

환경생물에 대한 내분비교란물질 의심 농약의 영향

김현우 · 박건호 · 박진홍 · 김화 · 김준성 · 유국종 · 조현선 · 강가미 · 이명성
송병훈¹ · 신진섭¹ · 조명행*

서울대학교 수의과대학 독성학교실, ¹농업과학기술원 작물보호부 농약안전성과

요약 : 내분비교란물질은 동물에서 생식기계통을 통제하는 호르몬 조절에 영향을 준다. 상기 선정된 농약을 투여함에 있어서 실험동물로 *Xiphophorus helleri*로 선정하였는데 이는 암수의 구별이 육안적으로 명확히 관찰되며 또한 난태생으로 사육이 용이한 점이 있다. *Xiphophorus helleri*에 있어서 내분비교란물질로 의심되는 endosulfan과 molinate의 영향을 조사하기 위하여 vitellogenin과 aromatase를 진단 biomarker로써 사용하였다. RT-PCR 결과 endosulfan과 molinate의 혼합처치군 및 alachlor 단독군 수컷에서 vitellogenin과 aromatase의 induction이 동시에 관찰되었고, endosulfan 단독군에서는 aromatase의 induction이 관찰되었다. 본 실험에서는 endosulfan이나 molinate 단독 처치군에서의 성호르몬과 세포에 대한 유해 효과는 나타나지 않았다. 그러나, endosulfan과 molinate의 혼합처치군에서는 vitellogenin과 aromatase의 발현 및 apoptosis가 관찰되었다. 이러한 결과는 swordtail fish에 영향을 미치지 않는 낮은 농도의 molinate와 endosulfan이라도 병용되는 경우에 생식기계의 호르몬 변화와 apoptosis를 야기시킨다는 사실을 제시한다.(2003년 6월 8일 접수, 2003년 9월 22일 수리)

Key words : endocrine disrupting chemicals (EDCs), swordtail fish, vitellogenin, aromatase, apoptosis.

서론

Endocrine disrupter chemicals (EDCs)란 내분비계에 혼란을 초래하는 물질을 말하며 화학물질의 estrogenic activity란 암, 수의 생식기능에 영향을 끼치며 발생기에 노출되었을 때 비가역적인 기형을 유발하고, 암을 유발하기도 하는 작용을 말한다.

환경으로부터 estrogenic activity를 나타내는 물질에 노출될 때 사람과 야생동물의 발생과 생식에 해로운 영향을 미치며 암을 유발할 수 있다는 사실이 밝혀지면서 endocrine disruption에 대한 세계적 관심이 증대되고 있어, 선진국에서는 내분비계 장애물질에 대한 영향평가 및 대응방책을 연구를 중점적으로 추진하고 있는 실정이다. 그러나, 국내에서는 연구사례가 전무한 상태이며, 최근 1998년 5월부터 환경부와 식품의약품안전청 중심으로 대책 및 연구협의회를 구성하고 이 문제를 다루기 시작하였다. 즉, 환경부 주도하여 1998년 5월 29일 내분비계 장애물질 대책회의를 개최

하여 '대책 협의회'와 '전문연구협의회'를 구성 운영하고 있으며, Endocrin disrupter에 대한 용어를 "내분비계 장애물질"로 결정하고 내분비계 장애물질은 세계야생생물기금(WWF)에서 선정한 67종을 추정물질로 선정하여 국내 사용 및 규제 실태를 조사하기로 하였다. 조사결과 세계야생생물기금(WWF)에서 선정한 67종 중 16종은 국내에서 사용실적이 없는 물질이고, 국내에서 제조되거나 수입사례가 있는 물질이 51종이고 이중 42종은 유해화학물질관리법, 농약관리법, 산업안전보건법 등에 의하여 규제하고 있는 물질이며 비스페놀 A, 노닐페놀류 및 플라스틱 관련 산업용 화학물질 9종은 현재 규제되고 있지 않은 물질이다. 규제되고 있지 않은 9종의 물질 중 환경잔류성이 높고 유해성이 있다고 보고된 4종(펜타-노닐페놀류, 비스페놀 A, 디에틸헥실포탈레이트, 디부틸벤질포탈레이트)은 환경부에서 관찰 물질로 지정하여 제조, 수입 및 용도를 신고하도록 하여 관리하고 있다. 그러나 국내에서 내분비계장애의심물질에 대한 검색 기법 및 시험방법은 정립된 것이 없다. 또한 biomarker의 개발 등 이들 물질을 올바르게 평가할 수 있는 방법이 전무

*연락처

한 상태이다. 따라서 내분비계 장애물질을 올바르게 평가할 수 있는 기법의 개발이 시급한 실정이다. 그러므로 내분비교란물질에 관한 *in vivo* 실험은 필수라고 하는 전제와 그 물질들의 환경 중 오염과 먹이사슬의 최종 숙주인 인간과의 관련성, 그리고 환경 중 노출 여부를 판단하기 위한 야외 실험 등의 측면에서 가지는 장점 등을 고려할 때, 내분비교란물질 여부를 보다 신속히 검색할 수 있고, 생체내 독성기전의 연구에 유리한 물고기 모델을 개발해내는 것은 현 시기에 있어서 매우 중요한 과제라고 할 수 있겠다 (Jobling 등, 1996; Gendron 등, 1997; Hontela, 1997). 이것을 기반으로 농업환경 중 내분비 장애 추정농약의 잔류 상태를 모니터링하고 포유류 및 어류에 대한 생식영향 및 위해성 평가를 통한 내분비계 장애물질의 위해방지 및 안전관리의 기반을 구축하기 위한 일환의 노력으로 내분비계 장애 의심 물질에 해당되는 일부 농약들에 대한 *in vivo* assay법의 개발이 본 연구의 목적이다.

그리하여 본 연구는 내분비계 장애 의심물질로 추정되는 농약에 대한 환경생물인 어류를 실험동물로 이용하여 농약에 대한 노출 결과 야기되는 어류의 성분화와 성결정 정도를 조사하며 또한 이를 통한 자료를 토대로 하여 내분비계 의심 농약의 *in vivo* assay법을 개발하는데 목적이 있다. 따라서 본 연구에서는 내분비계 의심 물질로 추정되는 농약중 endosulfan, molinate, alachlor 각각에 대한 원재를 시험물질로 선정하였고, 또한 혼합독성 여부를 관찰하기 위하여 endosulfan과 molinate 단일 투여군과 endosulfan + molinate 혼합독성을 비교하는 실험을 수행하였다. 그리고 논물에서의 molinate 잔류시 독성을 알아보기 위하여 논물에서의 molinate 잔류 반감기와 동일한 환경으로 하여 비교하는 실험도 병행하였다. 또한 testosterone의 영향으로 인한 성분화 이전의 sword tail fish의 수컷으로의 분화 사이의 상관관계를 규명하여 꼬리길이를 이용한 내분비계 시험 적용여부를 확인하는 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

급성 LC₅₀ test

실험동물로 sword tail fish로 선정하였으며 아직 성분화가 되지 않은 juvenile fish (45일령)를 사용하였고

선정된 농약에의 dose를 산출하기 위해 juvenile fish에 대한 급성 LC₅₀ test를 96시간 동안 실시하였다. 결과는 Probit 법으로 SPSS를 이용하여 분석하였다.

노출농도의 설정

기산출한 LC₅₀ 자료를 바탕으로 노출량을 선정하기 위해 LC₅₀의 1/10값에 5의 공비로 2단계를 낮추어 고농도와 저농도를 선정하고 두 농도의 중간농도를 중농도로 취하여 최고농도로 선정하여 3달동안 각각의 농약원제에 대한 노출을 실시하였고 혼합독성군(endosulfan+molinate)을 두었으며 양성대조군으로 β -estradiol 10 ppb를 투여하였고, 음성대조군이자 sword tail fish와의 상관관계를 알아보기 위하여 testosterone 100 ppb를 투여하였으며, 0.1% ethyl alcohol로 용매대조군을 두어서 노출시켰다. 잔류하는 molinate에 대한 농도 설정은 LC₅₀ 자료를 바탕으로 반감기를 4일로 하여 한 군은 1개월 동안, 다른 한 군은 3개월 동안 잔류량을 반감기를 기준으로 계속 감소시키면서 노출시켰다.

Vitellogenin assay (VTG assay) 및 aromatase assay

각각의 시험군에서 수컷 sword tail fish에 대한 부검을 실시하여 total RNA를 추출하여 정량한 후 1% agarose gel 전기영동으로 RNA 발현을 확인하였다. 전체 RNA 중에서 각각 처리한 시험군당 RNA 1 μ g씩을 RT-PCR 법으로 역전사 증폭을 시켰다. 이에 사용한 primer로는 vitellogenin primer를 제작하여 사용하였고 이에 대한 비교를 보기 위해 house keeping gene 검출로 많이 이용하는 β -actin primer를 사용하였다.

RT-PCR 조건

Vitellogenin은 50°C에서 30분 동안 reverse transcription 반응을 시킨 후 94°C에서 2분 동안 남아있는 reverse transcriptase를 제거한 후 PCR 반응을 진행하였다. PCR 조건은 30 cycle 동안 94°C 30초, 58°C 45초, 72°C 1분, last cycle은 94°C 30초, 58°C 45초, 72°C 7분으로 전 샘플에 대해서 동일하게 진행하였다. Aromatase는 48°C에서 45분 동안 reverse transcription 반응을 시킨 후 94°C에서 2분 동안 남아있는 reverse transcriptase를 제거한 후 PCR 반응을 진행하였다. PCR 조건은 40 cycle 동안 94°C 30초, 48°C 1분, 68°C

2분, last cycle은 94°C 30초, 48°C 1분, 68°C 7분으로 전 샘플에 대해서 동일하게 진행하였다.

Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) assay

부검시 각 실험군 중 수컷의 생식기 부분을 절단하여 슬라이드 표본을 제작하였다. 다음에 xylene으로 파라핀을 제거하고 에탄올을 사용하여 수화시킨 다음 proteinase K로 단백질을 분해하여 샘플의 투과성을 높였다. TdT enzyme으로 효소 반응을 일으킨 후 형광 물질로 fluorescein isothiocyanate (FITC)를 labeling하여 488~530 nm에서 관찰하였다.

결과 및 고찰

급성 LC₅₀ test

선정된 농약의 sword tail juvenile fish에 대한 급성 LC₅₀ 수치는 표 1과 같다. Molinate와 alachlor에 비해 endosulfan에서는 매우 낮은 수치가 나타났다. 이와 같은 결과에서 볼 때 다른 어종인 Rainbow trout에 대한 경우와 마찬가지로 endosulfan의 독성이 매우 높은 것으로 판단된다 (Schulz, 2001).

Table 1. LC₅₀ values of EDCs such as alachlor, endosulfan and molinate

Test material	acute LC ₅₀ value
Alachlor	6.01 ppm
Endosulfan	7.57 ppb
Molinate	12.47 ppm

노출농도의 선정시 초기에는 기산출한 LC₅₀ 자료를 바탕으로 노출량을 선정하기 위해 LC₅₀의 1/10값을 취하여 최고농도로 정하고 고농도의 값에 5의 공비로 2단계를 낮추어 중농도, 고농도를 선정하여 3달동안 각각의 농약원제에 대한 노출을 실시하였고 혼합독성군(endosulfan+molinate)을 두었으며 양성대조군으로 β -estradiol 20 ppb를 투여하였고, 음성대조군이 sword tail fish와의 상관관계를 알아보기 위하여 testosterone 100 ppb를 투여하였으며, 0.1% ethyl alcohol로 용매대조군을 두어서 노출시켰다. 그러나, 혼합독성군에서 고농도의 혼합군이 투여 후 1, 2주 내로 폐사하는 관계로 전 실험군의 재설계가 필요하여 중농도를 고농

도로, 중농도와 저농도의 평균값을 중농도로 다시 설계하여 실시하였고, β -estradiol도 투여 후 1주 내로 폐사하여 10 ppb로 다시 설계 후 실시하였다.

Vitellogenin assay (VTG assay) 및 aromatase assay

수컷에서의 난황단백질인 vitellogenin과 암컷에서 주로 많이 생성되는 estradiol의 전구체인 estrone을 합성하는데 관여하는 효소인 aromatase의 발현정도를 보기 위하여 RT-PCR을 실시하였으며, 이에 사용된 primer의 sequence는 표 2와 같다 (Jonsson 등, 1994; Gronen 등, 1999; Kwak 등, 2001).

Table 2. Oligonucleotides used for RT-PCR analysis

Primer	sequence
Vitellogenin	up : 5'-GGT TGC CAC ATC TGA AAG GAC-3'
	down : 5'-AGG CAG ACA ACG CAG CAC AG-3'
β -Actin	up : 5'-CCT GAC CCT GAA GTA CCC CA-3'
	down : 5'-CGT CAT GCA GCT CAT AGC TC-3'
Aromatase	up : 5'-AGA ACA GAA AAT ACA CCT CGC GTT T-3'
	down : 5'-CGA GCA GCT CTT TCT CGT CAA C-3'

VTG assay를 실시한 결과 alachlor 단독군, endosulfan과 molinate의 혼합군에서 vitellogenin mRNA의 발현이 용량의존적으로 확인되었고(그림 1, 2), aromatase assay를 실시한 결과에서는 molinate 처리군을 제외한 다른 두 군에서 aromatase 발현이 용량의존적으로 확인되었다(그림 3, 4, 5). Vitellogenin은 농약과 같은 xenobiotics에 의한 성호르몬의 변화를 진단하는데 사용되는 biomarker이며, aromatase는 주된 자성 호르몬인 estrogen의 합성에 관련되어 있는 단백질이다 (Finlayson 등, 1986; Kime 등, 1999; Mellanen 등, 1999; Nicolas 등, 1999; Orlando 등, 1999). 두 가지 biomarker의 사용 결과 aromatase의 감수성이 더 높은 것으로 판단되며 내분비계교란물질로 의심되는 농약 중 단독군의 경우 뿐만 아니라 molinate처럼 단독 노출의 경우에는 영향을 주지 않더라도 혼합시에는 영향을 줄 수 있는 것으로 판단된다.

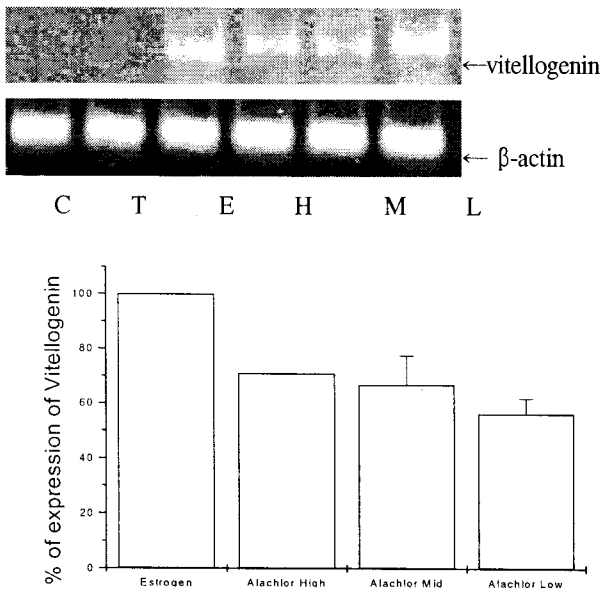


Fig. 1. Results of vitellogenin mRNA level examined by RT-PCR using 1µg of total RNA from male sword tail fish sample treated with alachlor for three months.(C : control, T : group treated with testosterone, E : group treated with estradiol, H : group treated with high conc. of alachlor, M : group treated with middle conc. of alachlor, L : group treated with low conc. of alachlor).

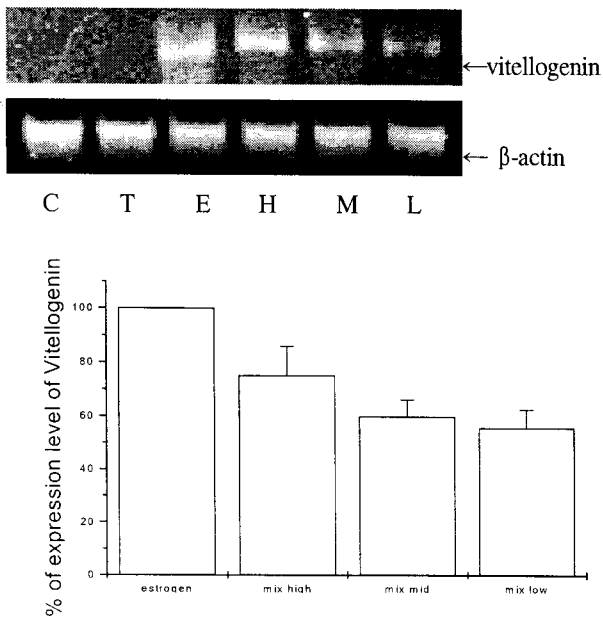


Fig. 2. Results of Vitellogenin mRNA level examined by RT-PCR using 1µg of total RNA from male sword tail fish sample treated with mixture of endosulfan and molinate during three months.(C :

control, T : group treated with testosterone, E : group treated with estradiol, H : group treated with high conc. of mixture of endosulfan and molinate, M : group treated with middle conc. of mixture of endosulfan and molinate, L : group treated with low conc. of mixture of endosulfan and molinate).

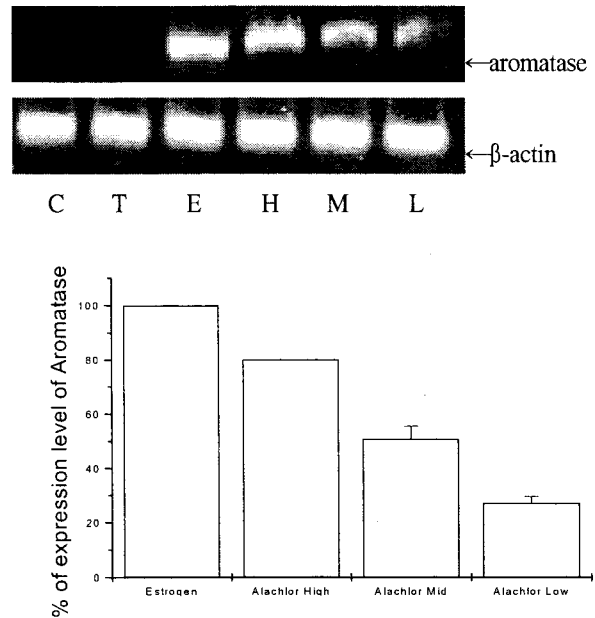


Fig. 3. Results of aromatase mRNA level examined by RT-PCR using 1µg of total RNA from male sword tail fish sample treated with alachlor for three months.(C : control, T : group treated with testosterone, E : group treated with estradiol, H : group treated with high conc. of alachlor, M : group treated with middle conc. of alachlor, L : group treated with low conc. of alachlor).

TdT assay

EDC 의심 물질로 생각되는 농약에 의한 apoptosis를 확인하기 위하여 terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) assay를 실시하였다. Apoptosis는 자극에 의해 세포가 스스로 사멸하는 것을 의미하는데 apoptosis가 일어나면 DNA가 여러 조각으로 끊어지게 된다. TdT는 이러한 apoptotic signal에 의해 생성되는 DNA fragment의 3'-OH 말단에 결합하므로 TdT의 결합 정도와 apoptosis의 정도는 비례하므로 본 실험에 사용되었다. 혼합군의 경우 전 농도군에서 apoptosis 및 necrosis가 관찰되었고, alachlor와 endosulfan 노출군에서는 고농도와 중농도 처리군에서, molinate 처리군

에서는 고농도 처리군에서만 apoptosis와 necrosis가 관찰되었다(그림 6, 7, 8, 9).

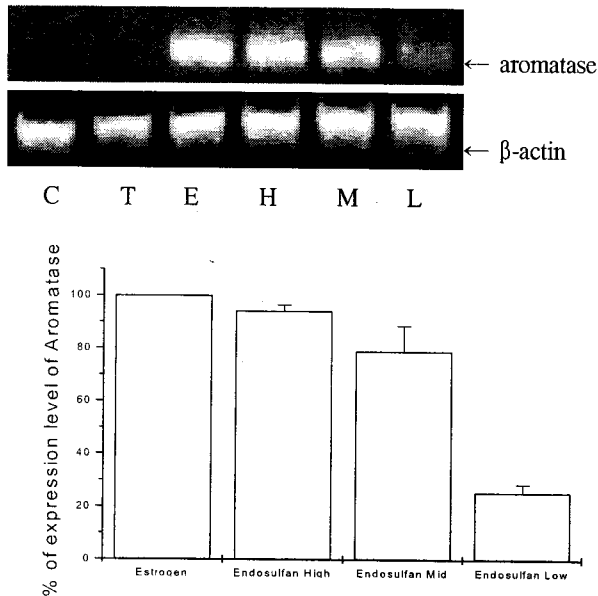


Fig. 4. Results of aromatase mRNA level examined by RT-PCR using 1µg of total RNA from male sword tail fish sample treated with endosulfan for three months.(C: control, T: group treated with testosterone, E: group treated with estradiol, H: group treated with high conc. of endosulfan, M: group treated with middle conc. of endosulfan, L: group treated with low conc. of endosulfan.).

이는 내분비계교란물질이 생식기 계통의 hormone 변화 뿐만 아니라 세포 수준에서의 손상도 야기시키며, 특히 혼합군의 경우 단독군의 경우보다 높은 수준으로 작용한다는 사실을 제시한다 (Formoli와 Fong, 1995; Harris 등, 1998; Miles- Richardson, 1999; Monteverdi와 Di Giulio, 1999).

노출 후 성비율 측정 및 꼬리 길이 변화

성비율에서는 그다지 뚜렷한 변화가 관찰되지 않았고(그림 10), 꼬리 길이에서는 전 시험군의 고농도 그룹에서 대조군에 비해 육안적으로 낮은 성장을 보였으며, 특히 alachlor와 endosulfan의 경우에는 중농도 그룹에서도 성장의 저하를 보였다(그림 11, 12). sword tail의 경우 성분화된 수컷에서만 꼬리가 발생하므로 꼬리 길이의 성장 저하는 내분비계교란물질이 성호르몬에 영향을 끼치는 것으로 판단되므로 이와 같은 꼬리 성장 변화가 농약 이외의 다른 내분비계의심물질을

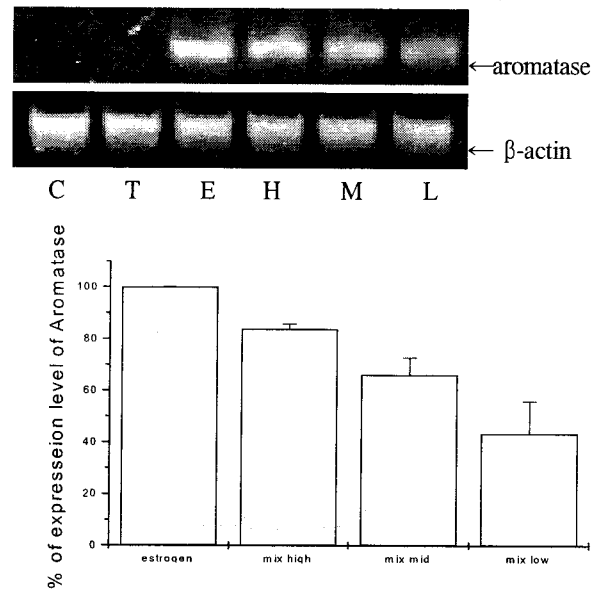


Fig. 5. Results of aromatase mRNA level examined by RT-PCR using 1µg of total RNA from male sword tail fish sample treated with mixture of endosulfan and molinate for three months.(C: control, T: group treated with testosterone, E: group treated with estradiol, H: group treated with high conc. of mixture of endosulfan and molinate, M: group treated with middle conc. of mixture of endosulfan and molinate, L: group treated with low conc. of mixture of endosulfan and molinate).

에 의해서도 유사한 결과를 보이는지에 대한 실험이 더 추가된다면 sword tail fish를 모델 동물로 이용하여 내분비계의심물질을 screening하는 시도도 가능할 것으로 판단된다.

인용문헌

- Finlayson, B. J. and G. A. Faggella (1986) Comparison of laboratory and field observations of fish exposed to the herbicides molinate and thiobencarb. *Trans Am Fish Soc* 12:212~215.
- Formoli, T. A. and H. R. Fong (1995) Estimation of exposure of persons in California to pesticide products that contain molinate HS. pp.1543. *Worker Health and Safety Branch, Department of Pesticide Regulation, California Environmental Protection Agency, U.S.A.*
- Gendron, A. D., C. A. Bishop, R. Fortin and A.

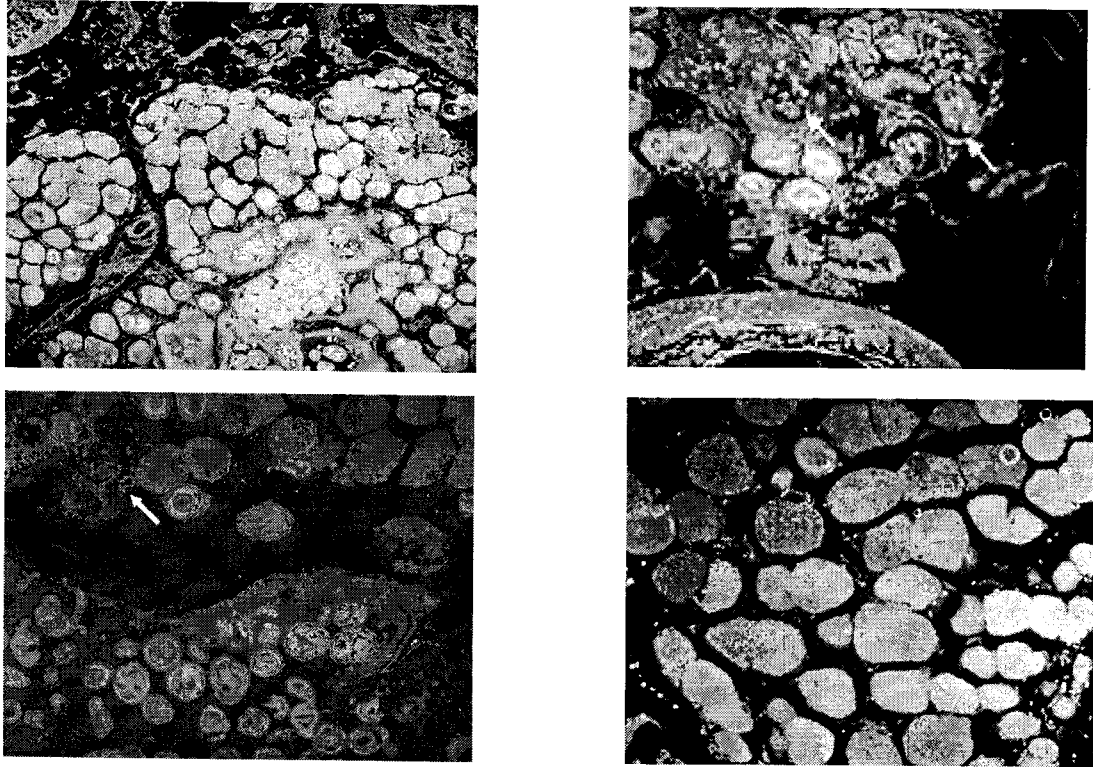


Fig 6. Normal testes (left upper, X200). Degenerative and necrotic changes (arrow) in the testes of sword-tail fish treated with alachlor (high conc. : right upper, mid conc. : left lower, low conc. : right upper).

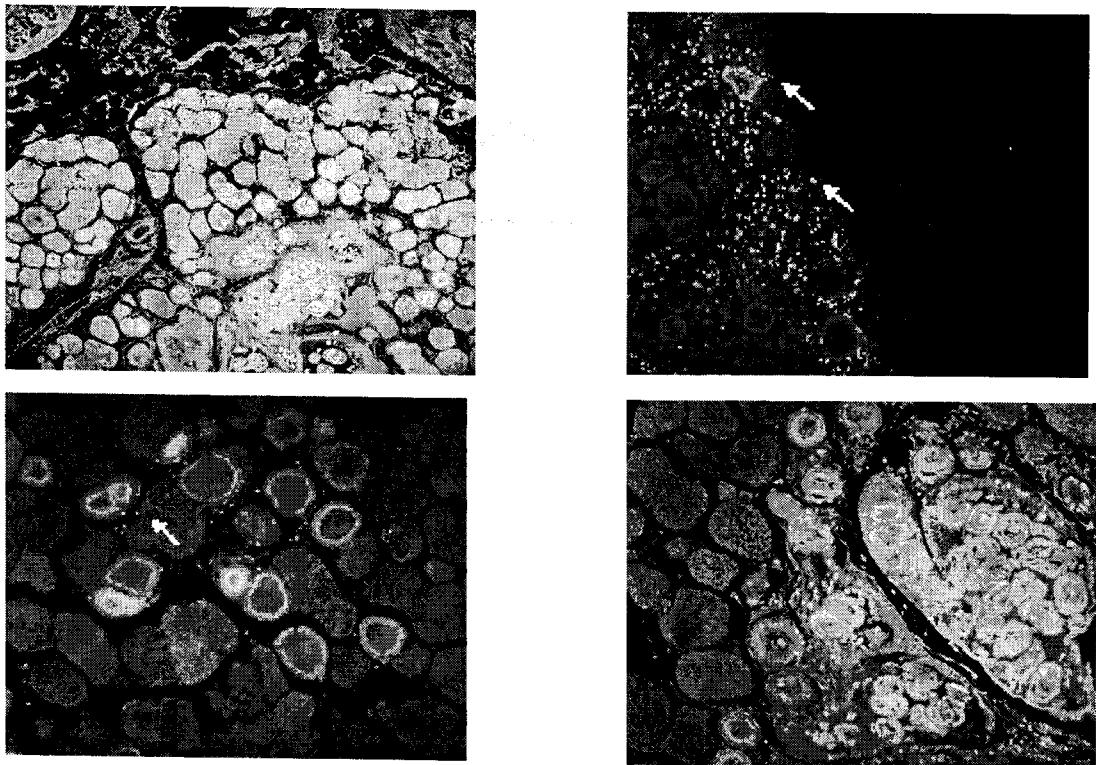


Fig. 7. Normal testes (left upper, X200). Degenerative and necrotic changes (arrow) in the testes of sword tail fish treated with endosulfan (high conc. : right upper, mid conc. : left lower, low conc. : right upper).

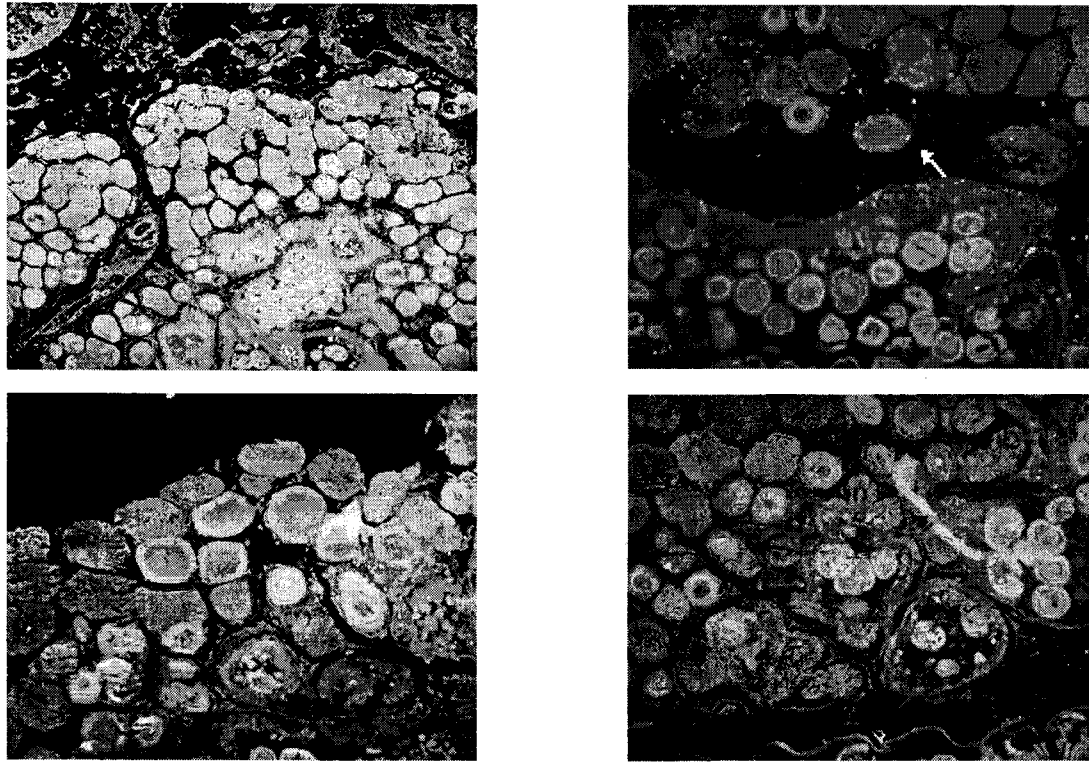


Fig. 8. Normal testes (left upper, X200). Degenerative and necrotic changes (arrow) in the testes of sword tail fish treated with molinate (high conc. : right upper, mid conc. : left lower, low conc. : right upper).

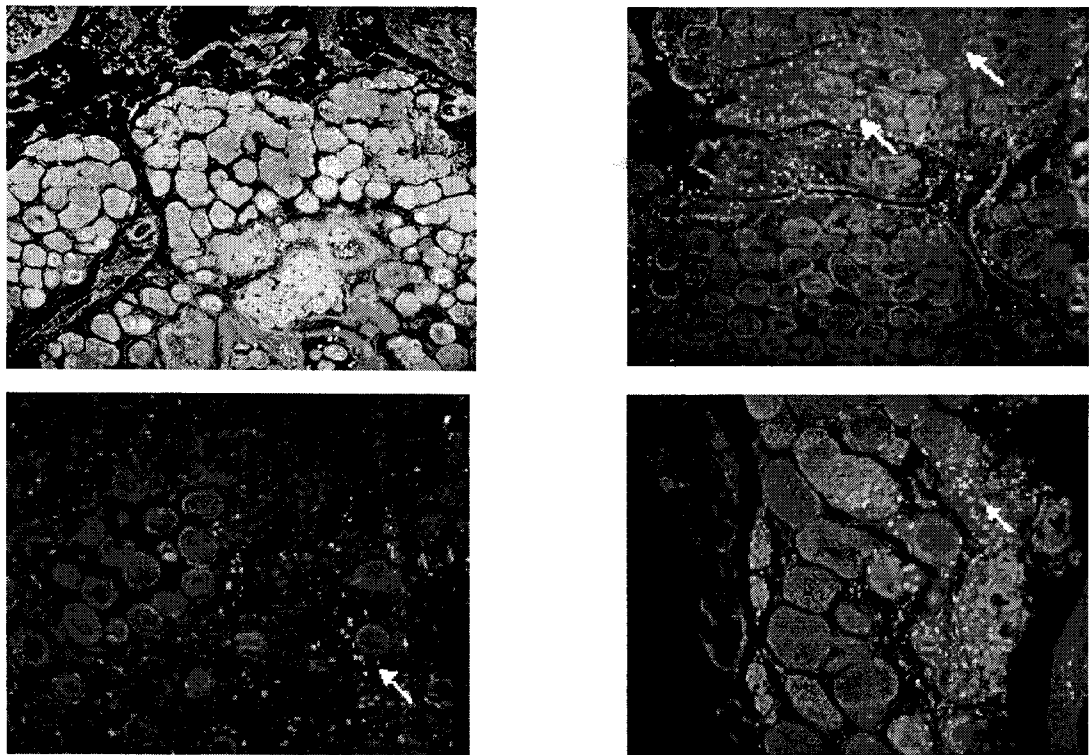


Fig. 9. Normal testes (left upper, X200). Degenerative and necrotic changes (arrow) in the testes of sword tail fish treated with mixture of endosulfan and molinate (high conc. : right upper, mid conc. : left lower, low conc. : right upper).

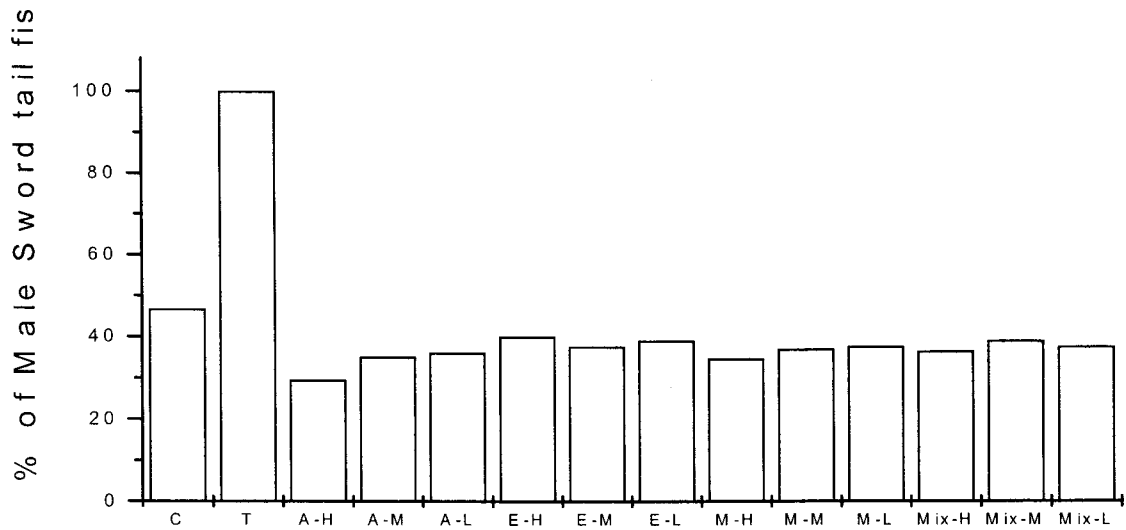


Fig. 10. Sex ratio (%) of sword tail fish treated with each materials for three months. (C:control, T:testosterone, A:alachlor, E:endosulfan, M:molinate, Mix:mixture of endosulfan and molinate, H:high conc., M:mid conc., L:low conc.)

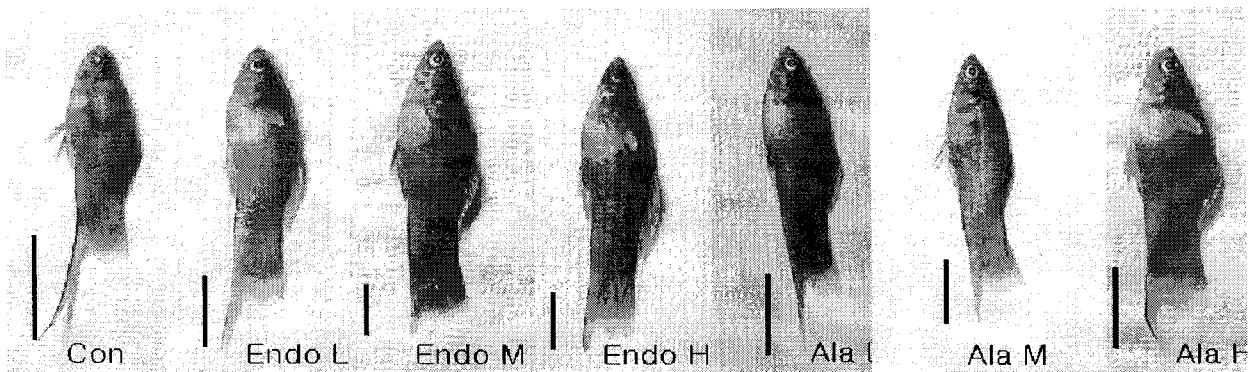


Fig. 11. Representative sword tail fish treated with endosulfan andalachlor for three months. The group treated with mid and high concentrations of endosulfan andalachlor showed the shorter tail than any other groups. (Con : control, Endo : endosulfan, Ala :alachlor, H : high conc., M : mid conc., L : low conc.)

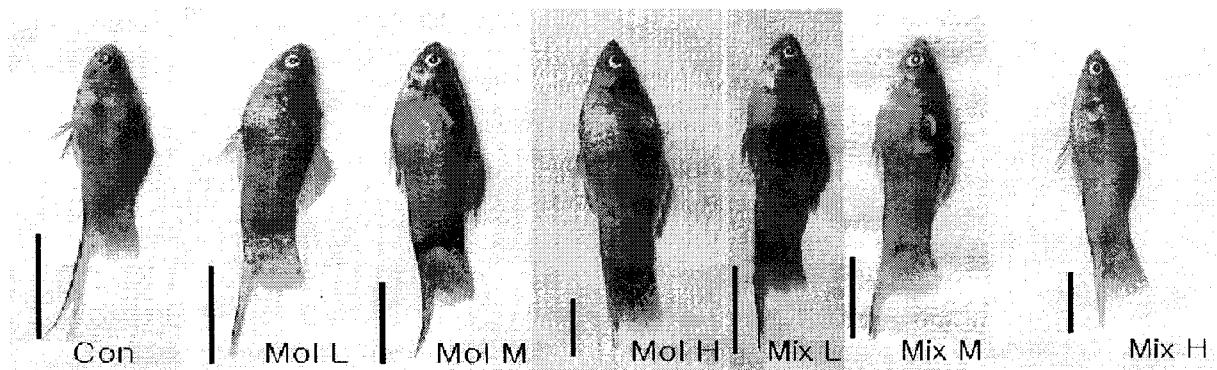


Fig. 12. Representative sword tail fish treated with molinate and mixture of endosulfan and molinate for three months. The group treated with high concentration of molinate showed the shorter tail than any other groups. (Con : control, Mol : molinate, Mix : mixture of endosulfan and molinate, H : high conc., M : mid conc., L : low conc.)

- Hontela (1997) In vivo testing of the functional integrity of the corticosterone-producing axis in mudpuppy (Amphibia) exposed to chlorinated hydrocarbons in the wild. *Environ Toxicol Chem* 16:1694~1706.
- Gronen, S, N. Denslow, S. Manning, S. Barenes, D. Barnes and M. Brower (1999) Serum vitellogenin production levels and reproductive impairment of male Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 4-tert-octylphenol. *Environ Health Perspect* 107:385~390.
- Harris, M. L., C. A. Bishop, J. Struger, M. R. Van Den Heuvel, G. J. Van Der Kraak, D. G. Dixon, B. Ripley and J. P. Bogart (1998) The functional integrity of northern leopard frog (*Rana pipiens*) and green frog (*Rana clamitans*) populations in orchard wetlands. I. Genetics, physiology, and biochemistry of breeding adults and young-of-the-year. *Env Toxicol Chem* 17:1338~1350.
- Hontela A. (1997) Endocrine and physiological responses of fish to xenobiotics: Role of glucocorticosteroid hormones. *Rev Toxicol* 1:1~46.
- Jobling, S, D. Sheahan, J. A. Osborne, P. Mauhiessen and J. P. Sumpter (1996) Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Onchomycus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environ Toxicol Chem* 15:194~202.
- Jonsson, C. J., B. O. Lund, B. Brunstrom and I. Brandt (1994) Toxicity and irreversible binding of two DDT metabolites-3-methylsulfonyl-DDE and o,p'-DDD-in adrenal interrenal cells in birds. *Environ Toxicol Chem* 13:1303~1310.
- Kwak, H. I, M. O. Bae, M. H. Lee, Y. S. Lee, B. J. Lee, K. S. Kang, C. H. Chae, H. J. Sung, J. S. Shin, J. H. Kim, W. C. Mar, Y. Y. Sheen and M. H. Cho (2001) Effects of nonylphenol, bisphenol A, and their mixture on the viviparous swordtail fish (*Xiphophorus Helleri*). *Environ Toxicol Chem* 20(4):787~795.
- Kime, D. E., J. P. Nash and A. P. Scott (1999) Vitellogenesis as a biomarker of reproductive disruption by xenobiotics. *Aquaculture* 177:345~352.
- Mellanen, P, M. Soimasuo, B. Holmbom, A. Oikari and R. Santti (1999) Expression of the vitellogenin gene in the liver of juvenile whitefish (*Coregonus lavaretus*) exposed to effluents from pulp and paper mills. *Ecotoxicol Environ Saf* 43:133~137.
- Miles-Richardson, S. R. (1999) effects of waterborne exposure to 4-nonylphenol and nonylphenol ethoxylate on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ Res* 80:S122~S137.
- Monteverdi, G. H. and R. T. Di Giulio (1999) An enzyme-linked immunosorbent assay for estrogenicity using primary hepatocyte cultures from the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Arch Environ Contam Toxicol* 37:62~69.
- Nicolas, J. M. (1999) Vitellogenesis in fish and the effects of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminants. *Aquat Toxicol* 45:77~90.
- Orlando, E. F. and N. D. Denslow Jr. (1999) A comparison of the reproductive physiology of largemouth bass, *Micropterus salmoides*, collected from the Escambia and Blackwater Rivers in Florida. *Environ health Perspect* 107:199~204.
- Schulz, R. (2001) Rainfall-induced sediment and pesticide input from orchards into the Lourens River, Western Cape, South Africa : Importance of a single event 8:1869-1876.

Effects on EDC-like farming chemicals in aquatic Organism

Hyun Woo Kim, Kun Ho Park, Jin Hong Park, Hua Jin, Joon Seong Kim, Gook Jong Eu, Hyun Sun Cho, Gami Kang, Myung Sung Lee, Byung Hoon Song¹, Jin Sup Shin¹, Maing Haing Cho* (*Laboratoy of Toxicology, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, ¹Pesticide Safety Division, Department of Crop Protection, National Institute of Agricultural Science & Technology, 441-707 Suwon, Korea*)

Abstract : Endocrine disrupting chemicals (EDCs) can alter hormone regulation that control reproductive system in animals. The effects of endosulfan, molinate, and alachlor that suspected to have examined disruption EDCs effect on a fish species of interest, *Xiphophorus helleri* (swordtail fish), were studied using vitellogenin (Vtg) and aromatase as diagnostic biomarkers. Induction of Vtg proteins was detected by RT-PCR in male fish treated with alachlor, and mixture of endosulfan and molinate in dose response manner. Also, induction of aromatase was detected by RT-PCR in male fish treated with alachlor, endosulfan, and mixture of endosulfan and molinate in similar manner. In this study, swordtail fish exposed to endosulfan or molinate individually did not show any adverse effects. However, Vtg and aromatase expressions and apoptosis were detected in swordtail fish exposed to the mixture of endosulfan and molinate. These results suggested that low concentrations of mixture of molinate and endosulfan individually do not affect swordtail fish, but may influence genital system, and induce apoptosis.

*Corresponding author (Fax : +82-2-873-1268, E-mail : mchotox@snu.ac.kr)