

Nonylphenol의 장기간 노출에 의한 붕어, *Carassius auratus*의 생식지표 변화

조남국, 진영국, 이철우¹, 김현미¹, 최경희¹,
정규혁², 강주찬³, 이정식*

전남대학교 수산해양대학 수산생명의학과,
¹국립환경과학원 환경노출평가과, ²성균관대학교 약학대학,
³부경대학교 수산생명의학과

Change of Reproductive Indicator of the Crucian Carp, *Carassius auratus* (Teleostei : Cyprinidae) Long-term Exposed to Nonylphenol

Nam Guk Cho, Young Guk Jin, Chulwoo Lee¹, Hyun-Mi Kim¹,
Kyunghee Choi¹, Kyu-Hyuck Chung², Ju-Chan Kang³ and Jung Sick Lee*

Department of Aqualife Medicine, College of Fisheries and Ocean Science,
Chonnam National University, Yeosu 550-749, Korea

¹Environmental Exposure Assessment Division, National Institute of Environmental Research,
Kyungseo-dong Seo-gu, Incheon 404-708, Korea

²College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, #300 Cheoncheondong
Jangan-gu, Suwon, Gyeonggi-do 440-746, Korea

³Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

ABSTRACT

Toxicity of nonylphenol (NP) one of EDCs was studied with focus on reproduction of the crucian carp, *Carassius auratus*. Fishes were cultured under control and nonylphenol exposure conditions for 32 weeks. Experimental group was composed of total of 4 groups, 1 control condition and 3 nonylphenol exposure condition (18 $\mu\text{g NP L}^{-1}$, 37 $\mu\text{g NP L}^{-1}$ and 83 $\mu\text{g NP L}^{-1}$). Survival rate was found to be similar in control and 18 $\mu\text{g NP L}^{-1}$. However, it is lower in the 37 $\mu\text{g NP L}^{-1}$ and 83 $\mu\text{g NP L}^{-1}$ in comparison to the control group. Deformation of gonads was the highest in the exposure condition of 18 $\mu\text{g NP L}^{-1}$ with the female illustrating higher ratio than the male. GSI was not much different in the male but in the female, NP exposure group illustrated lower value compared to the control group. HSI and GI did not illustrate any clear differences between the control and exposure group for both male and female. Intersex was 0% in the wild group, 4.16% in the laboratory control group, and 25.67% in the NP exposure condition with female illustrating higher compared to male. Concentration of blood vitellogenin in female illustrated no clear differences between the control and NP exposure group. However, in the male, it was higher in the NP exposure group in comparison to the control group, and illustrated higher values of vitellogenin compared to the figures found in the female of same

* To whom correspondence should be addressed.

Tel: +82-61-659-3172, E-mail: ljs@chonnam.ac.kr

con-centration condition.

Key words : *Carassius auratus*, nonylphenol, reproduction, vitellogenin

서 론

인위적으로 합성된 화학물질들이 생태계로 배출되어 일으키는 문제들 가운데 하나는 이들이 인간과 야생 생물들의 정상적인 내분비계 작용기작을 방해한다는 것이다. 이런 종류의 화학물질을 내분비계장애물질(endocrine disrupting chemicals: EDCs)이라 부른다. 내분비계장애물질은 쉽게 분해되지 않고 안정하여, 환경 또는 생체 내에 지속적으로 축적되는 성질이 있으며, 일반적으로 물질의 종류에 따라 교란시키는 호르몬의 종류 및 교란방법이 서로 다르다. 내분비계장애물질이 생물체에 미치는 영향 정도는 종, 연령, 생활사 그리고 노출형태 등에 따라 큰 차이를 보인다(Mallatt, 1985; Wester *et al.*, 1990; Holm *et al.*, 1993). EDCs는 대부분 지용성으로서 생태계 내에서 잔류성이 강하며 매체간 이동 및 먹이사슬을 통한 생체농축이 일어날 수 있기 때문에 저농도로 분포할지라도 먹이사슬 상위단계의 생물에게는 악영향을 줄 수 있다.

Nonylphenol은 alkylphenol류에 속하는 비이온화 계면활성제로 분류되며, 세제나 페인트의 성분으로 상업적으로 폭넓게 이용되고 있다. Nonylphenol이 어류에 미치는 유해한 영향에 관해서는 carp, *Cyprinus carpio*의 성전환 유도(Gimeno *et al.*, 1998), rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*의 estrogen 수용체의 구조와 전사의 이상, 성전환, 부화율 감소 및 암컷에서 testosterone 농도 증가(Madigou *et al.*, 2001; Schwaiger *et al.*, 2002), zebrafish, *Danio rerio* 초기생활사에서 시원생식세포의 분포변화(Willey and Krone, 2001), 간에서 vitellogenin 합성 증가(Achermann *et al.*, 2002), 자웅동체의 출현이 관찰되는 어류인 *Rivulus marmoratus*에서 비정상적인 생식소의 분화(Tanaka and Grizzle, 2002) 그리고 guppy, *Poecilia reticulata*에서 에스트로젠성활성(Cardinali *et al.*, 2004)이 보고되어 있다.

하지만 nonylphenol에 대한 연구는 대부분 단기간 노출에 의한 연구들이 주를 이루고 있으며, 특히 장기간 노출 동안의 용량-반응에 대한 연구 자

료는 찾아보기 어려운 실정이다. 따라서 본 연구는 국내 담수어종 중의 하나인 붕어, *Carassius auratus*를 nonylphenol에 장기간 노출시킴으로써 나타나는 생식지표의 변화를 조사하여 추후 여러 종류의 EDCs가 수서동물에 미치는 위해성에 관한 연구를 수행하는데 기초 자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료

본 연구에 사용된 붕어, *Carassius auratus*는 충청북도 내수면연구소에서 315개체를 분양받아 실험실로 운반 후 30L 수조 6개에 나누어 4주 동안 순응시켰다. 개체의 크기는 평균 전장 53 mm, 평균 전중 2.0g이었다.

2. 방법

1) 사육조건

실험기간은 2004년 10월 5일부터 2005년 5월 20일까지 32주였다. 실험수조는 30L의 지수형 순환여과식 사각 유리수조에 각 농도구별로 두 그룹으로 나누어 2회 반복 실험을 하였다. 실험어는 각 수조마다 35 개체씩 수용 하였으며, 실험기간 동안 광주기와 온도는 자연조건으로 설정하였다. 먹이는 1,000 μm 크기의 잉어용 인공배합사료(Ewha oil & fat ind. Co., Ltd. Korea)를 매일 1회 각 수조마다 전체 체중의 0.5~1%씩 공급하였다. Nonylphenol은 휘발성이 있으며, 수조 내 모래나 수조벽면에 흡착되거나 분해 될 수도 있기 때문에, 본 연구에서는 실험수의 일정한 농도를 유지하기 위해 Robert *et al.* (2003)의 연구방법을 감안하여 2일마다 실험수 50%를 교환하였다.

2) 시험용액 및 실험구

본 연구에 사용된 시험용액은 nonylphenol (NP, Aldrich Chem. Co. Inc., U.S.A)을 acetone에 1:100으로 녹인 후, 증류수로 1g NP L⁻¹의 표준용액을

만든 다음, 실험농도 별로 희석하여 조제하였다. 실험구는 대조구(negative)와 acetone(solvent) 대조구의 5개 농도구를 설정하여 급성독성 실험을 하였으며, 노출농도는 예비실험 결과 Ackermann *et al.* (2002) 등의 문헌을 참고하여 0(control), 18, 37, 83 $\mu\text{g NPL}^{-1}$ 로 설정하였다.

3) 사육수 내의 nonylphenol 농도측정

시료 1L를 포집용 고상 카트리지, 초산메틸 4 mL, KD 농축관, n-hexane 그리고 내부표준액(NP-d4 5 $\mu\text{g/mL}$) 0.1 mL를 사용하여 전처리액을 만들었다. 전 처리된 시료에 1 N-KOH ethanol 0.5 mL를 넣은 다음 diethyl sulfate 0.2 mL를 넣어 실온에서 10분간 방치하였다. 여기에 1 N-KOH ethanol 용액 5 mL를 표선까지 채운 후 마개를 닫고 70°C에서 1시간 동안 가열하였다. 가열 후 실온까지 냉각한 시료에 증류수를 넣고 잘 흔들어 고형물을 녹인 다음 n-hexane 1 mL를 넣고 흔들어 정치하였다. 미리 10 mL 원심관에 작은 깔때기를 설치하고 솜으로 마개를 하여 그 위에 약 3g의 Na_2SO_4 를 넣어 두었다. n-hexane층 약 0.7 mL를 취하여 Na_2SO_4 위에 스며들게 하였고, n-hexane 3 mL로 용출시켰다. 용출된 n-hexane에 N_2 가스를 넣고, 4% diethyl ether/n-hexane 1 mL를 더해서 용해시켰다. 이 용액을 4% diethyl ether/n-hexane으로 통과시키면서 최초의 용출액 8 mL를 채취하였고, 용출된 4% diethyl ether/n-hexane에 N_2 가스를 불어넣어 0.5 mL까지 농축하여 측정용 시료용액으로 하였다. 이와 같은 과정을 거친 다음 GC-MSD(Shimadzu, Model GC 17A, QP-5050A)로 검출하였다. 위와 같은 방법으로 검출된 사육수내의 nonylphenol 농도는 Table 1과 같다.

Table 1. Nominal and measured nonylphenol concentrations ($\mu\text{g NPL}^{-1}$) in water

Nominal concentration ($\mu\text{g NPL}^{-1}$)	Measured concentration ($\mu\text{g NPL}^{-1}$)			
	0h	24h	48h	72h
Control	ND	ND	ND	ND
18.0	18.28	3.01	2.09	0.49
37.0	37.76	9.49	7.57	1.15
83.0	82.70	19.14	14.67	3.97

* ND : not detected.

4) 생존율

어류의 생존율은 매일 12시간 간격으로 사망개체를 확인하여 누적사망율을 구한 후 생존율로 환산하였다.

5) 생식소 기형을

대조구를 포함한 각 노출구에서 실험 종료시기에 생존한 전 개체를 채집하여 해부한 후 생식소의 외형을 육안으로 확인하였고, 외형적 이상을 가진 개체들을 농도구별로 백분율(%)로 표시하였다.

6) 생식지수

(1) 생식소중량지수(gonadosomatic index: GSI)

및 간중량지수(hepatosomatic index: HSI)

GSI와 HSI는 어류의 체중 및 적출된 생식소와 간을 전자저울을 이용하여 0.01 g까지 측정된 후 이 값을 토대로 GSI는 생식소 무게(g) \times 100/체중(g), HSI는 간 무게(g) \times 100/체중(g)의 식으로 표시하였다.

(2) 생식소 발달단계

생식세포 발달단계를 기초로 이들이 우점하는 단계를 나누었다.

암컷의 생식세포 발달은 난원세포기(oogonial stage), 난황형성전기(previtellogenic stage), 난황형성개시기(initial vitellogenic stage), 난황형성활성기(active vitellogenic stage) 성숙기(mature stage) 그리고 완숙기(ripe stage)의 6단계로 나누었으며, 이를 토대로 생식소 발달단계를 성장기(growing: G), 성숙기(mature: M), 완숙 및 산란기(ripe and spawning: RS) 그리고 회복 및 휴지기(recovery and resting: RR)의 4단계로 나누었다(Fig. 1).

수컷의 생식세포 발달은 정원세포기(spermatogonium stage), 정모세포기(spermatocyte stage), 정세포기(spermatid stage), 정자기(sperm stage)의 4단계로 나누었으며, 이를 토대로 생식소 발달단계를 분열증식 및 성장기(multiplicative and growing: MG), 성숙기(mature: M), 완숙 및 방정기(ripe and spent: RS) 그리고 회복 및 휴지기(recovery and resting: RR)의 4단계로 나누었다(Fig. 2).

(3) 생식소지수(gonad index: GI)

GI는 조직표본 관찰 결과 구분된 생식소 발달단계를 이용하여 다음과 같이 조사하였다. 암컷은 각

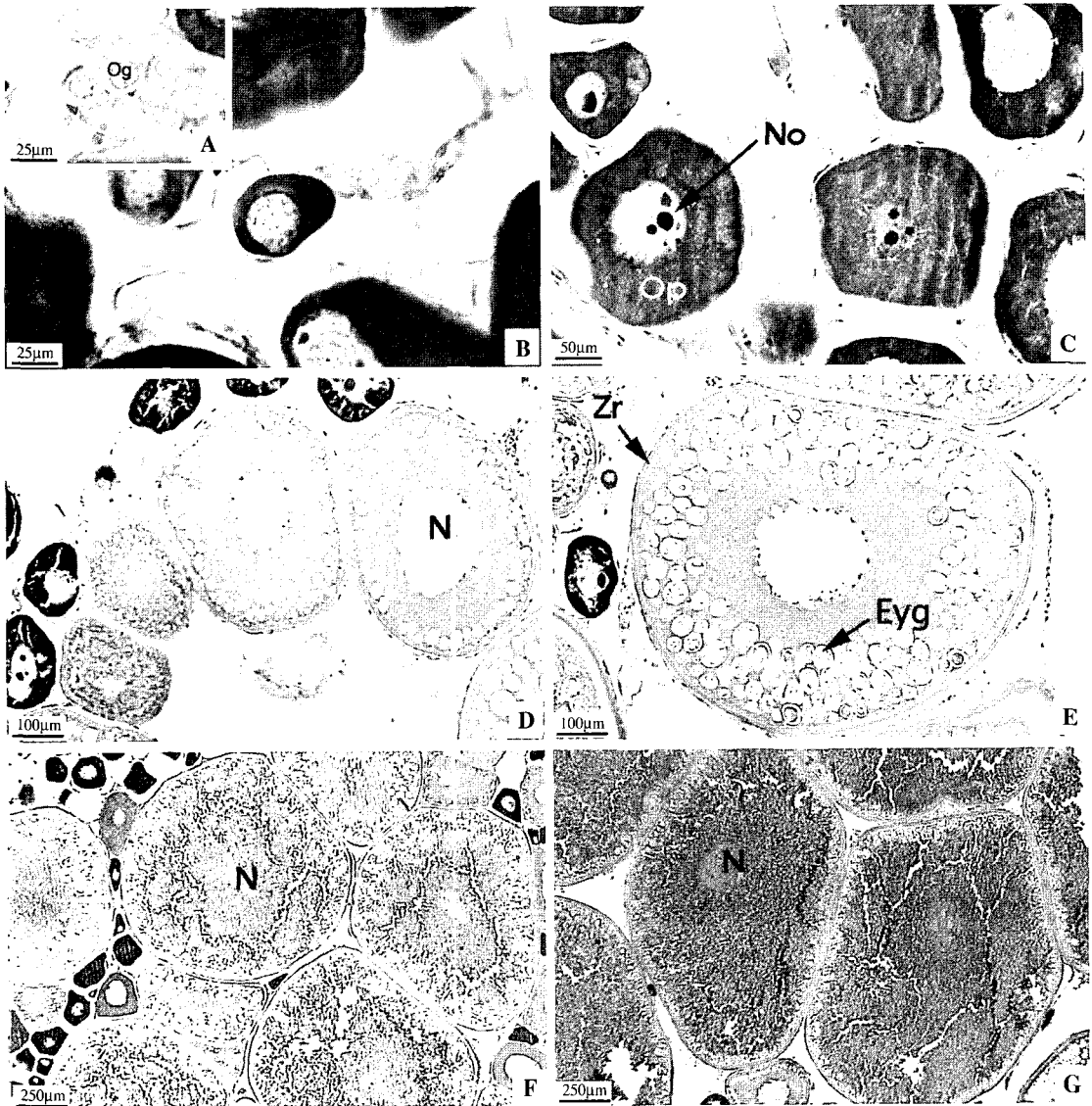


Fig. 1. Oocyte developmental stage of the crucian carp, *Carassius auratus*. A: Oogonial stage. B: Previtellogenic stage. Note the homogeneous cytoplasm. C: Initial vitellogenic stage. Note the appearance of small yolk vesicle. D: Early active vitellogenic stage (Eyg). Note the numerous yolk vesicle. E: Late active vitellogenic stage. Note the eosinophilic yolk granules. F: Mature stage. Note the germinal vesicle breakdown and numerous eosinophilic yolk granules. G: Ripe stage. N: nucleus, No: nucleolus, Og: oogonia, Op: ooplasm, Zr: zona radiata.

발달단계별로 상수(RR=1, G=2, M=3, RS=4)를 곱한 전체의 합을 개체 수로 나누었으며, 수컷 역시 각 발달단계별로 상수(RR=1, MG=2, M=3, RS=4)를 곱하여 계산하였다.

7) 조직학적 방법

채집된 모든 개체들은 Bouin's solution에 고정 후, 파라핀 절편법으로 두께 4~6 µm의 횡단면과 종단면으로 연속절편을 제작하였으며, Mayer's hematoxylin-eosin (H-E) 염색 후 광학현미경으로 관찰하였다.

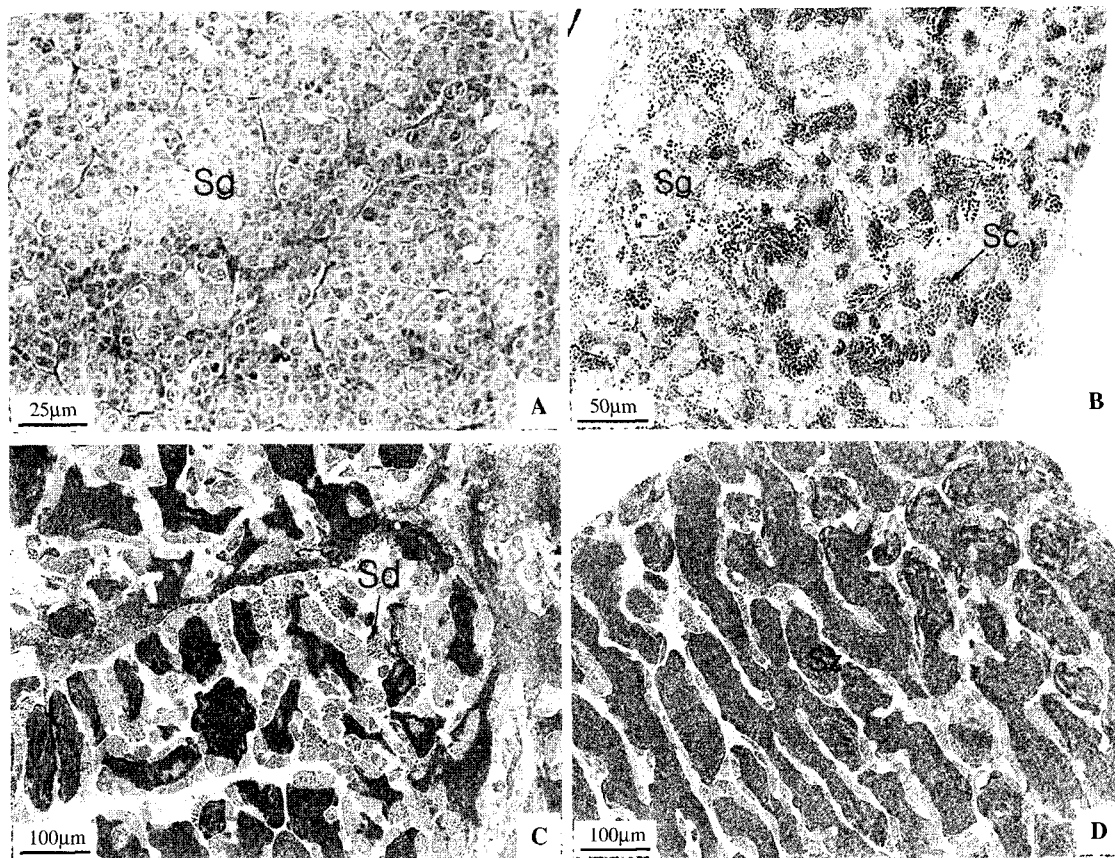


Fig. 2. Testicular developmental stage of the crucian carp, *Carassius auratus*. A: Recovery and resting stage. Note the numerous spermatogonia (Sg). B: Multiplicative and growing stage. Note the numerous spermatocytes (Sc). C: Mature stage. Note the spermatid (Sd) and spermatozoa (Sz). D: Ripe and spent stage. Note the numerous basophilic spermatozoa.

8) Intersex

Intersex 출현율은 실험개시기에 충청북도 내수면 연구소에서 채집한 자연대조구(wild group), 실험종료일의 실험대조구 및 노출구의 어류를 채집하여 조사하였다. Intersex는 생식소 조직표본의 현미경 검경 시 난소에서 수컷의 생식세포 또는 정소에서 암컷의 생식세포가 관찰되는 것을 기준으로 조사하였다.

9) Vitellogenin 측정

Vitellogenin은 국립환경과학원 연구사업으로 개발된 붕어의 vitellogenin 모노클론 항체를 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 방법으로 정량검색을 수행하였다. 혈청은 붕어의 미부정맥에서

주사기를 이용하여 혈액을 채취한 후 10분간 4°C 냉장고에서 안정시킨 다음 3,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 분리하였다. 분리된 혈청을 1,000배 희석하여 50 µL씩 ELISA용 96 well에 넣어 4°C에서 16시간 동안 코팅하였다. 판을 PBS로 세척한 후 PBSTG 용액을 첨가하여 상온에서 1시간 동안 반응시킴으로써 blocking 하였다. 판을 PBS-Tween 20으로 세척한 후 각 well에 적절하게 희석된 모노클론 항체를 넣고 상온에서 2시간 동안 반응시켰으며, PBS-Tween 20을 사용하여 판을 3회 세척한 후 alkaline phosphatase가 붙어 있는 secondary antibody를 첨가하였다. 상온에서 2시간 동안 반응시킨 후 PBS-Tween 20으로 3회 세척하고 substrate를 넣었다. 상온에서 10분간 반응시킨 후 2.5%

EDTA용액 70 μL 씩을 넣어 반응을 중지시킨 다음 595 nm에서 OD 값을 측정하였다. 정제된 붕어의 혈액 속에 있는 vitellogenin의 흡광도를 측정하고 표준적정그래프에 의하여 그 농도를 계산하였다.

10) 통계적 방법

분석은 32주 노출 후 모든 개체들을 대상으로 하였으며, 통계처리는 SPSS 통계 프로그램을 이용하여 ANOVA t-test를 한 후 다중비교를 최소 유의치 검정(Lesat-significant difference test)으로 유의성($P < 0.05$)을 검정하였다.

결 과

1. 생존율

노출구의 평균 생존율은 83.0%로 대조구의 생존율 88.5%보다 다소 낮게 나타났다. 대조구는 실험 개시 후 3주까지는 100%의 생존율을 보이다가 차츰 감소하기 시작하여 20주에 88.5%를 나타냈다. 모든 노출구는 실험개시 후 11주까지는 불규칙한 양상을 나타냈지만, 12주부터 농도가 높을수록 생존율이 감소하기 시작하였다 (Fig. 3).

2. 생식소 기형

생식소의 외형적 이상이 나타난 개체들은 생식소가 한 엽만 존재하거나 또는 2엽의 생식소에서 크기가 비정상적으로 차이가 났다 (Fig. 4). 32주 동안 nonylphenol에 노출된 붕어 암컷과 수컷의 생식소 기형율은 Fig. 5와 같다. 생식소 기형은 대조구를 포함한 모든 노출구에서 암컷 생식소의 기형율

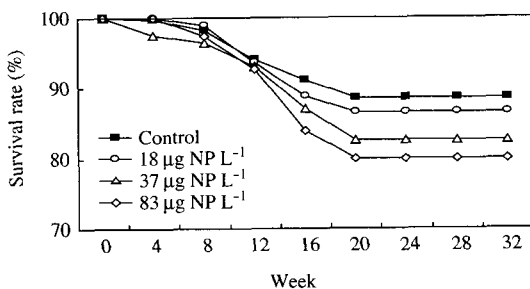


Fig. 3. Survival rate of the crucian carp, *Carassius auratus* exposed to nonylphenol for 32 weeks.

이 수컷보다 높게 나타났다. NP 노출구에서 암컷의 생식소 기형은 18, 37 및 83 $\mu\text{g NPL}^{-1}$ 농도구에서 각각 31.25, 16.67, 19.23%를 나타냈다. 수컷의 생식소 기형은 18 $\mu\text{g NPL}^{-1}$ 농도구에서는 관찰되지 않았지만, 37과 83 $\mu\text{g NPL}^{-1}$ 농도구에서는 각각 6.67과 7.69%를 나타냈다.

3. 생식소증량지수 (GSI)

32주 동안 nonylphenol에 노출된 붕어의 GSI는 Fig. 6과 같다. 암컷의 GSI는 대조구에서 23.43 이었으나, 18, 37 및 83 $\mu\text{g NPL}^{-1}$ 농도구에서 각각 15.27, 19.38, 16.11로 나타나 대조구에 비해 NP 노출구에서 낮은 값을 보였다. 수컷의 GSI는 대조구에서 4.23 이었으며, 모든 NP 노출구에서 각각 4.2 내외로 조사되어 대조구와 NP 노출구 사이에 뚜렷한 차이는 없었다.

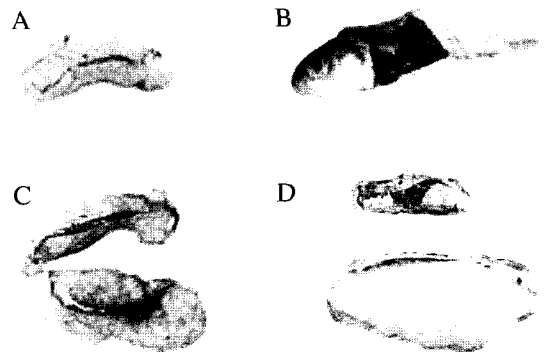


Fig. 4. Gonad deformation of the crucian carp, *Carassius auratus* exposed to nonylphenol for 32 weeks. A: Single lobular ovary. B: Unbalanced testis. C and D: Unbalanced ovary.

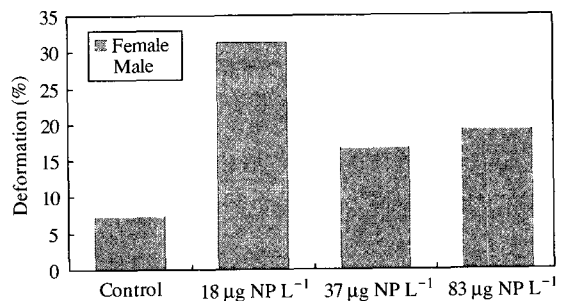


Fig. 5. Deformation rate of gonad of the crucian carp, *Carassius auratus* exposed to nonylphenol for 32 weeks.

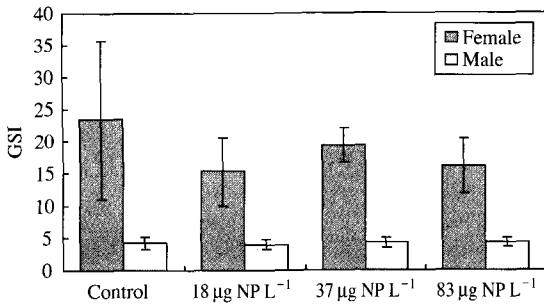


Fig. 6. Gonadosomatic index (GSI) of the crucian carp, *Carassius auratus* exposed to nonylphenol for 32 weeks. Vertical bar: SD.

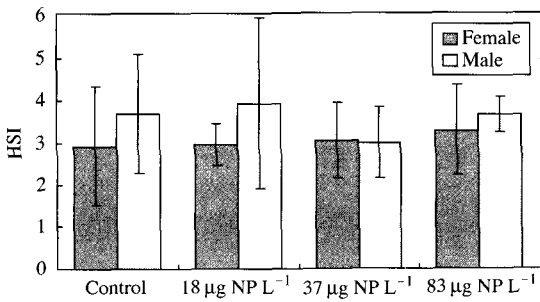


Fig. 7. Hepatosomatic index (HSI) of the crucian carp, *Carassius auratus* exposed to nonylphenol for 32 weeks. Vertical bar: SD.

4. 간중량지수 (HSI)

32주 동안 nonylphenol에 노출된 붕어의 HSI는 Fig. 7과 같다. 암컷의 HSI는 대조구에서 2.93, NP 노출구에서 평균 3.10으로 조사되었고, 수컷의 HSI는 대조구에서 3.69, NP 노출구에서 평균 3.42로 조사되어 암·수 모두 대조구와 NP 노출구 사이에 유의한 차이는 관찰되지 않았다.

5. 생식소 발달

암컷의 생식소 발달은 대조구에서 전 개체가 완숙 및 산란기로 조사되었고, NP 노출구에서 18과 37 µg NP L⁻¹ 농도구에서는 완숙 및 산란기가 100%, 83 µg NP L⁻¹ 농도구에서는 성장기 9.1%, 완숙 및 산란기 90.9%로 조사되었다. 수컷의 생식소 발달은 대조구에서 전 개체가 완숙 및 방정기로

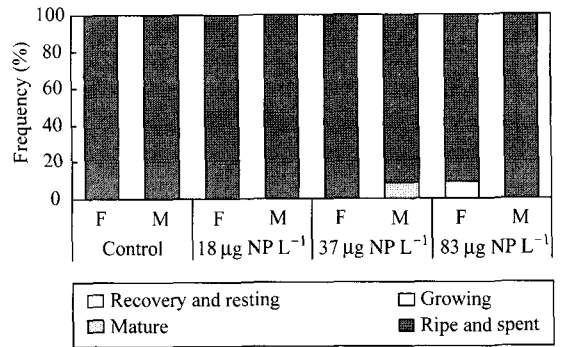


Fig. 8. Frequency of gonad developmental stage of the crucian carp, *Carassius auratus* exposed to nonylphenol for 32 weeks.

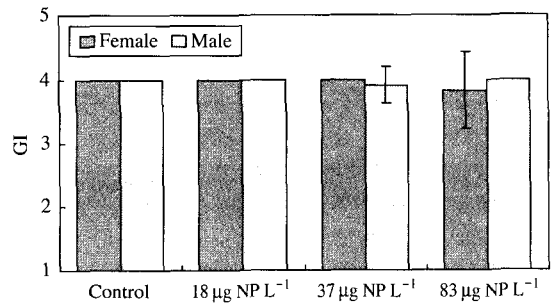


Fig. 9. Gonad index (GI) of the crucian carp, *Carassius auratus* exposed to nonylphenol for 32 weeks. Vertical bar: SD.

조사되었고, NP 노출구에서 18과 83 µg NP L⁻¹ 농도구에서는 완숙 및 방정기가 100%, 37 µg NP L⁻¹ 농도구에서는 성숙기 8.3%, 완숙 및 방정기 91.7%로 조사되었다. 대조구에 비해 37 µg NP L⁻¹ 농도구에서의 수컷과 83 µg NP L⁻¹ 농도구에서의 암컷에서 생식소 발달이 다소 느린 개체들이 관찰되었지만, 전체적으로 암·수 모두 대조구와 NP 노출구 사이에 유의한 차이는 관찰되지 않았다(Fig. 8).

6. 생식소지수 (GI)

32주 동안 nonylphenol에 노출된 붕어의 GI는 Fig. 9와 같다. 암컷의 GI는 대조구에서 전 개체가 4.0으로 조사되었고, NP 노출구에서 18과 37 µg NP L⁻¹ 농도구에서는 4.0, 83 µg NP L⁻¹ 농도구에서는 3.82로 조사되었다. 수컷의 생식소 발달은 대조

구에서 전 개체가 4.0으로 조사되었고, NP 노출구에서 18과 83 $\mu\text{g NPL}^{-1}$ 농도구에서는 4.0, 37 $\mu\text{g NPL}^{-1}$ 농도구에서는 3.92로 조사되었다. 대조구에 비해 83 $\mu\text{g NPL}^{-1}$ 농도구의 암컷과 37 $\mu\text{g NPL}^{-1}$ 농도구의 수컷에서 GI가 다소 낮게 관찰되었지만, 전체적으로 암·수 모두 대조구와 NP 노출구 사이에 유의한 차이는 관찰되지 않았다.

7. Intersex

Intersex 출현율은 대조구에서 4.16%, NP 노출구에서 25.67%로 대조구보다 NP 노출구가 높게 조사되었으며, 18 $\mu\text{g NPL}^{-1}$ 농도구에서 36.51%로 가장 높았다. 또한 수컷 생식소에서 intersex 출현율은

대조구에서 0%, NP 노출구에서 10.1%로 조사되었고, 암컷 생식소에서의 출현율은 대조구에서 4.2%, NP 노출구에서 15.6%로 나타나, 수컷보다 암컷의 생식소에서 높게 조사되었다(Fig. 10).

8. Vitellogenin 농도

32주 동안 nonylphenol에 노출된 붕어의 vitellogenin 농도는 Fig. 12와 같다. 암컷의 혈중 vitellogenin 농도는 대조구에서 50.2 $\mu\text{g L}^{-1}$, NP 노출구에서 43.4 $\mu\text{g L}^{-1}$ 로 조사되어 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 하지만, 수컷의 경우 대조구의 0.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ 에 비해 NP 노출구에서 58.7 $\mu\text{g L}^{-1}$ 로 높게 나타나 유의한 차이가 관찰되었다. 또한 수컷의 경우 같은 NP 농도구의 암컷보다도 높게 나타났다.

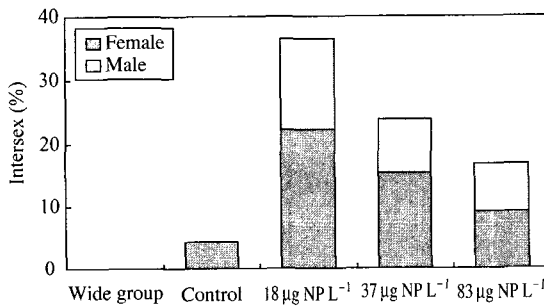


Fig. 10. Intersex of the crucian carp, *Carassius auratus* exposed to nonylphenol for 32 weeks.

고찰

Nonylphenol은 다양한 수서동물에서 생존, 생식 그리고 기관계의 구조적 이상 등 여러 가지 이상 현상을 유발한다(Gimeno *et al.*, 1998; Achkermann *et al.*, 2002; Cardinali *et al.*, 2004).

Fathead minnow, *Pimephales promelas*의 발생중인 배와 자어의 nonylphenol 노출에서 23 $\mu\text{g NPL}^{-1}$ 농도에서 56.7%, 14 $\mu\text{g NPL}^{-1}$ 농도에서 66.7% 그리고 7.4 $\mu\text{g NPL}^{-1}$ 농도에서 76.7%의 생존율을 나

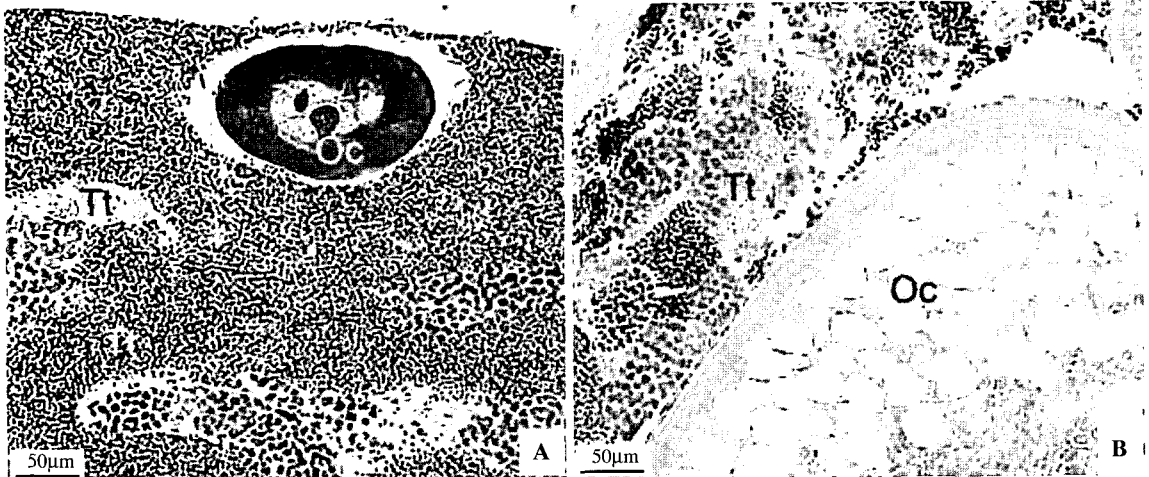


Fig. 11. Photomicrographs of intersex of the crucian carp, *Carassius auratus* exposed to 83 $\mu\text{g NPL}^{-1}$ for 32 weeks. A: Intersex in the testis, B: Intersex in the ovary. Oc: oocyte, Tt: testicular tissue.

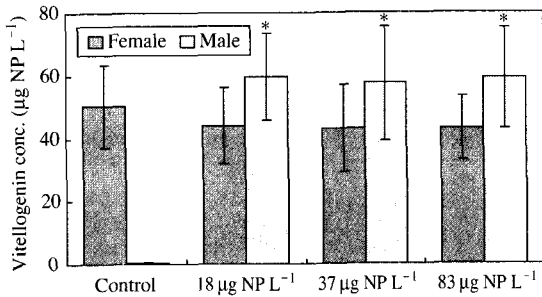


Fig. 12. Vitellogenin concentration of the crucian carp, *Carassius auratus* exposed to nonylphenol for 32 weeks. Vertical bar: SD. *: Significantly different from control ($P < 0.05$).

타냈다 (Ward and Boeri, 1991).

본 연구에서 nonylphenol에 노출되는 동안 붕어의 생존율은 노출 후 11주까지는 농도와 뚜렷한 상관관계가 없었으나, 12주부터는 농도에 따라 생존율이 감소하였다. 이와 같은 변화는 중, 노출물질 및 방법 등 다양한 요인에 따라 생물이 받는 영향이 서로 다르며, 환경에 대한 개체의 적응력 차이로 생각된다.

일반적으로 nonylphenol은 암컷에서 난 생산 증가, 수컷 이차성징의 감소, 그리고 수컷 정소조직에서 intersex 출현 등 에스트로겐 유사물질로서의 작용을 하는 것으로 알려져 있다 (Ren, 1996; Sumpter, 1998; Nimrod and Benson, 1998; Tanghe *et al.*, 1999; Harries *et al.*, 2000). 또한 수컷의 생식소에 난황전구체인 vitellogenine의 수치를 큰 폭으로 증가시키거나 암컷과 수컷 모두에서 생식소 발달을 부분적으로 억제시키는 효과도 나타낸다. Fathead minnow, *Pimephales promelas*를 butyl benzyl phthalate와 4-nonylphenol에 3주 동안 노출시킨 결과, butyl benzyl phthalate ($100 \mu\text{g L}^{-1}$)에서는 생존, GSI, 생식력, 난의 크기, vitellogenin 및 이차성징 등에서는 영향이 없었으나, nonylphenol (1, 10 and $100 \mu\text{g L}^{-1}$)에 노출된 암컷들에서 산란 수와 GSI가 농도의존적으로 감소하였고, 특히 $100 \mu\text{g NP L}^{-1}$ 에서는 난의 크기와 전체적인 생식력이 감소하는 것으로 나타났다 (Harries *et al.*, 2000). Nonylphenol $0.05 \sim 3.4 \mu\text{g L}^{-1}$ 에 노출된 fathead minnow, *Pimephales promelas*에서 난 생산성에 대한 영향이 관찰되지 않았으며 (Geisy *et al.*, 2000), methoxychlor $2.3 \mu\text{g}$

L^{-1} 에 노출된 medaka, *Oryzias latipes*의 부화자어에서 성비, 난 생산, 부화율 등에 유의성 있는 영향을 발견하지 못했다 (Nimrod and Benson, 1998). Nonylphenol $30 \mu\text{g L}^{-1}$ 과 $54.3 \mu\text{g L}^{-1}$ 에 노출된 rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*에서는 수컷의 GSI가 감소하였으며 (Jobling *et al.*, 1996), 164일 동안 bisphenol A에 노출된 fathead minnow, *Pimephales promelas* 성어에서는 대조구와 비교하여 $640 \mu\text{g L}^{-1}$ 과 $1280 \mu\text{g L}^{-1}$ 농도구에서 정자의 수가 감소하였고 (Sohoni *et al.*, 2001), $274 \mu\text{g L}^{-1}$ 과 $549 \mu\text{g L}^{-1}$ 에 노출된 guppy, *Poecilia reticulata* 성어에서는 총 정자수가 40.75% 감소하였다 (Haubruge *et al.*, 2000).

본 연구에서 32주간 nonylphenol에 노출된 붕어의 생식소의 외형적 기형율이 대조구에 비해 모든 NP 노출구에서 높았으며, GSI는 암컷에서, HSI는 수컷에서 대조구에 비해 감소하는 경향을 보였다. 생식소 발달빈도와 GI는 암컷에서는 $83 \mu\text{g NP L}^{-1}$, 수컷에서는 $37 \mu\text{g NP L}^{-1}$ 농도구에서 생식소 발달이 일부 개체에서 지연되는 것으로 나타났지만 유의적 차이는 관찰되지 않았다.

Vitellogenin은 난황전구체로 난황형성과정 동안에 estradiol cycle에 의하여 정상적으로 암컷의 간에서 생성되며 (Hinton and Lauren, 1990), 수컷의 간에서도 이와 유사한 유전자는 존재하지만 정상적인 조건에서는 거의 발현되지 않는 silent gene 형태로 존재한다 (Denslow *et al.*, 1999). 이러한 유전자들이 estrogen이나 estrogen 유사물질에 노출되면 자극을 받아 vitellogenin 합성이 유도되어, nonylphenol에 노출된 수컷에서 vitellogenin의 합성을 증가시키는 등의 기능을 한다 (Jobling and Sumpter, 1993; Ren *et al.*, 1996). 따라서 어류의 vitellogenin은 환경오염의 biomarker 또는 어류 생식능력이 변화를 가늠할 수 있는 중요한 인자로 인식된다.

본 연구에서 vitellogenin 농도는 암컷은 대조구에 비해 거의 차이가 없었지만, 수컷은 대조구에 비해 모든 NP 노출구에서 큰 폭으로 증가된 양상을 나타냈다.

Nonylphenol은 어류의 생식소에 intersex의 출현을 유도하거나, 정상적으로 자웅동체인 어류를 암컷으로 전환시키는 등의 영향을 미친다. Gimeno 등은 미성숙한 common carp, *Cyprinus carpio*를 pen-

tylphenol에 노출시켜 수컷에서 암컷의 생식관 형성을 관찰하였고, 정소의 일부에서 난모세포를 발견하였다(Gimeno *et al.*, 1998). Orn 등은 부화 후 20~60일 된 zebrafish, *Danio rerio*를 methyltestosterone $0.26 \mu\text{g L}^{-1}$, $1.0 \mu\text{g L}^{-1}$ 에 노출시켜 intersex 생식소가 $0.26 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서는 3%, $1.0 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서는 27% 발생한다(Orn *et al.*, 2003)고 보고하였으며, Koger 등은 testosterone $100 \mu\text{g L}^{-1}$ 에 노출된 medaka, *Oryzias latipes*에서 intersex를 관찰하였고(Koger *et al.*, 2000), Kang 등은 estradiol $0.03 \sim 0.46 \mu\text{g L}^{-1}$ 농도구에서 intersex를 관찰하였다(Kang *et al.*, 2002). 또한 ethinylestradiol $0.001 \sim 0.016 \mu\text{g L}^{-1}$ 농도에 노출된 fathead minnow, *Pimephales promelas*에서 intersex가 농도에 관련되어 증가한다는 보고도 있다(Lange *et al.*, 2001). 하지만 intersex가 형성 되었다고 해서 이것이 반드시 생식 불가능을 뜻하는 것은 아니다(Koger *et al.*, 2000; Metcalfe *et al.*, 2001; Seki *et al.*, 2004).

본 연구에서는 대조구에 비해 $83 \mu\text{g NP L}^{-1}$, $37 \mu\text{g NP L}^{-1}$ 그리고 $18 \mu\text{g NP L}^{-1}$ 농도구 순으로 intersex의 출현율이 높게 나타났다. 하지만 암컷의 생식소에서 분포비율이 높고, 생식소 발달 및 GI가 대조구와 NP 노출구 사이에 유의적인 차이가 나타나지 않아 기존 연구들과 같은 결론을 내리기에는 어려움이 있었다.

이상의 연구결과들을 볼 때 nonylphenol은 장기간 노출 시 어류의 생존에 영향을 미치며, 기존 단기간 노출결과들과 마찬가지로 내분비계장애물질로서의 작용을 하는 것으로 보여진다.

참 고 문 헌

- Ackermann GE, Schwaiger J, Negele RD and Fent K. Effects of long-term nonylphenol exposure on gonadal development and biomarkers of estrogenicity in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, *Aquat Toxicol* 2002; 60: 203-221.
- Cardinali M, Maradonna F, Olivotto I, Bortoluzzi G, Mosconi G, Polzonetti-Magni AM and Carnevali O. Temporary impairment of reproduction in freshwater teleost exposed to nonylphenol, *Repro Toxicol* 2004; 18: 597-604.
- Denslow ND, Marjorie CC, Kroll KJ and Green L. Vitellogenin as a biomarker of exposure for estrogen or estrogen mimics, *Ecotoxicology* 1999; 8: 385-398.
- Geisy JP, Pierens SL, Snyder EM, Miles-Richardson S, Kramer VJ, Snyder SA, Nichols KM and Villeneuve DA. Effects of 4-nonylphenol on fecundity and biomarkers of estrogenicity in fathead minnow, *Pimephales promelas*, *Environ Toxicol Chem* 2000; 19(5): 1368-1377.
- Gimeno S, Komen H, Jobling S, Sumpter J and Bowmer T. Demasculinisation of sexually mature male common carp, *Cyprinus carpio*, exposed to 4-tert-pentylphenol during spermatogenesis, *Aquat Toxicol* 1998; 43: 93-109.
- Harries JE, Runnalls T, Hill E, Harris CA, Maddix S, Sumpter JP and Tyler CR. Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnow, *Pimephales promelas*, *Environ Sci Technol* 2000; 34(14): 3003-3011.
- Haubruege E, Petit F and Gage MJG. Reduced sperm counts in guppies, *Poecilia reticulata* following exposure to low levels of tributyltin and bisphenol A, *Rproc R Soc Lond Ser B Biol Sci* 2000; 267(1459): 2333-2337.
- Hinton DE and Lauren DJ. Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes, *Am Fish Soc Symp* 1990; 8: 51-66.
- Holm G, Norrgren L, Andersson T and Thuren A. Effects of exposure to food contaminated with PBDE, PCN or PCB on reproduction, liver morphology and cytochrome P450 activity in the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*, *Aquat Toxicol* 1993; 27: 33-50.
- Jobling S and Sumpter JP. Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: An in vitro study using rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* hepatocytes, *Aquat Toxicol* 1993; 27: 361-372.
- Jobling S, Sheahan D, Osborne JA, Matthiessen P and Sumpter JP. Inhibition of testicular growth in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals, *Environ Toxicol Chem* 1996; 15(2): 194-202.
- Kang JJ, Yokota H, Oshima Y, Tsuruda Y, Yamaguchi T, Maeda M, Imada N, Tadokoro H and Honjo T. Effect of 17β -estradiol on the reproduction of Japanese medaka, *Oryzias latipes*, *Chemosphere* 2002; 47(1): 71-80.
- Koger CS, The SJ and Hinton DE. Determining the sensitive developmental stages of intersex induction in medaka, *Oryzias latipes* exposed to 17β -estradiol or testosterone, *Marine Environ Res* 2000; 50: 201-206.
- Lange R, Hutchinson TH, Croudace CP, Siegmund F, Schweinfurth H, Hampe P, Panter GH and Sumpter JP. Effects of synthetic estrogen 17α -ethinylestradiol on the life-cycle of the fathead minnow, *Pimephales promelas*, *Environ Toxicol Chem* 2001; 20(6): 1216-1227.

- Madigou T, Goff PL, Salbert G, Cravedi JP, Segner H, Pakdel F and Valotaire Y. Effects of nonylphenol on estrogen receptor conformation, transcriptional activity and sexual reversion in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, *Aquat Toxicol* 2001; 53: 173-186.
- Mallatt J. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants; a statistical review, *Can J Fish Aquat Sci* 1985; 42: 630-648.
- Metcalfe CD, Metcalfe TL, Kiparissis Y, Koenig BG, Khan C, Hughes RJ, Croley TR, March RE and Potter T. Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by in vivo assays with Japanese medaka, *Oryzias latipes*, *Environ Toxicol Chem* 2001; 20 (2): 297-308.
- Nimrod AC and Benson WH. Reproduction and development of Japanese medaka following an early life stage exposure to xenoestrogens, *Aquat Toxicol* 1998; 44: 141-156.
- Orn S, Holbech H, Madsen TH, Norrgren L and Petersen GI. Gonad development and vitellogenin production in zebrafish, *Danio rerio* exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone, *Aquat Toxicol* 2003; 65: 397-411.
- Ren L, Lewis SK and Lech JJ. Effects of estrogen and nonylphenol on the post-transcriptional regulation of vitellogenin gene expression, *Chem Biol Interac* 1996; 100 (1): 67-76.
- Robert L, Hill Jr and Janz DM. Developmental estrogenic exposure in zebrafish, *Danio rerio*: I. Effects on sex ratio and breeding success, *Aquat Toxicol* 2003; 63: 417-429.
- Schwaiger J, Mallow U, Ferling H, Knoerr S, Braunbeck Th, Kalbfus W and Negele RD. How estrogenic is nonylphenol? A transgenerational study using rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* as a test organism, *Aquat Toxicol* 2002; 59: 177-189.
- Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H and Kobayashi K. Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka, *Oryzias latipes*, *Environ Toxicol Chem* 2004; 23 (3): 774-781.
- Sohoni P, Tyler CR, Hurd K, Caunter J, Hetheridge M, Williams T, Woods C, Evans M, Toy R, Gargas M and Sumpter JP. Reproductive effects of long-term exposure to bisphenol A in the fathead minnow, *Pimephales promelas*, *Environ Sci Technol* 2001; 35 (14): 2917-2925.
- Sumpter JP. Xenoendocrine disrupters-environmental impacts, *Toxicol Letters* 1998; 101: 337-342.
- Tanaka JN and Grizzle JM. Effects of nonylphenol on the gonadal differentiation of the hermaphroditic fish, *Rivulus marmoratus*, *Aquat Toxicol* 2002; 57: 117-125.
- Tanghe T, Devriese G and Verstraete W. Nonylphenol and estrogenic activity in aquatic environmental samples, *J Environ Quality* 1999; 28 (2): 702-709.
- Ward TJ and Boeri RL. Early life stage toxicity of nonylphenol to the fathead minnow, *Pimephales promelas*, Study Number 8979-CMA Enviro Systems Hamp 1991; NH 59 pp.
- Wester PW, Canton JH, Iersel AAJ van, Krajnc EI and Vaessen HAMG. The toxicity of bis (tri-n-butyltin)oxide (TBTO) in small fish species medaka, *Oryzias latipes* and guppy, *Poecilia reticulata*, *Aquat Toxicol* 1990; 16: 53-72.
- Wiley JB and Krone PH. Effects of endosulfan and nonylphenol on the primordial germ cell population in pre-larval zebrafish embryos, *Aquat Toxicol* 2001; 54: 113-123.