

21일간 methomyl에 노출한 미꾸리의 생물지표 및 내분비계 영향

한선영 · 김자현 · 권가영 · 염동혁*

안전성평가연구소 환경독성연구센터, 대전

(Received on December 28, 2011. Revised on February 5, 2012. Accepted on February 20, 2012)

Effects on Biomarkers and Endocrine in Muddy Loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) under 21 day Exposure to Methomyl

Sun-Young Han, Ja-Hyun Kim, Ga-Young Gwon and Dong-Hyuk Yeom*

Environmental Toxicology Research Center, Korea Institute of Toxicology, Deajeon

Abstract

To evaluate the effect of endocrine disruption chemicals (EDCs) to aquatic organisms, muddy loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) was exposed to low concentration methomyl for 21 days in order to identify the effect of biomarkers and endocrine. Vitellogenin (VTG) in blood plasma, which used widely as validated biomarker for endocrine disruption, was significantly greater in male fish exposed to 0.4 mg/L and 2 mg/L methomyl, and in female fish exposed to 0.08 mg/L, 0.4 mg/L, and 2 mg/L methomyl for 21 days ($p < 0.05$). This results suggest that methomyl have probability of endocrine disruption to organism on aquatic system. While inhibition of Acetylcholinesterase (AChE) activity and increase of DNA damage in comet assay were verified by fish exposed to methomyl, change of ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) activity was not occurred, comparing the control group ($p < 0.05$). Indicators at the level of organism such as condition factor (CF), hepato-somatic index (HSI), and gonado-somatic index (GSI) were not influenced by exposure of methomyl. In conclusion, these results showed the possibility of methomyl in regard to not only endocrine disruption but also impacts on biochemical biomarkers to aquatic organisms.

Key words Methomyl, *Misgurnus anguillicaudatus*, Vitellogenin, Biochemical biomarkers, Endocrine disruption

서론

내분비계교란물질(Endocrine Disrupting Chemicals, EDCs)은 생체 내 호르몬들의 정상적인 기능을 방해하는 물질을 의미하며, DDT, lindane, vinclozolin 등과 같은 많은 농약들이 내분비계교란물질로 알려져 있다(Hayes et al., 2002; Tiemann, 2008). EDCs가 생체 내에 유입될 경우, 정상 호르몬 같이 작용을 하여 생식기능에 손상을 입히거나, 성장 발달, 기형유발 등과 같은 부작용을 초래할 수 있다(이 등, 2004;

국립환경과학원, 1999). 우리나라의 농약 총사용량은 1998년 22.1천 톤에서 2001년 28.2천 톤으로 증가하여 최대 사용량을 보인 후 2008년 23.0천 톤으로 잠정적으로 감소추세에 있다(한국작물보호협회, 2009). 그러나 여전히 내분비계교란 물질로 추정되는 많은 농약들이 식품에서 농약성분의 기준치를 초과하거나, 폐사한 야생조류나 동물들의 체내에서 과량으로 검출되는 등의 연구 결과가 보고되고 있으며(이 등, 2010b; 장 등, 2010a), 이들 농약들에 대한 환경으로의 노출 경로, 생태계에 미치는 부정적 영향, 그리고 비특정 생물들에게 미치는 영향 등에 대한 관심이 증가하고 있다(Hayes et al., 2006; Pimentel 1992). 카바메이트 농약 가운데 하나인

*Corresponding author: Tel. +82-55-750-3710

Fax. +82-42-610-8254, E-mail. dhyeom@kitox.re.kr

methomyl은 유전독성 및 내분비계교란 물질로 알려져 있으며(유 등, 1991; 이 등, 2004; Klotz et al., 1996), 국내 한강 수계에서 검출되는 것으로 보고되었다(장 등, 2010b).

1996년 World Wildlife Funds(WWF)에서 내분비계 장애추정 물질로 DDT 등 67종을 분류한 이후, 선진국 및 국제기구에서는 이 물질들에 대한 관리방안을 모색하기 위하여 다양한 연구가 진행되어 왔다. 우리나라에서도 환경매체 및 어류를 대상으로 내분비계교란물질에 대한 조사를 전국적으로 실시하는 등 다각도로 연구가 진행되었다(이 등, 2004; 이 등, 2010a; US EPA, 1997; Boenke et al., 2002; 국립환경연구원, 2007). 그 중 어류의 생물지표(biomarker)를 이용하는 평가방법은 수 생태계의 변화 또는 손상의 원인에 대하여 구체적이며 과학적인 정보를 제공해 줄 수 있고, 어류의 생물학적 조직수준에 따라 나타나는 여러 가지 반응을 바탕으로 환경손상에 대한 조기경보를 제공할 수 있다는 점에서 주목받고 있다(USGS, 1999; USGS, 2000; 김 등, 2010). 2009년 OECD에서도 2차 성징과 vitellogenin (VTG) 생물지표(biomarker)를 이용하여 내분비계 추정 교란물질을 스크리닝하기 위한 표준 시험법 “21-day Fish Assay: A Short-Term Screening for Oestrogenic and Androgenic Activity, and Aromatase Inhibition”을 채택하였다(OECD, 2009). 그러나 실험에 사용되는 국제표준 시험어종들 대부분이 우리나라에 서식하지 않는 종(species)이므로 시험물질이 국내 토착 어류에 미치는 영향을 평가하기에 제한점이 있으며, OECD 시험법에서 제시된 2차 성징과 VTG 생물지표를 이용한 방법의 기타 종(species)에 대한 적용가능성 및 추가적인 생물지표(biomarker) 측정 필요성 등에 대한 연구가 부족한 실정이다. 한편 EDCs에 대한 관심의 증가로 향후 국내에서도 농약 안전성 시험 시, 내분비계 영향에 대한 시험의 도입이 불가피할 것으로 보인다.

미꾸리는 현재 국내 농약 등록을 위한 환경생물 독성시험의 시험 종으로 농촌진흥청 고서를 통해 지정되어 있다(농촌진흥청, 2010). 미꾸리과에 속하는 국내 토착 어종인 미꾸리(*Misgurnus anguillicaudatus*)는 우리나라에 전국적으로 분포하고 있고, 동일과에 속하는 미꾸라지(*Misgurnus mizolepis*)에 비해 몸통이 가늘고 원형에 가까운 특징을 지닌다. 산란기는 4-7월경이며, 부화 후 암컷은 2년, 수컷은 1년이 지나면 성숙하여 산란에 참여한다(Fujimoto et al., 2008; doopedia 두산백과; 한국 브리태니커). 현재까지 미꾸리를 이용한 내분비계 추정 교란물질의 스크리닝에 대한 연구 및 시도는 이루어지지 않았으며, EDCs로 알려져 있는 methomyl이 실제 미꾸리에 영향을 미치는 지에 대한 확인 연구 또한 시도된 바

없다.

본 연구에서는 methomyl의 내분비계 및 생물지표에 대한 영향을 조사하기 위하여, OECD의 21일 어류 시험법을 미꾸리에 적용하였으며, 추가적으로 생화학적 수준부터 개체수준에 이르는 생물지표(biomarker)를 측정하였다. 생화학적 수준의 생물지표로는 plama VTG 농도, 7-ethoxyresorufin-O-deethylase(EROD) 활성, acetylcholinesterase(AChE) 활성, comet assay를 이용한 tail extent moment(TEM)를 측정하였고, 개체수준의 생물지표로는 condition factor(CF), 간중량지수(hepato-somatic index, HSI), 생식소중량지수(gonado-somatic index, GSI)를 측정하였다.

재료 및 방법

시험농약

본 연구에서 사용한 농약 methomyl(순도: 97.2%) 원제는 국립농업과학원에서 제공받았으며, 양성대조물질(positive control)인 17 β -estradiol(순도: 98%)은 Sigma-aldrich(St. Louise, MO, USA)에서 구입하였다. 양성대조군의 stock solution 조제를 위하여 용매로 *N,N*-Dimethylformamide(DMF, Honeywell Burdick & Jackson, NJ, USA)를 사용하였다.

미꾸리의 입수 및 순화

본 연구의 시험에 사용된 미꾸리는 충청남도 보령시의 민물생태관에서 체장이 12 cm 이상 되는 개체를 선별하여 입수하였다. 입수한 미꾸리는 0.8% 소금물에서 약 2일 동안 약욕 시켜 주었고, 성적 성숙(sexual maturation)을 위하여 수온(25~26°C)과 광주기(광조건: 16시간, 암조건: 8시간)를 조절하여 약 2개월 이상 성숙시켜 주었으며, 시험 전에 GSI를 측정하여 성적 성숙 정도를 확인하였다. 노출 시험을 위한 미꾸리의 순화는 노출 시험 조건과 동일한 환경(수온 23~25°C, 광주기(광조건: 16시간, 암조건: 8시간))에서 2주 동안 실시하였고, 순화기간 동안 질병 및 치사어는 발생하지 않았다. 먹이는 Top meal(Tabia, 한국)을 매일 공급하였다.

21일 노출시험 방법

Methomyl의 노출시험을 위해 OECD test guideline No. 230(OECD, 2009)을 미꾸리 적용하였으며, 유수식장치(flow-through system)를 이용하여 21일 동안 노출하였다. 노출농도의 결정은 OECD TG No. 230(OECD, 2009)에 따라 MTC(maximum tolerated concentration)을 최고 농도로 하

였으며, MTC를 구하기 위해 11일 동안 유수식장치를 이용하여 예비시험을 수행하였다. 예비시험 결과 MTC가 2 mg/L 인 것으로 관찰되었으므로, 노출농도는 0.08, 0.4, 2 mg/L로 결정하였고 대조군(control, C)과 양성대조군(positive control, PC)을 두었다. 모든 시험군과 대조군에는 2개의 반복구를 설치하였고, 양성대조군의 농도는 OECD(2008) 보고서를 참고하여 100 ng/L로 결정하였다. 미꾸리는 각 노출 농도의 반복구별로 암컷 6마리, 수컷 6마리씩 총 12마리를 노출하였다. 시험기간 동안 미꾸리의 먹이는 Top meal(Tabia, 한국; 2회/일)을 공급하였고, 치사여부 및 독성증상을 매일 관찰하였으며, 수질(온도, DO, pH)은 최소 3일에 한번 이상 측정하였다. 생물지표(biomarker) 분석을 위한 미꾸리의 샘플링은 노출 후 11일과 21일이 경과하였을 때 실시하였고, 각 노출 농도의 반복구별로 암컷 3마리, 수컷 3마리씩 샘플링하였다. 미꾸리의 순화 및 독성시험에 사용된 사육수 및 희석수는 수돗물을 1 µm membrane filter와 활성탄 여과장치를 통과시켜 사용하였다.

시험농약의 분석

Methomyl의 농도는 high performance liquid chromatography(HPLC)를 이용하여 분석하였다. 노출시험 전에 회수율 시험 및 안정성 시험을 수행하였으며, 시험기간 동안에는 시험 시작일로부터 0일, 7일, 14일, 21일에 농도 측정을 실시하였다. 분석조건은 Table 1과 같다.

생물지표(Biomarker) 분석

1. 샘플 준비

노출시험 11일과 21일에 샘플링한 미꾸리는 얼음을 이용하여 마취하였으며, 체중과 체장을 측정하였다. VTG와 comet assay 분석을 위한 혈액을 채취하였고, 복부를 절개하여 EROD 분석 및 간중량지수(HSI) 측정을 위한 간(liver)과

생식소중량지수(GSI) 분석을 위한 생식소(gonad)를 적출하였다. 적출한 간은 0.15 M KCl에 헝균 다음 무게를 측정하였고, 냉동을 위한 전처리 후에 액체질소에 넣어 급속냉동시켰으며, 초저온냉동고에서 -80°C로 분석 시까지 보관하였다. AChE 분석을 위하여 두개골을 절개하고 뇌를 적출한 후 액체질소에 넣어 급속냉동시켰으며, 초저온냉동고에서 -80°C로 분석 시까지 보관하였다.

생물지표(Biomarker) 분석방법

1. 생화학적 생물지표 분석

1) VTG 농도

채혈된 혈액은 모세관을 밀봉하여 4°C, 6000 rpm에서 10분간 원심분리 한 후, 상등액을 분리하여 1.5 mL tube에 옮겨주고 분석 시까지 -80°C에서 냉동보관 하였다. 미꾸리의 항체(monoclonal, polyclonal)와 Vn standard는 동의대에서 제작하였으며, VTG enzyme-linked immunoassay kit(ELISA, Biosense Lab., Norway)를 사용하여 VTG 농도를 측정하였다.

2) AChE 활성

AChE 활성은 Ellman 등의 방법(Jung et al., 2008)을 수정하여 분석하였다. -80°C에 보관해 두었던 미꾸리의 뇌를 해동하고 0.1 M phosphate buffer(pH 7.6) 1 mL에 균질화(homogenization) 시킨 다음, 4°C, 10,000 g에서 10분간 원심분리 하였다. 이 때 얻어진 상층액 postmitochondrial supernatant(PMS)를 AChE의 활성을 측정하는데 사용하였다. AChE 활성은 PMS의 단백질량을 통해 알 수 있으며, bovine serum albumin을 standard로 하는 bicinchoninic acid(BCA) protein assay kit를 이용하며 단백질 정량을 실시하였다. Microplate reader(BioTek®, VT, USA)를 이용하여 415 nm 파장에서 흡광도를 분석하고, 측정된 흡광도를 이용하여 AChE 활성도를 계산하였다.

Table 1. HPLC condition for the analysis of methomyl

Instrument	HPLC Agilent 1200 series
Injector	ALS G1329A
Pump	Quaternary pump G1311A
Detector	DAD G1315D
Column	COSMOSIL 5C18-AR-II, 4.6×150 mm, 5 µm
Mobile phase	Acetonitrile/Water = 55/45 (v/v)
Flow rate	1.0 mL/min
Wavelength	230,16 nm
Injection volume	20 µl

3) EROD 활성

미꾸리의 간을 이용한 hepatic EROD 활성도 분석은 Kennedy and Jones(1994)의 fluorescamine assay 방법을 미꾸리에 맞게 수정하여 실시하였다. -80°C 에 보관되어진 간 시료를 해동하고, 50 mM phosphate buffer 1 mL와 10 mM Phenylmethylsulfonyl Fluoride(PMSF) 200 μL 가 담겨진 유리분쇄기에서 균질화를 하였다. 균질화된 시료는 4°C , 7,300 g에서 30분간 원심분리한 후, 상층액을 취하여 1.5 mL tube에 옮겨주었다. 상층액만을 다시 4°C , 16,000 g에서 60분간 원심분리하고, 이번에는 상층액은 버리고 남겨진 pellet을 50 mM phosphate buffer 100 μL 과 섞어주었다. Fluorescence analyzer(Fluoroskan Ascent, Thermo Labsystems, Finland)를 이용하여 resorufin은 530-590 nm 파장에서, 단백질은 400-460 nm 파장에서 측정하였다.

4) Comet assay

미꾸리의 혈액을 이용한 DNA damage 분석 방법은 Kim 등(2010)의 방법을 따라 수행하였다. 채혈한 혈액은 HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)가 담긴 tube에 넣어 분석 시까지 -80°C 에서 냉동보관 하였다. 시료를 해동시킨 후 3000 rpm에서 5분간 원심분리를 하고, 1% agarose를 얇게 입혀 자연건조 시킨 슬라이드에 얇게 입혀 건조시켰다. 샘플이 건조되면 슬라이드를 lysis buffer에 3시간 이상 담가둔 후, 1×electrophoresis buffer가 담긴 전기영동 chamber에 넣고 25 V, 300 mA에서 25분간 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 슬라이드는 0.4 M Tris buffer에 행구어 주었

으며, ethanol에 넣어 고정시킨 후 건조하였다. 건조된 슬라이드를 ethidium bromide(EtBr) stain 용액으로 염색하여 형광현미경으로 관찰하였고, DNA strand breakage 정도는 Image Analyzer Software(Komet ver. 5.0, Kinetic Imaging Ltd., UK)를 이용하여 extent tail moment(tail length×tail % DNA/100) 값을 계산하였다.

2. 개체수준의 생물지표 분석

개체 수준의 생물지표인 CF, 간중량지수(HSI), 생식소중량지수(GSI)는 $\text{CF}=(\text{체중}(\text{g})\times 100)/\text{체장}^3(\text{cm})$, $\text{HSI}=\text{간의 무게}(\text{g})\times 100/\text{체중}(\text{g})$, $\text{GSI}=\text{생식소의 무게}(\text{g})\times 100/\text{체중}(\text{g})$ 식에 의해 각각 계산하였다(Ham et al., 1997).

통계분석

VTG 농도, EROD 활성도, AChE 활성도 및 DNA 손상 정도에 관련된 생물지표는 ANOVA(Analysis of Variance) 분석을 수행한 다음, 대조군과 처리군 사이의 다중분석으로 Bonferroni post hoc comparison test를 수행하였다. CF, GSI, HSI와 같은 개체수준의 생물지표는 공변수로서 체장 또는 체중을 사용하여 ANCOVA(Analysis of Covariance) 분석을 수행하였다. 만일 각 생물지표 반응이 정규분포를 따르지 않는 경우에는 log 또는 square-root transformation을 수행하였다. 또한 각 변수의 분산의 동질성은 Leven's test를 수행하였다. 모든 통계분석은 SYSTAT 12 프로그램(SYSTAT, USA)를 사용하였다.

Table 2. Measured concentration of methomyl in the test solutions for 21 days exposure period

Nominal Concentration (mg/L)	Replication	Measured Concentration (mg/L)				Mean±SD ^{a)} (mg/L)
		Exposure day				
		0	7	14	21	
Control	R ₁	ND ^{b)}	ND	ND	ND	ND
	R ₂	ND	ND	ND	ND	
Positive Control	R ₁	ND	ND	ND	ND	ND
	R ₂	ND	ND	ND	ND	
0.08	R ₁	0.07	0.08	0.08	0.06	0.07±0.01
	R ₂	0.07	0.08	0.08	0.06	0.07±0.01
0.4	R ₁	0.39	0.39	0.41	0.34	0.38±0.03
	R ₂	0.40	0.40	0.42	0.34	0.39±0.03
2	R ₁	2.12	2.04	2.23	2.14	2.13±0.08
	R ₂	2.11	2.03	2.21	2.13	2.12±0.07

^{a)}SD: standard deviation

^{b)}ND: not detected

결과 및 고찰

21일 노출시험 및 농도분석

21일 노출시험 기간 동안 대조군을 포함한 모든 실험군에서 치사어가 발생하지 않았다. 21일의 시험기간 동안 온도는 $24.8 \pm 0.5^\circ\text{C}$, pH는 7.3 ± 0.1 , DO는 $7.2 \pm 1.4 \text{ mg/L}$, 조도는 $206 \pm 19 \text{ Lux}$ 로 측정되었다. Methomyl 분석에 대한 직선성은 0.99998 이었고, 검출한계는 0.02 mg/L , 정량한계는 0.07 mg/L 이었다. 또한 methomyl의 회수율은 $112.3 \pm 0.6\%$, 96시간 동안 methomyl의 안정성은 $93.0 \pm 4.3\%$ 이었다. 시험기간인 21일 동안 시험용액의 농도를 분석한 결과는 Table 2와 같으며, 각 반복군에 대한 평균측정농도는 설정농도의 87.5-106.5%로 설정농도의 $\pm 20\%$ 이내로 농도가 유지되었다. 한편, methomyl에 대한 미꾸리의 48시간 반수치사농도(LC₅₀)는 1.5 mg/L 로 보고되고 있으나(Hashimoto and Nishiuchi, 1981), 본 연구를 통해 측정된 21일 0% 치사율이 나타난 최고농도는 2 mg/L 로 관찰되었다.

생물지표(Biomarker) 분석

1. VTG 농도

수컷 미꾸리의 경우 노출 11일에는 2 mg/L , 노출 21일에는 0.4 mg/L 와 2 mg/L 에서 대조군에 비해 VTG 농도가 유의하게 증가하였으며($p < 0.05$), 암컷 미꾸리의 경우 노출 11일에는 0.4 mg/L 와 2 mg/L , 노출 21일에는 0.08 , 0.4 , 2 mg/L 의 모든 실험군에서 대조군에 비해 VTG 농도가 통계적으로 유의하게 증가한 것으로 관찰되었고($p < 0.05$), methomyl의 노출농도가 증가할수록 VTG의 농도가 증가하는 경향이

관찰되었다(Fig 1). 어류는 estrogen에 의해 유도되는 VTG 합성에 민감하게 반응하므로, 어류에서의 VTG는 내분비계 교란 화학물질(EDCs)을 탐지하기 위한 생물지표(biomarker)로 널리 이용되어 왔다(Anderson et al., 1996; Hutchinson et al., 2006). 본 실험결과에 따르면 수컷은 $0.4\text{-}2 \text{ mg/L}$, 암컷은 $0.08\text{-}2 \text{ mg/L}$ 의 농도에서 각각 VTG가 대조군에 비해 유의하게 증가한 것으로 나타났는데(Fig. 1), 이와 같은 결과는 methomyl이 인간 유방암 세포와 자궁내막 세포 실험, 그리고 에스트로겐성 활성 실험에서 내분비계를 조절하는 것으로 관찰된 기존연구들에 의해 뒷받침 될 수 있다(Giesy et al., 2002; 이 등, 2004). 한편, 장 등(2010b)이 2007-2009년에 한강수계 하천수에서 측정한 농약 모니터링자료에 따르면, 한강수계에서 methomyl의 농도는 $0.19\text{-}0.96 \text{ }\mu\text{g/L}$ 수준으로 매우 낮게 관찰되었다. 환경 중 검출 농도가 본 시험에서 수행된 시험농도에 비해 매우 낮아 실제 환경에서의 methomyl의 내분비계교란 영향이 없는 것으로 평가할 수도 있다. 그러나 농약이 높은 수준으로 잔류할 수 있는 농수로, 농지와 가까운 소하천에서의 농약 모니터링이 이루어지지 않은 점, 본 연구에서 21일이라는 짧은 기간의 영향을 관찰한 점, 본 연구결과 실험 최저 농도인 $0.08 \text{ }\mu\text{g/L}$ 에서도 암컷의 VTG가 증가하여 더 낮은 농도에서의 영향도 기대할 수 있다는 점 등을 고려할 때 환경 중 methomyl의 어류에 대한 내분비계교란 영향 가능성이 있을 것으로 판단된다.

100 ng/L $17\beta\text{-estradiol}$ 이 21일 동안 노출된 양성대조군의 경우 수컷은 대조군과 차이를 보이지 않았고, 암컷에서는 21일에 샘플링한 미꾸리에서만 대조군에 비해 유의하게 VTG 농도가 증가한 것으로 관찰되었다($p < 0.05$, Fig. 1). Methomyl에 노출된 처리군의 VTG 농도와 비교할 때도 양

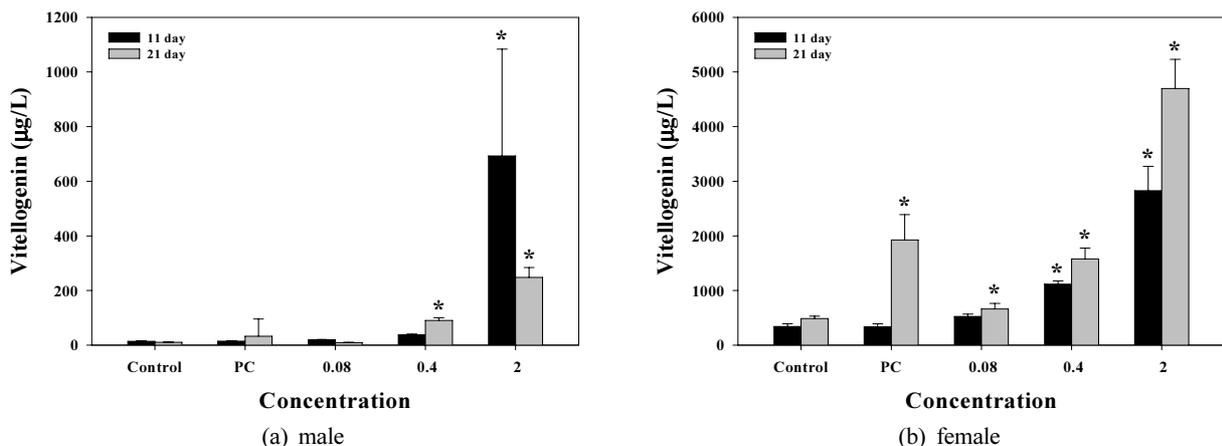


Fig. 1. Vitellogenin(VTG) concentrations in blood plasma of muddy loach exposed to methomyl for 21 days. The values represent mean \pm standard deviation of level of vitellogenin. Asterisk indicates a significant difference from the control ($p < 0.05$).

성대조군에서의 VTG는 비교적 낮은 수준으로 나타났는데, 이것은 미꾸리의 17 β -estradiol에 대한 VTG 민감도(sensitivity)가 다른 어종에 비해 낮기 때문인 것으로 생각된다. 기존연구에 따르면 17 β -estradiol에 노출된 수컷 물고기들의 VTG protein 유도에 대한 최저영향관찰농도(Lowest observed effect concentration, LOEC)가 rare minnow (*Gobiocypris rarus*)는 1 ng/L(28일, 우수식 조건), zebrafish (*Danio rerio*)는 3 ng/L(8일, 우수식 조건), Japanese medaka (*Oryzias latipes*)는 10 ng/L(28일, 반지수식 조건), mummichog (*Fundulus heteroclitus*)는 100 ng/L(21일, 반지수식 조건)로 어종에 따라 반응정도가 매우 다르게 나타남을 알 수 있다(Woods and Kumar, 2011).

2. AChE 활성

살충제 가운데 유기인계 및 카바메이트계 농약들의 주요한 작용기작(mode of action)은 신경전달 저해, 즉 acetylcholinesterase활성 저해로 알려져 있다(Albert, 1981). AChE의 억제체는 시냅스 사이에 acetylcholine(ACh)를 축적시켜 신경과 근육섬유에 지속적이고 과도한 자극을 일으키게 되며, 이로 인해 어류의 유영, 급식, 외류에서의 탈출에 문제를 일으키거나 최종적으로는 사망까지 야기할 수 있다(Li et al., 2008). 21일 동안 methomyl에 노출된 미꾸리의 평균 AChE 농도는 대조군에서 812.4 pmol/mg protein/min 수준으로 측정되었고, 0.08, 0.4, 2 mg/L의 노출 농도에서 각각 380.1, 335.7, 411.8 pmol/mg protein/min로 대조군에 비해 약 53%, 59%, 49%씩 감소된 것으로 나타났다(Fig. 2). 그러나 AChE가 농도 의존적으로 감소하지는 않았으며, 0.4 mg/L 노출 농

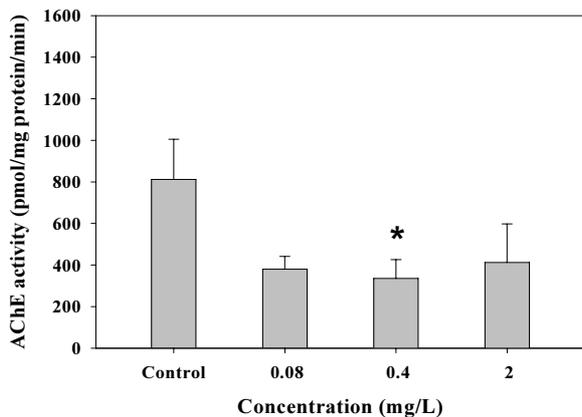


Fig. 2. Acetylcholinesterase(AChE) activity of muddy loach exposed to methomyl for 21 days. The values represent mean \pm standard deviation of level of AChE activity. Asterisk indicates a significant difference from the control ($p<0.05$).

도에서만 통계적으로 대조군과 유의한 차이를 보였다($p<0.05$, Fig. 2). 기존 연구들 또한 수생생물에 대한 methomyl의 AChE저해 영향을 보고한바 있다(Li et al., 2008; Ozdemir et al., 2010; Tomlin, 2003; Xuereb et al., 2009; Yi et al., 2006).

3. EROD 활성

대조군, 0.08 mg/L, 0.4 mg/L, 2 mg/L 노출 농도에서 평균 EROD 활성도는 각각 0.45, 0.96, 0.85, 0.96 pmol/mg protein/min으로 농도에 따른 변이차가 크지 않았으며, 시험군에서 활성의 증가가 관찰되었으나 대조군과 유의한 차이가 나타나지 않았다($p>0.05$, Fig. 3). EROD는 어류가 외인성 화합물(xenobiotic chemicals)을 흡수할 경우 cytochrome P4501A1 monooxygenase가 유도되었다는 증거를 제공하는 민감한 생물지표이다(Whyte et al., 2000). 주로 planar halogenated와 polycyclic aromatic hydrocarbons(PHHs와 PAHs) 또는 구조가 유사한 화학물질들에 의해 EROD 활성이 증가하지만, 수온, pH, 연령, 번식단계, 섭식과정 등과 같은 환경조건에 의해 변하기도 한다(Bucheli and Fent, 1995; Stegeman and Hahn, 1994; Whyte et al., 2000). 그러나 시험물질인 methomyl의 경우 수생생물에서의 EROD 활성 영향에 대해 보고된 연구결과가 없으며, 시험 결과에서도 역시 EROD 활성 변화가 관찰되지 않았다.

4. Comet assay

대조군의 tail extend moment 값은 평균 26.0으로 나타났고, 0.08, 0.4, 2 mg/L의 노출 농도에서는 각각 평균 35.6,

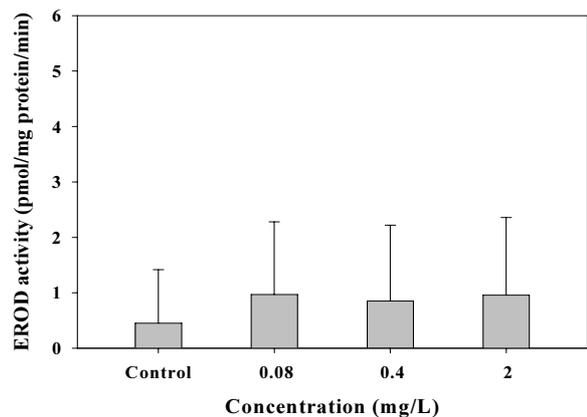


Fig. 3. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity of muddy loach exposed to methomyl for 21 days. The values represent mean \pm standard deviation of level of EROD activity. Asterisk indicates a significant difference from the control ($p<0.05$).

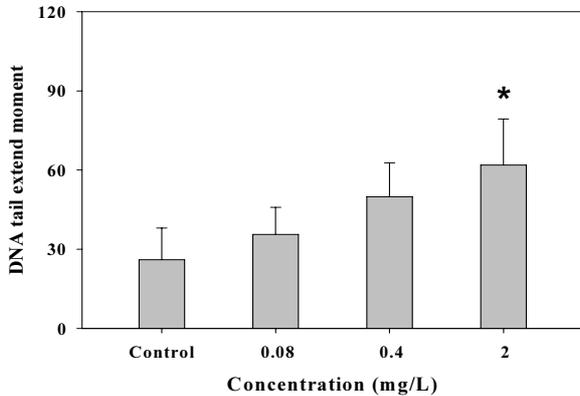


Fig. 4. DNA tail extend moment of muddy loach exposed to methomyl for 21 days. The values represent mean±standard deviation. Asterisk indicates a significant difference from the control ($p<0.05$).

49.9, 61.9로 노출 농도가 증가할수록 DNA 손상 정도가 증가하는 경향을 보였다(Fig. 4). 특히 2 mg/L의 노출 농도에서는 대조군에 비해 유의하게 증가하여 DNA 손상이 가장 높은 것으로 나타났다($p<0.05$, Fig. 4).

기존에도 methomyl의 유전독성 발현 여부를 알아보기 위한 몇 가지 연구가 시도된바있다. 사람의 림프구 세포와 쥐의 *in vivo* 시험결과에서 methomyl이 DNA 손상을 일으킴을 확인할 수 있었던 반면, 잉어 적혈구의 소핵실험에서는 음성 반응이 나타나기도 하였다(Bolognesi et al., 1994; Bonatti et al., 1994; Horng et al., 2007; Sun et al., 2010; Wei et al., 1997).

5. 개체 수준의 생물지표

개체 수준의 생물지표인 CF, 간중량지수(HSI), 생식소중량지수(GSI)는 대조군과 methomyl 처리군 간에 통계적으로 유의한 차이가 관찰되지 않았다($p<0.05$, Table 3). OECD test guideline No. 230 (OECD, 2009)에 따라 수행된 21일

노출시험이 2년 이상의 성장 및 성숙과정을 거친 미꾸리들에게 개체수준의 영향을 미칠 만큼 충분히 길지 않았고, 노출 농도 또한 시험법에 따라 MTC 이하의 수준으로 결정되므로 독성이 낮았기 때문인 것으로 판단된다. 또한 김 등(2010)은 분자수준의 생물지표 변화가 관찰되었다 하더라도 조직병리학적 지표 이상의 상위 단계와의 연계성이 비교적 낮다고 보고한 바 있다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: PJ005302)의 지원에 의해 이루어졌습니다.

>> 인 / 용 / 문 / 헌

- Adrien Albert (1981) Selective Toxicity: The physico-chemical basis of therapy. p. 455, Chapman & Hall, the UK
- Anderson, M. J., H. Olsen, F. Matsumura and D. E. Hinton (1996) *In vivo* modulation of 17 β -estradiol-induced vitellogenin synthesis and estrogen receptor in rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*) liver cells by β -naphthoflavone. Toxicol. Appl. Pharmacol. 137:210~218.
- Boenke, A. C., C. Searle and T. Karjalainen (2002) Contribution of European research to endocrine disruptors. Analytica. Chimica. Acta. 473:161~165.
- Bolognesi, C., M. Peluso, P. Degan, R. Rabboni, A. Munnia and A. Abbondandolo (1994) Genotoxic effects of the carbamate insecticide, methomyl. II. *In vivo* studies with pure compound and the technical formulation, "Lannate 25". Environ. Mol. Mutagen. 24(3):235~242.
- Bonatti, S., C. Bolognesi, P. Degan and A. Abbondandolo (1994) Genotoxic effect of the carbamate insecticide methomyl: I. *In vitro* studies with pure compound and the technical

Table 3. Condition indices of muddy loach exposed to methomyl for 21 days

Condition Indices ^{a)}	Sex ^{b)}	Concentration (mg/L)			
		Control	0.08	0.4	2
CF	M&F	0.41±0.05	0.42±0.07	0.40±0.05	0.41±0.04
HSI	M&F	0.92±0.21	0.84±0.18	0.74±0.13	0.65±0.20
GSI	M	1.14±0.39	0.82±0.23	0.88±0.33	0.63±0.15
	F	6.65±4.55	5.21±4.49	6.44±4.09	6.61±2.57

^{a)}CF: condition factor, HSI: hepato-somatic index, GSI: gonado-somatic index

^{b)}M: male, F: female

- Values are mean±standard deviation(SD).

- formulation "Lannate 25". *Environ. Mol. Mutagen.* 23(4): 306~311.
- Bucheli, T. D. and K. Fent (1995) Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystem. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 25: 201~268.
- David Pimentel (1992) Ecological Effects of Pesticides on Non-target Species in Terrestrial Ecosystems. In *Methods to Assess Adverse Effects of Pesticides on Non-target Organisms Vol. SCOPE 49* (ed. Robert G. Tardiff), Scientific Committee on Problems of the Environment (SCOPE), France.
- Ellman G. L., K. D. Courtney, V. Andres, Jr. and R. M. Feather-Stone (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol* 7:88~95.
- Fujimoto Y., Y. Ouchi, T. Hakuba, H. Chiba and M. Iwata (2008) Influence of modern irrigation, drainage system and water management on spawning migration of mud loach, *Misgurnus anguillicaudatus* C. *Environ. Biol. Fish* 81:185~194.
- Giesy, J. P., K. Hilscherova, P. D. Jones, K. Kannan, and M. Machala (2002) Cell bioassays for detection of aryl hydrocarbon (AhR) and estrogen receptor (ER) mediated activity in environmental samples. *Mar. Pollut. Bull.* 45:3~16.
- Ham, K. D., S. M. Adams and M. J. Peterson (1997) Application of multiple bioindicators to differentiate spatial and temporal variability from the effects of contaminant exposure on fish. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 37:53~61.
- Hashimoto, Y. and Y. Nishiuchi (1981) Establishment of Bioassay Methods for the Evaluation of Acute Toxicity of Pesticides to Aquatic Organisms. *Journal of Pesticide Science* 6:257~264 (Japanese, with English abstract).
- Hayes, T., K. Haston, M. Tsui, A. Hoang, C. Haeffele and A. Vonk (2002) Feminization of male frogs in the wild. *Nature* 419, 895~896.
- Hayes, T. B., P. Case, S. Chui, D. Chung, C. Haeffele, K. Haston, M. Lee, V. P. Mai, Y. Marjuoa, J. Parker and M. Tsui (2006) Pesticide Mixtures, Endocrine Disruption, and Amphibian Declines: Are We Underestimating the Impact? *Environ. Health Perspect.* 114:40~50.
- Hornig, S. B., H. H. Kuo, M. Y. Lin, W. W. Lin and T. C. Wang (2007) Human gastric cells resistant to (–)-epigallocatechin gallate show cross-resistance to several environmental pollutants. *Food Chem. Toxicol.* 45:2171~2178.
- Hutchinson, T. H., G. T. Ankley, H. Segner and C. R. Tyler (2006) Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarker as "signposts," not "traffic light," in risk assessment. *Environ. Health Perspect.* 114(Suppl 1):106~114.
- Jung J. H., S. J. Kim, T. K. Lee, W. J. Shim, S. Woo, D. J. Kim and C. H. Han (2008) Biomarker responses in caged rockfish (*Sebastes schlegeli*) from Masan Bay and Haegeumgang, South Korea. *Mar. Pollut. Bull.* 57:599~606.
- Kennedy S. W. and S. P. Jones (1994) Simultaneous measurement of cytochrome P450A catalytic activity and total concentration with a fluorescence plate reader. *Anal. Biochem.* 222:217~223.
- Kim W. K., S. K. Lee and J. Jung (2010) Integrated assessment of biomarker responses in common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to perfluorinated organic compounds. *J. Hazard. Mater.* 180:395~400.
- Koltz D. M., B. S. Beckman, S. M. Hill, J. A. McLachlan, M. R. Walters and S. F. Arnold (1996) Identification of environmental chemicals with estrogenic activity using a combination of in vitro assays. *Environ. Health Perspect.* 104(10):1084~1089.
- Li, H., H. Jiang, X. Gao, X. Wang, W. Qu, R. Lin and J. Chen (2008) Acute toxicity of the pesticide methomyl on the topmouth gudgeon (*Pseudorasbora parva*): mortality and effects on four biomarkers. *Fish Physiol. Biochem.* 34:209~216.
- OECD (2008) Draft report of the validation of the 21-day fish endocrine screening assay for the detection of endocrine active substances (Phase 2- Testing Negative Substance). April 2007.
- OECD (2009) OECD guideline for the testing of chemical No. 230. 21-day Fish Assay: A Short-Term Screening for Oestrogenic and Androgenic Activity, and Aromatase Inhibition. Adopted: 7 September 2009.
- Ozdemir, A., M. Duran and A. Sen (2010) Potential use of the oligochaete *Limnodrilus profundicola* V., as a bioindicator of contaminant exposure. *Environ. Toxicol.* Published online 22 July 2010 in Wiley Online Library: DOI 10.1002/tox.20527.
- Stegeman, J. J. and M. E. Hahn (1994) Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: current perspectives on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. pp. 87-206, In *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical, and Cellular Perspectives* (ed. DC Malins and GK Ostrander), Lewis Publishers, U. S. A.
- Sun, X. Y., Y. T. Jin, B. Wu, W. Q. Wang, X. L. Pang and J. Wang (2010) Study on genotoxicity of aldicarb and methomyl. *Huan Jing Ke Xue* 31(12):2973-2980 (Chinese, with English abstract).
- Tiemann, U. (2008) *In vivo* and *in vitro* effects of the organochlorine pesticides DDT, TCPM, methoxychlor, and lindane on the female reproductive tract of mammals: A review. *Reprod. Toxicol.* 25:316~326.
- Tomlin, C. D. S. (2003) *The pesticide manual*(13th Ed.), British Crop Protection Council, th UK.
- US EPA (1997) EPA special report on endocrine disruption.
- US EPA (1998) Final report of endocrine disruptor screening and testing advisory committee.
- US Geological Survey (USGS) (1999) Biomonitoring of Environmental Status and Trends (BEST) program: Field Procedures for Assessing the Exposure of Fish to Environmental Contaminants, USGS/BRD/ITR-1999-0007.
- US Geological Survey (USGS) (2000) Biomonitoring of Environmental

- Status and Trends (BEST) Program: selected methods for monitoring chemical contaminants and their effects in aquatic ecosystems. USGS/BRD/ITR-2000-0005.
- Wei, L. Y., J. S. Chao and C. C. Hong (1997) Assessment of the ability of propoxur, methomyl and aldicarb, three carbamate insecticides, to induce micronuclei in vitro in cultured Chinese hamster ovary cells and *in vivo* in BALB/c mice. *Environ. Mol. Mutagen.* 29:386-393.
- Whyte J. J., R. E. Jung, C. J. Schmitt and D. E. Tillitt (2000) Ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Crit. Rev. Toxicol.* 30(4): 347~570.
- Woods, M. and A. Kumar (2011) Vitellogenin induction by 17 β -estradiol and 17 α -ethynylestradiol in male Murray rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*). *Environ. Toxicol. Chem.* 30(11): 2620~2627.
- Xuereb, B., E. Lefèvre, J. Garric and O. Geffard (2009) Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): Linking AChE inhibition and behavioural alteration. *Aqua. Toxicol.* 94:114~122.
- Yi, M. Q., H. X. Liu, X. Y. Shi, P. Liang and X. W. Gao (2006) Inhibitory effects of four carbamate insecticides on acetylcholinesterase of male and female *Carassius auratus* in vitro. *Comp. Biochem. Physiol. C* 143:113~116.
- Doopedia 두산백과, “미꾸리”
- 국립환경연구원 (1999) 내분비계 장애물질 이해와 대응.
- 국립환경연구원 (2007) 내분비계장애물질에 의한 생태영향 정밀조사.
- 김정곤, 박예나, 김우근, 김지원, 이성규, 최경호 (2010) 유해물질 노출로 인한 분자·생화학적 바이오마커와 담수 어류에 대한 현장 적용성, *한국환경보건학회지* 36(5):418~434.
- 농촌진흥청 (2010) 농촌진흥청 고시 제2010-29호 농약의 등록기준 (2010. 10. 13.)
- 유홍일, 이해근, 전성환 (1991) 농약잔류분석법. pp. 119~127, 동화기술, 대한민국.
- 이병천, 김수진, 윤준현, 김은주, Duong, N. C., 엄익춘, Shiraishi, F., 최경희 (2010a) 에스트로겐과 다이옥신 수용체 효모를 이용한 내분비계장애 영향 평가, *한국환경분석학회지* 13(2):109~115.
- 이제봉, 신진섭, 이희동, 정미혜, 유아선, 강규영 (2004) 내분비계 장애추정농약에 대한 에스트로겐성 영향검색 및 위해성 평가, *농약과학회지* 8(2):95~102.
- 이주영, 이희정, 김우성, 최동미, 채갑용, 강찬순, 신용운, 도정아, 최원조 (2010b) 2009년 유통 농산물 중 잔류농약 실태조사, *한국식품위생안전성학회지* 25(2):192~202.
- 장정희, 봉영훈, 김동규, 김미경, 정갑수, 손성완 (2010a) 2008-2009년 국내 폐사 야생조류 및 동물 체내의 잔류농약 분석, *대한수의학회지* 50(3):197~203.
- 장제현, 김정희, 최재원, 오은전, 노혜란 (2010b) 한강수계 하천수의 카바메이트계 농약 모니터링(2007~2009), *한국환경분석학회지* 13(1):33~39.
- 정영호외 (2000) (최신) 농약학. p. 100, 시그마프레스, 대한민국
- 한국브리태니커, 전상인, “미꾸리”
- 한국작물보호협회, 농림수산식품부 친환경농업팀 (2009)

21일간 methomyl에 노출한 미꾸리의 생물지표 및 내분비계 영향

한선영 · 김자현 · 권가영 · 염동혁*

안전성평가연구소 환경독성연구센터, 대전

요약 내분비계교란물질이 수서생물에 미치는 영향을 평가하기 위하여 미꾸리를 저농도의 methomyl에 21일 동안 노출시켜 생물지표 및 내분비계 영향을 평가하였다. 내분비계교란물질에 대한 노출을 입증하기 위해 널리 이용되는 생물지표인 vitellogenin(VTG)은 21일 동안 0.4 mg/L와 2 mg/L methomyl에 노출된 수컷과 0.08 mg/L, 0.4 mg/L, 2 mg/L의 methomyl에 노출된 암컷에서 대조군에 비해 유의하게 증가하여($p < 0.05$), methomyl의 수생태계 생물에 대한 내분비계교란 가능성을 확인하였다. Acetylcholinesterase(AChE) 시험 및 comet assay에서는 methomyl에 노출시킨 미꾸리로부터 AChE 활성 저해와 DNA 손상을 확인한 반면, 7-ethoxyresorufin-*O*-deethylase(EROD) 활성에 대한 대조군과 처리군의 차이는 나타나지 않았다($p < 0.05$). 개체수준의 생물지표인 condition factor(CF), 간중량지수(hepato-somatic index, HSI), 생식소중량지수(gonado-somatic index, GSI)는 methomyl 노출에 의해 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 현재의 연구결과를 종합해 볼 때, methomyl의 수서생물에 대한 내분비계교란 가능성 및 생화학적 생물지표에 대한 영향을 확인할 수 있었다.

색인어 Methomyl, 미꾸리, 비텔로제닌, 생화학적 생물지표, 내분비계교란