

물벼룩을 이용한 bisphenol A의 급성독성 평가

황갑수[†]

군산대학교 토목환경공학부
(2007. 10. 11. 접수/2007. 10. 26. 채택)

Acute Toxicity of Bisphenol A to the Crustacean *Daphnia magna*

Gab Soo Hwang[†]

School of Civil and Environmental Engineering, Kunsan National University, Kunsan, Jeonbuk 573-701, Korea
(Received October 11, 2007/Accepted October 26, 2007)

ABSTRACT

Aquatic ecotoxicity of bisphenol A, a well-known endocrine disrupter in mammals, was studied using laboratory-reared *Daphnia magna* as a test organism. The static acute 48 h EC₅₀ of bisphenol A for daphnid neonates (<24 h old) was 12.9 mg/l and 110 h LC₅₀ values of bisphenol A for daphnid embryos of different ages after deposition into the brood chamber increase with ages in the range of 1.55 mg/l-8.91 mg/l. Also, 48 h EC₅₀s generally increase with daphnid's ages in the range of 12.9 mg/l-19.8 mg/l. In the acute toxicity tests using mature daphnids, the lethal response and immobility all showed good concentration-response relationship with exposure concentration and exposure time, showing little difference between lethality and immobility. These results clarify that acute toxicity tests, using daphnid and its embryo, could also be useful tools easily available for the assessment of ecotoxicity of various harmful chemicals.

Keywords: bisphenol A, endocrine disrupter, *Daphnia magna*, 48 h EC₅₀, 110 h LC₅₀, embryo

I. 서 론

현대 산업사회의 발달과 함께 현재 우리들의 생활환경 내에는 전 세계적으로 개발된 화학물질이 1,300만여종에 이르고 이 중 약 10만여 종의 화학물질들이 상업적으로 유통되고 있으며 매일 새로운 화학물질들이 소개되고 있다.¹⁾ 대부분 유기합성기술의 산물인 이들 화학물질들은 인간의 생활수준 향상에 많은 기여를 해 온 것이 사실이나 산업발전에 대한 국가간의 경쟁적 구조 속에서 그 종류와 사용량이 급속히 증가함에 따라 이들에 의한 위해성문제는 지구생태계의 안정과 인간의 건강에 도전하는 중대한 위협요인으로서 제기되어 왔다. 따라서 미국과 유럽을 비롯한 선진국들에서는 환경유해물질들의 관리가 오존층 파괴, 지구온난화 등과 함께 범지구적 환경문제로서 인식되어 오래 전부터 그 대책마련에 고심하여 왔으며 구체적으로 화학물질의 안전성 평가와 적절한 관리대책 수립을 위한 제도적 장

치를 강화하고 이의 효과적 수행을 위한 사회적 시스템을 효율적으로 확립, 운영하고자 지속적인 노력을 경주하고 있다.²⁾

Bisphenol A는 폴리카보네이트 수지 및 에폭시 수지 등의 중요한 공업원료로서 산화방지 및 염화비닐의 안정제로 널리 사용되고 있는데 식품 캔, 우유병 등을 가열시 용출되는 등 우리의 실제적인 일상생활과 밀접한 관련을 가지는 내분비 교란물질인 만큼 그간 많은 연구노력이 집중되어 왔다.^{3,7)} Bisphenol A는 보통정도의 수용성(120-300 mg/l at pH 7)을 가진 비휘발성물질로서 수계환경 등으로 유출되어 토양, 저질 등에 흡착될 수 있는 특성을 가지고 있는데⁸⁾ 척추동물에 있어 내분비 교란물질로서의 환경독성학적 중요성에도 불구하고 국내에서 bisphenol A의 생태위해성평가와 관련된 그간의 연구노력은 상대적으로 미약하게 이루어진 것으로 평가된다.

급성독성시험은 일반적으로 화학물질간의 상대적 독성을 평가하는데 있어 1차적으로 수행되는 유용한 평가수단으로서 수서생물을 이용한 생태위해성 평가와 관련하여서는 화학물질의 농도-반응의 상관관계로부터 산출되는 LC₅₀과 EC₅₀이 치사율과 운동성상실을 endpoint

[†]Corresponding author : School of Civil and Environmental Engineering, Kunsan National University
Tel: 82-63-469-4763, Fax: 82-63-469-4964
E-mail : gshwang@kunsan.ac.kr

로 하여 그 대표적인 지표로서 사용되어지고 있다.^{9,11)} Bisphenol A의 경우 그간의 주요 연구보고들을 검토해 볼 때 *Daphnia magna*를 이용한 급성독성시험 결과로서 일반적으로 제시되는 48 h EC₅₀의 보고치가 큰 차이를 보이고 있어^{8,12)} 이에 대한 명확한 규명이 요구되고 있다.

따라서 본 연구에서는 대표적인 내분비교란물질로 알려져 있는 bisphenol A의 생태독성과 관련하여 실험동물로서 물벼룩(*Daphnia magna*)을 사용하여 심도 있는 급성 독성평가를 수행함으로써 bisphenol A에 대한 보다 명확한 수계 생태위해성 평가를 도모하고자 하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 실험동물(*Daphnia magna*)의 배양

금번 연구의 수행에 있어서 물벼룩의 배양 및 관리는 미국 EPA 방법에 준하여 수행¹³⁾하였다. 물벼룩의 사육을 위하여 항상 20±2°C의 온도, 16L/8D의 광주기가 유지되었고 매일 오전중 정기적으로 먹이공급여부, sieving여부, 사육수 교체여부, *Daphnia*의 건강상태등이 점검되어졌다. 사육수로서는 KCl, MgSO₄, NaHCO₃, CaSO₄가 첨가되는 Hard constituted water medium이 조제되었으며 여기에 selenium oxide와 vitamin B₁₂가 규정량 첨가되어 사용되었다. 물벼룩의 먹이로는 Tetrafin fish food(Pet International, Chesterfill, Australia)와 green algae(*Selenastrum capricornutum*)의 현탁액들이 배합된 적당량이 매일 2차례 공급되어졌으며 이같은 실험실적 배양조건하에서 물벼룩은 단성생식을 통해 female들이 배양되었다.

2. Bisphenol A의 급성독성실험

1) Daphnid를 사용한 급성독성시험

Bisphenol A의 급성독성을 평가하기 위해 본 연구에서는 EPA시험법¹⁴⁾에 따라 *Daphnia neonate*(<24 h old)에 대한 급성독성시험을 수행하고 48 h EC₅₀ 값을 산출하였다. 아울러 본 연구에서는 *Daphnia neonate*에 대해서 뿐만 아니라 생후 7일 사이의 일령별 *daphnia*에 대한 급성독성실험을 아울러 수행하여 *Daphnia magna*의 age에 따른 급성 독성수준의 차이/변화와 함께 규명하였다. Bisphenol A의 폭로농도는 예비실험을 통해 EC₅₀ 값을 포함하도록 선정되었으며 각 실험농도군에 대해 실험용액(test medium) 40 ml가 채워진 50 ml beaker 2개씩이 준비되었고 각 beaker 당 10마리의 *daphnids*가 사용되었다. 각 실험용액은 적당량의

시료물질을 순 ethanol 용액에 용해하여 해당 목표농도에 맞도록 배지용액에 첨가, 제조하였으며 실험을 위한 모든 시료용액들과 대조용액들에는 동일농도(≤0.01%)의 ethanol이 함유되도록 하였다. 조작이 완료된 실험용기들은 사육시와 동일한 조건으로 배양기에서 유지되었으며 48시간 후 운동성소실(immobilization)이 확인되었고 그 결과로부터 EC₅₀ 값과 95% 신뢰구간을 Origin software(MicroCal Software, Northhampton, USA)를 사용하여 산출하였다. 종말점으로서의 운동성소실은 실험용기를 가법계 혼든 후 15초 이상 움직임이 없는 것으로 정의하였다.

2) Embryo를 사용한 급성독성시험

본 연구에서는 상기의 *daphnid* 개체들을 사용한 급성독성시험과 함께 물벼룩 embryo들에 대한 급성독성시험이 수행되었다. 실험에 사용될 물벼룩 embryo들은 실험의 안정성과 감수성이 충족되도록 brood chamber내 embryo 출현확인 후 6-35시간 사이에서 8개 연령대를 대상으로 채취되었는데 이 때 embryo들은 동일세대의 *daphnid*들로부터 가급적 동일 brood들이 사용되도록 하였다. 실험에 사용된 embryo개체들은 Kast-Hutcheson 등¹⁵⁾에 의해 구분된 물벼룩 embryo의 전성숙과정 6단계중 1-3단계 초기에 해당하는 것으로 파악되었다. 급성독성실험방법의 세부 수행과정은 상기 *daphnid*를 사용한 시험법과 동일하며 embryo에 대해서는 72 h LC₅₀ 또는 110 h LC₅₀이 산출되었다.

3) 노출농도와 시간에 따른 급성독성의 비교

본 연구에서는 노출농도, 노출시간에 따른 bisphenol A의 급성독성차이를 파악하기 위해 각 군당 20-30마리의 6일령 성숙 *daphnid*를 사용하여 노출개시 48시간 후 노출농도에 따른 운동성소실과 치사율이 확인되었으며 또한 동일한 실험조건으로 20 mg/l의 bisphenol A에 *daphnid*를 노출시켜 노출시간에 따른 운동성소실과 치사율이 확인되었다.

III. 결과 및 고찰

Bisphenol A는 수계를 비롯한 환경내에서 용이하게 생분해되며 수생생물의 체내 축적에 대한 잠재력이 bioconcentration factor가 5-68 정도로서 크지 않은 것으로 알려져 왔다.⁸⁾ 그럼에도 불구하고 bisphenol A의 척추동물에 대한 내분비교란작용등의 유해성을 반영하여 그것의 생태독성에 대한 연구가 그간 지속적으로 이루어져 왔으며 그러한 관련연구들에 있어서는 기본적으로 여러 수생생물종들과 영양수준들(trophic levels)에 대한 급성독성실험에 많은 비중이 두어져 왔다. 본 연

구에서는 bisphenol A의 경우 *Daphnia magna*를 이용한 그간의 급성독성시험 연구결과들에 있어 상당한 수준차이가 발견되는 바 이와 관련하여 bisphenol A의 급성독성수준에 대해 명확히 규명하고 나아가 *daphnia* embryo에 대한 급성독성시험등을 수행하여 bisphenol A의 생태독성수준에 대해 면밀한 검토와 이해를 도모하고자 하였다.

*Daphnia magna*에 있어 bisphenol A의 급성독성실험 결과는 Table 1에서와 같이 그 간 EC₅₀ 값의 상당한 수준차이로서 보고되어왔는데 본 연구에서 EPA 시험법에 따라 생후 24시간 이내의 neonate를 사용하여 급성독성시험을 수행하고 산출한 bisphenol A의 48 h EC₅₀ 값은 12.9 mg/l(95% 신뢰구간: 12.76-13.04 mg/l)로서 그 간 보고된 *Daphnia magna*에 있어 bisphenol A의 48 h EC₅₀ 값들 중 일본 환경청에서 제시한 13 mg/l와 동일하게 일치하였다(Table 1). 본 연구결과로부터 얻은 bisphenol A의 48 h EC₅₀ 값은 본 연구에서와 동일 조건으로 기보고된 주요 유기용매의 급성 독성실험결과와 비교할 때(Table 2) formaldehyde의 48 h EC₅₀ 값보다는 다소 낮고 benzene의 48 h EC₅₀ 값보다는 약간 높은 수준이었으며 toluene의 48 h EC₅₀ 값보다는 2배 정도 높은 수준인 것으로 나타났다. 또한 본 연구결과로서 산출된 bisphenol A의 48 h EC₅₀ 값은 소형 어류인 *Japanese medaka*에 대한 48 h LC₅₀ 값으로 보고²¹⁾된 15 mg/l와도 거의 동일한 수준임을 보여

주었다. 한편 본 연구결과로서 산출된 bisphenol A의 48 h EC₅₀ 값은 같은 갑각류인 *Mysid shrimp*, *Mysidopsis bahia*에 대해 96 h LC₅₀로서 보고된 1.1 mg/l에 비해 10배 이상 큰 수준으로 EPA는 bisphenol A의 이러한 무척추동물들에 대한 급성독성수준에 대해 “slightly to moderately toxic”으로 분류⁸⁾하고 있다.

*Daphnia magna*의 age에 따른 급성 독성수준의 차이를 규명하고자 수행된 실험 결과 생후 7일 까지의 물벼룩 일령 증가에 따른 48 h EC₅₀ 값은 전체적으로 12.9 mg/l~19.8 mg/l 사이에서 일령증가에 따라 증가하는 경향(p<0.01)으로 2일령과 3일령사이에서 특히 크게 증가하였고 3일령 이후에는 6일령의 경우를 제외하면 48 h EC₅₀ 값의 증가 폭은 크지 않았다(Fig. 1).

물벼룩 embryo에 대한 급성독성시험으로서 본 연구에서는 brood chamber내 embryo 출현확인 후 6-35시간 사이에서 8개 연령대를 대상으로 72 h LC₅₀ 또는 110 h LC₅₀을 산출한 바(Table 3, Fig. 2) 물벼룩 embryo의 성숙과정 중 초기 1단계에 해당하는 6-7.5시간 연령대의 embryo의 경우에는 동일한 72 h LC₅₀

Table 1. Comparison of published 48 h EC₅₀s in *Daphnia magna* for bisphenol A

Reported value of 48 h EC ₅₀ (mg/l) of bisphenol A in <i>Daphnia magna</i>	Reference
3.9	Stephenson (1983) ¹⁶⁾
10.2	Alexander et al.(1988) ¹²⁾
20	Hendriks et al.(1994) ¹⁷⁾
13.0	日本環境廳(1999) ¹⁸⁾
12.9	This study

Table 2. Comparison of 48 h EC₅₀s in *Daphnia magna* between bisphenol A and organic solvents

Compound	Reported value* of 48 h EC ₅₀ (mg/l) of bisphenol A in <i>Daphnia magna</i>	Reference
Benzene	9.23-11.73	19)
Toluene	6.56, 6.68	19)
Formaldehyde	14.6	20)
Bisphenol A	12.9	This study

*Obtained from experiments using neonates(<24 h) under static conditions.

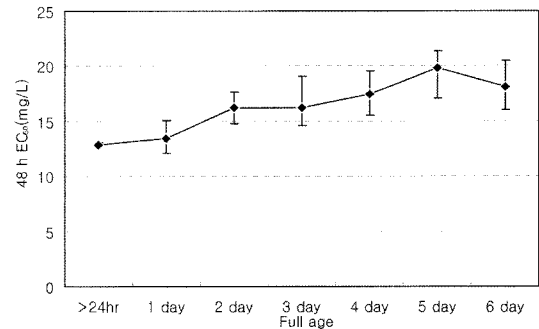


Fig. 1. Age dependent variation of 48 h EC₅₀ value(with 95% confidence interval) of bisphenol A in *Daphnia magna*.

Table 3. Comparison of 110 h LC₅₀ of bisphenol A in *Daphnia* embryo

Embryo age (hr)	Developmental stage of embryo used	72 h LC ₅₀ (mg/l)	110 h LC ₅₀ (mg/l)
6-6.5	1	1.55	1.55
7-7.5	1	3.86*	3.86
8-8.5	1	-	4.79
9-9.5	1	-	5.53
18-18.5	1.5	-	6.01
20-20.5	1.5	-	7.32
23-23.5	2	-	8.70
35-35.5	2.5	-	8.91

*Almost the same as the 110 h LC₅₀.

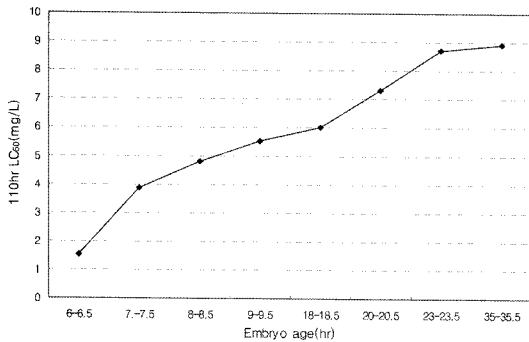


Fig. 2. Age dependent variation of 110 h LC₅₀ value of bisphenol A in daphnid embryo.

값과 110 h LC₅₀ 값을 산출할 수 있었으나 이 후 연령대의 경우는 embryo의 내성증가로 인해 72 h LC₅₀은 산출되지 못하고 110 h LC₅₀만을 산출할 수 있었음으로서 물벼룩 embryo에 대한 급성독성의 관찰에는 전체 연령대에 걸쳐 110시간 후가 적합함을 알 수 있었다. 본 실험에서 110 h LC₅₀ 값은 1.55 mg/l~8.91 mg/l 사이에서 연령증가에 따라 의존적으로 증가(p<0.01)함을 나타내었다.

Daphnid를 이용한 유해화학물질의 생태독성평가에 대한 실제적 유용성을 검증하고자 노출농도 및 노출시간에 따른 bisphenol A의 급성독성차이를 파악하기 위해 수행된 독성실험결과는 Fig. 3, 4와 같다. 6일령 daphnid를 사용하여 노출농도에 따른 운동성소실 및 치사율을 관찰, 산정한 결과실험에 적용한 bisphenol A의 농도범위(10-25 mg/l)내에서 전형적인 농도의존적 반응곡선(concentration-response curve)을 나타내었으며 48 h EC₅₀은 상기 Fig. 1의 결과에 비해 다소 낮은 수준이었으나 큰 차이는 보여지지 않았다. 또한 6일령 daphnid는 20 mg/l의 bisphenol A에 노출시 노출시간에

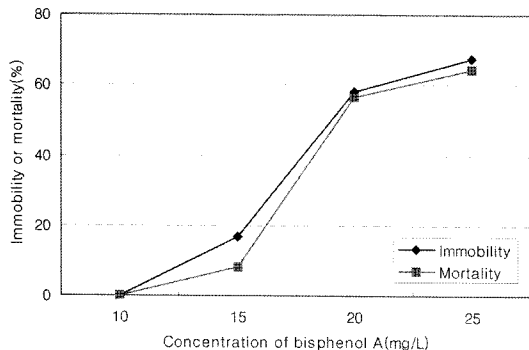


Fig. 3. Concentration dependent change of 48 h acute toxicity in 6 day old daphnid exposed to bisphenol A.

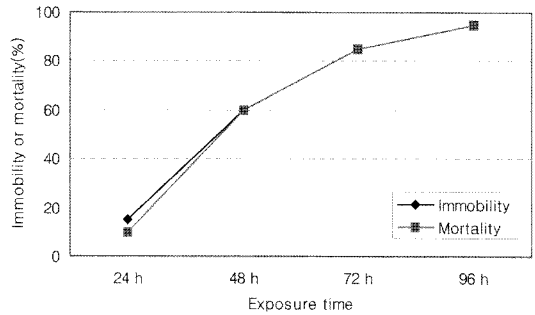


Fig. 4. Exposure time dependent change of acute toxicity in daphnid exposed to 20 mg/l of bisphenol A.

의존적으로 운동성소실과 치사율이 증가함을 나타내었으며 본 실험에서 전체적으로 노출농도 및 노출시간에 따른 운동성 소실과 치사율 변화에는 유의할 만한 차이가 보여지지 않았다. 이러한 실험결과들은 daphnid를 사용한 급성독성실험이 bisphenol A와 같은 유해화학물질들의 생태독성평가에 실제적으로 매우 유용하게 활용될 수 있음을 시사하는 것으로 볼 수 있으며 산업폐수 및 각종 방류수 수질독성평가에의 응용을 위한 지속적인 관련 연구노력이 필요할 것으로 사료된다.

IV. 결 론

실험동물로서 물벼룩(*Daphnia magna*)을 사용하여 대표적인 내분비교란물질로 알려져 있는 bisphenol A에 대해 생태 급성독성시험을 수행한 본 연구결과 bisphenol A의 48 h EC₅₀ 값은 12.9 mg/l(95% 신뢰구간: 12.76-13.04 mg/l)였으며 생후 7일 까지의 물벼룩 일령 증가에 따른 48 h EC₅₀ 값은 전체적으로 12.9 mg/l~19.8 mg/l 사이에서 일령증가에 따라 증가하는 경향을 나타내었다.

물벼룩 embryo에 대한 급성독성시험으로서 본 연구에서는 brood chamber내 embryo 출현확인 후 6-35시간사이에서 8개 연령대를 대상으로 110 h LC₅₀을 산출한 바 본 실험에서 110 h LC₅₀ 값은 1.55 mg/l~8.91 mg/l 사이에서 연령증가에 따라 의존적으로 증가함을 나타내었다.

물벼룩을 이용한 유해화학물질의 생태독성평가에 대한 실제적 유용성을 검증하고자 노출농도, 노출시간에 따른 bisphenol A의 급성독성차이를 파악하기 위해 6일령 성숙 daphnid를 사용하여 노출농도에 따른 48시간 후 운동성소실 및 치사율을 관찰, 산정한 결과, 실험에 적용한 bisphenol A의 농도범위(10-25 mg/l)내에서 전형적인 농도의존적 반응곡선(concentration-

response curve)을 나타내었으며 또한 6일령 성숙 물벼룩을 20ppm의 bisphenol A에 노출시 노출시간에 의존적으로 운동성소실과 치사율이 증가함을 나타내었고 본 실험에서 전체적으로 노출농도, 노출시간 및 실험동물의 연령에 따른 운동성소실과 치사율 변화에는 유의할 만한 차이가 보여지지 않았다. 이러한 실험결과들은 daphnid를 사용한 급성독성실험들이 bisphenol A와 같은 유해화학물질들의 생태독성평가에 실제로 매우 유용하게 활용될 수 있음을 시사하는 것으로 볼 수 있으며 지속적인 관련 연구노력들이 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 지역대학 우수과학자 연구지원사업(과제번호, R05-2004-000-10180-0)으로 학술진흥재단의 지원으로 수행되었음에 감사드립니다.

참고문헌

- 이철희, 이순화 역 : 화학물질과 생태독성. 라이프사이언스, 23-30, 2007.
- 임경택, 김현욱, 김영교, 조해원, 마용석, 이권섭, 임철홍, 김현영, 양정선 : 화학물질 유해성평가를 위한 정보의 작성 및 활용. 한국환경독성학회지, **22**(1), 91-101, 2007.
- Lee, H. J., Chattopadhyay, S., Gong, E. Y., Ahn, R. S. and Lee, K. : Antiandrogenic effects of bisphenol A and nonylphenol on the function of androgen receptor. *Toxicological Sciences*, **75**, 40-46, 2003.
- Krishnan, A. V., Stathis, P., Permuth, S. F., Tokes, L. and Feldman, D. : Bisphenol A: An estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology*, **132**, 2279-2286, 1993.
- Colerangle, J. B. and Roy, D. : Profound effects of the weak environmental estrogen-like chemical bisphenol A on the growth of the mammary gland of noble rats. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **60**, 153-160, 1997.
- Ramos, J. G., Varayoud, J., Sonnenschein, C., Soto, A. M., Munoz de T. M. and Luque, E. H. : Prenatal exposure to low doses of bisphenol A alters the periductal stroma and glandular cell function in the rat ventral prostate. *Biology of Reproduction*, **65**, 1271-1277, 2001.
- Kim, P. G., Lee, N. R. and Hwang, S. H. : The bisphenol A : a modulator of pregnancy in rats. *Korean Journal of Environmental Health*, **29**(3), 27-34, 2003.
- Staples, C. A., Dorn, P. B., Klecka, G. M., O'Block, S. T. and Harris, L. R. : A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere*, **36**, 2149-2173, 1998.
- 김정곤, 이민정, 오소린, 최경호 : 담수 물벼룩 *Daphnia magna*의 자외선 B 적용이 자외선과 중금속의 동시노출에 따른 독성반응에 미치는 영향. 한국환경보건학회, **33**(2), 123-131, 2007.
- Wong, C. L., Dorn, P. B. and Chai, E. Y. : Acute toxicity and structure-activity relationships of nine alcohol ethoxylate surfactants to fathead minnow and *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **16**(9), 1970-1976, 1997.
- Kim, P. G. : Ecotoxicological risk assessment for acetaminophen in Kyongahn river. *Korean Journal of Environmental Health*, **32**(5), 440-445, 2006.
- Alexander, H., C., Dill D. C., Smith, L. W., Guiney, P. D. and Dorn, P. : Bisphenol A : acute aquatic toxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **7**, 19-26, 1988.
- Mu, A. and LeBlanc, G. A. : Environmental anti-ecdysteroids alter embryo development in the crustacean *Daphnia magna*. *Journal of Experimental Zoology*, **292**, 287-292, 2002.
- Stephan, C. E. : Methods for acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates, and amphibians. EPA/660/3-75-009. US Environmental Protection Agency, Duluth, MN., 1975.
- Kast-Hutcheson, K., Rider, C. V. and LeBlanc, G. A. : The fungicide propiconazole interferes with embryonic development of the crustacean *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **20**(3), 502-509, 2001.
- Stephenson, R. R. : Diphenylol propane. Acute toxicity to *Daphnia magna* and *Selanastrum capricornutum*. Group Research Report, Shell Research Ltd., Sittingbourne Research Centre, Kent, England, 1983.
- Hendriks, A. J., Mass-Diepeveen, J. L., Noordsij, A. and Van der Gaag, M. A. : Monitoring response of XAD-concentrated water in the rhine delta: A major part of the toxic compounds remains unidentified. *Water Research*, **28**(3), 581-598, 1994.
- 日本環境廳 : 平成 10年度 生態影響試驗實施事業報告, 1999.
- MacLean, M. M. and Doe, K. G. : The comparative toxicity of crude and refined oils to *Daphnia magna* and *Artemia*, Environmental Canada, EE-111, Dartmouth, Nova Scotia, 64, 1989.(www.pesticideinfo.org)
- Office of pesticide programs, Pesticide ecotoxicity database, Environmental Fate and Effects Division, U.S. EPA, Washington, D.C., 2000.
- MITI. Data of Existing Chemicals Based on the CSCL Japan - Biodegradation and Bioaccumulation. Chemical Inspection and Testing Inst. Japan(ed.), 1992.