

TBTCl이 구피(*Poecilia reticulata*)의 행동과 번식에 미치는 영향

윤명희* · 오지현

경성대학교 이과대학 생물학과

Received October 7, 2003 / Accepted December 1, 2003

Effects of TBTCl on the Behavior and Reproduction of the Guppy (*Poecilia reticulata*). Myung Hee Yoon* and Ji Hyun Oh. *Department of Biology, College of Sciences, Kyungsoong University, Busan 608-736, Korea* – Sexually matured guppies (*Poecilia reticulata*) were exposed to TBTCl (0.1, 0.32, 1, 3.2, 10, 25, 32, 50, 75 and 100 µg/l) for 144 hours to determine the bioaccumulation rate and effects on the reproduction and behavior. The ratio of TBT residues to ΣBTs (TBT:ΣBTs) was 67% or higher in all the guppies exposed to TBTCl, and the higher the level of TBTCl exposed, the higher the ratio of TBT:ΣBTs, suggesting that the higher the level of TBTCl exposed, the lower the metabolism rate of the fish. TBTCl exposure led to a poor reproductivity and an abnormal sexual behavior in the fish, i.e. a reduced number of the male sexual sigmoid display and of spermatophore in the efferent duct was observed in the fish exposed to 0.1 µg/l and higher levels of TBTCl, and a decreasing ratio of the testicular spermatophore cyst to the whole germ cell cysts was observed in the fish exposed to 0.32~10 µg/l of TBTCl. The reduced ratio of the spermatophore cyst seems to be an effect of the endocrine disruptor inhibiting spermiogenesis. In the fish exposed to 25 µg/l and higher levels of TBTCl, more serious effects, such as a rapid increase of mortality, the necrosis of most of the germ cells, great damages in Sertoli cells and epithelial cells of the efferent duct, a significant increase of abnormal swimming behavior, and a cessation of feeding were observed, which suggest the acute toxicity of TBTCl inhibiting not only the reproduction and behavior but also the survival of the fish itself.

Key words – guppy, TBTCl, reproduction, sexual behavior, bioaccumulation rate

유기주석화합물은 1925년 방충제로써 처음 사용된 이후 1936년 합성폴리머의 안정제로써 상품화되어 산업용 공정 및 농업적 목적으로 널리 사용되고 있는 물질이다. 유기주석화합물의 생산량은 1955년에는 연간 5,000 톤이었으나 1985년에 35,000 톤이었고 최근의 통계에 따르면 약 50,000 톤에 달하는 것으로 보고되어 있다[6]. 유기주석화합물 중, MBT (monobutyltin)와 DBT (dibutyltin)는 주로 PVC (polyvinyl chloride)의 안정제와 폴리우레탄폼, 실리콘 등 산업공정에서 촉매로써 널리 사용되어 왔으나, 독성이 강한 TBT (tributyltin)는 주로 선박이나 어망, 어구 등의 방오제로 사용되어 왔다. 이로 인한 해양환경의 오염으로 굴 종류에서 성장억제와 패각 기형을 유도하며[35], 홍합의 성장속도를 감소시키고 사망률을 높이는 것으로 알려져 있다[24,34]. 또한 복족류에서 imposex 등의 심각한 내분비계 장애현상이 보고되어, 지난 수년간은 복족류에서 imposex가 일어난 기작에 관한 연구가 활발히 진행되어 왔다[19-21].

한편 TBT는 고무의 보존제나 PVC 안정제 등 산업용 biocide로도 사용되고 있으며, 1985년의 통계자료에 따르면 세계의 유기주석화합물 중 75% 이상이 이러한 공업용 약제로서 이용되고 있고, 그 사용량도 증가하고 있다[6]. PVC나 실리콘 수지 중에 포함된 DBT 등의 2가 유기주석화합물이나

TBT 등의 3가 유기주석화합물은 환경으로 쉽게 용출됨이 밝혀져 있는데[28,30], 하수처리장으로부터 유기주석화합물이 검출되거나[6,10], 해수 중에서 옥틸주석화합물이 검출되는 사례 등은 육상에서 사용되는 유기주석화합물이 해양 및 담수환경으로 이행되고 있다는 것을 시사하고 있다[28]. 따라서 해양환경 뿐 아니라 육상 및 담수환경에서도 이들 유기주석화합물에 의한 피해가 클 것으로 생각되고 있다. 실지로 인간과 야생 너구리에서 TBT가 검출되고[15,30], 고농도의 TBT가 검출된 야생 등줄쥐에서 정소왜축현상이 보고된 바 있다[33]. 또한 해양 및 담수환경에 서식하는 어류에서도 TBT의 생체 내 축적현상이 보고되어 있어[7,9,29], TBT가 어류의 번식에도 크게 영향을 미칠 것으로 예상되지만, TBT를 투여한 가시고기[12]와 구피[11]에서 각각 생식소중량 감소와 정자 감소의 예가 알려져 있을 뿐이다.

본 연구에서는 TBTCl로 오염된 물에 담수산 구피를 노출시켜 부틸주석화합물의 구피 생체 내의 축적 정도를 알아보고, 구피의 행동이상과 정소조직의 관찰을 통하여 부틸주석화합물이 구피의 행동과 번식에 미치는 영향에 대해서 알아보고자 한다. 또한 내분비계 장애 기작에 대해서 고찰하고자 한다.

재료 및 방법

시약 및 실험 설계

본 연구에서 사용된 TBTCl (tri-*n*-butyltin chloride, [CH₃

*Corresponding author

Tel : +82-51-620-4642, Fax : +82-51-627-4115

E-mail : yhyun@star.ks.ac.kr

(CH₂)₃SnCl=325.51)의 순도는 95%로서 동경화성공업주식회사(Tokyo, Japan)로부터 구입하였다.

생후 6개월 정도의 성체 암컷 구피(전장 35.65±2.23 mm, N=170)와 성체 수컷 구피(전장 33.46±2.67 mm, N=170)를 수족관으로부터 구입하여 실험에 사용하였다. 어항 용품으로부터 내분비계 장애물질이 누출되는 것을 막기 위해서 유리로 된 원형 수조를 사용하였으며, 공기를 주입시키면서 7일간 순화시켰다. 48시간마다 수조 전체의 물을 갈아주었고, 수질을 매일 정기적으로 체크하였다(pH, 7.3~7.8; 경도, 2~4 dH; 산소농도, 7.2~7.8 mg/l; 암모니아농도, <0.1 mg/l; 수온, 22±2°C; 명암주기, 12 h light/12h dark). 먹이로서 시판용 배합사료(Tetramin-Tetraphil)를 구입하여 매일 3회씩 공급하였다.

TBTCI의 농도 설정을 위한 예비 실험으로서 구피 10마리(암컷 5마리, 수컷 5마리)씩 5그룹의 실험군(대조군, 0.1, 1, 10 및 100 µg/l)을 설정하여, 144시간 동안 각 농도의 TBTCI에 노출시켰다. 아세톤을 매개물로 하여(0.1 µg TBTCI/µl acetone) TBTCI을 10 l의 물에 희석하였는데, 이 농도의 아세톤은 독성을 나타내지 않는다고 알려져 있다[6]. 예비실험 결과 대조군, 0.1, 1 및 10 µg/l 실험군의 구피들은 모두 생존해 있었으나 100 µg/l 실험군의 구피들은 노출 24시간 이내에 모두 사망하였으므로, 본 실험에서는 각 실험군당 구피 20개체(암컷 10개체, 수컷 10개체)씩 대조군, 0.1, 0.32, 1, 3.2, 10, 25, 32, 50, 75 및 100 µg/l의 11개 실험군으로 재설정하였다.

TBTCI의 분석방법 및 생체 축적을 측정

TBTCI의 체내 잔류 농도를 측정하기 위해 TBTCI 노출 144시간 후, 조직학적 관찰을 위하여 간과 생식기를 적출한 다음, 나머지 사체를 -20°C에 냉동 보존하였다. 시료의 크기가 매우 작기 때문에 각 실험군의 전 개체를 균질화하여 분석에 사용하였다.

각 실험군마다 균질화한 시료 중 약 2 g(습중량)을 취하여 0.1% tropolone/acetone 70 ml와 2 N 염산 10 ml를 넣어 원심분리(3000 rpm, 15분)시킨 후, 상층액을 0.1% tropolone/benzene 100 ml로 추출했으며, 이 중 benzene층을 취하여 무수황산나트륨으로 수분을 제거하였다. 추출된 시료를 회전식 증발기(rotary evaporator)로 농축시킨 후 n-propyl magnesium bromide 10 ml를 첨가해 킬레이트화 하였다. 킬레이트화 된 시료를 florisol 컬럼으로 세정하여, GC-MS (Hewlett-Packard 6890)를 사용하여 분석 및 측정하였다. 또한 TBTCI의 생체 축적을 다음과 같이 계산하였다.

생체 축적률 = [구피 체내의 TBTCI의 농도] / [수조 물 속 TBTCI의 농도]

노출 144시간 동안 48시간마다 수조 전체의 물을 환수해주는 방법을 사용하였으므로 TBTCI의 손실이 없었을 것이라 가정하고, 각 실험군의 TBTCI 농도를 수조 물 속 TBTCI의 농도로서 그대로 사용하였다.

치사율

위의 11개 실험군의 구피에게 각 해당농도의 TBTCI을 144시간 동안 노출시키고, 시간의 경과에 따른 치사율을 구하였다. 또한 구피에 대한 TBTCI의 중간치사농도를 측정하기 위해 프로빗 해석을 사용하여 LC₅₀ 값을 구하였다.

유영행동 및 구애행동의 이상과 섭식행동의 변화 관찰

성체 구피의 유영행동과 섭식행동의 변화를 분석하기 위하여 각 실험군별로 TBTCI 노출 6, 12, 18, 24, 48, 72, 96, 120 및 144시간 경과시 각 10분간 비디오 카메라 리코더(CCD-VX1/NTSC, SONY)로 녹화하여 모니터링 하였다. 한편, 구애행동의 변화를 관찰하기 위해서는 TBTCI 노출 6시간 경과 후 10분 동안 모니터링 하였다.

유영행동 이상으로서 평형을 유지하지 못하거나, 정지 상태에서 가슴지느러미를 지속적으로 움직이거나, 빠른 속도로 수조 안을 배회하거나, 지속적으로 원형운동을 하는 등의 행동 이상이 관찰되어, 이러한 유영행동 이상을 보이는 개체수를 기록하였다.

또한 수컷 구피는 교미시기에 시그모이드상의 구애행동(sigmoid display)을 하는 것으로 알려져 있는데, 수컷은 암컷의 시야로 접근할 때, 몸을 "S"자 또는 "C"자로 구부려 수영하면서 암컷의 옆에서 몸을 진동시킨다. 이와같은 행동의 빈도를 구애행동을 하는 빈도로 간주하였다.

정소의 조직학적 관찰

위의 11개 실험군의 구피에게 각 해당농도의 TBTCI을 144시간 동안 노출시킨 후, 살아있는 개체에 대해서는 얼음으로 마취시켜 몸길이와 무게를 측정하고, 수컷으로부터 정소를 적출하여 체중에 대한 생식소의 무게비(생식소중량지수, GSI=testis weight/body weight×100)를 구하였다. 실험 도중에 죽은 개체들에 대해서는 가능한 한 치사 직후 동일한 처리를 하였다. 적출한 조직은 예리한 면도칼로 1×1×1 mm³의 크기로 세절한 후, 2% 파라포름알데히드와 25% 글루타르알데히드의 혼합 고정액에서 24시간 고정하였다. 1.3% 오스뮴산으로 1시간 30분간 후고정한 후, 알콜 탈수와 아세톤 치환을 거쳐 에폭시 수지(epon 812) 혼합액으로 포매·중합하였다. 포매된 조직을 초박절기(LKB2088)를 이용하여 0.5~1 µm의 두께로 자른 후 0.5% 툴루이딘 블루로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였고, 60-90 nm의 두께로 자른 후 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하여 투과전자현미경(TEM, JEOL-100S)으로 관찰하였다.

결 과

구피 체내의 TBTCI 농도 및 생체 축적률

각 실험군별로 실험에 이용된 모든 개체를 균질화하여 구피 체내에 잔류하는 유기주석화합물의 농도와 생체 축적률

을 측정 한 결과, 총 유기주석화합물(Σ BTs)의 농도는 10 $\mu\text{g/l}$ 실험군부터 급격히 상승했으며, 이 실험군을 전후로 하여 완만한 상승을 보였다(Fig. 1). 또한 TBTCI의 생체 축적율은 70.6 (100 $\mu\text{g/l}$ 실험군)~403 (0.1 $\mu\text{g/l}$ 실험군)으로 매우 높았고 일반적으로 노출 농도가 높아질수록 생체 축적율이 감소하는 경향을 보였다(Fig. 2). 한편 모든 실험군에서 TBTCI의 농도는 MBTCI이나 DBTCI에 비해서 높았다(Fig. 1). 즉 대조군에서는 구피 체내에 축적된 TBTCI의 농도가 MBTCI과 DBTCI의 농도보다 낮지만(MBTCI>DBTCI>TBTCI), 0.1 $\mu\text{g/l}$ 실험군에서 TBTCI의 농도가 더 높아져서 TBTCI>MBTCI>DBTCI의 순으로 농도가 높았고, 0.32 $\mu\text{g/l}$ 실험군부터 100 $\mu\text{g/l}$ 의 고농도에 이르는 실험군까지 TBTCI은 DBTCI과 MBTCI에 비해 매우 높은 농도로 검출되었다(TBTCI>DBTCI> MBTCI).

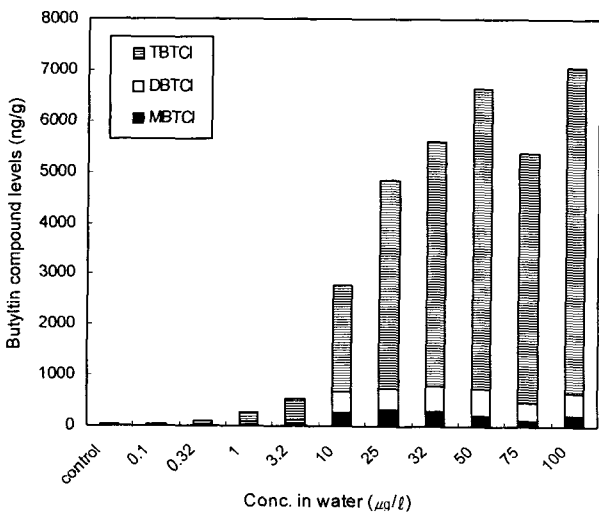


Fig. 1. Butyltin compound levels (wet weight) detected from the guppies exposed to TBTCI for 18-144 hours (see Table 1).

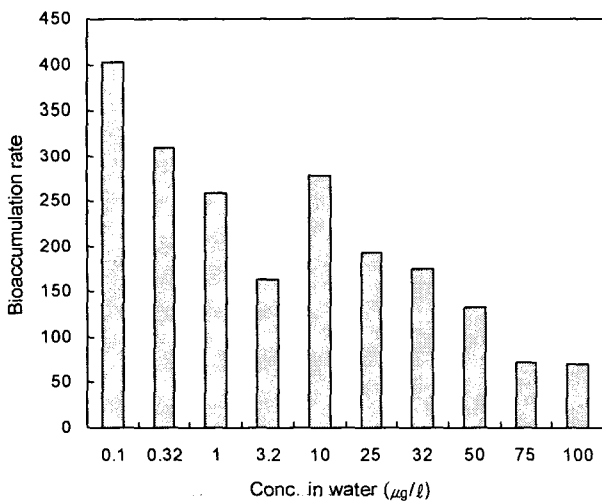


Fig. 2. Changes in the bioaccumulation rate in the guppies exposed to TBTCI for 18-144 hours (see Table 1).

치사율 변화

Table 1에서 제시한 바와 같이 대조군, 0.1, 0.32, 1 및 3.2 $\mu\text{g/l}$ 실험군에서는 144시간 경과 후 모두 생존해 있었으나 10 $\mu\text{g/l}$ 실험군에서 144시간 경과 후 1마리가 죽었다. 그러나 25 $\mu\text{g/l}$ 이상의 실험군에서는 농도 상승에 비례해서 죽기 시작하는 시간이 점차 빨라졌고(25 $\mu\text{g/l}$, 24시간; 32 $\mu\text{g/l}$, 18시간; 50 $\mu\text{g/l}$, 12시간; 75와 100 $\mu\text{g/l}$, 6시간), 전 개체가 치사에 이르는 시간도 농도가 높을수록 빨라졌다(25 $\mu\text{g/l}$, 144시간 이상; 32 $\mu\text{g/l}$, 96시간; 50 $\mu\text{g/l}$, 72시간; 75 $\mu\text{g/l}$, 48시간; 100 $\mu\text{g/l}$, 18시간). TBTCI에 대한 구피의 144시간 LC_{50} 은 17.5 $\mu\text{g/l}$ 이었다.

유영행동 및 구애행동의 이상과 섭식행동의 변화

각 실험군별로 TBTCI 노출 6~144시간 경과 후 구피의 유영행동 이상을 암·수 구별없이 관찰하여 분석한 결과는 Table 2와 같다. 대조군~3.2 $\mu\text{g/l}$ 실험군까지는 유영행동의 변화를 보이지 않았으나, 10 $\mu\text{g/l}$ 실험군부터 소수의 구피에

Table 1. Mortality (%) of the guppies exposed to TBTCI

conc. ($\mu\text{g/l}$)	hr									
	6	12	18	24	48	72	96	120	144	
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0.32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
3.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
10	0	0	0	0	0	0	0	0	5	
25	0	0	0	5	45	55	90	95	95	
32	0	0	5	15	70	90	100			
50	0	25	55	60	80	100				
75	5	50	75	90	100					
100	10	75	100							

Table 2. The rates (%) of the abnormal behavior in the guppies exposed to TBTCI

conc. ($\mu\text{g/l}$)	hr									
	6	12	18	24	48	72	96	120	144	
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0.32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
3.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
10	0	0	0	15	15	15	15	15	15	
25	0	15	15	35	65	80	95	100	100	
32	0	20	25	50	85	95	100			
50	0	35	65	90	95	100				
75	15	70	95	100	100					
100	20	90	100							

서 24시간 경과 후 유영행동 이상이 관찰되기 시작했다. 25 $\mu\text{g/l}$ 실험군부터는 행동 이상을 보이는 시기가 점점 더 빨라졌는데, 25~50 $\mu\text{g/l}$ 실험군에서는 12시간 경과 후부터 행동 이상이 관찰되었고, 48~72시간 경과 후에는 거의 모든 실험군의 개체에서 행동 이상이 보였다. 75와 100 $\mu\text{g/l}$ 의 고농도 실험군에서는 6시간이 경과된 후부터 행동 이상이 관찰되어 12~18시간 후에는 거의 모든 개체에서 행동 이상이 관찰되었다.

수컷의 시그모이드상의 구애행동은 높은 농도의 TBTCI에 노출될수록 감소되는 경향을 보였다(Fig. 3). 즉 수컷 구피들은 대조군에서 TBTCI 노출 6시간 후 10분 동안 평균 8.8회(SD=1.03, N=10)에 걸쳐 시그모이드상의 구애행동을 했으나, 0.1 $\mu\text{g/l}$ 실험군에서 평균 8.3회(SD=0.94, N=10), 0.32 $\mu\text{g/l}$ 실험군에서는 평균 7.5회(SD=0.85, N=10), 1 $\mu\text{g/l}$ 실험군에서 평균 7.1회(SD=1.60, N=10), 3.2 $\mu\text{g/l}$ 실험군에서는 평균 6.8회(SD=1.48, N=10), 10 $\mu\text{g/l}$ 실험군에서 평균 6.8회(SD=0.63, N=10), 25 $\mu\text{g/l}$ 실험군에서 평균 6.1회(SD=0.88, N=10)로서 서서히 감소되는 경향을 보였다. 그러나 32 $\mu\text{g/l}$ 실험군부터 구애행동의 횟수가 급감해서 평균 4.1회(SD=1.18, N=10), 50 $\mu\text{g/l}$ 실험군에서 평균 3.0회(SD=1.05, N=10), 75 $\mu\text{g/l}$ 실험군에서 평균 1.7회(SD=1.49, N=10) 그리고 100 $\mu\text{g/l}$ 실험군 농도군에서 평균 1.1회(SD=1.37, N=10)의 시그모이드상의 구애행동이 관찰되었다.

섭식행동은 대조군~10 $\mu\text{g/l}$ 실험군에서는 정상이었으나, 25 $\mu\text{g/l}$ 실험군에서는 TBTCI 노출 후 96시간 경과 후부터 섭식을 중단했다. 이러한 섭식중단 현상은 높은 농도군일수록 이른 시기에 나타나, 32 $\mu\text{g/l}$ 와 50 $\mu\text{g/l}$ 실험군에서 48시간 경과 후, 75 $\mu\text{g/l}$ 실험군에서 24시간 경과 후, 100 $\mu\text{g/l}$ 실험군에서 6시간 경과 후 섭식을 중단했다.

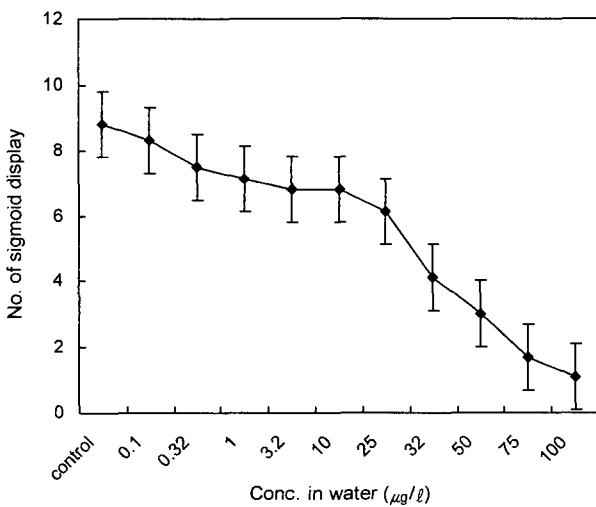


Fig. 3. The average number and standard deviation of the number of the sigmoid display in the adult male guppies during 10 min. after 6 hrs. exposed to TBTCI.

생식소 중량지수

수컷 구피의 생식소 중량지수(GSI)는 3.2 및 10 $\mu\text{g/l}$ 실험군에서 감소하는 경향을 보였으나, 유의차는 없었다(Fig. 4). 25 $\mu\text{g/l}$ 이상의 고농도 실험군부터는 치사율 증가로 인해서 TBTCI에 노출되는 시간이 달랐으므로(Table 1참조) 제외시켰으며, 대조군~10 $\mu\text{g/l}$ 실험군의 경우도 체중의 편차가 큰 개체들은 제외시켰다.

정소의 조직학적 변화

0.1~3.2 $\mu\text{g/l}$ 실험군에서는 대조군(Fig. 5A~E)과 큰 차이를 보이지 않았으나, 10 $\mu\text{g/l}$ 실험군에서는 각 생식세포 낭을 둘러싸는 일부 지지세포에서 핵질의 전자밀도가 낮아지고 핵막부분의 전자밀도가 부분적으로 높아지는 현상이 관찰되었다. 한편 25 $\mu\text{g/l}$ 실험군에서는, 정원세포낭(Fig. 5F), 정모세포낭(Fig. 5G), 정세포낭(Fig. 5H), 정자낭(Fig. 5I), 정포낭(Fig. 5J) 내의 생식세포 뿐만 아니라 각 생식세포낭을 둘러싸는 지지세포의 세포질 대부분이 파괴되거나 핵질이 부분적으로 응축되는 괴사현상이 관찰되었다. 또한 수출관 내부의 정포가 붕괴되어 있고, 정포 내의 정자 중 약 반수 정도에서는 분리되지 못한 잔여체가 관찰되었고 그 세포질 안에는 미토콘드리아가 산재해 있었다(Fig. 6C). 수출관을 둘러싸는 상피세포도 괴사현상을 보였다(Fig. 6D). 이와 유사한 현상들이 50~100 $\mu\text{g/l}$ 의 실험군에서도 관찰되었다.

수컷 구피의 정소내에서 관찰되는 100개의 생식세포낭을 임의로 선택하여 생식세포낭에 대한 정포낭의 비율을 각 실험군별로 비교한 결과, 대조군과 0.1 $\mu\text{g/l}$ 실험군에서는 전체 낭에 대해서 정포낭의 비율이 22.0%로서 변화가 없었으나, 0.32~25 $\mu\text{g/l}$ 실험군에서는 정포낭의 비율이 점차 감소하였고(0.32 $\mu\text{g/l}$, 20.2%; 1 $\mu\text{g/l}$, 16.7%; 3.2 $\mu\text{g/l}$, 14.3; 10 $\mu\text{g/l}$, 13.8%; 25 $\mu\text{g/l}$, 11.3%), 25~100 $\mu\text{g/l}$ 실험군에서는 정포낭

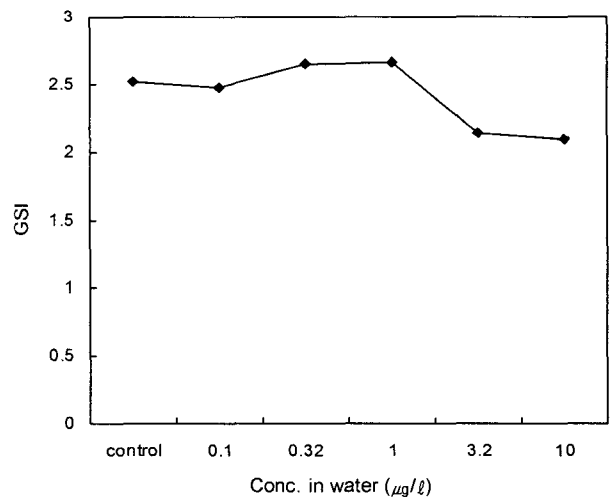


Fig. 4. Changes in the gonadosomatic index(GSI) of the guppies exposed to TBTCI.

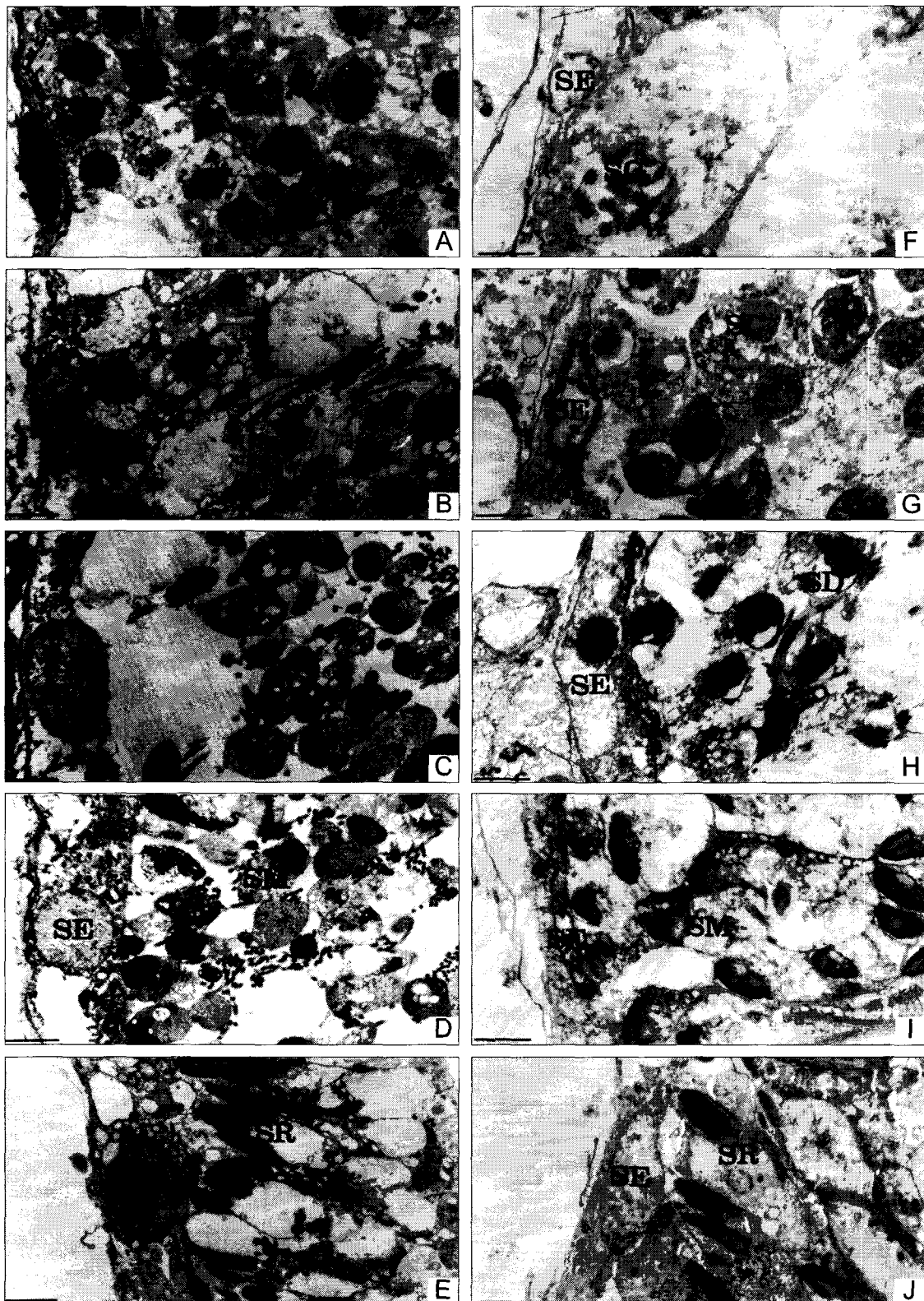


Fig. 5. Electron micrographs ($\times 3,200$) showing testicular germ cells in the cysts of spermatogonium (A, F), spermatocyte (B, G), spermatid (C, H), sperm (D, I) and spermatophore (E, J) in the control (A~E) and the group exposed to 25 $\mu\text{g}/\text{l}$ TBTCI (F~J), respectively. Note necrotic Sertoli cells (SE) and various germ cells in the group exposed to 25 $\mu\text{g}/\text{l}$ TBTCI. Scale bar=3.5 μm . SC, spermatocyte; SD, spermatid; SG, spermatogonium; SM, sperm; SR, spermatophore.

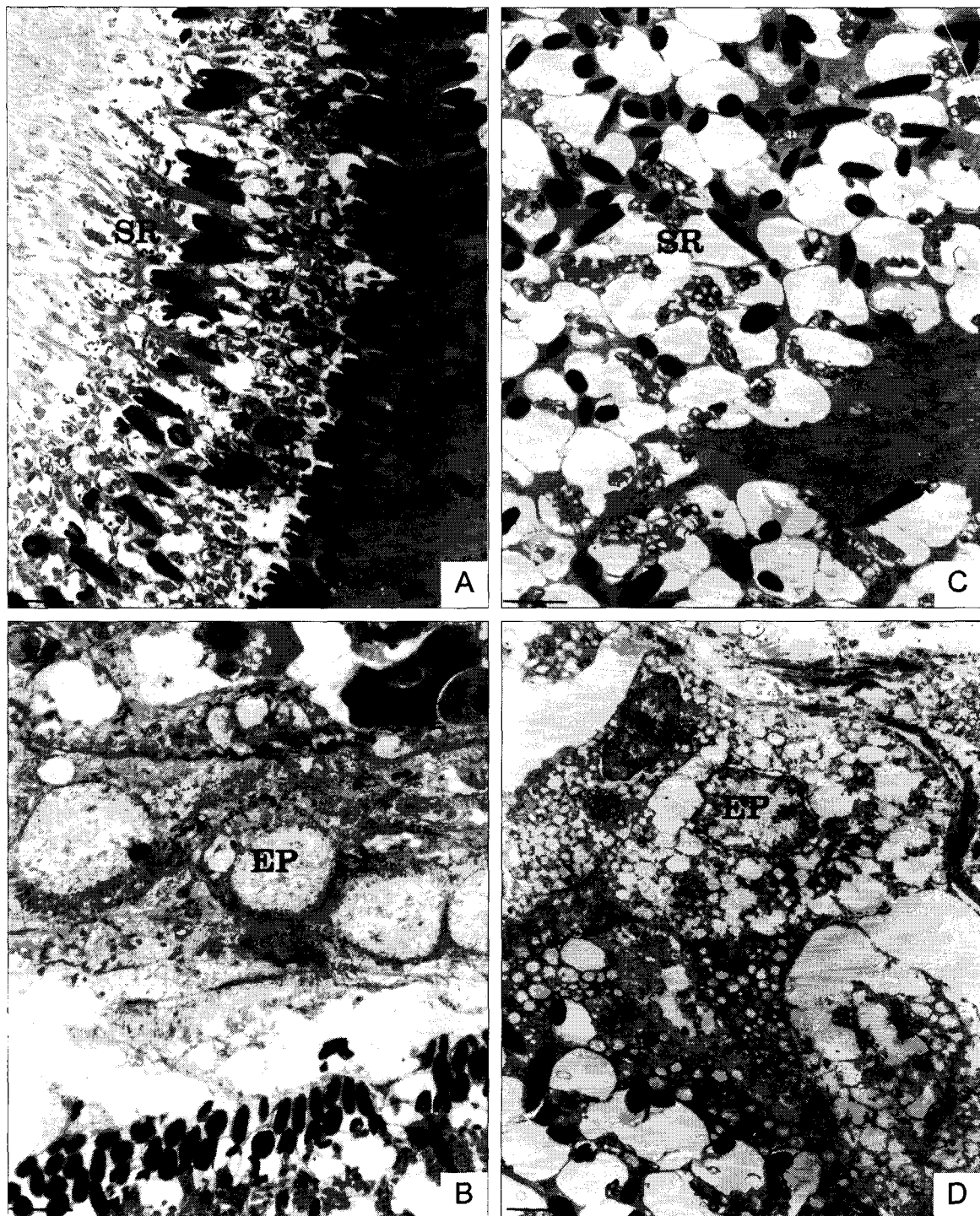


Fig. 6. Electron micrographs ($\times 3,200$) showing spermatophores (A, C) and epithelial cells (B, D) in the efferent ducts in the control (A, B) and the group exposed to $25 \mu\text{g/l}$ TBTCI (C, D). Note ruptured spermatophores, necrotic epithelial cells, and abnormal spermatozoa with expanded residual cytoplasm containing mitochondria scattered irregularly. Scale bar= $3.5 \mu\text{m}$. EP, epithelial cell; SR, spermatophore.

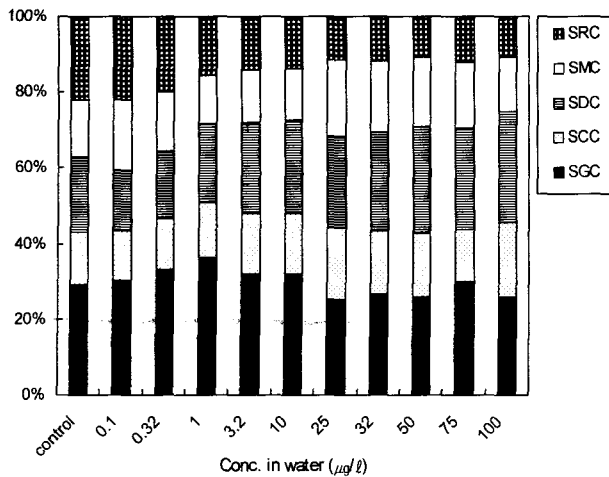


Fig. 7. Comparisons of the ratios of testicular germ cell cysts to the whole cysts in the testes of the guppies exposed to TBTCI (0~100 µg/l, N=10). SCC, cyst of spermatocyte; SDC, cyst of spermatid; SGC, cyst of spermatogonium; SMC, cyst of sperm; SRC, cyst of spermatophore.

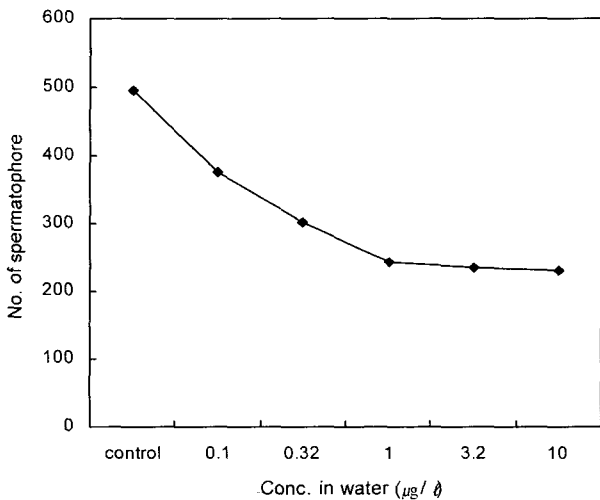


Fig. 8. Changes in the number of spermatophore in the efferent duct of the male guppies exposed to TBTCI.

의 비율이 거의 일정하게 유지되었다(32 µg/l, 12%; 50 µg/l, 11.2%; 75 µg/l, 12.2%; 100 µg/l, 10.8%)(Fig. 7). 또한 수출관 내의 정포의 수는 1 µg/l에 이르기까지 TBTCI 농도에 거의 반비례해서 감소하는 경향을 보였으나, 3.2와 10 µg/l에서는 거의 변화가 없었고, 25 µg/l 실험군부터는 대부분의 정포가 파괴되어 있어 수출관 내의 정포의 수를 산출할 수 없었다 (Fig. 8).

고찰

TBTCI의 구피 생체 내 축적

본 연구 결과, TBTCI을 구피에게 단기간에 걸쳐 노출시켰

음에도 생체 축적율은 매우 높았으며, 특히 저농도의 TBTCI에 노출될수록 생체 축적율이 높아, 구피가 단기간동안 저농도의 TBTCI에 노출되더라도 생체에 미치는 영향이 클 수 있음이 시사되었다. 실제로 TBTCI은 0.1 µg/l의 저농도 실험군에서도 수컷의 구애행동과 수출관 내 정포의 수를 감소시켜 번식을 저해함이 밝혀졌다. 또한 3.2 µg/l 이상의 농도군에서는 생식소 중량을 감소시키고, 25 µg/l 이상의 고농도군에서는 치사율 급증, 유영행동 이상 급증, 섭식 중단 및 정소조직 파괴 현상을 일으켜, 생체에 축적된 TBTCI이 구피의 번식 및 생존에 크게 영향을 미치고 있음이 밝혀졌다. 한편 25 µg/l 이상의 고농도군에서 생체 축적율이 감소하는 현상은 치사율의 증가로 인해 TBTCI에 노출되는 시간이 감소된 것이 반영되었다고 생각되므로, 고농도에 노출되었을 경우의 생체 축적율은 본 실험에서 산출된 축적율보다는 다소 높을 것으로 생각되었다.

부틸주석화합물은 포유류에서 cytochrome P-450 mono-oxygenase에 의하여 대사되며[16], 이러한 약물대사효소계의 활성은 육상포유류에서 해양포유류에 비해 높다는 것이 알려져 있다[31,36]. 즉 육상포유류에서는 TBT의 분해산물인 DBT나 MBT의 농도가 TBT에 비해서 높고, 육상포유류(약 2-8%)나 조류(약 5-12%)에서의 총부틸주석화합물에 대한 TBT의 비율(TBT:ΣBTs)은 기각류(약 10-35%)나 고래류(약 7-35%)보다도 낮음이 알려져 있다[30]. 어류에서도 전반적인 효소대사계의 특징이 포유류와 유사한 monoxygenase계를 가지는 것이 알려져 있는데[27], 구피 체내에서 검출된 부틸주석화합물의 조성을 보면, 0.1 µg/l 이상의 모든 실험군에서 TBT:ΣBTs가 67% 이상이고, 고농도 실험군일수록 이 비율이 더 높아져, 이러한 현상은 구피의 TBT 대사에 관련된 효소의 대사능력이 포유류나 조류에 비해서 낮을 뿐 아니라, 고농도의 TBT에 노출될수록 대사능력이 저해됨을 시사한다.

TBTCI이 구피의 번식에 미치는 영향

대부분의 동물에서 번식 성공률은 성적인 행동의 성공률에 의해서 크게 영향을 받는데, “시그모이드상 구애행동”이라고 불리는 수컷 구피의 구애행동은 가장 잘 알려져 있는 구애행동의 한 가지 예이다[14]. 본 연구 결과 수컷 구피의 구애행동은 저농도 실험군부터 고농도 실험군에 이르기까지 농도에 거의 반비례해서 감소하고 있어, 구피의 시그모이드상 구애행동이 TBTCI 오염에 대한 biomarker로서 매우 유용함이 시사되었다.

한편 성적인 행동의 수행에는 테스토스테론 특히 11-케토 테스토스테론이 크게 관여함이 알려져 있다[2]. 테스토스테론은 동물에 있어 매우 중요한 안드로젠으로써[23], 수컷 어류에서 2차 성징의 발달을 유도하고 정자형성을 촉진시킨다[23,32]. 구피에서도 테스토스테론이 수컷의 구애색깔(display coloration)을 발현시키고[18,22], 수컷 치어의 생식기(gonopodium)의 발달[13,22]을 유도하며, 정자형성을 촉진시킨다

는 것이 알려져 있다[32]. 한편 안드로젠에 의하여 발현되는 현상들은 flutamide, vinclozolin과 *p,p'*-DDE 등의 안티안드로젠에 의해서 억제됨이 알려져 있다. 즉 flutamide, vinclozolin 및 *p,p'*-DDE에 노출된 구피 치어에서는, 테스토스테론에 의하여 유도되는 현상들이 억제되어 수컷의 구애색깔, 성적행동 및 정자 수가 감소하고, 생식지가 왜축되는데, 이러한 현상은 이들 화합물이 구피의 안드로젠 수용체(ARs)와 상호작용한 직접적인 결과라고 알려져 있다[4]. 또한, 천연 여성호르몬 인 17β -estradiol과 4-*tert*-octylphenol 등의 유사 에스트로젠(xenoestrogen)도 구피의 시그모이드상의 구애행동의 지속시간과 빈도를 감소시키고[3], 수컷의 구애색깔인 오렌지색 피부의 면적과 색의 강도를 감소시키며, 정소의 성장을 억제시키는 작용을 가지고 있음이 알려져 있다[32]. 그러나 이들 화합물질들은 정자의 수를 증가시키는 점에서 안티안드로젠의 작용과 다른데, 이는 지지세포가 정액분비를 원활히 하지 못하게 함으로써 정자가 정소와 정관에 저장됨에 의한 것이라고 생각되고 있다[32].

한편, 최근 Kinnberg와 Toft [17]에 의하면, 천연여성호르몬인 17β -estradiol, 유사에스트로젠인 4-*tert*-octylphenol과 bisphenol A, 그리고 안티안드로젠인 flutamide와 *p,p'*-DDE를 각각 높은 농도로 구피에게 처리한 결과, 17β -estradiol을 제외한 위의 네 가지 화합물들이 정원세포의 수를 감소시키는 반면 정포의 수를 증가시키는 현상을 보여, 이러한 현상을 이들 화합물이 정원세포의 유사분열을 방해한 결과라고 보고한 바 있다. 즉 4-*tert*-octylphenol과 bisphenol A는 에스트로젠 수용체의 길항제(agonists)로서 알려져 있지만[1,25], 정포의 수에 영향을 미치지 않는 17β -estradiol보다 오히려 안티안드로젠인 flutamide 및 *p,p'*-DDE와 유사한 영향을 나타낸 점으로부터, 높은 농도의 4-*tert*-octylphenol과 bisphenol A가 안드로젠 수용체와 결합했음을 시사한다고 보고했다. Gray와 Kelce [8], Sohoni와 Slumpter [26]도 각각 octylphenol과 bisphenol A가 안드로젠 수용체와 결합한다는 것을 밝힌 바 있다.

본 연구 결과에서도 대부분의 TBTCI 처리군에서 수컷의 시그모이드상의 구애행동과 생식소지수가 감소하고, 정소 내 정포낭 및 수출관 내 정포의 수가 감소하는 점으로부터 TBTCI이 안티안드로젠으로서 작용하여 내분비계 장애를 일으킨 것으로 생각되었다. 그러나 TBTCI 처리군에서 정소 내 정포낭의 비율과 수출관 내 정포의 수가 감소되는 점은 전술한 Kinnberg와 Toft [17]의 연구결과와 상반되어, TBTCI이 위의 화합물과는 다른 영향을 나타내고 있음을 시사하고 있다. 즉 그들의 연구에 이용된 유사에스트로젠(octylphenol, 100~900 $\mu\text{g/l}$ (물); bisphenol A, 500~5000 $\mu\text{g/l}$ (물)) 및 안티안드로젠(flutamide, 1~100 $\mu\text{g/mg}$ (사료); *p,p'*-DDE, 1~10 $\mu\text{g/mg}$ (사료))은 정원세포의 유사분열에 영향을 미쳤을 뿐 정자변태과정에는 영향을 미치지 않았으나, 본 연구에서는 0.32 $\mu\text{g/l}$ 실험군부터 점차 정소 내 정포낭의 수가 감소되고 있어, 이는 정자세포에서 정자로 변태하는 과정에 영향을

미쳤음을 시사하고 있다. 한편 25 $\mu\text{g/l}$ 이상의 고농도군에서 정포낭의 비율이 낮지만 거의 일정하게 유지되는 것은 고농도군일수록 구피의 치사율이 높아 TBTCI에 노출되는 시간이 짧아지는 것에 기인한다고 생각되었다. 매우 낮은 농도(11.2~22.3 ng/l)의 TBT를 구피에게 처리했을 때도 정자 수가 감소되는 것이 알려져 있는데, 이는 지지세포의 기능 억제에 의한 것으로 추측되고 있다[11].

한편 25 $\mu\text{g/l}$ 이상의 고농도 실험군에서는 정포의 수가 감소될 뿐 아니라 정소의 지지세포와 수출관 내의 상피세포가 팽창되고, 대부분의 정소조직이 심한 상해를 일으키며, 유영행동 이상이 급증하고, 섭식이 중단되며, 단기간 내에 치사율이 증가하는 등, 급성독성을 일으키고 있음을 알 수 있다. 이와 유사한 급성독성은 6.55 $\mu\text{g/l}$ 이상의 TBTCI을 유생단계의 잉어에게 처리하거나[5], 32 $\mu\text{g/l}$ 의 TBTO를 구피에게 처리하거나[34], 0.1~10 $\mu\text{g/l}$ TBTO를 가시고기에게 처리했을 때 [12]에도 나타나며, 모든 예에서 치사율이 급증하고, 면역계의 이상을 일으키거나 또는 유영행동 및 식욕감퇴가 동반됨이 알려져 있다.

결론적으로 0.32~10 $\mu\text{g/l}$ 의 TBTCI은 안티안드로젠으로 작용하여 구피의 정자변태에 영향을 미쳐서 번식을 저해하지만, 25 $\mu\text{g/l}$ 이상의 고농도에서는 세포독성을 일으킴으로써 구피의 번식 뿐 아니라 생존을 저해하고 있음이 시사된다.

요 약

TBTCI(0.1, 0.32, 1, 3.2, 10, 25, 32, 50, 75 및 100 $\mu\text{g/l}$)을 구피에게 144시간 동안 노출시켜 TBTCI의 구피 생체 내 축적정도 및 구피의 번식과 행동에 미치는 영향에 대해서 조사하였다. 0.1 $\mu\text{g/l}$ 이상의 모든 TBTCI 실험군에서 TBT:ΣBTs가 67% 이상으로 매우 높았고, 고농도 실험군일수록 이 비율이 높아져, 고농도의 TBTCI에 노출될수록 구피의 대사능력이 저해됨을 알 수 있었다. 또한 TBTCI은 구피의 번식력을 약화시키고 행동이상을 유발함이 밝혀졌다. 즉, 0.1 $\mu\text{g/l}$ 의 실험군부터 수컷의 구애행동과 수출관 내 정포의 수가 감소되었고, 0.32~10 $\mu\text{g/l}$ 의 실험군에서는 정소 내 전체 생식세포낭에 대한 정포낭의 수도 점차 감소하여 TBTCI이 정자변태 과정에 영향을 미치는 내분비계 장애물질로서 작용하고 있음이 시사되었다. 더욱이 25 $\mu\text{g/l}$ 이상의 고농도군에서는 단기간 내에 치사율이 증가하고, 생식세포가 피사되고, 정소의 지지세포와 수출관 내의 상피세포가 상해되고, 유영행동 이상이 급증하고, 섭식이 중단되는 등 급성독성이 관찰되어, TBTCI이 구피의 번식 뿐 아니라 생존을 저해하고 있음이 시사되었다.

감사의 글

이 논문은 2001학년도 경성대학교 학술지원연구비에 의하

여 연구되었음. 본 연구를 위해 유기주석화합물의 분석을 도와주신 일본 에히메대학교 本田克久 教授와 上田祐子씨에게 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Andreassen, T. K. and B. Korsgaard. 2000. Characterization of a cytosolic estrogen receptor and its up-regulation by 17 β -estradiol and the xenoestrogen 4-tert-octylphenol in the liver of eelpout (*Zoarces viviparus*). *Comp. Biochem. Physiol. C* **125**, 299-313.
2. Arcand-Hoy, L. D. and W. H. Benson. 1998. Fish reproduction: an ecologically relevant indicator of endocrine disruption. *Environ. Toxicol. Chem.* **17**, 49-57.
3. Bayley, M., J. R. Nielsen and E. Baatrup. 1999. Guppy sexual behavior as an effect biomarker of estrogen mimics. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **43**, 68-73.
4. Bayley, M., M. Junge and E. Baatrup. 2002. Exposure of juvenile guppies to three antiandrogens causes demasculinization and a reduced sperm count in adult males. *Aquat. Toxicol.* **56**, 227-239.
5. Fent, K. 1992. Embryotoxic effects of tributyltin on the minnow *Phoxinus phoxinus*. *Environ. Pollut.* **76**, 187-194.
6. Fent, K. 1996. Ecotoxicology of organotin compounds. *Crit. Rev. Toxicol.* **26**, 1-117.
7. Fent, K. and J. Hunn. 1991. Phenyltins in water, sediment, and biota of freshwater marinas. *Environ. Sci. Technol.* **25**, 956-963.
8. Gray, Jr. L. E. and W. R. Kelce. 1996. Latent effects of pesticides and toxic substances on sexual differentiation of rodents. *Toxicol. Ind. Health* **12**, 515-531.
9. Harino, H., M. Fukushima and S. Kawai. 2000. Accumulation of butyltin and phenyltin compounds in various fish species. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **39**, 13-19.
10. Hashimoto, S., M. Watanabe, Y. Noda, T. Hayashi, Y. Kurita, Y. Takasu and A. Otsuki. 1998. Concentration and distribution of butyltin compounds in a heavy tanker route in the strait of malacca and in Tokyo bay. *Mar. Environ. Res.* **45**, 169-177.
11. Haubruge, E. F. Peti and M. J. G. Gage. 2000. Reduced sperm counts in guppies (*Poecilia reticulata*) following exposure to low levels of tributyltin and bisphenol A. *Proc. R. Soc. Lond. B* **267**, 2333-2337.
12. Holm, G., L. Norrgren and O. Lindén. 1991. Reproductive and histopathological effects of long-term experimental exposure to bis (tributyltin) oxide (TBTO) on three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* Linnaeus. *J. Fish Bio.* **38**, 373-386.
13. Hopper, A. F. 1965. Inhibition of regeneration of the gonopodium of the guppy by treatment with thiouracil. *J. Exp. Zool.* **15**, 231-240.
14. Houde, A. E. 1997. Sex, color, and mate choice in guppies, In Krebs, J. R. and T. Clutton-Brock (eds.), *Monographs in behavior and ecology*, Princeton Univ. Press. Princeton NJ.
15. Kim, N. S., D. U. Park, J. R. O and W. J. Shim. 2001. Analysis of butyltin compounds(mono-, di-, and tributyltin) in human blood. *Analytical Sci. Technol.* **14**, 115-122.
16. Kimmel, E. C., R. H. Fish and J. E. Casida. 1977. Bioorganotin chemistry: metabolism of organotin compounds in microsomal monooxygenase system in mammals. *J. Agri. Food Chem.* **25**, 1-9.
17. Kinnberg, K. and G. Toft. 2003. Effects of estrogenic and antiandrogenic compounds on the testis structure of the adult guppy (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **54**, 16-24.
18. López, S. 1998. Acquired resistance affects male sexual display and female choice in guppies. *Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. B* **265**, 717-723.
19. Oberdörster, E. and P. McClellan-Green. 2000. The neuropeptide APGWamide induces imposex in the mud snail, *Ilyanassa obsoleta*. *Peptides* **21**, 1323-1330.
20. Oberdörster, E. and P. McClellan-Green. 2002. Mechanisms of imposex induction in the mud snail, *Ilyanassa obsoleta*: TBT as a neurotoxin and aromatase inhibitor. *Mar. Environ. Res.* **54**, 715-718.
21. Oberdörster, E., D. Rittschof and P. McClellan-Green. 1998. Testosterone metabolism in imposex and normal *Ilyanassa obsoleta*: a comparison of field and TBTCI-induced imposex. *Mar. Pollut. Bull.* **36**, 144-151.
22. Pandey, S. 1969. The role of pituitary and gonadal hormones in the differentiation of testis and secondary sex characters of the juvenile guppy *Poecilia reticulata* Peters. *Biol. Reprod.* **1**, 272-281.
23. Pandey, S. 1969. Effects of hypophysectomy on the testis and secondary sex characters of the adult guppy *Poecilia reticulata* Peters. *Can. J. Zool.* **47**, 775-781.
24. Salazar, M. H. and S. M. Salazar. 1991. Assessing site-specific effects of TBT contamination with mussel growth rates. *Mar. Environ. Res.* **32**, 131-150.
25. Smeets, J. M. W., T. R. Rankouhi, K. M. Nichols, N. E. Kaminski, J. P. Giesy and M. van den Berg. 1999. In vitro vitellogenin production by carp (*Cyprinus carpio*) hepatocytes as a screening method for determining (anti) estrogenic activity of xenobiotics. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **157**, 68-76.
26. Sohoni, P. and J. P. Sumpter. 1998. Several environmental oestrogens are also anti-androgens. *J. Endocrinol.* **158**, 327-339.
27. Stegeman, J. J. and M. E. Hahn. 1994. Biochemistry and molecular biology of monooxygenase: current perspectives on forms, functions and regulation of cytochrome P450 in aquatic species, pp. 87, In Malins D. C. and G. K. Ostrander (eds.), *Aquatic Toxicology, Molecular, Biochemical, and Cellular Perspectives*, Lewis Publishers, Boca Raton, FL.
28. Takahashi, S. and S. Tanabe. 2003. Utilization of organotin compounds as industrial chemicals, and the environmental problem. *Endocrine Disrupter news letter* **5**, 7-8.
29. Takahashi, S., S. Tanabe, I. Takeuchi and N. Miyazaki. 1999. Distribution and specific bioaccumulation of butyltin compounds in a marine ecosystem. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **37**, 50-61.

30. Takahashi, S., H. Mukai, S. Tanabe, K. Sakayama, T. Miyazaki and H. Masuno. 1999. Butyltin residues in livers of humans and wild terrestrial mammals and in plastic products. *Environ. Pollut.* **106**, 213-218.
31. Tanabe, S., S. Watanabe, H. Kan and R. Tatsukawa. 1988. Capacity and mode of PCB metabolism in small cetaceans. *Mar. Mam. Sci.* **4**, 103-124.
32. Toft, G. and E. Baatrup. 2001. Sexual characteristics are altered by 4-*tert*-octylphenol and 17 β -estradiol in the adult male guppy (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **48**, 76-84.
33. Ueda, Y., M. H. Yoon, J. H. Kim, B. Y. Min and K. Honda. 2002. Accumulation of endocrine disruptors in the Korean striped field mouse, *Apodemus agrarius*, and their abnormalities in reproductive organs. *The 5th Annual Meeting of Japan Society of Endocrine Disrupters Research* pp. 115.
34. Valkirs, A. O., B. M. Davidson and P. F. Seligman. 1987. Sublethal growth effects and mortality to marine bivalves from long-term exposure to tributyltin. *Chemosphere* **16**, 201-220.
35. Waldock, M. A., J. E. Thain and M. E. Waite. 1996. An assessment of the value of shell thickening in *Crassostrea gigas* as an indicator of exposure of tributyltin. In: Organotin, pp. 219-237, In Champ M. A. and P. F. Seligman (eds.), *Chapman and Hall*, London, UK.
36. Watanabe, S., T. Shimada, S. Nakamura, N. Nishiyama, N. Yamashita, S. Tanabe and R. Tatsukawa. 1989. Specific profile of liver microsomal cytochrome P-450 in dolphin and whales. *Mar. Environ. Res.* **27**, 51-65.
37. Wester, P. W. and J. H. Canton. 1987. Histopathological study of *Poecilia reticulata* (guppy) after long-term exposure to bis (tri-*n*-butyltin) oxide (TBTO) and di-*n*-butyltin dichloride (DBTC). *Aquat. Toxicol.* **10**, 143-165.