

## 단기번식독성시험법을 이용한 제초제 Alachlor의 송사리 내분비계 영향 조사

이제봉\* · 박연기 · 최영웅 · 김병석 · 권혜영 · 진용덕 · 임건재 · 강규영<sup>1</sup>농촌진흥청 농업과학기술원, <sup>1</sup>경상대학교 환경생명화학학과

(Received on April 17, 2012. Revised on April 30, 2012. Accepted on May 11, 2012)

### Evaluation of endocrine disrupting effect of the herbicide Alachlor on Japanese Medaka using short term reproduction assay

Je-Bong Lee\*, Yoen-Ki Park, Young-Woong Choi, Byung-Seok Kim, Hyeyoung Kwon, Yong-Duk Jin, Geon-Jae Im and Kyu-Young Kang<sup>1</sup>National Academy of Agricultural Science, Suwon, Korea, <sup>1</sup>Dept. of Environ. Biotechnology, Gyeong Sang National University, Jinju, Korea

#### Abstract

Acute toxicity, water resolvability and short term reproduction test on Japanese medaka (*Oryzias latipes*) for evaluating alachlor susceptibility to endocrine system were studied. Alachlor is known for suspected endocrine disruptors. As the results of tests, LC<sub>50</sub> (Median lethal concentration) was determined as 2.36 (1.994~2.805) mg/L, and test water replaced at 7 day intervals as its water resolvability was less than 20% in 7 days. The short term reproduction tests on Japanese medaka (*Oryzias latipes*) were performed with a solvent control group, a treated group (alachlor concentrations of 0.02, 0.04, 0.11, 0.27, 0.68 ppm) and a positive control group (17  $\beta$  estradiol, 0.01, 0.1, 0.5 ppb). The number of spawning and embryo rates were declined in a alachlor-dose dependent manner, and the number of unfertilized eggs rates were in contrast increased depending on the concentrations. Further study should be needed to confirm whether the adverse effects may be effected by the concentrations. Additionally, alachlor was evaluated as a non-vitellogenin by the result of a test of significance of the vitellogenin content test for determination of the effect of estrogen among the endocrine disruptors.

**Key words** Alachlor, short term reproduction test, vitellogenin

#### 서 론

Alachlor는 국내에서 콩, 옥수수, 감자, 고구마 등 11작물에 일년생잡초를 방제하기 위하여 등록되어 있는 선택성 제초제(한국작물보호협회, 2011)로 신초 및 뿌리에 의해 흡수되어 식물체로 이동되고 축적되는 물질이다. 분자수준에서의 작용기작은 알려져 있지 않으나 일반적으로 단백질합성차단

에 의한 세포분열 억제 및 뿌리발육을 저해한다는 보고와 긴 사슬의 지방산합성을 저해한다고 알려져 있다(Tomlin, 2009). Alachlor의 독성은 랫드에 대한 급성경구독성 LD<sub>50</sub>이 930~1350 mg/kg, 안구 및 피부자극성은 없으나 피부감작성이 있어서 반복하여 노출되면 알러지를 일으킬 가능성이 있고 소비자 일일섭취허용량은 0.01 mg/kg/day(미국 EPA)으로 설정해 놓고 있다(Tomlin, 2009). Alachlor는 가소제, 플라스틱용 화학물질, 산업물질, 중금속 등과 함께 생체내의 호르몬 농도에 영향을 주어 내분비계의 정상적인 기능을 방해하는

\*Corresponding author: Tel. +82-31-290-0533

Fax. +82-31-290-0506, E-mail. jblee627@korea.kr

농약으로 알려져 있다(국립환경과학원, 1999). 100 ug/L를 노출시킨 송사리 초기 생활사시험에서 성장 및 발육저해가 나타났고(Lee et al., 2004), 2007년 이 등은 국내 수계 및 토양에서의 alachlor 모니터링에서 각각 ND~0.54 ug/L와 ND~0.9 ug/kg이 검출되었음을 보고하였으며, Sanches-Camazano (2005) 등은 스페인 Catilla-Leon지역의 관개 옥수수 재배지에서 alachlor에 대한 지표수 및 지하수에서의 잔류량을 모니터링한 결과 지표수에서 0.06~31.9 ug/L, 지하수에서 0.05~4.85 ug/L가 검출되었다. 북부그리스 수로에 서식하는 환경생물에 대한 위해성평가 결과 alachlor 등 15종 농약이 환경생물에 위해한 것으로 보고 하였다(Vryzas et al., 2011). 1996년 WWF(World Wildlife Funds)에서 내분비계 장애 추정 물질로 DDT 등 67종을 분류한 이후, 선진국 및 국제기구에서는 이들 물질에 대한 관리방안을 모색하기 위하여 다각도의 연구가 진행 중에 있으며, 국내에서도 WWF가 지정한 67종을 내분비계 장애 추정물질로 분류하였다(국립환경연구원, 1999). 이중 농약은 총 44종이 포함되어 있고, 현재 사용 중에 있는 농약도 16종이 관련되어 있다. 화학물질 중 잔류성오염물질, 신중유해물질 등과 같이 내분비계 장애추정 물질도 인체 및 환경생물에 영향을 미치므로 정확한 작용기전 구명과 관리방안 마련이 시급한 문제로 대두되고 있다(US/EPA, 1997; Boenke et al., 2002). 일본 송사리(*Oryzias latipes*)는 환경독성연구에 널리 이용되며 내분비계장애성 구명에 적합한 생물종으로 알려져 있다(Patyna et al., 1999). 따라서 본 연구에서는 alachlor의 환경생물에 대한 영향을 구명하기 위하여 미국 EPA가 추천하는 Tier 1 screening battery *in vivo* 시험 중 송사리에 대한 fish short-term reproduction test의 수정된 방법(US/EPA, 2009)을 이용하여 내분비계에 미치는 영향을 구명하고자 수행한 결과를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 시험생물

시험종으로 3년 이상 실내에서 계대 사육되고 부화 후 4개월 이상 자라 성 성숙이 완료된 일본 송사리(*Oryzias latipes*, 체중 300 mg, 체장 33 mm 내외) 34쌍을 선발하여 1L 수조에 1쌍씩 분리하여 사용하였으며, 사육 환경은 수온 25±1°C, pH 8.0, 명암조건 18 : 6시간으로 하였다.

### 시험물질 및 조제

시험물질 alachlor(technical grade 90% up)는 동부한농

으로부터 입수하였으며, 투여농도 선정을 위한 급성독성 및 단기번식독성시험을 위하여 acetone을 용매로 사용하여 2,000 ppm stock solution을 조제한 다음 적당한 농도로 희석하여 처리하였다. 양성대조 물질로는 17 β estradiol을 에탄올에 녹여 사용하였다.

### 시험물질 분해성시험

시험물질인 alachlor의 수중 분해성 시험은 5 L 수조 3개에 0.767~0.829(평균 0.803)ppm을 처리하여 매일 수조 중 농도를 분석하여 80%까지 분해되는 기간을 산정하고 노출기간 중 시험수 교체 기간을 설정하였다. 분석기기 GC는 Agilent사의 7890시리즈를 사용하였으며 분석조건은 잔류농약 공정 분석법에 준하여 수행하였다. 회수율은 > 95%이었다.

### 급성독성시험

Alachlor의 송사리 급성독성시험은 5 L 수조에 시험생물 사육환경과 동일한 조건으로 용매대조군을 두어 시험하였으며, 용매로는 acetone을 사용하였다. 처리 농도는 1.0, 1.5, 2.25, 3.38, 5.06 ppm으로 5단계를 두어 시험하였으며, LC<sub>50</sub>은 probit분석법(Finney, 1952)으로 산출하였다.

### 단기번식영향시험

Alachlor의 내분비장애성을 검정하기 위하여 US/EPA EDSP (Endocrine disruptor screening program) Tier 1 *in vivo* 시험 중 환경생물에 대한 영향을 검색하는 방법으로 제시된 단기번식영향시험(Endocrine Disruptor Screening Program Test Guidelines - OPPTS 890.1350: Fish Short-Term Reproduction Assay [EPA 740-C-09-007])을 시험 중, 측정항목 등을 시험여건에 맞게 변형하여 수행하였다(US/EPA 2009). 시험에 사용할 송사리는 1~2주간 순화 및 예비 노출기간을 가지면서, 개체 당 산란 수, 시험생물의 건강도 등을 측정하여 본 시험에 사용가능한 개체군을 선발하고 21일간 5농도 수준의 alachlor를 노출하여 수행하였다. 시험기간 중 매일 산란수를 측정하고 부화할 때까지 무정란과 유정란을 0.01% methylene blue가 들어있는 배지를 사용하여 선별하였다. 부화가 완료된 개체는 기형검사를 실시하였으며 기형율을 산출하였다. 시험결과는 군당(3 마리) 산란 수, 유정란 수, 무정란 수 및 기형개체 수를 one-way ANOVA를 이용하여 통계적 유의성검정을 수행하였다. 각 군간의 유의성은 Duncan's multiple range test를 이용하여 분석하였다. 수컷은 vitellogenin 함량 측정을 위하여 시험 종료 즉시 냉동 보관하여 시험물질의 에

스트로겐성 검색에 사용하였다. 본 시험은 alachlor 최고투여 농도에 사용된 량인 acetone 340 ppm을 용매대조군으로 사용하였으며, alachlor(0.02, 0.04, 0.11, 0.27, 0.68 ppm)처리군, 양성대조군(17β estradiol, 0.01, 0.1, 0.5 ppb)을 두어 실시하였다.

**Vitellogenin 활성화시험**

Vitellogenin(VTG) 활성화시험 재료는 노출 종료시 -70 °C에 보관한 수컷 송사리 몸통 전체를 균질화하여 사용하였으며, VTG ELISA kit는 Biosense Lab.에서 구입하였다. VTG 활성측정은 VTG ELISA kit 매뉴얼에 따라 표준물질을 0.05 ng/L~50 ng/L까지 11농도 단계로 조제하였으며, 시료는 50, 5,000, 500,000배로 희석하여 450 nm microplate reader에서 흡광도를 측정하여 VTG양을 산출하였다.

**결과 및 고찰**

**Alachlor 수중분해 시험**

Alachlor의 21일 노출 단기번식독성 시험을 수행하기 위하여 수중분해시험을 수행한 결과 그림 1과 같이 노출 10일에 최초 처리농도 0.803 ppm의 0.744 ppm(92.6%), 15일 0.665 ppm (82.8%)로 15일까지도 20% 이내로 분해되어 투여군의 alachlor 농도를 유지시키기 위하여 시험수를 매 7일마다 교체하였다. 7일 시험 수 교체주기 설정사유는 노출전체 기간이 21일이고 시험물질 농도가 80% 이상 유지되며 시험물질 교체횟수, 시기 등이 용이하여 7일을 시험 수 교체 주기로 하여 수행하였다.

**Alachlor 단기번식독성시험을 위한 노출량 설정시험**

Alachlor의 단기번식독성시험을 위한 노출량을 설정하기

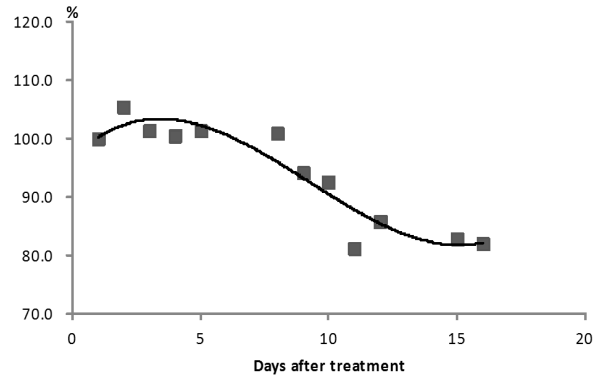


Fig. 1. Time dependant degradation curve of alachlor in water.

위하여 송사리(*Oryzias latipes*)에 대한 96시간 급성독성시험을 수행하였다. 처리농도 1.0, 1.5, 2.25, 3.38 및 5.06 mg/L에 노출시켜 시험한 결과 표1에서와 같이 특별한 임상 증상은 관찰되지 않았으나 2.25 mg/L에서는 노출 96시간에 5마리가 치사하였으며, 3.38 mg/L에서는 48시간 1마리가 치사하였으나 96시간까지는 9마리가 치사하였다. 5.06 mg/L 처리군은 48시간에 7마리가 치사하였으며 72시간에 10마리 모두 치사하였고, probit을 이용한 96시간 LC<sub>50</sub>은 2.36 (1.994~2.805) mg/L로 산출되었다. 이 결과는 타 어종에 대한 독성과 비교했을 때 유사한 것으로 96시간 LC<sub>50</sub>이 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*) 1.6 mg/L, 볼루길(*Lepomis macrochirus*) 3.2 mg/L으로 보고된 바 있다(이 등, 2007). 이 송사리 급성독성시험결과를 근거로 alachlor의 단기번식독성시험을 위한 처리농도를 LC<sub>50</sub>의 1/4을 최고농도로 0.02, 0.04, 0.11, 0.27 및 0.68 mg/L로 선정하였다.

**Alachlor 단기번식영향시험**

Alachlor의 내분비장애성을 검정하기 위하여 US/EPA EDSP (Endocrine disruptor screening program) Tier 1 in

Table 1. Result of acute toxicity test for herbicide alachlor on *Oryzias latipes*

Concentration (mg/L)	No. of Medaka	Mortality				LC50 (96 hr)
		24 hr	48 hr	72 hr	96 hr	
1.0	10 <sup>a)</sup>	0	0	0	0	2.365(1.994~2.805)
1.5	10	0	0	0	0	
2.25	10	0	0	0	5	
3.38	10	1	1	4	9	
5.06	10	4	7	10	10	
Solvent control	10	0	0	0	0	

<sup>a)</sup>Number of *Oryzias latipes*

\* Test water condition : pH 8.0, temperature 26.8°C

**Table 2.** Spawning index of exposure to different concentration of alachlor on *Oryzias latipes*

Concentration(ppm)	No. of total spawning		Fertilized egg		Non-fertilized egg	
	Mean±SD <sup>a)</sup>	Mean±SD <sup>b)</sup>	%	Mean±SD <sup>c)</sup>	%	
Solvent control	53.2±9.5 <sup>ab</sup>	50.3±11.3 <sup>ab</sup>	94.5	2.9±5.3 <sup>a</sup>	5.5	
0.02	61.5±12.0 <sup>a</sup>	59.2±12.8 <sup>a</sup>	96.3	2.3±3.4 <sup>a</sup>	3.7	
0.04	54.2±11.6 <sup>ab</sup>	52.6±11.0 <sup>a</sup>	97.0	1.6±2.0 <sup>a</sup>	3.0	
0.11	49.5±7.1 <sup>ab</sup>	47.3±8.1 <sup>ab</sup>	95.6	2.2±2.9 <sup>a</sup>	4.4	
0.27	42.1±15.2 <sup>b</sup>	37.4±16.0 <sup>b</sup>	88.8	4.7±4.8 <sup>a</sup>	11.2	
0.68	29.2±23.1 <sup>c</sup>	14.0±23.0 <sup>c</sup>	47.8	15.2±13.9 <sup>b</sup>	52.2	

<sup>a)</sup>Mean numbers of 1 day spawning for 21 day

<sup>b)</sup>Mean numbers of 1 day fertilized egg for 21 day

<sup>c)</sup>Mean numbers of 1 day non-fertilized egg for 21 day

<sup>a,b,c</sup>Values with different letters are significantly different among groups at P<0.05 by Duncan's multiple range test

**Table 3.** Effect of exposure to different concentration of alachlor on *Oryzias latipes*

Concentration (ppm)	Fertilized egg			Rate of hatch		Mortality <sup>a)</sup>		Adverse effect <sup>b)</sup>	
	Mean±SD	Mean±SD	%	Mean±SD	%	Mean±SD	%		
Solvent control	50.3±11.3 <sup>ab</sup>	38.2±12.8 <sup>ab</sup>	75.9	12.0±9.8 <sup>a</sup>	24.0	2.5±1.9 <sup>b</sup>	6.5		
0.02	59.2±12.8 <sup>a</sup>	46.0±17.2 <sup>a</sup>	77.7	13.2±10.7 <sup>a</sup>	22.7	4.7±3.1 <sup>a</sup>	10.2		
0.04	52.6±11.0 <sup>a</sup>	42.2±15.6 <sup>a</sup>	80.2	10.4±6.9 <sup>ab</sup>	19.7	5.0±3.3 <sup>a</sup>	11.8		
0.11	47.3±8.1 <sup>ab</sup>	34.6±15.2 <sup>ab</sup>	73.2	12.8±12.5 <sup>a</sup>	27.0	0.4±0.7 <sup>c</sup>	1.2		
0.27	37.4±16.0 <sup>b</sup>	26.7±16.9 <sup>b</sup>	71.4	10.7±9.0 <sup>ab</sup>	28.5	1.4±1.8 <sup>bc</sup>	5.2		
0.68	14.0±23.0 <sup>c</sup>	11.6±20.6 <sup>c</sup>	82.9	2.3±3.7 <sup>c</sup>	16.7	0.3±0.8 <sup>c</sup>	2.5		

<sup>a)</sup>Mortality was measured the dead embryos within alachlor exposure duration

<sup>b)</sup>Adverse effect include cardiovascular defect, hemorrhage, growth inhibition, curvature of the spine, crooked tail, death

<sup>a,b,c</sup>Values with different letters are significantly different among groups at P<0.05 by Duncan's multiple range test

*vivo* 시험 중 환경생물에 대한 영향을 검색하는 방법으로 단 기번식영향시험을 지정하고 있어 본 시험법을 이용하여 시험을 수행하였다. 시험결과 Table 2에서 제시한 바와 같이 일일 평균 산란 수는 용매대조군 53.2이었으며, 0.11ppm 처리 군부터 49.5로 총 산란 수 및 유정란 수가 유의성 있게 감소하였고 무정란 수는 0.27 ppm에서부터 유의성 있게 증가하였다. 수정란에 대한 부화율은 Table 3에서 보는 바와 같이 0.27 ppm부터 유의성 있게 감소하였으나, 사망이나 기형을 예에서는 농도 의존적인 영향이 관찰되지 않았다. 이와 같은 결과는 이미 수정율과 부화율에 alachlor에 의한 영향이 대부분 반영된 것으로 판단되며, 0.02 및 0.04 ppm에서 다소 높은 빈도의 기형개체 출현은 높은 농도에서는 부화하지 못했거나 치사되었을 가능성이 큰 것으로 판단되고, 낮은 농도에서 시험물질에 대한 영향이 나타난 것은 최근 내분비계 장애 독성이 있는 것으로 추정되는 비스페놀 에이의 경우 독성반응이 역 U자 형태를 보인다는 보고가 있어 이와 같은 유형의 독성 반응으로 추정되거나 정확한 원인을 구명하기 위해서는 추가의

연구가 필요할 것으로 사료된다(Aschberger et al., 2010). 이 등(2007)은 송사리 수정란에 alachlor를 10~500 ug/L 처리한 초기생장단계에서의 영향을 관찰한 결과 부화율이 농도 의존적으로 감소하였고, 미 부화된 개체들은 주로 embryo의 발달장애에 기인하였으며, 주요 증상으로 생장저해, 미발달 안구 등이 관찰되어 사망하였다고 보고하였다. 이와 같은 내용이 본연구의 결과와 차이가 있는 것은 alachlor의 처리시기에 기인하는 것으로 본 연구에서는 시험물질이 처리된 시험수에 송사리를 노출시켰기 때문에 산란율, 유정란 및 무정란율, 부화율 등에 약제의 영향이 이미 반영되었기 때문인 것으로 판단된다.

### 17 β-estradiol에 대한 번식영향 시험

송사리에 대한 17 β-estradiol 단기번식독성시험 결과 Table 4에 보는바와 같이 0.5 ppb에서 산란 수가 6개 까지 떨어지고 무정란 비율도 35.7%까지 증가하였다. 그러나 그 외의 농도에서는 농도 의존적인 영향은 관찰되지 않았다.

**Table 4.** Spawning index of exposure to different concentration of 17  $\beta$ -estradiol on *Oryzias latipes*

Concentration(ppb)	No. of total spawning		Fertilized egg		Non-fertilized egg	
	Mean $\pm$ SD <sup>a)</sup>		Mean $\pm$ SD <sup>b)</sup>	%	Mean $\pm$ SD <sup>c)</sup>	%
Solvent control	42.2 $\pm$ 10.9 <sup>a</sup>		39.8 $\pm$ 10.7 <sup>a</sup>	94.1	2.5 $\pm$ 3.4 <sup>b</sup>	5.9
0.01	37.6 $\pm$ 12.2 <sup>a</sup>		17.4 $\pm$ 8.5 <sup>b</sup>	46.4	20.1 $\pm$ 10.3 <sup>a</sup>	53.6
0.1	41.9 $\pm$ 12.2 <sup>a</sup>		37.4 $\pm$ 13.8 <sup>a</sup>	89.2	4.5 $\pm$ 4.5 <sup>b</sup>	10.8
0.5	6.0 $\pm$ 11.7 <sup>b</sup>		3.9 $\pm$ 9.0 <sup>c</sup>	64.3	2.1 $\pm$ 4.0 <sup>b</sup>	35.7

<sup>a)</sup>Mean numbers of 1 day spawning for 21 day

<sup>b)</sup>Mean numbers of 1 day fertilized egg for 21 day

<sup>c)</sup>Mean numbers of 1 day non-fertilized egg for 21 day

<sup>a,b,c</sup>Values with different letters are significantly different among groups at P<0.05 by Duncan's multiple range test

**Table 5.** Effect of exposure to different concentration of 17  $\beta$ -estradiol on *Oryzias latipes*

Concentration(ppb)	Rate of hatch		Mortality <sup>a)</sup>		Adverse effect <sup>b)</sup>	
	Mean $\pm$ SD	%	Mean $\pm$ SD	%	Mean $\pm$ SD	%
Solvent control	29.4 $\pm$ 12.4 <sup>a</sup>	73.9	10.4 $\pm$ 7.8 <sup>a</sup>	26.1	4.4 $\pm$ 3.1 <sup>a</sup>	14.9
0.01	11.0 $\pm$ 8.2 <sup>b</sup>	63.4	6.4 $\pm$ 5.5 <sup>a</sup>	36.6	0.6 $\pm$ 0.8 <sup>bc</sup>	5.6
0.1	29.2 $\pm$ 14.5 <sup>a</sup>	78.2	8.1 $\pm$ 4.7 <sup>a</sup>	21.8	1.9 $\pm$ 1.7 <sup>b</sup>	6.4
0.5	2.9 $\pm$ 8.0 <sup>b</sup>	75.3	1.0 $\pm$ 1.8 <sup>b</sup>	24.7	0.3 $\pm$ 1.1 <sup>c</sup>	11.5

<sup>a)</sup>Mortality was measured the dead embryos within alachlor exposure duration

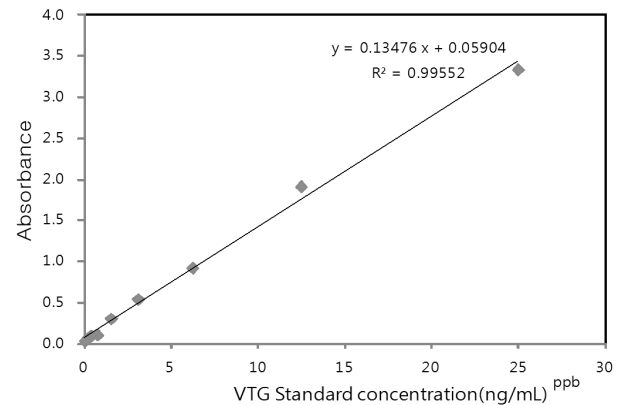
<sup>b)</sup>Adverse effect include cardiovascular defect, hemorrhage, growth inhibition, curvature of the spine, crooked tail, death

<sup>a,b,c</sup>Values with different letters are significantly different among groups at P<0.05 by Duncan's multiple range test

Table 5의 부화율, 치사 및 기형발생에서는 부화율만 유의성 있게 감소하는 경향이 있었으나 치사 및 기형발생에서는 영향이 관찰되지 않았다. Tsutomu와 Meiko(2000)는 송사리에 17  $\beta$ -estradiol를 노출시켜 영향을 조사한 결과 3 nmol/L에서 산란 수 및 부화율이 유의성 있게 감소하였다고 보고하였고, Kang et al. (2002)은 하수처리장에서 17  $\beta$ -estradiol 및 이들의 유사물질오염 실태를 조사한 결과 최고 64 ng/L까지 검출되어 오염 수에 대한 환경위해성평가를 위해 17  $\beta$ -estradiol 29.3~463 ng/L의 농도로 송사리에 21일간 노출시켜 단기변식독성시험을 수행한 결과 최고 노출 농도에서 산란 수 및 수정 율이 현저하게 감소하였다고 보고하였다. 또한 Shosaku et al. (2002)은 일본 수계의 내분비계장애물질의 오염과 수질평가를 위해 수행한 연구에서 송사리에 대한 부화저해 IC<sub>50</sub> 농도를 0.47 mg/L로 산출하였다. 이와 같은 결과는 본시험에서 처리한 500 ng/L와 유사한 결과였으며 추후에 환경에 대한 내분비계추정물질에 대한 모니터링 및 환경위해성평가 시 지표농도로 이용할 수 있을 것으로 판단된다.

### Alachlor 및 17 $\beta$ -estradiol 노출 송사리 수컷의 vitellogenin 측정

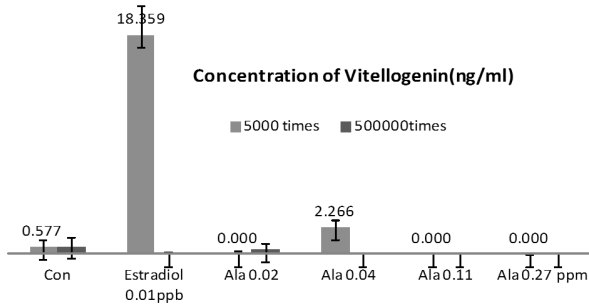
송사리를 이용한 단기변식독성시험에 이용된 수컷을 이용한 alachlor 및 17  $\beta$ -estradiol에 대한 에스트로겐성을 평가하기 위하여 vitellogenin 활성시험을 수행한 결과 Fig 2 및 Fig 3에서 보는 바와 같이 vitellogenin 정량을 위한 표준곡선은 R<sup>2</sup> = 0.99로 양호하였으며, 양성대조물질로 사용된 17



**Fig. 2.** Calibration curve of vitellogenin(VTG) standard using 450 nm microplate reader

## 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업(과제번호 : PJ005302201008)의 지원에 의하여 이루어진 것임.



**Fig. 3.** Whole body vitellogenin(VTD) concentrations in Japanese male medaka after treatment with alachlor and 17  $\beta$ -estradiol for 21days. Values are expressed as mean $\pm$ SD VTG concentration

$\beta$ -estradiol은 5000배 희석에서 18.4 ng/mL로 분명한 에스트로겐 양성이었으나 alachlor 처리군은 음성대조군과 비슷한 결과로 활성이 관찰되지 않았다.

이와 같은 결과는 Lange et al. (2011)이 수행한 실험실 및 야외서식 어류에 대한 17  $\beta$ -estradiol 등 천연 및 합성 에스트로겐에 대한 감수성시험에서 7일간 2 및 10 ng/L 노출하였을 때의 활성과 Tsutomu와 Meiko(2000)가 송사리에 17  $\beta$ -estradiol 3 nmol/L를 노출시켜 영향을 조사한 결과와 유사하였다.

이상의 결과에서 alachlor를 이용한 송사리 단기번식독성 시험결과 산란율, 유정란율, 무정란율, 부화율에는 영향이 관찰되었으나, 치사율과 기형 율에는 거의 영향이 관찰되지 않았고 양성대조 물질로 사용된 17  $\beta$ -estradiol에서는 0.5 ppb 수준에서 산란율, 유정란 및 무정란에 영향이 관찰되었으나 부화율, 치사율 및 기형율에서는 영향이 관찰되지 않았다. Alachlor의 에스트로겐성을 검증하기 위해 수행된 vitellogenin 측정결과 양성대조물질에서는 저 농도에서도 상당한 활성이 관찰된 반면 alachlor는 거의 활성이 관찰되지 않았다.

이와 같은 결과는 WWF, 미국, 일본, 우리나라 등에서 alachlor를 내분비계 장애추정물질로 지정하고 있지만 수서생물을 이용한 내분비계장애성 1단계 스크리닝 방법인 단기 번식독성시험에서는 유의성 있는 에스트로겐성 내분비계 영향이 관찰되지 않아 미국 EPA가 내분비계장애물질 검색프로그램(EDSP)에서 제안한 *in vitro* 및 *in vivo* 시험 등을 수행해야 더욱 정밀한 결론을 내릴 수 있을 것으로 판단된다. 미국 EPA에서는 alachlor의 발암성 등의 원인으로 잔류허용 기준치 zero를 적용하여 EDSP 우선검색물질 리스트에서 삭제하였으나 국내에서는 차후 여러 종류의 독성증상, 노출량, 환경생물 영향 등을 고려하여 관리하여야 할 것으로 판단된다.

## >> Literature Cited

- Aschberger, K., P. Castello, E. Hoekstra, S. Karakitsios, S. Munn, S. Pakalin and D. Sarigianis (2010) Bisphenol A and baby bottles: challengers and perspectives. JRC scientific and technical reports.
- Tomlin, C. D, S. (2009) Alachlor, pp. 23~24, in The Pesticide Manual., UK.
- Boenke, A., C. Searle and T. Karjalainen (2002) Contribution of European research to endocrine disruptors. *analytica Chimica Acta* 473:161~165.
- Lee, C., J. Ryu, S. Y. Park, K. Choi, S. H. Jeon, J. G. Na and D. G. Rhee (2004) Effect of alachlor on the early development and induction of estrogen-responsive genes. *Organohalogen compounds* 66:2951~2957.
- Kang I. K., Y. Hirofumi, O. Yuji, T. Yukinari, Y. Tomomi, M. Masanobu, I. Nobuyoshi, T. Hiroshi, and H. Tsunoo (2002) Effect of 17  $\beta$ -estradiol on the reproduction of Japanese medaka(*Oryzias latipes*). *Chemosphere* 47:71~80.
- Lange A., Y. Katsu, S. Miyagawa, Y. Ogino, H. Urushitani, T. Kobayashi, T. Hirai, J. A. Shears, M. Nagae, J. Yamamoto, Y. Ohnishi, T. Oka, N. Tatarazako, Y. Ohta, C. R. Tyler, and T. Iguchi (2011) Comparative responsiveness to natural and synthetic estrogens of fish species commonly used in the laboratory and field monitoring. *Aquat Toxicol.* 2011 Sep 28.
- Patyna, P. J., R. A. Davi, T. F. Parketon, R. P. Brown and K. R. Cooper (1999) A proposed multigenerational protocol for Japanese Medaka(*Oryzias latipes*) to evaluate effect of endocrine disruptors. *Sci. Total Environ.* 233, 211~220.
- 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(1-3):11~24.
- Shosaku K., I. Hidenori, M. Nobukazu, O. Yuta, and M. Yasumoto (2002) Fish test for endocrine-disruption and estimation of water quality of Japanese rivers. *Water research* 36:2161~2166.
- Tsutomu S. and W. Meiko (2000) Effect of certain chemicals on the reproduction of medaka(*Oryzias latipes*). *Chemosphere* 40:239~243.
- US/EPA (1997) EPA special report on endocrine disruption.

- US/EPA (1998) Final report of endocrine disruptor screening and testing advisory committee.
- US/EPA (2009) Endocrine disruptor screening program test guidelines.
- 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(2):174~181.
- National Institute of Environmental Research (1999) Comprehension and Reaction of Endocrine Disrupting Chemicals.
- Lee, J. B., J. S. Shin, H. D. Lee, M. Jeong, A. You and K. Y. Kang (2005) Risk Assessment for Estrogenic Effect of the Suspected Endocrine Disrupting Pesticides, *The Korea Journal of Pesticide Science* Vol. 8(2):95~102.
- 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):1~7.
- Korea Crop Protection Association (2011) Agrochemicals Use Guide Book.

---

## 단기변식독성시험법을 이용한 제초제 Alachlor의 송사리 내분비계 영향 조사

이제봉\* · 박연기 · 최영웅 · 김병석 · 권혜영 · 진용덕 · 임건재 · 강규영<sup>1</sup>

농촌진흥청 농업과학기술원, <sup>1</sup>경상대학교 환경생명화학과

**요 약** 내분비계 장애 추정물질로 알려진 alachlor의 어류 생체내 호르몬에 미치는 영향을 검색하고자 송사리를 이용한 급성독성, 수중 분해성 및 단기변식독성시험을 수행하였다. 시험결과 96시간 LC<sub>50</sub>은 2.37(1.994~2.805) mg/L 이었으며, 수중 분해성이 15일에 초기 처리농도에 비해 20% 정도 분해되었으므로 단기변식독성시험의 시험용수 교체는 매 7일로 하였다. 송사리를 이용한 21일 단기변식시험의 노출농도는 용매대조군, alachlor(0.02, 0.04, 0.11, 0.27, 0.68ppm)처리군, 양성 대조군(17β estradiol, 0.01, 0.1, 0.5ppb)을 두어 수행한 결과 산란 수는 대조군에 비해 최고투여 농도에서 47.9% 감소하였고, 유정란 율은 47.8% 감소하였다. 기형율도 부분적으로 농도 의존성 경향이 관찰되었다. 또한 내분비계 장애성 중 에스트로겐 영향을 검색할 목적으로 어체내 vitellogenin 농도 변화를 조사한 결과 유의성이 나타나지 않았으므로 alachlor는 vitellogenin성 에스트로겐은 아닌 것으로 판단되었다.

**색인어** Alachlor, 단기변식독성, Vitellogenin

---