



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

크롬 (Cr^{6+}) 노출에 따른 송어,
*Mugil cephalus*의 생체 축적
및 생화학적 변화



2012년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 명 의 학 과

안 태 영

이 학 석 사 학 위 논 문

크롬 (Cr^{6+}) 노출에 따른 송어,
*Mugil cephalus*의 생체 축적
및 생화학적 변화

지도교수 강 주 찬

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함.

2012년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수산생명의학과

안 태 영

안태영의 이학석사 학위논문을 인준함.

2012년 2월 24일



주 심 약학박사 정 준 기 (인)

위 원 이학박사 김 기 홍 (인)

위 원 이학박사 강 주 찬 (인)

목차

목 차	i
Abstract	iii
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	5
1. 실험어 및 실험환경	5
2. Bioaccumulation	6
3. 성장	7
4. 전혈	8
5. 혈청	9
6. 생화학적 분석	10
6-1. Superoxide dismutase (SOD)	
6-2. Glutathione S-transferase (GST)	
6-3. Glutathione (GSH)	
6-4. Metallothionein (MT)	
7. 유의성 검정	12
III. 결과	13
1. Bioaccumulation 분석	13
2. 성장	20
3. 혈액 성분 분석	24
4. 혈청 성분 분석	26
5. 생화학적 변화	30
5-1. Superoxide dismutase (SOD) activity	30
5-2. Glutathione s-transferase (GST) activity	33

5-3. Glutathione (GSH) level	36
5-4. Metallothionein (MT) level	38
IV. 고찰	40
V. 요약	46
VI. 참고문헌	47



Bioaccumulation and biochemical changes in mullet,
Mugil cephalus exposed to hexavalent chromium

Tae Young Ahn

Department of Fish pathology, Graduate School,
Pukyong National University

Abstract

Chromium is the sixth most abundant heavy metal in the earth crust. This metal exhibits trivalent and hexavalent states predominantly in the environment. Especially hexavalent chromium (Cr^{6+}) is one of the most common heavy metal pollutants of the environment, discharged with the effluents of various industries. In aqueous solution Cr(VI) predominately exists as chromate ion, which easily penetrates biological membranes and causes oxidative stress and bioaccumulation. Mullet is euryhaline fish that lives brackish water zone in most of life cycle and appears one of the most widely geographical distribution among osteichthyes.

The objective of this study was to investigate the effects of 4 weeks exposure to hexavalent chromium (0, 25, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g}/\text{L}$) on growth, hematological parameters, antioxidative response and bioaccumulation of mullet, *Mugil cephalus*.

Bioaccumulation of chromium appeared similar pattern, except for muscle. And accumulation of chromium for 4weeks had many kidney, liver, intestine, gill, spleen, muscle in descending order. Also compared to control, commonly bioaccumulation was significantly increased over 200 $\mu\text{g}/\text{L}$ concentration. Growth of mullet was slowed, because daily length gain and daily weight gain were significantly decreased over 25 $\mu\text{g}/\text{L}$, 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ concentration respectively. In hematological parameters, Cr(VI) reduced RBC count at 50, 200, 400 $\mu\text{g}/\text{L}$ and elevated Ht over 50 $\mu\text{g}/\text{L}$ significantly. In inorganic substance of serum parameters, calcium was reduced and magnesium was elevated over 25 $\mu\text{g}/\text{L}$. Total protein of

organic substance was increased at 200, 400 μ g/L. But no change was detected in glucose and triglyceride. In enzyme factor, GOT and GPT were increased entirely and significantly changed at high concentration. SOD and GST activity of antioxidative enzyme were depressed at high concentration significantly in liver and gill. And Cr(VI) induced significantly elevated GSH and MT in liver.



I. 서론

중금속은 산업 배출수와 폐기물, 우수에 의한 농업 살충제의 배출, 가정 쓰레기 처리장, 채광 활동 등 여러 경로로 환경 내에 유입된다(Merian, 1991). 그리고 수계에 유입된 중금속은 직접적인 경로인 아가미 상피와 체표, 간접적 경로인 소화관 벽의 생물학적 장벽을 가로질러 어체 내로 들어가게 되며, 주로 신장, 간, 아가미 등의 대사적으로 활동적인 조직에 축적된다(Mzimela et al., 2003). 세포 내 금속은 단백질, 핵산, 지질의 손상에 의해 결국 세포 사멸을 야기하는 활성산소종(ROS)을 발생시킨다. ROS의 해로운 효과는 reduced glutathione 같은 비효소적 항산화물질(Zirong and Shijun, 2007)과 superoxide dismutase(SOD), catalase(CAT), glutathione reductase(GR) 같은 항산화 효소(Oruç and Üner, 2000)의 항산화 활동에 의해 조절된다.

크롬(Cr)은 원자번호 24, 원자량 51.9961로 지구의 지각 내 6번째로 풍부한 중금속이다(U.S. Environmental protection agency, 1984). 크롬은 다양한 산화 형태를 나타내지만, 환경 내에선 3가(III)와 6가(VI) 크롬이 대부분을 차지한다(L.E. Towill, 1978). 미국 내에 크롬산염 광석은 야금(冶金), 화학, 내열 공업에 매년 수천 톤의 상품을 생산하기 위해 사용된다.(J.F. Papp, 1984). 이런 공업에서 부적절하게 처리된 배출수는 종종 크롬에 의한 수자원의 대규모 오염을 일으켜, 결국 어류와 다른 수계 생물의 생존에 큰 영향을 미친다(U.S. Environmental protection agency, 1984).

6가 크롬(Cr^{6+})은 피혁, 스테인리스강, 섬유 등 다양한 산업의 배출수로 배출되어 환경을 오염시키는 주요 중금속 중 하나로, 수용액의 $Cr(VI)$ 은 주로 크롬산 이온으로 존재하며, 생체막을 쉽게 통과하여 산화 스트레스를 유발해 세포 손상을 일으키고(Irwin et al., 1997; Begum et al., 2006), 여러 조직과 장기에 축적된다(Goyer, R.A., 1986). 따라서 $Cr(VI)$ 은 수질 지표로 참조되며(SCORECARD, 2005), 표준 독성 시험의 참조 독성물질로 사용을 추천한다(ASTM, 1997; US EPA, 2002).

$Cr(VI)$ 은 인간과 동물에 독성과 발암뿐만 아니라 알레르기성 피부염을 일으키는 것으로 알려져 있다(Norseth, 1981; Stohs and Bagchi, 1995; Kawanishi et al., 2002; von Burg and Liu, 1993). $Cr(VI)$ 에 의해 야기된 급성과 만성 독

성, 신경독성, 피부독성, 유전독성, 발암독성, 면역독성, 환경 독성은 광범위하게 증명되었으며(von Burg and Liu, 1993; Barceloux, 1999), 가용성과 불용성 6가 크롬염은 쥐와 인간 세포 내 형태적 변형, 종양성 변형, 돌연변이 유발을 일으키는 것으로 증명되었다(Patierno et al., 1988).

어류에서 크롬의 아치사 영향은 다양한 대사과정을 억제하며(Nath and Kumar, 1987), 크롬 화합물은 어류 삼투 능력과 호흡을 소실시켜 신장의 손상을 발생시킨다(Artillo and Melodio, 1988). 세포 내에서 6가(VI) 형태는 유전물질 등의 세포내 큰 분자들과 복합체를 형성하는 3가(III) 형태로 환원되며, 이것이 궁극적으로 크롬의 독성과 돌연변이 발생을 나타낸다(Goyer, R.A., 1986). 그리고 배양세포 및 시험관(in vitro) 실험에서 Cr(VI)의 환원에 의해 생성된 Cr(V) 및 hydroxyl radical, singlet oxygen 등과 같은 활성산소종이 Electron Paramagnetic Resonance(EPR) Spectroscopy에 의해 발견되어지고 있다(O'Brien et al., 1985; Shi et al., 1988; Sugiyama, 1991). 이처럼 발생하는 활성적 크롬 중간대사물(reactive chromium intermediates) 및 크롬에 의한 활성산소종(Cr-mediated ROS) 발생이 지속적인 산화성 스트레스를 일으켜, 세포손상을 유도한다(Granger et al., 1982).

위에서 언급했듯이 세포 내에선 산화 스트레스에 대해 항산화 활동을 한다. 주요 항산화 효소로 superoxide dismutase(SOD)는 superoxide anion을 hydrogen peroxide(H_2O_2)로 변환시키며, catalase(CAT)는 H_2O_2 를 물과 산소 분자로 분해시킨다. 또한 glutathione peroxidase(GPx)는 H_2O_2 와 lipid hydroperoxide 모두 환원시킨다(Nordberg and Arnér, 2001; Almeida et al., 2007). Glutathione S-transferase(GST)는 무독화 효소로 모든 호기성 생물에 존재하며, 내인성과 외인성 기질을 tripeptide GSH 황 원자의 친핵성 공격을 촉매한다. 그럼으로써 기질을 reduced glutathione에 결합시키거나 glutathione disulfide 생성으로 환원 또는 이성체로 변환시킨다(Vuilleumier, 1997 ;Kim et al., 2001; Vuilleumier and Pagni, 2002). 또한 지질과 핵산의 hydroperoxide와 다른 지질 과산화 생성을 제거하는 기능도 있다고 알려져 있다(Hayes et al., 1995).

세포의 주요 non-protein thiol인 glutathione은 xenobiotics, oxyradicals, metal cations의 독성에 대한 세포 방어에 관여한다(Meister and Anderson, 1983; Segner and Braunbeck, 1998). Sulfhydryl-rich tripeptide인 GSH는 다양

한 방법으로 금속의 독성을 방해하는데, 우선 금속의 흡수율과 제거율을 바꿀 수 있으며(Foulkes, 1993; Burton et al., 1995), 세포 내 금속 킬레이터로써 역할을 할 수 있다(Freedland et al., 1989; Rabenstein, 1989). 또한 금속 축매로 인한 산화 환원 반응으로 발생하는 산화 스트레스에 대해 방어할 수 있다(Winston and Di Giulio, 1991; Sugiyama, 1994).

Metallothionein (MT)은 저분자량(6000-7000Da), 높은 cysteine 함량(33%), 내열성의 세포질 내 단백질로 카드뮴, 구리, 아연, 수은 등의 금속과 결합하고, 척추동물의 간, 신장 및 장에 많이 분포하고, 주로 세포질 내에 존재한다(Banerjee et al., 1982; Kagi and Schaffer, 1988; Roesijadi, 1992; Roesijadi and Robinson, 1994). MT는 조직 내에서 자연적으로 발생하고 필수금속(특히, 아연과 구리)의 항상성에 중요한 역할을 하며, 또한 비필수금속과 결합하여 제거하는 역할도 한다. 필수금속과 비필수금속 모두 MT 생성을 자극하며, 유도 정도는 금속마다 다르다(Hogstrand and Haux, 1990; Wu et al., 1999; Atli and Canli, 2003). 기본적으로 세포 내 중금속 농도가 증가하면 금속 양이온과 결합할 수 있는 apothionein의 합성이 자극되어 중금속의 유해한 영향을 줄인다(Hamer, 1986; Roesijadi, 1992; Viarengo and Nott, 1993). 또한 간 내 MT 합성은 금속뿐만 아니라 스트레스 또는 염증 반응을 간접적으로 일으키는 여러 화학물질과 cytokine, 스트레스 호르몬에 의해서도 유도된다(Coyle et al., 2002). 어류에서도 MT 전사와 단백질 합성은 다양한 2가 금속에 의해 유도된다(Ikebuchi et al., 1986; Carginale et al., 1998; Riggio et al., 2003b; Eroglu et al., 2005; Alvarado et al., 2006; Yudkovski et al., 2008). 이런 이유로 MT는 해양환경오염을 측정하는데 있어서 중요하며, 어류의 금속 노출에 대한 잠재적 biomarker로 여겨진다(George and Olssen, 1994; Langston et al., 2002; Sarkar et al., 2006; Nesto et al., 2007; Fernandes et al., 2008).

생체 축적은 종종 오염된 생태계 내 생물의 화학물질 노출에 대한 좋은 통합 지표이다(Luoma and Rainbow, 2005). 더욱이 금속의 조직 특이적 축적은 수계 독성학에서 만성 노출에 대한 중요한 지표로써 이용해왔다(Bergman and Dorward-King, 1997). 그리고 만성 아치사 노출 중 독성 작용은 위험평가에서 독성과 노출 사이의 관계를 입증하는데 있어서 중요한 요소로 고려된다(McCarty and Mackay, 1993). 수계 생물 내 금속 축적은 지구 화학적, 생물학적 요인에 영향을 받는다(Luoma and Rainbow, 2005). 용해된 금속의 생물학적

이용 가능성은 화학적 중 형성과 다른 이온과의 경쟁, 용해물질과 미립자와의 상호 능력에 따라 조절된다. 또한 살아있는 생물 내 금속 축적은 종 사이 다양하게 흡수, 조절, 제거의 특이적 메커니즘에 의존된다(Chapman et al., 1996; Luoma and Rainbow, 2005). 어체 내로 금속이 들어오는 데는 체표, 아가미, 장관의 3가지 방법이 있다. 여러 실험의 결과로써 체표는 중금속의 섭취에 주된 역할을 하지 않는 것으로 보인다. 연구실 내 실험에서는 수중으로부터 중금속을 섭취하는 어류에서는 주로 장관보다 아가미에 더 높은 농도가 나타난다고 보고해왔다. 반면 섭이를 통해 중금속이 축적되는 어류는 아가미에 비해 장관에서 증가된 금속량이 나타난다(Ney and Van Hassel, 1983; Dallinger et al., 1987; Heath, 1990). 요약컨대 수중 내 중금속 농도가 높으면 아가미를 통한 수송 효율이 더 크기 때문에 상대적으로 먹이를 통한 축적은 덜 중요시되며, 수중 내 농도가 낮으면 먹이 사슬을 통한 금속 이동이 노출에 대한 1차적 경로가 될 것이다(Clements, 1991)

승어(*Mugil cephalus*)는 생활사 중 많은 시기를 기수에서 서식하는 광염성 어류로, 경골어류들 중에서 가장 광범위한 지리적 분포를 나타낸다(Thomson, 1963; Thomson, 1968). 또한 잡식성이고 영양단계가 낮으며 삼투조절에 의한 급격한 염분 변화에 견딜 수 있어서 양식 대상으로 선호도가 높다(Odum, 1970; Nash and Shehaden, 1980). 이런 이유로 개발도상국의 식량자원을 위한 산업적 가치가 높다고 보고된 바 있다(Nash and Koningsberger, 1981). 한국에서도 승어류는 산업적으로 중요한 어종으로, 생산량 측면에서 2005년도 천해어류양식 기준으로 넙치, 조피볼락, 참돔에 이어 4번째로 많이 생산되는 품종이다(해양수산통계연보, 2006).

따라서 승어에 대한 중금속의 영향 연구가 필요하며, 그 중 6가 크롬의 항산화적 (효소, 비효소) 영향과 축적에 대한 연구는 거의 이루어지지 않았고, 기수나 연안에 사는 어종에 충분히 노출 가능성이 있다고 여겨진다. 이에 본 연구의 목적은 4주간 0, 25, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/L}$ 농도로 Cr(VI)에 노출된 승어의 성장, 혈액학적 성장, 항산화 반응 및 생체 축적 변화를 분석하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험어 및 실험환경

본 실험에 사용한 실험어는 하동 양식장에서 분양 받은 송어, *Mugil cephalus* 로 4주간 순치시킨 후 전장 $17.23 \pm 0.85\text{cm}$, 체중 $48.25 \pm 8.36\text{g}$ 의 외관상 건강한 개체를 사용하였다. 선별된 개체는 $500 \times 280 \times 310\text{mm}$ 의 유리 수조 내 해수 20L를 채워 입식하였고, 이틀에 한 번 환수해 주었다. 실험을 위한 외부온도는 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 일정하게 유지하였으며, 실험에 사용된 해수의 수질은 Table. 1과 같다.

6가 크롬의 노출을 위해 Potassium dichromate(SIGMA-ALDRICH. Inc., USA) 일정량을 증류수에 용해시킨 후 사육수조에 혼합하여 노출농도가 0, 25, 50, 100, 200, $400\mu\text{g/L}$ 가 되도록 설정하였다.

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

Item	Value
Temperature ($^\circ\text{C}$)	20.0 ± 1.0
pH	8.1 ± 0.5
Salinity (‰)	33.5 ± 0.6
Dissolved Oxygen (mg/L)	7.1 ± 0.3
Chemical Oxygen Demand ($\mu\text{g/L}$)	1.13 ± 0.1
Ammonia (mg/L)	12.5 ± 0.7
Nitrite (mg/L)	1.3 ± 0.3
Nitrate (mg/L)	11.48 ± 1.0
Chromium ($\mu\text{g/L}$)	≤ 0.1

2. bioaccumulation

채취한 간, 신장, 비장, 아가미, 장, 근육을 3차 증류수로 세척 후 동결건조기 내에서 24시간 이상 건조시킨 후 건조량 (Dry weight)을 측정하여 wet digestion method를 이용하여 시료를 분해하였다. 건조된 시료를 HNO₃에 용해 후, 120℃로 가온하여 재건조하였다. 이 과정은 유기물이 완전히 분해되도록 반복 시행하였다. 다 분해되고 건조한 시료는 2% HNO₃를 넣어 용해한 후 membrane filter (Advantec mfs, Ins. 0.2μm)를 이용하여 필터링한 것을 분석에 사용하였다. Standard curve는 ICP multi-element standard solution VI (Merck)를 이용하고, ERM-CE278 (European commission)을 시료와 같이 처리하여 분석한 후 회수율을 보았다. 함유량은 총크롬으로 분석하였고, μg/g dry wt로 표시하였다.



3. 성장

실험에 사용한 송어는 실험에 들어가기 전 전장과 체중을 측정하였으며, 실험 후 2주와 4주차에 장기를 채취하기 전 전장과 체중을 다시 측정하였다. 일일성장성장량, 일일체중성장량, 비만도 지수는 다음과 같이 측정하였다.

일일성장량 (Daily growth gain) = $(W_f - W_i)/\text{day}$

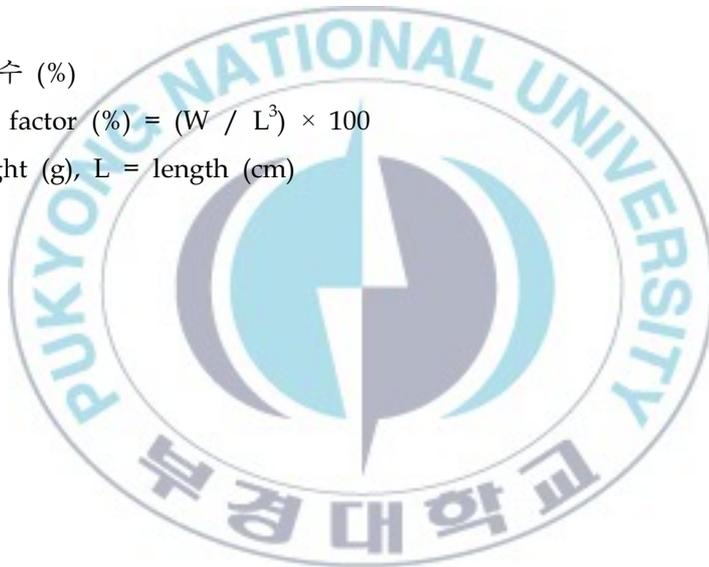
W_f = Final length or weight

W_i = Initial length or weight

비만도 지수 (%)

Condition factor (%) = $(W / L^3) \times 100$

W = weight (g), L = length (cm)



4. 전혈

실험어는 혈액응고를 방지하기 위해 heparin-Na (5,000 I.U., 중외제약)을 처리한 1회용 주사기를 사용하여 미부정맥에서 채취하였다. 채취한 혈액으로 RBC (Red Blood Cell) count, hemoglobin (Hb) 농도 및 hematocrit (Ht)을 즉시 분석하였다. RBC count는 Hendrick's diluting solution으로 혈액을 400배 희석 후, hemo-cytometer (Improved Neubauer, Germany)를 이용하여 광학현미경으로 계수하였다. Ht는 Ht 모세관 내로 혈액을 넣어, microhematocrit centrifuge (Model; 01501, HAWKSLEY AND SONS Ltd., England)에서 12,000rpm, 5분간 원심분리 후 판독관 (Micro-Haematocrit reader, HAWKSLEY AND SONS, England)로 측정하였다. Hb 농도는 임상용 kit (Asan Pharm. Co., Ltd.)를 이용하여 Cyan-methemoglobin법으로 측정하였다.



5. 혈청

채취한 혈액은 4℃, 3000g로 5분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 분리한 혈청으로 무기성분, 유기성분, 효소활성의 변화를 보았다.

무기성분으로는 칼슘 (Calcium), 마그네슘 (Magnesium)을 측정하였다. 칼슘은 OCPC법, 마그네슘은 Xylidyl blue-I 법에 의해 시판되고 있는 임상용 kit (Asan Pharm. Co., Ltd.)를 이용하였다.

유기성분으로는 혈당 (Glucose), 총단백질 (Total protein), 중성지방 (Triglyceride)을 측정하였다. 혈당은 GOD/POD법, 총단백질은 Biuret법, 중성지방은 Enzyme법에 의하여 임상용 kit(Asan Pharm. Co., Ltd.)를 이용하였다.

혈청 내 효소활성으로는 GOT (Glutamic oxalate transminase), GPT (Glutamic pyruvate transminase), ALP (Alkaline phosphatase)를 측정하였다. GOT와 GPT는 Reitman-Frankel법, ALP는 Kind-king법에 의하여 임상용 kit (Asan Pharm. Co., Ltd.)를 이용하였다.



6. 생화학적 분석

간과 아가미의 효소 활성을 측정하기 위해 washing buffer (0.1M KCl, pH 7.4)로 세척 후, homogenizing buffer (0.1M PBS, pH 7.4)로 teflon-glass homogenizer (099CK4424, Glass-Col, Germany)를 이용하여 균질화하였다. 이것을 4°C, 10000g로 60분간 원심분리하여 상등액을 실험에 사용하였다. 간 내 비효소인 Metallothionein 및 Glutathione 측정에서는 homogenizing buffer로 20mM Tris buffer (containing 0.25M sucrose, pH 7.8)를 사용하였고, 균질액은 4°C, 10000g로 30분간 원심분리하여 상등액을 사용하였다. 모든 상등액은 실험 전까지 -75°C (MDF-U53V, SANYO Electric Co. Ltd., Japan)에 보관하였다.

각 조직의 단백질 함량은 Bradford (1976) 방법을 이용한 kit (Biorad. Co., Ltd.)를 이용하여 정량하였다.

6-1. Superoxide dismutase (SOD)

SOD 활성은 WST-1의 환원에 대한 50% inhibitor rate로 측정하는 SOD Assay Kit - WST (Dojindo Co., Japan)를 이용하였다. 각 상등액은 5의 배수씩 0.1mM PBS로 희석 후 분광광도계를 이용하여 흡광도 450nm에서 측정하였다. 측정값으로 50% inhibitor rate를 구하여 unit/mg protein으로 표시하였다.

* W S T - 1 =
2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium,
monosodium salt)

6-2. Glutathione s-transferase (GST)

GST 활성은 Habig (1974)의 방법을 변형하여 측정하였다. 일정량의 시료에 0.2M potassium phosphate (pH 6.5)와 증류수를 첨가, 혼합시킨 뒤 10mM GSH와 10mM CDNB를 첨가하여 실온에서 1분간 반응시켰다. 그것을 분광광도계 (Zenyn 200, Anthos Labtec Instruments GmbH, Austria)를 이용하여 파장 340nm에서 30초 단위로 5분 동안 측정하여 nmol/min/mg protein으로 표시하였

다.

6-3. Glutathione (GSH)

Reduced glutathione 함량은 Beutler 등 (1963)의 방법을 이용하였다. 상등액에 precipitation solution (metaphosphoric acid, Na₂EDTA, NaCl)을 첨가하여 혼합 후 4500g에 10분간 원심분리 하였다. 그 상등액에 0.3M Na₂HPO₄을 넣고, 0.5mM DTNB로 발색시켜 분광광도계로 412nm에서 흡광도를 측정하였다. GSH 함량은 reduced glutathione standard curve를 이용하여 측정하였고, nmol GSH/mg protein으로 표시하였다.

6-4. Metallothionein (MT)

Metallothionein (MT) 함량은 Viarengo 등 (1996)의 방법을 따라 측정하였다. 상등액을 항온조에서 10분간 80℃로 가열한 후 2500g, 10분간 원심분리하여 응고된 입자를 제거하였다. 그리고 상등액에 cold(-20℃) absolute ethanol과 chloroform을 첨가한 후 4℃, 6000g에서 10분간 원심분리 후 상등액에 cold ethanol를 혼합시키고 1시간동안 -20℃를 유지시켰다. 그 후 4℃, 6000g에서 10분간 원심분리하고 상등액을 제거하여 pellet을 87% ethanol과 1% chloroform이 포함된 homogenizing buffer로 washing한 후 4℃, 6000g로 10분간 원심분리하였다. 그 pellet을 0.25M NaCl로 재현탁시켜 1N HCl (containing 4mM EDTA)과 0.2M Na-phosphate로 완충된 0.43mM DTNB (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid, pH 8.0)를 첨가하여 4500g로 10분간 원심분리 후 분광광도계 (Zenyn 200, Anthos Labtec Instruments GmbH, Austria)를 이용하여 파장 412nm에서 흡광도를 측정하였다. MT농도는 reduced glutathione standard curve를 작성하여 측정하였고, 단위는 μg MT/mg protein으로 표시하였다.

7. 유의성 검정

실험 분석 결과에 대한 통계학적 유의성은 SPSS 통계 프로그램 (SPSS Inc.)을 이용하여 ANOVA test를 실시하여 Duncan's multiple range test를 통해 $P < 0.05$ 일 때 유의성이 있는 것으로 간주하였다.



Ⅲ. 결과

1. Bioaccumulation 분석

6가 크롬에 노출된 송어의 조직별 축적량은 Fig. 1-6에 나타내었다. 간에서는 2주차에 400 $\mu\text{g}/\text{L}$ 농도에서 유의한 증가가 나타났고, 4주차에 200 $\mu\text{g}/\text{L}$ 농도 이상에서 유의한 증가가 나타났다. 신장에서는 2주차에 200 $\mu\text{g}/\text{L}$ 농도 이상에서 유의한 증가를 나타냈고, 4주차에 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 농도 이상에서 유의한 증가를 나타냈다. 비장에서는 2주차에 대조구와 비교하여 모든 구간에서 유의성이 없었으며, 4주차에 200 $\mu\text{g}/\text{L}$ 농도 이상에서 유의한 증가를 보였다. 장에서는 2주차에 400 $\mu\text{g}/\text{L}$ 농도에서만 증가하였고, 4주차에 200 $\mu\text{g}/\text{L}$ 농도 이상에서 유의한 증가가 나타났다. 아가미에서는 2주차에 200 $\mu\text{g}/\text{L}$ 농도 이상에서 유의한 증가를 보였고, 4주차에 50 $\mu\text{g}/\text{L}$ 농도 이상에서 유의한 증가를 보였다. 근육에서는 2주차와 4주차 모두 대조구와 비교하여 유의성이 없었다.

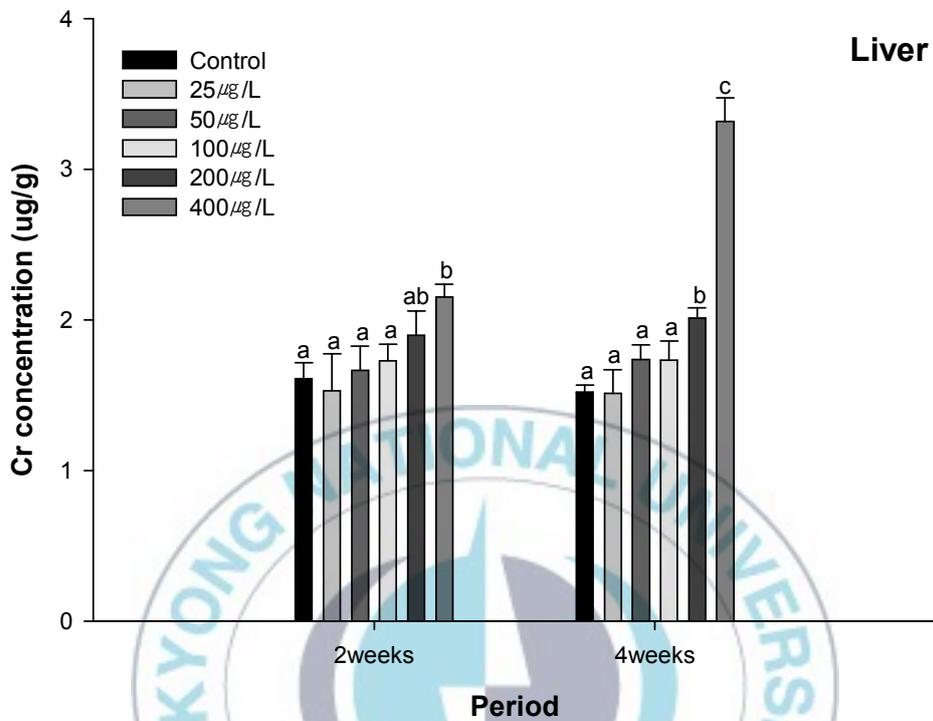


Figure. 1 Cr concentration in liver of mullet, *Mugil cephalus* exposed to the different concentration of hexavalent chromium. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

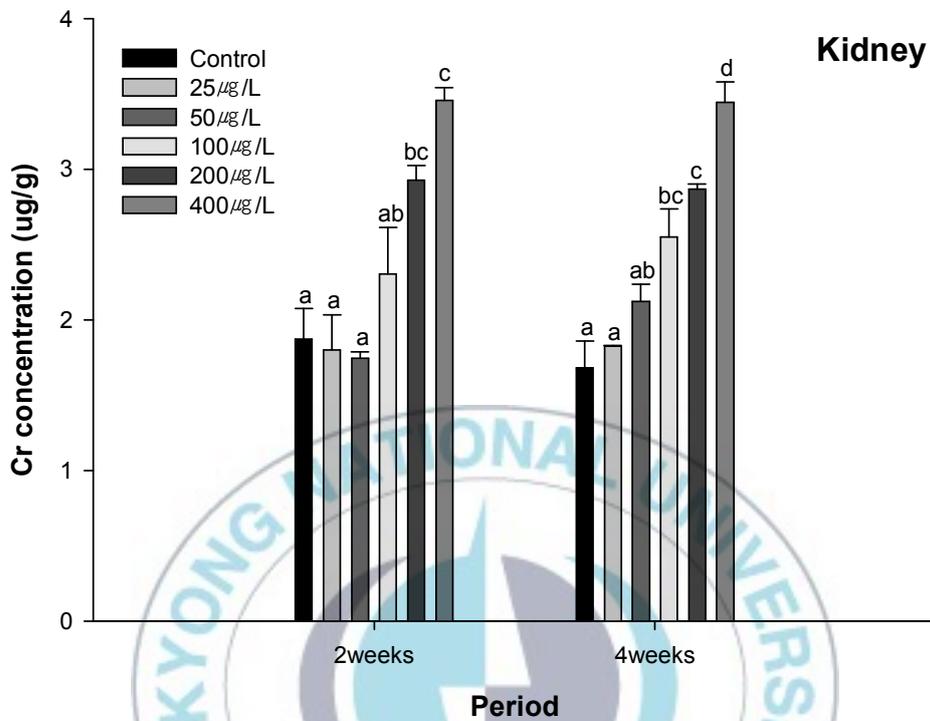


Figure. 2 Cr concentration in kidney of mullet, *Mugil cephalus* exposed to the different concentration of hexavalent chromium. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

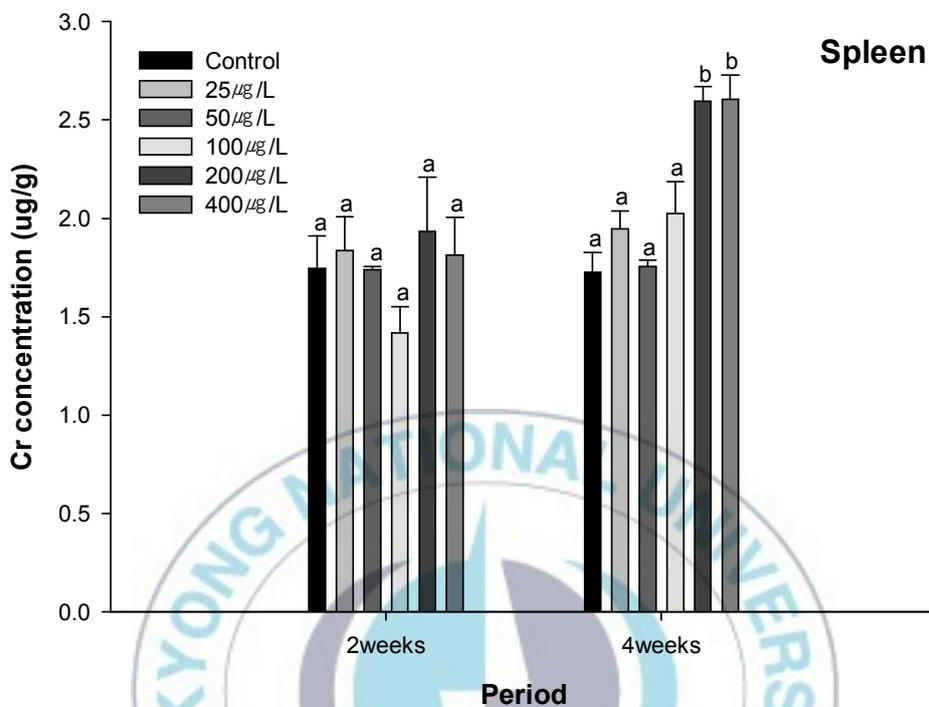


Figure. 3 Cr concentration in spleen of mullet, *Mugil cephalus* exposed to the different concentration of hexavalent chromium. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

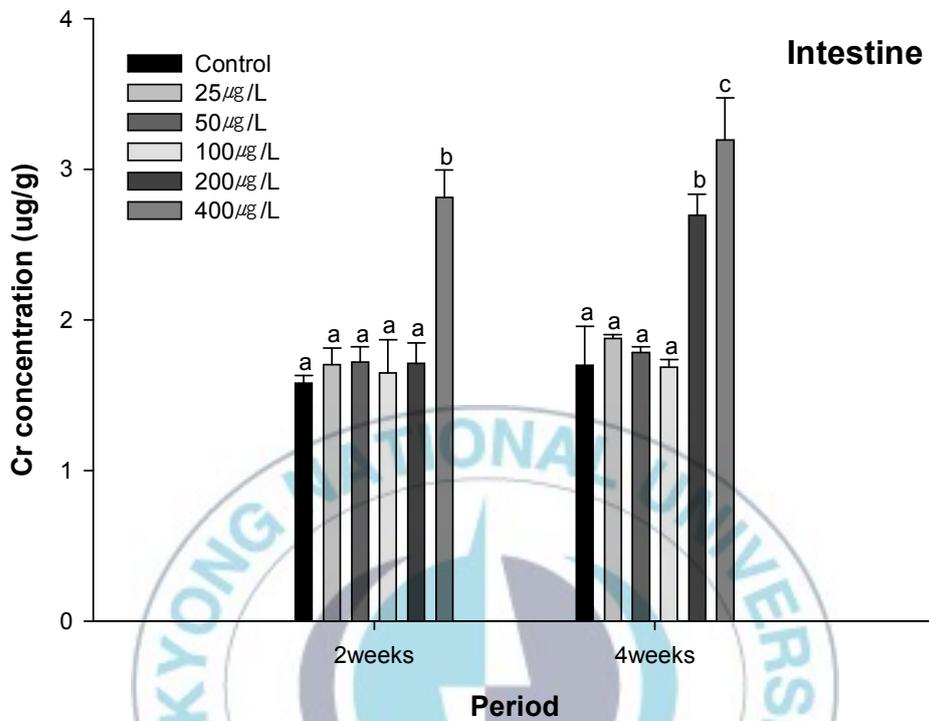


Figure. 4 Cr concentration in intestine of mullet, *Mugil cephalus* exposed to the different concentration of hexavalent chromium. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

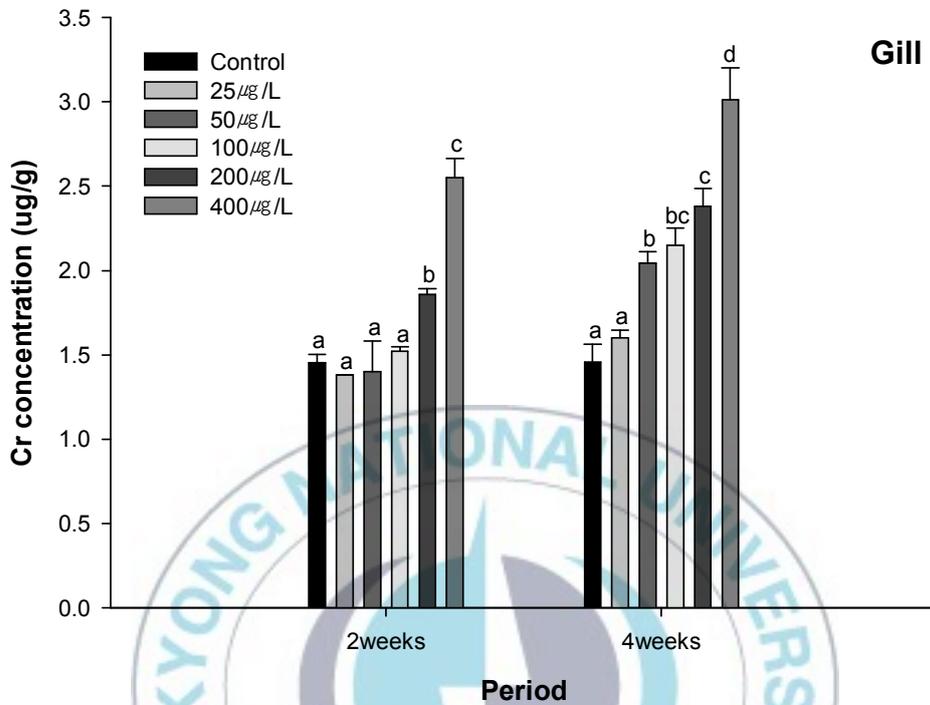


Figure. 5 Cr concentration in gill of mullet, *Mugil cephalus* exposed to the different concentration of hexavalent chromium. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

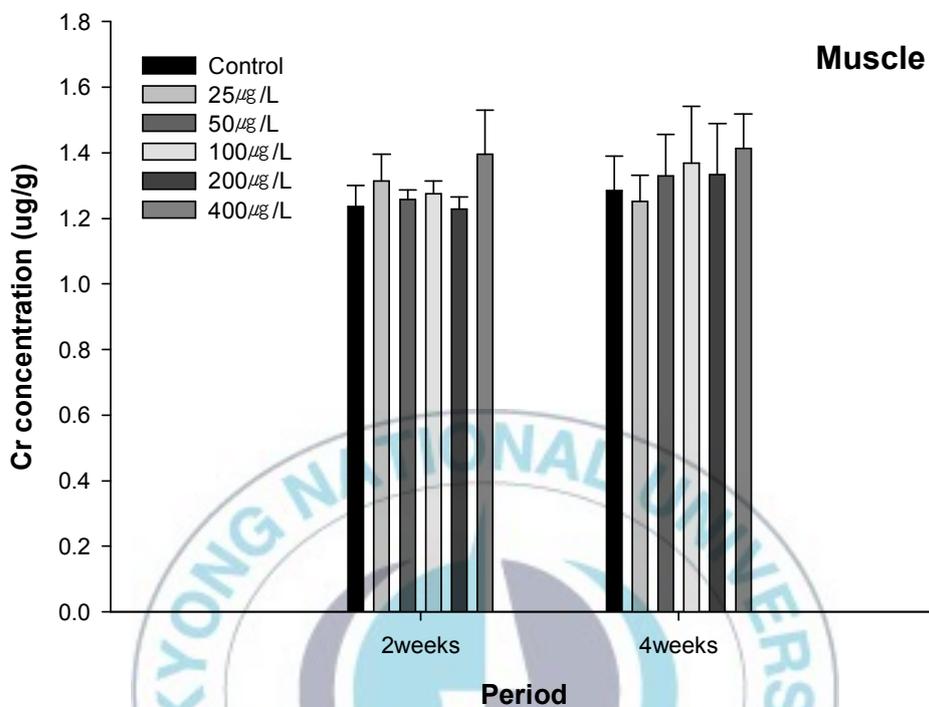


Figure. 6 Cr concentration in muscle of mullet, *Mugil cephalus* exposed to the different concentration of hexavalent chromium. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

2. 성장

일일전장과 체중 성장량 변화, 비만도 지수는 Fig. 7-9에 나타내었다. 일일전장 성장량의 경우 2주차에는 $50\mu\text{g}/\text{L}$ 농도 구간부터 유의적인 감소가 나타났으며, 4주차에서는 6가 크롬 노출에 따른 모든 구간에서 유의적인 감소가 나타났다. 일일체중성장량의 경우 2주차에는 모든 구간에서 유의적인 차이를 보이지 않았으나, 4주차에서는 $100\mu\text{g}/\text{L}$ 과 $400\mu\text{g}/\text{L}$ 농도 구간에서 유의적인 감소가 나타났다. 비만도 지수의 경우 4주차 $100\mu\text{g}/\text{L}$ 농도부터 유의적인 감소가 나타났다.



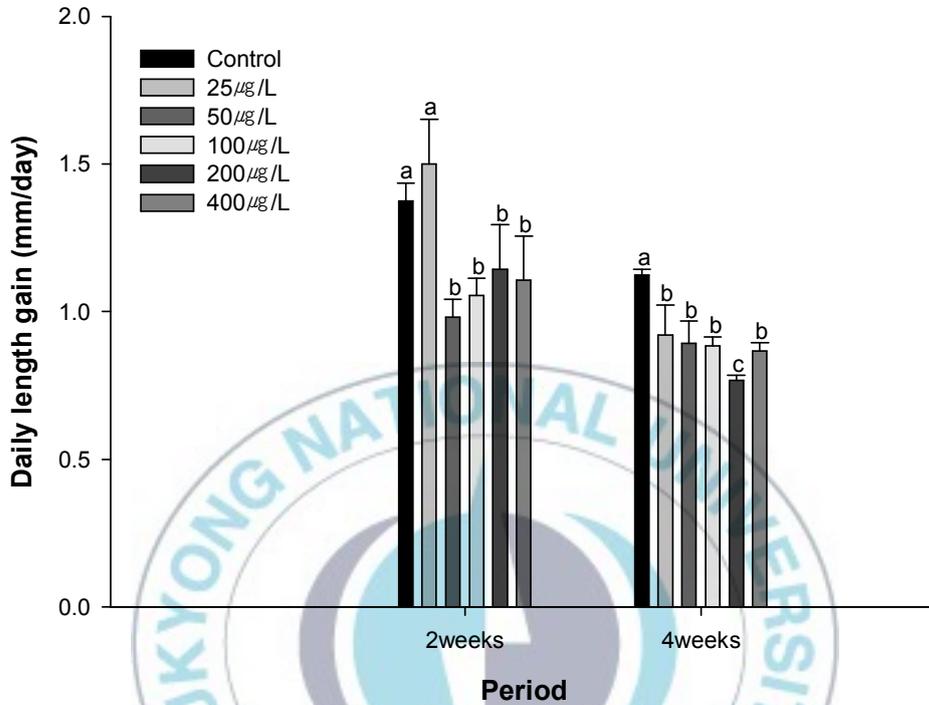


Figure. 7 Daily length gain of mullet, *Mugil cephalus* exposed to the different concentration of hexavalent chromium. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

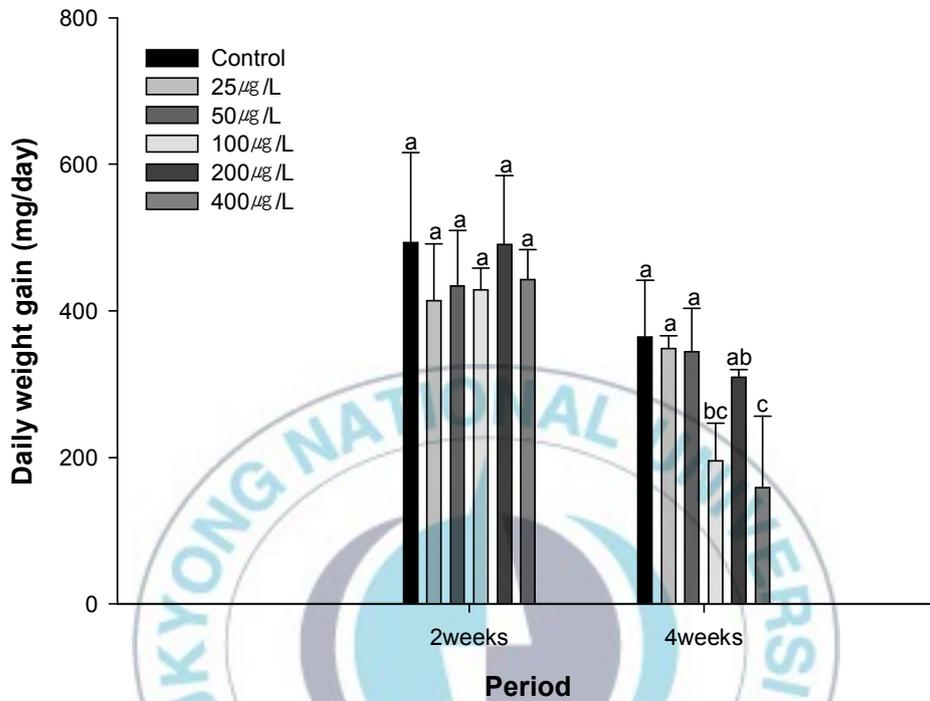


Figure. 8 Daily weight gain of mullet, *Mugil cephalus* exposed to the different concentration of hexavalent chromium. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

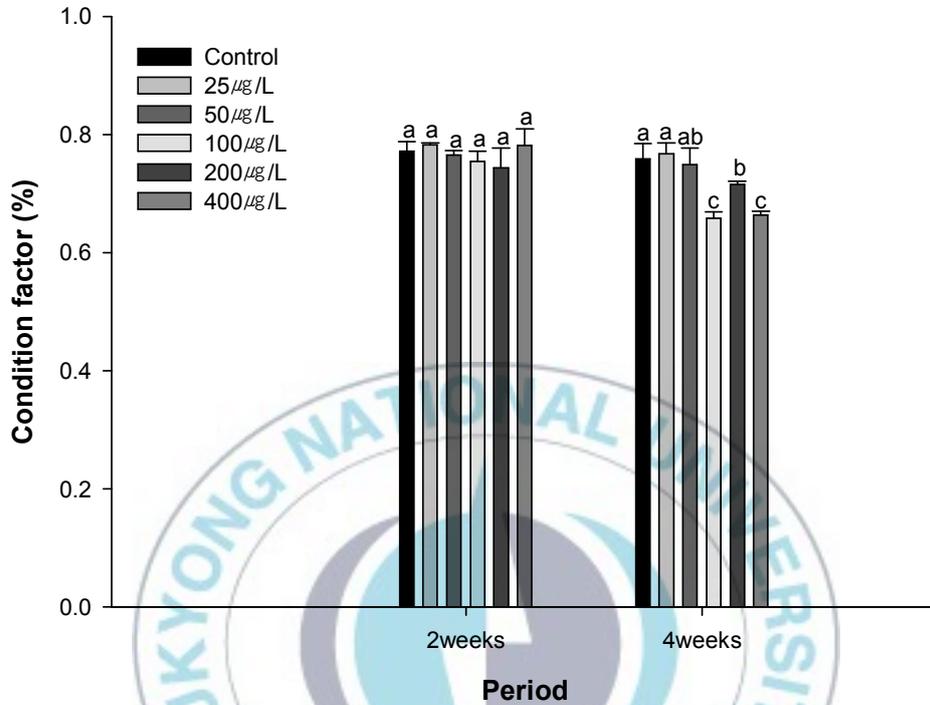


Figure. 9 Condition factor of mullet, *Mugil cephalus* exposed to the different concentration of hexavalent chromium. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

3. 혈액 성분 분석

6가 크롬에 노출된 송어의 혈액 성분 변화는 Table. 2에 나타내었다. RBC count의 경우 2주차에는 $100\mu\text{g/L}$ 농도 구간 이상에서 유의적인 감소가 나타났으며, 4주차에서는 $50, 200, 400\mu\text{g/L}$ 농도 구간에서 유의적인 감소가 나타났다. Hematocrit의 경우 2주차에는 $25, 50, 400\mu\text{g/L}$ 농도에서 유의적인 증가가 나타났으며, 4주차에는 $50\mu\text{g/L}$ 농도구간 이상에서 유의적인 증가가 나타났다. Hemoglobin의 경우 유의적인 변화가 나타나지 않았다.



Table. 2 Changes of RBC count, Hematocrit and Hemoglobin in mullet, *Mugil cephalus* exposed to hexavalent chromium for 4 weeks.

Parameters	Period (week)	Hexavalent chromium concentration ($\mu\text{g/L}$)					
		0	25	50	100	200	400
RBC count ($\times 10^4 \text{mm}^3$)	2	45.44 \pm 4.27 ^a	40.36 \pm 9.72 ^{ab}	38.48 \pm 3.01 ^{ab}	35.68 \pm 5.64 ^b	35.08 \pm 4.93 ^b	35.84 \pm 2.60 ^b
	4	59.36 \pm 5.35 ^a	51.60 \pm 6.45 ^{ab}	48.88 \pm 5.78 ^b	51.52 \pm 2.30 ^{ab}	45.68 \pm 5.47 ^{bc}	39.44 \pm 7.43 ^c
Hematocrit (%)	2	35.25 \pm 6.30 ^a	46.00 \pm 3.67 ^c	42.75 \pm 3.90 ^{bc}	36.25 \pm 2.28 ^a	39.50 \pm 1.80 ^{ab}	54.25 \pm 0.43 ^d
	4	38.75 \pm 4.15 ^a	38.75 \pm 3.03 ^a	58.00 \pm 5.87 ^b	54.00 \pm 6.60 ^b	62.00 \pm 3.32 ^b	58.75 \pm 4.09 ^b
Hemoglobin (g/dL)	2	6.43 \pm 0.46	6.99 \pm 1.67	6.29 \pm 0.19	7.23 \pm 0.65	6.86 \pm 0.09	6.60 \pm 0.19
	4	7.68 \pm 0.57	8.29 \pm 0.20	7.69 \pm 0.28	7.25 \pm 0.47	8.04 \pm 0.59	8.40 \pm 0.53

Values are mean \pm S.E. Values with different superscript are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

4. 혈청 성분 분석

혈청 성분의 변화는 Table. 3-5에 나타내었다.

혈청 내 무기성분 변화 중 칼슘의 경우 2주차에는 가장 높은 농도 구간에서 유의적인 감소를 보였고, 4주차에는 6가 크롬이 노출된 모든 구간에서 유의적인 감소를 보였다. 마그네슘의 경우 2주차에는 가장 높은 농도 구간에서 유의적인 증가를 보였고, 4주차에는 25, 50, 200 $\mu\text{g}/\text{L}$ 농도에서 유의적인 증가를 보였다.

혈청 내 유기성분 변화 중 glucose의 경우 2주차에는 400 $\mu\text{g}/\text{L}$ 농도에서 유의적인 증가를 보였지만, 4주차에는 증가하다가 감소하는 경향만 보이고 유의적인 변화는 없었다. Total protein의 경우 2주차에는 유의성이 나타나지 않았으나, 4주차에는 200, 400 $\mu\text{g}/\text{L}$ 농도에서 유의적인 증가를 나타내었다. 중성지방인 triglyceride의 경우 노출기간 동안 유의적인 변화가 관찰되지 않았다.

혈청 내 효소성분 변화 중 GOT의 경우 2주차에는 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 농도 이상에서 유의적인 감소를 보였으나, 4주차에서는 50, 200, 400 $\mu\text{g}/\text{L}$ 농도에서 유의적인 증가를 보였다. GPT의 경우 2주차에는 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 농도를 제외한 모든 구간에서 유의적인 증가를 보였고, 4주차에는 50, 400 $\mu\text{g}/\text{L}$ 농도에서 유의적인 증가를 보였다. ALP의 경우 2주차 50 $\mu\text{g}/\text{L}$ 농도 구간에서의 증가를 제외하고 유의성을 나타내지 않았다.

Table. 3 Changes of serum calcium and magnesium in mullet, *Mugil cephalus* exposed to hexavalent chromium for 4 weeks.

Parameters	Period (week)	Hexavalent chromium concentration ($\mu\text{g/L}$)					
		0	25	50	100	200	400
Calcium (mg/dL)	2	15.51 \pm 1.29 ^a	16.68 \pm 0.81 ^a	16.23 \pm 1.14 ^a	16.30 \pm 0.93 ^a	15.79 \pm 1.63 ^a	11.47 \pm 0.86 ^b
	4	14.43 \pm 0.78 ^a	13.22 \pm 0.87 ^b	12.72 \pm 0.92 ^b	12.51 \pm 0.50 ^b	13.16 \pm 0.56 ^b	12.35 \pm 0.59 ^b
Magnesium (mg/dL)	2	4.34 \pm 0.50 ^a	4.12 \pm 0.70 ^a	4.62 \pm 0.52 ^{ab}	4.32 \pm 0.80 ^a	5.02 \pm 0.80 ^{ab}	5.41 \pm 0.54 ^b
	4	4.15 \pm 0.18 ^a	4.70 \pm 0.41 ^b	4.85 \pm 0.19 ^b	4.47 \pm 0.14 ^{ab}	4.70 \pm 0.39 ^b	4.48 \pm 0.08 ^{ab}

Values are mean \pm S.E. Values with different superscript are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

Table. 4 Changes of serum glucose, total protein and triglyceride in mullet, *Mugil cephalus* exposed to hexavalent chromium for 4 weeks.

Parameters	Period (week)	Hexavalent chromium concentration ($\mu\text{g/L}$)					
		0	25	50	100	200	400
Glucose (mg/dL)	2	59.55 \pm 17.60 ^a	54.20 \pm 6.67 ^a	51.72 \pm 15.76 ^a	75.78 \pm 9.81 ^{ab}	56.83 \pm 2.65 ^a	92.73 \pm 12.80 ^b
	4	57.38 \pm 15.01	61.84 \pm 5.56	76.05 \pm 2.59	72.68 \pm 6.43	51.00 \pm 8.44	53.10 \pm 7.68
Total protein (g/dL)	2	4.67 \pm 0.15	4.88 \pm 0.06	4.70 \pm 0.18	4.51 \pm 0.07	4.77 \pm 0.12	4.69 \pm 0.13
	4	5.07 \pm 0.04 ^a	5.25 \pm 0.09 ^{ab}	4.98 \pm 0.23 ^a	5.06 \pm 0.07 ^a	5.34 \pm 0.08 ^{bc}	5.46 \pm 0.06 ^c
Triglyceride (mg/dL)	2	78.52 \pm 15.45	99.83 \pm 18.50	66.11 \pm 8.95	76.51 \pm 7.81	98.32 \pm 35.13	91.11 \pm 15.62
	4	108.60 \pm 6.95	106.14 \pm 2.86	96.67 \pm 6.61	97.02 \pm 11.13	116.49 \pm 29.48	111.40 \pm 23.31

Values are mean \pm S.E. Values with different superscript are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

Table. 5 Changes of serum GOT, GPT and ALP in mullet, *Mugil cephalus* exposed to hexavalent chromium for 4 weeks.

Parameters	Period (week)	Hexavalent chromium concentration ($\mu\text{g/L}$)					
		0	25	50	100	200	400
GOT (karmen unit)	2	15.75 \pm 1.44 ^a	15.02 \pm 2.15 ^a	16.25 \pm 0.53 ^a	5.16 \pm 0.48 ^c	4.68 \pm 1.46 ^c	9.12 \pm 2.03 ^b
	4	12.54 \pm 1.47 ^a	17.18 \pm 1.21 ^{ab}	22.70 \pm 1.47 ^b	17.55 \pm 4.33 ^{ab}	21.12 \pm 3.70 ^b	32.40 \pm 6.22 ^c
GPT (karmen unit)	2	1.40 \pm 0.60 ^a	2.92 \pm 0.24 ^b	2.92 \pm 0.63 ^b	2.12 \pm 0.30 ^{ab}	2.92 \pm 0.49 ^b	3.04 \pm 0.64 ^b
	4	6.32 \pm 0.30 ^a	7.89 \pm 0.20 ^{ab}	9.95 \pm 0.59 ^b	7.56 \pm 0.31 ^{ab}	6.81 \pm 0.91 ^a	9.80 \pm 2.38 ^b
ALP (K-A)	2	3.71 \pm 0.24 ^a	4.16 \pm 0.08 ^{ab}	4.40 \pm 0.33 ^b	3.98 \pm 0.46 ^{ab}	3.79 \pm 0.27 ^a	3.76 \pm 0.16 ^a
	4	3.66 \pm 0.09	3.58 \pm 0.11	3.61 \pm 0.05	3.52 \pm 0.18	3.49 \pm 0.12	3.69 \pm 0.44

Values are mean \pm S.E. Values with different superscript are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

5. 생화학적 변화

5-1. Superoxide dismutase (SOD) activity

6가 크롬에 노출된 송어의 간과 아가미 내 SOD 활성 결과를 Fig. 10-11에 나타내었다. 간에서 SOD 활성은 2주차에서는 가장 높은 구간에 유의적인 활성 감소를 나타냈고, 4주차에서는 100 μ g/L 농도 이상에서 유의적인 활성 감소가 나타났다. 아가미 내 SOD 활성 변화의 경우 2주차에는 50, 100 μ g/L 농도에서 유의적인 증가를 보였으나 더 높은 농도 구간에서는 유의성이 나타나지 않았고, 4주차에는 가장 높은 농도 구간인 400 μ g/L에서 유의적인 감소가 나타났다.



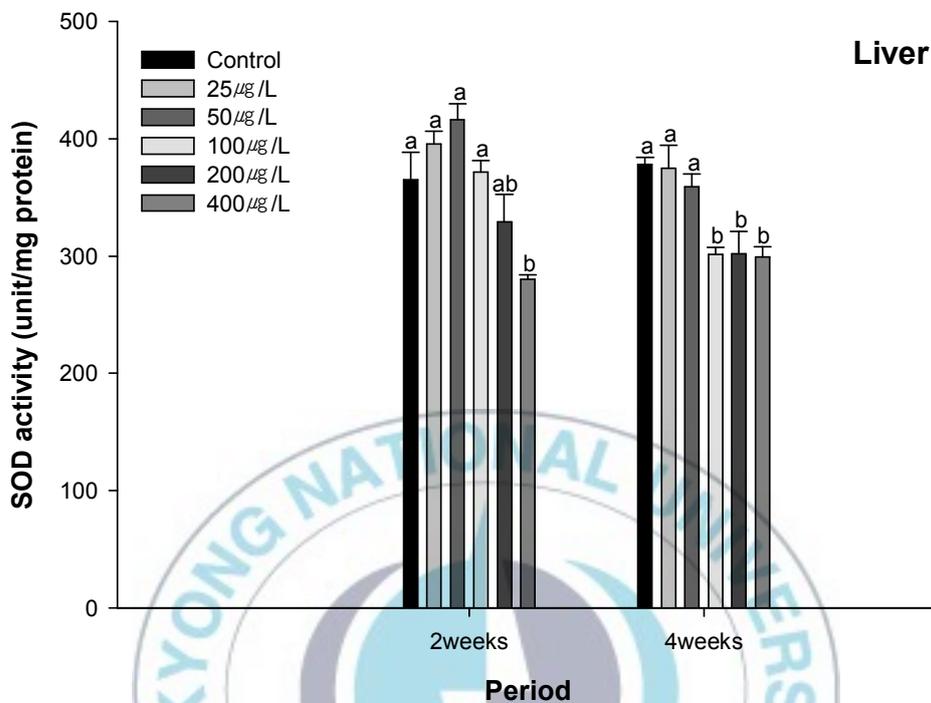


Figure. 10 Superoxide dismutase activity in liver of mullet, *Mugil cephalus* exposed to the different concentration of hexavalent chromium. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

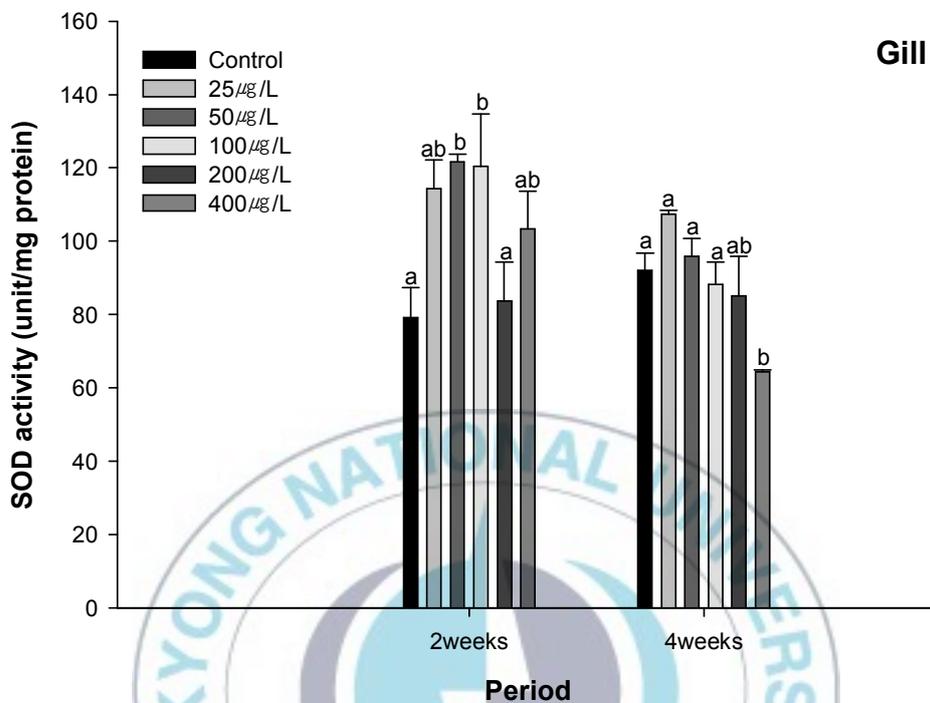


Figure. 11 Superoxide dismutase activity in gill of mullet, *Mugil cephalus* exposed to the different concentration of hexavalent chromium. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

5-2. Glutathione s-transferase (GST) activity

6가 크롬에 노출된 송어의 간과 아가미 내 GST 활성 변화는 Fig. 12-13에 나타내었다. 간 내 GST 활성의 경우 2주차에는 가장 높은 농도 구간인 $400\mu\text{g/L}$ 에서만 유의적인 감소를 나타냈고, 4주차에서도 높은 농도 구간으로 갈수록 감소하는 경향을 보였으나 $400\mu\text{g/L}$ 농도에서만 유의성이 있었다. 아가미 내 GST 활성의 경우 2주차에는 50, 100, $400\mu\text{g/L}$ 농도구간에서 유의적인 감소를 나타냈으며, 4주차에는 전체적으로 감소하는 경향은 보였으나 $200\mu\text{g/L}$ 농도에서만 유의성이 있었다.



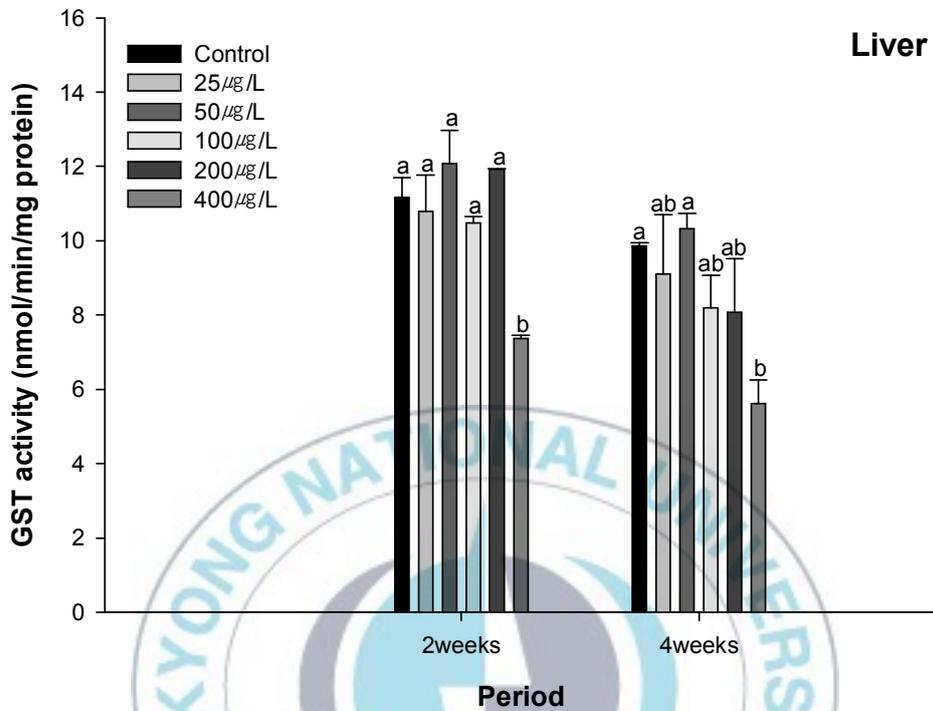


Figure. 12 Glutathione s-transferase activity in liver of mullet, *Mugil cephalus* exposed to the different concentration of hexavalent chromium. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

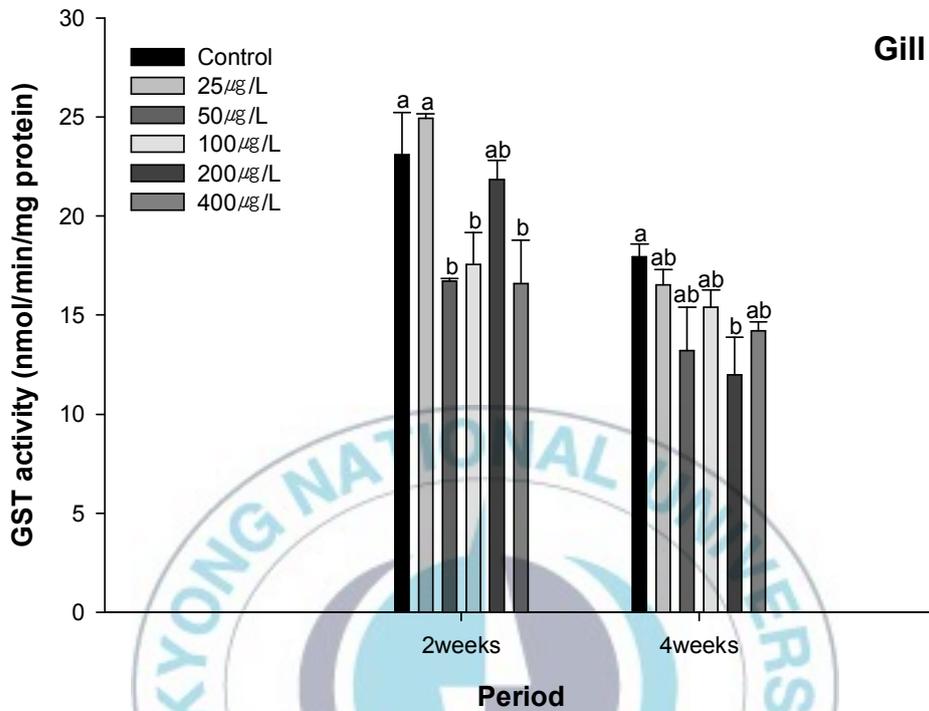


Figure. 13 Glutathione s-transferase activity in gill of mullet, *Mugil cephalus* exposed to the different concentration of hexavalent chromium. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

5-3. Glutathione (GSH) level

6가 크롬에 노출된 송어의 간 내 reduced glutathione 함량은 Fig. 14에 나타내었다. 간에서 GSH 함량은 2주차에 200, 400 μ g/L 농도 구간에서 유의적인 증가를 나타냈으며, 4주차에는 50 μ g/L 농도 이상에서 유의적인 증가가 나타났다. 또한 2주차와 4주차의 유의성이 없는 구간에서도 증가하는 경향은 나타났다.



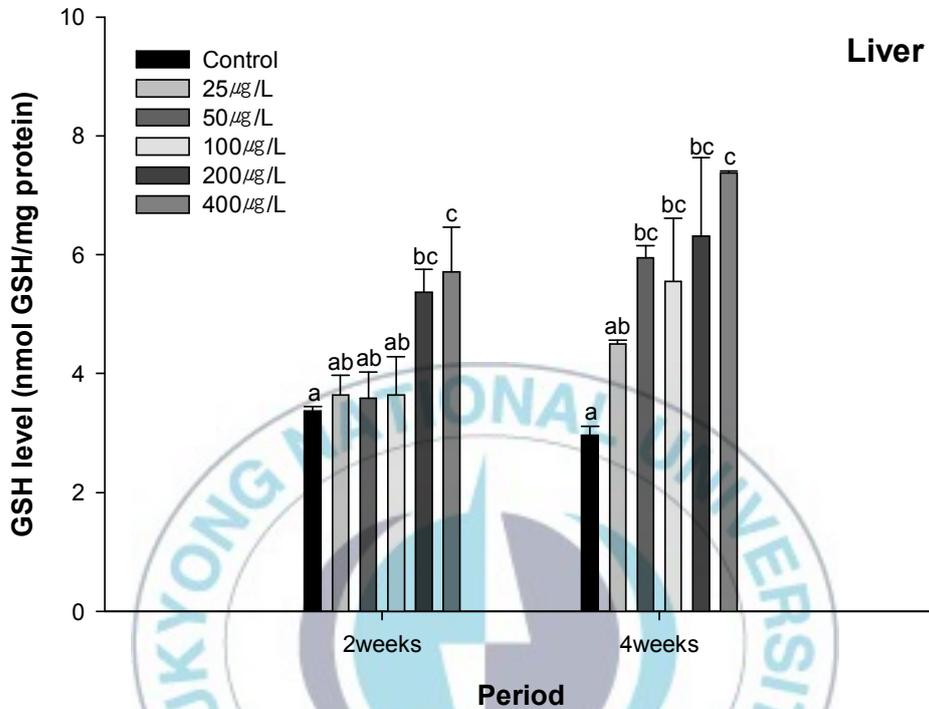


Figure. 14 Reduced glutathione level in liver of mullet, *Mugil cephalus* exposed to the different concentration of hexavalent chromium. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

5-4. Metallothionein (MT) level

6가 크롬에 노출된 송어의 간 내 MT 함량은 Fig. 15에 나타내었다. 간에서 MT 함량은 2주차에는 모든 구간에서 유의적인 증가가 나타났고, 4주차에는 가장 높은 농도 구간인 $400\mu\text{g/L}$ 에서만 유의적인 증가가 나타났다.



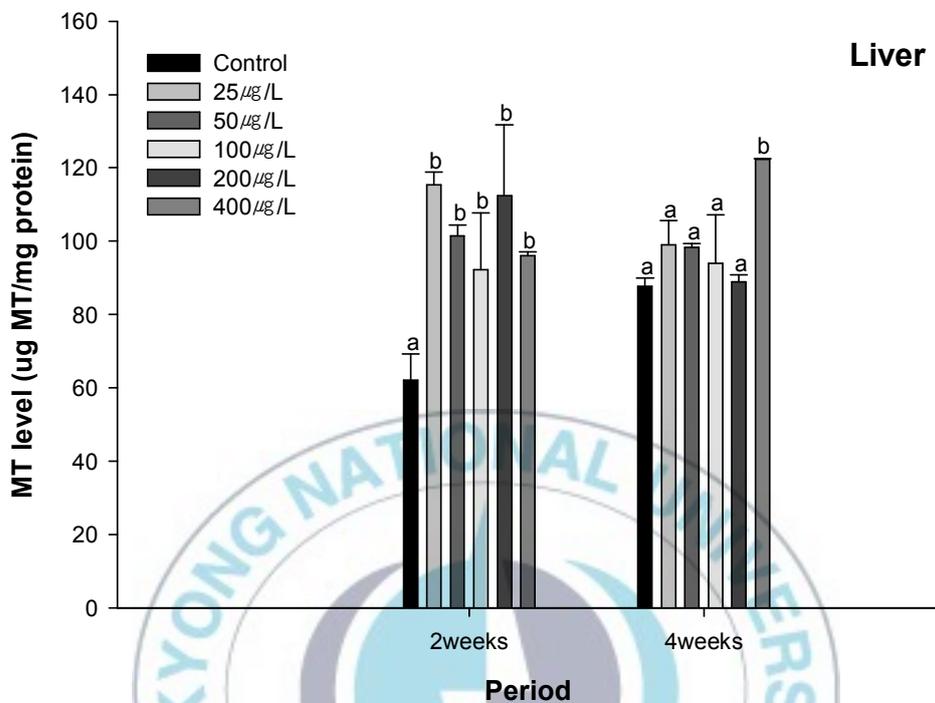
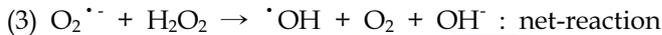
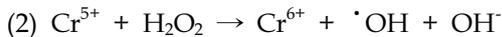
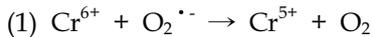


Figure. 15 Metallothionein level in liver of mullet, *Mugil cephalus* exposed to the different concentration of hexavalent chromium. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

IV. 고찰

전이금속인 크롬이온은 생물 내에서 자유 라디칼 생성을 자극시킨다. 6가 크롬의 경우 Fenton and Haber-Weiss 반응을 촉매한다(Wang et al., 2004; Valko et al., 2005; Lushchak, 2008). Fenton and Haber-Weiss 반응은 다음과 같다.



이것은 크롬에 의해 산화 스트레스를 유도할 수 있다. 생물학적 시스템 내 6가 크롬(Cr^{6+})에서 3가 크롬(Cr^{3+})으로의 전환 능력은 6가 크롬을 무독화하기 위한 메카니즘으로 추정된다(Arillo and Melodia, 1990; Lushchak et al., 2008). 크롬이온은 역가가 변할 수 있고, 산화된 크롬형태는 비효소와 효소적 메카니즘에 의해 줄어들게 된다(Lushchak, 2008). Cr^{6+} 은 주로 $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ 또는 CrO_4^{2-} 음이온 형태로 존재하여 비특이적 음이온 수송 시스템을 통해 세포 내로 들어간다(Valko et al., 2005). 따라서 Cr^{3+} 보다 Cr^{6+} 이 생물 내로 흡수되기 더 쉽다고 여겨진다(De Flora, 2000).

미량 금속의 생체 축적에 대한 변동성은 널리 알려져 있다(Eisler, 1981). 어류의 경우 중금속의 생체 축적은 다양한 요인에 영향을 받으며 그 중 섭이행동, 성장률, 온도, 경도, 염도, 나이, 성별, 금속과의 상호작용이 중요시 여겨진다(McCarty, 1978; Hakanson, 1980; Czarnezki, 1985; Bendell-Young and Harvey, 1989; Mance, 1990). Cr(VI)은 생체 내에서 신장, 고환, 뼈에 다량 축적되며 심장, 췌장, 폐, 뇌에는 적은 양이 축적된다(Costa, 1997; Saner, 1980). 또한 인체 내에선 간과 신장이 50%에 달하는 크롬량을 책임진다(Saner, 1980). Palaniappan and Karthikeyan (2008)의 연구에서 약한 아치사 농도의 크롬에 노출시킨 담수어 *Cirrhinus mrigala*의 간, 신장, 아가미, 근육 내 크롬 양을 측정 시 신장과 간에서 가장 많이 축적되었다. 또한 각종 중금속으로 오염된 인도 보팔의 Upper Lake에서 잉어목인 *L. rohita*의 체내 크롬 축적량이 간과 신장에서 가장 많고 비슷하였으며, 그 뒤로 아가미와 근육 순으로 나타났다(Neetu Malik, 2008). 본 연구에서도 유사하게 Cr(VI)에 노출된 송어의 조직별 축적량은

신장, 간, 장, 아가미, 비장, 근육 순이었다. 또한 근육을 제외하고 전체적으로 유사한 패턴을 보였으며, 대체적으로 4주차 200 $\mu\text{g}/\text{L}$ 농도 이상에서 유의한 증가를 나타냈다. 간과 신장은 각각 해독과 배설의 주요장소이며, 크롬의 주요 축적장소이기에 많은 축적량이 나타난 것으로 여겨진다. 또한 장에서의 축적은 해산어의 경우 삼투조절을 위해 물을 마시게 되어 장으로 수분을 흡수하는데 그 과정에서 크롬이 동반되어 나타난 것으로 추측된다. 아가미에서 축적은 해수와 의 직접적인 접촉과 이온 교환에 따른 것으로 짐작되며, 근육은 크롬의 축적과 큰 연관이 없는 것으로 여겨진다.

어류의 성장은 수온, pH, 성별, 영양분, 각종 오염물질 등의 여러 가지 요인에 영향을 받는다. 또한 일반적으로 아치사 농도의 금속에 노출 시 성장이 저해된다. 본 연구에서 Cr(VI)에 노출된 송어의 성장은 대조구와 비교하여 일일성장성장량의 경우 2주차에는 50 $\mu\text{g}/\text{L}$ 농도 이상에서 감소하였고, 4주차에는 모든 농도 구간에서 유의적인 감소가 나타났다. 또한 일일체중성장량은 4주차의 100, 400 $\mu\text{g}/\text{L}$ 농도 구간에서 유의적인 감소가 나타났으며, 비만도 지수도 4주차 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 농도 이상에서 유의적인 감소가 나타났다. 이와 유사하게 크롬을 음식으로 섭취시킨 *Cyprinus carpio juveniles*의 경우 2, 5mg Cr/kg 농도에서 성장이 감소했고, 심지어 10mg Cr/kg의 경우 성장이 멈췄다는 연구가 보고되었다(Lin Yuhua et al., 2003). 또한 일정 농도의 Cr(VI)에 노출된 메기, *Heteropneustes fossilis*의 경우도 20일 이후 성장률이 명백히 감소했다고 보고되었고(Pandey and Nisha, 1983), Benoit (1976)은 만성 독성으로 노출시킨 brook trout, *Salvelinus fontinalis* 치어의 경우 10 $\mu\text{g}/\text{L}$ 농도에서 8개월 동안 체중성장률이 감소했다고 보고했다. 이러한 성장의 감소는 산화 스트레스로 인한 항상성 유지를 위해 대사에너지가 증가함으로써 성장에 장애를 가져온 것으로 보인다.

어류의 혈액학적 성상 변화는 환경 오염물질에 의해 야기되는 독성 스트레스를 측정하는데 널리 사용되고 있다. 그리고 혈액학적 지표들은 금속에 노출 시 빠르게 반응한다. 본 연구에서 혈액학적 성장 중 Hb를 제외한 RBC count와 Ht에는 유의한 변화가 있었다. RBC count는 2주차에는 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 농도 이상에서 유의적으로 감소하였고, 4주차에는 50, 200, 400 $\mu\text{g}/\text{L}$ 농도 구간에서 유의적인 감소를 하였다. 반면 Ht의 경우 2주차에는 25, 50, 400 $\mu\text{g}/\text{L}$ 농도에서 유의적으로 증가하였고, 4주차에는 50 $\mu\text{g}/\text{L}$ 농도 이상에서 유의적으로 증가하였다. 일반적으로 외부 스트레스 요인에 의해 혈액 성상이 감소하는 것으로 보고되지만(Benifey

and Biron, 2000; Mattsson et al., 2001), Ht의 경우 독성 금속 노출 후 증가하는 경향이 있다고 보고된 바 있다(Wilson and Taylor, 1993). 또한 비소의 경우 스트레스 반응으로 RBC의 swelling 현상을 증가시키는데 영향을 준다고 보고되었다(Nemcsok and Boross, 1982). 본 연구에서 RBC count 감소와 Ht 증가에 의해 mean corpuscular volume (MCV)가 증가됨을 알 수 있다. El-Demerdash et al. (2006)는 토끼에 엽산과 Cr(VI)을 각각 처리한 것과 함께 처리한 것을 비교하였는데, 그 결과 엽산은 크롬에 의해 유도된 라디칼 증가를 줄였으며, 그것의 독성 효과도 최소화한 것으로 나타났다. 이에 따라 본 실험에서 MCV의 증가는 Cr(VI) 노출에 대한 방어 작용으로 엽산이 소비되어 결핍 현상이 일어나 거대적혈구가 생성된 것 일수도 있다.

본 연구에서는 혈청 내 무기성분, 유기성분, 효소성분의 변화를 실험하였다. 우선 혈청 내 무기성분인 칼슘과 마그네슘은 혈청 삼투압 변화에 따라 증가하거나 감소한다(Waring et al., 1996; Chang et al., 2001; Hur et al., 2001). 본 연구 결과로써 칼슘은 2주차에는 가장 높은 농도에서 유의한 감소를 나타냈고, 4주차에는 모든 농도 구간에서 유의한 감소를 나타냈다. 그리고 마그네슘은 2주차에는 가장 높은 농도에서 유의한 증가를 나타냈고, 4주차에는 25, 50, 200 μ g/L 농도에서 유의한 증가를 나타냈다. 중금속에 대한 영향으로 칼슘의 감소와 마그네슘의 증가는 많이 보고되었다(Larsson et al., 1981; Gile, 1984; Haux and Larsson, 1984; Kuroshima, 1992; Rogers et al., 2003). 칼슘은 금속이온의 섭취 과정 중 칼슘과 크롬의 상호작용에 의한 감소로 여겨지며, 마그네슘은 칼슘 감소에 따른 간접적인 결과로써 증가한 것으로 추측된다. 또한 이러한 증감으로 어류의 삼투압 조절에 영향을 미쳤을 것으로 간주된다. 혈청 내 유기성분으로 혈당, 총단백질, 중성지방을 측정하였다. 혈청 내 혈당의 경우 일반적으로 스트레스를 받을 시 탄수화물 대사의 증가에 따라 증가하게 된다(Hontela et al., 1996; Kennedy et al., 1995). 본 연구에서는 2주차에 400 μ g/L 농도에서 유의한 증가를 나타냈고, 4주차에는 100 μ g/L 농도 구간까지 증가하는 경향을 보이다가 더 높은 농도 구간에서 감소하는 경향을 보였지만 유의적인 차이는 없었다. 4주차에서의 증가한 후 감소하는 경향은 Cr(VI)의 농도와 노출 기간에 따른 저장된 탄수화물의 과도한 이용에 의한 결과로 생각된다(Bhattacharya et al., 1987). 혈청 내 총단백질 분석 결과 4주차의 200, 400 μ g/L 농도 구간에서 유의한 증가를 나타냈다. 이는 단백질 합성, 분해 등에 문제가 생겼거나, 산화 스트레스에

따른 생리적 적응에 따른 결과일 수 있다. 일반적으로 중성지방의 농도는 수온, 성별, 생식주기와 먹이의 지질 함량이나 섭식율에 따라 변하는 것으로 알려져 있다(Lie et al., 1988; Shikata et al., 1993). 중성지방인 triglyceride의 경우 모든 구간에서 증가하는 경향을 보였으나, 유의성은 없었다. 혈청 내 효소성분으로 GOT와 GPT는 어류에 대한 환경 오염물질의 아치사 독성 영향을 측정하는데 종종 사용되며(Loroux and Perry, 1972), 간이나 췌장 등 장기의 조직적 손상이나 이상발생시 혈중 농도가 높아지는 것으로 알려져 있다(Blasco and Puppo, 1999). ALP는 간이나 뼈에 주로 존재하며, 여러 간질환에 따라 증가한다(Matsuzawa et al., 1993). 본 연구에서 GOT는 2주차에 100 μ g/L 농도 이상에서 유의한 감소를 보였지만, 4주차에는 50, 200, 400 μ g/L 농도 구간에서 유의적으로 증가하고 모든 농도 구간에서 증가하는 경향을 보였다. GPT의 경우 대조구와 비교하여 2주차에는 100 μ g/L 농도를 제외한 모든 구간에서 유의한 증가를 보였고, 4주차에는 전체적으로 증가하는 경향과 함께 50, 400 μ g/L 농도에서 유의성을 나타냈다. ALP는 2주차 50 μ g/L 농도에서만 유의한 증가를 나타냈다. 혈청 내 효소성분의 전체적인 증가로 보아 Cr(VI)에 노출된 송어의 간이 손상되었음을 알 수 있다.

Superoxide dismutase (SOD)는 세포의 항산화 방어 메커니즘에 중요한 역할을 한다. SOD 활성의 조절은 생물학적 시스템 내 산화 스트레스에 대한 초기 지표로, 항산화 효소 중 oxyradical 형성을 억제하여 산소 독성에 대한 첫 방어선으로 고려된다(Firat et al., 2009; Li et al., 2010). 본 연구에서는 간과 아가미의 SOD 활성을 측정하였다. 그 결과 간에서 2주차에는 가장 높은 농도인 400 μ g/L에서 유의한 감소를 나타냈고, 4주차에는 100 μ g/L 농도 이상에서 유의한 활성 감소를 나타냈다. 아가미에서는 2주차에 50, 100 μ g/L에서 유의한 증가를 나타냈으나, 4주차 400 μ g/L 농도에서 유의한 활성 감소가 나타났다. 일반적으로 SOD는 중금속이나 독성물질에 노출 시 활성이 증가하는 경향을 보인다. 담수어의 경우 많은 연구에서 크롬 등의 중금속에 노출 시 SOD 활성이 증가하는 결과를 나타낸다. 하지만 Velma and Tchounwou (2010)의 연구에서 Cr(VI) 노출된 goldfish, *Carassius auratus*의 간과 신장에서 농도에 따라 SOD 활성이 증가하였지만, 4주차에서는 활성이 Control 그룹과 차이가 없어짐이 나타났다. Kubrak et al. (2010)의 연구에서도 Cr(VI)에 48시간 노출된 goldfish 뇌의 SOD 활성이 감소했으며, 또한 강한 항산화제로 알려진 구리와 아연 이온의 경우에도

in vitro 방법으로 이 금속에 노출된 sea bass 적혈구 내 SOD와 catalase 활성이 감소하였다(Cooley and Klaverkamp, 2000). 본 연구와 유사하게 송어에 대한 연구의 경우 중금속(크롬, 철)에 오염된 하구에 서식하는 송어의 간 내 SOD 활성이 오염되지 않은 지역의 송어보다 낮은 결과를 보였다(Padmini et al., 2008). 이런 중금속에 노출하였을 때 항산화 활성이 억제되는 것은 자유 라디칼의 과도한 생성 또는 단백질의 sulfhydryl group에 금속이 공유 결합한 것으로 여겨진다(Dallinger et al., 1987; Lackner, 1998; Ercal et al., 2001).

GST와 GPx(glutathione peroxidase)는 산화 스트레스로부터 생물을 보호하는데 중요한 역할을 하며 수계생물의 오염물질에 대한 유용한 지표로(Winston and Di Giulio, 1991), GST는 생체이물의 수송 또는 배출을 위한 친수성을 만들기 위해 친전자성 물질 또는 tripeptide glutathione group을 생체이물과 결합시킨다(Ozmen et al., 2006). 본 연구에서 Cr(VI)에 노출된 송어의 간과 아가미의 GST 활성을 측정하였다. 간 내 GST 활성은 2주차와 4주차 모두 400 μ g/L 농도에서 유의한 감소를 나타냈다. 아가미 내 GST 활성은 2주차에는 50, 100, 400 μ g/L 농도에서 유의한 감소를 나타냈고, 4주차에는 전체적으로 감소하는 경향을 보였지만 200 μ g/L 농도에서만 유의성을 나타냈다. 본 연구와 유사하게 zebra fish larvae에서 Cr(VI)은 GST 활성, cholinesterase 및 세포 대사를 억제시켰다고 보고되었으며(Domingues et al., 2010), 또한 CuSO₄로 100, 250 μ g Cu/L에 96 시간 노출된 잉어의 경우 CAT(catalase)와 GST가 억제되었다고 보고되었다(Dautremepuits et al., 2002). 이전 연구에 따르면 여러 어종에서 GST 활성은 종모양 패턴을 가진다고 보고되었다. 즉 오염물질 노출에 대해 적정 농도가 될 때까지 효소활성이 증가하다가 그 후 점진적으로 감소한다는 것이다(Elia et al., 2003; Vieira et al., 2009). 더욱이 여러 PAH와 금속의 노출에 대한 GST 활성의 억제와 야기가 모두 보고되어왔다(Sanchez et al., 2005; Vieira et al., 2008).

GSH는 금속에 대한 감수성을 변동시키는 것으로 알려진 금속 방어 분자로서(Rabenstein, 1989; K대호 et al., 1994), 간에서 합성되어 혈액을 통해 신장, 근육 등의 장기로 이동하게 된다(Pena et al., 2000). 일반적으로 어류에 금속 노출은 GSH 상태를 변하게 하는데(Maracine and Segner, 1998), 주로 금속을 킬레이트, 무독화하며 oxyradical 제거와 GPx에 의해 촉매 되는 무독화 반응에 참여함으로써 금속에 대한 세포의 첫 방어선으로 고려된다(Sies, 1999). 본 연구에서 간 내 GSH는 2주차에 200, 400 μ g/L에서 유의한 증가를 나타냈으며, 4주차에

는 25 μ g/L를 제외한 모든 구간에서 유의한 증가가 나타났다. 이러한 결과는 금속에 의한 산화 스트레스를 받아 송어 내 GSH 합성이 증가한 것으로 보인다. 본 연구와 유사하게 Atli and Canli (2008) 연구에서도 카드뮴, 아연, 구리에 각각 노출된 *O. niloticus*의 간 내 GSH 함량이 증가하였으며, 이것은 GSH가 산화 스트레스에 대해 어류를 보호하기 위한 첫 방어 시스템이기 때문일 것이라고 보고하였다. 그리고 카드뮴과 아연에 노출된 rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*에서도 시간과 농도에 따라 GSH가 증가되었다고 보고된 바 있다(Lange et al., 2002). 그 외 여러 연구에서 금속과 유기 오염물질에 노출된 어류에서 세포독성 영향에 대해 보호하기 위해 GSH level을 증가시켰다고 보고되었다(Thomas and Wofford, 1984; Gallagher et al., 1992; Stein et al., 1992; Di Giulio et al., 1993; Kuroshima, 1995; Tort et al., 1996; Paris-Palacios et al., 2000). 본 연구에서 간 내 GSH의 증가는 방어 기작에 의한 합성의 증가뿐만 아니라 GSH를 금속과 접합시키는 GST의 활성이 감소됨으로써 GSH 소비가 빠르게 이루어지지 않은 것과는도 연관되는 것으로 여겨진다.

MT는 중금속 독성을 중화하는데 중요한 역할을 하며, 스트레스로부터 세포를 보호한다(Kägi and Schäffer, 1988). Velma and Tchounwou (2010)의 연구에서 Cr(VI)에 노출된 goldfish의 간과 신장의 MT level이 농도와 시간에 따라 증가하였다. 또한 Cr(VI)에 노출된 쥐의 간과 신장 세포 내 MT가 농도에 따라 유도되었다는 연구 결과가 보고되었다(Solis-Heredia et al., 1999). 이와 유사하게 본 연구에서도 간 내 MT level 측정시 2주차에는 Cr(VI)에 노출된 모든 농도 구간에서 유의한 증가가 있었으며, 4주차에는 가장 높은 농도 구간인 400 μ g/L 농도에서 유의한 증가를 나타냈다. 이와 같은 MT level 증가와 관련하여 zebra fish의 간과 꼬리지느러미 cell-line에 Cr(VI)을 처리하였을 때 MT mRNA가 유도된다고 보고되었으며(Cheuk et al., 2008), Roberts and Oris (2004)는 간과 신장 내 MT mRNA 유도는 금속에 반응하는 MT 유전자 요소의 직접적인 활성화에 의한 결과라 할 수 있다고 보고하였다.

V. 요약

크롬은(Cr)은 지구의 지각 내 6번째로 풍부한 금속으로 환경 내에선 3가(III)와 6가(VI) 크롬이 대부분을 차지한다. 특히 Cr(VI)은 여러 산업의 배출수로 배출되어 환경을 오염시키는 주요 중금속 중 하나이다. Cr(VI)은 수용액 내에서 주로 크롬산 이온으로 존재하며, 생체막을 쉽게 통과하여 산화 스트레스 및 생체 축적을 일으킨다. 송어는 기수에서 많은 시기를 보내는 광염성 어류로 경골어류 중 가장 광범위한 지리적 분포를 나타낸다. 또한 한국에서 송어는 산업적으로 중요한 어종이며, 천해어류양식 기준으로 생산량이 많은 편에 속한다.

따라서 본 연구의 목적은 4주간 0, 25, 50, 100, 200, 400 μ g/L 농도로 Cr(VI)을 노출시킨 송어의 성장, 혈액학적 성상, 항산화 반응 및 생체 축적 변화를 분석하였다.

4주간 Cr(VI)에 노출시킨 송어의 생체 축적은 근육을 제외하고 유사한 패턴을 보였으며, 신장, 간, 장, 아가미에 많은 축적량을 보였고, 대체로 200 μ g/L 농도 이상에서 유의한 증가를 나타냈다. 성장률 지표인 일일전장성장량은 25 μ g/L, 일일체중성장량은 100 μ g/L 농도 이상에서 성장이 둔화되었고, 이에 따른 비만도 지수는 100 μ g/L 농도 이상에서 유의한 감소를 나타냈다. 혈액학적 성분 중 RBC count는 감소하였고, Ht은 증가하였다. 혈청에서 무기성분으로 칼슘은 감소하고 마그네슘은 증가하였으며, 유기성분에서는 총단백질만 200 μ g/L 농도 이상에서 유의한 증가를 보였다. 혈청 내 효소성분인 GOT와 GPT는 높은 농도 구간에서 유의한 증가를 보였다. 항산화 반응 중 효소인 SOD와 GST 활성은 높은 농도 구간에서 유의한 감소를 나타냈다. 비효소 중 GSH와 MT level은 둘 다 증가하였다. 모든 요인들은 대체적으로 200 μ g/L 농도 이상에서 유의성을 나타냈다.

VI. 참고문헌

- Alvarado, N.E., Quesada, I., Hylland, K., Marigómez, I., Soto, M. 2006. Quantitative changes in metallothionein expression in target cell-types in the gills of turbot (*Scophthalmus maximus*) exposed to Cd, Cu, Zn and after a depuration treatment. *Aquatic Toxicology* (Amsterdam, Netherlands). 77(1), 64-77.
- Almeida, E.A., Bainy, A.C.D., Loureiro, A.P.M., Martinez, G.R., Miyamoto, S., Onuki, J., Barbosa, L.F., Garcia, C.C.M., Prado, F.M., Ronsein, G.E., Sigolo, C.A., Brochini, C.B., Martins, A.M.G., Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P. 2007. Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. *Comp. Biochem. Physiol., Part A: Mol. Integr. Physiol.* 146, 588-600.
- Arillo, A., Melodia, F. 1990. Protective effect of fish mucus against Cr(VI) pollution. *Chemosphere.* 20, 397-402.
- Atli G, Canli M. 2008. Responses of metallothionein and reduced glutathione in a freshwater fish *Oreochromis niloticus* following metal exposures. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 25, 33-38.
- Banerjee D, Onosaka S, Cherian MG. 1982. Immunohistochemical localization of metallothionein in cell nucleus and cytoplasm of rat liver and kidney. *Toxicology.* 24(2), 95-105.
- Bendell-Young, L. and Harvey, H.H. 1989. Concentrations and distribution of Fe, Zn and Cu in Tissues of the White Sucker in Relation to Elevated Levels of Metals and low pH. *Hydrobiologia.* 176/177, 349-354.
- Benifey T.J. and Biron M. 2000. Acute stress response in triploid rainbow trout (*Onchyrhynchus mykiss*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Aquaculture.* 184, 167-176.
- Benoit, D.A. 1976. Toxic effects of hexavalent chromium on brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Water Res.* 4,

497.

- Bergman, H.L. and Dorward-King, E.J. 1997. Reassessment of Metals Criteria for Aquatic Life Protection SETAC Tech. Pub. Series. SETAC Press, Pensacola, USA.
- Bhattacharya T., Ray A.K., Bhattacharya S. 1987. Blood glucose and hepatic glycogen. Interrelationship in *Channa punctatus*(Bloch). A parameter of non-lethal toxicity bioassay with industrial pollutants. Indian J. Exp. Biol. 25, 539-541.
- Burton C.A., Hatlelid K, Divine K, Carter D.E., Fernando Q, Brendel K, Gandolfi A.J. 1995. Glutathione effects on toxicity and uptake of mercuric chloride and sodium arsenite in rabbit renal cortical slices. Environ. Health Perspect. 103(1), 81-84.
- Carginale, V., Scudiero, R., Capasso, C., Capasso, A., Kille, P., di Prisco, G., et al., 1998, Cadmium-induced differential accumulation of metallothionein isoforms in the Antarctic icefish, which exhibits no basal metallothionein protein but high endogenous mRNA levels. The Biochemical Journal, 332(2), 475-481.
- Chang Y.J., Hur J.W., Lim H.K. and Lee J.K. 2001. Stress in olive flounder (*Oaralichthys olivaceus*) and fat cod (*Hexagrammos otakii*) by the sudden drop and rise of water temperature. J. Korean. Fish. Soc. 34, 91-97.
- Chapman, P.M., Allen, H.E., Godfredsen, K., Z'Graggen, M.N. 1996. Evaluation of bioaccumulation factors in regulating metals. Environ. Sci. Technol. 30, 448-452.
- Cheuk W.K., Chan P.C., Chan K.M. 2008. Cytotoxicities and induction of metallothionein (MT) and metal regulatory element (MRE)-binding transcription factor-1 (MTF-1) messenger RNA levels in the zebrafish (*Danio rerio*) ZFL and SJD cell lines after exposure to various metal ions. Aquat. Toxicol. 89, 103-112.
- Clements, W.H. 1991. Community Responses of Stream Organisms to Heavy Metals, Dept. of Fishery and Wildlife Biology. Colorado State Univ. U.S.A., 28 pp.

- Cooley H.M. and Klaverkamp J.F. 2000. Accumulation and distribution of dietary uranium in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *Aquat. Toxicol.* 48, 477-494.
- Costa M. 1997. Toxicity and carcinogenicity of Cr(VI) in animal models and humans. *CRC Critical Reviews in Toxicology.* 27, 431-442.
- Coyle, P., Philcox, J.C., Carey, L.C., Rofe, A.M. 2002. Metallothionein: The multipurpose protein. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 59(4), 627-647.
- Czamezki, J.M. 1985. Accumulation of Lead in Fish from Missouri Streams Impacted by Lead Mining. *Bull. Environ. Contain. Toxicol.* 34, 736-745.
- Dallinger R., Prosi F., Segner H. and Back H. 1987. Contaminated food and uptake of heavy metals by fish: a review and a proposal for further research. *Oecologia.* 73, 91-98.
- Dautremepuits, C., Betoulle, S., Vernet, G. 2002. Antioxidant response modulated by copper in healthy or parasitized carp (*Cyprinus carpio* L.) by *Ptychobothrium* sp. (Cestoda). *Biochim. Biophys. Acta.* 1573, 4-8.
- De Flora, S. 2000. Threshold mechanisms and site specificity in chromium(VI) carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 21, 533-541.
- Debetto, P., Luciani, S. 1988. Toxic effect of chromium on cellular metabolism. *Sci. Total Environ.* 71, 365-377.
- Di Giulio, R.T., Habig, C., Gallagher, E.P. 1993. Effect of black rock harbor sediments on indices of biotransformation oxidative, stress, and DNA integrity in channel catfish. *Aquat. Toxicol.* 26, 1-2.
- Domingues, I., Oliveira, R., Lourenco, J., Grisolia, C.K., Mendo, S., Soares, A.M. 2010. Biomarkers as a tool to assess effects of chromium (VI): comparison of responses in zebrafish early life stages and adults. *Comp. Biochem. Physiol. C* 152, 338-45.
- E. Padmini, M. Usha Rani, B. Vijaya Geetha. 2008. Studies on antioxidant status in *Mugil cephalus* in response to heavy metal pollution at Ennore estuary. *Environ. Monit. Assess.* 155, 215-225.
- Eisler, R. 1981. *Trace Metal Concentrations in Marine Organisms*; Pergamon Press: Oxford.

- Elia, A.C., Galarini, R., Taticchi, M.I., Dorr, A.J., Mantilacci, L. 2003. Antioxidant responses and bioaccumulation in *Ictalurus melas* under mercury exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 55, 162-67.
- Ercal N., Gurer-Orhan H. and Aykin-Burns N. 2001. Toxic metals and oxidative stress: Part I. Mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Cur. Top. Medicinal Chem.* 1, 529-539.
- Eroglu, K., Atli, G., Canli, M. 2005, Effects of metal (Cd, Cu, Zn) interactions on the profiles of metallothionein-like proteins in the Nile fish *Oreochromis niloticus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology.* 75(2), 390-399.
- Fatma M. El-Demerdash, Mokhtar I. Yousef, Fathia A.M. Elswad. 2006. Biochemical study on the protective role of folic acid in rabbits treated with chromium(VI). *J. Environ. Sci. Health. Part B* 41, 731-746.
- Fernandes, D., Bebianno, M.J., Porte, C. 2008. Hepatic levels of metal and metallothioneins in two commercial fish species of the Northern Iberian shelf. *The Science of the Total Environment.* 391(1), 159-167.
- Firat, O., Cogun, H.Y., Aslanyavrusu, S., Kargin, F. 2009. Antioxidant responses and metal accumulation in tissues of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* under Zn, Cd and Zn plus Cd exposures. *J. Appl. Toxicol.* 29, 295-301.
- Foulkes EC. 1993. Metallothionein and glutathione as determinants of cellular retention and extrusion of cadmium and mercury. *Life Sci.* 52, 1617-1620.
- Freedland J.H., Ciriolo M.R., Peisach J. 1989. The role of glutathione in copper metabolism and toxicity. *J. Biol. Chem.* 264, 5598-5605.
- Gallagher, E.P., Canada, A.T., Di Giulio, R.T. 1992. The protective role of glutathione in chlorothalonil-induced toxicity to channel catfish. *Aquat. Toxicol.* 23, 155-168.
- George, S.G. and Olssen, P.E. 1994. Metallothioneins as indicators of trace metal pollution. In K. J. M. Kramer (Ed.), *Biological monitoring of coastal waters and estuaries*. Boca Raton: CRC, 151-178.
- Giles M.A. 1984. Electrolyte and water balance in plasma and urine of

- rainbow trout (*Salmo gairdneri*) during chronic exposure to cadmium. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 41, 1678-1686.
- Hakanson, L. 1980. The Quantitative Impact of pH, Bioproduction and Hg-Contamination on the Hg-content of Fish (pike), Environ. Poll. 18, 285-304.
- Hamer, D.H. 1986. Methallothionein. Ann. Rev. Biochem. 55, 913-951.
- Haux C., Larsson A. 1984. Long-term sublethal physiological effects on rainbow trout, *Salmo gairdneri*, during exposure to cadmium and after subsequent recovery. Aquatic Toxicology 5, 129-142.
- Heath, A.G. 1990. Water Pollution and Fish Physiology. CRC Press, 254 pp.
- Hontela, A., C. Daniel and A. C. Richard. 1996. Effects of acute and subacute exposure to cadmium on the interrenal and thyroid function in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquat. Toxicol. 35, 171-182.
- Hur J.W., Chang Y.J., Lim H.K., Lee B.K. 2001. Stress responses of cultured fishes elicited by water level reduction in rearing tank and fish transference during selection process. J. Korean. Fish. Soc. 34, 465-472.
- Ikebuchi, H., Teshima, R., Suzuki, K., Terao, T., Yamane, Y. 1986. Simultaneous induction of Pbmetallothionein-like protein and Zn-thionein in the liver of rats given lead acetate. The Biochemical Journal. 233, 541-546.
- Kägi J.H.R., Schäffer A. 1988. Biochemistry of metallothionein. Biochem. 27, 8509-8515.
- Kennedy, C.J., R.M. Sweeting, A.P. Farrell, B.A. McKeown. 1995. Acute effects of chlorinated resin exposure on juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Environ. Toxicol. Chem. 14, 977-982.
- Keogh J.P., Steffen B, Siegers C.P. 1994. Cytotoxicity of heavy metals in the human small intestinal epithelial cell line I-407: The role of glutathione. J. Toxicol. Environ. Health. 43, 351-359.
- Kim, H.G., Park, K.N., Cho, Y.W., Park, E.H., Fuchs, J.A., Lim, C.J. 2001. Characterization and regulation of glutathione Stransferase gene from *Schizosaccharomyces pombe*. Biochim. Biophys. Acta. 1520, 179-185.

- Kuroshima, R. 1992. Effects of acute exposure to cadmium on the electrolyte balance in plasma of the carp and girella. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58, 1139-1144.
- Kuroshima, R. 1995. Hepatic metallothionein and glutathione levels in red sea bream. *Comp. Biochem. Physiol. C* 110, 95-100.
- L.E. Towill. 1978. Reviews of the Environmental Effects of Pollutants: III, Chromium. EPA-600/1-78-023 and ORNL/EIS-80, 12-17.
- Lackner R. 1998. Fish ecotoxicologie (Braunbeck T., Hinton D.E., Streit B., Bale), 203-224.
- Lange A., Ausseil O., Segner H. 2002. Alterations of tissue glutathione levels and metallothionein mRNA in rainbow trout during single and combined exposure to cadmium and zinc. *Comp Biochem Physiol.* 131C, 231-243.
- Langston, W.J., Chesman, B.S., Burt, G.R., Pope, N.D., McEvoy, J. 2002. Metallothionein in liver of eels *Anguilla anguilla* from the Thames Estuary: An indicator of environmental quality? *Marine Environmental Research.* 53(3), 263-293.
- Larsson A., Bengtsson B.E., Haux C. 1981. Disturbed ion balance in flounder, *Platichthys flesus* exposed to sublethal levels of cadmium. *Aquatic Toxicology* 1, 19-35.
- Li, Z.H., Velisek, J., Zlabek, V., Grabic, R., Machova, J., Kolarova, J., Randak, T. 2010. Hepatic antioxidant status and hematological parameters in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, after chronic exposure to carbamazepine. *Chem. Biol. Interact.* 183, 98-104.
- Lie, Oe., R. Waagboe, and K. Sandnes. 1988. Growth and chemical composition of adult Atlantic salmon (*Salmo Salar*) fed dry and silage-based diets. *Aquaculture.* 69, 343-353.
- Lin Yuhua, Lu Jianmin, Fu Huiguang. 2003. Effect of chromium on growth and plasma biochemical indexes of *Cyprinus carpio* juveniles. *Journal of Dalian Fisheries University* v.18 no.1, 48-51.
- Luoma, S.N., Rainbow, P.S. 2005. Why is metal bioaccumulation so variable? Biodynamics as a unifying concept. *Environ. Sci. Technol.* 39, 1921-1931.

- Lushchak, O.V., Kubrak, O.I., Nykorak, M.Z., Storey, K.B., Lushchak, V.I. 2008. The effect of potassium dichromate on free radical processes in goldfish: possible protective role of glutathione. *Aquat. Toxicol.* 87, 108-114.
- Lushchak, V.I. 2008. Oxidative stress as a component of transition metal toxicity in fish. In: Svensson, E.P. (Ed.), *Aquatic Toxicology Research Focus*. Nova Science Publishers Inc., Hauppauge, NY, USA, 1-29.
- Mance, G. 1990. *Pollution Threat of Heavy Metals in Aquatic Environments*. Elsevier, 372 pp.
- Maracine M, Segner H. 1998. Cytotoxicity of metals in isolated fish cells: Importance of the cellular glutathione status. *Comp. Biochem. Physiol.* 120A, 83-88.
- McCarty, C.S. and Henry, J. 1978. Toxicity of Cadmium to Goldfish, *Carassius auratus*, in Hard and Soft Water, *J. Fish Res. Bd. Can.* 35, 35-42.
- McCarty, L.S., Mackay, D. 1993. Enhancing ecotoxicological modeling and assessment. Body residues and modes of toxic action. *Environ. Sci. Technol.* 27, 1718-1728.
- Meister A and Anderson M.E. 1983. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* 52, 711-760.
- Merian E. 1991. *Metals and their Compounds in the Environment. Occurrence, Analysis and Biological Relevance*. VCH: Weinheim.
- Mzimela H.M., Wepener V, Cyrus D.P. 2003. Seasonal variation of selected metals in sediments, water and tissues of the groovy mullet, *Liza dumerelii* (Mugilidae) from the Mhlathuze Estuary, South Africa. *Mar. Pollut. Bull.* 46, 659-676.
- Nash, C.E. and R.M. Koningsberger. 1981. Artificial propagation. In *Aquaculture of Grey Mulletts* (O.H. Oren, eds.). International Biological Programme, Cambridge University Press, New York, 265-312.
- Nash, C.E. and Z.H. Shehaden. 1980. Review of breeding and propagation techniques for grey mullet, *Mugil cephalus*. *ICLARM Studies and*

- Reviews 3, Int. Cent. Living Aquatic Resources Management, Manila, 87.
- Nath, K. and Kumar, N. 1987. Effects of hexavalent chromium on the carbohydrate metabolism of a freshwater tropical teleost *Colisa sciatus*. Bull. Inst. 2001. Acad. Sin. (Taipei) 26, 245-248.
- Neetu Malik, A.K. Biswas, T.A. Qureshi, K. Borana, Rachna Virha. 2008. Bioaccumulation of heavy metals in fish tissues of a freshwater lake of Bhopal. Environ Monit Assess. 160, 267-276.
- Nemcsok J., Boross L. 1982. Comparative studies on the sensitivity of different fish species to metal pollution. Acta Biol. Hung. 33, 23-27.
- Nesto, N., Romano, S., Moschino, V., Mauri, M., Da Ros, L. 2007. Bioaccumulation and biomarker responses of trace metals and micro-organic pollutants in mussels and fish from the Lagoon of Venice, Italy. Marine Pollution Bulletin. 55(10-12), 469-484.
- Ney, J.J. and Van Hassel, J.H. 1983. Sources of Variability in Accumulation of Heavy Metals by Fishes in a Roadside Stream. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 12, 701-706.
- Nordberg, J., Arner, E.S. 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. Free Radical Biol. Med. 31, 1287-1312.
- Norseth, T. 1981. The carcinogenicity of chromium. Environ. Health Perspect. 40, 121-130.
- O'Brien P., Barrett J., Swanson F. 1985. Chromium(V) can be generated in the reduction of chromium(VI) by glutathione, Inorg. Chim. Acta. 108, L19-L20.
- Odum, W.E. 1970. Utilization of the direct grazing and plant detritus food chains by the striped mullet, *Mugil cephalus*. Marine food chains, 222-240.
- Olha I. Kubrak, Oleh V. Lushchak, Julia V. Lushchak, Ihor M. Torous, Janet M. Storey, Kenneth B. Storey, Volodymyr I. Lushchak. 2010. Chromium effects on free radical processes in goldfish tissues: Comparison of Cr(III) and Cr(VI) exposures on oxidative stress markers, glutathione status and antioxidant enzymes. Comp. Biochem. Physiol. Part C 152, 360-370.

- Oruç EÖ and Üner N. 2000. Combined effects of 2,4-D and azinphosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of *Oreochromis niloticus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 127C, 291-296.
- Ozmen, M., Gungordu, A., Kucukbay, F.Z., Guler, R.E. 2006. Monitoring the effects water pollution *Cyprinus carpio* in Karakaya Dam Lake. Turkey. *Ecotoxicology*. 15, 157-169.
- Pandey G.N. and Nisha. 1983. EFFECT OF HEXAVALENT CHROMIUM ON FRESH WATER FISH. *Journal of the Institution of Engineers (India). Chemical Engineering Division.* 64, 9-12.
- Paris-Palacios, S., Biagianti-Risbourg, S., Vernet, G. 2000. Biochemical and (ultra)structural hepatic perturbations of *Brachydanio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) exposed to two sublethal concentrations of copper sulphate. *Aquat. Toxicol.* 50, 109-24.
- Patierno, S.R., Banh, D., Landolph, J.R. 1988. Transformation of C3H/10T1/2 mouse embryo cells to focus formation and anchorage independence by insoluble lead chromate but not soluble calcium chromate: relationship to mutagenesis and internalization of lead chromate particles. *Cancer Res.* 48, 5280-5288.
- Pena, S., Pena, J.B., Rios, C., Sancho, E., Fernandez, C., Ferrando, M.D. 2000. Role of glutathione thiobencarb resistance in the European eel *Anguilla anguilla*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 46, 51-56.
- PL. RM. Palaniappan and S. Karthikeyan. 2008. Bioaccumulation and depuration of chromium in the selected organs and whole body tissues of freshwater fish *Cirrhinus mrigala* individually and in binary solutions with nickel. *J. Environ. Sci.* 21, 229-236.
- Rabenstein D.L. 1989. Metal complexes of glutathione and their biological significance. In *Glutathione: Chemical, Biochemical and Medical Aspects*, Dolphin D, Avramovic O, Poulson R (eds). Wiley, New York, 147-186.
- Riggio, M., Filosa, S., Parisi, E., Scudiero, R. 2003. Changes in zinc, copper and metallothionein contents during oocyte growth and early development of the teleost *Danio rerio* (zebrafish). *Comparative Biochemistry and*

- Physiology C Toxicology and Pharmacology. 135(2), 191-196.
- Roberts A.P., Oris J.T. 2004. Multiple biomarker response in rainbow trout during exposure to hexavalent chromium. *Comparative Biochem Physiol Part C* 138, 221-228.
- 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: mechanism of uptake, accumulation and release. In: Malins, D.C., Ostrander, G.K. (Eds.), *Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives. Aquatic Toxicology*. Lewis Publishers, London, 539.
- Rogers J.T., Richards J.G., Wood C.M. 2003. Ionoregulatory disruption as the acute toxic mechanism for lead in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 64, 215-234.
- Sanchez, W., Palluel, O., Meunier, L., Coquery, M., Porcher, J.M., Ait-Aissa, S. 2005. Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 19, 177-83.
- Saner G. 1980. Chromium in nutrition and Disease-Current Topics in Nutrition and Disease. Alan R. Liss, New York, 2, 26-29.
- Sarkar, A., Ray, D., Shrivastava, A. N., Sarker, S. 2006. Molecular biomarkers: Their significance and application in marine pollution monitoring. *Ecotoxicology* (London, England). 15(4), 333-340.
- Segner H and Braunbeck T. 1998. Cellular response profile to chemical stress. In *Ecotoxicology, Part 3*, SchÜürmann G, Markert B (eds). Wiley/Spektrum Akademische, New York, 521-569.
- Shi X. and Dalal N.S. 1988. The mechanism of the chromate reduction by glutathione: ESR evidence for the glutathionyl radical and an isolable Cr (V) intermediate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 156, 137-142.
- Shikata, T., D. Kheyyali, S. Shimeno. 1993. Effect of feeding rates on hepatopancreatic enzymes and body composition in common carp. *Nissuishi.* 59, 835-839.

- Sies H. 1999. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 916-921.
- Solis-Heredia M.J., Quintanilla-Vega B., Sierra-Santoyo A., Hernández. J.M., Brambila E, Cebrián ME, Albores A, 1999. Chromium increases pancreatic metallothionein in the rat. *Toxicol* 142, 111-117.
- Stein, J.E., Collier, T.K., Reichert, W.L., Casillas, E., Hom, T., Varanasi, U. 1992. Biondicators of contaminant exposure and sublethal effects: studies with benthic fish in Puget Sound, Washington. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 701-714.
- Stohs, S.J., Bagchi, D. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.* 18, 321-336.
- Sugiyama M. 1991. Effects of vitamins on chromium(VI)-induced damage, *Environ. Health Perspect.* 92, 63-70.
- Sugiyama M. 1994. Role of cellular antioxidants in metal-induced damage. *Cell Biol. Toxicol.* 10, 1-22.
- Thomas, P. and Wofford, H.W. 1984. Effects of metal and organic compounds on hepatic glutathione, cysteine and acid soluble thiol levels in mullet (*Mugil cephalus* L.). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 76, 172-82.
- Thomson, J.M. 1963. Synopsis of biological data on the grey mullet, *Mugil cephalus*. Fish. Synop. Div. Fish. Oceanogr. C.S.I.R.O. Australia, (1)
- Thomson, J.M. 1968. The grey mullets. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 4, 301-305.
- Tort, L., Kargacin, B., Torres, P., Giralt, M., Hidalgo, J. 1996. The effect of cadmium exposure and stress on plasma cortisol, metallothionein levels and oxidative status in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver. *Comp. Biochem. Physiol. C* 114, 29-34.
- U. S. Environmental protection agency. 1984. Locating and Estimating Air Emissions from Sources of Chromium, Traingle Park.
- Valko, M., Morris, H., Cronin, M.T. 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* 12, 1161-1208.
- Venkatramreddy Velma and Paul B. Tchounwou. 2010. Hexavalent

- chromium-induced multiple biomarker responses in liver and kidney of goldfish, *Carassius auratus*. Environ. Toxicol. 26, 649-656.
- Viarengo, A. and Nott, J.A. 1993. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. Comp. Biochem. Physiol. 104C, 355-372.
- Vieira, L.R., Sousa, A., Frasco, M.F., Lima, I., Morgado, F., Guilhermino, L. 2008. Acute effects of benzo[a]pyrene, anthracene and a fuel oil on biomarkers of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae). Sci. Total Environ. 295, 87-100.
- Vieira, L.R., Gravato, C., Soares, A.M.V.M., Morgado, F., Guilhermino, L. 2009. Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: Linking biomarkers to behavior. Chemosphere. 76, 1416-1427.
- von Burg, and R., Liu, D. 1993. Chromium and hexavalent chromium. J. Appl. Toxicol. 13, 225-230.
- Vuilleumier, S. 1997. Bacterial glutathione S-transferases: what are they good for? J. Bacteriol. 179, 1431-1441.
- Vuilleumier, S. and Pagni, M. 2002. The elusive role of bacterial glutathione S-transferases: new lessons from genomes. Appl. Microbiol. Biotechnol. 58, 138-146.
- Wang, S., Leonard, S.S., Ye, J., Gao, N., Wang, L., Shi, X. 2004. Role of reactive oxygen species and Cr(VI) in Ras-mediated signal transduction. Mol. Cell. Biochem. 255, 119-127.
- Waring C.P., Stagg R.M., and Poxton M.G. 1996. Physiological responses to handling in the turbot. J. Fish Biol. 48, 161-173.
- Winston D.W. and Di Giulio R.T. 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. Aquat. Toxicol. 19, 137-161.
- Wu, S.M., Weng, C.F., Yu, M.J., Lin, C.C., Chen, S.T., Hwang, J.C., Hwang, P.P. 1999. Cadmium-inducible metallothionein tilapia (*Oreochromis mossambicus*). Bull. Environ. Contam. Toxicol. 62, 758-768.
- Yudkovski, Y., Rogowska-Wrzesinska, A., Yankelevich, I., Shefer, E., Herut,

B., Tom, M. 2008. Quantitative immunochemical evaluation of fish metallothionein upon exposure to cadmium. *Marine Environmental Research*. 65(5), 427-436.

Zirong X. and Shijun B. 2007. Effects of waterborne Cd exposure on glutathione metabolism in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver. *Ecotoxicol. Environ. Safety*. 67, 89-94.

해양수산통계연보, 2006

