

Triclosan의 독성에 중금속이 미치는 영향 - *V. fischeri* Assay 관련 내용 중심으로 - A Effect of Heavy Metal to Toxicity of Triclosan Focused on *Vibrio fischeri* Assay

김지성* · 김일호***,† · 이우미*** · 이혜인** · 김석구***
Ji-Sung Kim* · IL-Ho Kim***,† · Woo-Mi Lee*** · Hye-in Lee** · Seok-Gu Kim***

*과학기술연합대학원대학교 건설환경공학과

한국건설기술연구원 수자원·환경 연구본부 환경연구실 · *금강유역환경청

*Department of Construction Engineering, University of Science and Technology

**Environmental Engineering Research Division, Korea Institute of Construction Technology

***Geum River Basin Environmental Office

(2013년 11월 15일 접수, 2014년 2월 17일 채택)

Abstract : The purpose of this study is to evaluate effect of heavy metals (i.e., Cu²⁺, Zn²⁺, Cr⁶⁺, Cd²⁺, Hg²⁺, and Pb²⁺) to toxicity of Triclosan as binary mixture. The individual toxicity and combined toxic effects of Triclosan with heavy metals were evaluated by *Vibrio fischeri* assay. In individual toxicity, the Hg²⁺ was found to be most toxic followed by Triclosan, Pb²⁺, Cr⁶⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, and Cd²⁺, respectively. To evaluate combined toxic effect, correlation analysis of 'predicted value' calculated by Concentration addition (CA) model and Independent action (IA) model with 'experimental value' were performed based on the toxicity of individual compound. As a result, all of the combinations showed that IA model were more correlated with experimental value than CA model. On the basis of the median effect concentration of combination (EC_{50mix}) predicted by IA model, experimental EC_{50mix} of Triclosan + Cu, Triclosan + Zn, Triclosan + Pb, Triclosan + Hg, Triclosan + Cd, and Triclosan + Cr were 191%, 226%, 138%, 137%, 209%, and 138% of EC_{50mix} predicted by IA model, respectively, indicating that all of the combinations produced antagonistic effect.

Key Words : Combined Toxicity, Heavy Metal, Triclosan, *Vibrio fischeri*

요약 : 본 연구에서는 합성 항균제로 이용되는 Triclosan이 Cu²⁺, Zn²⁺, Cr⁶⁺, Cd²⁺, Hg²⁺, Pb²⁺ 등과 같은 중금속과 공존할 경우의 독성영향을 발광박테리아인 *Vibrio fischeri*를 이용하여 평가하였다. 우선, Triclosan과 상기 6종 중금속의 단일물질별 *Vibrio fischeri*에 대한 독성을 평가한 결과, Hg²⁺의 독성이 가장 높았으며 뒤이어 Triclosan > Pb²⁺ > Cu²⁺ > Cr⁶⁺ > Zn²⁺ > Cd²⁺ 순의 독성 민감도가 나타났다. 각 물질의 독성평가결과를 바탕으로 Triclosan과 중금속 혼합물질의 독성작용분석을 위해 유사한 독성작용을 가정하여 독성치를 예측하는 Concentration Addition (CA) 모델과 독립적인 독성작용을 가정하여 독성치를 예측하는 Independent Action (IA) 모델에 대한 상관도분석을 실시하였다. 그 결과 Triclosan + Cu, Triclosan + Zn, Triclosan + Pb, Triclosan + Hg, Triclosan + Cd, 그리고 Triclosan + Cr 등 모든 조합에서 CA 모델보다는 IA 모델과 상관성이 높은 것으로 나타나 Triclosan과 대상 중금속들은 서로 독립적인 독성작용을 하는 것으로 나타났다. 한편 Triclosan과 중금속의 혼합독성영향은 IA 모델로 예측된 EC_{50mix} 기준으로 Triclosan + Cu, Triclosan + Zn, Triclosan + Pb, Triclosan + Hg, Triclosan + Cd, 그리고 Triclosan + Cr의 실험 EC_{50mix}이 IA 모델로 예측한 농도보다 각각 191%, 226%, 138%, 137%, 209% 그리고 138%로 나타나, Triclosan과 시험 중금속이 공존하는 경우, 모두 길항작용이 나타나는 것으로 확인되었다.

주제어 : 혼합독성, 중금속, Triclosan, *Vibrio fischeri*

1. 서론

산업 활동과 더불어 새로운 물질이 개발되고 사용됨에 따라 다양한 화학물질이 환경으로 노출되고 있다. 한편, 최근 우리 생활과 밀접하게 연관되어 있는 pharmaceuticals and personal care products (PPCPs)는 환경으로 노출되어 생태계에 악영향을 미칠 수 있는 새로운 물질로 부상하고 있다.¹⁾ PPCPs는 환경 중에 미량으로 존재하며, 전 세계적으로 수체 내 약 0.1 µg/L의 농도로 분포되어 있다고 알려져 있다.²⁻⁷⁾ 한편, 이러한 PPCPs는 고도처리 설비를 갖추지 못한 기존의 하·폐수처리장에서는 적절히 처리되지 못한다는 연구들이 보고된 바 있으며,^{8,9)} 특히 잔류성과 생물축적성이 높은 물질은 환경으로 노출되어 수 환경에 악영향을 미칠

가능성이 높은 것으로 보고되고 있다.

PPCPs 중에서도 Triclosan은 광범위한 항균성을 지니는 합성 항균제로 소독제, 비누, 세제, 치약 등과 같은 다양한 생활용품 및 주방용품의 원료로 이용되고 있으며, 그 사용량은 매년 증가하고 있어,¹⁰⁾ 환경으로의 노출량 또한 증가하고 있다. 국내 수계에 분포하고 있는 Triclosan의 농도는 약 17 ng/L~55 ng/L로 조사되었으며,⁹⁾ 국제적으로 지표수에서의 Triclosan의 최대 검출농도는 2.3 µg/L로 보고된 바 있는데,¹¹⁾ 특히 하수처리장의 유입수에는 최대 26.8 µg/L의 Triclosan이 검출될 바 있으며, 하수처리과정에서 완전히 처리되지 않은 Triclosan의 50% 이상이 biosolid에 잔류한 채로 존재한다고 알려져 있다.¹²⁾

위와 같이 보고된 바에 의하면 실제 환경 중 Triclosan은

† Corresponding author E-mail: ihkim@kict.re.kr Tel: 031-910-0649 Fax: 031-910-0291

미량의 농도로 존재하고 있는 것으로 나타났지만, 그 정도의 유해성 여부에 대해서는 구체적으로 보고되고 있지 않다. 그러나 Triclosan은 물에서 안정한 친유성 화합물이며, 상대적으로 높은 옥탄올-물 분배계수(pH 7에서 $K_{ow} = 4.8$)를 가지고 있어 수체에 지속적으로 노출되면 생물체내 축적되어 수서생물에 독성을 야기할 수 있으며, 내분비계 장애물질과 구조적으로 유사하여 어류, 양서류, 설치류를 대상으로 한 연구에서 성비 교란 및 갑상선 항상성에 영향을 미칠 수 있다는 보고도 있다. 또한 수계에 존재하면서 햇빛에 노출될 경우 광화학적 변환을 통해 잠재적으로 내분비계 장애를 유발할 수 있는 2,8-dichlorodibenzo-*p*-dioxin (2,8-DCDD)을 생성한다고 보고되어 있다.¹³⁻¹⁷⁾

한편 중금속들은 자연적으로 존재하나 산업 활동의 부산물로 종종 환경 중에서 생태계에 유해할 수준의 농도가 검출되고 있으며, 이중 자연적으로 존재하는 구리, 아연, 크롬, 카드뮴, 수은, 납 등 일부 중금속의 경우 그 독성영향이 많은 선행연구에서 입증되어, 수질 및 토양환경기준 항목으로 관리하고 있다. 이와 더불어 환경에는 이러한 중금속 이외에도 산업 활동으로 인해 배출된 다양한 화학물질이 공존하고 있기 때문에 이들 물질간의 상호작용, 대사형태, 생물 이용성 등에 따라 단일물질로 존재할 때와는 다른 영향이 나타날 수 있다.¹⁸⁾ Wang¹⁹⁾의 Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs)인 phenanthrenequinone (PHQ)와 중금속(Cu, Cd)의 혼합독성영향에 대한 연구에 의하면 PHQ에 Cu, Cd가 첨가됨에 따라 독성영향이 변화되었으며, 특히 Cu의 경우에는 저농도 존재할 시에는 독성이 완화되는 길항작용, 고농도가 존재할 시에는 독성이 증가하는 상승작용이 나타나는 것으로 확인되었다.

본 연구에서는 재현성이 높고, 비교적 짧은 시간에 독성을 파악할 수 있는 장점이 있어,²⁰⁾ 수계내 독성모니터링에 적합한 *Vibrio fischeri*를 이용하여 Triclosan 및 중금속 6종에 대한 독성시험을 수행하였다. 또한 중금속이 *Vibrio fischeri*에 대한 Triclosan의 독성에 미치는 영향을 파악하고자 각 물질들의 독성평가결과를 기반으로 혼합독성영향을 평가하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시험물질

실험에 사용한 중금속은 총 6종으로 Copper(II) chloride dihydrate ($CuCl_2 \cdot 2H_2O$, 99% purity, WAKO chemical, Japan), Zinc chloride ($ZnCl_2$, 98% purity, Junsei, Japan), Potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$, 99.5% purity, Yakuri pure chemicals, Japan), Cadmium chloride ($CdCl_2$, $\geq 99\%$ purity, Fluka, USA), Mercury(II) chloride ($HgCl_2$, 99.5% purity, Daejung, Korea), Lead(II) chloride ($PbCl_2$, 99% purity, Junsei, Japan) 등이다. 각 중금속은 2% NaCl solution을 이용하여 표준용액(1,000

mg/L)을 제조하였으며, 매 실험시 표준용액을 일정한 농도로 희석하여 실험에 이용하였다. Triclosan (Irgasan, $\geq 97.0\%$ purity, Sigma)은 dimethyl sulfoxide (DMSO, $\geq 99.9\%$ purity, Sigma, France)을 이용하여 Triclosan 표준용액(25,000 mg/L dissolved in DMSO)을 제조한 후, 2% NaCl solution에 희석하여 사용하였다. DMSO 자체가 *Vibrio fischeri*에 미치는 영향을 확인하기 위해, DMSO에 대한 독성 실험을 수행하였으며, 그 결과 DMSO농도가 0.2% (v/v) 미만일 경우에는 *V. fischeri*의 발광저해영향을 미치지 않은 것으로 나타나, 본 실험에서는 DMSO농도를 최대 0.2% (v/v) 미만으로 제조하여 측정하였다.

2.2. V. fischeri assay

발광박테리아는 동결건조된 *V. fischeri* (NRRL B-11177, VF201, NeoEnBiz Co, Korea)를 이용하였다. 시험 전 *V. fischeri*는 reagent solution (RS202, NeoEnBiz Co, Korea)을 이용하여 활성화하였으며, *V. fischeri*의 발광저해실험은 기술 표준원의 표준시험법²¹⁾에 준하여 수행하였다. 각 시험물질별 최대농도는 Triclosan, Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cr^{6+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , 그리고 Pb^{2+} 순으로 1, 25, 50, 50, 50, 1, 그리고 5 mg/L이며, 각 물질은 연속 희석하여, 대조군(2% NaCl)을 포함하여 6개 농도로 준비하였다(Table 1).

혼합독성에 대한 Triclosan과 중금속의 농도비는 각 단일 물질의 독성결과를 바탕으로 설정하였다. Triclosan + Zn, Triclosan + Cr, Triclosan + Cd의 농도비는 1:50이며, 그 외 Triclosan + Cu, Triclosan + Hg, 그리고 Triclosan + Pb는 각각 1:25, 1:5, 그리고 1:1로 설정하였다. 단일독성시험과 마찬가지로 각 혼합물은 연속희석 하여 6개의 농도로 준비하였다. 96-well microplate에 시험물질을 각각 100 μ L씩 주입한 이후에, *V. fischeri* 현탁액을 100 μ L씩 주입하였으며, *V. fischeri* 현탁액을 주입한 시점부터 30분간 노출시켰다. 모든 시험물질 및 시험에 사용한 96well plate는 $15 \pm 1^\circ C$ 로 준비한 후 실험에 사용하였으며, 각 농도별 4회 반복 측정하였다. 발광도는 *V. fischeri*를 시험물질에 노출한 직후 측정된 초기발광도와 시험물질 노출 5, 15, 30분 후의 발광도를 luminometer (Lubi, Microdigital, Korea)를 이용하여 측정

Table 1. Stock and Working solution of each single chemicals (unit: mg/L)

	Triclosan	Cu^{2+}	Zn^{2+}	Pb^{2+}	Hg^{2+}	Cd^{2+}	Cr^{6+}
Stock solution	25,000*	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Working solution	0.06	1.56	3.13	0.31	0.06	3.13	3.13
	0.13	3.13	6.25	0.63	0.13	6.25	6.25
	0.25	6.25	12.50	1.25	0.25	12.50	12.50
	0.50	12.50	25.00	2.50	0.50	25.00	25.00
	1.00	25.00	50.00	5.00	1.00	50.00	50.00

*In DMSO

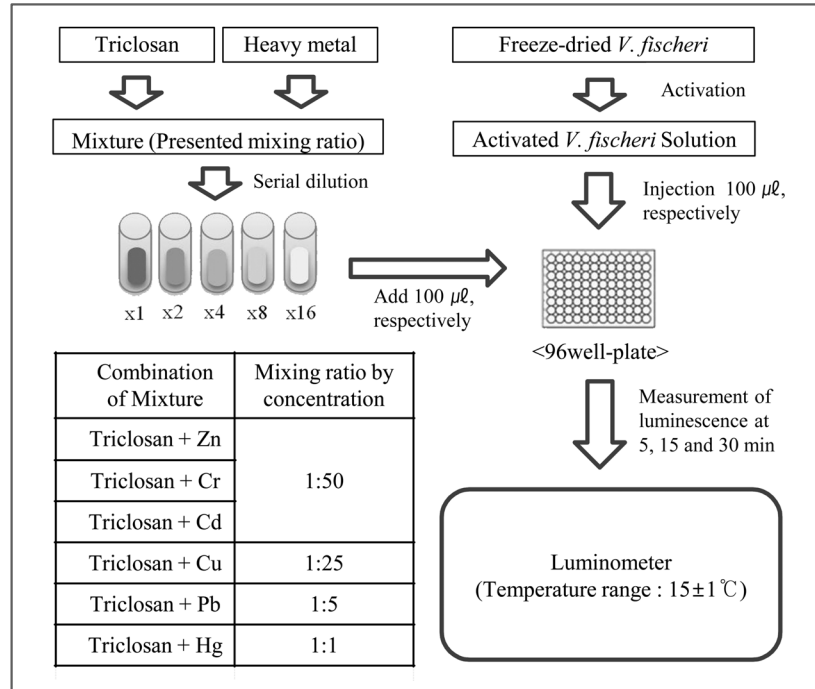


Fig. 1. Scheme of experimental procedure.

하였으며 초기발광도 대비 노출시간에 따른 상대적 발광저해도를 평가하였다(Fig. 1).

2.3. 데이터 분석

시험물질에 대한 *V. fischeri*의 발광저해는 대조구의 발광도 대비 각 노출농도별 상대발광도를 산출하여 평가하였으며 식으로 표현하면 다음과 같다.²²⁾

$$RLU = \frac{L_c - L_t}{L_c} \times 100 \quad (1)$$

Relative Luminescence Unit (RLU)은 상대발광도를 의미하며, L_c 는 대조군의 발광량, L_t 는 실험군의 발광량을 나타낸다. 단일물질에 대한 독성반응을 평가하기 위해서 Origin pro 8 program[®]을 사용하여 Sigmoidal Curve를 작성하였으며, 혼합독성 평가를 위해 Toxic Unit (TU)모델을 이용하였다.¹⁹⁾ 혼합독성영향평가를 위하여 독성물질이 유사한 독성작용을 나타낸다는 가정을 전제로 하는 Concentration Addition (CA)모델과 독립적인 독성작용을 나타낸다는 가정을 전제로 하는 Independent Action (IA)모델을 이용하여 산출한 예측값과 실험값을 각각 비교하였다. CA모델은 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$\sum_{i=1}^n \frac{C_i}{ECx_i} = 1 \quad (2)$$

C_i 는 혼합상태에서 정해진 영향정도인 x%를 얻기 위한 n 가지 화학물질의 개별 농도를 나타내며, ECx_i 는 x%의 영향

을 얻기 위한 화학물질의 개별농도를 나타낸다. 한편 IA모델은 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$E(C_{mix}) = 1 - \prod_{i=1}^n (1 - E(C_i)) \quad (3)$$

$E(C_i)$ 는 개별 화학물질들의 독성영향을 나타내며 C_i 는 $E(C_{mix})$ 를 나타내기 위한 개별오염물질의 농도를 나타낸다.²³⁾

3. 결과 및 고찰

3.1. Triclosan 및 중금속의 독성영향

*V. fischeri*를 이용한 단일물질의 독성영향을 파악하기위해 각 물질의 농도별 상대발광도를 그래프로 나타내었다(Fig. 2). 먼저 Triclosan의 경우 최대 1 mg/L까지 노출한 결과, 0.5 mg/L와 1.0 mg/L로 노출농도가 증가되었을 경우, 발광도가 감소하는 것을 볼 수 있다. 또한 시간대별 변화추이를 살펴본 결과 *V. fischeri*는 Triclosan에 5분의 단기노출에도 발광이 50가 저해되는 급격한 독성영향을 나타내는 것으로 확인되었으며 이러한 초기영향이 노출 30분후까지도 유지되었다. Farre 등⁸⁾의 선행연구에 따르면 *V. fischeri*의 15분과 30분 노출후의 dose-response curve가 일치하는 것을 확인할 수 있다. 이러한 현상은 뛰어난 항균효과를 나타내는 Triclosan이 *V. fischeri*에 즉각적인 독성영향을 야기했기 때문으로 판단된다.⁸⁾

한편 상대발광도를 바탕으로 sigmoidal curve를 작성한 후 EC_{50} 값을 산출한 결과 Triclosan의 30 min- EC_{50} 이 0.522 mg/L로 산출되었으며, Lopez-Roldan²⁴⁾의 연구에 의하면 Triclosan

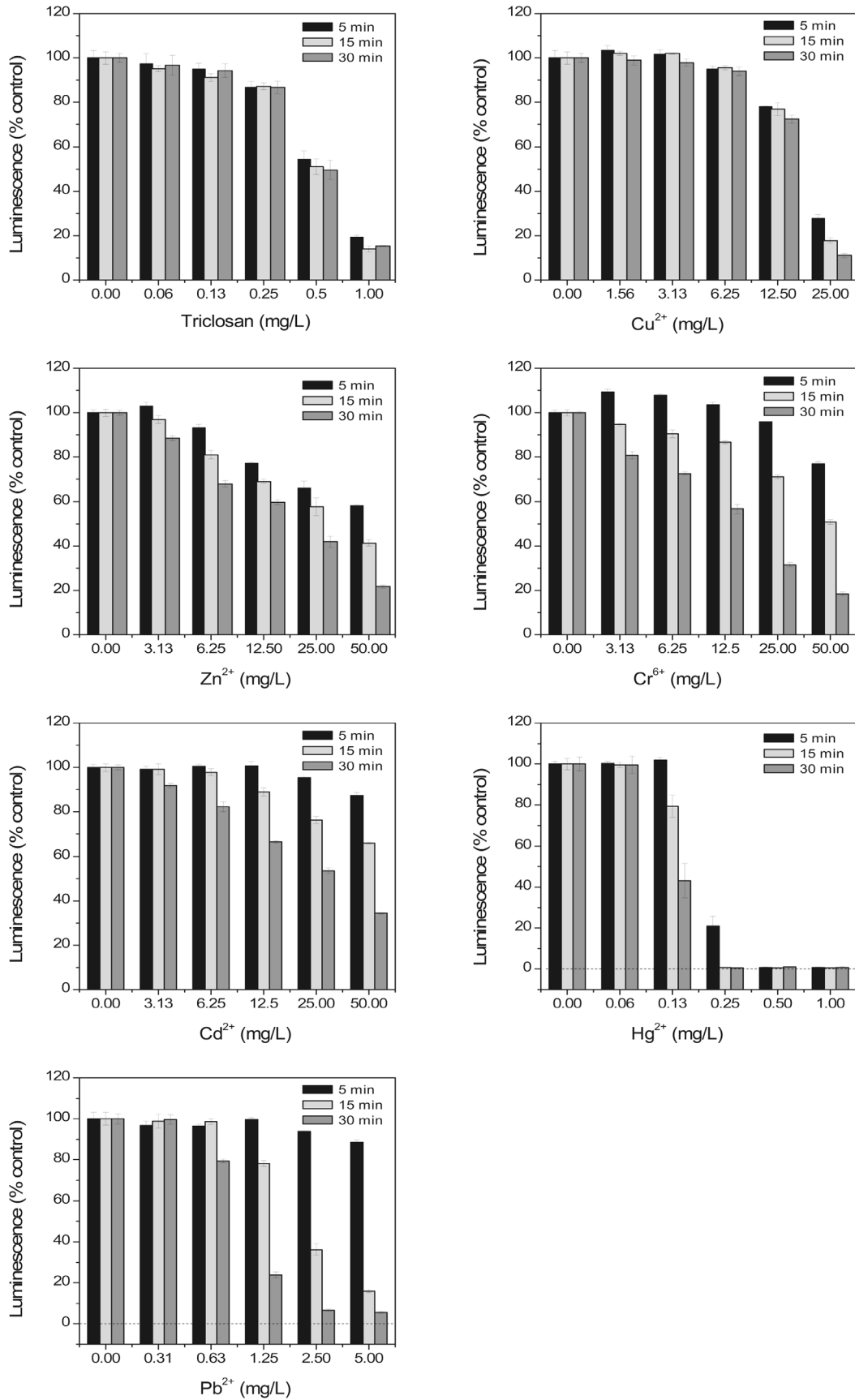


Fig. 2. Luminescence of *V. fischeri* exposed to Triclosan, Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cr^{6+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , and Pb^{2+} for 5, 15, 30 min. Bars represent one standard deviation of the mean of four replicates.

Table 2. The median effective concentration (EC₅₀) for *Vibrio fischeri* exposed to Triclosan, Cu²⁺, Zn²⁺, Pb²⁺, Hg²⁺, Cd²⁺, and Cr⁶⁺

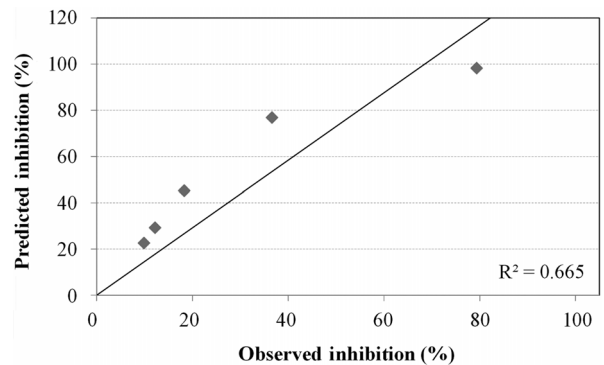
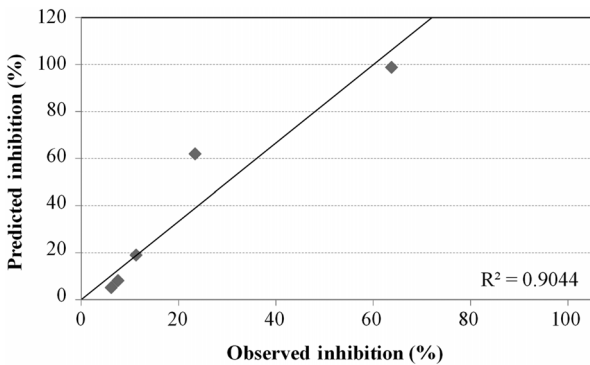
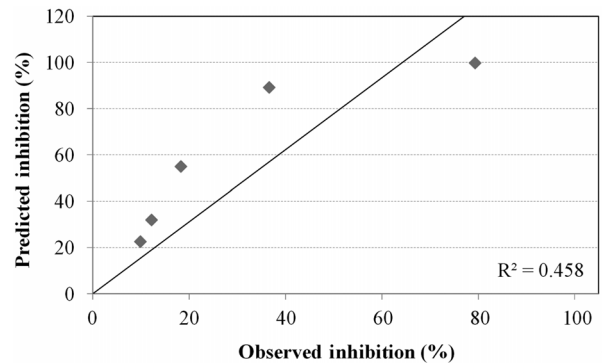
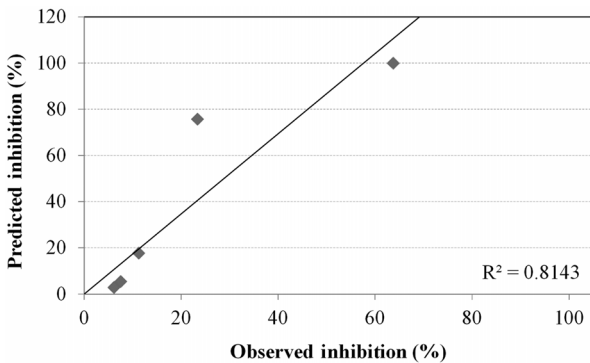
Chemical	Experimental value		Literature value
	30 min - EC ₅₀ (mg/L)		30 min - EC ₅₀ (mg/L)
Triclosan	0.522 (0.484-0.560)		0.13 ⁽²⁴⁾
Cu ²⁺	16.409 (16.134-16.684)		0.25 ⁽²⁷⁾ ~36 ⁽²⁸⁾
Zn ²⁺	22.787 (18.479-27.095)		0.488 ⁽²⁹⁾ ~13.4 ⁽²⁸⁾
Pb ²⁺	0.976 (0.923-1.029)		0.122 ⁽²⁹⁾ ~130 ⁽²⁴⁾
Hg ²⁺	0.124		0.62 ⁽³⁰⁾ ~0.8 ⁽²⁸⁾
Cd ²⁺	32.802 (27.687-37.917)		7.965 ⁽²⁹⁾ ~21.8 ⁽²⁸⁾
Cr ⁶⁺	17.848 (14.963-20.734)		13.76 ⁽²⁹⁾ ~17.5 ⁽²⁸⁾

의 *V. fischeri*에 대한 15 min-EC₅₀과 30 min-EC₅₀이 모두 0.13 mg/L으로 나타나 선행연구에서도 높은 급성독성을 나타내는 것으로 확인되었다(Table 2). 또한 Isidori 등의 매크로라이드계(Macrolide) 항생제인 Erythromycin, Lincomycin 그리고 Clarithromycin, 테트라사이클린계(Tetracyclin) 항생제인 Oxytetracyclin, 설파계(Sulfamide) 항생제인 Sulfamethoxazole, 그리고 퀴놀론계(Quinolone) 항생제인 Ofloxacin 등 6 가지 항생제에 대한 생태독성 연구결과에 따르면, 상기물질들의 *V. fischeri*에 대한 30 min-EC₅₀이 23.3 mg/L에서 >100 mg/L까지의 범위에서 나타나, 다른 항생물질에 비해 Triclosan의 *V. fischeri*에 대한 독성이 높은 것으로 나타났다.²⁵⁾ 한편 Triclosan은 박테리아 세포내로 침투하여 RNA합성 및 macromolecule합성에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며,¹⁰⁾

0.2% (w/v)의 Triclosan이 *V. fischeri*의 cell을 용해시킨다는 연구도 보고된 바 있다.²⁶⁾ Triclosan에 대한 본 연구결과 및 선행연구를 바탕으로 판단하였을 때 수계로 배출된 Triclosan은 수생태계 생물 특히 미생물에 악영향을 미칠 수 있을 것이라 사료된다.

다음으로 중금속 6종(Cu²⁺, Zn²⁺, Pb²⁺, Hg²⁺, Cd²⁺, Cr⁶⁺)의 노출시간에 따른 상대적 발광도 또한 그래프로 나타내었다(Fig. 2). *V. fischeri*의 상대적 발광도는 모든 중금속에서 농도증가에 따라 감소하였으며, Cu를 제외한 중금속들은 시간이 지남에 따라 독성이 서서히 발현되는 것으로 나타났다. Cu의 경우 Triclosan과 비슷하게 초기에 나타난 발광저해 이후에 큰 변화가 없는 것으로 나타났다.

Cu²⁺, Zn²⁺, Pb²⁺, Hg²⁺, Cd²⁺, 그리고 Cr⁶⁺의 30 min-EC₅₀는 각각 16.409 (16.134-16.684), 22.787 (18.479-27.095), 0.976 (0.923-1.029), 0.124, 32.802 (27.687-37.917), 그리고 17.848 (14.963-20.734) mg/L로 산출되어 *V. fischeri*에 대한 각 물질의 독성은 Hg²⁺, Pb²⁺, Cu²⁺, Cr⁶⁺, Zn²⁺, Cd²⁺의 순으로 Hg²⁺이 가장 높았고, Cd²⁺의 독성이 가장 낮은 것으로 나타났다(Table 2). 한편 본 연구에서 수행한 6종 중금속에 대한 *V. fischeri*의 선행연구 결과를 보면, 30 min-EC₅₀기준으로 Cu²⁺의 경우 0.25⁽²⁷⁾~36⁽²⁸⁾ mg/L, Zn²⁺은 0.488⁽²⁹⁾~13.4⁽²⁸⁾ mg/L, Pb²⁺는 0.122⁽²⁹⁾~130⁽²⁴⁾ mg/L, Hg²⁺는 0.62⁽³⁰⁾~0.8⁽²⁸⁾ mg/L, Cd²⁺는 7.965⁽²⁹⁾~21.8⁽²⁸⁾ mg/L, Cr⁶⁺은 13.76⁽²⁹⁾~17.5⁽²⁸⁾ mg/L로 보고되고 있어 본 연구에서 도출된 독성값과의 유의성을 확인하였다(Table 2).



(a) Triclosan + Cu

(b) Triclosan + Zn

Fig. 3. Correlation of observed inhibition with predicted Inhibition calculated by concentration addition (up) and independent action (down) mode.

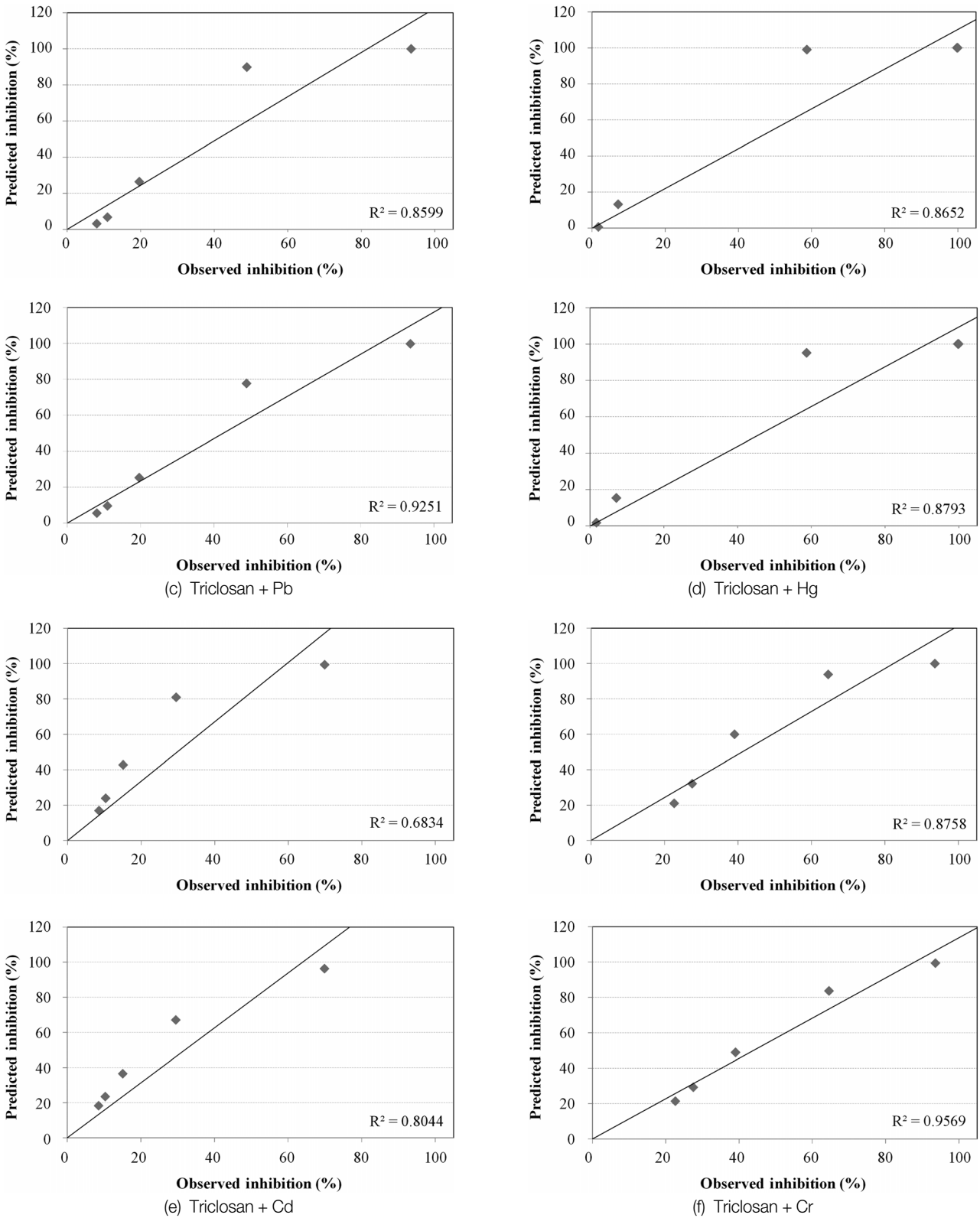


Fig. 3. Continued.

3.2. Triclosan과 중금속 혼합물질의 독성작용 분석

혼합독성영향평가를 위하여 독성물질이 유사한 독성작용을 나타낸다는 가정을 전제로 하는 Concentration Addition (CA)모델과 독립적인 독성작용을 나타낸다는 가정을 전제

로 하는 Independent Action (IA)모델을 이용하여 산출한 예측값과 실험값과의 비교를 통하여 Triclosan과 각 중금속과의 혼합물이 어떠한 독성작용에 가까운지 분석하였다.

Fig. 3은 Triclosan과 6종 중금속의 혼합물에 *V. fischeri*를

노출시켰을 때 측정된 상대발광도를 바탕으로 산출한 발광저해율과 단일물질의 독성평가에서 기인하는 CA모델과 IA모델로부터 얻어진 예측값과의 상관도를 나타낸 것이다. Triclosan + Cu, Triclosan + Zn, Triclosan + Pb, Triclosan + Hg, Triclosan + Cd, 그리고 Triclosan + Cr의 조합에서 상관도를 비교해보면, Triclosan + Hg의 조합에서 R²값의 차이가 거의 없는 것을 제외하고는 Triclosan + Cu는 CA모델과 IA모델에 대한 R²값이 각각 0.8143, 0.9044로 IA모델과의 상관도가 더 높았으며, Triclosan + Zn의 R²값은 CA 및 IA에 대해서 각각, 0.458, 0.665로 IA모델과의 상관도가 타 조합보다 낮았지만 CA모델보다는 IA모델과 상관성이 있는 것으로 나타났다. Triclosan + Pb, Triclosan + Cd 그리고 Triclosan + Cr의 경우, CA 및 IA에 대해서 각각 0.8599, 0.9251, 0.6834, 0.8044 그리고 0.8758, 0.9569로 CA모델 보다는 IA모델과의 R²값이 높은 것으로 나타났다. 이를 근거로 Triclosan과 각 중금속과의 혼합물은 유사한 독성작용 보다는 독립적인 독성작용을 나타내고 있다고 판단할 수 있다.

3.3. Triclosan과 중금속 공존 시 독성영향 평가

혼합물의 독성영향은 물질간의 상호작용, 대사형태, 생물이용성 등이 상이하기 때문에, 크게 각 물질의 독성의 합보다 혼합물의 독성이 감소하는 길항작용(Antagonistic effect), 각 물질의 독성의 합과 혼합물의 독성이 유사한 상가작용(Addictive effect), 각 물질의 독성의 합보다 혼합물의 독성이 증가하는 상승작용(Synergistic effect)으로 구분된다.³¹⁾

앞서 수행된 상관도분석결과, 혼합물의 독성영향이 혼합물간의 독립적인 독성작용을 가정하는 IA모델에 적합한 것으로 판단되어, IA모델로 예측된 값을 기준으로 실험값의 독성영향을 길항작용, 상가작용, 상승작용으로 평가하였다. 이를 위해 IA모델로 예측된 EC_{50mix}값과 실험값으로부터 산출된 EC_{50mix}값을 비교하였다.

Fig. 4는 Triclosan과 각 중금속의 혼합물의 독성영향을 IA 모델에 근거하여 평가한 것이다. Triclosan + Cu, Triclosan +

Zn, Triclosan + Pb, Triclosan + Hg, Triclosan + Cd, 그리고 Triclosan + Cr을 포함한 모든 경우에서 길항작용이 나타났으며, Triclosan + Cu, Triclosan + Zn, Triclosan + Pb, Triclosan + Hg, Triclosan + Cd, 그리고 Triclosan + Cr의 실험EC_{50mix}가 IA모델로 예측한 EC_{50mix}대비 각각 191%, 226%, 138%, 137%, 209% 그리고 138%로 나타났다. 다시 말해 평가기준인 예측 EC_{50mix}보다 일정수준 높은 농도에서 50%발광저해가 나타나므로 길항작용이 나타난다고 판단할 수 있다. Vettori 등³²⁾의 연구에 의하면 길항작용이 나타나는 근거로 두 물질의 생체 내 binding site가 동일하여 하나의 물질만 선택적으로 반응하여 독성영향을 일으키거나 두 물질 중 하나의 물질이 binding site에 결합하여 반응한 후 해독작용을 야기하여 두 번째 물질에 대한 독성영향을 저감함으로써 야기될 수 있다고 하였다. 이를 근거로 본 연구결과에서는 IA모델과의 상관도가 높게 나타났으므로 Triclosan과 중금속이 독립적인 독성작용을 한다고 가정할 수 있고, 따라서 두 물질 중 하나의 물질이 binding site에 결합하여 반응한 후 해독작용을 야기하여 두 번째 물질에 대한 독성영향이 저감되었다고 추정할 수 있다.

4. 결론

환경에서는 다양한 물질이 공존하므로 혼합독성영향에 대한 연구가 필요하다. 본 연구에서는 PPCPs중 항균제로 사용되는 Triclosan과 중금속이 수체내 공존할 때의 영향을 평가하고자 *V. fischeri*를 이용하여 혼합독성영향을 평가하였다. 그 결과 다음과 같은 결론을 얻었다. 단일물질의 경우 30 min-EC₅₀기준으로 Hg²⁺의 독성이 가장 높았으며 뒤이어 Triclosan > Pb²⁺ > Cu²⁺ > Cr⁶⁺ > Zn²⁺ > Cd²⁺ 순의 독성민감도를 나타냈다. 각 물질의 독성평가결과를 바탕으로 Triclosan과 중금속 혼합물질의 독성작용분석을 위해 IA모델과 CA모델에 대한 상관도분석을 실시한 결과 Triclosan + Cu, Triclosan + Zn, Triclosan + Pb, Triclosan + Hg, Triclosan + Cd, 그리고 Triclosan + Cr의 모든 조합이 CA모델보다는 IA모델과 상관성이 높은 것으로 나타나 Triclosan과 중금속은 서로 독립적인 독성작용을 하는 것으로 나타났다. 이러한 결과를 바탕으로 IA모델로 산출된 예측치를 기준으로 한 혼합독성영향을 평가한 결과, Triclosan + Cu, Triclosan + Zn, Triclosan + Pb, Triclosan + Hg, Triclosan + Cd, 그리고 Triclosan + Cr에 대해서 50%의 발광저해가 나타나는 농도인 실험EC_{50mix}이 IA모델로 예측한 EC_{50mix}대비 각각 191%, 226%, 138%, 137%, 209% 그리고 138%로 나타나 모든 경우에서 길항작용이 나타나는 것으로 확인되었다. 한편 본 연구는 순수한 배지에 오염물질을 제조하여 독성영향을 평가하였으나 실제 수환경에서는 다양한 환경인자들에 의해 독성영향이 달라질 수 있으며 또한 각 생물종별로 독성영향이 상이할 수 있으므로 수생태계 존재하는 다양한 생물 및 실제 환경수를 대상한 후속연구의 확대가 필요하다고 사료된다.

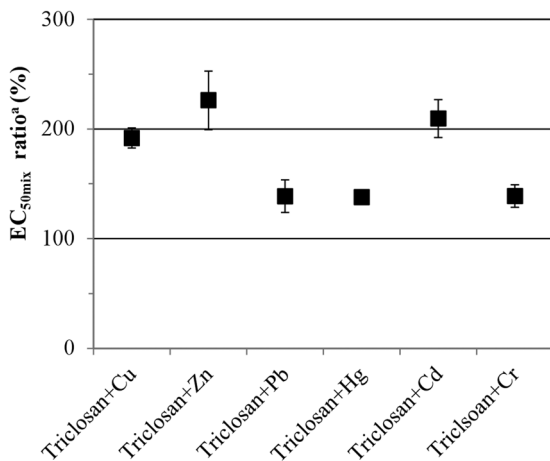


Fig. 4. Evaluation of combined toxic effect to predicted toxicity by IA model. a, EC_{50mix} for experimental value/EC_{50mix} for predicted value by IA model.

Reference

- Zuccato, E., Calamari, D., Natangelo, M. and Fanelli, R., "Presence of therapeutic drugs in the environment," *Lancet*, **355**(9217), 1789~1790(2000).
- Boyd, G. R., Palmeri, J. M., Zhang, S. and Grimm, D. A., "Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and endocrine disrupting chemicals (EDCs) in stormwater canals and Bayou St. John in New Orleans, Louisiana, USA," *Sci. Total Environ.*, **333**(1-3), 137~148(2004).
- Cargouët, M., Perdiz, D., Mouatassim-Souali, A., Tamisier-Karolak, S. and Levi, Y., "Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France)," *Sci. Total Environ.*, **324**(1-3), 55~66(2004).
- Ashton, D., Hilton, M. and Thomas, K. V., "Investigating environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom," *Sci. Total Environ.*, **333**(1-3), 167~184(2004).
- Kim, S. D., Cho, J. W., Kim, I. S., Vanderford, B. J. and Snyder, S. A., "Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters," *Water Res.*, **41**(5), 1013~1021(2007).
- Stasinakis, S. A., Gatidou, G., Mamais, D., Thomaidis, S. N. and Lekkas, D. T., "Occurrence and fate of endocrine disruptors in Greek sewage treatment plants," *Water Res.*, **42**(6-7), 1796~1804(2008).
- Benotti, M. J., Trenholm, R. A., Vanderford, B. J., Standford, B. D. and Snyder, S. A., "Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in U.S. drinking water," *Environ. Sci. Technol.*, **43**, 597~603(2009).
- Farrè, M., Asperger, D., Kantiani, L., González, S., Petrovic, M. and Barceló, D., "Assessment of the acute toxicity of Triclosan and methyl Triclosan in wastewater based on the bioluminescence inhibition of *Vibrio fischeri*," *Anal. Bioanal. Chem.*, **390**, 1999~2007(2008).
- Yoon, Y. M., Ryu, J. N., Oh, J. I., Choi, B. G. and Snyder, S. A., "Occurrence of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals, and personal care products in the Han River (Seoul, South Korea)," *Sci. Total Environ.*, **408**, 636~643(2010).
- Dann, A. B. and Hontela, A., "Triclosan: environmental exposure, toxicity and mechanisms of action," *J. Appl. Toxicol.*, **31**, 285~311(2011).
- Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Thurman, E. M., Zaugg, S. D., Barber, L. B. and Buxton, H. T., "Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: a national reconnaissance," *Environ. Sci. Technol.*, **36**, 1202~1211(2002).
- Kinney, C. A., Furlong, E. T., Kolpin, D. W., Burkhardt, M. R., Steven, D., Zaugg, S. D., Werner, S. L., Bossio, J. P. and Benotti, M. J., "Bioaccumulation of pharmaceuticals and other anthropogenic waste indicators in earthworms from agricultural soil amended with biosolid or swine manure," *Environ. Sci. Technol.*, **42**(6), 8(2008).
- Foran, C. M., Bennett, E. R. and Benson, W. H., "Developmental evaluation of a potential non-steroidal estrogen: Triclosan," *Mar. Environ. Res.*, **50**, 153~156(2000).
- Ishibashi, H., Matsumura, N., Hirano, M., Matsuoka, M., Shiratsuchi, H., Ishibashi, Y., Takao, Y. and Arizono, K., "Effects of Triclosan on the early life stages and reproduction of medaka *Oryzias latipes* and induction of hepatic vitellogenin," *Aquat. Toxicol.*, **67**(2), 167~179(2004).
- Veldhoen, N., Skirrow, R. C., Osachoff, H., Wigmore, H., Clapson, D. J., Gunderson, M. P., van Aggelen, G. and Helbing, C. C., "The bactericidal agent Triclosan modulates thyroid hormone associated gene expression and disrupts post-embryonic anuran development," *Aquat. Toxicol.*, **80**(3) 217~227(2006).
- Crofton, K. M., Paul, K. B., De Vito, M. J. and Hedge, J. M., "Short term in vivo exposure to the water contaminant Triclosan: evidence for disruption of thyroxine," *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **24**(2), 194~197(2007).
- Mezcua, M., Gomez, M. J., Ferrer, I., Aguera, A., Hernandez, M. D. and Fernandez-Alba, A. R., "Evidence of 2,7/2,8-dibenzodichloro-p-dioxin as a photodegradation product of triclosan in water and wastewater samples," *Anal. Chim. Acta.*, **524**, 241~247(2004).
- Gust, K. A., "Joint toxicity of cadmium and phenanthrene in the freshwater amphipod *Hyaella azteca*," *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **50**, 7~13(2006).
- Wang, W., Lampi, M. A., Huang, X., Gerhardt, K., Dixon, D. G. and Greenberg, B. M., "Assessment of Mixture Toxicity of Copper, Cadmium, and Phenanthrenequinone to the Marine Bacterium *Vibrio fischeri*," *Environ. Toxicol.*, **24**, 166~177(2009).
- Viguria, J. R., Irabienb, M. J., Yustab, I., Sotoc, J., Gómezc, J., Rodríguezd, P., Martínez-Madríd, M., Irabien, J. A. and Coz, A., "Physico-chemical and toxicological characterization of the historic estuarine sediments: A multidisciplinary approach," *Environ. Int.*, **10**(1), 41~46(2007).
- KSIIISO, "Water quality-determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (luminescent bacteria test)-part3 : method using freeze-dried bacteria," KSIIISO 11348:3(2009).
- Ren, S. and Frymier, P. D., "Toxicity of metals and organic chemicals evaluated with bioluminescence assays," *Chemosphere*, **58**, 543~550(2005).
- Faust, M., Altenburger, R., Backhaus, T., Blanck, H., Boedeker, W., Gramatica, P., Hamer, V., Scholze, M., Vighi, M. and Grimme, L. H., "Joint algal toxicity of 16 dissimilarly acting chemicals is predictable by the concept of independent action," *Aquat. Toxicol.*, **63**(1), 43~63(2003).
- Lopez-Roldan, R., Kazlauskaitė, L., Ribo, J., Carme Riva, M., Gonzalez, S. and Cortina, J. L., "Evaluation of an automated luminescent bacteria assay for in situ aquatic toxicity determination," *Sci. Total Environ.*, **440**, 307~313(2012).
- Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Pascarella, L. and Parrella, A., "Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms," *Sci. Total Environ.*, **346**(1-3), 87~98(2005).

26. Martin, E. B., Mansfield, L. P., Smith, A. and Forsythe, S. J., "Inhibition of light emission from the bioluminescent bacterium *Vibrio fischeri* after exposure to Triclosan and related hygiene care products," *Luminescence*, **16**, 29~32(2001).
27. Tsiroidis, V., Petala, M., Samaras, P., Hadjispyrou, S., Sakellaropoulos, G. and Kungolos, A., "Interactive toxic effects of heavy metals and humic acids on *Vibrio fischeri*," *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **63**, 158~167(2006).
28. Cho, J. C., Park, K. J., Ihm, H. S., Park J. E., Kim, S. Y., Kang, I., Lee, K. H., Jahng, D., Lee, D. H. and Kim, S. J., "A novel continuous toxicity test system using a luminously modified freshwater bacterium," *Biosens. Bioelectron.*, **20**, 338~344(2004).
29. Guéguena, C., Gilbina, R., Pardosa, M. and Dominika, J., "Water toxicity and metal contamination assessment of a polluted river: the Upper Vistula River (poland)," *Appl. Geochem.*, **19**, 153-162(2004).
30. Son, Y. H, Lee, H. M., Ryu, J. K. and Rhu, H. I., "A study on biotoxicity assessment of toxic materials on *Vibrio fischeri*," *Kor. J. Environ. Toxicol.* **9**(2), 41~50 (1994).
31. Van der geest, H. G., Greve, G. D., Blivin, M. E., Kraak, M. H. S. and van Gestel, C. A. M., "Mixture toxicity of copper and diazinon to larvae of the mayfly judging additivity at different effect levels," *Environ. Toxicol. Chem.*, **19**, 2900~2905(2000).
32. Vettori, M. V., Goldoni, M., Caglieri, A., Poli, D., Folesani, G., Ceccatelli, S. and Mutti, A., "Antagonistic effects of methyl-mercury and PCB153 on PC12 cells after a combined and simultaneous exposure," *Food Chem. Toxicol.*, **44**, 1505~1512(2006).