

碩士學位論文

*Chlamydomonas reinhardtii*를 이용한
농약의 독성평가



濟州大學校 大學院

環境工學科

愼祐奭

2004年 12月

*Chlamydomonas reinhardtii*를 이용한 농약의 독성평가

指導教授 李 容 斗

愼 祐 奭

이 論文을 工學 碩士學位 論文으로 提出함

2004年 12月

愼祐奭의 工學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 오 윤 근 印

委 員 조 은 일 印

委 員 이 용 두 印

濟州大學校 大學院

2004年 12月

Toxicity Assessment of Biocide Using
Chlamydomonas reinhardtii

Woo-Seok Shin
(supervised by professor Yong-Doo Lee)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for the
degree of Master of Engineering

2004. 12

This thesis has been examined and approved

Thesis director, Youn-Keun Oh, Prof. of Environmental Engineering

Thesis director, Eun-Il Cho, Prof. of Environmental Engineering

Thesis director, Yong-Doo Lee, Prof. of Environmental Engineering

December, 2004

Department of Environmental Engineering

GRADUATE SCHOOL

CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

Summary	v
I. 서 론	1
II. 이론적 배경	3
1. <i>C. reinhardtii</i> 의 특성 및 Biomarkers(생물학적 지시자)	3
2. 독성평가	6
3. 계면 활성제	9
4. 국내·외 관련 연구진행 상황	12
III. 재료 및 방법	13
1. 실험재료	13
2. 실험방법	17
3. <i>C. reinhardtii</i> 의 성장량	18
4. <i>C. reinhardtii</i> 의 평균비성장속도(μ)	20
5. EC ₅₀ 계산	20
IV. 결과 및 고찰	21
1. 농약의 종류에 따른 <i>C. reinhardtii</i> 의 성장곡선	21
2. 농약의 종류에 따른 <i>C. reinhardtii</i> 의 평균비성장속도(μ)	29
3. EC ₅₀	33
4. 편모재생저해 시험	39
V. 결론	48
VI. 참고문헌	50
용어 정리	55

List of Figures

Fig. 1. Schematic diagram of a typical cell of <i>C. reinhardtii</i>	3
Fig. 2. The process of surfactant(LAS) biodegradation.	11
Fig. 3. Phase contrast micrograph of <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	13
Fig. 4. Cell growth curve of <i>C. reinhardtii</i>	19
Fig. 5. The relationship between chlorophyll-a concentration and OD660	19
Fig. 6. The cell growth change curve of <i>C. reinhardtii</i> treated with various concentration of herbicide.	22
Fig. 7. The cell growth change curve of <i>C. reinhardtii</i> treated with various concentration of pesticide.	22
Fig. 8. The cell growth change curve of <i>C. reinhardtii</i> treated with various concentration of fungicide.	23
Fig. 9. The cell growth change curve of <i>C. reinhardtii</i> treated with various concentration of herb.+pest.	23
Fig. 10. The cell growth change curve of <i>C. reinhardtii</i> treated with various concentration of herb.+fung.	24
Fig. 11. The cell growth change curve of <i>C. reinhardtii</i> treated with various concentration of fung.+pest.	24
Fig. 12. The cell growth change curve of <i>C. reinhardtii</i> treated with various concentration of herbicide(M).	26
Fig. 13. The cell growth change curve of <i>C. reinhardtii</i> treated with various concentration of pesticide(M).	26
Fig. 14. The cell growth change curve of <i>C. reinhardtii</i> treated with various concentration of fungicide(M).	27
Fig. 15. The cell growth change curve of <i>C. reinhardtii</i> treated with various concentration of herb.(M)+pest.(M).	27
Fig. 16. The cell growth change curve of <i>C. reinhardtii</i> treated with various concentration of herb.(M)+fung.(M).	28
Fig. 17. The cell growth change curve of <i>C. reinhardtii</i> treated with various concentration of pest.(M)+fung.(M).	28
Fig. 18. The Average specific growth rate(μ) of each biocide(product).	30

Fig. 19. The Average specific growth rate(μ) of mixing biocide(product).	30
Fig. 20. The Average specific growth rate(μ) of each biocide(main component). ..	31
Fig. 21. The Average specific growth rate(μ) of mixing biocide(main component).	31
Fig. 22. The gamma(γ) value of each biocide(product).	35
Fig. 23. The gamma(γ) value of mixing biocide(product).	35
Fig. 24. The gamma(γ) value of each biocide(main component).	36
Fig. 25. The gamma(γ) value of mixing biocide(main component).	36
Fig. 26. The phase of flagellum regeneration in <i>chlamydomonas reinhardtii</i> of 50 cells.	39
Fig. 27. The relative flagellum length response of <i>C. reinhardtii</i> to 2.5mg/l concentrations of the biocides(product).	41
Fig. 28. The relative flagellum length response of <i>C. reinhardtii</i> to 12.5mg/l concentrations of the biocides(product).	41
Fig. 29. The relative flagellum length response of <i>C. reinhardtii</i> to 25mg/l concentrations of the biocides(product).	42
Fig. 30. The relative flagellum length response of <i>C. reinhardtii</i> to 2.5mg/l concentrations of the mixing biocides(product).	42
Fig. 31. The relative flagellum length response of <i>C. reinhardtii</i> to 12.5mg/l concentrations of the mixing biocides(product).	43
Fig. 32. The relative flagellum length response of <i>C. reinhardtii</i> to 25mg/l concentrations of the mixing biocides(product).	43
Fig. 33. The relative flagellum length response of <i>C. reinhardtii</i> to 2.5mg/l concentrations of the biocides(main component).	45
Fig. 34. The relative flagellum length response of <i>C. reinhardtii</i> to 12.5mg/l concentrations of the biocides(main component).	45
Fig. 35. The relative flagellum length response of <i>C. reinhardtii</i> to 25mg/l concentrations of the biocides(main component).	46
Fig. 36. The relative flagellum length response of <i>C. reinhardtii</i> to 2.5mg/l concentrations of the mixing biocides(main component).	46
Fig. 37. The relative flagellum length response of <i>C. reinhardtii</i> to 12.5mg/l concentrations of the mixing biocides(main component).	47
Fig. 38. The relative flagellum length response of <i>C. reinhardtii</i> to 25mg/l concentrations of the mixing biocides(main component).	47

List of Tables

Table 1. Classification of Biomarkers (ANAS, 1989)	5
Table 2. Attractive Features of Microbiotests	7
Table 3. short-term bacterial toxicity assays(Bitton, et al., 1992a)	8
Table 4. Basic special character of dithiopyr	14
Table 5. Basic special character of imidacloprid	15
Table 6. Basic special character of etridiazole	16
Table 7. Composition of SGI(Sager, R. and S. Granick, 1953)	17
Table 8. Trend line of Average specific growth rate in each biocide	32
Table 9. Trend line of EC ₅₀ in each biocide	37
Table 10. EC ₅₀ of each biocide of <i>C. reinhardtii</i> at 72 hour	38



Summary

This study reports on toxicity of several biocides towards influence on *Chlamydomonas reinhardtii* growth. The results of this study were summarized as follows:

Cell growth showed various growth change by existence of biocides. Specially, the test of single herbicide and mixture biocides (herbicide+pesticide) were more toxic to the cell growth. Also, the average specific growth rates(μ) were to decrease with the increase in biocide concentrations. The toxicity of biocides toward μ was as follows (in descending order of toxicities): herbicide > pesticide > fungicide.

EC₅₀ in each biocide were 0.0017 mg/l, 1.06 mg/l and 13.3 mg/l for herbicide, pesticide and fungicide respectively. Moreover, EC₅₀ was strong toxicity by 2.7×10^{-7} mg/l when herbicide and pesticide were mixed. Also, EC₅₀ in main components of each biocide were 5.26 mg/l, 9.37 mg/l and 20.58 mg/l for herbicide, pesticide and fungicide respectively. Moreover, EC₅₀ was strong toxicity of 3.10 mg/l when main components of herbicide and pesticide were mixed.

The flagellum revival of *C. reinhardtii* was inhibited by existence of each biocide. The inhibitory effect on flagellum revival of *C. reinhardtii* by biocide concentration was decreased in order of herbicide, pesticide and fungicide.

As toxicity estimation result, main component of each biocide were less toxic than product of biocide. These results suggest that experiment need to about affecting not main component of biocide but product of biocide (include of assistant ingredient, i.e. a synthetic detergent) to do estimation about biocide toxicity among environment.

I. 서론

농약은 살포된 후 미미한 양만이 작용 대상 식물에 효과를 나타낼 뿐, 대부분은 공기 중으로 증발하거나, 토양에 흡수되고, 나머지는 수계로 유입된다(Patin, 1982). 수계 생태계로 흘러 들어온 농약은 수계에 존재하는 녹조류에 지대한 영향을 미치게 되는데, 이 녹조류는 수계 생태계에서 중요한 비중을 갖는 1차 생산자로, 결국 이들 환경오염원을 적절히 제거하지 않는다면 먹이사슬의 혼란을 초래하게 되어 자연 생태계를 파괴하게 되고, 급기야는 인류 자신의 존립마저 위태롭게 할 것임에 틀림없다.

이렇게 수계로 유입된 환경오염물질들은 수계 내에서 이동과 변환이 가장 급속하게 일어나는 매체로서, 오염물질들에 의한 수서 생태계 위해성을 바르게 평가하기 위해서는 가능한 다양한 종류의 생물들에 대한 유해성이 분석되어야 한다(김은주 등, 2001). 이러한 이유에 의해서, 수 생태계에 대한 화학물질들의 영향을 예측하기 위해서는 수질오염의 원인 물질들에 대한 환경독성을 정확히 평가하는 방법의 필요성이 대두되며, 수질오염 상황에 알맞은 환경독성 평가 방법의 선택이 이루어져야 할 필요가 있게 된다. 따라서 최근에는 생물학적 방법으로 많은 독성실험을 하고 있고 이 중에서 물고기나 물벼룩을 이용한 측정 방법을 들 수 있는데 이 방법은 독성물질에 대한 반응시간이 길고 독성 물질의 양과 반응 정도의 상관관계를 정확히 규명하기 어려운 단점이 있고 또 on-line화하기 위해서는 행동 양상을 표준화하고 늘 같은 양상을 나타내어야 되나 재현성이 낮다는 것이 단점이다. 반면 미생물을 이용한 생물학적 방법은 빠른 반응으로 신속, 정확하여 많은 연구가 진행되고 있다. 따라서 화학물질의 수생독성(aquatic toxicity)을 평가하는데 있어서 세계적인 추세는 분석화학기법에서 생물분석으로 독성실험을 평가하는 방향으로 전환하고 있으며, 생물 중 또한 덩치가 큰 동물에서 미생물로 선택하여 실험하고 있는 실정이다.

그런데 농약은 그 자체의 화학적 구조와 독성 발현 메커니즘에 따라서 미치는 영향 정도가 다르고 농약의 종류 및 생물의 종류에 따라서도 독성 및 감수성이 다르다고 알려져 왔다(Hashimoto, et al., 1982 ; Yamamoto, et al., 1979). 또한 외국에서 도입되는 화학물질로부터 우리나라 산업 및 환경을 보호하기 위한 한 방편으로 다양한 생물 검정법을 이용할 수 있으며, 또 국내에서 개발된 화학물질의 수출을 위한 수생독성(aquatic toxicity) 자료를 위해서라도 선진국에서 요구되어지고 있는 여러 가지 담수생물에 대한 독성평가 방법의 확립이 시급한 실정이다. 그러나 현재까지 보고된 연구결과 대부분은 사용량이 많았던 DDT나 PCB 등에 대한 연구일 뿐, 그 외 사용량이 증가하고 있는 다른 biocide에 대한 것은 많이 보고 되어 있지 않다. 또한 이 실험에 사용된 농약의 주성분은 아직까지 *C. reinhardtii*을 이용해서 독성평가를 한 연구

는 거의 없는 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 단세포 녹조류로 세대간의 번식주기가 짧으며, 실험실에서 대량배양이 가능하고, 관리가 쉬운 *C. reinhardtii*를 이용하여 현재 국내에서 다량 사용되어지고 있는 제초제(dithiopyr), 살충제(imidacloprid) 및 살균제(etridiazole)의 종류별, 농도별 및 상호 혼합에 따른 독성평가를 하고자 *C. reinhardtii*의 성장속도, 편모재생 및 EC₅₀의 측정을 통하여 독성정도를 평가하는데 그 목적이 있다.



II. 이론적 배경

1. *C. reinhardtii*의 특성 및 Biomarkers(생물학적 지시자)

1. 1 *C. reinhardtii*의 특성

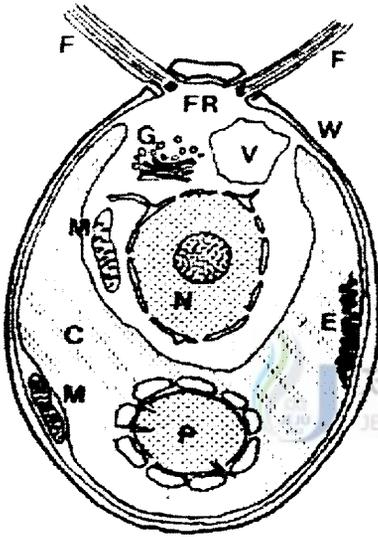


Fig. 1. Schematic diagram of a typical cell of *C. reinhardtii*.

C: chloroplast, E: eyespot, F: flagella, FR: site of flagellar roots, G: Golgi, M: mitochondria, N: nucleus with nucleolus, P: pyrenoid, V: vacuole, W: wall.

*Chlamydomonas*는 *Chlamydomonas*과에 속하며 학명은 *chlamydomonadina*이며 단세포성 녹조류를 대표하는 가장 오래된 녹색식물의 선조형으로 짐작되고 있다. 일반적으로 *C. reinhardtii*는 10-30 μ m 정도의 크기이고, 공 모양 또는 계란 모양·유선형을 하고 있으며 생활하는 장소는 담수, 바닷물, 그리고 산꼭대기의 눈 속 등 어디서나 발견되는 등 분포범위가 넓은 녹조류이다. 일부는 토양이나 오염된 시궁창 등에서 물이 녹색으로 보이게도 하고 유전 연구의 중요한 재료로 쓰인다. 특히 봄부터 여름에 많이 존재한다. 또한 낙동강에서는 연중 존재하는 것으로 보고 되고 있다(문성기,1995). Fig. 1.와 같이 각 개체는 길이가 같은 두개의 편모를 앞 쪽 끝에 갖고 있어, 이를 이용해 물속을 빠른 속도로 움직인다. 또한 편모를 이용해서 밝은 곳에서는 편모로 운동하여 빛이 있는 곳으로 모이는 성질이 있고, 성장조건이 나빠지거나 어두운 곳에서는 편모가 없어져 운동성이 없는 둥근 형태가 되었다가 밝은 곳으로 옮기면 다시 헤엄치기 시작한다. 각각의 세포는 반수체인 한 개의 핵과 커다란 엽록체, 뚜렷하게 관찰되는 피레노이드와 세포의 주광성(phototactic) 반응을 돕는 안점(eyespot, stigma)

이 있다. 두 개의 작은 수축포를 편모의 바닥에 갖고 있어 물을 지속적으로 제거하는 삼투조절기관으로 사용한다. *C. reinhardtii*는 암수형태 구별이 없고 세포분열을 통해 유동 포자를 만드는 무성생식을 한다. 또한 이 조류는 유성생식으로도 생식하는데 이런 경우에는 세포분열의 산물이 배우자의 역할을 하여 최종적으로는 편모를 소실하고 휴지기 상태로 들어가는 4개의 편모를 가진 이배체인 접합자를 형성하도록 융합된다. 이 휴지기의 말기에는 감수분열이 일어나, 성체가 되는 4개의 반수체 세포를 생산한다(김경민 등, 2003).

이러한 특성들 때문에 *C. reinhardtii*는 많은 연구에 이용되었다. 그중에서 독성평가에 이용되어 연구된 내용들을 살펴보면 이은경(1982)은 *C. reinhardtii*의 생장에 미치는 biocides의 영향을 연구하였고, 이창균(1990)은 *C. reinhardtii*의 생장에 미치는 환경오염원의 영향과 채영규 등(1991)은 카드뮴 저항성에 대하여 *C. reinhardtii*의 부분 특성에 관하여 연구하였다. 그리고 田中 仁志 (2001) 등은 단세포녹조 *C. reinhardtii*의 편모재생에 주목한 연속 생물학적 분석을 연구하였고, 김주현(2003)는 녹조생장저해실험에 의한 논 지역을 흐르는 하천의 생태영향평가에 *C. reinhardtii*를 이용해서 실험하였다.

1. 2 Biomarkers의 개념 및 특성

최근에는 환경독성 분야가 점차 발전되어 가고 있는 반면에, 환경오염에 대한 규제는 복잡해지고 있어, 유해화학물질에 노출된 생물체의 세포 수준에서 나타나는 생화학적, 생리학적 그리고 병리학적 biomarkers에 대한 관심이 고조되고 있다. 적절한 biomarkers는 유해화학물질의 수질오염에 의한 피해가 나타날 수 있는 수서 생물의 건강성을 신속하게 판정할 수 있다.

환경 과학 분야에서는 외부의 스트레스에 의한 환경의 변화를 표현하기 위하여 bio-indicator, biocriteria, 또는 biomarker라는 용어를 사용하고 있다. 이 용어들은 community, population, organismic, cellular, 그리고 molecular 수준에서 각각의 변화 정도를 나타내는 적절한 지시자들을 의미하고 있다. 유해화학물질의 노출에 의한 생물체내의 측정 가능한, 생리·생화학적 변화를 표현하는 것으로써 Table 1과 같이 구분하고 있다.

Biomarkers에 의한 수질오염 수준 평가는 민감하고, 경제적이며, 용이하고, 간편한 장점이 있다. 즉, biomarkers 기법은 낮은 농도 수준의 유해화학물질에 노출된 생물체가 사망 등의 병변현상을 일으키기 전, 생리·생화학적 변화가 먼저 일어나는 것을 응용하여 그 변화량을 감지하는 기법이므로 유해화학물질이 유입된 후 하천 수에 의해 희석되어 낮은 농도로 존재하게 되는 수질을 평가할 수 있는 방안이 될 수 있다.

또한, 수질오염 평가를 위한 biomarker 기법은 독성 시험용 생물체를 배양하거나 유지할 필요가 없는 경제적 방법이며, 생물체를 직접 다루지 않는 기법이므로 생물체를 대상으로 하는 방법에 비해 비숙련 연구자도 쉽게 기술을 습득할 수 있는 용이한

기법이다. 그 뿐만 아니라, 최근에는 이러한 biomarkers를 실험실이나 오염현장에서 손쉽게 측정할 수 있도록 kit 상품이 개발되고 있어서 사용하기에 매우 간편해지고 있다.

Table 1. Classification of Biomarkers (ANAS, 1989)

Class	Definition
Exposure	An exogenous substance or its metabolite or the product of an interaction between a xenobiotic agent and some target molecule or cell that is measured in a compartment within an organism
Effect	A measurable biochemical, physiological, or other alteration within an organism that, depending on magnitude, can be recognized as an established or potential health important of disease
Susceptibility	An indicator of an inherent or acquired limitation of an organism's ability to respond to the challenge of exposure to a specific xenobiotic substance

Biomarkers의 선정시 고려해야 하는 특성으로는 특이성, 명백한 관련성, 연관성 및 유용성을 들 수 있다.

환경독성을 평가하고자 하는 특정 유해화학물질에 대하여 선택적으로 예민하게 반응하는 적절한 biomarkers를 선정하여야 하고(특이성), 유해화학물질의 노출에 의한 생물체의 반응이 분명한 biomarkers라야 한다(명백한 관련성). 또한, 세포 또는 그 이하 수준에서 적용되는 biomarkers의 변화가 개체 또는 그 이상 수준의 변화를 대변할 수 있는 생물학적 단계간의 연관성이 있는 biomarkers라야 하며(연관성), 유해화학물질의 노출에 의한 생물학적 변화량을 용이하게 측정할 수 있어야 하고, 객관적으로 검증된 biomarkers라야 한다(유용성)(황인영, 1997).

2. 독성평가

2. 1 급성 독성

급성독성이란 학자들에 의해 여러 가지 개념으로 정의되고 있는데 경제 협력개발기구(Organization of Economic Cooperation and Development ;OECD)전문 위원회는 급성독성을 「어떤 물질의 단일 용량을 단 시간에 (경구)투여하거나 24시간 내에 여러 용량을 투여할 때 일어나는 해로운 효과」라고 정의하고 있다. 또한 급성 독성시험의 목적은 화학물질의 고유독성을 정의하는 것이고, 민감한 종(種)에 대해 평가하고, 표적기관을 동정하며 화학물질에 급성노출 될 때의 위험평가에 대한 정보를 제공하고, 지연독성실험에 대한 용량수준을 계획하고 선택하는 정보를 제공하는 것이다.

급성 독성시험은 때로 만성독성시험에 대한 데이터가 없는 상태에서 제일 첫 번째의 방어에 대한 시험이라고 불린다. 이런 데이터는 제조회사·정부 및 연구기관이 연구자들 및 어떤 화학물질의 초기 개발단계에서 작업집단의 안전성 정도를 설명하는데 도움을 준다. 규제하는 입장에서 보면 급성 독성데이터는 어떤 화학물질의 독성분류·라벨링·수송 등에 필수적인 도움을 준다. 학문적 관점으로 본다면, 용의주도하게 계획된 급성독성시험은 때로 독성메커니즘 및 특정부류의 화학물질에 대한 구조-활성관계에 관한 정보를 제공한다(김야원, 1988).

2. 2 미생물을 이용한 독성 시험법

유해화학 물질에 대한 독성 평가는 일반적으로 물고기와 무척추동물을 이용한 급성 및 만성 독성 시험법으로 구성된다(Peltier, et al., 1985). 그러나 화학물질의 다양성으로 인해 근래에는 단기간 내에 평가를 행할 수 있는 단기 시험법들이 각광을 받고 있다. 단기 시험법은 대개 효소의 활성저해, 세균, 진균류, 조류, 원생동물을 이용하는(Bitton, et al., 1986 ; Blaise, 1991 ; Dutton, et al., 1986 ; Liu, et al., 1984) 미생물 시험법(microbiotests)으로 시험법은 단순하고 빠르며 비용이 적게 들고 소형화 될 수 있다는 장점이 있다. 미생물 시험법의 장점을 Table 2에 요약하였다.

수 환경의 유해성을 결정하기 위해서는 여러 가지 미생물을 이용한 독성 시험법들이 유용하며, 대표적인 방법들은 Table 3에 요약하였다(Bitton, et al., 1992a ; Liu, et al., 1984 ; Kwan, et al., 1992a). 유해성 화합물들은 bioluminescent bacteria의 발광에 불리하게 영향을 미친다. Microtox라는 이름으로 시판되고 있는 독성 시험법은 생물 발광(bioluminescence)을 내는 marine bacteria인 *Photobacterium phosphoreum*의 냉동 건조된 박테리아를 배양하여 이용하는데 유해 화합물이 존재 시 이 박테리아의 생물 발광(bioluminescence)이 저해되는 것에 근거한다(Bulich, 1984).

Table 2. Attractive Features of Microbiotests

Features
Inexpensive or cost-efficient
Generally not labor-intensive
High sample through-put potential
Cultures easily maintained or maintenance-free
Modest laboratory and incubation space requirement
Insignificant postexperimental chores
Low sample volume requirement
Sensitive / rapid responses to toxicants
Precise / reproducible responses
Surrogate testig potential
portability

Microtox는 폐수 방류수, 복합적 산업 폐기물, 화학 연료 제조수, 침출수, 위생 매립지 침출수, 위해 폐기물 침출수의 독성을 결정하는데 이용되어 왔다(Bulich, et al., 1981). 이 시험법은 물고기, 물벼룩, 조류를 이용한 독성 시험법과 좋은 상관관계를 보여 주며(Munkuttrick, et al., 1991) 중금속 보다는 유기성 화합물에 더욱 민감한 것으로 보고 되어 왔다. Microtox는 폐수 또는 상수 처리장으로 유입되는 독성물의 on-line 제어에 이용될 수 있다.

독성 시험법은 순수 또는 혼합 박테리아의 성장 저해에 근거할 수 있는데, 주로 박테리아 현탁액의 O.D(optical density)를 측정함으로써 박테리아 밀도의 변화를 결정하거나 고체성장배지 상의 저해 지역을 측정하고 ATP 측정을 통해 이루어진다. ATP-TOX 시험법은 ATP 측정을 통한 대장균의 성장 저해와 발광효소인 luciferase의 활성저해에 근거하고 있다.

유해 화합물들은 또한 미생물에 의한 영양소 순환에도 악영향을 미친다. 질소 순환에 따르면 질산화 과정이 독성 물질에 가장 민감한 반응이다. 질산화 과정은 탄소성 BOD 제거 과정보다 더 빠르게 영향 받는다. Nitrosomonas와 Nitrobacter의 저해에 근거한 독성 시험법이 폐수의 유독성을 결정하기 위해 개발되었다. 그러나 Nitrosomonas는 유해 물질에 대해 Nitrobacter보다 더 민감한 것으로 나타나고 있다. 유해 화합물의 탄소 순환에 대한 영향은 미생물의 호흡 저해를 측정함으로써 편리하게 결정된다. 미생물의 호흡은 산소 전극, 압력계 또는 전해질 호흡계로 측정할 수 있

다.

Table 3. Short-term bacterial toxicity assays(Bitton, et al., 1992a)

Assay	Basis for the Assay
Microtox	Inhibition of bioluminescence of <i>Photobacterium Phosphorium</i>
<i>Spirillum volutans</i>	Toxicants cause loss of coordination of rotating fascicles of flagella with subsequent loss of motility in <i>Spirillum volutans</i>
Growth Inhibition	Measure growth inhibition of pure or mixed culture via absorbance determination for microbial suspensions or via measurement of zones of inhibition on solid growth media
ATP assay	Inhibition effect of toxic chemicals on ATP levels
ATP-TOX assay	Test based on both growth inhibition, via ATP measurement, of bacterial culture, and inhibition of luciferase activity
Respitometest	Measures effect of toxicants on microbial respiration
Toxi-Chromotest	Based on inhibition of biosynthesis of β -galactosidase in <i>E.coli</i>
Nitrobacter bioassay	Measures inhibition of nitrite conversion to nitrate
Microcalorimetry	Measures decrease in heat production

호흡 저해 속도 분석법은 활성슬러지 미생물에 의한 기질 제거의 동력화에 대한 유해 물질의 효과를 측정하고 있다. 유해 물질에 대한 미생물의 노출은 또한 젤 전기영동 분석법을 통해 감지될 수 있는 스트레스성 단백질의 유도를 초래한다. 이러한 단백질의 일부는 열 충격 단백질(heat shock protein)과 기아 단백질(starvation protein)과 겹치기도 하지만 일부는 특정한 무기 또는 유기 화합물에 대한 반응으로 생성된다. 스트레스성 단백질의 형태가 유해 화합물에 대한 노출의 지수로 이용될 수 있지만 급성 독성 시험법으로는 아직 유용하지 않다.

조류도 독성 시험법의 실험 생물체로 이용될 수 있다. 미국 환경보호청이 제안한 조류 시험법은 녹조류인 *Selenastrum capricornutum*의 성장 저해에 근거하고 있다(US/EPA, 1989a). 이 시험법은 96-well microplate를 이용함으로써 소형화 될 수 있는 데 시험법의 end-point는 96시간후 세포수를 결정함에 따른 성장 저해이거나 4 시간 노출 후의 ATP 저해이다. 이 녹조류는 대개 중금속과 제초제에 민감하다.

3. 계면 활성제

3. 1 계면활성제의 종류 및 특성

계면활성제(surfactant)는 물질의 계면에 작용하여 계면의 성질을 변화시키는 기능을 하는 화합물로 한 분자 내에 친수기와 소수기를 모두 가진 물질이다. 계면활성제를 물에 용해시키면 소수기는 물에서부터 멀어지려는 성질을 갖는데 계면활성제가 나타내는 특성은 바로 이러한 성질 때문이다(Milton, 1989). 물의 표면에서 소수기는 공기 쪽으로 향하지만 수중에 기름이나 고체가 존재하면 소수기는 물과의 접촉을 피해서 기름이나 고체 쪽으로 향하게 된다. 그러므로 계면활성제는 소수기를 갖지 않는 화합물에 비해 강한 흡착능력을 나타내는데 이 때문에 표면 장력의 저하, 유화, 분산 등의 각종 특성이 나타난다. 계면활성제는 가정용, 공업용 등 여러 가지 용도로 사용되고 있으며, 우리나라에서 1966년에 생산하여 1989년에는 비누 계 세제를 능가할 정도로 광범위하게 사용되고 있다(홍사옥, 1989 ; 권숙표, 1992).

양이온 계면활성제는 음이온 계면활성제와 혼용시 세정력에 매우 불리한 효과를 나타내며 일반적으로 섬유 유연제 등 후처리제의 원료로 사용된다. 양이온 계면활성제는 섬유에 빠르고 쉽게 흡착되어 부드러운 감촉과 정전기 방지 효과가 있다(아·태 환경경영연구원, 1994a).

음이온 계면활성제는 세정력, 기포력이 우수하고 가격이 저렴하여 의료용 세제, shampoo 제조 등 많은 분야에 적용되고 있고 계면활성제 부분(친수기)이 물에 용해되어 음이온을 띄며 음이온기의 구조에 따라 sulfate(-O-SO₃H)과 sulfonate형(-SO₃H)으로 구분된다(최윤호 등, 1992).

비이온 계면활성제는 ester형, ether형, ester ether형, alkyl amide형 등으로 분류되며 단독으로 쓰이거나 또는 음이온 계면활성제 등과 병용하여 사용되며 산업용, 섬유 공업, 안료, 염료 등 광범위한 용도로 사용되고 있다(日本規格學會, 1990 ; 中村, 1990).

양성 계면활성제는 음이온 계면활성제의 세정력과 기포력을 향상시키기 위한 보조 계면활성제로 사용되는 경우가 많다. 이것은 음이온 계면활성제와 분자 간 화합물을 형성하여 그 상승효과를 이용한 결과로 양성 계면활성제는 양쪽성 이온의 특성을 갖고 특수 세제에만 적용된다(아·태 환경경영연구원, 1994b)

3. 2 계면활성제가 수 환경에 미치는 영향

초기의 합성 세제는 경성 세제인 alkyl benzene sulfonate(ABS)로 생분해가 잘 이루어지지 않고 하천에 유입되면, 수 표면에 피막을 형성시켜 수중으로의 산소 공급을 차단하고 하천 수질의 자정능력을 저하시키는 등 수질 오염을 일으키기 때문에 1980년부터 연성세제인 LAS(linear alkylbenzene sulfonate), AOS(α -olefin sulfonate) 및

AES(alkyl ester sulfate) 등으로 대체 생산되고 있다(홍사육, 1984 ; 홍사육, 1989 ; 임재명 등, 1990 ; 정용 등, 1993).

유기물로서 계면활성제가 하천 등에 유입되면 그곳에 존재하는 미생물의 작용으로 세포 일부로 동화되기도 하고 에너지원으로 이용되기도 하며 CO₂, H₂O 등의 무기물로 생분해(biodegradation) 된다.

생분해는 분해 되는 정도에 따라 기능적 생분해, 환경이 수용할 정도의 생분해 그리고 최종적 생분해로 구분되는데 기능적 생분해는 그 물질이 본래 가지고 있는 특성을 잃을 정도의 분해, 즉 계면활성제의 경우는 계면활성능을 상실할 정도의 분해를 말한다. 환경이 수용할 정도의 생분해는 하천 등에서 거품이 생기거나 수생생물에 독성을 미치는 등 현상적으로 환경 보전상 악영향을 미치지 않을 정도의 분해를 말한다. 최종적 생분해는 유기 화합물의 무기물질(CO₂, H₂O, 무기염류)로 완전히 분해되거나 미생물 생체로 동화되어 세포 내 대사 과정 등에 이용될 수 있는 물질로 완전히 변화되는 것을 뜻한다. 계면활성제의 생분해는 보통 미생물에 먼저 흡착된 후 순차적으로 분해 되어 기능적 생분해, 환경이 수용할 정도의 생분해 과정을 거쳐 최종적인 생분해로 진행된다(奥山 & 皆川, 1990)

계면활성제의 생분해에 관한 연구는 화학물질 중에서는 비교적 일찍부터 이루어져서 많은 연구가 진행되어 왔다. 이들 연구들은 세제가 가정 등에서 사용된 후 하수처리장 또는 하천으로 유입되는 것과 하수처리장에서의 제거, 피 처리 특성 및 자연수계에서의 생분해 거동 등 다양한 범위에서 조사가 이루어졌다.

연구 초기는 주로 하수처리장과 하천에서의 거품 발생에 의한 피해에 관하여 조사가 이루어졌으나 이후로는 최종적 생분해를 측정하는 등 분자 구조의 변화를 추적하여 환경에서의 거동을 자세히 조사하는 연구가 이루어지고 있다. 현재 합성세제에 주로 사용되는 계면활성제는 세제가 보급되기 시작한 때와는 달리 대부분이 soft 성분으로 구성되어 있어 생분해 거동의 차이를 보이며 환경에 미치는 영향도 과거에 비해 줄어든 것으로 평가되고 있다(Sugiyama et al., 1972 ; 井上, 1972).

계면활성제인 LAS를 조사한 연구 중 하천 및 하수처리장에서의 생분해 과정을 살펴보면, 호기적 조건하에서 (Fig. 2.) alkyl고리의 ω-산화와 계속되는 β-산화에 의한 단쇄화, 이어서 benzene 고리가 열린 후 무기화되어 최종적으로 생분해가 이루어진다(奥山 & 皆川, 1990).

계면활성제는 수 환경으로 유입되면 수중 생물에 독성으로 나타낼 뿐만 아니라 발포현상을 유발하고, 수중 식물의 광합성 억제, 물고기의 산소 기능 저하 등을 유발하여 우리나라 오염 하천의 경우, 계면활성제인 LAS 농도가 약 2000μg/l 이상인 것으로 조사되었으며(윤 등, 1997), 일본 대도시권의 생활하수에 의해 오염된 수역에서의 농도도 수천μg/l에 이른다고 보고 된 바가 있다(高田, 1990).

생활하수의 상당 부분을 차지하는 합성세제는 하천 등의 수계에서는 생분해가 문제가 되며, 특히 인산염을 함유한 세제의 경우는 부영양화의 주 요인으로 작용하여 부

영양화를 가속 시킨다.

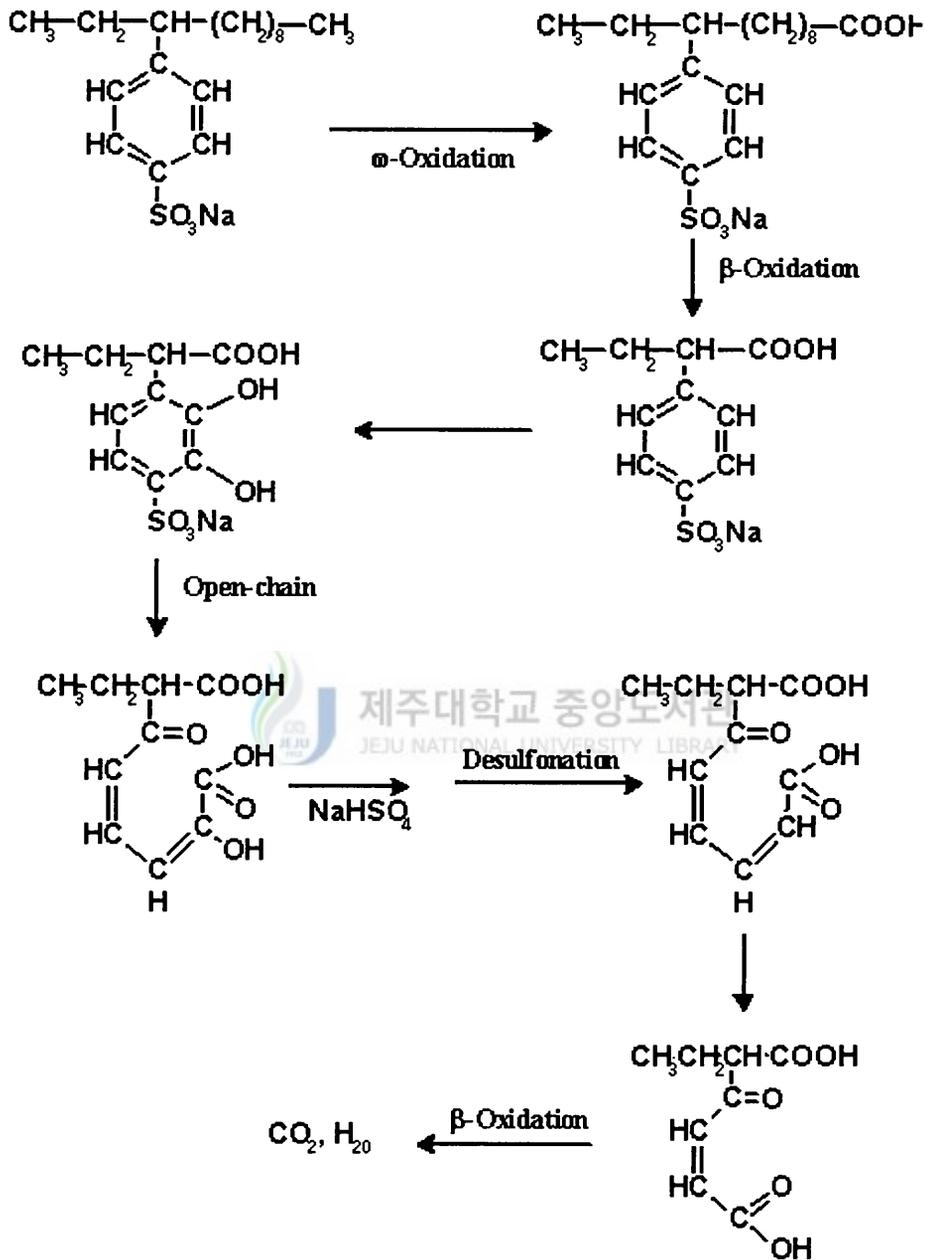


Fig. 2. The process of surfactant(LAS) biodegradation.

4. 국내·외 관련 연구진행 상황

WHO에서는 1973년부터 농약의 위해성 관리를 위해 LD₅₀을 기준으로 독성구분을 시작하였고(WHO, 2000), US/EPA 는 1982년에 “Pesticide Assessment Guideline”을 설정하였고, 1983년이 발암성 등에 대한 “Risk assessment guideline”을 마련하였다(Reed, 1998). 국내에서도 1992년 “농약의 안정성평가 기법”이란 심포지움을 개최하면서 농약에 대한 부분적인 위해성 평가를 시도하여왔다. 농약 개발비의 30%이상을 차지하는 독성시험은 결국 위해성을 알아내기 위한 것이 목적이다. 농약의 위해성 평가는 일반적으로 독성확인(hazard identification), 용량반응평가(dose-response assessment), 노출평가(exposure assessment), 및 위해성 판정(risk characterization)의 4단계로 수행되고 있다(US/EPA, 1999 ; James, 1999 ; Kamrim, 1997 ; US/EPA, 2001). 독성확인 은 주로 인축 및 환경생물에 대한 영향지표인 LD₅₀, IC₅₀ 및 NOEL(no observed effect level) 등을 산출하는 것이며, 유전독성은 양성 또는 음성으로 평가하고 있다(OECD, 1999). 용량반응 평가는 발암성물질에 대하여 역치(threshold) 와 non-threshold를 결정하며, 어떤 농약이 얼마나 낮은 농도까지 영향이 있는가를 결정하는 것으로 안전계수 (safety factor or uncertainty factor) 및 reference dose(RfD)의 설정, ADI(Acceptable Daily Intake) 등 평가에 필요한 독성수치를 설정하는 것이다. 노출평가는 식품, 음용수, 거주지 및 작업자에 대한 노출량을 산출하는 것이다. 미국에서 1996년 FQPA(Food Quality Protection Act)가 제정되면서 어린이 및 노약자, 복합노출, 누적노출, 등으로 나누어 평가하고 있으나(US/EPA, 2001 ; Sielken, 2000), 국내에서는 아직 여기에 미치지 못하고 있다. 소비자 안전성평가는 농산물 중 농약의 잔류량, 일일식품섭취량, 작물별 MRL(Maximum Residue Limit), ADI, 발암지수 등을 이용하여 평가하고, 작업자 노출 평가는 농약의 제형, 살포형태, 주성분함량, 살포기의 종류 등을 고려하여 노출량을 계산하고, 특정 노출량에 대하여 기형독성이나 아급성 독성 NOEL과 비교하여 안전성여부를 평가한다.

최근 선진국을 중심으로 사용중에 있는 농약이나, 등록하고자 하는 농약에 대해 위해성 평가를 하고 있으며, 미국에서는 잔류허용기준을 재설정하기 위해 대대적인 재평가를 수행하고 있다(US/EPA, 1997 ; Meister, 2001).

이러한 연구들을 살펴보면 Renata등은 독성실험을 위한 조류종들의 선택과 감수성을 비교하였으며(Renata, 1999), Christiane등은 Hydra의 형태학적 변형으로 (아)치사의 정도를 파악평가했다(Christian, 1997).

또한 Tamara 등은 생물지시자의 활동성을 이용해서 유기인계화학물질의 급성독성 분석을 했고(Tamara, et al., 1997), Chang는 단세포 조류의 쌍편모의 변화를 이용한 수계에서의 살충제 탐지에 대하여 연구하였다(Chang, et al., 1997).

Ⅲ. 재료 및 방법

1. 실험재료

1. 1 균주

본 실험에 사용한 균주는 단세포 녹조류인 *C. reinhardtii*의 야생형(BIU-90 mt')으로 일본 사이타마현 환경과학국제센터에서 분양을 받아 이용하였다(Fig. 3.).

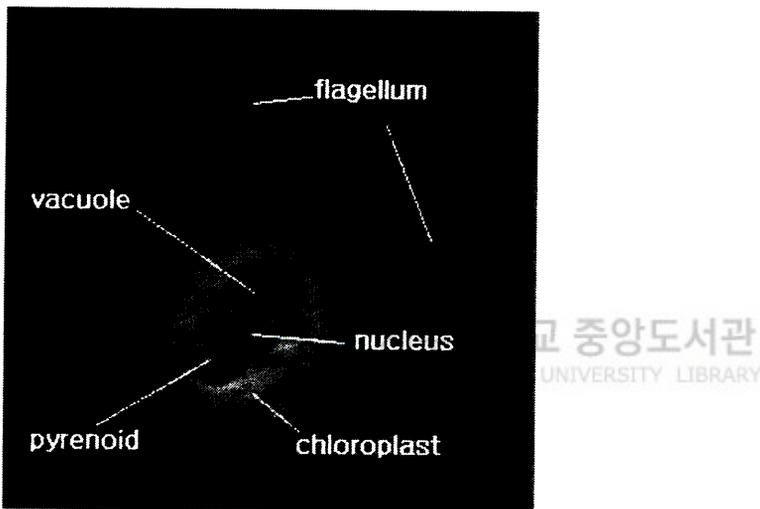


Fig. 3. Phase contrast micrograph of *Chlamydomonas reinhardtii*.

1. 2 농약

농약은 시중에서 판매되는 농약중에서 국내에서 많이 이용되고 있는 것을 대상으로 제초제, 살충제 및 살균제를 각각 한가지씩 선정하여 실험에 이용하였다. 제초제로는 DH화학의 스쿠프(입제)이며, 주성분은 Dithiopyr이고, 살충제로는 DH화학의 코니도(수화제)이며, 주성분은 Imidacloprid이며, 살균제로는 DH화학의 안타(유제)를 이용하였고, 주성분은 Etridiazole인 것을 실험대상 농약으로 선택하여 사용하였다. 또한 보조성분의 영향을 알아보기 위하여 주성분만을 실험을 행했는데 여기에 사용된 주성분은 AccuStandard Inc.에서 Dithiopyr, Imidacloprid, Etridiazole을 각각 주문 공급받아 실험에 사용하였다.

각 주성분의 물리·화학적 특성은 다음과 같다.

1. 2. 1 제초제(스쿠프 제초제, dithiopyr)

Dithiopyr는 토양처리용 발아전 처리제로서 1년생 화본과 잡초 및 광엽잡초에 대한 살초효과가 우수하다. 작용기작은 세포분열 중 미세소관(microtubule) 형성을 저해하는 것으로 알려져 있다. 특히 잔디밭에서의 잡초 방제효과가 뛰어난 제초제이다(정영호 등, 2000)

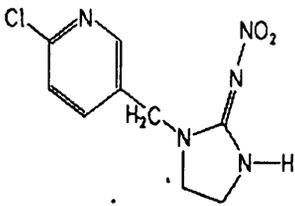
Table. 4 Basic special character of herbicide

Trade name	scoop
Common name	Dithiopyr
Chemical name	S,S-Dimethylester-2-(difluoromethyl)-4-(2-methylpropyl)-6-(trifluoromethyl)-3,5-pyridinedicarbothioic acid
Molecular formula	C ₁₅ H ₁₆ F ₅ NO ₂ S ₂
Molecular weight	401.4
Chemical structure	

1. 2. 2 살충제(코니드 살충제, imidacloprid)

Imidacloprid는 1992년 Nihon Bayer사에서 개발한 Neonicotinoid계 살충제로서 해충의 중추신경의 시냅스(synapse) 후막에 작용하여 아세틸콜린(acetylcholine)의 수용을 저해함으로써 살충효과를 발휘하는 약제이다. 접촉 및 식독작용을 하는 침투이행성의 살충제로 이화명나방, 진딧물, 샴주벌레, whitefly 등의 흡즙해충 및 벼물바구미, 콜로라도 딱정벌레 등의 토양해충에도 효과가 있으며, 선충이나 응애에는 효과가 없다(정영호 등, 2000)

Table. 5 Basic special character of pesticide

Trade name	Konido
Common name	Imidacloprid
Chemical name	1-[(6-chloro-3-pyridinyl)methyl]-N-nitro-2-imidazolidinimine
Molecular formula	C ₉ H ₁₀ ClN ₅ O ₂
Molecular weight	255.5
Chemical structure	

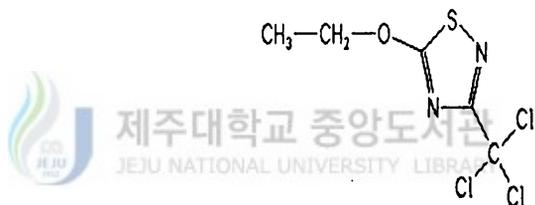
1. 2. 3 살균제(안타 살균제, etridiazole)

Etridiazole은 접촉성의 치료 및 보호 살균제로 벼, 잔디의 피시움블라이트 등의 방제에 사용된다(정영호 등, 2000).

Table. 6 Basic special character of fungicide

Trade name	Anta
Common name	Etridiazole
Chemical name	5-ethoxy-3-(trichloromethyl)-1,2,4-thiadiazole
Molecular formula	C ₅ H ₅ ClN ₂ OS
Molecular weight	292.5

Chemical structure



2. 실험방법

2. 1 배지

*C. reinhardtii*을 배양하기 위하여 사용한 무기영양염 배지는 Sagar and Granick I (SGI) 배지를 사용하였다(Table 7.). 배지는 크게 주성분과 미량성분으로 나누어지는데 주성분(stocks)과 미량성분(trace)을 각각 초순수 1ℓ에 녹이고, 녹인 주성분과 미량성분 1ℓ에서 각각 1ml을 초순수에 넣고 1ℓ로 만들고, 이때 pH는 약 6.4~6.8이 되어야 한다.

Table. 7 Composition of SGI(Sager, R. and S. Granick, 1953)

Stocks		Trace(Bring to one litre)	
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	50.0g/l	H_3BO_3	0.1g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	30.0g/l	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1g
NH_4NO_3	30.0g/l	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.03g
$\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	10.0g/l	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.02g
K_2HPO_4	10.0g/l	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.02
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5.3g/l	CuSO_4	0.004g
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.0g/l		
Use 1 ml of each to make 1 litre of basic medium			

2. 2 배양조건

배양은 OECD기준(OECD, 1984)에 준하여 실시하였다.

초기 미생물 농도가 10^4 cells/ml되도록 멸균된 배지에 주입하여 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 로 일정하게 유지 시킨 수욕상에서 실험을 행하였다. 배양은 72시간 동안 5000lux의 빛의 세기에서, 130rpm으로 진탕(SHAKING WATER BATH HB-205SWM) 시키면서, 배양하였다.

2. 3 실험방법

본 연구에서는 *C. reinhardtii*를 이용한 각 농약의 독성을 파악하기 위하여 농약의

주성분 및 보조성분 첨가에 의한 성장저해 실험과 편모재생저해 실험을 행하였다. 각 실험에는 전 배양을 행한 세포 현탁배지를 이용하여 초기 미생물 농도가 10^4 cells/ml 가 되도록 주입하여 실험을 행하였다.

전배양은 멸균된 150ml 투명병에 멸균된 배지 80ml을 주입한 다음, 세포수가 10^7 cells/ml가 될 때까지 *C. reinhardtii*를 상기 배양조건과 동일하게 실시하였다.

농약에 의한 성장저해 실험에는 농약의 주성분 농도가 0, 1.25, 2.5, 7.5, 12.5, 25mg/l 되도록 각각의 시험관에 주입하고, 전 배양 세포 현탁배지를 0.5ml 정도 추출하고, 미리 준비한 배지에 접종하고, 총량이 8ml가 되도록 하였다. 대조구 및 시험구에서는 각각 3번의 실험을 행하였다. 분광광도계(DR/2000, HACH)로 660nm의 흡광도를 일정시간 간격으로 측정하여 흡광도의 변화와 세포밀도의 관계를 구하고 (Rochaix, et al., 1988), 660nm의 흡광도를 측정하여 세포밀도로 나타내었다.

편모재생저해시험은 *C. reinhardtii*의 편모를 믹서기를 이용 3min동안 분쇄·절단 후, 바로 세포현탁액 5ml을 15ml 유리병에 분주하고 각 농도(2.5, 12.5, 25mg/l)가 되도록 농약을 주입하고 최종량이 8ml가 되도록 멸균된 SGI배지를 주입하고, 성장저해 실험과 동일한 배양조건하에서 배양을 하면서, 일정시간 간격으로 채취 후 현미경으로 관찰하였다. 현미경 관찰은 2% glutaraldehyde를 첨가하여 고정한 후 편모길이를 측정하였다. 바로 측정이 불가능할 경우에는 4°C에서 보존하고, 고정 후 24시간이내에 측정 완료하였다(田中仁志 등, 2001).



3. *C. reinhardtii*의 성장량

C. reinhardtii 성장량을 Chlorophyll-a 농도를 이용하여 측정하였다.

*C. reinhardtii*의 광합성 chlorophyll-a의 측정은 수질오염 공정시험법에 준하여 측정하였다. *C. reinhardtii*의 성장에 따른 Chlorophyll-a 농도와 O.D660nm 값을 Fig. 4.에 나타내었다. Chlorophyll-a 농도와 O.D660nm는 거의 동일하게 변화하고 있음을 알 수 있고, 그림에서 보면 배양 후 약 24시간 후부터 빠른 속도로 증가하기 시작하였고, 배양 125시간 이후에 안정상태를 유지하다가 약 164시간 후부터는 감소하는 영향을 나타내고 있다. 이와 같은 결과는 O.D660nm를 이용하여 *C. reinhardtii*의 성장을 간접적으로 측정할 수 있음을 알 수 있다(Fig. 5.), chlorophyll-a와 O.D660nm의 관계는 다음 식으로 나타낼 수 있고, 이때 상관계수(R^2)은 0.9155으로 나타났다.

$$\text{Chlorophyll-a} = 16182 \times \text{O.D660nm} + 309.39$$

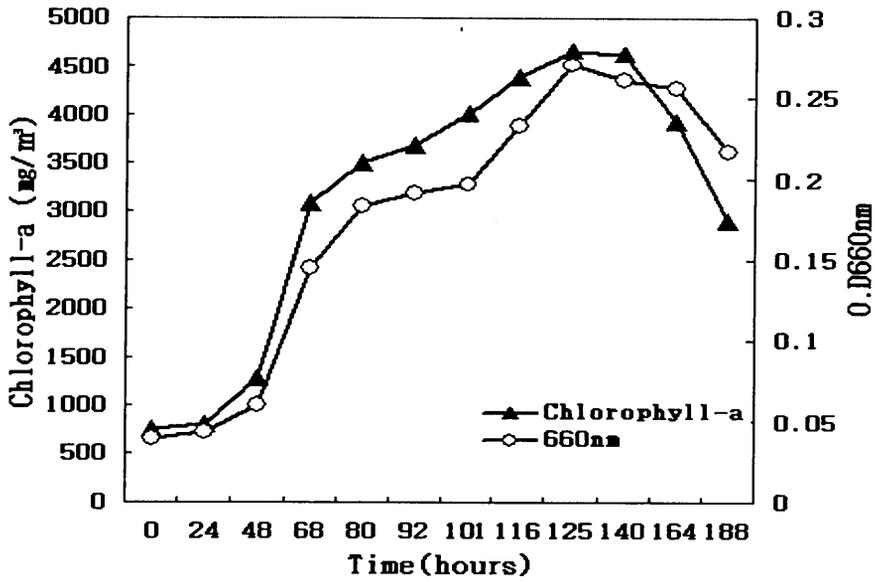


Fig. 4. Cell growth curve of *C. reinhardtii*.

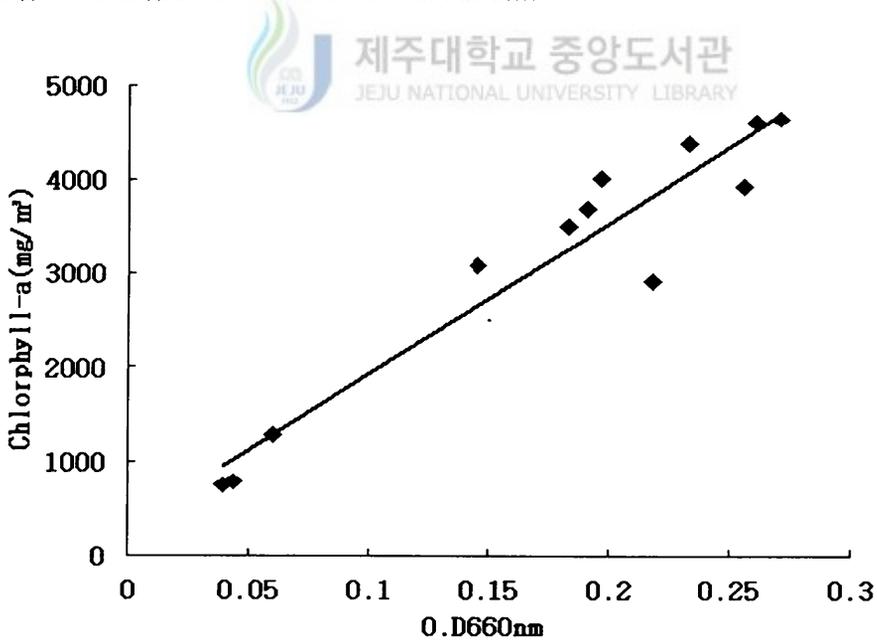


Fig. 5. The relationship between Chlorophyll-a concentration and O.D660(optical density).

4. *C. reinhardtii*의 평균비성장속도(μ)

독성물질의 농도가 높으면 그만큼 *C. reinhardtii*의 변화량도 클 것이라는 가정하에 Average specific growth rate(μ)를 측정하고 계산하였다(Britz, et al, 1997b).

μ 는 일정 시간동안 *C. reinhardtii*의 감소를 나타내는 다음 식에 의하여 계산할 수 있는데 t_0 은 초기시간, t_1 는 실험을 행한 일정한 시간이고, L_0 , L_1 는 각각 초기(독성물질 첨가하지 않았을 때)와 일정 시간 후에서 측정된 *C. reinhardtii*의 O.D660이다.(Britz et al., 1997b)

$$\mu = \frac{(\ln L_1 - \ln L_0)}{(t_1 - t_0)}$$

5. EC₅₀ 계산

EC₅₀(50% Effective Concentration)은 대조구에 비해 성장 또는 성장율을 50%감소시키는 공시물질 농도를 말하며(OECD, 1984) γ value를 이용하여 구할 수 있다. 각 농도에서의 γ 값을 구하여 log-log graph에 나타내면 직선으로 나타나고, $\gamma = 1$ 이 되는 독성물질의 농도가 t시간 동안의 EC₅₀이다(Mallak et al., 1984).

γ 값은 잔류하는 *C. reinhardtii*에 대하여 감소한 *C. reinhardtii*의 비이며 다음 식에 의하여 계산할 수 있다.

$$\gamma_t = \frac{R_t L_0 - L_t}{L_t} = \frac{R_t L_0}{L_t} - 1$$

$\gamma(t)$ 는 t시간의 γ 값이고 R_t 은 blank(독성 물질을 넣지 않은 시료)의 O.D660의 비로 t시간 후 blank의 O.D660을 0시간일 때의 값으로 나누어서 구하였다. L_0 은 0시간에서 시료의 O.D660(독성물질을 첨가하기 전)이고 L_t 은 t시간 후의 O.D660 즉 독성물질을 첨가하고 t시간 동안 변화한 *C. reinhardtii*의 O.D660이다(Mallak, et al, 1984).

IV. 결과 및 고찰

1. 농약의 종류에 따른 *C. reinhardtii*의 성장곡선

1. 1 시판의 완제품 농약을 사용한 경우

각각의 완제품 농약 및 폭로농도가 *C. reinhardtii*의 성장에 미치는 영향을 Fig. 6~11.에 나타내었다. *C. reinhardtii*의 성장은 농약의 종류 및 폭로 농도에 따라 다양한 성장곡선을 보였다. 제초제에 폭로 되었을 경우가 가장 *C. reinhardtii*의 성장에 영향을 미치는 것으로 나타났고, 배양 후 18시간까지는 성장을 나타내었으나, 이후 48시간까지는 아무런 변화를 볼 수 없었고, 48시간이 지난 후 약간 감소를 보이고 있으나 7.5mg/l, 12.5mg/l의 농도에서 다소 증가형태를 보였다. 그리고 살충제와 살균제의 성장변화를 살펴보면, 살충제는 배양 후 9시간까는 감소형태를 보이다가 18시부터는 다시 증가형태를 보였다. 여기에서도 마찬가지로 48시간까지는 거의 일정하게 유지하다가 제초제와 마찬가지로 7.5mg/l, 12.5mg/l의 농도에서 증가형태를 보였다. 살균제는 살충제와 성장변화 곡선이 거의 비슷한 변화를 보이고 있지만 살균제 일때는 48시간부터는 모든 농도에서 감소변화를 보였으며, 각 농약들을 혼합하여 사용한 경우에는 제초제+살균제인 경우가 큰 변화를 보였고, 제초제+살충제, 살충제+살균제는 비슷한 변화를 보였다(Fig. 9~11.). 특히 25mg/l일때에는 거의 성장을 하지 못하는 양상을 나타냈다. 성장곡선에서 제초제가 가장 많은 영향을 보이고 있는데 이것은 제초제의 광합성 전자전달계에서 전자의 흐름을 억제하는 것(Mazur, et al., 1989)과 세포분열 중 microtubule 형성을 저해하는 작용기작에 의한 영향 때문으로 판단된다(정영호 등, 2000). 또한 시판되고 있는 농약과 농약의 주성분만을 가지고 실험한 결과는 시판되고 있는 농약일때의 실험결과가 배양 후 24시간이전 까지는 약간의 충격을 받았다가 점차 안정적인 성장곡선을 보였다. 이는 시판되고 있는 농약에 들어있는 계면활성제가 *C. reinhardtii*에게 주성분과 더불어 독성을 나타낸 것으로 판단된다.

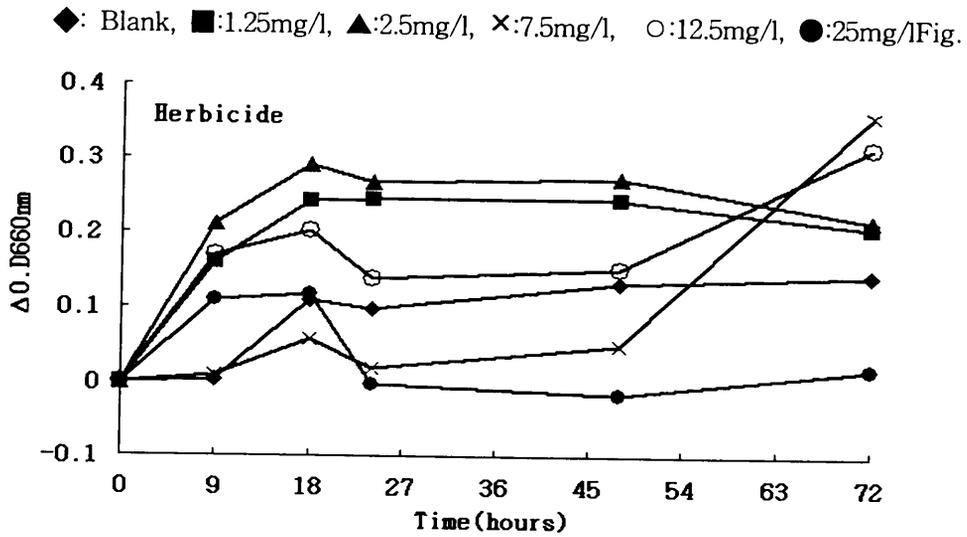


Fig. 6. The cell growth change curve of *C. reinhardtii* treated with various concentration of herbicide.

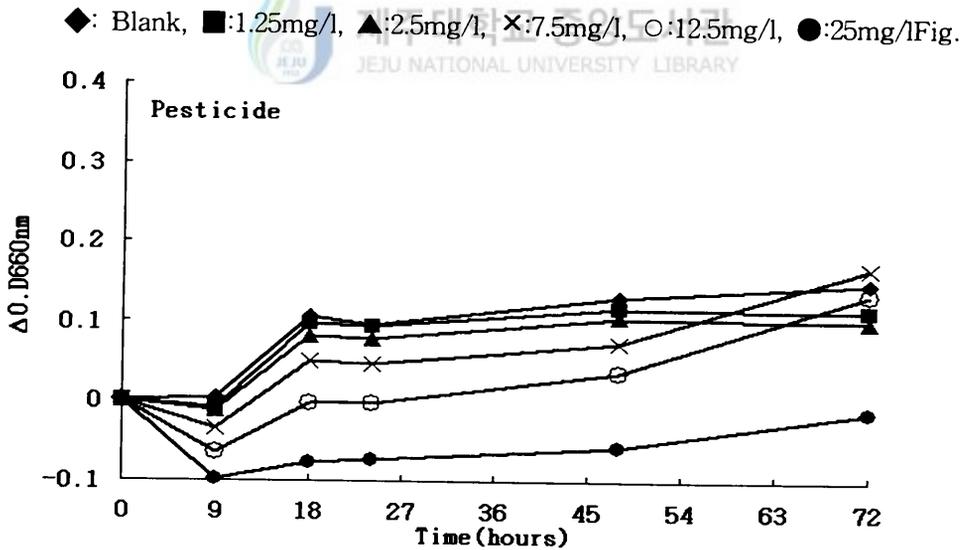


Fig. 7. The cell growth change curve of *C. reinhardtii* treated with various concentration of pesticide.

◆: Blank, ■:1.25mg/l, ▲:2.5mg/l, ✕:7.5mg/l, ○:12.5mg/l, ●:25mg/l

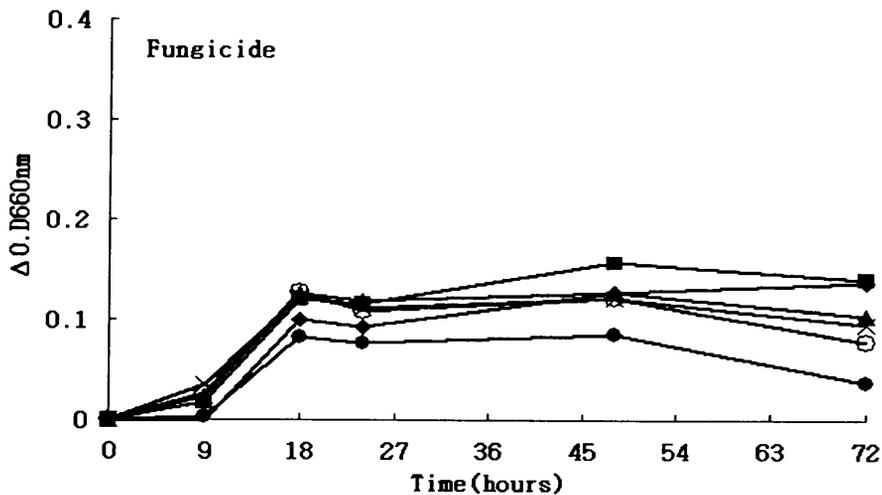


Fig. 8. The cell growth change curve of *C. reinhardtii* treated with various concentration of fungicide.

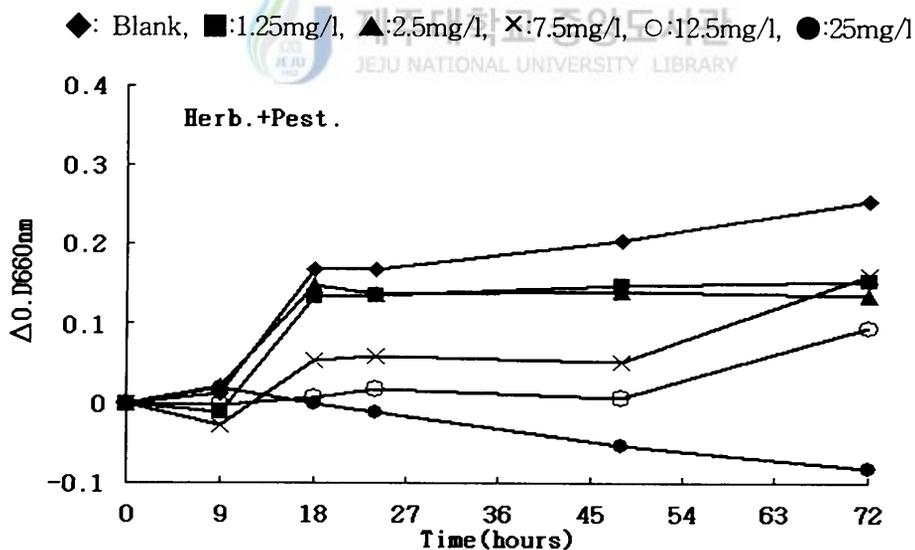


Fig. 9. The cell growth change curve of *C. reinhardtii* treated with various concentration of herb.+pest.

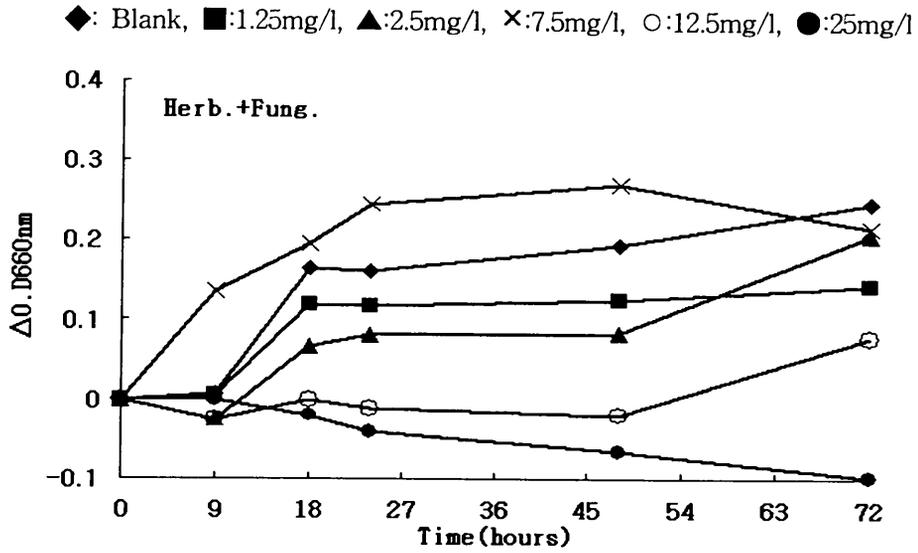


Fig. 10. The cell growth change curve of *C. reinhardtii* treated with various concentration of herb.+fung.

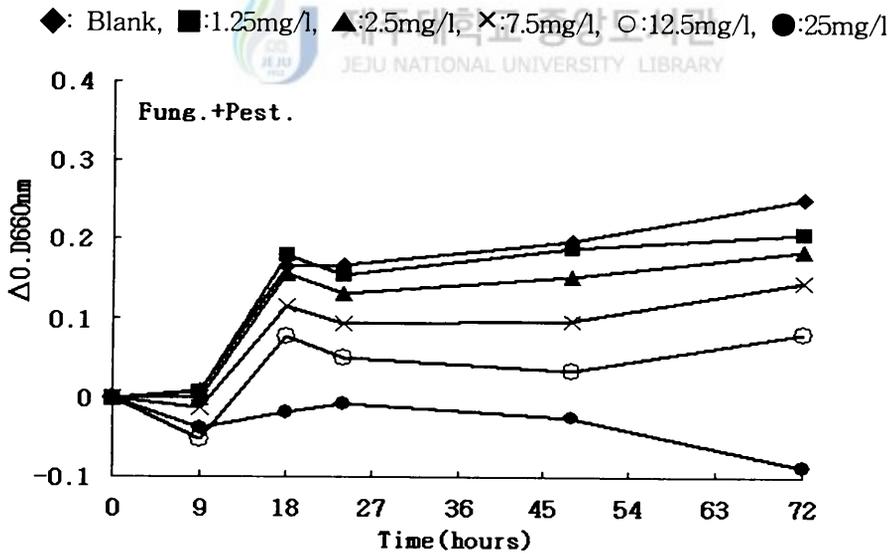


Fig. 11. The cell growth change curve of *C. reinhardtii* treated with various concentration of fung.+pest.

1.2 농약의 주성분만을 사용한 경우

각각의 주성분 및 폭로농도가 *C. reinhardtii*의 생장에 미치는 영향을 Fig. 12.~17.에 나타내었다. *C. reinhardtii*의 생장은 농약의 종류 및 폭로 농도에 따라 성장곡선의 변화를 보였다. 제초제에 폭로 되었을 경우가 가장 *C. reinhardtii*의 생장에 많은 영향을 미치는 것으로 나타났고, 배양 후 대부분이 9시간에서 18시간까지 급속히 생장을 하다가 18시간 이후 거의 변화를 볼 수 없었다. 그리고 살충제와 살균제의 성장변화를 살펴보면, 살충제는 배양 후 계속적으로 성장하는 형태를 보였고, 48시간이 지난 후 일부 농도에서 감소하는 경향을 보였다. 살균제는 살충제와 성장변화 곡선이 거의 비슷한 변화를 보였다.

주성분을 혼합하여 실험한 결과를 보면, 단일 성분만을 가지고 실험한 경우보다 변화폭이 크게 나타났지만 변화하는 형태는 거의 비슷하게 나타났다. 이는 주성분이 혼합에 의해서 독성의 강도가 상승하는 것으로 판단되고 또한 주성분의 성분에 따라 작용하는 기작이 다르기 때문에 성장곡선변화가 다르게 나타난 것으로 판단된다. 주성분을 혼합하여 사용한 경우에도 비슷한 변화 양상을 보였지만(Fig. 15.~17.), 그림 8~10에서의 혼합농약 25mg/l 일때의 변화 양상과는 달리 Fig. 15.~17.에서는 주성분 혼합 25mg/l시 타농도와 비슷하게 변화하고 있음을 알 수 있었다.

그리고 보조성분의 유무에 따라 성장곡선의 변화는 크게 달라졌는데 이는 보조성분으로 쓰인 계면활성제가 *C. reinhardtii*에게 비교적 강하게 독성 영향을 미치는 것으로 판단된다. Fig. 6.와 Fig. 12.을 비교해 봐도 보조성분의 유무에 따라 크게 변화는 양상을 보였고, 혼합농약의 실험결과에서도 보조성분의 유무에 따라 많은 차이를 보였다.

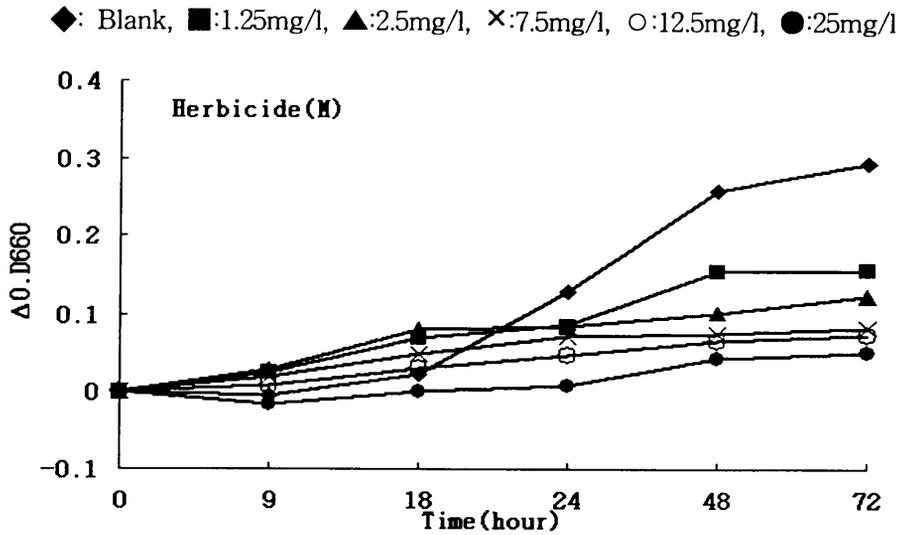


Fig. 12. The cell growth change curve of *C. reinhardtii* treated with various concentration of herbicide(M).

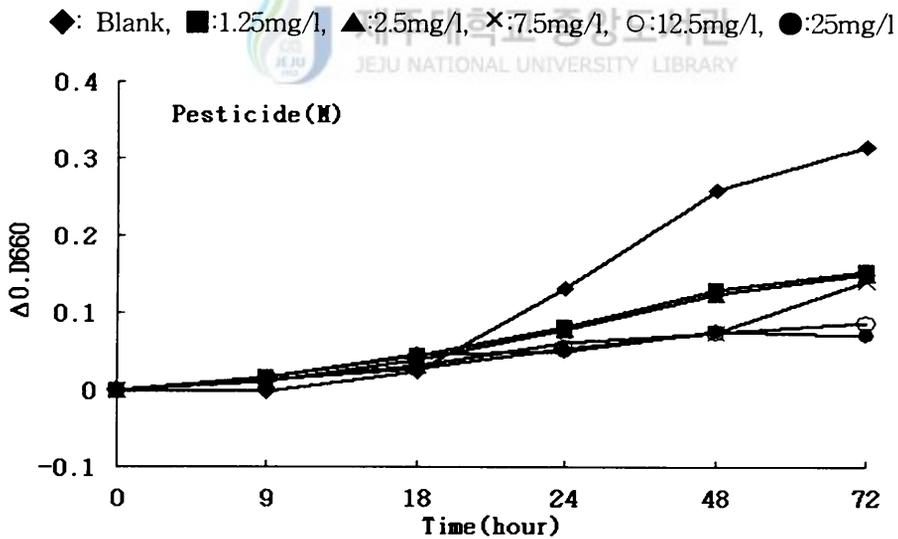


Fig. 13. The cell growth change curve of *C. reinhardtii* treated with various concentration of pesticide(M).

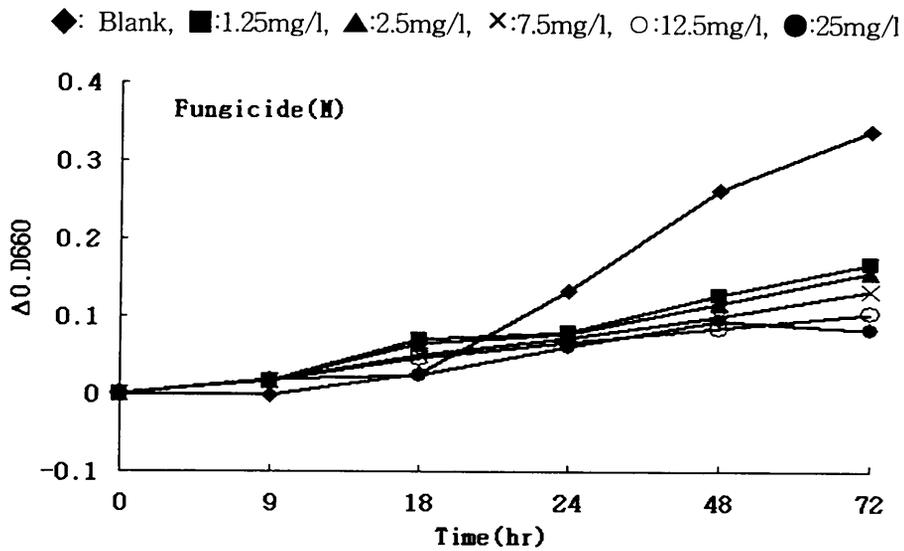


Fig. 14. The cell growth change curve of *C. reinhardtii* treated with various concentration of fungicide(M).

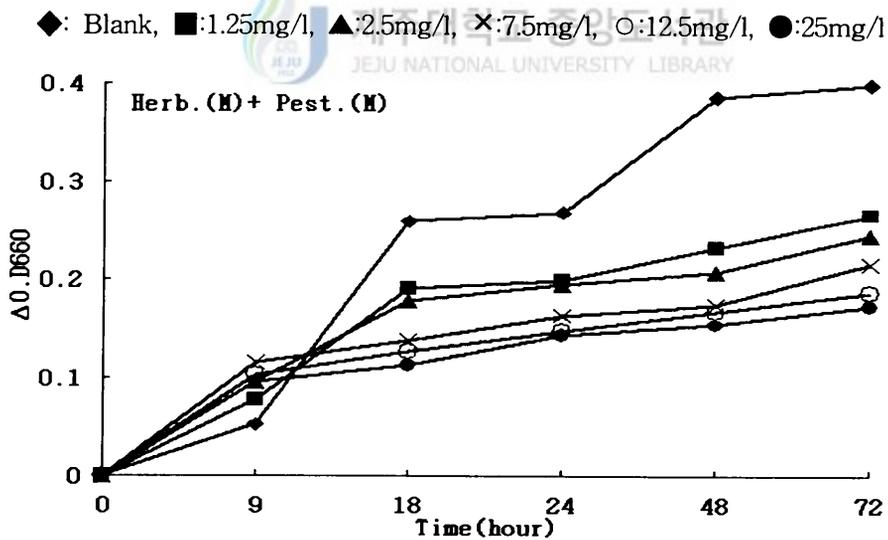


Fig. 15. The cell growth change curve of *C. reinhardtii* treated with various concentration of herb.(M)+pest.(M).

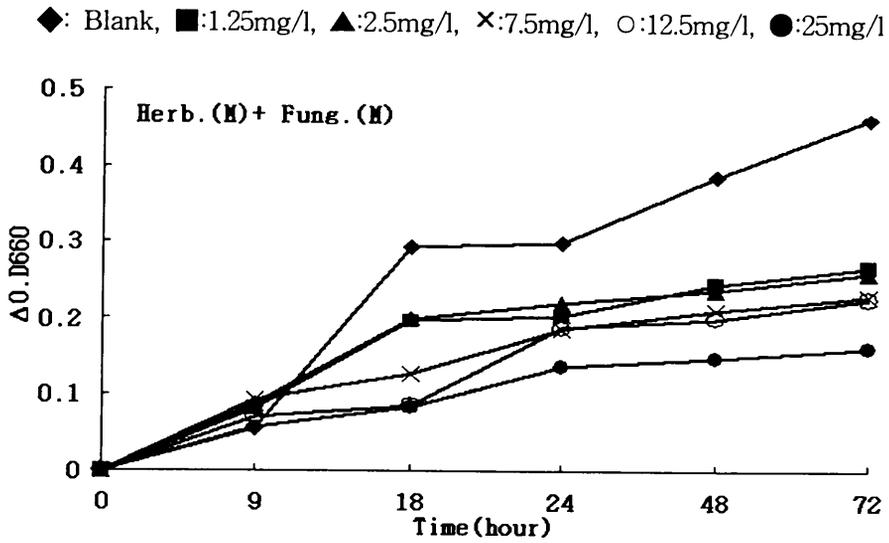


Fig. 16. The cell growth change curve of *C. reinhardtii* treated with various concentration of herb.(M)+fung.(M).

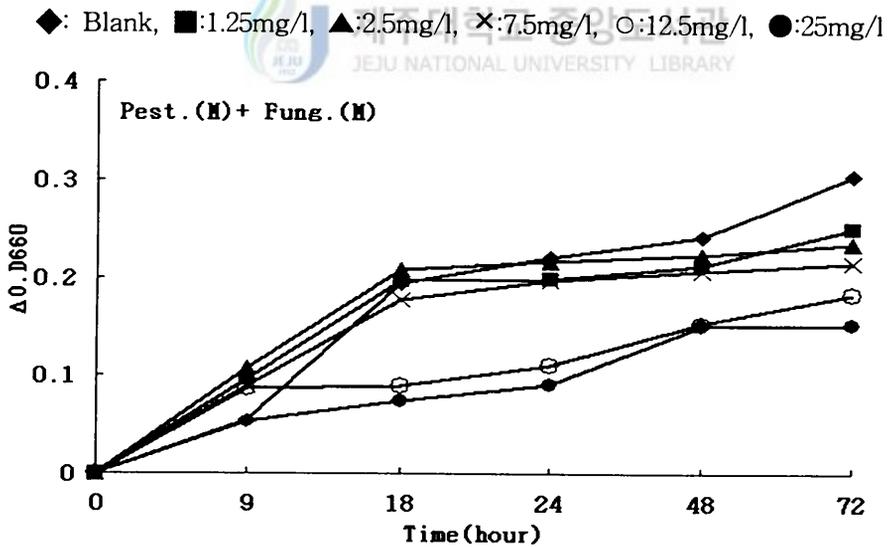


Fig. 17. The cell growth change curve of *C. reinhardtii* treated with various concentration of pest.(M)+fung.(M).

2. 농약의 종류에 따른 *C. reinhardtii*의 평균비성장속도(μ)

각각 농약에서의 실험결과 Fig. 18.~21.은 1.25~25mg/l까지의 농도에서 각 농약의 영향과 혼합에 따른 독성의 차이 및 보조성분의 영향을 나타냈다. Table 8을 보면 상관계수(R^2)값이 비교적 높은 0.89이상을 보였으며, 1.25mg/l에서 25mg/l 농도까지인 제초제, 살충제, 살균제, 제초제+살충제, 제초제+살균제, 살균제+살충제가 성장속도에 미치는 영향을 나타내었다. 모든 경우가 농도가 높아질수록 평균 비성장속도값(μ)은 낮았다. 제초제인 경우 가장 큰 영향을 주었으며, 살충제와 살균제인 경우는 살충제가 살균제보다 많은 영향을 나타낸 것으로 보아 살균제가 *C. reinhardtii*에게 가장 적은 독성을 보인 것으로 판단된다. 즉 제초제가 가장 강한 독성을 보이고 그 다음으로 살충제, 살균제 순으로 *C. reinhardtii*에게 영향을 끼친 것으로 판단된다.

농약을 혼합하여 사용한 경우에는 살균제+살충제가 가장 높은 값을 보이고 제초제+살균제, 제초제+살충제 순으로 높은 값을 보인다. 이는 제초제+살충제가 가장 강하게 *C. reinhardtii*에게 영향을 나타낸 것으로 보이고 제초제+살균제, 살균제+살충제 순으로 독성을 보였다.

또한, 보조성분인 영향을 알아보기 위하여 각 농약들의 주성분만을 가지고 실험을 행하였다(Fig. 20.~21.). Table 8에서 보면 여기에서도 상관계수(R^2)값이 0.84이상으로 비교적 높은 값을 보였다. 먼저 각 농약들의 평균 비성장속도값(μ)을 살펴보면 Fig.18, 19.에서와 비슷한 현상을 보였다. 즉, 제초제가 가장 강하게 *C. reinhardtii*에게 영향을 주었으며, 그 다음으로 살충제, 살균제 순으로 영향을 주었다. 또한 주성분들을 혼합하여 사용한 실험에서는 제초제+살충제가 가장 강하게 독성을 나타낸 것은 Fig.18, 19.과 비슷하나 Fig.20, 21.에서는 살균제+살충제와 제초제+살균제는 거의 비슷한 독성을 나타냈다.

앞의 Fig.18, 19.와 Fig.20, 21.을 비교해 보면 Fig.18, 19.에서의 μ 값이 Fig.20, 21.보다 낮은 값을 형성하고 있다. 이는 Fig.18, 19.에서는 주성분+보조성분인 농약을 사용하였기 때문에 보조성분으로 사용되는 계면활성제의 독성이 농약의 주성분의 독성과 서로 상승작용을 하여 보다 높은 작용을 일으킨 것으로 판단된다. 또한 조류내에 축적되는 농약의 양은 물에 대한 용해도가 작을수록 크므로(Böhm et al, 1976) 농약의 물에 대한 용해도는 성장 효과의 차이에 큰 영향이 있을 것으로 생각된다. 각 농약들의 생장에 미치는 농도의 차이는 이러한 물에 대한 용해도에 기인하였을 것으로 판단된다. 그리고 물에 대한 용해도 뿐만 아니라 각 농약들의 주성분의 작용기작들의 차이에 따라서도 *C. reinhardtii*에게 미치는 영향이 달라질 수 있다.

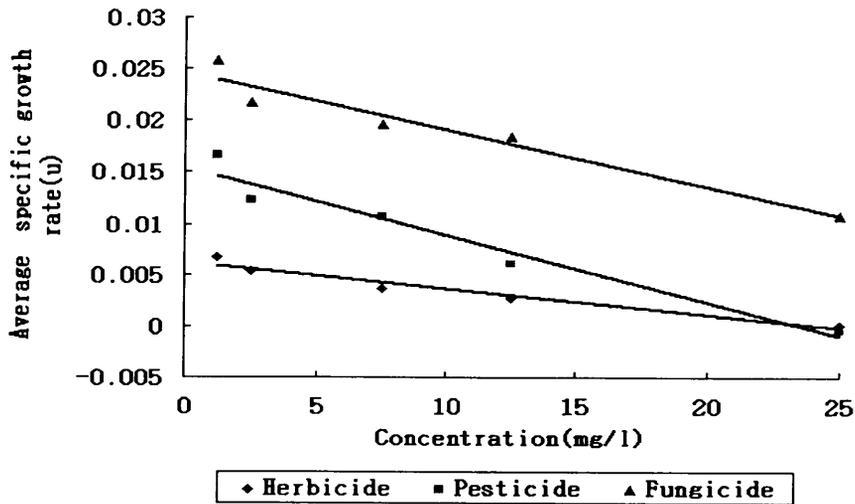


Fig. 18. The Average specific growth rate(μ) of each biocide(product).

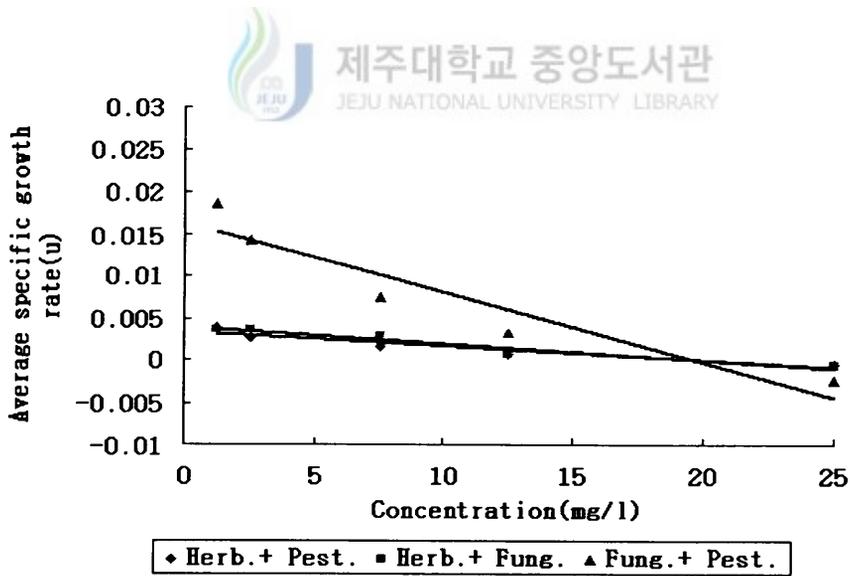


Fig. 19. The Average specific growth rate(μ) of mixing biocide(product).

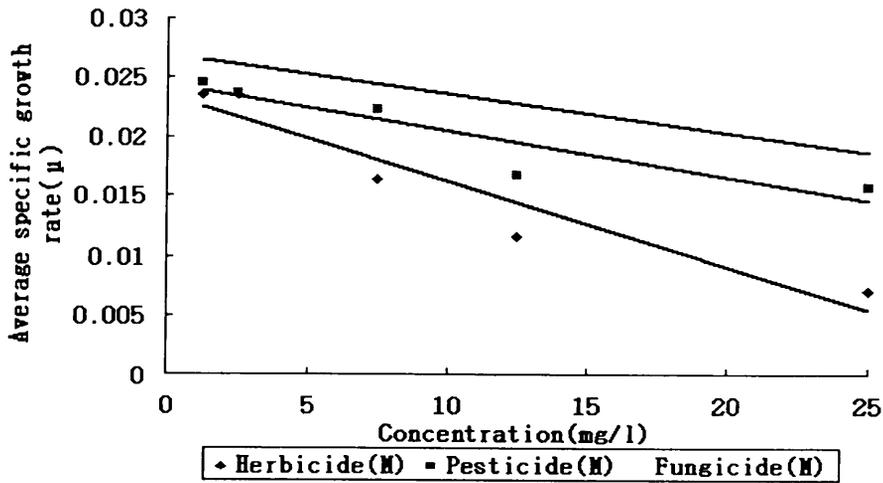


Fig. 20. The Average specific growth rate(μ) of each biocide(main component).

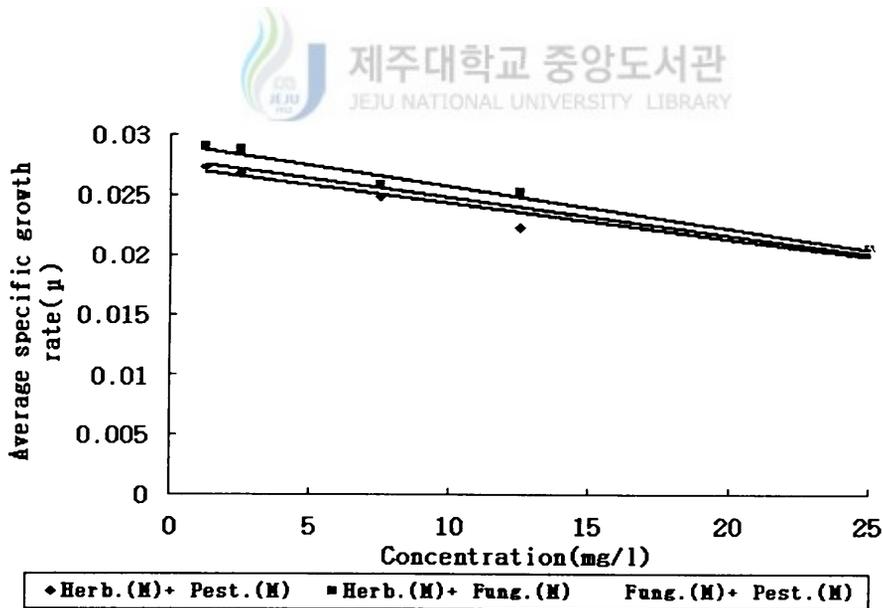


Fig. 21. The Average specific growth rate(μ) of mixing biocide(main component).

Table. 8 Trend line of Average specific growth rate in each biocide

Product			Main Component		
Toxic substance	Trend line	R ²	Toxic substance	Trend line	R ²
Herbicide (dithiopyr+surfactant)	y=-0.0006 x+0.0247	0.9401	Herbicide (dithiopyr)	y=-0.0003 x+0.0268	0.9714
Pesticide (imidacloprid+surfactant)	y=-0.0007 x+0.0155	0.9543	Pesticide (imidacloprid)	y=-0.0004 x+0.0244	0.8435
Fungicide (etr Diazole+surfactant)	y=-0.0003 x+0.0062	0.9392	Fungicide (etr Diazole)	y=-0.0007 x+0.0235	0.9151
Herb.+Pest. (dithiopyr+imidacloprid+ surfactant)	y=-0.0008 x+0.0163	0.8955	Herb.+Pest. (dithiopyr+imidacloprid)	y=-0.0003 x+0.0293	0.9785
Herb.+Fung. (dithiopyr+etr Diazole+ surfactant)	y=-0.0002 x+0.0039	0.9298	Herb.+Fung. (dithiopyr+etr Diazole)	y=-0.0003 x+0.028	0.9623
Fung.+Pest. (etr Diazole+imidacloprid+ surfactant)	y=-0.0002 x+0.0032	0.8911	Fung.+Pest. (etr Diazole+imidacloprid)	y=-0.0003 x+0.0272	0.9306

3 EC₅₀

*C. reinhardtii*는 엽록체가 세포 부피의 40%정도를 차지하며 부모의 게놈(parent genome)이 다음 세대로 유전되고, 엽록체 DNA는 190 고리(circles)로 구성되어 있어 독성 실험을 수행하기에 적합하다(Roach et al., 1983 ; APHA, 1989).

EC₅₀을 산출하기 위해 독성물질의 농도와 미생물간의 관계를 γ 값을 이용하여 log-log graph로 나타내어 직선의 관계식을 구하였다(Fig. 21.~24.).

EC₅₀은 대조구에 비해 성장 또는 성장율을 50%감소시키는 공시물질 농도를 나타내는데 여기서는 제초제, 살충제, 살균제를 이용하여 EC₅₀을 산출하였다. EC₅₀이 작게 산출된 것은 적은 농도에도 *C. reinhardtii*이 민감하게 반응한다는 것을 의미하며 또한 EC₅₀이 작을수록 독성물질의 독성 정도가 강하다는 것을 의미한다.

먼저, 주성분+보조성분일때의 제초제, 살충제, 살균제로 각각 실험을 했을 경우 (Fig. 21.)에는 EC₅₀이 각각 0.0017mg/l, 1.06mg/l, 13.3로 제초제가 *C. reinhardtii*에게 가장 강하게 독성을 보였고 살충제, 살균제 순으로 독성이 강하게 나타났다(Table 10).

그리고 제초제+살충제, 제초제+살균제, 살충제+살균제일 경우(Fig. 22.)에는 EC₅₀이 각각 2.7×10^{-7} mg/l, 1.2×10^{-5} mg/l, 1.05mg/l로 제초제+살충제, 제초제+살균제, 살충제+살균제 순으로 각각 독성이 강하게 나타남을 의미한다(Table 10). 이 실험결과를 보면 혼합농약 일때는 독성이 서로 상승작용을 하여 단일 농약 일 때 보다 독성이 더 강하게 나타난 것으로 판단된다.

그리고 각 농약들의 주성분만을 가지고 행한 실험에서는 제초제, 살충제, 살균제 (Fig. 23.)의 EC₅₀이 각각 5.26mg/l, 9.37mg/l, 20.58mg/l로 제초제가 *C. reinhardtii*에게 가장 강하게 독성을 보였고 살충제, 살균제 순으로 독성이 강하게 나타났으며(Table 10) 제초제+살충제, 제초제+살균제, 살충제+살균제일 경우(Fig. 24.)에는 EC₅₀이 각각 3.10mg/l, 4.01mg/l, 16.5mg/l로 제초제+살충제, 제초제+살균제, 살충제+살균제 순으로 각각 독성이 강하게 나타났다(Table 10). 이의 실험결과는 앞의 μ 값의 결과와 비슷한 결과를 보여주고 있는 것으로 보아 보조성분으로 쓰이는 계면활성제가 농약의 주성분과 혼합하였을 경우에 보다 높은 독성으로 *C. reinhardtii*에게 커다란 영향을 주고 있는 것으로 판단된다. 이은경(1983)의 결과에서 보면 제초제인 경우는 0.04mg/l(butachlor)와 0.35mg/l(alachlor)에서 *C. reinhardtii*의 저해 효과가 50%가 되는 값을 얻었으며, 살균제는 0.9mg/l(phenazine-5-oxide)와 3.4mg/l(isoprothiolane)을 얻었으며, 살충제인 경우는 3.3mg/l(fenthion)와 332.5mg/l(trichlorfon)의 값을 얻었다. 그리고 이창균(1990)의 결과에서는 제초제의 종류에 따라 EC₅₀값이 0.12mg/l(alachlor)에서 2320mg/l(2,4-D)까지 아주 큰 폭을 보였다. 또한 살충제의 주성분으로 쓰인 imidacloprid은 9~33mg/l에서 남조류와 규조류의 성장을 감소한다는 연구 보고도 있다(Insecticide factsheet, 2001). 또한 제초제, 살충제, 살균제일때의 포유류 동물의 독

성 실험에서는 경구 투여시 LD₅₀이 각각 5000mg/kg, 2000mg/kg, 200~2000mg/kg으로 제초제, 살충제 및 살균제의 독성을 보였다(농약사용지침서, 2002). 그리고 물고기 실험에서는 제초제일때는 0.5~2mg/l(농약사용지침서, 2002)이고, 살충제일때는 1.2~80mg/l(Insecticide factsheet, 2001)의 독성을 보였다. 이는 실험 생물체의 종이 다르고 농약성분들의 주성분이 달라 미생물에게 미치는 영향이 다른 때문이라고 판단된다. 또한 앞에서의 결과로 보면 살충제와 살균제는 실제로 자연계에서 검출될 수 있는 농도보다 매우 높은 농도이다. 그러나 제초제인 경우는 매우 낮은 농도에서 저해 효과가 나타나는 것으로 보아 많은 양이 지속적으로 사용되었을 경우 *C. reinhardtii*의 생장에 대한 영향을 초래할 수도 있다. 그리고 이러한 농도들을 실험실 내에서의 지수성장기에서 산출된 농도이므로 실제 자연 상태에서의 농도는 더 낮아질 수도 있을 것이다. 또한 *C. reinhardtii*가 속한 녹조생물은 농약에 대해 다른 조류보다 저항성이 큰 것으로 나타나므로(Palmer, 1969), 다른 조류에 대해서는 더 낮은 농도에서 생장에 대한 효과가 있을 것으로 사료된다. 또한 중금속에 비해 농약에 약한 특성을 보이고 있다(이창균 등, 1991).



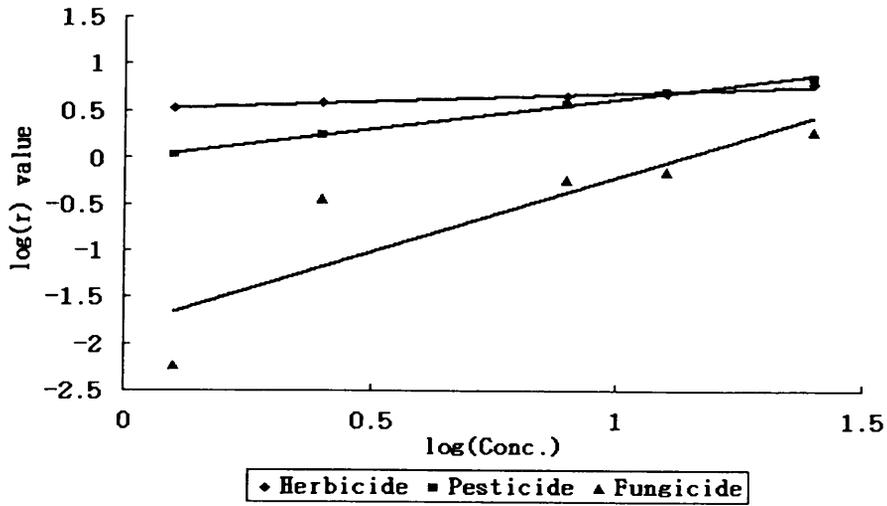


Fig. 22. The gamma(γ) value of each biocide(product).

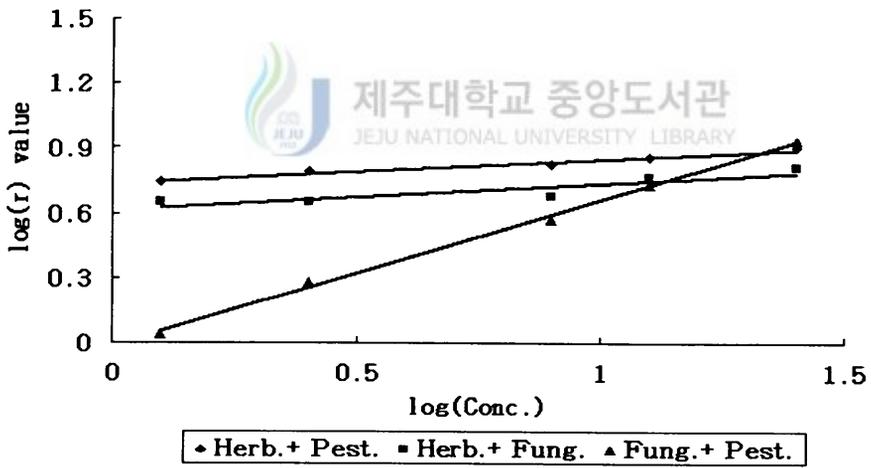


Fig. 23. The gamma(γ) value of mixing biocide(product).

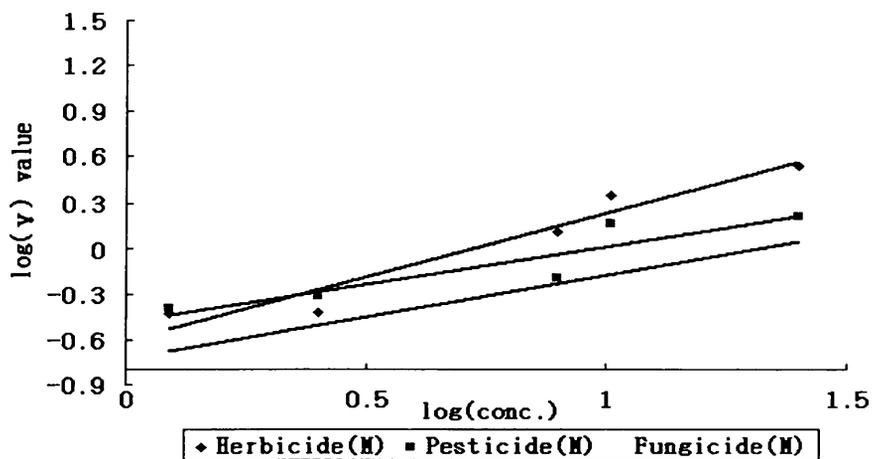


Fig. 24. The gamma(γ) value of each biocide(main component).

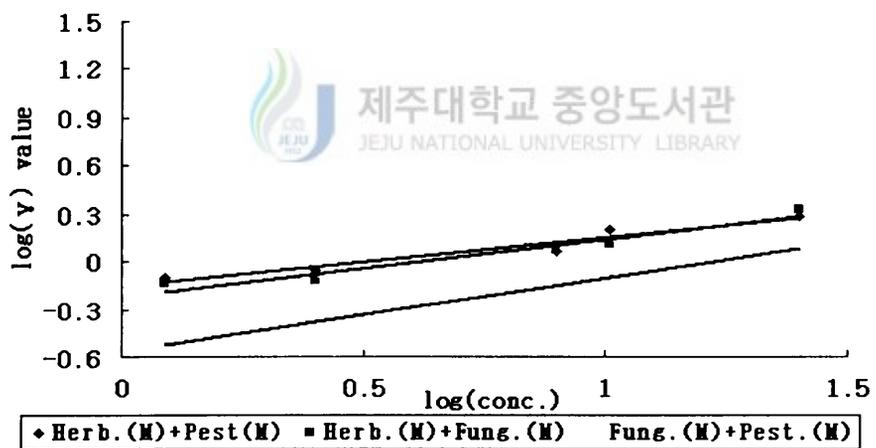


Fig. 25. The gamma(γ) value of mixing biocide(main component).

Table. 9 Trend line of EC₅₀ in each biocide

Product			Main Component		
Toxic substance	Trend line	R ²	Toxic substance	Trend line	R ²
Herbicide (dithiopyr+surfactant)	y=0.1832x +0.5061	0.9691	Herbicide (dithiopyr)	y=0.8328x -0.6006	0.9409
Pesticide (imidacloprid+surfactant)	y=0.6359x -0.0168	0.9957	Pesticide (imidacloprid)	y=0.4929x -0.479	0.8461
Fungicide (etr Diazole+surfactant)	y=1.6133x -1.8151	0.7628	Fungicide (etr Diazole)	y=0.5471x -0.7187	0.9924
Herb.+Pest. (dithiopyr+imidacloprid+ surfactant)	y=0.112x+ 0.7349	0.9732	Herb.+Pest. (dithiopyr+imidacloprid)	y=0.308x -0.1514	0.9372
Herb.+Fung. (dithiopyr+etr Diazole+ surfactant)	y=0.1244x +0.6123	0.8195	Herb.+Fung. (dithiopyr+etr Diazole)	y=0.3582x -0.2163	0.9379
Fung.+Pest. (etr Diazole+imidacloprid+ surfactant)	y=0.6745x -0.0142	0.9971	Fung.+Pest. (etr Diazole+imidacloprid)	y=0.4588x -0.5591	0.9549

Table. 10 EC₅₀ of each biocide of *C. reinhardtii* at 72 hour

Product			Main Component		
Toxic substance	EC ₅₀ (mg/l)	R ²	Toxic substance	EC ₅₀ (mg/l)	R ²
Herbicide (dithiopyr+surfactant)	0.0017	0.9691	Herbicide (dithiopyr)	5.26	0.9409
Pesticide (imidacloprid+surfactant)	1.06	0.9957	Pesticide (imidacloprid)	9.37	0.8461
Fungicide (etridiazole+surfactant)	13.3	0.7628	Fungicide (etridiazole)	20.58	0.9924
Herb.+Pest. (dithiopyr+imidacloprid+ surfactant)	2.7×10 ⁻⁷	0.9732	Herb.+Pest. (dithiopyr+imidacloprid)	3.10	0.9372
Herb.+Fung. (dithiopyr+etridiazole+ surfactant)	1.2×10 ⁻⁵	0.8195	Herb.+Fung. (dithiopyr+etridiazole)	4.01	0.9379
Fung.+Pest. (etridiazole+imidacloprid+ surfactant)	1.05	0.9971	Fung.+Pest. (etridiazole+imidacloprid)	16.5	0.9549

4. 편모재생저해 시험

4. 1 대조구의 재생 곡선

편모재생저해 실험에서는 *C. reinhardtii*의 편모의 시간에 따른 변화를 나타내었는데 *C. reinhardtii*의 편모는 통상 절단 후 약 2시간 까지는 약 $9\mu\text{m}$ 까지 빠른 속도로 재생되었고, 약 4시간 정도에서는 약 $10\mu\text{m}$ 로 안정적인 길이로 나타났다. 田中仁志(2001)의 결과에서도 마찬가지로 절단 후 약 2시간 까지는 편모들이 빠른 속도로 약 $12\mu\text{m}$ 까지 자라다가 4시간 그 이후에는 안정적인 길이를 나타내고 있다. 이 실험결과를 바탕으로 최종 관찰 시간을 4시간으로 정하였으며 시간 배정은 30분, 60분, 120분, 180분, 240분으로 정하여 50개의 *C. reinhardtii*를 관찰하였다(Fig. 26.).

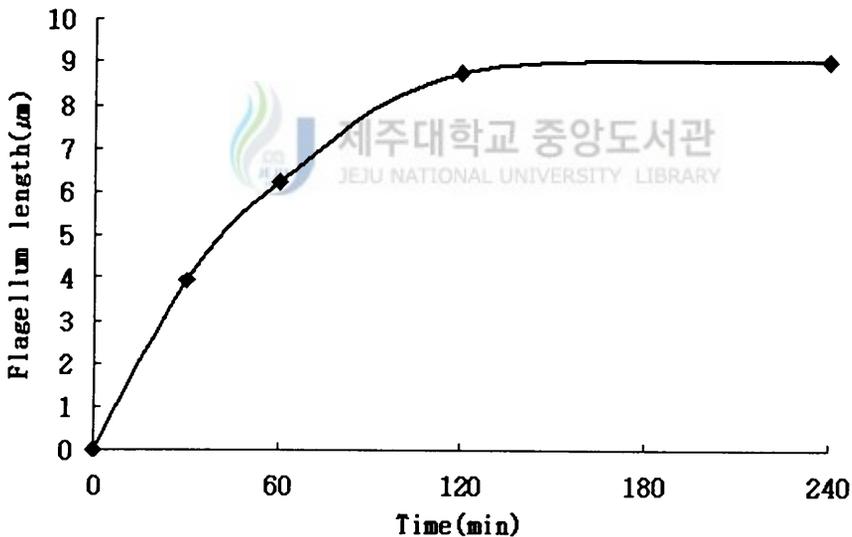


Fig. 26. The phase of flagellum regeneration in *chlamydomonas reinhardtii* of 50 cells.

4. 2 시판완제품 농약을 사용한 실험에서 *C. reinhardtii*의 편모재생저해

시판되고 있는 농약일때(Fig. 27.~32.)의 제초제, 살충제, 살균제, 제초제+살충제, 제초제+살균제, 살충제+살균제의 각각의 농도에서 편모재생저해 실험결과를 보면 제초제, 살충제, 살균제인 단일 농약일 때에는 농도가 높아질수록 *C. reinhardtii*의 편모재생길이는 짧아졌다. 하지만 편모재생저해 실험에서는 2.5mg/l에서는 살충제가 살균제보다 *C. reinhardtii*에게 큰 영향을 주고 있지만 12.5mg/l, 25mg/l에서는 살균제가 살충제보다 *C. reinhardtii*의 편모재생에 큰 영향을 주었다.

또한 실험시간에 따른 길이 재생을 보면 시간이 지남에 따라 *C. reinhardtii*가 농약에 순응을 해 조금씩 편모길이가 길어졌으며 농약종류별로 봐서는 제초제가 가장 큰 독성 영향을 미쳤고 살균제와 살충제 순으로 거의 비슷한 독성을 보였다. 이는 앞에서 EC₅₀인 결과와 비슷한 결과를 보였다. 제초제+살충제, 제초제+살균제, 살충제+살균제인 혼합농약 일 때도 단일 농약을 사용했을 때와 유사한 결과를 얻을 수 있었으며, 제초제+살균제가 가장 큰 독성을 보였으며, 제초제+살충제, 살충제+살균제 순으로 나타났다. 혼합농약일때도 농약의 농도가 증가할수록 편모재생능력은 떨어졌고 시간이 지남에 따라서는 편모가 재생은 하지만 단일 농약실험과 비교해 봐서는 많은 차이를 보였다. 이는 제초제가 *C. reinhardtii*의 광합성을 저해하고 또한 보조성분으로 사용된 계면활성제가 독성을 더하기 때문에 가장 영향을 크게 나타낸 것으로 판단된다.

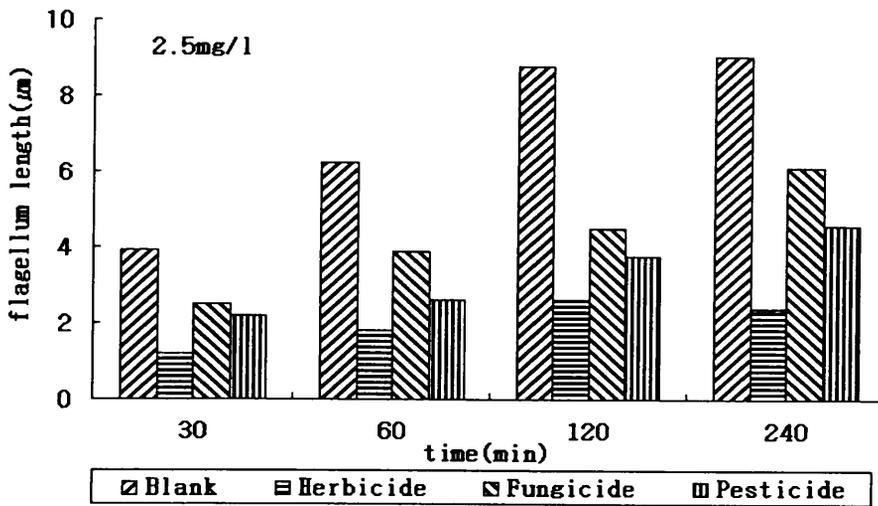


Fig. 27. The relative flagellum length response of *C. reinhardtii* to 2.5mg/l concentrations of the biocides(product).

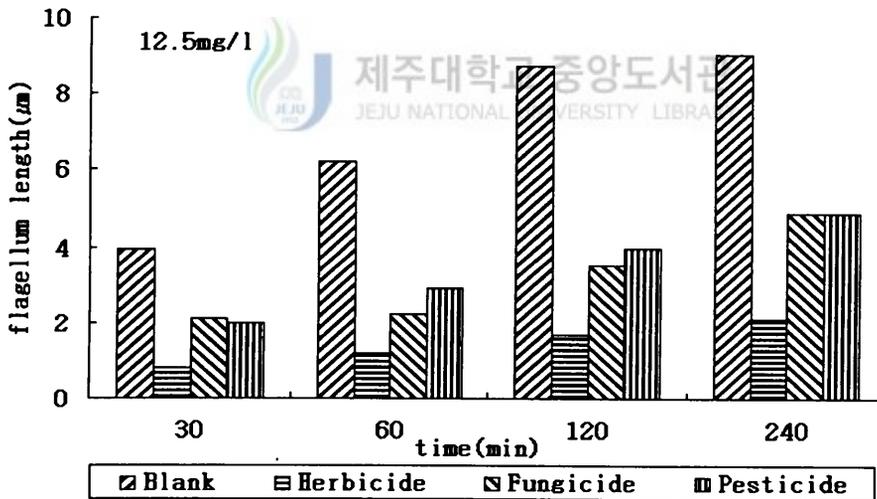


Fig. 28. The relative flagellum length response of *C. reinhardtii* to 12.5mg/l concentrations of the biocides(product).

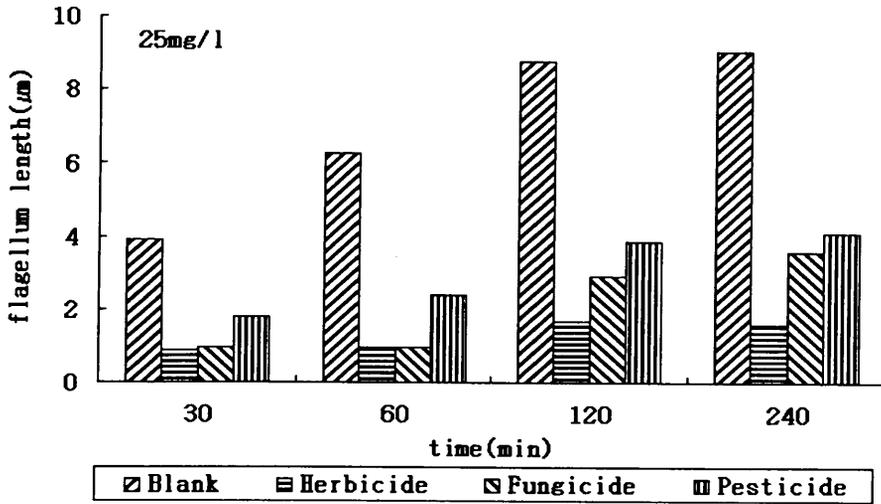


Fig. 29. The relative flagellum length response of *C. reinhardtii* to 25mg/l concentrations of the biocides(product).

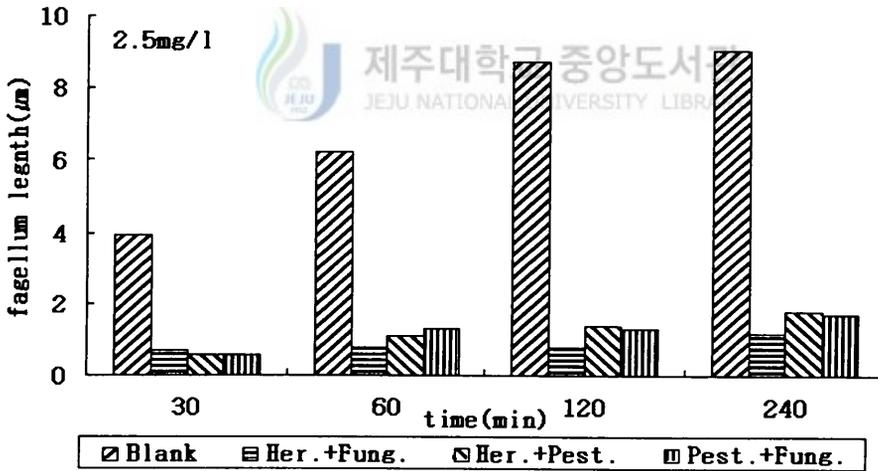


Fig. 30. The relative flagellum length response of *C. reinhardtii* to 2.5mg/l concentrations of the mixing biocides(product).

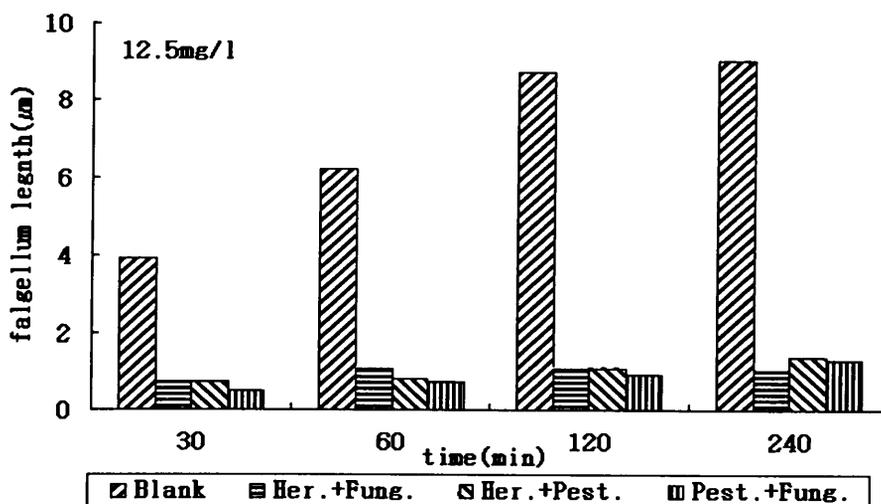


Fig. 31. The relative flagellum length response of *C. reinhardtii* to 12.5mg/l concentrations of the mixing biocides(product).

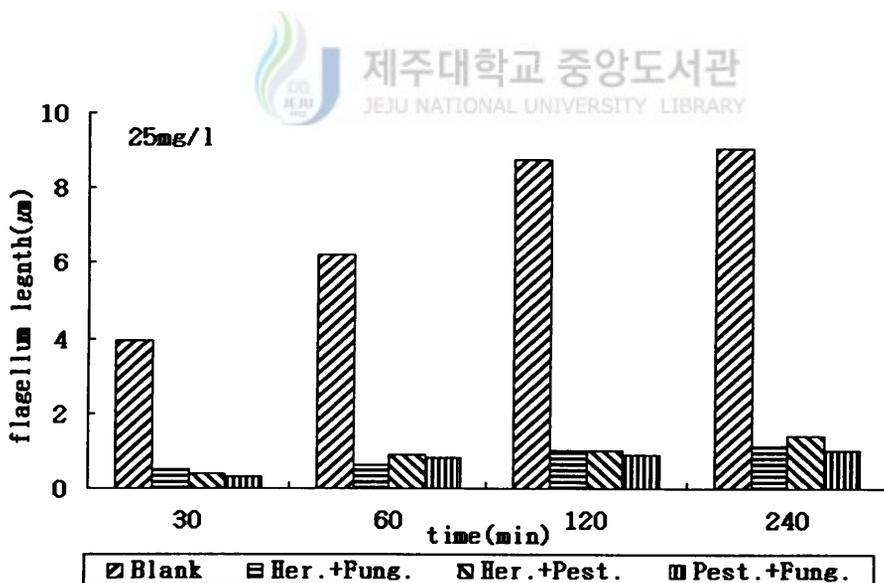


Fig. 32. The relative flagellum length response of *C. reinhardtii* to 25mg/l concentrations of the mixing biocides(product).

4. 3 주성분만을 사용한 실험에서 *C. reinhardtii*의 편모재생저해

각 농약들의 주성분만을 가지고 실험한 결과(Fig.33.~38.)를 보면, 농도에 따라서는 제초제가 가장 강하게 영향을 주었으며, 살충제와 살균제는 농도에 따라 높아지거나 낮아지는 경향을 보였고 농약의 종류별로 보아서는 제초제가 가장 강하게 미생물의 편모재생저해에 영향을 주었으며, 살균제가 살충제보다 좀더 강한 영향을 보였다. 또한 시간이 경과에 따른 편모재생에 관한 실험에서는 처음에는 거의 비슷한 수준으로 재생을 하다가 점차 차이가 많이 나는 것으로 나타났다. 특히 농도가 낮을수록 그 차이는 컸으며 농약의 종류에 따라서도 많은 차이를 보였다.

그리고 주성분을 혼합하여 사용한 제초제+살충제, 제초제+살균제, 살균제+살충제 실험에서는 제초제+ 살충제가 가장 강한 영향을 보였고, 그 다음으로 살균제+살충제, 제초제+살균제 순으로 크게 영향을 주었지만 시간의 경과와 농도에 따라 조금씩 다른 경향을 보였다. 그리고 주성분+보조성분일때와 주성분일때의 편모재생은 주성분 일때가 주성분+보조성분일때 보다 비교적 편모재생이 잘되고 있는 것으로 보아 보조성분으로 쓰인 계면활성제가 주성분의 독성에 한층 더 독성을 더하는 것으로 판단할 수 있으며 각 농약종류에 따른 *C. reinhardtii*에게 작용하는 작용기작이 다르기 때문이라고 판단된다.



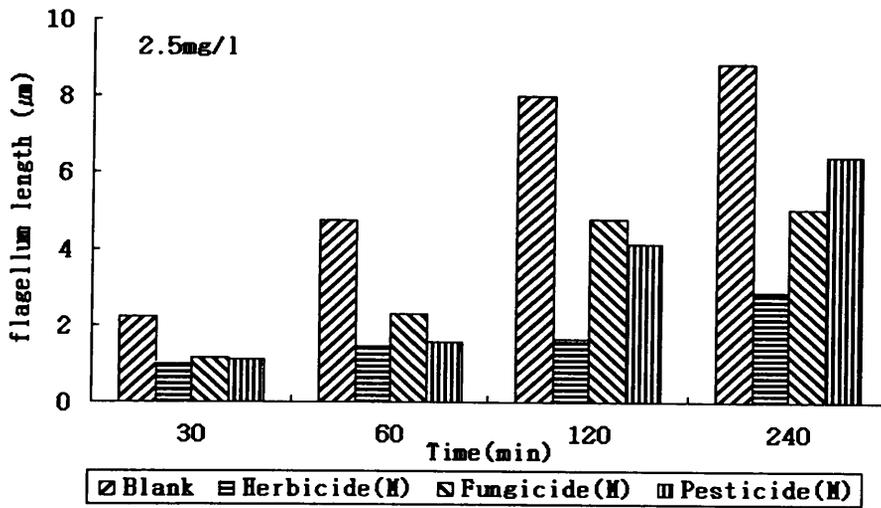


Fig. 33. The relative flagellum length response of *C. reinhardtii* to 2.5mg/l concentrations of the biocides(main component).

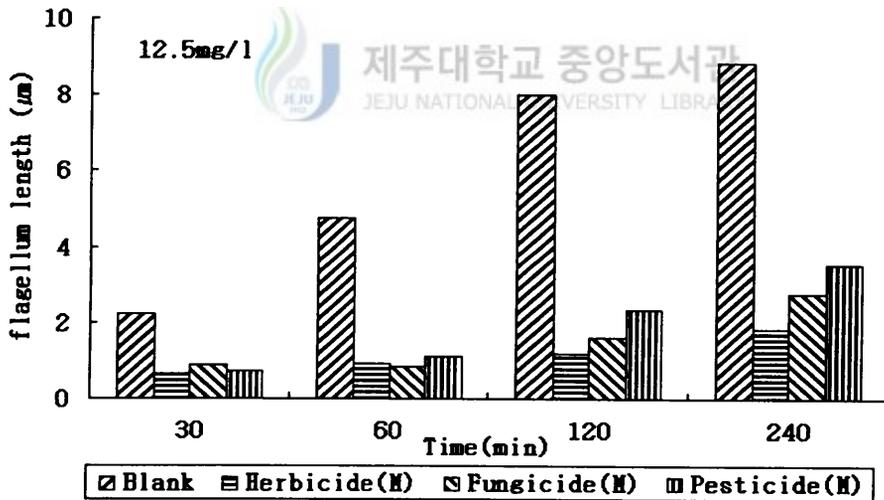


Fig. 34. The relative flagellum length response of *C. reinhardtii* to 12.5mg/l concentrations of the biocides(main component).

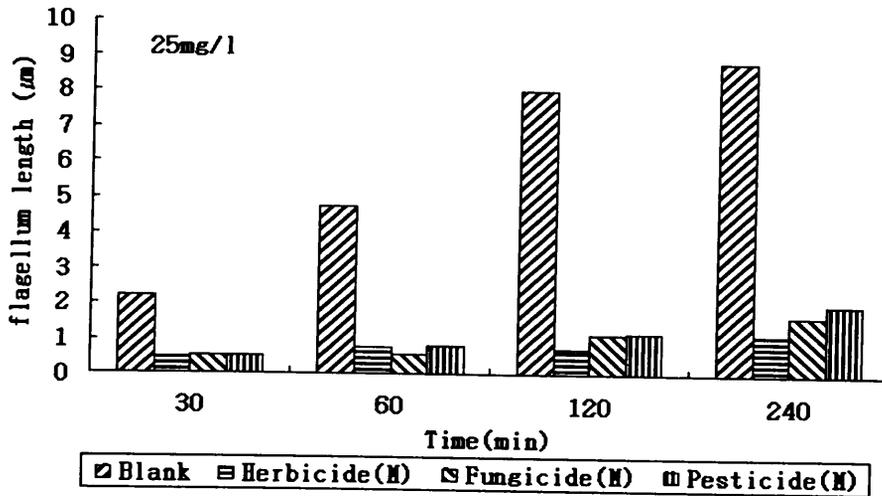


Fig. 35. The relative flagellum length response of *C. reinhardtii* to 25mg/l concentrations of the biocides(main component).

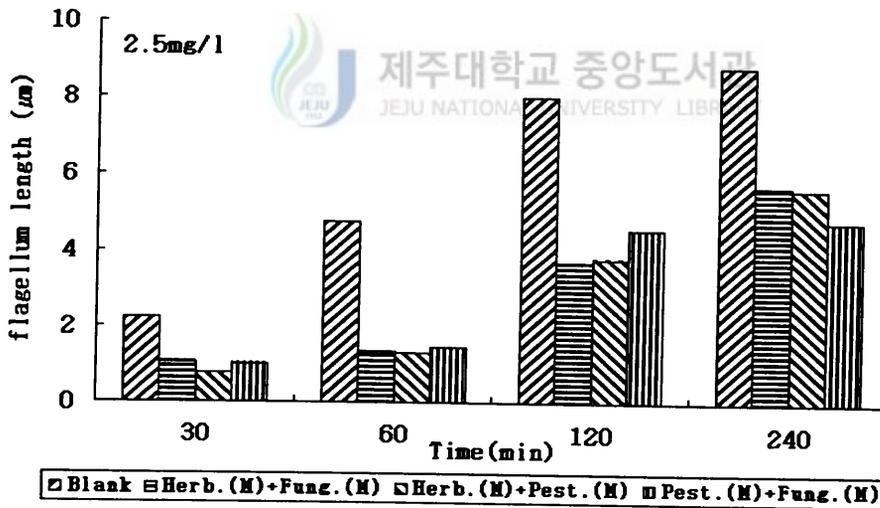


Fig. 36. The relative flagellum length response of *C. reinhardtii* to 2.5mg/l concentrations of the mixing biocides(main component).

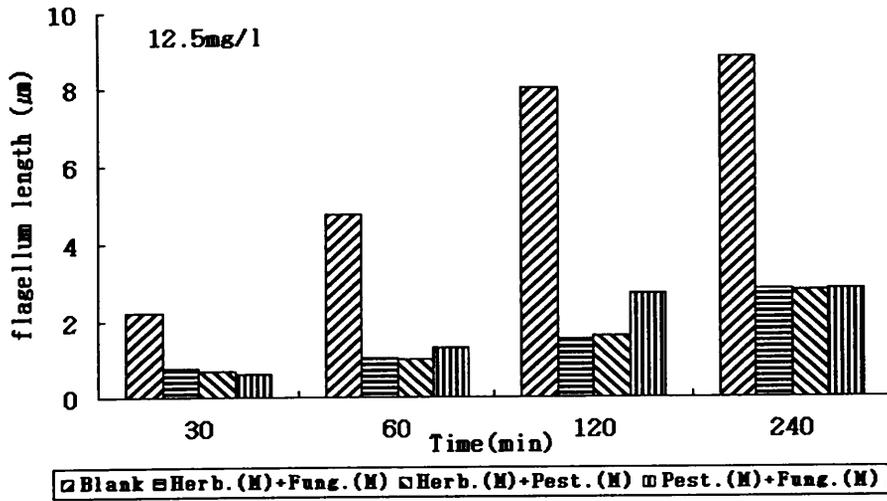


Fig. 37. The relative flagellum length response of *C. reinhardtii* to 12.5mg/l concentrations of the mixing biocides(main component).

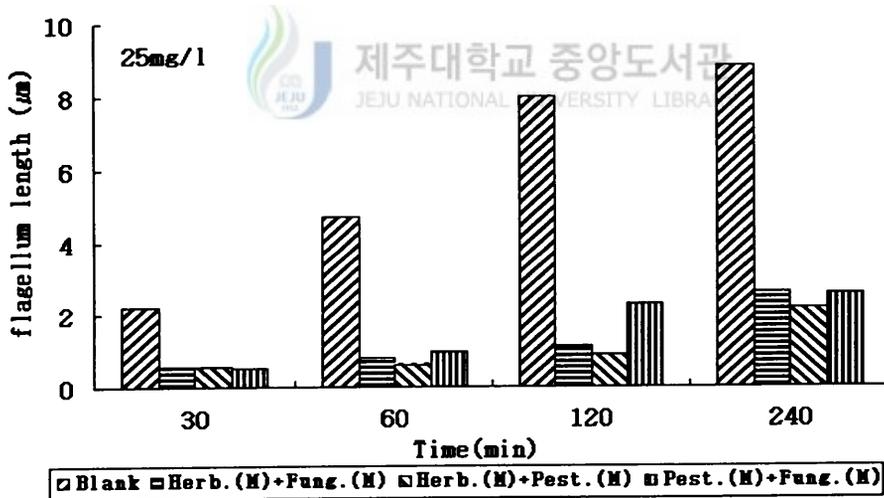


Fig. 38. The relative flagellum length response of *C. reinhardtii* to 25mg/l concentrations of the mixing biocides(main component).

V. 결 론

본 연구에서는 국내에서 다량 사용되고 있는 농약의 독성을 *C. reinhardtii*를 이용하여 관찰한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 시판되고 있는 농약을 이용하여 *C. reinhardtii* 성장량(OD660)을 측정한 결과, 제초제가 변화폭이 크게 나타났고 살충제와 살균제는 비슷한 경향을 나타냈다. 또한, 주성분만을 이용한 실험에서도 시판되고 있는 농약을 사용했을때와 비슷한 결과를 나타냈다.
2. 각 농약의 종류와 농도에 따른 *C. reinhardtii*의 평균비성장속도(μ)를 실험한 결과, 제초제일때가 가장 큰 영향을 주었고 혼합시 사용한 결과에서는 제초제+살충제가 큰 영향을 주었다. 또한 각 농약 종류별 농도에 따른 μ 는 농도가 높아질수록 μ 는 낮아지는 경향을 보였다. 이는 각 농약들의 주성분의 작용기작들의 차이에 따라 다르게 나타나는데 특히 제초제로 쓰인 농약의 성분인 dithiopyr가 광합성을 저해하는 성질이 있기 때문에 제초제가 보다 큰 영향을 준 것으로 판단된다.
3. 시판되고 있는 농약의 종류별 EC_{50} 을 계산한 결과, 단일 농약일때는 제초제, 살충제, 살균제가 각각 0.0017mg/l, 1.06mg/l, 13.3mg/l로 독성이 강하게 나타났으며, 혼합시에는 제초제+살충제, 제초제+살균제, 살충제+살균제 순으로 각각 2.7×10^{-7} mg/l, 1.2×10^{-5} mg/l, 1.05mg/l로 제초제+살충제가 가장 독성이 강하게 나타났다.
또한, 농약의 주성분만 가지고 실험한 결과에서는 제초제, 살충제, 살균제 순으로 각각 5.26mg/l, 9.37mg/l, 20.58mg/l로 제초제가 가장 독성이 강하게 나타났고 농약들을 혼합시 실험한 결과에서는 제초제+살충제, 제초제+살균제, 살충제+살균제 순으로 각각 3.10mg/l, 4.01mg/l, 16.5mg/l로 각각 독성이 강하게 나타났다.
4. 시판되고 있는 농약종류별로 *C. reinhardtii*을 이용한 편모재생저해실험을 행한 결과, 농약의 농도가 증가할수록 편모길이의 재생속도는 느리고, 시간이 지남에 따라서 편모길이는 조금씩 회복되는 경향을 나타냈고, 제초제가 가장 큰 영향을 미치고 있음을 알았다. 또한, 농약의 혼합 및 주성분을 이용한 편모재생저해 실험에서도 성장저해실험의 결과와 비슷한 경향을 나타냈다.

5. 독성평가 결과, 시판되고 있는 농약을 이용하였을 경우가 농약의 주성분만을 이용한 경우보다 독성이 높게 나타났다. 이러한 결과는 현재까지 진행되어온 농약의 주성분만을 이용한 독성평가로는 실제 환경 중에서의 독성에 대한 정확한 평가를 얻기가 곤란하다고 판단되며, 추후 보조성분만의 경우 어떠한 영향을 미치는지에 대해서 보다 많은 고찰이 필요하다고 판단된다.



VI. 참고문헌

- 권숙표, 1992, 합성세제와 환경 및 인간. 국립공업기술원, 제1회 합성세제에 관한 국제 심포지엄, 3~8
- 김경민, 서영훈, 신주옥, 이혜영, 정인실, 조은희, 하영미, 2003, 미생물학, 라이프사이언스
- 김양원, 1988, 독성학-원리와 시험방법, 동화기술
- 김은주, 이성규, 2001, 환경독성 평가를 위한 좁개구리밥의 성장저해시험법에 관한 연구, 한국환경독성학회지, 16(4), 205~209
- 류재천, 2002, 진보된 세포, 분자 독성평가기법, 한국농약과학회지, 6(3), 155~165
- 문성기, 이종남, 1995, 부산의 미소 조류군, 세종출판사, *Chlamydomonas* Index
- 아·태 환경경영연구원, 1994b, 합성세제의 환경영향 평가 및 안정성 평가를 위한 조사 연구 보고서, 25
- 아·태환경경영연구원, 1994a, 합성세제의 환경영향평가 및 안정성평가를 위한 조사 연구 보고서, 24
- 윤동선, 오종민, 박재영, 염철민, 1997, 접촉산화법을 이용한 LAS의 제거효율에 관한 연구, 한국수질보전학회 논문 초록집, 131~132
- 위성옥, 1999, 수계 microcosm을 이용한 계면활성제 및 산업폐수 등의 독성평가에 관한 연구
- 이은경, 1983, *Chlamydomonas reinhardtii*의 생장에 미치는 biocides의 영향
- 이 창균, 1990, *Chlamydomonas reinhardtii*의 생장에 미치는 환경오염원의 영향, 석사 학위 논문, 밀양대학교 대학원
- 이 창균, 채영규, 최영길, 1991, 카드뮴 저항성인 *Chlamydomonas reinhardtii*의 부분 특성, korean, journal of limnology 24(2), 93~98
- 임재명, 임경택, 조원득, 1990, 유동상에 의한 합성세제의 수중 생분해도 비교 연구, 한국수질보전학회, 9(2), 84~58
- 정영호, 김장익, 김정한, 이영득, 임치환, 허장현. 2000, 최신 농약학, 시그마프레스출판사. 158
- 정영호, 김장익, 김정한, 이영득, 임치환, 허장현. 2000, 최신 농약학, 시그마프레스출판사. 217
- 정영호, 김장익, 김정한, 이영득, 임치환, 허장현. 2000, 최신 농약학, 시그마프레스출판사, 253
- 정용, 이자경, 최윤호, 1993, 유지비누와 합성세제의 수중 생분해도 비교 연구, 한국수

- 질보전학회, 9(2). 84~85
- 최윤호, 정용, 1992, 계면활성제가 돌연변이원성 물질의 활성화에 미치는 영향, Kor, J. Environ. Toxicol, 7(4), 69~79
- 홍사육, 1984, 하천수중의 음이온 계면활성제 농도와 인의 관계, 한국 육수 학회지, 17(31) 1~3
- 홍사육, 1989, 합성세제의 일반지식, 한국 수질보전학회지, 5(2), 1~14
- 홍사육, 1989, 합성세제의 일반지식, 한국수질보전학회지, 5, 1~14
- 황인영, 1997, 생물학적 지시자에 의한 수질오염 평가, 심포지움(인제대학교)
- Alsop, G. M., G. T. Waggy, and R. A. Conway, 1980, Bacterial Growth Inhibition Test, JWECF., 52(10), 2452~2456
- ANAS(1989) Biological Markers in Pulmonary Toxicology, American National Academy Press, Washington,DC
- APHA., AWWA., WPCF, 1989, Standard Methods : For the Examination of Water and wastewater, 17th ed., American Public Health Association, Wasington.
- Bitton, G., B. Koopman, 1986, Biochemical tests for toxicity screening. In Toxicity testing using Toxicity testing using microorganisms, Ed., By Bitton, G., Dutka, B. J., 1(1), CRC Press, Boca Rattess, Boca Raton, FL. 27~55
- Bitton, G. and B. Koopman, 1999a, Bacterial and enzymatic bioassays for toxicity testing in the environmen toxicity testiesting in the environment, Rev. Environ Contam. Toxicol., 125, 1~22
- Blaise, C., 1991, Microtests in aquatic ecotoxicology : Characteristics, utility, prospects. Environ. toxicol. Water Qual., 6, 145~155
- Böhm, H.H. H. Müller, 1976, Model studies on the accumulation of herbicides by microalage, Naturwissenschaften, 63, 296
- Britz, M. L., N. Simonov, and U. -H. Chun, 1997b, Stabilization of bioluminescence of Immobilized *Photobacterium phosphoreum* and Monitoring of Environmental Pollutants, J. Microbiol. Biotchnol., 7(4), 242~249
- Brynhildsen, L.. Lundgren, B.V., Allard, B., and Rosswall, T., 1988, Effects of glucose concentrations of cadmium, copper, mercury and zinc toxicity to a *klebsiella sp.* Appl. Environ. Microbiol. 54, 1689~1693
- Bulich, AA. 1984, Microtox-a bacterial toxicity test with several environmental applications In Toxicity screening procedures using bacterial systems. Lui, D., and B.J. Dutka (Eds.). Marcel Dekker, New York, 55~64
- Bulich, AA., M.W. Greene and D.L. Isenberg, 1981, Reliability of the bacterial luminescence assay for determination of the toxicity of pure compounds and complex effluents In: Aquatic toxicology and hazarnts assessment, 4th conference,

- STP 737. Branson D. R. and K.L. Dickson (Eds). American Society Testing and Materials, Philadelphia, PA, 338~347
- Christian Blaise, Takashi Kusui, 1997, John & Sons, inc.
- Dutton, B.J., G. Bitton, Koopman, B., 1986, Toxicity testing using microorganisms, 2, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Hashimoto, Y., E.Okubo, T, Ito, M. Yamaguchi and S. Tanaka. 1982, Changes in susceptibility of carp to several pesticides with growth, J. Pesticide Sci., 7, 457~461
- <http://megasun.bch.umontreal.ca/protists/chlamy/summary.html>
- Insecticide Factsheet, 2001, Imidacloprid, Journal of Pesticide Reform, 21(1)
- James V. Bruckner. 1999, Differences in Sensitivity of Children and Adult to Chemical Toxicity : The NAS Panel Report. Regulatory Toxicology and Pharmacology 31, 280~285
- Kamrin, M. A., 1997, Environmental risk harmonization: Federal/State Approachs to Risk assessment and Management. Regulatory toxicology and Pharmacology 25, 158~165
- Kwan, K.K. and B.J. Dutka, 1992a, A novel bioassay approach Direct application of the Toxi-Chromotes and SOS Chromotest to sediments Environ Toxicol, Water Qual, 7, 49~60
- Liu, D and B.J. Dutka, 1984, Toxicity screening procedures using bacterial systems Marcel Dekker, New York, 476
- Mallak, F. P. and R. L. Brunner, 1984, Determination of the Toxicity of Selected Metalworking Fluid Preservatives by Use of the Microtox System and an *in vitro* Enzyme Assay, 65~76, In D. Liu and B. J. Dutka(ed.), Toxicity Screening Procedures using Bacterials Systems, Marcel Dekker, Inc., New York.
- Mazur, B. J., Faclo, S. C., 1989, The development of herbicide resistant crops, Ann., Rev., Plant., Physiol., Mol., Biol., 40, 441~470
- MeisterPRO, 2001, Farm Chemicals Handbook
- Milton J. Rosen, 1989, Surfactants and Interfacial Phenomena. John Wiley & Sons, Inc. 3~4
- Munkittrick, K.R., EA Power and G.A. Sergy, 1991, The relative sensitivity of Microtox, daphnids, rainbow trout, and fathead minnow acute lethality tests Environ Toxicol Water Qual, 6, 35~62
- OECD. 1999, Detailed Review Document on Classification Systems for Germ Cell Mutagenicity in OECD Member Countries OECD series on testing and assessment.
- Parsons, T. R., Maita, Y., and Lalli, C. M. 1985, A Manual of Chemical and

- Biological Methods of Seawater Analysis, 99-107. pergamon press. oxford.
- Patin, S.a., 1982, Pollution and the Biological Resources of the Oceans. 80~109, Butterworth Scientific Press. Londen.
- Peliter, WH, C.I Weber, 1985, Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms, 3rd. ed, EPA-600/4-85/013, US Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH
- Ramanathan, S., Ensor, M. and Daunert, S., 1997, Bacterial Biosensors for Monitoring Toxic Metals, TIBTECH. 15(12), 500~506
- Reed, N. R., 1998, Health risk assessment-overview
- Renata Rojickova-Padrtova, Blahoslav Marsalek., 1999, Seleycion and Sensitivity Comparisons of Algal Species for Toxicity Testing, chemoshere, 38(14), 3329~3338
- Roberts, S., Vasseur, P. and Dive, D., Combined effects between atrazine, copper and pH on target and nontarget species, Water Res. 24, 485~491
- Rochaix, J. D., Dron, M., Vallet, J.M., Erickson, J., 1983, *Chlamydomonas reinhardtii* : A Model System for studying the biosynthesis of the photosynthetic apparatus : In Meleclar Genetics of Plants and Animals, 81~100, Academic Press, Oxford
- Rochaix, J. D., Mayfield, S., Goldschmit, C. M., and Erickson, J. 1988, Molecular biology of *Chlamydomonas* : In Plant Molecular Biology. 253~25, IRL PRESS. Oxford.
- Sager, R. and S. Granick, 1953, Ann, N, Y, Acad, Sci, 56, 831~838 or <http://biology.ecsu.ctstateu.edu/chlamyteach/growthmedia.htm>
- Sielken, R. L. 2000, Risk Metrics and Cumulative Risk Assessment Methodology for the FQPA. Regulatory Toxicology and Pharmacology 31, 300~307
- Smith, L. L. Jr.1978, Endpoints in bioassy, In; Proceedings of the 1st-2nd USA-USSR symposium on the effects of pollutants upon aquatic ecosystems, EPA, 600/3-78-076
- Sugiyama, T., K. Oba, K. Ruijwara, 1972, Annual Report of the institute of food microbiology, Chiba University 25, 41~43
- Sushila krishnaswamy-Chang, 1997, Bifllated Unicellular Algae as Detectors of Pesticide Contamination in Water, 44, 487~502
- Tamara S. Galloway, Nicholas Millward, Mark A. Browne, Michael H. Depledge, 2002, Rapid assessment of organophosphorous/carbamate exposure in the bivalvemollusc *Mytilus edulis* using combined esterase activities as biomarkers, 61, 169~180
- US EPA, 1989a, Algal (*Selenastrum capricornutum*) growth test. In Short- term

- methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. EPA/600/4-89/001 US Environ Prot Agency, Cincinnati, OH 147~174
- US/EPA, 1997, Code of federal registration
- US/EPA. 2001, Benomyl and carbendazim - endpoint selection for incidental oral ingestion for carbendazim
- US/EPA. 2001, Benomyl RED Facts.
- US/EPA. 2001, Fundamentals of Pesticide Risk Assessment
- US/EPA. 2001, Revised occupational and residential risk assessment for carbendazim
- Van Dyk, T. K., W. R. Majarian, K. B. konstantinov, R. M. Young, P. S. Dhurjati, and R. A. Larossa, 1994, Rapid and sensitive pollutant detection by induction of heat shock gene-bioluminescence gene fusions, Appl. Environ. Microbiol., 60(5), 1414~1420
- WHO, 2000~2002, The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification
- Wong, W.H., 1989, Toxicity test of landfill leachate using *Sarotherodon mossambicus* (Freshwater fish), Ecotox. Environ. Safe, 17, 149~156
- Yamamoto, I and J. Fukami, 1979, Pesticide Design. Soft Sci. Inc Tokyo, p, 1061~1062
- 日本規格協会, 1990, 界面活性剤用語解説, 代表的な界面活性剤の分類と名称. 東京, 23~25
- 奥山春彦, 皆川基, 1990a, 洗剤. 洗淨の事典 朝倉書店, 713
- 中村悦郎, 木村, 1983, 生物検定法と應用推計學, 東京廣川書店
- OECDガイドライソネ, 1984, 藻類生長阻害試験, 323~331
- 高田秀重(Takata), 1990, 多摩川およびその支流における直銷アルキルベンゼンスルホン酸鹽(LAS)の下流に伴う除去過程, 237~238
- 田中仁志, 金主鉉, 西村修, 中村省吾, 李容斗, 2001, 單細胞綠藻クラミドモナスの鞭毛の機能に注目した迅速なバイオアッセイ, 日本水處理生物學會誌, 21, 109
- 田中仁志, 金主鉉, 西村修, 海渡ゆり子, 齊藤茂雄, 佐々木弘, 2003, 藻類生長阻害試験による水田地帯流下流下する河川の生態影響評價, 用水と廢水, 45(8), 743~750

용어 정리

- ACh(acetylcholine): 콜린의 아세트산에스테르로서 염기성 물질. 신경의 자극을 근육에 전달하는 물질.
- ADI (Acceptable Daily Intake):일일허용 섭취량.
- 생애를 통해 연속해 매일 노출을 받아도 유해한 영향을 받지 않는 노출량.
- Biocide : 살(殺)생물제(herbicide(제초제), fungicide(살균제)등의 총칭); 살생, 생명파괴
- Biomarkers(생물학적 지시자): 독성물질의 노출에 따라 생물체내에서 발생하는 탐지 가능한 제반 생리,생화학적 변화를 나타내는 지시자를 총칭하는 용어.
- Carotenoid: 당근의 색소인 카로틴에 유사한 색소군.
- Colony: 군집.
- EC₅₀ (50% Effective Concentration): 반수영향 농도(수성독성) 대조구에 비해 성장 또는 생장율을 50%감소시키는 공시물질 농도.
- FQPA(Food Quality Protection Act): 식품품질 보호법.
- IC₅₀ (50% Inhibition Concentration): 반수 치사농도.
- 일회의 노출로 일군의 시험 동물의 50%를 사망시키는 공기중의 물질 농도.
- LD₅₀ (Lethal Dose 50% kill): 반수치사량.
- 시험 동물군의 50%가 사망예상되는 통계학적인 시험물질의 일회의 경구투여량.
- MRL (Maximum Residue Limit): 최대잔류허용기준.
- NOEL(No Observed Effect Level): 무유해성 영향량.
- 독성시험에 있어서 투여물질의 유해한 영향이 장기적으로 미치지 않는 최고의 노출량.
- O.D(Optical Density): 광화학 밀도.
- Reference Dose(기준선량): 기준이 되는 양.
- Safety Factor or Uncertainty Factor: 재료의 기준강도와 허용용력의 비를 구하는 계수. 안전율이라고도 한다.
- Synapse: 신경섬유의 말단은 가지가 나누어지고 그 끝은 주머니 모양으로 부풀어 다른 뉴런의 세포체 또는 시상돌기와 접촉하여 시냅스를 만든다.
- Threshold(역치): 최소 한계값.

감사의 글

본 연구를 위하여 처음부터 끝까지 지도와 격려를 하여주신 이 용두 교수님께 진심으로 감사드리며 도움의 말씀을 아끼지 않으신 오 윤근 교수님, 허 목 교수님, 허 철구 교수님, 감 상규 교수님, 이 기호 교수님, 조은일 교수님께도 감사로 드립니다. 또한 원고작성과 조언을 해주신 고 인범 선배님을 비롯한 많은 선배님들에게 감사드리고, 실험을 할 때 옆에서 도와준 홍 성민 후배를 비롯한 여러 후배들에게도 고마움을 느낍니다. 또한, 어려울때 옆에서 슬친구가 되준 동네 친구들에게도 감사로 드립니다. 그리고 저를 길러주시고 보살펴주신 부모님께 깊은 감사로 드리고, 옆에서 항상 도움을 준 누님들과 매형들에게도 감사로 드립니다. 마지막으로 사랑하는 이 은혜! 고맙다.

