

4-Nonylphenol에 노출된 *Tigriopus japonicus* 암컷의 생존율과 포란율

곽인실·박명옥·이원철*

한양대학교 자연과학대학 생명과학과

The Survival Rate and the Rate of Attached Egg Sac for Female *Tigriopus japonicus* Exposure to 4-nonylphenol

Inn-Sil Kwak, Myung Ok Park and Wonchoel Lee*

Department of Life Science, Hanyang University, 17 haengdang-dong, Seongdong-gu, Seoul 133-791, Korea

Abstract – The aim of this study was to evaluate the attach rate and survival rate for the female harpacticoid *Tigriopus japonicus* response to 4-nonylphenol, known endocrine disrupter. The organisms were sampled by net sweeping on the Jeju Island in April, 2004 were reared in the laboratory condition. As the concentrations increased, the mortality was slowly increased. The first day for appearing dead individuals was clearly different between control conditions and treated conditions. When the female with egg sac was moved to experimental conditions for the adaptation, the female was dropped the egg sac from the body and then reproduced the egg sac into four to five days. Usually the female in control group recovered egg sac but that in the treated group made egg sac between 89% and 95% on exposed individuals. The dead individuals for control conditions were showed on ten days after treating chemicals while those for treated conditions were appeared four to six day after exposure to chemicals.

Key words : 4-nonylphenol, mortality, attach rate, egg sac, *Tigriopus japonicus*

서론

인간의 경제활동과 다양한 인위적인 활동에 의해 수 생태계로 유입된 일부 화학물질은 퇴적이라는 과정을 통해 하상에 잔존하거나 생물의 체내에 축적되어 생물 농축을 유도한다고 알려져 있다. 이런 유해 물질은 단지 체내에 축적이 되는 것뿐만 아니라 사람이나 동물의 체내에 있는 내분비 기관에서 미량으로 만들어져 혈액을

통해서 표적 기관에 작용하여 그 기능을 조절하는 호르몬과 같은 작용을 하여, 몸속의 내분비계를 교란시킨다. 이들 유해물질을 내분비계 교란물질 (endocrine disrupter), 일명 환경호르몬이라 한다. 이들은 정상적인 생명체 뿐만 아니라 그 후손에게까지 부작용을 유발시킨다. 현재 내분비계 장애를 일으킬 수 있다고 추정되는 물질로는 각종 산업용 화학물질 (원료물질), 살충제 및 제초제 등의 농약류, 유기중금속류, 다이옥신류, 식물에 존재하는 식물성 에스트로겐 (phytoestrogen) 등의 호르몬 유사물질, Diethylstilbestrol (DES)과 같은 의약품으로 사용되는 합성 에스트로겐류 및 기타 식품, 식품 첨가물 등이 있

* Corresponding author: Wonchoel Lee, Tel. 02-2220-0951, Fax. 02-2296-7158, E-mail. wlee@hanyang.ac.kr

다(국립환경연구원 1999).

내분비계 교란물질을 대상으로 한 연구는 많이 이루어져 있으나 이들의 대부분은 척추동물을 대상으로 이루어져 실제 지구상의 전체 동물계의 95%를 차지하고 있는 무척추동물에 대한 연구는 미비한 실정으로 많은 연구가 필요하다. 최근 들어 무척추동물은 내분비계 교란 물질의 생태계에 미치는 영향에 대한 지표자로 주목 받고 있으며 (Alvarez and Ellis 1990; Crisp *et al.* 1997; LeBlanc and Bain 1997) 무척추동물의 여러 물질들에 대한 비정상적인 발생과 생식 반응 관련 연구는 많이 이루어졌다(Choi *et al.* 1997; Oehlman *et al.* 2000; Billinghamurst *et al.* 2001). 무척추동물로는 갑각류 (crustacean)에 대한 연구가 많이 이루어졌다(Baldwin *et al.* 1997).

*Tigriopus japonicus*는 조간대에 주로 서식하며 식물플랑크톤을 섭식하는 초식성 요각류로 해양생태계에서 저차생산자이고 먹이생물로 중요한 위치를 차지하고 있다. 또한 온도나 염분과 같은 환경변화에 강한 내성을 지니므로 연구실 내의 사육이 용이한 편이다(Ito 1970; Koga 1970; Hagiwara *et al.* 1995). *T. japonicus*를 내분비계 교란물질로 알려져 있는 4-nonylphenol에 노출시켜 이에 대한 반응을 살펴보았다. Nonylphenol을 이용한 연구는 많이 이루어졌는데, 예로, 4-nonylphenol 노출 후 *T. japonicus*의 세대에 따른 발생과 생식에 관련된 반응과 노출 농도에 따라 달라지는 생존율과 생산율, 성비 등에 대

해 연구가 보고되기도 하였다(Marcial *et al.* 2002, 2003). 해양 요각류의 하나인 *Tisbe battagliai*에 nonylphenol을 노출시킨 후 성비에 변화가 나타나기도 한다고 하였다(Bechmann 1999). Rainbow trout의 경우 nonylphenol이 vitellogenin의 합성을 야기하여 수컷 생식기의 발현에 이상이 발생한다고 하였다(Purdom *et al.* 1994). 따라서 nonylphenol은 ‘estrogenic effect’를 보인다고 할 수 있다(Jobling *et al.* 1996). 본 연구에서는 포란을 하고 있는 암컷만을 실험에 투입하여 4-nonylphenol의 노출에 따른 생존율(survival rate)과 포란율(attach rate)의 변화에 대해 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 사육체계

실험생물인 *T. japonicus*는 2004년 4월 11일 제주도 구안연안 rock pool에서 63 µm의 플랑크톤 망을 이용하여 쓸어잡기로 채집하였다. 실내사육을 위한 사육수는 인공해수염을 이용하여 25.7 ppt로 제조하였으며 실온(25±1°C)에서 사육하였다. 먹이로는 서해 파도리에서 채집한 해조류를 세척 건조 한 후 갈아서 사용하였다. 실험에 투입된 *T. japonicus*는 포란한 상태의 개체로 각 농도별로 20마리씩 투입하였다. 실험에 투입된 개체의

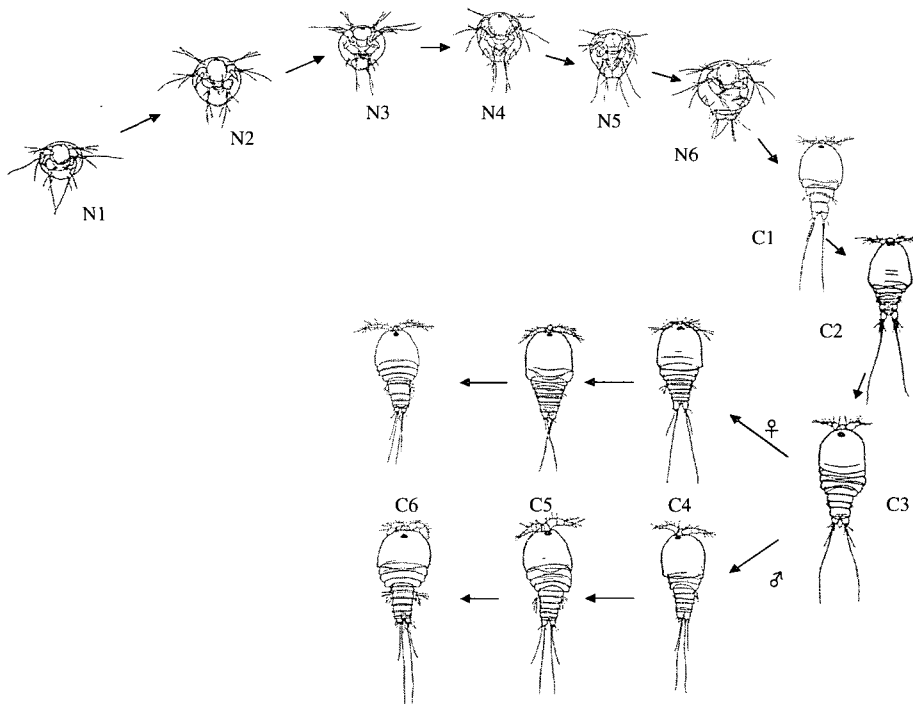


Fig. 1. The life cycle of *Tigriopus japonicus* (N: nauplius stage, C: copepodid stage).

적응을 위하여 비커에 옮긴 후 24시간 경과 후 약제를 처리 하였다. 노출기간 동안 *T. japonicus*는 낮과 밤 처리를 각각 16시간, 8시간으로 하였으며 온도 $20 \pm 1^\circ\text{C}$, 광도 500 lx 수준을 유지하는 항온기 (Sanyo incubator MIR-553)에서 노출실험을 하였다. 비커 (schott duran 250 mL)에 100 mL의 사육수를 넣고 각각 20마리의 포란한 개체를 투입하였으며 농도별로 두 번씩 반복하였다. 실험기간 동안 4일마다 사육수를 교체하고, 먹이 (0.07 g 해조류)를 공급하였다.

*T. japonicus*는 6단계의 nauplius stage (N1, N2, N3, N4, N5, N6)와 6단계의 copepodid stage (C1, C2, C3, C4, C5, C6)의 생활주기를 가지며, 마지막 6번째 copepodid stage가 성체이다 (Fig. 1). Copepodid stage의 제4기에 이르면 양성분화의 특징이 나타나고, 암컷과 수컷의 구별은 first antenna와 fifth swimming legs의 차이로 알 수 있다 (Ito 1970). 현재로는 완전한 성체의 형질을 기준으로 분류가 이루어지고 있으므로, 암컷은 포란한 개체를 가지고 동정하는 것이 안전하다. 이에 본 실험은 포란의 유무를 확인한 암컷 개체를 사용하였다. 실험기간 동안 매일 생존 개체수와 포란 개체수를 확인하였다. 생존 개체수 확인 시 죽은 개체는 주변의 물을 흔들었을 때 움직임이 없는 것 (3에서 5초)으로 판별하였다. 포란의 여부는 해부 현미경 (Olympus SZX12)을 통하여 개체에 알덩이가 달려 있는 지 확인하여 판별하였다. 본 실험에서 attach number는 포란한 상태의 개체수를, unattach number는 포란하지 않은 개체 수를 측정기록 하였다.

2. 투입 약제와 노출

실험 약제인 4-nonylphenol의 stock solution은 아세트산 100 mL에 4-nonylphenol 1 mg을 넣어 제조하여 4°C 에 보관하였다. 노출 농도는 nonylphenol 노출에 대한 해양요각류 *Tisbe battagliai*의 생존율과 성장률 연구를 참고하여 (Bechmann 1999) 농도를 각각 비처리군 (control), $10 \mu\text{g L}^{-1}$, $30 \mu\text{g L}^{-1}$, $100 \mu\text{g L}^{-1}$ 로 선정하였다.

4-nonylphenol의 반감기는 4°C 에서 47일, 20°C 에서 11

Table 1. The mortality rate and survival rate of *Tigriopus japonicus* response to 4-nonylphenol in each concentration. Asterisks (*) denote a significant difference, H_0 : difference between control and treatment ($P < 0.05$)

	Concentration ($\mu\text{g L}^{-1}$)			
	Control	10	30	100
Input number of individuals	40	35	37	38
Survival number of individuals	17	13	10	13
Survival rate (%)	42.50	37.14	27.03*	34.21*
Mortality rate (%)	57.50	62.86	72.97*	65.79*

일이다. 노출된 Nonylphenol 농도는 이를 후 처음 농도의 약 60%가 줄어들고 (McLeese *et al.* 1980a; Comber *et al.* 1993), 3일 후에는 처음 농도의 약 25% (McLeese *et al.* 1980b), 4일 후에는 약 16% 줄어든다고 하였다 (Bechmann 1999). 따라서 노출농도의 유지를 위하여 4일마다 사육수를 교체하고 약제를 투입하였다.

결 과

1. 약제 노출에 따른 치사율과 생존율

노출된 개체들의 치사율을 살펴보면, 농도에 따른 치사율이 비례되는 양상은 분명하지 않았으며 처리 후 62.86%에서 72.97%의 치사율 분포를 보였다 (Table 1). 약제처리에 따른 효과는 $30 \mu\text{g L}^{-1}$ 이상의 농도에서는 유의적인 것으로 나타났다. 그러나 약제 처리 후 처음 치사한 날을 살펴보면, 비처리군은 실험 시작 후 10일째에 첫 치사가 나타났고, $10 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서는 4일째, $30 \mu\text{g L}^{-1}$ 은 6일째, $100 \mu\text{g L}^{-1}$ 은 4일째 첫 치사가 나타났다 (Fig. 2).

생존율은 치사율과 반대로 처리농도가 낮을수록 높은 양상을 보였다. 약제 노출 9일 이후 개체들의 생존율이 떨어지기 시작하였다. 고농도인 $100 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서 9일째 생존율이 급격히 떨어졌으나 상대적으로 저농도인 $10 \mu\text{g L}^{-1}$ 과 $30 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서는 서서히 생존율이 감소하였다.

2. 약제 노출에 따른 포란율

포란율 (attach rate)을 살펴보면, 비처리군은 47.50%, 처리군은 34.21%에서 45.71%의 분포를 보였다 (Table 2). 포란율은 시간경과 후 전체적으로 감소되는 경향을 보였으며 처리한 약제의 농도가 높아짐에 따라 포란율이 낮아지는 것을 볼 수 있었으며 $30 \mu\text{g L}^{-1}$ 이상의 처리에서 비처리군과 유의적인 차이가 있는 것으로 나타났다. 실험조건적 적응시간인 24시간 후 포란의 여부를 관찰

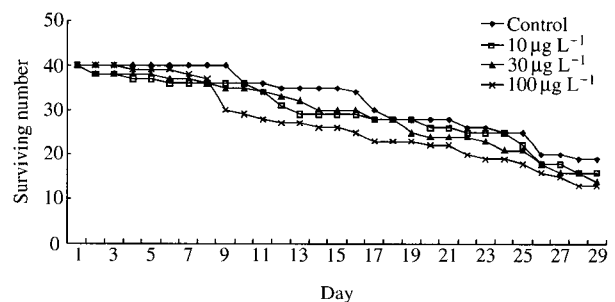


Fig. 2. The number of surviving individuals of *Tigriopus japonicus* response to 4-nonylphenol in each concentration.

Table 2. The rate of attached egg sac of *Tigriopus japonicus* response to 4-nonylphenol in each concentration. Asterisks (*) denote a significant difference, H₀: difference between control and treatment (P<0.05)

	Concentration ($\mu\text{g L}^{-1}$)			
	Control	10	30	100
Input number of individuals	40	35	37	38
Number of individuals with attached egg sac	19	16	14	13
Attach rate (%)	47.50	45.71	37.84*	34.21*

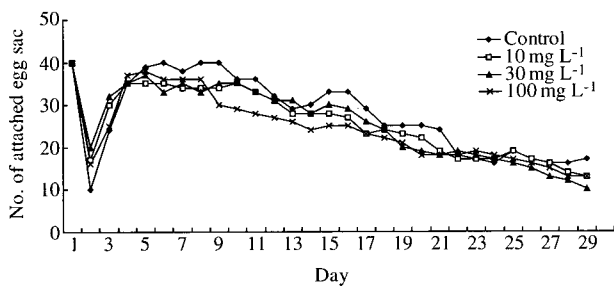


Fig. 3. The number of attached egg sac of *Tigriopus japonicus* response to 4-nonylphenol in each concentration.

한 결과 47%에서 75%의 개체가 포란을 하지 않았으나 4~5일 후 89% 이상의 암컷들이 다시 포란을 하는 높은 회복을 보였으며 이 후 약제 노출에 따라 전 농도에서 개체들의 포란 수가 줄어드는 것을 볼 수 있었다 (Fig. 3).

고 찰

전 실험 기간 동안 4-nonylphenol에 노출된 개체들의 치사율은 농도가 높아짐에 따라 증가하는 양상이었으나 비례적인 규칙은 보이지 않았다. 반면, 치사가 처음 발생하는 날은 비처리군과 처리군 간에 매우 뚜렷한 차이를 보였다(비처리군 10일째, 처리군 4에서 6일째). 해양 요각류 *Tisbe battagliai*는 $62 \mu\text{g L}^{-1}$ 이상의 nonylphenol 농도에서 생존율이 급격히 떨어지며, $125 \mu\text{g L}^{-1}$ 이상의 농도에서는 대부분의 개체들이 치사되었다 (Bechmann 1999). 실험 약제인 4-nonylphenol의 농도가 높아짐에 따라 개체의 생존에 영향이 크다는 것을 시사하였다. 포란한 암컷의 생존율은 노출농도가 높아짐에 따라 낮게 나타나지만 초기에는 농도에 따른 생존률의 차이가 없으나 노출 9일 후 생존율이 떨어지기 시작하여 독성효과로 인한 치사에 유발하는 데에 요구되는 시간이 상대적으로 길었다. 비처리군과 $100 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서는 9일째, $10 \mu\text{g L}^{-1}$ 는 11일과 13일 사이에 생존율이 급격히 감소하

고, $30 \mu\text{g L}^{-1}$ 에는 점차 감소하는 경향을 보여 노출농도에 따른 생존율 감소의 규칙성은 뚜렷하지 않았다. *T. japonicus*에 환경호르몬 물질인 bisphenol과 4-nonylphenol을 노출시킨 결과 발생이 지연되는 효과가 있으나 알의 생존율이나 생산력에는 크게 영향을 끼치지 않는다고 보고하였다(Marcial HS *et al.* 2002, 2003; Brown *et al.* 2003). 암컷의 약제 처리 후 포란율은 약제농도가 높아짐에 따라 낮아지며 노출 시간이 경과함에 따라 포란하는 암컷 개체수가 줄어들었다.

Rainbow trout를 이용한 연구에서 nonylphenol은 vitellogenin의 합성을 야기하여 수컷의 생식기 이상을 유발하며 (Purdum *et al.* 1994) nonylphenol이 환경호르몬 효과를 나타낸다고 하였다 (Jobling *et al.* 1996). 17-estradiol과 bisphenol A는 난소의 성숙을 촉진시켜 알의 생산율을 높여주나 4-nonylphenol은 암컷의 포란율에 큰 영향을 미치지 않는다고 하였다 (Andersen *et al.* 1999). Lindane에 노출된 담수 요각류 *Bryocamptus zschokkei*는 100 mg L^{-1} 의 농도에서 포란하는 암컷의 수는 비처리군에 비해 현저히 떨어졌다고 하였다 (Brown *et al.* 2003). 따라서 노출된 시약에 따라 요각류의 반응이 다르게 나타남을 알 수 있다.

요각류의 알 생산에 영향을 주는 환경요인으로 해수의 수온과 먹이농도가 가장 중요한 것으로 꼽았으나 (Park and Landry 1993) 본 실험여건에서는 수온과 먹이농도는 전 노출농도에서 동일하게 하여 영향을 끼친 요인으로서의 수온과 먹이는 배제하였다. 포란한 개체를 비커에 옮기고 24시간이 경과한 뒤 포란의 여부를 살펴본 결과 47.50%에서 75.00%의 개체들이 알을 떼어 낸 것으로 나타나 생리적인 변화에 의한 스트레스로 인한 영향으로 파악되었다 (Fig. 3). 수온이나 염분의 변동에 따라 생리적 변화가 나타나 (Burton and Feldman 1982; Hakimzadeh and Bradley 1990) 포란한 알을 떼어 낸 것으로 유추할 수 있었다. 이 후 모든 농도에서 4~5일이 경과한 후 89% 이상이 다시 포란을 회복하였다. 비처리한 개체들은 100%의 포란 회복을 보인 반면, 약제에 노출된 개체들은 89%에서 95%의 회복을 보여 약제에 따른 영향이 나타남을 보였다.

Alkylphenols류의 하나인 nonylphenol은 이미 일본 후생성, 세계생물보호기금 (World Wildlife Fund: WWF)에서 내분비계 교란물질로 추정하고 있는 물질의 목록에 포함되어 있는 알려진 내분비계 교란물질 중 하나이며, 이는 estrogenic compound의 하나로 'estrogenic effect'를 나타낸다고 알려져 있다. 본 연구에서 *T. japonicus*에 대한 4-nonylphenol의 효과는 암컷의 포란율이 회복되지 않는 개체들이 증가된 것을 보여주었다. 앞으로는 노출

된 암컷에서 출생한 개체들의 생리적인 형태적인 특성 및 생식능력 등을 파악하는 장기적인 세대간 연구가 필요하다 하다고 할 수 있다.

적 요

포란한 성충 암컷 *Tigriopus japonicus* (요각류)를 내분비계 교란물질로 잘 알려져 있는 4-nonylphenol에 노출하여 생존율과 포란율의 변화를 살펴보았다. 실험생물은 2004년 4월 제주도 구안연안에서 플랑크톤망으로 끌어잡기로 채집한 후 실내순응을 한 달 동안 시켰다. 치사율은 노출농도의 높아지면 증가하였으나 그 경향이 뚜렷하지 않았다. 반면, 노출 후 처음으로 치사한 개체가 발생하는 시기는 비처리군과 처리군에 따라 명백한 차이를 보였다. 포란한 암컷을 실험조건에 이동시키면 생리적인 변동으로 인해 알이 떨어졌다가 4~5일 후 비처리군은 100% 포란을 회복하지만 처리군에서는 89~95%가 회복되어 약제노출에 따른 영향을 보였다. 치사가 발생하는 시기는 비처리 시에는 10일 후부터이지만 노출 시에는 4에서 6일 후부터 발생하였다.

사 사

본 연구는 한국학술진흥재단의 중점연구소 지원과제 (KRF-2002-005-C00022) 지원에 의해 수행되었습니다.

참 고 문 헌

- 국립환경연구원. 1999. 분비계 장애물질의 이해와 대응. 125pp.
- Alvarez MMS and DV Ellis. 1990. Widespread neogastropod imposex in the Northeast Pacific: Implications for TBT contamination surveys. *Mar. Pollut. Bull.* 21:244-247.
- Andersen HR, B Halling-Sorensen and KO Kusk. 1999. A parameter for detecting estrogenic exposure in the copepod *Acartia tonsa*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 44:56-61.
- Baldwin WS, SE Graham, D Shea and GA LeBlanc. 1997. Metabolic androgenization of female *Daphnia magna* by the xenoestrogen 4-nonylphenol. *Environ. Toxicol. Chem.* 16:1905-1911.
- Bechmann RK. 1999. Effect of the endocrine disrupter nonylphenol on the marine copepod *Tisbe battagliai*. *Sci. Total Environ.* 233:33-46.
- Billinghurst Z, AS Clare and MH Depledge. 2001. Effects of 4-n-nonylphenol and 17-oestradiol on early development of the barnacle *Elminius modestus*. *J. Exp. Biol. Ecol.* 257: 255-268.
- Brown RJ, SD Rundle, TH Hutchinson, TD Williams and MB Jones. 2003. A copepod life-cycle test and growth model for interpreting the effects of lindane. *Aquatic Toxicol.* 63: 1-11.
- Burton RS and MW Feldman. 1982. Changes in free amino acid concentrations during osmotic response in the intertidal copepod *Tigriopus californicus*. *Comp. Biochem. Physiol. part A: Physiol.* 73:441-445.
- Choi KH, MS Suh and CH Kim. 1997. Effects of the Insect Growth Regulator Dimilin on the Survival Rate of Larvae, Adults, Egg Viability of *Tigriopus japonicus* Mori (Copepoda: Harpacticoida) *Environ. Sci.* 1(1):61-67.
- Comber MHI, TD Williams and KM Stewart. 1993. The effect of nonylphenol on *Daphnia magna*. *Water Res.* 27:273-276.
- Crisp TM, ED Clegg, RL Cooper, DG Anderson, KP Baetcke, JL Hoffmann, MS Morrow, DJ Rodier, JE Schaeffer, LW Touart, MG Zeeman, YM Patel and WP Wood. 1997. Special report on environmental ED: an effects assessment and analysis. Washington DC: USEPA. EPA/630/R-96/012.
- Hagiwara A, CS Lee and DJ Shiraishi. 1995. Some reproductive characteristics of the broods of the harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus* cultured in different salinities. *Fish Sci.* 61:618-622.
- Hakimzadeh R and BP Bradley. 1990. The heat shock response in the copepod *Eurytemora affinis* (POPPE) *Thermal Biol.* 15:67-77.
- Ito T. 1970. The biology of a harpacticoid copepod, *Tigriopus japonicus* Mori. *Journal of Faculty of Science Hokkaido University Series. Zoology* 17:474-500.
- Jobling S, D Sheahan, JA Osborne, P Mattiessen and JP Sumpter. 1996. Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* 15:194-202.
- Koga F. 1970. On the Life History of *Tigriopus japonicus* MORI (Copepoda) *J. Oceanogr. Soc. Japan* 26:11-21.
- LeBlanc GA and LJ Bain. 1997. Chronic toxicity of environmental contaminants: Sentinels and biomarkers. *Environ. Health Perspect* 105:65-80.
- Marcial HS, A Hagiwara and TW Snell. 2002. Effects of known and suspected endocrine disrupting chemicals on the demographic parameters of the copepod *Tigriopus japonicus*. *Fish Sci. (Suppl. 1)*:863-866.
- Marcial HS, A Hagiwara and TW Snell. 2003. Estrogenic compounds affect development of harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 22:3025-

3030.

McLeese DW, V Zitko and CD Metcalfe. 1980. Lethality of aminocarb and the components of the aminocarb formulation to juvenile Atlantic salmon, marine invertebrates and a freshwater clam. *Chemosphere* 9:79–82.

McLeese DW, DB Sergeant, CD Metcalfe, V Zitko and L Burridge. 1980. Uptake and excretion of aminocarb, nonylphenol, and pesticide diluent 585 by mussels (*Mytilus edulis*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 24:575–581.

Oehlmann J, U Schulte-Oehlmann, M Tillman and B Markert. 2000. Effects of endocrine disrupters on prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the Laboratory. Part 1. Bisphenol A and octylphenol as xeno-estrogens. *Ectotoxicol.* 9:

383–397.

Park C and MR Landry. 1993. Egg production by the subtropical copepod *Undinula vulgaris*. *Mar. Biol.* 117:415–421.

Purdom CE, PA Hardiman, VJ Bye, NC Eno, CR Tyler and JP Sumpter. 1994. Estrogenic effects of effluent from sewage treatment works. *Chem. Ecol.* 8:275–285.

Manuscript Received: January 20, 2005

Revision Accepted: April 26, 2005

Responsible Editorial Member: Ho Young Soh
(Yosu Univ.)