

## DEHP에 노출된 *Chironomus riparius*의 하순기절에 나타난 기형 유형들

곽인실\* · 정경숙

전남대학교 해양기술학부

## Types of Mentum Deformity for *Chironomus riparius* Exposure to DEHP

Inn-Sil Kwak\* and Gyeong-Suk Jeong

Faculty of Marine Technology, Chonnam National University, Yeosu 550-749, Korea

**Abstract** - Induction of morphological deformities in *Chironomus riparius* larvae was assessed after exposure to 0.3, 1, 10 and 30  $\mu\text{g L}^{-1}$  potential endocrine disruption chemicals, Diethylhexyl phthalate (DEHP). We observed and subdivide types of mentum deformities and counted the incidence of mentum deformities. The mortality was not increased according to concentrations of DEHP, while was depend on the exposed days. The incidence of mentum deformities for MLT (median lateral teeth), LT (lateral teeth), and MIX (MLT+LT) of the mentum morphological structure showed MLT (2.8 ~ 11.4%) > LT (2.8 ~ 2.9%) > MIX (2.8 ~ 3.0%). The type of mentum deformities on *C. riparius* was classified six groups following exposure to DEHP. The incidence rate was occupied following to tooth addition (4.3%), tooth split (2.8%), tooth deletion (2.4%), tooth fusion (1.4%), Köhn gap (0.5%) and abnormal shape (0.5%). Especially tooth split and tooth fusion were observed in DEHP treated conditions.

**Key words** : *Chironomus riparius*, DEHP, mentum deformity types, tooth split, tooth fusion

### 서 론

수환경 평가와 위해성 연구를 위해서 다양한 생물이 시도되고 적용 평가되고 있는데 이 중 갈따구류는 오염된 환경에 다수가 서식하며 우점도가 높다는 점에서 전반적인 평가를 할 수 있다는 장점이 있다. 갈따구의 유충은 퇴적물 형태의 미세한 입자성 물질로 집을 짓고 그 속에서 생활하며 먹이로 저니 속의 유기물을 섭취한다. 유충이 사용하는 입자성 물질 속에는 산업활동에 의

해 수생태계에 유입된 각종 합성물질이 포함되어 있으므로 오염원에 의한 반응을 연구하기에도 유리하다.

외국 사례들을 살펴보면, 갈따구과의 기형 발생은 dichlorodiphenyl-dichloroethylene (DDE), 중금속, 제지공장 아래의 침적물로 오염된 곳에서 관찰되었고, 기형의 형태학적인 특징을 이용한 생태지표들이 개발되고 있다 (Milbrink 1983; Kosalwat and Knight 1987; Warwick 1989, 1991; Dickman *et al.* 1990). 특히 갈따구과의 구기 기형은 다양한 유해물질에 의해 나타나고 있기 때문에 환경 스트레스를 반영하는 평가지표로 개발되고 있다 (Kwak and Lee 2005a, b, c, 2007). 농작물에 살포되는 bipyridilium 계열 제초제인 diquat dibromide와 paraquat dichloride는

\* Corresponding author: Inn-Sil Kwak, Tel. 061-659-3139, Fax. 061-659-3199, E-mail. iskwak@chonnam.ac.kr

수서곤충의 내분비과정에 관여하여 cytochrome P-450 효소를 저해하는 것으로 알려져 *Neobellieria bullata* (회색쉬파리) 유충의 제1령기 기간 연장, 첫 탈피의 장애, 용화 지연 등과 같은 발육과 성장에 영향을 미치는 것이 보고되었다 (Darbas *et al.* 1990). 국내에서는 파리류인 *Chironomus*를 대상으로 살충제인 tebufenozide에 의한 발생지연, 우화 연장, 성비의 교란, 암컷의 체적 비대화, 구강기형 등을 보고하였다 (Kwak and Lee 2003a, b, 2004a, b, 2005a, b, c). 갈따구 유충의 구기와 두부의 기형 (deformity)은 중금속과 농약의 노출에 의해 영향을 받으며 (Hamilton and Saether 1971), *C. thummi*에서 발견된 특정 기형은 중금속, phthalates 또는 DDT의 존재와 연관성이 있는 것으로 보고되었다 (De Bisthoven *et al.* 1995). 또한 최근에는 내분비계교란물질에 의한 *C. plumosus* (장수갈따구)의 구강기형이 보고되고 있다 (Kwak and Lee 2005c). 이와는 반대로 플라스틱 가소제인 phthalate ester에 노출된 *C. 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 알려지고 있다. Di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP)는 플라스틱 제조시 가소제로 사용되거나 전선피복제, 농업용 비닐 등에 사용되는 물질로서 국내에서는 내분비계장애물질로 분류되어 규제되고 있는 물질이며, 미국에서는 이를 인체에서 발암의 가능성이 있을 수 있는 물질로 분류하고 있다.

본 연구에서는 *C. riparius* 구기의 하순기절을 대상으로 약제노출 시간에 따른 구강기형의 발생빈도를 살펴보고 또한 발견된 다양한 기형들을 기재하고 발생률을 파악해 보고자 하였다. 정량화하기에 좋은 연구가 다수 이루어져 있는 실험실 사육에 적응된 *C. riparius* 알을 부화시켜 깨어난 지 11일째 된 동일한 연령조건의 유충을 대상으로 DEHP에 노출시킨 후 하순기절에 나타난 기형발생의 형태적인 특징을 유형 (type)으로 세분화하고 정량화하여 일정한 경향성의 여부를 파악해 보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험생물 사육조건

*Chironomus riparius*의 알과 유충을 1.5L 수조에 고운 모래 (입자 크기 600  $\mu\text{m}$  이하)를 0.5 cm 두께로 깔고 M4 배지 (Elendt and Bias 1990) 1L를 넣고 실내 사육하였다. 명암주기는 각각 16시간과 8시간으로 하였으며 광도는

500 lx 수준을 유지하여 항온기 (Jeio Tech growth chamber GC-300) 내에서 온도는  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ , 습도는 60%를 유지하였다.

실험수조는 300 mL 비커에 고운 모래를 넣고 M4 배지를 200 mL 넣어준 후 지속적으로 공기를 공급하였다. 먹이는 미세하게 처리한 테트라비트를 매일 개체 20마리당 10 mg을 공급하였다. 알에서 깨어난 지 11일째 된 붉고 건강한 개체를 각 농도별로 실험수조 당 20마리씩 투입하여 2회 반복 실시하였다. 사육수는 4일마다 교체하였으며, 수분감소는 매일 점검하여 200 mL 수준을 유지시켰다.

### 2. 투입약제와 노출

DEHP (Diethylhexyl phthalate,  $\text{C}_6\text{H}_4[\text{COOCH}_2\text{CH}(\text{C}_2\text{H}_5)(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3]_2$ , Junsei Chemical Co., Ltd.)는 stock solution ( $20 \text{ mg L}^{-1}$ )을 만들어서 사용하였다. 처리 농도는 각각 0 (control),  $0.3 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ 와  $30 \mu\text{g L}^{-1}$ 로 하였으며 용매인 아세톤 (Acetone,  $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ , Kanto Chemical Co., Inc.)의 영향을 보기 위해 solvent control ( $\leq 0.2\%$ )을 처리하였다. 실험개체를 추출하는 과정과 환경변화에 따른 개체의 적응을 고려하여 실험수조에 옮긴 후 2일째에 약제를 처리하였다. DEHP의 수중에서의 반감기는 2~3주임 (USEPA 2004)을 고려하여 4일마다 사육수를 교체하였다. 실험개체가 교란을 받지 않도록 가능한 한 저층에 깔아 준 기질의 움직임 최소화 하여 사육수를 교체 공급하였다.

### 3. 기형성 관찰

기형 관찰은 살아있는 유충을 대상으로 노출 후 1일부터 9일까지 매일 각 농도별로 2개체씩을 추출하여 포르말린 10%로 고정하였다. 해부현미경 (Olympus SZX16)을 이용하여 전체적인 형태를 먼저 관찰하고 기형 발생을 관찰하기 위하여 두부 (head capsule)와 몸체 (body)를 슬라이드로 제작하였다. 두부는 광학현미경 (Olympus BX510) 하에서 400배로 확대 관찰하였으며 구기부분에 있는 하순기절 (mentum)의 tooth 상태와 기형을 살펴보았다. 하순기절의 구조는 MLT (median lateral teeth) 부분과 LT (lateral teeth) 부분으로 나누어 관찰하였고, tooth의 기형 정도에 따라 상태를 기록하였다. 기형 부위는 MLT, LT 및 MIX로 구분하여 MLT와 LT 중 한 부분만 기형이 나타났으면 해당 부분에 기록을 하고, MLT와 LT 두 부분에 기형이 발생한 경우에는 MIX에 기록을 하여 기형 발생 부분이 중복 기록되는 것을 피하였다.

**Table 1.** Percent (%) of dead larvae in *Chironomus riparius* following exposure to DEHP

Concentration ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Exposed day									Total	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
Control	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Solvent control	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.5	0.0	2.5
1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
10	0.0	0.0	0.0	0.0	2.5	0.0	2.5	0.0	0.0	0.0	5.0
30	10.0	0.0	2.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	12.5
Total	1.7	0.0	0.4	0.0	0.4	0.0	0.4	0.4	0.0	0.0	3.3

## 결 과

### 1. 독성에 의한 치사율

DEHP에 노출된 개체의 치사율은 비처리시 (control)에 0%, 약제 처리시 2.5~10.0%의 분포를 보이는 것으로 나타났다 (Table 1). 비처리와 solvent control,  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서 치사한 개체는 없었다.  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서는 치사율이 2.5%, 고농도인  $30 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서는 10.0%로 가장 높게 나타났다. 노출시간에 따른 치사율을 살펴보면  $0.3 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서는 약제 노출 후 8일에 2.5%,  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서는 노출 후 5일과 7일에 각각 2.5%가 치사하였다. 반면  $30 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서는 약제에 노출된지 1일 후에 10.0%, 노출 3일 후 2.5%가 치사하여 노출농도가 높으면 치사가 빨라짐을 보였다. 그럼에도 불구하고 농도의 증가에 따라 치사율이 일정 경향을 보이며 증가하는 것으로 나타나지는 않았다.

### 2. 하순기절 구조 (mentum structure)에 따른 기형 발생

하순기절의 구조별 기형 발생 비율을 살펴보면, MLT (medial lateral tooth)에서 가장 높은 비율로 기형이 나타났으며 그 다음이 LT (lateral tooth), MIX 순으로 높게 나타났다 (Table 2). 비처리군과 처리군 모두 MLT 단독의 기형이 가장 많았으며 MIX 부분에 발생한 기형의 비율이 가장 낮았다. 비처리군의 경우 MLT (medial lateral tooth)에서 8.3%의 기형이 나타났으며 LT (lateral tooth)에서는 2.8%의 기형이 발생하였다 (Table 2). Solvent control의 경우 MLT에서만 2.8%의 기형이 나타났고 LT와 MIX에서는 기형이 나타나지 않았다.  $0.3 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서도 MLT에서만 11.4%의 기형이 발생하였다.  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ 의 경우, MLT에서 11.4%의 기형이 나타났으며 LT에서는 2.9%의 기형 발생률을 나타냈다.  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서는 MLT에서 11.1%의 기형이 나타났으며 LT와 MIX에서 각각

**Table 2.** The incidence rates (%) of deformity on mentum structure in *Chironomus riparius* following exposure to DEHP

Concentration ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Mentum structure		
	MLT	LT	MIX
Control	8.3	2.8	0.0
Solvent control	2.8	0.0	0.0
0.3	11.4	0.0	0.0
1	11.4	2.9	0.0
10	11.1	2.8	2.8
30	6.1	0.0	3.0
Total	8.5	1.4	0.9

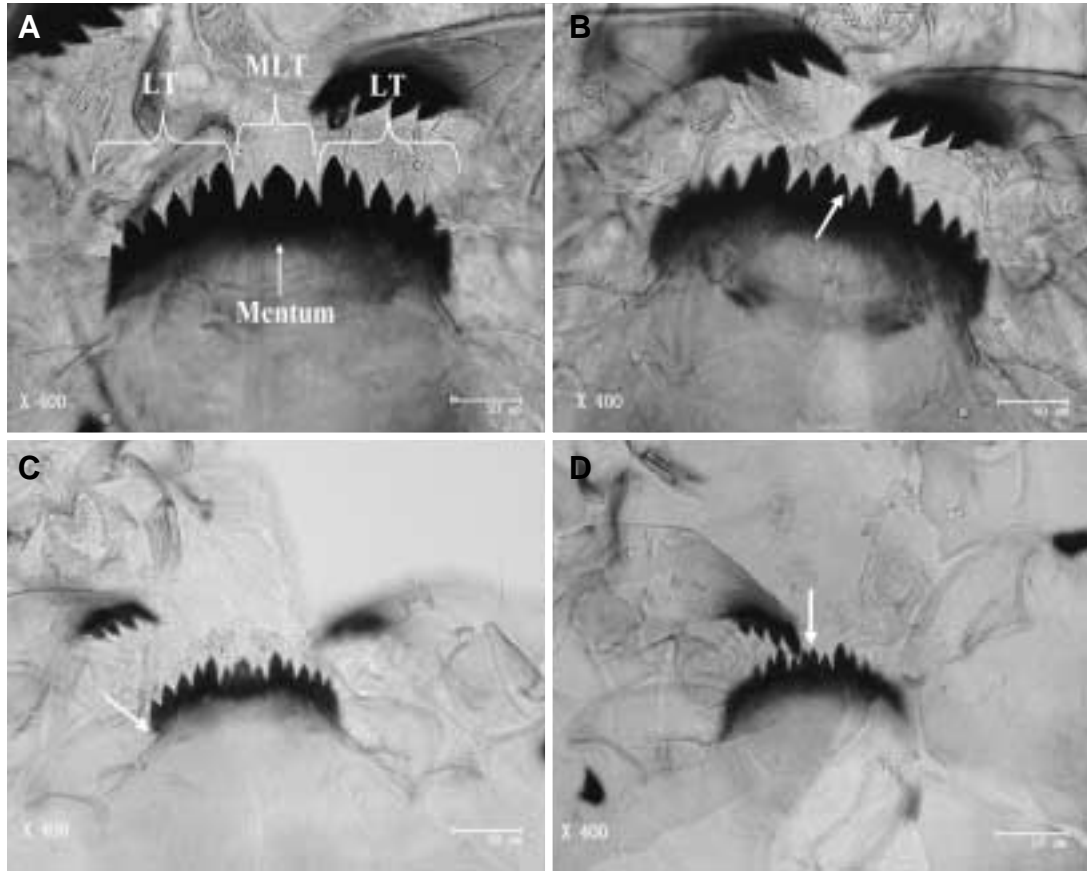
MLT: three median lateral teeth, LT: lateral teeth, MIX: MLT+LT

2.8%의 기형이 발생하였다.  $30 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서는 MLT에서 6.1%로 기형 발생률이 다소 낮게 나타났으며, MIX에서 3.0%의 기형이 나타났다.

### 3. 하순기절 기형 발생 유형 (deformity occurrence type)과 발생률

노출된 유충의 하순기절을 살펴본 결과 여섯 가지의 기형 유형들로 나눌 수 있었다 (Fig. 1): tooth의 결실 (deletion), 추가 (addition), medial tooth의 쪼개짐 (split), 합쳐짐 (fusion), 형태적 이상 (abnormal shape)과 mentum이 함입된 Köhn gap 유형이다 (Table 3). 상처나 깨어짐이 없이 정상적인 하순기절과 유사하게 부드럽게 마모 (smooth)가 된 형태의 tooth는 기형으로 분류하지 않았다.

가장 높은 발생빈도를 보인 기형의 유형은 tooth 추가로 총 4.3%를 보였으며 그 다음 순으로 tooth 쪼개짐이 2.8%, tooth 결실은 2.4%, tooth 합쳐짐은 1.4%, Köhn gap과 형태적 이상은 각각 0.5% 발생하였다 (Table 3). 약제 처리에서만 관찰된 tooth 쪼개짐은  $0.3 \mu\text{g L}^{-1}$  (5.7%)에서 가장 높은 발생률을 보였고 나머지 처리군에서는 2.8~3.0%의 발생률을 보였다. Tooth 합쳐짐 또한 처리군인  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  (5.6%)와  $30 \mu\text{g L}^{-1}$  (3.0%)에서만 관찰되고 그 외 조건에서는 발생하지 않았다. Tooth 쪼개짐과 합쳐짐을 제외한 나머지 기형유형은 처리와 비처리, 처리농도



**Fig. 1.** Types of mentum deformity depict (A) control: Normal arrangement of teeth is three median lateral tooth (MLT) and lateral tooth (LT), (B) addition of tooth, (C) deletion of tooth, (D) split medial tooth of *Chironomus riparius*.

**Table 3.** The incidence rates (%) of mentum deformity types in *Chironomus riparius* following exposure to DEHP

Types of mentum deformity	DEHP concentrations ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )						
	Control	Solvent control	0.3	1	10	30	Total
Addition	8.3	0.0	2.9	8.6	2.8	3.0	4.3
Split	0.0	2.8	5.7	2.9	2.8	3.0	2.8
Deletion	2.8	0.0	0.0	2.9	5.6	3.0	2.4
Fusion	0.0	0.0	0.0	0.0	5.6	3.0	1.4
Köhn gap	0.0	0.0	2.9	0.0	0.0	0.0	0.5
Abnormal shape	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8	0.0	0.5
Total	11.1	2.8	11.4	14.3	19.4	12.1	11.8

에 따른 일정한 경향성을 보이지 않았다. Tooth 추가는 solvent control를 제외하고 모든 처리조건에서 관찰되었는데 비처리군(8.3%)과  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  (8.6%)에서 특히 높았으며 그 외 조건에서는 2.8~3.0%의 발생률을 보였다. Tooth 결실은  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  (5.6%)에서 가장 높은 발생률을 보였고 그 외 나머지 농도에서는 tooth 추가와 같은 2.8~3.0%의 발생률 보였다. Köhn gap은  $0.3 \mu\text{g L}^{-1}$  (2.9%)와 형태적 이상은  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  (2.8%)에서 소수에서만 관찰되었다.

## 고 찰

본 연구에서는 DEHP 노출로 *C. riparius*의 구강 내 하순기절에 기형이 나타났다. 하순기절의 기형이 고농도인  $30 \mu\text{g L}^{-1}$  (12.1%)에 비해 저농도인  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  (14.3%)와  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  (19.4%)에서 기형발생이 높게 나타났다. 저농도의 내분비교란물질에 노출되었을 경우 개체에 더 큰 영향이 발생하는 것으로 보고된 다수의 결과들과 일치

하였다 (Sheehan and Branham 1987; Patlak 1996; Santillo *et al.* 1998). 예로, 17 $\alpha$ -ethinylestradiol과 bisphenol A에 노출된 *C. riparius*가 고농도인 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ 와 1  $\text{mg L}^{-1}$ 에서의 기형발생률은 낮았으나 1  $\text{mg L}^{-1}$ 에 노출되었을 때 탈피와 성장이 억제되어 개체의 발달에 상당한 영향을 주는 것으로 나타났다 (Watts *et al.* 2001, 2003). 또한 낮은 농도인 10 ng~10  $\mu\text{g L}^{-1}$ 에서 높은 수준의 기형이 발생하였으며 이는 17 $\alpha$ -ethinylestradiol과 bisphenol A가 엑디스테로이드 수용기 (ecdysteroid receptors)에 직접 작용하여 내분비작용에 영향을 줄 수 있는 것으로 보고하였다. DDT와 4-*n*-nonylphenol도 에스트로겐 수용기를 방해하여 정상적인 호르몬의 기능을 교란시켜 기형을 유도하는 것으로 알려졌다 (Gillesby and Zacharewski 1998). 구기 구조의 기형은 내분비계 호르몬의 교란에 의해 발생할 수 있다는 보고가 되고 있다 (deFur *et al.* 1999; Pinder *et al.* 1999; Vermeulen *et al.* 2000; Kwak and Lee 2005c).

내분비교란물질의 생물노출 결과들은 농도에 따라 일정한 경향을 보이는 농도의존성은 뚜렷하지 않고 저농도가 문제가 됨을 많은 연구자들이 보고하고 있는 실정이다. 그럼에도 불구하고 저농도가 위해하다는 인식을 갖고 대처하는 평가기법의 필요성과 집중연구는 더디게 진행되고 있다. 현실적인 성과들이 빠르게 나올 수 없고 장기적인 실험자료의 축적이 필요하기 때문이다.

DEHP 노출로 인해 *C. riparius*의 암수에 따른 체적과 우화시기의 변화가 나타났음을 이미 보고하였다 (Kwak and Lee 2005a). 우리 생활에 다량으로 사용되는 플라스틱과 비닐 제조에 사용되는 프탈레이트의 사용은 줄어들지 않는다는 점과 현재 대체할 수 있는 안전한 물질이 없다는 점에서 세대를 거친 장기적인 연구결과들을 향후 진행하여야 할 것이다. 수생태계의 오염에 의한 생물의 건강성을 판단하기 위해 국가대형과제들이 진행 중이다. 건강성이 서식환경만을 평가하는 것이 아니라 생물의 건강성을 진단할 수 있는 본 연구의 결과들이 건강을 진단할 수 있는 방법이 될 수 있을 것으로 여겨진다. 건강진단을 위해 생리적, 분자생물학적인 기술에 의해 평가하는 고비용의 방법도 필요하지만 고전적인 방법도 병행한다면 좋은 교차효과를 통하여 성과들이 실용화 될 수 있는 구조가 될 수 있을 것이다. 예로, 고전적인 분류학적인 형태와 노출에 따른 단백질 발현을 비교하여 그 가능성을 시도하였다 (Kwak and Lee 2005a, b, c, 2007). 본 연구에서는 노출시간에 따른 손상 정도와 기형의 정도를 정량화를 시도하였고 향후 반복실험을 통하여 데이터를 축적하고자 한다.

## 적 요

실내에서 사육된 *C. riparius*를 대상으로 내분비계 교란물질인 DEHP를 처리하여 노출시간에 따른 기형발생률과 발생한 기형의 유형을 세분화하였다. 하순기절 구조별 기형발생률은 MLT (medial lateral tooth)에서 가장 높았고 그 다음이 LT (lateral tooth), MIX 순으로 높게 나타났다. 비처리군과 처리군 모두 MLT 단독의 기형이 가장 많았다. 하순기절의 기형유형은 여섯 가지로 세분화하였다. 발생빈도가 높은 기형유형은 tooth 추가(4.3%), tooth 쪼개짐(2.8%), tooth 결실(2.4%), tooth 합쳐짐(1.4%), Köhn gap(0.5%)과 형태적 이상(0.5%) 순으로 발생하였다. 약제 처리에서만 관찰된 기형은 tooth 쪼개짐과 tooth 합쳐짐이었다.

## 사 사

이 논문은 2007년도 과학기술부의 재원으로 한국과학재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (No. R01-2007-000-11099-0). 본 연구의 실험생물인 *Chironomus riparius*를 분양해 주신 한국화학연구원 안정성평가연구원에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

- 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. *Chemosphere*. 32:2177-2187.
- Darbas B, J Zdarek, T Timar and MHT El-Din. 1990. Effects of the bipyridylium herbicides diquat dibromide and paraquat dichloride on growth and development of *Neobellieria bullata* (Diptera: Sarcophagidae) larvae. *J. Econ. Entomol.* 83: 2175-2180.
- De Bisthoven LJ, C Huysmans and F Ollevier. 1995. The in situ relationship between sediment concentrations of micropollutants 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).
- deFur PL, M Crane, CG Ingersoll and L Tattersfield. 1999. Endocrine Disruption in Invertebrates: Endocrinology, Test-

- ing and Assessment. SETAC technical publication, Pensacola, Florida. 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.
- Gillesby BE and TR Zacharewski. 1998. Exoestrogens: mechanisms of action and strategies for identification and assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 17:3-14.
- Hamilton AL and OA Saether. 1971. The occurrence of characteristic deformities in the chironomid larvae of several Canadian lakes. *Can. Entomol.* 103:363-368.
- Kosalwat P and KW Knight. 1987. Chronic toxicity of copper to a partial life cycle of the midge, *Chironomus decorus*. *Environ. Contam. Toxicol.* 16:283-290.
- Kwak IS and W Lee. 2003a. Effects of the hormone mimetid insecticide tebufenozide on *Chironomus flaviplumus* larvae. *Korean J. Environ. Biol.* 21(1):72-76.
- Kwak IS and W Lee. 2003b. Effects of the molting-hormone mimetid insecticide tebufenozide on *Chironomus riparius* larvae. *Korean J. Environ. Biol.* 21(3):286-291.
- Kwak IS and W Lee. 2004a. Effects of ecdysteroid agonist tebufenozide on freshwater Chironomids. *Korean J. Limnol.* 37(1):96-101.
- Kwak IS and W Lee. 2004b. Detecting points for ecological disruptions and developmental delay exposure to DEHP in *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae). *Korean J. Environ. Biol.* 22(2):321-328.
- Kwak IS and W Lee. 2005a. Endpoint for DEHP exposure assessment in *Chironomus riparius*. *Environ. Contam. Toxicol.* 74:1179-1185.
- Kwak IS and W Lee. 2005b. Two-dimensional gel electrophoresis analysis of proteins following tebufenozide treatment of *Chironomus riparius*. *Environ. Contam. Toxicol.* 74:1159-1165.
- Kwak IS and W Lee. 2005c. Mouthpart deformity and developmental retardation exposure of *Chironomus plumosus* (Diptera: Chironomidae) to tebufenozide. *Environ. Contam. Toxicol.* 75:859-865.
- Kwak IS and W Lee. 2007. The mentum deformity of *C. riparius* following exposure to bisphenol A and 4-nonylphenol. *Korean J. Environ. Biol.* 25(1):66-71.
- Milbrink G. 1983. Characteristic deformities in tubificid oligochaetes inhabiting polluted bays of Lake Vanern, Southern Sweden. *Hydrobiologia.* 106:169-184.
- Patlak M. 1996. A testing deadline for endocrine disruptors: EPA scrambles to develop a screening program for these complex substances. *Environ. Sci. Technol.* 30:540A-544A.
- Pinder LCV, TG Pottinger, Z Billingham 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.
- Santillo D, RL Stringer, PA Johnston and J Tickner. 1998. The precautionary principle: protecting against failures of scientific method and risk assessment. *Mar. Pollut. Bull.* 36: 939-950.
- Sheehan DS and WS Branham. 1987. Dissociation of estrogen induced uterine growth and ornithine decarboxylase activity in the post natal rat. *Teratogen. Carcin. Mut.* 7:411-422.
- US EPA. 2004. "National Primary Drinking Water Regulations: Consumer Factsheet on: Phthalate, di(2-ethylhexyl)," Office of Water, Office of Ground Water and Drinking Water. EPA 811-F-95-003-T.
- Vermeulen AC, G Liberloo, P Dumont, F Ollevier and BR Goddeeris. 2000. Exposure of *Chironomus riparius* larvae (Diptera) to lead, mercury and  $\beta$ -sitosterol: effects on mouthpart deformation and moulting. *Chemosphere.* 41:1581-1591.
- Warwick WF. 1989. Morphological deformities in larvae of *Procladius skuse* (Diptera: Chironomidae) and their biomonitoring potential. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 46:1255-1271.
- Warwick WF 1991. Indexing deformities in ligulae and antennae of *Procladius* larvae (Diptera: Chironomidae); Application to contaminant-stressed environments. *Can. J. Aquat. Sci.* 48:1151-1156.
- Watts MM, D Pascoe and K Carroll. 2001. Chronic exposure to  $17\alpha$ -ethinylestradiol and bisphenol a effects on development and reproduction in the freshwater invertebrate *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae). *Aquat. Toxicol.* 55:113-124.
- Watts MM, D Pascoe and K Carroll. 2003. Exposure to  $17\alpha$ -ethinylestradiol and bisphenol A-effects on larval moulting and mouthpart structure of *Chironomus riparius*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 54:207-215.
- 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.