

물벼룩에 있어 bisphenol A의 embryo독성

황 갑 수

군산대학교 토목환경공학부

Embryotoxicity of Bisphenol A in *Daphnia magna*

Gab Soo Hwang

School of Civil and Environmental Engineering, Kunsan National University

ABSTRACT

Embryotoxicity tests were performed in *Daphnia magna* to assess aquatic ecotoxicity of bisphenol A, a well known industrial compound showing estrogen-like activity in vivo, and to examine their effectiveness in the toxicological assessment. The whole embryonic developmental period was classified into 6 stages and developmental abnormality was checked to evaluate the embryotoxicity. In the present study, bisphenol A showed the ability to interfere with embryonic development, suggesting its antiestrogenic activity. The rates of mortality, delayed development, deformity and immobility all showed good concentration-response relationship, demonstrating their possibility as useful toxicological indices in daphnid embryotoxicity tests that have been rarely performed so far. It seemed favorable to the test sensitivity that embryos are removed from maternal daphnids around 7 hr after deposition from the ovaries to the brood chamber. These results suggest that daphnid embryotoxicity tests can be one of useful tools available for the assessment of ecotoxicity of various chemicals in the aquatic environment.

Key words : Embryotoxicity, *Daphnia magna*, bisphenol A, aquatic ecotoxicity, developmental abnormality

서 론

현대 산업사회에서 우리인간은 수많은 화학물질들의 홍수 속에 살고 있다. 다양한 환경 중으로 유출된 각종 유해화학물질들은 그 환경매체 중에서 서식하는 수많은 생물 종들에 피해를 가하여 생태계 전반의 안정성을 교란시키게 되고 그 중독적 폐해는 결국 인간에게 미치게 된다. 그러나 그간의 유해화학물질 관리와 관련된 국제적 연구노력은 주로 인간 건강에 대한 위해성평가에 보다 편중되

어 왔으며 상대적으로 환경중의 생물체를 대상으로 하는 생태위해성 평가에 대한 관심은 미흡했던 것으로 평가된다. 따라서 근래 생태위해성 평가의 중요성을 인식하여 하천, 해양, 대기, 토양, sediment 등의 환경매체들에 대한 오염평가에 있어 물리화학적 기법에 의한 오염물질의 단순정량분석을 지양하고 다양한 생물학적 재료들을 이용한 생물검정시험법들의 적용을 통해 생태계에 대한 실제적인 위해성평가를 수행하고자 하는 연구노력들이 국내외에서 활발히 시도 (한국화학연구소 안전성 연구센터, 1997; West *et al.*, 1997; Wernersson *et al.*, 1999; Hisao *et al.*, 2000; 이철우 등, 2005)되어 오고 있으며 향후 효율적 평가기술의 개발과 표준화를 위한 국제적 노력은 갈수록 한층 가속화될 전망이

※ To whom correspondence should be addressed.
Tel: +82-63-469-4763, Fax: +82-63-469-4964
E-mail: gshwang@kunsan.ac.kr

다.

Bisphenol A는 식품 캔 등을 가열시 용출되는 등 우리의 실제적인 일상생활과 밀접한 관련을 가지는 내분비계 장애물질인 만큼 그간 많은 연구노력이 집중되어 왔다. 그러나 그 독성학적 중요성에도 불구하고 국내에서의 bisphenol A에 대한 연구는 미미하였고 또한 국외의 관련 연구결과들도 대부분이 내분비계 장애물질로서 척추동물에 있어 건강위해성평가에 집중되어 왔으며 (Bond *et al.*, 1980; Krishnan *et al.*, 1993) 무척추동물 등을 이용한 생태위해성평가와 관련된 연구는 매우 미미한 실정이다.

산업폐수, 도시폐수 등에 의한 수질오염이 인간의 건강과 수중생물에 심각한 위해를 초래함은 주지의 사실이며 이들 수중 유해독성물질들을 감시, 제어하기 위한 실제적인 유용한 접근법으로서 다수의 생물학적 기법들이 제시되어 왔는데 이 중 소형어류나 갑각류의 embryo를 이용한 독성실험은 실험동물의 배양 및 관리가 비교적 간편하고 실험동물들이 비교적 짧은 세대기간과 생식주기를 갖고 있어 필요한 때에 충분한 실험재료 (embryo)를 얻기가 용이하며 짧은 성장기간 내에서 우수한 감도로서 developmental toxicity에 대한 관찰이 가능하다는 장점 때문에 근래 생태독성학자들을 중심으로 많은 관심을 받아왔다 (Dave *et al.*, 1987; LeBlanc *et al.*, 2000; Wirth *et al.*, 2001). 이와 같은 장점에도 불구하고 bisphenol A의 위해성평가와 관련된 그간의 연구보고들을 검토해 보면 소형어류나 갑각류의 embryo를 이용한 embryotoxicity 시험의 연구결과는 극히 찾아보기 어렵다.

따라서 본 연구에서는 daphnia의 embryo를 사용한 embryotoxicity 실험을 통하여 대표적인 내분비계 장애물질로 알려져 있는 bisphenol A의 생태위해성 평가를 수계환경을 대상으로 수행하고 나아가 daphnia의 embryo를 활용한 효율적 생태위해성 평가기법의 개발에 기여하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 (*Daphnia magna*)의 배양

금번 연구의 수행에 있어 물벼룩의 배양 및 관리 는 Olmstead 등 (Olmstead *et al.*, 2002)의 방법에 준

하여 수행하였다. 그 내용을 요약하면, 물벼룩의 사육을 위하여 항상 $20 \pm 2^\circ\text{C}$ 의 온도, 16L/8D의 광주기가 유지되어지며 매일 오전 중 정기적으로 먹이 공급여부, sieving여부, 사육수 교체여부, 물벼룩의 건강상태 등이 점검되어졌다. 사육수로서는 증류수에 KCl 8 mg/L, MgSO₄ 120 mg/L, NaHCO₃ 192 mg/L, CaSO₄ · H₂O 120 mg/L가 첨가되는 Hard constituted water medium이 조제되었고 여기에 selenium 1 mg/L와 vitamin B₁₂ 1 mg/L가 첨가되어 사용되었으며 물벼룩의 먹이로는 tetrafin fish food와 green algae (*Selenastrum capricornutum*)의 배합된 적당량이 매일 2차례 공급되어졌다. 물벼룩은 1 L의 배양액 중 45마리의 밀도로 유지 배양되었으며 배양액은 1주일에 3회씩 교환되었다. 이와 같은 실험실적 배양조건하에서 단성생식 (parthenogenetic reproduction)을 통해 물벼룩의 female들이 연속적으로 배양되었다.

2. Bisphenol A의 embryotoxicity 실험

본 연구에서는 bisphenol A가 물벼룩에 대한 발육독성물질 (developmental toxicant)인지의 여부와 함께 물벼룩 embryo들의 brood chamber내 출현 후 성숙시간별에 따른 독성실험을 수행하여 독성 감수성의 차이를 확인하여 가장 효율적인 daphnia embryotoxicity 평가기법의 수행 조건들을 확립하는데 기여토록 하였다. 물벼룩 embryo의 전성숙과정은 6단계들로 구분되어졌으며 (Kast-Hutcheson *et al.*, 2001) 실험의 안정성과 감수성이 충족되도록 brood chamber내 embryo 출현확인 후 6~7.5시간, 8~8.5시간, 20~20.5시간의 연령대를 대상으로 관련 embryo독성실험들이 수행되었다. 실험수행을 위해 6~7.5시간 연령대의 경우 각 농도별로 40~45개, 8~8.5시간 및 20~20.5시간 연령대의 경우 16~20개의 embryo들이 가급적 동일 어미의 brood chamber내에서 채취되어 0~20 mg/L 농도범위에서 2배수 계열농도의 bisphenol A 함유 배양액 200 μL가 주입 (0.01% ethanol 함유)된 96 well microtiter plate의 각 well에 개별적으로 분리되었다. 분리된 embryo들은 20°C, 16 h 광주기하에서 배양되었고 치사율 (mortality), 발육지연 (delayed development), 형태이상 (deformity), 비운동성 (immobility) 등을 산출하기 위해 매 12시간마다 현미경을 통하여 발육상의 이

상유무가 면밀히 관찰되어졌다.

결과 및 고찰

Embryo 독성시험의 유용성을 인식하고 물벼룩 embryo를 이용하여 bisphenol의 생태발육독성을 평가하고자 수행된 본 연구에서 초기 6~7.5시간 연령대의 물벼룩 embryo를 사용하였을 때 sigmoid 형의 전형적인 농도의존적 치사반응곡선을 얻을 수 있었으며 (Fig. 1) 이를 위한 최적 관찰시간은 폭로개시 72시간 후 임을 알 수 있었다. 반면 8시간 이후의 embryo 연령대에 있어서는 적용된 bisphenol A의 전농도범위에 걸쳐 폭로 후 72시간동안 매우 낮은 치사감수성을 나타냄으로서 농도의존적 치사반응곡선을 제공하지 못하였다. 물벼룩 embryo의 발육단계에 있어 stage 1단계는 기존의 보고 (Kast-Hutcheson *et al.*, 2001)와는 다소 다르게 본 실험에 있어서는 embryo가 brood chamber내에 출현된 후 18~19시간 정도까지 지속되는 것으로 관찰되었는데 초기 연령대의 embryo사이에 있어서도 외부 환경에 대한 감수성의 차이가 매우 뚜렷하였다. 구체적으로 6시간 연령 이전의 embryo들은 실험수행 중 안정성을 제공하지 못하고 거의 파열됨을 보여주었으며 8시간 이후 연령대의 embryo들은 bisphenol에 대해 강한 저항성을 나타내어 실험수행을 위한 높은 감수성을 제공하지 못하였다.

Fig. 1로부터 6~7.5시간 연령대의 embryo에 대한 bisphenol A의 72 h LC₅₀은 2.5~3 mg/L 범위의

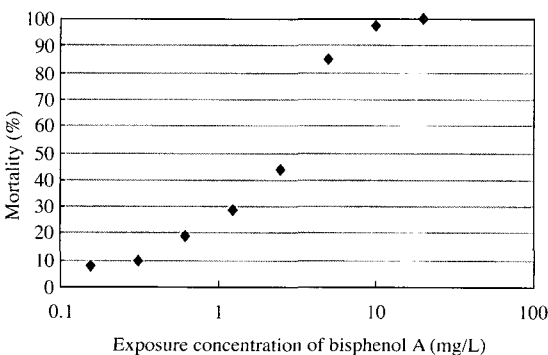


Fig. 1. The lethal response curve of early daphnid embryo (age of 6~7.5 hr) to bisphenol A. Response was checked 72 hrs after exposure.

것으로 파악되었다.

Fig. 2는 bisphenol A의 폭로로부터 생존한 embryo들 중에서 운동성의 유무에 대해 관찰한 결과이다. 이때 30초 이상 전혀 운동성이 보이지 않은 경우 비운동성 embryo로 check되었으며 최적 관찰시기는 bisphenol A 폭로 후 60~62시간사이로 이 시기에 6~7.5시간 및 8~8.5시간 연령대의 모든 생존 embryo들은 발육단계 분류상 stage 5의 후반기에 해당하였다. 실험결과 6~7.5시간과 8~8.5시간 연령대의 경우들이 감수성의 차이에 따른 일정한 반응 gap을 나타내면서 대체적으로 농도의존적으로 증가하는 반응 pattern을 보여주었다.

Fig. 3은 bisphenol A가 물벼룩 embryo들에 대해 발육저해작용 (developmental inhibition)을 나타냄을 보여주고 있다. 최적관찰시간은 폭로 후 72시간 전후인 것으로 확인되었으며 이 시기에 정상적인 embryo들은 완전히 성체로 발육된 발육단계 분류상 stage 6에 해당하나 bisphenol A의 폭로에 의해 일부의 embryo들이 stage 5에 해당되는 발육저해를 보이는 것으로 나타났으며 특히 6~7.5시간 연령대의 경우에 있어 8~8.5시간 연령대의 경우에 비해 전형적인 농도의존적 반응 pattern을 보여주었고 이 경우 bisphenol A의 폭로농도 10 mg/L에서 모든 embryo들이 stage 5단계에 해당하는 것으로 나타났다. 이러한 발육저해작용에 대한 실험결과를 Fig. 4와 관련된 형태이상에 대한 관찰결과와 함께 bisphenol A가 물벼룩에 대해 anti-ecdysteroidal activity를 가지고 있음을 시사하는 것으로 볼 수

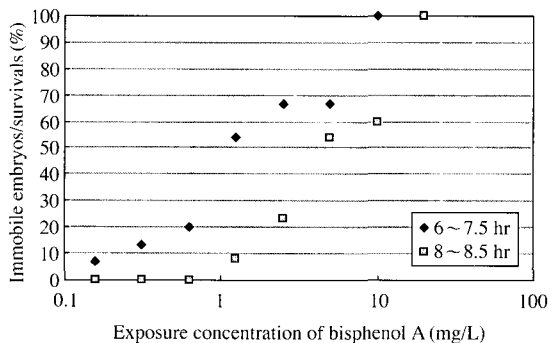


Fig. 2. Immobility by bisphenol A exposure in early daphnid embryo (age of 6~8.5 hr). Response was checked 60~62 hrs after exposure in the late stage 5 of all daphnids.

있으며 이와 관련하여 Mu 등(2005)은 bisphenol A가 물벼룩에 있어 molting을 지연시키고 embryo의 발육을 저해시키는 antiecdysteroidal activity를 야기한다고 보고하였다.

Fig. 4에서는 bisphenol A에 폭로된 물벼룩 embryo들에 있어 생존 embryo들 중 형태이상(deformity)을 가진 embryo들의 존재비율을 도시하였다. 이 때 embryo 발육상에 있어 형태이상에 대한 대표적인 관찰대상 내용은 shell spine과 antennae 등의 발육이상(Fig. 5)으로 최적관찰시간은 폭로 후 72시간 전후였다. 본 실험에 있어 6~7.5시간 연령대의 경우는 bisphenol A의 폭로농도 0.3 mg/L, 8~8.5시간 연령대의 경우는 bisphenol A의 폭로농도 5 mg/L에서부터 형태이상이 농도의존적으로 유발

됨을 보여주었으며 20~20.5시간 연령대의 경우 생존 embryo들 중 모두에서 형태이상은 관찰되지 않았다.

Fig. 6에서는 6~7.5시간 연령대의 embryo들에 있어 상기 단일 독성반응변수들에 대한 대표적인 부가변수반응 결과를 산출, 도시하였는데 제시된 2개 부가변수들 (dead+developmental inhibition, dead+deformity) 모두의 경우에 있어 전형적인 농도의존적 S자 반응곡선을 제공함으로써 물벼룩 embryo독성시험이 전반적인 발육이상 (develop-

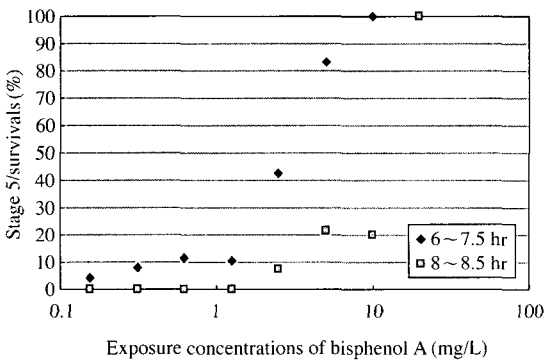


Fig. 3. Developmental inhibition by bisphenol A exposure in early daphnid embryo (age of 6~8.5 hr). Response was checked 72 hrs after exposure.

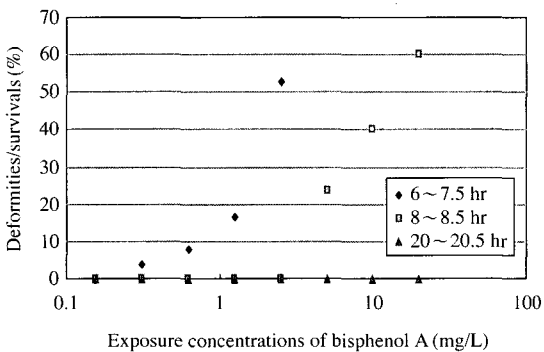


Fig. 4. Deformity by bisphenol A exposure in early daphnid embryo (age of 6~8.5 hr). Response was checked 72 hrs after exposure.

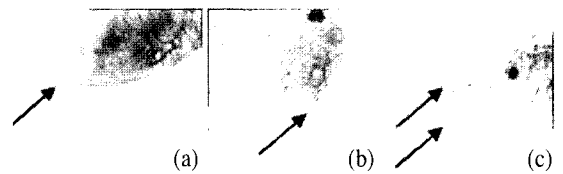


Fig. 5. Examples of representative deformities. Abnormalities such as curved (a) or unextended (b) shell spine and underdeveloped antennae (c) were observed.

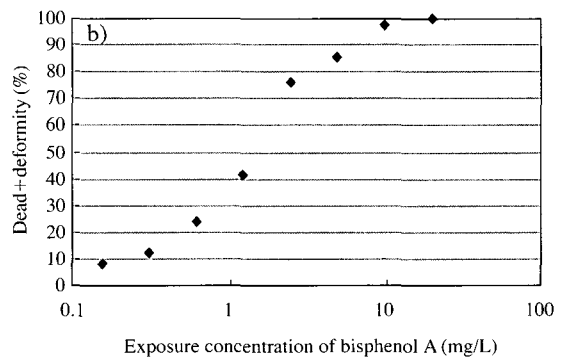
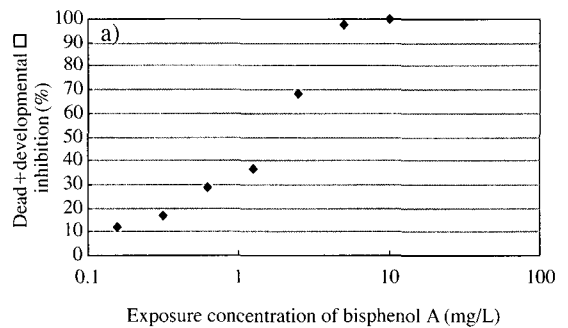


Fig. 6. Additive parameters in early daphnid embryo (age of 6~7.5 hr). Response was checked 72 hrs after exposure.

mental abnormality)을 검정하는 효율적 시험법으로서 화학물질의 발육독성을 평가하는데 있어 유용한 평가수단이 될 수 있음을 확인시켜 주었다. 아울러 8시간 이후 연령대의 embryo들에 대해서는 반응 감수성의 약화로 인해 폭로농도변화에 따른 유효한 반응분별성을 얻기 어려운 것으로 판명된 바 발육독성평가를 위한 물벼룩의 embryo독성시험을 위해서는 7시간 전후 연령대의 embryo를 사용함이 가장 적합함을 알 수 있었다.

이상 본 연구에서 수행된 실험결과들로부터 물벼룩 embryo들을 사용한 독성실험은 다양한 독성 parameter들의 활용에 대한 합리성을 부여해 주며 실험수행의 경제성 및 발육독성관찰에 대한 효율성의 제공을 통해 화학물질의 생태독성평가를 위한 유용한 평가수단으로서 제시될 수 있음을 알 수 있었다.

결 론

대표적인 내분비교란물질로 알려져 있는 bisphenol A에 대해 실험동물로서 물벼룩 (*Daphnia magna*)을 사용하여 embryo독성시험을 수행한 본 연구결과

1. 관찰된 독성반응들(mortality, immobility, delayed development, deformity)에 대해 전체적으로 양호한 농도상관성을 보여주었다.
2. bisphenol A는 전반적으로 물벼룩 embryo의 발육을 저해하여 무척추동물에 있어 anti-ecdysteroidal activity를 가지고 있음을 시사하였다.
3. 물벼룩 embryo를 사용하여 화학물질의 발육독성평가를 수행시 brood chamber내 출현 후 7시간 전후 연령대의 embryo들을 사용함이 가장 적합하며 전반적인 반응 parameter들에 대한 최적 관찰시간은 폭로 후 72시간임을 알 수 있었다.
4. 전체적으로 물벼룩을 이용한 embryo독성시험이 화학물질의 생태독성평가에 다양한 유용성을 제공할 수 있음을 시사하였다.

감사의 글

본 연구는 지역대학 우수과학자 연구지원사업

(과제번호, R05-2004-000-10180-0)으로 학술진흥재단의 지원으로 수행되었음에 감사드립니다.

참 고 문 헌

이철우, 박수영, 윤준현, 최경희, 정영희, 김현미. Nonylphenol과 bisphenol A의 지렁이 독성시험 및 토양 중 생태위해성평가, 한국환경독성학회지 2005; 20(4): 279-286.

한국화학연구소 안전성 연구센터. 환경위해성평가, 제1회 환경독성 workshop 발표논문집, 1997.

Bond GP, McGinnis PM, Cheever L, Harris J, Plotnich HB and Niemeier RW. Reproductive effects of bisphenol A, *The Toxicologist*; 1980; A23.

Dave G, Damgaard B, Grande M, Martelin JE, Rosander B and Viktor T. Ring test of an embryo-larval toxicity test with zebrafish (*Brachydanio rerio*) using chromium and zinc as toxicants, *Environ Toxicol Chem* 1987; 6: 61-71.

Hsiao WL, Mo, ZY, Fang M, Shi XM and Wang F. Cytotoxicity of PM (2.5) and PM (2.5-10) ambient air pollutants assessed by the MTT and Comet assays, *Mutat Res* 2000; 471(1-2): 45-55.

Kast-Hutcheson K, Rider CV and LeBlanc GA. The fungicide propiconazole interferes with embryonic development of the crustacean *Daphnia magna*, *Environ Toxicol Chem* 2001; 20(3): 502-509.

Krishnan AV, Stathis P, Permeth SF, Tokes L and Feldman D. Bisphenol A: An estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving, *Endocrinology* 1993; 132: 2279-2286.

LeBlanc GA, Mu X and Rider CV. Embryotoxicity of the alkylphenol degradation product 4-nonylphenol to the crustacean *Daphnia magna*, *Environ Health Perspec* 2000; 108: 1133-1137.

Mu X, Rider CV, Hwang GS, Hoy H and LeBlanc GA. Covert signal disruption: anti-ecdysteroidal activity of bisphenol A involves cross talk between signaling pathways, *Environ Toxicol Chem* 2005; 24(1): 146-152.

Olmstead A and LeBlanc G. Effects of endocrine-active chemicals on the development of sex characteristics of *Daphnia magna*, *Environ Toxicol Chem* 2002; 19: 2107-2113.

Wernersson AS, Dave G, and Nilsson E. Combining sediment Quality criteria and sediment bioassays with photoactivation for assessing sediment quality along the swedish west coast, *J Aquat Ecosyst Health* 1999; 2(4): 379-389.

- West CW, Ankley GT, Nichols JW, Elonen GE and Nessa DE. Toxicity and bioaccumulation of 2, 3, 7, 8-TCDD in long-term tests with the freshwater benthic invertebrates *Chironomus tentans* and *Lumbriculus variegatus*, Environ Toxicol Chem 1997; 16: 1287-1294.
- Wirth EF, Lund SA, Fulton MH and Scott GI. Determination of acute mortality in adult and sublethal embryo responses of *Palaemonetes pugio* to endosulfan and methoprene exposure, Aquatic Toxicol 2001; 48: 127-134.