Article

BaP 및 TBT에 노출된 넙치와 개조개의 *in vivo* Comet assay

김소정¹ · 정영재² · 이택건^{3*}

¹경북해양바이오산업연구원
(767-813) 경북 울진군 죽변면 후정리 688-3
²신경대학교 생명공학과
(445-852) 경기도 화성시 남양동 1485
³한국해양연구원 남해연구소
(656-830) 경남 거제시 장목면 장목 1길 41

In vivo Comet Assay on Flounder and Clam Exposed to BaP and TBT

So Jung Kim¹, Youngjae Chung², and Taek-Kyun Lee^{3*}

¹Gyeongbuk Institute for Marine Bio-Industry
Wooljin 767-813, Korea
²Department of Life Science and Biotechnology, Shin Gyeong University
Hwaseong 445-852, Korea
³South Sea Research Institute, KORDI
Geoje 656-830, Korea

Abstract : The comet assay, also called single-cell electrophoresis (SCGE) assay, is a potential sensitive monitoring tool for DNA damage in cells. The primary objective of this study was to use comet assay to ascertain if the blood cells of flounder (*Pleuronichthys olivaceus*) and muscle cells of clam (*Saxidomus purpurata*) are suitable for genotoxicity screening. This was achieved by initially exposing blood and muscle cells under *in vitro* conditions to the reference genotoxin hydrogen peroxide (H₂O₂); strong correlation between H₂O₂ concentration and comet values were found. Subsequently, the identification of DNA damage in isolated cells from flounder and clam was performed under *in vivo* exposure to benzo(a)pyrene (BaP) and tributyltin (TBT). Flounder and clam were exposed to different concentrations (1, 10, 50, 100 µg/L) of BaP or TBT for 4 days. Regardless of treated chemicals, blood cells of flounder were more prone to DNA breakage compared to muscle cells of clam. In conclusion, *in vivo* genotoxicity of BaP and TBT can be biomonitoring using the comet assay. This study suggests that flounder and clam do show potential as mediums for monitoring genotoxic damage by comet assay.

Key words : comet assay, BaP, TBT, flounder, clam

1. 서 론

해양은 자연적 또는 인위적인 오염물질의 최종 수용체

이기 때문에 해양으로의 산업배출수의 축적 및 지속성은 해양생물에 위협이 되고 있다(Fleeger et al. 2003). 해양으로 배출되는 오염물질은 중금속, polycyclic aromatic hydrocarbons(PAHs), 농약, 의약품, 건강관련 물질 및 산업화학물질 등 인간에 의해 만들어진 다양한 물질들을 포함

*Corresponding author. E-mail : tklee@kordi.re.kr

하고 있다(Daughton and Ternes 1999; Kummerer 2001). 생식 및 면역 기작을 교란시킬 수 있는 해양오염물질은 해양생물뿐만 아니라 그들을 섭취하는 인간에게까지 영향을 미칠 수 있어 관심이 증가하고 있다(Guillette and Guillette 1996; Schiff and Bay 2003).

Benzo(a)pyrene(BaP)와 tributyltin(TBT)는 인간활동에 의해 수생생태계로 유입되는 주요 오염물질이며, 용해 또는 미립자 형태로 존재한다. BaP와 TBT는 배아독성(Wessel et al. 2007)과 면역독성(Gopalakrishnan et al. 2011)을 유발할 수 있으며, 강한 유전독성 유발 물질이다(Jha et al. 2005). BaP는 유기물질의 불완전한 연소 및 유류 유출로부터 대량 발생하는 PAHs의 일종이며, PAHs 중 가장 독성이 높은 것으로 알려져 있다(Pointet and Milliet 2000). BaP는 잠재적인 발암물질이며, 돌연변이를 유발할 수 있는 특성으로 인하여 해양어류, 무척추동물의 신경 및 유전독성을 유발한다(La Rocca et al. 1996; Woo et al. 2006). 유기주석화합물인 TBT는 목재의 방부제나 방오도로 주로 사용되었으며(Alzieu 2000), 다양한 수생생물의 imposex 유발(Santos et al. 2002; Shim et al. 2000), 어류에 대한 유전독성 및 생식독성 유발(Mitchellmore and Chipman 1998) 및 mussel의 조기 배발생 억제(Paul and Davies 1986) 등이 보고되고 있다. 최근에 대부분의 선진국에서 TBT의 사용이 금지되고 있지만, 해양환경에 축적된 TBT는 아직까지 해양생태계에 영향을 미치고 있다(Michel et al. 2001).

해양으로 유입된 오염물질에 의한 해양생물의 영향을 평가하는데 있어서, 효과적인 현장연구를 수행하는 것은 매우 어렵다. 따라서 실험실에서의 생물검정실험이 일반적으로 수행되는데, 이는 해양생물에 대한 오염물질의 잠재적인 독성영향을 평가하기 위한 좋은 대안으로 평가받고 있다(Ma et al. 2005). 특히 해양생물을 *in vitro* 또는 *in vivo*로 오염물질에 노출한 후 각 세포의 DNA 손상을 측정하는 comet assay는 민감한 유전독성 바이오마커로 활용되고 있다(Tice et al. 2000). Comet assay는 single cell gel electrophoresis(SCGG)라고도 하는데, DNA 손상여부를 알아보기 위해 도입된 방법이며, 세포 유형에 관계없이 소량의 세포만을 사용하여 유전독성 손상을 측정하는 빠르고, 간편하고, 민감한 방법이다(Collins et al. 1997; Singh et al. 1988). 해양생물에 대한 comet assay 연구보고가 최근에 증가하고 있지만 대부분 *in vitro* 실험이 보고되었고, 해양생물에 대한 *in vivo* 독성평가 연구는 최근에 시작되고 있다(Woo et al. 2006).

DNA 사슬 손상 측정시 알칼리 반응에 민감한 DNA 위치는 조직이나 생물 종에 따라 다르기 때문에, comet assay를 위한 생물 및 조직의 선정은 중요하다(Lee and

Steinert 2003). 해양어류의 경우 comet assay를 위해서 gut, 간, 신장, 근육, 아가미, 생식소 등에서 분리된 세포가 사용되지만, 주로 혈액세포를 활용하게 되며(Villarini et al. 1998), 연체동물의 경우는 시험생물에 따라 아가미, 생식소, 소화관, 족부, 사이편 등이 사용된다(Binelli et al. 2008; Steinert et al. 1998).

본 연구의 목적은 우리나라 남해안에 서식하며, 쉽게 채취 가능한 넙치와 개조개를 시험재료로 사용하여, (1) 넙치 혈액세포와 개조개 근육세포의 comet assay 시험재료로서의 활용가능성을 평가하고, (2) 대표적인 유전독성 유발 물질인 BaP와 TBT에 의한 넙치와 개조개의 유전독성 영향 평가 및 (3) 처리시간과 농도와의 연관관계를 분석하는데 있다. 이를 통하여 넙치와 개조개 유래 세포의 유전독성평가를 위한 바이오마커로써 comet assay 활용가능성을 평가하였다.

2. 재료 및 방법

시험생물

본 연구에서는 양식장 등에서 손쉽게 구입가능하고 해양에 널리 서식하고 있는 넙치(*Pleuronichthys olivaceus*; 15-25 cm×150-200 g)와 개조개(*Saxidomus purpuratus*; 5-9 cm×50-70 g)를 실험 종으로 선택하였다. 실험실로 이송한 후 3~4일 정도 순치시켰으며, 유전독성물질에 노출되는 동안 2차 오염을 막기 위하여 먹이는 공급하지 않았다.

혈액세포 및 조직세포 분리

넙치의 꼬리 부분에서 1 mL 주사기를 이용하여 1~0.5 mL 정도의 혈액을 뽑아, 굳지 않은 상태의 혈액을 1 mL의 phosphate buffered saline(PBS)에 현탁하였다. 원심분리(5000 rpm, 10 min) 후 상등액을 버리고, pellet 부분을 PBS에 다시 현탁시켜 comet assay에 사용하였다. 개조개의 경우 근육조직을 절단하여 소량의 Hanks balanced salt(HBS)을 넣고, homogenizer를 이용하여 분쇄하였다. 분쇄된 시료는 40, 20 µm mesh로 여과 후 원심분리(5000 rpm 10 min)하였고, pellet을 HBS에 현탁시켜 comet assay에 사용하였다(Birmelin et al. 1998).

과산화수소 노출(*in vitro*)

과산화수소 노출에 의한 comet assay 검증은 Petridis 등(2009)의 방법을 일부 수정하여 사용하였다(Petridis et al. 2009). 간단히 기술하면, 분리된 넙치 혈액세포와 개조개 근육세포에 저농도의 과산화수소(0, 1, 5, 10 µM)를 각각 처리하고(n=5), 4°C에서 2시간 노출하였다. 처리된 세포를 원심분리(2,000 rpm, 2 min)하고, 상등액은 제거하고

pellet 부분을 PBS에 다시 현탁시켜 comet assay에 사용하였다.

BaP 및 TBT 노출(*in vivo*)

시험대상물질인 BaP과 TBT는 0.1% DMSO에 용해시켰으며, 노출 농도는 각각 1, 10, 50, 100 µg/L를 적용하였다. 각 간이수조 당 어류는 5마리, 패류는 4마리를 기준으로 하여 4일간 노출하였다. 0, 2, 4일에 시료를 채취하여 comet assay를 실시하였으며, 동일 조건으로 3반복 실험을 수행하였다. (-) 대조구로는 dimethylene sulfoxide (DMSO)를 사용하였다. 정체식 노출방법을 사용하였으며, 25 L 해수에 정해진 농도의 BaP와 TBT를 첨가하면서 노출하였다. 시험수는 2일에 한번 교체하였으며, 수온은 18~20°C가 되도록 유지하였다.

Comet assay

Comet assay 방법은 Tice 등 (2000)의 방법에 따라 수행하였다(Tice et al. 2000). 0.5% agarose가 코팅된 슬라이드에 50 µl의 희석된 세포를 올리고, agarose를 가해 세포가 agarose에 매몰되도록 하였다. 슬라이드를 냉장 보관된 lysis 용액(2.23 M NaCl, 90 mM EDTA, 9 mM Tris-HCl, 10% DMSO, 1% Triton X-100)에 담구었다(4°C, 2시간 이상). 슬라이드를 전기영동 buffer에서 20분간 방치하여 DNA가 unwind되도록 하고, 전기영동시켰다(25 V, 300 mA, 20 min). 0.4 M Tris buffer(pH 7.5)에서 중화시킨 후 ethidium bromide로 염색하였다. 염색된 슬

라이드는 형광현미경(Leica DMLB, Germany)을 이용하여 이미지 관찰을 하였고, 4개의 슬라이드로부터 200개(각 슬라이드 당 50개)의 세포를 대상으로 DNA 손상 정도를 측정하였다. DNA 손상으로 인하여 발생한 comet 형태 및 정량화는 KOMET IMAGE ANALYSIS SYSTEM (Jae Woo Trading Co., Ltd.)으로 분석하였다(Tice and Vasquez 1998).

자료분석

모든 자료는 평균 $\pm$ S.D.로 표시하였다. 표시된 값은 non-parametric ANOVA 분석 후 Dunn's pair-wise multiple comparison test를 사용하여 통계분석 하였으며, 통계학적으로 유의한 $p < 0.05$ 를 적용하였다.

3. 결 과

in vitro 과산화수소 노출에 의한 comet assay 검증

넙치와 개조개로부터 혈액세포와 근육세포를 추출하여 *in vitro* 과산화수소 처리 후, comet assay를 통하여 혈액세포와 근육세포의 유전독성 여부를 확인하고, 적합한 바 이오마커로서의 활용 가능성을 분석하였다. 0, 1, 5, 10 µM의 과산화수소 처리에 대한 전형적인 comet은 Fig. 1과 같다. 넙치 및 개조개 유래 혈액세포 및 근육세포는 생물종 뿐만 아니라 세포의 종류도 다르지만, 핵의 크기나 형태는 차이를 보이지 않았고, 손상된 DNA의 움직임도 거의 유사하였다(Data not shown). 과산화수소의 농

Fig. 1. Typical comets showing flounder blood cells with increasing amount of damage after a 2 hr *in vitro* exposure to different H_2O_2 concentrations. (a) 0 mM, (b) 1 mM, (c) 5 mM, (d) 10 mM

Fig. 2. Levels of DNA damage in flounder blood cells (a) and clam tissue cells (b) exposed to the designated concentrations of H₂O₂. Data are expressed as mean±SD from three determinations (n=5, each group). *, Significantly different from 0 mM group ($p<0.05$)

도가 높아질수록 전형적인 DNA 손상이 일어나 tail DNA 이동이 일어났다(Fig. 2). 과산화수소 농도에 따른 tail 길이는 개조개 근육세포(91.26 μm)에 비해 넙치 혈액세포(167.48 μm)에서 더 증가하여, 넙치 혈액세포가 개조개 근육세포에 비해 민감한 것으로 나타났다.

***in vivo* BaP 및 TBT 노출에 의한 넙치와 개조개의 유전독성**

BaP와 TBT의 *in vivo* 유전독성 반응을 평가하기 위해 각각 1, 10, 50, 100 μg/L의 BaP 및 TBT에 넙치를 노출시킨 후 2일과 4일에 혈액세포를 채취하고, comet assay를 수행하였다(Fig. 3). 대조구로는 0.1% DMSO가 첨가된 해수를 사용하였고, DNA 손상과 처리시간과의 연관관계를 분석하였다. 대조구와 비교하였을 때, BaP에 노출된

혈액세포는 2일에 대부분의 tail DNA의 길이 증가가 관찰되었고, 4일째는 거의 변화되지 않았다(Fig. 3a). 10 μg/L 이상의 BaP에서 유의한 DNA 손상 결과를 보였다($p<0.05$). TBT에 노출된 넙치의 혈액세포는 BaP에 노출된 혈액세포에서의 결과와 유사하게 처리 후 2일에 대부분의 tail DNA 길이 증가가 관찰되었으나, 50 μg/L 이상의 TBT 노출에 유의한($p<0.05$) DNA 손상을 보였다(Fig. 3b).

개조개에 대한 BaP와 TBT의 *in vivo* 유전독성 영향을 평가하기 위해 각각 1, 10, 50, 100 μg/L의 BaP 및 TBT에 개조개를 노출시킨 후 2일과 4일에 조직세포를 채취하고, Comet assay를 수행하였다(Fig. 4). DNA 손상을 분석한 결과, 2일까지는 tail DNA의 길이 변화가 모든 처리구에서 관찰되지 않았으나, 4일간 노출된 세포에서는 tail

Fig. 3. DNA damage expressed as tail length in flounder blood cells to BaP and TBT *in vivo*. Data are expressed as mean±SD from three determinations (n=5, each group). *, Significantly different from 0 μg/L group ($p<0.05$)

Fig. 4. DNA damage expressed as tail length in clam tissue blood cells to BaP and TBT *in vivo*. Data were expressed as means $\pm$ SD from three determinations (n=5, each group). *, Significantly different from 0 μ g/L group ($p<0.05$)

DNA 길이가 크게 증가하였고, 1 μ g/L의 BaP에도 유의한 변화($p<0.05$)가 관찰되었다(Fig. 4a). TBT에 노출된 근육 세포의 DNA 손상은 BaP에 비해서는 전반적으로 낮은 수준이었지만, BaP 처리시와 유사하게 2일째까지는 변화가 관찰되지 않았으며, 4일간 노출된 세포에서 크게 증가하는 경향을 보였다(Fig. 4b). 개조개 조직세포의 tail DNA 길이 변화는 BaP 처리와 유사하게 1 μ g/L 노출에도 유의한 변화를 보였다($p<0.05$).

4. 토의 및 결론

과산화수소는 해양생물 혈액세포에 대하여 광범위하게 DNA 손상을 유발하며, 농도의존적으로 어류와 이매패류의 유전독성을 유발하는 것으로 알려져 있다(Jha et al. 2005; Mitchelmore and Hyatt 2004; Petridis et al. 2009). 또한 과산화수소를 이용한 DNA 손상 연구는 세포의 민감도를 분석하기 위한 매우 좋은 연구방법으로 받아들여지고 있다(Mitchelmore and Chipman 1998; Seo et al. 2005). 해양생물의 DNA 시슬에 영향을 미치는 과산화수소의 농도는 0.1 μ M의 과산화수소에 민감한 반응을 나타내는 갯지렁이의 혈구세포(Seo et al. 2005)를 제외하면, 담치의 아가미 조직(Pruski and Dixon 2002), 굴의 아가미 조직(Kim and Pae 2003), 말미잘(Mitchelmore and Hyatt 2004) 및 이매패류(*Scrobicularia plana*)의 혈구세포(Petridis et al. 2009) 등에서도 같이 10-200 μ M 이상의 농도에서 유의한 차이($p<0.05$)가 있음이 보고된 바 있다. 본 연구에서의 넙치 혈액세포와 개조개 근육세포에 대해 유의하게 영향을 미치는 과산화수소의 농도는 1 μ M이며(Fig. 2), 이는 넙치의 혈액세포와 개조개의 근육세포가 다른 해양생물의 조직에 비해 과산화수소에 대해 비교적 높은 민감도를 보여주는 것으로 판단되었다.

해양생물에 대한 BaP와 TBT의 독성을 비교분석한 연

구는 저서성 단각류(*Grandidierella japonica*)의 단기독성(Lee et al. 2005), 썸뱅이(*Sebasticus marmoratus*) 생식선에서의 성호르몬 농도의 변화(Zhang et al. 2007)와 비장에서의 활성산소 발생(Wu et al. 2007) 및 전복(*Haliotis diversicolor*) 혈구세포의 면역독성(Gopalakrishnan et al. 2011) 등이 보고되어 있으나, comet assay를 이용한 유전독성 영향을 비교 분석한 보고는 아직까지 없다. 본 연구에서는 BaP와 TBT가 용해되어 있는 수조에 넙치와 개조개를 *in vivo* 노출한 후 각각 혈액세포와 근육세포를 추출하고, 이들의 DNA 손상 정도를 비교 분석하였다. BaP를 넙치와 개조개에 노출하였을 때 넙치 혈액세포의 tail DNA의 길이는 2일에 크게 증가하였고, 2일과 4일의 차이는 없는 반면, 개조개는 처리된 농도에서 2일까지는 반응을 나타내지 않았지만, 4일째 독성영향이 크게 증가하는 다른 양상을 보였다(Fig. 3a 및 4a). 또한 넙치는 10 μ g/L의 BaP에 유의한($p<0.05$) 반응을 나타냈지만, 개조개는 1 μ g/L의 BaP에 반응을 나타내어 시간적으로는 넙치가 민감하였으나, BaP 농도 측면에서는 개조개가 민감한 결과를 보였다. 굴의 혈구세포와 아가미 조직세포에 대한 BaP의 유전독성 연구에서 혈구세포가 아가미조직 세포보다 더 민감한 것으로 보고되고 있는(Kim and Pae 2003) 반면, 본 연구에서는 개조개 근육세포가 넙치 혈액세포에 비해 더 민감한 것으로 나타났다. 이러한 결과는 오염된 퇴적물에 노출된 Manila 조개(*Tapes semidecussatus*)의 경우 혈액세포보다 아가미 조직이 BaP에 대한 민감도가 높다는 보고(Coughlan et al. 2002)와 유사한 결과를 보였다. TBT에 노출되었을 때, 시간에 따른 유전독성 영향은 BaP와 유사하였으나, 대조구와 비교하여 넙치는 50 μ g/L, 개조개는 1 μ g/L 농도에 유의한($p<0.05$) 반응을 보였다(Fig. 3b와 4b).

본 연구의 결과는 다음과 같이 요약될 수 있다. (1) 과산화수소에 노출되었을 때 넙치 혈액세포(tail length=

167.48 μm)가 개조개 근육세포(tail length=91.26 μm)에 비해 민감하였고, (2) BaP와 TBT에 노출되었을 때, 넙치(2일)가 개조개(4일)에 비해 민감한 반응을 보였다. (3) 넙치는 TBT(50 $\mu\text{g/L}$)에 비해 BaP(10 $\mu\text{g/L}$)에 민감하였고, (4) 개조개는 BaP와 TBT에 대해 동일한 1 $\mu\text{g/L}$ 의 민감도를 보였다. 결론적으로 BaP와 TBT의 *in vivo* 유전독성은 comet assay에 의해 모니터링될 수 있으며, 넙치와 개조개가 comet assay에 의한 유전독성을 모니터링할 수 있는 실험재료로써 유용한 것임을 시사한다.

사 사

이 논문은 2010년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구(KRF-2010-0016829)입니다.

참고문헌

- 김기범, 배세진 (2003) Pyrene과 Benzo(a)pyrene에 노출된 굴의 혈구세포와 아가미 세포에서의 DNA 손상 측정을 위한 Comet assay의 이용. 한국양식학회지 **16**(3):196-201
- 서진영, 성찬경, 최진우, 이창훈, 류태권, 한기명, 김기범 (2005) Comet assay를 이용한 갯지렁이의 혈구세포에 대한 유전독성 평가. J Environ Toxicol **20**(4):333-341
- Alzieu C (2000) Environmental impact of TBT: the French experience. Sci Total Environ **258**:99-102
- Binelli A, Riva C, Cogni D, Provini A (2008) Assessment of the genotoxic potential of benzo (a) pyrene and pp'-dichlorodiphenyldichloroethylene in Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). Mutat Res Gen Tox En **649**:135-145
- Birmelin C, Mitchelmore C, Goldfarb P, Livingstone D (1998) Characterisation of biotransformation enzyme activities and DNA integrity in isolated cells of the digestive gland of the common mussel, *Mytilus edulis* L. Comp Biochem Phys A **120**:51-56
- Collins A, Du inska M, Franklin M, Somorovska M, Petrovska H, Duthie S, Fillion L, Panayiotidis M, Ralova K, Vaughan N (1997) Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. Environ Mol Mutagen **30**:139-146
- Coughlan B, Hartl M, O'Reilly S, Sheehan D, Morthersill C, Van Pelt F, O'Halloran J, O'Brien N (2002) Detecting genotoxicity using the Comet assay following chronic exposure of Manila clam *Tapes semidecussatus* to polluted estuarine sediments. Mar Pollut Bull **44**:1359-1365
- Daughton CG, Ternes TA (1999) Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? Environ Health Persp **107**(6):907-938
- Fleegeer JW, Carman KR, Nisbet RM (2003) Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. Sci Total Environ **317**:207-233
- Gopalakrishnan S, Huang WB, Wang QW, Wu ML, Liu J, Wang KJ (2011) Effects of tributyltin and benzo [a] pyrene on the immune-associated activities of hemocytes and recovery responses in the gastropod abalone, *Haliotis diversicolor*. Comp Biochem Phys C **154**(2):120-128
- Guillette LJ, Guillette EA (1996) Environmental contaminants and reproductive abnormalities in wildlife: implications for public health? Toxicology and Industrial Health **12**:537-550
- Jha AN, Dogra Y, Turner A, Millward GE (2005) Impact of low doses of tritium on the marine mussel, *Mytilus edulis*: Genotoxic effects and tissue-specific bioconcentration. Mutat Res Gen Tox En **586**:47-57
- Kummerer K (2001) Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources-a review. Chemosphere **45**:957-969
- La Rocca N, Moro I, Andreoli C (1996) Survey on a microalga collected from an Edmonson Point pond (Victoria Land, Antarctica). Plant Biosyst **130**:960-962
- Lee JS, Lee KT, Park GS (2005) Acute toxicity of heavy metals, tributyltin, ammonia and polycyclic aromatic hydrocarbons to benthic amphipod *grandierella japonica*. Ocean Sci J **40**:61-66
- Lee RF, Steinert S (2003) Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. Mutat Res Rev Mutat **544**:43-64
- Ma T, Wan X, Huang Q, Wang Z, Liu J (2005) Biomarker responses and reproductive toxicity of the effluent from a Chinese large sewage treatment plant in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Chemosphere **59**:281-288
- Michel P, Averty B, Andral B, Chiffolleau JF, Galgani F (2001) Tributyltin along the coasts of Corsica (Western Mediterranean): A persistent problem. Mar Pollut Bull **42**:1128-1132
- Mitchelmore C, Chipman J (1998) DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. Mutat Res Fund Mol **399**:135-147
- Mitchelmore CL, Hyatt S (2004) Assessing DNA damage in cnidarians using the Comet assay. Mar Environ Res **58**:707-711

- Paul J, Davies I (1986) Effects of copper-and tin-based anti-fouling compounds on the growth of scallops (*Pecten maximus*) and oysters (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture* **54**:191-203
- Petridis P, Jha AN, Langston WJ (2009) Measurements of the genotoxic potential of (xeno-) oestrogens in the bivalve mollusc *Scrobicularia plana*, using the Comet assay. *Aquat Toxicol* **94**:8-15
- Pointet K, Milliet A (2000) PAHs analysis of fish whole gall bladders and livers from the Natural Reserve of Camargue by GC/MS. *Chemosphere* **40**:293-299
- Pruski AM, Dixon DR (2002) Effects of cadmium on nuclear integrity and DNA repair efficiency in the gill cells of *Mytilus edulis* L. *Aquat Toxicol* **57**:127-137
- Santos M, ten Hallers-Tjabbes, Vieira N, Boon J, Porte C (2002) Cytochrome P450 differences in normal and imposex-affected female whelk *Buccinum undatum* from the open North Sea. *Mar Environ Res* **54**:661-665
- Schiff K, Bay S (2003) Impacts of stormwater discharges on the nearshore benthic environment of Santa Monica Bay. *Mar Environ Res* **56**:225-243
- Shim WJ, Kahng SH, Hong SH, Kim NS, Kim SK, Shim JH (2000) Imposex in the rock shell, *Thais clavigera*, as evidence of organotin contamination in the marine environment of Korea. *Mar Environ Res* **49**:435-451
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* **175**:184-191
- Steinert SA, Streib-Montee R, Leather JM, Chadwick DB (1998) DNA damage in mussels at sites in San Diego Bay. *Mutat Res Fund Mol M* **399**:65-85
- Tice R, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu J, Sasaki Y (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* **35**:206-221
- Tice R, Vasquez M (1998) Protocol for the application of the pH> 13 alkaline single cell gel (SCG) assay to the detection of DNA damage in mammalian cells.
- Villarini M, Moretti M, Pasquini R, Scassellati-Sforzolini G, Fatigoni C, Marcarelli M, Monarca S, Rodriguez AV (1998) In vitro genotoxic effects of the insecticide deltamethrin in human peripheral blood leukocytes: DNA damage ([] comet'assay) in relation to the induction of sister-chromatid exchanges and micronuclei. *Toxicology* **130**:129-139
- Wessel N, Rousseau S, Caisey X, Quiniou F, Akcha F (2007) Investigating the relationship between embryotoxic and genotoxic effects of benzo [a] pyrene, 17 [alpha]-ethinylestradiol and endosulfan on *Crassostrea gigas* embryos. *Aquat Toxicol* **85**:133-142
- Woo S, Kim S, Yum S, Yim UH, Lee TK (2006) Comet assay for the detection of genotoxicity in blood cells of flounder (*Paralichthys olivaceus*) exposed to sediments and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mar Pollut Bull* **52**:1768-1775
- Wu Y, Wang C, Wang Y, Zhao Y, Chen Y, Zuo Z (2007) Antioxidant responses to benzo [a] pyrene, tributyltin and their mixture in the spleen of *Sebastiscus marmoratus*. *J Environ Sci* **19**:1129-1135
- Zhang J, Zuo Z, Chen Y, Zhao Y, Hu S, Wang C (2007) Effect of tributyltin on the development of ovary in female cuvier (*Sebastiscus marmoratus*). *Aquat Toxicol* **83**:174-179

Received Apr. 13, 2011

Revised Apr. 30, 2011

Accepted May 24, 2011