

한국산 도롱뇽 (*Hynobius leechii*)의 농경지에서의 배 발생 이상과 살균제 Benomyl의 독성효과

최영주 · 윤춘식² · 박주흥¹ · 진정효¹ · 정선우^{1*}

(창원대학교 교육대학원 생물교육학과, ¹자연과학대학 생물학과, ²창원대학교 유전공학연구소)

Developmental Abnormality in Agricultural Region and Toxicity of the Fungicide Benomyl on Korean Salamander, *Hynobius leechii*. Choi Yeoung-Ju, Chun-Sik Yoon², Joo-Hung Park¹, Jung-Hyo Jin¹ and Seon-Woo Cheong^{1*} (Dept. of Biological Education, Graduate School of Education, Changwon National university, Changwon, Kyungnam 641-773, Korea, ¹Dept. of Biology, College of Natural Sciences, Changwon National university, Changwon, Kyungnam 641-773, Korea, ²Institute of Genetic engineering, Changwon National university, Changwon, Kyungnam 641-773, Korea)

A numerical variation and abnormalities were studied on egg bags and embryos of Korean salamander, *Hynobius leechii* from agricultural habitat. The teratogenic and toxic effects of fungicide benomyl were also investigated with early embryos from non-agricultural habitat. We collected 144 egg bags from agricultural region, and 3418 of early embryos were contained. The lengths of egg bags were varied from 10 to 23 cm and the most frequent length was 19 cm. The number of embryos was varied from 7 to 43, and the most frequent range was 22 to 26. Spontaneous abnormalities were occurred in 406 embryos among 116 egg bags, and 24 kinds of external abnormalities were found. Individuals showing severe external defect were histologically studied and they showed optic dyspalsia, thyroid carcinoma, somatic muscular dysplasia, partial biaxial structure, decrease of red blood cells in the heart, cephalic degeneration and intestinal dysplasia. 385 embryos from non-agricultural region were exposed to 200 nM ~ 1 μM of benomyl at blastula or gastrula for 12 days. All embryo were dead in the concentration of 1 μM (LD₁₀₀) and 75% of embryos were dead in 800 nM of benomyl. Specific effect due to benomyl was acrania or cephalic dysplasia and this result suggests that the benomyl inhibit strongly to the development of neural tissue. These abnormal developments may be caused by antimitotic action, inhibition of tubulin complex, destruction of microtubule, inhibitions of neurulation and closing of neural fold, and by the inhibition of the movement of neural crest cells.

Key words : Korean salamander, *Hynobius leechii*, abnormal development, toxicity, fungicide benomyl

서 론

양서류는 농경지나 계류 등에서 서식하는 점과 매년

같은 장소에 산란하는 특이한 습성으로 인해 농약 등의 환경오염 물질에 노출되어 영향을 받기 쉬우므로 환경 지표로서의 역할을 할 수 있고, 환경의 질을 평가하는데 있어 매우 신빙성 있는 생물로 취급되고 있다. 최근 양

* Corresponding author: Tel: 055) 279-7444, Fax: 055) 279-7449, E-mail: swcheong@sarim.changwon.ac.kr

서류는 현저히 감소하고 발생학적 기형이 증가하고 있는 추세이며 (Burkhardt *et al.*, 1998), 양서류의 수적 감소에 대한 원인으로는 서식지 파괴, 외래종의 이입, 남획, 질병, 기후의 변화 그리고 수질저하 등을 들 수 있다 (Boyer and Grue, 1995). 세계의 많은 지역에서 보고되는 이상하고 극적인 양서류의 감소 현상에 대하여 전문가들은 서식지 침범이나 가뭄 등의 분명한 이유가 없는 양서류 수의 감소는 내분비계 장애물질에 의한 것일 가능성이 있다고 믿고 있으며 (Colborn *et al.*, 1997), 내분비계 교란물질로 작용하는 물질에 대한 광범위한 조사가 필요하여 실제로 이루어지고 있다.

내분비계 장애물질은 인간이 만들어 쓰다 버리거나 사용 중인 각종 화학물질, 농약 등이 먹이사슬을 통해 체내에 들어와 마치 진짜 호르몬처럼 작용하여 성장프로그램을 방해하는 물질로서 분자의 크기가 작고 구조가 단순하며 대부분 벤젠고리를 가진 지용성 저분자 화합물로서 세포막을 쉽게 통과하여 내분비계를 교란하게 된다. 현재 세계생태 보전기금의 목록에는 67종의 화학물질이 등재되어 있으며, 일본 후생성에서는 산업용 화학물질, 의약품, 식품첨가물 등 142종의 물질을 내분비계 장애물질로 분류하고 있다. 이 중에는 많은 종류의 농약이 포함되어 있으며 농약의 사용이 자연생태계에 미치는 파급효과는 실제로 엄청나다. 농약에 의해 일어나는 동물기형의 보고는 매우 많다. Carbaryl과 trichlorophan이 분화중인 mouse의 N2a 신경세포의 axon 발생을 억제하고 (Flaskos *et al.*, 1999), carbaryl에 의해서는 장기와 사지기형을 포함한 몇 가지 기형이 유도되는 것으로 보고되어 있다 (Bridges, 2000). Carbamate계 살충제인 ZZ-Aphox는 *Rana perezi* 올챙이에서 아가미, 간, 담낭, 심장, 척색의 구조적 변화를 일으켰고 (Pilar *et al.*, 1993), 골격계의 기형을 유발하였으며 (Alvarez *et al.*, 1995), DDT와 DDE를 스테로이드 호르몬 estradiol 이나 dihydro testosterone과 함께 tiger salamander의 유생에 처리하였을 때 암컷의 생식관 형성에 기형이 발생하는 것으로 나타났다 (Edmund *et al.*, 1998). Cadmium chloride를 *Xenopus* embryo에 처리한 연구에서 처리농도에 의존한 사망률과 다수의 기형, 즉 소화관 회전이상, 눈의 이상, 척색의 구부러짐, 기형의 지느러미, 안면골 형성장애, 심혈관계의 기형, 피부의 포진, 탈색, 성장장애를 가져오며 (Sunderman *et al.*, 1992), 유기인산염 살충제인 malathion에 의해 기형이 유도되고 (Snawder and Chambers, 1993), Ni이온을 배 형성기관에 투여하면 소안구, 탈색, 맥락막과 망막의 헤르니아, 홍채결손 등 눈의 기형적 발생을 일으키는 것으로 나타났다 (Haupt-

man *et al.*, 1993). 또한 Fenitrothion 처리시 몸의 외형변경, 선천성 소두태아, 부종, 심장, 척수액, 척색의 비정상 이 나타나며 낭배형성기에 이러한 현상이 가장 강한 것으로 나타났다 (Elliott-Feeley and Armstrong, 1982). 제초제 diuron을 여러 종류의 양서류에 처리하였을 때는 성장이 축소되며 앞다리 발달이 지연되고 기형이 증가한다는 보고가 있다 (Schuytema and Nebeker, 1998).

본 연구에서는 한국특산종 양서류 중 도롱뇽 (*Hinobius leechii*)에 대한 농약독성실험 및 농경지에서의 도롱뇽 배 이상발생 그리고 배의 다양한 관점에서의 배의 수적변이를 연구하였다. 독성실험에는 농약 중 살균제로 많이 이용되고 있고 내분비계 장애물질로 분류되어 있는 benomyl을 사용하였다. Benomyl의 분자량은 290.3이며 벤젠고리를 가지는 지용성 저분자 화합물로서 분자식은 $C_{14}H_{18}N_4O_3$ 이다. 이는 무색의 결정체로서 녹는 점 이전의 온도에서 분해되며 기화하지 않고 물에 대한 용해도는 $3.6 \mu\text{g/l}$ (실온, pH5)로서 잘 녹지 않으며 강산과 강알칼리에 의해 분해되고, carbendazim과 butyl isocyanate 형태로 분해된다. Benomyl은 미국의 듀폰사에서 개발한 것으로 미환경보호국에 범용성 농약으로 등록된 저독성의 곰팡이 제거제이다. 이러한 사실은 benomyl이 적용대상 작물의 범위가 넓다는 것 뿐 아니라 인체에 독성이 극히 적고 잔류성으로 인한 환경오염 면에서 비교적 안전하다는 것을 뜻한다. 국내에서는 “취급제한 등 규제되고 있는 물질”에 속하는 농약으로 판매되고 있으며 세계적으로 가장 널리 사용되고 있는 살균제이다. Benomyl은 균류의 포자발아와 균사의 성장을 저해하고 (Chiocchio *et al.*, 2000), 배양중인 효모에 RNA, 단백질, 인의 함량을 감소시키는 것으로 나타났으며 (Razmovski and Pejin, 1997), 이 물질의 유사분열 억제작용으로 포유동물의 성장, 발달, 생식에 많은 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 사람에게는 피부와 눈에 민감하게 작용하는데, 무안구증, 소안구증 등의 기형을 유발한다는 보고가 있으며 (Kallen *et al.*, 1996), benomyl에 노출된 작업자들의 조사에서 피부접촉이 일차적인 접촉 원인이 되는 것으로 나타났고 (Hoekstra *et al.*, 1996), 첫 대사물질인 carbendazim은 남성의 생식계에 특히 큰 피해를 주는 것으로 알려져 있는데, 낮은 농도의 투약에서 germ cell의 괴사, 분열중인 세포 괴사, 핵형성의 변질등을 일으키며, 높은 농도로 투약하면 수정관이 폐색되어 고환이 쇠퇴된다 (Hess and Nakai, 2000). 포유동물의 간 세포에 benomyl 단독 처리 시 microtubule의 분해와 글루타티온을 소모시키는 역할을 하고 (Urani *et al.*, 1995), rats의 자궁 탈락막 무게와 자궁단백질 용량에 감소를

가져왔으며 (Spencer *et al.*, 1996), 체중감소와 먹이소비의 감소현상이 쥐에 투여 시 나타났는데, 이는 코의 점막이 아니라 흡입이 원인 루트인 것으로 보고되었다 (Hurt *et al.*, 1993). 또한 정소와 부고환의 중량 감소, 정자생산 감소, 꼬리가 없거나 머리 없는 정자의 수 증가, 세정관 내 다핵의 giant cell 증가가 나타나고 (Linder *et al.*, 1988), sertoli cell이 microtubules의 파괴로 세포내 골격을 잃게 되어 형태를 유지할 수 없는 것으로 보고되었다 (Nakai *et al.*, 1992). 쥐의 정소 내에서 benomyl의 처리에 의해 정세포는 2개의 핵, 거대 핵, 핵의 변형, 정자형성과정의 지연, 핵막 변형, 침체 이상 등이 관찰되었다 (Nakai *et al.*, 1997). 쥐의 림프구에 처리하였을 때는 염색체나 염색분체의 이상을 증가시키는 것으로 보고되었다 (Dolara *et al.*, 1994). 나이에 따른 benomyl의 감수성은 rats의 경우 성적 성숙기로부터 단독처리 시 고환이나 부고환 무게 감소, 부고환 정자 수 감소, 수정관 정자 농도 감소, 고환 손상이 있는 것으로 보고되었으며 (Carter *et al.*, 1984), 세포막에 산화스트레스를 줄 수 있으며 (Banks and Soliman, 1997), 간의 효소인 mALDH 혹은 ALDH₂를 저해하며 (Staub *et al.*, 1998), 수출소관의 폐쇄를 가져오는 고환 기능장애의 원인이 되고 (Hess *et al.*, 1991), 수컷 쥐에게 benomyl 400 mg kg⁻¹ 일⁻¹을 10일간 경구투여 시 정자 수 감소 및 정모세포, 정자의 형성부전이 생기고 (Carter and Laskey, 1982), 203 ppm을 경구투여 시 사정 정자수의 유의미한 감소, 투여의 모든 군에서 상대적인 정소 중량 저하와 수컷의 수정율의 저하 등이 일어났지만, 이들 변화는 투여 뒤 70일까지 회복되었다는 보고가 있다 (Barnes *et al.*, 1983). Benomyl의 암컷 쥐에 대한 영향으로 높은 농도에서 체중과 자궁의 무게, LH를 줄이고 estradiol을 증가시키며 (Cummings *et al.*, 1990), 낮은 농도에서 자궁 내막의 성장을 저해하고, rats의 태아기형이 발생하는 것과 동일한 농도에서 배양중인 신경세포의 분화를 억제한다 (McLean *et al.*, 1998)는 보고가 있다.

농경지는 Benomyl을 포함한 여러 가지 내분비계 장애물질에 의해 지속적으로 영향을 받는 곳이고 거기서 먹이를 취하고 자손을 낳는 도롱뇽은 치명적인 영향을 필연적으로 받는다 하겠다. 따라서 도롱뇽에 대한 피해 실태의 조사가 필요하며 그 결과는 환경오염 물질의 노출에 의한 영향을 잘 반영할 것으로 판단된다. 한국산 도롱뇽의 배 발생이상과 변이에 대한 연구는 정 등 (1999)이 행한 바 있으나, 한국산 도롱뇽에 대한 농약의 독성, 특히 benomyl의 독성연구는 보고된 바 없는 실정이다.

본 연구에서는 도롱뇽의 산란기에 그 알주머니와 배

의 변이 폭을 조사하여 기존의 도롱뇽에 대한 생태학적 자료와 비교함으로써 한국산 도롱뇽의 배에 대한 폭넓은 자료를 제시하였고, 둘째로 농약사용량이 많은 농경지에서 채집한 도롱뇽 배의 초기발생동안 나타나는 이상 발생의 빈도와 패턴을 분석하였으며, 외형적인 결함을 보여주는 개체의 조직학적 이상에 대해서도 연구하였다. 셋째 한국산 도롱뇽에 대한 benomyl 독성 실험을 위해 환경오염 물질의 피해가 적은 곳의 도롱뇽 알주머니를 재료로 benomyl이 도롱뇽의 초기 발생에 미치는 독성효과를 밝혔다.

재료 및 방법

1. 알주머니와 배의 수적변이 조사

도롱뇽의 알주머니는 2000년 3월 20일부터 31일까지 경상남도 의령군 화정면 석천 계곡에서 채집하였으며 채집 장소는 북위 35° 17'00"~35° 17'30"와 동경 128° 12'30"~128° 13'00"사이에 소재하고 있다. 석천계곡 주변에는 경작지가 많고 골이 깊어 심한 건기에도 소량의 물이 흘러 도롱뇽의 좋은 산란장소로 판단되며, 알주머니는 계류가 완만하게 흐르는 곳의 바위에 붙여져 있거나 약간 물이 깊은 곳의 바닥에 몇 개씩 남아놓은 상태였다. 물은 깨끗해 보이나 이 곳은 항공방제를 자주 하고, 농약사용이 빈번한 경작지의 물이 유입되어 도롱뇽의 서식에 악영향이 예상되는 지역이다.

채집된 알주머니는 그 길이와 각 알주머니 속의 배의 수를 측정, 기록한 후 알주머니는 300 ml 1회용 비커에 하나씩 분리하여 넣은 후 20°C에서 2주일 동안 두어 부화단계까지 발생시켰다. 비커 속의 물은 알주머니의 채집지로부터 공급하였으며 물은 3일에 한번 교환하였다. 초기 발생을 마치고 부화한 정상개체들은 원래의 채집 장소에 방류하였다.

2. 배 발생 이상의 외형패턴 분석 및 조직학적 연구

채집 당시의 상태 (포배기 또는 낭배기)에서 유생이 초기발생을 마치고 부화하는 단계까지 이상 발생을 일으킨 개체 및 치사되거나 발생이 중지된 개체를 조사하여 기록하였다. 외형적 이상이 관찰된 개체는 Bouin's solution (picric acid 15 : formalin 5 : acetic acid 1)에 하루 고정된 후 70% 에탄올에 넣은 상태로 외부 형태 이상 패턴을 해부 현미경 하에서 조사하여 분류하였다. 외형적 이상발생을 조직학적으로 연구하기 위하여 이들을

70~99.5% 에탄올 탈수 및 xylene 처리 후 paraffin에 embedding 하고, 8 μ m 두께의 절편을 제작하였으며, hematoxylin-eosin으로 염색하여 광학현미경하에서 관찰하였다.

3. Benomyl의 독성에 의한 배 발생이상 조사

Benomyl독성실험에 필요한 알집의 채집은 2001년 3월 24일 창원시 사립동에 소재한 정병산의 계류에서 하였으며, 채집 장소는 북위 35° 14'30"~35° 15'00"와 동경 128° 42'00"~128° 42'30"사이이다. 정병산의 계류는 주변에 경작지가 많지 않으며 경작지는 주말농장으로 활용되는 곳이 많아 농약의 사용량이 많지 않은 곳이므로, 물이 깨끗해 보이지는 않으나 농약의 피해는 적은 곳으로 판단되는 지역이다. 채집된 알주머니 중에서 배의 수가 많고 상태가 좋은 것을 골라 알의 수를 기록한 후 플라스틱 비커 속에 알집을 하나씩 담아 실험하였다.

Benomyl독성에 의한 발생이상 및 치사농도를 조사하기 위해 후기포배 또는 초기 낭배기의 배가 들어있는 알주머니를 1 pM, 10 pM, 100 pM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μ M 그리고 10 μ M의 benomyl에 각각 12일간 처리하여 대조구와 비교 관찰하였다. 또한 배의 치사율 50%에 해당하는 농도인 LD₅₀을 파악하기 위하여 benomyl 200 nM, 400 nM, 600 nM, 800 nM 그리고 1 μ M의 농도에서 별도로 실험하였다. 사용된 benomyl은 미국의 듀폰사에서 합성하여 한국의 한농화학에 공급한 것을 본 연구의 실험용으로 제공받았다. Benomyl은 99.5% ethanol에 용해시킨 후 물에 희석하여 사용하였다. 실험 용액은 250 ml를 각각 처리하였고 3일에 한번씩 새 용액으로 교환하였다. 처리구에서 나타나는 발생이상 개체의 외형적 및 조직학적 분석은 앞의 2. 배 발생 이상의 외형패턴 분석 및 조직학적 연구의 방법과 동일하게 하였다.

결 과

1. 알주머니와 배의 수적변이

전체 조사 대상 알주머니의 수는 144개였고, 알주머니의 길이는 10~23 cm의 범위였으며 그 중 상대빈도가 가장 높은 알주머니의 길이는 19 cm로 24개에 달하였다. 최저길이인 10, 11 cm와 최고길이인 21, 22, 23 cm는 각각 4개 이하로 알주머니의 길이는 89%가 12~20 cm의 범위에 포함되었다(Table 1). 배의 수는 알주머니 당 7~43개로 그 변이 폭이 매우 컸으며 상대빈도가 가장

Table 1. Numerical variation of length for each egg bag in *Hynobius leechii* (n = 144, SD: 2.95).

Length (cm)	Frequency	Relative frequency	Cumulative frequency
10	1	0.007	1
11	4	0.028	5
12	15	0.104	20
13	10	0.069	30
14	16	0.111	46
15	17	0.118	63
16	16	0.111	79
17	17	0.118	96
18	8	0.056	104
19	24	0.167	128
20	8	0.056	136
21	2	0.014	138
22	2	0.014	140
23	4	0.028	144

Table 2. Numerical variation of embryo number for each egg bag in *Hynobius leechii* (n = 144, SD: 7.05).

Number of embryo	Frequency	Relative frequency	Cumulative frequency
7~11	3	0.021	3
12~16	23	0.160	26
17~21	29	0.201	55
22~26	43	0.299	98
27~31	24	0.167	122
32~36	18	0.125	140
37~41	3	0.021	143
42~46	1	0.007	144

높은 개수는 22~26개로 43개의 알주머니에서 이와 같은 배의 수를 보여 주었다. 최저수치인 7~11개 사이는 3개의 알주머니, 최고수치인 37~43개 사이는 4개의 알주머니에 불과했다. 따라서 전체 알주머니 중 95% 이상에서 12~36개의 배가 들어 있었다(Table 2). 전체 알주머니 144개에 대한 전체 배의 수는 3418개였으며 알주머니의 평균 길이는 16 cm 알주머니 당 평균 배의 수는 24개였다. 정상발생한 배는 3012개였고 하나의 알주머니에서 모든 배가 정상적으로 발생하는 알주머니는 28개에 불과하였다. 반면 죽거나 이상발생을 일으킨 알주머니는 116개였고 죽거나 발생정지한 배는 156개, 비정상 발생한 배는 251개였다(Table 3).

2. 농경지에서 채집된 배의 발생이상

1) 외형적 이상

알주머니 내에서 또는 부화 직후에 나타나는 외형적

Table 3. A condition of surveyed egg bags and embryos of Korean salamander, *Hyonbius leechii*. TN: total number of egg bag, TE: total number of embryo, HN/LN: the highest number of embryo per egg bag/the lowest number, L/S: the longest egg bag/the shortest egg bag (cm), EL: average length of egg bag (cm), LS: standard deviation of egg bag length (cm), EN: average number of embryo for each egg bag, NS: standard deviation of embryo number for each egg bag, NE: total number of normal embryo, AD: number of all developed egg bag, DA: number of egg bag including dead or abnormal embryo, DE: number of dead or arrest embryo, AE: number of abnormal embryo.

TN	TE	HN/LN	L/S	EL	LS	EN	NS	NE	AD	DA	DE	AE
144	3418	43/7	23/10	16	2.95	24	7.05	3012	28	116	156	251

발생이상은 251개체에서 나타났으며 이상패턴 별로 개체를 선별한 결과 37개체가 선택되었다. 이들 개체로부터 이상발생의 양상은 24종류로 요약되었다 (Table 4). 이는 발생초기에 치사된 배를 제외한 것이며 발생이상의 종류와 상태를 열거하면 다음과 같다. 부화된 정상개체는 아가미가 잘 분화되어 있고, 눈의 맥락막과 피부색소는 짙으며 꼬리는 곧고 배는 매끈하여 부풀어 있지 않다 (Fig. 1, Plate 1). 반면, 꼬리가 휘어지는 것 (tail bent)은 복부가 끝나는 곳에서 일어나며 휘는 방향은 복부 쪽, 등 쪽과 옆 등이다 (Fig. 1, Plate 2). 머리의 발육이 부진 (cephalic dysplasia)하거나 (Fig. 1, Plate 3) 심지어 머리가 전혀 발달하지 않는 무두증 (acrania) 개체도 있었다. 눈의 색소상피는 진하게 발달하는 것이 정상이나 색소형성부진 (hypo-pigmentation of eye)을 보이는 개체가 있었으며 눈의 발육이 부진하여 수정체가 확인되지 않거나 한쪽 또는 양쪽 모두에 눈이 발달하지 않는 개체도 관찰되었다 (Plate 1-4). 머리끝에 돌기가 형성되는 경우도 있었으며 (Fig. 1, Plate 5), 하나의 몸통에 두 개의 머리가 발생 중인 개체 (siamese twins)도 나타났는데 눈은 3개만 가지고 있었다 (Fig. 1, Plate 6). 복부 팽만은 복부가 비정상적으로 부풀어 난황으로 찬 내배엽부가 팽대된 경우이며 (Fig. 1, Plate 7), 탈장 (hernia)은 내장이 복벽을 뚫고 나와 외부로 노출된 경우이다 (Fig. 1, Plate 9). 몸통의 축이 옆으로 휘어지거나, 아치형 (Fig. 1, Plate 11)과 U자형을 보이는 개체가 있었으며 목 부위에서 옆으로 휘어진 개체도 있었다. 이상발달 개체 중에는 죽지는 않고 있으나 발달이 중지된 것도 있었다 (Fig. 1, Plates 8 & 9). 그 외에도 미부형성부진 (caudal dysplasia)은 동일한 발생단계의 정상개체보다 꼬리의 형성이 잘 되지 않는 경우이며, 지느러미 발육부진은 등과 배쪽의 지느러미가 넓게 발달하지 않은 것을 의미한다. 외새형성부진은 정상개체의 아가미보다 분지가 약하거나 거의 발생하지 않는 경우이며 배의 수포 (ventral blister)는 복부 내에 생긴 수포가 밖으로 비쳐 보이는 것이다. 이러한 수포가 머리와 가슴에 발생하는 개체도 있었다. 코의 발달이 불완전하거나 없는 개체도 관찰되

었다. 기형을 나타낸 251개체에서 보이는 여러 가지 발생이상 중 비교적 빈발하는 이상은 미부 형성부진, 지느러미 발육부진, 꼬리가 휘어지는 것, 외새 형성부진, 복부 수포, 눈의 색소형성 부진 등이며 가장 빈발하는 이상은 외새 형성부진으로 92개체에서 나타났고 전체적으로 이상이 가장 많이 나타나는 부위는 꼬리부위로 반 이상의 개체에서 꼬리와 관련된 이상이 나타났다. 또한 발생이상을 보이는 개체들은 Table 4처럼 하나의 개체에서 많게는 7종류의 발생이상이 나타났다.

2) 조직학적 이상

외형적 발생이상이 있는 개체 중에서 심한 기형을 나타내는 개체를 선별하여 체내 조직학적 이상을 관찰하였다. 정상적으로 부화된 개체는 눈과 이포가 보이는 준위에서 중단면을 보았을 때 눈의 색소상피와 망막층이 잘 분화되었고 뇌의 신경세포층과 신경교 부분이 뚜렷하게 분리되어 염색되어 있다. 복부에는 심장과 간이 잘 분화되어 있었다 (Fig. 2, Plate 1). 이의 횡단면을 보면 장 발달된 외새 (external gill)와 척색, 그리고 조밀한 중배엽성 체절 (somite), 그리고 등쪽의 신경관이 관찰되었다 (Fig. 2, Plate 2). 반면 이상개체는 Fig. 1, Plate 5의 개체의 경우, 눈의 발달이 미약하여 망막층과 수정체의 분화가 없고 중추신경계를 비롯한 체내의 기관분화가 거의 없으며 대신 갑상선 종 (thyroid carcinoma)으로 가득 차 있었다 (Fig. 2, Plate 3). Fig. 1, Plate 7의 개체는 외형적 이상에서 발견하지 못한 눈의 헤르니아, 즉 수정체방이 없이 수정체가 망막과 접해있어 수정체가 밖으로 불거지는 현상을 보였으며 수정체 자체도 발달이 미약했다 (Fig. 2, Plate 4). Fig. 1, Plate 10의 개체는 전체적으로 세포에 난황이 그대로 남아있어 발달이 미약하다는 것을 알 수 있으며 뇌와 신경관의 발달도 초기의 형태를 보이고 있었다. 또한 중배엽성 간엽조직의 발달은 거의 볼 수 없었다 (Fig. 2, Plate 5). Fig. 1, Plate 2의 개체는 외형적으로 눈의 색소형성부진을 보이며 아가미의 발달이 미약하고 꼬리가 아래쪽으로 심하게 굽어져 보이는 데, 정상 배의 눈이 보이는 준위와 같은 위치에서 보았

Table 5. Dose dependent survival rates (%) when embryos were exposed to 200 nM ~ 1 µM of benomyl at blastula or early gastrula for 12 days. Lethal density was 1 µM of benomyl, and 75% of embryos were dead at 800 nM of benomyl.

Benomyl (M)	Case	Day					
		2	4	6	8	10	12
control	46	100	100	100	100	100	100
200 nM	46	93	93	93	93	93	93
400 nM	65	92	92	92	92	92	92
600 nM	46	97	74	74	74	65	65
800 nM	56	40	40	40	25	25	25
1 µM	59	0	0	0	0	0	0

8). Fig. 1, Plate 4의 개체는 심장의 발달이 비정상적이고 심장내의 적혈구가 아주 적게 나타났으며 체절은 느슨하게 배열되어 있었다 (Fig. 2, Plate 9).

3. Benomyl 독성에 의한 배 발생이상

1) 외형적 이상

농약사용량이 매우 적은 지역에서 채집한 도롱뇽의 배 중 포배 또는 낭배 초기단계에 있는 배에 benomyl을 처리한 결과 다양한 배 발생이상과 농도별 생존율을 파악하였다. 대조구에서는 모든 배가 정상적으로 발생하였으나 200 nM ~ 1 µM의 benomyl을 처리하였을 때, 200 nM에서는 93%가 생존하였으며, 400 nM에서는 92%, 600 nM에서는 65%, 800 nM에서는 25%, 1 µM에서는 모든 배가 치사하였다 (Table 5). 따라서 포배 또는 낭배 초기 단계에 있는 도롱뇽 배의 benomyl에 대한 전체치사농도(LD₁₀₀)는 1 µM 이내임을 알 수 있었으며 이 시기 도롱뇽 배의 LD₅₀는 600 ~ 800 nM 사이에 있는 것으로 나타났다. 도롱뇽의 초기 발생에 대한 benomyl의 독성효과는 전체배가 치사되는 1 µM 이상에서는 발생이 전혀 진행되지 않는 것이며 100 nM 이하에서는 배의 발생 속도가 느려지고 복부에 수포가 발생하는 개체가 많아지며 부화 직전까지 별다른 이상이 없어 보이는 개체라 하더라도 발달이 부진하여 땅땅한 체형으로 부화되는 것으로 나타났다. 8개의 알주머니 385개의 배에 1 pM ~ 10 µM의 benomyl을 처리하였을 때 치사되거나 발생이 정지된 개체 (Fig. 1, Plate 13)를 제외한 외형적 발생이상 개체는 총 69 개체였으며 (Table 6), 이들에서 나타난 발생이상은 외새 (external gill)와 미부형성부전 (Fig. 1, Plate 15), 두부형성부전 (Fig. 1, Plate 12), 무두증, 복부수포형성 (Fig. 1, Plate 16), 가슴수포형성 (Fig. 1, Plate 14), 옆으로 휜 꼬리 (Fig. 1, Plate 18), 삼각형의 몸통 (Fig. 1, Plate 17), 땅땅한 체형 등 9종류로 나타났다. 열거한 발생 이상 중 비교적 높은 빈도로 나타나는 것

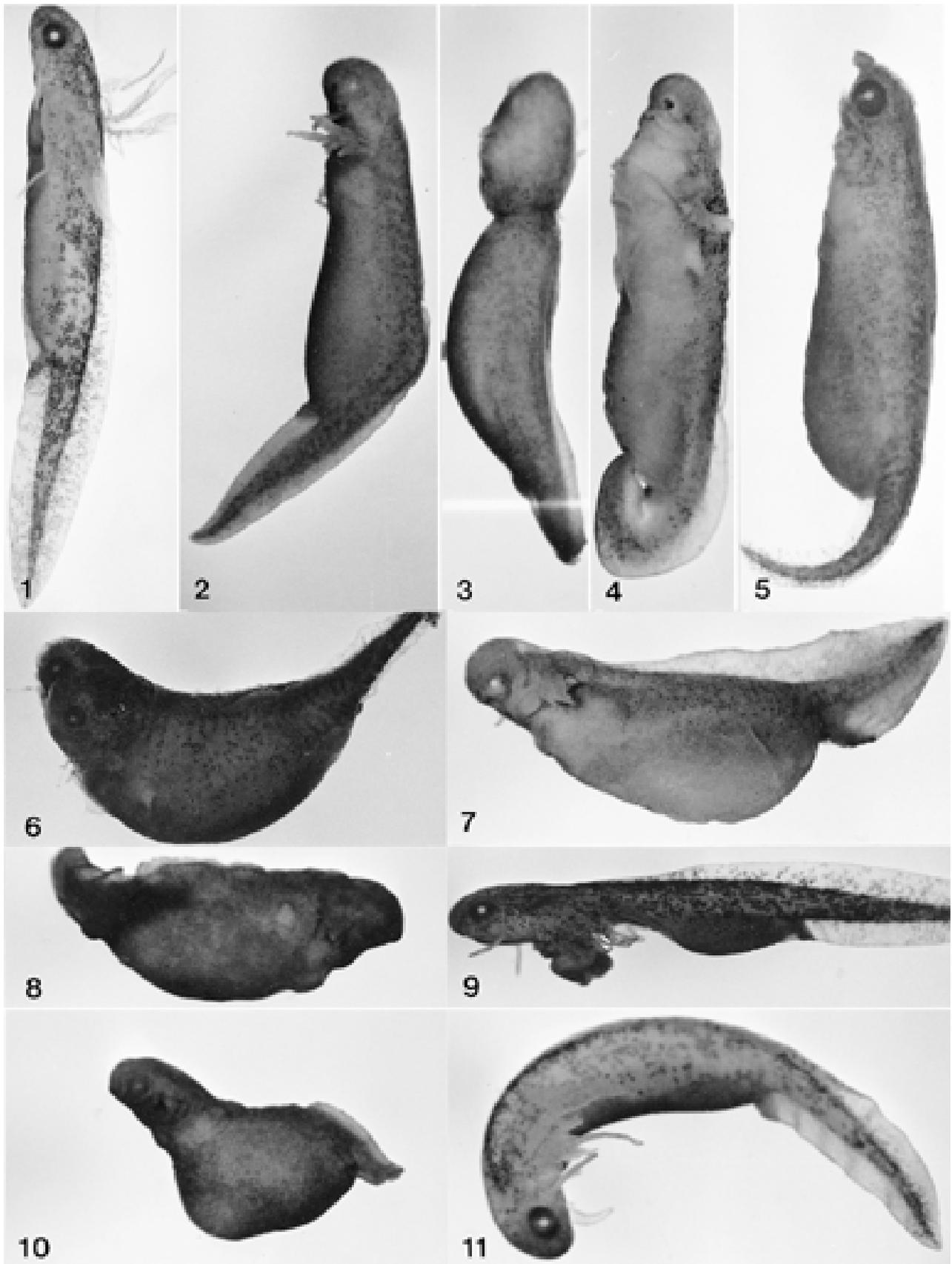
Table 6. The pattern of abnormal embryos exposed to 1 pM ~ 10 µM of benomyl. Total number of tested embryos was 385, the number of abnormal embryos were 69, and dead or arrest embryos were 119. Many abnormal individuals have two or more deflection in their body, as seen in table 4, and the sum of abnormal embryos is not same to 69.

No	Abnormal condition	Number of abnormal embryo	Rates (%)
1	Ventral blister	26	37.68
2	Thick-set body	25	36.23
3	Caudal dysplasia	19	27.54
4	Acrania	14	20.29
5	Branchial dysplasia	6	8.70
6	Pectoral blister	5	7.25
7	Tail bent laterally	3	4.35
8	Triangle trunk	3	4.35
9	Cephalic dysplasia	3	4.35

은 복부수포형성 (ventral blister), 땅땅한 체형 (thick-set body), 미부형성부전 (caudal dysplasia), 무두증 (acrania) 등이며 가장 높은 빈도로 나타나는 이상은 복부수포형성이었다 (Table 6).

2) 조직학적 이상

초기발생 시 100 nM 이하의 benomyl 처리를 한 개체들의 조직학적 이상을 관찰하였다. 100 nM에서는 체절의 비정상 발달과 복부수포가 관찰되었으며 망막 층과 렌즈가 분화되지 않았고, 장의 분화가 관찰되지 않는 것으로 나타났다. 1 nM에서는 심장의 준위에서 관찰하였을 때 심장발달은 혼적적이며 척색은 비정상적이고, 많은 다른 기관들이 미발달 상태이며 장의 부위에서 갑상선종이 관찰되었다. 특히 척수 등 중추신경계의 발달이 치명적으로 저해되었다 (Fig. 2, Plate 10). 1 nM에서는 눈의 준위에서 관찰했을 때 머리에 전체적으로 갑상선종으로 차 있었으며 신경계가 치명적으로 영향을 받아 눈



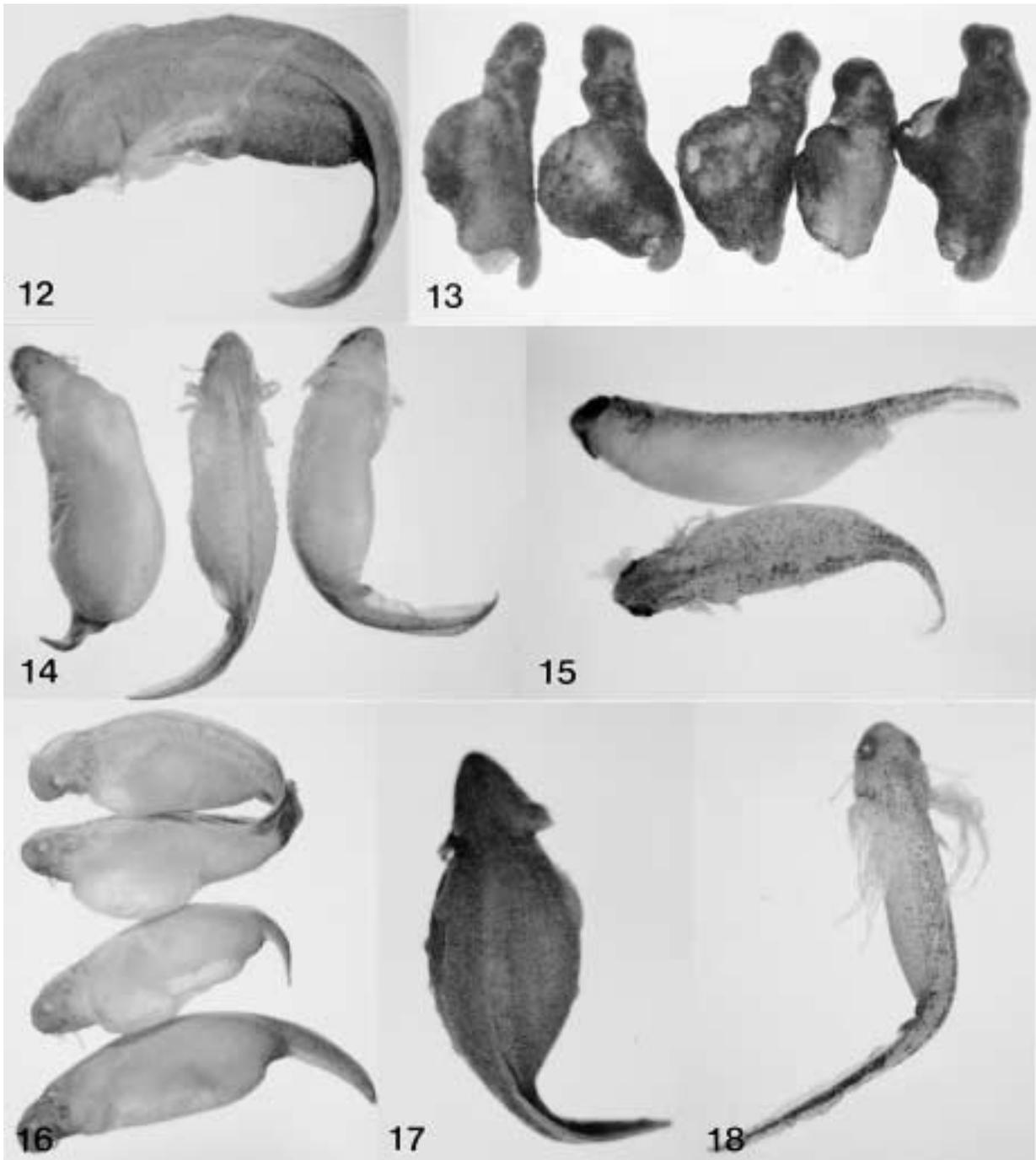
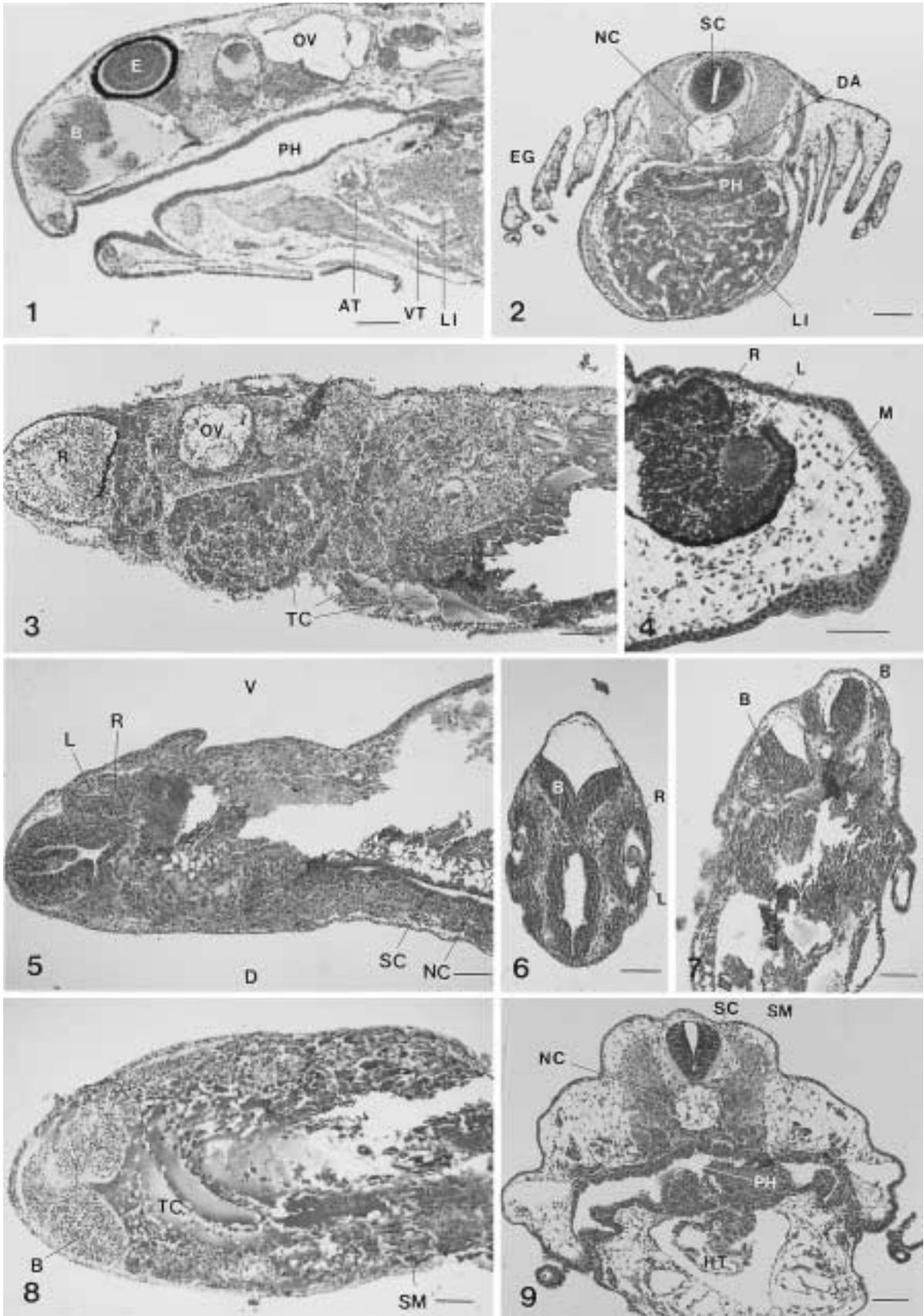


Fig. 1. Various abnormal condition in tadpoles of *Hynobius leechii* collected from the agricultural region of Uiryeong (plates 1–11) and the malformation due to 1 pM~10 μ M of benomyl (plates 12–18). The abnormal tadpoles from agricultural region shows malformations that described in table 4, and plates from the experiment of benomyl toxicity shows abdominal swelling, caudal dysplasia, tail bent, and developmental arrest. Plate 1: Newly hatched normal tadpole, Plate 2: tail bent ventrally, Plate 3: cephalic dysplasia, Plate 4: hypo-pigmentation of eye and coiled tail, Plate 5: head with process and caudal dysplasia, Plate 6: two headed siamese twins, Plate 7: abdomen swelled abnormally, Plate 8: developmental arrest and blisters, Plate 9: intestinal hernia Plate 10: developmental arrest and blister, Plate 11: arched back, Plate 12: cephalic dysplasia and bent tail Plate 13: developmental arrest and failure of closing yolk plug, Plate 14: pectoral blister, Plate 15: branchial and caudal dysplasia, Plate 16: ventral blister, Plate 17: triangle head and trunk, Plate 18: lateral bent of tail.



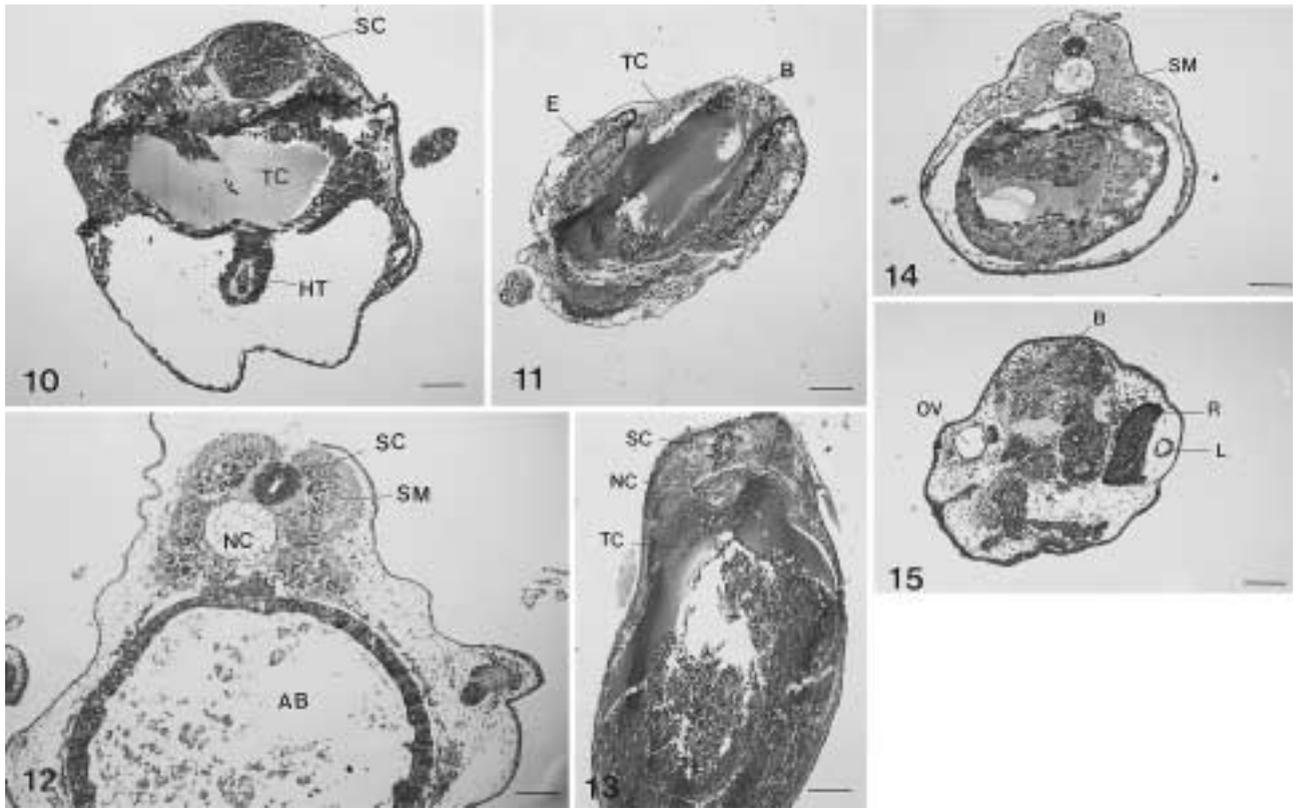


Fig. 2. Histology of normal and abnormal tadpoles of *Hynobius leechii* collected from the agricultural region of Uiryeong (plates 1-9), and they showed retinal hypopigmentation, thyroid carcinoma, somatic muscular dysplasia, partially biaxial structure, degeneration of cephalic neuron and various organ dysplasia. The histological abnormality was also seen in the tadpoles exposed to 1 pM~10 μ M of benomyl (plates 10-15). They showed various organ dysplasia including central nerve system. Paraffin section and H-E stain. E: eye, OV: otic vesicle, PH: pharynx, AT: atrium, VT: ventricle, LI: liver, B: brain, NC: notochord, EG: external gill, DA: dorsal aorta, SC: spinal cord, SM: somatic muscle, R: retina, TC: thyroid carcinoma, L: lens, M: mesenchyme, HT: heart, V: ventral D: dorsal, E: eye, Bar: 200 μ m. Plate 1: Longitudinal sectioned normal tadpole at the lateral part of head. Plate 2: Cross section of newly hatched normal tadpole at the level of pharynx and liver. Hepatic cords of liver and somatic muscle are well developed. Plate 3: Longitudinal sectioned abnormal individual of fig. 1, plate 5 at the level of eye shows thyroid carcinoma and degeneration of central nerve system. Plate 4: Longitudinal sectioned abnormal individual of fig. 1, plate 7 at the level of eye shows lens hernia. Plate 5: Longitudinal sectioned abnormal individual of fig. 1, plate 10 at the level of eye and brain shows cephalic dysplasia. Plate 6: Cross sectioned abnormal individual of fig. 1, plate 2 at the level of eye and brain shows abnormal head pressed laterally and abnormal position of eye under hind brain. Plate 7: Cross sectioned abnormal individual of fig. 1, plate 8 at the level of hind-brain shows partial bi-axes. Plate 8: Longitudinal sectioned abnormal individual of fig. 1, plate 3 at the region of head shows cephalic dysplasia and thyroid carcinoma. Plate 9: Cross sectioned abnormal individual of fig. 1, plate 4 at the level of heart shows the reduction of red blood cell and somatic dysplasia. Plate 10: Histological abnormality of tadpole exposed to 10 nM of benomyl. Individuals were cross sectioned at the heart level showing neuronal dysplasia and thyroid carcinoma. Plate 11: Cross sectioned abnormal individual exposed to 1 nM of benomyl at the level of eye shows neuronal dysplasia and thyroid carcinoma. Plate 12 & 13: Cross sectioned abnormal individual exposed to 1 nM of benomyl at the level of intestine shows twisted body, intestinal dysplasia, neuronal dysplasia and thyroid carcinoma. Plate 14: Cross sectioned abnormal individual exposed to 1 pM of benomyl at the level of intestine shows intestinal dysplasia. Plate 15: Cross sectioned abnormal individual exposed to 1 pM of benomyl at the level of eye shows neuronal dysplasia.

과 뇌의 발달이 거의 없었다(Fig. 2, Plate 11). 장의 준 위에서는 소화기관의 발달이 거의 없으며 체질은 느슨

하게 배열되고(Fig. 2, Plate 12), 어떤 개체에서는 복부에 감상선 증으로 가득 찬 것이 관찰되었다(Fig. 2, Plate

13). 1 pM에서는 장과 이포(otic vesicle)의 준위에서 관찰하였을 때, 비교적 적은 영향을 받은 것으로 나타났으나 신경과 장의 발달은 매우 강한 영향을 받은 것으로 보였다(Fig. 1, Plate 14 & 15). 즉, 10 pM이상의 고농도 benomyl 처리 시 도롱뇽은 신경계에 극단적인 발달저해가 뚜렷이 나타나고 소화계의 발달부진 및 갑상선 종양이 빈발하였고 1 pM~1 nM의 낮은 농도에서도 뇌와 눈을 비롯한 신경계의 발달저해가 뚜렷하며 소화계의 발달저해 및 갑상선 종양이 빈발하였다. 반면 체절과 척색, 그리고 이포의 발달은 다른 기관의 발달에 비해 benomyl에 대하여 영향을 약하게 받는다는 것을 알 수 있었다.

고 찰

한국산 도롱뇽(*Hynobius leechii*)의 알주머니 크기와 배의 수에 대한 기록은 1975년 한국동식물 도감(강과윤, 1975), '87 자연생태계 전국조사(환경청, 1987) 등에 구체적으로 나타나 있다. 동식물도감에는 알주머니 길이가 12~14 cm, 배의 수는 1개의 알주머니에 보통 30~75개이며 한 마리가 산란하는 배의 수는 57~125개라고 서술되어 있다. 그리고 '87 자연생태계 전국조사에서는 알주머니의 길이가 12~14 cm 라고 되어있다. 1999년의 정 등의 조사에서는 73%의 알주머니가 16~21 cm의 길이 범위에 포함되며 배의 수는 19~98개라고 하였다. 이들과 비교했을 때 본 연구에서는 91%의 알주머니 12~20 cm의 길이 범위에 포함되었으며 배의 수는 7~43개로 측정되었다. 알주머니의 길이는 참고문헌의 기록들과 큰 차이를 보이지 않았으나 배의 수에 있어서는 그 범위가 아주 낮게 나타났다. 이러한 차이는 단순히 지리적 또는 개체에 따른 것인지 아니면 환경문제에 기인하는 것인지는 충분한 조사가 이루어질 때 밝혀질 수 있으리라 본다. 한편, 배의 색깔에 대해 본 연구의 채집 과정에서 파악된 바로는 산란장소의 밝기에 의존하여 배의 전체적인 색깔이 달라지는 것으로 나타났다. 즉, 주변이 어두울수록 배는 짙은 색을 띠고 있었다. 또한 '87 자연생태 전국조사에서는 산란시기가 4월 3일 경이라 하였으며, 동식물 도감에서는 산란된 배가 부화되기까지는 3~4주가 필요하다고 하였다. 그러나 본 연구에서는 경남 의령지방에서의 산란시기가 3월 20일 경으로 보이며 산란된 배가 부화되기까지는 2~3주 정도가 소요되는 것으로 나타났다. 이러한 현상은 본 연구 외에도 경남지역의 다양한 곳으로부터의 조사에 의해 나타났으며 결국 그 해 초봄의 기온이 높으면 산란기가 앞당겨지고

부화기간도 단축되었다.

도롱뇽의 배가 발생 도중 많은 자연적인 이상을 일으킨 것에 대해서는 여러 가지 요인이 있을 수 있으나 알주머니의 채집지가 농경지인 만큼 농약의 악 영향을 배제할 수 없다. 농경지에서 조사된 많은 발생이상 개체 중에는 서론에서 언급된, 다양한 농약성분으로 독성실험을 한 다른 실험결과들과 그 이상패턴이 일치하는 것이 많은 것으로 보아 토양에 있던 잔류 농약이 계류 등지로 침투되어 배에 영향을 주었을 것으로 생각된다. 이와 같이 주변 환경으로부터 유입되는 여러 가지 유해성분은 양서류 발생에 나쁜 영향을 주며 신체적 결함을 일으켜 이들을 도태시키고 그 수가 줄어들게 하는 원인이 될 것이다. 실제로 발생초기는 단계별로 유해물질에 대한 감수성이 다르기 때문에 낮은 농도에서 일시적인 노출만으로도 장기적이고도 심각한 효과가 나타날 수 있으며 작은 변화가 개체군의 쇠퇴나 지역적 멸종을 가져올 수 있다. 또 다른 요인으로는 난 자체의 선천적 결함을 들 수 있는데, 이는 모체로부터 물려받았거나 여러 세대에 걸친 유전적 결함에 의한 것이라고 할 수 있다. 이것 또한 환경요인을 배제할 수 없는 것으로, 도롱뇽의 모체가 먹이연쇄를 통해 체내에 축적되었거나 피부를 통해 침투된 농약 성분에 의해 이미 결함을 가지고 있는 난을 산란하였기 때문일 것이다. 본 연구 중 농경지로부터 채집한 배에서 나타난 발생 이상 중 중추신경계의 발달이상이 많았는데, 이러한 경우는 신경배의 형성 지연과 신경습의 폐쇄가 방해를 받아서 일어나는 것으로 보이며(Kratke and Kirschbaum, 1996), 몸이 옆으로 또는 위 아래로 휘어져 나타나는 이상은 적도의 위쪽과 동물극 사이의 할구가 결함이 있었기 때문에 나타나는 것(Kageura, 1995)으로 생각된다. 또한, 갑상선 종양을 나타내는 이상 개체도 많이 관찰되었는데 이것에 관련된 요인에 관해서는 정확히 알 수 없으나 갑상선 종도 암화 한 조직이고 이러한 암화는 여러 가지 발암물질과 내분비장애물질에 의해 일어날 수 있으므로 농약과 무관하다고 할 수 없다.

농약사용량이 적은 것으로 생각되는 지역에서 채집된 도롱뇽의 배에 대한 조사는 정 등(1999)에 의해 조사된 바 있으며 정상적으로 배 발생을 완료한 빈도가 본 연구의 결과와 비교했을 때 높은 것으로 나타났으나 그것 역시 많은 배에서 이상발생이 나타나 국내 농경지에서의 도롱뇽의 종 영속성은 크게 위협받고 있는 실정이다. 이러한 지역에서 채집된 배에 benomyl을 처리하여 나타나는 이상은 농경지에서 채집된 도롱뇽 배의 발생 이상 패턴보다는 단순하였으나 치사현상과 이상발생의

빈도는 훨씬 높게 나타났다. Benomyl 처리에서 나타나는 특징적 이상은 몸의 길이가 짧아지는 것과 두부발달 저해 등이다. 이는 benomyl이 도롱뇽의 발생과정에서 신경계의 발달을 크게 저해한다는 것을 보여주는 것이다. 이러한 현상은 의령군의 농경지에서 채집해온 배의 발생이상에서도 나타나는 것으로서 이는 benomyl 같은 살균제에 의한 영향일 가능성을 강하게 시사해 준다. 이러한 심한 기형은 benomyl이 가지는 세포분열저해작용과 tubulin 중합을 저해하는 작용 (Spencer *et al.*, 1996)이 성장 및 변태에 악영향을 끼쳐 나타나는 것으로 볼 수 있다. 또한, 신경관이 형성될 때 그 위쪽에 나타나는 신경체세포 (neural crest cell)들은 배의 등 쪽으로 이동하여 말초신경계, 내분비계, 색소세포, 얼굴의 연골과 경골, 결합조직 등을 발생시키는데, benomyl이 이들의 이동을 방해하여 비정상 발생이 나타나도록 하는 것으로 알려져 있으며 그 결과 초기발생에 치명적 영향을 주었을 것이다. 그 외, 이들의 작용으로 나타나는 생식소의 많은 변화는 생식계 자체보다는 호르몬계의 피드백 신호의 변화와 중추신경계에 대한 이 화합물의 직접적인 효과와 관련이 있다는 보고가 있으며 (Jerome *et al.*, 1989), 물의 재흡수조절을 파괴하여 내강 용액의 점도를 바꾸고 세포골격요소를 파괴하는 작용으로 benomyl이 기형을 유도한다는 보고도 있다 (Hess and Nakai, 2000). 이와 같이 지금까지 밝혀진 benomyl의 세포 내에서의 영향과 기작을 고려하였을 때 도롱뇽에 대한 benomyl 처리 실험에서 나타나는 발생이상은 대부분 이와 관련된 것으로 생각된다.

Benomyl의 실제 사용권장량이 야생 양서류에게 얼마나 안전한지는 현재 알려진 바 없으며 본 연구의 결과와 비교하여 고려해 볼 만하다. Benomyl은 농업용 살균제로 사용 시 3.5~7mM의 농도로 사용이 권장되고 있으며 이는 도롱뇽 배의 LD₁₀₀이 1µM 이내 임을 감안하였을 때, 알주머니가 놓여진 환경의 물의 양에 의존하겠지만 그 물의 양이 많아 배가 죽지 않는다 해도 1pM 정도의 희석에도 기형이 발생하는 것으로 보아 현재의 농약사용 추세라면 장차 한국산 도롱뇽의 도태 및 수적감소는 심각한 상태에 이를 것이 분명하다. 한편, 본 연구에서 조사된 도롱뇽의 서식지인 농경지에서 빈번하게 사용된 농약의 종류를 알아보기 위하여 의령여고 학생들을 통하여 각 농가에서 사용된 농약의 종류를 설문조사해 본 결과 benomyl 제제도 사용되었으나 사용된 농약의 종류가 다양하여 도롱뇽 이상발생의 패턴과 연관시켜 고려하였을 때 그들 농약의 해가 복합적으로 나타난 결과라고 생각된다.

도롱뇽은 특정한 실험동물로 이용되어온 model 동물이 아니라 야생동물이므로 이들을 이용하여 독성실험 등을 하는 데는 여러 가지 어려움이 뒤따른다. 어느 농도 범위에서 치사가 일어날지 또는 기형발생이 될지 예측할 수 없고, 도롱뇽은 1년에 한번 단기간만 산란하므로 일단 알주머니를 채집하면 매우 광범위한 농도범위로 처리하여야 하며 구체적인 치사 농도범위의 결정을 위해서는 여러 차례 반복실험을 하여야 하나 적기에 다수의, 그것도 포배기부터 초기 낭배기의 알주머니를 선별하여 실험하는 일은 본 연구에서 매우 까다로운 절차 중의 하나이다. 따라서 본 연구에서 얻어진 독성실험 결과는 다년간에 걸친 실험을 하여 보완할 필요가 있다. 또한 benomyl은 물 속에서 빠르게 carbendazim과 butyl isocyanate로 변환되므로 필요한 용액을 제작하여 도롱뇽의 배에 신속히 처리하고 그 처리액을 자주 교체해 주었다고 해도 이들 분해산물의 효과를 배제할 수 없다. 즉, 본 연구에서 나타난 benomyl의 독성효과 중 기형발생에 대한 효과는 이들 분해산물의 효과가 일부 포함될 가능성이 있다고 생각된다. 그러므로 carbendazim과 butyl isocyanate의 효과를 각각 분석하는 등 이에 관련된 계속적인 연구가 요구된다.

적 요

한국산 도롱뇽의 알주머니를 농경지에서 채집하여 그 길이와 배의 수에 대한 변이를 조사하였으며 배의 이상 발생 패턴과 조직학적 이상을 연구하였다. 아울러 비 농경지로부터 채집한 도롱뇽의 배에 살균제 benomyl을 처리하여 기형발생을 비롯한 독성효과를 밝혔다. 알주머니의 길이 변이 폭은 10~23 cm이었으며 상대빈도가 가장 높은 것은 19 cm 길이였다. 알주머니 당 배의 수는 7~43개의 변이 폭을 나타냈으며 22~26개 사이가 가장 빈번하게 나타났다. 조사된 총 144개의 알주머니, 3418개를 일으킨 배중에서 116개의 알주머니, 406개의 배에서 발생정지 또는 외형적 이상 발생을 일으킨 배가 나타났다. 외형적 이상발생은 미부형성부전, 외새형성부전, 복부수포 등 24종류의 발생이상 패턴으로 정리되었다. 그 중 외형상 심각한 이상을 보이는 개체들의 조직 절편을 관찰한 결과 눈의 불완전 발달, 갑상선종, 중배엽성 체절의 불완전 발달, 부분적인 이 측 발생, 심장의 비정상 발달, 적혈구 감소증, 뇌의 붕괴와 장의 발달부진 등이 관찰되었다.

포배 또는 낭배 초기 단계에 있는 도롱뇽 정상 배에

12일 동안 200 nM~1 µM의 benomyl을 처리하였으며 모든 배는 1 µM의 농도에서 치사되었다. Benomyl 처리의 특징적인 이상은 머리의 발달이 부진하거나 전혀 나타나지 않는 것이며, 이러한 이상은 benomyl이 도롱뇽의 발생과정에서 신경계의 발달을 크게 저해한다는 것을 뜻하며 이러한 조직발달의 비정상 현상은 benomyl의 유사분열억제, tubulin 중합의 저해, microtubule의 파괴 등과 같은 세포내 작용과 신경배형성, 신경습의 폐쇄, 신경세포의 이동을 저해하는 작용에 의해 일어나는 것으로 생각된다.

사 사

본 연구는 한국학술진흥재단 연구 200-005-D20021에 의하여 수행되었음.

인 용 문 헌

- 강영선, 윤일병. 1975. 한국동식물도감 제17권 동물편(양서·파충류). 문교부, p.55-69.
- 정선우, 김정인, 윤춘식. 1999. 농경지에서 채집된 도롱뇽 (*Hynobius leechii*) 초기 배의 수적 변이 및 자연적 배 발생 이상, 한국육수학회지 **32**: 261-270.
- 환경청. 1987. '87 자연생태계 전국조사 (IV) 제2차년도(양서류·파충류·육상곤충). p. 5-12.
- Alvarez, R., M.P. Honrubia and M.P. Herraes. 1995. Skeletal malformations induced by the insecticides ZZ-Aphox and Folidol during larval development of *Rana perezi*. *Arch. Environ. contam. Toxicol.* **28**: 349-356.
- Banks, D. and M.R. Soliman. 1997. Protective effects of antioxidants against benomyl-induced lipid peroxidation and glutathione depletion in rats. *Toxicology* **116**: 177-181.
- Barnes, T.B., A.J. Verlangieri and M.C. Wilson. 1983. Reproductive toxicity of methyl-1 (butylcarbamoyl)-2-benzimidazole carbamate (benomyl) in male Wister rats. *Toxicology* **28**: 103-115.
- Boyer, R. and C.E. Grue. 1995. The need for water quality criteria for frogs. *Environ. Health Perspect* **103**: 352-357
- Bridges, C.M. 2000. Long-term effects of pesticide exposure at various life stages of the Southern Leopard Frog (*Rana sphenocarpa*). *Arch. Environ. contam. Toxicol.* **39**: 91-96
- Burkhardt, J.G., J.C. Helgen, D.J. Fort, K. Gallager, D. Bowers, T.L. Propst, M. Gernes, J. Magner, M.D. Shelby and G. Lucier. 1998. Induction of mortality and malformation in *Xenopus laevis* embryos by water sources associated with field frog deformities. *Environ. Health Perspect* **106**: 841-848.
- Carter, S.D. and J.W. Laskey. 1982. Effect of benomyl on reproduction in the male rat. *Toxicol. Lett.* **11**: 87-94.
- Carter, S.D., J.F. Hein, G.L. Rehnberg and J.W. Laskey. 1984. Effect of benomyl on the reproductive development of male rats. *J. Toxicol. Environ. Health* **13**: 53-68.
- Chiocchio, V., N. Venedikian, A.E. Martinez, A. Menendez, J.A. Ocampo and A. Godeas. 2000. Effect of the fungicide benomyl on spore germination and hyphal length of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Int. Microbiol.* **3**: 173-175.
- Cummings, A.M., S.T. Harris and G.L. Rehnberg. 1990. Effect of methyl benzimidazolecarbamate during early pregnancy in the rat. *Fundam Appl. Toxicol.* **15**: 528-535.
- Dolara, P., F. Torricelli and N. Antonelli. 1994. Cytogenetic effects on human lymphocytes of a mixture of fifteen pesticides commonly used in Italy. *Mutat Res.* **325**: 47-51.
- Edmund, J.C., O.N. David and E.J. Fichard. 1998. Interactions of gonadal steroids and pesticides (DDT, DDE) on gonaduct growth in larval tiger salamanders, *Ambystoma Tigrinum*. *General and Comparative Endocrinology* **109**: 94-105.
- Elliott-Feeley, E. and J.B. Armstrong. 1982. Effects of fenitrothion and carbaryl on *Xenopus laevis* development. *Toxicology* **22**: 319-335.
- Flaskos, J., M.J. Fowler, C. Teurtrie, A.J. Hargreaves. 1999. The effects of carbaryl and trichlorophan on differentiating mouse N2a neuroblastoma cells. *Toxicol. Lett.* **110**: 79-84.
- Hauptman, O., D.M. Albert, M.C. Plowman, S.M. Hopfer and F.W. Jr. Sunderman. 1993. Ocular malformations of *Xenopus laevis* exposed to nickel during embryogenesis. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **23**: 397-406.
- Hess, R.A., B.J. Moore, J. Forrer, R.E. Linder and A.A. Abuel-Atta. 1991. The fungicide benomyl (methyl 1-(butylcarbamoyl)-2-benzimidazolecarbamate) causes testicular dysfunction by inducing the sloughing of germ cells and occlusion of efferent ductules. *Fundam. Appl. Toxicol.* **17**: 733-745.
- Hess, R.A. and M. Nakai. 2000. Histopathology of the male reproductive system induced by the fungicide benomyl. *Histol. Histopathol.* **15**: 207-224.
- Hoekstra, E.J., M. Kiefer and A. Tepper. 1996. Monitoring of exposure to benomyl in nursery workers. *J. Occ-*

- up. *Environ. Med.* **38**: 775-781.
- Hurtt, M.E., C.A. Mebus and M.S. Bogdanffy. 1993. Investigation of the effects of benomyl on rat nasal mucosa. *Fundam. Appl. Toxicol.* **21**: 253-255.
- Jerome, M.G., L.R. Georgia and L.C. Ralph. 1989. Effect of the benomyl metabolite, carbendazim, on the hypothalamic-pituitary reproductive axis in the male rat. *Toxicology* **57**: 173-182.
- Kageura, H. 1995. Three regions of the 32-cell embryo of *Xenopus laevis* essential for formation of a complete tadpole. *Developmental Biology* **170**: 376-386.
- Kallen, B., E. Robert and J. Harris. 1996. The descriptive epidemiology of anophthalmia and microphtahlmia. *Int. J. Epidemiol.* **25**: 1009-1016.
- Kratke, R. and F. Kirschbaum. 1996. Effects of the antiepileptic drug valproic acid on the development of the axolotl (*Ambystoma mexicanum*): histological investigations. *Teratog. Carcinog. Mutagen* **16**: 149-167.
- Linder, R.E., G.L. Rehnberg, L.F. Strader and J.P. Diggs. 1988. Evaluation of reproductive parameters in adult male Wistar rats aftersubchronic exposure (gavage) to benomyl. *J. Toxicol. Environ. Health* **25**: 285-298.
- Nakai, M., R.A. Hess, B.J. Moore, R.F. Guttroff, L.F. Strader and R.E. Linder. 1992. Acute and long-term effects of a single dose of the fungicide carbendazim on the Male reproductive system in the rat. *Journal of Andrology* **13**: 507-518.
- Nakai, M., R.A. Hess, F. Matsuo, Y. Gotoh, T. Nasu. 1997. Further observations on carbendazim-induced abnormalities of spermatid morphology in rats. *Tissue & Cell* **29**: 477-485.
- McLean, W.G., A.D. Holme, O. Janneh, A. Southgate, C.V. Howard and M.G. Reed. 1998. The effect of benomyl on neurite outgrowth in mouse NB2A and human SH-SY5Y neuroblasoma cells *in vitro*. *Neurotoxicology* **19**: 629-632.
- Pilar Honrubia, M., M. Paz Herraiez and R. Alvarez. 1993. The carbamate insecticide ZZ-Aphox induced structural changes of gills, liver, gall-bladder, heart, and notochord of *Rana perezi* tadpoles. *Arch. Environ. contam. Toxicol.* **25**: 184-191.
- Razmovski, R. and D. Pejin. 1997. Effect of benomyl on *Saccharomyces cerevisiae* during continuous cultivation. *Acta. Microbiol. Immunol. Hung.* **44**: 249-256.
- Schuytema, G.S. and A.V. Nebeker. 1998. Comparative toxicity of diuron on survival and growth of Pacific treefrog, bullfrog, red-legged frog, and African clawed frog embryos and tadpoles. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **34**: 370-376.
- Snawder, J.E. and J.E. Chambers. 1993. Osteothyrogenic effects of malathion in *Xenopus* embryos. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **121**: 210-216.
- Spencer, F., L. Chi and M.X. Zhu. 1996. Effect of benomyl and carbendazim on steroid and molecular mechanisms in uterine decidual growth in rats. *J. Appl. Toxicol.* **16**: 211-214.
- Staub, R.E., G.B. Quistad and J.E. Casida. 1998. Mechanism for benomyl action as a mitochondrial aldehyde dehydrogenase inhibitor in mice. *Chem. Res. Toxicol.* **11**: 535-543.
- Sunderman, F.J., M.C. Plowman and S. M. Hopper. 1992. Teratogenicity of cadmium chloride in the South African frog, *Xenopus laevis*. *IARC Sci. Publ.* **118**: 249-256.
- Urani, C., E. Chiesara, P. Galvani, L. Marabini, A. Santagostino and M. Camatini. 1995. Benomyl affects the microtubule cytoskeleton and the glutathione level of mammalian primary cultured hepatocytes. *Toxicol. Lett.* **76**: 135-144.

(Received 20 July 2002, Manuscript accepted 25 Aug. 2002)