

Chironomus flaviplumus (Diptera: Chironomidae)에 삼재적 환경교란물질, Tebufenozide 처리효과

곽인실·이원철*

한양대학교 자연과학대학 생명과학과

Effects of the Hormone Mimetic Insecticide Tebufenozide on *Chironomus flaviplumus* Larvae

Inn-Sil Kwak and Wonchoel Lee

Department of Life Science, Hanyang University, 17 haengdang-dong,
Seongdong-gu, Seoul 133-791, Korea

Abstract - We investigated the effects of molting-hormone insecticide tebufenozide on fourth larvae of the midge *C. flaviplumus* in growth development from fourth-instar to adult. Fourth-instar larvae were exposed test concentrations were chosen control, 10 µg L⁻¹, 30 µg L⁻¹, 60 µg L⁻¹ and 100 µg L⁻¹. In control and 10 µg L⁻¹, 10~20% individuals succeed adults while low emergence rates were observed surplus 30 µg L⁻¹. Death larvae appeared a various day along the concentration. We observed the converged day: control, 10 µg L⁻¹, 30 µg L⁻¹ and 60~100 µg L⁻¹ were day 4 to day 18, day 13 to day 16, day 9 to day 17 and day 9 to day 15, respectively. Therefore we concerned a tendency that exposure concentration was high, death period was short. Also, due to molting hormone disruption, development of midge was postponed relatively low concentration such as 10 µg L⁻¹. The converged days of pupa stage revealed control, 10 µg L⁻¹, 30 µg L⁻¹ and 60~100 µg L⁻¹ were day 11~15, day 16~20, day 9~15 and day 5~9, respectively. About 10% individuals grow up the pupa-stage in 60~100 µg L⁻¹ condition. Sex ratio of the emerged adults was not different in this study. Death pupae frequently appeared in day 13~16 in control, day 6~23 in 10 µg L⁻¹, day 13~16 in 30 µg L⁻¹ and day 6~16 in 60~100 µg L⁻¹.

Key words : Molting-hormone, *Chironomus flaviplumus*, Development delay

서 론

최근 들어 인위적인 활동에 의해 생태계에 유입된 화학물질 중 비록 매우 낮은 농도일지라도 인간과 동물의

호르몬 활동을 유발시키며 기능을 교란시키는 것으로 보고 되었는데 이를 내분비교란(endocrine disruption) 이라고 부르게 되었다(Colborn *et al.* 1993; Umweltbundesamt 1995; Ankley *et al.* 1998). 국내에서는 내분비계 장애물질에 대한 정의를 “인체나 생태계의 생물들에게 호르몬 분비의 불균형, 생식능력 저하 또는 생식기관의 기형 발생, 성장 저해, 암 유발, 그리고 면역 기능의

*Corresponding author: Wonchoel Lee, Tel. 02-2290-0951,
Fax. 02-2296-7158, E-mail. wlee@hanyang.ac.kr

저해 등의 효과를 나타내는 것으로 추정되는 화학물질들"이라고 하였다(국립환경연구원). 내분비계 장애물질의 일반적 특성은 다음과 같다. 첫째, 생체 호르몬과는 달리 생체 또는 환경 매체 내에서 분해 속도가 매우 느리고, 둘째, 물질이 유입된 환경 매체 내에 장기간 지속 존재하며, 셋째, 인체나 생체의 지방층에 농축되는 성질을 갖고 있다. 현재 내분비계 장애를 일으키는 것으로 추정되는 물질로 산업용 화학물질, 농약류, 유기중금속류, 다이옥신류, 식물성 에스트로젠(phytoestrogen) 등의 호르몬 유사물질, Diethylstilbestrol (DES)과 같은 합성의약품 등으로 보고 되어져 있다.

인위적인 활동에 의해 수생태계에 유입된 화학물질은 거의 모두 퇴적물의 형태로 하상에 침적되므로 여기에 서식하는 생물군집의 변화와 변동은 좋은 연구대상이다. 따라서 최근 해양과 조간대와 같이 인위적 자연적으로 방출된 환경물질이 가라앉은 지표수에 노출된 갑각류(crustacean)에 대한 연구가 이루어졌다(Baldwin *et al.* 1997; Depledge and Billingham 1999; LeBlanc and McLachlan 2000). 그러나 아직 담수생태계의 하상에 서식하는 수서곤충에 대한 직접적인 내분비계장애의 영향을 연구한 것은 거의 없다. 살충제인 tebufenozide는 곤충의 성장을 조절하는 약제로 분자수준에서 탈피호르몬의 길항물질(agonist)로 작용하는 것으로 밝혀졌고 따라서 곤충과 갑각류(crustacean)와 절지동물(arthropod)에 다양한 호르몬 효과를 유발시키는 것으로 보고되었다(Wing 1988; Clare *et al.* 1992; Dhadialla *et al.* 1998; Retnakaran *et al.* 1995). Tebufenozide는 Confirm, Romdan, Mimic이라는 이름으로 동남아시아에서는 벼농사에 사용되고 미국, 캐나다에서는 과수원, 산림과 농업에 사용되고 있다(Dhadialla *et al.*, 1998). 이 약제가 주로 나비류(lepidopteran)를 공격하므로(Sundaram *et al.* 1998) 안전한 물질로 고려되어졌었다. 불특정 수서절지동물에 대한 tebufenozide의 효과는 대다수 매우 높은 농도로 처리하여야 명백한 독성효과를 보인다고 하였다(Kreutzweiser *et al.* 1994, 1998; Pauli *et al.* 1999; Song *et al.* 1997). 따라서 교란에 지표성이 있는 생물종을 탐색하는 것은 중요하므로 이미 사육이 잘 체제화 된 *Chironomus riparius* Meigen을 대상으로 tebufenozide를 처리하기도 하였다(Hahn *et al.* 2001, 2002). 그러나 Hahn의 연구에는 처리에 따른 독성을 연구하는 데 그쳐 시간경과에 따른 개체의 발생에 따른 양상을 제시하지는 않았다. 또한 우리 나라의 하천에 유기물에 대한 지표성이 있는 것으로 알려진 종들이 소수 있으나 어떤 교란을 받고 있는가에 대한 연구는 매우 미미한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 유기물 지표성이 있는 *Chironomus*

flaviplumus (노랑털깔따구)를 대상으로 독성기작이 잘 연구되어져 있는 tebufenozide를 처리하여 시간경과에 따른 영향을 살펴보고자 시도하였다.

재료 및 방법

1. 실험생물 사육조건

*C. flaviplumus*의 알과 유충은 부산 석대천에서 채집하여 사육하였다. 낮과 밤 처리는 각각 16시간과 8시간으로 하였으며 광도 500 lx 수준을 유지시켜 향온기(Sanyo incubator MIR-553) 내에서 사육하였다. 온도는 $20 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도는 대략 70%를 유지하였다. 유충은 crystallizing dish에 고운 흙(입자 크기가 $600 \mu\text{m}$ 이하)을 1 cm 두께로 깔고 M4배지를 500 ml 넣어주었다. 먹이로는 테트라민(TetraMin, Tetra-Werke, Melle, Germany)을 미세하게 처리한 후 현탁액 상태로 공급하였다.

실험생물은 300 ml crystallizing dish에 200 ml의 M4 배지로 채웠다. 노출실험은 노출기간 동안 사육수의 교체 없는 조건(static condition)하에서 하였으며 수분감소는 매일 점검하여 200 ml 수준으로 유지시켰다. 공기는 매일 일정시간동안 공급하여 결핍을 방지하였다. 각 실험조에는 20마리의 4령충을 투입하였다. 동일 알덩이에서 올라온 개체들이 아니므로 두둑과 체장이 유사한 개체들을 추출하여 사용하였다.

2. 투입약제와 노출

Tebufenozide (Sigma-Aldrich, product No. 46095)는 stock solution (20 mg L^{-1})을 만들어서 사용하였으며 농도는 $10 \sim 100 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서 정하였다. 약제로 사용되는 tebufenozide는 탈피호르몬과 유사기능을 하는 것으로 밝혀져 있어(Nijhout 1994) 우화시기가 가까운 4령충에 control, $10 \mu\text{g L}^{-1}$, $30 \mu\text{g L}^{-1}$, $60 \mu\text{g L}^{-1}$ 와 $100 \mu\text{g L}^{-1}$ 로 처리하였다. 약제의 반감기(half-time)는 40일로(Sundaram 1997) 실험기간 동안 노출에 따른 시간경과가 문제가 되지 않을 것으로 사료되었다. 약제 처리가 성비(sex ratio)에 영향을 주는지, 높은 농도에서 치사효과가 있는지를 보고자 하였다. 또한 부화사고(emergence accident)와 번데기(pupae)의 치사를 매일 측정하였다.

결과 및 고찰

실험은 노출 후 15~25일 이내에서 우화가 모두 이루어

어졌다. 비처리 (control)에서 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ 까지는 17~26일 이내에 우화가 완료되었으나 60~100 $\mu\text{g L}^{-1}$ 의 처리에서는 15~17일 내에 우화가 일어났다. 반복은 각 농도별로 약 60개체로 총 300마리를 대상으로 3회에 걸쳐 수행하였다. 노출기간 동안 4령충의 발생 진행을 보면 비처리와 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ 에서는 10~20%가 성충으로 우화에 성공하였으나 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ 이상에서는 성충으로 우화한 비율이 매우 저조하였다 (Fig. 1). 또한 유충의 치사도 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ 이상에서 급격히 증가하여 80%를 차지하였다. 발생 단계별로는 번데기 (pupa)와 탈피 후 우화에 성공한 비율이 처리에 따라 가장 많은 차이를 보였다.

각 농도처리 후 시간경과에 따른 4령충의 사망수를 비교해 보면, 비처리에서는 4일 후부터 치사되기 시작하여 18일로, 10~30 $\mu\text{g L}^{-1}$ 에서는 4~24일까지, 60~100

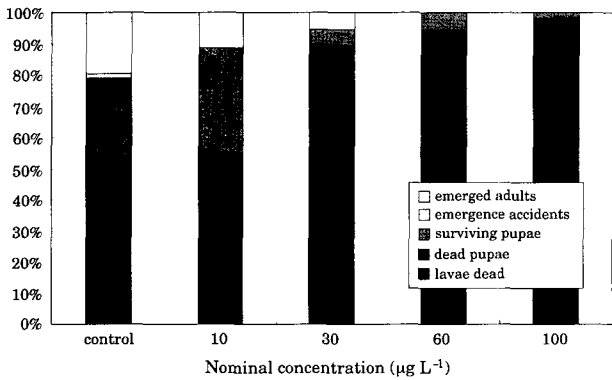


Fig. 1. Rates of emerged adults, emergence accidents, surviving pupae, dead pupae, and dead larvae in *Chironomus flaviplumus* after exposure to various concentrations of tebufenozide in fourth-instar larvae.

$\mu\text{g L}^{-1}$ 처리 시에는 4일에서 17일까지 분포하는 것으로 나타났다 (Fig. 2). 특히, 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ 처리에서는 20일 이후에도 치사되는 유충이 관찰되어 유충호르몬 (juvenile hormone)에 비해 탈피호르몬 (molting hormone)의 양이 부족하여 발생이 지연되고 있는 것으로 사료되었다. 비처리에서는 성장하여 우화까지 이루어지는 수가 많아 치사되는 수는 상대적으로 적었으나 약제 처리시에는 집중 치사되는 기간은 농도별로 차이를 보였다. 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ 에서는 13~16일, 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ 에서는 9~17일, 60~100 $\mu\text{g L}^{-1}$ 에서는 9~15일로, 노출농도가 높으면 집중치사 기간이 짧아졌다. 고농도인 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ 에서는 번데기 단계까지 성장하는 개체는 8%에 그쳤으며 이 개체들은 6~15일 내에 치사되는 것으로 나타났다 (Fig. 3).

성장하여 번데기상태에 도달한 개체수를 측정하였다 (Fig. 3). 비처리에서는 9~21일에 걸쳐서 나타났으며 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ 에서는 5~24일, 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ 에서는 9~15일, 60~100 $\mu\text{g L}^{-1}$ 에서는 5~9일에 걸쳐 나타났다. 노출농도가 높았던 60~100 $\mu\text{g L}^{-1}$ 에서는 처리 개체 중에 10% 미만이 살아있는 번데기상태로 관찰되었으며 (Fig. 1) 9일 후에는 나타나지 않았다. 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ 의 경우도 10% 미만이 번데기 상태에 도달하였으나 60~100 $\mu\text{g L}^{-1}$ 노출보다 출현시기가 늦어 9~15일 동안 관찰되었다. 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ 에서 집중적으로 나타난 시기는 16~20일로 비처리 (집중 출현시기; 11~15일)에 비해 지연되어져 나타났다. 따라서 처리 약제가 탈피호르몬의 기능을 교란시켜 정상적인 발생을 지연시키는 것으로 사료된다.

번데기 상태로 치사한 개체수를 검토해 보았다. 비처리 시에는 13~16일 동안에 집중적으로 나타났다 (Fig. 4). 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ 처리 시에는 앞서 언급하였던 발생지연되는 경향이 반영되어 번데기상태로 치사되는 개체가 출

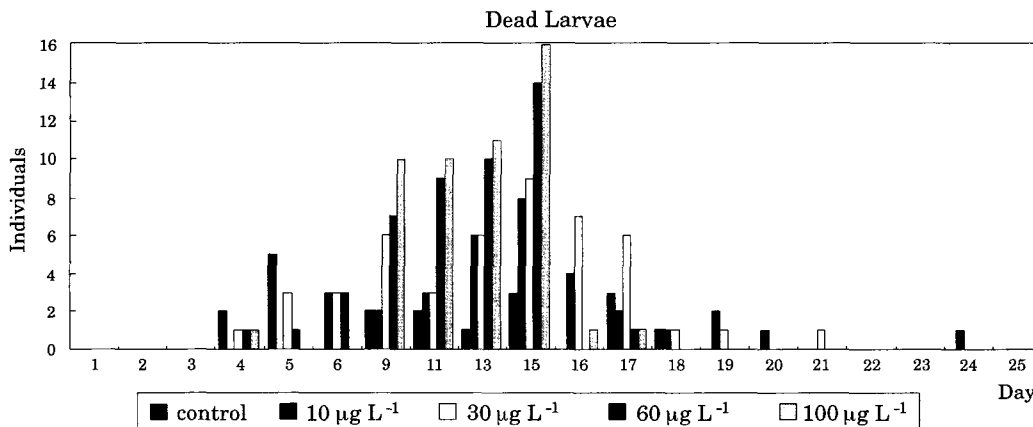


Fig. 2. Number of dead larvae in *Chironomus flaviplumus* after exposure to various concentrations of tebufenozide in fourth-instar larvae.

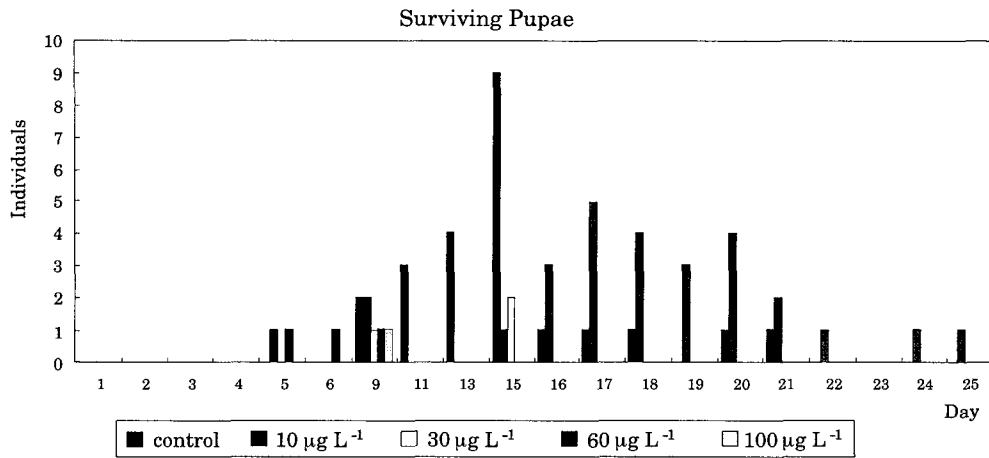


Fig. 3. Number of surviving pupae in *Chironomus flaviplumus* after exposure to various concentrations of tebufenozide in fourth-instar larvae.

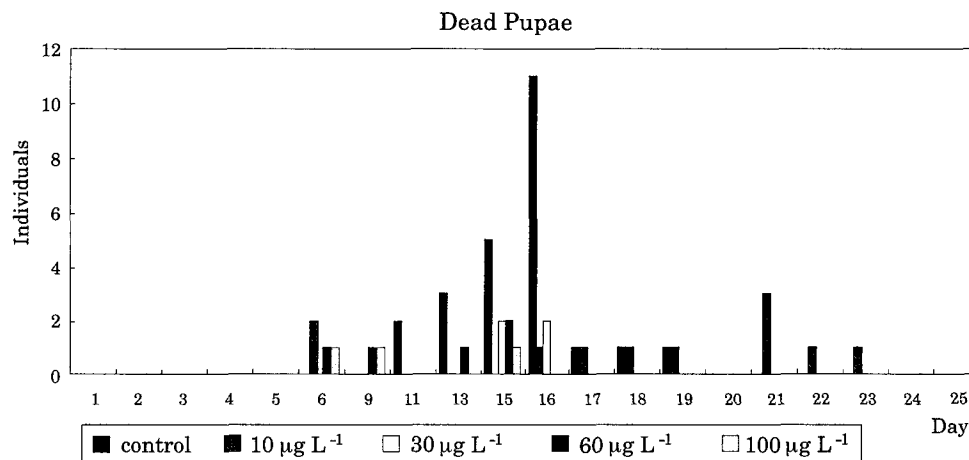


Fig. 4. Number of dead pupae in *Chironomus flaviplumus* after exposure to various concentrations of tebufenozide in fourth-instar larvae.

현한 시기도 6~23일로 넓은 분포를 보였다. 이와는 대조적으로 30 µg L⁻¹ 처리에서는 13~16일의 비교적 짧은 기간 내에 치사가 발생하였으며 60~100 µg L⁻¹ 처리에서는 6~16일 동안에 치사가 되는 것으로 나타났다. 따라서 60~100 µg L⁻¹ 노출농도에서는 유충단계에서 치사되지 않고 번데기에 도달하더라도 17일 이내에 사망하는 것으로 측정되었다. 언급하였던 바와 같이 10 µg L⁻¹에서는 번데기 상태에 치사되는 양상이 처리 21일 이후에도 조사되어 발생지연 뒀을 보여 주었다.

이상에서 국내 하천에서 오염지표성이 있는 것으로 보고 된 *Chironomus flaviplumus*를 대상으로 탈피호르몬 기작을 교란시키는 것으로 알려진 tebufenozide를 처리하여 번데기화와 우화를 살펴보았다. 상대적으로 농

도가 높은 60~100 µg L⁻¹에서는 치사되는 개체수가 증가하여 번데기에서 우화하는 개체수가 10%를 넘지 않았다. 반면, 저농도인 10 µg L⁻¹에서는 유충시기가 길어지거나 번데기가 되더라도 성충으로 되는 시기가 연기되는 발생지연 현상이 나타났다.

적 요

잠재적인 교란물질로 사료되는 농약제인 tebufenozide를 *C. flaviplumus* (노랑털갈따구)에 처리하여 성장발달을 장기적으로 조사하였다. *C. flaviplumus*의 4령충에 control, 10 µg L⁻¹, 30 µg L⁻¹, 60 µg L⁻¹와 100 µg L⁻¹의 농

도로 약제를 처리하였다. 비처리와 $10 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서는 10~20%가 성충으로 우화에 성공하였으나 $30 \mu\text{g L}^{-1}$ 이상에서는 성충으로 우화한 비율이 매우 저조하였다. 4령기 유충의 집중치사 시기는 비처리에서는 4일부터 18일로, $10 \mu\text{g L}^{-1}$ 처리에서는 13~16일, $30 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서는 9~17일, $60\sim 100 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서는 9~15일로 노출농도가 높으면 치사가 발생하는 시간이 짧아졌다. 상대적으로 저농도인 $10 \mu\text{g L}^{-1}$ 노출에서는 유충의 치사가 19~24일 사이에도 관찰되어 탈피호르몬의 교란으로 인해 발생이 지연되고 있음을 볼 수 있었다. 성장하여 번데기상태에 도달하는 집중시기를 보면 비처리에서는 11~15일, $10 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서는 16~20일, $30 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서는 9~15일, $60\sim 100 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서는 5~9일에 걸쳐 나타났다. 고농도인 $60\sim 100 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서 처리 개체 중에 10% 미만이 살아있는 번데기 상태로 관찰되었다. 또한 $10 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서는 16~20일로 비처리(11~15일)에 비해 발생지연이 나타났다. 우화에 성공한 개체들의 암컷과 수컷의 비율에는 차이가 없었다. 번데기 상태로 치사된 시기는 비처리 시에는 13~16일 동안에 집중적으로 나타났으며 $10 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서는 6~23일로 넓은 분포를 보여 발생지연이 반영되었다. $30 \mu\text{g L}^{-1}$ 처리에서는 13~16일, $60\sim 100 \mu\text{g L}^{-1}$ 처리에서는 6~16일 동안에 치사되는 것으로 나타났다.

사 사

이 논문은 2002년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음(KRF-2002-005-C00022).

참 고 문 헌

- Ankley G, E Mihaich, R Stahl, D Tillitt, T Cloborn, S McMaster, R Millier, J Bantle, P Campbell, N Denslow, R Dickerson, L Formar, M Fry, J Giesy, LE Gray, P Guiney, T Hutcison, S Kennedy, V Kramer, G LeBlanc, M Mayes, A Nirmrod, R Patino, G van der Kraak and T Zacharewski. 1998. Overview of a workshop on screening methods for detecting potential (Anti-) Estrogenic/Androgenic chemical in wildlife. *Environ. Toxicol. Chem.* 17:68-87.
- Baldwin WS, SE Graham, D Shea and GA LeBlanc. 1997. Metabolic androgenization of female *Daphnia magna* by the xenoestrogen 4-nonylphenol. *Environ. Toxicol. Chem.* 16:1905-1911.
- Clare AS, D Rittschof and JD Costlow. 1992. Effects of nonsteroidal ecdysone mimic RH 5849 on larval crustaceans. *J. Exp. Zool.* 262:436-440.
- Colborn T, FS vom Saal and AS Soto. 1993. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health Perspect* 101:378-384.
- Depledge MH and Z Billingham. 1999. Ecological significance of endocrine disruption in marine invertebrates. *Mar. Pollut. Bull.* 39:32-38.
- Dhadialla TS, GS Carlson and P LeDat. 1998. New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. *Annu. Rev. Entomol.* 43:545-569.
- Hahn T, L Matthias and S Ralf. 2001. Effects of the Hormone Mimetic Insecticide Tebufenozide on *Chironomus riparius* Larvae in Two Different Exposure Setups. *Toxicol. Environ. Saf.* 49:171-78.
- Kreutzweiser DP, SS Capell, KL Wainio-Keizer and DC Eichenberg. 1994. Toxicity of a new molt-inducing insecticide (RH-5992) to aquatic macroinvertebrates. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 28:14-24.
- DP Kreutzweiser, JM Gunn, DG Thompson, HG Pollard and MJ Faber. 1998. Zooplankton community responses to a novel forest insecticide, tebufenozide (RH-5992), in littoral lake enclosures. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 55:639-648.
- LeBlanc GA, and J McLachlan. 2000. Changes in the metabolic elimination of testosterone following exposure of the crustacean *Daphnia magna* to tributyltin. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 45:296-303.
- Pauli BD, DR Coulson and M Berrill. 1999. Sensitivity of amphibian embryos and tadpoles to MIMIC 240LV insecticide following single or double exposure. *Environ. Toxicol. Chem.* 18:2538-2544.
- Retnakaran A, K Hiruma, SR Palli and LM Riddiford. 1995. Molecular analysis of the mode of action of RH-5992, a lepidopteran-specific, non-steroid agonist. *Insect hem. Mol. Biol.* 25:109-117.
- Song MY, JD Stark and JJ Brown. 1997. Comparative toxicity of four insecticides, including imidacloprid and tebufenozide, to four aquatic species. *Environ. Toxicol. Chem.* 16:2494-2500.
- Sundaram M, SR Palli, PJ Krell, SS Sohi, TS Dhadialla and A Retnakaran. 1998. Basis for selective action of a synthetic molting hormone agonist, RH-5992 on lepidopteran insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28:693-704.
- Umweltbundesamt (Ed.). 1995. *Umweltchemikalien mit endokriner Wirkung*. UBA Texte 65/95, Berlin.
- Wing KD. 1988. RH-5849, a nonsteroidal ecdysone agonist: Effects on a *Drosophila* cell line. *Science* 241:467-469.

(Received 18 December 2002, accepted 20 February 2003)