

Burkholderia Pyrocinia CAB08106-4의 국소자극성시험 및 피부감작성시험

이보승^{1,2} · 신성섭² · 정창국³ · 백철기³ · 권민^{2*} · 이범준^{1*}¹충북대학교, ²(주)센트럴바이오, ³한국삼공 연구소³

Local Irritation and Skin Sensitization Evaluation of *Burkholderia pyrocinia* CAB08106-4

Bo-Seung Lee^{1,2}, Sung-Sup Shin², Chang-Kook Chung³, Cheol-Ki Beak³, Min Kwon^{2*} and BeomJun Lee^{1*}¹Chungbuk National University, Chungdae-ro 1, Seowon-Gu, Cheongju, Chungbuk 28644, Korea²CentralBio Co., Ltd, 25, Josanjae-ro 66beon-gil, Gaegok-ri, Wolgot-myeon, Gimpo-si, Gyeonggi-do, Korea³Agricultural Research Center Hankook Samgong, #788-22, Kongjwipatjwi-Ro, Geumgu-Myun, Kimje-Si, Jeonrabuk-Do, Korea

(Received on December 14, 2018. Revised on June 19, 2019. Accepted on June 26, 2019)

Abstract *Burkholderia pyrocinia* CAB08106-4 has antibacterial efficacy against garlic black rot mycosis caused by *Sclerotium cepivorum* and *Sclerotium* sp. It is an environmentally friendly microbial product for the management and prevention of various plant pathogens including *scarreotium cepivorum* and *Sclerotium* sp. The purpose of this study is to evaluate *Burkholderia pyrocinia* CAB08106-4 against local irritation and skin sensitization that develops in the skin and mucosa. In skin and eye irritation test, test substance was administered to the skin and eye of NewZealand White rabbits. Skin irritation test was performed for 72 hours and eye irritation test was performed for 7 days. Body weights were measured on days of before test substance administration, and on days 3 after administration in skin irritation test and measured on days of before test substance administration, and on days 3, 7 after administration in eye irritation test. As a result, general clinical signs, skin irritation, and eye irritation were not observed during the entire test period, and the body weight was increased normally. In the skin sensitization test, test substance was administered to the skin of Hartley guinea pigs, and skin was observed at 24 hours and 48 hours after the induction of the test substance. As a result, there were no general clinical signs due to administration of the test substance, normal weight gain was observed, no skin reaction such as erythema and edema was observed, and the sensitization index and the frequency index were calculated as 0 and 0%, respectively. From the above results, it was evaluated that the test substance did not cause skin irritation and eye irritation and did not cause any skin sensitization, so that it was not problematic.

Key words Local Irritation, skin sensitization, Microbial Pesticide toxicity, Garlic White Rot, *Burkholderia pyrocinia*

서 론

화학농약은 농작물과 그 수확물을 보호하는 화학물질로서, 영농과정에서 자주 발생하는 병해충의 방제를 위해 사용하

는 물질로 가장 직접적이고 효과가 빠르며, 경비가 적게 들어 농업생산성을 높이기 위해 사용하는 물질이다. 그러나 최근에 농업생산성을 높이기 위해 사용한 농약이 그 본래의 효과 이외에 수자원이나 토양 등을 오염시키는 환경오염원으로 악영향을 끼치는 결과를 초래하고 있으며, 병해충의 농약 저항성 증대와 같이 예기치 않은 많은 사회적 문제를

*Corresponding author
E-mail: beomjun@cbu.ac.kr

야기하고 있다. 이러한 화학농약의 잠재적 유해영향에 대한 사회적 관심의 증대로 농작물의 안정적 생산을 유지하면서 농약의 부정적 영향을 최소화 할 수 있는 해충관리에 대한 새로운 관리법으로서 친환경 유기농 자재를 사용하고 있다. 그러나 친환경 유기농자재의 목록공시는 평가가 일회성이고, 사용목적이 광범위하고, 대부분 유기성자재로서 주성분의 최소량 또는 유해성분의 최대량 등 객관적인 규격 제기가 어려우며, 약효 발현 주성분과 살충, 살균효과가 불분명한 단점이 있다(Nam, 2011).

최근 유기 합성 농약의 사용으로 인한 환경생태계 오염에 대한 우려와 친환경 유기농업자재의 문제점을 대체하기 위한 방법으로 자연계에 존재하는 토착미생물을 직접 이용하거나 이들의 기능을 활용한 생물농약이 꾸준히 개발되고 있다(Park, 2011). 미국에서 1961년 등록된 Bt 살충제는 다양한 종류의 농작물과 해충들을 방제하는데 효과적(Sudakin, 2003; Siegel, 2001)이라고 알려져 있다. 전 세계적으로 널리 사용되고 있고, OECD는 2020년 세계 농약시장에서 Bt를 이용한 생물농약이 20% 정도 차지할 정도로 성장 할 것으로 예측하였다(Whalon and Wingerd 2003). 그러나 정부의 화학농약 저감 정책에도 불구하고 사용량이 줄지 않는 것은 화학농약을 대체할 수 있는 유기농업자재 및 생물농약의 개발이 미흡한 점을 그 이유로 볼 수 있다. 우수한 생물농약의 상품화에는 미생물의 분리/동정 기술, 미생물 배양기술, 천연물 분리/동정 기술, 제제기술, 방제기술의 체계화 등 다양한 분야의 전문기술이 필요하다. 화학농약에 대한 병원균의 내성발현문제를 해결하고 농가의 경제적 이득과 농산물 소비자의 안전보호의 측면에서도 효과를 기대할 수 있다.

마늘 흑색썩음균핵병은 1988년 고흥지방의 난지형 마늘 포장에서 처음 흑색썩음균핵병이 발생하여 큰 피해를 주었으며, 지금은 제주도와 무안, 서산, 태안지방까지 발생하고 있다. 특히 난지형 노지마늘 재배 지역에서 피해가 크며 서산, 태안지방에서는 한지형 마늘까지 피해가 확산되고 있고 무안지방에서는 양파포장에도 발생하여 큰 피해를 주고 있다. 토양 전염성 병원균의 일종으로(*Sclerotium cepivorum* Berkeley) 흑색의 구형 또는 편구형 균핵을 형성하고, 균핵의 크기는 보통 0.5~0.8 mm로서 다른 균핵병의 균핵보다 매우 작다. 병징은 마늘 지상부가 황변하여 고사하는 증상을 나타내고, 지하부의 구근에서는 처음 흰균사가 나타나며, 병이 진전되면서 구근 껍질에 흑색의 균핵이 형성된다. 병원균은 균핵 상태로 토양에서 여름을 휴면한 후 9~10월 마늘 파종과 함께 발아하여 기주에 침입하고, 추운 12~1월에 잠시 멈추었다가 2월경부터 발생하여 육안으로 피해 병징을 볼 수 있다. 4월 상순에 가장 피해가 크며, 고온기인 5월 이후에는 줄게 된다. 마늘 흑색썩음균핵병은 토양전염성 병해로 까다롭고 현재 흑색썩음균핵병에 사용되고 있는 살균제는 방제 효과가 그다지 높지 않은 편이다. 또한 화학농약이기 때문

에 인축에 독성을 나타내고 약제의 저항성 유발, 농약 잔류 문제 등의 문제점을 가지고 있다(Asari et al., 1994). *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4는 작물에 발생하는 흑색썩음균핵병균을 효과적으로 방제할 수 있는 버크홀데리아속 미생물 균주를 토양으로부터 분리하고, 버크홀데리아 파이로시니아 CAB08106-4(*Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4)로 명명하였다. *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4는 미생물제제로 마늘의 흑색썩음균핵병을 비롯한 여러 식물병에 대해 방제효과가 우수하며, 기존의 화학농약이 가지고 있는 잔류독성, 환경 유해 등의 문제점을 해결하고 화학농약보다 우수한 방제효과를 얻을 수 있다.

본 시험에서 사용된 피부감작성 시험방법(Draize sensitization test)은 1935년 Landsteiner와 Jacobs에 의해 처음 발표된 시험방법으로 1980년대까지 USFDA 등 가장 널리 사용된 시험방법이고, 국내에서는 농촌진흥청의 미생물농약의 피부감작성 시험방법으로 채택되어 사용되고 있다. 피부감작성시험은 면역보조제인 Friends Complete Adjuvant (FCA)를 병용투여하여 알레르기 상태를 일으키기 쉽게하는 시험법인 Maximization test와 면역보조제를 사용하지 않는 시험법인 Draize test, Buehler test가 있다. 면역보조제를 이용할 경우 사용하는 동물에 감수성을 증진시켜 약한 감작성 물질도 검출을 가능하게 하여 인간에서의 위험성 검출감도를 보다 높여려는 목적으로 사용되고 있다. 일반적으로 면역보조제를 사용하지 않는 시험법은 면역보조제를 이용하는 시험법에서 얻어지는 양성소견을 재확인하기 위해서 이용되는 시험법이다. 최근 동물복지에 대한 인식 향상과 국제사회의 동물시험법대체법에 대한 요구 증가로 기니픽을 이용한 피부감작성시험법의 대체시험법으로 마우스를 이용한 국소 림프절시험법이 개발되어 사용되고 있다. 일반적인 조건에서는 기니픽을 사용한 Maximization test가 사람에게 나타나는 반응과 가장 유사하고 Draize sensitization test는 과소평가되는 경향을 가지고 있다. 그러나 단백질을 포함하는 미생물농약은 Friends Complete Adjuvant (FCA)와 같은 면역증가제를 사용하는 Maximization test로 시험하는 경우 과도하게 과대평가될 가능성이 있어 Draize sensitization test를 사용하는 것으로 알려져 있다.

피부 및 눈 자극성, 피부감작성에 관한 정보는 제품의 안전성 확인에 있어 기본적인 부분이다. 피부 및 눈과 같은 표면장기는 *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 균주를 이용한 생물농약 제품의 제조 및 사용과정에서 주요 노출 경로가 될 가능성이 있다. 따라서 본 시험에서는 마늘 흑색썩음균핵병에 대해 항균물질을 분비하는 *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 균주를 이용한 생물농약 개발 및 상품화를 위해 생물농약 제품의 피부, 안점막에 대한 자극성 및 피부감작성을 평가하고자 한다.

재료 및 방법

본 연구는 농촌진흥청고시(고시 제2013-21호) “농약 및 원제의 등록기준”에 따라 수행되었으며, “동물보호법(제정 1991년 05월 31일 법률 제 4379호, 일부개정 2014년 03월 24일 법률 제 12512호)”에 따라 (주)에이비솔루션 동물실험윤리위원회 운영규정을 준수하여 실시하였다.

시험물질

시험물질인 *Burkholderia pyrocinia* CAB08106-4 원제 (1.0×10^9 cfu/mL)은 한국삼공에서 제공받았다. 시험의 투여 농도에 맞게 멸균생리식염수를 이용하여 희석하여 조제하였으며, 대조물질로는 멸균생리식염수를 사용하였다.

시험동물 및 사육환경

피부 및 안점막자극성시험은 2~3개월의 암컷 NewZealand White계 토끼를 각각 6마리씩 (주)샘타코바이오표로부터 구입하여 6일간 동물 사육실 환경에 적응시켜 시험에 사용하였다. 동물사육실은 온도 $22 \pm 3^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 20\%$, 환기횟수 10~15회/시간, 조명시간 12시간(오전 8시~오후 8시), 조도 150~300 Lux로 유지하였다. 실험동물은 스테인레스제 사육상자(W 380 × L 490 × H 310 mm)에 개별적으로 사육하였고, 음수와 사료는 자유섭취 시켰다.

피부감작성시험은 Hartley계 수컷 기니픽 21마리를 (주)샘타코바이오표로부터 구입하여 7일간 동물 사육실 환경에 적응시켜 시험에 사용하였다. 동물사육실은 온도 $23 \pm 3^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 20\%$, 환기횟수 10~15회/시간, 조명시간 12시간(오전 8시~오후 8시), 조도 150~300 Lux로 유지하였다. 실험동물은 폴리카보네이트 사육상자(W 420 × L 280 × H 180 mm)에 개별적으로 사육하였고, 음수와 사료는 자유섭취 시켰다.

사육상자에는 시험유형, 시험번호, 시험물질, 군번호, 개체번호, 성별, 투여용량 및 투여액량, 시험기간 및 시험책임자를 기재한 개체식별카드를 부착하였다.

피부자극성시험

순화기간을 거친 후 건강한 암컷 NewZealand white 토끼 6마리를 1군으로 구성하였다. 시험물질은 시험물질 10 g에 멸균증류수를 이용하여 10 mL로 총량을 맞추어 마그네슘바를 넣고 5분간 교반기에 교반하여 현탁시킨 후 사용하였다. 시험물질 투여 24시간 전에 전기 제모기를 이용하여 토끼의 배부 피부에 상처가 나지 않도록 $15 \text{ cm} \times 15 \text{ cm}$ 의 넓이로 제모하였다. 토끼의 척추를 중심으로 좌우에 대각선 방향으로 18G 주사침을 이용하여 피부에 약 $2 \text{ cm} \times 3 \text{ cm}$ 넓이의 [#]형 찰과상을 입혔다. 이때 진피에 손상을 입히거나 출혈은 발생하지 않았으며, 각질층만 파괴되었다. 척추를 중심으

로 표시한 적용구획 위에 가로, 세로 $2 \text{ cm} \times 3 \text{ cm}$ 넓이로 좌우 1개소씩 모두 2개소에 현탁시킨 시험물질 상층액 0.5 mL을 피부와 접촉시켰다. 시험물질의 위에는 침투성이 없는 비작극성 의료용 테이프(Tegardern, 3 M)로 감아주었다. 시험물질은 투여 4시간 경과 후 제거하였고, 시험물질의 접촉 부위는 미온수로 가볍게 씻어냈다. 피부반응의 평가는 농촌진흥청고시 “농약 및 원제의 등록기준” [별표 12] 인축 독성 시험기준과 방법 12-2-6, 피부자극성 시험 [피부 반응 평가 기준]에 준하여 실시하였고, 피부 반응의 정도는 첩포를 제거한 후 1, 24, 48시간 및 72시간에 피부 반응 평가 기준에 따라 채점하여 기록하였다. 홍반, 부종 및 가피형성은 육안 및 가변용 촉진을 병행하여 판정하였다. 채점 한 점수를 이용하여 시험물질 투여 후 24시간과 72시간 때의 홍반 평점과 부종 평점을 더해서 평균치를 산출하였고, 이 수치로 피부자극성을 평가하였다. 이때 시험물질의 자극성은 일차자극지수 외에도 시험기간 중 관찰된 일반증상 등을 고려하여 평가하였다. 시험물질 투여 후 72시간까지 일반증상의 변화, 중독증상 및 사망동물의 유무를 관찰하였고, 시험물질 투여 전과 투여 후 24, 72시간에 개체별 체중을 측정하였다.

안점막자극성시험

순화기간을 거친 후 건강한 암컷 NewZealand white 토끼 6마리를 1군으로 구성하였다. 시험물질은 시험물질 10 g에 멸균증류수를 이용하여 10 mL로 총량을 맞추어 마그네슘바를 넣고 5분간 교반기에 교반하여 현탁시킨 후 사용하였다. 시험물질의 투여는 토끼를 고정된 후 우안의 하안검을 가볍게 잡아당기고 결막낭 내에 기술적으로 투여 가능한 최대농도인 10^6 단위에 해당하는 시험물질을 마리당 0.1 mL씩 투여하였고, 좌안은 대조로 하여 투여하지 않았다. 시험물질 투여 후 시험물질의 손실을 방지하기 위하여 약 1초간 양안검을 잡아 폐안시켰다. 시험물질 투여 후 세안을 실시하지 않았다. 안점막반응 평가는 농촌진흥청고시 “농약 및 원제의 등록기준” [별표 12] 인축 독성 시험기준과 방법 12-2-5, 안점막자극성 시험 [안반응 평가표]에 준하여 실시하였고, 시험물질 투여 후 1시간, 1일, 2일, 3일, 4일 및 7일에 각각, 홍채 및 결막 등의 이상 유무를 관찰하였다. 각 관찰시기의 개체별안점막자극지수[0~110점 범위, The Individual Index of Ocular Irritation (I.I.O.I.)]를 산출하였고 이를 이용하여 각 시기별 평균안점막자극지수(M.O.I., Mean Ocular Irritation Index)를 산출하여 평균안자극지수 중 최고치를 급성안점막자극지수(A.O.I., Acute Ocular Irritation Index)로 하였다. 급성안점막자극지수를 이용하여 [안자극 판정표]에 따라 자극성의 정도를 판정하였다. 시험물질 투여 후 7일까지 일반증상의 변화, 중독증상 및 사망동물의 유무를 관찰하였고, 시험물질 투여전과 투여 후 3일 및 7일 후에 개체별 체중을 측정하였다.

피부감작성시험

순화기간을 거친 건강한 수컷 Hartley계 기니픽을 음성대조물질 투여군 5마리, 양성대조물질 투여군 5마리, 시험물질투여군 10마리로 구성하였다. 시험물질은 시험물질 40g에 멸균증류수를 가하여 40 mL로 총량을 맞춘 뒤 마그네틱 바를 넣고 5분간 교반기에 교반한 후 상등액을 분리하여 10⁶에서 10²으로 단계 희석하여 사용하였다. 음성대조물질은 멸균증류수를 그대로 사용하였고, 양성대조물질은 DNCB (SIGMA, Lot No. 100K1323)를 Corn Oil에 용해하여 0.1% DNCB로 조제하였다. 예비시험은 기술적으로 투여 가능한 농도 100% (w/v) 용액인 10⁶cfu를 최고용량으로 설정하였으며, 멸균증류수에 단계별로 10⁵, 10⁴, 10³, 10² 및 10¹으로 희석한 다음 6단계의 용량 수준을 설정하였다. 투여량은 동물개체 당 0.1 mL로 하였고, 각 용량 수준별 개체수는 2마리로 하였다. 예비시험결과 100% 용액과 10⁵, 10⁴ 및 10³ cfu까지 투여부위 자극과 부종이 관찰되어, 시험물질 처리군을 10² cfu용액으로 설정하였고, 음성대조군은 멸균증류수를 적용하였으며, 양성대조물질은 0.1% DNCB를 적용하였다. 감작유도는 기니픽의 측복부를 제모한 다음 10회 투여 중 첫번째 투여 시에는 개체 당 0.05 mL를 피내 주사하였고, 그 후에는 2일 간격으로 0.1 mL씩 9번 피내주사하였다. 음성대조군에는 멸균증류수, 양성대조군은 0.1% DNCB 및 시험물질투여군은 시험물질을 투여하였다. 감작유도 10회 주사 2주 후에 야기주사를 실시하였다. 기니픽의 사용하지 않은 옆구리의 털을 제모한 다음 야기시의 시험물질 농도와 동일 농도의 시험물질을 투여하였다. 야기 후 24시간과 48시간에 피부반응을 조사하였다. 피부반응 평가기준과 피부감작성 평가기준에 따라 감작야기 후 24시간과 48시간째에 홍반과 부종의 평점을 기록하였고, 감작율을 산출하였다. 시험물질 투여 후 첫 30분부터 4시간까지는 매 시간마다 각 개체별로 관찰하고 매일 1회 이상 일반증상관찰을 실시하였다. 체중은 투여 전, 투여 후 7일 및 주 1회 측정하였다.

결과 및 고찰

본 연구는 Burkholderia pyrrocinia CAB08106-4균주를 이용한 생물학적 살충제 개발 및 상품화를 위한 안전성 평가에서 중요한 단계인 피부와 눈에 미치는 잠재적인 자극성 및 민감성 효과를 알아보기 위하여 농촌진흥청의 고시 기준에 따라 실시하였다.

급성독성 평가에서 투여경로의 선택은 시험물질의 특성과 작용 방식을 고려해야한다. 랫트를 이용하여 Burkholderia pyrrocinia CAB08106-4에 대한 급성 경구, 정맥 및 호흡기 독성/병원성 시험을 수행한 결과 암컷과 수컷 모두에서 시험 물질 투여로 인한 변화는 관찰되지 않았다(Kwon et al., 2013). 일반적으로 사람은 경구를 통해 외부로부터 독성물

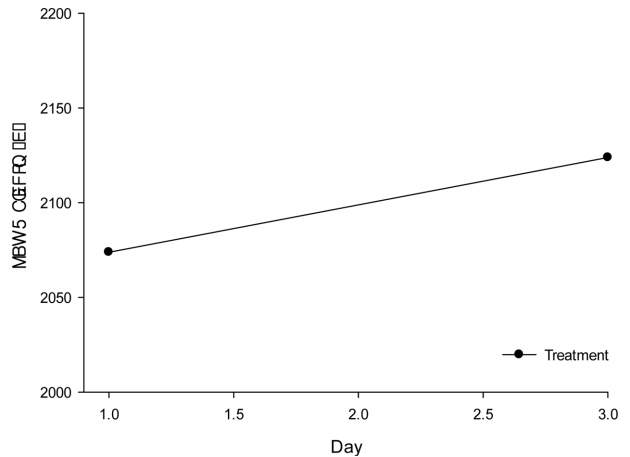


Fig. 1. Changes of body weights of New Zealand white rabbit with the *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4(Skin irritation).

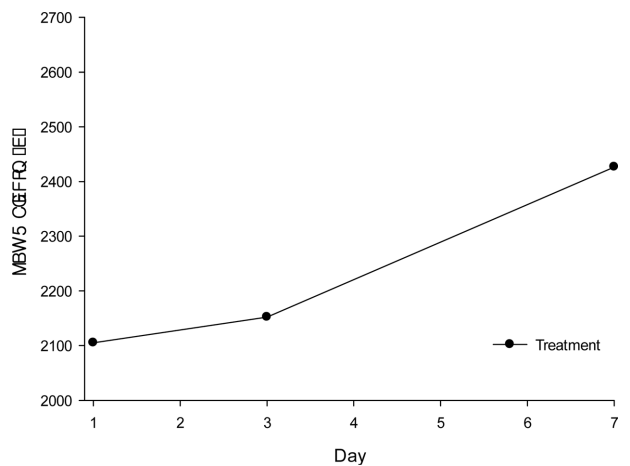


Fig. 2. Changes of body weights of New Zealand white rabbit with the *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4(Eye irritation).

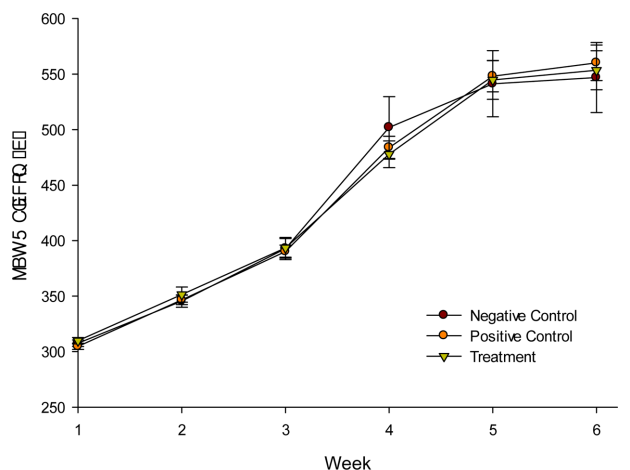


Fig. 3. Changes of body weights of Hartley guinea pigs with the *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4(skin sensitization).

질을 흡수하고, 흡입이나 정맥 노출을 통해서도 노출된다. 그러나 생물학적 살충제를 제조하거나 직접 사용하는 사람

들은 피부나 안점막에 직접 노출될 수 있다. 그러나 아직까
 지 *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4으로 인한 피부와
 안점막 자극에 대한 잠재적인 유해성은 연구되지 않았다.
 피부와 안점막 자극 시험은 함께 이루어지기 때문에(Mancebo
 et al., 2008), 본 시험에서도 피부자극성 시험과 안점막 자
 극성 시험, 피부감작성 시험을 함께 수행하였다.

피부는 외부 환경으로부터 인체를 보호하는 보호 장벽이
 기 때문에 물질의 독성을 평가하는데 있어서 피부 감각과
 자극을 평가하는 것은 매우 중요하다. 시험물질의 경피 흡
 수로 인한 경련, 체중 감소 등과 같은 전신 독성 및 피부와
 의 접촉으로 인한 홍반, 가피 및 부종과 같은 국소 독성을
 평가하여 시험물질의 흡수가 전신 효과 또는 치사를 일으키

기에 충분한지를 평가하는 피부자극성 시험은 국내 및 국제
 독성 시험 규정에 포함되어 있다(U.S.EPA, 1996a와 b). 그
 리고 피부 자극 시험을 통해 얻어진 자료들은 시험 물질에
 반복적으로 노출되는 사람들에서 잠재적으로 발생할 수 있
 는 위험을 평가하는데 사용될 수 있다. 이에 따라 본 시험에
 서도 피부자극성 시험과 안점막자극성시험, 피부감작성시험
 을 모두 수행하였다.

토끼를 이용하여 *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4의
 피부자극성 시험을 수행한 결과 시험물질의 투여로 인한 사
 망 동물이나 이상반응은 나타나지 않았다(Table 1). 시험 기
 간 동안 투여군과 대조군 모두 정상적인 체중 증가가 관찰
 되었다. 그리고 시험물질 투여 후 72시간까지 모든 동물에

Table 1. Evaluation of skin irritation

Sites	Control sites																
	Erythema & Eschar								Edema								
	C1 ³⁾				C2				C1				C2				
Phases	1 h ¹⁾	24 hr	48 hr	72 hr	1 hr	24 hr	48 hr	72 hr	1 hr	24 hr	48 hr	72 hr	1 hr	24 hr	48 hr	72 hr	
2101	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2102	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2104	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2105	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2106	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mean	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Sum of means at 24 and 72 hr	0.0																
P.I.I. ²⁾	0.0																

Sites	Test sites																
	Erythema & Eschar								Edema								
	T1 ⁴⁾				T2				T1				T2				
Phases	1 hr	24 hr	48 hr	72 hr	1 hr	24 hr	48 hr	72 hr	1 hr	24 hr	48 hr	72 hr	1 hr	24 hr	48 hr	72 hr	
2101	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2102	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2104	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2105	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2106	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mean	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Sum of means at 24 and 72 hr	0.0																
P.I.I.	0.0																

¹⁾: Time after topical application

²⁾: P.I.I.(Primary Irritation Index) = Sum of means at 24 and 72 hour/2

³⁾: Control Site

⁴⁾: Test Site

Table 2. Evaluation of eye irritation

Group		Non - Washing						
Animal Number		2101	2102	2103	2104	2105	2106	
Cornea	Degree of Opacity (A)	1 hr	0	0	0	0	0	0
		1 Day	0	0	0	0	0	0
		2 Day	0	0	0	0	0	0
		3 Day	0	0	0	0	0	0
		4 Day	0	0	0	0	0	0
		7 Day	0	0	0	0	0	0
		Diffuse areas of Opacity (B)	1 hr	0	0	0	0	0
	1 Day		0	0	0	0	0	0
	2 Day		0	0	0	0	0	0
	3 Day		0	0	0	0	0	0
	4 Day		0	0	0	0	0	0
	7 Day		0	0	0	0	0	0
	Iris (C)		1 hr	0	0	0	0	0
		1 Day	0	0	0	0	0	0
2 Day		0	0	0	0	0	0	
3 Day		0	0	0	0	0	0	
4 Day		0	0	0	0	0	0	
7 Day		0	0	0	0	0	0	
Conjunctiva		Redness (D)	1 hr	0	0	0	0	0
	1 Day		0	0	0	0	0	0
	2 Day		0	0	0	0	0	0
	3 Day		0	0	0	0	0	0
	4 Day		0	0	0	0	0	0
	7 Day		0	0	0	0	0	0
	Edema (E)		1 hr	0	0	0	0	0
		1 Day	0	0	0	0	0	0
		2 Day	0	0	0	0	0	0
		3 Day	0	0	0	0	0	0
		4 Day	0	0	0	0	0	0
		7 Day	0	0	0	0	0	0
		Lacrima (F)	1 hr	0	0	0	0	0
	1 Day		0	0	0	0	0	0
2 Day	0		0	0	0	0	0	
3 Day	0		0	0	0	0	0	
4 Day	0		0	0	0	0	0	
7 Day	0		0	0	0	0	0	
I.O.I. ^{a)}	1 hr		0	0	0	0	0	0
	1 Day	0	0	0	0	0	0	
	2 Day	0	0	0	0	0	0	
	3 Day	0	0	0	0	0	0	
	4 Day	0	0	0	0	0	0	
	7 Day	0	0	0	0	0	0	
	M.O.I. ^{b)}	1 hr	0.0					
1 Day		0.0						
2 Day		0.0						
3 Day		0.0						
4 Day		0.0						
7 Day		0.0						

a) : I.O.I (Individual Ocular Irritation Index) = (A × B × 5) + (C × 5) + (D + E + F)

b) : M.O.I (Mean Ocular Irritation Index) = $\sum \text{I.O.I} / \sum \text{Number of animal}$

Table 3. Evaluation of skin irritation

Group	Negative Control		Positive Control		Treatment group	
	24 hr	48 hr	24 hr	48 hr	24 hr	48 hr
Mean score	0.0	0.0	2.4	2.8	0	0
Sensitization Rate (%)	0.0	0.0	100	100	0	0
등급	I	I	V	V	I	I

서 흥반, 가피 및 부종이 관찰되지 않았다. 피부자극표와 Draize의 산출방법에 따른 피부 자극성을 판정한 결과 일차 자극지수(P.I.I.)는 0.0으로 산출되었다.

점막은 피부와 비슷하지만 두께가 얇으므로 외부물질의 흡수와 확산 속도가 피부보다 빠르게 진행되고, 전신독성 및 국소독성이 빠르게 나타날 수 있기 때문에 시험물질이 점막에 접촉하였을 때 나타나는 전신독성 및 국소독성을 파악하는 것이 중요하다. 따라서 본 연구에서는 *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4이 점막에 접촉하였을 때 나타나는 전신독성 및 각막 혼탁, 홍채이상, 결막의 발적, 부종 및 배출물과 같은 안점막자극성을 파악하기 위하여 실시하였다. 그 결과 *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4가 투여된 토끼에서는 시험물질의 투여에 의한 사망동물이나 이상반응은 관찰되지 않았다(Table 2). 체중측정 결과, 투여군과 대조군 모두 정상적인 체중 증가가 관찰되었다. 시험물질 투여 후 1시간, 1일, 2일, 3일, 4일 및 7일 후에 안점막 자극성을 관찰한 결과, 모든 동물에서 각막의 혼탁, 홍채 이상, 결막의 발적, 부종 및 배출물이 관찰되지 않아 평균 안자극 지수(M.O.I.)는 투여 후 1시간, 1일, 2일, 3일, 4일 및 7일까지 모두 0.0으로 산출되었고, 급성안점막자극지수(A.O.I.)는 0.0으로 산출되었다.

그리고 피부감작성 시험에서는 실험기간 동안 *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4의 투여에 의한 사망동물 및 이상반응은 관찰되지 않았다(Table 3). 투여군과 대조군 모두 정상적인 체중 증가가 관찰되었다. *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4로 피부감작을 유발한 후 24 시간과 48 시간에 적용부위의 피부를 관찰한 결과, 흥반 및 부종 등의 피부반응이 관찰되지 않아 감작지수와 빈도지수는 각각 0과 0%로 산출되어 I 등급으로 평가되었다. 피부감작성 반응(알러지성 접촉성 피부염)을 유발하거나 유발할 가능성을 결정하는 것은 물질의 독성을 평가하는 중요한 요소이다. 감수성 검사에서 파생된 정보는 시험물질에 반복적으로 노출된 개체군의 가능한 위험을 식별하는데 사용된다.

지금까지 가장 일반적으로 사용되는 생물 농약인 *Bacillus thuringiensis* (Bt)에서도 경구, 정맥 및 호흡기를 통한 단회 투여시 병원성이나 독성이 관찰되지 않았다(Mancebo et al., 2014). 최근에는 Bt의 새로운 계통인 *B. thuringiensis israelensis* (Bti) SH14는 시험 동물에서 피부 자극과 안점막 자극은 관찰되지 않았으나 반복 노출에 따른 자극성은 관찰되었다

(Arteaga et al., 2014). 이와 비슷하게 본 연구에서도 *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4는 단회 처치로 인해서는 피부 자극과 안점막 자극, 피부감작성 등은 유도되지 않았기 때문에 비교적 안전하다고 판단할 수 있다. 그러나 *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4를 사용하는 사람에서 나타나는 피부 반응과 자극에 대한 역학 조사와 반복 노출되는 동물에서 유도되는 피부 자극 등에 대한 연구가 추가적으로 필요할 수 있다. 왜냐하면 해충의 유충과 검은 파리나 모기의 알 등을 제거하기 위해 광범위하게 사용되는 Bt 기반의 제품에 반복 노출될 경우 알러지가 유발될 수 있음이 보고되었다. Bt serovar kurstaki 제품을 처리한 야채를 취급하는 농부들 중 일부는 피부단자검사(skin-prick tests)에서 양성 반응을 나타냈고 IgG와 IgE 항체가 유도되었다(Bernstein et al., 1999). 그리고 Bt 제품들에 노출되는 329명의 덴마크의 온실 근로자들을 대상으로 다년간 연구한 결과 IgE를 매개 로하는 자극의 가능성이 나타났다(Doekes et al., 2004). 이들은 연구 시작 후 2차 년도에는 대상자의 23-29% 정도의 혈액에서 IgE가 증가하였고 2차년도와 3차년도 사이에는 86-88% 수준으로 증가하였다.

이상의 결과로부터 농촌진흥청 고시 기준에 따라 생물학적 살충제인 *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4의 급성 단회 처치에 따른 독성이나 병원성은 관찰되지 않았으며, 피부나 안점막 자극이나 피부감작성 등이 관찰되지 않았다. 따라서 *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4군을 단회 노출된 경우 피부 자극이나 안점막에 대한 자극, 피부감작성을 유발하지 않는 것으로 평가되었다.

Literature Cited

- Arteaga, M. E., A. Mancebo, T. Molier, D. Gómez, C. González, A. M. Bada, B. González, N. M. Rojas and G. Rodríguez (2014) Dermal toxicity, eye and dermal irritation and skin sensitization evaluation of a new formulation of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* SH-14. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 68(1):147-151.
- Asari, S., H. Horie and Y. Nakazawa (1994) Current status in sensitivity of *Sphaerotheca fuliginea* to DMI in Kanto_Tosan district, Japan. *Proc. Kanto-Tosan Plant protec. Soc.* 41:69-75.
- Bernstein, I. L., J. A. Bernstein, M. Miller, S. Tierzieva, D. I.

- Bernstein, Z. Lummus, M. K. Selgrade, D. L. Doerfler and V. L. Seligy (1999) Immune responses in farm workers after exposure to *Bacillus thuringiensis* pesticides. *Environ. Health. Perspect.* 107(7):575-582.
- Doekes, G., P. Larsen, T. Sigsgaard and J. Baelum, (2004) IgE sensitization to bacterial and fungal biopesticides in a cohort of Danish greenhouse workers: the BIOGART study. *Am. J. Ind. Med.* 46(4):404-407.
- Nam, H. -S. (2011) Environmentally-friendly Agriculture & Biotic Pesticide. *KIC News.* 14(4):12-18.
- Landsteiner, K. and John Jacobs (1935) Studies on the Sensitization of Animals with Simple Chemical Compounds. *J Exp Med.* 1935 Apr 30; 61(5):643-656.
- Park, K. -S. (2011) Development of Biopesticide and Role of *Bacillus* spp. *KIC News.* 14(4):1-11
- Mancebo, A., O. Hernandez, Y. Gonzalez, L. Aldana, and O. Carballo (2008) Assessment of Skin and eyes irritation of 14 products under the stepwise approach of the OECD. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 27(3):173-185.
- Kwon, M., T. K. Kang, C. K. Chung and C. B. Park (2013) Acute Oral, Pulmonary and Intravenous Toxicity/Pathogenicity Testing of *Burkholderia pyrocinia* CAB08106-4 of in Rats. *Korean J. Pestic. Sci.* 17(3):193-199.
- Sudakin, D. L. (2003) Biopesticides. *Toxicol. Rev.* 22(2):83-90.
- Siegel, J.P. (2001) The Mammalian Safety of *Bacillus thuringiensis*-Based Insecticides. *J. Invertebr. Pathol.* 77(1):13-21.
- U.S. Environmental Protection Agency (EPA), 1996a. OPPTS 885.3100 Acute dermal toxicity/pathology. Available online at: <<http://www.regulations.gov/#!documentDetail;D=EPA-HQ-Oppt-2009-0159-0020>> (accessed 20 December 2001).
- U.S. Environmental Protection Agency (EPA), 1996b. OPPTS 885.3000 Background-Mammalian toxicity/pathogenicity/infecitivity. Available online at: <www.epa.gov/pesticides/biopesticides/guidelines/oppts_885.3000.htm> (accessed 20 December 2001).
- Whalon, M. E. and B. A. Wingerd (2003) Bt: mode of action and use. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 54(4):200-211.

● ●

***Burkholderia Pyrocinia* CAB08106-4의 국소자극성시험 및 피부감작성시험**

이보승^{1,2} · 신성섭² · 정창국³ · 백철기³ · 권민^{2*} · 이범준^{1*}

¹충북대학교, ²㈜센트럴바이오, ³한국삼공 연구소³

요약 *Burkholderia pyrocinia* CAB08106-4은 *Sclerotium cepivorum*와 *Sclerotium* sp.균주에 의해 발생하는 마늘 흑색썩음균핵병에 대한 항박테리아 효능을 가지고 있다. 이는 *Sclerotium cepivorum*와 *Sclerotium* sp.에 의해 발생하는 마늘 흑색썩음균핵병을 포함한 다양한 식물병원체를 관리하고 예방하는데 있어 친환경적인 미생물 제형이다. 이번 시험의 목적은 *Burkholderia pyrocinia* CAB08106-4를 피부, 안점막 투여시에 나타나는 국소자극성과 피부감작성에 대해 평가하고자 한다. 피부, 안점막 자극성 시험에서 NewZealand White계 토끼의 피부와 안점막에 투여를 하고, 피부자극성시험은 72시간 동안, 안점막자극성시험은 7일 동안 매일 임상증상 관찰을 하였으며, 시험물질 투여 전, 투여 후 3일 및 안점막자극성시험은 7일째에 체중을 측정하여 체중증가량을 평가하였다. 그 결과, 전체 시험기간 동안 일반증상 및 피부자극성, 안점막자극성이 관찰되지 않았고, 체중도 정상적으로 증가한 것으로 관찰되었다. 피부감작성시험에서 Hartley계 기니피그에 투여를 하고, 시험물질 야기 후 24시간과 48시간에 투여부위의 피부를 관찰하였다. 그 결과, 시험물질 투여에 의한 일반증상이 관찰되지 않았고, 정상적인 체중 증가가 관찰되었으며, 홍반 및 부종 등의 피부반응이 관찰되지 않아 감작지수와 빈도지수가 각각 0과 0%로 산출되어 1등급으로 평가되었다. 이상의 결과를 통해 피부자극성시험, 안점막자극성시험 및 피부감작성시험에서 시험물질은 피부자극성과 안점막자극성을 일으키지 않았고, 피부감작성도 일으키지 않아 문제가 없는 것으로 평가되었다.

색인어 국소자극, 피부감작성, 미생물살충제 독성, 마늘흑색썩음균핵병, *Burkholderia pyrocinia*

● ●