

물벼룩 (*Daphnia magna*)에서 내분비계장애물질인 노닐페놀의 영향

조 태 민 · 김 판 기¹ · 김 세 화*

용인대학교 생명과학과, ¹용인대학교 산업환경보건학과

Effects of Endocrine Disruptors, Nonylphenol in *Daphnia magna*

Taemin Cho, Pangyi Kim¹ and Saywa Kim*

Department of Life Science, Yong In University, Yongin 17092, Korea

¹Department of Occupational and Environmental Health, Yong In University, Yongin 17092, Korea

Abstract - Nonylphenol is one of endocrine disruptors, as structurally stable, hydrophobic compounds exhibit high condensability and long-lasting in the natural environment. The purpose of this study was to determine the toxic effects of nonylphenol on *Daphnia magna*. In acute toxicity test, *D. magna* was exposed for 48 h at concentrations of 0, 10, 18, 32, 56 and 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ nonylphenol. In chronic toxicity test, *D. magna* were exposed through water for 21 days at concentrations of 0, 1.0, 1.8, 3.2, 5.6 and 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ nonylphenol. Acute toxicity was assessed on the basis of immobility, while chronic toxicity was assessed on the basis of fecundity. The acute toxicity test on nonylphenol was showed that the values of 24 h and 48 h EC_{50} were 25.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 13.7 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively. In chronic test, fecundity was reduced significantly at 5.6 $\mu\text{g L}^{-1}$ of nonylphenol. These results indicated that nonylphenol have some hazard for acute or chronic toxicity to freshwater invertebrate organism.

Key words: endocrine disruptors, nonylphenol, *Daphnia magna*, acute, chronic

서 론

내분비계장애물질(endocrine disruptors) 또는 EDCs(endocrine disrupting compounds)는 생명체의 정상적인 호르몬 기능에 영향을 주는 합성화학물질이나 천연화학물질을 총칭한다(Choi *et al.* 2007). 환경배출을 통하여 인간의 건강에 미칠 잠재적인 부정적 영향에 의하여 주목 받고 있으며, 호르몬 수용체와 생체신호전달 경로를 방해하여 내분비 기능

을 교란시키는 것으로 알려져 있다(Janicki *et al.* 2015). 내분비계(endocrine system)는 신체의 화학적 조절계로 모든 호르몬 분비세포를 포함하며, 분비되는 호르몬은 혈류를 타고 운반되어 전신활동을 조절하는데 매우 중요하다(Kim *et al.* 2004). 내분비계장애물질은 호르몬계에 영향을 주기 때문에 극미량으로도 생식기능에 이상을 가져올 수 있으며, 급성과 만성 외에 차세대에 영향이 나타날 수 있어 경각심을 일으키고 있다(Choi *et al.* 2007).

내분비계장애물질의 하나인 노닐페놀(Nonylphenol)은 페놀에 탄소수가 9개인 분자사슬이 붙은 화합물로 무색 또는 황색의 열은 색상이며 물과 혼합되지 않는 끈적한 액체로 NPEs(노닐페놀 에톡시레이트)의 원료로 이용되며(Soares *et*

* Corresponding author: Saywa Kim, Tel. 031-8020-2778,
Fax. 031-8020-2886, E-mail. swkim@yongin.ac.kr

al. 2008), 노닐페놀 에톡시레이트는 가정, 농업 및 공업 제품에서 비이온성 계면활성제로 광범위하게 사용된다(Korsman et al. 2015). 노닐페놀은 계면활성제로서의 뛰어난 성능과 효율적인 비용으로 인하여 산업활동에서 주로 사용되며(Soares et al. 2008), 산업 제품 및 폐수에 의하여 방출되는데(Lee et al. 2015), 폐수처리시설의 부족으로 인하여 환경 중에 배출된 노닐페놀은 지표수와 지하수, 퇴적물과 토양 및 대기와 같이 다양한 환경에서 존재한다(Janicki et al. 2015). 노닐페놀은 구조적으로 안정된 소수성 화합물질로 자연환경에서 쉽게 분해되지 않고 높은 지속성과 농축성을 가지고 있어 저농도에서도 장기간 노출로 인한 피해가 예상되는 화합물질이며(Kim et al. 2012), OECD 시험지침에 따른 노닐페놀의 생분해성시험 결과 23~46%의 분해율을 보이는 난분해성물질로 구분되지만, 분해율 자체가 하천이나 호수의 퇴적물에 흡착하는 성질로 인한 제거량일 가능성이 높다는 연구결과도 있다(Kang et al. 2001). 또한, 노닐페놀과 노닐페놀 에톡시레이트는 에스트로겐처럼 작용하여 어류, 양서류, 포유류 등 많은 생물 중에서 내분비계의 교란을 유발하는 것으로 알려져 있다(Zhang et al. 2003; Hwang et al. 2008; Riva et al. 2010; Park and Lee 2011; Park and Bae 2012; Kim and Yoon 2014; Korsman et al. 2015). 2003년부터 유럽연합(EU, European Union)에서는 노닐페놀의 사용을 제한하고 있으며, 미국 환경보호청(EPA, Environmental Protection Agency)에서는 해수와 담수에서의 검출 농도 기준을 제시하며 사용을 제한하고 있다(Soares et al. 2008). 또 일본과 유럽 및 캐나다 등 국가들은 노닐페놀 에톡시레이트를 다른 계면활성제로 대체하고 있으며(Soares et al. 2008), 우리나라에서도 2002년부터 보건복지부의 공중위생관리법에 의하여 세척제의 성분으로 노닐페놀을 사용할 수 없게 되었다(Korea Ministry of Health & Welfare 2013). 그러나 중국, 인도 및 여러 남미 국가들은 아직도 많은 양의 노닐페놀 화합물을 생산하고 있으며(Soares et al. 2008), 우리나라도 공중위생관리법에 세척제는 사람이 먹을 수 있는 과일 등의 세척제, 식기류 등 용기의 세척제, 식품의 가공 및 조리기구의 세척제로 국한되어 있어서 세척제 성분 외에는 사용이 가능하다. 실제로 2014년 환경부에서 발표한 화학물질 배출량 조사결과 2012년에 약 2.1톤이 배출된 것으로 보고되었다(Korea Ministry of Environment 2014). 또 2012년 환경부 실적보고에 의하면 노닐페놀의 취급량은 2010년에 3,800톤, 2009년에 5,500톤으로 보고되어(Korea Ministry of Environment 2012) 화학제품 제조업 등에서 사용되고 있는 것이 확인되었다.

노닐페놀은 국내 환경 내에서 지속적으로 검출되고 있는데, 2003년 서울시 6개 취수장 원수 중의 농도가 0.122~2.724 $\mu\text{g L}^{-1}$ 범위에 있었으며(Ham et al. 2004), 2004년 마산

만 연안 퇴적물 시료에서 8.82~770.91 (평균 149.19) ng g^{-1} wet wt.의 농도를 보였고, 만의 바깥쪽보다 안쪽의 농도 분포가 높았다(Lee et al. 2004). 2004년 발표된 광양만 주변 노닐페놀 화합물 분포 결과에 의하면 광양만 해수에서는 4.0~70.4 ng L^{-1} (평균 20.9 ng L^{-1}), 해양퇴적물에서는 3.1~74.3 ng g^{-1} dry wt. (평균 15.8 ng g^{-1} dry wt.)의 농도를 보였으며, 만의 내해에서 외해로 갈수록 농도가 낮게 조사되었다(Li et al. 2004). 2012년 수영강 표층수에서 142.0~569.0 (평균 271.0) ng L^{-1} 의 분포를 보였으며(Kim et al. 2012), 2013년 부산연안 중 부산북항과 남항, 감천항 및 다대포항에서 선정한 33개 정점의 퇴적물에서 21~2,170 ng g^{-1} 의 범위를 보였으며(Kim et al. 2013). 또 2013년 남해연안 대형 조선소 및 화력발전소 주변 조건대 퇴적물 중 조선소 주변 3개 정점에서 각각 41.28, 35.61, 27.77 ng g^{-1} wet wt.의 농도를 보였으며(Ju et al. 2014). 이처럼 국내 환경 중에서 노닐페놀이 잔류하고 있음이 확인되고 있으며, 환경부 화학물질의 등록 및 평가 등에 관한 법률에 따른 등록대상기존화학물질 510종 중 노닐페놀이 포함되어(Korea Ministry of Environment 2015), 노닐페놀이 수생생태계에 미치는 독성에 대한 명확한 규명의 필요성이 대두되고 있다.

노닐페놀이 수생 생물에 미치는 영향에 관하여 세계적으로 많은 연구가 이루어 지고 있는데, 갑각류에서 발생독성을 유발한다는 보고가 있으며(Leblanc et al. 2000), 얼룩조개(*Dreissena polymorpha*)의 생체 내에 4-노닐페놀이 축적된다는 연구와(Riva et al. 2010) 노닐페놀 이성질체가 물벼룩 체내에 농축된다는 연구도 있다(Preuss et al. 2008). 또, 조류(*Cyclotella caspia*)를 통한 독성 연구에서 96시간 EC_{50} 값이 0.18 mg L^{-1} 로 관찰되었으며, 노닐페놀의 농도가 증가할수록 조류 세포의 성장속도가 감소된다고 보고되었다(Liu et al. 2013). 대서양 연어, 잉어와 같은 어류의 만성독성에 미치는 영향을 관찰한 결과 대조군에 비교하여 어류의 생식에 영향을 미칠 수 있는 에스트로겐 교란 반응이 나타난 것으로 보고되었고(Schwaiger et al. 2000; Robertson and McCormick 2012), 대형담수산새우의 세포에서 면역력에 영향을 미치는 mRNA 발현을 통하여 노닐페놀의 영향을 관찰한 결과 대조군과 비교하여 유의한 차이를 나타냈다(Sung and Ye 2009). 국내에서는 노닐페놀의 영향에 관하여 노래미(*Hexagrammos agrammus*)의 성숙단계 난모세포에서 에스트로겐을 반감시키는 것으로 보고되었으며(Hwang et al. 2008), 바지락(*Ruditapes philippinarum*)의 암컷 특성을 유발시키는 것으로 보고되었다(Park and Lee 2011). 또한 조류의 섭식자인 편모충이나 동물플랑크톤이 조류보다 노닐페놀에 대한 내성이 약하여 섭식자 소멸로 인한 식물플랑크톤 대발생 인자로 노닐페놀이 작용될 수 있다는 연구결과도 보

고되었다(Lee *et al.* 2007). 그러나 지금까지 노닐페놀이 생물에 미치는 독성영향은 주로 어류, 양서류, 포유류를 대상으로 하는 일반독성 및 생식독성 연구가 대부분이며(Hwang *et al.* 2008; Park and Lee 2011; Park and Bae 2012; Kim and Yoon 2014), 생물농축연구와 수생생태 먹이사슬 연구에 기초가 되는 조류나 동물플랑크톤을 대상으로 하는 생태독성 연구는 상대적으로 부족하게 이루어진 것으로 평가된다. 또한 기존 연구에서 보고된 물벼룩을 이용한 독성평가 결과값에서 차이를 보이고 있어(Comber *et al.* 1993; Leblanc *et al.* 2000; Lee *et al.* 2007; Campos *et al.* 2012) 이에 대한 명확한 연구가 요구되고 있다고 판단된다.

물벼룩(*Daphnia magna*)은 지각목의 하나로 전 세계적으로 생태독성 시험에 사용되는 가장 중요한 담수종 중 하나이며(Zhang *et al.* 2003), OECD Test guideline에 따른 화학물질 수생독성시험의 시험생물로 사용되고 있다(OECD 2004). 국내외적으로 생태독성 시험의 공시생물로 널리 사용되고 있어, 물벼룩은 노닐페놀과 같은 내분비계장애물질로 알려진 화학물질의 영향을 평가하기에 유용한 생물이라고 할 수 있다. 따라서, 본 연구에서는 담수산 물벼룩을 대상으로 내분비계장애물질인 노닐페놀에 의한 독성 영향을 알아보고자 급성독성 및 만성독성 실험을 수행하였으며, 수생 생태계 중 1차 소비자에 미치는 명확한 위해성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험생물

본 연구에서 실험생물로 사용한 담수산 물벼룩(*Daphnia magna*, 새각강, 지각목, 물벼룩과)은 한국화학시험연구원에서 분양받아, OECD 시험지침 202번 *Daphnia* sp., Acute Immobilisation test의 사육방법에 준하여 사육하였다(OECD 2004). 물벼룩의 사육을 위하여 수온은 $20 \pm 1^\circ\text{C}$, 광주기는 16 : 8 (light : dark)의 비율로 유지하였고, 배양액은 Elendt M4배지(OECD 2004)를 사용하여 배양하였으며, 먹이는 녹조류인 *Chlorella vulgaris*를 $1 \times 10^5 \sim 10^6$ cells mL^{-1} 의 밀도로 공급하였다. 사육기간 동안 매일 먹이공급여부, 산란여부, 배지교체여부, 개체 사망여부를 확인하였다. 실험에 사용된 물벼룩은 3회 이상 출산한 경험이 있는 어미개체를 통하여 24시간 이내에 태어난 어린 개체를 선별하여 실험에 이용하였다.

2. 시약 및 재료

노닐페놀은 시그마알드리치사(Nonylphenol, $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$,

Sigma-Aldrich Co. LLC. CAS No. 84852-15-3)에서 구매하여 사용하였다. 노닐페놀은 수용해도가 낮아, 에탄올(ethanol, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, Sigma-Aldrich Co. LLC. CAS No. 64-17-5)을 용매로 사용하여 Stock solution을 조제한 후 물벼룩 배양액인 Elendt M4 배지로 희석하여 사용하였다.

3. 급성독성시험

본 연구에서는 OECD 시험지침 202번에 따라 물벼룩에 대한 급성독성시험을 수행하였다. 시험용액을 불활성용기(유리비커)에 100 mL씩 조제 후, 농도별로 4개의 반복구를 설정하고 각 반복구에 물벼룩을 5마리씩 노출하여 시험농도당 20마리의 물벼룩을 이용하였다. 수온 및 조도의 실험환경 조건은 물벼룩 사육조건과 동일하게 설정하였으며, 시험기간 동안 먹이의 급여는 실시하지 않았다. 노출시간은 48시간으로 설정하였고, 노출 후 24시간 및 48시간 경과 후 개체를 관찰하여 유영저해를 확인하였다. 유영저해는 실험용기를 살짝 흔들고 약 15초 후에 관찰하여 일부기관(촉각, 후복부 등)은 움직이지 않거나 유영하지 못하는 경우를 유영저해로 판단하였다(OECD 2004). 시험물질의 농도는 예비시험을 통하여 결정된 대조군(0), 10, 18, 32, 56, 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (nominal concentration)로 설정하였으며, 공비는 1.78로 정하였다. 환경 중에서 농도가 절반으로 줄어드는데 약 48시간이 소요되는 것으로 조사되어(National Institute of Environmental Research 2011), 노출 24시간 경과 시 시험용액을 교환하는 반수시식으로 설정하여 4회 반복 실험하였다. 반수영향농도(EC_{50})를 구하기 위한 통계방법은 US EPA에서 제공하는 Probit 및 TSK (Trimmed Spearman-Kärber Method) 통계법을 이용하였으며(US EPA 2002), 무영향관찰농도(NOEC)도 산출하였다. 물벼룩의 일령 별 급성독성수준 차이와 변화를 관찰하기 위하여 생후 7일 사이의 일령 별 물벼룩 중 생후 24시간이내, 2일차, 4일차, 7일차 개체를 이용하여 급성독성시험과 동일한 실험조건으로 실험을 실시하였다.

4. 만성독성시험

만성독성시험은 OECD 시험지침 211번에 따라 생후 24시간 미만의 어린 개체를 선별하여 21일간 실시하였다(OECD 1998). 만성독성시험의 시험농도는 급성독성시험을 통하여 산출된 EC_{10} 값인 $10 \mu\text{g L}^{-1}$ 를 최고농도로 하였으며, 공비는 1.78로 정하고 대조군(0), 1.0, 1.8, 3.2, 5.6, $10 \mu\text{g L}^{-1}$ 의 농도(nominal concentration)로 설정하였다. 시험용액은 불활성용기(유리비커)에 50 mL씩 조제하고, 각 농도당 10개의 반복구를 설정하였으며, 반복구 당 1마리의 물벼룩을 노출하여, 농도 당 총 10마리를 사용하였다(Kim *et al.* 2010). 수온

및 조도는 사육조건과 동일하게 설정하였으며, 먹이는 매일 *Chlorella vulgaris*를 1×10^5 cells mL⁻¹ 밀도로 공급하였다 (Kim *et al.* 2010). 시험용액은 48시간에 한번 전량 교환하였으며 (Comber *et al.* 1993), 총 실험기간은 21일로 설정하였다. 생식능력에 미치는 영향을 파악하기 위하여 어미개체가 첫 출산까지 걸린 시간, 어미개체의 평균출산 횟수를 관찰하고, 매일 각 어미개체로부터 태어난 어린 개체를 계수하고 기록하여 총 출산된 새끼 물벼룩의 개체수와 어미개체 당 평균 출산 개체수를 조사하였다. 어린 개체는 계수 즉시 제거하였으며, 어미개체가 사망한 경우도 기록하여 생존율도 관찰하였다. 실험종료일에는 실체현미경 (OLYMPUS SZ40)을 이용하여 어미개체를 관찰하고 체장을 측정하여 노닐페놀이 어미개체의 성장에 미치는 영향도 관찰하였다. 결과의 산출은 21일간의 실험기간 종료 후 번식능력에 대한 NOEC 및 LOEC는 결과가 정규분포하는 경우 실험군의 반복수에 따라 물벼룩의 생식능력과 관련하여 총 출산한 새끼 수, 어미개체의 평균 출산횟수, 각 실험군 별 첫 출산일을 기준으로 Dunnett's Test 통계법을 이용하여 산출하였다.

5. 표준물질시험

시험에 사용된 물벼룩이 유해물질에 일정한 민감도를 유지하는지 확인하기 위하여 표준지표독성시험을 실시하였다. 본 연구에서는 OECD 시험지침 202번에서 제시한 중크롬산칼륨 (Potassium dichromate, K₂Cr₂O₇, Wako Chemical Ind. Ltd.)를 표준지표물질로 사용하여 급성독성시험을 수행하였으며, OECD에 근거하여 급성독성시험과 동일한 시험방법과 시험절차를 설정하였다. OECD에 의하면, 24시간 EC₅₀이 0.6 mg L⁻¹~2.1 mg L⁻¹범위 내에 있도록 권장한다 (OECD 2004). 3회 반복하여 실험한 결과 24시간 EC₅₀ 값이 1.33 mg L⁻¹~1.52 mg L⁻¹로 OECD에서 정한 기준에 만족함을 확인하였다 (Table 1).

결 과

1. 급성독성시험

급성독성시험은 유영저해를 End point로 하여 24시간 및 48시간 동안 급성독성을 평가하였다. 노출 24시간 경과 후 18 µg L⁻¹의 농도부터 유영저해가 관찰되었다. 최고농도인 100 µg L⁻¹과 56 µg L⁻¹의 농도에서는 모든 개체가 움직임이 없는 사망 상태를 보였다. 48시간이 경과 후 유영저해를 관찰한 결과 최저농도인 10 µg L⁻¹에서 20%의 유영저해가 관찰되었고, 18 µg L⁻¹의 농도에서는 95%의 유영저해가 관찰

Table 1. Acute toxicity of potassium dichromate to *D. magna*

Organism	Exposed period (hour)	EC ₅₀ (mg L ⁻¹)			Mean	SD
		1	2	3		
<i>Daphnia magna</i>	24	1.52	1.33	1.47	1.44	0.08
	48	0.79	0.94	1.19	0.97	0.16

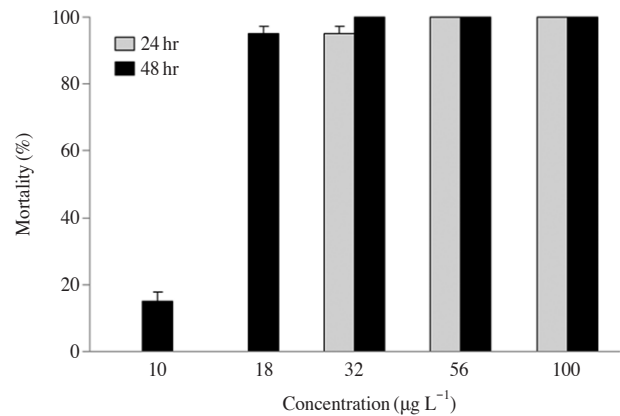


Fig. 1. Acute toxicity of nonylphenol to *D. magna*. The data are expressed as the mean \pm SD.

Table 2. Result of acute toxicity test with *D. magna* exposed to nonylphenol

Organism	Exposed period (hour)	EC ₅₀ (µg L ⁻¹)	NOEC (µg L ⁻¹)
		(95% Confidence interval)	
<i>Daphnia magna</i>	24	25.0 (23.0~26.0)	18.0
	48	13.7 (12.9~14.7)	<10.0

되었으며, 32, 56, 100 µg L⁻¹의 농도군에서는 모든 개체가 유영저해를 보여 유영저해율은 용량의존적 증가를 나타냈다 (Fig. 1). 24시간 경과 시 EC₅₀ 값은 25 µg L⁻¹이었고, 48시간 경과 시 EC₅₀ 값은 13.7 µg L⁻¹로 나타났다 (Table 2). 물벼룩의 일령 별 독성수준을 관찰하고자 실시한 실험의 결과 일령 증가에 따른 48시간 EC₅₀ 값은 13.7~17.0 µg L⁻¹로 독성수치의 변동폭은 크지 않았다 (Fig. 2).

2. 만성독성시험

1) 노닐페놀이 생존이 미치는 영향

대조군과 같이 1.0 µg L⁻¹부터 3.2 µg L⁻¹까지 물벼룩의 생존률은 100%였으며, 5.6 µg L⁻¹에서 사망개체가 관찰되어 90%의 생존률을 보였고, 10 µg L⁻¹에서도 사망개체가 발생하여 90% 생존률을 보였다. 평균 수명에 있어서는 3.2 µg L⁻¹까지 21일, 5.6 µg L⁻¹에서 20.9일 10 µg L⁻¹에서 20.8일로 나타나 대조군의 21일과 유의한 차이를 보이지 않았다

(Table 3).

2) 노닐페놀이 생식능에 미치는 영향

어미개체의 첫 출산까지 평균적으로 걸리는 시간은 대조군에서 8.1일로 관찰되었으며, 각 농도군에서는 $1.0 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서 8.5일, $1.8 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서 8.9일, $3.2 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서 10.9일로 관찰되었고, $5.6 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서 11.3일, $10 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서는 16.0일이 소요되었다. 어미개체의 평균 출산횟수는 대조군에서 6.1회로 관찰되었으나, $5.6 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서는 2.4회, $10 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서는 0.3회를 출산하여 대조군과 유의한 차이를 보였으며, 최저농도인 $1.0 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서 7.3회로 대조군보다 출산횟수가 증가되었다(Table 4). 각 실험군별로 21일 동안 생산된 새끼 물벼룩의 총 마리수는 대조군 647마리, $1.0 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서 739마리, $1.8 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서 653마리, $3.2 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서 444마리, $5.6 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서 105마리, $10 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서는 3마리가 관찰되어 시험물질의 농

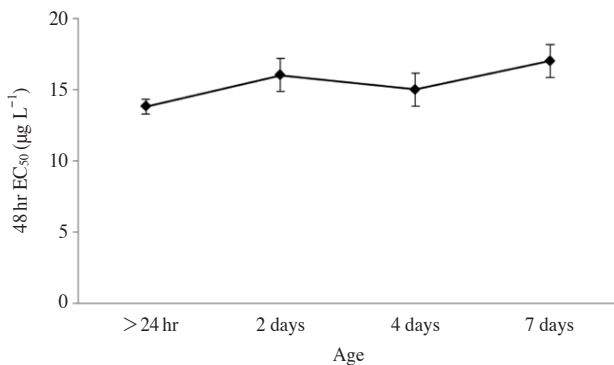


Fig. 2. Age dependent variation of 48 h EC₅₀ value (with 95% confidence interval) of nonylphenol in *D. magna*. The data are expressed as the mean \pm SD.

Table 3. Survival rate of 21 days chronic toxicity test with *D. magna* exposed to nonylphenol

Parameter	Concentration ($\mu\text{g L}^{-1}$)					
	Control	1.0	1.8	3.2	5.6	10
Survival rate (%)	100	100	100	100	90	90
Longevity (day)	21.0	21.0	21.0	21.0	20.9	20.8

도가 증가할수록 감소하는 경향을 보였으며, 특히 $5.6 \mu\text{g L}^{-1}$ 이상의 농도부터는 새끼 물벼룩의 개체수가 대조군의 절반 이하의 수준으로 급격하게 감소하였다(Fig. 3). 실험종료 시 생존한 어미개체 당 출산된 새끼의 수는 대조군에서 64.7마리로 OECD 시험지침 211번에서 제시한 실험의 성립 요건인 60마리 이상에 충족되었으며(OECD 1998), $5.6 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서 11.7마리, $10 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서 0.3마리로 대조군과 유의한 차이가 관찰되었다(Table 4).

3) 노닐페놀이 성장에 미치는 영향

21일간의 실험 종료 후 어미개체의 평균 체장은 대조군에서 $4.1 \pm 0.5 \text{ mm}$ 로 측정되었다. 실험군에서는 $1.0 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서 $3.7 \pm 0.4 \text{ mm}$, $1.8 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서 $4.1 \pm 0.7 \text{ mm}$, $3.2 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서 $3.6 \pm 0.5 \text{ mm}$, $5.6 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서 $3.3 \pm 0.6 \text{ mm}$, $10 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서 $3.2 \pm 0.4 \text{ mm}$ 로 대조군과 비교하였을 때, $5.6 \mu\text{g L}^{-1}$ 이상의 농도부터 성장속도가 대조군에 비해 저해되는 것을 관찰하였다(Table 4).

4) 만성독성시험의 NOEC 및 LOEC 값

물벼룩의 생식능력과 관련하여 21일 동안의 총 출산한 새끼 수, 어미개체의 평균 출산횟수, 각 실험군 별 첫 출산일을 기준으로 Dunnett's Test 통계법을 사용하여 산출한 NOEC와 LOEC는 각각 모두 NOEC는 $3.2 \mu\text{g L}^{-1}$ 이며, LOEC는 $5.6 \mu\text{g L}^{-1}$ 로 나타났다(Table 5).

고 찰

본 연구에서는 물벼룩을 대상으로 노닐페놀이 노출시켜 급성독성시험 및 만성독성시험을 실시하여 수생생태계에 미치는 영향을 파악하고자 하였다. 급성독성시험의 결과 유영저해율은 용량의존적 증가를 보였으며(Fig. 1), 24시간 경과 시 EC₅₀ 값은 $25 \mu\text{g L}^{-1}$ 이었고, 48시간 경과 시 EC₅₀ 값은 $13.7 \mu\text{g L}^{-1}$ 로 나타났다(Table 2). 이러한 결과는 물벼룩을 이용한 노닐페놀의 독성에 관한 기존 연구에서 보고된 96시간 EC₅₀ 값인 $7.61 \mu\text{g L}^{-1}$ 와 유사한 수준인 것으로 나타났으

Table 4. Reproduction result of 21 days chronic toxicity test with *D. magna* exposed to nonylphenol

Parameter	Concentration ($\mu\text{g L}^{-1}$)					
	Control	1.0	1.8	3.2	5.6	10
Day to first brood	8.1	8.5	8.9	10.9	11.3*	16.0*
No. produced brood	64.7	73.9	65.3	44.4	11.7*	0.3*
Total offspring/adult	6.1	7.3	5.8	5.3	2.4*	0.3*
Growth length (mm)	4.1 ± 0.5^a	3.7 ± 0.4	4.1 ± 0.7	3.6 ± 0.5	$3.3 \pm 0.6^*$	$3.2 \pm 0.4^*$

*Significantly different from control ($P < 0.05$, T-test)

^aMean \pm standard deviation.

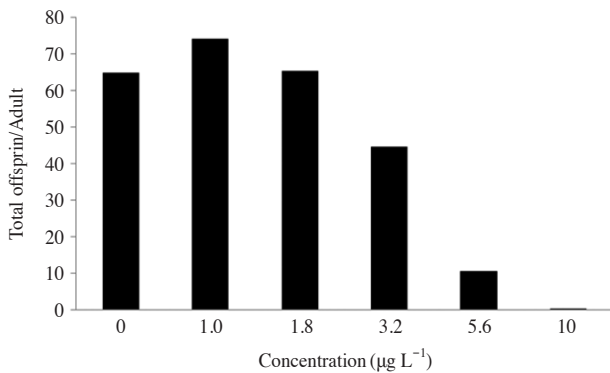


Fig. 3. Fecundity of *D. magna* exposed to nonylphenol for 21 days.

Table 5. Result of 21 days chronic toxicity test with *D. magna* exposed to nonylphenol

Toxicity (End point)	21-days NOEC ($\mu\text{g L}^{-1}$)	21-days LOEC ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Chronic toxicity	3.2	5.6

나(Lee *et al.* 2007), 48시간 EC_{50} 값인 0.19 mg L^{-1} 와는 차이를 보였다(Comber *et al.* 1993). 노닐페놀에 21일간 노출시켰을 때 대조군에서 어미개체의 생존율은 100%를 보였으며, 이는 OECD 시험법 211번의 시험 성립조건인 대조군에서 어미개체의 사망률이 20%를 초과하지 않는다는 조건에 만족하였다(OECD 1998). 만성독성시험의 결과 실험종류 시험점에서 고농도 실험군의 어미개체에서 사망이 관찰되었으나 대조군과 비교하였을 때 사망률에는 뚜렷한 영향을 보이지 않았다. 어미개체가 첫 출산까지 소요된 시간은 대조군에서 평균 8.1일로, 이 결과는 앞선 연구에서 보고된 대조군의 첫 출산일인 평균 8일과 유사한 경향이 관찰되었고(Comber *et al.* 1993), 고농도 실험군에서는 대조군과 비교하여 2배이상 시간이 경과하였으며, 어미개체 당 출산된 평균 어린개체의 수는 최저실험농도에서 대조군에 비하여 증가하였으나, 이후 실험농도가 증가할수록 감소하는 경향을 보였다. 또한 평균출산횟수도 농도가 증가할수록 감소하는 경향을 보여 노닐페놀이 물벼룩의 생식에 영향을 미친다고 판단된다. 21일간의 NOEC값은 $3.2 \mu\text{g L}^{-1}$ 으로, 기존에 보고된 21일 NOEC 값인 0.024 mg L^{-1} 와 차이를 보였으나(Comber *et al.* 1993), LOEC 값인 $5.6 \mu\text{g L}^{-1}$ 은 낮은 농도인 $3\sim 15 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서 물벼룩의 생식에 영향을 미친다는 기존 보고와 유사한 경향을 보였다(Campos *et al.* 2012). 바지락은 노닐페놀에 16주간 노출시킨 결과 외투막, 아가미 및 발 등 기관에서 조직병리학적 변화가 관찰되고 이성생식세포 발현이 유도되었으며(Park and Lee 2011), 노래미의 성숙단계 난모세포에서 에

스트로겐 수용체 대항체(antagonist)로 작용하는 것으로 보고되었다(Hwang *et al.* 2011). 또한 32주간 노닐페놀에 노출된 봉어의 생식소에서 외형적 기형이 대조군에 비해 높게 관찰된 연구가 보고 되었고(Cho *et al.* 2007), 조피볼락의 레티놀결합 단백질의 발현에 미치는 노닐페놀의 영향을 연구한 결과 에스트로겐 유사물질이 유전자 발현에 상반되는 효과를 유도한다고 보고되었다(Cho *et al.* 2006). 이들 연구결과를 통하여 생물종에 따라 노닐페놀에 대한 민감도와 상대적인 독성영향은 차이가 있으나, 생식능력을 저해시키는 작용을 하는 것으로 생각된다. 만성독성실험 결과, 노닐페놀이 물벼룩의 생식능력을 저하시키는 것으로 나타났으나, 물벼룩의 생식기작이 어떠한 영향을 받아 교란되는지 확인되지 않아 유해물질의 양을 관찰하기 보다는 생물의 생리반응을 평가하는 *in vivo* 실험을 수반한 향후 연구가 필요하다. 또한, 노닐페놀에 노출된 어미개체가 출산한 어린 개체의 기형유발 및 성장지해와 차세대 생식능력에도 영향을 미칠 가능성을 배제할 수 없다고 생각되어 앞으로 이와 관련된 지속적인 연구가 필요하다고 판단된다.

적 요

노닐페놀에 물벼룩을 노출하여 급성독성수치를 산출하고 만성독성을 조사하여 생존, 생식능, 성장에 미치는 영향을 관찰하였다. 그 결과, 노닐페놀에 노출된 물벼룩의 급성독성 수치 EC_{50} 은 용량의존적인 증가를 보였으며, 물벼룩의 일령 증가에 의한 EC_{50} 의 증가 폭은 크지 않았다. 만성독성 시험에 의한 생존율은 최고농도인 $10 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서 90%로 관찰되어 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았으나, 대조군과 비교하여 고농도에서 총 출산한 새끼수, 출산횟수가 감소하며, 첫 출산까지 걸리는 시간이 늘어나는 경향이 관찰되었고 NOEC와 LOEC는 각각 $3.2 \mu\text{g L}^{-1}$, $5.6 \mu\text{g L}^{-1}$ 로 산출되었다. 또한 체장 측정 결과 대조군에 비해 노닐페놀 노출군에서 농도가 증가할수록 성장이 저해되는 양상이 관찰되었다. 이러한 결과는 노닐페놀이 물벼룩의 생식을 저해시키는 물질로 작용했음을 알 수 있다.

REFERENCES

- Bang HW, WC Lee, SH Lee and IS Kwak. 2008. Life Cycle, Morphology and Gene Expression of Harpacticoid Copepod, *Tigriopus japonicus* s.l. Exposed to 4-nonylphenol. Korean J. Limnol. 41:81-89.

- Campos B, B Pina, S Fernandez, S Lacorte and C Barata. 2012. Enhanced offspring production in *Daphnia magna* clones exposed to serotonin reuptake inhibitors and 4-nonylphenol. Stage- and food-dependent effects. *Aquat. Toxicol.* 109:100-110.
- Cho HK, JH Jung, JY Lee, MH Kim and CH Han. 2006. Effect of 4-Nonylphenol on the Gene Expression of Retinol-Binding Protein in the Rockfish, *Sebastes schlegeli*. *Dev. Reprod.* 10:177-184.
- Cho NG, JY Guk, CW Lee, HM Kim, KH Choi, KH Chung, JC Kang and JS Lee. 2007. Change of Reproductive Indicator of the Crucian Carp, *Carassius auratus* (Teleostei: Cyprinidae) Long-term Exposed to Nonylphenol. *J. Environ. Toxicol.* 22:235-245.
- Choi SB, HS Lee and YG Kim. 2007. Human and Environment. Donghwa Technology Publishing Co. 264-270pp.
- Comber MHI, TD Williams and KM Stewart. 1993. The Effects of Nonylphenol on *Daphnia magna*. *War. Res.* 27:273-276.
- LeBlanc GA, X Mu and CV Rider. 2000. Embryotoxicity of the Alkylphenol Degradation Product 4-Nonylphenol to the Crustacean *Daphnia magna*. *Environ. Health Perspect.* 108:1133-1138.
- Ham YK, SJ Oh and SW Kim. 2004. Monitoring of Bisphenol A and Nonylphenol in Waterworks System of Seoul, Korea. *Analytic. Sci. Technol.* 17:423-433.
- Hwang IJ, HB Kim and HJ Baek. 2008. Effects of Bisphenol A and Nonylphenol on *In Vitro* Steroid Production in Matured Oocyte of Greenlings, *Hexagrammos agrammus*. *Dev. Reprod.* 12:275-281.
- Janicki T, M Krupinski and J Dlugonski. 2015. Degradation and toxicity reduction of the endocrine disruptors nonylphenol, 4-*tert*-octylphenol and 4-cumylphenol by the non-ligninolytic fungus *Umbelopsis isabellina*. *Bioresour. Technol.* 200: 223-229.
- Ju MJ, BK Min, DJ Kim, JH Lee, JR Cha and HS Cho. 2014. Distribution of organotins, NP and BPA in sediment of intertidal zone around the south coast of Korea. *J. Korean Assoc. Ocean Sc. Technol. Soc.* 2270pp.
- Kim JH and MH Yoon. 2014. Effects of 4-*t*-octylphenol and Nonylphenol on the Reproduction of the Striped Field Mouse. *J. Environ. Sci. Int.* 23:313-322.
- Kim KT, JG Cho, JH Yoon, CW Lee, KH Choi, HM Kim and JS Ryu. 2010. Toxicity Evaluation of Perfluorinated Compounds Using *Daphnia magna*. *Environ. Health Toxicol.* 25:153-159.
- Kim MY, OY Kim, HJ Kim, JO Shin, HY Lee, US Jin and YM Ha. 2004. Biology concepts & connections. Life Science Publishing Co. 443-444pp.
- Kim SY, DM Kim, YM Kim, YH Chung, SJ Hong, WC Lee and KJ Roh. 2012. A study of the distribution and transport of Nonylphenol on the Suyeong river mouth. *J. Korean Soc. Mar. Environ. Saf.* 387-388pp.
- Korea Ministry of Environment. 2012. Chemical emissions, the amount of movement Investigation Report. 28-29pp.
- Korea Ministry of Environment. 2014. Chemical emissions, the amount of movement Investigation Report. 32-33pp.
- Korea Ministry of Environment. 2015. Act on the Registration and Evaluation, etc. of Chemical Substances.
- Korea Ministry of Health & Welfare. 2013. PUBLIC HEALTH CONTROL ACT.
- Korsman JC, AM Schipper, MG Vos, MG Heuvel-Greve, AD Vethaak, PD Voogt and AJ Hendriks. 2015. Modeling bioaccumulation and biomagnification of nonylphenol and its ethoxylates in estuarine-marine food chains. *Chemosphere* 138:33-39.
- Lee CC, LY Jiang, YL Kuo, CY Chen, CY Hsieh, CF Hung and CJ Tien. 2015. Characteristics of nonylphenol and bisphenol A accumulation by Fish and implications for ecological and human health. *Sci. Total Environ.* 502:417-425.
- Lee CW, SY Park, JH Yun, KH Choi, YH Ghung and HM Kim. 2005. Risk Assessment of Soil through Earthworm Toxicity Test of Nonylphenol and Bisphenol A. *J. Environ. Toxicol.* 20:279-286.
- Lee JH, HS Cho, SW Seol, CR Cho and YO Kim. 2004. Contaminations of organotin compounds, nonylphenol and bisphenol-A in sediments of Masan bay. *J. Korean Soc. Mar. Environ. Engin.* 4:28-35.
- Lee JH, HO Lee, BH Kim, T Katano, SO Hwang, DH Kim and MS Han. 2007. Effects of Nonylphenol on the Population Growth of Algae, Heterotrophic Nanoflagellate and Zooplankton. *Korean J. Limnol.* 40:379-386.
- Liu Y, X Dai and J Wei. 2013. Toxicity of the xenoestrogen nonylphenol and its biodegradation by the alga *Cyclotella caspia*. *J. Environ. Sci.* 25:1662-1671.
- Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). 1998. OECD Guideline for testing of chemicals; *Daphnia magna* Reproduction Test (TG211).
- Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). 2004. OECD Guideline for testing of chemicals; *Daphnia* sp., Acute immobilisation test (TG202).
- Park JS and JS Lee. 2011. Change of Reproductive and Histological Biomarkers of *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia: Veneridae) Exposed to Nonylphenol. *Korean J. Malacol.* 27:181-190.
- Park KI and YH Bae. 2012. Effect of endocrine disrupter, Nonylphenol and DEHP (Di-(2ethylhexyl)phthalate) on the cocoon production and the hatchability of *Eisenia fetida* (Ennelida; Oligochaeta). *J. KORRA.* 20:89-95.

- Preuss TG, M Telscher and HT Ratte. 2008. Life stage- dependent bioconcentration of a nonylphenol isomer in *Daphnia magna*. Environ. Pollut. 156:1211-1217.
- Riva C, C Porte, A Binelli and A Provini. 2010. Evaluation of 4-nonylphenol *in vivo* exposure in *Dreissena polymorpha*: Bioaccumulation, steroid levels and oxidative stress. Comp. Biochem. Phys. C. 152:175-181.
- Robertson LS and SD McCormick. 2012. The effect of nonylphenol on gene expression in Atlantic salmon smolts. Aquat. Toxicol. 122-123:36-43.
- Schwaiger J, OH Spieser, C Bauer, H Ferling, U Mallow, W Kalbfus and RD Negele. 2000. Chronic toxicity of nonylphenol and ethinylestradiol: haematological and histopathological effects in juvenile Common carp (*Cyprinus carpio*). Aquat. Toxicol. 51:69-78.
- Soares A, B Guieysse, B Jefferson, E Cartmell and JN Lester. 2008. Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. Environ. Int. 34:1033-1049.
- Sung HH and YZ Ye. 2009. Effect of nonylphenol on giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) via oral treatment: Toxicity and messenger RNA expression of hemocyte genes. Aquat. Toxicol. 91:270-277
- United States Environmental Protection Agency. 2002. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving water to freshwater and marine organisms.
- Zhang L, Gibble R and KN Baer. 2003. The effects of 4-nonylphenol and ethanol on acute toxicity, embryo development, and reproduction in *Daphnia magna*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 55:330-337.

Received: 27 November 2015

Revised: 18 December 2015

Revision accepted: 19 December 2015