

제초제 Alachlor과 살충제 Endosulfan이 무당개구리
(*Bombina orientalis*) 배아의 생존 및 기형유발에 미치는 영향

강한승 · 계명찬 · 이재성¹ · 윤용달 · 김문규*

한양대학교 자연과학대학 생명과학과, ¹한양대학교 대학원 환경과학과

Effects of Alachlor and Endosulfan on the Survival and
Malformation of *Bombina orientalis* Embryos

Han Seung Kang, Myung Chan Gye, Jae-Seong Lee¹,
Yong Dal Yoon and Moon Kyoo Kim *

Department of Life Science, College of Natural Sciences;

¹Department of Environmental Science, Graduate School,
Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

Abstract - The chloroacetanilide herbicide alachlor (2-chloro-2', 6'-diethyl-N-(methoxymethyl)-acetanilide) and organochlorine insecticide endosulfan (6, 7, 8, 9, 10, 10-hexachloro-1, 5, 5a, 6, 9, 9a-hexahydro-6, 9-methano-2, 3, 4-benzodioxathiepin-3-oxide) are the highly toxic agricultural chemicals. *Bombina orientalis* is one of the most common amphibians in the world and comprises a large proportion of their total number. *B. orientalis* spawns in the farming regions at Spring when the massive application of agricultural chemicals occurs. These chemicals in farmland may threaten the reproduction of this frog. Therefore, we examined the embryotoxic and survival effects of alachlor and endosulfan at various concentrations in *B. orientalis* embryos. The survival rates of embryos at 312h post fertilization treated with alachlor and endosulfan were decreased with concentration dependent manner. Also, developmental malformations appeared by alachlor and endosulfan in *B. orientalis* embryos. The malformations showed in order of frequency with bent trunk, tail dysplasia, bent tail, thick-set body and ventral blister in alachlor treated embryos. The exposure of endosulfan produced 7 types of severe external malformations with tail dysplasia, pectoral blister, bent trunk, bent tail, cephalic dysplasia, ventral blister, and thick-set body. Following exposure to alachlor and endosulfan the types of malformations were diverse, suggesting these chemicals target multiple events in embryonic and larval development in this species. These results suggested that alachlor and endosulfan were detrimental for survival and development of *B. orientalis* embryos.

Key words : alachlor, endosulfan, embryo toxicity, *Bombina orientalis*

* Corresponding author: Moon Kyoo Kim, Tel: 02-2290-0954
Fax: 02-2295-1960, E-mail: kimmk@hanyang.ac.kr

서 론

내분비계 장애물질(Endocrine Disruptors: EDs)이란 미국 EPA에 의하면 '항상성의 유지와 발달의 조절을 담당하는 체내의 자연 호르몬의 생산, 방출, 이동, 대사, 결합 및 배설을 간섭하는 체외물질'을 말한다. 즉 '내분비 기능에 변화를 일으켜, 생체 또는 그 자손의 건강에 위대한 영향을 나타내는 외인성 물질'이라 정의된다. 내분비계 장애물질이 생물의 내분비계를 교란하여 무척추동물, 어패류, 양서류·파충류, 조류, 포유류 등의 생식호르몬의 생산, 저장과 분비, 이동, 대사, 수용체 결합의 방해 등의 장애를 유발하고, 그 결과로 발생과정의 이상을 초래하며, 성 행동, 신경과 면역계의 이상 발생, 암의 발생을 유발한다는 보고들이 급증하고 있다(Colborn *et al.* 1996; Cadbury 1997). 내분비계 장애물질은 종류에 따라 교란시키는 호르몬의 종류 및 교란 방법이 서로 다르다고 알려져 있다. 내분비계 장애물질의 특성은 생태계내 소비자에 의해 쉽게 분해되지 않고, 매우 안정하여 인체 또는 생물의 지방조직에 농축되어 대물림 된다는 것이다. 그러므로 그 개체가 죽더라도, 환경 생태계 내에 잔류하여 지속적인 위협을 준다. 현재 세계야생생물보호기금(World Wildlife Fund; WWF)의 목록에는 67종의 화학물질이 등재되어 있으며, 일본 후생성에서는 산업용 화학물질, 의약품, 식품첨가물 등 142종의 물질을 내분비계장애물질로 분류하고 있다. 내분비계 장애물질로 분류된 화학물질 중에는 많은 종류의 농약이 포함되어 있으며 농약의 사용은 자연생태계에 엄청난 파괴효과를 가져온다. 농약에 의해 일어나는 동물기형의 보고는 매우 많다. Carbamate계 살균제인 mancozeb은 생쥐에서 자궁의 무게를 감소시키고, 호르몬의 불균형을 초래하여 착상을 억제시킨다는 보고가 있다(Bindali and Kaliwal 2002). 살충제 methoxychlor은 xenopus 성체에 노출 시 생식기관과 내분비계의 장애를 일으키며, progesterone에 의하여 난자 성숙을 억제시키는 것으로 알려져 있으며(Pickford and Morris 1999, 2003), 생쥐에 있어서 follicle의 atresia를 증가시키는 것으로 보고되고 있다(Borgeest *et al.* 2002). 살충제인 mirex는 생쥐 배아에 노출시 기형을 유발한다고 알려져 있다(El-Bayomy *et al.* 2002).

양서류는 먹이연쇄의 중위 포식자로 먹이연쇄를 통해 내분비계 장애물질의 생체 내 축적이 예상되는 표적생물이다. 상위 포식자들의 주요 먹이 생물이 되므로 내분비계 장애물질의 순환 및 생체축적 회로의 중간자로 중요한 위치를 갖는다. 양서류는 농경지나 계류 등에서 서식하는 점과 매년 같은 장소에 산란하는 특이한 습성으로

인해 농약 등의 환경오염 물질에 노출되어 영향을 받기 쉬우므로 환경지표로서의 역할을 할 수 있다. 또한 환경의 질을 평가하는 데에 있어서 매우 민감성 있는 척도로 취급되고 있다. 최근 세계 각 지역에서는 개구리의 수가 현저히 감소하는 것이 발견되고 있다. 이런 현상은 개발사업의 영향도 있으나, 주로 내분비계 장애물질의 영향이라고 보고되고 있다(Stebbin and Cohen 1995; Burkhart *et al.* 1998). 개구리 등 양서류는 피부호흡을 하므로 내분비계 장애물질의 흡수가 빠르고, 갑상선 호르몬의 작용으로 변태하기 때문에 내분비계 장애물질의 영향을 가장 많이 받는 동물중의 하나이다(Stebbin and Cohen 1995).

내분비계 장애물질이 발생 및 생식에 미치는 영향에 대한 연구는 매우 중요하다. 생식과정은 종의 유지를 통한 생태계의 기능과 안정성 유지에 필수적인 생명활동으로 다양한 오염물질 및 독성물질에 매우 민감하다. 따라서 내분비계 장애물질에 의한 발생과정에 수반하는 생식세포의 형성과 분화, 수정과 난할 등에 대한 위해성 평가는 매우 중요하다. 그리고 야생생물 종을 대상으로 내분비계 장애물질이 발생 및 생식에 미치는 영향에 대한 연구는 생명현상의 다양성 및 공통성을 연구하는 비교연구 측면에서 중요한 의미를 갖는다. 본 연구는 한국 토착 양서류중의 하나인 무당개구리(*Bombina orientalis*)를 모델로 내분비계 장애물질이 양서류 배아의 발생 및 생존에 미치는 영향에 대하여 연구하였다. 무당개구리(*B. orientalis*)는 우리나라에서 저지대에서 고지대의 계류에 이르기까지 전역에 많이 분포하며 3월부터 7월까지 비교적 장기간에 걸쳐서 논이나 물가의 웅덩이나 낙엽이 쌓인 곳에서 산란을 한다. 이 시기는 작물의 재배를 위한 농약의 사용이 많은 시기로서 무당개구리를 비롯한 양서류의 서식지 및 산란장소가 논이나 물가의 웅덩이이기 때문에 이들 농약이 배 발생에 영향을 미치리라 생각된다.

본 연구는 우리나라에서 제초제와 살충제로 많이 사용되고 있으며 내분비계 장애물질로 분류된 alachlor과 endosulfan의 배아발생 독성을 조사하였다. Alachlor(2-chloro-2',6'-diethyl-N-(methoxymethyl)-acetanilide)은 chloroacetanilide계 화학물로서 담배나 옥수수, 땅콩 재배시 제초제 농약으로 사용되고 있다(Hayes and Laws 1991). 작용기전은 식물의 단백질합성을 억제하여 뿌리의 성장을 방해한다. 우리나라에서는 라소(Lasso), 알라(Ala)라는 상품명으로 판매되고 있다. Alachlor은 포유동물에 있어서 후점막종양(olfactory mucosal tumors)(Wetmore *et al.* 1999; Genter *et al.* 2002a, b; Burman *et al.* 2003), 갑상선암(Wilson *et al.* 1996; Heydens *et al.* 2000)등을 일으키는 것으로 알려져 있다. Organochlorine계 화학물인 endosulfan(6,7,8,9,10,10-hexachloro-1,5,5a,6,9,9a-

hexahydro-6, 9-methano-2, 3, 4-benzodioxathiepin-3-oxide)은 채소나 과일, 목화 등의 재배시 살충제로서 많이 사용된다 (Kullman and Matsumura 1996). 포유동물에 대한 독성이 다소 높은 편이며, 특히 어패류 등 수서동물에 대한 독성이 높은 편이다 (Sunderam *et al.* 1992). 포유동물의 뇌에서 endosulfan의 대사물질은 중추신경계에 영향을 미쳐 신경전달을 방해 또는 변형하여 (Abalis *et al.* 1986; Gant *et al.* 1987) cholinergic (Anand *et al.* 1986), dopaminergic (Anand *et al.* 1985), 그리고 serotonergic (Agrawal *et al.* 1983; Seth *et al.* 1986) 기작을 활성화하는 것으로 나타났다. 또한 생식소에 독성으로 작용하여 (Singh and Pandey 1989; Sinha *et al.* 1997, 2001) 생식능력을 감소시키며, 유전적 변이 (Yadav *et al.* 1982; Pandey *et al.* 1990; Chaudhuri *et al.* 1999; Lu *et al.* 2000)를 일으키는 것으로 알려져 있다. 우리나라에서는 지오릭스라는 상품명으로 판매되고 있으며 배추의 잎벌레, 거세미나방 등의 토양 살충제로 사용된다.

농경지는alachlor 및 endosulfan을 포함한 여러가지 내분비계 장애물질에 의해 지속적으로 영향을 받는 곳이고, 거기서 생활하는 양서류는 치명적인 영향을 필연적으로 받을 것으로 추측된다. 따라서 한국 토착 양서류중의 하나인 무당개구리(*B. orientalis*)에 대한 내분비계 장애물질의 연구는 환경오염에 대한 위해성 평가 및 평가 모델 동물의 개발에 있어 매우 중요하리라 생각된다.

재료 및 방법

1. 실험동물 채집 및 사육

실험에 사용된 무당개구리(*B. orientalis*)는 강원도 홍천에서 채집하여 한양대학교 실험동물실에서 사육하였다. 실험동물실 수조환경은 온도 20~22°C, 조명시간 14L:10D로 유지하였다. 먹이로는 mealworm을 주 3회 공급하였으며, 이 시기에 염소성분을 제거시킨 수돗물을 사육수로 사용하여 교환해주었다.

2. 무당개구리 난자 및 정자 성숙유도

무당개구리(*B. orientalis*) 난자의 성숙을 유도하기 위하여, 인공수정 24시간 전에 암컷에게 750 IU의 human chorionic gonadotropin (hCG; 대성미생물, 경기도, 한국)를 복강에 주사하여 과배란을 유도하였다. 성숙한 정자의 준비를 위하여 수컷에 500 IU의 hCG를 인공수정 24시간 전에 주사하여 정자의 성숙을 유도하였다.

3. 인공수정

무당개구리(*B. orientalis*)의 수정란은 인공수정을 통하여 준비하였다. 암컷의 복부를 압박하는 방법으로 난자를 채취하였으며, 정자는 수컷의 정소를 해부, 수집한 후 정소에서 정자를 분리하였다. 준비된 난자와 정자는 0.1×MMR (10 mM NaCl, 0.2 mM KCl, 0.1 mM MgSO₄, 0.2 mM CaCl₂, 0.5 mM HEPES (pH 7.8), 0.01 mM EDTA)용액에서 인공수정을 시행하였다. 수정 방법은 0.1X MMR 용액으로 난자를 3회 세척한 후, 소량의 0.1X MMR 용액에 난자를 담가두었다. 수집한 정소는 1X MMR (100 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 2 mM CaCl₂, 5 mM HEPES (pH 7.8), 0.1 mM EDTA)용액을 이용하여, 정자 현탁액을 만든다. 정자 현탁액을 0.1X MMR 용액에 담겨진 난자에 뿌린 후, 5분간 잘 섞어주면서 수정시켰다. 수정란은 0.1X MMR 용액으로 3회 세척한 후, 배양기(MIR550, Sanyo, Japan)에서 18°C 조건 하에서 13일간 배양하였다.

4. 약제 노출 및 관찰

실험에 사용한alachlor (CAS No. 15972-60-8)과 endosulfan (CAS No. 115-29-7)은 Riedel-de Haën (Seelze, Germany)로부터 구입하였으며, 에탄올에 녹여 사용하였다. Alachlor 및 endosulfan에 의한 생존율을 조사하기 위하여, 수정란을alachlor (5 µM, 10 µM, 20 µM, 40 µM)와 endosulfan (1 µM, 5 µM, 10 µM, 50 µM)을 처리한 0.1X MMR 용액 0.5L가 들어있는 수조에 넣어 배양기(MIR550, Sanyo, Japan)에서 18°C 조건 하에서 13일간 배양하였으며, 대조군과 비교 관찰하였다. Alachlor 실험군과 endosulfan 실험군의 대조군 수조에는 각각 0.0004%, 0.00005%의 에탄올을 처리하였다. 배양액 0.1X MMR 용액은 각각의 약제를 농도별로 처리한 후, 주 3회 교환하였으며, 치사한 배아는 매일 제거하면서 관찰하였다. 유의적 통계 분석은 chi square test와 Fisher's exact를 이용하였다.

결 과

1. Alachlor에 의한 무당개구리 배아의 발생 이상

무당개구리(*B. orientalis*) 수정란을alachlor에 노출시킨 후, 배양한 결과alachlor를 농도에 따라 처리한 실험군간의 생존율은 명확히 다르게 나타났다($P < 0.0001$ by chi square test). 13일간 배양한 무당개구리 배아의 생존율은 대조군이 81.3%를 보였으며,alachlor 5 µM, 10 µM,

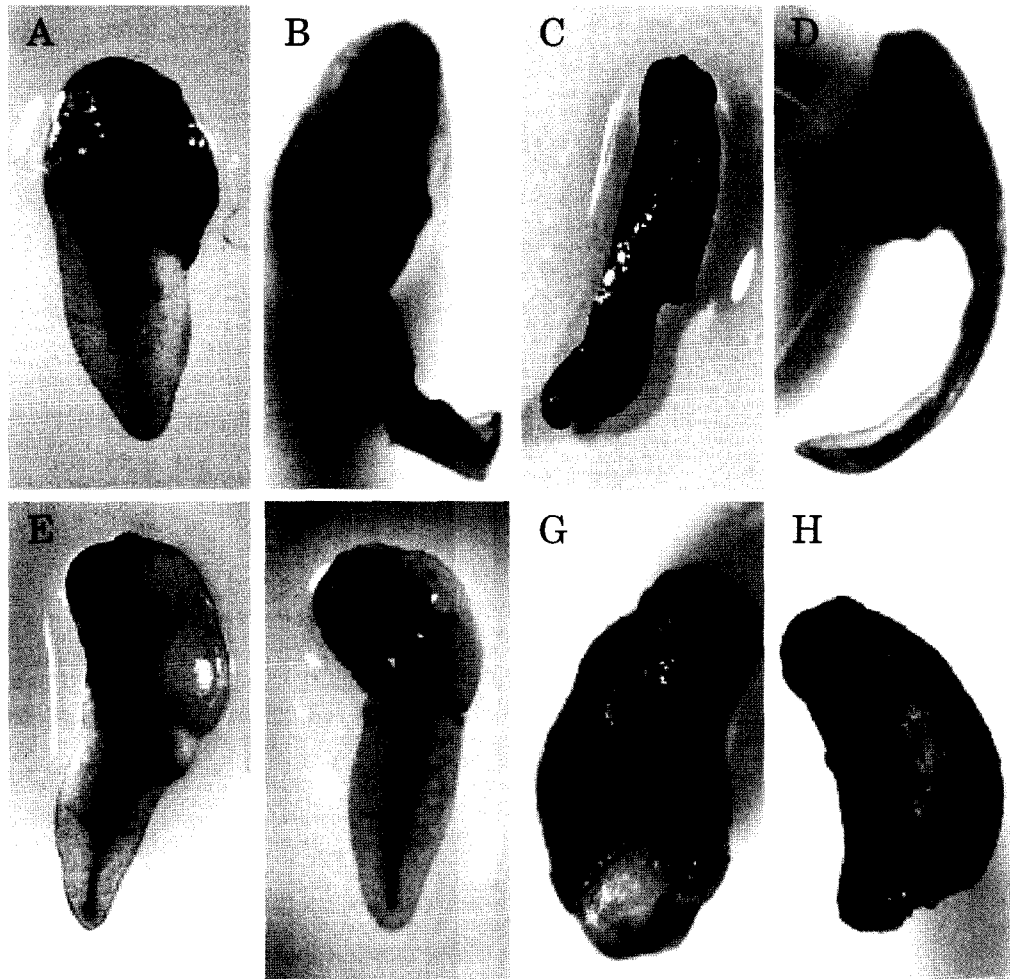
Table 1. Survival rates of *B. orientalis* embryos exposed to alachlor

Alachlor (μM)	No. of embryos	Survived embryos (%)							
		Time after fertilization (h)							
		24	48	72	96	144	168	192	312
		Lb	Np	Tb	Mr	Mo	Tc	Tc	Oc
0	48	47 (97.9)	43 (89.6)	43 (89.6)	43 (89.6)	41 (85.4)	41 (85.4)	41 (85.4)	39 (81.3)
5	45	43 (95.6)	41 (91.1)	38 (84.4)	36 (80.0)	36 (80.0)	36 (80.0)	36 (80.0)	32 (71.0)
10	37	35 (94.6)	31 (83.8)	30 (81.1)	29 (78.4)	28 (75.7)	28 (75.7)	27 (73.0)	21* (56.8)
20	48	42 (85.4)	36 (75.0)	34 (70.8)	17 (35.4)	15 (31.3)	15 (31.3)	15 (31.3)	9* (18.8)
40	44	40 (90.9)	39 (88.6)	18 (40.9)	5 (11.4)	5 (11.4)	5 (11.4)	5 (11.4)	0* (0)

Survival rate of embryos at 312h post fertilization was showed significantly different among the experimental groups by chi square test ($P < 0.0001$).

*Significantly different when compared with control group by Fisher's exact test ($P < 0.05$).

Lb: Late blastula, Np: Neural plate, Tb: Tail bud, Mr: Muscle response, Mo: Mouth open Tc: Tail fin circulation, Oc: Operculum complete

**Fig. 1.** Various malformations in embryos and tadpoles of *B. orientalis*.

(A) Normal, (B) Bent trunk, (C) Bent tail, (D) Cephalic dysplasia, (E) Pectoral blister, (F) Ventral blister, (G) Tail dysplasia, (H) Thick-set body. A-F: tadpole, G-H: embryo

20 μ M, 40 μ M 처리군에서 배아의 생존율은 각각 71.0%, 56.8%, 18.8%, 0%를 나타내었다. 배아의 생존율은 alachlor 처리농도에 따라 감소하는 경향을 나타내었는데, 특히 처리농도 10 μ M 이상에서는 농도가 높아짐에 따라 생존율은 유의적으로 감소하였으며 ($P < 0.05$) 처리농도 40 μ M에서는 모든 배아가 죽었다 (Table 1). Alachlor를 처리한 배아에서는 몇 가지 유형의 기형이 관찰되었다. Alachlor에 의해 나타난 기형의 유형은 몸통 휨 (bent trunk), 꼬리형성장애 (tail dysplasia), 꼬리 휨 (bent tail), 성장장애 (thick-set body) 및 복부수포 (ventral blister) 등이 각각 43.2%, 34.1%, 11.4%, 9.1% 그리고 2.3%의 빈도 순으로 나타났다 (Table 2, Fig. 1).

2. Endosulfan에 의한 무당개구리 배아의 발생 이상

무당개구리 (*B. orientalis*) 수정란을 endosulfan에 노출시킨 후, 배양한 결과 처리농도에 따라 실험 군간의 생존율은 명확히 다르게 나타났다 ($P < 0.0001$ by chi square test). 13일간 배양한 무당개구리 배아의 생존율은 대조군이 71.8%를 보였으며, 처리농도 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 50

μ M에서 배아의 생존율은 각각 64.4%, 54.3%, 47.2%, 20.8%를 나타내었다. 배아의 생존율은 endosulfan 처리농도에 따라 감소하는 경향을 나타내었으며, 처리농도 50 μ M에서의 생존율은 대조군에 비하여 3.45배 정도 감소하는 결과를 보였다 ($P < 0.0001$, Table 3). Endosulfan를 처리한 배아에서는 몇 가지 유형의 기형이 관찰되었는데, 꼬리형성장애 (tail dysplasia), 가슴수포 (pectoral blister), 몸통 휨 (bent trunk), 꼬리 휨 (bent tail), 두부미형성 (cephalic dysplasia), 복부수포 (ventral blister) 및 성장장애 (thick-set body) 등의 기형이 41.5%, 19.5%, 13.0%, 11.7%, 5.2%, 5.2%, 3.9%의 빈도 순으로 나타났다 (Table 4, Fig. 1).

고 찰

내분비계 장애물질로 분류된 alachlor와 endosulfan은 우리나라를 비롯하여 전 세계에서 제초제 및 살충제로 많이 사용하는 농약이다. 따라서 이러한 화학물질들은 경작 시기에 농경지나 웅덩이 등의 수서환경에서 산란 및 서식을 하는 양서류에게는 성체뿐만 아니라 배아의 생존에 있어서도 치명적인 영향을 미칠 것이 자명한 사실이다. 최근 양서류의 개체 수는 현저히 감소하고 있는 추세이며, 다양한 기형이 출현하고 있다 (Burkhart *et al.* 1998). 이러한 원인에 대해서는 서식지 파괴, 남획, 기후의 변화 등에 원인을 두지만, 그 중에서도 내분비계 장애물질과 같은 환경오염물질이 주된 요인으로 생각된다. 본 연구 결과 제초제 alachlor를 수정란에 처리한 후, 생존율을 관찰한 결과 처리 농도가 높아질수록 생존율은 감소하며

Table 2. Frequency of malformed *B. orientalis* embryos after alachlor treated for 312 hours

Malformation patterns	No. of malformed embryos	% of malformed embryos
Bent trunk	19	43.2
Tail dysplasia	15	34.1
Bent tail	5	11.4
Thick-set body	4	9.1
Ventral blister	1	2.3
Sum	44	100.0

Table 3. Survival rates of *B. orientalis* embryos exposed to endosulfan

Alachlor (μ M)	No. of embryos	Survived embryos (%)							
		Time after fertilization (h)							
		24	48	72	96	144	168	192	312
		Lb	Np	Tb	Mr	Mo	Tc	Tc	Oc
0	39	36 (92.3)	33 (84.6)	31 (79.4)	30 (76.9)	28 (71.8)	28 (71.8)	28 (71.8)	28 (71.8)
1	45	40 (88.8)	37 (82.2)	32 (71.1)	30 (66.6)	30 (66.6)	29 (64.4)	29 (64.4)	29 (64.4)
5	46	39 (84.7)	37 (80.4)	33 (71.7)	28 (60.8)	26 (56.5)	26 (56.5)	25 (54.3)	25 (54.3)
10	55	46 (83.6)	45 (81.8)	36 (65.4)	31 (56.4)	28 (50.9)	26 (47.2)	26 (47.2)	26 (47.2)
50	48	41 (85.4)	37 (77.0)	30 (62.5)	24 (50.0)	20 (41.6)	18 (37.5)	17 (35.4)	10* (20.8)

Survival rate of embryos at 312h post fertilization was showed significantly different among the experimental groups by chi square test ($P < 0.0001$).
*Significantly different when compared with control group by Fisher's exact test ($P < 0.0001$).

Lb: Late blastula, Np: Neural plate, Tb: Tail bud, Mr: Muscle response, Mo: Mouth open, Tc: Tail fin circulation, Oc: Operculum complete

Table 4. Frequency of malformed *B. orientalis* embryos after endosulfan treated for 312 hours.

Malformation patterns	No. of malformed embryos	% of malformed embryos
Tail dysplasia	32	41.5
Pectoral blister	15	19.5
Bent trunk	10	13.0
Bent tail	9	11.7
Cephalic dysplasia	4	5.2
Ventral blister	4	5.2
Thick-set body	3	3.9
Sum	77	100.0

40 μM 의 처리농도에서는 배아가 모두 치사 하는 양상을 보여주었다 (Table 1). 또한 살충제 endosulfan의 경우도 alachlor와 마찬가지로 생존율이 처리농도에 의존적인 결과를 나타내었다 (Table 2). 앞선 연구에 의하면 alachlor (Osano *et al.* 2002), endosulfan (Broomhall and Shine 2003; Gendron *et al.* 2003; Goulet and Hontela 2003), benomyl (Yoon *et al.* 2003) 그리고 diuron (Schuytema and Nebeker 1998) 등의 농약이 개구리 배아의 발생에서 배아에 유해 하게 작용하며, 이들 화학물질의 농도에 의존적으로 생존율이 감소한다는 사실이 밝혀졌다. 이상의 결과를 고찰해보면 이러한 화학물질들은 종류에 따라 정도의 차이는 있지만 양서류 초기 배아의 발생에 있어서 유해하게 작용한다는 사실을 인지할 수 있다. 본 연구의 관찰 결과 alachlor 또는 endosulfan를 처리하지 않은 대조군의 생존율이 각각 81.3%와 71.8%를 보여주었다 (Table 1, Table 3). 화학물질을 처리하지 않은 실험군에서의 배아의 생존율은 예상 외로 높지 않았다. 자연상태에서의 배아 발생과 달리 실험실에서의 배아 발생의 연구에서는 관찰을 위하여 배아에 물리적 충격이 가해지는 경우가 생길 수 있다. 실제로 물리적 충격이 많았던 배아의 경우 치사율이 높게 나타나는 경우가 많다. 그러나 이러한 결과는 단지 물리적 충격이 원인의 전부가 아닐 수도 있다. 또 다른 원인으로서는 정자나 난자 자체의 선천적 결함이 원인일 수 있는데, 이는 모체로부터 물려받았거나 여러 세대에 걸친 유전적 결함에 의한 것일 수도 있다. 이 또한 환경요인을 배제할 수 없는 것으로, 양서류의 모체가 먹이연쇄를 통해 체내에 농약과 같은 내분비계 장애 물질이 축적되었거나, 피부를 통해 침투된 농약 성분에 의해 이미 결함을 가지고 생성된 정자나 또는 난자를 배아 발생 실험에 사용하였기 때문 일수도 있을 것이다.

Alachlor과 endosulfan은 배아의 발생에 있어서 생존의 영향뿐만 아니라 기형을 유발하는 것으로 나타났다. 본 연구결과 alachlor과 endosulfan에 노출된 배아에서는 몇 가지 유형의 기형이 관찰되었다. Alachlor에 노출

된 배아에서는 몸통 휨, 꼬리형성장애, 꼬리 휨, 성장장애 및 복부수포 등의 유형을 가진 기형이 관찰되었다 (Table 2, Fig. 1). Endosulfan에 노출된 배아에서도 꼬리형성장애, 가슴수포, 몸통 휨, 꼬리 휨, 두부미형성, 복부수포 및 성장장애 유형의 기형이 관찰되었다 (Table 4, Fig. 1). 이러한 결과는 alachlor과 endosulfan이 무당개구리의 배아 발생과정에 있어 다양한 표적기관에 작용하여 기형을 유발하는 것으로 생각된다. Alachlor와 endosulfan에 의한 배아의 기형에는 유형 및 발생빈도에 차이점을 나타내었다. Alachlor에 의한 기형에는 몸통 휨 유형의 기형 발생이 가장 높은 빈도로 나타났다. 반면에 endosulfan의 경우에는 꼬리형성장애의 기형 발생이 가장 높은 빈도로 나타났으며, alachlor 노출 시에는 관찰되지 않았던 두부미형성이 나타났다. 이전의 연구에 의하면 Roth (1991)는 골격계 이상은 기형형성물질이 신경계에 영향을 미치기 때문이라고 보고하였다. 또한 Alvarez 등 (1995)은 *R. perezi*의 올챙이에 살충제 ZZ-Aphox를 처리하였을 때 골격계의 기형이 나타남을 보고하였다. 따라서 alachlor와 endosulfan에 의해서 몸통휨, 꼬리휨 등의 골격계 기형이 나타나는 것으로 보아 이들 화학물질들이 신경계에 기형형성물질로 작용하는 것으로 생각되며, 특히 alachlor이 골격계 기형에 많은 영향을 미치는 것으로 사료된다. 꼬리형성장애의 기형은 발생이 정지되고, 난황의 배내 흡수가 실패하여 나타난 기형의 유형이다. 정상적인 배아 발생 과정 중에서 난황은 기관 형성 과정에서 소비된다. 본 연구에서는 endosulfan에 노출된 배아에서 꼬리형성장애의 기형이 높은 빈도로 나타났다. 따라서 endosulfan은 몇 가지 다른 기형도 유발하지만, 특히 난황의 배내 흡수 및 기관형성에 영향을 미쳐 꼬리형성장애를 유발하는 것으로 생각된다.

양서류는 상위 포식자들의 주요 먹이 생물로서 내분비계 장애물질의 순환 및 생체축적 회로의 중간자로 중요한 위치를 갖는다. 따라서 환경오염에 의한 양서류의 개체감소 및 기형의 유발은 단지 생태계의 문제일 뿐만 아니라 먹이 연쇄의 상위 포식자인 인간에게는 섭식에 의한 내분비계 장애물질의 축적이 이루어지는 매우 위험한 경우가 생길 수 있다.

본 연구결과 우리나라에서 많이 사용하는 제초제 alachlor과 살충제 endosulfan은 각각 10 μM 과 50 μM 의 농도에서 무당개구리 배아의 생존에 유의적으로 유해함을 보였다. 또한 이들 화학물질들은 내분비계 장애물질로 분류된 다른 농약에서와 마찬가지로 배아의 발생과정에 노출시 농도에 의존적으로 기형을 유발시킴을 나타내었다. 이들 농약은 우리나라에서 많이 사용하는 농약으로서 이들 농약의 사용시 적절한 농도의 농약 사용이 이루어져

야 된다고 생각된다. 본 연구 결과는 이들 농약 사용에 있어서 위해한 농도의 기준으로 사용할 수 있으리라 생각된다. 농약 등과 같은 내분비계 장애물질에 대한 위해성 평가에 대한 연구는 *Xenopus laevis* 등의 실험 동물로 사육화된 개구리 및 우리나라에 서식하지 않는 개구리를 대상으로 한 연구들이 대부분이다. 그러나 실험동물로 정형화된 모델(model)동물을 이용한 연구도 중요한 의미를 가질 수 있으나, 그 지역에 서식하는 토착 생물을 모델로 이용한 환경오염의 위해성 연구는 더욱 더 중요한 의미를 가지리라 생각된다.

본 연구는 우리나라 토착 양서류인 무당개구리(*B. orientalis*)를 이용하여 연구하였다. 무당개구리(*B. orientalis*)를 이용한 내분비계 장애물질의 위해성 연구는 우리나라를 비롯하여 전 세계에서 연구가 이루어지지 않았으며, 무당개구리(*B. orientalis*)의 인공산란유도, 인공수정 및 배양의 기술은 아직까지 확립되어지지 않은 상태이다. 따라서 본 연구결과는 무당개구리를 비롯한 한국 토착 양서류 종의 연구에 있어 중요한 기반이 되리라 사료된다.

사 사

본 연구는 한국학술진흥재단 지원 연구비(2002-005-C00019)에 의하여 수행되었음.

참 고 문 헌

- Abalis IM, ME Eldefrawi and AT Eldefrawi. 1986. Effects of insecticides on GABA-induced chloride influx into rat brain microsacs. *J. Toxicol. Environ. Health* 18:13-23.
- Agrawal AK, M Anand, NF Zaidi and PK Seth. 1983. Involvement of serotonergic receptors in endosulfan neurotoxicity. *Biochem. Pharmacol.* 32:3591-3593.
- Alvarez R, MP Honrubia and MP 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.
- Anand M, S Mehrotra, K Gopal, RN Sur and SV Chandra. 1985. Role of neurotransmitters in endosulfan-induced aggressive behaviour in normal and lesioned rats. *Toxicol. Lett.* 24:79-84.
- Anand M, AK Agrawal, K Gopal, RN Sur and PK Seth. 1986. Endosulfan and cholinergic (muscarinic) transmission: effect on electroencephalograms and [³H] quinclidinyl benzilate in pigeon brain. *Environ. Res.* 40:421-426.
- Bindali BB and BB Kaliwal. 2002. Anti-implantation effect of a carbamate fungicide mancozeb in albino mice. *Ind. Health* 40:191-197.
- Borgeest C, D Symonds, LP Mayer, PB Hoyer and JA Flaws. 2002. Methoxychlor may cause ovarian follicular atresia and proliferation of the ovarian epithelium in the mouse. *Toxicol. Sci.* 68:473-478.
- Broomhall S and R Shine. 2003. Effects of the insecticide endosulfan and presence of congeneric tadpoles on Australian treefrog (*Litoria freycineti*) tadpoles. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 45:221-226.
- Burkhart JG, JC Helgen DJ Fort, K Gallager, D Bowers, TL Propst, M Gernes, J Magner, MD Shelby and G Lucier. 1998. Induction of mortality and malformation in *Xenopus laevis* embryos by water sources associated with field frog deformities. *Environ. Health Persp.* 106:841-848.
- Burman DM, HG Shertzer, AP Senft, TP Dalton and MB Genter. 2003. Antioxidant perturbations in the olfactory mucosa of alachlor-treated rats. *Biochem. Pharmacol.* 66:1707-1715.
- Cadbury D. 1997. The feminization of nature; our future at risk, Penguin Books Ltd.
- Chaudhuri K, S Selvaraj and AK Pal. 1999. Studies on the genotoxicology of endosulfan in bacterial system. *Mutat. Res.* 439:63-67.
- Colborn T, D Dumanoski and JP Myers. 1996. Our stolen future. The Spieler Agency.
- El-Bayomy AA, IW Smoak and S Branch. 2002. Embryotoxicity of the pesticide mirex in vitro. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 22:239-249.
- Gant DB, ME Eldefrawi and AT Eldefrawi. 1987. Cyclo-diene insecticides inhibit GABAA receptor-regulated chloride transport. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 88:313-321.
- Gendron AD, DJ Marcogliese, S Barbeau, MS Christin, P Brousseau, S Ruby, D Cyr and M Fournier. 2003. Exposure of leopard frogs to a pesticide mixture affects life history characteristics of the lungworm *Rhabdias ranae*. *Oecologia* 135:469-476.
- Genter MB, DM Burman, S Vijayakumar, CL Ebert and BJ Aronow. 2002a. Genomic analysis of alachlor-induced oncogenesis in rat olfactory mucosa. *Physiol. Genomics* 12:35-45.
- Genter MB, DM Burman and B Bolon. 2002b. Progression of alachlor-induced olfactory mucosal tumours. *Int. J. Exp.* 83:303-308.
- Goulet BN and A Hontela. 2003. Toxicity of cadmium, end-

- osulfan, and atrazine in adrenal steroidogenic cells of two amphibian species, *Xenopus laevis* and *Rana catesbeiana*. *Environ. Toxicol. Chem.* 22:2106–2113.
- Hayes WJ and ER Laws. 1991. Alachlor. In: Handbook of pesticide toxicology, classes of pesticides. Academic Press. New York. 3:1341–1343.
- Heydens WF, AG Wilson, LJ Kraus, WE Hopkins II and KJ Hotz. 2000. Ethane sulfonate metabolite of alachlor: assessment of oncogenic potential based on metabolic and mechanistic considerations. *Toxicol. Sci.* 55:36–43.
- Kullman SW and F Matsumura. 1996. Metabolic pathways utilized by *Phanerochaete chrysosporium* for degradation of the cyclodiene pesticide endosulfan. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:593–600.
- Lu Y, K Morimoto, T Takeshita, T Takeuchi and T Saito. 2000. Genotoxic effects of alpha-endosulfan and beta-endosulfan on human HepG2 cells. *Environ. Health Persp.* 108:559–561.
- Osano O, W Admiraal and D Otieno. 2002. Developmental disorders in embryos of the frog *Xenopus laevis* induced by chloroacetanilide herbicides and their degradation products. *Environ. Toxicol. Chem.* 21:375–379.
- Pandey N, F Gundevia, AS Prem and PK Ray. 1990. Studies on the genotoxicity of endosulfan, an organochlorine insecticide, in mammalian germ cells. *Mutat. Res.* 242:1–7.
- Pickford DB and ID Morris. 1999. Effects of endocrine-disrupting contaminants on amphibian oogenesis: methoxychlor inhibits progesterone-induced maturation of *Xenopus laevis* oocytes in vitro. *Environ. Health Persp.* 107:285–292.
- Pickford DB and ID Morris. 2003. Inhibition of gonadotropin-induced oviposition and ovarian steroidogenesis in the African clawed frog (*Xenopus laevis*) by the pesticide methoxychlor. *Aquat. Toxicol.* 62:179–194.
- Roth M. 1991. Campomelic syndrome: experimental models and pathomechanism. *Pediatr. Radiol.* 21:220–225.
- Schuytema GS. and AV 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.
- Seth PK, NF Saidi, AK Agrawal and M Anand. 1986. Neurotoxicity of endosulfan in young and adult rats. *Neurotoxicology* 7:623–635.
- Singh SK and RS Pandey. 1989. Gonadal toxicity of short term chronic endosulfan exposure to male rats. *Indian J. Exp. Biol.* 27:341–346.
- Sinha N, R Narayan and DK Saxena. 1997. Effect of endosulfan on testis of growing rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 58:79–86.
- Sinha N, N Adhikari and DK Saxena. 2001. Effect of endosulfan during fetal gonadal differentiation on spermatogenesis in rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 10:29–32.
- Stebbins R and N Cohen. 1995. A natural history of amphibians. Princeton Univ. Press.
- Sunderam RIM, DMH Cheng and GB Thompson. 1992. Toxicity of endosulfan to native and introduced fish in Australia. *Environ. Toxicol. Chem.* 11:1469–1476.
- Wetmore BA, AD Mitchell, SA Meyer and MB Genter. 1999. Evidence for site-specific bioactivation of alachlor in the olfactory mucosa of the Long-Evans rat. *Toxicol. Sci.* 49:202–212.
- Wilson AG, DC Thake, WE Heydens, DW Brewster and KJ Hotz. 1996. Mode of action of thyroid tumor formation in the male Long-Evans rat administered high doses of alachlor. *Fundam. Appl. Toxicol.* 33:16–23.
- Yadav AS, RK Vashishat and SN Kakar. 1982. Testing of Endosulfan and Fenitrothion for genotoxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.* 105:403–407.
- Yoon CS, JH Jin, JH Park, HJ Youn and SW Cheong. 2003. The fungicide benomyl inhibits differentiation of neural tissue in the *Xenopus* embryo and animal cap explants. *Environ. Toxicol.* 18:327–337.

Manuscript Received: March 31, 2004

Revision Accepted: May 18, 2004

Responsible Editorial Member: Wonchoel Lee
(Hanyang Univ.)