬 교수님께 우선 첫 감사의 말을 드립니다. 그리고 학문과 학과에 바쁘신 와중에서 논문의 지도과 부족한 점을 살펴주셨던 허민도 교수님과 정준기 교수님께 진심어린 감사를 드립니다. 언제나 수산생명의학과와 학생들을 위해 애써 주시는 박수일 교수님, 정현도 교수님 그리고 김기홍 교수님께도 진심어린 감사를 보냅니다.

대학교 2학년 때부터 이어온 수권환경학 실험실과의 인연이 지금은 참으로 고맙고 기쁩니다. 지치고 힘든 시절도 있었지만, 모두의 힘으로 슬기롭게 헤쳐온 시간이 있었기에 지면으로나마 감사의 마음을 전합니다. 지금은 실험실 밖의 더 큰 세상에서 열심히 지내고 계신 많은 선배님들이 생각납니다. 제가 가진 마음의 빛이 너무 많기에 선배님들 한분 한분의 이름을 다 적지는 못하지만 마음만 알아주셨으면 합니다. 지금은 학교에서 거의 볼 수 없지만, 저와 함께 수업을 듣고 캠퍼스의 추억을 함께한 99동기들에게도 감사의 마음을 전합니다. 부족한 저를 선배로서 믿고 따라준 실험실 후배들에게도 진심으로 고맙다는 말을 하고 싶습니다.

지금까지 제가 성장해오면서 늘 저를 믿어주시고 격려해 마지 않으셨던 가족들, 할머니, 부모님, 누나, 매형, 이쁜 조카들, 삼촌, 숙모, 지형이의 모습이 생각납니다. 그리고 민정이와의 결혼으로 행복한 가정을 허락해 주신 장인장모님께 감사의 말을 드립니다.

실험실에서의 모습과 가족 안에서의 모습 이외에 저와 관계된 가장 많은 것들을 알고 있는 나의 친구들에게도 감사의 마음을 전합니다. 즐거운 추억과 아쉬움을 늘 함께 해왔던 이들이기에 지금 이 순간에도 생각이 나나 봅니다. 차례로 이름을 나열하면 나오는 순서에 마음 상할 녀석들이기에 늘 함께여서 즐거웠다고 모두에게 말하고 싶습니다.

마지막으로, 가장 많은 부분에서 저에게 긍정적인 영향을 미치는 사람에게 말을 전합니다. 늘 제 옆에서 사랑의 힘이 되어준 아내에게 최선을 결과를 위해 노력하는 모습을 약속하며 감사의 말을 전하고 싶습니다. 감사합니다.

VII. 참고문헌

- Abdel-Moati M. (1992). Biochemical and physiological responses of *Mytilus edulis* to Hg and Pb in the coastal waters of Alexandria region. Proceeding of the FAD-UNEP-IOC workshop on biological effects of pollutants in marine organisms. Athens, Greece. 69, 61-62.
- APHA-AWWA-WEF. (1992). Standard methods for the examination of water and wastewater. 18th. Ed., APHA, Washington, D. C.
- Ashida M, Soderhall K. The prophenoloxidase activating system in crayfish. *Comp Biochem Physiol* (1984). 77 B:21-6
- Ballan C., Dufrancais, A.Y. Jeantet, A. Geffard, J.C. Amiard and C. Amiard-Triquet, (2001) Cellular and tissular distribution of copper in an intrasedimentary bivalve, the Baltic clam *Macoma balthica*, originating from a clean or a metal-rich site, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 58, 1964-1974.
- Barry Halliwell, John M. C. Gutteridge (1995). The definition and measurement of antioxidants in biological systems *Free Radical Biology and Medicine*, Volume 18, Issue 1, January 125-126.
- Bogé G. , D. Bussiere, G. Pérès, (1988). Effets du chrome hexavalent sur les fonctions de la bordure en brosse de l'intestin de la truite arc en ciel (*Salmo gairdneri* R.) *Water Research*, Volume 22, Issue 4, April 441-447
- Blasco J. and J. Puppo, (1999). Effect of heavy metals (Cu, Cd and Pb) on aspartate and alanine aminotransferase in *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia) *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, Volume 122, Issue 2, 253-263.
- Bryan, G. W. (1976). Heavy metal contamination in the sea. In *Marine Pollution*, R. Johnston, eds., Academic Press, New York, pp 185-302.
- Chance, B., H. Sice and A. Boveris, (1979). Hydroperoxide metabolism in mamamalian

- organs. *Physiol. Rev.*, 59, 527–605.
- Chan H.M., (1988) Accumulation and tolerance to cadmium, copper, lead and zinc by the green mussel *Perna viridis*, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 48, 295–303.
- Cheng T. C. 1981 Bivalves. In *invertebrate Blood cell* (N. A. Ratcliffe and A. F. Rowley, eds). 233–300. London; Academic Press.
- Cheng W. and C. H. Wang. (2001). The susceptibility of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* to *Lactococcus parvieae* and its resistance under copper sulfate stress. *Dis Aquat Organ.* 47, 137–144.
- Clark R. B., (1992). V. Metal. In *Marine pollution*, Oxford university press, New York. pp 74–77.
- Diagnostic value of AST, ALT, amylase, and lipase in differentiating gallstones from alcohol induced pancreatitis
- Daisuke Goto, William G. Wallace (2010). Relative importance of multiple environmental variables in structuring benthic macroinfaunal assemblages in chronically metal-polluted salt marshes *Marine Pollution Bulletin*, Volume 60, Issue 3, March 363–375.
- Davis, K.G., Mertz, W., (1987). Copper. In: Mertz, W. (Ed.), *Trace Elements in Human and Animals Nutrition*. Academic Press, New York, pp. 301.364.
- Diagnostic value of AST, ALT, amylase, and lipase in differentiating gallstones from alcohol induced pancreatitis
- Exon J. H. and Koller L. D. (1986). Immunotoxicity fo cadmium: *In hand book of experimental pharmacology. Cadmium* (E. C. Foulkes, ed). Berlin Heidelberg, Springer-Verlag. 339–350.
- Fernandes JC and Henriques FS. (1991). Biochemical, physiological and structural effects of excess copper in plants, *Botany Rev* 57: 246–273.
- Flik, G., X.J.H.X. stouthart, S. Khan and H.C. Bailey, (1999). The effect of copper on

- blood and biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 36, 415–423.
- Forman, H.J. and I. Fridovich, (1973). Superoxide dismutase: A comparison of rate constant. Arch. Biochem. Biophys., 158, 396.
- Gatlin III, D.M., Wilson, R.P., (1986). Dietary copper requirement of fingerling channel catfish. Aquaculture 54, 277-285.
- George H. Fried, Norman L. Levin, (1973). Enzymatic activity in hepatopancreas of *Nassarius obsoletus*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, Volume 45, Issue 1, 15 May 153–157
- Geret F. and M. J. Bebianno. (2004). Does Zinc produce reactive oxygen species in *Ruditapes decussatus*. Ecotoxicol. Safe. 57: 399–409
- Gert Flik, Xander J. H. X. Stouthart, F. A. Tom Spanings, Robert A. C. Lock, James C. Fenwick, Sjoerd E. Wendelaar Bonga, (2002). Stress response to waterborne Cu during early life stages of carp, *Cyprinus carpio* Aquatic Toxicology, Volume 56, Issue 3, February, 167–176
- 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.
- Gomez S., Villar C., Bonetto C., (1998) Zinc toxicity in the fish *Cnesterodon decemmaculatus* in the Paraná River and Río de La Plata Estuary. Environmental Pollution 99, 159–165.
- Gudrun De Boeck, Wouter Meeus, Wim De Coen and Ronny Blust, (2004). Tissue-specific Cu bioaccumulation patterns and differences in sensitivity to waterborne Cu in three freshwater fish: rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), common carp (*Cyprinus carpio*), and gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) Aquatic Toxicology Volume 70, Issue 3, 179–188.
- Gu Jing, Yu Li, Liping Xie, Rongqing Zhang (2006). Metal accumulation and enzyme

- activities in gills and digestive gland of pearl oyster (*Pinctada fucata*) exposed to copper. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, Volume 144, Issue 2, October 184–190.
- Han seock jung et al. (2003). Effect go Urea on the exfoliation of juvenile abalone, *Haliotis discus* Reeve. *J. of Aquaculture* vol.16(4):223–228
- J. Gorski and D. Nugegoda, (2006 a). Toxicity of trace metals to juvenile abalone, *Haliotis rubra* following short-term exposure. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 77:732–740
- J. Gorski and D. Nugegoda, (2006 b). Sublethal toxicity of trace metals to larvae of the Blacklip abalone, *Haliotis rubra*. *Environmental toxicology and Chemistry*, Vol. 25, 5, pp. 1360–1367
- Jacqueline A. Leea, Islay D. Marsdena and Chris N. Glover, (2010). The influence of salinity on copper accumulation and its toxic effects in estuarine animals with differing osmoregulatory strategies. *Aquatic Toxicology*, Available online 13 April.
- Ji.Hoe Kim, Jong.Soo Mok† and Hee.Yeon Park. (2005). Trace Metal Contents in Seaweeds from Korean Coastal Area. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 34(7), 1041–1051.
- Jiro, K. and Yasuo, I. (1977). Effects of oral administration of cadmuim on fish: I. Analutical results of the blood and bones. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 43(5):523–526.
- Jonathan Blancharda, Kevin Brixa and Martin Grosella, (2009). Subcellular fractionation of Cu exposed oysters, *Crassostrea virginica*, and Cu accumulation from a biologically incorporated Cu rich oyster diet in *Fundulus heteroclitus* in fresh and sea water. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* Volume 149, Issue 4, May 531–537.
- Jung-Hoon Jee, Seong-Gil Kim, Ju-Chan Kangl, (2004). Effects of phenanthrene on growth and basic physiological functions of the olive flounder, *Paralichthys*

- olivaceus Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, Volume 304, Issue 1, 16 June 123–136.
- K. Van Campenhout, L. Bervoets, R. Blust, (2007). Assimilation efficiencies of Cd and Zn in the common carp (*Cypricus carpio*): Effects of metal concentration, temperature and prey type. *Environ. Pollution* 145, 905–914.
- Kawai K., (1959). The cytochrome system in marine lamellibranch tissues. *Biol Bull* 117:125.32.
- Kang J.C., J.H. Jee and K.S. Cho. (2001). Hemochemimcal changes in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* exposed to various iron concentrations. *J. Fish Pathol.*, 14, 37–45.
- Kim seong gil and Kang ju chan. (2004). Effect of dietary copper exposure on accumulation, growth and hematological parameters of the juvenile rockfish, *Sebastes schlegeli*. *Marine Environmental Research*, Volume 58, Issue 1, 65–82.
- Kim tae-hyung, Moon-Hyu Yang, Mi-Kyung Choe, Seok-Jung Han and In-Kyu Yeo, (2005). Physiological studies on acute water-temperature stress of juvenile abalone, *Haliotis discus hannai*. *J. of Aquaculture* vol. 19, 7–12.
- Lall, S.P., (2002). The minerals. In: Halver, J.E., Hardy, R.W. (Eds.), *Fish Nutrition*. Academic Press, New York, pp. 259.308.
- Lello Zolla, Lilia Calabrese and Maurizio Brunori. (1984). Distribution of copper atoms and binding of carbon monoxide in partially copper-depleted hemocyanin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Protein Structure and Molecular Enzymology*, Volume 788, Issue 2, 31 July 206–213.
- Lidon FC and Henriques FS. (1991). Limiting step on photo-synthesis of rice plants treated with varying copper levels, *J Plant Physiology* 138: 115–118.
- Lidon FC, Ramalho J and Henriques FS. (1993). Copper inhibition of rice photosynthesis, *J. Plant Physiology* 142: 12–17.

- Livingston D.R., Lemaire P., Mathews A., Peters L., Bucke D. and Law R.J., (1993). Pro-oxidant antioxidant and 7-ethoxyresorufin O-deethylase activity response in liver of dab *Limanda limanda*, exposed to sediment contaminated with hydrocarbons and other chemicals. *Mar. Pollut. Bull.*, 26, 602–606.
- Lopes P.A., Pinheiro T., M.C. Mathias, M.D.L., Collares-Pereira, M.J. and Viegas-Crespo, A.M. (2001). Response of antioxidant enzymes in freshwater fish population (*Leuciscus alburnoides* complex) to inorganic pollutants exposure., *Sci. Total Environ.*, 280, 153–163.
- Lundebye, A.K., M.H.G Berntssen, S.E. Wendelaar Bonga and A. Maage, (1999). Biochemical and physiological responses in atlantic salmon (*Salmo salar*) following dietary exposure to copper and cadmium. *Mar. Poll.*, 39, 137–144.
- Marr, J.C.A., J. Lipton, D. Cacela, J.A. Hansen, H.L. Bergman, J.S. Meyer and C. Hogstrand, (1996). Relationships between copper exposure duration, tissue copper concentration, and rainbow trout growth. *Aquat. Toxicol.*, 36, 17–30.
- M. Minghettia, M.J. Leavera, E. Carpeneb and S.G. Georgea. (2008). Copper transporter 1, metallothionein and glutathione reductase genes are differentially expressed in tissues of sea bream (*Sparus aurata*) after exposure to dietary or waterborne copper. *Toxicology & Pharmacology* Volume 147, Issue 4, 450–459.
- Martin, M. *et al.* (1977). Copper toxicity experiments in relation to abalone deaths observed in a power plant's cooling-waters. *Calif. Fish. Game*, 63(2), 95–100.
- Mcgeer, J.C., C. Szebedinszky, D.G. McDonald, and C.M. Wood, (2000). Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout. 1: Iono-regulatory disturbance and metabolic costs. *Aquat. Toxicol.* 50, 231–243.
- Moody, C. S. and H. M. Hassan, (1982). Mutagenicity of oxygen free radicals. *Proc. Natl. Acad. SCI.*, 79, 2855–2859.
- Nebot, C., Moutet, M., Huet, P., Xu, J.Z., Yadan, J.C. and Chaudiere, J. (1993).

- Spectrophotometric assay of superoxide dismutase activity based on the activated autoxidation of a tetracyclic catechol. *Anal. Biochem.*, 214, 442–451.
- Niyogi S., C.N. Kamunde, C.M. Wood, (2006). Food selection, growth and physiology in relation to dietary sodium chloride content in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under chronic waterborne Cu exposure *Aquatic Toxicology*, Volume 77, Issue 2, 1 May 210–221
- Nussey, G., J.H.J. Van Vuren and H.H. du Preez, (1995). Effect of copper on the haematology and osmoregulation of the Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae). *Comp. Biochem. Physiol.*, 111C, 369–380.
- Ogino, C., Yang, G.Y., (1980). Requirements of carp and rainbow trout for dietary manganese and copper. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 46 (4), 455-458.
- Ouzounidou G. (1994). Copper-induced changes on growth, metal content and photosynthetic functions of *Alyssum montanum* L. plants. *Environmental and Experimental Botany* 34: 165–172.
- Pagenkopf, G.K. (1983). Gill surface interaction model for trace-metal toxicity to fishes: role of complexation, pH and water hardness. *Environ. Sci. Technol.*, 17, 342–347.
- Parihar M.S., Javeri T., Hemnani T., Dubey A.K. and Parkash P. (1997). Response of superoxide dismutase, glutathion peroxidase and reduced glutathion antioxidant defenses in gills of the freshwater catfish (*Heteropneustes fossilis*) to short-term elevated temperature. *J. Therm. Biol.*, 22, 151–156.
- Pipe R. K., J. A. Coles, F. M. M. Carissan and K. Ramanathan. (1999). Copper induced immunomodulation in the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicol.* 46, 43–54.
- Rajalakshmi, S., Mohandas, A., (2005). Copper-induced changes in tissue enzyme activity in a freshwater mussel. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 62, 140-143.
- Rishan C. S. Wenjie, L. Guangxing, F Tingjun, M. xianghong, Y. Lingling and Z. Liyan.

- (2005). Purification and characterization of phenoloxidase from clam, *Ruditapes philippinarum*. *Fish Shell Immuno.* 18, 61–70.
- Roosenburg, W. J. (1969). Greening and copper accumulation in the American Oyster, *Crassostrea virginica*, in the vicinity of a steam electric generating station. *Ches. Sci.*, 10, 241–252
- Roy E. Weber, Albertus de Zwaan, Anny Bang. (1992). Interactive effects of ambient copper and anoxic, temperature and salinity stress on survival and hemolymph and muscle tissue osmotic effectors in *Mytilus edulis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, Volume 159, Issue 2, 21 August 135–156.
- Sherba, M., D.W. Dunham and H.H. Harvey, (2000). Sublethal copper toxicity and food response in the freshwater crayfish, *Cambarus bartonii* (Cambaridae, Decapoda, Crustacea). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 46, 329–333
- Shiau, S.Y., Ning, Y.C., (2003). Estimating of dietary copper requirements for juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Anim. Sci.* 77, 287–292.
- Shin sung-woo, hyun-Duk Cho, Tae-Soo Chon, Jong-Sang Kim, Sung-kyu Lee, and Sung-ceol Koh. (2003). Neurobiochemical analysis of abnormal fish behavior caused by copper toxicity. *J. environ. toxicol.* vol. 18, 145–153.
- 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.
- Strausak D, Mercer JFB, Dieter HH, Stremmel W and Multhaup G. (2001). Copper in disorders with neurological symptoms: Alzheimer's, Menckes, and Wilson disease, *Brain research bulletin* 55(2): 175–185.
- Sutherland J, Major CW. (1981). Internal heavy metal changes as a consequence of exposure of *Mytilus edulis*, the blue mussel, to elevated external copper (II) levels. *Comp Biochem Physiol* 68C:63.7.

- Takaomi Arai, Masaru Maeda, Hiroshi yamakawa Akiyoshi kamatani and Nobuyuki Miyazaki, (2002). Growth effect on the uptake and elimination of trace metals in the abalones *Haliotis*. Fisheries science 2002; 68: 1094–1098
- Urooj Ahmed, Affan Quadri, Jerry Jacobsen, Aboud Affi, (2001). The American Journal of Gastroenterology, Volume 96, Issue 9, Supplement 1, September S95–S96
- Viarengo, A., (1985). Biochemical effects of trace metals. Mar. Pollut. Bull., 16, 153–158
- Weifang wang, Kangsen Mai, Wenbing Zhang, Qinghui Ai, Chunfeng YAO, Huitao Li, Zhiguo Liufu. (2009). Effects of dierttry copper on survival, growth and immune response of juvenile abalone, *Haliotis discus hannai* Ino. Aquaculture 297, 122–127.
- Wen–Xiong Wang, Nicholas S. Fisher, (1999). Delineating metal accumulation pathways for marine invertebrates The Science of The Total Environment, Volumes 237–238, 30 September 459–472
- Wendel, A. and S. Feuerstein, (1981). Drug–induced lipid peroxidation in mice–1. Modulation by monooxygenase activity, glutathione and selenium status. Biochem Pharmacol., 30, 2513–2520.
- Winston G.W. and Di Giulio R.T. (1991). Pro–oxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organsm. Aquat. Toxicol., 19 137–161.
- Wong, P.P.K., L.M. Chu and C.K. Wong, (1999). Study of toxicity and bioaccumulation of copper in the silver sea bream Sparus sarba. Environ. Int., 25, 417–422.
- Zar J.H. (1996). Biostatistical Analysis. Prentice Hall, London, 662pp.
- 농림수산식품 주요통계, (2008). 농림수산식품부. 94–97, 417–419
- 새만금 해양호나경보전대책을 위한 조사연구. (2003). 해양수산부
- 시화호 해양환경 개선 사업. (2007). 해양수산부
- 천해양식. (1979). 유성규. 구덕출판사. 287–349.
- 환경정책기본법. 1990.