

[단보, Short communication]

저온 노출 꼬막 (*Tegillarca granosa*) 의 nitric oxide 농도 변화

이희중¹, 송재희², 정희도², 박경일³

¹국립수산과학원 남동해수산연구소, ²국립수산과학원 서해수산연구소 갯벌연구센터,
³군산대학교 해양과학대학 수산생명의학과

Effect of cold stress on nitric oxide concentration in blood cockle (*Tegillarca granosa*)

Hee-Jung Lee¹, Jae-Hee Song², Hee-Do Jeung² and Kyungil Park³

¹South East Sea Fisheries Research Institute, NIFS, Tongyeong 39769, Korea

²Tidal Flat Research Institute, NFIS, Gunsan 54014, Korea

³Department of Aquatic Life Medicine, College of Ocean Science and Technology, Kunsan National University, Gunsan 54150, Korea

ABSTRACT

Winter mortality of blood cockles (*Tegillarca granosa*) is one of the main concerns of cockle aquaculture in Korea. Thus, we investigated the physiological alternation of cockles when they were placed in abnormally cold temperatures. For this purpose, cockles were exposed to temperatures of 4°C (control), 2°C, 0°C, -2°C, and -5°C for four hours/day over eight days, and the condition index, nitric oxide concentration, and mortality rates were measured after each cold treatment. The results showed that the cockle nitrite concentration increased significantly in all groups, except for the control group, from the 1st day of exposure, and that this NO increase continued until the end of the experiment. In addition, cockles exposed to -5°C for 5 days showed an increase mortality rate. These results suggested that cockles experienced physiological stress when they were exposed to < 2°C, and might have resulted in mortality under severe hypothermic conditions in winter. Our study also suggested that the measured NO concentration in the hemocytes of cockles is an efficient biomarker for diagnosing physiological stress in cockles exposed to cold shock.

Key words: *Tegillarca granosa*, cold stress, nitric oxide, biomarker, hemocytes

서 론

꼬막류는 돌조개목 돌조개과의 이매패류로 꼬막 (*Tegillarca granosa*) 과 새꼬막 (*Scapharca subcrenata*) 이 국내에서 양식생산량과 종사 인구가 많아 사회·경제적으로 매우 유용한 자원이다. 꼬막은 실트 (silt) 가 우세하고 4시간 정도의 간출 시간이 유지되는 조간대에서 최대 7 cm 길이

의 저질에 잠입하여 서식 한다 (Moon, 2005; Marsden *et al.*, 2009). 따라서 국내 꼬막과 새꼬막의 주 생산지는 실트 저질이 잘 발달된 전라남도로서 2019년도 우리나라 전체 새꼬막과 꼬막의 생산량 8,412 톤 (새꼬막 8,375 톤, 꼬막 37 톤) 중 8,407 톤이 전남에서 생산되었으며, 이 지역에서 새꼬막과 꼬막은 각각 8,370 톤과 37 톤이 생산되었다 (KOSIS, 2020).

그러나 최근 꼬막 및 새꼬막의 대량 폐사를 비롯해 성장도 감소 및 자연 채묘율 부진 등이 빈번히 발생하고 있으며, 이로 인해 연간 꼬막류의 생산량 변동폭이 크다 (NIFS, 2018; KOSIS, 2020), 특히 새꼬막과 꼬막의 대량폐사는 동절기와 하절기에 주기적으로 발생하고 있어 사회적 관심을 많이 받고 있다 (Yoon and Jeong, 2018; Yonhapnews, 2018). 이에 대해 기후변화나 과도한 밀식 등이 폐사의 원인으로 추정된 바 있으나 현재까지 원인규명을 위한 노력은 미진한 편이다 (NIFS, 2018).

Received: December 12, 2020; Revised: December 20, 2020;
Accepted: December 29, 2020

Corresponding author: Kyungil Park

Tel: +82 (63) 469-1882, e-mail: kipark@kunsan.ac.kr
1225-3480/24780

This is an Open Access Article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License with permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproducibility in any medium, provided the original work is properly cited.

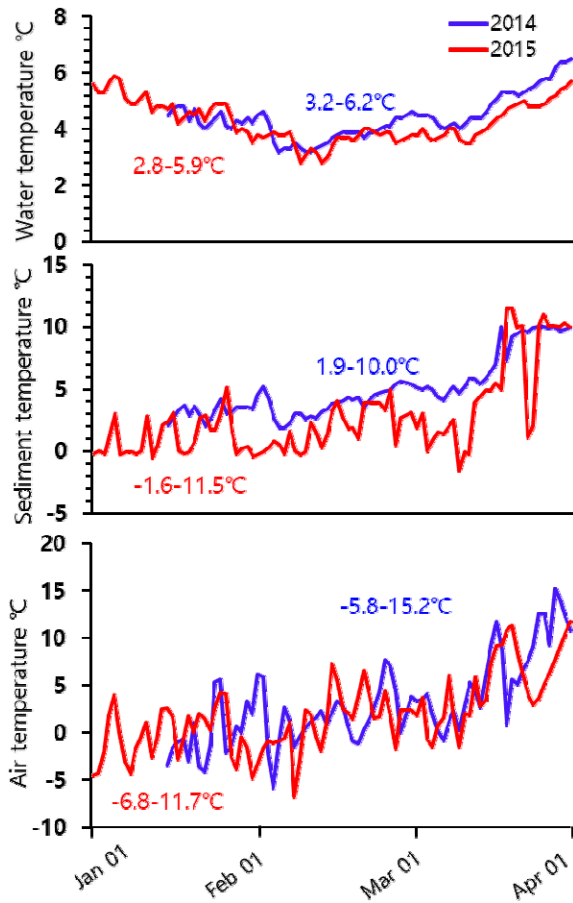


Fig. 1. Time series of daily mean air, sediment and water temperatures measured between January 1 to March 1, 2014 and 2015 at the monitoring station in the Taeon tidal flat, Choongnam Province, Korea.

꼬막류 폐사의 원인을 규명하는데 있어 아치사 (Sub-lethal) 상태의 시료에 대한 생리학적 진단은 폐사 발생 이전의 이상 징후를 파악하는데 유용하다 (Handy and Depledge, 1999; Sherry, 2003). 이런 목적에 현재 다양한 종류의 면역반응 측정기 이용되고 있으며 (Park *et al.*, 2012), 다양한 면역 지표 중 이매페류의 혈림프액 또는 혈구의 nitric oxide (NO) 농도가 다양한 해양환경 변화를 잘 대변하는 것으로 보고되고 있음을 고려할 때 (Taffala *et al.*, 2003; Chakraborty *et al.*, 2013; Nam *et al.*, 2013; Park, 2013; Kim and Park, 2018), NO 정량은 꼬막의 건강도를 판정하는 지표로서 유용하게 이용될 수 있을 것으로 판단된다. NO는 세포 내 신경전달 물질로써 이온의 항상성을 유지하는데 관여하며 과다하게 분비될 경우 활성산소 (유리 라디칼) 로 작용하여 세포에 독성 작용을 일으키는 물질이다 (Chung *et al.*, 2003). 이러한 활성산소의 증가는 사이토카인 등 염증 물질의 분비를 증가시켜

생체 내 염증량의 증가로 이어진다 (Guo *et al.*, 2015).

따라서 본 연구는 새꼬막과 꼬막 중 생산량은 낮으나 부가가치가 높은 꼬막을 남해안에서 서해안 중부해역의 조건대로 이식하였을 때 꼬막의 생리적 특성을 진단할 수 있는 NO농도를 측정함으로써 기존 서식지인 남해안보다 동절기 서식지 온도가 낮은 서해안에서의 양식 가능성을 판단하는데 기초자료로 이용하기 위하여 수행되었다. 또한 동절기에 발생하고 있는 꼬막류 폐사의 원인규명과 폐사 예측 기술 개발에 NO 측정 기법이 기여할 수 있는지 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

1. 실험 환경 설정

본 실험의 꼬막 노출 온도를 결정하기 위하여 국립수산과학원 갯벌연구센터의 ‘갯벌어장정보시스템’ (갯벌 지온) 및 기상청 (기온), 국립해양조사원 (수온) 의 자료를 활용하였다. 관측 정점은 꼬막 이식 예정지 인근의 가로림만으로 이 지역의 동절기 (2014년과 2015년 1-4월) 일평균 갯벌 지온 및 기온, 수온 자료를 바탕으로 실험실내 노출 온도 4°C (대조구), 0°C, 2°C, -2°C, -5°C를 설정하였다 (Fig. 1). 온도 노출 시간은 일반적으로 꼬막 서식지의 간조시간을 감안하여 4시간/일로 설정하였다 (Moon *et al.*, 2004; Shin *et al.*, 2002).

2. 시료

실험에 사용된 꼬막은 2020년 3월 전라남도 강진군 (34° 34' 17"N 126° 46' 1"E) 에서 채집한 2년생 약 500개체를 전라북도 군산시에 위치한 갯벌연구센터로 옮긴 후 수온 4°C 염분 31.9 psu의 환경에서 48시간동안 순치시켰다.

3. 저온 노출

수조 바닥에 9 cm 두께의 저질이 조성된 4 개의 사각 수조 (30 × 50 × 30 cm) 에 유사한 각장의 꼬막을 100 마리씩 넣은 다음 수온 4°C에서 48 시간 동안 안정화시켰으며, 뒤이어 이들을 수조에서 꺼내 4°C (대조구), 2°C, 0°C, -2°C 및 -5°C로 설정된 저온배양기 (IL-11-4C, Jeio tech) 에 넣고 4시간 동안 공기중에 노출 시켰다. 이후 꼬막을 수온 4°C의 해수가 들어있는 수조에 다시 넣었으며, 20시간 후 다시 배양기에 넣어 저온 환경에 재노출 하였다. 이러한 해수-고온 공기 노출을 8일간 반복하였다. 해수는 1일 1회 전량 환수하였고, 실험 기간 동안 수온, 염분 및 DO는 YSI MPS 550을 이용해 매일 측정하였다. 저온배양기의 기온은 수온 온도계로 측정하였다. 실험 기간 중 먹이는 공급하지 않았다.

4. Diaminofluorescein (DAF) 을 이용한 NO 정량

Table 1. Descriptive analysis of NO concentrations in the hemocytes of cockles exposed to various temperatures for 8 days (standard deviation, SD)

Day	Temperature (°C)					Total
	-5.00	-2.00	.00	2.00	4.00	
	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD
0	69.52 ± 18.22	51.38 ± 7.75	71.46 ± 9.33	66.75 ± 5.02	52.85 ± 6.84	62.39 ± 12.95
1	80.39 ± 4.96	74.31 ± 7.53	45.97 ± 2.00	52.33 ± 5.31	44.97 ± 5.36	59.59 ± 15.91
2	85.71 ± 7.39	75.55 ± 10.78	57.54 ± 4.72	82.19 ± 3.37	54.05 ± 5.03	71.01 ± 14.54
3	101.12 ± 4.45	106.38 ± 8.31	100.09 ± 6.76	64.60 ± 2.73	59.78 ± 7.30	86.40 ± 21.13
4	124.13 ± 5.21	125.84 ± 7.14	100.09 ± 6.76	71.31 ± 3.09	65.33 ± 3.91	97.34 ± 26.45
5	142.08 ± 6.68	138.65 ± 4.48	123.44 ± 3.97	76.39 ± 2.52	78.62 ± 2.15	111.83 ± 29.59
6	157.84 ± 9.87	139.45 ± 5.52	165.59 ± 3.59	118.36 ± 16.24	86.66 ± 2.44	133.58 ± 30.31
7	171.08 ± 12.27	173.12 ± 21.66	180.71 ± 10.15	115.29 ± 4.39	87.78 ± 1.87	145.60 ± 39.52
8	248.73 ± 22.79	278.78 ± 25.77	193.11 ± 4.85	111.46 ± 15.85	88.28 ± 1.77	184.07 ± 77.53
Total	131.18 ± 55.04	129.27 ± 65.89	115.33 ± 51.95	84.30 ± 24.56	68.70 ± 16.64	105.76 ± 52.71

배양기에서 4시간동안 저온 노출이 완료된 꼬막을 매일 무작위로 10개체씩 선택하고 헴림프액을 후폐각근에서 1 ml 주사기를 이용해 추출하였다. 헴림프액을 멸균여과해수에 20배로 희석하여 1.5 ml tube에 분주한 뒤 diaminofluorescein-2 diacetate (DAF-2DA, Sigma, D2813) 을 첨가하여 최종농도가 5 μ M이 되도록 한 다음 암실에서 10분간 반응 시켰다. 이후 1.5 ml tube에 100 μ l의 헴림프액을 넣고 유세포분석기 (Beckman coulter, GiliotTM) 를 이용하여 FSC-HLin (gain2, vlots 106) / SSC-HLin (gain 20, volts 303, Discr. 43) 상에서 density plot를 설정하였고 혈구 5,000개의 형광량을 FL1 (gain 2, volts 433) histogram으로 나타냈다. 데이터 분석은 Kaluza 1.2 (Beckman coulter) 프로그램을 이용하였다. 혈구의 평균 형광량은 relative fluorescence unit, RFU로 나타냈다.

5. 각장, 각고, Condition index

혈액 채취가 완료된 꼬막시료의 각장, 각고는 버니어캘리퍼스를 이용해 0.01 mm 단위까지 측정하였으며, 습중량은 꼬막을 개각하고 전자저울 이용해 0.01 g까지 측정하였다. 뒤이어 동결 건조 후 0.0001 g까지 육질건중량과 패각건중량을 측정하였다. 비만도는 육질건중량/패각건중량으로 계산하였다.

7. 통계분석

각 노출 온도별 NO 농도의 차이를 검증하기 위해 SPSSWIN 25.0 프로그램을 사용하여 two-way ANOVA를 실시한 후 LSD (least significant difference) 로 집단간 사

후검증을 실시하였다. 이 때 전체적인 통계적 유의수준은 $p < 0.05$ 에서 확인하였다.

결과 및 고찰

본 연구는 겨울철 조간대 서식 꼬막의 생리적 특성의 변화를 이해하기 위하여 다양한 온도에 꼬막을 노출시키고 NO 농도를 DAF 측정법을 이용하여 측정하였다. 각 그룹간 바지락의 각장, 습중량 및 비만도는 유의적 차이가 없어 동일한 크기의 개체들이 본 연구에 사용된 것으로 확인되었다 ($P > 0.05$, data not shown).

그러나 동일한 크기의 개체들이라 하더라도 각 온도에 노출된 꼬막의 NO 농도를 비교한 결과 수온이 낮을수록 NO 농도는 현저히 증가하였다 ($P < 0.001$, Table 1, 2). 이러한 NO 농도의 증가는 노출 1일째부터 2°C에 노출된 꼬막을 제외한 전 그룹에서 유의하게 나타나기 시작하였으며, 이후 모든 그룹에서 지속적으로 상승함으로써 대조군과의 현저한 격차가 확인되었다 ($P < 0.001$, Table 1, 2). 특히 실험 종료시점인 노출 8일째에는 -2°C와 -5°C에 노출된 시료의 NO 농도가 그 이전보다 더욱 급격하게 증가하였다.

그러나 일반적으로 조간대에 서식하는 꼬막은 간조시 저질에 잠입하므로 본 연구와 같이 공기중으로 노출된 상황은 아니다. 따라서 금번 연구 결과처럼 급격한 NO의 농도 변화를 나타내지는 않을 것으로 추정된다. 그러나, 가로림만의 일평균 저질 온도 자료 (Fig. 1) 에 따르면 꼬막 이식 대상 해역인 태안지역 조간대 저질의 1월-3월 기간 중 일평균 온도가 -1.6°C

Table 2. Two-way ANOVA, the effect of exposure temperature and dates on changes in NO concentrations

Source	Type III sum of squares	df	Mean squared	F	Sig.
Corrected model	606494.687a	44	13783.970	156.018	.000
Intercept	2516510.828	1	2516510.828	28483.853	.000
Temperature	140610.957	4	35152.739	397.886	.000
Day	354912.485	8	44364.061	502.147	.000
Temperature * Day	110971.245	32	3467.851	39.252	.000
error	15902.763	180	88.349		
Total	3138908.277	225			
Corrected total	622397.450	224			

^aR² = .974 (corrected R² = .968)

를 기록한 경우도 있으므로 일최저 (daily minimum) 지온은 이보다 현저히 낮을 것으로 판단되며, 이는 저질에 잠입한 꼬막이라 하더라도 저온 스트레스에 노출될 가능성이 매우 높음을 추정케 한다. 따라서 남해안 꼬막을 충남 태안지역으로 이식할 경우 원 서식지보다 심화된 저온스트레스에 노출 될 수 있음을 고려해야 할 것이다.

실험 기간 동안 꼬막의 폐사율은 -5°C에 노출된 그룹에서만 노출 5일째부터 6.7%로 증가하였고 실험 종료시에는 55.6 %로 급격한 증가를 나타냈다 (Fig. 2). 따라서 이러한 결과는 꼬막이 낮은 온도에 노출될 경우 생리적 저하뿐만 아니라 대량 폐사가 발생할 수 있음을 의미한다. 한편, 저온 노출 8일째에 꼬막의 대량폐사가 나타난 것은 동일 기간에 발생한 NO 증가와 유사한 패턴이다. 그러나 NO 농도는 폐사가 발생하지 않은 노출 1일째부터 급격히 증가한 것을 고려하면 NO 농도의 변화는 폐사에 앞서 저온스트레스를 받는 꼬막의 생리적 상태를 나타내는 유용한 지표로 평가된다.

물리적 변동이 큰 조간대나 천해역에서 서식하는 이매패류는 이동성이 낮기 때문에 동절기 기온의 급격한 저하에 따른

서식지의 수온이나 지온 변화에 적응하여 생존해야 하나 그렇지 못한 경우 대량폐사가 발생하는 경우가 있다. 일본의 바지락 동계폐사는 저수온과 먹이부족 (Kakino *et al.*, 1995), giant clam 유생의 동절기 폐사는 박테리아 감염과 저수온의 복합작용 (Norton *et al.*, 1993), *Rangia cuneata*의 겨울철 착저 후 대량 폐사는 장기간에 걸친 저온에 의한 건강 악화가 원인으로 보고되었다 (Kornijów *et al.*, 2018). 따라서 현재 우리나라 조간대와 조하대에서 발생하고 있는 꼬막류의 대량 폐사는 서식지 수온 또는 지온의 저하뿐만 아니라 다양한 요인들과의 복합 작용에 의해 발생할 수도 있음을 고려해야 한다. 한편, 저온에 노출된 패류의 지질대사는 패류 종마다 상이하며 이러한 차이가 저온에 대한 저항성의 차이를 유발한다고 보고되고 있으므로 꼬막류의 지질대사효율에 대한 조사는 겨울철 폐사를 이해하는데 중요한 단서를 제공할 수도 있을 것으로 판단된다 (Pernet *et al.*, 2007).

본 연구에서 NO 농도의 변화가 꼬막 폐사 발생 이전부터 급격히 증감함이 확인됨으로써 바이오마커로서 NO의 유용성이 확인됐다. 이러한 저온 스트레스에 대한 NO 농도 정량을 통한 저온 노출 생물의 생리적 변화를 측정하는 사례는 다양한 생물군에서 보고되고 있다. Zhang *et al.*, (2011) 은 만성적인 저온 쇼크에 노출된 병아리에서 NO 농도의 증가를 확인하였으며, Cantrel *et al.* (2010) 은 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*) 와 같은 식물의 경우에도 냉장 시 NO 농도가 증가함을 보고한 바 있다.

결론적으로, 저온 노출 생물의 NO 정량은 저온스트레스를 진단할 수 있는 방법이며, 꼬막류와 같은 경제적, 생태학적 중요성이 높은 패류의 생리적 상태를 진단하고 나아가 폐사를 예측하는데 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

사 사

이 연구는 2020년도 국립수산물학원 수산시험연구사업 ‘지

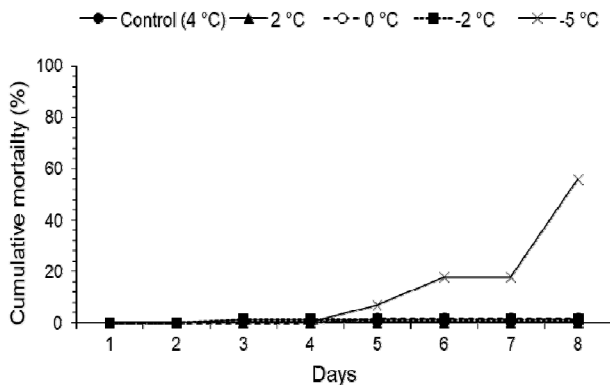


Fig. 2. *Tegillarca granosa* cumulative mortality rates (%) after cold exposure.

속 가능한 남해안 패류양식 안정화 연구 (R2020016)' 의 지원으로 수행 수행되었습니다.

REFERENCES

- Cantrel, C., Vazquez, T., Puyaubert, J., Rezé, N., Lesch, M., Kaiser, W.M., Dutilleul, C., Guillas, I., Zachowski, A., Baudouin, E. (2010) Nitric oxide participates in cold responsive phosphosphingolipid formation and gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, **189**: 415-427. Doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03500.x |
- Chakraborty, S., Ray, M. and Ray, S. (2013) Cell to organ: Physiological, immunotoxic and oxidative stress responses of *Lamellidens marginalis* to inorganic arsenite. *Ecotoxicol. Ecotoxicology and Environmental Safety*, **94**(1): 153-163. Doi: 10.1016/j.ecoenv.2013.04.012.
- Chung, W.H., Park, S.-K., Cho, D.-Y., Hong, S.-H. (2003) Normal Distribution of Nitric Oxide Synthase (NOS) in the Inner Ear of Guinea Pig. *Korean Journal of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery*, **46**(8): 627-633.
- Guo, H., Callaway, J.B., Ting, J.P. (2015) Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat. Med.*, **21**(7): 677-87. <http://doi.org/10.1038/nm.3893>.
- Handy, R.D., and Depledge, M.H. (1999) Physiological responses: their measurement and use as environmental biomarkers in ecotoxicology. *Ecotoxicology*, **8**: 329-349. Doi:10.1023/A:1008930404461.
- Kakino, J., Huruhata, K., Hasegawa, K. (1995) Winter Life and Mortality in Japanese Littleneck Clam *Ruditapes philippinarum* on Banzu Tidal Flat, Tokyo Bay. *Journal of Fisheries Engineering*, **32**: 23-32. Doi: 10.18903/fishing.32.1_23.
- Kim, S.-H., Park, K.-I. (2018) Measurement of nitric oxide concentration in juvenile Manila clam *Ruditapes philippinarum* when exposed to a pro-inflammatory drug. *The Korean Journal of Malacology*, **34**: 185-189. Doi: 10.9710/kjm.2018.34.3.185.
- Kornijów, R., Pawlikowski, K., Drgas, A. (2018) Mortality of post-settlement clams *Rangia cuneata* (Mactridae, Bivalvia) at an early stage of invasion in the Vistula Lagoon (South Baltic) due to biotic and abiotic factors. *Hydrobiologia*, **811**: 207-219. Doi: 10.1007/s10750-017-3489-4.
- KOSIS (2020) Korean Statistical Information Service. Statistical database for agriculture and forestry/fishery [Accessed Nov 1, 2020]. [https://kosis.kr/eng/statisticslist/statisticslistindex.do?menuId=M_01_01&vxcd=MT_ETI_TLE&parmTabld=M_01\)01&statId=1971002&themald=#Selectstatsboxdiv](https://kosis.kr/eng/statisticslist/statisticslistindex.do?menuId=M_01_01&vxcd=MT_ETI_TLE&parmTabld=M_01)01&statId=1971002&themald=#Selectstatsboxdiv).
- Marsden, I. D. and Bressington, M. J. (2009) Effects of macroalgal mats and hypoxia on burrowing depth of the New Zealand cockle (*Austrovenus stutchburyi*). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **81**(3): 438-444. Doi: 10.1016/j.ecss.2008.11.022.
- Moon, T. K.(2005) Reproductive cycle, seedling production and aquaculture of blood cockle, *Tegillarca granosa* (Linnaeus). Feb 2005, Pukyong National University, Korea, pp 165.
- Moon, T.S., Jung, M.M., Shin, Y.K., Yang, M.H., Ko, C.S. and Chang, Y.J. (2004) Spawning inducement, egg development and early larval rearing of Ark shell (*Tegillarca granosa*) (L.). *Korean Society of Fisheries and Ocean Technology*, **37**(6): 485-491. Doi: 10.5657/kfas.2004.37.6.485
- Nam, K.-W., Yang, H.-S. and Park, K.-I. (2013) Quantification of nitric oxide concentration in the hemocytes of Manila clam *Ruditapes philippinarum* by using 4, 5-diaminofluorescein diacetate (DAF-2) detection method. *The Korean Journal of Malacology*, **29**: 15-21. Doi: 10.9710/kjm.2013.29.1.15.
- NIFS (2018) Investigation of the cause of decline in fishery productivity in Yeosu bay ark shell (*Andara kagoshimensis*) of south coast off Korea. National Institute of Fisheries Science, Research Report. pp 56.
- Norton, J.H., Shepherd, M.A., Prior, H.C. (1993) Intracellular bacteria associated with winter mortality in juvenile giant clams, *Tridacna gigas*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **62**: 204-206.
- Park, K.-I. (2013) Variation of nitric oxide concentrations in response to shaking stress in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *The Korean Journal of Malacology*, **29**: 1-6. Doi: 10.9710/kjm.2013.29.1.1.
- Park, K.-I., Donaghy, L., Kang, H.-S., Hong, H.-K., Kim, Y.-O., Choi, K.-S. (2012) Assessment of Immune Parameters of Manila Clam *Ruditapes philippinarum* in Different Physiological Conditions using Flow Cytometry. *Ocean Science*, **47**:. Doi: 10.1007/s12601-012-0002-x.
- Pernet, F., Tremblay, R., Comeau, L., and Guderley, H. (2007) Temperature adaptation in two bivalve species from different thermal habitats: energetics and remodeling of membrane lipids. *Journal of Experimental Biology*, **210**: 2999-3014. Doi: 10.1242/jeb.006007.
- Sherry, J.P. (2003) The role of biomarkers in the health assessment of aquatic ecosystems. *Aquatic Ecosystem Health and Management*, **6**(4): 423-440. Doi: 10.1080/714044172.
- Shin, Y.K., Moon, T.S. and Wi, C.H. (2002) Effects of the dissolved oxygen concentration on the physiology of the Manila clam, *Tegillarca granosa* (Linnaeus). *Korean Society of Fisheries and Ocean Technology*, **35**(5): 485-489. Doi: 10.5657/kfas.2002.35.5.485.
- Taffala, C., Gomez-Leon, J., Novoa, B. and Figueras, A. (2003) Nitrite oxide production by carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) hemocytes. *Development & Comparative Immunology*, **27**: 197-205. Doi: 10.1016/S0145-305X(02)00098-8.
- Yonhapnews (2019) Mass mortality of blood cockle (Saekomak). Yonhapnews. <http://www.yonhapnews.co.kr/news/MYH20191211019400038>.

Effect of cold stress on nitric oxide concentration in blood cockle

Yoon, Y-H., Jeong, D. (2018) Marine Environmental Characteristics of the Fishing Ground for Blood Cockle, *Tegillarca granosa* (Linnaeus) in the Northwestern Areas of Yeosu Bay, South Sea of Korea. Fall Conference Abstract Book, The Korean Society for Marine Environment and Energy. p. 250.

Zhang, Z & Lv, Z & Li, J & Li, S & Xu, S & Wang, Xiao-Long. (2011) Effects of cold stress on nitric oxide in duodenum of chicks. *Poultry Science*, **90**: 1555-61. Doi: 10.3382/ps.2010-01333.