

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)가 보라성게 (*Anthocidaris crassispina*)의 초기발생에 미치는 영향

나오수, 문상희¹, 이치훈, 박창범, 김병호²,
진영석, 허상우, 감상규¹, 이영돈*

제주대학교 해양과환경연구소,
¹제주대학교 토목환경공학전공, ²(재)제주하이테크산업진흥원

Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) on Early Development of Sea Urchin *Anthocidaris crassispina*

Oh-Soo Na, Sang-Hee Moon¹, Chi-Hoon Lee, Chang-Beom Park,
Byung-Ho Kim², Young-Seok Jin, Sang-Woo Hur,
Sang-Kyu Kam¹ and Young-Don Lee*

Marine and Environmental Research Institute, Cheju National University, Jeju 695-814
¹Division of Civil and Environmental Engineering, Cheju National University, Jeju 690-756
²Jeju Hi-Tech Industry Development Institute, Jeju 690-121

ABSTRACT

Effects of five polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) constituents (naphthalene, fluorine, fluoranthene, benzo(a)pyrene, pyrene) on fertilization and early development of sea urchin egg, sperm and fertilized egg were investigated. The eggs, sperm and fertilized eggs were exposed to several concentrations of PAHs (1, 10, 100, 1000 and 10000 µg/L). The rate of fertilization and hatching decreased when the eggs and sperm were exposed to aqueous solution of PAHs. Also, Exposure of fertilized eggs with each PAHs did decrease survival and hatching rate. Concentration-dependent toxic effects on the rate of fertilization, hatching, survival and abnormality in *A. crassispina* were observed following exposure to PAHs (1, 10, 100, 1000 and 10000 µg/L). These data show that PAHs exposure decreased in fertilization success of sea urchin egg and sperm and produced abnormal embryo. It is plausible to suggest that PAHs had the potential to significantly reduce coastal recruitment of sea urchin.

Key word : PAHs, sea urchin, *Anthocidaris crassispina*, fertilization, hatching

서 론

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-64-782-8922, E-mail: leemri@cheju.ac.kr

PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons)는 2개
이상의 벤젠고리를 지닌 방향족 탄화수소로, 미량

으로 암을 유발시키는 발암물질 또는 돌연변이원성을 가진 내분비계장애물질이다 (McElroy *et al.*, 1985). PAHs는 모든 탄소화합물의 연소과정에서 나타날 수 있는데 주로 석탄 또는 석유 연소과정, 산업장의 연기와 매연, 자동차 배기가스, 산업 폐기물 등에서 생성되며 (Heit *et al.*, 1988; Van Metre *et al.*, 2000; Incardona *et al.*, 2004), 대기중으로 방출된 PAHs는 토양 및 연안환경으로 유입된다 (National Research Council, 2003). PAHs는 물에 대한 용해도가 낮은 반면에 유기용매에 대한 용해도가 크고 입자상 물질에 흡착이 잘되는 특성을 가지고 있어 연안 및 기수권역에 PAHs 농도가 지속적으로 증가하고 있다 (Bartlett *et al.*, 2000). PAHs는 수서생물의 체내에 축적되어 초기발생단계에서 부화율 및 성장률 감소, 기형개체 유발, 성 스테로이드 호르몬 감소, 생식소 발달 저해 등 신진대사와 생식 내분비계의 장애를 일으켜 (Varanasi, 1989; Fent and Bätischer, 2000; Giessing *et al.*, 2003; Venturini and Tommasi, 2004), 연안지역에 서식하는 수서생물의 생존에 영향을 미치고 (Barron *et al.*, 1999) 있어 이를 복원하기 위한 노력이 중요한 과제로 대두되고 있다.

Wilson (1951) 이후 성계의 배우자와 수정란은 해양환경 모니터링과 오염물질의 독성을 평가하는데 유용한 실험 재료로 널리 이용되고 있으며 (Pagano *et al.*, 1989; Kobayashi, 1991), 특히 초기발생과정에서 제1차 난황의 변화, 성장, 유생의 골격 발달에 대한 분석은 연안 환경의 변화에 대한 중요한 자료로 이용되고 있다 (Jackim and Nacci, 1986).

이 연구는 PAHs (naphthalene, fluorene, fluoranthene, benzo(a)pyrene, pyrene)가 보라성계의 초기발생에 미치는 영향을 탐색하기 위해 알과 정자에 PAHs를 농도별로 처리하여 수정율과 부화율을 조사하였고, 수정란에 처리하여 생존율, 부화율, 기형율을 조사하였다.

재료 및 방법

실험 재료 및 사육조건

이 연구에 사용된 보라성계는 제주도 북제주군 조천읍 함덕리 연안에서 채집하여 제주대학교 해양과환경연구소 읍긴 후, 1 μ M 여과필터로 여과된

자연해수를 이용하여 50 L 원형 아크릴 수조에서 사육하였다. 산란을 유도하기 위해 0.5 M KCl을 보라성계 한 마리당 0.5 mL씩 주사하였고, 산란된 알은 100 μ M 여과망에서 수세한 후 10 L 유리수조에 수용하였다. 정자는 수거하여 4°C에서 냉장 보관한 후 실험 시작 시 여과해수에 희석하여 사용하였다. 실험 기간동안 사육수의 수온은 $18.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$, pH는 8.0 ± 0.2 이었다.

보라성계 알과 정자, 수정란의 PAHs 침적처리

실험에 사용한 각각의 PAHs 구성요소들 중 naphthalene (NA), fluorene (FL) 그리고 pyrene (PY)는 Aldrich Co. (Milwaukee, Wisconsin, USA)에서, fluoranthene (FLR)과 benzo(a)pyrene (BaP)은 Sigma Co.에서 구입하였다. 각각의 PAHs 구성요소들은 hexan을 용매로 하여 1 mg/mL 농도로 각각의 PAHs stock solution 제작한 후 사용하였다.

PAHs (NA, FL, FLR, BaP, PY)가 보라성계의 초기발생에 미치는 영향을 조사하기 위해, 알과 정자, 그리고 수정란에 각각의 PAHs를 침적처리 하여 6 well plate (10 mL/well)안에 실험구별로 각각 1000 개씩 수용하였다. 알과 정자는 30분 동안 PAHs에 침적처리 한 후, 각각 수정시켜(침적 처리한 알 \times 정자, 알 \times 침적 처리한 정자) 수정율과 부화율을 조사하였다. 그리고 정상 수정란에 PAHs를 48시간 동안 침적 처리하여 누적생존율, 부화율, 기형율을 조사하였다. PAHs 처리구는 1, 10, 100, 1000, 10000 $\mu\text{g/L}$ 가 되도록 미리 조제한 stock solution을 처리구에 0.1 mL 첨가하였고, 대조구는 여과해수만을 공급한 실험구와 여과해수 9.9 mL에 PAHs의 용매로 사용한 hexan을 0.1 mL 첨가한 solvent control를 두었다.

보라성계 알과 정자를 대상으로 한 PAHs 처리구의 수정율은 수정 후 2시간째에 각각의 PAHs에 침적 처리된 알 중 100개를 10% 중성포르말린에 고정 후 생물현미경으로 수정된 개체를 계수하여 고정된 전체 개체수에 대한 백분율로 계산하였다. 부화율은 수정 후 8시간째에 수정율 조사 방법과 동일한 방법으로 수행하였다.

보라성계 수정란을 대상으로 한 PAHs 처리구의 누적생존율은 실험개시 후 6, 12, 24, 48시간째에 각각의 PAHs의 농도별 처리구에서 수정란 100 ± 5 개

를 수거한 후 죽은 개체를 계수하여 백분율로 산출하였다. 부화율은 실험개시 후 12시간까지 부화된 개체를 계수하여 1000개의 수정란에 대한 백분율로 산출하였다. 기형율은 수정란의 발생과정에서 비정상적인 세포분열을 보이는 개체와 부화 후 비정상적인 유생의 형태를 보이는 개체의 출현비율로 조사하였다. 수정란을 대상으로 한 PAHs 처리구는 PAHs의 농도 유지를 위해 사육수를 12시간 마다 전량 환수하였다.

통계분석

생존율과 부화율에 대한 실험결과는 t-test를 이용해 대조구와 처리구의 평균간 유의성을 검정하였다($P < 0.05$).

결과 및 고찰

보라성게 알 침적처리

산란 유도한 보라성게 알에 PAHs 침적 처리한 후 여과해수에 희석된 정자를 혼합하여 수정한 결과, 대조구와 solvent control의 수정율은 각각 97.8 ± 1.1 과 $96.8 \pm 0.8\%$ 이었으나, 각각의 PHAs를 처리한 실험구의 수정율은 농도가 증가할수록 감소하는 경향을 보였다. NA와 FL의 $1 \mu\text{g/L}$ 처리구를 제외한 모든 PAHs의 $1 \mu\text{g/L}$ 처리구 수정율은 $93.2 \sim 87.7\%$ 대조구와 solvent control보다 낮았고($P < 0.05$), $10000 \mu\text{g/L}$ 를 처리한 모든 PAHs 실험구의 수정율은 60% 이하였다(Fig. 1).

부화율도 수정율과 유사한 경향을 보여 대조구와 solvent control의 부화율은 각각 91.3 와 89.0% 이었으며, $10 \mu\text{g/L}$ 이상 처리한 실험구의 부화율은 80.5% 로 이하로 대조구와 solvent control보다 낮았고($P < 0.05$), 모든 PAHs 처리구들의 $1000 \mu\text{g/L}$ 농도 이상에서 부화율은 50% 이하였다(Fig. 2).

성게류인 *Paracentrotus lividus*의 알을 살충제인 lindane과 dieldrine에 2시간 노출후 수정한 결과 다정자수정률이 증가하였으며, 처리농도와 처리시간이 증가할수록 제1차 난황이 지연 또는 차단되었고, 발생과정 중 이상발생을 보였다(Pesando *et al.*, 2004). 또한 보라성게 알을 카드뮴 5.6 mg/L 에 30분 동안 노출시킨 후 수정한 결과 살충제와 동일

하게 제1차 난황을 지연 또는 차단되어 수정율이 감소하였고 (Vaschenko *et al.*, 1999), $25 \sim 50 \mu\text{g/L}$

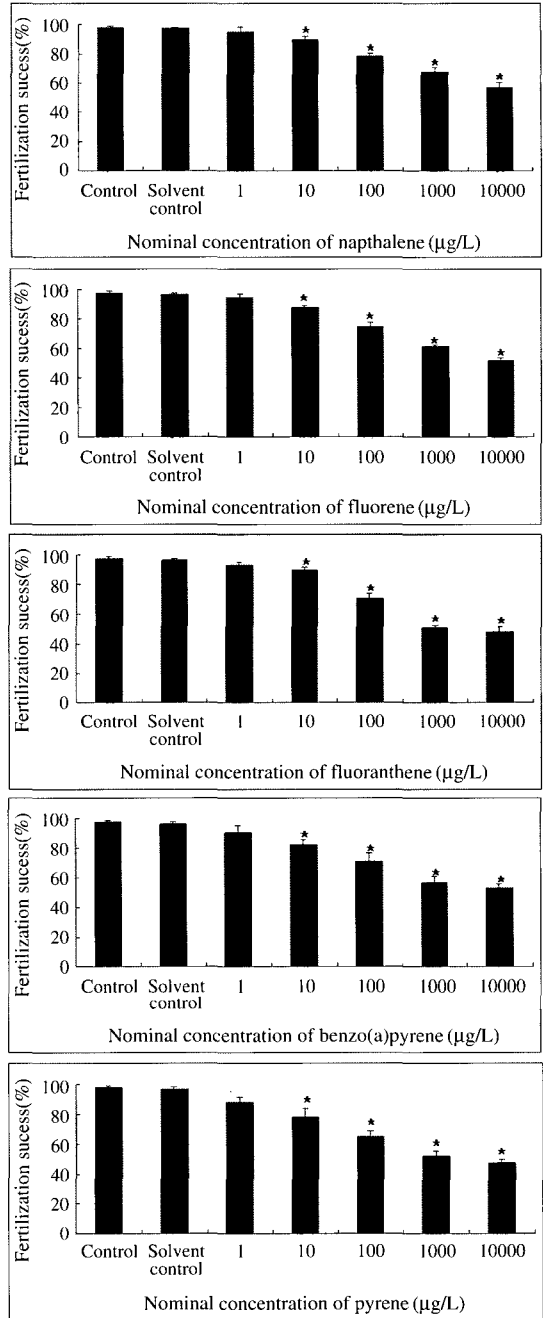


Fig. 1. Fertilization success of *A. crassispina* eggs exposed to aqueous solution of PAHs. Asterisk indicates significantly different from control ($P < 0.05$).

Tributyltin에 성게 알을 30분간 침적 처리한 결과 수정이 일어나지 않았다(Ozretić *et al.*, 1998). 성게

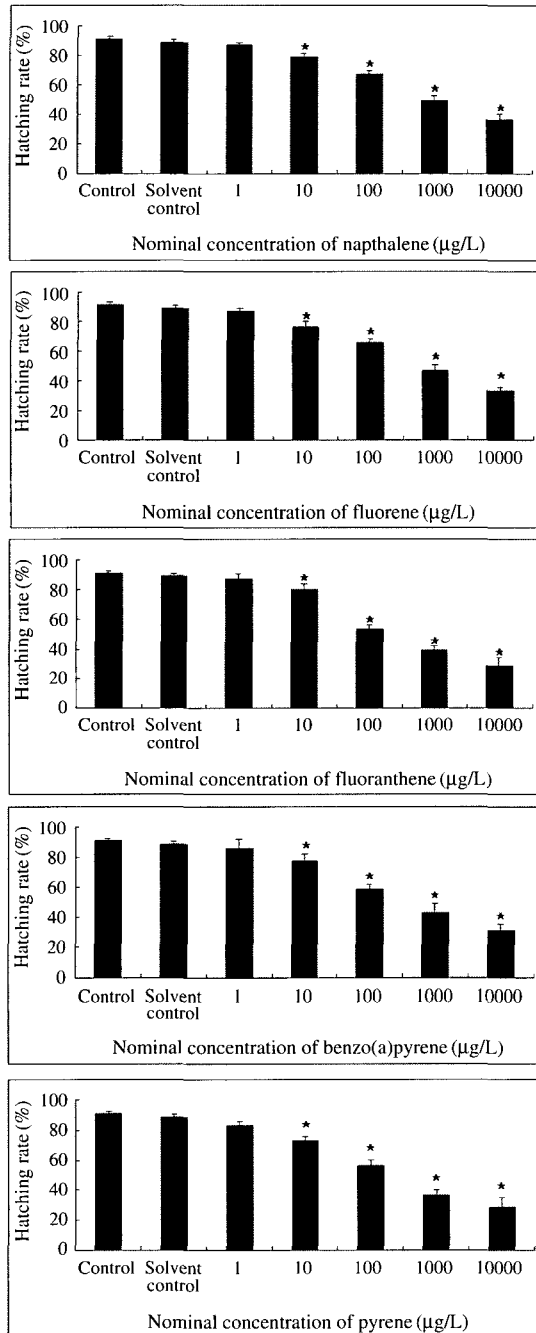


Fig. 2. Hatching rate of *A. crassispina* eggs exposed to aqueous solution of PAHs. Asterisk indicates significantly different from control ($P < 0.05$).

의 수정과 세포분열과정에 있어 Ca^{2+} 은 초기발달 과정을 조절하는 중요한 역할을 한다(Singh *et al.*, 1996). 카드뮴과 살충제의 독성 기작은 이런 Ca^{2+} 채널을 방해하거나 세포막 Ca^{2+} 투과성, 세포간 칼슘 항상성과 난할촉진인자의 활성화, 난할축의 형성과 같은 세포간 생화학 경로에 영향을 준다(Swann and Whitaker, 1990; Pesando *et al.*, 2004). 또한 어류에서도 이런 유기화합물질은 미수정란의 난문을 막아 정자의 출입을 방해하여 수정을 저해하거나, 난막에 흡착 결합되어 부화를 지연시킨다(Khan and Weis, 1993; Meteyer *et al.*, 1988). 이 연구에서도 1000 µg/L 이상의 모든 PAHs 처리구에서는 수정율과 부화율이 50% 이하로 감소하여, 각각의 PAHs가 보라성게 알의 세포간 생화학 경로에 영향을 준 것으로 생각되어진다.

보라성게 정자 침적처리

보라성게 정자에 PAHs를 침적 처리한 후 산란 유도된 알과 수정한 결과, 대조구와 solvent control의 수정율은 각각 96.0 ± 1.9 , $94.8 \pm 2.1\%$ 이었으나, 각각의 PAHs 처리한 실험구의 수정율은 농도가 증가할수록 감소하는 경향을 보였다. 모든 PAHs의 10 µg/L 이상 처리한 실험구의 수정율은 $89.0 \pm 1.2\%$ 이하로 대조구와 solvent control보다 낮았으며 ($P < 0.05$), 10000 µg/L를 처리한 모든 PAHs 실험구의 수정율은 60% 이하였다(Fig. 3).

부화율도 수정율과 유사한 경향을 보여 대조구와 solvent control의 부화율은 각각 88.0 ± 3.7 와 $85.3 \pm 2.4\%$ 이었으며, NA를 제외한 모든 PAHs 10 µg/L 이상 처리한 실험구의 부화율은 $75.5 \pm 3.0\%$ 이하로 대조구와 solvent control보다 낮았으며 ($P < 0.05$), 모든 PAHs 처리구들의 1000 µg/L 농도 이상에서 부화율은 50% 이하였다(Fig. 4).

보라성게 성체를 4주간 카드뮴에 노출 시킨 후 정자의 운동성과 수정율을 조사한 결과 카드뮴의 농도가 증가할수록 정자의 운동능력이 떨어졌고, 수정율이 감소하였다(Au *et al.*, 2001). 또한 유기염소계 살충제인 dieldrin, lindane 그리고 methoxy-chlor (MXC)에 성게 (*Paracentrotus lividus*) 정자를 침적처리하여 수정한 결과 dieldrin과 lindane는 정자의 운동능력에 영향을 주어 수정율이 감소하였지만, MXC에 노출된 정자의 운동능력은 어떠한 영향도 받지 않았다(Pesando *et al.*, 2004). 그러나

Mwatibo and Green (1997, 1998)은 보다 낮은 농도 MXC에 노출된 성게 *Strongylocentrotus*의 정자는

수정율이 감소하였다고 보고하였다. 이와 같이 내분비계장애물질이 생물에 미치는 영향은 생물의 종

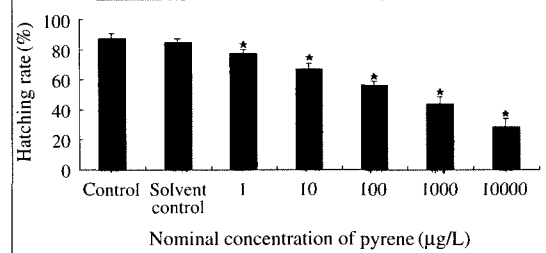
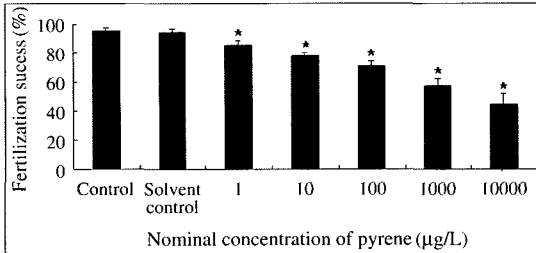
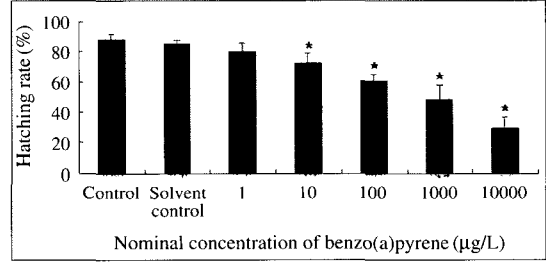
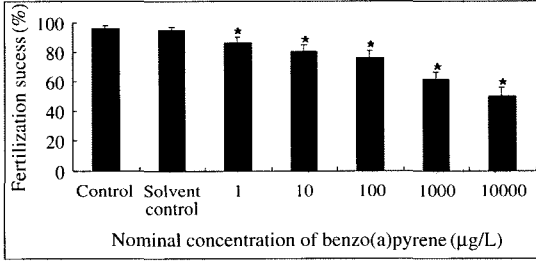
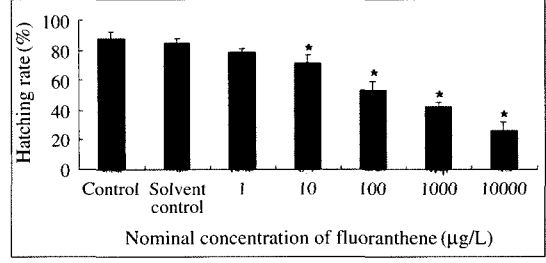
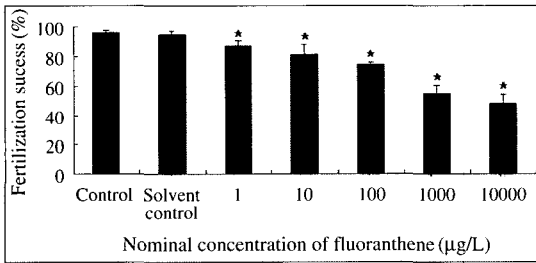
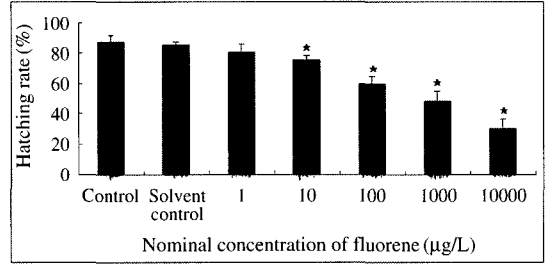
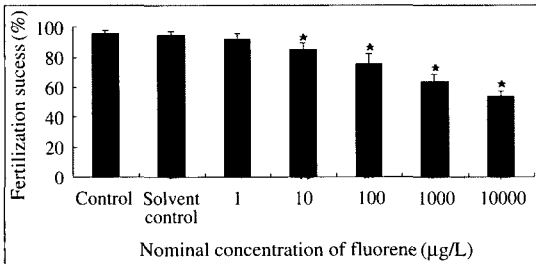
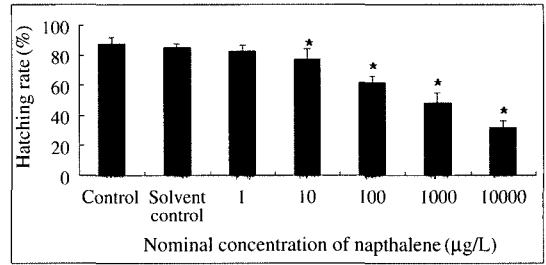
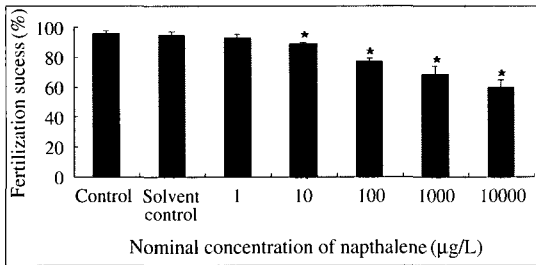


Fig. 3. Fertilization success of *A. crassispina* sperm exposed to aqueous solution of PAHs. Asterisk indicates significantly different from control ($P < 0.05$).

Fig. 4. Hatching rate of *A. crassispina* sperm exposed to aqueous solution of PAHs. Asterisk indicates significantly different from control ($P < 0.05$).

과 생리적인 상태에 따라 차이가 있지만, 대부분은 처리 농도와 처리기간에 비례하여 영향을 받는다. 이 연구에서도 각각의 PAHs 수정율과 부화율은 차이가 있지만, 처리 농도가 증가할수록 모든 PAHs 처리구의 수정율과 부화율은 감소하였다.

정자는 2개씩 9쌍의 미세소관이 원형으로 배치되어 있는 편모에 의해 운동 능력을 갖으며, 편모는 머리와 꼬리사이에 밀집되어 있는 미토콘드리아에서 생성된 ATP를 운동 에너지로 사용한다 (Takahashi and kamimura, 1983). 구리, 아연과 같은 중금속은 홍합류 *Mytilus edulis* 정자의 침체와 미토콘드리아에 축적되며 편모의 수축기작을 방해하여 정자의 운동능력을 감소시킨다 (Earnshaw *et al.*, 1986). 또한, 카드뮴은 소의 정자 편모축삭에서 미세소관의 움직임을 억제하고 (Kanous *et al.*, 1993), lindane과 같은 살충제는 와편모조류 *Dunaliella*의 편모 운동을 방해하며 (Marano *et al.*, 1988), 인간의 정자에서 보고된 것처럼 침체반응에 의한 정자의 수정능을 감소시킨다 (Silvestroni *et al.*, 1997). 이 연구에 사용된 PAHs도 보라성계 정자의 운동성에 영향을 주어 수정율이 감소하였다고 생각되나, 보다 정확한 활성 기작을 조사하기 위해서 PAHs에 노출된 보라성계 정자의 미세구조적 변화 또는 운동성 변화에 대한 연구가 필요하다고 생각된다.

보라성계 수정란 침적처리

보라성계 수정란에 PAHs (NA, FL, FLR, BaP, PY)를 침적 처리하여 48시간 경과 후, 대조구와 solvent control의 누적생존율은 각각 91.5, 90.5% 이었으나, 각각의 PAHs 처리한 실험구의 누적생존율은 농도가 증가할수록 감소하는 경향을 보였다. 실험개시 24시간 경과 후, 모든 PAHs 100, 1000, 10000 $\mu\text{g/L}$ 처리한 실험구의 누적생존율은 각각 70.0, 58.5, 37.5% 이하였고, 48시간 후 각각 50.0, 30.0, 7.5% 이하였다 (Fig. 5).

부화율은 수정율과 유사한 경향을 보여 대조구와 solvent control의 각각 88.5, 86.8% 이었으나, 각각의 PAHs를 처리한 실험구의 부화율은 농도가 증가할수록 감소하는 경향을 보였다. 모든 PAHs 100 $\mu\text{g/L}$ 이상 처리한 실험구의 부화율은 56.8~69.3%로 대조구와 solvent control보다 낮았으며 ($P < 0.05$), 1000 $\mu\text{g/L}$ 이상 처리구에서의 부화율은

50% 이하였고, 10000 $\mu\text{g/L}$ 처리구는 30.0% 이하였다 (Fig. 6).

대조구와 solvent control에서는 기형개체가 출현하지 않았지만, 모든 PAHs 처리구에서 기형율은 농도가 높을수록 증가하였고, 10000 $\mu\text{g/L}$ NA, FL,

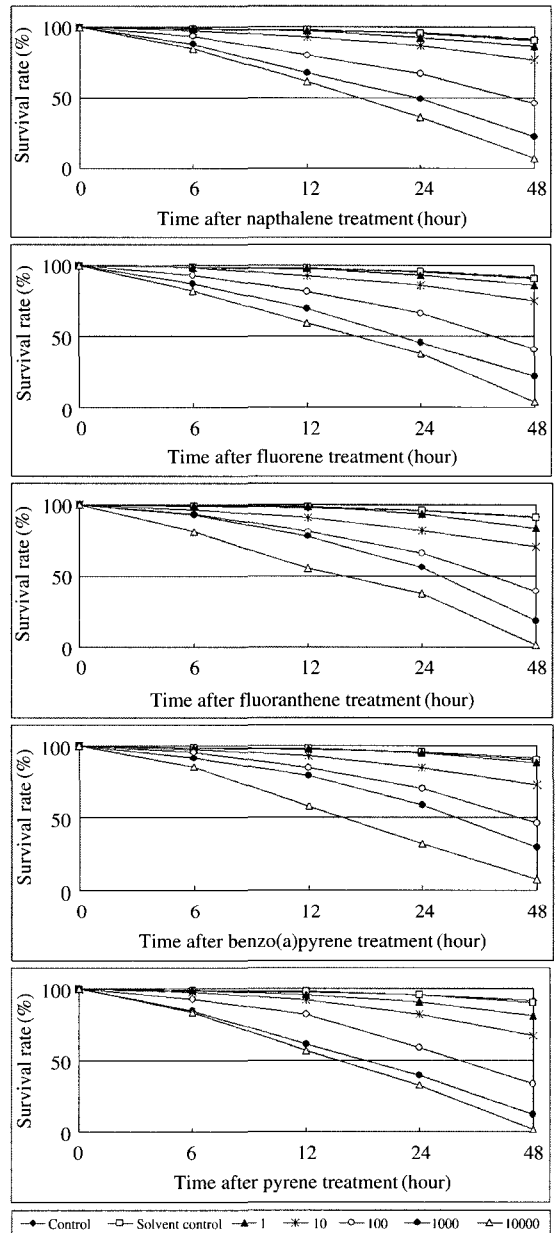


Fig. 5. Survival rate of *A. crassispina* fertilized eggs exposed to aqueous solution of PAHs.

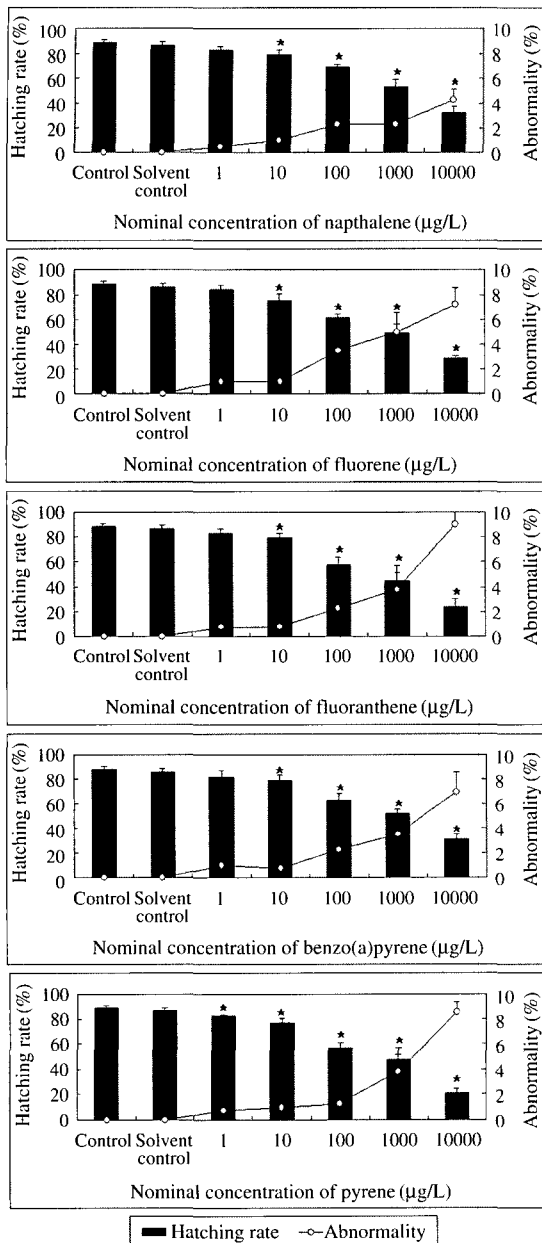


Fig. 6. Hatching rate and abnormality of *A. crassispina* fertilized eggs exposed to aqueous solution of PAHs. Asterisk indicates significantly different from control ($P < 0.05$).

FLR, BaP, PY 처리구에서 기형율은 각각 7.3, 9.0, 7.5, 8.5%였다 ($P < 0.05$, Fig. 6).

미수정란은 세포의 생리학적 또는 신진대사 활성

이 잠재적인 단계이기 때문에 초기발생과정에서 가장 저항력이 강한 단계이나 수정직후에는 세포막 투과성의 증가로 인한 세포 신진대사 활성이 일어나 외부환경으로부터 영향을 받기가 쉽다(Ozretić *et al.*, 1998). 성게류인 *Strongylocentrotus purpuratus* 와 *Lytechinus anamesus*의 수정란에 octylphenol (OP), BPA, TBT 같은 내분비계장애물질에 침적 처리한 결과, 발달이 지연되고, 생존율과 부화율이 감소하였으며(Roepke *et al.*, 2005), 살충제인 methoxychlor 100 ppm를 90분간 성게 수정란에 침적 처리한 결과 4세포기 단계에서 비대칭 분열과 같은 비정상 발생을 하는 개체들이 출현하였고, 부화한 유생은 장이 비정상적으로 발달하였다(Green *et al.*, 1997). Dieldrin과 DDT 같은 유기염소계의 살충제들은 세포간의 정보교환의 통로가 되는 gap junction을 차단하거나 gap junction 단백질과 결합하여 세포 분열을 방해한다(Roseng *et al.*, 1994). 낭배기 단계의 성게 수정란에 PAHs를 처리한 결과 합입에 장애를 일으켜 원장이 뒤집혀져 안이 밖으로 팽출되는 의원장배가 형성되었으며(Pillai *et al.*, 2003), 타르와 크레오소트에서 일반적으로 발견되는 PAHs를 쥐의 상피세포에 처리한 결과 gap junction을 통한 세포간의 정보교환을 방해하였다(Ghoshal *et al.*, 1999). 이 연구에서도 모든 PAHs 처리구에서 농도가 증가할수록 누적생존율과 부화율이 감소하였고, 기형개체 발생율이 증가하는 경향을 보여 각각의 PAHs가 보라성게 수정란 발생과정에 있어 세포간 정보교환 및 세포 분열을 방해하는 작용을 한 것이라 생각된다.

결론

PAHs (naphthalene, fluorene, fluoranthene, benzo(a)pyrene, pyrene)가 보라성게의 초기발생에 미치는 영향을 탐색하기 위해 알과 정자에 PAHs를 농도별로 처리하여 수정율과 부화율을 조사하였고 수정란에 처리하여 생존율, 반수치사농도(50% Lethal Concentration, LC₅₀), 부화율, 기형율을 조사하였다. 알과 정자에 PAHs를 처리한 결과 수정율과 부화율은 처리농도가 증가할수록 감소하는 경향을 보여 10000 µg/L 처리구에서는 각각 60과 50% 이하였다. 수정란에 PAHs를 침적 처리하여 48시간 경

과 후, 모든 PAHs 100, 1000, 10000 µg/L 처리한 실험구의 누적생존율은 각각 50.0, 30.0, 7.5% 이하였다. 부화율은 수정율과 유사한 경향을 보여 농도가 증가할수록 감소하는 경향을 보였으며, 기형율도 농도가 높을수록 증가하여 10000 µg/L NA, FL, FLR, BaP, PY 처리구에서 기형개체가 각각 7.3, 9.0, 7.5, 8.5% 출현하였다. 이상의 결과로부터 PAHs는 보라성계의 초기 발생과정에 악영향을 끼치는 것으로 판단되며, 향후 보라성계의 알, 정자, 수정란에 영향을 주는 PAHs의 정확한 활성 기작을 조사하기 위해 다양한 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(R05-2001-000-00278-0)지원으로 수행되었습니다.

참고 문헌

- Au DWT, Lee CY, Chan KL and Wu RSS. Reproductive impairment of sea urchins upon Chronic exposure to cadmium. Part I: Effects on gamete quality, Environmental Pollution 2001; 111: 1-9.
- Barron MG, Podrabsky T, Ogle S and Richer RW. Are aromatic hydrocarbons the primary determinant of petroleum toxicity to aquatic organisms?, Aquatic Toxicology 1999; 46: 253-268.
- Bartlett JHG, Mageean DM and O'Conner RJ. Residential expansion as a continental threat to U.S. coastal ecosystem. Popul Environ 2000; 21: 429-468.
- Earnshaw MJ, Wilson S, Akberali HB, Butler RD and Marriott KRM. The reaction of heavy metals on the gametes of the marine mussel, *Mytilus edulis* (L.) III. The effect of applied copper and zinc on sperm motility in relation to ultrastructural damage and intercellular metal localization, Marine Environmental Research 1986; 20(4): 261-278.
- Fent K and ätscher BR. Cytochrome P450A induction potencies of polycyclic aromatic hydrocarbons in a fish hepatoma cell line: demonstration of additive interactions and an induction equivalency concept, Environ Toxicol Chem 2000; 19: 2047-2058.
- Giessing AM, Mayer LM and Forbes TL. Synchronous fluorescence spectrometry of 1-hydroxypyrene: a rapid screening method for identification of PAH exposure in tissue from marine polychaetes, Mar Environ Rea 2003; 56(5): 599-615.
- Ghoshal S, Weber WJ, Rumel AM, Trosko JE and Upham BL. Epigenetic toxicity of a mixture of polycyclic aromatic hydrocarbons on gap junctional intercellular communication before and after biodegradation, Environ Sci Technol 1999; 33: 1044-1050.
- Green JD, Mwatibo JM and Swartz WJ. The effects of methoxychlor on early sea urchin development, Environmental Research 1997; 72: 56-64.
- Jackim E and Nacci D. Improved sea urchin DNA-based embryo growth toxicity test, Environmental Toxicology and Chemistry 1986; 5: 561-565.
- Heit M, Tan YL and Miller KM. The origin and deposition history of polycyclic aromatic hydrocarbons in the finger lakes region of New York USA, Water Air Soil Pollut 1988; 37: 85-110.
- Incardona JP, Collier TK and Scholz NL. Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons, Toxicol Applied Pharmacol 2004; 196: 191-205.
- Kanou KS, Casey C and Lindemann CB. Inhibition of microtubule sliding by nickel and cadmium: evidence for a differential response of certain microtubule pairs within the bovine sperm axoneme, Cell Motility and Cytoskeleton 1993; 26: 66-76.
- Khan AT and Weis JS. Differential effects of organic and inorganic mercury on the micropyle of the eggs of *Fundulus heteroclitus*, Environ Bio Fish 1993; 37: 323-327.
- Kobayashi N. Marine pollution bioassay by using sea urchin eggs in the Tanabe Bay, Wakayama Prefecture, Japan, 1970-1987, Mar Pollut Bull 1991; 23: 709-713.
- Marano J, Krishn FS, Wamy S, Betrencourt C, Schoevaert D, Provost JM and Volochine B. Control of ciliary beat by calcium: the effects of lindane, a potent insecticide, Biol Cell 1988; 63: 143-150.
- McElroy AE, Bates S, Rice SD and Korn S. Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. In: Varanasi, U. (Ed.), Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment, CRC Press. Boca Raton FL 1985. pp. 1-39.
- Meteyer MJ, Wright DA and Martin FD. Effects of cadmium on early developmental stages of the sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*), Environ Toxicol Chem 1988; 7: 321-328.
- Mwatibo JM and Green JD. Effects of methoxychlor pre-exposure on sea urchin gametes, Bull Environ Contam

- Toxicol 1997; 58: 589-595.
- Mwatibo JM and Green JD. Appearance of new glycoprotein in methoxychlor-exposed sea urchin gastrulae, Bull Environ Contam Toxicol 1998; 60: 791-796.
- National Research Council. Oil in the Sea III: Inputs, Fates, and Effects. National Academics Press. Washington. DC. 2003. p. 446.
- Ozretić B, Petrović S and Krajnović-Ozretić M. Toxicity of TBT-based paint leachates on the embryonic development of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. Chemosphere 1998; 37(6): 1109-1118.
- Pagano G, Corsale G, Esposito A, Dinnel PA and Romana LA. Use of sea urchin sperm and embryo bioassay in testing the sublethal toxicity of realistic pollutant level, Adv Appl Biotech Ser 1989; 5: 153-163.
- Pesando D, Robert S, Huitorel R, Gutknecht E, Pereira L, Girard JP and Ciapa B. Effects of methoxychlor, dieldrin and lindane on sea urchin fertilization and early development, Aquatic Toxicology 2004; 66: 225-239.
- Pillai MC, Vines CA, Wikramanayake AH and Cherr GN. Polycyclic aromatic hydrocarbons disrupt axial development in sea urchin embryo through a β -catenin dependent pathway, Toxicology 2003; 186: 93-108.
- Roepke TA, Snyder MJ and Cherr GN. Estradiol and endocrine disrupting compounds adversely affect development of sea urchin embryos at environmentally relevant concentrations, Aqua Toxicol 2005; 71: 155-173.
- Roseng L, Rivedal E, Skaare and Sanner T. Effect of 1,1'-(2,2,2-trichloroethylyl-dene)-bis(4-chlorbenzene) (DDT) on gap junctional intercellular communication and morphological transformation of *Syrina* hamster embryo cells, Chem Biol Interact 1994; 90: 73-85.
- Silvestroni L, Fiorini R and Palleschi S. Partition of the organochlorine insecticide lindane into the human sperm surface induces membrane depolarization and Ca^{2+} influx, Biochem J 1997; 321: 691-698.
- Singh J, Viswanathan PN, Gupta P and Devi S. Changes in uptake of calcium caused by phytotoxicity of cadmium in *Salvinia molesta*, Ecotoxicology 1996; 5: 9-21.
- Swann K and Whitaker MT. Second messengers at fertilization in sea-urchin eggs, Journal of Reproduction and Fertilization 1990; 42: 141-154.
- Tkashashi, K and Kamimura S. Dynamic aspects of microtubule sliding in sperm flagella, Journal of Submicroscope Cytology 1983; 15: 1-3.
- Van Metre PC, Barbara J Mahler and Edward T Furlong. Urban sprawl leaves its PAH signature, Environmental Science & Technology 2000; 34(19): 4064-4070.
- Varanasi U. Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment, CRC. Boca Raton FL USA. 1989.
- Venturini N and Tommasi LR. Polycyclic aromatic hydrocarbons and changes in the trophic structure of polychaete assemblages in sediments of Todos os Santos Bay, Northeastern, Brazil Mar Poll Bull 2004; 48(1-2): 97-107.
- Wilson DP. A biological difference between natural waters, J Mar Biol Assoc UK 1951; 30: 1-21.