



ORIGINAL ARTICLES

## 제초제 3종(alachlor, oxadiargyl, pendimethalin)의 독성평가를 통한 개구리밥 성장저해시험법 비교

윤창영\*† · Bala Murali Krishna Vasamsetti† · 전경미 · 황소정 · 김주영 · 박경훈

<sup>1</sup>농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부 독성위해평가과

## Comparison of Duckweed Growth Inhibition Test Methods Based on the Evaluation of Alachlor, Oxadiargyl and Pendimethalin

Chang-Young Yoon\*†, Bala Murali Krishna Vasamsetti†, Kyongmi Chon, Sojeong Hwang, Juyeong Kim, and Kyeong-Hun Park

Toxicity and Risk Assessment Division, Department of Agro-Food Safety and Crop Protection, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, 166, Nongsaeogmyeong-ro, Iseo-myeon, Wanju-gun, Jeollabuk-do 55365, Republic of Korea

(Received on November 14, 2025. Revised on December 2, 2025. Accepted on December 2, 2025)

**Abstract** Pesticides are crucial to enhance crop yields but pose a risk to aquatic ecosystems when they diffuse into water bodies through runoff or drift and potentially impact primary producers like aquatic plants. Due to their rapid growth rate and genetic uniformity, Duckweed (Lemnaceae) species are widely accepted as standard test organisms in aquatic toxicity assessments. Our study compared the sensitivity of two standard growth inhibition test methods, OECD TG 221 using *Lemna minor* and ISO 20227 using *Spirodela polyrhiza*, to assess the toxicity of three herbicides with different modes of action: alachlor, oxadiargyl, and pendimethalin. All test substances showed concentration-dependent responses in both test methods, confirming the validity of the toxicity assessments. There was an approximate 1.0 to 2.7 difference in value of the median effective concentration (EC<sub>50</sub>) derived from the two methods, which is within the acceptable range of interspecies variation and assay conditions. Specifically, alachlor exhibited similar sensitivity across both methods. In contrast, oxadiargyl and pendimethalin demonstrated greater sensitivity in the OECD TG 221 method. These results suggest that although ISO 20227 is a valuable, rapid, and cost-effective screening tool to assess herbicide toxicity, it carries the potential risk of underestimating the toxicity of herbicides with delayed or slow mode of action, such as pendimethalin. To fully evaluate the two standard growth inhibition test methods (OECD TG221, ISO 20227) and to understand how they complement each other in assessing herbicide toxicity, it is recommended to perform further research that incorporates a broad spectrum of pesticides.

**Key words:** Herbicide, ISO 20227, *Lemna minor*, OECD TG 221, *Spirodela polyrhiza*

### 서론

농약은 농작물의 피해를 경감시키고 수확량을 증대시켜 농업 발전에 중요한 역할을 수행한다. 그러나 살포된 농약의

일부는 비산(drift), 유출(runoff) 또는 용탈(leaching)을 통해 수계로 이동하며, 이는 잠재적으로 수생태계에 영향을 미칠 수 있다(Ueda and Nagai, 2021; EFSA, 2013). 이러한 오염은 조류나 수생식물과 같은 1차 생산자의 성장과 종의 변화를 일으켜 생태계 기능을 저하시킬 수 있다(Nagai, 2019). 따라서 농약에 대한 환경 위해성평가 시 수생식물에 대한 독성을 평가하는 것은 필수적이다.

개구리밥과(Lemnaceae) 식물은 단순한 형태 구조, 빠른

†The authors contributed equally to this work

\*Corresponding author

E-mail: evermoo2600@korea.kr

생장 속도, 유전적 균일성을 가지고 있어 수생 독성시험에서 표준 시험생물로 널리 사용되고 있다(Wang and Williams, 1990; Kumar and Han, 2010). Lemnaceae는 *Spirodela*, *Lemna*, *Wolffia* 등 5속 36종으로 구성된 배양이 용이한 피자식물로 알려져 있다(Fourounjian et al., 2021). 이러한 개구리밥을 이용한 독성시험은 잎의 수와 면적과 같은 지표를 통해 시험물질의 독성을 평가할 수 있다(Ziegler et al., 2016). 이와 같은 특성으로 수질오염 모니터링(Ziegler, Sree, and Appenroth 2019), 중금속 연구(Khellaf and Zerdaoui, 2009; Hou et al., 2007), 농약 독성평가 등 다양한 분야에서 개구리밥을 이용하여 관련 연구가 수행되고 있다.

수생식물의 독성을 평가하기 위해 널리 사용되는 표준 시험법으로는 OECD test guideline(TG) 221과 ISO 20227 이 있다(OECD, 2006b; ISO, 2017). OECD TG 221은 7일간의 시험물질 노출 후 잎의 수와 총 면적 등을 기반으로 *Lemna minor* 또는 *Lemna gibba*의 생장량과 수율을 평가하는 시험이다. 반면, ISO 20227은 *Spirodela polyrhiza*의 turion을 이용하여 72시간 동안 단기 시험을 수행한다(Baudo et al., 2015). 두 시험법은 모두 높은 신뢰성을 보이지만 시험생물의 종 차이와 노출기간, 배양조건의 차이로 인해 독성 민감도 차이가 발생할 수 있다.

제초제는 작물의 잡초 방제를 위해 사용되지만 식물의 특정 생리대사 경로를 저해하기 때문에 조류나 수생식물에 대해 높은 독성을 나타낼 수 있다(Vonk and Kraak, 2020). Alachlor (2-chloro-2',6'-diethyl-N-(methoxymethyl)acetanilide)는 chloracetamide계 제초제로 잔디와 광엽잡초 방제에 사용되며 옥수수, 콩, 수수 재배지에서 널리 사용된다(Deal and Hess, 1980). 이러한 alachlor의 광범위한 사용은 환경에 영향을 미칠 수 있으며 실제로 미국 중서부 지역의 지하수에서 검출된 바 있어 환경적 영향에 대한 우려가 제기되고 있다(Schwab et al., 2006). Pendimethalin(N-(1-ethylpropyl)-2,6-dinitro-3,4-xylidine)은 dinitroaniline계 제초제로 파종 전이나 발아 전 토양처리제로 사용된다(Vighi et al., 2017). Pendimethalin은 European Food Safety Authority(EFSA)에서 재평가가 진행되었으며, 환경 내 잔류성과 조류를 포함한 수생생물에 대해서 높은 독성이 보고되었다(Authority et al., 2025). Oxadiargyl(3-[2,4-dichloro-5-(2-propynyloxy)phenyl]-5-(1,1-dimethylethyl)-1,3,4-oxadiazol-2(3H)-one)은 oxadiazole계 제초제로 벼 재배 시 일년생 화본과 잡초, 사초과 및 광엽잡초 방제에 사용된다(Dickmann et al., 1997). Oxadiargyl은 논에서 사용되기 때문에 수계를 통해 비표적 수생식물에 영향을 미칠 수 있다.

본 연구에서는 *Lemna minor*와 *Spirodela polyrhiza*를 이용하여 서로 다른 작용기작을 갖는 3종의 제초제인 alachlor, pendimethalin, oxadiargyl에 대한 OECD TG 221과 ISO 20227 시험법의 독성 민감도를 비교 평가하고자 한다. 이를

통해 두 시험법 간 차이를 분석하고 향후 수생식물 시험법의 국제적 표준화 및 농약에 대한 환경 위해성평가의 과학적 근거를 강화하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 시험물질

Alachlor(순도: 99.3%, Sigma-Aldrich, USA), oxadiargyl(순도: 99.4%, Dr. Ehrenstorfer, Germany), pendimethalin(순도: 98.7%, Sigma-Aldrich, USA)을 시험물질로 사용하였다. 시험용매로 acetone(순도: 99.8%, Merck, Germany)을 사용하였다.

### OECD 시험법(TG 221)에 따른 개구리밥 생장저해독성평가 시험생물

본 시험에 사용한 개구리밥 *Lemna minor*는 한국생명공학연구원 생물자원센터에서 구입하여 사용하였다. *Lemna minor*는 페트리디쉬(지름 120 × 높이 20 mm)에서 배양하였으며 온도는 24±2°C, 광도는 6,500~10,000 lux를 유지하였다. 배지는 Swedish Standard(SIS) 배지를 사용하였고 pH는 6.5±0.2로 조정하였다. 약 3주간 배양한 후 2~5개의 잎을 가진 건강한 개체를 선별하여 시험에 사용하였다.

### 개구리밥 생장저해시험

*Lemna minor*를 이용한 개구리밥 생장저해시험은 OECD TG 221(OECD, 2006b)에 준하여 수행하였다. 시험에 사용한 배지는 SIS 배지를 사용하였으며, 시험용기는 125 mL 원통형 유리수조(지름 7 × 높이 5 cm)를 사용하였다. 각 수조에는 2~5개의 잎을 가진 콜로니를 투입하여 총 잎의 수가 9~12개가 되도록 하였다. 시험기간 동안 온도는 24±2°C, 광도는 6,500~10,000 lux 조건을 유지하였고, 배지의 pH는 6.5±1.5로 조정하였다. 시험구는 대조군과 시험물질 처리군으로 설정하였고, pendimethalin의 경우 용매대조군(acetone 100 µL/L 이하)을 추가로 두었다. 각 처리군은 3반복으로 시험을 수행하였으며, 시험농도는 alachlor의 경우 0.0025, 0.0050, 0.0100, 0.0200, 0.0400 mg/L, oxadiargyl은 0.0010, 0.0025, 0.0063, 0.0156, 0.0391 mg/L, pendimethalin은 0.031, 0.063, 0.125, 0.250, 0.500 mg/L로 설정하였다. 각 시험용액은 100 mL씩 분주하였으며, 시험은 7일동안 진행하였다. 시험 3일 및 5일째에 시험용액을 교체하였으며 24시간 간격으로 잎의 수와 총 잎의 면적을 측정하였다. 총 잎의 면적은 ImagineJ 소프트웨어(Version 1.54 g, National Institutes of Health, USA)를 이용하여 분석하였다. 시험종료 후 7일간의 평균 생장량과 수율을 산출하여 반수영향농도(EC<sub>50</sub>) 값과 95% 신뢰구간을 도출하였다.

## ISO 시험법(20227)에 따른 개구리밥 성장저해독성평가

### 시험생물

본 독성시험에 사용한 개구리밥은 Duckweed Toxkit F(SPP030, Microbiotests, Belgium)에서 제공하는 *Spirodela polyrhiza*를 사용하였다. *Spirodela polyrhiza*의 turion을 72 시간 동안 발아시킨 후 시험에 사용하였다. Turion 발아는 페트리디쉬(지름 120 × 높이 20 mm)에서 수행하였으며, 배양조건은 온도 25±2°C, 광도 6,000 lux를 유지하였다. 배지는 Steinberg 배지를 사용하였고 pH는 5.5±0.2로 조정하였다. 발아 후 첫 잎이 형성되면 건강한 개체를 선별하여 시험에 사용하였다.

### 개구리밥 성장저해시험

*Spirodela polyrhiza*를 이용한 개구리밥 성장저해시험은 ISO 20227(ISO, 2017)에 따라 Duckweed Toxkit F(SPP030, Microbiotests, Belgium)를 사용하여 수행하였다. 배지는 Steinberg 배지를 사용하였으며, 48 well plate의 각 well에 발아한 *Spirodela polyrhiza* 개체를 1개씩 투입하였다. 시험 조건은 온도 25±1°C, 광도 6,000 lux, 시험기간은 72시간이었으며, 배지의 pH는 5.5±0.2로 유지하였다. 시험구는 대조군과 시험물질 처리군으로 설정하였고 각 처리군은 8반복으로 시험을 수행하였다. 시험농도는 alachlor는 0.005, 0.010, 0.020, 0.040, 0.080 mg/L, oxadiargyl은 0.0025, 0.0050, 0.0100, 0.0200, 0.0400 mg/L, pendimethalin은 0.075, 0.150, 0.300, 0.600, 1.200 mg/L로 설정하였다. 각 시험용액은 well 당 1 mL 씩 분주하였으며, 시험기간 동안 시험용액은 교체하지 않았다. 시험 중 24시간 간격으로 총 잎의 면적을 측정하였으며, 총 잎의 면적은 ImagineJ 소프트웨어(Version 1.54 g, National Institutes of Health, USA)를 이용하여 분석하였다. 시험종료 후 72시간 평균 성장률과 수율을 산출하여 EC<sub>50</sub> 값과 95% 신뢰구간을 도출하였다.

### 평균 성장률 및 수율 산출

시험종료 후 측정값을 바탕으로 시험물질이 개구리밥의 성장에 미치는 영향을 정량적으로 평가하기 위해 평균 성장률과 수율을 산출하였다. 이를 바탕으로 대조군 대비 성장저해율을 계산하여 시험물질의 독성영향을 분석하였다.

### 평균 성장률에 대한 저해율

대조군과 처리군의 모든 반복구에 대하여 시험시작부터 종료까지의 평균 비성장률을 아래의 식을 이용하여 산출하였다.

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

-  $\mu_{i-j}$  : 시간  $i$ 부터  $j$ 까지의 평균 비성장률

-  $N_i$  : 시험시작 시점( $i$ )의 생물량

-  $N_j$  : 시험종료 시점( $j$ )의 생물량

-  $t$  :  $i$  시간부터  $j$  시간까지의 총 기간

계산된 각 처리군의 평균 비성장률을 대조군의 평균 비성장률과 비교하여 시험물질에 대한 성장률 저해율을 다음의 식을 통해 산출하였다.

$$\%I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

-  $\%I_r$  : 평균 비성장률 저해율(%)

-  $\mu_C$  : 대조군의 평균 비성장률

-  $\mu_T$  : 처리군의 평균 비성장률

### 수율에 대한 저해율

시험종료 시점의 총 바이오매스에서 시험시작 시점의 바이오매스를 뺀 값으로 계산하였다. 각 처리군과 대조군의 수율을 산출한 후 시험물질이 바이오매스 증가에 미친 영향을 평가하기 위해 수율 저해율을 아래의 식을 이용하여 계산하였다.

$$\%I_y = \frac{(b_C - b_T)}{b_C} \times 100$$

-  $\%I_y$  : 수율 저해율(%)

-  $b_C$  : 대조군의 평균 수율(최종 바이오매스 - 초기 바이오매스)

-  $b_T$  : 처리군의 평균 수율(최종 바이오매스 - 초기 바이오매스)

산출된 각 농도별 저해율은 통계 프로그램을 이용하여 농도-반응 관계를 분석하고 EC<sub>50</sub> 값을 산출하는 데 사용하였다.

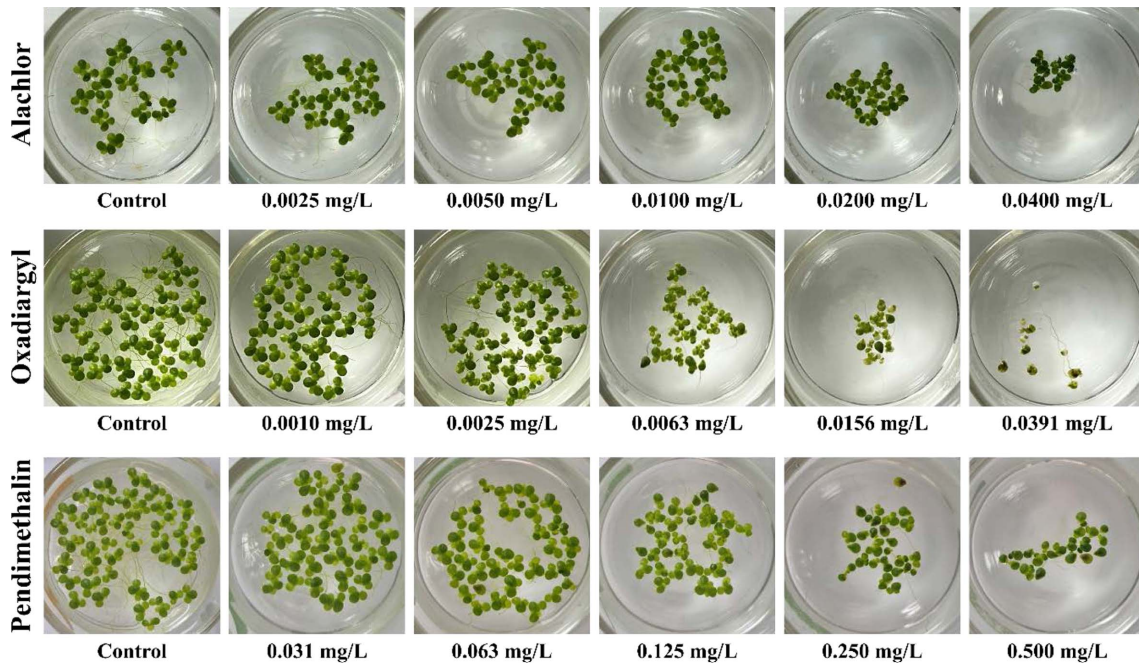
### 통계분석

각 시험물질의 농도에 따른 데이터를 바탕으로 EC<sub>50</sub> 값을 산출하기 위해 통계 분석을 실시하였다. 통계 프로그램 R (Version 4.5.1)을 사용하였으며 Weibull 모델을 적용하여 EC<sub>50</sub> 값과 95% 신뢰구간을 산출하였다(OECD, 2006a).

## 결 과

### 제초제 처리에 따른 개구리밥의 농도-반응 관계 비교

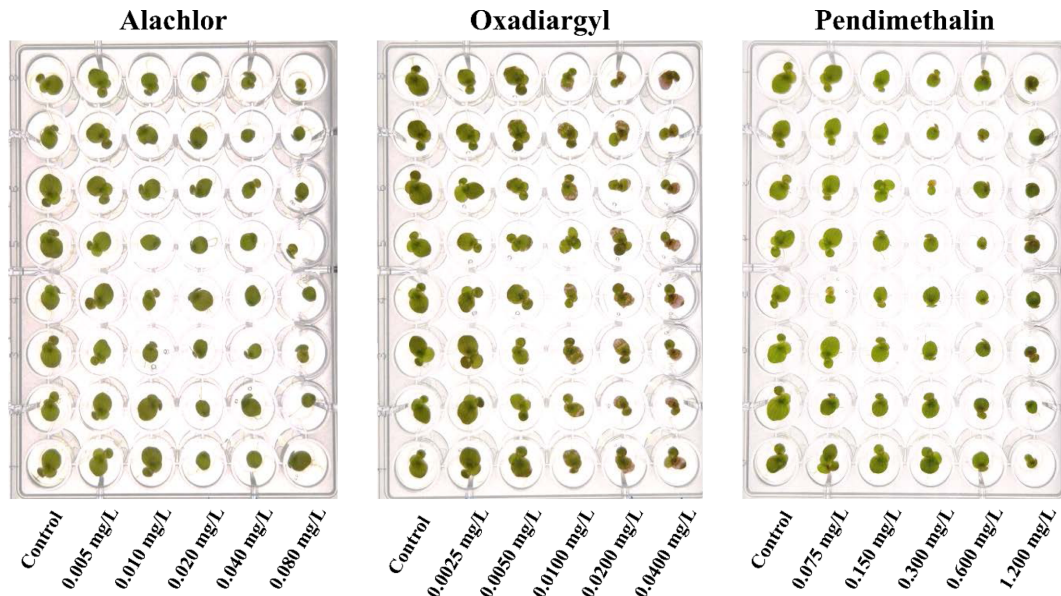
OECD 시험법에 따라 7일간 성장저해시험을 진행한 결과, alachlor, oxadiargyl, pendimethalin의 농도가 증가함에 따라 *Lemna minor*의 생장이 감소하였다(Fig. 1). 각 시험물질의 성장률 및 수율 저해율을 Table 1에 나타내었다. Alachlor의 경우 잎의 수를 기준으로 한 성장률 및 수율 저해율은 0.0100 mg/L에서 각각 3.9 및 8.9%로 낮았으나, 최고농도인 0.0400 mg/L에서는



**Fig. 1.** Growth inhibition test of *Lemna minor* conducted according to the OECD TG 221 method. Representative images showing the growth responses of *Lemna minor* after 7 days of exposure to increasing concentrations of alachlor, oxadiargyl, and pendimethalin.

**Table 1.** Inhibition of *Lemna minor* growth parameters following exposure to different concentrations of three herbicides (alachlor, oxadiargyl, and pendimethalin) as determined using the OECD TG 221 test method

Pesticide	Concentration (mg/L)	Frond number		Frond area	
		Inhibition growth rate (%)	Inhibition yield (%)	Inhibition growth rate (%)	Inhibition yield (%)
Alachlor	Control	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.0025	3.6	8.3	5.5	13.7
	0.0050	3.4	7.8	3.4	14.5
	0.0100	3.9	8.9	5.0	13.7
	0.0200	16.5	33.3	29.7	55.1
	0.0400	52.5	76.0	64.0	84.4
Oxadiargyl	Control	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.0010	1.5	4.4	0.9	2.7
	0.0025	4.0	11.3	12.3	25.3
	0.0063	39.3	70.8	42.2	74.8
	0.0156	100.0	100.0	81.0	96.2
	0.0391	100.0	100.0	100.0	100.0
Pendimethalin	Control	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.031	7.8	21.1	5.6	17.4
	0.063	9.5	25.2	11.7	24.9
	0.125	22.5	50.3	23.1	50.3
	0.250	33.9	65.8	36.9	69.3
	0.500	58.2	85.9	53.5	85.0



**Fig. 2.** Growth inhibition test of *Spirodela polyrhiza* conducted according to ISO 20227. Representative 96-well microplate images show *Spirodela polyrhiza* responses after 3 days of exposure to increasing concentrations of alachlor, oxadiargyl, and pendimethalin.

**Table 2.** Inhibition of *Spirodela polyrhiza* frond area following exposure to different concentrations of three herbicides (alachlor, oxadiargyl, and pendimethalin) as determined using the ISO 20227 test method

Pesticides	Concentration (mg/L)	Frond area	
		Inhibition growth rate (%)	Inhibition yield (%)
Alachlor	Control	0.0	0.0
	0.005	3.0	5.0
	0.010	26.2	37.5
	0.020	43.0	57.4
	0.040	47.2	65.8
	0.080	62.9	78.3
Oxadiargyl	Control	0.0	0.0
	0.0025	-1.7	-1.7
	0.0050	15.3	22.7
	0.0100	39.0	53.7
	0.0200	58.6	71.1
	0.0400	73.4	83.9
Pendimethalin	Control	0.0	0.0
	0.075	11.4	22.0
	0.150	22.1	40.0
	0.300	37.5	56.4
	0.600	49.7	69.9
	1.200	67.8	81.3

50% 이상으로 급격히 증가하였다. 총 잎의 면적 기준에서도 유사한 양상이 나타났으며 0.0400 mg/L에서 60% 이상의 저해가

관찰되었다. Oxadiargyl은 0.0063 mg/L에서 약 40% 이상 저해가 나타났으며, 최고농도인 0.0391 mg/L에서는 100% 저해율이 관찰되었다. Pendimethalin은 0.125 mg/L에서 20% 이상의 저해가 확인되었고, 최고농도인 0.500 mg/L에서는 50% 이상의 저해율을 보였다.

ISO 시험법을 따른 시험에서도 72시간 동안의 성장저해 시험 결과, 시험물질 3종에 대해서 모두 농도 의존적인 성장 저해가 나타났다(Fig. 2). 각 시험물질 저해율은 Table 2에 나타내었다. Alachlor는 총 잎의 면적 기준으로 0.020 mg/L에서 생장률 및 수율이 40% 이상 저해되었으며, 최고농도인 0.080 mg/L에서는 60% 이상의 저해율을 보였다. Oxadiargyl의 경우 0.0100 mg/L에서 약 40% 이상의 저해가 나타났고, 최고농도 0.0400 mg/L에서는 70% 이상의 저해율이 확인되었다. Pendimethalin은 최고농도 0.300 mg/L에서 35% 이상, 1.200 mg/L에서 65% 이상의 성장 저해가 나타났다.

**개구리밥 성장저해시험**

Table 3에는 3종의 제초제에 대해 OECD 시험법과 ISO 시험법에 따라 산출한 EC<sub>50</sub> 값을 나타내었다. 각 시험법 내에서 생장률과 수율을 기준으로 EC<sub>50</sub> 값을 산출하였으며 OECD 시험법은 잎의 수와 총 잎의 면적을 기준으로, ISO 시험법은 총 잎의 면적 기준으로 독성값을 산출하였다.

OECD 시험법에 따른 alachlor에 대한 시험결과 잎의 수 기준의 생장률 및 수율 EC<sub>50</sub> 값은 각각 0.0383 및 0.0249 mg/L 이었고, 총 잎의 면적 기준으로는 각각 0.0295 및 0.0182 mg/L로 나타났다. ISO 시험법에서는 총 잎의 면적 기준 EC<sub>50</sub> 값이 각각 0.0373 및 0.0182 mg/L로 확인되었다. Oxadiargyl의 경우 OECD 시험법에서는 잎의 수 기준의 생장률 및 수율의

**Table 3.** Comparison of EC<sub>50</sub> and EC<sub>10</sub> values (95% CI) for alachlor, oxadiargyl and pendimethalin using the OECD TG 221 (*Lemna minor*) and ISO 20227 (*Spirodela polyrhiza*) test methods

Pesticides	OECD TG 221				ISO		
	Frond numbers		Total fronds area		Total fronds area		
	Growthrate	Yield	Growthrate	Yield	Growthrate	Yield	
Alachlor	EC <sub>50</sub>	0.0383 (0.0322 – 0.0444)	0.0249 (0.0187 – 0.0310)	0.0295 (0.0251 – 0.0339)	0.0182 (0.0117 – 0.0248)	0.0373 (0.0203 – 0.0542)	0.0182 (0.0123 – 0.0241)
	EC <sub>10</sub>	0.0165 (0.0122 – 0.0208)	0.0122 (0.0052 – 0.0192)	0.0125 (0.0092 – 0.0158)	0.0091 (0.0026 – 0.0155)	0.0048 (0.0014 – 0.0083)	0.0043 (0.0019 – 0.0068)
Oxadiargyl	EC <sub>50</sub>	0.0066 (0.0054 – 0.0077)	0.0044 (0.0038 – 0.0050)	0.0068 (0.0053 – 0.0083)	0.0037 (0.0035 – 0.0040)	0.0150 (0.0128 – 0.0172)	0.0100 (0.0084 – 0.0115)
	EC <sub>10</sub>	0.0055 (0.0027 – 0.0084)	0.0025 (0.0020 – 0.0029)	0.0028 (0.0016 – 0.0039)	0.0019 (0.0017 – 0.0021)	0.0040 (0.0031 – 0.0050)	0.0034 (0.0026 – 0.0043)
Pendimethalin	EC <sub>50</sub>	0.4131 (0.2531 – 0.5732)	0.1178 (0.0789 – 0.1567)	0.4480 (0.3857 – 0.5103)	0.1178 (0.0906 – 0.1450)	0.5353 (0.4583 – 0.6123)	0.2266 (0.2199 – 0.2333)
	EC <sub>10</sub>	0.0618 (0.0258 – 0.0979)	0.0247 (0.0085 – 0.0408)	0.0539 (0.0441 – 0.0638)	0.0280 (0.0156 – 0.0405)	0.0737 (0.0553 – 0.0921)	0.0411 (0.0385 – 0.0437)

EC<sub>50</sub> 값은 각각 0.0066 및 0.0044 mg/L, 총 잎의 면적 기준으로는 각각 0.0068 및 0.0037 mg/L이었다. ISO 시험에서는 총 잎의 면적 기준 EC<sub>50</sub> 값이 각각 0.0150 및 0.0010 mg/L로 나타났다. Pendimethalin에 대해서는 OECD 시험법에서 잎의 수 기준 생장률 및 수율의 EC<sub>50</sub> 값은 각각 0.4131 및 0.1178 mg/L, 총 잎의 면적 기준으로는 각각 0.4480 및 0.1178 mg/L이었다. ISO 시험법에서는 총 잎의 면적 기준 EC<sub>50</sub> 값은 각각 0.5353 및 0.2266 mg/L로 나타났다.

OECD 시험법을 이용한 결과 잎의 수와 총 잎의 면적 간의 민감도는 시험물질에 따라 상이하였다. Pendimethalin은 생장률과 수율에서 두 종말점의 EC<sub>50</sub> 값이 유사하고 95% 신뢰구간이 겹쳐 민감도에 차이가 없는 것으로 나타났다. 반면 alachlor와 oxadiargyl은 총 잎의 면적 기준이 잎의 수보다 민감한 것으로 나타났다.

## 고 찰

농약은 비산, 유출, 침투 등을 통해 하천이나 강으로 유입될 수 있다. 이러한 환경 내 농약 노출에 따른 위해성을 평가하기 위해 수생식물에 대한 독성평가는 필수적이다. 본 연구에서는 서로 다른 작용기작을 가진 3종의 제초제(alachlor, oxadiargyl, pendimethalin)를 대상으로 두 가지 표준시험법인 OECD TG 221과 ISO 20227의 결과를 비교하였다. 두 시험법 모두 시험물질 농도가 증가함에 따라 농도 의존적인 반응을 보여 시험이 적절히 수행되었음을 확인하였다.

OECD 시험법 내에서 잎의 수와 총 잎의 면적을 비교한 결과 pendimethalin은 두 지표 간 EC<sub>50</sub> 값의 95% 신뢰구간이 겹쳐 유의미한 차이가 없었다. 반면 alachlor와 oxadiargyl에

서는 총 잎의 면적이 잎의 수보다 더 민감하게 반응하였다. 이러한 차이는 제초제의 작용기작과 관련이 있는 것으로 확인된다. 잎의 수는 주로 새로운 잎의 출현을 반영하는 반면 총 잎 면적은 기존 잎의 생장을 포함한다(Irfan et al., 2024). Pendimethalin에서 유사하게 반응한 것은 해당 제초제가 잎의 출현과 생장을 동시에 억제함을 시사한다. 반면 alachlor는 세포막 및 큐티클 왁스의 구성성분인 very long-chain fatty acids(VLCFA)의 합성을 저해하여 세포 생장을 억제한다(Batsale et al., 2021). 이로 인해 새로운 잎이 발생하더라도 정상적으로 생장이 어렵고 잎의 면적이 감소하는 왜소화가 관찰될 수 있다(Zheng et al., 2005). Oxadiargyl은 protoporphyrinogen oxidase(PPO) 억제제로 세포막 파괴 및 산화 스트레스 유발을 통해 잎 면적의 생장을 저해하는 특성이 있다(Duke et al., 1991; Grossmann et al., 2010). 따라서 총 잎 면적이 더 민감하게 나타난 것은 새로운 잎의 출현은 유지되더라도 생장이 저해되었음을 의미한다. 이러한 결과는 Park et al.(2017)이 보고한 바와 같이 제초제의 작용기작에 따라 가장 민감한 종말점이 달라질 수 있음을 시사한다(Park et al., 2017).

본 연구에서 두 시험법을 통해 산출된 EC<sub>50</sub> 값은 약 1.0~2.7 배의 차이를 보였으며, 이는 Baudo et al.(2015)이 보고한 종 간 변동범위(10배 이내)에 해당된다(Baudo et al., 2015). Baudo 등은 22종의 화학물질을 비교한 결과 두 시험 간 높은 상관관계(R<sup>2</sup>=0.95)를 확인했으며 이는 두 시험법이 전반적으로 유사한 민감도를 가진다는 것을 시사한다. Alachlor에서의 유사한 EC<sub>50</sub> 값과 oxadiargyl 및 pendimethalin에서의 차이는 시험물질의 작용기작 외에도 시험에 사용된 생물종의 차이, 노출시간, 실험조건 등 방법론적 차이에서 기인한 것으로 해석할 수 있다.

먼저 시험 생물종의 차이이다. 두 시험법은 권장 시험 생물종이 다르며 이는 독성 민감도에 영향을 미칠 수 있는 핵심요인 중 하나이다. OECD TG 221은 *Lemna minor* 또는 *Lemna gibba*를 사용하도록 권장하며, ISO 20227은 *Spirodela polyrhiza*를 시험 생물종으로 사용한다(OECD, 2006b; ISO, 2017). 본 연구에서 관찰된 EC<sub>50</sub> 값 차이의 일부는 이러한 생물종간 민감도 차이에 기인할 수 있다. Cruz 등(2024)은 제초제 atrazine에 대해 *Lemna minor*(EC<sub>50</sub>=101.0 µg/L)가 *Spirodela polyrhiza*(EC<sub>50</sub>=164.8 µg/L)보다 더 민감하게 반응한다고 보고하였다(Cruz et al., 2024). 그러나 동일한 연구에서 S-metolachlor에 대해서는 *Spirodela polyrhiza*(EC<sub>50</sub>=15.5 µg/L)가 *Lemna minor*(EC<sub>50</sub>=128.9 µg/L)보다 훨씬 더 민감하게 반응하였다. 본 연구에서 alachlor에 대해 두 시험법간 유사한 EC<sub>50</sub> 값이 관찰되었으며 해당 물질에 대해서는 두 생물종 간 민감도 차이가 크지 않음을 보여준다. 이러한 결과는 생물종 간 민감도가 시험물질의 종류에 따라 달라질 수 있으며 항상 일관되게 나타나지는 않는다는 점을 시사한다.

시험물질의 작용기작과 노출기간의 차이는 독성 민감도에 영향을 미칠 수 있다. OECD TG 221은 7일간의 노출을 평가하며, ISO 20227은 3일간의 노출을 평가한다. 각 제초제의 작용기작이 독성 발현에 요구하는 시간이 다르기 때문에 노출기간은 민감도 차이의 결정적인 요인이 된다. Alachlor는 VLCFA 합성을 저해하며 이는 세포막의 유지와 지질 대사를 방해한다(HRAC, 2024). 이러한 작용기작은 비교적 빠르게 세포 기능 저하를 유발할 수 있으며(Couderchet and Boger, 1993), 3일의 짧은 노출기간 만으로도 7일과 유사한 수준의 독성이 나타날 수 있다. 반면 pendimethalin은 dinitroaniline계 제초제로 미세소관의 중합을 억제하여 세포분열을 방해한다(Vaughn and Lehnen Jr, 1991). 이는 뿌리와 신초 발달을 저해하는 방식으로 작용하며(Chen et al., 2021), 작용 반응이 비교적 느리다. 따라서 3일 동안에는 세포분열 억제가 이루어지지 않아 명확한 독성반응이 나타나지 않을 수 있으나, 7일 동안에는 세포분열이 억제되어 그 영향이 수율에 나타났을 가능성이 있다. 실제로 pendimethalin과 같이 약효 반응이 느린 제초제의 경우 장기간 노출 시 더 낮은 농도에서 독성 영향이 나타나는 것이 보고된 바 있으며(Cedergreen et al., 2005), 이는 본 연구에서 7일 시험에서 더 낮은 EC<sub>50</sub> 값이 나타난 결과와 일치한다. Oxadiargyl은 PPO 저해제로 광합성 과정 중 protoporphyrin IX를 축적을 유도하고 빛의 존재 하에 ROS를 발생시켜 급격한 세포막 파괴를 유발한다(Duke et al., 1991). 하지만 본 연구에서는 OECD 시험법에서 더 낮은 EC<sub>50</sub> 값이 관찰되었다. 이는 노출기간 및 작용기작 외에도 다른 요인이 복합적으로 영향을 미쳤음을 시사한다.

시험배지의 조성 차이 또한 독성 민감도에 영향을 미칠 수 있다. 두 시험법은 서로 다른 배지를 사용하며 pH, 영양 염류 조성, 용존 유기물(Dissolved Organic Matter, DOM)의

함량이 상이하다. 이러한 차이는 시험물질의 용해도, 안전성, 화학적 형태 등에 영향을 미쳐 실제 시험생물이 흡수하는 유효 농도를 달라지게 할 수 있다(Rosenkrantz et al., 2013). 배지에 포함된 유기물 성분이 oxadiargyl이나 pendimethalin과 같은 소수성 제초제와 결합하거나 흡착될 경우(Akkanen and Kukkonen, 2001; Coquillé et al., 2018), 용액 내 농도를 감소시켜 생물 이용성이 낮아질 수 있다.

ISO 20227은 신속성, 편의성, 비용 효율성(Blaise and Féraud, 2005) 등 장점을 가지고 있지만 모든 물질의 독성평가에 있어 OECD TG 221과 상호교환이 가능한 것은 아니다. 특히 pendimethalin처럼 약효 발현이 느린 제초제의 경우 ISO 시험법만으로는 실제 환경조건에서의 독성을 과소평가할 가능성이 있다. 그러나 본 연구에서 관찰된 두 시험법간 EC<sub>50</sub> 차이는 일반적으로 허용 가능한 범위 내에 있었으며 ISO 시험법은 제초제 독성의 스크리닝 평가를 위한 실용적이고 신뢰할 수 있는 시험법으로 판단된다.

다만, 본 연구는 제초제 계열의 일부 물질만을 대상으로 하였기 때문에 본 결과를 다른 작용기작을 가진 농약이나 살충제, 살균제 등으로 일반화하는 데는 한계가 있다. 또한 시험물질의 수가 제한적이기 때문에 통계적 대표성이 부족하다는 한계점을 갖는다. 따라서 향후 연구에서는 시험물질의 범위를 확대하고 다양한 작용기작을 포함한 농약을 대상으로 독성 민감도에 미치는 영향을 종합적으로 검토할 필요가 있다.

## 결론

본 연구는 3종의 제초제(alachlor, oxadiargyl, pendimethalin)를 대상으로 OECD TG 221과 ISO 20227 두 표준 시험법간 독성비교를 수행하였다. Alachlor는 두 시험법에서 유사한 민감도를 나타냈으나, oxadiargyl과 pendimethalin은 OECD 시험법이 ISO 시험법보다 민감한 반응이 나타났다. 이는 ISO 시험법이 신속한 초기 스크리닝 도구로 실용성이 있지만 일부 제초제의 특성에 따라 민감도 차이가 발생할 수 있다. 하지만 본 연구는 3종의 제초제에 국한된 결과이므로 다양한 작용기작을 포함하여 농약에 대한 추가적인 비교 연구가 필요하다. 따라서 농약의 환경 위해성평가에서는 농약의 작용기작과 시험조건의 차이를 고려하여 두 시험법의 결과를 종합적으로 접근하는 것이 바람직할 것으로 판단된다.

## 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원의 ‘좁개구리밥 생장저해시험법 설정연구’(과제번호: PJ01579704)의 지원 및 2025년도 농촌진흥청 국립농업과학원 전문연구원 과정

지원사업으로 이루어진 것입니다.

## Author Information and Contributions

Chang-Young Yoon, Toxicity and Risk Assessment Division, National Institute of Agricultural Sciences, Researcher, Investigation, data analysis & writing-original draft preparation, supervision, funding acquisition, <https://orcid.org/0000-0001-7220-5425>

Bala Murali Krishna Vasamsetti, Toxicity and Risk Assessment Division, National Institute of Agricultural Sciences, Doctor of Philosophy, Investigation, data analysis, writing-review & editing, <https://orcid.org/0000-0001-5529-418X>

Kyongmi Chon, Toxicity and Risk Assessment Division, National Institute of Agricultural Sciences, Doctor of Philosophy, Data analysis, writing-review & editing, <https://orcid.org/0000-0003-2143-2614>

Sojeong Hwang, Toxicity and Risk Assessment Division, National Institute of Agricultural Sciences, Researcher, Investigation, <https://orcid.org/0009-0009-8950-0696>

Juyeong Kim, Toxicity and Risk Assessment Division, National Institute of Agricultural Sciences, Researcher assistant, Investigation, <https://orcid.org/0000-0002-6413-1822>

Kyeong-Hun Park, Toxicity and Risk Assessment Division, National Institute of Agricultural Sciences, Doctor of Philosophy, Supervision, <https://orcid.org/0000-0001-8626-9753>

## 이해상충관계

저자는 이해상충관계가 없음을 선언합니다.

## Literature Cited

- Akkanen J, Kukkonen JVK, 2001. Effects of water hardness and dissolved organic material on bioavailability of selected organic chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* 20:2303-2308.
- Authority EFSA, Álvarez F, Arena M, Auteri D, Colagiorgi A, et al., 2025. Peer review of the pesticide risk assessment for the active substance pendimethalin in light of confirmatory data submitted. *EFSA J.* 23:e9511.
- Batsale M, Bahammou D, Fouillen L, Mongrand S, Joubès J, et al., 2021. Biosynthesis and functions of very-long-chain fatty acids in the responses of plants to abiotic and biotic stresses. *Cells* 10:1284.
- Baudo R, Foudoulakis M, Arapis G, Perdaen K, Lanneau W, et al., 2015. History and sensitivity comparison of the Spirodela polyrhiza microbiotest and Lemna toxicity tests. *Knowl. Manag. Aquat. Ecosyst.* 23.
- Blaise C, Féraud JF, 2005. Small-scale freshwater toxicity investigations. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, USA.
- Cedergreen N, Andersen L, Olesen CF, Spliid HH, Streibig JC, 2005. Does the effect of herbicide pulse exposure on aquatic plants depend on Kow or mode of action? *Aquat. Toxicol.* 71:261-271.
- Chen J, Yu Q, Patterson E, Sayer C, Powles S, 2021. Dinitroaniline herbicide resistance and mechanisms in weeds. *Front. Plant Sci.* 12:634018.
- Coquillé N, Ménard D, Rouxel J, Dupraz V, Éon M, et al., 2018. The influence of natural dissolved organic matter on herbicide toxicity to marine microalgae is species-dependent. *Aquat. Toxicol.* 198:103-117.
- Couderchet M, Böger P, 1993. Chloroacetamide-induced reduction of fatty acid desaturation. *Pestic. Biochem. Physiol.* 45:91-97.
- Cruz FVdS, Brant HSC, Ohlund L, Sleno L, Juneau P, 2024. Tolerance and phytoremediation capacity of atrazine and S-metolachlor by two duckweeds. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 31:59382-59397.
- Deal LM, Hess FD, 1980. An analysis of the growth inhibitory characteristics of alachlor and metolachlor. *Weed Sci.* 28:168-175.
- Dickmann R, Melgarejo J, Loubiere P, Montagnon M, 1997. Oxadiargyl: a novel herbicide for rice and sugarcane. *Proc. Br. Crop Prot. Conf.* 1:53-58.
- Duke SO, Lydon J, Becerril JM, Sherman TD, Lehnen LP Jr, et al., 1991. Protoporphyrinogen oxidase-inhibiting herbicides. *Weed Sci.* 39:465-473.
- EFSA, 2013. Guidance on tiered risk assessment for plant protection products for aquatic organisms in edge-of-field surface waters. *EFSA J.* 11:3290.
- Fourounjian P, Slovin J, Messing J, 2021. Flowering and seed production across the Lemnaceae. *Int. J. Mol. Sci.* 22:2733.
- Grossmann K, Niggeweg R, Christiansen N, Looser R, Ehrhardt T, 2010. The herbicide saflufenacil (Kixor™) is a new inhibitor of protoporphyrinogen IX oxidase activity. *Weed Sci.* 58:1-9.
- Hou W, Chen X, Song G, Wang Q, Chang CC, 2007. Effects of copper and cadmium on heavy metal polluted waterbody restoration by duckweed (*Lemna minor*). *Plant Physiol. Biochem.* 45:62-69.
- HRAC, 2024. 2024 HRAC Global Herbicide MoA Classification. <https://hracglobal.com> (Accessed Oct. 15, 2024).
- Irfan M, Mészáros I, Szabó S, Oláh V, 2024. Comparative phytotoxicity of metallic elements on duckweed *Lemna gibba* L. using growth and chlorophyll fluorescence induction-based endpoints. *Plants* 13:215.
- ISO, 2017. Water quality — Determination of the growth inhibition

- effects of waste waters, natural waters and chemicals on the duckweed *Spirodela polyrhiza* — Method using a stock culture independent microbiotest. ISO 20227. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Khellaf N, Zerdaoui M, 2009. Growth response of the duckweed *Lemna minor* to heavy metal pollution. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72:685-690.
- Kumar KS, Han T, 2010. Physiological response of *Lemna* species to herbicides and its probable use in toxicity testing. *Toxicol. Environ. Health Sci.* 2:39-49.
- Nagai T, 2019. Sensitivity differences among seven algal species to twelve herbicides with various modes of action. *J. Pestic. Sci.* 44:225-232.
- OECD, 2006a. Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD Series on Testing and Assessment, No. 54. OECD Publishing, Paris, France.
- OECD, 2006b. Test No. 221: *Lemna* sp. Growth Inhibition Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD Publishing, Paris, France.
- Park J, Brown MT, Depuydt S, Kim JK, Won DS, et al., 2017. Comparing the acute sensitivity of growth and photosynthetic endpoints in three *Lemna* species exposed to four herbicides. *Environ. Pollut.* 220:818-827.
- Rosenkrantz RT, Cedergreen N, Baum A, Kusk KO, 2013. Influence of pH, light cycle, and temperature on ecotoxicity of four sulfonyleurea herbicides towards *Lemna gibba*. *Ecotoxicology* 22:33-41.
- Schwab AP, Splichal PA, Banks MK, 2006. Persistence of atrazine and alachlor in groundwater aquifers and soil. *Water Air Soil Pollut.* 171:203-235.
- Ueda K, Nagai T, 2021. Relative sensitivity of duckweed *Lemna minor* and six algae to seven herbicides. *J. Pestic. Sci.* 46:267-273.
- Vaughn KC, Lehnen LP Jr, 1991. Mitotic disrupter herbicides. *Weed Sci.* 39:450-457.
- Vighi M, Matthies M, Solomon KR, 2017. Critical assessment of pendimethalin in terms of persistence, bioaccumulation, toxicity, and potential for long-range transport. *J. Toxicol. Environ. Health Part B* 20:1-21.
- Vonk JA, Kraak MHS, 2020. Herbicide exposure and toxicity to aquatic primary producers. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 250:119-171.
- Wang W, Williams JM, 1990. The use of phytotoxicity tests (common duckweed, cabbage, and millet) for determining effluent toxicity. *Environ. Monit. Assess.* 14:45-58.
- Zheng H, Rowland O, Kunst L, 2005. Disruptions of the *Arabidopsis* enoyl-CoA reductase gene reveal an essential role for very-long-chain fatty acid synthesis in cell expansion during plant morphogenesis. *Plant Cell* 17:1467-1481.
- Ziegler P, Sree KS, Appenroth KJ, 2016. Duckweeds for water remediation and toxicity testing. *Toxicol. Environ. Chem.* 98:1127-1154.
- Ziegler P, Sree KS, Appenroth KJ, 2019. Duckweed biomarkers for identifying toxic water contaminants? *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26:14797-14822.

## 제초제 3종(alachlor, oxadiargyl, pendimethalin)의 독성평가를 통한 개구리밥 생장저해시험법 비교

윤창영\* · Bala Murali Krishna Vasamsetti<sup>†</sup> · 전경미 · 황소정 · 김주영 · 박경훈

<sup>†</sup>농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부 독성위해평가과

**요약** 농약은 농작물의 수확량 증대에 필수적이지만 비산, 유출 등을 통해 수생태계로 유입되어 수생식물과 같은 1차 생산자에 영향을 미칠 수 있다. 개구리밥과(Lemnaceae) 식물은 빠른 생장과 유전적 균일성으로 수생식물 독성시험에 사용되고 있다. 본 연구에서는 서로 다른 작용기작을 가진 3종의 제초제(alachlor, oxadiargyl, pendimethalin)를 대상으로 OECD TG 221(*Lemna minor*)과 ISO 20227(*Spirodela polyrhiza*) 두 표준 시험법의 민감도를 비교하였다. 두 시험법 모두 농도 의존적인 반응을 보였다. 산출된 반수영향농도(EC<sub>50</sub>)는 시험법 간 약 1.0~2.7배의 차이를 보였고 이는 종 간 허용범위 내에 있었다. Alachlor는 두 시험법에서 유사한 민감도가 나타났으나, oxadiargyl과 pendimethalin은 OECD TG 221 시험법에서 더 높은 민감도를 보였다. 이러한 결과는 ISO 20227 시험법이 신속하고 효율적인 스크리닝 도구로 활용될 수 있지만 pendimethalin과 같이 작용 발현이 느린 제초제의 경우 독성이 과소평가될 가능성이 있다는 것을 보여준다. 향후 다양한 농약을 대상으로 추가 연구를 통해 두 시험법의 상호 적용 가능성에 대한 추가 연구가 필요하다.

**검색어:** 제초제, ISO 20227, *Lemna minor*, OECD TG 221, *Spirodela polyrhiza*