

Article

17 β -estradiol에 노출된 저서성 요각류 *Tigriopus japonicus s.l.*의
세대간 생활사 및 형태학적 변이 연구

방현우¹ · 임동현¹ · 이원철^{2*}

¹국립수산과학원 서해수산연구소
(400-420) 인천광역시 중구 을왕동 707
²한양대학교 자연과학부 생명과학과
(133-791) 서울특별시 성동구 행당동 17

Effect of 17 β -estradiol on Life History Parameters and Morphological
Deformities in *Tigriopus japonicus sensu lato*: A Two-generation Studies

Hyun Woo Bang¹, Donghyun Lim¹, and Wonchoel Lee^{2*}

¹West Sea Fisheries Research Institute, NFRDI
Incheon 400-420, Korea

²Department of Life Science, Division of Natural Sciences
Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

Abstract : To characterize ecotoxicological responses to a natural estrogen, 17 β -estradiol, we evaluated the life-history of the parental (F₀) and first generation (F₁) of the harpacticoid copepod, *Tigriopus japonicus sensu lato*. We evaluated the survival of nauplii and copepodites, the number of days until the emergence of copepodites and adult males, the sex ratio, brooding success, and the first brooding day of adult females. No significant differences in the survival rate were noted in response to treatments with different concentrations of 17 β -estradiol. However, 17 β -estradiol induced developmental delay and skewed the sex ratio toward males. Copepod development was delayed significantly in the 0.1 and 1 $\mu\text{g l}^{-1}$ 17 β -estradiol treatment groups relative to the control group, with a more pronounced delay in the F₁ group. Body length and biomass were significantly smaller in the 17 β -estradiol treated groups than in the controls. The male emergence of *T. japonicus s.l.* was very high in the 10 and 30 $\mu\text{g l}^{-1}$ 17 β -estradiol treatment group. Furthermore, exposure to 17 β -estradiol resulted in morphological deformities such as shrinking and swelling of the urosome, twisted setae of the caudal rami, setal loss of swimming legs, abnormal segmentation of antennules, and dwarfism.

Key words : 17 β -estradiol, copepod, *Tigriopus japonicus s.l.*, morphological deformity, two-generation

1. 서 론

최근 들어 독성 평가에 수서무척추동물을 이용하는 연

구가 많이 늘어나고 있다. 이는 무척추동물이 척추동물에 비해 독성 노출 및 외부 환경 변화에 빠르고 민감하게 반응할 뿐 아니라 수서 생태계 내의 먹이 사슬에 가장 중요한 고리 역할을 하기 때문이며(DeFur et al. 1999; DeFur 2004), 많은 경우에 다음과 같은 독성평가 생물의 기준을

*Corresponding author. E-mail : wlee@hanyang.ac.kr

충족하기 때문이다. 독성평가를 위한 지표 생물은 유성 생식을 하며, 실험실내 사육이 가능하고, 짧은 생활사를 가져야 한다. 또한 성장 단계별 구분이 쉽고, 크기가 작아야 하며, 대체적으로 독성에 민감하게 반응하고, 표준 시험 방법이 있어야 한다(Kusk and Wollenberger 2007). 특히 해양생물을 이용한 독성 평가의 경우 대상 물질의 염분을 인위적으로 조절할 경우 대상 물질의 본성이 변하게 되는 경우가 있기 때문에, 시험 생물은 가능한 광염성 종이 우선 고려되어야 한다(Hall et al. 1995; McAllen and Taylor 2001; Kwok and Leung 2005; Yoon et al. 2006). 연안에서 서식하는 요각류의 경우 광염성 생물일 뿐 아니라, 쉽게 채집할 수 있으며, 생활사가 짧고, 현장에서 다량 채집이 가능하며, 실험실 내 배양이 용이하고, 수온과 pH에 대해 매우 넓은 내성 한계를 갖기 때문에 위의 독성평가를 위한 지표 생물선정기준을 잘 충족시키는 실험생물로 많이 이용되고 있다(Andersen et al. 1999; Kusk and Wollenberger 1999; Marcial et al. 2003; Oetken et al. 2004; LeBlanc 2007; Bang et al. 2009).

내분비계장애물질(endocrine disruptors)은 과거 환경호르몬, 내분비교란물질, 내분비계장애물질, 내분비계교란화학물질 등으로 다양하게 불렸으나, 우리나라 정부에서는 공식적으로 “내분비계장애물질”로 용어를 통일하여 사용하고 있다. 내분비계장애물질의 과학적 정의 또한 각 단체 및 나라별로 차이가 있으나, 환경부에서는 “DDT, PCB 등 환경중의 화학물질이 사람이나 생물체의 몸속에 들어가서 성장, 생식 등에 관여하는 호르몬의 정상적인 작용을 방해하여 정자수의 감소, 암수 변환, 암 등을 유발할 수 있다고 말해지는 화학물질”로 내분비계장애물질을 정의하고 있다(환경부 2000). 17 β -estradiol(E2)은 인체 및 동물체 내에 존재하며 암컷의 임신, 분만, 생리, 착상 등에 관계하는 대표적인 에스트로겐으로, 과다 노출되면 유방암 등을 유발할 수 있으며(Henderson 1993), 요각류의 경우 발생초기에 노출되면 생존율 감소와 성장지연 등을 유발한다(Marcial et al. 2003). E2는 수환경에는 주로 축산폐수 및 분뇨에서 기인하여 발생하는 경우가 많은 것으로 알려져 있으며, 내분비계장애물질 분포 조사에 따르면 천연에스트로겐의 국내 하수처리장 배출 농도는 2.5 ng l⁻¹(ND-15.5 ng l⁻¹)로 캐나다 1.8 ng l⁻¹(0.2-14.7 ng l⁻¹), 네덜란드 0.2-2.4 ng l⁻¹, 노르웨이 최대 13.0 ng l⁻¹ 등과 유사한 것으로 알려져 있다(Servos et al. 2005; Johnson et al. 2005; 이 등 2007).

ISO(International Organization for Standard, 국제표준화기구), ASTM(American Society for Testing and Materials, 미국재료시험협회) 등에서 요각류를 이용한 독성평가 표준 시험방법을 제시하고 있다(ISO 1997; ASTM 2004). 그러나 요각류를 포함한 무척추동물에서 독성영향

을 정확하게 판단하기 위해서는 전생애 배양시험을 포함한 세대 간 평가가 필수적인데(DeFur et al. 1999; Barata et al. 2004; Kusk and Wollenberger 2007), 위의 두 표준 시험 방법에는 이러한 세대간 실험에 대한 기준이 포함되어 있지 않다. 이에 따라 OECD(Organization for Economic Co-operation and Development; 경제협력개발기구)에서는 전생애 시험법에 대한 초안을 제시하였으며(OECD 2005; Kusk and Wollenberger 2007), 최근 세대 간 독성 실험이 늘어나고 있는 추세다(Bejarano and Chandler 2003; Marcial et al. 2003; Cary et al. 2004; Chandler et al. 2004; 방 등 2008b).

형태학적 변이를 이용한 생태계 평가는 비교적 신속하고 간편하며 저렴한 방법이다. 이러한 이유 때문에 최근 곤쟁이(*Americamysis bahia*)를 이용한 내분비계 교란물질 시험법에서 형태학적 방법을 도입하려는 시도(Verslycke et al. 2007)와 갈따구를 이용한 시도(Kwak and Lee 2005, 2007; 방 등 2008d) 등이 이루어지고 있으나, 이는 대부분 대형 무척추동물을 이용한 연구이며, 아직까지 요각류와 같은 소형 갑각류의 형태적 변이를 통한 환경오염 지표 연구는 단 1편만 있을 뿐이다(Bang et al. 2009).

본 연구는 17 β -estradiol에 노출된 저서성 요각류 *Tigriopus japonicus s.l.*의 생태독성반응과 형태적 변이를 관찰하고 그 영향이 세대를 통해 전달되는가를 살펴보고, 향후 계속적으로 진행될 내분비계장애물질 노출에 따른 저서성 요각류의 생태독성 반응에 대한 연구에 기초적인 자료를 제공하는데 목적이 있다.

2. 재료 및 방법

실험 생물 채집 및 배양

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

실험 독성 물질

실험 물질로 천연 에스트로겐 17 β -estradiol(E2; cas no. 50-28-2)을 사용하였으며, carrier solvent로 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 이용하였다. DMSO는 최종 농도가 최대

0.01%(v/v) 이하가 되도록 했으며, 실험 물질은 대조군과 solvent 대조군을 포함하여 0.1, 1, 10, 30 $\mu\text{g l}^{-1}$ 농도로 실험하였다.

독성 노출 및 외형 관찰

모든 노출실험은 배양 조건과 같은 환경에서 실시하였으며, 시험 용기로 60×15 cm petri-dish(Arambra)와 6-well, 24-well cell culture plate(SPL)를 이용하였다. 노출 실험은 ISO의 표준시험 방법을 참조하였다(ISO 1997). 유생은 부화 후 12시간 이내의 nauplius 유생 1단계를, 성체는 포란한 암컷 성체를 이용하였으며, 노출 대상 개체는 한 농도 당 최소 5개체씩 6회 이상 반복실험을 실시하였고, 생존율, 성장률, 포란, 부화 등을 24시간 간격으로 확인하였다. 실험 기간 중에는 독성 물질의 반감기를 고려하여 3일 간격으로 사육수를 교체해 주었다.

생존율은 개체를 5분 동안 관찰하여 아무런 움직임이 없는 경우 사망한 것으로 1차 판단 후 24시간 이후에 사망을 확정하여 생존율을 결정하였다. Nauplius 유생의 성장률은 copepodite 유생으로 변태하는 시기를 매일 관찰하여 측정하였으며, copepodite 유생의 성장률은 수컷 출현일은 성체 수컷이 관찰되는 시기인 수컷 출현일을 통해 판단하였다. 이 후 성체가 된 개체를 대상으로 각각 성비, 포란일, 포란율 등을 확인하였다.

독성에 직접 노출된 개체의 생태반응 뿐 아니라, 직접 노출되지 않은 그 자손까지 영향을 미칠 수 있는지 알아보기 위하여 자손세대(F_1) 실험을 진행하였다. 자손세대 실험은 부모세대 실험 중 포란한 암컷 개체(F_0)를 선별한 후 어미세대와는 다르게 독성이 없는 정상 조건에서 유생을 부화시킨 후 배양하여 생존율, 성장률, 포란율 등을 측정하였다.

실험 후 모든 개체는 70% 에탄올로 고정하여 보관하였으며, 해부 현미경(Olympus SZX12), 광학 현미경(Olympus BX-51) 등을 사용하여 체장, 체적, 각 부속지의 형태 변이 등을 측정 관찰하였다. 각 개체의 길이와 폭은 해부 현미경과 광학 현미경에 부착된 카메라를 이용하여 이미지 분석 프로그램(MetaMorph 6.0)에서 계산하였으며, 생체량(biomass) 측정은 Feller and Warwick의 Volumetric method(Higgins and Thiel 1988)를 이용하였다.

통계 분석

각각의 독성 물질에 대한 생물종의 생존율, 성장률, 포란율 등을 분석하기 위해 SPSS 프로그램(ver. 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL)을 이용하였다. 통계 분석은 one-way ANOVA 분석을 기본으로 하여 분석한 후 Duncan test로 사후 검정하였으며, 성비는 χ^2 검정을 이용하여 분석하였다.

3. 결 과

부모세대(F_0) 생존 및 성장

대조군 nauplius 유생의 생존율은 $96.55 \pm 9.36\%$, copepodite 유생은 97.86 ± 6.07 (평균 \pm 표준편차)%로 나타났다. nauplius 유생은 부화 후 평균 5.20 ± 0.65 일에 copepodite 유생으로 발달하였다(Table 1). Carrier solvent, DMSO에 nauplius 유생의 생존율과 copepodite 유생 생존율은 100%, copepodite 출현일은 5.23 ± 0.54 일, 성체출현일은 10.75 ± 0.89 일로 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다. E2 처리 실험에서는 $1 \mu\text{g l}^{-1}$ 에서 가장 낮은 생존율을 보였으나 nauplius $90.00 \pm 12.25\%$, copepodite $96.30 \pm 4.08\%$ 로 대조군과 유의적 차이를 보이지 않았다.

그러나 copepodite와 수컷 성체 출현일을 기준으로한 성장을 실험에서는 농도에 따른 뚜렷한 변화가 관찰되었다. Copepodite 출현일의 경우 비처리 농도에서부터 $1 \mu\text{g l}^{-1}$ 까지 5.20 ± 0.65 , 5.55 ± 0.74 , 6.11 ± 0.89 일로 농도가 높아짐에 따라 성장이 지연되었으며, $10 \mu\text{g l}^{-1}$ 를 정점으로 농도가 더 증가하면 copepodite 출현일이 각각 4.97 ± 0.18 , 4.59 ± 0.50 일로 점점 빨라지는 것으로 나타났다. 수컷 출현일의 경우 0.1 , $1 \mu\text{g l}^{-1}$ 에서 각각 11.59 ± 0.94 , 11.55 ± 1.32 일로 성장이 1.3일 정도 지연되었으며, 10 , $30 \mu\text{g l}^{-1}$ 에서는 각각 10.21 ± 0.42 , 10.62 ± 0.62 일로 대조군과 유사한 출현일을 보였다.

출현한 성체 중 수컷 비율로 산정한 성비를 관찰한 결과, 대조군은 전체 성체 중 수컷이 61.48%를 차지하였으며, E2에 노출된 실험군은 노출 농도가 증가함에 따라 수컷 출현 비율 높아지는 경향을 보였다. 특히 노출 농도 중 10 , $30 \mu\text{g l}^{-1}$ 에서 성체 수컷 비율이 각각 93.33%, 96.67%로 매우 높은 출현율을 보였다.

대조군 암컷은 $98.08 \pm 10.00\%$ 의 포란율을 보이며, 부화 후 평균 13.64 ± 0.67 일에 포란하는 것으로 나타났다. E2 노출 개체는 $10 \mu\text{g l}^{-1}$ 에서 $50.00 \pm 0.00\%$ 로 매우 낮은 것으로 나타났으나, 그 이외의 다른 농도에서는 90% 이상의 높은 포란율을 보여주었다. 최초 포란일은 노출 농도가 높아짐에 따라 15.91 ± 2.21 , 18.83 ± 2.32 , 21.00 ± 0.00 일로 점점 지연되어 $10 \mu\text{g l}^{-1}$ 에서 가장 느린 포란을 보였다. 하지만 $30 \mu\text{g l}^{-1}$ 에서는 다시 빨라지는 양상을 보였다(Table 1).

E2에 노출되어 성장한 암컷 성체의 체장은 모든 농도에서 대조군보다 작은 크기를 보였으며, $10 \mu\text{g l}^{-1}$ 에서 $767.19 \pm 20.41 \mu\text{m}$ 로 가장 작은 것으로 나타났다(Table 2). 개체 폭 역시 $1 \mu\text{g l}^{-1}$ 을 제외하고 모두 대조군보다 작은 것으로 관찰되었으며, 이에 따라 $1 \mu\text{g l}^{-1}$ 을 제외한 전 농도에서 생물량이 대조군보다 작은 것으로 나타났다. 특히 $10 \mu\text{g l}^{-1}$ 은 체장, 폭, 생물량이 각각 대조군의 74%, 82%, 50%로 매우 작은 것으로 나타났다. 그러나 수컷의 경우에

Table 1. Summarized responses of *Tigriopus japonicus* s.l. exposed to different concentrations of 17 β -estradiol

| Generation | | | NSR (%) | CSR (%) | CED (day) | AMED (day) | FBD (day) | MER (M%) | BSR (%) | |
|----------------|----------------|------|------------|------------|--------------|---------------|--------------|--------------------|------------|--------|
| Control | Mean | | 96.55 | 97.86 | 5.20 | 10.33 | 13.64 | 61.48 | 98.08 | |
| | SD | | 9.36 | 6.07 | 0.65 | 0.49 | 0.67 | - | 10.00 | |
| F ₀ | 0.10 | Mean | 96.67 | 100.00 | 5.55* | 11.59* | 15.91* | 58.62 | 91.67 | |
| | | SD | 8.16 | 0.00 | 0.74 | 0.94 | 2.21 | - | 28.87 | |
| | 1.00 | Mean | 90.00 | 96.30 | 6.11* | 11.55* | 18.83* | 76.92 | 100.00 | |
| | | SD | 24.49 | 8.16 | 0.89 | 1.32 | 2.32 | - | 0.00 | |
| | 10.00 | Mean | 100.00 | 96.67 | 4.97* | 10.21 | 21.00* | 93.33 [†] | 100.00 | |
| | | SD | 0.00 | 8.16 | 0.18 | 0.42 | 0.00 | - | 0.00 | |
| | 30.00 | Mean | 100.00 | 100.00 | 4.57* | 10.62 | 15.00* | 96.67 [†] | 100.00 | |
| | | SD | 0.00 | 0.00 | 0.50 | 0.62 | 0.00 | - | 0.00 | |
| | F ₁ | 0.10 | Mean | 95.45 | 96.67 | 5.04 | 11.43* | 16.00* | 48.28 | 100.00 |
| | | | SD | 10.37 | 8.16 | 0.94 | 0.65 | 2.10 | - | 0.00 |
| 1.00 | | Mean | 83.48* | 93.33 | 5.78* | 12.20* | 18.35* | 35.71 | 94.44 | |
| | | SD | 19.47 | 10.33 | 1.14 | 2.53 | 4.91 | - | 20.41 | |
| 10.00 | | Mean | 98.08 | 95.00 | 5.70* | 11.56* | 17.50* | 47.37 | 100.00 | |
| | | SD | 21.08 | 10.00 | 1.30 | 1.33 | 2.46 | - | 0.00 | |
| 30.00 | | Mean | 98.23 | 100.00 | 5.09 | 11.23* | 17.50* | 93.94 [†] | 100.00 | |
| | | SD | 8.16 | 0.00 | 0.37 | 0.67 | 0.71 | - | 0.00 | |

NSR: nauplius survival rate, CSR: copepodite survival rate, CED: copepodite emergence day ; periods from birth to copepodite stage, AMED: adult male emergence day ; periods from birth to adult male, MER: male emergence rate; sex ratio, BSR: brooding success rate, FBD: 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 Dunnett's test ($p < 0.05$), †: crosses denote a significant difference from control by χ^2 -test ($p < 0.05$)

Table 2. Body length, width, and biomass of *Tigriopus japonicus* s.l. in relation to different concentrations of 17 β -estradiol

| Generation | Concentrations ($\mu\text{g l}^{-1}$) | | Female | | | Male | | | |
|----------------|--------------------------------------------|------|-----------------------------|----------------------------|------------------------------|-----------------------------|----------------------------|------------------------------|-------|
| | | | length (μm) | width (μm) | Biomass (μg) | length (μm) | width (μm) | Biomass (μg) | |
| 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 | |
| F ₀ | 0.1 | Mean | 951.20* | 316.16* | 4.30* | 775.11* | 284.58* | 2.84* | |
| | | SD | 61.64 | 7.36 | 0.38 | 25.37 | 11.94 | 0.17 | |
| | 1 | Mean | 955.80* | 326.71 | 4.67 | 851.91 | 283.26* | 3.11* | |
| | | SD | 43.64 | 37.04 | 1.11 | 44.22 | 15.13 | 0.43 | |
| | 10 | Mean | 767.19* | 290.84* | 2.93* | 821.75 | 309.46 | 3.90 | |
| | | SD | 20.41 | 2.54 | 0.13 | 120.26 | 53.45 | 1.39 | |
| | 30 | Mean | 920.54 | 294.47 | 3.61 | 757.50* | 280.61* | 2.75* | |
| | | SD | - | - | - | 38.34 | 20.04 | 0.41 | |
| | F ₁ | 0.1 | Mean | 930.99* | 326.58* | 4.50* | 868.88 | 252.20* | 2.71* |
| | | | SD | 12.34 | 16.42 | 0.50 | 37.42 | 79.26 | 0.99 |
| 1 | | Mean | 911.37* | 312.19* | 4.02* | 866.54 | 281.80* | 3.13* | |
| | | SD | 9.56 | 9.01 | 0.26 | 20.27 | 23.09 | 0.51 | |
| 10 | | Mean | 940.11* | 332.47* | 4.71* | 827.24 | 279.70* | 2.94* | |
| | | SD | 30.82 | 12.88 | 0.48 | 40.99 | 16.28 | 0.39 | |
| 30 | | Mean | 884.14* | 304.94* | 3.72* | 831.47 | 270.46* | 2.77* | |
| | | SD | 7.29 | 5.19 | 0.16 | 43.08 | 20.33 | 0.45 | |

는 10 µg l⁻¹의 체장, 폭, 생물량이 대조군과 유사하게 나타났다. 수컷 체장은 1, 10 µg l⁻¹에서는 대조군과 차이를 보이지 않았으나, 나머지 농도에서는 대조군의 90% 내외로 작게 나타났다. 개체 폭은 10 µg l⁻¹을 제외한 다른 농도에서는 280 µm 내외로 대조군의 90% 정도로 나타났으며, 생물량 역시 10 µg l⁻¹를 제외한 모든 농도에서 대조군보다 적은 것으로 관찰되었다.

자녀세대(F₁) 생존 및 성장

E2에 직접 노출되지 않은 자녀세대(F₁) 배양 실험은 각 농도별로 110개 내외의 개체를 대상으로 이루어졌다. F₁ nauplius는 1 µg l⁻¹에서 83.48±19.47%로 비교적 낮은 생존율을 보였으나 다른 농도에서는 95% 이상의 생존율을 보였다. Copepodite 유생 생존율은 전 농도에서 95% 이상으로 나타났다. Nauplius 유생 성장은 0.1, 30 µg l⁻¹에서는 대조군과 비슷하게 나타났으나, 1, 10 µg l⁻¹에서 대조군에 비해 지연되는 것으로 나타났다. 성체 수컷 출현일을 기준으로 한 copepodite 유생 성장은 모든 농도에서 대조군보다 지연되었으며, 특히 1 µg l⁻¹에서는 평균 12.20±2.53일로 대조군 보다 약 1.9일 지연되었다.

E2 F₁의 성비는 30 µg l⁻¹에서는 수컷이 93.94%로 매우 높게 나타났으나, 그 이외의 농도에서는 대조군과 유의적

차이를 보이지 않았다(Table 2). 포란율은 농도에 상관없이 전 농도에서 90% 이상으로 높게 나타났다. 최초 포란일은 모든 실험군이 대조군보다 지연되는 것으로 나타났으며, 1 µg l⁻¹에서 18.35±4.91일로 가장 늦은 포란일을 보였다.

E2 F₁ 암컷의 체장 역시 모든 농도에서 대조군보다 작게 나타났으며, 특히 30 µg l⁻¹에서 884.14±7.29 µm로 가장 짧은 체장을 보였다. 실험군 중 가장 긴 체장을 보인 10 µg l⁻¹ F₁도 체장 940.11±30.82 µm로 대조군보다 10% 정도 작게 나타났다. 개체 폭에서도 모든 농도에서 대조군과 많은 차이를 보였으며, 이에 따라 전 농도에서 생물량이 대조군보다 매우 적은 것으로 나타났다. 가장 적은 생물량을 보인 농도는 30 µg l⁻¹로 3.72±0.16 µgC로 측정되었으며, 10 µg l⁻¹에서 4.71±0.48 µgC로 가장 높게 나타났으나 이 역시 대조군 생물량의 80% 정도에 불과했다 E2 F₁ 수컷의 체장은 모든 농도에서 대조군과 유사하게 나타났다. 그러나 암컷과 마찬가지로 전 농도에서 개체의 폭이 대조군보다 좁은 것으로 관찰되었고, 이에 따라 생물량도 적게 나타났다. 가장 낮은 생물량은 0.1 µg l⁻¹에서 2.71±0.99 µgC로 대조군의 약 65% 정도로 관찰되었다.

형태 변이

E2에 노출되어 배양된 개체에서 형태적 변이가 관찰되

Table 3. The deformities of *Tigriopus japonicus* s.l. exposed to 17β-estradiol

| Concentrations (µg l ⁻¹) | Deformity types | | | | | |
|-----------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | AE | US | CA | SA | AA | DM |
| 0.1 | - | - | - | - | - | - |
| 1 | F ₁ ♀ (1/18) | - | - | - | - | - |
| 10 | - | F ₀ ♂ (2/28) | F ₀ ♂ (1/28) | - | F ₀ ♂ (1/28) | F ₀ ♂ (3/28) |
| 30 | - | F ₀ ♂ (1/29) | - | F ₀ ♀ (1/1) | - | F ₀ ♂ (1/29) |
| 100 | - | - | - | - | - | F ₀ ♂ (1/17) |

AE: abnormal egg sac, US: urosome shrink or swelling, CA: caudal rami and seta abnormal, SA: seta absence, AA: abnormal antennule, DM: dwarfism, parenthesis: abnormal individuals/observed individuals

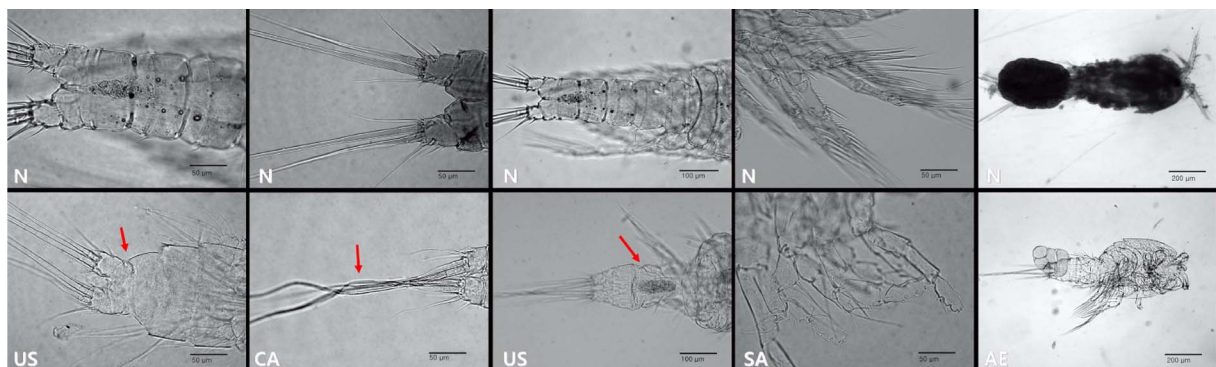


Fig. 1. The morphological deformities in *Tigriopus japonicus* s.l. exposed to 17β-estradiol. N: normal type in control conditions, US: urosome shrink or swelling, CA: caudal rami and seta abnormal, SA: seta absence, AE: abnormal egg sac

었다(Table 3; Fig. 1). E2 10 $\mu\text{g l}^{-1}$ 에서 꼬리마디(caudal rami)가 비정상적인 형태로 성장한 수컷 개체가 발견되었는데, 이 개체는 정상적인 *T. japonicus s.l.*의 형태와는 달리 항문마디(anal somite)와 복부(urosome)의 접합 부위가 비정상적으로 합몰되어 잘록한 형태를 띠고 있으며, 꼬리마디가 양쪽으로 심하게 벌어진 형태를 보였다. 또 다른 개체는 복부가 두흉부(prosome)에 비해 상대적으로 폭이 좁고, 제 1더듬이(antennule)가 매우 크게 발달하였으며, 꼬리마디의 5번째 강모(caudal rami seta V)가 비정상적으로 구불거리는 형태를 하고 있다. 그리고 복부의 3번째 마디와 4번째 마디 사이가 잘록한 형태를 갖고 있으며, 복부의 4, 5번째 마디가 부풀어 있는 것으로 관찰되었다. 그리고 개체의 크기가 570 μm 정도로 매우 작은 특징도 갖고 있다. E2 30 $\mu\text{g l}^{-1}$ 에서 관찰된 수컷 개체는 모든 부속지의 강모(seta)가 거의 발달되지 않아 이번에 관찰된 형태변이 중 가장 특이한 것으로 판단되었다. 이러한 기형 이외에도 다른 성체와 달리 크기가 매우 작은 개체들도 발견되었다. 이 개체들은 체장이 500~600 μm 내외로 매우 작으며, 복부가 상대적으로 잘 발달되지 않았으며, 큐티클(cuticle) 층이 얇은 것으로 관찰되었는데, 이러한 개체들은 주로 10 $\mu\text{g l}^{-1}$ 이상 농도에서 관찰되었다. E2 F₁은 부모세대에서 많은 기형 개체가 발견된 것과는 다르게 특별한 형태변이는 발견되지 않았으나, 일부 암컷에서 비정상적인 egg sac을 포란한 경우가 관찰되었다.

4. 고 찰

본 연구에서는 17 β -estradiol (E2)에 직접 노출되지 않은 자녀세대(F₁) 1 $\mu\text{g l}^{-1}$ 에서만 생존율의 감소가 있었을 뿐 대부분의 농도에서 E2는 *Tigriopus japonicus s.l.*의 생존에 영향을 주지 않았다. 이러한 결과는 *T. japonicus*를 대상으로 한 Marcial et al. (2003)의 연구, *T. battagliai*에 대한 Hutchinson et al. (1999a, 1999b)의 연구 및 부유성 요각류 *Eurytemora affinis*에 대한 Forget-Leray et al. (2005)의 연구결과와 유사하다. E2에 대한 *T. japonicus*의 48-h LC50은 3.35 mg l^{-1} (3.29-3.41 mg l^{-1})로 매우 높은 것으로 알려져 있으며, NOEC 역시 1.0 mg l^{-1} 로 일반적인 생태계에서 관찰하기 어려운 고농도이다(Marcial et al. 2003). 따라서 고농도의 천연에스트로겐에 노출되었을 때 *T. japonicus*의 생존율이 감소할 수 있으나, 일반적인 하천 및 연안에서 조사된 농도 범위에서는 생존율이 거의 영향을 받지 않는다고 할 수 있다.

요각류는 부화 후 성체가 되기까지 여러 번의 탈피와 한 번의 변태를 거쳐 성장하며, 이 과정은 곤충의 탈피호르몬으로 많이 알려진 엑디스테로이드(ecdysteroids)에 의해 조절된다(Block et al. 2003). 내분비계장애물질은 엑디

스테로이드와 구조적 유사성으로 인해 성장을 교란시킬 수 있다(Hasegawa et al. 1993; Fingerman 1997). 이번 연구에서도 *T. japonicus s.l.*의 성장은 E2에 영향을 받는 것으로 나타났으며, 특히 1.0 $\mu\text{g l}^{-1}$ 이하에서는 nauplius 유생과 copepodite 유생 모두 대조군에 비해 성장이 지연되는 것으로 나타났다. 이 결과는 1.0 $\mu\text{g l}^{-1}$ 에서 nauplius 유생의 성장이 지연된 Marcial et al. (2003)의 연구와 일치하였다. F₁의 경우 nauplius 유생은 1.0, 10 $\mu\text{g l}^{-1}$ 에서 성장 지연이 나타났으며, copepodite 유생은 모든 농도에서 성장이 지연된 것으로 관찰되었다. 이러한 내분비계장애물질의 성장지연 효과는 benzo(a)pyrene이 *T. japonicus s.l.* 유생의 성장을 지연시킨다는 Bang et al. (2009)의 연구와 살충제 Fipronil이 *Amphiascus tenuiremis*의 성장속도를 지연시키며 저농도에서 수컷의 생식 능력을 떨어뜨린다는 보고(Chandler et al. 2004), 내분비계장애물질에 의해 *E. affinis*의 nauplius 유생의 성장이 느려진다는 연구(Forget-Leray et al. 2005) 등 이전 연구에서도 나타나고 있다. 그러나 10 $\mu\text{g l}^{-1}$ 이상 농도에서는 nauplius 유생의 성장은 촉진되어, F₀ 세대의 30 $\mu\text{g l}^{-1}$ 에서는 copepodite 유생 출현일이 대조군에 비해 약 0.6일 빠른 것으로 나타났다. 또한 F₁ 세대에서도 1.0 $\mu\text{g l}^{-1}$ 에서 copepodite 출현일이 5.78일로 가장 느린 성장을 보였으나 농도가 높아질수록 다시 성장이 빨라져 30 $\mu\text{g l}^{-1}$ 에서는 대조군 nauplius 유생과 유의적 차이를 보이지 않았다. 하지만 두 세대의 모든 노출 실험에서 개체의 생물량은 대조군에 비해 작은 것으로 나타났다(Table 2). 이는 E2에 노출된 개체는 일부 고농도에서 성장이 촉진될 수 있지만, 정상적인 개체 크기로 성장을 하지 못한다고 할 수 있을 것이다.

Cary et al. (2004)은 *A. tenuiremis*가 저농도의 스테로이드 호르몬에 노출 시 수컷의 vitellogenin이 유발되며, 생식능력이 저하됨을 보고하였고, Chandler et al. (2004)은 저농도의 내분비계 교란물질이 수컷의 생식 능력을 떨어뜨린다고 하였으며, Bang et al. (2009)은 고농도의 benzo(a)pyrene에 노출된 *T. japonicus s.l.*의 포란율이 매우 낮아지는 것을 확인한 바 있다. 반면 다른 연구에서는 내분비계장애물질에 의한 요각류의 포란율, 부화율 등 생식능력 저하현상을 찾아볼 수 없는 경우도 있었으며(Brown et al. 2003; Marcial et al. 2003; 방 등 2008a), 천연/합성 에스트로겐이 요각류 성비에 영향을 주지 않는다고 하였다(Marcial et al. 2003; Bechman 1999; Hutchinson et al. 1999a, 1999b). 그러나 이번 연구에서는 F₀에서 10 $\mu\text{g l}^{-1}$ 이상 농도에서 수컷의 발생비율이 매우 높은 것으로 나타났으며, F₁에서도 30 $\mu\text{g l}^{-1}$ 에서 90% 이상의 높은 수컷 출현 비율을 보였다. 이전 연구와 다른 결과를 보인 이유는 각 실험 중 및 실험 물질 간 차이일 것으로 추측되나 정확한 결론을 위해서는 추가적인 연구가 필요하다.

이번 연구에서는 E2에 노출된 *T. japonicus* s.l.의 생존, 성장, 성비 등의 변화뿐 아니라 형태적인 변이도 관찰 할 수 있었다. 발생된 형태변이 중 대표적인 것은 왜소증 (dwarfism)과 복부 기형이다. 왜소증은 10 $\mu\text{g l}^{-1}$ 이상 농도에서 수컷에서만 관찰되었다. 왜소증 개체는 대조군보다 70% 이하의 체장과 절반 이하의 생물량을 갖으며, 이 중 몇몇 개체는 성장 속도가 대조군에 비해 2배 이상 느리게 나타났다. 복부 이상은 복부의 중간 부분이 함몰되어 있거나 전체적으로 대조군보다 얇게 나타나거나, 복부의 끝 부분인 항문마디가 비정상적으로 부풀어있는 형태를 지닌 것이다. 이 이외에도 제1더듬이, 꼬리마디와 강모 등의 변이를 찾아 볼 수 있었다. 그리고 또 하나 특이한 것은 개체에 직접 나타나는 현상은 아니지만, 비정상적인 egg sac을 포란하는 것이다. 비정상적인 egg sac을 포란하고 있는 것은 대조군에서는 거의 찾아 볼 수 없었으나, 각 처리 농도에서는 비정상적인 egg sac을 포란한 개체를 발견할 수 있었다.

수서 무척추동물의 기형을 이용한 생태 지표 개발을 위한 노력이 계속되고 있지만(Milbrink 1983; Warwick 1989; Dickman et al. 1990; Kwak and Lee 2005, 2007), 아직까지 요각류를 대상으로 형태학적 관찰을 한 연구는 거의 되어있지 않다(Bang et al. 2009). 이전부터 몇몇 연구자들은 요각류를 포함한 갑각류에서 간혹 발견되는 간성현상(intersexuality)을 생태 지표의 하나로 제시하기도 하였다(Moore and Stevenson 1991, 1994; Gross et al. 2001; Yamashita et al. 2001). 이전에도 저서성 요각류에서도 간성 현상은 드물지만 발견되어지고 있었으나(Klie 1944; Huys and Gee 1993), 대부분의 신종 기재 과정 중에 발견되어 발표되는 것이 대부분이었다. 하지만 Moore and Stevenson (1991)은 영국 연안에서 채집한 저서성 요각류 *Paramphiascella hyperborea*에서 90% 이상의 높은 간성 현상을 발견하였다. 이렇게 높은 간성을 보인 이유는 오수 배출과 같은 오염 때문인 것으로 추측만 하였을 뿐 그에 대한 추가 실험은 이루어지지 않았다. 이번 연구에서 내분비계장애물질이 저서성 요각류의 기형을 유도한다는 사실을 확인할 수 있었으며, 추후 지속적인 연구를 통해 오염에 대한 형태 변이 자료를 축적하여 이를 바탕으로 저서성 요각류의 형태적 변이를 이용한 오염 판단 기준을 세울 수 있을 것이라 기대된다.

전생애(full life cycle) 시험은 중금속, 내분비계장애물질 등 오염원의 영향을 판단하기 위해 가장 이상적인 방법으로(DeFur et al. 1999; Barata et al. 2004), 요각류에서도 최소한 F₀ 세대 nauplius 유생 I 단계부터 F₁ 세대 nauplius 유생 I 단계까지 전생활사에 대한 연구가 필수적이다(Pound et al. 2002). 요각류의 단계별 배양 독성실험을 통하여 nauplius가 성체보다 생존율에서 28배나 민감

하고, 수컷이 암컷에 비해 2배 이상 높은 반응을 보였으며(Green et al. 1996; Barata et al. 2002), 독성 처리 시 F₀ 세대 보다 F₁ 세대가 독성에 훨씬 민감한 것으로 나타나고(방 등 2008b), 내분비계장애물질에 노출된 F₀ 세대는 고농도에서, F₀ 세대는 모든 농도에서 출산이 저해되는 등(Bejarano and Chandler 2003) 세대별·발생단계별 반응 차이에 대해 다양하게 보고되었다. 이러한 이유로 최근 세대간 장기 독성 실험이 늘어나고 있으며(Bejarano and Chandler 2003; Marcial et al. 2003; Cary et al. 2004; Chandler et al. 2004; 방 등 2008b), OECD에서도 장기 독성 실험을 필수적으로 권장하고 있다(OECD 2005).

이번 연구를 통해 17 β -estradiol에 직접 노출된 개체뿐 아니라 직접 노출되지 않은 그 자손까지 영향을 미칠 수 있음을 확인 하였으며, 요각류를 이용한 독성평가 시 생존, 성장, 생식 뿐 아니라 형태적 변이를 이용한 연구도 가능성을 제시하였다.

사 사

이 논문은 2009년 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구입니다(NRF-2009-351-C00152).

참고문헌

- 방현우, 이원철, 이승한, 광인실 (2008a) 4-nonylphenol에 노출된 저서성 요각류 *Tigriopus japonicus* s.l.의 생활사, 형태와 유전자 발현. 하천호수학회지 **41**:81-89
- 방현우, 이원철, 광인실 (2008b) 4-nonylphenol에 노출된 암컷 저서성 요각류 *Tigriopus japonicus* s.l.에서 부화한 자손의 생태독성 반응. 하천호수학회지 **41**:90-97
- 방현우, 이원철, 광인실 (2008c) 4-tert-octylphenol에 노출된 저서성 요각류 *Tigriopus japonicus* s.l.의 발생지연 현상. 환경독성학회지 **23**:93-100
- 방현우, 이창훈, 정경숙, 광인실 (2008d) 4-tert-octylphenol에 노출된 장수갈따구 *Chironomus plumosus*의 생태독성 반응과 기형. 환경독성학회지 **23**:231-349
- 이병천, 이지호, 김현영, Duong CN, 나진성, 장남익, 김현구, 김상돈 (2007) 국내 5 하수처리장에서 E-screen과 Yeast two-hybrid assay에 의한 에스트로겐 활성도와 내분비계장애물질 농도의 평가. 대한환경공학회지 **29**: 1145-1153
- 환경부 (2000) 내분비계장애물질이란. http://www.me.go.kr/kor/info/info_view.jsp?gubun=3&code=A10601&inpymd=20000719163443. Accessed 19 Jul 2000
- Andersen HR, Halling-Sørensen B, Kusk KO (1999) A parameter for detecting estrogenic exposure in the copepod *Acartia tonsa*. Ecotoxicol Environ Saf **44**:56-61
- ASTM-American Society for Testing and Materials (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
- Bang HW, Lee W, Kwak IS (2009) Detecting points as developmental delay based on the life-history development and urosome deformity of the harpacticoid copepod, *Tigriopus japonicus sensu lato*, following exposure to benzo(a)pyrene. *Chemosphere* **76**:1435-1439
- Barata C, Medina M, Telfer T, Baird DJ (2002) Determining demographic effects of cypermethrin in the marine copepod *Acartia tonsa*: Stage-specific short tests versus life-table tests. *Arch Environ Con Tox* **43**:373-378
- Barata C, Porte C, Baird DJ (2004) Experimental designs to assess endocrine disrupting effects in invertebrates-A review. *Ecotoxicology* **13**:511-517
- Bechmann RK (1999) Effect of the endocrine disrupter nonylphenol on the marine copepod *Tisbe battagliai*. *Sci Total Environ* **233**:33-46
- Bejarano AC, Chandler GT (2003) Reproductive and developmental effects of atrazine on the estuarine meiobenthic copepod *Amphiascus tenuiremis*. *Environ Toxicol Chem* **22**:3009-3016
- Block DS, Bejarano AC, Chandler GT (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
- Brown RJ, Rundle SD, Hutchinson TH, Williams TD, Jones MB (2003) A copepod life-cycle test and growth model for interpreting the effects of lindane. *Aquatic Toxicol* **63**:1-11
- Cary TL, Chandler GT, Volz DC, Walse SS, Ferry L (2004) Phenylpyrazole insecticide fipronil induces male infertility in the estuarine meiobenthic crustacean *Amphiascus tenuiremis*. *Environ Sci Technol* **38**:522-528
- Chandler GT, Cary TL, Volz DC, Spencer SS, Ferry JL, Klosterhaus SL (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
- DeFur PL, Crane M, Ingersoll C, Tattersfield L (1999) Endocrine Disruption in Invertebrates: Endocrinology, Testing and Assessment. Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Pensacola, FL, USA, 303 p
- DeFur PL (2004) Use and role of invertebrate models in endocrine disrupter research and testing. *ILAR J* **45**:484-493
- Dickman M, Lan Q, Matthews B (1990) Teratogens in the Niagara River watershed as reflected by chironomid (Diptera: Chironomidae) labial plate deformities. *Water Pollut Res J Can* **24**:47-79
- Fingerman M (1997) Crustacean endocrinology: a retrospective, prospective, and introspective analysis. *Physiol Zool* **70**:257-269
- Forget-Leray J, Landriau I, Minier C, Leboulenger F (2005) Impact of endocrine toxicants on survival, development, and reproduction of the estuarine copepod *Eurytemora affinis*. (Poppe). *Ecotoxicol Environ Saf* **60**:288-294
- Green AS, Chandler GT, Piegorsch WW (1996) Life-stage-specific toxicity of sediment-associated chlorpyrifos to a marine, infaunal copepod. *Environ Toxicol Chem* **15**:1182-1188
- Gross MY, Maycock DS, Thorndyke MC, Morrith D, Crane M (2001) Abnormalities in sexual development of the amphipod *Gammarus pulex*(L.) found below sewage treatment works. *Environ Toxicol Chem* **20**:1792-1797
- Hall LW, Ziegenfuss MC, Anderson RD, Lewis BL (1995) The effect of salinity on the acute toxicity of total and free cadmium to a Chesapeake Bay copepod and fish. *Mar Pollut Bull* **30**:376-384
- Hasegawa Y, Hirose E, Katakura Y (1993) Hormonal control of sexual differentiation and reproduction in Crustacea. *Am Zool* **33**:403-411
- Henderson IC (1993) Risk factors for breast cancer development. *Cancer* **71**:2127-2140
- Higgins RP, Thiel H (1988) Introduction to the study of meiofauna. Smithsonian Institution Press, Washington D.C. 488 p
- Hutchinson TH, Pounds NA, Hampel M, Williams TD (1999a) Impact of natural and synthetic steroids on the survival, development and reproduction of marine copepods (*Tisbe battagliai*). *Sci Total Environ* **233**:167-179
- Hutchinson TH, Pounds NA, Hampel M, Williams TD (1999b) Life-cycle studies with marine copepods (*Tisbe battagliai*) exposed to 20-hydroxyecdysone and diethylstilbestrol. *Environ Toxicol Chem* **18**:2914-2920
- Huys R, Gee JM (1993) A revision of *Danielssenia* Boeck and *Psammis* Sars with the establishment of two new genera *Archisenia* and *Bathypsammis* (Harpacticoida: Paranannopidae). *Bull nat Hist Mus (Zool)* **59**:45-81
- ISO-International Organization for Standardisation (1997) Water quality-determination of acute lethal toxicity to marine copepods (Copepoda, Crustacea). In: Draft International Standard ISO/DIS 14669, Genève, Switzerland
- Johnson AC, Aerni HR, Gerritsen A, Gibert M, Giger W, Hylland K, Jürgens M, Nakari T, Pickering A, Suter

- MJF, Svenson A, Wettstein FE (2005) Comparing steroid estrogen, and nonylphenol content across a range of European sewage plants with different treatment and management practices. *Water Research* **39**:47-58
- Klie W (1944) Ein gynandromorpher. *Amphiascus* (Cop. Harp.) von Helgoland. *Zoologischer Anzeiger* **145**:77-79
- Kusk KO, Wollenberger L (1999) Fully defined saltwater medium for cultivation of and toxicity testing with marine copepod *Acartia tonsa*. *Environ Toxicol Chem* **18**:1564-1567
- Kusk KO, Wollenberger L (2007) Towards an internationally harmonized test method for reproductive and developmental effects of endocrine disrupters in marine copepods. *Ecotoxicology* **16**:183-195
- Kwak IS, Lee W (2005) The Mentum deformity of *C. plumosus* following exposure to endocrine disruption chemicals. *Korean J Limnol* **38**:11-17
- Kwak IS, Lee W (2007) The Mentum deformity of *C. plumosus* following exposure to Bisphenol A and 4-nonylphenol. *Korean J Environ Biol* **25**:66-71
- Kwok KWH, Leung KMY (2005) Toxicity of antifouling biocides to the intertidal harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus* (Crustacea, Copepoda): Effects of temperature and salinity. *Mar Pollut Bull* **51**:830-837
- LeBlanc GA (2007) Crustacean endocrine toxicology: a review. *Ecotoxicology* **16**:61-81
- Marcial HS, Hagiwara A, Snell TW (2003) Estrogenic compounds affect development of harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus*. *Environ Toxicol Chem* **22**:3025-3030
- McAllen R, Taylor AC (2001) The effect of salinity change on the oxygen consumption and swimming activity of the high-shore rockpool copepod *Tigriopus brevicornis*. *J Exp Mar Biol Ecol* **263**:227-240
- Milbrink G (1983) Characteristic deformities in tubificid oligochaetes inhabiting polluted bays of lake Vanern, Southern Sweden. *Hydrobiologia* **106**:169-184
- Moore CG, Stevenson JM (1991) The occurrence of intersexuality in harpacticoid copepods and its relationship with pollution. *Mar Pollut Bull* **22**:72-74
- Moore CG, Stevenson JM (1994) Intersexuality in benthic harpacticoid copepods in the Firth of Forth, Scotland. *Journal of natural history* **28**:1213-1230
- OECD-Organization for Economic Cooperation and Development (2005) OECD Draft Guidelines for testing of chemicals: Proposal for a new guideline. In: Harpacticoid copepod development and reproduction test. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France
- Oetken M, Bachmann J, Schulte-Oehlmann U, Oehlmann J (2004) Evidence for endocrine disruption in invertebrates. *Int Rev Cyto* **236**:1-43
- Pounds NA, Hutchinson TH, Williams TD, Whiting P, Dinan L (2002) Assessment of putative endocrine disrupters in an in vivo crustacean assay and an in vitro insect assay. *Mar Environ Res* **54**:709-713
- Servos MR, Bennie DT, Burnison BK, Jurkovic A, McInnis R, Neheli T, Schnell A, Seto P, Smyth SA, Ternes TA (2005) Distribution of estrogens, 17 β -estradiol and estrone, in Canadian municipal wastewater treatment plants. *Sci Total Environ* **5**:155-170
- Verslycke T, Ghekiere A, Raimondo S, Janssen C (2007) Mysid crustaceans as standard models for the screening and testing of endocrine-disrupting chemicals. *Ecotoxicology* **16**:205-219
- Warwick WF (1989) Morphological deformities in larvae of *Procladius Skuse* (Diptera: Chironomidae) and their biomonitoring potential. *Can J Fish Aquat Sci* **46**:1255-1270
- Yamashita Y, Okumura T, Yamada H (2001) Intersexuality in *Acanthomysis mitsukurii* (Mysidae) in Sendai Bay, Northeast Japan. *Plankton Biol Ecol* **48**:128-132
- Yoon SJ, Park GS, Oh JH, Park SY (2006) Marine ecotoxicological assessment using the nauplius of marine harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus*. *J Korean Soc Environ Eng* **9**:160-167

Received Aug. 11, 2010

Revised Oct. 18, 2010

Accepted Nov. 4, 2010