



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

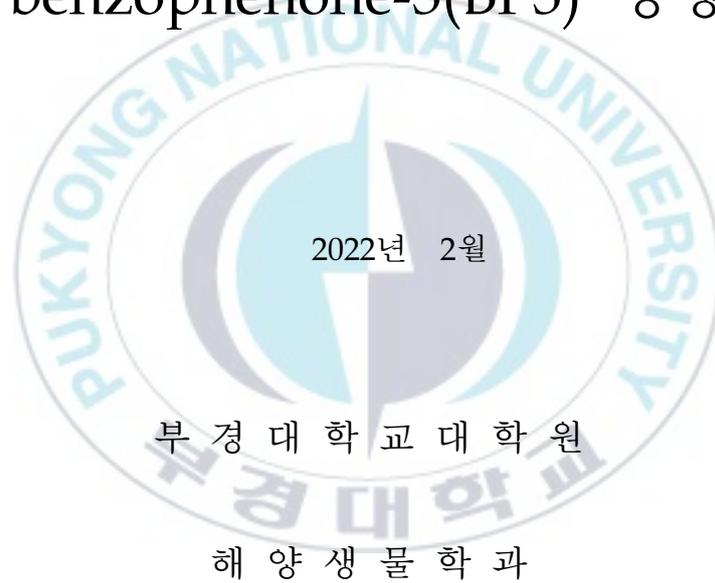
저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이 학 석 사 학 위 논 문

민물두줄망둑, *Tridentiger bifasciatus*,
수정란 발생과정에 미치는
benzophenone-3(BP3) 영향



2022년 2월

부경대학교 대학원

해양생물학과

송미해

이 학 석 사 학 위 논 문

민물두줄망둑, *Tridentiger bifasciatus*,
수정란 발생과정에 미치는
benzophenone-3(BP3) 영향

지도교수 백 혜 자

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함.

2022년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

해 양 생 물 학 과

송 미 해

송미해의 이학석사 학위논문을 인준함.

2022년 2월 25일

 위 원 장 이학박사 김 진 구 (인)
위 원 이학박사 김 현 우 (인)
위 원 이학박사 백 혜 자 (인)

목 차

List of figures	ii
List of table	iv
Abstract	v
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	5
1. 화학물질	5
2. 실험어 사육 및 수정란 관찰	6
3. 코르티솔 분석	15
4. 통계처리	16
III. 결 과	17
1. 민물두줄망둑 수정란 초기 발생과정	17
2. BP3가 수정란 초기 발달에 미치는 영향	21
3. BP3가 부화율, 생존율에 미치는 영향	27
4. BP3 노출 시 수정란의 유구, 난황 부피 비 변화	31
5. BP3에 노출된 수정란의 심장박동수 및 코르티솔 호르몬 농도 변화	34
IV. 고 찰	37
V. 참고문헌	42
감사의 글	47

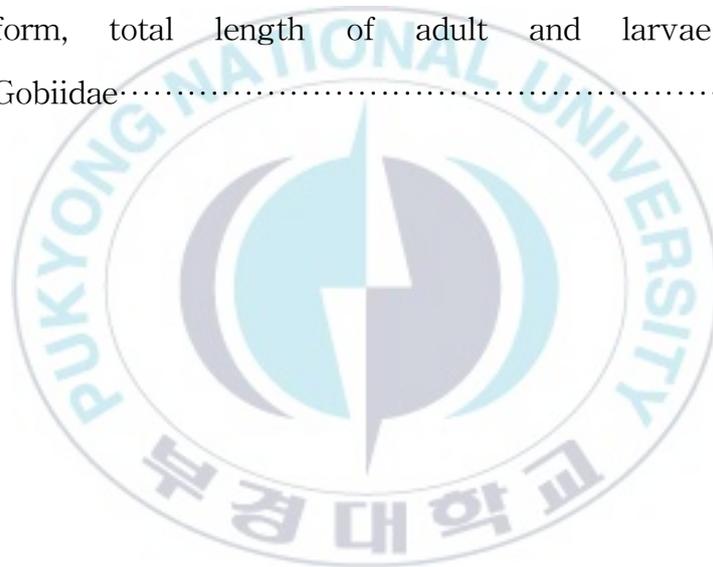
List of figures

Fig. 1. The Neighbor Joining tree reflects phylogenetic relations between found variants of nucleotide sequence (haplotypes) of the 16S rRNA gene in gobies of the <i>Tridentiger</i> genus.	10
Fig. 2. Mature male <i>Tridentiger bifasciatus</i>	11
Fig. 3. Location of the sampling area in Sindeok Beach, Yeosu, Korea.	12
Fig. 4. Experimental design.	13
Fig. 5. Measurement of <i>Tridentiger bifasciatus</i> , oil droplet diameter (OD), yolk length and depth (YL and YD)	14
Fig. 6. Development of eggs of the <i>Tridentiger bifasciatus</i>	19
Fig. 7. The observation of egg during egg development in fertilized eggs of BP3 treatment.	22
Fig. 8. The observation of egg during egg development at 24, 36 hours	23
Fig. 9. The observation of egg during egg development at 48, 60 hours	24
Fig. 10. Incomplete eye pigmentation of egg during egg development at 60, 72 hours exposed in BP3 treatment.	25

Fig. 11. The observation of egg during egg development at 96 hours	26
Fig. 12. The survival rate of BP3 exposed <i>Tridentiger bifasciatus</i> eggs.	28
Fig. 13. The hatching rate of BP3 exposed <i>Tridentiger bifasciatus</i> eggs	29
Fig. 14. The hatchability of BP3 exposed <i>Tridentiger bifasciatus</i> eggs at different time point.....	30
Fig. 15. The liquid droplet volume of the <i>Tridentiger bifasciatus</i> eggs	31
Fig. 16. The yolk sac volume (mm ³) of the <i>Tridentiger bifasciatus</i> eggs after exposed BP3.	33
Fig. 17. The heartbeat times (time / 20 sec) of <i>Tridentiger bifasciatus</i> embryo exposed to different concentrations of BP3 for 60 hours.	35
Fig. 18. Level of cortisol in fertilized eggs <i>Tridentiger bifasciatus</i> exposed to BP3.	36

List of table

Table. 1. Summary of concentrations of BP3 in reported studies.	4
Table. 2. Summary of test conditions and test acceptability criteria for study	9
Table. 3. The comparison of egg diameter, time for hatching, egg form, total length of adult and larvae size in Gobiidae.....	41



Abstract

Benzophenone-3 (BP3) is used as a component of sunscreens, and known to disrupt the endocrine system of marine organisms. In this study, to evaluate the toxicity of BP3, *Tridentiger bifasciatus*, was selected as the experimental species. We evaluated morphological changes during embryogenesis. In addition, hatching rate and embryo survival to hatching were assessed. Embryos (6 hours after fertilization) were exposed to different concentrations of BP3 (0, 10, 100, and 1000 μgL^{-1}), and then they were randomly sampled every 12 hours for the microscopic observation and cortisol analysis. Cortisol levels were measured by radioimmunoassay (RIA). 24 *hae* (hours after exposure) to BP3, the formation of embryos was complete and the oil droplets have coalesced into one except BP3 10 μgL^{-1} group. 36 *hae* to BP3 100 and 1000 μgL^{-1} groups, the tail was not separated from the yolk sac. 60 *hae* in the control and the BP3 10 μgL^{-1} groups, the heart formation was complete, but inactive heartbeat was observed in the BP3 100 and 1000 μgL^{-1} . The hatching rate of larvae decreased in a dose-dependent manner, with a significant difference in all BP3 treatment groups ($p < 0.01$). The survival rate was more than 90% in the control, but BP3 treatment groups all died 120 *hae* (immediately after hatching). High levels of

cortisol were observed in the initial group (0 *hae*) and decreased after 24 hours. The BP3 100 and 1000 μgL^{-1} showed significantly lower cortisol levels than the control at 96 hours of exposure ($p < 0.05$). This study suggests that BP3 can interfere with embryo development, resulting in lower hatching and survival rates.



I. 서 론

UV 필터는 개인이 피부를 보호하기 위해 사용하는 선크림, 로션, 샴푸, 헤어스프레이 등의 구성성분으로 환경 오염 물질에 속한다(Balmer et al. 2005, Fent et al. 2010, Kim and Choi, 2014). EU 화장품 규정에 따르면, 현재 26개 종류의 UV 필터가 화장품 재료로 허용되고 있다. 벤조페논-3(Benzophenone-3; BP3)은 가장 일반적으로 사용되는 UV 필터 중 하나이며, 적은 광변화로 UVA 및 UVB 영역의 햇빛을 흡수할 수 있다(Fent et al., 2010).

BP3는 자외선(UV)에 의한 손상으로부터 인간의 피부와 모발을 보호하기 위해 다양한 퍼스널 케어 제품(PCP)에 사용되는 자외선 차단제이다(Kim and Choi, 2014). 국내와 일본, 미국, 유럽에서 자외선 차단제의 활성 성분으로 최대 5-6% 사용한다(식품의약품안전청, 2012; The Society of Japanese Pharmacopoeia, 1985; US FDA Department of Health and Human Services, 2013b; EEC 지침, 2016). 또한 식품의 부패, 변성으로부터 보호하기 위해 투명 포장재의 성분으로도 사용되며, 간접 식품 첨가물로도 미국 식품의약국(U.S. Food and Drug Administration)의 승인을 받았다(U.S. FDA Department of Health and Human Services, 2013a).

벤조페논-3(BP3)은 담수 및 해수의 모든 영역에서 검출되었으며, 심지어 어류의 채내 및 인간에 축적된다(Poiger et al. 2004, Fent et al. 2010, Kameda et al. 2011). 스위스의 호수 및 하천(Fent et al. 2010, Poiger et al. 2004)과 일본에서 최대 125 ng/L 농도로 검출되었다(Kameda et al. 2011). 원폐수 및 처리 폐수에서 BP3는 각각 최대 7.8 µg/L와 700 ng/L의 농도로 발생한다(Fent et al. 2008). BP3는 샤워 중 씻어내거나 폐수를 통해 간접적으로 수중 환경에 방출될 수 있으며 가정에서 세수, 샤워 등으로

검출되는 양은 최대 4.9 µg/L로(Hernández-Leal et al., 2010), 이는 하수 슬러지에 축적된다(Rodil et al., 2009a; Gago-Ferrero et al., 2011). 미국과 중국의 하천 퇴적물은 최대 13ng/g dw (dry weight) BP3를 포함하고 있다(Zhang et al., 2011). 친유성인 BP3은 어류에서 최대 151 ng/g까지 축적된다(Fent et al., 2010)(Table. 1). 그리고 BP3와 그 대사 산물은 미국 인구의 소변 샘플의 98%에서 검출되었다(Calafat et al., 2008).

유기 UV필터는 일반적으로 물고기에게 급성 독성을 일으키지 않는다. 그러나 UV필터가 산호에게 백화현상을 일으킬 수 있음이 입증되었다(Corinaldesi et al., 2018; Tsui et al., 2017). 또한 일부 UV 필터의 경우 배아 독성이 입증되었다. BP3은 제브라피쉬 배아의 발달에 부정적인 영향을 미친다(Jang et al., 2016). Quintaneiro et al. (2019)의 연구에 따르면 *Danio rerio*와 제브라피쉬 배아는 4-MBC에 노출된 후 배아의 척삭 곡률, 난황의 흡수 지연 및 심낭 부종이 관찰되었다. 또한, 4-MBC는 글루타티온-S-트랜스퍼라제(GST)를 활성화하여 해독 시스템을 유도했다. Zhou et al. (2019)에서 EHMC는 zebrafish(*D. rerio*)의 항산화 능력을 약화시켰다. 하와이 주는 이러한 화합물을 함유한 자외선 차단제 사용에 대한 제한을 도입했다(Hawaii State Legislature. S.B. No. 2571, 2018).

In vivo 및 *in vitro* 연구에 따르면 환경에 존재하는 BP3는 강한 어류의 내분비계 기능을 방해할 수 있다고 보고하였다(Schreurs et al., 2002; Kunz and Fent, 2006; Bluethgen et al., 2012; Kim et al., 2014; Zhang et al., 2017). BP3 노출은 암컷화 유해영향관찰농도(Lowest Observed Effect Concentration, LOEC = 388mg/L)로 zebrafish 성비를 변화시키고 생식선 발달에 영향을 미치는 것으로 보고하였다(Kinnberg et al., 2015).

어류의 초기 배발생 동안 부화와 성장에 관여하는 것으로 알려진(C. Simontacchi et al. 2009) 코르티솔은 모든 척추동물에서 내분비 신호전달

분자이며 면역 기능, 행동, 스트레스, 대사, 성장 및 기관형성을 포함하여 호흡기, 신장 및 심혈관을 비롯한 많은 기관 및 생물학적 기능에 중요한 역할을 한다(EM Wintour, 2006; V. Trayer et al. 2013). 어류에서 난모세포로 전달된 모체 코르티솔은 부화 단계까지 스테로이드의 유일한 공급원이며 성숙을 포함하여 초기 발달에 필수적이다(D. and Vijayan. 2013; D. and Vijayan, 2016). 게다가 에너지 저장을 발달 중인 배아가 쉽게 이용할 수 있는 형태로 동원하는 데 중요한 역할을 한다(Mark I. and Igor V, 2002). 코르티솔에 노출된 제브라피쉬 배아는 심장 기능과 발달에 영향을 미치는 것으로 나타났다(MH Farley and L Fohn, 2015).

본 연구에 사용된 민물두줄망둑(*Tridentiger bifasciatus*)은 농어목(Perciformes) 망둑어과(Gobiidae)에 속하는 어류로 한국, 일본, 중국, 타이완 등 주로 아시아에 분포하는 종으로 보고되었다(Ye et al., 2014). 망둑어과 어류는 상업적으로 중요한 어종은 아니지만, 물리적인 변화가 큰 환경에 뛰어난 적응능력(Akihisa and Seiichi, 2005)으로 인하여 광범위하게 분포하고 있으며, 연안에 출현하는 상업 어종에 에너지를 전달하는 매개체로써 중요한 위치를 차지하고 있다(Kwak et al., 2010). 그리고 환경지표종으로 개체의 크기가 작고 생활사가 다른 해산 어종에 비해 짧아 실험 종으로 선택하였다.

현재까지 BP3가 해산어류에 미치는 영향은 거의 알려지지 않았다. 또, 초기생활사에 미치는 영향은 성어에 미치는 영향보다 클 수 있으며, 단기간에도 부화율, 생존율, 발생과정에 영향을 미칠 수 있다. BP3에 노출됨에 따라 해산어류의 초기생활사에 미치는 영향에 대한 연구가 필요한 실정이다. 본 연구에서는 실내 수조에서 산란된 민물두줄망둑 수정란을 이용하여, BP3에 노출되었을 때 초기 발생과정, 부화율 및 생존율, 그리고 코르티솔 수치에 어떤 영향을 미치는지 조사하였다.

Table. 1. Summary of concentrations of BP3 in reported studies. (dry weight, dw)

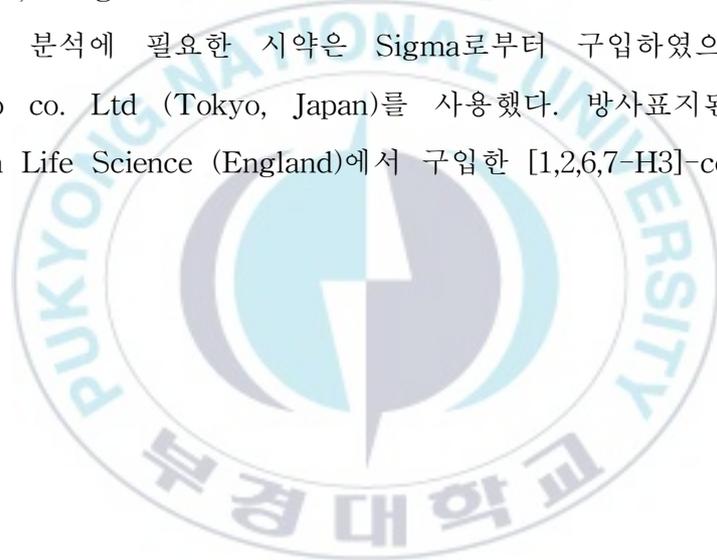
Environmental Sample	Region	Concentration of BP3 (ngL ⁻¹)	Reference
Surface water	Arctic	17 - 33	Tsui et al., 2014
	Bangkok, Thailand	86 - 116	
	Chaozhou, China	37 - 49	
	Hong Kong	39 - 5429	
	Los Angeles, USA	227 - 601	
	New York, USA	23 - 178	
	Tokyo, Japan	24 - 86	
Lakes and rivers	Switzerland	125	Fent et al., 2010
	China	13 (dw)	Zhang et al., 2011
Sea water	Spain	1280 - 3500	Tarazona et al., 2010
	Norway	269	Fent et al., 2008
	Antarctic	2.6 - 88.4	Emnet et al., 2015
Sea ice	Antarctic	2.6 - 3.8	Emnet et al., 2015
Raw water	Switzerland	7.8 ug/L	Fent et al., 2008
Treated wastewater	Switzerland	700	Fent et al., 2008
Wastewater	Antarctic	16.7 - 195	Emnet et al., 2015
Swimming pool water	Slovenia	400	Fent et al., 2008
Fish	Antarctic	6.6 - 14.1 (dw)	Emnet et al., 2015
Fish liver	Antarctic	41 (dw)	Emnet et al., 2015

II. 재료 및 방법

2.1 화학물질

본 실험에 사용한 옥시벤존(2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone, BP3, CAS number: 131-57-7)은 Sigma-Aldrich (Saint Louise, Mo, USA)로부터 구입하여, 1 mg/ml 농도로 에탄올에 용해한 후 -20 °C에 보관하였다.

코르티솔 분석에 필요한 시약은 Sigma로부터 구입하였으며, 항체는 Cosmo-bio co. Ltd (Tokyo, Japan)를 사용했다. 방사표지된 호르몬은 Amersham Life Science (England)에서 구입한 [1,2,6,7-³H]-cortisol를 사용하였다.



2.2 실험어 사육 및 수정란 관찰

실험에 사용된 민물두줄망둑 (Fig. 1, Fig. 2A)은 2020년 10월 여수 신덕 해수욕장(Fig. 3)에서 뜰채를 이용하여 채집된 개체를 사용하였다. 또한 검정망둑속의 유사 종인 두줄망둑(*Tridentiger bifasciatus*)과 민물두줄망둑(*Tridentiger trigonocephalus*)을 두부에 존재하는 흰 점의 분포와 뒷지느러미 중앙의 흰 줄무늬에 의하여 구분한 후, 유전자 분석을 통하여 종을 동정하였다. COI 유전자는 중간 차이를 나타내었다(Fig. 1). 실내 수조에 사육하기 전 oxytetracyclin (100 ppm)으로 1시간 약욕 후, 실험실 수조에 2주간 적응시켰다. 순치기간 중 사육 조건은 수온 20.0 ± 0.5 °C, 광주기 12 L : 12 D(Light : Dark)로 조절하였으며 먹이는 배합사료를 1일 2회 반복 급여하였다.

2주간의 순치 기간이 끝난 후, 2주 단위로 광주기를 0 ~ 2주차엔 12 L : 12 D, 2 ~ 4주차 13 L : 11 D, 4 ~ 6주차 14 L : 10 D로 조절하여 산란을 유도하였으며 수온 21.0 ± 0.5 °C, 광주기 14 L : 10 D에서 산란하였다(Fig. 2). 수시로 산란 여부를 관찰하여 암컷의 산란 완료 확인, 또는 산란 완료 후 수컷이 알을 지키는 모습을 발견했을 때 PVC 파이프를 수조에서 격리한 후 파이프에 부착된 수정란을 분리하였다.

BP3가 0, 10, 100 그리고 $1000 \mu\text{gL}^{-1}$ 농도로 용해된 21.0 ± 0.5 °C, 30 psu의 인공해수가 담긴 6 well-plate로 파이프에서 분리된 수정란을 옮겨 노출 실험을 진행했다. 실험은 수정란 부화 직후에 종료되었으며, 3회 반복 실험하였다. 실험 디자인은 Fig. 4와 같다. 실험 1은 두줄망둑의 초기생물사 및 형태관찰 위주로 진행하였으며, 실험 2는 두줄망둑의 부화율, 생존율, LC₅₀, 코르티솔 호르몬 농도를 분석했다.

실험 1의 초기생활사 및 형태관찰을 위해, 이미지 촬영장치가 장착된 광학현미경을 이용하여 12시간마다 살아있는 수정란을 관찰하였다. 수정란의 난경, 유구경, 부화 직후 자어 전장은 Motic image-plus 2.0 프로그램으로 0.1 μm 까지 측정하였다.

실험 2의 생존율은 12시간마다 기록하고, 사망 개체는 발견 즉시 제거하였다. 사망 개체는 수정 84시간 후 심장이 완전히 형성되었을 때, 심장박동 유무로 판별하였으며, 생존율(survival rate, SR, %)은 다음의 식으로 계산되었다.

$$: \text{SR} (\%) = (\text{SN}_{t_x} / \text{SN}_{t_0}) \times 100 \quad (1)$$

SN(survival number)은 살아있는 개체 수를 의미하며, SN_{t_x} 와 SN_{t_0} 에서 t_x 는 노출 후 x 시간 (x HPE)에서 살아있는 수정란의 개수를 의미하고 t_0 는 실험을 시작할 때 (0 HPE)의 개체를 의미한다.

비슷하게, 부화율은 BP3 노출 후 72시간에서 108시간 사이에 부화한 개체 수를 측정한 값이다. 노출 실험 완료 후(108 HPE)의 부화 성공률(hatching success, HS, %)은 다음과 같이 계산되었다.

$$: \text{HS} (\%) = (\text{HN}_{t_{108h}} / \text{SN}_{t_{108h}}) \times 100 \quad (2)$$

$\text{HN}_{t_{108h}}$ 은 노출 후 108시간에 부화하고 살아있는 개체 수를 의미한다.

수정란 배아의 유구, 난황 흡수는 유구와 난황의 부피를 BP3(0, 10, 100 그리고 1000 μgL^{-1}) 노출 6, 12, 18, 24, 30, 48, 72시간 쯤 측정하여 조사하였다. 유구와 난황의 부피는 Fig. 5와 같이 Blaxter and Hempel(1963)의 방법을 인용하였다. 유구의 길이(Oil droplet diameter, OD), 난황의 가로길이(Yolk

length, YL)와 세로길이(Yolk height, YH)를 측정하여 계산하였으며, 난황 부피 계산식은 다음과 같다.

$$: \text{Oil droplet volume}(\text{mm}^3) = \pi / 6 \times \text{OD}^3 \quad (3)$$

$$: \text{Yolk volume}(\text{mm}^3) = \pi / 6 \times \text{YL} \times \text{YH}^2 \quad (4)$$

심장박동수(heartbeat time, HBT)는 노출 60시간 된 수정란의 20초 동안 심장박동 횟수를 측정한 결과이다. 그리고 모든 측정값(SR, HS, HBT)은 3반복구에 대해 각각 계산하고 이를 평균 낸 값이다.



Table 2. Summary of test conditions and test acceptability criteria for study.

Parameters	Test condition
Test type	static renewal
Salinity	30 psu for <i>Tridentiger bifasciatus</i> .
Temperature	21.0 ± 0.5 °C
End point	death
Test organism	<i>Tridentiger bifasciatus</i> .
Age of test organism	6, 24 hours after fertilized eggs
Test duration	96 hours
Light quality	“cool white” fluorescent lighting
Light intensity	ambient laboratory level
Photoperiod	14 h light, 10 h darkness
Test chamber size	6 well-plate
Test solution volume	10 ml
Dilution water	artificial seawater
Renewal of test solution	none
Aeration	none, unless DO falls below 4.0 mg/L
Initial density	about 300 individuals / well
Feeding regime	none
Cleaning of test chamber	none
Test concentrations	three + control
Number of replicates per concentration	3 replicates
Sample volume required	10 ml depending on test volume
Test acceptability criterion	80% or greater survival in controls

COI 586bp

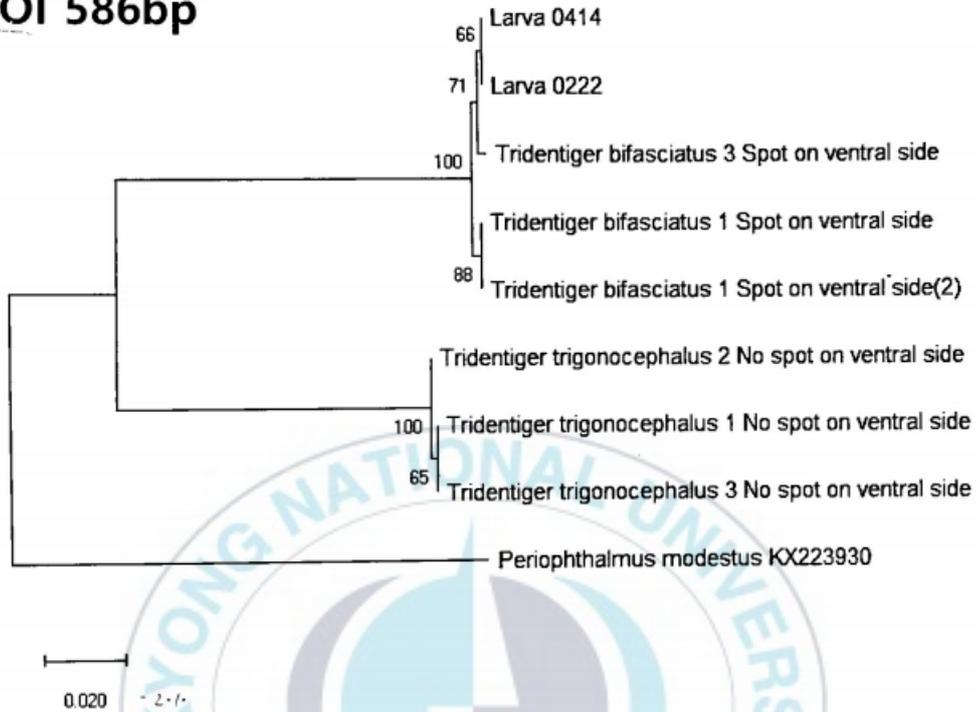


Fig. 2. The Neighbor Joining tree reflects phylogenetic relations between found variants of nucleotide sequence (haplotypes) of the 16S rRNA gene in gobies of the *Tridentiger* genus.

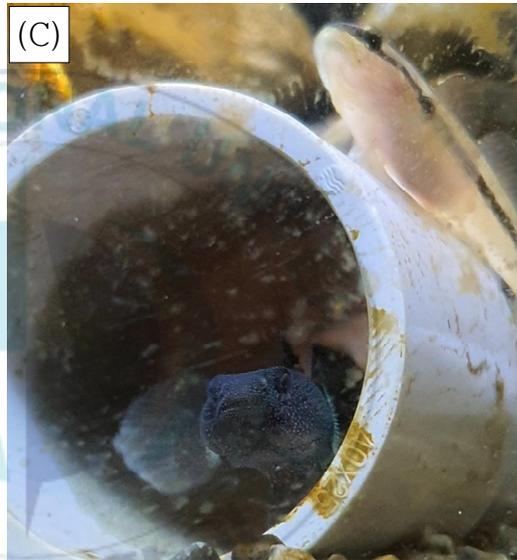


Fig. 3. (A) Mature female *Tridentiger bifasciatus*. (B) is a mature male *Tridentiger bifasciatus* and (C) is a picture of *Tridentiger bifasciatus* male guarding eggs.

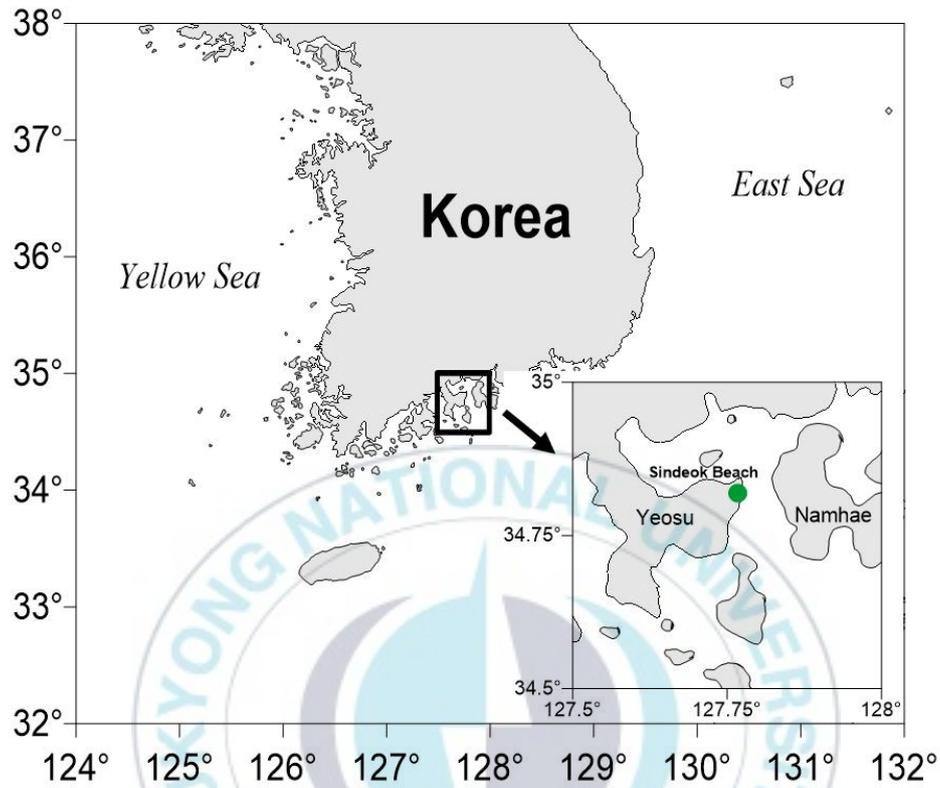


Fig. 3. Location of the sampling area (circle) in Sindeok Beach, Yeosu, Korea.

Experiment schedule

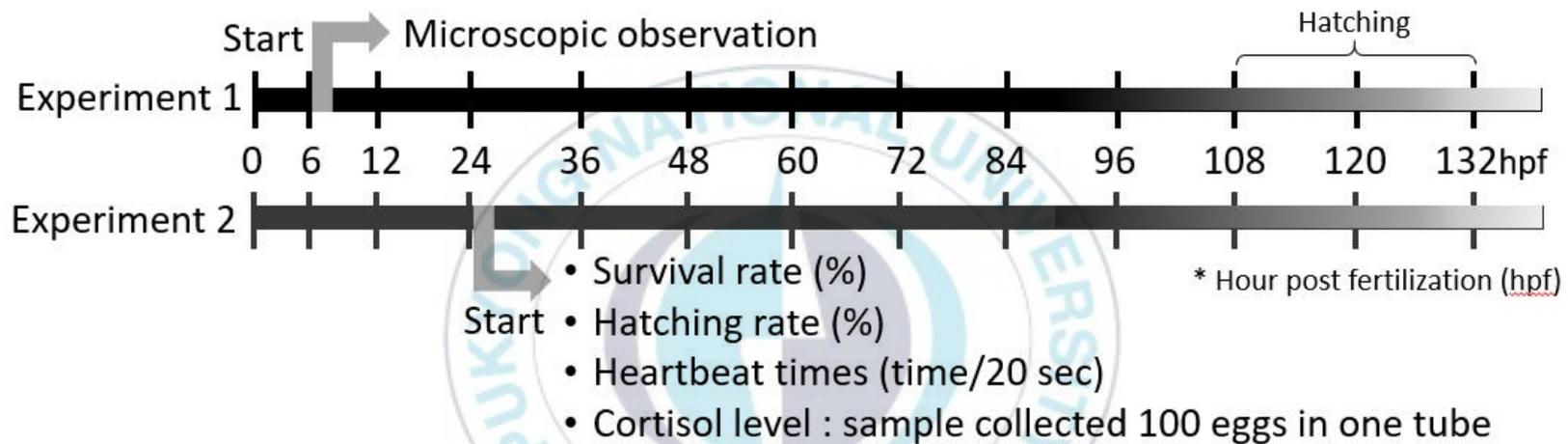


Fig. 4. Experimental design. Randomly sampled every 12 hours for the microscopic observation. Survival rate (%) was defined as the percentage of surviving fish among the fertilized eggs from hatched fish during experiment time. Hatching rate (%) was the percentage of hatching among the live embryos on 108 hpf. Heartbeat times (time / 20 sec) was the heartbeat times of the live embryos on 84 hpf for 20 seconds. Cortisol level was measured by RIA (radioimmunoassay) at 0, 24, and 96 HPE. For these indicators, survival or hatching rate (%) was calculated for each replicate and later their average were obtained for each treatment.

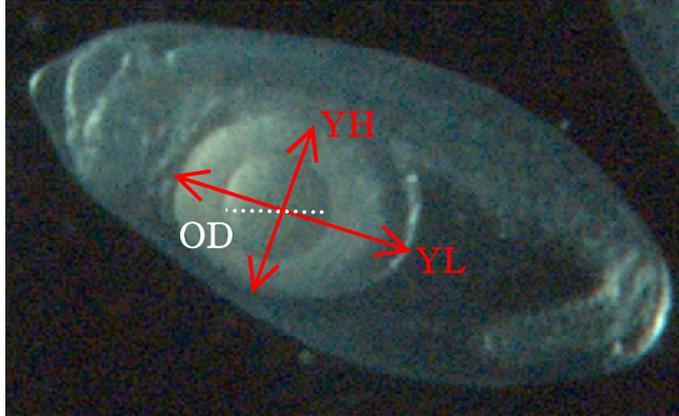
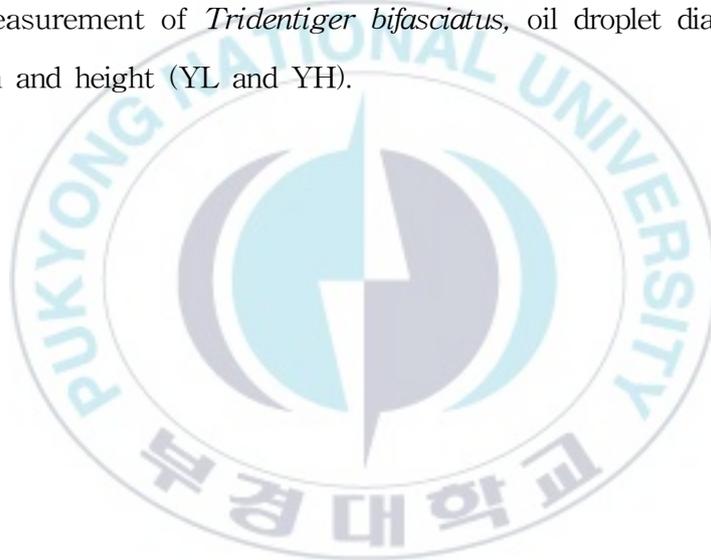


Fig. 5. Measurement of *Tridentiger bifasciatus*, oil droplet diameter (OD), yolk length and height (YL and YH).



2.3 코르티솔 분석

수정란의 초기 발생 과정에서 BP3에 노출된 수정란 내의 코르티솔 농도는 방사면역측정법(radioimmunoassay, RIA)으로 분석하였다. RIA 분석을 위한 수정란은 실험구 당 약 100개씩 BSS(Balanced salt solution, pH: 7.7, 삼투압 농도: 360 mOsm/kg)에 넣어 분석 전까지 -80°C 에서 보관하였고, 샘플링은 BP3 (0, 10, 100 그리고 $1000\ \mu\text{gL}^{-1}$) 노출 0, 24, 96시간째에 이루어졌다 ($n = 3$). 샘플링된 알은 미세저울로 무게 0.1 mg 단위로 측정하고 호모게나이저로 마쇄 후 4°C , 13,000 rpm, 5분 원심분리한 상층액을 이용하여 코르티솔을 측정하였다. 추출 용매는 ethylacetate : cyclohexane(1 : 1, v : v)으로 2번 반복 추출하였고, 코르티솔 측정 농도 범위는 15 pg/ml ~ 3840 pg/ml이다.

2.4 통계처리

BP3 노출에 따른 민물두줄망둑의 부화율, 생존율, 심장박동수 및 cortisol 농도는 모두 평균 \pm 표준편차로 나타났다. IBM SPSS Statistics (version 21.0)을 이용하여 일원분산분석(one-way analysis of variance, ANOVA)를 실시하였고, Turkey test 사후 분석을 통해 95% 신뢰수준에서 BP3 노출에 따른 대조구와 실험구간의 유의차 검정을 실시하였다. BP3 노출 시간에 따른 민물두줄망둑의 유구, 난황 부피 변화는 공분산 분석(analysis of covariance, ANCOVA)을 사용하여 절편과 회귀 기울기의 차이를 비교했다.



Ⅲ. 결 과

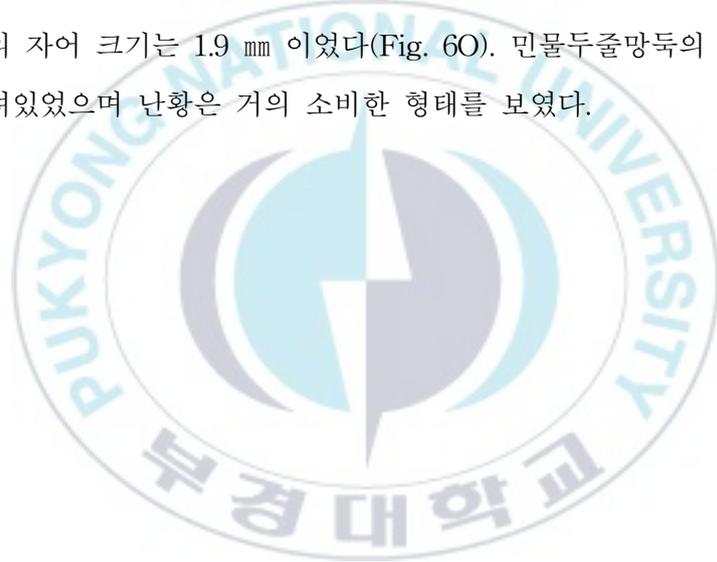
3.1. 민물두줄망둑 수정란 초기 발생과정

3.1.1 민물두줄망둑의 산란 행동

민물두줄망둑 *Tridentiger bifasciatus* 산란행동을 관찰한 결과 수컷이 PVC 파이프 영역을 지키기 시작하며, 체색이 검게 변한다. 가슴지느러미의 흰 띠가 두드러지게 관찰되는 것이 특징이다. 산란 영역을 보유한 수컷은 암컷에겐 꼬리를 흔들며 교미행동을 보이고, 다른 수컷은 쫓아낸다. 이후 암컷은 파이프 내에 알을 붙이며, 수컷은 그 옆에서 꼬리를 흔들며 방정한다. 암컷이 알을 붙이는 행동은 6시간 이상 지속되었으며, 산란이 끝나면 암컷은 산란 영역 밖으로 나간다. 또한 수컷의 등지에 여러 마리 암컷이 들어가 알을 붙이기도 한다. 수컷이 먹이를 먹으러 나갔을 때, 다른 수컷이 산란장을 차지하여 알을 빼앗는 모습도 관찰되었다. 수컷은 산란장에 남아 가슴, 배 꼬리지느러미를 이용하여 수정란 움직임과 노폐물 제거와 산소를 공급한다(Fig. 2B).

3.2.2 민물두줄망둑 수정란 초기 발생과정

수정란의 형태는 타원형으로 알의 밑부분에 부착사가 존재하며, 평균 장경 $1032 \pm 35 \mu\text{m}$ 단경 $425 \pm 18 \mu\text{m}$ 이었다. 수정 후 15시간 배체가 형성되기 시작하고(Fig. 6H), 30시간엔 유구가 하나로 합쳐지며 쿠퍼씨포(Kuffer's vesicle)가 관찰된다(Fig. 6J). 수정 후 36시간부터 난황으로부터 꼬리가 떨어져 꼬리를 움직이며(Fig. 6K), 48시간에 심장박동이 관찰되고 눈에 흑색소포가 침착된다(Fig. 6L). $21.0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 수정 후 108시간 이후에 부화를 시작하였다(Fig. 6N). 부화 직후의 자어 크기는 1.9 mm 이었다(Fig. 6O). 민물두줄망둑의 자어는 입과 항문이 열려있었으며 난황은 거의 소비한 형태를 보였다.



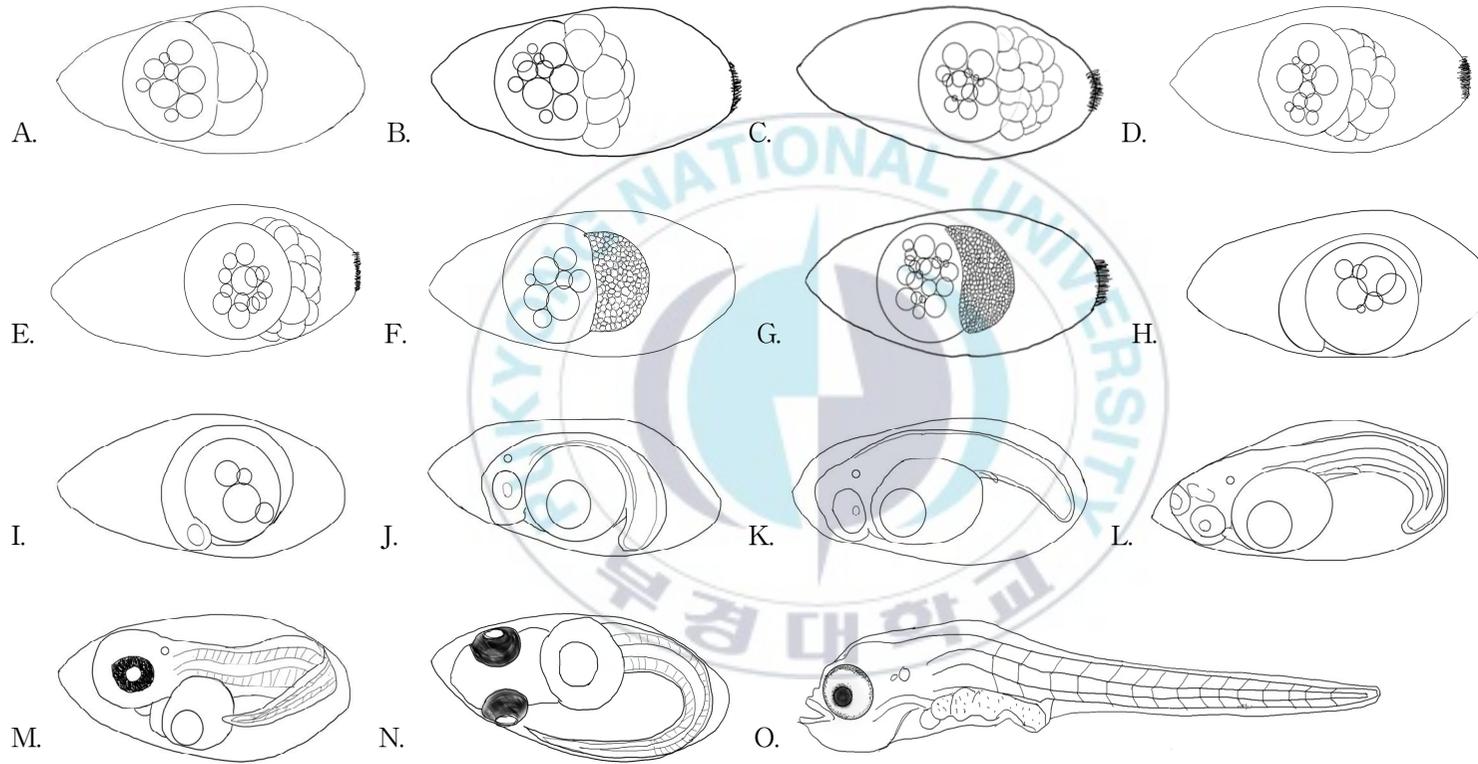


Fig. 6. Development of eggs of the *Tridentiger bifasciatus*. A: 4 cells stage, 2 hrs after fertilization; B: 8 cells stage, 2 hrs 30 mins after fertilization; C: 16 cells stage, 3 hrs after fertilization; D: 32 cells stage, 4 hrs after fertilization; E: 64 cells stage, 6 hrs after fertilization; F: Morula stage, 8 hrs after fertilization; G: Blastula stage, 11 hrs after fertilization; H: Embryo formation 15 hrs after fertilization; I: Appearance of optic vesicles, 24 hrs after fertilization; J: Formation of eye lens and Kuffer's vesicle, 30 hrs after fertilization; K: Formation of notochord, 36 hrs after fertilization; L: Formation of mambranous fin and heart formation. Beginning of blood circulation, 48 hrs after fertilization; M: Appearance of melanophore on the eye, 78 hrs after fertilization; N: Embryo just before hatching, 96 hrs after fertilization; O: The hatched larva, 108 hrs after fertilization, 1.9 mm in total length(TL). Scale bar indicate 1mm.

3.2. BP3가 수정란 초기 발달에 미치는 영향

BP3가 민물두줄망둑, *Tridentiger bifasciatus*, 초기 생활사에 미치는 영향은 다음과 같다(Fig. 7) 노출 24시간 후 (수정 후 30시간), 대조구에서 수정란은 배체 형성이 완료되고, 유구가 1개로 합쳐졌지만, BP3 10 μgL^{-1} 의 실험구에서 유구가 합쳐지지 않았다(Fig. 8). 또 노출 36시간 후 BP3 100, 1000 μgL^{-1} 의 실험구에서 아직 난황에서 꼬리가 분리되지 않고, 유구가 1개로 합쳐지지 않았다(Fig. 8). 노출 60시간 후엔 Control과 BP3 10 μgL^{-1} 그룹에선 개체의 심장 형성이 완료되고 활발한 심장박동이 관찰되지만 100과 1000 μgL^{-1} 에선 미세한 심장박동이 관찰되거나 심장 형성이 제대로 이루어지지 않았다(Fig. 9). 또한 대조구에서 눈에 흑색소포 침착이 시작되는 개체가 확인되지만 모든 BP3 처리 실험구에서 흑색소포 침착이 나타나지 않았다. 노출 72시간 후 대조구의 모든 개체 눈에 흑색소포 침착이 완료되었고, BP3 10 μgL^{-1} 실험구에서 눈에 흑색소포 침착이 시작된 개체가 관찰되었다(Fig. 10). 하지만 BP3 100 μgL^{-1} 와 1000 μgL^{-1} 실험구에서는 흑색소포 침착된 개체가 관찰되지 않았다. 노출 96시간 후, 대조구의 모든 개체의 꼬리가 신장하여, 꼬리가 머리 끝에 위치하고 있지만 BP3 처리 실험구 개체는 꼬리가 신장되지 못하거나 구부러진 모습이 관찰되었다(Fig. 11).

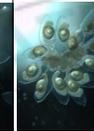
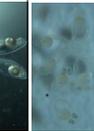
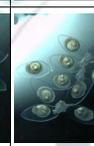
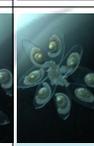
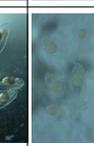
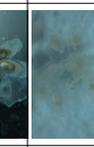
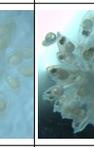
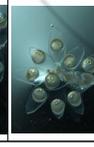
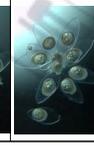
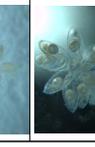
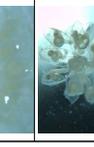
HPE BP3 (μgL^{-1})	0	2	5	8	15	18	24	30	36	42	48	60	60 (w)	72	72 (w)	96
Control																
10																
100																
1000																

Fig. 7. The observation of egg during egg development in BP3 treatment. Scale bar indicates 1mm (white background, w; hour post exposure, HPE).

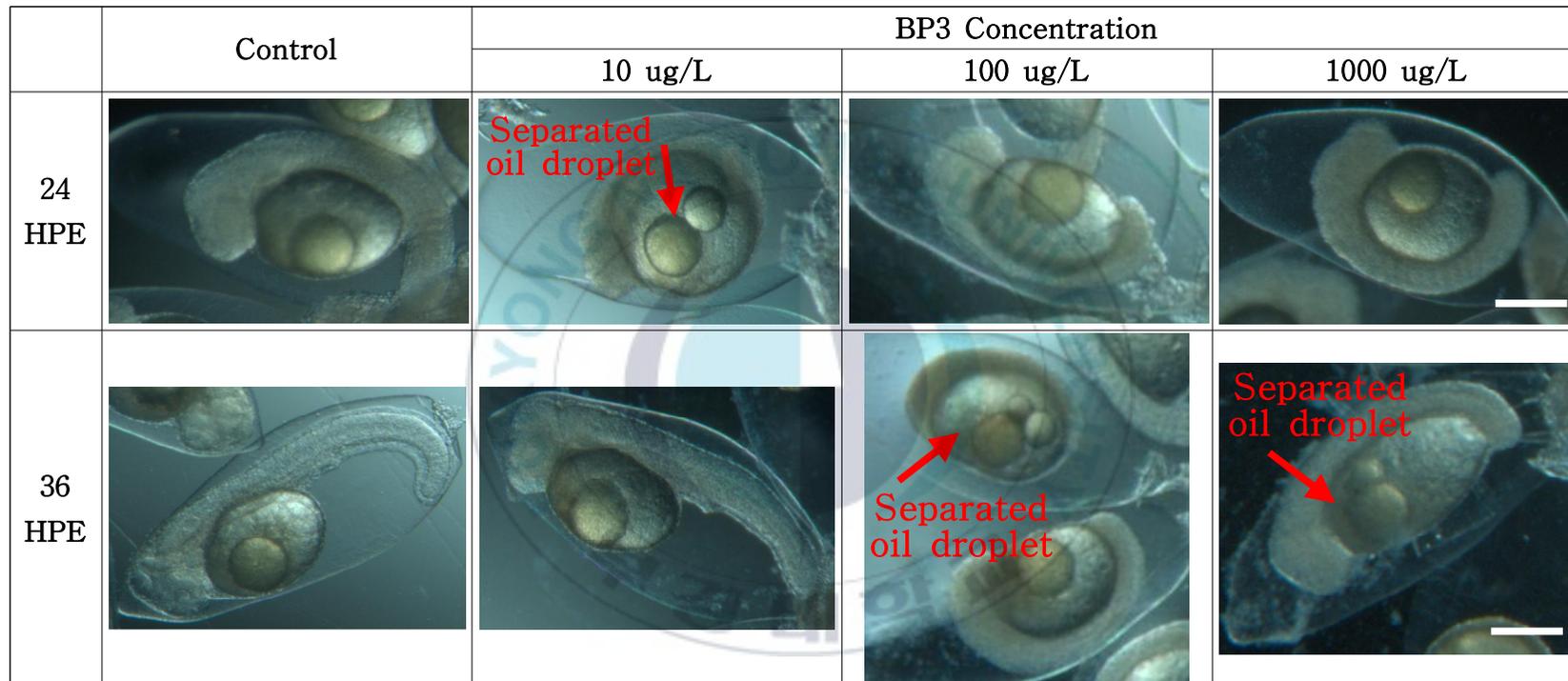


Fig. 8. The observation of egg during egg development at 24, 36 hours exposed in BP3 treatment. Scale bar indicate 200 μ m.

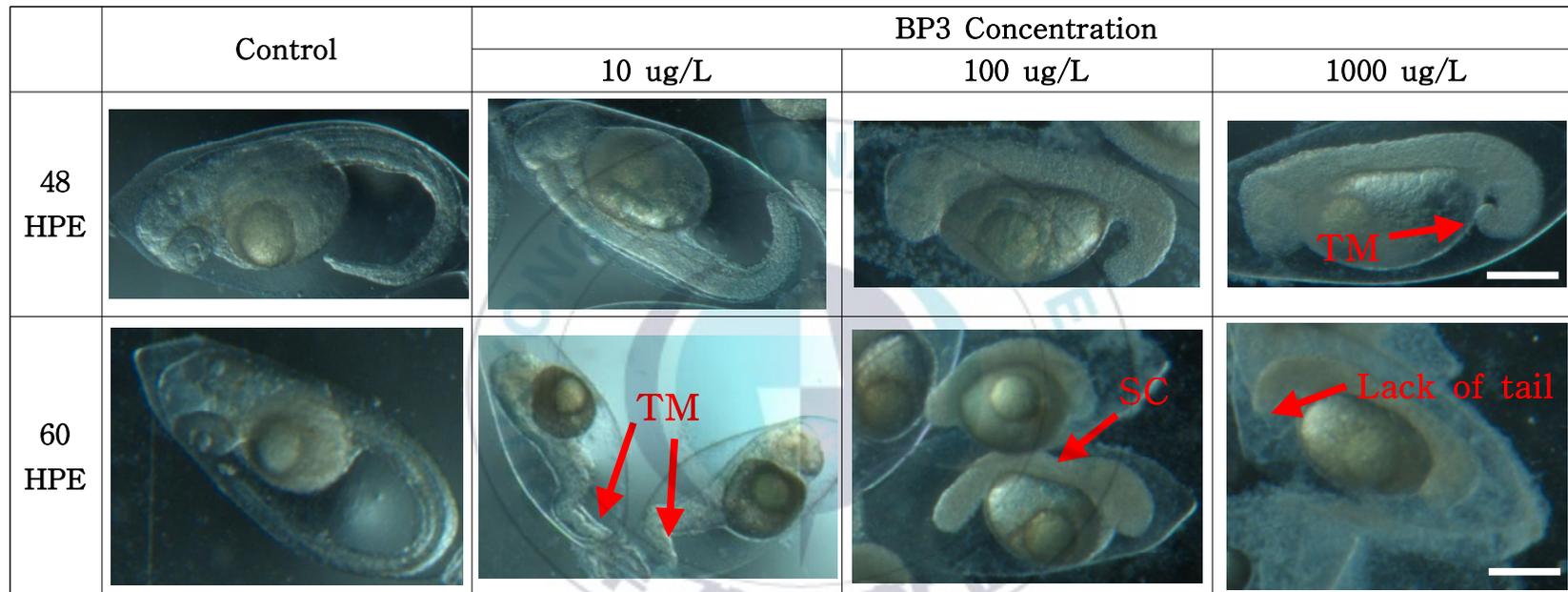


Fig. 9. The observation of egg during egg development at 48, 60 hours exposed in BP3 treatment. SC, Scoliosis; TM, Tail Malformation. Scale bar indicate 200 μ m.

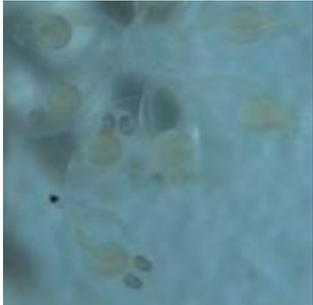
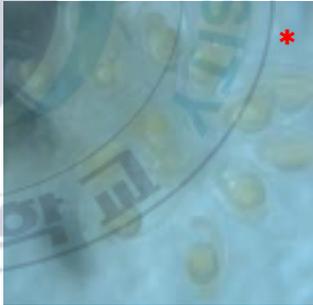
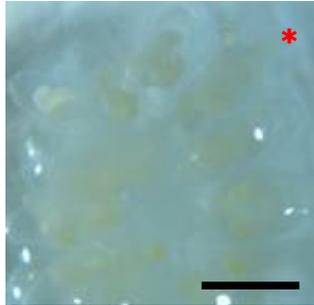
	Control	BP3 Concentration		
		10 ug/L *	100 ug/L *	1000 ug/L *
60 HPE				
72 HPE				

Fig. 10. Incomplete eye pigmentation of egg during egg development at 60, 72 hours exposed in BP3 treatment. Scale bar indicate 1mm. Asterisks show incomplete eye pigmentation.

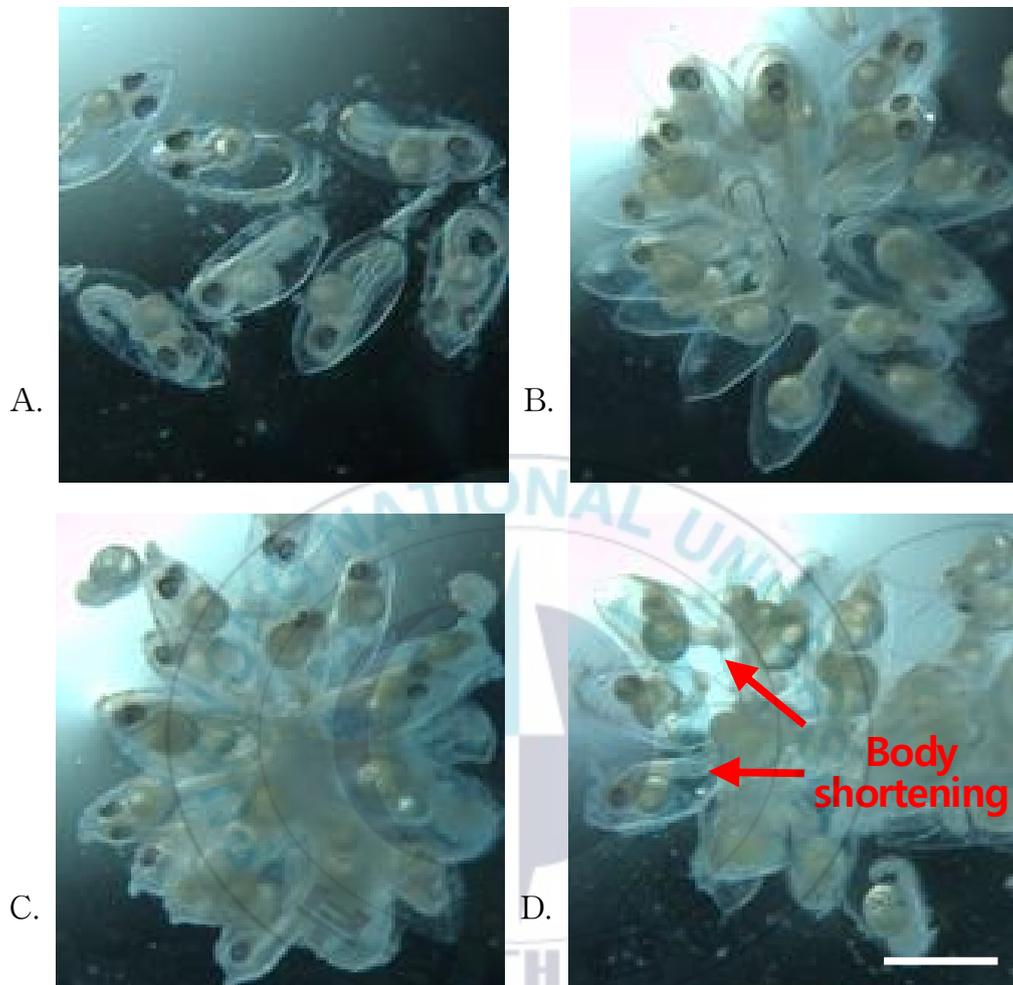


Fig. 11. The observation of egg during egg development at 96 hours exposed in BP3 treatment. A, Control; B, Concentration of BP3 $10 \mu\text{g L}^{-1}$; C. Concentration of BP3 $100 \mu\text{g L}^{-1}$; D, Concentration of BP3 $1000 \mu\text{g L}^{-1}$; Scale bar indicate 1mm.

3.3. BP3가 부화율, 생존율, 심장박동수에 미치는 영향

민물두줄망둑의 부화율, 생존율, 심장박동수에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 30시간 된 수정란에 BP3(10, 100 그리고 1000 μgL^{-1})를 처리하였다. 그 결과 민물두줄망둑의 부화율은 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 13). BP3를 처리한 모든 실험구에서 대조구에 비해 유의한 차이를 보였다 ($p < 0.05$). 노출 72시간째 현미경 관찰 후 심장박동이 없거나 형성되지 않은 개체를 사망한 개체로 판별하였다. 민물두줄망둑의 생존율은 대조구에서 90% 이상을 보였으나 BP3를 처리한 모든 실험구에서 노출 84시간에서 96시간(부화 직후)에 급격한 사망률을 나타냈다(Fig. 12). BP3 노출 96시간 후의 민물두줄망둑의 LC_{50} 은 493 μgL^{-1} 로 나타났다.

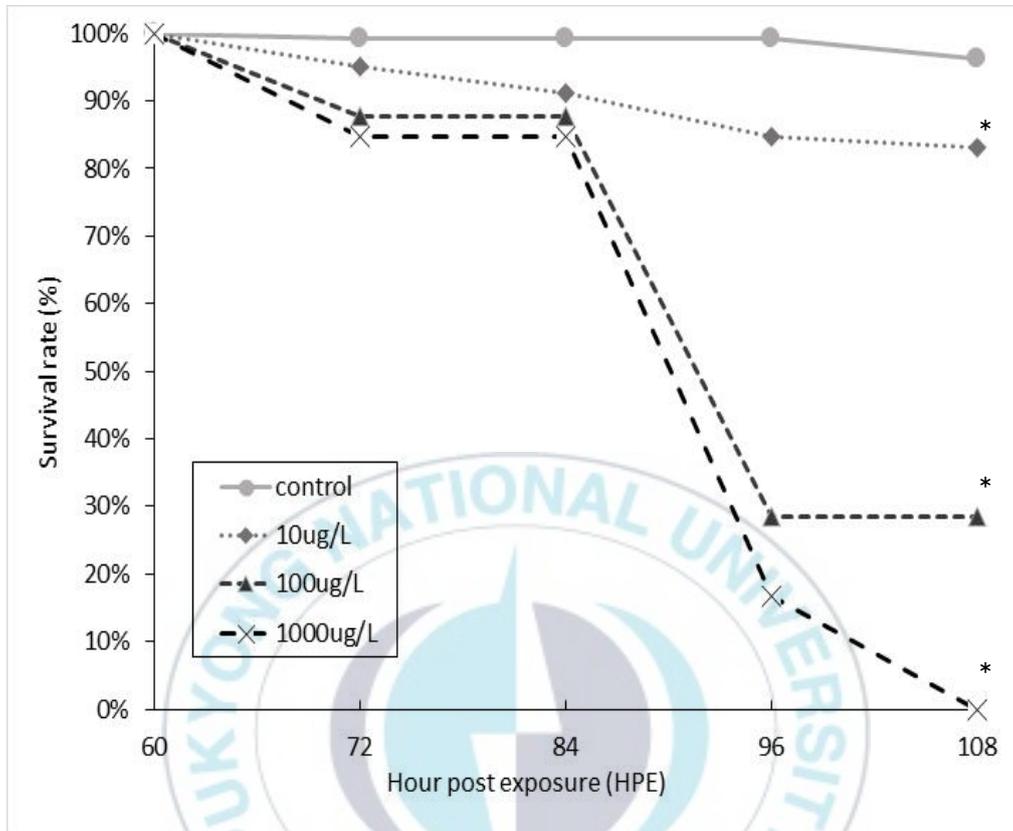


Fig. 18. The survival rate (%) of BP3 exposed *Tridentiger bifasciatus* eggs. The asterisk indicates a significant difference ($p < 0.05$) between the control and experimental groups at the same time of exposure.

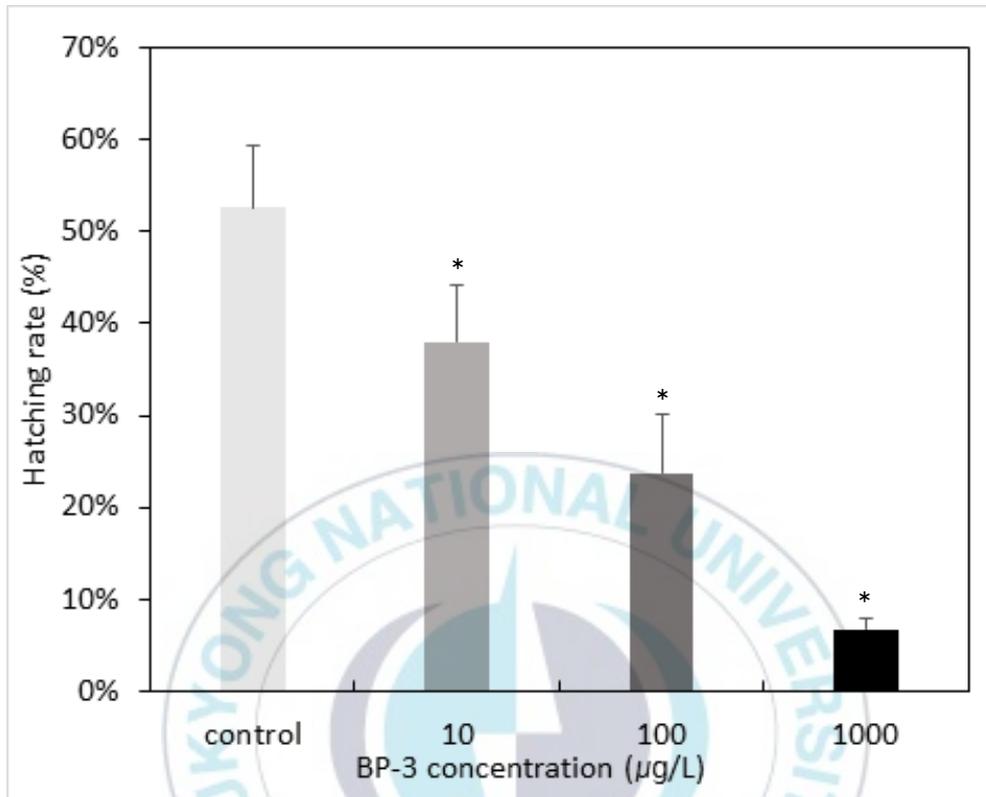


Fig. 19. The hatchability of BP3 exposed *Tridentiger bifasciatus* eggs. Hatching rate (%) was defined as the percentage of successful hatching among the fertilized eggs. Data are expressed as the mean \pm S.E.M (n=100). The asterisk indicates a significant difference ($p < 0.05$) between the control and experimental groups at the same time of exposure.

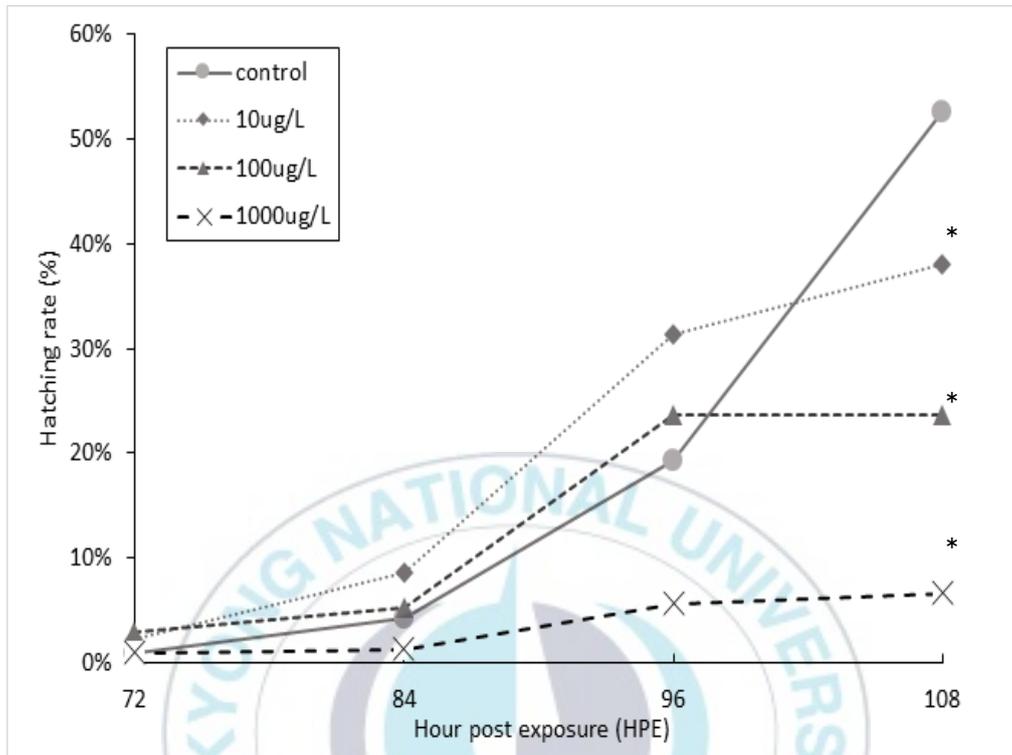


Fig. 20. The hatchability of BP3 exposed *Tridentiger bifasciatus* eggs at different time point. Data are expressed as the mean \pm S.E.M (n = 100). The asterisk indicates a significant difference ($p < 0.05$) between the control and experimental groups at the same time of exposure.

3.4. BP3 노출 시 수정란의 유구, 난황 부피 비 변화

노출 후 6시간 된 대조구의 유구 부피 평균은 $1.40 \pm 0.24 \text{ mm}^3$, BP3 $10 \mu\text{gL}^{-1}$ 실험구에서 $1.31 \pm 0.32 \text{ mm}^3$, BP3 $100 \mu\text{gL}^{-1}$ 에서 $1.36 \pm 0.33 \text{ mm}^3$ 그리고 BP3 $1000 \mu\text{gL}^{-1}$ 실험구에서 $1.33 \pm 0.28 \text{ mm}^3$ 으로 나타났다. 노출 72시간 후 대조구와 BP3 $1000 \mu\text{gL}^{-1}$ 실험구 사이의 유구 부피 감소 회귀 직선의 기울기에 있어서 유의한 차이가 있었다(Fig. 15, ANCOVA, $F = 1.654$, $df = 3$, $p < 0.05$).

비슷하게, 난황 부피는 대조구 $15.5 \pm 4.3 \text{ mm}^3$, BP3 $10 \mu\text{gL}^{-1}$ 실험구에서 $16.7 \pm 3.8 \text{ mm}^3$, BP3 $100 \mu\text{gL}^{-1}$ 에서 $19.4 \pm 6.3 \text{ mm}^3$ 그리고 BP3 $1000 \mu\text{gL}^{-1}$ 실험구에서 $16.4 \pm 6.4 \text{ mm}^3$ 으로 나타났다. 노출 72시간 후 대조구와 BP3 100, $1000 \mu\text{gL}^{-1}$ 실험구 사이의 난황 소모에 의한 난황 부피 감소 회귀 직선의 기울기에 있어서 유의한 차이가 있었다(Fig. 16, ANCOVA, $F = 3.126$, $df = 3$, $p < 0.05$).

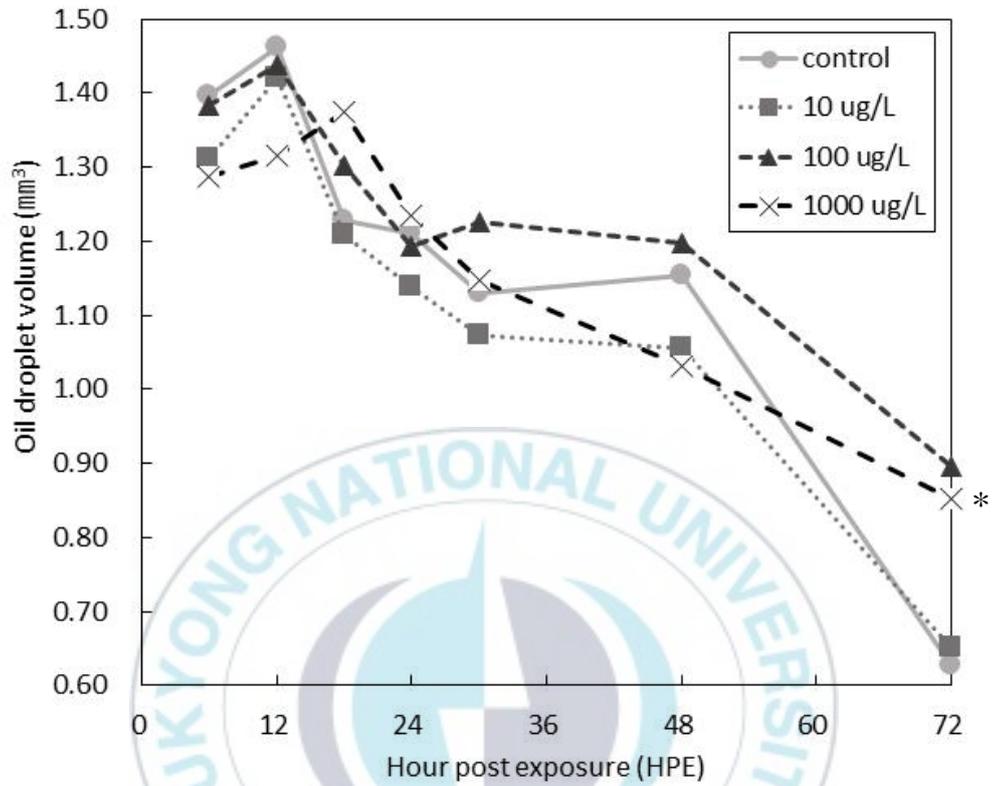


Fig 21. The oil droplet volume(μm^3) of the *Tridentiger bifasciatus* eggs. Data are expressed as the mean \pm S.E.M (n = 7). The asterisk indicates a significant difference ($p < 0.05$) between the control and experimental groups at the same time of exposure.

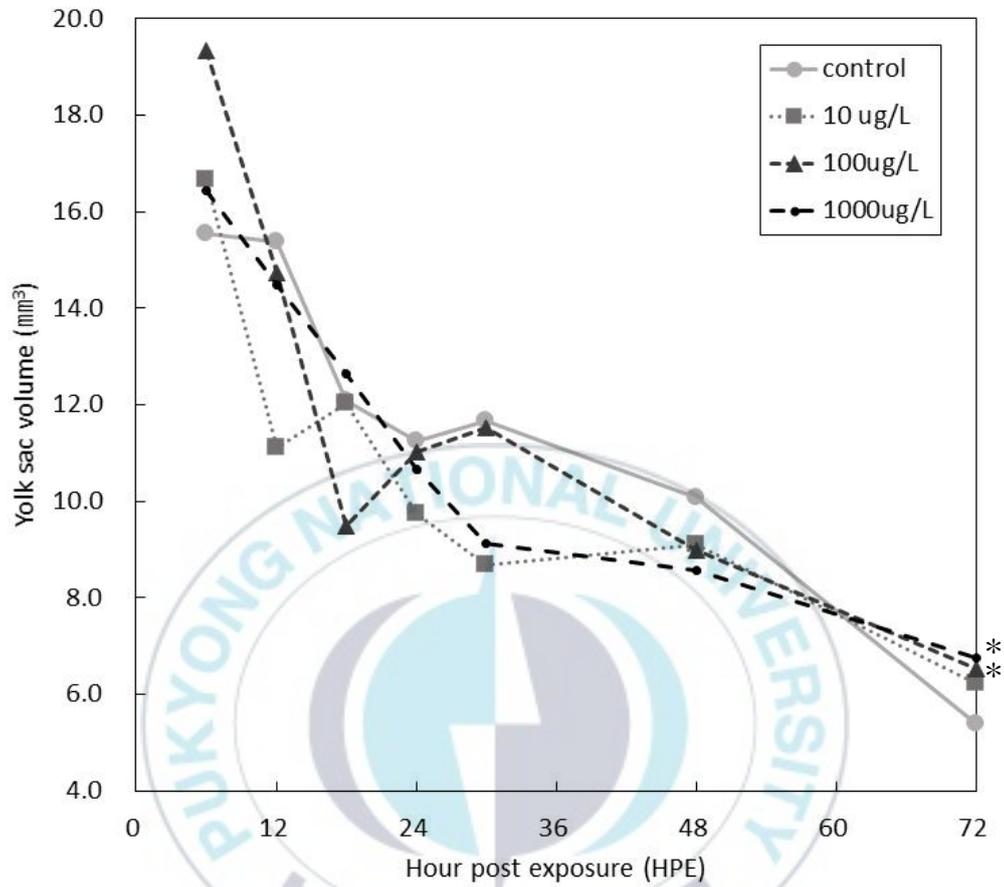
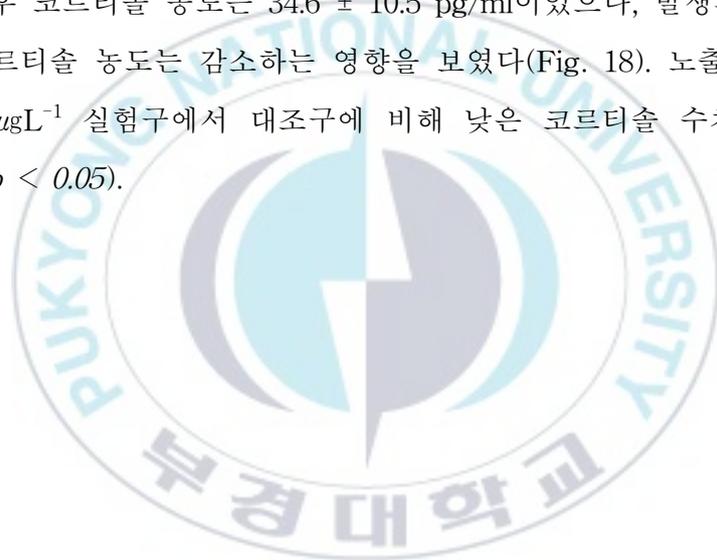


Fig. 22. The yolk sac volume (mm³) of the *Tridentiger bifasciatus* eggs after exposed BP3. Data are expressed as the mean \pm S.E.M (n = 7). The asterisk indicates a significant difference ($p < 0.05$) between the control and experimental groups at the same time of exposure.

3.5. BP3에 노출된 수정란의 심장박동수 및 코르티솔 호르몬 농도 변화

심장발달이 완료된 BP3 노출 60시간 후 개체의 심장박동수를 20초 동안 관찰한 결과, 대조군은 20초당 44회로 BP3 농도 $1000 \mu\text{gL}^{-1}$ 처리 실험구 (50회 / 20초)보다 유의미하게 심장박동수가 낮았다(Fig. 17, $p < 0.05$). BP3 처리에 따라 심장박동수가 증가하는 경향이 관찰된다(Fig. 17).

노출 직후 코르티솔 농도는 $34.6 \pm 10.5 \text{ pg/ml}$ 이었으나, 발생과정이 진행될수록 코르티솔 농도는 감소하는 영향을 보였다(Fig. 18). 노출 후 96시간 BP3 $100 \mu\text{gL}^{-1}$ 실험구에서 대조구에 비해 낮은 코르티솔 수치를 보였다 (Fig. 18, $p < 0.05$).



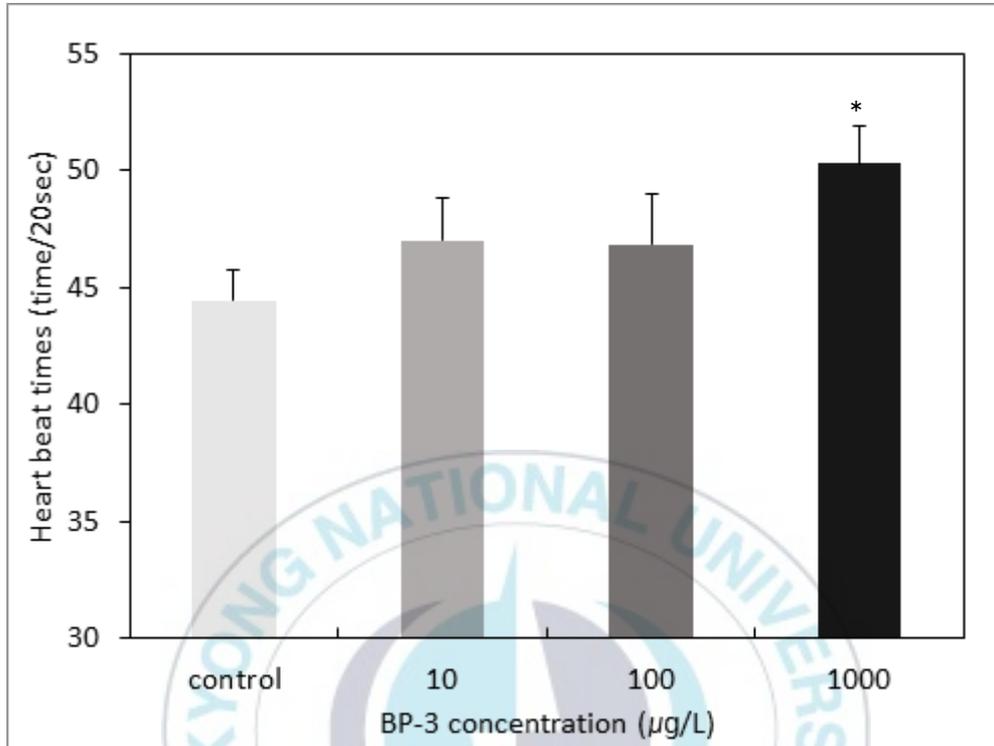


Fig. 23. The heartbeat times (time / 20 sec) of embryo *Tridentiger bifasciatus* exposed to different concentrations of BP3 for 72 hours. Data are expressed as the mean \pm S.E.M (n = 7). The asterisk indicates a significant difference ($p < 0.05$) between the control and experimental groups at the same time of exposure.

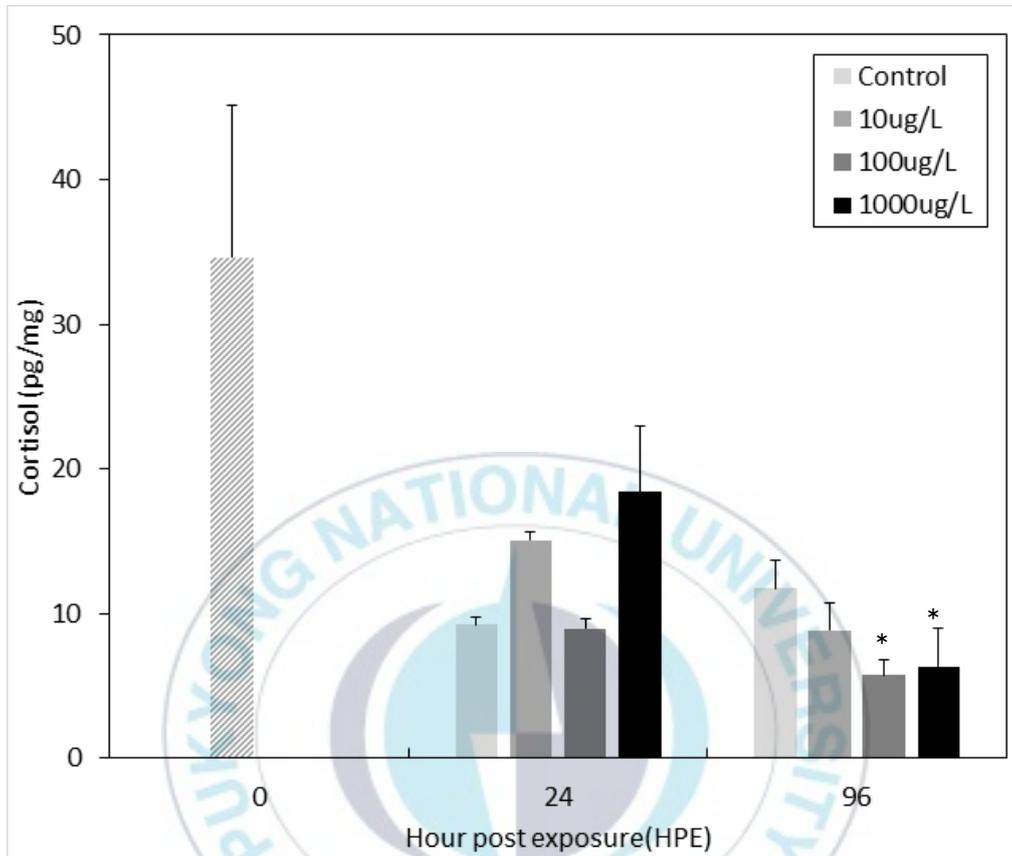


Fig. 24. Level of cortisol in fertilized eggs *Tridentiger bifasciatus* exposed to BP3. Data are expressed as the mean \pm S.E.M (n = 3). The asterisk indicates a significant difference ($p < 0.05$) between the control and experimental groups at the same time of exposure.

IV. 고 찰

망둑어류의 산란생태 보고에 의하면 수컷은 산란하기 전 산란 영역을 형성하고 적극적인 방어 행동을 보이며, 성숙한 암컷에게 구애 행동을 하며 알을 보호하는 보호 행동을 하는 것으로 알려져 있다(Kim and Han, 1990; Hwang et al., 2006). 망둑어류의 난은 돌 등에 부착하는 부착란으로 수컷이 보호한다. 부착성 난을 낳는 종으로는 두줄망둑(Kim and Han, 1990)과 검정망둑(Hwang et al., 2006), 미끈망둑(Kim et al., 1992) 그리고 밀어(Moon et al., 2005) 종 등이 있다. 민물두줄망둑 수정란도 부착성 난에 포함되며 전구모양으로 난경은 평균 장경 $1.03 \pm 0.04 \times$ 단경 0.43 ± 0.02 mm 이었다. 다른 부착사를 지닌 망둑어과 어류의 부착란 난경은 두줄망둑(Kim and Han 1990) $1.40 \sim 1.58 \times 0.5 \sim 0.66$ mm, 검정망둑(Hwang et al., 2006) 0.97×0.66 mm, 밀어(Moon et al., 2005)의 $1.28 \sim 1.56 \times 0.62 \sim 0.67$ mm, 날개망둑(Jin et al., 2003)의 1.50×0.57 mm, 문질망둑(Dotu and Mito, 1955) $0.50 \sim 0.580 \times 0.96$ mm, 흰동갈망둑(Shiogaki and Dotsu, 1974)의 $1.20 \sim 1.45 \times 0.51 \sim 0.55$ mm보다는 작은 편이었고 모치망둑(Kim and Han, 1991)의 $0.93 \sim 0.96 \times 0.43 \sim 0.45$ mm 와 비슷한 경향을 보였다(Table. 2).

민물두줄망둑은 수정란에서 부화까지의 시간은 수온 20°C 에서 수정 후 108시간이었다. 민물두줄망둑과 같은 검정망둑 속에 속하는 검정망둑과 두줄망둑은 수온 $19.3 \sim 24.5^{\circ}\text{C}$ (평균 22.2°C)에서 수정 후 154시간 40분, 22.2°C 에서 137시간이 소요되며 민물두줄망둑의 부화까지 소요된 시간보다 길었다. 이처럼 망둑어과 어류의 부화 소요시간은 수온 차이에 따라 다르며, 침성란이 부성란에 비해 부화에 소요되는 시간이 길고 눈과 심장을 비

못한 기관형성이 난 속에서 진행된 후 부화하는 경향을 보였다.

민물두줄망둑의 부화 직후의 자어 크기는 평균 1.9 mm이었고, 이를 다른 망둑어과 부화 직후 자어의 전장과 비교해 보면, 두줄망둑(Kim and Han, 1990)의 2.88 ~ 3.14 mm, 검정망둑(Hwang et al., 2006)의 2.48 ~ 2.92 mm (평균 2.86 mm), 밀어(Moon et al., 2005)의 3.10 ~ 3.30 mm, 문절망둑(Dotu and Mito, 1955)의 4.60 ~ 5.00 mm, 미끈망둑(Kim et al., 1992)의 3.85 ~ 4.00 mm, 날망둑(Dotu, 1954)의 7.80 mm과 비교하면 작은 편이었고 모치망둑(Kim and Han, 1991)의 2.04 ~ 2.10 mm과는 비슷한 경향을 보였다.

민물두줄망둑 배아의 BP3에 대한 LC50 테스트 결과 0.493 mgL^{-1} 에서 독성을 나타내었다. OECD 203 가이드라인(2013)에 따르면, 송사리, *Oryzias latipes*의 성어 BP3 96시간 단기 독성 테스트 결과 LC50 값은 3.8 mgL^{-1} 였으며, 제브라피쉬 배아에서는 15.93 mgL^{-1} 의 농도 값을 보였다.

BP3 농도 0, 10, 100 그리고 $1000 \mu\text{gL}^{-1}$ 에 108시간 노출된 민물두줄망둑 수정란은 농도 의존적으로 부화율 감소를 초래하였다. 부화율은 초기 발달 독성의 중요한 endpoint로 널리 보고된다(Samaee et al., 2015, Torres et al., 2016, Si et al., 2019). BP3(10, 100, $1000 \mu\text{gL}^{-1}$)는 본 연구에서 농도 의존적으로 부화율을 감소시켰다. 송사리, *Oryzias latipes* 성어를 10, 100 및 $1000 \mu\text{gL}^{-1}$ BP3에 21일 동안 노출시킨 후 산란하는 알의 수와 부화율을 모니터링한 연구에서 BP3 $1000 \mu\text{gL}^{-1}$ 에서 부화율이 현저히 감소되는 것으로 나타났다(Coronado et al., 2008). 마찬가지로 제브라피쉬 배아를 BP3에 노출 시켰을 때도 부화율의 유의한 감소가 관찰되었다(Balázs et al., 2016). 이러한 부화 지연 및 부화율 감소는 척추 만곡 또는 부화 효소의 억제로 인한 것으로 배아가 난막에서 부화하는 것을 방해한다(Sun and Liu, 2017). 또한 BP3에 노출된 배아는 꼬리가 변형되기 때문에 배아의 움

직임을 방해하여 부화에 실패할 수도 있다(Coronado et al. 2008). 본 실험에서도 BP3는 민물두줄망둑 배아의 꼬리 변형을 일으켰다. 이 외에도 Incardona et al.(2004)의 연구에선 심장 기능 장애가 등쪽 및 꼬리 만곡과 같은 기형으로 이어질 수 있다고 시사했다. 순환 장애는 난황낭 부종을 유발할 수 있고 신장 형태 발생에 부정적인 영향을 미칠 수 있다(Incardona et al., 2004).

심장박동수 또한 초기 발달 독성 테스트에서 중요한 요소로 사용된다(Suvarchala and Philip, 2016). Jang et al.(2016)은 UV filter 중 하나인 Ethylhexyl methoxycinnamate(OMC)에 노출된 후 야생형 제브라피쉬에서 심박수가 감소하는 것을 관찰했으며 이는 용량 및 시간 의존적이다. 또한, Torres et al. (2016)은 다른 UV filter 종류인 4-Methylbenzylcathinone (4-MBC)에 대한 노출이 제브라피쉬 배아의 심장박동수에 영향을 미친다고 밝혔다. 게다가, Li et al. (2018a)은 심장과 심낭에서 발생하는 기형이 심장 기능에 영향을 미쳐 불규칙한 심장박동과 혈류 장애를 일으킬 수 있음을 확인했다.

또한 이 과정에서 코르티솔의 역할을 테스트한 결과 코르티솔에 노출된 제브라피쉬 배아는 심장 기능과 발달에 영향을 미치는 것으로 나타났다(MH Farley and L Fohn, 2015). 배아의 심장 형성은 대조군보다 코르티솔 노출 배아에서 1 ~ 1.5시간 일찍 나타나며 코르티솔 노출 배아의 초기 심장박동수는 대조군보다 높았다(MI McCormick and IV Nechaev, 2002). 제브라피쉬 배아는 코르티솔이 처리된 환경에 노출되었을 때 심장강이 확장되는 기형이 나타났고, 48시간 이상 코르티솔 용액에 노출되면 심장박동수가 급격히 증가했다(MH Farley and L Fohn, 2015). 이는 본 연구결과와도 일치한다. BP3 처리를 하여 스트레스 환경을 주었을 때, 민물두줄망둑의 심장박동수가 증가하고, 심장 형성이 비정상적으로 이루어지는 모습이 관

찰되었다. 코르티솔의 농도 변화는 배아의 심장 형성 호르몬으로서 직접적인 영향을 미칠 수 있으며, 심장 성장 이상이 생길 수 있다고 보고하였다 (EM Wintour, 2006).

본 연구에서는 BP3 100과 1000 μgL^{-1} 실험구에서 96시간 처리한 결과, 코르티솔 농도 감소가 일어났다. MH Farley and L Fohn (2015)에 따르면 코르티솔에 의해 유발되는 배아 성장의 가속화로 인해 코르티솔 수치가 감소하고 에너지 소비가 증가하지만, 에너지 보충은 수요를 공급하지 못할 수 있다. 이는 에너지 불충분으로 발달 초기 단계에서 성장과 성장 정체 기간이 번갈아 발생하게 되며, 이러한 불연속적 성장 패턴은 *P. amboinensis* 배아에서 코르티솔에 노출된 배아가 대조군에 비해 짧은 기간 동안 상대적 성장률이 더 높지만 성장 정체 기간이 길어 전반적인 성장 감소를 초래한다. 또 틸라피아의 자어에 다양한 농도의 코르티솔에 2주 동안 노출시킨 연구에서도 코르티솔이 성장에 영향을 줄 뿐만 아니라 가속화된 난황 흡수와 움직임이 일어난다는 것을 발견했다(Mathiyalagan et al. 1996).

Table. 3. The comparison of egg diameter, time for hatching, egg form, total length of adult and larvae size in Gobiidae

Species	Egg diameter (mm)	Time for hatching (Water temperature)	Egg form	Average total length as an adult (mm)	Hatching larvae size (mm)	References
<i>Tridentiger bifasciatus</i>	1.03 × 0.43	130 hrs (21 °C)	Ellipse	55 ~ 83	1.9	Present
<i>Tridentiger trigonocephalus</i>	1.40 ~ 1.58 × 0.50 ~ 0.66	116 hrs 70mins (18.3 ~ 21.7 °C)	Ellipse	55 ~ 80	2.96	Kim and Han, 1990
<i>Tridentiger obscurus</i>	0.97 × 0.66	154 hrs 40 mins (19.3 ~ 24.5 °C)	Ellipse	-	2.83	Hwang et al., 2006
<i>Mugilogobius abei</i>	0.93 ~ 0.96 × 0.43 ~ 0.45	103 hrs (24 °C)	Ellipse	50	2.04 ~ 2.10	Kim and Han, 1991
<i>Rhinogobius brunneus</i>	1.28 ~ 1.56 × 0.62 ~ 0.67	95 hr (22 °C)	Ellipse	80	3.3 ~ 3.4	Moon et al., 2005
<i>Favonigobius gymnauchen</i>	1.50 × 0.57	48 hrs (23 °C)	Ellipse	-	2.31 ~ 2.54	Jin et al., 2003

V. 참고문헌

- Balázs, A., C. Krifaton, I. Orosz, S. Szoboszlai, R. Kovács, Z. Csenki, B. Urbányi and B. Kriszt (2016). "Hormonal activity, cytotoxicity and developmental toxicity of UV filters." *Ecotoxicology and environmental safety* **131**.
- Balmer, M. E., H.-R. Buser, M. D. Müller and T. Poiger (2005). "Occurrence of some organic UV filters in wastewater, in surface waters, and in fish from Swiss Lakes." *Environmental science & technology* **39**(4).
- Calafat, A. M., L.-Y. Wong, X. Ye, J. A. Reidy and L. L. Needham (2008). "Concentrations of the sunscreen agent benzophenone-3 in residents of the United States: National Health and Nutrition Examination Survey 2003--2004." *Environmental health perspectives* **116**(7).
- Cuderman, P. and E. Heath (2007). "Determination of UV filters and antimicrobial agents in environmental water samples." *Analytical and bioanalytical chemistry* **387**(4).
- Emnet, P., S. Gaw, G. Northcott, B. Storey and L. Graham (2015). "Personal care products and steroid hormones in the Antarctic coastal environment associated with two Antarctic research stations, McMurdo Station and Scott Base." *Environmental research* **136**.
- Farley, M. H. (2015). "The Effects of Cortisol on the Cardiac Development/Functionality in Zebrafish - Search Results - PubMed." from <http://hdl.handle.net/2346.1/30396>.

- Fent, K., P. Y. Kunz and E. Gomez (2008). "UV Filters in the Aquatic Environment Induce Hormonal Effects and Affect Fertility and Reproduction in Fish."
- Fent, K., A. Zenker and M. Rapp (2010). "Widespread occurrence of estrogenic UV-filters in aquatic ecosystems in Switzerland." *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)* **158**(5).
- Gago-Ferrero, P., M. S. Díaz-Cruz and D. Barceló (2011). "Occurrence of multiclass UV filters in treated sewage sludge from wastewater treatment plants." *Chemosphere* **84**(8).
- Kameda, Y., K. Kimura and M. Miyazaki (2011). "Occurrence and profiles of organic sun-blocking agents in surface waters and sediments in Japanese rivers and lakes." *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)* **159**(6).
- Kim, S. and K. Choi (2014). "Occurrences, toxicities, and ecological risks of benzophenone-3, a common component of organic sunscreen products: a mini-review." *Environment international* **70**.
- Kim, Y.-U., K.-H. Han, C.-B. Kang and J.-W. Ryu (1992). "Early Life History and Spawning Behavior of the Gobiid Fish, *Luciogobius guttatus* Gill." *Korean Journal of Ichthyology* **4**(1): 1-13.
- Leal, L. H., N. Vieno, H. Temmink, G. Zeeman and C. J. N. Buisman (2010). "Occurrence of xenobiotics in gray water and removal in three biological treatment systems." *Environmental science & technology* **44**(17).

- Loraine, G. A. and M. E. Pettigrove (2006). "Seasonal variations in concentrations of pharmaceuticals and personal care products in drinking water and reclaimed wastewater in southern California." *Environmental science & technology* **40**(3).
- Matern, S. A. (2011). "Using Temperature and Salinity Tolerances to Predict the Success of the Shimofuri Goby, a Recent Invader into California." Changed publisher: Wiley.
- McCormick, M. I. and I. V. Nechaev (2002). "Influence of cortisol on developmental rhythms during embryogenesis in a tropical damselfish." *The Journal of experimental zoology* **293**(5).
- Moon, W.-K., Y.-E. Na and K.-G. An (2005). "Spawning Behavior and Early Life History of Korea Freshwater Goby (*Rhinogobius brunneus*)." *Korean Journal of Ecology and Environment* **38**(1): 83-94.
- Nesan, D. and M. M. Vijayan (2013). "Role of glucocorticoid in developmental programming: evidence from zebrafish." *General and comparative endocrinology* **181**.
- Nesan, D. and M. M. Vijayan (2016). "Maternal Cortisol Mediates Hypothalamus-Pituitary-Interrenal Axis Development in Zebrafish." *Scientific reports* **6**.
- Niu, Y., N. Sun, C. Li, Y. Lei, Z. Huang, J. Wu, C. Si, X. Dai, C. Liu, J. Wei, L. Liu, S. Feng, Y. Kang, W. Si, H. Wang, E. Zhang, L. Zhao, Z. Li, X. Luo, G. Cui, G. Peng, J. C. I. Belmonte, W. Ji and T. Tan (2019). "Dissecting primate early post-implantation development using long-term in vitro embryo culture." *Science (New York, N.Y.)* **366**(6467).

- Poiger, T., H.-R. Buser, M. E. Balmer, P.-A. Bergqvist and M. D. Müller (2004). "Occurrence of UV filter compounds from sunscreens in surface waters: regional mass balance in two Swiss lakes." *Chemosphere* **55**(7).
- Rodil, R., M. Moeder, R. Altenburger and M. Schmitt-Jansen (2009). "Photostability and phytotoxicity of selected sunscreen agents and their degradation mixtures in water." *Analytical and bioanalytical chemistry* **395**(5).
- Samaee, S.-M., S. Rabbani, B. Jovanović, M. R. Mohajeri-Tehrani and V. Haghpanah (2015). "Efficacy of the hatching event in assessing the embryo toxicity of the nano-sized TiO₂ particles in zebrafish: a comparison between two different classes of hatching-derived variables." *Ecotoxicology and environmental safety* **116**.
- Simontacchi, C., E. Negrato, M. Pazzaglia, D. Bertotto, C. Poltronieri and G. Radaelli (2008). "Whole-body concentrations of cortisol and sex steroids in white sturgeon (*Acipenser transmontanus*, Richardson 1836) during early development and stress response." *Aquaculture International* **17**(1): 7-14.
- Sun, G. and K. Liu (2017). "Developmental toxicity and cardiac effects of butyl benzyl phthalate in zebrafish embryos." *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)* **192**.
- Suvarchala, G. and G. H. Philip (2016). "Toxicity of 3,5,6-trichloro-2-pyridinol tested at multiple stages of zebrafish (*Danio rerio*) development." *Environmental science and pollution research international* **23**(15).

- Tarazona, I., A. Chisvert, Z. León and A. Salvador (2010).
"Determination of hydroxylated benzophenone UV filters in sea water samples by dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry." *Journal of chromatography. A* **1217**(29).
- Trayer, V., P.-P. Hwang, P. Prunet and V. Thermes (2013).
"Assessment of the role of cortisol and corticosteroid receptors in epidermal ionocyte development in the medaka (*Oryzias latipes*) embryos." *General and comparative endocrinology* **194**.
- Wintour, E. M. (2006). "Cortisol: a growth hormone for the fetal heart?" *Endocrinology* **147**(8).
- Zhang, Z., N. Ren, Y.-F. Li, T. Kunisue, D. Gao and K. Kannan (2011).
"Determination of benzotriazole and benzophenone UV filters in sediment and sewage sludge." *Environmental science & technology* **45**(9).
- 강주찬, 지정훈, 김성길, 박경수 and 박승윤 (2004). "염분농도에 따른 두줄망둑, *Tridentiger trigonocephalus* 치어의 내성." *Korean Journal of Environmental Biology* **22**(1): 153-158.
- 예상진, 백근욱, 정재묵, 김현지, 박주면 and 허성희 (2014). "순천 상내리 갯골에 출현하는 민물두줄망둑(*Tridentiger bifasciatus*)의 식성." *한국수산과학회지* **47**(2): 160-167.

감사의 글

먼저 항상 올바른 방향으로 지도해 주시고 어리숙한 저를 냉철한 피드백과 조언을 통해 성장시켜주신 백혜자 교수님께 진심으로 감사드립니다.

바쁘신 와중에도 저의 논문을 꼼꼼히 살펴봐주신 김진구 교수님과 바쁘신 가운데도 흔쾌히 맞아주시고 진심 어린 조언해주신 김현우 교수님 정말 감사드립니다. 힘들고 지칠 때마다 많은 조언과 격려를 아끼지 않으셨던 현상윤 교수님께도 감사의 마음을 전합니다. 그리고 학부생 때부터 전공지식을 가르쳐 주신 남기완 교수님, 오철웅 교수님, 박원규 교수님 모두 감사드리고 존경합니다.

아무것도 모르는 학부생 때부터 저와 함께 해주시고 제일 의지하게 되었던 희원언니, 실험실 중심이 되어주고 있는 진성오빠, 오래 보지는 못했지만 열심히 하는 모습에 정이 갔던 막내 민설이, 사소한 질문도 답변해주며 따뜻한 격려로 저에게 많은 힘이 되어준 소라언니, 바쁘신 와중에도 실험실을 오가며 진심 어린 조언을 해주신 김대근 선배님, 김효원 선배님, 강민주 선배님께도 감사의 말씀 드립니다.

석사생활 하면서 가장 큰 버팀목이 되어준 소중한 학·석사과정 친구 항상 제 말을 끝까지 들어주고 공감해주는 유안이, 항상 웃으면서 열렬한 리액션을 해주는 소연이에게도 감사의 말 전합니다. 또 학부 때부터 의지하고 있는 동기 활미들 영신언니, 아람언니, 친구들 윤지, 주원이, 은서에게도 감사의 말을 전합니다. 옆에서 대학원 생활을 응원해준 재익이에게도 감사합니다.

마지막으로 언제나 저를 믿고 응원해주는 부모님과 동생에게도 깊이 감사드리며 사랑합니다.