

4-nonylphenol에 노출된 암컷 저서성 요각류 *Tigriopus japonicus s.l.*에서 부화한 자손의 생태독성 반응

방 현 우 · 이 원 철¹ · 곽 인 실*

(전남대학교 해양기술학부, ¹한양대학교 생명과학과)

Ecotoxicological Response of Offspring from *Tigriopus japonicus s.l.* Parents Exposure to 4-nonylphenol. Bang, Hyun Woo, Wonchoel Lee¹ and Inn-Sil Kwak* (Division of Marine Technology, Chonnam National University, Yeosu 550-749, Korea; ¹Department of Life Science, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea)

The aim of this research was to detect and observe delivering generation effects from F₀ generation exposed to 4-nonylphenol (4NP) to F₁ generation on *Tigriopus japonicus*. The nauplius survival rate of F₁ from F₀ exposed to low 4NP concentration was significantly lower than other concentrations. Among the developmental process, copepodite first emergence day (CE) and adult male first emergence day (ME) on F₁ were accelerated relatively high concentration conditions. The sex ratio of F₁ was different between control group and treatment groups for 1, 10 and 30 µg L⁻¹ 4NP. The fecundity of F₁ was not significantly affected (except, 0.1 µg L⁻¹ 4NP). When 4NP concentrations were increased, first brooding day (FB) of F₁ was generally delayed. The length, width, and biomass of F₁ adult female were smaller than control group. In addition, the width and biomass of adult male were narrower or smaller than control group.

Key words : 4-nonylphenol, *Tigriopus japonicus s.l.*, morphological characters, F₁ generation

서 론

무척추동물은 전체 동물군의 90% 이상을 차지하고 있으나 (Barne, 1980), 무척추동물의 내분비계 생리에 대해서는 거의 알려지지 않았으며, 단지 몇몇 연구에 의해 제한적으로 알려져 왔다 (Fox, 1992; Colburn *et al.*, 1993; Baldwin *et al.*, 1995; DeFur *et al.*, 1999; DeFur, 2004; Verslycke *et al.*, 2007). 최근 내분비계 교란 물질이 생태계에 미치는 영향이 이슈화 되면서 오염 물질의 지표자로서 무척추동물이 중요한 역할을 할 수 있을 것이라는 인식이 커지게 되었다 (Alvarez and Ellis, 1990; Crisp *et*

al., 1997; LeBlanc and Bain, 1997; WGBEC, 2002; Kwak and Lee, 2004a, b; Verslycke *et al.*, 2007). 이것은 무척추동물이 척추동물에 비해 내분비계 교란물질이 생태계에 미치는 영향을 빠르고 민감하게 감지해 낼 수 있을 뿐만 아니라, 척추동물까지 연결되는 먹이 사슬 전체에 많은 부분을 차지하고 있는 것을 고려해 볼 때 전체 생태계를 대변 할 수 있을 것이라 여겨지기 때문이다 (Bechmann, 1999; DeFur *et al.*, 1999; DeFur, 2004; Kusk and Wollenberger, 2007). 이미 미국 등 선진국에서는 다양한 오염물질에 대한 독성평가용 시험 생물로 무척추동물을 이용하려 하고 있으며 (Baldwin *et al.*, 1997; Marcial *et al.*, 2003; Yoon *et al.*, 2006), 최근에 무척추동물에서 내분비계 교란

* Corresponding author: Tel: 061) 659-3193, Fax: 061) 659-3199, E-mail: iskwak@chonnam.ac.kr

물질이 성장과 생식 등 여러 가지 잠재적 영향을 준다는 연구 결과들이 발표되고 있다(Andersen *et al.*, 1999; Kusk and Wollenberger, 1999; Oetken *et al.*, 2004; LeBlanc, 2007).

Alkylphenol polyethoxylates (APEOs)는 비 이온성 계면 활성제로서 가정용 및 산업용 세제, 라텍스 페인트, 유화제 등의 주요 성분으로서 산업적으로 대단히 많이 사용되고 있으며, 이 중 약 60%가 수중 환경에 유출되어 하수 처리과정을 통해 nonylphenol과 octylphenol로 분해되어 안정된 대사 물질로서 하구 또는 연안에 퇴적된다고 알려져 있다. 이 중 4-nonylphenol은 alkylphenol 성분 중 가장 널리 알려진 물질로서 17 β -estradiol과 구조적으로 완전히 다름에도 불구하고 수용체에 경쟁적으로 반응하는 내분비계 교란물질로 잘 알려져 있다(Giger *et al.*, 1984; Ahel *et al.*, 1987).

무척추동물에서 내분비계 교란물질의 영향을 정확하게 판단하기 위해서는 전생애(full life cycle) 독성 실험, 즉 세대 간 장기 독성 실험이 필수적이다(DeFur *et al.*, 1999; Barata *et al.*, 2004). 따라서 최근 세대 간 독성 실험이 늘어가고 있는 추세다(Bejarano and Chandler, 2003; Cary *et al.*, 2004; Chandler *et al.*, 2004). ISO (International Organization for Standard, 1997), ASTM (American Society for Testing and Materials, 2004) 등에서 표준시험방법을 제시하였으나, 생식이나 생활사에 대한 내용은 포함되어 있지 않아 장기 독성 실험에 대한 국제 표준이 필요한 실정이다. 최근 OECD에서 전생애 시험법에 대한 초안을 제시하였다(OECD, 2005; Kusk and Wollenberger, 2007).

이번 연구의 시험 종으로 선택한 저서성 요각류 *Tigriopus* 속은 생태 독성 시험에 적합한 종으로 판단되는데, 이는 *Tigriopus* 속이 이런 광범성을 지닐 뿐 아니라, 전 세계적으로 분포하고, 연안의 조수 웅덩이에서 쉽게 채집할 수 있으며, 생활사가 짧고, 현장에서 다량 채집이 가능하며, 실험실 내 배양이 용이하고, 수온과 pH에 대해 매우 넓은 내성 한계를 갖는 것으로 잘 알려져 있기 때문이다(Ito, 1970; Marcial *et al.*, 2003). *Tigriopus japonicus s.l.*는 6단계의 nauplius 단계와 6단계의 copepodite 단계의 생활 주기를 가지며(Fig. 2), 수컷과 암컷의 구분은 제1촉각과 5번째 유영지의 차이로 구분할 수 있다(Ito, 1970).

본 연구의 목적은 독성 시험생물로서 많은 장점을 가지고 있는 저서성 요각류 중 우리나라 연안에서 쉽게 발견할 수 있는 *Tigriopus japonicus s.l.*를 이용하여 4-nonylphenol에 노출된 암컷이 포란한 알에서 부화한 유

생을 실험 대상생물로 사용하여, 생태 독성 반응의 양상을 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험 생물 채집 및 배양

*Tigriopus japonicus s.l.*는 전라남도 여수시 만성리 해수욕장 부근 조수 웅덩이에서 소형 핸드넷(망목 크기 63 μm)으로 채집한 후 배양하였다. 배양액으로 사용한 해수는 1차 증류수와 인공 해수염(Crystal Sea Marine Mix, Crystal Sea[®])을 이용하여 농도 25 psu로 제조하였다. 실험 기간 중 수온 20°C, DO 80% 이상, pH 8 \pm 0.3, light/dark=16h/8h 조건에서 항온기(Sanyo incubator MIR-553) 내에서 배양하였다. 먹이로는 Tetramin(Tetra-Werke, Melle, Germany)을 미세하게 처리한 후 현탁액 상태로 공급하였다. 이러한 배양 조건은 ISO의 표준시험방법을 참고하였다(ISO, 1997).

2. 실험 독성 물질

에스트로겐성 화합물로 4-nonylphenol (4NP; Sigma-Aldrich, cas no. 104-40-5)을 사용하여 실험하였다. Carrier solvent로 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 사용하였고 최종 농도가 최대 0.01% (v/v) 이하가 되도록 했으며, 독성 물질은 대조군과 solvent 대조군을 포함하여 0.1, 1, 10, 30, 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ 농도로 실험하였다.

3. 부모세대(F₀ generation)의 독성 노출

실험은 배양 조건과 같은 환경에서 실시하였으며, 시험 용기로는 60 \times 15 petri-dish(Arambra)와 6-well, 24-well cell culture plate (SPL)을 이용하였다. 독성실험은 ISO의 표준시험방법을 참조하여 실시하였다(ISO, 1997). 각 개체는 시험 생물이 부화 후 성체가 될 때까지 계속 배양하였으며, 각 실험 대상 개체는 한 농도 당 최소 5개체씩 6회 이상 반복실험을 실시하였다. 생존 여부를 24시간 간격으로 확인하였고, 실험 기간 중 독성 물질의 반감기를 고려하여 3일 간격으로 사육수를 교체해 주었다.

4. 자손세대(F₁ generation)의 배양 및 외형 관찰

부화한지 24시간 이내의 유생을 4NP에 노출시켜 배양하고 그 중 포란한 암컷 개체(F₀)를 선별하여 독성이 없는 정상 배지와 환경 조건에서 부화시켰다. F₀ 개체들의

4NP 노출 농도는 대조군, solvent 대조군, 0.1, 1, 10, 30, 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ 로 하였다. 생성된 자손세대 (F_1) 개체는 무독 상태 조건에서 배양하여 생존율, 성장률, 포란율 등을 측정하였다.

각각의 개체를 관찰하여 5분 동안 아무런 움직임이 없는 경우 사망한 것으로 판단한 후 24시간 이후에 사망을 확정하여 생존율(NS: nauplius survival rate, CS: copepodite survival rate)을 결정하였으며, 개체 별로 copepodite 유생이 되는 시기를 관찰하여 copepodite 출현일(CE: copepodite first emergence day)을 결정하였다. 수컷 출현일(ME: adult male first emergence day)은 성체 수컷이 관찰되는 시기를 통해 판단하였으며, 성체가 된 개체를 대상으로 각각 성비(SR: sex ratio), 포란율(BR: brooding success day), 포란일(FB: first brooding day) 등을 확인하였다.

실험 후 모든 개체는 70% 에탄올로 고정하여 보관하였으며, 해부현미경(Olympus SZX12), 광학현미경(Olympus BX-51) 등을 이용하여 체장, 체적, 부속지의 외형 변화 등을 살펴보았다. 개체의 길이와 폭은 해부현미경과 광학현미경에 부착된 카메라를 이용하여 이미지 분석 프로그램(MetaMorph 6.0)에서 계산하였으며, 생물량(biomass) 측정은 Feller and Warwick의 Volumetric method (Higgins and Thiel, 1988)를 이용하였다.

5. 통계 분석

각각의 독성 물질에 대한 생물종의 생존율, 성장률, 포란율 등을 분석하기 위해 SPSS 프로그램(ver. 12.0)을 이용하였다. 기본적으로 모든 통계 분석은 one-way ANOVA 분석을 기본으로 하여 분석한 후 Duncan test로 사후검정하였다. 성비는 X^2 검정을 통하여 분석하였다. 모든 분석은 유의수준 $p < 0.05$ 에서 검정하였다.

결 과

1. 처리농도 별 생존율과 발생 소요기간

대조군 nauplius 유생의 생존율(NS)은 $96.55 \pm 9.36\%$, copepodite 유생(CS)은 $97.86 \pm 6.07\%$ 로 나타났다(Table 1). Nauplius 유생은 부화 후 평균 5.20 ± 0.65 일이 후에 copepodite 유생으로 발달하였다(Table 1). 발생 후 10일째 되는 날부터 성체 수컷이 관찰되기 시작하여 11일 이내에 성체가 되었으며, 평균 수컷 성체 출현일은 10.33 ± 0.49 일로 나타났다. Carrier solvent인 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 nauplius 유생의 생존율과 copepodite 유생

Table 1. Survival rates and development of F_1 *Tigriopus japonicus s.l.* exposed to different concentrations of 4-nonylphenol.

	n		NS (%)	CS (%)	CE (day)	ME (day)
Control	145	Mean	96.55	97.86	5.20	10.33
		SD	9.36	6.07	0.65	0.49
Solvent C	120	Mean	100.00	100.00	5.23	10.75
		SD	0.00	0.00	0.54	0.89
0.10	120	Mean	85.00*	100.00	5.27	10.88*
		SD	27.19	0.00	0.49	0.33
1.00	120	Mean	72.41*	100.00	5.46	9.20*
		SD	33.35	0.00	1.88	0.41
10.00	120	Mean	83.90*	100.00	5.28	9.61*
		SD	19.95	0.00	0.71	0.63
30.00	120	Mean	94.89	100.00	5.36	10.50
		SD	12.16	0.00	1.30	0.55
100.00	120	Mean	93.39	96.70	4.73*	9.42*
		SD	13.98	8.16	0.76	0.61

n: number of individuals

NS: nauplius survival rate

CS: copepodite survival rate

CE: copepodite first emergence day

ME: adult male first emergence day

SD: standard deviation

*: asterisks denote a significant difference from control by one-way ANOVA followed by Duncan test ($p < 0.05$)

생존율은 100.00%, copepodite 출현일은 5.23 ± 0.54 일, 성체 출현일은 10.75 ± 0.89 일로 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다.

4NP 0.1, 1, 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ 에 노출된 F_0 세대에서 발생한 F_1 세대 nauplius 유생의 생존율은 각각 85.00 ± 27.19 , $72.41 \pm 33.35\%$, $83.90 \pm 19.95\%$ 로 대조군에 비해 낮은 생존율을 보였으며($p < 0.05$), 높은 농도에 노출된 부모에서 태어난 자손 세대의 생존율이 오히려 높아지는 경향을 보였다(Table 1; Fig. 1). Nauplius의 성장을 반영한 최초 copepodite 유생 출현일(CE)은 저농도에서는 조금 지연되며, 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ 이상에서는 빨라지는 경향을 보였으나 유의한 차이는 나타나지 않았다. 전체적으로 저농도에서 수컷의 성장 속도가 빨라지는 경향을 보였다. 특히, 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ 에서 발생한 F_1 세대 성체 수컷 출현일(ME)이 평균 9.20 ± 0.41 일로 대조군에 비해 약 1.1일 빨리 출현하여 비교적 빠른 성장 속도를 보여주었다($p < 0.05$).

2. 처리 농도 별 성비(SR) 및 포란(BR)과 최초 포란일(FB)

출현한 성체 수컷의 비율을 산정하여 성비(SR)를 살펴

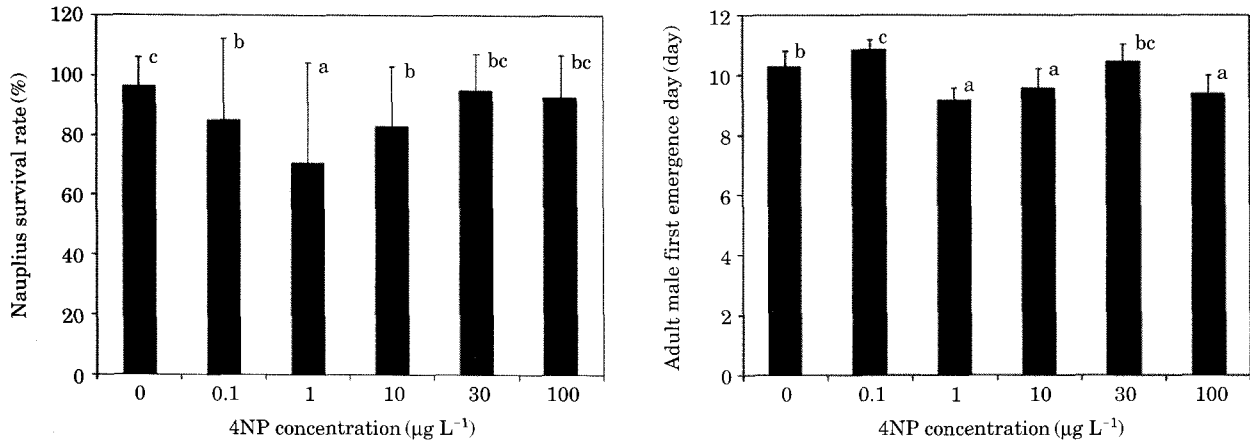


Fig. 1. Nauplius survival rate and adult male first emergence day of *Tigriopus japonicus* exposed to different concentrations of 4-nonylphenol.

Table 2. Sex ratio, brooding success rates and brooding days of F₁ *Tigriopus japonicus* s.l. exposed to different concentrations of 4-nonylphenol.

	n		SR (M%)	BR (%)	FB (day)
Control	140	Mean	61.48	98.08	13.64
		SD	-	10.00	0.67
Solvent C	120	Mean	54.00	100.00	13.80
		SD	-	0.00	1.14
0.10	102	Mean	56.67	38.46*	16.80*
		SD	-	25.09	3.70
1.00	87	Mean	100.00†	-	-
		SD	-	-	-
10.00	101	Mean	93.33†	100.00	12.50
		SD	-	0.00	0.71
30.00	114	Mean	20.00†	100.00	13.88
		SD	-	0.00	1.15
100.00	108	Mean	65.52	100.00	13.50
		SD	-	0.00	1.35

n: number of individuals

SR: sex ratio; percentage of male in population

BR: brooding success rate

FB: first brooding day; periods from birth to female borne egg sac

SD: standard deviation

*: asterisks denote a significant difference from control by one-way ANOVA followed by Duncan test ($p < 0.05$)

†: crosses denote a significant difference from control by X²-test ($p < 0.05$)

본 결과, 대조군의 경우 수컷이 전체 성체의 61.48%를 차지하였다(Table 2). 4NP 처리군에서 발생한 F₁세대 성비는 0.1 µg L⁻¹와 100 µg L⁻¹에서는 대조군과 차이를 보이지 않았으나(Table 2), 1 µg L⁻¹와 10 µg L⁻¹에서는 수컷

이 각각 100.00%, 93.33%를 차지하였으며, 30 µg L⁻¹에서는 암컷의 비율이 80.00%로 매우 높게 나타났다($p < 0.05$).

대조군 암컷은 98.08±10.0%의 포란율(BR), 부화 후 평균 13.64±0.67일에 포란하는 것으로 나타났다. 4NP F₁세대는 0.1 µg L⁻¹에서 38.46±25.09%의 매우 낮은 포란율을 보였으나($p < 0.05$) 그 이상 농도 처리군의 F₁세대에서는 모두 100% 포란하였다. 암컷의 최초 포란일(FB)은 0.1 µg L⁻¹에서는 평균 16.80±3.70일로 대조군에 약 3일 이상 지연된 것으로 나타났다($p < 0.05$).

3. 독성물질 처리에 따른 형태학적 변화

대조군 성체 암컷의 체장(length)은 평균 1034.25±61.89 µm, 폭(width)은 평균 355.38±13.06 µm, 생물량(biomass)은 5.90±0.45 µgC로 나타났다(Table 3). 성체 수컷의 체장, 폭, 생물량의 평균은 각각 858.19±36.90 µm, 322.49±11.47 µm, 4.04±0.38 µgC로 측정되어, 암컷이 수컷에 비해 각각 체장은 1.21, 폭은 1.10 생물량은 1.46배가 더 큰 것으로 나타났다.

4NP 처리군에서 발생한 F₁세대 암컷 개체의 체장은 저농도에서부터 고농도까지 모두 대조군보다 짧게 나타났다(Table 3). 0.1 µg L⁻¹에서 908.20±16.72 µm로 대조군의 90% 이하의 체장을 보였으며, 100 µg L⁻¹에서도 984.53±21.40 µm로 대조군보다 작았다. 개체 폭은 모든 농도에서 대조군에 비해 약 25~50 µm정도 짧았는데, 0.1 µg L⁻¹에서 305.99±12.44 µm로 가장 폭이 짧았다. 이러한 개체 폭의 감소로 인해 모든 농도에서 생물량이 대조군에 비해 적었는데, 저농도에서 더욱 뚜렷하게 나타

Table 3. Morphological characters of *F₁ Tigriopus japonicus s.l.* in relation to different concentrations of compounds.

	Concentrations ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Female			Male		
			Length (μm)	Width (μm)	Biomass (μg)	Length (μm)	Width (μm)	Biomass (μgC)
Control		Mean	1034.25	355.38	5.90	858.19	322.49*	4.04
		SD	61.89	13.06	0.45	36.90	11.47	0.38
0.1		Mean	908.20*	305.99*	3.85*	814.50*	280.83*	2.92*
		SD	16.72	12.44	0.33	22.49	15.70	0.36
1		Mean	-	-	-	827.25	289.67*	3.14*
		SD	-	-	-	32.31	8.19	0.26
4NP	10	Mean	913.20*	310.55*	3.98*	833.84	283.64*	3.04*
		SD	9.24	1.97	0.01	51.24	17.56	0.39
30		Mean	949.34*	330.42*	4.69*	884.89	288.76*	3.35*
		SD	34.82	10.02	0.40	53.85	15.85	0.51
100		Mean	984.53*	324.50*	4.70*	866.22	282.14*	3.13*
		SD	21.40	16.54	0.54	28.12	16.19	0.44

*: asterisks denote a significant difference from control ($p < 0.05$)

났다. 특히 $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서 생물량은 암컷이 $3.85 \pm 0.33 \mu\text{gC}$ 로 대조군에 비해 약 70% 정도인 것으로 나타났으며, 농도가 올라 갈수록 생물량이 커지는 경향을 보였으나 모든 농도에서 대조군보다 적은 생물량을 보였다.

수컷 역시 $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서 가장 짧은 체장과, 폭 그리고 가장 적은 생물량을 나타냈다. 수컷의 체장은 $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서 $814.50 \pm 22.49 \mu\text{m}$ 로 가장 작았으며 농도가 높아질수록 체장이 길어져 $30 \mu\text{g L}^{-1}$ 이상에서는 대조군보다 길었다. 폭은 모든 농도에서 대조군의 88% 정도로 짧은 것으로 나타났으며 농도에 따른 차이는 나타나지 않았다. 수컷의 생물량 역시 $2.92 \pm 0.36 \mu\text{gC}$ 로 대조군의 70% 정도였으며, 농도가 증가할수록 생물량이 증가하였다.

고 찰

*Tigriopus japonicus*를 비롯한 요각류는 부화 후 성체가 되기까지 여러 번의 탈피와 한 번의 변태를 거쳐 성장하게 된다(Ito, 1970). 탈피와 변태는 엑디스테로이드(ecdysteroids)에 의해 조절되며 변태는 곤충에서 알려진 유약 호르몬(juvenile hormone)과 유사한 methyl farnesoate가 관여하는 것으로 알려져 있다(Laufer *et al.*, 1987; Laufer and Borst, 1988; Chang *et al.*, 1993; Block *et al.*, 2003). 내분비계 교란물질은 엑디스테로이드와 구조적 유사성으로 인해 갑각류의 탈피와 성장 과정을 방해하여 시간을 지연시키게 된다(Fingerman, 1987; 1997; Hasegawa *et al.*, 1993). 선행 연구에서는 내분비계 교란물질인

4NP에 직접 노출된 저서성 요각류 *Tigriopus japonicus s.l.*에 처리 농도의 차이에 따른 생존율의 차이가 나타나지 않았으며, 개체의 성장만 지연된 것으로 나타났다. 그러나 노출된 암컷에서 포란한 알을 정상 배지로 옮겨 성장시킨 결과 그 자손은 저농도에서 낮은 생존율을 보였으며, 성장속도 역시 지연되는 것으로 나타났다. 저농도에서 치사한 개체들은 주로 copepodite 유생 단계로 성장하는 변태과정에서 실패하여 사망하였을 것으로 여겨진다. CE와 ME를 통해서 살펴본 성장속도는 저농도에서 발생한 개체는 성장이 느리고 고농도에서 발생한 개체는 오히려 성장이 빨라지는 경향을 보였다(Table 1). 이는 저농도에 노출된 부모세대가 포란하여 발생한 개체가 성장과정에서 더 크게 영향을 받는 것으로 나타나 부모세대가 내분비계 교란물질에 노출되면 개체 성장에 영향을 주는 것을 시사하였다.

배아, 유생, 성체 등 모든 성장 단계를 포함한 전생애(full life cycle) 독성 시험은 중금속, 내분비계 교란물질 등 오염원의 영향을 판단하기 위해 가장 이상적인 방법이다(DeFur *et al.*, 1999; Barata *et al.*, 2004). 요각류도 F_0 세대 nauplius 유생 I단계부터 최소한 F_1 세대 nauplius 유생 I단계까지 전생애 생활사에 대한 연구의 필요성이 대두되고 있다(Pound *et al.*, 2002). 요각류의 단계별 배양 독성실험을 통하여 nauplius가 성체보다 생존율에서 28배나 민감한 것으로 나타났으며, 수컷이 암컷보다 2배 민감한 경우도 보고되었다(Green *et al.*, 1996; Barata *et al.*, 2002). 또한 *Amphiascus sp.* nauplius 단계일 때 독성에 노출시키면 생식력이 가장 떨어지는 것으로 나타나

성장 초기가 독성에 가장 민감한 것으로 나타났다(Chandler and Green, 2001). Bejarano and Chandler (2003)는 내분비계 교란물질에 노출된 F₀세대는 고농도에서, F₁세대는 모든 농도에서 출산율이 저해되는 생식 저해 현상을 보고하였다. 이런 연유로 최근 2세대 이상의 장기 독성 실험이 늘어가고 있으며(Bejarano and Chandler, 2003; Marcial *et al.*, 2003; Cary *et al.*, 2004; Chandler *et al.*, 2004), OECD (2005)에서도 표준 시험을 위한 장기 독성 실험을 필수적으로 권장하고 있다. 본 연구에서도 직접 독성처리를 한 F₀세대와 F₀세대에서 생산되어 무독한 상태에서 배양된 F₁세대 간의 생활사에 분명한 차이가 있음을 보여주었다. 4NP 처리시 F₀세대보다 F₁세대 nauplius 유생이 독성에 훨씬 민감하여 저농도에서부터 높은 사망률을 보였다. 또한 F₁세대는 생존율 이외에도 단계별 성장, 포란, 성비 등 많은 항목에서 대조군과 유의적인 차이를 보였다. 본 연구를 통해 4NP에 직접 노출된 개체뿐 아니라 그 자손까지 오염의 영향이 계속 이어질 수 있음을 확인 하였다. 독성이 있는 물질이 생물에 끼치는 영향을 연구하기 위해서는 성장 단계별 연구가 필수적이며, 특히 세대 간 연구를 통해서 독성에 대한 생물의 민감도를 파악할 수 있을 것이다.

본 연구는 4NP에 의한 요각류의 형태변이와 노출된 부모세대에서 발생한 자손의 생활사(성장, 성비, 포란)에 대한 최초 연구로, 추후 F₁세대의 기형과 같은 형태변이, 유전자 변이 등을 연구를 통해 이를 바탕으로 현장 적용이 가능한 생체지표를 발굴하여 이용 가능하게 될 수 있을 것이다.

적 요

본 연구에서는 4-nonylphenol에 노출된 부모 세대 *Tigriopus japonicus s.l.*에서 태어난 그 자손 세대의 성장 과정과 외형의 변화를 살펴보았다. 4NP 노출된 암컷에서 태어난 F₁세대 nauplius 유생은 저농도에서 낮은 생존율을 보였으며, 성장 속도를 반영한 copepodite 유생 발생일과 성숙 수컷의 최초 출현일은 고농도에서 빠른 성장을 보였다. 성비는 0.1 µg L⁻¹와 100 µg L⁻¹에서는 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았으나, 1 µg L⁻¹와 10 µg L⁻¹에서는 수컷의 비율이 매우 높았다. 포란율의 경우 0.1 µg L⁻¹에서 매우 낮은 포란율을 보였으나, 그 이상 농도에서는 100% 포란하였다. 암컷의 최초 포란일은 모든 농도에서 대조군보다 지연되었으며, 농도가 높아질수록 느려지는 경향을 보였다. 4NP 처리군에서 발생한 F₁세대

암컷 성체의 체장, 폭 그리고 생물량은 모든 농도에서 대조군보다 짧게 나타났다. 성숙 수컷의 경우 체장은 대조군과 큰 차이가 없었으나 폭과 생물량은 모든 농도에서 대조군보다 짧은 것으로 나타났다.

사 사

본 연구는 환경부의 차세대핵심환경기술개발사업(Eco-technopia 21 project)으로 지원받은 과제입니다.

인 용 문 헌

- Ahel, M., T. Conrad and W. Giger. 1987. Persistent organic chemicals in sewage effluents-3. Determinations of nonylphenoxy carboxylic acids by high-resolution gas chromatography/mass spectrometry and high performance liquid chromatography, *Environ. Sci. Technol.* **21**: 697-703.
- Alvarez, M.M.S. and D.V. Ellis. 1990. Widespread neogastropod imposex in the Northeast Pacific: Implications for TBT contamination surveys. *Mar. Pollut. Bull.* **21**: 244-247.
- Andersen, H.R., B. Halling-Sørensen and K.O. Kusk. 1999. A parameter for detecting estrogenic exposure in the copepod *Acartia tonsa*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **44**: 56-61.
- ASTM. 2004. Standard guide for conducting renewal microplate-based life-cycle toxicity tests with a marine meiobenthic copepod. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, ASTM Standard No E2317-E2324.
- Baldwin, W.S., D.L. Milam and G.A. LeBlanc. 1995. Physiological and biochemical perturbations in *Daphnia magna* following exposure to the model environment estrogen disthylstibestrol. *Environ. Toxicol. Chem.* **14**: 945-952.
- Baldwin, W.S., S.E. Graham, D. Shea and G.A. LeBlanc. 1997. Metabolic androgenization of female *Daphnia magna* by the xenoestrogen 4-nonylphenol. *Environ. Toxicol. Chem.* **16**: 1905-1911.
- Barata, C., M. Medina, T. Telfer and D.J. Baird. 2002. Determining demographic effects of cypermethrin in the marine copepod *Acartia tonsa*: Stage-specific short tests versus life-table tests. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **43**: 373-378.
- Barata, C., C. Porte and D.J. Baird. 2004. Experimental designs to assess endocrine disrupting effects in inver-

- tebrates-A review. *Ecotoxicology*. **13**: 511-517.
- Barne, R.D. 1980. Invertebrate zoology. Philadelphia PA: W.S. Sanunders.
- Bechmann, R.K. 1999. Effect of the endocrine disrupter nonylphenol on the marine copepod *Tisbe battagliai*. *Sci. Total Environ.* **233**: 33-46.
- Bejarano, A.C. and G.T. Chandler. 2003. Reproductive and developmental effects of atrazine on the estuarine meiobenthic copepod *Amphiascus tenuiremis*. *Environ. Toxicol. Chem.* **22**: 3009-3016.
- Block, D.S., A.C. Bejarano and G.T. Chandler. 2003. Ecdysteroid concentrations through various life-stages of the meiobenthic harpacticoid copepod, *Amphiascus tenuiremis* and the benthic estuarine amphipod, *Leptocheirus plumulosus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **132**: 151-160.
- Cary, T.L., G.T. Chandler, D.C. Volz, S.S. Walse and L. Ferry. 2004. Phenylpyrazole insecticide fipronil induces male infertility in the estuarine meiobenthic crustacean *Amphiascus tenuiremis*. *Environ. Sci. Technol.* **38**: 522-528.
- Chandler, G.T. and A.S. Green. 2001. Developmental stage-specific life-cycle bioassay for assessment of sediment-associated toxicant effects on benthic copepod production. *Environ. Toxicol. Chem.* **20**: 171-178.
- Chandler, G.T., T.L. Cary, D.C. Volz, S.S. Spencer, J.L. Ferry and K. Iosterhaus. 2004. Fipronil effects on estuarine copepod (*Amphiascus tenuiremis*) development, fertility, and reproduction: a rapid life-cycle assay in 96-well microplate format. *Environ. Toxicol. Chem.* **23**: 117-124.
- Chang, E.S., M.J. Bruce and S.L. Tamone. 1993. Regulation of crustacean molting: a multi-hormonal system. *Am. Zool.* **33**: 324-329.
- Colburn, T., F.S. vom Saal and A.M. Soto. 1993. Developmental effect of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and human. *Environ. Health Perspectives.* **101**: 378-384.
- Crisp, T.M., E.D. Clegg, R.L. Cooper, D.G. Anderson, K.P. Baetcke, J.L. Hoffmann, M.S. Morrow, D.J. Rodier, J.E. Schaeffer, L.W. Touart, M.G. Zeeman, Y.M. Patel and W.P. Wood. 1997. Special report on environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis. Washington DC: USEPA. EPA/630/R-96/012.
- DeFur, P.L., M. Crane, C. Ingersoll and L. Tattersfield. 1999. Endocrine disruption in Invertebrates: Endocrinology, Testing and Assessment. Pensacola, Fla.: Society of Environmental Toxicology and Chemistry.
- DeFur, P.L. 2004. Use and role of invertebrate models in endocrine disrupter research and testing. *ILAR J.* **45**(4): 484-493.
- Fingerman, M. 1987. The endocrine mechanisms of crustaceans. *J. Crust. Biol.* **7**: 1-24.
- Fingerman, M. 1997. Crustacean endocrinology: a retrospective, prospective, and introspective analysis. *Physiol. Zool.* **70**: 257-269.
- Fox, G.A. 1992. Epidemiological and pathobiological evidence of contaminant-induced alterations in sexual development in free-living wildlife, In: Colborn, T. and C. Clement (eds.). Chemically Induced Alterations in Sexual and Functional Development. The Wildlife/ Human Connection. Princeton Scientific Pub. Co., Princeton, NJ. p. 147-158.
- Giger, W., P.H. Brunner and D. Schaffner. 1984. 4-Nonylphenol in sewage sludge: Accumulation of toxic metabolites from nonionic surfactants, *Science* **225**: 623-625.
- Green, A.S., G.T. Chandler and W.W. Piegorsch. 1996. Life-stage-specific toxicity of sediment-associated chlorpyrifos to a marine, infaunal copepod. *Environ. Toxicol. Chem.* **15**: 1182-1188.
- Hasegawa, Y., E. Hirose and Y. Katakura. 1993. Hormonal control of sexual differentiation and reproduction in Crustacea. *Am. Zool.* **33**: 403-411.
- Higgins, R.P. and H. Thiel. 1988. Introduction to the study of meiofauna. Smithsonian Institution Press.
- ISO. 1997. Water quality-determination of acute lethal toxicity to marine copepods (Copepoda, Crustacea). Draft International Standard ISO/DIS 14669. Genève, Switzerland.
- Ito, T. 1970. The biology of the harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus* Mori. *J. Fac. Sci. Hokkaido Univ.* **17**: 474-500.
- Kusk, K.O. and L. Wollenberger. 1999. Fully defined salt-water medium for cultivation of and toxicity testing with marine copepod *Acartia tonsa*. *Environ. Toxicol. Chem.* **18**: 1564-1567.
- Kusk, K.O. and L. Wollenberger. 2007. Towards an internationally harmonized test method for reproductive and developmental effects of endocrine disrupters in marine copepods. *Ecotoxicology*. **16**(1): 183-195.
- Kwak, I.S. and W. Lee. 2004a. Changes in Proteome following exposure to Di (2-ethylhexyl) Phthalate in *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae). *Korean J. Environ. Biol.* **22**(4): 532-536.
- Kwak, I.S. and W. Lee. 2004b. Detecting points for ecological disruptions and developmental delay exposure to DEHP in *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae). *Korean J. Environ. Biol.* **22**(2): 321-328.
- Laufer, H, D. Borst, F.C. Baker, C. Carrasco, M. Sinkus,

- C.C. Reuter, L.W. Tsai and D.A. Schooley. 1987. Identification of a juvenile hormone-like compound in a crustacean. *Science*. **235**: 202-205.
- Laufer, H. and D.W. Borst. 1988. Juvenile hormone in Crustacea. *In: Endocrinology of Selected Invertebrate Types*. H Laufer and RGH Downer, eds. Alan R. Liss, New York, NY, USA, p. 305-313.
- LeBlanc, G.A. and L.J. Bain. 1997. Chronic toxicity of environmental contaminants: sentinels and biomarkers. *Environ. Health Perspect.* **105**: 65-80.
- LeBlanc, G.A. 2007. Crustacean endocrine toxicology: a review. *Ecotoxicology*. **16**: 61-81.
- Marcial, H.S., A. Hagiwara and T.W. Snell. 2003. Estrogenic compounds affect development of harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus*. *Environ. Toxicol. Chem.* **22**(12): 3025-3030.
- Oetken, M., J. Bachmann, U. Schulte-Oehlmann and J. Oehlmann. 2004. Evidence for endocrine disruption in invertebrates. *Int. Rev. Cyto.* **236**: 1-43.
- OECD. 2005. OECD Draft Guidelines for testing of chemicals. Proposal for a new guideline. Harpacticoid copepod development and reproduction test. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
- Pounds, N.A., T.H. Hutchinson, T.D. Williams, P. Whiting and L. Dinan. 2002. Assessment of putative endocrine disrupters in an in vivo crustacean assay and an in vitro insect assay. *Mar. Environ. Res.* **54**: 709-713.
- Verslycke, T., A. Ghekiere, S. Raimondo and C. Janssen. 2007. Mysid crustaceans as standard models for the screening and testing of endocrine-disrupting chemicals. *Ecotoxicology*. **16**: 205-219.
- WGBEC. 2002. Report of the Working Group on the Biological Effects of Contaminants. ICES CM 2002/E:02 Ref.: ACME.
- Yoon, S.J., G.S. Park, J.H. Oh and S.Y. Park. 2006. Marine ecotoxicological assessment using the nauplius of marine harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus*. *J. Korean Soc. Environ. Eng.* **9**(3): 160-167.

(Manuscript received 17 January 2008,
Revision accepted 10 March 2008)