

Tin-free 방오제인 Sea-Nine 211에 노출된 북방대합에서 MFO 효소계의 반응

이지선 · 전영하¹ · 심원준² · 전중균*

강릉대학교 해양생명공학부 · 동해안해양생물자원연구센터 (EMBRC)

¹강원도 환동해출장소, ²한국해양연구원 남해연구소

Responses of MFO System in Surf Clam, *Pseudocardium sachalinensis*, Injected with Sea-Nine 211 Antifoulant

Ji-Seon Lee, Yeong-Ha Jeon¹, Won-Joon Shim² and Joong-Kyun Jeon*

Kangnung National University · EMBRC, Gangneung, Gangwon 210-702, Korea

¹Government of Gangwon Province, Gangneung 210-800, Korea

²KORDI South Sea Institute, Geoje, Gyeongnam 656-830, Korea

Abstract – Many alternative biocidal additives were applied to antifouling paint to replace TBT, and Sea-Nine 211 is one of alternating organic booster compounds used in antifouling paint. In this study, extent of Sea-Nine 211 toxicity on marine benthic bivalve is evaluated.

Sea-Nine 211 was injected to surf clam, *Pseudocardium sachalinensis*, that inhabitate northern part of Gangwon Province, Korea. Survival rate of the clam and xenobiotics metabolizing enzyme activities in digestive gland were measured during 4 day-exposure period. The results were compared with those of TBT exposed clam. There were no mortality of clam in the solvent (DMSO) control group and the three Sea-Nine 211 exposure groups (5, 25, 50 mg kg⁻¹ body weight), while the clam exposed to 1, 2 and 5 mg kg⁻¹ TBT chloride (TBTC) demonstrated 70, 30 and 0% survival rate, respectively. The Sea-Nine 211 exposure group showed a tendency of cytochrome P450 (CYP) induction according to the exposure duration, on the other hand, CYP content was decreased in the TBT exposure group. NADPH cytochrome P450 reductase activity slightly increase according to the exposure duration in the Sea-Nine 211 exposure group, while TBTC inhibit its activity as CYP content. Moreover, there was no significant change of NADH cytochrome b5 reductase activity in the clam exposed to Sea-Nine 211. In the TBTC exposure group, its activity increased in early exposure period and then significantly decreased the rest of exposure period.

All the results indicate that Sea-Nine 211 demonstrated a tendency to induce CYP level, while TBTC inhibits the CYP level, NADPH cytochrome P450 reductase and NADH cytochrome b5 reductase activities.

Key words : Sea-Nine 211, TBTC, clam, *Pseudocardium sachalinensis*, cytochrome P450

* Corresponding author: Joong-Kyun Jeon, Tel. 033-640-2412,
Fax. 033-647-2410, E-mail. jkjeon@kangnung.ac.kr

서 론

유기주석화합물은 PVC 안정제, 각종 플라스틱 첨가제, 산업용 촉매, 살충제, 살균제, 목재보존제로 쓰였고 특히 방오제 (antifoulant)로서 효과가 뛰어나서 해양구조물이나 어망, 어구 등에 1970년대부터 많이 쓰였다. 하지만 1980년대에 들어서면서 유기주석화합물이 해양생물에게 미치는 독성이 심각하다는 것이 밝혀지면서, 오늘날에는 세계 여러 나라에서 제한적으로 사용하거나 또는 사용을 금지시키고 있다. 방오제 또는 부착방지제로 사용된 유기주석화합물 특히 트리부틸주석 (TBT)은 페인트와 화학적으로 결합되어 있다가 수화에 의해 서서히 용출되면서 부착생물들이 선박 바닥에 부착하는 것을 억제하는데, 페인트에서 용출되는 TBT는 부착성 생물뿐만 아니라 확산을 통해 근처에 있는 비표적생물 (non-targeting organism)에게도 나쁜 영향을 미침으로 생태계에 인위적인 변화를 초래한다 (WHO 1990; Alzieu 1991).

더욱이 이동성이 적은 패류는 지역해양 오염에 직접 영향을 받을 수밖에 없는데, 대형선박이 자주 왕래하는 항구나 또는 마리나 부근에서는 유기주석화합물에 의해 참굴 (*Crassostrea gigas*)의 폐각기형과 개체군 감소가 처음 보고된 이래로 패류인 굴에게는 성장억제와 폐각기형 유발 (Stephenson *et al.* 1986; Lee 1991; Stephenson 1991; Michel 1992; Davies *et al.* 1998), 치패의 성장 저해 (Lawler *et al.* 1987), 그리고 홍합에서는 성장속도 지연 (Stephenson *et al.* 1986), 유생의 생존을 저해 (Beaumont 1984) 등이 알려져 있다.

더욱이 유기주석화합물은 내분비교란물질 (endocrine disrupting chemicals)이므로 대부분의 나라에서는 1982년 이후 선박의 방오페인트에 유기주석화합물 사용을 적극 억제하고 있는 추세이다. 따라서 주석이 들어있지 않은 새로운 방오제를 개발하려는 연구가 세계적으로 진행되고 있으며, 지금까지 copper pyrithione, Diuron, Irgarol 1051, KH 101, Sea-Nine 211, zinc pyrithione 등이 시판되고 있고, 일본에서는 copper pyrithione를 제외한 나머지 5종류가 사용 허가되었고, 영국에서는 Diuron, Irgarol 1051, zinc pyrithione이 인가를 받아 방오도료에 첨가되고 있으며, Sea-Nine 211은 영국에서 특허를 얻은 화합물이다 (Pesticides Safety Directorate 1998).

본 연구에서는 새로운 유기주석화합물의 대체제로 개발된 Sea-Nine 211 (4,5-dichloro-2-n-octyl-3(2H) isothiazolone)이 패류에 미치는 영향을 조사하는 연구의 일환으로 약물대사효소계에 미치는 영향을 조사하였고 이를 TBT와 비교하였다.

재료 및 방법

1. 주사 시약

실험에는 tin-free 방오제인 Sea-Nine 211 (Romm & Haas, England)과 TBTC (tributyltin chloride; 96%, Sigma, USA)를 사용하였으며, 이들 화합물은 DMSO (dimethylsulfoxide, Sigma, USA)에 녹여 복방대합에 주사하였다.

2. 대상 생물과 주사 실험

실험에 사용한 복방대합 (*Pseudocardium sachalinensis*)은 강릉지역의 전문판매장에서 구입 (150~180 g)하여 실험하기까지 1주일가량을 강원도수산시험장의 사각 콘크리트 수조 (2×10×1 m)에 수용하여 자연 여과해수 (염분도 33‰, 수온 17~20°C)를 유수식으로 공급하면서 안정화시켰다. 그리고 주사 실험은 Sea-Nine 211을 각각 5, 25 및 50 mg kg⁻¹의 농도로 16마리의 복방대합에 주사하였고, TBTC는 각각 1, 2 및 5 mg kg⁻¹의 농도로 주사하였으며, sham구에는 용제인 DMSO만을 주사하였다. 화합물의 주입은 1 mL용 주사기로 각 농도별 화합물을 흡인한 다음 복방대합의 인대 부위에 삽입시켜 주사하였고, 주사 후 1, 2 및 4일째에 내장낭 부위를 적출한 다음 불필요한 조직을 가위로 충분히 떼어내고 중장선 (digestive gland) 조직의 일부를 사용하여 마이크로솜을 만들어 효소계 분석에 사용하였다. 실험 기간에는 클로렐라 등의 먹이생물을 하루 두 차례씩 공급하였다.

3. 마이크로솜 조제와 약물대사효소계의 분석

마이크로솜은 대합 두 마리의 중장선을 모아 인산완충액 (pH 7.4)과 함께 균질화 시켜 원심분리 (5,000 rpm, 20 분, 4°C)와 초원심분리 (100,000×g, 120 분, 4°C)를 거쳐 만들었다. 그리고 효소로는 cytochrome P450 (CYP), cytochrome b5 (b5), NADPH-cytochrome P450 reductase (P450R), NADH-cytochrome b5 reductase (b5R)의 농도와 활성을 분석하였다. 즉, CYP와 b5의 정량은 Omura and Sato (1964)의 방법으로, P450R 활성은 Phillips and Langdon (1962)의 방법으로, 그리고 b5R 활성은 Omura and Takesue (1970)의 방법으로 각각 정량하였으며, 마이크로솜의 단백질 정량은 Lowry *et al.* (1951)의 방법을 따랐다.

4. 통계처리

모든 측정치는 평균±표준편차로 나타내었으며, SPSS

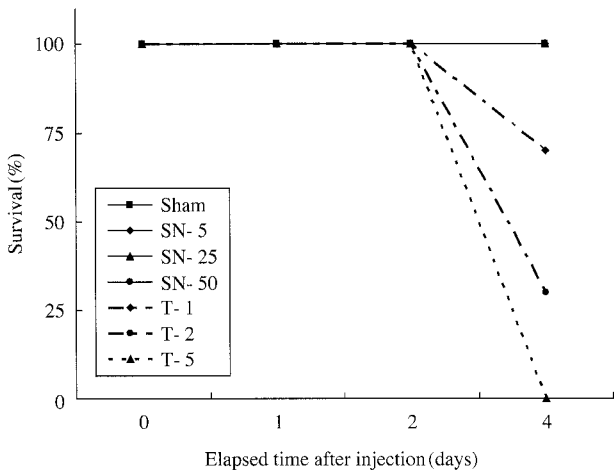


Fig. 1. Survival rate of surf clam, *Pseudocardium sachalinensis* injected with Sea-Nine 211 (5, 25 and 50 mg kg⁻¹) and TBTC (1, 2 and 5 mg kg⁻¹).

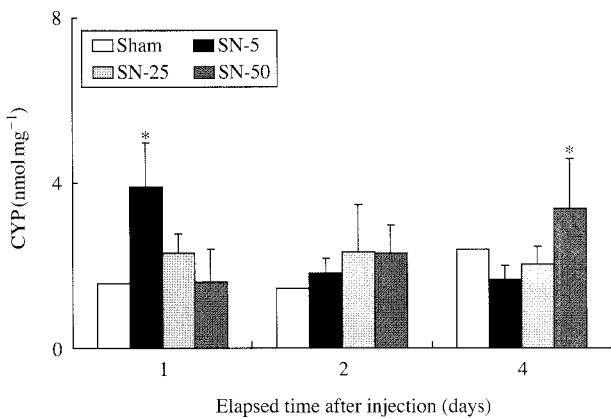


Fig. 2. Changes in cytochrome P450 (CYP) concentration of surf clam, *P. sachalinensis* injected with Sea-Nine 211 (5, 25 and 50 mg kg⁻¹). Asterisk symbols denote significant differences from the respective sham group at p<0.05.

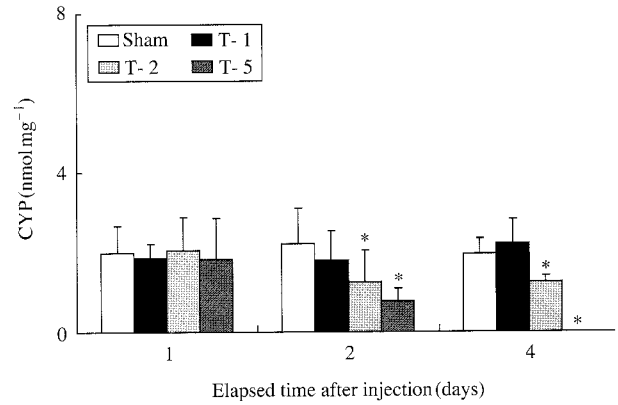


Fig. 3. Changes in cytochrome P450(CYP) concentration of surf clam, *P. sachalinensis* injected with TBTC (1, 2 and 5 mg kg⁻¹). Asterisk symbols denote significant differences from the respective sham group at p<0.05.

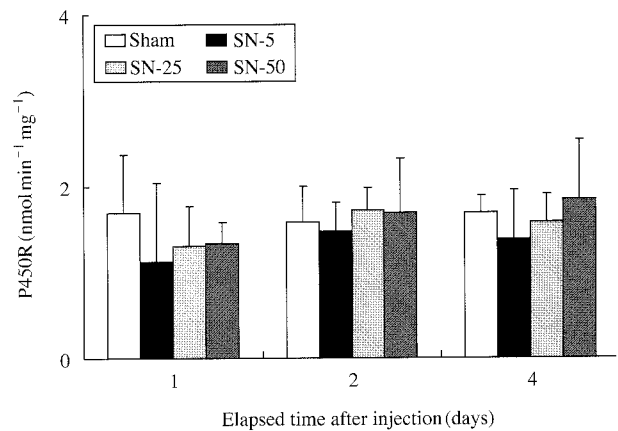


Fig. 4. Changes in NADPH cytochrome P450 reductase (P450R) activity of surf clam, *P. sachalinensis* injected with Sea-Nine 211 (5, 25 and 50 mg kg⁻¹).

(V. 10.0)를 사용하여 one-way ANOVA test를 실시하였고, Duncan' program으로 95% 신뢰구간에서 유의차 검정을 하였다.

결 과

복방대합에 Sea-Nine 211과 TBTC의 농도를 달리하여 주사하였을 때 생존율의 경시적인 변화는 Fig. 1과 같다. Sham구를 비롯하여 Sea-Nine 211 5, 25 및 50 mg kg⁻¹ 실험구는 주사 후 4일까지 폐사한 개체가 없었고, TBTC 1, 2 및 5 mg kg⁻¹ 실험구도 주사 후 2일까지는 폐사가

일어나지 않았으나 이후 폐사하기 시작하여 4일째의 생존율은 각각 70%, 30% 및 0%였다.

Sea-Nine 211과 TBTC를 주사한 후 CYP 농도의 경시적 변화는 각각 Fig. 2 및 Fig. 3과 같다. 우선, Sea-Nine 211을 주사한 실험 (Fig. 2)에서 sham구는 4일째까지 1.6~2.4 nmol mg⁻¹의 범위에서 큰 변화를 보이지 않았으나, Sea-Nine 211 25 mg kg⁻¹ 실험구는 4일째에 3.4 nmol mg⁻¹으로 크게 증가하여 sham구와 유의적인 차이를 보였다(p<0.05). 한편, TBTC를 주사한 경우 (Fig. 3)에는 TBTC 2 및 5 mg kg⁻¹ 실험구에서 2일 후부터 sham구와 유의적(p<0.05)인 차이를 보이며 감소하였고, 특히 TBTC 5 mg kg⁻¹ 실험구는 4일째에 CYP가 거의 검출되지 않았다.

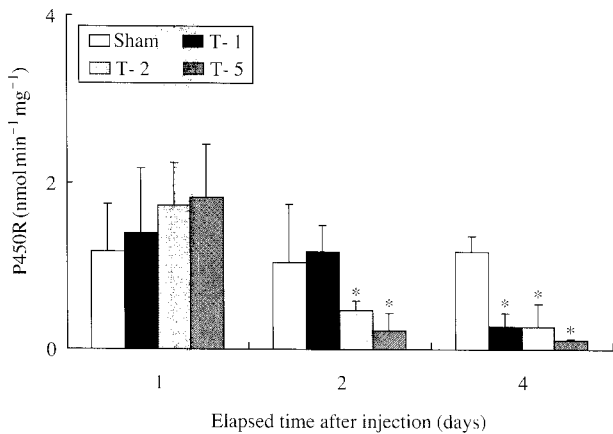


Fig. 5. Changes in NADPH cytochrome P450 reductase (P450R) activity of surf clam, *P. sachalinensis* injected with TBTC (1, 2 and 5 mg kg⁻¹). Asterisk symbols denote significant differences from the respective sham group at $p < 0.05$.

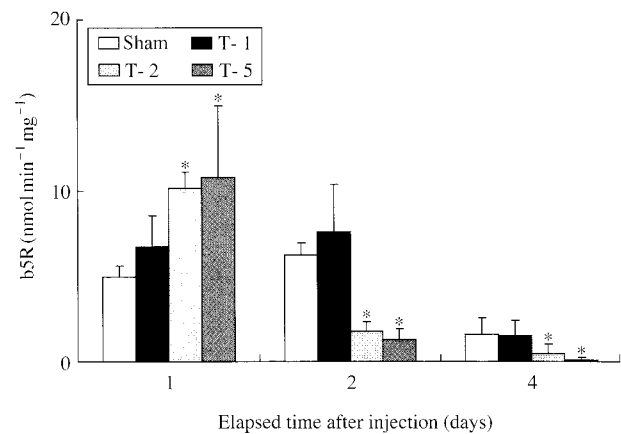


Fig. 7. Changes in NADH cytochrome b5 reductase (b5R) activity of surf clam, *P. sachalinensis* injected with TBTC (1, 2 and 5 mg kg⁻¹). Asterisk symbols denote significant differences from the respective sham group at $p < 0.05$.

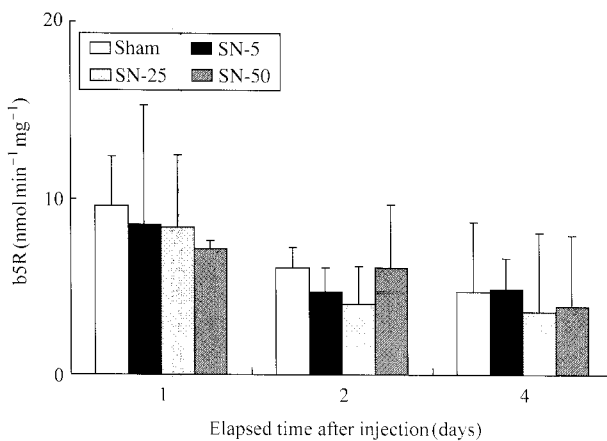


Fig. 6. Changes in NADH cytochrome b5 reductase (b5R) activity of surf clam, *P. sachalinensis* injected with Sea-Nine 211 (5, 25, 50 mg kg⁻¹).

P450R 활성의 변화에서 sham구와 Sea-Nine 실험구의 효소활성은 큰 차이가 없었던 것에 비해 (Fig. 4), TBTC 2, 5 mg kg⁻¹를 주사한 실험구는 2일째부터 sham구보다 유의적으로 낮았고 그 정도는 주사 농도가 높을수록 컸다 (Fig. 5).

b5R 활성은 sham구와 Sea-Nine 실험구의 효소활성이 P450R 활성의 경우와 마찬가지로 차이가 없었으나 (Fig. 6), TBTC를 2, 5 mg kg⁻¹를 주사한 실험구는 1일째에 유의적으로 증가하였다가 이후 2일째부터 유의적으로 감소하였고, 특히 TBTC 5 mg kg⁻¹ 실험구는 4일째에 0.1 nmol min⁻¹ mg⁻¹까지 감소하였다. 이렇게 감소하는 정도는 주사 농도가 높을수록 컸다 (Fig. 7).

고 찰

본 연구에서는 대체 방오제로서 역사가 가장 오랜 Sea-Nine 211을 사용하여 패류에 미치는 영향을 중장선의 미크로솜 중 약물대사효소, 그 중에서도 I상 효소를 중심으로 그 반응을 조사하였다. Sea-Nine 211이 해양생물에게 미치는 영향에 관해서는 해조류 (Willingham and Jacobson 1993), 따개비류 (Willingham and Jacobson 1993; Willingham *et al.* 1998), 홍합이나 굴 유생 (Shade *et al.* 1993; Willingham and Jacobson 1996; Kobayashi and Okamura 2002), 성게 (Kobayashi 1991; Marin *et al.* 2000) 등에 대해 조사된 바는 있으나 (de Nys *et al.* 1996), 대부분 독성의 관점에서 다루었을 뿐 생체 대사에 미치는 영향을 조사한 경우는 거의 없다.

홍합 및 굴 유생에 대한 Sea-Nine 211의 48 hr-LC50은 각각 2 µg L⁻¹ 및 7 µg L⁻¹이고 (Shade *et al.* 1993), 굴 유생에 대한 48 hr-EC50은 24 µg L⁻¹ (Willingham and Jacobson 1996), 성게 알에 대한 최고 무영향 농도 (maximum no effect concentration, MNEC)는 1 fg L⁻¹ (Kobayashi and Okamura 2002)라 보고되었으며, TBT 화합물이 굴 (*Crassostrea gigas*)의 유생에 미치는 영향으로는 해수 중 농도가 100 ppb이면 수정이 억제되며, 50 ppb에서는 세포분열이 억제되고, 3~5 ppb에서는 6일 안에 모두 치사하며, 1 ppb에서는 1일 안에 모두 치사하고, TBT의 영향이 전혀 없는 농도는 0.02 ppb라 한다 (Thompson *et al.* 1985).

한편, 일반적으로 생체는 외인성 유해물질이 체내에 들어오면 각종 약물대사효소들에 의해 생체변환이 일어

나며 (Van Veld 1990), 어류에서는 cytochrome P450 monooxygenase (phase I)와 포합효소(phase II)가 주로 관여하며, I상 효소로는 CYP, b5, P450R, b5R이 중요한 역할을 한다 (Chambers and Yarbrough 1976; Hansson *et al.* 1978).

본 연구에서 사용한 Sea-Nine 211의 I상 효소계에 대한 반응은 TBTC와는 상이하였다. 즉, Sea-Nine 211을 주사한 북방대합은 CYP가 유도되었고 P450R과 b5R의 활성은 크게 달라지지 않았던 것에 비해서 TBTC로는 CYP를 비롯하여 P450R과 b5R이 모두 저해되었다. TBT가 MFO 효소계를 저해한다는 것은 담수산 어류 (Fent and Bucheli 1994), 해산 어류 (Fent and Stegeman 1991, 1993a, b; Morcillo and Porte 1997) 및 패류 (Morcillo and Porte 1997; Morcillo *et al.* 1998; Solé 2000)를 대상으로 한 연구에서도 관찰된 바 있다.

이렇듯 두 화합물에 의한 약물대사효소계의 반응에 차이를 보이는 것은 이들 화합물의 독성과도 상관이 있을 것 같다. Sea-Nine 211은 환경 중에서 미생물에 의해 신속하게 분해되고 저질에서 호기적 또는 혐기적 조건 하의 반감기는 1시간 이내에 불과하지만 (Jacobson and Willingham 2000), TBT는 분해속도가 늦고 반감기는 6~9개월이나 된다고 한다 (Maguire and Katz 1985; Stang and Seligman 1986; Thian *et al.* 1987). 또한 Sea-Nine 211의 생체농축계수 (bioconcentration factor, BCF)도 TBT의 1,500에 비해 훨씬 작아 13 정도이다. 이 때문에 BCF가 100 이상인 TBT는 환경위해성이 있다고 구분되는 것이다. 더욱이 Sea-Nine 211과 TBT가 급성독성을 나타내는 수준은 2~10 ppb로 비슷하지만, TBT가 성장이나 발달, 번식에 크게 영향을 미치는 것과는 달리 Sea-Nine 211은 이 정도의 농도에서도 만성독성이나 생식독성을 나타내지 않는다고 알려져 있다 (Shade *et al.* 1993; Jacobson and Willingham 2000). 또한 패류는 어류나 다른 무척추동물과 달리 TBT를 대사하여 체외로 제거시키지 못하기 때문에 독성에 의한 영향을 크게 받을 수밖에 없다 (Laughlin 1996; Lee 1996)는 점도 본 실험에서 두 화합물에 의한 약물대사효소계의 반응 패턴이 차이를 보이는 원인이 될 수가 있을 것이다.

다만 우리나라 연안 해수 중 Sea-Nine 211의 잔류농도에 관한 자료가 없어서 본 연구에서 나타난 반응이 자연계에서 실제로 일어날 것이라고는 단정하기 어렵다. 게다가 본 실험은 단기간의 주사실험을 통한 결과이므로 앞으로는 장기간의 노출실험으로 더욱 정확하게 효소계 반응을 조사할 필요가 있을 것이다. 최근에는 이들 효소계의 반응이 유해물질의 대사에 관여할 뿐만 아니라 활성산소종 (active oxygen species) 생산이나 산화 스

트레스 (oxidative stress)와도 관련이 있다는 것 (Lemaire *et al.* 1994)이 밝혀지고 있으므로 이와 연계한 연구도 필요할 것이다.

적 요

방오도료로 많이 쓰인 유기주석화합물은 일반생물에게 미치는 독성이 매우 강하고 또한 내분비계 장애물질임이 밝혀지면서 이를 대체할 화합물들의 개발이 요구되고 있다. 그 가운데 이런 목적으로 만들어진 화합물인 Sea-Nine 211을 사용하여 이것이 해양생물 특히 저서생물인 패류에게 얼마나 영향을 미치는지를 살펴보고자 북방대합 (*P. sachalinensis*)에게 강제 주사하여 생존율과 증장선의 마이크로솜 중 I상 약물대사효소의 변화를 4일째까지 조사하였으며, 또한 비교를 위해 tributyltin chloride (TBTC)의 주사실험을 병행하였다.

생존율에서는 sham구나 Sea-Nine 211 실험구 (5, 25 및 50 mg kg⁻¹) 모두 생존하였으나 TBTC (1, 2 및 5 mg kg⁻¹) 실험구의 생존율은 4일째에 각각 70%, 30% 및 0%였다. 한편, 약물대사효소계 중 I상효소인 CYP는 Sea-Nine 211 주사 후 시간이 지나면서 유도되었지만, TBTC는 반대로 저해되는 경향을 보였다. 그리고 P450R 활성은 Sea-Nine 211 실험구에서 시간 경과와 더불어 약간 증가하는 추세를 보였지만 sham구와는 유의적인 차이가 없었으나, TBTC 실험구는 주사농도와 비례하면서 저해되었다. b5R 활성도 마찬가지로 Sea-Nine 211 실험구는 큰 변화가 없었으나, TBTC 실험구에서는 유의적으로 저해되는 경향을 관찰할 수가 있었다.

이처럼 비주석계 방오도료 화합물인 Sea-Nine 211은 북방대합에 대한 독성이 TBTC에 비해 크게 낮았으며, 약물대사효소계에 미치는 영향도 TBTC는 저해하는데 반해서 P450R이나 b5R에는 별다른 변화를 일으키지 않았으나 CYP는 유도하였다.

사 사

본 연구는 해양수산부의 『내분비계장애물질의 해양생태 영향 연구』 프로그램과 산업자원부에서 시행하는 지역혁신센터 사업으로 강릉대학교 해양바이오RIC (동해안해양생물자원연구센터)의 지원에 의한 것입니다.

참 고 문 헌

Alzieu C. 1991. Environmental problems caused by TBT in

- France: Assessment, regulations, prospects. *Mar. Environ. Res.* 32:7-17.
- Beaumont AR. 1984. High mortality of the larvae of the common mussel at low concentrations of tributyltin. *Mar. Poll. Bull.* 15:402-405.
- Chambers JE and JD Yarbrough. 1976. Xenobiotic biotransformation in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 55C:77-84.
- Davies IM, J Drinkwater and JC McKie. 1988. Effects of tributyltin compounds from antifoulants on Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) in Scottish sea lochs. *Aquaculture* 74: 319-330.
- De Nys, RT Leya, R Maximilien, A Afsar, PSR Nair and PD Steinberg. 1996. The need for standardized broad scale bioassay testing: a case study using the red algae *Laurencia rigida*. *Biofouling* 10:213-224.
- Fent K and JJ Stegeman. 1991. Effects of tributyltin chloride *in vitro* on the hepatic microsomal monooxygenase system in the fish *Stenotomus chrysops*. *Aquat. Toxicol.* 20:159-168.
- Fent K and JJ Stegeman. 1993a. Effects of tributyltin chloride *in vitro* on hepatic microsomal cytochrome P450 and associated enzyme activities in the marine fish *Stenotomus chrysops*. pp. 210-211. In 7th International Symposium on Responses of Marine Organisms to Pollutants (Stegeman JJ, MN Moore and ME Hahn eds.). Elsevier, Göteborg.
- Fent K and JJ Stegeman. 1993b. Effects of tributyltin *in vivo* on hepatic cytochrome P450 forms in marine fish. *Aquat. Toxicol.* 24:219-240.
- Fent K and TD Bucheli. 1994. Inhibition of hepatic microsomal monooxygenase system by organotins *in vitro* in freshwater fish. *Aquat. Toxicol.* 28:107-126.
- Hansson T, J Rafter and JA Gustafsson. 1978. A comparative study on the hepatic *in vitro* metabolism of 4-androstene-3,17-dione in the hagfish (*Myxine glutinosa*), dogfish (*Squalus acanthias*), and the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Gen. Comp. Endocr.* 37:240-245.
- Jacobson AH and GL Willingham. 2000. Sea-nine antifoulant: an environmentally acceptable alternative to organotin antifoulants. *Sci. Total Environ.* 258:103-110.
- Kobayashi N. 1991. Marine pollution bioassay by using sea urchin eggs in the Tanabe Bay. *Mar. Pollut. Bull.* 23:709-713.
- Kobayashi N and H Okamura. 2002. Effects of new antifouling compounds on the development of sea urchin. *Mar. Pollut. Bull.* 44:748-751.
- Laughlin RB Jr. 1996. Bioaccumulation of TBT by aquatic organisms. pp. 331-355. In *Organotin. Environmental Fate and Effects* (Champ MA and PR Seligman eds.). Chapman & Hall, London.
- Lawler IA and JC Aldrech. 1987. Sublethal effects of bis (tri-n-butyltin) oxide on *Crassostrea gigas* spat. *Mar. Poll. Bull.* 18:274-278.
- Lee RF. 1991. Metabolism of tributyltin by marine animals and possible linkages to effects. *Mar. Environ. Res.* 32:29-35.
- Lee RF. 1996. Metabolism of tributyltin by aquatic organisms. pp. 369-382. In *Organotin. Environmental Fate and Effects* (Champ MA and PR Seligman eds.). Chapman & Hall, London.
- Lemaire P, A Matthews, L Forlin and DR Livingstone. 1994. Stimulation of oxyradical production of hepatic microsomes of flounder (*Platichthys flesus*) and perch (*Perca fluviatilis*) by model and pollutant xenobiotics. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 26:191-200.
- Lowry OH, NJ Roseborough, LA Farr and RJ Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Maguire RJ and RJ Katz. 1985. Degradation of the tri-n-butyltin species in water and sediment from Toronto Harbor. *J. Agric. Food Chem.* 33:947-953.
- Marin MG, V Moschio, F Cima and C Celli. 2000. Embryotoxicity of butyltin compounds to the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Mar. Environ. Res.* 50:231-235.
- Michel P. 1992. The need for speciation of metal and organometallic compounds for risk assessment in the marine environment: Mercury, arsenic and tin. *Hydroecol. Appl.* 4:43-53.
- Morcillo Y and C Porte. 1997. Interaction of tributyl- and triphenyltin with the microsomal monooxygenase system of molluscs and fish from the western Mediterranean. *Aquat. Toxicol.* 38:35-46.
- Morcillo Y, MJJ Ronis, M Solé and C Porte. 1998. Effects of tributyltin on the cytochrome P450 monooxygenase system and sex steroid metabolism in the clam *Ruditapes decussata*. *Mar. Environ. Res.* 46:583-586.
- Omura T and R Sato. 1964. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 239:2370-2378.
- Omura T and S Takesue. 1970. A new method for simultaneous purification of cytochrome b5 and NADPH-cytochrome c reductase from rat liver microsomes. *J. Biochem.* 67:249-257.
- Pesticides Safety Directorate. 1998. *Antifouling Products*. The Stationary Office, London.
- Phillips AH and RG Langdon. 1962. Hepatic triphosphopyridine nucleotide- cytochrome c reductase: isolation, characterization, and kinetic studies. *J. Biol. Chem.* 237:2652-2660.
- Shade WD, SS Hurt, AH Jacobson and KH Reinert. 1993. Ecological risk assessment of a novel marine antifoulant. American Society for Testing and Materials (ASTM) Spe-

- cial Technical Publication (STP) 1216:381-407.
- Solé M. 2000. Effects of tributyltin on the MFO system of the clam *Ruditapes decussata*: a laboratory and field approach. *Comp. Biochem. Physiol.* 125C:93-101.
- Stang PM and PF Seligman. 1986. Distribution and fate of butyltin compounds in the sediment of San Diego Bay. pp. 1256-1261. In *Proceedings of the Oceans '86 International Organotin Symposium*. Mar. Technol. Soc. Washington.
- Stephenson MD, DR Smith, J Goetzl, G Ishikawa and M Martin. 1986. Growth abnormalities in mussels and oysters from areas with high levels of tributyltin in San Diego Bay. pp. 1246-1251. In *Proceedings of the Oceans '86 International Organotin Symposium*. Mar. Technol. Soc. Washington.
- Stephenson MD. 1991. A field bioassay approach to determining tributyltin toxicity to oysters in California. *Mar. Environ. Res.* 32:51-59.
- Thian JE, MJ Waldock and ME Waite. 1987. Toxicity and degradation studies of tributyltin (TBT) and dibutyltin (DBT) in aquatic environments. pp. 1398-1402. In *Proceedings of the Oceans '87 International Organotin Symposium*. Mar. Technol. Soc. Washington.
- Thompson JA, MG Sheffer, RC Pierce, YK Chau, JJ Cooney, WP Cullen and RJ Maguire. 1985. Organotin compounds in the aquatic environment: Scientific criteria for assessing their effects on environmental quality. National Research Council Canada, Ottawa.
- Van Veld PA. 1990. Absorption and metabolism of dietary xenobiotics by the intestine of fish. *CRC Crit. Rev. Aquat. Sci.* 2:185-203.
- WHO (World Health Organization). 1990. International Programme on Chemical Safety Environmental Health Criteria 116 Tributyltin Compounds, Geneva.
- Willemsen PR, K Overbeke and A Suurmond. 1998. Repetitive testing of TBTO, Sea-Nine 211 and farnesol using *Balanus amphitrite* (Darwin) cypris larvae: Variability in larval sensitivity. *Biofouling* 12:133-147.
- Willingham GL and AH Jacobson. 1993. Efficacy and environmental fate of a new isothiazolone antifoulant. pp. 14.1-14.13. In *Proceedings of the 3rd Asia-Pacific Conference of the Paint Research Association*, Singapore.
- Willingham GL and AH Jacobson. 1996. Designing an environmentally safe marine antifoulant. pp. 224-233. In *Designing Safer Chemicals* (DeVito SC and RL Garrett eds.). American Chemical Society Symposium Series 640. American Chemical Society, Washington.

Manuscript Received: May 30, 2008

Revision Accepted: June 23, 2008

Responsible Editor: Myung Chan Gye