ENVIRONMENTAL HEALTH & TOXICOLOGY
Vol. 25, No. 2, 145~151 (2010)

유수식 연속노출장비를 이용한 과불화화합물(PFOS, PFOA)이 송사리(*Oryzias latipes*) 알의 초기발생과정에 미치는 영향 연구

조재구, 김경태, 류태권, 박유리, 윤준헌, 이철우,
김현미[1], 최경희, 정기은※

국립환경과학원 환경건강위해성연구부 위해성평가과,
[1]국립환경과학원 연구전략기획실 미래전략연구팀

Toxicity of PFCs in Embryos of the *Oryzias latipes* Using Flow though Exposure System

Jae-Gu Cho, Kyung-Tae Kim, Tae-Kwon Ryu, Yuri Park, Junheon Yoon, Chul-woo Lee, Hyun-Mi Kim[1], Kyunghee Choi and Ki-Eun Jung※

Risk Assessment Divison, National Institute of Environmental Research
[1]Future Strategy Research team, National Institute of Environmental Research

ABSTRACT

Perfluorinated chemicals (PFCs) is a kinds of persistent organic pollutants, and have the potential toxicity of which is causing great concern. In this study, we employed *Oryzias latipes* embryos to investigate the developmental toxicity of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA)s compound using flow-throw system for 14 day. *O. latipes* embryos were exposed to solvent control, 20, 40 and 80 mg/L of PFOS and 62.5, 130, 260 mg/L of PFOA respectively. After exposure, hatchability, mortality, total length and heart beats were examined. Hatching rates were reduced approximately 27% in the 80 mg/L PFOS-treated group and 17% in the 62.5, 130 mg/L PFOA-treated groups. Heart beats in the PFOS-treated groups were reduced at 7 day but, PFOA-treated groups were increased heart beats. 80 mg/L PFOS treated group showed significant reduction in growth (total length) level to 90% of control. But PFOA did not showed significant effect on growth. In the 14 days LC_{50} of PFOS and PFOA was 22.74 mg/L and 173 mg/L, respectively. The overall results indicated that the early stage of *O. latipes* might be a reliable model for the testing of developmental toxicity to perfluorinated chemicals.

Key words : Perfluorooctane sulfonate (PFOS), Perfluorooctanoic acid (PFOA), *Oryzias latipes*, Embryo developmental toxicity

접수일: 2010년 2월 24일, 채택일: 2010년 6월 1일
※ To whom correspondence should be addressed.
Tel: +82-32-560-7126, Fax: +82-32-560-7979
E-mail: aubrey1@korea.kr

서 론

과불화화합물(perfluorinated chemicals, PFCs)은 자연적으로 발생하지 않는 인공합성물이다. 이 물질은 식품 포장제, 카펫, 반도체, 의류, 필름 등의 일상용품에 광범위하게 사용되었다(Kannan *et al*., 2002; So *et al*., 2004; Zhao *et al*., 2007). 과불화화합물은 쉽게 분해되지 않기 때문에 환경 또는 생체 내에서 오랜 기간 잔류함으로써 유해성과 위해성이 우려되는 물질이다(Inoue *et al*., 2004). 특히 높은 빈도로 환경 중에 검출되는 주요 물질은 PFOS (perfluorooctane sulfoate), PFBS (perfluorobutane sulfonate), PFOSA (perfluorooctane-sulfonamide), PFOA (perfluorooctanoic acid) 등이 있다. 이 물질 중 과불화물의 환경 중 최종 대사체로 알려진 PFOS와 PFOA는 여러 환경매체 및 인간 혈장 속에서 상대적으로 고농도로 발견되고 있다(Martin *et al*., 2002; Stock *et al*., 2004). 과불화화합물의 대표적인 물질인 PFOS와 PFOA는 많은 연구자들에 의해 물리·화학적 성질이 규명되었으며(Table 1), 또한 설치류의 실험에서 혈액 중의 단백질과 결합하는 것으로 보고되었다(Giesy and Kannan, 2001). 또한 PFOS와 PFOA는 동물시험에서 간독성과 면역독성을 유발하는 것으로 알려져 있다(Liu *et al*., 2007; Qazi *et al*., 2009). 따라서 과불화화합물의 유해영향정도를 규명하기 위하여 다양한 시험을 바탕으로 한 연구가 필요하다고 판단된다.

생태독성시험은 수생생물, 육생생물, 저서생물 등 시험대상이 매우 다양하다. 수생생물의 경우 주로 어류, 갑각류, 조류가 시험 생물종으로 사용된다. 그 중 어류를 이용한 독성시험은 크게 기간에 따라 급성 및 만성독성시험과 시험어류의 발달단계에 따라 성체와 유생 혹은 알을 이용한 시험으로 구분되어 진다. 특히, 발생과정의 특이성을 확인하기 위하여 어류의 알을 이용하는 것이 용이하다고 알려져 있다(Cooper and Liu, 1991).

송사리(*Oryzias latipes*)는 우리나라를 비롯한 일본, 중국 등 아시아 지역에 서식하며 미국을 비롯한 몇몇 국가에서 현재 독성 실험용으로 사용되고 있는 생물종이다(Park *et al*., 1996). 또한 송사리(*O. latipes*)의 알은 채란이 용이하고 발생과정이 명확하게 구분되어 있으며, 독성물질에 민감한 영향을 나타냄으로 독성 검사에서 신뢰성이 높은 것으로 알려져 있다(Wisk and Cooper, 1990). 특히 수정란이 투명하여 관찰이 용이하므로 독성물질에 대한 변화를 연속적으로 관찰할 수 있다는 장점이 있다(Kirchen and West, 1976; Cooper and Liu, 1991).

이에 본 시험에서는 PFOS와 PFOA가 수서생물 초기 생장단계에 미치는 독성영향을 단기간에 평

Table 1. Physical/chemical properties of PFOS and PFOA

Parameter	PFOS (Potassium salt)	Refs.	PFOA	Refs.
Melting point	≥400°C	Jacobs *et al*., 1999	45～50°C	US EPA, 2003
Boiling point	Not calculable	OECD, 2002	189～192°C at 736 mm Hg	US EPA, 2003
Specific gravity[a]	～0.6 (7～8)	OECD, 2002	–	
Vapor pressure	3.31×10^{-4} Pa at 20°C	Hoven *et al*., 1999	1.33×10^{-5} Pa at 25°C (PFOA ammonium salt)	US EPA, 2003
Water solubility				
Pure water	680 mg/L	3M company, 2001a	3.4 g/L	US EPA, 2003
Fresh water	370 mg/L	OECD, 2002	–	
Sea water	12.4 mg/L	3M company, 2001b	–	
Octanol solubility	56 mg/L	3M company, 2001c	–	
Log Kow[b]	−1.08	OECD, 2002	–	
Henry's law constant[c]	2.0×10^{-6}	3M company, 2003	–	

[a]pH values in parameter; [b]Log Kow calculated with solubility of PFOS in water and n-octanol; [c]Henry's law constant calculated at 20°C with the solubility for pure water

가하기 위하여 송사리(*O. latipes*) 수정란을 대상으로 노출농도를 일정하게 유지할 수 있는 유수식 장치를 이용하여 배아독성시험을 실시하였다.

재료 및 방법

1. 시험물질의 선정 및 조제

시험물질은 PFOS (CAS NO. 1763-23-1, Wako, Japan)와 PFOA (CAS NO. 355-67-1 Sigma, US)는 시험농도가 수용해도 보다 낮으므로, ethanol (CAS NO. 64-17-5, J.T. Baker, US)에 녹여 stock solution을 조제하였고, 농도별로 희석한 후 생물에게 영향을 미치지 않도록 최종 ethanol 농도가 0.1 mL/L가 되도록 처리하여 노출하였다 (국립환경과학원, 2009).

2. 시험생물

시험어종으로 사용한 *O. latipes* (Orange-red type)는 국립환경과학원 위해성평가과 공시어류사육실에서 수온 25±1°C, pH 7.5±0.2, 용존산소 7~8 mg/L, 광주기 16시간/8시간(명/암)의 조건으로 사육하였으며, 갓 부화된 알테미아를 먹이로 1일 1회 공급하였다. 수정란 확보를 위해 부화 후 4개월 이상 된 외관상 기형이 없는 건강한 암·수 개체를 1.5 (♀):1 (♂)의 비율로 교배하였다. 건강한 성어로부터 산란된 알을 채취한 후, 현미경 관찰을 통해 포배기이전 단계의 수정란을 선택하여 실험에 사용하였다.

3. 시험물질의 노출 및 관찰

노출은 연속노출장치 (Sibata JP/SIS-16FH2, Japan)를 이용하여 유수식으로 수행하였으며, 시험용액은 1일 1회 교환되도록 설정하였다. 시험농도는 예비시험인 *O. latipes*의 반수치사농도(LC_{50})값을 바탕으로 PFOS는 0, 20, 40, 80 mg/L, PFOA는 0, 62.5, 130, 260 mg/L로 설정하였다. 각 농도당 30개의 (10×3반복구) 수정란을 노출시켰으며, 시험은 사육조건과 동일한 조건에서 수행하였다. 시료를 녹이기 위해 사용한 용매인 ethanol을 0.1 mL/L의 농도로 용매대조군으로 이용하였다.

노출시점은 수정란에서부터 대조군의 부화 후 난황 흡수가 완료되는 시점까지 설정하였다. 본 시험에서는 14일간 노출하였으며, 시험 기간 중 먹이는 공급하지 않았다. 초기 발생과정에서 시험물질의 영향을 확인하기 위하여 실체현미경 (Stemi SV11, Zeiss co., Germany)을 이용하여 24시간 마다 치사율, 기형 발생율, 심박수, 부화율, 전장을 주요 종말점으로 측정하였다. 부화율은 난상태에서 치사한 것과 부화되지 아니한 것을 모두 포함하였다. 치사율은 EPA에서 제공하는 probit analysis program (version 1.5)을 이용하여 계산하였으며, 통계처리는 분산분석 (ANOVA) 검정법으로 $p<0.05$ 및 $p<0.005$ 수준에서 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

부화는 노출 시킨 후 10~11일 경과 한 뒤에 완료되었으며, 대조군 및 용매 대조군에서의 부화율은 90% 이상으로 나타났다. 시험물질 노출군에서의 부화율은 PFOS 20, 40 mg/L에서는 90% 이상이었으나 80 mg/L 노출군에서의 부화율은 73%로 관찰되었다. 한편 PFOA의 경우 62.5, 130 mg/L 노출군의 부화율이 80% 이상으로 관찰되었으나, 260 mg/L의 노출군에서는 모든 개체가 치사한 것으로 나타났다 (Figs. 1, 2). 따라서 PFOS 및 PFOA 노출농도가 증가함에 따라 부화율이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

심박수는 노출 후 3, 4, 7일째에 측정하였다. PFOS 처리군의 경우 용매대조군에서는 3일차에 심박수가 증가하였고 4일차에서는 20 mg/L 노출군에서 심박수가 증가하였다. 그러나 7일차가 되면서 모

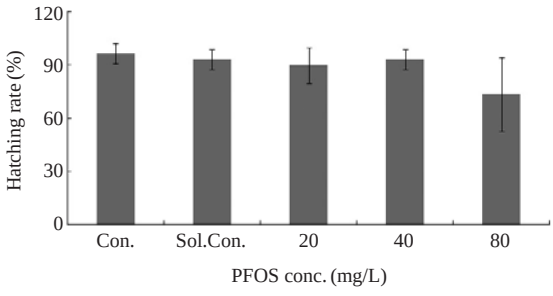

Fig. 1. Percentage of hatching in *O. latipes* embryos/larvae at 14 day upon exposure to different concentrations of PFOS (0, 20, 40 and 80 mg/L). Values are presented as mean±standard deviation.

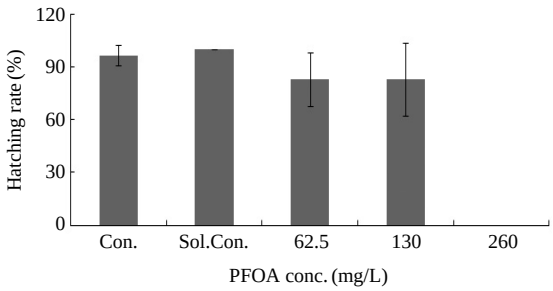

Fig. 2. Percentage of hatching in *O. latipes* embryos/larvae at 14 day upon exposure to different concentrations of PFOA (0, 62.5, 130 and 260 mg/L). Values are presented as mean±standard deviation.

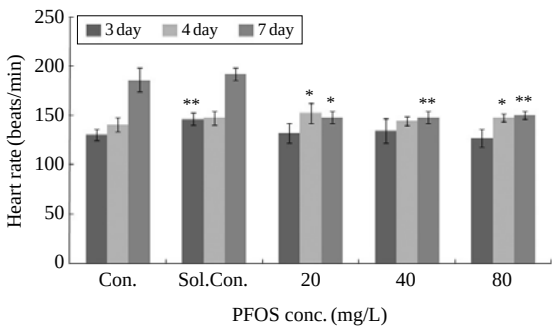

Fig. 3. Heart rate in *O. latipes* embryos at 3, 4 and 7 day upon exposure to control and 20, 40 and 80 mg/L PFOS. Values that are significantly different from the control are indicated by asterisks (one-way ANOVA, followed by a post hoc test: *p＜0.05, **p＜0.005). Values are presented as mean±standard deviation.

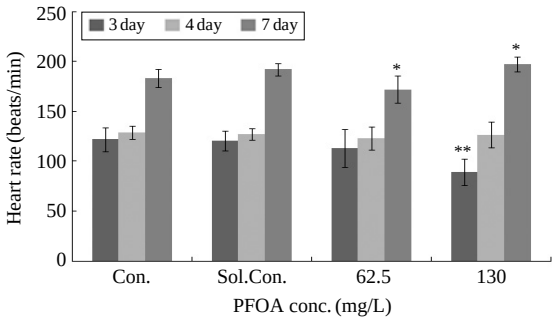

Fig. 4. Heart rate in *O. latipes* embryos at 3, 4 and 7 day upon exposure to control and 62.5, 130 and 260 mg/L PFOA. Values that are significantly different from the control are indicated by asterisks (one-way ANOVA, followed by a post hoc test: *p＜0.05, **p＜0.005). Values are presented as mean±standard deviation.

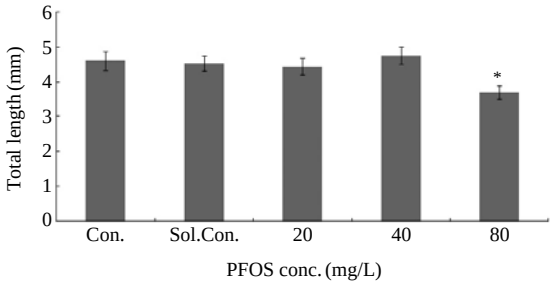

Fig. 5. Total length of larvae at 14 day upon exposure to different PFOS concentrations. Values that are significantly different from the control are indicated by asterisks (one-way ANOVA, followed by a post hoc test: *p＜0.05). Values are presented as mean±standard deviation.

든 처리군(20～80 mg/L)에서 심박수가 대조군에 비하여 약 20% 수준으로 감소하였다(Fig. 3). 이는 Shi *et al.* (2008)이 실험한 결과와도 유사한 경향성을 나타내었다. 반면 PFOA는 62.5 mg/L 노출군에서 3, 4일차는 대조군과 차이가 없었고, 7일차에서 심박수가 유의하게 감소하였다. 반면에 130 mg/L 노출군에서는 3일차에 심박수가 유의하게 감소하였으나, 7일차에서는 130 mg/L는 심박수가 대조군에 비하여 유의한 수준으로 오히려 증가하였다(Fig. 4).

노출종료 후 모든 개체에 대하여 전장을 측정한 결과, PFOS는 대조군, 용매 대조군, 20, 40 mg/L 노출군에서 전장이 각각 4.604, 4.53, 4.431, 4.756 mm로 나타나 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 그러나 PFOS 80 mg/L 노출군에서는 용매 대조군에 비하여 평균 약 0.9 mm 작은 3.698 mm로 측정되었다(Fig. 5). 이러한 결과는 zebrafish를 이용한 기존 연구에서도 유사하게 보고되었다(Shi *et al.*, 2008). 또한 다른 연구결과를 보면 곳체다슬기를 이용한 PFOS 시험에서 16주 후 성장률이 대조군에 비해 감소하였으며(Lee *et al.*, 2007), 22일간 노출된 northern bobwhites의 유생도 체중이 감소된 사례가 있다(Newsted *et al.*, 2006). 이러한 결과들을 고려하여 보면 초기성장단계에 있는 생물이 PFOS에 노출되었을 경우 성장저해가 유발될 수 있을 것으로 사료된다. 반면 PFOA는 모든 농도 노출군에서 유의한 차

이가 나타나지 않았으므로 성장저해가 본 농도에서는 나타나지 않은 것으로 판단된다(Fig. 6).

PFOS와 PFOA에 의한 14일 반수치사농도(LC_{50})는 각각 22.74 및 173 mg/L로 나타났다. 치사율을 부화일을 기준으로 구분하여 보면 PFOS와 PFOA 노출군 모두 embryo보다 larvae에서 더 높게 나타났다(Figs. 7, 8). PFOS에 노출된 zebrafish 역시 embryo보다는 부화 후의 개체가 더 민감하게 영향을 받는다는 연구결과가 있었다(Shi *et al*., 2008). 또한 어류 만성독성 및 초기생활사 시험에서 부화율보다 부화후 생존율이 더 민감한 지표라는 연구(Wolter-

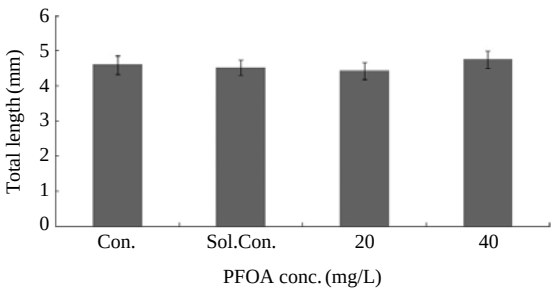

Fig. 6. Total length of larvae at 14 day upon exposure to different PFOA concentrations. Values are presented as mean ± standard deviation.

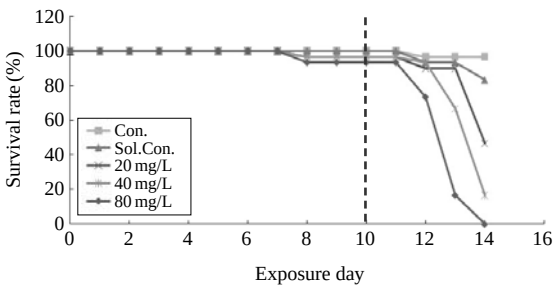

Fig. 7. The cumulative survival rate in *O. latipes* embryos upon exposure to different PFOS concentrations at every 14 days. The dotted line (10 day) mark the start of hatching embryos.

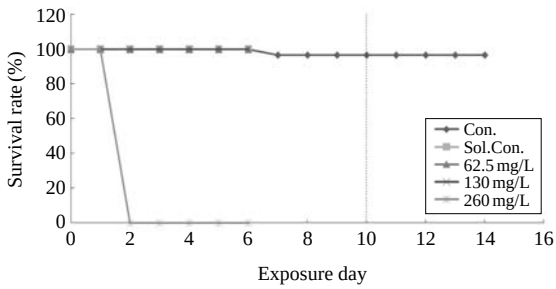

Fig. 8. The cumulative survival rate in *O. latipes* embryos upon exposure to different PFOA concentrations at every 14 days. The dotted line (10 day) mark the start of hatching embryos.

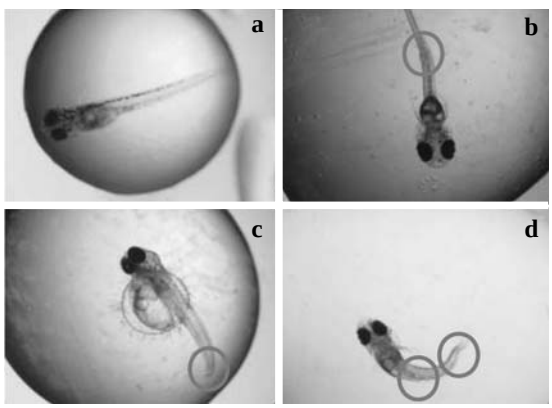

Fig. 9. Major types of abnormalities of larvae at 14 day upon exposure to PFOS and PFOA. a. normal, b. vertebra, c. tail, d. tail and vertebra (mixture).

Table 2. Effects of exposure to different concentrations of PFOS on embryos and larvae

Conc. (mg/L)	†Mortality (%)	Hatch success (%)	*Adverse effects (%)	Major types of lesions and deformations
Control	3.3 (1/30)	96.7 (29/30)	6.7 (2/30)	–
Solvent control	16.7 (5/30)	93.3 (28/30)	16.7 (5/30)	–
20	53.3 (16/30)	90 (27/30)	66.7 (20/30)	–
40	83.3 (25/30)	93.3 (28/30)	83.3 (25/30)	–
80	100 (30/30)	73.3 (22/30)	100 (30/30)	Growth inhibition

†Mortality was measured from the dead embryos within 14 days after the chemical treatment.
*Adverse effects of *O. latipes* embryos include cardiovascular defect, hemorrhage, growth inhibition and death. Adverse effects of *O. latipes* embryos were observed within 14 days after the chemical treatment.

Table 3. Effects of exposure to different concentrations of PFOA on embryos and larvae

Conc. (mg/L)	† Mortality (%)	Hatch success (%)	*Adverse effects (%)	Major types of lesions and deformations
Control	3 (1/30)	96 (29/30)	10 (3/30)	–
Solvent control	0 (0/30)	100 (30/30)	20 (6/30)	–
62.5	17 (5/30)	83 (25/30)	36 (11/30)	–
130	17 (5/30)	83 (25/30)	80 (24/30)	–
260	100 (30/30)	0 (0/30)	100 (30/30)	–

† Mortality was measured from the dead embryos within 14 days after the chemical treatment.
*Adverse effects of *O. latipes* embryos include cardiovascular defect, hemorrhage, growth inhibition and death. Adverse effects of *O. latipes* embryos were observed within 14 days after the chemical treatment.

ing, 1984)와도 유사한 결과를 보였다. 이와 같은 결과는 embryo의 난막이 PFOS와 PFOA의 흡수를 저해하기 때문일 것으로 사료되어지나, 이와 관련하여 차후 연구가 필요할 것으로 판단된다.

PFOS와 PFOA 노출 개체에서 특정부위의 기형은 관찰되지 아니하였으나, 척추 및 꼬리가 휘어지는 형태학적 비정상 개체가 관찰되었다(Fig. 9). 또한 부화율, 기형 및 치사개체와 성장에 저해가 나타난 정도를 비교해보면 농도 의존적으로 악영향 정도가 증가하는 것으로 나타났다(Tables 2, 3).

결 론

본 연구에서는 PFOS와 PFOA 노출이 *O. latipes* embryo의 초기발생에 미치는 영향이 있음을 확인하였으며, PFOS가 PFOA보다 어류의 초기 발생과정에 대한 독성이 높은 것으로 나타났다. 14일간 PFOS와 PFOA에 노출된 embryo는 농도 의존적으로 부화시기가 늦추어 지는 것을 확인하였다. 심박수의 경우 PFOS 노출군에서는 농도 증가에 따라 심박수의 저해를 보였으나, PFOA 노출군은 심박수가 증가되는 것으로 나타나, 서로 다른 영향을 나타내었다. 이러한 현상을 해석하기 위해서는 추가적인 연구가 차후에 필요할 것으로 판단된다. 또한 치사율의 경우 난상태보다 부화 후 더욱 명확하게 나타났다. 이는 난막이 노출물질의 흡수에 영향을 미치기 때문인 것으로 판단된다. 또한 PFOS에 노출된 개체의 성장은 최고농도에서 대조군에 비해 20% 저해되어 다른 생물종을 이용한 연구에서도 보고된 바와 같은 성장저해가 *O. latipes*에서도 나타나고 있는 것을 알 수 있었다. 따라서 PFOS등 과불화화합물은 생물의 초기성장에 영향을 미칠 수 있는 물질로 판단되며, *O. latipes* 수정란을 이용한 독성시험이 환경 내 다른 오염물질의 독성을 평가하는데 있어 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

국립환경과학원. 화학물질유해성시험방법, 화학물질유해성시험기관의 지정 등에 관한 규정, 2009; 국립환경과학원 고시 2009-57호, 별표 5.

3M Company. Solubility of PFOS in water, 3M Company, 3M Environmental Laboratory, 2001a; Laboratory Project Number E00-1716, US EPA Docket AR226-1030a025.

3M Company. Solubility of PFOS in natural seawater and an aqueous solution of 3.5% of sodium chloride, 3M Company, 3M Environmental Laboratory, 2001b; Laboratory Project Number E00-1716, US EPA Docket AR226-1030a026.

3M Company. Solubility of PFOS in octanol, 3M Environmental Laboratory, 2001c; Laboratory Project Number E00-1716, US EPA Docket AR226-1030a027.

3M Company. Environmental and Health Assessment of perfluorooctane sulfonate and its salts, 2003; US EPA Docket AR226-1486.

Cooper KR and Liu H. Evaluation of baltic herring and icelandic cod liver oil for embryo toxicity, using the japanese medaka (*Oryzias latipes*) embryo larval assay, Environ Toxi Chemi 1991; 10: 707-714.

Giesy JP and Kannan K. Global distribution of perfluorooctane sulfonate in widelife, Environ Sci Technol 2001; 35(7): 1339-1342.

Hoven RL, Stenzl JI and Nixon WB. Determination of the vapor pressure of perfluorooctane sulfonated (PFOS) using the spinning rotor gauge method, Wildlife Interna-

tional Ltd. 1999; Project No. 454C-105. US EPA Docket No. AR226-0048.

Inoue K, Okada F, Ito R, Kato S, Sasaki S, Nakajima S, Uno A, Saijo Y, Sata F, Yoshimura Y, Kishi R and Nakazawa H. Perfluorooctane sulfonate (PFOS) and related perfluorinated compounds in human maternal and cord blood samples: assessment of PFOS exposure in a susceptible population during pregnancy, Environ Health Perspect 2004; 112(11): 1204-1207.

Jacobs RL and Nixon WB. Determination of the melting point/melting range of perfluorooctance sulfonate, Wildlife International Ltd. 1999; Project No. 45C-106. US EPA Docket No. AR226-0045.

Kannan K, Choi J, Iseki N, Senthilkumar K, Kim DH and Giesy JP. Concentrations of perfluorinated acids in livers of birds from Japan and Korea, Chem 2002; 49(3): 225-236.

Kirchen RV and West WR. The Japanese medaka: Its care and development. Carolina Biology Supply, Burlington, NC 1976.

Lee JW, Park JJ, Jin YG, Jung JA, Cho HS and Lee JS. Effect of chronic exposure of PFOS (perfluorooctane sulfonate) on survival, activity, growth and organ structure of the Melania Snail, *Semisulcospira gottschei* (Gastropoda: Pleuroceridae), J Environ Toxicol 2007; 22(2): 119-128.

Liu C, Yu K, Shi X, Wang J, Lam PKS, Wu RSS and Zhou B. Induction of oxidative stress and apoptosis by PFOS and PFOA in primary cultured hepatocytes of freshwater tilapia (*Oreochromis niloticus*), Aquat Toxicol 2007; 82(2): 135-143.

Martin JW, Muir DCG, Moody CA, Ellis DA, Kwan WC, Solomon KR and Mabury SA. Collection of airborne fluorinated organics and analysis by gas chromatography/ Chemical ionization mass spectrometry, Anal Chem 2002; 74(3): 584-590.

Newsted JL, Beach SA, Gallagher SP and Giesy JP. Pharmacokinetics and acute lethality of perfluorooctane sulfonate (PFOS) to Juvenile Mallard and Northern Bobwhite, Arch Environ Contam Toxicol 2006; 50(3): 411-420.

OECD. Hazard Assessment of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and its salts, 2002.

Park BK, Park SS, Karen ME and Cooper KR. Toxicity evaluation of landfill leachate using embryo-larval assay of Rice fish, *Oryzias latipes*, Korean J Environ Biol 1996; 14(1): 55-61.

Qazi MR, Xia Z, Bogdanska J, Chang SC, Ehresman DJ, Butenhoff JL, Nelson BD, DePierre JW and Abedi-Valugerdi M. The atrophy and changes in the cellular compositions of the thymus and spleen observed in mice subjected to short-term exposure to perfluorooctane sulfonate are high-dose phenomena mediated in part by peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR α), Toxicology 2009; 260(1-3): 68-76.

Shi X, Du Y, Lam PK, Wu RS and Zhou B. Developmen-tal toxicity and alteration of gene expression in zebrafish embryos exposed to PFOS, Toxicol Appl Phamacol 2008; 230(1): 23-32.

So MK, Taniyasu S, Yamashita N, Giesy JP, Zheng J, Fang Z, Im SH and Lam PK. Perfluorinated compounds in coastal waters of Hong Kong, South China and Korea, Environ Sci Technol 2004; 38(15): 4056-4063.

Stock NL, Lau FK, Ellis DA, Martin JW, Muir DCG and Mabury SA. Polyfluorinated telomer alcohols and sulfonamides in the north american troposphere, Environ Sci Technol 2004; 38(4): 991-996.

US EPA. Preliminary risk assessment of the developmental toxicity associated with exposure to perfluorooctanoic acid and its salts, 2003.

Wisk JD and Cooper KR. Comparison of the toxicity of several polychlorinated dibenzo-p-dioxins and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran in embryos of the Japanese medaka (*Oryzias latipes*), Chem Osphere 1990; 20(3-4): 361-377.

Woltering DM. The growth response in fish chronic and early life stage toxicity test: A critical review, Aqua Toxicol 1984; 5: 1-21.

Zhao X, Li J, Shi Y, Cai Y, Mou S and Jiang G. Determination of perfluorinated compounds in wastewater and river water samples by mixed hemimicelle-based solid-phase extraction before liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry detection, J Chromatogr A 2007a; 1154(1-2): 52-59.