

농약alachlor, butachlor 및 fipronil이 제브라피쉬 배아 발생에 미치는 영향

박수진¹ · 정미혜^{2*} · 백민경³ · 이제봉² · 유아선² · 흥순성² · 임양빈²

¹(주)한국생물안전성연구소, ²농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부 농자재평가과

³농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부 화학물질안전과

Study on Development Effect on Zebrafish Embryo by Alachlor, Butachlor and Fipronil

Soo Jin Park¹, Yeana Shin², Mihye Jeong^{2*}, Min-Kyoung Paik³, Je-Bong Lee², Are-Sun You², SoonSung Hong² and Yang Bin Ihm²

¹Korea Bio-Safety Institute Co., LTD. Eumseong 362-20, Korea

²Agro-Material Safety Evaluating Division, Department of Agro-Food Safety, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea

³Chemical Safety Division, Department of Agro-Food Safety, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea

(Received on November 14, 2013. Revised on November 24, 2013. Accepted on February 5, 2014)

Abstract This study is aimed to search the possibility of developmental toxicity test using the zebrafish from the pesticide. We selected herbicidesalachlor and butachlor, reported for fish toxicity, and insecticide fipronil reported for the high fish toxicity and the honey bee risk among the pesticides with high usability for the examples of the pesticides in this experiment. In this study, we showed those effects on the zebrafish embryo development by exposing different kinds of pesticide with different concentration and exposed time periods. As a result, the rates of hatching and abnormality of the zebrafish embryo after treatments ofalachlor were increased in 24-48 hpf group, and the juvenile fishes in every group exposed to 40 μM or more ofalachlor displayed sever morphological changes such as bent tails, edema and activity failures. In case of the butachlor, the rates of hatching and the abnormality in 24-48 hpf group were higher than the other groups exposed in different time periods. The fatality before hatching was high in 40 μM or more of butachlor treatment, and entire zebrafish embryos in 48 hpf group died before hatching. All the living juvenile fishes showed morphological changes as like as the treatment ofalachlor. The rate of hatching and the survival of the zebrafish embryo by the fipronil were higher than other pesticides. However, morphological changes such as bent tails were observed from the most of living juvenile fishes. Therefore, the effects of three different pesticides with different concentrations and exposing time periods on the development of zebrafish embryos showed that all the pesticides effects were proportional to the concentration, and exposing time periods may cause the morphological abnormality.

Key wordsalachlor, butachlor, developmental toxicity test, fipronil, Zebrafish embryo

서론

Alachlor는 선택성 제초제로 신초 및 뿌리에 의해 흡수되어 식물체로 이동되고 축적되는 물질로, 단백질합성차단에

의한 세포분열 억제 및 뿌리발육을 저해하고, elongase 억제하며, geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) 고리화효소, 지베렐린 경로의 일부를 억제한다(Tomlin, 2009), 국내에서는 3품목 등록되어 있다(Korea Crop Protection Association, 2013). Butachlor는 chloroacetamider계의 제초제로, 비제배용으로 가장 많이 사용되고 있으며, 국내 Butachlor 10품목 등록되어 사용되고 있다(Korea Crop Protection Association,

*Corresponding author

Tel: +82-31-290-0593, Fax: +82-31-290-0508

E-mail: mhjeong@korea.kr

2013) 또한, Fipronil은 흡습성, 저작성 해충에 대해 높은 살충효과를 갖는 phenylpyrazole계열의 살충제로 γ -amino butyric acid (GABA) 수용기에 길항제로 작용하고 GABA유래의 Cl-채널을 차단하여 과도한 흥분상태를 유발하여 살충효과를 나타내며(Kim et al., 2009; Kang et al., 2002; Cole et al., 1993; Tomlin, 2009; Moffa, 1993), 국내에서는 3품목이 등록되어 사용되고 있다(Korea Crop Protection Association, 2013). Lee et al. (2007)은 수계 및 토양의 잔류농약을 모니터링결과alachlor 검출되었음을 보고하였고, Sanchez-Camazano (2005)과 Vryzas (2011) 또한alachlor 등 15종 농약에 대해 수로에 서식하는 환경생물의 위해성을 보고 하였다. 또한 WWF (World Wildlife Funds)에서는alachlor를 내분비계 장애추정 물질로 분류하였고, 국내에서는 취급제한목록으로 분류하고 있다(National Institute of Environmental Research, 1999)

Butachlor는 농약 사용량이 많은 5-6월에 하천수 중 잔류량이 검출되는 것으로 보고되고 있다(Park et al., 2009).

Fipronil의 경우 꿀벌에 대한 급성독성이 매우 높고 장기간의 잔류독성이 있다고 보고되고 있다(Kim et al., 2009). Mendoza-Elias는 zebrafish 배아를 fipronil에 노출시켰을 때 333 $\mu\text{g/L}$ 에서 기형이 관찰되었다고 보고하였다(Mendoza-Elias, 2006).

Zebrafish는 유전자종류가 인간과 매우 유사한 척추동물로 발생배의 대량채취가 가능하다. Zebrafish는 10 hpf (수정 후 10시간. hpf; hours post fertilization) 동안 낭배가 형성되고, 10-24 hpf(수정 후 10시간부터 24시간)에는 체절이 형성되며, 2 dpf (수정 후 2일. dpf; day post fertilization)에는 부화 3 dpf에는 내장형성이 완성된다(Kwon et al., 2006; Kimme, 1995) 이처럼 개체발생 및 기관형성과정이 매우 빠르게 진행되고, 배아가 투명하여 in vivo imaging이 가능하여 발생과정에서 일어나는 cellular process의 변화 관찰이 용이하여 질병 및 돌연변이 형성과정을 실험현미경에서 쉽게 관찰할 수 있어 질병관련 유전자 탐색 및 발생독성시험에 사용되고 있다(Kim et al., 2005; Kwon et al., 2006; Graham et al., 2007; Feitsma et al., 2008; Amatruda et al., 2002; Stern and Zon, 2003).

Carla et al. 등은 zebrafish의 배아에 fipronil을 노출시켰을 때 발생신경독성에 미치는 영향을 측정 결과, 333 $\mu\text{g/L}$ 이상의 농도에서 기형이 관찰되었다 하였고(Carla et al, 2006), Selderslaghs et al.은 zebrafish의 배아를 사용하여 기형 및 배아독성에 규명을 위한 시험방법을 스크리닝하기 위하여 시험물질 retinolic acid, valproic acid, caffeine 및 lithium chloride을 zebrafish의 배아에 24 hpf, 48 hpf, 72 hpf 그리고 144 hpf에 각각 노출시켜 LC₅₀ 및 행동에 미치는 영향연구를 수행하였다(Selderslaghs et al., 2009). 또한, Hong et al.은 Somite stage에 노출된 은나노입자가

zebrafish에 미치는 영향연구에서 somite stage에 노출된 zebrafish의 배아가 somite stage 이전에 노출된 배아에서 보다 낮은 부화율과 높은 이상율을 나타낸다고 하였다(Hong et al., 2009).

Zebrafish 배아를 사용한 발달독성 시험연구가 국내외로 진행되고 있으나, 국내zebrafish 배아를 사용한 발달독성에 대한 연구는 부족한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 사용량이 많은 농약 중 제초제alachlor 및 butachlor와 살충제 fipronil을 시험물질로 선정하였고, zebrafish의 배아에 발달단계를 달리하여 노출시켰으며 zebrafish 발생에 미치는 영향 및 발생독성시험의 가능성을 모색해 보았다.

재료 및 방법

시험물질

시험물질은alachlor (99.2%. 45316, Sigma-Aldrich Co. LLC., USA), butachlor (97.0%. 37887, Sigma-Aldrich Co. LLC., USA), fipronil (97.9%. 46451, Sigma-Aldrich Co. LLC., USA)을 사용하였으며, acetone으로 200 mM stock solution 조제 후 60 $\mu\text{g/ml}$ sea salt (S9883, Sigma-Aldrich Co. LLC., USA) (Westerfield, 1995)를 사용하여 0, 20, 40, 80, 160 및 320 μM 로 각각 조제 후 시험에 사용하였다.

시험용수

시험용수는 24시간동안 기포기를 사용하여 공기공급 후 사용하였고, pH meter (Orion Star A216., Thermo Electron Coporation., USA)와 DO meter(Orion 4-Star pH/DO meter., Thermo Electron Coporation., USA)로 pH 및 용존산소량을 측정하였다.

시험생물

시험생물은 국립농업과학원 안전성부 화학물질안전과 어류사육실에서 사육되어진 7-8월령의 zebrafish (*Danio rerio*)를 사용하였다.

알과 성어를 분리하기 위한 망을 설치한 수조에 암컷과 수컷 성어를 1:2의 비율로 넣고 18-24시간 후 zebrafish 알을 채취하였다. 채취 후 20.5 \pm 1°C에서 배 발생을 지연시킨 후 60 $\mu\text{g/ml}$ sea salt (Westerfield, 1995)로 수회 세척하여 이물질 등을 제거 후 시험에 사용하였다.

시험방법

대조군과 시험군으로 나누어 시험하였으며, 시험군은 시험물질의 농도 및 노출시기를 달리하여 시험하였다(Hong et al., 2009; Chapin et al., 2008). 노출시기는 3단계로 수정 후-24시간(24 hpf ; heures postfertilization), 수정 후 24-48시간

(24-48 hpf), 수정후-48시간(48 hpf)에 각각 zebrafish 배아를 노출시켜 발생에 미치는 영향을 측정하였고, 각 농약의 노출농도는 0, 20, 40, 80, 160, 320 µM였다. 또한 각 시험군 당 15개씩의 배아를 노출시켰다.

이상증상 및 치사율 관찰

노출 24-168시간까지 24시간 간격으로 치사율, 부화율 등을 측정하였고, 120시간째 morphology를 현미경(TE2000-U, Nikon Co., Japan)으로 확인하여 이상개체를 관찰하였다. 이상율은 부화후 생존한 zebrafish 치어를 관찰하여 측정하였으며, 색소이상, 부종, 척추휨을 이상형태로 판단하였다.

통계처리방법

120시간째 관찰결과로 LC₅₀과 95% 신뢰한계는 Probit method (Minitab ver14, USA) 통계프로그램을 사용하여 계산하였다.

Table 1. Condition of embryo medium

	pH-values	Dissolved oxygen (mg/L)
Embryo medium	6.78	9.8

결과 및 고찰

pH값 및 용존산소량

Zebrafish embryo medium의 pH값 및 용존산소량 측정결과, pH값은 6.78였고, 용존산소량은 9.8 mg/L로 측정되었다 (Table 1).

Embryo medium의 적정 pH값의 범위를 Engeszer et al. (2007)은 5.9-8.1, Brand et al (2002)은 6.8-7.5라 보고하였고, Matthews (2002)은 용존산소량이 6.0 mg/L 이상이면 embryo medium의 적정범위라 하였다. 따라서 본 시험에서 zebrafish 및 zebrafish 배아 배양시 사용될 용수의 pH값 및 용존산소량의 범위가 적정 범위임을 확인 할 수 있었다.

치사율 및 LC₅₀

3종의 시험물질을 zebrafish 발생배에 노출시켜 24시간마다 치사율을 측정하였고, 120시간째의 치사율로 LC₅₀ 값을 산출하였다(Chapin et al., 2008)

그 결과, 치사율은 농도의존적이었다. LC₅₀ 값은 alachlor 24 hpf는 128.46 µM (0.0347 µg/L), 24-48 hpf의 경우 95.36 µM (0.0257 µg/L), 48 hpf는 43.60 µM (0.0117 µg/L)였다. Tomlin은 alachlor의 어종간의 급성독성은 96시간 LC₅₀ 값이

Table 2. Result of Mortality and LC₅₀ for exposure to by pesticides exposure

hpf ^{a)}	µM	Mortality (%)			LC ₅₀		
		Alachlor	Butachlor	Fipronil	Alachlor	Butachlor	Fipronil
24	Contol	0.00	0.00	0.00			
	VC ^{b)}	0.00	0.00	0.00	128.46 µM	39.20 µM	307.69 µM
	20	20.00	26.67	0.00	(96.50-177.44 µM)	(28.25-51.86 µM)	(245.86-438.56 µM)
	40	26.67	66.67	0.00			
	80	40.00	86.67	6.67			
	160	46.67	100.00	26.67	0.0347 µg/L	0.0122 µg/L	0.1342 µg/L
24-48	320	100.00	100.00	46.67	(0.0261-0.0479 µg/L)	(0.0088-0.0162 µg/L)	(0.1073-0.1913 µg/L)
	Contol	0.00	0.00	0.00			
	VC	0.00	0.00	0.00	65.65 µM	33.34 µM	118.19 µM
	20	20.00	20.00	6.67	(43.90-94.58 µM)	(24.41-42.42 µM)	(84.57-175.15 µM)
	40	26.67	53.33	20.00			
	80	53.33	100.00	20.00			
48	160	73.33	100.00	46.67	0.0257 µg/L	0.0115 µg/L	0.0648 µg/L
	320	100.00	100.00	100.00	(0.0191-0.0354 µg/L)	(0.0091-0.0152 µg/L)	(0.0513-0.0863 µg/L)
	Contol	0.00	0.00	0.00			
	VC	0.00	0.00	0.00	39.75 µM		73.69 µM
	20	13.33	100.00	20.00	(31.23-50.19 µM)		(44.07-119.25 µM)
	40	33.33	100.00	20.00		NA ^{c)}	
48	80	100.00	100.00	66.67			
	160	100.00	100.00	73.33	0.0117 µg/L		0.0558 µg/L
	320	100.00	100.00	80.00	(0.0095-0.0153 µg/L)		(0.0376-0.0793 µg/L)
	320	100.00	100.00	80.00			

a) heures postfertilization, b) Vehicle Control (Vechicle; 0.16% acetone), c) not applicable, not observed because of 100% mortality

rainbow trout 5.3 mg/L, bluegill sunfish 5.8 mg/L, channel catfish 2.1 mg/L, seepshead minnow 3.9 mg/L라 하였다 (Tomlin, 2009).

Han (2004)은 무당개구리 배아를 5, 10, 20, 40 uM에서 배양한 결과, 배아생존율이 71.0%, 56.8%, 18.8%, 0%로 40 uM의 농도에서는 100% 치사하였고, 농도가 증가함에 따라 생존율이 감소하였다고 보고하였다.

Butachlor 24 hpf는 39.20 µM (0.0122 µg/L), 24-48 hpf는 36.85 µM (0.0115 µg/L)이었으며, Butachlor 48 hpf 군은 모든 농도에서 치사하여 LC₅₀을 산출할 수 없었다. Tomlin은 어류독성 96시간 LC₅₀ 값이 butachlor rainbow trout 0.52 mg/L, bluegill sunfish 0.44 mg/L, channel catfish 0.1-0.42 mg/L, crap 0.574 mg/L, fathead minnow 0.31 mg/L라 하였다(Tomlin, 2009).

Fipronil의 경우alachlor와 butachlor에 비해 치사율이 낮았고, LC₅₀은 24 hpf 307.69 µM (0.1342 µg/L), 24-48 hpf는 148.09 µM (0.0648 µg/L), 48 hpf는 127.64 µM (0.0558 µg/L)로 나타났다(Table 2). Fipronil은 어류독성 96시간 LC₅₀ 값이 rainbow trout 248 mg/L, bluegill sunfish 85 mg/L, european carp 430 ug/L라 보고되어있다(Tomlin, 2009).

따라서 본 연구결과와 Tomlin가 보고한 각 시험물질에 따른 LC₅₀은 크게 차이가 있으나, 이는 시험생물에 따른 차이로 사료된다.

또한, 각 시험물질의 치사율과 LC₅₀ 값이 zebrafish 배아의 수정 후부터 체절형성이후(48 hpf)까지 긴 시간 시험물질에 노출되었을 때 LC₅₀ 값이 가장 낮았고, 체절형성이후(24-48 hpf)가 체절형성이전(24 hpf)보다 LC₅₀ 값이 낮았다. 따라서, 노출시간이 길수록, 체절형성이전에 비해 체절형성이후 시점에서 유해성이 크다고 사료된다.

부화율 및 부화 후 생존율

Alachlor와 fipronil의 부화율 및 부화 후 생존율을 살펴본 결과, 24 hpf(체절형성이전)의 시험물질 노출이 부화에 미치는 영향이 가장 적었으며, 모든 시험군에서 부화 후 생존율이 높게 나타났다.

Butachlor의 경우 40 µM 이상 농도에서 부화전 치사율이 높았고, 부화후 치사율 또한 다른 시험물질에 비해 높게 나타났다(48 hpf) zebrafish 배아는 부화 전 모두 치사되었다(Table 3).

Table 3. Result of hatching and survival for exposure by pesticides exposure

hpf ^{a)}	µM	Alachlor		Butachlor		Fipronil	
		Rate of hatch (%)	Post hatching survival (%)	Rate of hatch (%)	Post hatching survival (%)	Rate of hatch (%)	Post hatching survival (%)
24	Control	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
	VC ^{b)}	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
	20	86.67	92.31	73.33	100.00	100.00	100.00
	40	86.67	84.62	46.67	71.43	100.00	100.00
	80	80.00	75.00	40.00	33.33	93.33	100.00
	160	66.67	80.00	0.00	NA	86.67	84.62
	320	0.00	NA ^{c)}	0.00	NA	73.33	72.73
24-48	Control	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
	VC	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
	20	80.00	100.00	86.67	92.31	93.33	100.00
	40	86.67	92.31	93.33	50.00	80.00	100.00
	80	80.00	75.00	93.33	0.00	86.67	92.31
	160	86.67	46.15	86.67	0.00	73.33	72.73
	320	86.67	0.00	80.00	0.00	73.33	0.00
48	Control	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
	VC	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
	20	86.67	100.00	0.00	NA	80.00	100.00
	40	73.33	90.91	0.00	NA	86.67	92.31
	80	0.00	NA	0.00	NA	40.00	83.33
	160	0.00	NA	0.00	NA	46.67	57.14
	320	0.00	NA	0.00	NA	40.00	50.00

a) heures postfertilization, b) Vehicle Control (Vechicle; 0.16% acetone), c) not applicable, not observed because of 100% mortality

Table 4. Result of total abnormal rate for exposure by pesticides exposure

hpf ^{a)}	Total Abnormal rate (%)			
	μM	Alachlor	Butachlor	Fipronil
24	Contol	0.0	0.0	0.0
	VC ^{b)}	0.0	0.0	0.0
	20	0.0	100.0	93.3
	40	18.2	100.0	86.7
	80	55.6	100.0	92.9
	160	100.0	NA	100.0
	320	NA ^{c)}	NA	100.0
24-48	Contol	0.0	0.0	0.0
	VC	0.0	0.0	0.0
	20	0.0	100.0	100.0
	40	27.3	100.0	100.0
	80	100.0	NA	100.0
	160	0.0	NA	100.0
	320	NA	NA	NA
48	Contol	0.0	0.0	0.0
	VC	0.0	0.0	0.0
	20	15.4	NA	100.0
	40	90.0	NA	100.0
	80	NA	NA	100.0
	160	NA	NA	100.0
	320	NA	NA	100.0

a) heures postfertilization, b) Vehicle Control (Vechicle; 0.16% acetone), c) not applicable, not observed because of 100% mortality

이상율

시험물질 3종 alachlor, butachlor 및 fipronil을 zebrafish 배아에 노출시켜 발생과정중에 나타나는 기형형태를 관찰한 결과는 Table 4와 Fig. 1-4와 같다.

Alachlor 40 μM 이상 농도에 노출된 모든 군의 치어에서 척추휨 증상, 부종이 관찰되었으며 활동성 저하의 증상이 관찰되었다

Lee et al. (2012)은 송사리에 alachlor를 노출시켜 단기변식독성시험을 한 결과, 0.68 ppm에서 대조군 대비 산란수가

47% 감소하였고, 유정란율은 47.8% 감소하였으며, 기형을 또한 농도의존성 경향이 관찰되었다고 보고하였고(Lee et al., 2012), Lee et al. (2004)은 100 ug/L를 노출시킨 송사리 초기 생활사시험에서 성장 및 발육저해가 나타났다고(Lee et al. 2004), 본 시험의 결과와 유사한 경향을 나타냈다. Han et al. (2004)은 alachlor를 5, 10, 20, 40 uM의 농도로 노출시킨 무당개구리에서 몸통 휨, 꼬리형성장애, 꼬리 휨, 성장장애 및 복부수포 등의 기형이 43.2%, 34.1%, 11.4%, 9.1%, 2.3%의 빈도로 나타났다고 보고하였다(Han et al., 2004).

Butachlor에 노출된 시험군에서, 척추휨과 심한 부종이 관찰되었다. Liu et al. (2011) butachlor 4.8 mg/L 농도에서 올챙이 DNA 손상이 있었음을 보고하였고, Dwivedi et al. (2012)은 butachlor 25 uM 처리시 DNA손상 및 necrosis를 유발한다고 보고하였으며, 이는 butachlor가 발생과정 중 DNA손상 등을 일으키며, 이로인해 기형이 유발된다고 사료되어진다. Park et al. (2009)은 butaclor의 수서생물에 대한 위해성평가 결과 butachlor 처리한 잉어 중 1.0 mg/L 농도에서와 송사리 중 0.35, 0.42, 0.51 mg/L 농도에서 평형상실, 수조바닥 또는 수면 위 유영개체가 있었다고 보고했다. 또한, 논에서의 TER (Toxicity exposure ratios)산출결과 어류 및 조류가 위해가능성이 있다고 보고하였으며, 미꾸리산란시기와 butachlor의 사용시기가 비슷하므로 수정란과 치어에 의한 영향은 우려된다고 보고하였다.

Fipronil 이상을 또한 높아 생존한 대부분의 치어에서 꼬리휨 증상이 관찰되었다. Stehr et al. (2006)은 fipronil을 이

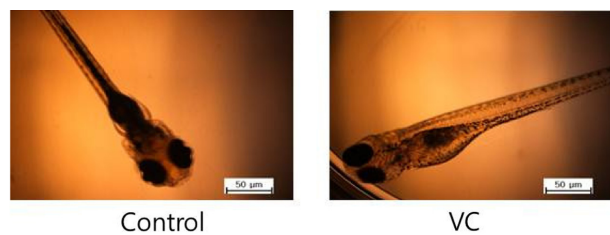


Fig. 1. The development effects on juvenile fishes of zebrafish embryo exposed to egg water (control) and 0.16% acetone (Vehicle Control).

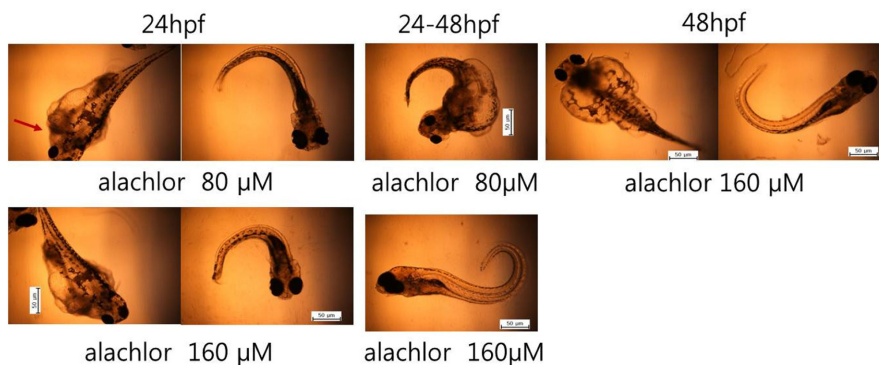


Fig. 2. The development effects on juvenile fishes of zebrafish embryo exposed to alachlor.

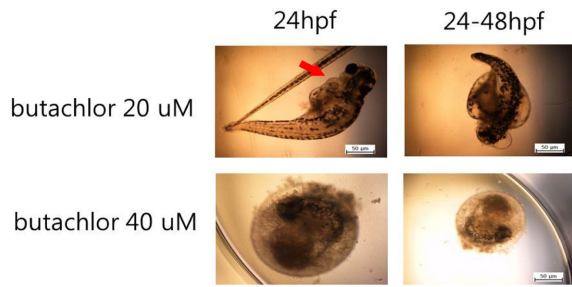


Fig. 3. The development effects on juvenile fishes of embryo exposed to butachlor.

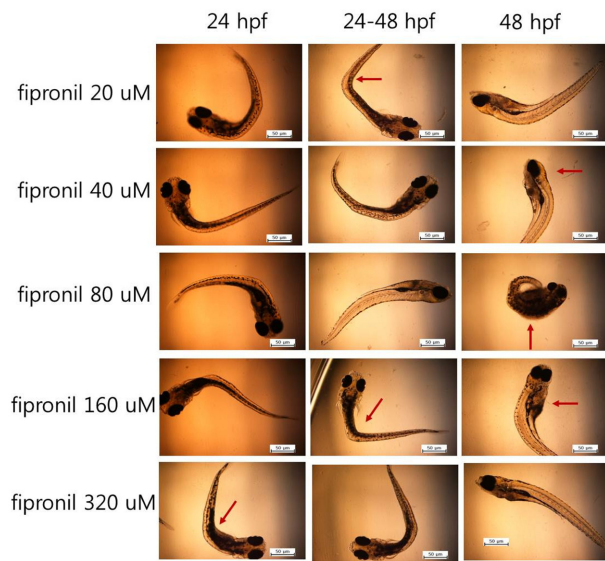


Fig. 4. The development effects on juvenile fishes of embryo exposed to fipronil.

용한 발달 및 신경독성연구에서 333 ug/L 이상의 농도에서 zebrafish 기형 등 발달에 영향을 준다고 보고 하여 본 연구의 결과와 유사한 경향을 보였다.

Han et al. (2004)은 꼬리 휨, 몸통휨 등의 골격계 이상은 기형형성물질이 신경계에 영향을 미쳤기 때문이라고 하였고 (Han et al., 2004), Roth 또한 골격계 이상은 기형형성물질이 신경계에 영향을 미치기 때문이라고 보고하였다(Roth, 1991).

따라서 본 연구에서 사용된 시험물질alachlor, butachlor 및 fipronil을 zebrafish 배아 발생단계에 따라 노출시켜 관찰결과, 꼬리휨, 척추휨, 부종 등의 기형현상이 나타났으며, 이는 시험물질이 zebrafish 신경계에 영향을 미쳐 발생된 결과라 사료된다. 또한, 향후 더 전문적인 다양한 연구를 통해, 기형발생기전 규명연구가 이루어져야 할 것이라 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2013년 농촌진흥청 국립농업과학원 박사후연수 과정지원사업에 의해 이루어진 것이며(과제번호: PJ008582), 이에 감사드립니다.

Literature cited

Amatruda, J. F., J. L. Shepard and H. M. Stern (2002) Zebrafish as a cancer model system. *Cancer cell.* 1:229-231.

Brand, M., M. Granato and C. Nüßlein-Volhard (2002) 'Keeping and raising zebrafish' in Nüßlein-Volhard & Dahm Zebrafish - A Practical Approach Oxford University Press, Oxford, UK.

Chapin, R., K. A. R. Beyer, B. G. Daston, R. Finnell, T. Flynn, S. Hunter, A. M. Piersma, D. Sandler and P. Vanparry (2008) State of the art in developmental toxicity screening methods and way forward: A meeting report addressing embryonic stem cell, whole embryo culture, and zebrafish. *Birth defects research (Part B)* 83:446-456.

Cole, L. M., R. A. Nicholson and J. E. Casida (1993) Action of phenylpyrazole insecticides at the GABA-gated chloride channel. *Pestic Biochem Physiol.* 46:47-54.

Dwivedi, S., Q. Saquib, A. Al-Khedhairi and J. Musarrat (2012) Butachlor induced dissipation of mitochondrial membrane potential, oxidative DNA damage and necrosis in human peripheral blood mononuclear cells. *Toxicology* 302:77-87.

Engeszer, R. E., L. B. Patterson, A. A. Rao and D. M. Parichy (2007) 'Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field' *Zebrafish* 4:21-38.

Feitsma, H. and E. Cuppen (2008) Zebrafish as a cancer model. *Mol Cancer Res.* 6:685-94.

Graham, J. L. and D. C. Peter (2007) Animal models of human disease zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet.* 8:353-367.

Hong, S. H., H. G. Song, K. J. Jeong, K. I. Ko and M. K. Yeo (2009) Effects of Silver Nanoparticles Exposed in Somite Stage on Zebrafish Development. *J. Environ Toxicol.* 24:17-23.

Kang, S. H., C. G. Myung, J. S. Lee, Y. D. Yoon and M. K. Kim (2004) Effects ofalachlor and endosulfan on the survival and malformation of bombina orientalis embryos. *Korean J. Environ. Bio.* 22:300-307.

Kang, S. M., C. H. Lee, O. J. Park, J. H. In, H. J. Yoon and O. K. Kuyen (2002) Efficacy of Fipronil-applied Canine Hair against House Dust Mites. 19:215-218.

Kim, B. S., Y. J. Yang, Y. K. Park, M. H. Jeong, A. S. You, K. H. Park and Y. J. Ahn (2009) Risk Assessment of fipronil on Honeybee (*Apis mellifera*). *Korean J. Pestic. Sci.* 13:39-44.

Kim, K. W., J. C. Ann and J. A. Park (2005) Using zebrafish and future research trends. *Biowave* 7:1-12.

Kimme, W., S. Ballard, B. K. Ullman and T. Schilling (1995) Stages of embryonic development in zebrafish, *Developmental Dynamics* 203:253-310.

Korea Crop Protection Association (2013) Pesticide Use Guidelines.

Kwon, H. B., H. J. Lee, and K. W. Kim (2006) Studies using zebrafish blood vessels through-Study of imiin vivo imaging studies *Biowave* 8:1-11.

- Lawrence, C. (2007) 'The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review' *Aquaculture* 269, p1-20.
- Liu, W. Y., C. Y. Wang, T. S. Wang, G. M. Fellers, B. C. Lai and Y. C. Kam (2011) Impacts of the herbicide butachlor on the larvae of a paddy field breeding frog (*Fejervarya limnocharis*) in subtropical Taiwan. *Ecotoxicology* 20:377-384.
- Lee, C., H. M. Kim, J. Yoon, S. H. Song, J. Ryu, E. K. Kim, C. Y. Yang, Y. H. Chung, K. Choi and M. S. Lee (2007) Ecological Risk Assessment of Alachlor Using Medaka (*Oryzias latipes*) and Earthworm (*Eisenia fetida*). *Korean J. Environ. Biol* 25:1-7.
- Lee, C. J., S. Y. Ryu, K. Park, S. H. Choi, J. G. Jeon and D. G. Rhee (2004) Effect of alachlor on the early development and induction of estrogen-responsive genes. *Organohalogen compounds* 66:2951-2957.
- Lee, J. B., Y. K. Park, Y. W. Chio, B. S. Kim, H. Y. Kwon, Y. D. Jin, G. J. Im and K. Y. Kang (2012) Evaluation of endocrine disrupting effect of the herbicide Alachlor on Japanese Medaka using short term reproduction assay. *Korean J. Pestic. Sci.* 16:187-193.
- Matthews, M., B. Trevarrow and J. Matthews (2002) 'A virtual tour of the Guide for zebrafish users' *Lab Animal* 31, p34-40.
- Moffat, A. S. (1993) New Chemicals seek to outwit insect pests. *Science (Wash., DC)* 22:495-504.
- National Institute of Environmental Research (1999) Comprehension and Reaction of Endocrine Disrupting Chemicals.
- Park, Y. K., C. H. Bae, B. S. Kim, J. B. Lee, A. S. You, S. S. Hong, K. H. Park, J. S. Shin, M. K. Hong, K. S. Lee and J. H. Lee (2009) The risk assessment of butachlor for the freshwater aquatic organism. *Korean J. Pestic. Sci.* 13:1-12.
- Roth, M. (1991) Campomelic syndrome: experimental models and pathomechanism. *Pediatr. Radiol.* 21:220-225.
- Sanchez-Camazona, M. L., F. Lorenzo and M. J. Sanchez-Martin (2005) Atrazine and alachlor inputs to surface and ground waters in irrigated corn cultivation areas of Castilla-Leon, Spain. *Environ monit Assess.* 105:11-24.
- Selderslaghs, I. W. T., A. R. V. Rompay, W. D. Coen and H. E. Witters (2009) Development of a screening assay to identify teratogenic and embryotoxic chemicals using the zebrafish embryo. *Reproductive Toxicology.* 28:308-320.
- Stern, H. M. and L. I. Zon (2003) Cancer genetics and drug discovery in the zebrafish. *Nature review cancer.* 3:533-539.
- Stehr, C. M., T. L. Linbo, J. P. Incardona and N. L. Scholz (2006) The Developmental Neurotoxicity of Fipronil: Notochord Degeneration and Locomotor Defects in Zebrafish Embryos and larvae. *Toxicological sciences.* 92: 270-278.
- Tomlin, C. (2009) *The pesticide manual* (12th ed.), The British Crop Protection Council, U.K.
- Tsutomu, S. and W. Meiko (2000) Effect of certain chemicals on the reproduction of medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere.* 40:239-243.
- Vryzas, Z., C. Alexoudis, G. Vassiliou, K. Galanis and E. Papadopoulou-Mourkidou (2011) Determination and aquatic risk assessment of pesticide residue in riparian drainage canals in Northeastern Greece. *Ecotoxicol Environ Saf.* 74:174-181.
- Kim, K. W., Ann, J. C. and Park, J. A Using zebrafish and future research trends. (2005) *Biowave* 7:1-12.
- Korea Crop Protection Association (2013) *Pesticide Use Guidelines*.
- Koun, H. B., Lee, H. J. and Kim, K. W Studies using zebrafish blood vessels through-Study of imiin vivo imaging studies (2006) *Biowave* 8:1-11.

● ● 농약 alachlor, butachlor 및 fipronil이 제브라피쉬 배아 발생에 미치는 영향

박수진¹ · 정미혜^{2*} · 백민경³ · 이제봉² · 유아선² · 홍순성² · 임양빈²

¹(주)한국생물안전성연구소, ²농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부 농자재평가과

³농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부 화학물질안전과

요약 본 연구에서는 농약에서 제브라피쉬를 이용한 발생독성시험 가능성을 탐색하고자 사용량이 많은 농약 중 어독성이 보고된 제초제 alachlor 및 butachlor와 어독성이 높고 꿀벌위해성 등이 보고된 살충제 fipronil을 시험물질로 선정하였고, 농도와 노출시기를 달리하여 제브라피쉬 배아에 노출시켜 발생에 미치는 영향을 측정하였다. 그 결과, alachlor에 의한 제브라피쉬 배아의 부화율 및 이상율은 24-48 hpf 군이 높았고, 40 µM 이상 농도에 노출된 모든 군의 치어에서 꼬리휨, 부종 및 활동성 저하의 증상이 관찰되었다. Butachlor의 경우 24-48 hpf 군의 부화율과 이상율이 다른 시기에 노출된 군에 비해 높았고, 40 µM 이상 농도에서 부화전 치사율이 높았으며, 48 hpf 군 제브라피쉬 배아는 부화 전 모두 치사되었다. 생존한 모든 치어에서 꼬리휨, 부종 등 증상이 관찰되었다. Fipronil에 의한 제브라피쉬 배아의 부화율 및 생존율은 다른 농약에 비해 높았으나 생존한 대부분의 치어에서 꼬리휨 증상이 관찰되었다. 따라서, 농약 3종을 농도와 시기를 달리하여 제브라피쉬 배아의 발생에 미치는 영향을 측정된 결과, 모든 농약이 발생에 미치는 영향은 농도에 비례하였고, 형태이상 및 이상증상은 농도 뿐 아니라, 노출시기에 따라 다르게 나타났다.

색인어 제브라피쉬 배아, 알라클로르, 부타클로르, 피프로닐, 발생독성

● ●