SI-4

The Study of Spontaneous Developmental Abnormalities and Toxicology of Benomyl and Its Metabolite on Salamander, *Hynobius leechii*.

박 용 욱
(창원대학교 자연과학대학 생물학과)

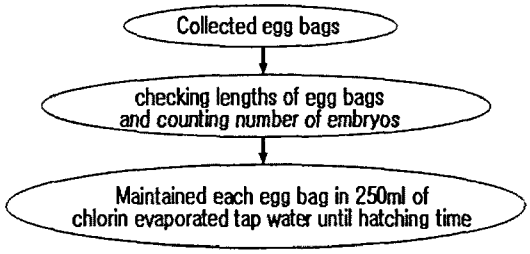
Abstract

The egg bags of Korean salamander(*Hynobius leechii*) were collected from farmlands in Gyeongsangnam-do area. The assumed breeding time, numerical variation of embryos in each egg bag, mortality and the rates of abnormalities were investigated. The toxicity of benomyl, the metabolite carbendazim and BIC which were frequently spread in agricultural area and caused spontaneous embryonic malformation was investigated. The assumed breeding time between the end of February and the end of March has the difference about a month because of a habitat and it takes about 2 or 3 weeks from laying eggs to hatching. The length of each egg bag and the number of embryos were very varied in each area. It is due to geographical variation. Among egg bags in total study area, only 406 of egg bags(17.70% of total egg bags) developed all of embryos to normal larvae, and 78.49% of total embryos were normally developed. The patterns of spontaneous embryonic malformation were 26 species from A to Z and the abnormal patterns in individual were 8 species and above. The geographical differences about the abnormal pattern were identified and 11 habitats categorized 4 groups. The most frequent abnormality in Gyeongsangnam-do area is the dysplasia of external gill. The caudal dysplasia, abdominal blister and dysplasia of fin were also frequently observed. Individuals showing severe external defect were histologically studied and they showed retinal hypo-pigmentation, thyroid carcinoma, somatic muscular dysplasia, degeneration of cephalic neuron and various organ dysplasia. Benomyl and carbendazim were treated by 10pM~10uM and BIC was treated by 1~40ppm to know the effect of toxicity about toxic substances of salamander. After benomyl was treated, a survival rate was sharply dropped from 2 to 8 days. LC_{100} identified in 1μM, LC_{50} identified between 100nM and 1μM. EC_{50} was assumed between 10nM and

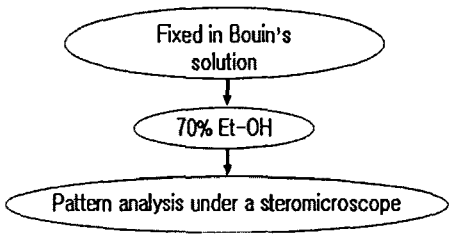
100nM. The prevalent external malformation was abdomen swelled abnormally and histo-pathological effects were abdomen, neural tube and lens hernia. This suggests that benomyl is the toxicitic substance which inhibits the development of digestive system and nervous system. The result of treated carbendazim was similar to that of the treated benomyl. The survival rate is sharply dropped between 2 and 6 days. LC_{100} was identified 1μM and LC_{50} was identified between 10nM and 100nM. This shows that cabendazim has stronger lethal toxicity than benomyl. Ventral blister, eye dysplasia and cephalic dysplasia in the individual of external malformation mean that cabendazim affected nervous system much more than benomyl. Because the toxicity of BIC affected less in the beginning but affected more in the near hatching period, the period causing toxicity is somewhat different. LC_{100} identified near 40ppm and LC_{50} identified near 25ppm. The external defect shows mainly ventral blister and histo-pathological results show intestinal deformities This result suggests the BIC inhibited strongly the development of digestive system. 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 movement of neural crest cells of benomyl. These abnormal developments may be caused by the rupture of epithelium, the loss of microtubule, the reduction of spindle size, the inhibition of spindle assembly formation, the destruction of spindle poles of carbendazim. These abnormal developments may be caused cytotoxicity by inhibition of the synthesis of a number of macromolecules and similar reaction the inhibition of benomyl.

Material & Method

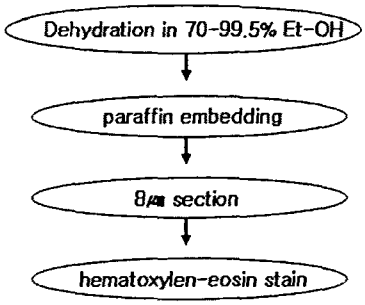
▶ A numerical variation on egg bags and embryos.



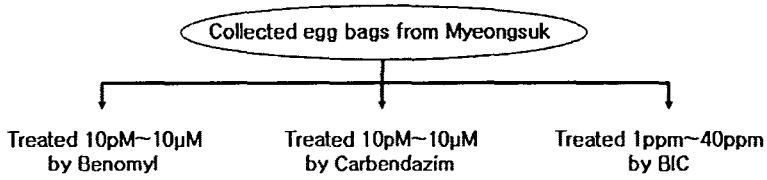
▶ Pattern analysis of spontaneous embryonic malformation.



▶ Histopathological investigation of test organisms.



▶ The embryotoxicity of Benomyl, the metabolite Carbendazim and BIC.



→ Renewal tested everyday.

→ The study of specific effect due to Benomyl, Carbendazim and BIC identified with analysis of spontaneous embryonic malformation.

Result & Discussion

본 조사에서는 경상남도 일대에서 산란 시기가 지역에 따라 한 달 정도의 차이를 보이며 남해 지역이 2월 중순부터 산란을 시작하여 가장 이르며, 거창 지역의 경우 3월 중순 이후에 산란하는 것으로 조사되었다. 창원, 의령과 같은 위도 선상인 지역들에서는 3월 중순경으로 비슷한 결과를 확인하였다. 한국동식물도감에서는 산란 후 부화까지 소요되는 시간이 3~4주로 기록되어 있으며, 최 등(2002)에 의한 보고에 의하면 경남 의령에서는 2~3주가 소요된다고 하였는데 본 조사에서는 의령과 비슷하게 대부분의 지역에서 2~3주가 소요되었다. 이는 도롱뇽의 생활사 조사(윤 등, 1996)에서 채집 당시 12℃의 자연 상태보다 17~20℃로 유지된 실험실에서 성장이 빠른 것은 온도의 영향으로 생각할 수 있다는 보고처럼 실험실내의 일정하고도 높은 온도가 성장 및 발생 속도에 어떤 영향을 미쳤을 것으로 사료된다.

본 연구에서 나타난 알주머니의 길이와 배의 수는 2년 동안 본 연구 대상 지역에서 일치된 결과를 보였는데 이것은 그 지역의 수적 변이를 대표한다고 해석할 수 있다. 지역에 따라 알주머니 길이와 배의 수는 각각 6~31㎝, 6~112개의 변이 폭을 보였다. 산청, 마산, 고성, 밀양 지역은 길이가 짧고 배의 수가 적으며, 반면 거창, 이반성, 창원 지역은 길이가 길고 배의 수가 많았다. 특히 지역에 따라 길이와 수가 2~3배 이상 차이를 보였으며 경상남도 일대의 도롱뇽은 평균 16.14㎝의 알주머니 길이와 각 알주머니 당 평균 40.05개의 배가 들어 있었다. 전체 조사 지역에서 알주머니의 길이가 길수록 배의 수도 많아 알주머니 길이와 배의 수와는 밀접한 상관관계가 있었다. 이러한 차이는 단순히 지리적인 것인지 아니면 환경 문제에 기인한 것인지에 대해서는 충분한 조사가 필요하다고 하였는데(최, 2002) 본 조사에서 같은 지역에서 채집된 도롱뇽 배의 색이 차이가 나고 알주머니와 배의 수적변이가 큰 지역을 선정하여 배를 부화시켜 개체를 면밀히 관찰해 본 결과 동일한 알주머니에서도 부화된 개체의 색깔과 크기가 차이가 있었으며 머리 부분과 아가미의 길이와 색이 약간씩의 차이를 보이나 점차 자라면서 구분이 명확하지 않았고, 같은 지역이라 하더라도 장소를 조금 달리하면 알주머니 길이와 배의 수에 차이를 보이는 경우도 확인된 점, 2년간의 수적 변이 조사를 종합해 볼 때, 상술한 알주머니와 배의 수적변이는 도롱뇽의 지리적 변이가 가장 큰 요인임을 제시하고자 한다.

산란된 도롱뇽의 배가 발생 도중 치사하고 자연적인 이상을 일으킨 것에 대해서는 여러 가지 요인이 있을 수 있으나 알주머니의 채집지가 농경지인 만큼 서식지 물속의 독성물질에 의한 악영향을 배제할 수 없다. 2년간의 자연발생 조사에서 채집된 알주머니 중 모든 배가 정상 발생한 알주머니는 2,294개 중 406개로

17.70%에 불과하였으며, 나머지는 알주머니속의 배에 적어도 하나 이상이 부화되기 전 치사되거나 발생 정지 또는 외형적인 이상을 일으켰다. 이러한 사실은 수질의 저하로 인해 대부분의 알주머니가 물속의 독성 물질에 노출되어져 영향을 받고 있음을 의미한다. 하지만 전체 배 중에서 정상적으로 부화한 것이 74,765개로 82.82%로 나타나 배에 직접적인 독성 영향은 다소 적게 받았는데, 이는 독성 물질이 전체 알주머니에 영향을 주지만 도롱뇽의 배가 3중의 난막에 싸여 있어 독성물질의 침투를 방해하기 때문일 것이다. 이러한 사실은 *Xenopus laevis* 난할기에 제초제 Paraquat(PQ)을 처리하였을 때 PQ는 젤리막과 난황막을 통과한 것처럼 보이지만 genotoxicity를 부화 전에는 보이지 않았다는 보고(Claudio *et al*, 2001) 나 양서류의 성공적인 부화는 화학 약품의 노출에 거의 영향을 받지 않는 이유가 젤리층 때문이라는 보고(Berrill et al, 1993, 1994, 1995, 1998; Mahaney, 1994)를 통해 유추할 수 있다. 하지만 본 연구에서 베노밀, 카벤다짐과 BIC를 치사농도로 포배와 낭배 초기의 배에 처리하였을 때 베노밀 과 카벤다짐은 10μM에서 2~6일째 생존율이 급감하여 100% 치사되었으나, BIC의 경우 부화에 임박하여 100% 치사된 점으로 미루어보아 독성 물질에 따라 영향을 받는 발달 단계가 다르거나 물질의 분자량의 차이 등으로 젤리층을 통과하는 정도에 차이가 있을 것으로 판단된다. 이렇게 난막을 통과하여 영향을 끼치는 독성물질들이 물속에 있기 때문에 배의 치사와 기형 발생이 유발되는 것이다.

2002년과 2004년의 자연발생 조사에서 나타난 연구의 결과는 충격적이었으며 일부 지역에서는 30% 가까운 사망률이 기록되었고, 기형 개체의 모습 속에서 환경의 질 저하에 따른 도롱뇽의 직접적인 피해를 확인할 수 있었다. 지역별로 보면 사망률과 기형률은 산청, 마산, 창원, 김해, 밀양 지역이 높게 나타났으며, 남해, 명석, 금산, 이반성과 고성 지역은 비교적 낮았다. 이는 산청을 제외한 서부경남 보다 동부 경남의 지역이 환경적인 질 저하가 심각하다는 것을 의미하는데 이러한 사실은 본 연구를 수행하는 동안 나타난 산란지 탐색의 어려움과 개체수의 감소로 인해 알주머니의 채집이 되지 않거나, 알주머니의 수가 적거나 채집된 배의 상태가 나빠 실험에 사용하기 어려워서 2004년도의 창원과 김해 지역이 실험 자료로서의 의미를 가지지 못한 점과 밀접한 관계가 있다. 실제로 밀양 지역의 한 채집지는 육안으로 보아도 수질의 악화가 확인될 수 있는 정도였지만 도롱뇽이 산란하였고 서식하고 있었다. 그러나 이들이 산란한 알들은 이미 대부분이 괴사되어 있었고, 도롱뇽의 성체에도 사지 기형과 피부의 수포 형성이 관찰되었다.

알주머니에서 부화한 개체 중 외형적 발생 이상을 일으킨 2,790개체에 대해 이상 빈도와 유형을 분석해 본 결과 한 개체가 적게는 1종류에서 많게는 8종류의 발생 이상을 보였으며, 기형 유형은 A~Z까지 26개의 종류로 요약 하였으며, 이

는 보는 관점에 따라 더 요약되거나 세분화 될 수 있다. 2년에 걸쳐 11개의 지역에서 기형 빈도와 유형을 분석해 본 결과 지역에 따라 많은 차이를 보였다. 이들을 4가지 그룹으로 구분해 보았을 때 전반적으로 기형 유형이 고루 분포하는 남해 지역을 제1그룹으로, 복부 수포 형성과 체축의 휨 증상이 많고 외새 형성 부전은 비교적 적은 산청, 창원 지역을 제2그룹, 외새 형성 부전이 압도적으로 많은 명석, 김해, 밀양 지역을 제3그룹, 외새 형성 부전과 복부 수포 형성이 비슷한 비율을 보이며 미부 형성 부전과 지느러미 형성 부전이 비교적 많은 거창, 금산, 이반성, 고성, 마산을 제4그룹으로 구분하였다. 이는 이러한 지역들을 그룹화하여 그룹의 토양과 물속의 독성 물질들, 주변의 환경적 요소 등을 종합적으로 분석해 보면 기형 현상을 유발하는 물질들에 대한 규명이 가능하리라 여겨지기 때문이다. 이러한 결과가 나오기 위해서는 보다 지속적이고 광범위한 변인들을 통제하여야 하는 어려움이 따르지만 충분한 조사가 이루어진다면 가능하리라 본다.

경상남도 일대의 전체 기형 유형을 분석한 결과 외새 형성 부전이 가장 빈번하였고, 복부 수포 형성, 꼬리 옆으로 휨, 지느러미 발육 부전, 미부 형성 부전 등이 비교적 빈번하게 확인되었다. 이는 창원 지역에서 꼬리 아래로 휨, 외새 형성 부전이 빈번하다는 보고(정 등, 1999)과 의령 지역에서 외새 형성 부전, 미부 형성 부전과 복부 수포 등이 빈번하게 나타난다는 보고(최, 2002)와 일치하였다. 또한 boron과 nitrate에 의해 도롱뇽의 복부가 부풀어 오르고 아가미 형태가 바뀌거나 소실되었고(Laposata *et al*, 1998), paraquat, 2, 4-D, amitraz를 개구리 배에 처리했을 때 척삭의 휨과 부종, 생장의 지연이 있었다(Oladimeji *et al*, 2002)는 보고와, Cadimum chloride를 *Xenopus* 배에 처리하였을 때 사망률과 다수의 기형, 즉 소화관 회전의 이상, 눈의 이상, 척삭의 구부러짐, 기형의 지느러미, 안면골 형성 장애, 심혈관계의 기형, 피부의 포진, 탈색, 성장 장애를 가져오며(Sunderman *et al*, 1992), 과량의 아연을 *Xenopus* 초기배에 처리하였을 때 복부가 부풀어 오르며 체장이 짧아지는 외형적 결함이 유발되었다(윤 등, 2003)는 보고에서처럼 자연 생태의 기형 유형은 이들 인자들과 무관하지 않을 것이며, 그 외에도 알려지지 않은 다양한 유발 인자에 의한 상호작용으로 일어나기 때문에 보다 심도 있는 조사가 보완되어야 한다.

외형적 이상이 있는 개체 중 심각한 기형 개체의 조직학적 이상을 관찰한 결과 주된 조직 이상 중 복부의 이상과 상피의 이상, 눈과 척삭의 이상, 신경관과 체축의 이상 등이 빈번하였으며 간과 신장의 이상, 연골 과다 형성과 이포의 이상은 비교적 적게 관찰되었다. 이것은 자연 상태에서 노출되어진 대부분의 독성 물질이 주로 복부와 상피, 눈과 척삭, 신경관과 체축의 형성을 방해하는 것이 많기 때문으로 판단되며, 이는 멕시칸 도롱뇽 axolotl(*Ambystoma mexicanum*)의 발달 동안 Valproic acid에 의해 신경계의 이상을 유발하고(Kratke *et al*, 1996),

atrazine, carbaryl, endosulfan과 octylphenol이 도롱뇽의 치사와 기형 현상에 영향을 주어 유생의 생존과 신경계에 이상을 초래하였다는 보고(Rohr *et al*, 2003)나 fenitrothion과 carbaryl이 *Xenopus laevis*의 발달동안 심장, 척수, 척삭의 이상을 일으켰으며(Elliott-Feeley *et al*, 1981), All-trans-retinoic acid(ATRA)와 All-trans-retinoyl-beta-D-glucuronide(ATRAG)는 도롱뇽의 두개 안면과 심혈관의 기형, 발달 지연과 신경관의 결손을 일으키고(Kratke et al, 2000), *Xenopus* 배에서 말라치온이 체적근육과 상피조직을 파괴한다는 보고(Snawder, 1993) 등에서 잘 나타난다. 이러한 사실들은 물속의 독성 물질과 농약의 잔류가 병리생리학적, 형태학적 변화를 야기 시키고 배의 정상적인 발달을 교란하여(Varnagy, 1999) 자연 발생의 이상 유형을 야기하는 데 중요한 인자로 작용한다는 것을 의미한다.

물속의 독성물질과 토양에 잔류하고 있는 농약이 일으키는 독성의 영향을 파악하고자 선택한 베노밀과 그 분해대사산물들의 연구에서는 10μM에서 베노밀의 경우 처리 2일째부터 시작하여 6일째 100% 치사하였고, 1μM에서는 처리 4일째부터 시작하여 8일째 100%로 치사하였다. 하지만 카벤다짐의 경우 10μM에서 처리 2일째 시작하여 4일째 급격히 감소하고 6일째 100% 치사하였고, 1μM에서는 처리 2일째부터 시작하여 6일째 100% 치사하였다. 따라서 베노밀 처리시 LC_{100}은 1μM 농도에서, LC_{50}은 100nM~1μM 사이인 것으로 확인되었으며, EC_{50}은 10nM~100nM의 사이인 것으로 예측된 반면, 카벤다짐의 독성 처리에서 LC_{100}은 1μM 농도에서, LC_{50}은 10nM~100nM 사이인 것으로 확인되어 베노밀보다 낮은 농도에서도 치명적인 영향을 받는 것으로 나타났으며, EC_{50}은 10nM~100nM의 사이인 것으로 예측되었다. 이러한 점은 *Xenopus leavis* 배에 stage 9시기에 처리된 베노밀의 LD_{100}과 LD_{50}이 40μM, 20μM(서, 2001)인데 비해 카벤다짐의 LD_{100}과 LD_{50}이 7μM, 5~6μM로 낮게 나온 연구(김, 2002)나 고환의 독성 유도에서 IC_{50}이 베노밀에서 75μM인데 비해 카벤다짐은 5μM이라는 보고(Lim, *et al*, 1997)와 유사한 경향을 나타낸다. BIC는 베노밀과 카벤다짐이 신경배의 초기에 영향을 주는 것과는 달리 부화 직전에 이르러서 생존율이 급감하여 처리 14일째에 40ppm의 농도에서 100% 치사되었다. 이는 BIC가 휘발성이 강하고 물위에 수막을 형성하므로 3중의 난막으로 침투하는데 베노밀이나 카벤다짐보다 느린 점과 독성물질에 따라 영향을 받는 발달 단계가 다르기 때문으로 해석된다.

베노밀과 카벤다짐, BIC의 기형 빈도와 유형은 비교적 유사한 점도 있지만 베노밀의 경우 외형적인 기형으로 복부 이상 팽대와 복부 수포와 같은 복부 이상이 많았고 지느러미나 두부 형성 부진, 몸통 옆으로 휨도 빈번하였다. 또한 조직학적으로는 눈의 이상과 신경관의 이상, 복부 조직의 파괴, 장의 암화된 조직, 갑상선종, 체절 근육의 이상들이 빈번하였다. 이것은 베노밀이 소화계와 신경계에

강한 독성을 일으키는 물질임을 의미하는 것으로 이러한 작용은 베노밀이 가지는 세포분열저해작용과 튜불린 중합을 저해하는 작용(Spencer *et al*, 1996)이 생장 및 변태에 악영향을 끼쳐 나타난다고 생각된다. 특히 신경관이 형성될 때 그 위쪽에 나타나는 신경제세포들은 배의 등 쪽으로 이동하여 말초신경계, 내분비계, 색소세포, 얼굴의 연골과 경골, 결합조직 등을 발생시키는데, 베노밀이 이들의 이동을 방해하여 비정상 발생을 일으키는 것으로 생각된다.

카벤다짐의 경우 외형적 기형으로 복부 수포 형성, 눈의 색소 형성과 두부 발육 부진이 많았고 안구 발달 부진과 외새 형성 부전도 비교적 빈번하였다. 또한 조직학적으로는 신경관의 이상과 눈의 이상이 많았고 복부의 내장 기관의 파괴와 암화 현상, 갑상선종, 체절근육의 이상 등 나타났다. 이것은 카벤다짐이 신경계와 소화계에 강한 배독성을 일으키는 물질임을 의미하는 것으로 이러한 작용은 카벤다짐에 의해 도관이 폐색되어 상피의 수포와 복부 팽만이 수반되고, 방추사 집합체의 형성을 방해 받거나 방추사 형성 시 방추사극을 분해되거나 파괴되고(Can *et al*, 1997), 미세소관의 저해와 조직 내부의 세포 간 결합이 영향을 받아 조직의 이상 발생을 일으키는 것으로 판단된다. 이처럼 베노밀과 유사하게 작용하는 것은 베노밀과 카벤다짐이 유사분열의 붕괴와 미세소관의 중합을 저해하며 더욱이 세포분열억제 작용과 튜불린 복합체의 저해를 일으킨다(Fitzerald, 1996)는 보고에서 그 이유를 찾을 수 있다.

BIC의 경우 외형적 기형으로 복부 수포 형성과 외새 형성 부전이 많았고 두부 형성 부진과 안구 발달 부진, 색소 형성 부진은 베노밀이나 카벤다짐보다 적게 나타났다. 또한 조직학적으로는 복부 내장기관과 상피의 약화와 팽대, 복부 조직의 암화, 미약하지만 아가미의 발달 저하와 두부의 이상과 눈의 이상도 확인되었다. 이것은 BIC도 베노밀, 카벤다짐과 마찬가지로 소화계에 강한 독성을 일으키는 물질임을 의미하는 것으로 이러한 작용은 효소와 같은 고분자 합성의 저해를 수반하여 Cytochrome P450의 세포 독소에 의한 세포 파괴 때문이라는 보고(Douch, 1973; Pauluhn *et al*, 1992)처럼 도롱뇽에 세포 독성 효과을 일으켰을 것으로 추정되며, 베노밀의 대사산물의 기능이 유도와 저해라는 상보적인 관계에서 볼 때 BIC는 베노밀의 저해 작용의 기능을 수행한다는 점에서 베노밀의 유사 기작에 따라 기형 현상이 유발되는 것으로 생각된다.

하지만 본 자연 발생 이상 조사에서 나타난 다양한 기형 현상들이 자연 상태에서 받을 수 있는 여러 가지 농약의 영향과 복합적인 시너지 효과, 알려지지 않은 인자들에 의한 잠재적인 효과가 있다는 점에서 베노밀과 그 분해대사산물에 의한 것만이 아니라는 사실을 간과해서는 안 될 것이다. 따라서 앞으로 지속적이고도 종합적인 보완과 추가 실험이 이루어져야 할 것이다.