



꿀벌 반야외시험법을 활용한 carbaryl 수화제 독성평가

전경미* · 김보선 · 이 환 · 박경훈 · 백민경 · 최용수¹ · 문병철

농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부

¹농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부 잠사양봉소재과

A Study on the Effect of Carbaryl Wettable Powder on Honeybee Brood Under Semi-field Conditions

Kyongmi Chon*, Bo-sun Kim, Hwan Lee, Kyung-Hun Park, Min Kyoung Paik, Yong-soo Choi¹ and Byeong-Cheol Moon

Chemical Safety division, Department of Agro-food Safety and Crop Protection, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Wanju, Korea

¹Sericulture and Apiculture Division, Department of Agricultural Biology, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Wanju, Korea

(Received on March 2, 2018. Revised on May 25, 2018. Accepted on June 12, 2018)

Abstract Honeybee semi-field tests were carried out to assess the effect of carbaryl wettable powder (WP) 50% from April to May, 2017. The experiment included three treatment groups (control, toxic reference (diflubenzuron WP), and carbaryl WP), each with three replicate tunnels. Mortality, flight activity, brood development, and condition of colonies were assessed during the testing period (28 days). Sever adverse effects of carbaryl WP were detected in the terms of the mortality and flight activity from the days of application to three following days but were observed lasting no more than 4 days. Brood termination rates (BTR) for marked eggs were 29.3%, 77.3%, and 68.8% in the control, toxic reference and carbaryl WP groups, respectively. Even though clear adverse effects on the brood development were observed, no adverse effects on the overall survival of the colonies could be observed in the carbaryl WP treatment.

Key words Carbaryl, honey bees, semi-field test

서 론

꿀벌은 전세계적으로 주요 농작물에 대한 중요한 화분매개충으로 그 경제적 가치가 약 2000억 달러 이상이라고 추정되고 있다(vanEngelsdorp and Mexiner, 2010). 우리나라에서도 꿀벌의 화분매개 경제적 가치를 약 6조원으로 추정하고 있으며 이는 전체 과수와 채소 생산액의 50%에 해당한다(Jung, 2008). 꿀벌은 화분활동을 하기 위해 벌통으로부터 약 5.5 km까지 나가 비행활동을 하기 때문에 농약을 포함한 여러 오염물질에 노출되기 쉽다(Beekman and Ratnieks, 2000).

2006년 미국에서 원인 모를 이유로 꿀벌들이 갑자기 없어지는 붕괴현상(CCD: colony collapse disorder)이 보고되는 등 유럽과 미국에서는 꿀벌 개체수가 지속적으로 감소추세에 있다고 알려져 있다(Ellis et al., 2010). 그 원인으로 바이러스 감염, 면역결핍, 기후변화 등을 보고하고 있는데 주요 원인 중 하나로 농약을 지목하고 있다. 따라서 각국에서는 꿀벌에 영향을 미치는 농약을 규제하기 위해 꿀벌 독성 시험법을 구축하고 위해성 평가를 실시하고 있다.

EU나 미국의 꿀벌 위해성 평가는 Tier 시스템을 가지고 있다. Tier 1 단계에서는 꿀벌 및 유충의 급성독성, Tier 2단계에서는 반야외시험(semi-field test), Tier 3단계에서는 야외시험(full-field test)을 진행하도록 되어있다(EFSA, 2012; USEPA, 2014).

*Corresponding author
E-mail: kmchon6939@korea.kr

국내 농약에 대한 꿀벌의 위해성 평가체계는 총 3단계로 이루어져 있다. Tier 1단계에서는 꿀벌 접촉 및 섭식 급성독성, Tier 2단계에서는 염상잔류독성, Tier 3단계에서는 야외 시험을 진행하도록 되어있다(농촌진흥청 고시 제 2014-36 호, 농약 및 원제의 등록기준). 하지만 현재 Tier 3단계의 시험법과 평가기준이 없는 실정이다. 이에 국립농업과학원에서는 3단계 시험법의 구축과 평가 기준 제시 연구를 수행 중에 있으며 최근에 「농약 및 원제의 등록 기준」에 시험법 고시안을 제출하였다.

꿀벌 반야외시험법은 OECD No. 75에 해당하는 시험법으로 망사 터널 안에 파셀리아(*Phacelia tanacetifolia*), 야생 겨자(*Sinapis arvensis*), 유채(*Brassica napus*) 같은 밀원 식물을 키운 후 봉군을 넣고 화분활동을 하는 꿀벌을 직접 농약에 노출시켜 꿀벌 치사 개체 수, 비행활동, 난 유충 발육도, 봉군 상태를 측정하는 시험법이다(OECD No. 75, 2007). 난 유충 발육도를 측정하기 위해서는 BFD(brood area fixing day) 개념을 사용하는데 BFD는 소비관에서 관찰하고자 하는 알(egg)을 지정하는 날로서 첫날이 BFD 0일이 된다. 시험물질 처리 2~3일전에 BFD 0일을 정하고 시험 물질 노출 후 BFD +5, +10, +16, +22일에 난 유충이 제대로 발달했는지 관찰하여 약 한 달의 시간이 소요되는 시험법이다. 기존의 평가방법과 달리 농약이 꿀벌의 알부터 유충, 성체에 이르기까지 미치는 영향을 종합적으로 평가할 수 있는 장점을 가지고 있다.

최근 유럽의 반야외시험 결과들이 논문으로 발표되고 있다. 예를 들어 Becker et al. (2015)는 독일과 스위스에서 2011년부터 2014년 사이에 수행한 62개의 반야외시험 데이터 분석 결과 및 시험법 개선 사항을 발표하였으며 영국은 spinosad에 대한 반야외시험 결과를 발표하였다(Miles, 2003). 한편, 국립농업과학원에서는 꿀벌 반야외시험법을 국내 최초 구축하여 시험작물(유채꽃)에 양성대조군 물질로 dimethoate과 diflubenzuron 약제를 살포하여 시험법을 구축하였고 이와 관련된 논문을 게재하였다(Chon et al., 2017).

카바메이트계 살충제인 carbaryl은 사과원의 화학적 적과제로 주로 사용되고 있다. Carbaryl은 AChE 저해제로써 진딧물과 나방류 방제로 사용되어 사과 개화기 전 후 사용시 양봉농가의 꿀벌 피해사례가 다수 보고되고 있다. Carbaryl 원제의 급성 접촉 및 섭식독성 값은 0.84, 0.15 ug/bee로 꿀벌에 독성이 매우 강하다(Sanchez-Bayo and Goka, 2014). 또한 carbaryl 수화제의 RT₂₅(Residual Time to 25% mortality) 값은 5일 이상으로 경고문구 VI에 해당하여 농진청에서는 사과 꽃이 완전히 진 후, 과수원 내 다른 꽃을 완전히 제거 후 carbaryl 수화제를 사용하라고 당부하고 있다.

따라서 본 연구에서는 최근 구축된 꿀벌 반야외시험법을 활용하여 carbaryl 수화제가 꿀벌에 미치는 영향을 종합적으로 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

터널 및 시험 디자인

9동의 망사터널을 국립농업과학원(NAS)(35°49'40.7 "N, 127°02'44.9"E) 야외 포장에 설치하였다. 각 터널은 길이 14 m, 폭 5 m, 높이 3 m이었고 너비가 3 mm 이하인 망사로 씌웠다. 시험작물은 꿀벌 화분활동에 적합하며 국내에서 흔히 볼 수 있는 유채꽃으로 선정하였다. 유채꽃 씨앗은 2016년 10월에 과종하였으며 시험 농약 처리 시점에 만개하였고 약 1 m의 높이로 자랐다. 터널은 총 9동으로 배치하였고 각 처리군마다 3반복을 수행하도록 하였다. 각 처리군은 무처리군, 양성대조군, 시험물질 처리군으로 구성되었다. 죽은 벌의 수집이 용이하게 땅을 고르게 하고 터널의 앞, 뒤, 중간에 길을 만들어 흰 부직포로 덮어주었다. 꿀벌에게 물을 공급하기 위해 각 터널 안에 수조를 배치하였고 농약 살포 시에는 수조를 터널 밖에 꺼내두었다. 무처리군은 수돗물을, 양성대조군은 diflubenzuron 수화제 25%, 시험물질은 carbaryl 수화제 50%를 사용하였다. 무처리군은 꿀벌 비행활동이 활발한 시간에 수돗물(400 L/ha)을 살포하였다. 양성대조군은 diflubenzuron 수화제 25% (800 g a.i./ha in 400 L tap water/ha)를 살포하였다. 시험물질 처리군은 carbaryl 수화제 50% (250 g a.i./ha in 400 L tap water/ha)를 살포하였다. 살포자는 수동식 압축 농약 분무기를 사용하였고(DIA sprayer 7560, Furupia, Japan) 시험작물에 고르게 농약이 살포되도록 충분한 연습을 하였다. 꿀벌의 치사 개체 수, 비행활동, 봉군 상태, 난 유충 발육도를 28일의 시험기간 동안 평가하였다.

기후 조건

시험기간 동안 시험포장과 1 km 떨어진 국립농업과학원 내의 기상 관측소의 온도, 상대습도, 강우량 데이터를 매일 기록하였다.

봉군 준비

시험에 사용할 봉군은 약 7000~9000마리의 건강하고 상태가 좋은 벌을 양봉농가에서 구입하여 사용하였다. 각 봉군은 3개의 산란판, 1개의 봉판, 1개의 먹이판으로 구성하였다. 각 벌통 입구에 dead bee trap을 설치하였다. 시험 시작한 달 전부터 약제 및 화학물질 처리를 금지하였고 시험물질 살포 최소 3일 전부터 터널에 입식하여 터널환경에 적응하도록 하였다.

꿀벌 및 번데기 치사 개체 수

죽은 일벌은 벌통 앞, 터널 중간, 앞, 뒤 시트와 dead bee trap에서 수집하였다. 죽은 번데기는 dead bee trap 및 벌통 앞에서 수집하였다. Table 1에 제시된 일정에 따라 시험을 수행하였다.

Table 1. Evaluation of mortality of honey bees

Time of the test	Evaluations of mortality
Before application (day -3 to -1)	once a day at the same time of the day in the morning
On the day of application (day 0)	<ul style="list-style-type: none"> • shortly before application • 2 h after application • in the evening after daily flight activity of the bees
During exposure period in the tunnels	once a day at the same time of the day in the morning
Up to day +28 after BFD (out of tunnels; only in dead bee traps)	once a day at the same time of the day in the morning

BFD = Brood area fixing day

Table 2. Evaluation of flight activity

Time of the test	Evaluations of flight activity
Before application (day -3 to -1)	once a day during the flight activity of the bees <ul style="list-style-type: none"> • shortly before application • 0.5 h after application
Day of application (day 0)	<ul style="list-style-type: none"> • 1 h after application • 2 h after application • 4 h after application • 6 h after application
Day following application (day 1)	three times during the flight activity of the bees (10:00, 13:00, 17:00)
During exposure period in the tunnels (day 2-7 after application)	once a day during the flight activity of the bees

비행활동

꿀벌 비행활동은 터널 내 3개의 1 m² 구획을 지정하여 관찰하였다. Table 2에 제시된 일정에 따라 화분매개 활동하는 벌과, 꽃 주위를 날아다니는 벌 개체 수를 짧은 시간 동안(예: 10-15초) 측정하였다.

봉군 상태

봉군의 상태는 농약 처리 전과 처리한 후 5번(BFD +5, +10, +16, +22, +28)에 걸쳐 평가하였다. 평가항목은 봉군의 세력(각 봉군당 소비관에 붙어있는 벌들의 수), 건강한 여왕벌의 존재, 각 소비관의 산란영역, 화분 및 먹이 영역(각 소비 면적에 대한 비율)이었다(Chon et al., 2017).

산란 평가(Brood assessment)

시험기간 동안 각 봉군당 지정된 200개의 알(egg)을 포토박스를 이용하여 관찰하였다. 난 유충 발육도를 평가하기 위해 처음 지정한 구역을 BFD 0으로 지정하였다. 하나의 표시된 셀의 난 유충 발육단계를 평가하기 위해 0에서 5의 점수를 부여하였다. 지정된 소비관 촬영은 BFD +5, +10, +16, +22일에 수행하였다. 평가일 별 예상 산란 단계는 Table 3에 나타내었다.

포토박스(Photobox)

포토박스는 선행연구에 제시한 방법(Jeker et al., 2012)을 참고하여 제작하였으며 상세한 사항은 Chon et al. (2017)에

Table 3. Expected brood stage at each assessment day for eggs at BFD 0

Assessment date	Brood stage in marked cells
BFD 0	Eggs (1) ^{a)}
Assessment date	Expected brood stage in marked cells
BFD +5 days (± 1day)	young to old larva (2, 3)
BFD + 10 days (± 1day)	capped cells (4)
BFD + 16 days (± 1day)	capped cells shortly before hatch (4)
BFD + 22 days (± 1day)	empty cells or egg containing cells (5)

^{a)}The recorded growth stages are transferred into values counting from 0 to 5; 0: termination of development; 1: egg stage; 2: young larvae; 3: old larvae; 4: pupal stage; 5: empty or again filled with brood

묘사하였다. 포토박스 크기는 1.2 × 0.6 × 1.5 m (L × W × H) 이고 소비관 홀더가 있어서 소비관을 고정할 수 있다. AF-S NIKKOR 18-105 mm 1:3.5-5.6G ED 렌즈가 있는 NIKON D300S 카메라를 이용하여 소비관을 촬영하였다. 카메라는 exposure time 1/6s, F-number F/4.8, aperture 4.5, ISO 200, focal length 52 mm로 설정하였다. 소비관 이미지는 컴퓨터로 옮겨 Microsoft PowerPoint 2010로 분석하였다. BFD 0일에 200개의 알을 원모양의 셀로 지정하였다. 처음 촬영한 사진(BFD 0)에서 지정된 200개의 셀을 그룹으로 설정한 후 다음 지정 관측일 날에 촬영한 소비관 이미지 위에 겹쳐놓아 셀 분석을 수행하였다.

Brood termination rate (BTR)

BTR은 다음과 같이 계산하였다

$BTR = (\text{관측일자에 예상 난 유충 발달단계에 도달하지 못한 셀의 수} / \text{관찰된 셀의 총 수}) \times 100$

Brood index (BI) and compensation index (CI)

BI는 난 유충 발달의 지표이며 봉군마다 각 BFD 평가일에 계산을 하였다. 평가 일정에 예상되는 발달 단계에 도달한 셀은 1부터 5점까지 점수를 부여하였다. 난 유충 셀이 정상 발달 단계에 도달하지 못했거나 BFD +5일에서 +16일동안 먹이가 셀(BFD 0일에 알인 경우)에 저장되어 있다면, 다시 셀이 산란에 이용되는 여부와 상관없이, 평가일과 평가일 이후에도 0점 처리하였다. 봉군의 BI는 BFD 일자 별로 평가된 셀의 값을 모두 합한 후 관찰된 셀의 수로 나누어 구하였다.

CI는 봉군 회복의 지표이며 각 BFD 평가일에 계산하였다. 셀은 평가일에 확인된 성장단계만을 토대로 1부터 5점까지 점수를 부여하였다. BI와 달리 셀이 정상 발달단계에 도달하지 못해도 셀 안에 산란이 있으면 점수를 부여하였다. 봉군의 CI는 같은 BFD 일자에 평가된 셀의 값을 모두 합한 후 관찰된 셀의 수로 나누어 구하였다.

통계

통계분석은 IBM SPSS를 사용하였다. 데이터는 Shapiro-Wilk's test을 사용하여 정규분포를, Levene's test을 사용하여 등분산 검정을 하였다. Dunnett's t-test을 사용하여 치사율(>control), 비행활동(<control), BTR (>control), BI (<control) 그리고 CI (<control)을 비교하기 위해 다중비교($\alpha = 0.05$)를 수행하였다.

Table 4. Data on the climatic conditions during the experimental period

Date	Days of experiment	Temperature (°C)			Rel. humidity (%)			Rain (mm)
		mean	max	min	mean	max	min	
18-Apr	-3	13.5	21.9	8.8	81.0	97.5	51.6	0.5
19-Apr	-2	12.3	17.7	6.1	60.2	90.9	29.0	0
20-Apr	-1	11.6	15.2	8.6	68.6	95.9	34.9	3
21-Apr	0	12.3	18.8	6.8	74.4	97.4	42.9	0
22-Apr	1	12.7	20.3	6	70.5	96.5	27.3	0
23-Apr	2	13	22.1	5.1	62.7	92.9	32.2	0
24-Apr	3	14.5	22.9	4.9	54.4	89.4	23.9	0.5
25-Apr	4	16.9	22.2	11.1	96.0	93.2	46.4	5.5
26-Apr	5	15.3	20.5	8.7	61.4	94.8	27.1	0.5
27-Apr	6	12.1	19.1	5.1	54.4	91.5	20.9	0
28-Apr	7	14.9	24.2	7.2	54.1	81.2	15.9	0
29-Apr	8	17.6	25.3	7.9	49.6	94.2	12.5	0
30-Apr	9	20	26.8	13.8	53.4	81.6	40.5	0
01-May	10	18.3	28.3	10.3	66.4	94.9	25.9	0
02-May	11	18.7	27	11	62.1	91.7	30.4	0
03-May	12	19.6	27.9	11.2	59.9	92.6	30.9	0
04-May	13	19.9	27.4	12.8	63.4	91.9	29.6	0
05-May	14	18.9	25.5	15.7	77.6	95.4	48.0	11.5
06-May	15	15.5	21.9	9.8	59.2	94.4	15.8	0
07-May	16	14.9	22.8	8.5	67.7	90.6	33.2	0
08-May	17	17.1	23.3	9.7	55.5	92.0	23.9	0
09-May	18	15	18.2	12.6	82.5	95.2	58.4	15.5
10-May	19	15	17.2	12.5	88.0	95.7	67.3	2.5
11-May	20	19.9	26.7	14.7	68.9	83.9	38.0	0
12-May	21	19.8	23.3	14.6	73.8	91.9	56.9	0
13-May	22	18.5	25.6	13.6	76.6	93.9	49.9	0
14-May	23	15.7	21.6	10.3	65.0	95.6	26.2	0
15-May	24	15	21.2	9	68.5	91.7	37.5	0
16-May	25	15.5	22.5	9.9	70.4	92.7	40.2	0

결과 및 고찰

기후 조건

시험기간 동안 온도, 상대습도, 강수량을 Table 4에 나타내었다. 농약 살포일로부터 7일간 터널 내 농약 노출기간 동안 평균 기온은 12.1°C~16.9°C 였고 낮에는 20°C가 넘는

따뜻한 날씨를 유지하여 꿀벌의 비행활동이 활발하였다. 시험기간 동안 총 8회의 비가 내렸고 농약 살포 후 3일에 소량(0.5 mm)의 비가 내렸다. 터널 밖 시험기간인 농약 살포 후 8일부터 26일까지는 3회의 비가 내렸고 비가 내린 5월 9일, 10일을 제외하고는 낮 기온은 20°C가 넘었고 최고 28°C 까지 따뜻한 날씨를 유지하였다.

Table 5. Mortality of worker bees during the experimental phase

day ^{a)}	Control		Diflubenzuron WP 25%		Carbaryl WP 50%	
	mean ^{b)}	SD ^{c)}	mean	SD	mean	SD
day -3	294.7	15.4	232.3	70.1	375.3	126.0
day -2	150.3	46.7	67.3	32.3	117.0	40.1
day -1	213.7	64.2	127.3	36.1	183.0	17.7
daily mean day -3 to day-1b.a. ^{d)}	219.6	72.3	142.3	83.5	225.1	134.2
day 0	318.7	80.0	143.7	29.0	1142.3	170.4
day 1	92.7	30.7	36.7	20.6	315.3	80.6
day 2	235.0	32.5	101.3	25.7	609.7	169.5
day 3	222.0	119.8	127.7	31.8	336.0	124.1
day 4	301.3	70.8	165.3	54.6	293.3	42.2
day 5	248.7	79.6	155.7	27.4	317.7	37.7
day 6	291.7	117.9	170.3	35.7	251.7	36.8
day 7	219.0	76.0	123.0	45.2	277.0	82.3
daily mean day 0 to day7a.a. ^{e)}	241.1	70.9	128.0	43.5	442.9 (*)	304.0
day 8	10.3	2.5	10.0	2.0	13.7	6.5
day 9	7.3	3.5	8.0	1.7	6.7	0.6
day 10	18.3	10.8	11.3	4.0	20.0	7.9
day 11	19.7	13.6	7.0	1.7	26.7	19.1
day 12	7.3	4.0	8.0	1.0	20.0	18.5
day 13	16.3	6.7	7.3	2.9	14.7	13.3
day 14	19.7	8.5	18.0	5.6	19.0	14.7
day 15	83.7	23.8	92.7	11.0	130.7	45.9
day 16	8.7	3.8	4.0	2.6	16.7	6.8
day 17	19.7	13.6	7.0	1.7	26.7	19.1
day 18	-	-	-	-	-	-
day 19	45.7	20.0	34.0	4.0	43.7	11.6
day 20	13.0	7.0	11.0	6.6	15.7	2.1
day 21	45.7	18.6	28.3	24.4	33.3	19.3
day 22	52.3	15.0	46.7	15.9	100.7	19.0
day 23	14.0	3.0	8.3	2.5	20.7	5.7
day 24	15.0	4.4	17.3	5.8	21.7	11.0
day 25	17.3	3.8	10.3	5.5	17.3	3.1
daily mean day 8 to day 25a.a.	24.4	20.6	19.4	22.1	32.2	32.9
daily mean day 0 to day 25a.a.	93.7	111.4	54.1	59.6	163.6 (*)	256.7

^{a)}days -3 to -1 = days before application; day 0 to 25 = days after application

^{b)}mean values of three tunnels per treatment group

^{c)}SD = standard deviation

^{d)}b.a = before application; ^{e)}a.a = after application

day 18 = there was heavy rain on the assessment day and therefore mortality of worker bees could not be assessed.

* = statically significant compared to the control

꿀벌 및 번데기 치사 개체 수

Table 5는 무처리군, 양성대조군, carbaryl 수화제 처리군에서 꿀벌 치사 개체 수를 나타낸다. 농약 살포 전 3일 동안 꿀벌 치사 개체 수는 세 처리군 모두 통계적으로 유의한 차이가 없어서 처리 전 조건이 비슷했음을 알 수 있었다. Carbaryl 수화제 처리군에서 약제 살포 후 3일 동안은 무처

리군에 비해 많은 수의 치사 개체 수가 발생하였지만 살포 후 4일부터는 무처리군과 치사 개체수가 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다. 이는 carbaryl 수화제의 안전방사 기간이 5일인 것과 비교했을 때 예측 가능한 결과라고 할 수 있다. 반면 양성대조군의 꿀벌 치사 개체 수는 무처리군과 비교할 때 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 이는 2016

Table 6. Mortality of pupae during the experimental phase

day ^{a)}	Control			Diflubenzuron WP 25%			Carbaryl WP 50%		
	total	mean ^{b)}	SD ^{c)}	total	mean	SD	total	mean	SD
day -3	5	1.7	1.2	0	0.0	0.0	2	0.7	0.6
day -2	3	1.0	1.0	0	0.0	0.0	0	0.0	0.0
day -1	1	0.3	0.6	4	1.3	2.3	2	0.7	1.2
sum day -3 to day -1 b.a. ^{d)}	9	3.0	2.0	4	1.3	2.3	4.0	1.3	1.2
day 0	9	3.0	2.0	5.0	1.7	0.6	4.0	1.3	2.3
day 1	0.0	0.0	0.0	2.0	0.7	0.6	1.0	0.3	0.6
day 2	7.0	2.3	2.5	5.0	1.7	2.1	7.0	2.3	0.6
day 3	1.0	0.3	0.6	11.0	3.7	2.3	2.0	0.7	0.6
day 4	6.0	2.0	3.5	16.0	5.3	4.2	9.0	3.0	1.0
day 5	0.0	0.0	0.0	19.0	6.3	2.5	9.0	3.0	0.0
day 6	0.0	0.0	0.0	18.0	6.0	1.0	8.0	2.7	2.5
day 7	2.0	0.7	0.6	15.0	5.0	4.6	1.0	0.3	0.6
Sum day 0 to day 7 a.a. ^{e)}	25	3.1	3.6	91.0 (*)	11.4	6.6	41.0	5.1	3.5
day 8	6	2.0	2.6	7.0	2.3	2.3	1.0	0.3	1.0
day 9	3	1.0	1.0	1.0	0.3	0.6	3.0	1.0	0.6
day 10	0	0.0	0.0	3.0	1.0	1.0	1.0	0.3	1.2
day 11	7	2.3	4.0	7.0	2.3	3.2	2.0	0.7	0.6
day 12	0	0.0	0.0	4.0	1.3	1.5	1.0	0.3	0.6
day 13	6	2.0	2.6	5.0	1.7	2.9	1.0	0.3	0.6
day 14	0	0.0	0.0	18.0	6.0	8.7	1.0	0.3	0.0
day 15	0	0.0	0.0	23.0	7.7	10.8	0.0	0.0	1.5
day 16	0	0.0	0.0	2.0	0.7	0.6	5.0	1.7	0.6
day 17	7	2.3	4.0	7.0	2.3	3.2	1.0	0.3	0.6
day 18	-	-	-	-	-	-	-	-	-
day 19	0	0.0	0.0	7.0	2.3	2.1	0.0	0.0	0.0
day 20	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
day 21	0	0.0	0.0	1.0	0.3	0.6	0.0	0.0	0.0
day 22	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
day 23	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
day 24	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6
day 25	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	0.7	0.0
sum day 8 to 25 a.a.	29	1.7	2.8	85.0 (*)	5.0	6.5	18.0	1.1	1.3
sum day 0 to day 25 a.a.	54	2.2	3.1	176.0 (*)	7.0	7.1	59.0	2.4	2.9

^{a)}days -3 to -1 = days before application; day 0 to 25 = days after application

^{b)}mean values of three tunnels per treatment group

^{c)}SD = standard deviation

^{d)}b.a = before application; ^{e)}a.a = after application

day 18 = there was heavy rain on the assessment day and therefore mortality of pupae could not be assessed.

* = statically significant compared to the control

년 수행한 반야외시험 양성대조군 diflubenzuron 처리군과 비슷한 결과이다(Chon et al., 2017). 터널 밖 관찰기간 +8일부터 +25일까지는 세 처리군 모두 꿀벌 치사 개체 수에서 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다.

Table 6은 시험기간 동안 번데기 치사 개체 수 변화를 나타낸다. 농약 처리 전 3일 동안에는 세 처리군 모두 통계적으로 유의한 차이가 없어 비슷한 봉군이 유지되고 있는 것을 알 수 있었다. 하지만 농약 처리 후에는 양성대조군의 번데기 치사개체수가 무처리군 및 carbaryl 수화제 처리군보다 통계적으로 유의하게 많았다. 이는 diflubenzuron이 IGR계 농약으로서 꿀벌의 유충에 영향을 미치므로 예측 가능한 결과였다(Emmett and Archer, 1980). 터널 밖 관찰 기간 동안에도 diflubenzuron 처리 군의 번데기 치사 개체수가 무처리군과 carbaryl 수화제 처리군에 비해 통계적으로 유의하게 많았다. Carbaryl 수화제 처리군은 무처리군에 비해 꿀벌 치사 개체 수는 영향을 받았지만 번데기 치사 개체 수에서는 영향을 받지 않았음을 알 수 있었다.

비행활동

농약 살포 전 3일 동안 평균 꿀벌 비행활동 수는 세 처리군 모두 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 무처리군, 양성대조군, carbaryl 수화제 처리군의 평균 비행활동은 각각 19.4, 13.5, 12.1 bees/m²이었다. 농약 살포일 하루 전에는 비

가 내려 꿀벌 비행활동 개체 수가 3마리 미만이었다. 살포일 당일에는 무처리군과 양성대조군의 꿀벌 비행활동이 통계적으로 유의한 차이가 없었지만 carbaryl 수화제 처리군은 농약 살포일 날과 다음날은 비행활동 개체 수가 2마리 미만 이었고 점점 회복되기 시작하여 약제 노출 5일 후 비행활동 개체 수가 10마리 이상으로 증가하였다. 약제 살포 후 7일 동안의 무처리군, 양성대조군, carbaryl 수화제 처리군의 평균 비행활동 수가 각각 19.2, 17.7, 8.0 bees/m² 이었고 시험물질 처리군의 비행활동 수가 통계적으로 유의하게 작았다. 이는 꿀벌 치사 개체 수와 일치하는 결과로서 carbaryl 수화제 처리시 꿀벌 성체의 개체 수 및 비행활동이 영향을 받는다는 것을 알 수 있었다.

봉군 세력

Table 8은 BFD 0일부터 +28일까지의 꿀벌 개체 수 변화를 나타낸다. BFD 0일의 무처리군, 양성대조군, carbaryl 수화제 처리군의 평균 꿀벌 개체 수는 각각 6905, 6417, 8396 마리로 봉군 전체 크기는 약 7000~8000 마리 되는 규모였다. 무처리군은 꿀벌 개체 수가 꾸준히 증가하여 BFD +28일에 약 37% 이상 증가하였지만 양성대조군 diflubenzuron 처리군은 BFD +22일에 꿀벌 개체 수가 약 15% 이상 감소하였다가 BFD +28일에 98.7%로 증가하였다. Carbaryl 수화제 처리군은 살포 후 치사 개체가 발생하여 그 개체 수가

Table 7. Flight activity of honey bees during the exposure phase in the treatments

days ^{a)}	Control		Diflubenzuron WP 25%		Carbaryl WP 50%	
	number of bees		number of bees		number of bees	
	mean ^{b)}	SD ^{c)}	mean	SD	mean	SD
day -3	25.0	3.5	16.3	1.5	9.8	0.4
day -2	32.3	3.5	25.8	4.0	25.3	1.5
day -1	1.0	0.6	2.7	0.6	1.2	0.5
mean day 0 b.a. ^{d)}	19.2	0.7	9.2	2.2	12.1	0.5
daily mean day -3 to day 0 b.a.	19.4	13.4	13.5	9.9	12.1	10.0
mean day 0 a.a. ^{e)}	17.7	1.2	12.4	1.2	1.7	0.3
day 1	14.3	0.3	23.9	3.0	1.2	0.8
day 2	20.0	1.5	28.1	0.7	4.7	1.2
day 3	28.2	2.7	11.1	1.5	8.6	2.4
day 4	15.0	0.9	16.0	1.3	9.6	2.7
day 5	22.1	0.8	17.3	0.7	13.0	1.8
day 6	19.9	1.1	17.8	1.5	12.9	3.1
day 7	16.0	0.9	15.0	1.7	12.2	3.4
daily mean day 0 to day 7 a.a.	19.2	4.5	17.7	5.7	8.0 (*)	4.9

^{a)}days -3 to -1 = days before application; day 0 to 25 = days after application

^{b)}mean values of three tunnels per treatment group

^{c)}SD = standard deviation

^{d)}b.a = before application; ^{e)}a.a = after application

* = statically significant compared to the control

Table 8. Number of bees per assessment per colony

(a) Number of bees per colony in the control group						
tunnel	BFD 0	BFD +5	BFD +10	BFD +16	BFD +22	BFD +28
	# bees	# bees	# bees	# bees	# bees	# bees
1	7137	8159	8894	9079	7258	8799
2	6455	7177	7702	7993	7909	7983
3	7123	8071	8757	9955	11580	11650
sum	20715	23407	25353	27027	26747	28432
mean	6905.0	7802.3	8451.0	9009.0	8915.7	9477.3
SD	389.8	543.3	652.3	982.9	2330.2	1925.3
%	100.0	113.0	122.4	130.5	129.1	137.3
(b) Number of bees per colony in diflubenzuron group						
tunnel	BFD 0	BFD +5	BFD +10	BFD +16	BFD +22	BFD +28
	# bees	# bees	# bees	# bees	# bees	# bees
1	5702	5004	6288	5435	4354	6831
2	6920	7095	7472	8055	6385	6760
3	6630	8322	8191	7372	5449	5401
sum	19252	20421	21951	20862	16188	18992
mean	6417.3	6807.0	7317.0	6954.0	5396.0	6330.7
SD	636.2	1677.6	960.9	1359.1	1016.5	805.9
%	100.0	106.1	114.0	108.4	84.1	98.7
(c) Number of bees per colony in carbaryl group						
tunnel	BFD 0	BFD +5	BFD +10	BFD +16	BFD +22	BFD +28
	# bees	# bees	# bees	# bees	# bees	# bees
1	9906	9228	9659	6508	5490	6282
2	8030	7073	8567	6650	9491	9330
3	7254	7287	8911	11822	14800	12290
sum	25190	23588	27137	24980	29781	27902
mean	8396.7	7862.7	9045.7	8326.7	9927.0	9300.7
SD	1363.5	1187.2	558.3	3027.9	4670.3	3004.1
%	100.0	93.6	107.7	99.2	118.2	110.8

줄었지만 터널 밖 시험기간인 BFD +10일 이후 봉군 쏠림 현상이 나타나 세 번째 봉군에서 꿀벌 개체 수가 급격히 증가하였다. BFD +28일에 전체 봉군의 10%가 증가하여 꿀벌 전체 개체 수에 대한 약제 영향이 없는 것으로 판단되었다. 하지만 봉군 쏠림 현상으로 인한 개체 수 증가 영향이 있기 때문에 약제의 영향이 어느 정도였는지 정확히 말할 수 없는 한계가 있다. 꿀벌 반야외시험법은 BFD +10일 이후에 터널 밖에서 봉군을 밖으로 꺼내어 관찰을 하도록 되어있다. 국내에서 이 시험법을 적용시 터널 밖에 아카시 꽃등이 만발하여 농약에 영향을 받은 봉군일지라도 회복할 가능성이 있어 이 부분에 대한 향후 추가 연구가 필요하다고 생각된다.

Brood termination rate (BTR)

BFD 0을 알(egg)로 기준했을 때 무처리군, 양성대조군, carbaryl 수화제 처리군의 BTR은 각각 29.3%, 77.3%, 68.8%

이었다. 무처리군에 비해 양성대조군과 carbaryl 수화제 처리군의 BTR은 통계적으로 유의한 차이를 보였다. 이는 carbaryl 수화제가 꿀벌 난 유충 발육에 영향을 미쳤다는 것을 의미한다. 또한 양성대조군 BTR 값은 선행 연구에서 70% 이상 되어야 한다는 조건과 부합한 결과이다(Becker et al., 2015).

Brood index (BI) and compensation index (CI)

BTR 결과에서 예측할 수 있듯이 BFD +22일에서 음성대조군의 BI는 3.52였고 양성대조군 및 carbaryl 수화제 처리군은 BI가 각각 1.13, 1.56으로서 알(egg)이 발달단계에 따라 제대로 성장하지 못했다는 것을 알 수 있었다. 양성대조군과 carbaryl 수화제의 BI 값은 BFD +5일부터 +22일까지 2 미만을 유지하였다. CI 값은 BFD +5에서 +22일까지 무처리군은 2.60에서 4.26으로 양성대조군은 1.75에서 3.38로,

Table 9. Brood termination rates of the marked cells in the case of eggs at BFD 0

Treatment Group	Eggs BFD 0	22 day after BFD 0 brood terminated		
		#	BTR [%]	Mean BTR [%]
Control	200	63	31.5	29.3
	200	69	34.5	
	200	44	22.0	
Diflubenzuron WP 25%	200	168	84.0	77.3 (*)
	200	96	48.0	
	200	200	100.0	
Carbaryl WP 50%	200	118	59.0	68.8 (*)
	200	173	86.5	
	200	122	61.0	

BFD 0 = brood fixing day 0; # = number of terminated cells; BTR = brood termination rate
 * = statically significant compared to the control

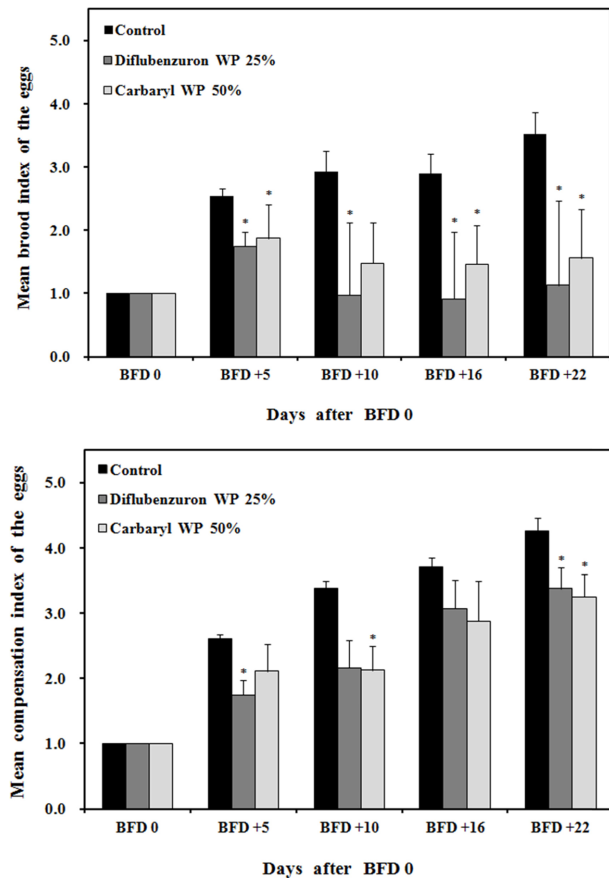


Fig. 1. Mean brood indices and compensation indices of eggs, * = statistically significant compared to the control.

carbaryl 수화제는 2.11에서 3.25로 변화였다. CI 값도 BI 값과 비슷한 패턴으로 무처리군에 비해 양성대조군 및 carbaryl 수화제 처리군은 낮은 값을 나타내었다. 이는 carbaryl 수화제 처리군의 봉군 내 난 유충이 농약의 영향을 받았다는 것을 의미한다.

국내 구축된 꿀벌 반야외시험법을 활용하여 carbaryl 수화

제의 독성평가를 수행한 결과 carbaryl 수화제가 꿀벌 치사 개체 수 및 비행활동에서 살포 후 4일정도 영향을 미쳤고 그 이후에는 이에 대한 영향이 없었다. Carbaryl 수화제 살포 후에 봉군의 난 유충 발육에는 분명한 영향을 미쳤지만 터널 밖 시험에서 봉군 쏠림 현상으로 전체 봉군의 개체 수에 대한 영향은 단정지을 수 없는 결과를 나타내었다. 향후 터널 밖 시험에서 봉군 배치에 대한 추후 연구가 필요할 것으로 보이며 본 시험법을 활용하여 꿀벌에 위해성이 있는 농약에 대한 심층연구가 가능할 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 국립농업과학원 기관고유 연구사업(과제번호: PJ0109372017)에 의해 수행되었습니다. 이에 감사드립니다.

Literature Cited

Becker, R., J. Lückmann and J. Pistorius (2015) Effectiveness of method improvements of OECD GD 75-Evaluation by the ICP-PR Bee Brood Working Group. *Julius-Kühn-Archiv.* 450:83-92.

Beekman, M. and F. L. W. Ratnieks (2000) Long range foraging by the honey bee, *Apis mellifera* L. *Funct. Ecol.* 14(4):490-496.

Chon, K., H. Lee, H. C. Hwang, J. Im, K. H. Park, M. K. Paik and Y. S. Choi (2017) The honey bee brood test under semi-field conditions for the assessment of positive reference chemicals in Korea. *Appl. Biol. Chem.* 60(5):569-582.

EFSA (2012) Scientific Opinion on the science behind the development of a risk assessment of Plant Protection Products on bees (*Apis mellifera*, *Bombus* spp. and solitary bees). *EFSA J.* 10(5):2668.

Ellis, J. D., J. D. Evans and J. Pettis (2010) Colony losses,

- managed colony population decline, and Colony Collapse Disorder in the United States. *J. Apic. Res.* 49(1):134-136.
- Emmett, B. J. and B. M. Archer (1980) The toxicity of diflubenzuron to honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies in apple orchards. *Plant. Pathol.* 29(4):177-183.
- Jeker, L., L. Schmid, T. Meschberger, M. Candolfi, S. Pudenz and J. P. Magyar (2012) Computer-assisted digital image analysis and evaluation of brood development in honey bee combs. *J. Apic. Res.* 51(1):63-73.
- Jung, C. (2008) Economic value of honeybee pollination on major fruit and vegetable crops in Korea. *Korean J. Apic.* 23(2):147-152.
- Miles, M. (2003) The effects of spinosad, a naturally derived insect control agent to the honeybee. *Bull. Insectol.* 56(1):119-124.
- OECD (2007) Guidance document on the honey bee (*Apis mellifera* L.) brood test under semi-field conditions. Series on testing and assessment. No. 75:3-27.
- Sanchez-Bayo, F. and K. Goka (2014) Pesticide residues and bees - A risk assessment. *PloS one*, 9(4):e94482.
- USEPA (2014) Guidance for assessing pesticide risks to bees. Pollinator Risk Assessment Guidance.
- vanEngelsdorp, D. and M. D. Mexiner (2010) A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *J. Invert. Pathol.* 103:S80-S95.

꿀벌 반야외시험법을 활용한 carbaryl 수화제 독성평가

전경미* · 김보선 · 이 환 · 박경훈 · 백민경 · 최용수¹ · 문병철

농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부, ¹농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부 잠사양봉소재과

요 약 국내 구축된 꿀벌 반야외시험법을 활용하여 carbaryl 수화제가 꿀벌에 미치는 영향을 종합적으로 평가하였다. 본 시험은 국립농업과학원 반야외시험 야외포장에서 2017년 4월 중순부터 약 한 달간 수행되었다. 시험은 무처리군, 양성대조군(diflubenzuron 수화제), carbaryl 수화제 처리군으로 각각 3반복 시험을 수행하였다. 총 28일의 시험 기간 동안 꿀벌의 치사 개체 수, 비행활동, 봉군 상태, 난 유충 발육도를 측정하였다. Carbaryl 수화제 처리군에서는 농약 살포 후 3일간은 꿀벌 치사 개체 수가 무처리군에 비해 현저히 증가하였고 비행활동은 5마리 이하로 감소하였다. 하지만 시간이 지난 후 치사 개체 수와 비행활동은 무처리군과 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았다. 무처리군, 양성대조군, carbaryl 수화제 처리군의 brood termination rate (BTR)은 각각 29.3%, 77.3%, 68.8%이었다. Carbaryl 수화제가 봉군의 난 유충 발육에는 분명한 영향을 미쳤지만 터널 밖 시험에서 봉군 쏠림 현상으로 약제 처리군의 봉군 크기에 대한 영향은 정확히 설명할 수 없었다. 향후 터널 밖 시험에서 봉군 배치에 대한 추후 연구가 필요할 것으로 보이며 본 시험법을 활용하여 꿀벌에 위해성이 있는 농약에 대한 심층연구가 가능할 것으로 생각된다.

색인어 꿀벌, 반야외시험, carbaryl 수화제