

Bisphenol A와 4-nonylphenol에 노출된 *C. riparius* (Diptera: Chironomidae)의 하순기절 기형성

곽인실* · 이원철¹

전남대학교 해양기술학부, ¹한양대학교 생명과학과

The Mentum Deformity of *C. riparius* Following Exposure to Bisphenol A and 4-nonylphenol

Inn-Sil Kwak* and Wonchoel Lee¹

Faculty of Marine Technology, Chonnam National University,
¹Department of Life Science, Hanyang University

Abstract – The fourth instar larvae of *C. riparius* were treated with potential endocrine disruption chemicals (EDCs) such as bisphenol A (BPA) and 4-nonylphenol and the effects of morphological abnormalities were observed. The deformities of the mentum following exposure to EDCs showed the smooth tooth, the loss of tooth and deformed tooth. The incidence rates of the mentum deformity were associated with chemicals: BPA 31~90%, and 4-nonylphenol was 40~80%. As the concentration of BPA increased, the incidence of deformed mentum was dose dependent. While the incidences of deformed mentum following exposure to 4-nonylphenol was not associated with their concentrations. The deformed MLT observed smooth or round tooth and the deformity of LT showed loss of one or more than tooth. Also, the MIX type was usually smooth or loss tooth. The abundance of deformity type for the mentum showed MIX (MLT+LT) >LT (lateral teeth) >MLT (median lateral teeth).

Key words : deformity, *Chironomus riparius*, bisphenol A, 4-nonylphenol, endocrine disruption

서론

수생태계에서 내분비계교란물질이 하등 무척추동물에 끼친 영향을 보고한 예는 드물었으나 최근 들어 내분비계교란물질이 수서곤충에 끼친 영향에 관한 연구가 다수 보고 되고 있는 추세이다(Kwak and Lee 2005a, b, c). 농작물을 위해 살포되는 bipyridilium 계열 제초제인 diquat dibromide와 paraquat dichloride는 수서곤충의 내

분비 관련 과정에 관여하여 cytochrome P-450효소를 저해하는 것으로 알려져 *Neobellieria bullata* (회색취파리) 유충의 제1령기 기간 연장, 첫 탈피의 장애, 용화 지연 등과 같은 발육과 성장에 모두 영향을 미치는 것이 보고되었다(Darbas *et al.* 1990). 국내에서는 파리류인 *Chironomus*를 대상으로 살충제인 tebufenozide에 의한 발생 지연, 우화 연장, 성비의 교란, 암컷의 체적 비대화, 구강기형 등을 보고하였다(Kwak and Lee 2003a, b, 2004a, b, 2005a, b, c).

특히 깔따구 유충의 구기와 두부의 기형(deformity)은 중금속과 농약의 노출에 의해 영향을 받으며(Hamilton

*Corresponding author: Inn-Sil Kwak, Tel. 061-659-3193, Fax. 061-659-3199, E-mail. inkwak@hotmail.com, iskwak@chonnam.ac.kr

and Saether 1971), *C. thummi*에서 발견된 특정기형은 중금속, phthalates 또는 DDT의 존재와 관련이 있는 것으로 보고되었다(De Bisthoven *et al.* 1995). 최근에 내분비계교란물질에 의한 *C. plumosus* (장수갈따구)의 구강기형이 보고되었다(Kwak and Lee 2005c).

반대되는 연구 결과들로, 플라스틱 가소제인 phthalate ester에 노출된 *Chironomus riparius*는 발육에 영향을 받지 않았으며(Brown *et al.* 1996), tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD; West *et al.* 1997)에 노출된 *C. tentans*도 생존, 성장, 발육 또는 생식에 영향을 받지 않는 것으로 보고되었다. TCDD는 숲모기류인 *Aedes aegyptii*의 용화에 영향을 미치지 않는다고 보고되었다(Miller *et al.* 1973). 특히, 노닐페놀은 *C. tentans*의 성장, 생존, 우화, 성비, 난 치사에 영향을 미치지 않는 것으로 보고되었다(Kahl *et al.* 1997).

갈따구과의 유충시기는 대부분 진흙이나 미세한 입자성 물질로 집을 짓고 그 속에서 생활하며 먹이로 저수층의 유기물을 섭취한다. 인간의 산업활동에 의해 수생태계에 유입된 합성물질은 거의 모두 퇴적물의 형태로 하상에 침적되므로 하상공간을 서식처로 생활하는 저서생물군집의 변화와 각 개체들은 오염원에 의한 반응을 연구하기에 좋은 연구대상이다. 특히, 대형 저서생물군집의 우점군인 갈따구과 생물은 좋은 지표생물이다. 실제로 외국 사례들을 살펴보면, 갈따구과의 기형 발생 증가는 내분비계교란물질 [예, dichlorodiphenyl-dichloroethylene (DDE)], 중금속, 제지공장 아래의 침적물로 오염된 곳에서 관찰되었고, 기형의 형태학적인 적합성을 평가하기 위한 생태지표들이 개발되고 있다(Milbrink 1983; Kosalwat and Knight 1987; Warwick 1989, 1991; Dickman *et al.* 1990). 수생태계의 건강성을 측정하거나 탐지할 수 있는 신뢰성 있는 방법에 대한 논란과 연구가 다수 이루어지고 있는데, 갈따구과의 구기 기형과 환경동물의 강도 기형은 형태학적인 특성을 환경스트레스 평가 지표로 이용될 수 있을 것이다.

이에 본 연구에서는 실험실 사육이 이루어진 갈따구과의 *C. riparius*의 알을 부화시켜 동일 성장 연령 조건을 유지시킨 4령기 유충을 대상으로 교란물질에 노출시킨 후 하순기절의 기형 발생정도를 노출농도에 따라 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험생물 및 사육조건

실험실에서 사육하던 *C. riparius*의 알을 1~2개 덩이

를 따로 분리하여 부화시켜 실험에 사용될 개체간의 연령별 차이를 최소화하여 사용하였다. 명암주기는 각각 16시간과 8시간으로 하였으며 광도는 500 lx 수준을 유지시켜 향온기(Sanyo incubator MIR-553) 내에서 사육하였다. 온도는 $20 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도는 60%를 유지하였다. Crystallizing dish에 고운 흙(입자 크기가 $600 \mu\text{m}$ 이하)을 1 cm 두께로 깔고 M4 배지(Elendt and Bias 1990)를 500 mL 넣어 준 후에 유충을 사육하였다.

먹이로는 테트라민(TetraMin, Tetra-Werke, Melle, Germany)을 미세하게 처리한 후 현탁액 상태로 공급하였다. 실험에 투입된 개체는 알에서 깨어난 지 12일째 된 선명하게 붉으며 건강한 개체를 사용하였다. 실험개체를 추출하는 과정과 환경변화에 따른 개체의 적응을 고려하여 약제의 투입은 2일째에 실시하였다.

300 mL crystallizing dish에 200 mL의 M4배지로 채운 후 실험생물을 투입하였다. 본 실험에서는 처리약제 농도의 정확성을 위하여 매일 배지와 시약을 새로 교체 투입하는 방법을 사용하였다. 실험개체가 교란을 받지 않도록 가능한 한 저층에 깔아 준 기질의 움직임 최소화 하여 사육수를 교체 공급하였다. 공기는 지속적으로 공급하여 결핍을 방지하였다.

2. 투입약제 노출과 기형성 측정

Bisphenol A ($[(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{C}_6\text{H}_4\text{OH})_2]$, Junsei Chemical Co. Ltd.)와 4-nonylphenol을 만들어 사용하였다. 처리 농도는 각각 0 (control), 0.3, 1, $10 \mu\text{g L}^{-1}$ 와 $30 \mu\text{g L}^{-1}$ 로 처리하였다. BPA의 반감기는 대략 3주이며(국립환경연구원 2002), 4-nonylphenol은 11일 정도이다(Bechmann 1999). 따라서 노출 약제를 반감기를 넘기지 않도록 조절하여 사용하였다.

노출 후 치사된 개체는 포르말린 7%에 보관하였으며, 두부는 슬라이드로 제작하여, Hoyer solution으로 처리한 후 커버글라스로 눌러 하순기절(mentum)이 잘 보일 수 있도록 한 후 Olympus SZX-ILLB 하에서 200배와 400배로 확대 관찰하였다. 머리의 구기 부분에 있는 하순기절의 tooth 상태와 기형을 살펴보았다. 하순기절의 구조는 MLT (median lateral teeth) 부분과 LT (lateral teeth) 부분으로 나누어 관찰하였으며, tooth의 기형 정도와 하순기절의 색에 따라 상태를 기록하였다. 기형 부위는 MLT, LT 및 MIX로 구분하여 한 부분만 기형을 입었으면 해당 부분에 기록을 하고 두 부분에 기형이 발생한 경우에는 MIX에 기록을 하여 기형 발생 부분이 중복 기록되는 것을 피하였다.

결과 및 고찰

전체적으로 약제에 노출되어 치사된 개체의 하순기절은 뾰족한 모양보다는 부드러워지거나 (smooth) 손실 (loss)이 가장 많았으며 기형도 보였다 (Table 1, Fig. 1). 노출되지 않은 비처리군에서는 하순기절의 기형은 거의 관찰되지 않았으나 처리군에서는 농도가 증가함에 따라 기형이 증가되는 양상을 보였다 (Table 1). 각 처리 물질에 따른 기형발생을 살펴보면, BPA는 31~90%, 4-nonylphenol은 40~80%의 범위를 보였다. BPA는 처리 농도가 증가할수록 기형도 증가하였는데 주로 하순기절이 부드러워진 형태를 보였다 (Table 1). 반면, 4-nonylphenol은 노출농도 증가와 기형발생이 비례적으로 나타나지 않았다. 이는 4-nonylphenol 노출농도 $10 \mu\text{g L}^{-1}$ 이상에서 많은 개체들의 치사가 짧은 시간에 이루어져 노출시간이 길지 않았던 것에 기인하였다.

처리 물질별 하순기절의 기형 부위를 살펴보면, MLT와 LT 부분의 복합적인 기형 형태인 MIX 타입의 기형이 가장 많이 나타났으며 그 다음으로 LT, MLT 타입의 기형이 나타났다. MLT 단독의 기형은 노출 초기에 나타나는 경우가 관찰되었다. MLT에서는 부드러워지는 형태가 가장 많았고 LT에서는 teeth가 손실되는 loss 타입의 기형이 가장 많이 나타났다. 또한 LT에서는 부드러워지는 마모와 손실이 복합적인 타입이 그 다음으로 빈번하였다. MIX에서도 역시 부드러워지거나 손실 타입의 기형이 가장 다수의 개체에서 관찰되었다.

생물들의 호르몬 기능 교란, 즉 생리적으로 영향을 끼

치는 물질들에 대한 보고들은 많았다 (Colborn and Clement 1992; Colborn *et al.* 1996; DeFur *et al.* 1999; Pinder *et al.* 1999). 어류인 무지개 송어 (*Oncorhynchus mykiss*) 수컷의 경우, 2 ng l-1 EE2 (17-ethynylestradiol) 처리시에 비텔로제닌 유도에 유의적이었으며 gonadosomatic index를 감소시켰다 (Jobling *et al.* 1996). Zebrafish는 5 ng l-1 EE2에서 난 발생과 비텔로제닌 유도가 영향을 받았다 (Kime and Nash 1999). 그러나 *Daphnia magna* (Schweinfurth *et al.* 1996)와 요각류인 *Tisbe battagliai* (Hutchinson *et al.* 1999)는 EE2의 높은 농도 처리에도 생존, 발생과 생식에 유의적인 영향이 나타나지 않았음이 보고되었다.

반면, 내분비계 교란에 의해 형태적인 변형이나 기형이 초래된 사례들은 상대적으로 드물다. 이런 면에서 갈따구의 서식환경의 특이성은 좋은 연구재료가 될 수 있다. 갈따구의 하순기절의 기형은 유충의 우화 과정 중 구기 구조의 발달 동안 생리적인 교란에 의해 유발된다고 하였다 (De Bisthoven *et al.* 1995). 우화는 엑디손과 유약호르몬에 의해 호르몬적으로 조절되어지며 (DeFur *et al.* 1999; Pinder *et al.* 1999), 구기 구조의 기형은 내분비계 호르몬의 교란에 의해 발생한다고 제시되었다 (DeFur *et al.* 1999; Pinder *et al.* 1999; Vermeulen *et al.* 2000). Vermeulen 등 (2000)은 에스트로젠과 엑디손의 분자구조의 유사성이 있을 것이라는 가설을 세웠으며 화합물이 에스트로젠 수용기를 방해하며, 따라서 엑디손의 작용에 장애가 발생하여 갈따구 유충의 형태적인 기형의 주요 인인이 된다고 하였다. 그는 이를 증명하기 위하여 *Chironomus riparius* 유충을 β -sitosterol (Vermeulen *et al.*

Table 1. The deformity of the mentum in the fourth-instar *C. riparius* (MLT: median lateral teeth, LT: lateral teeth)

	Chemicals ($\mu\text{g L}^{-1}$)									
	BPA					4-Nonylphenol				
	Con	0.3	1	10	30	Con	0.3	1	10	30
Mentum deformity										
MLT	Smooth	1							6	2
	Loss								3	
	Deformed		1		1		1		3	2
LT	Smooth	1	1		1			1	2	1
	Loss			1	3	2	1	3	3	7
	Deformed	1							1	
MIX	Smooth/smooth	1	3	6	2	2	2	2	8	11
	Smooth/loss		2	2	2	4		3	1	2
	Loss/loss									1
	Loss/deformed			1		1				
	Deformed/smooth			1	1					
	Deformed/deformed								4	
Total damage percent (%)	31	47	65	63	90	40	67	80	75	60
Total death individuals (n)	13	15	17	16	10	10	12	10	48	48

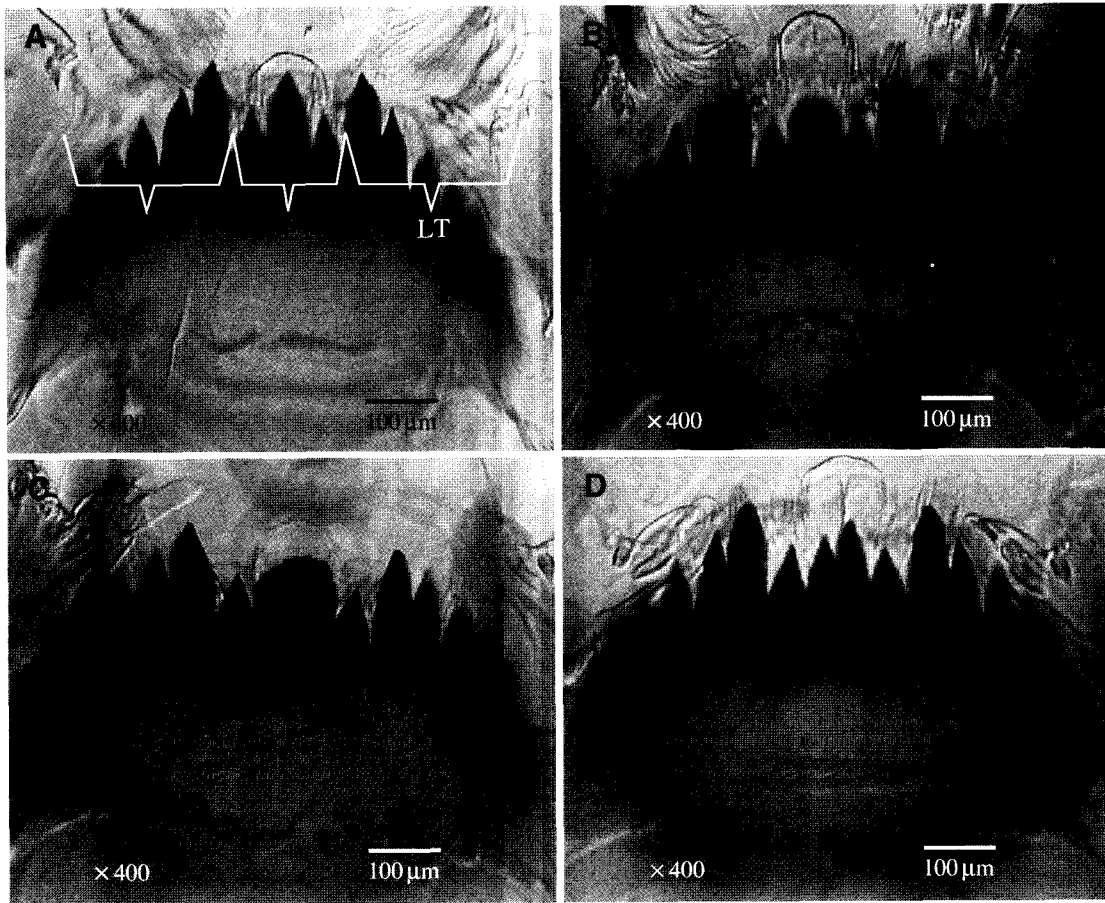


Fig. 1. Deformity types of the mentum depict (A) control (B) smooth (rounded) tooth (C) loss of teeth (D) deformed teeth of *C. riparius* fourth-instar larve. (A) Normal arrangement of teeth is three median lateral teeth (MLT), lateral teeth (LT).

2000), 4-*n*-nonylphenol (Meregalli *et al.* 2000a) 또는 bisphenol A (Meregalli *et al.* 2000b)에 노출시켜 실험실 분석을 하기도 하였다.

수생태계의 오염에 의한 생물의 건강성을 판단하기 위해 이루어진 연구들은 주로 생리적, 분자생물학적인 기술에 의해 발달되는 방향으로 진행되고 있다. 반면, 현상을 다루는 고전적인 분류학적인 형태에 대한 연구 사례는 매우 드물다 (Kwak and Lee 2005c). 형태학적인 이상과 기형에 대한 연구는 생리-분자연구와의 정량적인 축적이 필요한 작업이다. 이미, 벨기에의 모니터링 프로그램 (De Cooman *et al.* 1998)과 UK 환경부 (Pinder *et al.* 1999)에서는 퇴적물에 의한 기형을 응용하여 사용하는 것에 관심을 가지고 연구가 진행되고 있다. 이미 생태 건강성과 안전성을 보장하기 위한 장치로 저서성 대형 무척추동물의 이용에 대한 연구는 세계적인 추세이며 하천에 유입되는 모든 물질은 퇴적물의 형태로 하상 저질에 축적되므로 그 곳에 서식하는 대표적인 생물인 깔따구과에 대한 연구는 매우 필요하다. 이에 본 연구에서

는 *C. riparius*를 이용하여 잠재적인 교란물질인 BPA와 4-nonylphenol의 노출 농도에 따른 기형의 발생을 살펴 보았다. 향 후 노출시간에 따른 손상 정도와 기형의 정도를 정량적으로 분류시키는 연구들이 더 진행되어야 할 것이다.

적 요

실내에서 사육된 *C. riparius*를 대상으로 내분비계 교란물질인 BPA와 4-nonylphenol을 처리하여 형태적인 변화를 살펴보았다. 약제에 노출된 개체의 하순기절은 부드러워지거나 (smooth) 손실 (loss)이 가장 많았다. 처리 물질에 따른 기형의 정도를 살펴보면, BPA는 31~90%, 4-nonylphenol은 40~80%의 범위를 보였다. BPA는 처리 농도가 증가할수록 기형도 증가하였으나 4-nonylphenol은 노출농도 증가와 기형발생의 비례적으로 나타나지 않았다. 처리 물질별 하순기절의 기형 부위를 살펴

보면, MIX 타입의 기형이 가장 많이 나타났으며 그 다음으로 LT, MLT 타입의 기형이 나타났다. MLT에서는 부드러워지는 형태가 가장 많았고 LT에서는 teeth가 손실되는 loss 타입의 기형이 가장 많이 나타났다. 또한 LT에서는 부드러워지는 마모와 손실이 복합적인 타입이 그 다음으로 빈번하였다. MIX는 부드러워지거나 손실 타입의 기형이 가장 다수 관찰되었다.

사 사

이 논문은 2006년도 학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음 (KRF-2006-005-J01901).

참 고 문 헌

- 국립환경연구원. 2002. 내분비계장애물질 측정분석방법.
- Bechmann RK. 1999. Effect of the endocrine disrupter nonylphenol on the marine copepod *Tisbe battagliai*. Sci. Total Environ. 233:33-46.
- Brown D, RS Thompson, KM Stewart, CP Croudace and E Gillings. 1996. The effect of phthalate ester plasticisers on the emergence of the midge (*Chironomus riparius*) from treated sediments. Chmosphere 32:2177-2187.
- Colborn T and C Clement. 1992. Chemically induced alterations in sexual and functional development: the wildlife/human connection. Princeton, NJ: Princeton Scientific, 403pp.
- Colborn T, D Dumanoski and JP Myers. 1996. Our Stolen Future. London: Abacus, 306pp.
- Darbas B, J Zdarek, T Timar and MHT El-Din. 1990. Effects of the bipyridylum herbicides diquat dibromide and paraquat dichloride on growth and development of *Neobellieria bullata* (Dipteralarvae). J. Econ. Entomol. 83:2175-2180.
- De Bisthoven LJ, C Huysmans and F Ollevier. 1995. The in situ relationship between sediment concentrations of micro-pollutants and morphological deformities in *Chironomus thummi* larvae (Diptera; Chironomidae) from lowland river (Belgium): a spatial comparison. In: Chironomids: from genes to ecosystems (Cranston PS, ed.). Canberra, Australia: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation (CSIRO).
- De Cooman W, M Florus and M Devroede. 1998. Karakterisatie van de bodems van de Vlaamse onbevaarbare waterlopen. Report D/1998/3241/224. Brussels: Administratie Milieu-, Natuur-Land- en Waterbeheer. 56.
- DeFur P, M Crane, C Ingersoll and L Tattersfield. 1999. Endocrine disruption in invertebrates: endocrinology, testing, and assessment. Pansacola, FL: SETAC, 303pp.
- Dickman M, Q Lan and B Matthews. 1990. Teratogens in the Niagara River watershed as reflected by chironomid (Diptera:Chironomidae) labial plate deformities. Water Pollut. Res. J. Can. 24:47-79.
- Elendt BP and WR Bias. 1990. Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing; effects of the optimization of culture conditions on life history parameters of *Daphnia magna*. Water Res. 24:1157-1167.
- Hamilton AL and OA Saether. 1971. The occurrence of characteristic deformities in the chironomid larvae of several Canadian lakes. Can. Entomol. 103:363-368.
- Hutchinson TH, NA Pounds, M Hampel and TD Williams. 1999. Impact of natural and synthetic steroids on the survival, development and reproduction of marine copepods (*Tisbe battagliai*). Sci. Total Environ. 233:167-179.
- Jobling S, D Sheahan, JA Osborne, P Matthiesen and JP Sumpter. 1996. Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic compounds. Environ. Toxicol. Chem. 15:194-202.
- Kahl MD, EA Makynen, PA Kosian and GT Ankley. 1997. Toxicity of 4-nonylphenol in a life-cycle test with the midge *Chironomus tentans*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 38: 155-160.
- Kosalwat P and KW Knight. 1987. Chronic toxicity of copper to a partial life cycle of the midge, *Chironomus decorus*. Archiv. Environ. Contam. Toxicol. 16:283-290.
- Kime DE and JP Nash. 1999. Gamete viability as an indicator of reproductive endocrine disruption in fish. Sci. Total Environ. 233:123-129.
- Kwak I-S and W Lee. 2003. Effects of the hormone mimetic insecticide tebufenozide on *Chironomus flaviplumus* larvae. Korean J. Environ. Biol. 21:72-76.
- Kwak I-S and W Lee. 2003. Effects of the Molting-Hormone Mimetic Insecticide Tebufenozide on *Chironomus riparius* Larvae. Korean J. Environ. Biol. 21:286-291.
- Kwak I-S and W Lee. 2004. Effects of Ecdysteroid agonist Tebufenozide on freshwater Chironomids. Korean J. Limnol. 37:96-101.
- Kwak I-S and W Lee. 2004. Detecting Points for Ecological Disruptions and Developmental Delay exposure to DEHP in *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae). Korean J. Environ. Biol. 22:321-328.
- Kwak I-S and W Lee. 2005. Endpoint for DEHP exposure assessment in *Chironomus riparius*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 74:1179-1185.
- Kwak I-S and W Lee. 2005. Two-dimensional gel electroph-

- oresis analysis of proteins following tebufenozide treatment of *Chironomus riparius*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 74:1159-1165.
- Kwak I-S and W Lee. 2005. Mouthpart Deformity and Developmental Retardation Exposure of *Chironomus plumosus* (Diptera: Chironomidae) to Tebufenozide. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 75:859-865.
- Meregalli G, L Pluymers and F Ollevier. 2000a. Induction of mouthpart deformities in *Chironomus riparius* larvae exposed to 4-n-nonylphenol. Environ. Pollut. 111:241-246.
- Meregalli G, L Pluymers, N Van lent and F Ollevier. 2000b. Induction of mouthpart deformities in *Chironomus riparius* larvae exposed to known endocrine disrupters. Presented at SETAC 3 rd World Congress, 21-25 May, Brighton, UK.
- Milbrink G. 1983. Characteristic deformities in tubificid oligochaetes inhabiting polluted bays of Lake Vanern, Southern Sweden. Hydrobiologia. 106:169-184.
- Miller RA, LA Norris and CL Hawks. 1973. Toxicity of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in aquatic organisms. Environ. Health Perspect. 5:177-186.
- Pinder LCV, TG Pottinger, Z Billinghamurst and MH Depledge. 1999. Endocrine function in aquatic invertebrates and evidence for disruption by environment pollutants. R & D report TR E67. Bristol, UK: Environment Agency and Endocrine Modulators Steering Group. 150.
- Schweinfurth H, R Lnge and P Gnzal. 1996. Environmental fate and ecological effects of steroidal estrogens. Presented at IBC Conference, 9-10 May 1996, London, UK.
- Vermeulen AC, G Liberloo, P Dumont, F Ollevier and BR Goddeeris. 2000. Exposure of *Chironomus riparius* larvae (Diptera) to lead, mercury and -sitosterol: effects on mouthpart deformation and moulting. Chemosphere 41:1581-1591.
- West CW, GT Ankley, JW Nichols, GE Elonen and DE Nessa. 1997. Toxicity and bioaccumulation of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in long-term tests with the freshwater benthic invertebrates *Chironomus tentans* and *Lumbriculus variegatus*. Environ. Toxicol. Chem. 16:1287-1294.
- Warwick WF. 1989. Morphological deformities in larvae of *Procladius skuse* (Diptera:Chironomidae) and their bio-monitoring potential. Can. J. Fish Aquat. Sci. 46:1255-1271.
- Warwick WF. 1991. Indexing deformities in ligulae and antennae of *Procladius* larvae (Diptera: Cimonomidae); Application to contaminant-stressed environments. Can. J. Aquat. Sci. 48:1151-1156.

Manuscript Received: January 15, 2007
Revision Accepted: January 31, 2007
Responsible Editor: Seung Bum Kim