

Chlamydomonas reinhardtii 를 이용한 농약의 독성평가

이용두[†] · 고인범 · 신우석

제주대학교 환경공학과

Toxicity Assessment of Biocide using *Chlamydomonas reinhardtii*

Yong-Doo Lee[†] · In-Beom Ko · Woo-Seok Shin

Department of Environmental Engineering, Cheju National University

(Received 7 February 2005, Accepted 25 April 2005)

Abstract

The average specific growth rate of *C. reinhardtii* (μ) was decreased with increase in biocide concentrations. The toxicity of biocides toward was as follows (in descending order of toxicities): herbicide > pesticide > fungicide.

EC₅₀ in each biocide was 0.0017 mg/L, 1.06 mg/L and 13.3 mg/L for herbicide, pesticide and fungicide respectively. When herbicide and pesticide were mixed, EC₅₀ was decreased by 2.7×10^{-7} mg/L. EC₅₀ in effective components of each biocide was 5.26 mg/L, 9.37 mg/L and 20.58 mg/L for herbicide, pesticide and fungicide respectively. Mixed main components of herbicide and pesticide caused to decrease by 3.10 mg/L.

keywords : Cell growth, Biocide, Pesticide, Fungicide, EC₅₀

1. 서론

농약은 살포된 후 미미한 양만이 작용 대상 식물에 효과를 나타낼 뿐, 대부분은 공기 중으로 증발하거나, 토양에 흡수되고, 나머지는 수계로 유입된다(Patin, 1982). 수생 생태계로 흘러 들어온 농약은 녹조류에 지대한 영향을 미치게 되는데, 이 녹조류는 수계 생태계에서 중요한 비중을 갖는 1차 생산자로, 결국 이들 환경오염원을 적절히 제거하지 않는다면 먹이사슬의 혼란을 초래하게 되어 자연 생태계를 파괴하게 되고 급기야는 인류 자신의 존립마저 위태롭게 할 것임에 틀림없다.

이렇게 수계로 유입된 환경오염물질들은 수계 내에서 이동과 변환이 가장 급속하게 일어나는 매체로서, 오염물질들에 의한 수서 생태계 위해성을 바르게 평가하기 위해서는 가능한 다양한 종류의 생물들에 대한 유해성 분석이 이루어져야 한다(김 등, 2001). 최근에 물고기나 물벼룩을 이용한 생물학적 독성실험이 행하여지고 있으나, 이 방법은 독성물질에 대한 반응시간이 길고 독성 물질의 양과 반응 정도의 상관관계를 정확히 규명하기 어려운 단점이 있으며 또한, on-line화하기 위해서는 행동 양상을 표준화하고 늘 같은 양상을 나타내어야 되나 재현성이 낮다는 것이 단점이다(Ramanathan et al., 1997; van Dyk et al., 1994). 반면 미생물을 이용한 생물학적 방법은 경제적이고 관리가 쉬우며, 빠른 반응으로 신속, 정확하여 최근 연구가 진행되고

있다.

따라서, 본 연구에서는 주위환경에 많이 분포된 단세포 녹조류로 세대간의 번식주기가 짧으며, 실험실에서 대량배양이 가능하고, 관리가 쉬운 *C. reinhardtii*를 이용하여 현재 국내에서 다량 사용되어지고 있는 제초제, 살충제 및 살균제의 종류별, 농도별 및 상호 혼합에 따른 독성정도를 평가하는데 그 목적이 있다.

2. 재료 및 방법

2.1. 균주

본 실험에 사용한 균주는 단세포 녹조류인 *C. reinhardtii*의 야생형(BIU-90 mt⁺)으로 일본 사이타마현 환경과학국제센터에서 분양을 받아 이용하였다(Fig. 1).

2.2. 농약

농약은 시중에서 판매되는 농약중에서 국내에서 많이 이용되고 있는 것을 대상으로 제초제, 살충제 및 살균제를 각각 한 가지씩 선정하여 실험에 이용하였다. 제초제로는 DH화학의 스쿠프(DH화학, KOREA)이며, 유효성분은 Dithiopyr이고, 살충제로는 DH화학의 코니도(DH화학, KOREA)이며, 유효성분은 Imidacloprid이며, 살균제로는 DH화학의 안타(DH화학, KOREA)를 이용하였고, 유효성분은 Etridiazole인 것을 실험대상 농약으로 선택하여 사용하였다. 또한 보조성분의 영향을 알아보기 위하여 유효성분만을 가지고 실험을 행했는데 여기에 사용된 유효성분은 AccuStandard Inc.에서 순도 99% 이상인 Dithiopyr

[†] To whom correspondence should be addressed.
eeenvlyd@cheju.ac.kr

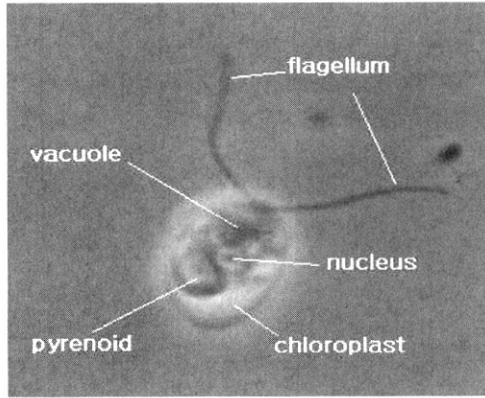


Fig. 1. Phase contrast micrograph of *Chlamydomonas reinhardtii*.

(AccuStandard Inc., USA) Imidacloprid(AccuStandard Inc., USA), Etridiazole(AccuStandard Inc., USA)을 각각 주문 공급받아 실험에 사용하였다.

2.3. 실험조건

초기 미생물 농도가 10⁴ cells/mL 되도록 멸균된 배지에 주입하여 25±2°C로 일정하게 유지 시킨 수욕상에서 실험을 행하였다. 배양은 72 시간 동안 5000 lux의 빛의 세기에서, 130 rpm으로 진탕(SHAKING WATER BATH HB-205SWM, DAIHAN, USA) 시키면서 배양하였다.

2.4. 실험방법

*C. reinhardtii*를 배양하기 위하여 Sagar and Granick I (SGI) 배지를 사용하였다(Table 1).

본 연구에서는 *C. reinhardtii*를 이용한 각 농약의 독성을 파악하기 위하여 농약의 유효성분 및 보조성분 첨가에 의한 성장저해 실험을 행하였다. 각 실험에는 전 배양을 행한 세포 현탁배지를 이용하여 초기 미생물 농도가 10⁴ cells/mL가 되도록 주입하여 실험을 행하였다.

농약에 의한 성장저해 실험에는 농약의 유효성분 농도가 0, 1.25, 2.5, 7.5, 12.5, 25 mg/L 되도록 각각의 시험관에 주입하고, 전 배양 세포 현탁배지를 0.5 mL 정도 추출하고, 미리 준비한 배지에 접종하고, 총량이 8 mL가 되도록 하였다. 실험조건은 전배양과 똑같다. 대조구 및 시험구에서는 각각 3번의 실험을 행한후 평균값을 가지고 계산하였다. 분광광도계(DR/2000, HACH, USA)로 660 nm의 흡광도를 일정시간 간격으로 측정하여 흡광도의 변화와 세포밀

도의 관계를 구하고(Rochaix et al., 1988), 이를 근거로 계산하여 세포밀도로 나타내었다.

2.5. *C. reinhardtii*의 성장량

C. reinhardtii 성장량을 Chlorophyll-a농도를 이용하여 측정하였다. *C. reinhardtii*의 광합성 chlorophyll-a의 측정은 수질오염 공정시험법에 준하여 측정하였다. *C. reinhardtii*의 성장에 따른 Chlorophyll-a 농도와 O.D_{660nm}값을 Fig. 2에 나타내었다. Chlorophyll-a농도와 O.D_{660nm}는 거의 동일하게 변화하고 있음을 알 수 있다. 이와 같은 결과는 O.D_{660nm}를 이용하여 *C. reinhardtii*의 성장을 간접적으로 측정할 수 있는데 chlorophyll-a와 O.D_{660nm}의 관계는 다음 식으로 나타냈다.

$$\text{Chlorophyll-a(mg/m}^3\text{)} = 16182 \times \text{O.D}_{660\text{nm}} + 309.39 (\text{R}^2 = 0.915)$$

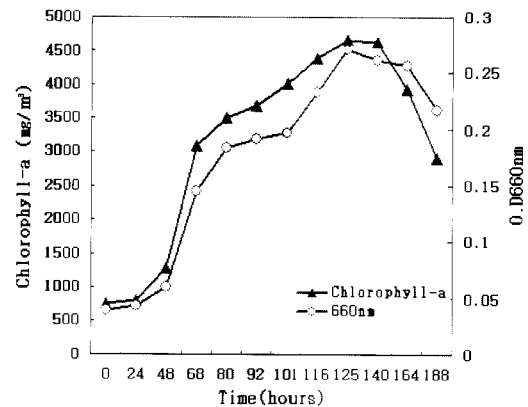


Fig. 2. Cell growth curve of *C. reinhardtii*.

3. 결과 및 고찰

3.1. 농약의 종류에 따른 *C. reinhardtii*의 평균비성장 속도(μ)

독성물질의 농도가 높으면 그만큼 *C. reinhardtii*의 변화량도 클 것이라는 가정하에 Average specific growth rate (μ)를 측정하고 계산하였다(Britz et al., 1997).

각각 농약에서의 실험결과 Fig. 3~6은 1.25~25 mg/L까지의 농도에서 각 농약의 영향과 혼합에 따른 독성의 차이 및 보조성분의 영향을 나타냈다. 1.25 mg/L에서 25 mg/L 농도까지인 제초제, 살충제, 살균제, 제초제+살충제, 제초제

Table 1. Composition of SGI (Sager et al., 1953)

Stocks		Trace (Bring to one litre)	
Na ₂ C ₆ H ₅ O ₇ · 2H ₂ O	50.0 g/L	H ₃ BO ₃	0.1 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	30.0 g/L	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.1 g
NH ₄ NO ₃	30.0 g/L	MnSO ₄ · H ₂ O	0.03 g
KH ₂ PO ₄ · 3H ₂ O	10.0 g/L	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.02 g
K ₂ HPO ₄	10.0 g/L	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.02 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	5.3 g/L	CuSO ₄	0.004 g
FeCl ₃ · 6H ₂ O	1.0 g/L		

Use 1 mL of each to make 1 litre of basic medium

+살균제, 살균제+살충제가 성장속도에 미치는 영향을 나타내었다. 모든 경우가 농도가 높아질수록 평균 비성장속도값(μ)은 낮았다. 제조제인 경우 가장 큰 영향을 주었으며, 살충제와 살균제인 경우는 살충제가 살균제보다 많은 영향을 나타낸 것으로 보아 살균제가 *C. reinhardtii*에게 가장 적은 독성을 보인 것으로 판단된다. 즉 제조제가 가장 강한 독성을 보이고 그 다음으로 살충제, 살균제 순으로 *C. reinhardtii*에게 영향을 끼친 것으로 판단된다.

농약을 혼합하여 사용한 경우에는 살균제+살충제가 μ 값이 가장 높은 값을 보이고 제조제+살균제, 제조제+살충제 순으로 높은 값을 보인다. 이는 제조제+살충제가 가장 강하게 *C. reinhardtii*에게 영향을 나타낸 것으로 보이고 제조제+살균제, 살균제+살충제 순으로 완화된 독성을 보였다.

또한, 보조성분인 영향을 알아보기 위하여 각 농약들의 유효성분만을 가지고 실험을 행하였다(Fig. 5~6). 먼저 각 농약들의 평균 비성장속도값(μ)을 살펴보면 Fig. 3과 4에서와 비슷한 현상을 보였다. 즉, 제조제가 가장 강하게 *C. reinhardtii*에게 영향을 주었으며, 그 다음으로 살충제, 살균제 순으로 영향을 주었다. 또한 유효성분들을 혼합하여 사용한 실험에서는 제조제+살충제가 가장 강하게 독성을 나타낸 것은 Fig. 3, 4와 비슷하나 Fig. 5, 6에서는 살균제+살충제와 제조제+살균제는 거의 비슷한 독성을 나타냈다.

앞의 Fig. 3과 4, 그리고 Fig. 5와 6을 비교해 보면 Fig. 3과 4에서의 μ 값이 Fig. 5와 6에서보다 낮은 값을 형성하

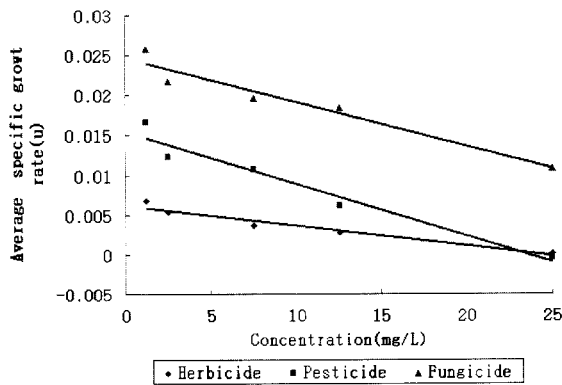


Fig. 3. Average specific growth rate(μ) of each biocide (product).

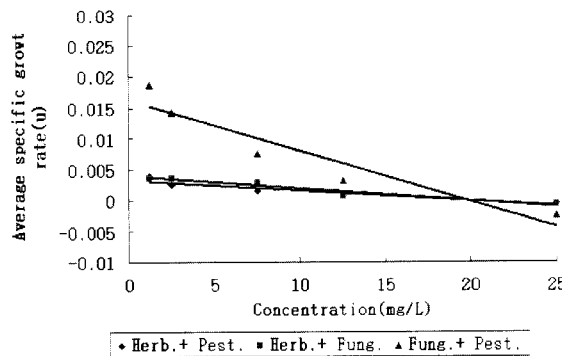


Fig. 4. Average specific growth rate(μ) of mixing biocide (product).

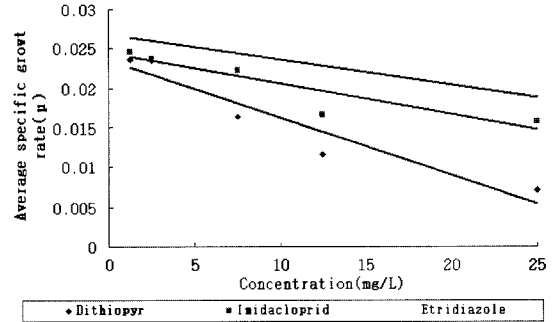


Fig. 5. Average specific growth rate(μ) of each biocide (effective component).

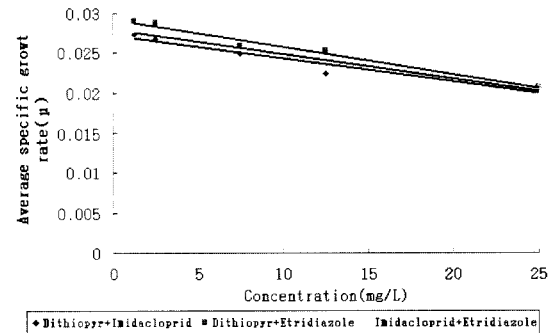


Fig. 6. Average specific growth rate(μ) of mixing biocide (effective component).

고 있다. 이는 Fig. 3과 4에서는 유효성분+보조성분인 농약을 사용하였기 때문에 보조성분으로 사용되는 계면활성제, 증량제 및 보조제 등의 독성이 농약의 유효성분의 독성과 서로 상승작용을 하여 보다 높은 작용을 일으킨 것으로 판단된다. 또한 각 농약들의 주성분의 작용기작들의 차이에도 따라 *C. reinhardtii*에게 미치는 영향이 달라질 수 있다.

3.2. EC₅₀

EC₅₀은 대조구에 비해 성장 또는 생장율을 50% 감소시키는 공시물질 농도를 나타내는데 Gamma(γ) value를 이용하여 구할 수 있다. 각 농도에서의 γ 값을 구하여 log-log graph에 나타내면 직선으로 나타나고, $\gamma=1$ 이 되는 독성물질의 농도가 1시간 동안의 EC₅₀이다(Mallak et al., 1984).

Gammar(γ) 값은 잔류하는 *C. reinhardtii*에 대하여 감소한 *C. reinhardtii*의 비이며 다음 식에 의하여 계산할 수 있다. 여기서는 제조제, 살충제, 살균제를 이용하여 EC₅₀을 산출하였다. EC₅₀이 작게 산출된 것은 적은 농도에도 *C. reinhardtii*이 민감하게 반응한다는 것을 의미하며 또한 EC₅₀이 작을수록 독성물질의 독성 정도가 강하다는 것을 의미한다.

먼저, 유효성분+보조성분일때의 제조제, 살충제, 살균제로 각각 실험을 행했을 경우(Fig. 7)에는 EC₅₀이 각각 0.0017 mg/L, 1.06 mg/L, 13.3 mg/L로 제조제가 *C. reinhardtii*에게 가장 강하게 독성을 보였고 살충제, 살균제 순으로 독성이 강하게 나타났다(Table 2).

그리고 제조제+살충제, 제조제+살균제, 살충제+살균제일

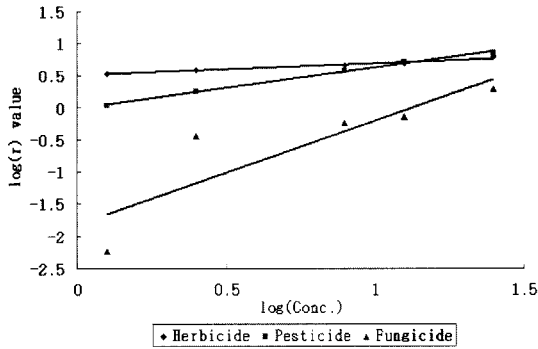


Fig. 7. Gamma(γ) value of each biocide(product).

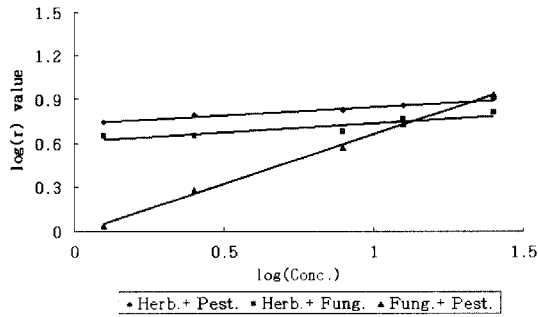


Fig. 8. Gamma(γ) value of mixing biocide(product).

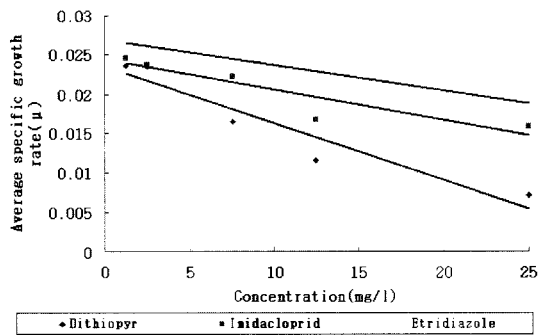


Fig. 9. Gamma(γ) value of each biocide(effective component).

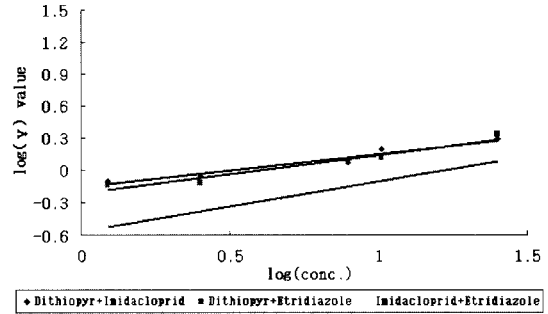


Fig. 10. Gamma(γ) value of mixing biocide(effective component).

경우(Fig. 8)에는 EC_{50} 이 각각 2.7×10^{-7} mg/L, 1.2×10^{-5} mg/L, 1.05 mg/L로 제초제+살충제, 제초제+살균제, 살충제+살균제 순으로 각각 독성이 강하게 나타남을 의미한다 (Table 2). 이 실험결과를 보면 농약을 혼합하였을 때 독성이 서로 상승작용을 하여 단일 농약일 때보다 독성이 더 강하게 나타난 것으로 판단된다.

그리고 각 농약들의 유효성분만을 가지고 행한 실험에서는 제초제, 살충제, 살균제(Fig. 9)의 EC_{50} 이 각각 5.26 mg/L, 9.37 mg/L, 20.58 mg/L로 제초제가 *C. reinhardtii*에게 가장 강하게 독성을 보였고 살충제, 살균제 순으로 독성이 강하게 나타났으며 (Table 2) 제초제+살충제, 제초제+살균제, 살충제+살균제일 경우(Fig. 10)에는 EC_{50} 이 각각 3.10 mg/L, 4.01 mg/L, 16.5 mg/L로 제초제+살충제, 제초제+살균제, 살충제+살균제 순으로 각각 독성이 강하게 나타났다 (Table 2). 이의 실험결과는 앞의 μ 값의 결과와 비슷한 결과를 보여주고 있는 것으로 보아 보조성분으로 쓰이는 계면활성제, 증량제 및 보조제가 농약의 유효성분과 혼합하였을 경우에 보다 높은 독성으로 *C. reinhardtii*에게 커다란 영향을 주고 있는 것으로 판단된다. 이는 약제의 유효, 분산, 현탁, 전착 등의 목적으로 첨가된 계면활성제가 상승작용을 일으켜 반응한 결과라 판단된다. 그리고 이(1990)의 결과에서는 제초제의 종류에 따라 *C. reinhardtii*의 EC_{50} 값

Table 2. EC_{50} of each biocide of *C. reinhardtii* at 72 hour

Product		Effective Component	
Toxic substance	EC_{50} (mg/L)	Toxic substance	EC_{50} (mg/L)
Herbicide (dithiopyr+surfactant)	0.0017	Herbicide (dithiopyr)	5.26
Pesticide (imidacloprid+surfactant)	1.06	Pesticide (imidacloprid)	9.37
Fungicide (etridiazole+surfactant)	13.3	Fungicide (etridiazole)	20.58
Herb.+Pest. (dithiopyr+imidacloprid+surfactant)	2.7×10^{-7}	Herb.+Pest. (dithiopyr+imidacloprid)	3.10
Herb.+Fung. (dithiopyr+etridiazole+surfactant)	1.2×10^{-5}	Herb.+Fung. (dithiopyr+etridiazole)	4.01
Fung.+Pest. (etridiazole+imidacloprid+surfactant)	1.05	Fung.+Pest. (etridiazole+imidacloprid)	16.5

이 0.12 mg/L(alachlor)에서 2320 mg/L(2,4-D)까지 아주 큰 폭을 보였다. 또한 살충제의 유효성분으로 쓰인 imidacloprid은 9~33 mg/L에서 남조류와 규조류의 성장을 감소한다는 연구 보고도 있다(Insecticide factsheet, 2001). 이는 농약성분들의 유효성분이 달라 미생물에게 미치는 영향이 다른 때문이라고 판단된다. 또한 앞에서의 결과로 보면 살충제와 살균제는 실제로 자연계에서 검출될 수 있는 농도보다 매우 높은 농도이다. 그러나 제조제인 경우는 매우 낮은 농도에서 저해효과가 나타나는 것으로 보아 많은 양이 지속적으로 사용되었을 경우 *C. reinhardtii*의 성장에 대한 영향을 초래할 수도 있다. 그리고 이러한 농도들을 실험실 내에서의 지수성장기에서 산출된 농도이므로 실제 자연 상태에서의 농도는 더 낮아질 수도 있을 것이다. 또한 *C. reinhardtii*가 속한 녹조생물은 농약에 대해 다른 조류보다 저항성이 큰 것으로 알려져 있으며 다른 조류에 대해서는 더 낮은 농도에서 성장에 대한 효과가 있을 것으로 사료된다(이, 1983).

4. 결론

본 연구에서는 국내에서 다량 사용되고 있는 농약의 독성을 *C. reinhardtii*를 이용하여 관찰한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 각 농약의 종류와 농도에 따른 *C. reinhardtii*의 평균비 성장속도(μ)를 실험한 결과, 제조제가 가장 큰 독성을 나타내었고 혼합시 사용한 결과에서는 제조제+살충제가 큰 독성을 나타내었다. 또한 각 농약 종류별 농도에 따른 μ 는 농약의 농도가 높아질수록 μ 는 낮아지는 경향을 보였으나 종류에 따라 다소 차이를 보였다. 이는 각 농약들의 주 성분의 작용기작들의 차이에 따라 다르게 나타나는데 특히 제조제로 쓰인 농약의 성분인 dithiopyr가 광합성을 저해하는 성질이 있기 때문에 제조제가 보다 큰 영향을 준 것으로 판단된다.
2. 시판되고 있는 농약의 종류별 EC₅₀을 측정한 결과, 단일 농약일 때는 제조제, 살충제, 살균제가 각각 0.0017 mg/L, 1.06 mg/L, 13.3 mg/L로 독성이 강하게 나타났으며, 혼합시에는 제조제+살충제, 제조제+살균제, 살충제+살균제 순으로 각각 2.7×10⁻⁷ mg/L, 1.2×10⁻⁵ mg/L, 1.05 mg/L로 제조제+살충제가 가장 독성이 강하게 나타났다.
3. 농약의 유효성분만 가지고 실험한 결과에서는 제조제, 살충제, 살균제 순으로 각각 5.26 mg/L, 9.37 mg/L, 20.58 mg/L로 제조제가 가장 독성이 강하게 나타났고 농약들을 혼합시 실험한 결과에서는 제조제+살충제, 제조제+살균제, 살충제+살균제 순으로 각각 3.10 mg/L, 4.01 mg/L, 16.5 mg/L로 각각 독성이 강하게 나타났다.
4. 독성평가 결과, 시판되고 있는 농약을 이용하였을 경우가 농약의 유효 성분만을 이용한 경우보다 독성이 높게

나타났다. 이러한 결과는 현재까지 진행되어온 농약의 유효성 성분만을 이용한 독성평가로는 실제 환경 중에서의 독성에 대한 정확한 평가를 얻기가 곤란하다고 판단되며, 추후 보조성분만의 경우 어떠한 영향을 미치는지에 대해서 보다 많은 고찰이 필요하다고 판단된다.

사 사

이 논문은 2004년도 두뇌한국21 사업에 의하여 지원되었습니다.

참고문헌

- 김은주, 이성규, 환경독성 평가를 위한 좁개 구리밭의 성장 저해시험법에 관한 연구, *한국환경독성학회지*, **16**, pp. 205-209 (2001).
- 신우석, 이용두, 고인범, *Chlamydomonas reinhardtii*를 이용한 농약의 독성평가, *대한상하수도학회·한국물환경학회 2004년 공동 추계학술발표회 논문집*, p. 71 (2004).
- 이은경, *Chlamydomonas reinhardtii*의 성장에 미치는 biocides의 영향, 서울대학교 대학원 석사학위논문, p. 19 (1983).
- 이창균, *Chlamydomonas reinhardtii*의 성장에 미치는 환경오염원의 영향, 밀양대학교 대학원 석사학위논문, p. 9 (1990).
- Britz, M. L., Simonov, N. and Chun, U. H., Stabilization of Bioluminescence of Immobilized Photobacterium phosphoreum and Monitoring of Environmental Pollutants, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **7**, pp. 242-249 (1997).
- Insecticide Factsheet, Imidacloprid, *J. Pest. Reform*, **21**, p. 19 (2001).
- Mallak, F. P. and Brunner, R. L. Determination of the Toxicity of Selected Metalworking Fluid Preservatives by Use of the Microtox System and an in vitro Enzyme Assay, In Liu D. and Dutka(ed.), *B. J. Toxicity Screening Procedures using Bacterials Systems*, Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 65-76 (1984).
- Patin, S. A., Pollution and the Biological Resources of the Oceans, Butter worth Scientific Press, London, pp. 80-109 (1982).
- Ramanathan, S., Ensor, M. and Daunert, S., Bacterial Biosensors for Monitoring Toxic Metals, *TIBTECH.*, **15**, pp. 500-506 (1997).
- Rochaix, J. D., Mayfield, S., Goldschmit, C. M. and Erickson, J., Molecular biology of *Chlamydomonas* : In Plant Molecular Biology., IRL PRESS, Oxford, pp. 253-25 (1988).
- Sager, R. and S. Granick, Ann, N, Y, Acad., Sci., **56**, pp. 831-838 (1953).
- van Dyk, T. K., Majarian, W. R., konstantinov, K. B., Young, R. M., Dhurjati, P. S. and Larossa, R. A., Rapid and Sensitive Pollutant Detection by Induction of Heat Shock Gene-Bioluminescence Gene Fusions, *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, pp. 1414-1420 (1994).