

청개구리 배아를 활용한 농약류(살균제, 살충제, 제초제)의 독성평가 연구¹

윤필상², 고선근^{3*}

Studies on Toxicological Evaluation of Pesticides(Fungicide, Insecticide, Herbicide) using Tree Frog Embryos, *Hyla japonica*¹

Pil-Sang Yoon², Sun-Kun Ko^{3*}

요약

국내에 서식중인 청개구리의 배아를 활용하여 농약류 3종의 독성평가를 위해 FETAX(Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus) 기법에 따라 청개구리(*Hyla japonica*)의 배아를 배양하면서 Benomyl(살균제), Carbofuran(살충제), Thiobencarb(제초제)의 효과를 probit 분석법으로 조사하였다. 그 결과, Benomyl, Carbofuran, Thiobencarb의 농도에 의존하여 유생의 체장 길이는 감소하고 치사율과 기형율은 증가하였다. Benomyl, Carbofuran, Thiobencarb의 teratogenic concentration(EC₅₀)은 각각 1.00, 0.58, 4.75mg/L을 나타내어 Carbofuran이 기형유발에 가장 민감하게 반응하였으며, embryo lethal concentrations(LC₅₀)은 7.04, 28.71, 16.12mg/L을 나타내어 Benomyl이 가장 낮은 농도에서 배아를 치사하는 것으로 나타났다. Teratogenic index(TI=LC₅₀/EC₅₀)는 Benomyl 7.04, Carbofuran 49.50, Thiobencarb 3.39를 나타내어 TI값이 모두 기형유발물질로 판단하는 기준인 1.5 이상을 나타내어 시험에 사용된 농약류 3종은 최기형성 물질로 판단되며 Carbofuran이 가장 강력한 최기형성물질로 작용함을 알 수 있었다.

주요어 : Benomyl, Carbofuran, Thiobencarb, FETAX

ABSTRACT

This study used the probit analysis to evaluate the toxicity of three chemicals - benomyl (Germicide), carbofuran (insecticide), and thiobencarb (herbicide) - with the FETAX (Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus) protocol using the incubated embryos of tree frog, *Hyla japonica*. The results showed that the larval body length decreased while the mortality and malformation rates increased as the concentrations of benomyl, carbofuran, and thiobencarb increased. The teratogenic concentration (EC₅₀) of benomyl, carbofuran, and thiobencarb were 1.00, 0.58, 4.75 mg/L, respectively, indicating that the malformation of larvae was the most sensitive to carbofuran. The embryo lethal concentration (LC₅₀) was 7.04, 28.71, and 16.12mg/L, respectively, indicating that benomyl showed the lowest embryo lethal concentration. The teratogenic index (TI) was 7.04 in Benomyl, 49.50 in Carbofuran, and 3.39 in Thiobencarb, indicating that the TI values were above 1.5, which is the criterion of teratogenicity, for all three chemicals. All three pesticides

1 접수 2019년 1월 3일, 수정 (1차: 2019년 2월 18일), 게재확정 2019년 2월 26일

Received 3 January 2019; Revised (1st: 18 February 2019; Accepted 26 February 2019

2 전남대학교 대학원 생물과학·생명기술학과 박사과정 Graduate school of Biological Sciences and Biotechnology, Chonnam University, Gwangju(61186), Korea(jangel1999@nate.com)

3 호남대학교 물리치료학과 교수 Dept. of Physical therapy, Honam University, Gwangju(62399), Korea(sunkun@honam.ac.kr)

* 교신저자 Corresponding author: sunkun@honam.ac.kr

examined by this study were considered to be the most teratogenic substances, and the carbofuran was the most potent teratogen.

KEY WORDS: BENOMYL, CARBOFURAN, THIOBENCARB, FETAX

서 론

일부 양서류의 경우 농경지나 계류를 주요 서식지로 하며 번식이 이루어졌던 장소에서 매년 번식 및 산란을 하는 것으로 알려져 있어 농약 등 환경오염물질에 노출될 경우 배아의 발달과정에 성장이 저해되고, 사지형성 및 기형성 등의 영향이 나타나기 쉽다고 보고된 바 있다(Wassersug, 1975; Henle, 1981; Nebeker *et al.*, 1994a,b; Choi *et al.*, 2002). 농약은 가장 흔하게 접할 수 있는 환경오염물질의 한 종류로 내분비계 장애물질을 포함하는 종류도 있으며, 그 영향을 기준으로 저독성, 보통독성, 고독성, 맹독성으로 구분된다. 농약류 중 살균제인 Benomyl의 분자량은 290.62의 백색 결정물질로 화학명은 Methyl-[(Butylamino)carbonyl]-1H-benzimidazol-2-yl carbamate(CAS No. 17804-35-2)이며, 작물에 피해를 발생시키는 진균류의 제거를 위해 사용하는 농약으로 알려져 있다. Benomyl은 자연계에서 쉽게 가수분해되어 carbendazim으로 변하며 이 물질이 농약의 유효성분으로 알려져 있다. 카바메이트계 침투성 살충제로 알려진 Carbofuran(2,3-Dihydro-2, 2-dimethyl-7-benzofuranol N-methyl carbamate)(Kuhr and Dorough, 1976)은 보통독성 및 생태독성 II 급으로 구분되어 있으며, 독성은 주로 콜린 에스테라제(cholinesterase)의 억제에 의해 발생하며 생식 관련 요소에 대한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Ferslew *et al.*, 1992). 제초제인 Thiobencarb의 분자식은 $C_{12}H_{16}ClNOS$ (IUPAC: S-4-chlorobenzyl diethylthiocarbamate, S-4-chlorobenzyl diethyl(thiocarbamate))로 알려져 있다. 분자량은 257.8이며, 대부분 저독성 및 생태독성 II 등급을 나타내고 있다. 국내의 경우 랫드(Rat)를 활용한 일본의 조사결과를 바탕으로 2년 만성독성/발암성 시험에서 NOAEL 0.9 mg/kg bw/day를 도출하였으며, 해당 근거를 활용하여 ADI를 0.009 mg/kg bw/day로 설정하였다(MFDS, 2018). 화학물질의 독성평가와 환경오염물질의 독성 및 기형유발에 대해 개구리류의 배아를 활용하는 시험법인 Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus (FETAX) 방법이 다양한 종에 적용되어 널리 사용되어지고 있다(Fort *et al.* 1988; Bantle *et al.*, 1990; Presutti *et al.*, 1994; Morgan *et al.*, 1996). FETAX 방법에 따른 독성유발 여부는 사망률(Mortality)과 기형율(Malformation) 등을 측정하여 평가한다. 사망률과 기형율을 기준으로 반수치사농도(LC₅₀) 및 반

수영향농도(EC₅₀)로 나타내며 두 값의 비율인 LC₅₀/EC₅₀을 기형유발 지수(teratogenic index, TI)로 표시하며 시험대상 물질에 의한 TI 지수의 범위가 1.5 이상의 경우에 시험대상 물질은 독성에 의한 최기형성 물질로 판정한다(Bantle *et al.*, 1985). 이러한 FETAX 방법에 따라 여러 나라에서 자국에 서식중인 양서류의 배아를 활용하여 화학물질들의 독성을 파악하는 연구가 진행되고 있다(Gutleb *et al.*, 1999; Mann and Bidwell, 2000). 국내에서도 청개구리의 배아를 활용한 화학물질의 독성평가 연구(Ko, 2012)가 진행되었으며, 청개구리의 배아발달에 대해 Benomyl(Ko, 2013)과 Carbofuran(Yoon, 2008)이 미치는 영향을 조사한 바 있다.

본 연구에서는 Benomyl과 Carbofuran의 선행연구결과를 참고하여, 국내에 서식중인 청개구리 배아의 정상발달 과정을 관찰하면서 청개구리 배아의 발달단계를 이용하여 FETAX 기법에 따라 Benomyl(살균제), Carbofuran(살충제), Thiobencarb(제초제)의 독성을 비교 평가하고자 한다.

연구방법

1. 실험동물

실험에 사용한 청개구리(*Hyla japonica*)는 2018년 5월 하순에서 6월 초까지 광주광역시 일대 서식지를 중심으로 포집 중인 개체들을 직접관찰 및 포획을 통해 채집하였다.

2. 수정란 및 배아 채취

실험에 사용된 배아의 경우 포집된 개체 중에서 실험실내 자연배란을 유도하였으며 수정된 배아들 중 세포질이 균일하게 나누어진 배아들을 선택하여 포셉으로 젤리층을 물리적으로 제거한 후 시험에 사용된 낭배기까지 배양하였다.

3. 배양액

배아를 세척하거나 배양 할 때는 6.6g/L NaCl, 0.15g/L

KCl, 0.15g/L CaCl₂, 0.2g/L NaHCO₃, 0.05g/L Streptomycin, 0.03g/L Penicillin G을 혼합하여 Amphibian Ringer(AR) 용액을 제조한 후 pH를 7.4로 맞추어 사용하였다(Johnson and Volpe, 1973).

4. 시험물질처리

Benomyl(농촌진흥청 제공), Carbofuan(Sigma-aldrich), Thiobencarb(농촌진흥청 제공)는 각각 AR용액에 희석하여 사용하였으며 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100mg/L의 농도 구간을 설정하였다. 배양액에 시험물질이 전혀 포함되지 않은 대조군과 농도별로 시험물질을 포함한 실험군을 대상으로 대상종의 번식기 실외온도인 25℃에 맞춰 배아를 배양했으며, 외부의 영향이 없는 독립된 공간에서 배양을 진행했다. 각각의 실험군은 10개의 배아를 배양하면서 24시간마다 새로운 배양액과 시험물질로 교환하여 120시간 동안 배양하였으며 모든 시험은 3회 반복하였다.

5. 결과분석

1) 정상발생과정 조사

유리로 된 배양접시에 정상적으로 발생이 이루어져 세포질이 균일하게 나누어진 배아의 젤리층을 포셉으로 제거한 후 매 24시간마다 시험물질이 첨가되지 않은 배양액으로 교체하며 배양하였다. 배아의 발달과정은 Gosner(1960)의 방법에 따라 판별하였다.

2) 사망률

사망률의 경우 실험군과 대조군을 매 24시간마다 확인하여 치사된 배아를 제거한 뒤 노출 120시간 후 생존한 것만을 관찰하였다. 기관 형성 전에는 운동성이 없거나 세포질 붕괴가 일어난 배아를 기관이 형성된 후에는 심장 박동이 멈춘 것을 치사된 개체로 판정하였으며 한 농도의 사망률은 시험물질에 120시간 노출된 배아들 중 치사된 배아의 수를 노출된 배아의 수로 나누어 계산하였다(치사된 배아의 수/노출된 배아의 수×100). 시험 농도 구간은 5개 이상으로 설정하여 Probit 분석법을 활용하여 반수치사농도(half maximal lethal concentration; LC₅₀)를 구하였다(Goh and Neff, 2003).

3) 기형율

대조군과 실험군의 배아 중 치사된 개체를 제외하고 120시간 배양 후 생존한 배아를 대상으로 머리, 척추, 복부, 꼬리 등에 나타난 기형을 각각 부위별로 조사하였다(Bantle

et al., 1998). 기형율은 120시간 동안 노출된 배아 중 살아서 영향을 받은 개체를 정상 개체로 나누어 계산하였으며(살아서 영향을 받은 배아/정상 생존 배아×100) 농도 구간을 5개 이상으로 설정하여 Probit 분석법을 활용하여 반수 영향농도(half maximal effective concentration; EC₅₀)를 구하였다(Goh and Neff, 2003).

4) 기형양상

정상개체는 대조군 중에서 정상적으로 발생이 이루어진 개체를 기준으로 정했으며, 기형양상은 꼬리가 물결치는 것 같은 모양을 나타내거나, 휘어지는 양상 혹은 길이가 짧아지는 등의 양상을 꼬리기형(Tail Abnormality)으로 판정하였다. 척추기형(Spine Abnormality)의 경우 척추가 아치형으로 휘어지거나 굽어지는 형태의 경우 기형으로 판정하였다. 복부가 돌출되거나 소화기관의 형태, 내부장기의 팽만 등이 확인된 경우 복부기형(Abdominal Abnormality)으로 판정하였다. 두 가지 이상의 다양한 기형이 동시에 확인된 경우 복합기형(Profound Abnormality)으로 판정하였다(Bantle *et al.*, 1991).

5) 성장률

배아의 체장을 중심으로 발달과 성장에 미치는 시험물질의 영향을 확인하기 위해 120시간 동안 시험물질에 노출되어 시험 종료까지 생존한 배아를 대상으로 AM-423x Dino-Eye와 Dinocapture 2.0 program (ANMO)을 이용하여 배아 및 유생의 직경 또는 체장을 측정하여 Independent t-test로 대조군과 실험군 간의 유의성을 SPSS 20.0 program을 사용하여 분석하였다.

6) 기형성 지수(Teratogenic Index; TI)

기형성 지수(TI)는 Probit 분석법을 통해 구한 LC₅₀를 EC₅₀으로 나누어(LC₅₀/EC₅₀) 그 값이 1.5 이상으로 나타나면 시험에 사용된 개구리의 배아 발달과정에 최기형성을 나타내는 것으로 판정하였다(ASTM, 1998).

결과

1. 정상발생과정 조사

청개구리 배아에 미치는 영향을 알아보기 위해 시험에 사용된 낭배기(Gastrula) 배아는 수정이 이루어진 후 약 18시간 이내에 나타나기 시작하여 배란 직후의 배아와 비슷한 직경인 1.2±0.1mm로 유지하였다. 유지하였다. 기관형성(organogenesis) 단계인 신경습(Neural fold)까지는 약 44시

간이 소요됐으며 배아의 크기가 다소 증가한 $1.5 \pm 0.1 \text{mm}$ 를 나타내었다. 아가미에서 혈액의 흐름을 확인할 수 있는 아가미순환시기(Gill circulation)는 수정 후 약 68시간 경과 후 확인되었으며, 체장은 $5.2 \pm 0.3 \text{mm}$ 로 나타내었다. 완전한 올챙이의 형태를 나타내는 아가미 닫힘(Operculum complete) 시기까지는 수정 후 133시간이 소요됐으며, 체장은 $6.9 \pm 0.3 \text{mm}$ 를 나타내었다(Figure 1, Table 1).

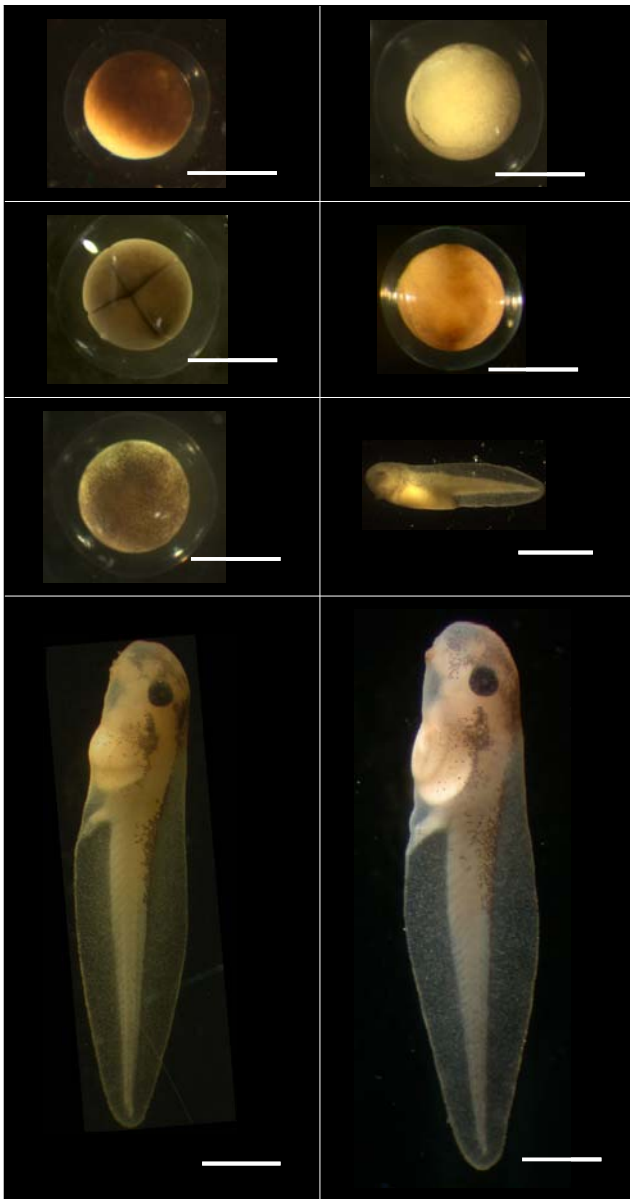


Figure 1. Embryonic development of *Hyla japonica*. A; fertilized, B; 4-cell, C; Blastula, D; Gastrula, E; Neural fold, F; Gill circulation, G; Tailfin circulation, H; Operculum complete. Scale bar=1mm

Table 1. Change of Embryonic development time and body length according to stage in Tree frog embryo.

Gosner stage	time(hr)	length(mm, mean+SD)
1(fertilized)	0	1.2 ± 0.1
4(4-Cell)	2	1.2 ± 0.1
9(Blastula)	14	1.2 ± 0.1
12(Gastrula)	18	1.2 ± 0.1
14(Neural fold)	24	1.2 ± 0.1
18(Muscular response)	44	2.4 ± 0.1
20(Gill circulation)	68	5.2 ± 0.3
22(Tailfin circulation)	109	6.2 ± 0.2
26(Operculum complete)	133	6.9 ± 0.3

2. 농약의 농도에 따른 치사율 조사

120시간 배양 후 Benomyl은 1mg/L 의 농도에서 3.3%의 배아가 치사되기 시작하였으며 5mg/L 의 농도에서는 16.7%, 10mg/L 의 농도에서는 90.0%, 25mg/L 이상에서는 모든 배아가 치사되어 나타났다. Carbofuran의 경우 1mg/L 의 농도에서 3.3%의 치사된 개체가 확인되기 시작하여 10mg/L 에서는 20.0%, 50mg/L 의 농도에서는 100.0%의 치사율을 나타내었다. Thiobencarb는 0.5mg/L 에서 배아가 치사되기 시작하였으며, 10mg/L 에서 10.0%, 25mg/L 의 농도에서는 93.3%, 50mg/L 이상에서는 모든 배아가 치사되었다(Figure 2).

3. 농약의 농도에 따른 기형을 조사

기형율은 Benomyl의 경우 0.5mg/L 의 농도부터 10.0%의 배아에서 기형이 관찰되기 시작하여 5mg/L 이상에서는 모든 배아가 기형을 나타내었다. Carbofuran은 0.1mg/L 의 농도의 구간에서 10.0%의 비율로 기형의 배아가 관찰되기 시작하여 1mg/L 의 농도에서는 72.8%의 배아에서 기형이 관찰되었으며, 5mg/L 이상의 농도에 노출된 배아에서는 모두 기형이 관찰되었다. Thiobencarb는 1mg/L 에서 37.9%의 비율로 기형이 출현하였으며, 25mg/L 의 농도에 노출된 배아는 100.0% 기형을 나타내었다(Figure 3.).

4. 농약의 농도에 따른 기형양상 조사

Benomyl에 노출된 배아들은 0.5mg/L 에서 복부기형(66.7%), 복합기형(33.3%)이 나타났으며, 1.0mg/L 에서는

복부기형(78.6%) 복합기형(21.4%)이 확인되었으며 5mg/L 이상의 농도에서는 100% 복합기형만이 관찰되었다. Carbofuran의 경우 1.0mg/L에서 복부기형(20.8%), 척추기형(25.0%), 복합기형(54.2%)이 나타났으며 25mg/L의 농도에서는 척추

기형(18.2%), 복합기형(81.8%)가 관찰되었고 50mg/L에서는 생존한 모든 배아에서 복합기형이 확인되었다. Thiobencarb는 1mg/L농도에서 복부기형(81.8%), 복합기형(18.2%)이 나타났고 10mg/L의 농도에서는 복부기형(72.0%), 꼬리기형

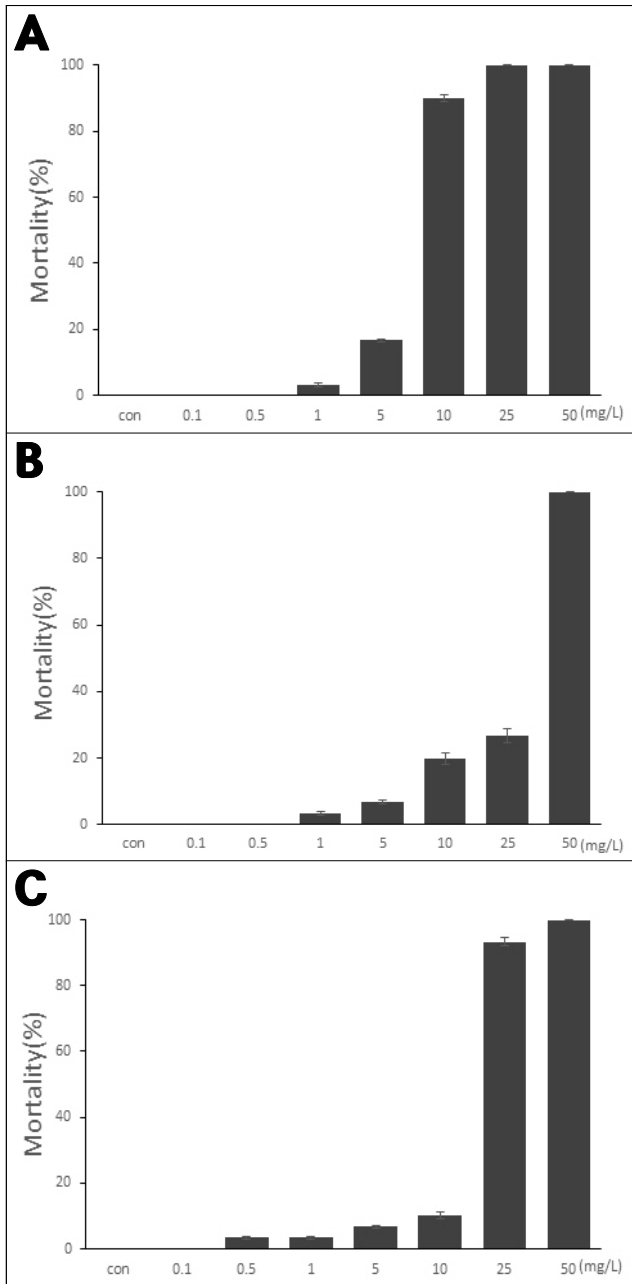


Figure 2. Frequencies of mortality according to Pesticides treated concentration. (A) Benomyl, (B) Carbofuran, (C) Thiobencarb. Bar height represents mortality and error bars indicate standard deviation.

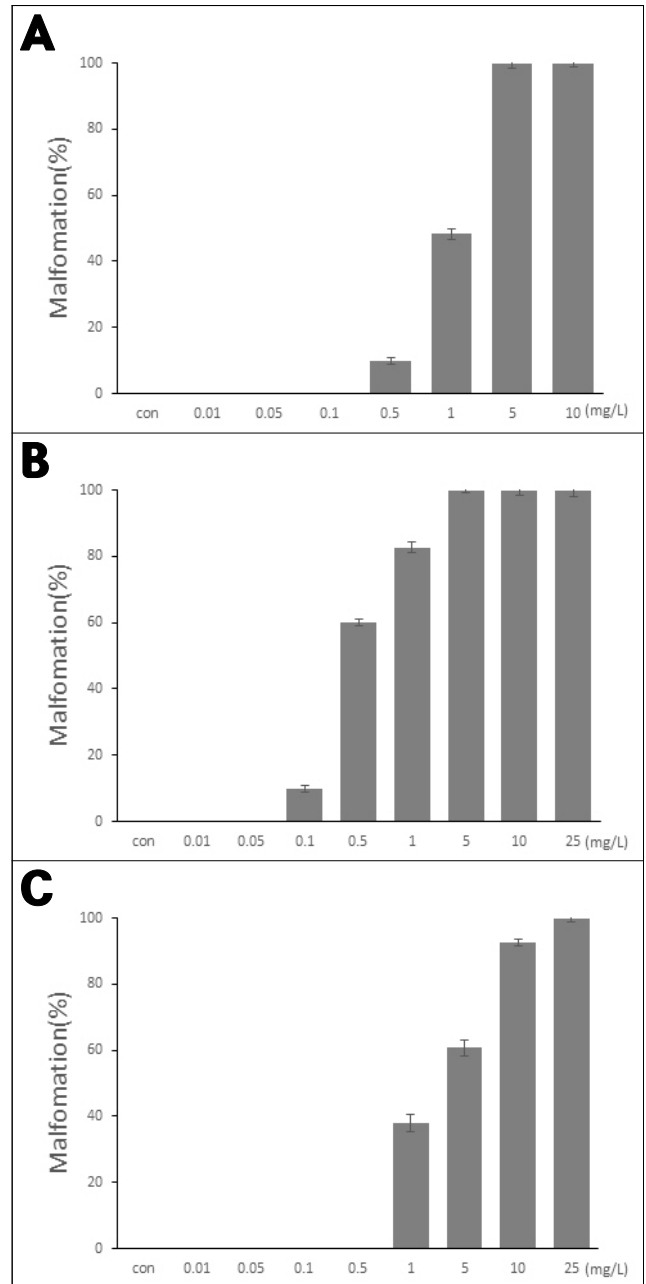


Figure 3. Frequencies of malformation ratio according to Pesticides treated concentration. (A) Benomyl, (B) Carbofuran, (C) Thiobencarb. Bar height represents malformation ratio and error bars indicate standard deviation.

(8.0%), 복합기형(20.0%)가 확인됐으며, 25mg/L의 농도에 서는 모든 배아가 복합기형을 나타내었다(Figure 4, 5).

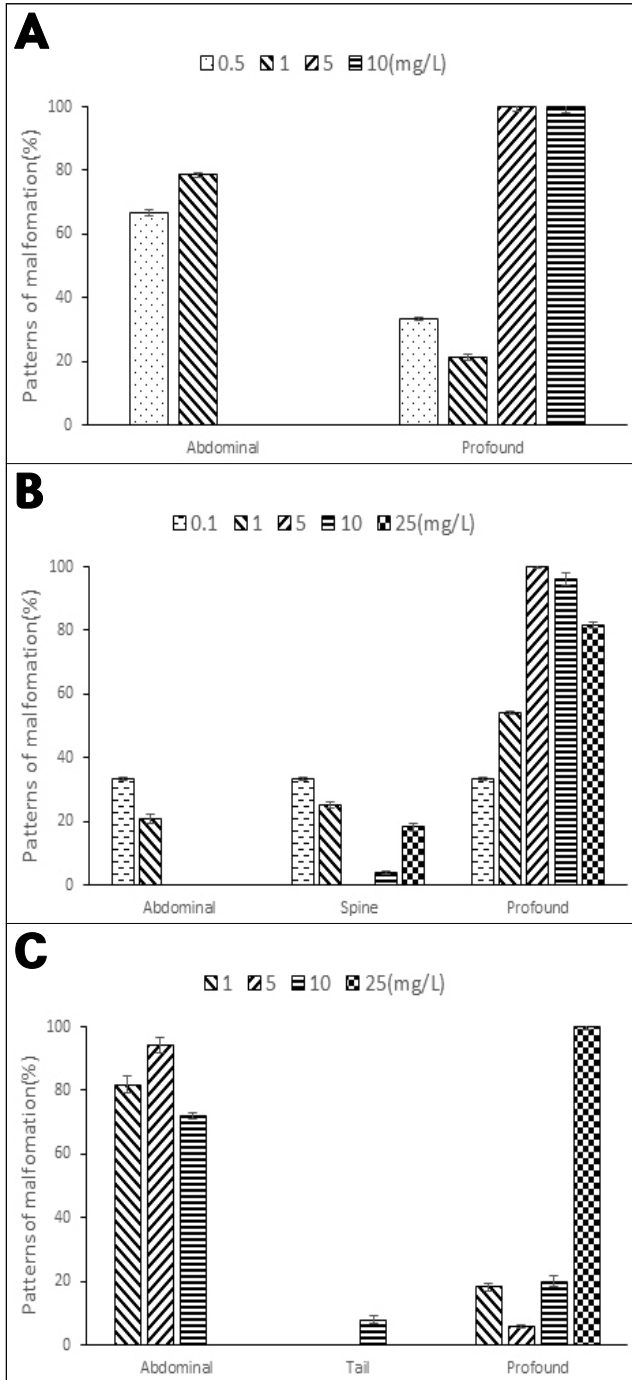


Figure 4. Frequency of malformation patterns according to Pesticides treated concentration. (A) Benomyl, (B) Carbofuran, (C) Thiobencarb. Bar height represents malformation ratio and error bars indicate standard deviation.

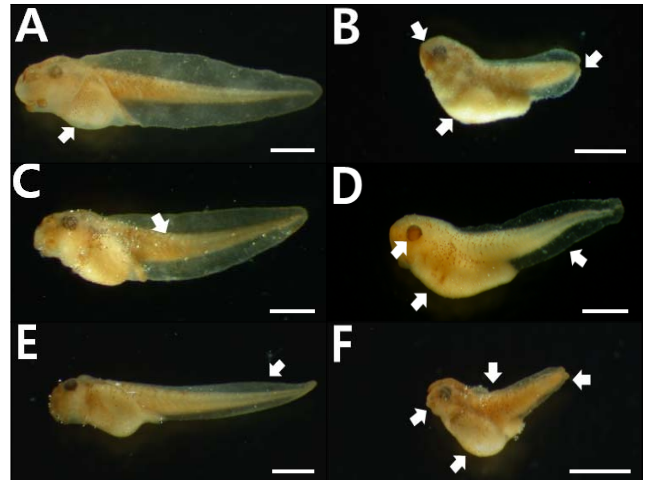


Figure 5. External morphology of *Hyla japonica* embryo exposed Pesticides. Arrows indicate anomalies. A: Abdominal abnormality appeared on benomyl 1mg/L, B: Profound abnormality appeared on benomyl 5mg/L, C: Spine abnormality appeared on carbofuran 1mg/L, D: Profound abnormality appeared on carbofuran 25mg/L, E: Tail abnormality appeared on thiobencarb 10mg/L, F: Profound abnormality appeared on thiobencarb 25mg/L.

5. 농약의 농도에 따른 성장률 조사

성장에 대한 영향을 조사하기 위해 대조군 30개체와 시험 후 생존한 실험군 전체를 대상으로 측정을 실시하였다. 대조군의 경우 체장이 6.9±0.3mm로 나타났으며, Benomyl의 경우 0.5mg/L 이하의 농도에서는 대조군과 거의 차이를 나타내지 않았으나 1mg/L부터 6.5±0.3mm로 차이를 나타내기 시작하여 5mg/L 이상에서는 4.3±0.7mm로 큰 차이를 나타내었다. Carbofuran의 경우 0.5mg/L이하의 농도에서는 대조군과 차이가 거의 없었으나 1mg/L부터 6.5±0.4mm로 차이를 나타내기 시작하여 5mg/L농도에서는 6.3±0.4mm로 차이를 나타내는 것을 확인 할 수 있었다. Thiobencarb는 10mg/L까지는 대조군과 비슷한 체장을 나타냈으나, 25mg/L에서는 5.3±0.7로 체장의 감소를 확인할 수 있었다. 대조군과 실험군의 유의성을 확인하기 위해 Independent t-test로 분석했으며 Benomyl은 1mg/L, Carbofuran은 5mg/L의 농도에 노출된 배아에서 대조군과 차이를 나타냈으며, Thiobencarb에 노출된 배아는 25mg/L의 농도에서 차이를 나타내었다($p < 0.01$)(Figure 6).

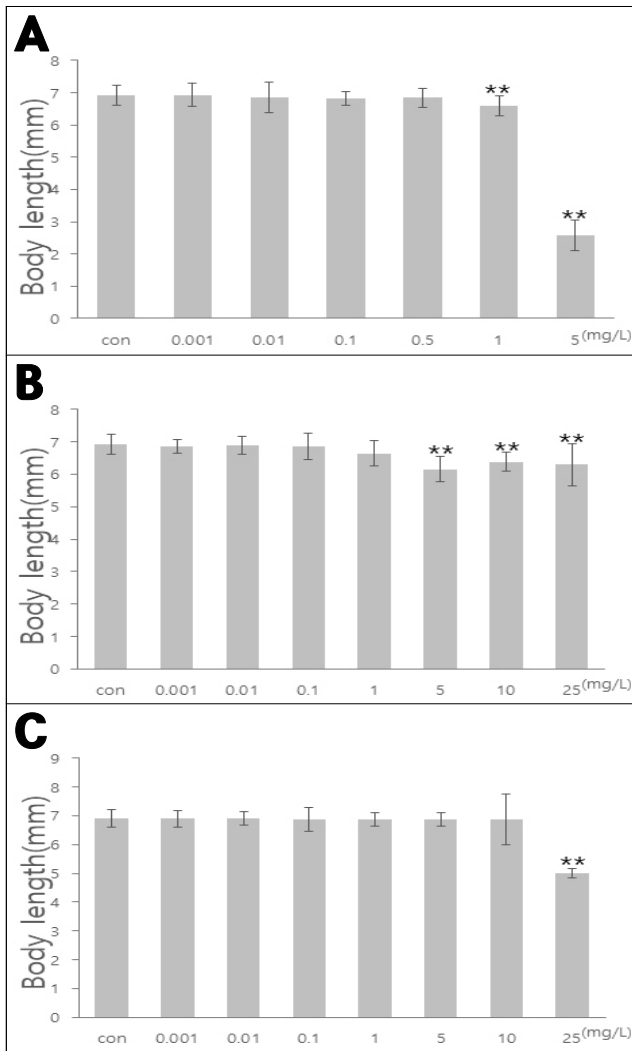


Figure 6. Measured tadpole body length of exposed for each Pesticides, A. Benomyl, B. Carbofuran, C. Thiobencarb. *H. japonica* embryos were cultured for 120hours in petri dish contained 10ml. Bar height represents mean and error bars indicate standard deviation. Asterisks indicate significant difference(**p<0.01, independent sample t-test)

6. 농약에 의한 기형성 지수 조사

청개구리 배아에 노출된 Benomyl, Carbofuran, Thiobencarb에 의한 LC₅₀은 각각 7.04, 28.71, 16.12mg/L로 나타났다. EC₅₀은 각각 1.00, 0.58, 4.75mg/L로 나타났으며, 기형성 지수를 나타내는 TI는 각각 7.04, 49.50, 3.39를 나타내었다 (Table 2).

고찰

개구리류의 난자를 비롯한 배아와 올챙이의 경우 공기와 물이 투과하기 용이한 표면과 피부를 가지고 있으며, 알과 올챙이 시기에는 수중에서 발생 및 성장이 이루어진다. 먹이활동의 경우 올챙이는 식물성의 먹이를 주로 섭취하는데 반해 개구리로 변태한 뒤에는 육식성으로 변하는 특징적인 생활사를 가지고 있어 식물성과 동물성 양측 모두 섭취가 이루어져 다양한 오염물질에 노출되기 쉬운 특징을 나타낸다. 또한 계류 및 농경지 등에서 서식하며 대부분 매년 일정한 장소에서 산란을 하는 습성이 있어 농약 등 환경오염물질이 유입될 경우 노출되기 쉬워 이에 대한 영향을 쉽게 받게 된다. 따라서 개구리류는 환경지표로서의 역할을 할 수 있으며, 환경질을 평가하는데 매우 신뢰도가 높은 생물로 취급받고 있다(Choi *et al.*, 2002). 이러한 특징을 활용하여 오염물질에 의한 사지형성저해, 발생저해, 성장저해, 기형유발, 기형비율 등을 평가해 모니터링 생물로 활용되고 있다(Wassersug, 1975; Henle, 1981; Nebeker *et al.*, 1994a,b).

국내에 서식하고 있는 청개구리는 3~4월 동면에서 깨어나 활동을 시작하며 번식에 접어들는다. 번식은 6~7월까지 이어지며 이후 활동기를 가진다. 동면기는 10~11월경에 시작된다. 한번에 산란하는 난자 수는 약 600~700개 정도로 나타났으며 알은 산란 직후에는 수면에 떠 있다가 시간이 지나며 가라앉는(globular mass type) 것으로 알려져 있다(Yoon, 2008).

Table 2. LC₅₀, EC₅₀ and TI value of *H. japonica* embryos exposed to Pesticides

Pesticides	LC ₅₀ (mg/L)			EC ₅₀ (mg/L)			TI
	Exposure conc.	95% confidence limit		Exposure conc.	95% confidence limit		
		lower	upper		lower	upper	
Benomyl	7.04	6.19	8.06	1.00	0.88	1.20	7.04
Carbofuran	28.71	24.87	33.77	0.58	0.46	0.74	49.50
Thiobencarb	16.12	13.92	18.99	4.75	2.92	9.43	3.39

Benomyl의 시험 결과 1mg/L에서 치사 개체가 확인되기 시작하였으며 25mg/L 이상에서는 모든 배아가 치사되었다. 이후 5, 10mg/L로 점차 농도가 높아지면서 치사 개체의 비율도 16.7%, 90.0%로 증가하는 것을 나타내었다. 또한 Carbofuran의 시험결과 1mg/L에서부터 치사된 배아의 비율이 3.3%로 나타나기 시작하여 25, 50mg/L로 농도가 높아지면서 26.7%, 100.0%로 비율도 증가하는 것으로 나타내었다. Thiobencarb 역시 0.5mg/L의 농도에서 3.3%의 비율로 치사된 개체가 확인되기 시작하여 5mg/L, 10mg/L, 25mg/L로 농도가 증가함에 따라 6.7%, 10.0%, 93.3%로 치사율이 증가하였으며, 50mg/L 이상의 Thiobencarb 농도에 노출된 배아들은 모두 치사된 것으로 확인되어 시험에 사용된 농약 3종 모두 농도의 증가에 따라 치사율이 증가하는 경향을 나타내었다.

체장의 경우 Benomyl의 시험 결과 대조군(6.9 ± 0.3 mm)과 비교했을 때 농도가 0.5, 1, 5mg/L로 농도가 증가함에 따라 유생의 체장이 6.8 ± 0.3 , 6.6 ± 0.3 , 2.6 ± 0.5 mm로 감소하였으며 1mg/L 이상의 농도에서 유의적인 차이를 나타내었다. Carbofuran의 시험결과도 대조군에 비해 농도가 1, 10, 25mg/L로 농도구배에 따라 유생의 체장은 6.6 ± 0.4 , 6.4 ± 0.3 , 6.3 ± 0.6 mm로 감소하여 나타났으며 10mg/L 이상의 농도에서 대조군과 차이를 보였다. Thiobencarb 역시 대조군에 비해 농도가 10, 25mg/L로 증가할수록 6.9 ± 0.9 , 5.0 ± 0.2 mm로 감소하여 나타났으며 25mg/L 농도에서 대조군과 차이를 보였다. 시험물질의 농도가 증가함에 따라 치사율이 높아지고 체장이 감소되는 현상이 시험에 사용된 모든 농약에서 공통적으로 나타내었다. 이를 다른 연구와 비교해 봤을 때 Benomyl에 노출된 *Xenopus laevis*가 20 μ M에서 전치사되었으며, 10 μ M의 농도에서 100%의 비율로 기형이 발견되었다. 성장저해는 10 μ M 이상의 농도에서부터 대조군과 차이를 나타내는 것으로 확인되었다(Jin 2005). 이러한 결과는 농도에 따라 치사율과 기형율의 증가 및 성장이 저해되는 본 실험에서 나타난 결과와 유사한 경향을 나타내었으나 본 실험에 사용된 청개구리에 비해 높은 농도에서 치사 및 성장저해의 영향을 받는 것을 알 수 있었다.

기형율의 경우 Benomyl에서 기형 개체는 0.5mg/L에서 나타나기 시작하여 농도가 증가함에 따라 기형율도 증가하였으며 Carbofuran의 처리 결과 기형은 0.1mg/L에서부터 10.0%의 비율로 나타나기 시작하였고 기형율도 1, 5mg/L로 농도가 높아지면서 그 비율도 82.6%, 100.0%로 각각 증가하였다. Thiobencarb의 경우 1mg/L의 농도부터 37.9%의 비율로 기형이 확인되기 시작하여 5, 10, 25mg/L로 농도가 증가함에 따라 60.7, 92.6, 100.0%로 농도에 따라 증가하는 양상을 확인하였다. *Hynobius leechii*의 배아를 benomyl에 노출시켰을 때 1 μ M의 농도에서 모든 개체에서 치사가

일어났으며 LD₅₀(half lethal Dose) 600~800nM로 확인되어 본 실험에 노출된 청개구리보다 낮은 농도에서 영향을 받는 것을 알 수 있었다. Carbofuran에 노출된 *X. laevis*는 LC₅₀ 43.4mg/L, EC₅₀ 0.1mg/L로 청개구리보다 치사는 높은 농도에서 일어났으나, 기형이 더욱 낮은 농도에서 유발되는 것으로 확인되었으며, TI 434로 청개구리에 비해 높은 기형성지수를 나타내었다(Lee, 2003). 제초제인 Thiobencarb의 경우 *X. laevis*의 LC₅₀가 1.3~6.5mg/L를 나타냈으며(Saka, 1999), *Silurana tropicalis*는 LC₅₀가 0.752~1.77mg/L로 확인되어 본 실험이 16.12mg/L를 나타내는데 비해 더 민감한 영향을 나타냄을 알 수 있었다(Saka, 2010).

따라서, 시험에 사용된 농약 3종은 모두 청개구리의 배아 발달에 최기형성물질로 작용하는 것을 확인 할 수 있었으며 특히, Carbofuran의 경우 0.1mg/L의 농도부터 기형이 확인되어 다른 농약보다 낮은 농도에서 청개구리 배아에 영향을 미치는 것으로 나타났으며 TI값이 49.5로 확인되어 Benomyl 7.04, Thiobencarb 3.39에 비해 강력한 최기형성물질로 작용함을 알 수 있었다.

한편, 기형양상의 경우 Benomyl에 노출된 *H. leechii*에서 수포형성기형, 복부기형, 꼬리기형(지느러미형성기형, 꼬리휨, 미부형성부진), 머리기형(무두증) 등이 확인되었으며(Choi et al., 2002), *X. laevis*에서는 머리기형, 꼬리기형, 척추기형, 복부기형(소화관 형성부진) 등 다양한 기형양상을 나타내는 것으로 확인되었다(Jin, 2005). Carbofuran의 경우 *X. laevis*에서 복부기형(Gut miscoiling), 수포형성기형, 척추기형, 머리기형을 나타내는 것으로 확인되었다(Lee, 2003).

본 실험을 통해 Carbamate계 농약류인 Benomyl과 Carbofuran, Thiobencarb는 청개구리 배아에 대해 최기형성물질로 작용하며, Benomyl은 치사율 및 체장의 성장 과정에 가장 민감하게 반응하였으며, Carbofuran은 기형양상을 포함한 기형성에 가장 민감하게 반응함을 알 수 있었다. 국내에 서식하는 청개구리의 번식 시기와 시험에 사용했던 농약류의 사용시기가 거의 일치할 것으로 예상되어져 본 시험에 사용했던 농약류들의 사용시기가 중첩되어 이들의 공동상승효과(synergic effect)가 나타날 가능성이 클 것으로 판단되어지나 이에 대한 결과는 아직 없다. Carbamate계 농약류가 청개구리 및 양서류의 배아 발달에 미치는 영향과 그 작용기작을 규명하기 위해서는 보다 구체적인 연구가 더 필요하다고 판단된다.

REFERENCES

- ASTM(1993) Standard guide for conducting the frog embryo teratogenesis assay-*Xenopus*(FETAX). ASTM standards on

- aquatic toxicology and hazard evaluation. ASTM, Philadelphia, PA, pp. 457-467.
- Bantle, J.A., D.J. Fort, J.R. Rayburn, D.J. Deyoung and S.J. Bush(1990) Further validation of FETAX: evaluation of the developmental toxicity of five known mammalian teratogens and non-teratogens. *Drug. Chem. Toxicol.* 13(4): 267-282.
- Choi, Y.J., C.S. Yoon, J.H. Park, J.H. Jin and S.W. Cheong(2002) Developmental abnormality in agricultural region and toxicity of the fungicide benomyl on Korean salamander, *Hynobius leechii*. *Korean Journal of Limnology* 35(3): 198-212.
- Dawson, D.A., C.A. McCormick and J.A. Bantle(1985) Detection of teratogenic substances in acidic mine water samples using the frog embryo teratogenesis assay—*Xenopus* (FETAX). *J. Appl. Toxicol.* 5(4): 234-244.
- Ferslew, K.E., A.N. Hagardorn and W.F. McCormick(1992) Poisoning from oral ingestion of carbofuran (Furadan 4F), a cholinesterase-inhibiting carbamate insecticide, and its effects on cholinesterase activity in various biological fluids. *J. Forensic. Sci.* 37(1): 337-344.
- Fort, D.J., D.A. Dawson and J.A. Bantle(1988) Development of a metabolic activation system for the frog embryo teratogenesis assay *Xenopus* (FETAX). *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 8: 251-264.
- Goh, E.H. and A.W. Neff(2003) Effects of fluoride on *Xenopus* embryo development. *Food and Chem. Toxicol.* 41: 1501-1508.
- Gosner, K.L.(1960) A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* 16: 183-190.
- Gutleb, A.C., J. Appelman, M.C. Bronkhorst, J.H.J. Van den Berg, A. Spenkelink, A. Brouwer and A.J. Murk(1999) Delayed effects of pre-and early-life time exposure to polychlorinated biphenyls on tadpoles of two amphibian species (*Xenopus laevis* and *Rana temporaria*). *Environ. Toxicol. Phar.* 8(1): 1-14.
- Henle, K.(1981) *Adenomera griseigularis*, eine neue Leptodactyliden-Art aus Peru (Amphibia: Salientia: Leptodactylidae). *Amphibia-Reptilia* 2(2): 139-142.
- Jin, J.H.(2005) The toxicity of benomyl and its metabolic derivatives carbendazim and n-butyl isocyanate on early development of *Xenopus laevis*. Ph. D. Graduate School, Changwon Univ. 86pp.
- Ko, S.K.(2012) Toxicity evaluation of chemicals using tree frog embryos, *Hyla japonica*. *Kor. J. Env. Eco.* 26(5):675-681.
- Ko, S.K.(2013) Effect of fungicide benomyl on the development of tree frog embryos. *J. Ind. Res.* 19(2): 33-40.
- La Clair, J.J., J.A. Bantle and J. Dumont(1998) Photoproducts and metabolites of a common insect growth regulator produce developmental deformities in *Xenopus*. *Environ. Sci. Technol.* 32(10): 1453-1461.
- Lee, S.A.(2003) A study for teratogenicity and evaluation of ecotoxicity(endocrine disruption effect) using frog embryo. MS. Graduate School, Inje Univ. 87pp.
- Mann, R.M. and J.R. Bidwell(2000) Application of the FETAX protocol to assess the developmental toxicity of nonylphenol ethoxylate to *Xenopus laevis* and two Australian frogs. *Aquat. Toxicol.* 51: 19-29.
- Morgan, M.K.(1996) Teratogenic potential of atrazine and 2, 4-D using FETAX. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* 48(2): 151-168.
- Nebeker, A.V., G.S. Schuytema and S.L. Ott(1994) Effects of cadmium on limb regeneration in the northwestern salamander *Ambystoma gracile*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 27(3): 318-322.
- Presutti, C., C. Vismara, M. Camatini and G. Bernardini(1994) Ecotoxicological effects of a nonionic detergent (Triton DF-16) assayed by ModFETAX. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 53(3): 405-411.
- Saka, M.(1999) Acute toxicity tests on Japanese amphibian larvae using thiobencarb, a component of rice paddy herbicides. *Herpetol. J.* 9(2): 73-81.
- Saka, M.(2010) Acute toxicity of rice paddy herbicides simetryn, mefenacet, and thiobencarb to *Silurana tropicalis* tadpoles. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73(6): 1165-1169.
- Schuytema, G.S., A.V. Nebeker and W.L. Griffis(1994) Toxicity of Guthion® and Guthion® 2S to *Xenopus laevis* embryos. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 27(2): 250-255.
- Wassersug, R.J.(1975) The adaptive significance of the tadpole stage with comments on the maintenance of complex life cycles in anurans. *Am. Zool.* 405-417.
- Yoon, P.S.(2008) Effect of Pb²⁺ and Carbofuran on the Embryo Development of Tree frog, *Hyla japonica*. MS. Graduate school, Honam Univ. 41pp.