

TBT 노출에 따른 넙치, *Paralichthys olivaceus*의 혈액학적 성상 및 혈장성분의 변화

김신후 · 황인기 · 강주찬 · 김준환[†]

부경대학교 수산생명의학과

Changes of hematological parameters and plasma constituents in the olive flounder *Paralichthys olivaceus* exposed to TBT

Shin-Hu Kim, In-Ki Hwang, Ju-Chan Kang and Jun-Hwan Kim[†]

Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University, Busan 608-737, Republic of Korea

Juvenile *Paralichthys olivaceus* (mean length 17.3 ± 2.2 cm, mean weight 46.5 ± 6.3 g) were exposed for 10 days to tributyltin (TBT) at various concentrations (0, 1, 2, 4 and 8 $\mu\text{g/L}$). Hematological parameters, such as red blood cell (RBC) count, hematocrit (Ht), and hemoglobin (Hb) concentration, were considerably decreased by high TBT concentrations. In plasma constituents, inorganic components such calcium and magnesium were also significantly altered. Plasma calcium was notably decreased, whereas plasma magnesium was increased. The enzyme components, glutamic oxalate transaminase (GOT) and glutamic pyruvate transaminase (GPT), were significantly decreased by TBT exposure. The present findings suggest that TBT exposure can cause significant alterations in hematological parameters and plasma constituents of flatfish *Paralichthys olivaceus*.

Key words: *Paralichthys olivaceus*, TBT, Hematological parameters, Plasma constituents

내분비계 장애물질은 생물체 내의 내분비 호르몬과 비슷하게 작용하여, 생물체의 내분비계에 영향을 미쳐, 다음 세대의 성장 및 생식이상 등을 초래한다. 내분비계 장애물질인 tributyltin (TBT)은 종이, 가죽, 전자장비의 보존제 등으로 널리 사용되고 있으며, 특히 큰 선박의 선체의 밑바닥과 해양구조물 등에 해적생물이 부착하는 것을 막기 위한 페인트의 주요 성분이다. TBT는 강력한 내분비 교란물질 중 하나로, 해양환경에서 소라, 고둥 등 복족류에서 암컷의 수컷화 (임포섹스)를 일으켜,

개체수 감소 등 생태계를 파괴할 수 있다. 많은 나라에서는 TBT를 생태계 교란 물질로 분류하여, 사용을 금지하고 있지만 (Horiguchi et al., 1994), 여전히 TBT는 위해 수준으로 여러 해역에 잔류하고 있다 (Horiguchi et al., 1998). 해역에 잔류하는 TBT와 같은 유기주석화합물질은 광분해와 생물학적 분해과정을 거쳐, 부유물질이나 퇴적물 등으로 생물 체내에 흡착되거나 축적되어 생물체의 생리대사에 영향을 미치는데, 부착생물뿐만 아니라, 확산을 통해 어류 등 해양의 비표적생물에게도 독성 영향을 미치게 된다 (Reader and Pelletier, 1992).

TBT에 의한 독성의 영향으로 암컷 dog-whelk, *Nucella lapillus*의 성전환에 관한 보고를 비롯하여,

[†]Corresponding author: Jun-Hwan Kim
Tel: +82-51-629-5944, Fax: +82-51-629-5938
E-mail: junhwan1982@hanmail.net

생물의 생식과 기능적인 측면에서 활발하게 연구되어 왔다 (Santos et al., 2002). 어류의 생화학적 변화로 cytochrome P450을 억제함으로써, 독성물질의 해독능력 저하와 ATP 합성저해로 인한 생체 에너지 대사 억제 등을 유발한다 (Fent and Stegeman, 1991).

어류의 혈액학적 성상은 독성물질의 영향을 분석하기 위한 독성학적 환경연구에서 생리·병리적 영향을 가능하는 주요한 지표로 이용된다 (Adhikari et al., 2004). 혈액 적혈구 수, 헤모글로빈, 적혈구용적 등과 같은 혈액학적 수치는 오염된 환경에 대한 생리학적 반응을 확인하는 지표로 사용된다 (Dethloff et al., 2001). 그리고, 어류의 혈청성분 역시 유해물질의 노출에 의한 대사 장애의 수준을 판단할 수 있는 주요한 지표로 사용된다.

본 실험에 사용된 넙치는 우리나라 주요 양식 어종 중 하나로, 높은 양식 생산량을 기록하고 있다. 하지만, TBT에 노출된 넙치의 독성학적 연구는 다양하게 이루어지지 않았다. 따라서, 본 실험에서는 TBT에 노출된 넙치의 혈장성분 분석을 실시하여, TBT 독성이 실험어에 미치는 영향을 판단하는 지표를 마련하고자 한다.

재료 및 방법

실험어 및 실험환경

본 실험에 사용한 실험어는 기장 동백리에서 분양 받은 넙치, *Paralichthys olivaceus*로 2주간 순치시킨 후 전장 17.3±2.2 cm, 체중 46.5±6.3 g의 외관상 건강한 개체를 사용하였다. 선별된 개체는 500×280×310 mm의 유리 수조 내 해수 20 L를 채워 입식 하였고, 이틀에 한 번 환수해 주었다.

Tributyltin Chloride(TBTCl)의 노출을 위해 acetone을 용매로 하여 TBTCl을 용해시킨 후 사육수조에 혼합하여 노출농도가 1, 2, 4, 8 µg/L가 되도록 설정하였다.

노출은 5일, 10일 동안 실시 하였다.

전혈을 사용한 혈액분석

실험어는 혈액응고를 방지하기 위해 heparin-Na (5,000 I.U., 중외제약)을 처리한 1회용 주사기를 사

용하여 미부정맥에서 채취하였다. 채취한 혈액으로 RBC(red blood cell) count, hemoglobin (Hb) 농도 및 hematocrit (Ht)을 즉시 분석하였다. RBC count는 diluting soluton으로 혈액을 400배 희석 후, hemocytometer (Improved Neubauer, Germany)를 이용하여 광학현미경으로 계수 후 다시 희석 배수를 곱하여 계산하였다. Ht는 Ht 모세관 내로 혈액을 넣어, microhematocrit centrifuge(Model; 01501, HAWKSLEY AND SONS Ltd., England)에서 12,000 rpm, 5분간 원심분리 후 판독관 (Micro-Haematocrit reader, HAWKSLEY AND SONS Ltd., England)으로 측정하였다. Hb 농도는 임상용 kit (Asan Pharm. Co., Ltd.)를 이용하여 Cyan-methemoglobin법으로 측정하였다.

혈장을 사용한 혈액분석

채취한 혈액은 4°C, 3000g로 5분간 원심분리하여 혈장을 분리하였다. 분리한 혈장으로 무기성분, 유기성분, 효소활성의 변화를 보았다.

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

유기성분으로는 혈당 (glucose), 총단백질 (total protein)을 측정하였다. 혈당은 GOD/POD법, 총단백질은 Biuret법에 의해 시판되고 있는 임상용 kit (Asan Pharm. Co., Ltd)를 이용하였다.

혈장 내 효소활성으로는 GOT (Glutamic oxalate transminase), GPT (Glutamic pyruvate transminase)를 측정하였다. GOT와 GPT는 Reitman-Frankel법에 의하여 시판되고 있는 임상용 kit (Asan Pharm. Co., Ltd)를 이용하였다.

통계분석 방법

본 실험에서 모든 실험은 triplicate로 실시하였다. 통계학적 유의성 분석은 SPSS/PC+ statistical package (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) 프로그램을 이용해 ANOVA test를 실시하여 Duncan's multiple range test를 통해 $P < 0.05$ 일 때 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결 과

혈액성상분석

TBT에 노출된 넙치의 혈액 성상 변화는 Table 1에 나타내었다. RBC count의 경우 5일차에는 4 $\mu\text{g/L}$, 8 $\mu\text{g/L}$ 농도 구간에서 유의적인 감소가 나타났으며, 10일차에서는 1 $\mu\text{g/L}$ 농도 구간 이상에서 모두 유의적인 감소가 나타났다. Hematocrit의 경우 5, 10일차 모두 4 $\mu\text{g/L}$, 8 $\mu\text{g/L}$ 농도 구간에서 유의적인 감소가 나타났다. Hemoglobin은 5일차에서는 8 $\mu\text{g/L}$ 농도 구간에서만 유의적 감소가 나타났고, 10일차에서는 4 $\mu\text{g/L}$, 8 $\mu\text{g/L}$ 농도 구간에서 유의적인 감소가 나타났다.

혈장 성분 분석

혈장 성분 변화 중 무기성분 변화는 Table 2에 나타내었다. 칼슘은 5일차에는 8 $\mu\text{g/L}$ 농도 구간에

서만 유의적인 감소가 나타났고, 10일차에서는 2 $\mu\text{g/L}$ 농도구간 이상에서 모두 유의적인 감소가 나타났다. 마그네슘은 5, 10일차 모두 4 $\mu\text{g/L}$, 8 $\mu\text{g/L}$ 농도구간에서 유의적인 증가가 나타났다.

혈장 내 유기성분 변화 중 glucose, total-protein의 변화는 Table 3에 나타내었다. Glucose의 경우에는 5일차에서는 8 $\mu\text{g/L}$ 농도구간에서만 유의적 증가가 나타났고, 10일차는 2 $\mu\text{g/L}$ 이상 모두에서 유의적인 증가가 나타났다. Total-protein은 유의적 변화가 나타나지 않았다.

혈장 내 효소성분 변화는 Table 4에 나타내었다. GOT의 경우 5, 10일차 모두에서 4 $\mu\text{g/L}$, 8 $\mu\text{g/L}$ 농도구간에서 유의적인 감소가 나타났다. GPT의 경우 5일차에서는 8 $\mu\text{g/L}$ 농도구간에서만 유의적 감소가 나타났고, 10일차에서는 4 $\mu\text{g/L}$, 8 $\mu\text{g/L}$ 농도구간에서 유의적 감소가 나타났다.

Table. 1 Changes of RBC count, hematocrit and hemoglobin in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* exposed to TBT for 5 and 10 days

Parameters	Period (days)	TBT concentration ($\mu\text{g/L}$)				
		0	1	2	4	8
RBC count ($\times 10^4 \text{mm}^3$)	5	324.0 \pm 17.1 ^a	345.3 \pm 19.2 ^a	331.0 \pm 18.3 ^a	291.3 \pm 13.3 ^b	264.4 \pm 17.6 ^c
	10	315.6 \pm 19.3 ^a	270.7 \pm 18.1 ^b	228.4 \pm 22.1 ^c	223.5 \pm 21.9 ^c	222.6 \pm 14.6 ^c
Hematocrit (%)	5	25.45 \pm 1.61 ^a	24.27 \pm 1.85 ^a	23.21 \pm 1.83 ^a	20.62 \pm 1.12 ^b	21.31 \pm 1.09 ^b
	10	23.66 \pm 1.33 ^a	23.25 \pm 1.25 ^a	21.13 \pm 1.42 ^{ab}	19.66 \pm 0.96 ^b	16.41 \pm 1.31 ^c
Hemoglobin (g/dL)	5	4.88 \pm 0.48 ^a	4.67 \pm 0.43 ^a	4.42 \pm 0.43 ^a	4.02 \pm 0.54 ^{ab}	3.87 \pm 0.32 ^b
	10	4.96 \pm 0.34 ^a	4.81 \pm 0.62 ^a	4.12 \pm 0.81 ^{ab}	3.61 \pm 0.53 ^b	3.21 \pm 0.43 ^b

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

Table. 2 Changes of serum calcium and magnesium in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* exposed to TBT for 5 and 10 days

Parameters	Period (days)	TBT concentration ($\mu\text{g/L}$)				
		0	1	2	4	8
Calcium (mg/dL)	5	8.64 \pm 1.26 ^a	7.92 \pm 1.66 ^a	7.85 \pm 1.58 ^{ab}	7.36 \pm 2.19 ^{ab}	6.99 \pm 1.63 ^b
	10	8.74 \pm 1.95 ^{ab}	8.38 \pm 0.51 ^{ab}	7.67 \pm 1.12 ^b	6.86 \pm 1.18 ^c	6.65 \pm 1.21 ^c
Magnesium (mg/dL)	5	3.73 \pm 0.34 ^a	3.61 \pm 0.26 ^a	3.58 \pm 0.18 ^a	4.09 \pm 0.27 ^b	4.07 \pm 0.32 ^b
	10	3.54 \pm 0.13 ^a	3.85 \pm 0.15 ^a	3.33 \pm 0.27 ^a	4.23 \pm 0.16 ^b	3.91 \pm 0.25 ^b

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

Table. 3 Changes of serum glucose and total protein in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* exposed to TBT for 5 and 10 days

Parameters	Period (days)	TBT concentration ($\mu\text{g/L}$)				
		0	1	2	4	8
Glucose (mg/dL)	5	45.81 \pm 5.73 ^a	47.28 \pm 3.92 ^a	51.32 \pm 4.31 ^{ab}	54.82 \pm 5.03 ^{ab}	60.13 \pm 5.78 ^b
	10	47.98 \pm 8.69 ^a	49.31 \pm 4.83 ^a	56.32 \pm 5.72 ^b	58.91 \pm 3.72 ^b	57.31 \pm 4.11 ^b
Total protein (g/dL)	5	5.63 \pm 0.57 ^a	5.42 \pm 0.63 ^a	5.31 \pm 0.69 ^a	5.55 \pm 0.73 ^a	5.43 \pm 0.59 ^a
	10	5.63 \pm 0.73 ^a	5.41 \pm 0.96 ^a	5.63 \pm 0.64 ^a	5.75 \pm 0.72 ^a	5.48 \pm 0.66 ^a

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

Table. 4 Changes of serum GOT and GPT in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* exposed to TBT for 5 and 10 days

Parameters	Period (days)	TBT concentration ($\mu\text{g/L}$)				
		0	1	2	4	8
GOT (karmen unit)	5	22.5 \pm 4.19 ^a	19.13 \pm 2.32 ^{ab}	18.37 \pm 4.58 ^{ab}	16.52 \pm 4.38 ^b	15.28 \pm 2.44 ^b
	10	20.86 \pm 2.13 ^a	18.37 \pm 2.66 ^{ab}	18.21 \pm 4.11 ^{ab}	15.47 \pm 4.99 ^b	13.23 \pm 2.62 ^c
GPT (karmen unit)	5	16.54 \pm 2.04 ^a	16.23 \pm 1.21 ^a	15.37 \pm 0.69 ^a	13.82 \pm 0.86 ^{ab}	12.11 \pm 0.92 ^b
	10	15.51 \pm 1.97 ^a	16.55 \pm 2.29 ^a	15.14 \pm 1.32 ^a	12.28 \pm 0.74 ^b	10.36 \pm 1.21 ^b

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

고 찰

내분비계 장애물질 중 하나인 TBT는 어류에 독성물질로 작용하여, 신장 기능의 장애를 유발하여, 조혈기관을 손상시킨다 (Witters et al., 1990). 이러한 조혈기관의 손상으로 인해 혈액학적 성상이 변화되어 심각한 빈혈증을 유발한다 (Schwaiger et al., 2000). 본 실험에서, TBT에 노출된 넙치에서 적혈구 수, 헤모글로빈 및 적혈구 용적이 모두 유의적으로 감소했다. 이러한 생체의 산소 운반능력을 나타내는 적혈구 수, 헤모글로빈, 적혈구 용적의 감소는 TBT에 의한 산소 운반능력의 감소에 의해 빈혈이 발생되었다고 보여진다. Mitra et al. (2014)는 TBT에 노출된 Wistar rats에서 적혈구 수, 헤모글로빈, 그리고 적혈구 용적의 감소를 보고했으며, 이러한 감소는 TBT에 의해 적혈구의 체내 산소 수요공급을 불안정하게 하여, 산소 운반능력에 부정적 영향을 미친 결과로 판단된다. Rice et al. (1995)는 높은 수준의 TBT에 노출된 channel catfish, *Ictalurus punctatus*에서 감소된 적혈구 용적을

보고한 바 있다.

어류의 혈장 화학성분은 독성 화학물질의 노출에 의한 대사 장애 정도를 판단하는 주요한 지표로 사용된다. 혈장 내 무기성분인 칼슘과 마그네슘은 혈청 삼투압의 변화에 따라 증가하거나 감소한다 (Chang et al., 2001; Hur et al., 2001). 본 연구 결과, 혈장 칼슘의 농도는 TBT 노출에 의해 유의적으로 감소한 반면, 혈장 마그네슘은 유의적 증가를 나타냈다. 이러한 증감으로 TBT 독성은 어류의 삼투압 조절에 영향을 미쳤을 것으로 간주된다. 독성물질에 의한 혈장 칼슘의 감소 (Srivastav et al., 1997; Ricard et al., 1998; Pane et al., 2005)와 혈장 마그네슘의 증가 (Grosell et al., 2004; Nieves-Puigdollor et al., 2007)는 많이 보고되어 있다. 이러한 혈장 무기성분의 변화는 TBT 등의 독성물질 노출에 따른 어류에서 2가 이온의 주요 조절기관인 신장의 손상으로 인한 것으로 판단된다.

혈장 내 혈당의 경우, 스트레스를 받을 경우 탄수화물 대사의 증가에 따라 상승하게 된다 (Kennedy et al., 1995). 본 실험에서 넙치의 TBT 노출은 혈장

glucose 수치를 유의적으로 증가시켰다. 이는 TBT 급성노출에 따른 glycogen reserves의 방출 과정인 glycogenolysis에 의한 것으로 판단된다. Hwang et al. (2013)은 TBT 노출에 따른 돌돔 혈장 내의 glucose의 증가를 보고한 바 있다. 그 외에도 다양한 독성물질 노출에 따른 glucose의 증가가 많이 보고되어 있다 (Bleau et al., 1996; Knoph and Thorud, 1996; Al-Attar, 2005). 일반적으로 어류의 혈장의 total protein의 농도는 독성물질의 노출에 의해 장관의 흡수장애, 간체장의 손상 및 세노관의 재흡수 장애로 인해 감소되는 경향을 보인다 (Shen et al., 1997). 하지만, 본 실험에서는 TBT 노출에 따른 혈장 total protein의 유의적 변화는 관찰되지 않았다. 어류의 혈장효소 성분인 GOT와 GPT는 간, 심장 및 근육 등의 조직 손상을 판단하는 지표로 많이 사용된다. 본 실험에서 TBT 노출에 의해 넙치의 GOT와 GPT 수치 모두 유의적으로 감소되었다. 이러한 감소는 소포체와 세포막 수송 시스템과 같은 세포기관 구조의 파괴에 의한 것으로 판단되며, 이러한 혈장효소 감소는 많이 보고되어 있다 (Roy, 2002; Humtsoe et al., 2007).

이상의 결과와 논의에서 넙치의 혈액성상 및 혈장 성분은 TBT 노출에 의해 유의적 변화를 나타내었다. 따라서 TBT는 실험생물인 넙치의 혈액성상 및 혈장 성분 조성에 다양한 독성영향을 나타내었을 것이라 판단된다.

References

- Adhikari, S., Sarkar, B., Chatterjee, A., Mahapatra, C.T., and Ayyappan, S.: Effects of cypermethrin and carbofuran on certain hematological parameters and prediction of their recovery in a freshwater teleost, *Labeo rohita* (Hamilton). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 58: 220-226, 2004.
- Al-Attar, A.M.: Biochemical effects of short-term cadmium exposure on the freshwater fish, *Oreochromis niloticus*. *Journal of Biological Sciences*, 5(3): 260-265, 2005.
- Bleau, H., Daniel, C., Chevalier, G., Tra, H.V., and Hontela, A.: Effects of acute exposure to mercury chloride and methylmercury on plasma cortisol, T3, T4, glucose and liver glycogen in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 34: 221-235, 1996.
- Chang, Y.J., Hur, J.W., Lim, H.K., and Lee, J.K.: Stress in olive flounder (*Oaralichthys olivaceus*) and fat cod (*Hexagrammos otakii*) by the sudden drop and rise of water temperature. *J. Korean. Fish. Soc.*, 34: 91-97, 2001.
- Dethloff, G.M., Bailey, H.C., and Maier, K.J.: Effects of dissolved copper on select hematological, biochemical, and immunological parameters of wild rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 40: 371-380.
- Fent, K. and Stegeman, J.J.: Effects of tributyltin chloride in vitro on the hepatic microsomal mono-oxygenase system in the fish *Stenotomus chrysops*. *Aquatic Toxicology*, 20: 159-168, 1991.
- Grosell, M., McDonald, M.D., Wood, C.M., and Walsh, P.J.: Effects of prolonged copper exposure in the marine gulf toadfish (*Opsanus beta*) I. Hydromineral balance and plasma nitrogenous waste products. *Aquatic Toxicology*, 68: 249-262, 2004.
- Horiguchi, T., Hiroaki, S., Makoto, S., Sunao, Y., and Masatoshi, M.: Organotin compounds and their effects on aquatic organisms, focusing on imposex in gastropods. *Main Group Metal Chem*, 17(1-4): 81-100, 1994.
- Horiguchi, T., Cho, H.S., Shiraishi, H., Shibata, Y., Soma, M., Morita, M., and Shimizu, M.: Field studies on imposex and organotin accumulation in the rock shell, *Thais clavigera*, from the Seto Inland Sea and the Sanriku region, Japan. *Sci Total Environ*, 214: 65-70, 1998.
- Humtsoe, N., Davoodi, R., Kulkarni, B.G., and Chavan, B.: Effect of arsenic on the enzymes of the rohu carp, *Labeo rohita* (Hamilton, 1822). *The Raffles Bulletin of Zoology*, 14: 17-19, 2007.
- Hur, J.W., Chang, Y.J., Lim, H.K., and Lee, B.K.: Stress responses of cultured fishes elicited by water level reduction in rearing tank and fish transference during selection process. *J. Korean. Fish. Soc.*, 34: 465-472, 2001.
- Hwang, U.G., Kim, J.H., and Kang, J.C.: Changes of growth and hematological constituents in the rock bream *Oplegnathus fasciatus* exposed to TBT. *J. Fish Pathol.*, 26(3): 219-229, 2013.
- Kennedy, C.J., Sweeting, R.M., Farrell, A.P., and Mckeown, B.A.: Acute effects of chlorinated resin exposure on juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 14: 977-982, 1995.
- Knoph, M.B. and Thorud, K.: Toxicity of ammonia to Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in seawater –

- Effects on plasma osmolality, ion, ammonia, urea and glucose levels and hematologic parameters. *Comp. Biochem. Physiol.*, 113A: 375-381, 1996.
- Mitra, S., Gera, R., Singh, V., and Khandelwal, S.: Comparative toxicity of low dose tributyltin chloride on serum, liver, lung and kidney following sub-chronic exposure. *Food and Chemical Toxicology*, 64: 335-343, 2014.
- Nieves-Puigdoller, K., Bjornsson, B.T., and McCormick, S.D.: Effects of hexazinone and atrazine on the physiology and endocrinology of smolt development in Atlantic salmon. *Aquatic Toxicology*, 84: 27-37, 2007.
- Pane, E.F., Bucking, C., Patel, M., and Wood, C.M.: Renal function in the freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following acute and prolonged exposure to waterborne nickel. *Aquatic Toxicology*, 75: 119-133, 2005.
- Reader, S. and Pelletier, E.: Biosorption and degradation of butyltin compounds by the marine diatom *Skeletonema costatum* and the associated bacterial community at low temperature. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 48: 599-607, 1992.
- Ricard, A.C., Daniel, C., Anderson, P., and Hontela, A.: Effects of subchronic exposure to cadmium chloride on endocrine and metabolic functions in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 34: 377-381, 1998.
- Rice, C.D., Banes, M.M., and Ardelt, T.C.: Immunotoxicity in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, following acute exposure to tributyltin. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 28: 464-470, 1995.
- Roy, S.S.: Some toxicological aspects of chlorpyrifos to the intertidal fish *Boleophthalmus dussumieri*. PhD thesis, University of Mumbai, India.: pp 52-71.
- Santos, M.M., Hallers-Tjabbes, C.C.T., Santos, A.M., and Vieira, N.: ImPOSEX in *Nucella lapillus*, a bio-indicator for TBT contamination: re-survey along the Portuguese coast to monitor the effectiveness of EU regulation. *Journal of Sea Research*, 48(3): 217-223, 2002.
- Schwaiger, J., Spieser, O.H., Bauer, C., Ferling, H., Mallow, U., Kalbfus, W., and Negele, R.D.: Chronic toxicity of nonylphenol and ethinylestradiol: haematological and histopathology effects in juvenile common carp (*Cyprinus carpi*). *Aquatic Toxicology*, 51(1): 69-78, 2000.
- Shen, H., Zhang, Q., Xu, R., and Wang, G.: Effects of petroleum on the proteins of tilapia. *Mar. Environ. Sci.*, 16: 1-5, 1997.
- Shimasaki, Y., Kitano, T., Oshima, Y., Inoue, S., Imada, N., and Honjo, T.: Tributyltin causes masculinization in fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22(1): 141-144, 2003.
- Srivastav, A.K., Srivastava, S.K., and Srivastav, S.K.: Impact of deltamethrin on serum calcium and inorganic phosphate of freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 59: 841-846, 1997.
- Witters, H.E., Van Puymbroeck, S., Van Den Sande, I., and Vanderborght, O.L.J.: Haematological disturbances and osmotic shifts in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) under acid and aluminum exposure. *J Comp Physiol*, 160B: 563-571, 1990.

Manuscript Received : Jun 5, 2015

Revised : Aug 12, 2015

Accepted : Aug 17, 2015