

농약의 노출시간에 따른 급성어독성의 변화

신천철*·이성규*·노정구*

The changes of acute toxicity of pesticides depending on the exposure time to killifish, *Oryzias latipes*.

Chun-Chul Shin*·Sung-Kyu Lee* and Jung-Koo Roh*

Abstract

Prolonged aquatic toxicity tests (7-days) of six pesticides to the freshwater fish *Oryzias latipes* were performed to confirm the adequacy of the exposure times, 48-hr or 96-hr, which has been required by the protocols for the aquatic acute toxicity test. The toxicity curves were plotted for each chemical, and the significance of the difference between lethal threshold concentrations and 48-hr or 96-hr LC50's was analysed statistically.

The lethal threshold concentrations of butachlor, fenobucarb, and chlorothalonil were clearly defined on the 5th day, 2nd day, and 2nd day at 0.53mg/l, 10.3mg/l, and 0.085mg/l, respectively. But the toxicity curves of alachlor, diazinon, and iprobenfos continued with no threshold for 7 days. Four out of six test pesticides failed to show the threshold concentration during the 96-hr exposure time.

Therefore, the results of the acute toxicity test using 48-hr or 96-hr exposure time would not describe the ideal toxicity of pesticides. It is recommended that the prolonged exposure should be continued long enough to define the threshold adequately.

서 론

농약의 환경독성실험은 1946년 Odum과 Sumerford⁽¹⁾에 의해 DDT가 표적생물인 장구벌레(mosquito pupae)의 구제보다 비표적생물인 어류에 대한 독성이 더 크다는 것이 처음 발표되었다. 그후 수서생물에 대한 농약의 영향에 대해 관심이 고조되어 주로 단기간(4일 이하) 노출에 의한 급성독성실험에 의하여 농약의 환경 위해성을 평가하는 것이 일반화 되었다.⁽²⁾ 그런데 Doudoroff 등⁽³⁾이 독성실험방법의 표준화를 제안한 이후 독성실험 결과 자료의 재현성과 비교성을 높이기 위한 연구가 활발하였으며, 그 결과 미국 EPA⁽⁴⁾, OECD⁽⁵⁾ 등에서 실험 지침서가 출간되고 Standard Method (APHA)⁽⁶⁾가 제안

되었다. 그런데 이러한 지침서에는 어류 및 수서무척추동물(aquatic macroinvertebrates)을 대상으로 하는 급성독성 실험에서의 노출시간을 96시간으로 추천하고 있다.

그러나 농약을 포함한 화학물질에 따라서는 독성의 발현이 1) 빨리 나타나는 것, 2) 늦게 나타나거나 오래 끄는 것, 3) 축적되어 독성이 나타나는 것 등이 있는데 2)와 3)의 경우는 96시간 노출만으로는 정확한 급성독성값(LC50)을 얻기 힘들다.⁽⁷⁾ 따라서 이들 화학물질에 대한 급성독성 실험기간을 96시간으로 하는 것이 적당한가에 대한 논란이 계속되어 왔다. Palawski 등⁽⁸⁾은 methylparathion을 rainbow trout에 노출시켰을 때 96시간 이후에도 추가적인 치사를 확인하였으며, Fogels와 Spra-

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

gue⁽⁹⁾는 flagfish와 trout에 대한 picloram 독성평가에서 96시간 노출 시에는 trout가 더 민감하나, 10일 동안 노출시에는 flagfish가 더 민감하다고 하였다. Phipps 등⁽¹⁰⁾은 실험에 사용한 세가지 폐쇄화합물중 2가지는 노출시간이 증가함에 따라 TI지수 (192-h LC50/96-h LC50)가 감소하였다고 보고한 바 있다.

노출시간에 따라 독성이 달라지는 문제를 해결하기 위하여 최근 학자들은 time-independent(TI) LC50의 개념을 제안하였다.^(11,12) TI LC50는 기존의 time-dependent LC50(96hr LC50)와는 달리 공시생물을 1주일이상 실험물질에 노출시켜서 얻은 값이므로 독성발현의 양상에 대하여 보다 정확한 정보를 제공한다. 실제 자연 환경에서는 독성 화학물질이 지속적으로 유입되거나 또는 일단 유입된 이후에도 별다른 이동없이 장기간 존재하는 것이 보통이므로 TI-LC50가 48-hr LC50 또는 96-hr LC50보다 독성 평가를 위한 실제적인 수단이 된다고 할 수 있다.⁽¹³⁾ 따라서 OECD 지침서⁽⁵⁾에서 96시간 급성독성에 부가하여 노출시간을 더 연장한 실험(prolonged toxicity test : 14day)이 추가된 것도 이러한 맥락에서 이해되어야 할 것이다.

본 연구에서는 송사리를 공시동물로 했을 때 농약의 독성발현 양상과 이를 기초로 하여 최적 노출시간이 얼마인가를 규명하기 위하여 우리나라 수도작 및 과수, 원예에서 다량 사용하고 있는 6종의 농약에 대해 독성 실험을 하였다. 현재 이러한 농약에 대해서는 현재 관

행적인 방법에 의해 실험한 48시간 또는 96시간 LC50 값은 보고된 바 있으나 toxicity curve의 모양이나 치사한계 농도(threshold concentration)에 대하여서는 아직 보고되지 못하였다.

재료 및 방법

1. 실험농약

본 실험에 사용된 농약은 제초제 2종, 살균제 2종, 살충제 2종등 총 6가지로써 농약회사에서 원제를 분양받았고, 농약명과 순도는 표1과 같다. 실험용액은 실험농약을 DMSO(Dimethylsulfoxide)에 일정량 용해시키고, 여기에 계면활성제인 HCO-40(일광 Chemical : 일본)을 1-2방울 넣은 후 증류수를 용량플라스크의 표선까지 채워 분산시킨 후, 이것을 미리 정해진 노출농도에 따라 각 실험수조에 적당량을 투여하였다. 대조군은 각 농약별로 가장 높은 농도에 들어가는 양의 용매 및 계면활성제를 처리한 대조군과 희석수만 넣은 대조군을 설치하였다. 그리고 본 실험에서는 예비실험결과 나타난 치사율을 근거로 농약별로 8개 이상의 농도군을 대수등간격으로 설정하여 실험하였다.

2. 공시동물

본 실험에 사용된 공시어류는 담수산 송사리(*Oryzias latipes*)로 충남 대덕군 탄동면 자운리 소하천에서 채집

Table 1. List of chemical used in this study.

Conmon Name	Chemical Name (CA)	Purity (%)	Uses
Butachlor	N- (butoxymethyl) -2- chlor- N- (2, 6-diethylphenyl) acetamide	Technical (89.57)	Herbicide
Alachlor	2- chloro- N- (2, 6-diethylphenyl) - N- (methoxymethyl) acetamide	Technical (90.0)	Herbicide
Chlorothalonil	2, 4, 5, 6- tetrachloro- 1, 3- benzenedicarbonitrile	Technical (97.0)	Fungicide
Iprobenfos	0, 0-bis (1- methylethyl) - S- phenyl methyl phosphorothioate	Technical (95.0)	Fungicide
Fenobucarb	2- (1- methylpropyl) phenyl methylcarbamate	Technical (90.0)	Insecticide
Diazinon	0, 0- diethyl 0- (6- methyl- 2- (1- methylethyl) - 4- primidinyll) phosphorothioate	Technical (95.4)	Insecticide

망으로 채집하여 본 연구실의 사육실로 운반하여 광조건 14시간, 암조건 10시간, 수온 23-25°C에서 15일 이상 순화시킨 개체중에서 무작위적으로 선발하여 24시간전에 절식시켜 실험을 시작하였다. 실험에 사용된 어류의 크기는 체중 $0.22 \pm 0.04g$, 체장은 $3.0 \pm 0.4cm$ 이었다.

3. 실험방법

실험기간 중 수온은 약 23°C내외, 광주기는 광조건 14시간, 암조건 10시간으로 40W 형광등을 사용하였다. 실험용 수조는 5L 원형수조를 이용하였고, 농도에 따라 수조당 20마리씩 2반복하여 한처리당 40마리를 공시하였다.

노출방법은 peristaltic pump를 이용하여 1일 2회 실험용액이 완전히 교체되도록 각 농도별로 조제된 실험용액을 연속 공급하였다. 시험수조내 DO 농도와 수온은 각 수조별로 1일 2회 DO meter (YSI Model 57)로 측정하였고, pH는 1일 1회 pH meter (Cole-Parmer, Model 5987)로 측정한 바, 실험기간 동안 DO는 $8.0 \pm 0.4 mg/l$, 수온 $23 \pm 2C$, pH 6.8 ± 0.4 가 유지 되었다. 실험기간 중

먹이와 공기는 공급하지 않았으며 실험실 순화기간중에는 먹이를 배양어 양어사료-혹자용(우성사료)와 테라민(세화사료)을 4 : 1로 섞어 0.3g/50마리의 비율로 1일 2회 투여하였다.

그리고 실험기간중 사용한 회석수는 수도물을 1차로 membrane filter를 통과시켜 고형물질을 제거한 후 황성탄소로 충전한 2차 여과장치를 통과시켜 잔류염소를 제거한 후 수온을 23°C로 올려 사용하였고 수질특성은 전기전도도 95uMHO, 전 Alkalinity 25.8 mg/l, 경도 52.4 mg/l, 전 NH_3-N 0.02 mg/l이하, pH 6.5이었다.

공시어류의 치사판정은 노출시작 1,3,6,12,24 시간에, 그 이후는 24시간마다 7일 동안 관찰하여 아가미 호흡이 중지된 것과 유리막대로 자극하여 유영능력을 상실한 것을 치사한 것으로 간주하였고 확인 즉시 실험수조에서 제거하였다.

각 노출 시간별 LC50 값은 log-probit 법에 따른 전산화된 프로그램에 의하여 구하였으며, Sprague의 방법에 의하여 toxicity curve를 작성하여 lethal threshold값과 95% 신뢰한계를 구하였다.⁽¹⁴⁾ 그리고 급성독성값간의

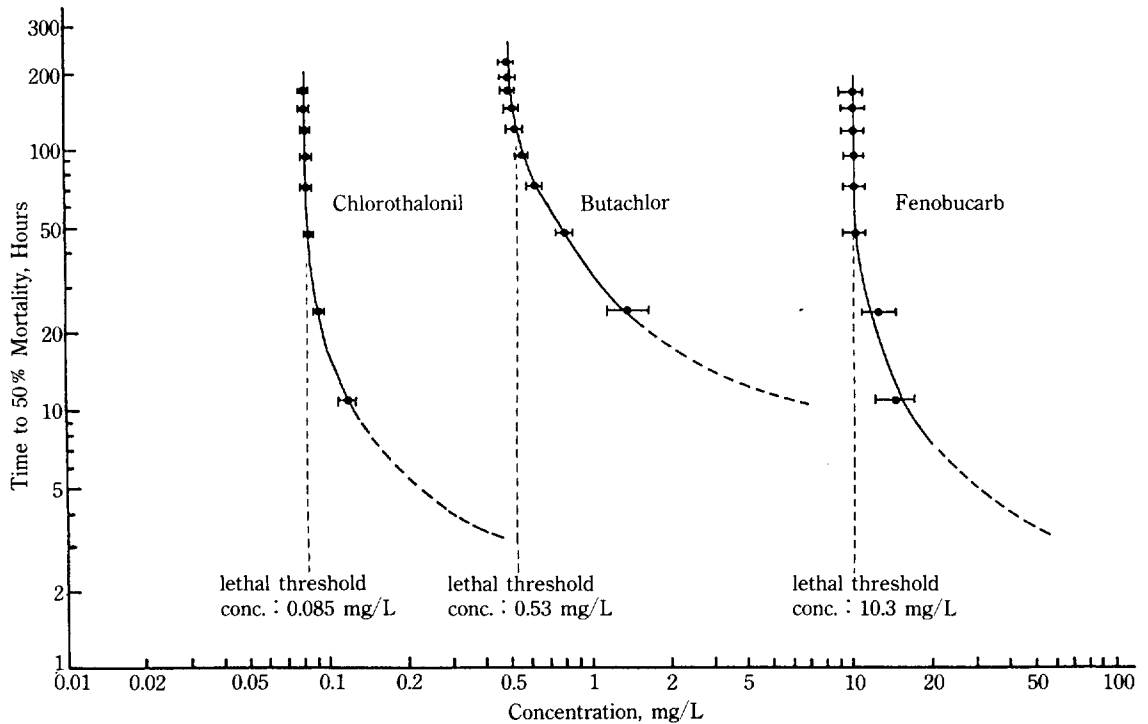


Fig. 1. The toxicity curves of butachlor, fenobucarb, and chlorothalonil to killifish. The lethal threshold concentrations were clearly defined.↔ indicates LC50 for specific exposure time and its 95% confidence limit.

유의성 비교는 Dryer⁽¹⁵⁾가 제안한 전산화된 프로그램을 이용하였다.

결과 및 고찰

1. 급성독성 실험에 의한 toxicity curve

Butachlor, alachlor, chlorothalonil, probenfos, fenobucarb, diazinon의 6개 농약을 송사리에 1주일간 노출시켜 관찰시간별 50% 치사농도에 따라 농약별 toxicity curve를 그리면 그림 1,2와 같다. 그림에서 lethal threshold 농도란 노출시간이 증가하여도 급성독성현상이 증가하

지 않고 정지되는 때의 농도를 말한다.

그림에서 보듯이 6개 농약중에서 butachlor는 노출후 120시간 이후부터 lethal threshold level에 도달하였으며, chlorothalonil과 fenobucarb는 48시간후에 이 수준에 도달하였다. 그러나 alachlor, iprobenfos와 diazinon에서는 48시간 이후에도 치사율이 계속 증가하여 노출후 168시간까지도 lethal threshold level에 도달하지 않았다. 시간과 농도간의 toxicity curve의 모양도 butachlor, chlorothalonil, fenobucarb는 곡선적(curvilinear)관계인데 비하여 alachlor, iprobenfos, diazinon은 직선에 가까운 관계를 나타내는 것으로 보여 Sprague⁽¹⁴⁾가 언급한 바와 같이 화학물질에 따라 toxicity curve의 모양이 다를 수 있음을 시사하였다. 본 실험에서 공시한 6개 농약의 to-

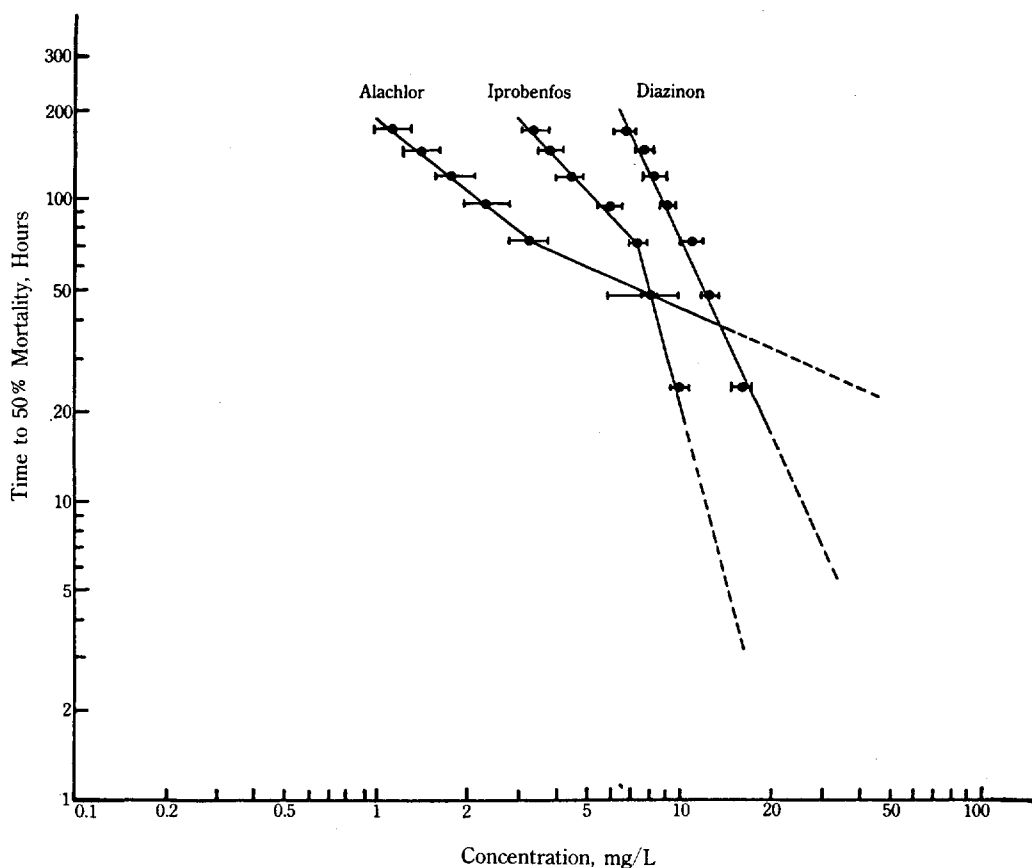


Fig. 2. The toxicity curves of iprobenfos, alachlor, and diazinon to killfish. The lethal threshold concentrations were not clear. \bullet - \bullet indicates LC50 for specific exposure time and its 95% confidence limit.

xicity curve는 농약의 작용양상(mode of action)에 대한 정보를 제공해 준다고 하는데 곡선적 관계를 나타내는 butachlor, chlorothalonil, fenobucarb는 독성의 발현이 빨라 빠른 시간안에 생체내 대사작용을 저해시키는 것으로 추측되었다. 이 부류에 속하는 농약의 96시간 LC50은 butachlor 0.57 mg/l, chlorothalonil 0.084 mg/l, fenobucarb 10.2 mg/l이었다. 직선적 관계를 보이는 alachlor, iprobenfos, diazinon은 96시간 LC50값이 각각 2.43 mg/l, 5.97 mg/l, 9.58 mg/l로 비교적 중 정도의 독성을 보여 Rothschein이 가정된 것과 비슷하였다.⁽¹⁴⁾ 왜 농약에 따라서 이런 독성발현 양상에 차이가 나는지는 아직 명확히 밝혀지지 못하였는데, 그것은 화학물질의 화학적 구조와 그것이 어체내에서의 물질대사를 저해하는 기작(mechanism)과의 관계를 쉽게 규명하기 어렵기 때문이다.

2. 급성독성과 lethal threshold 농도

48시간 및 96시간에 대한 LC50값과 lethal threshold 농도와의 유의성 검정결과 (표 2)에 따르면, butachlor는 lethal threshold 농도가 0.53 mg/l 로써 96-h LC50인 0.57 mg/l 와는 약간 차이가 있었다. Alachlor, iprobenfos, diazinon의 경우도 lethal threshold 농도와 LC50 사이에 차이가 있었으므로, 6개의 실험농약중 4개의 농약에서 96시간 이후에도 시간의 경과에 따라 급성독성 현상이 나타남을 관찰하였다.

그러나 살균제 chlorothalonil과 살충제 fenobucarb는 48시간과 96시간 LC50 값과 lethal threshold 농도가 거의 비슷하여 급성독성현상이 48시간 이내에 완전히 발현되었음을 알 수 있었다. 따라서 실험농약 6개중에서 2개만 48시간에 이내에 lethal threshold 농도를 나타내

었으나 4개는 96시간 이후에 이 수준에 도달하였다. Sprague⁽¹⁴⁾가 정리한 자료에 따르면 275경우의 독성실험중에서 211경우 전체의 56%가 4일 이내에 lethal threshold농도에 도달하였고, 나머지 122경우는 4일 이후에 이농도에 도달하였다고 하므로 본 연구 결과와는 상이하였다. 그러나 이 자료들은 대부분의 경우 농약보다는 중금속, 폐수, 기타 수질오염물질등을 대상으로 한 실험이기 때문에 Sprague가 언급했듯이 농약은 이와같은 환경오염물질과는 차이가 있지 않나 생각된다. 또한 Pickering 등⁽¹⁶⁾이 13개 유기인계 농약을 4개 어종에 대해 실험한 결과를 분석해 보면 goldfish의 경우는 대상농약의 약 54%가 48시간 이내에 lethal threshold농도를 나타내지만, bluegill, fathead minnow, guppy의 경우는 약 85%가 96시간 또는 그 이후에 lethal threshold 농도를 나타낸다고 하며, delnav의 경우는 15일 이후에 lethal threshold 농도에 도달하였다. 이렇게 볼때 농약의 독성발현 양상은 농약의 종류에 따라 달리 나타나지만 또 사용하는 어종에 따라서도 그 양상이 크게 다를 수 있었다.

따라서 위의 결과를 고려한다면 48시간의 노출시간은 농약의 급성독성을 평가하는데 미흡하다고 사료되며, 96시간의 노출시간은 실험결과와 재현성과 비교성을 높이기 위한 독성실험의 표준화의 견지에서는 타당하다고 생각된다. 그러나 실험 물질의 종류에 따라 비교적 늦게 독성이 발현하는 화학물질에서는 노출시간을 연장하여 lethal threshold 농도를 관찰하는 것이 필요하다고 하겠다.

그리고 Pickering 등⁽¹⁶⁾의 결과에서도 보였듯이 어종을 달리했을 경우의 독성발현 양상에 대한 연구도 이루어져야 급성독성실험이 화학물질의 환경독성 평가에서의 위상이 정립되리라 사료된다.

Table 2. Acute toxicity values (LC50, mg/l) by exposure time and lethal threshold concentrations of test chemicals and statistical comparison of them using computer program written by James Dryer.

	Butachlor			Alachlor			Chlorothalonil			Iprobenfos			Fenobucarb			Diazinon		
	48	96	LTC*1	48	96	LTC	48	96	LTC	48	96	LTC	48	96	LTC	48	96	LTC
	0.81	0.57	0.53	8.36	2.43	1.15	>0.085	0.084	0.085	8.09	5.97	3.42	>10.3	10.2	10.3	13.1	9.58	6.70
48-hr	-	S**	S	-	S	S	-	NS**3	NS	-	S	S	-	NS	NS	-	S	S
96-hr	-	-	S	-	-	S	-	-	NS	-	-	S	-	-	NS	-	-	S

*1. LTC : Lethal threshold concentration

*2. S : Significant

*3. NS : Non-significant

요 약

담수산 어류인 송사리(*Oryzias latipes*)에 대한 6개 농약의 급성독성을 7일동안 시간의 경과에 따라 측정, toxicity curve를 작성하여 각 농약의 시간의 경과에 따른 급성독성 발현의 현상을 평가하고 48시간 및 96시간 LC 50값과 lethal threshold 농도와와의 관계를 분석하여 얻은 결과는 다음과 같다.

농약의 toxicity curve를 중심으로 시간의 경과에 따른 급성독성값의 변화를 보면 butachlor가 120시간째, fenobucarb가 48시간째, chlorothalonil이 48시간째 lethal threshold 농도를 나타내어, 각각 120시간, 48시간만에 급성독성현상이 더이상 시간의 경과에 따라 발현되지 않으나, 나머지 3개의 농약인 alachlor, diazinon, iprobenfos는 노출 7일 이후에도 계속 급성독성현상을 나타낼 수 있었다. 이로써 6개의 농약에 대한 lethal threshold 농도는 butachlor 0.53 mg/l (0.49-0.57 mg/l), alachlor 1.15 mg/l, fenobucarb 10.3 mg/l(9.3-11.4 mg/l), diazinon 6.70mg/l, chlorothalonil 0.085 mg/l(0.082-0.087 mg/l), iprobenfos 3.42 mg/l)이었다.

결국 노출시간 96시간이내에 독성현상이 발현되어 더 이상 치사율이 증가하지 않은 농약은 6개중 2종류뿐이며 나머지 4개중 3개에서는 노출후 7일이 경과하여도 계속하여 독성이 발현됨을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Odum, E.P. and Sumerford, W.T. (1946) : Comparative toxicity of DDT and four analogues to goldfish, *Gambusia*, and *culex* larve, *Science*, **104**, 480.
2. Parrish, P.R. (1985) : *Acute toxicity tests*, In G.M. Rand and S.R. Petrocelli, eds. *Fundamentals of aquatic toxicology*, Hemisphere Publishing Corporation, pp. 31.
3. Doudoroff, P., Anderson, B.G. Burdick, G.E., Galsoff, P.S., Hart, W.B., Patrick, R., Strong, E.R., Surber, E. W., and Horn, W.M.V. (1951) : Bio-assay methods for the evaluation of acute toxicity of industrial wastes to fish, *Sewage Ind. Wastes*, **23**, 1380.
4. U.S.EPA (1984) : Methods for acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates and amphibians, EPA-600/3-75-009.
5. OECD(1984) : OECD guideline for testing of chemicals.
6. APHA(1981) : Standard methods for the examination of water and wastewater, 15th ed.
7. Davis, J.C. (1977) : *Standardization and protocols of bioassays-Their role and significance for monitoring research and regulatory usage*, In W.R. Parker, E. Pessah, P.G. Wells, and G.F. Westlake, eds., *Proceedings, Third Aquatic Toxicology Workshop*. EPS-5-AR-77-1. Environ. Proc. Serv. Report. pp. 1-14.
8. Palawski, D., Buckler, D.R., and Mayer, F.L. (1983): Survival and condition of rainbow trout(*Salmo gairdneri*) after acute exposures to methylparathion, tri-phenyl phosphate and DEF, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **30**, 614.
9. Fogels, A. and Sprague, J.B. (1977) : Comparative short-term tolerance of zebrafish, flagfish, and rainbow trout to five poisons including potential reference toxicants. *Water Res.*, **11**, 811.
10. Phipps, G.L., Holcombe, G.W., and Fiandt, J.T. (1981) : Acute toxicity of phenol and substituted phenols to the fathead minnow, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **26**, 585.
11. Stephan, C.E. (1982) : *Increasing the usefulness of acute toxicity tests*, In J.G. Pearson, R.B. Foster and W.E. Bishop, eds., *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment : Fifth Conference*, ASTM, pp. 69-81.
12. Smith, L.L. Jr. (1978) : *Endpoints in bioassay*, In. *Proceedings of the 1st-2nd USA-USSR symposium on the effects of pollutants upon aquatic ecosystems*. EPA 600/3-78-076, pp. 36-45.
13. Hong, W.H., Meier, P.G., and Deininger, R.A. (1988) : Determination of dose-time-response relationships from long-term acute toxicity test data, *Environ. Toxicol. Chem.*, **7**. (In Press)
14. Sprague, J.B. (1969) : Measurement of pollutant toxicity to fish, I. Bioassay methods for acute toxicity, *Water Res.*, **3**, 793.
15. U.S. EPA (1985) : Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms (3rd. ed.), EPA 600/4-85-013.
16. Pickering, Q.H., Henderson, C., and Lemke, A.E. (1962) : The toxicity of organic phosphorus insecticides to different species of warmwater fishes, *Trans. Am. Fish Soc.*, **91**, 175.