

## 환경호르몬 비스페놀 A가 *Xiphophorus maculatus*의 생식에 미치는 영향

등 영 건\*, 김 동 희  
연세대학교 원주의과대학 기초과학교실 · 연세대학교 기초의학연구소

### Effects of Environmental Endocrine Disruptor Bisphenol A on the Reproduction of *Xiphophorus maculatus*

Young Kun Deung\* and Dong Heui Kim  
Dept. of Basic Science and Institute of Basic Medical Science, Wonju College of Medicine,  
Yonsei University, Wonju 220-701, Korea  
(Received February 6, 2004; Accepted March 5, 2004)

#### ABSTRACT

In this study, we examined effects of environmental endocrine disruptor bisphenol A on the reproduction of *Xiphophorus maculatus*. We exposed the males of *X. maculatus* to the bisphenol A adjusted to the various concentrations such as 100 ppb, 200 ppb, 400 ppb and 800 ppb for 3 months for the experimental groups and then inbred with normal females that was not any treated. We counted the number of second generation for confirmation of fertilizing ability of first generation. Also, we observed the ratios of female and male, the abnormality and mortality, and spermatogenesis of the second generation was exposed to bisphenol A for 6 months.

As the result, the number of fry in the second generation was  $11.50 \pm 2.22$  in 100 ppb,  $6.40 \pm 2.76$  in 200 ppb,  $5.70 \pm 1.34$  in 400 ppb and  $3.70 \pm 2.11$  in 800 ppb at the experimental groups while it was  $19.00 \pm 3.02$  at the control group which was not treated with bisphenol A. This result showed that the experimental groups exhibited a decreasing tendency according to the increase of bisphenol A concentration comparing with the control group. The ratio of female and male of the second generation had no relations with the concentration of bisphenol A, and the ratios of abnormality and mortality were 0%. The spermatogenesis of experimental groups was normal in 800 ppb as well as 100 ppb, 200 ppb, 400 ppb after even 6 months.

**Key words** : Bisphenol A, Environmental endocrine disruptor, Reproduction, *Xiphophorus maculatus*

본 연구는 2002년도 연세대학교 원주의과대학 학술연구비로 이루어졌음.

\* Correspondence should be addressed to Dr. Young Kun Deung, Dept. of Basic Science and Institute of Basic Medical Science, Wonju College of Medicine, Yonsei University, Wonju 220-701, Korea. Ph: (033) 741-0351, FAX: (033) 732-4446, E-mail: youngkun@wonju.yonsei.ac.kr  
Copyright © 2004 Korean Society of Electron Microscopy

## 서 론

비스페놀 A (bisphenol A)는 에폭시, polycarbonate, 불포화 폴리에스테르 수지, 화장품의 향균제 및 곰팡이 제거제 제조에서도 널리 사용되어 왔으며 통조림 내의 코팅제와 포함된 음식물의 액체에서 검출된 바 있다(Brotons, 1995). 이 물질은 흰쥐에서 프로락틴 방출을 자극하고, hCG에 의해 자극된 스테로이드 형성 과정을 억제하는 환경호르몬 기능을 나타내며(Nikula et al., 1999), 인체의 피부에 접촉되면 과민성 피부염(atopic dermatitis)을 유발하는 것으로 알려져 있다(Estlander et al., 1999). 또한 치과 치료용 수지에서도 포함되어있어 타액에 노출되어 체내로 유입이 용이하기 때문에 피해가 더욱 심각할 것으로 생각된다(Olea et al., 1996). 환경호르몬이 동물에 미치는 영향에 대한 연구는 송사리(Gronen et al., 1999; Kang et al., 2002), swordfish (Fossi et al., 2001), 개구리(Pickford & Morris, 1999), 붉은귀 거북(Bergeron et al., 1999), 흰쥐(Boockfer & Blake, 1997), 생쥐(Honma et al., 2002; Nagao et al., 2002) 및 돼지 태아(Barthold et al., 1999)에서 수컷의 성전환, 생식능력 약화 및 생식기관의 기형유발 등 많은 악영향을 미치는 것으로 보고된 바 있으나 비스페놀A의 경우 어류의 성전환, 생식소에 미치는 영향 및 환경호르몬 기능이 나타나는 최소 농도에 대한 연구는 미미한 실정이며, 환경호르몬에 노출된 경우 정자의 수정 능력에 대한 평가, 다음세대의 산란 수와 암수비율의 변화, 독성에 따른 기형 발생율과 사망율에 대한 연구는 전혀 이루어지지 않고 있다.

따라서 본 연구는 생활사가 짧고 출생 후 한 달 내에 암수구분이 가능한 난태생 어류인 *Xiphophorus maculatus*를 이용하여 다양한 농도의 비스페놀 A에 성체를 3개월간 노출시킨 후 광학현미경과 전자현미경을 이용하여 정소의 조직학적 변화와 미세구조적 변화, 출생된 치어 수의 통계처리를 통한 정자의 수정 능력 평가, 비스페놀 A에 노출된 치어의 암수비율, 출생한 치어의 기형율과 사망율을 확인하고 치어를 성어까지 사육하여 정소의 형태변화를 조사함으로써 환경호르몬 비스페놀 A가 *X. maculatus*의 생식에 미치는 영향을 밝히고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

*X. maculatus*를 pH  $7.6 \pm 0.5$  및  $25.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 의 수조 ( $60 \times 45 \times 45$  cm)에서 검역한 후 1개월 이상 기초 사육하여 실험에 사용하였다. 기초 양어수는 Fritz-guard (Fritz Co., USA)로 상수의 염소를 제거시킨 후 사용하였고 스폰지 여과기 (Brilliant sponge filter™, Tetra Co., Germany)를 이용한 생물학적 여과 (biological filtration)법으로 물을 정화하였다. 배설물은 1주일에 1/4 씩 환수시켜 제거하였고 하루 10시간씩 낮 환경을 유지시켰다. 먹이는 실지렁이와 테트라 민 (Tetra Min™, Tetra Co., Germany)을 오전 9시와 오후 2시에 하루 2번 급여 하였다.

### 2. 실험방법

#### 1) 암수분리

암컷의 출산 일을 정확히 맞추기 위하여 *X. maculatus*를 암수 따로 분리한 후 위의 방법대로 비스페놀 A가 처리되지 않은 수조에서 사육하였다.

#### 2) 비스페놀 A의 처리

유리수조 ( $60 \times 45 \times 45$  cm) 5개를 준비하여 수조 4개는 비스페놀 A를 100% 에탄올에 용해하여 수조내의 전체 함량이 100, 200, 400 및 800 ppb가 되도록 조정하였고, 대조군은 비스페놀 A를 처리하지 않았다. 각 수조 당 수정 능력이 확인된 성어 수컷을 10마리씩 넣고 3개월간 비스페놀 A에 노출 시켰다.

#### 3) 수컷의 수정능력 확인

위의 방법대로 처리한 각 군의 수컷을 대조군의 암컷과 1:1로 합사시켰고 3일 후 수컷의 정소를 적출하여 조직처리에 사용하였다. 암컷은 그물(직경 2 mm)이 쳐진 유리수조 ( $60 \times 45 \times 45$  cm)에 넣은 후 출산되어 그물 밑으로 떨어진 치어를 비스페놀 A의 농도에 따라서 각 군별로 계수하여 통계 처리하였다.

#### 4) 정소의 조직처리

교배 후 수컷의 정소를 적출하여 광학현미경 시료

는 10% 포르말린으로 고정 및 탈수하여 파라핀으로 포매한 후 2~3  $\mu\text{m}$  두께의 절편을 통상적인 방법에 의해 hematoxylin과 eosin으로 염색하여 대조군의 조직과 비교하여 관찰하였고, 전자현미경 시료는 정소조직을 0.1 M 인산완충용액 (pH 7.4)으로 조정된 2.5% glutaraldehyde 용액과 1% 오스뮴산으로 각각 전, 후고정한 후 통상적인 전자현미경 방법에 따라 처리하였고, uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색하여 JEOL-1200EX II형 투과전자현미경으로 관찰하였다.

#### 5) 치어의 암수비율, 기형율, 사망율 및 6개월 후 점소에 미치는 영향

각 처리군에서 출산된 치어는 2달간 사육한 후 암수구분이 가능할 때 암수비율을 계수하여 농도별로 통계 처리하였고, 성장함에 따라 기형어 발생율과 사망율을 확인하였다. 이 시기의 먹이는 초기 2주간은 Inve group사(USA)의 알테미아를 해수에서 부화시켜 난황이 소모되기 전에 하루 3번씩, 그 후부터는 실지렁이와 테트라 민을 굶어 하였다. 또한 출생 후 6개월이 될 때까지 계속 노출 시킨 후 정소를 조직처리하여 조직학적 변화를 확인하였다.

## 결과 및 고찰

비스페놀 A를 각각 100, 200, 400 및 800 ppb로 처리한 수조에서 3개월간 사육한 수컷을 처리하지 않은 암컷과 교배시켜 얻은 치어를 농도에 따라 계수한 결과는 다음과 같다(Table 1).

대조군에서 평균 출산된 치어수는  $19.00 \pm 3.02$ 마리였으나 비스페놀 A의 농도가 증가함에 따라서 치어수는 100 ppb에서  $11.50 \pm 2.22$ 마리, 200 ppb에서  $6.40 \pm 2.76$ 마리, 400 ppb에서  $5.70 \pm 1.34$ 마리 및 800 ppb에서  $3.70 \pm 2.11$ 마리로 감소하는 경향을 보였다. 비스페놀 A는 prolactin (Steinmetz et al., 1997)과 난황전구물질(vitellogenin)을 수컷의 어류에서 증가시키고(Chikae et al., 2003; Pait & Nelson, 2003), 4-tert-octylphenol의 경우 20, 50, 100 및 200 ppb의 농도를 송사리 수컷에 처리할 경우 산란수는 농도가 증가함에 따라 감소하며 혈중내의 난황전구물질이 증가하는 것으로 알려져 있다(Gronen et al., 1999). 본 실험에서도 환경호르

**Table 1.** A number of fry according to the concentration of bisphenol A

Individual	Concentration of bisphenol A (ppb)				
	0	100	200	400	800
1	23	14	10	6	7
2	18	14	8	7	8
3	20	15	8	8	2
4	17	8	5	5	3
5	15	10	2	5	3
6	19	11	8	4	2
7	22	10	5	4	2
8	20	12	2	5	3
9	14	11	8	6	3
10	22	10	8	7	4
Average $\pm$ S.D.	19.00 $\pm$ 3.02	11.50 $\pm$ 2.22	6.40 $\pm$ 2.76	5.70 $\pm$ 1.34	3.70 $\pm$ 2.11

**Table 2.** The ratio of male according to the concentration of bisphenol A in the second generation

Concentration of bisphenol A (ppb)				
0	100	200	400	800
22.57%	12.28%	17.28%	38.10%	27.50%

몬인 비스페놀 A의 농도증가에 따른 치어수는 감소되는 경향을 보였지만 높은 농도에서도 적은 수지만 번식이 이루어지고 있었기 때문에 수컷의 완전한 불임은 관찰되지 않았고 더 높은 농도를 처리한 군에 대한 실험이 추가적으로 실시되어야 할 것으로 생각된다. 또한 비스페놀 A에 의한 개체수 감소는 종의 멸종 위험에 처하게 할 수 있으므로 비스페놀 A를 함유한 물질에 주의를 요해야 할 것으로 생각된다.

비스페놀 A로 처리된 수컷과 정상 암컷에서 태어난 치어를 100, 200, 400 및 800 ppb로 처리한 수조에서 2개월간 사육한 후 전체 마리 수에 대한 수컷의 발현 비율을 확인한 결과는 다음과 같다(Table 2).

도표에서처럼 정상군에서 수컷의 발현비율은 평균 22.57%였으나 비스페놀 A의 농도에 따라 연속적인 증감은 전혀 관찰되지 않았으며 심지어 400 ppb에서 38.10%로 정상군보다 더 높은 경향을 보였고, 낮은 처리농도인 100 ppb에서 제일 낮은 비율 12.28%를 보였다. 어류의 성전환은 외부체색, 행동, 생식소의 구조, 호르몬과 관련된 효소의 활성화, 스테로이드 호르몬의 농도 및 유전적인 요소에 의해 결정되는데(Shapiro,

1990) 환경호르몬에 의한 암수비율의 불균형과 수컷의 암컷화는 종의 멸종을 유발시킬 수 있다. 환경호르몬에 의한 정소내 난소형성이 보고 되고 있지만(Berkowitz, 1941; Boockfor & Blake, 1997; Gray & Metcalfe, 1997; Gronen et al., 1999) 본 실험결과는 환경호르몬으로 알려진 비스페놀 A가 고농도에서도 전혀 암수비율에 영향을 주지 않았다. 본 실험결과는 암수비율이 800 ppb의 농도까지는 비스페놀 A에 의하여 변화되지 않고 단지 유전적인 성결정에 의한 것임을 알 수 있었다. 또한 이 치어들을 6개월간 계속 사육하면서 관찰한 결과 기형이나 사망은 800 ppb의 고농도에서도 전혀 나타나지 않았다. 그러나 환경호르몬의 일종인 나무에서 생성되는  $\beta$ -sitosterol은 갈색송어(*Salmo trutta lacustris* L.)에서 수정란의 생존율 감소, 알의 크기 감소 및 난황시기의 치어 체중감소를 나타내며(Lehtinen et al., 1999) 곰팡이 제거제인 vinclozolin은 흰쥐에서 음경열(cleft phallus), 서혜부 정소일소증(inguinal ectopic testes) 및 저정낭의 위축현상을 유발하고(Kelce et al., 1994), 4-nonylphenol, nonylphenoxycarboxylic acid, 4-tert-octylphenol, nonylphenoldiethoxylate 및 17 $\alpha$ -ethynylestradiol은 무지개 송어에서 정소의 성장을 억제하는 것으로 알려져 있다(Jobling et al., 1996).

비스페놀 A를 100, 200, 400, 800 ppb로 처리한 수조에서 출생한 치어를 6개월간 사육하여 수컷만을 선별하여 정소를 저출한 후 광학현미경과 전자현미경으로 정자형성과정을 확인한 결과 정자형성과정은 정소낭(testicular cyst) 내에서 이루어지고 있었으며, 각 정소낭 내에는 동일한 분화시기의 생식세포가 분포하고 있었고, 제1정모세포, 제2정모세포, 정세포 및 정자의 형태가 모두 정상군과 같은 양상을 보여 Kim(2003)의 연구에서와 같은 정상적인 정자형성과정이 일어나고 있음을 확인할 수 있었다(Figs. 1-8). 또한 형태학적으로 대조군과 거의 유사하여 고농도인 800 ppb에서도 정자형성과정상에서 문제점은 발견하지 못했다. 4-tert octylphenol의 경우는 수컷의 흰쥐에서 정소위축, 생식에 관련된 기관의 위축, 정자형성과정억제 및 정자생성량의 감소를 유발시키고 정자의 두부와 미부의 기형이 증가하는 것으로 알려져 있다(Boockfor & Blake, 1997).

이상과 같이 비스페놀 A의 *X. maculatus*의 생식에

미치는 영향은 800 ppb의 농도까지도 생식은 계속 일어나고 있었고, 암수비율에는 전혀 영향을 미치지 않으나 개체수 감소가 종의 멸종위험에 처하게 할 수 있으므로 비스페놀 A를 함유한 물질에 주의를 요해야 할 것으로 생각된다. 환경호르몬은 최근에 인류와 야생동물의 발달과 생식에 영향을 미칠 수 있기 때문에 주의가 요망되고 있으나 환경호르몬의 위험성 확인을 위하여 환경호르몬 기능을 나타낼 수 있는 현존하거나 새롭게 생산되는 화학물질들을 분류 및 평가하고, 생물학적 영향에 관한 연구도 반드시 함께 이루어져야 할 것이다. 아직도 어류의 성전환, 생식소에 미치는 영향 및 환경호르몬 기능이 나타나는 최소 농도에 대한 연구는 미미한 실정이며 환경호르몬에 노출된 경우 정자의 수정 능력에 대한 평가, 다음세대의 산란수 및 암수비율의 변화, 기형 발생 율에 대한 연구는 전혀 이루어지지 않고 있다. 원칙적으로 환경호르몬이 어류의 생식에 미치는 영향을 연구하기 위해서는 실험동물의 수정란, 배자(embryo)부터 성체에 이르기까지 수정란 크기, 부화시간, 성장률, 생존율, 생식소분화과정, 난황전구물질 합성율, 호르몬 양 측정 등 많은 연구 자료가 필요하다(Schrag et al., 1998). 그러나 사육기술의 부족, 시설문제, 암수구별불능, 번식기술 및 치어사육기술 등 어려움이 많아 성체에 국한되어 연구되고 있다. *X. maculatus*는 생후 2달이면 암수구별이 매우 쉽고, 생활사가 4개월 정도로 매우 짧아 다른 환경호르몬 연구용 어류로 매우 적합하며 앞으로 비스페놀 A가 어류의 생식에 미치는 영향을 확인하기 위하여 800 ppb 이상의 고농도에 대한 실험과 3세대 이상의 장기적인 연구도 추가적으로 필요할 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

- Barthold JS, Kryger JV, Derusha AM, Duel BP, Jednak R, Skafar DF: Effects of an environmental endocrine disruptor on fetal development, estrogen receptor $\alpha$  and epidermal growth factor receptor expression in the porcine male genital track. *J Urol* 162 : 864-871, 1999.
- Bergeron JM, Willingham E, Osborn T, Rhen T, Crews D: Developmental synergism of steroidal estrogens in sex

- determination. Environ Health Perspect 107(2): 93-97, 1999.
- Bookfor FR, Blake CA: Chronic administration of 4 tert octylphenol to adult male rats causes shrinkage of the testes and male accessory sex organs, disrupts spermatogenesis, and increases the incidence of sperm deformities. Biol Reprod 57: 267-277, 1997.
- Brotons JA, Olea Serrano MF, Villalobos M, Pedraza V, Olea N: Xenoestrogens released from lacquer coating in food cans. Environ Health Perspect 103: 608-612, 1995.
- Chikae M, Ikeda R, Hasan Q, Morita Y, Yamiya E: Effect of alkylphenols on adult male medaka: plasma vitellogenin goes up to the level of estrous female. Environ Toxicol Pharm 15: 33-36, 2003.
- Estlander T, Jolanki R, Henriks Eckerman ML, Kanerva L: Occupational contact allergy to bisphenol A. Contact Dermatitis 40: 52-53, 1999.
- Fossi MC, Casini S, Ancora S, Moscatelli A, Ausili A, Notarbartolo di Sciarra G: Do endocrine disrupting chemicals threaten Mediterranean swordfish? Preliminary results of vitellogenin and zona radiata proteins in *Xiphias gladius*. Mar Environ Res 525: 477-483, 2001.
- Gray MA, Metcalfe CD: Induction of testis ova in japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to p nonylphenol. Environ Toxicol Chem 16(5): 1082-1086, 1997.
- Gronen S, Denslow N, Manning S, Barnes S, Barnes D, Bro-uwer M: Serum vitellogenin levels and reproductive impairment of male japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 4 tert octylphenol. Environ Health Perspect 107(5): 385-390, 1999.
- Honma S, Suzuki A, Buchanan DL, Katsu Y, Watanabe H, Iguchi T: Low dose effect of in vitro exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on female mouse reproduction. Reprod Toxicol 16(2): 117-122, 2002.
- Jobling S, Sheahan D, Osborne JA, Matthiessen P, Sumpter JP: Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. Environ Toxicol Chem 15(2): 194-202, 1996.
- Kang JJ, Yokota H, Oshima Y, Tsuruda Y, Yamaguchi T, Maeda M, Imada N, Tadokoro H, Honjo T: Effect of 17 beta estradiol on the reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Chemosphere 47(1): 71-80, 2002.
- Kelce WR, Monosson E, Gamcsik MP, Laws SC, Gray LE Jr: Environmental hormone disruptors: Evidence that vinclozolin developmental toxicity is mediated by antiandrogenic metabolites. Toxicol Appl Pharmacol 126: 276-285, 1994.
- Kim DH, Reu DS, Deung YK: An ultrastructural study on the spermatogenesis of *Xiphophorus maculatus*. Korean J Electron Microscopy 33(4): 267-274, 2003. (Korean)
- Lehtinen KJ, Mattsson K, Tana J, Engstrom C, Lerche O, Hemming J: Effect of wood related sterols on the reproduction, egg survival, and offspring of brown trout (*Salmo trutta lacustris* L.). Ecotoxicol Environ Safety 42: 40-49, 1999.
- Nagao T, Saito Y, Usumi K, Yoshimura S, Ono H: Low dose bisphenol A does not affect reproductive organs in estrogen sensitive C57BL/6N mice exposed at the sexually mature, juvenile, or embryonic stage. Reprod Toxicol 16(2): 123-130, 2002.
- Nikula H, Talonpoika T, Kaleva M, Toppari J: Inhibition of hCG stimulated steroidogenesis in cultured mouse Leydig tumor cells by bisphenol A and octylphenols. Toxicol Appl Pharmacol 157: 166-173, 1999.
- Olea N, Pulgar R, Perez P, Olea Serrano F, Rivas A, Novillo Fertil A, Pedraza V, Soto AM, Sonnenschein C: Estrogenicity of Resin based composites and sealants used in dentistry. Environ Health Perspect 104(3): 298-305, 1996.
- Pait AS, Nelson JO: Vitellogenesis in male *Fundulus heteroclitus* (killifish) induced by selected estrogenic compounds. Aquatic Toxicology 64: 331-342, 2003.
- Pickford DB, Morris ID: Effects of endocrine disrupting contaminants on amphibian oogenesis: Methoxychlor inhibits progesterone induced maturation of *Xenopus laevis* oocytes in Vitro. Environ Health Perspect 107(4): 285-292, 1999.
- Steinmetz R, Brown NG, Allen DL, Bigsby RM, Ben Jonathan N: The environmental estrogen bisphenol A stimulates prolactin release in Vitro and in Vivo. Endocrinology 138(5): 1780-1786, 1997.

#### < 국문초록 >

환경호르몬 비스페놀 A가 *Xiphophorus maculatus*의 생식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 수컷을

100 ppb, 200 ppb, 400 ppb, 800 ppb의 농도에 3개월간 노출시킨 후 정상의 암컷과 교배시켜 치어수를 계수하여 수컷의 수정능력을 확인하였고, 치어를 6개월 동안 비스페놀 A에 노출시켜 치어의 암수비율, 기형율, 사망률 및 형태학적으로 정자형성과정을 조사하였다.

3개월간 비스페놀 A에 노출시킨 수컷과 정상인 암컷을 교배시켜 얻은 치어수는 정상대조군에서 평균  $19.00 \pm 3.02$ 마리였으나 비스페놀 A의 농도가 증가함에 따라서 치어수는 100 ppb에서  $11.50 \pm 2.22$ 마리,

200 ppb에서  $6.40 \pm 2.76$ 마리, 400 ppb에서  $5.70 \pm 1.34$ 마리 및 800 ppb에서  $3.70 \pm 2.11$ 마리로 감소하는 경향을 보였다. 치어의 암수비율은 비스페놀 A의 농도와 전혀 상관이 없었고 기형과 사망률은 0%였다. 노출시킨 지 6개월 후 정자형성과정은 800 ppb에서도 정상적으로 일어나고 있었다. 이상과 같이 비스페놀 A는 성전환, 수컷의 비율감소, 기형 및 사망에는 전혀 영향을 주지 않았고 단지 출생 개체수에만 영향을 주었다.

## FIGURE LEGENDS

- Fig. 1.** Light micrograph of *X. maculatus* testis section in control group ( $\times 40$ ). Each cyst contains a clone of synchronously differentiating germ cell. Various staged cysts consisted mainly of spermatocytes (A), early spermatid (B) and spermatozoa (C) are compared.
- Fig. 2.** Light micrograph of testis section in group treated with concentration of 200 ppb bisphenol A ( $\times 80$ ).
- Fig. 3.** Light micrograph of testis section in group treated with concentration of 400 ppb bisphenol A ( $\times 80$ ).
- Fig. 4.** Light micrograph of testis section in group treated with concentration of 800 ppb bisphenol A ( $\times 80$ ).
- Fig. 5.** An electron micrograph of sperms in control group (scale bar = 500 nm). M: mitochondria, N: nucleus.
- Fig. 6.** The tangential section of sperms in group treated with concentration of 400 ppb bisphenol A (scale bar = 2  $\mu$ m).
- Fig. 7.** Transmission electron micrograph of early spermatids in group treated with concentration of 800 ppb bisphenol A (scale bar = 2  $\mu$ m).
- Fig. 8.** The section of sperms in group treated with concentration of 800 ppb bisphenol A (scale bar = 2  $\mu$ m).



