

살균제 Tebuconazole이 한국산 개구리류(두꺼비, 청개구리, 참개구리) 배아 발달에 미치는 영향

이해범, 고선근^{1,*}

전남대학교 대학원 생물과학·생명기술학과, ¹호남대학교 물리치료학과

Effects of fungicide tebuconazole on the embryonic development of Korean domestic frogs (*Bufo gargarizans*, *Hyla japonica*, and *Pelophylax nigromaculatus*)

Hae-Bum Lee and Sun-Kun Ko^{1,*}

Graduate School of Biological Sciences and Biotechnology, Chonnam University, Gwangju 61186, Republic of Korea

¹Department of Physical therapy, Honam University, Gwangju 62099, Republic of Korea

***Corresponding author**

Sun-Kun Ko

Tel. 062-940-5432

E-mail. sunkun@honam.ac.kr

Received: 31 May 2021

First Revised: 8 August 2021

Second Revised: 3 September 2021

Revision accepted: 6 September 2021

Abstract: In this experiment, we investigated the toxicity of tebuconazole (fungicide) using domestic frog embryos, along the FETAX (Frog Embryo Teratogenesis Assay-*Xenopus*) protocol. *Bufo gargarizans*, *Hyla japonica*, and *Pelophylax nigromaculatus* embryos were incubated, and investigation of the tebuconazole effect was performed by the probit analysis. As a result, depending on the concentrations of tebuconazole, the mortality and malformation rates were increased and larval body length was decreased. The teratogenic concentrations (EC₅₀) of tebuconazole were 34.4 mg L⁻¹, 10.6 mg L⁻¹, and 14.9 mg L⁻¹, respectively, and the embryo lethal concentrations (LC₅₀) of tebuconazole were 74.7 mg L⁻¹, 38.5 mg L⁻¹, and 39.1 mg L⁻¹, respectively. The teratogenic index (TI) values of tebuconazole were 2.19, 3.58, and 2.65; thus, it showed teratogenicity in embryonic development of these three frogs. These results revealed that in this experiment, tebuconazole suppressed the development of embryos at a relatively low concentration. In addition, mortality, malformation ratios, malformation patterns, and growth rates were similar to the results from the other assay systems. Therefore, tebuconazole was thought to have an effect on the embryo development of domestic frogs. In future, it will be necessary to identify species specificity in order to the clarify the causes of differences in mortality, malformation rate, and malformation patterns depending on the species.

Keywords: pesticides, teratogenicity, *Bufo gargarizans*, *Hyla japonica*, *Pelophylax nigromaculatus*

서 론

최근 새로운 화학물질들이 다양하게 개발되어 그 종류

와 사용량이 급증하고 있다. 그중 농약은 독성의 강도에 따라 저독성(IV급), 보통독성(III급), 고독성(II급), 맹독성(I급)으로 구분되며, 농약에 대한 포유동물의 반수치사약량

(LD₅₀)을 기준으로 구분하고 있다. 이외에도 수도용 농약의 특성에 따라 어류를 대상으로 하는 어독성 기준이 있으며, 발암성, 신경독성, 생식독성 등을 별도의 특수독성으로 구분하여 취급하고 있다(KCPA 2015).

Tebuconazole{1-(4-Chlorophenyl)-4,4-dimethyl-3-(1,2,4-triazol-1-ylmethyl)pentan-3-ol}은 Triazole계 살균제로 균사의 ergosterol 생합성을 저해하는 작용을 하여 농작물의 흰가루병, 부재병, 흑수병, 점무늬병 등에 대한 방제효과를 나타내는 것으로 알려져 있다(Tomlin 2000). Tebuconazole의 경우 벼의 키다리병 방제를 위한 종자소독부터 잎집무늬마름병 방제, 도복경감 등을 위해 유수형성기, 수잉기, 출수기까지 사용되며, 이외에도 사과, 고추, 복숭아, 잔디 등 다양한 작물에 균 방제를 위해 이용되는 것으로 알려져 있다(KCPA 2015; NIER 2020).

Tebuconazole은 척추동물에 경구투여하였을 때 rat에서 LD₅₀이 암, 수 각각 1,700 mg kg⁻¹, 4,000 mg kg⁻¹, mice에서 300 mg kg⁻¹이었고, 경피독성(LD₅₀)은 rat의 암·수 모두 5,000 mg kg⁻¹ 이상을 나타내는 것으로 보고되었다(FAO 1994). 또 다른 연구에서는 임신한 rat에 tebuconazole을 투여한 후 태어난 새끼들을 조사한 결과 암컷 rat은 남성화하고 수컷 rat은 젖꼭지가 달리는 여성화가 관찰되었다(Taxvig et al. 2007, 2008).

국제적으로 공인된 시험법으로 개구리의 배아를 활용하여 화학물질에 대한 독성평가와 환경오염물질의 독성에 의한 기형유발 시험법으로 Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus (FETAX) 방법이 널리 사용되고 있다(Fort et al. 1988; Bantle et al. 1990; Presutti et al. 1994; Morgan et al. 1996). FETAX 기법은 남아프리카산 발톱개구리(*Xenopus laevis*)의 수정란에서 배아단계를 거쳐 올챙이로의 발달 단계를 활용하는 활용성이 매우 높은 시험기법으로 알려져 있다(Bantle et al. 1996). 그러나 같은 시험물질에 노출된다고 하더라도 종에 따른 감수성에 차이가 있어(Hoke and Ankley 2005) 정확한 독성 여부를 판단하고 보호대책을 마련하기 위해서는 해당 종에 대한 실험이 필요하다.

이러한 FETAX 기법에 따라 농약류인 tebuconazole에 의한 최기형성 여부 등을 평가하여 주로 농경지를 중심으로 번식이 이루어지는 한국 토착 양서류인 두꺼비(*Bufo gargarizans*)와 청개구리(*Hyla japonica*), 참개구리(*Pelophylax nigromaculatus*)의 배아발달에 미치는 독성효과를 확인하고자 한다.

재료 및 방법

1. 시험동물

시험에 사용했던 두꺼비(*B. gargarizans*)는 광주광역시 광산구 운수동에 위치한 운수제에서 청개구리(*H. japonica*)와 참개구리(*P. nigromaculatus*)는 광주광역시 광산구 등임동 산막제 인근에서 각 종의 번식시기에 맞춰 포집 중인 암·수 성체를 직접 채집하여 사용하였다.

2. 배양액 제조

Amphibian Ringer 용액(AR; 6.6 g L⁻¹ NaCl, 0.15 g L⁻¹ KCl, 0.15 g L⁻¹ CaCl₂, 0.2 g L⁻¹ NaHCO₃, 0.05 g L⁻¹ Streptomycin, 0.03 g L⁻¹ Penicillin G)을 제조하여 pH 7.4로 맞추어 사용하였다.

3. 수정란 채취 및 배양

포집중인 암·수를 채집하여 실험실에서 자연 배란 및 수정과정에 의해 출현된 2세포의 배아들 중 세포질이 정확히 나누어져 균일한 할구들을 가진 정상배아들을 선택하여 예리한 포셉으로 젤리층을 제거하고 24±1°C에서 낭배기까지 배양하여 시험에 사용하였다(Johnson and Volpe 1973; Mathews 1986).

4. 시험물질 처리

Tebuconazole (농업진흥청 제공)은 DMSO에 녹여 1,000 mg L⁻¹ stock solution으로 제조한 후 이를 AR 용액으로 희석하여, 한국산 개구리류 배아 발달에 미치는 영향 중 사망률, 기형률 및 기형양상을 조사하기 위해 두꺼비 배아에 tebuconazole 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 mg L⁻¹, 청개구리와 참개구리의 배아에 tebuconazole 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 mg L⁻¹를 각각 처리 후 그 효과를 대조군과 비교하였다. 유리 배양접시에 시험물질이 농도별로 포함된 실험군과 시험물질이 포함되지 않는 대조군의 배양액 10 mL에 낭배기까지 배양된 배아들을 각 시험물질에 농도별로 30개씩 노출시킨 후 24±1°C의 온도에서 96시간 배양하였다. 매 24시간마다 새로운 용액으로 교환하였으며 시험물질의 농도는 5개 이상으로 정하여 실시하였고 모든 농도구간에 대해 각기 다른 개체에서 채취한 배아들을 사용

하여 ASTM FETAX guideline에 따라 3회 이상 반복 시험 하였다(ASTM 1998).

5. 결과처리 및 분석

각 농도별 사망률은 24시간마다 관찰하여 죽은 것을 제거하고 96시간 후 생존된 것을 3% formalin에 고정하고, 이들 고정된 개체들을 대상으로 기형 개체 수 및 양상을 조사하였다. 그 결과들을(죽은 개체수/노출 개체수)×100으로 계산하여 한 농도의 사망률을 구하였다. 기형률은 96시간 배양 후 생존한 tadpole을 개체당 머리, 복부 및 꼬리 등 각 부위별로 기형 여부를 조사하였다. 정상적인 tadpole의 범위에서 벗어나면 기형으로 판정하였으며 96시간 후 생존한 개체 중(영향을 받은 개체수/영향을 받지 않은 개체수)×100으로 계산하여 한 농도의 기형률을 구하였다. 사망률과 기형률 값을 대상으로 probit analysis (SPSS 25.0)를 활용하여 반수치사농도(LC₅₀), 반수영향농도(EC₅₀)를 구하였으며 아울러 96h LC₅₀ 값을 96h EC₅₀ 값으로 나누어 Teratogenic Index (TI)를 구하여 TI 값이 1.5 이상이면 유해성이 있는 물질로 판정하였다(Bantle *et al.* 1985). 기형의 종류는 정상발생 올챙이를 기준으로 올챙이 꼬리가 파상을 나타내는 양상, 꼬리가 휘어지는 양상 등을 관찰

하여 꼬리기형으로 판정하였고 복부의 돌출현상 등을 관찰하여 복부기형으로 판정하였다. 또한, 몸 전체에 형성된 수포(물집)의 형성을 관찰하여 수포형성기형(Edema)으로 판정하였다(Bantle *et al.* 1998). 배아의 발달과정과 시험물질이 성장에 미치는 영향을 조사하기 위해 AM-423x와 Dinocapture 2.0 프로그램(Dunwell Tech, US)을 사용하여 배아의 직경 및 유생의 머리끝부터 꼬리 끝까지의 전체 장의 길이를 측정하고 Independent t-test (신뢰한계 95%, $p < 0.05$)를 통해 대조군과 실험군의 유의성을 분석하여 성장에 미치는 영향을 확인하였다(SPSS 25.0).

결 과

1. 두꺼비 배아 발달에 미치는 tebuconazole의 효과

치사율의 경우 60 mg L⁻¹부터 6.7%의 비율로 나타나기 시작하여 70 mg L⁻¹에서 40%, 80 mg L⁻¹에서 46.7%의 비율로 농도가 높아짐에 따라 배아의 치사비율도 증가하였으며, 전치사 농도는 90 mg L⁻¹로 나타났다(Fig. 1A). 기형 배아는 30 mg L⁻¹에서부터 6.7%의 비율로 나타나기 시작하여 40 mg L⁻¹에서는 66.7%의 기형률을 나타내었으며 50

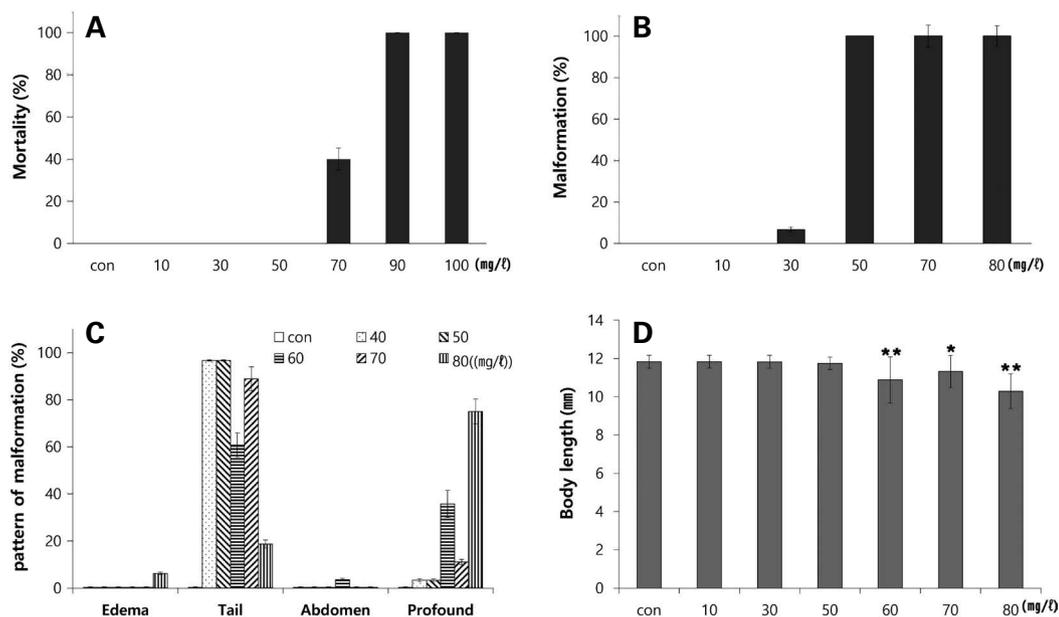


Fig. 1. Frequencies of the mortality (A), malformation (B), pattern of malformation (C), and body length (D) in tebuconazole treated *Bufo garizans* embryos. Error bars indicate standard deviation, and asterisks indicate a significant difference from control (0 mg L⁻¹). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

mg L⁻¹ 이상부터는 100%의 기형률을 나타내었다(Fig. 1B). Tebuconazole에 의한 기형은 농도에 따라 20 mg L⁻¹에서는 복합기형(100%)이 확인되었으며, 40 mg L⁻¹에서는 꼬리기형(96.7%), 복합기형(3.3%), 60 mg L⁻¹에서는 꼬리기형(60.7%), 복부기형(3.5%), 복합기형(35.7%), 80 mg L⁻¹에서는 수포기형(6.3%), 꼬리기형(18.7%), 복합기형(75.0%)을 나타내었다(Fig. 1C). 배아의 성장에 미치는 영향을 조사한 결과 대조군(11.8 ± 0.3 mm)에 비해 tebuconazole의 농도가 60, 70, 80 mg L⁻¹로 증가함에 따라 유생의 체장은 10.9 ± 1.2, 11.3 ± 0.8, 10.2 ± 0.9 mm로 감소하여 나타났다(Fig. 1D). Tebuconazole의 효과 중 반수치사농도(LC₅₀)는 75.4를 나타내었고 반수기형유발농도(EC₅₀)는 34.4를 나타내었으며 tebuconazole에 의한 배아의 기형성 지수(Teratogenesis Index; TI)의 값은 2.19를 나타내어

tebuconazole은 두꺼비 배아 발달에 최기형성 물질로 작용함을 알 수 있었다(Table 1).

2. 청개구리 배아 발달에 미치는 tebuconazole의 효과

치사율의 경우 10 mg L⁻¹에서부터 죽는 배아들이 2.5%의 비율로 나타나기 시작하여 40, 50 mg L⁻¹로 농도가 높아지면서 치사율도 45.0, 100.0%로 증가하는 것이 확인되었다(Fig. 2A). 기형은 10 mg L⁻¹부터 53.9%의 비율로 확인되기 시작하여 치사율과 마찬가지로 20, 30, 40 mg L⁻¹로 농도가 높아지면서 그 비율이 94.7, 100.0, 100.0%로 증가하였다(Fig. 2B). Tebuconazole의 영향에 의해 나타난 기형양상은 수포형성기형과 복합기형이 대부분을 이루었으며, 복합기형을 제외하면 수포형성기형의 비율이 다른 기형 종류

Table 1. LC₅₀, EC₅₀ (malformation), and TI (teratogenesis index) of *Bufo gargarizans*, *Hyla japonica*, and *Pelophylax nigromaculatus* embryos exposed to tebuconazole

Species	Exposure time (hr)	LC ₅₀ (mg L ⁻¹)	EC ₅₀ (mg L ⁻¹)	TI (LC ₅₀ /EC ₅₀)
<i>Bufo gargarizans</i>		75.4	34.4	2.19
<i>Hyla japonica</i>	96	38.2	10.6	3.58
<i>Pelophylax nigromaculatus</i>		39.6	14.9	2.65

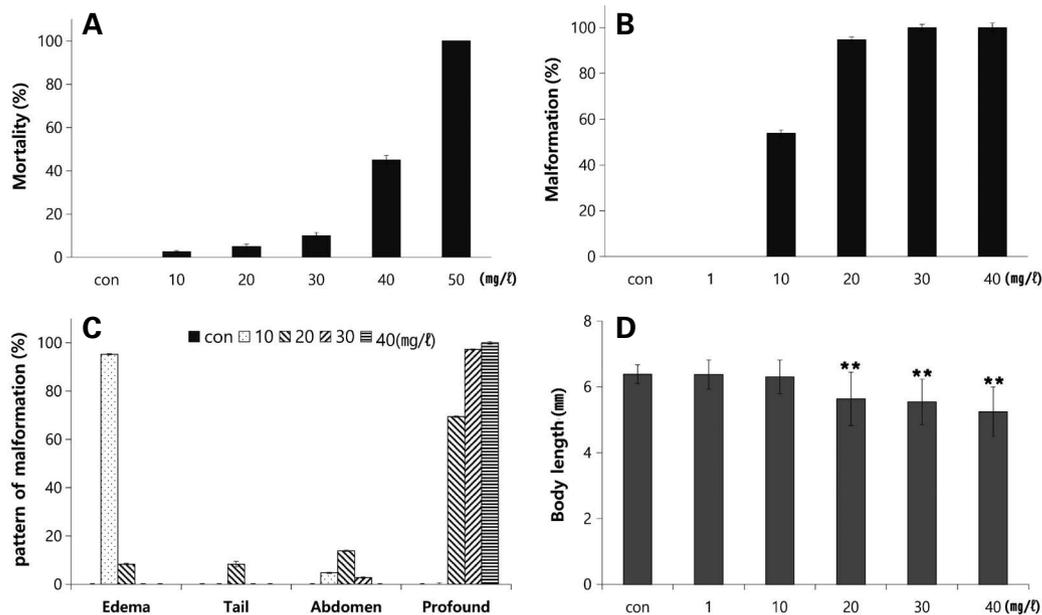


Fig. 2. Frequencies of the mortality (A), malformation (B), pattern of malformation (C), and body length (D) in tebuconazole treated *Hyla japonica* embryos. Error bars indicate standard deviation, and asterisks indicate a significant difference from control (0 mg L⁻¹). *p < 0.05, **p < 0.01.

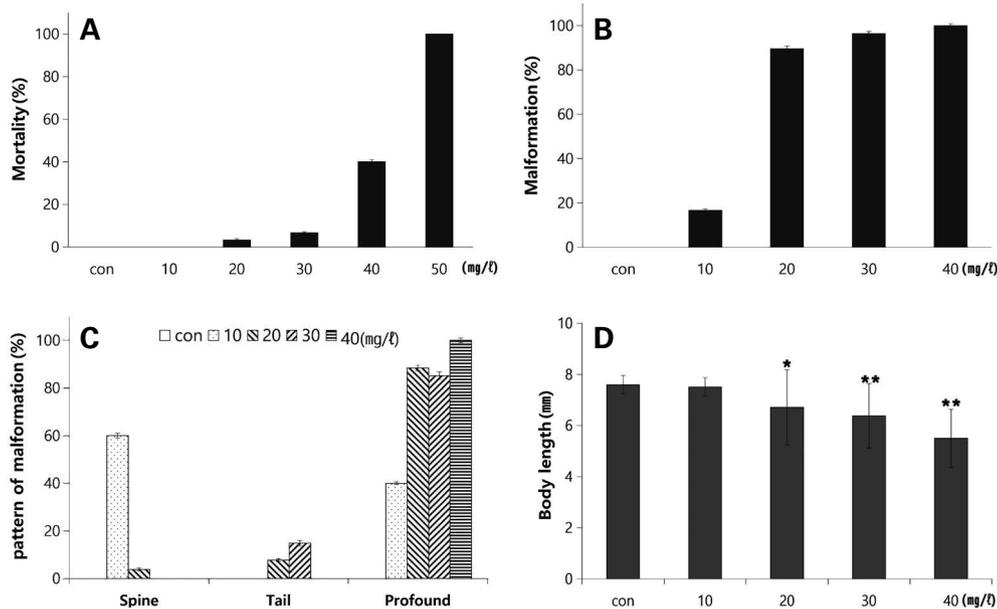


Fig. 3. Frequencies of the mortality (A), malformation (B), pattern of malformation (C), and body length (D) in tebuconazole treated *Pelophylax nigromaculatus* embryos. Error bars indicate standard deviation, and asterisks indicate a significant difference from control (0 mg L⁻¹). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

에 비해 높은 비율을 차지했다. 이들의 비율을 농도별로 살펴보면 EC₅₀을 나타내는 농도보다 낮은 10 mg L⁻¹의 농도에서는 수포형성기형의 비율이 높게 관찰되었고 EC₅₀보다 높은 20 mg L⁻¹ 이상의 농도에서는 복합기형의 비율이 높게 나타났다(Fig. 2C). 배아의 성장에 미치는 영향을 조사한 결과 대조군(6.6 ± 0.4 mm)의 체장에 비해 tebuconazole에 노출된 배아의 체장은 농도가 12.5, 20 mg L⁻¹로 증가함에 따라 6.3 ± 0.3, 5.5 ± 0.8 mm로 대조군에 비해 체장이 감소하여 나타났다(Fig. 2D). 청개구리의 배아에 대한 tebuconazole의 LC₅₀은 38.2를 나타내었고 EC₅₀은 10.6를 나타내었으며 TI는 3.58를 나타내었다(Table 1).

3. 참개구리 배아 발달에 미치는 tebuconazole의 효과

치사율을 조사한 결과 20 mg L⁻¹에서부터 죽는 배아들이 3.3%의 비율로 나타나기 시작하여 40, 50 mg L⁻¹로 농도가 높아지면서 40.0%, 100.0%로 치사율도 각각 증가하였다(Fig. 3A). 기형은 10 mg L⁻¹에서부터 16.7%의 비율로 나타나기 시작하였으며 20, 30 mg L⁻¹로 농도가 높아지면서 96.4, 100.0%로 증가하였다(Fig. 3B). Tebuconazole의 영향에 의해 나타난 기형의 종류는 척추기형, 꼬리기형, 복합기형 등이 나타났으며 복합기형의 비율이 다른 기형 종류에

비해 높았다(Fig. 3C). 배아의 성장에 미치는 영향을 조사한 결과 대조군(7.6 ± 0.4 mm)에 비해 tebuconazole의 농도가 20, 40 mg L⁻¹로 증가함에 따라 유생의 체장은 6.7 ± 1.5, 5.5 ± 1.1 mm로 감소하여 나타났다(Fig. 3D). Tebuconazole에 의한 참개구리 배아의 LC₅₀은 39.6를 나타내었고 EC₅₀은 14.9, TI는 2.65를 나타내어 최기형성물질로 작용하는 것으로 나타났다(Table 1).

고 찰

Tebuconazole의 시험결과 두꺼비, 청개구리, 참개구리 각각의 LC₅₀은 75.4, 38.2, 39.6 mg L⁻¹였으며, 모든 배아는 농도가 증가함에 따라 치사되는 비율도 증가하여 농도에 의존하여 치사율이 증가하는 경향을 나타냈다. 체장의 경우 tebuconazole의 시험결과 각각의 대조군에 비해 농도가 증가함에 따라 유생의 체장은 감소하여 나타났다. Tebuconazole의 처리 결과 두꺼비, 청개구리, 참개구리 각각의 EC₅₀은 34.4, 10.6, 14.9 mg L⁻¹로 나타났으며, 기형양상은 수포형성기형, 척추기형, 꼬리기형, 복합기형 등을 나타내었고, 농도에 의존하여 기형률이 증가하였다(Fig. 4). Tebuconazole에 의한 기형성지수(Teratogenic Index; TI)

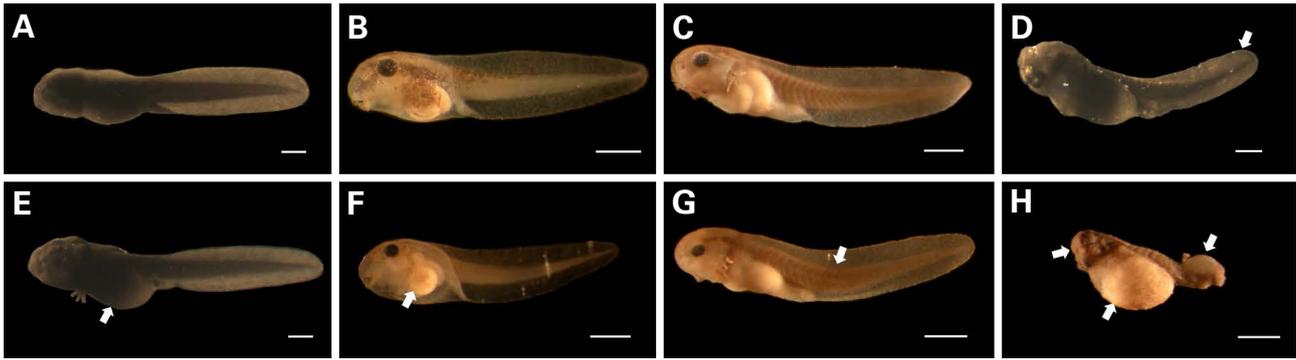


Fig. 4. Various malformations of *Bufo gargarizans*, *Hyla japonica*, and *Pelophylax nigromaculatus* tadpoles exposed to tebuconazole. (A) *B. gargarizans* control. (B) *H. japonica* control. (C) *P. nigromaculatus* control. (D) *B. gargarizans* tadpole after 96 hour exposure to 50 mg L⁻¹ tebuconazole displaying tail abnormality. (E) *B. gargarizans* tadpole after 96 hour exposure to 40 mg L⁻¹ tebuconazole displaying abdominal abnormality. (F) *H. japonica* tadpole after 96 hour exposure to 10 mg L⁻¹ tebuconazole displaying edema abnormality. (G) *P. nigromaculatus* tadpole after 96 hour exposure to 20 mg L⁻¹ tebuconazole displaying spine abnormality. (H) *P. nigromaculatus* tadpole after 96 hour exposure to 40 mg L⁻¹ tebuconazole displaying propound abnormality. White arrows indicate abnormality sites. Bars represent 1 mm.

는 각각 두꺼비 2.19, 청개구리 3.58, 참개구리 2.65로 계산되었으며, 이러한 기형성 지수는 1.5보다 값이 클 때 시험 물질이 최기형성을 갖는 것으로 판단하게 된다(Bantle *et al.* 1985). 따라서, tebuconazole은 실험에 노출된 모든 개구리 배아발달에 최기형성 물질로 작용하는 것으로 나타났다. 두꺼비의 경우 2~3월에 저수지나 농경지를 중심으로 번식이 이루어지는 것으로 알려져 있으며, 청개구리와 참개구리는 물이 고인 농경지일대에 산란하며 4~7월 사이에 번식이 이루어지는 것으로 알려져 있다(Yang *et al.* 2001; Ministry of Environment 2011). Tebuconazole의 경우 주로 봄철 잔디에 발병하는 라이족토니아마름병과 벼의 유수형성기, 수잉기, 출수기에 맞춰 6월말에서 8월까지 이삭 누룩병, 잎집무늬마름병 방제를 위해 사용되며, 이외에도 감, 고구마, 고추, 더덕, 인삼 등 다양한 작물에 적용되고 있다(KCPA 2015; NIER 2020). 잔디의 식재가 많은 골프장의 경우 유출수에 농약이 포함되어 지표수 및 지하수로 유입될 가능성이 있으며(Toshinari *et al.* 1998; Candela *et al.* 2007), 미국 내 골프장을 대상으로 20년간 모니터링 결과 지표수 및 지표수에서 농약 검출기준을 초과한 경우도 확인되었다(Baris *et al.* 2010). 식품의약품안전처에서 정한 잔류농약검출기준의 경우 쌀과 땅콩, 도라지 같은 경우 0.05 mg kg⁻¹부터 깻잎, 부추 15 mg kg⁻¹, 호프(Hop) 40 mg kg⁻¹까지 허용되고 있으며, 농약 제품의 경우도 12.5%의 원액을 2,000배로 희석하여 사용하고 있어 두꺼비를 제외한 청개구리와 참개구리의 LC₅₀ 농도 이상, EC₅₀의 경우 모두 농도 이상으로 노출될 가능성이 있는 것으로 확인되었다(KCPA

2015). 미국의 경우 캘리포니아 지역에 서식하는 Pacific chorus frog (*Pseudacris regilla*)의 최대 60%의 개체들에서 체내 tebuconazole이 검출되었고, 개체 전체 조직 검사에서 최대 250 µg kg⁻¹ 이상의 농도로 tebuconazole 검출되어 양서류 체내에 생물농축 가능성이 확인되었다(Smalling *et al.* 2013). 따라서, 농경지를 중심으로 번식이 이루어지는 양서류의 특성상 직·간접적인 유입을 통해 배아 발달에 영향을 미칠 수 있을 것으로 생각된다.

또한, 두꺼비, 청개구리, 참개구리의 결과들을 *Xenopus laevis* 배아에 tebuconazole이 노출되었을 때 배아발달에 미치는 효과와 비교해보면, *X. laevis*의 경우 LC₅₀이 82.35 µmol L⁻¹ (MW 307.82)로 나타났으며 농도 증가에 따른 체장의 길이가 감소하고, 수포(edema), 수종(blisters), 장(gut) 형성 이상에 의한 복부기형, 심장기형 등이 확인되어 본 실험과 유사한 경향을 나타내었다(Hwang *et al.* 2010). 또한, *X. tropicalis*에 tebuconazole이 노출된 경우 LC₅₀ 7.29 mg L⁻¹ 이상, EC₅₀ 2.76 mg L⁻¹의 영향을 나타냈으며, 복부 쪽 색소과소침착(hypopigmentation)이 확인되었다(Li *et al.* 2016). 이러한 기형성에 있어 기형양상이나 성장저해 등은 종에 상관없이 유사한 패턴을 나타냈는데 이는 혈액과 근육의 발달을 저해하는 것으로 알려져 있는 tebuconazole에 의한 특성으로 여겨진다(Hwang *et al.* 2010). 그러나 tebuconazole에 의한 반수치사농도(LC₅₀) 및 반수영향농도(EC₅₀)는 노출된 종에 따라 차이를 나타내는 것으로 확인되었다.

이상의 결과들로 보아 본 실험에서 사용된 개구리들의

배아들은 tebuconazole의 낮은 농도에 민감하게 반응하여 배아발달에 영향을 미쳐 최기형성물질(teratogen)로 작용하는 것으로 판단되어지며, 개구리들의 종에 따라 치사율 및 기형률 등의 차이를 나타내는 원인을 명확히 파악하기 위해서는 개구리들의 종에 따라 서로 다른 난자의 크기와 같은 종 특이적 특성 등을 규명하는 연구가 더 필요할 것으로 여겨진다.

적 요

국내에 서식하는 개구리들의 배아를 이용하여 살균제인 tebuconazole의 독성을 파악하기 위해 FETAX (Frog Embryo Teratogenesis Assay-*Xenopus*) 기법에 따라 두꺼비 (*Bufo gargarizans*), 청개구리(*Hyla japonica*), 참개구리(*Pelophylax nigromaculatus*)의 배아를 배양하면서 tebuconazole의 효과를 probit 분석법으로 조사하였다. 그 결과, tebuconazole의 농도에 의존하여 유생의 체장 길이는 감소하고 치사율과 기형률은 증가하였으며 tebuconazole의 teratogenic concentration (EC_{50})은 각각 34.4, 10.6, 14.9 mg kg⁻¹을 나타내었고 embryo lethal concentrations (LC_{50})은 75.4, 38.2, 39.6 mg kg⁻¹을 나타내었다. Teratogenic index (TI = LC_{50}/EC_{50})는 각각 2.19, 3.58, 2.65을 나타내어 두꺼비, 청개구리, 참개구리 배아 발달에 최기형성 물질로 작용함을 알 수 있었다. 이상의 결과들로 보아 tebuconazole은 낮은 농도에서 개구리 배아의 발달에 민감하게 반응하였으며 치사율, 기형률, 성장률, 기형양상 등을 기존의 연구들과 비교하였을 때 유사한 결과를 나타내어 국내 서식하는 개구리류 배아발달에 영향을 미칠 수 있는 것으로 여겨지며, 종에 따라 치사율 및 기형률, 기형양상 등의 차이를 나타내는 원인 등을 명확히 파악하기 위해서 종 특이적 특성 등을 규명하는 연구가 더 필요할 것으로 여겨진다.

REFERENCES

- ASTM. 1998. Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay-*Xenopus* (FETAX). ASTM E1439-98. American Society for Testing and Materials. Philadelphia, PA.
- Bantle JA and CL Courchesne. 1985. The combined use of genotoxicity and whole embryo teratogenicity screening assays in predicting teratogenic risks. pp.175-176. In: Proceedings of the Second International Conference on Ground-Water Quality Research. Oklahoma State University Press. Stillwater, OK.
- Bantle JA, DJ Fort, JR Rayburn, DJ Deyoung and SJ Bush. 1990. Further validation of FETAX: evaluation of the developmental toxicity of five known mammalian teratogens and non-teratogens. Drug Chem. Toxicol. 13:267-282.
- Bantle JA, JN Dumont, RA Finch and G Linder. 1998. Atlas of Abnormalities: a Guide the Performance of FETAX. Oklahoma State University. Stillwater, OK.
- Bantle JA, RA Finch, DT Burton, DJ Fort, DA Dawson, G Linder, JR Rayburn, M Hull, M Kumsher-King, AM Gaudet-Hull and SD Turley. 1996. FETAX interlaboratory validation study: phase III - part 1 testing. J. Appl. Toxicol. 16:517-530.
- Baris RD, SZ Cohen, NL Barnes, J Lam and Q Ma. 2010. Quantitative analysis of over 20 years of golf course monitoring studies. Environ. Toxicol. Chem. 29:1224-1236.
- Candela L, S Fabregat, A Josa, J Suriol, N Vigués and J Mas. 2007. Assessment of soil and groundwater impacts by treated urban wastewater reuse. A case study: Application in a golf course (Girona, Spain). Sci. Total Environ. 374:26-35.
- FAO. 1994. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy.
- Fort DJ, DA Dawson and JA Bantle. 1988. Development of am- etabolic activation system for the frog embryo teratogenesis assay *Xenopus* (FETAX). Teratogenesis Carcinog. Mutagen. 8:251-264.
- Goh EH and AW Neff. 2003. Effects of fluoride on *Xenopus* embryo development. Food Chem. Toxicol. 41:1501-1508.
- Hoke RA and GT Ankley. 2005. Application of frog embryo teratogenesis assay *Xenopus* to ecological risk assessment. Environ. Toxicol. Chem. 24:2677-2690.
- Hwang YG, MJ Lee, YH Lee, SW Cheong and CS Yoon. 2010. Toxic effects of fungicide tebuconazole on the early development of African clawed frog, *Xenopus laevis*. J. Environ. Sci. 19:1001-1012.
- Johnson RE and EP Volpe. 1973. Patterns and experiments in developmental biology. pp. 7-9, 215-227. In: Observation and Experiments on the Living Frog Embryo. William C. Brown Co. Dubuque, IA.
- Li D, M Liu, Y Yang, H Shi, J Zhou and D He. 2016. Strong lethality and teratogenicity of strobilurins on *Xenopus tropicalis* embryos: Basing on ten agricultural fungicides. Environ. Pollut. 208:868-874.
- KCPA. 2015. Guideline of Crop Protection Products (pesticides). Korea Crop Protection Association. Seoul.
- Mathew WW. 1986. Atlas of Descriptive Embryology. Forth edition. Macmillan Pub. Co. New York. p. 54.
- Ministry of Environment. 2011. Amphibians & Reptiles of Namdo.

- Ministry of Environment. Sejong, Korea.
- Morgan MK, PR Scheuerman, CS Bishop and RA Pyles. 1996. Teratogenic potential of atrazine and 2,4-D using FETAX. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* 48:151-168.
- NIER. 2020. Guideline for the Safe Use of Pesticides on Golf Course Lawn. National Institute of Environmental Research. Incheon, Korea.
- 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.* 53:405-411.
- Suzuki T, H Kondo, K Yaguchi, T Maki and T Suga. 1998. Estimation of leachability and persistence of pesticides at golf courses from point-source monitoring and model to predict pesticide leaching to groundwater. *Environ. Sci. Technol.* 32:920-929.
- Taxvig C, U Hass, M Axelstad, M Dalgaard, J Boberg, HR Andeasen and AM Vinggaard. 2007. Endocrine-disrupting activities in vivo of the fungicides tebuconazole and epoxiconazole. *Toxicol. Sci.* 100:464-473.
- Taxvig C, AM Vinggaard, U Hass, M Axelstad, S Metzdorff and C Nellemann. 2008. Endocrine disrupting properties in vivo of widely used azole fungicides. *Int. J. Androl.* 31:170-177.
- Tomlin CD. 2000. *The Pesticide Manual: A World Compendium* (No. ed. 12). British Crop Protection Council. Alton, UK.
- Yang SY, JB Kim, MS Min, JH Suh and YJ Kang. 2000. *Monograph of Korean Amphibia*. Academybook Press. Seoul.