

살충제 imidacloprid의 붕어(*Carassius auratus* L.)중 행적 및 장기에 대한 독성

임양빈 · 김찬섭¹ · 이희동¹ · 김대규² · 경기성^{2*}

농업과학기술원 농업환경부 토양관리과, ¹농산물안전성부 농약평가과,
²충북대학교 농업생명환경대학 농화학과

요약 : 살충제 imidacloprid(1-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-N-nitroimidazolidin-2-ylideneamine)의 붕어(*Carassius auratus* L.) 체내 행적과 장기에 미치는 영향을 구명하기 위하여 imidacloprid를 환경추정농도인 0.064 mg kg⁻¹로 처리한 시험수에 붕어를 4일간 경시적으로 노출시켰다. 수중의 imidacloprid는 붕어체내에 흡수되어 노출 2일차에 최대 흡수량을 나타내었으며, 다른 장기에 비해 쓸개에서 농도가 가장 높았다. 붕어 사육수에서 미확인 주대사산물과 imidacloprid urea가 대사산물로 검출되었다. 또한 붕어체내에 흡수된 imidacloprid의 주요 배설경로는 담도이었으며, 장기에 대한 조직학적 이상증상은 발견되지 않았다. (2006년 11월 23일 접수, 2006년 12월 23일 수리)

색인어 : imidacloprid, crucian carp, behavior, enterohepatic recirculation.

서 론

농약은 환경과 농산물 중 안전성에 대한 논란과 우려에도 불구하고 농산물의 증산, 작부체계 및 재배 방법의 개선, 품질과 저장성의 향상 및 노동력 절감 등 여러 면에서 필수적인 농업자재이다. 또한 농약은 주로 농작물 및 토양 등 농업환경에 직접적으로 투입되어 사용되는데 농작물에 살포된 농약은 대부분 작물체에 부착되어 약효를 나타내며, 그 중 일부는 토양표면 및 수면에 떨어지고, 일부는 대기 중으로 비산된다. 또한 토양 중에 살포된 농약들은 식물의 뿌리를 통하여 식물체내로 이동되며, 일부는 유기물 등에 흡착되고 극히 일부는 강우에 의하여 지하수 및 강으로 이동하게 된다.

Imidacloprid (1-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-N-nitroimidazolidin-2-ylideneamine)는 neonicotinoid계의 침투성 살충제로써 국내에서는 1993년에 imidacloprid 2% 입제가 등록된 후 사용량이 매년 증가하여 2005년에는 66,732 a.i. kg이 출하되었다(농약연보, 2005).

Imidacloprid는 물에 대한 용해도가 610 mg L⁻¹(20°C)로 높고(The Pesticide Manual, 2003) 화합물의 이동성의 지표로 사용되는 토양 유기탄소기준 흡착계수(K_{oc})가 228~249 낮아(임 등, 2006) 토양입자에 흡착은 적으나 포장에서는 잔류기간이 길어 반감기는 27~229

일에 이르며(Miles inc, 1993), 토양에 작물을 재배하는 조건에서 반감기는 48일이었으나 작물을 재배하지 않는 조건에서는 반감기가 190일까지 증가하였다고 보고하였다(Scholz와 Spiteller, 1992). 토양표면에서는 광분해에 의하여 분해되어 반감기가 38일로 크게 감소하였으나, 광이 없는 조건의 포장에서 반감기는 229일로 증가하였으며, 실내에서의 반감기는 997일까지 증가되는 것으로 알려져 있다(Miles Inc., 1993).

토양 중 반감기가 길고 물에 대한 용해도가 높은 imidacloprid가 표면유실(runoff)에 의해 수계에 유입될 가능성이 높을 뿐만 아니라 벼멸구, 딱노린재, 애멸구, 벼물바구미 등을 방제하기 위한 수도용으로 사용하고 있어(농약사용지침서, 2006) 수계에 유입될 가능성이 높아 수생 어류에 대한 영향이 예상된다.

따라서 본 시험에서는 최근 국내에서 사용량과 사용 빈도가 높은 농약인 살충제 imidacloprid에 대하여 농업환경에 투하 후 하천수를 통하여 생태계 서식 수생생물에 대한 영향을 조사하기 위하여 국내 토종 어종인 붕어에 노출시켜 각 장기별 분포와 생물농축성 및 병리조직학적인 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

시험 화합물

Imidacloprid의 붕어체내 행적을 구명하기 위하여

*연락처자

[¹⁴C]imidacloprid(비방사능 4.2 MBq mg⁻¹, 순도 99.7%)와 비표지 imidacloprid(순도 99.5%)를 Bayer사로부터 분양받아 사용하였으며, 그 화학구조 및 표지위치는 그림 1에 제시하였다.

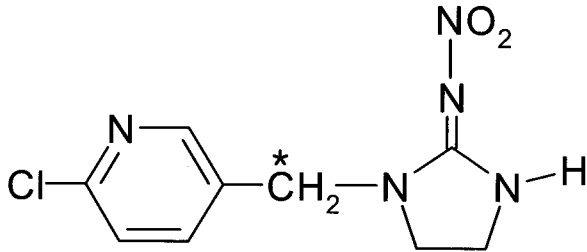


Fig. 1. Structural formula and labeled position(*) of imidacloprid (1-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-N-nitroimidazole-2-ylideneamine).

시험용 어류 및 시험수

시험용 어류는 청평내수면연구소에서 분양받은 붕어 (*Carassius auratus* L.)의 치어를 실험실 조건에서 10개월간 순화시켜 사용하였으며, 평균 전장은 15.0±1.1 cm, 평균체중은 53.5 ± 8.5 g이었다. 시험수는 24시간 동안 통기(aeration)시킨 지하수를 사용하였으며, 이 시험수는 pH 7.4, DO 8.0 mg kg⁻¹, 수온 23 ± 1°C, CaCO₃ 25.4 mg kg⁻¹이었다.

환경추정농도(predicted environmental concentration, PEC) 산출

벼 재배시 발생하는 벼멸구를 방제하기 위하여 벼 재배 논에 이미다클로프리트 액제 (4% imidacloprid)의 2,000배 희석액을 10 a당 160 L 살포(제품은 4% 액제 80 mL 10a⁻¹)하였을 때 살포된 imidacloprid가 수심 5 cm인 논물에 전량 용해된 경우를 가정하여 다음 식으로부터 환경추정농도를 산출하였다.

$$\text{환경추정 농도} = \frac{10 \text{ a당 제품농약 살포량(mL)} \times \text{제품농약중 주성분 함량 (\%)}}{\text{수심 5 cm인 10 a 논물의 양(L)} \times 100}$$

노출시험 및 시료채취

20 L의 유리수조(내경 28.5 × 높이 37 cm)에 24시간 통기시킨 시험수 6 L를 담고, 223.11 kBq의 [¹⁴C]imidacloprid와 비표지 imidacloprid를 합하여 환경추정농도(PEC)인 0.064 mg L⁻¹ 되게 처리한 후 24시간 절식시킨 붕어를 2반복으로 처리구당 3 마리씩 넣고 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72, 96 시간 각각 노출시켰다. 노

출이 끝난 붕어는 흐르는 물로 외부를 세척한 후 1 mL 소형주사기를 이용하여 척추 동맥으로부터 혈액을 채취하고 간, 심장, 쓸개, 부레, 신장, 내장, 근육 및 생식소(정소 및 난소)를 적출하였다.

시료 추출

어체 30 g을 취하여 원통여지(thimble filter, 33 × 80 mm, Advantec Toyo Roshi Kaisha, Ltd, Japan)에 담아 Soxhlet 추출장치(Soxtherm 2000 automatic, Gerhardt, Germany)에 연결하고 acetonitrile 140 mL를 가한 후 200°C의 hot plate 상에서 40분간 열탕 추출하고 1시간 동안 재차 추출하였다. 추출액을 500 mL 분액여두에 옮긴 후 n-hexane 50 mL로 액액분배하여 n-hexane 층을 버리고 acetonitrile층을 감압농축기를 이용하여 농축한 후 imidacloprid의 대사산물을 분석하는데 사용하였다.

시험수중 ¹⁴C의 수상(aqueous phase)과 유기상(organic phase)간 분배

[¹⁴C]imidacloprid를 처리하고 잉어를 사육한 사육수중 극성대사산물이 어느 정도 생성되었는지를 알아보기 위하여 5 mL의 시험수와 동량의 dichloromethane으로 분배 추출한 후 분리된 각층에서 2 mL를 취하여 방사능을 측정하였다.

Thin-layer chromatography와 autoradiography

시료중 imidacloprid의 대사산물 분포를 알아보기 위한 TLC는 TLC용 glass plate (Kieselgel 60F254, 20×20 cm, Merck, Germany)에 분석시료를 spotting하여 ethyl acetate-isopropanol-water(65:23:12, v/v/v) 혼합액으로 전개시킨 후 X-ray film (X-OMAT, 20.3 × 25.4 cm, Kodak, Japan)에 21일간 직접 노출시켜 현상기(Fuji Medical Film Processor, FPM 1200, Japan)로 현상하여 auto-radiogram을 얻었다.

방사능 측정

붕어의 각 장기에 흡수된 방사능은 측정하기 위하여 세절한 생체시료 0.1 g에 조직용해제 (Beckman tissue solubilizer-450, BTS, Beckman) 1 mL를 첨가하여 실온에서 1일간 방치하고 30% H₂O₂ 용액을 3방울 첨가하여 색깔을 제거한 후 Ready-organic (Packard, U.S.A.) 15 mL를 첨가하여 액체섬광계수기(liquid scintillation counter, LSC, Tri-Carb 1600 TR, Packard, U.S.A.)로 방사능을 측정하였다.

한편 어류 사육수 중 방사능은 사육수 5 mL를 취하여 15 mL의 Aquasol (DuPont, NEN Research Products, U.S.A.)을 첨가한 후 4°C의 암소에서 24시간 안정시킨 후 방사능을 계측하였다.

장기(간과 신장) 및 생식소의 조직병리학적 분석

적출하여 중성 포르말린액에 고정시킨 붕어의 장기(간과 신장)와 생식소를 1~2 mm 크기로 세절하여 조직처리기 (tissue processor, Leica TP 1020, Germany)를 이용하여 탈수 및 탈지하고 microtome (Leica RM 2145, Germany)을 이용하여 3~5 µm 두께로 박절한 후 hematoxylin과 eosin 염색을 하여 광학현미경 (Axiolab RE, Zeiss, Germany)으로 조직병리학적 검사를 실시하였다.

결과 및 고찰

환경추정농도 산출

벼 재배시 발생하는 벼멸구를 방제하기 위하여 벼 재배 논에 이미다클로프리트 액제 (4% imidacloprid)의 2,000배 희석액을 10 a당 160 L 살포(제품은 80 mL 4% 액제/10 a)하였을 때 살포된 imidacloprid가 수심 5 cm인 논물에 전량 용해된 경우를 가정하여 구한 환경추정농도는 0.064 mg L⁻¹이었다.

$$\frac{80 \text{ mL} \times 0.04}{50,000 \text{ L}} = 0.064 \text{ mg L}^{-1}$$

시험수중 imidacloprid의 경시적 농도

벼 재배시 발생하는 벼멸구 방제용으로 이미다클로프리트 4% 액제를 사용했을 때의 환경추정농도 0.064 mg L⁻¹에 붕어를 4일간의 노출시키는 시험기간 동안

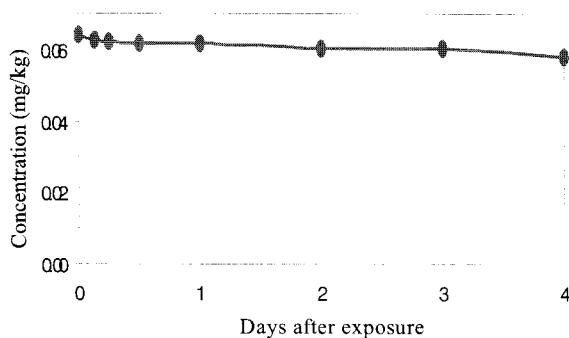


Fig. 2. Concentration of imidacloprid in test water during 4 days of exposure to crucian carps.

시험수중 imidacloprid의 경시적 농도는 그림 2에서 보는 바와 같이 처리 직후에는 최초 처리농도인 0.064 이었으나 처리후 4일차의 농도는 0.058 mg L⁻¹로써 초기농도의 약 91% 수준이었으며, 4일간 평균 농도는 0.061 ± 0.0018 mg L⁻¹이었다.

붕어체내 장기중 ¹⁴C의 경시적 분포

Imidacloprid를 환경추정농도인 0.064 mg L⁻¹되게 처리한 시험수에 4일간 노출시킨 붕어의 부위 및 장기별 imidacloprid와 그 대사산물의 경시적 분포는 그림 3에서 보는 바와 같이 다른 장기 중 잔류량과 비교할 때 쓸개 중 잔류량이 현저히 높았으며, 그 다음으로 간에서 높았다. 이 결과는 독성물질의 배설에는 일반적으로 신장과 담즙을 통한 배설이 가장 중요하다는 보고(이, 1993)와 신장 중 잔류량이 쓸개에 비해 현저히 낮은 것을 고려하면 imidacloprid는 신장보다는 담도를 통하여 배설되는 것으로 보인다. 또한 [¹⁴C]metolachlor를 처리한 사육수에 잉어를 노출시켰을 때 쓸개 중 [¹⁴C]metolachlor의 잔류량이 다른 장기에 비해 현저히 높았으며, 이는 잉어 아가미의 filament와 피부를 통하여 혈액에 흡수된 후 간과 쓸개 및 장을 거친 후 혈액을 거쳐 순환하는 enterohepatic recirculation 과정을 거쳐 체외로 배설(Levine, 1990; Amdur, 1991; Hodgson과 Levi, 1994; Matthew, 1994)된다는 경 등(1999)의 연구 결과와 일치하였다.

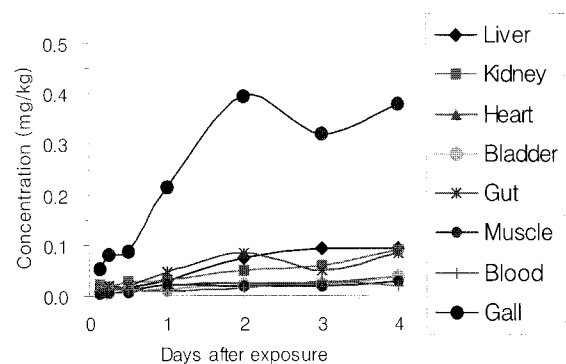


Fig. 3. Concentration of imidacloprid in crucian carp tissues as a function of exposure time. Concentration of imidacloprid in test water was calculated as imidacloprid equivalents on the basis of the specific activity of [¹⁴C]imidacloprid.

붕어 사육수 중 ¹⁴C의 수상과 유기상간의 분배

[¹⁴C]Imidacloprid를 처리하고 잉어를 사육한 사육수 중 극성대사산물이 어느 정도 생성되었는지를 알아보

기 위하여 행한 사육수중 ^{14}C 의 수상과 유기상간의 분배시험 결과는 그림 4에서 보는 바와 같이 처리 후 3시간에 수상으로 약간 분배되었을 뿐 그 이후는 거의 변화가 없었다. 이는 imidacloprid의 log Kow값이 0.57 (21°C)로써 (The Pesticide Manual, 2003) 여체 내에서 생물농축이 일어날 가능성이 거의 없어 체내 흡수 후 쉽게 배설될 것으로 추정되기 때문에 극성대사산물의 형성 가능성은 매우 낮을 것으로 판단되었다.

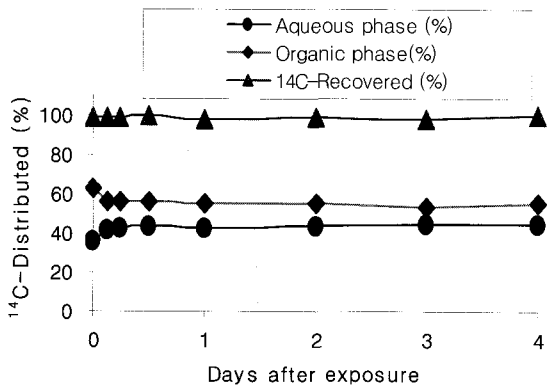


Fig. 4. Distribution of ^{14}C in test water between aqueous phase and organic phase during 4 days of exposure to crucian carps.

대사산물의 분석

붕어 사육수 추출액의 autoradiogram은 그림 5에서 보는 바와 같이 미확인 대사산물이 주 대사산물이었으며, 미량 대사산물로 imidacloprid urea가 검출되었다. Moza (1988)와 Wamhoff와 Schneider(1999)는

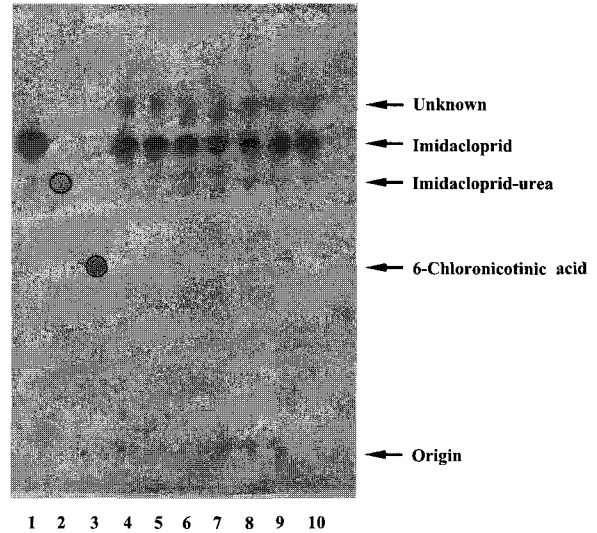
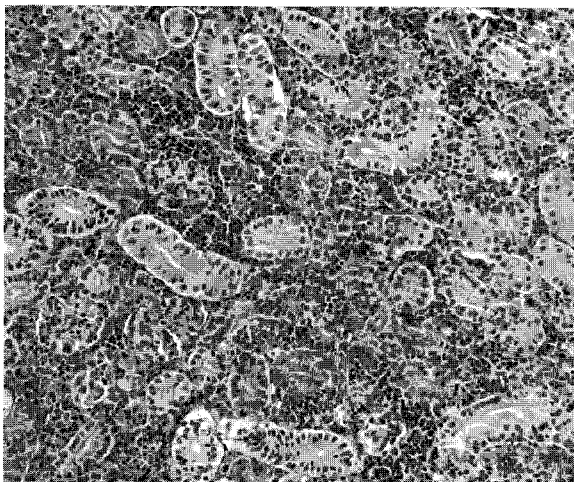


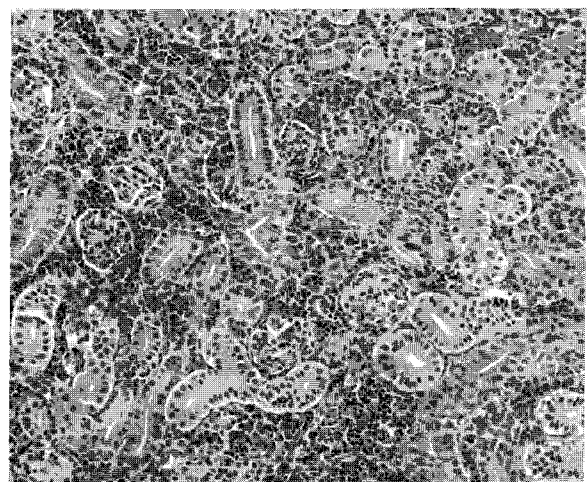
Fig. 5. Autoradiogram of the extracts of test water during 4 days of exposure to crucian carps after treatment of [^{14}C]imidacloprid. The location of the spots for imidacloprid urea and 6-chloro-nicotinic acid were confirmed by UV irradiation.

1, Authentic [^{14}C]imidacloprid; 2, authentic imidacloprid urea; 3, authentic 6-chloronicotinic acid; 4, exposed for 3 hours; 5, exposed for 6 hours; 6, exposed for 12 hours; 7, exposed for 24 hours; 8, exposed for 48 hours; 9, exposed for 72 hours; and 10, exposed for 96 hours.

imidacloprid는 수중에서 광에 의하여 쉽게 분해되어 6-chloronicotinaldehyde, 6-chloro-N-methylnicotinacidamide, 6-chloronicotinic acid, 6-chloro-3-pyridyl-methylethylendi amine, imidacloprid urea 등이 생성된다고 보고하였으며, 임 등(2004)은 수중 광분해산물인 imidachloprid



A



B

Fig. 6. Typical microscopic pictures of the kidney of the crucian carp exposed to imidacloprid for 4 days. A, Control and B, exposed to imidacloprid for 4 days.

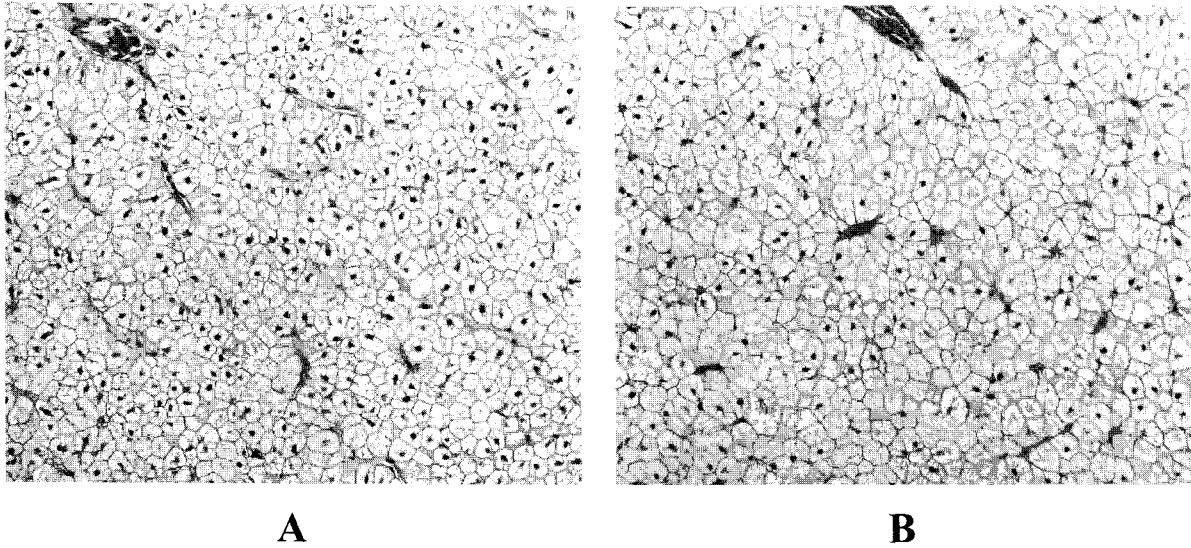


Fig. 7. Typical microscopic pictures of the liver of the crucian carp exposed to imidacloprid for 4 days.

A, Control and B, exposed to imidacloprid for 4 days.

urea가 최고 0.026 mg kg⁻¹ 검출되었다고 보고하였다. 그러나 이 연구에서는 붕어 사육수에서 imidacloprid urea만이 검출되어 광분해 실험과는 다른 대사 경향을 나타내었다.

붕어의 장기에 미치는 imidacloprid의 영향

환경추정농도에 경시적으로 노출시킨 후 간과 신장 및 생식소(정소와 난소) 조직중 병리조직학적 이상증상의 유무를 관찰한 결과 그림 6, 7, 8, 9에서 보는 바와 같이 대조구와 비교해 볼 때 특별한 이상 증상을 발견할 수 없었다. 경 등(1999)은 metolachlor의 LC₁₀ 농도인 1.93 mg kg⁻¹에 잉어를 노출시켰을 때 신

장을 통한 독성물질의 배설과정에서 체내에 유입된 독성물질에 의해 세뇨관이 괴사하는 초자적(hyaline droplet)과 사구체의 기능 중 수분은 통과시키고 단백질은 통과시키지 않는 사구체 역과기증의 이상으로 단백질이 통과되어 세뇨관내에 단백질주(protein cast)를 형성하는 이상 증상을 발견하였다고 보고를 근거로 할 때 imidacloprid는 간과 신장에 대한 독성은 낮은 것으로 판단되었다.

감사의 글

이 논문은 2005학년도 충북대학교 학술연구지원사

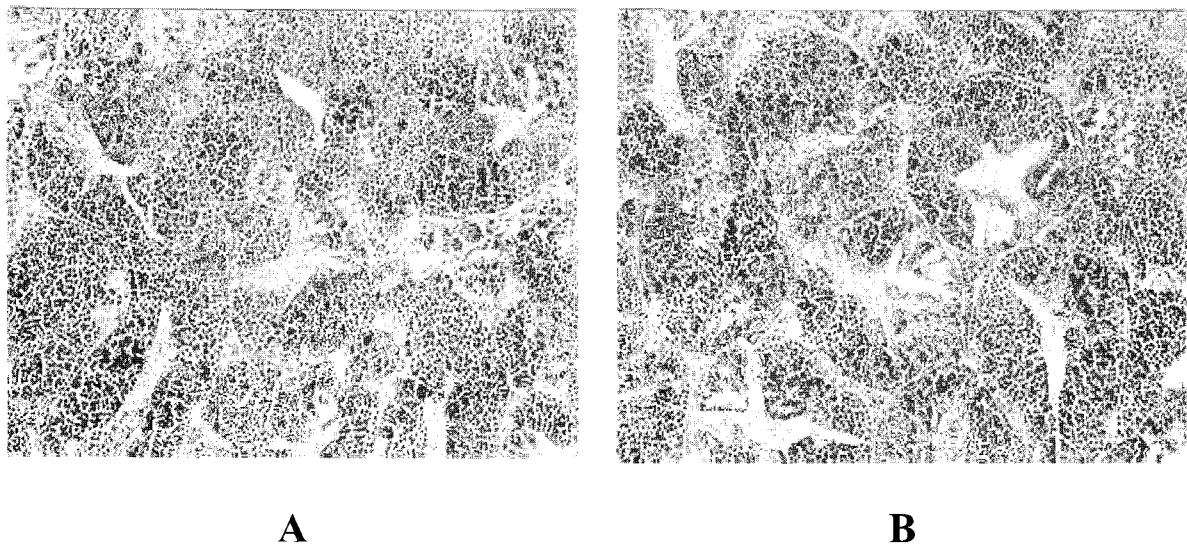


Fig. 8. Typical microscopic pictures of the testis of the crucian carp exposed to imidacloprid for 4 days.

A, Control and B, exposed to imidacloprid for 4 days.

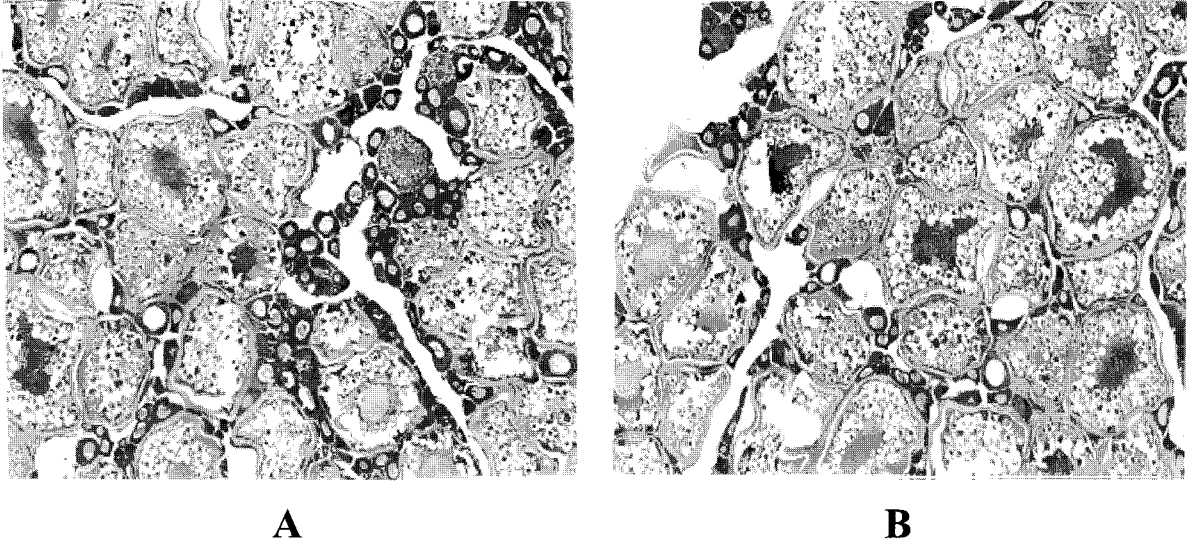


Fig. 9. Typical microscopic pictures of the ovary of the crucian carp exposed to imidacloprid for 4 days.

A, Control and B, exposed to imidacloprid for 4 days.

업의 연구비 지원에 의해 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

인용문헌

- Amdur, M. O., J. Doull and C. D. Klaassen (1991) Toxicology, pp.69~71, Pergamon Press.
- Hodgson, E. and P. E. Levi (1994) Introduction to biochemical toxicology, 2nd Edition, pp.183~186, Appleton & Lange.
- Levine, R. R. (1990) Pharmacology: Drug action and reactions, pp.145~147, Little, Brown and Company.
- Matthew, H. B. (1994) Excretion and elimination of toxicants and their metabolites. Chapter 2, *In* Introduction to biochemical toxicology (Ed. Hoderson, E. and P. E. Levi), 2nd edition, Appleton & Lange, Norwalk, Connecticut, pp.177~192.
- Miles Inc. (1993) Imidacloprid: Pesticide leaching potential model. Report No. 105008.
- Moza, P., K. Hustet and A. Ketrup (1998) Photolysis of imidacloprid in aqueous solution. Chemosphere 36:497~502.
- Scholz, K. and M. Spiteller (1992) Influence of groundcover on the degradation of [14 C]imidacloprid in soil. Brighton Crop Conference-Pest and Diseases, pp.883~888.
- The Pesticide Manual (2003) British Crop Protection Council, Tenth edition, pp.562~564.
- Wamhoff, H. and V. Schneider (1999) Photodegradation of imidacloprid. J. Agric. Food Chem. 47:1730~1734.
- 경기성, 이병무, 김진화, 오병렬, 정영호, 이재구 (1999) 제초제 metolachlor의 잉어체내 행적, 농약과학회지, 3(2):54~59.
- 농약사용지침서 (2006) 한국작물보호협회
- 농약연보 (2005) 한국작물보호협회
- 이창업 (1993) 수의독성학. pp.54~74, 서울대학교 출판부.
- 임양빈, 경기성, 김찬섭, 이희동, 류갑희, 이재구 (2006) 살충제 imidacloprid의 농토양 중 흡착 및 용탈 특성, 한국환경농학회지 25(1):58~63.
- 임양빈, 경기성, 김찬섭, 최병렬, 홍수명, 이재구 (2004) 살충제 imidacloprid의 물 및 물-토양계 중 광분해, 농약과학회지 8(1):38~45.

Behavior of the insecticide imidacloprid in crucian carp (*Carassius auratus* L.) and its toxic effects on organs

Yang Bin Ihm, Chan Sub Kim¹, Hee Dong Lee¹, Dae Kyu Kim², and Kee Sung Kyung^{2*} (*Soil Management Division, Department of Agricultural Environment, ¹Pesticide Safety Division, Department of Crop Life Safety, National Institute of Agricultural Science & Technology, Suwon 441-707 and ²Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, Life and Environmental Sciences, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea*)

Abstract : In order to elucidate the behavior of the insecticide imidacloprid (1-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-N-nitroimidazolidin-2-ylideneamine) in crucian carp (*Carassius auratus* L.) and its effects on the internal organs of crucian carp, the crucian carps were exposed to [¹⁴C]imidacloprid at a predicted environmental concentration of 0.064 mg/L for 4 days. Imidacloprid in water was absorbed into crucian carps to reach the maximum concentration at 2 days after exposure. Unknown major metabolite and imidacloprid urea, minor metabolite, were detected in test water. The amounts of the [¹⁴C]imidacloprid and its metabolites absorbed in gall were much higher than those in the other parts, strongly suggesting that biliary excretion involving enterohepatic recirculation could be an import route for the elimination of imidacloprid absorbed in crucian carps. Meanwhile, no toxic effects of imidacloprid on liver and kidney as well as the genital organs such as testis and ovary were observed by microscopic inspection.

Key words : imidacloprid, crucian carp, behavior, enterohepatic recirculation.

*Corresponding author (Fax: +82-43-271-5921, E-mail: kskyung@chungbuk.ac.kr)