

碩 士 學 位 論 文

Nonylphenol이 넙치, *Paralichthys
olivaceus*의 번식에 미치는 영향



文 珣 株

1999年 12月

**Effects of Nonylphenol on Reproduction
of the Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus***

Soon-Ju Moon

(Supervised by Professor Young-Don Lee)



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE**

**DEPARTMENT OF MARINE BIOLOGY
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY**

1999. 12.

Nonylphenol이 낚치, *Paralichthys olivaceus*의 번식에 미치는 영향

指導教授 李 榮 敦

文 珣 株

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함



文珣株의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 최 광 식

委 員 여 인 규

委 員 이 영 돈



濟州大學校 大學院

1999年 12月

목 차

Abstract	1
I. 서 론	3
II. 재료 및 방법	5
III. 결 과	9
1. 수정란 및 부화자어의 NP 침적처리	9
2. NP 경구투여에 의한 성장 및 생식소 발달	17
3. NP 복강주사에 의한 생식소 발달	21
IV. 고 찰	27
V. 요 약	30
VI. 참고문헌	32
감사의 글	34

Abstract

This study was conducted to investigate effects of nonylphenol (NP), known as one of the endocrine disrupting chemicals (EDCs), on the early development of the fertilized egg, survival rate and LT_{50} of the hatched larva, gonad development of the fry in sexually undifferentiated stage and sexually differentiated stage of the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*.

Hatching rate of the fertilized eggs immersed to NP at morula stage were 78.7, 46.0, 48.0 and 33.3% in NP-50, 100, 150 and 200 $\mu\text{g}/\ell$ treatment groups respectively. Hatching rate of the control I, control II were 90.7 and 90.0%. Sixty five hr-survival rates of the fertilized eggs were 73.3 and 46.0% in the controls, whereas NP-50, 100, 150 and 200 $\mu\text{g}/\ell$ treatment groups were 0%. Hatching time were 36.1, 40.0, 39.7 and 41.7 hr in NP-50, 100, 150 and 200 $\mu\text{g}/\ell$ treatment, respectively, controls were 32.3 and 33.0 hr. Hatching time was postponed in high-dose group rather than controls. Fertilized eggs of NP immersed group could not hatch normally and vertebra of the hatched larvae was in abnormal shape. Twenty six hr-survival rate of the hatched larvae were 61.7, 21.7, 11.7 and 0% in NP-50, 100, 150 and 200 $\mu\text{g}/\ell$ treatment, respectively, while controls were 88.3 and 83.3%. LT_{50} were 33.5 hr in NP-50 $\mu\text{g}/\ell$, 15.7 hr in NP-100 $\mu\text{g}/\ell$, 11.5 hr in NP-150 $\mu\text{g}/\ell$ and 9.5 hr in NP-200 $\mu\text{g}/\ell$. Growth of the controls and NP oral administration groups was significantly different ($P < 0.05$), whereas growth among the NP oral administration groups were not significantly different ($P > 0.05$). NP oral administration were treated to the sexually undifferentiated olive flounders which were hatched 55 to 64 days old.

Development of ovarian cavity was observed in the ovary and the early growing oocytes were distributed in the ovarian lamella of the olive flounder 85 days old. The proliferating spermatogonia were observed in the testis of the olive flounder 85 days old. Ovarian lamella of the ovary were filled with oogonia and perinucleolus oocytes in female 159 days old. Testicular lobules of the testis were occupied by spermatogonia, spermatocytes and spermatids in male 159 days old. Histological examination on the gonadal development were not different compared to the controls and the NP treatment groups. NP intraperitoneal injection were conducted to the sexually differentiated olive flounder 167 days old. Histological examination were conducted at 30 days after injection. Ovarian lamella of the ovary were filled with oogonia and perinucleolus oocytes. Testicular lobules of the testis were filled by spermatogonia, spermatocytes and spermatids.

Results of this study suggest that the effect of NP on reproduction of the olive flounder is mainly on development of fertilized egg and hatching, rather than sexual development of gonad.

I. 서 론

1940년대부터 1990년대에 이르기까지 산업발달과 더불어 생산된 산업화학물질들은 생태계에 생식기의 결합, 행동이상, 생식기능 손상, 새끼들의 죽음과 같은 악영향을 미쳐 야생동물의 멸종은 물론 인류의 생존까지도 위협하고 있다. 소각장에서 발생하는 다이옥신, 변압기의 절연유 등으로 사용되는 PCB, 살충제로 사용되었던 DDT, 선박용 방오도료 TBT, 합성세제 원료인 nonylphenol (NP), 플라스틱원료인 Bisphenol A 등 70 여종의 유독화학물질이 생태계의 내분비계를 교란시키는 것으로 밝혀졌다(Colborn *et al.*, 1996; Cadbury, 1997). ‘체내 호르몬의 생산, 분비, 이동, 대사, 결합작용 및 배설을 간섭하는 외인성 물질’이라 정의된 내분비교란물질은 생태계내 소비자에 의해 쉽게 분해되지 않으며, 생물의 지방조직에 농축되어 대물림함으로써, 그 개체가 죽더라도, 환경내에 잔류하여 지속적인 위협을 준다. 그 중 NP는 사람의 눈과 호흡기계를 자극하고 단백질을 변성시키는 작용이 있는 것으로 알려져 있으며, 다른 내분비교란물질에 비해 바다생물에 대해 독성이 높고 자연에서 분해율이 낮다고 보고되어 있으나(Ahel *et al.*, 1994, 1996), 어류에 미치는 영향에 대한 연구는 미흡한 형편이다.

NP는 phenol과 nonene를 원료로 하는 담황색의 점성이 있는 액체이다. 비중 : 0.95(20/4), 비점 : 298~303℃, 인화점 : 146.6℃, 색상도(APHA) : 200이하로, 더운물에 용해되나 찬물에는 용해되지 않고, 유기용제에서는 미량 용해된다. NP는 phenol이 알킬화(alkylation)에 의해 만들어진 nonyl기를 지닌 여러 가지의 이성체의 4-치환 monoalkyphenol의 혼합물로 구성된 물질이며, 이성질체에는 NP, 4-NP, Branched 4-NP, 3-NP 및 2-NP 등이 있다. 가장 일반적으로 사용되고 있는 비이온성 종류의 산업 계면활성제인 NP는 주로 플라스틱 및 고무공업에서 쓰이는 공업용 세제, 합성세제로 섬유, 펄프 및 제지 산업에서 이용되며, 그 외에 석탄, 금속, 납, 식품, 음료처리과정, latex 착색 및 제지 탈색 과정 등에 이용된다.

NP는 직물, 펄프, 제지 생산시 배출수에 의해 환경으로 유출되어 지하수, 산업폐수, 생활오수, 침전물 등에서 검출되어진다(Ahel *et al.*, 1994, 1996). 최근 NP와 NP ethoxylate 분해산물이 “estrogenic”이라고 보고되어지고 있어(Jobling *et al.*, 1996), 수생생물의 내분비계를 교란시킬 가능성이 큰 물질로 여겨진다.

유독화학물질 NP가 수서생물에게 미치는 영향에 관한 연구에는 β -hexachlorocyclohexane, p-NP 처리에 의한 송사리, *Oryzias latipes*의 testis-ova 유도(Wester and Canton, 1986; Gray *et al.*, 1997), estrogenic alkylphenol 화학물질에 침적된 rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*에 있어 정소 성장 억제(Jobling *et al.*, 1996), NP을 침적시킨 eelpout, *Zoarces viviparus*에 있어서의 vitellogenin 합성 유도와 정소에서 Sertoli 세포의 발달을 저해하는 영향(Christiansen *et al.*, 1998), 0.25 mg/l methoxychlor 살충제를 flagfish의 egg에 2시간 동안 침적 처리하여 부화율, 이상개체 발생 연구(Holdway and Dixon, 1986)등이 보고되어 있다.

이 논문은 NP의 해산어류에 있어서의 estrogenic 효과를 조사하기 위하여, 저서성 해산어류인 넙치를 대상으로, NP가 수정란의 초기발생, 부화자어의 발달, 생존율, LT₅₀ 그리고 성적 미분화 시기와 성분화 시기의 생식소 발달에 미치는 영향을 변식생물학적으로 조사하였다.

II. 재료 및 방법

수정란 및 부화자어

이 실험에 사용된 넙치 수정란(난경 1.1 ± 0.14 mm, 유구 0.1 ± 0.01 mm)은 제주도 북제주군 조천읍 북촌리 소재 한라수산 넙치 친어조에서 생산된 것을 사용하였다. 수정란은 세란 한 후 실험구에 수용하여 상실기 단계의 발생 수정란을 사용하였다.

실험에 사용한 부화자어(2.4 ± 0.04 mm)는 수정란을 500 ml 유리 비이커에 수용하여 수온 $20 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 에서 부화시켜 사용하였다. 부화자어 20마리씩 250 ml 유리 비이커에 각각 수용하였다. 실험구별 배양 수온은 $20 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 로 유지하여 수온 변화에 의해 발생속도가 차이 나지 않도록 하였다. 각 실험구의 실험 중 염분농도는 32‰, 용존산소는 4.32 mg/l , 그리고 pH는 8.19 이었다(Table 1).

실험 약품



실험 약품은 미국 Aldrich Chemical사에서 제조한 것을 사용하였다. 실험에 사용하기 위한 NP는 1 g을 아세톤 10 ml에 녹여 NP-50, 100, 150 및 $200 \mu\text{g/l}$ 농도로 수정란 및 부화자어 침적 처리 실험에 사용하였고, NP-50, 100 및 $150 \mu\text{g/g}$ 농도로 경구투여 및 복강 주사 실험에 사용하였다.

수정란 및 부화자어의 NP 침적 처리

넙치 수정란의 발생 그리고 부화자어의 발달과 생존율에 미치는 NP 물질의 영향 급성 독성실험으로 수정란, 부화자어의 각 발생 단계별로 조사하였다. NP의 농도는 각각 50, 100, 150 및 $200 \mu\text{g/l}$ 로 침적 처리하였다. 대조구 II는 아세톤 $200 \mu\text{g/l}$ 로 침적 처리하였다. 수정란의 침적 처리는 상실기 단계의 수정란을 각각 50개씩 실험구 250 ml 유리 비이커에 수용하

Table 1. Experimental conditions of fertilized eggs and hatched larvae of the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*

Condition	Fertilized eggs	Hatched larvae
Water temperature	20 ± 0.5 °C	20 ± 0.5 °C
Age at NP exposure	0 days	3 days
NP concentrations(µg/ℓ)	50, 100, 150, 200	50, 100, 150, 200
Number of replication	3	3
DO	4.32 mg/ℓ	4.32 mg/ℓ
pH	8.19	8.19
Salinity	32‰	32‰
Response variable	HR, HT, SR	SR, LT ₅₀

HR : Hatching rate, HT : Hatching time, SR: Survival rate

LT₅₀ : lethal time 50%.

였다. 부화 시간은 수정란이 50% 부화했을 때로 하였고, 부화율, 생존율을 각각 조사하였다.

부화자어의 발달과 생존율에 미치는 영향은 각 NP 농도별 실험구 250 ml에 부화자어를 20미씩 넣은 후, 부화자어의 LT₅₀(반수치사시간, lethal time 50%), 생존율을 구하여 평가하였다. 부화자어에는 먹이를 공급하지 않았으며, 자어의 생존율은 실험기간동안 폐사 개체를 계수하여 구하고, 이로부터 LT₅₀을 산정하였다.

NP 경구투여

이 실험에 사용한 넙치 치어는 제주도 북제주군 구좌읍 종달리 소재 동림수산에서 부화 후 45일령 치어(전장 3 ± 0.5 cm)를 제주대학교 해양연구소 실험 사육동 수조(ϕ 60 cm \times 30 cm)로 옮겨, 각 수조 당 80미씩 나누어 수용하였다. NP의 경구투여 농도는 1 g을 methanol 100 ml에 용해시킨 후, 각 처리구별로 치어의 어체중 당 50, 100 및 150 μ g/g 농도가 되도록, 처리구 당 10 g의 사료에 골고루 혼합시켰다. NP를 혼합시킨 사료의 투여는 부화 후 55일부터 64일까지 10일 간 하루에 한 번 아침에 공급하였다. 대조구 I은 시판용 EP사료, 대조구 II는 methanol을 시판용 EP사료에 처리하여 공급하였다. 사육수는 자연해수를 사용하였고, 사육 중에 용존산소를 충분히 유지하기 위해 통기시켰으며, 사육기간 중 수온은 16.7~19.3℃의 범위였다. 먹이는 시판용 EP사료(日淸飼料, 日本)를 하루 5회 공급하였다.

성분화 과정을 조직학적으로 검경하기 위해 실험어는 부화 후 85일, 159일에 채포하여 전장과 체중을 측정한 후, Bouin's solution에 고정하였다. 고정된 시료는 자동조직 파라핀 유도기(Richertjung, Histokinett 2000)를 이용하여 paraffin 유도 과정을 거쳐 5 μ m로 절편을 만든 후, 탈파라핀을 유도하여 Hansen's Haematoxylin과 0.5% Eosin에 비교염색 하였다 염색한 시료는 생물현미경(Carl Zeiss, HBO 50)을 이용하여 검경하였다.

NP 복강 주사

복강 주사에 의한 영향은 NP 1 g를 olive oil (SIGMA사) 100 ml에 혼합한 후, NP-50, 100 및 150 $\mu\text{g/g}$ BW의 농도로 실험하였다. 복강 주사는 일주일에 2회로 나누어 부화 후 167일령의 넙치를 이용하여 행하였다. 생식소 조사를 하기 위해 주사 후 30일이 경과한 후 해부하여 Bouin's solution에 고정하였다. 고정된 시료는 자동조직 파라핀 유도기(Richertjung, Histokinett 2000)를 이용하여 paraffin 유도 과정을 거쳐 5 μm 로 절편을 만든 후, 탈파라핀을 유도하여 Hansen's Haematoxylin과 0.5% Eosin에 비교 염색을 하였다. 염색한 시료는 생물현미경(Carl Zeiss, HBO 50)을 이용하여 검경하였다.

통계분석

각 실험 결과에서 실험 자료는 3회 반복 자료의 평균으로 구하였으며, 이를 Excel (Microsoft Inc.)을 이용하여 정리를 하였다. 처리구간 자료 검정은 Statistical Analysis (SAS Institute North Caroline, USA)를 이용하여 Duncan's multiple range test로 평균간의 유의성을 검정하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 수정란 및 부화자어의 NP 침적 처리

상실기 단계의 넙치 수정란에 NP를 침적 처리한 결과 부화율은 대조구 I 90.7 ± 7.02 , 대조구 II $90.0 \pm 5.29\%$, NP-50, 100, 150 및 $200 \mu\text{g}/\ell$ 농도 처리구에서는 78.7 ± 4.16 , 46.0 ± 9.17 , 48.0 ± 3.46 및 $33.3 \pm 11.02\%$ 로 처리 농도가 높을수록 부화율은 상대적으로 낮았다. NP-50 $\mu\text{g}/\ell$ 처리구를 제외하고는 처리구의 부화율은 50%에도 달하지 못하였다(Table 2, Fig. 1).

NP 처리하지 않은 대조구 I 과 대조구 II의 부화 후 65시간의 생존율은 각각 73.3 ± 13.61 , $46.0 \pm 5.29\%$ 이었고, NP-50, 100, 150 및 $200 \mu\text{g}/\ell$ 농도 처리구의 생존율은 0%였다(Fig. 2). 대조구 I 과 대조구 II는 실험 종료 후 부화 후 9일까지 생존하였다. 부화 시간은 대조구 I 과 대조구 II가 각각 32.3 ± 1.53 , 33.0 ± 2.65 시간이었으며, NP-50, 100, 150 및 $200 \mu\text{g}/\ell$ 농도 처리구에서는 각각 36.1 ± 1.85 , 40.0 ± 2.05 , 39.7 ± 2.52 및 41.7 ± 1.53 시간으로 NP 농도가 높을수록 부화시간이 지연되었다(Fig. 3). 대조구 I 에서 부화 후 21시간에 배체 형성기를 거쳐 부화 후 32시간에 50%가 부화한 반면에, NP-200 $\mu\text{g}/\ell$ 처리구에서는 부화 후 32시간에 배체 형성기에 머물러 발생 또한 지연되었다(Fig. 4). NP 침적 처리한 부화 후 40시간 실험구에서는 척추가 휘는 이상발생이 일어나 정상적인 개체로 부화하지 못하였다(Fig. 5). 그리고 부화 후 65시간이 경과 된 개체들은 NP의 침적 처리에 의해 폐사하였고, 이러한 개체들은 척추가 휘거나, 꼬리지느러미의 발달이 저해되어 있는 것으로 나타났다(Fig. 6)

넙치 부화자어시기에 NP를 침적 처리한 후, 처리 26시간에 생존율을 조사한 결과, 대조구 I 은 $88.3 \pm 10.41\%$, 대조구 II는 $83.3 \pm 7.64\%$ 이었고, NP-50, 100, 150 및 $200 \mu\text{g}/\ell$ 농도 처리구에서는 각각 61.7 ± 5.77 , $21.7 \pm$

Table 2. Hatching rates and hatching time of fertilized eggs, survival rates and LT₅₀ of hatched larvae of the olive flounder, *Paralichthys olivaceus* treated to NP.

Experimental group	Fertilized eggs		Hatched larvae	
	HR (%)	HT (hr)	SR (%)	LT ₅₀ (hr)
Control I	90.7±7.02	32.3±1.53	88.3±10.41	
Control II	90.0±5.29	33.0±2.65	83.3±7.64	
NP-50 µg/ℓ	78.7±4.16	36.1±1.85	61.7±5.77	33.5±3.12
NP-100 µg/ℓ	46.0±9.17	40.0±2.05	21.7±16.07	15.7±5.75
NP-150 µg/ℓ	48.0±3.46	39.7±2.52	11.7±16.07	11.5±7.86
NP-200 µg/ℓ	33.3±11.02	41.7±1.53	0	9.5±7.86

HR : Hatching rate, HT : Hatching time,

SR : Survival rate, LT₅₀ : Lethal time 50%

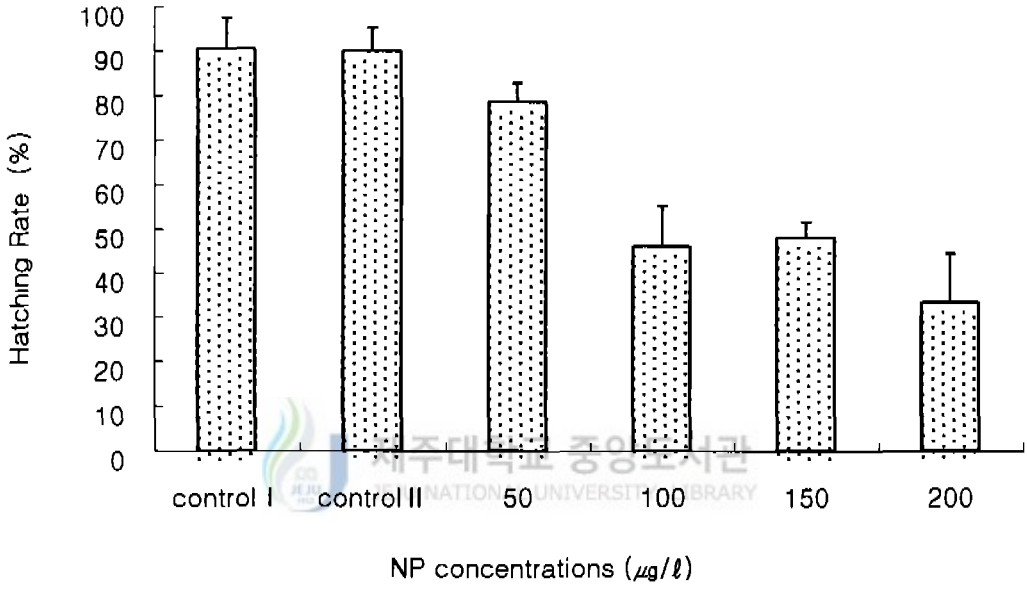


Fig. 1. Hatching rate of the fertilized eggs of the olive flounder, *Paralichthys olivaceus* treated to NP.

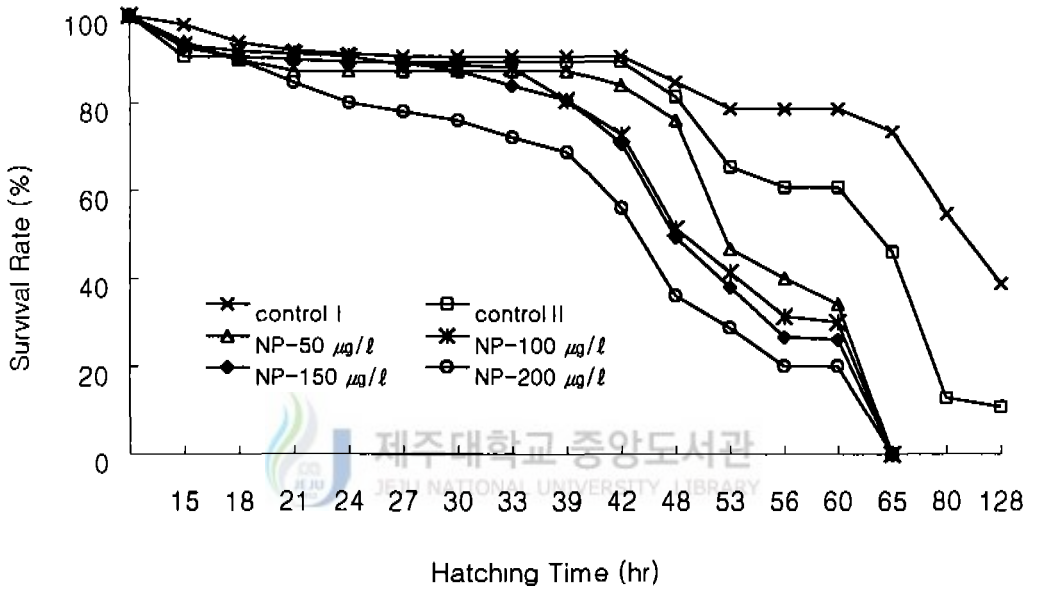


Fig. 2. Survival rate of the fertilized eggs of the olive flounder, *Paralichthys olivaceus* treated to NP.

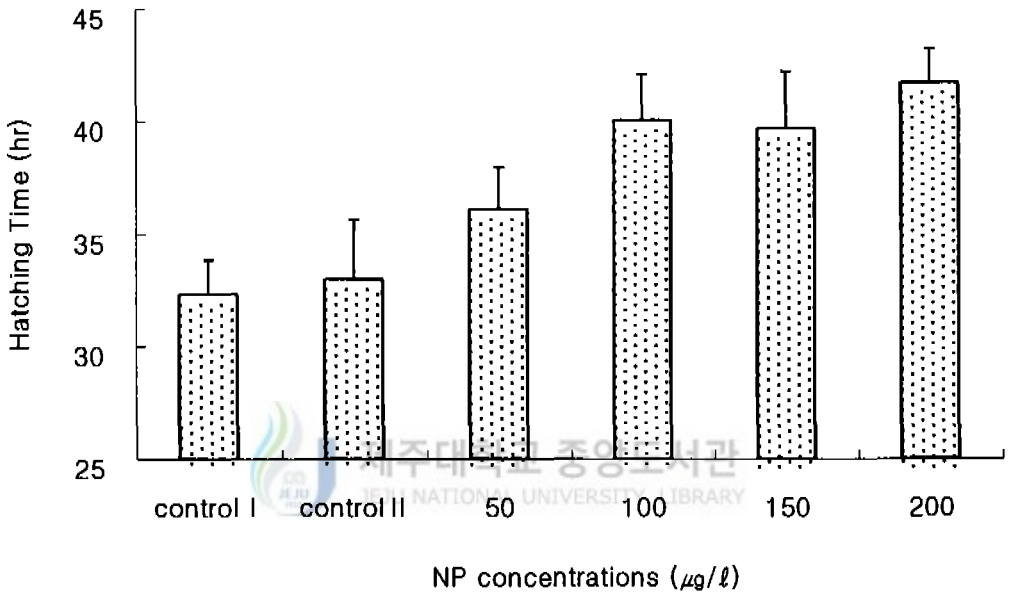


Fig. 3. Hatching time of the fertilized eggs of the olive flounder, *Paralichthys olivaceus* treated to NP.

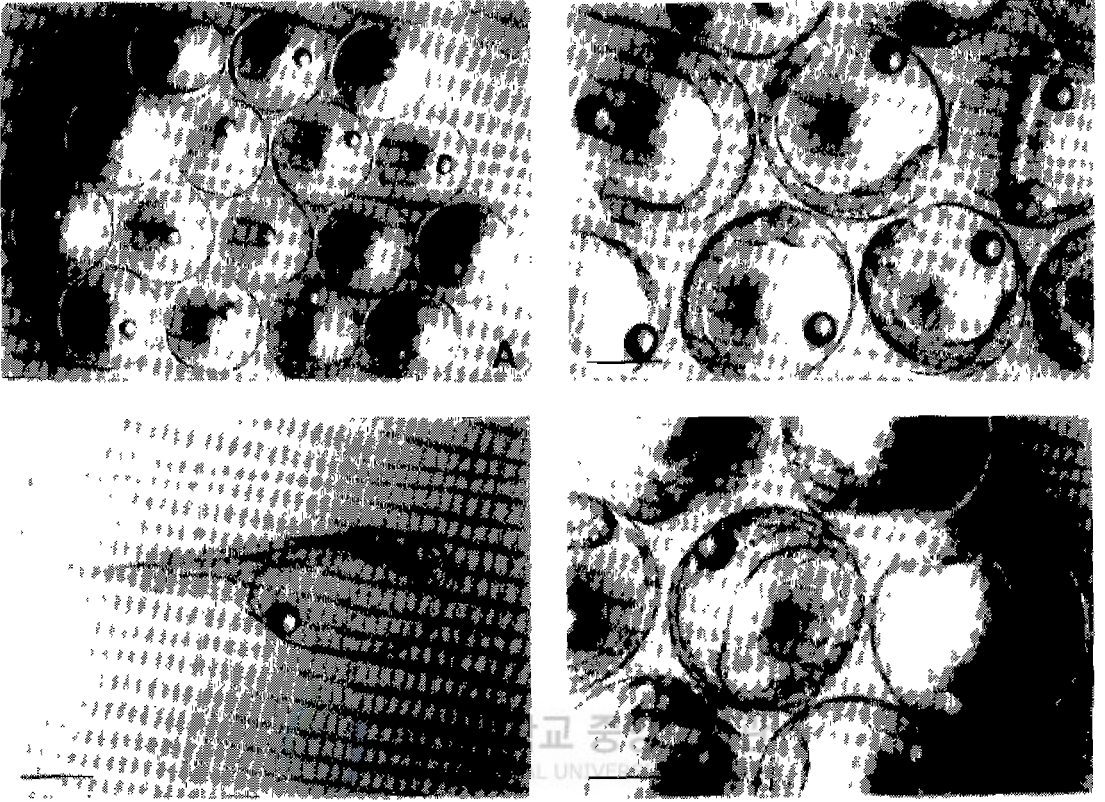


Fig 4 Eggs development of the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*.
(A) the morula stage. Scale bar=700 μm . (B) the embryo, 21 hr after fertilization at the control I. Scale bar=350 μm . (C) the larva, 32 hr after fertilization at the control I. Scale bar=430 μm . (D) the embryo, 32 hr after fertilization at the NP-200 $\mu\text{g}/\ell$ treatment group. Scale bar=350 μm .

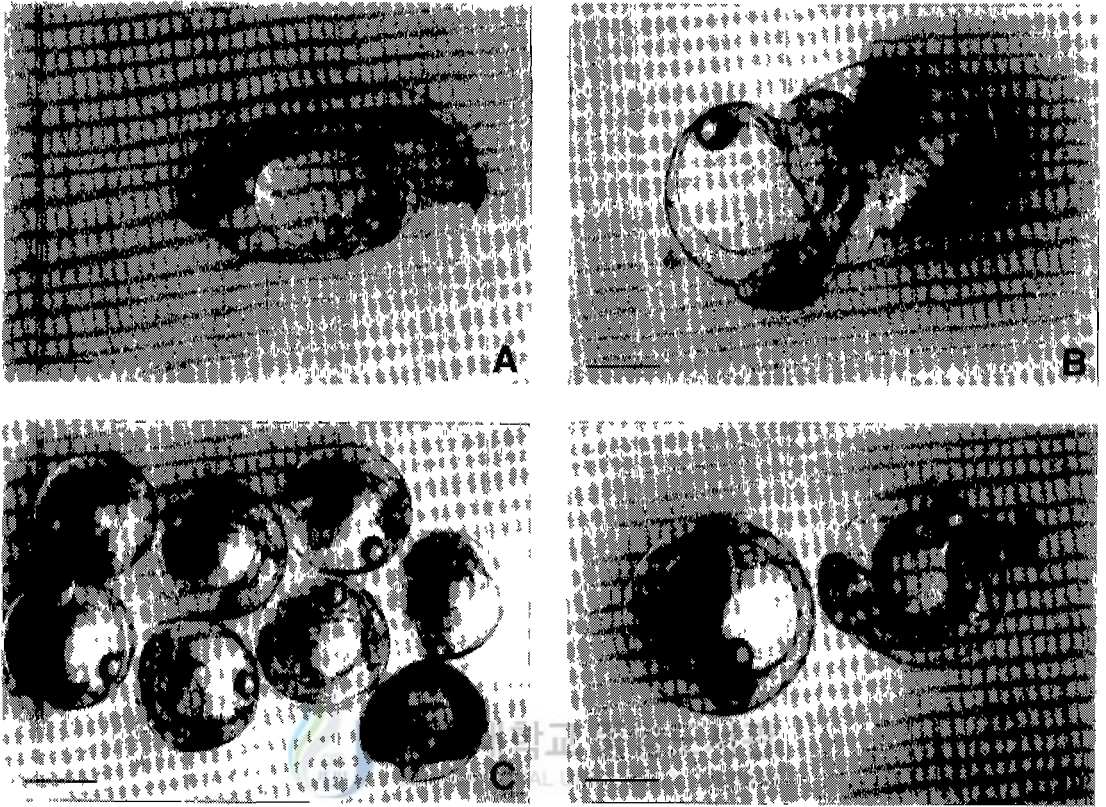


Fig 5 Eggs development of the olive flounder, *Paralichthys olivaceus* at the NP treatment groups, 40 hr after fertilization
(A) NP-50 $\mu\text{g}/\ell$ treatment group. Scale bar=430 μm . (B) NP-100 $\mu\text{g}/\ell$ treatment group. Scale bar=430 μm . (C) NP-150 $\mu\text{g}/\ell$ treatment group. Scale bar=540 μm . (D) NP-200 $\mu\text{g}/\ell$ treatment group. Scale bar=430 μm .

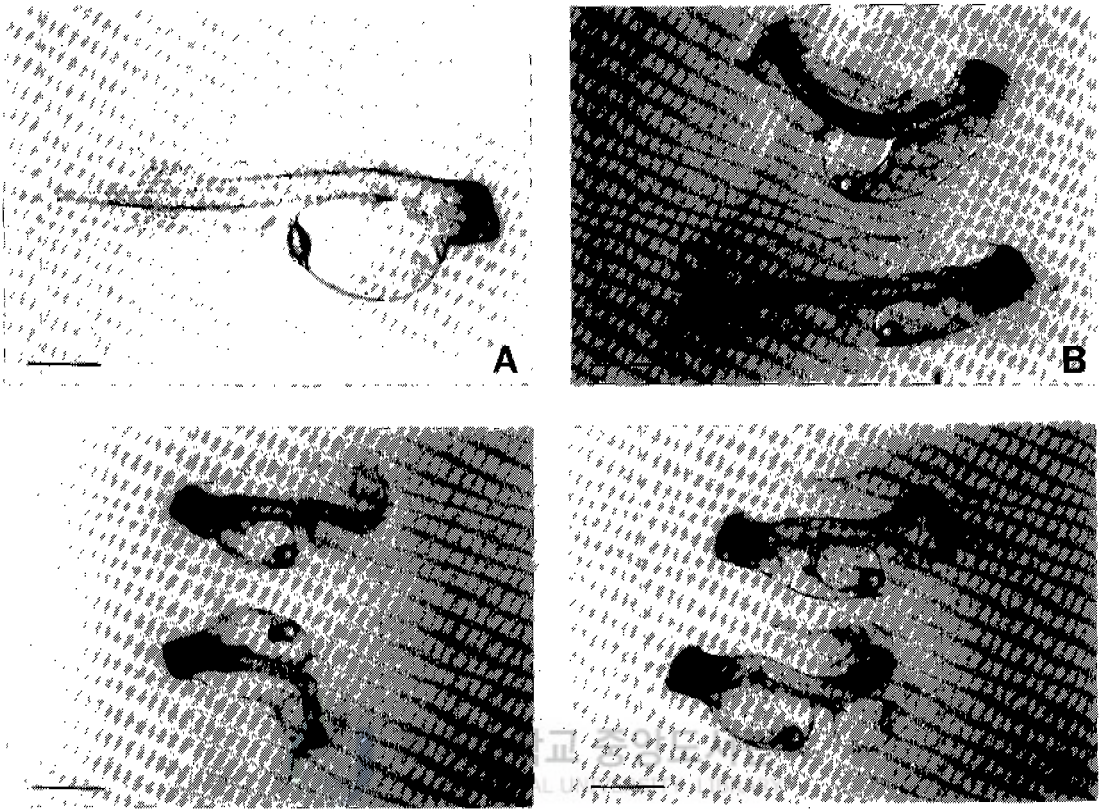


Fig. 6. Larvae of the olive flounder, *Paralichthys olivaceus* at the control and NP treatment groups at 65 hr after fertilization. (A) control I. Scale bar=430 μm . (B) NP-50 $\mu\text{g}/\ell$ treatment group. Scale bar=540 μm . (C) NP-150 $\mu\text{g}/\ell$ treatment group. Scale bar=540 μm . (D) NP-200 $\mu\text{g}/\ell$ treatment group. Scale bar=540 μm .

16.07, 11.7 ± 16.07 , 0%이었다. 대조구 I 과 대조구 II는 부화 후 9일에 전 개체가 폐사하였다(Table 2, Fig. 7). NP-50 $\mu\text{g}/\ell$ 는 처리 62시간, NP-100 $\mu\text{g}/\ell$ 는 처리 53시간, NP-150 $\mu\text{g}/\ell$ 는 처리 46시간, NP-200 $\mu\text{g}/\ell$ 는 26시간만에 전 개체가 폐사하여 처리 농도가 높을수록 생존율이 낮았다(Fig. 7). 넙치 부화자어의 침적에 따른 생존율을 기반으로 실험구별 자어의 LT₅₀은 NP-50, 100, 150 및 200 $\mu\text{g}/\ell$ 농도 처리구에서 각각 33.5 ± 3.12 , 15.7 ± 5.75 , 11.5 ± 7.86 및 9.5 ± 7.86 시간이었다(Fig. 8).

2 NP 경구 투여에 의한 성장 및 생식소 발달

1) 성장

NP의 농도별 경구투여에 따른 처리구와 대조구간의 성장은 NP 처리구가 대조구보다 유의하게 성장이 빠르게 나타났지만($P < 0.05$), NP의 농도에 따른 처리구간의 성장의 유의차는 없었다($P > 0.05$, Table 3).

부화 후 85일 제 넙치 치어의 NP 처리구와 대조구간의 성장을 비교 분석한 결과, 전장과 체중에 있어서 NP 처리구간에는 유의차가 없으나($P > 0.05$), NP 처리구가 전장 10.03~10.18 cm, 체중 10.12~10.35 g로 대조구 I의 전장 9.64 cm, 체중 8.66 g에 비해 유의하게 성장이 빠르게 나타났다($P < 0.05$, Table 3).

부화 후 159일 제 넙치 치어의 NP 처리구와 대조구간의 성장을 비교 분석한 결과, 전장은 NP-50 $\mu\text{g}/\text{g}$ BW 처리구에서 22.38 cm, NP-150 $\mu\text{g}/\text{g}$ BW 처리구에서 22.25 cm, 대조구 II에서 21.38 cm, 대조구 I에서 20.66 cm로 NP 처리구와 대조구 I 간에는 유의차($P < 0.05$)가 있고, NP-50 $\mu\text{g}/\text{g}$ BW 처리구와 NP-150 $\mu\text{g}/\text{g}$ BW 처리구간에는 유의차가 없다($P > 0.05$). 체중은 NP 처리구간에는 유의차($P > 0.05$)가 없고, 처리구와 대조구간에는 대조구 I이

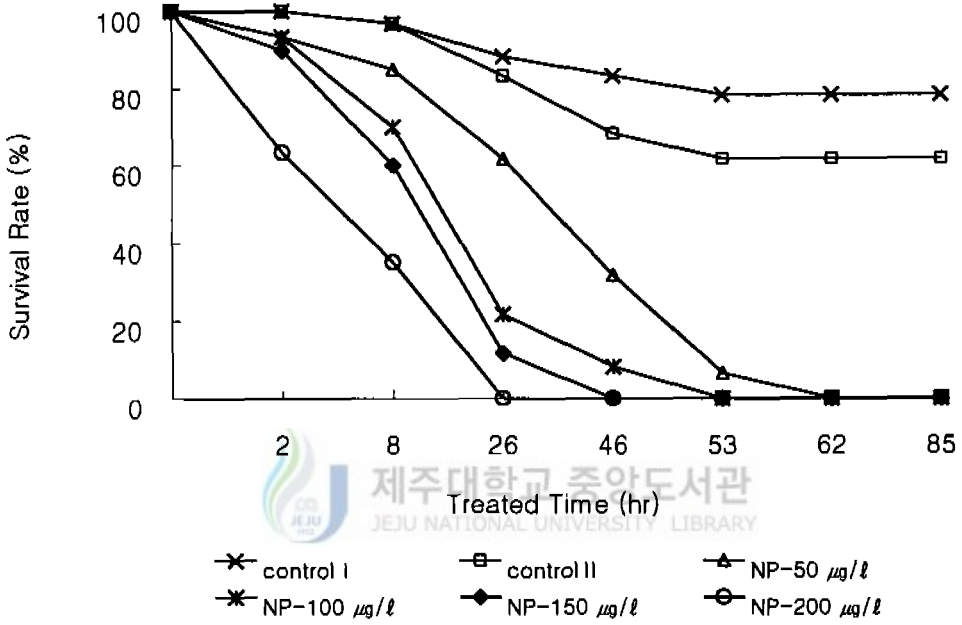


Fig. 7. Survival rate of the hatched larvae of the olive flounder, *Paralichthys olivaceus* treated to NP.

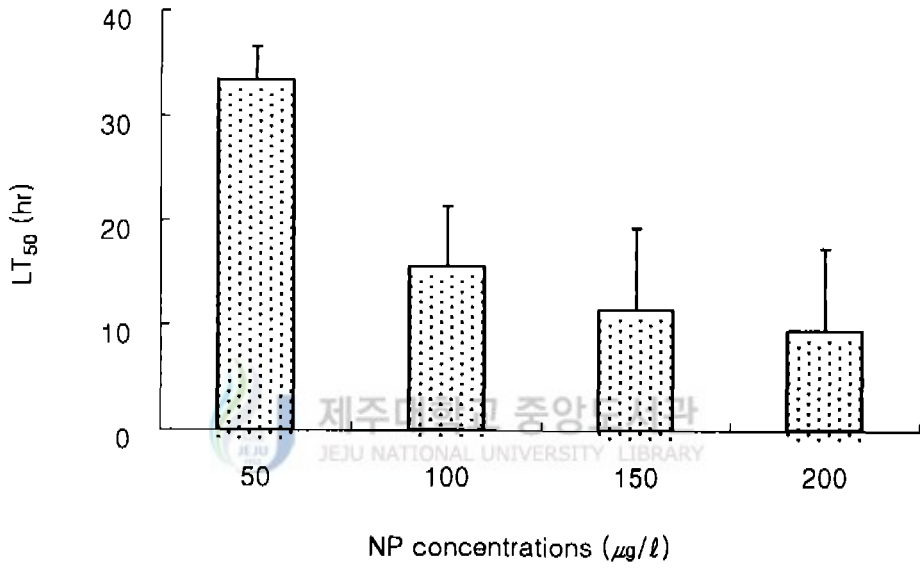


Fig. 8. LT₅₀ of the hatched larvae of the olive flounder, *Paralichthys olivaceus* treated to NP.

Table 3. Growth of fry 55, 85 and 159 days after hatching of the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*

Experimental group	55days		85 days		159 days	
	Total length(cm)	Body weight(g)	Total length(cm)	Body weight(g)	Total length(cm)	Body weight(g)
Control I	3.88(±0.1)	0.52(±0.02)	9.64(±0.37) ^b	8.66(±3.37) ^b	20.66(±1.43) ^c	88.75(±18.91) ^c
Control II	3.85(±0.1)	0.56(±0.02)	10.10(±0.55) ^a	9.94(±5.05) ^a	21.38(±1.23) ^b	102.50(±18.81) ^b
NP-50 µg/g BW	3.92(±0.1)	0.53(±0.02)	10.03(±0.30) ^a	10.12(±3.10) ^a	22.38(±1.23) ^a	124.03(±18.33) ^a
NP-100 µg/g BW	3.89(±0.1)	0.54(±0.02)	10.05(±0.27) ^a	10.35(±3.65) ^a	21.40(±1.25) ^b	114.91(±20.08) ^a
NP-150 µg/g BW	3.86(±0.1)	0.57(±0.02)	10.18(±0.32) ^a	10.25(±3.73) ^a	22.25(±1.03) ^a	127.30(±17.68) ^a

Means within a column superscripted with different letters are significantly different(P<0.05).

88.7 g로 NP 처리구 102.5~127.3 g 보다 낮은 결과를 보이는 유의차 ($P<0.05$)가 있었다(Table 3).

2) 생식소 발달

NP 경구 투여에 따른 대조구와 NP 처리구간의 생식소를 검정한 결과 생식소의 분화와 발달에는 차이가 없었다.

넙치의 원시생식소는 부화 후 40일을 전후하여 난소와 정소로 분화 발달하는데, 난소가 정소보다 다소 빠르게 초기 분화가 일어난다(이, 1990). 난소는 부화 후 45일 경부터 난소의 구조적 체제를 갖추고, 정소는 부화 후 80일 경에 비로소 생식세포의 분열증식상이 나타나기 시작하는 것으로 알려져 있다.

NP 경구 투여 시기 전인 부화 후 55일령(전장 3 cm)의 생식소는 선단이 비후되면서 실질부는 얇은 피막에 의해 싸였다. 생식소는 중신 후단의 복막상피로부터 방광의 후단까지 선상구조를 나타내며 복측 후방 전체가 약간 비후되었다(Fig. 9-A, B).

부화 후 85일령(전장 8~10 cm)의 생식소는 대조구와 NP 처리구에 있어서 조직발달의 차이가 없이, 난소는 난소강이 형성되어 난소의 구조적 체제를 갖추고, 기부쪽에는 어린 난원세포들이 드문드문 섬유성 기질 속에 분포되어 나타났다. 그리고 난소강쪽의 수질층이 부분적으로 함입하여 주름이 형성되어 난소박판 형성을 이루고 있었다. 피질층에는 체세포성 간질세포들과 혈관이 분포하였다(Fig. 10-A, C, E). 정소의 정원세포들은 피질층에서 간질세포에 둘러 싸여 분포하였다(Fig. 10-B, D, F).

부화 후 159일령(전장 20~22 cm)의 생식소도 대조구와 NP 처리구에 있어서 조직발달의 차이가 없이, 난소는 소낭상피상에 분열증식하는 난원세포와 핵 내에 인이 2~3개씩 존재하는 초기성장중인 난모세포들이 대부분 차지하고 있었다(Fig. 11-A, C, E). 정소는 후단 부분이 비후 신장된 삼각형의 엽상구조로 피질부에는 많은 정소 소엽이 형성되어 있고, 분열 증식중인 정원세포군, 성장중인 정모세포군들이 존재하였다. 이들 주위에는 타원형의 간질세포와 결체성 섬유조직들이 발달하였다(Fig. 11-B, D, F).

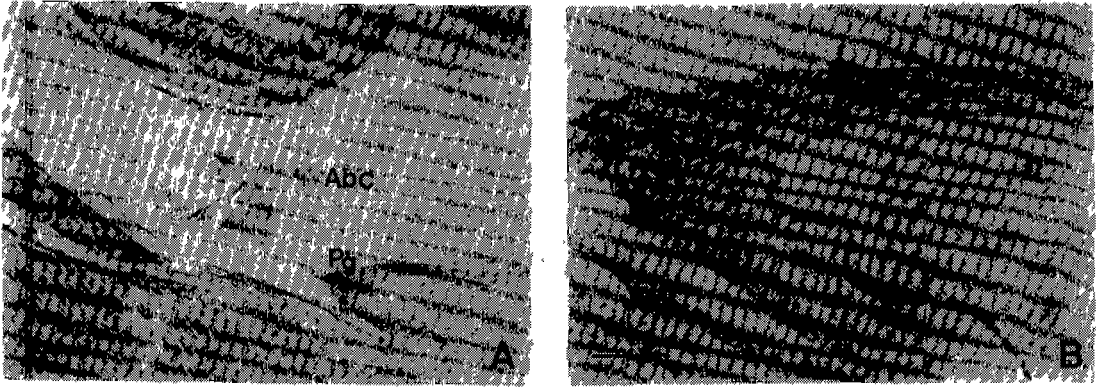
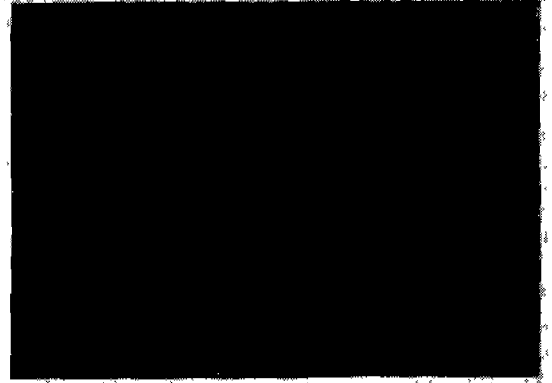
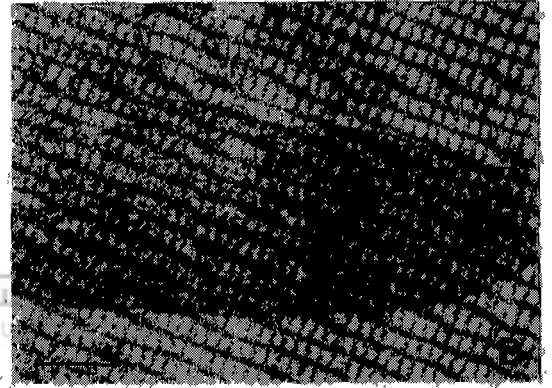
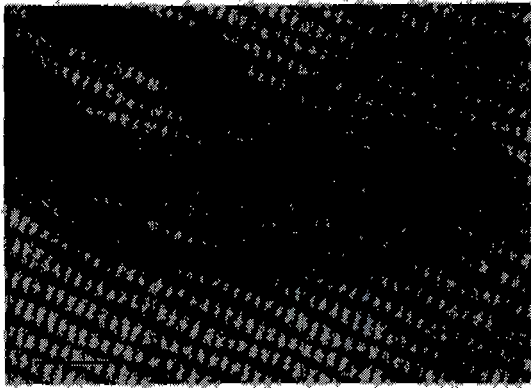
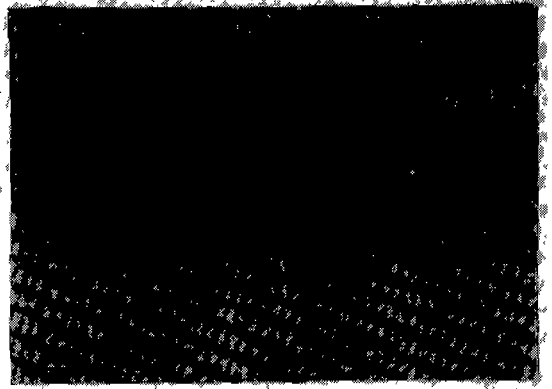
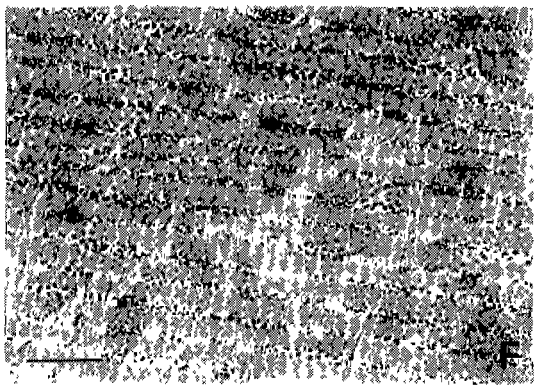
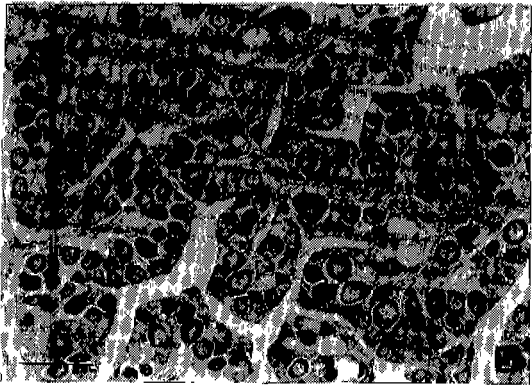
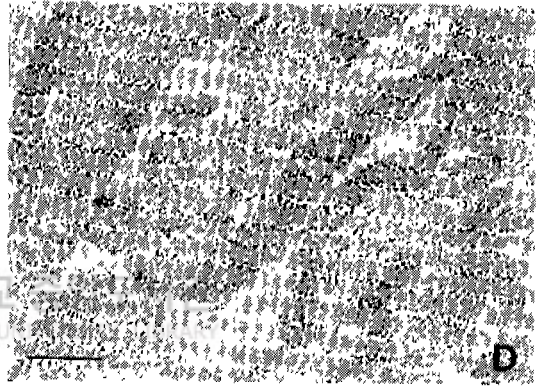
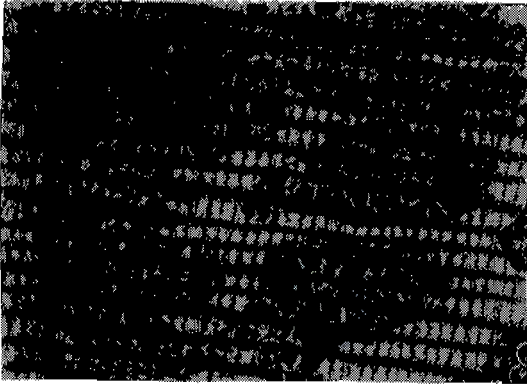
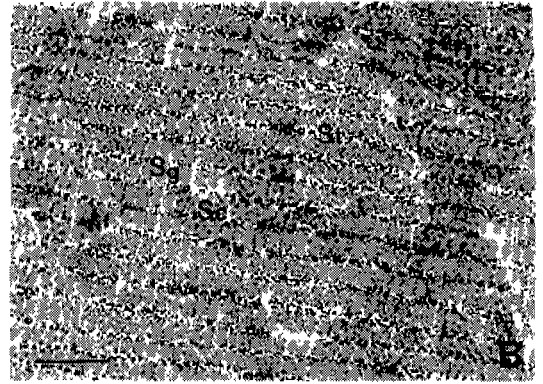
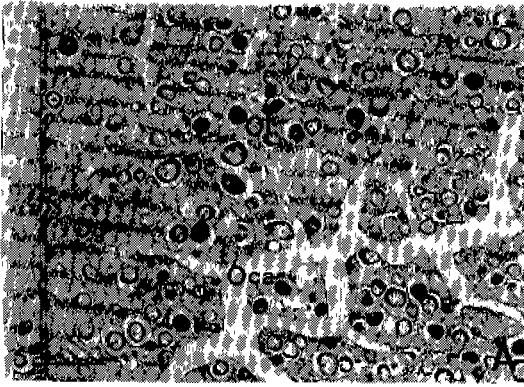


Fig. 9. Photomicrographs of the 55 days old primitive gonad of the olive flounder, *Paralichthys olivaceus* of sexually undifferentiated stage. (A) Primitive gonad (Pg) was observed in retroperitonium. Scale bar=50 μm . (B) This micrograph magnified the gonial cell (Gc) of the primitive gonad (Pg). Scale bar=25 μm . Abc: Abdominal cavity, Gl: Germinal lamella, K: Kidney, MI: Muscle layer, S: Stomach.

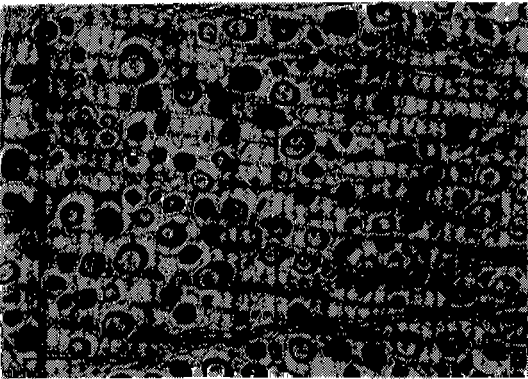
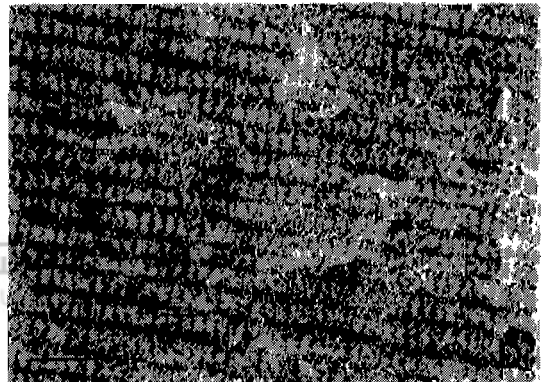
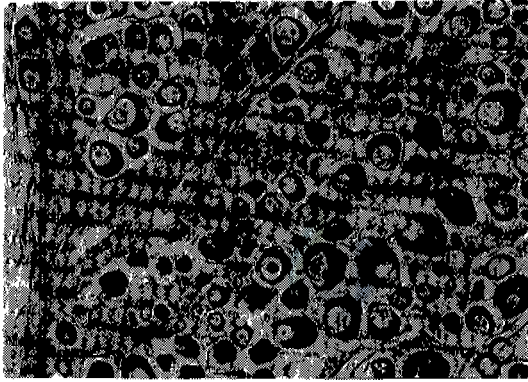
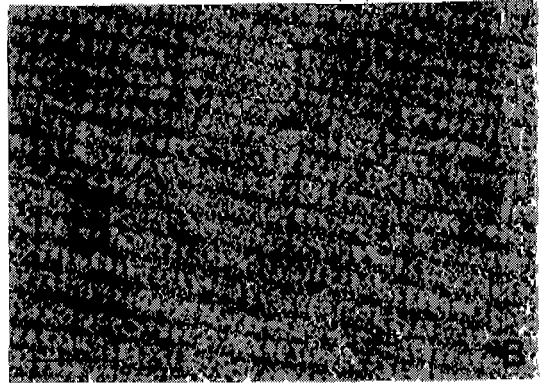
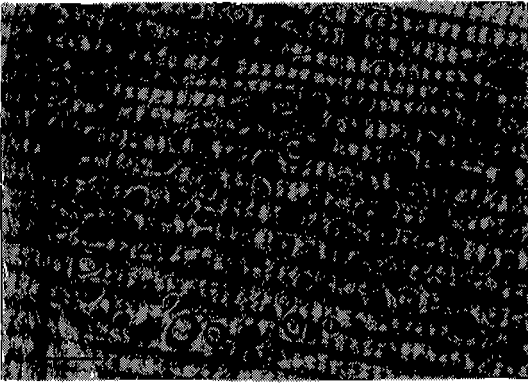




3. NP 복강 주사에 의한 생식소 발달

부화 후 197일령의 생식소는 비뇨생식공 후방의 복강에 위치하며, 난소는 발달함에 따라 복강 후방의 근육층으로 신장한 반면에, 정소는 복강 내에서만 삼각형의 형태로 비대해지면서 발달하였다. 부화 후 197일령(전장 24~26 cm)의 난소는 소낭상피에서 난원세포와 난모세포들이 발달하였다 (Fig. 12-A, C, E). 정소는 소엽구조를 이루고 있으며, 소엽상피에는 활발하게 분열증식중인 정원세포를 비롯하여, 정모세포가 분포하고, 소엽내강에는 정세포들로 가득 차 있는 것이 관찰되었다. 생식소의 발달은 대조구와 NP-50, 100 및 150 $\mu\text{g/g}$ BW 농도 처리구에 따른 생식소 발달의 차이는 광학현미경 상에서 찾아 볼 수 없었다(Fig. 12-B, D, F).





IV. 고 찰

최근, 잔류성이 강한 화학물질의 과다 사용으로 생명체의 호르몬 작용을 교란시켜 정자 수를 감소시키거나, 기형을 유발하고 성의 변이를 가져올 수 있다라는 문제가 제기되고 있다. 내분비계 호르몬은 혈류를 따라 돌면서 세포들의 호르몬 수용체와 결합하여 성장, 생식, 행동, 기타 세포반응 및 신체기능을 유도한다. 그러나 내분비교란물질들은 이런 호르몬 분비의 정상적 기능을 방해하여 모방작용, 차단작용, 촉발작용, 간접영향 작용 등으로 생물의 성장, 생식 및 행동을 비롯한 다양한 생리 작용에 영향을 미친다.

이 연구에서는 분화형 자용이체인 넵치에 있어 NP-50, 100, 150 및 200 $\mu\text{g}/\ell$ 의 농도로 상실기 단계의 수정란에 침적시킨 결과 NP-50 $\mu\text{g}/\ell$ 처리구를 제외하고는 부화율이 50%에도 미치지 못하였고, 부화가 이루어지더라도 정상적인 발달을 하지 못하였다. NP-50, 100, 150 및 200 $\mu\text{g}/\ell$ 농도 처리구에서 78.7, 46.0, 48.0 및 33.3%로 처리 농도가 높을수록 부화율이 상대적으로 낮은 반면에, 대조구 I 90.7%, 대조구 II 90.0%로 부화율이 높았다. 부화 65시간에는 전 개체가 폐사하였다. 이 때 대조구 I, II는 각각 73.3, 46.0%의 생존율을 보였다. 부화 시간은 대조구 I 와 대조구 II 각각 32.3, 33.0시간이었고, NP-50, 100, 150 및 200 $\mu\text{g}/\ell$ 농도 처리구에서는 각각 36.1, 40.0, 39.7 및 41.7시간으로 NP 농도가 높을수록 부화 시간이 지연되었다. 대조구 I 에서 부화 후 21시간에 배체 형성기를 거쳐 부화 후 32시간에 50%가 부화한 반면에, NP-200 $\mu\text{g}/\ell$ 처리구에서는 부화 후 32시간에 배체 형성기에 머물러 발생 또한 지연되었다. NP 침적 처리한 부화 후 40시간 실험구에서는 척추가 휘는 이상발생이 일어나 정상적인 개체로 부화하지 못하였다. 부화한 개체의 대부분은 배체 형성기에 이상발생이 높게 나타나 폐사하는 결과를 보였다.

NP-50, 100, 150 및 200 $\mu\text{g}/\ell$ 농도로 부화자어에 침적 처리한 후, 처리

26시간 생존율을 조사한 결과, 대조구 I 은 88.3%, 대조구 II는 83.3%, NP-50, 100, 150 및 200 $\mu\text{g}/\ell$ 농도 처리구에서는 61.7, 21.7, 11.7 및 0%였다. 대조구 I 와 대조구 II는 부화 후 9일에 전 개체가 폐사하였다. NP-50 $\mu\text{g}/\ell$ 처리구는 처리 62시간에, NP-100 $\mu\text{g}/\ell$ 처리구는 처리 53시간, NP-150 $\mu\text{g}/\ell$ 처리구는 처리 46시간, NP-200 $\mu\text{g}/\ell$ 처리구는 처리 26시간 만에 전 개체가 폐사하여 처리 농도가 높을수록 생존율이 낮았다. 넙치 부화자어의 침적 일수에 따른 생존율을 기반으로 실험구별 자어의 LT_{50} 은 NP-50, 100, 150 및 200 $\mu\text{g}/\ell$ 농도 처리구에서 각각 33.5, 15.7, 11.5 및 9.5시간이었다. NP 처리구에서 부화자어는 꼬리가 흰 심한 골격이상을 보였고, 움직임이 없고, 눈이 불투명하였다. 이상의 결과에서와 같이, NP는 넙치 수정란의 부화율, 생존율, 부화자어의 생존율과 같은 초기발생 단계에 영향을 미치는 환경독성작용을 가지는 것으로 추정된다.

NP를 혼합한 사료를 경구 투여한 부화 후 85일령, 159일령 넙치 치어에서 NP 처리구와 대조구간의 성장, 생식소 발달에 관하여 뚜렷한 차이는 없었다. Gimeno *et al.*(1997)은 0.1 mg/ℓ 의 4-tert-pentylphenol (TPP)에 30일 동안 노출된 전 수컷 잉어(YY) 정소조직에서 testis-ova 형성으로 정소의 불완전한 발달을 보고하였다. 배-자어기(부화 후 3일)에 3일 동안 TTP의 노출은 성분화 과정에 영향을 미치지 않았고, 원시생식세포의 증식도 이루어지지 않았다. 성분화 전(부화 후 24~51일)과 성분화가 이루어지는 시기부터 장기간 노출되기 시작하면, 정소에서 불완전하게 난관이 발달하고, 한 번 형성된 이상 발현은 깨끗한 물에 되돌아간 후에도 지속되었다. 이 연구에서는 NP의 단기 노출에 있어 성분화 변화와 생식소 발달에 영향을 미치지 않은 것으로 나타났다. 이 연구에서 50, 100 및 150 $\mu\text{g}/\text{g}$ BW 정도의 NP는 넙치의 초기 성분화에 영향을 주기보다는 수정란의 발생과 부화 초기 발달 단계에 영향을 끼치므로, 이것은 NP의 처리 기간과 처리 농도에 따른 결과의 차이로 여겨지므로 보다 세부적인 연구가 필요하다.

Christiansen *et al.*(1998)은 NP를 복강주사 한 eelpout, *Zoarces viviparus*에서 GSI의 감소, 혈장 vitellogenin 농도 증가, sertoli 세포 기능

저해 등이 일어나는 것을 보고하여 NP가 생식소 발달에 영향을 끼친다는 것을 제시하고 있다.

성분화가 이루어지고 난 후 NP를 복강 주사한 넙치의 생식소 발달은 대조구와 NP-50, 100 및 150 $\mu\text{g/g}$ BW 농도 처리구에서 발달 차이가 없었다. 그러나 NP가 함유된 오물 배출수의 유입으로 강에 서식하는 유럽산 잉어과 어류 roach에 있어서의 자웅동체의 출현이 보고되고 있어(Jobling *et al.*, 1998), 이것은 성어에 대한 직접적인 영향보다는 생활사 중 민감기에 받은 영향이 더 큰 것으로 여겨진다. 그러므로 NP가 넙치에 영향을 미치는 민감기와 활성 기작을 좀 더 자세하게 조사하기 위해서 전 생활사에 걸친 노출 실험, 처리 농도, 처리 기간, 처리 방법 등 이에 관한 연구가 앞으로 지속적으로 이루어져야 한다고 본다.



V. 요약

내분비교란물질로 알려진 nonylphenol(NP)이 해산어류인 넙치에 있어 수정란의 초기발생, 부화자어의 발달, 생존율, LT₅₀, 성적 미분화 시기와 성분화 시기의 생식소 발달에 미치는 영향을 번식생물학적으로 조사하였다.

상실기 단계의 넙치 수정란에 NP를 침적 처리한 결과 부화율은 다음과 같다. NP-50, 100, 150 및 200 $\mu\text{g}/\ell$ 농도 처리구에서 78.7, 46.0, 48.0 및 33.3%로 처리 농도가 높을수록 부화율이 상대적으로 낮은 반면에, 대조구 I 90.7%, 대조구 II 90.0%로 부화율이 높았다. 대조구 I 과 대조구 II의 부화 후 65시간 생존율은 73.3, 46.0%이었고, NP-50, 100, 150 및 200 $\mu\text{g}/\ell$ 농도 처리구의 생존율은 0%이었다. 부화 시간은 대조구와 대조구 II에서 32.3, 33.0시간이었으며, NP-50, 100, 150 및 200 $\mu\text{g}/\ell$ 농도 처리구에서는 각각 36.1, 40.0, 39.7 및 41.7시간으로 NP 농도가 높을수록 부화시간이 지연되었다.

부화 후 65시간이 경과 된 NP-50, 100, 150 및 200 $\mu\text{g}/\ell$ 농도 처리구의 부화자어들은 폐사하였고, 부화자어는 척추가 휘어지는 이상 발생이 일어나 정상적인 발달을 저해하였다.

넙치 부화자어시기에 NP를 침적 처리한 후, 처리 26시간에 생존율을 조사한 결과, 대조구 I 은 88.3%, 대조구 II는 83.3%이었고, NP-50, 100, 150 및 200 $\mu\text{g}/\ell$ 농도 처리구에서는 각각 61.7, 21.7, 11.7 및 0%이었다. 처리 농도가 높을수록 생존율이 낮았다. 부화자어의 LT₅₀은 NP-50, 100, 150 및 200 $\mu\text{g}/\ell$ 농도 처리구에서 각각 33.5, 15.7, 11.5 및 9.5시간이었다.

NP의 경구투여는 성적 미분화 시기인 부화 후 55일부터 64일까지 이루어졌다. 부화 후 85일령의 난소는 난소강이 형성되어 난소의 구조적 체제를 갖추었고, 기부쪽에는 어린 난원세포들이 드문드문 섬유성 기질 속에 분포하였다. 정소의 정원세포들은 피질층에서 간질세포에 둘러 싸여 분포하였다. 부화 후 159일령의 난소는 소낭상피상에 분열증식하는 난원세포와

핵 내에 인이 2-3개씩 존재하는 초기성장중인 난모세포들이 대부분 차지하고 있다. 정소의 후단 부분은 비후 신장된 삼각형의 엽상구조를 가진다. 피질부에는 많은 정소 소엽이 형성되며, 분열중식중인 정원세포, 성장중인 정모세포가 존재하였다. 생식소 조직 검경에서 대조구와 NP 처리구간의 생식소의 분화와 발달은 차이가 없었다.

성분화가 이루어지고 난 후의 부화 후 197일령의 난소는 소낭상피에서 난원세포와 난모세포들이 발달하였다. 정소는 소엽 구조를 이루고 있으며, 소엽 상피에는 활발하게 분열중식중인 정원세포, 정모세포 분포하고, 소엽 내강에는 정세포로 가득 차 있었다. 성분화 시기에 NP를 복강 주사한 넙치 대조구와 NP-50, 100 및 150 $\mu\text{g/g}$ BW 농도 처리구는 광학현미경을 이용한 조직 검경에서 생식소 발달의 차이는 없었다..

이 연구에서 NP-50, 100 및 150 $\mu\text{g/g}$ BW 처리 농도는 넙치의 초기 성분화에 영향을 주기보다는 수정란의 발생과 부화 초기 발달 단계에 영향을 주는 것으로 사려된다



VI. 참고문헌

- Ahel, M., W. Giger and M. Koch. 1994. Behavior of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment- I. Occurrence and transformation in sewage treatment. *Wat. Res.*, 28(5) : 1131-1142.
- Ahel, M., W. Giger and C. Schaffner. 1994. Behavior of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment- II. Occurrence and transformation in rivers. *Wat. Res.*, 28(5) : 1143-1152.
- Ahel, M., C. Schaffner and W. Giger. 1996. 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.*, 30(1) : 37-46.
- Cadbury, D. 1997. *The Feminization of Nature; Our Future at Risk*, Penguin Books Ltd., pp
- Christiansen, T., B. Korsgaard and A. Jespersen. 1998. Induction of Vitellogenin Synthesis by nonylphenol and 17β -Estradiol and Effects on the Testicular Structure in the Eelpout, *Zoarces viviparus*. *Mar. Environ. Res.*, 46(1-5) : 141-144.
- Colborn, T., D. Dumanoski and J. P. Myers. 1996. *Our Stolen Future*. The Spieler Agency. pp.
- Gimeno, S., H. Komen, P. W. M. Venderbosch and T. Bowmer. 1997. Disruption of sexual differentiation in genetic male common carp, *Cyprinus carpio* exposed to an alkylphenol during different life stage. *Environ. Sci. Technol.* 31(10) : 2884-2890.
- Gray, M. A. and C. D. Metcalf. 1997. Induction of testis-ova in Japanese

- medaka, *Oryzias latipes* exposed to *p*-nonylphenol. Environ. Toxicol. Chem. 16(5) : 1082-1086.
- Holdway, D. A. and D. G. Dixon. 1986. Impact of pulse exposure to methoxychlor on flagfish, *Jordanella floridae* over one reproductive cycle. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 43 : 1410-1415.
- Holdway, D. A. and D. G. Dixon. 1986. 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. 20(7) : 893-897.
- Jobling, S., D. Sheahan, J. A. Osborne, P. Matthiessen and J. P. Sumpter. 1996. Inhibition of testicular growth in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. Environ. Toxicol. Chem. 15(2) : 194-202.
- Jobling, S., M. Nolan, C. R. Tyler, G. Brighty and J. P. Sumpter. 1998. Widespread sexual disruption in wild fish. Environ. Sci. Technol. 32(17) : 2498-2506.
- Lee Y. D. and T. Y. Lee, 1990. Sex Differentiation and Development of the Gonad in the flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). Bull. Mar. Res. Inst. Cheju Nat. Univ., 14 : 61-86.
- Wester, P. W. and J. H. Canton. 1986. Histopathological study of medaka, *Oryzias latipes* after long-term β -hexachlorocyclohexane exposure. Aquat. Toxicol. 9 : 21-45.

감사의 글

지금의 순간이 있기까지 약하고 좌절하는 마음 앞에 용기와 힘을 주시고, 어리석게 욕심내는 때에는 무섭게 호령을 내려 삶의 거름이 되도록 적절히 배려해 주시고, 지도해 주신 이영돈 선생님의 손길에 고마움의 마음을 바칩니다. 바쁘신 와중에도 부족한 논문을 면밀히 다듬어 주신 최광식 교수님과 여인규 교수님께 감사 드립니다. 또한 많은 관심을 가지고 지도와 격려를 해 주신 이정재 교수님, 정상철 교수님, 노섭 교수님, 이기완 교수님, 송춘복 교수님, 이제희 교수님, 허문수 교수님께 깊은 감사 드립니다.

한 치 앞도 내다볼 수 없는 칠흑같은 동굴속에서 한가닥 희망의 밝은 빛을 갈망하며, 순간순간 마음 편히 쉬지 못하고 기쁨과 어려움을 함께 하며 여기까지 힘껏 달려온 발생학 실험실의 오성립, 나오수, 송영보, 김봉원, 이치훈, 박성보, 진숙자, 서종표, 김봉래, 최정권, 김한준, 김진완, 고희진, 박창범, 고범호, 한성민 등에게 고마운 마음을 전합니다. 외롭고 힘든 유학 생활 중에서도 항상 아낌없는 격려를 보내 온 김병호, 임봉수, 박용주 오빠에게 고마운 마음을 전합니다. 이 논문을 수행할 수 있도록 도움을 주신 동림수산 양유석 선배님께 고마운 마음을 전합니다. 그리고 곁에서 관심을 갖고 날카로운 조언을 아낌없이 해 주신 변수철 선배님을 비롯한 대학원 선·후배님들께 감사 드립니다.

태어날 때부터 온 동네를 떠들썩하게 하고, 매사 걱정만 끼쳐드린 막내 딸이 부모님의 정성스럽고 끝없는 보살핌에 사랑하는 마음을 이 자그마한 결실로 조금이나마 보답 드립니다. 그리고 어려운 여건에서도 이번에 졸업할 수 있도록 옆에서 아낌없이 돌봐주신 사랑하는 이모님, 성재오빠, 정훈 오빠와 나의 투정을 언제나 변함없이 받아준 선희언니에게 고마움과 미안함을 함께 전합니다.

이 연구는 제주대학교 해양연구소의 시설과 기자재를 이용하여 수행하였고, 연구수행에 큰 도움을 주신 해양연구소 직원 여러분들께 진심으로 사의를 표합니다.