

농약에 대한 송사리의 생육단계별 감수성의 변화

신천철* · 이성규* · 김영배* · 김용화* · 노정구*

(1987. 6. 15 접수)

Changes in Susceptibility of Killifish (*Oryzias latipes*) to Three Pesticides with Growth

Chun Chul Shin* · Sung Kyu Lee* · Young Bae Kim* · Young-Hwa Kim* and Jung Koo Roh*

Abstract

Sensitivity, expressed in the 96h-LC₅₀ determined with continuous flow system, was compared for eight developmental stages of *Oryzias latipes* with butachlor, diazinon and fenitrothion. Significance of the laboratory determined 96h-LC₅₀ in real field situation was evaluated for butachlor using outdoor model agrosystem.

In the laboratory tests, the most sensitive stage was post-larva stage IV (7 days after hatching) with 96h-LC₅₀ of 0.14, 1.4, and 1.6ppm for butachlor, diazinon and fenitrothion, respectively, whereas the least sensitive stage was early embryo stage (1 day after fertilization), and then the susceptibility was somewhat stable after 21 days after hatching.

In the model agrosystem test, the highest concentration of 0.53ppm of butachlor in water was obtained at the 2nd day after application. The stages IV and VIII showed mortality of over 50% at 96 hours after application. It is concluded that the conventional use of butachlor in the field would cause significant adverse effect on *O. latipes*.

It is suggested that sensitivity test at the early life stages with fish is an important part of the ecotoxicological assessment of chemicals.

1. 서 론

급속한 산업발전에 따라 많은 종류의 화학물질이 인류의 생활여건 향상을 위하여 지속적으로 새로이 합성되고 있으나 이러한 목적으로 개발된 농약등의 화학물질은 그 목적 이외에 환경오염을 초래하여 생태계를 파괴시키고 있다는 사실이 널리 알려져 있다. 또한 이

러한 농약에 의한 수질오염으로 치사되는 어류는 현재 수계에서 치사된 전체 어류의 8% 정도를 차지하고 있다는 보고가 있다⁽¹⁾. 따라서 농약등의 화학물질에 대한 환경독성 평가가 요구되어지며 이와같은 농약등의 환경독성 평가는 1차적으로 어류를 포함한 수서생물을 이용한 환경독성 평가가 선진국에서는 일찍부터 많이 연구되어져 왔다^(2,3,4).

이에 따라 보다 체계적이고 실질적인 어류를 이용한

* 한국화학연구소 안전성연구센터(Korea Research Institute of Chemical Technology, Daedeogdanji, Daejeon, Chungnam)

환경독성 평가체계를 확립키 위한 노력의 일환으로써 어류의 발달 정도에 따른 급성독성 발현 정도를 규명키 위한 연구가 활발히 진행되어, 어류의 화학물질에 대한 감수성은 embryo에서 성어가 될때까지 많은 차이를 가져온다는 보고가 있다^(5,6).

뿐만 아니라 화학물질의 구조 등에 따라서 동일어종이라 하더라도 그 감수성의 양상이 생육단계에 따라 다를 수 있다는 것도 알려져 왔다⁽⁷⁾. 즉, 1982년 Seikai는 Japanese Striped Knifejaw(*Oplegnathus fasciatus*)를 이용하여 2종의 농약에 대한 24시간 급성독성을 static method를 이용, 생육단계별 민감도를 평가하였고⁽⁸⁾, 역시 1982년 Hashimoto등도 carp (*Cyprinus carpio*)를 이용한 8종의 농약에 대하여 이를 실험한 바 있다⁽⁷⁾. 또한 1982년 Devlin 등도 fathead minnow (*Pimephales promelas*)를 이용한 Toluene에 대한 실험⁽⁹⁾과 1985년 Borthwick등이 3종의 Atherinid fish를 이용한 2종의 농약에 대한 실험등이 continuous flow system에서 보고 되어진 바 있으며⁽¹⁰⁾, 1984년 Takimoto등이 killifish(*Oryzias latipes*)를 이용하여 static system에서 DDT와 fenitrothion에 대한 96시간 급성독성 실험을 실시하여 이 종의 생육 단계별 민감시기 결정을 위한 실험을 실시한 바 있다⁽¹¹⁾.

따라서 본 연구실에서 사육하고 있으며, 우리나라 소하천, 호수, 논등에 널리 서식하고 있는 송사리에 대한 생육단계별 감수성에 대해서는 국내 연구가 전혀 없으며, 또한 Takimoto와 Hashimoto 등의 fenitrothion 및 diazinon에 대한 실험결과를 static 방법이 아닌 continuous flow system으로 확인하고, butachlor의 경우는 어독성이 높고 농약살포 시기가 송사리의 초기생육단계와 대체로 일치하며, 물에서의 예상농도도 높아^(5,18), butachlor에 의한 송사리의 피해가 예상되므로 본 실험은 유기인계 살충제인 fenitrothion, diazinon과 제초제 butachlor등의 3종의 농약에 대하여 continuous flow system을 이용, 96시간 급성어독성값을 측정하여 농약의 구조 및 성질에 따른 생육단계별 감수성 차이를 규명코자 하였다.

아울러 실험실내 송사리의 생육단계별 감수성 비교 실험의 결과와 실제 관행 사육시 물에서의 butachlor 농도와 치사여부를 비교하기 위하여 현재 사용량이 우리나라 수도작에서 가장 많은⁽¹²⁾ butachlor를 대상으로 하여 model agrosystem 실험을 실시하였다. 따라서 본 실험은 3종의 농약중 제초제인 butachlor에 대하여 model agrosystem 하에서 관행량을 살포한 후, embryo stage를 제외한 발육단계별 6단계 공시어에 대한 민감시기를 관찰코자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 공시동물

본 실험에 사용된 공시어는 국립 부산수산대학에서 1984년 분양받은 일본산 송사리(Himedaka; *Oryzias latipes*)로서 본 실험실에서 제대 사육중인 F2 세대의 embryo와 치어 및 성어를 공시하였다. embryo는 F1 parent에서 강제 포획하여 인위적으로 채취하였고 약 25°C 내외의 수온에서 petridish에 넣어 incubation 시킨 상태로 실험에 사용하였고 치어와 성어는 유리수조 (31cm×50cm×35cm)에서 일반 사육관리 기준에 준하여 사육하였다.

사육실의 수온은 약 25°C 내외, 광주기는 광조건 14시간, 암조건 10시간으로 40W 형광등을 사용하여 시간조절기(Omron, H2E-C)로 자동조절 하였고, 생육단계별로 먹이는 Brine shrimp(*Artemia salina*)의 유생(nauplii) 및 paramecium으로 사육하였다. 특히 embryo는 실험 시작전에 해부 현미경(Olympus, X-Tr)하에서 관찰하여 정상 embryo만 선별한 후 그 중에서 무작위 추출하여 본 실험에 사용하였다. 그리고 실험에 사용된 embryo와 공시어의 생육별 크기는 표 1과 같다.

또한 model agrosystem에 사용한 공시어는 stage III~VIII까지의 생육단계별 송사리를 이용하였다.

나. 공시 농약

본 실험에 사용된 농약은 현재 우리나라 수도작에 사용되고 있는 유기인계 살충제인 diazinon과 fenitrothion 및 제초제 butachlor이다. Diazinon(0,0-diethyl-0-(2-isopropyl-6-methylpyrimidin-4-yl) phosphorothioate)은 technical(95.89%)를 사용하였고 fenitrothion(0,0-dimethyl 0-4-nitro-m-tolyl phosphorothioate)도 technical(96.5%)을 사용하였다. 제초제 butachlor(2-chloro-2',6'-diethyl-N-(butoxymethyl)acetanilide)은 technical(89.57%)을 사용하였으며 model agrosystem에서 사용한 butachlor는 시중에서 구입한 입제(6%)를 사용하였다.

다. Continuous flow 급성독성 실험과정

Embryo 단계인 stage I, II에서는 water bath(100cm×60cm×20cm)를 이용하여 수온을 25°C에 맞춰 표 1에서와 같이 하루에 1회씩 검정용액을 교환해 주었다. 용기는 250ml beaker를 사용하였고, beaker내에 40 mesh wire screen으로 만든 embryo desk를 넣어 embryo를 검정용액에 고르게 노출되게 하였다. Water

Table 1. Ages, size and test conditions of test organisms with growth stages.

Stage	Age	Test organisms			Test condition					No. of *2 organisms per treatment
		Total length (cm, Mean \pm S.D.)	Body wt. (g, Mean \pm S.D.)	No. of organism per con.	DO (ppm)	Temp. ($^{\circ}$ C)	pH	Vol. of test soln. (ml)	exposure system	
I	1 day after fertilization	*1	—	20	8.5 \pm 0.4	24.8 \pm 0.9	7.3 \pm 0.1	200	Renewal every 24hrs.	•
II	7 day after fertilization	—	—	20	8.2 \pm 0.6	24.8 \pm 0.9	7.4 \pm 0.2	200	Renewal every 24hrs.	•
III	1 day after hatching	0.48 \pm 0.02	—	20	8.6 \pm 0.3	23.1 \pm 1.9	7.3 \pm 0.2	500	Continuous flow	60
IV	1 week after hatching	0.53 \pm 0.03	—	20	7.9 \pm 0.7	23.5 \pm 1.0	7.3 \pm 0.1	500	Continuous flow	60
V	3 weeks after hatching	0.93 \pm 0.10	0.006 \pm 0.001	20	8.2 \pm 0.5	23.1 \pm 1.0	7.2 \pm 0.2	500	Continous	30
VI	7 weeks after hatching	1.56 \pm 0.15	0.029 \pm 0.007	20	7.2 \pm 1.0	23.1 \pm 1.9	7.0 \pm 0.2	500	Continuous flow	30
VII	14weeks after hatching	2.20 \pm 0.16	0.094 \pm 0.021	20	7.7 \pm 0.8	21.7 \pm 1.4	6.9 \pm 0.2	2000	Continuous flow	30
VIII	28weeks after hatching	2.79 \pm 0.19	0.188 \pm 0.045	20	8.3 \pm 0.6	21.9 \pm 1.9	7.0 \pm 0.2	5000	Continuous flow	30

*1 : not measured

*2 : Model agrosystem test only

bath내의 배치는 완전 임의 배치하였다.

Embryo에서 부화한 직후인 stage III에서 성어인 stage VIII까지는 임의 배치로 반복없이 처리하였으며 접촉방법은 continuous flow system으로 peristaltic pump(10 channel master-flex Coleparmer, Model 7568-00)를 이용하여 stage III~IV에서는 1일 4회, stage VII~VIII에서는 1일 2회 검정용액을 교환해 주도록 유량을 조절하였고, 공시어의 투입은 실험시작전 48시간 전에 (stage III 제외) 2배수의 공시어를 선발하여 외관상으로 이상이 없고 균일한 개체를 수조배열 순서에 따라 5마리씩 넣어 각 수조에 20마리씩 들어가도록 하였다.

Toxicant 조제와 처리 농도에 있어서 diazinon과 fenitrothion은 DMSO에 녹인후 surfactant인 HCO-40 (일본, 日光 chemical.)을 수적 가한 후 증류수로 일정 농도의 표준용액을 만들었으며 butachlor는 DMSO에만 녹인후 역시 증류수로 일정 농도의 표준용액을 만들어 이 표준용액을 일정량씩 넣어 각 농도별 검정용액을 만들었다. 처리 농도는 각 stage별 공히 7~8 단계의 농도를 log scale로 등간격으로 나누어 실시하였다. 처리 농도는 본 실험이 들어가기 전에 공시된 실험동물의 1/2 수준으로 예비실험을 실시하여 이를 근거로 농도를 결정하였다. 그리고 대조군은 희석수대조군과 DMSO와 HCO-40용액이 최고 농도의 검정용액

에 들어간 DMSO와 HCO-40양과 동일량이 들어가는 DMSO와 HCO-40 대조군, 2가지로 병행 실시하였다.

희석수는 수도물을 1차로 membrane filter를 통과시켜 부유물질을 제거한 후 active carbon으로 충전한 2차 여과장치를 통과시켜 잔류염소를 제거한 후 수온을 25 $^{\circ}$ C로 올려 사용하였다. 이때의 희석수 수질특성은 다음과 같다.

- Specific conductance : 95 μ MHO
- Total alkalinity : 25.84mg/l as CaCO₃
- Total hardness : 52.35mg/l as CaCO₃
- Total NH₃-N : <0.02mg/l
- DO : 7.3mg/l
- pH : 6.5

실험수조내 DO 농도와 수온은 각 수조별로 1일 2회 DO meter(YSI, Model 57)로 측정하였고 pH는 1일 1회 pH meter (Cole-Parmer, Model 5987)로 측정하였다. 실험기간 동안 측정한 결과는 표 1과 같다.

실험기간 동안 photoperiod는 광조건 14시간, 암조건 10시간으로 하였고 실험기간 동안에는 먹이나 공기를 공급하지 않았다.

공시생물의 치사확인인 stage I, II인 경우는 16배해부 현미경하에서 심장박동 여부를 관찰하였다. 관찰은 stage I인 경우 수정후 약 48시간후에 심장형성 및 박동이 시작되므로⁽¹³⁾ 처리후 48시간 부터 관찰하였고

stage II는 실험편의상 24시간 후부터 관찰하였다. stage III~VIII에서는 처리후 1, 3, 12, 24, 48, 72, 96시간마다 관찰하여 공시어가 유영능력이 없거나 아가미 호흡이 중지된 것을 치사한 것으로 간주하였고, 확인 즉시 실험수조에서 제거하였다. LC₅₀값을 구하기 위한 통계처리법은 Litchfield and Wilcoxon의 방법⁽¹⁴⁾에 따랐으며 대조구에서 10% 이상의 치사가 생기는 경우는 그 실험을 무효로 간주하였다.

라. Model agrosystem내에서의 송사리 감수성 비교 실험과정

각 생육단계별 공시어는 토양처리군(T-S, C-S)에서 만 live-box을 이용하여 농약에 노출하였으며 live-box (10×10×8H,cm)는 stage III과 IV의 경우 100mesh wire screen을, V에서 VIII stage는 40mesh wire screen을 사용하여 제작하였다. 처리농도는 농약사용 지침서⁽¹⁵⁾를 참고하여 butachlor 입제를 10a당 3kg을 기준하여 면적비례로 계산한 바, 한 처리당 460mg(27.6 mg A.I)을 전면에 고르게 살포하였다. 토양을 넣지 않은 처리군도 설치하여 같은 비례로 농약을 살포하였다.

Model agrosystem은 유리수조(31×49×25H, cm)로 만들어 농약처리구 수조는 유리접착시 사용하는 silicone sealant가 농약을 흡착하는 것을 방지하기 위해 각 모서리는 teflon tape로 붙인 후 논흙을 약 15cm 채우고 수도물을 토양위 4cm까지 실험시작 2일전에 채운 후 표면을 표시한 뒤, 육묘상에서 키운 3령 기묘 4분을 약 12cm 간격으로 식재하였다. 또한 butachlor 용출과 토양과의 관계를 보기 위하여 토양은 넣지 않고 물만 4cm 넣은 대조 수조를 설치하였다. 따라서 실험군은 물+토양과 butachlor 처리군(T-S), 토양+물 배치군(C-S), 물과 butachlor 처리군(T-W) 및 물 처리군(C-W)이며 물+토양과의 butachlor 처리군 및 토양+물 처리군에서만 생육단계별로 6 stage의 송사리를 live-box을 이용, 분할구 배치법으로 3반복하여 옥외에 설치하였다. 본 실험에 사용한 토양은 pH 5.2, 유기물 함량 0.6%, CEC 7.0me/100g, 토성은 clay 7%, silt 37%, sand 56%로 사양토였다. 치사된 공시어는 1일 1회 기록한 후 제거하였고, 본 실험기간동안 광도, 대기온도, 수온을 1일 6회 측정하였고 공시어 처리군에서는 용존산소를, 전처리군에서는 pH를 1일 2회 측정하였다. Butachlor의 수중농도를 측정하기 위해 매일 표전까지 물을 채운 후 처리별로 100ml를 채수하여 다음과 같은 방법으로 추출하였다. 즉, 물시료 100ml를 250ml의 분액여두에 취하고 40ml iso-octane(Merck)으로 1분간 진탕하여 추출하고 iso-octane층을 무수 Na₂SO₄로 채운 깔대기를 통과시켜 탈수시킨다. 이와 같은

추출과정을 2회 반복하여 추출액을 합하여 rotary evaporator로 농축한 후 N₂가스하에서 건조시킨 뒤 n-hexane(Merck)으로 일정량으로 희석하여 Gas chromatograph(Varian, Model 3700)로 분석하였다. 분석조건은 아래와 같다.

- Detector : ECD(⁶³Ni)
- Column : 12 m BP-1 fused silica
- Capillary column(0.25mm I.D.)
- Temp. : Injector-250°C
- Detector-250°C
- Column-200°C
- Attenuation : 32×10⁻¹¹
- Carrier gas : Nitrogen 30ml/min.

3. 결과 및 고찰

가. 96시간 급성독성 실험

Diazinon과 fenitrothion 및 butachlor에 대한 생육단계별 송사리 감수성 비교 실험에서 얻은 96h-LC₅₀값과 극한치간의 비율을 보면 다음 표 2와 같다. 표 2에서 살펴보면 diazinon에 대한 송사리의 96h-LC₅₀값의 최대치와 최소치의 비율(극한치값의 비율)은 21.4이었고 또한 embryo 시기인 stage I과 II를 제외한 생육단계 내에서의 96h-LC₅₀값에 의한 극한치값의 비율은 7.5를 나타내어 생육단계에 따라 diazinon에 대한 감수성의 차이가 비교적 높다고 생각된다.

또한 fenitrothion의 송사리 생육단계별 96h-LC₅₀값의 최대치와 최소치의 비율을 보면 그 비율은 8.4로서 diazinon에 비하여 다소 낮은 비율을 나타내었다. 그리고 embryo 시기인 stage I과 II를 제외한 나머지 생육단계에서의 급성독성값에 의한 극한치 간의 비율은 3.9로써 역시 diazinon보다는 낮은 비율을 나타내었다. 따라서 fenitrothion의 경우는 생육단계에 따라 감수성의 차이가 크지 않은 것으로 사료된다.

아울러 제초제인 butachlor에 대한 송사리 생육단계별 96h-LC₅₀값의 최대치와 최소치의 비율은 23.9로써 유기인계 살충제 보다 더욱 높은 비율값이 나타났다. 그러나 embryo 시기인 stage I과 II를 제외한 말육시기에서는 극한치간의 비율이 6.8로써 diazinon의 경우와 유사한 경향을 보여주었다.

한편 3종의 농약의 96-LC₅₀값과 95% 신뢰한계의 생육단계별 감수성 변화 양상을 보면 그림 1과 같다. 그림 1에서 보듯이 3종의 농약 모두에서 송사리가 나타낸 감수성은 수정후 1일 경과된 stage I에서 가장 낮았고, 그 이후 점차 증가하여 yolk sac이 막 없어진 post-larva시기인 부화후 1주일의 송사리 치어인 stage

Table 2. 96h-LC₅₀ values, 95% confidence limits, and ratios between maximum and minimum value with growth stages by chemicals.

Stage	Diazinon		Fenitrothion		Butachlor	
	96h-LC ₅₀ value (ppm)	95% confidence limit(ppm)	96h-LC ₅₀ value (ppm)	95% confidence limit(ppm)	96h-LC ₅₀ value (ppm)	95% confidence limit(ppm)
I	30.0	27.4 ~32.9	13.0	11.5~14.7	3.10	2.70~3.60
II	22.0	20.1 ~24.0	11.1	9.8~12.6	1.80	1.00~1.60
III	10.5	7.8 ~14.1	3.6	3.1~ 4.2	0.88	0.72~1.09
IV	1.4	1.00~ 2.1	1.6	1.2~ 1.9	0.14	0.07~0.36
V	9.2	7.3 ~11.6	5.2	4.7~ 5.8	0.89	0.71~1.10
VI	9.8	7.7 ~12.4	6.0	5.1~ 7.0	0.64	0.56~0.74
VII	10.1	9.2 ~11.1	5.2	4.7~ 5.8	0.58	0.49~0.69
VIII	8.4	7.9 ~ 9.2	5.5	4.5~ 6.7	0.36	0.31~0.41
max./mini.	21.4(7.5)*		8.4(3.9)*		23.9(6.8)*	

* Value based on 96h-LC₅₀ values excepting the embryo stages(I ~ II)

IV에서 가장 높은 감수성을 나타내어 3가지 농약에 대해 stage IV의 송사리 발육단계가 가장 취약함이 판명되었다. 그 이후의 발육단계에서 다시 감수성이 감소하여 96h-LC₅₀값이 증가하는 경향을 나타내었다. 다만, 유기인계 살충제인 diazinon과 fenitrothion에 대한 실험에서는, 부화후 3주, 7주, 14주 및 28주가 경과된 송사리인 stage V, VI, VII과 VIII의 96h-LC₅₀값 등이 95% confidence limit상의 분석에서 거의 유의성이 없음이 판명되어, 급성독성값의 비교에 따른 감수성변동이 stage IV 이후에는 Fujiya의 잉어에 대한 실험⁽⁷⁾과는 달리 체중이 증가하여도 감수성 변화가 거의 없음이 판명되었다. 그러나 butachlor의 실험에서만은 부화후 28주가 경과된 stage VIII에서 다시 급 감수성은 높아짐이 관찰되었다. 이것은 살충제인 diazinon 및 fenitrothion과는 다소 다른 양상이며 결국 3종류의 농약에 대한 송사리 감수성 실험을 실시한 바, 부화후 1주일째인 stage IV에서 송사리는 가장 높은 감수성을 나타내었으므로 본 실험에서는 제초제와 살충제등의 농약 종류에 관계없이 일치된 송사리의 생육단계별 농약에 대한 감수성의 변화 양상은, 기존의 여러문헌에서 밝힌 농약을 사용한 어류의 감수성 비교 실험에서 보고한 것과 비교적 유사한 양상을 보여주고 있다.

즉, Seikai(1982)는 MEP와 diazinon이 해수어인 Japanese striped knifejaw(*Oplegnathus fasciatus*)의 생육단계에 미치는 독성을 실험한 결과, MEP에서 egg와 pre-larval stage에서는 2.4~4.2ppm의 24h-LC₅₀값을 나타내었으나 그 다음 발육단계인 post-larval stage에서 역시 가장 낮은 독성값인 0.145ppm을 나타내어 감수성이 가장 높았고 이후 juvenile stage까지의

발육단계에서는 급성독성값이 1.25~2.3ppm으로써 감수성이 다시 감소하는 경향을 보여준 바 있다. 그러나 이 실험에서 diazinon의 경우는 embryo단계의 24h-LC₅₀값이 3.2~4.7ppm이며 이후의 시기는 급성독성값이 0.0175~0.038ppm을 나타내므로써 larva 이후의 생육 단계에서는 전반적으로 유사한 독성값을 보여주어서 생육단계내에서의 농약의 독성은 성장에 따른 어류 생체내의 다양한 대사과정의 변화에 따라 그 어류에서의 감수성 정도가 다르게 나타난다고 보고한 바 있다⁽⁸⁾. 이러한 결과는 본 실험에서 나타난 diazinon에 대한 송사리의 감수성 변화 양상과는 다른 결과로써, 생육 단계별 독성값 변화양상이 두 어종간에 차이를 알 수 있었다.

또한 Hashimoto(1982)등은 잉어를 생육 단계별로 8개의 농약에 대하여 감수성을 실험한 결과 농약들 중 살충제 endosulfan과 제초제 chlornitrofen만이 극한치 비율이 각각 1,667배 및 23배로 측정되어 농약에 따라서 생육단계별 감수성이 크게 차이가 난다고 하였으며 이때의 감수성 시기의 변화 양상은 본실험의 변화양상과 유사함을 알 수 있었다. 그리고 나머지 6개의 농약은 극한치 비율이 4.0이하로써 embryo 시기의 발육초기와 부화후 발육단계에서의 감수성이 거의 비슷함이 보고되었다⁽⁷⁾. 이 실험에서는 잉어에 대하여 fenitrothion과 diazinon이 특이한 감수성 변화 양상을 나타내지 않았으나 본 실험인 송사리에서는 극한치 비율이 8.4와 21.4로 각각 나타나 이들 농약에 대한 민감한 시기가 존재하고 있음을 관찰할 수 있었고, 이에 앞서도 밝힌바 있는 Seikai 실험 결과와 미루어 생각해 보면 농약의 구조와 실험에 사용된 어종의 발육시기에

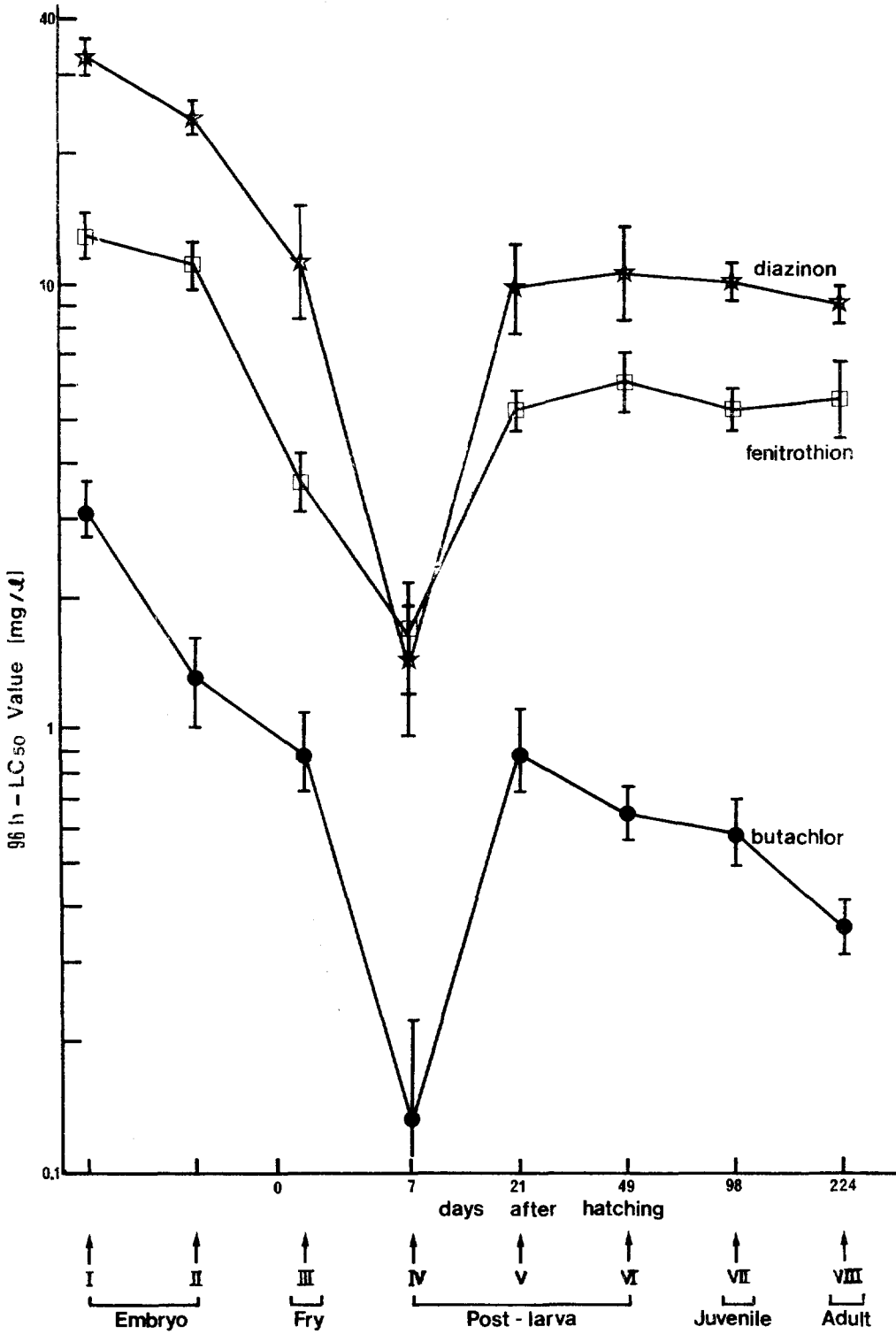


Fig. 1. 96h-LC₅₀ values for butachlor, diazinon, and fenitrothion at eight developmental stages of killifish (*Oryzias latipes*).

따른 독성발현기작에 따라 민감시기가 존재함을 알 수 있었고, 그 시기는 아마도 yolk sac이 소실되어 에너지 공급원인 먹이를 요구하는 post-larva 단계가 가장 감수성이 강한 발육단계라고 사료된다. 이러한 생육단계별 감수성의 변화는 Hall등(1982)이 striped bass (*Morone saxatilis*)을 이용한 실험⁽⁹⁾과 Devlin등(1982)이 fathead minnow(*Pimephales promelas*)에 대한 실험⁽⁹⁾ 및 Borthwick등(1985)이 3종의 어류를 이용한 2종의 농약에 대한 실험⁽¹⁰⁾ 또는 송사리를 사용한 Takimoto등(1984)의 실험⁽¹¹⁾에서 보고한 바와 같이 embryo시기는 아마도 embryo를 둘러싸고있는 barrier인 chorion의 농약투과 저항성 때문에 상대적으로 적은 농약이 흡수되며 또한 그나마 흡수된 농약이 egg내의 풍부한 yolk sac내 oil globule에 축적됨으로 인하여 급성독성에 관하여 그 감수성이 비교적 둔할 것이며, 아울러 CNS (central nervous system)의 미성숙으로 인한 유기인계 살충제의 cholinestrase inhibitors로서의 작용이 제한됨에 따른 것으로 보고된 바 있다^(7,11). 그리고 yolk sac fry stage인 stage III에서는 CNS가 발달하기 시작하였으나 아직 egg-yolk가 복부에 남아 있어 몸속에 들어온 농약등이 여기의 lipid와 결합하여 저장되어 농약 등의 독성 발현이 비교적 적게 나타날 것이며 이후 초기 post-larva에서는 아마도 CNS가 더욱 성숙되고 농약등의 독성발현을 방해하는 yolk sac이 사라지는 발육단계이므로 농약의 독성발현이 가장 높게 나타날 것이다. 그러나 어류가 성장함에 따라 다시 먹이를 섭취함으로써 지방이 다시 체내에 축적되어 여기에 농약등이 흡착되고, 또한 간이 기능을 발휘하여 해독작용을 하며, 어체내 blood-brain barrier의 성숙에 따른 상호 작용으로 농약의 독성발현은 더욱더 어려워질 것이다. 그러나 산란시기의 어류는 풍부한 체내 지방함유에도 불구하고 산란을 위한 빠른 대사활동등의 영향으로 다시금 독성이 높게 나타날 것으로 사료된다. 또한 농약등의 화학물질에 대한 어류의 생육단계별 감수성 차이는 다음과 같은 요인에 의해서도 영향을 받을 수 있다는 견해도 있다. 즉 작은 개체일수록 체중당 화학물질이 흡수되는 체표면적이 증가하며, 어린 개체일수록 호흡율이 큰 개체보다 많고, 아울러 어린 개체일수록 체내 흡수된 물질의 분비를 위한 기관들이 불완전하여 결국 어류의 생육단계에서 어린 개체일수록 독성에 민감함이 알려진 바 있다⁽¹²⁾.

한편 DDT와 fenitrothion을 사용하여 송사리의 생육단계별 감수성 실험을 한 Takimoto는 본 실험 방법인 continuous flow방법 대신 static method를 이용하여 송사리 생육단계중 post-larva 시기인 부화후 28일째가 가장 민감하였다고 보고한 바 있다⁽¹¹⁾. 이는 본

실험과 감수성 변화 양상면에서는 일치하였으나 post-larva의 시기에 관하여, Takimoto가 부화후 28일째가 가장 민감하였다고 한 반면 본 실험은 부화후 7일째가 가장 민감하였고, 28일경에는 다시 높아지는 경향(그림1 참조)을 나타내고 있다. 이러한 차이는 Takimoto 실험은, 본 실험이 가장 민감한 시기라고 밝힌 stage IV에 가까운 부화후 10일째 발육단계의 실험이 성공적이지 못하여 이 시기에 대한 96시간 급성독성값을 산출치 못하고 48시간 급성독성값을 구한데 기인된다고 사료되며 아울러 농약의 노출방법에 따른 차이도 있을 것으로 추측된다.

또한, diazinon에 대한 송사리의 감수성 실험에서 stage V 이상의 발육단계에서의 송사리는 치사농도 이하의 농도에서 척추가 굽는 급성독성 현상도 아울러 관찰되었다.

이상과 같이 기존의 실험결과와 본 실험결과를 비교 종합해 볼 때, 농약등 화학물질에 대한 어류의 생육단계별 감수성은 선택된 어종과 chemical에 따라서 다소의 차이는 있으나 발육초기단계인 초기 post-larva에서 감수성이 가장 높게 나타난다고 생각된다.

나. Model Agrosystem내에서의 송사리 감수성 비교 실험

관행량의 butachlor를 살포한 후 model agrosystem 내 물에서의 butachlor의 경시적 변화는 다음 그림 2와 같다.

그림 2에서 보듯이 model agrosystem에서의 butachlor 용출 및 분해 양상은, 물+토양에 butachlor를 살포한 군(T-S)과 물에 butachlor를 살포한 군(T-W)에서 비슷한 양상을 보였으나 용출속도 및 절대농도면에서는 T-W군이 T-S군보다 높았다. 이는 토양 존재의 결과로 보여지며 기존의 문헌^(17,18)에 따르면 토양에 처리된 butachlor는 표토(0~3cm)에 주로 흡착되며, 또한 식물체에 의한 흡수도 많다는 보고가 있어 본 실험결과를 뒷받침 해 주고 있다. 그리고 농약의 분해속도를 결정하는 것은 생물학적⁽¹⁹⁾, 화학적⁽²⁰⁾, 물리학적⁽¹⁸⁾ 성질등이 있으나 대체로 분해 초기에는 1차반응의 양상으로 시간이 경과함에 따라 후기에 들어서는 분해속도가 둔화됨을 볼 수 있었다. 아울러 이기간 조사된 광도 및 DO, pH, 수온과 대기온도상의 유의한 변화는 관찰되지 않아 환경조건에 따른 실험의 영향은 없었으리라 사료된다.

또한 butachlor의 분해 속도 상수 K와 반감기를 계산해 보면 다음 표 3과 같다.

따라서 T-S 처리군의 반감기가 T-W 처리군보다 짧음을 알 수 있었다. 이러한 차이는 butachlor가 광분

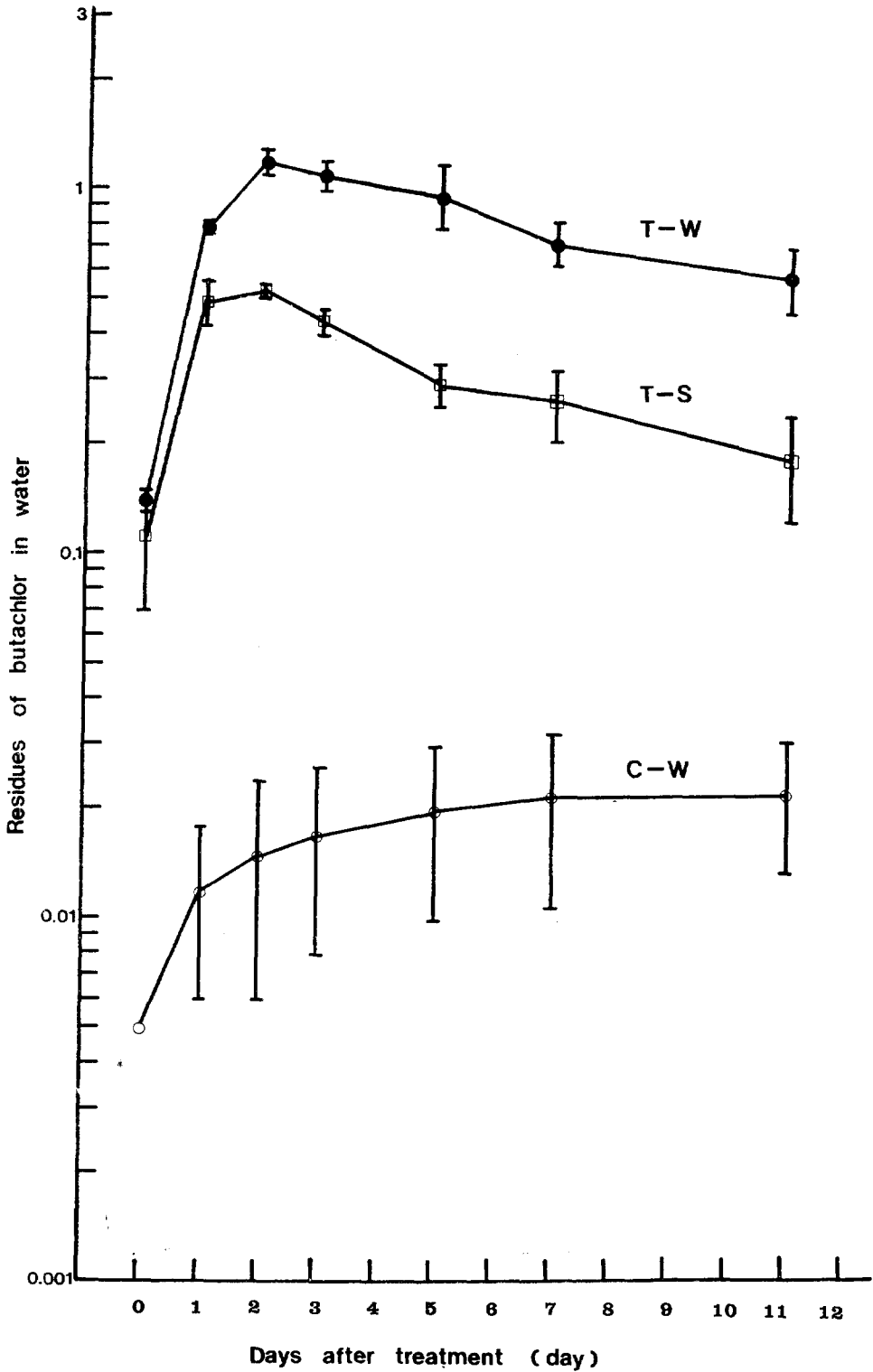


Fig. 2. Disappearance of butachlor in the model agrosystem during test period.

Table 3. Disappearance rate constant 'K' and half-life of butachlor in water.

Description	K(day ⁻¹)	Half-life(days)
T-S처리군(27.6mg a.i./31×49cm)	0.114	6.1
T-W처리군(18.0mg a.i./25×40cm)	0.07	9.7

해와 미생물 및 자연유실등에 의하여 분해된다고 이미 보고된바^(17, 18, 21, 22) 있으므로 이점을 감안하면 광분해와 자연유실은 두 처리군이 같은 조건이므로 결국 토양미생물의 영향으로 이러한 실제 농도에 차이가 생긴 것으로 사료된다.

Model agrosystem에 처리된 송사리의 생육단계(stage III~VIII)별 치사율을 보면 아래표 4와 같다.

Table 4. Mortality of test fish by growth stages within 4 days after butachlor treatment

Treatment	Replication	Stages		Mortality(%)					
		III	IV	V	VI	VII	VIII		
T-S	I	5*	56*	0	0*	40	100		
	II	0	82*	0	0	10	100		
	III	5	41*	0	0	10	40		
	Mean	3	60	0	0	20	80		
C-S	I	0*	0*	0	0*	0	0		
	II	0	0*	0	0	0	0		
	III	0	0*	0	10	0	0		
	Mean	0	0	0	3	0	0		

* Correction value based on Abbott's formula⁽²⁵⁾

표 4를 통계처리한 결과 처리 즉 T-S 처리군과 C-S 처리군간에서, 공시어의 치사율은 5% 수준에서 유의성이 인정되었으며 T-S 처리군내의 생육단계별 치사율에 있어서도 고도의 유의성이 인정되었다. L.S.D. 검정에 의한 각 생육단계별 치사율을 검정해 보면 stage IV 및 VIII은 다른 stage와의 유의성이 인정되었으나 stage IV와 VIII간에는 유의성이 인정되지 않아 이 두 stage간에는 감수성의 차이가 인정되지 않는다고 할 수 있다. 그러나 표 4의 치사율은 보면 stage VIII이 stage IV보다 약 20%의 높은 치사율을 보이고 있고, 또한 실험실적 96시간 급성어독성값을 비교해 보면 stage IV가 0.14ppm으로 stage VIII의 0.36ppm보다 약 2배 더 butachlor에 민감한 것으로 나타난 결과와 함께 생각해 보면 stage VIII의 높은 치사율은 의외의 결과이다.

공시한 어류는 동일한 사육수조에서 동일한 조건에서 사육했기 때문에 형질상으로는 같다고 한다면, 2가

지 관점에서 그 이유를 가정해 볼 수 있겠다. 첫째는 실험실에서의 stage VIII보다 model agrosystem에서의 stage VIII이 약 50일 더 경과한 것이고 따라서 stage가 진행함에 따라 butachlor에 대한 감수성이 증가하는 경향이 있다는 것과(그림 1) 둘째 space에 따른 stress가 감수성에 영향을 주지 않았나 생각된다. stage VIII의 경우 live-box에 들어간 총 loading은 2.7g인데 비하여 stage IV인 경우 개체당 무게가 0.001g으로 보면 약 0.02g이므로 약 130배 정도 과밀한 상태로 처리되었다고 할 수 있다. 포유동물의 경우는 이러한 space stress가 독성에 영향을 준다는 보고가 있다⁽²³⁾.

따라서 이러한 space stress가 어류의 mortality에 영향을 주는지에 대해서는 앞으로 연구되어야 할 과제로 생각된다. 그리고 실험실적 96hr-LC₅₀값과 model agrosystem에서 농도 및 치사율을 비교하기 위해서 실내 실험은 수중의 농도가 일정하나 model agrosystem 실험에서는 제제로 부터 용출되는 속도와 유실, 분해되는 과정으로 인하여 수중농도가 변동하므로 4일동안의 평균 butachlor 농도가 약 0.39ppm이고, stage IV와 VIII의 실험실적 96hr-LC₅₀값이 각각 0.14ppm과 0.36ppm이므로 이 두 stage에서 60~80%의 치사율을 나타내고 있어 실험실적 급성어독성값과 model agrosystem의 결과치가 잘 일치된다고 하겠다.

따라서 butachlor의 경우 96hr-LC₅₀값이 야외포장에서도 적용할 수 있음을 알 수 있으며, 이러한 사실로 미루어 볼때 국내 수도작에서 다량 사용하고 있는 butachlor의 사용시기가 논과 수로에 서식하고 있는 송사리의 산란, 부화후의 초기생육단계와 대체로 일치하므로, 제초제 살포후 논물을 가둬 놓는 3~4일 동안 상당한 영향을 줄 것으로 예상된다.

4. 요 약

살충제 diazinon과 fenitrothion 및 제초제 butachlor에 대하여, continuous flow system하에서 송사리 생육단계별 감수성 비교를 위한 96시간 급성 독성 실험을 한 결과와 model agrosystem에서 실제 관행량의 butachlor를 살포하여 물속의 butachlor의 농도와 공시어의 각 생육단계별 치사율을 조사한 결과는 다음과 같다.

가. 농약의 종류에 관계없이 송사리의 가장 민감한 생육단계는 부화후 1주일 경과된 치어시기 즉 stage IV이었다.

나. Continuous flow system하에서 송사리 생육단계별로 96시간 급성독성 실험을 한 결과 유기인계 살충제인 diazinon의 극한치 비율은 21.4이며 fenitroth-

ion의 경우 비율은 8.4이었고, 제초제 butachlor의 극한치 비율은 23.9로서 가장 높은 극한치 비율이 측정되었다. 따라서 3종의 농약중 가장 감수성이 높은 시점에서 가장 낮은 96h-LC₅₀ 값을 나타낸것은 butachlor로서 독성이 강함이 관찰되었다.

다. 논문에서의 butachlor는 살포 2일후 최고치에 도달한 후 반감기는 토양+물에 butachlor를 처리한 군이 6.1일 물에만 butachlor를 처리한 군은 9.7일로 나타났다, butachlor의 용출 및 분해에는 토양에 의한 영향이 컸다.

라. 생육단계별 및 처리별 공서어의 치사율은 통계적으로 유의성이 인정되었으며, 생육단계별로는 stage IV 및 VIII이 가장 butachlor에 대한 감수성이 높았다. 따라서 실제 논에서 butachlor를 관행 시용량을 살포했을 때 송사리의 생육초기단계에는 많은 영향을 받을 것으로 예상된다.

결국, 농약등의 화학물질에 대한 어류의 생육단계에 따른 감수성 변화는 선택된 어종과 chemical에 따라서 다소의 차이는 있으나 발육 초기단계인 초기 post-larva 시점에서 감수성이 가장 높게 나타난다고 사료된다. 따라서 화학물질의 환경독성 평가에 있어서 급성어독성외에 화학물질에 대한 민감도가 높은 시기인 초기생육단계에 미치는 영향도 함께 평가되어야 한다고 생각된다.

참 고 문 헌

1. Bartik, M. and A. Piskac, (1981) : *Veterinary toxicology*. In: General part. Elsevier Scientific Publ. Co., N.Y., pp. 21~24.
2. Parrish, P.R., (1985) : Acute toxicity test. In: Fundamentals of aquatic toxicology. (G.M. Rand and S.R. Petrocelli, editors). Hemisphere Publ., N.Y., pp. 31~57.
3. U.S. EPA, (1975) : Methods for acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates and amphibians. EPA-600/3-75-009.
4. OECD, (1981) : OECD Guideline for testing of chemicals. pp. 203 : 1~12.
5. 노정구 외, (1986) : 화학물질의 안전성 평가연구 (IV). 과학기술처.
6. Hall, L.W. Jr., W.C. Graves, D.T. Burton, S.L. Margrey, F.M. Hetrick, and B.S. Roberson, (1982) : A comparison of chlorine toxicity to three life stages of striped bass (*Morone saxatilis*). *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, 29 : 631~

- 636.
7. Hashimoto, Y., E. Okuba, T. Ito, M. Yamaguchi and S. Tanaka, (1982) : Changes in susceptibility of carp to several pesticides with growth. *J. Pesticide Sci.*, 7 : 457~461.
8. Seikai, T., (1982) : Acute toxicity of organophosphorus insecticides on the developmental stages of eggs, larvae and juveniles of Japanese Striped Knifejaw, *Oplegnathus fasciatus*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 48(5) : 599~603.
9. Devlin, E.W., J.D. Brammer, and R.L. Puyear, (1982) : Acute toxicity of toluene to three age groups of fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, 29 : 12~17.
10. Borthwick, P.W., J.M. Patrick, Jr., and D.P. Middaugh, (1985) : Comparative acute sensitivities of early life stages of atherinid fishes to chlorpyrifos and thiobencarb. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 14 : 465~473.
11. Takimoto, Y., S. Hagino, H. Yamada and J. Miyamoto, (1984) : The acute toxicity of fenitrothion to killifish (*Oryzias latipes*) at twelve different stages of its life history. *J. Pesticide Sci.*, 9 : 463~470.
12. 농약공업협회, (1984) : 농약년보
13. Yamamoto, T.O., (1976) : Medaka (Killifish) : Biology and strain. Keigaku Publ. Co., Tokyo. pp. 365.
14. U.S. EPA, (1978) : Methods for measuring the acute toxicity of effluent to aquatic organisms. EPA 600/4-78-012.
15. 농약공업협회, (1986) : 농약사용지침서.
16. Rand, G.M. and S.R. Petrocelli, (1985) : Fundamentals of aquatic toxicology. McGraw-Hill International Book Co., N.Y., pp. 335~373.
17. 이은호 외, (1983) : 농약의 농작물 축적 및 어류의 독성연구, 한국과학기술원.
18. Chen, Y.L. and J.S. Chen, (1979) : Degradation and dissipation of herbicide butachlor in paddy field., *J. Pesticide Sci.*, 4 : 431.
19. Beestman, G.B. and J.M. Deming, (1974) : Dissipation of acetanilide herbicides from soils. *Agronomy J.*, 66 : 308.
20. Howard, P.J., J. Saxema and H. Sikka, (1978) : Determining the fate of chemicals, *Environm.*

- Sci. Tech.*, 12(4) : 398.
21. Chen, Y.L., C.C. Lo and Y.S. Wang, (1982) : Photodecomposition of the herbicide butachlor in aqueous solution, *J. Pesticide Sci.*, 7 : 41.
22. Lee, J.K., (1978) : A study on degradation of butachlor by a soil fungus, *Chaetomium globosum*: Part I, Identification of major metabolites by GLC-MS. *J. Kor. Agr. Chem. Soc.*, 21(1) : 1
23. Doull, J., C.D. Klaassen, and M.O. Amdur, (1980) : Toxicology(2nd Ed.), Macmillan, Publ. Co., N.Y.
24. 신천철, 이성규, 노정구, (1986) : 농약의 급성독성평가를 위한 담수생물의 감수성 비교연구. 한국환경농학회지, 5 : 130.
25. U.S. EPA, (1983) : Protocol for bioassessment of hazardous waste sites. EPA-600/2-83-054.