

농약류(Benomyl, Carbofuran, Thiobencarb)가 두꺼비(*Bufo Gargarizans*) 배아발달에 미치는 영향¹

고선근^{2*}

Effects of Pesticides(Benomyl, Carbofuran, Thiobencarb) on the Asian Toad(*Bufo Gargarizans*) Embryo Development¹

Sun-Kun Ko^{2*}

요약

농약류 3종의 독성평가를 위해 FETAX(Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus) 기법에 따라 국내에 서식 중인 두꺼비(*Bufo gargarizans*)의 배아를 배양하면서 Benomyl(살균제), Carbofuran(살충제), Thiobencarb(제초제)의 영향을 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 1.03, 8.74, 4.98mg/ℓ을 나타내어 Benomyl이 기형 유발에 가장 민감하게 반응하였으며, embryo lethal concentrations(LC₅₀)은 7.26, 560.72, 16.87mg/ℓ을 나타내어 Benomyl이 가장 낮은 농도에서 배아가 치사되는 것으로 나타났다. Teratogenic index (TI=LC₅₀/EC₅₀)는 Benomyl 7.05, Carbofuran 64.16, Thiobencarb 3.39를 나타내어 TI값이 모두 기형유발물질로 판단되는 기준인 1.5이상으로 시험에 사용된 농약류 3종은 최기형성 물질로 판단된다. Carbofuran이 가장 강력한 최기형성물질로 작용함을 알 수 있었으며, 농약류가 두꺼비 및 양서류의 배아 발달에 미치는 영향과 그 작용기작을 규명하기 위해서는 보다 구체적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

주요어: Benomyl, Carbofuran, Thiobencarb, FETAX, 기형유발, 농약류, 생물독성, 두꺼비, 배아발생

ABSTRACT

In this experiment, investigated toxicity evaluation of chemicals using Asian toad embryos, along FETAX(Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus) protocol. Asian toad, *Bufo gargarizans* embryo incubated and investigation of Benomyl(Germicide), Carbofuran(Insecticide) and Thiobencarb(Herbicide) effect by probit analysis. As a result, depends on the concentrations of Benomyl, Carbofuran and Thiobencarb, along mortality and malformation rates were increases and larval body length were decreased. The teratogenic concentration(EC₅₀) of Benomyl, Carbofuran and Thiobencarb were 1.03, 8.74, 4.98mg/ℓ, respectively. And when exposed to Benomyl, larvae responded most sensitively to malformations. Embryo lethal concentration (LC₅₀) Benomyl, Carbofuran and Thiobencarb were 7.26, 560.72, 16.87mg/ℓ, respectively. And Benomyl were

1 접수 2020년 3월 24일, 수정 (1차: 2020년 5월 21일, 2차: 2020년 5월 27일), 게재확정 2020년 6월 16일
Received 24 March 2020; Revised (1st: 21 May 2020, 2nd: 27 May 2020); Accepted 16 June 2020

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

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

at the lowest concentration of lethal the embryos. The teratogenic index(TI) were 7.05 in Benomyl, 64.16 in Carbofuran and 3.39 in Thiobencarb, thus TI values were above 1.5, which is the criterion of teratogenicity. Three of the pesticides used in this study were considered to be a teratogenic substances and Carbofuran was the most potent teratogen. And more specific researches are needed to investigate the effects of pesticides on the embryo development of toads and amphibians and their mechanism.

KEY WORDS: BENOMYL, CARBOFURAN, THIOBENCARB, FETAX, TERATOGEN, PESTICIDES, BIOLOGICAL TOXICITY, EMBRYO DEVELOPMENT

서론

국내에 서식하고 있는 양서류 중 두꺼비(*Bufo gargarizans*)의 경우 농경지나 계류를 주요 서식지로 하며 번식이 이루어졌던 장소에서 매년 번식 및 산란을 하는 습성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 이러한 양서류의 산란 장소에 농약 등 환경오염물질이 노출될 경우 배아의 발달과정에 성장이 저해되고, 사지형성 및 기형성 등의 영향이 나타나기 쉽다고 보고된바 있다(Wassersug, 1975; Henle, 1981; Nebeker *et al.*, 1994a,b; Choi *et al.*, 2002).

농약은 독성을 기준으로 저독성, 보통독성, 고독성, 맹독성으로 구분되며, 살균제인 Benomyl(CAS No. 17804-35-2)은 저독성(IV)으로 분류된다. Benomyl은 분자량 290.62의 백색 결정물질로 자연계에서 쉽게 가수분해되어 carbendazim으로 변화하며, 작물에 피해를 발생시키는 진균류에 영향을 미치는 유효성분으로 알려져 있다. 살충제인 Carbofuran은 분자량 221.3의 물질로 보통독성으로 구분되어 있으며, 콜린에스터라제(cholinesterase)의 억제를 통해 곤충의 생식에 영향을 미쳐 독성을 일으키는 것으로 알려져 있다(Kuhr and Dorough, 1976; Ferslew *et al.*, 1992). 제초제인 Thiobencarb의 분자량은 257.8이며, 저독성으로 분류되고 있으며 국내의 경우 2년 만성독성/발암성 시험에서 NOAEL 0.9 mg/kg bw/day, ADI를 0.009 mg/kg bw/day로 설정하였다(MFDS, 2018).

화학물질의 독성평가에 대해 *Xenopus laevis*의 배아를 활용하는 시험법인 Frog Embryo Teratogenesis Assay-*Xenopus* (FETAX) 방법이 다양한 종에 적용되어 활용되어지고 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 반수영향농도(EC₅₀)로 나타내며 두 값의 비율인 LC₅₀/EC₅₀을 기형유발 지수(teratogenic index, TI)로 표시하며 시험 대상 물질에 의한 TI 지수의 범위가 1.5 이상의 경우에 시험대상 물질은 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 두꺼비의 배아를 활용한 화학물질의 독성평가 연구가 진행되었으며, 두꺼비의 배아발달에 대해 Benomyl(Ko, 2013)과 Thiobencarb(Ko, 2016)가 미치는 영향을 조사한 바 있다.

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

연구방법

1. 실험동물의 수정란 및 배아채취

실험에 사용한 두꺼비(*Bufo gargarizans*)는 2019년 2월 하순에서 3월 초까지 광주광역시 일대 서식지를 중심으로 포집 중인 개체들을 직접관찰 및 채집하여 실험실에서 자연배란을 유도하였으며 수정된 배아들 중 세포질이 균일하게 나누어진 배아들을 선택하여 포셉으로 젤리층을 제거한 후 낭배기까지 배양하여 시험에 사용하였다.

2. 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).

3. 시험물질처리

Benomyl(농촌진흥청 제공), Carbofuran(Sigma-aldrich), Thiobencarb(농촌진흥청 제공)는 각각 AR용액에 희석하여 사

용하였다. Benomyl과 Thiobencarb는 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100mg/l, Carbofuran은 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500, 750, 1000mg/l의 농도 구간을 설정하였다. 배양액에 시험물질이 전혀 포함되지 않은 대조군과 농도별로 시험물질을 포함한 실험군을 대상으로 대상종의 번식기 실외온도인 20℃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 반복 하였다.

4. 결과분석

1) 정상발생과정 조사

유리로 된 배양접시에 정상적으로 발생이 진행되어 세포질이 균일하게 나누어진 배아의 젤라층을 포셉으로 제거한 후 매 24시간마다 시험물질이 첨가되지 않은 배양액으로 교환하면서 배양했다. 배아의 발달과정은 Gosner(1960)의 방법에 따라 판별했다.

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 설정하고 Probit 분석법을 활용하여 반수치사농도(half maximal lethal concentration; LC₅₀)를 구하였다(Goh and Neff, 2003).

3) 기형을

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 설정하고 Probit 분석법을 활용하여 반수영향농도(half maximal effective concentration; EC₅₀)를 구하였다(Goh and Neff, 2003).

사망률과 기형을 분석은 회귀분석 중 Probit 분석법을 활용하였다. 이를 통해 반수치사농도 및 반수영향농도를 구하였으며, 수식은 다음과 같다.

$$Y' = \Phi^{-1}(p)$$

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 시험종료까지 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.

Independent t-test의 수식은 다음과 같으며, p<0.01에서 유의한 차이가 있는 것으로 판단하였다.

t-value

$$t = \frac{mA - mB}{\sqrt{\frac{S^2}{nA} + \frac{S^2}{nB}}}$$

공분산(S²)

$$S^2 = \frac{\sum(x - mA)^2 + \sum(x - mB)^2}{nA + nB - 2}$$

자유도(df)

$$df = nA + nB - 2$$

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 두꺼비의 배아 발달과정에 최기형성을 나타내는 것으로 판정하였다(ASTM, 1993).

결 과

1. 정상발생과정

자연배란된 두꺼비 난자의 직경은 2.1 ± 0.1 mm 정도였으며 수정 후 2세포 출현은 대략 3시간 가량이 소요됐으며 32세포까지지는 약 12시간이 소요되었다. 이후 상실배까지는 18시간, 포배기(blastula)까지는 25시간 정도 소요되었으며, 시험에 사용했던 낭배기의 배이는 수정 후 대략 41시간 후에 나타나기 시작했다. 이들 배이는 낭배시기부터 점차적으로 성장하기 시작해 이후 신경관(neural plate), 신경습(neural fold), 신경관(neural tube) 등을 형성하는 기관형성(organogenesis)단계에서는 그 크기가 다소 증가하여 2.5 ± 0.1 mm 정도의 크기를 나타냈으며 수정이후 신경습이 완성되는 시기까지 약 58시간 정도를 필요로 했다. 올챙이의 기본 형태를 갖추고 꼬리가 발달되기 시작하는 미아(Tail bud)시기에는 배아의 크기가 급격하게 증가하여 전장 3.8 ± 0.2 mm 정도의 크기를 나타냈으며 수정 후 대략 75시간 정도가 소요됐다. 현미경 시야에서 올챙이의 운동성을 관찰해 볼 수 있는 근육반응 시기에는 전장 4.8 ± 0.1 mm 정도였으며 수정 후 대략 92시간 후에 나타나기 시작했다. 이후 미아가 신장하여 심장박동시기를 거쳐 올챙이의 갈아가미가 나타난 시기에는 그 전장의 길이가 7.6 ± 0.3 mm 정도였으며 약 106시간 정도가 소요됐다. 꼬리지느러미 순환시기에는 그 전장이 8.3 ± 0.4 mm 정도이고 대략 128시간이 소요됐으며 아가미 뚜껑주름시기의 전장은 10.8 ± 0.6 mm 정도이며 대략 139시간 정도가 필요했다. 아가미 완성 시기까지는 161시간이 소요됐으며 전장은 11.8 ± 0.3 mm를 나타냈다(Figure 1).

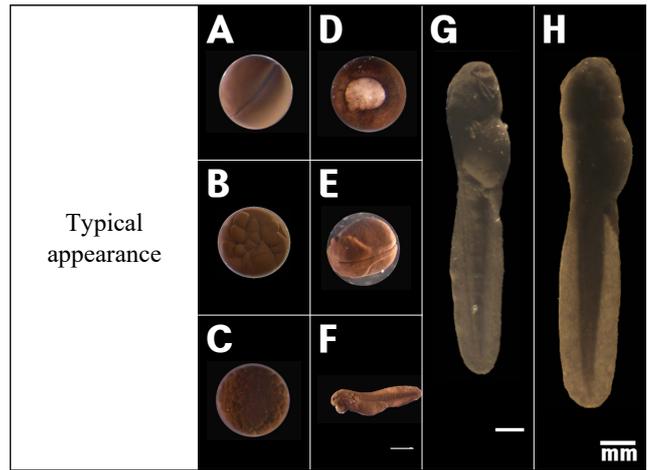
2. 농약의 농도에 따른 치사율

120시간 배양 후 Benomyl은 5 mg/l 의 농도에서 16.7%의 배아가 치사되기 시작하였으며 10 mg/l 의 농도에서는 86.7%, 10 mg/l 이상에서는 모든 배아가 치사되어 나타났다. Carbofuran의 경우 100 mg/l 의 농도에서 3.3%의 치사된 개체가 나타나기 시작하여 250 mg/l 에서는 33.3%, 500 mg/l 의 농도에서는 80.0%의 치사율을 나타냈다. Thiobencarb는 5 mg/l 에서 배아가 치사되

기 시작했으며, 10 mg/l 에서 6.7%, 25 mg/l 의 농도에서는 93.3%, 50 mg/l 이상에서는 모든 배아가 치사되어 나타났다(Figure 2). 이를 통해 얻어진 결과를 probit 분석법으로 회귀분석을 시행한 결과 Benomyl의 LC_{50} 는 7.26 mg/l , Carbofuran의 경우 560.74 mg/l , Thiobencarb 16.70 mg/l 를 나타냈다(Table 1, Figure 2).

3. 농약의 농도에 따른 기형을

기형율은 Benomyl의 경우 0.5 mg/l 의 농도부터 10.0%의 배아에서 기형이 관찰되기 시작하여 5 mg/l 이상에서는 모든 배아가 기형을 나타냈다. Carbofuran은 0.1 mg/l 의 농도의 구간에서



stage	time (hr)	length (mm)	stage	time (hr)	length (mm)
A	3	2.1 ± 0.1	E	65	2.6 ± 0.1
B	12	2.1 ± 0.1	F	106	6.1 ± 0.3
C	18	2.1 ± 0.1	G	139	8.8 ± 0.4
D	41	2.1 ± 0.2	H	161	11.8 ± 0.5

Figure 1. Embryonic development of the toad, *B. gargarizans*. A; 2-cell, B; 32-cell, C; morula, D; gastrula, E; neural tube, F; gill circulation, G; opercular fold, H; operculum closed. n=30

Table 1. LC_{50} , EC_{50} and TI value of *B. gargarizans* embryos exposed to Pesticides

Pesticides	$LC_{50}(\text{mg/l})$			$EC_{50}(\text{mg/l})$			TI
	Exposure conc.	95% confidence limit		Exposure conc.	95% confidence limit		
		lower	upper		lower	upper	
Benomyl	7.26	6.37	8.33	1.03	0.88	1.27	7.05
Carbofuran	560.72	430.68	755.16	8.74	5.54	12.29	64.16
Thiobencarb	16.87	14.64	19.64	4.98	3.26	8.70	3.39

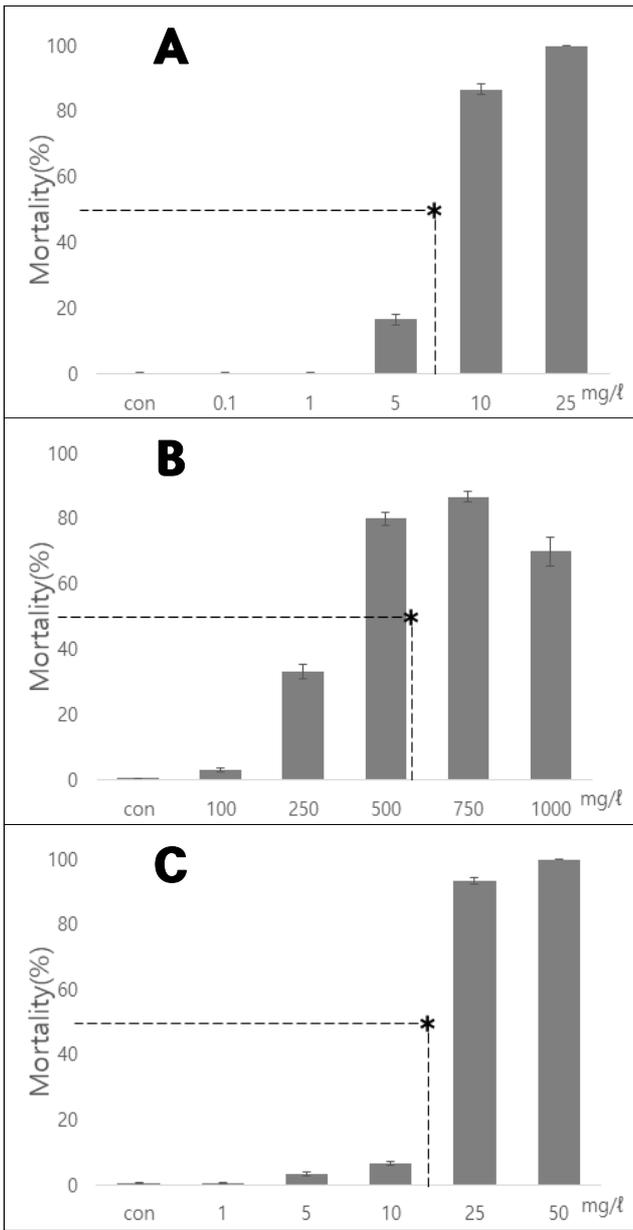


Figure 2. Frequencies of mortality ratio according to Pesticides treated concentration. Bar height represents mortality ratio and error bars indicate standard deviation. Asteriks and dotted line represents half lethal concentration(LC₅₀) by probit analysis. (A) Benomyl, (B) Carbofuran, (C) Thiobencarb. n=30

10.0%의 비율로 기형의 배아가 관찰되기 시작하여 1mg/l의 농도에서는 80.0%의 배아에서 기형이 관찰됐으며, 25mg/l에 노출된 배아에서는 96.7%, 100mg/l 이상의 농도에서는 모든 배아에서 기형이 관찰됐다. Thiobencarb는 1mg/l에서 36.7%의 비율로 기형이 출현하였으며, 25mg/l의 농도에 노출된 배아는

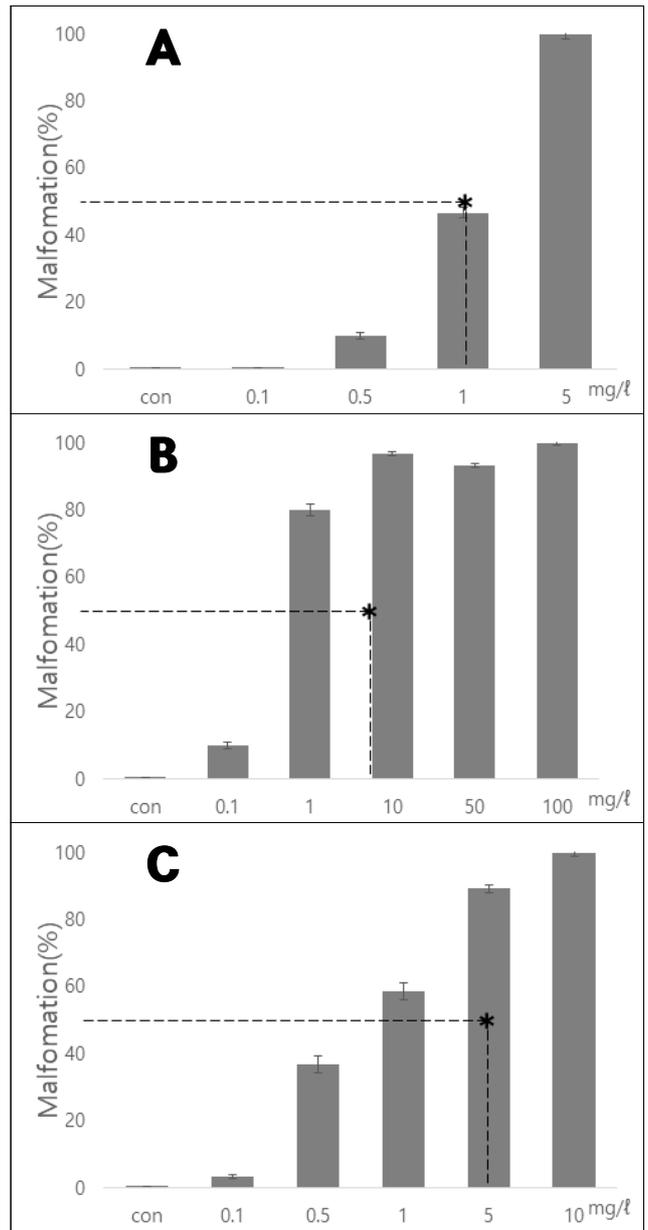


Figure 3. Frequencies of malformation ratio according to Pesticides treated concentration. Bar height represents malformation ratio and error bars indicate standard deviation. Asteriks and dotted line represents half effective concentration(EC₅₀) by probit analysis. (A) Benomyl, (B) Carbofuran, (C) Thiobencarb. n=30

100.0% 기형을 나타냈다(Figure 3). 이를 통해 얻어진 결과를 probit 분석법으로 회귀분석을 시행한 결과 Benomyl의 EC₅₀는 1.03mg/l, Carbofuran의 경우 8.56mg/l, Thiobencarb 4.98mg/l를 나타냈다(Table 1).

4. 농약의 농도에 따른 기형양상

Benomyl에 노출된 배아들은 0.5mg/l에서 복부기형(66.7%), 복합기형(33.3%)이 나타났으며, 1.0mg/l에서는 복부기형(78.6%), 척추기형(7.1%), 복합기형(14.3%)이 확인되었으며 10mg/l 이상의 농도에서는 100% 복합기형만이 관찰됐다. Carbofuran의 경우 1.0mg/l에서 복부기형(12.5%), 척추기형(25.0%), 복합기형(62.5%)이 나타났으며 50mg/l의 농도에서는 복부기형(46.4%), 척추기형(21.4%), 복합기형(32.1%)가 관찰되었고 100mg/l 이상의 농도에서는 생존한 모든 배아에서 복합기형이 확인됐다. Thiobencarb는 1mg/l 농도에서 복부기형(81.8%), 복합기형(18.2%)이 나타났고 10mg/l의 농도에서는 복부기형(68.0%),

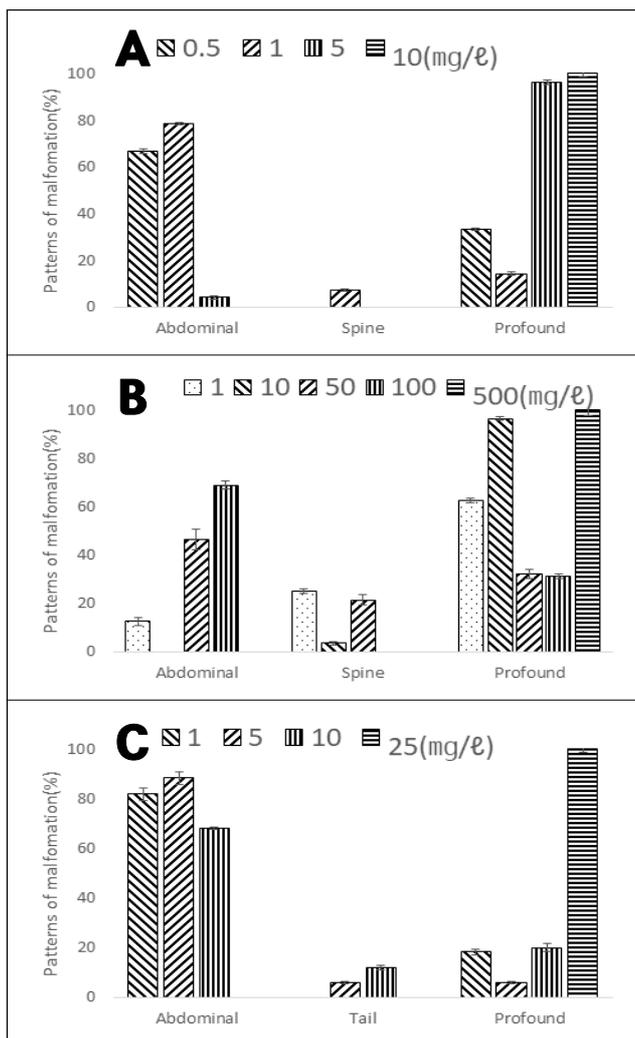


Figure 4. Frequency of malformation patterns according to Pesticides treated concentration. (A) Benomyl, (B) Carbofuran, (C) Thiobencarb. Bar height represents malformation ratio and error bars indicate standard deviation. n=30

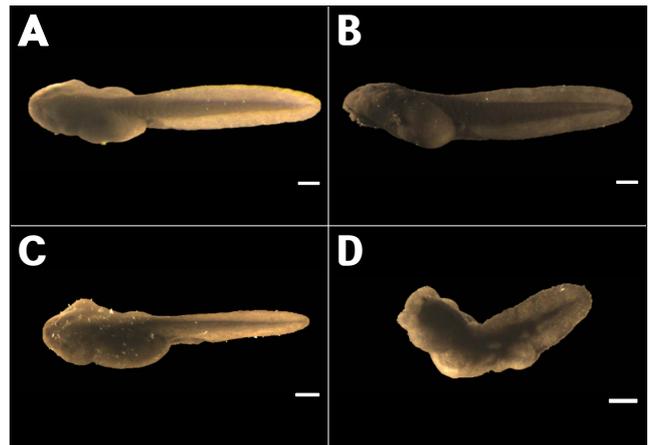


Figure 5. Tadpoles of *B. gargarizans* exposure to Pesticides at the gastrula stage. Scale bars indicate 1mm.

- (A) Tadpole of control approximately 161h after fertilization.
 (B) Tadpole after 120h exposure to 1mg/l Benomyl displaying abdominal abnormality.
 (C) Tadpole after 120h exposure to 50mg/l Carbofuran displaying tail abnormality.
 (D) Tadpole after 120h exposure to 25mg/l Thiobencarb displaying propound abnormality.

꼬리기형(12.0%), 복합기형(20.0%)가 확인됐으며, 25mg/l의 농도에서는 모든 배아가 복합기형을 나타냈다(Figure 4, 5).

5. 농약의 농도에 따른 성장률

성장에 대한 영향을 조사하기 위해 대조군 30개체와 시험 후 생존한 실험군 전체를 대상으로 측정을 실시했다. 대조군의 체장은 11.8 ± 0.3 mm로 나타났으며, Benomyl의 경우 1, 5, 10mg/l로 농도가 증가함에 따라 11.6 ± 0.3 , 8.4 ± 0.7 , 5.3 ± 0.9 mm로 농도가 증가함에 따라 체장이 감소하였으며 5mg/l 이상의 농도에서 유의미한 차이를 나타냈다. Carbofuran의 경우 10, 100, 250 mg/l의 농도에서 각각 11.4 ± 0.4 , 11.6 ± 0.4 , 9.9 ± 0.8 mm로 점차 감소하는 양상을 나타냈으며, 250mg/l 이상의 농도에서 대조군과 의미있는 차이를 나타냈다. Thiobencarb는 1, 10, 25mg/l의 농도에서 각각 11.8 ± 0.5 , 11.8 ± 0.3 , 10.2 ± 0.7 mm로 체장의 감소를 확인할 수 있었으며, 25mg/l의 농도에서 의미있는 차이를 나타냈다(Figure 6).

6. 농약에 의한 기형성 지수

두꺼비 배아에 노출된 Benomyl, Carbofuran, Thiobencarb에 의한 LC_{50} 은 각각 7.26, 560.72, 16.87mg/l로 나타났다. EC_{50} 은 각각 1.03, 8.74, 4.98mg/l로 나타났으며, 기형성 지수를 나타내는 TI는 각각 7.05, 64.16, 3.39를 나타내었다(Table 1).

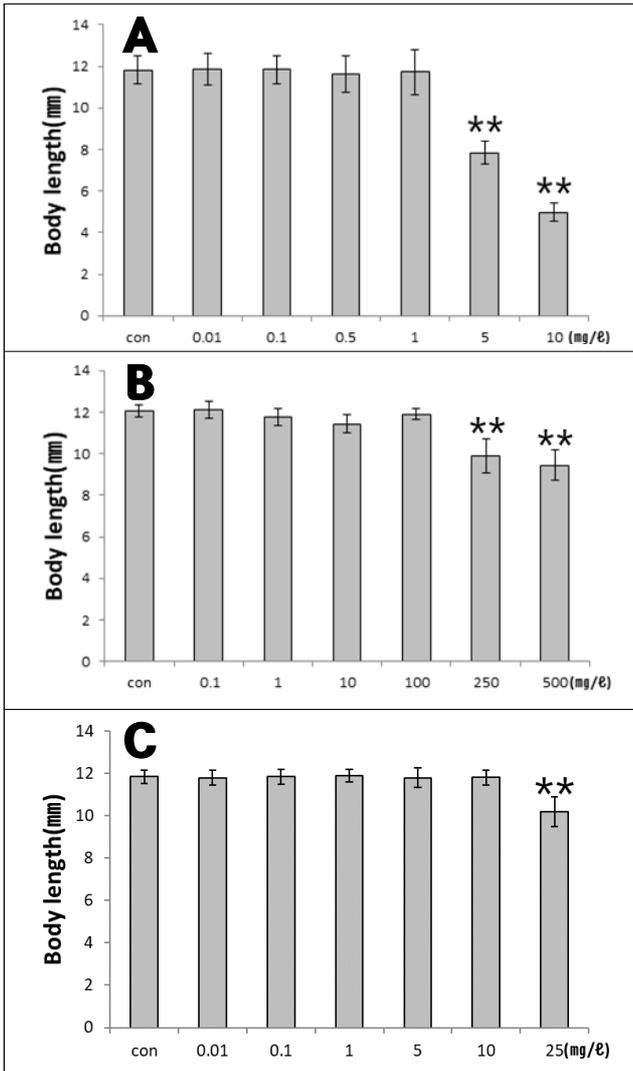


Figure 6. Measured tadpole body length of exposed for each Pesticides, A. Benomyl, B. Carbofuran, C. Thiobencarb. *B. gargarizans* embryos were cultured for 120hours in petri dish contained 10ml. Bar height represents body length and error bars indicate standard deviation. Asterisks indicate significant difference(**p<0.01, independent sample t-test). n=30

고찰

두꺼비의 경우 알을 수초에 감아 수면 위에 띄워놓으며, 산란이 이루어졌던 지역을 지속적으로 이용하는 특성을 가지고 있고 직경 2.1mm가량의 알을 염주알의 형태로 한 번에 약 12,000~14,000 개 가량 산란하는 것으로 알려져 있다(Ko, 2016).

개체의 치사는 Benomyl 1mg/l에서 확인되기 시작하여 농

도가 높아지면서 치사 개체의 비율도 증가하는 것으로 나타났다. 또한, Carbofuran과 Thiobencarb 역시 각각 100mg/l, 0.5 mg/l의 농도에서 치사된 배아가 확인되기 시작하여 농도에 비례하여 치사율도 증가하였으며, Benomyl과 Thiobencarb의 경우 각각 10mg/l, 25mg/l의 농도에서 전치사 되는 것으로 확인되었다. 기형개체의 경우 Benomyl 0.5mg/l, Carbofuran 0.1 mg/l, Thiobencarb 1mg/l의 농도부터 확인되기 시작하여 실험에 사용된 농약 모두 농도 증가에 따라 기형율이 증가하는 양상을 나타냈다. Benomyl에 도롱뇽(*Hynobius leechii*) 배아를 노출시킨 결과 반수치사농도(LC₅₀)는 600~800nM에서 일어나는 것으로 확인되었으며, 1μ M의 농도에서는 모든 개체가 치사되어 본 실험에서 확인된 두꺼비의 전치사농도가 10mg/l로 나타나 두꺼비의 배아보다 낮은 농도에서 영향을 받는 것을 알 수 있었다(Choi et al. 2003). 이외에도 *X. laevis*에 Carbofuran을 노출시킨 결과 LC₅₀ 43.4mg/l, EC₅₀ 0.1mg/l로 두꺼비의 배아보다 민감하게 반응하는 것으로 확인되었으며, TI 역시 43.4로 두꺼비의 결과인 64.16보다 높은 것으로 확인되었다(Lee, 2003). Thiobencarb의 경우 *X. laevis*를 대상으로 보고된 결과에 따르면 LC₅₀ 1.3~6.5mg/l(Saka, 1999), *Silurana tropicalis*의 경우 LC₅₀ 0.752~1.77mg/l로 보고되어 두꺼비의 실험결과인 16.87mg/l에 비해 더 민감하게 반응하는 것을 알 수 있었다(Saka, 2010). 또한, 청개구리를 대상으로 시험한 결과와 비교했을 때 Benomyl 7.04, Carbofuran 49.50, Thiobencarb 3.39의 TI값을 나타내어 Carbofuran을 제외한 Benomyl과 Thiobencarb은 두 종이 유사한 농도에서 영향을 받는 것을 확인 할 수 있었으며, LC₅₀ Benomyl 7.04, Carbofuran 24.87, Thiobencarb 16.12, EC₅₀ benomyl 1.00, Carbofuran 0.58, Thiobencarb 4.75로 LC₅₀ 과 EC₅₀ 역시 두꺼비에 노출된 Carbofuran이 더 높은 농도에서 영향을 나타냈고 Benomyl과 Thiobencarb는 유사한 농도에서 영향을 미치는 것으로 확인되었다(Yoon and Ko, 2019).

또한, 실험에 사용된 농약 3종은 모두 TI 1.5이상을 나타내어 두꺼비의 배아발달에 최기형성물질로 작용하는 것을 확인 할 수 있었으며 특히, 본 실험에서는 Carbofuran과 Thiobencarb가 0.1mg/l의 농도부터 기형이 확인되어 Benomyl보다 낮은 농도에서 두꺼비 배아에 영향을 미치는 것으로 나타났으며 TI 값이 64.15로 확인되어 Benomyl 7.05, Thiobencarb 3.39에 비해 강력한 최기형성물질로 작용함을 알 수 있었다.

기형양상의 경우 Benomyl에 노출되었을 때 *X. laevis*와 도롱뇽(*H. leechii*)에서 공통적으로 머리기형, 복부기형, 꼬리기형이 확인되었으며, 도롱뇽에서 수포형성기형, *X. laevis*에서는 척추기형이 각각 추가로 확인됐다(Jin, 2005). 또한, Carbofuran에 노출된 *X. laevis* 배아에서 수포형성기형, 척추기형, 복부기형, 머리기형 등의 기형이 확인되어(Lee, 2003) 본 실험에 노출된 두꺼비의 기형과 유사한 양상을 나타내는 것으로 확인되었다.

체장의 경우 시험물질로 사용된 농약의 농도구배에 따라 체장

이 감소하는 것이 확인되었으며, Benomyl에 노출된 *X. laevis*가 10 μ M이상의 농도부터 대조군과 차이를 나타내는 성장저해가 일어난 것으로 확인되었다(Jin, 2005). 이상의 결과들은 농도에 따라 치사율과 기형율의 증가 및 성장이 저해되는 본 실험에서 확인된 결과와 유사한 경향을 나타내는 것으로 확인되어지나 대부분의 결과가 두꺼비의 배아에 비해 낮은 농도에서 개체의 치사 및 기형유발, 성장저해 등의 영향을 받는 것을 알 수 있었다.

본 실험을 통해 Carbamate계 농약인 Benomyl과 Carbofuran, Thiobencarb 모두 두꺼비 배아발달에 있어 최기형성물질로 작용하는 것으로 나타났다. 또한, 치사율 및 성장저해에 가장 민감하게 반응하는 농약은 Benomyl로 확인되었으며, 기형유발 및 최기형성에 관해서는 Carbofuran이 가장 민감한 것으로 확인되었다. 이러한 결과로 미루어보아 두꺼비의 번식기 및 활동기에 사용되는 농약류의 특성 상 두꺼비의 서식에 영향을 미칠 수 있을 것으로 판단되며, 사용시기가 비슷한 농약의 특성 상 다양한 농약이 혼합되어 유입될 경우 이들의 공동상승효과(synergic effect)가 나타날 가능성이 클 것으로 판단되어지나 이에 대한 결과는 아직 없다. 또한, Carbamate계 농약류가 두꺼비 및 양서류의 배아 발달에 미치는 영향과 그 작용기작을 규명하기 위해서는 보다 구체적인 연구가 필요할 것으로 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*. *K. J. Limnol.* 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. Dissertation, Graduate School, Changwon Univ. 86pp.
- Ko S.K.(2012) Toxicity evaluation of chemicals using Tree Frog Embryos, *Hala 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. Master Dissertation, 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.
- Schuytama, 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. 15(2): 405-417.
- Yoon, P.S. and S.K. Ko(2019). Studies on toxicological evaluation of pesticides(Fungicide, Insecticide, Herbicide) using Tree Frog Embryos, *Hyla japonica*. Kor. J. Env. Eco. 33(2): 178-186.