



ORIGINAL ARTICLES

뒤영벌(*Bombus spp.*)에 대한 OECD 급성 접촉 및 섭식독성시험법의 국내 확립

김보선 · 김아름누리 · 전경미* · 이 환 · 박연기 · 유아선 · 윤형주¹

농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부 화학물질안전과, ¹농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부 곤충산업과

Domestic Establishment of OECD Guidelines of Acute Contact and Oral Toxicity Tests for Bumblebees

Boseon Kim, Areumnuri Kim, Kyongmi Chon*, Hwan Lee, Yeon-Ki Park, Are-Sun You, Hyung Joo Yoon¹

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

¹Industrial Insect Division, Department of Agricultural Biology, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Wanju, Korea

(Received on January 14, 2020. Revised on March 5, 2020. Accepted on March 9, 2020)

Abstract Bumblebees are buzz pollinators and have been increasingly used in greenhouse tomato crops. Risk assessment for bees in EU includes bumble bees and solitary bees in addition to honeybees and new test methodologies for bees have been developed. Recently, OECD has published guidelines for bumblebee acute contact (TG 246) and oral toxicity (TG 247). The objective of this study was to establish and validate bumblebee acute toxicity tests using dimethoate for the reference chemical. The mortality of dimethoate 4 µg/bee treatment was greater than 90% after 24 hr oral exposure. A droplet of 2 µL and 5 µL solution containing dimethoate for each treatment (10, 12, and 15 µg /bumblebee) was applied to the throax of each bumblebee. The mortality of each treatment group with a droplet of 2 µL and 5 µL was greater than 70% after 48 h exposure. There were no difference in mortality between 2 µL and 5 µL of droplets. The acute contact and oral toxicity tests were validated since the mortality of toxic reference group was greater than 50% at the end of the test period. In the near future, this test method could be used to assess the effect of various pesticides on bumblebees

Key words acute toxicity tests, bumblebees, dimethoate, domestic establishment, OECD guideline

서 론

화분매개곤충은 세계적으로 1530억 유로의 경제적 가치가 있으며(Seo et al., 2011), 그 중 과수 및 채소 작물에서 화분매개곤충의 경제적 가치는 각각 500억 유로에 달한다(Gallai et al., 2009). 국내의 경우 과수 및 채소의 연 생산액 중 50%인 약 6조원이 화분매개곤충을 통해 얻어졌다고 추정되며 양봉산업 생산물(꿀, 프로폴리스, 로얄제리 등)의 18 배에 이르는 경제적 가치를 가진다(Jung, 2008).

국내에서 주로 사용되는 화분매개곤충은 꿀벌(*Apis mellifera*), 뒤영벌(*Bombus spp.*), 뿔가위벌류(*Osmia spp.*) 등이 있다. 2016년도 채소류 작물에 사용된 화분매개곤충은 총 45만 봉군으로 꿀벌(32만 봉군, 72%), 뒤영벌(11만 봉군, 25%) 순으로 사용되었으며, 그 중 뒤영벌 사용량은 2011년(5만 봉군) 대비 2.1배로 가장 많이 증가 하였다(Yoon et al., 2013; 2017). 뒤영벌은 꿀벌보다 상대적으로 크고 저온 및 흐린 날씨에서도 활동력이 높으며 진동수분형벌로 꿀이 없는 가지과 작목의 화분매개에 효과적이다(Kim and Jung, 2013). 주요 가지과 작물인 토마토와 고추 작목의 경우 재배 면적 중 각각 63.6%, 31.8%에서 화분매개충을 이용하고 있으며, 특히 화분매개곤충으로 뒤영벌만을 사용하는 토마토

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

농가수가 2011년(742 농가) 대비 2016년(8,149 농가)에 10 배 이상 증가함에 따라 향후 뒤영벌 사용량은 계속 증가될 것으로 판단된다(Yoon et al., 2013; 2017).

과일 및 채소 작목의 고품질화 및 생산력 향상은 뒤영벌의 수분활동 능력과 밀접한 연관이 있으며 농약살포는 뒤영벌의 수분활동을 저하시킬 수 있는 중요한 요인 중 하나이다(Ahn et al., 2008; RDA, 2005). European Food Safety Authority(EFSA)는 꿀벌과 함께 뒤영벌, 단독벌(solitary bees)에 대한 농약의 위해성평가를 실시하고 있으며 이를 위해 각각의 화분매개충에 대한 실험실 시험(laboratory test), 반야외시험(semi-field test), 야외시험(field test)에 대한 가이드라인을 제시하고 있다(EFSA, 2012). 국내 꿀벌 위해성 평가체계는 총 3단계로 구성되어 있으며 1단계 꿀벌 접촉 및 섭식 급성독성, 2단계 엽상잔류독성, 3단계에서 야외시험을 평가하도록 제도화되어 있다. 하지만 뒤영벌에 대한 위해성평가는 구축되지 않은 실정이다.

뒤영벌은 꿀벌보다 크기가 커 농약의 노출수준이 다를 수 있으며 종 차이에 따라 농약에 대한 감수성이 다를 수 있다(EFSA, 2012). 이에 유럽을 중심으로 꿀벌 뿐만 아니라 뒤영벌에 대한 농약 위해성 평가 및 독성 시험법에 대한 연구가 진행되었다. 예를 들어 Thompson and Hunt (1999), Thompson (2001), Van der Steen (2001)은 뒤영벌 급성독성시험법부터 야외시험법에 대한 리뷰논문을 발표하였다. 이탈리아의 Marletto 등(2003)은 imidacloprid, dimethoate 등의 농약에 대한 서양뒤영벌(*Bombus terrestris*) 급성 섭식 및 접촉독성시험을 수행하여 독성값(LD₅₀)을 제시하였다. Scottdupree 등(2009)과 Gradish 등(2012)은 호박벌(*Bombus impatiens*)을 사용하여 농약 원제 및 제품에 대한 급성독성 시험 결과를 발표하였다. 최근 뒤영벌 급성독성시험법의 OECD 가이드라인 제정을 위해 독일, 네덜란드 등이 포함된 13개의 유럽 연구팀들이 International Commission for Plant-Pollinator Relationships (ICP-PR) working group으로 참여하여 뒤영벌에 대한 급성 섭식 및 접촉독성시험법의 ring test 결과를 발표하였다(Hanewald et al., 2015). 이를 바탕으로 2017년 뒤영벌 급성독성시험법이 OECD 시험가이드라인에 게재되었다(OECD 2017a; OECD 2017b).

국내에서 뒤영벌 독성연구 사례는 매우 드물지만, 몇몇 연구들에서 보고된바 있다. 국립농업과학원은 시설재배 농가에서 주로 사용되는 농약들을 선별하여 뒤영벌의 접촉, 섭식독성 및 엽상잔류독성을 통해 안전방사기간을 설정하였다(RDA, 2005). Ahn 등(2008)은 69종의 농약에 대한 꿀벌과 서양뒤영벌의 급성접촉독성 및 엽상잔류독성 연구를 발표하였다. Kim and Jung (2013)은 사과 적화/적과제로 사용되는 carbaryl 등에 대한 섭식독성연구를 하였으며, 추후 연구에서 메밀 잎을 이용한 엽상잔류독성평가를 통해 carbaryl과 lime sulfur의 안전방사기준을 제시하였다(Kim et al.,

2014). 하지만 기존의 선행 연구에서 적용한 시험법은 US EPA (2012) 및 OECD 꿀벌 급성독성시험법(OECD 1998a; OECD 1998b)을 변형하여 적용한 것으로 최근 발표된 OECD 뒤영벌 급성독성시험법과는 차이가 있다. 따라서 국내에서는 최근 구축된 OECD 시험법(TG 246, 247)을 활용한 연구가 전무한 실정이다. 이에 본 연구에서는 양성대조군으로 dimethoate를 사용하여 국내의 연구환경에 맞게 뒤영벌 급성독성시험법을 확립 및 검증하고자 하였다.

재료 및 방법

시험곤충

3개 이상의 건강한 서양뒤영벌(*Bombus terrestris*) 봉군에서 무작위 선별한 일벌을 국립농업과학원 곤충산업과에서 공급받아 시험을 진행하였다.

시험약제

시험에 사용한 약제는 dimethoate (Dr. Ehrenstorfer, Germany)를 사용하였다.

시험용기

서양뒤영벌의 먹이 공급 및 약제를 공급하기 위해 2 mL 주사기(Henke-Sass Wolf, Germany)를 사용하였다. 먹이용 주사기는 팁을 제거하여 먹이 공급이 용이하게 하였으며 약제용 주사기는 팁을 제거하지 않았다(Fig. 1A). 시험용기는 환기가 되고 세척이 가능한 약 15 cm³ 이상의 왕대보호기(roller queen cage, 메인양봉원)를 사용하였으며 주사기와 고정 될 수 있도록 주문 제작한 고무 마개를 조립하여 사용하였다(Fig. 1B). 시험용기는 주문 제작한 시험대에 일렬로 고정하여 서양뒤영벌이 후각과 시각적으로 접촉 할 수 있게 배치하였다(Fig. 1C). 뒤영벌은 개체간 영양교환(trophallaxis)을 하지 않는 습성이 있어 개체당 섭식량 차이로 인해 시험 결과에 영향을 준다(Van der Steen, 2001). 또한 서로 다른 봉군으로부터 선별될 경우 뒤영벌간에 물리적 충돌이 일어날 수 있으며 이는 대조군의 높은 치사율과 LD₅₀ 값에 영향을 준다고 알려져 있다(Hanewald et al., 2015). 따라서 꿀벌 독성시험법과는 다르게 한 마리씩 개별적인 케이지에 사육되는 방법이 반영되었다.

시험 전 처리

급성 접촉 및 섭식독성시험의 시험 전 처리 과정은 다음과 같다. 봉군으로부터 무작위 수집한 서양뒤영벌을 마취시키지 않고 적색조명 아래 한 마리씩 조립이 완료된 시험용기에 넣어 시험대에 고정한 후 최소 8시간 이상 시험조건에 순응시켰다. 서양뒤영벌을 시험용기에 넣기 전 무게를 측정하였으며 너무 작거나 큰 것은 시험에 사용하지 않았다. 한

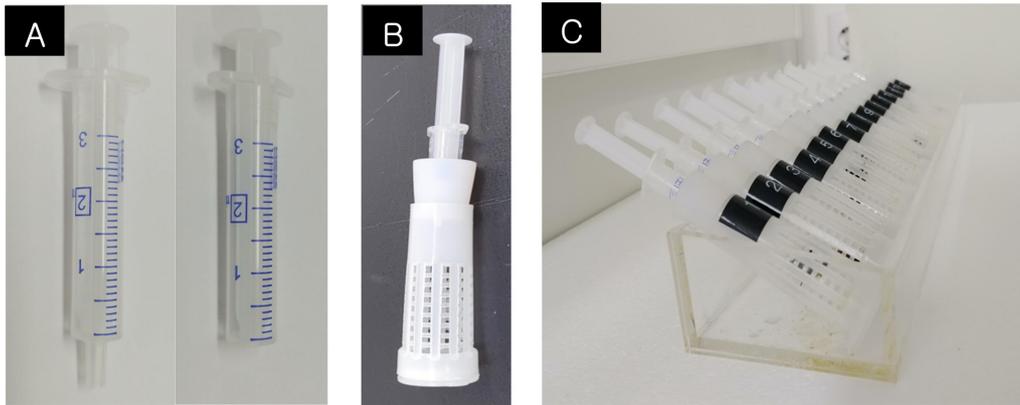


Fig. 1. Photographs of trial materials for acute toxicity tests: A, feeding devices ((left) a syringe with a tip, (right) a syringe without a tip); B, a single housing cage; C, a trial setup (the rack is inclined to the syringes for *ad libitum* feeding).

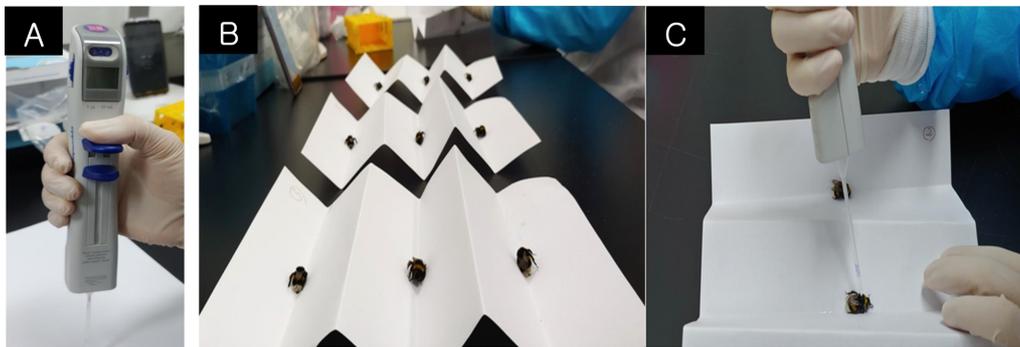


Fig. 2. Photographs of trial materials and procedure for acute contact toxicity test: A, multipipette M4 pipette; B, bumblebees placed on W-folded papers; C, individual treatment on the dorsal side of the thorax of bumblebees.

처리군 당 1마리씩 30반복으로 시험을 진행하였다. 50% 자당용액을 먹이로 사용하였으며 먹이용 주사기로 급여하였다. 순응기간 및 시험기간 동안 서양뒤영벌이 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다. 급성 섭식독성시험의 경우, 처리한 약제를 충분히 섭취할 수 있도록 약제를 처리하기 전 4시간 동안 먹이를 공급하지 않았다.

시험조건

시험이 진행되는 동안 실험실 환경은 온도 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대 습도 $60 \pm 20\%$, 암조건을 유지하였으며 관찰을 위해 조건을 이탈한 시간이 2시간을 넘지 않도록 하였다.

급성 접촉독성시험

순응기간이 끝난 서양뒤영벌은 약제 처리 전 CO_2 가스로 마취하였으며 W 형태로 접은 종이 사이에 등쪽을 보이도록 한 마리씩 배치하였다(Fig. 2B). 시험물질인 dimethoate는 증류수로 용해하였으며, 시험용액의 균등한 도포를 위해 계면활성제 triton X-100(Sigma Aldrich, USA)을 사용하였으며 시험 용액 중 함량은 0.1%로 하였다. Dimethoate 최종 처리량이 각각 10, 12, 15 μg a.i./bumblebee가 되도록 stock

solution을 제조하였다. 각 처리군 당 최종 처리량이 동일하게 각각 2 μL , 5 μL 로 용량을 달리하여 처리하였다. 정상적인 약제처리를 위해 multipipette M4 pipette (Eppendorf, Germany)를 사용하였으며(Fig. 2A), 시험약제는 Fig. 2C와 같이 서양뒤영벌의 등쪽 흉부(thorax)에 도포하였다. 약제를 처리한 후, 시험용기에 옮겨 최소 48시간 또는 최대 96시간 동안 치사율 및 이상증상을 관찰하였다.

급성 섭식독성시험

급성 섭식독성시험은 제공된 시험용액을 충분히 섭취하지 않는 개체군(non-feeder)을 시험에서 제외하여야 하기 때문에 순응이 끝난 서양뒤영벌을 한 처리군 당 1마리씩 45반복으로 시험하였다. 약제처리기간 동안 제공된 시험용액을 80% 미만으로 섭취한 개체를 non-feeder로 정의하였으며, 섭식량의 판단 기준은 Fig. 3과 같이 설정하였다. 시험용액인 dimethoate 2000 mg/L을 제조하여 50% 자당용액으로 20배 희석한 후, 약제용 주사기 팁에 40 μL 씩 넣어 최종 처리량이 4 μg /bumblebee 되게 처리하였다. 약제는 4시간 노출하였으며 섭취한 먹이의 양을 기록하였다. 45마리 중 non-feeder를 제외한 후 최종 30마리를 선정하여 시험을 진

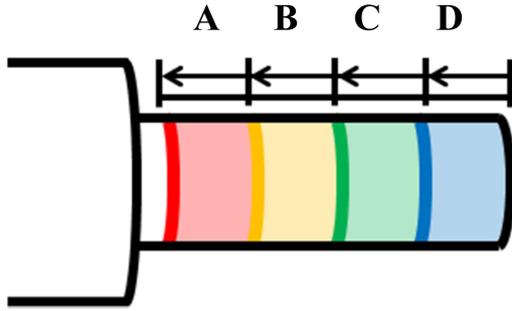


Fig. 3. Consumption amount of test solution after 4 hour exposure: A, $\geq 30 \mu\text{L}$; B, $20 \mu\text{L}-30 \mu\text{L}$; C, $10 \mu\text{L}-20 \mu\text{L}$; D, $< 10 \mu\text{L}$.

행하였다. 약제 노출 후 먹이용 주사기로 교체하였으며 관찰 기간 동안 먹이를 자유롭게 공급하였다. 최소 48시간 또는 최대 96시간 동안 치사율 및 이상증상을 관찰하였다.

치사율 및 이상증상 확인

뒤영벌 급성 접촉 및 섭식독성시험법은 실험실 조건에서 뒤영벌 일벌을 사용하여 약제를 노출한 뒤 48시간 또는 최대 96시간을 관찰하여 반수치사량(Lethal dose, LD_{50})을 산출하여 독성을 평가하는 시험법이다. 약제 노출 후 4시간, 24시간, 48시간의 치사개체 및 이상증상을 관찰하였으며 약

제 처리군에서 24시간과 48시간 사이의 치사율이 10% 이상 증가할 경우 72시간 및 96시간까지 관찰한 후 시험을 종료하였다. 약제 노출 후 관찰사항으로는 이상행동이 관찰되지 않는 상태(unaffected, U), 움직일 수 있지만 감소된 신체 조정력을 보이는 상태(affected, A), 걷지 못하고 다리와 더듬이의 움직임이 매우 약하며, 자극에 대한 반응이 매우 약한 상태(moribund, M), 벌이 죽은 상태(dead, D)로 구분하여 관찰한 뒤 기록하였다(Table 1). 급성 접촉 및 섭식독성 시험법의 시험 진행과정을 도식화하여 Fig. 4에 나타내었다.

결과 및 고찰

실험조건 설정

사육조건

본 연구의 시험 및 관찰기간 동안 평균 온도 및 상대 습도는 급성 접촉독성시험에서 $23.5 \pm 0.9^\circ\text{C}$, $48.1 \pm 8.4\%$ 이었으며 급성 섭식독성시험에서 $25.1 \pm 0.4^\circ\text{C}$ 및 $48.4 \pm 8.5\%$ 이었다. 따라서 OECD TG (246, 247)에서 제시한 온도($25 \pm 2^\circ\text{C}$) 및 상대습도(40-80%) 조건에 부합하였다(Table 2). Mundy and Raine (2018)에 따르면 실험실의 상대습도가 낮을 경우 먹이용액이 경화될 수 있어 원활한 먹이섭취를 방해하여 실험 결과에 잠재적인 영향을 줄 수 있다고 시사하

Table 1. Sublethal effects and mortality assessments, adapted from OECD (2017a, 2017b)

Assessments	Observations and measurements
Unaffected (U)	Showing inconspicuous behavior (including natural occurring phases of inactivity).
Affected (A)	Still upright and attempting to walk but showing signs of reduced coordination.
Moribund (M)	Unable to walk, and show only very weak movements of legs and antennae, may recover but usually die.
Dead (D)	Showing no movement and reaction to stimulation.

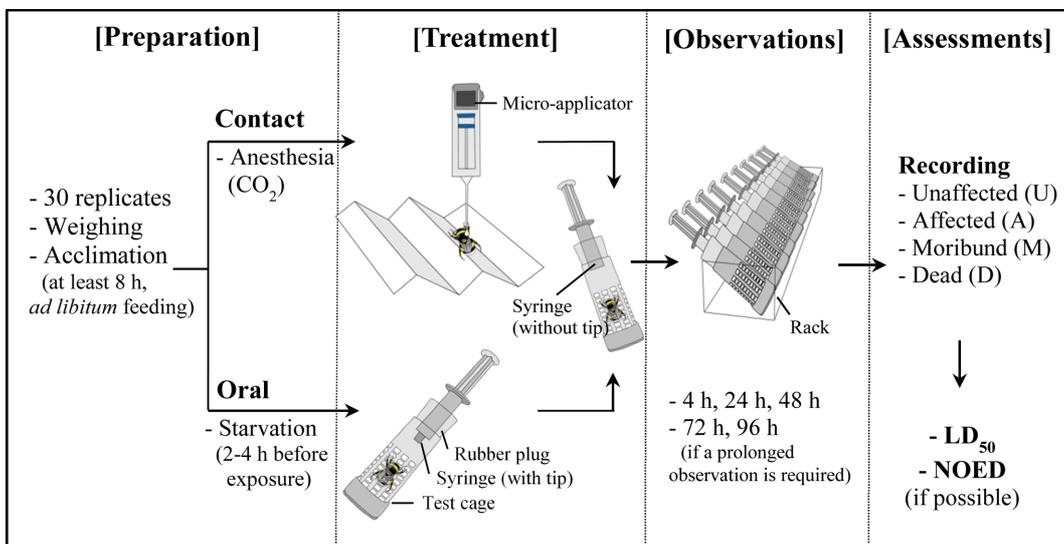


Fig. 4. Procedure of acute toxicity tests for bumblebees.

Table 2. Experimental temperature and humidity conditions in acute toxicity tests

Treatment routes	Temperature (°C)	Relative humidity (%)
Contact	23.5 (±0.9)	48.1 (±8.4)
Oral	25.1 (±0.4)	48.4 (±8.5)

Table 3. Mean weight of bumblebees in acute toxicity tests

Treatment routes	Treatment groups (µg a.i./ bumblebee)	Contact amount (µL)	Mean weight (g)	
Contact	Control	-	0.276 (±0.036)	
		10	0.271 (±0.032)	
	Dimethoate	5	2	0.280 (±0.034)
			5	0.278 (±0.038)
		12	2	0.288 (±0.026)
			5	0.275 (±0.038)
Oral	Control	-	0.280 (±0.034)	
		4	0.259 (±0.026)	
	Dimethoate	-	0.262 (±0.025)	
		-	-	-

였다. 따라서 뒤영벌 급성독성시험을 위해서는 실험실내 적정 온도 및 상대습도를 일정하게 유지해야 한다.

무게조건

OECD 시험법에서는 너무 작거나 큰 뒤영벌은 실험에서 배제하여야 한다고 제시하고 있으나 별도의 수치화된 기준은 없다. 본 연구에서 사용된 서양뒤영벌의 평균무게 범위는 처리군별로 0.259 ± 0.026 g에서 0.288 ± 0.034 g이었다 (Table 3). 서양뒤영벌의 무게가 0.200 g 이하이거나 0.300 g 이상인 것은 시험에서 제외하였다. Helson 등(1994)은 꿀벌과 뒤영벌 등을 포함한 4종의 벌에 대한 permethrin, aminocarb 등의 독성시험에서 무게 0.150 ± 0.026 g에서 0.215 ± 0.048 g 범위의 뒤영벌을 사용하였다. Drescher and Geusen-Pfister (1991)은 뒤영벌 무게 0.220 g을 기준으로 무게 차이에 대한 methomyl oral LD₅₀ 값을 비교 하였을 때 관찰 후 24시간에서 0.220 g 이상인 처리군에서 1.26배 큰 LD₅₀ 값이 나타났다고 보고하였다. Van der Steen (1994)는 뒤영벌 평균무게를 기준으로 가장 작은 그룹(0.162 g)과 가장 큰 그룹(0.297 g)간의 dimethoate contact LD₅₀ 값을 비교 하였는데 무게가 가장 큰 그룹의 LD₅₀ 값이 2.36배 높게 나타났다. 반면 뒤영벌 평균 무게가 0.168~0.285 g인 그룹은 비슷한 LD₅₀ 값을 나타내었다. 본 시험에서 사용한 뒤영벌의 평균무게는 0.259~0.288 g으로 처리군 별 무게에 따른 독성영향은 없을 것으로 생각된다. 뒤영벌 크기는 농약의 민감도와 연관성이 있으며, 크기가 클수록 농약에 덜 민감한 것으로 보고되었다. 따라서 뒤영벌의 무게조건은 실험결과의 신뢰와 정확성을 위한 중요한 요소이다.

급성 접촉독성시험

OECD TG 246에 따르면 약제처리 용량을 2 µL로 제시하고 있으나 필요시 처리 용량을 달리 할 수 있다고 기재되었다(OECD 2017a). 또한 ICP-PR non-Apis working group의 ring test에서는 처리 용량을 5 µL로 하여 처리 후 96시간에서 dimethoate의 평균 LD₅₀ 값을 5 µg a.i./bumblebee로 보고하였다(Hanewald et al., 2015). 하지만 처리 용량에 따른 독성영향에 대한 연구는 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 서양뒤영벌의 약제처리 용량에 따른 독성영향을 확인하기 위해 각 처리군 당 2 µL와 5 µL로 처리하여 이상증상 및 치사율을 관찰하여 기록하였다(Table 4).

약제처리 후 4시간이 경과한 뒤 dimethoate 15 µg a.i./bumblebee를 제외한 10, 12 µg a.i./bumblebee 처리군에서는 치사개체가 관찰되지 않았다. 관찰 후 24시간과 48시간 사이에서 치사율이 10% 이상 증가하였기에 96시간까지 관찰하였다. 무처리군은 관찰 기간 동안 치사개체가 관찰되지 않았다. 약제 처리 후 24시간에서 2 µL 용량 처리군의 경우 10, 12, 15 µg a.i./bumblebee dimethoate 처리군에서 치사개체가 각각 20, 21, 24 마리로 50% 이상의 치사율이 관찰되었다. 5 µL 용량 처리군의 경우 15 µg a.i./bumblebee 처리군에서 치사개체가 17마리로 50% 이상 치사율을 보였으나 10, 12 µg a.i./bumblebee에서 50% 미만의 치사율이 관찰되었다. 약제처리 48시간 경과 후에는 5 µL 용량 처리군의 10, 12, 15 µg a.i./bumblebee 처리군 모두에서 70% 이상의 치사율을 나타냈다. 이는 24시간 관찰시점에서 affected 상태였던 뒤영벌들이 48시간 후 치사 상태가 되어 나타난 결과로 판단된다. 시험 종료 시점인 96시간에서는 5 µL 용량 처리군의 10 µg a.i./bumblebee 처리군에서 치사율이 73.3%였고

Table 4. Number of affected bumblebees in acute contact toxicity tests

Treatment group	Contact amount (μL)	Total number of bumblebees	Symptom	Number of bumblebees				
				4 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Control	2	30	Death (D)	0	0	0	0	0
			Unaffected (U)	29	30	29	30	30
			Affected (A)	1	0	1	0	0
			Moribund (M)	0	0	0	0	0
			Total	30	30	30	30	30
Dimethoate (10 μg a.i./ bumblebee)	2	30	Death (D)	0	20	23	26	27
			Unaffected (U)	21	1	2	0	0
			Affected (A)	9	9	5	4	3
			Moribund (M)	0	0	0	0	0
			Total	30	30	30	30	30
	5	30	Death (D)	0	10	21	22	22
			Unaffected (U)	21	8	4	2	2
			Affected (A)	9	12	5	6	6
			Moribund (M)	0	0	0	0	0
			Total	30	30	30	30	30
Dimethoate (12 μg a.i./ bumblebee)	2	30	Death (D)	0	21	26	28	28
			Unaffected (U)	15	0	0	0	0
			Affected (A)	13	9	4	2	2
			Moribund (M)	2	0	0	0	0
			Total	30	30	30	30	30
	5	30	Death (D)	0	14	23	27	27
			Unaffected (U)	18	4	0	0	0
			Affected (A)	11	12	5	3	3
			Moribund (M)	1	0	2	0	0
			Total	30	30	30	30	30
Dimethoate (15 μg a.i./ bumblebee)	2	30	Death (D)	0	24	28	28	28
			Unaffected (U)	18	0	0	0	0
			Affected (A)	11	6	2	2	2
			Moribund (M)	1	0	0	0	0
			Total	30	30	30	30	30
	5	30	Death (D)	1	17	27	29	29
			Unaffected (U)	18	1	0	0	0
			Affected (A)	9	12	3	1	1
			Moribund (M)	2	0	0	0	0
			Total	30	30	30	30	30

나머지 처리군에서는 모두 90% 이상의 치사율을 나타냈다.

OECD TG 246에서는 뒤영벌의 감수성과 시험결과의 신뢰성을 검증하기 위해 용매대조군의 치사율($\leq 10\%$)과 양성대조군(10 μg a.i./bumblebee) 치사율($\geq 50\%$)의 기준을 제시하였다(OECD 2017a). 본 시험 결과 급성 접촉독성시험에서 양성대조군으로 dimethoate 10 μg a.i./bumblebee 2 μL 를 처리하면 48시간 후에 50% 이상의 치사율을 나타내어 양성대조군의 기준에 부합하였다. 양성대조군의 급성 접촉독성

시험의 경우 48시간 또는 96시간 기준으로 독성 값을 산정할 때 시험약제 처리용량(2 μL , 5 μL)에 따른 독성영향 차이가 없음을 확인할 수 있었다

급성 섭식독성시험

OECD TG 247에서는 시험의 유효성 검증 기준으로 양성대조군 dimethoate 4 μg /bumblebee에서 관찰기간 동안 50% 이상의 치사율을 제시하고 있다(OECD 2017b). 시험 결과

Table 5. Number of affected bumblebees in acute oral toxicity tests

Treatment groups	Total number of bumblebees	Symptoms	Number of bumblebees		
			4 h	24 h	48 h
Control	30	Dead (D)	0	0	0
		Unaffected (U)	30	30	30
		Affected (A)	0	0	0
		Moribund (M)	0	0	0
		Total	30	30	30
Dimethoate (4 µg a.i./ bumblebee)	30	Dead (D)	6	28	28
		Unaffected (U)	2	2	2
		Affected (A)	5	0	0
		Moribund (M)	17	0	0
		Total	30	30	30

무처리군의 경우 관찰기간 동안 치사 개체는 관찰되지 않았다. Dimethoate 처리군에서는 초기 4시간에 뒤영벌이 20%가 치사되었으며 48시간 후 90% 이상의 치사율을 나타내었다(Table 5). 본 시험 결과 양성대조군에서 관찰기간 동안 50% 이상의 치사율을 나타내어 OECD 급성 섭식독성시험의 기준에 부합하였다.

본 연구에서는 OECD 시험 유효성 기준에 부합하도록 서양뒤영벌 급성 접촉 및 섭식독성시험법을 구축하였다. 앞으로 이 시험법을 활용하여 최근 이슈가 되고 있는 네오니코티노이드계 농약 및 다양한 농약에 대한 뒤영벌의 독성 정보를 제공할 수 있을 것이라고 생각된다.

감사의 글

본 연구는 국립농업과학원 기관고유 연구사업(과제번호: PJ013516)에 의해 수행되었습니다. 이에 감사드립니다.

Literature Cited

Ahn KS, Oh MG, Ahn HG, Yoon CM, Kim GH, 2008. Evaluation of toxicity of pesticides against honeybee (*Apis mellifera*) and bumblebee (*Bombus terrestris*). Korean J. Pestic. Sci. 12(4):382-390.

Drescher W, Geusen-Pfister H, 1991. Comparative testing of the oral toxicity of acephate, dimethoate and methomyl to honey bees, bumble bees and syrphidae. Acta Hort. 288:133-138.

European Food Safety Authority (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 Journal. 10(5):2668.

Gallai N, Salles JM, Settele J, Vaissière BE, 2009. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted

with pollinator decline. Ecol. Econ. 68(3):810-821.

Gradish AE, Scott-Dupree CD, Frewin AJ, Cutler GC, 2012. Lethal and sublethal effects of some insecticides recommended for wild blueberry on the pollinator *Bombus impatiens*. Can. Entomol. 144(3):478-486.

Hanewald N, Roessink I, Mastitsky S, Amsel K, Bortolotti L, et al., 2015. Compilation of results of the ICPPR non-*Apis* working group with a special focus on the bumblebee acute oral and contact toxicity ring test 2014 ICPPR Non-*Apis* Working Group. Julius-Kuhn-Archiv. 450:194-296.

Helson BV, Barber KN, Kingsbury PD, 1994. Laboratory toxicology of six forestry insecticides to four species of bee (Hymenoptera: Apoidea). Arch. Environ. Contain. Toxicol. 27(1):107-114.

Jung C, 2008. Economic value of honeybee pollination on major fruit and vegetable crops in Korea. Korean J. Apic. 23(2):147-152.

Kim D, Jung C, 2013. Oral acute toxicity of chemical compounds used for flower/fruit thinner of apple against buff-tailed bumblebee, *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae). Korean J. Apic. 28(1):25-32.

Kim DW, Yun WK, Jung CL, 2014. Residual toxicity of carbaryl and lime sulfur on the European honey bee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) and buff-tailed bumble bee, *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae). Korean J. Apic. 29(4):341-348.

Marletto F, Patetta A, Manino A, 2003. Laboratory assessment of pesticide toxicity to bumblebees. Bull. Insectology. 56(1):155-158.

Mundy KA, Raine NE, 2018. A comparison of acute toxicity methodologies for *Bombus* spp. PeerJ Prepr. 6:27436v1.

OECD, 1998a. OECD guidelines for the testing of chemicals. Honeybees, acute contact toxicity test. No 214.

OECD, 1998b. OECD guidelines for the testing of chemicals. Honeybees, acute oral toxicity test. No 213.

OECD, 2017a. OECD guidelines for the testing of chemicals. Bumblebee, acute contact toxicity test. No 246.

- OECD, 2017b. OECD guidelines for the testing of chemicals. Bumblebee, acute oral toxicity test. No 247.
- Rural Development Administration (RDA), 2005 Standard fixing on safe foraging activity of *Bombus terrestris* according to use of pesticides in green house, pp.930-973.
- Scott-Dupree CD, Conroy L, Harris CR, 2009. Impact of currently used or potentially useful insecticides for canola agroecosystems on *Bombus impatiens* (Hymenoptera: Apidae), *Megachile rotundata* (Hymenoptera: Megachilidae), and *Osmia lignaria* (Hymenoptera: Megachilidae). *Ecotoxicology*. 102(1):177-182.
- Seo DK, Lee SB, Lee SY, Park SH, Kim DS, et al., 2011. An economic analysis of pollinator's activities on the production of major fruit trees in Korea. *Korean J. Apic.* 26(4):331-340.
- Thompson HM, 2001. Assessing the exposure and toxicity of pesticides to bumblebees (*Bombus* sp.). *Apidologie*. 32(4): 305-321.
- Thompson HM, Hunt LV, 1999. Extrapolating from honeybees to bumblebees in pesticide risk assessment. *Ecotoxicology*. 8(3):147-166.
- United States Environmental Protection Agency (US EPA), 2012. Ecological effects test guidelines OCSPP 850.3020: honey bee acute contact toxicity test. Retrieved from <http://www.regulations.gov>
- Van der Steen JJM, 1994. Method development for the determination of the contact LD₅₀ of pesticides for bumble bees (*Bombus terrestris* L). *Apidologie*. 25(5):463-465.
- Van der Steen JJM, 2001. Review of the methods to determine the hazard and toxicity of pesticides to bumble bees. *Apidologie*. 32(5):399-406.
- Yoon HJ, Lee KY, Lee HS, Lee MY, Choi YS, et al., 2017. Survey of insect pollinators use for horticultural crops in Korea, 2016. *Korean J. Apic.* 32(3):223-235.
- Yoon HJ, Lee KY, Park IG, Kim MA, Kim YM, et al., 2013. Current status of insect pollinators use for horticultural crops in 2011. *Korean J. Apic.* 28(1):9-18.

뒤영벌(*Bombus* spp.)에 대한 OECD 급성 접촉 및 섭식독성시험법의 국내 확립

김보선 · 김아름누리 · 전경미* · 이 환 · 박연기 · 유아선 · 윤형주¹

농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부 화학물질안전과, ¹농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부 곤충산업과

요 약 뒤영벌은 진동형 수분벌로 토마토 등 가지과 작물에 주로 사용되고 있으며 사용량이 지속적으로 증가하고 있는 실정이다. 이에 유럽에서는 꿀벌뿐만 아니라 뒤영벌, 단독벌에 대한 위해성평가를 확대하고 있으며 이에 따른 다양한 독성시험법을 개발하고 있다. 최근 뒤영벌 급성 섭식 및 접촉독성시험법이 OECD 시험가이드라인(TG 246, 247)에 등재되었다. 이에 본 연구에서는 OECD 시험법을 기준으로 dimethoate를 양성대조군으로 사용하여 뒤영벌 급성 독성시험법을 국내 확립 및 검증하고자 하였다. 급성 섭식독성시험은 약제용 주사기에 dimethoate를 포함한 먹이를 40 µL씩 넣어 각각의 서양뒤영벌(*Bombus terrestris*)에게 4 µg/bumblebee로 처리하였다. 급성 섭식독성시험 결과 처리 후 24시간에 90% 이상의 치사율을 나타내었다. 급성 접촉독성시험은 처리 용량에 따른 독성 영향을 평가하기 위해 각 처리군당(dimethoate 10, 12, 15 µg/bumblebee) 2 µL와 5 µL로 용량을 달리하여 뒤영벌 흉부에 도포하였다. 급성 접촉독성시험 결과 약제 처리 48시간 이후에는 2 µL, 5 µL 용량 처리군에서 각 처리군별 치사율이 모두 70% 이상으로 처리용량에 따른 독성 차이를 보이지 않았다. 급성 섭식 및 접촉독성시험 모두 48시간 치사율이 50% 이상 나타나 시험의 유효성이 있는 것으로 판단되었다. 향후 본 연구에서 구축된 시험법을 활용하여 농약에 대한 뒤영벌 독성영향을 평가하는데 활용될 수 있을 것이라고 생각된다.

색인어 급성 독성시험, 국내 확립, 서양뒤영벌, dimethoate, OECD guideline