



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](#)

이 학 석 사 학 위 논 문

비소 노출에 따른 강도다리의 생체  
축적, 혈액학적, 항산화 및  
면역 반응의 변화



2020년 2월

부경대학교 대학원

수산생명의학과

이 상 목

이 학 석 사 학 위 논 문

비소 노출에 따른 강도다리의 생체  
축적, 혈액학적, 항산화 및  
면역 반응의 변화

지도교수 강 주 찬

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함.



2020년 2월

부경대학교 대학원

수산생명의학과

이 상 목

이상목의 이학박사 학위논문을 인준함.

2020년 2월 21일



위 원 장	약학박사	정 준 기 (인)
위 원	농학박사	허 민 도 (인)
위 원	이학박사	강 주 찬 (인)

# 목 차

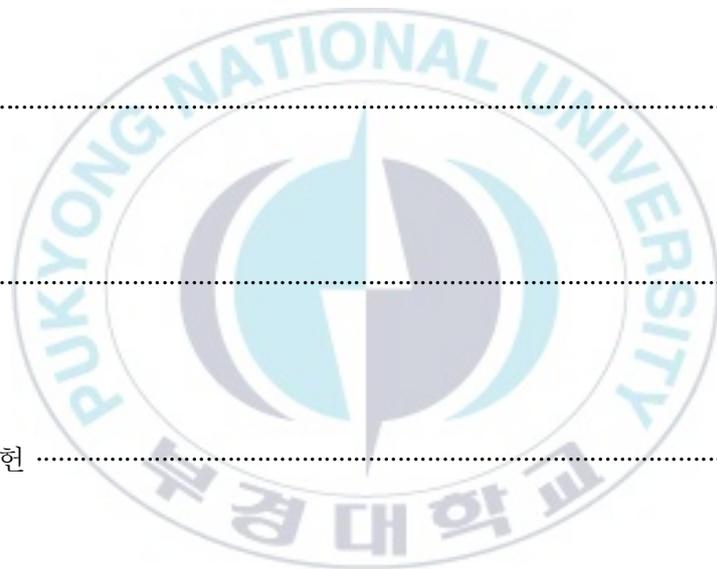
목 차	i
Abstract	iii
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	6
1. 실험어 및 실험환경	6
2. 사료성분 및 배합	8
3. Bioaccumulation	10
4. Growth performance	11
5. 혈액학적 분석	12
6. 항산화효소 분석	14
6-1. SOD	15
6-2. CAT	15
7. Lysozyme	16
8. Acetylcholinesterase activity	16
9. 유의성 검정	16
III. 결과	17
1. Bioaccumulation	17

2. Growth performance .....	21
3. 혈액학적 분석 .....	26
4. 항산화효소 분석 .....	32
4-1. SOD .....	32
4-2. CAT .....	35
5. Lysozyme activity .....	38
6. Acetylcholinesterase activity .....	40

IV. 고찰 .....	44
--------------	----

V. 요약 .....	52
-------------	----

VI. 참고문헌 .....	54
----------------	----



Bioaccumulation, alterations of hematological, antioxidant and immunological response in starry flounder, *Platichthys stellatus* by dietary arsenic exposure

Sang Mok Lee

Department of Aquatic Life Medicine, Graduate School  
Pukyong National University

### Abstract

In order to confirm bioaccumulation and changes in hematological, antioxidant and immune responses of starry flounder following exposure to arsenic, feed prepared at levels of 0, 5, 10, 20, 40 and 80 mg / kg of arsenic for 4 weeks were exposed to starry flounder, *Platichthys stellatus* (length  $20.9 \pm 1.6$ cm, weight  $152.5 \pm 13.7$ g). bioaccumulation following arsenic exposure showed high accumulation in the order of intestine, liver, and gills, and significantly increased above 20 mg / kg concentration. growth rate and liver weight index showed a significant decrease at concentrations above 40 mg / kg. hematological markers of RBC count, hemoglobin, and hematocrit were significantly decreased at high concentrations of 80 mg / kg. plasma minerals calcium and magnesium did not show significant changes. plasma organic component glucose showed a significant increase, but total protein did not show a significant change. Plasma enzymes, GOT and GPT, showed significant increase at 80 mg / kg concentration at 4 weeks. antioxidant response to arsenic exposure was analyzed using gills and liver, and SOD and CAT were observed. both SOD and CAT showed significant increase in gill and liver tissue. in experiments to observe the immune response, plasma lysozyme activity showed a significant decrease above 40 mg / kg concentration. in the

acetylcholinesterase activity test, brain, intestine, and liver were used and there was a significant increase.

In conclusion, exposure to arsenic induced bioaccumulation and altered hematological properties, antioxidant and immune responses.



# I. 서론

오늘날 현대사회는 많은 산업활동에 의하여 많은 중금속을 포함한 독성 오염물질들이 생태계에 매년 다량으로 흘러 들어가고 있다. 물론 환경을 생각하여 유해물질에 대한 저감 조치를 시행하고 있지만 매년 많은 양의 오염물질이 유입되고 있다. 또한, 여러 작용을 통하여 수중 생태계에 영향을 미친다. 수중으로 관류한 각종 독성 오염 물질은 여러 형태의 변화를 거치며 직·간접적으로 어체 및 수중 생물체 내에서 이용된다(Bryan, 1976).

여러 금속류 중 일부 금속류는 생물체내에서 대사활동의 구성성분이 되거나 생체내 필요한 성분이 되어지기도 하지만, 비소(As), 카드뮴(Cd), 납(Pb) 등의 금속 원소는 생물체 내에 필요하지 않으며, 조금의 양으로 치명적인 영향을 끼칠 수 있다(Baumann, 2011; Nugegoda, 2006). 이러한 중금속에 노출된 생물체는 세포의 항상성을 변화시키거나 DNA 손상, 생리 활성 저하 등의 여러 악 영향을 미치게 된다(Badisa V. L et al., 2007).

비소(As)는 원자번호 33번이며, 분자량 74.92인 금속과 비금속의 중간형태의 메탈로이드 원소이다. 비소는 여러가지 형태의 화합물이 존재하고 환경 중에 널리 분포하며, 강한 독성을 가지고 있는 주요 환경 오염물질 중 하나이다. 비소는 일반적으로 살충제, 목재 보존제 등 농작물에 필요한 보충제 뿐만 아니라 유리 및 전자 기기의 제조에 사용되어져 왔으며(Eisler R, 1988) 광산업 제련 금속 제조와 화석 연료 등으로 사용되어지며 환경을 오염시켰다. 또한, 사용된 비소는 여러 자연적 과정을 거치며 수계 생태계에 흘러 들어가 수계 환경 속 생물에 많은 영향을 야기한다.

일반적으로 비소는 유기비소와 무기비소 크게 두가지 형태로 존재한다. 수계 환경속에서 비소는 주된 형태가 무기비소로 존재하며, 3가 비소는 체내에서 methylation과 환원 반응을 거쳐 5가 비소로 산화되고 다시 5가 비소 중 일부는 3가 비소로 환원되어 진다. 일반적으로 무기 비소의 경우 삼산화 비소는 수생 생물에 유해하며 오산화 비소보다 독성이 강하다고 알려져 있으며, 무기비소 중에서 가장 큰 독성을 나타내는 비소 화합물이다. 이러한 비소의 영향으로 성장 및 생식, 이온 조절, 유전자 발현, 면역 기능 등 전반적인 영향을 야기한다(Rahman et al., 2009).

비소는 어류 체내에서 축적이 이루어지며 그에 따라 대사활성의 장애나 생식, 성장등에 영향을 미치게 된다. 비소와 같은 중금속은 waterborne 노출 및 급이 노출시 장, 아가미, 간 등의 장기에 축적이 이루어지고 특히 급이 노출에 따른 축적은 장에서 많이 이루어진다. 체내의 중금속 축적은 어류 체내의 여러 방어 기작을 영향을 주며, 아가미나 간 등 대사활성이 많은 장기의 손상 시 여러 스트레스 작용과 생리 활성을 저하를 가져온다 (Brannon et al., 2008)

어류는 성장에 필요한 에너지와 영양소를 얻기 위해 먹이 섭취 및 대사 활성을 하며, 그로 인하여 성장은 독성물질의 영향을 알 수 있는 지표로 활용된다. 중금속이나 독성 오염물질이 체내에 들어오거나 여러가지 스트레스 작용이 생기면 어류 체내에서는 이를 해독하기 위하여 에너지 및 영양소를 사용하게 된다(Lemaire., 1992). 이에 따라 제한된 영양소와 에너지가 해독을 위해 대사활성에 이용되므로 성장이 저해가 된다. 따라서 성장의 변화는 독성물질 정도를 알 수 있는 지표이다(De Boeck, Vlaeminck & Blust, 1997). 또한, 이로 인한 성장 감소의 사례는 많이 보고가 되었다 (Culioli et al., 2009;Farag et al., 1999). 생물체 체내에 독성 오염물질이 유입되게 되면 축적이 일어난 후 그에 따라 조직에 손상이 일어나는데 특히

아가미의 손상, 간의 손상은 혈액학적 지표를 변화시키는 주요 요인 중 하나이다. 우선 아가미의 손상에 따라 아가미의 역할 중 가스 교환 및 이온 조절의 영향을 미쳐 RBC count, 헤마토크릿 수치, 헤모글로빈 농도에 대한 변화를 가져오며 이러한 변화 정도는 독성 오염을 평가하는 중요한 지표가 된다. 또한, 칼슘과 마그네슘 등 무기 성분의 변화는 혈액 내의 이온 조절 기능의 저해를 나타내며 그에 따라 독성 영향 정도를 알 수 있다. 여러 논문에서 보고 되어져 왔으며(Goessler, W., Kuehnett, 2002), 아가미 및 적혈구 손상에 따른 기능 저하가 나타날 수 있다. 또한, 간과 같은 해독 기관에서 해독작용을 거치며 해독작용에 필요한 에너지 및 영양소를 채워주기 위하여 혈류 내 포도당 성분의 이동이 촉진되어진다. 비소는 적혈구의 구조에 대해 영향을 미침으로써 변성을 야기시키고 변성이 된 적혈구로 인하여 산소나 영양분의 운반이 느려진다(Hall, M., Chen, Y., 2006). 따라서 혈액학적 성상이 변화할 수 있다. GPT와 GOT 같은 경우, 대사 활성화에 영향을 미치는 효소들으로써, 이러한 효소는 독성물질의 영향으로 간과 같은 대사 활성이 높은 장기가 손상을 입었을 경우, 혈류내로 많은 양이 흘러들어오게 되는데(Kubota, R., Kunito et al., 2001) 이러한 혈액 내 여러 구성 성분의 변화 정도는 비소 독성을 판단하는 중요한 바이오마커가 된다(Ayotte, J.D et al., 2003; Karagas, M.R et al., 2002).

비소와 같은 중금속에 노출된 생물체는 활성 산소를 많이 유발시킨다(Tripathi et al., 1998). 이러한 활성 산소는 비소노출에 따른 대사작용의 산물로써 보통의 경우 항상성을 유지하고 있지만, 중금속의 노출에 따른 활성 산소로 인하여 산화 스트레스를 유발시킨다(Kavitha et al., 2010). 이러한 산화스트레스는 세포의 항상성을 저하시키고 세포벽에 영향을 미치고 DNA의 산화와 같은 생물체 내에 악영향을 야기한다.

생물체는 활성산소로 인한 산화스트레스가 주는 손상을 방지하고자 체내

방어기작을 가지는데, 대표적으로 SOD(superoxide dismutase)와 CAT(catalase)이다. SOD는 superoxide free radical에 작용하여 과산화수소로 변환시키며 활성산소에 대한 독성을 저해시킨다(Sorenson, 1991). 또한 CAT는 SOD의 작용이 끝난 뒤 생성된 과산화수소를 물과 산소로 전환시켜 활성산소의 영향을 저해하는 역할을 가진다(Reif, Truong et al., 2015). 따라서 SOD와 CAT의 작용은 체내의 활성산소를 저해시키는 작용이며, 이러한 항산화 효소의 발현은 독성물질이 체내에 들어와 영향을 미치는 정도에 대하여 알 수 있는 좋은 지표가 되어진다(Xue J et al., 2004). 또한, SOD와 CAT의 활성정도는 독성물질의 종류, 독성정도, 노출시간 및 노출양 등에 의하여 다양하게 나타나며 이에 따라 독성의 영향 정도를 평가할 수 있는 중요한 생체 지표가 될 수 있다.

아세틸콜린에스테라아제는 신경계의 주된 신경전달물질로써 이러한 신경전달은 어체를 움직이는데 영향을 미친다. 아세틸콜린이 분해되면서 시냅스의 신경 자극이 주어지고 이에 따라 신경에 대한 반응이 이루어진다. 아세틸콜린에스테라아제 활성은 일반적으로 어류에서 뇌와 근육에 많이 분포하며(Farombi et al., 2007) 이는 어류의 신경계가 콜린성이 주로 나타나 있으며, 근육의 행동과 발현에 영향을 미치기 때문이다. 중금속이 어류 체내에 들어와 뇌와 근육 등에 축적이 되거나 영향을 미치게 되면 아세틸콜린에스테라아제의 활성이 제대로 이루어지지 않는다. 따라서 아세틸콜린에스테라아제의 활성 저하는 근육마비나 근육을 제대로 사용할 수 없게 되는 등의 증상이 발현되며(Kirby et al, 2000) 심하게는 사망에도 이를 수 있다. 따라서 아세틸콜린에스테라아제의 활성은 중추신경계의 중금속의 독성 영향 정도를 확인할 수 있다(Casado-Martinez., 2010).

라이소자임은 어류에게 중요한 선천성 면역을 담당하는 요소 중 하나로, 라이소자임은 침입한 그람 양성 및 일부 음성 박테리아의 세포벽을 파괴하

여 면역기능을 수행하며 넓은 항원 스펙트럼을 가져 전반적인 면역기능을 가진다. 면역은 체내의 항상성을 유지시키는 중요한 역할이다(Rainbow et al., 2011). 중금속과 같은 독성 오염물질은 체내에 들어와 면역체계를 저해시키는 중요 물질로써, 중금속과 같은 독성 오염물질이 체내에 들어왔을 경우, 라이소자임이 활성화되어 독성물질을 막아내는 역할을 한다(Sanchez Dardon et al., 1999). 라이소자임은 어류 체내에서 백혈구에서 주로 생산된다. 따라서 라이소자임의 활성 정도는 독성 물질이 미치는 영향 정도를 면역학적으로 파악할 수 있는 중요 지표이다(Georgopoulos et al, 2008).

우리나라 양식생산량 중 가장 많은 양식 양을 차지하고 있는 어류는 넙치, *Paralichthys olivaceus*이다. 최근 다양한 어종이 우리나라 소비시장에 들어와 넙치의 생산량 대비 소비량이 부족한 상황이다. 따라서, 상품 경쟁력 하락으로 인한 경제적 어려움이 나타날 수 밖에 없다. 따라서 넙치를 대신하여 새롭게 양식되어질 종에 대한 개발이 필요하며, 이는 최근 강도다리, *Platichthys stellatus*가 좋은 대안이 될 수 있다.

어류에게 있어 성장과 대사활성을 하기위한 생체 구성요소들을 흡수하는 주된 경로는 먹이 섭취와 아가미이며, 이 두 경로 중 먹이 섭취를 통하여 많은 부분을 담당하고 있다. 중금속의 수계 오염은 증가하고 있는 현재, 사람이 어류나 다른 수계 생물을 섭취하여 나타난 질병이나 악영향을 겪은 바 있다. 이는 오염된 물에 서식하는 어류 및 수계 생물이 오염된 먹이 섭취를 통하여 중금속이 체외로 배설되지 못하고 체내로 축적이 되며, 먹이 사슬을 통하여 사람에게 축적이 되어진다.

따라서, 본 연구는 유해 중금속 중 하나인 비소를 이용하여 앞으로 많은 양식이 되어질 강도다리에게 먹이로 노출시켜 비소의 축적과 항산화, 혈액학적 및 면역 반응에 대한 독성의 영향 정도를 확인하고 강도다리의 민감도를 판단하기 위해 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험어 및 실험환경

본 실험에 사용한 실험어, 강도다리(*Platichthys stellatus*)는 기장 동백리에서 구입하였으며, 전장  $20.9 \pm 1.6\text{cm}$ , 체중  $152.5 \pm 13.7\text{g}$ 의 어류로, 250L 원형 수조에서 순치 후 외관상 질병이 없는 개체를 선별하여 실험에 사용하였다. 순치기간을 포함하여 제조한 사료를 이용하여 보름간 입불힘을 하였으며, 순치 후 15마리씩 250L 원형 수조 6개에 나누어 담아 농도별로 제조된 사료를 하루 2회 어체중의 1%만큼 급이를 하였다. 실험기간동안 사육수온은  $13.1 \pm 0.9^\circ\text{C}$ , 12시간 간격으로 광주기를 조절하였으며, 시간당 250L의 환수율로 사육하였다. 실험에 사용한 수질성분은 Table. 1과 같다.

실험에 사용한 사료의 농도는 비소 0, 5, 10, 20, 40, 80 mg/kg으로 대조군을 포함하여 6종류의 사료를 제작하였고 각 구간의 실험어에게 농도별 사료를 하루에 두 번씩, 어체중의 2%씩 공급하였다. 실험기간은 총 4주로 실험어는 제조된 사료 공급 후 각각 2주와 4주 후 샘플링하였다.

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

Item	Value
Temperature (°C)	13.1 ± 0.9
pH	8.1 ± 0.4
Salinity (‰)	32.8 ± 0.7
Dissolved Oxygen (mg/L)	7.2 ± 0.2
Chemical Oxygen Demand (μg/L)	1.21 ± 0.2
Ammonia (mg/L)	11.7 ± 0.8
Nitrite (mg/L)	1.2 ± 0.8
Nitrate (mg/L)	10.95 ± 1.1



## 2. 사료성분 및 배합

사료성분 및 배합은 Table. 2에 나타내었다. 사료 제작의 바탕은 국립 수산과학원 동해수산연구소 소속 동해특성화 연구센터에서 발간한 강도다리 양식 기술서를 참고하였으며, 기록된 강도다리 영양요구에 맞추어 만들었다. 기본구성 성분 white fish meal 62%, casein 10%, dextrin 19.42%, fish oil 2%, squid fish oil 2%, carboxymethylcellulose 1%, vitamin premix 1%, mineral premix 1%, coline salt 0.5%에 비소 프리믹스를 각 구간의 설정 농도에 맞춰 첨가하였다. 비소 프리믹스는 비소 10g과 셀룰로오스 340g을 혼합하여 3일간 벌크 작업을 통해 제작하였으며 비소 농도에 따른 6종류의 사료에 포함된 실제 비소 농도는 각각 0, 5, 10, 20, 40, 80 mg/kg 이었다. 사료 제작은 분말 형태로 이루어진 각 성분들을 비율에 맞추어 일차 혼합을 하고 난 후, 오일과 물을 조금씩 넣어 반죽형태로 만들었다. 이렇게 만들어진 반죽은 다시 압축성형기를 이용하여 정해진 크기로 만들었다. 건조 전, 강도다리의 입크기를 기준으로 분쇄를 한 후, 48시간 동안 실온 상태에서 건조하였다. 사료 제작 완료 후, 사료는 -20℃의 냉장고에서 보관하였다. 사료 내 비소 농도는 ELAN 6600DRC ICP-MS 기기를 이용하여 측정하여 나타내었다.

Table. 2. Formulation of the experimental diet (% dry matter)

Ingredient	concentration (mg/kg)					
	0	5	10	20	40	80
White fish meal <sup>1</sup>	62	62	62	62	62	62
Casein <sup>2</sup>	10	10	10	10	10	10
Dextrin <sup>3</sup>	18.90	18.90	18.90	18.90	18.90	18.90
Fish oil <sup>4</sup>	2	2	2	2	2	2
<b>Squid liver oil</b> <sup>5</sup>	2	2	2	2	2	2
carboxymethylcellulose <sup>6</sup>	1	1	1	1	1	1
$\alpha$ -Cellulose <sup>7</sup>	1.6	1.5	1.4	1.2	0.8	0
Vitamin premix <sup>8</sup>	1	1	1	1	1	1
Mineral premix <sup>9</sup>	1	1	1	1	1	1
Coline salt <sup>10</sup>	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Arsenic premix <sup>11</sup>	0	0.1	0.2	0.4	0.8	1.6
Total	100	100	100	100	100	100

1. White fish meal, Dajeon Co., Ltd., Pusan, Korea

2. Casein, The Feed Co., Ltd., Pusan, Korea

3. Dextrin, TS Co., Ltd., Incheon, Korea

4. Fish oil, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO

5. Squid liver oil, Sigma, USA

6. Carboxymethylcellulose, Sigma, USA

7.  $\alpha$ -Cellulose, Sigma, USA

8. Vitamin premix (mg/kg diet) : dl-calcium pantothenate, 368; Choline chloride, 10; Inositol, 400; Menadione, 1800; Nicotivamide, 1030; Pyridoxine·HCl, 88; Riboflavin, 380; Thiamine mononitrate, 115; dl-a-tocopherol acetate, 210; Retinyl acetate, 38; Biotin, 10; Folic acid, 20; Cyanocobalamin, 1.3; Cholecalciferol, 13.2

9. Mineral premix (g/kg) : Ferrous Fumarate, 12.5; Dried Ferrous sulfate, 20; Manganese Sulfate, 11.25; Dried Cupric Sulfate, 1.25; Cobaltous sulfate, 0.75; Zinc sulfate, 13.75; Calcium iodate, 0.75, Magnesium Sulfate, 80.2; Aluminum Hydroxide, 0.75

10. Coline salt, Kofavet Co., Ltd., Ulsan, Korea

11. Arsenic premix (mg/kg diet) : 18,000 mg As/ kg diet

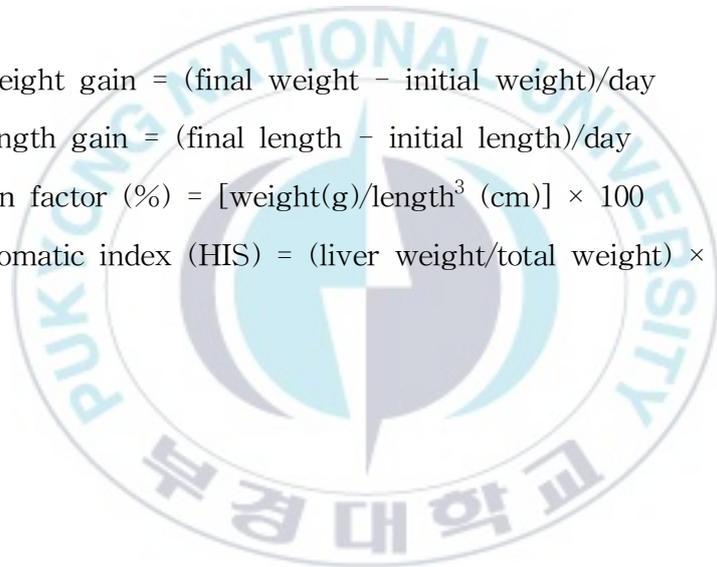
### 3. Bioaccumulation

실험어인 강도다리의 간, 아가미 그리고 장의 조직을 샘플링하여 우선 동결 건조를 진행하였다. 건조 후 건조 중량을 측정하여 알맞은 중량을 이용하였다. 다음 시료의 전처리 방법으로 wet digestion method를 이용하였으며, 65%  $\text{NHO}_3$  (Merk, 65% ultra pure)로 용해시킨 후 120°C의 hot plate에서 조직 시료를 완전히 분해될 때까지 반복하여 건조시켰다. 완전히 분해된 시료를 다시 2%  $\text{NHO}_3$ 를 이용하여 용해시켰다. 용해가 완료된 시료를 0.2 $\mu\text{m}$  membrane filter(Advantec mfs, Ins.)를 이용하여 필터링을 하였다. 필터링 후 시료를 분석에 이용하였다. 전처리 과정 속 모든 시료의 보관은 빛이 들지 않는 곳에 보관하였다. 분석은 ELAN 6600DRC ICP-MS(Perkin-Elmer) 기기를 사용하여 비소의 함량을 분석하였으며, standard curve로 ICP multi-element standard solution VI (Merck)를 이용하였다. 조직 내 비소 양은 mg/kg dry wt으로 나타내었다.

#### 4. Growth performance

실험어 순치 후 강도다리의 전장과 체중을 측정하였고, 사료 급이 후 2주와 4주에 각각 전장과 체중 및 간중량을 측정하였다. 일일체중성장량(Daily weight gain), 일일전장성장량(Daily length gain), 간중량 지수(Hepatosomatic index, HIS), 비만도 지수(Condition factor)를 측정하였으며, 측정 방법은 다음과 같다.

- Daily weight gain = (final weight - initial weight)/day
- Daily length gain = (final length - initial length)/day
- Condition factor (%) = [weight(g)/length<sup>3</sup> (cm)] × 100
- Hepatosomatic index (HIS) = (liver weight/total weight) × 100



## 5. 혈액학적 분석

혈액 채취는 실험어의 혈액 샘플의 응고를 막기 위하여 heparin-Na(5000 I.U., 중외제약)를 처리한 1회용 주사기를 이용하여 미부정맥에서 채취하였다. 채취한 혈액으로 RBC(red blood cell) count, Hb(hemoglobin) 농도 및 Ht (hematocrit) 수치를 즉시 측정하였다.

RBC count는 Hendrick's solution으로 400배 희석을 시킨 후, hemocytometer(Improved Neubauer, Germany)를 이용, 광학현미경으로 계수를 한 다음 다시 희석 배수를 곱하여 계산하였다. Hb 농도는 임상용 kit (Asan Pharm. Co., Ltd.)를 이용하여 Cyan-methemoglobin법으로 측정하였다. Ht 수치는 microhematocrit capillary tube 내로 혈액을 넣어, microhematocrit centrifugation(Model: 01501, HAWKSLEY AND SONS Ltd, England)로 4℃에서 5분간, 12,000rpm으로 원심분리 후 판독판 (Micro-Haematocrit reader, HAWKSLEY AND SONS Ltd., England)을 통하여 측정하였다.

채취한 혈액을 혈청내 무기성분, 유기성분, 효소활성의 변화를 관찰하기 위하여 4℃, 3000g에서 5분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 혈청을 분리한 후 실험 전까지 -75℃에 보관하였다.

무기성분으로는 칼슘 (Calcium), 마그네슘 (Magnesium)을 측정하였으며, 칼슘은 OCPC(o-cresolphthalein-complexon technique) technique을, 마그네슘은 Xylidyl blue- I technique을 이용한 임상용 kit (Asan Pharm. Co., Ltd)를 이용하였다. 유기성분으로는 혈당 (Glucose)와 총단백질 (Total protein)을 측정하였으며, 혈당은 GOD/POD technique을, 총단백질은 biuret technique을 이용한 임상용 kit (Asan Pharm. Co., Ltd.)를 사용하여

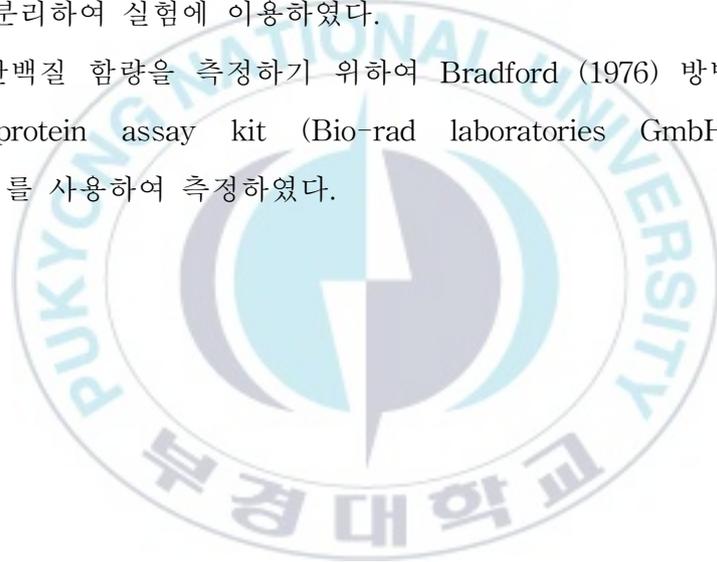
분석하였다. 혈청 내 효소활성으로는 GOT (Glutamic oxalate transminase), GPT (Glutamic pyruvate transminase)를 측정하였으며, GOT와 GPT는 Reitman-Frankel technique에 의한 임상용 kit (Asan Pharm. Co., Ltd)를 이용하였다.



## 6. 항산화효소 분석

분석을 위하여 간과 아가미를 채취한 후 조직을 washing buffer(0.1M KCl, pH 7.4)를 이용하여 세척하였다. 세척 후 간, 아가미 무게와 homogenizing buffer(0.1M KCl, pH 7.4)의 비율이 1:10이 되도록 넣어준 후, Teflon-glass homogenizer (099CK4424, Glass-Col, Germany)를 사용하여 균질화하였다. 균질액은 4℃, 10000g에서 30분간 원심분리를 한 뒤 상층액을 분리하여 실험에 이용하였다.

조직의 단백질 함량을 측정하기 위하여 Bradford (1976) 방법을 이용한 Bio-rad protein assay kit (Bio-rad laboratories GmbH, Munich, Germany) 를 사용하여 측정하였다.



## 6-1. Superoxide dismutase (SOD)

SOD 활성은 WST-1의 환원 반응에 대한 50% inhibitor rate로 측정하는 SOD Assay Kit - WST (Dofindo co., Japan)를 사용하여 분석하였다. 1 unit은 WST-1과 superoxide 음이온의 환원 반응을 50% 억제하는 시료 용액 20  $\mu$ l 중의 효소의 양으로 나타내었으며 SOD activity는 unit/mg protein으로 나타내었다.

\* WST - 1 = 2 - (4-Iodophenyl) - 3 - (4 - nitrophenyl) - 5 - (2,4-disulfophenyl) - 2H - tetrazolium,monosodium salt

## 6-2. Catalase (CAT)

CAT 활성은 OxiSelect™ Catalase Assay Kit (Cell Biolabs, Inc.)를 사용하여 분석하였다. 과산화수소와 대응되는 생성물인 quinonimine dye coupling 생성물을 흡광도 520 nm에서 분광광도계를 이용하여 측정하였다. 1분당 과산화수소 1 $\mu$ M를 분해하는 효소의 양을 CAT의 1 unit으로 나타내었으며, CAT activity는 unit/mg protein로 나타내었다.

## 7. Lysozyme activity

라이소자임의 활성을 확인하기 위하여 Turbidimetric method (Ellis, 1990)를 이용한 Lysozyme Detection Kit (Sigma, USA)를 사용하였다. 혈청 샘플을 이용하여 *Micrococcus lysodeikticus*와 0.05 M phosphate buffer (pH 6.2)를 혼합한 후 생성된 혼합물을 시간 간격을 두고 흡광도를 측정하였다. 분광광도계에서 450nm에서 측정하였으며 standard curve를 이용하여 결과 값을  $\mu\text{g/ml}$ 로 나타내었다.

## 8. Acetylcholinesterase activity

아세틸콜린에스테라아제 활성을 확인하기 위해 Acetylcholinesterase (AChE) Assay Kit (Sigma, USA)를 사용하였다. AChE는 acetylcholine 기질을 choline으로 전화하고, choline은 산화되어 probe에 의하여 발색하는 생성물을 만든다. 샘플을 kit 내에 적용 후 빛이 들지 않는 곳에서 30분간 반응 후 분광광도계를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 흡광도는 570 nm로 측정하였으며, standard curve를 이용하여 결과를 계산하였으며, 값은  $\text{nmol/min/mg protein}$ 으로 나타내었다.

## 9. 유의성 검정

실험 분석 결과에 대하여 통계학적인 유의성은 SPSS 통계 프로그램을 사용하여 나타내었고, ANOVA test를 실시하여 Duncan's multiple range test를 통해  $P < 0.05$  일 때 유의성이 있다고 간주하였다.

### Ⅲ. 결과

#### 1. Bioaccumulation

제조한 단계별 As 혼합 사료 급이에 따른 강도다리의 간, 아가미, 장의 As 축적은 Fig.1-3에 나타내었다. 조직별 축적량은 장>간>아가미 순이었으며, 2,4주차 As 10 mg/kg 이상에서 유의한 증가가 나타났다. 간에서는 2주차, 4주차 모두 10 mg/kg 농도 이상에서 유의적인 증가가 있었다. 장에서는 2주차의 10 mg/kg 농도 이상에서 유의적인 증가가 있었으며 4주차에서는 5 mg/kg 농도 이상에서 유의적인 증가가 있었다. 아가미에서는 2주차의 10 mg/kg 농도 이상에서 유의적인 증가가 있었고 4주차에서는 5 mg/kg 농도 이상에서 유의적으로 증가가 나타났으며, 20 mg/kg 농도와 40 mg/kg 농도에서는 유의적인 증가가 나타나지 않았다.

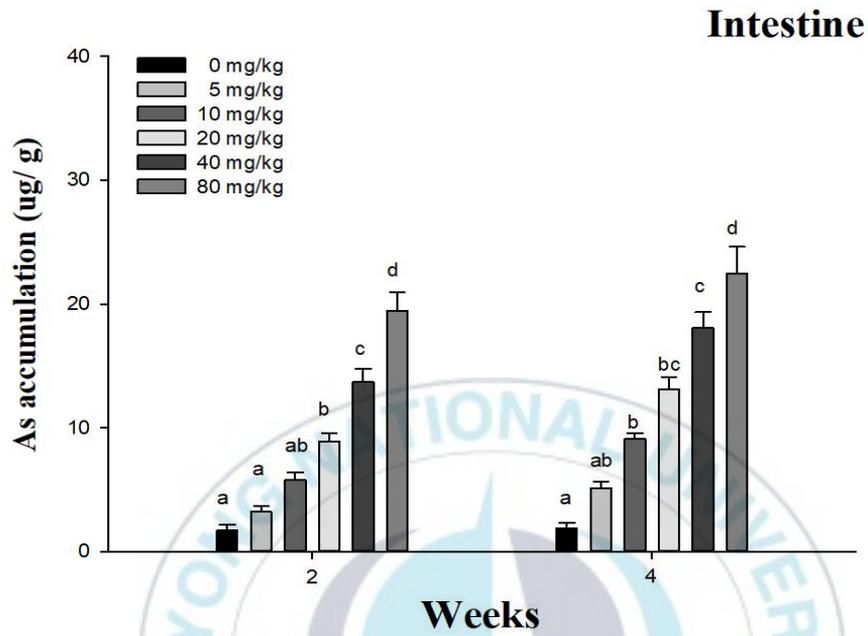


Fig. 1. As accumulation in intestine of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to the different concentration of dietary arsenic for 4 weeks. Value with different superscript are significantly different in 2 and 4 weeks (  $P < 0.05$ ) as determined by Duncan's multiple range test.

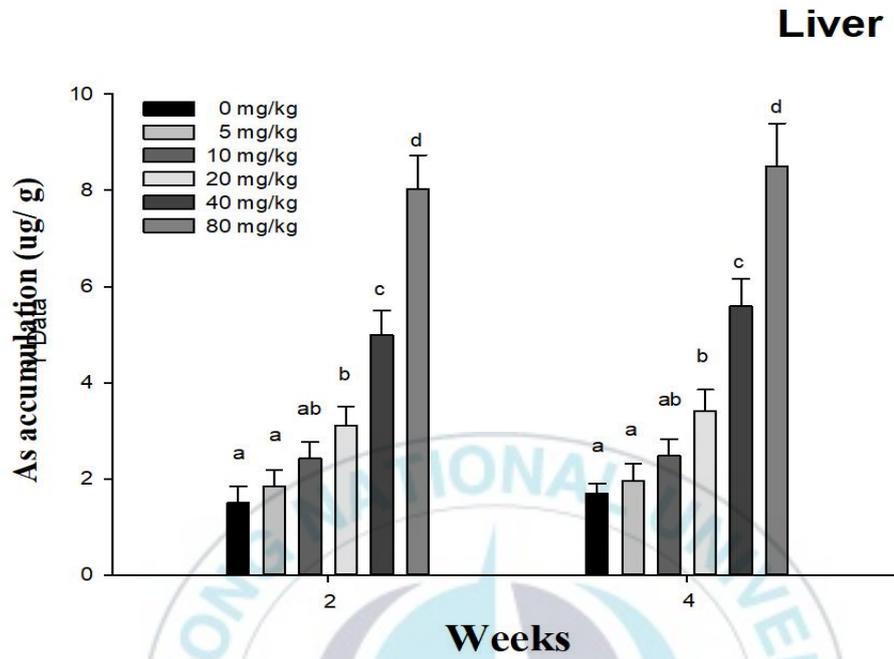


Fig. 2. As accumulation in liver of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to the different concentration of dietary arsenic for 4 weeks. Value with different superscript are significantly different in 2 and 4 weeks (  $P < 0.05$ ) as determined by Duncan's multiple range test.

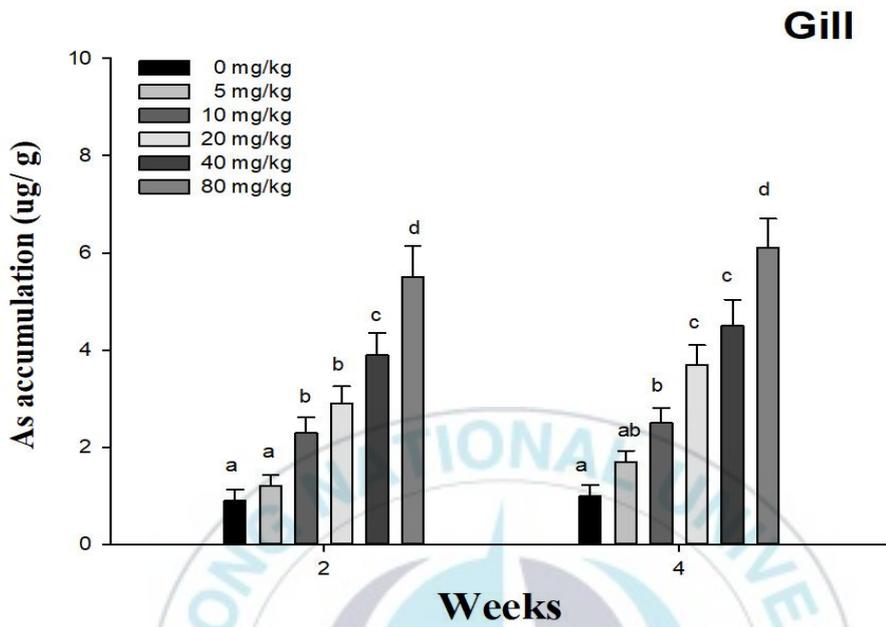


Fig. 3. As accumulation in gill of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to the different concentration of dietary arsenic for 4 weeks. Value with different superscript are significantly different in 2 and 4 weeks (  $P < 0.05$ ) as determined by Duncan's multiple range test.

## 2. Growth performance

단계별 As 혼합 사료 급이에 따른 강도다리의 일일체중성장량(Daily weight gain), 일일전장성장량(Daily length gain), 간중량 지수 (Hepatosomatic index, HIS), 비만도 지수(Condition factor)는 Fig.4-5에 나타내었다. 일일체중성장량의 경우, 2주차 20 mg/kg 농도 에서 유의한 감소를 나타내었으며, 40mg/kg 농도에서 변화가 비슷하다 80 mg/kg 농도에서 유의적인 감소를 보였고, 4주차에서는 20 mg/kg 농도 이상에서 유의적인 변화를 나타내었다. 일일전장성장량의 경우에는 2주차에서 20 mg/kg 농도 이상에서 유의적인 감소를 나타내었으며, 4주차에서 10 mg/kg 농도 이상에서 유의적인 감소를 나타내었다. 간 중량 지수는 2주차와 4주차에서 비슷한 경향을 나타내었으며, 2주차와 4주차에서 20 mg/kg 농도 이상에서 유의적인 감소를 나타내었다. 비만도 지수의 경우 2주차 20 mg/kg, 80mg/kg 농도에서 유의한 감소를 나타내었으며, 4주차에서는 20 mg/kg, 40mg/kg 농도에서 유의한 감소를 나타내었다.

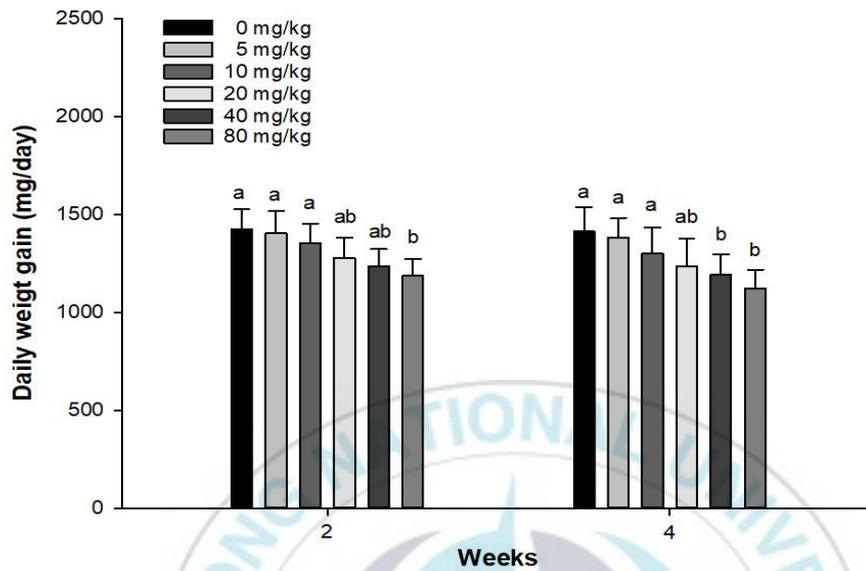


Fig. 4. Daily weight gain of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to the different concentration of dietary arsenic for 4 weeks. Value with different superscript are significantly different in 2 and 4 weeks (  $P < 0.05$ ) as determined by Duncan's multiple range test.

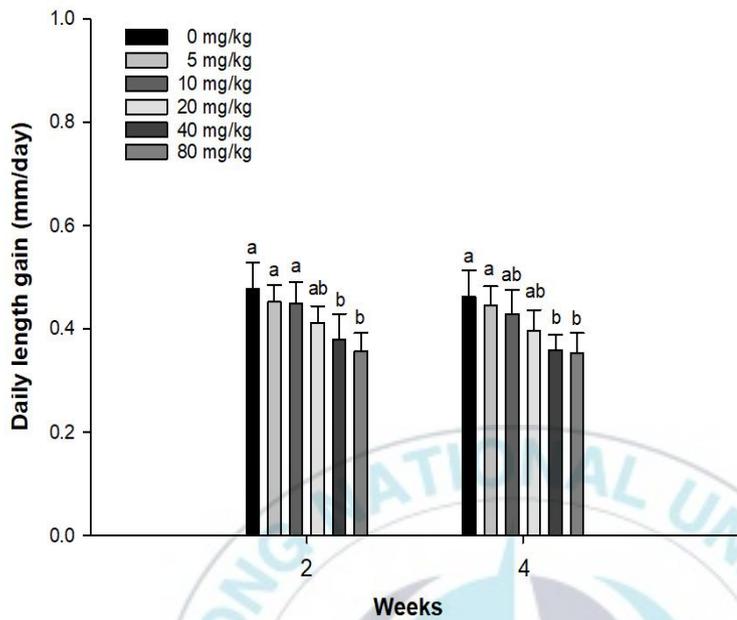


Fig. 5. Daily length gain of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to the different concentration of dietary arsenic for 4 weeks. Value with different superscript are significantly different in 2 and 4 weeks (  $P < 0.05$ ) as determined by Duncan's multiple range test.

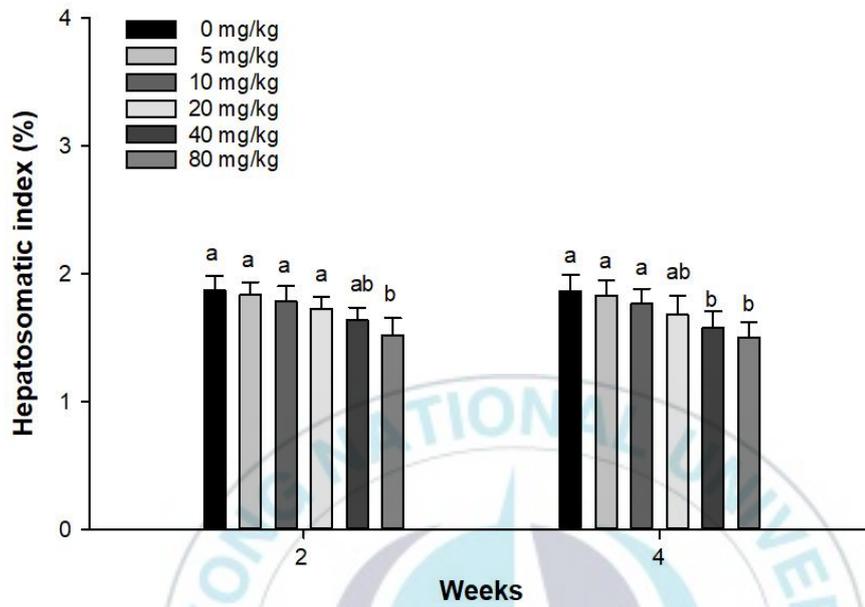


Fig. 6. Hepatosomatic index of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to the different concentration of dietary arsenic for 4 weeks. Value with different superscript are significantly different in 2 and 4 weeks (  $P < 0.05$ ) as determined by Duncan's multiple range test.

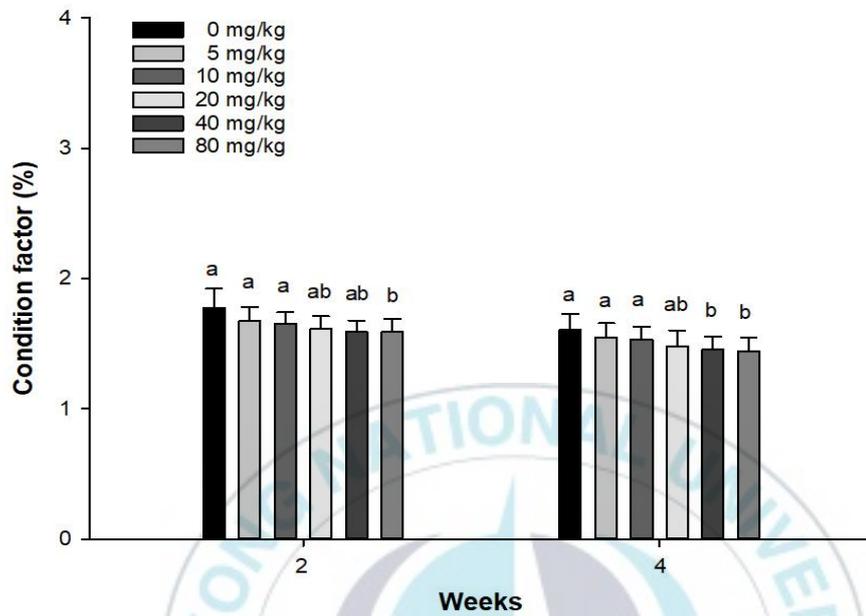


Fig. 5. Condition factor of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to the different concentration of dietary arsenic for 4 weeks. Value with different superscript are significantly different in 2 and 4 weeks (  $P < 0.05$ ) as determined by Duncan's multiple range test.

### 3. 혈액학적 분석

단계별 As 혼합 사료 급이에 따른 강도다리의 RBC count, hematocrit value, hemoglobin concentration 은 Table. 3에 나타내었다. RBC count의 결과 2주차에서는 80 mg/kg 농도에서 유의적인 감소가 나타났으며, 4주차에서는 40 mg/kg 농도 이상에서 유의적인 감소가 나타났다.

Hematocrit 실험의 결과로는 2주차에서 80 mg/kg 농도에서 유의적인 감소가 나타났으며, 40 mg/kg 이상의 농도에서 유의적인 감소가 나타났다. Hemoglobin의 결과, 2주차와 4주차에서 80 mg/kg 농도에서 유의적인 감소가 나타났다.

단계별 As 혼합 사료 급이에 따른 강도다리의 혈청 성분 변화는 Table. 4-6에 나타내었다.

무기성분으로는 칼슘과 마그네슘을 분석하였다. 무기성분 중 칼슘은 2주차와 4주차, 모든 농도에서 유의적인 변화가 나타나지 않았다. 또한, 마그네슘 분석 결과, 2주차와 4주차, 모든 농도 구간에서 유의적인 변화가 나타나지 않았다. 유기성분으로 혈당, 총단백질을 분석하였다.

유기성분 중 혈당은 2주차에서 40 mg/kg 농도 이상에서 유의적인 증가가 나타났으며, 4주차에서는 20 mg/kg, 80mg/kg 농도에서 유의적인 증가가 나타났다. 그러나, 총단백질의 분석 결과, 2주차와 4주차 모든 농도 구간에서 유의적인 변화가 나타나지 않았다.

효소 활성의 변화로 GOT와 GPT를 분석하였다. 효소 활성 중 GOT에서는 2주차에서 80 mg/kg 농도에서 유의적인 증가가 나타났으며, 4주차에서

는 40 mg/kg 농도에서 유의적인 증가가 나타났다. GPT는 2주차에서 80 mg/kg 농도에서 유의적인 증가가 나타났으며, 4주차에서 또한, 80 mg/kg 농도에서 유의적인 증가가 나타났다.



Table. 3. Change of RBC count, hematocrit, hemoglobin in starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to different concentration of dietary arsenic for 4 week

Parameters	Period (weeks)	Arsenic concentration ( mg / kg )					
		0	5	10	20	40	80
RBC count ( $\times 10^4 \text{mm}^3$ )	2	260.58 $\pm$ 20.84 <sup>a</sup>	259.26 $\pm$ 22.96 <sup>a</sup>	257.94 $\pm$ 22.23 <sup>a</sup>	237.45 $\pm$ 16.26 <sup>ab</sup>	234.21 $\pm$ 18.84 <sup>ab</sup>	200.84 $\pm$ 16.52 <sup>b</sup>
	4	259.24 $\pm$ 19.61 <sup>a</sup>	258.01 $\pm$ 22.34 <sup>a</sup>	252.51 $\pm$ 16.34 <sup>a</sup>	229.64 $\pm$ 21.95 <sup>ab</sup>	212.45 $\pm$ 18.21 <sup>b</sup>	195.56 $\pm$ 16.65 <sup>b</sup>
Hematocrit (%)	2	29.27 $\pm$ 1.79 <sup>a</sup>	29.61 $\pm$ 2.25 <sup>a</sup>	28.59 $\pm$ 1.87 <sup>a</sup>	25.45 $\pm$ 2.40 <sup>ab</sup>	23.27 $\pm$ 1.74 <sup>ab</sup>	19.21 $\pm$ 1.64 <sup>b</sup>
	4	29.19 $\pm$ 1.48 <sup>a</sup>	29.56 $\pm$ 1.35 <sup>a</sup>	25.08 $\pm$ 1.65 <sup>ab</sup>	22.31 $\pm$ 1.23 <sup>ab</sup>	20.13 $\pm$ 2.45 <sup>b</sup>	18.06 $\pm$ 1.84 <sup>b</sup>
Hemoglobin (g/dL)	2	6.06 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>	5.98 $\pm$ 0.39 <sup>a</sup>	5.78 $\pm$ 0.28 <sup>a</sup>	5.57 $\pm$ 0.42 <sup>ab</sup>	5.25 $\pm$ 0.27 <sup>ab</sup>	5.03 $\pm$ 0.35 <sup>b</sup>
	4	6.01 $\pm$ 0.31 <sup>a</sup>	5.84 $\pm$ 0.46 <sup>a</sup>	5.60 $\pm$ 0.42 <sup>ab</sup>	5.45 $\pm$ 0.38 <sup>ab</sup>	5.23 $\pm$ 0.29 <sup>b</sup>	4.98 $\pm$ 0.31 <sup>b</sup>

Value are mean $\pm$ S.D. Values with a different letter are significantly different from others at 2 weeks and at 4 weeks (P<0.05) as determined by Duncan's multiple range test.

Table. 4. Change of Calcium, Magnesium in starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to different concentration of dietary arsenic for 4 weeks

Parameters	Period (weeks)	Arsenic concentration ( mg / kg )					
		0	5	10	20	40	80
Calcium (mg/dL)	2	12.45±1.12 <sup>a</sup>	13.01±0.98 <sup>a</sup>	13.39±1.46 <sup>a</sup>	14.34±2.01 <sup>a</sup>	12.12±1.34 <sup>a</sup>	13.25±1.54 <sup>a</sup>
	4	13.46±1.28 <sup>a</sup>	13.33±1.53 <sup>a</sup>	14.25±1.86 <sup>a</sup>	14.21±1.57 <sup>a</sup>	13.34±1.21 <sup>a</sup>	13.54±1.56 <sup>a</sup>
Magnesium (mg/dL)	2	3.33±0.42 <sup>a</sup>	3.54±0.56 <sup>a</sup>	3.15±0.35 <sup>a</sup>	3.24±0.37 <sup>a</sup>	3.64±0.51 <sup>a</sup>	3.27±0.41 <sup>a</sup>
	4	3.57±0.64 <sup>a</sup>	3.69±0.45 <sup>a</sup>	3.89±0.22 <sup>a</sup>	3.12±0.27 <sup>a</sup>	4.01±0.42 <sup>a</sup>	3.68±0.59 <sup>a</sup>

Value are mean±S.D. Values with a different letter are significantly different from others at 2 weeks and at 4 weeks (P<0.05) as determined by Duncan's multiple range test.

Table. 5. Change of glucose, total protein in starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to different concentration of dietary arsenic for 4 weeks

Parameters	Period (weeks)	Arsenic concentration ( mg / kg )					
		0	5	10	20	40	80
Glucose (mg/dL)	2	87±4.39 <sup>a</sup>	87±4.64 <sup>a</sup>	88±4.12 <sup>a</sup>	91±4.78 <sup>ab</sup>	96±4.93 <sup>b</sup>	107±4.31 <sup>c</sup>
	4	88±4.52 <sup>a</sup>	89±4.76 <sup>a</sup>	92±4.13 <sup>ab</sup>	97±4.59 <sup>b</sup>	102±4.01 <sup>bc</sup>	109±4.27 <sup>c</sup>
Total protein (g/dL)	2	6.54±0.34 <sup>a</sup>	7.01±0.23 <sup>a</sup>	6.35±0.29 <sup>a</sup>	6.78±0.35 <sup>a</sup>	7.09±0.58 <sup>a</sup>	6.78±0.48 <sup>a</sup>
	4	5.99±0.23 <sup>a</sup>	6.47±0.27 <sup>a</sup>	6.51±0.38 <sup>a</sup>	7.05±0.41 <sup>a</sup>	6.59±0.39 <sup>a</sup>	6.59±0.36 <sup>a</sup>

Value are mean±S.D. Values with a different letter are significantly different from others at 2 weeks and at 4 weeks (P<0.05) as determined by Duncan's multiple range test.

Table. 6. Change of GOT, GPT in starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to different concentration of dietary arsenic for 4 weeks

Parameters	Period (weeks)	Arsenic concentration ( mg / kg )					
		0	5	10	20	40	80
GOT (Karmen/ml)	2	24.24±4.93 <sup>a</sup>	25.17±4.26 <sup>a</sup>	26.58±5.17 <sup>a</sup>	28.67±6.72 <sup>a</sup>	30.24±4.81 <sup>ab</sup>	34.64±6.22 <sup>b</sup>
	4	23.65±6.12 <sup>a</sup>	24.92±5.95 <sup>a</sup>	27.24±4.12 <sup>a</sup>	30.94±5.59 <sup>ab</sup>	33.18±5.23 <sup>b</sup>	37.25±5.75 <sup>b</sup>
GPT (Karmen/ml)	2	14.15±3.42 <sup>a</sup>	15.54±3.09 <sup>a</sup>	14.97±2.52 <sup>a</sup>	17.56±2.21 <sup>a</sup>	19.12±2.16 <sup>ab</sup>	22.27±2.91 <sup>ab</sup>
	4	15.62±2.69 <sup>a</sup>	16.21±2.75 <sup>a</sup>	16.37±2.29 <sup>a</sup>	20.59±3.55 <sup>ab</sup>	22.51±3.01 <sup>ab</sup>	25.03±1.59 <sup>b</sup>

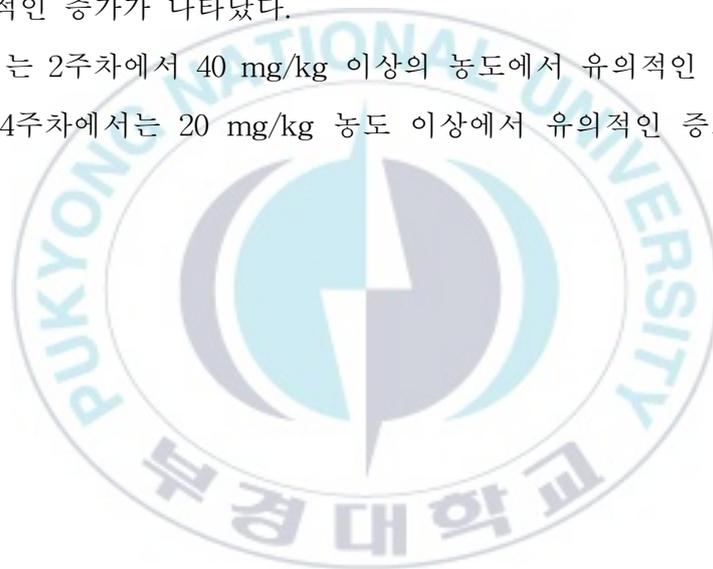
Value are mean±S.D. Values with a different letter are significantly different from others at 2 weeks and at 4 weeks (P<0.05) as determined by Duncan's multiple range test.

## 4. 항산화 효소

### 4-1. Superoxide dismutase (SOD)

단계별 As 혼합사료 급이에 따른 강도다리의 간, 아가미 내 SOD 활성은 Fig.6-7에 나타내었다. 간 내 SOD 활성은 2주차에서 40 mg/kg 이상의 농도에서 유의적인 증가가 나타났으며, 4주차에서 또한, 40 mg/kg 농도 이상에서 유의적인 증가가 나타났다.

아가미에서는 2주차에서 40 mg/kg 이상의 농도에서 유의적인 증가를 나타내었으며, 4주차에서는 20 mg/kg 농도 이상에서 유의적인 증가를 나타내었다.



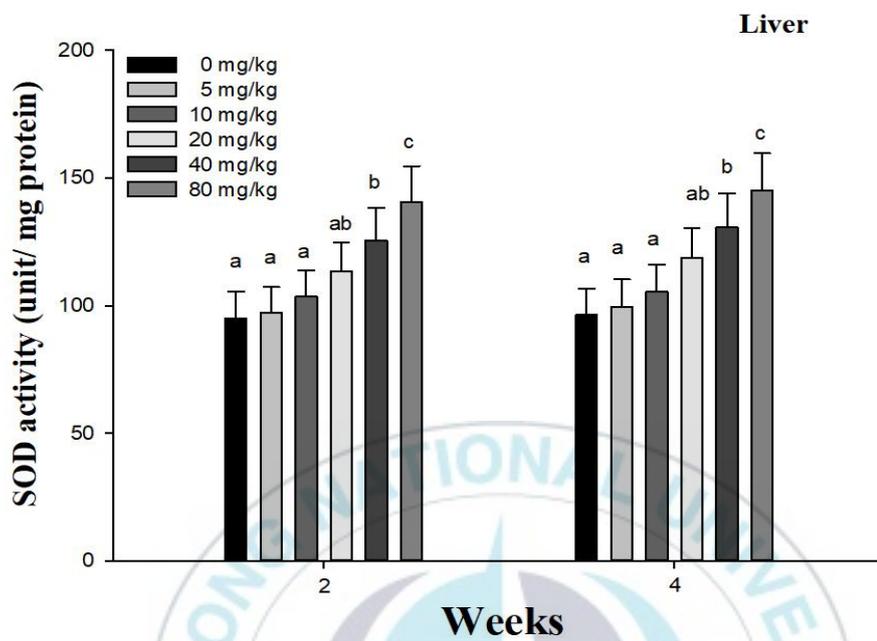


Fig. 6. SOD activity in liver of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to the different concentration of dietary arsenic for 4 weeks. Value with different superscript are significantly different in 2 and 4 weeks (  $P < 0.05$  ) as determined by Duncan's multiple range test.

## Gill

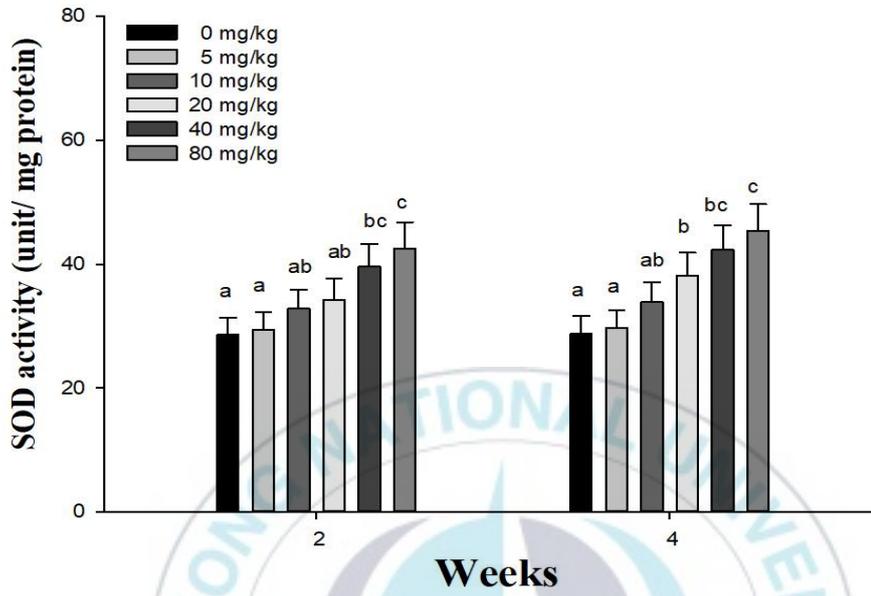


Fig. 7. SOD activity in gill of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to the different concentration of dietary arsenic for 4 weeks. Value with different superscript are significantly different in 2 and 4 weeks (  $P < 0.05$  ) as determined by Duncan's multiple range test.

#### 4-2. Catalase (CAT)

단계별 As 혼합사료 급이에 따른 강도다리의 간, 아가미 내 CAT 활성은 Fig. 8-9에 나타내었다. 간 내 CAT 활성은 2주차에서 40 mg/kg 농도 이상에서 유의적인 증가가 나타났으며, 4주차에서는 20 mg/kg, 80 mg/kg 농도에서 유의적인 증가가 나타났다.

아가미 내 CAT 활성은 2주차에서 40 mg/kg 농도 이상에서 유의적인 증가가 나타났으며, 4주차에서는 20 mg/kg 농도 이상에서 유의적인 증가가 나타났다.



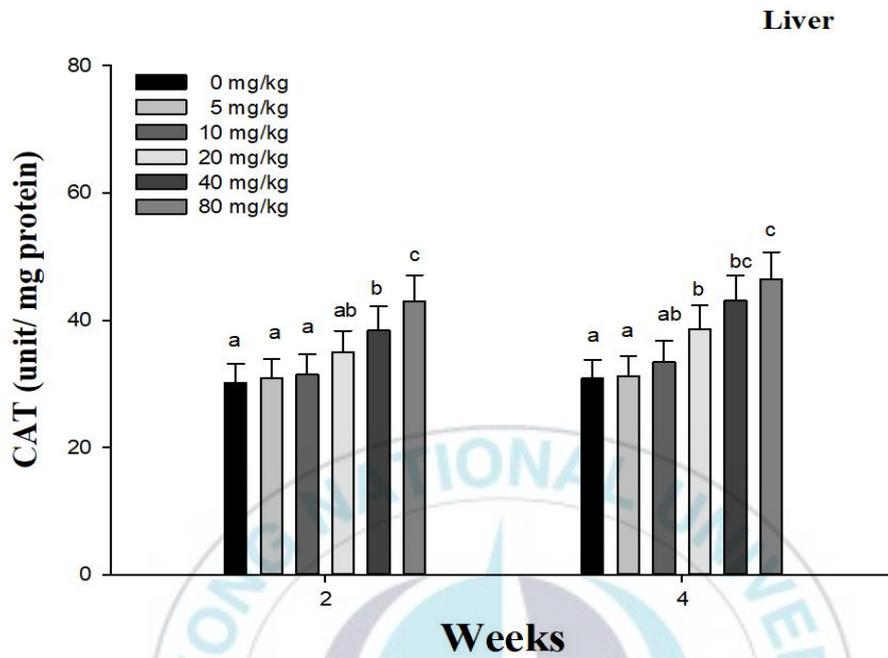


Fig. 8. CAT activity in liver of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to the different concentration of dietary arsenic for 4 weeks. Value with different superscript are significantly different in 2 and 4 weeks (  $P < 0.05$  ) as determined by Duncan's multiple range test.

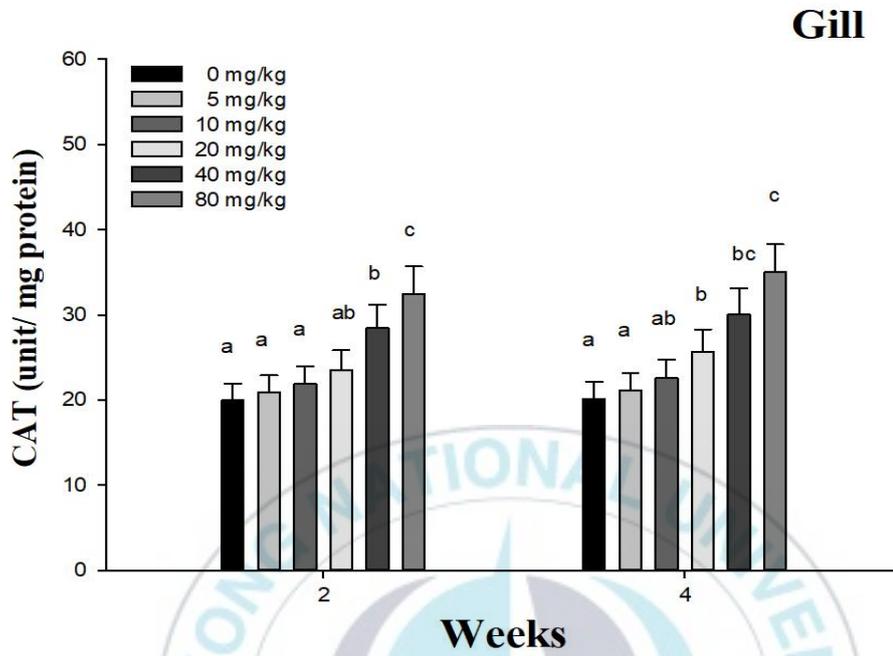


Fig. 9. CAT activity in gill of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to the different concentration of dietary arsenic for 4 weeks. Value with different superscript are significantly different in 2 and 4 weeks (  $P < 0.05$  ) as determined by Duncan's multiple range test

## 5. Lysozyme activity

단계별 As 혼합사료 급이에 따른 강도다리의 혈청 내 lysozyme activity 는 Fig. 10에 나타내었다.

혈청 내 lysozyme activity 결과는 2주차에서 40 mg/kg 농도 이상에서 유의적인 감소를 나타내었으며, 4주차에서는 20 mg/kg 농도 이상에서 유의적인 감소가 나타났다.



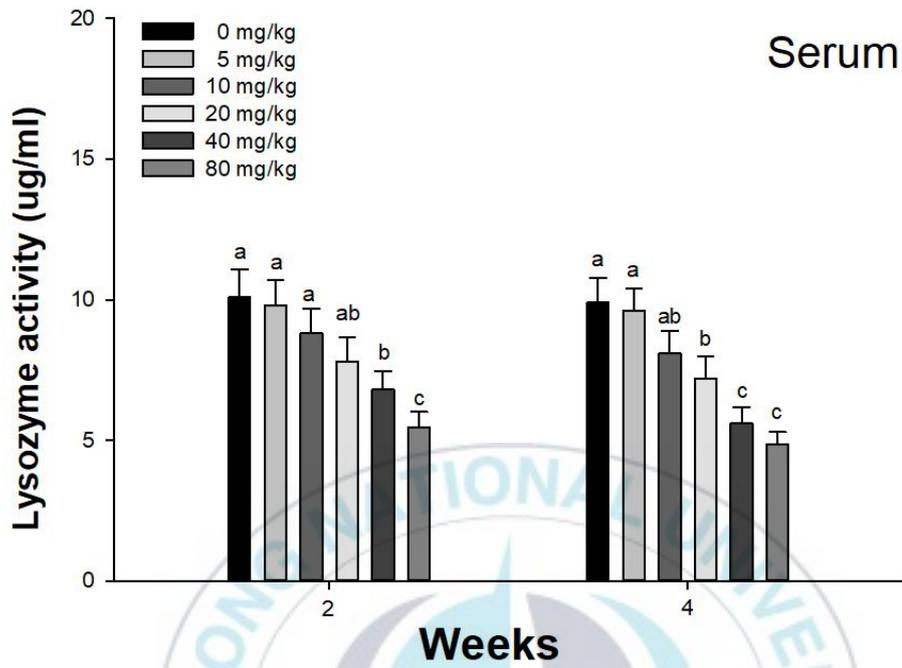


Fig. 10. Lysozyme activity in serum of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to the different concentration of dietary arsenic for 4 weeks. Value with different superscript are significantly different in 2 and 4 weeks (  $P < 0.05$  ) as determined by Duncan's multiple range test

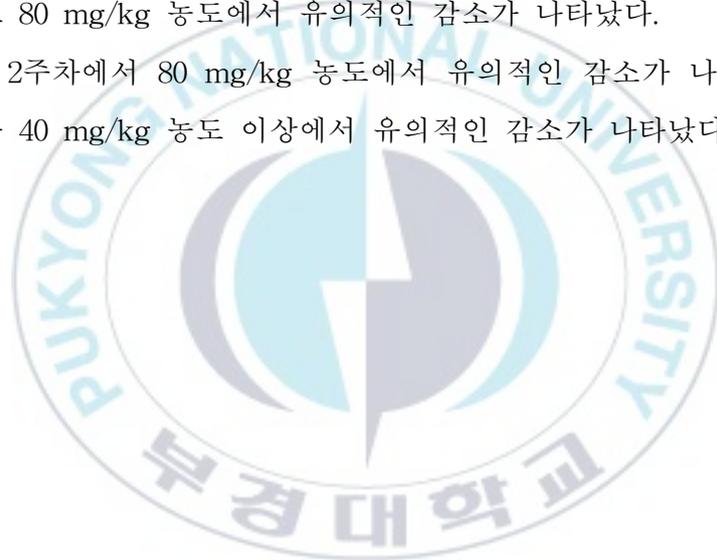
## 6. Acetylcholinesterase activity

단계별 As 혼합사료 급이에 따른 강도다리의 뇌, 근육, 장의 acetylcholinesterase activity는 Fig. 11-13에 나타내었다.

뇌에서는 2주차에서 40 mg/kg 농도에서 유의적인 감소가 나타났으며, 4주차에서는 20 mg/kg 농도 이상에서 유의적인 감소가 나타났다.

근육에서는 2주차에서 80 mg/kg 농도에서 유의적인 감소가 나타났으며, 4주차에서도 80 mg/kg 농도에서 유의적인 감소가 나타났다.

장에서는 2주차에서 80 mg/kg 농도에서 유의적인 감소가 나타났으며, 4주차에서는 40 mg/kg 농도 이상에서 유의적인 감소가 나타났다.



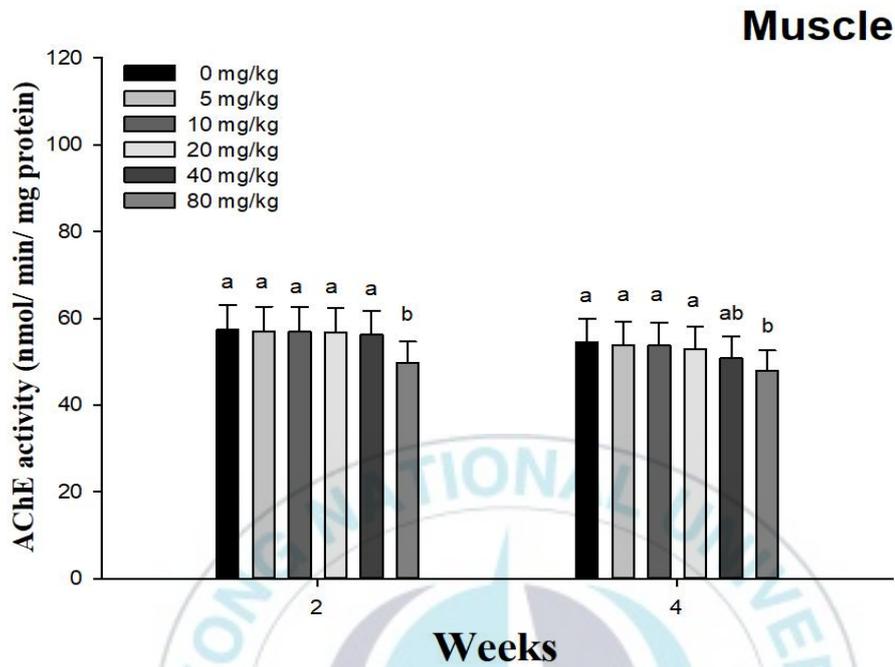


Fig. 11. Acetylcholinesterase activity in muscle of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to the different concentration of dietary arsenic for 4 weeks. Value with different superscript are significantly different in 2 and 4 weeks (  $P < 0.05$  ) as determined by Duncan's multiple range test

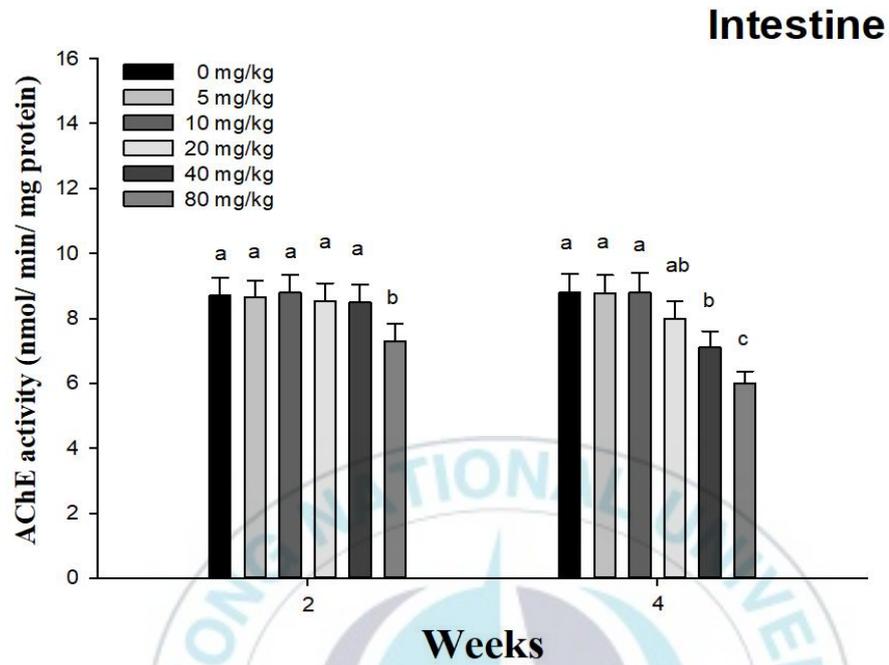


Fig. 12. Acetylcholinesterase activity in intestine of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to the different concentration of dietary arsenic for 4 weeks. Value with different superscript are significantly different in 2 and 4 weeks (  $P < 0.05$  ) as determined by Duncan's multiple range test

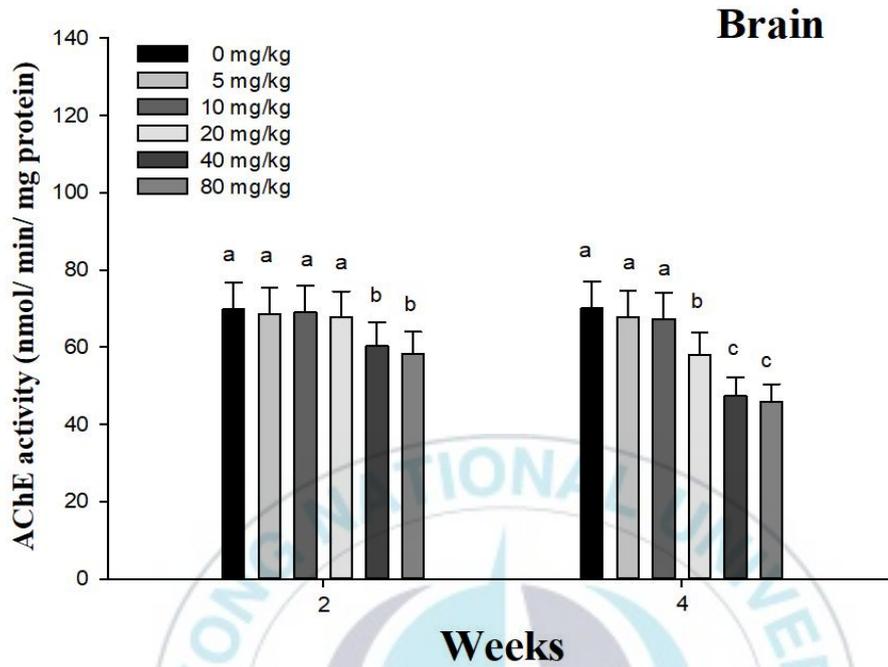


Fig. 13. Acetylcholinesterase activity in brain of starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to the different concentration of dietary arsenic for 4 weeks. Value with different superscript are significantly different in 2 and 4 weeks (  $P < 0.05$  ) as determined by Duncan's multiple range test

## IV. 고찰

자연계에 흔히 존재하는 비소(As)는 수생 환경에도 많이 퍼져있으며 가장 유해한 독성을 나타내는 중금속 중 하나이다(ATSDR., 2002;Reimer et al., 2002). 이러한 비소는 여러 국가에서 관리되고 있는 유해한 중금속 중 하나이지만, 여러 산업에서 사용되어지며 아직까지도 많은 오염을 야기하고 있다. 특히, 수중 생태계 내에서 어류가 비소에 오염된 먹이를 섭취하였을 경우, 장기간 독성을 유발할 뿐만 아니라(Handy, 1996), 간, 비장, 신장 등 여러 장기에서 많은 부작용을 나타낼 수 있다(Lamas et al., 2007). 또한, 이러한 비소는 어류의 여러 장기에 축적을 야기한다(Mason, Jenkins et al., 1995).

어류에서의 중금속 축적은 중금속의 노출 시간, 노출 농도뿐만 아니라 여러 다양한 요인으로 대사활동, 온도, 염분, 생화학적 작용 등 여러가지 요인에 의하여 영향을 받는다(Heather., 2005;Egan et al., 2007). 또한 축적은 주된 생체의 구성성분을 흡수하는 경로를 통하여 흡수가 되며, 이는 보통 먹이 섭취와 아가미 호흡이다(Ciardullo Silvia et al., 2008; Hughes et al., 2002). 주로 자연 상태의 어류의 축적은 먹이 섭취를 통하여 많이 이루어지며(Jason, Hong et al., 2006) 본 연구는 단계별 비소 농도를 함유한 사료를 제작하여 먹이 섭취에 따른 비소의 독성 영향 정도를 파악하였다. 비소를 혼합한 사료 급이에 따른 강도다리에서 가장 높은 축적 정도를 보인 조직은 장이었다. 장은 어류가 섭취한 먹이를 분해 및 흡수가 이루어지는 곳으로써, 제일 먼저 도달하는 부분이다(Thomann at el., 1997). 다른 연구 결과에서 무지개 송어를 통한 카드뮴 급이 실험시 장에서 가장

많은 축적이 나타난다고 알려져 있으며(Kitcin et al., 2001), 납을 이용한 급이 실험(Oliverira et al., 2006)에서도 장에서 가장 많은 축적이 이루어진다는 연구 결과가 있다. 비소를 함유한 먹이가 장에 도달하는데 장에서의 1차적인 반응으로 장벽을 원활하게 통과하지 못하도록 하기 위하여 점액을 장벽에 분비하고 이에 따라 금속물질이 장에 축적된다는 연구 결과도 있었다(Hogstrand et al., 2002). 또한, 비소가 함유된 먹이를 먹은 틸라피아에서 장에서 가장 높은 축적을 나타내었다고 보고되었다(Nussey, Van vuren et al 1995).

중금속의 축적이 체내에서 많이 이루어지는 장기는 대사활성이 많이 이루어지는 곳으로, 대표적인 장기인 간이다. 간은 독성 물질이 체내에 들어왔을 시 축적과 생체변환 및 해독과정이 이루어지는 주요 기관이며 이러한 간의 역할로 축적의 정도를 파악할때 중요한 지표가 된다(Lloyd et al., 2013). 또한, 간의 축적은 장 등 소화 기관에서 흡수된 중금속이 혈류를 통해 체내에서 비소가 이동되었다고 알 수 있다. 비소 등 중금속 노출시 어체 내에서는 메탈로티오네인과 같은 금속 결합단백질이 유도되어 금속 성분과 결합하여 해독과정이 이루어 지는데, 이와 같은 역할을 하는 중추적인 기관이 간이다(Roesijadi et al., 1994). 따라서 본 연구의 결과에서도 강도다리의 간에서 비소 농도에 따라 유의적으로 증가하였다.

강도다리와 같은 경골어류의 아가미는 가스교환뿐만 아니라 체내 산-염기 조절, 노폐물 배출 및 이온조절에 있어 중요한 역할을 담당한다. 일반적으로 중금속의 waterborne 노출 시 먹이 섭취에 따른 노출보다 아가미에서 보다 높은 축적을 나타낸다(Richardson et al., 1975). 이는 아가미가 수중 환경에서 바로 노출되어 상호적인 작용이 이루어지는 조직이기 때문이다(Chang et al., 1998). 본 연구는 사료 급이를 통한 강도다리의 비소 독성 정도를 파악한 실험으로 아가미 축적이 나타났지만 장에 비하여 낮

은 축적을 보였다. 식이를 통하여 체내로 들어온 비소가 장에서 흡수되어 혈류를 통하여 아가미로 들어가 축적이 이루어지고 상당한 손상을 야기할 수 있다(Cockell and Hilton, 1988). 무지개 송어에 납이 포함된 먹이를 노출 시켰을 때도 같은 연구 결과가 나타났다(Pandey and Shukla, 1982).

어류의 성장변화 관찰은 독성 연구에서 보편적으로 이용되어지는 독성 평가 지표이다(De Castro et al., 2009). 일반적으로 어류 성장은 영양분을 섭취하고 흡수를 통하여 이루어지지만, 중금속과 같은 독성물질이 체내에 유입될 때 독성물질을 해독하기 위하여 체내에서 신진대사가 일어난다(Collvin, 1985), 이러한 신진대사의 영향으로 성장에 위해 섭취한 영양분과 에너지를 신진대사를 하기 위해 사용되어지며 그에 따라 성장이 저해된다고 알려져 있다(Roche and Mattei et al., 1997). 본 연구에서는 성장변화 관찰을 위하여 일일체중성장량(daily weight gain), 일일전장성장량(daily length gain), 간중량지수(hepatosometric index), 비만도지수(condition factor)를 측정하였으며 함유된 비소가 높은 사료를 주입할 경우 보다 높은 성장 저해 정도를 나타내었다. 다른 연구 결과인 비소에 노출된 틸라피아에서도 비슷한 경향을 보인다고 보고가 되었다(Roy and Bhattacharya, 2006). 따라서 비소의 영향으로 성장이 저해가 되었다고 판단할 수 있다.

성장과 더불어 독성 평가 지표로 많이 활용 되는 것으로 혈액학적 성상 분석이 있다. 이는 혈액학적 성상 분석이 오염 물질 노출에 따른 독성 영향 정도를 판명하기 위해 생리학적인 임상 진단 방법 중 하나가 되기 때문이다(Barcellos et al., 2004). 또한, 고농도의 비소 노출은 어류에게서 혈액학적 지표를 변화시킬 수 있다(Ishaque et al, 2004). 이러한 혈액학적 지표는 어류에서 독성 오염 물질 노출에 따른 생리학적인 변화와 어류 체내의 구조적인 상태를 측정하기 위한 방법이다(Suvetha et al., 2010). 본 연

구에서는 비소에 노출된 강도다리의 혈액학적 지표, RBC count, 헤모글로빈 농도, hematocrit 수치 모두 유의적인 감소를 나타내었다. 보통 어류가 중금속에 노출될 시 아가미가 구조적인 변형을 일으키거나 상처를 입는 등의 손상을 야기시킨다(Mallet, 1985). 이러한 아가미에 대한 손상은 아가미에서의 가스교환 및 이온교환이 저해되고 그에 따라 혈액학적 성상의 변화에 영향을 미친다(A. Larsson et al., 1980). 중금속에 노출이 된 다른 어류를 다룬 연구 결과에서도 비슷한 결과를 나타낸다(Smet and R. Blust., 2001; Lohner et al., 2001; Gurer et al., 1998; G. Federici et al., 2007). 또한, 중금속의 영향으로 인하여 어류 내에서 적혈구의 swelling을 야기하며, swelling 등으로 변형된 적혈구는 제 기능을 수행할 수 없으며 헤모글로빈과 hematocrit 수치의 변화를 야기한다(Maheswaran et al., 2008). 비소의 독성으로 인하여 나타난 아가미의 손상과 적혈구의 변형 및 파괴는 빈혈을 유발하며, 이러한 빈혈은 혈액성상이 변화되어진 지표로써 활용되어진다(Vinodhini and Narayanan, 2009). 따라서, 본 연구 결과인 혈액학적 성상 변화가 유의적인 감소를 나타낸 것으로 보아 비소에 대한 영향으로 강도다리 내의 아가미 혹은 적혈구가 손상을 입었으며, 그에 따라 빈혈을 일으킬 수 있다고 사료된다.

혈장 내 무기성분인 칼슘과 마그네슘을 변화를 관찰하는 것은, 이 두 이온이 항상성을 유지하기 위해 이온 조절을 하기 때문에 금속물질의 독성을 확인할 수 있는 좋은 평가 지표로 활용되어진다(Vutukuru, 2003). MacDonald et al(2002)는 중금속 성분이 칼슘과 마그네슘의 이온 교환 과정에 영향을 미쳐 두 이온 모두 낮아진다는 연구가 있었으며, 칼슘과 마그네슘이 장에서 흡수될 때 중금속이 길항적으로 작용하여 흡수를 방해하여 체내 농도가 낮아진다는 연구도 있었으나(Sorensen, 1991) 본 연구에서는 칼슘과 마그네슘의 분석 결과 유의적인 변화가 나타나지 않았으며 이

러한 이유는 칼슘과 마그네슘이 체내에서 부족해짐에 따라 항상성 유지의 작용으로 아가미에서 재흡수가 일어났을 수 있다(Pratap et al., 1988). 본 연구에서 유기성분 분석을 위하여 혈청 내 글루코즈와 혈장 단백질의 변화를 관찰 하였으며, 글루코즈는 유의적인 증가를 보였으나 혈장 단백질은 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 혈청 내 글루코즈의 변화를 살피는 것은 스트레스에 대한 작용을 알기 위한 지표로 사용되어지며(Nemcsok and Boross, 1981), 독성물질에 대한 스트레스 작용으로 인하여 농도가 조절 되어진다. 비소가 어류 체내에 들어오게 되면 비소에 따른 스트레스가 발생하게 되고 생성된 스트레스를 저해하기 위하여 에너지의 이동 및 대사가 이루어지게 된다. 에너지의 이동 및 대사 작용을 위하여 필요한 글루코즈를 위하여 혈중 내에서 글루코즈의 농도가 증가하게 된다(Aly et al., 2003). 따라서 비소는 강도다리 체내에서 스트레스를 발생시켰으며 글루코즈 변화를 토대로 스트레스를 극복하는 작용이 이루어 지는 것을 알 수 있다. 혈청 내 혈장 단백질의 변화는 '오염 물질 스트레스에서 대사의 건강 상태 및 생물학적인 매커니즘을 나타내는 좋은 지표로 활용된다(Mirghaed, A. at el., 2007). 이전 연구에서 독성 화학물질인 제초제에 노출된 틸라피아 실험에서 총 단백질의 증가가 나타났으며(A. Figueiredo et al., 2005), 어류가 낚에 노출될 시 수치가 감소한다는 연구도 있었으나(Martinez et al., 2003) 본 연구에서는 혈장 단백질 수치는 유의적인 변화가 나타나지 않았다.

비소 등 중금속에 대한 간세포독성을 알 수 있는 지표로, GOT(glutamic acidoxaloacetic acid-transaminase)와 GPT(glutamic acid-pyruvic acidtransaminase)를 측정하였다. 이러한 두 효소는 간의 효소로써 오염 물질이나 독성물질, 혹은 스트레스에 의하여 간에서 독성이 나타날 때 간에서 배출이 증가하면서 혈액 내에 농도가 증가하게 된다(Zaki et al.,

2009). 또한, 간의 손상이 야기 될 때 다량의 GPT, GOT 효소들이 혈중으로 증가하게 된다(Wu, J. P. et al., 2004). 본 연구에서는 단계별 비소 함량이 증가한 사료를 주입하였을 경우, 주입 기간이 증가하였을 경우에 따라 모두 유의적인 증가를 나타내었다. 이는 앞서 간에 축적이 이루어진 비소가 독성을 일으켰으며 그에 따라 간에서 GOT와 GPT의 분비를 증가하였다고 볼 수 있다. 또한, 비소 노출은 간 세포의 사멸을 유도한다(Limuro et al., 1998).

비소와 같은 중금속 및 여러 독성 오염 물질들은 어류 체내에서 산화스트레스를 유발하는 인자이다(Livingstone., 2002). 이러한 산화스트레스가 나타나는 작용은 어류의 많은 종에서 연구가 되어졌으며(Soundararajan et al., 2009), 활성 산소(reactive oxygen species, ROS)가 체내에서 제거되는 양에 비하여 생성되는 양이 많을 때 일어난다(Sies, 1986). 여러가지 연구 결과에서 나타나듯이 비소 및 비소 화합물들은 활성 산소(ROS)의 생성을 촉진시킴으로써 체내 여러 세포에 영향을 미친다고 알려져 있다(Burdon et al., 1987; Sakurai et al 2005). 활성 산소의 증가로, 세포의 산화-환원 반응 및 지질과 단백질의 산화, 유전자의 변화 등을 일으킬 수 있다(Liu et al., 2009). 이러한 독성물질의 영향으로 산화스트레스의 작용에 대하여 생물체는 스스로의 방어기작을 가지고 있으며, 방어기작의 구성요소로 항산화 효소를 가진다(Gutteridge, 2007; Kharroubi et al., 2014). 이러한 항산화 효소는 체내에서 생성되며, 중금속 노출 시 활성산소를 억제하는 방어기작을 나타내는 효소이다. 이러한 효소로, SOD(superoxide dismutase), CAT(catalase), GST(glutathione-s-transferase) 등이 있다(Mates, 2000).

본 연구에서는 이러한 반응을 관찰하기 위하여 SOD와 CAT를 분석하였다. SOD는 산화 스트레스에 대하여 첫 번째로 작용하며, SOD는

superoxide radical( $O_2^-$ )를 과산화수소( $H_2O_2$ )으로 전환시키는 반응을 촉매하는 항산화 효소이다(Shao et al., 2012). 이러한 반응은 활성 산소에 의하여 나타나는 산화스트레스를 줄여주는 역할을 한다. 비소의 노출 농도 및 노출 시간, 경로 등에 따라 SOD가 촉진되거나 억제되기도 한다(Zhang et al., 2006). SOD 작용을 이어 CAT가 작용하는데, CAT는 SOD의 반응 후 남은 과산화수소를 물( $H_2O$ )과 산소( $O_2$ )로 분해하는 역할을 한다. 본 연구의 결과는 SOD와 CAT 모두, 간과 아가미 조직에서 비소의 농도가 증가됨에 따라 SOD와 CAT의 값이 유의적으로 증가하는 경향이 나타났다. 따라서, 강도다리가 비소에 노출되어 그에 따른 활성 산소 유발로 산화스트레스를 받고 있으며 이에 반한 방어기작이 활성화되고 있다고 사료된다.

아세틸콜린에스테라아제 활성(acetylcholinesterase(AChE) activity) 변화는 중금속에 체내에 유입되었을 경우, 중금속 오염에 대하여 중추신경계의 독성을 알 수 있는 지표로 활용되어진다(Saurabh and Sahoo., 2008). 이러한 이유는 중금속이 콜린에스테라아제에 반하는 anti-cholinesterase로써 작용을 하기 때문이며(Costa, 2007), 정확한 기전으로 알려져 있지 않지만, 장기에 축적된 중금속이 에스테라아제와 복합체를 형성하면서 아세틸콜린에스테라아제가 활성이 저해된다고 알려져 있다(Guilhermino et al., 1998). 본 연구에서는 뇌, 근육 그리고 장에서 아세틸콜린에스테라아제 활성을 분석하였다. 연구의 결과는 모든 조직에서 비소의 함량이 많아 질수록 유의적인 감소를 나타내었으며, 특히 신경계와 밀접한 연관을 가지는 뇌와 근육 조직에서 더 큰 폭으로 감소를 나타내었다. 따라서 강도다리 체내에 들어간 비소가 중추 신경계의 독성을 야기하는 것을 알 수 있었다.

라이소자임(Lysozyme)은 어류의 중요한 선천성 면역 인자 중 하나로, 광범위한 항균 스펙트럼을 가지고 주요 그람 양성 박테리아 및 일부 그람 음성 박테리아의 세포벽에 있는 펩티도 글리칸 층을 파괴한다. 따라서 혈

청 내 라이소자임 활성의 변화는 독성물질이 어류 체내 면역에 미치는 영향 정도를 파악할 수 있는 좋은 지표이다(Adeyemi et al., 2014). 라이소자임 활성은 병원성 박테리아 및 기타 다양한 스트레스 요인이 어류를 공격할 때 면역 기능을 향상 시키도록 조절된다(Sanchez Dardon et al., 1999). 또한, 독성물질이 작용할 때에도 활성이 된다고 알려져 있다. 이전 연구에서 수은에 노출된 어류에서 라이소자임의 활성이 낮아지는 것을 알 수 있었고(Flecher, 1998), 비소에 노출된 틸라피아에게도 라이소자임의 활성이 낮아지는 것을 알 수 있었다(Bhattachaya et al., 2007). 본 연구에서도 노출되는 비소 농도가 높아질수록 라이소자임 활성이 저하하였는데, 이는 라이소자임이 활성화 되어 소비되는 것에 비하여 라이소자임을 합성하기 위한 능력이 약화된 것으로 간주된다(Low and Sin, 1998). 따라서 비소 노출이 된 강도다리의 면역 기능이 저하한것을 알 수 있었다.

현재 국가에서 지정하여 관리하는 유해한 중금속 중 하나인 비소이지만, 비소를 사용하는 많은 산업들이 활성화 되어 있는 지금도 많은 비소 화합물들이 생태계에 흘러 들어와 오염을 야기하고 있다. 이러한 오염은 단순히 수중 생태계를 오염시키는 것뿐만 아니라 먹이 연쇄 작용으로 이러한 어류를 섭취하는 사람들에게도 영향을 미칠 수 있다. 또한 어류의 독성 정도는 독성의 종류, 노출 정도, 온도, 염분, 해당 어종의 발육 상태, 종별 특이성 등 여러 가지 영향을 받고 그에 따라 지속적인 모니터링이 필수적이다. 본 연구는 비소를 포함한 사료를 제작하여 먹이를 통하여 강도다리에게 급이하였으며 그에 따른 변화정도를 관찰하였다. 비소의 오염정도가 높은 지역에서는 강도다리에게 더 높은 독성 영향 정도를 나타내었다. 하지만 앞서 언급했듯 독성물질의 종류, 어종 및 환경 등에 따라 독성 영향은 달라질 수 있으며 그에 따라 다양한 관점에서 독성연구가 추가적으로 이루어져야 할것으로 판단된다.

## V. 요약

비소는 환경 중에 널리 분포하는 금속 물질 중 하나이며, 강한 독성을 가지는 환경 오염물질이다. 이러한 비소는 살충제, 목재 보존제 등에도 쓰이며 유리 및 전자기기 제조 등의 여러 산업에서 사용되어 지고 이는 환경을 오염시켜왔다. 환경에 노출된 비소 오염은 어류 및 수중 생물에 게 많은 영향을 야기하며 그에 따라 먹이연쇄에 따른 사람에게도 영향을 미칠 수 있다.

비소 노출에 따른 생체 축적 및 혈액학적, 항산화, 면역반응의 변화를 확인하기 위하여 강도다리(평균 전장  $20.9 \pm 1.6$ cm, 평균 체중  $152.5 \pm 13.7$ g) 를 이용하여 비소를 단계별 농도 0, 5, 10, 20, 40, 80 mg/kg으로 나누어 사료를 제작 후 급이하여 실험하였다.

실험기간은 총 5주로, 순치기간을 제외하고 2주와 4주차에 각각 샘플링을 실시하였으며, 실험 사료 급이 전, 전장과 체중을 측정하고 2주, 4주 샘플링 과정에서 다시 측정하여 일일전장성장량, 일일체중성장량, 비만도 및 간중량 지수로 성장 인자를 확인하였으며, 혈액을 채취하고 전혈을 이용하여 RBC Count, Ht 수치, Hb 농도를 측정하였으며, 혈청을 분리하고 무기성분인 칼슘과 마그네슘, 유기성분인 총단백질과 혈당, 효소활성의 변화 관찰로 GOT와 GPT를 측정하였다. 또한, 샘플링한 조직을 이용하여 SOD 활성 변화와 CAT 활성 변화를 측정하였고 AchE 활성 변화와 Lysozyme 활성 변화를 관찰하였다. 그리고 ICP-MS기기를 이용하여

조직 내 축적을 측정하였다.

이에 따른 결과로 성장 관련 인자에서는 유의적인 감소가 나타났으며, 전혈을 이용한 RBC, Hb, Ht 인자 또한 유의적인 감소를 확인할 수 있었다. 혈청 성분을 이용한 분석은 칼슘과 마그네슘 측정은 유의적인 변화가 없었으나, 글루코즈는 유의적인 변화가 나타났으나 총단백질에서는 유의한 변화가 나타나지 않았다. GOT와 GPT는 유의적인 증가가 나타났다. 비소 노출에 따른 항산화반응에서 SOD와 CAT 모두 유의적인 증가를 나타냈으며, AchE와 Lysozyme 활성은 유의적인 감소를 나타냈으며, 생체 축적은 유의적으로 증가하였다.



## 참 고 문 헌

ATSDR, 2002. Interaction Profiles for Toxic Substances. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Atlanta, GA: Agency for Toxic Substances and Disease Registry, <http://www.atsdr.cdc.gov/iphome.html>.

ATSDR, 2006. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Toxicological Profiles for Arsenic. Atlanta, USA. Basaglia, F., 2000. Isozyme distribution of ten enzymes and their loci in South American lung fish, *Lepidosiren paradoxa* (Osteichthyes, Dipnoi). *Comp. Biochem. Physiol. B* 126, 503 - 510.

Ayotte, J.D., Montgomery, D.L., Flanagan, S.M. and Robinson, K.W.: Arsenic in groundwater in eastern New England: occurrence, controls, and human health implications. *Environ. Sci. Technol.*, 37:2075-2083, 2003.

Baumann, Z., Fisher, N.S., 2011. Relating the sediment phase speciation of arsenic, cadmium, and chromium with their bioavailability for the deposit-feeding polychaete *Nereis succinea*. *Environ. Toxicol. Chem.* 30,

747 - 756.

Bhattacharya, A., Bhattacharya, S., 2007. Induction of oxidative stress by arsenic in *Clarias batrachus*: involvement of peroxisomes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 66, 178 - 187.

Bhattacharya, T., Ray, A.K., Bhattacharya, S., 1987. Blood glucose and hepatic glycogen. Interrelationship in *Channa punctatus* (Bloch). A parameter of nonlethal toxicity bioassay with industrial pollutants. *Indian J. Exp. Biol.* 25, 539 - 541.

Brannon, J.M., Patrick Jr., W.H., 1987. Fixation, transformation, and mobilization of arsenic in sediments. *Environ. Sci. Technol.* 121, 450 - 459.

Casado-Martinez, M.C., Smith, B.D., Luoma, S.N., Rainbow, P.S., 2010. Bioaccumulation of arsenic from water and sediment by a deposit-feeding polychaete (*Arenicola marina*): a biodynamic modelling approach. *Aquat. Toxicol.* 98, 34 - 43.

Chang, S., Zdanowicz, V.S., Murchelano, R.A., 1998. Associations between liver lesions in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) and sediment chemical contaminants from north-east United States estuaries. *ICES J. Mar. Sci.* 55, 954 - 969.

Cockell, K.A., Hilton, J.W., 1988. Preliminary investigations on the comparative chronic toxicity of four dietary arsenicals to juvenile rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Aquat. Toxicol.* 12, 73 - 82.

Cockell, K.A., Hilton, J.W., Bettger, W.J., 1991. Chronic toxicity of dietary disodium arsenate heptahydrate to juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 21, 518 - 527.

Culioli, J.L., Fouquoire, A., Calendini, S., Mori, C., Orsini, A., 2009. Trophic transfer of arsenic and antimony in a freshwater ecosystem: a field study. *Aquat. Toxicol.* 94, 286 - 293.

De Castro, M.R., Lima, J.V., de Freitas, D.P., Valente Rde, S., Dummer, N.S., de Aguiar, R.B., dos Santos, L.C., Marins, L.F., Geracitano, L.A., Monserrat, J.M., Barros, D.M., 2009. Behavioral and neurotoxic effects of arsenic exposure in zebrafish (*Danio rerio*, Teleostei: Cyprinidae). *Comp. Biochem. Phys. C* 150, 337-342.

Egan S, Bolger P, Carrington C., 2007 Update of US FDA's total diet study food list and diets. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 17:573 - 582

Eisler, R.: Arsenic hazards to fish, wild life and invertebrates: a synoptic review. *U.S. Fish. Wildl. Serv. Biol.*, 85:1-12, 1988.

Farag, A.M., Woodward, D.F., Goldstein, J.N., Brumbaugh, W., Meyer,

J.S., 1998. Concentrations of metals associated with mining waste in sediments, biofilm, benthic macroinvertebrates, and fish from the Coeur d'Alene River Basin, Idaho. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 34, 119 - 127.

Farag, A.M., Stansbury, M.A., Hogstrand, C., Macconnell, E., Bergman, H., 1995. The physiological impairment of freeranging brown trout exposed to metals in the Clark Fork River, Montana. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 52, 2038 - 2050.

Farombi EO, Adelowo OA, Ajimoko YR (2007) Biomarkers of oxidative stress and heavy metal levels as indicators of environmental pollution in African cat fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River. Int J Environ Res Publ Health 4:158 - 65

Federici, G., Benjamin, J.S. and Richard, D.H.: Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. Aqua. Toxicol., 84:415-430, 2007.

Figueiredo, A., Fontainhas-F, A., Peixoto, F., Rocha, E. and Reis-H, M.A.: Effects of gender and temperature on oxidative stress enzymes in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to paraquat. Biochem. Physiol., 85:97-103, 2006.

Georgopoulos P, Wang SW, Yang YC, Xue J, Zartarian V, McCurdy T, Ozcaynak H (2008) Biologically based modeling of multimedia, multipathway, multiroute population exposures to arsenic. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 18(5):462 - 476

Goessler, W., Kuehnett, D., 2002. Analytical Methods for the Determination of Arsenic and Arsenic Compounds in the Environment, *Environmental Chemistry of Arsenic*. Marcel Dekker, New York, pp. 27 - 50.

Hall, M., Chen, Y., Ahsan, H., Slavkovich, V., Geen, A.V., Parvez, F., Graziano, J., 2006. Blood arsenic as a biomarker of arsenic exposure: results from a prospective study. *Toxicology* 225, 225 - 233.

Handy, R.D., 1996. Dietary exposure to toxic metals in fish. In: Taylor, E.W. (Ed.), *Toxicology of Aquatic Pollution: Physiological, Cellular and Molecular Approaches*, Cambridge University Press, pp. 29 - 60.

Heather, B., Jeff, G.R. and Patricia, M.S.: Arsenic exposure alters hepatic arsenic species composition and stress-mediated gene expression in the common killifish (*Fundulus heteroclitus*). *Aquat. Toxicol.*, 77:257-266, 2005.

Hogstrand, C., Ferguson, E.A., Galvez, F., Shaw, J.R., Webb, N.A., Wood, C.M., 1999. Physiology of acute silver toxicity in the starry

flounder *Platichthys stellatus* in seawater. *J. Comp. Physiol. B* 169, 461 - 473.

Hughes, M.F.: Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicol. Lett.* 133: 1-16, 2002.

Ishaque, A.B., Tchounwou, P.B., Wilson, B.A., Washington, T., 2004. Developmental arrest in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) embryos exposed to sublethal concentrations of atrazine and arsenic trioxide. *J. Environ. Biol.* 25, 1 - 6.

Jason, M.H. Hong, Z. and Dean, P.J.: Differential oxidation of thioredoxin-1, thioredoxin-2, and glutathione by metal ions. *Free Radic. Biol. Med.* 40: 138-145, 2006.

Karagas, M.R., Stukel, T.A. and Tosteson, T.D.: Assessment of cancer risk and environmental levels of arsenic in New Hampshire. *Environ. Health.*, 205: 85-94, 2002.

Kavitha, C., Malarvizhi, A., Senthil Kumaran, S., Ramesh, M., 2010. Toxicological effects of arsenate exposure on hematological, biochemical and liver transaminases activity in an Indian major carp, *Catla catla*. *Food Chem. Toxicol.* 48, 2848 - 2854.

Kitchin, K.T., 2001. Recent advances in As carcinogenesis: modes of action, animal models systems and methylated As metabolites. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 172, 249 - 261.

Kubota, R., Kunito, T., Tanabe, S., 2001. Arsenic accumulation in the liver tissue of marine mammals. *Environ. Pollut.* 115, 303 - 312.

Lamas S, Fernandez JA, Aboal JR, Carballeira A (2007) Testing the use of juvenile *Salmo trutta* L. as biomonitors of heavy metal pollution in freshwater. *Chemosphere* 67:221 - 228

Larsson, A., Lehtinen, K.J. and Haux, C.: Biochemical and hematological effects of a titanium dioxide industrial effluent on fish. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 25:427-435, 1980.

Limuro, Y., Nishiura, T., Hellerbrand, C., Behrns, K.E., Schoonhoven, R., Grisham, J.W., Brenner, D.A., 1998. NF $\kappa$ B prevents apoptosis and liver dysfunction during liver regeneration. *J. Clin. Invest.* 101, 802 - 811.

Liu, F., Kendall, R.J., Theodorakis, C.W., 2005. Joint toxicity of sodium arsenate and sodium perchlorate to zebrafish *Danio rerio* larvae. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 1505-1507.

Liu, H., Zhang, J.F., Shen, H., Wang, X.R. and Wang, W.M.: Impact of Copper and Its EDTA Complex on the Glutathione-Dependent

Antioxidant System in Freshwater Fish (*Carassius auratus*). Bull. Environ. Contam. Toxicol. 74: 1111-1117, 2005.

Livingstone, D.R.: Contaminant-stimulated reaction oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. Mar. Pollut. Bull. 42: 656-666, 2001.

Lloyd, C., Lanz, C., Raddatz, G., Schuster, S.C., 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. Nature 496, 498-503.

Lowe, T.P., May, T.W., Brumbaugh, W.G., Kane, D.A., 1985. National contaminant biomonitoring program: concentrations of seven elements in freshwater fish, 1978 - 1981. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 14, 363 - 388.

M.A.F., Rabitto, I.S., Alves, S.R.M. and Pelletier, E.: Hematological findings in neotropical fish *Hoplias malabaricus* exposed to subchronic and dietary doses of methylmercury, inorganic lead, and tributyltin chloride. Environ. Research., 101:74-80, 2006.

Maher, A., Goessler, W., Kirby, J., Raber, G., 1999. As concentration and speciation in the tissues and blood of sea mullet (*Mugil cephalus*) from lake Macquarie NSW, Australia. Mar. Chem. 68, 169 - 182.

Mason, A.Z., Jenkins, K.D., 1995. Metal detoxification in aquatic organisms. In: Tessier, A., Turner, D.R. (Eds.), Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems, Wiley, Toronto, pp. 479 - 608.

Min, E.Y. and Kang, J.C.: Effect of waterborne benomyl on the hematological and antioxidant parameters of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Pest. Biochem. Physiol., 92:138-143, 2008.

Nemcsok, J. and Boross, L.: Comparative studies on the sensitivity of different fish species to metal pollution. Acta Biol. Hung., 33:23-27, 1982.

Nussey, G., Van Vuren, J.H.J., Preez, H.H.D., 1995. Effect of copper on the haematology and osmoregulation of the Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae). Comp. Biochem. Physiol. 11 (3), 369 - 380.

Oliverira, C.A., Neto, R., Mela, M., Silva, P.H., Randi, M.A.F., Rabitto, I.S., Alves, S.R.M. and Pelletier, E.: Hematological findings in neotropical fish *Hoplias malabaricus* exposed to subchronic and dietary doses of methylmercury, inorganic lead, and tributyltin chloride. Environ. Research., 101:74-80, 2006.

Pandey, K., Shukla, J.P., 1982. Deleterious effects of arsenic on the

growth of fingerlings of a freshwater fish, *Colisa fasciatus* (Bl. & Sch.).  
*Acta Pharmacol. Toxicol.* 50, 398 - 400.

Rainbow, P., Smith, B., Casado-Martinez, M., 2011. Biodynamic modelling of the bioaccumulation of arsenic by the polychaete *Nereis diversicolor*. *Environ. Chem.* 8, 1 - 8.

Reif, D.M., Truong, L., Mandrell, D., Marvel, S., Zhang, G., Tanguay, R.L., 2015. Highthroughput characterization of chemical-associated embryonic behavioral changes predicts teratogenic outcomes. *Arch. Toxicol.* 1e12. <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-015-1554-1>. Posted online on July 1, 2015.

Reimer, K.J., Koch, I., Ollson, C.A., Cullen, W.R., Granchinho, S., Andrews, P., Jamieson, H., Walker, S.R., 2002. Arsenic Report #72. Environmental Science Group, Royal Military College, Kingston, Ontario, Kingston. 984

Richardson, R.J. and Murphy, S.D.: Effect of glutathione depletion on tissue deposition of methylmercury in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 31: 505-519, 1975.

Roche B, Mattei J (1997) The animal species introduced into the

Corsican freshwaters. Bull Fr Peche Piscicult 344-45:233 - 239

Roesijadi, G., 1992. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. Aquat. Toxicol. 22, 81 - 114.

Roesijadi, G., Robinson, W.E., 1994. Metal regulation in aquatic animals: mechanisms of uptake, accumulation, and release. In: Malins, D.C., Ostrander, G.K. (Eds.), Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical, and Cellular Perspectives, Lewis Publishers, Boca Raton, FL, pp. 387 - 420.

Roy S, Bhattacharya S (2006) Arsenic-induced histopathology and synthesis of stress proteins in liver and kidney of *Channa punctatus*. Ecotoxicol Environ Saf 65:218 - 229

Sakurai, T., Kojima, C., Ochiai, M., Ohta, T., Sakurai, M.H., Waalkes, M.P., Fujiwara, K., 2004. Cellular glutathione prevents cytolethality of monomethylarsonic acid. Toxicol. Appl. Pharmacol. 195, 129 - 141.

S., Das, B., Nayak, B., Lodh, D., Rahman, M.M. and Chakraborti, D.: Arsenic contamination in groundwater: a global perspective with emphasis on the Asian scenario. Health. Popul. Nutr., 24:142-163, 2006.

Smet, S. M. and Blust, R.: Stress Responses and Changes in Protein Metabolism in Carp *Cyprinus carpio* during Cadmium Exposure. Ecotoxicol. Environ. Saf., 48:255-262, 2001.

Sun, Y., Zhang, H., Yu, J., Shen, Y., Yin, H., Liu, H. and Wang, X.: Bioaccumulation and antioxidant responses in goldfish *Carassius auratus* under HC Orange No 1 exposure. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 63: 430-437, 2006.

Sorenson, E.M.B., 1991. Arsenic. In: Sorenson, E.M.B. (Ed.), *Metal Poisoning in Fish*. CRC Press, pp. 61 - 99.

Suvetha, L., Ramesh, M., Saravanan, M., 2010. Influence of cypermethrin toxicity on ionic regulation and gill  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  -ATPase activity of a freshwater teleost fish *Cyprinus carpio*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 29 (1), 44 - 49.

Tripathi, N. and Flora, S.J.S.: Effect of some thiol chelatorson enzymatic activities in blood, liver and kidneys of acute arsenic (III) exposed mice. *Biomed. Environ. Sci.* 11: 38-45, 1998.

Ventura-Lima, J., de Castro, M.R., Acosta, D., Fattorini, D., Regoli, F., de Carvalho, L.M., Bohrer, D., Geracitano, L.A., Barros, D.M., Marins, L.F., da Silva, R.S., Bonan, C.D., Bogo, M.R. and Monserrat, J.M.: Effects of arsenic (As) exposure on the antioxidant status of gills of the zebrafish *Danio rerio* (Cyprinidae). *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol.* 149(4C): 538-43, 2009.

Vijan, P.N., Wood, G.R., 1974. An automated submicrogram determination of arsenic in atmospheric particulate matter by flameless atomic absorption spectrophotometry. *A. A. Newslett.* 13, 33 - 37.

Vinodhini R, Narayanan M (2008) Bioaccumulation of heavy metals in organs of fresh water fish *Cyprinus carpio* (Common carp). *Int J Environ Sci Technol* 5:179 - 182

Vutukuru, S.S., 2003. Chromium induced alterations in some biochemical profiles of the Indian major carp, *Labeo rohita* (Hamilton). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 70, 118 - 123.

Vutukuru, S.S., Prabhath, N.A., Raghavender, M., Yerramilli, A., 2007. Effect of Arsenic and chromium on the serum amino-transferases activity in Indian major carp, *Labeo rohita*. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 4 (3), 224 - 227.

Wang, Y.-H., Chen, Y.-H., Wu, T.-N., Lin, Y.-J., Tsai, H.-J., 2006. A keratin 18 transgenic zebrafish *tg* (K18 (2.9): RFS) treated with inorganic arsenite reveals visible overproliferation of epithelial cell. *Toxicol. Letts.* 163, 191 - 197.

Winston, G.W. and Giulio, R.T.: Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 19: 137-161, 1991.

Xue J, Zartarian V, Wang SW, Liu SV, Georgopoulos P (2010)  
Probabilistic  
modeling of dietary arsenic exposure and dose and evaluation with  
2003 - 2004 NHANES data. Environ Health Perspect 118:345 - 350

