

Nonylphenol이 넙치, *Paralichthys olivaceus*의 초기 발생에 미치는 영향

문순주, 김진완, 나오수, 김병호¹, 이영돈*, 김형배², 최영찬³

제주대학교 해양과환경연구소, ¹류큐대학 열대생물권연구센터
²강릉도립대학 수산개발과, ³제주대학교 해양과학대학 해양과학부

Effects of Nonylphenol on Early Development of Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus*

Soon Ju Moon, Jin Wan Kim, Oh Soo Na, Byung Ho Kim¹,
Young Don Lee*, Hyung Bae Kim² and Young Chan Choi³

Marine and Environmental Research Institute, Cheju National University, Jeju 695-814, Korea
¹Sesoko Station, Tropical Biosphere Research Center, University of the Ryukyus, Motobu, Okinawa, Japan
²Department of Fisheries Development, Kangwon Province University, Gangwon 210-804, Korea
³Division of Applied Marine Science, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea

ABSTRACT

Effects on nonylphenol (NP) treatment on early development of fertilized eggs and survival of larvae in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* were investigated. Fertilized eggs and hatched larvae were exposed to aqueous solutions of NP at nominal concentrations of 50, 100, 150 and 200 µg/L. In the control I and II (methanol-carrier control) groups, the hatchability of fertilized eggs were 90.7 ± 7.02 and $90.0 \pm 5.29\%$ ($P < 0.05$), respectively. However, treatments of NP concentrations at 50, 100, 150 and 200 µg/L were reduced to 78.7 ± 4.16 , 46.0 ± 9.17 , 48.0 ± 3.46 and $33.3 \pm 11.02\%$ ($P < 0.05$), respectively. The time to hatching of fertilized eggs was delayed in high-dose NP treatment groups rather than control groups. Fertilized eggs of NP immersed group could not hatch normally, and also vertebra of the larvae observed as abnormal shape. Cumulative mortality of hatched larvae after 26 hr NP treatment was 38.3, 78.3, 88.3 and 100% in NP 50, 100, 150 and 200 µg/L treatment groups, respectively. Whereas, control I and II were 11.7, 16.7% ($P < 0.05$). Hatched larvae showed most death at the embryonic development stage with abnormalities. These results suggest that NP treatment in fertilized eggs and larvae was inhibited as normally development for fertilized egg and growing of larvae.

Key words : Nonylphenol (NP), Olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, Hatchability, Cumulative mortality

서 론

내분비계장애물질로 알려진 Nonylphenol (NP)은 phenol과 nonene의 alkylation에 의해 생성된다. Alkylphenol의 세계에서 연간 생산량 300,000톤

* To whom correspondence should be addressed.

Tel: 82-64-782-8922, E-mail: leemri@cheju.ac.kr

중 80%를 차지하며 중성세제, 페인트, 살충제와 그 외의 화학물질 등에 광범위하게 사용되고 있는 비이온성 계면활성제이다 (White *et al.*, 1994; Jobling *et al.*, 1996). NP는 사람의 눈과 호흡기계를 자극하고 단백질을 변성시키는 작용이 있는 것으로 알려져 있으며, 다른 내분비계장애물질에 비해 바다생물에 대해 독성이 높고 자연에서 분해율이 낮다 (Ahel *et al.*, 1994a, b, 1996). 안정적인 유기화합물 NP가 어류의 발생단계에 미치는 저해 현상에 관한 연구를 보면, 담수어를 대상으로 4-NP에 노출된 medaka, *Oryzias latipes*의 testis-ova 유도 현상 (Gray and Metcalfe, 1997)과, killifish, *Fundulus heteroclitus*의 난과 자어를 NP와 4-tert-octylphenol (4-t-OP)의 노출되었을 때 이상 발생과 폐사되는 현상을 볼 수 있다 (Kelly and Di Giulio, 2000). PCBs의 체내축적에 따른 Baltic flounder, *Platichthys flesus*와 lake trout, *Salvelinus namaycush*에서 난 부화율 감소 (Von Westernhagen *et al.*, 1981; Mac and Swartz, 1992)와 winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*의 부화자어 외소 현상을 볼 수 있다 (Black *et al.*, 1988). 그리고, 어류에 대한 내분비계장애물질에 대한 영향이 종종 보고되어지고 있는데, 이 논문에서는 NP가 넙치, *Paralichthys olivaceus*의 수정란의 초기 발생, 부화자어의 발달에 미치는 영향을 탐색하여, 누적사망율과 LT₅₀을 조사하였다.

재료 및 방법

실험약품

실험에 사용한 NP ethoxylate는 Aldrich (Milwaukee, Wisconsin, USA)에서 구입하였으며, methanol을 용매로 하여 10 mg/mL NP stock solution을 만들어 사용하였다.

실험어 및 사육조건

이 연구에 사용된 넙치 수정란(난경 1.1±0.14 mm)은 제주도 북제주군 조천읍 소재 한라수산에서 구입하였다. 부화자어 (2.4±0.04 mm)는 수정란을 500 ml 유리 비이커에 수용하여 부화한 것을 사용하였다. 실험에 사용한 사육수는 수온 22±

0.5°C, pH 8.19, 용존산소 4.32 mg/L, 염분농도 32 이었다.

수정란 및 부화자어 침적처리

NP에 침적처리된 수정란의 부화율, 부화 소요시간과 부화자어의 사망율, LT₅₀을 조사하기 위하여, 수정란과 부화자어를 NP 50, 100, 150 및 200 µg/L 농도로 노출시켰다. 상실기 단계의 수정란을 실험구별로 해수 200 ml를 채운 250 ml 유리 비이커에 50개씩 수용하였다. 부화자어는 20마리씩 같은 방법으로 각각 수용하였다. 대조구 I은 여과해수만을 사용하였고 대조구 II는 NP의 용매로 사용한 methanol을 4 µl를 첨가하였다. NP 처리구는 50, 100, 150 및 200 µg/L이 되도록 미리 조제한 NP stock solution을 각각의 처리구에 1, 2, 3, 4 µl씩 첨가하여 3회 반복 실험하였다.

통계분석

각각의 실험 결과는 Statistical Analysis (SAS Institute North Carolina, USA) 통계처리 프로그램을 이용하여 ANOVA-test를 실시한 후 Duncan's multiple range test로 평균간의 유의성을 검정하였으며 (P<0.05), LT₅₀을 'Probit analysis' software를 이용하여 산출하였다.

결과 및 고찰

넙치 수정란에 NP를 침적처리한 결과를 Table 1에 나타내었다. 대조구 I과 II의 부화율은 각각 90.7±7.02, 90.0±5.29%인 반면, NP 50, 100, 150 및 200 µg/L 처리구의 부화율은 각각 78.7±4.16, 46.0±9.17, 48.0±3.46 및 33.3±11.02%로 대조구에 비해 낮았다 (P<0.05). 부화에 소요되는 시간은 대조구 I과 II에서 각각 32.3±1.53, 33.0±2.65 시간인 반면, NP 50, 100, 150 및 200 µg/L 처리구에서는 각각 36.1±1.85, 40.0±2.05, 39.7±2.52 및 41.7±1.53시간으로 대조구보다 시간이 지연되었다 (P<0.05).

대조구에서 수정란의 배발생에 따른 부화과정은 수정 후 20시간을 전후로 배체 형성기를 거쳐 수정 후 32~34시간에 90% 정도 부화하였지만,

Table 1. Hatchability and time to hatching by treatment of various NP concentration in fertilized eggs of olive flounder, *P. olivaceus*

Experimental group	Hatchability (%)	Time to hatching (hr)
Control I	90.7 ± 7.02 ^a	32.3 ± 1.53 ^c
Control II (methanol)	90.0 ± 5.29 ^a	33.0 ± 2.65 ^c
NP 50 µg/L	78.7 ± 4.16 ^a	36.1 ± 1.85 ^{bc}
NP 100 µg/L	46.0 ± 9.17 ^{bc}	40.0 ± 2.05 ^a
NP 150 µg/L	48.0 ± 3.46 ^b	39.7 ± 2.52 ^{ab}
NP 200 µg/L	33.3 ± 11.02 ^c	41.7 ± 1.53 ^a

Values (mean ± S.D) in the same column followed by a different letter are significantly different ($P < 0.05$).

NP 침적 처리구에서는 대부분이 배체 형성기에서부터 발생 속도가 지연되었다. NP 침적 처리한 모든 처리구에서는 수정 후 40시간에 척추 만곡과 이상발생이 일어나 정상적인 개체로 부화하지 못

하였다 (Fig. 1). 수정 후 65시간이 경과된, 모든 NP 처리구에서 사망한 부화자어들은 척추가 심하게 휘거나, 꼬리지느러미의 발달이 저해되었다 (Fig. 2).

NP에 노출된 수정란의 발생과정에서, NP 처리 후 30~40시간의 누적사망률은 NP 200 µg/L에서는 50% 정도로 높았고, 대조구 I, II는 10% 정도였으며, NP 50, 100, 150 µg/L 처리구에서 20% 이하의 값을 보였으나, 이후 증가하기 시작하여 처리 후 65시간에는 NP 50, 100, 150 및 200 µg/L 처리구에서 전 개체가 사망하였다 ($P < 0.05$, Fig. 3).

넙치 부화자어에 NP를 침적처리하여 노출시켰을 때 누적 사망률은 Fig. 4와 같다. NP 처리 26시간에 부화자어의 사망률은 NP 50, 100, 150 및 200 µg/L 처리구에서는 각각 38.3, 78.3, 88.3 및 100% 이었고 대조구 I과 II에서는 각각 11.7, 16.7%였다. NP 50 µg/L 처리구는 처리 62시간, NP 100 µg/L은 처리 53시간, NP 150 µg/L은 처리 46시간, NP

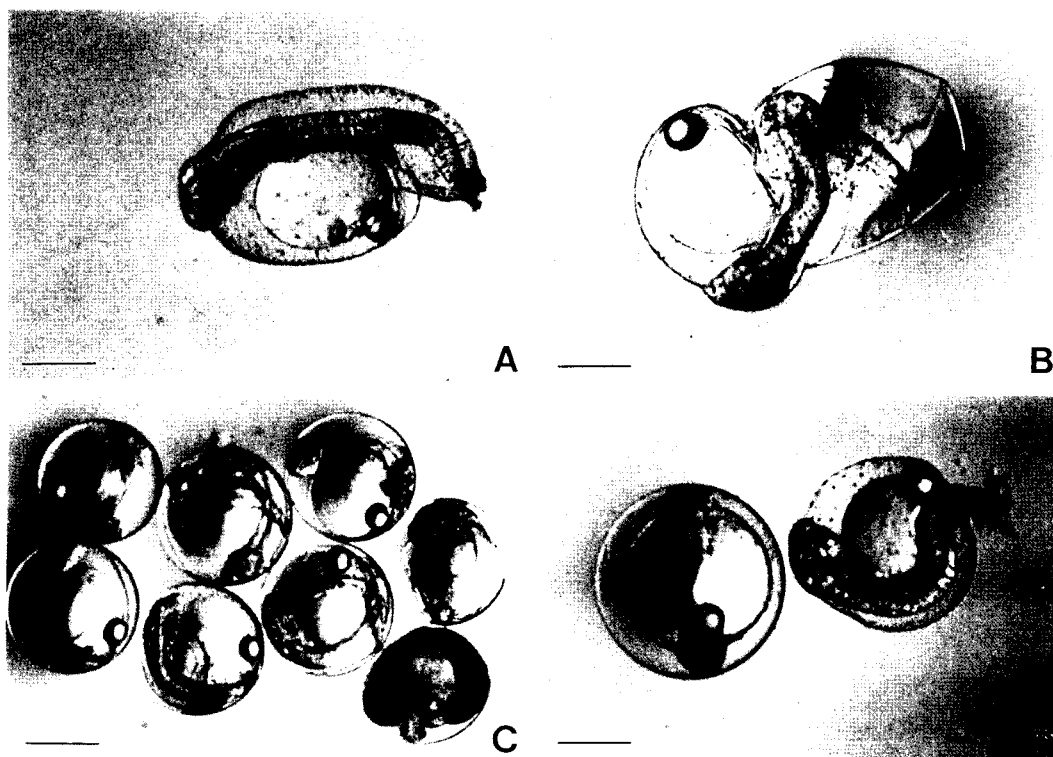


Fig. 1. Photomicrograph of embryo after 40 hr treatment of NP in fertilized eggs of olive flounder, *P. olivaceus*. NP treatment carried out A: 50, B: 100, C: 150 and D: 200 µg/L. Scale bars indicate 430 µm.

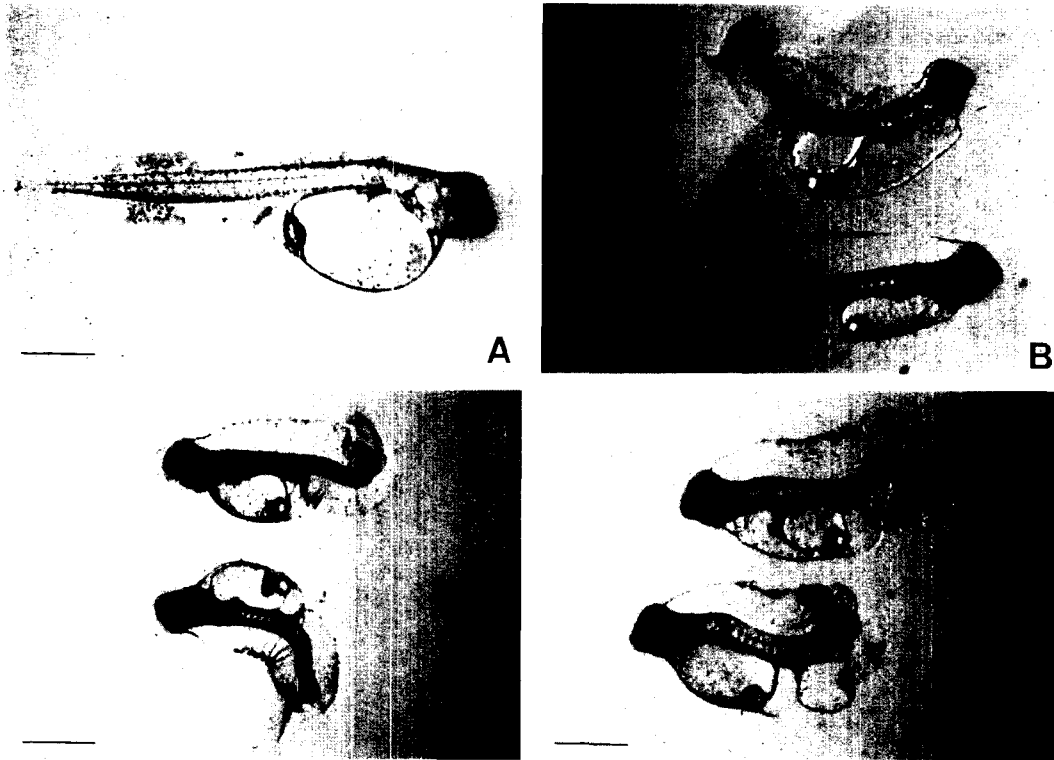


Fig. 2. Photomicrograph of hatched larvae after 65 hr treatment of NP in fertilized eggs of olive flounder, *P. olivaceus*. NP treatment carried out A: control B: 50, C: 150 and D: 200 $\mu\text{g}/\text{L}$. Scale bars indicate 430 μm .

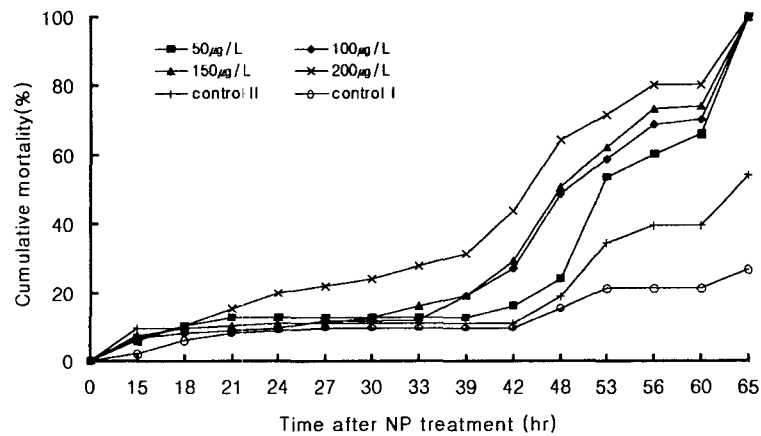


Fig. 3. Cumulative mortality by treatment of various NP concentration in fertilized eggs of olive flounder, *P. olivaceus*.

200 $\mu\text{g}/\text{L}$ 은 26시간만에 전 개체가 사망하였다($P < 0.05$, Fig. 4).

각 NP 처리 농도별 수정란 및 부화자어의 반수 치사시간은 Table 2와 같다. 수정란 및 부화 자어

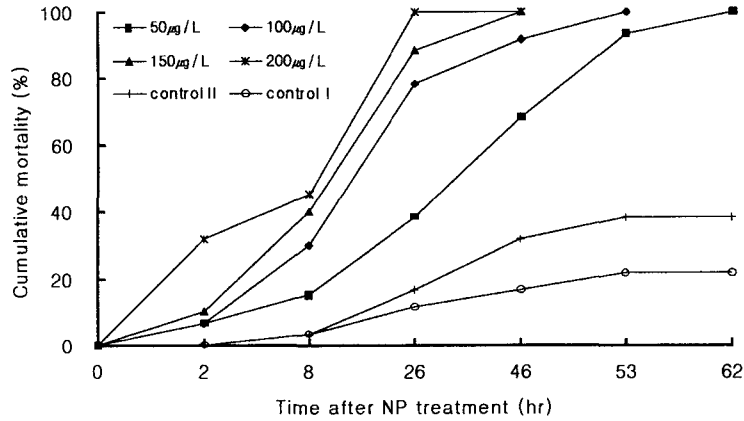


Fig. 4. Cumulative mortality by treatment of various NP concentration in hatched larvae of the olive flounder, *P. olivaceus*.

Table 2. The lethal time (LT₅₀) by treatment of various NP concentration in fertilized eggs and hatched larvae of olive flounder, *P. olivaceus*

Concentration	Fertilized eggs		Hatched larvae	
	Number of fish	LT ₅₀ (hr)	Number of fish	LT ₅₀ (hr)
50 µg/L	150	52	60	20
100 µg/L	150	47	60	11
150 µg/L	150	45	60	8
200 µg/L	150	40	60	5

의 반수치사시간은 농도가 증가할수록 짧았으며, 수정란에 NP 200 µg/L 처리시 반수치사시간은 약 40시간이었고, 부화자어에 NP 200 µg/L 처리시 반수치사시간은 약 5시간이었다.

최근, 잔류성이 강한 화학물질의 과다 사용으로 생명체의 호르몬 작용을 교란시켜 정자 수를 감소시키거나, 기형을 유발하고 특히, 수정란 및 초기 부화 자어에 영향을 미칠 수 있다라는 문제가 제시되고 있다. Kaur and Toor (1977)는 pesticides diazinon, fenitrothion, carbyaryl, malathion에 노출된 *cyprinus carpio* Linnaeus 난에서 골격이상과 같은 증상들을 관찰하였으며, Holdway and Dixon (1986)은 수정 후 24시간된 flagfish의 알에 methoxy chlor를 노출시켰을 때, 부화율의 감소가 일어났다고 보고하였다. 또한, 2, 3, 7, 8-tetra chlo rodibenzo-p-dioxin (TCDD)를 101~470 pg/g으로 노출시켰을 때 brook trout, *Salvelinus fontinalis*의 초기발

생 기간동안에 있어 난황낭의 부종, 출혈 및 난 발생단계의 진행을 지연시키며 (Walker and Peterson, 1994), 선박의 방오페인트로 사용되어지는 Tributyltin (TBT) 10 µg/L에 노출된 minnow, *Phoxinus phoxinus*의 사망률은 90% 이상이었고, 4.26 µg/L로 노출시킨 부화자어들은 꼬리느러미가 구부러지는 심한 골격이상을 보였다 (Fent, 1992),

이 연구에서도, NP를 상실기 단계의 넙치 수정란에 노출시켰을 때, 부화율의 감소가 일어났으며, 발생단계가 배체 형성에 머물러 발생 또한 지연되었다. 그리고, 배체 형성 후, 몸체의 근절이 만족되는 이형적 발달을 일어나 정상적인 개체로 부화하지 못하고, 전 개체가 사망하였다. 이들 결과에서 NP는 넙치 수정란의 초기 발생단계에 영향을 미치는 환경독성작용을 가지는 것으로 추정되며, 이런 내분비계 장애물질이 어떻게 발생 과정에 교란을 초래하는 기작에 관한 세부적인 연구가 필요하다고 사려된다.

결론

내분비계장애물질로 알려진 Nonylphenol (NP)이 넙치, *paralichthys olivaceus* 수정란의 초기발달단계에 미치는 영향에 대하여 조사하였다. 수정란과 부화자어는 NP 50, 100, 150 및 200 µg/L에 노출시켰을 경우, 각각의 부화율은 78.7±4.16, 46.0±9.17, 48.0±3.46, 그리고, 33.3±11.02였다 (P<

0.05). NP에 노출시킨 수정란은 부화율이 떨어졌으며 부화 자어는 골격 이상 증세를 보였다. NP 처리 26시간에 부화자어의 사망률은 대조구 I과 II에서는 각각 11.7, 16.7%이었고, NP 50, 100, 150 및 200 µg/L 처리구에서는 각각 38.3, 78.3, 88.3 및 100%이었다 ($P < 0.05$). NP 50 µg/L 처리구는 처리 62시간, NP 100 µg/L은 처리 53시간, NP 150 µg/L은 처리 46시간, NP 200 µg/L은 26시간만에 전 개체가 사망하였다. 이들 결과에서 NP 농도에 따라서 넙치, *paralichthys olivaceus* 수정란의 배발생과 부화 자어의 초기 성장에 저해를 주는 것으로 보인다.

감사의 글

이 연구는 2001년도 두뇌한국21사업 핵심분야에 의하여 지원되었습니다.

참고 문헌

- Ahel M, Giger W and Koch M. Behavior of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment-I. Occurrence and transformation in sewage treatment. *Wat. Res.* 1994a; 28(5) : 1131-1142.
- Ahel M, Giger W, and Schaffner C. Behavior of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment-II. Occurrence and transformation in rivers. *Wat. Res.* 1994b; 28(5) : 1143-1152.
- Ahel M, Schaffner C and Giger W. Behavior of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment-III. Occurrence and elimination of their persistent metabolites during infiltration of river water to groundwater. *Wat. Res.* 1996; 30(1) : 37-46.
- Black ED, Phelps DK and Lapan RL. The effect of inherited contamination on egg and larval winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*. *Mar. Environ. Res.* 1988; 25 : 45-62.
- Fent K. Embryonic effects of tributyltin on the minnow, *Phoxinus phoxinus*. *Environ. Poll.* 1992; 76 : 187-194.
- Gray AM and Metcalfe CD. Induction of testis-ova in Japanese medaka, *Oryzias latipes* exposed to *p*-nonylphenol. *Environ. Toxicol. Chem.* 1997; 16 : 1082-1086.
- Jobling S, Sheahan D, Osborne JA, Mattiessen P and Sumpter JP. Inhibition of testicular growth in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* 1996; 15 : 194-202.
- Holdway AD and Dixon DG. Effects of methoxychlor exposure of flagfish eggs, *Jordanella floridae* on hatchability, juvenile methoxychlor tolerance and whole-body levels of tryptophan, serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid. *Wat. Res.* 1986; 20(7) : 893-897.
- Kaur K and Toor HS. Toxicity of pesticides to embryonic stages of *Cyprinus carpio communis* Linn. *Ind. J. Exp. Biol.* 1977; 15 : 193-196.
- Kelly AS and Di Giulio RT. Developmental toxicity of estrogenic alkylphenols in killifish, *Fundulus heteroclitus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 2000; 19 : 2564-2570.
- Mac JM and Schwartz TR. Investigations into the effects of PCB congeners on reproduction in lake trout from the Great Lakes. *Chemosphere.* 1992; 25 : 189-192.
- Walker KM and Peterson RE. Toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin to brook trout, *Salvelinus fontinalis* during early development. *Environ. Toxic. Chem.* 1994; 13(5) : 817-820.
- Westernhagen Von H, Rosenthal H, Dethlefsen V, Ernst W, Harms U and Hansen PD. Bioaccumulating substances and reproductive success in Baltic flounder, *Platichthys flesus*. *Aquat. Toxicol.* 1981; 1 : 85-99.
- White DR, Hahn ME, Lockhart WL and Stegeman JJ. Catalytic and immunochemical characterization of hepatic microsomal cytochromes P450 in beluga whale, *Delphinapterus leucas*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1994; 126 : 45-57.