

유해물질 노출로 인한 분자·생화학적 바이오마커와 담수 어류에 대한 현장 적용성

김정곤·박예나·김우근*·김지원*·이성규*·최경호†

서울대학교 보건대학원, *안전성평가연구소 환경독성연구센터
(2010. 9. 6. 접수/2010. 10. 1. 수정/2010. 10. 25. 채택)

Molecular/biochemical Biomarkers for Exposure to Hazardous Chemicals in the Water Environment and their Application to Freshwater Fish

Jungkon Kim · Yena Park · Woo-Keun Kim* · Jiwon Kim* · Sung-Kyu Lee* · Kyungho Choi†

School of Public Health, Seoul National University, Seoul, Korea

**Ecotoxicology Research Center, Korea Institute of Toxicology, Daejeon, Korea*

(Received September 6, 2010/Revised October 1, 2010/Accepted October 25, 2010)

ABSTRACT

As concerns regarding water pollution grow, the need increases for a fast and accurate assessment of ecological risk. In this context, many studies have been conducted to identify biomarkers which can sensitively indicate exposure to and effects of various contaminants in a water environment. However, the utility of most such biomarkers in the real water environment is not yet validated. In this paper, we conducted a thorough review of publications that were related to developing or evaluating molecular and biochemical biomarkers of freshwater fish in ecological risk assessment, and evaluated whether these biomarkers of interest could link to the effects on higher biological levels, such as histopathology and above. Biomarkers of interest included those associated with metabolism, oxidative stress, reproduction and endocrine disruption, genotoxicity, and defense against heavy metal exposure. We found that, when used alone, most molecular and biochemical biomarkers are not sufficient to understand the effects of toxic substances in higher biological levels, due to defense or acclimation mechanisms of organisms. Moreover, some biomarkers respond not only to hazardous substances but also to the changes in water quality and disease outbreak. Molecular and biochemical biomarkers may be most useful in understanding the potential biological effects of toxic compounds when used in parallel with relevant endpoints of higher biological levels.

Keywords: aquatic ecosystem, risk, metabolic enzyme, oxidative stress, endocrine disruption, genotoxicity, metallothionein

I. 서 론

인간활동으로 인하여 다양한 유해화학물질이 물환경으로 유입되고 있다. 그러나 이들 유해화학물질의 노출로 인해 초래되는 생태계 영향의 기전과 심각성에 대해서 정확히 파악하는 것은 쉽지 않다. 환경오염물질의 영향을 평가하기 위해서 많은 연구가 수행되어 왔으나 대부분의 연구가 실험실 내에서 이루어져 현장에서의

상황을 적절히 반영하지 못하는 경우가 많다. 게다가 유해인자 노출로 인한 영향을 분절적으로 평가하는 경우가 대부분이어서 실제의 생태계 영향을 정확히 이해하기가 어려운 실정이다.

실제 환경에서 나타나는 생태계 영향은 대부분 오랜 기간 동안 지속적으로 발생되었던 노출의 결과로 초래되는 것이며, 일단 발생한 생태계 영향을 되돌려 회복시키는 것이 극히 어려운 경우가 많다. 이러한 사태의 발생을 미연에 방지하기 위해서는 개체, 개체중, 또는 군집 수준의 부정적인 영향이 나타나기 전에 유해인자의 생물학적 영향을 조기에 감지할 수 있는 바이오마커를 활용하는 것이 필요하다. 독성학 분야에서 바이오

†Corresponding author : School of Public Health, Seoul National University
Tel: 82-2-880-2738, Fax: 82-2-745-9104
E-mail : kyungho@snu.ac.kr

마커는 외인성물질의 노출, 이로 인한 생물체의 영향, 그리고 생물체의 감수성을 나타내는, 다양한 수준에서 관찰 또는 측정 가능한 지표라고 정의될 수 있다.^{1,4)}

일반적으로 개체와 같은 상위 단계에서의 영향은 그 아래의 생물학적 수준, 예를 들면 분자·생화학적, 세포 또는 조직수준에서 일어나는 변화를 거친 다음에야 발생한다. 하위 단계의 생물학적 변화는 상위단계에서의 변화에 비해 훨씬 더 신속하면서도 독성영향의 생물학적 기전을 설명하는데 용이하다는 장점이 있다. 그러므로 바이오마커를 적절히 이용하면 개체군 혹은 생태계 수준의 영향을 예측하는 조기경보지표로 활용될 수 있다.^{5,6)}

그러나 이러한 바이오마커를 이용한 대부분의 연구는 특정한 생물학적 수준에 국한되어 본질적으로 이루어져 왔다. 또한, 이들 연구에서 관찰된 바이오마커의 반응이 실제로 생물 개체에 어떤 의미를 갖고 있는 것인지에 대해 충분히 이해하기가 어렵다는 단점이 있다. 분자·생화학적 바이오마커를 적절한 조기경보 바이오마커로 활용하면 물환경으로 유입되는 유해물질의 효과적인 관리에 도움이 될 것으로 판단된다. 따라서 실제 환경에서의 생태계 영향을 이해하기 위해 분자·생화학적 바이오마커의 반응을 활용하는 것이 적절한지 파악할 필요가 있다.

물환경에 유해물질의 노출과 영향을 지시하는 바이오마커는 매우 다양한데, 그 가운데서도 대사관련 효소(대사효소), 산화적인 스트레스 요인(항산화효소, 지질과산화, DNA 손상 등), 스트레스 단백질(heat-shock protein), 중금속 노출 인자(metallothionein, MT), 혈액학적 요인(혈구용적, 헤모글로빈, 단백질, 당 등), 생식 및 내분비계 요인(vitellogenin, VTG), 신경학적 요인(acetylcholinesterase, AChE), 유전독성학적 요인, 생리학적이고 형태학적 요인 등이 대표적이다. 이러한 바이오마커는 물환경 유해인자의 독성영향 기전에 대한 정보를 제공하고 잠재적인 생태계 영향을 제시한다는 측면에서 활용도가 크다.

이 연구는 지금까지 생태독성학 및 생태위해성평가 분야에서 개발되어 활용되어 온 주요 분자·생화학적 수준의 바이오마커가 생태위해성관리 측면에서 어떤 효용을 갖는지 평가하기 위한 목적으로 수행되었다. 이를 위해 생태독성학 연구에서 활용되는 주요 바이오마커의 종류와 기능에 대해서 요약하고, 이 바이오마커를 현장에서 포획된 담수어종에 적용하여 수행된 여러 가지 분자·생화학적 수준의 바이오마커의 분석 사례들을 검토하였다. 이를 통하여 이러한 바이오마커가 생태위해성 평가를 위해 적절히 활용될 수 있는지 알아보았다.

II. 연구방법

생태독성학 및 생태위해성평가 분야에서 활용되는 바이오마커에 대한 보고를 탐색하기 위하여 상용 데이터베이스를 활용하였다. 학술지 데이터베이스 “ISI Web of Science”를 이용하여 오염 현장과 대조지역의 담수 어류를 대상으로 분자·생화학적 바이오마커 혹은 이것과 조직병리학적 수준 이상의 지표를 병행하여 조사한 사례를 검색하였다(2010년 5월 검색). “fish”, “biomarker” 및 “field”의 검색어를 사용하여 검색한 결과 모두 198 건의 논문을 파악할 수 있었다. 이 가운데 현장에서 포획한 담수어류를 대상으로 분자·생화학적 바이오마커 혹은 조직 수준 이상의 지표를 동시에 분석한 사례들을 선별하여 주요 분자·생화학적 바이오마커 중심으로 조사하였다.

III. 연구결과

1. 대사효소

대사와 관련된 여러 가지 효소 중에서 바이오마커로 가장 많이 활용되어 온 대사효소는 phase I 대사를 담당하는 cytochrome P450 효소(CYP)이다. CYP은 모든 생명계에서 발견될 수 있는 헴단백질(hemoprotein)로 27종의 다양한 superfamily를 포함하고 있다. CYP에 의해 일어나는 가장 일반적인 반응은 기질에 1개의 산소를 첨가함으로써 기질의 수용성을 증가시키는 것이다. 이를 mixed function oxygenase (MFO) system 이라고도 하며 거의 모든 동물과 식물에 존재하며 내인성 물질일 뿐 아니라 외인성 유독물질의 대사에 관여하는 효소계이다.

CYP은 오염물질 노출에 민감하게 반응하는 경우가 많아서 환경중 오염물질의 노출평가와 유해성평가에 널리 사용되는 바이오마커 중의 하나이다. 일반적으로 오염물질에 노출되면 CYP가 유도되고 이에 따라 오염물질의 대사가 촉진되어 궁극적으로 체외 배출이 용이하게 된다. 다이옥신과 polychlorinated biphenyls(PCBs) 등의 잔류성 유기오염물질과 β -naphthalene과 같은 방향족 탄화수소류(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) 화합물은 CYP1A를 유도하는 대표적 물질로 알려져 있다. CYP 유도를 저해하는 물질도 다양하다.

현장 환경 시료에서 CYP은 주로 단백질 발현량이나 효소의 활성도(arylhydrocarbon hydroxylase[AHH], ethoxyresorufin O-deethylase[EROD]) 등을 측정하는 방법으로 평가된다(Table 1). CYP의 수준은 대개 유기오염물질의 오염도에 따라 증가하는 경향을 보인다. 특

Table 1. Summary of studies which applied metabolic enzymes of freshwater fish as biomarkers to assess the effects of water contamination

Water contamination	Tissues	Species	Biomarkers	
chronically contaminated PCBs site	liver	<i>L. megalotis</i> ; <i>A. Rupestris</i> ; <i>S. atromaculatus</i>	EROD(+)	70)
PCB-contaminated lake	liver	<i>A. brama</i> ; <i>A. aspius</i>	EROD(+)	7)
PAHs, PCBs, PCDD/Fs, DDT, HCH, and heavy metals-contaminated river	liver	<i>L. cephalus</i>	EROD activity(+); CYP3A27(=)	8)
contaminated river near a PCB incineration plant	liver	<i>C. nasus</i> ; <i>R. mlilus</i> ; <i>T. thymallus</i>	AHH(+); ECOD(+); EROD(+); CYP protein(=)	10)
plant effluent	liver	<i>B. fluviatilis</i> ; <i>L. cephalus</i> ; <i>C. nasus</i> ; <i>N. barbatulus</i>	AHH(+)	11)
effluent of chemical plant containing 7-HCH and DDT	liver	<i>B. barbuis</i> ; <i>L. cephalus</i> ; <i>C. nasus</i>	EROD(+)	12)
PCDDs and PCDFs-contaminated river	liver; kidney; muscle	<i>E. lucius</i>	EROD(+); CYP1A protein(+)	13)
PCDD and PCDF-contaminated river	liver	<i>C. commersoni</i> ; <i>E. lucius</i> ; <i>S. vitreum</i> ; <i>I. nebulosus</i> ; <i>S. corporalis</i> ; <i>C. cutostomus</i> ; <i>M. dolomieu</i>	AHH(+)	14)
TCDD, and TCDF-contaminated river	liver	<i>F. heteroclitus</i>	EROD(+); CYP1A mRNA(+); CYP1A1 protein(+); CYP3 protein(+)	16)
PCDDs, PCDFs, and PCBs-contaminated river	liver	<i>M. tomcod</i>	CYP1A1 mRNA(+)	71)
PCBs and PAHs-contaminated river	liver	<i>B. plebejus</i> ; <i>C. nasus</i> ; <i>L. cephalus</i>	APDM(+); EROD(+); UDPG(+)	15)
PAHs-contaminated river	liver; bile	<i>A. nebulosus</i>	EROD(+)	29)
petroleum hydrocarbons and PCBs-contaminated river	liver	<i>L. lota</i>	CYP protein(=); AHH(=); EROD(=)	72)
PCBs-contaminated river	liver; kidney	<i>C. nasus</i>	EROD(+); CYP protein(+)	73)
PAHs, HCB, PCBs, DDE, and heavy metals-contaminated river	liver; muscle	<i>P. flesus</i> ; <i>L. limanda</i> ; <i>P. platessa</i>	UDPGT(=); ECOD(=); EROD(+); CYP 1A protein(+)	17)
BKME	liver	<i>P. williamsoni</i> ; <i>C. catostomus</i>	CYP1A protein(=)	74)
BKME	liver	<i>A. brama</i> ; <i>P. fluviatilis</i> ; <i>R. rutilus</i>	AHH(+); CYP protein(+ in <i>A. Brama</i> and <i>P. fluviatilis</i>); PROD(+ in <i>R. rutilus</i> and <i>P. fluviatilis</i>); EROD(+); RED(=); UDPG(=)	22)
BKME	liver	<i>P. fluviatilis</i>	EROD(+)	18)
BKME	liver	<i>C. commersoni</i> ; <i>C. catostomus</i> ; <i>C. chupeatormis</i> ; <i>S. namaycush</i>	EROD(+)	19)
PCDD/Fs-contaminated river	liver	<i>C. carpio</i>	EROD(+), ECOD(=)	21)
BKME	blood; liver	<i>L. aurtus</i>	EROD(+)	26)
metals-contaminated river	liver	<i>G. aculeatus</i> <i>L.</i>	EROD(+)	27)
PCBs, lindane, HCB, chlordane, DDE, phenol, methylphenol, and metals-contaminated river	liver	<i>L. cephalus</i> ; <i>N. barbatulus</i>	EROD(+ in male <i>L. cephalus</i>)	31)
BKME	liver	<i>P. fluviatilis</i>	EROD(=); PROD(=); UDPGT(=); CYP1A protein(=); cyt b5 activity(=)	32)
BKME	bile; liver; serum	<i>P. fluviatilis</i> ; <i>R. rutilus</i>	PROD(+); EROD(+)	33)

Table 1. Continued

Water contamination	Tissues	Species	Biomarkers	
BKME	liver	<i>C. cafofostomus</i> ; <i>P. williamson</i> ; <i>L. tola</i>	EROD(+); CYP1A protein(+)	75)
PCDD/Fs and PAHs-contaminated river	liver	<i>P. oregonensis</i> ; <i>O. clarkia</i> ; <i>C. carpio</i>	EROD(+ in <i>C. carpio</i>); CYP protein (+ in <i>C. carpio</i>); CYP1A1 protein(+ in <i>C. carpio</i>); RED(- in <i>C. carpio</i>)	23)
BKME	liver	<i>A. brama</i> ; <i>P. fluviatilis</i> ; <i>R. rutilus</i>	UDPGT(+); EROD(+)	25)
PCBs and PAHs-contaminated river	liver	<i>A. brama</i>	<i>p</i> -Nitroanisole- <i>O</i> -demethylase(+)	28)
metals, PAHs, PCBs, lindane, and DDE-contaminated river	liver	<i>B. barbus</i> ; <i>L. cephalus</i> ; <i>G. gobio</i>	EROD(-)	30)
PAHs and heavy metals-contaminated river	liver	<i>feral fish</i>	AHH(+)	47)
PCBs, PAHs, and OCPs-contaminated river	liver	<i>R. rutilus</i>	cyt b5(-); EROD(=); total CYP protein (-); CYP1A protein(=); RED(=)	62)
effluents of a coking plant containing 2,3,7,8-TCDD and PAHs	liver	<i>A. nebulosus</i>	EROD(-)	63)
oil-contaminated site	liver; gill	<i>S. trutta</i>	AHH(+)	76)
pesticides-contaminated river (diuron, simazine, fenithrothion, methidathion, bromopropylate, tetradifon)	liver	<i>P. phoximus</i> ; <i>R. rutilus</i> ; <i>N. barbatulus</i> ; <i>L. soufia</i> ; <i>G. gobio</i> ; <i>L. cephalus</i>	EROD(+)	77)
PAHs and PCBs-contaminated river	liver	<i>P. vetulus</i> ; <i>L. bilineata</i> ; <i>P. stellatus</i>	CYP1A protein(+); AHH(+); EROD(+)	78)
PCBs and PAHs-contaminated river	liver; muscle	<i>L. cephalus</i>	EROD(+); CYP1A protein(+)	79)
urban rivers and a paper mill	liver	<i>S. trutta</i> ; <i>P. americanus</i>	EROD(+ in liver; - in muscle)	80)
HCB, PCBs, and heavy metals-contaminated river	liver	<i>B. graellsii</i>	CYP1A mRNA and protein(+); EROD(+)	68)
complex mixture of organics (chloroform, methylene chloride, toluene, 2-butanone, o-xylene, 2-hexanone, dieldrin, 4,4'-DDE, 4,4'-DDD, PCB-1254) and trace metals (Ag, Cr, Cu, Hg, Ni)	liver	<i>I. nebulosus</i>	CYP protein(-); EROD(-); cyt b5(=)	81)
PCB, TCDD, DDE, and heavy metals-contaminated river	liver	<i>C. carpio</i> ; <i>M. salmoides</i> ; <i>M. dolomieu</i> ; <i>I. furcatus</i>	EROD activity(+)	82)
PCBs and DDE-contaminated river	liver; kidney	<i>I. nebulosus</i>	UDPGT(=); EROD(+)	83)
PCBs, PAHs, OCPs, and PCDD/Fs-contaminated river	liver	<i>A. anguilla</i>	UDPGT(+); CYP1A protein(+); CYP3A protein(=); EROD(+); cyt b5(+); CYP RED(=); PROD(+)	84)
PCBs and Hg-contaminated river	liver	<i>A. brama</i>	EROD(+); ECOD(+)	85)
oil shale processing plant with high PAHs and heavy metals (Cd, Cu, Hg, Pb) contamination	Liver; kidney; spleen; intestine	<i>P. fluviatilis</i> ; <i>R. rutilus</i>	EROD(=); CYP1A protein(=); AHH(-); UDPGT(=)	86)
heavy metals and OCs-contaminated river	liver	<i>L. cephalus</i> ; <i>G. gobio</i>	EROD(+)	87)
PCBs, metals, chlorine, and nutrient-contaminated river	liver	<i>L. auritus</i>	EROD(+)	88)
urban, industrial or agricultural contamination sites		<i>G. aculeatus L.</i>	EROD(+)	89)
BKME	liver	<i>C. gobio L.</i>	AHH(+)	90)

-, inhibition; =, no (significant) response; +, induction; OCS, organochlorine compounds; 7-HCH, hexachlorocyclohexane; PCDDs, polychlorinated dibenzodioxins; PCDFs, polychlorinated dibenzofurans; TCDD, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin; TCDF, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran; ECOD, 7-ethoxycoumarin O-deethylase; UDPGT, uridine diphosphate glucuronyltransferase; RED, cytochrome c-reductase; The numbers in parenthesis represent references.

히 PCBs 또는 다이옥신과 같은 잔류성유기오염물질과 bleached kraft mill effluent(BKME)가 오염된 지역에서 포획된 담수어류에서는 대사 효소의 활성이 대조지역에 비해 현저히 증가하였다.⁷⁻²⁵ BKME 유출 하류지역에서 포획된 개체의 경우, 전 개체종에서 CYP 활성이 높게 나타났으나 해당 제지공장의 조업이 정지된 2주 후에는 CYP의 활성이 감소된 것은 CYP가 BKME 함유 오염물질의 독성을 잘 반영하는 바이오마커임을 보여준다.¹⁹ 지금까지의 조사결과를 종합해 볼 때 CYP1A1 단백질 수준과 효소 활성도는 PAHs, PCBs, dichloro-diphenyl-trichloroethanes(DDTs) 등을 포함한 유기오염물질로 인한 담수 어류의 영향을 모니터링하기 위한 목적으로 유용한 바이오마커로 판단된다.¹⁷⁾

대사효소 바이오마커의 반응과 조직병리학적 수준 이상의 상위 단계 지표를 병행하여 측정한 보고사례는 총 25건이 검색되었다(Table 2). 관련 오염물질은 PCBs가 가장 많았으며 PAHs, BKME, 중금속 순으로 나타났다. 대사효소와 함께 분석된 상위단계 지표로는 hepatosomatic index(HSI), gonadosomatic index(GSI), condition factor(CF) 등의 생리학적 지표가 많았다. 이외에도 마크로파지 응집, 성 성숙도 및 조직병리학적 분석이 병행된 사례도 있었으며, 개체 연령구조, 성장률, 개체군 지표 그리고 군집 지표를 대사 효소와 함께 적용한 사례도 2건이 검색되었다.^{26,27)}

PCBs와 PAHs로 오염된 하천에서 포획된 개체에서는 대조지역에 비해 HSI가 유의하게 높게 나타났다. 간의 상대 중량이 증가하였음은 유해물질 대사 및 해독을 위한 장기 수준의 보상적 노력을 반영하는 것으로, 오염물질의 노출로 인한 개체의 영향을 반영하는 것으로 여겨진다.²⁸⁾ Arcand-Hoy와 Metcalfe²⁹⁾도 PAHs로 오염된 하천의 물고기에서 HSI 및 EROD 활성 증가를 보고한 바 있다. 그러나 위의 두 사례 이외에는 염소계 화합물과 PAHs의 노출에 의해 여러 바이오마커의 반응이 일관성 있게 나타난 경우는 발견하기 어려웠다. Van der Oost²⁴⁾는 PCBs, organochlorine pesticides(OCs), PAHs 그리고 PCDF/Ds로 오염된 하천에서 포획된 개체가 대조지역의 생물에 비해 CYP 단백질 수준이 높은 것으로 보고하였으나, 대조지역과 오염지역의 개체 간의 HSI의 차이는 관찰되지 않았다. 또한 Flammarion과 Garric³⁰⁾의 연구에 의하면 PCBs와 PAHs로 오염된 하천의 개체에서 CF, HSI 및 GSI 등의 생리학적 지표가 지역간 오염도를 비교적 잘 반영하였지만 지역에 따른 EROD 활성의 차이는 관찰되지 않았다.

염소계 화합물 및 PAHs의 경우와는 달리 BKME

의 노출에 의한 영향을 평가한 연구에서는 대사효소 수준의 반응이 비교적 상위 수준 반응을 잘 반영하는 것으로 보고된다. 대조지역에 비해 BKME가 방류되는 지점에서 포획된 개체에서 AHH 활성이 10배 그리고 방류지점부터 95 km 떨어진 하류에서는 5배 높았다. 또한 BKME에 노출된 개체에서 HSI, 혈구용적, 혈청 단백질과 당, 그리고 지느러미 비대칭 지표 등은 대사효소 활성과 동일한 양상으로 증가하였다.¹⁴⁾ 그 외 다수의 연구에서도 BKME에 노출된 개체에서 대사효소와 관련된 바이오마커의 수준과 HSI 및 CF 등의 생리학적 지표가 증가하는 것으로 나타났다.³¹⁻³³⁾ 이러한 사례들을 종합해 볼 때 대사효소와 관련된 바이오마커는 BKME 오염으로 인한 상위 수준의 영향을 잘 반영하는 지표인 것으로 보이지만, 그 이외의 오염물질에 대해서는 상위 단계의 지표와 함께 분석했을 때 활용성이 증가하는 것으로 판단된다.

2. 산화적 손상 관련 지표

생체 내에서 다양한 과정을 거쳐 생산된 자유라디칼(free radical)은 단백질, 핵산, 지질 등의 생분자들을 공격하여 분해시키거나 그 기능을 저해한다. 생체는 자유라디칼의 악영향을 제어하기 위해 다양한 방어 메커니즘을 가지고 있다. 자유라디칼의 한 종류인 활성산소종(reactive oxygen species: ROS)은 산소라디칼 및 이것으로부터 파생된 산소화합물로 최외곽 전자궤도에 쌍을 이루지 않은 전자를 가지고 있어 반응성이 높기 때문에 DNA 손상, 단백질 불활성화, 지질 과산화(lipid peroxidation: LPO) 등의 영향을 초래한다.³⁴⁾ 이에 대처하여 항산화효소는 외인물질의 생체 내로 유입된 ROS를 제거하거나 세포 내 대사과정에서 생성된 ROS로부터 생체를 보호하는 역할을 한다. 대표적인 항산화효소는 superoxide dismutase(SOD),³⁵⁾ catalase(CAT),³⁶⁾ glutathione peroxidase (GPx),³⁷⁾ 그리고 glutathione S-transferase(GST)³⁴⁾가 있다. 항산화효소는 특정 ROS를 기질로 반응한다. 그러므로 특정한 항산화효소의 활성이 증가했다면 이것이 어떤 ROS의 노출 영향 때문인지 간접적으로 추정할 수 있다.

물 환경 중에 존재하는 다양한 금속이온은 물고기에게 산화적 손상을 일으킬 수 있는 것으로 알려져 있다.^{38,39)} 실내 노출 연구를 토대로 보면 항산화효소나 산화적 손상 관련 지표들이 다양한 환경오염물질 노출로 인해 발생하는 산화적 손상을 잘 지시하는 것으로 보인다.⁴⁰⁻⁴⁴⁾ Table 3은 수질오염으로 인한 담수어류의 독성영향을 평가하기 위해 산화적 손상과 관련된 분자·생화학적 수준의 바이오마커를 적용한 사례를 제시

Table 2. Summary of studies which link biomarkers of metabolic enzymes to the observational endpoints of higher biological levels in freshwater fish

Water contamination	Tissues	Species	Biomarkers/higher level endpoints	
PAHs, PCBs, PCDD/Fs, DDT, HCH, and heavy metals-contaminated river	liver	<i>L. cephalus</i>	EROD activity(+); CYP3A27(=); CF(=)	⁸⁾
PCB, TCDD, DDE, and heavy metals-contaminated river	Blood; liver; kidney; gonad; mesenteric fat	<i>C. carpio</i> ; <i>M. salmoides</i> ; <i>M. dolomieu</i> ; <i>I. furcatus</i>	EROD activity(+); external lesions(+); HAI(- in <i>Micropterus</i> sp.); histopathological analysis(abnormal); CF(=), HSI(=); GSI(-)	⁸²⁾
PCDD/Fs and PAHs-contaminated river	Gill; liver; kidney; intestine; gonad	<i>P. oregonensis</i> ; <i>O. clarkia</i> ; <i>C. carpio</i>	EROD(+ in <i>C. carpio</i>); CYP protein(+ in <i>C. carpio</i>); CYP1A1 protein(+ in <i>C. carpio</i>); RED(- in <i>C. carpio</i>); histopathological analysis(normal)	²³⁾
PCBs and DDE-contaminated river	liver; kidney	<i>I. nebulosus</i>	HSI(=); CF(+); UDPGT(=); EROD(+)	⁸³⁾
PCBs, PAHs, OCPs, and PCDD/Fs-contaminated river	liver	<i>A. anguilla</i>	HSI(=); CF(=); UDPGT(+); CYP1A protein(+); CYP3A protein(=); EROD(+); cyt b5(+); CYP RED(=); PROD(+); histopathological analysis(normal)	⁸⁴⁾
metals, PAHs, PCBs, lindane, and DDE-contaminated river	liver	<i>B. barbus</i> ; <i>L. cephalus</i> ; <i>G. gobio</i>	EROD(-); CF(=); HSI(=); GSI(=)	³⁰⁾
PCBs and PAHs-contaminated river	liver	<i>A. brama</i>	HSI(+); <i>p</i> -Nitroanisole- <i>O</i> -demethylase(+); histopathological analysis(abnormal)	²⁸⁾
PCBs and Hg-contaminated river	liver	<i>A. brama</i>	CF(=); EROD(+); ECOD(+); GSI(=)	⁸⁵⁾
PCBs, PAHs, and OCPs-contaminated river	liver	<i>R. rutilus</i>	CF(=); HSI(=); cyt b5(-); EROD(=); total CYP protein(-); CYP1A protein(=); RED(=)	⁶²⁾
oil shale processing plant with high PAHs and heavy metals (Cd, Cu, Hg, Pb) contamination	liver; kidney; spleen; intestine	<i>P. fluviatilis</i> ; <i>R. rutilus</i>	EROD(=); CYP1A protein(=); histopathological analysis(normal); CF(=); HSI(=); AHH(-); UDPGT(=)	⁸⁶⁾
BKME	blood; liver	<i>L. aurtus</i>	EROD(+); histopathological analysis(abnormal); age structure (abnormal); CF(+ in female); HSI (-); growth rates(-); IBI(-); CPUE(-); fecundity(=)	²⁶⁾
PCBs, metals, chlorine, and nutrient-contaminated river	liver	<i>L. auritus</i>	EROD(+); CF(=); HSI(=)	⁸⁸⁾
PCDD and PCDF-contaminated river	blood; liver; gonad; pectoral	<i>C. commersoni</i> ; <i>E. lucius</i> ; <i>S. vitreum</i> ; <i>I. nebulosus</i> ; <i>S. corporalis</i> ; <i>C. cutostomus</i> ; <i>M. dolomieu</i>	AHH(+); HSI(+); GSI(=); CF(=)	¹⁴⁾
PCBs, lindane, HCB, chlordane, DDE, phenol, methylphenol, and metals-contaminated river	liver	<i>L. cephalus</i> ; <i>N. barbatulus</i>	EROD(+ in male <i>L. cephalus</i>); HSI(+)	³¹⁾
BKME	liver	<i>P. fluviatilis</i>	HSI(+); CF(+); EROD(=); PROD(=); UDPGT(=); CYP1A protein(=); cyt b5 activity(=)	³²⁾
BKME	bile; liver; serum	<i>P. fluviatilis</i> ; <i>R. rutilus</i>	HSI(+); GSI(=); PROD(+); EROD(+); 17 β-estradiol(- in female, + in male); testosterone(-)	³³⁾
PAHs and heavy metals-contaminated river	liver	feral fish	AHH(+); CF(=)	⁴⁷⁾
PAHs-contaminated river	liver; bile	<i>A. nebulosus</i>	HSI(+); external lesions(=); histopathological analysis(normal); EROD(+)	²⁹⁾
heavy metals and OCs-contaminated river	liver	<i>L. cephalus</i> ; <i>G. gobio</i>	EROD(+); female sexual maturity(+); GSI(-)	⁸⁷⁾
PCBs and PAHs-contaminated river	liver; muscle	<i>L. cephalus</i>	EROD(+); CYP1A protein(+); HSI(+); GSI(=)	⁷⁹⁾
effluents of a coking plant containing 2,3,7,8-TCDD and PAHs	liver	<i>A. nebulosus</i>	EROD(-); ssDNA(+); CAT(-); GPx(=); GR(=); GST(=); SOD(=); TGSH(=); liver size(+);	⁶³⁾

Table 2. Continued

Water contamination	Tissues	Species	Biomarkers/higher level endpoints	
metals, PAHs, PCBs, lindane, and DDE-contaminated river	liver	<i>B. barbus</i> ; <i>L. cephalus</i> ; <i>G. gobio</i>	EROD(-); CF(=); HSI(=); GSI(=)	30)
urban, industrial or agricultural contamination sites	Liver	<i>G. aculeatus</i> L.	CF(+); HSI(+); EROD(+); GST(+); GPx(+); GSH(+); TBARS(+)	89)
metals-contaminated river	liver	<i>G. aculeatus</i> L.	EROD(+); HSI(+); GSI(+); CF(+); population disturbance(+)	27)

-, inhibition; =, no (significant) response; +, induction; GSI, gonadosomatic index; HAI, health assessment index; PROD, 7-pentocycresorufin O-dealkylase; NADPH cytochrome P450 reductase; CPUE, catch per unit effort; The numbers in parenthesis represent references.

Table 3. Summary of studies which applied oxidative stress parameters of freshwater fish as biomarkers to assess the effects of water contamination

Water contamination	Tissues	Species	Biomarkers	
PCB-contaminated lake	liver	<i>A. brama</i> ; <i>A. aspius</i>	GST(+)	7)
PAHs, PCBs, PCDD/Fs, DDT, HCH, and heavy metals-contaminated river		<i>L. cephalus</i>	GST(+); GR(+); TBARS(=)	8)
contaminated river near a PCB incineration plant	Liver	<i>C. nasus</i> ; <i>R. milius</i> ; <i>T. thymallus</i>	GST(+)	10)
PCDD and PCDF-contaminated river	liver	<i>C. commersoni</i> ; <i>E. lucius</i> ; <i>S. vitreum</i> ; <i>I. nebulosus</i> ; <i>S. corporalis</i> ; <i>C. cutostomus</i> ; <i>M. dolomieu</i>	GST(-)	14)
PCBs and PAHs-contaminated river	liver	<i>B. plebejus</i> ; <i>C. nasus</i> ; <i>L. cephalus</i>	GSH(=); nonprotein thiol(=); GST(+); GPx(=); GR(=)	15)
BKME	liver	<i>A. brama</i> ; <i>P. fluviatilis</i> ; <i>R. rutilus</i>	GST(+ in <i>P. fluviatilis</i>); TGSH(+ in <i>P. fluviatilis</i> and <i>R. rutilus</i>)	22)
BKME	liver	<i>A. brama</i> ; <i>P. fluviatilis</i> ; <i>R. rutilus</i>	GST(=)	25)
metals-contaminated river	liver	<i>G. aculeatus</i> L.	GST(+); GPx(+); GSH(-); TBARS(+)	27)
BKME	liver	<i>P. fluviatilis</i>	GST(=)	32)
PAHs and heavy metals-contaminated river	liver	feral fish	SOD(+)	47)
PCBs, PAHs, and OCPs-contaminated river	liver	<i>R. rutilus</i>	GST(-); GSH/GSSG(-)	62)
effluents of a coking plant containing 2,3,7,8-TCDD and PAHs	liver	<i>A. nebulosus</i>	CAT(-); GPx(=); GR(=); GST(=); SOD(=); TGSH(=)	63)
PCBs and PAHs-contaminated river	liver; muscle	<i>L. cephalus</i>	GST(=)	79)
PCBs and DDE-contaminated river	muscle; liver; kidney	<i>I. nebulosus</i>	SOD(+ in liver); CAT(- in muscle); GST(+); GPx(+ in muscle); TGSH(+)	83)
PCBs, PAHs, OCPs, and PCDD/Fs-contaminated river	liver	<i>A. anguilla</i>	GSH(=); TGSH(=); GST(+); GPx(=); SOD(=); CAT(+)	84)
PCBs and Hg-contaminated river	liver	<i>A. brama</i>	GST(+)	85)
oil shale processing plant with high PAHs and heavy metals (Cd, Cu, Hg, Pb) contamination spleen; intestine	Liver; kidney; spleen; intestine	<i>P. fluviatilis</i> ; <i>R. rutilus</i>	GST(+)	86)
urban, industrial or agricultural contamination sites	liver	<i>G. aculeatus</i> L.	GST(+); GPx(+); GSH(+); TBARS(+)	89)
BKME	liver	<i>C. gobio</i> L.	GSH(-); SOD(=); CAT(=); vitamin C(-)	90)
heavy metals (Cu, Fe, Pb, Hg, Cd)-contaminated river	liver	<i>L. cephalus</i>	SOD(-); TBARS(=); GR(=); GPx(+); GST(=)	91)

-, inhibition; =, no (significant) response; +, induction; GR, glutathione reductase; TGSH, total glutathione; The numbers in parenthesis represent references.

하고 있다. Sturve 등⁴⁵⁾은 무지개 송어(*Oncorhynchus mykiss*)를 하수처리장 방류수에 노출시켜 항산화효소의 활성 변화를 관찰한 결과, 방류수 농도 50%에 5일 동안 노출된 개체에서 CAT의 활성이 대조군에 비해 유의하게 증가함을 보고하였다. 하지만 하수처리 시설 하류에서 서식하는 무지개 송어를 대상으로 분석한 항산화효소(GST, CAT)의 활성과 LPO의 수준은 청정지역의 대조군에 비해 방류지역의 어류에서 LPO의 수준만 높게 관찰되었을 뿐, 항산화효소의 활성에는 변화가 없었다.⁴⁶⁾ 오염된 지역의 담수 어류에 대한 독성영향을 평가하기 위해 산화적 손상과 관련된 바이오마커와 상위 수준 지표를 동시에 적용한 사례에서도 이와 유사한 경향이 관찰되었다(Table 4). Roberts Jr 등⁴⁷⁾은

PAHs와 중금속으로 오염된 하천의 개체에서 SOD와 CF를 측정된 결과, 대조지역과 오염지역의 개체 모두에서 SOD 활성이 높게 나타났으나, 물고기 개체의 성장에는 부정적 영향이 관찰되지 않았다. Sanchez 등²⁷⁾도 다양한 오염원에 의해 오염된 지역에서 개체군의 교란을 발견하였으나 바이오마커와 개체군 반응 간에 뚜렷한 상관성을 찾지 못하였다.

이와 같이 오염으로 인한 산화적 손상 바이오마커의 반응과 상위 수준의 지표 사이의 반응이 일치하지 않는 것에는 여러 가지 이유가 있다. 항산화효소의 활성 또는 발현은 산화적 손상을 지시하는 좋은 바이오마커이지만, 산화적 손상의 유발 요인은 화학물질 이외에도 산소부족, 산소과포화, 열충격, 내인성독소, 질병, 자외

Table 4. Summary of studies which link biomarkers of oxidative stress to the observational endpoints of higher biological levels in freshwater fish

Water contamination	Tissues	Species	Biomarkers/higher level endpoints
PAHs, PCBs, PCDD/Fs, DDT, HCH, and heavy metals-contaminated river		<i>L. cephalus</i>	GST(+); GR(+); TBARS(=); CF(=) ⁸⁾
PCDD and PCDF-contaminated river	blood; liver; gonad; pectoral	<i>C. commersoni</i> ; <i>E. lucius</i> ; <i>S. vitreum</i> ; <i>I. nebulosus</i> ; <i>S. corporalis</i> ; <i>C. cutostomus</i> ; <i>M. dolomieu</i>	GST(-); HSI(+); GSI(=); CF(=) ¹⁴⁾
BKME	liver	<i>P. fluviatilis</i>	GST(=); HSI(+); CF(+) ³²⁾
PCBs, PAHs, OCPs, and PCDD/Fs-contaminated river	liver	<i>A. anguilla</i>	SOD(=); GPx(=); CAT (=); HSI(=); CF(=) ⁸⁴⁾
PAHs and heavy metals-contaminated river	liver	feral fish	SOD(+); CF(=) ⁴⁷⁾
PCBs, PAHs, and OCPs-contaminated river	liver	<i>R. rutilus</i>	GST(-); GSH/GSSG(-); CF(=); HSI(=) ⁶²⁾
effluents of a coking plant containing 2,3,7,8-TCDD and PAHs	liver	<i>A. nebulosus</i>	CAT(-); GPx(=); GR(=); GST(=); SOD(=); TGSH(=); liver size(+) ⁶³⁾
urban, industrial or agricultural contamination sites		<i>G. aculeatus</i> L.	CF(+); HSI(+); GST(+); GPx(+); GSH(+); TBARS(+) ⁸⁹⁾
PCBs and PAHs-contaminated river	liver; muscle	<i>L. cephalus</i>	GST(=); HSI(+); GSI(=) ⁷⁹⁾
PCBs and DDE-contaminated river	muscle; liver; kidney	<i>I. nebulosus</i>	HSI(=); CF(+); SOD(+ in liver); CAT(- in muscle); GST(+); GPx(+ in muscle); TGSH(+) ⁸³⁾
PCBs, PAHs, OCPs, and PCDD/Fs-contaminated river	liver	<i>A. anguilla</i>	GSH(=); TGSH(=); GST(+); GPx(=); SOD(=); CAT(+); HSI(=); CF(=); histopathological analysis(normal) ⁸⁴⁾
PCBs and Hg-contaminated river	liver	<i>A. brama</i>	GST(+); CF(=); GSI(=) ⁸⁵⁾
oil shale processing plant with high PAHs and heavy metals (Cd, Cu, Hg, Pb) contamination	Liver; kidney; spleen; intestine	<i>P. fluviatilis</i> ; <i>R. rutilus</i>	histopathological analysis(normal); CF(=); HSI(=); GST(+) ⁸⁶⁾
metals-contaminated river	liver	<i>G. aculeatus</i> L.	GST(+); GPx(+); GSH(-); TBARS(+); HSI(+); GSI(+); CF(+); population disturbance(+) ²⁷⁾

-, inhibition; =, no (significant) response; +, induction; The numbers in parenthesis represent references.

선 등 다양하다.⁴⁸⁾ 한편 생물이 유해인자 또는 독성물질에 만성적으로 노출되는 경우 이 스트레스에 점진적으로 적응하여 개체가 산화적 손상 요인에 대해 나타내는 반응이 달라지는 경우도 있다.⁴⁹⁾ 동일 생물종이라도 야외에서 생존해 온 야생종이 실내에서 사육된 실험종보다 자외선에 대한 저항성이 크다는 보고⁵⁰⁾는 수서생물이 처한 환경에 따라 산화적 손상에 대한 방어기전을 획득할 수 있다는 것을 뒷받침한다. 강화된 방어기전 덕분에 다른 오염물질에 의해 유발될 수 있는 산화적 손상에 대해서도 보호 효과를 나타낼 수도 있다. 이러한 복잡성 때문에 상위 수준의 영향평가와 병행하여 활용될 때 산화적 손상 관련 바이오마커의 효용성이 증가할 것으로 판단된다.

3. 생식 및 내분비계교란 관련 지표

내분비계장애물질은 화학구조가 호르몬과 유사하여 노출될 경우 생체의 정상적인 호르몬의 작용을 저해하거나 마치 호르몬처럼 작용하여 불필요한 생리작용을 초래하게 된다. 이러한 외인성 내분비계장애물질들은 주로 에스트로겐과 유사한 작용을 하여 특히 수컷의 생식기능에 영향을 준다. 어류에서 내분비계장애물질의 영향을 평가하기 위해 자주 사용하는 방법은 생체내 성호르몬의 변화를 측정하거나 난황단백질(vitellogenin, VTG)의 생성을 측정하는 것이다. VTG는 난황 단백질

의 전구체로서 어류, 양서류, 또는 곤충 등의 비포유류 난생동물의 암컷 혈장에서 주로 발견된다.^{51,52)} VTG는 간에서 생성된 후 혈액을 통해 난소로 이동하여 발달 중인 난모세포로 흡수된 후 알 내부에서 리포비텔린(lipopitelline)과 포스비틴(phosvitin)으로 전환되는데, 에스트로겐은 이러한 VTG의 합성과 분비를 촉진시킨다. 암컷 붕어의 VTG 농도는 수컷에 비해 20~40배 높으며 수컷에서는 10 µg/ml 이하로 측정된다.⁵³⁾ 그러나 외부에서 에스트로겐이나 내분비장애 물질에 노출된 경우에는 수컷이나 미성숙 암컷에서도 VTG의 합성이 유발될 수 있어 VTG는 외인성 에스트로겐 유사물질(estrogenic chemical)의 노출을 지시하는 바이오마커로 널리 활용되고 있다.^{54,55)}

생식 및 내분비계교란 관련 바이오마커를 이용하여 외인성 내분비계장애물질의 노출과 영향을 분석한 사례는 총 10건이 파악되었으며(Table 5), 바이오마커로 호르몬 변화를 측정 한 사례는 4건, VTG 수준을 평가 한 사례는 6건이었다. TCDD와 PCB 등의 잔류성유기 화합물과 17α-ethynylestradiol 및 BKME가 주요 오염 물질로 제시되었다.

BKME가 어류에 초래하는 내분비계 교란작용은 여러 연구에서 확인되었다. Karelis 등³³⁾은 BKME 오염 지역에서 포획한 암컷 농어에서 HSI 수준이 대조지역에 비해 높게 측정되었다고 보고하였다. 또한 공장 근

Table 5. Summary of studies which applied reproduction and endocrine disruption parameters of freshwater fish as biomarkers to assess the effects of water contamination

Water contamination	Tissues	Species	Biomarkers	
PCDD and PCDF-contaminated river	blood	<i>C. commersoni</i> ; <i>E. lucius</i> ; <i>S. vitreum</i> ;/ <i>I. nebulosus</i> ; <i>S. corporalis</i> ; <i>C. cutostomus</i> ; <i>M. dolomieu</i>	testosterone(=); 17 β-estradiol(=)	14)
TCDD, and TCDF-contaminated river	liver	<i>F. heteroclitus</i>	6β-hydroxyprogesterone activity(+)	16)
BKME	liver	<i>C. commersoni</i> ; <i>C. catostomus</i>	testosterone and estradiol(- in female <i>C. catostomus</i>)	19)
BKME	blood	<i>L. caurtus</i>	17 β-estradiol(-)	26)
metals-contaminated river	liver	<i>G. aculeatus</i> L.	VTG(+)	27)
BKME	bile; liver; serum	<i>P. fluviatilis</i> ; <i>R. rutilus</i>	VTG mRNA(-); testosterone(-); 17 β-estradiol(- in female, + in male)	33)
PCB, TCDD, DDE, and heavy metals-contaminated river	blood	<i>C. carpio</i> ; <i>M. salmoides</i> ; <i>M. dolomieu</i> ; <i>I. furcatus</i>	VTG(+ in <i>Micropterus</i> sp.)	82)
effluents from a single sewage treatment plant	liver	<i>S. trutta</i>	VTG mRNA(-); VTG protein(+)	92)
17α-ethynylestradiol (5-6 ng/L)-contaminated lake	liver	<i>P. promelas</i>	VTG mRNA and protein expression in males(+)	93)
contaminated river	blood	<i>L. cephalus</i>	VTG(+)	94)

-, inhibition; =, no (significant) response; +, induction; The numbers in parenthesis represent references.

처의 수체에서 포획된 암컷의 혈장 17β-estrodioI 농도와 VTG 유전자 발현이 감소하였지만 수컷의 17β-estrodioI 농도는 증가하였으며, 암·수 모두에서 testosterone 수준이 감소하였다. 또 다른 사례²⁶⁾에서는 BKME로 오염된 지역의 개체에서 종의 풍부함과 구성을 나타내는 IBI(index of biotic integrity) 지표가 낮게 나타나 물고기 군집의 영양구조가 불균형하게 나타났다. 오염 지역의 개체군에서 크기와 연령의 구조가 비정상적이었으며, 오염된 지역의 개체에서 다수의 폐쇄성 난모세포와 17β-estradiol 저하가 관찰되었다. 이 두 사례의 결과를 종합해 볼 때 BKME는 암·수컷 개체에 내분비계교란을 일으켜 성호르몬 수준을 변화시키고, 이로 인해 암컷에서 난황전구물질인 VTG 발현을 감소시켜 생식기능장애와 자손번식 실패를 통해 물고기 개체군에 영향을 주는 것으로 결론지을 수 있었다.

수질 오염으로 인한 생식 영향 및 내분비계교란을 분자·생화학적 바이오마커들과 상위 수준 지표로 평가한 사례는 7건을 찾을 수 있었다(Table 6). 이 사례들을 분석한 결과 VTG발현과 성호르몬 변화는 내분비계교

란 물질의 노출에 따른 생식 독성을 잘 반영하는 것으로 나타났으며, 생식선의 발달이나 양성화 등과 같은 상위 수준의 관측과도 일치하는 반응을 보였다. 하지만 VTG는 암컷의 성장과 생육단계 별로 생성되는 농도가 다르고, 계절적 변이가 크다는 점은 바이오마커로서 VTG의 활용성을 제한하는 특성이다.⁵⁶⁾ 내분비계 교란 물질 오염과 번식장애를 파악하기 위해 VTG를 바이오마커로 사용하는 경우 개체의 번식주기, 지리적 분포와 생물 다양성의 차이를 고려할 필요가 있다.⁵⁷⁾

4. 유전독성 매개변수

일부 유해물질은 직·간접적으로 세포에 염색체 이상 및 DNA 손상을 유발하여 어떤 경우에는 돌연변이, 암, 유전자 이상과 같은 유전독성을 초래할 수 있다. 예를 들면 유해물질 노출로 인해 세포 내에 ROS가 발생되고 세포 내 redox 균형을 붕괴시켜 산화적 스트레스를 유발함으로써 이러한 유전독성이 발생할 수 있다. DNA의 구조적 손상은 유전독성의 바이오마커로 나아가 생태계 이상의 조기 경보로서 활용성이 있다.⁵⁸⁾ 유전독성 관련 분자·생화학적 바이오마커로 자주 활

Table 6. Summary of studies which link biomarkers of reproduction and endocrine disruption to the observational endpoints of higher biological levels in freshwater fish

Water contamination	Tissues	Species	Biomarkers/higher level endpoints
PCB, TCDD, DDE, and heavy metals-contaminated river	blood; liver; kidney; gonad; mesenteric fat	<i>C. carpio</i> ; <i>M. salmoides</i> ; <i>M. dolomieu</i> ; <i>I. furcatus</i>	EROD activity(+); external lesions(+); HAI(- in ⁸²⁾ <i>Micropterus</i> sp.); histopathological analysis (abnormal); CF(=), HSI(=); GSI(-); VTG(+ in <i>Micropterus</i> sp.)
BKME	blood; liver	<i>L. aurltus</i>	histopathological analysis(abnormal); age structure (abnormal); CF(+ in female); HSI(-); growth rates (-); IBI(-); CPUE(-); 17 β-estradiol(-); vitellogenic oocytes(=); fecundity(=); atretic oocyte(+) ²⁶⁾
PCDD and PCDF-contaminated river	blood; liver; gonad; pectoral	<i>C. commersoni</i> ; <i>E. lucius</i> ; <i>S. vitreum</i> ; <i>I. nebulosus</i> ; <i>S. corporalis</i> ; <i>C. cutostomus</i> ; <i>M. dolomieu</i>	HSI(+); CF(=); testosterone(=); 17 β-estradiol(=) ¹⁴⁾
BKME	bile; liver; serum	<i>P. fluviatilis</i> ; <i>R. rutilus</i>	HSI(+); GSI(=); VTG mRNA(-); Testosterone(-); 17 β-estradiol(- in female, + in male) ³³⁾
17α-ethynylestradiol (5-6 ng/L)-contaminated lake	liver	<i>P. promelas</i>	feminization of males(+); VTG mRNA and protein expression in males(+); gonad development and intersex in males(+); oogenesis in females(altered); population effect(extinction) ⁹³⁾
metals and organics-contaminated river	blood	<i>L. cephalus</i>	VTG(+); testicular structure(altered) ⁹⁴⁾
metals-contaminated river	liver	<i>G. aculeatus</i> L.	VTG(+); HSI(+); GSI(+); CF(+); population disturbance(+) ²⁷⁾

-, inhibition; =, no (significant) response; +, induction; The numbers in parenthesis represent references.

용되는 것에는 DNA 부가물(DNA adduct), DNA 절단(breakage), comet assay, 염색체 이상(chromosome aberration), 소핵분석(micronucleus; MN), 핵변이(nuclear anomalies; NA) 등이 있다. 현장 담수어류를 대상으로 바이오마커를 이용하여 유전독성을 분석한 사례는 총 10건이 있다(Table 7). 이 중 DNA 부가물 분석을 적용한 사례가 모두 6건으로 가장 빈도가 높았고, 유전독성의 원인물질로는 PAHs가 7건으로 가장 많았다. 또한 현장 담수 어류의 PAHs 노출을 평가하기 위해 DNA 부가물을 측정된 모든 사례에서 이 바이오

마커는 PAHs 노출에 민감하게 반응하여 PAHs의 노출 지표로 적합한 것으로 나타났다.^{25,59-61)} 하지만 PAHs 노출로 인한 유전독성 바이오마커의 반응과 조직학적 수준 이상의 상위 단계 지표를 연계하여 분석한 사례는 발견할 수 없었다.

BKME로 오염된 지역에서 DNA 부가물의 증가와 생리학적 지표, 조직병리학적 분석, 개체 연령 구조, 성장률 및 군집 지표 등의 상위 지표와 연계하여 분석한 연구가 1건 발견되었으나 상위 지표와의 뚜렷한 상관성을 보이지 않았다.²⁶⁾ 또한 PCBs, OCPs 및 creosote

Table 7. Summary of studies which applied genotoxic parameters of freshwater fish as biomarkers to assess the effects of water contamination

Water contamination	Tissues	Species	Biomarkers	
BKME	liver	<i>A. brama</i> ; <i>P. fluviatilis</i> ; <i>R. rutilus</i>	DNA adduct(+)	25)
BKME	blood	<i>L. aurltus</i>	DNA damage(+)	26)
PAHs-contaminated river	liver	<i>A. anguilla</i>	DNA adduct(+)	61)
PAHs-contaminated river	liver	<i>B. barbuis</i> ; <i>A. brama</i> ; <i>C. carpio</i> ; <i>L. cephalus</i>	DNA adduct(-)	60)
PAHs-contaminated river	liver	<i>C. commersoni</i>	DNA adduct(+)	59)
effluents of a coking plant containing 2,3,7,8-TCDD and PAHs	liver	<i>A. nebulosus</i>	ssDNA(+)	63)
PCBs, PAHs, and OCPs-contaminated river	liver	<i>R. rutilus</i>	DNA adduct(=)	62)
PAHs-contaminated river	liver	<i>P. fluviatilis</i>	DNA adduct(+)	64)
oil shale processing plant with high PAHs and heavy metals (Cd, Cu, Hg, Pb) contamination	blood	<i>P. fluviatilis</i> ; <i>R. rutilus</i>	micronuclei test(=)	86)
polluted water bodies by industrial discharges (metals), non-treated urban wastes, and pesticides	liver	<i>O. niloticus</i>	micronuclei test(=)	95)

-, inhibition; =, no (significant) response; +, induction; single-strand DNA breakage; The numbers in parenthesis represent references.

Table 8. Summary of studies which link biomarkers of genotoxicity to the observational endpoints of higher biological levels in freshwater fish

Water contamination	Tissues	Species	Biomarkers/higher level endpoints	
PCBs, PAHs, and OCPs-contaminated river	liver	<i>R. rutilus</i>	CF(=); HSI(=); DNA adduct(=)	62)
BKME	blood; liver	<i>L. aurltus</i>	histopathological analysis(abnormal); age structure (abnormal); CF(+ in female); HSI(-); growth rates(-); IBI(-); CPUE(-); fecundity(=); DNA damage(+)	26)
effluents of a coking plant containing 2,3,7,8-TCDD and PAHs	liver	<i>A. nebulosus</i>	ssDNA(+); liver size(+)	63)
PAHs-contaminated river	liver	<i>P. fluviatilis</i>	DNA adduct(+); CF(=); GSI(=); HSI(=); histopathological analysis(normal)	64)
oil shale processing plant with high PAHs and heavy metals (Cd, Cu, Hg, Pb) contamination	liver; kidney; spleen; intestine; blood	<i>P. fluviatilis</i> ; <i>R. rutilus</i>	histopathological analysis(normal); micronuclei test(=); CF(=); HSI(=)	86)
polluted water bodies by industrial discharges (metals), non-treated urban wastes, and pesticides	liver	<i>O. niloticus</i>	micronuclei test(=), CF(- in fish at a metal-contaminated site)	95)

-, inhibition; =, no (significant) response; +, induction; ssDNA; The numbers in parenthesis represent references.

로 오염된 지역의 개체에서 DNA 부가물과 DNA 손상 등의 바이오마커와 상위 수준 지표들을 연계하여 분석하였으나 오염으로 인한 유전독성 반응을 일관되게 반영하는 사례는 관찰되지 않았다(Table 8).^{26,62-64)} 이는 심각한 수준의 손상이 아닐 경우 DNA 회복 기전에 의해 대부분 회복되어 상위 단계까지 그 영향이 나타나지 않기 때문인 것으로 생각된다.

5. Metallothionein

Metallothionein(MT)은 세균과 균류로부터 사람을 포함한 척추 동물에 이르기까지 다양한 생물체에 존재하고 있는 단백질로, 열에 안정하며 thiol기(-SH)가 풍부하여 일부 중금속과 결합력이 큰 특성이 있다. 이 때문에 MT는 중금속 노출시 발현하여 독성을 저감하는 작용을 한다.⁶⁵⁾ 중금속 노출 시 생성되는 MT의 수준은 종, 개체, 기관에 따라 다르다. 중금속으로 오염된 하천에서 포획된 물고기를 대상으로 조사한 결과 MT가 중

금속 노출을 지표하는 좋은 바이오마커임을 보여주었다(Table 9).⁶⁶⁻⁶⁸⁾ MT의 변화가 개체의 건강 수준과도 잘 일치하는 것으로 보고한 연구도 있었다(Table 10). Linde-Arias 등⁶⁹⁾은 오염원이 서로 다른 지역(인구밀집 지역, 공업지역, 농업지역)에서 포획된 어류를 대상으로 MT와 CF를 분석한 결과, 중금속 오염이 심한 공업 지역에서 MT의 수준이 가장 높았으며, 대조지역에 비해 CF 수준이 낮은 것을 관찰하였다. 그러나 중금속 노출을 평가하기 위해 MT와 조직수준 이상의 지표를 동시에 분석한 사례는 3건으로 매우 제한적이어서 MT의 활용성을 판정하기 위해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

IV. 결 론

물 환경오염의 생태위해성 평가를 위한 주요 분자·생화학적 바이오마커의 현장 적용성을 알아보기 위해

Table 9. Summary of studies which applied reproduction metallothionein of freshwater fish as biomarkers to assess the effects of water contamination

Water contamination	Tissues	Species	Biomarkers	
PAHs, PCBs, PCDD/Fs, DDT, HCH, and heavy metals-contaminated river	liver	<i>L. cephalus</i>	MT(-)	8)
Cd, Cu, and Zn-contaminated river	liver	<i>G. cotidiamus</i>	MT mRNA(+)	66)
Cd and Zn-contaminated river	gill; liver; kidney	<i>G. gobio</i>	(Cd, Zn)-MT protein in liver(+)	67)
polluted water bodies by industrial discharges (metals), non-treated urban wastes, and pesticides	liver	<i>G. brasiliensis</i>	MT(+)	69)
HCB, PCBs, and heavy metals-contaminated river	liver	<i>B. graellsii</i>	MT mRNA(=); MT protein(+)	68)
polluted water bodies by industrial discharges (metals), non-treated urban wastes, and pesticides	liver	<i>O. niloticus</i>	MT(+ in fish at a metal-contaminated site)	95)
heavy metals-contaminated river	gut	<i>L. aurata</i>	MT(+)	96)

-, inhibition; =, no (significant) response; +, induction; The numbers in parenthesis represent references.

Table 10. Summary of studies which link biomarkers of metallothionein to the observational endpoints of higher biological levels in freshwater fish

Water contamination	Tissues	Species	Biomarkers/higher level endpoints	
PAHs, PCBs, PCDD/Fs, DDT, HCH, and heavy metals-contaminated river	liver	<i>L. cephalus</i>	MT(-); CF(=)	8)
heavy metals-contaminated river	gut	<i>L. aurata</i>	gut morphological analysis(+); histomorphological analysis of mucous goblet cells(normal); MT(+)	96)
polluted water bodies by industrial discharges (metals), non-treated urban wastes, and pesticides	liver	<i>G. brasiliensis</i>	MT(+); CF(-)	69)
polluted water bodies by industrial discharges (metals), non-treated urban wastes, and pesticides	liver	<i>O. niloticus</i>	MT(+ in fish at a metal-contaminated site); CF(- in fish at a metal-contaminated site)	95)

-, inhibition; =, no (significant) response; +, induction; The numbers in parenthesis represent references.

담수 어류를 대상으로 화학물질의 노출을 평가한 사례를 조사하였다. 조사된 바이오마커는 대사효소, 산화적 손상 매개변수, 생식 및 내분비계교란 매개변수, 유전독성 매개변수, MT 등이다. 대사효소로는 CYP1A1와 같은 대사효소의 단백질 수준과 효소 활성을 측정하는 방법이 주로 활용되었으며, 유기오염물질 오염을 모니터링하기 위한 적절한 바이오마커인 것으로 나타났다. 산화적 손상 관련 바이오마커는 일부 화학물질의 노출을 잘 지시하는 것으로 나타났다. 유전독성을 평가하기 위해 가장 빈번하게 사용하는 DNA 부가물 분석은 현장시료에서도 일부 오염물질의 노출을 민감하게 지시하였다. 중금속으로 오염된 하천에서 포획된 물고기를 대상으로 MT의 농도를 측정할 때 대부분의 연구사례들은 MT가 중금속 노출을 지표하는 좋은 바이오마커임을 보여주었다. 이와 같이 조사된 바이오마커는 대개 현장시료에서 유해물질의 독성기전을 지시하는데 활용성이 컸다. 그러나 분자·생화학적 바이오마커만을 가지고 개체 또는 개체군 이상에서 나타나는 영향을 추정하는 것은 어려웠다. 특히 생식 및 내분비계교란과 관련된 바이오마커를 제외한 나머지 바이오마커의 경우에는 조직병리학적 지표 이상의 상위 단계와의 연계성이 비교적 낮았다. 그 이유는 분자·생화학적 바이오마커는 비교적 단기간 낮은 수준에 노출되어도 나타날 수 있지만 쉽게 회복될 수 있기 때문에 상위단계의 영향으로까지 진행되지 않는 경우가 많기 때문이다. 한편 일부 바이오마커는 유해물질 노출뿐만 아니라 수질변화나 질병발생에 의해서도 반응하는 경우도 있어, 바이오마커의 반응이 반드시 유해물질 노출의 결과라고 볼 수는 없었다. 따라서 바이오마커를 직접 환경 시료에 적용할 경우에는 이러한 제한점을 고려해야 할 것이다. 유해인자의 물환경 생태계 영향을 정확하게 파악하기 위해서는 분자·생화학적 바이오마커와 함께 적절한 상위단계의 생물영향지표를 평가하는 것이 타당한 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 환경부 Eco-STAR 수생태복원사업단(CAER)에서 지원을 받아 수행되었다. 원고를 검토한 서울대학교 보건환경연구소 배현주 박사께 감사드립니다.

참고문헌

1. Editorial: *Biomarkers*, **1**, 1-2, 1996.
2. Goksoyr, A. and Husoy, A. M.: Immunochemical approaches to studies of CYP1A localization and induction by xenobiotics in fish. *EXS*, **86**, 165-202, 1998.
3. Goldfarb, P., Livingstone, D. and Birmelin, C. : Biomonitoring in the aquatic environment: use of molecular biomarkers. *Biochemical Society Transactions*, **26**, 690-694, 1998.
4. Bayne, B. L., D. A., B., Burns, K., Dixon, D. R., Ivanovici, A., Livingstone, D. A., Lowe, D. M., Moore, M. N., Stebbing, A. R. D. and Widdings, J. : The effects of stress and pollution on marine animals. New York, USA: Praeger, 1985.
5. Fernando, G. and Antonio, P. : Biomarker as biological indicators of xenobiotic exposure. *Journal of Applied Toxicology*, **21**, 245-255, 2001.
6. Martin-Diaz, M. L., Sales, D. and Del Valls Casillas, T. A. : Influence of salinity in hemolymph vitellogenin of the shore crab *Carcinus maenas*, to be used as a biomarker of contamination. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **73**, 870-877, 2004.
7. Koponen, K., Huuskonen, S., Ritola, O., Venalainen, R., Tarhanen, J. and Lindstrom-Seppa, P. : Muscle chemical content and hepatic biotransformation in bream (*Abramis brama*) and asp (*Aspius aspius*) in a PCB-contaminated lake. *Boreal Environment Research*, **8**, 203-213, 2003.
8. Machala, M., Dusek, L., Hilscherova, K., Kubinova, R., Jurajda, P., Neca, J., Ulrich, R., Gelnar, M., Studnickova, Z. and Holoubek, I. : Determination and multivariate statistical analysis of biochemical responses to environmental contaminants in feral freshwater fish *Leuciscus cephalus* L. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **20**, 1141-1148, 2001.
9. Melancon, M. J., Yeo, S. E. and Lech, J. J. : Induction of hepatic microsomal monooxygenase activity in fish by exposure to river water. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **6**, 127-135, 1987.
10. Monod, G., Devaux, A. and Riviere, J. L. : Effects of chemical pollution on the activities of hepatic xenobiotic metabolizing enzymes in fish from the River Rhone. *Science of the Total Environment*, **73**, 189-201, 1988.
11. Vindimian, E. and Garric, J. : Freshwater fish cytochrome P450-dependent enzymatic activities: a chemical pollution indicator. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **18**, 277-285, 1989.
12. Vindimian, E., Namour, P., Migeon, B. and Garric, J. : In situ pollution induced cytochrome P450 activity of freshwater fish: barbel (*Barbus barbus*), chub (*Leuciscus cephalus*) and nase (*Chondrostoma nasus*). *Aquatic Toxicology*, **21**, 255-266, 1991.
13. Forlin, L., Balk, L., Celander, M., Bergek, S., Hjelt, M., Rappe, C., de Wit, C. and Jansson, B. : Biotransformation enzyme activities and PCDD/PCDF levels in pike caught in a Swedish Lake. *Marine Environmental Research*, **34**, 169-173, 1992.
14. Hodson, P. V., McWhirter, M., Ralph, K., Gray, B.,

- Thivierge, D., Carey, J. H., Van Der Kraak, G., Whittle, D. M. and Levesque, M.-C. : Effects of bleached kraft mill effluent on fish in the St. Maurice River, Quebec. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **11**, 1635-1651, 1992.
15. Vigano, L., Arillo, A., Melodia, F., Arlati, P. and Monti, C. : Biomarker responses in cyprinids of the middle stretch of the River Po, Italy. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **17**, 404-411, 1998.
 16. Haasch, M. L., Prince, R., Wejksnora, P. J., Cooper, K. R. and Lech, J. J. : Caged and wild fish: induction of hepatic cytochrome P-450 as an environmental biomonitor. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **12**, 885-895, 1993.
 17. Goksoyr, A., Husoy, A. M., Larsen, H. E., Klungsoyr, J., Wilhelmsen, S., Maage, A., Brevik, E. M., Andersson, T., Celander, M., Pesonen, M. and Forlin, L. : Environmental contaminants and biochemical responses in flatfish from the Hvaler Archipelago in Norway. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **21**, 486-496, 1991.
 18. Lindstrom-Sepp, P., Huuskonen, S., Pesonen, M., Muona, P. and Haninen, O. : Unbleached pulp mill effluents affect cytochrome P450 monooxygenase enzyme activities. *Marine Environmental Research*, **34**, 157-161, 1992.
 19. Munkittrick, K. R., Van Der Kraak, G. J., McMaster, M. E. and Portt, C. B. : Response of hepatic MFO activity and plasma sex steroids to secondary treatment of bleached kraft pulp mill effluent and mill shutdown. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **11**, 1427-1439, 1992.
 20. Klopper-Sams, P. J., Swanson, S. M., Marchant, T., Schryer, R. and Owens, J. W. : Exposure of fish to biologically treated bleached kraft effluent. I: Biochemical, physiological, and pathological assessment of Rocky Mountain whitefish (*Prosopium williamsoni*) and longnose suckers (*Catostomus catostomus*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, **13**, 1469-1482, 1994.
 21. Ahokas, J. T., Holdway, D. A., Brennan, S. E., Goudey, R. W. and Bibrowski, H. B. : MFO activity in carp (*Cyprinus carpio*) exposed to treated pulp and paper mill effluent in Lake Coleman, Victoria, Australia, in relation to AOX, EOX and muscle PCDD/PCDF. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **13**, 41-50, 1994.
 22. Lindstrom-Seppa, P. and Oikari, A. : Biotransformation activities of feral fish in waters receiving bleached pulp mill effluents. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **9**, 1415-1424, 1990.
 23. Curtis, L. R., Carpenter, H. M., Donohoe, R. M., Williams, D. E., Hedstrom, O. R., Deinzer, M. L., Beilstein, M. A., Foster, E. and Gates, R. : Sensitivity of cytochrome P450-1A1 induction in fish as a biomarker for distribution of TCDD and TCDF in the Willamette River, Oregon. *Environmental Science & Technology*, **27**, 2149-2157, 1993.
 24. Van der Oost, R., Heida, H., Opperhuizen, A. and Vermeulen, N. P. : Interrelationships between bioaccumulation of organic trace pollutants (PCBs, organochlorine pesticides and PAHs), and MFO-induction in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology. C*, **100**, 43-47, 1991.
 25. Kantonemi, A., Vahakangas, K. and Oikari, A. : The Capacity of Liver Microsomes to Form Benzo[a]Pyrene-Diolepoxide-DNA Adducts and Induction of Cytochrome P450 1A in Feral Fish Exposed to Pulp Mill Effluents. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **35**, 136-141, 1996.
 26. Adams, S. M., Crumby, W. D., Greeley, M. S., Jr., Shugart, L. R. and Saylor, C. F. : Responses of fish populations and communities to pulp mill effluents: a holistic assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **24**, 347-360, 1992.
 27. Sanchez, W., Katsiadaki, I., Piccini, B., Ditche, J. M. and Porcher, J. M. : Biomarker responses in wild three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a useful tool for freshwater biomonitoring: a multiparametric approach. *Environment International*, **34**, 490-498, 2008.
 28. Slooff, W., Van Kreijl, C. F. and Baars, A. J. : Relative liver weights and xenobiotic-metabolizing enzymes of fish from polluted surface waters in the Netherlands. *Aquatic Toxicology*, **4**, 1-14, 1983.
 29. Arcand-Hoy, L. D. and Metcalfe, C. D. : Biomarkers of exposure of brown bullheads (*Ameiurus nebulosus*) to contaminants in the lower Great Lakes, North America. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **18**, 740-749, 1999.
 30. Flammarion, P. and Garric, J. : Cyprinids EROD activities in low contaminated rivers: A relevant statistical approach to estimate reference levels for EROD biomarker? *Chemosphere*, **35**, 2375-2388, 1997.
 31. Kosmala, A., Migeon, B., Flammarion, P. and Garric, J. : Impact assessment of a wastewater treatment plant effluent using the fish biomarker ethoxyresorufin-O-deethylase: Field and on-site experiments. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **41**, 19-28, 1998.
 32. Huuskonen, S. and Lindstro-Sepp, P. : Hepatic cytochrome P4501A and other biotransformation activities in perch (*Perca fluviatilis*): the effects of unbleached pulp mill effluents. *Aquatic Toxicology*, **31**, 27-41, 1995.
 33. Karels, A. E., Soimasuo, M., Lappivaara, J., Leppanen, H., Aaltonen, T., Mellanen, P. and Oikari, A. O. J. : Effects of ECF-bleached kraft mill effluent on reproductive steroids and liver MFO activity in populations of perch and roach. *Ecotoxicology*, **7**, 123-132, 1998.
 34. Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. : Free radicals in biology and medicine. Oxford: Oxford University Press, 1999.
 35. Mc Cord, J. M. and Fridovich, I. : Superoxide dis-

- mutase: an enzymatic function for erythrocyte (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, **244**, 6049-6055, 1969.
36. Kostromskaia, V. A. : Changes in the intensity of oxidative phosphorylation and catalase activity following irradiation of different types of invertebrates. *Radiobiologia*, **12**, 437-440, 1972.
 37. Radi, A. A. and Matkovic, B. : Effects of metal ions on the antioxidant enzyme activities, protein contents and lipid peroxidation of carp tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology. C*, **90**, 69-72, 1988.
 38. Winston, G. W. and Di Giulio, R. T. : Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology*, **19**, 137-161, 1991.
 39. Valko, M., Morris, H. and Cronin, M. T. : Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*, **12**, 1161-1208, 2005.
 40. Ding, F., Song, W. H., Guo, J., Gao, M. L. and Hu, W. X. : Oxidative stress and structure-activity relationship in the zebrafish (*Danio rerio*) under exposure to paclobutrazol. *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes*, **44**, 44-50, 2009.
 41. Zhang, X., Yang, F., Zhang, X., Xu, Y., Liao, T., Song, S. and Wang, J. : Induction of hepatic enzymes and oxidative stress in Chinese rare minnow (*Gobio-cypris rarus*) exposed to waterborne hexabromocyclododecane (HBCDD). *Aquatic Toxicology*, **86**, 4-11, 2008.
 42. Sun, Y., Yin, Y., Zhang, J., Yu, H., Wang, X., Wu, J. and Xue, Y. : Hydroxyl radical generation and oxidative stress in *Carassius auratus* liver, exposed to pyrene. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **71**, 446-453, 2008.
 43. Prieto, A. I., Jos, A., Pichardo, S., Moreno, I. and Camean, A. M. : Protective role of vitamin E on the microcystin-induced oxidative stress in tilapia fish (*Oreochromis niloticus*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, **27**, 1152-1159, 2008.
 44. Orun, I., Talas, Z. S., Ozdemir, I., Alkan, A. and Erdogan, K. : Antioxidative role of selenium on some tissues of (Cd²⁺, Cr³⁺)-induced rainbow trout. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **71**, 71-75, 2008.
 45. Sturve, J., Almroth, B. C. and Förlin, L. : Oxidative stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to sewage treatment plant effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **70**, 446-452, 2008.
 46. Almroth, B. C., Albertsson, E., Sturve, J. and Förlin, L. : Oxidative stress, evident in antioxidant defences and damage products, in rainbow trout caged outside a sewage treatment plant. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **70**, 370-378, 2008.
 47. Roberts Jr, M. H., Sved, D. W. and Felton, S. P. : Temporal changes in AHH and SOD activities in feral spot from the Elizabeth River, a polluted sub-estuary. *Marine Environmental Research*, **23**, 89-101, 1987.
 48. Pang, Q.-F., Ji, Y., Bermúdez-Humarán, L. G., Zhou, Q.-M., Hu, G. and Zeng, Y. : Protective effects of a heme oxygenase-1-secreting *Lactococcus lactis* on mucosal injury induced by hemorrhagic shock in rats. *Journal of Surgical Research*, **153**, 39-45, 2009.
 49. Oris, J. T. and Giesy, J. P. : The photoenhanced toxicity of anthracene to juvenile sunfish (*Lepomis* spp.). *Aquatic Toxicology*, **6**, 133-146, 1985.
 50. Calfee, R. D., Little, E. E., Cleveland, L. and Barron, M. G. : Photoenhanced toxicity of a weathered oil on *Ceriodaphnia dubia* reproduction. *Environmental Science and Technology*, **6**, 207-212, 1999.
 51. Kang, H. J., Choi, K., Kim, M. and Kim, P. : Endocrine disruption induced by some sulfa drugs and tetracyclines on *oryzias latipes*. *Journal of Environmental Health Sciences*, **32**, 227-234, 2006.
 52. Kim, E. J. : Study on anti-estrogenic activity of DEHP as an endocrine disruption chemical. *Journal of Environmental Health Sciences*, **29**, 7-15, 2003.
 53. Koo, J., Ryu, J., Chung, K., Lee, C., Park, E.-R. and Park, K. : Studies on the endocrine disruption in wildlife fish. *Korean Journal of Environmental Toxicology*, **4**, 197-204, 2001.
 54. Van Bohemen, C. G., Lambert, J. G. D., Goos, H. J. T. and Van Oordt, P. G. W. J. : Estrone and estradiol participation during exogenous vitellogenesis in the female rainbow trout *Salmo gairdneri*. *General Comparative Endocrinology*, **46**, 81-92, 1982.
 55. Olsson, P. E., Kling, P., Petterson, C. and Silversand, C. : Interaction of cadmium and oestradiol-17 beta on metallothionein and vitellogenin synthesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *The Biochemical Journal*, **307**, 197-203, 1995.
 56. Li, C. R., Lee, S. H., Kim, S. S., Kim, A., Lee, K. W., Lu, M., Kim, H. E., Kwak, I. J., Lee, Y. J., Kim, D. K., Lee, J. S., Kang, S. W., Huh, M. D., Chung, K. H. and Park, J. S. : Environmental estrogenic effects and gonadal development in wild goldfish (*Carassius auratus*). *Environmental Monitoring and Assessment*, **150**, 397-404, 2008.
 57. Gye, M. C. and Han, M. S. : Vitellogenesis in vertebrates and environmental estrogen. *Korean Journal of Environmental Biology*, **18**, 291-298, 2000.
 58. Shugart, L. R. : DNA damage as a biomarker of Exposure. *Ecotoxicology*, **9**, 329-340, 2000.
 59. El Adlouni, C., Tremblay, J., Walsh, P., Lagueux, J., Bureau, J., Laliberte, D., Keith, G., Nadeau, D. and Poirier, G. G. : Comparative study of DNA adducts levels in white sucker fish (*Catostamus commersoni*) from the basin of the St. Lawrence River (Canada). *Molecular and Cellular Biochemistry*, **148**, 133-138, 1995.
 60. Kurelec, B., Garg, A., Krca, S., Chacko, M. and Gupta, R. C. : Natural environment surpasses polluted environment in inducing DNA damage in fish. *Carcinogenesis*, **10**, 1337-1339, 1989.
 61. Van der Oost, R., Van schooten, F. J., Ariese, F., Heida, H., Satumalay, K. and Vermeulen, N. P. E. : Bioaccumulation, biotransformation and DNA-bind-

- ing of PAHs in feral eel (*Anguilla-Anguilla*) exposed to polluted sediments - a field survey. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **13**, 859-870, 1994.
62. Van der Oost, R., Van Gestel, L., Worst, D., Hanraads, M., Satumalay, K., van Schooten, F.-J., Heida, H. and Vermeulen, N. P. E. : Biochemical markers in feral roach (*Rutilus rutilus*) in relation to the bioaccumulation of organic trace pollutants. *Chemosphere*, **29**, 801-817, 1994.
 63. McFarland, V. A., Inouye, L. S., Lutz, C. H., Jarvis, A. S., Clarke, J. U. and McCant, D. D. : Biomarkers of oxidative stress and genotoxicity in livers of field-collected brown bullhead, *Ameiurus nebulosus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **37**, 236-241, 1999.
 64. Ericson, G., Liewenborg, B., Lindesjoo, E. N. C. and Balk, L. : DNA adducts in perch (*Perca fluviatilis*) from a creosote contaminated site in the River Agermanalven, Sweden. *Aquatic Toxicology*, **45**, 181-193, 1999.
 65. Templeton, D. M. and Cherian, M. G. : Toxicological significance of metallothionein. *Methods in Enzymology*, **205**, 11-24, 1991.
 66. Laurie, A. D. : Quantitation of metallothionein mRNA from the New Zealand common bully (*Gobiomorphus cotidianus*) and its implications for biomonitoring. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, **38**, 869-877, 2004.
 67. Van Campenhout, K., Bervoets, L. and Blust, R. : Metallothionein concentrations in natural populations of gudgeon (*Gobio gobio*): Relationship with metal concentrations in tissues and environment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **22**, 1548-1555, 2003.
 68. Quiros, L., Pina, B., Solee, M., Blasco, J., Lopez, M. A., Riva, M. C., Barcelo, D. and Raldua, D. : Environmental monitoring by gene expression biomarkers in *Barbus graellsii*: Laboratory and field studies. *Chemosphere*, **67**, 1144-1154, 2007.
 69. Linde-Arias, A. R., Inacio, A. F., Novo, L. A., de Albuquerque, C. and Moreira, J. C. : Multibiomarker approach in fish to assess the impact of pollution in a large Brazilian river, Paraiba do Sul. *Environmental Pollution*, **156**, 974-979, 2008.
 70. Brammell, B. F., Price, D. J., Birge, W. J. and Elskus, A. A. : Apparent lack of CYP1A response to high PCB body burdens in fish from a chronically contaminated PCB site. *Marine Environmental Research*, **58**, 251-255, 2004.
 71. Yuan, Z. P., Wirgin, M., Courtenay, S., Ikonoumou, M. and Wirgin, I. : Is hepatic cytochrome P4501A1 expression predictive of hepatic burdens of dioxins, furans, and PCBs in Atlantic tomcod from the Hudson River estuary? *Aquatic Toxicology*, **54**, 217-230, 2001.
 72. Lockhart, W. L. and Metner, D. A. : Applications of hepatic mixed function oxidase enzyme activities to Northern freshwater fish: I. Burbot, *Lota lota*. *Marine Environmental Research*, **34**, 175-180, 1992.
 73. Masfaraud, J. F., Monod, G. and Devaux, A. : Use of the fish cytochrome P-450-dependent 7-ethylresorufin O-deethylase activity as a biochemical indicator of water pollution. Study of the liver and the kidney of male and female nase (*Chondrostoma nasus*) from the River Rhone. *Science of the Total Environment*, **97-98**, 729-738, 1990.
 74. Kloepersams, P. and Swanson, S. : Bioindicator field monitoring: use of fish biochemical parameters at a modern bleached kraft pulp-mill site. *Marine Environmental Research*, **34**, 163-168, 1992.
 75. Kloepfer-Sams, P. J. and Benton, E. : Exposure of fish to biologically treated bleached kraft effluent. 2: Induction of hepatic cytochrome P4501A in mountain whitefish (*Prosopium williamsoni*) and other species. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **13**, 1483-1496, 1994.
 76. Payne, J. F. and Penrose, W. R. : Induction of aryl hydrocarbon (benzo[a]pyrene) hydroxylase in fish by petroleum. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **14**, 112-116, 1975.
 77. Vindimian, E., Namour, P., Munoz, J.-F. i., Gril, J.-J., Migeon, B. and Garric, J. : Ethoxyresorufin-o-deethylase induction in fish from a watershed exposed to a non-point source pollution of agricultural origin. *Water Research*, **27**, 449-455, 1993.
 78. Collier, T. K., Anulacion, B. F., Stein, J. E., Goksoyr, A. and Varanasi, U. : A field-evaluation of cytochrome-P4501a as a biomarker of contaminant exposure in 3 species of flatfish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **14**, 143-152, 1995.
 79. Krca, S., Zaja, R., Calic, V., Terzic, S., Grubescic, M. S., Ahel, M. and Smital, T. : Hepatic biomarker responses to organic contaminants in feral chub (*leuciscus cephalus*)-laboratory characterization and field study in the Sava River, Croatia. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **26**, 2620-2633, 2007.
 80. Payne, J. F., Mathieu, A., Melvin, W. and Fancey, L. L. : Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. *Marine Pollution Bulletin*, **32**, 225-231, 1996.
 81. Gallagher, E. P. and Di Giulio, R. T. : Effects of complex waste mixtures on hepatic monooxygenase activities in brown bullheads (*Ictalurus nebulosus*). *Environmental Pollution*, **62**, 113-128, 1989.
 82. Schmitt, C. J., Hinck, J. E., Blazer, V. S., Denslow, N. D., Dethloff, G. M., Bartish, T. M., Coyle, J. J. and Tillitt, D. E. : Environmental contaminants and biomarker responses in fish from the Rio Grande and its US tributaries: Spatial and temporal trends. *Science of the Total Environment*, **350**, 161-193, 2005.
 83. Otto, D. M. and Moon, T. W. : Phase I and II enzymes and antioxidant responses in different tissues of brown bullheads from relatively polluted and non-polluted systems. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **31**, 141-147, 1996.

84. Van der Oost, R., Goksoyr, A., Celander, M., Heida, H. and Vermeulen, N. P. E. : Biomonitoring of aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*) II. Biomarkers: pollution-induced biochemical responses. *Aquatic Toxicology*, **36**, 189-222, 1996.
85. Jedamskigrymlas, J., Kammann, U., Tempelmann, A., Karbe, L. and Siebers, D. : Biochemical responses and environmental contaminants in breams (*Abramis brama* L.) caught in the river elbe. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **31**, 49-56, 1995.
86. Tuvikene, A., Huuskonen, S., Koponen, K., Ritola, O., Mauer, U. and Lindström-Seppä, P. : Oil shale processing as a source of aquatic pollution: monitoring of the biologic effects in caged and feral freshwater fish. *Environmental Health Perspectives*, **10**, 745-752, 1999.
87. Flammarion, P. and Garric, J. : A statistical approach for classifying the extent of EROD induction of fish sampled in clean and contaminated waters. *Water Research*, **33**, 2683-2689, 1999.
88. Bucher, F., Hofer, R. and Salvenmoser, W. : Effects of treated paper mill effluents on hepatic morphology in male bullhead (*Cottus gobio* L.) *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **23**, 410-419, 1992.
89. Sanchez, W., Ait-Aissa, S., Palluel, O., Ditché, J. M. and Porcher, J. M. : Preliminary investigation of multi-biomarker responses in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) sampled in contaminated streams. *Ecotoxicology*, **16**, 279-287, 2007.
90. Bucher, F., Hofer, R., Krumschnabel, G. and Doblender, C. : Disturbances in the prooxidant - antioxidant balance in the liver of bullhead (*Cottus gobio* L.) exposed to treated paper mill effluents. *Chemosphere*, **27**, 1329-1338, 1993.
91. Lenartova, V., Holovska, K., Pedrajas, J. R., Lara, E. M., Peinado, J., Barea, J. L., Rosival, I. and Kosuth, P. : Antioxidant and detoxifying fish enzymes as biomarkers of river pollution. *Biomarkers*, **2**, 247-252, 1997.
92. Burki, R., Vermeirssen, E. L. M., Korner, O., Joris, C., Burkhardt-Holm, P. and Segner, H. : Assessment of estrogenic exposure in brown trout (*Salmo trutta*) in a Swiss midland river: Integrated analysis of passive samplers, wild and caged fish, and vitellogenin mRNA and protein. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **25**, 2077-2086, 2006.
93. Kidd, K. A., Blanchfield, P. J., Mills, K. H., Palace, V. P., Evans, R. E., Lazorchak, J. M. and Flick, R. W. : Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 8897-8901, 2007.
94. Flammarion, P., Brion, F., Babut, M., Garric, J., Migeon, B., Noury, P., Thybaud, E., Tyler, C. R., Palazzi, X. and Tyler, C. R. : Induction of fish vitellogenin and alterations in testicular structure: Preliminary results of estrogenic effects in chub (*Leuciscus cephalus*). *Ecotoxicology*, **9**, 127-135, 2000.
95. Linde-Arias, A. R., Inacio, A. F., de Alburquerque, C., Freire, M. M. and Moreira, J. C. : Biomarkers in an invasive fish species, *Oreochromis niloticus*, to assess the effects of pollution in a highly degraded Brazilian River. *Science of the Total Environment*, **399**, 186-192, 2008.
96. Ferrando, S., Maisano, M., Parrino, V., Ferrando, T., Giosi, L. and Tagliafierro, G. : Gut morphology and metallothionein immunoreactivity in *Liza aurata* from different heavy metal polluted environments. *Italian Journal of Zoology*, **73**, 7-14, 2006.